

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-526005

(P2018-526005A)

(43) 公表日 平成30年9月13日 (2018.9.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
AO 1 K 67/027 (2006.01)	AO 1 K 67/027	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/37 (2006.01)	C 1 2 N 15/37 Z N A	
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735	
C 1 2 N 15/90 (2006.01)	C 1 2 N 15/90 1 O 4 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-511431 (P2018-511431)	(71) 出願人	597160510
(86) (22) 出願日	平成28年9月1日 (2016.9.1)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ
(85) 翻訳文提出日	平成30年3月6日 (2018.3.6)		・インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/049823		REGENERON PHARMACEU
(87) 国際公開番号	W02017/040738		TICALS, INC.
(87) 国際公開日	平成29年3月9日 (2017.3.9)		アメリカ合衆国10591-6707ニュ
(31) 優先権主張番号	62/213, 389		ーヨーク州タリータウン、オールド・ソー
(32) 優先日	平成27年9月2日 (2015.9.2)		・ミル・リバー・ロード777番
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺がんのげっ歯類モデル

(57) 【要約】

本開示は、前立腺がんのげっ歯類モデルを提供する。本明細書で開示されるげっ歯類は、マウスプロバシン遺伝子の5'及び3'調節領域の制御下で発がん性タンパク質（例えば、SV40腫瘍抗原）の前立腺特異的発現をもたらす導入遺伝子を含む。当該げっ歯類は、ヒト前立腺がんの発生に似ている進行型の前立腺腫瘍を発生する。自らのゲノム内に導入遺伝子を含むげっ歯類であって、前記導入遺伝子が、（a）マウスプロバシン遺伝子の5'調節領域、（b）発がん性タンパク質をコードする第1のヌクレオチド配列を含む核酸、及び、（c）前記マウスプロバシン遺伝子の3'調節領域、を含み、前記5'調節領域、前記核酸、及び前記3'調節領域が互いに作用可能に連結している、げっ歯類。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

自らのゲノム内に導入遺伝子を含むげっ歯類であって、前記導入遺伝子が、

(a) マウスプロバシン遺伝子の 5' 調節領域、

(b) 発がん性タンパク質をコードする第 1 のヌクレオチド配列を含む核酸、及び、

(c) 前記マウスプロバシン遺伝子の 3' 調節領域、を含み、

前記 5' 調節領域、前記核酸、及び前記 3' 調節領域が互いに作用可能に連結している、げっ歯類。

【請求項 2】

前記 5' 調節領域が、前記マウスプロバシン遺伝子の転写開始部位の少なくとも 5 kb 上流の核酸配列を含む、請求項 1 に記載のげっ歯類 10

【請求項 3】

前記 5' 調節領域が、前記マウスプロバシン遺伝子の転写開始部位の少なくとも 10 kb 上流の核酸配列を含む、請求項 1 に記載のげっ歯類。

【請求項 4】

前記 5' 調節領域が、前記マウスプロバシン遺伝子の転写開始部位の少なくとも 25 kb 上流の核酸配列を含む、請求項 1 に記載のげっ歯類。

【請求項 5】

前記 5' 調節領域が、前記マウスプロバシン遺伝子の 5' 非翻訳領域 (UTR) を含む、請求項 1 に記載のげっ歯類。 20

【請求項 6】

前記 5' 調節領域が配列番号 6 に記載のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載のげっ歯類。

【請求項 7】

前記 3' 調節領域が、前記マウスプロバシン遺伝子の転写終結部位の少なくとも 5 kb 下流の核酸配列を含む、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のげっ歯類。

【請求項 8】

前記 3' 調節領域が、前記マウスプロバシン遺伝子の転写終結部位の少なくとも 25 kb 下流の核酸配列を含む、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のげっ歯類。

【請求項 9】

前記 3' 調節領域が、前記マウスプロバシン遺伝子の転写終結部位の少なくとも 50 kb 下流の核酸配列を含む、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のげっ歯類。 30

【請求項 10】

前記 3' 調節領域が、前記マウスプロバシン遺伝子の 3' 非翻訳領域を含む、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のげっ歯類。

【請求項 11】

前記 3' 調節領域が配列番号 7 に記載のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のげっ歯類。

【請求項 12】

前記発がん性タンパク質が SV40 腫瘍抗原または Myc を含む、請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載のげっ歯類。 40

【請求項 13】

前記 SV40 腫瘍抗原が、SV40 ラージ T 抗原またはその機能的に活性な断片を含む、請求項 12 に記載のげっ歯類。

【請求項 14】

前記 SV40 腫瘍抗原が、SV40 スモール t 抗原またはその機能的に活性な断片を含む、請求項 12 に記載のげっ歯類。

【請求項 15】

前記第 1 のヌクレオチド配列が、SV40 ラージ T 抗原またはその機能的に活性な断片と、さらに SV40 スモール t 抗原またはその機能的に活性な断片との両方をコードする 50

、請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載のげっ歯類。

【請求項 16】

前記第 1 のヌクレオチド配列が配列番号 1 に記載の配列を含む、請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載のげっ歯類。

【請求項 17】

前記核酸が、レポーターをコードする第 2 のヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 1 から 16 のいずれか 1 項に記載のげっ歯類。

【請求項 18】

前記レポーターがルシフェラーゼである、請求項 17 に記載のげっ歯類。

【請求項 19】

前記第 1 のヌクレオチド配列が、2A ペプチドをコードする第 3 のヌクレオチド配列を介してインフレームで前記第 2 のヌクレオチドに連結している、請求項 17 または 18 に記載のげっ歯類。

【請求項 20】

前記 2A ペプチドが、配列番号 10 のアミノ酸配列を含む F2A ペプチド、配列番号 11 のアミノ酸配列を含む E2A ペプチド、配列番号 12 のアミノ酸配列を含む P2A ペプチド、及び配列番号 13 のアミノ酸配列を含む T2A ペプチドからなる群から選択される、請求項 19 に記載のげっ歯類。

【請求項 21】

前記 2A ペプチドが、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む T2A ペプチドである、請求項 19 に記載のげっ歯類。

【請求項 22】

前記核酸が、前記げっ歯類細胞中で活性なプロモーターに作用可能に連結している選択マーカーをコードする第 4 のヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 1 から 21 のいずれか 1 項に記載のげっ歯類。

【請求項 23】

前記導入遺伝子が、前記ゲノム内の異所的な遺伝子座で統合される、請求項 1 から 22 のいずれか 1 項に記載のげっ歯類。

【請求項 24】

少なくとも 1 ～ 10 個の前記導入遺伝子のコピーが、前記異所的な遺伝子座で直列に統合される、請求項 23 に記載のげっ歯類。

【請求項 25】

前記げっ歯類がマウスまたはラットである、請求項 1 から 24 のいずれか 1 項に記載のげっ歯類。

【請求項 26】

前記げっ歯類がマウスである、請求項 1 から 24 に記載のげっ歯類。

【請求項 27】

前記マウスが、C57BL/6 系統、129 系統、またはこれらの交雑系からなる群から選択される系統のものである、請求項 26 に記載のげっ歯類。

【請求項 28】

前記マウスが F1H4 系統のものである、請求項 27 に記載のげっ歯類。

【請求項 29】

前記発がん性タンパク質が前立腺において特異的に発現される、請求項 1 から 28 のいずれか 1 項に記載のげっ歯類。

【請求項 30】

前記発がん性タンパク質が、前立腺の背側葉、前葉、または背側葉及び前葉において発現される、請求項 29 に記載のげっ歯類。

【請求項 31】

前記げっ歯類が、以下からなる群から選択される少なくとも 1 種の表現型により特徴づけられる、請求項 1 から 30 のいずれか 1 項に記載のげっ歯類：(i) 前記げっ歯類が、

10

20

30

40

50

少なくとも生後約 2 ヶ月以降に、前立腺組織中に前立腺上皮内新生物 (P I N) を呈し始める; (i i) 前記げっ歯類が、前立腺の背側葉、または背側葉及び前葉において P I N を呈する; (i i i) 前記げっ歯類が、実質的に前立腺の背側葉、前葉、または背側葉及び前葉の両方において P I N を呈し、実質的に前立腺の腹葉において P I N を呈しない; (i v) 前記げっ歯類が、少なくとも生後約 6 ヶ月以降に、腺がんを呈し始める; (v) 前記げっ歯類が、前立腺の背側葉、前葉、または背側葉及び前葉の両方において腺がんを呈する; (v i) 前記げっ歯類が、実質的に前立腺の背側葉、前葉、または背側葉及び前葉の両方において腺がんを呈し、実質的に前立腺の腹葉において P I N を呈しない。

【請求項 3 2】

前記げっ歯類が、生後約 4 ~ 6 ヶ月で P I N を呈し始める、請求項 3 1 に記載のげっ歯類。

10

【請求項 3 3】

前記げっ歯類が、生後約 7 ~ 9 ヶ月で腺がんを呈し始める、請求項 3 1 に記載のげっ歯類。

【請求項 3 4】

前記腺がんが神経内分泌がんではない、請求項 3 1 または 3 3 に記載のげっ歯類。

【請求項 3 5】

前立腺において腺がんを呈し、前記腺がんが神経内分泌がんではない、請求項 1 に記載のげっ歯類。

【請求項 3 6】

前記げっ歯類が、生後約 4 ~ 6 ヶ月で前立腺の背側葉及び／または前葉において P I N を呈し始め、生後約 7 ~ 9 ヶ月で前立腺の背側葉及び／または前葉において腺がんを呈し始める、請求項 3 1 に記載のげっ歯類。

20

【請求項 3 7】

請求項 1 から 3 6 のいずれか 1 項に記載のげっ歯類の、単離された細胞または組織。

【請求項 3 8】

ゲノム内に導入遺伝子を含むげっ歯類胚幹 (E S) 細胞であって、前記導入遺伝子が、
 (a) マウスプロバシン遺伝子の 5' 調節領域、
 (b) 発がん性タンパク質をコードする第 1 のヌクレオチド配列を含む核酸、及び、
 (c) マウスプロバシン遺伝子の 3' 調節領域、を含み、
 前記 5' 調節領域、前記核酸、及び前記 3' 調節領域が互いに作用可能に連結している、
 げっ歯類。

30

【請求項 3 9】

マウス E S 細胞またはラット E S 細胞である、請求項 3 8 に記載のげっ歯類 E S 細胞。

【請求項 4 0】

前記発がん性タンパク質が S V 4 0 腫瘍抗原または M y c を含む、請求項 3 8 に記載のげっ歯類 E S 細胞。

【請求項 4 1】

前立腺がんのげっ歯類モデルを作製する方法であって、
 (a) げっ歯類 E S 細胞に導入遺伝子を導入するステップであって、
 (i) マウスプロバシン遺伝子の 5' 調節領域、
 (i i) 発がん性タンパク質をコードする第 1 のヌクレオチド配列を含む核酸、及び、
 (i i i) マウスプロバシン遺伝子の 3' 調節領域、を含み、
 前記 5' 調節領域、前記核酸、及び前記 3' 調節領域が作用可能に連結している、導入するステップと、
 (b) ゲノム内に導入遺伝子を含む修飾げっ歯類 E S 細胞を選択するステップと、
 (c) 前記修飾げっ歯類 E S 細胞を、前記げっ歯類の桑実期以前の宿主胚に導入するステップと、
 (d) 前記宿主胚を代理母に移植するステップと、

40

50

(e) 前記前立腺がんのげっ歯類モデルを得るステップと、を含む、方法。

【請求項 4 2】

前記導入遺伝子が異所的な遺伝子座に統合される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記げっ歯類がマウスまたはラットである、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記発がん性タンパク質が S V 4 0 腫瘍抗原または M y c を含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記発がん性タンパク質が、前記げっ歯類の前立腺において特異的に発現される、請求項 4 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年9月2日に提出された米国仮出願第62/213,389号の優先権の利益を主張し、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、前立腺がんのげっ歯類モデルに関する。本明細書で開示されるげっ歯類は、マウスプロバシン遺伝子の5'及び3'調節領域に作用可能に連結したS V 4 0 腫瘍抗原コード配列を含む導入遺伝子を含む。本明細書で開示されるげっ歯類は、この導入遺伝子の前立腺特異的発現を示し、ヒト前立腺がんの発生に似ている進行性形態の前立腺腫瘍を発生する。

【0003】

配列表の参照による組み込み

2016年8月24日に作成され、E F S - W e b を介し米国特許商標庁に提出された、32350_10161US01_SequenceListing.txt という名称の440KBのASCIIテキストファイルの配列表が、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

ヒト疾患の動物モデルは、疾患の根底にある病理学的機序を理解するための、そして有効な治療法を開発するための重要なツールである。前立腺がんは、米国において今年だけでも約30,000人の男性の命を奪い、新たに200,000人超の男性が当該疾患と診断される見込みとなっている。当技術分野では前立腺がんのマウスモデルが説明されているが、それぞれのモデルには制約がある。例えば、ラットプロバシンプロモーターの制御下でS V 4 0 腫瘍抗原を発現するトランスジェニックマウスは、急速な疾患進行を示したが、典型的には生後6～12週で前立腺上皮内新生物を呈し、生後18～22週で浸潤性がんを呈した。このような結果は、ヒトにおける特徴的にゆっくりとしたがんの発生とは異なる。さらに、マウスモデルの一部では、腹葉において導入遺伝子の顕著な発現が検出されたが、腹葉は、ヒト前立腺がんが典型的に生じる周辺帯に類似しない部分である。加えて、マウスモデルの一部における神経内分泌がんの蔓延も、これらのモデルと神経内分泌がんを有する患者の小規模な亜集団との関連性を制約するものである。

【0005】

そのため、ヒト前立腺がんの病理学的特徴を忠実に再現する、改良された前立腺がんの動物モデルが必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本開示は、新規の前立腺がんのげっ歯類モデルを提供する。本明細書で開示されるげっ歯類は、マウスプロバシン遺伝子の5'及び3'調節領域を利用して、S V 4 0 腫瘍抗原

10

20

30

40

50

またはMycなどの発がん性タンパク質の前立腺特異的発現に向ける。当該げっ歯類は、ヒト前立腺がんの発生及び進行を再現する進行型の前立腺腫瘍を発生する。

【0007】

一態様では、本開示は、ゲノム内に導入遺伝子を含むげっ歯類であって、導入遺伝子が、5'から3'にかけて、マウスプロバシン遺伝子の5'調節領域、SV40腫瘍抗原またはMycなどの発がん性タンパク質をコードする第1のヌクレオチド配列を含む核酸、及びマウスプロバシン遺伝子の3'調節領域を含む、げっ歯類を提供する。5'調節領域、SV40腫瘍抗原などの発がん性タンパク質をコードする第1のヌクレオチド配列を含む核酸、及び3'調節領域は、互いに作用可能に連結して、げっ歯類におけるSV40腫瘍抗原またはMycなどの発がん性タンパク質の前立腺特異的発現に影響を及ぼす。

10

【0008】

一部の実施形態では、導入遺伝子内の5'調節領域は、マウスプロバシン遺伝子の転写開始部位の上流にあるマウスプロバシン遺伝子座からのヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、導入遺伝子内の5'調節領域は、マウスプロバシン遺伝子の転写開始部位のすぐ上流にあるマウスプロバシン遺伝子座からのヌクレオチド配列を含む。あるいくつかの実施形態では、導入遺伝子内の5'調節領域は、マウスプロバシン遺伝子の転写開始部位の少なくとも5kb、10kb、または25kb上流（例えば、すぐ上流）にある配列を含む。一部の実施形態では、5'調節領域は、マウスプロバシン遺伝子の5'非翻訳領域（UTR）を含む。特定の実施形態では、5'調節領域は、配列番号6に記載のヌクレオチド配列を含む。

20

【0009】

一部の実施形態では、導入遺伝子内の3'調節領域は、マウスプロバシン遺伝子の転写終結部位の下流にあるマウスプロバシン遺伝子座からのヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、導入遺伝子内の3'調節領域は、マウスプロバシン遺伝子の転写終結部位のすぐ下流にあるマウスプロバシン遺伝子座からのヌクレオチド配列を含む。あるいくつかの実施形態では、3'調節領域は、マウスプロバシン遺伝子の転写終結部位の少なくとも5kb、25kb、または50kb下流（例えば、すぐ下流）にある配列を含む。一部の実施形態では、3'調節領域は、マウスプロバシン遺伝子の3'非翻訳領域（UTR）を含む。特定の実施形態では、3'調節領域は、配列番号7に記載のヌクレオチド配列を含む。

30

【0010】

一部の実施形態では、導入遺伝子内のSV40腫瘍抗原をコードする核酸配列は、SV40ラージT抗原またはその機能的に活性な断片をコードする。一部の実施形態では、導入遺伝子内のSV40腫瘍抗原をコードする核酸配列は、SV40スモールt抗原またはその機能的に活性な断片をコードする。他の実施形態では、SV40腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列は、SV40ラージT抗原またはその機能的に活性な断片をコードし、さらにSV40スモールt抗原またはその機能的に活性な断片もコードする。特定の実施形態では、SV40腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列は、配列番号1に記載の配列を含む。

【0011】

一部の実施形態では、導入遺伝子はレポーター遺伝子をさらに含む。特定の実施形態では、当該レポーターはルシフェラーゼである。詳細な実施形態では、当該レポーター遺伝子は、配列番号3に記載のヌクレオチド配列を含む。

40

【0012】

当該レポーター遺伝子は、発がん性タンパク質（例えば、SV40腫瘍抗原またはMyc）コード配列に対し、当該レポーター遺伝子が発がん性タンパク質（例えば、SV40腫瘍抗原またはMyc）の発現を反映するように、作用可能に連結している。一部の実施形態では、導入遺伝子内の発がん性タンパク質（例えば、SV40腫瘍抗原）コード配列は、2Aペプチドをコードするヌクレオチド配列を介してインフレイムでレポーター遺伝子に連結している。特定の実施形態では、当該2Aペプチドは、F2Aペプチド、E2A

50

ペプチド、P 2 A ペプチド、及び T 2 A ペプチドからなる群から選択される。詳細な実施形態では、当該 2 A ペプチドは、配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む T 2 A ペプチドである。

【0013】

一部の実施形態では、当該導入遺伝子は、追加のエレメント、例えば、当該導入遺伝子を有するげっ歯類細胞の選択及び同定を可能にする、選択可能なマーカー遺伝子またはカセットを含むことができる。

【0014】

一部の実施形態では、当該導入遺伝子は、げっ歯類遺伝子の異所的な遺伝子座に統合される。あるいくつかの実施形態では、当該導入遺伝子の少なくとも 1 ~ 10 のコピー（すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 またはそれ以上のコピー）がゲノム内の 1 つ以上の異所的な遺伝子座で統合される。特定の実施形態では、当該導入遺伝子の複数のコピー（2、3、4、5、6、7、8、9、10 またはそれ以上のコピー）は、ゲノム内の 1 つの異所的な遺伝子座で直列に統合される。詳細な実施形態では、当該導入遺伝子の 5 コピーは、ゲノム内の 1 つの異所的な遺伝子座で直列に統合される。他の実施形態では、当該導入遺伝子は、標的遺伝子座、例えば内在性プロバシン遺伝子座に統合される。

【0015】

一実施形態では、げっ歯類はマウスである。一部の実施形態では、本明細書で提供されるげっ歯類は、マウスまたはラットである。一部の実施形態では、当該げっ歯類は、C 5 7 B L 系統、1 2 9 系統、またはこれらの交雑種から選択される系統のマウスである。特定の実施形態では、当該げっ歯類は、C 5 7 B L / 6 及び 1 2 9 の交雑種である F 1 H 4 系統のマウスである。

【0016】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるげっ歯類は、本明細書に記載のヒト前立腺がんの発現及び病理学的特徴、例えば、レポーター（例えば、ルシフェラーゼ）及び発がん性タンパク質（例えば、SV 40 T 抗原または Myc）をコードする導入遺伝子が発現される部分、前立腺上皮内新生物（PIN）の発生にかかる時間期間、PIN が発生する前立腺内の部分、前立腺腺がんの発生にかかる時間期間、腺がんが発生する前立腺内の部分、及び発生した腺がんが神経内分泌がんではないという特徴、を含めた発現及び病理学的特徴のいずれかの組み合わせを示す。特定の実施形態では、当該げっ歯類は、生後約 4 ~ 6 ヶ月で前立腺組織中に前立腺上皮内新生物を呈し始める。一部の実施形態では、当該げっ歯類は、生後約 7 ~ 9 ヶ月で腺がんを呈し始める。あるいくつかの実施形態では、当該げっ歯類において発生する腺がんは、神経内分泌がんではない。

【0017】

別の態様では、本開示は、本明細書で提供されるげっ歯類から単離された細胞または組織を提供する。細胞が単離され得るげっ歯類組織としては、例えば、胸腺、脾臓、胃腸、肝臓、肺、膀胱、及び前立腺を挙げることができる。

【0018】

なお別の態様では、本開示は、ゲノム内に導入遺伝子を含むげっ歯類胚幹（ES）細胞であって、当該導入遺伝子が、5' から 3' にかけて、マウスプロバシン遺伝子の 5' 調節領域、SV 40 腫瘍抗原または Myc などの発がん性タンパク質をコードする核酸、及びマウスプロバシン遺伝子の 3' 調節領域を含み、当該 5' 調節領域、SV 40 腫瘍抗原または Myc などの発がん性タンパク質をコードする当該核酸、及び当該 3' 調節領域が、互いに作用可能に連結している、げっ歯類胚幹（ES）細胞を提供する。一部の実施形態では、当該げっ歯類 ES 細胞は、マウス ES 細胞またはラット ES 細胞である。

【0019】

さらなる態様では、本開示は前立腺がんのげっ歯類モデルを作製する方法であって、げっ歯類 ES 細胞のゲノム内に、5' から 3' にかけて、マウスプロバシン遺伝子の 5' 調節領域、SV 40 腫瘍抗原または Myc などの発がん性タンパク質をコードする核酸、及

びマウスプロバシン遺伝子の3'調節領域を含む導入遺伝子を導入するステップであって、当該5'調節領域、SV40腫瘍抗原またはMy cなどの発がん性タンパク質をコードする当該核酸、及び当該3'調節領域が、互いに作用可能に連結している、導入するステップと、ゲノム内に当該導入遺伝子を含む修飾げっ歯類ES細胞を選択するステップと、当該修飾げっ歯類ES細胞を、桑実期以前の当該げっ歯類の宿主胚に導入するステップと、当該宿主胚を代理母に移植するステップと、前立腺がんのげっ歯類モデルを得るステップと、を含む方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0020】

本出願のファイルには、カラーで制作された図面が少なくとも1点含まれている。カラー図面を含む本特許のコピーは、要請時及び必要料金の支払時に特許商標庁から提供されることになる。

【図1】図1は、前立腺がんのマウスモデルの作製に使用される導入遺伝子及びその構成成分の例を示す図である。導入遺伝子は、5'から3'にかけて、マウスプロバシン遺伝子から約51 kbの5'調節領域、SV40腫瘍抗原をコードする核酸配列、T2Aペプチドをコードする核酸配列、ルシフェラーゼレポーターをコードする核酸配列、ネオマイシン選択カセット、及びマウスプロバシン遺伝子から約107 kbの3'調節領域を含む。

【図2】図2は、Luci-TRAMP ESクローンA-C10 (5x)の同定及びESクローン由来マウスにおける導入遺伝子の前立腺特異的発現を示す図である。遺伝子導入mRNAを、定量的PCR (qPCR)を用いて、T抗原及びルシフェラーゼ導入遺伝子に対し設計したアッセイで評価した。生後8週のマウスからの組織を採取し、直ちにRNALater試薬に浸した。全RNAをRegeneron DNACoreにより抽出し、PerkinElmer社の指示に軽微な変更を行ったものに従ってqPCRを実施した。野生型 (交雑種非トランスジェニック対照マウス)、A-B1 (導入遺伝子の発現が低い/ないマウス)、A-B8 (中程度、ただし異所性発現のマウス)、A-C10 (前立腺背側葉 (DLP) 及び前立腺前葉 (AP) 及び精嚢 (SV) のみに発現される約5コピーの導入遺伝子を有するLuci-TRAMPマウス)。グラフ内でバーにより表される組織の順序は、左から右へ、DLP、AP & SV、膀胱、肝臓、肺、腎臓、心臓、胸腺、及び唾液腺である。

【図3A】図3A~3Cは、Luci-TRAMPマウスの一生を通じたいくつかの月齢における縦断的インビボ生物発光イメージングを示す図である。図3Aにおいて、F1H4野生型対照マウスは、加齢に伴ういかなる生物発光も示さなかったが、Luci-TRAMPマウスは、加齢に伴い腹部に生物発光の増加を示した。

【図3B】図3A~3Cは、Luci-TRAMPマウスの一生を通じたいくつかの月齢における縦断的インビボ生物発光イメージングを示す図である。図3Bは、この腹部生物発光の代表例 (マウスID番号1255743) であり、生後11ヵ月におけるルシフェラーゼ遺伝子の双方向の泌尿生殖器発現が非常に明らかである。野生型F1H4対照は生物発光を示さなかったが、第2の対照マウス (R26-L-Luc2) は、ルシフェラーゼ遺伝子をユビキタスなROSA26 (R26) プロモーターから発現させたため、全臓器及び全月齢で生物発光を示した。

【図3C】図3A~3Cは、Luci-TRAMPマウスの一生を通じたいくつかの月齢における縦断的インビボ生物発光イメージングを示す図である。図3Cは、肺、ならびに場合によっては肝臓及び骨髄 (BM)、におけるルシフェラーゼ遺伝子の検出を示している。指示組織を用いてqPCRアッセイ (図2で記載したものと同一) を実施し、結果から、Luci-TRAMP肺で検出され、いずれの対照系統の肺と比較しても顕著であるT抗原導入遺伝子シグナルの存在が示された。Luci-TRAMP BM及び肝臓からのシグナルは、当該肺より低かったが、対照組織と比較したときに統計的に有意であった。ルシフェラーゼqPCRの結果は、Luci-TRAMP肺から、F1H4肺と比較して統計的に有意なシグナルが示された。BM及び肝臓のシグナルは野生型の組織よりも高

10

20

30

40

50

かったが、統計的な有意性には至らなかった。R 2 6 - L - L u c 2 マウスからの結果は L u c i - T R A M P マウスからのシグナルをしのぐものであり、グラフからは除いた。

【図 4 A】図 4 A ~ 4 B は、L u c i - T R A M P マウス及び野生型マウスの背側外側葉のパラフィン切片における代表的なヘマトキシリン／エオシン染色画像である。図 4 A は、L u c i - T R A M P マウスの前立腺背側葉からの前立腺上皮内新生物（P I N グレードは各サブパネルのラベルに記載されている）を示している。生後 8 ヶ月までに、過形成が腺がんに行進したが、ただし基底辺縁部はインタクトであった。生後 1 1 ヶ月までに、ますます前立腺の間質が間質細胞で浸潤された（おそらくは免疫性質のもの）。これとは対照的に、野生型 F 1 H 4 前立腺は、生後 1 1 ~ 1 6 ヶ月でいくらか年齢に関連した過形成を示したが、L u c i - T R A M P 前立腺のポイントには達しなかった。

10

【図 4 B】図 4 A ~ 4 B は、L u c i - T R A M P マウス及び野生型マウスの背側外側葉のパラフィン切片における代表的なヘマトキシリン／エオシン染色画像である。図 4 B は、L u c i - T r a m p 前葉における高悪性度 P I N から腺がんへの同様な進行を、野生型対照マウスにおける同様な正常な前立腺上皮と比較して示している。

【図 5 A】図 5 A ~ 5 B は、L u c i - T R A M P マウスにおいて発生した前立腺腫瘍が上皮腫瘍であり、神経内分泌腫瘍ではないことを実証している。図 5 A は、抗 E - カドヘリン抗体を用いた前立腺組織サンプルの免疫染色を示している。黒褐色の沈着は、抗体が、管腔上皮細胞が発現するタンパク質に対し特異的に反応していた場所を示す。

【図 5 B】図 5 A ~ 5 B は、L u c i - T R A M P マウスにおいて発生した前立腺腫瘍が上皮腫瘍であり、神経内分泌腫瘍ではないことを実証している。図 5 B は、抗 E - シナプトフィジン抗体を用いた前立腺組織サンプルの免疫染色を示している。脾臓内の褐色の反応産生物は、本来神経内分泌系である島細胞を示している。これとは対照的に、F 1 H 4 野生型前立腺及び L u c i - T R A M P 前立腺については、いずれの葉（D L P または A P）も特に反応産生物を示さなかった。標準的手順に従って免疫組織化学プロトコールを実施し、パラフィン切片を切り、脱パラフィンし、指示抗体と反応させた。ホースラディッシュペルオキシダーゼと結合した 2 次抗体を、1 次抗体の宿主に対し、特定の相互作用を増幅するために使用した。免疫複合体を視覚化するために D A B（図 5 B）を使用した。

20

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 1】

30

配列番号 1 ~ 1 7 を以下に概括する。配列は、本開示の最後に記載する。

- 1 S V - 4 0 T 抗原コード配列（ラージ T 及びスモール t 抗原をコードする）
- 2 T 2 A コード配列
- 3 ルシフェラーゼコード配列
- 4 S V - 4 0 後期ポリ（A）配列
- 5 ネオマイシン選択カセット
- 6 5 1 k b のマウスプロバシン遺伝子の 5 ' 調節領域配列
- 7 1 0 7 k b のマウスプロバシン遺伝子の 3 ' 調節領域配列
- 8 S V 4 0 ラージ T 抗原のアミノ酸配列 (GenBank: AAB59924.1)
- 9 S V 4 0 スモール t 抗原のアミノ酸配列 (GenBank: AAB59925.1)
- 1 0 ペプチド F 2 A のアミノ酸配列
- 1 1 ペプチド E 2 A のアミノ酸配列
- 1 2 ペプチド P 2 A のアミノ酸配列
- 1 3 ペプチド T 2 A のアミノ酸配列
- 1 4 L X C X E モチーフ
- 1 5 S V 4 0 タグー T 2 A - ルシフェラーゼ導入遺伝子の完全なヌクレオチド配列
- 1 6 マウスプロバシン遺伝子の 5 ' 非翻訳領域（5 ' U T R）を含めた 5 ' 配列
- 1 7 マウスプロバシン遺伝子の 3 ' 非翻訳領域（3 ' U T R）を含めた 3 ' 配列

40

【0 0 2 2】

（詳細な説明）

50

本開示は、新規の前立腺がんのげっ歯類モデルを提供する。本明細書で開示されるげっ歯類は、マウスプロバシン遺伝子の5'及び3'調節領域に作用可能に連結した、がん遺伝子または発がん性タンパク質（SV40腫瘍抗原またはMycなど）をコードするヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含む。当該げっ歯類は、この導入遺伝子の前立腺特異的発現を示し、ヒト前立腺がんの発生に似た進行性形態の前立腺腫瘍を発生する。

【0023】

ラットプロバシンプロモーターが駆動するSV40腫瘍抗原の発現に基づいた前立腺がんのトランスジェニックマウスモデルは、当技術分野で説明されている。しかし、これらのトランスジェニックマウスモデルには複数の制約がある。例えば、トランスジェニックマウスは、概して疾患進行が急速であり、典型的には生後6～12週で前立腺上皮内新生物（PIN）を呈し、生後18～22週で浸潤性がんを呈する。この結果は、ヒトにおける特徴的にゆっくりとしたがんの発生とは異なる。さらに、マウスモデルの一部において、腹葉に導入遺伝子の顕著な発現が検出されたが、この部分は、ヒト前立腺がんが典型的に生じる周辺帯に類似していない。加えて、マウスモデルの一部における神経内分泌がんの蔓延も、これらのモデルと神経内分泌がんを有する患者の小規模な亜集団との関連性を制約するものである。

【0024】

本明細書で開示されるげっ歯類は、ヒト前立腺がんにおいて生じる病理学的現象を、既存のマウスモデルよりも良好に再現する。例えば、本明細書で提供されるげっ歯類では、当該導入遺伝子の優勢な発現が前立腺の背側葉に検出されるが、背側葉は、ヒト前立腺がんが典型的に生じるヒト前立腺周辺帯に類似する部分である。さらに、本明細書で提供されるげっ歯類は、進行型の前立腺腫瘍を発生するが、これは、当技術分野で報告されているトランスジェニックマウスよりも疾患進行の速度がはるかに遅く、かつ寿命が長いヒト前立腺腫瘍における、過形成から高悪性度前立腺上皮内新生物（すなわちHGPIN）、浸潤性腺がんに至るまでの様々な段階に似ている。加えて、本明細書で開示されるげっ歯類において発生する腺がんは、本質的に神経内分泌系ではない。

【0025】

いかなる特定の理論にも拘泥する意図はないが、SV40腫瘍抗原を発現させるために当該導入遺伝子に含まれるマウスプロバシン遺伝子の5'調節領域及び／または3'調節領域は、本開示のげっ歯類モデルについて観察された利点に関する重要な因子であり得ると考えられる。

【0026】

導入遺伝子

「導入遺伝子」という用語には、受容生物の染色体または染色体外DNAへの導入のために遺伝子的に操作された核酸分子が含まれる。また、「導入遺伝子」には、生物の染色体または染色体外DNAに統合された外因性核酸も含まれる。

【0027】

本明細書で開示される、トランスジェニックげっ歯類の生成を目的とした導入遺伝子は、5'から3'にかけて、マウスプロバシン遺伝子の5'調節領域、SV40腫瘍抗原をコードする核酸配列、及びマウスプロバシン遺伝子の3'調節領域を含み、これらは互いに作用可能に連結して、げっ歯類におけるSV40腫瘍抗原の前立腺特異的発現に影響を及ぼす。

【0028】

一部の実施形態では、当該導入遺伝子は、中でもレポーター遺伝子及び選択可能なマーカー遺伝子などの、追加的なエレメントを含む。

【0029】

「作用可能に連結」という用語には、機能的関係にある核酸エレメントの連結が含まれる。核酸配列は、他の核酸配列との機能的関係に置かれた場合に「作用可能に連結」している。例えば、プロモーターもしくはエンハンサー、またはプロモーターもしくはエンハンサーを含む5'調節領域は、コード配列の転写に影響を及ぼす場合、コード配列に

作用可能に連結している。本開示の文脈において、マウスプロバシン遺伝子の5'調節領域及びマウスプロバシン遺伝子の3'調節領域は、SV40腫瘍抗原をコードする核酸配列に作用可能に連結して、SV40腫瘍抗原をコードする核酸配列による転写の開始及び終結に影響を及ぼす。

【0030】

本明細書で開示される導入遺伝子は、公知の方法を用いて作製することができる。例えば、導入遺伝子は、細菌相同組み換え及びVELOCIGENE（登録商標）の技術を用いて組み立てることができる（例えば、U. S. 6, 586, 251及びValenzuelaら、High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, 2003, Nature Biotech. 21(6):652-659を参照）。本明細書で提供される導入遺伝子の一例は、配列番号15に記載のヌクレオチド配列を含む。

【0031】

前立腺がんのげっ歯類モデルの生成における使用に好適な様々な導入遺伝子のエレメントを、以下でさらに詳細に説明する。

【0032】

マウスプロバシン遺伝子の5'及び3'調節領域

プロバシンは、元々はラットから単離された前立腺特異的遺伝子である。ラットプロバシンのプロモーター（rPB）遺伝子は、トランスジェニックマウスにおいて異種遺伝子を前立腺に対し特異的に標的化できることが示されている（Greenbergら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3439-3443, 1995; Kasperら、Lab. Invest. 78 (3): i-xv, 1998; Hillら、Cancer Res. 65(22): 10243-10254, 2005）。これらの研究では、利用されるプロモーター領域が、ラットプロバシン遺伝子の5'領域からの比較的短いセグメントに限定されている（Greenbergら（1995）では454bp断片（-426+28）、Kasperら（1998）では11.5kb断片、及びHillら（2005）では458bp断片（-458））。

【0033】

本開示によれば、マウスプロバシン遺伝子からの5'調節領域及び3'調節領域は、SV40腫瘍抗原の前立腺特異的発現に向けるための導入遺伝子に含まれる。

【0034】

「前立腺特異的発現」とは、前立腺における発現が非前立腺の組織及び臓器における発現より実質的に高い、または非前立腺の組織及び臓器における発現が前立腺における発現と比較してわずかであることを意味する。「実質的に高い」とは、前立腺における発現が、他の組織及び臓器における発現よりも、少なくとも50%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、または1000%高いことを意味する。「わずか（insignificant）」とは、このような他の組織の各々における発現が、前立腺における発現の20%、10%、5%、または1%以下であることを意味する。

【0035】

本明細書における導入遺伝子で使用するための5'及び3'調節領域は、マウスプロバシン遺伝子の5'上流領域及び3'下流領域に見いだされる調節エレメントを含み、SV40腫瘍抗原コード配列などの異種遺伝子の前立腺特異的発現を付与するのに十分である。

【0036】

「調節エレメント」という用語には転写調節配列が含まれ、これには5'転写調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、及びサプレッサーエレメント）及び3'転写調節配列（例えば、転写終結配列）が含まれる。また、「調節エレメント」という用語には、転写の効率や転写の安定性、さらに翻訳の開始にも影響を及ぼし得る、5'非翻訳領域（5'UTR）及び3'UTRにおける調節配列も含まれる。

【0037】

本開示によれば、導入遺伝子内のSV40腫瘍抗原コード配列に隣接する5'調節配列は、マウスプロバシン遺伝子の翻訳開始点（すなわち、開始コドンATG）の上流にある

マウスプロバシン遺伝子座からのヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、導入遺伝子内のSV40腫瘍抗原コード配列に隣接する5'調節配列は、マウスプロバシン遺伝子の転写開始点（すなわち、転写開始部位）のすぐ上流にあるマウスプロバシン遺伝子座からのヌクレオチド配列を含む。「転写開始点のすぐ上流」というフレーズは、配列（例えば、5'調節配列）がマウスプロバシン遺伝子の転写開始部位の上流かつ35、30、25、20、15、10、5、2、または1bp以内であることを意味する。一部の実施形態では、導入遺伝子内のSV40腫瘍抗原コード配列に隣接する5'調節配列は、マウスプロバシン遺伝子の転写開始点の約1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、または10kb上流（例えば、すぐ上流）にある配列を含む。他の実施形態では、SV40腫瘍抗原コード配列に隣接する5'配列は、マウスプロバシン遺伝子の転写開始点の少なくとも10kb、11kb、12kb、13kb、14kb、15kb、16kb、17kb、18kb、19kb、または20kb上流（例えば、すぐ上流）にある配列を含む。さらに他の実施形態では、SV40腫瘍抗原コード配列に隣接する5'調節配列は、マウスプロバシン遺伝子の転写開始点の少なくとも15kb、20kb、25kb、30kb、35kb、40kb、45kb、または50kb上流（例えば、すぐ上流）にある配列を含む。特定の実施形態では、SV40腫瘍抗原コード配列に隣接する5'配列は、マウスプロバシン遺伝子の転写開始点の少なくとも約45kb、46kb、47kb、48kb、49kb、または50kb上流（例えば、すぐ上流）にある配列を含む。

10

【0038】

20

一部の実施形態では、導入遺伝子内のSV40腫瘍抗原コード配列に隣接する5'調節配列は、マウスプロバシン遺伝子の5'UTR配列も含む。あるいくつかの実施形態では、SV40腫瘍抗原コード配列に隣接する5'配列は、マウスプロバシン遺伝子の5'UTR配列全体を含む。特定の実施形態では、SV40腫瘍抗原コード配列に隣接する5'調節配列内に含まれるマウスプロバシン遺伝子の5'UTR配列は、配列番号16のヌクレオチド329～469または427～469に記載のヌクレオチド配列を含む。

【0039】

特定の実施形態では、導入遺伝子内のSV40腫瘍抗原コード配列に隣接する5'調節配列は、配列番号6に記載のポリヌクレオチド配列、それと実質的に同一な配列、またはその断片を含む。

30

【0040】

2つの配列を比較する文脈における「実質的に同一な」とは、対象配列が、参照配列に対し少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%、またはそれ以上の配列同一性を有することを意味する。

【0041】

あるいくつかの実施形態では、導入遺伝子内のSV40腫瘍抗原コード配列に隣接する5'調節配列は、配列番号6に記載のポリヌクレオチド配列を含む。他の実施形態では、SV40腫瘍抗原コード配列に隣接する5'調節配列は、少なくとも15kb、20kb、25kb、30kb、35kb、40kb、45kb、または50kbの長さの配列番号6の断片、好ましくは配列番号6の3'末端から測定した長さが上述のいずれかである断片を含む。

40

【0042】

本開示によれば、導入遺伝子内のSV40腫瘍抗原コード配列に隣接する3'調節配列は、マウスプロバシン遺伝子の翻訳終結部位の下流にあるマウスプロバシン遺伝子座からのヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、導入遺伝子内のSV40腫瘍抗原コード配列に隣接する3'調節配列は、マウスプロバシン遺伝子の転写終結部位のすぐ下流にあるマウスプロバシン遺伝子座からのヌクレオチド配列を含む。「転写終結部位のすぐ下流」というフレーズは、配列（例えば、3'調節配列）がマウスプロバシン遺伝子の転写終結部位の下流かつ35、30、25、20、15、10、5、2、または1bp以内であることを意味する。

50

【0043】

一部の実施形態では、導入遺伝子内のSV40腫瘍抗原コード配列に隣接する3'調節配列は、マウスプロバシン遺伝子の転写終結点の少なくとも500bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、または10kb下流（例えば、すぐ下流）にある配列を含む。特定の実施形態では、SV40腫瘍抗原コード配列に隣接する3'配列は、マウスプロバシン遺伝子の転写終結点の少なくとも10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、または100kb下流（例えば、すぐ下流）にある配列を含む。他の実施形態では、SV40腫瘍抗原コード配列に隣接する3'配列は、マウスプロバシン遺伝子の転写終結点の約100kb、101kb、102kb、103kb、104kb、105kb、106kb、または107kb下流（例えば、すぐ下流）にある配列を含む。

10

【0044】

一部の実施形態では、SV40腫瘍抗原コード配列に隣接する3'配列は、マウスプロバシン遺伝子の3'UTR配列も含む。あるいくつかの実施形態では、SV40腫瘍抗原コード配列に隣接する3'配列は、マウスプロバシン遺伝子の3'UTR配列全体及びイントロンを含む。特定の実施形態では、マウスプロバシン遺伝子の3'UTR及びイントロン配列を含む3'配列は、配列番号17のヌクレオチド4～3982に記載されている。

【0045】

特定の実施形態では、SV40腫瘍抗原コード配列に隣接する3'配列は、配列番号7に記載のポリヌクレオチド配列、それと実質的に同一な配列、またはその断片を含む。

20

【0046】

あるいくつかの実施形態では、SV40腫瘍抗原コード配列に隣接する3'配列は、配列番号7に記載のポリヌクレオチド配列を含む。他の実施形態では、SV40腫瘍抗原コード配列に隣接する3'配列は、少なくとも20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、または105kbの長さの配列番号7の断片、好ましくは配列番号7の5'末端から測定した長さが上述のいずれかである断片を含む。

【0047】

SV40腫瘍抗原

多くの実施形態では、がん遺伝子または発がん性タンパク質をコードする核酸が本開示で使用される。一部の実施形態では、当該がん遺伝子はMy cである(Grabowskaら、Cancer Metastasis Rev. 2014 September ; 33(0):377-397)。他の実施形態では、発がん性タンパク質はSV40腫瘍抗原である。

30

【0048】

シミアンウイルス40 (SV40) ゲノムは、5243bpからなり（例えば、Gen Bankアクセッション番号J02400.1を参照）、初期コード領域、後期コード領域、及び調節領域の3つの領域に分類される(Ahujaら、Oncogene 24: 7729-7745 (2005))。初期コード領域は、増殖性感染の初期に発現される3種のタンパク質：ラージT抗原、スモールt抗原、及び17K T抗原をコードする(Ahujaら(2005)(上記参照))。ラージT抗原及びスモールt抗原は、共通のプレmRNA転写物からの選択的スプライシングを通じて生成された2つのmRNAから産生される(vanSantenら、Nucleic Acid Res. 14 (24): 9911-9926 (1986))。SV40ラージT抗原によるp53及び網膜芽腫(Rb)ファミリーの腫瘍抑制剤の阻害、ならびにSV40スモールt抗原によるpp2Aホスファターゼへの作用は、SV40誘導形質転換にとって重要であることが確証されている(Ahujaら (2005)(上記参照))。トランスジェニックマウスにおける、切断型ラージT抗原を含めたSV40腫瘍抗原の発現は、過形成及びがんの発生をもたらす(Ahujaら (2005)(上記参照) ; Hillら、Cancer Res 65: 10243-54, 2005)。

40

【0049】

SV40ラージT抗原は708アミノ酸からなり、スモールt抗原は174アミノ酸か

50

らなる。ラージ T 抗原及びスモール t 抗原は共に、タンパク質の N 末端領域に位置する J ドメインを共有する。ラージ T 抗原は、R b タンパク質結合モチーフ (L X C X E、配列番号 14) 及び核局在化シグナル (N L S) を含めた複数の追加的ドメインを有する。スモール t 抗原は、J ドメインに後続する p p 2 A 結合ドメインを有する。Ahuja ら (2005) (上記参照)を参照されたい。

【0050】

「S V 40 腫瘍抗原」という用語には、全長 (すなわち、野生型) S V 40 ラージ T 抗原もしくはその機能的に活性な断片、全長 (すなわち、野生型) の S V 40 スモール t 抗原もしくはその機能的に活性な断片、またはこれらの組み合わせが含まれる。言い換えれば、導入遺伝子内の S V 40 腫瘍抗原をコードする核酸配列は、全長 S V 40 ラージ T 抗原もしくはその機能的に活性な断片 (スモール t 抗原なし)、全長 S V 40 スモール t 抗原もしくはその機能的に活性な断片 (ラージ T 抗原なし)、またはこれらの組み合わせ (例えば、核酸配列が S V 40 ラージ T 抗原及び S V 40 スモール t 抗原の両方をコードする) をコードすることができる。

10

【0051】

「機能的に活性な断片」という用語は、全長 (野生型) T 抗原に関連付けられた 1 つ以上の機能 (例えば、形質転換誘導、または腫瘍形成の開始、促進、もしくは持続に関連付けられた全長 T 抗原の機能、p 53 または R b の活性阻害におけるラージ T 抗原の機能、あるいは p p 2 A に対する結合及び作用におけるスモール t 抗原の機能) を有する T 抗原の断片を指す。T 抗原の機能的に活性な断片の一例に、Hill ら (2005) (上記参照) で説明されている切断型ラージ T 抗原があるが、これは、野生型ラージ T 抗原 (スモール t 抗原なし) のうちの N 末端のわずかに 121 アミノ酸を含み、「T 121」とも称される。T 121 変異体抗原は、J ドメイン及び p R b 結合ドメインを含み、p R b ファミリータンパク質を不活性化しマウスにおいて P I N 及び腺がんを産生するのに十分であることが見いだされている (Hill ら (2005) (上記参照))。

20

【0052】

野生型 S V 40 T 抗原の腫瘍形成を開始、促進、または持続する機能も維持する他の変異体 S V 40 T 抗原が説明されている。例えば、K a s p e r ら (Lab Invest. 78 (3): i-xv, 1998) により説明される S V 40 遺伝子欠失変異体は、ラージ T 抗原のみを発現しスモール t 抗原を発現せず、マウスにおいて P I N 及び腺がんを誘導することも見いだされた。

30

【0053】

一部の実施形態によれば、導入遺伝子内の S V 40 腫瘍抗原をコードする核酸配列は、全長 S V 40 ラージ T 抗原またはその機能的に活性な断片をコードし、スモール t 抗原をコードしない。あるいくつかの実施形態では、ラージ T 抗原は、配列番号 8 のアミノ酸配列またはそれと実質的に同一な配列を含む。特定の実施形態では、S V 40 腫瘍抗原をコードする核酸配列は、配列番号 8 のアミノ酸配列を含むラージ T 抗原をコードする。別の特定の実施形態では、S V 40 腫瘍抗原をコードする核酸配列は、配列番号 8 の最初の 121 アミノ酸を含む切断型ラージ T 抗原をコードする。

【0054】

一部の実施形態では、導入遺伝子内の S V 40 腫瘍抗原をコードする核酸配列は、全長 S V 40 スモール t 抗原またはその機能的に活性な断片をコードし、ラージ T 抗原をコードしない。あるいくつかの実施形態では、スモール t 抗原は、配列番号 9 のアミノ酸配列またはそれと実質的に同一な配列を含む。特定の実施形態では、S V 40 腫瘍抗原をコードする核酸配列は、配列番号 9 のアミノ酸配列を有するスモール t 抗原をコードする。

40

【0055】

さらに他の実施形態では、導入遺伝子内の S V 40 腫瘍抗原をコードする核酸配列は、全長 S V 40 ラージ T 抗原またはその機能的に活性な断片と、全長 S V 40 スモール t 抗原またはその機能的に活性な断片との両方をコードする。あるいくつかの実施形態では、S V 40 腫瘍抗原をコードする核酸配列は、全長 S V 40 ラージ T 抗原及び全長 S V 40

50

スモール t 抗原の両方をコードする。特定の実施形態では、SV40 腫瘍抗原をコードする核酸は、配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列、またはそれと実質的に同一なヌクレオチド配列を含む。

【0056】

レポーター

一部の実施形態では、本明細書で開示される導入遺伝子は、検出可能なシグナルを提供するかまたはそれを生成可能なレポータータンパク質（すなわち、「レポーター」）をコードする、レポーター遺伝子も含む。本開示における使用に好適なレポーターとしては、 β -ガラクトシダーゼ、mPlum、mCherry、tdTomato、mStrawberry、J-Red、DsRed、mOrange、mKO、mCitrine、Venus、YPet、黄色蛍光タンパク質（YFP）、強化型黄色蛍光タンパク質（EYFP）、Emerald、緑色蛍光タンパク質（GFP）、強化型緑色蛍光タンパク質（EGFP）、CyPet、シアン蛍光タンパク質（CFP）、Cerulean、T-Sapphire、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、またはこれらの組み合わせが挙げられる。

【0057】

あるいくつかの実施形態では、当該レポーターはルシフェラーゼである。「ルシフェラーゼ」という用語には、基質、ルシフェリンの酸化反応を触媒する酸化酵素のクラスが含まれ、生物発光は、この酸化反応の結果として放出される。本明細書での使用に好適なルシフェラーゼとしては、ホタル種 Photinus pyralis 由来のホタルルシフェラーゼ、他の生物由来のルシフェラーゼ、及びこれらの機能的誘導体（例えば、遺伝子工学の手法により作成される機能的誘導体）が挙げられる。野生型（または天然存在）の「機能的誘導体」ルシフェラーゼには、1つ以上のアミノ酸修飾（例えば、付加、欠失、または置換）を有することにより野生型ルシフェラーゼとは異なる、そして野生型ルシフェラーゼの酵素活性を実質的に保持するタンパク質が含まれる。「野生型ルシフェラーゼの酵素活性を実質的に保持する」というフレーズには、機能的誘導体及び野生型の酵素活性を比較した際の、両方向における 30%、25%、20%、15%、10%、5%、2%、または 1% 以下の相違が含まれる。一部の実施形態では、野生型ルシフェラーゼの機能的誘導体は、野生型ルシフェラーゼのアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有する。特定の実施形態では、当該レポーター遺伝子は、ルシフェラーゼをコードし、かつ配列番号 3 に記載のヌクレオチド配列、または配列番号 3 と実質的に同一なヌクレオチド配列を含む。

【0058】

SV40 腫瘍抗原コード配列とレポーター遺伝子との間の連結

レポーター遺伝子配列は、SV40 腫瘍抗原をコードする核酸配列と作用可能に連結して、レポーターの発現が SV40 腫瘍抗原の発現を反映しかつ同時発生するように、導入遺伝子内に配置される。SV40 腫瘍抗原コード配列とレポーター核酸との間の作用可能な連結は、当技術分野で公知のいくつかの方法で、例えばマルチシストロニックな（multicistronic）発現戦略を使用することで、達成することができる。マルチシストロニック発現ベクターは、同じ mRNA から（すなわち、同じプロモーターから產生された転写物から）2つ以上の別々のタンパク質を同時に発現する。タンパク質のマルチシストロニック発現に好適な戦略としては、2A ペプチドの使用及び内部リボソーム進入部位（IRES）の使用が挙げられる。

【0059】

一部の実施形態では、SV40 腫瘍抗原コード配列及びレポーター遺伝子は、2A ペプチドをコードする核酸配列を介して、互いに連結している。当該 SV40 腫瘍抗原コード配列は、2A ペプチドコード配列の N 末端に配置することができ、当該レポーター遺伝子は、2A ペプチドコード配列の C 末端に配置する。代替方法として、当該 SV40 腫瘍抗原コード配列は、2A ペプチドコード配列の C 末端に配置することができ、当該レポーター遺伝子は、2A ペプチドコード配列の N 末端に配置する。

【0060】

2Aペプチドは小さな「自己切断」ペプチドであり、概して長さが18～22アミノ酸である。リボソームが2AペプチドのC末端におけるグリシループロリンペプチド結合の合成をスキップし、2Aペプチドとそのすぐ下流のペプチドとの切断につながることを実証されている(Kimら、PLoS One 2011; 6(4): e18556)。結果として、「切断された」下流ペプチドはそのN末端にプロリンを有する。2A介在の切断は、全真核細胞における普遍的な現象である。2Aペプチドは、ピコルナウイルス、昆虫ウイルス、及びC型ロタウイルスから同定され(Szymczakら、"Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors" Expert Opin Biol Ther 5: 627-638 (2005))、本開示における使用に好適である。あるいくつかの実施形態では、SV40腫瘍抗原及びレポータータンパク質の連結に使用する2Aペプチドは、FMDV 2A(「F2A」)、ウマ鼻炎Aウイルス(ERAV) 2A(「E2A」)、ブタテッショウウイルス-1 2A(「P2A」)、またはThoseaasignaウイルス2A(「T2A」)から選択される2Aペプチドである。詳細な実施形態では、これらの2Aペプチドは、以下の配列を有する。

F2A VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 10)

E2A QCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 11)

P2A ATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 12)

T2A EGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 13)

【0061】

一部の実施形態では、T2Aペプチドは、SV40腫瘍抗原とレポータータンパク質との間の連結を提供するために使用される。一実施形態では、本明細書で使用されるT2Aペプチドは、配列番号13のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、当該T2Aペプチドは、配列番号2のヌクレオチド配列によりコードされる。

【0062】

他の実施形態では、SV40腫瘍抗原コード配列及びレポーター核酸配列は、内部リボソーム進入部位(IRES)を介して互いに連結している。IRESは、当技術分野で十分に立証されたヌクレオチド配列であり、mRNAの途中での翻訳開始を可能にし、それにより単一のmRNA分子から2つ以上のタンパク質産物の翻訳をもたらす。

【0063】

導入遺伝子内の他のエレメント

一部の実施形態では、本明細書で提供される導入遺伝子は、選択マーカーをコードする核酸配列も含む。このような選択マーカーとしては、以下に限定するものではないが、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo^r)、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ(hyg^r)、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ(pur^r)、ブラストサイジンSデアミナーゼ(bsr^r)、キサンチン/グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(gpt)、または単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-k)、またはこれらの組み合わせが挙げられる。

【0064】

当該選択マーカー核酸は発現カセットに含まれてもよく、この選択マーカーをコードする核酸配列は、所望の細胞内で活性の1つ以上のプロモーター、例えば一方がげっ歯類ES細胞などのげっ歯類細胞内で活性であり、他方が細菌細胞内で活性である2つのプロモーター、と作用可能に連結している。

【0065】

一部の実施形態では、選択マーカーをコードする核酸配列には部位特異的組み換え標的配列が隣接し、これにより、導入遺伝子が統合された後に部位特異的組み換え標的配列間にある核酸配列(例えば、選択マーカー核酸)の除去が可能になる。選択マーカー核酸または対象のポリヌクレオチドに隣接し得る部位特異的組み換え標的配列としては、以下に限定するものではないが、loxP、lox511、lox2272、lox66、lox71、loxM2、lox5171、FRT、FRT11、FRT71、attP、a

10

20

30

40

50

t t、r o x、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【0066】

詳細な実施形態では、本明細書で提供される導入遺伝子は、5'から3'にかけて、l o x P (5') 配列、T A T A b o x - h U b (ヒトユビキチンプロモーター)、E M 7 プロモーター、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼコード配列、ポリA配列、及び l o x P (3') 配列を含有するネオマイシン選択カセットを含む。特定の実施形態では、当該ネオマイシン選択カセットは、配列番号5に記載のヌクレオチド配列、またはそれと実質的に同一なヌクレオチド配列を含む。一旦当該導入遺伝子を含むE S細胞クローンが選択されると、当該ネオマイシン選択カセットは、例えば電気穿孔を介して、C r e レコンビナーゼを導入することにより、切除することができる。代替方法として、当該ネオ 10
マイシン選択カセットは、E Sクローンから生成した後代を、C r e レコンビナーゼを発現する除去 (d e l e t o r) げっ歯類系統と交配することにより、除去することができる。

【0067】

一部の実施形態では、本明細書で提供される導入遺伝子は、S V 40 腫瘍抗原コード配列の3'側に配置され、レポーター核酸が存在する場合にはレポーター核酸の3'側に配置される、S V 40 後期領域ポリA配列も含む。特定の実施形態では、当該S V 40 後期領域ポリA配列は、配列番号4に記載のヌクレオチド配列、またはそれと実質的に同一なヌクレオチド配列を含む。

【0068】

前立腺がんのげっ歯類モデル

マウスプロバシン遺伝子の5'及び3'調節領域に作用可能に連結したS V 40 腫瘍抗原をコードする導入遺伝子をゲノム内に含有する、げっ歯類が提供される。このようなげっ歯類は、当該導入遺伝子を前立腺において特異的に発現し、ヒト前立腺がんの発生に似ている進行型の前立腺腫瘍を呈する。

【0069】

当技術分野において、前立腺がんのトランスジェニックマウスモデルが説明されている。例えば、マウス前立腺のトランスジェニック腺がん (T R A M P) モデルはGreenberg ら (1995)(上記参照)、及びGingrich ら (Cancer Res. 56:4096-4102, 1996)により説明されているが、これは前立腺特異的ラットプロバシンミニマルプロモーター (-427/+28bp) を利用してS V 40 ラージT及びスモールt抗原の発現を駆動する。導入遺伝子は、T R A M Pマウスの前立腺上皮において発現され、前立腺の背葉、側葉、及び前葉よりも腹葉において顕著に高いレベルで発現される (Greenberg ら(1995)の図1)。T R A M Pマウスは、生後6~12週までに前立腺上皮内新生物 (P I N) を発生し、これは、生後20~24週までに前立腺の背側葉において低分化で浸潤性の腺がんに行進する (Greenbergら(1995))。T R A M Pマウスに形成された腺がんは離れた部位 (例えば、リンパ節及び肺) への転移を発生する (Gingrichら(1996)(上記参照)) が、骨に転移することは少ない。T R A M Pマウスにおいて発生する腺がんの多くが、神経内分泌を起源とするものであり (Chiaverottiら、AmJ Pathol. 172(1): 236-246, 2008)、このタイプのがんは、ヒト前立腺がん患者の10%に相当するに過ぎない。T R A M Pモデルの派生物がHillら (2005) (上記参照により説明されているが、これは2つのアデニン及びウリジンリッチなエレメント (すなわち「A R E」) を置き換えた切断型ラットプロバシンプロモーターセグメント (-458bp) を利用して、切断型S V 40 ラージT抗原の発現を駆動する。) 導入遺伝子は、前立腺の背葉、前葉、及び腹葉において発現される。このようなT R A M P派生マウスは、生後2ヵ月までにP I Nを発生し、これは生後4ヵ月までにがんに行進する。前立腺がんのL A D YトランスジェニックマウスモデルがKasperら(1998)(上記参照)により説明されているが、これは比較的大きい (11.5kb) ラットプロバシンプロモーターセグメントを利用して切断型S V 40 ラージT抗原を駆動し、前立腺における導入遺伝子発現をもたらす。L A D Yマウスは、生後5~10週までに腺過形成及びP I Nを発生し、次に20週までに高悪性度上皮異形成及び低未分化腺がんを、主に前立腺 40
50

の背側葉及び前葉において発生する。L A D Yマウスは、他の臓器への転移を発生することは少ない。これらのトランスジェニックマウスモデルの全てにおいて疾患進行の速度が急速であり、特徴的にゆっくりとしたヒトにおけるがんの発生とは異なる。T R A M Pマウスにおける神経内分泌がんの蔓延も、このマウスモデルと神経内分泌がんを有する患者の小規模な亜集団との関連性を制約するものである。

【0070】

本明細書で提供されるげっ歯類は、当技術分野で説明されているモデルよりも良好にヒト前立腺がんの病理学的特徴を再現する。例えば、当該導入遺伝子の優勢な発現が当該げっ歯類の背側葉で検出されるが、背側葉は、ヒト前立腺腺がんが典型的に生じるヒト前立腺周辺帯に類似する部分である。さらに、本明細書で提供されるげっ歯類は、進行型の前立腺腫瘍を発生するが、これは、当技術分野で報告されているT R A M P及びL A D Yマウスと比較して疾患進行の速度がはるかに遅く、かつ寿命が長いヒト前立腺がんにおける、過形成から高悪性度前立腺上皮内新生物（すなわちH G P I N）、腺がんに至るまでの様々な段階に似ている。加えて、本明細書で開示されるげっ歯類において発生する腺がんは、本質的に神経内分泌系ではない。

10

【0071】

一部の実施形態では、当該導入遺伝子は、当該げっ歯類の前立腺の背側葉及び／または前葉において発現される。一部の実施形態では、背側葉及び／または前葉における当該導入遺伝子の発現は、前立腺の腹葉におけるものよりも高い。特定の実施形態では、背側葉、前葉、または背側葉及び前葉を合わせたものにおける当該導入遺伝子の発現は、腹葉における発現よりも実質的に高い（すなわち、少なくとも30%、40%、50%、75%、100%またはそれ以上高い）。

20

【0072】

本明細書で提供されるげっ歯類は、前立腺上皮内新生物、すなわちP I Nを発生する。P I Nは、典型的には、既存の腺腔（g l a n d u l a r s p a c e）内における浸潤を伴わない（すなわち、基底膜が破られていない）非定型細胞の増殖によって特徴づけられる。一部の実施形態では、当該げっ歯類は、生後約3～7ヵ月、または生後約4～6ヵ月でP I Nを呈し始める。あるいくつかの実施形態では、当該げっ歯類は、少なくとも生後約2、3、4、5、または6ヵ月までP I Nを呈しない。一部の実施形態では、当該げっ歯類において発生するP I Nは、前立腺の背側葉、または背側葉及び前葉にある。特定の実施形態では、当該げっ歯類において発生するP I Nは、実質的に前立腺の背側葉及び／または前葉にあり、実質的に前立腺の腹葉にはない。「実質的に」という用語は、P I Nを呈する部分の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上が前立腺の背側葉及び／または前葉にあり、P I Nを呈する部分の50%、40%、30%、20%、10%以下が前立腺の腹葉にあることを意味する。

30

【0073】

本明細書で提供されるげっ歯類は、前立腺腺がんを発生する。腺がんは、概して、非定型細胞の浸潤性及び／または破壊的増殖により特徴づけられる。一般的には、この非定型細胞はある程度の腺性分化を有する。一部の実施形態では、当該げっ歯類は、生後約7～9ヵ月、または生後約8ヵ月で前立腺腺がんを呈し始める。あるいくつかの実施形態では、当該げっ歯類は、少なくとも生後約6、7、8、9、または10ヵ月まで腺がんを呈しない。一部の実施形態では、当該げっ歯類において発生する腺がんは、前立腺の背側葉、または背側葉及び前葉にある。特定の実施形態では、当該げっ歯類において発生する腺がんは、実質的に前立腺の背側葉及び／または前葉にあり、実質的に前立腺の腹葉にはない。「実質的に」という用語は、腺がんを呈する部分の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上が前立腺の背側葉及び／または前葉にあり、腺がんを呈する前立腺内の部分の50%、40%、30%、20%、10%以下が前立腺の腹葉にあることを意味する。

40

【0074】

一部の実施形態では、当該レポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子）は、別

50

の臓器で検出される。特定の実施形態では、当該レポーター遺伝子は、膀胱、肝臓、肺、腎臓、心臓、胸腺、唾液腺、骨、またはこれらの組み合わせから選択される臓器で検出される。

【0075】

一部の実施形態では、当該げっ歯類において発生する腺がんは、神経内分泌がんではない。神経内分泌（NE）がんは、別個の形態及びマーカー発現パターンに関連付けられる（Chiaverottiら（2008）（上記参照））。例えば、NEがんは、低分化で高浸潤性の病変により特徴づけられ、管構造をゆがめる大きな腫瘍を形成し、正常なまたは過形成の腺を捕捉し、通常は複数の葉を巻き込み、しばしば広い部分の壊死をもたらす。免疫染色アッセイにおいて、NEがんは、典型的にはアンドロゲン受容体（AR）の染色が陰性であるか、またはARについて弱く分散した細胞質染色を示すが、シナプトフィジン染色は陽性である。これは、シナプトフィジン染色が陰性であり、ARについて強い核染色がある正常及び過形成前立腺上皮とは著しく対照的である。特定の実施形態では、本明細書で提供されるげっ歯類において発生する腺がんはシナプトフィジンを発現しない。すなわち、例えば免疫染色による判定で、シナプトフィジンの染色は陰性であるが、上皮マーカーのE-カドヘリンに対しては陽性である。

10

【0076】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるげっ歯類は、上述の発現及び病理学的特徴、例えば、導入遺伝子が発現される部分、PINの発生にかかる時間期間、PINが発生する前立腺内の部分、前立腺腺がんの発生にかかる時間期間、腺がんが発生する前立腺内の部分、及び発生した腺がんが神経内分泌がんではないという特徴を含めた、発現及び病理学的特徴のいずれかの組み合わせを示す。多くの実施形態では、当該げっ歯類は以下の特徴のいずれか1つの組み合わせを示すことができる：（i）前立腺の背側葉及び／または前葉における導入遺伝子発現；（ii）少なくとも生後約2、3、4、5、6ヵ月までPINを呈さず、特定の実施形態では、生後約3～7ヵ月、または生後約4～6ヵ月でPINを呈し始める；（iii）前立腺の背側葉、または背側葉及び前葉においてPINを呈し、一部の実施形態では、実質的に前立腺の背側葉及び／または前葉においてPINを呈するが実質的に前立腺の腹葉において呈しない；（iv）少なくとも生後約6、7、8、9、または10ヵ月まで腺がんを呈さず、特定の実施形態では、生後約7～9ヵ月、または生後約8ヵ月で前立腺腺がんを呈し始める；（v）背側葉、または背側葉及び前葉において腺がんを呈し、特定の実施形態では、実質的に前立腺の背側葉及び／または前葉において腺がんを呈するが、実質的に前立腺の腹葉において呈しない。特定の実施形態では、生後約4～6ヵ月で前立腺組織にPINを呈し始め、生後約7～9ヵ月で腺がんを呈し始めるげっ歯類であって、このげっ歯類において発生する腺がんが神経内分泌がんではない、げっ歯類が本明細書で開示される。

20

30

【0077】

本明細書で提供されるげっ歯類は、当技術分野で報告されているTRAMP及びLAYマウスと比較して長い生存時間を有するが、この理由はおそらくは、本明細書で提供されるげっ歯類の疾患進行速度が遅く、かつより攻撃的な神経内分泌がんを発生しないことによる。一部の実施形態では、本明細書で提供されるげっ歯類は、少なくとも生後約16、18、20、22、または24ヵ月まで生きる。特定の実施形態では、当該げっ歯類は、生後24ヵ月よりも長く生きる。

40

【0078】

本明細書で提供されるげっ歯類には、例えば、マウス、ラット、及びハムスターが含まれる。一部の実施形態では、当該げっ歯類はマウスまたはラットである。特定の実施形態では、当該げっ歯類はマウスである。

【0079】

一部の実施形態では、当該げっ歯類は、C57BL系統、例えば、C57BL/A、C57BL/An、C57BL/Grfa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C5

50

7BL/10ScSn、C57BL/10Cr、及びC57BL/Olaから選択されるC57BL系統のマウスである。別の実施形態では、当該げっ歯類は、129系統、例えば、129P1、129P2、129P3、129X1、129S1（例えば、129S1/SV、129S1/SvIm）、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129/SvJae、129S6（129/SvEvTac）、129S7、129S8、129T1、129T2からなる群から選択される129系統のマウスである（例えば、Festing ら（1999）、Mammalian Genome 10:836; Auerbach ら（2000）、Biotechniques29(5):1024-1028, 1030, 1032を参照）。一部の実施形態では、当該げっ歯類は、前述の129系統及び前述のC57BL/6系統のミックスのマウスである。あるいくつかの実施形態では、当該マウスは、前述の129系統のミックス（すなわち、交雑種）
10、または前述のC57BL系統のミックス、またはC57BL系統及び129系統のミックスである。あるいくつかの実施形態では、当該マウスは、C57BL/6系統及び129系統のミックスである。特定の実施形態では、当該マウスはVGF1系統であり、これは、C57BL/6及び129の交雑種であるF1H4系統としても知られる。他の実施形態では、当該マウスは、BALB系統、例えばBALB/c系統である。一部の実施形態では、当該マウスは、BALB系統及び前述の別系統のミックスである。

【0080】

一部の実施形態では、当該げっ歯類はラットである。あるいくつかの実施形態では、当該ラットは、Wistarラット、LEA系統、Sprague Dawley系統、Fischer系統、F344、F6、及びDark Agoutiから選択される。他の
20実施形態では、当該ラットは、Wistar、LEA、Sprague Dawley、Fischer、F344、F6、及びDark Agoutiからなる群から選択される2つ以上の系統のミックスである。

【0081】

トランスジェニックげっ歯類を作製する方法

本明細書で提供されるげっ歯類は、当技術分野で公知の方法を用いて作製することができる。代表的な実施形態では、マウスプロバシン遺伝子の5'及び3'調節領域に作用可能に連結したSV40腫瘍抗原をコードする導入遺伝子を含有するベクターを、構築することができる。例えば、細菌人工染色体（BAC）のクローン及び相同組み換えならびに
30VELOCIGENE（登録商標）の技術を利用して、所望の導入遺伝子を保有するBACベクターを構築することができる（例えば、U.S. 6,586,251及びValenzuelaら（2003）、High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech 21(6):652-659を参照）。

【0082】

一部の実施形態では、導入遺伝子を保有するBACベクターは、例えば電気穿孔により、rげっ歯類胚幹（ES）に導入することができる。マウスES細胞及びラットES細胞は共に当技術分野で説明されている。例えば、US 7,576,259、US 7,659,442、US 7,294,754、及びUS 2008-0078000 A1（これらの全てが参照により本明細書に組み込まれる）は、マウスES細胞及び遺伝子修飾マウスを作製するVELOCIMOUSE（登録商標）法について記載しており、US2014/0235933 A1及びUS 2014/0310828 A1（これらの全てが参照により本明細書に組み込まれる）は、ラットES細胞及び遺伝子修飾ラットを作製する方法
40について記載している。

【0083】

ゲノム内で統合された導入遺伝子を有するES細胞を選択することができる。一部の実施形態では、げっ歯類の標的遺伝子座に統合された導入遺伝子を有するES細胞が選択される。標的遺伝子座としては、例えば、内在性げっ歯類プロバシン遺伝子座（例えば、相同組み換え介在の統合を介して）が挙げられる。導入遺伝子の標的化された統合を有するES細胞を生成するために、標的化統合を容易にする標的化ベクターを設計し使用することができる。他の実施形態では、ゲノム内で統合された導入遺伝子を有するES細胞は、統合が生じる部位に無関係に選択される。言い換えると、導入遺伝子の1つ以上のコピー
50

は、1つ以上の異所的な遺伝子座（すなわち、標的遺伝子座以外の部位）で統合されてもよい。一部の実施形態では、導入遺伝子の少なくとも1～10のコピーがES細胞のゲノム内で統合される。あるいくつかの実施形態では、導入遺伝子の複数のコピー、例えば、導入遺伝子の2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のコピーが、ES細胞のゲノム内で統合される。当該導入遺伝子の複数のコピーは、ゲノムの1つの遺伝子座に統合されても複数の遺伝子座に統合されてもよい。特定の実施形態では、当該導入遺伝子の複数のコピー（すなわち、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のコピー）は、ゲノムの1つの遺伝子座に直列に統合される。次に、ゲノム内で統合された導入遺伝子を有するES細胞をドナーES細胞として、VELOCIMOUSE（登録商標）法（例えば、US 7,576,259、US 7,659,442、US 7,294,754、及びUS 2008-0078000 A1を参照）、またはUS2014/0235933 A1及びUS 2014/0310828 A1に記載の方法を用いることにより、桑実期以前の胚（例えば、8細胞期胚）への注入に使用する。ドナーES細胞を含む胚は胚盤胞期までインキュベートし、次に代理母に移植して、完全にドナーES細胞に由来するF0げっ歯類を産生する。当該導入遺伝子を有するげっ歯類の子は、導入遺伝子配列の存在を検出する対立遺伝子の修飾（MOA）アッセイ（Valenzuelaら（上記参照））を用いて、尾切片から単離されたDNAを遺伝子型判定することにより同定することができる。）当該導入遺伝子が陽性の子は、当該導入遺伝子の前立腺特異的発現に基づいて（例えば、他の組織及び臓器と比較しての前立腺における発現レベル、及び前立腺の様々なセクション（例えば背葉、側葉、前葉、及び腹葉）における発現レベル）、かつ／または前立腺がんの発生及び信仰に基づいて（例えば、PIN及びがんの発症及び進行）、さらにスクリーニングすることができる。

【0084】

上述のような所望の表現型を示すげっ歯類を生成可能なESクローンは、同定することができる。所望の表現型としては、例えば、実質的に前立腺の背側葉及び前葉における当該導入遺伝子の前立腺特異的発現、及び生後約4～6ヵ月におけるPINの発症及び生後約8ヵ月におけるがんの発症があることが挙げられる。このようなESクローンは、培養し保管することができる。一部の実施形態では、ESクローンは、標的遺伝子座（例えば、内在性プロバシン遺伝子座）で統合された当該導入遺伝子の少なくとも1つのコピーを含有する。他の実施形態では、導入遺伝子の少なくとも1～10のコピーが、ゲノム内の1つ以上の異所的な部位で統合される。一部の実施形態では、ESクローンは、ゲノム内で統合された導入遺伝子の複数のコピー、例えば、導入遺伝子の2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のコピーを含有する。あるいくつかの実施形態では、導入遺伝子の複数のコピー（2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のコピー）は、ゲノムの複数の遺伝子座に統合される。あるいくつかの別の実施形態では、当該導入遺伝子の複数のコピーは、ゲノムの1つの遺伝子座、例えば1つの異所的な遺伝子座で、直列に統合される。特定の実施形態では、クローンA-C10（5x）と称される、ゲノムの1つの遺伝子座に直列に統合された導入遺伝子の5つのコピーを有するマウスESクローンが本明細書で提供される。この導入遺伝子は、マウスプロバシン遺伝子の5'及び3'調節領域が隣接するSV40タグ-T2A-アルシフェラーゼのコード配列を含む。

【0085】

他の実施形態では、ES細胞を使用することなくトランスジェニックげっ歯類が作製され得る。例えば、げっ歯類の非ES細胞のゲノム（例えば、線維芽細胞または誘導多能性細胞）は、従来の形質転換法（例えば、電子穿孔）に基づいて修飾することができ、このような非ES細胞の修飾ゲノムは、核移植手法を用いることにより、好適な受容細胞（例えば、卵母細胞）に移行させることができる。次に、修飾細胞（例えば、修飾卵母細胞）を好適な条件下で懐胎（gestated）させて胚を形成する。例えば、Hanら "Nuclear Transfer in Mouse Oocytes and Embryos", Methods in Enzymology 476: 171-184 (2010)、及びZhouら "Generation of Fertile Cloned Rats by Regulating Oocyte Activation", Science 302: 1179(2003)を参照。

【0086】

トランスジェニックげっ歯類を使用する方法

本明細書で提供されるげっ歯類は、前立腺がんの識別、診断、ステージ分類の方法論開発を可能にすることに加え、前立腺がん進行の根底にある分子的機序のより良好な理解を可能にする。加えて、このようなげっ歯類は、前立腺がんの予防及び治療のためのスクリーニング及び治療剤の開発で使用する事ができる。

【0087】

本明細書は、限定するものとして解釈すべきではない以下の実施例により、さらに例示される。全ての引用参考文献（本出願全体で引用される文献参照、発行特許、及び公表された特許出願を含む）は、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

【実施例】

【0088】

実施例1 Luc1-TRAMPマウスの生成

本実施例は、本明細書でLuc1-TRAMPマウスとも称されるトランスジェニックマウスであって、マウスプロバシン遺伝子の5'調節領域及び3'調節領域が隣接するSV40腫瘍抗原-T2A-ルシフェラーゼポリペプチドの核酸コード配列を含む導入遺伝子を含有する、トランスジェニックマウスの生成を例示する。

【0089】

当該導入遺伝子を含有するベクターは、細菌相同組み換え及びVELOCI GENE（登録商標）の技術を介して構築することができる（例えば、U.S. 6,586,251及びValenzuelaら、High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, 2003, Nature Biotech. 21(6):652-659を参照）。簡潔に述べると、マウスプロバシン遺伝子を含有する細菌人工染色体（BAC）クローンRP23-417B18を利用し、以下のように修飾した。マウス5'-UTRの75塩基対（bps）、SV40-T抗原（終止コドンなし）、次にT2A配列、NcoI/XhoI/NheI制限部位、ならびに終止コドン及びマウス3'-UTRの89bpsからなる1断片をGenScriptにより合成し、伝播のためにR6Kバックボーンにクローニングした。ルシフェラーゼ2cDNA配列及びそのpAを、側面のNcoI及びXhoI制限部位を付加するプライマーを用いて、Promegaプラスミド（pGL4）から増幅した。XhoI及びNheI部位が隣接するネオマイシン耐性カセットをルシフェラーゼ増幅産物と共にライゲーション（co-ligated）合成断片にした。マウスPbsn遺伝子（開始ATGコドンから終止TAGコドンまで）を置き換えるための細菌相同組み換えを上流（75bps）及び下流（89bps）の相同配列により媒介した。組み換えがシームレスであることを確かにするための接合部のシーケンシング及び修飾BACの期待サイズを確認するための制限断片の分析を行った後、電子穿孔を行うためにBacベクターを線状化し精製した。

【0090】

得られた修飾BACベクターを図1に図示する。修飾BACベクターの構成成分のヌクレオチド配列は、配列番号1～7に記載されている。

【0091】

この修飾BACベクターを、VGF1（F1H4としても知られる）C57BL/6J 29F1一代交雑種胚幹（ES）細胞に電子穿孔して、ゲノム内で統合されたSV40-T2A-ルシフェラーゼ導入遺伝子を有する修飾ES細胞を作成した。SV40-T2A-ルシフェラーゼ導入遺伝子を含有する修飾ES細胞を、ジェネテシン（G418）への耐性に基づき選択した。

【0092】

次に、選択したES細胞クローンをドナーES細胞として使用し、VELOCI MOUSE（登録商標）法により、桑実期以前のマウス胚に顕微注入した（例えば、US 7,576,259、US 7,659,442、US 7,294,754、及びUS 2008-0078000 A1を参照）。ドナーES細胞を含むマウス胚を胚盤胞期までインキュベートし、次に代理母に移植して、完全にドナーES細胞に由来するF0マウスを産生した。当該導入遺伝子を有するマウスは、導入遺伝子

10

20

30

40

50

配列の存在を検出する対立遺伝子の修飾 (MOA) アッセイ (Valenzuelaら (上記参照)) を用いて、尾切片から単離されたDNAを遺伝子型判定することにより同定した。当該導入遺伝子が陽性の子をさらに、T抗原及びルシフェラーゼの前立腺特異的発現についてスクリーニングした。

【0093】

クローンA-C10 (5x) を8週間で前立腺特異的導入遺伝子発現を示すマウスを生産するESクローンとして同定した (図2)。遺伝子導入mRNAを、定量的PCR (qPCR) を用いて、T抗原及びルシフェラーゼ導入遺伝子に対し設計したアッセイで評価した。生後8週のマウスからの組織を採取し、直ちにRNALater試薬に浸した。全RNAをRegeneron DNA Coreにより抽出し、PerkinElmer社の指示を少々変更したものに従ってqPCRを実施した。野生型 (交雑種非トランスジェニック対照マウス)、A-B1 (導入遺伝子の発現が低い/ないマウス)、A-B8 (中程度、ただし異所性発現のマウス)、A-C10 (前立腺背側葉 (DLP) 及び前立腺前葉 (AP) 及び精囊 (SV) のみに発現される約5コピーの導入遺伝子を有するLuci-TRAMPマウス)。

【0094】

実施例2 Luci-TRAMPコホートの縦断的分析

ESクローンA-C10 (5x) から生成したLuci-TRAMPマウスをMAID 2319と称し、本実施例で説明する実験で使用した。MAID 2363と称されるマウスは、ゲノム内のRosa 26遺伝子座に導入遺伝子「R26-L-luc2」 (非組織特異的な様式でルシフェラーゼレポーターを発現する) を含有し、野生型F1H4マウスを対象として使用した。

【0095】

35匹のMAID 2319マウス (Luci-TRAMP) のコホートを飼育して前立腺腫瘍が発生させ、並行して同じ数のMAID 2363マウス (R26-L-luc2) 及びF1H4マウスを飼育した。各群から5匹のマウスを2、4、6、8、11、及び16ヵ月目にそれぞれ取り出し、インビボのルシフェラーゼイメージング、 μ CTスキャン (除脂肪量/体脂肪量/骨量を評価するため)、病理組織分析 (開始後4ヵ月)、及び分子フェノタイピング (RNA-seq及びqPCR) を行った。

【0096】

縦断的研究のため、各指示時点 (以下に挿入) において、全動物にルシフェリンを皮下投与 (150mg/kg、PerkinElmer) し、イソフルランにより麻酔をかけ、12~14分後にLumina XRインビボイメージングシステムでスキャンした。

Livingソフトウェアを使用して輪郭外周 (contour perimeter) でROIを自動描画し、5%閾値で強度シグナル (全光束) を計算した。

【0097】

BioSearch Technologies社及びRegeneron社のインハウス用検索パラメーターを用いてqPCRプローブを設計した。組織をTRIzol中で均質化し、クロロホルムを相分離に使用した。全RNAを含有する水相を、miRNeasy Mini Kit (Qiagen、カタログ番号217004) を用いて製造業者の使用に従って精製した。MagMAX (商標) Turbo (商標) DNアーゼ緩衝液及びTURBO DNアーゼ試薬 (Ambion by Life Technologies) を用いてゲノムDNAを除去した。SuperScript (登録商標) VILO (商標) マスターミックス試薬 (Invitrogen by Life Technologies、カタログ番号11755500) を用いてmRNAを逆転写してcDNAにした。ABI 7900HT配列検出システム (Applied Biosystems) を用いて、TaqMan (登録商標) Gene Expressionマスターミックス試薬 (Applied Biosystems by Life Technologies、カタログ番号4370074) でcDNAを増幅した。任意のcDNA入力の差を標準化するための内部制御遺伝子として、 β アクチンを使用した。サンプル間の倍数

差を算出するための参照サンプルとして、野生型 (F1H4) の肺を使用した。組織ごと、遺伝子型ごとに $N = 5$ のオス。Graph Pad Prismソフトウェア (バージョン 3.0) を用いて統計的分析及びグラフによる分析を実施した。スチューデントの独立 t 検定を用いてデータを分析した。結果は P 値 < 0.05 で統計的に有意と考えられた。エラーバーは、SDを示す。

【0098】

結果を図3A～3Cに示す。病理組織学分析から明らかにされた前立腺がんの進行を表1に概括した。mPIN及び腺がんの割り当ては、以下のガイドラインに基づいた。

【0099】

mPIN: 既存の腺腔内における非定型細胞の増殖、ただし浸潤を欠く (すなわち、基底膜は破られていない)。mPINは、特定のGEMモデルと互換性のある形態学 (非定型) に基づき、上皮過形成から分化している。mPINの進行は年齢に関連付けられ、浸潤性がんに進むことが示されている。グレード分けは、構造的または細胞学的異常の程度に基づき、1～4の尺度において数字が高いほど異常の程度が高い:

mPIN1 (上皮過形成) = 軟質核及び/または細胞質の異型 (炎症とは無関係) ならびに単層または2重層に並んだ細胞。

mPIN2 = 細胞層が2層以上で、房状の核異型または乳頭状分岐を伴う。

mPIN3 = 異型の増加/頻度増加及び管腔を部分的～完全に満たすさらに広範な乳頭状分岐。

mPIN4 = 著明な/頻繁な異型ならびに過増殖の分岐及び腺腔の膨満、ただし明らかな浸潤を欠く。

腺がん: ある程度の腺分化を有する非定型細胞の浸潤性及び/または破壊的増殖。マウスにおいては、間質線維増生及び様々な程度の間質性炎症がより進んだ病変と関連付けられている。

【0100】

代表的な病理染色の画像を、図4A～4Bに示す。Luci-TRAMPマウスからの前立腺腫瘍に対する免疫組織化学分析を図5A～5Bに示す。組織を、新たに調製した4%パラホルムアルデヒド中で終夜固定し、次にパラフィン包埋し、切片を作り、病期分類のためにヘマトキシリン及びエオシンで染色した。一部の切片を、シナプトフィジン (Abcam 番号32127) またはE-カドヘリン (Cell Signaling クローン64E10) に対する抗体を用いて、それぞれ神経内分泌または上皮の抗原をアッセイした。

【0101】

これらの研究により、以下のことが明らかになった。

- ・ 生後4ヵ月から、全てのLuci-TRAMP前立腺 (各年齢集団につき5/5マウス) において解剖顕微鏡下で前立腺腫瘍の発生が認められ (透明な前立腺内の真っ白な点/部分)、対象においては異常が検出されなかった。

- ・ 4ヵ月及び6ヵ月では、各月齢で分析した3/3のLuci-TRAMPマウスが、背側外側葉及び前葉の両方で非浸潤性前立腺がんを示した。各月齢群で分析した4/4の対照マウスは、いずれの葉でも一切異常を示さなかった。

- ・ 8ヵ月及び11ヵ月では、各月齢の3/3のLuci-TRAMPマウスが背側外側葉及び前葉の両方で前立腺腺がんを示した。各月齢群で分析した3/3の対照マウスは、いずれの葉でもほとんど異常を示さなかった。

- ・ 16ヵ月では、5/5のLuci-TRAMPマウスが前葉に前立腺腺がんを示し、4/4において背側外側葉に前立腺腺がんが検出された。

- ・ Luci-TRAMPマウスの腹葉はわずかな変化を示した (上皮過形成にとどまった)。

- ・ 生後8ヵ月から微小浸潤が観察されたが、生後16ヵ月までに血管侵入が生じた根拠はなかった。

- ・ IHC分析から、Luci-TRAMP前立腺腫瘍は、上皮マーカーE-カドヘリン

の染色が陽性であり、神経内分泌マーカーシナプトフィジンの染色が陰性だった。

【 0 1 0 2 】

【表 1 - 1】

表1 Luci-TRAMPマウス前立腺病理学の概要

	葉	マウス ID	背側(DLP)	前(CG)	腹
4ヵ月	F1H4	M6	WNL	WNL	WNL
		M8	WNL	WNL	NI
	ROSA: 2319	1258782	WNL	WNL	WNL
		1258784	WNL	WNL	NI
	Luci-TRAMP	M6	上皮過形成	mPIN-3、局所性	上皮過形成
		M8	上皮過形成	mPIN-2、局所性	上皮過形成
		M10*	上皮過形成、局所性	上皮過形成、局所性	NI
6ヵ月	F1H4	M12	WNL	上皮過形成、びまん性	WNL
		M14	WNL	WNL	WNL
	ROSA: 2314	M12	WNL	WNL	WNL (わずかに存在)
		M14	WNL	WNL	NI
	Luci-TRAMP	M11	上皮過形成	mPIN-3、局所性	WNL
		M13	上皮過形成	mPIN-3、びまん性	EH;拡張型腺管腔
		M15	上皮過形成	mPIN-3、びまん性	拡張型腺、WNL
8ヵ月	F1H4	16	WNL	WNL	WNL
		18	WNL	WNL	NI
		20	WNL	WNL	WNL
	Luci-TRAMP	M16	腺がん	腺がん	上皮過形成(NI)
		M18	腺がん	腺がん	上皮過形成

10

20

30

40

【表 1 - 2】

		M20	腺がん	腺がん	NI
11ヵ月	F1H4	21	WNL	上皮過形成、 局所性	NI
		22	WNL	WNL	NI
		23	WNL	WNL	WNL
	Luci-TRAMP	M21	腺がん	腺がん	NI
		M22	腺がん	腺がん	NI
		M23	腺がん	腺がん	NI
16ヵ月	F1H4	26	WNL(側方拡張)	上皮過形成、 局所性	WNL
		27	WNL	WNL	NI
		28	WNL	上皮過形成、 局所性	WNL(拡張)
		29	WNL(側方拡張)	WNL	WNL(拡張)
		30	WNL(拡張)	上皮過形成、 局所性	NI
	Luci-TRAMP	M26	腺がん	腺がん	NI
		M27	非常に少ない標 本	腺がん	NI
		M28	腺がん	腺がん	NI
		M29	腺がん	腺がん	NI
		M30	腺がん	腺がん	NI

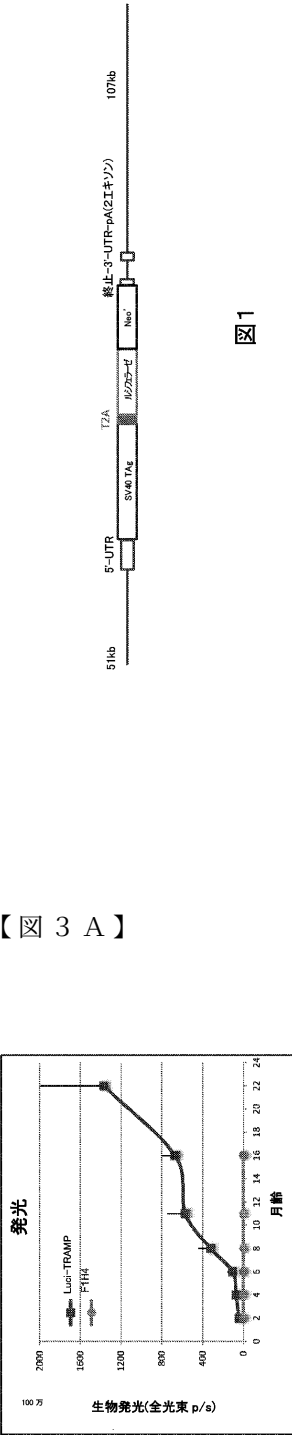
WNL=正常値内;NI=確認されず

10

20

30

【 図 1 】



【 図 3 A 】

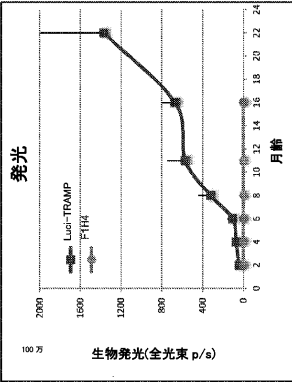


図 3A

【 図 2 】

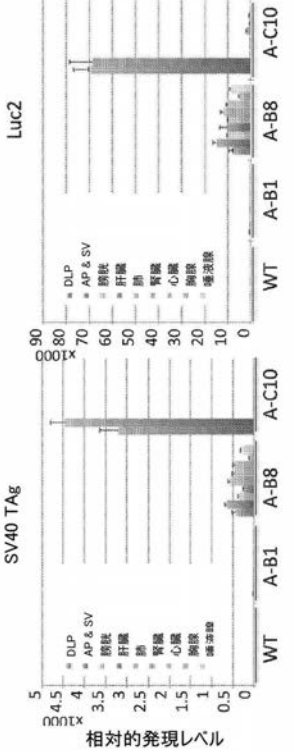


図 2

【 図 3 B 】

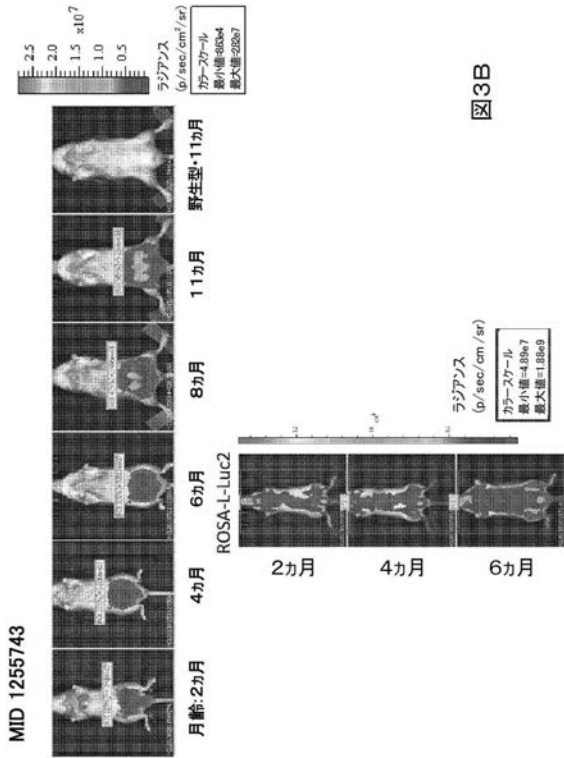


図 3B

【図 3 C】

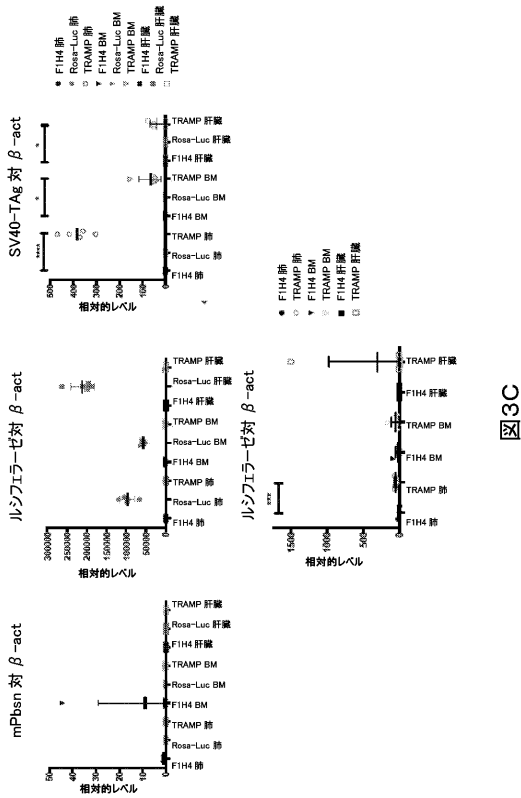


図 3C

【図 4 A】

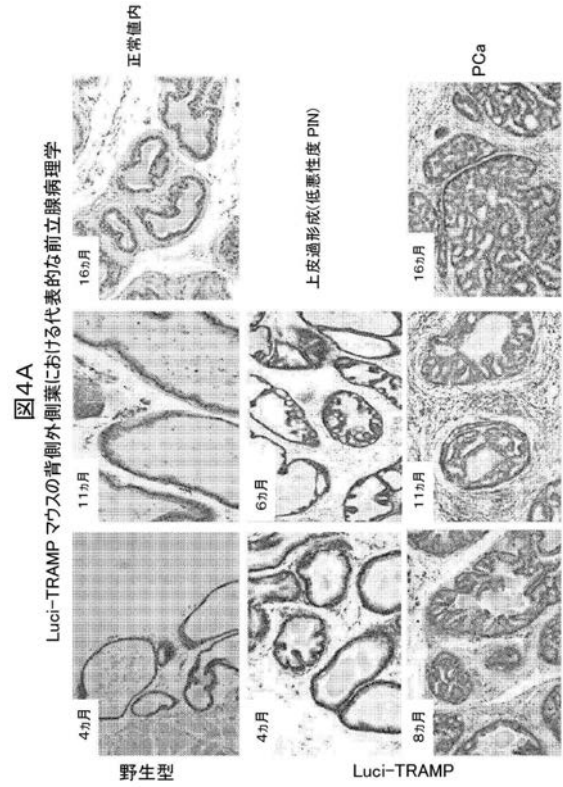


図 4A

Luci-TRAMP マウスの背側外側葉における代表的な前立腺病理学

【図 4 B】

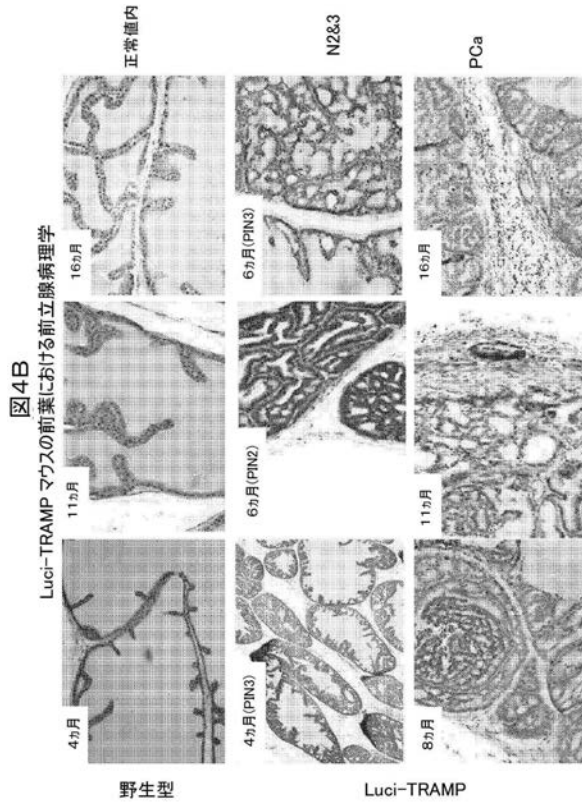


図 4B

Luci-TRAMP マウスの前葉における前立腺病理学

【図 5 A】

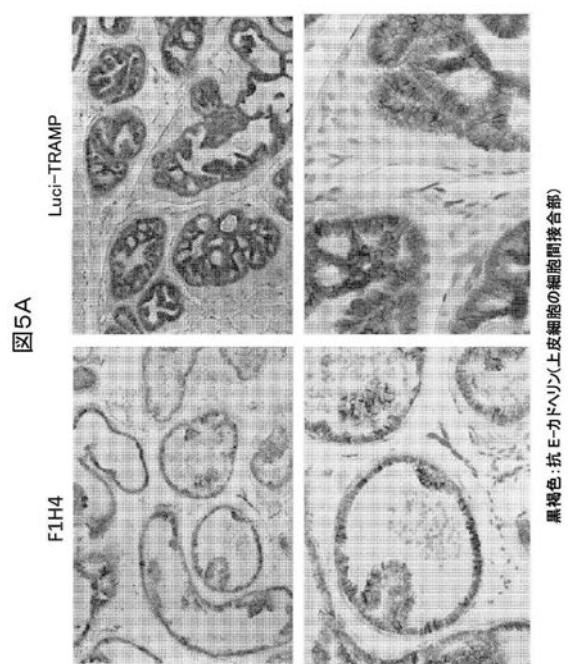


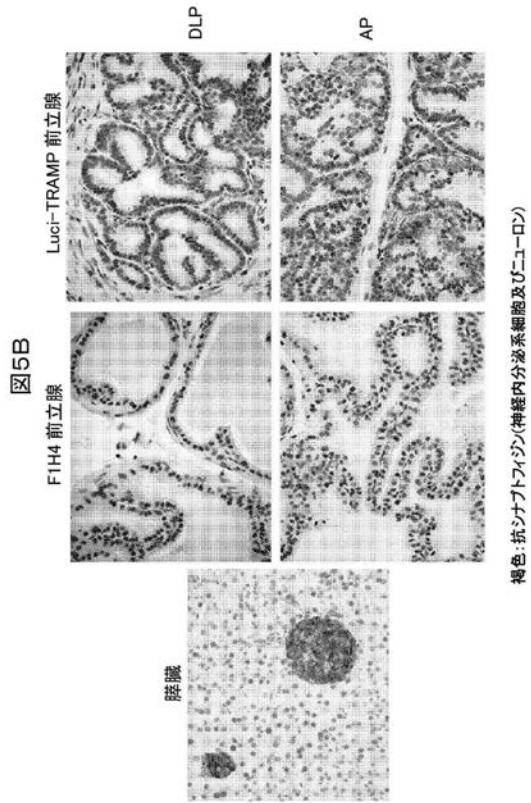
図 5A

Luci-TRAMP

F1H4

黒褐色: 抗 E-カドヘリン(上皮細胞の細胞間接合部)

【図 5 B】



【配列表】

2018526005000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/049823

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A01K67/027 C12N15/85
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01K C12N C07K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MAXIME PARISOTTO ET AL: "Genetically engineered mouse models of prostate cancer", MOLECULAR ONCOLOGY, vol. 7, no. 2, April 2013 (2013-04), pages 190-205, XP055316791, AMSTERDAM, NL ISSN: 1574-7891, DOI: 10.1016/j.molonc.2013.02.005 tables 1, 2 ----- -/--	1-45

☒ 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

7 November 2016

Date of mailing of the international search report

15/11/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Deleu, Laurent

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/049823

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SHAZIA IRSHAD ET AL: "Modeling prostate cancer in mice: something old, something new, something premalignant, something metastatic", CANCER METASTASIS., vol. 32, no. 1-2, November 2012 (2012-11), pages 109-122, XP055316561, NL ISSN: 0167-7659, DOI: 10.1007/s10555-012-9409-1 page 2 - page 3 -----	1-45
Y	ABBOTT DENISE E ET AL: "Expressed sequence tag profiling identifies developmental and anatomic partitioning of gene expression in the mouse prostate", GENOME BIOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD., LONDON, GB, vol. 4, no. 12, 28 November 2003 (2003-11-28), page R79, XP021012769, ISSN: 1465-6906, DOI: 10.1186/GB-2003-4-12-R79 page 79.6, left-hand column -----	1-16, 23-45
Y	MAC A. JOHNSON ET AL: "Isolation and characterization of mouse probasin: An androgen-regulated protein specifically expressed in the differentiated prostate", PROSTATE., vol. 43, no. 4, June 2000 (2000-06), pages 255-262, XP055316781, US ISSN: 0270-4137, DOI: 10.1002/1097-0045(20000601)43:4<255::AID-P ROS4>3.0.CO;2-M page 257, right-hand column -----	1-3,10, 12-16, 23-29, 37-45
Y	WENMING DUAN ET AL: "Knockin of SV40 Tag oncogene in a mouse adenocarcinoma of the prostate model demonstrates advantageous features over the transgenic model", ONCOGENE, vol. 24, no. 9, 24 February 2005 (2005-02-24), pages 1510-1524, XP055316407, GB ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/sj.onc.1208229 page 1511 - page 1512 ----- -/--	1-22, 25-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/049823

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VALENZUELA D M ET AL: "High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis", NATURE BIOTECHNOLOGY, GALE GROUP INC, US, vol. 21, no. 6, June 2003 (2003-06), pages 652-659, XP002615215, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT822 [retrieved on 2003-05-05] page 658; figures 1-3 -----	22,27,28
Y	HYE-LIM JU ET AL: "Transgenic mouse model expressing P53R172H, luciferase, EGFP, and KRASG12D in a single open reading frame for live imaging of tumor", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 5, 27 January 2015 (2015-01-27), page 8053, XP055316406, DOI: 10.1038/srep08053 figure 1 -----	17-22

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/65 (2006.01)		C 1 2 N 15/65		Z
C 1 2 N 15/113 (2010.01)		C 1 2 N 15/113	1 1 0	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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

(72)発明者 シャオ, チアージェン
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー
 ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 リー, ホイーチン
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー
 ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 リ, ゼ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー
 ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ライ, カーマン ビーナス
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, ウェスト メイン ストリート
 127, ユニット 201

(72)発明者 サーストン, ギャビン
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー
 ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

Fターム(参考) 4B065 AA91X AB01 CA60