

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年10月6日(06.10.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/159376 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/02 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/060974
- (22) 国際出願日: 2016年4月1日(01.04.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-077264 2015年4月3日(03.04.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP). 中外製薬株式会社(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 山田 泰広(YAMADA, Yasuhiro); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 嵯 克憲(SEMI, Katsunori); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). ウォルツェン、クヌート(WOLTJEN, Knut); 〒6068501 京都府京都市左京区

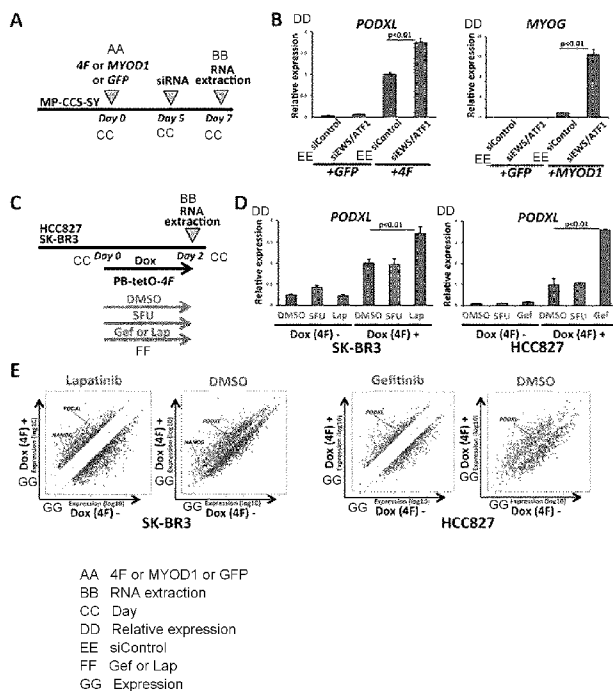
吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 松田 穰(MATSUDA, Yutaka); 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP).

- (74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR SCREENING FOR CANCER THERAPEUTIC AGENT

(54) 発明の名称: がんの治療薬のスクリーニング方法



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a method for screening for a cancer therapeutic agent, which is a molecule targeting drug capable of targeting any one of great many target protein candidates, among from the target protein candidates without requiring the identification of a true target protein. The present invention can solve the above-mentioned problem by providing a method for screening for a cancer therapeutic agent, said method comprising the steps of: (i) allowing an exogenous cell regulation factor to be expressed in a cancer cell of interest while contacting or non-contacting the exogenous cell regulation factor with a test substance; (ii) confirming the change in the cancer cell; and (iii), when the change in the cancer cell under the contact with a test substance is increased compared with that under the non-contact with the test substance, selecting the test substance as a cancer therapeutic agent.

(57) 要約: 本発明は、膨大な数の標的タンパク質の候補の中から、真の標的タンパク質を同定することなく、いずれかのタンパク質を標的とする分子標的薬としてのがん治療薬をスクリーニングする方法を提供することを目的とする。本発明は、(i) 対象となるがん細胞内で、被験物質との接触下または非接触下で、外因性の細胞制御因子を発現させる工程、(ii) がん細胞の変化を確認する工程、および (iii) 被験物質との接触下において、非接触下と比較してがん細胞

の変化が増加した場合、当該被験物質をがんの治療薬として選出する工程を含む、がんの治療薬をスクリーニングする方法を提供することにより、上記課題を解決する。

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

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： がんの治療薬のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、がんの治療薬をスクリーニングする方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、がん治療において、分子標的薬、すなわち、がん細胞の増殖・進展に関わる重要な細胞内シグナルに関係するタンパク質を直接標的とした治療薬が有効であることが多く示されており、新規な創薬標的となり得るタンパク質の探索が盛んにおこなわれている。がん治療の標的候補タンパク質として、がん細胞で特有あるいは過剰に発現している遺伝子によってコードされるタンパク質が例示される。マイクロアレイ法などの網羅的解析により、このような標的候補タンパク質をコードする遺伝子を多く見出すことは可能であるが、その中から実際にがん治療の標的となり得るタンパク質をコードする真の標的遺伝子を特定するには過度の実験を要する。

[0003] また、体細胞を初期化する技術が開発され、がん細胞を初期化する試みがなされているが（非特許文献1）、このような試みは、がん細胞そのものの性質を変えることに主眼が置かれており、がん細胞の初期化を利用したがんの治療薬のスクリーニングについての報告はない。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Kosaka T, et al, Cancer Sci. 104:1017-1026, 2013

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の課題は、がんの治療薬をスクリーニングする方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、がん細胞を

初期化又は別の細胞種に直接分化誘導する際に、既知標的遺伝子（即ち、がん細胞の増殖・進展に関わる重要な細胞内シグナルに関係することが既知のタンパク質をコードする遺伝子）の発現を抑制すると、初期化又は分化が亢進すること、言い換えれば、これらの標的遺伝子にコードされるタンパク質は、がん細胞としての特徴を維持し、がん細胞の運命変更を抑制する作用があることを見出した。さらに、既存の分子標的薬の標的タンパク質を発現するがん細胞に、該分子標的薬との接触下で初期化因子を導入したところ、薬剤非接触下で初期化した場合に比べて、初期化の程度が亢進されていることを確認した。従って、有効な標的タンパク質が既知のがん細胞と被験物質とを接触させた状態で当該がん細胞を初期化又は別の細胞種に直接分化誘導し、初期化又は分化が亢進した場合、当該被験物質が当該標的遺伝子の活性を抑制する機能を有すると確認できることが明らかとなった。また、任意のがん細胞を対象とした場合でも、被験物質が当該がん細胞の初期化又は分化を亢進させた場合、当該被験物質は、当該がん細胞の増殖・進展に関わる細胞内シグナルに関係する何らかのタンパク質の活性を抑制する機能を有すると推定できるので、標的タンパク質（標的遺伝子）を同定することなく、がん治療薬の候補物質を直接スクリーニングすることが可能となる。

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

[0007] すなわち、本発明は以下の方法を提供する。

[1] 下記の工程を含む、がんの治療薬をスクリーニングする方法；

(i) 対象となるがん細胞内で、被験物質との接触下または非接触下で、外因性の細胞制御因子を発現させる工程、

(ii) がん細胞の変化を確認する工程、および

(iii) 被験物質との接触下において、非接触下と比較してがん細胞の変化が増加した場合、当該被験物質をがんの治療薬として選出する工程。

[2] 前記細胞制御因子が、初期化因子であり、前記がん細胞の変化が、がん細胞の初期化である、[1]に記載の方法。

〔３〕前記初期化因子が、Oct3/4、Sox2、Klf4およびc-Mycである、〔２〕に記載の方法。

〔４〕前記がん細胞の初期化が、未分化特異的抗原が陽性である細胞数、または当該がん細胞における未分化特異的遺伝子の発現量を指標として評価される、〔２〕または〔３〕に記載の方法。

〔５〕前記未分化特異的遺伝子が、Nanog、Epcam、Cdh1、Fbxo15、PODXLおよびGDF3から選択される１以上の遺伝子である、〔４〕に記載の方法。

〔６〕前記がん細胞の初期化が、形成されるコロニー数を指標として評価される、〔２〕または〔３〕に記載の方法。

〔７〕前記細胞制御因子が、MyoD1であり、前記がん細胞の変化が、がん細胞から筋管細胞への変化である、〔１〕に記載の方法。

〔８〕前記がん細胞から筋管細胞への変化が、ミオゲニン（myogenin）またはミオシン重鎖（myosin heavy chain）の発現量を指標として評価される、〔７〕に記載の方法。

〔９〕下記の工程を含む、がん治療薬の創薬標的となり得るタンパク質の同定方法：

（i）被験タンパク質をコードする遺伝子を、発現制御可能な形態で含むがん細胞内で、該遺伝子を発現する条件下または該遺伝子の発現が抑制された条件下で、外来性の細胞制御因子を発現させる工程、

（ii）がん細胞の変化を確認する工程、および

（iii）該遺伝子の発現が抑制された条件下において、該遺伝子を発現する条件下と比較してがん細胞の変化が増加した場合、当該被験タンパク質をがんの治療薬の創薬標的となり得るタンパク質として選出する工程。

発明の効果

[0008] 本発明により、標的遺伝子を同定する必要がなく、分子標的薬となるがんの治療薬を直接スクリーニングすることが可能となる。また、本発明により、がん細胞に対する高い効果を有するがんの治療薬をスクリーニングすることが可能となる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1] 図1 Aは、EWS/ATF1の発現誘導と初期化因子の導入の方法を記載した概略図を示す。図1 Bは、EWS/ATF1を発現誘導した (DOX 0.2 μ g/ml) 場合または誘導しなかった (DOX 0 μ g/ml) 場合における初期化因子の導入後のサルコーマ細胞株G1297の位相差顕微鏡像を示す。図1 Cは、EWS/ATF1を発現誘導した (DOX 0.2または0.1 μ g/ml) 場合または誘導しなかった (DOX 0 μ g/ml) 場合における初期化因子の導入後のコロニー形成数を測定した結果を示す。図1 Dは、サルコーマ細胞株G1297から樹立したiPS細胞株 (C-1、C-2、C-3およびC-4) へ0.2 μ g/mlのDOX添加によるEWS/ATF1の発現誘導をRT-PCRで確認した結果を示す。図1 Eは、サルコーマ細胞株G1297および同細胞株から樹立したiPS細胞株における染色体マイクロアレイ (CGHアレイ) 解析の結果を示す。図1 Fは、iPS細胞株 (C-1、C-2、C-3およびC-4) におけるNanogの発現をRT-PCRで測定した結果 (左図) およびiPS細胞株をNanogおよびDAPIで染色した染色像 (右図) を示す。図1 Gは、サルコーマ細胞株G1297から樹立したiPS細胞をヌードマウスの皮下に移植して形成されたテラトーマの染色像を示す。図1 Hは、サルコーマ細胞株G1297から樹立したiPS細胞を胚盤胞へ注入し、発生したキメラマウスの写真を示す。図1 Iは、サルコーマ細胞株G1297へ初期化因子 (4F) 導入後4日目にEWS/ATF1を発現誘導した (DOX 0.2または0.1 μ g/ml) 場合または誘導しなかった (DOX 0 μ g/ml) 場合における4F導入後10日目にSS EA1の陽性率を測定したFACSの結果を示す。図1 Jは、マウス胚性線維芽細胞 (MEF) へ初期化因子 (4F) 導入後4日目にEWS/ATF1を発現誘導した場合 (DOX 0.2または0.1 μ g/ml) または誘導しなかった (DOX 0 μ g/ml) 場合における4F導入後10日目にSSEA1の陽性率を測定したFACSの結果を示す。図1 Kは、サルコーマ細胞株G1297へ初期化因子 (4F) 導入またはGFP導入後4日目にEWS/ATF1を発現誘導した (ON) 場合または誘導しなかった (OFF) 場合において、4F導入またはGFP導入後6日目の細胞から回収したRNAを用いてマイクロアレイ解析をした結果を示す。図1 Lは、EWS/ATF1の発現誘導とMYOD1を導入する方法を記載した概略図を示す。図1 Mは、サルコーマ細胞株G1297へMYOD1導入した細

胞においてEWS/ATF1を発現誘導した（ON）場合または誘導しなかった（OFF）場合でのMyogeninの発現をRT-PCRで測定した結果を示す。図1Nは、サルコーマ細胞株G1297へMYOD1導入した細胞においてEWS/ATF1を発現誘導した（ON）場合または誘導しなかった（OFF）場合において、Myosin heavy chain（MHC）およびDAPIで染色した染色像（左図）およびMyosin heavy chainの発現をRT-PCRで測定した結果（右図）を示す。図1Oは、サルコーマ細胞株G1297へMYOD1導入またはGFP導入後4日目にEWS/ATF1を発現誘導した（ON）場合または誘導しなかった（OFF）場合において、MYOD1導入またはGFP導入後6日目の細胞から回収したRNAを用いてマイクロアレイ解析をした結果を示す。

[図2]図2Aは、MP-CCS-SY細胞株へ初期化因子、MYOD1またはGFPおよびsiRNAの導入の方法を記載した概略図を示す。図2Bは、MP-CCS-SY細胞株へ初期化因子（+4F）またはGFPを導入した場合における、RNAiによりEWS/ATF1を発現抑制した（siEWS/ATF1）場合または発現抑制しなかった（siControl）場合でのPODXLの発現をRT-PCRで測定した結果（左図）、およびMP-CCS-SY細胞株へMYOD1またはGFPを導入した場合における、RNAiによりEWS/ATF1を発現抑制した（siEWS/ATF1）場合または発現抑制しなかった（siControl）場合でのMyogeninの発現をRT-PCRで測定した結果（右図）を示す。図2Cは、HCC827またはSK-BR3細胞株へ初期化因子の導入および各薬剤の添加方法を記載した概略図を示す。図2Dは、SK-BR3細胞株へ初期化因子を導入した（Dox(4F)+）場合または導入しなかった（Dox(4F)-）場合におけるDMSO、5FUまたはLapatinib（Lap）を添加した場合でのPODXLの発現をRT-PCRで測定した結果（左図）およびHCC827細胞株へ初期化因子を導入した（Dox(4F)+）場合または導入しなかった（Dox(4F)-）場合におけるDMSO、5FUまたはGefitinib（Gef）を添加した場合でのPODXLの発現をRT-PCRで測定した結果（右図）を示す。図2Eは、SK-BR3細胞株へ初期化因子を導入した（Dox(4F)+）場合または導入しなかった（Dox(4F)-）場合における、Lapatinib（Lap）またはDMSOを添加した場合でのマイクロアレイ解析の結果（左図）、およびHCC827細胞株へ初期化因子を導入した（Dox(4F)+）場合または導入しなかった（Dox(4F)-）場合におけるGefitin

ib (Gef) またはDMSOを添加した場合でのマイクロアレイ解析の結果 (右図) を示す。

[図3]図3Aは、サルコーマ細胞株G1297へドキシサイクリン (DOX) 0、0.1、0.2、1または2 μ g/mlを添加して培養した際の増殖曲線を示す。図3Bは、サルコーマ細胞株G1297へ初期化因子を導入した (+4F) 場合または導入しなかった (-4F) 場合において、EWS/ATF1を発現誘導した (ON) 場合または誘導しなかった (OFF) 場合でのOct3/4量をウェスタンブロッティング法で測定した結果を示す。図3Cは、EWS/ATF1を発現誘導しなかった (DOX 0 μ g/ml) 場合における初期化因子の導入後に樹立されたiPS細胞の位相差顕微鏡像を示す。図3Dは、サルコーマ細胞株G1297においてEWS/ATF1を発現誘導した (ON) 場合または誘導しなかった (OFF) 場合でのOct3/4およびNanogの発現量をRT-PCR法で測定した結果を示す。図中、ESC (ES細胞) は陽性対照として用いた。図3Eは、EWS/ATF1の発現誘導と初期化因子の導入の方法を記載した概略図を示す。図3Fは、サルコーマ細胞株G1297へ初期化因子を導入した (+4F) 場合または導入しなかった (GFP) 細胞において、EWS/ATF1を発現誘導した (ON) 場合または誘導しなかった (OFF) 場合でのCadh1 (左図) およびEpcam (右図) の発現をRT-PCRで測定した結果を示す。

[図4]図4Aは、初期化因子を導入するためのPiggyBacベクターのコンストラクトおよびSK-BR3へ導入後の細胞の位相差像および蛍光像を示す。図4Bは、A549細胞株へ初期化因子を導入した (Dox(4F)+) 場合または導入しなかった (Dox(4F)-) 場合における、DMSO、5FU (1mMまたは10mM) またはGefitinib (Gef) (10mMまたは50mM) を添加した場合でのPODXLの発現をRT-PCRで測定した結果を示す。

[図5]図5Aは、HCC827およびSK-BR3へのDox添加による初期化因子の誘導と、抗がん剤 (Gefitinib、Imatinib、Lapatinib、5-FU) の導入の方法を記載した概略図を示す。図5Bは、HCC827およびSK-BR3へ初期化因子を誘導した (Dox (4F)+) 場合における、Gefitinib (0 μ M(DMSOを添加)、0.005 μ Mまたは0.05 μ M)、Imatinib (0 μ M(DMSOを添加)、1 μ Mまたは10 μ M)、Lapatinib (0 μ

M(DMSOを添加)、 $0.05\mu\text{M}$ または $0.5\mu\text{M}$ または5-FU ($0\mu\text{M}$ (DMSOを添加)、 $10\mu\text{M}$ または $50\mu\text{M}$) を添加した場合でのNanogおよびGDF3の発現をRT-PCRで測定し、転写レベルをGAPDH値で標準化した結果を示す。

[図6]図6は、マウスサルコーマ細胞株G1297へEWS/ATF1を発現誘導した (Dox ON) 場合または誘導しなかった (DoxOFF) 場合において、それぞれ初期化因子を導入 (+4F) または導入しなかった場合での第6染色体のNanog遺伝子座におけるRNA-seq解析の結果を示す。

[図7]図7Aは、レポーター細胞作製のターゲティングベクターのコンストラクト、およびそのコンストラクトを、TALENを用いたゲノム編集技術により、ヒト胎児腎臓由来のHEK293細胞のPPP1R2C遺伝子座に導入する方法を記載した概略図を示す。図中、hRLは合成ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を示し、TagBFPは青色蛍光タンパク質遺伝子を示し、PuroRはピューロマイシン耐性遺伝子を示す。また、LHAおよびRHAはそれぞれ左側と右側のホモロジーアーム(homology arm)を示す。図7Bは、図7Aのコンストラクトを用いて行ったルシフェラーゼアッセイの概要図 (左図) およびその結果を示す (右図)。グラフの横軸は細胞の数を示し、縦軸はルシフェラーゼの相対的な発光強度を示す。

[図8]図8は、レポーター細胞作製のターゲティングベクターのコンストラクト、およびそのコンストラクトを、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術により、マウスがん細胞のNanog遺伝子座に導入する方法を記載した概略図を示す。図中、Luc2はホタルルシフェラーゼ遺伝子を示し、GFPは緑色蛍光タンパク質遺伝子を示し、NeoRはネオマイシン耐性遺伝子を示す。また、Roxは部位特異的組換え酵素Dreの標的配列を示し、sgRNAは一本鎖ガイドRNAを示す。

[図9]図9は、レポーター細胞作製のターゲティングベクターのコンストラクト、およびそのコンストラクトを、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術により、マウスがん細胞のNanog遺伝子座に導入する方法を記載した概略図を示す。図中、secNlucは分泌型のNanoLuc™ルシフェラーゼ遺伝子を示し、BsdRはブラストサイジン耐性遺伝子を示す。

[図10]図10は、レポーター細胞作製用のターゲティングベクターのコンストラクト、およびそのコンストラクトを、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術により、ヒトがん細胞のNanog遺伝子座に導入する方法を記載した概略図を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明は、下記の工程を含む、がんの治療薬をスクリーニングする方法を提供する；

(i) 対象となるがん細胞内で、被験物質との接触下または非接触下で、外因性の細胞制御因子を発現させる工程、

(ii) がん細胞の変化を確認する工程、および

(iii) 被験物質との接触下において、非接触下と比較してがん細胞の変化が増加した場合、当該被験物質をがんの治療薬として選出する工程。

[0011] がん細胞

本発明において、がんとは、悪性腫瘍を意味し、癌腫（上皮細胞由来の悪性腫瘍）、肉腫、その他白血病などを含み、特定のがんに限定されない。また、本発明で用いるがん細胞とは、悪性腫瘍を構成する細胞であり、株化された細胞であっても生体内から単離された細胞であってもよい。また、本発明で用いるがん細胞は、有効な標的タンパク質が既知（即ち、ある既存の分子標的薬に対して感受性であることが既知）のがん細胞（例えば、EWS/ATF1融合遺伝子強制発現がん細胞、ゲフィチニブ感受性の変異EGFR発現がん細胞、ラパチニブ感受性のHER2-増幅がん細胞、アレクチニブ感受性のEML4-ALK融合遺伝子発現がん細胞、イマチニブ感受性の慢性骨髄性白血病細胞など）であってもよいし、有効な標的タンパク質が不明のがん細胞であってもよい。

[0012] 本発明のスクリーニング方法に使用するがん細胞は、レポーター遺伝子を含有していてもよい。レポーター遺伝子の例としては、ルシフェラーゼ遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、および薬剤耐性遺伝子などが挙げられるが、これらに限定されない。ルシフェラーゼ遺伝子として、ホタルルシフェラーゼ遺伝子、合成ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子、分泌型のルシフェラーゼ

遺伝子などが挙げられるが、タンパク質の回収の容易さからは、分泌型のルシフェラーゼ遺伝子が好ましい。蛍光タンパク質遺伝子として、GFPやEGFPなどの緑色蛍光タンパク質遺伝子、BFPやTagBFPなどの青色蛍光タンパク質遺伝子、RFPやDsRedなどの赤色蛍光タンパク質遺伝子などが挙げられる。薬剤耐性遺伝子として、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子などが挙げられる。

[0013] レポーター細胞は、例えば、レポーター遺伝子を相同組換え等により、ゲノム中の特定の遺伝子座にノックインすることにより作製することができる。相同組換えは、ゲノム編集技術を用いて行ってもよく、ゲノム編集技術としては、例えば、ジンクフィンガーDNA結合ドメインと非特異的なDNA切断ドメインとを連結した、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を用いる方法（特許第4968498号公報）、DNA結合モジュールである転写活性化因子様（TAL）エフェクターと、DNAエンドヌクレアーゼとを連結したTALEN（TALエフェクターヌクレアーゼ）を用いる方法（特表2013-513389号公報）、あるいは、DNA配列CRISPR（Clustered Regularly interspaced short palindromic repeats）と、CRISPRとともに重要な働きを持つヌクレアーゼCasタンパク質ファミリーとを組み合わせたCRISPR-Cas9システムを利用する方法（特表2010-519929号公報）が挙げられる。特定の遺伝子座としては、ヒトPPP1R2C遺伝子座などのオープンクロマチン構造のため、挿入された遺伝子の発現抑制を受けにくい遺伝子座や、分化多能性細胞において特異的に高発現する遺伝子（例えば、Nanog、Oct3/4、Fbx15など、好ましくはNanog）の遺伝子座が挙げられる。そのようなレポーター遺伝子を含有する組換え細胞としては、例えばNanog遺伝子座に緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子とピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス由来のMEF（Okita et al., Nature, 448, 313-317（2007））などが挙げられる。

[0014] 細胞制御因子

本発明において、細胞制御因子とは、細胞内に導入することによって当該

細胞の性質を変化させ、他の細胞種へと変化させる因子であり、特に限定されないが、例えば、初期化因子、神経細胞誘導因子、神経幹細胞誘導因子、神経冠細胞誘導因子、心筋細胞誘導因子、筋細胞誘導因子、軟骨細胞誘導因子、肝細胞誘導因子、メラニン細胞誘導因子、造血前駆細胞誘導因子、赤芽球誘導因子および巨核球前駆細胞誘導因子などが例示される。

[0015] 本発明で用いられる初期化因子としては、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3、Glis1またはGDF3等の遺伝子または遺伝子産物が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、W02007/069666、W02008/118820、W02009/007852、W02009/032194、W02009/058413、W02009/057831、W02009/075119、W02009/079007、W02009/091659、W02009/101084、W02009/101407、W02009/102983、W02009/114949、W02009/117439、W02009/126250、W02009/126251、W02009/126655、W02009/157593、W02010/009015、W02010/033906、W02010/033920、W02010/042800、W02010/050626、W02010/056831、W02010/068955、W02010/098419、W02010/102267、W02010/111409、W02010/111422、W02010/115050、W02010/124290、W02010/147395、W02010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat. Cell Biol. 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotechnol., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature.

463:1096-100、Malip, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9.に記載の組み合わせが例示される。より好ましい初期化因子は、Oct3/4、Sox2、Klf4およびc-Mycを含む組み合わせである。

[0016] 上記初期化因子には、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸(VPA)、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool(登録商標) (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (Origene)等)等の核酸性発現阻害剤など]、MEK阻害剤 (例えば、PD184352、PD98059、U0126、SL327およびPD0325901)、Glycogen synthase kinase-3阻害剤 (例えば、BioおよびCHIR99021)、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、5-azacytidine)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、BIX-01294等の低分子阻害剤、Suv39hl、Suv39h2、SetDB1およびG9aに対するsiRNAおよびshRNA等の核酸性発現阻害剤など)、L-channel calcium agonist(例えばBayk8644)、酪酸、TGF β 阻害剤またはALK5阻害剤 (例えば、LY364947、SB431542、616453およびA-83-01)、p53阻害剤 (例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA)、ARID3A阻害剤 (例えば、ARID3Aに対するsiRNAおよびshRNA)、miR-291-3p、miR-294、miR-295およびmir-302などのmiRNA、Wnt Signaling (例えばsoluble Wnt3a)、神経ペプチドY、プロスタグランジン類 (例えば、プロスタグランジンE2およびプロスタグランジンJ2)、hTERT、SV40LT、UTF1、IRX6、GLIS1、PITX2、DMRTB1等の樹立効率を高めることを目的として用いられる因子も含まれており、本明細書においては、これらの樹立効率の改善目的のために用いられた因子についても初期化因子と別段の区別をしないものとする。

[0017] 本発明で用いられる神経細胞誘導因子としては、例えば、Lhx3、Ngn2およびIsl1 (W02014/148646)、Ascl1、Brn2およびMyt1l (Wapinski OL et al, Cell. 155:621-635, 2013) 等が挙げられる。

[0018] 本発明で用いられる神経幹細胞誘導因子としては、例えば、Brn4/Pou3f4、

Sox2、Klf4、c-MycおよびE47/Tcf3 (Han DW et al, Cell Stem Cell. 10:465-472, 2012) 等が挙げられる。

[0019] 本発明で用いられる神経冠細胞誘導因子としては、例えば、SOX10 (Kim YJ, et al, Cell Stem Cell. 15:497-506, 2014) 等が挙げられる。

[0020] 本発明で用いられる心筋細胞誘導因子としては、例えば、Gata4、Mef2cおよびTbx5 (Ieda M et al, Cell. 142:375-386, 2010) 等が挙げられる。

[0021] 本発明で用いられる筋細胞誘導因子としては、例えば、MYOD1またはMYF5 (Tanaka A, et al, PLoS One. 8:e61540, 2013) 等が挙げられる。

[0022] 本発明で用いられる軟骨細胞誘導因子としては、例えば、c-Myc、Klf4およびSOX9 (Outani H, et al, PLoS One. 8:e77365, 2013) 等が挙げられる。

[0023] 本発明で用いられる肝細胞誘導因子としては、例えば、FOXA3、HNF1AおよびHNF4A (Huang P, et al, Cell Stem Cell. 14:370-384, 2014) 等が挙げられる。

[0024] 本発明で用いられるメラニン細胞誘導因子としては、例えば、MITF、SOX10およびPAX3 (Yang R, et al, Nat Commun. 5:5807, 2014) 等が挙げられる。

[0025] 本発明で用いられる造血前駆細胞誘導因子としては、例えば、ERG、GATA2、LMO2、RUNX1cおよびSCL (Batta K, Cell Rep. 9:1871-84, 2014) 等が挙げられる。

[0026] 本発明で用いられる赤芽球誘導因子としては、例えば、c-MYCおよびBCL-XL (Hirose S, et al, Stem Cell Reports. 1:499-508, 2013) 等が挙げられる。

[0027] 本発明で用いられる巨核球前駆細胞誘導因子としては、例えば、BMI1、c-MYCおよびBCL-XL (Nakamura S, et al, Cell Stem Cell. 14:535-548, 2014) 等が挙げられる。

[0028] 本発明において、細胞制御因子を細胞内に導入する方法として、細胞制御因子がタンパク質の形態の場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド（例えば、HIV由来のTATおよびポリアルギニン）との融合、マイクロインジェクションなどの手法によって細胞内に導入してもよい。

[0029] 一方、細胞制御因子がDNAの形態の場合、例えば、ウィルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウィルスベクターとしては、レトロウィルスベクター、レンチウィルスベクター（以上、Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007）、アデノウィルスベクター（Science, 322, 945-949, 2008）、アデノ随伴ウィルスベクター、センダイウィルスベクター（WO 2010/008054）などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC、PAC）などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる（Science, 322:949-953, 2008）。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができるし、さらに、必要に応じて、前述の薬剤耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、蛍光タンパク質（GFP等）、 β -グルクロニダーゼ（GUS）、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。

[0030] 細胞制御因子がRNAの形態の場合、例えばリポフェクション、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入しても良く、分解を抑制するため、5-メチルシチジンおよびpseudouridine（TriLink Biotechnologies）を取り込ませたRNAを用いても良い（Warren L, (2010) Cell Stem Cell, 7:618-630）。

[0031] 細胞制御因子を導入後のがん細胞は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製される培養液中で培養することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、 α MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地およびこれらの混合培地などが包含される。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無

血清でもよい。必要に応じて、培地は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、サイトカインなどの1つ以上の物質も含有し得る。

[0032] 本発明の他の態様として、細胞制御因子を導入後のがん細胞は、細胞制御因子の特性に合わせた培養液を適宜選択して培養しても良く、以下にその条件を例示する。

[0033] 細胞制御因子が初期化因子の場合、初期化後の細胞のための培養液としては、例えば、10～15%FBSを含有するDMEM、DMEM/F12又はDME培養液（これらの培養液にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）または市販の培養液（例えば、マウスES細胞培養用培養液(TX-WES培養液、トロンボX社)、霊長類ES細胞培養用培養液（霊長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社）、無血清培地（mTeSR、Stemcell Technology社））などが含まれる。

[0034] 初期化後の細胞の培養法の例としては、たとえば、37℃、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DMEM又はDMEM/F12培養液上で体細胞と初期化因子とを接触させ約4～7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞（たとえば、マイトマイシンC処理ST0細胞、SNL細胞等）上にまきなおし、体細胞と初期化因子の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培養液で培養し、該接触から約30～約45日又はそれ以上ののちにiPS様コロニーを生じさせることができる。

[0035] あるいは、37℃、5% CO₂存在下にて、フィーダー細胞（たとえば、マイトマイシンC処理ST0細胞、SNL細胞等）上で10%FBS含有DMEM培養液（これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）で培養し、約25～約30日又はそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。望ましくは、フィーダー細胞の代わりに、初期化される

体細胞そのものを用いる (Takahashi K, et al. (2009), PLoS One. 4:e8067 またはW02010/137746)、もしくは細胞外基質 (例えば、Laminin-5 (W02009/123349) およびマトリゲル (BD社)) を用いる方法が例示される。

[0036] この他にも、血清を含有しない培地を用いて培養する方法も例示される (Sun N, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720-15725, 2009またはNakagawa M, et al, Sci Rep. 4:3594, 2014)。さらに、樹立効率を上げるため、低酸素条件 (0.1%以上、15%以下の酸素濃度) によりiPS細胞を樹立しても良い (Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237-241またはW02010/013845)。

[0037] 細胞制御因子が神経細胞誘導因子の場合、当該因子導入後の細胞のための培養液および培養条件としては、例えば、W02014/148646、Wapinski OL et al, Cell. 155:621-635, 2013に記載されるもの等が挙げられる。

[0038] 細胞制御因子が神経幹細胞誘導因子の場合、当該因子導入後の細胞のための培養液および培養条件としては、例えば、Han DW et al, Cell Stem Cell. 10:465-472, 2012に記載されるもの等が挙げられる。

[0039] 細胞制御因子が神経冠細胞誘導因子の場合、当該因子導入後の細胞のための培養液および培養条件としては、例えば、Kim YJ, et al, Cell Stem Cell. 15:497-506, 2014に記載されるもの等が挙げられる。

[0040] 細胞制御因子が心筋細胞誘導因子の場合、当該因子導入後の細胞のための培養液および培養条件としては、例えば、Ieda M et al, Cell. 142:375-386, 2010に記載されるもの等が挙げられる。

[0041] 細胞制御因子が筋細胞誘導因子の場合、当該因子導入後の細胞のための培養液および培養条件としては、例えば、Tanaka A, et al, PLoS One. 8:e61540, 2013に記載されるもの等が挙げられる。

[0042] 細胞制御因子が軟骨細胞誘導因子の場合、当該因子導入後の細胞のための培養液および培養条件としては、例えば、Ootani H, et al, PLoS One. 8:e77365, 2013に記載されるもの等が挙げられる。

[0043] 細胞制御因子が肝細胞誘導因子の場合、当該因子導入後の細胞のための培

養液および培養条件としては、例えば、Huang P, et al, Cell Stem Cell, 14:370-384, 2014に記載されるもの等が挙げられる。

[0044] 細胞制御因子がメラニン細胞誘導因子の場合、当該因子導入後の細胞のための培養液および培養条件としては、例えば、Yang R, et al, Nat Commun, 5:5807, 2014に記載されるもの等が挙げられる。

[0045] 細胞制御因子が造血前駆細胞誘導因子の場合、当該因子導入後の細胞のための培養液および培養条件としては、例えば、Batta K, Cell Rep, 9:1871-84, 2014に記載されるもの等が挙げられる。

[0046] 細胞制御因子が赤芽球誘導因子の場合、当該因子導入後の細胞のための培養液および培養条件としては、例えば、Hirose S, et al, Stem Cell Reports, 1:499-508, 2013に記載されるもの等が挙げられる。

[0047] 細胞制御因子が巨核球前駆細胞誘導因子の場合、当該因子導入後の細胞のための培養液および培養条件としては、例えば、Nakamura S, et al, Cell Stem Cell, 14:535-548, 2014に記載されるもの等が挙げられる。

[0048] 被験物質

本発明のスクリーニング方法においては、任意の被験物質を用いることができ、いかなる公知化合物および新規化合物であってもよく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、微生物発酵産物、海洋生物由来の抽出物、植物抽出物、精製タンパク質または粗タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成低分子化合物、天然化合物等が挙げられる。本発明において、被験物質はまた、(1) 生物学的ライブラリー法、(2) デコンヴォリューションを用いる合成ライブラリー法、(3) 「1ビーズ1化合物 (one-bead one-compound)」ライブラリー法、及び(4) アフィニティクロマトグラフィ選別を使用する合成ライブラリー法を含む当技術分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多くのアプローチのいずれかを使用して得ることができる。アフィニティクロマトグラフィ選別を使用する生物学的ライブラリー法はペプチドライブラリーに限定されるが、その他の4つのアプローチはペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の低分子化合物ライブラリーに適用できる

(Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12: 145-67)。分子ライブラリーの合成方法の例は、当技術分野において見出され得る (DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909-13; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422-6; Zuckermann et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37: 2678-85; Cho et al. (1993) *Science* 261: 1303-5; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37: 1233-51)。化合物ライブラリーは、溶液 (Houghten (1992) *Bio/Techniques* 13: 412-21を参照のこと) またはビーズ (Lam (1991) *Nature* 354: 82-4)、チップ (Fodor (1993) *Nature* 364: 555-6)、細菌 (米国特許第5,223,409号)、孢子 (米国特許第5,571,698号、同第5,403,484号、及び同第5,223,409号)、プラスミド (Cull et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-9) 若しくはファージ (Scott and Smith (1990) *Science* 249: 386-90; Devlin (1990) *Science* 249: 404-6; Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378-82; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 301-10; 米国特許出願第2002103360号) として作製され得る。

[0049] がん細胞と被験物質との接触は、好ましくは、上記のようにして細胞制御因子を導入したがん細胞を、被験物質を添加した培養液中で培養することにより実施することができる。培養液への被験物質の添加濃度は、細胞の生育に悪影響を及ぼさない範囲で適宜選択され得るが、通常0.1-100nMである。接触開始時期としては、細胞制御因子の導入直後ないし数日後以内が挙げられる。外因性の細胞制御因子が発現制御可能 (ON/OFF可能) な形態でがん細胞に導入されている場合、発現ONの処理と同時ないし当該処理から数日後以内に接触を開始することができる。接触期間はがん細胞の変化が観察されるのに十分な時間であれば特に制限はないが、通常は陽性コロニーが出現するまで培養液中に共存させておけばよい。

[0050] がん細胞の変化

本発明のがんの治療薬をスクリーニングする方法では、被験物質の接触下

で、がん細胞内で外来性の細胞制御因子を発現させることで起きる細胞の変化を指標とすることができる。本発明において、当該がん細胞の変化は、導入する細胞制御因子に依存する。

[0051] 細胞制御因子が、初期化因子である場合、当該細胞の変化は、がん細胞の初期化である。ここで初期化とは、完全な初期化（即ち、安定な多能性と未分化状態を有するiPS細胞の樹立）のみならず、元のがん細胞と比較してより未分化な状態に変化することを包含する概念として用いられる（細胞制御因子が、初期化を経由せず他の細胞へ直接分化誘導する因子である場合も、同様に当該目的細胞への完全な分化のみならず、元のがん細胞と比較してより目的細胞の特徴を獲得した状態に変化することを包含する）。したがって、がん細胞の初期化は、コロニーの形成、未分化特異的抗原の発現、または未分化特異的遺伝子の発現を指標として評価することができる。未分化特異的遺伝子としては、胚性幹細胞で特異的な発現を示す遺伝子または分化多能性維持における重要な役割が示唆される遺伝子などが例示され、このような遺伝子は、Cell. 2005 Sep 23;122(6):947-56、Stem Cells. 2004;22(1):51-64.、Mol Biol Cell. 2002 Apr;13(4):1274-81.、Mol Reprod Dev. 2000 Jun;56(2):113-23.、EMBO J. 1998 Apr 1;17(7):2019-32.、Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Nov 11;100(23):13350-5.、Development. 2005 Mar;132(5):885-96.、Blood. 2005 Jan 15;105(2):635-7.、Cell. 2003 May 30;113(5):631-42.、J Biol Chem. 2000 Mar 3;275(9):6608-19.、Mol Cell Biol. 2005 May;25(9):3492-505.、Mech Dev. 2004 Mar;121(3):237-46. およびWO2007/069666に記載されている。具体的な未分化特異的遺伝子として、特にそれらに限定されないが、Nanog、Epcam、Cdh1、Fbxo15、PODXL、Oct3/4、Sox2、GDF3が例示される。未分化特異的抗原としては、それらに限定されないが、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-2-54、TRA-1-60およびTRA-1-80からなる群より選択される抗原が例示される。なお、ヒトでは未分化細胞においてSSEA-1は検出されないことから、SSEA-1に代えて、SSEA-3およびSSEA-4が好適に用いられる。

- [0052] コロニーの形成は、特に限定されないが、顕微鏡下で測定され、その数により評価される。この測定は、機械的に行われてもよく（W02011/010449）、目視で行われてもよい。一方、未分化特異的抗原を発現している細胞は、FACSなどのセルソーターを用いて当該抗原を発現している細胞の数として評価することもでき、未分化特異的遺伝子の発現は、逆転写酵素PCR分析、定量的な逆転写酵素PCR分析、ノーザン・ブロット分析、免疫組織化学、アレイ分析、RNA-seq解析、レポーター遺伝子の解析およびそれらの組合せによって発現量として評価することができる。従って、本発明において、がん細胞の変化は、未分化特異的抗原を発現している細胞数が増える、未分化特異的遺伝子の発現量が増える、またはコロニーが形成すると言い換えることができる。
- [0053] 細胞制御因子が、神経細胞誘導因子である場合、がん細胞の変化は、神経細胞特異的遺伝子の発現を指標として評価することができる。神経細胞特異的遺伝子として、MFNG、GRIP1、NGFR、Zfp238、GRINT1およびSYT3からなる群より選択される遺伝子が例示される（W02014/148646およびWapinski OL et al, Cell. 155:621-635, 2013）。
- [0054] 細胞制御因子が、神経幹細胞誘導因子である場合、がん細胞の変化は、神経幹細胞特異的遺伝子の発現を指標として評価することができる。神経細胞特異的遺伝子として、Olig2、Sox2およびMash1/Ascl1からなる群より選択される遺伝子が例示される（Han DW et al, Cell Stem Cell. 10:465-472, 2012）。
- [0055] 細胞制御因子が、神経冠細胞誘導因子である場合、がん細胞の変化は、神経冠細胞特異的遺伝子の発現を指標として評価することができる。神経冠細胞特異的遺伝子として、TWIST1、SNAIL2、ITGA4、ITGA6、SOX5、SOX6、PLP1およびMyelin Protein Zero [MPZ] からなる群より選択される遺伝子が例示される（Kim YJ, et al, Cell Stem Cell. 15:497-506, 2014）。
- [0056] 細胞制御因子が、心筋細胞誘導因子である場合、がん細胞の変化は、心筋細胞特異的遺伝子の発現を指標として評価することができる。心筋細胞特異的遺伝子として、 α MHCまたはcTnTが例示される（Ieda M et al, Cell. 142:

375-386, 2010)。

- [0057] 細胞制御因子が、筋細胞誘導因子である場合、がん細胞の変化は、筋細胞特異的遺伝子の発現を指標として評価することができる。筋細胞特異的遺伝子として、ミオゲニン (myogenin)、ミオシン重鎖 (myosin heavy chain; MHC)、MEF2CおよびSIX1からなる群より選択される遺伝子が例示される (Tanaka A, et al, PLoS One. 8:e61540, 2013)。
- [0058] 細胞制御因子が、軟骨細胞誘導因子である場合、がん細胞の変化は、軟骨細胞特異的遺伝子の発現を指標として評価することができる。軟骨細胞特異的遺伝子として、COL11A2、COL2A1およびACANからなる群より選択される遺伝子が例示される (Outani H, et al, PLoS One. 8:e77365, 2013)。
- [0059] 細胞制御因子が、肝細胞誘導因子である場合、がん細胞の変化は、肝細胞特異的遺伝子の発現を指標として評価することができる。肝細胞特異的遺伝子として、albumin (ALB)、 α -1-antitrypsin (AAT)、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9およびCYP3A4からなる群より選択される遺伝子が例示される (Huang P, et al, Cell Stem Cell. 14:370-384, 2014)。
- [0060] 細胞制御因子が、メラニン細胞誘導因子である場合、がん細胞の変化は、メラニン細胞特異的遺伝子の発現を指標として評価することができる。メラニン細胞特異的遺伝子として、TYR、TYRP1およびDCTからなる群より選択される遺伝子が例示される (Yang R, et al, Nat Commun. 5:5807, 2014)。
- [0061] 細胞制御因子が、造血前駆細胞誘導因子である場合、がん細胞の変化は、造血前駆細胞特異的遺伝子の発現を指標として評価することができる。造血前駆細胞特異的遺伝子として、CD31、CD41、c-KIT、CD45、CD11bおよびTER119からなる群より選択される遺伝子または抗原が例示される (Batta K, Cell Rep. 9:1871-84, 2014)。
- [0062] 細胞制御因子が、赤芽球誘導因子である場合、がん細胞の変化は、赤芽球特異的遺伝子の発現を指標として評価することができる。赤芽球特異的遺伝子として、GPA、CD71、GATA1およびRAF1からなる群より選択される遺伝子または抗原が例示される (Hirose S, et al, Stem Cell Reports. 1:499-508,

2013)。

[0063] 細胞制御因子が、巨核球前駆細胞誘導因子である場合、がん細胞の変化は、巨核球前駆細胞特異的遺伝子の発現を指標として評価することができる。巨核球前駆細胞特異的遺伝子として、CD41a、CD42a、CD42bおよびCD9からなる群より選択される遺伝子または抗原が例示される (Nakamura S, et al, Cell Stem Cell, 14:535-548, 2014)。

[0064] 上述した各細胞特異的遺伝子を本発明のスクリーニングの指標として用いる場合、当該遺伝子を発現している細胞は、FACSなどのセルソーターを用いて細胞の数として評価することもでき、逆転写酵素PCR分析、定量的な逆転写酵素PCR分析、ノーザン・ブロット分析、免疫組織化学、アレイ分析、レポーター遺伝子の解析およびそれらの組合せによって発現量として評価することもできる。従って、本発明において、「がん細胞の変化が増加する」とは、当該遺伝子を発現している細胞数が増える、または当該遺伝子の発現量が増えると言い換えることができる。

[0065] がんの治療薬をスクリーニングするためのキット

本発明において、がんの治療薬をスクリーニングするためのキットは、上述した細胞制御因子を含む。

[0066] 本発明において、がんの治療薬をスクリーニングするためのキットは、さらに、細胞制御の製造手順、指標の測定方法や手順を記載した書面や説明書を含んでもよい。あるいは有効な標的タンパク質（ここで、有効な標的タンパク質とは上記と同義である）の異なる種々のがん細胞のパネルをさらに含んでもよいし、あるいは、上記がん細胞の変化の指標となる細胞表面抗原に対する抗体や細胞特異的遺伝子の検出用核酸をさらに含むこともできる。

[0067] 本発明の別の側面においては、がん治療薬の創薬標的となり得るタンパク質の同定方法が提供される。本同定方法は下記の工程：

(i) 被験タンパク質をコードする遺伝子（候補遺伝子）を、発現制御可能な形態で含むがん細胞内で、候補遺伝子を発現する条件下または該遺伝子の発現が抑制された条件下で、外来性の細胞制御因子を発現させる工程、

(ii) がん細胞の変化を確認する工程、および

(iii) 候補遺伝子の発現が抑制された条件下において、該遺伝子を発現する条件下と比較してがん細胞の変化が増加した場合、当該被験タンパク質をがんの治療薬の創薬標的となり得るタンパク質として選出する工程を含むことを特徴とする。

ここで、候補遺伝子としては、がん細胞における遺伝子発現をマイクロアレイ等を用いて網羅的に解析した結果同定される、がん細胞に特有に発現している遺伝子やがん細胞で高発現している遺伝子が挙げられる。

また、ここで、発現制御可能な形態とは、候補遺伝子の発現のON/OFFが可能な形態を意味し、例えば、候補遺伝子が、誘導プロモーター（例、メタロチオネインプロモーター（重金属イオンで誘導）、ヒートショックタンパク質プロモーター（ヒートショックで誘導）、Tet-ON/Tet-OFF系プロモーター（テトラサイクリン又はその誘導体の添加又は除去で誘導）、ステロイド応答性プロモーター（ステロイドホルモン又はその誘導体で誘導）等）の制御下におかれた発現ベクター等が挙げられる。

細胞制御因子、がん細胞の変化、当該変化を確認・評価するための指標等については、上記したがん治療薬のスクリーニング方法と同様である。

[0068] 本発明を以下の実施例でさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はそれら実施例によってなんら限定されるものではない。

実施例 1

[0069] がん細胞の初期化に対するがん遺伝子の効果を調べるため、Yamada K, et al, J Clin Invest. 123:600-610, 2013に記載のEWS/ATF1融合遺伝子をドキシサイクリン（Dox）依存性に誘導可能なマウスサルコーマ細胞株（G1297株とも称す）を用いた。なお、当該サルコーマ細胞は、EWS/ATF1の発現停止によりin vitroでの増殖停止およびin vivoでの腫瘍の退縮が確認されている。

[0070] 0.2 μ g/mlのドキシサイクリン添加によるEWS/ATF1を発現誘導することでマウスES細胞の増殖に影響が出ないことから、EWS/ATF1は、導入した初期化

因子の発現量に影響を与えないことを確認した（図3A、図3Bおよび図3D）。

[0071] 続いて、G1297に初期化因子を導入することにより、G1297が初期化されるのか否かについて確認した。EWS/ATF1を発現させたサルコーマ細胞では、初期化因子(4F: Oct3/4, Sox2, Klf4, および c-Myc)をレトロウイルスにより導入してもiPS細胞様コロニーは観察されなかった。一方、EWS/ATF1の発現を停止させた場合は、4Fの発現によりiPS細胞様コロニーが確認された（図1A～C）。このiPS細胞様コロニーをピックアップすることにより、iPS細胞様細胞株を樹立した（図3C）。なお、iPS細胞の誘導は、次の方法により行った。Oct3/4、Sox2、Klf4およびc-MycをpMXs-basedレトロウイルスベクターを用いて、それぞれPlat-E細胞へ導入し、ウイルス含有上清を回収し、 $0.45\mu\text{m}$ セルロースアセテートフィルターでろ過した。G1297を60-mmディッシュあたり 8×10^5 の細胞を播種し、ウイルス含有上清を用いて感染させ、感染後3日目にLIF含有ES培地に交換し培養した。

[0072] 樹立したiPS細胞様細胞株は、親サルコーマ細胞と同様にドキシサイクリン依存的にEWS/ATF1を発現することが確認された（図1D）。さらに、いくつかの染色体異常も同様に観察され、当該iPS細胞様細胞株がサルコーマ細胞由来であることが確認された（図1E）。当該サルコーマ細胞由来のiPS細胞様細胞における、Nanogおよび内在性のOct3/4 (Pou5f1)などの多能性関連遺伝子の発現をES細胞と比較したところ、大きな違いは見られなかった（図1Fおよび図3D）。なお、RT-PCRは次の方法を用いて行った。RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)を使用して全RNAを単離した。Go-taq qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA)を使用して定量的real-time PCR解析を行った。転写レベルを β -actinまたはGAPDH値で標準化した。

[0073] サルコーマ細胞の初期化の効率は、0.06%であり、このことは、MEFの初期化効率よりも低いことが示された。得られたiPS細胞様細胞を免疫不全マウスの皮下に投与したところ、テラトーマが形成され、さらに、胚盤胞に注入することでキメラマウスを作成できた（図1Gおよび図1H）。

[0074] 以上より、EWS/ATF1発現依存性サルコーマ細胞では、EWS/ATF1の発現を抑制することで初期化により多能性細胞を得られることが確認された。この結果は、EWS/ATF1発現依存性サルコーマ細胞の初期化において、EWS/ATF1は抑制的に働くことを示している。

実施例 2

[0075] 続いて、EWS/ATF1を介したがん細胞の初期化不全のメカニズムを解析した。まず、SSEA1陽性細胞の発生をFACS解析することで初期化の早期における現象を確認した（図1I）。その結果、SSEA1陽性細胞数は、Dox濃度依存的に減少することが確認された。このことから、EWS/ATF1は、初期化の早期段階から阻害することが示唆された。また、線維芽細胞の初期化における最初の事象である間葉-上皮移行のマーカーの発現をマイクロアレイによって調べたところ、EWS/ATF1の発現抑制後、これらの遺伝子が有意に上昇することが確認された。一方、EWS/ATF1の発現は、MEFでは、初期化によるSSEA1陽性細胞の発生を抑制していないことから（図1J）、EWS/ATF1の発現はサルコーマ細胞に特異的な初期化抑制をもたらすことが示唆された。

[0076] がん遺伝子の発現が、4Fの導入時の転写応答においていかなる影響を与えるかを調べるため、4Fを導入した際のサルコーマ細胞（4F-サルコーマ細胞）または陰性対照としてGFPを導入した際のサルコーマ細胞のマイクロアレイ解析をEWS/ATF1の発現させた場合と発現させなかった場合それぞれについて行った（図3E）。なお、マイクロアレイ解析は、Mouse Gene 1.0 ST Array (Affymetrix Inc., Santa Clara, USA)を使用して行った。すべてのデータ解析は、GeneSpring GX software program (version 12; Agilent Technology, Santa Clara, USA)を使用して行った。

[0077] その結果、4F-サルコーマ細胞においてEWS/ATF1の発現を抑制することで多くの遺伝子が上昇または下降することが確認された（図1K）。発現が変化した遺伝子は、EWS/ATF1を発現した4F-サルコーマ細胞においても同様に上昇または下降していたが、EWS/ATF1が発現していない4F-サルコーマ細胞に比べて、変化の違いは小さかった（図3F）。以上より、EWS/ATF1の発現は、サル

コーマ細胞における運命変更を抑制していることが示唆された。

実施例 3

[0078] さらにMYOD1の導入による骨格筋分化誘導へのEWS/ATF1の発現の影響を調べた(図1L)。その結果、初期骨格筋分化マーカーであるMyogenin (MYOG) の発現が、MYOD1導入サルコーマ細胞(MYOD1-サルコーマ細胞)においてEWS/ATF1発現抑制後、有意に上方制御されていることが確認された(図1M)。また、MHC (myosin heavy chain) 陽性細胞は、EWS/ATF1 が発現していないMYOD1-サルコーマ細胞において有意に増加していた(図1N)。MYOD1の導入による初期転写応答をマイクロアレイ法で分析したところ、EWS/ATF1発現したサルコーマ細胞と比べて、EWS/ATF1を発現しない細胞では、MYOD1の導入による遺伝子変化数が増加した(図1O)。骨格筋分化誘導関連遺伝子(例えば、Myogenin)は、EWS/ATF1の発現抑制されたサルコーマ細胞においてMYOD1の導入により大きく上方制御されることが示された。一方、筋細胞の分化形質転換は、EWS/ATF1発現により抑制されることが確認された。

[0079] 以上の結果より、EWS/ATF1の発現は、細胞運命を変える外来性の転写因子に対する転写応答を制限することが示唆された。

実施例 4

[0080] 次に、ヒト明細胞肉腫(CCS)細胞株の初期化におけるEWS/ATF1の発現の効果を調べた。4Fを導入したCCS細胞においてEWS/ATF1をノックダウンしたところ(図2A)、ヒト初期化の初期マーカーであるTRA-1-60をコードするPODXLの発現を増加させたが(図2B)、完全に初期化されたiPS細胞を樹立することはできなかった。同様に、MYOD1を導入したCCS細胞においてEWS/ATF1をノックダウンしたところ、MYOGの発現の増加が認められた(図2B)。

実施例 5

[0081] この他にも、がん遺伝子のシグナル活性化が、細胞の初期化に与える影響を調べた。上皮増殖因子レセプター(EGFR)変異肺がん細胞株HCC827およびHER2-増幅乳がん細胞株SK-BR3を実験に使用した。なお、これらのがん細胞株は、それぞれEGFR特異的チロシンキナーゼおよびHER2チロシンキナーゼ阻害

剤に感受性である。HCC827およびSK-BR3へDox誘導性4FをPBトランスポゾンを用いて導入し（図4A）、それぞれEGFRチロシンキナーゼ阻害剤であるgefitinibおよびHER2チロシンキナーゼ阻害剤lapatinibの初期化に対する効果を調べた（図2C）。その結果、4F導入SK-BR3において、lapatinibを50%阻害濃度（IC₅₀）で処置したところ、初期化マーカーであるPODXLの発現を促進したが（図2D）、ヒトがん細胞株から完全に初期化されたiPS細胞の樹立までは成功しなかった。一方、5-フルオロウラシル（5FU）をIC₅₀濃度で処置してもPODXLの発現は増加しなかった（図2D）。同様に、4Fを導入したHCC827において、gefitinibをIC₅₀濃度で処置したところ、PODXLの発現を促進したが、5FUをIC₅₀濃度で処置してもPODXLの発現は増加しなかった（図2D）。一方、野生型EGFRを有する肺がん細胞株A549では、4F導入時のgefitinib処置によってもPODXLは上昇しなかった（図4B）。マイクロアレイ解析によって、HCC827およびSK-BR3への4Fの導入時または非導入時の遺伝子発現変化を調べた。それぞれgefitinibおよびlapatinibで処置したところ、PODXLやNANOGを含む多くの遺伝子が上方または下方制御されることが明らかとなった（図2E）。これらの結果により、主要ながん遺伝子シグナルが、安定的な転写ネットワークを介してがん細胞の特徴を維持することが示唆された。

実施例 6

[0082] ある種の抗がん剤に対して感受性を持つがん細胞およびある種の抗がん剤に対して感受性を持たないがん細胞の組み合わせを使用して、薬剤特異的な細胞の初期化への影響を調べた。ここで、上皮増殖因子レセプター（EGFR）変異肺がん細胞株HCC827は、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤であるGefitinibおよびHER2チロシンキナーゼ阻害剤Lapatinibに感受性を示すこと、HER2-増幅乳がん細胞株SK-BR3はLapatinibに感受性を示すことが知られている。HCC827株およびSK-BR3株へDox誘導的に4Fを発現誘導可能なpiggyBacベクターを、piggyBac transposaseを用いて導入し、Doxによる発現誘導を行った後に、GefitinibおよびBcr-Ablチロシンキナーゼ阻害薬であるImatinib、Lapatinib、5-FUを添加した。2日後、細胞からRNAを抽出し、定量的RT-PCRによりNANOGお

よびGDF3の発現レベルを測定した（図5A）。結果を図5Bに示す。0.005 μ Mもしくは0.05 μ M Gefitinib、または0.5 μ M Lapatinibで処置したHCC827細胞株では、未分化特異的遺伝子であるNANOGおよびGDF3の発現が促進された。一方、Imatinibまたは5-FUで処置した場合は、NANOGおよびGDF3の発現促進は認められなかった。また、SK-BR3細胞株では、0.05 μ Mまたは0.5 μ M Lapatinibで処置した場合にのみNANOGおよびGDF3の発現促進が認められた。これらの結果から、感受性のある薬剤特異的にがん細胞の初期化が亢進されることが示され、本発明のスクリーニング方法が、効果を有する薬剤のみを選択的に取得でき得る方法であることが示唆された。

実施例 7

[0083] さらに、定量的RT-PCR以外の方法で、Nanogの発現を測定した。実験手順は、図3Eの概略図と同じであり、Dox添加によりEWS/ATF1を発現させたG1297株に、初期化因子(+4F)またはGFPをレトロウイルスにより導入し、導入4日後にDox添加を停止した細胞(DoxOFF)と、Dox添加を続けた細胞(DoxON)におけるNanogの発現をRNA-seq解析によって調べた。結果を図6に示す。DoxOFF+4Fの細胞において、Nanog遺伝子の発現が上昇すること、すなわちEWS/ATF1の発現を抑制することで、Nanog遺伝子の発現が上昇することを確認した。なお、RNA-seq解析は次の方法を用いて行った。それぞれの細胞からRNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を使用して全RNAを抽出した後に、TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold LT sample Prep kit (illumina)を用いてライブラリーを作成した。KAPA Library Quantification kits (日本ジェネティクス)を用いて濃度定量後、HiSeq PE Rapid Cluster kit v2-HSを用いて、HiSeq2500(illumina)にてシーケンスを行った。シーケンスデータは、TopHatソフトウェアおよびCufflinksソフトウェアを用いて解析し、IGV(Integrative Genomics Viewer)により可視化した。

実施例 8

[0084] レポーター細胞の作製

図7Aに示されるように、TALENを用いたゲノム編集技術により、レポータ

一遺伝子としてTagBFP遺伝子、合成ウミシタケルシフェラーゼ（hRL）遺伝子およびピューロマイシン耐性遺伝子を含有するターゲティングベクターを用いて、HEK298細胞のPPP1R2C遺伝子座におけるエクソン1とエクソン2の間にノックインすることにより、安定的にTagBFPおよび合成ウミシタケルシフェラーゼ（hRL）を発現するレポーター細胞を作製した。FACSを用いたセルソーティングによりTagBFP発現細胞を選択したのち、ルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼアッセイは、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)を使用し、Passive lysis bufferを用いて細胞を溶解後、Envision 2104 Multilabel Reader (PerkinElmer)を用いて測定した。結果を図7Bに示す。細胞の数と発光強度の間には高い正の相関関係が認められた ($R^2=0.9864$)。

[0085] 同様の方法によりレポーター遺伝子をがん細胞に導入することができ、このようにして作成されたレポーター細胞は、ルシフェラーゼの発光強度により細胞数を算出することができる。

[0086] 図8に示されるように、レポーター遺伝子として、GFP遺伝子、改変ホタルルシフェラーゼ（Luc2）遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子を含有するターゲティングベクターを作製した。CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術により、該ターゲティングベクターを用いることで、マウスがん細胞のNanog遺伝子座におけるエクソン1の5' 非翻訳領域（5' UTR）とコーディング領域（CDS）の間に、該レポーター遺伝子をノックインすることができる。

図9に示されるように、レポーター遺伝子として、GFP遺伝子、分泌型のNanoLuc™ルシフェラーゼ（secNluc）遺伝子およびブラストサイジン耐性遺伝子を含有するターゲティングベクターを作製した。CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術により、該ターゲティングベクターを用いることで、マウスがん細胞のNanog遺伝子座におけるエクソン4のCDSと3' 非翻訳領域（3' UTR）との間に、該レポーター遺伝子をノックインすることができる。

図10に示されるように、レポーター遺伝子として、GFP遺伝子、分泌型のNanoLuc™ルシフェラーゼ（secNluc）遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子を

含有するターゲティングベクターを作製した。CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術により、該ターゲティングベクターを用いることで、ヒトがん細胞のNanog遺伝子座におけるエクソン4のCDSと3'非翻訳領域(3' UTR)との間に、該レポーター遺伝子をノックインすることができる。

[0087] このように作製した細胞は、Nanogが発現する場合には、同時にレポーター遺伝子も発現するため、該細胞を使用することで、Nanog等の未分化特異的遺伝子の発現量を測定することなく、がん細胞の初期化を評価することができ、本発明のスクリーニング方法の使用に適している。

[0088] 以上のように、がん遺伝子シグナルによってがん細胞の特徴が維持されること、すなわちがん細胞の初期化を阻害することが示された。一方、がん遺伝子をターゲットとする抗がん剤が、がん細胞の初期化の早期段階を促進することも示された。これらの結果は、がん遺伝子シグナルを阻害する薬剤によって、がん細胞が、細胞の運命の変更に対して寛容な状態になり得ることを示している。従って、がん細胞における特定のシグナルを阻害する薬剤の初期化への影響を調べることによって、重要ながん遺伝子のシグナルを検出することが可能となる。

[0089] 本出願は、日本で出願された特許出願特願2015-77264（出願日：2015年4月3日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

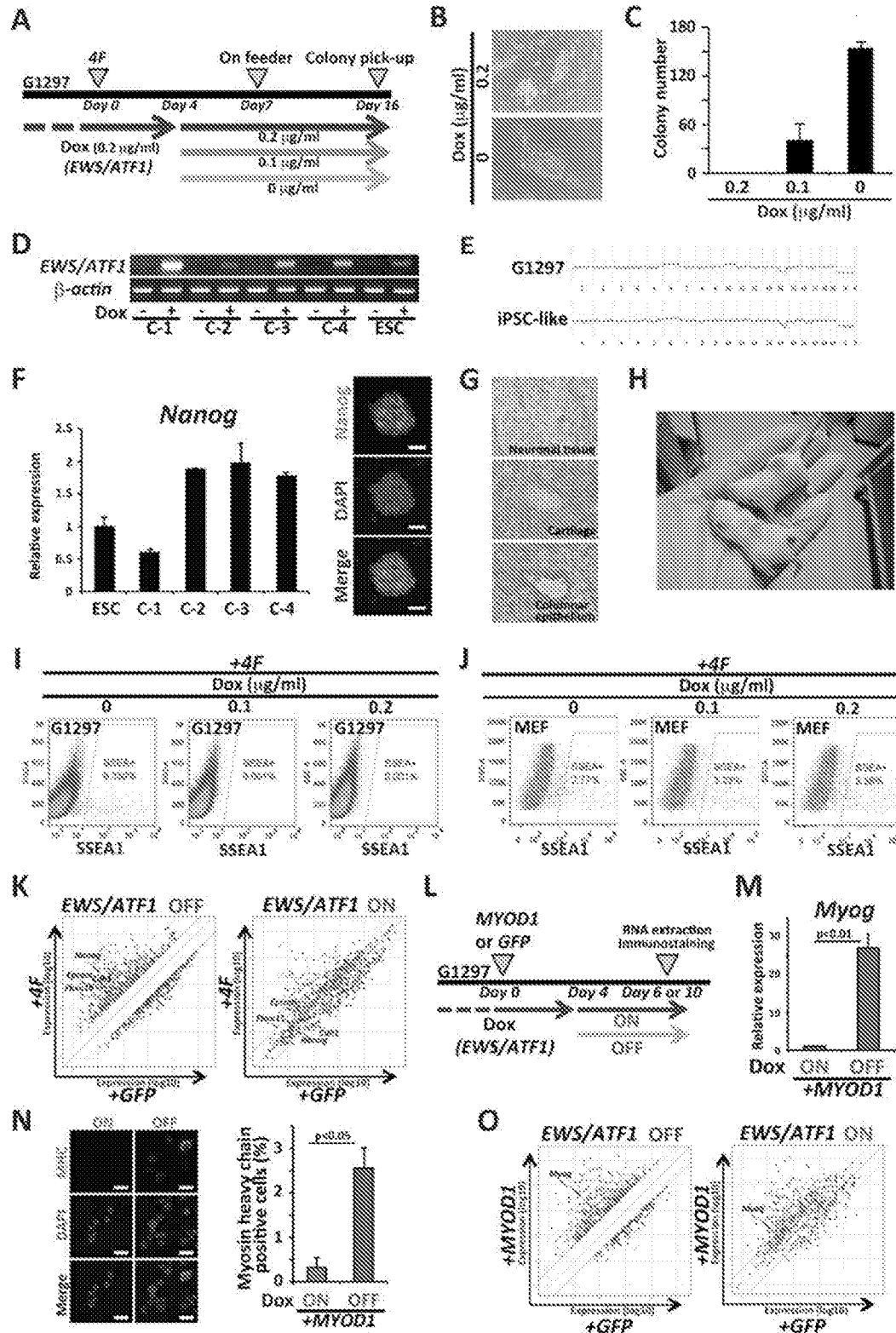
- [請求項1] 下記の工程を含む、がんの治療薬をスクリーニングする方法；
- (i) 対象となるがん細胞内で、被験物質との接触下または非接触下で、外因性の細胞制御因子を発現させる工程、
- (ii) がん細胞の変化を確認する工程、および
- (iii) 被験物質との接触下において、非接触下と比較してがん細胞の変化が増加した場合、当該被験物質をがんの治療薬として選出する工程。
- [請求項2] 前記細胞制御因子が、初期化因子であり、前記がん細胞の変化が、がん細胞の初期化である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記初期化因子が、Oct3/4、Sox2、Klf4およびc-Mycである、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記がん細胞の初期化が、未分化特異的抗原が陽性である細胞数、または当該がん細胞における未分化特異的遺伝子の発現量を指標として評価される、請求項2または3に記載の方法。
- [請求項5] 前記未分化特異的遺伝子が、Nanog、Epcam、Cdh1、Fbxo15、PODXLおよびGDF3から選択される1以上の遺伝子である、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 前記がん細胞の初期化が、形成されるコロニー数を指標として評価される、請求項2または3に記載の方法。
- [請求項7] 前記細胞制御因子が、MyoD1であり、前記がん細胞の変化が、がん細胞から筋管細胞への変化である、請求項1に記載の方法。
- [請求項8] 前記がん細胞から筋管細胞への変化が、ミオゲニン (myogenin) またはミオシン重鎖 (myosin heavy chain) の発現量を指標として評価される、請求項7に記載の方法。
- [請求項9] 下記の工程を含む、がん治療薬の創薬標的となり得るタンパク質の同定方法：
- (i) 被験タンパク質をコードする遺伝子を、発現制御可能な形態で

含むがん細胞内で、該遺伝子を発現する条件下または該遺伝子の発現が抑制された条件下で、外来性の細胞制御因子を発現させる工程、

(ii) がん細胞の変化を確認する工程、および

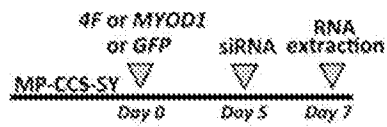
(iii) 該遺伝子の発現が抑制された条件下において、該遺伝子を発現する条件下と比較してがん細胞の変化が増加した場合、当該被験タンパク質をがんの治療薬の創薬標的となり得るタンパク質として選出する工程。

[図1]

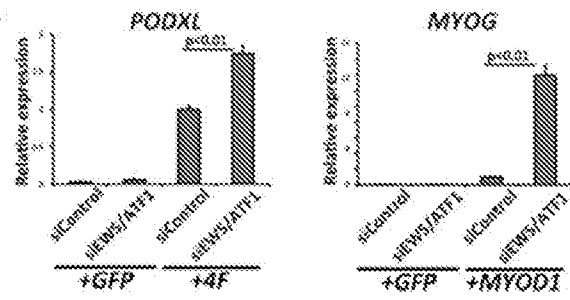


[圖2]

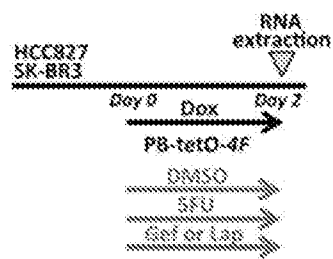
A



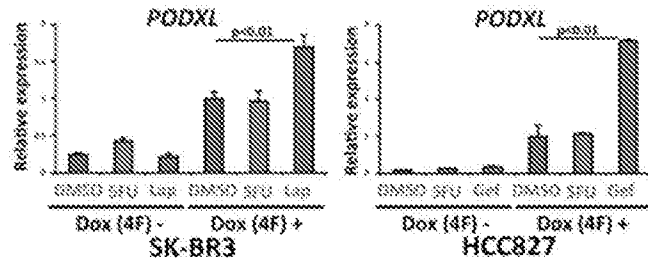
B



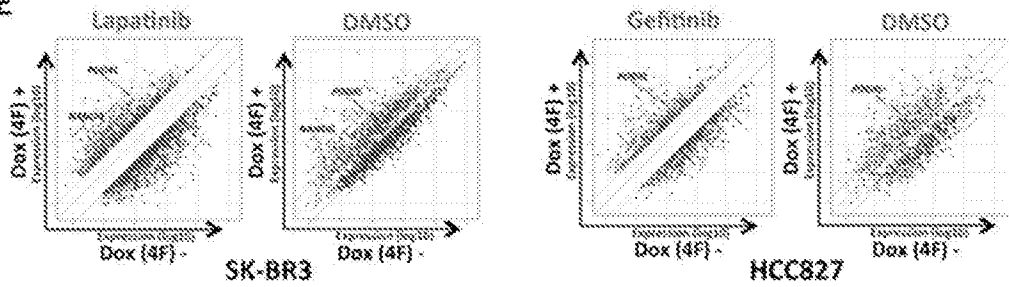
C



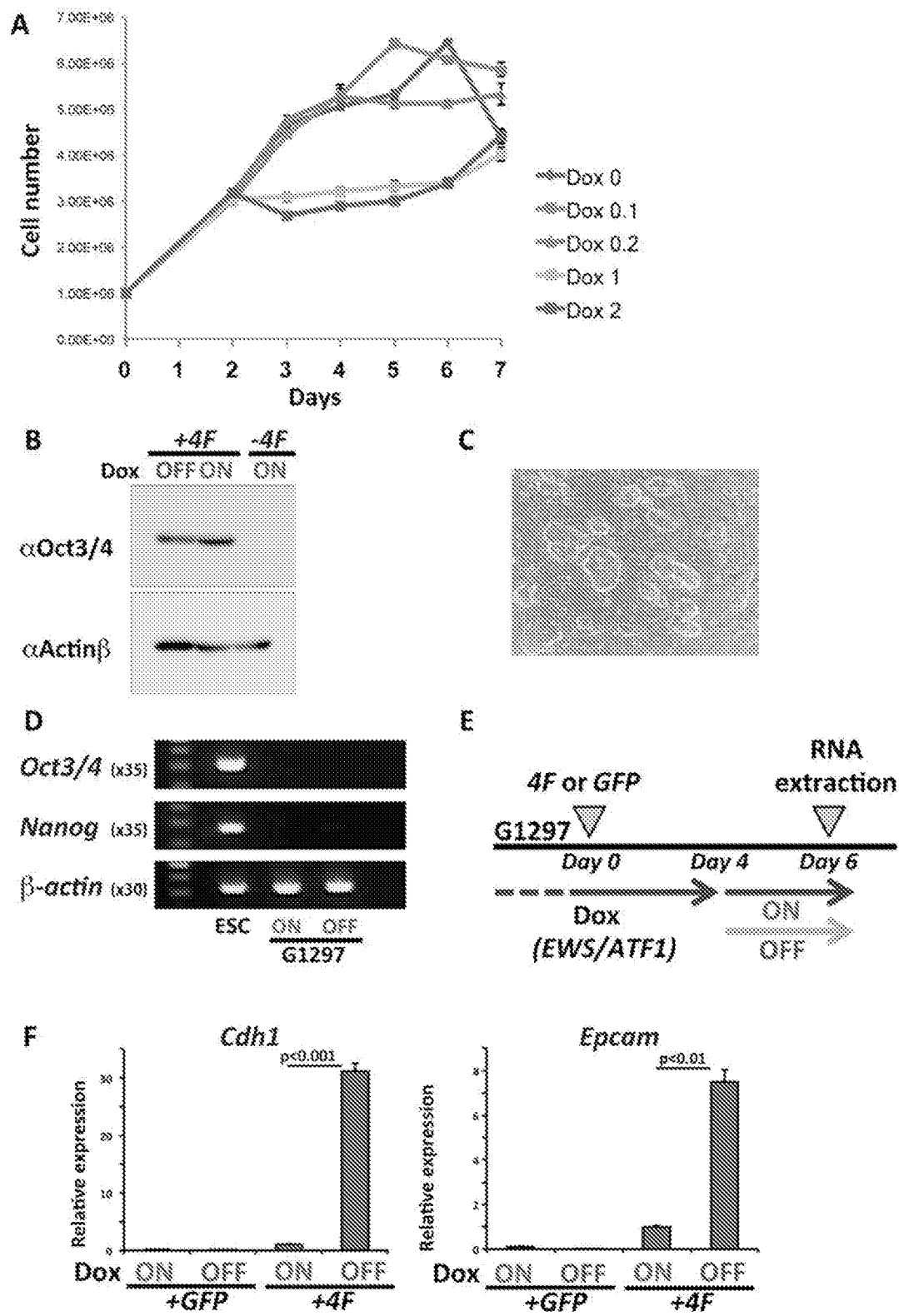
D



E

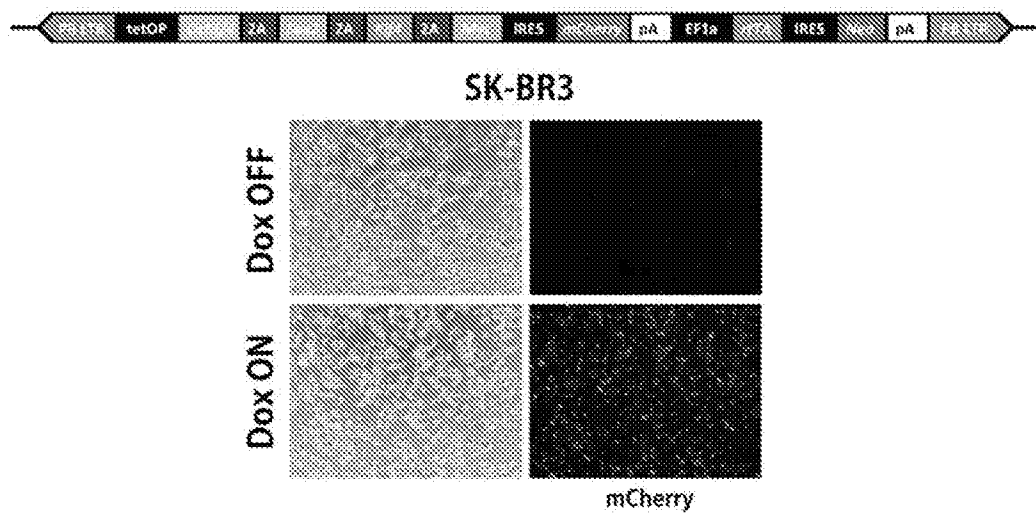


[図3]

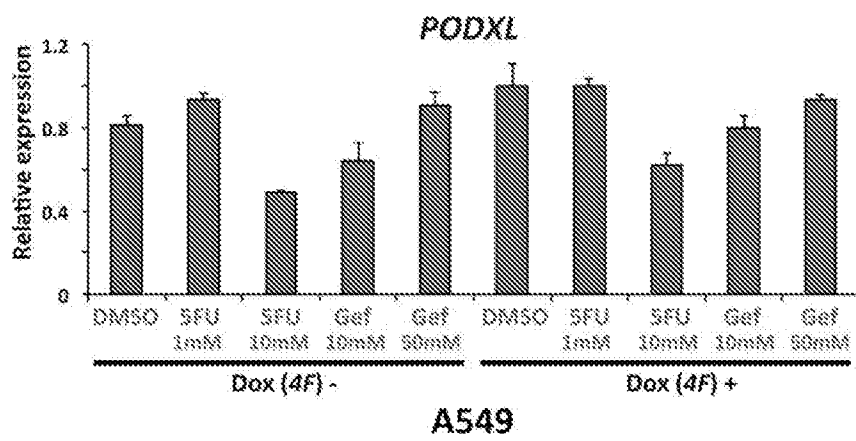


[図4]

A

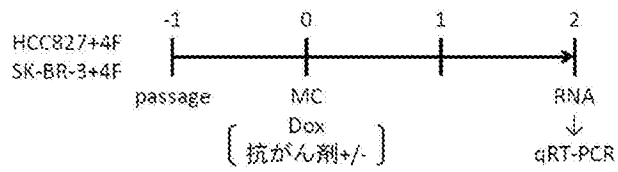


B

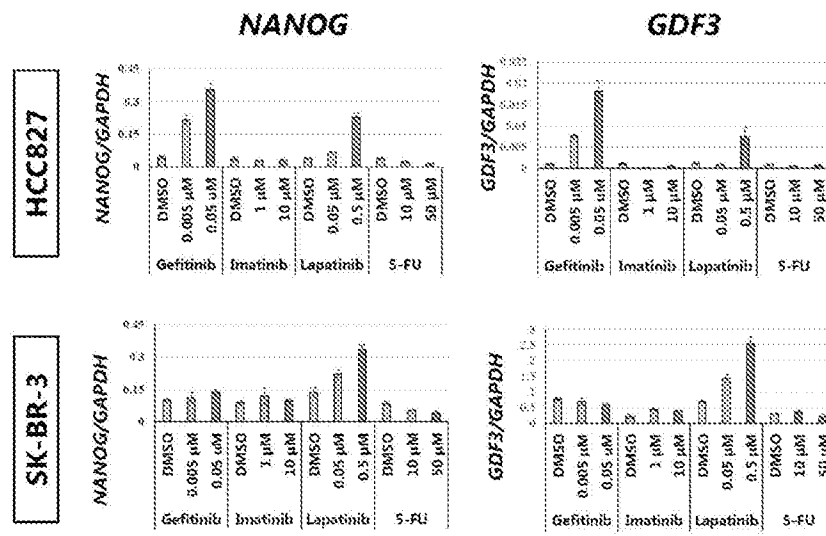


[図5]

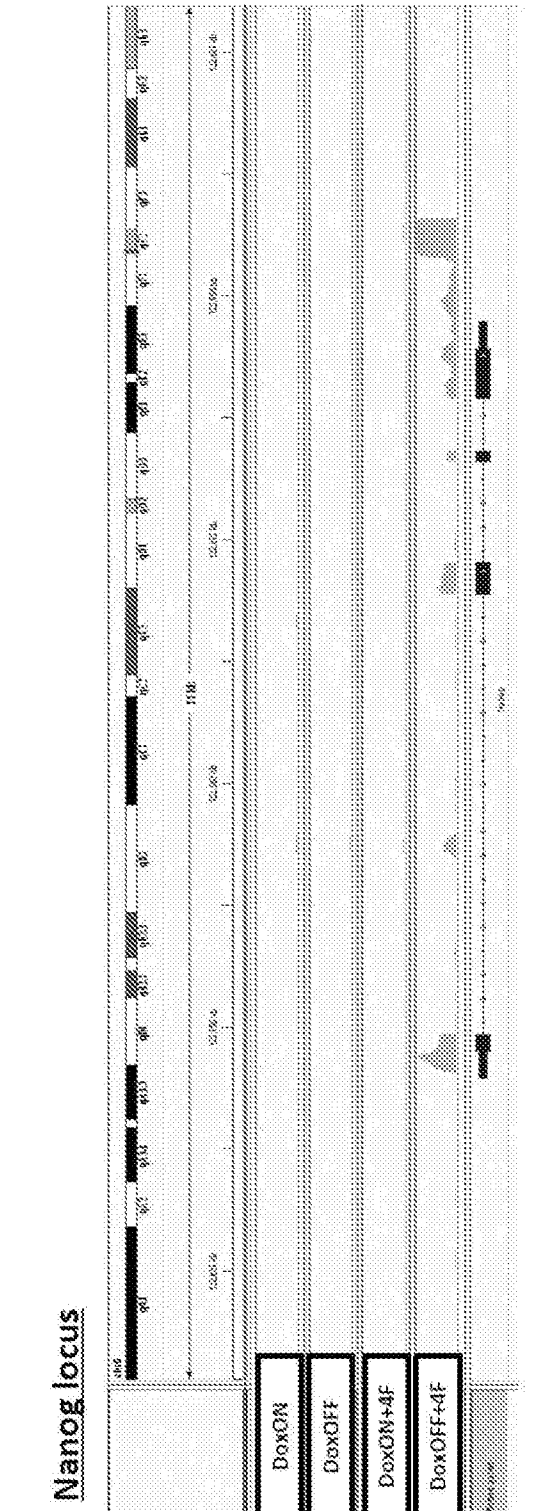
A



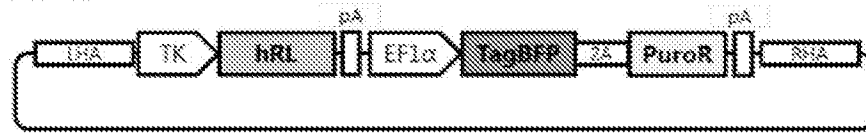
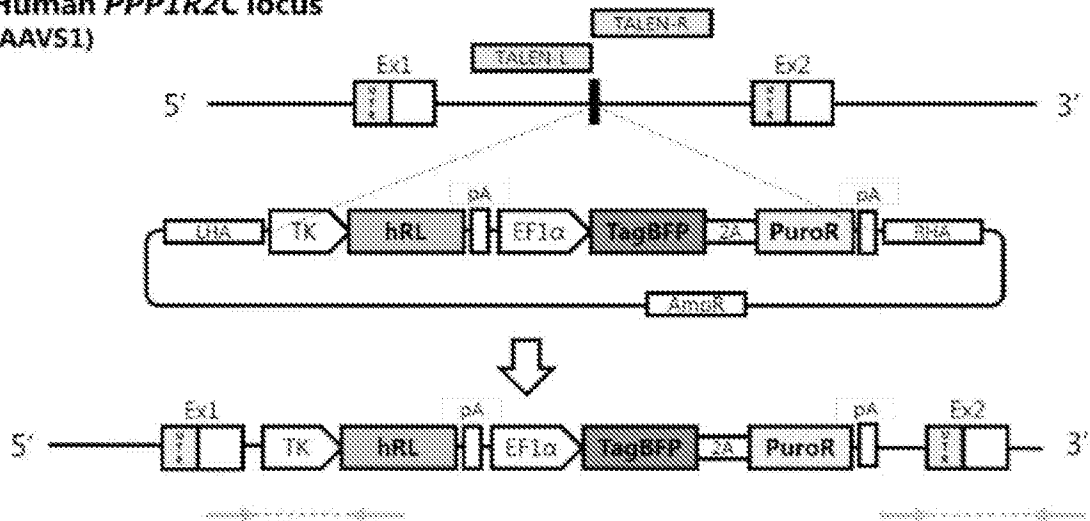
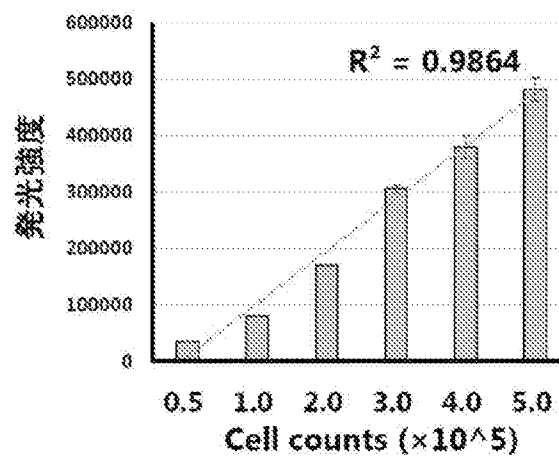
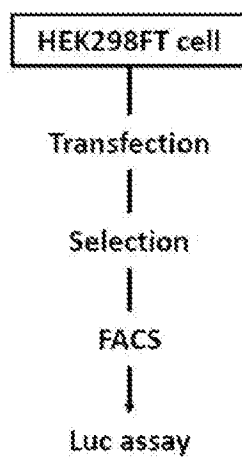
B



[図6]

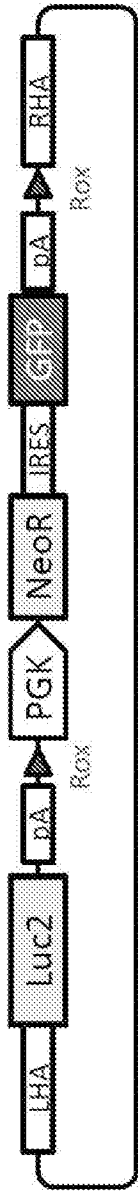


[図7]

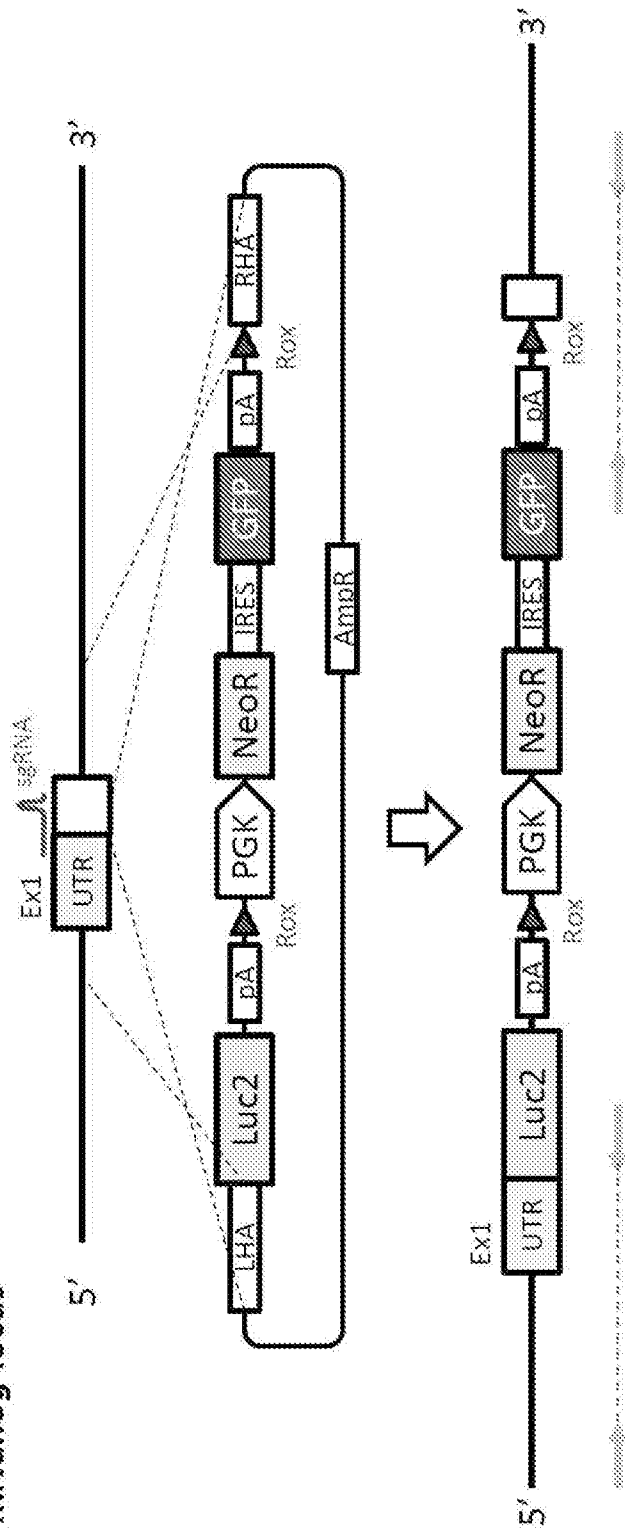
A**Targeting vector****Human *PPP1R2C* locus (AAVS1)****B**

[8]

Targeting vector

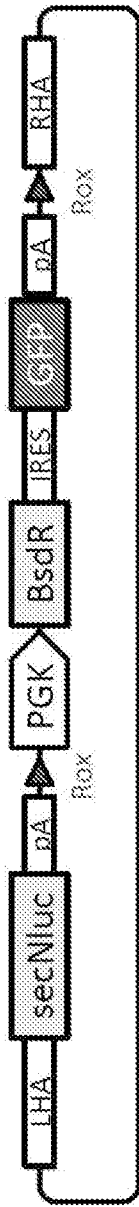


mNanog locus

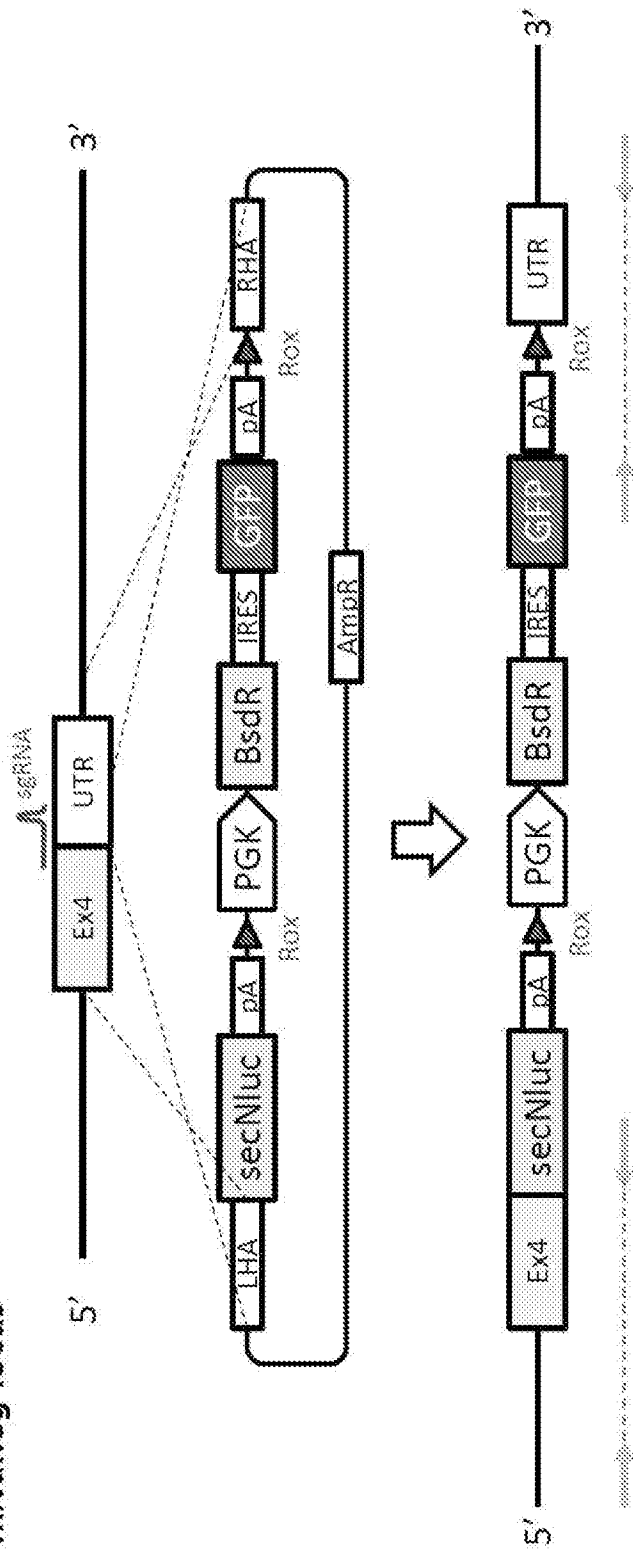


[9]

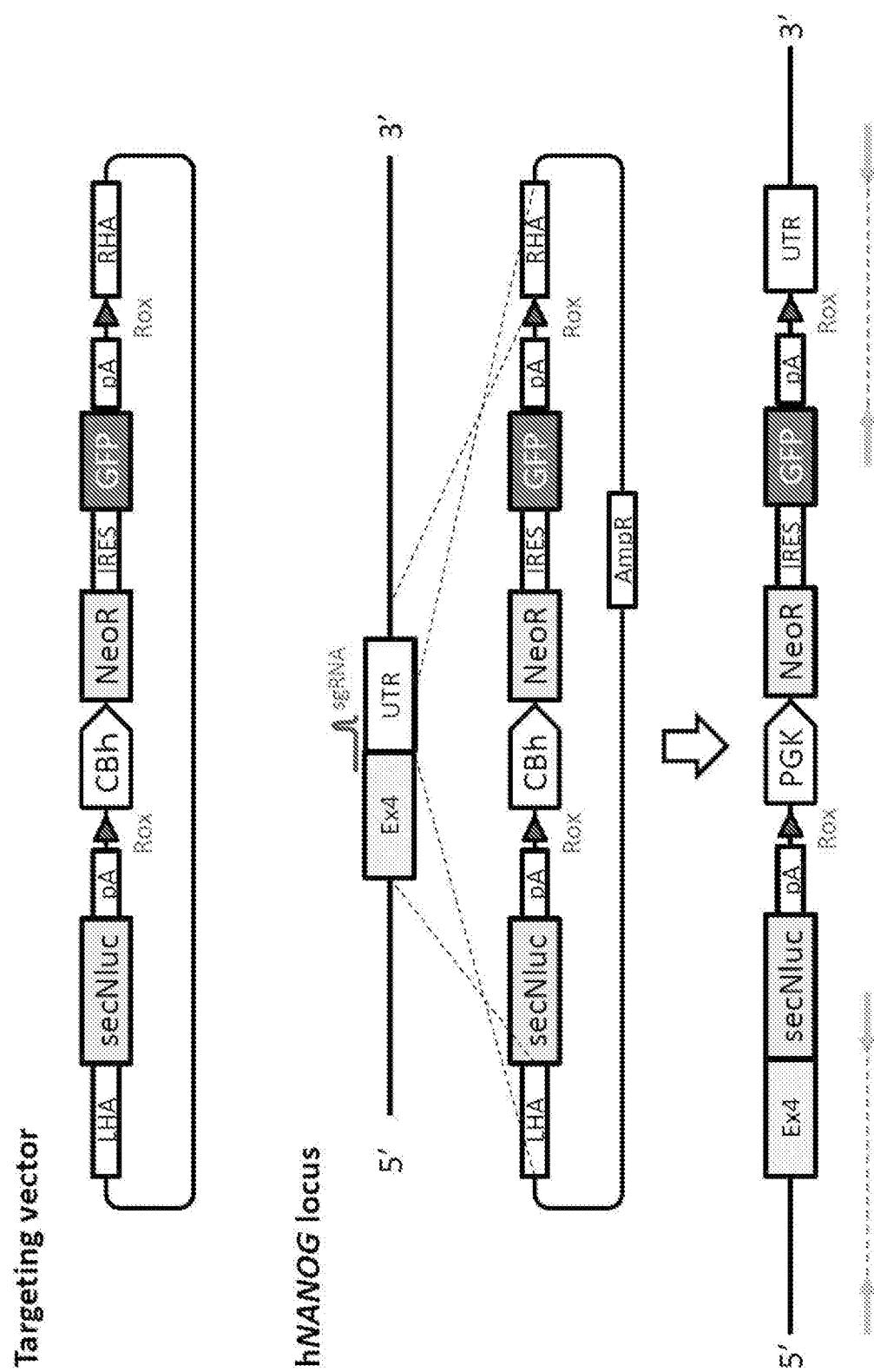
Targeting vector



mNanog locus



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/060974

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/02, C12Q1/68, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), DWPI(Thomson Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MATSUDA, Y. et al., "Application of iPS cell technology to cancer epigenome study: Uncovering the mechanism of cell status conversion for drug resistance in tumor.", PATHOLOGY INTERNATIONAL, 2014.07, Vol.64, No.7, P.299-308, ISSN 1320-5463, particularly, page 303, right column, line 40 to next page, left column, line 16, page 305, left column, line 30 to next page, left column, line 30, fig. 2 to 3	1-9
X	Katsunori SEMI et al., "Reprogramming Gijutsu o Mochiita Gan Epigenome Kenkyu", Experimental Medicine, 2014.12, vol.32, no.19, pages 3061 to 3065, ISSN 0288-5514, particularly, page 3061, lower right column, line 10 to next page, right column, line 11	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 June 2016 (20.06.16)

Date of mailing of the international search report
28 June 2016 (28.06.16)

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/060974

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/126993 A1 (MCMASTER UNIVERSITY), 06 September 2013 (06.09.2013), claims 1 to 93 & JP 2015-515261 A & US 2013/0065887 A1 & EP 2820148 A1	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/02, C12Q1/68, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), DWPI (Thomson Innovation)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	MATSUDA, Y. et al., "Application of iPS cell technology to cancer epigenome study: Uncovering the mechanism of cell status conversion for drug resistance in tumor.", PATHOLOGY INTERNATIONAL, 2014.07, Vol.64, No.7, P.299-308, ISSN 1320-5463, 特に 303 頁右欄 40 行一次頁左欄 16 行、305 頁左欄 30 行一次頁左欄 30 行、図 2-3	1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.06.2016

国際調査報告の発送日

28.06.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

野村 英雄

4 B

4155

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	蟬克憲、外 1 名, 「リプログラミング技術を用いたがんエピゲノム研究」, 実験医学, 2014. 12, Vol. 32, No. 19, P. 3061-3065, ISSN 0288-5514, 特に 3061 頁右下欄 10 行一次頁右欄 11 行	1 - 9
A	WO 2013/126993 A1 (MCMASTER UNIVERSITY) 2013. 09. 06, 請求項 1-93 & JP 2015-515261 A & US 2013/0065887 A1 & EP 2820148 A1	1 - 9