

(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2016-501021
(P2016-501021A)

(43) 公表日 平成28年1月18日(2016.1.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 5/09 (2010.01)	C12N 5/00 202U	2G045
C12Q 1/06 (2006.01)	C12Q 1/06	4B029
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4B063
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B065
C12M 1/00 (2006.01)	C12M 1/00 A	

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2015-544609 (P2015-544609)
 (86) (22) 出願日 平成25年12月2日 (2013.12.2)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年7月27日 (2015.7.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2013/060580
 (87) 国際公開番号 WO2014/083555
 (87) 国際公開日 平成26年6月5日 (2014.6.5)
 (31) 優先権主張番号 61/732, 375
 (32) 優先日 平成24年12月2日 (2012.12.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515147944
 バイオメドコア・インコーポレイテッド
 BIOMEDCORE INC.
 カナダ、エヌ9エイ・6ジェイ3、オンタ
 リオ、テカムセ、ロッシ・ドライブ158
 0番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の進行および処置に対する応答の早期予測

(57) 【要約】

本発明は、浸潤および転移特性、不均一性および治療剤に対するそれらの応答について腫瘍細胞を迅速にスクリーニングする方法、ならびにゼブラフィッシュ胚の自動化画像取得およびマイクロインジェクションのためのマルチウェルマイクロインジェクションシステムを提供する。

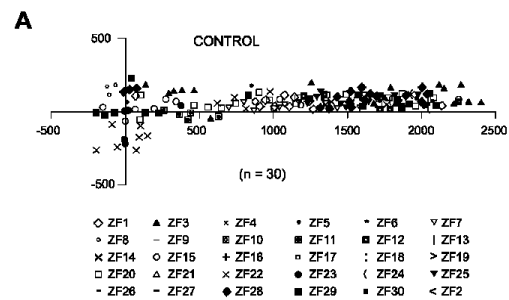


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生検または外科的に切除された腫瘍から得られた初代腫瘍細胞より腫瘍を確立する方法であって、

- (a) 初代腫瘍細胞を単離し、
 - (b) 該腫瘍細胞を細胞追跡用色素で標識し、
 - (c) 受精後 24 から 48 時間のゼブラフィッシュ胚に該細胞を注入し、
 - (d) 該胚を 24 時間またはそれ以上インキュベートすること
- を含む、方法。

【請求項 2】

腫瘍細胞が、血中循環腫瘍細胞から得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

細胞追跡用色素が蛍光色素である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

原発腫瘍の浸潤または転移の可能性を予測する方法であって、

- (a) 腫瘍細胞をゼブラフィッシュ胚の卵黄に注入し、
 - (b) 腫瘍細胞を注入された胚をインキュベートし、
 - (c) インキュベーション後、腫瘍細胞の位置を観察し、
 - (d) (i) 腫瘍細胞が、卵黄囊を経て胚体部分に浸潤するかどうか、または (ii) 該細胞が卵黄囊内に留まり、非浸潤性初代腫瘍細胞に近い挙動をするかどうかを解析すること
- を含む、方法。

【請求項 5】

疾患の再発可能性がより高い癌患者を同定する方法であって、

- (a) 初代腫瘍細胞を胚の卵黄に注入し、
 - (b) 腫瘍細胞を注入された胚をインキュベートし、
 - (c) インキュベーション後、腫瘍細胞の位置を観察し、
 - (d) 該腫瘍細胞が胚体部分に浸潤するとき、原発腫瘍の浸潤および転移の可能性が高いこと示すこと
- を含む、方法。

【請求項 6】

癌細胞侵襲を定量化する方法であって、

- (a) 固形腫瘍から腫瘍細胞を単離し、
- (b) 腫瘍細胞を細胞追跡用色素で標識し、
- (c) 受精後 24 - 48 時間のゼブラフィッシュ胚の卵黄に該細胞をマイクロインジェクションし、
- (d) 該胚を摂氏 35 で 24 時間またはそれ以上インキュベートし、
- (e) 蛍光顕微鏡下で腫瘍細胞の蛍光画像を自動取得し、
- (f) 腫瘍巣の幅 (W) および長さ (L)、各病巣のシグナル強度、および画像内のスポットの位置を取得するために画像解析ソフトウェアを用いて腫瘍巣の自動化分析を行い、
- (g) 病巣の体積を $1/2 W L^2$ (式中、W は幅であり、L は長さである。) により計算し、

(h) 原発腫瘍の浸潤の可能性を測定するために腫瘍巣の位置を用いること {ここで、侵襲性の指標 (invasive index) は、侵襲指標 (I I) = $1/n$ (T 時間での胚における腫瘍巣の数 / 胚に注入された腫瘍細胞の総数) (式中、n は、実験で考慮される胚の数であり、T は、インキュベーション時間である) として測定され得て、より高い I I 値は、原発腫瘍の浸潤の可能性がより高いとする。}、

(i) 侵襲性を測定するために腫瘍巣の位置を用いること {ここで、移動指数は、移動指数 (M I) = $1/n$ (T 時間での C D / T 時間での腫瘍巣の総数) (式中、C D は腫瘍細胞が伝播する累積距離であり、n は実験で考慮される胚の数であり、T はインキュベ

10

20

30

40

50

ーション時間である)として計算され、より高いM I値は、腫瘍細胞の侵襲性がより高いとする。}

を含む、方法。

【請求項7】

腫瘍細胞による化合物に対する応答が、腫瘍巢の体積、侵襲指標または移動指数のいずれか1つが、該化合物が存在するときに存在しない場合と比較して異なるかどうかを決定することにより測定される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

腫瘍細胞のホーミングに好適な臓器を予測する方法であって、

- (a) 固形腫瘍から腫瘍細胞を単離し、
- (b) 例えばPKH-26またはDiD等であって、これに限定されない赤色蛍光を有する細胞追跡用色素を用いて細胞を標識し、
- (c) 受精後24から48時間のTg(Fli:EGFP)ゼブラフィッシュ胚の卵黄に該細胞をマイクロインジェクションし、
- (d) 該胚を摂氏35で24時間またはそれ以上インキュベートし、
- (e) 緑色および赤色蛍光の両方のフィルターを用いて蛍光顕微鏡下で腫瘍細胞の蛍光画像を自動取得し、
- (f) 画像解析ソフトウェアを用いて腫瘍巢の自動化分析を行い、画像中の病巢の位置を得て、
- (g) 画像解析を用いて腫瘍のホーミング指数を計算すること{ホーミング指数(HI) = $1/n$ (T時間での臓器中の病巢の総数 / T時間での腫瘍巢の総数) (式中、nは実験で考慮される胚の数であり、Tはインキュベーション時間である。)}を含む、方法。

10

20

【請求項9】

腫瘍の侵襲、転移または臓器へのホーミング過程の間のゼブラフィッシュの免疫系における変化をモニターする方法であって、

- (a) 例えばgata2-GFPを発現するゼブラフィッシュ胚であるが、これに限定されない免疫細胞において発現された蛍光タンパク質を有する遺伝的に改変された胚を用いて、例えば好酸球であるが、これに限定されない、ゼブラフィッシュの身体のあらゆる部分に存在する特定の免疫細胞の局在および数の変化をモニターし、
- (b) 胚全体の免疫組織化学的染色を用いて免疫細胞の局在および計数をモニターすることを含む、方法。

30

【請求項10】

合成または天然の化合物または生物学的物質の有無下でインキュベーション後に腫瘍細胞の生存数を測定する方法であって、

- a. ゼブラフィッシュ胚をプロテアーゼ溶液中で消化し、
- b. 細胞をピペティングにより穏やかに分散させて、ゼブラフィッシュ胚を解離させて単一細胞懸濁液とし、
- c. 細胞を固定し、蛍光顕微鏡下で計数し、
- d. 生存蛍光腫瘍細胞の総数と注入細胞数の比を処理ゼブラフィッシュ胚と未処理ゼブラフィッシュ胚とで比較して、合成または天然の化合物および生物学的物質の効果を未処理胚と対比して予測すること

40

を含む、方法。

【請求項11】

腫瘍細胞の侵襲性パターンを薬物の存在下または不存在下で測定し、比較すること、および細胞の侵襲性が薬物の存在下で異なるかどうかを比較することを含む、腫瘍細胞の侵襲性に対する薬物の効果を予測するための方法。

【請求項12】

薬物の存在下と対比して、その不存在下で注入された腫瘍細胞の臓器へのホーミングバ

50

ターンの変化を観察することを含む、癌細胞の臓器ホーミング嗜好に対する薬物の効果を予測するための方法。

【請求項 13】

腫瘍細胞の DNA における変化を評価する方法であって、

- a. 腫瘍細胞を含む胚全体またはゼブラフィッシュ組織の一部を酵素消化し、
 - b. 消化された胚または組織から DNA を単離し、
 - c. ヒトの遺伝子配列に対して設計された PCR プライマーを用いて目的の遺伝子を PCR 増幅し、
 - d. 配列決定して、遺伝子変異を同定し、
 - e. パイサルファイトシーケンシングを行い、後成的修飾の位置を示すこと
- を含む、方法。

10

【請求項 14】

癌細胞における遺伝子発現を分析する方法であって、

- a. 腫瘍細胞を含む全胚またはゼブラフィッシュ組織の一部を酵素消化し、
 - b. 消化された胚または組織から RNA を単離し、
 - c. ヒトの遺伝子配列に対して設計された特定のプライマーを用いて遺伝子発現の定量的リアルタイム PCR 分析を行うこと、
- を含む、方法。

【請求項 15】

癌細胞におけるタンパク質発現を分析する方法であって、

- a. 4% パラホルムアルデヒドのような化学固定液を用いて全胚を固定し、ヒトタンパク質に特異的な抗体を用いる免疫組織化学を用いてタンパク質発現を可視化し、
 - b. 腫瘍細胞を注入した後、組織切片スライド上でゼブラフィッシュ胚の免疫組織化学を用いてタンパク質発現を可視化すること、
 - c. タンパク質発現を ELISA (酵素免疫測定アッセイ) を用いて可視化すること、および
 - d. タンパク質発現をウェスタンブロットを用いて可視化すること
- のうち 1 つを含む、方法。

20

【請求項 16】

(A) ホールディングフレーム、複数の取り外し可能なマルチウェルモジュール (ここで、各マルチウェルモジュールは溝板および取り外し可能なインサートから構成され、各溝板は、直線状に配置された円錐形開口底部を有する複数の胚ホールディングウェルを有し、溝板の外周縁のウェルモジュールが、このウェルを通して液体ハンドリングを可能にする円筒形状を有し、取り外し可能なインサートは、垂直な側面および溝板の各溝と位置を合わせた上部の円形開口部を有し、それ故に、溝板の上に配置されたとき、胚ホールディングウェルおよび胚ハンドリングウェルを形成する)、ならびにホールディングフレーム、溝板および取り外し可能なインサートを覆う蓋

および

30

(B) 胚を可変角度および/または高さで注入可能にするためのマルチウェルプレート上に回転可能に位置するマイクロインジェクションマイクロピペット

を含む、受精後 24 から 72 時間のゼブラフィッシュ胚のマイクロインジェクションを自動化するマルチウェルマイクロインジェクションシステム。

40

【請求項 17】

複数の胚ホールディングウェルのそれぞれが、その円錐形開口底部で溝板の外周縁にてウェルモジュールの開口底部へ接続されている、請求項 16 に記載のマルチウェルマイクロインジェクションシステム。

【請求項 18】

マイクロインジェクションの自動化が、ロボットアームにより制御されるマイクロピペットホルダーを用いて行われる、請求項 16 または 17 に記載のマルチウェルマイクロインジェクションシステム。

50

【請求項 19】

マイクロインジェクションの自動化が、ロボットアームによって制御されるマイクロピペットユニットを用いて行われることを含む、請求項 16 から 18 のいずれか一項に記載のマルチウェルマイクロインジェクションシステム。

【請求項 20】

マイクロピペットインジェクションシステムが、胚を可変角度および/または高さで注入するために、回転可能に位置決めされるように構成され、配列されている、請求項 16 または 17 に記載のマルチウェルマイクロインジェクションシステム。

【請求項 21】

ロボットアームの位置および/または角度が、手動で、またはソフトウェアコントロールインターフェースにより調節可能であることを含む、請求項 16 から 20 のいずれか一項に記載のマルチウェルマイクロインジェクションシステム。

10

【請求項 22】

ソフトウェアによりコントロールされるインターフェースが、市販されているマイクロインジェクターインジェクションシステムであるか、または特にゼブラフィッシュ胚へのマイクロインジェクション用に設計されている特定の自動注入システムの開発によるものである、請求項 21 に記載のマルチウェルマイクロインジェクションシステム。

【請求項 23】

ロボットアームが、胚構造のヒトによる視覚認識、または細胞の蛍光標識手段もしくは液体の注入の成功を検出可能にするようにプログラムされているソフトウェア手段(該ソフトウェアは、市販のマイクロインジェクターインジェクションシステムであるか、または特にゼブラフィッシュ胚へのマイクロインジェクションのために設計されている特定の自動注入システムの開発によるもの)による胚構造の視覚認識によって制御されている、請求項 21 に記載のマルチウェルマイクロインジェクションシステム。

20

【請求項 24】

注入部位および注入プロトコルの選択のための自動化がソフトウェアのアップデートにより変更されることを含む、請求項 21 から 23 のいずれか一項に記載のマルチウェルマイクロインジェクションシステム

【請求項 25】

受精後 24 から 72 時間後のゼブラフィッシュ胚の自動化されたマイクロインジェクションのための方法であって、

30

a. 請求項 16 から 24 のいずれか一項に記載のマルチウェルマイクロインジェクションシステムのマルチウェルモジュールに複数の受精後 24 から 72 時間のゼブラフィッシュ胚を配置し、

b. ゼブラフィッシュ胚の卵黄に選択された分子をマイクロインジェクションすることを含む、方法。

【請求項 26】

選択された分子が腫瘍細胞を含む、請求項 25 に記載の受精後 24 から 72 時間のゼブラフィッシュ胚の自動化されたマイクロインジェクションのための方法。

【請求項 27】

腫瘍細胞のマイクロインジェクション前、マイクロインジェクション中またはマイクロインジェクション後のいずれかに、ゼブラフィッシュ胚を含む水中に血管新生促進因子を添加することを含む、受精後 24 から 72 時間のゼブラフィッシュ胚の自動化マイクロインジェクションのための方法。

40

【請求項 28】

血管新生促進因子が増殖因子アンジオポエチンである、請求項 27 に記載の受精後 24 から 72 時間のゼブラフィッシュ胚の自動化マイクロインジェクションのための方法。

【請求項 29】

受精後 24 から 72 時間のゼブラフィッシュ胚の卵黄に腫瘍細胞をマイクロインジェクションし、腫瘍細胞のマイクロインジェクション前、マイクロインジェクション中または

50

マイクロインジェクション後のいずれかに、ゼブラフィッシュ胚を含む水中に血管新生促進因子を添加することを含む、腫瘍細胞がゼブラフィッシュの胚に効率的に取り込まれるようにするための方法。

【請求項 30】

血管新生促進因子が増殖因子アンジオポエチンである、請求項 29 に記載の腫瘍細胞がゼブラフィッシュの胚に効率的に取り込まれるようにするための方法。

【請求項 31】

腫瘍細胞に対する効果について薬物を試験するための方法であって、

a. 受精後 24 から 72 時間のゼブラフィッシュ胚に腫瘍細胞をマイクロインジェクションし、

b. 腫瘍を、所定の時間、ゼブラフィッシュ胚内で増殖させ、

c. 薬物を含む水系中で胚をインキュベートするか、またはその腫瘍細胞に対する効果について試験される薬物を受精後 24 から 72 時間のゼブラフィッシュ胚にマイクロインジェクションし、そして

d. 受精後 24 から 72 時間のゼブラフィッシュ胚における腫瘍細胞の量を測定することにより腫瘍細胞に対する薬物の効果をモニターすること

を含む、方法。

【請求項 32】

腫瘍細胞のマイクロインジェクション前、マイクロインジェクション中またはマイクロインジェクション後のいずれかに、ゼブラフィッシュ胚を含む水中に血管新生促進因子を添加することを含む、受精後 24 から 72 時間のゼブラフィッシュ胚において請求項 31 に記載の腫瘍細胞に対する効果について薬物を試験するための方法。

【請求項 33】

血管新生促進因子が増殖因子アンジオポエチンである、請求項 32 に記載の腫瘍細胞に対する効果について薬物を試験するための方法。

【請求項 34】

血管新生促進因子が受精後 24 から 72 時間のゼブラフィッシュ胚にマイクロインジェクションされる、請求項 27、29 または 32 に記載の腫瘍細胞に対する効果について薬物を試験するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2012年12月2日に出願した米国仮特許出願第61/732,375号に基づく優先権の利益を主張し、それは一部引用により本明細書中に包含される。

【0002】

発明の分野

本発明は、ヒト腫瘍細胞を注入することによりゼブラフィッシュにおいて腫瘍を確立する方法に関する。また、腫瘍細胞を特徴付けるため、薬物を試験するため、および個別化医療のために、ゼブラフィッシュにおける確立されたヒト腫瘍の使用にも関する。さらに、一般的に、マルチウェルマイクロインジェクションシステム、より具体的には、ゼブラフィッシュ胚についてのマルチウェルマイクロインジェクションシステムにも関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

細胞内シグナル伝達の適切な制御は、正常な細胞複製、増殖、細胞生理および細胞死を含む種々の生物学的機能に関与している。細胞内の正常なシグナル伝達の混乱は、身体に種々の疾患状態を引き起こし得て、該疾患状態は、複数の細胞型および身体全体の生理学的状態の関与の結果であることが多い。具体的には、癌の場合、この状況は、とりわけ、ヒト身体の多くの基礎的な炎症状態の関与があるために複雑である。肥満、アレルギー、

10

20

30

40

50

関節炎、および糖尿病のような種々の炎症状態は、全て、如何に癌が進行し、如何に処置され得るかに大きな影響を及ぼす。従って、癌のような複雑な状態を模倣するインビボモデルの作製は、能動免疫系を有する動物モデルを必要とする。能動免疫系がなければ、癌において観察された動的細胞不均一性は、完全に再現することができない。さらに、癌の動物モデルのような臨床的有用性のために、とりわけ各個々の癌の生物学的予測、臓器侵襲および身体の他の部分への癌細胞転移の予測のために、極短期間に（化学療法を開始する前に）個々の患者の癌を模倣し、癌細胞の治療に対する応答を予測する方法が必要である。

【 0 0 0 4 】

例えば乳癌、前立腺癌、肺癌、結腸癌および膵臓癌等の上皮性腫瘍については、そのような転移性腫瘍に向けて治療を集中する必要性が極めて重要である。遠隔転移した侵襲性のステージⅣの癌腫は顕著に低い生存率を示す（seer.cancer.gov）。

10

【 0 0 0 5 】

転移性癌は、血流および/またはリンパ管への原発腫瘍からの侵襲性悪性細胞の脱離を伴う。かかる血中循環腫瘍細胞（CTC）は、それらが二次転移を発症する遠隔臓器に到達するのを可能にする。同様に、これらのCTCの存在は、予後不良と関連している（Balic M, Williams A, Lin H, Datar R, Cote RJ. (2012). *Circulating Tumor Cells: From Bench to Bedside. Annu Rev Med.* 2012 Oct 18.）。

【 0 0 0 6 】

転移性疾患の患者の処置は、原発腫瘍で観察されたバイオマーカーと二次腫瘍で観察されたバイオマーカーとのよく見られる相違にもかかわらず、原発腫瘍から得られた情報に大部分依存し続けている（Naoki Niikura, Jun Liu, Naoki Hayashi, Elizabeth A. Mittemdorff, Yun Gong, Shana L. Palla, Yutaka Tokuda, Ana M. Gonzalez - Angulo, Gabriel N. Hortobagyi and Naoto T. Ueno (2011); Loss of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) Expression in Metastatic Sites of HER2 - Overexpressing Primary Breast Tumors. *J Clin Oncol*, 30:593 - 599; Dupont Jensen J, Laenholm AV, Knoop A, Ewertz M, Bandaru R, Liu W, Hackl W, Barrett JC, Gardner H. (2011); PIK3CA mutations may be discordant between primary and corresponding metastatic disease in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 17:667 - 77)。二次腫瘍および転移の環境に関する研究先駆者として、二次腫瘍の生物学を理解することは、進行性癌患者の個別化医療に新たな視点を追加し得る。本発明者らの仮説を支持して、CTCの予後に関する重要度は、種々の癌種について実証されている（Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. (2004); Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 351:781 - 91; Moreno JG, Miller MC, Gross S, Allard WJ, Gomella LG, Terstappen LW. (2005); Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 65:713 - 8; Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse MA, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ. (2009); Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 20:1223 - 9; Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou JM, Greystoke A, Ward TH, Ferraldeschi R, Hughes A, Clack G, Ranson M, Dive C, Blackhall FH. (2011); Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non - small - cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 29:1556 - 63)。

20

30

40

【 0 0 0 7 】

癌細胞の分子およびゲノムプロファイリングが、標的化療法および腫瘍研究における新たな傾向となってきた。しかしながら、癌細胞の分子多様性と絶えず変化しているそれらの性質の関連性、原発腫瘍とCTCとの分子指標の関連性は限定されている（Powell AA, Talasaz AH, Zhang H, Coram MA, Reddy A, et al. (2012) *Single Cell Profiling of Circulating Tumor Cells: Transcriptional Heterogeneity and Diversity from Bre*

50

ast Cancer Cell Lines. PLoS ONE 7: e33788.)。

【 0 0 0 8 】

癌細胞の分子およびゲノムプロファイリングは、個々の特定の癌を標的とした治療を提供し得るために重要となってきた。しかしながら、原発腫瘍のプロファイリングは、転移性CTCで生じた分子の変化を表すものではない。転移性二次腫瘍の標的療法に必要とされることは、CTCをプロファイリングするための方法である。しかし、患者の血液中に存在するCTCは顕著に少なく、そのため、細胞を単離し特徴付けるのは非常に困難である。さらに、患者の血液中の少ないCTCの単離は、細胞が増殖され試験され得る場合を除いて、用途が限定されている。組織培養においてCTCを増殖させることは可能であるが、インビトロでの培養は、細胞の特性、特に正常組織へ浸潤し、三次元の腫瘍を形成し、そして増殖因子および血管を動員するそれらの能力を十分に表すものではない。

10

【 0 0 0 9 】

一般的な淡水魚であるゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は、重要なモデル生物であり、科学的研究にますます使用されている (Lieschke and Currie (2007) “Animal models of human disease: zebrafish swims into view.” *Nature Reviews Genetics* 8:353 - 367)。医学分野において、ゼブラフィッシュは、胚発生、心血管研究、神経の発達および網膜再生の研究においてかなり用いられており、近年、ほとんど全ての癌種で優れたモデルとして確立されている (Stoletov and Klemke (2008) “Catch of the day: zebrafish as a human cancer model. *Oncogene* 27:4509 - 4520”)。

【 0 0 1 0 】

ゼブラフィッシュは、ヒトで見られるものとよく似た発癌性化学物質に対する応答および新生物の形成を示す (Beckwith et al (2000) “Ethyl nitrosourea induces neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*).” *Lab Invest.* 80(3):379 - 385)。また、癌遺伝学のための素晴らしいモデルである (Stern and Zon (2003). “Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish.” *Nature Rev. Cancer* 3: 533 - 539)。ゼブラフィッシュにおける遺伝子操作の容易性は、血管形成、アポトーシスおよび転移を理解するための優れたモデルであることに役立っている (Serbedija et al (1999) “Zebrafish angiogenesis: a novel model for drug screening.”; *Angiogenesis* 3:353 - 359; Parng et al (2002) “Zebrafish: a preclinical model for drug screening.”; *Assay Dev. Technol.* 1:41 - 48; Marques et al (2009) “Metastatic behavior of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model.” *BMC Cancer* 9:128)。

20

30

【 0 0 1 1 】

ゼブラフィッシュにおける操作は、その成長の種々の段階で実行されるが、受精後48時間 (hpf: 受精後の時間) が頻繁に使用され、操作のための優先度の高い段階の1つである。大規模な遺伝学的研究、薬物スクリーニングおよび毒性試験、および癌細胞アッセイ中に多くのゼブラフィッシュ胚の処理に必要な時間および労力はしばしば、ほとんどの研究室の制限要因であり得る。しかしながら、主にそれらの細長く独特な形状のために、現在のところ、受精後48時間 (hpf) のゼブラフィッシュ胚のマルチウェルマイクロインジェクションシステムは市販されていない。

【 0 0 1 2 】

自動化マルチウェルマイクロインジェクションシステムは細胞生物学の分野でよく知られており、主に、核内または細胞質内への、例えばDNA、RNAi、タンパク質または精子のような他の細胞等の物質の注入に使用される。自動化システムは、手動で達成することが困難であることが多い再現可能な一貫性および精度を有する大量のマイクロインジェクションを可能にする。

40

【 0 0 1 3 】

従って、初代腫瘍細胞およびCTCのプロファイリングおよび特徴付けに必要とされるのは、動物モデルにおいてインビボで腫瘍細胞を確立し、増殖させるための方法である。これは、腫瘍細胞における薬物試験を可能にし、患者における腫瘍細胞を標的とする療法を提供することができる。さらに、当技術分野で必要とされるのは、遺伝学的研究、毒性

50

試験、薬物試験、および癌研究のための受精後48時間のゼブラフィッシュ胚の効率的な操作および注入を可能にするシステムである。

【0014】

発明の背景

米国特許出願第10/923,253号(またはUS2005/0112030A1)は、Stephanie E. Gausにより2004年8月20日に出願され、“メッシュウェルプレート”と題して、溶液の迅速な排出を可能とし、かつウェル間の溶液の“吸い上げ”を阻止するために開口部を有するメッシュ構造の取り外して交換される底部を有する96ウェルプレートのようなマルチウェルプレートを開示している。“メッシュウェルプレート”は、ゼブラフィッシュ胚をアッセイするのに特に有用であることが意図されると記載されている。

10

【0015】

PCT特許出願番号PCT/ES2005/000255は、Alfonso Gutier - Rez Adan等により2005年5月12日に出願され、“胚および/または細胞の操作のための添加物”と題して、接着性を低下させ、かつ培地の流動性を保持しながら粘性を増加させるため、着床前期の胚への細胞のマイクロインジェクションを含むマイクロマニピュレーションを補助するために、合成ヒアルロン酸、大豆から得られるリン脂質または不飽和脂肪酸のような化合物を含む操作培地を補充することにより、胚および細胞の操作媒体の品質および安全性を高めるためのシステムを開示している。

20

【0016】

米国特許出願第11/224,364号(またはUS2006/0010510A1)は、Leandro Christmannにより2005年9月12日に出願され、“マイクロインジェクションアセンブリおよび鳥類の卵のマイクロインジェクションおよび再移植のための方法”と題して、顕微鏡、マイクロマニピュレータ、マイクロピペットおよび圧電発振器を含むマイクロインジェクションシステム、ならびに鳥類の卵の胚ディスクをマイクロインジェクション可能にする斜めに傾斜したマクロのモニタリングユニットを含むマイクロインジェクションアセンブリを開示している。

【0017】

PCT特許出願PCT/US2006/0006868は、Daniel G. O'Connellにより2006年2月27日に出願され、“細胞トレイ”と題して、細胞、生物学的液体、化合物および/または固体試料の大規模マトリックスの自動処理ならびに同時モニタリングおよび分析を可能にするマルチウェル細胞トレイを開示している。

30

【0018】

英国特許出願第1004629号は、Jan De Sonnevileにより2012年3月19日に出願され、“アレイマイクロインジェクション装置および方法”と題して、部分球形囊陥凹のアレイを有する表面を含むアレイマイクロインジェクション装置が開示されている。各凹部は、単一細胞または単一胚を収容可能である。細胞または胚を保持する凹部に合うインジェクタのアレイは、細胞または胚、とりわけ核に物質をマイクロインジェクションするのに使用され得る。

【0019】

米国特許第7,339,090号は、L. Christmannにより出願され、2008年3月4日に特許権が付与され、“マイクロインジェクション装置および使用方法”と題して、針および表示装置を含むマイクロインジェクション装置(表示装置は、直角以外の角度からオペレータへの被写体の拡大表示を提供する)を開示している。

40

【0020】

WO0065137号は、M. Palacios - Boyceにより2000年11月2日に出願され、“細胞または胚を操作するのに有用な微小電気機械装置”と題して、複合結合したシリコンウエハの対を含む細胞標識用微小電気機械システム装置に関する。

【0021】

WO2058847号は、M. Paranjape等により2002年8月1日に出願され、“統

50

合型マイクロピアシンジェクターを組み込んだシングルチップのシリコン製微細加工アレイを用いた細胞の形質転換”と題して、細胞内への分子の導入のための改良された方法であって、これらの手順が高スループットレベルで行われるための効率的な手段を提供する方法を開示している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0022】

【特許文献1】米国特許出願第10/923,253号

【特許文献2】PCT/ES2005/000255

【特許文献3】米国特許出願第11/224,364号

【特許文献4】PCT/US2006/0006868

【特許文献5】英国特許出願第1004629号

【特許文献6】米国特許第7,339,090号

【特許文献7】WO0065137号

【特許文献8】WO2058847号

【非特許文献】

【0023】

【非特許文献1】seer.cancer.gov

【非特許文献2】Balic M, Williams A, Lin H, Datar R, Cote RJ. (2012). Circulating Tumor Cells: From Bench to Bedside. *Annu Rev Med.* 2012 Oct 18. [Epub ahead of print]

【非特許文献3】Naoki Niikura, Jun Liu, Naoki Hayashi, Elizabeth A. Mittendorf, Yun Gong, Shana L. Palla, Yutaka Tokuda, Ana M. Gonzalez - Angulo, Gabriel N. Hortobagyi and Naoto T. Ueno (2011). Loss of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) Expression in Metastatic Sites of HER2 - Overexpressing Primary Breast Tumors. *J Clin Oncol*, 30:593 - 599.

【非特許文献4】Dupont Jensen J, Laenkholm AV, Knoop A, Ewertz M, Bandaru R, Liu W, Hackl W, Barrett JC, Gardner H. (2011). PIK3CA mutations may be discordant between primary and corresponding metastatic disease in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 17:667 - 77.

【非特許文献5】Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. (2004). Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 351:781 - 91.

【非特許文献6】Moreno JG, Miller MC, Gross S, Allard WJ, Gomella LG, Terstappen LW. (2005). Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 65:713 - 8.

【非特許文献7】Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail N Y, Picus J, Morse MA, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ. (2009). Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 20:1223 - 9.

【非特許文献8】Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou JM, Greystoke A, Ward TH, Ferraldeschi R, Hughes A, Clack G, Ranson M, Dive C, Blackhall FH. (2011). Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non - small - cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 29:1556 - 63.

【非特許文献9】Powell AA, Talasz AH, Zhang H, Coram MA, Reddy A, et al. (2012) Single Cell Profiling of Circulating Tumor Cells: Transcriptional Heterogeneity and Diversity from Breast Cancer Cell Lines. *PLoS ONE* 7: e33788.

【発明の概要】

【0024】

10

20

30

40

50

発明の概要

本発明の目的

本発明の目的は、動物モデルにおける初代腫瘍細胞およびCTCのプロファイリングおよび特徴付けの技術的問題を克服すること、およびゼブラフィッシュ胚の効率的な操作および注入を可能にするシステムを提供することである。

【0025】

本発明者等は、これらの技術的課題が、ゼブラフィッシュへ異種移植されたヒトCTCからの生存増殖可能な腫瘍の発生、注入されたCTCの転移の可能性の検討、単離されたCTCの臓器特異性の予測、および治療薬への応答の評価を含む種々の方法により解決されることを見出した。癌の進行および化学療法に対する応答を予測するハイスループットな早期アッセイ法もまた提供される。

10

【0026】

発明の説明

本発明の一面において、生検または外科的に切除された腫瘍から得られた初代腫瘍細胞から三次元の腫瘍を発生させるために、

(a) 腫瘍細胞を単離し、

(b) 腫瘍細胞を細胞追跡用色素で標識し、

(c) 受精後24から48時間(hpf)のゼブラフィッシュ胚に該細胞をインジェクションし、

(d) 該胚を24時間またはそれ以上インキュベートする

20

各工程を含んでなる方法が提供される。

【0027】

一態様において、腫瘍細胞は血中循環腫瘍細胞(CTC)から得られる。

【0028】

別の態様において、細胞追跡用色素は蛍光色素である。

【0029】

別の面において、本発明は、原発腫瘍の浸潤または転移の可能性を予測する方法であって、

(a) 腫瘍細胞をゼブラフィッシュ胚の卵黄に注入し、

(b) 注入された腫瘍細胞を有する胚をインキュベートし、

30

(c) インキュベーション後、腫瘍細胞の位置を観察し、

(d) (i) 腫瘍細胞が、卵黄囊を経て胚体部分に浸潤するか、または(ii) 該細胞が卵黄囊内に留まり、非浸潤性初代腫瘍細胞に近い挙動をするかを解析すること、を含む方法を提供する。

【0030】

本発明の別の態様において、疾患の再発可能性がより高い癌患者を同定するための方法が提供される。該方法は、

(a) 初代腫瘍細胞を胚の卵黄に注入し、

(b) 注入された腫瘍細胞を有する胚をインキュベートし、

40

(c) インキュベーション後、腫瘍細胞の位置を観察し、

(d) 該腫瘍細胞が胚体部分に進入するとき、原発腫瘍の浸潤および転移の可能性が高いとすること

を含む。

【0031】

別の態様において、癌細胞侵襲は、

(a) 固形腫瘍から腫瘍細胞を単離し、

(b) 該細胞を細胞追跡用色素で標識し、

(c) 受精後24 - 48時間(hpf)のゼブラフィッシュ胚の卵黄に該細胞をマイクロインジェクションし、

(d) 該胚を摂氏35 で24時間またはそれ以上インキュベートし、

50

(e) 蛍光顕微鏡下で腫瘍細胞の蛍光画像を自動取得し、
 (f) 画像解析ソフトウェアを用いて腫瘍巣(tumor foci)の自動化分析を行い(ここで、得られるデータは、腫瘍巣の幅(W)および長さ(L)、各病巣のシグナルの強度、および画像内のスポットの位置である。)、
 (g) 取得した画像上の腫瘍巣の面積が病巣のサイズおよび体積を提供し、体積は $1/2 WL^2$ (式中、Wは幅であり、Lは長さである。)により計算され得て、
 (h) 原発腫瘍の浸潤の可能性を測定するために腫瘍巣の位置を用いること{ここで、侵襲性の指標(invasive index)は、侵襲指標(II) = $1/n$ (T時間での胚における腫瘍巣の数/胚に注入された腫瘍細胞の総数)(式中、nは、実験で考慮される胚の数であり、Tは、インキュベーション時間である)として測定され得る。}、
 (i) 腫瘍の侵襲性を測定するために腫瘍巣の位置を用い得ること{ここで、移動指数は、移動指数(MI) = $1/n$ (T時間でのCD/T時間での腫瘍巣の総数)(式中、CDは腫瘍細胞が伝播する累積距離であり、nは実験で考慮される胚の数であり、Tはインキュベーション時間である)として計算され得る。}
 を含む工程により定量化され得る。

10

【0032】

別の態様において、腫瘍巣(tumor foci)の体積、侵襲指標、または移動指数のうちいずれか1つが、該化合物が存在するときに存在しない場合と比較して異なるかどうかを決定することにより、腫瘍細胞による化合物に対する応答を測定するための方法が提供される。

20

【0033】

本発明の別の態様において、好適な臓器への定着(ホーミング)の予測は、蛍光標識された血管新生を有するトランスジェニックフィッシュ(例えばTg(Flu:EGFP)等)を用いた画像解析により自動化された方法で行うことができる。血管新生に基づき、胚における腫瘍巣(tumor foci)の位置を予測することができる。該方法は、

(a) 固形腫瘍から腫瘍細胞を単離し、
 (b) 例えばPKH-26(Sigma)またはDiD(Lifetech)等の赤色蛍光を有する細胞追跡用色素を用いて細胞を標識し、
 (c) 受精後24 - 48時間(hpf)のTg(Flu:EGFP)ゼブラフィッシュ胚の卵黄に該細胞をマイクロインジェクションし、
 (d) 該胚を摂氏35 で24時間またはそれ以上インキュベートし、
 (e) 緑色および赤色蛍光の両方のフィルターを用いて蛍光顕微鏡下で腫瘍細胞の蛍光画像を自動取得し、
 (f) 画像解析ソフトウェアを用いて腫瘍巣の自動化分析を行い(得られたデータは、画像中の病巣の位置を示す。)
 (g) 画像解析を用いて、自動化された方法で腫瘍のホーミング指数を予測すること{ホーミング指数(HI) = $1/n$ (T時間での臓器中の病巣の総数/T時間での腫瘍巣の総数)(式中、nは実験で考慮される胚の数であり、Tはインキュベーション時間である。)}として計算され得る}
 を含む。

30

40

【0034】

別の態様において、本発明は、腫瘍の侵襲、転移または臓器へのホーミング過程の間のゼブラフィッシュの免疫系における変化をモニターする方法であって、

(a) 免疫細胞において発現された蛍光タンパク質を有する遺伝的に改変された胚を用いて、特定の免疫細胞の局在および数の変化をモニターすること。例えば、gata2-GFPを発現するゼブラフィッシュ胚は、ゼブラフィッシュの身体のあらゆる部分に存在する好酸球の局在をモニターし、ならびにその数を測定するために用いることができる。
 (b) 胚全体の免疫組織化学的染色を用いて免疫細胞の局在および計数をモニターすること
 を含む、方法を提供する。

50

【0035】

本発明の別の面において、合成または天然の化合物または生物学的物質の有無下でインキュベーション後に腫瘍細胞の生存数を測定する方法が提供され、以下

- (a) ゼブラフィッシュ胚をプロテアーゼ溶液中で消化し、
 - (b) 細胞をピペティングにより穏やかに分散させて、ゼブラフィッシュ胚を解離させて単一細胞懸濁液とし、
 - (c) 細胞を固定し、蛍光顕微鏡下で計数し、
 - (d) 生存蛍光腫瘍細胞の総数と細胞の注入数の比を処理ゼブラフィッシュ胚と未処理ゼブラフィッシュ胚とで比較して、合成または天然の化合物および生物学的物質の効果を未処理胚と比較して予測すること
- を含む方法が提供される。

10

【0036】

別の態様において、腫瘍細胞の侵襲性のパターンを薬物の存在下または不存在下で測定し、比較すること、および細胞の侵襲性が薬物の存在下で異なるかどうかを比較することを含む方法が、腫瘍細胞の侵襲性に対する薬物の効果を予測するために提供される。

【0037】

別の態様において、薬物の存在下または不存在下で腫瘍細胞の臓器へのホーミングパターンの変化を観察することを含む方法が、癌細胞の臓器ホーミング嗜好に対する薬物の効果を予測するために提供される。

【0038】

本発明の別の面において、腫瘍細胞のDNAにおける変化を評価するために、

- (a) 腫瘍細胞を含む全胚またはゼブラフィッシュ組織の一部を酵素消化し、
- (b) 消化された胚または組織からDNAを単離し、
- (c) ヒトの遺伝子配列に対して設計されたPCRプライマーを用いて目的の遺伝子をPCR増幅し、
- (d) 配列決定して、変異を位置決定し、
- (e) パイサルファイトシーケンシングを行い、後成的修飾の位置を示すこと

を含む方法が提供される。

20

【0039】

本発明の別の面において、癌細胞における遺伝子発現を分析するために、

- (a) 腫瘍細胞を含む全胚またはゼブラフィッシュ組織の一部を酵素消化し、
- (b) 消化された胚または組織からRNAを単離し、
- (c) ヒトの遺伝子配列に対して設計された特定のプライマーを用いて遺伝子発現の定量的リアルタイムPCR分析を行うこと、

を含む方法が提供される。

30

【0040】

本発明の別の面において、癌細胞におけるタンパク質発現を分析するために、

- (a) 4%パラホルムアルデヒドのような化学固定液を用いて全胚を固定し、ヒトタンパク質に特異的な抗体を用いる免疫組織化学を用いてタンパク質発現を可視化すること、
- (b) 腫瘍細胞を注入した後、ゼブラフィッシュ胚の組織切片スライド上の免疫組織化学を用いてタンパク質発現を可視化すること、
- (c) タンパク質発現をELISA(酵素免疫測定アッセイ)またはウェスタンブロットを用いて可視化すること、

のうち1つを含む方法が提供される。

40

【0041】

別の面において、本発明は、受精後48時間(hpf)のゼブラフィッシュ胚のマイクロインジェクションを自動化するマルチウェルマイクロインジェクションシステムを提供する。該システムは、(A)ホールディングフレーム、ホールディングフレーム内に支持されるボトムホールディングプレート、および複数の取り外し可能なマルチウェルモジュールを含む。各マルチウェルモジュールは、溝板および取り外し可能なインサートから構

50

成される。各溝板は、直線状に配置された円錐形開口底部を有する複数の胚ホールディングウェルを有する。各溝板は、円筒形状を有し、それ故に、このウェルを通して液体ハンドリングを可能にする、溝板の外縁に1ウェルモジュールを有する。各溝板は、垂直な側面および溝板の各溝と位置を合わせた上部の円形開口部を有し、それ故に、溝板の上に配置されたとき、胚を保持し、取り扱うウェルを形成する、取り外し可能なインサートを有する。蓋が、ホールディングフレーム、溝板および取り外し可能なインサートを覆うために提供される。該システムはまた、(B)可変角度および/または高さで胚を注入可能にするためのマルチウェルプレート上に回転可能に位置するマイクロインジェクションマイクロピペットを含む。

【0042】

別の態様において、本発明は、受精後24から72時間後のゼブラフィッシュ胚の自動化マイクロインジェクションのための方法であって、特に本明細書に記載のマルチウェルマイクロインジェクションシステムのマルチウェルモジュールに関連させて、受精後24から72時間後の複数のゼブラフィッシュ胚を配置し、そしてゼブラフィッシュ胚の卵黄に選択された分子をマイクロインジェクションすること、を含む方法を提供する。

【0043】

別の態様において、本発明は、受精後24から72時間のゼブラフィッシュ胚の卵黄に腫瘍細胞をマイクロインジェクションし、腫瘍細胞のマイクロインジェクション中またはマイクロインジェクション後のいずれかに、ゼブラフィッシュ胚の卵黄に血管新生促進因子、例えばアンジオポエチンをマイクロインジェクションするか、またはゼブラフィッシュの幼生が泳ぐ水中に血管新生促進因子、例えばアンジオポエチンを添加することを含む、腫瘍細胞がゼブラフィッシュの胚に効率的に取り込まれるようにするための方法を提供する。

【0044】

別の態様において、本発明は、腫瘍細胞に対する効果について薬物を試験するための方法であって、受精後24から72時間のゼブラフィッシュ胚に腫瘍細胞をマイクロインジェクションし、該腫瘍を、所定の時間、ゼブラフィッシュ胚内で増殖させ、腫瘍細胞に対する効果について試験される薬物を該ゼブラフィッシュ胚にマイクロインジェクションし、そして腫瘍細胞の量を測定することにより腫瘍細胞に対する薬物の効果をモニターすること、を含む方法を提供する。

【0045】

発明の変形

本発明の一面において、マルチウェルマイクロインジェクションシステムの変形は、以下のものを含む。

複数の胚ホールディングウェルのそれぞれが、溝板の外周縁にてウェルモジュールの底部へ円錐形底部で相互に接続されているもの；

マイクロインジェクションの自動化が、ロボットアームにより制御されるマイクロピペットホルダーを用いて行われるもの；

マイクロインジェクションの自動化が、ロボットアームによって制御されるマイクロピペットユニットを用いて行われるもの；

マイクロピペットインジェクションシステムが、可変角度および/または高さで胚を注入するために、回転可能に位置決めするように構成され、配置されるもの；

ロボットアームの位置および/または角度が、手動で、または市販のソフトウェアコントロールインターフェースにより調節可能であるか、または特にゼブラフィッシュ胚へのマイクロインジェクションのために設計されている特定の自動注入システムの開発によって調節可能であるもの；

ロボットアームが、胚構造のヒトによる視覚認識、または細胞の蛍光標識手段、または液体の注入の成功を検出可能にプログラムされているソフトウェア手段(該ソフトウェアは、市販のソフトウェアコントロールインターフェースであるか、または特にゼブラフィッシュ胚へのマイクロインジェクションのために設計されている特定の自動注入システムの

10

20

30

40

50

開発によるもの)による胚構造の視覚認識によって制御されるもの；
注入部位および注入プロトコルの選択のための自動化がソフトウェアのアップデートにより変更されるもの；および
自動化マイクロインジェクションシステムが、市販のマイクロインジェクターインジェクションシステムにより制御されるか、または特にゼブラフィッシュ胚へのマイクロインジェクションのために設計されている特定の自動注入システムの開発によって制御されるもの。

【0046】

本発明の一面において、腫瘍細胞に対する効果について薬物を試験するための方法の変形は、腫瘍細胞をインジェクション前に例えば脂溶性蛍光色素であるDiOで染色するか、または染色しないで、受精後24から72時間のゼブラフィッシュ胚に該腫瘍細胞をマイクロインジェクションし、そして腫瘍細胞のゼブラフィッシュ胚へのマイクロインジェクション前、マイクロインジェクション中またはマイクロインジェクション後のいずれかに、受精後24から72時間のゼブラフィッシュ胚の胚中に血管新生促進因子、例えば、増殖因子アンジオポエチンをマイクロインジェクションするか、またはゼブラフィッシュ幼生が泳ぐ水中に血管新生促進因子、例えばアンジオポエチンを添加することを含む。

【0047】

発明の他の特徴

当該装置は、適当な位置にホールディングフレームおよび溝板を有し、取り外し可能なインサートなしで用いられ得て、それにより、溝板の溝に胚を保持するのが可能であり、可変角度でのマイクロインジェクションのためにマイクロピペットによりアクセス可能である。この構成において、溝板によって形成される各円錐ウェルを覆うゴムで裏打ちされた開口部を有する取り外し可能なインジェクションカバープレートは、溝板上に位置され得て、受精後48時間のゼブラフィッシュ胚の注入をガイドするために使用され得る。

【0048】

本発明はまた、胚構造の視覚的認識を通してロボットアームを制御するオプションを提供する。そのような場合において、ソフトウェアは、液体または標識された細胞が蛍光性であるとき、注入の成功の検出を可能にするように設計され得る。インジェクション部位の選択のための自動化およびインジェクションのプロトコルはまた、単純なソフトウェアのアップデートによって変更することができる。視覚認識システムによる自動化はまた、より少数の胚および空のウェルを用いることを可能にする。

【0049】

本明細書に記載の装置は、市販の手動マイクロインジェクターと共に使用することもできる。手動操作であっても、この装置は、追加の操作およびチューブの標識化を減らすことによって労力を軽減し得る。胚はウェルから取り出されないため、胚の混合および標識ミス、ならびに胚にストレスを誘発する可能性が大幅に低減される。

【0050】

生きた胚がウェル中に存在するとき、ウェル中の液体の交換は、ロボットアームを用いて実行することができない。しかしながら、内部に生きた胚が存在しないウェル中の培地を交換する機能は、ロボットアームを用いて実行可能である。また、生きている胚を含むウェル内の液体の手動での交換は、胚に強いストレスになることがある。この方法により、円筒形状を有する溝板の外縁でのウェルモジュールからの溶液の緩やかな交換が、胚への不必要なストレスを軽減することができる。

【0051】

本発明は、液体および細胞をマイクロインジェクションするための多数の胚の取り扱いを容易にするだけでなく、ハイスループットな様式で胚への腫瘍片の適切な配置および注入を可能にする。

【0052】

本明細書に記載のマルチウェルマイクロインジェクションシステムは、経済的であり、“1回使用”用に製造されてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 3 】

本明細書に記載のマルチウェルマイクロインジェクションシステムおよび使用方法は、多数の胚の取り扱いを大幅に簡素化し、多数の実験に亘って注入の精度および一貫性を向上させる。単一のモジュール内の全てのウェルが連結されているため、全ての胚が同じ処理を受ける。乾燥による培地容量の不均等な損失、またはウェル当たりの不均等な添加は、ウェルからウェルへの何らの差異をもたらしことはない。同じ処理群の胚は全て等しくそのような変化に曝されている。

【 0 0 5 4 】

その好ましい態様において、このマルチウェルマイクロインジェクションシステムは、96ウェル形式で使用するためのものであるが、このシステムは、同様に、6ウェル、12ウェルまたは24ウェルプレートフォーマットに変更することができる。

10

【 0 0 5 5 】

その好ましい実施形態において、このマルチウェルマイクロインジェクションシステムは、受精後48時間のゼブラフィッシュの胚を使用するためのものであるが、受精後24から72時間のゼブラフィッシュ胚の操作のため、他の種の魚、例えばメダカ由来の胚、およびアフリカツメガエル、げっ歯動物、イヌ、および他の実験動物由来の胚の操作のために、使用することもできる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 6 】

【 図 1 - 1 】 図 1 : 侵襲性および非侵襲性原発肺腫瘍細胞の薬物に対する異なる応答。図 1 A : 画像により捕捉された30の異種移植片の腫瘍座標を図示する。

20

【 図 1 - 2 】 図 1 B : パクリタキセルで処理した28の異種移植片の腫瘍座標。

【 図 1 - 3 】 図 1 C : パクリタキセルおよびカルボプラチンで処理した29の異種移植片の腫瘍座標。(- D = 薬剤なしコントロール、+ P = パクリタキセル処理、C + P = カルボプラチンおよびパクリタキセル処理)。

【 図 1 - 4 】 図 1 D : 未処理および処理した異種移植片の計算された移動指数(- D = 薬剤なしコントロール、+ P = パクリタキセル処理、C + P = カルボプラチンおよびパクリタキセル処理)。図 1 E : 未処理および処理した異種移植片の計算された侵襲指標。(- D = 薬剤なしコントロール、+ P = パクリタキセル処理、C + P = カルボプラチンおよびパクリタキセル処理)。図 1 F : 脳転移腫瘍が異種移植片で観察され、患者において観察された臓器ホーミングが再現された。図 1 G : 異種移植片における脳転移腫瘍の薬物応答。(- D = 薬物なしコントロール、+ P = パクリタキセル処理、C + P = カルボプラチンおよびパクリタキセル処理)。

30

【 図 1 - 5 】 図 1 H : パクリタキセルで処理した異種移植片における侵襲性および非侵襲性細胞の薬物応答。薬物応答は、生存について9つ、死について9つの、MGM Tの発現により測定された。図 1 I : パクリタキセルおよびカルボプラチンで処理した異種移植片における侵襲性および非侵襲性細胞の薬物応答。

【 図 2 】 図 2 は、本発明の一面のマルチウェルプレートアセンブリの平面図である。

【 図 3 】 図 3 は、図 2 の態様の取り外し可能なモジュールの1つの平面図である。

【 図 4 】 図 4 は、図 2 の態様のホールディングフレーム内にある溝板を有する胚を操作するウェルを示す断面図である。

40

【 図 5 】 図 5 は、図 2 の態様の胚を操作するウェルオルソログおよび取り外し可能なインサートの拡大された断面図である。

【 図 6 】 図 6 A は、受精後48時間(h p f)のゼブラフィッシュ胚の水平断面図であり、図 6 B は、受精後48時間(h p f)のゼブラフィッシュ胚の横断面図である。

【 図 7 】 図 7 は、溝板中の受精後48時間のゼブラフィッシュ胚の配置を、図 2 の態様のインジェクションカバープレートおよびマイクロインジェクション用のマイクロピペットと共に示す、概略側面図である。

【 図 8 】 図 8 は、図 2 の態様のマイクロインジェクション用の回転可能なマイクロピペットの概略側面図である。

50

【図 9】図 9 は、溝板中の受精後 48 時間のゼブラフィッシュ胚を、本発明の態様による受精後 48 時間のゼブラフィッシュ胚への腫瘍のマイクロインジェクション用のマイクロピペットのためのガイドとしてのインジェクションカバープレートと共に示す、概略側面図である。

【図 10】図 10 は、胚が本発明の態様による溝板中にある間に、マイクロインジェクション用のマイクロピペットの回転可能な角度を示す、溝板中の受精後 48 時間のゼブラフィッシュ胚の概略側面図である。

【図 11】図 11 A および図 11 B は、本発明の態様により、マイクロインジェクションのために溝板中の胚へのアクセスを可能にしながら、マイクロピペットの回転性を示す、溝板中の受精後 48 時間のゼブラフィッシュ胚の概略側面図である。

【発明を実施するための形態】

【0057】

発明の詳細な説明

概要

癌細胞の分子および遺伝子プロファイリングは、標的療法および腫瘍学研究において新たな傾向となっている。しかしながら、癌細胞の分子多様性およびそれらの絶え間なく変化する性質の関連付け、原発腫瘍の分子特性ならびにそれらの浸潤または転移腫瘍細胞の関連付けには限界がある。転移性癌に対する現在の化学療法の限定された有効性、および癌細胞のゲノムプロファイリングの限定された適用で定義されるシナリオにおいて、本発明者等は、侵襲および転移について臨床的に関連する生理的情報を取得するために、腫瘍組織（例えば、外科的に切除される原発腫瘍、生検、CTC など）から代表的かつ生物学的に適切な生存 3D 腫瘍を作成する可能性を探究した。

【0058】

癌処置のための個別の、かつ標的化された対処のために、患者の腫瘍の生理（例えば、増殖、浸潤能、転移、臓器ホーミングなど）および種々の抗癌治療に対する応答を予測し得る迅速なアッセイ法が必要とされる。

【0059】

しかしながら、個別化および標的化された治療アプローチは、すべての癌の動的性質によりさらに複雑になる。結果として、すべての原発、浸潤または転移腫瘍は、細胞の不均一集団で構成されている。従って、種々の生理的または分子カテゴリーに癌細胞集団を分離 / 分別する方法が重要である。

【0060】

本発明は、癌の進行および処置への応答の予測のためのアッセイおよび方法を提供する。該方法は、改良された “Cancer Progression and Response Matrix” を使用してよい。従って、本発明の任意の態様は、予測可能な腫瘍の進行および処置への応答に基づいて個別化および標的化された治療の設計を容易にするために使用され得る。

【0061】

定義

本明細書で用いる以下の用語は、特に他に記載されない限り、それら本来の意味を有する。

【0062】

“対象” または “患者” または “個体” は、典型的にヒトを含むが、げっ歯動物、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ウシ、ブタおよび霊長動物を含み、かつこれらに限定されない他の動物も含み得る。

【0063】

“腫瘍” は、生理的、組織学的、分子および / または構造的異常のいくつかの形態を有する対象の身体中または身体上に見られる細胞塊を含む。

【0064】

“癌” は、無制御に増殖する異常な細胞を有する疾患のクラスの任意のメンバーを含む。これは、任意のステージまたはグレードを含む、良性、侵襲性、局在、転移前、転移、

10

20

30

40

50

転移後、軟部または固形組織の区別なく、全ての新生物状態および全ての癌を含む。

【0065】

“生物学”または“生理学”は、典型的に、形態学、生理学、解剖学、挙動、起源、および分布を含む。

【0066】

“病態生理学”は、全て典型的に、ある状態に関連する無秩序な生理的プロセスを意味する。特に、癌は、染色体異常、遺伝子変異およびエピジェネティックな変化を含む、進行性の遺伝子異常によって引き起こされる疾患群である。特に、ヌクレオチド配列における変化を伴わないゲノムに対する機能的に関連する修飾であるエピジェネティックな変化は、癌細胞の全体的な生物学の調節に重要な役割を果たす。エピジェネティックな変化は、環境的曝露により観察されている。

10

【0067】

“生検”は、診断または予後評価のために細胞または組織試料を取得する過程を意味する。任意の公知の生検技術は、本発明の方法および組成物に適用することができる。代表的な生検技術は、切除生検、切開生検、針生検および外科的生検を含むが、これらに限定されない。用いる生検技術の選択は、評価されるべき組織の種類ならびに腫瘍の位置、大きさおよび種類によって変わる。

【0068】

“侵襲”は、浸潤または侵入を意味する。特に、侵襲性腫瘍細胞は、周囲の組織に浸潤可能な細胞である。必ずしも全ての腫瘍細胞が浸潤する能力を有するわけではない。

20

【0069】

“転移”は、癌の原発部位から離れた位置での二次性悪性腫瘍（“転移腫瘍”）の発生を意味する。それは、1つの臓器または身体の一部からの癌細胞の別の隣接していない臓器または部分への拡散である。癌細胞は初めに、循環系に移動（血管内へ侵入）し、次いで、二次性腫瘍を構築するために二次部位へ移動（血管外へ溢出）する。

【0070】

“血中循環腫瘍細胞”または“CTC”は、血管内への侵入を経て循環系で見出される腫瘍細胞である。血中循環腫瘍外細胞は、血中循環腫瘍細胞、播種性癌細胞、および癌幹細胞を含むが、これらに限定されない。血中循環腫瘍細胞は、全血、痰、気管支肺胞洗浄、尿、乳頭吸引液、リンパ液、唾液、注射針吸引液などの何れかの利用可能な生体液から得られる可能性がある。

30

【0071】

“臓器ホーミング”は、転移の臓器への血中循環腫瘍細胞の播種を伴う。原発腫瘍は、特定の遠く離れた“標的”臓器に転移する傾向がある。例えば、肺癌は、しばしば脳に転移する傾向がある。臓器ホーミングに關与する生理学はよく理解されていないが、プロセスまたは臓器の選択は無作為なプロセスではない。

【0072】

“シグナル伝達”は、細胞外シグナル伝達分子が細胞表面受容体（“シグナル伝達分子”または“シグナル伝達因子”）を活性化するとき起こる。次に、この受容体は、典型的に、生化学反応の順序付けられた配列を含む応答を生成する細胞内分子を変化させる。

40

【0073】

“分子遺伝学的腫瘍マーカー”または“MGTM”は、腫瘍の発生、増殖、侵襲および転移等の腫瘍の生物学的特徴に基づいて同定されている。いくつかの例は、癌遺伝子（K-ras、erbB-1（EGFR）、erbB-2（HER-2/neu）、bcl-2、c- / N - / L - myc、c-kit）、腫瘍抑制遺伝子（p53、RB、p16、p27、FHIT、RASSF1A）、テロメラーゼ、侵襲および転移マーカー（MMP、VEGF、COX-2）、細胞接着因子（E-カドヘリン、ベータ-カテニン）、上皮性マーカー（サイトケラチン、CEA）、アポトーシスマーカー（カスパーゼ-3、切断されたPARP）、一塩基多型（SNP）、および抗癌剤感受性マーカー（MRP、LRP、MDR、ベータ-チューブリン、ERCC1）を含むが、これに限定されない。抗癌

50

剤の存在下での、シグナル伝達経路の異なる活性化/不活性化ならびに細胞の侵襲性および/または臓器ホーミングの変化は、それぞれの患者に適切な用量での好適な癌治療レジメンの選択に役立ち得る。所定の患者に対する化学療法の効果の予測を含む、複数の関連する適用が存在してよい。

【0074】

“化合物”は、粗物質として得られたか、天然物（植物源または人工源（例えば実験室で人工的に合成されたような）を経て性質上利用可能なもの）から精製された、広範な全ての化合物または物質を意味する。

【0075】

“合成または天然の化合物および生物学的物質”は、医薬または治療物質、非医薬物質、天然に存在する物質、人工的に作製された物質、生き物（植物、動物など）から生成された物質、または生き物ではない源から抽出された物質もしくは鉱物を含むが、これらに限定されない。これらは、化学療法薬、医薬製剤、自然健康製品、粉末、茶および抽出物、血清、ワクチン、抗原、抗毒素などを含んでよい。

【0076】

“免疫調節”は、免疫強化（免疫系の活性化）、免疫抑制（免疫系の抑制）、または免疫寛容の誘導のような免疫応答の調節である。具体的には、腫瘍微小環境における免疫細胞と悪性細胞との複雑な現象があり、実際に、免疫系が腫瘍の促進および阻害の両方の役割を有するように、顕著な予後関連性が存在する。腫瘍浸潤免疫細胞、および腫瘍部位での慢性炎症は、増殖、進行、侵襲および転移疾患に重要な役割を果たす。従って、免疫調節は、疾患の進行に大きな影響を与え得る。従って、本発明の文脈において、免疫調節は、患者の腫瘍細胞塊を伴う腫瘍浸潤免疫細胞の免疫応答の調節、免疫系の調節因子（インターロイキンおよびインターフェロン）の調節ならびに宿主免疫系、特にゼブラフィッシュ免疫細胞の調節を意味する。

【実施例】

【0077】

血中循環腫瘍細胞のインジェクションの例

実施例1：ゼブラフィッシュへの乳癌細胞株 MDA-MB-231の注入

ゼブラフィッシュの卵を収集し、摂氏36にて48時間、E3培地（5mM NaCl、0.17mM KCl、0.33mM CaCl₂、0.33mM MgSO₄、0.1%メチレンブルー）中でインキュベートした。該胚をトリカインで麻酔し、ピンセット（Dumont #5 forceps）を用いて卵殻を剥がした。

【0078】

MDA-MB-231細胞（転移性乳癌細胞）を、D-MEM（高グルコース）、10%ウシ胎仔血清（FBS）、0.1mM MEM 非必須アミノ酸（NEAA）、2mM L-グルタミン、1%ペニシリン-ストレプトマイシン中で増殖させ、CM-DiIを用いて標識した（Vibrant, Lifetech、4ng/ul 終濃度、37で4分インキュベート後、4で15分インキュベート）。50個の細胞を、1つのトリカインで麻酔した受精後48時間のゼブラフィッシュ胚の卵黄に注入した。画像をインジェクションの24時間後に取得した。

【0079】

結果：インジェクション後、単離されたCTCは、インジェクション部位に局在化したが、ゼブラフィッシュ胚の尾部全体にも見ることができ、ゼブラフィッシュ胚における転移パターンを形成することができた。

【0080】

実施例2：血液から単離されたCTCからのゼブラフィッシュにおける腫瘍の発生

CTCは、脳に転移を有するステージ4の肺癌患者および1名の対照となる健康な個体からの20mlの血液（抗凝固剤としてEDTA-Ca）から収集された。CTCは、製造業者の指示書に従い、抗体で被覆した磁気ビーズ（Dynabeads, Lifetech）を用いて順次正（抗EpCam BerP4 抗体、AbCaM）および負（抗CD45、AbCaM）

10

20

30

40

50

の選択により収集された。各工程で2回のキャプチャー - ウォッシュ - リリース (Two - capture - wash - release) を行った。収量は、転移患者から約110細胞であったが、健康なドナーからは細胞が検出されなかった。得られたCTCをDiO (Vibrant, Lifetech, 終濃度200mM)を用いて、37℃にて20分間染色した。総数100個の染色されたCTC細胞を、1つのトリカインで麻酔した受精後48時間(hpf)のゼブラフィッシュ胚の卵黄に注入した。画像をインジェクションの24時間後に得た。

【0081】

結果：単離されたCTCは、ゼブラフィッシュ幼生の脳組織における腫瘍形成能および転移形成能を有した。

【0082】

実施例3：薬物に対する侵襲性および非侵襲性の原発性肺腫瘍細胞の異なる応答

脳への転移を示した末期の肺癌患者からの腫瘍組織を切片にし、業者指示書に従いリベラーゼDL (Roche) 中でインキュベートした。肺細胞を70μmのセルストレーナーに通し、2mlのRPMI 1640に再懸濁させて計数した。細胞生存性をトリパンブルー排除法により確認した。細胞を、業者指示書に従って蛍光追跡PKH-67 (Sigma) 色素で標識し、25mMのグルコースを含むPBS中に再懸濁した。Nanoject II マイクロマニピュレータ装置を用いて、100個の細胞を卵黄嚢にインジェクトした。1グループの胚は、対照としてPBS + グルコースのみをインジェクトした。次いで、該胚を抗生物質 / 抗真菌剤を含むTE水溶液中でインキュベートし、インキュベーター中、摂氏35℃で一晩培養した。腫瘍移植後24時間のインキュベーション後、卵黄嚢中の腫瘍細胞の存在を確実にするために、胚を蛍光顕微鏡下で撮像した。薬物 / 処置剤を種々の濃度で添加し、胚を含むプレートをさらに3日間、35℃でインキュベートした。胚をトリカインで麻酔し、蛍光顕微鏡下で再度画像を取得した。この実験で用いた薬物は、パクリタキセルのみ、またはパクリタキセルとカルボプラチンの組み合わせであった。薬物応答を、生存について9遺伝子 (増殖および細胞周期) および死について9遺伝子 (アポトーシス) の、18遺伝子 (BCL2、BCL-X、BCL-B、BFL-1、BCL-W、MCL1、CDC2、CYCLIN-D、CYCLIN-A1、BAX、BAK、BOK、BID、BIM、BAD、BMF、NOXA、PUMA) の発現を通して測定した。

【0083】

結果：図示される腫瘍座標 (図1) は、薬物処理の存在下または不存在下における侵襲および転移パターンの顕著に高い再現性を示す。侵襲指標、移動指数ならびにホーミング指数により測定されるとおり、薬物の存在下において、非侵襲性腫瘍細胞と比較して侵襲性腫瘍の異なる応答がある。非侵襲性および侵襲性細胞の生存 (細胞周期および増殖によって測定される) および死 (アポトーシスによって測定される) における非常に明確な相違もある。

【0084】

マイクロインジェクション装置の使用例

図2から5の説明

図2から5に示す通り、本発明の一面のマルチウェルプレートアセンブリ10は、複数の胚ハンドリングウェル24を支持するベースプレート28を含むホールディングフレーム12を含む。この態様において、アセンブリ10は、96ウェルプレート形式で作られ、他の基準を用いることもできるが、国際標準に準拠している。従って、このセットアップは、全ての標準的なマイクロタイタープレートリーダーで使用可能であり、全ての好適な液体ハンドラーで操作することができる。マルチウェルプレートアセンブリ10は、好ましくはマルチウェルプレートアセンブリ10のウェルの位置をマークするラベルを備えている、安全性、単離、およびウェルからの液体の乾燥を防ぐ、蓋16を含む。

【0085】

この態様において、8つの分離可能な、取り外し可能なモジュール18 (図3に詳述) を、ホールディングフレーム12にマウントする。8つの分離可能な、取り外し可能なモ

10

20

30

40

50

ジュール 18 のそれぞれ 1 つは、溝板 20 および溝板 20 上にマウントされる取り外し可能なインサート 22 を有している。図 4 に示す通り、溝板 20 は、上記の複数の胚ハンドリングウェル 24 および側部の液体ハンドリングウェル 26 を含む。

【0086】

各胚ハンドリングウェル 24 は、好ましくは、円筒形の上部セクション 30 および円錐形の下部セクション 32 を有する。側部の液体ハンドリングウェル 26 は、好ましくは、完全に円筒形である。側部の液体ハンドリングウェル 26 および胚ハンドリングウェル 24 は、それらの出口端で横断するドレインチャンネル 34 により相互に接続されている。取り外し可能なインサート 22 は、その外縁部でホールディングフレーム 12 に隣接しており、その下縁部で胚ハンドリングウェル 24 の外縁部に隣接している。取り外し可能なインサート 22 は、胚のより良好な操作のために取り外し可能である。取り外し可能なインサート 22 のマウントは、各胚ハンドリングウェル 24 間に上記の相互接続があるため、気密性にする必要がない。ベースプレート 28 は、好ましくは透明で UV 照射可能であるべきである。取り外し可能なインサート 22 は着色されてよい。

10

【0087】

図 2 から 4 に示す通り、この態様において、胚を培養するための 11 個の胚ハンドリングウェル 24 (W1 - 11) および 1 つの側面の液体ハンドリングウェル 26 がある。上記の通り、側面の液体ハンドリングウェル 26 および胚ハンドリングウェル 24 は、それらの出口端で横断するドレインチャンネル 34 により相互に接続されている。従って、1 つのウェル (例えば、ウェル W1) での液体量の変化は、他のウェル (例えば、ウェル W2 から W11) によって補償される結果となる。これは、ウェルの乾燥ムラを防ぐことができ、全てのウェルが同じ液体量を有し得る。従って、全ての液体の取り扱い、培地の変更などは、液体ハンドリングロボットにより液体ハンドリングウェル 26 中で行われ得て、それ故に、胚の取り扱い、損傷またはストレスを実質的に防止することができる。

20

【0088】

全ての操作は、溝板 20 で行われる。上記の通り、胚ハンドリングウェル 24 は、ゼブラフィッシュ幼生を置くことのできる円錐形の底部 32 を有する。ゼブラフィッシュ幼生の形状は図 6 A および 6 B に後述される通りであり、一旦麻酔されると、それらは、卵黄を上側にして胚ハンドリングウェル 24 の円錐形の底部 32 に落ちる。図 7 に示す通り、カバープレート 36 は、取り外し可能なインサート 22 の代わりに溝板 20 の上に配置され得る。図 7 に示す通り、このカバープレート 36 は、胚へ血管新生促進因子と共に腫瘍細胞をインジェクションするためのガイドとして作用し得る。

30

【0089】

図 4 の破線内の長方形の領域を、図 5 に拡大して表示する。

【0090】

図 6 A および 6 B の説明

図 6 A は、受精後 48 時間 (hpf) のゼブラフィッシュ胚の水平方向の横断面であり、図 6 B は、受精後 48 時間 (hpf) のゼブラフィッシュ胚の垂直横断面図である。

【0091】

図 7 および 8 の説明

図 7 に示す通り、マイクロピペットユニット 40 は、好ましくはガラス製であり、交換可能なマイクロピペット 42 を有してよい。受精後 48 時間のゼブラフィッシュ胚 48 は、円錐形セクション 32 の下側の狭い端内にその背側 50 を、そして円錐形セクション 32 の上側の広い端にその卵黄 52 を配して、胚ハンドリングウェル 24 の円錐形の底部セクション 32 に配置される。そのように提供されるユニットは、カバープレート 36 により保護されている。マイクロピペットユニット 40 は、カバープレート 38 の開口部を通して卵黄 52 へ血管新生促進因子、好ましくは増殖因子アンジオポエチンと共に腫瘍細胞をインジェクトするために配置される。

40

【0092】

図 8 に示す通り、交換可能なマイクロピペット 42 を有するマイクロピペットユニット

50

40は、ロボットアーム54により制御される。血管新生促進因子、好ましくは増殖因子アンジオポエチンを含む腫瘍細胞の液体溶液は、導管56によりロボットアーム54によって注入される。ロボットインジェクタアーム54は、コントロールアーム58によって任意の角度で回転させることができる。回転は、矢印60によって概略的に示される。

【0093】

図9、10および11の説明

図9は、卵黄52への、血管新生促進因子、好ましくは増殖因子アンジオポエチンと共に腫瘍をインジェクションするためのガイドとしてのカバープレート36の使用を示す図7の単純な複製である。

【0094】

図10に示す通り、操作は、所定の位置に取り外し可能なインサートを配置せずに顕微鏡62下で行われ得る。これは、任意の角度で胚の操作が可能であり、胚体部50、52の任意の部分にインジェクションを行うことができる。

【0095】

図11Aに示す通り、マイクロピペットユニット40は、破線で示す傾斜位置に実線で示す垂直位置から回転させることができ、故に、胚体部50、52の任意の部分に注入が可能となる。

【0096】

図11Bに示す通り、マイクロピペットユニット40は、破線で示す傾斜位置に実線で示す垂直位置から回転させることができ、故に、胚体部50、52の任意の部分に注入が可能となる。図11Bはまた、胚体部50、52も回転可能であることを示す。

【0097】

操作工程

胚は、受精後48時間で卵殻を剥がし、ガラスピペットを用いてウェルに移動させる。要すれば、胚は、腫瘍細胞の取り込み可能性および効率を増大するために、血管新生促進因子、好ましくは増殖因子アンジオポエチンで処理され得る。培地をカバープレート36を通して一部除去し、トリカインを添加して、胚を麻酔する。トリカイン溶液は、工程の時間短縮のために各ウェル24に添加され得る。胚は麻酔され、溝板20の胚ハンドリングウェル24の下部の円錐形の底部32に落ちる。胚ハンドリングウェル24の底部に円錐形32があり、卵黄52が胚体部50の他の部分よりも軽いため、幼生は、卵黄52を上向きにして落ちる。必要に応じて、インジェクションカバープレート36は、血管新生促進因子、好ましくは増殖因子アンジオポエチンと共に腫瘍細胞を誘導するように位置し得る。ガラスマイクロピペット40を取り付けたロボットアーム54を用いて、血管新生促進因子、好ましくは増殖因子アンジオポエチンと共に腫瘍細胞を胚の卵黄52へ注入する。卵黄嚢は、それ自体迅速に密封される。

【0098】

一旦インジェクションが完了すると、インジェクションカバープレート36が除去され、取り外し可能なインサート22がウェル24を作成するために配置される。

【0099】

ウェル26を介するトリカイン溶液のピペッティングによる除去は、ウェル24において液体を交換することができ、新鮮な培地がウェル26によって再び充填される。従って、各11列の胚のためのウェル24は充填され、各胚は麻酔から回復し得る。一旦回復すると、それらは、自身のウェル中を自由に泳ぎ回り、近隣の胚と混合しない。これは、個々の胚の持続的な追跡を可能にする。ゼブラフィッシュ幼生が内部で泳ぎ、それと共に蓋16を有する全体的に組み立てられたユニットは、互いに積み重ねられていてよく、他のマイクロタイタープレートと同じくインキュベーターに格納され得る。

【0100】

好ましくは、溝板20は透明であるため、幼生は、それを処理する必要なくリアルタイムにUV下で観察され得る。要すれば、幼生は、上記の通り、それらを処理する必要なく、観察のために麻酔され得る。腫瘍の増殖はソフトウェアを用いて測定可能であるだけで

10

20

30

40

50

なく、水泳行動をリアルタイムで観察することもできる。そのような観察は、手動で行われ得るか、または検出ソフトウェアを用いることにより可能である。

【0101】

上記の実施例を実行後、幼生を安楽死させ染色する必要がある場合、幼生の全ての取り扱いおよび液体の交換は、このプレート内で行うことができる。全胚染色における最も重要な工程の1つは、適当な混合のための溶液中の胚を振動させることである。

【0102】

この工程は、一般的に、混合がシェーカー上であっても殆どの96ウェルプレートによくないため、エッペンドルフチューブ中で行われる。ウェル26のみ上下にピペティングすることにより、全ての11個の胚を単一のモジュールで揺動することができる。同様に、プログラムされた液体ハンドラーを用いて、プレート全体の全てのそのような工程を最適化することができる。

【0103】

すべての染色が行われると、腫瘍塊の尺度としての蛍光がUVプレートリーダーを用いて直接計算され得る。この同じ装置は、DNA、RNA、モルホリノ等の他のインジェクションにも同様に用いることができる。

【図1-1】

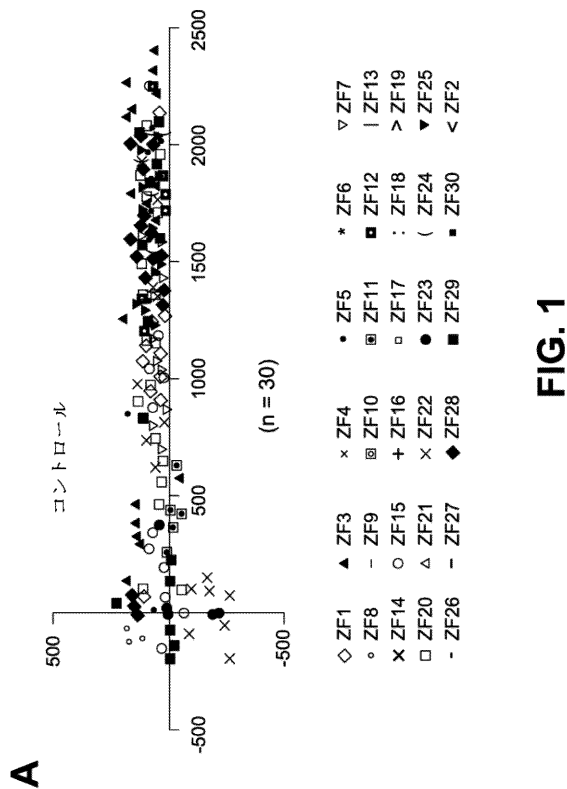


FIG. 1

【図1-2】

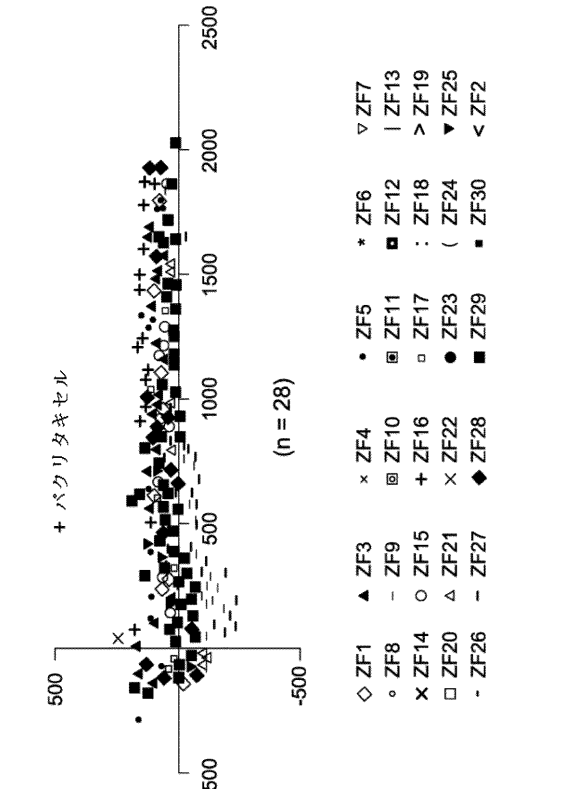


FIG. 1

B

【 図 1 - 3 】

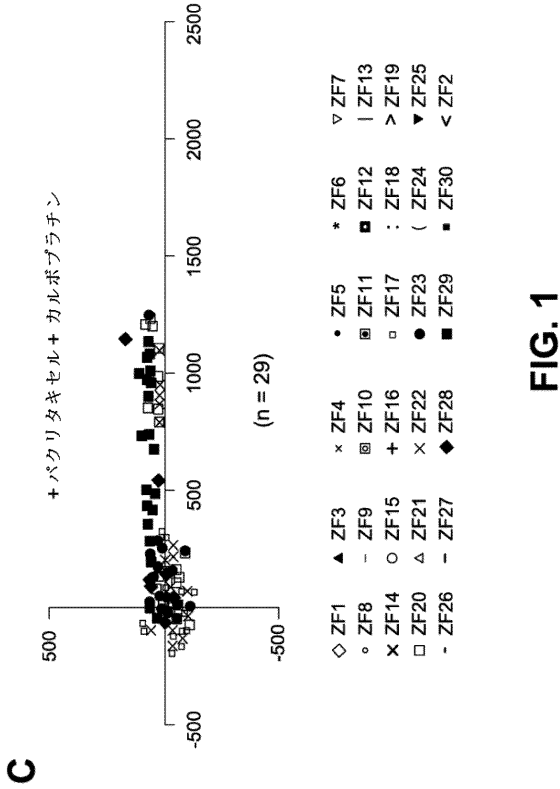


FIG. 1

【 図 1 - 4 】

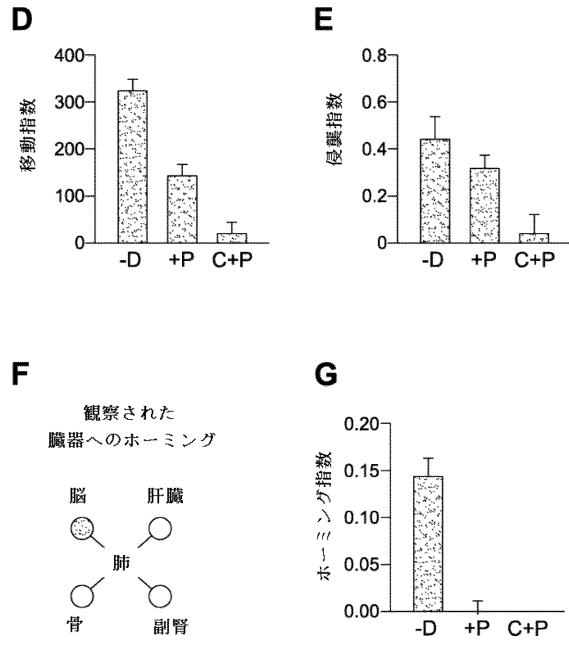


FIG. 1

【 図 1 - 5 】

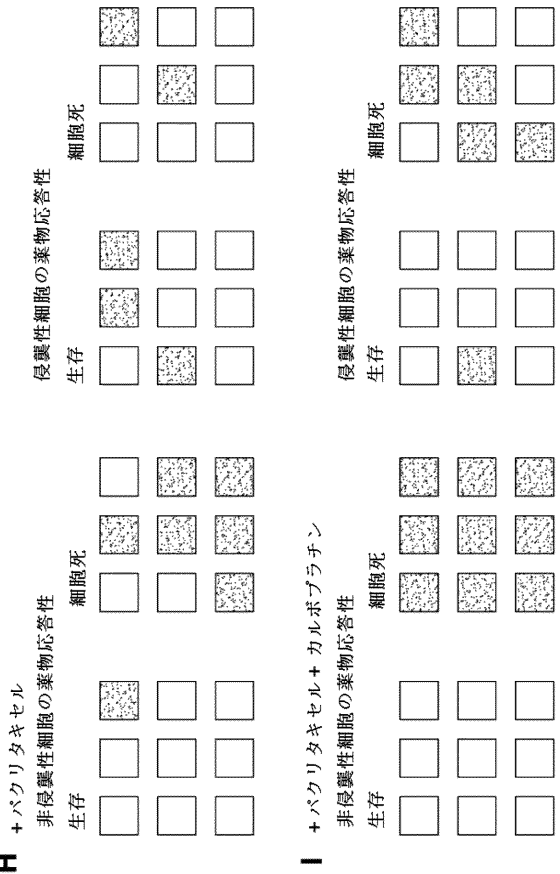


FIG. 1

【 図 2 】

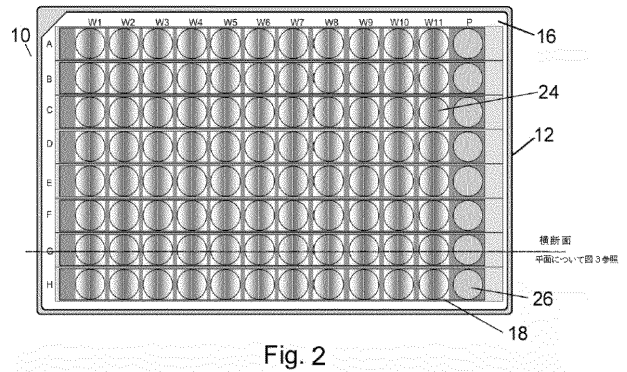


Fig. 2

【 図 3 】

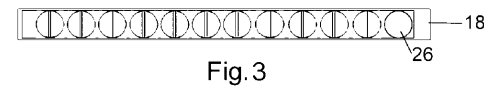


Fig. 3

【 図 4 】

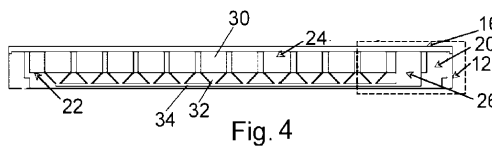


Fig. 4

【 図 5 】

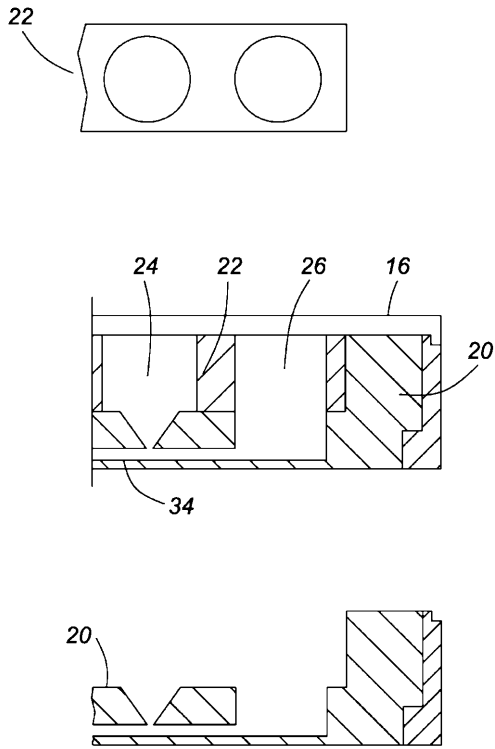
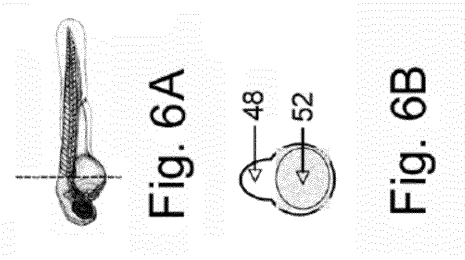


FIG. 5

【 図 6 】



【 図 7 】

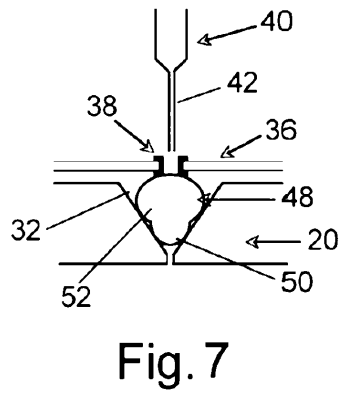


Fig. 7

【 図 8 】

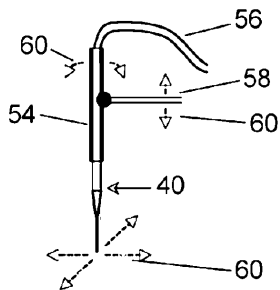


Fig. 8

【 図 9 】

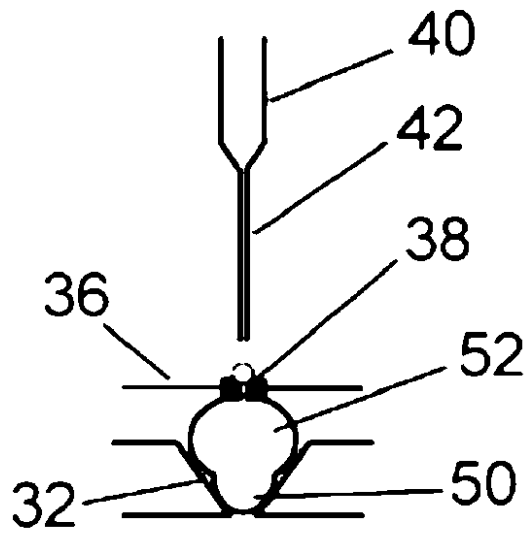


Fig. 9

【図 10】

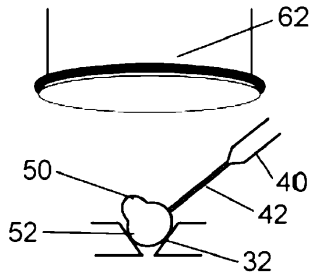


Fig. 10

【図 11】

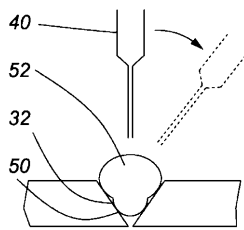


FIG. 11A

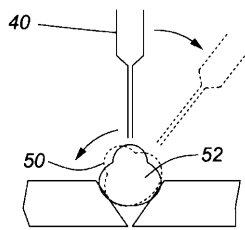


FIG. 11B

【手続補正書】

【提出日】平成27年8月4日(2015.8.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

生検または外科的に切除された腫瘍から得られた初代腫瘍細胞より腫瘍を確立する方法であって、

(a) 1またはそれ以上の初代腫瘍細胞を単離し、

(b) 該腫瘍細胞を細胞追跡用色素で標識し、

(c) 受精後24から48時間のゼブラフィッシュ胚に該腫瘍細胞を注入し、そして

(d) 該胚を24時間またはそれ以上インキュベートすること

を含む、方法。

【請求項2】

腫瘍細胞が、血中循環腫瘍細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

細胞追跡用色素が蛍光色素である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

腫瘍細胞が、受精後24から48時間のゼブラフィッシュ胚に注入される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

腫瘍細胞が、(i) 胚体部分に浸潤するか、または(ii) 卵黄嚢内に留まるかどうか

を決定するために胚をインキュベート後に腫瘍細胞の位置を測定することをさらに含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

腫瘍細胞が胚体部分に浸潤するとき、腫瘍細胞の位置を用いて該腫瘍細胞が転移の可能性を有することを示すことをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

腫瘍細胞の位置が、蛍光顕微鏡下で腫瘍細胞の 1 またはそれ以上の蛍光画像を取得することにより測定される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

a . 腫瘍細胞巢の幅 (W) および長さ (L) を測定するために画像解析ソフトウェアを用いて腫瘍細胞巢の体積を $1 / 2 (\text{幅} (W)) (\text{長さ} (L)) ^ 2$ として計算し、

b . 腫瘍細胞巢の侵襲性の指標 (invasive index) を侵襲指標 (I I) = $1 / n$ (T 時間での胚における腫瘍巢の数 / 胚に注入された腫瘍細胞の総数) (式中、 n は、実験で考慮される胚の数であり、 T は、インキュベーション時間である) として測定し、より高い I I 値は、原発腫瘍の浸潤の可能性がより高いことを示し、そして

c . 腫瘍細胞の移動指数を移動指数 (M I) = $1 / n$ (T 時間での C D / T 時間での腫瘍巢の総数) (式中、 C D は腫瘍細胞が伝播する累積距離であり、 n は実験で考慮される胚の数であり、 T はインキュベーション時間である) として測定し、より高い M I 値は、腫瘍細胞の侵襲性がより高いことを示す、
の 1 つまたはそれ以上により胚卵黄囊および胚体部分における腫瘍細胞を定量化することをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

腫瘍細胞巢の体積、侵襲指標または移動指数のいずれか 1 つが、化合物が存在するときに存在しない場合と比較して異なるかどうかを決定することをさらに含む、請求項 8 に記載の方法

【請求項 10】

胚のインキュベーションを化合物の存在下または不存在下で行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

a . インキュベーション後、胚および腫瘍細胞をプロテアーゼ溶液中で消化し、
b . 胚および腫瘍細胞をピペティングにより分散させて、単一細胞懸濁液に解離させ、
c . 腫瘍細胞を固定し、蛍光顕微鏡下で単一細胞懸濁液中の細胞を計数し、
d . 計数された腫瘍細胞と注入された腫瘍細胞の比を計算し、
e . 化合物の存在下でのインキュベーションの比率と化合物の不存在下でのインキュベーションの比率を比較し、
f . 該化合物が腫瘍細胞に影響を与えるかどうかを決定するための比較に用いること
により、腫瘍細胞に対する化合物の効果を測定することをさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

腫瘍細胞の侵襲性パターンを化合物の存在下または不存在下で測定および比較することをさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

a . インキュベーション後、胚および腫瘍細胞を酵素消化し、
b . 消化された胚または腫瘍細胞から D N A を単離し、
c . 消化された胚または腫瘍細胞の D N A から 1 またはそれ以上の遺伝子を P C R 増幅し、
d . 増幅させた 1 またはそれ以上の遺伝子を配列決定し、
e . 消化された胚および腫瘍細胞の D N A をバイサルファイトシーケンシングを行い、後成的修飾の位置を示すこと
により、腫瘍細胞の D N A における変化を評価することをさらに含む、請求項 1 に記載の

方法。

【請求項 14】

a. インキュベーション後、胚および腫瘍細胞を酵素消化し、
 b. 消化された胚および腫瘍細胞の RNA を単離し、
 c. ヒトの遺伝子配列に対して設計された 2 またはそれ以上のプライマーを用いて遺伝子発現の定量的リアルタイム PCR 分析を行うこと
により、腫瘍細胞における遺伝子発現を分析することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

a. 化学固定液を用いて胚を固定し、1 またはそれ以上のヒトタンパク質抗体を用いる免疫組織化学を用いて腫瘍細胞のタンパク質発現を可視化し、
 b. 腫瘍細胞を注入しインキュベーションした後、組織切片スライド上で胚の免疫組織化学を用いて腫瘍細胞のタンパク質発現を可視化すること、
 c. 腫瘍細胞のタンパク質発現を ELISA (酵素免疫測定アッセイ) を用いて可視化すること、および
 d. 腫瘍細胞のタンパク質発現をウェスタンブロットを用いて可視化すること
のうち 1 またはそれ以上により腫瘍細胞のタンパク質発現を分析することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

血管新生促進因子を、腫瘍細胞のマイクロインジェクション前、マイクロインジェクション中またはマイクロインジェクション後に、ゼブラフィッシュ胚を含む水中に添加する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

血管新生促進因子が増殖因子アンジオポエチンである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

a. 細胞追跡用色素が赤色蛍光を有し、
 b. 受精後 24 から 48 時間の緑色蛍光タンパク質を遺伝子導入したゼブラフィッシュ胚の卵黄に腫瘍細胞を注入し、
 c. 胚をインキュベーション後、緑色および赤色蛍光フィルターを用いて蛍光顕微鏡下で腫瘍細胞の 1 またはそれ以上の蛍光画像を取得し、
 d. 画像解析ソフトウェアを用いて蛍光画像を分析し、画像中の腫瘍細胞巢の位置を得て、
 e. 蛍光画像解析を用いて腫瘍細胞のホーミング指数を計算すること {ホーミング指数 (HI) = 1 / n (T 時間での臓器中の腫瘍細胞巢の総数 / T 時間での腫瘍細胞巢の総数) (式中、n は実験で考慮される胚の数であり、T はインキュベーション時間である。)}
をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

薬物の存在下と対比して、その不存在下で注入された腫瘍細胞の臓器へのホーミングパターンの変化を観察することをさらに含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

腫瘍細胞が、血中循環腫瘍細胞である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

a. ホールディングフレーム、複数の取り外し可能なマルチウェルモジュール (ここで、各マルチウェルモジュールは溝板および取り外し可能なインサートから構成され、各溝板は、直線状に配置された円錐形開口底部を有する複数の胚ホールディングウェルを有し、溝板の外周縁のウェルモジュールが、このウェルを通して液体ハンドリングを可能にする円筒形状を有し、取り外し可能なインサートは、垂直な側面および溝板の各溝と位置を合わせた上部の円形開口部を有し、それ故に、溝板の上に配置されたとき、胚ホールディングウェルおよび胚ハンドリングウェルを形成する)、ならびにホールディングフレーム

、溝板および取り外し可能なインサートを覆う蓋
および

b . 胚を可変角度および/または高さで注入可能にするためのマルチウェルプレート上に回転可能に位置するマイクロインジェクションマイクロピペットを含む、受精後24から72時間のゼブラフィッシュ胚のマイクロインジェクションを自動化するマルチウェルマイクロインジェクションシステム。

【請求項22】

複数の胚ホールディングウェルがそれぞれ、その円錐形開口底部で溝板の外周縁のウェルモジュールの開口底部へ接続されている、請求項21に記載のマルチウェルマイクロインジェクションシステム。

【請求項23】

マイクロインジェクションの自動化が、ロボットアームによって制御されるマイクロピペットユニットを用いて行われる、請求項21に記載のマルチウェルマイクロインジェクションシステム。

【請求項24】

マイクロピペットインジェクションシステムが、胚を可変角度および/または高さで注入するために、回転可能に位置決めされるように構成され、配列されている、請求項21に記載のマルチウェルマイクロインジェクションシステム。

【請求項25】

ロボットアームの位置および/または角度が、手動で、またはソフトウェアコントロールインターフェースにより調節可能である、請求項21に記載のマルチウェルマイクロインジェクションシステム。

【請求項26】

a . 受精後24から72時間のゼブラフィッシュ胚に1またはそれ以上の腫瘍細胞をマイクロインジェクションし、

b . 腫瘍細胞を、所定の時間、ゼブラフィッシュ胚内で増殖させ、

c . 薬物とゼブラフィッシュ胚をインキュベートするか、または薬物をゼブラフィッシュ胚にマイクロインジェクションし、そして

d . 一定時間後、該胚における腫瘍細胞の量を測定することにより腫瘍細胞に対する薬物の効果をモニターすること

を含む、腫瘍細胞に対する効果について薬物を試験するための方法。

【請求項27】

腫瘍細胞が、血中循環腫瘍細胞である、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

腫瘍細胞のマイクロインジェクション前、マイクロインジェクション中またはマイクロインジェクション後のゼブラフィッシュ胚を含む水中に血管新生促進因子を添加することをさらに含む、請求項26に記載の方法。

【請求項29】

血管新生促進因子が増殖因子アンジオポエチンである、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

血管新生促進因子が胚にマイクロインジェクションされる、請求項28に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2013/060580
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C12Q 1/68</i> (2006.01), <i>C12M 1/34</i> (2006.01), <i>C12M 3/00</i> (2006.01), <i>C12N 15/06</i> (2006.01), <i>C12N 15/07</i> (2006.01), <i>C12N 5/09</i> (2010.01), <i>C12Q 1/02</i> (2006.01), <i>C12Q 1/06</i> (2006.01), <i>G01N 33/48</i> (2006.01), <i>G01N 33/574</i> (2006.01), <i>G01N 35/00</i> (2006.01)		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01), <i>C12M 1/34</i> (2006.01), <i>C12M 3/00</i> (2006.01), <i>C12N 15/06</i> (2006.01), <i>C12N 15/07</i> (2006.01), <i>C12N 5/09</i> (2010.01), <i>C12Q 1/02</i> (2006.01), <i>C12Q 1/06</i> (2006.01), <i>G01N 33/48</i> (2006.01), <i>G01N 33/574</i> (2006.01), <i>G01N 35/00</i> (2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Canadian Patent, Scopus, Pubmed; Keywords: circulating tumor cells, primary tumor cells, metastatic tumor, zebrafish cancer model, zebrafish cancer model cancer drug screening, multiwell injection system zebrafish		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	KONANTZ, M. et al., Zebrafish xenografts as a tool for in vivo studies on human cancer, New York Academy of Sciences, August 2012, Volume 1266, pages 124-137, ISSN: 1749-6632 (Electronic)	1 and 3-34 2
Y	POWELL, A. A. et al., Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines, PLOS One, May 2012, Volume 7, Issue 5, pages 1-11, ISSN: 1932-6203 (Electronic)	2
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
*	Special categories of cited documents:	"T"
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y"
"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	
Date of the actual completion of the international search 21 March 2014 (21-03-2014)		Date of mailing of the international search report 31 March 2014 (31-03-2014)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer Damiano Conte (819) 934-7931

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/060580**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
The claims are directed to a plurality of inventive concepts as follows:

Continued on Extra Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/IB2013/060580

Continued from Box No. III

The claims are directed to a plurality of inventive concepts as follows:

Group A - Claims 1 and 3 (wholly) and 2 (partially) are directed to a method to establish tumors from primary tumor cells obtained from biopsies or surgically removed tumors with the use of zebrafish;

Group B - Claim 2 (partially) is directed to a method to establish tumors from circulating tumor cells (CTC) with the use of zebrafish; Group C - Claim 4 (wholly) are directed to a method to predict the likelihood of a primary tumor to invade or metastasize, with the use of zebrafish;

Group D - Claim 5 (wholly) is directed to a method to identify cancer patients with a higher probability of disease relapse, with the use of zebrafish;

Group E - Claims 6 and 7 (wholly) are directed to a method to quantitate cancer cell invasion and the use of said method for drug discovery, with the use of zebrafish;

Group F - Claim 8 (wholly) is directed to a method to predict the preferred organ for homing of the tumor cells, with the use of zebrafish;

Group G - Claim 9 (wholly) are directed to a method of monitoring changes in the zebrafish immune system during tumor invasion, metastasis or organ homing processes, with the use of zebrafish;

Group H - Claim 10 (wholly) is directed to a method for measuring the number of surviving tumor cells after incubation with or without synthesized or naturally occurring chemicals or biologicals, with the use of zebrafish;

Group I - Claim 11 (wholly) is directed to a method to predict drug efficacy against tumor cells;

Group J - Claim 12 (wholly) is directed to a method to predict a drug effect on the organ homing preference of cancer cells;

Group K - Claim 13 (wholly) is directed to a method to predict the likelihood of a primary tumor to invade or metastasize, with the use of zebrafish;

Group L - Claim 14 (wholly) is directed to a method to identify cancer patients with a higher probability of disease relapse, with the use of zebrafish;

Group M - Claim 15 (wholly) is directed to a method to quantitate cancer cell invasion and the use of said method for drug discovery, with the use of zebrafish;

Group N - Claims 16-28 (wholly) are directed to a method to predict the preferred organ for homing of the tumor cells, with the use of zebrafish;

Group O - Claims 29 and 30 (wholly) are directed to a method of monitoring changes in the zebrafish immune system during tumor invasion, metastasis or organ homing processes, with the use of zebrafish;

Group P - Claims 31-34 (wholly) are directed to a method for measuring the number of surviving tumor cells after incubation with or without synthesized or naturally occurring chemicals or biologicals, with the use of zebrafish;

The claims must be limited to one inventive concept as set out in Rule 13 of the PCT. Since the use of xenoplatation of human cancer cells (derived from tumors) into zebrafish embryos and adult fish for the monitoring of tumor-induced angiogenesis, invasiveness, and response to a range of treatments in vivo and in real time and the use of this system, (a live animal model system) for evaluating individual patient drug responses in a clinically relevant setting and all monitored with the use of automated systems, was previously known, see D1, there is no common inventive concept among claims of Groups A through to P.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/48	(2006.01)	G 0 1 N	33/48	M
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/48	P
		G 0 1 N	33/53	D
		G 0 1 N	33/53	M
		G 0 1 N	33/53	Y

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, LT, 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 インドラジット・シンハ

カナダ、エヌ９イー・４ブイ３、オンタリオ、ウィンザー、ホルバーン・ストリート３６３７番

Fターム(参考) 2G045 AA26 CB02 DA13 DA14 DA36 FB03
 4B029 AA09 BB11 CC01 CC02 DG08 DG10 GB06 HA07
 4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32
 QR35 QR48 QR55 QR62 QR72 QR77 QS14 QS24 QS25 QS28
 QS32 QS36 QX01 QX02
 4B065 AA90X AA99X AC20 BB19 BC50 BD25 BD39 CA46

专利名称(译)	早期预测对癌症进展和治疗的反应		
公开(公告)号	JP2016501021A	公开(公告)日	2016-01-18
申请号	JP2015544609	申请日	2013-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	生物学公司的核心 BIOMEDCORE		
申请(专利权)人(译)	Baiomedokoa公司		
[标]发明人	インドラジットシンハ		
发明人	インドラジット・シンハ		
IPC分类号	C12N5/09 C12Q1/06 C12Q1/02 C12Q1/68 C12M1/00 G01N33/48 G01N33/53 A01K67/027		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/154 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N33/5011 G01N33/5088 G01N2333/43526 G01N2800/7028 C12N5/0693 C12N15/02		
FI分类号	C12N5/00.202.U C12Q1/06 C12Q1/02 C12Q1/68.A C12M1/00.A G01N33/48.M G01N33/48.P G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB02 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB03 4B029/AA09 4B029/BB11 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/DG08 4B029/DG10 4B029/GB06 4B029/HA07 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS14 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS32 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA90X 4B065/AA99X 4B065/AC20 4B065/BB19 4B065/BC50 4B065/BD25 4B065/BD39 4B065/CA46		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	61/732375 2012-12-02 US		
其他公开文献	JP6430392B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译) 本发明提供了一种用于快速筛选肿瘤细胞的侵袭和转移特性，异质性及其对治疗剂的反应的方法，以及用于自动图像采集和显微注射斑马鱼胚胎的多孔显微注射系统。要做。	(21) 出願番号	特願2015-544609 (P2015-544609)	(71) 出願人	515147944
	(86) (22) 出願日	平成25年12月2日 (2013.12.2)		バイオメドコア・インコーポレイテッド BIOMEDCORE INC. カナダ、エヌ9エイ・6ジエイ3、オンタ リオ、テカムセ、ロッシ・ドライブ158 0番
	(85) 翻訳文提出日	平成27年7月27日 (2015.7.27)	(74) 代理人	100081422
	(86) 国際出願番号	PCT/182013/060580		弁理士 田中 光雄
	(87) 国際公開番号	W02014/083555	(74) 代理人	100084146
	(87) 国際公開日	平成26年6月5日 (2014.6.5)		弁理士 山崎 宏
	(31) 優先権主張番号	61/732,375	(74) 代理人	100122301
	(32) 優先日	平成24年12月2日 (2012.12.2)		弁理士 富田 憲史
	(33) 優先権主張国	米国 (US)		