

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6725699号  
(P6725699)

(45) 発行日 令和2年7月22日(2020.7.22)

(24) 登録日 令和2年6月29日(2020.6.29)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867 Z

請求項の数 8 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2018-560418 (P2018-560418)  
 (86) (22) 出願日 平成29年2月6日(2017.2.6)  
 (65) 公表番号 特表2019-504644 (P2019-504644A)  
 (43) 公表日 平成31年2月21日(2019.2.21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2017/001308  
 (87) 国際公開番号 W02017/135800  
 (87) 国際公開日 平成29年8月10日(2017.8.10)  
 審査請求日 平成30年9月10日(2018.9.10)  
 (31) 優先権主張番号 10-2016-0015103  
 (32) 優先日 平成28年2月5日(2016.2.5)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)

(73) 特許権者 518277055  
 エスエルビゲン・インコーポレイテッド  
 S L B I G E N I N C .  
 大韓民国、13488 ギョンギード、ソ  
 ンナムーシ、ブンダンーク、デワンパンヨ  
 ーロ、700、ビルディングシー、7エフ  
 7F, Bldg. C, 700, Daewa  
 ngpangyo-ro, Bundang  
 -gu, Seongnam-si, Gye  
 onggi-do 13488, Repu  
 blic of Korea  
 (74) 代理人 100108855  
 弁理士 蔵田 昌俊  
 (74) 代理人 100103034  
 弁理士 野河 信久

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T R A I L と C D を発現している間葉系幹細胞およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T N F 関連アポトーシス誘導リガンド ( T R A I L ) タンパク質、およびシトシンデア  
 ミナーゼ ( C D ) タンパク質を発現している不死化した間葉系幹細胞であって、前記 T R  
 A I L は前記細胞の表面に発現されることを特徴とする不死化した間葉系幹細胞。

【請求項 2】

前記 T R A I L タンパク質が配列番号 1 のアミノ酸配列からなるポリペプチドである、  
 請求項 1 に記載の不死化した間葉系幹細胞。

【請求項 3】

前記 C D タンパク質が配列番号 3 のアミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項  
 1 に記載の不死化した間葉系幹細胞。

【請求項 4】

前記間葉系幹細胞はレンチウイルスベクターを使用して製造し、前記ベクターが 1 つま  
 たは 2 つのプロモーターを含む、請求項 1 に記載の不死化した間葉系幹細胞。

【請求項 5】

前記プロモーターが、サイトメガウイルス ( C M V )、呼吸器合胞体ウイルス ( R S V )  
 )、ヒト伸張因子 - 1 アルファ ( E F - 1 ) またはテトラサイクリン応答エレメント ( T R E )  
 プロモーターである、請求項 4 に記載の不死化した間葉系幹細胞。

【請求項 6】

前記ベクターが内部リボソーム侵入部位 ( I R E S ) を含む、請求項 4 に記載の不死化

10

20

した間葉系幹細胞。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の不死化した間葉系幹細胞を有効成分として含む、癌を予防または治療するための医薬組成物。

【請求項 8】

前記癌が、胃癌、結腸癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部癌、黒色腫、子宮頸癌、卵巣癌、直腸癌、子宮内膜癌、ホジキン病、脳腫瘍、肉腫、食道癌、小腸癌、甲状腺癌、前立腺癌、白血病、リンパ腫、膀胱癌、中枢神経系癌、および脊髄腫瘍からなる群から選択される、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、T R A I L ( T N F 関連アポトーシス誘導リガンド ) タンパク質および C D ( シトシンデアミナーゼ ) タンパク質をコードする遺伝子を含む組み換えレンチウイルスベクター、およびそのベクターを用いて作製されたレンチウイルスによりトランスフェクトされた細胞に関連する。

【背景技術】

【0002】

細胞を用いた療法は全世界的に開発されており、特に幹細胞療法の市場は、毎年 of 平均成長率が 11.7% という着実な上昇傾向を示している。

20

【0003】

成人の幹細胞である間葉系幹細胞 ( M S C ) は、骨、軟骨、筋肉、脂肪、および線維芽細胞などに分化することができる、多能性細胞である。加えて M S C は骨髄、臍帯血、および脂肪など種々の成人組織から、比較的容易に得ることができる。M S C は炎症または損傷の部位に移動するというそれらの能力によって特徴付けられており、それは治療薬剤を送達するための送達ベヒクルとして大きな利点でもある。更にヒトの体の免疫機能は、T 細胞、B 細胞、樹枝状細胞、およびナチュラルキラー細胞などの免疫細胞の機能を阻害することにより調節することができる。加えて M S C はインビトロで比較的容易に培養することができるという利点を有し、よって細胞治療剤として M S C を使用するための研究が活発に行われている。

30

【0004】

しかしながら、そのような M S C の利点にも関わらず、細胞療法剤として臨床的に使用することができる M S C を作製するには以下の問題がある。第 1 に、M S C の増殖には制限があるために、それらを大量に産生することは困難である。第 2 に、得られた M S C は異成分からなるために、産生する毎に同じ効果を維持することは困難である。第 3 に、M S C 単独の使用は治療上有効ではない。

【0005】

一方韓国特許番号 1585032 は、ヒドロゲル中で培養された間葉系幹細胞を含む細胞療法剤を開示している。上記の文書は、細胞療法剤として使用するために間葉系幹細胞を単離する工程において、前処理過程を短縮することにより、直接的に投与することができる組成物を提供している。しかしながら、上記で述べた間葉系幹細胞の問題と、その問題を解決するための方法は全く述べられていない。よって細胞治療剤として利用できる間葉系幹細胞の研究を行う必要がある。

40

【発明の開示】

【0006】

技術分野

本発明の目的は、T R A I L タンパク質と C D タンパク質をコードする遺伝子を含む組み換えレンチウイルスと、上記の組み換えレンチウイルスによりトランスフェクトされた宿主細胞を提供することである。

【0007】

50

本発明の他の目的は、上記の組み換えレンチウイルスまたは宿主細胞を含む医薬組成物を提供することである。

【0008】

課題を解決する手段

本発明の1つの目的によれば、TRAILタンパク質とCDタンパク質をコードする遺伝子を含む組み換えレンチウイルスベクターが提供される。

【0009】

更に本発明の他の目的によれば、TRAILタンパク質とCDタンパク質をコードする遺伝子を含む組み換えレンチウイルスが提供される。

【0010】

更に本発明の他の目的によれば、上記の組み換えレンチウイルスによりトランスフェクトされた宿主細胞が提供される。

【0011】

更に本発明の他の目的によれば、活性成分として上記の組み換えレンチウイルスを含む、癌を予防または治療するための医薬組成物が提供される。

【0012】

更に本発明の他の目的によれば、活性成分として上記の宿主ウイルスを含む、癌を予防または治療するための医薬組成物が提供される。

【0013】

発明の有利な効果

本発明のTRAILタンパク質とCDタンパク質をコードする遺伝子を含む組み換えレンチウイルスによりトランスフェクトされた宿主細胞は、TRAILタンパク質とCDタンパク質を発現し、高い細胞増殖速度を維持する。加えて、異常な分化を阻害することができ、癌形成の可能性が阻止され、高い安全性を示す。よってそのレンチウイルスまたは宿主細胞は、細胞療法剤として有用となり得る。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、不死化したMSCと不死化していないMSCの細胞増殖速度を比較したグラフであり、imSMC：不死化したMSCであり；MSC：不死化していないMSCであり；X軸：インキュベーション期間であり；およびY軸：累積的集団倍加レベル(PDL)である。

【図2】図2は、pBD-4レンチウイルスベクター中に挿入された遺伝子コンストラクトの構造の略図であり、TRE：テトラサイクリン反応エレメントを含むプロモーターであり；TRAIL：TNF関連アポトーシス誘導リガンドであり；IRES：内部リボソーム侵入部位であり；およびCD：CDタンパク質である。

【図3】図3は、BM-03細胞株の遺伝子操作の後のMSCと、骨髄由来のMSCの、表面抗原タンパク質CD90、CD44、CD105、CD73（これらはMSCに固有の特性である）などの発現を比較している。

【図4】図4は、遺伝子操作の後のBM-03細胞株の分化能を示し、遺伝子操作の後のBM-03細胞株の脂質生成、骨生成、および軟骨形成の同定を行っている。

【図5】図5は、寄託された株であるBM-03の中で導入遺伝子(TRAILとCD)を検出した結果を示す。レーン1はマーカーを示し、レーン2は陰性コントロールを示し、レーン3は陽性コントロールを示し、レーン4から6はBM-03を示す。

【図6】図6は、FACSを用いたドキシサイクリン依存性のTRAIL発現を示す。

【図7】図7は、FACSにより試験された、TRAILタンパク質とCDタンパク質を発現している間葉系幹細胞の5FC処理による細胞死を示す。

【図8】図8は、継代培養により得られたBM-03細胞のPDLを示すグラフである。

【図9】図9は、遺伝子が導入されたBM-03細胞の核型の解析結果を示す。

【発明の詳細な説明】

【0015】

10

20

30

40

50

発明を実施するための最良の形態

以下において本発明を詳細に述べる。

## 【0016】

本発明はTRAILタンパク質とCDタンパク質をコードする遺伝子を含む組み換えレンチウイルスベクターを提供する。

## 【0017】

本明細書中で使用されるとき、用語「TNF関連アポトーシス誘導リガンド（以下TRAILと称する）」タンパク質は、TNFファミリーの中の2型膜貫通サイトカインに属する。TRAILは自殺遺伝子の一つとして、形質転換細胞のアポトーシスを選択的に誘導する。特にTRAILは、細胞表面に存在する死受容体-4(DR-4)、DR-5、  
10 デコイ受容体またはデコイ受容体-2と結合し、アポトーシスのシグナル伝達システムを活性化する。TRAILは正常細胞に対しては有毒ではなく、癌細胞のみにアポトーシスを特異的に誘導すると知られている。

## 【0018】

本発明のTRAILタンパク質はヒト由来のタンパク質であってもよい。TRAILタンパク質は、3つの受容体に結合可能なホモトリマーの型で存在している。本発明のTRAILタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドであってもよい。TRAILタンパク質は配列番号1のアミノ酸配列と、約70%、80%、90%、95%以上の相同性を有してもよい。一方TRAILタンパク質をコードする遺伝子は、配列番号2のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドであってもよい。加えて、TRAIL  
20 TRAILタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、配列番号2のヌクレオチド配列と、約70%、80%、90%、95%以上の相同性を有してもよい。

## 【0019】

本明細書中で使用されるとき、用語「CDタンパク質」はシトシンデアミナーゼタンパク質であり、CDとウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ(UPRT)が連結した融合タンパク質の型であってもよく、本明細書中で使用されるとき、用語「CDタンパク質」は「CD::UPRT」の代わりに使用することができる。

## 【0020】

上記CDタンパク質を発現している細胞のアポトーシスは、5-フルオロシトシン(5FC)を、強い細胞毒性を有する5-フルオロウラシル(5FU)に変えることによって  
30 誘導される。よってCDタンパク質遺伝子を含むレンチウイルスベクターを含んでいる細胞のアポトーシスを、5FCによる処理で誘導することができる。

## 【0021】

本発明によるCDタンパク質をコードしている遺伝子の配列は、サッカロマイセス・セレヴィシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)のCDアーゼをコードしているFCY1遺伝子と、N末端から35アミノ酸が欠損したUPRTアーゼをコードしているFUR1 105遺伝子を融合することにより、コドン最適化した配列である。そのような配列は、米国特許番号5,338,678、国際公開番号WO96/16183、および国際公開番号WO99/54481の中で述べられているものでもよい。1  
40 態様においてCDタンパク質は、配列番号3のアミノ酸配列を有するポリペプチドであってもよい。加えてCDタンパク質は、配列番号3のアミノ酸配列と約70%、80%、90%、または95%以上の相同性を有してもよい。一方CDタンパク質をコードする遺伝子は、配列番号4のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドであってもよい。加えて、CDタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、配列番号4のヌクレオチド配列と約70%、80%、90%、または95%以上の相同性を有してもよい。

## 【0022】

本明細書中で使用されるとき、用語「レンチウイルスベクター」は1種のレトロウイルスであって、それが一本鎖RNAの型のベクターとなったものであり、「レンチウイルス  
50 転移ベクター」ともいわれている。そのレンチウイルスベクターを感染の標的細胞のゲノムDNA中に挿入して遺伝子を安定に発現させ、有糸分裂および非有糸分裂の細胞に遺伝

子を転移することができる。そのベクターはヒトの体の免疫反応を誘導しないので、その発現は連続的である。加えて、従来のウイルスベクターであるアデノウイルスベクターと比較して、大きなサイズの遺伝子を送達することができるという利点がある。

#### 【0023】

レンチウイルスベクターはさらに、チミジンキナーゼ（TK）タンパク質をコードする遺伝子を含んでもよい。TKタンパク質はATPの 位においてリン酸をチミジンに結合させることにより、チミジル酸生成反応を触媒する酵素であり、それによってチミジンは三リン酸の型に変換される。修飾されたチミジンはDNA複製に使用されず、それを含む細胞の死を誘導すると知られている。本明細書で使用されるTKタンパク質は、既知の配列の何れか1つであってもよい。1態様においてTKタンパク質は、配列番号5のアミノ酸配列を有しているポリペプチドであってもよい。一方TKタンパク質をコードする遺伝子は、配列番号6のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドであってもよい。

10

#### 【0024】

本発明の組み換えレンチウイルスベクターは、1つまたは2つのプロモーターを含むことができる。そのプロモーターは、サイトメガロウイルス（CMV）、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、ヒト伸張因子-1アルファ（EF-1）またはテトラサイクリン応答エレメント（TRE）プロモーターであってもよい。1態様において、その組み換えレンチウイルスベクターは、1つのプロモーターによりTRAILまたはCDタンパク質の発現を調節することができる。そのプロモーターは、発現すべきタンパク質をコードする遺伝子と作動可能に連結されることができる。

20

#### 【0025】

1態様によると、TRAILとCDタンパク質はTREプロモーターに連結していてもよい。TREプロモーターはテトラサイクリン転写活性化（tTA）タンパク質により、プロモーターと連結した遺伝子の転写を活性化することができる。特にtTAタンパク質はTREプロモーターと結合し、テトラサイクリンまたはドキシサイクリンが存在しないときに転写を活性化するが、それに対して、テトラサイクリンまたはドキシサイクリンが存在するときには、それはTREプロモーターと結合して転写を活性化することができない。よってTRAILまたはCDタンパク質の発現を、テトラサイクリンまたはドキシサイクリンの添加または枯渇により調節することができる。

#### 【0026】

用語「作動可能に連結」しているとは、特定のポリヌクレオチドが他のポリヌクレオチドと連結されることによって、それがその機能を行えることを意味する。特定のタンパク質をコードしている遺伝子がプロモーターと作動可能に連結しているという表現は、その連結が、その遺伝子とそのプロモーターの作用によりmRNAに転写され、タンパク質に翻訳されるように行われることを意味する。

30

#### 【0027】

二つ以上の遺伝子が、本発明のレンチウイルスベクター中の1つのプロモーターによってそれらが転写されるように連結されているときには、そのベクターは内部リボソーム侵入部位（IRES）を含んでもよく、それによって各タンパク質を単一の転写産物から発現させることができる。

40

#### 【0028】

用語「内部リボソーム侵入部位（IRES）」は、真核生物のタンパク質合成の間に、5'-キャップ構造の代わりに、転写の中間領域からの翻訳を可能とするように機能する核酸配列をいう。IRESを使用することにより、種々の機能を行う多数のタンパク質を、単一の転写産物から作製することができる。1態様によると、TRAILタンパク質とCDタンパク質がIRESを介して連結した、本発明の組み換えレンチウイルスベクターは、単一の転写産物に転写することができ、その後それぞれから各タンパク質を産生することができる。

#### 【0029】

本発明は、TRAILタンパク質とCDタンパク質をコードする遺伝子を含む組み換え

50

レンチウイルスを提供する。

【0030】

その組み換えレンチウイルスは、本発明のレンチウイルスベクター、パッケージングプラスミド、およびエンベローププラスミドにより、宿主細胞を形質転換し；および、形質転換した宿主細胞からレンチウイルスを単離する工程によって得ることができる。

【0031】

用語「パッケージングプラスミド」と「エンベローププラスミド」は、本発明のレンチウイルスベクターからレンチウイルスを作製するためのヘルパーコンストラクト（例えばプラスミドまたは分離された核酸）を、効率的なトランスフェクションのために提供するものであってもよい。そのようなコンストラクトは、宿主細胞内でレンチウイルスベクターの調製およびパッケージングを行うために有用な要素を含む。上記の要素は、g a p プレカーサーのような構造タンパク質；p o l プレカーサーのようなプロセシングタンパク質；プロテアーゼ；外被タンパク質；および、宿主細胞内でのタンパク質を調製とレンチウイルス粒子の製造に必要な発現ならびに調節シグナルなどを含む。

10

【0032】

組み換えレンチウイルスの産生のために、クロンテックラボラトリー社により提供されるレンチ-Xレンチウイルス発現システム、アドジェーンにより提供されるパッケージングプラスミド（例えばp R S V - R e v、p s P A X、p C 1 - V S V G、p N H Pなど）またはエンベローププラスミド（例えばp M D 2 . G、p L T R - G、p H E F - V S V Gなど）を使用することができる。

20

【0033】

更に本発明は、上記の組み換えレンチウイルスによりトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。

【0034】

用語「トランスフェクション」は、ウイルス感染を介して、組み換えレンチウイルスベクター中に搭載された遺伝子を送達することをいう。

【0035】

本発明による宿主細胞は、ヒト胚性幹細胞（h E S）、骨髄幹細胞（B M S C）、間葉系幹細胞（M S C）、ヒト神経幹細胞（h N S C）、角膜縁（limbal）幹細胞、または口腔粘膜上皮細胞であってよい。本発明の1態様において、宿主細胞は間葉系幹細胞であってよい。

30

【0036】

用語「間葉系幹細胞（M S C）」とは、骨細胞、軟骨細胞、および脂肪細胞を含む、種々の細胞に分化することが可能な多能性間質細胞をいう。間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪、腱、神経組織、線維芽細胞および筋細胞などの特定の器官の細胞に分化することができる。これらの細胞は脂肪組織、骨髄、末梢血、臍帯血、骨膜、真皮、中胚葉由来組織などから単離または精製することができる。

【0037】

その宿主細胞は下記の方法：

1) h T E R Tとc - m y c 遺伝子を含むレンチウイルスによって宿主細胞を一次感染させ；

40

2) 一次感染した宿主細胞を、t T A 遺伝子を含むレンチウイルスにより二次感染させ；

3) T R A I L 遺伝子とC D 遺伝子を含むレンチウイルスにより、二次感染した宿主細胞を三次感染させる、

によって調製することができる。

【0038】

工程1)において、h T E R Tとc - m y c は宿主細胞を不死化する遺伝子である。h T E R Tとc - m y c 以外の不死化遺伝子として知られている遺伝子も、使用することができる。1態様によると、h T E R Tとc - m y c タンパク質は、それぞれ、配列番号9

50

と配列番号7のアミノ酸配列を有するポリペプチドであってもよい。一方、h T E R Tとc - m y cタンパク質をコードする遺伝子は、それぞれ、配列番号10と配列番号8のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドであってもよい。

【0039】

工程2)において、t T Aは標的遺伝子の発現を調節することができる遺伝子であり、テトラサイクリン転写活性化因子を意味する。本明細書で使用するときT e t - o f fシステムは、上記で述べたようにテトラサイクリンまたはドキシサイクリンの存在または非存在に依り、標的タンパク質の発現を調節することができる。

【0040】

工程2)の三次感染は、単一ベクター内にT R A I L遺伝子とC D遺伝子の両者を含む、本発明のベクターを用いて行うことができる。しかしながら本発明の他の態様において、T R A I L遺伝子とC D遺伝子を、それぞれのコンストラクトとして調製し、2つのレンチウイルスベクターの中にそれぞれ挿入することができる。すなわち、T R A I Lタンパク質をコードする遺伝子が発現するように調製された遺伝子コンストラクトが挿入されたレンチウイルスベクター、および、C Dタンパク質をコードする遺伝子が発現するように調製された遺伝子コンストラクトが挿入されたレンチウイルスベクターを、三次感染のために使用することができる。

10

【0041】

上記の方法により調製された細胞をB M - 03と名付け、寄託番号K C T C 13182 B Pとして、韓国生命工学研究院(K R I B B)の微生物資源センターに2017年1月6日に寄託されている。

20

【0042】

本発明は活性成分として上記の組み換えレンチウイルスまたは宿主細胞を含む、癌を予防または治療するための医薬組成物を提供する。

【0043】

癌とは、何れの血液癌と固形癌を包含する癌全般をいう。癌の例には、胃癌、結腸癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部癌、黒色腫、子宮頸癌、卵巣癌、直腸癌、子宮内膜癌、ホジキン病、脳腫瘍、肉腫、食道癌、小腸癌、甲状腺癌、前立腺癌、白血病、リンパ腫、膀胱癌、中枢神経系癌、脊髄腫瘍などを含んでもよい。

【0044】

30

この医薬組成物は一種の細胞療法剤であり、さらに薬学的に許容される担体を含んでもよい。その担体は薬剤の調製に一般的に使用されるものでもよく、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、澱粉、アカシアゴム、リン酸カルシウム、アルギン酸、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、シロップ、メチルセルロース、メチルヒドロキシ安息香酸、プロピルヒドロキシ安息香酸、タルク、ステアリン酸マグネシウム、鉱油などを含んでもよい。

【0045】

加えて、本発明の医薬組成物は薬学的に許容される添加剤をさらに含んでもよく、それは、滑沢剤、湿潤剤、甘味剤、矯味剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されてもよい。

40

【0046】

その担体は本発明の医薬組成物の総重量に基づいて、約1重量%から約99.99重量%、好ましくは約90重量%から約99.99重量%の量で含まれてもよく、薬学的に許容される添加剤は約0.1重量%から約20重量%の量で含まれてもよい。

【0047】

その医薬組成物は、薬学的に許容される担体および賦形剤と共に従来の方法に従って処方することにより単位剤形に調製することができ、または、複数回投与容器中に充填することにより調製することができる。本明細書中において、製剤は溶液、懸濁液、シロップもしくは油中もしくは水媒体中の乳液の形であってもよく、または、抽出物、粉末、散剤

50

、顆粒剤、錠剤もしくはカプセルの形であってもよく、加えて分散剤または安定化剤を含んでもよい。

【0048】

本発明は、本発明の医薬組成物を被験体に投与する工程を含む、上記で述べた癌を予防または治療するための方法も提供する。

【0049】

その被験体は哺乳類、特にヒトであってもよい。医薬組成物の投与経路と用量は種々の手段で調整することができ、被験体へ投与する量は患者の状態と副作用の存在に依り、および最適な投与方法と用量は適切な範囲内で当業者が選択することができる。加えて医薬組成物を、治療されるべき疾患について治療効果を有すると知られている他の薬物または生理学的に活性な物質と組み合わせ投与してもよく、または、他の薬物との組み合わせ製剤の形に製剤化してもよい。

10

【0050】

医薬組成物が非経口的に投与されるとき投与の例は、皮下投与、点眼、腹腔内投与、筋肉内投与、経口投与、直腸投与、眼窩内投与、脳内投与、頭蓋内投与、髄腔内投与、脳室内投与、くも膜下投与、経鼻投与、静脈内投与を含む。

【0051】

上記の投与は1回以上、1回～3回、特に2回に分割された用量で投与されてもよい。繰り返し投与の場合には、それらを12～48時間、24～36時間の間隔で、特に24時間の間隔で投与してもよい。レンチウイルスの場合には投与を、大人については、 $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^{12}$  TU、特に $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^{10}$  TUの量で行ってもよい。一方細胞の場合には投与を、大人については、 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^{11}$  細胞、特に $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^9$  細胞の量で行ってもよい。用量が高い場合には、投与を1日に数回行ってもよい。

20

【0052】

発明の態様

これから先、下記の実施例を参照にして本発明を詳細に述べる。しかしながら、下記の実施例は本発明を説明することを意図するものであって、本発明はそれに限定されない。

【実施例】

【0053】

例1. 不死化間葉系幹細胞(MSC)の調製

1-1. 不死化遺伝子を含むレンチウイルスベクターの調製

MSCを不死化するために、c-My cとhTERT(これらは不死化遺伝子である)をそれぞれ含んでいるレンチウイルスベクターを調製した。Tet-offシステムを使用するために、この中にtTAタンパク質を発現している遺伝子コンストラクトを共に挿入した。

30

【0054】

第1に、pWPTベクター(アドジェーン、米国)の発現カセット中のEFプロモーターをCMVプロモーターに置き換え、その下流にRSVプロモーターを加えることにより、pBDレンチウイルスベクターを調製した。

40

【0055】

c-My c遺伝子(配列番号8)とチミジンキナーゼ(TK)遺伝子(配列番号6)を、IRESを介して連結してpBDレンチウイルスベクター中に挿入し、CMVプロモーターにより発現を調節できるようにした。構築されたベクターをpBD-1と命名した。

【0056】

一方hTERT遺伝子(配列番号10)をpBDレンチウイルスベクター中に挿入し、CMVプロモーターにより発現を調節できるようにした。ゼオマイシンに耐性を有する遺伝子(ZeoR; 配列番号16)をその中に挿入し、RSVプロモーターにより発現を調節できるようにした。構築されたベクターをpBD-2と命名した。

【0057】

50

加えて、tTA（テトラサイクリントランス活性化因子）遺伝子（配列番号12）をpBDレンチウイルスベクター中に挿入し、CMVプロモーターにより発現を調節できるようにした。ピューロマイシンに対して耐性を有する遺伝子（PuroR；配列番号14）をその中に挿入し、RSVプロモーターにより発現を調節できるようにした。構築されたベクターをpBD-3と命名した。

【0058】

1-2. 不死化遺伝子を含むレンチウイルスの調製

例1-1で構築されたレンチウイルスベクターを使用して、不死化遺伝子を含むレンチウイルスを下記の方法により調製した。

【0059】

第1にレンチ-Xウイルス（クロンテックラボラトリー、米国）を、10%ウシ胎児血清を補充したDMEMを用いて150mmディッシュ中で培養した。一方、EndoFree Plasmid Maxi Kit（キアゲン、米国）を用いて、DH5 大腸菌細胞からレンチウイルスベクターを抽出して定量化した。

【0060】

培養されたレンチ-X細胞をPBSで洗浄し、その後3mlのTrypLE（登録商標）Select CTS（登録商標）（Gibco、米国）を、その中に添加した。細胞を37℃で約5分間放置し、その後それらの脱離を確かめた。脱離した細胞を、その中に10%ウシ胎児血清を補充したDMEMを7ml添加することにより中和した。中和した細胞を50mlチューブの中に収集し、1,500rpmで5分間遠心分離した。得られた上清を取り除き、その中に10%ウシ胎児血清を補充したDMEMを10ml添加することにより、細胞を再懸濁した。懸濁された細胞を血球計数器で計測し、その後150mmディッシュの中に $1.2 \times 10^7$ 細胞の量で分注した。分注された細胞を約90%の細胞飽和まで培養し、12μgのレンチウイルスベクター、12μgのpsPAX（アドジェーン；gag-pol発現、パッケージングプラスミド）、および2.4μgのpMD-Gプラスミド（アドジェーン；VSVG発現、エンベローププラスミド）の混合物で細胞を形質転換した。形質転換を促進するために、リポフェクタミン（インビトロゲン、米国）およびPLUS reagent（インビトロゲン、米国）を使用した。形質転換の6時間後培地を、10%ウシ胎児血清を補充したDMEMに置き換えた。48時間の追加培養の後に上清を回収した。

【0061】

得られた上清をレンチウイルス濃縮キット（レンチ-Xコンセントレーター、クロンテックラボラトリー、米国）と混合し、そして4℃で一晩培養した。それを4℃で4,000rpmの条件下で2時間遠心分離してウイルスを得、FBSを含まないDMEMの0.5ml中にそれを再懸濁した。結果として、pBD-1、pBD-2、およびpBD-3レンチウイルスベクターから産生されたレンチウイルスは、それぞれ、 $4.0 \times 10^8$  TU/ml、 $2.0 \times 10^8$  TU/ml、および $1.2 \times 10^9$  TU/mlの濃度で調製された。

【0062】

1-3. 不死化間葉系幹細胞の調製

例1-2で調製された不死化遺伝子を含むレンチウイルスを用いて、不死化MSCを調製した。

【0063】

第1に、骨髄由来MSCを下記の方法で作製した。具体的には、健康なドナーの腸骨稜から骨髄穿刺液を得た。凝集を阻止するために、滅菌容器中で穿刺液を20 IU/mlのヘパリンと混合した。骨髄混合溶液を4℃、739gの条件下で7分間遠心分離し、その後上清を除去し、結果産物を10倍（容積）の滅菌水と混合した。結果産物の混合液を同じ条件下で再び遠心分離し、細胞のペレットを得た。得られたペレットを20%FBSと5ng/ml b-FGF（100-18B, ペプロテック、米国）を補充したDMEM-低グルコース（11885-0834、ギブコ、米国）の中に懸濁し、その後それ

10

20

30

40

50

を培養フラスコ中に分注した。それを37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24~48時間培養し、その後新たな培地と置き換えた。細胞を継代培養し、一方3日~4日の間隔で培地を新しいものと置き換えた。2週間培養した後に、蛍光細胞分析装置を用いてMSCを確認した。

#### 【0064】

上記で調製されたMSCを、例1-2で調製したpBD-1レンチウイルスに、RetroNectin(クロンテックラボラトリー、米国)を用いて100 MOIで感染させた。感染させた細胞を同じ方法により、100 MOIでpBD-2レンチウイルスベクターに感染させた。感染の後、安定化した細胞の培養培地に500 µg/mlのゼオマイシンを添加することにより、pBD-2レンチウイルスに感染した細胞を選択した。

10

#### 【0065】

選択された細胞を100 MOIでpBD-3レンチウイルスベクターに感染させた。感染の後、安定化した細胞の培養培地に1 µg/mlのピューロマイシンを添加することにより、pBD-3レンチウイルスに感染した細胞を選択した。

#### 【0066】

結果として、不死化遺伝子を含むMSCの増殖速度と、不死化遺伝子を含まないMSCの細胞増殖速度を図1に示す。図1に示すように、不死化遺伝子、c-myc、およびhTERTを含むレンチウイルスに感染したMSCは、120日の培養後でも高い細胞増殖速度を維持した。一方、不死化していないMSCの細胞増殖速度は、40日の培養後に急速に低下した。

20

#### 【0067】

##### 例2. TRAILとCD遺伝子を含むレンチウイルスの構築

##### 2-1. TRAILとCD遺伝子を含むレンチウイルスベクターの構築

TRAIL遺伝子(配列番号2)とCD遺伝子(配列番号4)を、調製したpBDレンチウイルスベクターの中に挿入した。この中で、挿入されたTRAILとCD遺伝子は、IRES(内部リボソーム侵入部位)を介して連結され、発現がTREプロモーターにより調節されるように設計した。IRESは5'-キャップ構造がなくても翻訳の開始を許容するリボソーム結合部位であり、単独のmRNAにより2つのタンパク質の発現を可能とする。一方TREプロモーターは、そのプロモーターと連結した遺伝子の発現を、ドキシサイクリンの添加の存在または不存在に依って調節することができる。

30

#### 【0068】

構築されたベクターをpBD-4と名付け、その遺伝子コンストラクトの構造を図2に示す。

#### 【0069】

##### 2-2. TRAILとCD遺伝子を含むレンチウイルスの調製

例2-1で構築したTRAILとCD遺伝子を含むレンチウイルスベクターを用いて、例1-2で述べたのと同じ方法によりレンチウイルスを作製した。作製されたレンチウイルスは $7.6 \times 10^8$  TU/mlの濃度で調製した。

#### 【0070】

##### 例3. TRAILとCD遺伝子を含むレンチウイルスに感染したMSCの調製

##### 3-1. TRAILとCD遺伝子を含むレンチウイルスに感染したMSCの調製

例1-3で調製した不死化MSCを、例2-2で調製したTRAILとCD遺伝子を含むレンチウイルスに感染させることにより、TRAILとCD遺伝子を発現している細胞を調製した。例1-3で述べたのと同じ方法により感染を行った。感染の後に、1 µg/mlのドキシサイクリン(631311、クロンテック、米国)を安定化した細胞の培養培地に添加し、TRAILとCDの発現が抑制された状態で細胞を培養した。細胞が安定化した後に、ドキシサイクリンが除去された細胞培地の中で72時間細胞を培養することにより、TRAILとCDの発現を誘導した。その後、表面上にTRAILを発現している細胞を、FACSを用いて単離した。

40

#### 【0071】

50

具体的に、TRAILとCD遺伝子を含むレンチウイルスに感染した細胞を、 $5 \times 10^5$ 細胞/チューブでFACSチューブに分注し、4 と1,500rpmの条件下で5分間遠心分離し、得られた上清を除去した。1mlのFACS緩衝液(2%ウシ胎児血清を含むPBS)を添加することによって細胞をそれに再懸濁し、同じ条件下で遠心分離し、得られた上清を除去した。上記の洗浄操作をもう1回行った後に、細胞を1mlのFACS緩衝液中に再懸濁した。再懸濁された細胞に、0.3 $\mu$ lのLIVE/DEAD(登録商標)Fixable Near-IR Dead Cell Stain(ライフテクノロジーズ・モレキュラプローブス、米国)、および5 $\mu$ lのAPC抗ヒトCD253抗体(バイオレジェンド、カタログ番号308210、米国)、抗TRAIL抗体を、200 $\mu$ lのFACS緩衝液を添加することにより調製した混合液を添加し、得られた混合液を4 で30分間反応させた。反応の後に上記と同じ方法で細胞を2回洗浄し、得られた上清を除去した。300 $\mu$ lの固定化緩衝液(2%ホルムルデヒドと1%ウシ胎児血清を含むPBS)を洗浄された細胞に添加し、4 に少なくとも15分間放置した。細胞をFACS(LSRFortessa、BDバイオサイエンス、米国)装置で解析し、TRAILを発現している細胞を単離した。

#### 【0072】

単離された細胞を培養してコロニーを形成させた。形成されたコロニーから得られたモノクローナル細胞を培養し、細胞株を確立し、BM-03と名付けた。細胞株BM-03は寄託番号KCTC 13182BPとして、韓国生命工学研究( K R I B B )の微生物資源センターに2017年1月6日に寄託されている。

#### 【0073】

##### 3-2. 確立された細胞株における表面抗原タンパク質発現の試験

遺伝子挿入前の骨髄由来MSCの表面抗原タンパク質の発現と、TRAILとCD遺伝子が挿入されたBM-03細胞株の表面抗原タンパク質の発現を、ヒトMSCアッセイキット(Stemflow(登録商標)、カタログ番号562245、BD)を用いて解析した。各キットの中に含まれたマニュアルに従って実験を行い、その実験結果を図3に示す。

#### 【0074】

図3に示すように、(MSCが内在している特性である)表面抗原タンパク質CD90、CD44、CD105、およびCD73の、TRAILとCD治療遺伝子を発現させる操作を経たBM-03細胞株における発現は、骨髄由来のMSCにおける発現と同じであることが実証された。

#### 【0075】

##### 3-3. BM-03細胞株の分化能の試験

BM-03細胞株を12穴のプレート中に、 $1 \times 10^4$ 細胞/cm<sup>2</sup>の濃度で播種し、脂質生成を試験した。一般的な培養培地を用いて、5%CO<sub>2</sub>と37 の条件下でインキュベーターの中で2~3日間細胞を培養し、その後脂質生成分化培地(StemPro(登録商標) adipogenesis differentiation kit、サーモフィッシャー・サイエンティフィック、A10070-01)で置き換えた。細胞を21日間培養する一方で、培地を3日または4日毎に交換した。培養が完了したときに、細胞をオイルレッドO溶液で染色して顕微鏡で調べた。

#### 【0076】

骨形成を調べるために12穴のプレート中に、 $5 \times 10^3$ 細胞/cm<sup>2</sup>の濃度で細胞を播種した。一般的な培養培地を用いて、5%CO<sub>2</sub>と37 の条件下でインキュベーターの中で2~3日間細胞を培養し、その後骨形成分化培地(StemPro(登録商標) osteogenesis differentiation kit、サーモフィッシャー・サイエンティフィック、A10072-01)で置き換えた。細胞を21日間培養する一方で、培地を3日または4日毎に交換した。培養が完了したときに、細胞をアリザリンレッドSで染色し、顕微鏡で調べた。

#### 【0077】

10

20

30

40

50

軟骨形成を調べるために  $1.6 \times 10^7$  細胞/ml の濃度に細胞を懸濁し、5  $\mu$ l の懸濁液を 24 穴のプレート中に播種し、2 時間培養した。500  $\mu$ l の軟骨形成分化培地 (StemPro (登録商標) chondrogenesis differentiation kit、サーモフィッシャー・サイエンティフィック、A10071-01) をそれに添加し、細胞を 14 日間培養する一方で、培地を 3 日毎に交換した。培養の後に培地を吸引し、細胞を DPBS で洗い流してペレットを取り出した。凍結片 (cryosection) とした後に細胞をアルシアンブルーで染色し、顕微鏡で調べた。結果を図 4 に示す。

【0078】

図 4 に示されるように、TRAIL と CD 治療遺伝子を発現させる遺伝子のための遺伝子操作を受けた BM-03 細胞株は、MSC に内在する特性の分化能を有していた。

10

【0079】

#### 3-4. BM-03 細胞株の中に導入された遺伝子の試験

確立された細胞株である BM-03 のサンプルを、37 の恒温水浴中で約 1 分間解凍し、9 ml の PBS を含んでいる 15 ml のチューブに移し、1,500 rpm で 5 分間の細胞沈降工程 (Cell Down process) にかけた。PBS を完全に除去した後に、ペレットを 1.5 ml チューブ中で 200  $\mu$ l に懸濁し、移した。NucleoSpin (登録商標) Tissue (MN、740952.250) を用いて gDNA を調製し、下記の表 1 に示すように混合液を調製し、続いて下記の表 2 に示す工程により PCR を行った。この中に 100 ng の BM-03 プラスミド DNA を陽性コントロールとして添加し、陰性コントロールとして 1  $\mu$ l の蒸留水を使用した。

20

【0080】

【表 1】

[表1]

順方向プライマー(配列番号17) (10pmol/ $\mu$ l, GX535)	1 $\mu$ l
逆方向プライマー(配列番号18) (10pmol/ $\mu$ l, GX534)	1 $\mu$ l
サンプル(100ng/ $\mu$ g)	1 $\mu$ l
精製水	17 $\mu$ l
全容積	20 $\mu$ l

30

【0081】

【表2】

[表2]

工程	温度	時間	サイクル
第1工程	95°C	5分	1
第2工程	95°C	45秒	35
	58°C	45秒	
	72°C	1分	
第3工程	72°C	7分	1
第4工程	4°C	無限	1

10

## 【0082】

1%アガロ-スゲルを電気泳動キット中に設置した。10 $\mu$ lのDNAサイズマーカーを最初のウェルに搭載し、陰性コントロール、陽性コントロール、およびBM-03サンプル( $\times 3$ )の各10 $\mu$ lを、それぞれ上記の順序で以下のウェルに搭載した。その後

20

100Vで20分間電気泳動を行い、ゲルの写真を撮った。結果を図5に示す。

## 【0083】

図5に示されるように、3つのBM-03細胞株サンプルは全て、陽性コントロールとして同じサイズ(1.2kb)のPCR産物を示した。

## 【0084】

3-5. 確立された細胞株におけるTRAILとCDタンパク質の発現の同定

例3-1で確立されたBM-1細胞株において、例3-1におけるのと同じ方法によってTRAILとCDタンパク質の発現を誘導し、FACSを行い、ドキシサイクリンの存在または非存在に従ってTRAILの発現を同定した。その後、TRAILの発現が同定された細胞株においてCDタンパク質の発現を同定した。

30

## 【0085】

具体的には、2 $\mu$ g/mlのドキシサイクリンを含んでいる10%PBSを補充したDMEMと、2 $\mu$ g/mlのドキシサイクリンを含まない10%PBSを補充したDMEMを用いて、T75フラスコ中に5 $\times 10^5$ の細胞数でBM-03細胞株を播種した。3日間培養した後に細胞を回収した。細胞の数を測定した後に、1群あたり5 $\times 10^5$ の細胞を、PE抗ヒトCD253(TRAIL)抗体(バイオレジェンド、308206)とPEマウスIgG1、アイトタイプコントロール抗体(バイオレジェンド、400112)で染色した。加えて、死んだ細胞を排除した後に発現を同定するために、LIVE/DEAD(登録商標)Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit(サーモスフィシャー・サイエンティフィック L34976)抗体を使用した。

40

FACS(LSRFortessa、BDバイオサイエンス)装置を用いてサンプルを解析した。同じ方法で細胞を培養した後に、ドキシサイクリンを除去することによりCDの発現を誘導した。100 $\mu$ g/mlの濃度でそれに5-FU(5-フルオロシトシン、シグマ)を添加して48時間後、アポトーシスを観察した。その結果を図6と図7に示す。

## 【0086】

図6に示されたように、ドキシサイクリンを添加したときにTRAILは発現しないことが見出されたが、ドキシサイクリンを除去した培地の中で培養されたBM-03細胞株においてTRAILは発現した。さらに図7において示されるように、もしCDタンパク質が発現したならば、細胞は5FUにより殺されることが見出された。すなわちCDタン

50

パク質の発現のせいで細胞は死ぬ。従って、調製された間葉系幹細胞中で T R A I L タンパク質と C D タンパク質が発現し、それは T e t - o f f システムによって調節されている。

【 0 0 8 7 】

### 3 - 6 . 細胞集団倍加数 ( P D L ) 解析

2  $\mu$  g / m l のドキシサイクリンを含む培地を使用して、4  $\times$  1 0 <sup>5</sup> 細胞で T 7 5 フラスコ中に B M - 0 3 細胞株を播種した。約 3 日間または 4 日間の継代培養により細胞を得て、細胞の総数を計測した。同じ数の細胞を播種し、P D L を 3 日または 4 日毎に測定した。P D L を下記の式 1 を用いて計算し、その結果を図 8 に示す。式 1 において、X は当初の P D L を表し、I は培地内に播種された細胞の当初の数を表し、Y は最終的な細胞収量または増殖期の終わりにおける細胞数を表す。

【 0 0 8 8 】

【数 1】

[式 1]

$$PDL = X + 3.222 (\log Y - \log I)$$

【 0 0 8 9 】

図 8 に示されるように、長期継代培養において安定な増殖が観察された。

【 0 0 9 0 】

### 3 - 7 . 細胞の核型解析

B M - 0 3 細胞株中に遺伝子が導入された細胞の染色体異常を調べるために、解析をエオン ( EONE ) 生命科学研究所 ( 韓国 ) に依頼し、プロトコールに従って行った。解析の結果を図 9 に示す。

【 0 0 9 1 】

図 9 に示されるように、遺伝子が導入された B M - 0 3 細胞の染色体に異常は観察されず、よって正常な核型であると決定された。

以下に、当初の特許請求の範囲に記載していた発明を付記する。

[ 1 ] T N F 関連アポトーシス誘導リガンド ( T R A I L ) タンパク質、およびシトシンデアミナーゼ ( C D ) タンパク質をコードする遺伝子を含む組み換えレンチウイルスベクター。

[ 2 ] T R A I L タンパク質が配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、[ 1 ] に記載の組み換えレンチウイルスベクター。

[ 3 ] C D タンパク質が配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、[ 1 ] に記載の組み換えレンチウイルスベクター。

[ 4 ]

1 つまたは 2 つのプロモーターを含む、[ 1 ] に記載の組み換えレンチウイルスベクター。

[ 5 ] プロモーターが、サイトメガウイルス ( C M V ) 、呼吸器合胞体ウイルス ( R S V ) 、ヒト伸張因子 - 1 アルファ ( E F - 1 ) またはテトラサイクリン応答エレメント ( T R E ) プロモーターである、[ 4 ] に記載の組み換えレンチウイルスベクター。

[ 6 ] 内部リボソーム侵入部位 ( I R E S ) を含む、[ 1 ] に記載の組み換えレンチウイルスベクター。

[ 7 ] T R A I L タンパク質および C D タンパク質をコードする遺伝子を含む、組み換えレンチウイルス。

[ 8 ] [ 7 ] に記載の組み換えレンチウイルスであって、前記組み換えレンチウイルスが、

[ 1 ] に記載のレンチウイルスベクター、パッケージングプラスミド、およびエンベローププラスミドにより、宿主細胞を形質転換し；および  
形質転換した宿主細胞からレンチウイルスを単離する、  
という工程を介して得られる組み換えレンチウイルス。

10

20

30

40

50

[ 9 ] [ 7 ] に記載の組み換えレンチウイルスによりトランスフェクトされた宿主細胞

[ 10 ] 間葉系細胞である、[ 9 ] に記載の宿主細胞。

[ 11 ] 活性成分として [ 7 ] に記載の組み換えレンチウイルスを含む、癌を予防または治療するための医薬組成物。

[ 12 ] 前記癌が、胃癌、結腸癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部癌、黒色腫、子宮頸癌、卵巣癌、直腸癌、子宮内膜癌、ホジキン病、脳腫瘍、肉腫、食道癌、小腸癌、甲状腺癌、前立腺癌、白血病、リンパ腫、膀胱癌、中枢神経系癌、および脊髄腫瘍からなる群から選択される、[ 11 ] に記載の医薬組成物。

[ 13 ] 活性成分として [ 9 ] に記載の宿主細胞を含む、癌を予防または治療するための医薬組成物。

[ 微生物の寄託証 ]

【 0 0 9 2 】

## 【表 3】

特許手続上の微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

国際様式

## 規定7. 1に係る原寄託に対する受託証

エスエルービゲンに対して

エスエルービゲン

大韓民国、13488 ギョンギード、ソンナムーシ、ブンダンーク、デワンパンヨーロ、700、

ビルディングシー、7エフ

10

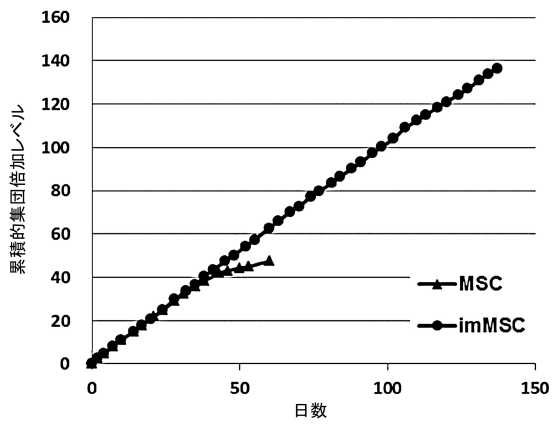
I. 微生物の同定	
寄託者によって与えられた同定レファレンス:  BM-03	国際寄託機関によって与えられた取得番号:  KCTC13182BP
II. 科学的記述および／または提案された分類学的指定	
前記Iで同定された微生物は <input type="checkbox"/> 科学的記述 <input type="checkbox"/> 提案された分類学的指定 (適用可能な部分にxでマーク) を伴う。	
III. 受託及び承認	
本国際寄託機関は、前記Iで同定された微生物を2017年1月6日付けで受け入れたことを承認する。	
IV. 変更の要請の受理	
前記Iで同定された微生物は本国際寄託機関に に受理され、原寄託をブダペスト条約に 基づく寄託に変更するという要請を に受理した。	
V. 国際寄託機関	
名称:微生物資源センター  住所:韓国生命工学研究院(KRIBB) 大韓民国、56212 ジョラクブード、 ジョングプシ、イプシンーギル 181	国際寄託機関を代表する権限を有する者または 承認された任員の署名:  キム チャ ヤン、ディレクター  日付:2017年1月17日

20

30

【 図 1 】

〔 図 1 〕



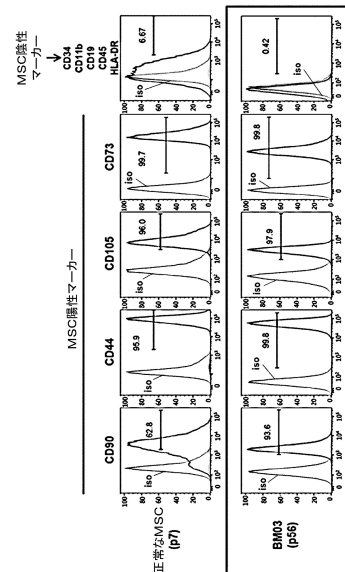
【 図 2 】

〔 5:2 〕



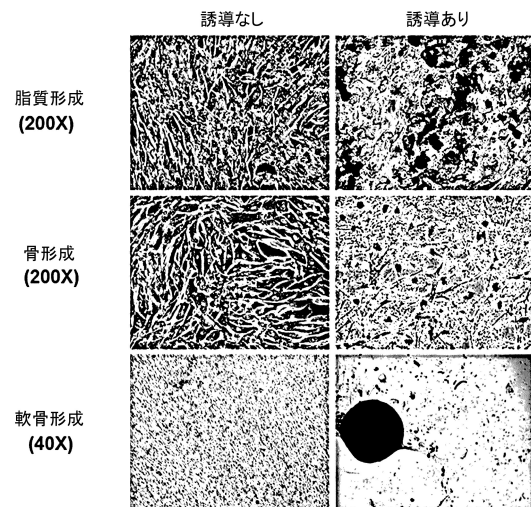
【 図 3 】

〔 図 3 〕



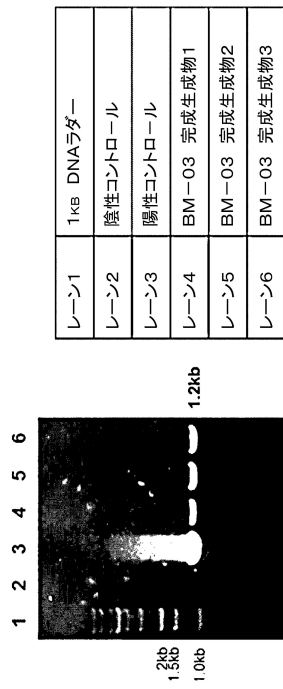
【 図 4 】

〔 図 4 〕



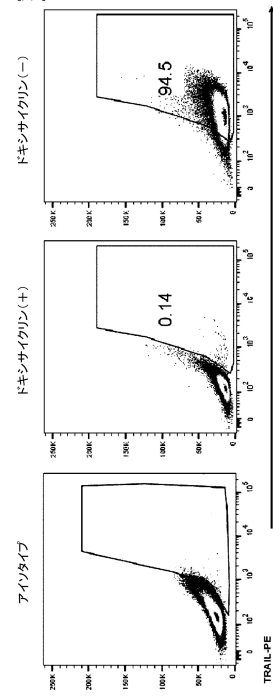
【 図 5 】

【 図 5 】



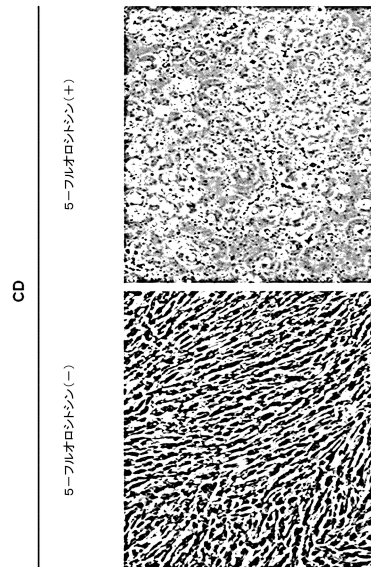
【 図 6 】

【 図 6 】



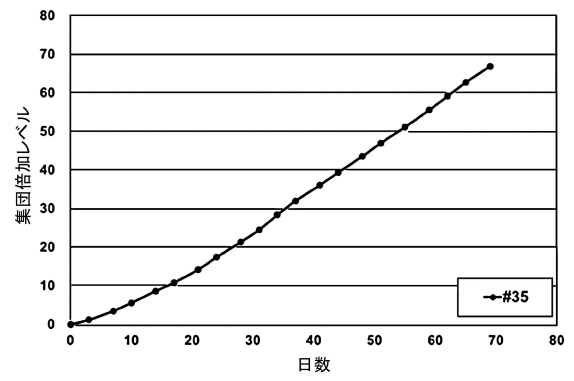
【 図 7 】

【 図 7 】



【 図 8 】

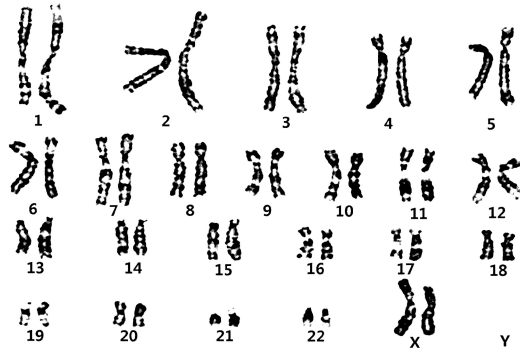
【 図 8 】



【 図 9 】

[図9]

核型の解析結果 >> 46,XX



【 配列表 】

0006725699000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100153051  
弁理士 河野 直樹
- (74)代理人 100179062  
弁理士 井上 正
- (74)代理人 100189913  
弁理士 鶴飼 健
- (74)代理人 100199565  
弁理士 飯野 茂
- (72)発明者 スン、ユン・チュル  
大韓民国、04385 ソウル、ヨンサン - ク、ソピング - 口、67、101 - 404
- (72)発明者 リー、ソン・ミン  
大韓民国、06762 ソウル、ソチョ - ク、ブメ - 口、53、103 - 302
- (72)発明者 キム、ヘイ - ヨン  
大韓民国、05578 ソウル、ソンパ - ク、ベクジェゴブン - 口 20 - ギル、13 - 18、202 - ホ

審査官 竹内 祐樹

- (56)参考文献 特表2015 - 506697 (JP, A)  
J. Cancer Res. Clin. Oncol., 2012, 138(2), pp.347-357  
Cell Death Differ., 2006, 13(10), pp.1740-1751

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12N 15/00 - 15/90  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)  
UniProt/GeneSeq