

(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2005-528115

(P2005-528115A)

(43) 公表日 平成17年9月22日(2005.9.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09	G O 1 N 33/15 Z	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02	G O 1 N 33/50 Z	4 B O 6 5
G O 1 N 33/15	C 1 2 N 15/00 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-510451 (P2004-510451)	(71) 出願人	503174475
(86) (22) 出願日	平成15年5月30日 (2003. 5. 30)		ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
(85) 翻訳文提出日	平成17年1月26日 (2005. 1. 26)		ザ リーランド スタンフォード ジュ
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/017289		ニア ユニバーシティ
(87) 国際公開番号	W02003/102215		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロ
(87) 国際公開日	平成15年12月11日 (2003. 12. 11)		アルト エル カミノ リアル 170
(31) 優先権主張番号	60/384, 529		5
(32) 優先日	平成14年5月31日 (2002. 5. 31)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	60/431, 655	(74) 代理人	100128048
(32) 優先日	平成14年12月6日 (2002. 12. 6)		弁理士 新見 浩一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ジェーミソン カトリオナ ヘレン エム
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロ
			アルト ホーマー アベニュー 425
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 幹細胞および癌幹細胞を同定および単離する方法

(57) 【要約】

幹細胞および癌幹細胞を同定するための方法および組成物を提供する。また カテニンは、造血器腫瘍、すなわち白血病およびリンパ腫細胞に対する治療成分開発の標的として同定され、この開発には、カテニンまたはカテニンシグナル伝達経路のメンバーに対するスクリーニングアッセイが含まれ得る。造血細胞の細胞増殖は、安定化カテニンを、アポトーシスを起こす能力が変化しているが完全に形質転換していない造血細胞に導入することにより、変化させることができる。不死化細胞は、スクリーニングアッセイおよび造血細胞が形質転換を起こす経路の解析において有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

カテニンによって制御される転写応答エレメントに機能的に連結された検出可能なマーカーをコードする配列を含む核酸構築物を、細胞または細胞集団に導入する段階；および

検出可能なマーカーの発現の存在を検出する段階を含む、幹細胞を同定する方法であって、該マーカーの発現により細胞が幹細胞であることが示される方法。

【請求項2】

マーカーが蛍光産生タンパク質である、請求項1記載の方法。

10

【請求項3】

カテニンによって制御される転写応答エレメントがLEF-1/TCF結合配列である、請求項2記載の方法。

【請求項4】

検出可能なマーカーを発現する細胞を選択する段階をさらに含む、請求項3記載の方法。

【請求項5】

細胞が生細胞である、請求項4記載の方法。

【請求項6】

細胞集団が腫瘍細胞集団である、請求項5記載の方法。

20

【請求項7】

細胞集団が正常細胞の複合集団である、請求項5記載の方法。

【請求項8】

細胞内の異常なカテニンの存在を判定する段階を含む、造血過剰増殖疾患を診断するまたは特徴づける方法。

【請求項9】

核酸構築物を幹細胞または造血前駆細胞に導入して、トランスジェニック造血幹細胞を産生する段階を含む、哺乳動物造血細胞の寿命を延ばす方法であって、

発現すると哺乳動物造血細胞の寿命を延ばすおよび/または数を増やす、カテニン配列由来のオープンリーディングフレームを、該核酸構築物が含む方法。

30

【請求項10】

腫瘍阻害用の候補薬剤をスクリーニングする方法であって、

該薬剤を請求項9記載の細胞と混合する段階；および

該薬剤の該細胞に及ぼす効果を判定する段階

を含む方法。

【請求項11】

腫瘍が造血器腫瘍である、請求項10記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

40

発明の背景

癌の基礎研究は、癌を引き起こす遺伝子変化の同定に重点的に取り組んできた。これにより、腫瘍形成および悪性転換に関与する分子経路および生化学的経路の理解において、大きな進展がもたらされた。しかし、細胞生物学の理解は遅れている。特定の変異がモデル細胞の増殖および生存に及ぼす影響は周知であると考えられるが、このような変異が、特定の癌に関与する実際の細胞にどのような影響を及ぼすのかは未知である。

【0002】

実際に、多くの知見から、正常幹細胞と腫瘍化細胞との類似性が妥当であることが示唆されている。正常幹細胞および腫瘍化細胞はどちらも、高度な増殖能および新たな（正常または異常）組織を生じる能力を有する。腫瘍組織および正常組織はどちらも、異なった

50

表現型特性および異なった増殖能を有する細胞の不均一な組み合わせから構成されている。ほとんどの腫瘍がクローン起源を有するため、腫瘍化癌細胞は、無限の増殖能を有する癌細胞および限定的な増殖能を有するまたは増殖能のない癌細胞を含む、表現型の多様な子孫を生ずるに違いない。このことから、腫瘍化癌細胞は正常幹細胞の自己複製および分化に類似した過程を経ることが示唆される。多くの種類の腫瘍が不均一な表現型を有する癌細胞を含むことが十分に実証されており、これは腫瘍が生じる元の組織で通常起こる分化の様子を反映している。腫瘍において癌細胞により通常の分化マーカーが変動して発現されることから、腫瘍における不均一性の一部は腫瘍細胞の異常な分化の結果として起こることが示唆される。したがって、腫瘍化細胞は、正常幹細胞の器官形成過程に類似した、異常でありかつ十分に制御されていない器官形成過程を経る癌幹細胞として考えられ得る。

10

【0003】

古くから癌と関連している多くの経路もまた、正常幹細胞の発達を制御している可能性がある。例えば、発癌遺伝子bcl-2の強制発現によりアポトーシスを防止するとインビボで造血幹細胞(HSC)の数が増加し、このことから細胞死はHSCの恒常性の制御において役割を有することが示唆される。ノッチ(Notch)、ソニックヘッジホッグ(Sonic hedgehog)(Shh)、およびWntシグナル伝達系路等の発癌に関与する他のシグナル伝達経路もまた、幹細胞の自己複製を制御する可能性がある。異なる器官において自己複製と発癌の両方を制御することも示されている1つの特に興味深い経路は、Wntシグナル伝達系路である。

【0004】

20

ある種の癌においては、幹細胞それ自体が形質転換の標的であることが示唆されている。幹細胞はすでに活性化された自己複製の機構を有するため、この活性化を維持する方がより分化した細胞において自己複製を新規に活性化するよりも単純である。また、幹細胞は自己複製することにより、高度に増殖性の組織における多くの成熟細胞のように短期間に死滅するのではなく、長期間持続する場合が多い。このことは、個々の幹細胞に変異が蓄積する機会は、ほとんどの成熟細胞種に蓄積する機会よりも非常に多いことを意味する。単一の変異のみが前駆細胞が形質転換を引き起こすのに必要であるような、幹細胞のように自己複製させる変異を獲得することにより、または既存の変異を幹細胞から受け継ぐことにより、場合によっては限られた前駆細胞が形質転換する可能性がある。

【0005】

30

幹細胞が悪性形質転換に必要なまたは十分な遺伝的事象の標的である場合が多いが、別の場合には限られた前駆細胞または実に分化した細胞が形質転換する可能性もある。自然発症するヒト白血病の場合には、幹細胞が腫瘍性増殖に必要な変異を蓄積するようである；しかし、たとえ変異の影響が限られた前駆細胞において現れるとはいえ、これらの変異は幹細胞に蓄積する可能性がある。すなわち、幹細胞に蓄積する変異が、幹細胞の下流に位置する原始的な前駆細胞の腫瘍性増殖を引き起こす可能性がある。

【0006】

幹細胞および癌幹細胞を同定および単離する方法は、これらの細胞を支配する機構を理解する上で、ならびに癌細胞の治療と幹細胞の増殖および発達の調節を適切に対象として得る治療様式を開発する上で非常に興味深い。

40

【発明の開示】

【0007】

発明の概要

幹細胞および癌幹細胞を同定するための方法および組成物を提供する。関心対象の細胞を検出するため、カテニンによって制御される転写応答エレメントに機能的に連結された検出可能なマーカーをコードする配列を含む核酸構築物を細胞または細胞集団に導入する。活性のある核カテニンの存在下では、検出可能なマーカーが発現され、細胞が幹細胞であることが示される。この局面において、本方法を用いて、試験細胞、特に正常または非形質転換細胞が幹細胞であるかどうかを判定することができる。本発明のいくつかの態様において、検出可能なマーカーは、蛍光タンパク質、例えば緑色蛍光タンパク質(GFP)

50

)およびその誘導体である。関心対象の幹細胞を単離または濃縮するために、GFPを発現する生細胞をソーティングすることができる。この局面において、本方法を用いて既知の幹細胞を濃縮することおよび今まで未知の幹細胞を選択することができる。

【0008】

本発明のいくつかの態様において、細胞集団は幹細胞および例えば拘束前駆細胞、分化細胞等の非幹細胞の混合集団である。これらの意味において、幹細胞は、造血幹細胞、胚性幹細胞、神経幹細胞等の正常幹細胞を含み得り、または腫瘍幹細胞であってもよい。細胞集団は、例えば固形腫瘍、白血病患者の血液試料等の腫瘍、および骨髄、上皮組織等の正常細胞の集団を含んでもよい。

【0009】

本発明の別の態様において、カテニンは、造血器腫瘍、すなわち白血病およびリンパ腫細胞、ならびに腫瘍幹細胞に対する治療成分を開発する標的として同定される。方法は、カテニンまたはカテニンシグナル伝達経路のメンバーに対するスクリーニングアッセイを含み得る。そのような造血器腫瘍はまた、異常なカテニン、例えば不適切な核移行、過剰発現等の存在により特徴づけおよび診断される。

【0010】

本発明の別の態様において、安定化カテニンを、アポトーシスを起こす能力が変化しているが完全に形質転換していない、すなわち連続した移植において腫瘍を形成し得る造血細胞に導入することによる、造血細胞における細胞増殖を変化させるための方法を提供する。不死化細胞は、スクリーニングアッセイおよび造血細胞が形質転換を起こす経路の解析において有用である。

【0011】

態様の詳細な説明

カテニンによって制御される転写応答エレメントに機能的に連結された検出可能なマーカーをコードする核酸構築物を導入することによる、幹細胞および癌幹細胞を同定するための方法および組成物を提供する。マーカーの発現は細胞におけるカテニンの活性化を示し、細胞が幹細胞であることを示す。本方法を用いて、細胞が幹細胞であるかどうかを試験すること；ならびに細胞の混合集団において幹細胞を単離および同定することができる。

【0012】

カテニンは、造血器腫瘍、すなわち白血病およびリンパ腫細胞、ならびに腫瘍幹細胞に対する治療成分を開発する標的として同定される。方法は、カテニンまたはカテニンシグナル伝達経路のメンバー対象としたスクリーニングアッセイを含む。

【0013】

本発明の別の態様においては、安定化カテニンの、アポトーシスを起こす能力が変化しているが完全に形質転換していない造血細胞への導入を利用して、細胞を不死化する。不死化細胞は、スクリーニングアッセイおよび造血細胞が形質転換を起こす経路の解析において有用である。スクリーニング法は、カテニンの発現または活性を調節する薬剤を同定するための様々な種類のアッセイを行う段階を含み得る。これらのスクリーニングにおいて同定されたリード化合物および/または結合成分は、より活性のある類似体の合成の基礎としての機能を果たし得る。これらから得られたリード化合物および/または活性類似体を、造血器腫瘍の治療に効果的な薬理的組成物に製剤化することができる。

【0014】

カテニンと血液腫瘍との関連性

本明細書に示すデータにより、カテニンが血液腫瘍と関連していることが実証される。不適切なカテニン活性、すなわち核移行、変異、過剰発現等の検出は、造血過剰増殖疾患の検出および特徴づけの診断アッセイに使用され、またカテニンは治療薬剤の標的として使用される。関心対象の過剰増殖状態には、1つもしくは複数の造血細胞系統または結合組織成分の異常な増殖によって特徴づけられる疾患の一群である骨髄増殖性疾患が含まれる。骨髄増殖性疾患には、真性多血症、骨髄線維症、慢性骨髄性(骨髄球性)白血

10

20

30

40

50

病、および原発性血小板血症が含まれる。急性白血病、特に赤白血病、および発作性夜間血色素尿症を含める血液学者もいる。各疾患は、主な特性または増殖の部位に従って同定される。骨髄増殖性疾患は、急性白血病の転帰をとる場合がある。

【0015】

白血病は、造血組織の悪性腫瘍である。ウイルス関連白血病には、パーキットリンパ種およびヒトTリンパ球ウイルスI型白血病が含まれる。電離放射線およびある種の化学物質（例えば、ベンゼン、いくつかの抗悪性腫瘍薬）への曝露は、白血病の危険性と関連する。いくつかの遺伝的欠陥（例えば、ダウン症候群、ファンコニ貧血）もまた、白血病の素因となる。

【0016】

悪性への形質転換（2つまたはそれ以上の段階を介する）は単一の細胞で起こり、続いて増殖およびクローンの拡大が起こる。通常、形質転換は多能性幹細胞または前駆細胞レベルで起こるが、より限定的な分化の能力を有する拘束細胞が関わる場合もある。クローンは、不均一性および表現型進化の特徴を備えて遺伝的に不安定になる傾向がある。一般に白血病細胞は、正常な骨髄細胞よりも長い細胞周期および少ない増殖分画で分裂し、アポトーシス（プログラム細胞死）が遅いために蓄積する。

【0017】

白血病の臨床上および検査上の特徴は、正常血液細胞形成の抑制および器官浸潤に起因する。白血病細胞によって産生される抑制因子または骨髄空間の置換によって正常な造血が抑制され、その後、貧血、血小板減少、および顆粒球減少が起こり得る。器官浸潤により、肝臓、脾臓、およびリンパ節が膨張し、時に腎臓および生殖腺も関与する。髄膜浸潤では、頭蓋内圧の上昇に関連した臨床的特徴（例えば脳神経麻痺）が生じる。

【0018】

白血病は最初は平均余命に基づき急性または慢性と称されたが、現在では細胞成熟度に従って分類される。急性白血病は主に未成熟細胞（通常は芽球型）からなり；慢性白血病はより成熟した細胞からなる。急性白血病はリンパ芽球性(ALL)と骨髄性(AML)に分けられ、これらはさらに形態および細胞化学的見かけまたは免疫表現型により細分される。慢性白血病は、リンパ性白血病(CLL)または骨髄性白血病(CML)と称される。骨髄異形性症候群は進行性骨髄機能不全を示すが、AMLであると確定診断するには不十分な割合の芽球(<30%)を有する；40~60%の症例でAMLになる。

【0019】

リンパ腫にはホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫が含まれ、リンパ節、骨髄、脾臓、肝臓、および胃腸管を含む免疫系の部位におけるリンパ球の悪性単クローン性増殖として特徴づけられる。NHLの経過は、緩慢でありかつ病初で痛みを伴わないものから速やかに死に至るものまで異なる。ある種のNHLを有する小児の最大で50%および成人の約20%において、白血病様の病像が発現する可能性がある。NHLはホジキン病よりも頻繁に起こる。NHL、特に免疫芽球性および小型非切れ込み（パーキットリンパ腫）細胞種の発生率は、HIV患者で増加する。ワーキング・フォーミュレーションにより、NHLは、以下のように治療への示唆を有する予後カテゴリーに分類される：低悪性度リンパ腫(38%)（びまん性小リンパ球型；濾胞性小型非切れ込み細胞型；濾胞性混合細胞型）；中悪性度リンパ腫(30%)（濾胞性大細胞型；びまん性小型非切れ込み細胞型；びまん性混合細胞型；びまん性大細胞型）；高悪性度リンパ腫(20%)（免疫芽球型リンパ腫；リンパ芽球型リンパ腫；小型非切れ込み細胞型リンパ腫（パーキットおよび非パーキット種））；その他のリンパ腫(2%)（混合リンパ腫、菌状息肉腫、組織球型、その他、および分類不能型）。

【0020】

CMLは、欠陥のある原始的造血前駆細胞のクローン拡大の結果として起こると考えられている。共焦点蛍光顕微鏡を用いると、慢性骨髄性白血病細胞では、核内および細胞質のカテニン発現が正常骨髄単核球およびアイソタイプ対照と比較して上昇していることが示される。5カラー-FACS解析により、CML試料における骨髄系前駆細胞は正常骨髄または末梢血と比較して著しく拡大しているが、造血幹細胞の数は同等であることが実証された。

10

20

30

40

50

特に、カテニン発現はCMLと正常HSCで類似しているものの、CMLにおけるカテニン発現は正常骨髄性前駆細胞と比較して上昇していることが見出された。

【0021】

さらに、カテニンの誘導する幹細胞自己複製の活性化がカテニンの転写因子LEF/TCFへの結合によって媒介されることが示されたため、健常人およびCML患者のHSCおよび骨髄性前駆細胞にレンチウイルスLEF/TCF-GFPベクターを形質導入し、カテニンのその下流標的への核内結合についてアッセイした。培養して7~10日後には健常人および患者のHSCは同様のGFPレベルを示したが、CMLの骨髄性前駆細胞は健常人のものよりも高いGFP発現を示し、このことからカテニンの核移行の増加が示された。総合すると、これらの実験から、骨髄性前駆細胞における活性化カテニンの過剰発現を介したWntシグナル伝達経路の活性化により、白血病の可能性が高まることが実証される。カテニンの過剰発現を診断で使用して、疾患を伝播する可能性のある癌「幹細胞」を検出すること、およびaxinおよびdickkopf等のカテニンの既知阻害因子を用いたレンチウイルス形質導入によるカテニンの標的阻害を介して、カテニンの過剰発現を治療に使用することができる。

10

【0022】

動物モデルにおいて、c-kit⁺前白血病lpr/lpr bcl-2細胞に対照ベクターまたはカテニンベクターを形質導入し、培養してから1日後に致死未満の照射をしたRAG2^{-/-}g^{-/-}マウスにこの細胞を移植した。カテニンベクターでは移植した細胞の腫瘍形成が有意に増加し、白血病を発症した。白血病表現型を伝播させるために、次に、カテニン形質導入細胞を移植したそのような白血病マウスの全骨髄細胞を、致死未満の照射をしたRAG2^{-/-}g^{-/-}マウスに移植したと、連続して移植した後に増殖の可能性が有意に増加することが見出された。

20

【0023】

幹細胞を検出および単離するための構築物

本発明の1つの態様においては、本明細書で「検出構築物」と称する、カテニンによって制御される転写応答エレメントに機能的に連結された検出可能なマーカーをコードする配列を含む核酸構築物を細胞または細胞集団に導入する。核カテニンの存在下では、検出可能なマーカーが発現され、細胞が幹細胞であることが示される。この局面において、本方法を用いて、試験細胞が幹細胞であるかどうかを判定することができる。関心対象の幹細胞を単離または濃縮するために、マーカーを発現する生細胞をソーティングすることも可能である。この局面において、本方法を用いて既知の幹細胞を濃縮することおよび今まで未知の幹細胞を選択することができる。

30

【0024】

プラスミドベクター、ウイルスベクター等を含む、細胞に配列を送達するための様々なベクターが当技術分野において周知である。好ましい態様において、ベクターはレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターである。例えば、Baumら (1996) *J Hematol* 5(4):323-9; Schwarzenbergerら (1996) *Blood* 87:472-478; Nolitaら (1996) *P.N.A.S.* 93:2414-2419; およびMazeら (1996) *P.N.A.S.* 93:206-210; Mochizukiら (1998) *J Virol* 72(11):8873-83を参照されたい。アデノウイルスに基づくベクターの造血細胞との使用もまた発表されており、それについてはOgnibenおよびHaas (1998) *Recent Results Cancer Res* 144:86-92を参照されたい。

40

【0025】

カテニン転写応答エレメント(TRE)は、カテニンによって活性化される転写因子に結合する1つまたは複数のヌクレオチドモチーフを含み得る。好ましい態様において、転写因子はLEF/TCFである。(総説に関しては、本明細書に参照として組み入れられるRooseおよびClevers (1999) *Biochim Biophys Acta* 1424(2-3):M23-37を参照のこと。)転写的に不活性のLEF/Tcf因子は、核内におけるカテニンとの相互作用により強力なトランス活性化因子となる。カテニンは細胞質に認められるが、これが活性化され核内に移行した場合に主要な生物学的作用が見られることが示され得る。このシグナル伝達経路に応答するヌクレオチドエレメントには、例えばヒトc-MYCプロモーターのKpnI~PvuII断片に含

50

まれるTBE1(配列番号:1; CCTTTGATT)およびTBE2(配列番号:2; GCTTTGATC)(Heら(1998) Science 281:1509を参照のこと)、LEF/TCF結合モチーフ(例えば、配列番号:3; CCTTTGATC; または配列番号:4; CCTTTGGCC)(Korinekら(1997) Science 275:1784-1787)、LEF-1結合部位(配列番号:5; GCTTTGATCTT)(Shtutmanら(1999) Proc Natl Acad Sci U S A 96(10):5522-7)、ならびに別の当技術分野で周知のものが含まれる。LEF-1/TCFに応答性の配列の教示に関して、これらの参考文献は特に参照として本明細書に組み入れられる。例えば(配列番号:13) GATCAAAGGGといったこれらの配列の相補鎖を用いることもできる。

【0026】

本発明の1つの態様において、カテニン応答性TREは、1つまたはそれ以上、2つまたはそれ以上、3つまたはそれ以上等の結合モチーフ配列(配列番号:12) X^1 C T T T G Pu T Py(式中、 X^1 はGまたはC、Puはプリン、Pyはピリミジンである)を含む。好ましい態様において、カテニン応答性TREは、1つまたはそれ以上、2つまたはそれ以上、3つまたはそれ以上等の、配列番号:12に相補的な結合モチーフ配列(配列番号:14) 5' Pu A Py C A A A G X^1 3'(式中、 X^1 はGまたはC、Puはプリン、Pyはピリミジンである)を含む。

10

【0027】

検出可能なマーカーをカテニンTREに機能的に連結する。多くのそのようなマーカーが当技術分野で周知であり、例えば、抗生物質耐性、基質の変色、間接的に検出される、例えばcreリコンビナーゼ、FLPリコンビナーゼ、pSR1リコンビナーゼ等といったリコンビナーゼの発現、例えばルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質等の発光産生タンパク質の発

20

【0028】

本発明の好ましい態様において、マーカーは発光産生タンパク質、好ましくはGFPである。このタンパク質をコードする天然遺伝子は、生物発光クラゲ*Aequorea victoria*からクローニングされた(Morin, J.ら、J Cell Physiol(1972) 77:313-318)。この遺伝子が利用できることにより、遺伝子発現のマーカーとしてのGFPの使用が可能となった。GFP自体は、分子量27 kDを有する283アミノ酸タンパク質である。GFPは蛍光を発するために、天然源からさらなるタンパク質を必要とせず、また天然源でのみ利用可能な基質または補因子を必要としない(Prasher, D. C.ら、Gene(1992) 111:229-233; Yang, F.ら、Nature Biotechnol(1996) 14:1252-1256; Cody, C. W.ら、Biochemistry(1993) 32:1212-1218)。GFP遺伝子の変異体は、発現を増強するのに、ならびに励起および蛍光を改変するのに有用であることが認められた。490 nmに単一の励起ピークを有するGFP-S65T(65位のセリンがスレオニンで置換されている)を使用することができる(Heim, R.ら、Nature(1995) 373:663-664); 米国特許第5,625,048号)。Delagrade, S.ら、Biotechnology(1995) 13:151-154; Cormack, B.ら、Gene(1996) 173:33-38、およびCramer, A.ら、Nature Biotechnol(1996) 14:315-319によって、他の変異体もまた開示されている。さらなる変異体もまた、米国特許第5,625,048号で開示されている。適切な改変により、GFPにより放射される光のスペクトルを変更することができる。したがって、本出願においては「GFP」という用語を用いるが、この定義の範囲内に含まれるタンパク質は必ずしも緑色に出現するとは限らない。様々な形態のGFPが緑色以外の色を示すが、これらもまた「GFP」の定義の範囲内に含まれ、本発明の方法および材料において有用である。さらに、本明細書の「GFP」の範囲内に入る緑色蛍光タンパク質は、ウミシイタケ*Renilla reriformis*等の他の生物から単離されたことに留意されたい。本発明の方法において、任意の適切でありかつ都合のよいGFP遺伝子を用いることができる。

30

40

【0029】

例えばエレクトロポレーション法、カルシウム沈殿DNA法、融合法、トランスフェクション法、リポフェクション法等の当技術分野で周知の様々な技法を用いて、標的細胞をトランスフェクションすることができる。DNAを導入する特定の方法は、本発明の実行に重要ではない。

【0030】

50

キャプシドタンパク質が標的細胞の感染に対して機能的であるレトロウイルスと適切なパッケージング株を併用することができる。通常、細胞およびウイルスを培地中で少なくとも約24時間インキュベートする。一般的に使用されるレトロウイルスベクターは「欠損型」である、すなわち増殖性の感染に必要なウイルスタンパク質を産生することができない。ベクターの複製は、パッケージング細胞株での増殖を必要とする。

【0031】

レトロウイルスの宿主細胞特異性は、エンベロープタンパク質、env(p120)によって決まる。エンベロープタンパク質は、パッケージング細胞株によって提供される。エンベロープタンパク質には、少なくとも3種類（同種指向性、両種指向性、および他種指向性）ある。例えばMMLVといった同種指向性エンベロープタンパク質でパッケージングされたレトロウイルスは、ほとんどのマウスおよびラット細胞腫に感染することができる。同種指向性パッケージング細胞株にはBOSC23が含まれる（Pearら（1993）P.N.A.S. 90:8392-8396）。例えば4070A（Danosら、前記）といった両種指向性エンベロープタンパク質を有するレトロウイルスは、ヒト、イヌ、およびマウスを含むほとんどの哺乳動物細胞種に感染することができる。両種指向性パッケージング細胞株にはPA12（Millerら（1985）Mol. Cell. Biol. 5:431-437）；PA317（Millerら（1986）Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902）；GRIP（Danosら（1988）PNAS 85:6460-6464）が含まれる。例えばAKR envといった他種指向性エンベロープタンパク質でパッケージングされたレトロウイルスは、マウス細胞以外のほとんどの哺乳動物細胞種に感染することができる。

10

【0032】

レトロウイルスの5'末端および3'末端の配列は、長い末端反復配列(LTR)である。MMLV-LTR、HIV-LTR、AKR-LTR、FIV-LTR、ALV-LTR等を含む多くのLTR配列が当技術分野で周知であり、使用することが可能である。公共のデータベースを介して、特定の配列にアクセスすることができる。天然LTR配列の様々な改変もまた周知である。5'LTRは、標的細胞のゲノムに組み込まれた後に、カテニン遺伝子の転写を駆動する強力なプロモーターとして働く。しかしいくつかの用途のためには、発現を駆動する制御可能なプロモーターを有することが望ましい。そのようなプロモーターが含まれる場合、LTRのプロモーター機能は不活性化されることになる。これは、プロモーター機能を不活性化するのに十分である、エンハンサー反復配列およびプロモーターを含む3'LTRのU3領域の欠失により達成される。標的細胞のゲノムに組み込まれた後、5'LTRと3'LTRに再編成が起こり、その結果「自己不活性化ベクター」と呼ばれる転写的欠陥プロウイルスが生じる。

20

30

【0033】

所望の標的細胞種、トランスフェクションした細胞またはその子孫において、適切な誘導性プロモーターを活性化する。転写の活性化により、標的細胞における転写は、基礎レベルの少なくとも約100倍、より一般的には少なくとも約1000倍増加することを意図する。例えばT細胞におけるIL-2プロモーター、B細胞における免疫グロブリンプロモーター等の、造血細胞種において誘導される様々なプロモーターが周知である。

【0034】

幹細胞を検出または選択するため、幹細胞であるまたは幹細胞を含むと思われる細胞または細胞集団に検出構築物を導入する。発現構築物を導入した後、検出可能なマーカーを発現するのに十分な期間、通常少なくとも12時間かつ約2週間以下で、おそらくは約1日～約1週間、細胞を維持する。

40

【0035】

細胞は任意の哺乳動物種、例えば、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター等のげっ歯類、霊長類等、特にヒトから得られ得る。組織は、生きたドナーの生検もしくはアフレーシスによって得ることができ、または死亡してから約48時間以内の死体ドナー、もしくは死亡してから約12時間以内に凍結し約-20 未満、通常は永久に液体窒素温度(-180)で維持した新鮮凍結組織から得ることができる。細胞集団には、推定される幹細胞クローン、腫瘍試料、骨髄試料、胚性幹細胞、例えば神経提、腸、脾臓、肝臓といった器官、臍帯血、末梢血、動員末梢血、卵黄嚢等が含まれる。

50

【0036】

蛍光タンパク質である検出可能なマーカーの発現は、レーザーによりフルオロフォアの定量的レベルを検出するフローサイトメトリーによりモニターすることができる。フローサイトメトリーまたはFACSを用いて、蛍光強度ならびに細胞の大きさおよび光散乱等の他のパラメータに基づいて細胞集団を分離することもできる。染色の絶対的レベルは異なり得るが、対照に対してデータを標準化することができる。

【0037】

カテニンに制御されるマーカー遺伝子の発現に加えて、例えば当業者に周知であるようなc-kit、thy-1(CD-90)、系統マーカー、CD34、増殖因子受容体等の発現といった関心対象のマーカーに特異的な抗体で、細胞を共染色してもよい。多くの前駆細胞および幹細胞マーカーが周知であり、これらの細胞種を識別するために用いられる。

10

【0038】

上記の特徴を有する細胞を濃縮する技法により、細胞の複合混合物から関心対象の細胞を分離することができる。組織から細胞を単離するため、分散または懸濁のために適切な溶液が用いられ得る。そのような溶液は一般に、一般に5~25 mMである低濃度の許容可能な緩衝液と同時に、ウシ胎児血清および他の天然因子を都合よく添加した、例えば生理食塩水、PBS、ハンクス平衡塩類溶液等の平衡塩類溶液である。簡便な緩衝液には、HEPES、リン酸緩衝液、乳酸緩衝液等が含まれる。

【0039】

分離した細胞は、通常コレクションチューブの底に血清のクッションを有する、細胞の生存度を維持する任意の適切な培地中に回収することができる。様々な培地が市販されており、細胞の性質に従って用いることができ、これにはdMEM、HBSS、dPBS、RPMI、イスコフ培地等が含まれ、ウシ胎児血清が添加されている場合が多い。

20

【0040】

この方法により、幹細胞活性について高度に濃縮された組成物が達成される。対象集団は、細胞組成物の50%もしくは約50%またはそれ以上、好ましくは細胞組成物の75%もしくは約75%またはそれ以上であり、90%またはそれ以上であってもよい。所望の細胞は、表面の表現型、幹細胞に必須の特性である自己複製の能力によって同定される。濃縮された細胞集団は、直ちに使用することも、または液体窒素温度で凍結して長期間保存し、融解して再使用することも可能である。細胞は通常、10% DMSO、50% FCS、40% RPMI 1640培地中に保存する。活性化 カテニンを有する細胞について濃縮された細胞の集団は、以下に記載するような様々なスクリーニングアッセイおよび培養において用いることができる。

30

【0041】

濃縮した細胞集団は、様々な培養条件下でインビトロで培養することができる。培地は、液体、または例えばアガー、メチルセルロース等を含む半固形であってよい。細胞集団は、通常ウシ胎児血清(約5%~10%)、L-グルタミン、チオール、特に2-メルカプトエタノール、ならびに例えばペニシリンおよびストレプトマイシンといった抗生物質を添加した、イスコフ改変DMEMまたはRPMI-1640等の適切な栄養培地に簡便に懸濁することができる。

【0042】

培地は、細胞が応答する増殖因子を含み得る。本明細書に定義する増殖因子は、培養においてまたは元の組織において、膜貫通受容体における特異的効果を介して、細胞の生存、増殖、および/または分化を促進し得る分子である。増殖因子には、ポリペプチド因子および非ポリペプチド因子が含まれる。細胞の培養において、例えばLIF、steel因子(c-kitリガンド)、EGF、インスリン、IGF、Fik-2リガンド、IL-11、IL-3、GM-CSF、エリスロポエチン、トロンボポエチン等の多種多様な増殖因子を用いることができる。

40

【0043】

増殖因子に加えて、またはその代わりに、対象細胞を線維芽細胞、間質細胞、または他のフィーダー層細胞と共培養してもよい。造血細胞の培養での使用に適した間質細胞は、当技術分野で周知である。これらには、「Whitlock-Witte」(Whitlockら [1985] Annu R

50

ev Immunol 3:213-235) または「Dexter」培養条件 (Dexterら [1977] J Exp Med 145:1612-1616) で用いられるような骨髄間質細胞、および不均一な胸腺間質細胞 (Smallおよび Weissman [1996] Scand J Immunol 44:115-121) が含まれる。

【0044】

本発明の別の局面では、例えば外因性核酸発現ベクターを細胞に導入することによって標的幹細胞または前駆細胞を不死化するため、構築物を用いて カテニン、通常は安定化 カテニンコード配列を送達する。外因性遺伝子を標的哺乳動物細胞に移行させるのに有用な多くのベクターが利用できる。ベクターは、例えばプラスミド、サイトメガロウイルス、アデノウイルス等のウイルス由来ベクターといったエピソームであってよく、または MMLV、HIV-1、ALV等のレトロウイルス由来ベクターのように、相同的組換えまたはランダム組み込みにより標的細胞ゲノムに組み込まれてもよい。そのような構築物を「不死化構築物」と称し得る。

10

【0045】

本明細書で用いる カテニンという用語は、野生型および安定型の カテニンタンパク質、ならびにその融合タンパク質および誘導体を指すことを意図する。通常、タンパク質は哺乳動物由来のものであるが、他の種のタンパク質も使用され得る。タンパク質は種間で保存され、例えばヒト配列はマウス細胞において活性がある。多くの カテニンタンパク質の配列が公的に周知である。本発明の1つの態様においては、安定型の カテニンを使用する。

【0046】

プロテアソーム媒介性のタンパク質分解が阻害されてこれにより カテニンのマルチユビキチン化型が蓄積した場合に、 カテニンは安定化する (Aberleら (1997) EMBO J 16(13):3797-804)。 カテニンのグリコーゲン合成酵素キナーゼ3 (GSK3)リン酸化共通モチーフ内のセリン残基の置換により、ユビキチン化が阻害され、その結果このタンパク質が安定化する。安定化 カテニンの例には、アミノ酸変化D32Y; D32G; S33F; S33Y; G34E; S37C; S37F; T41I; S45Y; およびアミノ酸1~173の欠失が含まれる。多くの出版物により、安定化 カテニン変異が記載されている。例えば、Morinら (1997) Science 275(5307):1780-90; Palaciosら (1998) Cancer Res 58(7):1344-7; Mullerら (1998) Genes C chromosomes Cancer 22(1):37-41; Miyoshiら (1998) Cancer Res 58(12):2524-7; Zurawelら (1998) Cancer Res. 58, 896-899; Voellerら (1998) Cancer Res 58, 2520-2526等を参照されたい。

20

30

【0047】

配列の標的変化を生じるために、当技術分野で周知の様々な方法で、 カテニンポリペプチドの配列を改変することができる。ポリペプチドは通常、本明細書で提供する配列と実質的に類似している、すなわち少なくとも1つのアミノ酸で異なり、また少なくとも2アミノ酸であるが約10アミノ酸以下で異なる可能性がある。欠失は、タンパク質の活性ペプチド断片を規定するドメインまたはエキソンの欠失のように、より大きな変化をさらに含み得る。関心対象の他の改変には、例えばFLAG系、HA、緑色蛍光タンパク質等とのタギングが含まれる。そのような改変により、安定性、特異性等に影響を及ぼすことによってタンパク質の特性を改変することができる。様々な目的で、特に膜を越える輸送を促進するために、タンパク質に多種多様な他のオリゴペプチドまたはタンパク質を連結してもよい。

40

【0048】

クローン化遺伝子のインビトロ突然変異誘発の技法は周知である。変異を調査する手順の例は、Gustinら、Biotechniques 14:22 (1993); Barany、Gene 37:111-23 (1985); Colicelliら、Mol Gen Genet 199:537-9 (1985); およびPrentkiら、Gene 29:303-13 (1984)に見出し得る。部位特異的突然変異誘発方法は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、CSH Press 1989、15.3~15.108ページ; Weinerら、Gene 126:35-41 (1993); Sayersら、Biotechniques 13:592-6 (1992); JonesおよびWinistorfer、Biotechniques 12:528-30 (1992); Bartonら、Nucleic Acids Res 18:7349-55 (1990); Marottiお

50

びTomich, Gene Anal Tech 6:67-70 (1989); およびZhu Anal Biochem 177:120-4 (1989)に見出すことができる。

【0049】

拡大した後に、標的細胞から遺伝子構築物を除去することができる。これは、一過性ベクター系の使用により、またはカテニンコード配列に隣接して異種組換え部位を含めることにより達成することができる。この方法においては、拡大した後に構築物を除去してから、拡大した細胞集団を用いることができる。構築物を欠失させた後に外因性カテニンを欠く細胞を容易に単離できるように、好ましくは、例えば緑色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、抗体選択法に適した細胞表面タンパク質等の検出可能なマーカーを発現ベクターに含める。「異種組換え部位」という用語は、部位特異的組換えを促進する任意の導入される遺伝子配列を包含することを意図する。一般に、特異的酵素と2つのそのような部位が相互作用することにより、そのような部位によって組換えが促進される。例示的な異種組換え部位には、Cre酵素によって組み換えられるlox配列; frt配列(Golicら(1989) Cell 59:499-509; O'Gormanら(1991) Science 251:1351-5; 組み換えはFLPリコンビナーゼに媒介される); Zygosaccharomyces rouxiiのpSR1リコンビナーゼの認識配列(Matsuzakiら(1990) J. Bacteriol. 172:610-8)等が含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。

10

【0050】

哺乳動物細胞において一過性の発現を提供する発現ベクターを用いてもよい。一般に一過性発現は、宿主細胞が多コピーの発現ベクターを蓄積し、次に発現ベクターによってコードされる所望のポリペプチドを高レベルで合成するような、宿主細胞内で効率的に複製し得る発現ベクターの使用を含む。適切な発現ベクターおよび宿主細胞を含む一過性発現系により、細胞の簡便な短期間の拡大が可能となるが、細胞の長期的な遺伝子型は影響を受けない。

20

【0051】

細胞の増殖する能力の調節を提供する不死化構築物を、様々な異なる方法のいずれかにより造血細胞に導入する。好ましくは造血細胞は、骨髓系前駆細胞、造血幹細胞、リンパ系前駆細胞、多系譜前駆細胞等の前駆細胞または幹細胞である。造血幹細胞および前駆細胞の系譜の総説については、それぞれ本明細書に参照として組み入れられる、Wagersら(2002) Gene Ther. 9(10):606-12; Parkら(2002) Blood 99(2):488-98; およびWeissmanら(2001) Annu Rev Cell Dev Biol 17:387-403を参照されたい。

30

【0052】

好ましくは、カテニン発現配列を導入する細胞は、1つまたは複数の「ヒット」を有するように、または細胞増殖を正確に制御する能力を減少させる遺伝子改変を有するように改変する。そのような細胞の例は、本明細書に参照として組み入れられる米国特許第5,614,397号、Lagasseらに見出し得る。関心対象の前駆細胞には、骨髓系およびリンパ系の細胞、詳細には骨髓系の細胞、より詳細には骨髓単球系の細胞、特に好中球が含まれる。

【0053】

カテニンを導入するために用いられる方法には、標的細胞の「エクスピゴ」トランスフェクションが含まれ、標的細胞は、例えば前駆細胞といった標的細胞、または標的細胞を生じる幹細胞であってよい。関心対象の方法には、裸のDNA、DNA-リポソーム複合物、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等の使用が含まれ、その後細胞をインビトロで細胞を培養するか、またはマウスまたはヒト等の宿主細胞に形質転換細胞を移植する。

40

【0054】

非相同的に組み込まれ遺伝子組み換え非ヒト動物(例えばマウス)を形成する導入遺伝子を導入するためには、受精卵(例えばマウス)の前核マイクロインジェクションが好ましい。相同的に標的した非ヒト動物を含む遺伝子組み換え非ヒト動物を作製するには、胚性幹細胞(ES細胞)が一般に好ましい。本質的に記載された(Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. E. J. Robertson編(Oxford: IRL Press)、7

50

1~112ページのRobertson, E. J. (1987)) ように、分裂不活性のSNL76/7細胞フィーダー層 (McMahonおよびBradley, Cell 62:1073-1085 (1990)) 上で培養したAB-1株等のマウスES細胞を、相同的遺伝子ターゲティングに用いることができる。他の適切なES株には、E14株 (Hooperら (1987) Nature 326:292-295)、D3株 (Doetschmanら (1985) J. Embryol Exp. Morph. 87:27-45)、およびCCE株 (Robertsonら (1986) Nature 323:445-448) が含まれる。ES細胞からマウス株の作製が成功するかは、ES細胞の多能性 (すなわち、宿主胚盤胞内に注入した際に、胚形成に関与する能力、および生じる動物の生殖系列に寄与する能力) に依存する。注入されたES細胞を含む胚盤胞は、偽妊娠非ヒト雌の子宮内で発達させる。所望の位置に関心対象の遺伝子を有する遺伝子組み換えマウスを同定するために、MRP8またはMRP14等の関心対象の血液リンパ球発現遺伝子制御配列に機能的に連結された、細胞の寿命を調節する関心対象の遺伝子を有する生じた遺伝子組み換えマウスを、尾または他の組織の生検DNAをPCRまたはサザンブロット解析することにより、正確に標的された構築物および/または導入遺伝子の存在についてスクリーニングする。そのようなトランスジェニック動物は、好中球等の特定の子孫細胞において関心対象の遺伝子を発現する、トランスジェニック造血幹細胞の有用な供給源である。トランスジェニック造血幹細胞は、移植および免疫調節剤スクリーニングアッセイに有用である。

10

【0055】

本発明の方法により単離した幹細胞、ならびに不死化構築物の導入により作製した細胞および動物は、化合物スクリーニングにおいて、幹細胞で発現される遺伝子を同定するため、幹細胞を利用した療法のため等に使用される。

20

【0056】

化合物スクリーニングは、インビトロモデル、遺伝子改変した細胞もしくは動物、またはカテニンに相当する精製タンパク質を用いて実施し得る。本明細書に由来するトランスジェニック動物または細胞もまた、化合物スクリーニングに使用される。

【0057】

化合物スクリーニングにより、カテニンの機能を調節する薬剤が同定される。特に興味深いのは、ヒト細胞への毒性が低い薬剤のスクリーニングアッセイである。この目的のために、標識インビトロタンパク質-タンパク質結合アッセイ、電気泳動移動度シフトアッセイ、タンパク質結合についての免疫アッセイ等の多種多様なアッセイを用いることができる。精製された組換えタンパク質の結晶化から得られるコードされるタンパク質の3次元構造の知識によって、活性を特異的に阻害する小薬剤の合理的設計がもたらされると考えられる。これらの薬剤は、測定ドメインを対象とすることができる。

30

【0058】

本明細書で用いる「薬剤」という用語は、例えばカテニンの生理的機能および造血細胞の自己複製を変化させるまたは模倣する能力を有するタンパク質または調合薬等といった任意の分子を表す。一般に、異なる薬剤濃度を有する複数のアッセイ混合物を並行して試験して、様々な濃度に対する異なる反応が得られる。典型的に、これらの濃度のうちの1つが陰性対照である、すなわち濃度ゼロまたは検出レベル未満の濃度である。

【0059】

候補薬剤には多数の化学的クラスが含まれるが、典型的には有機分子、好ましくは500ダルトンを上回り約2,500ダルトン未満である分子量を有する小有機化合物である。候補薬剤は、タンパク質との構造的相互作用、詳細には水素結合に必要な機能基を含み、典型的には少なくとも1つのアミン基、カルボニル基、水酸基、またはカルボキシル基を含み、好ましくは少なくとも2つの機能的化学基を含む。候補薬剤は、1つまたは複数の上記機能基に代えて、環式炭素もしくは複素環式構造、および/または芳香族もしくは多環芳香族構造を含む場合も多い。候補薬剤は、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造類似体、またはこれらの組み合わせを含む生体分子にも見出される。

40

【0060】

候補薬剤は、合成化合物または天然化合物のライブラリーを含む多種多様な供給源から

50

得られる。例えば、多種多様な有機化合物および生体分子をランダムにおよび方向性をもって合成するには、ランダムオリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドの発現を含む多くの手段が利用できる。または、細菌、菌類、植物、および動物抽出物の形態の天然化合物ライブラリーも利用可能であり、容易に産生される。さらに、天然でまたは合成により産生されたライブラリーおよび化合物は、従来の化学的、物理的、および生化学的手段によって容易に修飾され、コンビナトリアルライブラリーを作製するのに使用することができる。周知の薬物を、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化等の方向性をもったまたはランダムな化学修飾に供して、構造類似体を産生してもよい。試験薬剤は、例えば天然産物ライブラリーまたはコンビナトリアルライブラリー等のライブラリーから得ることができる。多くの異なる種類のコンビナトリアルライブラリーおよびそのようなライブラリーを調製するための方法が記載されており、これには例えば国際公開公報第93/06121号、国際公開公報第95/12608号、国際公開公報第95/35503号、国際公開公報第94/08051号、および国際公開公報第95/30642号が含まれ、これらはそれぞれ本明細書に参照として組み入れられる。

10

【0061】

スクリーニングアッセイが結合アッセイである場合、1つまたは複数の分子を、直接的または間接的に検出可能なシグナルを提供し得る標識に結合することができる。様々な標識には、放射性同位元素、蛍光、化学発光、酵素、特異的結合分子、例えば磁気粒子といった粒子等が含まれる。特異的結合分子には、ビオチンおよびストレプトアビジン、ジゴキシンおよび抗ジゴキシン等の対が含まれる。特異的結合メンバーについては、周知の手順に従って、通常相補的メンバーを、検出を提供する分子で標識する。

20

【0062】

スクリーニングアッセイには、様々な他の試薬が含まれ得る。これらには、最適なタンパク質-タンパク質結合を促進する、および/または非特異的もしくはバックグラウンド相互作用を低減させるために用いられる塩類等の試薬、例えばアルブミンといった中性タンパク質、界面活性剤等が含まれる。プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗菌剤等の、アッセイの効率を改良する試薬を用いてもよい。成分の混合物を、必要な結合を提供する任意の順番で添加する。インキュベーションは任意の適切な温度で行い、典型的には4 ~ 40 °Cで行う。インキュベーション時間は最適活性に対して選択するが、迅速なハイスループットスクリーニングを容易にするために最適化してもよい。典型的には、0.1時間 ~ 1時間で十分である。

30

【0063】

先のスクリーニング法のいずれかにより当初に同定した化合物をさらに試験して、明確な活性を確認することができる。そのような方法の基本的型式は、最初のスクリーニング過程で同定したリード化合物を、ヒトのモデルとなる動物に投与する段階、および次の活性を判定する段階を含む。検証試験で用いる動物モデルは、一般に哺乳動物である。適切な動物の具体例には、霊長類、マウス、およびラットが含まれるが、これらに限定されない。

【0064】

本明細書に記載するスクリーニング法により同定した、腫瘍増殖を阻害する活性試験薬剤は、類似体化合物を合成するためのリード化合物となり得る。典型的に類似体化合物は、リード化合物のものと類似した電子配置および分子配座を有するように合成する。類似体化合物の同定は、自己無頓着場 (self-consistent field; SCF) 解析、配置間相互作用 (CI) 解析、および通常モードの動力学解析等の技法の使用により行うことができる。これらの技法を実行するコンピュータプログラムが利用可能である。例えば、Reinら、(1989) Computer-Assisted Modeling of Receptor-Ligand Interactions (Alan Liss, New York) を参照されたい。

40

【0065】

活性化 カテニンを含む細胞の検出を含む診断法および予測法のいくつかは、細胞の溶解、および続く他の細胞物質、特に mRNA 転写産物からの核酸の精製から始まる。mRNA 転写

50

産物に由来する核酸とは、その合成のためにmRNA転写産物またはそのサブ配列が最終的に鋳型として働く核酸を指す。したがって、mRNAから逆転写されたcDNA、そのcDNAから転写されたRNA、cDNAから増幅されたDNA、増幅されたDNAから転写されたRNAはすべてmRNA転写産物由来であり、そのような由来産物の検出によって、試料中の元の転写産物の存在および/または存在量が示される。

【0066】

特定の配列の存在について、例えばアップレギュレートされたまたはダウンレギュレートされた発現について核酸を解析するために、多くの方法が利用可能である。ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)等の従来法により核酸を増幅して、解析に十分な量を提供することができる。ポリメラーゼ連鎖反応法の使用は、Saikiら(1985) Science 239:487に記載されており、技法の総説はSambrookら Molecular Cloning: A Laboratory Manual、CSH Press 1989、14.2~14.33ページに見出すことができる。

10

【0067】

増幅反応に検出可能な標識を含めてもよい。適切な標識には、例えばALEXA色素(Molecular Probes, Inc.から入手可能)、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ローダミン、テキサスレッド、フィコエリトリン、アロフィコシアニン、6-カルボキシフルオロセイン(6-FAM)、2,7-ジメトキシ-4,5-ジクロロ-6-カルボキシフルオロセイン(JOE)、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、6-カルボキシ-2,4,7,4,7-ヘキサクロロフルオレセイン(HEX)、5-カルボキシフルオレセイン(5-FAM)、またはN,N,N,N-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA)といった蛍光色素、例えば³²P、³⁵S、³Hといった放射性標識等が含まれる。標識は、増幅したDNAに、例えばアビジン、特異的抗体等の高親和性結合パートナーを有するビオチン、ハプテン等を結合し、結合パートナーに検出可能な標識を結合する、2段階系であってよい。標識はプライマーの一方または両方に結合してよい。または、増幅産物に標識が取り込まれるように、増幅に使用するヌクレオチドのプールを標識する。

20

【0068】

例えば増幅断片、標識断片、クローン化断片といった試料核酸を、当技術分野で周知の多くの方法の1つで解析する。プローブをノーザンブロットもしくはドットブロットにハイブリダイズさせることができ、または液体ハイブリダイゼーション反応を行うことができる。核酸はジデオキシ法または他の方法によって配列決定することができ、塩基の配列を野生型配列と比較することができる。一本鎖DNA高次構造多型(SSCP)解析、変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)、およびゲルマトリックス中のヘテロ二本鎖解析により、DNA配列変動によって生じる高次構造変化を、電気泳動移動度における変化として検出する。ゲルまたはキャピラリー電気泳動、特にアクリルアミドまたはアガロースゲルにより、分画を行う。

30

【0069】

インサイチューハイブリダイゼーション法は、ハイブリダイゼーション前に細胞を溶解しないハイブリダイゼーション法である。この方法はインサイチューで行われるため、細胞からRNAを調製する必要がないという利点がある。本方法は通常、最初の試験細胞を支持体(例えばマイクロタイターウェルの壁)に固定する段階、および次の適切な透過処理用液を用いて細胞を透過処理する段階を含む。次に、標識プローブを含む溶液を細胞と接触させ、プローブをハイブリダイズさせる。過剰なプローブを消化し、洗浄除去し、ハイブリダイズしたプローブの量を測定する。このアプローチは、Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach(Hamesら編、1987)により詳述されている。

40

【0070】

また、様々ないわゆる「リアルタイム増幅」法または「リアルタイム定量PCR」法を用いて、試料中に存在するmRNAの量を測定することができる。そのような方法は、増幅過程において形成された増幅産物の量を測定する段階を含む。蛍光発生ヌクレアーゼアッセイは、転写産物を検出および定量するために用いられ得るリアルタイム定量法の1つの具体例である。一般にそのようなアッセイでは、二重標識蛍光発生オリゴヌクレオチドプローブを用いて、連続してPCR産物の蓄積を測定する。これは、文献では簡単に「TaqMan」法としてたびたび称されるアプローチである。増幅産物の濃度のリアルタイム測定を行うた

50

めの蛍光発生法の理論および操作に関するさらなる詳細は、例えばそれぞれ本明細書に参照として組み入れられるGelfandの米国特許第5,210,015号、Livakらの米国特許第5,538,848号、およびHaalandの米国特許第5,863,736号に記載されている。

【0071】

カテニンの発現についてのスクリーニングは、タンパク質の核局在化を含むタンパク質の機能特性または抗原性特性に基づき得る。多型を検出するように設計された様々な免疫測定法を、スクリーニングに用いることができる。検出は、カテニンに特異的に結合する抗体または他の特異的結合メンバーを用いて従来法に従って行う、細胞または組織学的切片の染色を利用することができる。関心対象の抗体または他の特異的結合メンバーを細胞試料に添加し、エピトープへの結合を可能にするのに十分な時間、通常は少なくとも約10分間インキュベートする。抗体は、直接検出するために、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、化学発光物質、または他の標識で標識することができる。または、二次抗体または試薬を用いてシグナルを増幅する。そのような試薬は当技術分野で周知である。例えば、一次抗体をビオチンに結合し、西洋ワサビペルオキシダーゼを結合したアビジンを二次試薬として添加することができる。最終的な検出では、ペルオキシダーゼの存在下で変色する基質を用いる。解離した細胞のフローサイトメトリー、顕微鏡観察、エックス線撮影、シンチレーション計数等を含む様々な方法により、抗体結合の有無を検出することができる。

10

【0072】

好ましい態様の説明および添付の特許請求の範囲から、本発明の他の特徴および利点が明らかになるであろう。以下の実施例は説明の目的で提供されるものであり、限定する目的で提供されるものではない。

20

【0073】

実験

実施例1

白血病マウスから骨髓系前駆細胞および造血幹細胞(HSC)を濃縮した集団のソーティングおよび移植

5カラーフローサイトメトリー解析(FACS Vantage)を用いて、白血病マウス骨髓前駆細胞集団を解析およびソーティングし、対照マウスのものと比較した。簡潔に説明すると、大腿骨から骨髓を採取し、25ゲージ針を通すことにより単一細胞懸濁液を作製し、細胞を洗浄した後、CD3、4、8、B220、IL-7受容体、Thy 1.1、Mac-1、Gr-1、およびTer119からなるビオチン化系譜抗体混合物と30分間インキュベートし、その後洗浄してダイナビーズを添加して30分間置いた。次に、DynaI磁気粒子コンセントレータを用いてLin⁺細胞を除去した。抗CD-34 FITC、c-kit APC、Sca-1テキサスレッド、およびFc RIII PEで前駆細胞を30分間染色し、その後アビジンCy5 PEで30分間染色し、最後にヨウ化プロピジウムを添加した。同等数(5000/マウス)のGMP(c-kit⁺ sca⁻ lineage⁻ Fc RIII⁺ CD34⁺)およびHSC(c-kit⁺、Sca1⁺、lineage⁻)細胞を致死未満の照射(380ラド)をした、麻酔した免疫不全(RAG2^{-/-} Fc R^{-/-} またはnu/nu)マウスに眼窩後から移植した。図2に示すように、1°、2°、および3°白血病マウスにおけるHSCおよびGMPの拡大を記載した。

30

【0074】

Mac-1およびGr-1を系譜混合物に含めないこと以外は上記と同様に、lineage⁺細胞を染色した後に、FACS Vantageを用いて白血病マウス骨髓および脾臓の芽球を解析およびソーティングした。細胞を、CD47 FITC、Mac-1 PE、Gr-1テキサスレッド、およびc-kit APCで染色した。図3に示すように、芽球はCD47⁺、Mac-1/Gr-1中程度、c-Kit低度の集団内に濃縮され、連続して移植した白血病マウスの骨髓および脾臓に豊富であった。

40

【0075】

図4に示すように、Mac-1/Gr-1 PEで共染色し、固定(パラホルムアルデヒド)および透過処理した(0.3%サポニン)骨髓または脾臓の細胞内ヒトBcl-2 FITC染色のFACS Scanfor d解析により、移植した細胞の生着を正常対照と比較して評価した。

【0076】

50

骨髄細胞の形質導入

6~10週齢の非白血病Fas^{l^{Pr}/l^{Pr}}-MRP8-Bcl2マウスの大腿骨および頸骨から骨髄を採取した。塩化アンモニウムを用いて赤血球を溶解し、残った細胞をビオチン化抗c-kit抗体およびアビジン複結合磁気ビーズで標識した。次に、Miltenyi MACS磁気精製システムを用いて、c-kit陽性画分を濃縮した。次いでc-kit⁺画分を、メルカプトエタノール、グルタミン酸、および50 ng/ml幹細胞因子を含むX-Vivo15培地中の組織培養に供した。細胞の半分がPGK-カテニン-IRES-GFPレンチウイルスベクターを受け取り、細胞の半分がPGK-IRES-GFPレンチウイルスベクターを受け取った。細胞を一晩インキュベートし、翌日、致死未満の照射(380ラド)をしたRag-/-FcR-/-レシピエントに静脈内注射した。マウス8匹にカテニン形質導入細胞を注射し、マウス8匹に対照ベクター形質導入細胞を注射した。移植してから7~10週間以内に、カテニン形質導入細胞を受け取ったマウス8匹のうち6匹が白血病になった。対照ベクター形質導入細胞を受け取ったマウスは、どれも発病しなかった(20週間後にも生存していた)。白血病マウスの細胞を連続的に移植したところ、三次の移植の時点でレシピエントの著しい割合に白血病が生じた(表1)。

10

【0077】

【表1】

	移植したマウスの数	移植した細胞	白血病マウスの数
1°	8	活性化βカテニンを有するc-Kit+	7
2°	12	全骨髄	6
3°	4	HSC	0
4°	9	GMP	8

20

【0078】

レンチウイルスベクター

所望の配列を保有する遺伝子伝達ベクターをウイルス粒子にパッケージングし、適切なパッケージング分子を発現するプラスミドと共にトランスフェクションして293T細胞の上清に分泌させた。これらの実験で用いた2つのベクターは、カテニン-IRES-GFPまたは対照としてのIRES-GFPのみの発現を駆動するヒトホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)プロモーターを含んだ。第3のベクターは、GFPの発現を駆動するLEF/TCF応答プロモーターを含んだ。LEF/TCF応答エレメントは、以下の配列(配列番号:13)

30

CAGCTGAAGCTTGCATGCCTGCAGGATCAAAGGGGGTAAGATCAAAGGGGGTAAGATCAAAGGTCTAG

1 2 3

AGGGTATATAATGGATCCGGTA

を有する。結合部位(1、2、および3)を下線で示し、TATAボックスも同様に示す。

【0079】

実施例2

正常対白血病細胞によるカテニン発現の解析

40

正常もしくはCMLの末梢血または骨髄からフィコール濃縮した単核集団、およびCML急性転化細胞株K562を、抗カテニンAlexa-594(赤)結合抗体で染色し、かつ核の可視化のためにヘキスト(Hoechst)(青)で対比染色し、次にデュアルフォトZeiss LSM共焦点蛍光顕微鏡により、カテニンの細胞質対核局在について解析した。正常細胞と比較して、K562およびCML単核細胞では、細胞質および核の両方のカテニン発現が高かった。

【0080】

ヒト造血幹細胞および骨髄系前駆細胞集団を染色し、以前に記載された方法(ManzらP.N.A.S.(2002)99:11872-11877)を改変して用いて、FACS Vantageにより解析およびソートした。簡潔に説明すると、単核およびCD34+正常、またはCML慢性期(CP)、加速期(AP)、もしくは急性転化(BC)末梢血および骨髄細胞を、Cy-5 PE標識抗体を用いてCD2、

50

3、4、7、8、10、11b、14、19、20、56、およびグリコホリンAを含む系譜マーカーの発現について染色し、その後骨髄系前駆細胞についてCD34 APC、CD38ビオチン、IL-3R PEで、HSCについてCD90 PEで染色し、最終的にストレプトアビジン・テキサスレッドによりCD38ビオチン標識細胞を検出した。図5および図6にこれを示す。細胞をパラホルムアルデヒド(4%)で固定した後に透過処理し(0.3%サポニン)、抗カテニンFITCで一晩染色した。

【0081】

正常対白血球細胞のレンチウイルス形質導入後のLEF/TCF-GFP発現

HSCおよび前駆細胞集団を染色し、以前に記載されたように(Manzら PNAS (2002) 99巻;11872-11877)、FACS Vantageを用いて解析およびソーティングした。造血幹細胞および前駆細胞集団を、(10%ウシ胎児血清、グルタミン、抗生物質(Pen-Step)、ならびに、IL-6(10 ng/ml)、Flt3リガンド(50 ng/ml)、幹細胞因子(SCF; 50 ng/ml)、およびトロンボポエチン(TPO; 10 ng/ml)を含むサイトカインを添加した)イスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)150 μ lを含む96ウェルプレートに直接クローンソーティングした(200細胞/ウェル~1000細胞/ウェル)。LEF/TCF-IRES-GFPベクター(1/100)をウェルに添加しまたはベクターを添加せず、細胞を37、7% CO₂インキュベーター中で7日間~10日間インキュベートし、その後倒立蛍光顕微鏡を用いてGFP発現を定量的に解析し、FACS解析(FACS Vantage)によりGFP発現を定量的に解析した。データを図7に示す。

10

【0082】

実施例3

インビボのHSCは通常、LEF/TCFエレメントを介してシグナル伝達する

20

インビボのHSCがWnt/Fzd/カテニン経路に関連したシグナルを利用するか否かを判定した。ソーティングしたKTLS HSCに、不安定化GFP発現を駆動するLEF-1-TCFレポーター(TOP-dGFP)を有するベクター、またはLEF/TCF結合部位に変異を有する対照レポーター構築物(FOP-dGFP)感染させ、致死的に照射したマウスに移植した。次に照射したレシピエントマウスの群にHSCを移植し、14週間後にレシピエントの骨髄を調べて、ドナーHSCがレポーター活性を示すかどうかを判定した。示した代表的な例では、レシピエントマウスのHSCはGFPに対して陰性であったのに対し、TOP-dGFPで感染したドナー由来のHSCは細胞の29%においてGFPを発現することが認められた。さらに、対照FOP-dGFPレポーターを形質導入したHSCは2.5%しかGFPを発現せず、このことから、KTLS HSCがGFPを発現するには、機能的なLEF-TCF結合部位が特異的に必要であることが実証された。

30

【0083】

精製した野生型HSCをFACSによりソーティングし、2つのレンチウイルスレポーター構築物のうちの一方を感染させた：一方は不安定化GFPに連結したLEF-TCF結合部位を含み(TOP-dGFP)、もう一方は不安定化GFPに連結した変異型LEF-TCF結合部位を含む(FOP-dGFP)。感染から6時間後、致死的に照射した3匹のレシピエントマウスにHSCを移植し、14週間後に解析した。アロタイプマーカーCD45(Ly5)を用いて、ドナー由来のHSCを含む集団を宿主由来のHSCを含む集団から識別した。対照としての、変異型LEF-TCFレポーターを有するドナー由来HSCおよびレシピエントマウスHSCは、GFP陰性であることが認められた。不安定化GFP(TOP-dGFP)または非不安定化GFP(TOP-GFP)に連結したLEF-TCFレポーターで感染した精製HSCを、インビトロにおいて対照培地または100 ng/mlのWnt3Aで刺激し、FACS解析によりGFP発現の程度をモニタリングした。

40

【0084】

カテニンはHSCにおいてHoxB4およびNotch1をアップレギュレートする

活性化カテニンを発現するHSCが、どちらも以前にインビトロおよびインビボアッセイにおいてHSC増殖および自己複製に関与していた遺伝子である、HoxB4およびNotch1をアップレギュレートするかどうかを試験した。カテニンまたは対照ベクターを感染させたHSCに対してリアルタイムPCR解析を用いて、HoxB4が平均して3.5倍、Notch1が2.5倍アップレギュレートされたことを見出した。一方、GAPDH発現はカテニン発現の結果差次的に制御されず、これを対照として用いた。これらのデータから初めて、HSC自己複製の制御因子としてこれまでに同定された遺伝子が、分子階層に関連し、おそらく分子階層にお

50

いて作用することが示される。

【0085】

方法

マウス

C57Bl/Ka Ly5.1、Thy1.1、C57Bl/Ka Ly5.2、Thy1.1マウス、およびAKR/JマウスをSPF施設で飼育し、6週～10週齢で使用した。動物飼育施設において酸性水でマウスを飼育および維持した。

【0086】

HSCの単離

Domenら (2000) J Exp Med 191:253-64に記載されるように、抗体を用いてマウス骨髄からHSCをソーティングした。すべての細胞ソーティングおよびFACS解析は、スタンフォード共有FACS施設およびデューク癌センターFACS施設においてFACS Vantage (Becton Dickinson) により実施した。c-kit、Sca-1の発現、低レベルのThy1.1、および低レベルから陰性レベルの系譜マーカー(Lin)に基づき、細胞をソーティングおよび再解析した。

【0087】

細胞周期解析

レトロウイルスで形質導入したHSCを培養物から回収し、ヘキスト培地中で、ヘキスト3342 (Molecular Probes) を用いて37℃で45分間染色した。次に細胞を洗浄し、フローサイトメトリーにより解析して、GFP⁺細胞の細胞周期特性を決定した。

【0088】

レトロウイルスの産生および感染

gag-polおよびVSVG構築物と共にMSCV構築物を用いて293T細胞を3回トランスフェクションすることにより、ウイルスを産生させた。ウイルス上清を3日間回収し、50,000gで超遠心することにより100倍濃縮した。ウイルス感染には、10,000個のHSCを96ウェルプレートのウェルにソーティングし、SLF(30 ng/ml) (R&D systems) の存在下で一晩培養した。12時間後、濃縮したレトロウイルス上清を細胞に1:1比で添加した。次に細胞を37℃で12時間インキュベートし、37℃で36時間インキュベートし、インビトロ用およびインビボアッセイ用にGFP⁺細胞をソーティングした。用いたレンチウイルスは、以下のレンチウイルスレポーターアッセイにおいて記載するように産生させた。

【0089】

インビトロHSC増殖アッセイ

新鮮に精製したまたはウイルスにより形質導入したHSCを、単一細胞沈着ユニットおよびクローンサイクル・ソフトウェア (Becton Dickinson Immunocytometry systems) を用いて、Terasakiプレートのウェル当たり1個～20個細胞でプレーティングした。5×10⁻⁵ M 2-メルカプトエタノールおよび示した増殖因子を添加した無血清培地 (X-vivo 15、BioWhittaker) を含むウェルに、細胞をソーティングした。所定の間隔で各ウェル内の細胞数を計数することにより、増殖をモニタリングした。長期培養については、形質導入したHSCをSLF(1 ng/ml)の非存在下または存在下で96ウェルプレートにプレーティングし、所定の間隔で細胞計数することにより生じた細胞の数をモニタリングした。長期培養物については、10,000個の形質導入HSCをSLF(1 ng/ml)の非存在下または存在下で96ウェルプレートにプレーティングし、所定の間隔で細胞計数することにより生じた細胞の数をモニタリングした。

【0090】

HSC機能のインビボ解析

ウイルスにより形質導入したHSCをインビトロで培養し、200kV X線機器を用いて9.5 Gyで照射した4匹～6匹のレシピエントマウスの群に、300,000個のレスキュー宿主全骨髄またはSca-1欠乏細胞と共に、眼窩後から注射した。照射後、宿主マウスに抗生物質水 (1.1 g/L硫酸ネオマイシンおよび106 U/L硫酸ポリミキシンB) を与えた。移植したマウスから定期的に採血し、ドナー細胞によって寄与された造血区画の割合を測定した。ドナーおよび宿主細胞は、CD45(Ly5)の対立遺伝子発現またはBC12導入遺伝子の発現により識別した

10

20

30

40

50

。

【0091】

レンチウイルスレポーターアッセイ

ベクターの産生

EGFPまたはd2-EGFP遺伝子（不安定化、半減期2時間；Clontech）を、3つのLEF/TCF結合モチーフおよび1つのTATAボックスを含む、LEF/TCF応答プロモーター（Korinekら（1997）*Science* 275:1784-1787）の下流にクローニングした。次に、このカセットを自己不活性化レンチウイルスベクタープラスミド（Follenziら（2000）*Nat Genet* 25:217-22）にクローニングした。以前に記載されているように、ベクター保存液を調製し濃縮した。簡潔に説明すると、293T細胞に、伝達ベクタープラスミド、VSV-GエンベロープコードプラスミドpMD.GおよびパッケージングプラスミドCMV R8.74をトランスフェクションした。上清を回収して超遠心し、ベクターのペレットを少量のPBS/0.1% BSA中に懸濁した。類似の構築物をトランスフェクションし、それにコードされる遺伝子が非分裂HSCにおいて発現されることが示されている（Uchidaら（1998）*Proc Natl Acad Sci* 95:11939-44）。

10

【0092】

LEF-TCFレポーターのインビボ読み出し

以前に公表された方法により、HZ/Ly5.2/Thy1.1マウスから、二重ソーティングしたKTL S HSCを精製した。グルタミン酸、メルカプトエタノール、pen/strep、および、10 ng/ml IL-11、10 ng/ml TPO、50 ng/ml SCF、50 ng/ml Flt-3Lからなるサイトカイン混合物を含むX-Vivo15中で、細胞をインキュベートした。細胞を37℃、7% CO₂で6時間～一晩インキュベートし、致死的に照射したコンジェニックレシピエント（BAまたはB6/Ka）に移植した。致死的に照射したマウスはそれぞれ、レシピエント系統の3×10⁵個の骨髓単核細胞と共に、500個の形質導入HSCを受け取った。14週間を超える期間が過ぎた後（14週間～24週間の範囲）、マウスを解析した。解析するには、骨髓を採取し、AutoMACSを用いてc-kit+細胞を濃縮した。次にKit+画分を、Cy5-PE結合系譜混合物（CD3、CD4、B220、Gr-1、Mac-1、Ter119）、PE結合Ly5.2、APC結合c-kit、およびTR結合Sca-1で染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

20

【0093】

LEF-TCFレポーターのインビトロ読み出し

BAマウスからKTL S HSCを精製し、培地中に（上記のようにIL-11、TPO、SCF、およびFlt-3Lを添加したIMDM/10% FBS）直接二重ソーティングした。ウェル当たり500細胞～1000細胞で、細胞を96ウェルプレートに分注した。OT-GFPベクターを1:100希釈で適切なウェルに添加した。Wnt3aを、CTD, Inc.のランダムメチル化 シクロデキストリンの存在下で、1:1000希釈で適切なウェルに添加した。Wnt3aを受け取らないウェルは、代わりに1:1000 CHAPSを受け取った。5日後に細胞を回収し、PIで染色して非生細胞を排除し、GFP発現について解析した。

30

【0094】

リアルタイムPCR解析

75,000個の野生型HSCを、カテニン-IRES-GFPまたは対照IRES-GFPレンチウイルスと共に培養した。培養してから2日後、GFP発現に基づいて感染細胞を単離した。Trizol（登録商標）（Invitrogen）を用いてRNAを調製し、改良Eberwine合成を用いてリニア増幅した。SuperScript（商標）II逆転写酵素（Invitrogen）を用いて、各500 ngの増幅RNAを第一鎖に変換し、リアルタイムPCRにより差次的遺伝子発現を解析した。cDNAをFastStart Master SYBR Greenポリメラーゼ混合物（Roche）、ならびにGAPDH用（フォワード 配列番号: 6; 5'-CCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG および

40

リバーズ 配列番号:7; 5'-AGAGTGGGAGTTGCTGTTGAAGTC)

、HoxB4用

（フォワード 配列番号:8, 5'-GCACGGTAAACCCCAATTA および

リバーズ 配列番号:9; 5'-GGCAACTTGTGGTCTTTTTT)

50

、およびNotch1用
(フォワード 配列番号:10; 5'-GCAGCCACAGAAGCTTACCACTCCAG および
リバース 配列番号:11; 5'-TAAATGCCTCTGGAATGTGGGTGAT)

のプライマーと混合した。LightCycler(登録商標) (Roche) を用いてリアルタイムPCRを行い、LightCycler(登録商標)ソフトウェアを用いてリアルタイムデータを解析した。

【0095】

本明細書で言及した出版物および特許出願はすべて、個々の出版物または特許出願が詳細にかつ個別に参照として組み入れられることが示されるのと同程度に、参照として本明細書に込みこまれる。

【0096】

ここで、本発明は十分に説明されるが、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなく多くの変更および修正がなされ得ることは、当業者に明白であろう。

【図面の簡単な説明】

【0097】

【図1】図1Aおよび図1Bは、カテニン(1); および カテニン応答性転写制御エレメントに機能的に連結された検出可能なマーカー(3)を発現させるためのレンチウイルスベクターを説明する概略図である。

【図2】対照動物由来の細胞および カテニン形質転換細胞を移植した動物由来の細胞を比較するFACsプロットである。

【図3】カテニンを含む白血病芽球の特徴づけである。

【図4】正常細胞と カテニン移植細胞との比較である。

【図5】CML骨髓系前駆細胞による カテニン発現の増加を示す。

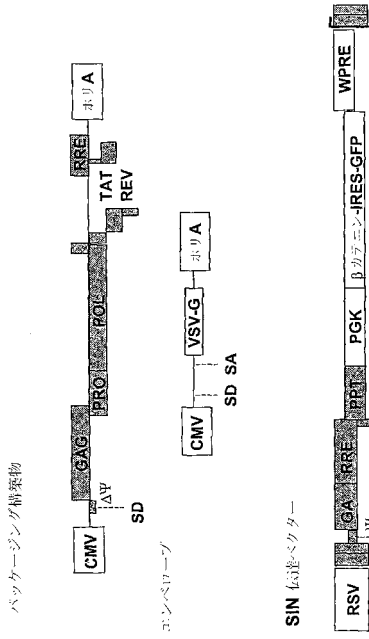
【図6】グリーベック処理後のCML CD34⁺前駆細胞による カテニン発現の減少を示す。

【図7】CML前駆細胞(顆粒球骨髓系前駆細胞)における カテニン応答性エレメントの制御下でのマーカー遺伝子発現の増加を示す。

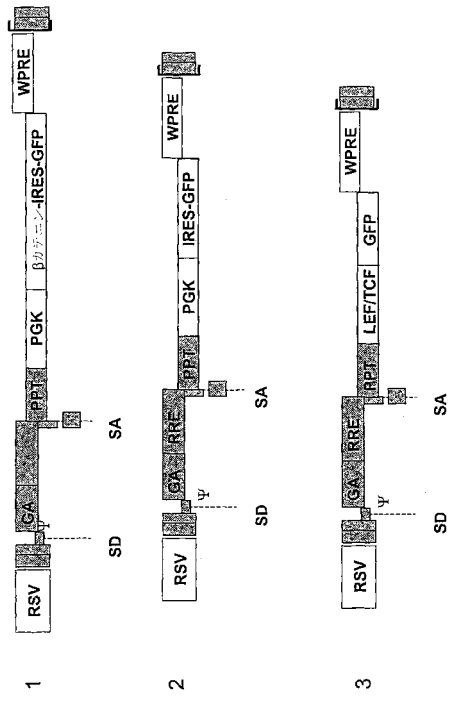
10

20

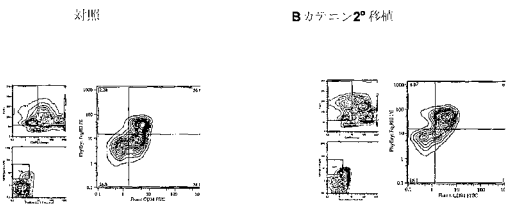
【 図 1 A 】



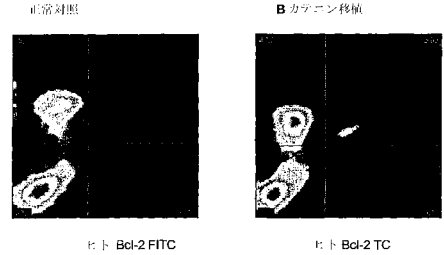
【 図 1 B 】



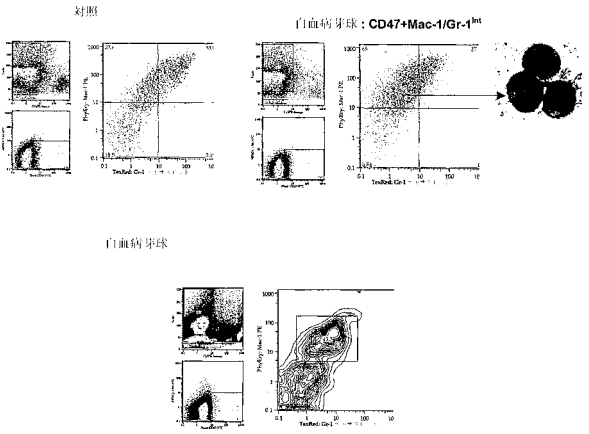
【 図 2 】



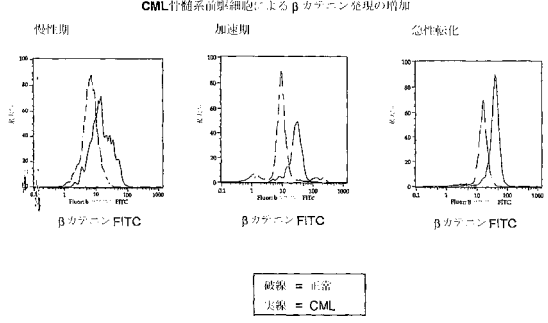
【 図 4 】



【 図 3 】

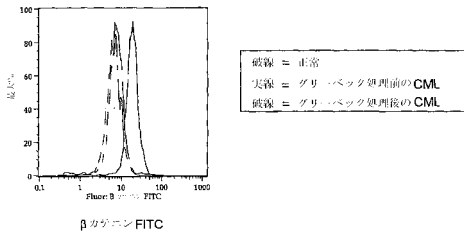


【 図 5 】



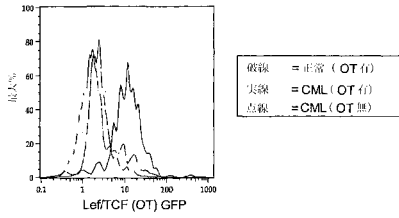
【 図 6 】

グリヘック処理後のCML CD34+ 前駆細胞によるβカゲニン発現の減少



【 図 7 】

CML GMPにおけるLEF/TCF-GFPの増殖



【 配列表 】

[2005528115000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/17289
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A01N 1/00, 1/02; C12N 5/00 US CL : 435/ 1.1, 325 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) U.S. : 435/ 1.1, 325		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched US provisional application 60/431,655		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, Medline		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XU et al. WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene. Genes and Development. 1999, Vol. 126, pages 2285-2298, entire reference.	1-11
Y	ZHU et al. Beta-catenin signalling modulates proliferative potential of human epidermal keratinocytes independently of intercellular adhesion. Development. 1999, Vol. 126, pages 2285-2298, entire reference.	1-11
A,P	US 6,465,249 B2 (REYA et al.) 15 October 2002 (15.10.2002), entire reference.	1-11
Y --- A	DASGUPTA et al. Multiple roles for activated LEB/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. Development. 1999, Vol. 126, pages 4557-4568, entire reference.	1-11 ----- 1-11
A,P	REYA et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature. 22 May 2003, Vol. 423, pages 409-414, entire reference.	1-11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 03 February 2004 (03.02.2004)		Date of mailing of the international search report 09 APR 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Joseph V. Weitach</i> Joseph V. Weitach Telephone No. (571)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
 G 0 1 N 33/50 C 1 2 N 5/00 B

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 エレス ローリエ エリザベス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 スタンフォード パソロジ 5 3 2 4 スタンフォード
 ユニバーシティー

(72)発明者 レヤ タニシュタ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 マウンテン ビュー ウェスト ミドルフィールド # 2 0
 0 7 7 7

(72)発明者 ワイスマン アービング エル.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 レッドウッド シティ ジェファーソン アベニュー 4 1
 4 7

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB20 CB01 CB02 DA36 DA77 DA78 FB12
 4B024 AA01 AA11 AA12 CA01 CA11 DA03 EA04 FA10 GA11 HA14
 4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ13 QQ52 QQ79 QR08
 QR32 QR56 QR62 QR69 QR77 QR80 QS25 QS34 QX02
 4B065 AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA25 CA24 CA44
 CA46