

(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
2017年8月24日(24.08.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/141987 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/005588
- (22) 国際出願日: 2017年2月15日(15.02.2017)
- (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 2016-030419 2016年2月19日(19.02.2016) JP
- (71) 出願人: コニカミノルタ株式会社(KONICA MINOLTA, INC.) [JP/JP]; 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 郷田 秀樹(GOUDA, Hideki); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP). 白石 武嗣(SHIRAIISHI, Takeshi); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP). 磯田 武寿(ISODA, Takeshi); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP). 小山 昇(KOYAMA, Noboru); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP). 岡田 尚大(OKADA, Hisatake); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 S S I N P A T (SSINPAT PATENT FIRM); 〒1410031 東京都品川区西五反田七丁目13番6号 五反田山崎ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: NON-CLINICAL TEST METHOD CHARACTERIZED BY QUANTITATIVE EVALUATION OF EXPERIMENTAL ANIMAL SPECIMEN

(54) 発明の名称: 実験動物検体を定量評価することを特徴とする、非臨床試験方法

(57) Abstract: Provided is a non-clinical test method characterized by including a step for: performing quality control of an experimental animal, such as a tumor-bearing mouse, having a transplanted tumor site, or another experimental animal having a lesion site; or specifying a profile of a lesion site, for example a transplanted tumor site of an experimental animal, by a quantitative technique, using a specimen collected from such an experimental animal.

(57) 要約: 担腫瘍マウスのように移植された腫瘍部を有する実験動物、その他の病変部を有する実験動物の品質管理や、そのような実験動物から採取された検体を使用して、実験動物の病変部、例えば移植された腫瘍部のプロファイルを定量的な手法により特定する工程を含むことを特徴とする、非臨床試験方法。



WO 2017/141987 A1

明 細 書

発明の名称：

実験動物検体を定量評価することを特徴とする、非臨床試験方法

技術分野

[0001] 本発明は、実験動物を使用して行われる、薬剤またはその候補物質の薬効や副作用などを評価するための、非臨床試験方法に関する。

背景技術

[0002] がんの研究では、ヒト由来のがん（腫瘍）細胞もしくは組織を実験動物に移植して作製されるモデル動物、例えばマウスを実験動物として用いて作製される担腫瘍マウスを、生体内の環境を再現した実験系として用いることがある。

[0003] 担腫瘍マウスとしては、患者から取り出した腫瘍細胞に由来する培養細胞をマウスに植え付け、マウス内で成長させることによって作製された培養がん細胞移植マウスや、患者から取り出した腫瘍組織または腫瘍細胞をマウスに植え付け、マウス内で成長させることによって作製された患者腫瘍組織移植マウス等が知られている。このような担腫瘍マウスを用いることにより、ヒトを対象とする試験の前に行われる、創薬研究または非臨床試験の段階でも、薬剤またはその候補物質の薬効や安全性（毒性）を調べることができる。また、様々な性質のがん患者由来のマウスを作製することができるので、比較評価することにより効果のある患者のプロファイルを見出すことも可能である。

[0004] 培養がん細胞移植マウスは、試験管で培養して安定化した、マウスへの移植が容易な細胞を用いて作製できるので、古典的に実験動物としての地位が確立されている。このクローン化した細胞を移植したマウスはクローン的要素を引き継ぎ、個体差の少ない担腫瘍マウスを使用したい試験には好適である。

[0005] 一方、患者腫瘍組織移植マウスは、患者から取り出した腫瘍組織（腫瘍部

）または腫瘍細胞を直接マウスに植え付けることで作製される。患者（ヒト）由来の腫瘍組織を獲得免疫不全マウスに植え付けて、一定期間、マウス等の体内で成長させることで作製した患者腫瘍組織移植マウスは P D X（Patient-derived tumor xenograft（患者由来腫瘍異種移植片））モデルマウスと呼ばれている。

[0006] このようにして作製される P D X モデルマウスには、試験管内で培養した細胞は用いられないため、従来の担腫瘍マウスよりも実際のヒトの病態を高度に再現した形で、薬効や安全性を評価することができると考えられている。近年では P D X モデルマウスを用いた非臨床的な試験方法による、診断・治療方法（診断または治療のための指標を得る方法）の開発が盛んになってきている。がん細胞の複雑さがそれを生み出す成因（遺伝子変異など）を含めて維持された担腫瘍マウスによる試験の重要性が認識され、またその複雑さが繰り返し再現されるようにすることが望ましいと考えられるようになったためである。なお、P D X モデルは、マウスに限らず様々な実験動物について作製することが可能である。

[0007] ところで、P D X モデルの実験動物においても実際には、継代することで、腫瘍部に含まれるがん細胞の形質（発現遺伝子および発現タンパク質）が完全に保持されるとは限らず、変化が起きることが分かってきた。例えば、非特許文献 1 には、膀胱がんの P D X モデルマウスを作製したことが記載されているが、患者の違いやタンパク質の種類によって、元の患者の検体から形質が大きく変化するもの、変化しないもの、また継代によって徐々に変化するものなど、様々な様子が示されている（例えば Figure 3 参照）。すなわち、P D X モデルの実験動物は継代によって腫瘍の遺伝情報を引き継ぐものの、培養がん細胞移植モデルほどクローン化されておらず、したがって初代 P D X モデル動物と継代 P D X モデル動物の間においては腫瘍細胞の形質が必ずしも完全に保持されているわけではなく、同じ系統の P D X モデル動物であっても個体ごとにばらつきが生じることとなる。

[0008] 非特許文献 1 では、P D X モデルマウスの腫瘍組織におけるタンパク質の

発現量を IHC（免疫組織化学）法によって評価している。IHC法では、目的とするタンパク質（抗原）に酵素標識された抗体を直接法または間接法により結合させた後、基質を反応させて発色させる方法、例えば、ペルオキシダーゼおよびジアミノベンジジンを用いる DAB 染色法を用いることが一般的であった。

[0009] しかしながら、IHC法における DAB 染色のような酵素による染色は、染色濃度が温度・時間などの環境条件により大きく左右されるため、染色濃度から実際の抗原等の量を正確に見積もることが難しいという問題がある。また、非特許文献 1 に示されているように評価は染色濃度などに基づいて数段階のスコアで表される場合が多く、定量的というよりは定性的な評価に近いものであった。

[0010] 現在のところ、アカデミアの研究においては、非特許文献 1 のように、IHC（免疫組織化学）法による患者および PDX マウスの腫瘍組織におけるタンパク質の発現量を定性的に分析しているにすぎない。また、マウス提供会社や試験受託会社においても、タンパク質の発現量を正確に評価することについてほとんど関心を示していない。PDX マウスの腫瘍組織等におけるタンパク質の発現量等を定量的に正確に把握することの技術的意義はまだ知られていないといえる。

[0011] 近年、タンパク質を標識するために、ナノサイズの蛍光粒子、例えば蛍光色素や量子ドットなどの蛍光体を樹脂等を母体として集積させた粒子（蛍光体集積粒子、Phosphor Integrated Dot : PID）を用いる方法が提案され、実用化が進められている。蛍光体集積粒子を用いて目的とするタンパク質を標識し、蛍光物質に適合する励起光を照射することで、タンパク質が輝度の高い輝点として観察することが可能となることから、発現しているタンパク質の量を定量的に評価することができ、またその位置を高い精度で示すことができる。また褪色しにくいため比較的長時間にわたって観察や撮像が可能となる。例えば、国際公開 WO 2012/029752 号パンフレット（特許文献 1）、国際公開 WO 2013/035703 号パンフレット（特許文

献2) などには、蛍光体集積粒子（蛍光物質集積ナノ粒子と呼ばれることもある）を用いて目的とするタンパク質の免疫染色を行う方法が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1：国際公開WO 2012/029752号パンフレット

特許文献2：国際公開WO 2013/035703号パンフレット

非特許文献

[0013] 非特許文献1：Jager et al., Patient-derived bladder cancer xenografts in the preclinical development of novel target therapies. *Oncotarget*, Vol.6, No. 25, 21522-21532

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0014] 前述したようにPDXモデルマウス等の患者腫瘍組織移植動物においては腫瘍細胞の形質が完全に保持されないことから、同じ系統のモデル動物であってもその形質にはばらつきがあり、品質管理が十分とは言えない状況にある。そのようなPDXマウスを用いて薬効等の試験を行っても、患者において起こりうる結果がマウスにおいて再現できているか否かが曖昧であり、試験結果の分析が確実なものではないという可能性が存在する。そのような曖昧さを避けるためには、通常、5匹程度のPDXマウスを一群として試験計画を立てる必要がある。これがPDXマウスが当初考えられていたほど浸透していない一因となっているのではないかと考えられる。

[0015] 本発明は、上記問題に鑑みてなされたものであって、PDXマウスのように移植された腫瘍部を有する実験動物の品質管理や、そのような実験動物を用いた試験結果の分析をより正確に行うための手段を提供することを課題とする。なお、そのような手段は、PDXマウスを含む担腫瘍マウスにおける問題にかぎらず、アルツハイマー病モデルマウス、糖尿病モデルマウス、遺

伝病モデルマウス、感染症モデルマウスなど、その他の病変モデル動物（特にマウス）における同様の問題を解決する手段となりえるものとする。

課題を解決するための手段

[0016] 発明者らは、実験動物から採取された検体を使用して、移植された実験動物の腫瘍部のプロファイルを定量的な手法、好ましくは蛍光体集積粒子のような蛍光ナノ粒子を用いた免疫染色法により特定し、例えば目的とするタンパク質の細胞あたりの平均発現量や、タンパク質の細胞あたりの発現量とそれに対応する細胞数（頻度）によって表されるヒストグラムなどから分かる情報を利用することで、上述したような品質管理や試験結果の分析をより正確に行うことができることを見出すに至った。さらに、このような担腫瘍動物（マウス）に対する非臨床試験方法は、前述したようなその他のモデル動物に対しても応用可能であることを見出した。

[0017] すなわち、本発明は一つの側面において、実験動物（病変モデル動物）から採取された検体を使用して、実験動物の病変部、例えば移植された腫瘍部のプロファイルを定量的な手法により特定する工程を含むことを特徴とする、非臨床試験方法を提供する。

発明の効果

[0018] 本発明により、PDXマウス等の各種のモデルマウスの実験動物の品質管理や、そのような実験動物を用いた試験結果の分析を、これまでにない高い水準で正確に行うことができる。それにより、実験動物を用いた非臨床試験が様々な場面で積極的に活用されることが期待できる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]図1は、実施例3において、患者の乳がん組織を移植した第1世代マウス（P1）の腫瘍部について測定した、細胞あたりの粒子数および頻度（細胞数）のヒストグラムである。

[図2]図2は、実施例3において、第2世代マウス1（P2-1）の腫瘍部について測定した、細胞あたりの粒子数および頻度（細胞数）のヒストグラムである。

[図3]図3は、実施例3において、第2世代マウス2（P2-2）の腫瘍部について測定した、細胞あたりの粒子数および頻度（細胞数）のヒストグラムである。

[図4]図4は、実施例3において、P2-1から作製した第3世代マウス1（P3-1）の腫瘍部について測定した、細胞あたりの粒子数および頻度（細胞数）のヒストグラムである。

[図5]図5は、実施例3において、P2-2から作製した第3世代マウス2（P3-2）の腫瘍部について測定した、細胞あたりの粒子数および頻度（細胞数）のヒストグラムである。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明の非臨床試験方法は、実験動物から採取された検体を使用して、実験動物の病変部のプロファイルを定量的な手法を用いて特定する工程（本明細書において「病変部プロファイル特定工程」と称することがある。）を含む。

[0021] 病変部は、例えば実験動物がPDXモデルマウスなどの担腫瘍動物モデルである場合、移植された腫瘍部である。この場合、上記「病変部プロファイル特定工程」は「移植後プロファイル特定工程」と呼ぶことができる。

[0022] 「腫瘍部」は、「ヒト由来の腫瘍組織または腫瘍細胞」を含む部位であり、そこから「検体」が採取される。腫瘍部には通常、ヒト由来の腫瘍組織または腫瘍細胞とともに、「ヒト由来の腫瘍組織以外の物質」も含まれている。

[0023] 「実験動物から採取された検体」は、一般的には、免疫染色法により目的タンパク質の発現量を評価する場合などで慣用されているように、例えば病理診断において、免疫染色法により目的とするタンパク質の発現量を評価する際などに従来慣用されているような、所定の手順に従って作製された標本スライドの形態をとる。本発明の非臨床試験方法は、そのような検体を用いて、実験動物の生体外において実施される。

[0024] 本発明における「プロファイル」とは目的タンパク質の発現量や、目的タ

ンパク質を発現している細胞の種類、数、形態、発現部位（実験動物として担腫瘍動物モデルを用いる場合には、腫瘍組織または腫瘍部内の分布、専有面積）等の情報によって形作られる特徴をいう。

[0025] 本発明のプロファイルにおいて特定される目的タンパク質は、検体に含まれる細胞が発現するものであれば特に限定されるものではないが、それらの細胞において多量に発現するものが好ましい。特定の1種類のタンパク質を目的タンパク質としてもよいし、2種類以上のタンパク質を目的タンパク質としてもよい。

[0026] 本発明の好ましい実施形態の一例において、目的タンパク質は、すでに開発されている分子標的薬のターゲットとなるマーカーであり、特定すべきプロファイルは、当該マーカーの発現量および前記腫瘍組織または腫瘍部内の発現分布を含む。そのようなマーカーとしては様々なものが知られているが、例えば、HER2、HER3、PD-L1、PD-1、CTLA-4、EGFR、VEGFRなどが挙げられる。

[0027] 本発明の好ましい実施形態の一例において、目的タンパク質は、リン酸化されたタンパク質であり、特定すべきプロファイルは、当該リン酸化されたタンパク質の発現量および前記腫瘍組織または腫瘍部内の発現分布を含む。そのようなリン酸化タンパク質としては、例えば、HER2、HER3、EGFR、VEGFRなどが挙げられる。リン酸化型タンパク質は、免疫染色の際に、目的タンパク質のうちリン酸化型のもののみを特異的に認識する抗体を用いることによって定量することができる。なお、リン酸化型か非リン酸化型かに関わらず目的タンパク質全体を定量したい場合は、それらを区別せずに認識する抗体を用いればよい。

[0028] 検体が腫瘍組織または腫瘍部である場合、そこに含まれる細胞には腫瘍細胞だけでなく、腫瘍細胞以外の細胞、例えば腫瘍細胞と相互作用する免疫細胞のような細胞も含まれる。したがって本明細書における目的タンパク質は、腫瘍細胞におけるがん関連タンパク質および／または免疫細胞におけるタンパク質を含むことが好ましい。

[0029] (腫瘍細胞におけるがん関連タンパク質)

「がん関連タンパク質」としては、代表的には「がん細胞における免疫系タンパク質」、「がん細胞におけるパスウェイ系タンパク質」、「がん細胞における転移系タンパク質」が挙げられる。それぞれに分類されるがん関連タンパク質には様々なものが知られており、診断または治療の目的に応じて適切なものを選択することができ、特に限定されるものではない。なお、nCounterが提供するがん関連遺伝子発現パネルには、免疫系(Immune)遺伝子パネル、パスウェイ系(Pathway)遺伝子パネル、転移系(Progression)遺伝子パネルのそれぞれについて770の遺伝子がカバーされており、それらの遺伝子がコードしているタンパク質は、それぞれがん細胞における免疫系タンパク質、パスウェイ系タンパク質、転移系タンパク質に該当する。また、これらの遺伝子の変異遺伝子に対応する変異タンパク質も、免疫系タンパク質、パスウェイ系タンパク質、転移系タンパク質に含むことができる。

[0030] 「がん細胞における免疫系タンパク質」としては、例えば、免疫チェックポイントタンパク質であるCD40、TL1A、GITR-L、, 4-188-L、CX4D-L、CD70、HLA2、ICOS-L、CD85、CD86、CD80、MHC-II、PDL1、PDL2、VISTA、BTNL2、B7-H3、B7-H4、CD48、HVEM、CD40L、TNFRSF25、GITR、4-188、OX40、CD27、TMIGD2、ICOS、CD28、TCR、LAG3、CTLA4、PD1、CD244、TIM3、BTLA、CD160、LIGHTなどが挙げられる。

[0031] 「がん細胞におけるパスウェイ系タンパク質」としては、例えば、がん細胞増殖因子あるいはがん細胞増殖因子受容体であるEGFR(HER1)、HER2、HER3、HER4、IGFR、HGFR；細胞表面抗原、血管増殖因子あるいは血管増殖因子受容体であるVEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、PIGF-1、PIGF-2；サイトカインあるいはサイトカイン受容体であるインターフェロン、イン

ターロイキン、G-CSF、M-CSF、EPO、SCF、EGF、FGF、IGF、NGF、PDGF、TGFなどが挙げられる。

[0032] 「がん細胞における転移系タンパク質」としては、例えば、がん転移マーカーであるACTG2、ALDOA、APC、BRMS1、CADM1、CAMK2A、CAMK2B、CAMK2D、CCL5、CD82、CDKN1A、CDKN2A、CHD4、CNN1、CST7、CTSL、CXCR2、YBB、DCC、DENR、DLC1、EGLN2、EGLN3、EIF4E2、EIF4EBP1、ENO1、ENO2、ENO3、ETV4、FGFR4、GSN、HK2、HK3、HKDC1、HLA-DPB1、HUNKIL11、KDM1A、KISS1、LDHA、LIFR、MED23、MET、MGAT5、MAP2K4、MT3、MTA1、MTBP、MTOR、MYCL、MYH11、NDRG1、NF2、NFKB1、NME1、NME4、NOS2、NR4A3、PDK1、PEBP4、PFKFB1、PFKFB4、PGK1、PLAUR、PTTG1、RB1、RORB、SET、SLC2A1、SNRPF、SSTR2、TCEB1、TCEB2、TCF20、TF、TLR4、TNFSF10、TP53、TSHR、MMP、MMP2、MMP10、HIF1などが挙げられる。

[0033] (免疫細胞におけるタンパク質)

「免疫細胞におけるタンパク質」としては、例えば、PD-1、CTLA-4、TIM3、Foxp3、CD3、CD4、CD8、CD25、CD27、CD28、CD70、CD40、CD40L、CD80、CD86、CD160、CD57、CD226、CD112、CD155、OX40 (CD134)、OX40L (CD252)、ICOS (CD278)、ICOSL (CD275)、4-1BB (CD137)、4-1BBL (CD137L)、2B4 (CD244)、GITR (CD357)、B7-H3 (CD276)、LAG-3 (CD223)、BTLA (CD272)、HVEM (CD270)、GITRL、ガレクチン-9 (Galectin-9)、B7-H4、B7-H5、PD-L2、KLRG-1、E-Cadherin

n、N-Cadherin、R-CadherinおよびIDO、TDO、CSF-1R、HDAC、CXCR4、FLT-3、TIGITが挙げられる。

[0034] (間質に含まれるタンパク質)

また、本明細書における目的タンパク質は、腫瘍細胞および免疫細胞以外の細胞において発現するタンパク質であってもよい。腫瘍細胞および免疫細胞以外の細胞において発現するタンパク質の具体例としては、間質に含まれるタンパク質が挙げられる。

[0035] 「間質」は主に、線維芽細胞、内皮細胞、白血球（リンパ球、単球、好中球、好酸球、好塩基球）などの間質細胞と、コラーゲン、プロテオグリカンなどのタンパク質からなる細胞外マトリックスとによって構成される。間質細胞および細胞外マトリックスのどちらの量を測定してもよいが、実験動物が担持するヒト由来の腫瘍細胞の形質に対する影響がより大きいと考えられる、間質細胞の量を測定することが好ましく、代表的な間質細胞である線維芽細胞において発現するタンパク質の量を測定することがより好ましい。

[0036] 例えば実験動物がPDXモデルマウスなどの担腫瘍動物モデルである場合、腫瘍部に含まれる「間質」は、典型的には、「実験動物由来の間質」または「ヒト由来の腫瘍組織の間質」である。実験動物由来の間質は、実験動物の生体内に腫瘍部が保持されている間に、ヒト由来の腫瘍組織の間質に混入したものである。一方、ヒト由来の腫瘍組織の間質は、実験動物にヒト（患者）から採取した腫瘍組織を移植した際にそこに含まれていたものに由来する。腫瘍組織ないし検体中に占める実験動物由来の間質の割合が大きいほど、相対的にヒト由来の腫瘍組織の間質の割合は小さくなる。

[0037] 間質細胞に含まれるタンパク質としては、例えば間質細胞マーカーである、以下に示すような膜タンパク質の中から適切なものを選択して利用することができる。なかでも、CD140aは、線維芽細胞、巨核球、単球、赤血球、骨髓系前駆細胞、内皮細胞などの細胞表面に発現する膜タンパク質であり、本発明における間質細胞マーカーとして好ましい。

- CD106 (VCAM-1, INCAM-110; CD49d/CD29-L) …活性化血管内皮細胞、DC
- CD109 (Platelet activation factor, 8A3, E123) …活性化T細胞、血小板、血管内皮、巨核球、CD34+前駆細胞サブセット
- CD140a (PDGF-R, PDGFR2) …繊維芽細胞、巨核球、単球、赤血球、骨髓系前駆細胞、内皮細胞
- CD140b (PDGF-R, PDGFR1) …内皮細胞、ストローマ細胞
- CD141 (Thrombomodulin) …血管内皮、骨髓系細胞、血小板、平滑筋
- CD142 (Tissue Factor(TF), Thromboplastin) …上皮細胞、活性化単球、活性化血管内皮
- CD143 (ACE; アンジオテンシン転換酵素) …血管内皮、上皮細胞、活性化マクロファージ
- CD144 (VE-Cadherin, Cadherin-5 : 血管内皮の透過性に関与) …血管内皮
- CD145 (7E9, P7A5) …内皮細胞
- CD146 (MUC18, s-endo, Mel-CAM) …血管内皮、活性化T細胞、黒色腫
- CD147 (Basigin, M6, EMMRRIN) …白血球、赤血球、血管内皮、血小板
- CD201 (EPCR : プロテインCレセプター) …血管内皮
- CD202 (TIE2, TEK; Angiopoietin-1-R) …血管内皮、造血幹細胞サブセット
- CD280 (Endo180, TEM22, uPARAP(uPAR-associated protein); 骨髓前駆細胞, 繊維芽細胞, 内皮細胞サブセット, マクロファージサブセット
- CD299 (DC-SIGN-related, L-SIGN(Liver/Lympho node specific ICAM3-grabbing nonintegrin)) …内皮細胞
- CD309 (VEGFR2: Vascular endothelial growth factor receptor2, KDR) …内皮細胞、巨核球、血小板、幹細胞サブセット
- CD322 (JAM2: Junctional adhesion molecule 2) …内皮細胞、単球、B細胞、T細胞サブセット
- CD331 (FGFR1: Fibroblast growth factor receptor1) …繊維芽細胞、上皮細胞
- CD332 (FGFR2, Keratinocyte growth factor receptor) …上皮細胞

CD333 (FGFR3, JTK4; Achondroplasia, Thanatophoric dwarfism) …繊維芽細胞、上皮細胞

CD334 (FGFR4, JTK2, TKF) …繊維芽細胞、上皮細胞

CD339 (Jagged-1, JAG1; Alagille syndrome) …ストローマ細胞、上皮細胞。

[0038] (実験動物)

本発明における「実験動物」は、非臨床試験方法の目的に応じて様々な実験動物、特に病変モデル動物を使用することができる。実験動物としては、例えば、腫瘍細胞または腫瘍組織に由来して生体内で生成した腫瘍部をあらかじめ保持している担腫瘍動物が挙げられるが、その他にも、アルツハイマー病モデルマウス、糖尿病モデルマウス、遺伝病モデルマウス、感染症モデルマウスなど、様々な病変モデル動物を本発明の対象とすることができる。動物種の例としては、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、スナネズミ、ハムスター、フェレット、イヌ、ミニブタ、サル、ウシ、ウマ、ヒツジなど、ある程度の遺伝学的な制御がなされており、均質な遺伝的要件を備えている動物が挙げられる。

[0039] 実験動物として担腫瘍動物モデルを用いる場合、実験動物に腫瘍部を保持させるための手法は特に限定されるものではなく、公知の手法を用いることができる。

[0040] 例えば担腫瘍モデルマウスは、大きく自然誘発腫瘍マウス、培養がん細胞移植マウス、患者腫瘍組織移植マウスの3つに分類できる（下記表参照；Kohrt et al., Defining the optimal murine models to investigate immune checkpoint blockers and their combination with other immunotherapies, Annals of Oncology 00: 1-9, 2016）。

[0041] 培養がん細胞移植マウスは患者から取り出した腫瘍細胞に由来する培養細胞を移植して作成される。ヒトに由来する培養がん細胞が移植されたマウスとしては、CDX (Cell-line derived xenograft) モデルマウスが挙げられ、ヒト(患者)に由来する腫瘍組織が移植されたマウスとしては、PDX (Patient

derived xenograft) モデルマウスのほか、Immuno-avatarモデルマウス、造血リンパ系ヒト化 (Hemato-lymphoid humanized) モデルマウス、Immune-PDXモデルマウスなどが挙げられる。

[表1]

	がん細胞	免疫細胞	モデル
自然誘発腫瘍マウス	マウス	マウス	発がん化合物を移植する古典的なモデル *Genetic-engineered mouse model *Human KI mice
培養がん細胞移植マウス	マウス	マウス	(3) Syngeneic murine model
	ヒト	マウス	(4) Cell-line derived xenograft (CDX)
患者腫瘍組織移植マウス	ヒト	マウス	(5) Patient derived xenograft (PDX) (6) Immuno-avatar mice (7) Hemato-lymphoid humanized mice (8) Immune-PDX

*遺伝子ノックインしたマウス

[0042] PDXマウスは上述したように患者由来の腫瘍組織を獲得免疫不全マウスに移植することによって作製される。また、Immuno-avatar モデルマウス、造血リンパ系ヒト化モデルマウスおよびImmune-PDXモデルマウスは、それぞれヒトの末梢血単核細胞、CD34 +ヒト造血幹細胞およびその前駆細胞 (HSPC) または腫瘍浸潤リンパ球を移植した獲得免疫不全マウスに、患者由来の腫瘍組織を移植することによって作製される。

[0043] 患者腫瘍組織移植マウスには、患者由来の腫瘍組織を移植してから一定期間成長させたマウス (初代: 第0世代) と、第0世代の腫瘍部が移植された (継代された) 第1世代のマウス、およびそれ以降の第n世代 ($n \geq 1$) の腫瘍部が移植された (継代された) 第n+1世代のマウスの全てが含まれる。

[0044] したがって、本発明における「移植された腫瘍部」は、患者の腫瘍細胞または腫瘍組織、あるいは培養細胞が移植された第0世代から第n+1世代の

実験動物の腫瘍部のすべてを包含する。

- [0045] 患者腫瘍組織移植動物の作製に当たっては、切開して腫瘍のブロックを移植したり、冷凍針に注入した腫瘍組織を注射により挿入したり、腫瘍と同時にマトリックスを導入したり、エストロゲンなどのホルモンを移植前にあらかじめ投与しておくなど、さまざまな手技が試みられている。その中でも腫瘍を移植する場所については、その場所によって、作製後の担腫瘍動物の状態及び腫瘍の状態に大きな差が生じるので、それぞれ用途に応じて使い分けることが好ましい。移植する場所については、皮下移植および同所移植（ある臓器に生じた腫瘍をドナー動物の同じ臓器へ移植）に大別できる。
- [0046] 前者は移植した腫瘍が徐々に大きくなる様子が目視で確認できるので、ある程度の大きさになったことを確認して試験に供することが可能であり、また処理も容易であることから通常第1選択肢とされている。しかし、本来腫瘍が生じていた場所と移植場所（皮下）との環境が大きく異なることから、腫瘍周囲に被膜が形成されてしまったり、血管形成が遅くて腫瘍が成長しない等のリスクがある。
- [0047] 一方、後者は被膜が形成されにくく、特に患者ヒト腫瘍組織を移植した場合にはその患者における腫瘍の特徴を反映して腫瘍が成長することが報告されている。例えばリンパ節転移が進行している患者の組織をマウスに同所移植したすると、腫瘍成長に伴ってリンパ節転移が進行することが報告されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 89, pp. 5645-5649, June 1992)。
- [0048] （プロファイル情報）
- 本発明の非臨床試験方法において特定されるプロファイルに含まれる情報のうち、目的タンパク質の発現量および発現細胞数に関する情報としては、例えば検体（標本スライド）における、（i）目的タンパク質の細胞あたりの平均発現量、（i i）目的タンパク質の組織の単位面積あたりの発現量、（i i i）目的タンパク質の細胞あたりの発現量とそれに対応する細胞数によって表されるヒストグラム、（i v）目的タンパク質の細胞あたりの発現量とそれに対応する細胞数によって表される曲線、などに関する情報が挙げ

られる。これらの情報は、いずれか一つだけでなく、複数が組み合わせられてプロファイルに含まれていてもよいし、目的タンパク質を複数選択してそれぞれの情報が組み合わせられたものがプロファイルに含まれていてもよい。

[0049] (i) 目的タンパク質の細胞あたりの平均発現量を定量する場合、例えば、検体（標本スライド）を蛍光ナノ粒子により免疫染色すると共に、形態観察用染色剤（例えばエオジン）によって細胞の形状が特定できるように染色する。蛍光ナノ粒子に対応する所定の波長を有する励起光を照射しながら行われる、暗視野における観察および撮像により、目的タンパク質を標識した蛍光ナノ粒子が輝点として表れている画像を取得する。一方で、明視野における観察および撮像により、細胞の形状を表すように染色されている画像を取得する。これらの2枚の画像を、画像処理により重ねあわせると、画像全体に含まれる、または画像中の特定の領域（例えば腫瘍組織のみ）に含まれる、個々の細胞について、発現している目的タンパク質を表す輝点数を計測することができる。目的タンパク質の発現量として、輝点数をその指標値として用いてもよい。また、複数の蛍光ナノ粒子が1つの輝点を形成している場合もあるので、ある1つの輝点の明るさ（輝度、蛍光強度）を、別途測定しておいた蛍光ナノ粒子1つあたりの明るさで割ることにより、その輝点に含まれる蛍光ナノ粒子の数を算出することができ、その粒子数を目的タンパク質の発現量の指標値として用いてもよい。画像に含まれる全ての細胞について輝点数または粒子数を求めることにより、細胞当たりの平均発現量を定量することが可能である。

[0050] (i i) 目的タンパク質の組織の単位面積あたりの発現量を求める場合、(i)と同様にして求めた輝点数または粒子数の、画像中の特定の領域にある組織に含まれる細胞についての総和を求めた後、その組織の面積で割るようにすればよい。

[0051] (i i i) 目的タンパク質の細胞あたりの発現量とそれに対応する細胞数によって表されるヒストグラムを作成する場合、まず、(i)と同様にして、画像全体に含まれる、または画像中の特定の領域（例えば腫瘍組織のみ）

に含まれる、個々の細胞について、発現している目的タンパク質を表す輝点数または粒子数を求める。そして、横軸に細胞あたりの目的タンパク質の発現量を所定の数ごとに区切ってとり（例えば、本明細書に記載した実施例で行っているように、1～300個までを20個ごとに分けて、0個区分を含めた16の範囲に区切り）、それぞれの区切りに対応する細胞数（頻度）を計測して縦軸にとることにより、ヒストグラムを作成することができる。

[0052] (i v) 目的タンパク質の細胞あたりの発現量とそれに対応する細胞数によって表される曲線を作成する場合、まず、(i)と同様にして、画像全体に含まれる、または画像中の特定の領域（例えば腫瘍組織のみ）に含まれる、個々の細胞について、発現している目的タンパク質を表す輝点数または粒子数を求める。そして、細胞あたりの目的タンパク質の発現量を連続的に（ヒストグラムのように区切らずに）横軸にとり、それぞれの発現量に対応する細胞数（頻度）を計測して縦軸にとることにより、曲線を作成することができる。

[0053] 上記(i i i)のヒストグラムおよび(i v)の曲線からは、分布（ヒストグラムまたは曲線の形状、ピークの数）がどのようなになっているか、平均値または中央値、分散(C V)がどのような値か、また特にヒストグラムの場合、細胞あたりの輝点数または粒子数が最大の区切りがどの程度の細胞数（頻度）になっているか、などの情報を得ることができる。そのような情報と、薬効や安定性などの試験結果と照らし合わせることにより、例えば、薬効や安定性などがどのような情報と最も関連しているか、換言すれば薬効や安定性などを予測する際にはどのような情報に基づくのが最も妥当か、といったことを分析し、把握することができる。

[0054] また、プロファイルには、検体（例えば腫瘍組織または腫瘍部）中の血管占有率のように、目的タンパク質を発現している細胞に関する情報以外の情報が含まれていてもよい。

「定量的な手法を用いて特定する」とは、上述したようなプロファイルについて、特にタンパク質の発現量、発現している細胞の数、及び組織内にお

ける発現している細胞の専有面積を含むプロフィールについて、「定性的」ではなく「定量的」な手法を用いて特定することをいう。

[0055] 「定性的」な手法とは、タンパク質の発現量や発現細胞数等と相関しているものの、それらの数またはそれと密接に関連する指標値を直接的に取り扱うのではなく、所定の範囲内にある数または指標値をまとめて一つのスコアで表し、そのようなスコアは数個程度、例えば2～5個程度であり、典型的には観察者の主観的・経験的な要素に依拠する手法をいう。例えば、乳がん細胞等の細胞膜に発現するHER2タンパク質を対象とし、DAB染色を用いるIHC法であって、がん細胞の膜における染色性およびその染色強度（染色パターン）に基づいて、3+（強く完全な細胞膜の陽性染色があるがん細胞>30%である場合：陽性）、2+（弱～中程度の完全な細胞膜の陽性染色があるがん細胞 $\geq$ 10%、または強い完全な細胞膜の陽性染色があるがん細胞 $\geq$ 10%～ $\leq$ 30%である場合：equivocal）、1+（ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の染色があるがん細胞 $\geq$ 10%で、がん細胞は細胞膜のみが部分的に染色されている場合：陰性）および0（細胞膜に陽性染色がない、あるいは細胞膜の陽性染色があるがん細胞>10%である場合（細胞膜に限局する陽性染色は判定対象外）：陰性）のように4段階のスコアで評価する方法（「HER2検査ガイド第三版」，トラスツズマブ病理部会作成，2009年9月より）は「定性的」な手法に該当する。また、非特許文献1（20527ページ、Figure 3）で用いられている、IHC法による染色像に基づいてタンパク質の発現量を4段階のスコアで表す手法も「定性的」な手法に該当する。

[0056] 一方、「定量的」な手法とは、タンパク質の発現量や発現細胞数またはそれらと密接に関連する指標値を直接的に取り扱い、典型的には装置を用いた客観的な測定結果に依拠する手法をいう。代表的には、蛍光ナノ粒子、すなわち、量子ドット（集積化していないもの）、または蛍光色素や量子ドットなどの蛍光体を樹脂等を母体として集積させた粒子（蛍光体集積粒子、Phosphor Integrated Dot：PID）のように、直径がナノサイズの粒子を用いて

、目的タンパク質を標識し、定量する手法が用いられる。中でも、本明細書の実施例でも採用されている、蛍光体集積粒子を用いて行われる定量方法（本明細書において「PID法」と称することがある。）は、本発明で用いる「定量的」な手法として特に好適である。しかしながら、本発明において用いることのできる「定量的」な手法はPID法などの蛍光体集積粒子を用いる手法に限定されるものではなく、それと同程度の精度を有するその他の手法であってもよい。

[0057] PID法の基本的な実施形態は、国際公開WO2012/029752号パンフレット（特許文献1）、国際公開WO2013/035703号パンフレット（特許文献2）、またはその他の特許文献または非特許文献により公知である。本発明でも、例えば標本スライドを用いて病理診断を行う場合に準じた実施形態で、PID法を実施することができる。

[0058] なお、「ヒストグラム」は、例えば本明細書に記載した実施例で行っているように、細胞あたりの目的タンパク質の発現量を所定の数ごとに区切り（例えば、1～300個までを20個ごとに分けて、0個区分を含めた16の範囲に区切り）、それぞれの区切りに対応する細胞数（頻度）をもって表されているが、もともとはタンパク質の発現量（輝点数または粒子数）および発現細胞数を計測し、それらの数を直接的に取り扱った上で、グラフ化されたものであるから、ヒストグラムは「定性的」ではなく「定量的」な手法を用いて得られる情報に分類される。

[0059] 本発明の非臨床試験方法は、好ましい実施形態の一例において、病変部が移植された腫瘍部である場合、つまり実験動物が担腫瘍動物である場合に、実験動物から採取された検体を使用する移植後プロファイル特定工程に加えて、患者または培養細胞から採取された検体を使用するプロファイル特定工程、すなわち、患者または培養細胞から採取された検体を使用して、実験動物に移植される前の腫瘍細胞または腫瘍組織のプロファイルを定量的な手法を用いて特定する工程（本明細書において「移植前プロファイル特定工程」と称することがある。）、および、この移植前プロファイル特定工程により

特定されたプロファイルと、移植後プロファイル特定工程により特定されたプロファイルとを比較する工程（本明細書において「プロファイル比較工程」と称することがある。）をさらに含む。このような実施形態により、実験動物に移植後の腫瘍部が実験動物に移植前の腫瘍細胞または腫瘍組織の特徴をどの程度引き継いでいるものかを評価することができ、それによって、実験動物の品質管理や薬効の分析などをより正確に行うことができるようになる。

[0060] 「移植される前の腫瘍細胞または腫瘍組織」には、患者から取り出した腫瘍組織または腫瘍細胞と、患者から取り出した腫瘍細胞に由来する培養細胞の両方が包含される。培養途中での細胞の変質による影響を排除することができるなどの観点からは、実験動物に移植される前の腫瘍細胞または腫瘍組織として患者から取り出した腫瘍組織または腫瘍細胞を用いることが好ましく、すなわち本発明の非臨床試験方法は患者から取り出した腫瘍組織または腫瘍細胞を移植した実験動物を使うものであることが好ましい。

[0061] また、本発明の非臨床試験方法は、同じまたは異なる世代の実験動物同士の間で、移植された腫瘍部のプロファイルを比較する工程を含んでいてもよい。本発明の非臨床試験方法は、好ましい実施形態の一例において、第0世代または第1世代の実験動物から採取された検体および第2世代以降の実験動物から採取された検体のそれぞれを使用して、移植された実験動物の腫瘍部のプロファイルを定量的な手法により特定する工程、および当該工程により特定された、第0世代または第1世代の実験動物の腫瘍部のプロファイルと、第2世代以降の実験動物の腫瘍部のプロファイルとを比較する工程をさらに含む。このような実施形態により、実験動物における継代によって移植部の特徴をどの程度引き継いでいるものかを評価するも、実験動物の品質管理や薬効の分析などをより正確に行うことができるようになるため有用である。

[0062] 本発明の非臨床試験方法は、好ましい実施形態において、移植された実験動物の病変部、例えば腫瘍部から複数回、検体を採取して、プロファイルを

経時的に特定する工程を含む。例えば、実験動物が担腫瘍モデル動物である場合、移植直後、そこから一定期間経過後、さらにそこから一定期間経過後に複数回に亘って検体を採取し、それぞれについてプロファイルを特定することができる。それらのプロファイルと比較すれば、同一の実験動物についてプロファイルに経時的な変化が起きるかどうかを判別することができ、例えば薬剤またはその候補物質についての薬効または毒性をより正確に評価することができる。

- [0063] 上記のように実験動物から検体を複数回採取するためには、一回採取したのちも実験動物を生存させ続ける、つまり実験動物を犠牲にすることなく検体を採取する必要がある。例えば、PID法は目的タンパク質の定量の精度に優れ、用いる検体は微量で済むので、実験動物を犠牲にすることなく腫瘍部から検体を採取することができる。また、腫瘍部から検体を採取する際に、検体を採取するための針（生検針）を凍結または加熱して、腫瘍部を凍結するまたは焼くなど、採取部位からの出血を最小限に抑える処置を施すようにすることは、実験動物へのダメージを軽減でき、検体の採取後も生存し続ける可能性が高まるので好ましい。

実施例

- [0064] [作製例1] ビオチン修飾抗ウサギIgG抗体の作製

50 mM Tris 溶液に、2次抗体として用いる抗ウサギIgG抗体50 μ gを溶解した。この溶液に、最終濃度3 mMとなるようにDTT（ジチオトレイトール）溶液を添加、混合し、37℃で30分間反応させた。その後、反応溶液を脱塩カラム「Zeba Desalt Spin Columns」（サーモサイエンティフィック社、Cat.#89882）に通して、DTTで還元化した2次抗体を精製した。精製した抗体全量のうち200 μ Lを50 mM Tris 溶液に溶解して抗体溶液を調製した。その一方で、リンカー試薬「Maleimide-PEG2-Biotin」（サーモサイエンティフィック社、製品番号21901）を、DMSOを用いて0.4 mMとなるように調整した。このリンカー試薬溶液8.5 μ Lを前記抗体溶液に添加、混合し、37℃で30分間反応させることにより、抗ウサ

ギ 1 g G 抗体に P E G 鎖を介してビオチンを結合させた。この反応溶液を脱塩カラムに通して精製した。脱塩した反応溶液について、波長 300 nm における吸光度を分光高度計（日立製「F-7000」）を用いて測定することにより、反応溶液中のタンパク質（ビオチン修飾 2 次抗体）の濃度を算出した。50 mM T r i s 溶液を用いて、ビオチン修飾 2 次抗体の濃度を 250 μ g / mL に調整した溶液を、ビオチン修飾 2 次抗体の溶液とした。

[0065] [作製例 2] テキサスレッド集積メラミン樹脂粒子の作製

 テキサスレッド色素分子「Sulforhodamine 101」（シグマアルドリッチ社）2.5 mg を純水 22.5 mL に溶解した後、ホットスターラーにより溶液の温度を 70℃ に維持ながら 20 分間攪拌した。攪拌後の溶液に、メラミン樹脂「ニカラック MX-035」（日本カーバイド工業株式会社）1.5 g を加え、さらに同一条件で 5 分間加熱攪拌した。攪拌後の溶液にギ酸 100 μ L を加え、溶液の温度を 60℃ に維持しながら 20 分間攪拌した後、その溶液を放置して室温まで冷却した。冷却した後の溶液を複数の遠心用チューブに分注して、12,000 rpm で 20 分間遠心分離して、溶液に混合物として含まれるテキサスレッド集積メラミン樹脂粒子を沈殿させた。上澄みを除去し、沈殿した粒子をエタノールおよび水で洗浄した。得られた粒子の 1000 個について SEM 観察を行い、平均粒子径を測定したところ、平均粒子径 152 nm であった。このようにして作製されたテキサスレッド集積メラミン樹脂粒子を、次の手順に従ってストレプトアビジンで表面修飾し、得られたストレプトアビジン修飾テキサスレッド集積メラミン樹脂粒子を実施例 1 および 3 における蛍光体集積粒子（P I D）として使用した。

[0066] [作製例 3] ストレプトアビジン修飾テキサスレッド集積メラミン樹脂粒子の作製

 作製例 2 で得られた粒子 0.1 mg を E t O H 1.5 mL 中に分散し、アミノプロピルトリメトキシシラン「LS-3150」（信越化学工業社製）2 μ L を加えて 8 時間反応させて表面アミノ化処理を行なった。

[0067] 次いで、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）を2 mM含有したPBS（リン酸緩衝液生理的食塩水）を用いて上記表面アミノ化処理を行なった粒子を3 nMに調整し、この溶液に最終濃度10 mMとなるようSM（PEG）12（サーモサイエンティフィック社製、succinimidyl-[(N-maleimidopropionamido)-dodecaethyleneglycol] ester）を混合し、1時間反応させた。この混合液を10,000 Gで20分遠心分離を行い、上澄みを除去した後、EDTAを2 mM含有したPBSを加え、沈降物を分散させ、再度遠心分離を行った。同様の手順による洗浄を3回行うことで末端にマレイミド基が付いたテキサスレッド集積メラミン樹脂粒子を得た。

[0068] 一方、ストレプトアビジン（和光純薬社製）をN-succinimidyl S-acetylthioacetate（SATA）を用いてチオール基付加処理を行ったのち、ゲルろ過カラムによるろ過を行い、テキサスレッド集積メラミン樹脂粒子に結合可能なストレプトアビジン溶液を得た。

[0069] 上記のテキサスレッド集積メラミン樹脂粒子とストレプトアビジンとを、EDTAを2 mM含有したPBS中で混合し、室温で1時間反応させた。10 mMメルカプトエタノールを添加し、反応を停止させた。得られた溶液を遠心フィルターで濃縮後、精製用ゲルろ過カラムを用いて未反応ストレプトアビジン等を除去し、ストレプトアビジン修飾テキサスレッド集積メラミン樹脂粒子を作製した。

[0070] [作製例4] 表面修飾基としてカルボン酸塩（カルボキシレート基）を持つCdSe/ZnS半導体ナノ粒子（量子ドット）を内包するメラミン樹脂粒子の作製

アルゴン気流下、トリ-n-オクチルホスフィンオキシド7.5 gに、ステアリン酸2.9 g、n-テトラデシルホスホン酸620 mg、および、酸化カドミウム250 mgを加え、370℃に加熱混合した。これを270℃まで放冷した後、トリブチルホスフィン2.5 mLにセレン200 mgを溶解させた溶液を加え、減圧乾燥し、トリ-n-オクチルホスフィンオキシドで被覆されたカドミウムセレンイド（CdSe）コア半導体ナノ粒子を得た。

- [0071] 得られたCdSeコア半導体ナノ粒子に、トリ-n-オクチルホスフィンオキシド15gを加えて加熱し、引き続き270℃でトリオクチルホスフィン10mLにジエチルジチオカルバミン酸亜鉛1.1gを溶解した溶液を加え、CdSe/ZnS半導体ナノ粒子を含む分散液を得た。
- [0072] 得られたCdSe/ZnS半導体ナノ粒子の濃度が5質量%となるように、デカンに分散させた。この分散液10μLにプロピオン酸ナトリウム0.5mLを添加し、室温で攪拌することにより、表面修飾を行った。反応混合物に純水2.5mLを添加した後、ホットスターラーにより溶液の温度を70℃に維持しながら20分間攪拌した。攪拌後の溶液に、メラミン樹脂「ニカラックMX-035」（日本カーバイド工業（株）製）1.5gを加え、さらに同一条件で5分間加熱攪拌した。
- [0073] 攪拌後の溶液にギ酸100μLを加え、溶液の温度を60℃に維持しながら20分間攪拌した後、該溶液を放置して室温まで冷却した。冷却した後の溶液を複数の遠心用チューブに分注して、12,000rpmで20分間遠心分離して、溶液に混合物として含まれるメラミン樹脂粒子を沈殿させて上澄みを除去した。その後、沈殿した粒子の洗浄をエタノールと水で行った。平均粒子径が150nmのナノ粒子（量子ドット集積メラミン樹脂粒子）を作製した。このようにして作製された量子ドット集積メラミン樹脂粒子を、次の作製例5の手順に従ってストレプトアビジンで表面修飾し、得られたストレプトアビジン修飾量子ドット集積メラミン樹脂粒子を実施例2における蛍光体集積粒子（PID）として使用した。
- [0074] [作製例5] ストレプトアビジン修飾量子ドット集積メラミン樹脂粒子の作製
- 作製例4で得られた粒子0.1mgをEtOH1.5mL中に分散し、アミノプロピルトリメトキシシラン「LS-3150」（信越化学工業社製）2μLを加えて8時間反応させて表面アミノ化処理を行なった。
- [0075] 次いで、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）を2mM含有したPBS（リン酸緩衝液生理的食塩水）を用いて上記表面アミノ化処理を行なった粒子

を 3 n M に調整し、この溶液に最終濃度 1 0 m M となるよう S M (P E G) 1 2 (サーモサイエンティフィック社製、succinimidyl- [(N-maleimidopropionamido) -dodecaethyleneglycol] ester) を混合し、1 時間反応させた。この混合液を 1 0, 0 0 0 G で 2 0 分遠心分離を行い、上澄みを除去した後、E D T A を 2 m M 含有した P B S を加え、沈降物を分散させ、再度遠心分離を行った。同様の手順による洗浄を 3 回行うことで末端にマレイミド基が付いた量子ドット集積メラミン樹脂粒子を得た。

[0076] 一方、ストレプトアビジン (和光純薬社製) を N-succinimidyl S-acetylthioacetate (S A T A) を用いてチオール基付加処理を行ったのち、ゲルろ過カラムによるろ過を行い、蛍光物質集積メラミン粒子に結合可能なストレプトアビジン溶液を得た。

[0077] 上記の量子ドット集積メラミン樹脂粒子とストレプトアビジンとを、E D T A を 2 m M 含有した P B S 中で混合し、室温で 1 時間反応させた。1 0 m M メルカプトエタノールを添加し、反応を停止させた。得られた溶液を遠心フィルターで濃縮後、精製用ゲルろ過カラムを用いて未反応ストレプトアビジン等を除去し、ストレプトアビジン修飾量子ドット集積メラミン樹脂粒子を作製した。

[0078] [実施例 1]

(1) 6 名の患者 (A ~ F) それぞれの乳がん組織 (体積約 2 0 0 m m³) を移植した P D X マウスを各 5 匹ずつ購入した。これらの P D X マウスに、ラパチニブ (商品名: タイケルブ) 1 0 0 m g / k g を 1 日 2 回、計 4 2 回静脈内投与した。初回投与前および初回投与から 2 1 日後の腫瘍体積を計測するとともに、各タイミングで凍結針を用いて、組織切片を採取した。採取した組織切片は、常法に従って、ホルマリン固定処理およびパラフィン包埋処理を行った後、薄切して標本スライドを作製した。この標本スライドは、H E R 2 を目的タンパク質とする発現量の定量的のために使用した。

[0079] (2) 標本スライドの蛍光体集積粒子による免疫染色および H E R 2 タンパク質の発現量 (粒子数) の解析は、下記の手順で行った。

(2-1) 標本作製工程

常法に従って、購入したPDXマウスの腫瘍部から検体を採取し、ホルマリン固定およびパラフィン包埋を行い、薄切して標本スライドを各マウスについて作製した。この標本スライド（各患者に対して $n=5$ ）を、ベントナーVIEWSパスウェーHER2（4B5）キットを用い、ベントナーベンチマークULTRAで染色し、DAB法によりHER2のスコアの特定し、腫瘍細胞領域と間質細胞領域を形態学的に同定した。HER2のスコアは標準的に使用されている基準に従った（例えば「HER2検査ガイド第三版」（トラストズマブ病理部会作成、2009年9月）参照）。実施例1では、スコアがーの領域を有する検体が1つ（A）、スコアが1+の領域を有する検体が1つ（B）、スコアが2+の領域を有する検体が1つ（C）、スコアが3+の領域を有する検体が3つ（D、EおよびF）であった。

[0080] 標本スライドは脱パラフィン処理した後、水に置換する洗浄を行った。洗浄した標本スライドを10mMクエン酸緩衝液中（pH6.0）中で121℃、15分間オートクレーブ処理することで、抗原の賦活化処理を行った。賦活化処理後の組織アレイスライドをPBSにより洗浄し、洗浄した組織アレイスライドに対してBSAを1%含有するPBSを用いて1時間ブロッキング処理を行った。

[0081] (2-2) 免疫染色工程

(2-2-1) 免疫染色の1次反応処理

目的タンパク質HER2に係る第1免疫染色用の1次反応処理は、BSAを1W/W%含有するPBSを用いて、抗HER2ウサギモノクローナル抗体「4B5」（ベントナー社）を0.05nMの濃度で含有する1次反応処理液を調製した。この1次反応処理液に工程（1）で作製した標本を浸漬し、4℃で1晩反応させた。

[0082] (2-2-2) 免疫染色の2次反応処理

作製例1で作製したビオチン修飾抗ウサギIgG抗体の溶液を、さらにBSAを1W/W%含有するPBSを用いて6μg/mLに希釈した2次反応

処理液を調製した。１次反応処理を終えた標本スライドをPBSで洗浄した後、この２次反応処理液に浸漬し、室温で３０分間反応させた。

[0083] (2-2-3) 免疫染色の蛍光標識処理

作製例３で作製したストレプトアビジン修飾テキサスレッド集積メラミン樹脂粒子を、カゼインおよびBSAを含有する蛍光ナノ粒子用希釈液を用いて、 0.02 nM に希釈した蛍光標識反応処理液を調製した。２次反応処理を終えた標本スライドをこの蛍光標識処理液に浸漬し、中性のpH環境下（ $\text{pH } 6.9 \sim 7.4$ ）、室温で３時間反応させた。

[0084] (2-2-4) 形態観察用染色処理

蛍光標識処理を行った標本スライドを、マイヤーヘマトキシリン液で５分間染色してヘマトキシリン染色を行った後、 45°C の流水で３分間洗浄した。

[0085] (2-3) 標本後処理工程

免疫染色を終えた標本スライドに対して、純エタノールに５分間浸漬する操作を４回行う固定化・脱水処理を行った。続いて、キシレンに５分間浸漬する操作を４回行う透徹処理を行った。最後に、標本に封入剤「エンテランニュー」（メルク社）を載せて、カバーガラスを被せる封入処理を行い、観察に用いる標本とした。

[0086] (2-4) 評価工程

(2-4-1) 観察・撮影工程

この工程における励起光の照射および蛍光の発光の観察には蛍光顕微鏡「BX-53」（オリンパス株式会社）を用い、免疫染色像（ 400 倍）の撮影には、当該蛍光顕微鏡に取り付けた顕微鏡用デジタルカメラ「DP73」（オリンパス株式会社）を用いた。

[0087] まず、目的タンパク質HER2の蛍光標識に用いたテキサスレッド色素に対応する励起光を標本に照射して蛍光を発光させ、その状態の免疫染色像を撮影した。この際、励起光の波長は、蛍光顕微鏡が備える励起光用光学フィルターを用いて $575 \sim 600\text{ nm}$ に設定し、観察する蛍光の波長は、蛍光

用光学フィルターを用いて612～692 nmに設定した。蛍光顕微鏡による観察および画像撮影時の励起光の強度は、視野中心部付近の照射エネルギーが900 W/cm²となるようにした。画像撮影時の露光時間は、画像の輝度が飽和しないような範囲で調節し、例えば4000 μ秒に設定した。

[0088] 次に、蛍光顕微鏡の明視野における観察および画像撮影により、細胞の形態観察用のヘマトキシリン染色による染色像を撮影した。

このような免疫染色像および形態観察用染色像の撮影は、同一視野において行った後、視野を変えて同じ操作を繰り返し、1つの標本スライドにつき5視野ずつ行った。

[0089] (2-4-2) 画像処理・計測工程

この工程における画像処理には、画像処理ソフトウェア「ImageJ」(オープンソース)を用いた。

[0090] 形態観察用染色像を用いた画像処理により、細胞の形状(細胞膜の位置)を特定し、免疫染色像と重ねあわせて、細胞膜上に発現しているHER2タンパク質を標識したテキサスレッド集積メラミン樹脂粒子を表す輝点を抽出した。なお、間質細胞領域にはHER2は発現しないので、間質細胞内に位置する輝点は非特異的シグナルすなわちノイズとして処理した。細胞膜上の基点のうち輝度が所定の値以上のものの数を計測し、その輝点の輝度を上記蛍光体集積粒子(PID)1粒子あたりの輝度で除して粒子数に換算し、これをその細胞のHER2の発現量として取り扱った。そして、1つの標本スライド(5視野)あたり1000個の細胞についてHER2の発現量(粒子数)を測定し、その平均値を算出して、その標本スライドの「PIDスコア」とした。さらに各患者(A～F)に対応する標本スライド5枚のPIDスコアの平均値をそれぞれ算出した。

[0091] (3) 結果は表2に示すとおりである。DABのスコア(定性的な評価値)では差を見ることができないタンパク質の発現量の変化が、蛍光体集積粒子を用いて測定したPIDスコア(定量的な評価値)では表される結果となった。そして、HER2タンパク質の発現量が大きい領域において、DAB

スコアが同じ3+であってもP I Dスコアが大きなP D Xマウスほど、ラパチニブ投与により腫瘍サイズが大きく減少し、ラパチニブの薬効（腫瘍サイズの減少効果）が大きくなる傾向が確認された。このような解析には、例えば、ラパチニブが効きやすいP D Xマウスの層別化が可能になるといった有用性がある。

[0092] [表2]

	ラパチニブ初回投与前		ラパチニブ初回投与 21 日後
サンプル	PID スコア	DAB スコア (HER2)	腫瘍サイズ (投与開始時を100%とする)
A	10	—	180%
B	30	1+	120%
C	100	2+	80%
D	200	3+	70%
E	400	3+	60%
F	800	3+	10%

[0093] [実施例2]

D A B染色で3+と判定された2人の患者それぞれの乳がん組織（体積約200mm³）を移植したP D Xマウス（サンプルX、Y）をそれぞれ各5匹作製した。これらのP D Xマウスに、トラスツズマブ（商品名：ハーセプチン）15mg/kgを1日1回、計3回静脈内投与し、初回投与前と、初回投与から3日後、1週間後および2週間後（サンプルX）、または初回投与から1週間後、2週間後および3週間後（サンプルY）の腫瘍体積を計測するとともに、各タイミングで凍結針を用いて、組織切片を採取した。採取した組織切片は、常法に従って、ホルマリン固定処理およびパラフィン包埋処理を行った後、薄切して標本スライドを作製した。この標本スライドは、H

HER2を目的タンパク質とする発現量の定量のために使用した。標本スライドの蛍光体集積粒子による免疫染色およびHER2タンパク質の発現量（粒子数）の解析は、免疫染色の蛍光標識処理において、作製例3で作製したストレプトアビジン修飾テキサスレッド集積メラミン樹脂ナノ粒子に代えて、作製例5で作成したストレプトアビジン修飾量子ドット集積メラミン樹脂粒子を用いたこと以外は、実施例1と同様にして行った。

[0094] 結果は表3および4に示すとおりである。実施例1のときと同様、DABスコアでは差を見ることができないタンパク質の発現量の変化がPIDスコアでは表される結果となった。また、2種類のマウスで薬効（腫瘍縮小効果）とタンパク質発現量の挙動が異なった結果となっており、そのメカニズムの解析に役立てられる可能性がある。

[0095] [表3]

サンプルX	PIDスコア	DABスコア (HER2)	腫瘍サイズ (投与開始時を100%とする)
投与前	200	3+	100%
3日後	200	3+	90%
1週間後	180	3+	80%
2週間後	140	3+	50%

[0096] [表4]

サンプルY	PIDスコア	DABスコア (HER2)	腫瘍サイズ (投与開始時を100%とする)
投与前	200	3+	100%
3日後	160	3+	80%
1週間後	80	3+	90%

[0097] [実施例3]

DAB染色で3+と判定された患者の乳がん組織（体積約200mm³）を移植し、継代した第1世代のPDXマウス（サンプルP1）を5匹作製した

。さらに、第2世代のPDXマウス（P2-1、P2-2）をそれぞれ5匹ずつ作製し、その後、P2-1、P2-2それぞれから採取した腫瘍組織を用いて第3世代のPDXマウス（サンプルP3-1、P3-2）をそれぞれ5匹ずつ作製した。

[0098] 各PDXマウスに、トラスツズマブ（商品名：ハーセプチン）15mg/kgを1週間1回、計5回静脈内投与し、初回投与前と、初回投与から1ヶ月後の腫瘍体積を計測するとともに、各タイミングで凍結針を用いて、組織切片を採取した。採取した組織切片は、常法に従って、ホルマリン固定処理およびパラフィン包埋処理を行った後、薄切して標本スライドを作製した。この標本スライドは、HER2を目的タンパク質とする発現量の定量のために使用した。標本スライドの蛍光体集積粒子による免疫染色およびHER2タンパク質の発現量（粒子数）の解析は、実施例1と同様に行い、さらに各サンプルごとにおける粒子数の平均値を用いて、頻度曲線（ヒストグラム）も作成した。

[0099] 結果は表5および図1～5に示す通りである。ヒストグラムが患者の乳がん組織（図1）と一致しているPDXマウスP2-1（図2）およびP3-1（図4）は、薬効（腫瘍縮小効果）が高い。なお、ヒストグラムは、(i) 平均値：15%以内、(ii) ピーク数：同数、(iii) CV値の差：5%以内、の全てを満たすときに、一致していると判断した。このような結果により、細胞あたりのタンパク質発現量のヒストグラムを比較することで、次世代へ形質を維持できるマウスを選択することができる。

[0100] [表5]

サンプル	ヒストグラム	薬剤投与後の腫瘍サイズ (投与開始時を100%とする)
P1（第1世代のマウス）	図1	50%
P2-1（第2世代のマウス1）	図2	50%
P2-2（第2世代のマウス22）	図3	110%
P3-1（P2-1から作製した第3世代のマウス）	図4	60%
P3-2（P2-2から作製した第3世代のマウス）	図5	120%

[0101] [実施例4]

CD140aは、線維芽細胞、巨核球、単球、赤血球、骨髓系前駆細胞、内皮細胞などの細胞表面に発現する膜タンパク質であり、間質細胞マーカーとして用いられる。PDXマウスの腫瘍組織におけるCD140aの発現量の測定を行なうことによりマウスを選別し、さらに選別されたマウスにおける抗がん剤の薬効の判定を行った。

[0102] <マウスの選別>

実施例1で用いたものと同様の6名の患者（A～F）それぞれの乳がん組織（体積約200mm³）を移植したPDXマウスを各5匹ずつ購入した。このPDXマウスを飼育していき、腫瘍を3日ないし4日おきに計測して腫瘍体積が500mm³となったところでメスを用いて腫瘍組織を摘出した。

[0103] <CD140aの発現量の測定>

上記のように作製したPDXマウスの腫瘍組織の約3mm角の切片を用いて、実施例1と同様の方法で標本スライドを作製し、賦活化およびブロッキング処理を行った。

[0104] 作製した標本スライドに対して、抗HER2ウサギモノクローナル抗体「4B5」（ベンタナ社）の代わりに、ビオチン修飾抗マウスCD140aラットモノクローナル抗体（クローン：APA5、BioLegend社製）を用いて1次反応処理液を調製する以外は実施例1と同様の手法により免疫反応の1次反応を行なった。PBSで洗浄した後、実施例1（2-2-3）と同様に作製例3で作製したストレプトアビジン修飾テキサスレッド集積メラミン樹脂体集積粒子（PID）を用いて蛍光標識処理を行ない、さらに形態観察用染色処理およびに標本後処理を行い、観察に用いる標本スライド（CD140a/PID染色標本スライド）とした。

[0105] 実施例1と同様に、免疫染色像および形態観察用染色像の観察・撮影を行い、CD140aのPIDスコアまたはDABスコアを測定した。各患者の腫瘍組織を移植したマウス5匹ずつの群のそれぞれから、CD140aのPIDスコアまたはDABスコアが低い値の、すなわちマウス由来の間質細胞

の割合が小さいマウスを3匹ずつ選別して以下の薬効試験に用いた。このように任意のマーカーを用いてマウスの選別を行うことで、より再現性の高い実験が可能になり、薬効試験において選別されなかったマウスの使用は省くことで実験動物の無駄を省くことが出来るので、動物保護の観点からも望ましい。

[0106] <抗がん剤の薬効の判定>

これらの選別された各3匹のPDXマウスに、実施例1と同様にラパチニブ（商品名：タイケルブ）100mg/kgを1日2回、計42回静脈内投与し、初回投与前および初回投与から21日後の腫瘍体積を計測するとともに、各タイミングで凍結針を用いて、組織切片を採取した。採取した組織切片は、実施例1と同様の手法を用いて、HER2タンパク質を目的タンパク質とする発現量の定量のために使用した。

結果は実施例1と同様に、HER2タンパク質のPIDスコアが大きなPDXマウスほど、ラパチニブ投与により腫瘍サイズが大きく減少し、ラパチニブの薬効（腫瘍サイズの減少効果）が大きくなる傾向が確認された。

[0107] [実施例5] 造血リンパ系ヒト化モデルマウス

獲得免疫不全マウスにヒトの造血幹細胞を移植することにより作製された造血リンパ系ヒト化マウス（Hemato-lymphoid humanized mice）に腫瘍組織を移植することで、患者腫瘍組織移植マウスのひとつである造血リンパ系ヒト化モデルマウスを作製した。肺がん患者6名から採取した腫瘍組織をSofia Bio社から購入し、2mm角の腫瘍組織を造血リンパ系ヒト化マウスの皮下へ移植した（各患者の腫瘍組織に対してマウス5匹ずつ作製）。1か月後に腫瘍組織が約300mm³まで成長したモデルマウスに、抗ヒトPD-1モノクローナル抗体医薬品ニボルマブ（商品名：オプジーボ）100mg/kgを1日2回、計42回静脈内投与した。実施例1と同様に初回投与前および初回投与から21日後の腫瘍体積を計測するとともに、組織切片を採取し、実施例1と同様に標本スライドを作成した。免疫染色の1次反応処理において、抗HER2ウサギモノクローナル抗体「4B5」（ベンタナ社）の代わりに、抗

PD-L1ウサギモノクローナル抗体（clone「SP142」Spring Bioscience（SBS）社）を用いる以外は、実施例1と同様の手法を用いることでこの標本スライドの、染色、観察を行った。

[0108] 結果は実施例1と同様に、PD-L1タンパク質のPIDスコアが大きなPDXマウスほど、ラバチニブ投与により腫瘍サイズが大きく減少し、ニボルマブの薬効（腫瘍サイズの減少効果）が大きくなる傾向が確認された。

[0109] [実施例6] Immune-PDXモデルマウスにおける腫瘍同所移植
リンパ節転移が進行している肺がん患者3名から採取した腫瘍組織をSofia Bio社から購入し、それぞれ2mm角の腫瘍組織を腫瘍浸潤リンパ球を移植した獲得免疫不全マウスの皮下組織内または肺組織内へ移植してImmune-PDXモデルマウスを作製した（各患者の腫瘍組織に対してマウス5匹ずつ作製）。それぞれのマウスから1か月後に約300mm³まで成長したがん組織およびリンパ節組織を採取して、実施例1と同じ手法で標本スライドを作成した。

[0110] 実施例1における免疫染色の1次反応処理において、抗HER2ウサギモノクローナル抗体「4B5」（ベンタナ社）の代わりに、抗METウサギモノクローナル抗体（SP44, Roche社）を用いる以外は、同様の手法を用いることでこれらの標本スライドの、染色、観察を行った。

[0111] その結果、腫瘍組織を同所移植したマウスのリンパ節組織から得られた組織スライドの形態観察において、腫瘍がリンパ節組織に転移している様子が確認された。これに対して、皮下移植したマウスの場合には全てのスライドにおいて、リンパ節組織における腫瘍の転移は確認できなかった。この結果は、腫瘍移植モデルを作製する際の移植部位によって転移の様子が異なることを意味する。

[0112] また、蛍光観察においては、同所移植したマウスから得られた組織スライドでは皮下移植したものに比べて総じて2倍以上の数の輝点が観察でき、皮下移植された腫瘍と同所移植された腫瘍とでは、がん転移マーカーであるMETの発現に差があるということがわかった。このことは、皮下移植したマウ

スにおいては元の患者の腫瘍の形質どおり転移し得るかどうかの正確な評価が出来ない一方で、同所移植したモデルマウスにおいては移植した腫瘍の形質が保持され、腫瘍の成長に伴って転移すると評価できる。このように移植後の腫瘍部が移植前の性質を引き継いでいるかどうかの評価を行うことで、上述したような担腫瘍マウスの品質管理やそれらを用いた試験結果の分析をより正確に行うことができる可能性を示唆している。

請求の範囲

- [請求項1] 実験動物から採取された検体を使用して、実験動物の病変部のプロファイルを定量的な手法により特定する工程を含むことを特徴とする、非臨床試験方法。
- [請求項2] 前記病変部が、移植された腫瘍部である、請求項1に記載の非臨床試験方法。
- [請求項3] さらに、患者または培養細胞から採取された検体を使用して、実験動物に移植される前の腫瘍細胞または腫瘍組織のプロファイルを定量的な手法を用いて特定する工程、および 当該工程により特定されたプロファイルと、前記移植された実験動物の腫瘍部のプロファイルとを比較する工程を含むことを特徴とする、請求項2に記載の非臨床試験方法。
- [請求項4] 前記実験動物に移植される前の腫瘍細胞または腫瘍組織が、患者から取り出した腫瘍細胞または腫瘍組織である、請求項3に記載の非臨床試験方法。
- [請求項5] 第0世代または第1世代の実験動物から採取された検体および第2世代以降の実験動物から採取された検体のそれぞれを使用して、移植された実験動物の腫瘍部のプロファイルを定量的な手法により特定する工程、および
当該工程により特定された、第0世代または第1世代の実験動物の腫瘍部のプロファイルと、第2世代以降の実験動物の腫瘍部のプロファイルとを比較する工程を含むことを特徴とする、請求項2に記載の非臨床試験方法。
- [請求項6] 前記工程により特定されたプロファイルに基づき、継代のために腫瘍部を採取する実験動物または採取する腫瘍部の箇所を決定する工程を含む、請求項2～5のいずれか一項に記載の非臨床試験方法。
- [請求項7] 前記プロファイルが、前記検体における、目的タンパク質の細胞あたりの平均発現量に関する情報を含む、請求項1～6のいずれか一項

に記載の非臨床試験方法。

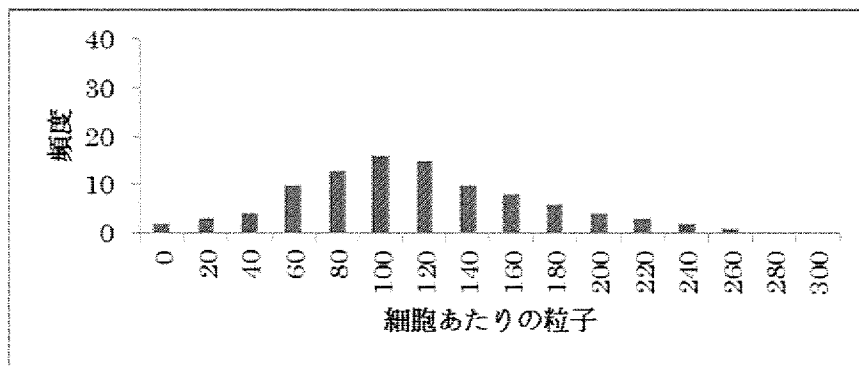
- [請求項8] 前記プロファイルが、前記検体における、目的タンパク質の組織の単位面積あたりの発現量に関する情報を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の非臨床試験方法。
- [請求項9] 前記プロファイルが、前記検体における、目的タンパク質の細胞あたりの発現量とそれに対応する細胞数によって表されるヒストグラムに関する情報を含む、請求項1～8の何れか一項に記載の非臨床試験方法。
- [請求項10] 前記プロファイルが、前記検体における、目的タンパク質の細胞あたりの発現量とそれに対応する細胞数によって表される曲線に関する情報を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の非臨床試験方法。
- [請求項11] 前記プロファイルを特定するための定量的な手法として、蛍光ナノ粒子を用いた免疫染色法を行う、請求項1～10のいずれか一項に記載の非臨床試験方法。
- [請求項12] 前記プロファイルが、前記検体中の血管占有率に関する情報を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の非臨床試験方法。
- [請求項13] 前記目的タンパク質が、免疫チェックポイントタンパク質、がん細胞増殖因子、がん細胞増殖因子受容体、細胞表面抗原、血管増殖因子、血管増殖因子受容体、サイトカインおよびサイトカイン受容体からなる群より選択される少なくとも1つである、請求項7～12のいずれか一項に記載の非臨床試験方法。
- [請求項14] 前記移植された実験動物の病変部から複数回、検体を採取して、前記プロファイルを特定する工程を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の非臨床試験方法。
- [請求項15] 前記検体の採取の際に、凍結または加熱した針を使用する、請求項1～14のいずれか一項に記載の非臨床試験方法。
- [請求項16] 前記目的タンパク質が、分子標的薬のターゲットとなるマーカーであり、前記プロファイルが、当該マーカーの発現量および発現分布を

含む、請求項 7 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の非臨床試験方法。

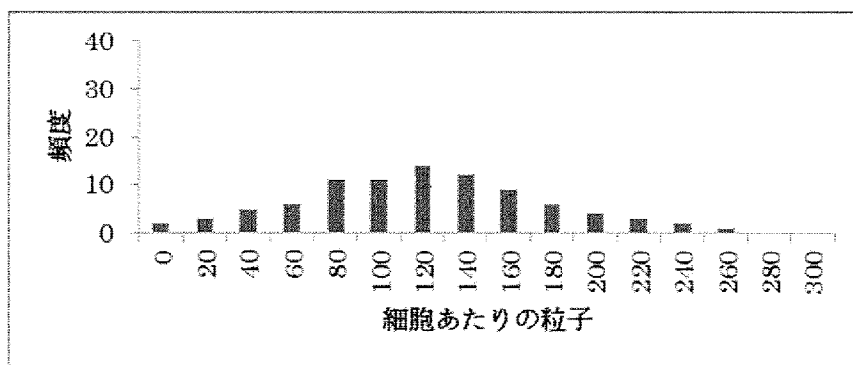
[請求項17]

前記目的タンパク質が、リン酸化されたタンパク質であり、前記プロファイルが、当該リン酸化されたタンパク質の発現量および発現分布を含む、請求項 7 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の非臨床試験方法。

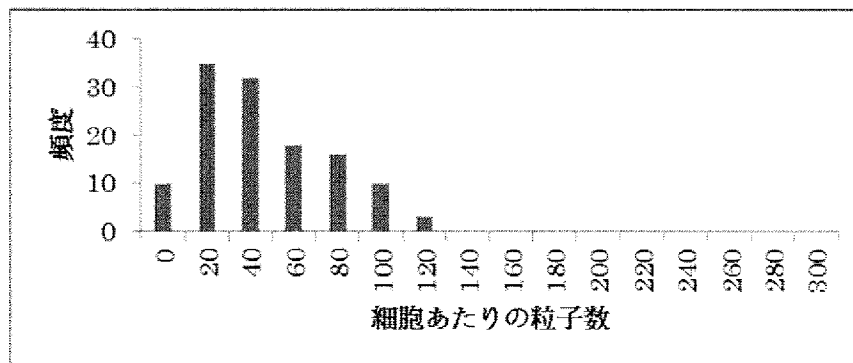
[図1]



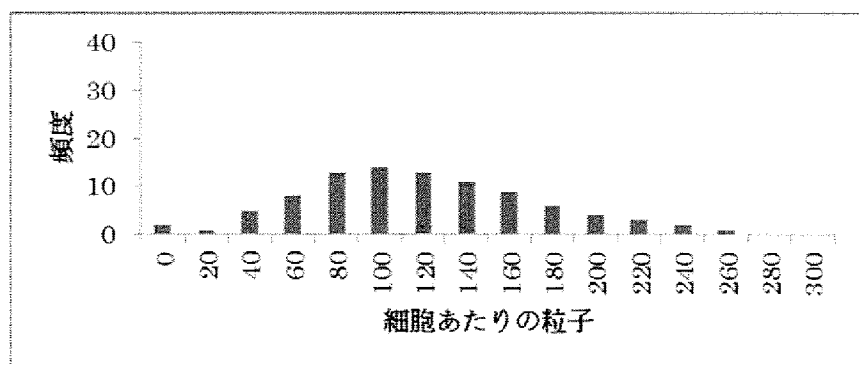
[図2]



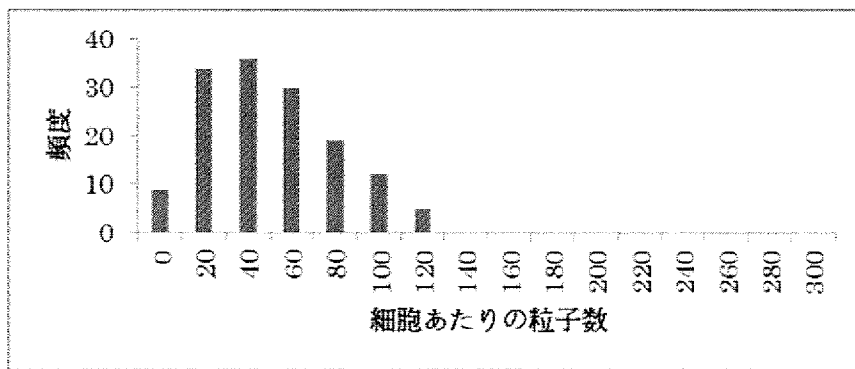
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005588

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/574(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/574, C12Q1/02, G01N33/48, G01N33/53, G01N33/543

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	WO 2007/049620 A1 (Fujifilm RI Pharma Co., Ltd.), 03 May 2007 (03.05.2007), entire text; all drawings; particularly, paragraphs [0062] to [0064] & JP 5317475 B2 & US 2009/0169473 A1 entire text; all drawings; particularly, paragraphs [0209] to [0213] & EP 1952826 A1	1-2/11/3-10, 12-17
X/A	JP 2008-169132 A (National University Corporation Chiba University), 24 July 2008 (24.07.2008), entire text; all drawings; particularly, paragraphs [0100], [0101] (Family: none)	1-2/3-17

☒ 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
27 March 2017 (27.03.17)

Date of mailing of the international search report
04 April 2017 (04.04.17)

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/JP2017/005588

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	WO 2012/029752 A1 (Konica Minolta, Inc.), 08 March 2012 (08.03.2012), entire text; all drawings & JP 5974892 B2 & US 2013/0157287 A1 entire text; all drawings & EP 2613138 A1	11/1-10, 12-17
Y/A	WO 2013/035703 A1 (Konica Minolta, Inc.), 14 March 2013 (14.03.2013), entire text; all drawings & JP 2014-142348 A & JP 2016-27340 A & US 2014/0186857 A1 entire text; all drawings & US 2014/0220598 A1 & EP 2755019 A1 & EP 2757378 A2	11/1-10, 12-17
A	JP 2007-274950 A (Yokohama City University), 25 October 2007 (25.10.2007), entire text; all drawings (Family: none)	1-17
A	WO 2008/001614 A1 (Hiroshima Industrial Promotion Organization), 03 January 2008 (03.01.2008), entire text; all drawings & JP 5172670 B2 & US 2009/0313710 A1	1-17
A	WO 2007/058021 A1 (Keio University), 24 May 2007 (24.05.2007), entire text; all drawings & JP 5288395 B2	1-17
A	JP 2014-510075 A (F. Hoffmann-La Roche AG.), 24 April 2014 (24.04.2014), entire text; all drawings & US 2014/0099264 A1 & WO 2012/119999 A1 & EP 2683290 A1	1-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/574(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/574, C12Q1/02, G01N33/48, G01N33/53, G01N33/543

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y/A	WO 2007/049620 A1 (富士フイルム R I ファーマ株式会社) 2007.05.03, 全文・全図、特に、段落[0062]-[0064]等参照 & JP 5317475 B2 & US 2009/0169473 A1, 全文・全図、特に、段落[0209]-[0213]等参照 & EP 1952826 A1	1-2/11/3-10, 12-17
X/A	JP 2008-169132 A (国立大学法人 千葉大学) 2008.07.24, 全文・全図、特に、段落[0100]、[0101]等参照 (ファミリーなし)	1-2/3-17

☑ 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

27.03.2017

国際調査報告の発送日

04.04.2017

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)

草川 貴史

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2 J

4075

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/A	WO 2012/029752 A1 (コニカミノルタ株式会社) 2012.03.08, 全文・全図等 参照 & JP 5974892 B2 & US 2013/0157287 A1, 全文・全図等参照 & EP 2613138 A1	11/1-10, 12-17
Y/A	WO 2013/035703 A1 (コニカミノルタ株式会社) 2013.03.14, 全文・全図等 参照 & JP 2014-142348 A & JP 2016-27340 A & US 2014/0186857 A1, 全 文・全図等参照 & US 2014/0220598 A1 & EP 2755019 A1 & EP 2757378 A2	11/1-10, 12-17
A	JP 2007-274950 A (公立法人横浜市立大学) 2007.10.25, 全文・全図等参 照 (ファミリーなし)	1-17
A	WO 2008/001614 A1 (財団法人ひろしま産業振興機構) 2008.01.03, 全文・ 全図等参照 & JP 5172670 B2 & US 2009/0313710 A1	1-17
A	WO 2007/058021 A1 (学校法人慶應義塾) 2007.05.24, 全文・全図等参照 & JP 5288395 B2	1-17
A	JP 2014-510075 A (エフ・ホフマンーラ・ロシュ・アクチュエンゲゼルシャ フト) 2014.04.24, 全文・全図等参照 & US 2014/0099264 A1 & WO 2012/119999 A1 & EP 2683290 A1	1-17