

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4170766号
(P4170766)

(45) 発行日 平成20年10月22日(2008.10.22)

(24) 登録日 平成20年8月15日(2008.8.15)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
A O 1 K	67/027	(2006.01)	A O 1 K 67/027
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 B
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53 M
G O 1 N	33/566	(2006.01)	G O 1 N 33/566

請求項の数 7 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-578422 (P2002-578422)	(73) 特許権者	500204740
(86) (22) 出願日	平成14年3月28日(2002.3.28)		ダナーファーバー キャンサー イン스티 チュート インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2004-535786 (P2004-535786A)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州021 15, ポストン, ビニー・ストリート 4 4
(43) 公表日	平成16年12月2日(2004.12.2)	(74) 代理人	100078282
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/009710		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開番号	W02002/079419	(74) 代理人	100062409
(87) 国際公開日	平成14年10月10日(2002.10.10)		弁理士 安村 高明
審査請求日	平成17年3月25日(2005.3.25)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	60/279,506		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成13年3月28日(2001.3.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子の同定および特徴付け

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

活性化または不活性化が、腫瘍形成性について、細胞の誘導性癌遺伝子への依存性をバイパスする遺伝子を同定する方法であって、

(a) 生体外で腫瘍細胞を提供する工程であって、該腫瘍細胞はマウスの腫瘍細胞であり、該細胞は誘導性テトラサイクリンプロモーターに作動可能に連結された該癌遺伝子を含み、該癌遺伝子は、発現がスイッチオンされたときに腫瘍形成性を与える、工程；

(b) 該癌遺伝子をスイッチオフする工程であって、それによって該細胞を腫瘍形成性から1変異離れたものにする、工程；

(c) 該細胞に、該細胞のゲノムに組み込まれるレトロウイルスベクターを導入する工程；

(d) 該細胞を、免疫無防備マウスの注射部位に導入し、そして該注射部位における腫瘍の形成について該マウスをモニターする工程；および

(e) 該レトロウイルスベクターの導入の結果、該腫瘍における発現の増加または発現の減少を示す遺伝子を、その活性化または不活性化が腫瘍形成性について細胞の該癌遺伝子への依存性をバイパスする遺伝子として同定する工程、

を包含する、方法。

【請求項2】

前記癌遺伝子が、活性型 r a s 遺伝子である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

10

20

工程 (a) における前記細胞は、内因性の腫瘍抑制遺伝子について、ホモ接合性でヌルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記腫瘍サプレッサー遺伝子が、INK4a / Arf 遺伝子である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記レトロウイルスベクターは、モロニー Maus 白血病ウイルスである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

工程 (a) における前記細胞がメラノサイトである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記工程 (a) の細胞が、以下：

(a) 組織特異的プロモーターもしくは細胞特異的プロモーターに作動可能に連結された逆テトラサイクリントランスアクチベーターをコードする遺伝子を含む、第 1 の発現構築物；および

(b) 該逆テトラサイクリントランスアクチベーターおよびテトラサイクリンまたはテトラサイクリンアナログによって調節されるプロモーターに作動可能に連結された前記遺伝子を含む、第 2 の発現構築物、

を含み、該第 1 の発現構築物および第 2 の発現構築物は、該細胞のゲノムに安定に組み込まれている、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(技術分野)

本発明は、癌発生、癌の進行、癌維持、転移および細胞生存のような表現型に関する遺伝子を同定するための方法および物質に関する。

【背景技術】

【0002】

(背景)

30

我々の社会に対する癌の影響を控えめに述べることはできない。さらに、化合物の問題に対し、いくつかの癌の発生率は、増加している。例えば、癌型として黒色腫の発生率は、女性の肺癌に次ぐ速度で増加している (R i g e l ら、J . A m . A c a d . D e r m . 3 5 : 1 0 1 2 , 1 9 9 6 を参照のこと)。この発症は、ほとんどの固形腫瘍型と対照的に、黒色腫は、非常に若い集団に影響し、疾患の過程の初期に転移し、そして現在の治療レジメンに対応できないという事実によって、悪化される (H e r l y n , M o l e c u l a r a n d C e l l u l a r B i o l o g y f o r M e l a n o m a , A u s t i n , R . G . L a n d e s , 1 9 9 3 を参照のこと)。

【0003】

癌の理解に向けた臨床努力および研究努力の長い歴史にも関わらず、驚いたことに、遺伝性病変の発生、進行、および臨床的性質の原因であるその遺伝性障害についてはほとんど知られていない。例えば、黒色腫の場合、多くの遺伝子が、この疾患の発生に関与しているが、INK4a 遺伝子およびRAS 遺伝子のみが、形式的遺伝的意味 (g e n e t i c s e n s e) において、真の病因学的病変であることが示されている (C h i n ら、G e n e s D e v e l . 1 1 : 2 8 2 2 , 1 9 9 7)。さらに、臨床医が直面し得る、最も恐ろしい状態中である進行型悪性腫瘍は、多くの癌遺伝子経路および腫瘍サプレッサー遺伝子経路に影響する多くの一連の遺伝性障害の表現型指標 (p h e n o t y p i c e n d p o i n t) を示す。従って、このような状態に導く病変は、その状態を維持するために必要とされる病変とは異なるかもしれない。これらの変異は、癌の処置における理に適った治療標的に相当する。

40

50

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0004】

(要旨)

第1の局面において、本発明は、癌（例えば、皮膚癌（例えば、黒色腫）、肺癌、前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、肝癌、膵癌、脳腫瘍、精巣癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、腎癌、甲状腺癌、膀胱癌、食道癌、血液の癌（例えば、白血病）、またはリンパ腺癌）- 関連遺伝子を同定する方法を提供する。これらの方法は、以下の工程を包含する：(a) 癌遺伝子の発現が誘導されない条件下で、腫瘍形成性 (tumorigenicity) が誘導性癌遺伝子の発現に依存する細胞を維持する工程；(b) 細胞のゲノム内に取り込まれる核酸分子を細胞中に導入し、これによって、組み込まれる遺伝子座に付加する工程；(c) 腫瘍形成性がその核酸分子の組み込みによって誘導された細胞を同定する工程；および (d) 組み込まれた核酸分子によって付加された遺伝子を、癌関連遺伝子として同定する工程。

10

【0005】

これらの方法において使用される細胞（例えば、上皮細胞、内皮細胞、またはメラノサイトのような皮膚細胞）は、これらの細胞に、腫瘍形成性に対する感受性を与える変異を含み得る。例えば、メラノサイトの場合、この細胞は、INK4a / ARF 遺伝子における変異を含み得る（例えば、その細胞は、INK4a / ARF 遺伝子変異についてヘテロ接合性であるか、またはホモ接合性であり得る）。このINK4a / ARF 遺伝子は、2つのポリペプチド (p16^{INK4a} および p19^{ARF}) をコードする。このINK4a / ARF 遺伝子における変異は、p16^{INK4a}、p19^{ARF}、または p16^{INK4a} および p19^{ARF} の両方の発現を中断させ得る。さらに、この細胞は、他の変異を含み得る（例えば、PTEN 遺伝子における変異（例えば、その細胞は、PTEN⁺ / - または PTEN⁻ / - であり得る）または Rb 遺伝子における変異（例えば、その細胞は、Rb⁺ / - または Rb⁻ / - であり得る））。さらに、この細胞は、変異の任意の組み合わせを含み得る（例えば、この細胞には、p16^{INK4a}、p19^{ARF}、および Rb が存在し得ない）。これらの方法における癌遺伝子は、任意の優性癌遺伝子（例えば、活性化 ras）であり得る。あるいは、腫瘍抑制遺伝子が使用され得る。組み込まれる核酸分子は、（例えば、モロニー (Moloney) レトロウイルス (MuLV)）を含み得る。

20

30

【0006】

これらの方法における核酸分子の組み込みによる腫瘍形成性の誘導は、例えば、非ヒト哺乳動物（例えば、マウス）に組み込まれた核酸分子を含む細胞を注入し、そして腫瘍発生についてその哺乳動物をモニターすることによって、決定され得る。あるいは、軟寒天アッセイまたは本明細書中に記載される任意の他のアッセイのいずれかが使用され得る。

【0007】

本発明の方法において使用される細胞は、任意の誘導性遺伝子系を含み得る。例えば、この誘導性遺伝子系としては、(a) 組織特異的プロモーター（例えば、黒色腫の場合、チロシナーゼプロモーター）に作動可能に連結されるテトラサイクリントランス活性化因子（これからは、標準テトラサイクリンOFFバージョンおよび逆性テトラサイクリン-ONバージョンの両方を示す）をコードする遺伝子を含む、第1の発現構築物、および (b) テトラサイクリントランス活性化因子およびテトラサイクリン（または、ドキシサイクリンのようなテトラサイクリンアナログ）によって調節されるプロモーターに作動可能に連結される癌遺伝子を含む第2の発現構築物が挙げられ得る。テトラサイクリンアナログは、本明細書中に記載されるテトラサイクリン調節系において使用されるテトラサイクリンと類似の様式で機能する化合物である。この第1の発現構築物および第2の発現構築物は、細胞のゲノム中に安定に組み込まれ得る。あるいは、この第1の発現構築物および第2の発現構築物は、ゲノム中に安定に組み込まれる単一の発現構築物中に含まれ得る。

40

【0008】

50

別の局面において、本発明は、腫瘍形成性に対する候補の癌関連遺伝子の効果を試験するための方法を提供する。この方法は、例えば、本明細書中に記載されるテトラサイクリンに基づく系であり得る誘導発現系を使用する。この方法は、以下の工程を包含する：

(a) (i) 第 1 の発現構築物および (i i) 第 2 の発現構築物がゲノム中に安定に組み込まれた細胞を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物（例えば、マウス）を作製する工程：ここで、(i) この第 1 の発現構築物が、以下のプロモーターに作動可能に連結される、逆テトラサイクリントランス活性化因子をコードする遺伝子を含む、第 1 の発現構築物：例えば、任意の組織特異的プロモーターまたは細胞型特異的プロモーター（例えば、黒色腫の場合、チロシナーゼプロモーター；メラノサイトの場合、TRP2プロモーター；乳房細胞および/または癌の場合、MMTVプロモーターまたはWAPプロモーター；腸管細胞および/または癌の場合、VillinプロモーターまたはFABPプロモーター；膵臓細胞の場合、RIPプロモーター；ケラチノサイトの場合、ケラチンプロモーター；前立腺上皮の場合、プロバシン(Probasin)プロモーター；CNS細胞および/または癌の場合、ネスチンプロモーターまたはGFAPプロモーター；ニューロンの場合、チロシンヒドロキシラーゼプロモーターまたはS100プロモーター；および心臓細胞の場合、ミオシンプロモーター)または任意の一般的なプロモーター（例えば、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター)、および (i i) この第 2 の発現構築物が、逆テトラサイクリントランス活性化因子およびテトラサイクリン（またはテトラサイクリンアナログ（例えば、ドキシサイクリン））によって制御されるプロモーターに作動可能に連結される候補の癌関連遺伝子を含む、第 2 の発現構築物、ならびに

(b) テトラサイクリン（または、そのアナログ）の存在または非存在下で、テトラサイクリン（または、そのアナログ）の存在または非存在に影響を受ける腫瘍の発達、維持、または進行について観察する工程。

【 0 0 0 9 】

このような試験はまた、誘導性癌遺伝子を含むように操作され、そして癌遺伝子、腫瘍サプレッサ遺伝子、および/またはテロメラーゼの適切な組み合わせの存在によって腫瘍形成性を与えられた細胞（例えば、ヒト細胞）において、実施され得る。これらの方法において使用される候補の癌関連遺伝子は、本明細書中に記載される方法を用いて同定される癌関連遺伝子であり得る。また、この方法および本発明の他の方法は、上記の癌遺伝子系の代わりに、任意の誘導性癌遺伝子系（例えば、メタロチオネイン(metallothionein)プロモーターまたはエストロゲンレセプター融合に基づく)を使用し得る。

【 0 0 1 0 】

さらなる局面において、本発明は、以下を含む細胞を提供する：(a) 組織特異的プロモーターまたは細胞型特異的プロモーターに作動可能に連結される逆テトラサイクリントランス活性化因子をコードしている遺伝子を含む、第 1 の発現構築物、(b) 逆テトラサイクリントランス活性化因子およびテトラサイクリン（または、ドキシサイクリンのようなテトラサイクリンアナログ）によって調節されるプロモーターに作動可能に連結される癌遺伝子を含む、第 2 の発現構築物、および (c) レトロウイルスベクター。この第 1 および第 2 の発現構築物ならびにレトロウイルスベクターは、細胞のゲノム中に安定に組み込まれる。

【 0 0 1 1 】

別の局面において、本発明は、その細胞のゲノム中に安定に組み込まれた以下を有する、トランスジェニックな、非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、またはウサギ）を提供する：(a) 組織特異的プロモーター、細胞型特異的プロモーターまたは一般的プロモーターに作動可能に連結される逆テトラサイクリントランス活性化因子をコードしている遺伝子を含む、第 1 の発現構築物、(b) 逆テトラサイクリントランス活性化因子およびテトラサイクリン（または、ドキシサイクリンのようなテトラサイクリンアナログ）によって調節されるプロモーターに作動可能に連結される、候補の癌関連遺伝子を含む第 2 の発現構築物。この方法で使用される候補の癌関連遺伝子は、本明細書中に記載される方

10

20

30

40

50

法を用いて同定される癌関連遺伝子であり得る。

【0012】

なおさらなる局面において、本発明は、癌（例えば、皮膚癌（例えば、黒色腫）、肺癌、前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、肝癌、膵癌、脳腫瘍、精巣癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、腎癌、甲状腺癌、膀胱癌、食道癌、血液の癌（例えば、白血病）、またはリンパ腺癌）を予防または処置することにおける候補化合物の効力を決定する方法を提供する。この方法は、本明細書中に記載されるトランスジェニック非ヒト哺乳動物に、候補化合物を投与する工程、および哺乳動物における腫瘍の発生、維持、または進行に対する化合物の効果を観察する工程を包含する。

【0013】

本発明は、いくつかの利点を提供する。例えば、癌モデルおよび本発明の遺伝子経路分析の方法は、疾患の特定の段階、特定の経路において機能する腫瘍遺伝子（例えば、インビボでの腫瘍の発生、維持、進行、および/または転移に必要とされる遺伝子）の同定および確認を可能にする。これは、非常に重要である。なぜなら、進行型の悪性腫瘍は、多くの癌遺伝子経路および腫瘍抑制遺伝子経路に影響する多くの一連の遺伝性障害の表現型指標を示し、そしてこのような状態に導く病変は、その状態を維持するために必要とされる病変とは異なるかもしれないからである。従って、例えば、初期腫瘍発生ではなく、腫瘍維持に関連する遺伝子および経路に焦点を合わせるアプローチは、より良い抗癌治療および進行型疾患についての診断の開発につながり得る。あるいは、癌のイニシエーションに関与すると同定される遺伝子は、疾患の予防または初期制御に関する治療および診断の発見において使用され得る。

【0014】

別の局面において、本発明は、癌関連遺伝子を同定する方法を特徴とする。この方法は、以下の工程を包含する：（a）腫瘍形成性が、癌遺伝子の発現に依存する細胞を提供する工程；（b）細胞が癌遺伝子を発現しない条件下で細胞を維持する工程であって、この癌遺伝子が発現される場合、その細胞が腫瘍形成性である、工程；（c）細胞のゲノム中に組み込まれる核酸分子を細胞に導入し、これによって核酸分子が組み込まれる遺伝子座に付加する工程；（d）核酸分子の組み込みによって腫瘍形成性が誘導されている細胞を同定する工程；および（e）組み込まれた核酸分子によって（d）の細胞中に付加された遺伝子を、癌関連遺伝子として同定する工程。（a）の細胞は、INK4a / Arf 遺伝子中に変異を含み得る。この癌遺伝子は、rasであり得る。この組み込まれた核酸分子は、レトロウイルスベクター配列を含み得る。この細胞は、メラノサイトであり得る。工程（d）は、工程（c）で作製された細胞を非ヒト哺乳動物中に導入する工程、および腫瘍発生について、その哺乳動物をモニターする工程を含み得る。工程（d）は、腫瘍形成性の軟寒天アッセイを含み得る。（a）の細胞は、以下：（a）組織特異的プロモーターまたは細胞型特異的プロモーターあるいは一般的プロモーターに作動可能に連結される逆テトラサイクリントランス活性化因子をコードしている遺伝子を含む、第1の発現構築物；および（b）逆テトラサイクリントランス活性化因子およびテトラサイクリンまたはテトラサイクリンアナログによって調節されるプロモーターに作動可能に連結される癌遺伝子を含む、第2の発現構築物を含み得；ここでこの第1および第2の発現構築物は、細胞のゲノム中に安定に組み込まれる。

【0015】

別の局面において、本発明は、癌関連遺伝子を同定する方法を特徴とする。この方法は、以下の工程を包含する：（a）細胞を提供する工程であって、ここでこの細胞は、以下によって獲得され得る：（i）腫瘍細胞の腫瘍形成性に必要とされる少なくとも1つの癌遺伝子が発現されないように、腫瘍細胞のゲノムを変化させる工程か、または（ii）腫瘍細胞の腫瘍形成性を防げる少なくとも1つの腫瘍抑制遺伝子が発現されるように、腫瘍細胞のゲノムを変化させる工程；（b）細胞のゲノム中に組み込まれる核酸分子を、この細胞内に導入し、これによって、核酸分子が組み込まれる遺伝子座に付加する工程；（c）腫瘍形成性が核酸分子の組み込みによって誘導されている細胞を同定す

10

20

30

40

50

る工程；および（d）組み込まれた核酸分子によって（c）の細胞中に付加された遺伝子を、癌関連遺伝子として同定する工程。この腫瘍細胞は、ヒト腫瘍細胞であり得る。この少なくとも1つの癌遺伝子は、*ras*であり得る。この少なくとも1つの腫瘍抑制遺伝子は、*INK4a/Arf* 遺伝子であり得る。この核酸分子は、レトロウイルスベクター配列であり得る。工程（c）は、工程（b）で作製された細胞を非ヒト哺乳動物中に導入する工程、および腫瘍発生について、その哺乳動物をモニターする工程を含み得る。工程（c）は、腫瘍形成性の軟寒天アッセイを含み得る。

【0016】

本発明の別の局面は、特定の表現型に関連する遺伝子を同定する方法を特徴とする。この方法は、以下の工程を包含する：（a）特定の表現型が遺伝子の発現に依存する細胞を提供する工程、（b）細胞が癌遺伝子を発現しない条件下で細胞を維持する工程であって、その遺伝子が発現される場合、その細胞が特定の表現型を示す、工程；（c）細胞のゲノム中に組み込まれる核酸分子を（b）の細胞内に導入し、これによって核酸分子が組み込まれる遺伝子座に付加する工程；（d）核酸分子の組み込みによって特定の表現型が誘導されている細胞を同定する工程；および（d）組み込まれた核酸分子によって（d）の細胞中に付加された遺伝子を、特定の表現型に関連する遺伝子として同定する工程。この特定の表現型は、腫瘍形成性、転移する能力、または細胞生存性（*survivability*）であり得る。この核酸分子は、レトロウイルスベクター配列を含み得る。

10

【0017】

本発明の別の局面は、所定の表現型と関連する遺伝子を同定する方法を特徴とする。本方法は、以下の工程を包含する：（a）細胞を提供する工程、ここで細胞は以下の工程によって得られ：（i）所定の表現型のために必要な少なくとも1つの遺伝子が細胞中で発現されないように、所定の表現型を示す細胞のゲノムを改変する工程、または（ii）表現型を防ぐ少なくとも1つの抑制遺伝子が細胞中で発現されるように所定の表現型を示す細胞のゲノムを改変する工程；（b）細胞のゲノム中に組み込まれる核酸分子を細胞中に導入し、これによって核酸分子が組み込まれる遺伝子座をタグ化する工程；（c）表現型が核酸分子の組込みによって誘導されている細胞を同定する工程；および（d）組み込まれた核酸分子によって、（c）の細胞中のタグ化されている遺伝子を、所定の表現型に関連する遺伝子として同定する工程。所定の表現型が、腫瘍形成性、転移する能力、または細胞生存性であり得る。核酸分子は、レトロウイルスベクター配列を含み得る。

20

30

【0018】

本発明の別の局面は、癌関連遺伝子を同定する方法を特徴とする。この方法は、以下の工程を包含する：（a）細胞の転移が遺伝子の発現に依存する細胞を提供する工程、（b）細胞が遺伝子を発現しない条件下で細胞を維持する工程であって、ここで遺伝子が発現される場合、細胞が哺乳動物内で転移する、工程；（c）細胞のゲノム中に組み込む核酸分子を細胞中に導入し、これによって、核酸分子が組み込む遺伝子座をタグ化する工程；（d）転移する能力が核酸分子の組込みによって誘導される細胞を同定する工程；および（e）組み込まれた核酸分子によって、（d）の細胞中でタグ化されている遺伝子を、癌関連遺伝子として同定する工程。

【0019】

本発明の別の局面は、癌関連遺伝子を同定する方法を特徴とする。この方法は以下の工程を包含する：（a）以下の工程によって得られる細胞を提供する工程：（i）転移する能力に必要な少なくとも1つの遺伝子が発現されないように、転移する能力を示す細胞のゲノムを改変する工程、または（ii）転移する能力を防ぐ少なくとも1つの抑制遺伝子が細胞で発現されないように、転移する能力を示す細胞のゲノムを改変する工程；（b）細胞のゲノムに組み込む核酸分子を細胞中に導入し、これによって核酸分子が組み込まれる遺伝子座をタグ化する工程；（c）転移する能力が核酸分子の組込みによって誘導されている細胞を同定する工程；および（d）組み込まれた核酸分子によって、（c）の細胞中のタグ化されている遺伝子を、癌関連遺伝子として同定する工程。

40

【0020】

50

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明、図面および特許請求の範囲から明らかである。

【0021】

(詳細な説明)

本発明は、腫瘍の発達、維持、進行および/または転移に關与する遺伝子を同定および特徴付けるために、インビボおよびインビトロでのモデル系を使用する方法を提供する。本発明の方法は、細胞を腫瘍形成性にするために遺伝子の活性化(または不活性化)を必要とする細胞の使用の周囲に焦点をあてられている。本明細書中でさらに考察されるように、これらの細胞は腫瘍形成性から「ワンヒット(one hit)」(すなわち、1つの変異)離れるように操作され得る。核酸分子(例えば、レトロウイルスベクター)は、

10

【0022】

細胞は、例えば動物(例えば、ヌードマウス)に移植すること、および腫瘍形成について動物をモニタリングすることによって、腫瘍形成性について分析され得る。移植された細胞が腫瘍を生じる場合、挿入に起因して活性化(または不活性化)されている任意の遺伝子を同定するために細胞のゲノム中の挿入部位が特徴付けられる(例えば、配列分析によって)。この様式で同定される遺伝子は、腫瘍発達、維持、進行および/または転移への關与についての候補であり、そして本明細書中に記載されるように動物モデル系においてさらに評価され得る。

20

【0023】

本発明の方法はまた、癌遺伝子発見のための系として癌の誘導性動物モデルを用いる。優性に作用する癌遺伝子の発現を制御する調節スイッチを保持する癌易発性動物の構築は、例えばインビボモデルを提供し、ここで完全に形成された腫瘍における癌遺伝子の連続した発現が、腫瘍形成性および腫瘍生存性を維持するために必要とされることを実証し得る。さらに、このようなモデルは、腫瘍形成性および腫瘍の維持のためのこのような癌遺伝子の発現を同様に必要とするインビトロ癌細胞株モデル系の確立を容易にする。従って、このような癌遺伝子が発現されない(すなわち、調節スイッチがオフである)場合、これらの細胞株は、完全に形質転換された状態または悪性の状態について、1つを除いて全ての必要な変更を持続しているゲノムを有する細胞のクローン性集団を表す。完全に形質

30

【0024】

インビボでの腫瘍発達、維持、進行および/または転移において役割を果たす任意の優性に作用する癌遺伝子が、本発明において使用され得る。例えば、EGFR、BDNF、HER2/Neu、erb-B2、TGF、RhoC、VEGF-C、KRAS、HRASおよびAKTのような癌遺伝子、ならびにそれらの活性化形態が使用され得る。特定の実施例および本明細書中にさらに記載されるように、RAS癌遺伝子は、本発明の方法において使用され得る。既知の経路または新規の経路に従って優性に作用する癌遺伝子の

40

50

発現を制御する調節スイッチを有する、腫瘍易発性変異マウス由来の腫瘍細胞株を生成し、インビボまたはインビトロのいずれかで所望の表現型を与える機能損傷の獲得または喪失について選択し（例えば、外植片モデル中での増強された腫瘍形成性、宿主中での腫瘍の維持、インビトロでの運動性/脈管形成能力、またはインビボでの腫瘍侵襲もしくは腫瘍転移）、次いでMaSSによってこれらの経路において機能する特定の候補を同定し得る。次いで、これらの候補は、インビトロで試験され得、そして治療的標的としてインビボの同じモデルにおいて確認され得る。

【0025】

本明細書中で提供される方法および材料は、ヒト細胞由来の癌関連遺伝子を同定するために使用され得る。例えば、2つの癌遺伝子（シミアンウイルス40ラージT腫瘍タンパク質およびスモールT対立遺伝子、ならびにH-rasの腫瘍形成）と組み合わせたテロメラーゼ触媒サブユニット（hTERT）の異所的発現は、正常なヒト上皮細胞および正常なヒト繊維芽細胞の直接的な腫瘍形成性転換を導き得る（Hahnら、Nature、400（6743）：464～8、1999）。従って、ヒト腫瘍細胞は、H-RASが誘導性ベクター（例えば、tet-調節された）下で発現されることを除いて、この組み合わせを導入することによって作製され得る。一旦腫瘍形成性転換が生じると、RAS発現は、スイッチオフされ得る。RASをスイッチオフすることは、ヒト腫瘍細胞を腫瘍形成性にし得ず、故に腫瘍形成性から「ワンヒット」離れたヒト細胞を作製する。このような細胞を用いて、MaSSスクリーニングが、RASと等価な遺伝子を同定するために実行され得る。

【0026】

さらに、完全に確立された腫瘍細胞（例えば、マウス腫瘍細胞またはヒト腫瘍細胞）は、優性に作用する癌遺伝子（例えば、RAS）を不活性化するために体細胞的に変更され得、その結果、腫瘍形成性から「ワンヒット」離れた細胞が作製される。例えば、ヒト結腸癌細胞株（例えば、DLD-1およびHCT 116）における活性化Ki-ras遺伝子は、他で記載されるように相同組換えによって破壊され得る（Shirasawara、Science、260（5104）：85～8、1993）。遺伝子発現の体細胞的不活性化は、リボソーム媒介不活性化（Tokunagaら、Br. J. Cancer、83（6）：833～9、2000を参照のこと）およびRNAi（Paddisonら、PNAS、99（3）：1443～1448、2002を参照のこと）のようなほかの標準的な方法を用いて達成され得る。一旦、腫瘍形成性に必要な癌遺伝子遺伝子の発現が減少されると、細胞は、癌関連遺伝子を同定するために、MaSSスクリーニングにて使用され得る。

【0027】

本明細書中で提供される方法および材料は、脈管形成または転移のような癌関連表現型を支配している遺伝子を同定するために使用され得る。例えば、本明細書中で提供される方法および材料は、非転移可能性癌細胞または低転移可能性癌細胞に対して転移可能性を与える遺伝子を同定するために使用され得る。簡潔には、特定の遺伝子の活性化/過剰発現は、種々の腫瘍細胞型の転移可能性を強力に増大し得る。このような優性に作用する遺伝子およびその関連の細胞系のいくつかの例としては、B16黒色腫細胞におけるRhoC過剰発現（Clarkら、Nature、406（6795）：532～5、2000）、ヒト乳癌細胞におけるVEGF-C過剰発現（Skobeら、Nat. Med.、7（2）：192～8、2001）、およびヒト乳癌細胞株におけるTGF 過剰発現（Tobinら、Oncogene、21（1）：108～18、2002）が挙げられるが、これらに限定されない。これらの系において、転移可能性のために必要なこれらの重要な変化との機能的等価性を表す変異事象を同定するために、MaSSスクリーニングが設計され得る。例えば、TGF 依存性転移能を示すように乳癌細胞株が操作され得る。これは、その肺接種（seeding）能がドキシサイクリン投与を介するTGF 発現の誘導に依存する、rtTA細胞およびTet-TGF 細胞を得ることによって、達成され得る。転移能は、試験される細胞を尾静脈に注射し、続いて腫瘍接種の証拠について肺

10

20

30

40

50

組織を試験することによって評価され得る。TGF 依存性転移能を示す細胞を得た後、この細胞は本明細書中に記載されるように遺伝的に操作され得、次いで例えば、細胞をドキシサイクリンの非存在下で免疫欠損動物に移植すること、および微小転移または大きい転移について肺を観察することによって、転移能について評価され得る。ネガティブコントロールは、培養物がドキシサイクリンで処置されない動物に注射される、操作されない培養物であり得る。ポジティブコントロールは、ドキシサイクリンで処置されたマウスへの Tet - TGF 培養物の注射であり得る。次いで、生じた肺転移病巣が収集され、そしてTGF 過剰発現の必要性を抑制する第2の部位を有するTGF 等価遺伝的エレメントが、本明細書中に記載されるように同定され得る。

【0028】

本明細書中で記載される方法および材料はまた、非腫瘍性の経路の分析（例えば、代謝、神経変性、リンパ球の活性化および成熟（例えば、造血幹細胞の発達）、アポトーシス、組織分化、細胞接着、DNA修復、ならびに細胞周期制御に関するそれらの経路）に適用され得る。これらのようなスクリーニングにおいて、細胞は、単一の優性遺伝子エレメントにより支配される、優性な表現型（例えば、細胞生存率、細胞遊走、サイトカイン分泌、CD分子のような特定のマーカーの発現、またはレポーター活性化）を示し得る。例えば、神経幹細胞（NSC）の増殖および生存率を増強させる遺伝子が、同定され得る。

【0029】

簡潔に述べると、NSCは培養物中での、増殖および生存についてEGFに依存する。培養培地からのEGFの除去は、培養の迅速かつ完全な死滅を導く。構成的に活性なEGFレセプター（EGFR）変異体をコードする発現構築物の輸送および発現は、EGFの非存在下では増殖および生存を付与する。従って、NSCは、優性表現型（例えば、増殖および生存）から離れた、「ワンヒット（one-hit）」（例えば、EGFの補充またはEGFR活性化の誘導）である。本明細書中に記載される、MaSSスクリーンの方法および材料を使用して、EGF/EGFRに同等な遺伝子エレメントを同定し得る。例えば、NSC培養を：（1）rtTAおよびtet-EGF、または活性化EGFR対立遺伝子を発現させるため、そして（2）EGF非存在下かつドキシサイクリン存在下において増殖を示すために、操作し得る。これらの培養物は、種々の標準的なアプローチ（プロウイルス挿入の遺伝子変異、遺伝子の抑制エレメント、およびcDNA補完を含むが、これらに限定されない）を介して遺伝子的に操作され得る。これらの培養物は、ドキシサイクリンを除かれ得る。ドキシサイクリンの除去後、EGFまたはEGFRに非依存的な様式で細胞の増殖または生存を付与する、EGF/EGFRに同等な遺伝子エレメント（遺伝子操作により活性化または不活性化される）を獲得した細胞を除いて、全ての細胞は増殖を停止し、そしてアポトーシスを受ける。言い換えると、生存した細胞は、第2の部位がEGF/EGFR経路の活性化の喪失を抑制する、1つ以上の遺伝子的な現象を受ける。このようにして同定された遺伝子の検証および薬理的な操作は、NSCの増殖および生存を増強させ得、従って細胞ベースの生体治療法の可能性を向上させる得るか、またはインビボでのNSCプールの拡大および可動化を増強させ得、次いで、傷害または変性の状態（例えば、大脳血管障害、アルツハイマー病、多発性硬化症など）の環境においてCNSの修復または回復を向上させる。

【0030】

同様に、本明細書中に提供される方法および材料を使用して、ニューロンの分化および生存を誘導する遺伝子を同定し得る。十分に確立された条件の下で、NSCは、EGFの除去および脳由来神経栄養因子（BDNF）への細胞の曝露により、ニューロンへとインビトロで分化するよう誘導され得る。これらのニューロンは、分化および増殖についてBDNFに依存する。従って、本明細書中で提供されるMaSSスクリーンの方法および材料を使用して、BDNFに同等な遺伝子を同定し得る。例えば、トランスジェニック動物を操作して、ニューロンにおいて神経栄養因子またはそのレセプターの誘導性対立遺伝子（例えば、Tetで制御されるBDNF）を発現させ得る。次いで、これらの動物由来のNSCは、ドキシサイクリンがBDNFの発現を開始するので、EGFの除去かつドキシ

10

20

30

40

50

サイクリンの曝露によってニューロンに分化され得る。次いで、これらにより生じたニューロン細胞は、例えば、プロウイルス挿入の遺伝子変異、またはcDNA補完を介して、遺伝子操作され得る。遺伝子操作の後、培養からドキシサイクリンを除去し得る。ドキシサイクリンの除去後、BDNF同等遺伝子を活性化する組み込み現象を受ける細胞のみが生存可能である。次いで、それらの組み込み現象は標準的な分子的技術により、生存している細胞からクローニングされ得る。

【0031】

本明細書中で提供される方法および材料を使用して、膵臓細胞の生存に関与する遺伝子を同定し得る。精製された膵臓細胞の初代培養物、またはマウスTC6-F7細胞株は、培養物中での生存についてNGFシグナル伝達に依存する(Perucciら、*Diabetologia*, 44:1281, 2001)。NGFならびにそのレセプター(gp140(Trk-A)およびp75(NTR))は、細胞において発現されており、ここからNGFが生物学的に活性な形態で産生されてそして分泌される。これらの培養物の、中和モノクローナル抗NGF抗体に対する曝露は、gp140(Trk-A)により媒介される、転写/翻訳に非依存性の様式で細胞のアポトーシスを誘導する。従って、増殖から離れた「ワンヒット」(NGF経路の活性化)である細胞を、MaSSスクリーンにおいて生産して使用して、第2部位がNGF産生の必要を抑制する、NGFに同等な遺伝子エレメントを同定し得る。例えば、マウスTCF-F7細胞株を操作して、rtTAおよびドミナントネガティブなTrk-AもしくはアンチセンスTrk-A(例えば、tet-dn Trk-AもしくはアンチセンスTrk-A)、またはアンチセンスNGF(tet-アンチセンスNGF)の誘導形態を発現させ得、ドキシサイクリンの非存在下(例えば、ドミナントネガティブ形態の活性化をせずに)でのみ生存する細胞の培養を確立する。続いて、そのような細胞を、例えばプロウイルス挿入の遺伝子変異、遺伝子的抑制エレメント、またはcDNA補完を介して、遺伝子操作し得る。このように操作された培養物を、ドキシサイクリンと共にインキュベートして、アポトーシスを誘導するドミナントネガティブな形態を稼動させ得る。NGF非依存性の様式で細胞の生存を付与する遺伝子操作によって活性化または不活性化される、1つ以上の遺伝子エレメントを有する細胞を除いて、全ての細胞はアポトーシスを受ける。言い換えると、このアッセイにおいて生存した細胞は、第2部位の抑制障害(例えば、NGF同等なヒット)を活性化する、1つ以上の組み込み現象を受ける細胞である。これらイベントのいくつかは、Trk-Aレセプター、Trk-Aに結合するリガンド、または抗アポトーシス経路の中心成分の代替シグナル伝達経路を含み得る。次いで、標準的な技術を適用して、このような組み込み現象により活性化または不活性化された遺伝子を同定し得る。

【0032】

細胞においてNGFシグナル伝達を中和することはまた、培養培地中に抗NGF抗体または抗Trk-A抗体を使用して達成され得る。あるいは、中和および誘導性の制御は、内因性のNGF遺伝子またはTrk-A遺伝子をロックアウトすること、およびロックアウトした遺伝子の誘導性対立遺伝子を導入またはロックインすることにより、達成され得る。標準的なロックアウト技術およびロックイン技術を使用し得る。これらの場合、培地へのドキシサイクリンの添加は、NGFループにおいて鍵となる成分の継続的な発現を可能にし得、従ってこれらの培養物の生存を可能とし得る。これらの同定された遺伝子を使用して、例えば移植手順の間に島細胞の生存を増強し得る。

【0033】

本発明の方法および材料は、多くの適用を有する。例えば、この方法は、癌の治療剤(例えば、アンタゴニスト/アゴニスト)を同定するためのスクリーニング方法において使用され得る。これらの方法において、試験化合物の存在下で、癌の誘導性動物モデルにおける腫瘍のサイズの低減/増大の決定を使用して、そのようなアンタゴニスト/アゴニストを同定し得る。同様に、本発明の腫瘍細胞株における、癌遺伝子のmRNA、タンパク質または活性のレベルに対する試験化合物の効果を使用して、その候補をアゴニストまたはアンタゴニストとして同定し得る(以下、ならびに図3Aおよび3Bを参照のこと)。

最後に、この系において誘導性の癌遺伝子を遺伝子的に停止させる効果と、試験化合物の効果と比較する能力により、その化合物に対する臨床的応答の指標となる代理のマーカの同定が可能となる。

【0034】

本発明の方法はまた、癌に關与する候補遺伝子（例えば、推定の表面レセプターまたはリガンドをコードする遺伝子）の機能的バリデーションにおいて使用され得る。具体的には、退行または再増殖を受ける腫瘍における遺伝子発現の詳細な発現プロファイルを使用して、腫瘍の維持に關係する可能性のある、それらの因子を同定し得る。さらに、確立された腫瘍（インビボでの退行/再発の間の）と精製された培養腫瘍細胞+/-誘導体（後者は宿主細胞を含まない）との発現プロファイルの比較を、実施し得る。インビボ発現プロファイル対インビトロ発現プロファイルの差異を使用して、宿主の微小環境により生じる、宿主由来の因子または腫瘍細胞の変化を同定し得る。マウスの発現プロファイリングのために、腫瘍退行の間の総合的なスクリーンおよび細胞株の誘導は、ある範囲の技術を使用して実施され得る。これらの技術としては、（細胞培養における）抑制サブトラクションの使用、ディファレンシャルディスプレイの使用、プロテオーム分析の使用、遺伝子発現の逐次的な分析（SAGE）の使用、ならびに例えば膜上もしくはガラス上でのcDNAおよび/またはオリゴヌクレオチドマイクロアレイ分析の使用が挙げられる。

【0035】

一旦、所望の候補因子を同定すると、発現動態を、RNAインサイチュハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学（MC）を使用して、より詳細に研究し得る。これらのデータは、細胞のコンパートメント（宿主または腫瘍細胞）が発現の供給源である情報を提供する。治療学的な観点から、既に变化した腫瘍のコンパートメントに対して、より多くのこのコンパートメントの静的な性質が提示されれば、宿主由来の因子がより有用であることが判明し得る。最終的に、これらの実験を基に、このインビボシステムを探索して、誘導物の存在下または非存在下での腫瘍形成および維持において、本発明の細胞株に対して、抗体中和の影響を評価すること、および構成的な発現（マウスcDNAまたはヒトcDNA）の影響を決定することが可能である。

【0036】

本発明はまた、腫瘍由来の脈管新生因子の同定のための細胞培養系を提供する。本明細書中に記載される方法を使用して調製された腫瘍細胞の培養への適用、および無血清条件において生存するそれら細胞の能力の適用は、細胞の生存に關係する分泌因子を同定する、細胞ベースの機能的アッセイに有用である。さらに、単純に、プロリファリン（proliferin）のような公知の因子との相同性に基づいて、発現プロファイリングを使用して、脈管新生因子のホモログを同定し得る。

【0037】

本発明はさらに、例として、黒色腫の病因に關与する遺伝子を同定するための方法において、INK4a/ARF欠失の背景（P16^{INK4a}およびP19^{ARF}の両方の欠失；図1参照のこと）で、アクチベーター（チロシナーゼにより駆動される逆性tTA、すなわちtet-ON）およびレポーター（Tet-RAS）の導入遺伝子を有する、テトラサイクリンで制御されるRASトランスジェニックマウスの使用を用いて以下に記載される。P16^{INK4a}およびP19^{ARF}の両方を破壊するINK4a/ARF遺伝子変異についてヘテロ接合性の動物または細胞は、Ink4a/Arf+/-動物、またはInk4a/Arf+/-細胞と称され、一方でP16^{INK4a}およびP19^{ARF}の両方を破壊したINK4a/ARF遺伝子変異についてホモ接合性の動物または細胞は、Ink4a/Arf-/-の動物または細胞と称される。このTyr/Tet-Ras

Ink4a/Arf-/-の系は、単なる例示のために意味されることに注意のこと。例えば、黒色腫に加えて、本発明の方法を使用して、他のあらゆる型の癌細胞のあらゆる段階（例えば、創生、進行、維持または転移）に關与する遺伝子を同定し得る。例えば、とりわけ、肺癌、前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、肝臓癌、膵臓癌、脳癌、精巣癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、腎臓癌、甲状腺癌、膀胱癌、食道癌、血液学的な癌（例えば、白血

10

20

30

40

50

病)およびリンパの癌、ならびに他の皮膚癌に關与する遺伝子を同定し得る。同様に、以下の例は、テトラサイクリンに基づく系を使用して、癌遺伝子発現の誘導を制御する。適切なプロモーターおよび細胞型、ならびに任意の他の多くの誘導系(例えば、メタロチオネインプロモーターまたはエストロゲンレセプターに基づく系)が、本発明において同様に使用され得、そしてこれらは当該分野で周知である。また、以下に記載される実施例は、*r a s*癌遺伝子を使用するが、本発明はまた、本発明の方法を使用して同定された遺伝子の使用、およびこれらの方法における他の全ての癌遺伝子(または癌抑制遺伝子)の使用を包含する。

【0038】

(黒色腫のマウスモデルの構築)

ヒトにおいて、*I N K 4 A / A R F*変異と黒色腫の素因との明確な関係にもかかわらず、*I n k 4 a / A r f*欠失マウス(*P 1 6^{I N K 4 a}*および*P 1 9^{A R F}*の欠失;*I n k 4 a / A r f - / -*マウス)は黒色種を発達することが出来ない。げっ歯類は黒色腫の発達に抵抗性であることは周知である。この抵抗性は、メラノサイトの微小環境において種特異的な差異と部分的に關係する可能性がある。ヒトにおいて、大部分の黒色腫は放射状の増殖期におけるインサイチュでの損傷として上皮の微小環境中に発生する。垂直方向の増殖期への進行(すなわち、真皮内への下方の侵食)は、より「支援的」でない真皮内部(*d e r m a l m i l e u*)において生存の優位さを付与し得るさらなる遺伝子的な変更を必要とすると考えられる。この観点は、上皮黒色腫細胞が、真皮の微小環境中へと移植される場合、容易には生存および増殖しないという観察から支持される(*N e s b i t t e r, O n c o g e n e 1 8 : 6 4 6 9, 1 9 9 9*)。成体のマウスのメラノサイトは真皮中に存在するので、複数の生存前/増殖刺激シグナルが、マウスにおいて重要な形質転換の閾値に達するために必要とされる。本発明者らは、*I n k 4 a / A r f - / -*メラノサイトにおいて、さらなる癌遺伝子の刺激を供給することにより、この高い閾値を克服した。本発明者らが最初に使用した癌遺伝子の刺激は、活性化*R A S (H - R A S^{V 1 2 G})*であった。

【0039】

*H - R A S^{V 1 2 G}*を、メラノサイトにおいてチロシナーゼプロモーターおよび上流のエンハンサーエレメントを用いて発現させた(*G a n s s e r, E m b o J . 1 3 : 3 0 8 3, 1 9 9 4*)。*I n k 4 a / A r f + / +*の背景に対して、自発的な皮膚の黒色腫は、非常に低い発生率かつ長い潜伏を有して発生した(*C h i n r a, 前出*)。意味深いことに、これらの稀な黒色腫は、両方の*I n k 4 a / A r f*対立遺伝子の自発的な欠失を示した。同様に、*I n k 4 a / A r f*ヘテロ接合体において発生する黒色腫は、野生型の*I n k 4 a / A r f*対立遺伝子の一貫した喪失を保持した。結局、*I n k 4 a / A r f - / -*の背景では、トランスジェニック動物は、短い潜伏の後に高い浸透率で、自発的な皮膚の黒色腫を発達させた。(*C h i n r a, 1 9 9 7, 前出*)。従って、本発明者らは、*R A S*活性化が*I n k 4 a / A r f*欠失と協調して、インビボで黒色腫の新生を促進し得ることを示した。最後に、ヒト黒色腫と同様に、*p 5 3*遺伝子はこれらのマウス黒色腫において野生型の構成を維持した(*C h i n r a, 1 9 9 7, 前出*)。従って、これらの黒色腫の遺伝子プロフィールは、ヒト黒色腫において観察された古典的な遺伝子特徴のいくつか、すなわち、*R A S*経路の活性化、*I n k 4 a / A r f*腫瘍抑制因子の欠失、および*p 5 3*変異の不在、を再現した。

【0040】

(黒色腫維持における活性化*R A S*の役割)

有意な活性化癌遺伝子(例えば、活性化*R A S*)の役割を研究するために、完全に形成した腫瘍において、テトラサイクリン調節系を利用する、馴化*H - R A S^{V 1 2 G}*トランスジェニックモデルは、確立された(図2)。完全に確立された腫瘍において、癌遺伝子機能を評価する必要性は、進行性悪性腫瘍が多くの癌遺伝子および腫瘍サプレッサ遺伝子経路の機能および調節に影響する多くの連続的な遺伝的損傷の表現型の終点を表すという事実から生じる。それ故、特定の癌開始損傷が、腫瘍維持に関連したままであるか否か、

10

20

30

40

50

もし関連したままであるなら、どのような役割であり得るかは明白でない。誘発性癌遺伝子損傷の「獲得した」役割の1つが、脈管形成および免疫隔離のようなプロセスを導く宿主-腫瘍相互作用に影響を及ぼし得るという概念は、特に重要である。これらの問題点をアドレスするために、テトラサイクリン(tet)系(Kistnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:10933, 1996)を使用した。特に、tet調節RASトランスジェニックマウス(Tyr/Tet-RAS)を生成し、これは、Ink4a/Arf-/-バックグラウンド上でアクチベーター(Try-rtTA)導入遺伝子およびレセプター(Tet-RAS)導入遺伝子の両方を有した(図2)。このモデルにおける活性化RAS発現は、それぞれ、インピトロまたはインピボで倍地中または飲料水中でドキシサイクリンによって調節され得る(Chinら、Nature 400:468, 1999)。さらに、これらのマウスは、厳密なドキシサイクリン依存様式において、突発性皮膚黒色腫を発症した(すなわち、黒色腫のみがドキシサイクリン処置Tyr/Tet-RAS Ink4a/Arf-/-マウスにおいて生じた)。これらのドキシサイクリン誘発性腫瘍は、構成的にTyr-RAS Ink4a/Arf-/-黒色腫モデルの全ての特性を共有した(Chinら、1997、前出)。特に、これらは、メラニン欠乏、侵襲性および高度の血管腫瘍として存在し、組織学的試験の際に、退化および多形態の細胞学を有する紡錘体の形態、早期のメラノサイト特異的マーカーのチロシナーゼ関連タンパク質-1(TRP-1)(Thomsonら、J Invest. Dermatol. 90(4):459, 1988)に対して強い免疫反応性、ならびに強いH-RAS^{V12G}の発現および活性を示した。

10

20

【0041】

1つまたは多数の独立した原発性黒色腫を有するこれらのドキシサイクリン処置Tyr/Tet-RAS Ink4a/Arf-/-マウスがドキシサイクリン投与から取り除かれる場合、かるうじて検出可能または検出可能でない質量に迅速に退化した黒色腫(直径0.5~1.5cm)を確立し(図3Aおよび図3B)、残った散らばった腫瘍病巣のみが、10~14日内で顕微鏡検査で検出可能である。言いかえると、確立された黒色腫において活性化RASの除去は、腫瘍退行を生じる。さらに、この退行プロセスは、腫瘍細胞および宿主誘導内皮細胞区画の両方においてアポトーシスの活性化によって起こる(Chinら、1999、前出)。この所見は、活性化RASに対して必須の役割を腫瘍形成においてだけでなく、腫瘍維持においても同様に確立し、そして宿主-腫瘍細胞の相互作用を維持する際に、腫瘍増殖およびホメオスタシスに対して必須の活性化RASに対する役割を示唆した。

30

【0042】

(RAS誘発Ink4a/Arf-/-黒色腫細胞株は、腫瘍形成に対して厳密にRAS依存性である)

独立したTyr/Tet-RAS Ink4a/Arf-/-黒色腫細胞株は、ドキシサイクリン追加培地において一次黒色腫に由来した。これらの細胞株は、ドキシサイクリン依存様式においてH-RAS^{V12G}mRNA、H-RAS^{V12G}タンパク質およびH-RAS^{V12G}活性を発現した。これはこれらの細胞のインピトロでの増殖特性は顕著に影響しないが、続くH-RAS^{V12G}の発現は、インピボでの腫瘍形成(腫瘍維持におけるH-RAS^{V12G}の役割と一貫した所見)に必要とされる。特に、これらの細胞の皮下注射または真皮注射は、100%の有効性でドキシサイクリンで処置したSCIDマウスにおいて腫瘍を生産したが、ドキシサイクリンを受け取らなかったこれらのマウスは、数ヶ月の観察の後、腫瘍を含まないままであった(Chinら、1999、前出)。同様に、足場独立性増殖(腫瘍形成の代理)はまた、RAS活性化に依存する。従って、このモデルは、腫瘍形成および腫瘍維持において遺伝子の検索が活性化RASの機能を補足し得る非バックグラウンド系を提供する。

40

【0043】

さらに、Ink4a/Arf欠乏腫瘍細胞のゲノムは、p53欠乏細胞とは異なり非常に安定なままであり、従って、安定な癌遺伝子発見系を提供する。この独特な系は、前例

50

のない多数の機会（癌標的の同定、特に腫瘍維持および宿主 - 腫瘍相互作用に対するこれらの重要性（以下を参照のこと））を提供する。

【0044】

（Tet - RAS腫瘍細胞は、インビトロでの内皮細胞の生存を支持する）

腫瘍脈管形成におけるH - RAS^{V12G}の役割を探索するために、発明者らは、SCIDの外植腫瘍におけるVEGFの実施された発現が、内皮細胞アポトーシスを助けず、ドキシサイクリンを受け取る際の腫瘍退行および結果としてH - RAS^{V12G}の下方制御もまた取り消さないことを決定した。従って、腫瘍維持におけるH - RAS^{V12G}の役割は、VEGF発現の調節を超えて伸展するというインビボでの証拠を提供する。腫瘍細胞においてH - RAS^{V12G}の発現の損失の際、宿主誘導内皮細胞の生存度の損失の所見は、腫瘍細胞によるH - RAS^{V12G}の発現が腫瘍脈管形成を支持するプロ脈管形成の状態を導き、そして一旦H - RAS^{V12G}の発現がドキシサイクリンの除去によって止まると、この状態は崩壊することを示唆する。この仮説に合わせて、発明者らは、RAS発現黒色腫細胞が、血清を含まない状態において、一次ヒト内皮細胞の生存度を増強し得るパラ分泌因子を確かに分泌することをインビトロでの共培養アッセイによって示した（図4）。本明細書中に記載される研究は、インビボおよびインビトロでのRASの下方制御の動力学および表現型の重要性を特徴付け、そしてインビボでの腫瘍細胞と宿主誘導内皮細胞との間の相互作用についての証拠を提供した。結果として、この系は、腫瘍許容の微小環境を維持する際に関連する癌遺伝子調節因子（脈管形成に関連する因子を含む）を発見する手段を提供する。

10

20

【0045】

本発明は、内皮細胞の生存度を増強する因子（例えば、分泌ポリペプチドのようなポリペプチド）を同定する方法を提供する。このような方法は、内皮細胞が生きるために必要な因子を欠損する条件下で、内皮細胞（例えば、一次ヒト内皮細胞）を培養する工程を包含し得る。例えば、内皮細胞は、血清を含まない状態で培養され得る。内皮細胞培地にRAS発現黒色腫細胞（例えば、ドキシサイクリン処置Tyr / Tet - Ras Ink4a / Arf - / - マウス由来の黒色腫細胞）によって生産された試験化合物（または試験化合物の集合）を添加した後、この内皮細胞は、生存の能力についてモニターされ得、それによって、内皮細胞の生存度を増強した試験化合物を同定する。細胞の生存度は、可視的にモニターされ得る。試験化合物および試験化合物の集合は、一般的なタンパク質精製技術（例えば、アフィニティークロマトグラフィー）を用いて、RAS発現黒色腫細胞培養の上清から得られ得る。例えば、培養上清は得られ得、そして上清内のポリペプチドは、分泌ポリペプチドのプールを得るために分画され得る。ポジティブコントロールは、ドキシサイクリンの存在下、内皮細胞とTyr / Tet - Ras Ink4a / Arf - / - 黒色腫細胞とを共培養する工程を包含し得、一方ネガティブコントロールは、ドキシサイクリンの不存在下、内皮細胞とTyr / Tet - Ras Ink4a / Arf - / - 黒色腫細胞とを共培養する工程を包含し得る。

30

【0046】

（RAS等価遺伝子座の同定）

（プロウイルスの変異誘発、癌遺伝子発見の方法）

ゆっくりと形質転換するレトロウイルスは、マウスのゲノムにランダムに組み込まれ得、そして癌遺伝子自体の存在なしで腫瘍の発達を促進し得る。これらは、腫瘍発達を導く両方の場合において、時折、内因性のプロト癌遺伝子を活性化するか、またはより少なく一般的に、腫瘍抑制遺伝子の機能を破壊することによってそのようにする。ウイルスの挿入は、主に白血病およびリンパ腫モデル（Bedigianら、J. Virol. 51: 586, 1984; van Lohuizenら、Cell 65: 737-1991; Hauptら、Cell 65(5): 753, 1991; Gilbertら、J. Virol. 67: 2083, 1993）において、マウスの乳癌ウイルス（Nusseら、1982、前出）によって誘発される胸部腫瘍においてもまた、癌関連遺伝子を「探し出す」ためののタグとして使用され、後者は、非リンパ系癌に対するこのアプローチの

40

50

有効性を示す。現在の研究は、白血病傾向性モデルにおける莫大な数の候補癌遺伝子を迅速に同定するためにこのようなアプローチを使用した(Liら、1999、前出)。プロウウイルスのゲノム配列の逆方向PCRに基づく方法を使用して、数百の組み込み部位は、クローン化され、そして特徴付けられた(Liら、1999、前出)。これをするために、高いスループット配列決定、データ分析および迅速に広がる配列データベース、ならびにマウスの精製した遺伝子マップは、開発された。一般的な組み込み部位として以前に分類された全ての遺伝子座は、同定され、ならびに、新しい一般的な組み込み部位は、H-Rasおよび他のモデル系における腫瘍の発達に関係した遺伝子のような癌遺伝子を囲む。プロウイルス挿入部位は、腫瘍形成に関連していなかった多くの公知の遺伝子、ならびに種々の未知の遺伝子を含む。それぞれと確立した癌経路に関連する可能性のある転写因子、キナーゼ、ホスファターゼおよび膜貫通レセプターをコードする遺伝子座への「単一」組み込み(集合において1回のみ表される組み込み)の同定が最も奨励される。公知の癌遺伝子が単一ヒットの標識として同定される場合、これらのスクリーニングは、飽和に達していないようである。要約すると、これらのスクリーニングは、多くの新しい組み込み部位を明らかにし、そして確証を現在必要とする多数の候補癌遺伝子を示す。それ故、これらの遺伝子が疾患に本当に関する否かを確認する必要がある、もしそうであるならば、これらの機能および公知の癌経路に関連するか否かを決定する。このような特性は、インビボの癌モデルにおいて研究され得、この癌モデルは、例えば、本発明の黒色腫傾向性マウスモデルによって提供される。従って、本発明によって提供されるこのスクリーニング方法は、これらおよび任意の他の候補癌遺伝子を確認し、そして特徴付けるために使用され得る。

10

20

【0047】

(ドキシサイクリン応答黒色腫細胞は、インビボでレトロウイルスによって感染され得る)

本明細書中に記載される場合、プロウイルスの挿入性変異誘発は、RAS補完遺伝子(本明細書中で「ras等価遺伝子座」または「REL」ともまたいう)を同定するために使用した。このアプローチは、標的細胞の効果的なプロウイルス感染を決定する。この目的のために、Tyr/Tet-RAS Ink4a/Arf-/-黒色腫細胞は、これらがレトロウイルスによって感染され得るか否かを決定するために評価された。pBABE骨格にGFP(グリーン蛍光タンパク質)遺伝子を含むレトロウイルスベクターを、構築した。GFP-pBABEプラスミドを、Phoenixパッケージ細胞に一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションの48時間後、ウイルスの上清を回収した。指数関数的に増殖するドキシサイクリン応答黒色腫R545細胞を、GFPレトロウイルスを用いて12時間、感染した。36時間後、感染細胞を、蛍光顕微鏡を用いて試験し、感染の効率を測定した。約20%の細胞が、GFPタンパク質の検出可能なレベルで発現した(図5)。従って、これらの細胞は、レトロウイルスによって迅速に感染される。同様に、R545細胞は、MuLV特異的U3LTRプローブを用いたサザンブロット分析によって測定された場合、インビボでMuLV特異的U3LTRによって感染され得る。MuLVの組み込みはランダムであるので、予測されたバックグラウンドのスメアを観察し、細胞の非選択的集団における多くの異なる組み込み事象をおそらく示した(図6)

30

40

【0048】

(OFF-Dox黒色腫細胞に感染したMuLVは、H-RASを活性化せずにSCIDマウス中で腫瘍を形成し得る。)

発明者らの結果は、MuLV感染OFF-Dox黒色腫細胞で感染したSCIDマウスが、ドキシサイクリンでの誘導なしでインビボで腫瘍を形成し得ることを示した。特に、発明者らは、2つの部位で 1×10^6 のMuLV感染OFF-Dox細胞を全部で20のマウスに注射し続けた。2週間内で、MuLV感染細胞を注射した40部位のうちの18部位(45%)が、測定可能な腫瘍に発達した(図7;表1)。多数のこれらの腫瘍は、ドキシサイクリン上で誘導されたRAS駆動親細胞の臨床的出現および臨床的挙動とは異

50

なる臨床的出現および臨床的挙動を表した。例えば、図7に示されるように、親非感染R545細胞株は、ドキシサイクリン上で維持されたSCIDマウス中で真皮腫瘍を生成した。腫瘍は、代表的に直径1.5~2cm以上になるまで潰瘍形成しない。対照的に、MuLV感染OFF-DoxR545細胞の感染の10日後に出現される1つの腫瘍において、0.4x0.4cmのみを測定した腫瘍でさえも、潰瘍形成は出現した。この研究からの結果は、MuLV感染OFF-Dox黒色腫細胞が高いパーセンテージの場合（この試験において、45%であった）において腫瘍を産出し、プロウイルスの標的配列のクローニング、ならびに引き続くプロウイルスの活性化遺伝子の単離および特徴付けを促進することを示した。

【0049】

表1. MuLV感染細胞を用いて注射したマウス内の部位感染したで発達した腫瘍の腫瘍の大きさ。

【0050】

【表1】

番号	注射前の腫瘍の大きさ (cm)		
	8日	12日	20日
1	0 x 0	0 x 0	0.3 x 0.2
2	0.2 x 0.2	0.2 x 0.3	0.2 x 0.3
3	0 x 0	>0 x 0	0.3 x 0.3
4	>0 x 0	0.1 x 0.1	0.2 x 0.1
5	0.2 x 0.2	0.3 x 0.3	0.4 x 0.4
6	>0 x 0	0.4 x 0.5	0.4 x 0.5
7	0.5 x 0.4	0.5 x 0.4	0.6 x 0.5
8	0.1 x 0.1	0.2 x 0.1	0.3 x 0.3
9	>0 x 0	0.8 x 0.2	0.8 x 0.3

10	0.1 x 0.1	0.1 x 0.1	0.3 x 0.2
11	0.3 x 0.2	0.2 x 0.2	0.4 x 0.4
12	0.1 x 0.2	0.1 x 0.1	0.3 x 0.4
13	0 x 0	0.2 x 0.3	0.3 x 0.4
14	0.1 x 0.1	0.3 x 0.3	0.4 x 0.3
15	0	0.3 x 0.3	0.3 x 0.3
16	0.2 x 0.3	0.3 x 0.3	0.5 x 0.4
17	0.2 x 0.2	0.3 x 0.3	0.1 x 0.2
18	0 x 0	0.1 x 0.1	0.1 x 0.2

（腫瘍（例えば、黒色腫）維持においてRAS活性化を補完し得る遺伝子の遺伝的同定

10

20

30

40

50

(図 8 を参照のこと)

本明細書中に記載される場合、プロウイルスの挿入変異誘発は、癌傾向マウスモデルにおける使用のために特に適する癌遺伝子発見の方法である。挿入変異誘発は、癌遺伝子発現の活性化によってか、またはそれほど多くはないが、腫瘍サプレッサー遺伝子の破壊のいずれかによって、腫瘍形成性の表現型を誘発する。プロウイルスの組込みは、比較的ランダムな過程であり、そして、ゲノムの組み込みに「印を付ける」ため、プロウイルスの組込みは、癌遺伝子の同定のための最も重要な系として現われる。このプロウイルス標識アプローチは、多くの新しい癌遺伝子および腫瘍サプレッサー遺伝子の同定を導いた。簡潔なリストは、E μ -Mycリンパ腫系については、Pim1、Bmi1、Gfi1、Pal1、およびFrat1を含み、BXH2骨髄性白血病系については、Nf1、Mrvvi1、Tre2、Meis1、Evi5およびHoxa9を含む。重要なことに、このアプローチは、1つの実験において、未知の多くの遺伝子に加えて、以前に記載された系の中の白血病誘発性遺伝子の全てを同定した(Lira、1999、上記)。同様のストラテジーは、乳癌遺伝子に対してMMTVを使用して行われた(Nusseら、1982、上記)。本発明者らは、原発性マウスメラノサイトおよび星状細胞が、MuLV感染に対し感受性であることを示し、この方法論が、主要な非リンパ系細胞型に適用可能であることを実証する。

【0051】

この最後の点は、腫瘍の維持に関与する任意の誘導可能な遺伝子を使用して、本発明が、任意の癌種に対し適用可能であるという事実を明らかにする。例えば、dox調節されたEGFR癌遺伝子マウスにおいて生じる膠芽細胞腫は、EGFR等価遺伝子の発見のための系として役立つ。EGFRが膠芽細胞腫の維持に重要であると判明した場合、次いで、これらの細胞は、培養のために適用され、そしてそれをMuLVに感染させ、プロウイルスがEGFRに等価な遺伝子を活性化する場合、SCIDマウスにおいて腫瘍が得られる。

【0052】

(MuLV感染)

プロウイルス突然変異誘発アプローチは、本発明者らの黒色腫系において、以下のように使用された。簡単に言うと、上記のOFF-Dox黒色腫細胞株は、ドキシサイクリンの補充なしに培養中に接種された。指数増殖期の間、これらのOFF-Dox黒色腫細胞を、新たにパッケージングされたMuLVウイルスに感染させた。感染の48時間後に、 $1 \sim 3 \times 10^6$ 細胞(特定の細胞株に依存する)を、独立して感染したプレートからカウントし、そして、4~6週齢のSCIDマウスの皮内または皮下に注射した。マウスの各々は、2つの独立の感染から得られた細胞の注射を2回、各側腹部に受けた。コントロールSCIDマウスを、同数の感染していないOFF-Dox細胞(これらの細胞は、培養において同じ長さの時間、同様に継代された)を用いて注射した。全てのマウスを、誘導しない状態(すなわち、OFFドキシサイクリン、通常の飲料水を用いる)で維持し、そして皮膚の腫瘍の発生のために入念に続けた。offドキシサイクリンの1つの研究において、本発明者らは、MuLV感染した黒色腫細胞に由来する約45%の腫瘍の形成率を観察した。飽和スクリーニングに取り組むために、プロウイルス変異誘発および組込み部位分析を、新しい遺伝子/遺伝子座の回収が減少するまで続け得る(以下を参照のこと)。以下に記載される別の研究において、本発明者らはMuLV感染した黒色腫細胞由来のoffドキシサイクリンの100%の腫瘍形成率を観察した。0%の腫瘍形成は、感染していないコントロール細胞にて観察される

(プロウイルス組込み部位の予備的な評価)

図8は、プロウイルス組込み部位を特徴付けるために実施され得るいくつかの工程を概略するフローチャートである。RAS非依存性腫瘍が、MuLV活性型癌遺伝子を有する細胞のクローン性増殖を示すことを利用して、ウイルス組込み部位の最初の特徴付けが、組込みプロファイルの全てについてのサザンプロット分析、ならびに、RTK-RASシグナル伝達において重要であることが公知の遺伝子(RAS(内因性および導入遺伝子の

10

20

30

40

50

両方)、Raf、MEK、MAPK/ERKおよびPI3K)の分析によって始められ得る。さらに、いくつかの増殖因子および黒色腫発生に關与するRTK(例として、EGFR、bFGF/FGFRおよびHGF/SC-METが挙げられる)が、評価され得る。EcoRI、SacIIまたは、BamHI消化された外植片腫瘍由来のDNAは、これらの遺伝子における多型性についてアッセイされ得る。プロウイルスの組込みによって生成されたこのような多型は、感染していない親の培養物との比較ゲノム解析によってか、および/またはMuLV特異的U3-LTRプローブを用いる連続ハイブリダイゼーションによって確認され得る。腫瘍が以前に黒色腫形成に關与した遺伝子に対して陽性である場合、この腫瘍において増加するさらなる分子が、推測され、そして「急速に発展した(fast-tracked)」遺伝子についてより詳細に機能研究され得る(以下を参照のこと)。このようなヒットは、インビボにおいて黒色腫の発生に対し生理学的に關連する可能性を持つ増殖因子およびRTKを指摘するために役立つ。既知の黒色腫關連遺伝子座の中へのプロウイルスの組込みを持たない腫瘍について、以下に記載されるように、より詳細な分子分析が実施され得る。

【0053】

(プロウイルス組込み部位におけるプロウイルス標識された配列(PTS)のクローニング)

サザンブロット分析の後、分子分析は、組込み部位に隣接するプロウイルス標識配列(PTS)のクローニングにより続けられ得る。逆PCR(IPCR)ストラテジーが、この目的のために使用され得る。図9において概説されるように、各組込み部位の分析は、それぞれMuLVゲノムに隣接する2つのPTSのクローニングを必要とした。MuLV誘導された腫瘍由来のDNAを、プロウイルスの内部を切断する制限酵素(例えば、BamHIおよびSacII)にて消化した後、PTSは、隣接するMuLV特異的配列で標識された、直線化フラグメントを含んでいる。これらのフラグメントは、再び環化され、そして両方のPTSを、ウイルス性LTRおよび制限酵素部位の外側に方向付けられたネストされたプロウイルス特異的プライマーセットを使用してPCR増幅した。500bp~14kbに及ぶ、得られたアンプリコンは、T/Aクローニングベクターの中にサブクローニングされ得る。次いで、標準的なプライマーを使用して、このPTSは、ハイスループット塩基配列決定装置を使用して、双方向に塩基配列決定され得る。SacIIは、この酵素が、遺伝子プロモーターのCpGアイランドにおいて以前に過剰に示されたことを示す場合、ゲノムDNAをフラグメント化するために使用され得る。従って、SacII消化されたPTSの塩基配列決定は、關連する遺伝子標的の近くに存在する配列情報を生じそうである。IPCRクローニングを許容する組込み部位の数は、腫瘍DNAを切断するための1より多い制限エンドヌクレアーゼ(例えば、BamHI)を使用することによって増加し得る。この場合、MuLV促進された腫瘍が保有する情報を最大限に引き出すために、MuLV誘導された各腫瘍のゲノムDNAが、2つ(またはそれより多く)の制限酵素(例えば、SacIIおよびBamHI)を使用してフラグメント化され得、それぞれの腫瘍に關連する4つのPTS(2つの制限消化の各々について2つ)は、IPCRによってクローン化され得(図9)、次いで、クローン化されたPTSの双方向的な塩基配列決定が、実施される。

【0054】

(データベース検索およびBACフィルタースクリーニング)

データベース検索は、隣接する候補REL遺伝子を同定するために、そして染色体の位置情報を得るために、MuLV標識されたPTSのゲノム配列を用いて実施され得る。データベースにヒットしなくても、BACライブラリースクリーニングおよびクローニングは、行われ得る。プロウイルスの組込みが、遺伝子から少し離れて生じ得ることに注目することは、重要である。従って、これらのいくつかはデータベースにヒットしなくても、まだ他の腫瘍において既に同定された遺伝子の近くにあり得る。従って、BACライブラリースクリーニングおよび塩基配列決定を試みを簡素化するために、頻繁に標的化される遺伝子座(例えば、EGFR、MetおよびbFGFに対するBAC)のBACを含有

10

20

30

40

50

するレプリカBACフィルターが生成され得る。これらのスクリーニングにおいて、IPCR生成物は、フィルターへのハイブリダイゼーションについてアッセイされる。ネガティブシグナルは、クローニングおよび塩基配列決定を保証するが、ポジティブシグナルは、さらなる分析を不用にする。多くのクローンに対するハイブリダイゼーションは、反復エレメントの存在を示唆し、そして独特のプロープの生成を必要とし得る。詳細な配列分析が必要なものとして、フィルタースクリーニングによって同定されたBACクローンは、少なくとも1つのエキソンを同定するために、ランダムシェアリング、ショットガンサブクローニング、および高処理塩基配列決定に供せられ得る。

【0055】

(MuLV標的化RELの最初の特徴付けおよび優先順位(図10を参照のこと))

これらのREL遺伝子の限定された特徴付けは、機能的特徴付けの成果に優先順位を付けるために行われ得る。塩基配列決定されたREL遺伝子の各々を用いて、以下の工程が行われ得る：(i)大きな系統学的距離を超えて、有益なORFホモロジー関連性について検索するための、データベースマイニングであって、推定上のタンパク質を機能的に関連するグループ(例えば、増殖因子、膜貫通レセプター、RASスーパーファミリーおよびアダプター分子)に分類可能なモチーフを適切に同定する工程、(ii)ヒトの癌における既知のホットスポットとの関連を明らかにするための、染色体の位置決定研究；(iii)遺伝子が、活性化されたRAS導入遺伝子の発現によって調節されるかどうか(すなわち、候補遺伝子およびRASとの間に調節性フィードバックループが存在するか?)、を決定するための、黒色腫遺伝子候補の発現研究ならびに(iv)ヒトオルソログ(ortholog)が、黒色腫および誘導的な細胞株において調節不全化されるかどうかを確認するためのヒト黒色腫突然変異研究。

【0056】

(バイオインフォマティクス)

手持ちの完全なまたは部分的な候補REL遺伝子配列を用いて、既知の機能の遺伝子との相同性の関連性について検索するために、データベース全体が使用され得る。相同性検索は、REL遺伝子の潜在的な機能および経路配置について得られる情報を最大化するために、大きな系統学的距離にわたって処理され得る。従って、このような成果は、REL遺伝子生成物の同定および/または分類を直接的に導き得る。例えば、これらの遺伝子産物の一部は、RTK-RAS経路の構成要素であり得る。多くのRTKが、黒色腫の病原論に関係付けられてきたが、遺伝的に確認されたものはほとんどない。この遺伝的スクリーニングによる特定のRTKの同定は、これらの遺伝子に磨きを掛け、そして本明細書中に記載される機能分析のために「急速に発展する」ことを可能とする。当然、このスクリーニングは、任意の癌種における任意の推定上の癌遺伝子の同様の取扱いを可能とする。既知の遺伝子との関連が確立できない場合、モチーフマッピング情報が、なお役立てられることを示し得る。例えば、RASスーパーファミリーのメンバー(例えば、スイッチドメインI)(Malumbresら、Frontiers in Bioscience 3:887, 1998に概説される)またはRTKのモチーフ特性の存在は、続く分析のためのRELの重要性を増大し得る。最後に、推定上のREL遺伝子産物が、パイオニアタンパク質として標識される場合(すなわち、パイオニアタンパク質は、データベースの全てに対し相同性を持たない)、どのように進めていくかの決定が、染色体の局在化および発現研究から得られる情報(これらは、いかに記載される)の分析によって容易にされ得る。

【0057】

(染色体の局在化)

REL遺伝子の染色体での局在化は、詳細な機能の特徴付けのためのクローンの優先順位において重要な因子であり得る。さらに、隣接する遺伝子が既知の場合において、その「遺伝子座」が、ヒトの癌における細胞発生のホットスポットであると判明した場合、対応するBACのクローニングおよび塩基配列決定が優先され得る。本発明者らが明白な病原性のヒット(例えば、Met)を持つ腫瘍において、データベース情報から容易に得

10

20

30

40

50

られる他のプロウイルス組込みの染色体の局在化が、決定され得る。上記されたように、多くの腫瘍は、多数の疾患関連組込みを有する。特に、プロウイルス組込みの大部分は、非病原性組込みのバックグラウンドを示さない。現在までに、これらの配列のうち20%が、共通の組込み部位または正真正銘の疾患遺伝子であるヒット遺伝子に局在化することが見出された。

【0058】

ほとんどの場合、配列データベース分析は、REL候補の染色体の局在化を提供する。他の全ての場合、REL候補のマッピングが、実施され得る。ここで、JAX種間の戻し交配マッピングサービスが、使用され得る。あるいは、多数のクローンのPCRに基づくマッピングによく適合する放射線ハイブリッド(RH)パネルが、使用され得る。このRHマップは、ヒトにおけるシンテニー領域の予測が可能である。しかし、RHマッピングのような成果のための要求は、データベースが、マウスゲノムおよびヒトゲノムの完全な配列を提供する場合、非常に少なくなる。

10

【0059】

(発現パターンの分析)

REL遺伝子をプローブとして使用する、ノーザンブロット分析は、予想されたサイズの転写物を明らかにするためだけでなく、親培養物と比較して、腫瘍中の転写物が「活性化された」発現の様式を示すことを実証するためにも、実施され得る。少なくとも、主要な候補遺伝子は、MULV誘導されたRAS独立黒色腫(または分析下にある他の癌細胞型)より高いレベルにて発現されるか、あるいはその転写物サイズは、変わり得た。REL遺伝子の腫瘍特異的活性化の実証に加えて、RASに対するその調節関係が、評価され得る。具体的には、RAFプルダウンアッセイにモニタリングされるようにREL遺伝子過剰発現がRAS/MAPK活性化と関連する否か、またはRAS導入遺伝子のドキシサイクリン誘導型活性化が特定のREL遺伝子の発現を変えるか否かが、決定され得る。後者の問題に取り組むために、候補REL遺伝子は、ONDキシサイクリンの間およびドキシサイクリンが取り下げられてからの種々の時点にて回収された(例えば、6、12、24、36、48および72時間)SCIDマウス外植片腫瘍に由来する総RNAに対するハイブリダイゼーションについてアッセイされ得る。さらに、RASの下流の主要な候補は、RAS発現との共調節(co-regulation)を示す。調節性のフィードバックループが存在する場合、RASの上流調節因子(おそらく新規のRTK)はまた、逆共調節を示し得る。最後に、プロウイルスの組込みが、腫瘍サプレッサー遺伝子の不活性化を導き得、従って転写物サイズの変更(短縮された非機能性生成物)または発現の減少を導くことに留意しなければならない。

20

30

【0060】

(ヒト癌パネルにおける候補REL遺伝子の発現)

本方法の重要な要素は、REL遺伝子のヒトオルソログがヒト癌(例えば、黒色腫)において、異常制御されるかどうかを決定することを含む。さらに、類似するアプローチが、(実質的に任意の癌の型における)他の癌維持遺伝子に対して使用し得、そしてそのような方法は、本発明に含まれる。

【0061】

この決定に関する第1のアプローチは、候補REL遺伝子の同定に関するメラノサイトおよび黒色腫に対する利用可能な電子的データベースを調べる(例えば、Vogelstein/Kinzlerのグループによる研究において作製されたヒトメラノサイトおよび黒色腫細胞株に対するSAGEデータ(Velculescuら、Science 286(5444):1491,1999)を検索する)能力が利用される。この研究において、19の正常組織型および疾患組織型由来の350万のヒト転写物を、これらの発現レベルについて分析した。メラノサイト系統について、正常なヒトメラノサイトについての2のSAGEライブラリー、およびヒト黒色腫細胞株についての10のSAGEライブラリーを、分析した。これらのデータは、ヒト黒色腫で過剰発現され得る候補RELの同定についての貴重な供給源を示す。同様に、黒色腫および他の癌の型における発現プロフ

40

50

ールが、近年公開された (Dugganら、Nature Genetics 1, 補遺: 10-14, 1999に概説される)。公開されたデータに加えて、公的/NIH助成データベース(例えば、多くの型の異なる癌および正常コントロールに対するSAGEライブラリーを含む、CGAPデータベース)が、存在する。これらのデータベースは、米国政府のNational Center for Biotechnology Informationウェブサイト(例えば、nebi.nlm.nih.gov/ncigap/またはncbi.nih.gov/SAGE/のワールドワイドウェブ)で利用可能である。

【0062】

第2のアプローチとしては、免疫組織化学によるヒト腫瘍組織における発現スクリーニングまたは組織アッセイにおけるRNAインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。これは、Massachusetts General Hospital Tumor Bank(例えば、現在、侵襲的黒色腫および転移性黒色腫の両方の多くのサンプルを含む、the Human Melanoma Tumor Bank)のような腫瘍バンクによって提供される巨大な供給源を利用し得る。従って、本発明者らは、最初に、ヒトオルソログESTを注文し、そしてノザンプロット分析によってヒトオルソログESTの発現を試験した。本発明者らは、組織アレイ技術を使用して、組織切片のIHCまたはRNAインサイチュ分析もまた利用し得る。組織アレイ技術は、100の腫瘍サンプルを、従来の病理学ガラススライド上に1つのアレイで配置する技術である。このように、数百の(同じ型または異なる型の)腫瘍サンプルを、同一の抗体またはインサイチュハイブリダイゼーションプローブを用いて、1つの設定でスクリーニングし得る。広い範囲の黒色腫サブタイプおよび他の癌の型を示す、数百の標本は、組織アレイによって、候補REL遺伝子の発現について迅速にスクリーニングされ得る。この型のスクリーニングは、私的/商用または公的な任意のレポジトリ(repository)から得られた任意の癌の型由来の組織を使用して実施され得る。

【0063】

機能的研究に対する種々のREL候補の選択は、上記特徴付け工程において得られたREL遺伝子のプロフィールに基づき得る。機能的研究を、以下に記載する。

【0064】

(MuLV挿入による活性化がRAS非依存性腫瘍形成性OFF-ドキシ(doxy)サイクリンを生じるMaSSスクリーニングによって同定された候補REL)

Tyr/Tet-RAS Ink4a/Arf-/-動物由来のドキシサイクリン応答性RAS依存性黒色腫細胞(例えば、R545)は、ドキシサイクリン補充物を有さない培養物中に維持され、そして新しくパッケージングされたMuLVウイルスを感染された。感染された細胞のサザンプロット分析は、MuLV 3'UTRプローブを使用して探查された場合、プロウイルスのゲノムへのランダムな組み込みを示すスメアーを示した。注射の48時間後、 1×10^6 のMuLV感染OFF-Dox細胞を、4~6匹の老SCIDマウスの2つの部位に注射した。各注射では、独立に感染されたプレート由来の細胞が用いられた。全部で20匹のSCIDマウスに、注射した。コントロールとして、20匹のSCIDに、培養物中で同じ期間継代された非感染黒色腫細胞を注射した。全ての動物を、非誘導状態で観察した(例えば、普通の飲料水におけるOFF-ドキシサイクリン)。4週間以内に、MuLV感染細胞を注射された動物の100%が、かなりの腫瘍を発生した(全部で40の腫瘍)。対照的に、非感染細胞を注射された動物はどれも、腫瘍を発生せず、このことは、これらの誘導黒色腫細胞が、腫瘍形成性に対するRAS活性化に厳密に依存しているという本発明者らの以前の観察に一致した。

【0065】

MuLV感染細胞由来のOFF-ドキシサイクリンを生じる腫瘍を、回収し、そしてゲノムDNAを、IPCRによるプロウイルス組込み部位のクローニングのために抽出した。DNAを、BamHIおよびSacIIの両方を用いて消化し、そして本明細書中に記載されるようにIPCRに供した。IPCRバンドを、二次的ネストIPCRの後に観察

10

20

30

40

50

した。各バンドは、クローンのプロウイルス組込み部位を示し、このことは、RELを活性化または不活化し、これらの細胞にドキシサイクリン非依存性(RAS非依存性)腫瘍形成性を付与すると考えられる。これらのIPCRバンドを単離し、精製し、そして配列決定に供した。

【0066】

約800のIPCRクローン化組込み配列を、分析し、約500が有益な配列をもたらした。これらの500の配列から、私的ゲノムデータベースおよび公的ゲノムデータベースの両方における、BLAST検索は、約50%に対してヒットを示した。これらの配列は、全部で57の組込み部位を同定し(表2)、これらのうち19は共通である(例えば、少なくとも2つの腫瘍で生じる)。これらの共通の組込み部位は、異なる染色体中に分配され、従って、このことは、プロウイルスがTet-RAS導入遺伝子または内因性RAS遺伝子座を活性化する僅かな可能性を排除する。実際に、これらの多数は、RAS関連GTPase活性化タンパク質; CDEP/エズリン(Ezrin)様タンパク質; EGF様ドメイン6; および潜伏性トランスホーミング増殖因子 4Sのような、癌関連経路と直接的な関連を有する。これが飽和スクリーニングでない場合、残りの38の単一ヒットは、bonafide REL事象を示す可能性がある。一緒にすると、これらのデータは、MaSSスクリーニングが腫瘍形成におけるRAS活性化の喪失を第2部位抑制し得る新規遺伝子および既知遺伝子を同定するために機能するという従わざるを得ない証拠を提出する。

【0067】

【表2】

表2. MaSSスクリーニングによって同定された配列

登録番号	Celera 遺伝子名	頻度 (n=40)	染色体
LM02B1	アンキリン関連 Fem1A ホモログ / (AK005944) 推定	37	17
LM18B5	転写因子/ トランスケトラーゼ-PKC- δ	35	14
QLM13A1F	TFIID--Tslp (胸腺支質リンパタンパク質 /?)	25	18
LM25C4	ヒストン H2B/ヒストン 3	20	13
QLM5A2F	GTPアーゼ活性化タンパク質 Ras 関連 (AF183183)/(AK005574) 推定	18	5
LM30D6	?/gag ポリタンパク質	17	2
LM15B8	?/メチオニンアミノペプチダーゼ 2 (または) 阻害因子 2 関連 67 kDa タンパク質	15	11
LM09A2	新生ポリペプチド・関連複合体 α ポリペプチド / (AK010636) 推定	6	10
LM15B11	(XM_049059) 仮想タンパク質 / T17101 推定 電圧作動性陽イオンチャンネル	6	14
LM15B7	Dell メジャースプライス改変体	5	
LM32A4	ORF/未知	4	
LM28A6	gag ポリタンパク質 / 未知	3	

LM29D7	タンパク質キナーゼ C/ 未知	3	
LM03B2	CDEP/エズリン・様タンパク質	2	
LM02A2	NADH デヒドロゲナーゼ Fe-S2	2	
LM32A2	Riken cDNA 遺伝子	2	
QLM02A1F	塩化ナトリウム/ 未知	2	
LM22B1	SRP RNA 3' アデニル化酵素	2	
QLM4A1R	未知 / Nedd4 WWドメイン 5	2	
LM22D16	アクチン結合ホモログ	1	
	11626 タンパク質	1	
LM34C2	C612746 遺伝子/ 未知	1	
LM37B8	CGI-49 タンパク質	1	
LM05D1	EGF-様 ドメイン 6/ 未知	1	
LM21D7	伸長因子 1 γ	1	
LM36B7	GDP diss インヒビター 3/ 未知	1	
LM32D6	GRLP1- glut 反復タンパク質 1	1	
LM29D17	高移動度群タンパク質	1	
LM27A1	高移動度/ hOAT4	1	
LM02B6	仮想タンパク質 FLJ11857	1	
LM28D9	仮想タンパク質 FLJ13287	1	
LM31A2	仮想的/ ORF-インテグラーゼ	1	
LM27D4	KIAA1326 タンパク質/ 仮想的	1	
	潜在的形質転換因子 β 4S	1	
LM37B10	KIAA1244 (sec 関連)	1	
LM32D8	ミオシン重鎖ポリペプチド 9	1	
LM11D2	NAC-1	1	
LM30D11	ニューレキシン II	1	
LM25D6	核因子 κ / Riken cDNA	1	
	嗅覚レセプター/ ORF-インテグラーゼ	1	
LM37D7	嗅覚レセプター 17/ 嗅覚レセプター	1	
	p91a/40S リボソームタンパク質	1	
	Ppic/ PR ジンクフィンガータンパク質 6	1	
LM31A3	推定	1	
LM30B6	推定/ 仮想的 FLJ13297	1	
LM06B3	推定/ rho 関連キナーゼ	1	
LM13B5	推定/ RNA 結合タンパク質 10	1	
LM32A6	推定/ 推定	1	
LM11A5	REV1/リンパ球核タンパク質	1	
	Rpl13a 60S リボソームタンパク質	1	
LM02B2	スカベンジャーレセプター/プロテアーゼ	1	
LM33D5	シナプトジャンクション 2	1	
	未知/ 仮想的	1	
LM25D9	未知/ ald3a2 アルコールデヒドロゲナーゼ	1	
LM29B9	未知/ G3P デヒドロゲナーゼ	1	
LM28D8	未知/ Ku70	1	
	無名タンパク質/ 免疫グロブリン	1	

10

20

30

40

(詳細なインビボ分析に対する最良の候補を同定するための R E L 遺伝子の機能的特徴付け (図 1 1 を参照のこと))

候補 R E L 遺伝子の同定に関して、メラノーマ生成におけるこれら遺伝子の病理学的役割を証明し、そして最終的にこれらの作用機構を解明する必要性が生じる。このように多くの R E L 遺伝子候補が、特徴付けを必要とするので、癌の病理 (および特に癌の維持) に最も可能性の高い関連を有するこれらの遺伝子は、最初のアプローチ (細胞培養ベースの研究) を使用して、追跡され得る。

【 0 0 6 8 】

(c D N A 産生)

インビトロの機能的分析を実施するために、全長 O R F を有する c D N A クローンを使

50

用し得る。そのような全長cDNAを、PCRベースの方法を使用して生成し得る。このことを達成するために、広範に使用されてきた十分に確立した技術である、5'および3'RACE PCR方法論(Clonetech system)を利用し得る。mRNAの供給源は、クローニングされるべき特定の遺伝子のプロウイルス活性化およびアップレギュレーションを有する特定のSCID体外移植組織腫瘍であり得る。データベースまたは本発明者らのBAC配列決定の努力のいずれかからのREL遺伝子のゲノム配列の知識は、プライマー選択を容易にし得る。

【0069】

(親OFF-ドキシサイクリン黒色腫細胞株および初代メラノサイト培養物への安定なレトロウイルス形質導入)

一旦、REL候補について、全長ORFを単離すると、このORFを、LoxP部位に隣接する遺伝子カセットを含むレトロウイルス骨格にサブクローニングし得る。レトロウイルスを、293Tパッケージング細胞株を使用して産生し、そしてレトロウイルスの上清を使用して、機能的な研究のための親OFF-Dox黒色腫細胞または他の初代非形質転換細胞(例えば、メラノサイトまたは星状細胞)を感染させる。安定に形質導入された細胞株の樹立を、ピューロマイシン選択によって達成する。選択の後、形質導入されたREL遺伝子が高レベルで発現されることを実証する。あるいは、ORFを、他の発現構築物にクローニングし得、そしてトランスフェクションによってそのような細胞に形質導入し得る。

【0070】

(REL発現メラノーマ細胞株の特徴付け)

REL形質導入OFF-Dox黒色腫細胞株を、増殖、生存、移動、不死化、および足場非依存性を含む複数のレベルでの特徴付けに供し得る。これらの研究を、Cre切除ありなしで、親(形質導入されない)OFF-Dox細胞株、およびREL-形質導入培養物を用いて、実施し得る。REL ORFのCre誘導性欠失は、観察された表現型がREL発現レトロウイルスの組込みよりむしろREL遺伝子の過剰発現に起因するかどうかを確かめるための重要なコントロールを提供する。このCre誘導性欠失を、Cre-GFP融合構築物の一過性トランスフェクション、その後のFACSによって達成し得る。細胞培養物中でのこのアプローチを用いた本発明者らの実験によって、100%のGFP+細胞がLoxP組換え/欠失を経験することが示された。従って、GFP-細胞およびGFP+細胞に対する選別によって、本発明者らは、細胞の同じ集団内の全ての、REL遺伝子発現の上記分析でカバーされていない表現型に対する正確な寄与を決定し得る。これらの細胞を特徴付けるために使用されたこのアッセイは、以下に記載される。

【0071】

(増殖および生存)

REL発現黒色腫細胞およびコントロールの増殖を、10%血清、2.5%血清、および0.5%血清を含む培地で試験した。10日を過ぎて14日までの増殖曲線を、0日目、1日目、3日目、5日目、7日目、9日目、11日目、および13日目の細胞計数によって分析し得る。S期進行の定量的な測定は、BrdUの取り込みによって決定され得る。これら2つのアッセイによって、これらの細胞の増殖履歴の静的な見解および動的な見解の両方が提供される。例えば、BrdUの取り込みによって測定される場合に、REL発現培養物がCre切除コントロールよりも高いS期の割合を有し、そしてさらにこれらの増殖曲線が重なる場合、このことは、REL発現はS期進行の増加を導くが、細胞死が増加しなければならず、類似の増殖曲線を生じることを示唆する。低血清条件および高血清条件でのアポトーシスの速度を決定するために、FACSによるアネキシンV染色を実施し得る。あるいは、細胞を、チャンバースライド(chamber slide)に播種し、TUNEL染色のためにメタノール:アセトン中で固定し得る。

【0072】

(移動)

REL発現が侵襲的能力を増強するかどうかを決定するために、Boydenチャンバ

10

20

30

40

50

ーアッセイを実施して、REL発現細胞およびコントロールの移動を測定し得る (Shimizuら、Biochem. Biophys. Res. Comm. 264: 751, 1999)。簡単には、チャンバーの下側のウェルを、10%または2.5%のFCSを有する600 μ lの培地で満たし、そして上側のウェルに、400 μ lの細胞懸濁物を播種する。次いで、酢酸セルロース膜フィルターを、2つのチャンバーの間に挟んだ。このチャンバーを、5%CO₂の湿潤雰囲気中で、37 $^{\circ}$ Cで4時間保持する。次いで、フィルターを洗浄し、メタノール:アセトンで固定し、クリスタルバイオレットで染色した。フィルターに移動し、そしてその下側に到達した細胞の数は、顕微鏡的に決定され得る。三連のアッセイを、各細胞株およびそのコントロールについて実施し得る。

【0073】

(不死化)

REL発現OFF-Dox黒色腫細胞は、不死化しやすさが増加している可能性がある。従って、低密度播種アッセイを、不死化能力についての代理アッセイとして使用し得る。このアッセイでは、6ウェルプレートに1ウェル当たり2500の細胞を播種する。高い不死化能力を有する細胞は、14日で目に見えるコロニーを形成するまで増殖し得る。出現コロニーの数を、これらの細胞の不死化の可能性についての定量的尺度として使用し得る。

【0074】

(足場非依存性)

所定のRELは、他の協同する変異のありおよびなしで、黒色腫生成を促進し得る癌遺伝子である可能性がある。REL発現黒色腫細胞は、足場非依存性増殖を示す可能性がある。足場非依存性が、SCID体外移植組織における腫瘍形成についての強力な予測指標であるので、ソフトアガーアッセイを実施し得る。ソフトアガーでは、6ウェルプレートに1ウェル当たり10,000の細胞を播種する。コロニー形成を、毎日顕微鏡観察でモニターする。大きさが0.5mmより大きな細胞クラスターをコロニーとして計数する。コロニー数は、細胞の腫瘍形成性についての定量的マーカーである。

【0075】

(SCID外植片モデルにおけるインビボでの腫瘍形成)

黒色腫細胞株に足場非依存性増殖をもたらし得るこれらのREL候補物は、さらに、SCID外植片モデルにおける腫瘍形成について評価され得る。特に、 1×10^6 のREL形質導入黒色腫細胞が、SCIDマウスの側腹部の各々2箇所に入注され、そして黒色腫の発生が、OFF-ドキシサイクリンで観察される。この腫瘍形成表現型が、レトロウイルスの組み込みではなく、実際にRELの過剰発現(overexpression)の結果であることを確認するために、SCIDマウスにCre励起された対応物が、同様に注入される。そして黒色腫発生が同時に観察される。

【0076】

一次ゲノム変化および二次ゲノム変化を維持する(すなわち、腫瘍形成性から1段階少ない)非誘導性腫瘍細胞がこれらの実験に用いられ得るが、インビボでの機能性研究もまた、REL候補物の機能についての情報およびインビボでの遺伝的確認のための候補者の選択の補助を得るために、REL発現性一次非形質転換細胞(この場合、メラノサイト)を用いることによって実施され得る。このことは、標準的なトランスジェニック技術および遺伝子ターゲティング技術を用いて達成される。

【0077】

(REL発現一次メラノサイトの特徴づけ)

増殖速度論、増殖因子依存性、生存能力、遊走挙動、および固定化は一次メラノサイト培養物において評価され得る。これらのアッセイは、REL形質導入OFF-Dox黒色腫細胞について上述されたように実施され得る。親のOFFドキシサイクリン黒色腫細胞における研究と同様に、重要なコントロールは、REL ORFのCre誘導性欠失を有する形質導入培養物およびREL ORFのCre誘導性欠失を有さない形質導入培養物の試験である。しかし一次メラノサイト培養物においてそのような研究を実施することは

10

20

30

40

50

難しく、それらの低いトランスフェクション効率をもたらす。言い換えると、Cre組み換え酵素の送達は、このコントロール実験を実施するためのREL ORFのCre誘導性欠失を達成することには非効率的である。

【0078】

あるいは、Harold Varmusによって開発された鳥類のレトロウイルスレセプター(tVA)系(Fisherら、Oncogene 18(38):5253、1999に概説される)が使用され得る。具体的には、チロシナーゼtVAカセットを有するトランスジェニックマウスが作製され得る。トランスジェニックマウスは、それらのメラノサイトにおいて、鳥類のレトロウイルスレセプターを発現する。従って、これらのメラノサイトの初代培養物が、Cre組み換え酵素を発現するRCASウイルスを用いて感染され得る。これらの一次メラノサイトは、第一に、REL ORFを発現するレトロウイルスを用いて感染され、次いで安定した形質転換について選択される。形質導入株は、Cre-GFPまたはGFP単独を発現するRCASウイルスでの感染の後、上記の実験に供される。

10

【0079】

(ゲノムワイドでの発現プロファイルを確立することによる候補RELの作用機構)

細胞培養物およびSCID外植片における機能性研究に加えて、候補RELの作用機構は、Cre励起ありおよびCre励起なしでRELで形質導入したメラノサイト培養物のゲノムワイドでの発現プロファイルを確立することによって明らかになり得る。遺伝子活性化のパターンを捜すことによって、実施者は、作用機構を解明し得る。例えば、細胞周期遺伝子の活性化は、細胞周期調節因子としての役割を示唆し得るか、またはp53依存性経路およびFAS依存性経路における公知のアポトーシスメディエーターの開始(turning on)は、アポトーシスにおける役割を示し得る。さらに、この種の実験から作成された情報ベースは、REL遺伝子についてのシグネチャプロファイル(signature profile)の作成に有用であり、そして上記の原発性腫瘍の選別を容易にすることを証明し得る。

20

【0080】

(遺伝子導入を介した候補REL遺伝子のインビボでの確認)

本明細書中に記載される、最初の機能性特徴づけに基づき収集したREL遺伝子候補が、インビボでのこれらの黒色腫遺伝子の能力についてアッセイされ得る。当然、このPTSのクローニングおよび配列決定から上記の候補遺伝子の特徴づけまでの種々の工程が、他の癌の型における、他の腫瘍維持遺伝子について適用可能である。すなわち、この黒色腫系において発見された遺伝子は、これらが他の細胞型において癌を作製または維持する能力についてアッセイされ得る。同様に、他の癌系において発見された遺伝子が、黒色腫系または他の癌系において試験され得る。例えば、REL遺伝子は、インビボでの確認のために選択され得、続いて、インビボでの遺伝子導入および特徴づけの努力が開始され得る。簡単には、REL遺伝子のメラノサイト特異的発現は、チロシナーゼプロモーターエレメントおよびチロシナーゼエンハンサーエレメント(Tyr-RELと示される)の使用によって達成され得る。Tyr-REL導入遺伝子がメラノサイトの増殖および生存ならびにメラノサイトの悪性形質転換に対して影響を与える能力は、野性型または腫瘍抑制因子ヌルのバックグラウンド(例えば、Ink4a/Arf+/+またはInk4a/Arf-/-バックグラウンド)を用いてインビボで試験され得る。

30

40

【0081】

(トランスジェニックコロニーの作製および確立)

チロシナーゼエンハンサー-プロモーターエレメントを用いて、REL発現は、メラノサイトに指向される。このプロモーターは、Tyr-RASトランスジェニック動物、Tyr-サイクリンD1トランスジェニック動物、Tyr-CDK4トランスジェニック動物およびTyr-rtTAトランスジェニック動物を作製するために首尾よく用いられてきた。このプロモーターがこのレポーター遺伝子のコピー数依存性発現を与えることが示されてきた。このREL ORFは、最初に、CPV1ベクター5'からSV40 PA

50

へとサブクロニングされる。次に、このREL ORF/PA+カセットが、単離され、そしてこのチロシナーゼエンハンサー/プロモーターエレメントにライゲートされる。これらのコロニーの確立を促進および簡素化するために、これらのTyr-REL構築物が、FVBバックグラウンドの、精管切除されたInk4a/Arf-/-の雄によって受精された野生型FVBの雌から回収された受精卵に、直接注入される。PCRベースのスクリーニングを使用する遺伝子型決定の提供が用いられ得る。重要なことに、最初の始祖およびF1祖先是、PCRよりも、サザンブロット分析によって確認され得る。いったん始祖株が確立されると、これらは、Ink4a/Arf+/-交配相手に交雑されて、Ink4a/Arf+/+およびInk4a/Arf-/-のバックグラウンドのRELトランスジェニックマウスを作製し得る。この交配図は、所望される遺伝子型の動物を作製する前の1世代の交配を除去し、これによって、時間、労力、および籠の経費を削減する。

10

【0082】

(インビボでの導入遺伝子発現の多様化(verification))

導入遺伝子の文書化およびサザンブロット分析によるコピー数の決定に加えて、REL転写物が、RNAインサイチュハイブリダイゼーションによって、標的化された細胞型(例えば、メラノサイト)において産生されることが確認され得る。約300bpの平均サイズの挿入部を含むリポベクターが、構築され得、そしてノーザンブロット分析によって、反復配列がないと判断される。3'プロモーターを用いたインビトロでの転写は、この組織切片へのハイブリダイゼーションのために必要なアンチセンスRNAプローブを作製するために用いられ得、そしてコントロールは、そのセンス転写物であり得る。ジゴキシゲン標識化リボプローブ(ribrprobe)および放射標識化リボプローブの両方が用いられ得る。放射標識化リボプローブの感度はより良好であり、一方、このジゴキシゲン標識インサイチュハイブリダイゼーションを用いる利点は速度である。具体的には、このトランスジェニック同腹仔および非トランスジェニック同腹仔は、皮膚サンプルから生検され得る。組織は、4%パラホルムアルデヒド中で24時間にわたり固定化され、17%スクロース溶液中で48時間にわたり平衡化され、OCT^TMの容器に入れられ、次いで、LN2中で固定化され、凍結されて(snapped-frozen)、OCT組織ブロックを作製する。これらの皮膚OCTブロックが、5μmの厚さに断片化され、そしてRNAインサイチュハイブリダイゼーションに用いられ得る。連続的切片が、形態学およびメラノサイトに関して抗TRP1 IHCを評価するためにH&Eで染色される。

20

30

【0083】

連続的Tyr-RELトランスジェニックに対する代替物として、誘導可能な系(例えば、tetオペロンプロモーター(TetO))の制御下でREL遺伝子を有するRELトランスフェニックマウスが、作製され得る。一旦、TetO-RELマウスが、確立されると、その創始者は、存在するTyr-rtTAトランスジェニック株に交雑され得る。Tyr-rtTA導入遺伝子およびTetO-REL導入遺伝子の両方を収容するマウスが、それらの飲み水へのドキシサイクリンの投与により誘導されて、REL遺伝子を発現し得る。この条件付発現系は、上記のように、その親のOFFドキシサイクリン黒色腫細胞株が誘導された、誘導性RAS発現黒色腫モデルを作製するために首尾良く使用されてきた。具体的には、二重のトランスジェニックマウス(Tyr/TetO-REL)が、誘導されて、真皮メラノサイトにおいて、出生後にREL遺伝子を発現し得る。標的細胞におけるREL転写物の発現は、上記のように、ドキシサイクリン飲み水での誘導の前後の皮膚の生検のインサイチュハイブリダイゼーションによって確認され得る。一旦、確認されると、構成的Tyr-RELトランスジェニックのための続く下記の実験が、誘導性Tyr/TetO-RELトランスジェニック動物と同様に、実施され得る。

40

【0084】

(プレ悪性(pre-malignant)メラノサイトにおけるRELの、インビトロでの機能的特徴付け)

50

非形質転換細胞におけるREL遺伝子の機能を決定するために、プレ悪性黒色腫におけるその過剰発現の生物学的結果物が、マウスメラノサイトの初代培養において試験され得る。具体的には、親生のマウスが屠殺されて、皮膚が回収される。滅菌の後、真皮線維芽細胞による汚染を防ぐために、その表皮がこの真皮から分離される。次いで、この表皮層が、機械的に破壊され、細かく切られ、そしてマイトマイシン処理され、増殖停止したXB2ケラチノサイトで構成されるフィーダー(feeder)細胞層上にプレートされる。約2週間後、サブスクリーニングを用いて、純粋なメラノサイト培養物が確立され得る。この技術を用いて、例えば、(REL+, Ink4a/Arf+/-) x (REL-, Ink4a/Arf+/-)交雑により産生された同腹仔から、初代培養物が作製されて、全ての遺伝子型のメラノサイトを得ることが可能となる。一旦、これらの初代培養物が、確立されると、これらは、本明細書中に記載されるような、これらの増殖特性、生存特性、移動特性、および固定化特性を特徴付けるために設計されたアッセイに供され得る。さらに、インタクトな死亡率経路を保有する活性化RASが、早期老衰を誘導することが示されているので、老衰は、Ink4a/Arf+/-およびInk4a/Arf-/-バックグラウンドのREL発現細胞における形態学(平坦な外観、染色されたメラノサイトにおける過剰メラニン形成(hypermelanization)、および増殖停止)によってモニターされ得る。

【0085】

(インビボでのREL誘導黒色腫の特徴づけ)

Tyr-RELトランスジェニックマウスにおける黒色腫発生は、長期にわたり、慎重に追跡される。耳および尻尾のような場所(好ましくは、FVBバックグラウンドのTyr-RASトランスフェニックマウスにおける発生場所)における連続的な皮膚生検が、プレ悪性病変、および初期黒色腫を検出するために、小集団の動物(例えば、各々の遺伝子型の群において10匹)において、毎月、実施され得る。一旦、臨床的に明白な腫瘍が出現すると、摘出的生検または切断的生検が、実施されて、病原性特徴付けのためのサンプルおよび細胞株の確立を得ることが可能となる(以下を参照のこと)。これらは、メラノサイトについての抗TRP1染色、増殖インデックスについてのKi67、アポトーシスについてのTUNEL、脈管構造についてのPECAM染色を含み得る。さらに、REL発現は、ノーザンブロット分析によって文書化され得る。さらに、RASの上流であると考えられるREL遺伝子について、腫瘍溶解物が、RAF結合RASについてのIP-ウェスタンによって活性化RAS活性について分析され得る。さらに、腫瘍促進および抑制に関連することが知られているloci(p53およびPTENを含む)が、試験され得る。

【0086】

(REL誘導性黒色腫のゲノム性特徴付け)

さらなるレベルの確認として、ヒト黒色腫に関連するシンテニー領域での変化を同定するための比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)によって、RAS誘導性黒色腫内で供されるゲノム全体の変化が試験され得る。本発明者らのInk4a/Arf-/-およびp53変異体のバックグラウンドの両方における、構成性黒色腫モデルおよび誘導性黒色腫モデルの両方において誘発される27匹のマウス黒色腫の事前の分析は、第8染色体、第11染色体、第15染色体(全て、ヒト黒色腫において増幅されることが知られている領域にシンテニーな(syntenic)領域を含む)の頻繁な増加を明らかにした。例えば、第11染色体は、EGFR(ヒト黒色腫において過剰発現されることが知られているRTK)を含む。遺伝子上で、別の候補物は、ヒトにおける末端部黒子黒色腫に関連した。さらに、REL誘導性黒色腫におけるゲノム変化は、CGHによって試験され得る。これらの研究は、ヒト黒色腫において変化した領域にシンテニーな領域において誘導されたRELの染色体の増加および損失を特徴付ける。さらに、REL誘導性腫瘍におけるゲノム変化のプロファイルは、RAS経路の活性化を伴う共通の変化を同定するために、RAS誘導性黒色腫のそのプロファイルと比較され得る。

【0087】

(インビトロでの、非形質転換黒色腫および形質転換黒色腫における R E L 遺伝子の分子の特徴付け)

R E L 遺伝子産物の作用機構をさらに特徴付けるために、原発性腫瘍が、生化学的研究のための細胞株を確立するための培養に適用され得る。例えば、R E L 垂細胞がどのように R A S - M A P K および P 1 3 - K 経路の活性に影響するのかを理解するために、その局在化が、評価され得る。そのような研究は、ウサギ抗 R E L 抗血清の作製から始まり得る。一旦、利用可能になると、R E L を発現するプレ悪性黒色腫および悪性黒色腫の両方における、R E L についての免疫蛍光染色は、例えば、I n k 4 a / A r f + / + および I n k 4 a / A r f - / - バックグラウンドの両方において、細胞周期に関して試験され得る。R A S - M E K - M A P K / E R K 経路の活性化は、M A P K 活性についてのキナーゼアッセイを使用することによって評価され得る。

10

【0088】

最終的には、これらのトランスジェニックモデルから得られる結果は、本明細書中に記載されるように誘導されるバイオインフォマティックデータと組み合わせられ得る。このことは、腫瘍形成(特に黒色腫形成)のプロセスにおける R A S シグナル伝達経路を表す補助となり得る。この結果はまた、この経路の成分の間の機能的関係および遺伝的關係、ならびに全体的発現パターンがその活性および非活性のいずれを示し得るかを評価することの補助になり得る。同じアプローチが、他の誘導性癌関連シグナル伝達分子が用いられる系における他のシグナル伝達経路に適用され得る。

【0089】

20

本発明は、本発明の実施のための様式の特定の例に対する参考によって記載されている。本発明の開示の範囲において、多数の改変および変化が、本発明の意図される範囲から逸脱することなく、例示される特定の実施形態に対してなされ得ることは、当業者によって理解される。そのような改変は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

【0090】

本明細書中に言及されるすべての刊行物、特許、特許出願は、夫々の個々の刊行物、特許、または特許出願が、詳細かつ個々に参考として援用されると示されているかのように、その全体が、本明細書中に参考として援用される。

【0091】

30

他の実施形態は、以下の特許請求の範囲にある。

【図面の簡単な説明】

【0092】

【図1】図1は、ヒトの 9 p 2 1 遺伝子座の概略図である。

【図2】図2は、T e t 調節系の概略図である。

【図3A】図3Aは、飲料水中のドキシサイクリンの使用中止後のドキシサイクリン処置された T y r / T e t - R a s I n k 4 a / A r f - / - マウス (p 1 6 ^{I N K 4 a} および p 1 9 ^{A R F} の両方についてヌル) における原発性皮膚黒色腫の退縮を示す顕微鏡写真である。

【図3B】ドキシサイクリンの誘導および使用中止の間の T y r / T e t - R A S I n k 4 a / A r f - / - マウス (p 1 6 ^{I N K 4 a} および p 1 9 ^{A R F} の両方についてヌル) における腫瘍サイズの測定のグラフ図である。

40

【図4】図4は、ドキシサイクリンの存在下または非存在下で T y r / T e t - R A S I n k 4 a / A r f - / - 黒色腫細胞 (p 1 6 ^{I N K 4 a} および p 1 9 ^{A R F} の両方についてヌル) との同時培養における初期継代初代ヒト臍帯血管内皮細胞 (H U V E C) の顕微鏡写真である。E G M - 2 = 完全に補充された培地; E B M - 2 + 2 % F C S = 2 % F C S を有する基礎培地; E B M - 2 + 0 % F C S = 無血清基礎培地。H U V E C 細胞の生存性の増強が、ドキシサイクリンの存在下で腫瘍細胞と共有される培地中に見出される。

【図5】図5は、G F P レトロウイルスが感染した R 5 4 5 細胞の顕微鏡写真である。

50

【図6】図6は、MuLV組み込みのサザンブロット分析を示す顕微鏡写真である。レーン1および2 = 感染；レーン3 = 非感染。

【図7】図7は、親の非感染R545細胞株が、ドキシサイクリン上に維持されているSCIDマウスにおいて皮膚の腫瘍を生成することを示す、顕微鏡写真である。上部：腫瘍#11（表1を参照のこと）、MuLV感染細胞由来の0.4cm x 0.4cmを測定、OFFドキシサイクリン誘導；下部：ドキシサイクリン上の非感染親R545細胞由来の1.2cm x 1.3cmの腫瘍を測定。

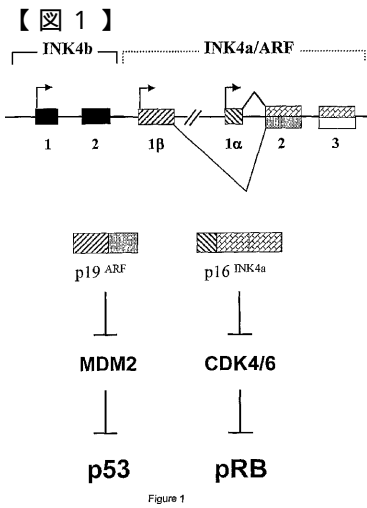
【図8】図8は、黒色腫におけるRAS活性を補完し得る遺伝子の遺伝的同定についての模式的な実験フローチャートである。

【図9】図9は、プロウイルスでタグ化された配列のクローニングのためのIPCR方法論の概略図である。B = BamHI；S = SacI。

【図10】図10は、MuLVタグ化ras等価遺伝子座(REL)の最初の特徴付けおよび優先化についての模式的な実験フローチャートである。

【図11】図11は、詳細なインピボ分析のための一次候補を同定する目的を有するRELの機能的特徴づけについての模式的な実験フローチャートである。

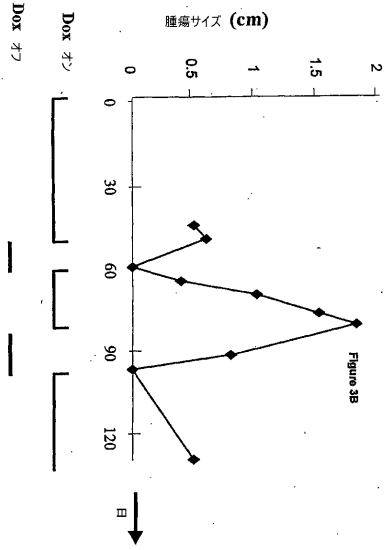
10



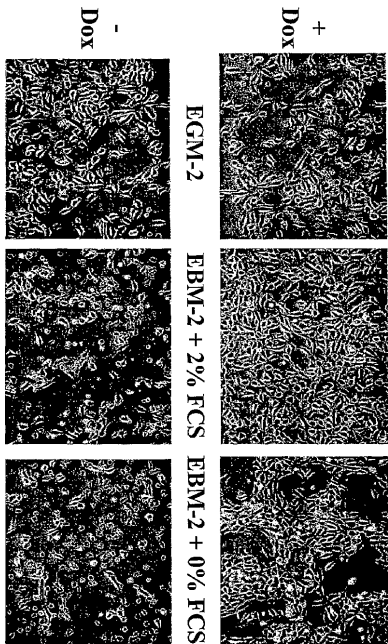
【図3A】



【図3B】



【図4】

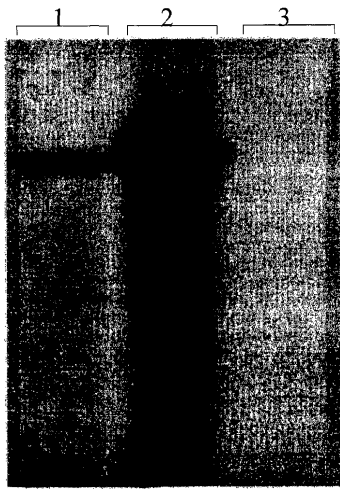


【図5】



【 図 6 】

Figure 6



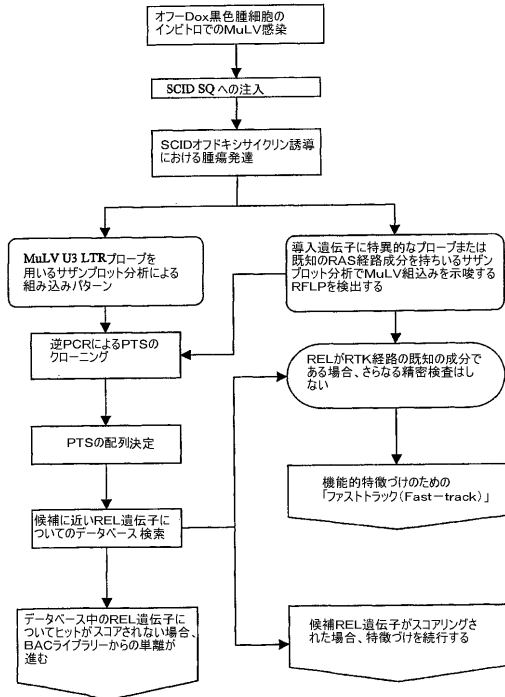
【 図 7 】

Figure 7



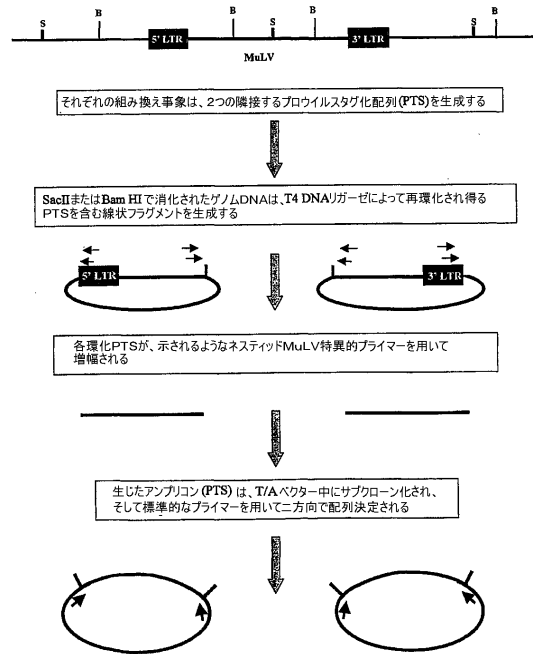
【 図 8 】

Figure 8



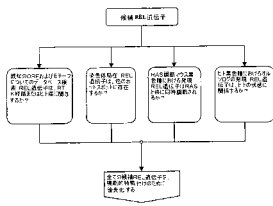
【 図 9 】

Figure 9

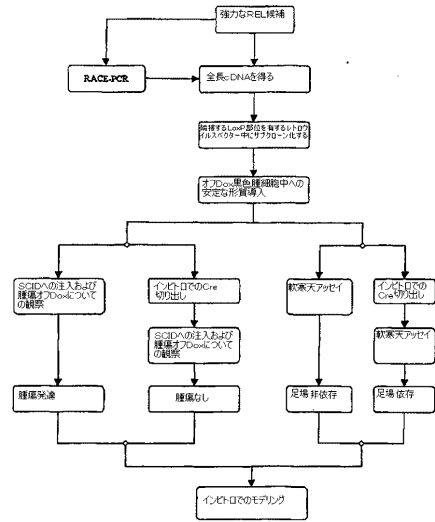


【図10】

Figure 10



【図11】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 デビンホ, ロナルド エイ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 4 5, ブルックライン, ボイルストン ストリー
ト 5 6 5

(72)発明者 チン, リンダ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 4 5, ブルックライン, ボイルストン ストリー
ト 5 6 5

審査官 引地 進

(56)参考文献 特表平06-502995(JP,A)
国際公開第99/047660(WO,A1)
TIBS, 1998年, Vol.23, pp.291-296
Carcinogenesis, 2000年, Vol.21, No.5, pp.865-869
Cancer Res., 1996年, Vol.56, pp.3075-3086
Oncogene, 2000年, Vol.19, pp.5964-5972
Nature, 1999年, Vol.400, pp.468-472

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00- 3/00

C12N 15/00-15/90

BIOSIS/WPI(DIALOG)

PubMed

Science Direct

JSTPlus(JDreamII)

专利名称(译)	基因的鉴定和表征		
公开(公告)号	JP4170766B2	公开(公告)日	2008-10-22
申请号	JP2002578422	申请日	2002-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	达那-法伯癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	达纳 - 法伯癌症研究所有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	达纳 - 法伯癌症研究所有限公司		
[标]发明人	デピンホロナルドエイ チンリンダ		
发明人	デピンホ, ロナルド エイ. チン, リンダ		
IPC分类号	C12Q1/68 A01K67/027 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/566 C12N15/09 C12N15/85 C12Q1/6886		
CPC分类号	C12N15/8509 A01K67/0275 A01K67/0276 A01K2217/05 A01K2217/075 A01K2217/20 A01K2227/105 A01K2267/0331 A01K2267/0393 C12N2799/027 C12N2800/30 C12N2830/008 C12Q1/6886 C12Q2600 /156 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.A A01K67/027 C12N5/00.B G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A		
代理人(译)	夏木森下		
审查员(译)	进Hikichi		
优先权	60/279506 2001-03-28 US		
其他公开文献	JP2004535786A JP2004535786A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于鉴定和表征与表型相关的基因(例如癌症和细胞活力)的方法和材料。本发明还提供了可用于这些方法的细胞和转基因非人类哺乳动物。在第一方面,本发明提供了一种癌症(例如,皮肤癌(例如,黑色素瘤),肺癌,前列腺癌,乳腺癌,结肠直肠癌,肝癌,胰腺癌,脑肿瘤,睾丸癌,卵巢癌,子宫癌,子宫癌,肾癌,甲状腺癌,膀胱癌,食道癌,血液癌(例如,白血病),或淋巴瘤)-相关基因相同提供一种确定方法。

番号	注射前の腫瘍の大きさ (cm)		
	8日	12日	20日
1	0 x 0	0 x 0	0.3 x 0.2
2	0.2 x 0.2	0.2 x 0.3	0.2 x 0.3
3	0 x 0	>0 x 0	0.3 x 0.3
4	>0 x 0	0.1 x 0.1	0.2 x 0.1
5	0.2 x 0.2	0.3 x 0.3	0.4 x 0.4
6	>0 x 0	0.4 x 0.5	0.4 x 0.5
7	0.5 x 0.4	0.5 x 0.4	0.6 x 0.5
8	0.1 x 0.1	0.2 x 0.1	0.3 x 0.3
9	>0 x 0	0.8 x 0.2	0.8 x 0.3