

(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2017-536088

(P2017-536088A)

(43) 公表日 平成29年12月7日(2017.12.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 5/095 (2010.01)</b>	C12N 5/095 ZNA	2G045
<b>GO1N 33/15 (2006.01)</b>	GO1N 33/15 Z	4B029
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 D	4B063
<b>GO1N 33/48 (2006.01)</b>	GO1N 33/48 M	4B065
<b>C12N 5/00 (2006.01)</b>	GO1N 33/48 P	4C084

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-516766 (P2017-516766)  
 (86) (22) 出願日 平成26年9月24日 (2014. 9. 24)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年5月17日 (2017. 5. 17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/057173  
 (87) 国際公開番号 WO2016/048299  
 (87) 国際公開日 平成28年3月31日 (2016. 3. 31)

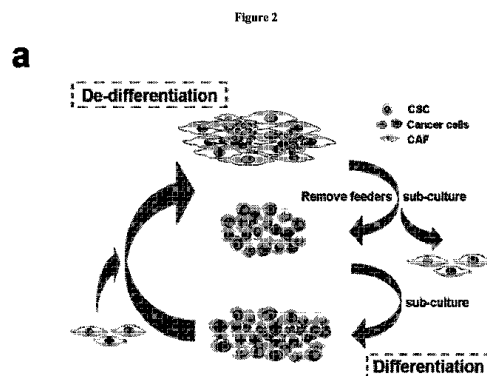
(71) 出願人 503209342  
 ナショナル タイワン ユニバーシティ  
 台湾 106 タイペイ ルーズベルト  
 ロード セクション 4 ナンバー1  
 (71) 出願人 517101126  
 アンドリュウ マン チュン ウー  
 台湾, タイペイ, 10617, ルーズベル  
 ト ロード, セクション 4, ナンバー  
 1  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がん幹細胞の幹細胞性を維持するがん関連線維芽細胞

(57) 【要約】

がん幹細胞を生産し、かつ維持するための、がん関連線維芽細胞 (CAF) とがん細胞を含むインビトロ共培養系と、がん細胞の幹細胞性を低下させることのできる薬剤を同定するためのその使用。本願において、CAFががん幹細胞の生産および/または維持を容易にするために用いる傍分泌ネットワークと、予後予測を目的とするとともに、所定の治療に応答しやすいがん患者の同定を目的とした、そのような傍分泌ネットワークの構成要素の使用も開示される。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

がん関連線維芽細胞（CAF）と、がん細胞の集団とを含むインビトロ共培養系であって、前記CAFはCD90<sup>+</sup>であり、前記CAFは前記共培養系の中でがん細胞の幹細胞性を維持する、インビトロ共培養系。

## 【請求項 2】

前記CAFががん患者から得られる、請求項2に記載のインビトロ共培養系。

## 【請求項 3】

前記がん患者が、肺がん患者、乳がん患者、腎臓がん患者、前立腺がん患者、卵巣がん患者、皮膚がん患者、子宮頸がん患者、大腸がん患者、肝臓がん患者、メラノーマ患者、口腔がん患者または膵臓がん患者である、請求項3に記載のインビトロ共培養系。

10

## 【請求項 4】

前記がん患者が非小細胞肺がん患者である、請求項3に記載のインビトロ共培養系。

## 【請求項 5】

前記がん細胞の集団が、肺がん細胞、乳がん細胞、腎臓がん細胞、前立腺がん細胞、卵巣がん細胞、皮膚がん細胞、子宮頸がん細胞、大腸がん細胞、肝臓がん細胞、メラノーマ細胞、口腔がん細胞または膵臓がん細胞を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載のインビトロ共培養系。

## 【請求項 6】

前記がん細胞が非小細胞肺がん細胞である、請求項5に記載のインビトロ共培養系。

20

## 【請求項 7】

がん幹細胞を含み、前記がん幹細胞がOct3/4<sup>+</sup>およびNanog<sup>+</sup>である、請求項1～6のいずれか1項に記載のインビトロ共培養系。

## 【請求項 8】

がん幹細胞（CSC）をインビトロで生産する、または維持する方法であって、がん細胞の集団を用意し；

CD90<sup>+</sup>であるがん関連線維芽細胞（CAF）を用意し；そして

前記がん細胞の集団を前記CAFと共培養して、培養物中でがん幹細胞を生産する、または維持することを含む、方法。

## 【請求項 9】

前記がん細胞の集団が、確立されたがん細胞系に由来する、請求項8に記載の方法。

30

## 【請求項 10】

前記がん細胞の集団が、がん患者から得られた原発がん細胞である、請求項8に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記がん細胞の集団が、肺がん細胞、乳がん細胞、腎臓がん細胞、前立腺がん細胞、卵巣がん細胞、皮膚がん細胞、子宮頸がん細胞、大腸がん細胞、肝臓がん細胞、メラノーマ細胞、口腔がん細胞または膵臓がん細胞を含む、請求項8～11のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記がん細胞の集団が非小細胞肺がん細胞を含む、請求項11に記載の方法。

40

## 【請求項 13】

前記CAFががん患者から得られる、請求項8～12のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記がん患者が、肺がん患者、乳がん患者、腎臓がん患者、前立腺がん患者、卵巣がん患者、皮膚がん患者、子宮頸がん患者、大腸がん患者、肝臓がん患者、メラノーマ患者、口腔がん患者または膵臓がん患者である、請求項12に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記CAFが、非小細胞肺がん患者から得られる、請求項14に記載の方法。

## 【請求項 16】

50

前記CAFが、確立されたCAF細胞系に由来する、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

前記がん幹細胞がOct3/4<sup>+</sup>およびNanog<sup>+</sup>である、請求項8～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

抗がん剤を同定する方法であって、  
薬候補の存在下でがん細胞と、CD90<sup>+</sup>であるがん関連線維芽細胞(CAF)を共培養し；

共培養物中のがん細胞の幹細胞性のレベルを決定し；

共培養物中のがん細胞の幹細胞性のレベルが、前記薬候補の不在下でのがん細胞とCAFの共培養物中のがん細胞の幹細胞性のレベルと比較して低下している場合に、前記薬候補が抗がん剤であると同定することを含む、方法。

10

【請求項19】

前記がん細胞が、確立されたがん細胞系に由来する、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記がん細胞が、がん患者から得られた原発がん細胞である、請求項18に記載の方法。

【請求項21】

前記がん細胞が、肺がん細胞、乳がん細胞、腎臓がん細胞、前立腺がん細胞、卵巣がん細胞、皮膚がん細胞、子宮頸がん細胞、大腸がん細胞、肝臓がん細胞、メラノーマ細胞、口腔がん細胞または膵臓がん細胞である、請求項18～20のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項22】

前記がん細胞が非小細胞肺がん細胞である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記CAFががん患者から得られる、請求項18～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

前記がん患者が、肺がん患者、乳がん患者、腎臓がん患者、前立腺がん患者、卵巣がん患者、皮膚がん患者、子宮頸がん患者、大腸がん患者、肝臓がん患者、メラノーマ患者、口腔がん患者または膵臓がん患者である、請求項23に記載の方法。

30

【請求項25】

前記がん患者が非小細胞肺がん患者である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記CAFが、確立されたCAF細胞系に由来する、請求項18～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

前記がん細胞の幹細胞性のレベルが、前記共培養物中のがん幹細胞(CSC)の数で表わされ、ここで前記CSCはOct3/4<sup>+</sup>及びNanog<sup>+</sup>である、請求項18～27のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項28】

前記がん細胞の幹細胞性のレベルが、共培養物中の前記がん細胞の薬剤耐性によって表わされる、請求項18～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

前記がん細胞の幹細胞性のレベルが、前記CAF中で発現しているIGF-II、HGF、LIFおよびSDF1の1つ以上のレベルによって、または前記がん細胞中で発現しているIGF1R、IGF2R、LIFR、CXCR4およびNanogの1つ以上のレベルによって、またはその両方によって表わされる、請求項18～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

50

前記がん細胞の幹細胞性のレベルが、前記共培養物中に形成されたがん細胞コロニー中の全細胞に対するCSCの比によって表わされる、請求項18～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項31】

がん患者の生存率を評価する方法であって、

がん患者の腫瘍組織を用意し；

前記腫瘍組織中のがん関連線維芽細胞(CAF)で発現しているIGF-IIのレベルを測定し；

前記腫瘍組織中のがん細胞で発現しているIGF1R、またはNanog、またはその両方のレベルを測定し；そして

CAFの中で発現しているIGF-IIのレベルと、前記がん細胞中で発現しているIGF1R、またはNanog、またはその両方のレベルとに基づいて前記がん患者の生存率を評価すること

を含み、

IGF-IIのレベルと、IGF1R、またはNanog、またはその両方のレベルが所定の値よりも高いことが、低い生存率を示し、IGF-IIのレベルと、IGF1R、またはNanog、またはその両方のレベルが所定の値よりも低いことが、良好な生存率を示す、方法。

【請求項32】

IGF-IIのレベルと、IGF1R、またはNanog、またはその両方のレベルを免疫組織化学によって測定する、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

前記生存率が全生存率である、請求項31または32に記載の方法。

【請求項34】

前記生存率が無再発生存率である、請求項31または32に記載の方法。

【請求項35】

前記がん患者が、肺がん、乳がん、腎臓がん、前立腺がん、卵巣がん、皮膚がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、メラノーマ、口腔がんまたは膵臓がんを有する、請求項31～34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項36】

前記がん患者が非小細胞肺がんを有する、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

がん細胞の幹細胞性を評価するためのキットであって、

IGF-II、HGF、LIF、SDF1、DLL1、Jagged1、IBP5、トロンスポンジン1、PLAUまたはデコリンを検出するための第1の薬剤と、

IGF1R、IGF2R、LIFR、CXCR4、HGFR、Notch3またはNanogを検出するための第2の薬剤と

を含む、キット。

【請求項38】

前記第1の薬剤、または前記第2の薬剤、またはその両方が抗体である、請求項37に記載のキット。

【請求項39】

前記第1の薬剤が、IGF-IIに特異的な抗体である、請求項37または38に記載のキット。

【請求項40】

前記第2の薬剤が、IGF1RまたはNanogに特異的な抗体である、請求項37～39のいずれか1項に記載のキット。

【請求項41】

前記第2の薬剤が、IGF1Rに特異的な抗体である、請求項40に記載のキット。

【請求項42】

10

20

30

40

50

N a n o gを検出するための第3の薬剤をさらに含む、請求項41に記載のキット。

【請求項43】

前記第3の薬剤が、N a n o gに特異的な抗体である、請求項42に記載のキット。

【請求項44】

肺がんを治療するための方法であって、治療を必要とする対象に有効量の抗肺がん剤を投与することを含み、前記対象が、がん関連線維芽細胞中のI G F - I Iのレベルが上昇し、そしてがん幹細胞中のI G F 1 RまたはN a n o gのレベルが上昇している肺がん患者である、方法。

【請求項45】

前記抗肺がん剤が、I G F - I I / I G F 1 Rシグナル伝達経路に干渉する薬である、請求項44に記載の方法。

10

【請求項46】

前記薬が、I G F - I IまたはI G F 1 Rに特異的に結合する抗体である、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

がん細胞の幹細胞性を評価するための画像ベースハイコンテンツアッセイ (image-based high content assay)であって、

( i ) がん細胞とがん関連線維芽細胞の両方を含むサンプルを用意し；

( i i ) 前記サンプルを、N a n o g検出用であって第1の標識と直接または間接的に複合化している第1の薬剤で染色し；

20

( i i i ) 前記サンプルを、C D 9 0検出用であって前記第1の標識とは異なる第2の標識と直接または間接的に複合化している第2の薬剤で染色し；

( i v ) 前記第1の薬剤と前記第2の薬剤で染色した前記サンプルを画像化し；

( v ) 前記第1の標識と前記第2の標識から放出される信号に基づき、そのサンプル中のがん細胞の幹細胞性を決定することを含む、アッセイ。

【請求項48】

前記第1の標識、または前記第2の標識、またはその両方が蛍光染料である、請求項47に記載の画像ベースハイコンテンツアッセイ。

【請求項49】

前記サンプルを核検出用の第3の薬剤で染色することをさらに含む、請求項47または48に記載の画像ベースハイコンテンツアッセイ。

30

【請求項50】

前記第3の薬剤がD A P Iである、請求項49に記載の画像ベースハイコンテンツアッセイ。

【請求項51】

前記第1の薬剤、または前記第2の薬剤、またはその両方が抗体である、請求項47～50のいずれか1項の画像ベースハイコンテンツアッセイ。

【請求項52】

ステップ( i i )は、前記サンプルを、N a n o gに特異的な抗体である前記第1の薬剤と反応させ、前記サンプルに結合した前記抗体を、T R I T Cで標識した第2の抗体と複合化することによって行われる、請求項51に記載の画像ベースハイコンテンツアッセイ。

40

【請求項53】

前記第2の薬剤が、F I T Cで標識した抗C D 9 0抗体である、請求項51または52に記載の画像ベースハイコンテンツアッセイ。

【請求項54】

ステップ( v )が、がん細胞コロニーを同定し、1つ以上のがん細胞コロニーの幹細胞性を評価することによって行われ、ここで前記幹細胞性は、各がん細胞コロニー中の全細胞数に対するN a n o g陽性細胞の数の比で表わされる、請求項47～53のいずれか1

50

項に記載の画像ベースハイコンテンツアッセイ。

【請求項 5 5】

前記サンプルが、前記がん細胞と前記がん関連線維芽細胞の共培養物である、請求項 4 7 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の画像ベースハイコンテンツアッセイ。

【請求項 5 6】

前記共培養物が候補化合物をさらに含む、請求項 5 5 に記載の画像ベースハイコンテンツアッセイ。

【請求項 5 7】

前記候補化合物が抗がん剤であるかどうかを決定することをさらに含み、前記候補化合物の不在下におけるがん細胞の幹細胞性のレベルと比較して、前記候補化合物の存在下におけるがん細胞の幹細胞性のレベルが低下していることは、前記候補化合物が抗がん剤であることを示す、請求項 5 6 に記載の画像ベースハイコンテンツアッセイ。

10

【請求項 5 8】

前記がん細胞が、肺がん細胞、乳がん細胞、腎臓がん細胞、前立腺がん細胞、卵巣がん細胞、皮膚がん細胞、子宮頸がん細胞、大腸がん細胞、肝臓がん細胞、メラノーマ細胞、口腔がん細胞または膵臓がん細胞である、請求項 4 7 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載の画像ベースハイコンテンツアッセイ。

【請求項 5 9】

前記がん細胞が非小細胞肺がん細胞である、請求項 5 8 に記載の画像ベースハイコンテンツアッセイ。

20

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

肺がんは世界中で最も一般的な致死性悪性腫瘍である。Siegel他、CA Cancer J. Clin. 第62巻、10~29ページ(2012年)。ドライバー遺伝子同定と特異的標的療法が成功したおかげで多くの肺がん患者がよい初期応答を示している。しかし大半の患者は最終的に薬剤耐性が進んで1年以内に再発する。Kobayashi他、N. Engl. J. Med. 第352巻、786~792ページ(2005年)；Sequist他、J. Clin. Oncol. 第25巻、587~595ページ(2007年)。現在の抗がん戦略は、固形腫瘍は1つの組織化された不均一な細胞集団であるのに、従来からの大半の介入行為が不特定のタイプのがん細胞に狙いを定めていることを示している。Eg 30  
 eblad他、Dev. Cell 第18巻、884~901ページ(2010年)。腫瘍の微小環境(またはニッチ)を形成する複雑な細胞-細胞相互作用には、がん幹/開始細胞(CSC)と名づけられた細胞小集団が関与している。これらの細胞は、大半の悪性腫瘍の原因であると考えられており、CSCと腫瘍ニッチの両方が、がんの再発、転移、薬剤耐性で主要な役割を果たしている。Eramo他、Oncogene 第29巻、4625~4635ページ(2010年)；Joyce他、Nat. Rev. Cancer 第9巻、239~252ページ(2009年)；Reya他、Nature 第414巻、105~111ページ(2001年)；McCarthy、Nat. Rev. Cancer 第12巻、152~153ページ(2012年)。

【0 0 0 2】

CSC理論は、真の多能性と非対称分裂能力を有する腫瘍形成性幹様細胞の小集団の存在に基づいている。そのためこれらの細胞は自己再生して特定のタイプの細胞に分化し、がんへと発達することが可能になる。Reya他、2001年；Wang他、Trends Cell Biol. 第15巻、494~501ページ(2005年)。「がんの幹細胞性」の表現型ががん形成の裏にある駆動力となっている可能性があり(Eramo他、2010年)、CSCが化学耐性または放射線耐性と転移に寄与している可能性がある(Malanchi他、Nature 第481巻、85~89ページ(2012年)；Pardal他、Nat. Rev. Cancer 第3巻、895~902ページ(2003年)；Clevers他、Nat. Med. 第17巻、313~319ページ(2011年)。CSCは、白血病だけでなく、肺がんを含むさまざまな固形腫瘍にも存在していることを示す証拠が増えてきている。Zhang他、Cell 第148巻、259~272ページ(2012年)；Kim他、Cell 第121巻、823~835ページ(2005年)；Eramo他、Cell Death Differ. 第15巻、504~514ページ(2008年)。肺CSCは、CD133やアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)などの特異的マーカーを通じて副集団(SP)から単離できる(Ho 50

他、Cancer Res. 第67巻、4827～4833ページ（2007年）、Vermeulen他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第105巻、13427～13432ページ（2008年）；Sullivan他、Cancer Res. 第70巻、9937～9948ページ（2010年））が、詳細に研究するためCSCの幹細胞性の特徴をインビトロで維持することは相変わらず難しい（Ho他、2007年と、Bertolini他、2009年）。大半の幹細胞（例えば胚性幹細胞、人工多能性幹細胞のほか、肺幹細胞でさえも）は、不活発な状態を維持するのに、微小環境での直接的な接触または「フィーダー細胞」の存在に頼っている。Fuchs他、2004年；Sneddon他、2007年；Ling他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第103巻、9530～9535ページ（2006年）；Takahashi他、Cell 第126巻、663～676ページ（2006年）；Thomson他、1998年；Williams他、Nature 第336巻、684～687ページ（1988年）。興味深いことに、最近の発見も、腫瘍の微小環境が、炎症性シグナルまたはトランスフォーミング増殖因子（TGF- $\beta$ ）シグナルのもとで腫瘍形成を促進している可能性のあることを示している。Chaffer他、Cell 第154巻、61～74ページ（2013年）；Schwitalla他、2013年；Ghajar他、Nat. Cell Biol. 第15巻、807～817ページ（2013年）。ヒト肺がんでは、腫瘍の微小環境は、がん関連線維芽細胞（cancer-associated fibroblast）（CAF）を豊富に含んでいる。Kalluri他、2006年。CAFは、形態と機能が正常な線維芽細胞と異なっており、がんが形成される間に活性化されて、がん細胞とのクロストークに応答する。Kojima他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第107巻、20009～20014ページ（2010年）；Bremnes他、J. Thorac. Oncol. 第6巻、209～217ページ（2011年）。

10

#### 【発明の概要】

##### 【0003】

20

本開示において、臨床上肺がんである患者からのがん関連線維芽細胞（CAF）フィーダーが、維持可能な球形形成性の一次肺CSC培養物として、がん幹細胞（CSC）の集団を維持して増やすのに重要であることを証明した。このCSC / CAF共培養系は、腫瘍の微小環境がどのようにしてがんの幹細胞性を維持しているのかや、がん細胞の分化に関するシグナル伝達、さらには抗CSC薬の開発に関するシグナル伝達を今後研究する上で役に立つであろう。最も重要なのは、本明細書に開示した知見により、CSCの増殖が、CAFによってIGF-II / IGF1R / Nanog経路を通じて傍分泌（paracrine）方式で調節されていることが明らかになったことである。特に、特異的抗体または阻害剤を用いてIGF1Rシグナル伝達を抑制することで、がんの幹細胞性と腫瘍の増殖を抑制することができた。最後に、そのような結果がI期のNSCLC患者80人のコホートで得られ、肺がんの進行におけるIGF-II / IGF1R / Nanog傍分泌シグナル伝達の病理生理学的重要性が明らかにされた。それと同時に、これらの知見は、CAFの腫瘍微小環境が、がんの幹細胞性を維持する上で重要な役割を果たしていることを示している。

30

##### 【0004】

そこで本明細書には、がん幹細胞（CSC）をインビトロで生産する、または維持するための方法と、インビトロ共培養系と、がん細胞の幹細胞性を低下させることのできる薬剤を同定するためのその利用と、がん患者の生存率を評価する方法と、そのような方法を実施するためのキットが提示されている。

##### 【0005】

1つの態様として、本明細書には、がん関連線維芽細胞（CAF）と、がん細胞の集団とを含むインビトロ共培養系であって、そのCAFがCD90<sup>+</sup>であり、そのCAFが本共培養系の中でがん細胞の幹細胞性を維持するインビトロ共培養系が開示されている。例えばこのインビトロ共培養系は、がん幹細胞を含んでいてもよく、そのがん幹細胞はOct3/4<sup>+</sup>およびNanog<sup>+</sup>であり得る。いくつかの実施形態では、CAFは、がん患者から、例えば肺がん患者、乳がん患者、腎臓がん患者、前立腺がん患者、卵巣がん患者、皮膚がん患者、子宮頸がん患者、大腸がん患者、肝臓がん患者、メラノーマ患者、口腔がん患者、膵臓がん患者のいずれかから得られる。一例では、がん患者は非小細胞肺がん患者である。

40

##### 【0006】

その代わりに、またはそれに加えて、がん細胞の集団は、肺がん細胞、乳がん細胞、腎臓がん細胞、前立腺がん細胞、卵巣がん細胞、皮膚がん細胞、子宮頸がん細胞、大腸がん

50

細胞、肝臓がん細胞、メラノーマ細胞、口腔がん細胞、膵臓がん細胞のいずれかを含んでいる。一例では、がん細胞は非小細胞肺がん細胞である。

【0007】

別の態様として、本明細書には、がん幹細胞(CSC)をインビトロで生産する、または維持する方法であって、(i)がん細胞の集団を用意し；(ii)がん関連線維芽細胞(CAF)としてCD90<sup>+</sup>を用意し；(iii)前記がん細胞の集団と前記CAFを共培養してその培養物の中でがん幹細胞を生産する、または維持することを含む方法が開示されている。そのがん幹細胞は、Oct3/4<sup>+</sup>及びNanog<sup>+</sup>の細胞であり得る。

【0008】

がん細胞の集団は、確立されたがん細胞系由来であり得る。あるいはがん細胞の集団は、がん患者から得られた原発がん細胞(primary cancer cells)でもよい。がん細胞の集団は、肺がん細胞、乳がん細胞、腎臓がん細胞、前立腺がん細胞、卵巣がん細胞、皮膚がん細胞、子宮頸がん細胞、大腸がん細胞、肝臓がん細胞、メラノーマ細胞、口腔がん細胞、膵臓がん細胞のいずれかを含むことができるが、これらに限定されない。一例では、がん細胞の集団は非小細胞肺がん細胞を含んでいる。

10

【0009】

CAFは、がん患者から得ること、例えば肺がん患者、乳がん患者、腎臓がん患者、前立腺がん患者、卵巣がん患者、皮膚がん患者、子宮頸がん患者、大腸がん患者、肝臓がん患者、メラノーマ患者、口腔がん患者、膵臓がん患者のいずれから得ることができるが、これらの患者に限定されない。一例では、CAFは、非小細胞肺がん患者から得られる。あるいはCAFは、確立されたCAF細胞系由来であり得る。

20

【0010】

さらに、本明細書には、抗がん剤を同定する方法であって、(i)薬候補の存在下でがん細胞とがん関連線維芽細胞(CAF)を共培養し、ここでCAFはCD90<sup>+</sup>であり；(ii)その共培養物におけるがん細胞の幹細胞性のレベルを決定し；(iii)その共培養物におけるがん細胞の幹細胞性のレベルが、前記薬候補の不在下でのがん細胞とCAFの共培養物におけるがん細胞の幹細胞性のレベルと比べて低下している場合にその薬候補が抗がん剤であると同定することを含む方法が提示されている。

【0011】

がん細胞は、確立されたがん細胞系由来であり得る。あるいはがん細胞は、がん患者から得られた原発がん細胞でもよい。いくつかの例では、がん細胞は、肺がん細胞、乳がん細胞、腎臓がん細胞、前立腺がん細胞、卵巣がん細胞、皮膚がん細胞、子宮頸がん細胞、大腸がん細胞、肝臓がん細胞、メラノーマ細胞、口腔がん細胞、膵臓がん細胞のいずれかである。一例では、がん細胞は非小細胞肺がん細胞である。

30

【0012】

CAFは、がん患者から、例えば肺がん患者、乳がん患者、腎臓がん患者、前立腺がん患者、卵巣がん患者、皮膚がん患者、子宮頸がん患者、大腸がん患者、肝臓がん患者、メラノーマ患者、口腔がん患者、膵臓がん患者のいずれから得ることができる。一例では、がん患者は非小細胞肺がん患者である。あるいはCAFとして、確立されたCAF細胞系であり得る。

40

【0013】

ここに記載した方法のいずれかでは、がん細胞の幹細胞性のレベルは、共培養物中のがん幹細胞(CSC)の数によって表わされる。そのCSCは、Oct3/4<sup>+</sup>およびNanog<sup>+</sup>である。その代わりに、またはそれに加えて、がん細胞の幹細胞性のレベルは、培養物中のがん細胞の薬剤耐性によって表わされる。別の実施形態では、がん細胞の幹細胞性のレベルは、CAFの中で発現しているIGF-II、HGF、LIF、SDF1のうちの1つ以上のレベルによって、またはがん細胞の中で発現しているIGF1R、IGF2R、LIFR、CXCR4、Nanogのうちの1つ以上のレベルによって、またはその両方によって表わされる。別の一例では、がん細胞の幹細胞性のレベルは、共培養物の中に形成されたがん細胞コロニーの中の全細胞に対するCSCの比によって表わされる。

50

## 【0014】

さらに、本明細書には、がん患者の生存率を評価する方法であって、(i)がん患者の腫瘍組織を用意し；(ii)その腫瘍組織の中にあるがん関連線維芽細胞(CAF)で発現しているIGF-IIのレベルを測定し；(iii)その腫瘍組織の中にあるがん細胞で発現しているIGF1R、またはNanog、またはその両方のレベルを測定し；(iv)前記CAFの中で発現しているIGF-IIのレベルと、前記がん細胞の中で発現しているIGF1R、またはNanog、またはその両方のレベルとに基づいて前記がん患者の生存率を評価することを含む方法が開示されている。IGF-IIのレベルと、IGF1R、またはNanog、またはその両方のレベルが所定の値よりも高い場合には、その患者の生存率が低いことを示している。IGF-IIのレベルと、IGF1R、またはNanog、またはその両方のレベルが所定の値よりも低い場合には、その患者の生存率が良好であることを示している。

10

## 【0015】

いくつかの例では、IGF-IIのレベルと、IGF1R、またはNanog、またはその両方のレベルは、免疫組織化学によって測定される。生存率は、全生存率または無再発生存率であり得る。

## 【0016】

がん患者は、肺がん、乳がん、腎臓がん、前立腺がん、卵巣がん、皮膚がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、メラノーマ、口腔がん、膵臓がんのいずれかを有し得る。一例では、患者は非小細胞肺がんを有する。

## 【0017】

さらに別の態様として、本明細書には、がん幹細胞の幹細胞性を評価するためのキットであって、(i)IGF-II、HGF、LIF、SDF1、DLL1、Jagged1、IBP5、トロンボスポンジン1、PLAU、デコリンのいずれかを検出するための第1の薬剤と、(ii)IGF1R、IGF2R、LIFR、CXCR4、HGFR、Notch3、Nanogのいずれかを検出するための第2の薬剤を含むキットが開示されている。第1の薬剤、または第2の薬剤、またはその両方として、抗体が可能である。いくつかの実施形態では、第1の薬剤は、IGF-IIに特異的な抗体である。その代わりに、またはそれに加えて、第2の薬剤は、IGF1RまたはNanogに特異的な抗体である。

20

## 【0018】

一例では、第2の薬剤は、IGF1Rに特異的な抗体である。このキットは、Nanog検出用の第3の薬剤、例えば抗Nanog抗体をさらに含んでもよい。

30

## 【0019】

さらに、本明細書には、肺がんを治療するための方法であって、治療を必要とする対象に有効量の抗肺がん剤を投与することを含み、その対象が、がん関連線維芽細胞中のIGF-IIのレベルが上昇し、がん幹細胞中のIGF1RまたはNanogのレベルが上昇している肺がん患者である方法が開示されている。抗肺がん剤は、IGF-II/IGF1Rシグナル伝達経路に干渉する薬である。いくつかの実施形態では、その薬は、IGF-IIまたはIGF1Rに特異的に結合する抗体である。

## 【0020】

がん細胞の幹細胞性を評価するための画像ベースハイコンテンツアッセイ(image-based high content assay)も本開示の範囲内である。このアッセイは、(i)がん細胞とがん関連線維芽細胞の両方を含むサンプルを用意し；(ii)そのサンプルを、Nanog検出用であって第1の標識と直接または間接的に複合化している第1の薬剤で染色し；(iii)そのサンプルを、CD90検出用であって第1の標識とは異なる第2の標識と直接または間接的に複合化している第2の薬剤で染色し；(iv)前記第1の薬剤と前記第2の薬剤で染色したそのサンプルを画像化し；(v)前記第1の標識と前記第2の標識から放出される信号に基づき、そのサンプルでがん細胞の幹細胞性を決定することを含む。第1の標識、または第2の標識、またはその両方は、蛍光染料であり得る。このアッセイは、サンプルを核検出用の第3の薬剤で染色することをさらに含んでもよい。この第3の薬剤はDAPIであり得る。いくつかの例では、第1の薬剤、または第2の薬剤、またはその両方は抗体である。

40

## 【0021】

50

いくつかの実施形態では、サンプルを、Nanogに特異的な抗体である第1の薬剤と反応させ、そのサンプルに結合したその抗体を、TRITCで標識した第2の抗体と複合化させることによってステップ(ii)を行うことができる。いくつかの例では、第2の薬剤として、FITCで標識した抗CD90抗体であり得る。

【0022】

いくつかの実施形態では、がん細胞コロニーを同定し、各がん細胞コロニー中の全細胞数に対するNanog陽性細胞の数の比で表わされる幹細胞性を1つ以上のがん細胞コロニーについて評価することによってステップ(v)を行う。

【0023】

ここに記載した画像ベースハイコンテンツアッセイのいずれかでは、サンプルは、がん細胞とがん関連線維芽細胞の共培養物である。この共培養物は候補化合物をさらに含むことができ、アッセイは、その候補化合物が抗がん剤であるかどうかを判断することをさらに含み、その候補化合物の存在下では、その候補化合物の不在下と比べてがん細胞の幹細胞性のレベルが低下していることが、その候補化合物が抗がん剤であることを示している。

10

【0024】

サンプル中のがん細胞として、肺がん細胞、乳がん細胞、腎臓がん細胞、前立腺がん細胞、卵巣がん細胞、皮膚がん細胞、子宮頸がん細胞、大腸がん細胞、肝臓がん細胞、メラノーマ細胞、口腔がん細胞、膵臓がん細胞のいずれかであり得る。一例では、がん細胞は非小細胞肺がん細胞である。

20

【0025】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細は、以下の記述に示される。本発明の他の特徴または利点は、以下の図面といくつかの実施形態に関する詳細な説明からと、添付の請求項から明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1-1】図1は、肺がん細胞の中で腫瘍形成を促進して幹細胞性マーカーを上方調節するフィーダーとしてのCAFまたはNFの役割を示す図を含む。(a)：さまざまな肺がん患者(N=4~5人の患者、PT707、PT 201、PT 376、PT 881、PT 337)からのCAFまたはNFと共培養したA549細胞系とEKVX細胞系のコロニー形成能力をペアにして示した写真とチャート。スケール棒、100 μm。

30

【図1-2】図1は、肺がん細胞の中で腫瘍形成を促進して幹細胞性マーカーを上方調節するフィーダーとしてのCAFまたはNFの役割を示す図を含む。(b)：NFおよびCAFとともに、またはNFとCAFなしで培養したA549細胞とEKVX細胞における幹細胞マーカーOct3/4とNanogのRT Q-PCR分析を示すチャート(N=3~4人の患者、PT707、PT 201、PT 376、PT 881)。

【図1-3】図1は、肺がん細胞の中で腫瘍形成を促進して幹細胞性マーカーを上方調節するフィーダーとしてのCAFまたはNFの役割を示す図を含む。(c)：CAFとともに、またはCAFなしで培養したA549細胞とEKVX細胞におけるNanogの免疫蛍光染色の写真。核はDAPIで染色した。スケール棒、100 μm。(d)：A549細胞とEKVX細胞を用いたPKH126保持アッセイを示す写真。細胞をPKH126赤色蛍光染料であらかじめ染色した後、CAFとともに、またはCAFなしで培養した。スケール棒、100 μm。

40

【図1-4】図1は、肺がん細胞の中で腫瘍形成を促進して幹細胞性マーカーを上方調節するフィーダーとしてのCAFまたはNFの役割を示す図を含む。(e)：CAFと共培養した初代培養肺がん細胞系(CL141、CL83、CL25、CL152)を示す写真。球様コロニーを形成したがん細胞系を調べた。スケール棒、200 μm。

【図1-5】図1は、肺がん細胞の中で腫瘍形成を促進して幹細胞性マーカーを上方調節するフィーダーとしてのCAFまたはNFの役割を示す図を含む。(f)：CAFとともに、またはCAFなしで培養したCL141細胞、CL83細胞、CL25細胞、CL152細胞における幹細胞マーカーNanogのRT Q-PCR分析を示すチャート(N=3)。

50

【図1 - 6】図1は、肺がん細胞の中で腫瘍形成を促進して幹細胞性マーカーを上方調節するフィーダーとしてのCAFまたはNFの役割を示す図を含む。(g) : CAFとともに2~10日間培養した後に球を形成した肺がん組織に由来する肺CSC (CLS1) を示す写真とチャート(上図)。CLS1細胞におけるOct3/4、Sox2、Nanogの発現のRT Q-PCR分析。CAFとともに培養したCLS1球 (CLS1 / CAF共培養物) から、またはCAFなしで培養して4継代した後のCLS1細胞 (CLS1 p4) からRNAを抽出した。胚性幹細胞系H9をポジティブコントロールとして用い、CAFまたはNFをフィーダー細胞対照として用いた(下図)(N=3)。

【図1 - 7】図1は、肺がん細胞の中で腫瘍形成を促進して幹細胞性マーカーを上方調節するフィーダーとしてのCAFまたはNFの役割を示す図を含む。(h) : CLS1細胞とCAFの免疫蛍光特徴づけを示す写真。CLS1細胞はOct3/4とNanogを発現したのに対し、CAFはCD90を発現した。核はDAPIで染色した。スケール棒、100  $\mu$ m。データは平均値  $\pm$  標準偏差で表わしており、有意差を、チューキーの事後補正を伴う両側ANOVA (a)、またはスチューデントのt検定 (b~g) を用いて検定した ; \*p<0.05。データは、少なくとも3回の独立な生物実験を表わしており、各実験で3回以上反復実験を行なった。

【図1 - 8】図1は、肺がん細胞の中で腫瘍形成を促進して幹細胞性マーカーを上方調節するフィーダーとしてのCAFまたはNFの役割を示す図を含む。(i) CAFの表面マーカーを示す図。

【図2 - 1】図2は、肺CSC (CLS1) が、CAFフィーダーとともに共培養したときにがんの幹細胞性と大きな腫瘍形成能を維持することと、肺CSCが、CAFフィーダーなしで培養したときにより小さな腫瘍形成能のがん細胞に分化することを示す図。(a) : 分化したがん細胞が、CAFの除去後にがんの幹細胞性を喪失すると考えられることを示す模式図。

【図2 - 2】図2は、肺CSC (CLS1) が、CAFフィーダーとともに共培養したときにがんの幹細胞性と大きな腫瘍形成能を維持することと、肺CSCが、CAFフィーダーなしで培養したときにより小さな腫瘍形成能のがん細胞に分化することを示す図。(b) : RT Q-PCR分析を示す図。この分析により、CAFなしの継代培養 (P1~P14) 後に幹細胞性マーカーNanogとOct3/4がCLS1細胞で顕著に低下することが確認された。データは平均値  $\pm$  標準偏差で表わしており (N=3)、CLS1 / CAFとともにCLS1細胞を異なる回数継代培養した結果を、チューキーの事後補正を伴う片側ANOVAによって検定した。データは、3回の独立な生物実験を表わしている。

【図2 - 3】図2は、肺CSC (CLS1) が、CAFフィーダーとともに共培養したときにがんの幹細胞性と大きな腫瘍形成能を維持することと、肺CSCが、CAFフィーダーなしで培養したときにより小さな腫瘍形成能のがん細胞に分化することを示す図。(c) : CLS1細胞をCAFあり (CLS1 / CAF)、またはCAFなし (CLS1) で5日間培養したときのOct3/4の免疫蛍光を示す写真。矢印の先は、CAFを除去した後にOct3/4染色が失われた腺型CLS1細胞を示している。核はDAPIで染色した。CLS1細胞のうちでPKH26で陽性に染色された細胞の保持アッセイ。細胞をPKH26赤色蛍光染料であらかじめ染色し、次いでCAFとともに、またはCAFなしで1週間共培養した。矢印は、PKH26蛍光を保持していたCLS1細胞を示す。スケール棒、50  $\mu$ m。(d) : CLS1 / CAF (N=15匹のマウス) 異種移植腫瘍とCLS1 (N=10匹のマウス) 異種移植腫瘍の自発的肺転移結節を示す写真(上図)と、それらをH&Eで染色した写真(下図)。スケール棒、100  $\mu$ m。

【図2 - 4】図2は、肺CSC (CLS1) が、CAFフィーダーとともに共培養したときにがんの幹細胞性と大きな腫瘍形成能を維持することと、肺CSCが、CAFフィーダーなしで培養したときにより小さな腫瘍形成能のがん細胞に分化することを示す図。(e) : CAFと共培養したCLS1球の注入に由来する異種移植腫瘍(皮下腫瘍と自発的肺転移腫瘍)におけるOct3/4とNanogの発現に関するIHC分析を示す写真。スケール棒、50  $\mu$ m。

【図3 - 1】図3は、分化した肺がん細胞が、CAFとともに再度共培養することで脱分化し、幹細胞様特性を再び獲得できることを示す図を含んでいる。(a) : CAFとともに、またはCAFなしで培養したCLS1 p12細胞とCLS1 p27細胞における幹細胞性マーカーNanogとOct3/4の発現を評価するために実施したRT Q-PCR分析を示すチャート (N=3)。

【図3 - 2】図3は、分化した肺がん細胞が、CAFとともに再度共培養することで脱分化し

10

20

30

40

50

、幹細胞様特性を再び獲得できることを示す図を含んでいる。(b) : さまざまな細胞数 ( $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$ 個の細胞) を皮下注射した後に調べ、CLS1 / CAF共培養物 (N = 6匹のマウス) からと、12継代後と27継代後の分化したCLS1細胞 (p6とp12 ; N = 6匹のマウス) であるA549 + CLS1 p.12 / CAFとA549 + CLS1 p.27 / CAFからと、A549 / CAF (N = 6匹のマウス) からマウス異種移植腫瘍が発生したことを示す写真とチャート。スケール棒、200  $\mu$ m。

【図3 - 3】図3は、分化した肺がん細胞が、CAFとともに再度共培養することで脱分化し、幹細胞様特性を再び獲得できることを示す図を含んでいる。(c) : SCIDマウスにさまざまな細胞数 ( $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$ 個の細胞) を皮下注射した後、3継代後にソーティングしたALDH-CLS1細胞 (p3 ; N = 6匹のマウス) からと、ALDH-CLS1 / CAF (N = 6匹のマウス) からマウス異種移植腫瘍が発生したことを示すチャート。(d) : CAFとともに、またはCAFなしで培養したALDH-CLS1細胞における幹細胞性マーカーNanogとOct3/4の発現を評価するために実施したRT Q-PCR分析を示すチャート (N = 3)。

【図3 - 4】図3は、分化した肺がん細胞が、CAFとともに再度共培養することで脱分化し、幹細胞様特性を再び獲得できることを示す図を含んでいる。(e) : CAFとともに、またはCAFなしで培養したALDH-CLS1細胞のALDH活性を示す図。ALDH活性は、DEAB (ALDH阻害剤) の不在下 (上) または存在下 (下) でALDEFUOR染料を用いて37℃で30分間染色することによって評価し、フローサイトメトリーによって分析した。データは平均値  $\pm$  標準偏差で表わしてあり、有意差をスチューデントのt検定により \*p < 0.05の水準で検定した。データは、少なくとも3回の独立な生物実験を表わしている。

【図4 - 1】図4は、CSCとCAFのクロストークにおける傍分泌ネットワークとそれに対応する受容体経路を示す図を含んでいる。(a) : CAFとともに、またはCAFなしで培養したCSC (CLS1) 細胞において発現が異なる遺伝子の階層的クラスター化を示す図。

【図4 - 2】図4は、CSCとCAFのクロストークにおける傍分泌ネットワークとそれに対応する受容体経路を示す図を含んでいる。(b) : 傍分泌調節経路をRT Q-PCRで確認した結果を示すチャート。CLS1細胞は、単一細胞群に解離させた後にCAFなしでさまざまな継代数 (p3、p6、p14) で継代培養したCLS1球に由来していた。CAFは、フィーダー細胞対照として機能した (N = 3)。

【図4 - 3】図4は、CSCとCAFのクロストークにおける傍分泌ネットワークとそれに対応する受容体経路を示す図を含んでいる。(c) : ならし培地で培養したCLS1細胞における幹細胞マーカーNanogのRT Q-PCR分析を示すチャート。ならし培地は、CAFと共培養したCLS1細胞から回収した (N = 3)。(d) : CAFによって、または無血清RPMI培地の中でCAFとともに、またはCAFなしで24時間培養したCLS1細胞によって分泌される増殖因子を調べるために使用した抗体アレイを示すチャート。このアレイを走査し、定量し、レベルをポジティブコントロールに対して規格化した。

【図4 - 4】図4は、CSCとCAFのクロストークにおける傍分泌ネットワークとそれに対応する受容体経路を示す図を含んでいる。(e) : サイトカインの発現レベルの半定量的結果を示す図であり、ヒートマップとして示してある。(f) : 以下に示すサイトカイン、すなわちIGF-II (10 ng/ml) ; IGFBP1 (10 ng/ml) ; IGFBP2 (10 ng/ml) ; IGFBP3 (10 ng/ml) ; IGFBP4 (100 ng/ml) ; bFGF (10 ng/ml) ; HGF (10 ng/ml) ; PARC (10 ng/ml) ; sCD14 (500 ng/ml) ; GM-CSF (1 ng/ml) で処理したCLS1細胞における幹細胞マーカーNanogのRT Q-PCR分析を示すチャート (N = 3)。

【図4 - 5】図4は、CSCとCAFのクロストークにおける傍分泌ネットワークとそれに対応する受容体経路を示す図を含んでいる。(g) : IGF-II (10 ng/ml) と、HGF (10 ng/ml) とsCD14 (500 ng/ml) の組み合わせで処理したCLS1細胞における幹細胞マーカーNanogのRT Q-PCR分析を示すチャート (N = 3)。(h) : 免疫蛍光を示す写真。IGF1RとIGF-IIはCLS1細胞とCAFの中での局在位置が異なることがわかる。IGF1R染色は肺CSCで観察された (赤色、上図)。CD90陽性CAF (緑色) はIGF-IIに関して染色された (赤色、下図)。核はDAPIで染色した (青色 ; N = 3)。スケール棒、50  $\mu$ m。

【図4 - 6】図4は、CSCとCAFのクロストークにおける傍分泌ネットワークとそれに対応

する受容体経路を示す図を含んでいる。(i) : 患者から取得して、がん細胞とともに、またはがん細胞なしで培養したCAFにおけるIGF-IIのRT Q-PCR分析を示すチャート (A549細胞ではN=6、EKVX細胞ではN=9)。(j) : 患者から取得したCAFとともに、またはCAFなしで培養したがん細胞 (A549またはEKVX) の中のIGF-IIのRT Q-PCR分析を示すチャート (N=4人の患者)。

【図4-7】図4は、CSCとCAFのクロストークにおける傍分泌ネットワークとそれに対応する受容体経路を示す図を含んでいる。(k) : がんの幹細胞性に寄与している可能性があるCSCとCAFの間のクロストークを示す模式図。データは平均値±標準偏差で表わしており、有意差を、スチューデントのt検定 (b~c、i~j) を用いて、またはテューキーの事後補正を伴う片側ANOVA (f~g) によって検定した。 $*p<0.05$ 。データは、少なくとも3回の独立な生物実験を表わしており、各実験で3回以上反復実験を行なった。

【図5-1】図5は、IGF-II / IGF1R / Nanog経路が微小環境傍分泌シグナル伝達に關与して肺CSCの幹細胞性を維持していることを示す図を含んでいる。(a) : IGF-II (100 ng/ml) で処理した4つの異なる肺がん細胞系 (CLS1、A549、H1975、H460) に関する幹細胞マーカーNanogのRT Q-PCR分析を示すチャート (N=3)。

【図5-2】図5は、IGF-II / IGF1R / Nanog経路が微小環境傍分泌シグナル伝達に關与して肺CSCの幹細胞性を維持していることを示す図を含んでいる。(b) : EGF (20 ng/ml) とbFGF (20 ng/ml) を含むMCDB201培地の中で21日間培養した後にIGF-II (10 ng/mlと100 ng/ml) で処理したCLS1細胞の球形形成能力 (下図) と形態 (上図) を示す写真とチャート。スケール棒、100  $\mu$ m。

【図5-3】図5は、IGF-II / IGF1R / Nanog経路が微小環境傍分泌シグナル伝達に關与して肺CSCの幹細胞性を維持していることを示す図を含んでいる。(c) : 示されている時点 (0分、10分、30分、1時間、2時間、6時間、24時間) にIGF-II (10 ng/ml) で処理したCLS1細胞と、IGF-II (100 ng/ml) で処理した一次細胞系 (CL141細胞とCL152細胞) におけるIGF1R、AKT、Nanogの発現のウエスタンブロットを示す写真。

【図5-4】図5は、IGF-II / IGF1R / Nanog経路が微小環境傍分泌シグナル伝達に關与して肺CSCの幹細胞性を維持していることを示す図を含んでいる。(d) : IGF-II (10 ng/ml) で24時間処理したNanogターゲティングshRNA Nanog (shN1とshN2) 細胞またはスクランブルsiRNA (shLuc) 細胞のタンパク質レベルを免疫ブロッティングで調べた結果を示す写真。 -アクチンを内部対照として用いた。

【図5-5】図5は、IGF-II / IGF1R / Nanog経路が微小環境傍分泌シグナル伝達に關与して肺CSCの幹細胞性を維持していることを示す図を含んでいる。(e) : MCDB201培地の中でEGF (20 ng/ml) およびbFGF (20 ng/ml) とともに14日間培養した後、IGF-II (100 ng/ml) で処理したCLS1細胞の球形形成能力 (球の数、N=6; 球の平均面積、N=10) および形態と、Nanogの特異的ノックダウンの分析を示す写真とチャート。スケール棒、50  $\mu$ m。

【図5-6】図5は、IGF-II / IGF1R / Nanog経路が微小環境傍分泌シグナル伝達に關与して肺CSCの幹細胞性を維持していることを示す図を含んでいる。(f) : NanogターゲティングshRNA 細胞 (shN1とshN2) またはスクランブルsiRNA (shLuc) 細胞のタンパク質レベルを免疫ブロッティングで調べた結果を示す写真。 -アクチンを内部対照として用いた。スケール棒、200  $\mu$ m。(g) : shRNAを媒介としたNanogのノックダウンあり、またはなしのCLS1 / CAF細胞から形成された異種移植腫瘍の発生を示すチャート。腫瘍は、1,000個のCLS1 / CAF細胞を注入することによって発生させた (N=8匹のマウス)。

【図5-7】図5は、IGF-II / IGF1R / Nanog経路が微小環境傍分泌シグナル伝達に關与して肺CSCの幹細胞性を維持していることを示す図を含んでいる。(h) : Nanogのノックダウンあり、またはなしのCLS1 / CAF細胞によって形成された腫瘍の体積を示すチャート (N=8匹のマウス)。データは平均値±標準偏差で表わしており、有意差を、スチューデントのt検定 (a)、またはテューキーの事後補正を伴う片側ANOVA (b~h) によって検定した。 $*p<0.05$ 。データは、3回の独立な生物実験を表わしており、各実験で3回以上反復実験を行なった。

【図6-1】図6は、肺がんの幹細胞性と腫瘍形成を抑制するための標的としてのIGF-II

10

20

30

40

50

/ IGF1Rシグナル伝達経路を示す図を含んでいる。(a) : 画像ベースハイコンテンツ分析で分析した、コロニー当たりのNanog陽性幹細胞を示す写真とチャート。CLS1細胞は、IGF1R中和抗体 (IGF1R Ab ; 1  $\mu$ g/ml) とIGFシグナル伝達阻害剤 (AEW541とPPP ; 1  $\mu$ M/ml) で処理したCAFと共培養した (N=3)。スケール棒、50  $\mu$ m。

【図6 - 2】図6は、肺がんの幹細胞性と腫瘍形成を抑制するための標的としてのIGF-II / IGF1Rシグナル伝達経路を示す図を含んでいる。(b) : CLS1の球形形成の形態と能力 (球の数、N=6 ; 球の平均面積、N=10) を示す写真とチャート。その能力は、IGF1R Ab (1  $\mu$ g/ml) を用いた処理により顕著に低下した。スケール棒、200  $\mu$ m。(c) : IGF-II (100 ng/ml) で処理するか、IGF1R Abと組み合わせたIGF-II で処理した4つの異なる肺がん細胞系 (CLS1、A549、H1975、EKVX) をフローサイトメトリーで調べたALDH活性を示すチャート (N=3)。

【図6 - 3】図6は、肺がんの幹細胞性と腫瘍形成を抑制するための標的としてのIGF-II / IGF1Rシグナル伝達経路を示す図を含んでいる。(d) : IGF-II (100 ng/ml) で処理するか、IGF1R Abと組み合わせたIGF-II で処理したCLS1細胞、A549細胞、H1975細胞、H460細胞で発現している幹細胞マーカーNanogのRT Q-PCR分析を示すチャート。

【図6 - 4】図6は、肺がんの幹細胞性と腫瘍形成を抑制するための標的としてのIGF-II / IGF1Rシグナル伝達経路を示す図を含んでいる。(e) : IGF-IIを用いるか、IGF1R Ab (1  $\mu$ g/ml) と組み合わせたIGF-II を用いて6時間 (CLS1細胞) または24時間 (CL141細胞とCL152細胞) 処理したCLS1細胞におけるIGF1R-p / IGF1R、AKT-p / AKT、Nanogのウエスタンブロット分析を示す写真。

【図6 - 5】図6は、肺がんの幹細胞性と腫瘍形成を抑制するための標的としてのIGF-II / IGF1Rシグナル伝達経路を示す図を含んでいる。(f) : CLS1 / CAF細胞から形成された異種移植腫瘍の発生を示す写真とチャート。1  $\mu$ g/mlのIGF1R Abで処理した後に発生が低下した。腫瘍は、1,000個のCLS1 / CAF細胞を注入することによって発生させた (N=5匹のマウス)。CLS1 / CAF細胞の腫瘍形成能力は、IGF1R Ab (1  $\mu$ g/ml) 処理によって抑制された (対照では100% (5/5) であったのに対してIGF1R Abで処理した群では40% (2/5) )。データは平均値  $\pm$  標準偏差で表わしており、有意差を、チューキーの事後補正を伴う片側ANOVA (a)、またはスチューデントのt検定 (b~d) によって検定した。\*p<0.05。データは、3回の独立な生物実験を表わしており、各実験で3回以上反復実験を行なった。

【図7 - 1】図7は、I期のNSCLC患者にとって、CAFの中のIGF-IIと、がん細胞の中のIGF1RとNanogが臨床で重要であることを示す図を含んでいる。(a) : CAFにおけるIGF-IIの発現レベルと腫瘍細胞におけるIGF1R / Nanogの発現レベルが高い患者と低い患者の割合を示すツリー図。

【図7 - 2】図7は、I期のNSCLC患者にとって、CAFの中のIGF-IIと、がん細胞の中のIGF1RとNanogが臨床で重要であることを示す図を含んでいる。(b) : 外科的切除を受けたI期のNSCLC患者80人の臨床コホートから得た原発腫瘍試料の連続切片からのCAFにおけるIGF-IIと腫瘍細胞におけるIGF1R / NanogのIHC染色を示す写真。画像は、CAFにおけるIGF-IIの発現とがん細胞におけるIGF1RとNanogの発現が低い (スコア<リスクスコア中央値) 患者と高い (スコア  $\geq$  リスクスコア中央値) 患者から得た (オリジナルの倍率、100倍)。

【図7 - 3】図7は、I期のNSCLC患者にとって、CAFの中のIGF-IIと、がん細胞の中のIGF1RとNanogが臨床で重要であることを示す図を含んでいる。(c~d) : IGF1R、IGF1R、Nanogの発現が高い患者または低い患者と表記できることを示すグラフ (カットオフ値 = リスクスコア中央値)。結果は、全生存 (c) と無再発生存 (d) のカプラン-マイヤー評価において高発現と低発現の間で有意差を示した。p値は両側ログ-ランク検定から得た。

【図7 - 4】図7は、I期のNSCLC患者にとって、CAFの中のIGF-IIと、がん細胞の中のIGF1RとNanogが臨床で重要であることを示す図を含んでいる。(e) : CAFにおけるIGF-IIの発現レベルとがん細胞におけるIGF1R / Nanogの発現レベルを組み合わせた結果を示すグラフ。患者は3つの群に分かれた。すなわち、高IGF-II / 高IGF1R / 高Nanog群と、低IGF-II / 低IGF1R / 低Nanog群と、その他である。この結果は、全生存と無再発生存のカプラン-マイヤー評価において有意差を示していた。p値は両側ログ-ランク検定から得た。

10

20

30

40

50

【図8-1】図8は、CAFと肺CSCの間のクロストークの模式図である。AとB：CAFはIGF-IIを分泌し、IGF1Rシグナル伝達とAktリン酸化を通じて肺CSCにおいてIGF1R/Nanogを活性化する。傍分泌IGF-II/IGF1R経路が開始されると、CAFとCSCの間の他のオートクリン(LIFとLIFR; TGF- $\beta$ とTGFBR1; WNTとFrizzled受容体)シグナル伝達と傍分泌(HGFとHGFR/c-MET; SDF-1とCXCR4)シグナル伝達が相乗的に寄与して肺CSCの幹細胞性を維持することができる。

【図8-2】図8は、CAFと肺CSCの間のクロストークの模式図である。AとB：CAFはIGF-IIを分泌し、IGF1Rシグナル伝達とAktリン酸化を通じて肺CSCにおいてIGF1R/Nanogを活性化する。傍分泌IGF-II/IGF1R経路が開始されると、CAFとCSCの間の他のオートクリン(LIFとLIFR; TGF- $\beta$ とTGFBR1; WNTとFrizzled受容体)シグナル伝達と傍分泌(HGFとHGFR/c-MET; SDF-1とCXCR4)シグナル伝達が相乗的に寄与して肺CSCの幹細胞性を維持することができる。

【図9】図9は、CAF共培養系が肺がんの幹細胞性を維持するためのプラットフォームになりうることを示す図を含んでいる。(a)：CAFと10日間共培養した肺CSC(CLS1)は、異なる時点で似た形態の腫瘍性の球を形成した(上)。CAFと共培養したCLS1(CLS1/CAF)であって継代数が異なるもの(CLS1/CAF p.3、CLS1/CAF p.6、CLS1/CAF p.16)(下)における幹細胞マーカーNanogとOct3/4のRT Q-PCR分析であり、CAFおよび分化したCLS1細胞と比較してある(N=3)。(b) SCIDマウスに皮下注射した細胞数( $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$ 個の細胞)が異なり、継代数が異なる(CLS1/CAF p.3、CLS1/CAF p.12、CLS1/CAF p.16)CLS1/CAF共培養物からのマウス異種移植腫瘍の発生(N=4~6匹のマウス)。データは平均値 $\pm$ 標準偏差で表わしており、有意差をスチューデントのt検定により $*p < 0.05$ の水準で検定した。データは、それぞれ3回の独立な生物実験を表わしている。

【図10】図10は、分化したCLS1が、CAFと再度共培養することを通じて脱分化できることを示すチャートを含んでいる。CAFと共培養した腫瘍細胞(CLS1/CAF)のさまざまなクローン(C1、C2、C3、C4)における幹細胞マーカーNanogとOct3/4のRT Q-PCR分析であり、腫瘍細胞のさまざまなクローンと比較してある(N=3)。データは平均値 $\pm$ 標準偏差で表わしており、有意差をスチューデントのt検定により $*p < 0.05$ の水準で検定した。データは、少なくとも3回の独立な生物実験を表わしている。

【図11】図11は、全ゲノム遺伝子発現プロファイリングによって明らかになった、CSCでカギとなるシグナル伝達経路を示すチャートを含んでいる。CLS1/CAFを10日間共培養し、次いでCAFなしで培養したCLS1細胞の連続継代(p3とp14)後の培養物におけるTGF関連経路の分子(TGFBR1、SMAD2)、Wnt関連経路の分子(TCF21)、EGFR関連経路の分子(EGR1)、LIF関連経路の分子(LIFとLIFR)のリアルタイムRT Q-PCR分析。データは平均値 $\pm$ 標準偏差で表わしており、有意差をスチューデントのt検定により $*p < 0.05$ の水準で検定した。データは、それぞれ3回の独立な生物実験を表わしている。

【図12】図12は、リアルタイムRT Q-PCRによって確認された、CAFとCLS1細胞の間の潜在的な傍分泌相互作用を示すチャートを含んでいる。CAFとCSC(CLS1)の間の傍分泌クロストークに関係する候補遺伝子、例えばIGF2R、IGFBP1、IGFBP2、IGFBP5、SPARC、デコリン、トロンスポンジン-1が、Q-PCRによって確認された。CLS1細胞(p3、p6、p14継代の後)は、単一細胞群に解離した後にCAFなしで継代培養したCLS1球に由来していた。CAFはフィーダー細胞対照として機能した。データは平均値 $\pm$ 標準偏差で表わしており、有意差をスチューデントのt検定により $*p < 0.05$ の水準で検定した。データは、それぞれ3回の独立な生物実験を表わしている。

【図13】図13は、肺がん細胞との共培養によってCAF内に誘導された遺伝子の相互作用を示すチャートを含んでいる。A549細胞、EKVX細胞、CLS1細胞とともに、またはこれらの細胞なしで培養したさまざまな患者のCAF(N=5人の患者)におけるHGFとSDF1のRT Q-PCR分析。データは平均値 $\pm$ 標準偏差で表わしており、有意差をスチューデントのt検定により $*p < 0.05$ の水準で検定した。データは、それぞれ少なくとも3回の独立な生物実験を表わしている。

10

20

30

40

50

【図14-1】図14は、ハイコンテンツ分析を通じてがん幹細胞を同定する手順を示す図を含んでいる。(a) CAFマーカーとしてのCD90；幹細胞性細胞のためのNanog；核のためのDAPI染色。DAPI染色は、画像ベースハイコンテンツ分析によってCSCコロニーを同定するのに役立つ。コロニーの数、面積、コロニー当たりの細胞数、Nanog陽性細胞。

【図14-2】図14は、ハイコンテンツ分析を通じてがん幹細胞を同定する手順を示す図を含んでいる。(b) CLS1細胞のNanog(+)コロニー形成能力が、IGF-II(10 ng/mlと100 ng/ml)を用いた処理によって増大したことを示す画像ベースハイコンテンツ分析。データは平均値±標準偏差で表わしており、有意差をスチューデントのt検定により $*p<0.05$ の水準で検定した。データは、それぞれ3回の独立な生物実験を表わしている。

【図15-1】図15は、異なる肺がん細胞系でIGF-IIが幹細胞性を誘導したことを示す図を含んでいる。(a) IGF-II(100 ng/ml)で処理したCLS1/CAF細胞のALDEFLUORアッセイを伴うフローサイトメトリー分析。ALDH活性に対応する蛍光強度を、DEABなし(上図)とDEABあり(下図)で測定した。

【図15-2】図15は、異なる肺がん細胞系でIGF-IIが幹細胞性を誘導したことを示す図を含んでいる。(b) IGF-II(100 ng/ml)で処理した4つの異なる肺がん細胞系(CLS1/CAF、A549、H1975、EKVX)でALDH活性をフローサイトメトリーによって調べた。データは平均値±標準偏差で表わしており、有意差をスチューデントのt検定により $*p<0.05$ の水準で検定した。データは、それぞれ3回の独立な生物実験を表わしている。

【図16-1】図16は、IGF1RによるIGF1Rシグナル伝達の阻止がAbを中和するか、阻害剤がさまざまな肺がん細胞系で幹細胞性を抑制することを示す図を含んでいる。(a) A549細胞とEKVX細胞のそれぞれを、IGF1R Ab(1 μg/ml)で処理したCAF、またはIGF1R Abで処理していないCAFと共培養した。コロニー当たりのNanog陽性幹細胞の数を調べた。(N=3)

【図16-2】図16は、IGF1RによるIGF1Rシグナル伝達の阻止がAbを中和するか、阻害剤がさまざまな肺がん細胞系で幹細胞性を抑制することを示す図を含んでいる。(b) コロニー当たりのNanog陽性幹細胞を画像ベースハイコンテンツ分析によって分析した。さまざまな原発肺がん細胞系(CLS1、CL141、CL152)を、IGF1Rキナーゼ阻害剤(1、5、10 μM/mlのAEW541)で処理したCAF、またはIGF1Rキナーゼ阻害剤で処理していないCAFと共培養した。(N=3)

【図16-3】図16は、IGF1RによるIGF1Rシグナル伝達の阻止がAbを中和するか、阻害剤がさまざまな肺がん細胞系で幹細胞性を抑制することを示す図を含んでいる。(c) 肺がん細胞系(A549とEKVXが含まれる)の球形形成の形態と能力(球の数、N=6；球の平均面積、N=10)は、IGF1R Ab(1 μg/ml)を用いた処理によって顕著に低下した。データは平均値±標準偏差で表わしており、有意差をスチューデントのt検定により $*p<0.05$ の水準で検定した。データは、それぞれ少なくとも3回の独立な生物実験を表わしている。

【図17】図17は、IGF1Rキナーゼ阻害剤によってIGF1Rシグナル伝達を阻止すると生体内で肺がんの幹細胞性が抑制されることを示す図を含んでいる。CLS1/CAF細胞から異種移植腫瘍を形成する能力は、AEW541を用いた処理によって低下した。腫瘍は、1,000個のCLS1/CAF細胞を注入することによって発生させた。CLS1/CAF細胞の腫瘍の重量は、AEW541(5 μM/ml)を用いた処理によって減少した(各群にN=5匹のマウス)。

【発明を実施するための形態】

【0027】

発明の詳細な説明

がん幹細胞(CSC)は、がんを治療するための有望な標的だが、CSCの可塑性がどのようにして生体内で維持されているかはまだ明確になっていない。インビトロでCSCの可塑性を維持することは難しいと考えられる。本明細書の少なくとも一部は、腫瘍微小環境でがん幹細胞を維持するためCD90(+)がん関連線維芽細胞(CAF)を供給したOct3/4(+)/Nanog(+)肺CSCの維持可能な初代培養物を確立したことに基づいている。さらに、トランスクリプトームのアプローチを適用することで、ニッチに関するある傍分泌ネットワークが、脱分化と幹細胞様特性の再獲得を通じてCSCをサポートし、豊富にしていることを同定した

10

20

30

40

50

。具体的には、IGF1Rシグナル伝達が、IGF-IIを発現するCAFの存在下でがん細胞において活性化されることが見いだされた。IGF-II / IGF1Rシグナル伝達は、Nanogの発現を誘導し、幹細胞性を促進する。さらに、この傍分泌シグナル伝達は、初期段階（例えばI期）のがん患者（例えば、非小細胞肺癌（NSCLC）患者などの肺がん患者）における全生存と無再発生存を予測する。さらに、IGF-II / IGF1Rシグナル伝達を阻止すると、Nanogの発現が抑制され、がん幹細胞の特徴が弱まる。ここに提示するデータは、CAFががんの幹細胞性をサポートするニッチを構成することを明らかにしており、この傍分泌シグナル伝達を標的にすると、NSCLCなどのがんのための新たな治療戦略になる可能性がある。

#### 【0028】

したがって本明細書には、がん細胞の幹細胞性を生産する、および/または維持するためのインビトロ共培養系と、それを利用して、がん細胞の幹細胞性を低下させることができ、したがってがんの治療に有効な薬候補を同定することが提示されている。本明細書の範囲には、がん患者の生存率を評価するのに用いるとともに、がん幹細胞を標的とした治療により応答しやすいがん患者を同定するのに用いるCAF / CSCバイオマーカーと、がん幹細胞の同定に用いるキットも含まれる。さらに、本明細書には、がんサンプル中のがん幹細胞を同定するためのハイコンテンツアッセイが提示されている。

10

#### 【0029】

1. がん細胞の幹細胞性を維持するための、がん関連線維芽細胞（CAF）とがん細胞を含むインビトロ共培養系

CAFとがん細胞を含むインビトロ共培養系（この系では、CAFが、がん細胞の幹細胞性を維持することを容易にしている）と、そのようなインビトロ共培養系を用いてがん幹細胞を生産する、および/または維持する方法と、がん細胞の幹細胞性を低下させることのできる薬候補を同定する方法が本明細書に記載される。本明細書では、「幹細胞性 (stemness)」という用語は、細胞が自己再生して表現型が異なったタイプの追加の細胞を生産する能力を意味する。

20

#### 【0030】

がん幹細胞 (cancer stem cell) (CSC) は、幹細胞様特性を示すがん細胞である。CSCは、がんの少なくとも1つの特質を示すことがしばしばあり、表現型が明確に異なる追加の少なくとも1つのタイプの細胞を生産することができる。さらに、がん幹細胞は、非対称な複製と対称な複製の両方が可能である。がん幹細胞は、幹細胞性形質を獲得する分化したがん細胞から、および/またはがん細胞に関連する表現型を獲得する幹細胞から得られることがわかっている。あるいはがん幹細胞は、腫瘍内で非ストローマ型の細胞を再構成することができる。

30

#### 【0031】

CAFは、腫瘍ストローマから単離した線維芽細胞の集団である。CAFとして、平滑筋細胞および線維芽細胞と性質を共有する大きな紡錘形の間充織細胞が可能である。Kharaiishvili他、Cancer Cell International 2014年、第14巻：41ページ。CAFは、典型的には、超増殖性の表現型を持つことを特徴としており、増加した量の増殖因子、細胞外マトリックスの諸成分、マトリックスメタロプロテナーゼを分泌することができ、これらの成分が腫瘍の増殖を促進する。

40

#### 【0032】

インビトロ共培養系で用いるCAFとして、がん患者（固形腫瘍を有するヒト患者）から得られる原発細胞が可能である。がん患者には、肺がん患者、乳がん患者、腎臓がん患者、前立腺がん患者、卵巣がん患者、皮膚がん患者、子宮頸がん患者、大腸がん患者、肝臓がん患者、メラノーマ患者、口腔がん患者、膵臓がん患者が含まれるが、これらの患者に限定されない。このようながん患者は、以前に化学療法や放射線療法といった治療を受けていない可能性がある。いくつかの例では、CAFは、非小細胞肺癌患者や小細胞肺癌患者などの肺がん患者から得られる。本明細書に記載する共培養系で使用するためのCAFは、さまざまな病期（例えば初期または末期）のがん患者から得ることができる。いくつかの例では、CAFは、I期の肺がん患者、例えばI期のNSCLC患者から得られる。CAFは、以

50

下の実施例1に記載した方法に従い、腫瘍組織から、または腫瘍を取り囲んでいる組織から得ることができる。Navab他、2011年；Tesei他、2009年も参照のこと。なお、関連する開示内容は、参照により本明細書に組み込まれている。あるいは本明細書で用いるCAFとして、確立された細胞系が可能である。

#### 【0033】

CAFは、がん幹細胞の増殖と維持を可能にする適切な条件下でがん細胞の集団と共培養することができる。いくつかの例では、がん細胞の集団はCSCを含んでおり、CAFとの共培養により、がん細胞の幹細胞性が維持される。がん細胞の幹細胞性を維持することには、がん細胞の集団に含まれるCSCの幹細胞特性を維持することが含まれる。そこには、すでに分化したがん細胞が脱分化して幹細胞様特性を再獲得することも含まれる。がん細胞の集団として、ヒトがん患者（例えば固形腫瘍を有するヒト患者）から得られる原発がん細胞が可能である。ヒトがん患者の例は、本明細書に開示した肺がん患者である。そのようながん患者は、以前に化学療法や放射線療法といった治療を受けていない可能性がある。あるいはがん細胞の集団として、確立された細胞系が可能である。好ましい実施形態では、CAFとがん細胞は、同じタイプのがんである。例えばCAFとがん細胞の両方とも、肺がん、例えば非小細胞肺がんまたは小細胞肺がん由来するものが可能である。

10

#### 【0034】

一例では、培養皿にCAFフィーダー細胞をあらかじめ播種することができる（例えば $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個の細胞/ウェル）。密度が例えば2,500~7,500個の生存細胞/mlであるがん細胞の集団を培養皿の中に入れ、CAFフィーダー細胞と共培養することができる。がん細胞に対するCAFの比は、100:1~5:1（例えば50:1、20:1、10:1）が可能である。CAFフィーダー細胞と共培養したがん細胞の幹細胞性は、公知の方法に従い、がん細胞のコロニー形成能力を調べることによって評価できる。以下の実施例を参照のこと。がん細胞の幹細胞性は、本明細書に記載したCSCマーカー（例えばIGF1R、Oct3/4、Nanog）を測定することによっても評価できる。あるいはがん細胞の幹細胞性は、本明細書に記載した画像ベースハイコンテンツアッセイによって決定することができる。

20

#### 【0035】

本明細書に記載したインビトロ共培養系は、がん幹細胞を標的とする抗がん剤候補を同定するためのプラットフォームを提供する。がん幹細胞は、腫瘍の中で全がん細胞のうちの小さな割合（例えば0.1%~10%）を占めることが報告されている。このようなタイプのがん細胞は、細胞ががんの形成を開始する上で、そして以前に形成されたのとは異なる表現型を持つ細胞を発達させることによってがんを進行させる上で、極めて重要である。がん幹細胞は、典型的には増殖・複製速度が遅いため、がんの中で撲滅が最も困難な細胞であると考えられている。残ったがん幹細胞は、他の全がん細胞が除去された後、1つのがん全体の複製を促進できることが示唆された。したがってがん幹細胞を標的にできる薬剤候補は、がんを治療する上で特に重要であろう。

30

#### 【0036】

ある候補化合物ががん細胞の幹細胞性を低下させることができるかどうかを明確にするには、そのような候補化合物を本明細書に記載したインビトロ共培養系に添加することができる。適切な条件下で適切な期間にわたって培養した後、共培養系に含まれるがん細胞の幹細胞性のレベルを、その候補化合物を含まない対照共培養系と比較することができる。候補化合物の存在下でのがん細胞の幹細胞性のレベルが、その候補化合物の不在下でのレベルと比べて低下している場合には、その候補化合物が、がん幹細胞を標的とする抗がん剤となる可能性のあることを示している。

40

#### 【0037】

いくつかの例では、がん細胞の幹細胞性のレベルは、共培養物に含まれるOct3/4<sup>+</sup>およびNanog<sup>+</sup>細胞（これらがCSCを表わす）の数を測定することによって求められる。他の例では、がん細胞の幹細胞性のレベルは、共培養物に含まれるがん細胞の薬剤耐性のレベルから求めることができる。高い薬剤耐性は、がん細胞の幹細胞性が高いことを表わしている。さらに別の例では、がん細胞の幹細胞性のレベルは、本明細書に記載した傍分泌ネッ

50

トワーク（図4参照）の構成要素、例えばCAFにおいて発現しているIGF-II、HGF、LIF、SDF1のうちの一つ以上のレベル、またはがん細胞において発現しているIGF1R、IGF2R、LIFR、CXCR4、Nanogのうちの一つ以上のレベル、またはその両方のレベルを測定することによって求めることができる。これら細胞表面マーカーの一つ以上の発現レベルは、定型的な方法、例えばFACS分析または免疫組織化学染色によって測定することができる。

#### 【0038】

本明細書に記載したスクリーニング法でインビトロ共培養系を用いて候補化合物が同定されると、定型的な技術を通じてそのような候補化合物をさらに調べ、その抗がん活性、特にその抗がん幹細胞活性を確認することができる。

#### 【0039】

##### 11. がん細胞の幹細胞性を調節している傍分泌ネットワーク

本明細書の別の態様は、CAFが脱分化と幹細胞様特性の再獲得を通じてCSCを豊富にする傍分泌ネットワークの発見に基づいている。特に、IGF-II / IGF1Rシグナル伝達経路がこの傍分泌ネットワークで重要な役割を果たして、CSCにおいてNanogの発現を開始させることが見いだされた。この傍分泌ネットワークは、初期段階のがん患者、例えば1期の非小細胞肺癌患者で全生存と無再発生存を予測するための信頼性あるバイオマーカー群を代表していることが見いだされた。したがってこの傍分泌ネットワークの一つ以上の構成要素を、本明細書に記載したがんの予後予測法に適用することができる。

#### 【0040】

本明細書に開示した傍分泌ネットワークの任意の構成要素、またはその組み合わせを予後マーカーとして使用して、初期段階（例えば1期のNSCLC患者）のがん患者（例えば本明細書に記載した患者であり、例えば非小細胞肺癌患者や小細胞肺癌患者などの肺癌患者）の生存率（例えば、全生存率または無再発生存率）を評価することができる。傍分泌ネットワークの構成要素の例を図4に示してある。例には、CAFで発現しているIGF-II、肝細胞増殖因子（HGF）、LIF、ストローマ細胞由来因子1（SDF1）と、CSCで発現している対応する受容体（例えばIGF1R、IGF2R、HGF受容体（HGFR）、LIFR、C-X-Cケモカイン受容体4型（CXCR4））が含まれるが、これらに限定されない。CSCに含まれている他のバイオマーカー、例えばNanogやIGF結合タンパク質（IGFBP）も、予後マーカーとして用いることができる。一例では、本明細書に記載した予後予測法で用いられるバイオマーカーに、CAFが発現するIGF-IIと、CSCが発現するIGF1RまたはNanogが含まれる。以下の実施例1も

#### 【0041】

この方法を実施するため、がん細胞とCAFを含む組織サンプルを定型的な方法で（例えば本明細書に記載したような固形腫瘍を有する）がん患者から回収することができる。本明細書に記載したバイオマーカーの一つ以上の発現レベルは、例えば上記のIHC分析を通じて測定することができる。このようにして得られたその一つ以上のバイオマーカーのレベルを規格化し、場合によっては上記の手順に従って処理することで、サンプルの発現プロファイルを作成することができる。その一つ以上のバイオマーカー（例えばIGF-IIと、IGF1RまたはNanog）の発現レベルが所定の値と比べて上昇していることは、患者の生存率が低いことを示す。それに対してその一つ以上のバイオマーカーの発現レベルが所定の値よりも低いことは、患者の生存率が良好であることを示す。いくつかの例では、所定の値は、初期段階のがん患者（例えば1期のNSCLC患者）の集団における一つのバイオマーカーの平均発現レベルにすることができる。本明細書に記載した予後予測法によって評価した患者の生存率に基づき、適切な治療を決定することができる。

#### 【0042】

上記予後バイオマーカーのうちの一つ以上のものを、がん治療法、例えばIGF-II / IGF1Rシグナル伝達経路を標的とするがん治療法（例えばIGF-IIまたはIGF1Rに特異的な抗体）に応答しやすいがん患者の同定に用いることもできる。そこで本明細書には、本明細書に記載した一つ以上のバイオマーカーのレベルが上昇しているがん患者を、IGF-II / IGF1Rシグナル伝達経路に干渉する薬剤で治療する方法が提示されている。いくつかの例では、がん

10

20

30

40

50

患者は、固形腫瘍、例えば肺がん（例えばNSCLCまたはSCLC）、乳がん、腎臓がん、前立腺がん、卵巣がん、皮膚がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、メラノーマ、口腔がん、膵臓がんのいずれかを持つことができる。患者は、例えばIHCアッセイによって求まるCAFが発現するIGF-IIのレベルが上昇している、および/またはCSCが発現するIGF1Rおよび/またはNanogのレベルが上昇している可能性がある。IGF-II / IGF1Rシグナル伝達経路に干渉することのできる薬剤には、抗IGF-II抗体または抗IGF1R抗体が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0043】

本明細書には、サンプル中のがん幹細胞と、がん細胞の幹細胞性のレベルを同定するのに用いるキットも提示されている。このようなキットは、傍分泌ネットワークの第1のバイオマーカー（例えばCAFが発現するIGF-II）を検出するための第1の薬剤と、傍分泌ネットワークの第2のバイオマーカー（例えばCSCが発現するIGF1RまたはNanog）を検出するための第2の薬剤を含み、場合によっては傍分泌ネットワークの第3のバイオマーカー（例えば第2の薬剤がNanogに特異的である場合にはIGF1R、第2の薬剤がIGF1Rに特異的である場合にはNanog）を検出するための第3の薬剤を含むことができる。

#### 【0044】

いくつかの例では、第1の薬剤および/または第2の薬剤および/または第3の薬剤は、上記バイオマーカーに特異的な抗体である。抗体（複数形も同じ意味で用いる）は、可変領域に位置する少なくとも1つの抗原認識部位を通じ、標的（例えば炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチドなど）に特異的に結合することのできる免疫グロブリン分子である。本明細書では、「抗体」という用語に、完全な（すなわち完全長の）ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体だけでなく、その抗原結合フラグメント（Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fvなど）、単鎖（scFv）、その変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、ヒト化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、直線状抗体、単鎖抗体、多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）や、必要とされる特異性を持つ抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の他の任意の改変形態（抗体のグリコシル化変異体、抗体のアミノ酸配列変異体、共有結合が改変された抗体が含まれる）が包含される。抗体には、任意のクラスの抗体、例えばIgD、IgE、IgG、IgA、IgM（またはそのサブクラス）が含まれ、抗体が特定のクラスである必要はない。免疫グロブリンは、重鎖の定常領域の抗体アミノ酸配列に応じ、異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには5つの主要なクラス、すなわちIgA、IgD、IgE、IgG、IgMがあり、そのうちのいくつかはさらにサブクラス、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2に分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常領域は、それぞれ、 $\mu$ と呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造と三次元配置は周知である。

#### 【0045】

本明細書に記載する方法で用いる抗体として、マウス、ラット、ヒトを起源とするものや、他の任意の起源（キメラ抗体またはヒト化抗体が含まれる）のものが可能である。本明細書に記載するどの抗体も、モノクローナルまたはポリクローナルが可能である。「モノクローナル抗体」は、均一な抗体集団を意味し、「ポリクローナル抗体」は不均一な抗体集団を意味する。これら2つの用語には、抗体の供給源や、抗体が作られるやり方の制限はない。

#### 【0046】

いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載したいずれかの方法に従って使用するための指示を含むことができる。含まれている指示は、第1の薬剤、第2の薬剤、第3の薬剤を用いて、興味の対象である細胞の集団（CAFまたはCSC）が発現する対応するバイオマーカーのレベルを測定するための記述を含むことができる。キットはさらに、分析に適した個人の選択に関する記述を含むことができる。

#### 【0047】

本発明のキットは、適切に包装されている。適切な包装には、バイアル、瓶、壺、可撓性パッケージング（例えば密封したマイラーやプラスチックの袋）などが含まれるが、こ

10

20

30

40

50

れらに限定されない。

【0048】

III. がん幹細胞を同定するためのハイコンテンツアッセイ (HCA)

本明細書には、がん細胞とCAFの両方を含むサンプル中のがん細胞の幹細胞性のレベルを分析するための画像ベースハイコンテンツアッセイ (image-based high content assay) (HCA) も記載されている。HCA法の一例の模式図を図14aに示してある。

【0049】

このアッセイは、CAFを作りだすもの (例えばCD90) を検出するための第1の薬剤と、がん幹細胞を作りだすもの (例えばNanog) を検出するための第2の薬剤を使用することを含んでいる。いくつかの実施形態では、第1の薬剤、または第2の薬剤、またはその両方として、抗体が可能である。例えば第1の薬剤として抗CD90抗体が可能であり、第2の薬剤として抗Nanog抗体が可能である。

10

【0050】

HCAを実施するため、CSCを、フィーダー細胞としてのCAFの存在下で培養することができる。CAFに対するCSCの比は、1:100~1:5 (例えば1:50、1:20、1:10) の範囲が可能である。CSCとCAFは、適切な条件下で適切な期間 (例えば72時間) にわたって共培養することで、がん幹細胞の1つの特徴であるがん細胞コロニーを形成することができる。10,000  $\mu\text{m}^2$  よりも大きい細胞クラスターは、細胞コロニーと見なすことができる。

【0051】

CSCとCAFを含むサンプルを、本明細書に記載したようにして第1の薬剤と第2の薬剤と反応させることができる。いくつかの実施形態では、第1の薬剤、または第2の薬剤、またはその両方を標識 (例えば蛍光染料) と直接複合化させる。その場合、第1の薬剤と第2の薬剤は、異なる標識と複合化させる。別の実施形態では、第1の薬剤と第2の薬剤の一方または両方に直接標識しない。その場合には、第1の薬剤と第2の薬剤のいずれかに特異的な (標識した) 二次的な薬剤を用い、第1の薬剤または第2の薬剤に間接的に複合化させることができる。

20

【0052】

一例では、CSC / CAF含有サンプルを抗Nanog抗体と抗CD90抗体で染色する。後者はFITCと複合化している。十分に洗浄して結合しなかった抗体を除去した後、サンプルをさらに、抗Nanog抗体に特異的な二次抗体と反応させる。この二次抗体はTRITCで標識することができる。

30

【0053】

CSC / CAF含有サンプルは、核を認識する薬剤 (DAPI) でさらに染色することができる。

【0054】

染色したサンプルは、例えば4倍対物レンズを備えたハイコンテンツ分析プラットフォームを用いて画像を取得することができる。画像は、公知の方法、例えばMetaXpress (登録商標) ソフトウェア (Molecular Devices社) を利用して分析することができる。がん細胞の核 (CD90<sup>-</sup>) は、例えば多波長細胞スコアリングを用いて同定することができる。次に、がん細胞コロニーは、本明細書に記載した方法を用いて同定することができる (実施例2参照)。CSCを表わすNanog<sup>+</sup>細胞 (例えばTRITCで染色された細胞) の数と全細胞数を求めることができる。各がんコロニーの幹細胞性は、全細胞に対するNanog陽性 (TRITCで染色された) 細胞の比として計算することができる。コロニーの密度は、全細胞のカウント数をコロニーの面積で割った値と定義することができる。

40

【0055】

CAFフィーダー細胞の総数は、CD90<sup>+</sup> (例えばFITC陽性) 細胞をカウントすることによって求められる。各ウェル内のコロニー当たりの細胞数と全コロニーの幹細胞の総数は、各ウェル内のコロニー当たりの平均細胞数と全コロニーの細胞の総数によってそれぞれ求めることができる。コロニー当たりの幹細胞の数とコロニーの幹細胞の総数は、各ウェル内のコロニー当たりの平均幹細胞数と全コロニーの幹細胞の総数によってそれぞれ計算することができる。

50

## 【 0 0 5 6 】

HCA法は、がん細胞の幹細胞性を低下させることのできる薬候補を同定するためのハイスループット・スクリーニング用プラットフォームとして使用できる。例えば候補化合物をCSC / CAF共培養物に添加し、適切な条件下で適切な期間インキュベートすることができる。がんの幹細胞性のレベルは、本明細書に記載したようにして求めることができる。候補化合物ががん細胞の幹細胞性をその候補化合物の不在下での幹細胞性よりも低下させるのであれば、その候補化合物は、がん細胞の幹細胞性を低下させることのできる潜在的な抗がん剤と同定することができる。

## 【 0 0 5 7 】

HCA法で用いるCSC / CAFのタイプに応じ、このスクリーニング用プラットフォームを適用して任意のタイプのがん、特に固形腫瘍を治療するための薬剤候補を同定することができる。例えばCSCとCAFは、例えば乳がん、腎臓がん、前立腺がん、卵巣がん、皮膚がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、メラノーマ、口腔がん、膵臓がんのいずれかを有する患者に由来するものが可能である。

10

## 【 0 0 5 8 】

当業者であれば、さらに工夫しなくとも、上記の記述に基づき、本発明を最大限に利用できると考えられる。したがって以下の具体的な実施形態は単なる例示であり、いかなる形でも本明細書の残部を制限することはないと見なすべきである。本明細書で引用したあらゆる刊行物は、本明細書で言及した目的または主題のため、参照により組み込まれている。

20

## 【 実施例 】

## 【 0 0 5 9 】

実施例1：がん関連線維芽細胞が、傍分泌シグナル伝達を通じて肺がんの幹細胞性の可塑性を調節する

本研究は、腫瘍微小環境における幹細胞の維持をさらに推進するためCD90(+)がん関連線維芽細胞(CAF)を供給された、Oct3/4(+)/Nanog(+)肺CSCの維持可能な初代培養物に関する。ここでは、トランスクリプトームのアプローチを適用し、傍分泌ネットワークが、脱分化と幹細胞様特性の再獲得を通じてCSCをサポートし、豊富にするニッチであることを突き止めた。具体的には、IGF-IIを発現するCAFの存在下におけるがん細胞のIGF1Rシグナル伝達活性化が、Nanogの発現を誘導し、幹細胞性を促進できることが観察された。さらに、この傍分泌シグナル伝達は、I期の非小細胞肺癌(NSCLC)患者における全生存と無再生存を予測する。さらに、IGF-II / IGF1Rシグナル伝達を阻止することでNanogの発現が抑制され、がん幹細胞の特徴が弱まる。この研究からのデータは、CAFががんの幹細胞性をサポートするニッチを構成することを証明しているため、この傍分泌シグナル伝達を標的とすることが、NSCLCの新たな治療戦略となりうる。Chen他、Nature Communication、第5巻：3472ページ(2014年)。その内容は、参照により本明細書に組み込まれている。

30

## 【 0 0 6 0 】

## 材料と方法

(i) 肺がん細胞系、患者、腫瘍試料

40

## 【 0 0 6 1 】

ヒトNSCLC細胞系であるNCI-A549、NCI-H460、H1975、NCI-EKVXを国立がん研究所(国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランド州、アメリカ合衆国)またはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC、マナサス、ヴァージニア州、アメリカ)から取得した。腺癌を有する肺がん患者からの初代培養物を用いてヒト肺がん細胞系であるCL25、CL83、CL141、CL152を確立した。10% FBSを補足したRPMI 1640の中で、20% O<sub>2</sub>かつ5% CO<sub>2</sub>からなる湿潤環境下で37 °Cにて細胞を培養した。

## 【 0 0 6 2 】

肺腫瘍組織試料を、完全な外科的切除を受けて組織学的にNSCLCであることが確認された患者(N=80)から取得した。参加した患者はI期に分類され、彼らは、以前にネオアジ

50

ユバント化学療法や放射線療法で治療されることがない。全試料をホルマリンで固定し、切片を作製し、H&Eで染色し、顕微鏡で調べた。肺がんのための国際病期分類システムに従って病期判定を行なった。Zuo他、J. Cell Biochem. 第113巻：2567～2575ページ（2012年）。

#### 【0063】

(ii) 肺がん幹細胞 (CSC)、がん関連線維芽細胞 (CAF)、正常な線維芽細胞 (NF) の初代培養物

ヒト肺CSCとCAFを、外科的切除を受けた肺がん患者の新たに切除した肺腫瘍組織から回収した。何人かの患者の人口統計情報を以下の表2に示す。腫瘍と、それとペアになる正常組織を、切除から30分以内に回収し、改変したプロトコルを用いて原発肺CSC培養物、CAF培養物、NF培養物を分離した。Navab他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA第108巻：7160～7165ページ（2011年）；Tesei他、Cell Prolif. 第42巻：298～308ページ（2009年）。

#### 【0064】

NSCLC患者から切除した組織のがん関連領域から肺CSCを分離し、フィーダー細胞（すなわちストローマ線維芽細胞）とともに培養して維持した。ヒト対象に関する研究で認められているIRBプロトコルに従ってサンプルを取得し、使用した。非がん関連ストローマは、病理医により、新生物病変領域から少なくとも5cm離れた位置で（殺菌条件下にて）切除から30分以内にサンプリングされた。非がん関連ストローマであることは、外科的切除とその後の組織学的分析の際の大まかな検査によって明らかになった。この組織は、以前に報告されているプロトコルの改変版に基づいて処理した。Dontu他、Genes Dev. 第17巻：1253～1270ページ（2003年）。簡単に述べると、この組織を薄片にし、S-MEM培地（GIBCO社）の中でデオキシリボヌクレアーゼ1（1 mg/ml；Bioshop社）とプロテアーゼ（1 mg/ml；Sigma社）の存在下にて4～6～12時間インキュベートした。消化後、細胞塊を40 μmの細胞濾過器（Falcon社）を通過させて篩にかけ、単一細胞懸濁液を得た。回収した細胞を、24ウェルのプレートに入れた10%FBSを含むRPMI1640の中で、改変した培養条件にて、10%O<sub>2</sub>かつ5%CO<sub>2</sub>という湿潤雰囲気の中で37℃にて、異なる細胞密度（5×10<sup>5</sup>）で培養した。30日間培養した後、ストローマ細胞が取り囲む球状コロニーを同定することができた。以前に報告されている方法をいくらか改変して球状細胞を継代培養した。Dontu他、2003年。7～10日後に軽く遠心分離（58g、800 rpm）して球を回収し、酵素（0.05%トリプシン、0.53 mMのEDTA.4Naの中で10分間；Invitrogen社）で解離させ、先端熱加工したパストゥール・ピペットを用いて機械的に解離させた。解離によって得られた細胞を40 μmの篩に通し、顕微鏡で単一細胞の状態を分析した。細胞を、5,000個の生存細胞/mlの密度で、フィーダーとしてストローマ細胞（5×10<sup>5</sup>細胞/ウェル）をあらかじめ播種したプレートに入れた。単一細胞/ウェルのクローン実験のため、FACS（FACS Ariel）の間に細胞ソーターを用いて細胞を96ウェルのプレートに入れた。そのウェルには、フィーダー細胞（2,000細胞/ウェル）があらかじめ播種してあった。以前に報告されている方法をいくらか改変して肺CSCを継代培養した。Dontu他、2003年。簡単に述べると、軽く遠心分離（58g、800 rpm）して球を回収し、酵素（0.25%トリプシン、1 mMのEDTA.4Naの中で10分間；Invitrogen社）で消化し、機械的に破壊した。この解離によって得られた肺CSCを100 μmの篩に通し、篩を通過した細胞を顕微鏡で分析した。その単一細胞を、5,000個の生存細胞/mlの密度で、CAFフィーダー細胞（5×10<sup>5</sup>細胞/ウェル）をあらかじめ播種しておいた10 cmの皿に入れた。

#### 【0065】

(iii) Cyntellect社のLEAP（登録商標）系を用いたコロニーの精製

EDTA含有溶液の中でトリプシンを用いてがん細胞を解離させて単一細胞群にし、その単一細胞懸濁液（500個の生存細胞/ウェル）を、あらかじめストローマ細胞（5×10<sup>4</sup>細胞/ウェル）を播種したC-lect（登録商標）6ウェル・プレートに添加した。コロニーが形成された後、LEAP（登録商標）系（Cyntellect社）を用いて個々の細胞を精製した。LEAP（登録商標）幹細胞コロニー精製アプリケーション・ガイドに従った。プレートをLEAP（登録商標）装置に装填し、コロニー精製アプリケーション・プロトコルを利用して処理した

。コロニー精製領域の画像処理とゲーティングを正方形の形で実施した。LEAP（登録商標）系は、選択された細胞の画像をプレビューのために表示した。細胞のアブレーションは、緑色レーザーを用いて個別に標的とした。LEAPの後、培養した細胞をウェルからトリプシンを用いて取り出し、標準的な培養条件で培養した。

【 0 0 6 6 】

(iv) リアルタイム逆転写酵素 (RT) Q-PCR

CAF、CLS1 / CAF、CLS1に関する幹細胞性関連遺伝子の発現レベルとAffymetrixのマイクロアレイのデータの確認を、ABI Prism 7900シーケンサー (Applied Biosystems社) を用いたRT Q-PCRによって実行した。プライマーは、Primer Express 3.0 (Applied Biosystems社) を用いて以下の表に示すように設計した。

10

【 0 0 6 7 】

【表 1】

表1: Q-PCRのためのプライマーのリスト

遺伝子の記号	Unigene ID	フォワードプライマー	配列番号	リバースプライマー	配列番号
POU5F1	Hs. 24918	TTCAGCCAAACGACCATCTG	1	GAACCACACTCGGACCACATC	19
SOX2	Hs. 518438	CACACTGCCCTCTCAGACAT	2	CCCATTTCCCTCGITTTTCTT	20
NANOG	Hs. 661360	CACAGTCCCAAAGGCAAAC	3	GCCTTCTGCGTCACACCATT	21
IGF-1I	Hs. 523414	GGCGGCATTTGGGATACA	4	TCTGTCATGGTGGAAAGATGGA	22
IGF1R	Hs. 649408	TACAAAGGGCCATCGTTCATC	5	TCCGGACACGAGGAATCAG	23
IGF2R	Hs. 487062	GCAGAAGCTGGGTGTCATAGGT	6	CACGGAGGATGCGGTCTTA	24
TGFBR1	Hs. 494622	TCCTTCAAACGTGCTGACATCT	7	TGGAACATCGTCGAGCAATTT	25
SMAD2	Hs. 12253	GCCACCTTGCAGGTTCGA	8	CAGACCCACCAGCTGACTTCTT	26
TCF21	Hs. 78061	TCCTGGCTAACGACAAATACGA	9	GGGCCACGTCAGGTTGAC	27
EGR1	Hs. 326035	TTTCACGTCTTGGTGCCTTTT	10	CCCTCACAATTGCACATGTCA	28
LIF	Hs. 2250	TCTCTAGTTCCCCACCTCAATCC	11	TTGTCACCCAAGGCCATGT	29
LIFR	Hs. 133421	CCAACATGACTTGGGACTACGT	12	CCTGGTCGAAACTCATCAGATTC	30
HGF	Hs. 396530	CAAATGTCAGCCCTGGAGTTC	13	CCGATAGCTCGAAGGCAAAA	31
HGFR	Hs. 132966	GCTAAAATGCTGGCACCCCTAAA	14	GATATCCGGGACACCAGTTCAG	32
SPARC	Hs. 111779	ATGCGGGACTGGCTCAAG	15	CAGTCAGAAGGTTGTTGCTCAT	33
DCN	Hs. 156316	GCCACCTGGACACAACAC	16	GGACCGGGTTGCTGAAAAG	34
THBS1	Hs. 164226	CATCCGCAAAGTGACTGAAGAG	17	CTGTACTGAACTCCGTTGTGATAGC	35
ACTB	Hs. 520640	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	18	CGGCCACATTGTGAACTTTG	36

20

30

【 0 0 6 8 】

TATAボックス結合タンパク質 (TBP) と  $\beta$ -アクチンを内部対照として用いた。発現レベルをTBPに対して規格化し、 $CT = - [CT_{標的} - CT_{TBP}]$  と定義した。相対的発現比は、対照に対する倍率変化として計算した ( $2^{-CT}$ )。実験は、三重反復で実施した。

40

【 0 0 6 9 】

(v) 免疫蛍光顕微鏡検査

4% パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) を用いて室温で細胞を固定した。標準的な免疫蛍光プロトコルに従った。Ginestier他、Cell Stem Cell第1巻: 555~567ページ (2007年)。3% (wt/vol) ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBSの中でブロッキングとハイブリダイゼーションを実施した。Nanog (ReproCELL; 1:300) とOct3/4 (H134; Santa Cruz社; 1:100) を標的とするモノクローナル抗体 (mAb) のほか、CD9

50

0 FITC複合化 (5E10; BD Pharmingen社; 1:100) 抗体、サイトケラチン-7 (Dako社; 1:50) 抗体、サイトケラチン-20 (Dako社; 1:25) 抗体、ケラチン-5/6 (Thermo社; 1:10) 抗体、甲状腺転写因子 (TTF1; Dako社) 抗体を使用した。Axiovert 200顕微鏡 (Carl Zeiss社、ゲッティンゲン、ドイツ国)、またはMetaXpress (登録商標) (Molecular Devices社) を備えた共焦点レーザー走査顕微鏡 (C1si、Nikon社、日本国)、またはフローサイトメトリー (FACSAria、Becton Dickinson社) を用い、染色された細胞を調べた。

【0070】

(vi) PKH26保持アッセイ

肺CSC ( $10^6$ 細胞/100  $\mu$ l) を2  $\mu$ MのPKH26レッド (Sigma社) で標識し、室温で5分間インキュベートした。Bertolini他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA第106巻: 16281~16286ページ (2009年)。標識した細胞を培地で3回洗浄した。標識した細胞をCAFとともに、またはCAFなしで1週間にわたって共培養した。蛍光顕微鏡を用い、染色されて明確な赤い蛍光を出す細胞をモニターした。

10

【0071】

(vii) 超低球形成アッセイ

超低球形成アッセイを以前に報告されている (Dontu他、2003年) ようにして実施したが、以下の手順のように改変した。20 ng/mlのEGF (Sigma社) と20 ng/mlのbFGF (Invitrogen社) を補足したMCDB201無血清培地 (Invitrogen社) に入れた肺CSCの単一細胞懸濁液を超低付着24ウェル・プレート (Corning、Corning社、ニューヨーク州、アメリカ合衆国; 200個の生存細胞/ウェル) に播種した。この培地に新鮮な増殖因子を週に2回補足した。3週間後、Axiovert 200顕微鏡で球を調べた。

20

【0072】

(viii) SP分析

ヘキスト染色を以前に報告されている (Goodell他、J. Exp. Med.第183巻: 1797~1806ページ; 1996年) ようにして実施したが、以下の手順のように改変した。細胞を、あらかじめ温めておいたPBS (Invitrogen社) の中に $1 \times 10^6$ 細胞/mlの密度で懸濁させ、レセルピン (50  $\mu$ M; Sigma社) の存在下と不在下でHoechst 33342染料 (Invitrogen社) を添加して最終濃度5  $\mu$ g/mlにした。細胞を37 °Cで間欠的に震盪させながら120分間インキュベートし、そのインキュベーションが終わると細胞をPBSで洗浄し、4 °Cで遠心分離し、PBSの中に再度懸濁した。ヨウ化プロピジウム (2  $\mu$ g/ml; Invitrogen社) を添加して生存細胞を選別した。次にこの懸濁液を40  $\mu$ m細胞濾過器に通して単一細胞懸濁液を得た後、細胞をソーティングした。FACSAria (Becton Dickinson社) を用いて分析とソーティングを行なった。Hoechst 33342染料を375 nmで励起し、蛍光を二重波長検出 (青色、450/20; 赤色、670LP) によって分析した。

30

【0073】

(ix) ALDEFLUORアッセイ

ALDEFLUORアッセイキット (StemCell Technologies社) を製造者のプロトコルと以前の報告に基づいて使用し、細胞のALDH活性を測定した。Ginestier他、2007年。さまざまな処理の後、細胞を、ALDH基質BODIPY-アミノアセトアルデヒド (BAAA、 $1 \times 10^6$ 個の細胞につき1 mM、37 °Cで30分間インキュベート) を含むALDEFLUORアッセイ緩衝液に懸濁させた。ネガティブコントロールとして、細胞サンプルを、特異的ALDH阻害剤であるジエチルアミノベンズアルデヒド (DEAB) で処理した。非生存細胞をヨウ化プロピジウム染色によって同定し、ACSAria (Becton Dickinson社) を用いて分析した。

40

【0074】

(x) 薬剤耐性アッセイ

MTT [3-(4,5-ジメチルチアゾリル-2)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド] (Sigma社) アッセイを実施して細胞増殖を調べた。簡単に述べると、CLS1/CAF細胞とCLS1細胞を96ウェルのプレートに $5 \times 10^3$ 細胞/ウェルの密度で添加した。24時間インキュベートした後、細胞を一晩血清が欠乏した状態にした。次にその細胞をさまざまな濃度 (0~50  $\mu$ M) の薬、すなわちドセタキセル、シスプラチン、エトポシド、ビノレルピンで48時間処理

50

した。48時間後、0.5 mg/mlのMTTを含む培地を各ウェルに添加した。1.5時間インキュベートした後、培地を除去し、DMSOをプレートに添加した。可溶化したホルマザンの色強度をELISAプレート読取装置 (Vector3 ; Perkin-Elmer社、アメリカ合衆国) で570 nmにて測定した。

#### 【 0 0 7 5 】

##### ( xi ) SCIDマウスにおける異種移植腫瘍形成

6週齢のオスSCIDマウスに低投与量 ( 100  $\mu$  l のHBSSを混合したMatrigelの中に $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 個の生存細胞 ) の肺がん細胞またはCSCを皮下注射した。マウスを8週間モニターし、腫瘍形成と転移の発生を調べた。腫瘍の切片をヘマトキシリンとエオシン ( H&E ) で染色し、Nanog ( ReproCELL )、Oct3/4 ( Santa Cruz社 ; H-134 )、ビメンチン ( NC L-L-VIM-V9 ) を標的とする抗体を用いてIHCによって分析した。染色を視覚化するのにUltra Vision検出システムを用いた。そのとき、HPRポリマー ( Dako社 ) とジアミノベンジジン ( DAB ) 色原体 ( Dako社 ) で染色した後、ヘマトキシリンで対比染色した。

10

#### 【 0 0 7 6 】

##### ( xii ) 遺伝子発現プロファイリングと経路分析

Affymetrix GeneChipシステム ( Affymetrix社、サンタ・クララ、カリフォルニア州、アメリカ合衆国 ) を製造者のプロトコルに従って使用し、CAF、CLS1 / CAF、CLS1の遺伝子発現プロファイリング地図を得た。Affymetrix GeneChipシステム ( Affymetrix社、サンタ・クララ、カリフォルニア州、アメリカ合衆国 ) を製造者のプロトコルに従って使用し、遺伝子発現プロファイリングを実施した。

20

#### 【 0 0 7 7 】

国立台湾大学のゲノム医学のためのマイクロアレイ・コア施設が、アレイのデータを処理した。簡単に述べると、CAFと肺CSCとがん細胞から単離した全RNAを用い、T7-(dT)<sub>24</sub>プライマーでcDNA ( Superscript選択システム、Gibco BRL Life Technologies社 ) を作り出した。ビオチンで標識したリボヌクレオチドをBioArray高収量PNA転写産物標識キット ( Enzo Diagnostic社 ) で合成し、ヒトゲノムU133 Plus 2.0チップ ( Affymetrix社 ) にハイブリダイズさせた。GeneGo社のMetaCore ( [genego.com/metacore.php](http://genego.com/metacore.php) ) を用いて遺伝子リストの遺伝子発現データ・ネットワークと豊富化の分析を実施した。

#### 【 0 0 7 8 】

##### ( xiii ) ヒトケモカインとサイトカイン抗体アレイ

ヒトサイトカイン抗体アレイ ( C Series 4000、Ray Biotech社 ) を製造者の指示に従って用いた。Acosta他、Cell第133巻 : 1006 ~ 1018ページ ( 2008年 )。簡単に述べると、CAF培養物、CLS1 / CAF共培養物、CLS1培養物からの無血清培地を回収し、ブロックされた膜とともに軽く震盪しながら4 で24時間インキュベートした。現像後、Fujifilm LAS 3000システム ( 富士フイルム社、東京、日本国 ) を用いて化学発光信号を捕獲し、ImageJソフトウェアを用いて画像を処理した。化学発光信号の強度は、内部ポジティブコントロールに対して規格化した。

30

#### 【 0 0 7 9 】

##### ( xiv ) ウエスタンブロット分析

Zoller、Nat. Rev. Cancer第11巻 : 254 ~ 267ページ ( 2011年 ) に記載されているようにして複雑な手順を実施した。p-IGF1R ( Y1316、6113S ; 1 : 1000 )、p-AKT ( D9E ; 1 : 1000 )、AKT ( 927L ; 1 : 1000 )、Nanog ( D73G4 ; 1 : 1000 ) のための一次抗体をCell Signaling Technology社から購入し、IGF1R ( C-20 ; 1 : 1000 ) のための一次抗体をSanta Cruz社から購入した。モノクローナルマウス抗  $\alpha$ -アクチン ( Chemicon、Millipore ; 1 : 5000 ) をローディングコントロールとして用いた。次に膜をTBSTで3回洗浄した後、TBST / 2% スキムミルクの中で、セイヨウワサビのペルオキシダーゼ ( HRP ) が複合化した二次抗体 ( 1 : 5000 ) とともにインキュベートした。結合した抗体をEnhanced Chemiluminescence System ( Santa Cruz社、カリフォルニア州 ) を用いて検出した。化学発光信号は、Fujifilm LAS 3000システム ( 富士フイルム社、東京、日本国 ) を用いて捕獲した。すべての実験で、二重反復実験を少なくとも3回実施した。

40

50

## 【 0 0 8 0 】

## ( xv ) 肺がん患者からの腫瘍サンプルの免疫組織化学分析

Wielenga他、Am. J. Pathol. 第154巻 : 515 ~ 523ページ ( 1999年 ) に記載されているようにして複雑な手順を実施したが、以下の手順のように改変した。NSCLC患者からの腫瘍組織サンプルのIHC染色を、改変したUltra Vision quanto HRP-DAB検出システム ( Thermo社、イギリス国 ) を用いて実施した。IGF-II、IGF1R、Nanog、増殖細胞核抗原 ( PCNA ) タンパク質の発現のIHC分析に用いる切片は、最初に、抗原回収AR-10溶液 ( Biogenex社 ) または抗原回収シトラ溶液 ( Biogenex社 ) の中で121 にて10分間消毒した。次にサンプルを3% $H_2O_2$ -メタノールで処理し、順番に、ウルトラVブロック ( Lab Visio社 ) とともに10分間インキュベートし、ポリクローナル抗IGF-II抗体 ( MBS551011、MyBioSource社 ; 1 : 100 )、ポリクローナル抗IGF1R 抗体 ( #3027、Cell signaling社 ; 1 : 20 )、ウサギモノクローナル抗Nanog抗体 ( D73G4、Cell signaling社 ; 1 : 300 )、マウスモノクローナル抗PCNA抗体 ( PC-10、Thermo Scientific社 ; 1 : 400 ) とともに室温で2時間インキュベートした。免疫染色の検出は、超高感度非ビオチンポリマーHRP検出システム ( BioGenex社 ) を製造者の指示に従って使用して行なった。

10

## 【 0 0 8 1 】

## ( xvi ) 統計的分析

Kaplan-Meier法を利用して全生存曲線と無再発生存曲線を評価し、ログ-ランク検定を実施して生存曲線の間を差を検定した。高リスク群 / 低リスク群を隔てるカットオフ値は、リスクスコア中央値であった。年齢、性別、細胞のタイプ、腫瘍のサイズ、腫瘍の病期、増殖マーカーとしての増殖細胞核抗原 ( PCNA )、IGF-II発現 ( 高発現か低発現か )、IGF1R発現 ( 高発現か低発現か )、Nanog発現 ( 高発現か低発現か ) を共変数とする多変数コックス比例ハザード回帰分析を利用して独立な予後因子を評価した。インビトロと生体内の定量的なデータは、特に断わらない限り、平均値 ± 標準偏差 ( S.D. ) として提示する。2つの群の比較ではスチューデントのt検定を用いた。多数の群の比較には、テューキーの事後相関を伴う一元配置 ( ANOVA ) 法または二元配置法を用いた。すべての検定は両側検定であり、p値<0.05を有意であると見なした。

20

## 【 0 0 8 2 】

## 結果

## ( i ) 原発肺腫瘍からのCAFが肺CSCの増殖をサポートする

NSCLS患者 ( 以下の表2参照 ) からのCAFががんの幹細胞性のニッチを提供できるかどうかを調べるため、腫瘍組織からのCAFをフィーダーとして培養し、A549肺がん細胞系とEKVX肺がん細胞系と原発肺がん細胞 ( CL25、CL83、CL141、CL152 ; 図1 ) で幹細胞性の特徴を調べた。

30

## 【 0 0 8 3 】

【表2】

表2：患者の人口統計、腫瘍の病期、病理診断

患者	年齢	性別	TNM	病期	組織構造	初代培養細胞
PT013	54	女	T1bN0	IA期	ADC	がん細胞とCAF
PT207	67	男	T4N	IV期	ADC	がん細胞とCAF
PT220	71	男	T3N3M1b	IV期	SCLC	がん細胞とCAF
PT270	63	男	T3N3M1a	IV期	ADC	がん細胞とCAF
PT281	72	男	T2bN0	IIA期	ADC	CAFとNF
PT290	84	男	T3N0	IIB期	SCC	がん細胞とCAF
PT337	87	女	T2aN0	IB期	ADC	CAFとNF
PT376	84	男	T4N0	IIIB期	SCC	CAFとNF
PT450	46	男	T4N3M1b	IV期	ADC	がん細胞とCAF
PT704	47	女	T2aN0	IIA期	ADC	CAFとNF
PT881	49	男	T3N0	IIB期	SCC	CAFとNF
CLS1	87	男	T2bN0	IIIA期	ASC	がん細胞とCAF

ASC：腺扁平上皮癌；ADC：腺癌；SCC：扁平上皮癌；SCLC：小細胞肺がん

10

20

## 【0084】

この結果は、球形成活性を促進する能力に関しては、CAFが、それとペアにした正常な線維芽細胞（NF）よりも優れていることを示していた（図1a）。さらに、これらの球は、レーザーによって可能になる分析と処理（EAP）（この方法で、肺CSCコロニーをCLS1 / CAFの共培養物から効果的に精製した）により、レーザー捕獲を通じて単離された。精製された球は、NFとではなくCAFと共培養したとき、幹細胞性マーカーであるOct3/4とNanogがより高い発現レベルを示した（図1b）。CAFと共培養したがん細胞は、幹細胞性マーカーNanogの免疫染色レベルもより高かった（図1c）。PKH保持細胞は、CAFと共培養したがん細胞でだけ観察された。さらに、図1eと図1fは、がん細胞においてCAFによって増大するNanogの球形成能力と発現が、がん細胞系だけでなく、肺腺癌患者に由来する原発肺がん細胞（CL25、CL83、CL141、CL152）でも観察されたことを示している。

30

## 【0085】

(ii) CAFをフィーダー細胞として用いてCSC細胞系を確立する

がん細胞の単離に用いられる従来のインビトロ技術には、CSCを豊富にしたり維持したりすることができないという制約がある。こうした制約を克服するため、肺腫瘍組織から単離したCAFをフィーダー細胞として用いてインビトロでCSCをサポートした。これら原発肺がん細胞は、CAFと共培養したときに球を形成し、球形成肺CSC系であるCLS1が確立された。図1gに示してあるように、単一CLS1細胞は、CAFとともに継代培養を始めてから10日以内に球を形成し、Nanog、Sox2、Oct3/4が高い発現レベルを示した（図1g、図1h）ため、異数性が証明された。逆に、正常な核型を示すCAFは、CD90陽性であると同定され（図1h）、筋線維芽細胞マーカーである $\alpha$ -SMA、HLA-a、HLA-b、HLA-cを発現した。さらに研究するため、CLS1細胞を限界希釈によってクローニングし、CAFフィーダー細胞とともに継代培養した。線維芽細胞表面マーカーのフローサイトメトリー分析により、CAFフィーダー細胞の表現型が明確になった。これらのCAFは、ヒト線維芽細胞特異的マーカーCD90、HLA-a、HLA-b、HLA-c（クラスI）と、筋線維芽細胞マーカー $\alpha$ -SMAで、陽性に染色された。図1i。

40

## 【0086】

CAFをフィーダー細胞として用いてCLS1細胞を継代培養し、NanogとOct3/4が高い発現レベルを示す球形成能力を維持した（図9a）。これは、がん細胞の幹細胞性の特徴を示している。生体内のCLS1細胞のがん幹細胞性をさらに評価するため、がん細胞の限界希釈液を

50

、Visvader他、Nat. Rev. Cancer第8巻：755～768ページ（2008年）に記載されているようにして免疫不全マウスに注入した。その結果は、わずか100個のCLS1細胞をCAFと共培養することで、NOD-SCIDマウスに異種移植腫瘍を発生させることができ、そのような腫瘍開始能力はCAFフィーダー細胞を用いた何回かの継代培養の後も維持されることを示していた（図9b）。

【0087】

（iii）共培養物からCAFを除去すると幹細胞性が低下した

CAFと共培養したCLS1細胞（CLS1/CAF）は、がん幹細胞性表現型を維持したが、CAFを継代培養の間に除去すると、そのようながん幹細胞性は失われ、その後Oct3/4とNanogの下方調節（図2a、図2b）と、Oct3/4陽性細胞とPKH26保持細胞の低減（図2c）が続いた。最も重要なことは、このデータから、CLS1/CAFの腫瘍開始頻度が1/910であり、これらの細胞は大きな転移活性（12/15）を示すのに対し、CLS1細胞の腫瘍開始能力と転移能力は、CAFなしでの12回の継代培養の後に低下すること（1/4,137）が分かった（以下の表3と表4を参照のこと）。

10

【0088】

【表3】

表3：がん細胞/CAFと分化したがん細胞のTIC頻度

細胞	1回に注入する細胞数	腫瘍の数/注入回数	TIC頻度 (95%CI)
CLS1/CAF	100	10/26	1/910 (1/552~1/1498)
	1000	16/21	
	10,000	20/21	
CLS1 p.12	100	0/11	1/4137 (1/2145~1/7979)
	1000	5/11	
	10,000	9/11	
	100,000	9/11	
CL141/CAF	100	2/6	1/670 (1/271~1/1652)
	1000	4/6	
	10,000	6/6	
CL141 p.6	100	0/6	1/61,464 (1/8,704~1/434,022)
	1000	0/6	
	10,000	1/6	
CL152/CAF	100	1/6	1/9,702 (1/3,721~1/25,293)
	1000	1/6	
	10,000	3/6	
CL152 p.6	100	0/6	ND
	1000	0/6	
	10,000	0/6	
A549	100	0/5	1/424,670 (1/109,505~1/546,672)
	1000	0/9	
	10,000	1/9	
	100,000	2/9	

20

30

40

CSCの腫瘍開始頻度（TIFC）は、L-calc限界希釈分析ソフトウェアを用いて計算した。CI、信頼区間；N.D.、不明。

【0089】

## 【表4】

表4：CLS1/CAF細胞、CLS1細胞、A549細胞の転移発生件数

細胞	肺転移/マウス
CLS1/CAF	12/15
CLS1	2/10
A549	0/3

10

## 【0090】

異種移植腫瘍は、皮下部位と転移部位にある細胞内でOct3/4とNanogの強い染色を示した(図2e)。さらに、これらの皮下腫瘍と転移した肺腫瘍は再培養することができ、転移部位に由来する肺がん細胞の初代培養物は、元のCLS1細胞と似た腫瘍性の球形表現型を示した。繰り返して培養したがん細胞は、親CLS1細胞と同じ腫瘍形成能力を示し、少ない細胞数(100細胞)でマウスに異種移植腫瘍を形成した。以下の表5を参照のこと。

## 【0091】

## 【表5】

表5：腫瘍の発生件数/注入したマウスの数

注入した細胞数	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^2$
転移肺腫瘍	4/4	4/4	3/5
SC異種移植	4/4	4/4	2/5

20

## 【0092】

CAFを原発肺がん細胞(CL141とCL152)およびCLS1と共培養すると、CAFなしでさらに3代継代培養したがん細胞と比べて、異種移植の中での球形形成能力を増大させること、より大きなサイズの球にすること、腫瘍開始頻度を増大させることができる(図2d)。CAFを共培養物から除去した後にはALDH活性も低下した。これらの結果は、CAFが、原発肺がん細胞におけるがんの幹細胞性にとってカギとなる調節因子として作用していることを示していた。

30

## 【0093】

細胞のSPの評価は、がん幹細胞性能力と薬剤耐性を評価する別の方法である。CAFと共培養したCLS1細胞では、他の肺がん細胞系(CL1-5、A549、H522、H23、Hop62、H322M、EKVXが含まれる)と比べてSP細胞の割合が多いことが判明した。細胞系CL1-5(腺癌)、A549(腺癌)、H522(腺癌)、H23(腺癌)、Hop62(腺癌)、H322M(気管支肺癌)、EKVX(腺癌)のSP%は、それぞれ、ND、5.1、0.2、ND、ND、ND、9.6である。CLS1細胞のSPは、CAFを除去した後に顕著に低下し(図10d)、化学療法薬(エトポシド、ドセタキセル、二酒石酸ピノレルピン、シスプラチン)に対する耐性が低下した(表6)。

40

## 【0094】

【表6】

表6：化学療法用化合物で処理したCLS1/ CAFとCLS1のIC<sub>50</sub>

薬	IC <sub>50</sub>	
	CLS1/ CAF	CLS1
エトポシド (VP-16)	109.47 μM	1.06 μM
ドセタキセル	54.8 nM	4.2 nM
二酒石酸ビノレルビン	775.4 nM	28.5 nM
シスプラチン	0.31 μM	0.20 μM

10

## 【0095】

(iv) CAFの除去によってCLS1肺CSCが「分化」する

CAFと共培養したCLS1細胞 (CLS1/CAF) は、そのがん幹細胞性表現型を維持した。しかしCLS1細胞は足場依存性になり、フィーダー細胞の除去後はNanogとOct3/4の発現が低下した。いくつかのCLS1細胞は、Oct3/4の損失に合わせて腺分化を示しさえし (図2c、矢印の先)、異なるCLS1単一細胞クローン (C1、C2、C3、C4クローン) で腺癌マーカーと扁平上皮癌マーカー (扁平上皮癌に関してはTTF1、CK7、CK20、p63、ケラチン5/6) が異なる発現パターンを示した。免疫組織化学 (IHC) でも、CLS1形成異種移植片において染色パターンが異なる分化したがん細胞 (TTF1、CK7、CK20、p63、ケラチン5/6、ムチン-1) になっていることがわかった。これらの結果は、幹細胞性の特徴を有するCLS1細胞が異なるタイプの肺がん細胞に分化できて、異なる腺癌マーカーと扁平上皮癌マーカーを発現したことを示している。重要なのは、CAFと共培養することによりこのパターンを逆転させることが可能になり、分化マーカーが下方調節され、NanogとOct3/4が顕著に上方調節されたことである (図10)。

20

## 【0096】

(v) CAFは肺がん細胞において幹細胞様特性を促進する

上に指摘したように、CAFを除去すると肺CSCの分化と幹細胞性の喪失が起こるが、分化したがん細胞 (CLS1 p12細胞、CLS1 p27細胞、A549細胞) は、CAFと共培養することで再分化してがん幹様特性を再び獲得することができて、幹細胞性マーカーの発現が増加する (NanogとOct3/4; 図3a) とともに、わずか100個の細胞を皮内投与した後に異種移植片を形成する能力を再び獲得できた (図3b)。これらのデータはさらに、分化した肺がん細胞の「脱分化」を誘導できたことを裏付けている。

30

## 【0097】

次に、負のALDH活性 (ALDH-) を持つCLS1細胞を、分化した (非CSC) 集団としてソーティングした。次いでこれらALDH- CLS1細胞をCAFと共培養し、CAFががん幹細胞性の増加を通じて腫瘍形成を促進する能力を有するかどうか調べた。結果は、ALDH- 集団は、異種移植モデルで腫瘍形成能力が非常に低いことを示していた (図3c)。興味深いことに、これらのALDH- CLS1細胞は、CAFと再度共培養した後に大きな腫瘍形成能力を再び獲得した。特に、そのがん幹細胞性が再活性化され、幹細胞性マーカーの発現が上昇した (NanogとOct3/4はそれぞれ53.8倍、145.3倍増加し、ALDH活性は8.83倍増加し、腫瘍開始頻度は1/7、917から1/91に増加した; 図3c~図3e)。

40

## 【0098】

これらの結果は、CAFフィーダーによってOct3/4(+)とNanog(+)のCSC集団を維持できるが、CAFの除去後にはその集団が減少すること、そしてCAFと再度共培養することでこの集団を再プログラムして幹細胞性を再獲得できることを示唆している (図2a)。したがってこのCSC/CAF共培養系は、微小環境がどのようにCSCに影響するか、特に腫瘍形成CSCから腫瘍形成がん細胞への分化がどのように腫瘍微小環境の影響を受けるかを研究するための優れたモデルを提示する。Magee他、Cancer Cell第21巻、283~296ページ (2012年)。

50

## 【0099】

(vi) トランスクリプトームのプロファイリングによりCSCにおける幹細胞性経路が明らかになる

## 【0100】

肺CSCにおいてがんの幹細胞性に特異的なシグナル伝達経路を発見するため、Oct3/4(+)/Nanog(+)/CLS1 CSC (CLS1 / CAF) の遺伝子発現プロファイル进行分析し、そのプロファイルを、フィーダー細胞なしで培養した異なる継代数 (CLS1 p3、p6、p12) のCLS1分化がん細胞のプロファイルと比較した。トランスクリプトームとMetaCoreソフトウェア分析によれば、インスリン様増殖因子1受容体 (IGF1R) 経路、上皮-間充織転移 (EMT) 経路、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3K) 経路、TGF- 経路、WNT経路、ヘッジホッグ経路に関係する幹細胞性経路が、いくつかの幹細胞性転写因子 (Oct3/4、Nanog、Sox2) を調節している、CLS1 / CAF共培養物で上方調節されたのに対し、CAFなしで継代培養した後は劇的に低下した。このCLS1 / CAF共培養物で同定された経路のいくつかは、がんの幹細胞性を維持するのに関与していることが報告されている。Chang他、*Nat. Cell Biol.* 第13巻、317~323ページ (2011年) ; Mani他、*Cell* 第133巻、704~715ページ (2008年) ; Zhao他、*Nature* 第458巻、776~779ページ (2009年)。例えば多数のエピジェネティックな機構によって調節されるEMTは、上皮マーカーの発現を抑制し、上皮細胞を、幹細胞特性を持つ攻撃的で侵襲性のある腫瘍細胞に変換することが知られている。Chang他、2011年。これらの結果は、肺CSCでがんの幹細胞性を維持するのに複雑な調節ネットワークが存在することを示していた。同定されたカギとなる調節因子のいくつか、すなわちトランスフォーミング増殖因子受容体1 (TGFR1)、転写因子21 (TGF21)、白血病抑制因子 (LIF)、白血病抑制因子受容体 (LIFR)、初期増殖応答1 (EGR1)、SMAD2がQ-PCRによって確認された。これらの調節因子は、CAFなしで継代培養を続けると低下していく傾向を示している (図11)。MetaCore経路分析により、CLS1 / CAF共培養物でEMT、PI3K、IGF1R、TGF-、WNT、ヘッジホッグの各シグナル伝達経路に関与している遺伝子が上方調節されることがわかった。興味深いことに、これらの幹細胞経路は、細胞外シグナル伝達を通じて開始される可能性がある。これは、傍分泌調節とオートクリン調節が生体内でCSC集団の維持に寄与している可能性のあることを示している。

## 【0101】

(vii) CAFが傍分泌ネットワークを通じてがんの幹細胞性を調節する

CAFが肺がんの幹細胞性の維持にどのように寄与しているかをさらによく理解するため、CAFとCLS1の中 / 間の転写調節ネットワークとサイトカインネットワークの両方を研究した。興味深いことに、CAFはいくつかの増殖因子 (その中には、IGF-II、肝細胞増殖因子 (HGF)、LIF、ストローマ細胞由来因子1 (SDF1) が含まれる) を強く発現する。逆に、これら増殖因子の受容体 (その中には、IGF1R、LIFR、C-X-Cケモカイン受容体4型 (CXCR4) が含まれる) と、関連するシグナル伝達モジュレーター (インスリン様増殖因子結合タンパク質 (IGFBP) など) が、CLS1細胞で強く発現していた (図4a、図4b)。この観察結果は、CAFとCLS1細胞の間のクロストークの存在と傍分泌調節の存在を示唆していた。最も重要なのは、CLS1 / CAF共培養系から得られたならし培地がCLS1細胞の中でNanogの発現を顕著に上方調節できたことである (図4c)。傍分泌調節のこの機構を探求するため、27種類の特異的抗体を含むヒトのケモカインとサイトカインの抗体アレイ (Ray Biotech社、ノークロス、ジョージア州) を使用した。その結果、CLS1 / CAF共培養培地には多数のサイトカインが比較的豊富であることが証明された (図4d、図4e)。

## 【0102】

同定されたこれらの候補サイトカインのうちで、IGF-II、可溶性CD14、HGFが、CLS1細胞において個別にNanogの発現を誘導することが明らかになり (図4f)、中でもIGF-IIが最大の効果を示した。興味深いことに、IGF-IIと可溶性CD14は、CLS1細胞において、IGF-IIによって誘導されるNanog発現の効果を相乗的に増大させて20倍にした (図4g)。重要なのは、IGFが、肝細胞癌におけるようにはオートクリン因子として作用しないことが見いだされたことである。Shan他、*Hepatology* 第56巻、1004~1014ページ (2012年)。その

代わりに、CAFからのIGF-1Iの傍分泌調節が、肺CSC (CLS1) で優勢に発現しているIGF1Rに作用するとともに、他のIGF応答因子 (IGF2R、IGFBP1、IGFBP2; 図4bと図12) に作用していることがわかった。免疫蛍光染色により、IGF1Rは肺CSCで豊富に発現しているのに対し、IGF-1IはCAFで優勢に発現していることがさらに確認された (図4h)。それに加え、HGFとCXCR4のmRNAはCLS1細胞で発現していたのに対し、HGFとSDF1は、CAFでより強く発現していた (図4a、図4b)。

#### 【 0 1 0 3 】

さらに、肺がん細胞との共培養によってCAFで誘導される遺伝子の相互作用も、がんの幹細胞性のニッチを調節する上で重要であることが示唆された。実際、いくつかの極めて重要な傍分泌因子 (その中にはIGF-1I、HGF、SDF-1が含まれる) がCAFから放出されて、がんの幹細胞性を維持するのに重要な役割を果たしている可能性がある (図4b)。さらに、これらの因子は、がん細胞 (CLS1細胞、A549細胞、EKVX細胞; 図4iと図13) との共培養によって調節することができた。したがってこのデータは、がんの幹細胞性のニッチががん細胞とCAFの間の双方向コミュニケーションに関係している可能性のあることを示唆している。

10

#### 【 0 1 0 4 】

(viii) CAFは、IGF-1I / IGF1R / Nanogシグナル伝達を通じて幹細胞性をサポートする腫瘍に由来するあらゆるCAFがIGF-1Iを生産できるかどうかをさらに評価するため、さまざまな肺がん患者から単離したCAFをさまざまな肺がん細胞と共培養した。異なるCAFサンプルからレーザー捕獲したフィーダー細胞は、IGF-1Iをより高レベルで発現した (A549細胞ではN=6、EKVX細胞ではN=9) (図4i)。同様に、CAFとともに培養したがん細胞からのコロニー細胞 (N=4) は、IGF1Rの発現レベルがより高かった (図4j)。患者から単離した12個のCAFサンプルの特徴を表2に示す。理論に囚われることなく、がんの幹細胞性に寄与するCAFと肺CSCの間の傍分泌相互作用が関係する仮想シグナル伝達クロストークモデルが提案された (図4k)。

20

#### 【 0 1 0 5 】

肺CSCにおけるがんの幹細胞性に対するIGF-1Iシグナル伝達の役割をさらに確認するため、がんの幹細胞性のいくつかの特徴をCLS1とそれ以外の肺がん細胞系で調べた。IGF-1IがNanogの発現を増加させ (図5a)、球の数とサイズを増大させ (図5b)、画像ベースハイコンテンツ分析 (HCA; 図14a、図14b。実施例2も参照のこと) を通じてコロニー当たりのNanog陽性細胞の数を増やし、さまざまな肺がん細胞 (CLS1 / CAF、A549、H1975、EKVX) でALDEFUOR陽性比 (図15a、図15b) を増大させることが見いだされた。ウエスタンブロッティングにより、原発肺がん細胞 (CLS1、CL141、CL152; 図5c) においてIGF-1IがIGF1RとAktリン酸化と下流のNanogの発現を時間に依存して誘導することがさらにわかった。さらに、PI3K阻害剤LY294002は、CAFと共培養した原発肺がん細胞 (CLS1、CL141、CL152) においてコロニー当たりのNanog陽性細胞の数を顕著に低下させた。それに加え、(1、5、10  $\mu$ M/mlの) LY294002は、NOD/SCIDマウスにおいて、IGF-1Iによって誘導されるAktリン酸化とNanogの発現を抑制し、CLS1細胞 (10<sup>3</sup>個の細胞) の腫瘍形成力を低下させた。これらの結果を合わせると、PI3KがIGF-1I / IGF1R / Nanogシグナル伝達経路の媒介要素となりうることと、PI3Kシグナル伝達を阻止することでIGF-1Iによって調節されるがんの幹細胞性を低下させうることを示唆している。

30

40

#### 【 0 1 0 6 】

さらに、IGF-1Iによって調節されるがんの幹細胞性は、Nanogの特異的ノックダウンによって減弱させうるが見いだされた。図5dに示したように、Nanog に対するshRNAが、IGF-1Iによって誘導されるp-IGF1RとNanogの発現を抑制し、インビトロでの球形成能力を低下させ (図5e、図5f)、NOD/SCIDマウスでの腫瘍形成を減らした (図5g、図5h)。これは、IGF-1Iによって誘導される肺がんの幹細胞性におけるNanogの重要性を示している。

#### 【 0 1 0 7 】

(ix) IGF1Rシグナル伝達を阻止すると肺がんの幹細胞性が抑制される

50

IGF-IIシグナル伝達が、肺CSCを標的とした抗がん治療薬の対象にできる経路であるかどうかをさらに評価するため、特別なIGF1R阻止戦略を用いた。画像ベースHCAから、肺がん細胞系（A549、EKVX）と原発肺がん細胞（CLS1、CL141、CL152；図6a）では、特異的IGF1R抗体またはIGF1R阻害剤（ピクロポドフィリン（PPP）とAEW541）の存在下で各コロニーのNanog陽性細胞が顕著に抑制されることがわかった。IGF1R阻止抗体（IGF1R Ab）を用い、CLS1細胞の球形成能力がIGF1Rシグナル伝達の阻止後に低下することがさらに確認された（図6b）。同様の効果がA549細胞とEKVX細胞で観察された。肺がん細胞系（CLS1、A549、H1975、EKVX；図6c）では、IGF-IIで処理した後に実質的に増大したALDEFLUOR陽性比が、IGF1R Abの添加後にブロックされることも見いだされた。さらに、IGF1Rシグナル伝達がブロックされるとIGF-IIを媒介としたNanog発現の上方調節も抑制され（図6d）、CLS1細胞、CL141細胞、CL152細胞では、IGF-IIによって誘導されるリン酸化と、Aktリン酸化と、下流のNanogのシグナル伝達も抑制された（図6e）。最も重要なのは、IGF1R Abと阻害剤（AEW541）が、NOD/SCIDマウスに注入したCLS1細胞（ $10^3$ 個の細胞）の腫瘍形成力を顕著に低下させたことである（図6fと図17）。これは、IGF-IIシグナル伝達が肺CSCの潜在的な抗がん標的であることを明らかにしている。

10

## 【0108】

(x) IGF-II-IGF1R/Nanogの共存が悪い予後と相関している

本研究により、CAFが、肺がん細胞でIGF-IIを分泌してIGF1Rに作用する「フィーダー」として作用し、幹細胞性経路を駆動し、がんの幹細胞性の特徴を維持させることが証明された。臨床との関連性と腫瘍形成の初期段階におけるIGF-II/IGF1R/Nanog傍分泌調節の重要性を調べるため、手術前に化学療法または放射線療法を受けていたI期のNSCLC患者80人から腫瘍試料を回収し、各試料の連続切片を、IHCを通じてIGF-II、IGF1R、Nanogに対する抗体で染色した。これらの患者の臨床上の特徴を以下の表7～表9にまとめてある。CAFにおけるIGF-IIのレベルと腫瘍細胞におけるIGF1R/Nanogのレベルをスコアにし、IGF-II、IGF1R、Nanogタンパク質の発現を高（スコア リスクスコア中央値）または低（スコア < リスクスコア中央値）という2つのカテゴリーに分けた。

20

## 【0109】

【表7】

表7：肺がん患者におけるIGF-IIとIGF1Rの発現の臨床的特徴

	高 (%)	低 (%)	p値
IGF-II	N=39	N=41	
年齢 (平均値±標準偏差)	63.1 ± 10.1	62.8 ± 9.2	0.900
性別			
女性	16 (41.0)	25 (61.0)	0.117
男性	23 (59.0)	16 (39.0)	
細胞のタイプ			
腺癌	33 (84.6)	31 (75.6)	0.401
その他	6 (15.4)	10 (24.4)	
サイズ (平均値±標準偏差)	3.6 ± 2.1	3.3 ± 1.4	0.331
増殖マーカー			
高	23 (56.1)	18 (43.9)	0.189
低	16 (41)	23 (59.0)	
腫瘍の悪性度			
MD	30 (54.5)	23 (45.5)	0.152
WD	9 (36)	16 (64)	
IGF1R	N=43	N=37	
年齢 (平均値±標準偏差)	62.8 ± 10.0	63.1 ± 9.4	0.901
性別			
女性	17 (39.5)	24 (64.9)	0.027
男性	26 (60.5)	13 (35.1)	
細胞のタイプ			
腺癌	35 (81.4)	29 (78.4)	0.785
その他	8 (18.6)	8 (21.6)	
サイズ (平均値±標準偏差)	3.9 ± 2.1	2.9 ± 1.0	0.012
増殖マーカー			
高	26 (63.4)	15 (36.6)	0.116
低	17 (43.6)	22 (56.4)	
腫瘍の悪性度			
MD	33 (60)	22 (40)	0.146
WD	10 (40)	15 (60)	
Nanog	N=39	N=41	
年齢 (平均値±標準偏差)	63.6 ± 9.6	62.4 ± 9.8	0.589
性別			
女性	21 (53.9)	20 (48.8)	0.662
男性	18 (46.2)	21 (51.2)	
細胞のタイプ			
腺癌	28 (71.8)	36 (87.8)	0.096
その他	11 (28.2)	5 (12.2)	
サイズ (平均値±標準偏差)	3.6 ± 1.4	3.3 ± 2.0	0.479
増殖マーカー			
高	22 (53.7)	19 (46.3)	0.382
低	17 (43.6)	22 (56.4)	
腫瘍の悪性度			
MD	33 (60)	22 (40)	0.004
WD	6 (24)	19 (76)	

連続変数：t検定

カテゴリー変数：フィッシャーの正確確率検定

MD：中度の分化；WD：よく分化

増殖マーカー：増殖細胞核抗原 (PCNA)

【0110】

【表 8】

表8：肺がん患者においてIGF1Rの発現と組み合わせたIGF-IIの発現の臨床的特徴

	IGF-II <sup>高</sup> IGF1R <sup>高</sup>	IGF-II <sup>高</sup> または IGF1R <sup>高</sup>	IGF-II <sup>低</sup> IGF1R <sup>低</sup>	p値
IGF-II+IGF1R	N=39	N=41	N=31	
年齢 (平均値±標準偏差)	62.6 ± 10.5	64.4 ± 8.1	62.6 ± 9.6	0.795
性別				
女性	13 (39.4)	7 (43.8)	21 (67.7)	0.057
男性	20 (60.6)	9 (56.3)	10 (32.3)	
細胞のタイプ				
腺癌	29 (87.9)	10 (62.5)	25 (80.7)	0.125
その他	4 (12.1)	6 (37.5)	6 (19.4)	
サイズ (平均値±標準偏差)	3.8 ± 2.2	3.7 ± 1.7	2.9 ± 1.1	0.125
増殖マーカー				
高	20 (48.8)	9 (22.0)	12 (29.3)	0.208
低	13 (33.3)	7 (18.0)	19 (48.7)	
腫瘍の悪性度				
MD	25 (45.5)	13 (23.6)	17 (30.9)	0.115
WD	8 (32)	3 (12)	14 (56)	

【 0 1 1 1 】

【表 9】

表9：肺がん患者においてIGF1RとNanogの発現と組み合わせたIGF-IIの発現の臨床的特徴

	IGF-II <sup>高</sup> IGF1R <sup>高</sup> Nanog <sup>高</sup>	IGF-II <sup>高</sup> または IGF1R <sup>高</sup>	IGF-II <sup>低</sup> IGF1R <sup>低</sup> Nanog <sup>低</sup>	p値
IGF-II+IGF1R+Nanog	N=24	N=31	N=25	
年齢 (平均値±標準偏差)	64.0 ± 9.7	62.5 ± 10.2	62.5 ± 9.3	0.824
性別				
女性	10 (41.7)	16 (51.6)	15 (60.0)	0.477
男性	14 (58.3)	15 (48.4)	10 (40.0)	
細胞のタイプ				
腺癌	20 (83.3)	23 (74.2)	21 (84.0)	0.640
その他	4 (16.7)	8 (25.8)	4 (16.0)	
サイズ (平均値±標準偏差)	3.5 ± 1.1	3.8 ± 2.4	2.9 ± 1.1	0.153
増殖マーカー				
高	15 (36.6)	15 (36.6)	11 (26.8)	0.424
低	9 (23.1)	16 (41.0)	14 (35.9)	
腫瘍の悪性度				
MD	21 (38.2)	22 (40)	12 (21.8)	0.012
WD	3 (12)	9 (36)	13 (52)	

【 0 1 1 2 】

図7aに示してあるように、IGF-II、IGF1R、Nanogの発現の条件付き確率を示すためツリー図を作成した。これらの結果は、IGF-IIとIGF1Rの発現レベルが高い患者の72%はNanog

10

20

30

40

50

の発現レベルも高いのに対し、IGF-IIとIGF1Rの発現レベルが低い患者の80.6%はNanogの発現レベルがより低いことを示していた。次に、図7bに示したように、各試料の連続切片を、CAFではIGF-IIに対する抗体で、腫瘍細胞ではIGF1RとNanogに対する抗体で染色した。これらの結果は、CAFでIGF-IIのレベルが高く、腫瘍細胞でIGF1RまたはNanogのレベルが高い患者は、発現が低レベルの患者と比べて全生存 ( $p<0.0001$ 、カプラン-マイヤー分析；図7c) と無再発生存 ( $p<0.0001$ 、カプラン-マイヤー分析；図7d) が有意に悪いことが証明されたことを示していた。

【 0 1 1 3 】

多変数コックス比例ハザード回帰分析を利用し、独立したさまざまな予後因子と患者の生存の関連性を評価した (表9)。

【 0 1 1 4 】

【表 10】

表9：年齢、性別、細胞のタイプ、腫瘍のサイズ、増殖マーカー、腫瘍の悪性度を共変数とした、がん幹細胞マーカーの全生存に関する多変数コックス比例ハザード回帰分析

	ハザード比	95%HR C. I.		p値
IGF-II				
IGF-II	19.15	6.32	58.00	<0.0001
年齢	0.99	0.96	1.03	0.623
性別	1.60	0.75	3.41	0.221
細胞のタイプ	0.48	0.21	1.11	0.086
腫瘍のサイズ	1.09	0.94	1.26	0.250
増殖マーカー	1.27	0.64	2.52	0.491
腫瘍の悪性度	0.60	0.24	1.50	0.273
IGF1R				
IGF1R	15.80	5.85	65.96	<0.0001
年齢	1.00	0.96	1.03	0.613
性別	1.56	0.64	2.48	0.499
細胞のタイプ	0.57	0.28	1.36	0.230
腫瘍のサイズ	1.06	0.91	1.21	0.515
増殖マーカー	1.51	0.76	3.00	0.238
腫瘍の悪性度	0.56	0.23	1.35	0.198
Nanog				
Nanog	4.84	2.17	10.80	0.0001
年齢	1.00	0.97	1.03	0.806
性別	2.51	1.25	5.05	0.010
細胞のタイプ	0.94	0.41	2.14	0.876
腫瘍のサイズ	1.22	1.04	1.43	0.016
増殖マーカー	1.70	0.86	3.37	0.130
腫瘍の悪性度	0.57	0.23	1.37	0.207
IGF-IIとIGF1Rの組み合わせ				
IGF-II+IGF1R	15.92	6.25	40.54	<0.0001
年齢	1.00	0.97	1.03	0.867
性別	1.88	0.87	4.06	0.107
細胞のタイプ	0.46	0.18	0.99	0.047
腫瘍のサイズ	1.04	0.90	1.21	0.605
増殖マーカー	1.23	0.60	2.51	0.577
腫瘍の悪性度	0.60	0.25	1.44	0.256
IGF-IIとIGF1RとNanogの組み合わせ				
IGF-II+IGF1R+Nanog	8.37	3.84	18.26	<0.0001
年齢	1.00	0.97	1.03	0.913
性別	1.66	0.82	3.35	0.159
細胞のタイプ	0.65	0.29	1.45	0.288
腫瘍のサイズ	1.24	1.05	1.46	0.010
増殖マーカー	1.56	0.79	3.11	0.204
腫瘍の悪性度	0.81	0.32	2.07	0.659

## 【0115】

これらの結果から、独立な予後因子に含まれるのは、IGF-IIの発現（ハザード比（HR）= 19.15、95%CI = 6.32 ~ 58.00； $p < 0.0001$ 、コックス比例ハザード回帰分析）、IGF1Rの発現（HR = 15.80、95%CI = 5.85 ~ 65.96； $p < 0.0001$ 、コックス比例ハザード回帰分析）、

10

20

30

40

50

Nanogの発現 (HR = 4.84、95%CI = 2.17 ~ 10.80 ; p<0.0001、コックス比例ハザード回帰分析) であることが明らかになった。転移と関係する独立な予後因子は、IGF-1Iの発現 (HR = 7.37、95%CI = 2.43 ~ 22.35 ; p<0.0004、コックス比例ハザード回帰分析)、IGF1Rの発現 (HR = 13.29、95%CI = 3.09 ~ 57.23 ; p<0.0005、コックス比例ハザード回帰分析)、Nanogの発現 (HR = 7.59、95%CI = 2.67 ~ 21.62 ; p<0.0001、コックス比例ハザード回帰分析) であった。表10。

【 0 1 1 6 】

【表 1 1】

表10：年齢、性別、細胞のタイプ、腫瘍のサイズ、増殖マーカー、腫瘍の悪性度を共変数とした、がん幹細胞マーカーの無再発生存に関する多変数コックス比例ハザード回帰分析

	ハザード比	95%HR C. I.		p値
IGF-II	7.37	2.43	22.35	0.0004
年齢	1.01	0.97	1.06	0.543
性別	2.78	1.14	6.75	0.024
細胞のタイプ	1.47	0.49	4.41	0.494
腫瘍のサイズ	0.95	0.77	1.17	0.612
増殖マーカー	1.21	0.52	2.81	0.653
腫瘍の悪性度	0.54	0.19	1.50	0.235
IGF1R	13.29	3.09	57.23	0.0005
年齢	1.02	0.98	1.07	0.3393
性別	2.70	1.10	6.60	0.023
細胞のタイプ	1.34	0.44	4.10	0.607
腫瘍のサイズ	0.94	0.75	1.17	0.555
増殖マーカー	1.43	0.63	3.28	0.396
腫瘍の悪性度	0.51	0.19	1.39	0.189
Nanog	7.59	2.67	21.62	0.0001
年齢	1.03	0.98	1.07	0.263
性別	3.98	1.62	9.77	0.003
細胞のタイプ	2.14	0.68	6.73	0.191
腫瘍のサイズ	1.04	0.80	1.36	0.749
増殖マーカー	1.30	0.56	3.04	0.539
腫瘍の悪性度	0.63	0.22	1.76	0.373
IGF-II + IGF1R	4.83	2.24	10.39	< 0.0001
年齢	1.02	0.98	1.07	0.382
性別	2.86	1.14	7.16	0.025
細胞のタイプ	1.35	0.43	4.22	0.605
腫瘍のサイズ	0.92	0.75	1.14	0.431
増殖マーカー	1.09	0.47	2.55	0.845
腫瘍の悪性度	0.56	0.20	1.53	0.258
IGF-II + IGF1R + Nanog	5.02	2.41	10.47	< 0.0001
年齢	1.02	0.97	1.06	0.488
性別	2.80	1.14	6.84	0.024
細胞のタイプ	1.69	0.55	5.20	0.363
腫瘍のサイズ	1.00	0.78	1.27	0.972
増殖マーカー	1.19	0.51	2.76	0.692
腫瘍の悪性度	0.91	0.32	2.66	0.869

【0 1 1 7】

リガンドと受容体の両方の組み合わせが患者の予後に対して及ぼす効果の分析から、CAFでIGF-IIの発現レベルが高く、腫瘍細胞でIGF1RとNanogの発現レベルが高い患者は、CAFでIGF-IIの発現レベルが低く、腫瘍細胞でIGF1RとNanogの発現レベルが低い患者と比べて全生存（IGF-II + IGF1R + Nanog、 $p < 0.0001$ 、カプラン-マイヤー分析；図7e；HR = 8.37、9

10

20

30

40

50

5%CI = 33.84 ~ 18.26 ;  $p < 0.0001$ 、コックス比例ハザード回帰分析 ; 表1 ) と無再発生存 ( IGF-1I + IGF1R + Nanog、 $p < 0.0001$ 、 Kaplan-Meier 分析 ; 図7e ; HR = 5.02、95%CI = 2.41 ~ 10.47 ;  $p < 0.0001$ 、コックス比例ハザード回帰分析 ; 補足の表7 ) が最低であることが明らかになった。これらの結果はさらに、IGF-1I と IGF1R と Nanog の傍分泌シグナル伝達が、初期段階の NSCLC 患者で転移 ( $p < 0.0001$ 、コックス比例ハザード回帰分析) と全生存 ( $p < 0.0001$ 、コックス比例ハザード回帰分析) を予測するための新規な予後指数を提供することを証明している ( 表9 と 表10 ) 。

#### 【 0 1 1 8 】

##### 考察

CSC 研究の障害となる重要な1つの因子は、幹細胞性を保持しながら CSC の増殖をサポートする強力な培養系が不足していることである。さらに、線維芽細胞をフィーダー細胞として用いる伝統的な胚性幹細胞培養系は、まだ CSC 研究の成功した作業モデルになっていない。ここでは、肺がん患者由来の肺 CSC の初代培養物を確立し、CSC の特性の研究と、CSC を標的としたがんの薬の同定に用いた。重要なのは、CAF をフィーダー細胞として使用して、肺 CSC を、がんの幹細胞性を維持しながら継代培養できたことである。

#### 【 0 1 1 9 】

この研究では、( NF ではなくて ) CAF が CSC の増殖をサポートすることが証明された。肺腫瘍とがん細胞系の初代培養物から単離したこれらの CSC は、幹細胞性マーカーを発現する能力と、マウス異種移植片において少ない細胞数 ( 100 個未満の細胞 ) で腫瘍を発生させる能力を維持したため、CAF は幹細胞性表現型を維持する上で重要であった。CAF フィーダー細胞のサポートなしで肺 CSC はがん細胞に分化した。興味深いことに、ニッチ細胞として CAF を添加すると、EMT / MET、WNT、ノッチ、ヘッジホッグという傍分泌シグナル伝達の活性化を通じ、分化した腫瘍細胞を容易に CSC 状態に変換することができた。Giannoni 他、Cancer Res. 第70巻、6945 ~ 6956 ページ ; 2010 年。最も重要なのは、CAF が、CSC の中で増殖因子 ( IGF-1I、HGF、SDF1 など ) を過剰発現させ、そして対応する受容体 ( IGF1R、IGF2R、HGFR、CXCR4 が含まれる ) の発現を誘導することによって CSC の増殖を傍分泌方式で調節していることが見いだされたことである。さらに、CAF は IGF-1I を分泌して CSC 上の IGF1R を刺激し、そうすることで IGF1R / IGF1R / Nanog シグナル伝達経路を活性化し、肺がんの幹細胞性をインビトロと生体内で維持した。まとめると、この研究から得られたデータは、CSC モデルを支持しており、オートクリン調節の存在を示唆している ( Richards 他、Nat. Biotechnol. 第20巻、933 ~ 936 ページ ; 2002 年 ) 。しかし CAF と CSC の間には、肺 CSC のがん幹細胞性ニッチを維持する上で極めて重要な傍分泌相互作用が存在していた ( 図8 ) 。

#### 【 0 1 2 0 】

重要なことだが、CAF フィーダー細胞を使用して、がんの幹細胞性を保持した状態で CSC を継代培養することができた。本研究では、異なる患者からの CAF を、それとペアにした NF と比較することで、NF ではなくて CAF が CSC の球形成能力を促進し、肺がん細胞系で幹細胞性マーカーを発現させることが見いだされた。これは、CAF がインビトロで CSC の増殖をサポートしたことを示している。CSC を単離するための以前に報告されている戦略には、特異的マーカーを用いて、または超低付着性プレート上に腫瘍様塊を形成することを通じて、CSC を腫瘍塊からソーティングすることが含まれている。例えば Fuchs 他、Cell 第116巻、769 ~ 778 ページ ( 2004 年 ) ; Sneddon 他、Cell Stem Cell 第1巻、607 ~ 611 ページ ( 2007 年 ) を参照されたい。しかしこれらの方法では、インビトロで CSC を維持すること、または継代培養することができない。本明細書において、CAF をフィーダー細胞として用いると、がんの幹細胞性を保持した状態で CSC を継代培養できることが確立された。この考え方は、マウス胚性線維芽細胞 ( MEF ) がヒト胚性幹 ( hES ) 細胞の幹細胞性を維持する能力と似ている。Thomson 他、Science 第282巻、1145 ~ 1147 ページ ( 1998 年 ) ; Richards 他、2002 年。この考え方に基つき、肺 CSC 培養のための新しいモデルとして、がん患者から得られた CAF をフィーダー細胞として用いることを含むモデルを本明細書において示唆することで、現在はインビトロでがんの幹細胞性を維持することが困難であるという問題を

克服した。この方法は、がんの幹細胞性の表現型を維持しつつ、長期にわたって肺CSCを増殖させ、継代培養することをサポートするため、このプラットフォームは、薬のスクリーニングと、CSCまたは幹細胞性ニッチを標的とした新規な治療戦略にとって有用であることが判明するはずである。

#### 【0121】

以前の研究から、腫瘍の微小環境に関係する細胞のタイプ、例えば浸潤する免疫細胞（例えば腫瘍関連マクロファージ）やCAFが、がんの特質（腫瘍形成、血管新生、転移など）を決める上で極めて重要であることが明らかにされている。Doedens他、*Cancer Res.* 第70巻、7465～7475ページ（2010年）；Xu他、*Cell Biol. Int.* 第35巻、509～517ページ（2011年）。しかし腫瘍の微小環境ががんの幹細胞性をどのようにサポートしているかはあまりよくわかっていないままである<sup>52, 53</sup>。Xu他、2011年；Hanahan他、*Cancer Cell* 第21巻、309～322ページ（2012年）。ES細胞の研究から、フィーダー細胞が、重要なシグナル伝達（WNTシグナル伝達、ノッチシグナル伝達、ヘッジホッグシグナル伝達、EMTシグナル伝達）を活性化するいくつかの因子（例えばTGF- $\beta$ 1、LIF、bFGF）の分泌を通じて幹細胞の増殖と分化の抑制をサポートする上で重要であることが示されている。Mannello他、*Stem Cells* 第25巻、1603～1609ページ（2007年）。本データから、肺CSCでは、CAF（HGF、IGF-II、SDF-1、bFGF、WNT、オンコスタチンM）が、対応する受容体/シグナル伝達要素（EMT、TGF- $\beta$ 、WNT、ノッチ、ヘッジホッグ）と幹細胞性因子（Oct3/4、Sox2、Nanog）を通じてCSC様特徴を傍分泌方式で調節していることが証明された。さらに、本データから、IGF-II / IGF1R / Nanog経路が、肺CSCの増殖を腫瘍微小環境において主に傍分泌方式で調節する上で、また肺がんの幹細胞性をサポートする上で重要であることが確認された。肺CSCは、肺CSCとCAFの間の相互作用を通じてCAFを刺激し、CSCにおいてIGF1Rシグナル伝達を開始させるのに重要なIGF-IIを生産させることができた。

10

20

#### 【0122】

さらに、CSCとCAFの間の双方向傍分泌コミュニケーションと、それががんの幹細胞性を促進する上で果たす役割を調べた。その結果は、CAFがIGF-II、HGF、SDF-1を分泌することを示していた。これらの因子は、がんの幹細胞性を維持する上で重要な役割を果たしている可能性があり、CSCまたはがん細胞と共培養した後に上方調節された。本データは、CSCならし培地に豊富に存在していたサイトカイン（例えばbFGF、HGF、IGFBP2、GM-CSF、PARC）が、IGF-IIの発現が誘導された後にCAFによって放出される可能性があることを示唆している。以前の研究からの追加の証拠は、がん細胞から放出されるbFGFとTGF- $\beta$ が線維芽細胞の活性化に関与している可能性のあることを示している。Kalluri他、*Nat. Rev. Cancer* 第6巻、392～401ページ（2006年）；Franco他、*Cancer Res.* 第71巻、1272～1281ページ（2011年）。本明細書に提示したこれらの結果は、がん幹細胞性ニッチが、hES細胞を調節しているのと同様の傍分泌ループを共有している可能性を示している。Bendall他、*Nature* 第448巻、1015～1021ページ（2007年）。

30

#### 【0123】

さらに、本データから、がん細胞とCAFの間の双方向コミュニケーションが明らかになった。IGF-IIの分泌に関するCAFの調節は、肺がん細胞またはCSCにより、bFGFとそれ以外のサイトカインを通じて上方調節することができたのに対し、IGF-II / IGF1R軸は、がん細胞においてNanogの発現を促進した。したがって、CSCにおけるIGF1Rの発現増大と、CSCの幹細胞性の維持につながる正のフィードバックループが存在している可能性がある。Shan他、2012年。この証拠が、がん-ストローマ相互作用の役割と、がんの幹細胞性を調節する上での腫瘍微小環境の重要性を裏付けている。本データからさらに、IGF-II / IGF1R / Akt / Nanogシグナル伝達を阻止するとCSCにおけるがんの幹細胞性を低下させうることが示された。これは、肺CSCを標的としてIGF1R阻害剤を用いる治療法を臨床に応用できる可能性があることを示唆している。

40

#### 【0124】

最近、CSCを標的として定めて殺すための新しい治療戦略が多く設計されている。しかし、CSCの悪性度を判断する際に腫瘍微小環境が主要な役割を果たしていることが示唆さ

50

れている。Vermeulen他、Lancet Oncol.第13巻、e83~89ページ(2012年)。非腫瘍形成性がん細胞が「脱分化」してCSCに向かうことがいくつかのニッチで起こりうるかどうかを判断することが特に重要である。以前の研究では、正常な体細胞における細胞の可塑性と脱分化は、環境因子によって、または正しい因子の人工的な形質導入によって制御できることが示唆されている。Bjornson他、Science第283巻、534~537ページ(1999年); Takahashi他、Cell第131巻、861~872ページ(2007年)。最近、腫瘍微小環境のストローマ細胞が腸上皮細胞の脱分化を誘導し、腸腫瘍形成の間にその腸上皮細胞が腫瘍開始能力を獲得することが示された。Schwitalla他、Cell第152巻、25~38ページ(2013年)。本研究では、分化したがん細胞(CLS1 p12細胞、CLS1 p27細胞、A549細胞)と非がん性幹細胞の集団(ALDH-CLS1細胞)がCAFとの共培養を通じておそらく脱分化することで、CSC様特性を再び獲得し、幹細胞性マーカー(NanogとOct3/4)を再び発現している可能性のあることが見いだされた。本発明の知見は、分化したがん細胞の脱分化が、腫瘍微小環境すなわちCAFの影響下で起こっている可能性があるという証拠を提供する。

10

#### 【0125】

さらに、本研究では、IGF-II/IGF1R傍分泌と幹細胞性マーカーNanogがI期のNSCLC患者で新規な予後マーカーとして役立つかどうかを調べた。以前は、大半の予後因子の研究は、CAFよりもがん細胞に焦点を絞っていた。11個の遺伝子の予後CAF特性がNSCLC患者の生存と関係していることが報告されているだけである。Navab他、2011年。しかしCAFとCSCの間の傍分泌調節が臨床に及ぼす影響はよく研究されていない。IHC染色を実施することで、CAFにおけるIGF-IIのレベルとがん細胞におけるIGF1R/Nanogのレベルを明確に区別することが、初期段階の肺がん患者における重要な予後マーカーであることが初めて明らかになった。実際、CAFにおけるIGF-IIのレベルだけ、またはそのレベルとがん細胞におけるIGF1RおよびNanogのレベルとの組み合わせが、全生存および無再発生存と強く関連していた。腫瘍の進行に関するIGF-II/IGF1R/Nanog傍分泌シグナル伝達を初期段階の肺がんの予後マーカーとして使えることが結論された。

20

#### 【0126】

結論として、本研究により、腫瘍微小環境とCSCの間のクロストークへの新たな見通しが提供される。CLS1/CAF共培養モデルは、抗がん剤をスクリーニングしてCSCと腫瘍関連ストローマ細胞を標的とする化合物を探すための新たなプラットフォームを示している。さらに、CAFがIGF-II/IGF1R/Nanog経路を通じて傍分泌方式でCSCを調節しているという知見は、抗がん治療のための新たな潜在的標的を提供する。

30

#### 【0127】

##### 実施例2:画像ベースハイコンテンツアッセイ

肺CSCまたはがん細胞(200細胞/ウェル)を、CAF(2000細胞/ウェル)をあらかじめ播種した96ウェルのプレートに添加し、一晩放置してそのプレートに付着させた。さまざまな処理の後、免疫蛍光プロトコルに従い、(がん幹細胞マーカーとしての)Nanog(ReproCELL)(1:300)一次抗体と、(CAFマーカーとしての)マウス抗ヒトCD90 FITC複合化(5E10、BD Pharmingen社)抗体を用いて細胞を4℃で一晩処理した。次に、一次抗体をTRITC複合化二次抗体[ヤギ抗ウサギIgG(H+L)複合体、Invitrogen社]とともに室温で2時間インキュベートした。核はHoechst 33342染料(Invitrogen社)で対比染色した。二次抗体の背景蛍光レベルを求めるため、各プレートには、(Hoechst 33342染料で染色した)二次抗体だけを含有する対照ウェルが含まれていた。染色された細胞の画像を、自動化蛍光顕微鏡撮影プラットフォームを用いて取得した。

40

#### 【0128】

以下のようにしてを画像化と分析を行なった。4倍の対物レンズを備えたハイコンテンツ分析プラットフォームを用い、染色された細胞の画像化した。さらに画像を分析するため、各波長についてウェル1つにつき12個の視野を捕獲してモンタージュにした。画像は、MetaXpress(登録商標)ソフトウェア(Molecular Devices社)を用いて分析した。最初に、がん細胞の核(FITC染色なしの細胞、CD90-)を、多波長細胞ソーティングを用いて同定した。形態フィルタを用い、区画化されたがん細胞の核を広げて滑らかにすること

50

で、細胞クラスターマスクを作った。10000  $\mu\text{m}^2$  よりも広い細胞クラスターをがん細胞コロニーと規定した。最後に、TRITCで染色された細胞のカウント数と全細胞のカウント数を求めた。各コロニーの幹細胞性は、全細胞に対するNanog陽性（TRITCで染色された）細胞の比として計算した。コロニーの密度は、全細胞のカウント数をコロニーの面積で割った値と定義した。

【0129】

画像ベースハイコンテンツアッセイのプロセスの一例を示す模式図を図14aに提示してある。

【0130】

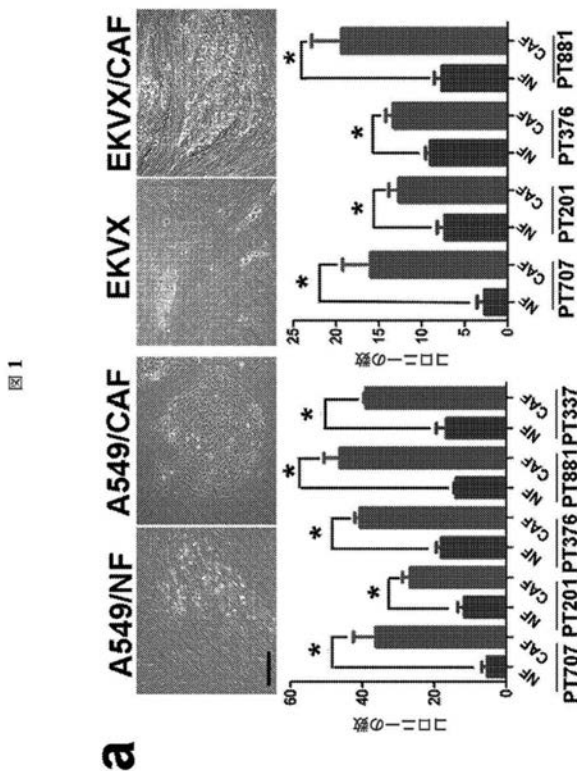
他の実施形態

本明細書に開示したすべての特徴は、どのように組み合わせてもよい。本明細書に開示したそれぞれの特徴は、同じ目的、同等な目的、類似した目的を持つ代替りの特徴で置き換えることができる。したがって特に明示しない限り、開示されている各特徴は、一連の一般的な同等な特徴または類似した特徴の一例にすぎない。

【0131】

上記の記述から、当業者は、本発明の本質的な特徴を容易に確認できるため、本発明の精神と範囲を逸脱することなく、さまざまな用途や条件に合わせるために本発明のさまざまな変更や改変を実現できる。したがって他の実施形態も請求項に含まれる。

【図1-1】



【図1-2】

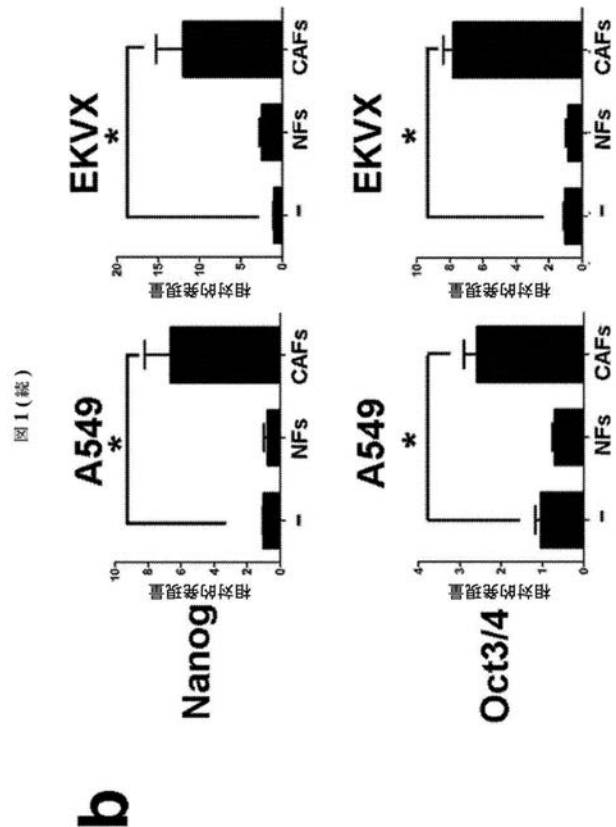


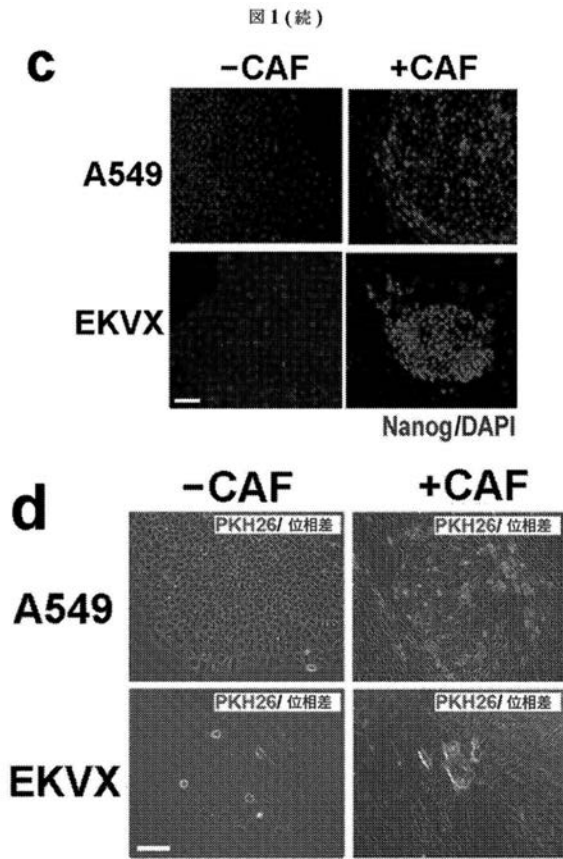
図1

図1(続)

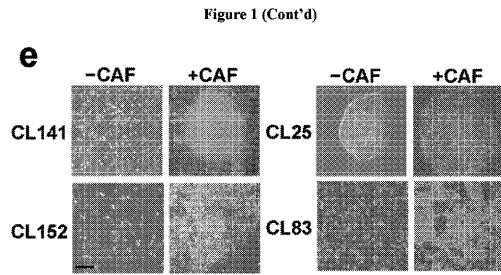
a

b

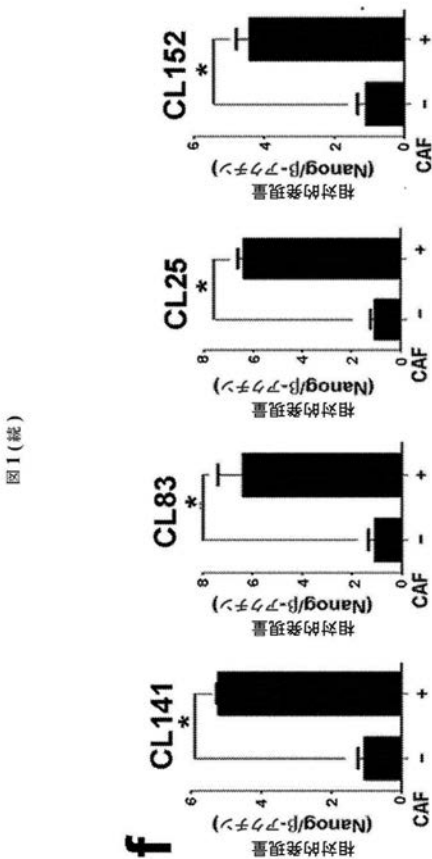
【 図 1 - 3 】



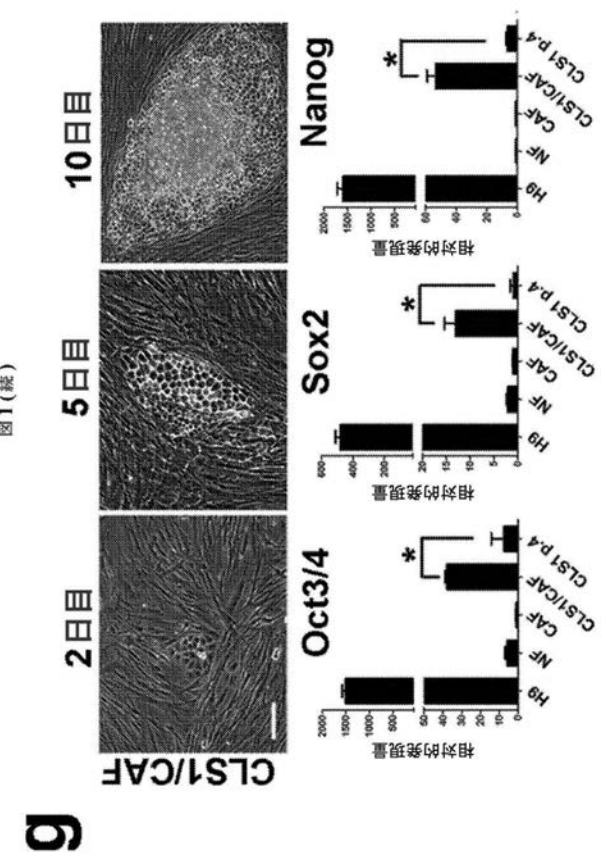
【 図 1 - 4 】



【 図 1 - 5 】

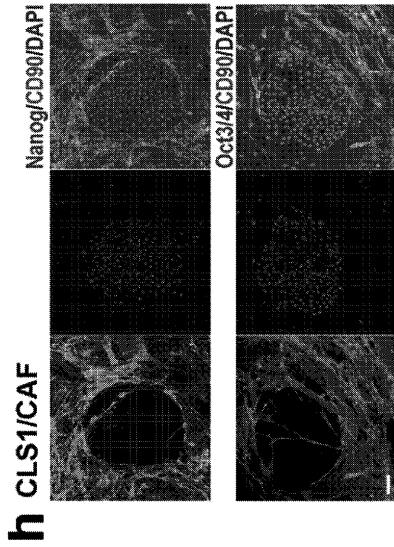


【 図 1 - 6 】



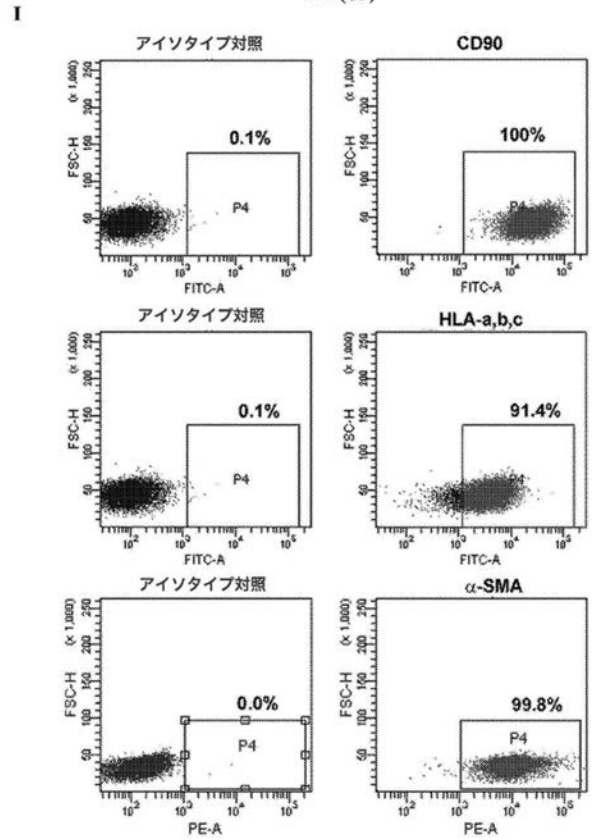
【 図 1 - 7 】

Figure 1 (Cont'd)



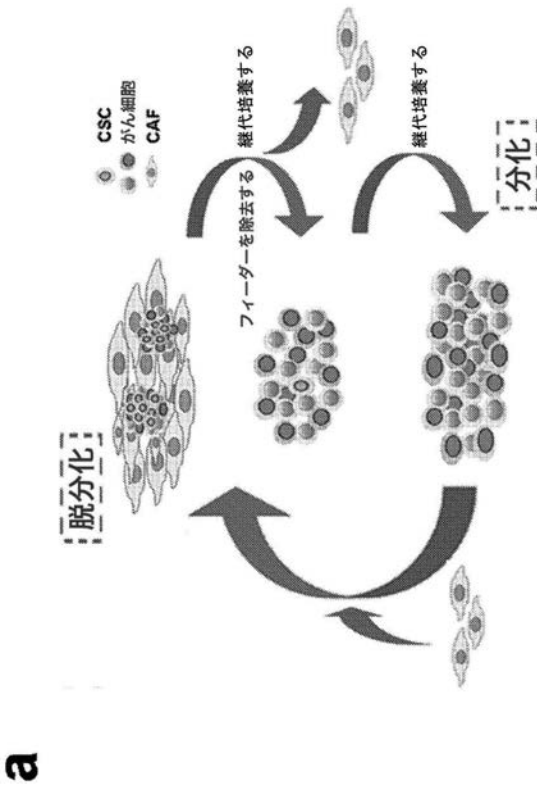
【 図 1 - 8 】

図 1 (続)



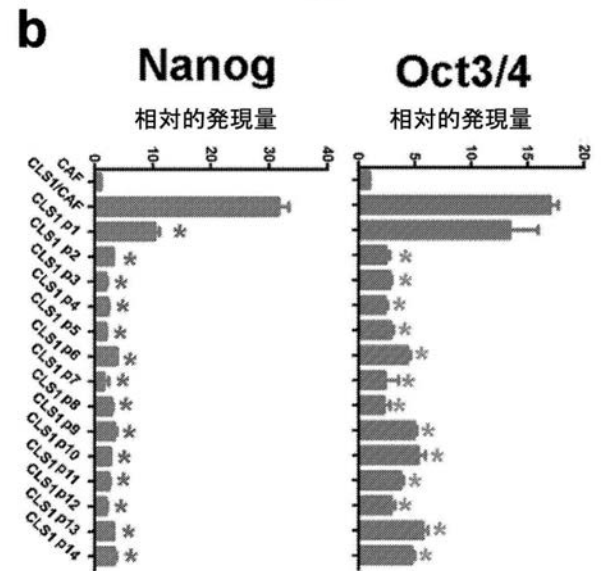
【 図 2 - 1 】

図 2

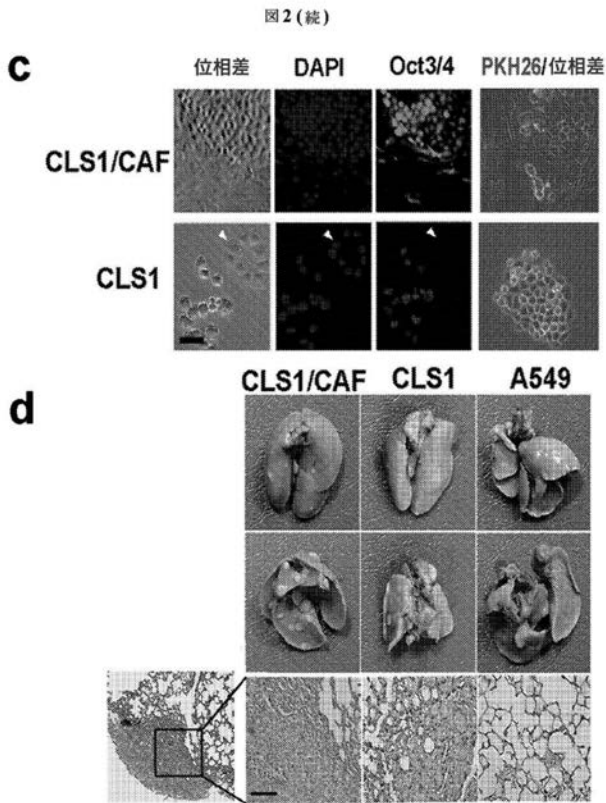


【 図 2 - 2 】

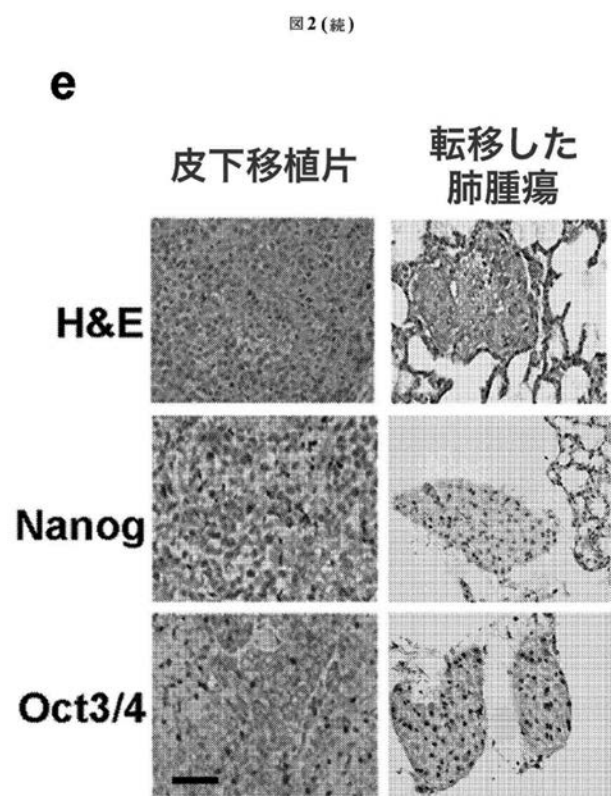
図 2 (続)



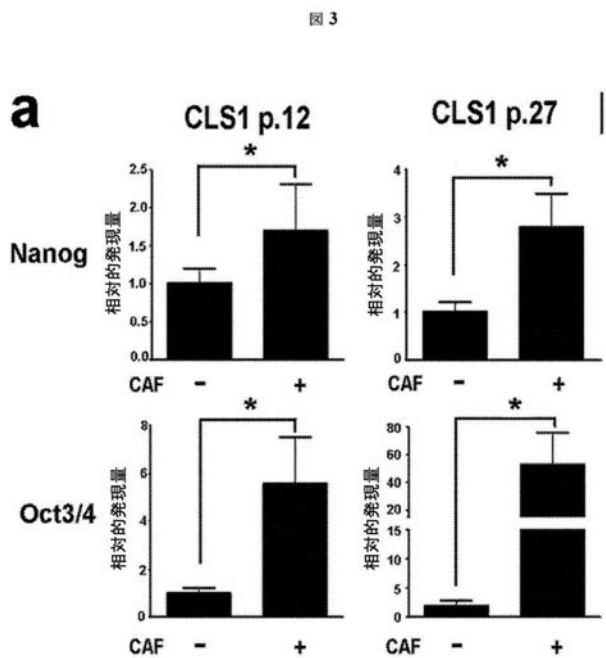
【 図 2 - 3 】



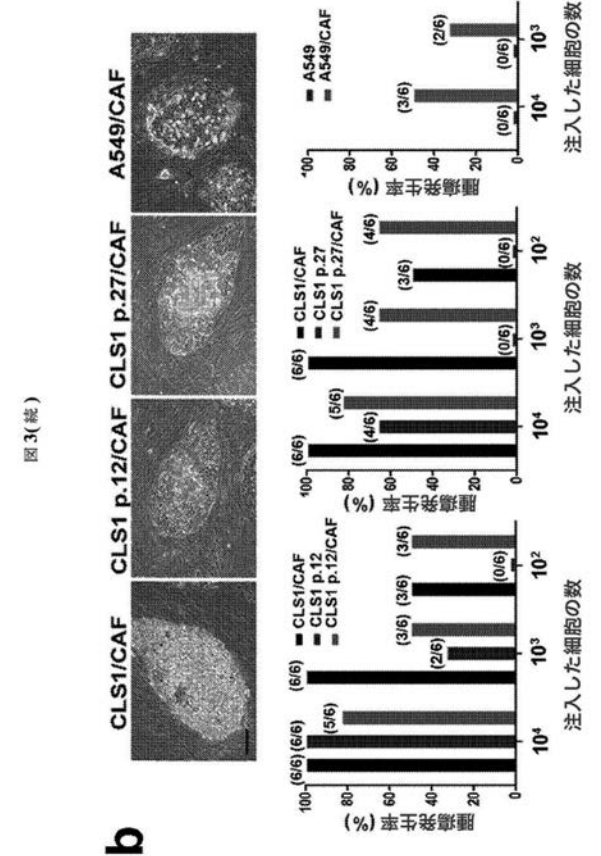
【 図 2 - 4 】



【 図 3 - 1 】



【 図 3 - 2 】



【 図 3 - 3 】

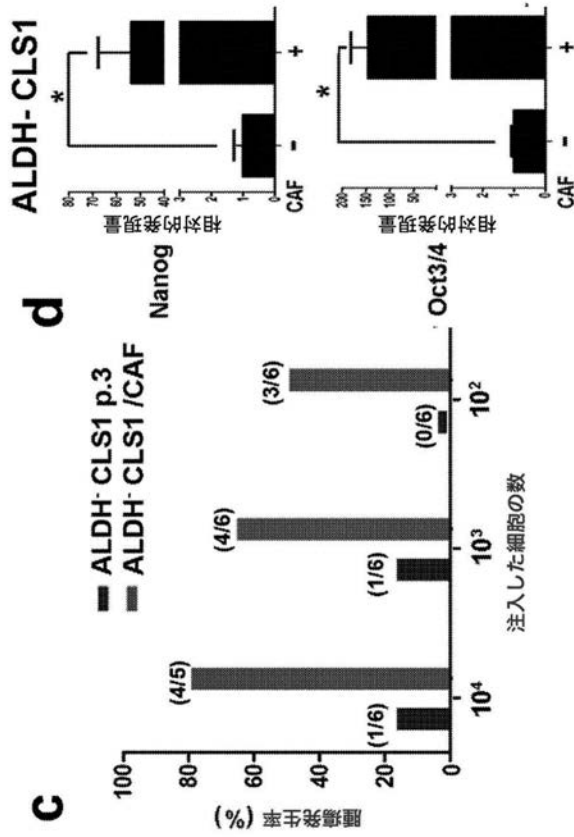


図 3(続)

【 図 3 - 4 】

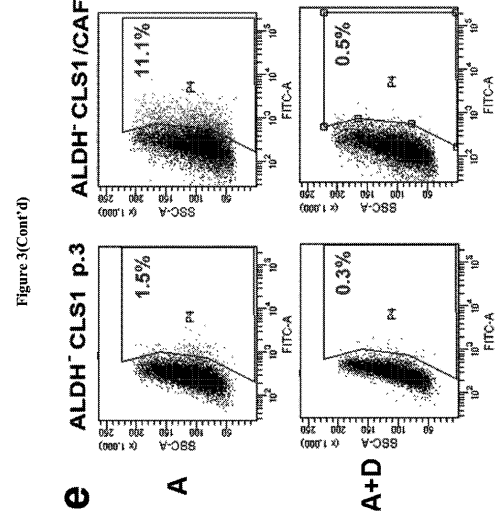


Figure 3(Cont'd)

【 図 4 - 1 】

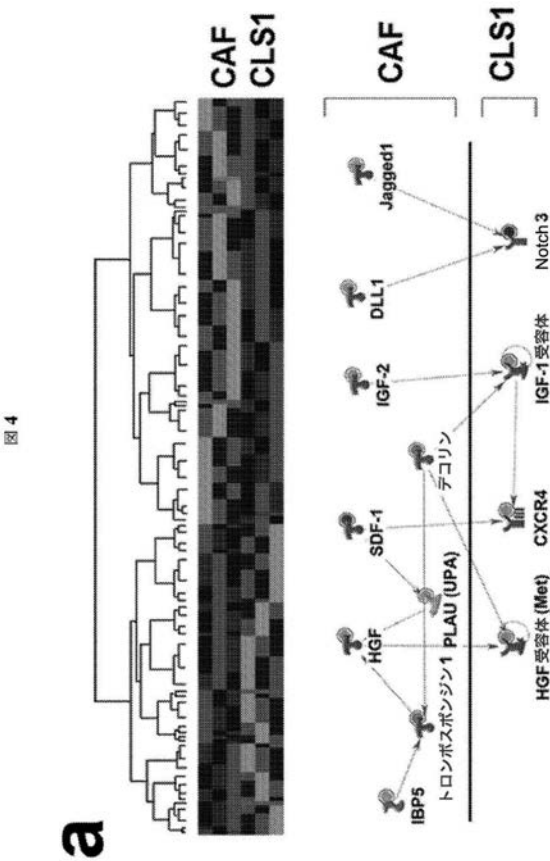


図 4

【 図 4 - 2 】

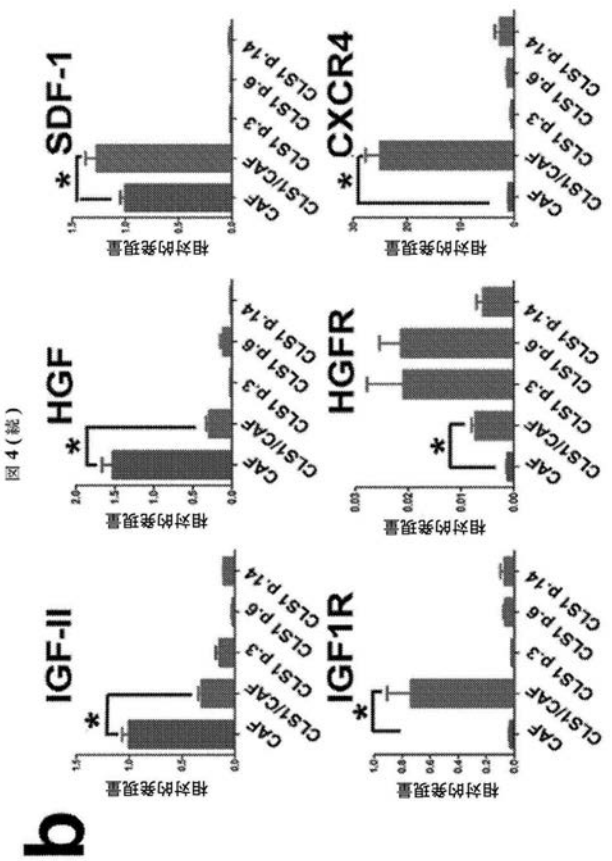
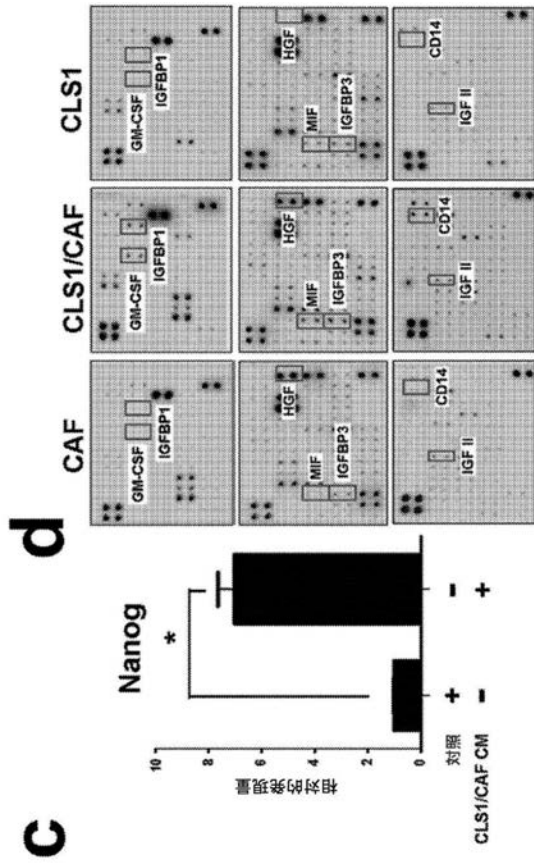


図 4(続)

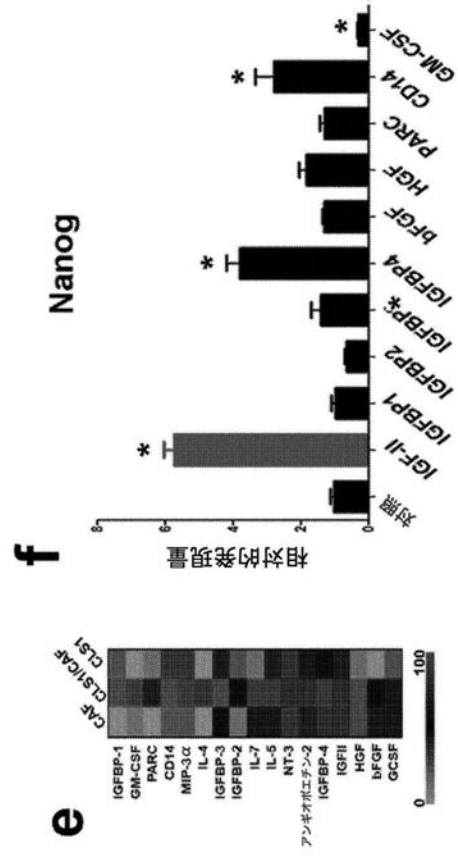
【 図 4 - 3 】

図 4 ( 続 )



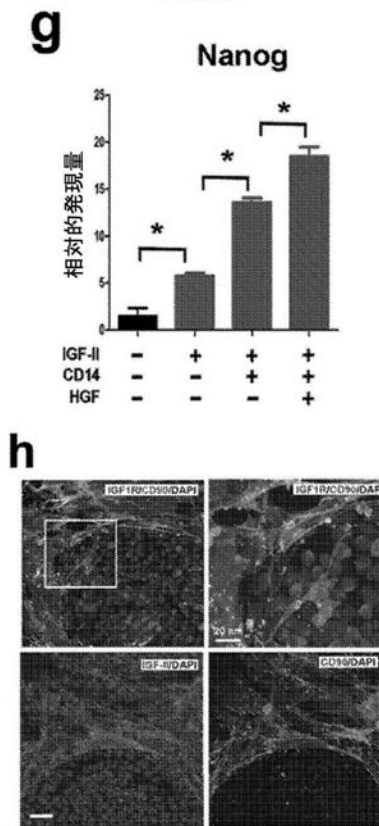
【 図 4 - 4 】

図 4 ( 続 )



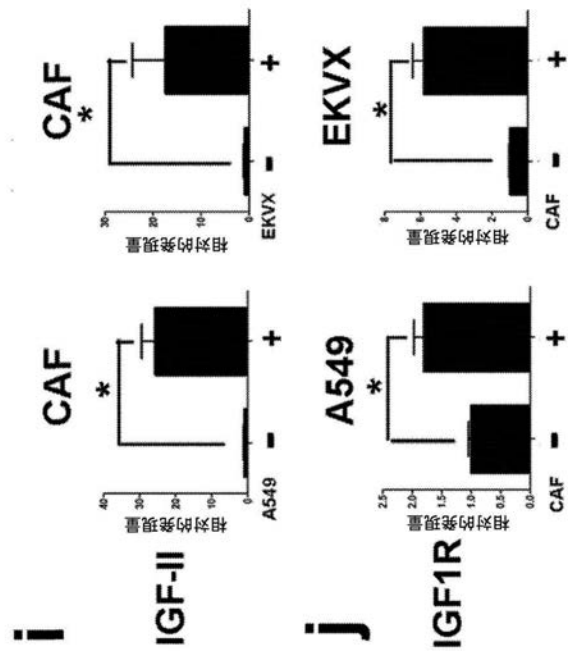
【 図 4 - 5 】

図 4 ( 続 )

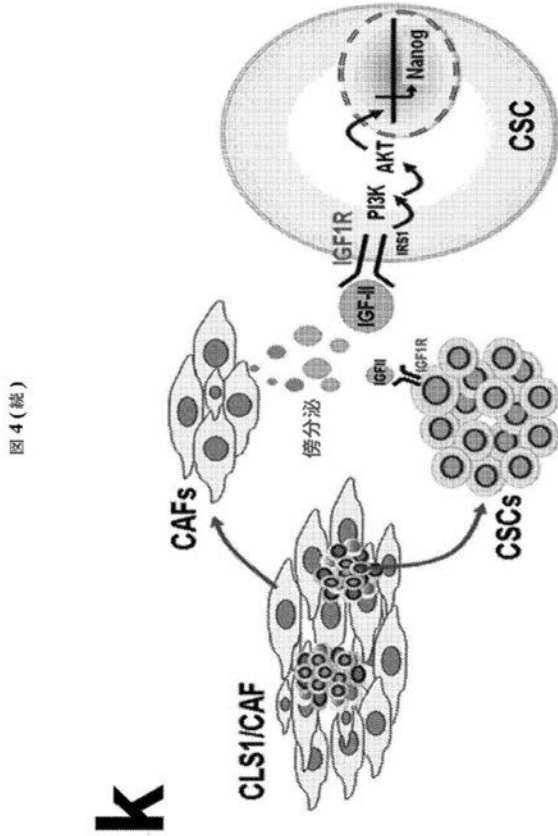


【 図 4 - 6 】

図 4 ( 続 )

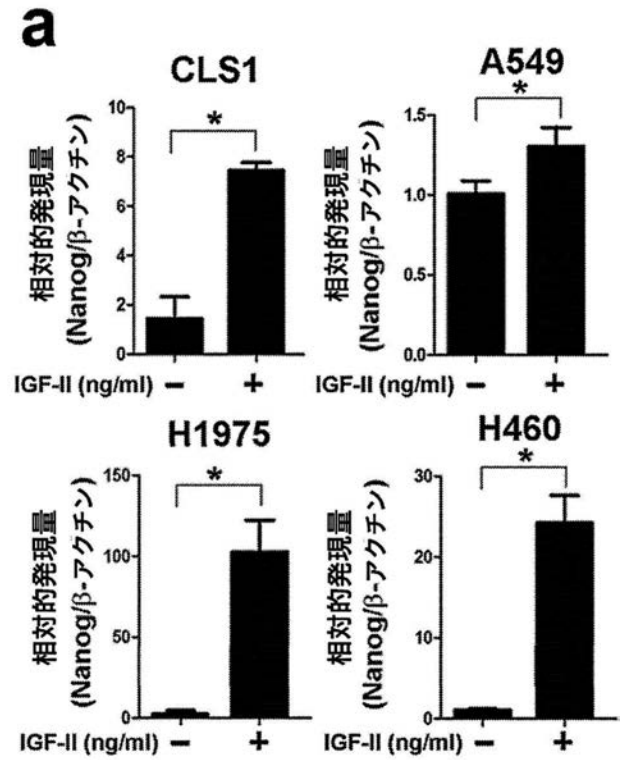


【 図 4 - 7 】



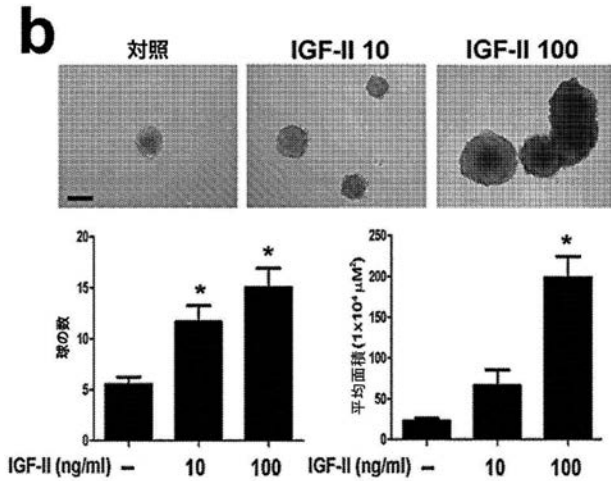
【 図 5 - 1 】

図 5



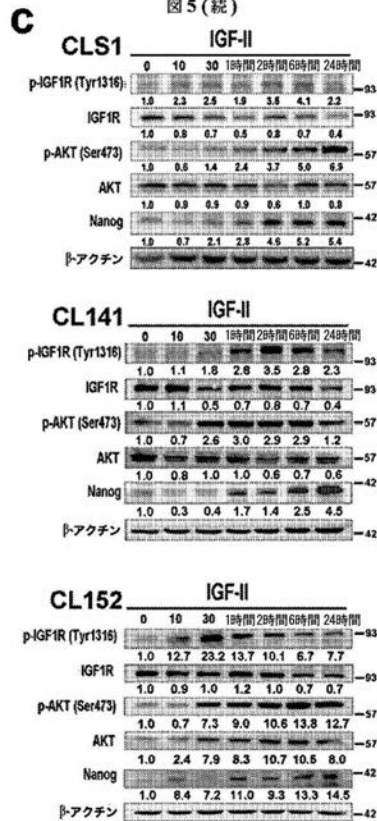
【 図 5 - 2 】

図 5 (続)

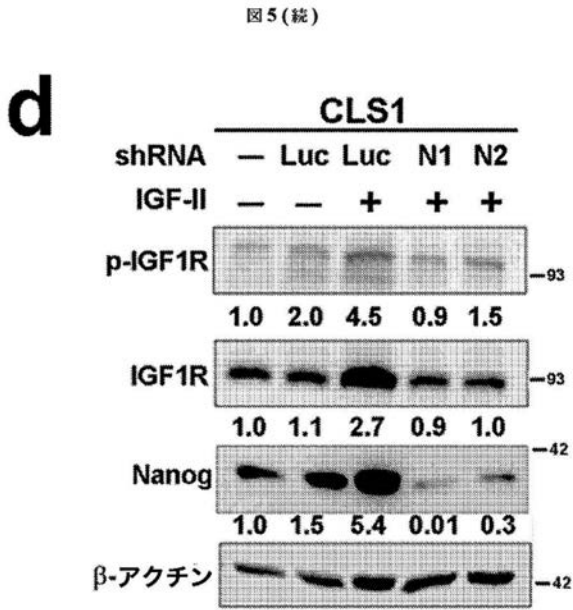


【 図 5 - 3 】

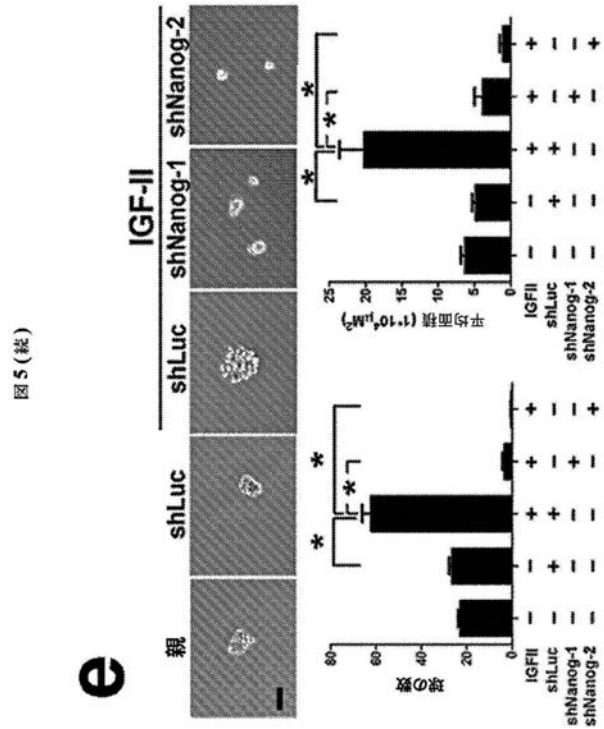
図 5 (続)



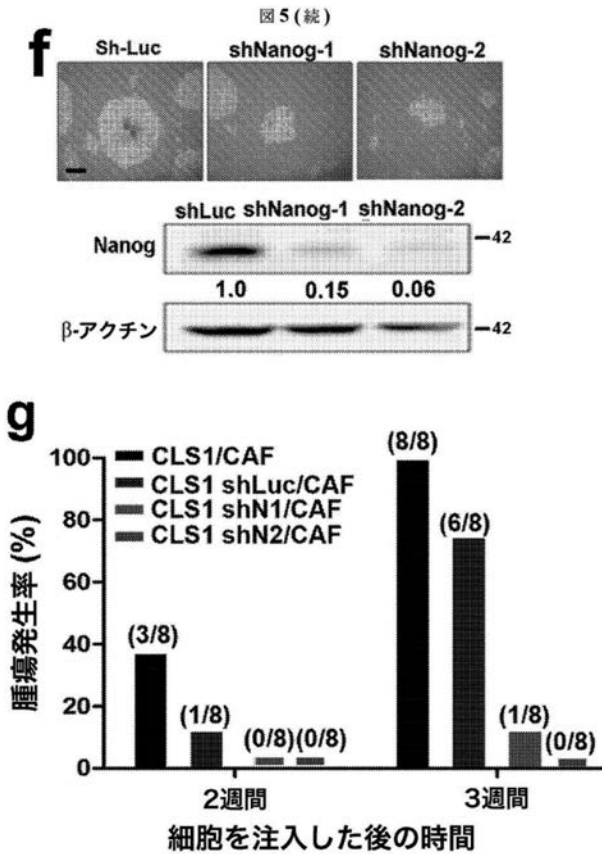
【 図 5 - 4 】



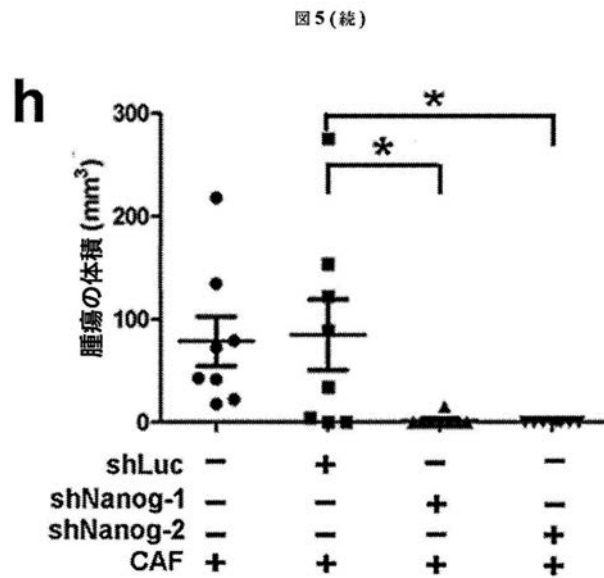
【 図 5 - 5 】



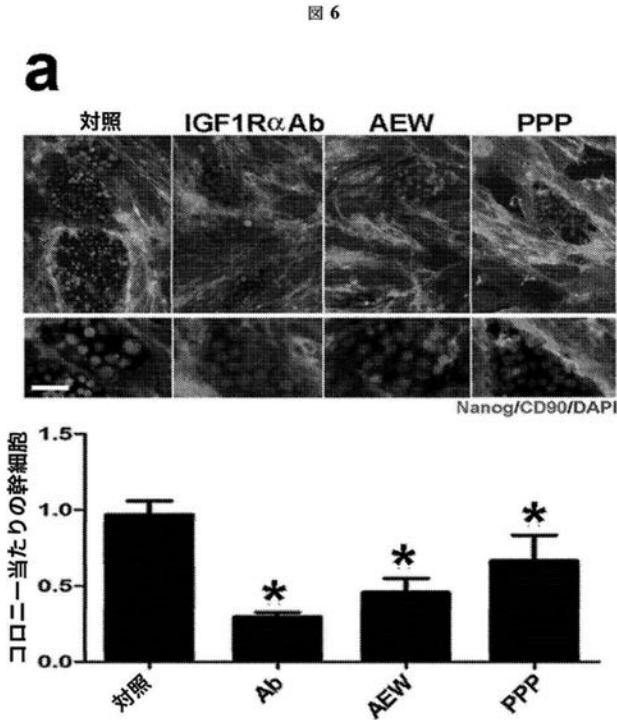
【 図 5 - 6 】



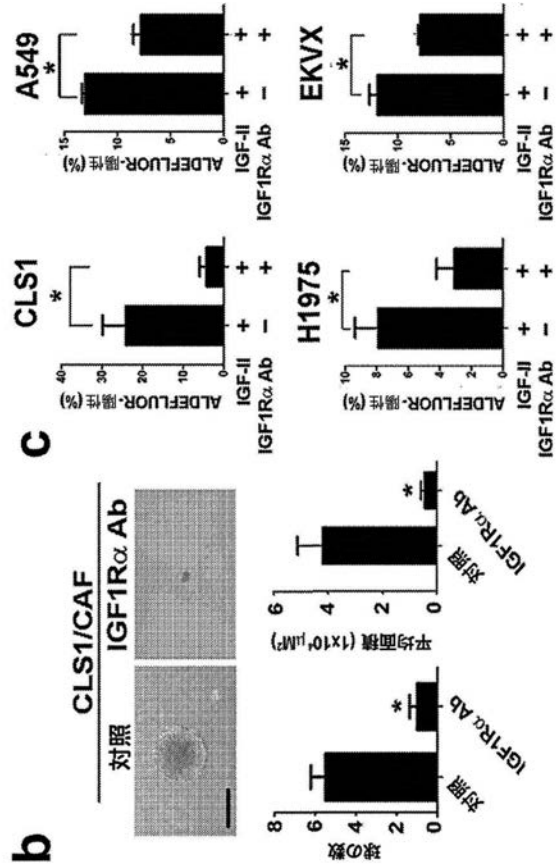
【 図 5 - 7 】



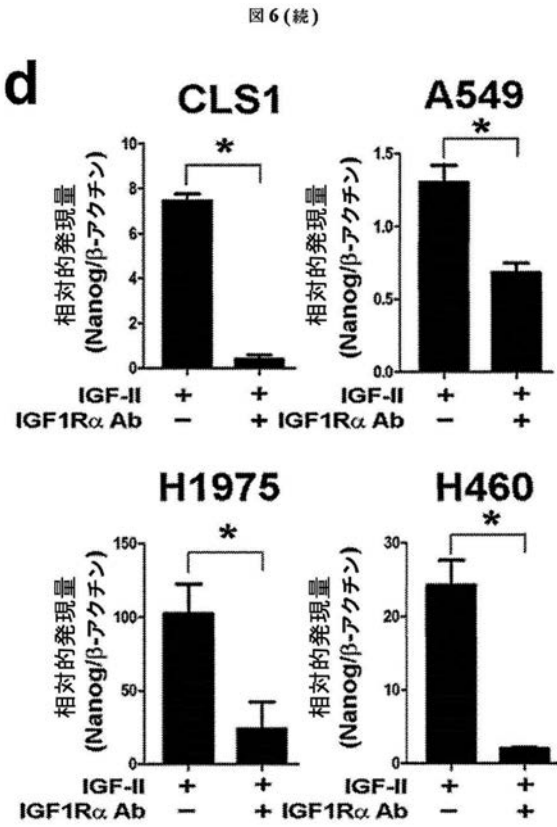
【 図 6 - 1 】



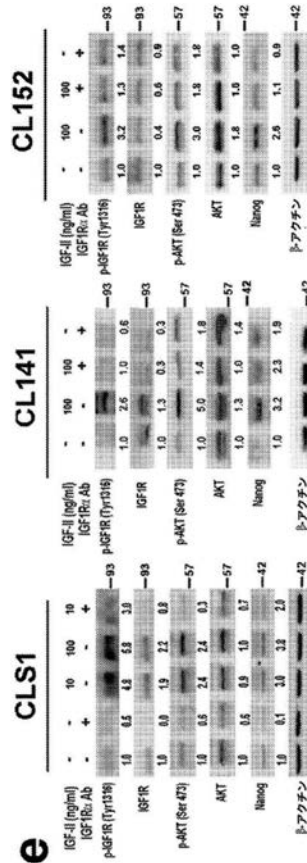
【 図 6 - 2 】



【 図 6 - 3 】

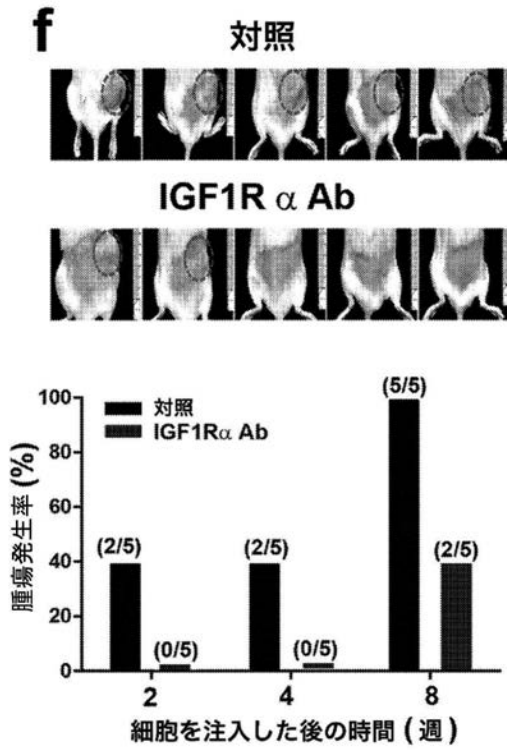


【 図 6 - 4 】

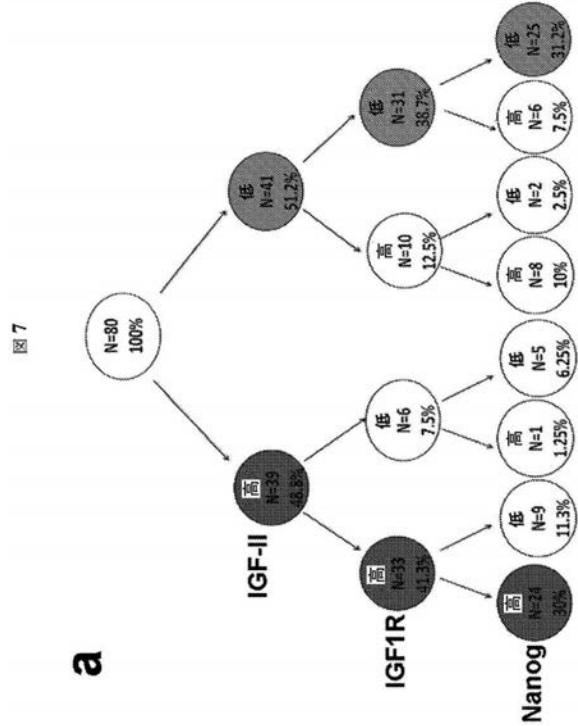


【 図 6 - 5 】

図 6 (続)

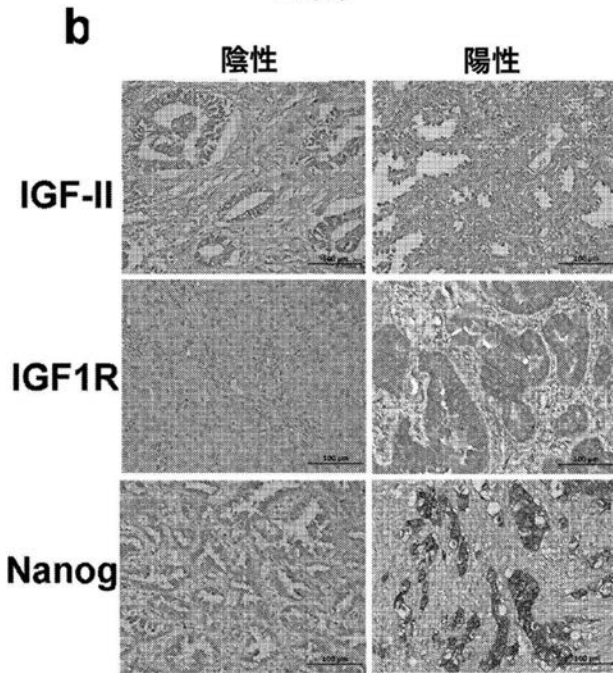


【 図 7 - 1 】

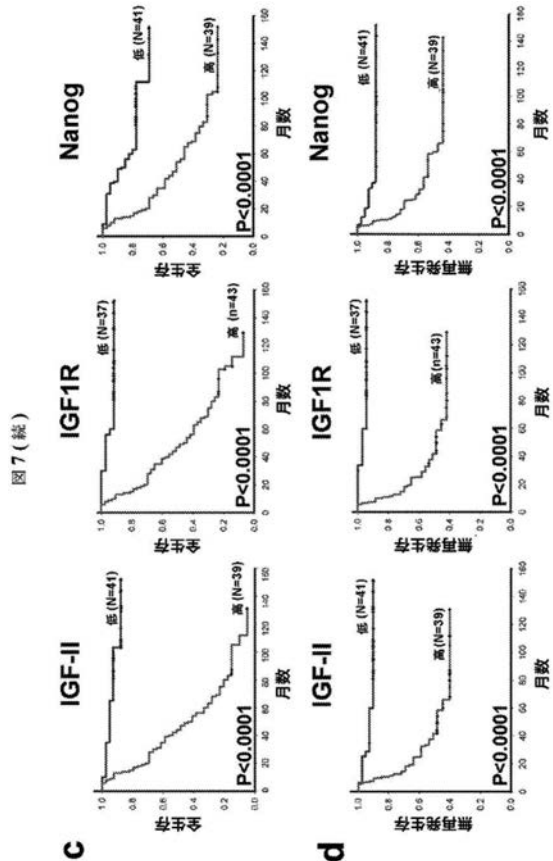


【 図 7 - 2 】

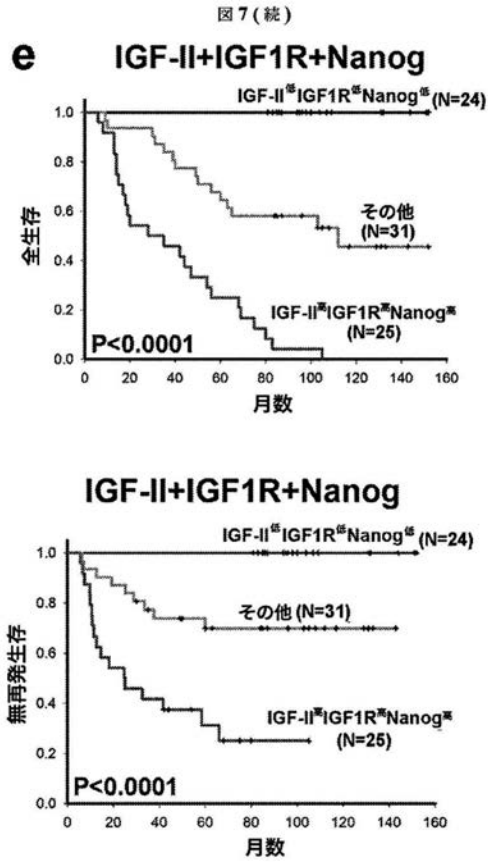
図 7 (続)



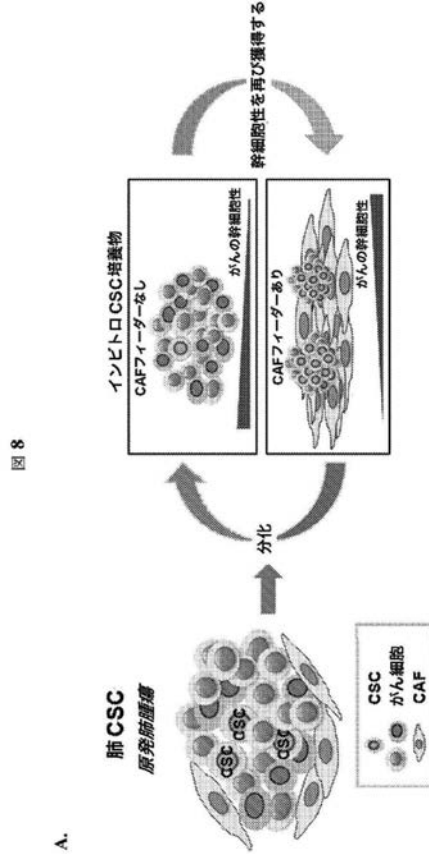
【 図 7 - 3 】



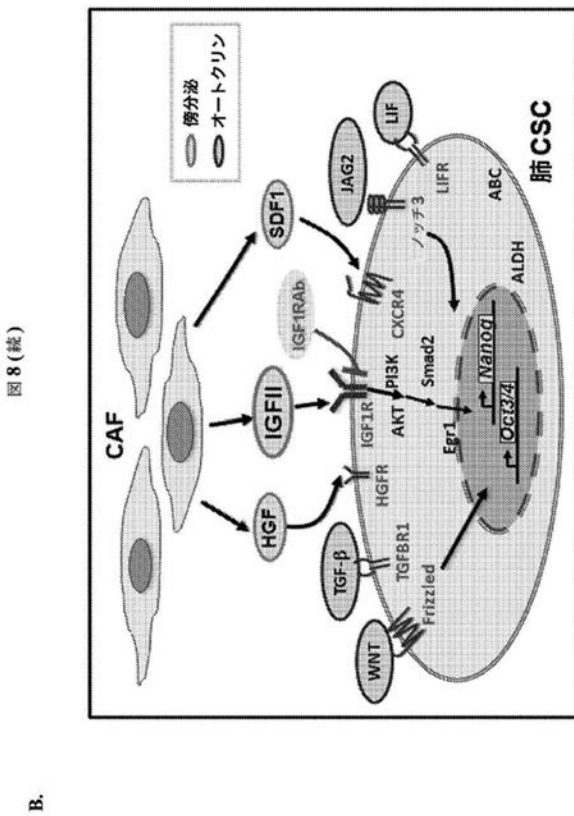
【 図 7 - 4 】



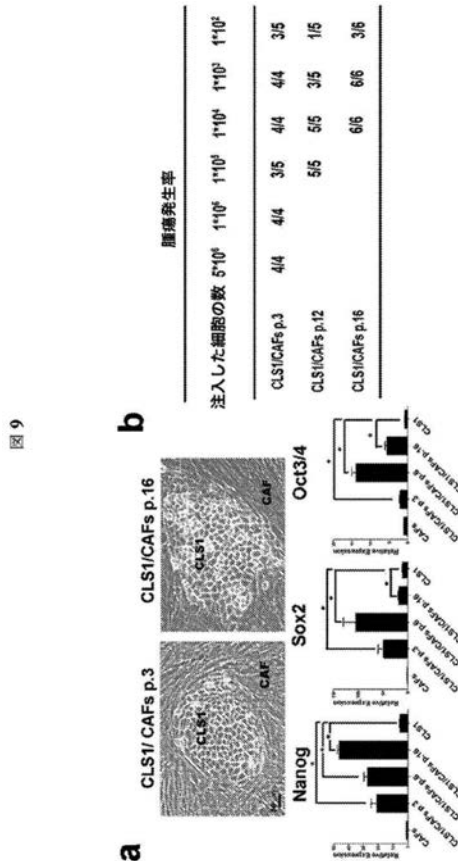
【 図 8 - 1 】



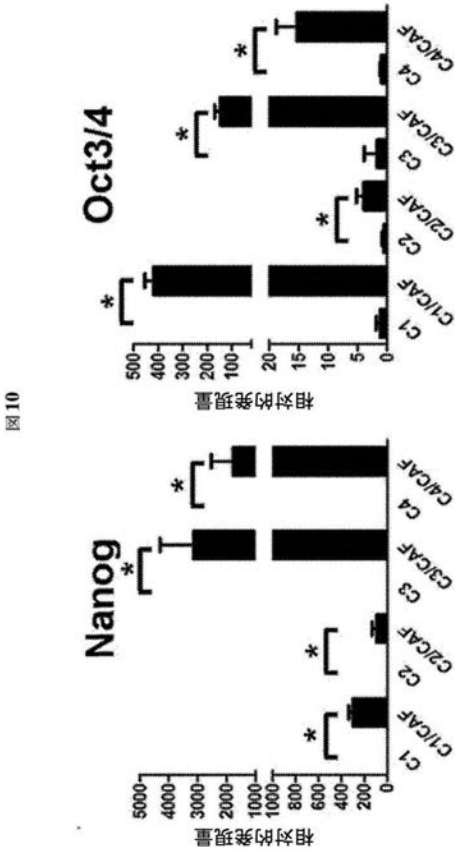
【 図 8 - 2 】



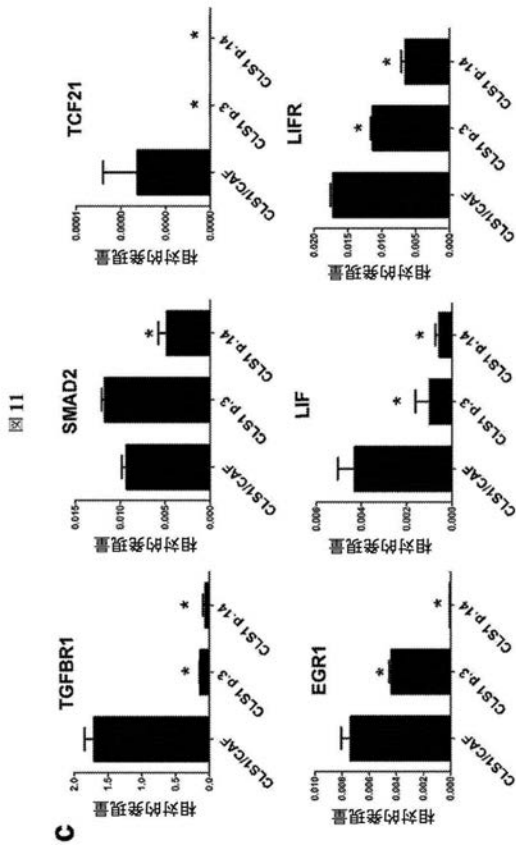
【 図 9 】



【 図 1 0 】

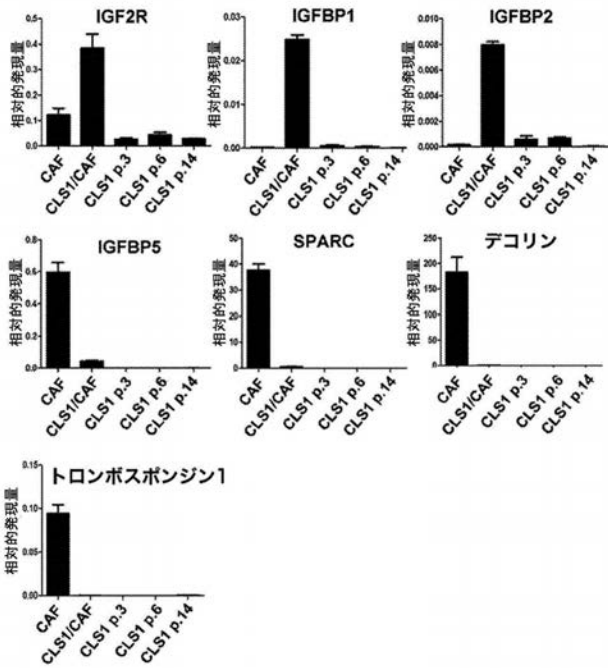


【 図 1 1 】



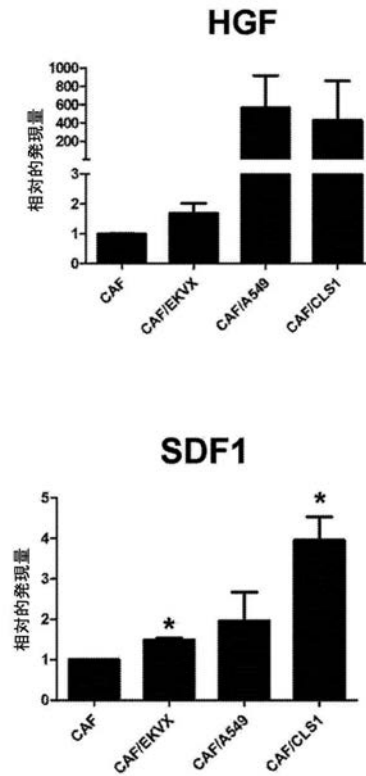
【 図 1 2 】

図 12



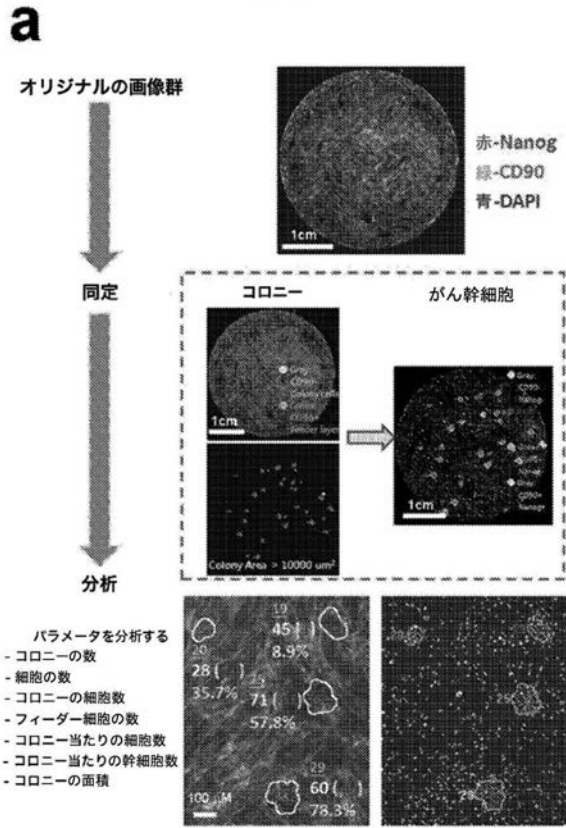
【 図 1 3 】

図 13



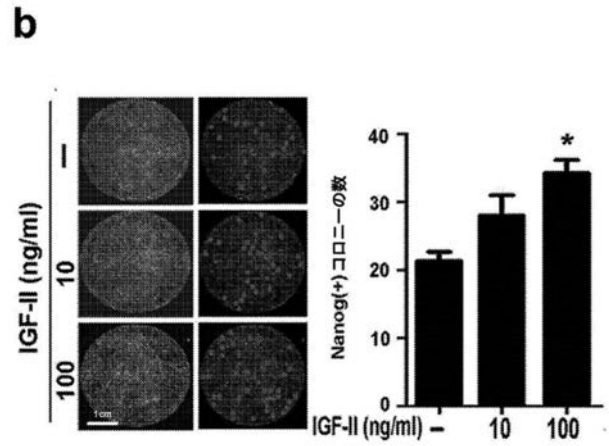
【 図 1 4 - 1 】

図 14



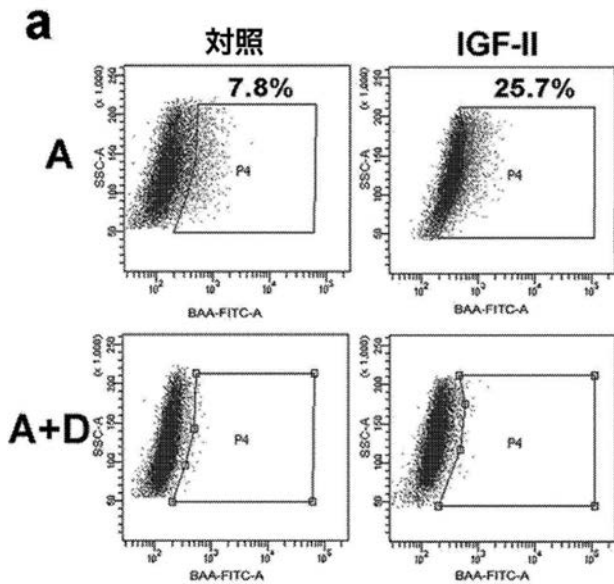
【 図 1 4 - 2 】

図 14 (続)



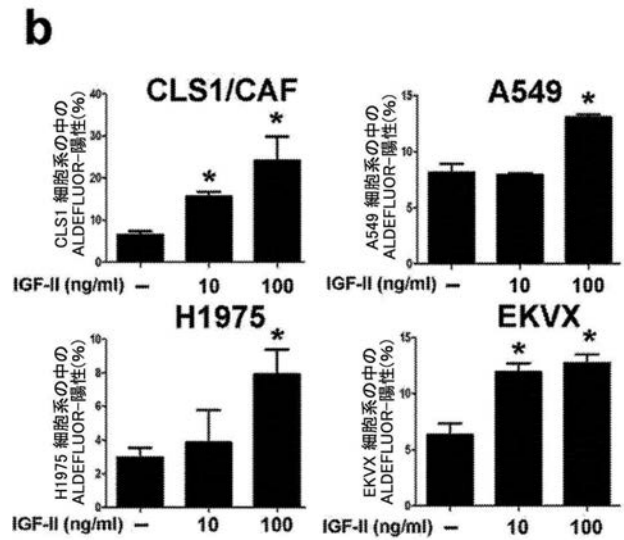
【 図 1 5 - 1 】

図 15

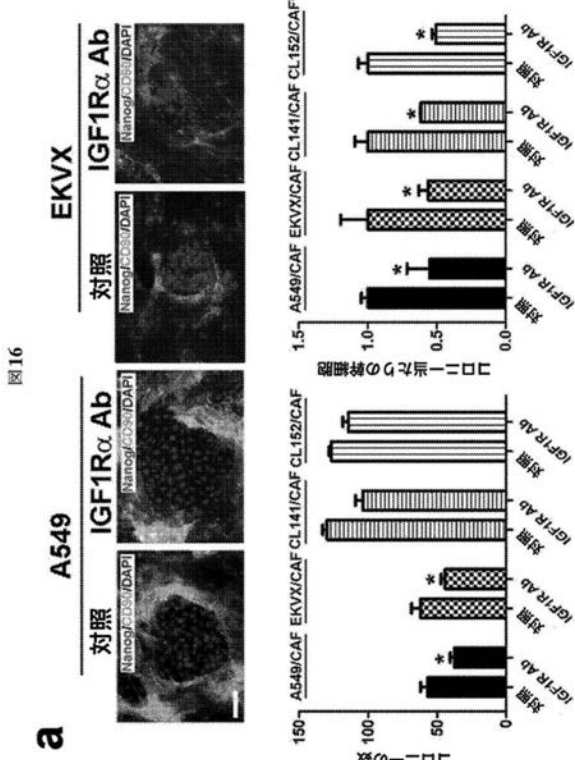


【 図 1 5 - 2 】

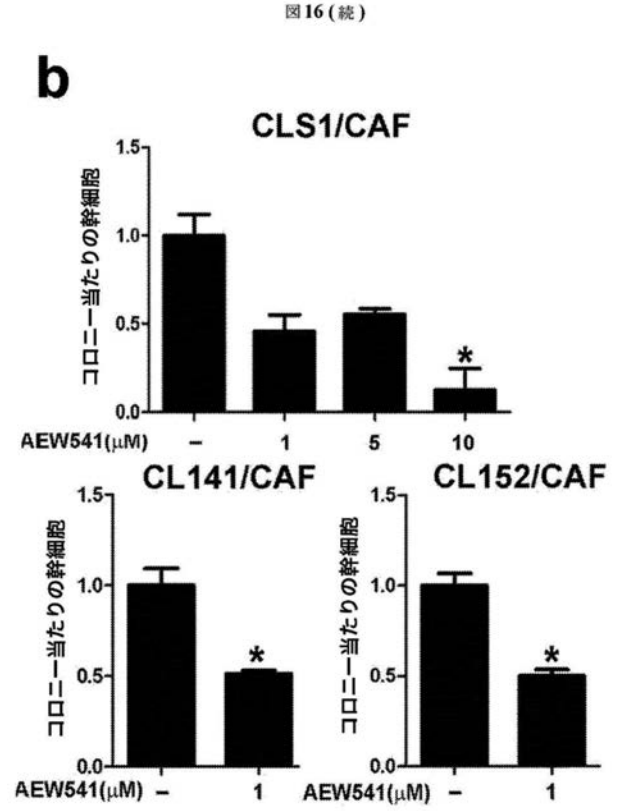
図 15 (続)



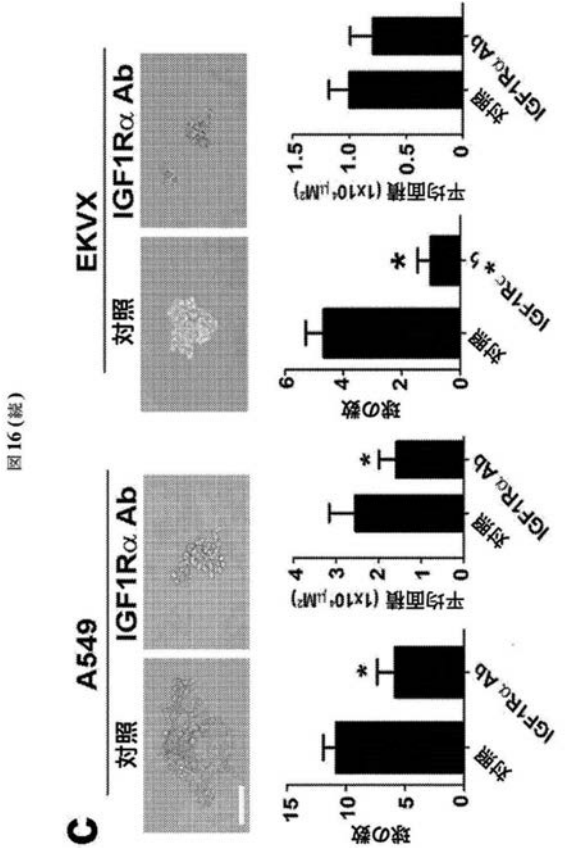
【 図 1 6 - 1 】



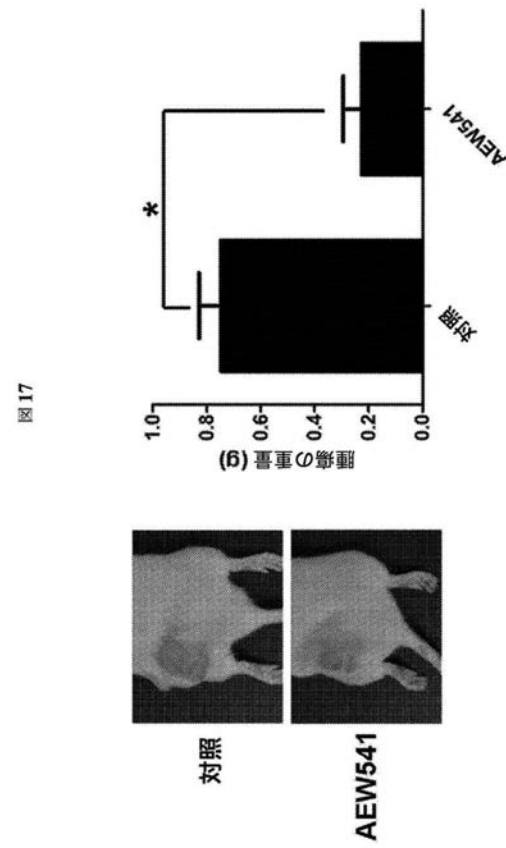
【 図 1 6 - 2 】



【 図 1 6 - 3 】



【 図 1 7 】



## 【配列表】

2017536088000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成29年9月22日(2017.9.22)

## 【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】

がん関連線維芽細胞(CAF)と、がん細胞の集団とを含むインビトロ共培養系であって、前記CAFはCD90<sup>+</sup>であり、前記CAFは前記共培養系の中でがん細胞の幹細胞性を維持する、インビトロ共培養系。

【請求項2】

前記CAFががん患者から得られる、請求項2に記載のインビトロ共培養系。

【請求項3】

前記がん患者が、肺がん患者、乳がん患者、腎臓がん患者、前立腺がん患者、卵巣がん患者、皮膚がん患者、子宮頸がん患者、大腸がん患者、肝臓がん患者、メラノーマ患者、口腔がん患者または膵臓がん患者である、請求項3に記載のインビトロ共培養系。

【請求項4】

前記がん患者が非小細胞肺がん患者である、請求項3に記載のインビトロ共培養系。

【請求項5】

前記がん細胞の集団が、肺がん細胞、乳がん細胞、腎臓がん細胞、前立腺がん細胞、卵巣がん細胞、皮膚がん細胞、子宮頸がん細胞、大腸がん細胞、肝臓がん細胞、メラノーマ細胞、口腔がん細胞または膵臓がん細胞を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載のインビトロ共培養系。

【請求項6】

前記がん細胞が非小細胞肺がん細胞である、請求項5に記載のインビトロ共培養系。

【請求項7】

がん幹細胞を含み、前記がん幹細胞がOct3/4<sup>+</sup>およびNanog<sup>+</sup>である、請求項1～6のいずれか1項に記載のインビトロ共培養系。

【請求項8】

がん幹細胞(CSC)をインビトロで生産する、または維持する方法であって、  
請求項1～7のいずれか1項に記載のインビトロ共培養系を用意し；そして  
前記インビトロ共培養系中で前記がん細胞の集団を前記CAFと共培養して、培養物中でがん幹細胞を生産する、または維持することを含む、方法。

【請求項9】

前記がん細胞の集団が、確立されたがん細胞系に由来する、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記CAFが、確立されたCAF細胞系に由来する、請求項8に記載の方法。

【請求項11】

抗がん剤を同定する方法であって、  
請求項1～7のいずれか1項に記載のインビトロ共培養系を用意し；  
前記インビトロ共培養系中、薬候補の存在下で、前記がん細胞と、前記がん関連線維芽細胞(CAF)を共培養し；

共培養物中のがん細胞の幹細胞性のレベルを決定し；

共培養物中のがん細胞の幹細胞性のレベルが、前記薬候補の不在下でのがん細胞とCAFの共培養物中のがん細胞の幹細胞性のレベルと比較して低下している場合に、前記薬候補が抗がん剤であると同定すること

を含む、方法。

【請求項 1 2】

前記がん細胞が、確立されたがん細胞系に由来する、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記 C A F が、確立された C A F 細胞系に由来する、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記がん細胞の幹細胞性のレベルが、共培養物中の前記がん細胞の薬剤耐性によって表わされる、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記がん細胞の幹細胞性のレベルが、前記 C A F 中で発現している I G F - I I、H G F、L I F および S D F 1 の 1 つ以上のレベルによって、または前記がん細胞中で発現している I G F 1 R、I G F 2 R、L I F R、C X C R 4 および N a n o g の 1 つ以上のレベルによって、またはその両方によって表わされる、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記がん細胞の幹細胞性のレベルが、前記共培養物中に形成されたがん細胞コロニー中の全細胞に対する C S C の比によって表わされる、請求項 1 1 に記載の方法。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 14/57173
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claims 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.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 7, 13, 17, 23-30, 35-36, 40-43, 51-59 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.		
Group I: Claims 1-6, 8-12, 14-16, drawn to a system and method for culturing cancer associated fibroblasts (CAFs) and cancer cells in vitro		
Group II: Claims 18-22, drawn to a method for identifying an anti-cancer drug		
Group III: Claims 31-34, 37-39, 44-50, drawn to methods that involve detection of IGF-II in CAFs and expression level of IGF1R or Nanog in cancer stem cells, and kits for said detection		
—please see continuation on extra sheet—		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.	<input type="checkbox"/>	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 claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	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 claims Nos.: 1-6, 8-12, 14-16
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
	<input type="checkbox"/>	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.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 14/57173
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12N 5/095, C12N 5/09, C12N 5/071 (2015.01) CPC - C12N 5/0695, C12N 2502/1323, C12N 2502/16 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C12N 5/095, C12N 5/09, C12N 5/071 (2015.01) CPC: C12N 5/0695, C12N 2502/1323, C12N 2502/16 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC: C12N 5/0693 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, PubWest, Google Scholar, Google Patents: Cancer associated fibroblast*, CD90+, NSCLC, non-small cell lung cancer, CAF, stemness, stem cell*, co-culture, in vitro, cancer, tumor, CD90*		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DOLZNIG et al., Modelling Colon Adenocarcinomas in Vitro: A 3D Co-Culture System Induces Cancer-Relevant Pathways upon Tumor Cell and Stroma Fibroblast Interaction. The American Journal of Pathology, July 2011, Vol. 179, No. 1, pp 487-501. Especially abstract; p 487, col 2, para 1; p 488, col 1, para 2-3; p 490, col 2, para 1	1-6, 8-12, 14-16
Y	FRANCO et al., Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis, seminars in Cell and Developmental Biology, 5 November 2009, Vol. 21, No 1, pages 33-39	1-6, 8-12, 14-16
Y	WO 2012/010105 A1 (YANG et al.) 26 January 2012 (26.01.2012); para [0045], [0047]	1-6
Y	WO 2012/093173 A1 (SUNDSTROM et al.) 12 July 2012 (12.07.2012); abstract, pg 13, ln 21-27	10, (11, 12, 14-16)/10
Y	WO 2008/068481 A1 (TSAO et al.) 12 June 2008 (12.06.2008); p 6, ln 24-29; p 61, ln 9-10, 24-27	4, 5/4, 6, 12, 14-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 26 February 2015 (26.02.2015)		Date of mailing of the international search report <b>12 MAR 2015</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/57173

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

## Special Technical Features

Group I requires in vitro co-culture of CAFs and cancer cells, not required by II and III.

Group II requires method steps for screening anti-cancer drugs, not required by Groups I and III.

Group III requires the detection or measurement of markers IGF-II, HGF, LIP, SDFI, DLLI, Jagged1, IBP5, thrombospondin1, PLAU, Decorin, IGFIR, IGF2R, LIFR, CXCR4, HGFR, Notch3, Nanog, not required by Groups I and II.

## Common Technical Features

The feature shared by Groups I, II, and III are cancer-associated fibroblasts (CAFs) that are CD90+, cancer cells, and cancer cell stemness. Groups I and II further share the feature of co-culturing CAFs and cancer cells. However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by WO 2012/010105 A1 to Yang in view of the article entitled "Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis" by Franco et al. (Semin Cell Dev Biol, February 2010, Vol 21, No 1, pp 33-9) (hereinafter 'Franco').

Yang discloses that cancer-associated fibroblasts (CAFs) coevolve with cancer cells (para [0045] - "spindle-shaped cancer associated fibroblasts (CAF) (Fig. 1B and C) could be simultaneously detected to coevolve with NFA+ MTC [mesenchymal tumor cell] as shown in Fig. 1B and C within poor outcome breast tumor stroma"), and also teaches cancer cell stemness (para [0045] - "the mesenchymal state of cancer cells contributes the metastatic and stemness potential of cancer cells for initiation and promotion of cancer progression and metastasis, which is essential and critical for tumor cell detachment, migration, invasion and metastatic dissemination and spread"). Yang does not specifically teach that the CAFs are CD90+. However, Franco discloses that high expression of CD90 in cancer-associated fibroblasts isolated from prostate cancer samples support cancer cell growth (p 37, col 1, para 1 - col 2, para 1 - "It has been shown recently that fibroblasts isolated from human prostate cancer samples that express high levels of the MSC marker CD90 (CD90hi) may have tumor-promoting potential compared to a subpopulation of low CD90 expressors (CD90lo)"; p 37, Fig 2). One of ordinary skill in the art would have found it obvious that the CAFs of Yang can be the CD90+ CAFs, since CD90+ CAFs would promote cancer cell growth, as taught by Franco, and would be ideal cells to co-culture with cancer cells to support their growth and survival. As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I, II, and III therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

NOTE: Claims 7, 13, 17, 23-30, 35-36, 40-43, 51-59 are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q	1/06 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	4 C 0 8 5
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 1 2 Q	1/06	4 H 0 4 5
C 1 2 M	1/34 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	B
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
		A 6 1 P	11/00	
		G 0 1 N	33/50	Z

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

特許法第30条第2項適用申請有り ウェブサイトのアドレス: <https://www.nature.com/articles/ncomms4472> 掲載日: 平成26年3月25日

(74)代理人 100087413

弁理士 古賀 哲次

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100164563

弁理士 佐々木 貴英

(72)発明者 イエン パン - チル

台湾, タイペイ シティ, 100, ジョージョユン ディストリクト, ジョーンシャン サウス  
ロード, ナンバー 7

(72)発明者 チェン ホエイ ウェン

台湾, タイペイ, 10617, ルーズベルト ロード, セクション 4, ナンバー 1

(72)発明者 チェン ワン - ジウン

台湾, タイペイ, 10617, ルーズベルト ロード, セクション 4, ナンバー 1

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA26 BB25 CB02 DA36 FA16 FA19 FB03 FB12 GB05

GB10 JA01 JA03

4B029 AA07 BB11 FA02

4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QR48 QR72 QR77 QS33 QS36 QS39

QS40 QX01

4B065 AA90X AC20 BC50 CA44

4C084 AA17 NA14 ZA59 ZB26

4C085 AA13 AA14 DD62 EE01

4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 DA76 EA51 FA74

专利名称(译)	癌症相关的成纤维细胞，维持癌症干细胞的干细胞特征		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017536088A</a>	公开(公告)日	2017-12-07
申请号	JP2017516766	申请日	2014-09-24
[标]申请(专利权)人(译)	国立台湾大学		
申请(专利权)人(译)	国立台湾大学		
[标]发明人	イエンパンチル チェンホエイウエン チェンワンジウン		
发明人	イエン パン-チル チェン ホエイ ウエン チェン ワン-ジウン		
IPC分类号	C12N5/095 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/48 C12N5/00 C12Q1/06 C07K16/28 C12M1/34 A61K45/00 A61K39/395 A61P35/00 A61P11/00 G01N33/50		
CPC分类号	A61P11/00 A61P35/00 C12N5/0693 C12N5/0695 C12N2501/605 C12N2502/30 G01N33/5017 G01N33/574 G01N2800/52 G01N33/5011 G01N33/57492 G01N33/57496 G01N2333/4706 G01N2333/475 G01N2333/4753 G01N2333/52 G01N2333/71 G01N2333/715 G01N2333/7158		
FI分类号	C12N5/095.ZNA G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/48.M G01N33/48.P C12N5/00 C12Q1/06 C07K16/28 C12M1/34.B A61K45/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 A61P11/00 G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BB25 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FA19 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GB05 2G045/GB10 2G045/JA01 2G045/JA03 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/FA02 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QS40 4B063/QX01 4B065/AA90X 4B065/AC20 4B065/BC50 4B065/CA44 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA59 4C084/ZB26 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎 隆英佐佐木		
其他公开文献	JP6694427B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

确定体外共培养系统，该系统包含用于产生和维持癌症干细胞的癌症相关成纤维细胞 (CAF) 和癌细胞，以及可以降低癌细胞干性的药物 它的用途。在本申请中，出于旁分泌网络CAF的目的，其用于促进癌症干细胞的产生和/或维持，以及出于预后预测的目的，其目的是鉴定可能对给定治疗有反应的癌症患者。还公开了这种旁分泌网络组件的使用。

Figure 2

**a**

