

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/110346

発行日 平成24年10月4日 (2012.10.4)

(43) 国際公開日 **平成22年9月30日 (2010.9.30)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	4 C O 8 5
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C O 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 54 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2011-506104 (P2011-506104)	(71) 出願人	503359821 独立行政法人理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2010/055131	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(22) 国際出願日	平成22年3月24日 (2010.3.24)	(74) 代理人	100125070 弁理士 土井 京子
(31) 優先権主張番号	特願2009-72400 (P2009-72400)	(74) 代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宜
(32) 優先日	平成21年3月24日 (2009.3.24)	(74) 代理人	100121212 弁理士 田村 弥栄子
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100122688 弁理士 山本 健二
		(74) 代理人	100117743 弁理士 村田 美由紀
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 白血病幹細胞マーカー

(57) 【要約】

ヒト白血病幹細胞 (L S C) に特異的な分子標的を見出し、急性骨髄性白血病 (A M L) の根治につながる治療手段などの提供。

A M L の初発又は再発を予測するための試験方法であって、(1) 被験者から採取した生体試料における L S C マーカー遺伝子の発現レベルを、当該遺伝子の転写産物又は翻訳産物を対象として測定する工程、および(2) 測定工程で得られた発現レベルを基準値と比較する工程を含み、当該 L S C マーカー遺伝子は、2 ~ 2 1 8 の遺伝子から構成される試験方法、L S C マーカー遺伝子から選ばれる遺伝子の発現を抑制し得る物質または当該遺伝子の翻訳産物の活性を抑制し得る物質を有効成分として含有する、L S C を標的化した A M L の治療剤、並びに A M L 患者に対する自家移植又は同種移植のための造血細胞を含む試料の製造方法であって、少なくとも1種の L S C マーカーを指標として、L S C がパーズングされた試料を得る工程を含む製造方法。L S C マーカー遺伝子は、明細書中に定義した通りである。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

急性骨髄性白血病の初発または再発を予測するための試験方法であって、

(1) 被験者から採取した生体試料における白血病幹細胞マーカー遺伝子の発現レベルを、当該遺伝子の転写産物または翻訳産物を対象として測定する工程、および

(2) 測定工程で得られた発現レベルを基準値と比較する工程

を含み、当該白血病幹細胞マーカー遺伝子が、

A D F P、A L O X 5 A P、A Z U 1、C 3 A R 1、C A C N B 4、C A L C R L、C C L 4、C C L 5、C D 3 3、C D 3 6、C D 3 D、C D 8 6、C D 9、C D 9 3、C D 9 6、C D 9 7、C F D、C H I 3 L 1、C L E C 1 2 A、C L E C L 1、C O C H、C S T 7、C X C L 1、D O K 2、E M R 2、F C E R 1 G、F C G R 2 A、F U C A 2、G P R 1 0 9 B、G P R 1 6 0、G P R 3 4、G P R 8 4、H A V C R 2、H B E G F、H C S T、H G F、H L A - D O B、H O M E R 3、I F I 3 0、I L 1 3 R A 1、I L 2 R A、I L 2 R G、I L 3 R A、I N H B A、I T G B 2、L G A L S 1、L R G 1、L Y 8 6、M A M D C 2、M G A T 4 A、P 2 R Y 1 4、P 2 R Y 5、P L A U R、P P B P、P R G 2、P R S S 2 1、P T H 2 R、P T X 3、R E E P 5、R N A S E 2、R X F P 1、S L C 3 1 A 2、S L C 4 3 A 3、S L C 6 A 6、S L C 7 A 6、S T X 7、S U C N R 1、T A C S T D 2、T I M P 1、T M 4 S F 1、T M 9 S F 1、T N F、T N F R S F 4、T N F S F 1 3 B、T Y R O B P、U T S 2 および V N N 1 からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；

A U R K A、C 1 3 o r f 3 4、C C N A 1、D S C C 1、F A M 3 3 A、H P G D、N E K 6、P Y H I N 1、R A S S F 4、T X N L 4 B および Z W I N T からなる細胞周期関連遺伝子；

M P O、I E R 3、B I K、T X N D C 1、G A D D 4 5 B および N A I P からなるアポトーシス関連遺伝子；

A K 5、A R H G A P 1 8、A R R B 1、D U S P 6、F Y B、H C K、L P X N、M S 4 A 3、P A K 1 I P 1、P D E 9 A、P D K 1、P R K A R 1 A、P R K C D、P X K、R A B 2 0、R A B 8 A、R A B I F、R A S G R P 3、R G S 1 8 および S 1 0 0 A 1 1 からなるシグナル伝達関連遺伝子；

W T 1、M Y C および H L X からなる転写因子遺伝子；ならびに

A C T R 2、A L O X 5、A N X A 2 P 2、A T L 3、A T P 6 V 1 B 2、A T P 6 V 1 C 1、A T P 6 V 1 D、C 1 2 o r f 5、C 1 7 o r f 6 0、C 1 8 o r f 1 9、C 1 G A L T 1 C 1、C 1 o r f 1 3 5、C 1 o r f 1 6 3、C 1 o r f 1 8 6、C 6 o r f 1 5 0、C A L M L 4、C C T 5、C L C、C O M M D 8、C O T L 1、C O X 1 7、C R I P 1、C S T A、C T S A、C T S C、C T S G、C Y B B、C Y P 2 E 1、D E N N D 3、D H R S 3、D L A T、D L E U 2、D P H 3、E F H D 2、E N C 1、E X O S C 3、F A M 1 0 7 B、F A M 1 2 9 A、F A M 3 8 B、F B X O 2 2、F L J 1 4 2 1 3、F N D C 3 B、G N P D A 1、G R P E L 1、G T S F 1、H I G 2、H N 1、H V C N 1、I D H 1、I D H 3 A、I K I P、K I F 2 C、K Y N U、L C M T 2、M E 1、M I R N 2 1、M K K S、M N D A、M T H F D 2、M Y O 1 B、M Y O 1 F、N A G A、N C F 2、N C F 4、N D U F A F 1、N P、N R I P 3、O B F C 2 A、P A R P 8、P D L I M 1、P D S S 1、P G M 2、P I G K、P I W I L 4、P P C D C、P P I F、P R A M E、P U S 7、R P P 4 0、R R M 2、S 1 0 0 A 1 6、S 1 0 0 A 8、S 1 0 0 P、S 1 0 0 Z、S A M H D 1、S H 2 D 1 A、S P C S 2、S P P L 2 A、T E S C、T H E X 1、T M E M 3 0 A、T M E M 3 3、T R I P 1 3、T U B B 6、U B A S H 3 B、U G C G、V S T M 1、W D R 4、W I T 1、W S B 2 および Z N F 2 5 3 からなるその他の遺伝子

からなる群より選ばれる2～218の遺伝子であり、被験者における2以上の白血病幹細胞マーカー遺伝子の発現が基準値に比べて有意に高い場合、採取した生体試料中または被験者の生体内に白血病幹細胞の存在可能性が示唆される、試験方法。

10

20

30

40

50

【請求項2】

白血病幹細胞マーカー遺伝子が、

ADFP、ALOX5AP、CACNB4、CCL5、CD33、CD3D、CD93、CD97、CLEC12A、DOK2、FCER1G、FCGR2A、FUCA2、GPR34、GPR84、HCST、HGF、HOMER3、IL2RA、IL2RG、IL3RA、ITGB2、LGALS1、LRG1、LY86、MGAT4A、P2RY5、PRSS21、PTH2R、RNASE2、SLC43A3、SUCNR1、TIMP1、TNF、TNFRSF4、TNFSF13B、TYROBP、およびVNN1からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；ZWINT、NEK6およびTXNL4Bからなる細胞周期関連遺伝子；BIKからなるアポトーシス関連遺伝子；AK5、ARHGAP18、FYB、HCK、LPXN、PDE9A、PDK1、PRKCD、RAB20、RAB8AおよびRABIFからなるシグナル伝達関連遺伝子；WT1およびHLXからなる転写因子遺伝子；ならびにCYBB、CTSCおよびNCF4からなるその他の遺伝子からなる群より選ばれる2～58の遺伝子である、請求項1に記載の試験方法。

10

【請求項3】

下記遺伝子群：

ADFP、ALOX5AP、AZU1、C3AR1、CACNB4、CALCRL、CCL4、CCL5、CD33、CD36、CD3D、CD86、CD9、CD93、CD96、CD97、CFD、CHI3L1、CLEC12A、CLECL1、COCH、CST7、CXCL1、DOK2、EMR2、FCER1G、FCGR2A、FUCA2、GPR109B、GPR160、GPR34、GPR84、HAVCR2、HBEGF、HCST、HGF、HLA-DOB、HOMER3、IFI30、IL13RA1、IL2RA、IL2RG、IL3RA、INHBA、ITGB2、LGALS1、LRG1、LY86、MAMDC2、MGAT4A、P2RY14、P2RY5、PLAUR、PPBP、PRG2、PRSS21、PTH2R、PTX3、REEP5、RNASE2、RXFP1、SLC31A2、SLC43A3、SLC6A6、SLC7A6、STX7、SUCNR1、TACSTD2、TIMP1、TM4SF1、TM9SF1、TNF、TNFRSF4、TNFSF13B、TYROBP、UTS2およびVNN1からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；

20

AURKA、C13orf34、CCNA1、DSCC1、FAM33A、HPGD、NEK6、PYHIN1、RASSF4、TXNL4BおよびZWINTからなる細胞周期関連遺伝子；

30

MPO、IER3、BIK、TXNDC1、GADD45BおよびNAIPからなるアポトーシス関連遺伝子；

AK5、ARHGAP18、ARRB1、DUSP6、FYB、HCK、LPXN、MS4A3、PAK1IP1、PDE9A、PDK1、PRKAR1A、PRKCD、PXK、RAB20、RAB8A、RABIF、RASGRP3、RGS18およびS100A11からなるシグナル伝達関連遺伝子；

WT1、MYCおよびHLXからなる転写因子遺伝子；ならびに

ACTR2、ALOX5、ANXA2P2、ATL3、ATP6V1B2、ATP6V1C1、ATP6V1D、C12orf5、C17orf60、C18orf19、C1GALT1C1、C1orf135、C1orf163、C1orf186、C6orf150、CALML4、CCT5、CLC、COMMD8、COTL1、COX17、CRIP1、CSTA、CTSA、CTSC、CTSG、CYBB、CYP2E1、DENND3、DHRS3、DLAT、DLEU2、DPH3、EFHD2、ENC1、EXOSC3、FAM107B、FAM129A、FAM38B、FBXO22、FLJ14213、FNDC3B、GNPDA1、GRPEL1、GTSF1、HIG2、HN1、HVCN1、IDH1、IDH3A、IKIP、KIF2C、KYNU、LCMT2、ME1、MIRN21、MKKS、MNDA、MTHFD2、MYO1B、MYO1F、NAGA、NCF2、NCF4、NDUFAF1、NP、NRIP3、OBFC2A、PARP

40

50

8、PDLIM1、PDSS1、PGM2、PIGK、PIWIL4、PPCDC、PPIF、PRAME、PUS7、RPP40、RRM2、S100A16、S100A8、S100P、S100Z、SAMHD1、SH2D1A、SPCS2、SPPL2A、TESC、THEX1、TMEM30A、TMEM33、TRIP13、TUBB6、UBASH3B、UGC G、VSTM1、WDR4、WIT1、WSB2およびZNF253からなるその他の遺伝子

からなる白血病幹細胞マーカー遺伝子から選ばれる遺伝子の発現を抑制し得る物質または当該遺伝子の翻訳産物の活性を抑制し得る物質を有効成分として含有する、白血病幹細胞を標的化した急性骨髄性白血病の治療剤。

【請求項4】

10

白血病幹細胞マーカー遺伝子が、

ADFP、ALOX5AP、CACNB4、CCL5、CD33、CD3D、CD93、CD97、CLEC12A、DOK2、FCER1G、FCGR2A、FUCA2、GPR34、GPR84、HCST、HGF、HOMER3、IL2RA、IL2RG、IL3RA、ITGB2、LGALS1、LRG1、LY86、MGAT4A、P2RY5、PRSS21、PTH2R、RNASE2、SLC43A3、SUCNR1、TIMP1、TNF、TNFRSF4、TNFSF13B、TYROBP、およびVNN1からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；ZWINT、NEK6およびTXNL4Bからなる細胞周期関連遺伝子；BIKからなるアポトーシス関連遺伝子；AK5、ARHGAP18、FYB、HCK、LPXN、PDE9A、PDK1、PRKCD、RAB20、RAB8AおよびRABIFからなるシグナル伝達関連遺伝子；WT1およびHLXからなる転写因子遺伝子；ならびにCYBB、CTSCおよびNCF4からなるその他の遺伝子からなる群より選ばれる、請求項3に記載の治療剤。

20

【請求項5】

白血病幹細胞マーカー遺伝子が、

ALOX5AP、CACNB4、CCL5、CD33、CD3D、CD93、CD97、CLEC12A、DOK2、FCGR2A、GPR84、HCST、HOMER3、ITGB2、LGALS1、LRG1、PTH2R、RNASE2、TNF、TNFSF13B、TYROBPおよびVNN1からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；NEK6からなる細胞周期関連遺伝子；BIKからなるアポトーシス関連遺伝子；AK5、FYB、HCK、LPXN、PDE9A、PDK1、PRKCDおよびRAB20からなるシグナル伝達関連遺伝子；WT1からなる転写因子遺伝子；ならびにCTSCおよびNCF4からなるその他の遺伝子からなる群より選ばれる、請求項3に記載の治療剤。

30

【請求項6】

白血病幹細胞マーカー遺伝子が、骨髄のニッチに存在し、細胞周期が静止し、かつ抗癌剤抵抗性の幹細胞に発現するマーカーであって、AK5、BIK、DOK2、FCGR2A、IL2RA、LRG1、SUCNR1およびWT1からなる群より選ばれる、請求項3に記載の治療剤。

【請求項7】

遺伝子の発現を抑制し得る物質がアンチセンス核酸またはRNAi誘導性核酸である、請求項3～6のいずれか一項に記載の治療剤。

40

【請求項8】

翻訳産物の活性を抑制し得る物質がアプタマーまたは抗体である、請求項3～6のいずれか一項に記載の治療剤。

【請求項9】

抗体が抗体と抗癌物質とのイムノコンジュゲートである、請求項8に記載の治療剤。

【請求項10】

急性骨髄性白血病患者に対する自家移植または同種移植のための造血細胞を含む試料の製造方法であって、

a) 当該患者またはドナーから造血細胞を含む試料を採取する工程、

50

b) 採取した試料と、下記遺伝子群：

A D F P、A L O X 5 A P、A Z U 1、C 3 A R 1、C A C N B 4、C A L C R L、C C L 4、C C L 5、C D 3 3、C D 3 6、C D 3 D、C D 8 6、C D 9、C D 9 3、C D 9 6、C D 9 7、C F D、C H I 3 L 1、C L E C 1 2 A、C L E C L 1、C O C H、C S T 7、C X C L 1、D O K 2、E M R 2、F C E R 1 G、F C G R 2 A、F U C A 2、G P R 1 0 9 B、G P R 1 6 0、G P R 3 4、G P R 8 4、H A V C R 2、H B E G F、H C S T、H G F、H L A - D O B、H O M E R 3、I F I 3 0、I L 1 3 R A 1、I L 2 R A、I L 2 R G、I L 3 R A、I N H B A、I T G B 2、L G A L S 1、L R G 1、L Y 8 6、M A M D C 2、M G A T 4 A、P 2 R Y 1 4、P 2 R Y 5、P L A U R、P P B P、P R G 2、P R S S 2 1、P T H 2 R、P T X 3、R E E P 5、R N A S E 2、R X F P 1、S L C 3 1 A 2、S L C 4 3 A 3、S L C 6 A 6、S L C 7 A 6、S T X 7、S U C N R 1、T A C S T D 2、T I M P 1、T M 4 S F 1、T M 9 S F 1、T N F、T N F R S F 4、T N F S F 1 3 B、T Y R O B P、U T S 2 および V N N 1 からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；

A U R K A、C 1 3 o r f 3 4、C C N A 1、D S C C 1、F A M 3 3 A、H P G D、N E K 6、P Y H I N 1、R A S S F 4、T X N L 4 B および Z W I N T からなる細胞周期関連遺伝子；

M P O、I E R 3、B I K、T X N D C 1、G A D D 4 5 B および N A I P からなるアポトーシス関連遺伝子；

A K 5、A R H G A P 1 8、A R R B 1、D U S P 6、F Y B、H C K、L P X N、M S 4 A 3、P A K 1 I P 1、P D E 9 A、P D K 1、P R K A R 1 A、P R K C D、P X K、R A B 2 0、R A B 8 A、R A B I F、R A S G R P 3、R G S 1 8 および S 1 0 0 A 1 1 からなるシグナル伝達関連遺伝子；

W T 1、M Y C および H L X からなる転写因子遺伝子；ならびに

A C T R 2、A L O X 5、A N X A 2 P 2、A T L 3、A T P 6 V 1 B 2、A T P 6 V 1 C 1、A T P 6 V 1 D、C 1 2 o r f 5、C 1 7 o r f 6 0、C 1 8 o r f 1 9、C 1 G A L T 1 C 1、C 1 o r f 1 3 5、C 1 o r f 1 6 3、C 1 o r f 1 8 6、C 6 o r f 1 5 0、C A L M L 4、C C T 5、C L C、C O M M D 8、C O T L 1、C O X 1 7、C R I P 1、C S T A、C T S A、C T S C、C T S G、C Y B B、C Y P 2 E 1、D E N N D 3、D H R S 3、D L A T、D L E U 2、D P H 3、E F H D 2、E N C 1、E X O S C 3、F A M 1 0 7 B、F A M 1 2 9 A、F A M 3 8 B、F B X O 2 2、F L J 1 4 2 1 3、F N D C 3 B、G N P D A 1、G R P E L 1、G T S F 1、H I G 2、H N 1、H V C N 1、I D H 1、I D H 3 A、I K I P、K I F 2 C、K Y N U、L C M T 2、M E 1、M I R N 2 1、M K K S、M N D A、M T H F D 2、M Y O 1 B、M Y O 1 F、N A G A、N C F 2、N C F 4、N D U F A F 1、N P、N R I P 3、O B F C 2 A、P A R P 8、P D L I M 1、P D S S 1、P G M 2、P I G K、P I W I L 4、P P C D C、P P I F、P R A M E、P U S 7、R P P 4 0、R R M 2、S 1 0 0 A 1 6、S 1 0 0 A 8、S 1 0 0 P、S 1 0 0 Z、S A M H D 1、S H 2 D 1 A、S P C S 2、S P P L 2 A、T E S C、T H E X 1、T M E M 3 0 A、T M E M 3 3、T R I P 1 3、T U B B 6、U B A S H 3 B、U G C G、V S T M 1、W D R 4、W I T 1、W S B 2 および Z N F 2 5 3 からなるその他の遺伝子

から選ばれる少なくとも1種の白血病幹細胞マーカー遺伝子の翻訳産物を認識する物質とを接触させる工程、ならびに

c) 前記物質が結合した細胞を選別し、白血病幹細胞がパーズングされた試料を得る工程を含む、製造方法。

【請求項11】

白血病幹細胞マーカー遺伝子が、

A D F P、A L O X 5 A P、C A C N B 4、C D 3 3、C D 3 D、C D 9 3、C D 9 7、C L E C 1 2 A、D O K 2、F C E R 1 G、F C G R 2 A、G P R 3 4、G P R 8 4、H C S T、H O M E R 3、I L 2 R A、I L 2 R G、I L 3 R A、I T G B 2、L Y 8 6、

10

20

30

40

50

P2RY5、PTH2R、SUCNR1、TNFRSF4、TYROBPおよびVNN1から選ばれる少なくとも1種の細胞表面マーカー遺伝子である、請求項10に記載の製造方法。

【請求項12】

下記遺伝子群：

ADFP、ALOX5AP、AZU1、C3AR1、CACNB4、CALCRL、CCL4、CCL5、CD33、CD36、CD3D、CD86、CD9、CD93、CD96、CD97、CFD、CHI3L1、CLEC12A、CLECL1、COCH、CST7、CXCL1、DOK2、EMR2、FCER1G、FCGR2A、FUCA2、GPR109B、GPR160、GPR34、GPR84、HAVCR2、HBEGF、HCST、HGF、HLA-DOB、HOMER3、IFI30、IL13RA1、IL2RA、IL2RG、IL3RA、INHBA、ITGB2、LGALS1、LRG1、LY86、MAMDC2、MGAT4A、P2RY14、P2RY5、PLAUR、PPBP、PRG2、PRSS21、PTH2R、PTX3、REEP5、RNASE2、RXFP1、SLC31A2、SLC43A3、SLC6A6、SLC7A6、STX7、SUCNR1、TACSTD2、TIMP1、TM4SF1、TM9SF1、TNF、TNFRSF4、TNFSF13B、TYROBP、UTS2およびVNN1からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；

10

AURKA、C13orf34、CCNA1、DSCC1、FAM33A、HPGD、NEK6、PYHIN1、RASSF4、TXNL4BおよびZWINTからなる細胞周期関連遺伝子；

20

MPO、IER3、BIK、TXNDC1、GADD45BおよびNAIPからなるアポトーシス関連遺伝子；

AK5、ARHGAP18、ARRB1、DUSP6、FYB、HCK、LPXN、MS4A3、PAK1IP1、PDE9A、PDK1、PRKAR1A、PRKCD、PXK、RAB20、RAB8A、RABIF、RASGRP3、RGS18およびS100A11からなるシグナル伝達関連遺伝子；

WT1、MYCおよびHLXからなる転写因子遺伝子；ならびに

ACTR2、ALOX5、ANXA2P2、ATL3、ATP6V1B2、ATP6V1C1、ATP6V1D、C12orf5、C17orf60、C18orf19、C1GALT1C1、C1orf135、C1orf163、C1orf186、C6orf150、CALML4、CCT5、CLC、COMMD8、COTL1、COX17、CRIP1、CSTA、CTSA、CTSC、CTSG、CYBB、CYP2E1、DENND3、DHRS3、DLAT、DLEU2、DPH3、EFHD2、ENC1、EXOSC3、FAM107B、FAM129A、FAM38B、FBXO22、FLJ14213、FNDC3B、GNPDA1、GRPEL1、GTSF1、HIG2、HN1、HVCN1、IDH1、IDH3A、IKIP、KIF2C、KYNU、LCMT2、ME1、MIRN21、MKKS、MNDA、MTHFD2、MYO1B、MYO1F、NAGA、NCF2、NCF4、NDUFAF1、NP、NRIP3、OBFC2A、PARP8、PDLIM1、PDSS1、PGM2、PIGK、PIWIL4、PPCDC、PPIF、PRAME、PUS7、RPP40、RRM2、S100A16、S100A8、S100P、S100Z、SAMHD1、SH2D1A、SPCS2、SPPL2A、TESC、THEX1、TMEM30A、TMEM33、TRIP13、TUBB6、UBASH3B、UGCG、VSTM1、WDR4、WIT1、WSB2およびZNF253からなるその他の遺伝子

30

からなる白血病幹細胞マーカー遺伝子から選ばれる遺伝子の発現を抑制し得る物質または当該遺伝子の翻訳産物の活性を抑制し得る物質の有効量を対象に投与することを含む、白血病幹細胞を標的化した急性骨髄性白血病の予防または治療方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は、白血病幹細胞マーカーに関し、急性骨髄性白血病の治療分野に関するものである。

【背景技術】

【0002】

急性骨髄性白血病(AML)は、最も一般的な頻度(発症率)の高い成人白血病であり、稀な白血病幹細胞(LSC)から始まる未熟な骨髄芽球のクローン性の増殖によって特徴付けられる(非特許文献1~3)。ヒトLSCの機能的特徴および分子的特徴は、大部分が不明である。従来、化学療法剤はAMLを一時的に寛解し得るものの、後になって再発することが患者を救うことができない困難な問題となっており、有効な治療剤および治療方法の開発のためには、これまでに知られていない白血病の性質を明らかにすることによる再発メカニズムの解明が強く望まれている。

10

【0003】

最近の研究は、白血病ならびに癌の一定の割合が不均一な細胞画分からなり、クローン性に増殖可能な均一な細胞集団から構成されていないことを明らかにした。LapidotとDickは、急性骨髄性白血病(AML)でそのような不均一性を同定し、CB17-scidおよびNOD/SCIDマウスでCD34+CD38-細胞が選択的に移植することを報告した(非特許文献4)。

【0004】

本発明者らは、マウスでなくヒトのAML、特に細胞株でない個々の患者のAMLの特徴を再現することができ、長期間評価にたえ得る動物モデルの開発に成功した(非特許文献5、特許出願PCT/JP2008/068892)。最も高感度のヒト幹細胞アッセイの1つである新生NOD/SCID/IL2rgKOマウスモデルを用いて、本発明者らは、CD34+CD38-AML細胞がアメリカ癌学会(American Association for Cancer Research)が推奨する癌幹細胞のすべての基準に合致することをさらに同定した(非特許文献6)。具体的には、CD34+CD38-AML細胞は自己複製し、非幹白血病細胞を発生させ、生体内でAMLを発症させる独占的能力を有する。NOD/SCID/IL2rgKOマウスで原発性ヒトAMLを繰り返すことにより、本発明者らは、本疾患の実体において最も重大な問題である化学療法耐性および再発の根底にあるメカニズムを探求し、ヒトAML幹細胞に関して下記2つの必須の特性を同定した。第一に、AML幹細胞は骨髄の骨内膜領域に優先的に存在し、ヒトAML移植マウスを化学療法剤で処置した場合、化学療法耐性AML細胞の大多数が骨芽細胞ニッチ内に見いだされた。第二に、AML幹細胞(CD34+CD38+およびCD34-AML細胞ではない)は静止しており、それ故、細胞周期依存性の化学療法剤に対して耐性を示す。これらの組織学的実験および細胞周期解析は、多数のAML患者が化学療法誘導を介して寛解を獲得するが最終的には再発を経験するという臨床的経験と一致する。LSCを根絶させるように設計された新規治療戦略の開発は、AMLの再発を克服する厳密なステップであると思われる。

20

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

40

【0005】

【非特許文献1】Passegue, E., Jamieson, C.H., Alilles, L.E. & Weissman, I.L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? Proc Natl Acad Sci U S A 100 Suppl 1, 11842-11849 (2003).

【非特許文献2】Hope, K.J., Jin, L. & Dick, J.E. Acute myeloid leukemia originates from

50

a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. Nat Immunol 5, 738-743 (2004).

【非特許文献3】Jordan, C.T. & Guzman, M.L. Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells. Oncogene 23, 7178-7187 (2004).

【非特許文献4】Lapidot, T. et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature 367, 645-648 (1994).

【非特許文献5】Ishikawa, F. et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone marrow endosteal region. Nature Biotechnol 25:1315-1321 (2007).

【非特許文献6】Clarke, M.F. et al. Cancer stem cells - perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer Res 66, 9339-9344 (2006).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

解決しようとする課題は、ヒト白血病幹細胞(LSC)に特異的な分子標的を見出し、急性骨髄性白血病(AML)の根治につながる治療手段などの提供である。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、LSCと非幹細胞との間で示差的に発現する遺伝子群を見出し、これらの遺伝子がAMLの治療標的となる可能性を提案してきた(Ishikawa F. et al. Nature Biotechnol 25:1315-1321, 2007およびPCT/JP2008/068892)が、同時に正常の造血幹細胞(HSC)においても示差的に発現している可能性を排除しきれていなかった。すなわち、LSCと非幹細胞との比較のみならず、LSCとHSCとの間で示差的に発現する遺伝子群を標的として同定することにより、初めて副作用の少ないAMLの治療剤ならびに治療方法が実現されるのである。本発明者らは、ヒトAMLが再現できるモデルマウス(NOD/SCID/IL2rg^{nu/nu}マウスにヒトAML患者由来の白血病幹細胞含有物を移植したマウス)を開発し、少量のAML患者由来の骨髄細胞を移植し、当該モデル動物内でAMLの病態を再構築することに成功した。そしてAML患者由来およびAML移植マウス由来のLSCならびに健常ドナー由来の骨髄試料および臍帯血試料(HSCが含まれる)を準備して網羅的に解析を進め、本発明を完成させるに至った。

【0008】

すなわち、本発明は以下を提供する。

[1]急性骨髄性白血病の初発または再発を予測するための試験方法であって、

(1)被験者から採取した生体試料における白血病幹細胞マーカー遺伝子の発現レベルを、当該遺伝子の転写産物または翻訳産物を対象として測定する工程、および

(2)測定工程で得られた発現レベルを基準値と比較する工程

を含み、当該白血病幹細胞マーカー遺伝子が、

ADFP、ALOX5AP、AZU1、C3AR1、CACNB4、CALCRL、CCL4、CCL5、CD33、CD36、CD3D、CD86、CD9、CD93、CD9

10

20

30

40

50

6、CD97、CFD、CHI3L1、CLEC12A、CLECL1、COCH、CST7、CXCL1、DOK2、EMR2、FCER1G、FCGR2A、FUCA2、GPR109B、GPR160、GPR34、GPR84、HAVCR2、HBEGF、HCST、HGF、HLA-DOB、HOMER3、IFI30、IL13RA1、IL2RA、IL2RG、IL3RA、INHBA、ITGB2、LGALS1、LRG1、LY86、MAMDC2、MGAT4A、P2RY14、P2RY5、PLAUR、PPBP、PRG2、PRSS21、PTH2R、PTX3、REEP5、RNASE2、RXFP1、SLC31A2、SLC43A3、SLC6A6、SLC7A6、STX7、SUCNR1、TACSTD2、TIMP1、TM4SF1、TM9SF1、TNF、TNFRSF4、TNFSF13B、TYROBP、UTS2およびVNN1からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；

AURKA、C13orf34、CCNA1、DSCC1、FAM33A、HPGD、NEK6、PYHIN1、RASSF4、TXNL4BおよびZWINTからなる細胞周期関連遺伝子；

MPO、IER3、BIK、TXNDC1、GADD45BおよびNAIPからなるアポトーシス関連遺伝子；

AK5、ARHGAP18、ARRB1、DUSP6、FYB、HCK、LPXN、MS4A3、PAK1IP1、PDE9A、PDK1、PRKAR1A、PRKCD、PXK、RAB20、RAB8A、RABIF、RASGRP3、RGS18およびS100A11からなるシグナル伝達関連遺伝子；

WT1、MYCおよびHLXからなる転写因子遺伝子；ならびに

ACTR2、ALOX5、ANXA2P2、ATL3、ATP6V1B2、ATP6V1C1、ATP6V1D、C12orf5、C17orf60、C18orf19、C1GALT1C1、C1orf135、C1orf163、C1orf186、C6orf150、CALML4、CCT5、CLC、COMMD8、COTL1、COX17、CRIP1、CSTA、CTSA、CTSC、CTSG、CYBB、CYP2E1、DENND3、DHRS3、DLAT、DLEU2、DPH3、EFHD2、ENC1、EXOSC3、FAM107B、FAM129A、FAM38B、FBXO22、FLJ14213、FNDC3B、GNPDA1、GRPEL1、GTSF1、HIG2、HN1、HVCN1、IDH1、IDH3A、IKIP、KIF2C、KYNU、LCMT2、ME1、MIRN21、MKKS、MNDA、MTHFD2、MYO1B、MYO1F、NAGA、NCF2、NCF4、NDUFAF1、NP、NRIP3、OBFC2A、PARP8、PDLIM1、PDSS1、PGM2、PIGK、PIWIL4、PPCDC、PPIF、PRAME、PUS7、RPP40、RRM2、S100A16、S100A8、S100P、S100Z、SAMHD1、SH2D1A、SPCS2、SPPL2A、TESC、THEX1、TMEM30A、TMEM33、TRIP13、TUBB6、UBASH3B、UGCG、VSTM1、WDR4、WIT1、WSB2およびZNF253からなるその他の遺伝子

からなる群より選ばれる2～218の遺伝子であり、被験者における2以上の白血病幹細胞マーカー遺伝子の発現が基準値に比べて有意に高い場合、採取した生体試料中または被験者の生体内に白血病幹細胞の存在可能性が示唆される、試験方法。

[2] 白血病幹細胞マーカー遺伝子が、

ADFP、ALOX5AP、CACNB4、CCL5、CD33、CD3D、CD93、CD97、CLEC12A、DOK2、FCER1G、FCGR2A、FUCA2、GPR34、GPR84、HCST、HGF、HOMER3、IL2RA、IL2RG、IL3RA、ITGB2、LGALS1、LRG1、LY86、MGAT4A、P2RY5、PRSS21、PTH2R、RNASE2、SLC43A3、SUCNR1、TIMP1、TNF、TNFRSF4、TNFSF13B、TYROBP、およびVNN1からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；ZWINT、NEK6およびTXNL4Bからなる細胞周期関連遺伝子；BIKからなるアポトーシス関連遺伝子；AK5、ARHGAP18、

10

20

30

40

50

FYB、HCK、LPXN、PDE9A、PDK1、PRKCD、RAB20、RAB8AおよびRABIFからなるシグナル伝達関連遺伝子；WT1およびHLXからなる転写因子遺伝子；ならびにCYBB、CTSCおよびNCF4からなるその他の遺伝子からなる群より選ばれる2～58の遺伝子である、[1]に記載の試験方法。

[3] 下記遺伝子群：

ADFP、ALOX5AP、AZU1、C3AR1、CACNB4、CALCRL、CCL4、CCL5、CD33、CD36、CD3D、CD86、CD9、CD93、CD96、CD97、CFD、CHI3L1、CLEC12A、CLECL1、COCH、CST7、CXCL1、DOK2、EMR2、FCER1G、FCGR2A、FUCA2、GPR109B、GPR160、GPR34、GPR84、HAVCR2、HBEGF、HCST、HGF、HLA-DOB、HOMER3、IFI30、IL13RA1、IL2RA、IL2RG、IL3RA、INHBA、ITGB2、LGALS1、LRG1、LY86、MAMDC2、MGAT4A、P2RY14、P2RY5、PLAUR、PPBP、PRG2、PRSS21、PTH2R、PTX3、REEP5、RNASE2、RXFP1、SLC31A2、SLC43A3、SLC6A6、SLC7A6、STX7、SUCNR1、TACSTD2、TIMP1、TM4SF1、TM9SF1、TNF、TNFRSF4、TNFSF13B、TYROBP、UTS2およびVNN1からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；

10

AURKA、C13orf34、CCNA1、DSCC1、FAM33A、HPGD、NEK6、PYHIN1、RASSF4、TXNL4BおよびZWINTからなる細胞周期関連遺伝子；

20

MPO、IER3、BIK、TXNDC1、GADD45BおよびNAIPからなるアポトーシス関連遺伝子；

AK5、ARHGAP18、ARRB1、DUSP6、FYB、HCK、LPXN、MS4A3、PAK1IP1、PDE9A、PDK1、PRKAR1A、PRKCD、PXK、RAB20、RAB8A、RABIF、RASGRP3、RGS18およびS100A11からなるシグナル伝達関連遺伝子；

WT1、MYCおよびHLXからなる転写因子遺伝子；ならびに

ACTR2、ALOX5、ANXA2P2、ATL3、ATP6V1B2、ATP6V1C1、ATP6V1D、C12orf5、C17orf60、C18orf19、C1GALT1C1、C1orf135、C1orf163、C1orf186、C6orf150、CALML4、CCT5、CLC、COMMD8、COTL1、COX17、CRIP1、CSTA、CTSA、CTSC、CTSG、CYBB、CYP2E1、DENND3、DHRS3、DLAT、DLEU2、DPH3、EFHD2、ENC1、EXOSC3、FAM107B、FAM129A、FAM38B、FBXO22、FLJ14213、FNDC3B、GNPDA1、GRPEL1、GTSF1、HIG2、HN1、HVCN1、IDH1、IDH3A、IKIP、KIF2C、KYNU、LCMT2、ME1、MIRN21、MKKS、MNDA、MTHFD2、MYO1B、MYO1F、NAGA、NCF2、NCF4、NDUFAF1、NP、NRIP3、OBFC2A、PARP8、PDLIM1、PDSS1、PGM2、PIGK、PIWIL4、PPCDC、PPIF、PRAME、PUS7、RPP40、RRM2、S100A16、S100A8、S100P、S100Z、SAMHD1、SH2D1A、SPCS2、SPPL2A、TESC、THEX1、TMEM30A、TMEM33、TRIP13、TUBB6、UBASH3B、UGCG、VSTM1、WDR4、WIT1、WSB2およびZNF253からなるその他の遺伝子

30

40

からなる白血病幹細胞マーカー遺伝子から選ばれる遺伝子の発現を抑制し得る物質または当該遺伝子の翻訳産物の活性を抑制し得る物質を有効成分として含有する、白血病幹細胞を標的化した急性骨髄性白血病の治療剤。

[4] 白血病幹細胞マーカー遺伝子が、

ADFP、ALOX5AP、CACNB4、CCL5、CD33、CD3D、CD93、

50

CD97、CLEC12A、DOK2、FCER1G、FCGR2A、FUCA2、GPR34、GPR84、HCST、HGF、HOMER3、IL2RA、IL2RG、IL3RA、ITGB2、LGALS1、LRG1、LY86、MGAT4A、P2RY5、PRSS21、PTH2R、RNASE2、SLC43A3、SUCNR1、TIMP1、TNF、TNFRSF4、TNFSF13B、TYROBP、およびVNN1からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；ZWINT、NEK6およびTXNL4Bからなる細胞周期関連遺伝子；BIKからなるアポトーシス関連遺伝子；AK5、ARHGAP18、FYB、HCK、LPXN、PDE9A、PDK1、PRKCD、RAB20、RAB8AおよびRABIFからなるシグナル伝達関連遺伝子；WT1およびHLXからなる転写因子；ならびにCYBB、CTSCおよびNCF4からなるその他の遺伝子からなる群より選ばれる、[3]に記載の治療剤。

10

[5] 白血病幹細胞マーカー遺伝子が、

ALOX5AP、CACNB4、CCL5、CD33、CD3D、CD93、CD97、CLEC12A、DOK2、FCGR2A、GPR84、HCST、HOMER3、ITGB2、LGALS1、LRG1、PTH2R、RNASE2、TNF、TNFSF13B、TYROBPおよびVNN1からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；NEK6からなる細胞周期関連遺伝子；BIKからなるアポトーシス関連遺伝子；AK5、FYB、HCK、LPXN、PDE9A、PDK1、PRKCDおよびRAB20からなるシグナル伝達関連遺伝子；WT1からなる転写因子遺伝子；ならびにCTSCおよびNCF4からなるその他の遺伝子からなる群より選ばれる、[3]に記載の治療剤。

20

[6] 白血病幹細胞マーカー遺伝子が、骨髄のニッチに存在し、細胞周期が静止し、かつ抗癌剤抵抗性の幹細胞に発現するマーカーであって、AK5、BIK、DOK2、FCGR2A、IL2RA、LRG1、SUCNR1およびWT1からなる群より選ばれる、[3]に記載の治療剤。

[7] 遺伝子の発現を抑制し得る物質がアンチセンス核酸またはRNAi誘導性核酸である、[3]～[6]のいずれかーに記載の治療剤。

[8] 翻訳産物の活性を抑制し得る物質がアプタマーまたは抗体である、[3]～[6]のいずれかーに記載の治療剤。

[9] 抗体が抗体と抗癌物質とのイムノコンジュゲートである、[8]に記載の治療剤。

[10] 急性骨髄性白血病患者に対する自家移植または同種移植のための造血細胞を含む試料の製造方法であって、

30

a) 当該患者またはドナーから造血細胞を含む試料を採取する工程、

b) 採取した試料と、下記遺伝子群：

ADFP、ALOX5AP、AZU1、C3AR1、CACNB4、CALCRL、CCL4、CCL5、CD33、CD36、CD3D、CD86、CD9、CD93、CD96、CD97、CFD、CHI3L1、CLEC12A、CLECL1、COCH、CST7、CXCL1、DOK2、EMR2、FCER1G、FCGR2A、FUCA2、GPR109B、GPR160、GPR34、GPR84、HAVCR2、HBEGF、HCST、HGF、HLA-DOB、HOMER3、IFI30、IL13RA1、IL2RA、IL2RG、IL3RA、INHBA、ITGB2、LGALS1、LRG1、LY86、MAMDC2、MGAT4A、P2RY14、P2RY5、PLAUR、PPBP、PRG2、PRSS21、PTH2R、PTX3、REEP5、RNASE2、RXFP1、SLC31A2、SLC43A3、SLC6A6、SLC7A6、STX7、SUCNR1、TACSTD2、TIMP1、TM4SF1、TM9SF1、TNF、TNFRSF4、TNFSF13B、TYROBP、UTS2およびVNN1からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；

40

AURKA、C13orf34、CCNA1、DSCC1、FAM33A、HPGD、NEK6、PYHIN1、RASSF4、TXNL4BおよびZWINTからなる細胞周期関連遺伝子；

MPO、IER3、BIK、TXNDC1、GADD45BおよびNAIPからなるアポ

50

トースス関連遺伝子；

AK5、ARHGAP18、ARRB1、DUSP6、FYB、HCK、LPXN、MS4A3、PAK1IP1、PDE9A、PDK1、PRKAR1A、PRKCD、PXK、RAB20、RAB8A、RABIF、RASGRP3、RGS18およびS100A11からなるシグナル伝達関連遺伝子；

WT1、MYCおよびHLXからなる転写因子遺伝子；ならびに

ACTR2、ALOX5、ANXA2P2、ATL3、ATP6V1B2、ATP6V1C1、ATP6V1D、C12orf5、C17orf60、C18orf19、C1GALT1C1、C1orf135、C1orf163、C1orf186、C6orf150、CALML4、CCT5、CLC、COMMD8、COTL1、COX17、CRIP1、CSTA、CTSA、CTSC、CTSG、CYBB、CYP2E1、DENND3、DHRS3、DLAT、DLEU2、DPH3、EFHD2、ENC1、EXOSC3、FAM107B、FAM129A、FAM38B、FBXO22、FLJ14213、FNDC3B、GNPDA1、GRPEL1、GTSF1、HIG2、HN1、HVCN1、IDH1、IDH3A、IKIP、KIF2C、KYNU、LCMT2、ME1、MIRN21、MKKS、MNDA、MTHFD2、MYO1B、MYO1F、NAGA、NCF2、NCF4、NDUFAF1、NP、NRIP3、OBFC2A、PARP8、PDLIM1、PDSS1、PGM2、PIGK、PIWIL4、PPCDC、PPIF、PRAME、PUS7、RPP40、RRM2、S100A16、S100A8、S100P、S100Z、SAMHD1、SH2D1A、SPCS2、SPPL2A、TESC、THEX1、TMEM30A、TMEM33、TRIP13、TUBB6、UBASH3B、UGCG、VSTM1、WDR4、WIT1、WSB2およびZNF253からなるその他の遺伝子

から選ばれる少なくとも1種の白血病幹細胞マーカー遺伝子の翻訳産物を認識する物質とを接触させる工程、ならびに

c) 前記物質が結合した細胞を選別し、白血病幹細胞がパーズングされた試料を得る工程を含む、製造方法。

[11] 白血病幹細胞マーカー遺伝子が、

ADFP、ALOX5AP、CACNB4、CD33、CD3D、CD93、CD97、CLEC12A、DOK2、FCER1G、FCGR2A、GPR34、GPR84、HCST、HOMER3、IL2RA、IL2RG、IL3RA、ITGB2、LY86、P2RY5、PTH2R、SUCNR1、TNFRSF4、TYROBPおよびVNN1から選ばれる少なくとも1種の細胞表面マーカー遺伝子である、[10]に記載の製造方法。

[12] 下記遺伝子群：

ADFP、ALOX5AP、AZU1、C3AR1、CACNB4、CALCRL、CCL4、CCL5、CD33、CD36、CD3D、CD86、CD9、CD93、CD96、CD97、CFD、CHI3L1、CLEC12A、CLECL1、COCH、CST7、CXCL1、DOK2、EMR2、FCER1G、FCGR2A、FUCA2、GPR109B、GPR160、GPR34、GPR84、HAVCR2、HBEGF、HCST、HGF、HLA-DOB、HOMER3、IFI30、IL13RA1、IL2RA、IL2RG、IL3RA、INHBA、ITGB2、LGALS1、LRG1、LY86、MAMDC2、MGAT4A、P2RY14、P2RY5、PLAUR、PPBP、PRG2、PRSS21、PTH2R、PTX3、REEP5、RNASE2、RXFP1、SLC31A2、SLC43A3、SLC6A6、SLC7A6、STX7、SUCNR1、TACSTD2、TIMP1、TM4SF1、TM9SF1、TNF、TNFRSF4、TNFSF13B、TYROBP、UTS2およびVNN1からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；

AURKA、C13orf34、CCNA1、DSCC1、FAM33A、HPGD、NEK6、PYHIN1、RASSF4、TXNL4BおよびZWINTからなる細胞周期

10

20

30

40

50

関連遺伝子；

M P O、I E R 3、B I K、T X N D C 1、G A D D 4 5 B および N A I P からなるアポトーシス関連遺伝子；

A K 5、A R H G A P 1 8、A R R B 1、D U S P 6、F Y B、H C K、L P X N、M S 4 A 3、P A K 1 I P 1、P D E 9 A、P D K 1、P R K A R 1 A、P R K C D、P X K、R A B 2 0、R A B 8 A、R A B I F、R A S G R P 3、R G S 1 8 および S 1 0 0 A 1 1 からなるシグナル伝達関連遺伝子；

W T 1、M Y C および H L X からなる転写因子遺伝子；ならびに

A C T R 2、A L O X 5、A N X A 2 P 2、A T L 3、A T P 6 V 1 B 2、A T P 6 V 1 C 1、A T P 6 V 1 D、C 1 2 o r f 5、C 1 7 o r f 6 0、C 1 8 o r f 1 9、C 1 G A L T 1 C 1、C 1 o r f 1 3 5、C 1 o r f 1 6 3、C 1 o r f 1 8 6、C 6 o r f 1 5 0、C A L M L 4、C C T 5、C L C、C O M M D 8、C O T L 1、C O X 1 7、C R I P 1、C S T A、C T S A、C T S C、C T S G、C Y B B、C Y P 2 E 1、D E N N D 3、D H R S 3、D L A T、D L E U 2、D P H 3、E F H D 2、E N C 1、E X O S C 3、F A M 1 0 7 B、F A M 1 2 9 A、F A M 3 8 B、F B X O 2 2、F L J 1 4 2 1 3、F N D C 3 B、G N P D A 1、G R P E L 1、G T S F 1、H I G 2、H N 1、H V C N 1、I D H 1、I D H 3 A、I K I P、K I F 2 C、K Y N U、L C M T 2、M E 1、M I R N 2 1、M K K S、M N D A、M T H F D 2、M Y O 1 B、M Y O 1 F、N A G A、N C F 2、N C F 4、N D U F A F 1、N P、N R I P 3、O B F C 2 A、P A R P 8、P D L I M 1、P D S S 1、P G M 2、P I G K、P I W I L 4、P P C D C、P P I F、P R A M E、P U S 7、R P P 4 0、R R M 2、S 1 0 0 A 1 6、S 1 0 0 A 8、S 1 0 0 P、S 1 0 0 Z、S A M H D 1、S H 2 D 1 A、S P C S 2、S P P L 2 A、T E S C、T H E X 1、T M E M 3 0 A、T M E M 3 3、T R I P 1 3、T U B B 6、U B A S H 3 B、U G C G、V S T M 1、W D R 4、W I T 1、W S B 2 および Z N F 2 5 3 からなるその他の遺伝子

からなる白血病幹細胞マーカー遺伝子から選ばれる遺伝子の発現を抑制し得る物質または当該遺伝子の翻訳産物の活性を抑制し得る物質の有効量を対象に投与することを含む、白血病幹細胞を標的化した急性骨髄性白血病の予防または治療方法。

【発明の効果】

【0009】

本発明は、ヒト原発性AML由来の白血病幹細胞(LSC)の網羅的発現プロファイリングを解析し、HSCからLSCを分離するLSC特異的標的の同定に成功したことにより、完成したものである。したがって、本発明で見出された白血病幹細胞マーカーは、非幹細胞とLSCとの識別のみならず、これまで識別が困難とされてきた正常の造血幹細胞(HSC)とLSCとの識別を可能ならしめるものである。本発明で見出された白血病幹細胞マーカーを分子標的とすることにより、AMLの発症源または再発源であるLSCに特異的に作用する治療剤を提供することができる。

また、本発明で見出された白血病幹細胞マーカーを指標としてFACS等の細胞選別装置を用いて、患者またはドナーの骨髄細胞からLSCを特異的に除去することができる。これにより、AMLの真の発症源または再発源を有効に除去することにつながる。したがって、AMLの再発を有意に防止することができる。

さらに、本発明で見出された白血病幹細胞マーカーを指標として、採取した生体試料中または生体内でLSCの存否を測定することができ、これにより急性骨髄性白血病の再発または初発を予測することもできる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は正常CD34+CD38-HSCおよびAML CD34+CD38-LSCの移植結果を示す。(上図)正常CD34+CD38-細胞の移植はヒトCD45+造血細胞の効率的な再構成という結果になった。ヒトCD45+細胞内で、CD11c+の通常の樹状細胞、CD123high形質細胞様樹状細胞、T細胞およびB細胞など正

10

20

30

40

50

常ヒト免疫細胞が分化することからCD34 + CD38 - が造血幹細胞であることがわかる。(下図)AML CD34 + CD38 - 細胞を移植したところ、レシピエントマウスでのAMLが発症した。レシピエントのBMは、マウスの細胞でなく、完全にヒトCD45 + 細胞で占有された。移植されたヒト細胞は、樹状細胞、T細胞またはB細胞等の正常な免疫サブセットのいずれも含まなかったことから、CD34 + CD38 - 細胞に正常造血幹細胞が含まれず、白血病幹細胞であることが確認された。

【図2】図2は正常CD34 + CD38 - HSCよりもAML CD34 + CD38 - LSCにおいて大量に発現する遺伝子を示す。ヒートマップは35個の突出したLSCマーカーに関するqPCRデータを含む：1)その機能および局在が抗AML薬剤の開発に適する、2)そのmRNA量がHSCよりもLSCにおいて有意に($P < 0.05$)高い、3)そのmRNA量のメジアン値がHSCよりもLSCにおいて5倍以上高い、および4)試験したすべてのLSC試料において、そのmRNA量が各HSC試料中のmRNA量よりも高い。このパネルにおいて、赤、黄および緑は、本図の左下の参照色コードで示すように、それぞれ、高、中程度、低発現を示す。値1はCD34 + CD38 - HSC中のmRNAの平均値を示す。

10

【図3】図3はフローサイトメトリーを示す。LSC特異的分子候補(CD32、ITGB2、CD93およびCD33)の発現をフローサイトメトリーで解析した。ヒストグラムは、正常HSCと5名のAML患者から得られたLSCの相対的発現を示す。

【図4】図4はCD32の機能アッセイおよび組織学的実験の結果を示す。FACSにより、CD32の発現とCD133の発現とを再度解析した。CD32の発現パターンに従い、AML患者をAML-aとAML-bのカテゴリーに分類した。正常HSCは、CD32 - 画分内に独占的に同定された。同様に、白血病誘発活性は、AML-a群のCD32 - 画分に見られた。対照的に、AML-bにおいて、CD32 + 細胞はインビボAML開始能を示した。AML-bにおいて、CD32 + 細胞は、骨髄の骨髄膜領域および中央領域の両方に検出された。

20

【図5】図5は、正常CD34 + CD38 - HSCよりもAML CD34 + CD38 - LSCにおいて転写物が高発現している遺伝子候補のヒートマップ図を示す。217遺伝子を、ジーンオントロジーに基づいて6つのカテゴリー：1)細胞膜および細胞外、2)細胞周期、3)アポトーシス、4)シグナル伝達、5)転写因子および6)その他に分類した。2つのマイクロアレイプラットフォーム(U133 plus 2.0およびGene 1.0ST)での遺伝子発現レベルを別々に示した。各パネルにおいて、赤、黄および緑はそれぞれ、高、中程度および低発現を示す。

30

【図6】図6は、化学療法後のAML患者において上記候補遺伝子のひとつであるCD32の発現がダウンレギュレートしないことを示すフローサイトメトリーの図である。

【図7】図7は、骨髄ニッチに存在し、細胞周期が静止した、白血病幹細胞における各マーカー遺伝子の発現を免疫蛍光染色で調べた図である。各遺伝子について4枚の写真をセットにし、左上の青色染色がDAPI抗体(核染色)、左下の赤色染色が各マーカーに対する抗体、右上の緑色染色が細胞周期マーカーであるCD34に対する抗体(FCGR2A, AK5, DOK2, LRG1, BIKの場合)またはKi67抗体(IL2RA, WT1, SUCNR1の場合)を用いた結果を示す。右下は、Mergeを示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0011】

(定義)

本発明において、白血病の初発とは、白血病を初めて発症した、または発症が見込まれる状態をいい、白血病の再発とは、初発白血病の治療後または寛解後に再び発症した、または発症が見込まれる状態をいう。再発する組織または再発が見込まれる組織は、初発組織に限定されるものではなく、別の組織であってもよい。したがって、再発という概念には浸潤または転移も含まれる。

【0012】

本発明において、白血病の治療とは、抗癌剤投与、放射線療法、骨髄移植を始めとした

50

あらゆる治療を包含する。

【0013】

本発明において、白血病幹細胞（LSC）とは、骨髄由来のCD34+細胞画分であってよく、CD34+CD38-細胞画分が好ましい。粗LSC含有物は常法により被験者または患者の骨髄より採取することができ、LSCを含む細胞画分は、CD34およびCD38の細胞表面マーカー分子を用いたフローサイトメリーなどにより得ることができる。さらに、本発明により見出された白血病幹細胞マーカーから選択した別の細胞表面マーカー分子を指標にして、LSCをさらに選別することも可能である。

【0014】

（試験方法）

本発明は、急性骨髄性白血病の初発または再発を予測するための試験方法を提供する。本発明の試験方法は、

- （1）被験者から採取した生体試料における白血病幹細胞マーカー遺伝子の発現レベルを、当該遺伝子の転写産物または翻訳産物を対象として測定する工程、および
- （2）測定工程で得られた発現レベルを健常人の発現レベルと比較する工程を含む。

【0015】

- （1）被験者から採取した生体試料における白血病幹細胞マーカー遺伝子の発現レベルを、当該遺伝子の転写産物または翻訳産物を対象として測定する工程

【0016】

本発明が標的とする白血病幹細胞マーカー遺伝子とは、CD34+CD38+細胞画分に比べてCD34+CD38-細胞画分で示差的に発現される遺伝子群の中から本発明者が独自の視点に基づいて選別した、白血病幹細胞特異的マーカーであり、下記白血病幹細胞マーカー遺伝子（以下、単に「マーカー遺伝子」または「マーカー」と省略する場合がある）（1）から選ばれる2～218の遺伝子から構成される。マーカー遺伝子（1）は、好ましくは3以上、5以上、10以上、15以上、20以上または25以上の遺伝子から構成される。

【0017】

マーカー遺伝子（1）：

A D F P、A L O X 5 A P、A Z U 1、C 3 A R 1、C A C N B 4、C A L C R L、C C L 4、C C L 5、C D 3 3、C D 3 6、C D 3 D、C D 8 6、C D 9、C D 9 3、C D 9 6、C D 9 7、C F D、C H I 3 L 1、C L E C 1 2 A、C L E C L 1、C O C H、C S T 7、C X C L 1、D O K 2、E M R 2、F C E R 1 G、F C G R 2 A、F U C A 2、G P R 1 0 9 B、G P R 1 6 0、G P R 3 4、G P R 8 4、H A V C R 2、H B E G F、H C S T、H G F、H L A - D O B、H O M E R 3、I F I 3 0、I L 1 3 R A 1、I L 2 R A、I L 2 R G、I L 3 R A、I N H B A、I T G B 2、L G A L S 1、L R G 1、L Y 8 6、M A M D C 2、M G A T 4 A、P 2 R Y 1 4、P 2 R Y 5、P L A U R、P P B P、P R G 2、P R S S 2 1、P T H 2 R、P T X 3、R E E P 5、R N A S E 2、R X F P 1、S L C 3 1 A 2、S L C 4 3 A 3、S L C 6 A 6、S L C 7 A 6、S T X 7、S U C N R 1、T A C S T D 2、T I M P 1、T M 4 S F 1、T M 9 S F 1、T N F、T N F R S F 4、T N F S F 1 3 B、T Y R O B P、U T S 2およびV N N 1からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；

A U R K A、C 1 3 o r f 3 4、C C N A 1、D S C C 1、F A M 3 3 A、H P G D、N E K 6、P Y H I N 1、R A S S F 4、T X N L 4 BおよびZ W I N Tからなる細胞周期関連遺伝子；

M P O、I E R 3、B I K、T X N D C 1、G A D D 4 5 BおよびN A I Pからなるアポトーシス関連遺伝子；

A K 5、A R H G A P 1 8、A R R B 1、D U S P 6、F Y B、H C K、L P X N、M S 4 A 3、P A K 1 I P 1、P D E 9 A、P D K 1、P R K A R 1 A、P R K C D、P X K、R A B 2 0、R A B 8 A、R A B I F、R A S G R P 3、R G S 1 8およびS 1 0 0 A 1 1からなるシグナル伝達関連遺伝子；

10

20

30

40

50

WT1、MYCおよびHLXからなる転写因子遺伝子；ならびに

ACTR2、ALOX5、ANXA2P2、ATL3、ATP6V1B2、ATP6V1C1、ATP6V1D、C12orf5、C17orf60、C18orf19、C1GALT1C1、C1orf135、C1orf163、C1orf186、C6orf150、CALML4、CCT5、CLC、COMMD8、COTL1、COX17、CRIP1、CSTA、CTSA、CTSC、CTSG、CYBB、CYP2E1、DEND3、DHRS3、DLAT、DLEU2、DPH3、EFHD2、ENC1、EXOSC3、FAM107B、FAM129A、FAM38B、FBXO22、FLJ14213、FNDC3B、GNPDA1、GRPEL1、GTSF1、HIG2、HN1、HVCN1、IDH1、IDH3A、IKIP、KIF2C、KYNU、LCMT2、ME1、MIRN21、MKKS、MNDA、MTHFD2、MYO1B、MYO1F、NAGA、NCF2、NCF4、NDUFAF1、NP、NRIP3、OBFC2A、PARP8、PDLIM1、PDSS1、PGM2、PIGK、PIWIL4、PPCDC、PPIF、PRAME、PUS7、RPP40、RRM2、S100A16、S100A8、S100P、S100Z、SAMHD1、SH2D1A、SPCS2、SPPL2A、TESC、THEX1、TMEM30A、TMEM33、TRIP13、TUBB6、UBASH3B、UGCG、VSTM1、WDR4、WIT1、WSB2およびZNF253からなるその他の遺伝子。

10

【0018】

前記白血病幹細胞マーカー遺伝子を構成する個々の遺伝子は公知であり、その塩基配列およびアミノ酸配列も既知である。IL2RAを除くマーカー遺伝子のシンボル名、Gene ID、位置する染色体およびその特徴などを表1に示す。IL2RAは、CD25とも称し、Gene ID：3559、第10染色体に位置し、インターロイキン2受容体アルファをコードする。IL2RAタンパク質は、細胞膜に局在する膜貫通型受容体である。

20

【0019】

【表 1 - 1】

symbol	geneID	probeID	probeID U133	probeID GeneST	Fold Change (AML/Health Y, U133)	Fold Change (AML/Health Y, GeneST)	染色体	説明	機能	局在	プロセス
ACTR2	10097	1558015_s at		8042337	4.2638	1.8188	2	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)		細胞質	
ADFP	123	209122 at		8160297	3.2797	2.3209	9	adipose differentiation-related protein		細胞膜	
AK5	26289	222862_s at		7902452	3.1895	16.5796	1	adenylylate kinase 5	シグナル伝達分子	細胞質	
ALOX5	240	204446_s at		7927215	18.4004	2.6463	10	arachidonate 5-lipoxygenase		細胞質	
ALOX5AP	241	204174 at		7968344	2.8061	9.5599	13	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein		細胞膜	
ANXA2P2	304	208816_x at		8154836	4.5495	4.8032	9	annexin A2 pseudogene 2		不明	
ARHGAP18	93663	225171 at		8129458	4.3548	2.5895	6	Rho GTPase activating protein 18	シグナル伝達分子	不明	
ARRB1	408	222912 at		7950473	3.8043	1.9404	11	arrestin, beta 1	シグナル伝達分子	細胞質	
ATL3	25923	223452_s at		7948997	3.6187	1.8605	11	atlastin 3		不明	
ATP6V1B2	526	201089 at		8144931	4.0733	2.0284	8	ATPase, H+ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B2		細胞質	
ATP6V1C1	528	202872 at		8147724	3.2006	2.3894	8	ATPase, H+ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C1		細胞質	
ATP6V1D	51382	208899_x at		7979698	4.6313	2.2873	14	ATPase, H+ transporting, lysosomal 34kDa, V1 subunit D		細胞質	
AURKA	6790	208079_s at		8067167	2.0444	2.4771	20	aurora kinase A	シグナル伝達分子	核	細胞周期
AZU1	566	2144575_s at		8024038	3.3641	4.0737	19	azurocidin 1		細胞外間隙	
BLK	638	205780 at		8073605	5.3934	8.8991	22	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)		細胞質	アポトーシス
C12orf5	57103	219099 at		7953211	6.1678	4.4117	12	chromosome 12 open reading frame 5		不明	
C13orf34	79866	219544 at		7969374	3.7631	2.3038	13	chromosome 13 open reading frame 34		不明	細胞周期
C17orf60	284021	217513 at		8009243	3.2027	3.7201	17	chromosome 17 open reading frame 60		不明	
C18orf19	125228	235022 at		8022404	2.828	1.8669	18	chromosome 18 open reading frame 19		不明	
C1GALT1C1	29071	219283 at		8174820	4.6168	2.2689	X	C1GALT1-specific chaperone 1		不明	
C1orf135	79000	220011 at		7913852	2.8168	2.9438	1	chromosome 1 open reading frame 135		不明	
C1orf163	65260	219420_s at		7916219	2.9798	2.4301	1	chromosome 1 open reading frame 163		不明	
C1orf186	440712	230381 at		7923875	10.2956	2.3674	1	chromosome 1 open reading frame 186		不明	
C3AR1	719	209906 at		7960874	8.2753	4.4025	12	complement component 3a receptor 1	膜貫通型受容体	細胞膜	
C6orf150	115004	1559051_s at		8127534	2.9862	3.4927	6	chromosome 6 open reading frame 150		不明	
CACNB4	785	207693 at		8055872	2.8303	2.6543	2	calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit		細胞膜	
CALCR1	10203	206331 at		8057578	2.5601	2.2288	2	calcitonin receptor-like	膜貫通型受容体	細胞膜	

【 0 0 2 0 】

【表 1 - 2】

CALML4	91860	221879	at	7989968	2.5411	2.2694	15	calmodulin-like 4		サイトカイン&成長因子	不明	
CCL4	6351	204103	at	8006602	12.0201	2.1087	17	chemokine (C-C motif) ligand 4		サイトカイン&成長因子	細胞外間隙	
CCL5	6352	1405	i. at	8014316	13.0433	10.0074	17	chemokine (C-C motif) ligand 5		サイトカイン&成長因子	細胞外間隙	免疫、細胞接着
CCNA1	8900	205899	at	7968637	3.325	3.9705	13	cyclin A1			核	細胞周期
CCT5	22948	229068	at	8104449	2.828	2.0069	5	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)			細胞質	
CD33	945	206120	at	8030804	3.4258	4.0167	19	CD33 molecule (thrombospondin receptor)		シグナル伝達分子	細胞膜	細胞接着
CD36	948	228766	at	8133876	6.3287	2.1815	7	CD36 molecule			細胞膜	
CD3D	915	213539	at	7952056	6.673	11.2019	11	CD3d molecule, delta (CD3-PCR complex)		膜貫通型受容体	細胞膜	
CD86	942	210895	s at	8082035	3.6193	4.1863	3	CD86 molecule		膜貫通型受容体	細胞膜	
CD9	928	201005	at	7953291	28.019	1.7512	12	CD9 molecule			細胞膜	
CD93	22918	202878	s at	8065359	13.7302	1.9706	20	CD93 molecule			細胞膜	細胞接着
CD96	10225	206761	at	8081564	4.247	4.9945	3	CD96 molecule			細胞膜	
CD97	976	202910	s at	8026300	7.6085	2.0902	19	CD97 molecule		膜貫通型受容体	細胞膜	免疫、細胞接着
CFD	1675	205382	s at	8024062	7.7147	3.955	19	complement factor D (adipsin)			細胞外間隙	
CHI3L1	1116	209395	at	7923547	3.3299	2.3625	1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)			細胞外間隙	
CLC	1178	206207	at	8036755	4.9719	20.5111	19	Charcot-Leyden crystal protein			細胞質	
CLEC12A	160364	155298	a at	7953901	14.7668	10.4421	12	C-type lectin domain family 12, member A			細胞膜	
CLECL1	160365	244413	at	7961069	3.2716	9.2279	12	C-type lectin-like 1			細胞膜	
COCH	1690	205229	s at	7973797	2.6217	2.5193	14	coagulation factor C homolog, cochlin (Limulus polyphemus)			細胞外間隙	
COMM8	54951	218351	at	8100145	4.696	2.2621	4	COMM domain containing 8			不明	
COTL1	23406	224583	at	8003171	4.2253	1.9761	16	coactosin-like 1 (Dictyostelium)			細胞質	
COX17	10063	203880	at	7968972	2.9867	2.0975	3	COX17 cytochrome c oxidase assembly homolog (S. cerevisiae)			細胞質	
CRIP1	1396	205081	at	7977409	10.2268	1.9145	14	cysteine-rich protein 1 (intestinal)			細胞質	
CST7	8530	210140	at	8061416	4.5721	4.3944	20	cystatin F (leukocystatin)			細胞外間隙	
CSTA	1475	204971	at	8082058	15.2724	8.2554	3	cystatin A (stefin A)			細胞質	
CTS1	5476	200661	at	8063078	7.4704	2.0204	20	cathepsin A			細胞質	
CTSC	1075	201487	at	7950906	4.4802	3.1109	11	cathepsin C			細胞質	免疫
CTSG	1511	205653	at	7978351	4.5766	5.8038	14	cathepsin G			細胞質	免疫
CXCL1	2919	204470	at	8095697	11.0827	2.1273	4	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating		サイトカイン&成長因子	細胞外間隙	

【 0 0 2 1 】

【表 1 - 3】

CYBB	1536	203923_s at	8166730	3.9235	4.1921	X	cytochrome b-245, beta polypeptide		細胞質	免疫
CYP2E1	1571	209975 at	7931643	2.58	2.2439	10	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1		細胞質	
DENND3	22898	212975 at	8148476	2.9132	2.0985	8	DENN/MADD domain containing 3		不明	
DHRS3	9249	202481 at	7912537	3.7799	2.499	1	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3		細胞質	
DLAT	1737	212568_s at	7943827	5.313	2.2002	11	dihydropyrimidinase S-acetyltransferase		細胞質	
DFEU2	8847	1556821_x at	7971653	2.876	3.9304	13	deleted in lymphocytic leukemia 2 (non-protein coding)		不明	
DOK2	9046	214054 at	8149638	5.6934	3.0391	8	docking protein 2, 56kDa	シグナル伝達分子	細胞膜	
DPH3	285381	225200 at	8085660	2.875	2.0279	3	DPH3, Kuhl1 homolog (S. cerevisiae)		細胞質	
DSOCL1	79075	219000_s at	8152582	2.5694	2.6348	8	defective in sister chromatid cohesion 1 homolog (S. cerevisiae)		核	細胞周期
DUSP6	1848	208893_s at	7965335	3.9521	2.0696	12	dual specificity phosphatase 6	シグナル伝達分子	細胞質	
EFHD2	79180	222483 at	7898161	3.0525	2.0378	1	EF-hand domain family, member D2		不明	
EMR2	30817	207610_s at	8034873	10.5352	2.0458	19	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 2		細胞膜	
ENCL	8507	201341 at	8112615	6.3235	1.8298	5	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)		核	
EXOSC3	51010	227916_x at	8161242	3.051	2.019	9	exosome component 3		核	
FAM107B	83641	223058 at	7932160	11.3343	2.1322	10	family with sequence similarity 107, member B		核	
FAM129A	116496	217966_s at	7922846	7.1413	1.714	1	family with sequence similarity 129, member A		細胞質	
FAM33A	348235	225684 at	8017133	2.6048	2.0228	17	family with sequence similarity 33, member A		核	細胞周期
FAM38B	63895	219602_s at	8022283	2.7684	2.4385	18	family with sequence similarity 38, member B		不明	
FBXO22	26263	225734 at	7985053	3.3569	1.8734	15	F-box protein 22		不明	
FCBR1G	2207	204232 at	7906720	5.172	4.5138	1	FC fragment of Igb, high affinity I, receptor for: gamma polypeptide	膜貫通型受容体	細胞膜	免疫、アポトーシス
FCGR2A	2212	203561 at	7906757	3.6163	4.5895	1	FC fragment of IgG, low affinity Iia, receptor (CD32)	膜貫通型受容体	細胞膜	
FLJ14213	79899	233379 at	7939383	3.2662	1.8592	11	protor-2		不明	
FNDCC3B	64778	222692_s at	8083901	4.0438	1.815	3	fibronectin type III domain containing 3B		不明	
FUCA2	2519	223120 at	8129974	2.7625	2.214	6	fucosidase, alpha-L- 2, plasma		細胞外間隙	
FYB	2533	227266_s at	8111739	5.75	3.4782	5	FYN binding protein (FYB-120/130)	シグナル伝達分子	核	免疫
GADD45B	4616	209305_s at	8024485	8.2835	1.8588	19	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta		細胞質	アポトーシス
GMPDAL	10007	202382_s at	8114787	4.3678	1.8908	5	glucosamine-6-phosphate deaminase 1		細胞質	
GPR109B	8843	205220 at	7967322	25.4362	5.9615	12	G protein-coupled receptor 109B	膜貫通型受容体	細胞膜	
GPR160	26996	223423 at	8083839	2.4534	2.4379	3	G protein-coupled receptor 160	膜貫通型受容体	細胞膜	
GPR34	2857	223620 at	8166906	3.7631	2.7359	X	G protein-coupled receptor 34	膜貫通型受容体	細胞膜	

【 0 0 2 2 】

【表 1 - 4】

GPR84	53831	223767_at	7963770	3.5766	2.6827	12	G protein-coupled receptor 84	膜貫通型受容体	細胞膜
GRAPEL1	80273	212432_at	8099246	8.8722	2.1952	4	Grp94-like 1, mitochondrial (E. coli)		細胞質
GTF1	121355	227711_at	7963817	8.6795	5.1142	12	gametocyte specific factor 1		細胞質
HAVCR2	84868	235458_at	8115464	3.8093	2.0482	5	hepatitis A virus cellular receptor 2	膜貫通型受容体	細胞膜
HBEGF	1839	203821_at	8114572	19.1502	3.4502	5	heparin-binding EGF-like growth factor	サイトカイン&成長因子	細胞外間隙
HCK	3055	208018_s_at	8061668	17.6625	4.7152	20	hemopoietic cell kinase	シグナル伝達分子	細胞質
HCSF	10870	223640_at	8028104	4.0478	2.9073	19	hematopoietic cell signal transducer		細胞膜
HGF	3082	210997_at	8140556	4.5623	2.7163	7	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	サイトカイン&成長因子	細胞外間隙
HIG2	29923	218507_at	8135915	2.6259	2.0696	7	hypoxia-inducible protein 2		不明
HLA-DOB	3112	205671_s_at	8178833	2.9282	1.8281	6	major histocompatibility complex, class II, DO beta	膜貫通型受容体	細胞膜
HLX	3142	214438_at	7909890	4.7545	1.972	1	H2.0-like homeobox	転写因子	核
HNI	51155	217755_at	8018305	3.5232	2.6057	17	hematological and neurological expressed 1		核
HOMER3	9454	204647_at	8035566	13.8417	4.0343	19	homer homolog 3 (Drosophila)	シグナル伝達分子	細胞膜
HPGD	3248	203914_x_at	8103769	1.9977	5.1611	4	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)		細胞質
HVCN1	84329	226879_at	7966356	3.112	2.231	12	hydrogen voltage-gated channel 1		不明
IDH1	3417	201193_at	8058552	2.5681	2.1009	2	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble		細胞質
IDH3A	3419	202069_s_at	7985134	3.9339	2.6845	15	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+)		細胞質
IER3	8870	201631_s_at	8179704	2.9818	2.6543	6	immediate early response 3		細胞質
IFT30	10437	201422_at	8026971	11.7514	3.0896	19	interferon, gamma-inducible protein 30		細胞外間隙
IKIP	121457	227295_at	7965681	3.5724	1.8803	12	IKK interacting protein		不明
ILL13RA1	3597	201887_at	8169580	7.1957	2.4697	X	interleukin 13 receptor, alpha 1	膜貫通型受容体	細胞膜
IL2RG	3561	204116_at	8173444	2.2169	2.6537	X	interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)	膜貫通型受容体	細胞膜
IL3RA	3563	206148_at	8176323	3.392	2.9718	X Y	interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)	膜貫通型受容体	細胞膜
INHBA	3624	210511_s_at	8139207	7.886	1.977	7	inhibin, beta A	サイトカイン&成長因子	細胞外間隙
ITGB2	3689	1555349_a_at	8070826	3.4371	2.3718	21	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4)	シグナル伝達分子	細胞膜
KIF2C	11004	209408_at	7901010	2.4566	2.3144	1	kinesin-family member 2C		核
KYNU	8942	217388_s_at	8045539	21.2871	4.5148	2	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)		細胞質
LCMT2	9836	204012_s_at	7988077	2.8266	1.8921	15	leucine carboxyl methyltransferase 2		不明
LGALS1	3956	201105_at	8072876	17.9891	7.0421	22	lectin, galactoside-binding, soluble, 1		細胞外間隙
LPXN	9404	216250_s_at	7948332	6.1566	5.0537	11	leupaxin	シグナル伝達分子	細胞質
LRG1	116844	228648_at	8032834	5.7066	2.2013	19	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1		細胞外間隙
LY96	9450	205859_at	8116734	9.8638	11.3294	6	lymphocyte antigen 86		細胞膜

【 0 0 2 3 】

【表 1 - 5】

MAMDC2	256691	228885	at	8155754	50.0231	1.9485	9	MAM domain containing 2	細胞外間隙
ME1	4199	204059	s at	8127854	3.167	6.0952	6	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	細胞質
MGAT4A	11320	226039	at	8054135	2.488	2.145	2	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-	細胞外間隙
MIRN21	406991	224917	at	8008885	7.1437	2.2647	17	microRNA 21	不明
MKKS	8195	218138	at	8064967	5.0082	2.1926	20	McKusick-Kaufman syndrome	細胞質
MNDA	4332	204959	at	7906377	7.9908	6.7427	1	myeloid cell nuclear differentiation antigen	核
MPO	4353	203949	at	8016932	3.4405	2.9167	17	myeloperoxidase	細胞質
MSA3	932	210254	at	7940216	2.9166	6.6468	11	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3	シグナル伝達分子
MTHFD2	10797	201761	at	8042830	2.7123	1.9426	2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2,	細胞質
MYC	4609	202431	s at	8148317	4.8528	1.9292	8	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	核
MYO1B	4430	212364	at	8047127	3.1023	1.9101	2	myosin IB	細胞質
MYO1F	4542	213733	at	8033605	3.93	2.5391	19	myosin IF	細胞質
NRGA	4668	202943	s at	8076403	2.7565	2.4116	22	N-acetylgalactosaminidase, alpha-NLR family, apoptosis inhibitory	細胞質
NALP	4671	239944	at	8177527	3.9106	2.0172	5	Protein	細胞質
NCF2	4688	209949	at	7922773	8.0756	3.4526	1	neutrophil cytosolic factor 2	細胞質
NCF4	4689	205147	x at	8072744	3.0753	3.3081	22	neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa	細胞質
NDUFA1	51103	204125	at	7987642	4.6031	2.1624	15	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, assembly factor	細胞質
NEK6	10783	223159	s at	8157761	5.1566	3.4558	9	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 6	シグナル伝達分子
NP	4860	201695	s at	7973067	8.9531	2.1755	14	nucleoside phosphorylase	核
NR1P3	56675	219557	s at	7946446	3.2732	3.6133	11	nuclear receptor interacting protein 3	不明
OBFC2A	64859	222872	x at	8047161	13.5591	2.7032	2	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 2A	核
P2RY14	9934	206637	at	8091511	3.0798	2.4295	3	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	膜貫通型受容体
P2RY5	10161	218589	at	7971565	1.5532	2.7233	13	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 5	膜貫通型受容体
PAK1IP1	55003	218886	at	8116848	4.0989	2.4894	6	PAK1 interacting protein 1	シグナル伝達分子
PARP8	79668	219033	at	8105191	7.2902	2.9745	5	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8	核
PDE9A	5152	205593	s at	8066833	5.8044	3.5595	21	phosphodiesterase 9A	細胞質
PDK1	5163	226452	at	8046408	2.6927	2.4033	2	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	細胞質
PDLIM1	9124	208690	s at	7935180	15.0721	1.5551	10	PDZ and LIM domain 1	細胞質
PDS1	23590	220865	s at	7926807	2.7366	2.4594	10	prenyl (decaprenyl) diphosphate synthase, subunit 1	不明
PGM2	55276	225366	at	8094556	3.8421	2.1135	4	phosphoglucosmutase 2	細胞質
PI3K	10026	209707	at	7917088	4.7506	2.9006	1	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class K	細胞質
PIWI4	143689	230480	at	7943240	3.308	1.9009	11	piwi-like 4 (Drosophila)	不明
PLAUR	5329	210845	s at	8037374	6.5367	1.697	19	plasminogen activator, urokinase receptor	膜貫通型受容体

【 0 0 2 4 】

【表 1 - 6】

遺伝子名	GenBank ID	Accession	NCBI ID	UniProt ID	分子量 (kDa)	PI	参照	機能	組織
PPBP	5473	214146 s at	8100971	12.1498	1.5966	4	pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	サイトカインの成長因子	細胞外間隙
PPDC	60490	219066 at	7984943	3.3971	2.0648	15	Phosphopantothencysteine decarboxylase		不明
PPIF	10105	201489 at	7928589	5.1105	2.4099	10	peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)		細胞質
PRAME	23532	204086 at	8074856	2.9345	7.1994	22	preferentially expressed antigen in melanoma		核
PRG2	5553	211743 s at	7948221	5.7443	5.1313	11	proteoglycan 2, bone marrow (natural killer cell activator, protein kinase, cAMP-dependant, regulatory, type I, alpha (tissue	シグナル伝達分子	細胞外間隙
PRKAL1	5573	200604 s at	8009457	2.5728	1.9221	17	protein kinase C, delta	シグナル伝達分子	細胞質
PRKCD	5580	202545 at	8080487	11.8684	4.4878	3	protease, serine, 21 (testisin)	シグナル伝達分子	細胞質
PRSS21	10942	220051 at	7992722	2.8945	2.4783	16	parathyroid hormone 2 receptor pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	膜通型受容体	細胞外間隙
PTH2R	5746	206772 at	8047910	32.9485	2.6488	2	pseudouridylylase synthase 7 homolog (S. cerevisiae)		細胞膜
PTX3	5806	206157 at	8083594	1.371	1.7203	3	PX domain containing serine/threonine kinase		細胞外間隙
PUS7	54517	218984 at	8142061	3.473	2.0097	7	Pyrin and HIN domain family, member 1	シグナル伝達分子	不明
PXK	54899	1552275 s at	8080781	2.9549	2.2995	3	RAB20, member RAS oncogene family	シグナル伝達分子	細胞質
PYHIN1	149628	240413 at	7906386	3.6814	1.9866	1	RAB8A, member RAS oncogene family	シグナル伝達分子	核
RAB20	55647	219622 at	7972805	4.2758	1.9982	13	RAB interacting factor	シグナル伝達分子	細胞質
RAB8A	4218	208819 at	8026520	3.089	2.0472	19	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	シグナル伝達分子	細胞質
RABIF	5877	204478 s at	7923483	6.673	1.9163	1	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4	シグナル伝達分子	不明
RASGRP3	25780	205801 s at	8041422	12.2403	2.3489	2	receptor accessory protein 5	シグナル伝達分子	細胞質
RASSF4	89937	226436 at	7927186	5.1219	1.8566	10	regulator of G-protein signaling 18	シグナル伝達分子	不明
REEP5	7905	208873 s at	8113542	1.9895	2.4938	5	Ribonuclease P/MRP 40kDa subunit (liver, eosinophil-derived)	シグナル伝達分子	細胞外間隙
RGS18	64407	223809 at	7908376	18.2071	3.0532	1	Ribonuclease P/MRP 40kDa subunit		核
RNASE2	6036	206111 at	7973110	6.2056	30.3509	14	polypeptide		細胞質
RPF40	10799	213427 at	8123717	2.5261	2.3867	6	Relaxin/insulin-like family peptide receptor 1	膜通型受容体	細胞質
RRM2	6241	201890 at	8040223	1.8022	1.9629	2	S100 calcium binding protein A11	シグナル伝達分子	細胞質
RXFP1	59350	231804 at	8098060	8.4366	4.7218	4	S100 calcium binding protein A16		核
S100A11	6282	200660 at	7920128	2.6989	1.9757	1	S100 calcium binding protein A8		細胞質
S100A16	140576	227998 at	7920291	6.5974	5.2295	1	S100 calcium binding protein P		細胞質
S100A8	6279	202917 s at	7920244	3.7254	4.1401	1	S100 calcium binding protein Z		不明
S100P	6286	204351 at	8093950	2.8439	4.35	4	SAM domain and HD domain 1		核
S100Z	170591	1554876 a at	8106411	2.5656	3.2588	5	SH2 domain protein 1A		細胞質
SAMHD1	25939	204502 at	8066117	3.5478	3.315	20	solute carrier family 31 (copper transporters), member 2		細胞膜
SH2D1A	4068	210116 at	8169792	5.4768	4.944	X	solute carrier family 43, member 3		細胞外間隙
SLC31A2	1318	204204 at	8157264	6.5551	1.9871	9			
SLC43A3	29015	213113 s at	7948229	4.0265	2.5036	11			

【 0 0 2 5 】

【表 1 - 7】

SIC6A6	6533	211030_s at	8078014	3.3096	1.9332	3	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ signal peptidase complex subunit 2) homolog (S. cerevisiae)	細胞膜
SIC7A6	9057	203579_s at	7996772	2.537	2.0624	16	signal peptidase complex subunit 2	細胞膜
SPCS2	9789	201239_s at	7914180	2.8247	2.8859	11	homolog (S. cerevisiae)	細胞質
SPPL2A	84888	226353 at	7988753	3.6826	3.1645	15	signal peptide peptidase-like 2A	不明
STX7	8417	212631_at	8129590	3.044	1.957	6	syntaxin 7	細胞膜
SUCNR1	56670	223939 at	8083422	10.3593	8.9094	3	succinate receptor 1	膜貫通型受容体
TACSTD2	4070	202286_s at	7916584	4.5271	2.3856	1	tumor-associated calcium signal transducer 2	細胞膜
TESC	54997	218872 at	7966749	6.7818	4.194	12	tescalcin	不明
THEX1	90459	226416 at	8144516	3.539	2.084	8	three prime histone mRNA exonuclease 1	不明
TIMP1	7076	201666 at	8167185	2.6582	1.8176	X	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	細胞外間隙
TM4SF1	4071	215034_s at	8091411	13.9334	3.1159	3	transmembrane 4 L six family member 1	細胞膜
TM9SF1	10548	209149_s at	7978166	3.8307	1.9283	14	transmembrane 9 superfamily member 1	細胞膜
TMEM30A	55754	232591_s at	8127637	3.436	1.8579	6	transmembrane protein 30A	不明
TMEM33	55161	218465 at	8094830	2.7565	2.4022	4	transmembrane protein 33	不明
TNF	7124	207113_s at	8179263	5.16	3.3831	6	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	サイトカイン&成長因子
TNFRSF4	7293	214228_x at	7911413	4.2204	2.4055	1	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	膜貫通型受容体
TNFRSF13B	10673	223501 at	7969986	9.7537	2.3209	13	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	サイトカイン&成長因子
TRIP13	9319	204033 at	8104234	2.146	2.0662	5	thyroid hormone receptor interactor 13	細胞質
TUBB6	84617	209191 at	8020220	5.4543	1.8033	18	tubulin, beta 6	細胞質
TXNDC1	81542	208097_s at	7974303	2.8632	1.9163	14	thioredoxin domain containing 1	細胞質
TXNLA4	54957	222748_s at	8002660	4.1397	1.9453	16	thioredoxin-like 4B	核
TYROBP	7305	204122 at	8036224	21.8206	5.4076	19	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	細胞膜
UBASH3B	84959	238587 at	7944722	3.5884	2.858	11	ubiquitin associated and SH3 domain containing, B	不明
UGCG	7357	221765 at	8157216	4.0106	2.3729	9	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	細胞質
UTS2	10911	220784_s at	7912136	5.3996	6.4651	1	urotensin 2	細胞外間隙
VNN1	8876	205844 at	8129618	11.9292	5.0877	6	vanin 1	細胞膜
VSTM1	284415	235818 at	8039109	2.8594	5.2732	19	V-set and transmembrane domain containing 1	不明
WDR4	10785	241937_s at	8070615	2.8509	2.2356	21	WD repeat domain 4	核
WIT1	51352	206954 at	7939131	2.8415	2.6555	11	Wilms tumor upstream neighbor 1	不明
WSB2	55884	201760_s at	7966829	3.5848	1.9757	12	WD repeat and SOCS box-containing 2	不明
WT1	7490	206067_s at	7947363	93.6087	1.7707	11	Wilms tumor 1	核
ZNF253	56242	242919 at	8027241	2.6622	2.176	19	zinc finger protein 253	核
ZWINT	11130	204026_s at	7933707	1.9796	2.3419	10	ZW10 interactor	核

10

20

30

40

50

【 0 0 2 6 】

本発明の試験方法がLSCとHSCとをより明確に識別することを目的とする場合、上記マーカー遺伝子(1)の中から、例えば、下記マーカー遺伝子(2)を指標とすることが好ましい。この実施態様において、マーカー遺伝子(2)は2~58の遺伝子から構成され、より好ましくは3以上、5以上、10以上、15以上、20以上または25以上の遺伝子から構成される。また、LSCとHSCとをさらにより明確に識別することを目的

とする場合、マーカー遺伝子(2)の中から、下記マーカー遺伝子(3)を指標とすることが好ましい。マーカー遺伝子(3)は、HSCに比べてLSCにおいて、通常5倍以上の示差的発現が観察されるのでより好ましい。この実施態様において、マーカー遺伝子(3)は2~35の遺伝子から構成され、より好ましくは3以上、5以上、10以上、15以上、20以上または25以上の遺伝子から構成される。

【0027】

マーカー遺伝子(2)：

A D F P、A L O X 5 A P、C A C N B 4、C C L 5、C D 3 3、C D 3 D、C D 9 3、C D 9 7、C L E C 1 2 A、D O K 2、F C E R 1 G、F C G R 2 A、F U C A 2、G P R 3 4、G P R 8 4、H C S T、H G F、H O M E R 3、I L 2 R A、I L 2 R G、I L 3 R A、I T G B 2、L G A L S 1、L R G 1、L Y 8 6、M G A T 4 A、P 2 R Y 5、P R S S 2 1、P T H 2 R、R N A S E 2、S L C 4 3 A 3、S U C N R 1、T I M P 1、T N F、T N F R S F 4、T N F S F 1 3 B、T Y R O B P、およびVNN1からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；Z W I N T、N E K 6およびT X N L 4 Bからなる細胞周期関連遺伝子；B I Kからなるアポトーシス関連遺伝子；A K 5、A R H G A P 1 8、F Y B、H C K、L P X N、P D E 9 A、P D K 1、P R K C D、R A B 2 0、R A B 8 AおよびR A B I Fからなるシグナル伝達関連遺伝子；W T 1およびH L Xからなる転写因子遺伝子；ならびにC Y B B、C T S CおよびN C F 4からなるその他の遺伝子。

10

【0028】

マーカー遺伝子(3)：

A L O X 5 A P、C A C N B 4、C C L 5、C D 3 3、C D 3 D、C D 9 3、C D 9 7、C L E C 1 2 A、D O K 2、F C G R 2 A、G P R 8 4、H C S T、H O M E R 3、I T G B 2、L G A L S 1、L R G 1、P T H 2 R、R N A S E 2、T N F、T N F S F 1 3 B、T Y R O B PおよびVNN1からなる細胞膜または細胞外局在遺伝子；N E K 6からなる細胞周期関連遺伝子；B I Kからなるアポトーシス関連遺伝子；A K 5、F Y B、H C K、L P X N、P D E 9 A、P D K 1、P R K C DおよびR A B 2 0からなるシグナル伝達関連遺伝子；W T 1からなる転写因子遺伝子；ならびにC T S CおよびN C F 4からなるその他の遺伝子。

20

【0029】

本発明の試験方法における被験者は、ヒトを始めとする哺乳動物であれば特に限定されるものではないが、白血病の初発または再発が疑われるヒトが好ましい。

30

【0030】

本発明の試験方法が測定対象とする生体試料は、哺乳動物、好ましくはヒトから採取可能なものであれば特に限定されるものではなく、血液、骨髄液、リンパ液などの体液試料、リンパ節、血管、骨髄、脳、脾臓、皮膚などの固形試料があげられる。

【0031】

本発明の試験方法において、マーカー遺伝子の発現レベルは、当該遺伝子の転写産物または翻訳産物を対象として測定する。転写産物を対象とする場合、常法に従い、RNAを生体試料から単離することができる。RNAを抽出するための一般的な方法が、当技術分野において周知されており、Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons (1997)など、分子生物学の標準的な教科書に開示されている。具体的には、Qiagenなどの製造業者から入手した精製キット、緩衝液セット、およびプロテアーゼを用いて、製造業者の指示に従ってRNA単離を行うことができる。

40

【0032】

転写産物を対象とするマーカー遺伝子の発現レベルの測定方法としては、特に限定されるものではないが、ノーザンブロットングおよびインサイチュハイブリダイゼーション(Parker & Barnes, Methods in Molecular Biology 106:247-283(1999))；RNaseプロテクション・アッセイ法(Hod, Biotechniques 13:852-854(1992))；

50

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR) (Weis et al., Trends in Genetics 8:263-264 (1992)); リアルタイム定量的 RT-PCR (Held et al., Genome Research 6:986-994 (1996)); ならびにマイクロアレイ解析法などがある。マイクロアレイ解析法は、製造業者の指示に従って、Affymetrix GeneChip 技術、Agilent Technologies のマイクロアレイ技術または Incyte のマイクロアレイ技術を用いるなどして、市販されている装置によって実施することができる。リアルタイム定量的 RT-PCR の詳細は、後述する実施例に記載されている。リアルタイム定量的 RT-PCR に好適に用いられるプライマーおよびプローブの塩基配列の例は、表 3 および配列表にリストされている。

10

【0033】

マーカー遺伝子の翻訳産物を対象とする場合、常法に従い、タンパク質を生体試料から単離することができる。タンパク質を抽出するための一般的な方法が、当技術分野において周知されており、Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons (1997) など、分子生物学の標準的な教科書に開示されている。なお、製造業者から入手した精製キット、緩衝液セット、およびプロテアーゼインヒビターを用いて、製造業者の指示に従ってタンパク質の単離を行うことができる。

【0034】

翻訳産物を対象とするマーカー遺伝子の発現レベルの測定方法としては、特に限定されるものではないが、免疫組織化学法、プロテオミクス法などがあげられる。免疫組織化学法は、各マーカー遺伝子産物に対して特異的な抗体を用いて発現を検出する。免疫組織化学法のプロトコールおよびキットは、当技術分野において周知されていて市販されている。プロテオミクス法は、あるサンプルにおけるタンパク質発現の全体的な変化を調べることを含む。プロテオミクス法は、一般的に以下の工程を含む：(1) 2-D ゲル電気泳動 (2-D PAGE) によるサンプル中の各タンパク質の分離、(2) このゲルから回収された各タンパク質の同定、例えば、質量分析または N-末端配列決定法、および(3) バイオインフォマティクスを用いたデータ解析。プロテオミクス法は、他の遺伝子発現プロファイリング法の有用な補助法であり、本発明のマーカー遺伝子の産物を検出するために単独または他の方法と組み合わせて使用することができる。また、細胞表面マーカーを標的とする場合、フローサイトメトリーを用いた測定方法が可能である。

20

30

【0035】

(2) 測定工程で得られた発現レベルを基準値と比較する工程

生体試料中のマーカー遺伝子の 2 ~ 218 種類の発現レベルを測定した結果、それらの 2 種以上の発現レベルが基準値と比べて有意に高い (遺伝子の発現に約 2 倍以上、好ましくは約 4 倍以上、より好ましくは約 6 倍以上、最も好ましくは約 10 倍以上の違いがある) 場合、当該試料中または被験者の生体内に白血病幹細胞の存在可能性が示唆される。ここで、基準値としては、健常人の発現レベルの平均値あるいは被験者の発症前の平均値など比較対照となる値が用いられる。白血病幹細胞の存在可能性の示唆は、被験対象において白血病の初発または再発の予想につながる。白血病の初発または再発の有無を、さらに別の検査によって確認することが好ましい。

40

【0036】

本発明の試験方法において、生体試料中のマーカー遺伝子の 2 ~ 218 種類の発現レベルを測定した結果、それらの 2 種以上の発現レベルが基準値と比べて有意に高い (遺伝子の発現に約 2 倍以上、好ましくは約 4 倍以上、より好ましくは約 6 倍以上、最も好ましくは約 10 倍以上の違いがある) 場合、当該試料中または試料の採取元の生体内に白血病幹細胞の存在可能性が示唆される。ここで、基準値としては、健常人の発現レベルの平均値あるいは被験者の発症前の発現レベルなど比較対照となる値が用いられる。この場合、白血病幹細胞の存在可能性は、白血病患者において癌の治療効果が完全に奏していないとの予測につながる。逆に、前記 2 種以上の発現レベルが有意に低い (例えば、実質的にゼロ

50

）場合、当該試料中に白血病幹細胞が存在しないと予測することができる。この場合、白血病の治療によって白血病幹細胞が消失し、治療が奏効していると考えられる。さらに、その他の検査と組み合わせて、白血病の治療効果を多面的に確認することが好ましい。

【0037】

このように、本発明の試験方法を適用することにより、生体内に存在する白血病幹細胞を白血病が初発または再発する前に検出して、発症を予測することが可能である。あるいは、白血病の発症を初期のステージで検出して癌患者の早期治療に導くことも可能である。さらに、白血病患者に対する治療効果を白血病幹細胞の存否を指標にして評価することも可能である。

【0038】

(治療剤)

また、本発明は、白血病幹細胞マーカー遺伝子の発現を抑制し得る物質または当該遺伝子の翻訳産物の活性を抑制し得る物質を有効成分として含有する、白血病幹細胞を標的化した急性骨髄性白血病の治療剤を提供する。

【0039】

本発明の治療剤の分子標的は、前述した白血病幹細胞マーカー遺伝子であり、治療目的に応じてどのマーカーを選択してもよい。本発明の治療剤が、白血病幹細胞の中でも、骨髄のニッチに存在し、細胞周期が静止し、かつ抗癌剤抵抗性を示す幹細胞を標的とする場合、AK5、BIK、DOK2、FCGR2A、IL2RA、LRG1、SUCNR1およびWT1からなる群より選ばれる遺伝子(以下、マーカー遺伝子(4)とも称する)の発現を抑制し得る物質または当該遺伝子の翻訳産物の活性を抑制し得る物質を選択することが推奨される。マーカー遺伝子(4)を構成する8の遺伝子から2~8(好ましくは2~5)を選択して分子標的とすることにより、多数の症例の白血病幹細胞を駆逐できる可能性が高い。したがって、本発明の治療剤に含まれる有効成分は、少なくとも1つであり、治療目的に応じて2以上を組み合わせることが好ましい。2以上の有効成分は、1つの医薬製剤に含まれていてもよく、別々の医薬製剤に含まれていてもよい。

以下、有効成分について説明する。

【0040】

白血病幹細胞マーカー遺伝子の発現を抑制し得る物質としては、例えば、アンチセンス核酸またはRNAi誘導性核酸などがあげられる。

【0041】

白血病幹細胞マーカー遺伝子の翻訳産物の活性を抑制し得る物質としては、例えば、アプタマーまたは抗体などがあげられる。当該物質は、各マーカーに直接または間接に作用する阻害物質であってもよい。

【0042】

以下、本発明の治療剤の有効成分について説明する。

【0043】

1. アンチセンス核酸

アンチセンス核酸の種類はDNAであってもRNAであってもよいし、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。アンチセンス核酸は、天然型のリン酸ジエステル結合を有するものであっても、分解酵素に安定なチオリン酸型(リン酸結合のP=OをP=Sに置換)や2'-O-メチル型等の修飾ヌクレオチドであってもよい。アンチセンス核酸の設計に重要な他の要素として、水溶性および細胞膜透過性を高めること等があげられるが、これらはリポソームやマイクロスフェアを使用するなどの剤形の工夫によっても克服できる。アンチセンス核酸の長さは、転写産物と特異的にハイブリダイズし得る限り特に制限はなく、短いもので約15個のヌクレオチド程度、長いもので転写産物の全配列に相補的な配列を含むような配列であってもよい。合成の容易さや抗原性の問題等から、例えば約15個以上のヌクレオチド、好ましくは約15個~約100個のヌクレオチド、より好ましくは約18個~約50個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドが例示される。さらに、アンチセンス核酸は、転写産物とハイブリダイズして翻訳を阻害するだけでなく

10

20

30

40

50

、二本鎖DNAと結合して三重鎖（トリプレックス）を形成し、mRNAへの転写を阻害し得るものであってもよい。

【0044】

2. RNAi誘導性核酸

RNAi誘導性核酸とは、細胞内に導入されることにより、RNA干渉（RNAi）効果を誘導し得るポリヌクレオチドをいい、好ましくはRNAである。RNAi効果とは、mRNAと同一の核酸配列またはその部分配列を含む二本鎖構造のRNAが、当該mRNAの発現を抑制する現象をいう。RNAi効果を得るには、例えば、少なくとも19の連続する標的mRNAと同一の核酸配列（またはその部分配列）を有する二本鎖構造のRNAを用いることが好ましい。二本鎖構造は、異なるストランドで構成されていてもよいし、一つのRNAのステムループ構造によって与えられる二本鎖であってもよい。RNAi誘導性核酸としては、例えばsiRNA、miRNAなどがあげられるが、siRNAが好ましい。siRNAは、RNAiを誘導できる限り特に制限されないが、例えば19～27塩基長、好ましくは21～25塩基長である。

【0045】

3. アプタマー

アプタマーとは、所定の標的分子に対する結合活性（または阻害活性）を有するポリヌクレオチドをいう。アプタマーは、RNA、DNA、修飾ヌクレオチドまたはそれらの混合物である。アプタマーはまた、直鎖状または環状の形態であってもよい。アプタマーの長さは特に限定されず、通常、約16～約200個のヌクレオチドであるが、例えば約100個のヌクレオチド以下であり、好ましくは約50個のヌクレオチド以下であり、より好ましくは約40個のヌクレオチド以下である。また、アプタマーの長さは、例えば約18個、約20個、約25個または約30個ヌクレオチド以上であってもよい。アプタマーは、結合性、安定性、薬物送達性等を高めるため、各ヌクレオチドの糖残基（例、リボース）が修飾されたものであってもよい。糖残基において修飾される部位としては、例えば、糖残基の2'位、3'位および/または4'位の酸素原子を他の原子に置き換えたものなどがあげられる。修飾の種類としては、例えば、フルオロ化、O-アルキル化、O-アリル化、S-アルキル化、S-アリル化およびアミノ化があげられる（例、Sproat et al., (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 733-738; Cotton et al., (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 2629-2635参照）。アプタマーはまた、プリン、ピリミジンが改変されたものであってもよい。このような改変としては、例えば、5位ピリミジン改変、8位プリン改変、環外アミンでの改変、4-チオウリジンでの置換、5-プロモまたは5-ヨード-ウラシルでの置換があげられる。また、ヌクレアーゼおよび加水分解に対して耐性であるように、本発明のアプタマーに含まれるリン酸基が改変されていてもよい。例えば、リン酸基が、チオエート、ジチオエートまたはアミデートで置換されていてもよい。アプタマーは、既報（例えば、Ellington et al., (1990) Nature, 346, 818-822; Tuerk et al., (1990) Science, 249, 505-510）に従って作製できる。

【0046】

4. 抗体

抗体は、ポリクローナル抗体（抗血清）、モノクローナル抗体のいずれであってもよく、周知の免疫学的手法により作製することができる。モノクローナル抗体は、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプであってもよいが、好ましくはIgGまたはIgMである。

【0047】

例えば、ポリクローナル抗体は、上記抗原（必要に応じて、ウシ血清アルブミン、KLH（Keyhole Limpet Hemocyanin）等のキャリア蛋白質に架橋した複合体とすることもできる）を、市販のアジュバント（例えば、完全または不完全フロイントアジュバント）とともに、動物の皮下あるいは腹腔内に2～3週間おきに2～4

10

20

30

40

50

回程度投与し（部分採血した血清の抗体価を公知の抗原抗体反応により測定し、その上昇を確認しておく）、最終免疫から約3～10日後に全血を採取して抗血清を精製することにより取得できる。抗原を投与する動物としては、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ハムスターなどの哺乳動物があげられる。

【0048】

また、モノクローナル抗体は、細胞融合法により作成することができる。例えば、マウスに上記抗原を市販のアジュバントと共に2～4回皮下あるいは腹腔内に投与し、最終投与の3日後に脾臓あるいはリンパ節を採取し、白血球を採取する。この白血球と骨髄腫細胞（例えば、NS-1、P3X63Ag8など）を細胞融合して該因子に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。細胞融合はPEG法でも電圧パルス法であ

10

【0049】

抗体はまた、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体であってもよい。

【0050】

キメラ抗体は、その可変領域および定常領域が互いに異なる動物種のイムノグロブリンに由来するモノクローナル抗体を意味する。例えば、キメラ抗体は、その可変領域がマウスイムノグロブリン由来の可変領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であるマウス/ヒトキメラモノクローナル抗体であり得る。ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明における組換キメラモノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。

20

【0051】

キメラ抗体は、自体公知の方法により作製できる。例えば、マウス/ヒトキメラモノクローナル抗体は、既報（例、実験医学（臨時増刊号），Vol. 6, No. 10, 1988および特公平3-73280号公報）に従って作製できる。詳細には、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから単離した該マウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV_H遺伝子（H鎖可変領域をコードする再配列されたVDJ遺伝子）の下流に、ヒトイムノグロブリンをコードするDNAから取得したC_H遺伝子（H鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、また該ハイブリドーマから単離したマウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV_L遺伝子（L鎖可変領域をコードする再配列されたVJ遺伝子）の下流にヒトイムノグロブリンをコードするDNAから取得したC_L遺伝子（L鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、各々発現可能なように配列して1つまたは別々の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞を培養することにより作製することができる。

30

【0052】

ヒト化抗体は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、例えば、その超可変領域の相補性決定領域の一部または全部がマウスモノクローナル抗体に由来し、その可変領域の枠組領域およびその定常領域がヒトイムノグロブリンに由来するヒト型モノクローナル抗体を意味する。超可変領域の相補性決定領域は、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する部位である3つの領域（Complementarity-determining region；CDR1、CDR2、CDR3）であり、可変領域の枠組領域は、該3つの相補性決定領域の前後に介在する比較的保存された4つの領域（Framework；FR1、FR2、FR3、FR4）である。換言すれば、例えばマウスモノクローナル抗体の超可変領域の相補性決定領域の一部または全部以外の全ての領域が、ヒトイムノグロブリンの対応領域と置き代わったモノクローナ

40

50

ル抗体を意味する。

【0053】

ヒト化抗体は、自体公知の方法により作製できる。例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換えヒト化抗体は、既報（例、特表平4-506458号公報および特開昭62-296890号公報）に従って作製できる。詳細には、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、少なくとも1つのマウスH鎖CDR遺伝子と該マウスH鎖CDR遺伝子に対応する少なくとも1つのマウスL鎖CDR遺伝子を単離し、またヒトイムノグロブリン遺伝子から前記マウスH鎖CDRに対応するヒトH鎖CDR以外の全領域をコードするヒトH鎖遺伝子と、マウスL鎖CDRに対応するヒトL鎖CDR以外の全領域をコードするヒトL鎖遺伝子を単離する。単離した該マウスH鎖CDR遺伝子と該ヒトH鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様に該マウスL鎖CDR遺伝子と該ヒトL鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう1つの発現ベクターに導入する。または、該マウスH鎖CDR遺伝子/ヒトH鎖遺伝子とマウスL鎖CDR遺伝子/ヒトL鎖遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト化抗体産生細胞を得、該細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト化抗体を得ることができる。

10

【0054】

ヒト抗体は、イムノグロブリンを構成するH鎖およびL鎖の可変領域および定常領域を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来する抗体を意味する。

20

【0055】

ヒト抗体は、自体公知の方法により作製できる。例えば、ヒト抗体は、少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原で免疫感作することにより、前述したポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体の作製法と同様にして製造することができる。例えば、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスは、既報（Nature Genetics, Vol. 15, p. 146-156, 1997; Nature Genetics, Vol. 7, p. 13-21, 1994; 特表平4-504365号公報; 国際出願公開W094/25585号公報; Nature, Vol. 368, p. 856-859, 1994; および特表平6-500233号公報）に従って作製できる。

30

【0056】

抗体はまた、前述の抗体（例、モノクローナル抗体）の一部であり得る。このような抗体としては、例えば、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv等のフラグメント、scFv、scFv-Fc、ミニボディー、ダイアボディー等の遺伝子工学的に作製されたコンジュゲート分子、あるいはポリエチレングリコール（PEG）等の蛋白質安定化作用を有する分子等で修飾されたそれらの誘導体などであってもよい。

【0057】

前記抗体は、種々の抗癌物質などを常法により結合したイムノコンジュゲートの形態であってもよい。この場合、抗体は、LSCに抗癌剤を送達するための薬物送達システムとして機能する。組み合わせる抗癌物質としては、シスプラチン、カルボプラチン、シクロフォスファミド、メルファラン、カルムスリン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、シタラピン（AraC）、メルカプトプリン、ダウノルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、チオグアニン、アザシチジン、アムサクリン、ドキシソルビシン、トレチノイン、アロプリノール、プレドニゾン（プレドニゾロン）、エビルビシン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ダクチノマイシン（アクチノマイシン）、マイトマイシンC、タキソール、L-アスパラギナーゼ、エトポシド、コルヒチン、デフェロキサミンメシレート、カンプトテシンなどがあげられるが、これに限定されるものではない。さらに、放射線核種、毒素等とのイムノコンジュゲートであってもよい。

40

【0058】

50

本発明の剤は、白血病幹細胞マーカー遺伝子の発現または当該遺伝子の翻訳産物の活性を抑制し得る物質に加え、任意の担体、例えば医薬上許容され得る担体を含むことができる。医薬上許容され得る担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニト、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウム - グリコール - スターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどがあげられるが、それらに限定されるものではない。

10

【 0 0 5 9 】

経口投与に好適な製剤は、水、生理食塩水のような希釈液に有効量の物質を溶解させた液剤、有効量の物質を固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤または錠剤、適当な分散媒中に有効量の物質を懸濁させた懸濁液剤、有効量の物質を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤、あるいは散剤、顆粒剤等である。

20

【 0 0 6 0 】

非経口的な投与（例、静脈内注射、皮下注射、筋肉注射、局所注入など）に好適な製剤としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤があげられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分および医薬上許容され得る担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解または懸濁すればよい状態で保存することもできる。

30

【 0 0 6 1 】

本発明の剤の投与量は、有効成分の活性や種類、投与様式（例、経口、非経口）、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なり一概に云えないが、通常、成人1日あたり有効成分量として約0.001mg～約5.0gである。

【 0 0 6 2 】

本発明の剤の投与対象としては造血組織（骨髄）を有し、急性骨髄性白血病に罹患する可能性がある動物種であれば特に限定されないが、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはヒトである。

【 0 0 6 3 】

（製造方法）

また、本発明は、急性骨髄性白血病患者に対する自家移植または同種移植のための造血細胞を含む試料の製造方法を提供する。本発明の製造方法は、

- a) 当該患者またはドナーから造血細胞を含む試料を採取する工程、
- b) 採取した試料と、少なくとも1種の白血病幹細胞マーカー遺伝子の翻訳産物を認識する物質とを接触させる工程、ならびに
- c) 前記物質が結合した細胞を選別し、白血病幹細胞がパーズングされた試料を得る工程を含む。すなわち、本発明は、自家移植または同種移植用の造血細胞を含む試料から白血病幹細胞を実質的に除去し、再発の懸念のない移植用試料を提供することができる。

40

【 0 0 6 4 】

50

白血病幹細胞マーカー遺伝子は、前述の通りであるが、パーズング目的のためには、下記遺伝子群：

A D F P、A L O X 5 A P、C A C N B 4、C D 3 3、C D 3 D、C D 9 3、C D 9 7、C L E C 1 2 A、D O K 2、F C E R 1 G、F C G R 2 A、G P R 3 4、G P R 8 4、H C S T、H O M E R 3、I L 2 R A、I L 2 R G、I L 3 R A、I T G B 2、L Y 8 6、P 2 R Y 5、P T H 2 R、S U C N R 1、T N F R S F 4、T Y R O B PおよびV N N 1から選ばれる少なくとも1種の細胞表面マーカー遺伝子を標的とすることが好ましい。

【0065】

a) 急性骨髄性白血病患者またはドナーから造血細胞を含む試料を採取する工程

試料は、通常、骨髄穿刺または末梢血採取により行われる。骨髄穿刺は、例えば、S. E. Haynesworth et al. Bone, 13, 81 (1992)に記載された方法等に基づき胸骨または腸骨から骨髄穿刺を行う。具体的には、骨髄穿刺を行う場所の皮膚面を消毒し、局所麻酔を行う。特に骨膜下を十分に麻酔する。骨髄穿刺針の内筒を抜き、5000単位のヘパリンを入れた10mL注射器を装着して必要量の骨髄液を速やかに吸引する。平均的には10 mL ~ 20 mLの骨髄液を吸引する。骨髄穿刺針を取り外し、10分間程圧迫止血する。取得した骨髄液を1,000×gの遠心分離により骨髄細胞を回収した後、該骨髄細胞をPBS (Phosphate Buffered Saline)で洗浄する。洗浄工程を数回繰り返した後、造血細胞を含む試料を得ることができる。

10

【0066】

末梢血の場合は、静脈から採取を行う。具体的には、末梢血採取を行う場所の皮膚面を消毒する。注射針の内筒を抜き、5000単位のヘパリンを入れた10mL注射器を装着して必要量の末梢血を速やかに吸引する。平均的には10 mL ~ 20 mLの末梢血を吸引する。注射針を取り外し、10分間程圧迫止血する。取得した末梢血を1,000×gの遠心分離により末梢血細胞を回収した後、該末梢血細胞をPBS (Phosphate Buffered Saline)で洗浄する。洗浄工程を数回繰り返した後、造血細胞を含む試料を得ることができる。

20

【0067】

b) 採取した試料と、少なくとも1種の白血病幹細胞マーカー遺伝子の翻訳産物を認識する物質とを接触させる工程

本工程で用いるマーカー遺伝子の翻訳産物を認識する物質は、前述した抗体があげられ、特に、A D F P、A L O X 5 A P、C A C N B 4、C D 3 3、C D 3 D、C D 9 3、C D 9 7、C L E C 1 2 A、D O K 2、F C E R 1 G、F C G R 2 A、G P R 3 4、G P R 8 4、H C S T、H O M E R 3、I L 2 R A、I L 2 R G、I L 3 R A、I T G B 2、L Y 8 6、P 2 R Y 5、P T H 2 R、S U C N R 1、T N F R S F 4、T Y R O B PおよびV N N 1から選ばれる少なくとも1種の細胞表面マーカーに対する抗体が好ましい。抗体は蛍光標識されていることが好ましく、標識に用いる蛍光色素はフローサイトメトリーに一般的に用いられている蛍光物質であることが好ましい。蛍光色素の具体例としては、F I T C (フルオレッセインイソチオシアネート)、P E (フィコエリトリン)、P e r C P (ペリジニククロフィルタンパク質)、P e r C P - C y 5 . 5、P E - C y 5、P E - C y 7、P E - T R (P E - テキサスレッド)、A P C (アロフィコシアニン)およびA P C - C y 7などがあげられる。接触は、前記細胞表面マーカー(抗原)と抗体との結合が達成される条件であれば特に限定されない。

30

40

【0068】

c) 前記物質が結合した細胞を選別し、白血病幹細胞がパーズングされた試料を得る工程

本工程において、細胞の選別は、フローサイトメトリーと組み合わせることで容易に達成することができる。蛍光標識した抗体と接触させた試料をフローサイトメーターにセットし、抗体と結合した細胞を選別し、当該試料から白血病幹細胞を分離することができる。

【0069】

50

このようにして得られたLSCがパーズングされた試料は、LSCが効率的に除去され、HSCは除去されずに逆に濃縮されることによって、再発の懸念なくAMLの患者の治療に用いることができる。

【実施例】

【0070】

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

【0071】

ヒト試料

すべての実験は、理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センターのInstitutional Review Board for Human Researchからの承認により実施した。AML患者由来の白血病細胞は、書面によるインフォームドコンセントにより収集した。健常ドナー由来のCB(臍帯血)は、書面によるインフォームドコンセントとともにTokyo Cord Blood Bankにより収集した。健常ドナー由来のBMMNC(骨髄単核球細胞)は、Cambrex(Walkerville, MD)から入手した。AML患者由来のBMMNCおよびCBMNC(臍帯血単核球細胞)は、密度勾配遠心分離を使用して単離した。

【0072】

FACSおよびフローサイトメトリーによる解析

蛍光活性化セルソーティング(FACS)のため、AML患者のBMMNC細胞を、蛍光色素結合マウス抗hCD3、抗hCD4、抗hCD8、抗hCD34および抗hCD38モノクローナル抗体(BD Biosciences, San Jose, CA)で標識し、レシピエントBMMNC細胞を、マウス抗hCD45、抗hCD34および抗hCD38モノクローナル抗体(BD Biosciences)で標識し、FACS Aria(BD Biosciences)を用いて細胞をソーティングした。FSC/SSC高さおよびFSC/SSC幅の分析によって、ダブレットを排除した。ソーティング後のhCD34+hCD38-およびhCD34+細胞の純度は、98%よりも高かった。フローサイトメトリー解析のため、AML患者のBMMNC、レシピエント末梢血またはレシピエントBMを、上述した蛍光色素結合マウス抗hCD3、抗hCD4、抗hCD8、抗hCD34および抗hCD38モノクローナル抗体またはマウス抗hCD45、抗hCD34および抗hCD38モノクローナル抗体で標識した。

【0073】

マイクロアレイ解析

全RNAを、TRIzol試薬(Invitrogen)を用いて抽出し、Agilent Bioanalyzerを用いて当該RNAの完全性を評価した。Human Genome U133 plus 2.0ジーンチップ(Affymetrix)に対して、Two-Cycle Target Labelingキット(Affymetrix)を用いてビオチン化cRNAを合成した。Human Gene 1.0STジーンチップ(Affymetrix)に対して、第1ラウンドのcDNA合成およびcRNA増幅を、Message Amp Premier RNA Amplificationキット(Applied Biosystems)を用いて行い、続く第2ラウンドのcDNA合成、ビオチン化および断片化を、WT cDNA合成およびTerminal Labelingキット(Affymetrix)を用いて行った。ハイブリダイゼーション、洗浄、染色およびスキャニングを、製造業者の指示書に従って行った。まず、各プラットフォームについて、Bioconductorパッケージ(<http://www.bioconductor.org/>)を用いて、マイクロアレイデータを別々に解析した。マイクロアレイプラットフォーム上のプローブセットのシグナル強度を、GC-RMAプログラム(Zhijin et al., J. Am. Stat. Assoc., 99, 909-917, 2004)を用いて正規化した。各プラットフォームに対して、正規化したデータをRankProdプログラム(Hong et al.,

10

20

30

40

50

, *Bioinformatics*, 22, 2825-2827, 2006) により解析し、カットオフp値0.01かつ擬陽性推定0.05%として、LSCとHSCとの間で示差的に発現した遺伝子を選択した。HSCに比べてLSCで有意に高いレベルの発現が両方のマイクロアレイプラットフォームで共通して観察された場合、当該遺伝子を顕著なLSCマーカーの遺伝子候補として選択した(図5、表1)。さらに、Human Gene 1.0STジーンチップにおいて高率にヒットした遺伝子IL2RAも、タンパク質レベルでの解析結果がよく、後述する抗癌剤抵抗性の幹細胞で発現しているという観点から、マーカー遺伝子候補として選択した(表1)。候補の局在および生物学的機能は、Ingenuity Pathway Analysisデータベース(Ingenuity Systems)およびジーンオントロジーアノテーションデータベース(<http://www.ebi.ac.uk/GOA/>)の情報に基づいてアノテーションした。

10

【0074】

定量PCR(qPCR)解析

HSCおよびLSCから10ngの全RNAを、WT-Ovation RNA増幅システム(Nugen)を用いるcDNA増幅に供した。cDNA産物をTEで1:7.5に希釈し、25 μ lのqPCR反応あたり1 μ lの希釈産物を使用した。二重標識した蛍光プローブおよび遺伝子特異的プライマー(Sigma-Aldrich)の配列を、表3に記載した。PCR反応は、LightCycler 480(Roche Applied Science)を使用して、Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG(Invitrogen)で行った。各転写物の存在量は、標準曲線法(Methods, 25, 386-401, 2001)により計算した。Kaleida Graphソフトウェアパッケージ中のKruskal-Wallis、Wilcoxon-Mann-Whitney、Student's t-検定のいずれかがP<0.05を示した場合、LSCとHSCとの間で発現レベルが有意に異なるとみなした。

20

【0075】

動物

NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/Sz(NOD/SCID/IL2rg^{nu11})マウスは、Il2rg遺伝子座の完全ヌル変異をNOD.Cg-Prkdc^{scid}(NOD/SCID)系統と戻し交雑することによって、The Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME)で開発された(Shultz, L.D. et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 154, 180-191 (1995))。マウスを、理研およびThe Jackson Laboratoryの動物施設で、各施設でInstitutional Animal Committeesによって確立されたガイドラインに従って、照射した食物および酸性化した水を用いて飼育し、規定された細菌叢のもとで維持した。

30

【0076】

異種移植

新生仔(誕生後2日以内) NOD/SCID/IL2rg^{nu11}マウスに、¹³⁷Cs源照射器を使用して、150cGyの全身照射を与え、その後2時間以内にAML細胞の静脈内注射を行なった。レシピエントは、3~4週間毎に後眼窩から採血し、末梢血ヒトAML移植キメラリズムを調べた。

40

【0077】

免疫蛍光標識およびイメージング

原発AML移植レシピエントの大腿骨から、パラホルムアルデヒド固定し脱灰したパラフィン包埋切片を調製した。標識に使用した一次抗体は、マウス抗ヒトCD45モノクローナル抗体(DAKO, Denmark)およびウサギ抗CD32モノクローナル抗体

50

(Abcam, UK)であった。Zeiss LSM ExciterおよびLSM 710 (Carl Zeiss)を用いて、レーザースキャニング共焦点イメージングを得た。

【0078】

免疫蛍光標識およびイメージング(2)

原発AMLを移植し、抗癌剤処置したレシピエントの大腿骨から、パラホルムアルデヒド固定し脱灰したパラフィン包埋切片を調製し、DAPI(核染色:青);各マーカー(FCGR2A, AK5, DOK2, LRG1, BIK, IL2RA, WT1, SUCNR1:赤);静止細胞マーカー(緑:CD34(FCGR2A, AK5, DOK2, LRG1, BIK)またはKi67(IL2RA, WT1, SUCNR1))に対する抗体で標識した。Zeiss LSM ExciterおよびLSM 710 (Carl Zeiss)を用いて、レーザースキャニング共焦点イメージングを得た(図7)。

10

【0079】

表2:正常CD34+CD38-HSCsよりもAML CD34+CD38-LSCsで転写物が大量に発現している遺伝子のリスト

【0080】

【表2】

GeneID	遺伝子名	局在	機能	プロセス	統計			メジアン値の比 (LSC/HSC)	すべてのHSC試料よりも高発現を示すLSC試料の数(最大5)
					T-test	Wilcoxon-Mann-Whitney	Kruskal-Wallis		
123	ADFP	細胞膜			0.011	0.032	0.027	5.5	4
26289	AK5	細胞質	シグナル伝達分子		0.014	0.018	0.013	>10000	5
241	ALOX5AP	細胞膜			0.125	0.016	0.014	33.8	5
93663	ARHGAP18	不明	シグナル伝達分子		0.033	0.063	0.050	2.3	4
638	BIK	細胞質		アポトーシス	0.087	0.016	0.014	129.4	5
785	CACNB4	細胞膜			0.009	0.016	0.014	50.4	5
6352	CCL5	細胞外間隙	サイトカイン	免疫、細胞接着	0.018	0.016	0.014	58.4	5
945	CD33	細胞膜	シグナル伝達分子	細胞接着	0.002	0.016	0.014	8.0	5
915	CD3D	細胞膜	膜貫通型受容体		0.086	0.015	0.011	>10000	5
22918	CD93	細胞膜		細胞接着	0.018	0.016	0.014	27.1	5
976	CD97	細胞膜	膜貫通型受容体	免疫、細胞接着	0.014	0.016	0.014	5.7	5
160364	CLEC12A	細胞膜			0.049	0.016	0.014	180.2	5
1075	CTSC	細胞質		免疫	<0.001	0.016	0.014	6.6	5
1536	CYBB	細胞質		免疫	0.107	0.036	0.027	639.5	4
9046	DOK2	細胞膜	シグナル伝達分子		0.080	0.019	0.014	31.5	5
2207	FCER1G	細胞膜	膜貫通型受容体	免疫、アポトーシス	0.042	0.016	0.014	24.5	4
2212	FCGR2A	細胞膜	膜貫通型受容体		0.347	0.016	0.014	21.1	5
2519	FUCA2	細胞外間隙			0.005	0.016	0.014	2.7	5
2533	FYB	核	シグナル伝達分子	免疫	0.031	0.018	0.013	5.4	5
2857	GPR34	細胞膜	膜貫通型受容体		0.085	0.016	0.014	4.3	5
53831	GPR84	細胞膜	膜貫通型受容体		0.259	0.016	0.014	3521.9	5
3055	HCK	細胞質	シグナル伝達分子		0.031	0.016	0.014	82.6	5
10870	HCST	細胞膜			<0.001	0.016	0.014	17.3	5
3082	HGF	細胞外間隙	成長因子		0.034	0.191	0.142	27.2	4
3142	HLX	核	転写調節分子		0.003	0.016	0.014	2.9	5
9454	HOMER3	細胞膜	シグナル伝達分子		0.081	0.018	0.013	330.1	5
3561	IL2RG	細胞膜	膜貫通型受容体	免疫	0.039	0.016	0.014	3.0	5
3563	IL3RA	細胞膜	膜貫通型受容体		0.142	0.016	0.014	2.7	5
3689	ITGB2	細胞膜	シグナル伝達分子	細胞接着、アポトーシス	0.016	0.016	0.014	5.6	5
3956	LGALS1	細胞外間隙		アポトーシス	0.011	0.016	0.014	34.5	5
9404	LPXN	細胞質	シグナル伝達分子	細胞接着	0.008	0.016	0.014	5.2	5
116844	LRG1	細胞外間隙			0.023	0.016	0.014	18.8	5
9450	LY86	細胞膜		免疫、アポトーシス	0.166	0.065	0.049	14.8	4
11320	MGAT4A	細胞外間隙			0.031	0.063	0.050	2.6	4
4689	NCF4	細胞質		免疫	0.003	0.016	0.014	5.7	5
10783	NEK6	核	シグナル伝達分子	細胞周期、アポトーシス	0.007	0.016	0.014	5.3	5
10161	P2RY5	細胞膜	膜貫通型受容体		0.043	0.063	0.050	20.8	4
5152	PDE9A	細胞質	シグナル伝達分子		0.140	0.016	0.014	42.0	5
5163	PKD1	細胞質	シグナル伝達分子		0.004	0.016	0.014	11.7	5
5580	PRKCD	細胞質	シグナル伝達分子		0.059	0.016	0.014	24.2	5
10942	PRSS21	細胞外間隙			0.023	0.191	0.142	43.3	4
5746	PTH2R	細胞膜	膜貫通型受容体		0.133	0.019	0.014	9.3	5
55647	RAB20	細胞質	シグナル伝達分子		0.117	0.019	0.014	157.1	5
4218	RAB8A	細胞質	シグナル伝達分子		0.017	0.063	0.050	2.1	3
5877	RABIF	不明	シグナル伝達分子		0.008	0.016	0.014	3.1	5
6036	RNASE2	細胞外間隙			0.152	0.016	0.014	88.1	5
29015	SLC43A3	細胞外間隙			0.013	0.016	0.014	3.3	5
56670	SUCNR1	細胞膜	膜貫通型受容体		0.075	0.032	0.027	29.9	4
7076	TIMP1	細胞外間隙			0.020	0.032	0.027	3.4	4
7124	TNF	細胞外間隙	サイトカイン	免疫、アポトーシス	0.325	0.016	0.014	2855.3	5
7293	TNFRSF4	細胞膜	膜貫通型受容体	免疫	0.327	0.034	0.025	>10000	4
10673	TNFRSF13B	細胞外間隙	サイトカイン	免疫	0.017	0.016	0.014	6.1	5
54957	TXNL4B	核		細胞周期	0.045	0.032	0.027	3.4	4
7305	TYROBP	細胞膜	シグナル伝達分子		0.016	0.016	0.014	14.8	5
8876	VNN1	細胞膜		免疫、アポトーシス、細胞接着	0.151	0.016	0.014	11.0	5
7490	WT1	核	転写調節分子	細胞周期	0.164	0.019	0.014	100.6	5
11130	ZWINT	核		細胞周期	0.078	0.032	0.027	2.2	4

10

20

30

40

3) 免疫調節、細胞周期、アポトーシス、および/または細胞接着に關与するもの。

【0085】

リストは57遺伝子を含み、当該遺伝子のmRNAレベルは、HSCよりもLSCにおいて有意に ($P < 0.05$; Kruskal-Wallis, Wilcoxon-Mann-WhitneyまたはStudent's t-検定による) 高かった。表2中の左欄から順に、Entrez Gene ID (Column A)、HUGO Gene Symbol (Column B)、局在 (Column C)、分子の機能 (Column D)、生物学的プロセス (Column E)、各統計学的検定のP-value (Columns F-H)、mRNAレベルのメジアン値の比 (Column I) およびHSC試料のmRNAレベルよりも高い発現レベルを示すLSC試料の数 (Column J) を示す。

10

【0086】

本発明者らは、以前、AML患者起源の骨髓 (BM) 由来のLSCおよびAML患者BMを移植したマウスのBM由来のLSCが類似した転写プロファイルを共有することを報告した (Nature Biotechnology, 2007、上述)。この知見に基づき、本発明者らは、2つのアレイプラットフォーム: Human Genome U133 plus 2.0 GeneChips (16名のAML患者由来および5つのAML移植マウス由来のBMを2名の健常ドナー由来のBMおよび5名の健常ドナー由来の臍帯血 (CB) と比較) および Human Gene 1.0 ST GeneChips (1名のAML患者由来BMおよび5つのAML移植マウス由来のBMを健常ドナー1名のCBおよび4名のBMと比較) を用いて、LSCと正常造血幹細胞 (HSC) とを比較する網羅的トランスクリプトーム解析を行った。以前の研究によりAML幹細胞が独占的にCD34+CD38-画分内に存在することが見出されていたので、 $> 1.2 \times 10^4$ 個のCD34+CD38-細胞を $> 98\%$ の純度で回収した (図1)。また、同様の方法で、正常BMおよびCB試料からCD34+CD38-HSCも精製した (図1)。新生NOD/SCID/IL2rg KOマウスに前記精製したHSCおよびLSCを静脈内注射することにより、LSCによるAMLの発症および正常免疫再構成の欠如を確認し、HSCによる長期移植および多系統 (T/B/骨髓) 分化を確認した (図1)。AML移植マウスに由来するCD34+CD38+細胞またはCD34-細胞ではなく、CD34+CD38-骨髓細胞が、二次レシピエントにおいて白血病を引き起こした。これらのデータは、移植したCD34+CD38-細胞はHSCによって混入したのではなくLSCの性質を保持していることを示唆する。得られた発現データセットを解析するため、Bioconductorパッケージに実装されたRankProd (Bioinformatics 22, 2825, 2006) を用いて、両方のマイクロアレイプラットフォームでHSCよりもLSCにおいて有意に高い (p 値 < 0.01 、擬陽性のパーセント < 0.05) アレイシグナルを示す遺伝子を抽出した。全部で217遺伝子候補がこの基準に適合し (図5、表1)、さらにIL2Rを追加し、218遺伝子候補とした。

20

30

【0087】

次に、LSCとHSCとを分離する候補の発現レベルを実証するため、5名のAML患者起源のBM由来のLSCおよび4名のBM由来のHSCを用いて、各候補遺伝子について定量PCR (qPCR) を行った (表3)。同定した217遺伝子の中から、医薬の開発に最も適する候補として、以下のカテゴリーの中の分子をコードする121遺伝子を選んでその後の解析を行った。前記カテゴリーは、以下の3つである:

40

- 1) 細胞膜または細胞外間隙に位置するもの、
- 2) サイトカイン、成長因子、膜貫通型受容体、プロテインキナーゼ、ホスファターゼ、転写調節分子、および/またはシグナル伝達分子、ならびに
- 3) 免疫調節、細胞周期、アポトーシス、および/または細胞接着に關与するもの。

【0088】

表2に示すように、121遺伝子のうちの57遺伝子に関するmRNA含量はHSCに比べてLSCにおいて統計学的に高かった。前記57遺伝子のうち、35遺伝子を優れた

50

LSCマーカーとして同定した。その理由は、1) LSCにおいて、それらの遺伝子のメジアン発現レベルが5倍よりも高かったこと、および2) 試験したすべてのLSC試料において、それらのmRNA含量が試験した各HSC集団のものよりも高かったことである(図2)。

【0089】

これらのLSC特異的候補分子の発現をタンパク質レベルで確認するために、35候補分子のそれぞれに対する利用可能なモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の品質を検証し、有効性を確認した抗体および32のAML患者試料を用いてフローサイトメトリー解析を行った。フローサイトメトリー解析を通じて、各候補分子における以下の側面を調べた：1) 局在(細胞表面または細胞内)、2) 陽性細胞の頻度および3) 発現強度。このように評価した57の候補分子の中から、FCGR2A(CD32)、ITGB2(CD18)、CD93、CD33、CD3DおよびTNF(TNF α)がLSC特異的マーカー/標的として最も有望な発現レベル/パターンを有していることを見出した。特に、FCGR2A(CD32)発現は、試験したAML症例の有意な割合でLSCとの強い相関を示し、さらなる機能解析のために選択した。試験した32のAML症例のうちの9つの症例で、AML幹細胞の大多数(>80%)がこの抗原を発現する(図3)。CD32発現が機能と排他的に相関することを確認するため、AMLの3症例由来の精製LSCを用いて、インビボNOD/SCID/IL2rgKO移植アッセイを行った。精製したCD34+CD38-CD32+およびCD34+CD38-CD32-細胞を亜致死的に照射したレシピエントに移植した場合、CD32+画分からAMLが独占的に発症した(図4)。LSCを標的とするいかなる治療も非LSC AML細胞を除去するのに有効な慣用の化学療法剤とともに最良に使用されと考えられるので、化学療法後でも標的分子が連続して発現されることを確認することが重要である。したがって、本発明者らは、CD32の発現が化学療法後に維持されるかどうかを調べ、Arac処置後のAML移植マウスのBM、脾臓および末梢血(PB)のCD32の発現を確認した(図6)。また、CD32発現細胞は、免疫蛍光標識により、骨髄の骨髄膜領域および中央領域内の両方に見出された(図4)。本知見は、化学療法耐性LSCがBM骨芽細胞ニッチ内に存在するという本発明者らの以前の報告に照らし合わせて、LSC標的療法の候補としてCD32をさらに支持する(Ishikawa F. et al. Nature Biotechnol 25:1315-1321, 2007およびPCT/JP2008/068892)。

【0090】

次に、正常ヒトHSC中のCD32の発現を評価した。原始ヒトCB CD34+CD38-集団内で、CD32+細胞の頻度は、9.8% +/- SDであった(図4A)。本画分内のCD133の発現を解析したとき、CD34+CD38-CD133-画分内にCD32+細胞を独占的に検出した(図4a)。異種移植アッセイにより、CD34+CD38-CD32+画分ではなくCD34+CD38-CD133+CD32-画分がHSCを含むことを見出した(図4B)。さらに、インビトロコロニー形成細胞(CFC)アッセイにより、CD34+CD38-CD32+細胞ではなくCD34+CD38-CD32-細胞が骨髄系および赤血球系造血コロニーを生じる能力を有することが示唆された。CD32+正常HSCにおけるインビボ長期免疫造血再構成能の欠如は、CD32発現細胞を標的とする治療剤がHSCに危害を与えず、正常な造血および免疫系に関する重大な副作用の回避を助長する可能性を示唆する。

【0091】

LSCがCD32を発現しないAML患者試料において、本発明者らは、新生NOD/SCID/IL2rgKOマウス移植アッセイにより、CD34+CD38-細胞がLSC機能を保有することを最初に確認し(図1)、次に、フローサイトメトリーによりITGB2(CD18)、CD93、(その他に、CD25、CD132、OX41、CD97)、CD33、CD3DおよびTNFの発現を調べた。抗原CD32、ITGB2、CD93、97および33の併用は、47症例の中の31症例において正常HSCからL

SCを良好に分離することが可能である。

【0092】

2つのセットのマイクロアレイおよび定量PCRにより同定されたLSC特異的遺伝子リスト(表2)は、骨髄後代で優先的に発現される遺伝子を含むが、HSCでは発現が限定されている。例えば、FCGR2A、HCKおよびNCF4は成熟骨髄細胞で高度に発現し、免疫複合体の食作用およびその後のスーパーオキシド産生に關与する(Prot Natl Acad Sci USA, 97, 1725; 2000; J Exp Med 191, 669, 2000; Nat Cell Biol, 3, 679, 2001; J Biol Chem 279, 1415, 2004)。他方、CD3複合体の構成成分であるCD3Dは、成熟Tリンパ球において、そのITAMモチーフを介するT細胞受容体シグナルを伝達する。したがって、AMLの少なくとも一定の割合は幹細胞ステージで分化の異常調節を介して発症する可能性がある。

10

【0093】

リストの別の特徴は、癌細胞および白血病細胞で顕著に発現された遺伝子の關与である。例えば、CD33はAML細胞のよく認識された免疫学的マーカーであり、ゲムツズマブ オゾガマイシン(gemtuzumab ozogamicin)等の抗体医薬の標的である(Leukemia 19: 176, 2005)。さらに、CD97はリンパ管内に浸潤する結腸直腸癌に蓄積されることが報告されている(Am J Pathol 161, 1657, 2002)。LSCにおけるこれらの分子の過剰発現は、これらの分子を標的にする治療法がLSCばかりでなく成熟AML細胞にも有効であるかもしれない。BIK、HOMER3、WT1(Genes Chromosomes Cancer 47, 8-20, 2008)およびCLEC12A(encoding CLL-1)(Blood 110, 2659-2666, 2007)などの遺伝子産物はLSC/AMLプラスト(blasts)に対するマーカー分子として提案されてきたことに注目すべきであり、このことは、本発明の知見が既報と一致することを示している。

20

【0094】

発現レベル/パターンの解析により、候補遺伝子が以下のセットに分類された:

- 1) RNAおよびタンパク質レベルでLSCの有意な割合で発現するが、HSCの少ない割合でしか発現しない(または無発現)分子をコードする遺伝子群、ならびに
- 2) LSCおよびHSCにおいてタンパク質レベルで発現するが、フローサイトメトリーによる発現強度がHSCからLSCの分離を可能にする遺伝子群。

30

【0095】

遺伝子セット1は、LSCを特異的に標的化し、HSCに危害を加えない、例えば、正常HSCに前記候補が欠如していることに基づく抗体医薬などの治療剤の開発にとって有力な候補を含む。遺伝子セット2に含まれる遺伝子(最も有望な候補としてCD33)は、自家造血幹細胞移植の背景で、HSCからLSCを分離するLSCのエクスピボパーキング等での適用に有力な利用可能性をもつバイオマーカーをコードする。

【0096】

図7では、各マーカー(FCGR2A, AK5, DOK2, LRG1, BIK, IL2RA, WT1及びSUCNR1)に対する抗体と静止細胞特異的マーカーを用いて、場所と細胞周期をイメージングにて同定することで、抗がん剤抵抗性を示す幹細胞の存在する骨内膜(ニッチ)にこれらの分子が多く存在すること、さらに、細胞周期の静止期にある白血病幹細胞に発現していることが判明した。したがって、これらの各マーカー分子を標的とすることが、白血病の再発克服に大きく貢献すると考えられる。

40

尚、WT1は、白血病をはじめ、多くの腫瘍にて発現が確認されている。しかし、この分子が再発や抗がん剤抵抗性を示す幹細胞レベルに発現しているかどうかについては、知られていなかった。本発明者らは、細胞周期が静止した、ニッチに存在する白血病幹細胞に発現することを見出したことから、これまでの化学療法や放射線治療では死滅させることができなかつた白血病幹細胞を殺すための標的分子として意義があることを示している

50

【 0 0 9 7 】

また、47名の様々なステージのAMLの症例から末梢血を採取して造血細胞を含む試料を調製し、試料中に含まれる白血病幹細胞でのFCGR2A(CD32a)、FCGR2B(CD32b)、IL2RA(CD25)、ITGB2(CD18)およびCD93の陽性率を調べた。結果を表4に示す。

【 0 0 9 8 】

【表4】

	n	Any marker	CD32-a	CD32-b	CD25	CD18	CD93
AML M0	2	2	2	0	0	0	0
% marker positive		100.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AML M1	7	4	0	2	2	3	0
% marker positive		57.1	0.0	28.6	28.6	42.9	0.0
AML M2	14	9	5	4	4	5	1
% marker positive		64.3	35.7	28.6	28.6	35.7	7.1
AML M4	4	4	3	1	1	2	1
% marker positive		100.0	75.0	25.0	25.0	50.0	25.0
Other AML	3	1	1	0	0	0	0
% marker positive		33.3	33.3	0.0	0.0	0.0	0.0
MDS/AML	17	11	3	6	9	0	1
% marker positive		64.7	17.6	35.3	52.9	0.0	5.9
All cases	47	31	14	13	16	10	3
% marker positive		66.0	29.8	27.7	34.0	21.3	6.4

10

20

【 0 0 9 9 】

表4より、FCGR2A(CD32a)、IL2RA(CD25)、ITGB2(CD18)およびCD93の4種類のマーカーを組み合わせることにより、高率に白血病幹細胞を識別でき、これら4種類の遺伝子を標的とする医薬を組み合わせることにより、60%を超える白血病細胞が駆逐できることが示された。

【産業上の利用可能性】

【 0 1 0 0 】

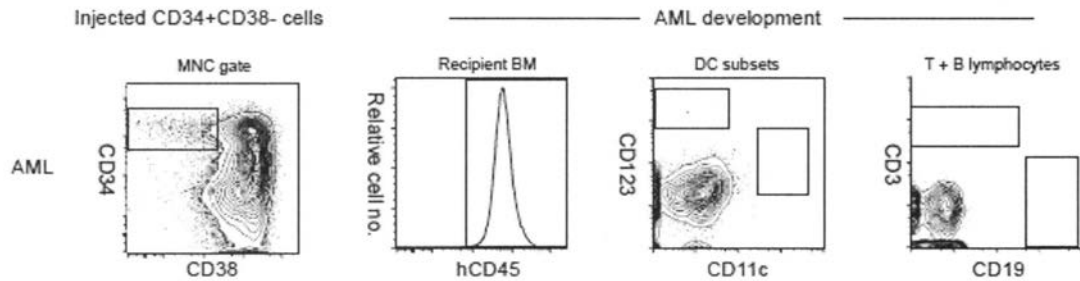
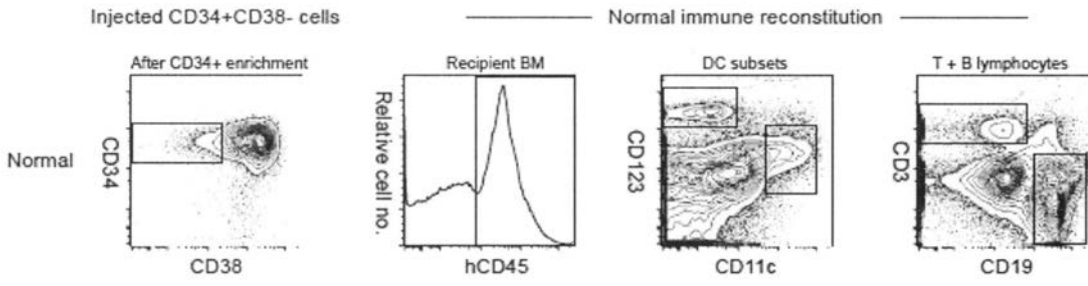
本発明で見出された白血病幹細胞マーカーを分子標的とすることにより、AMLの発症源または再発源であるLSCに特異的に作用する治療剤を提供することができる。本発明で見出された白血病幹細胞マーカーを指標としてFACS等の細胞選別装置を用いて、患者またはドナーの骨髄細胞からLSCを特異的に除去することができる。これにより、自家または同種骨髄移植の際のパーズングの効率が高くなり、急性骨髄性白血病の再発または初発を有意に防止することができる。さらに、本発明で見出された白血病幹細胞マーカーを指標として、採取した生体試料中または生体内でLSCの存否を測定することができ、これにより急性骨髄性白血病の再発または初発を予測することもできる。

30

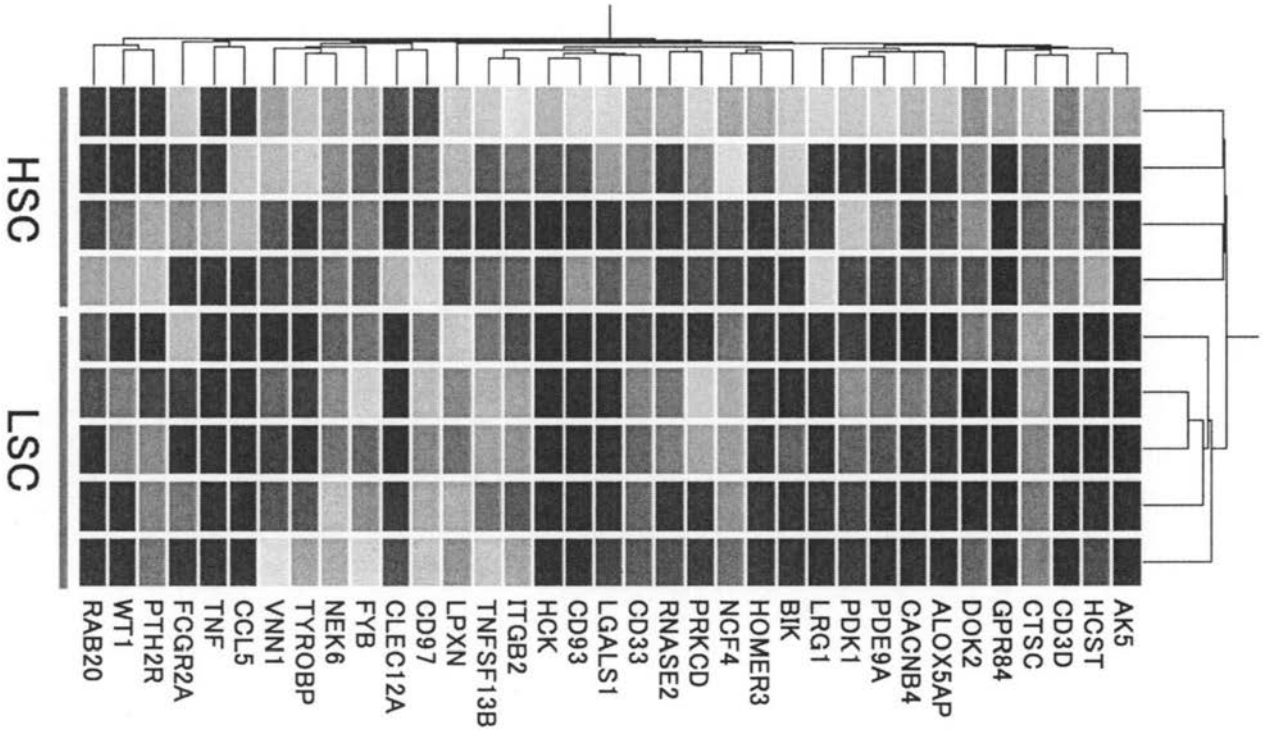
【 0 1 0 1 】

本出願は、日本で出願された特願2009-072400(出願日:平成21年3月24日)を基礎としており、その内容は本明細書にすべて包含される。

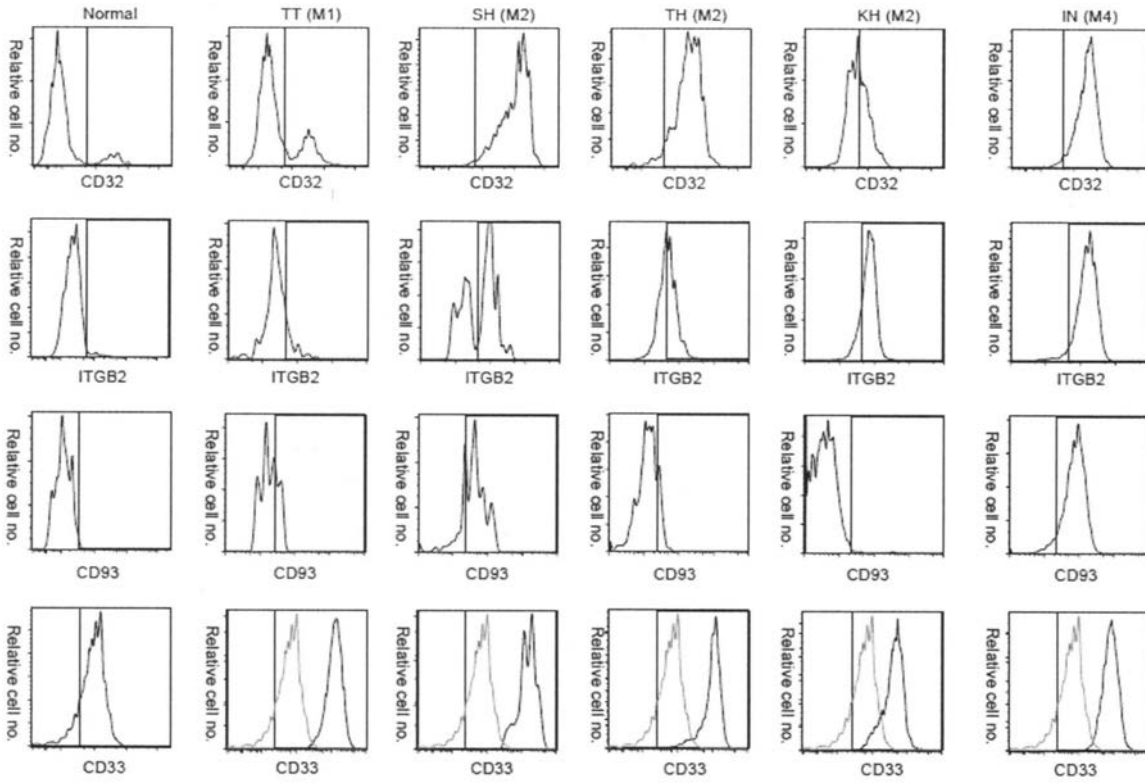
【 1 】



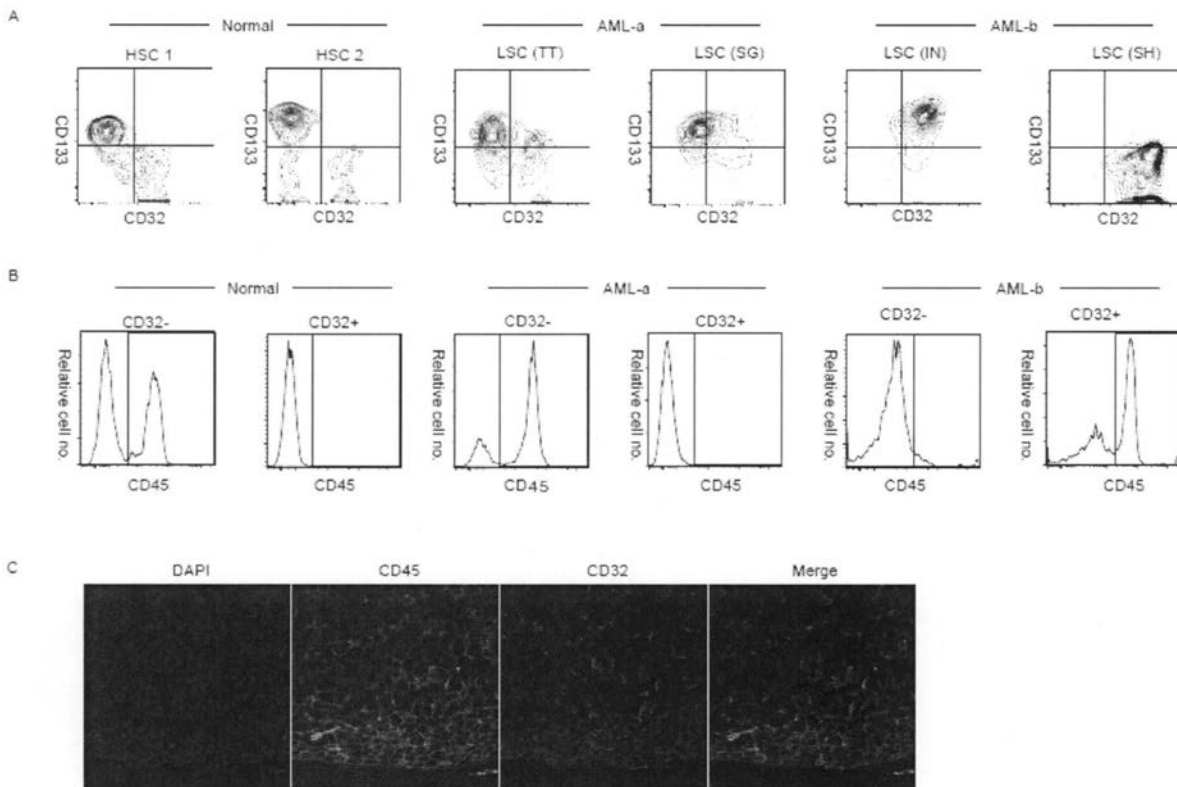
【 2 】



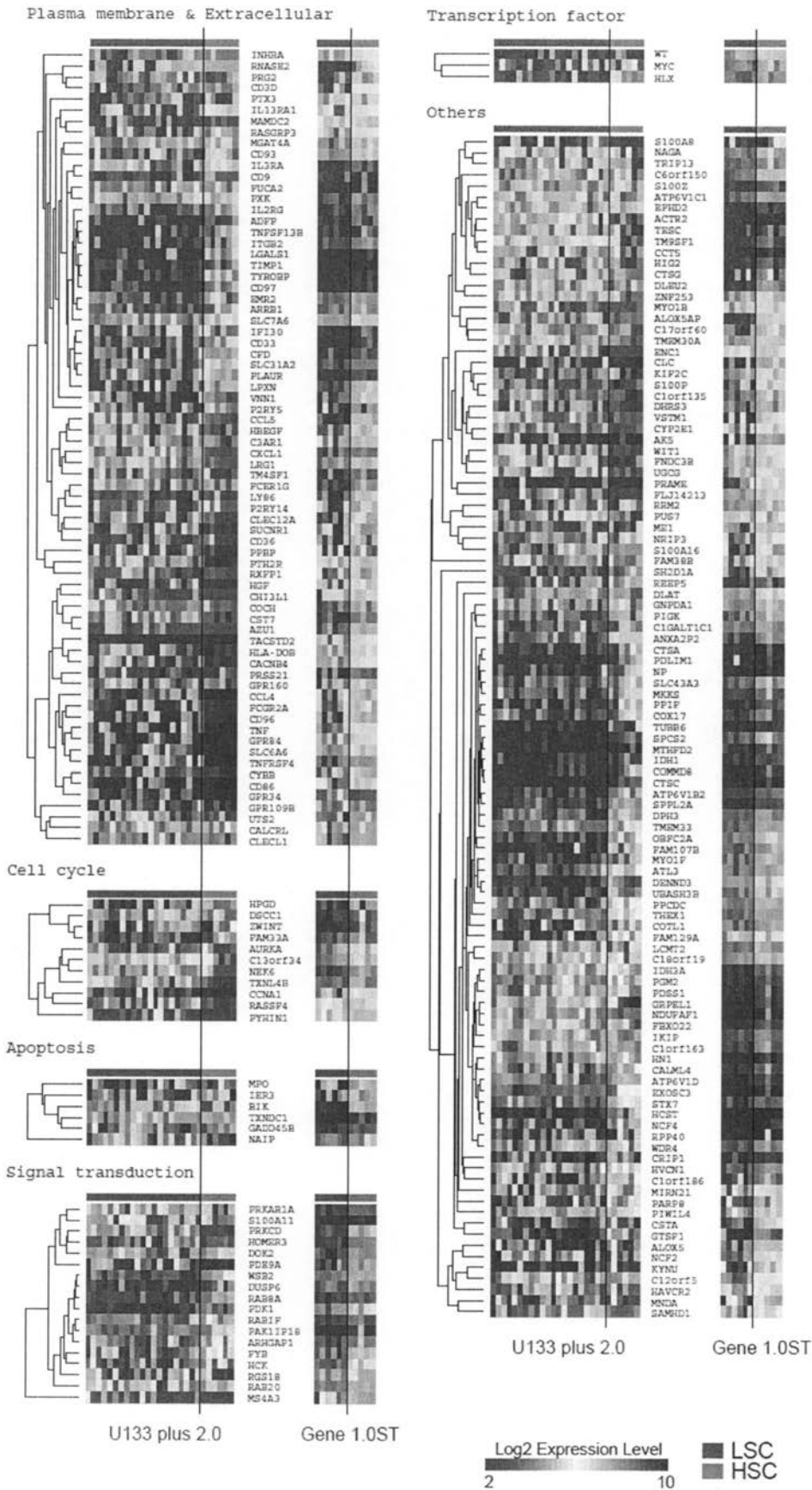
【 図 3 】



【 図 4 】

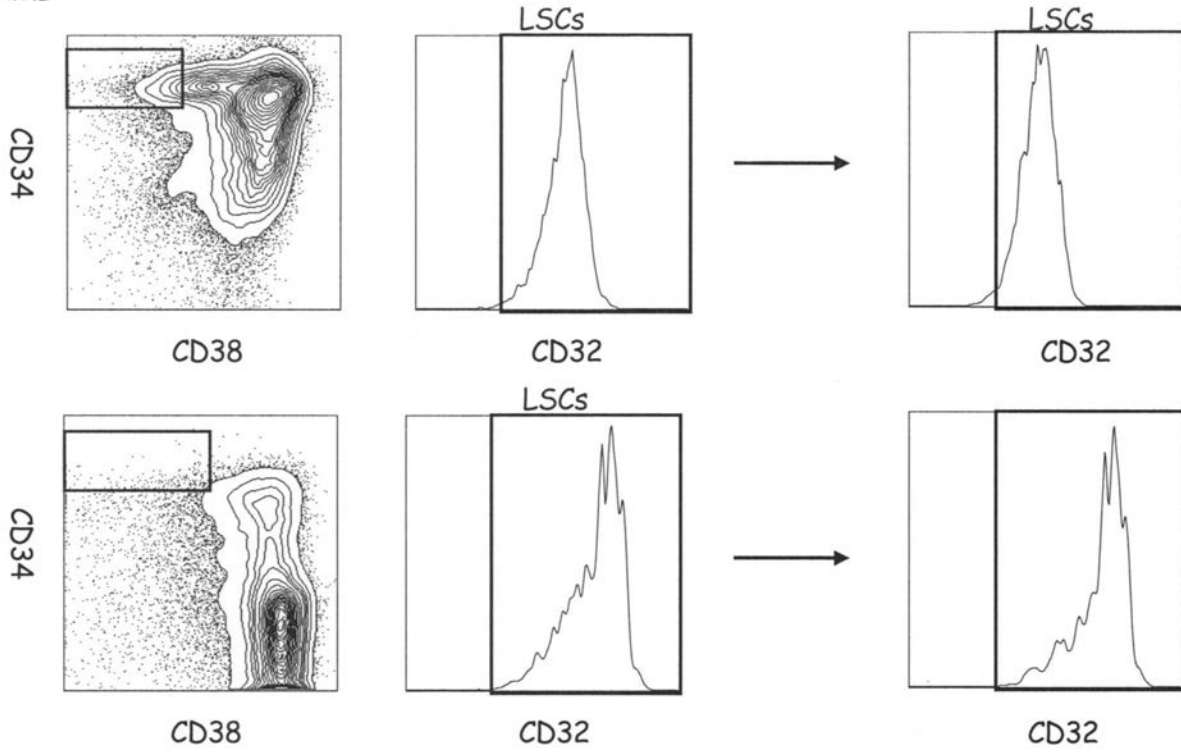


【 5 】

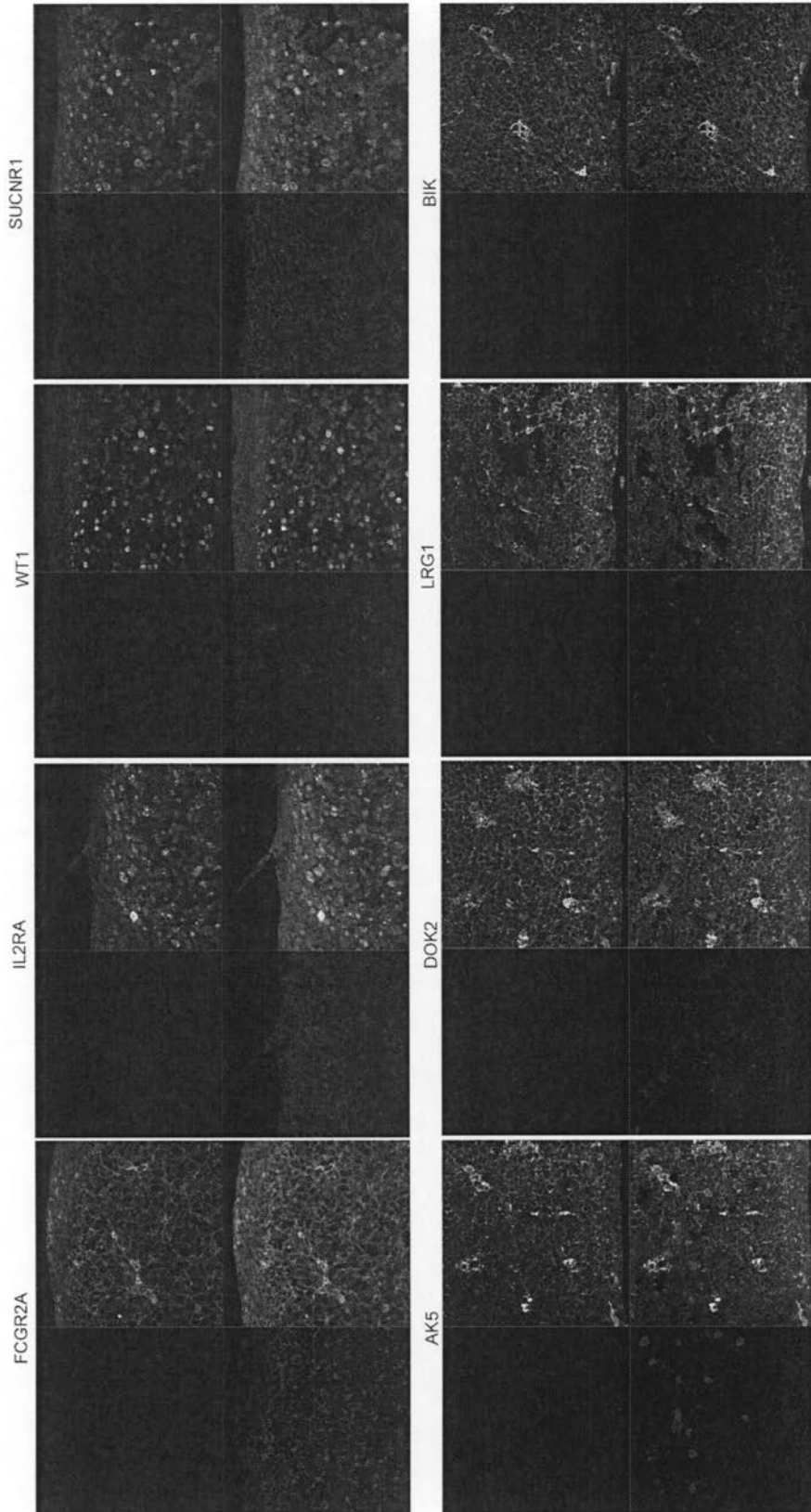


【 6 】

AML



【 図 7 】



【 配列表 】

2010110346000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2010/055131
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q1/68, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII), CAPlus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2009/051238 A1 (Riken, Japan), 23 April 2009 (23.04.2009), paragraphs [0026] to [0029] (Family: none)	1-11
X/Y	Naoki HOSEN et al., "CD96 wa Hakketsubyo Kansaibo Tokuiteki Saibo Hyomen Marker de aru", Japanese journal of clinical immunology, 2007, vol.30, no.4, page 349	3,7-9/1-2, 4-6,10-11
X/Y	Naoki HOSEN et al., "CD96 wa Hito Kyusei Kotsuzusei Hakketsubyo ni Oite Hakketsubyo Kansaibo to Seiyo Zoketsu Kaisaibo o Kubetsu suru Marker de aru", Dai 66 Kai Proceedings of the Japanese Cancer Association, 20 August 2007 (20.08.2007), pages 76 to 77	3,7-9/1-2, 4-6,10-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 April, 2010 (14.04.10)		Date of mailing of the international search report 27 April, 2010 (27.04.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer Telephone No.
Facsimile No.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/055131

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	HOSEN, N., et al., "CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2007, Vol. 104, No. 26, pp.11008-11013	3, 7-9/1-2, 4-6, 10-11
Y	STIREWALT, D., L. et al., "Identification of Genes with Abnormal Expression Changes in Acute Myeloid Leukemia", Genes, Chromosomes and Cancer, 2008, Vol. 47, pp.8-20	1-2, 4-6, 10-11
A	JP 2007-527238 A (Erasmus Universiteit Rotterdam), 27 September 2007 (27.09.2007), paragraphs [0097] to [0133] & US 2008/0305965 A1 & EP 1723257 A & WO 2005/080601 A2 & CA 2558366 A & CN 101088089 A & SG 155968 A	1-11
A	WO 2005/045434 A2 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH), 19 May 2005 (19.05.2005), claim 1; table 1 & US 2007/0105118 A1 & EP 1682898 A	1-11
A	Keiki KUMANO, et al., "Zoketsuki Shuyo ni Okeru Gan Kansaibo Kenkyu no Shinten: AML Kansaibo Kenkyu no Shinten", Hematology & Oncology, 28 June 2008 (28.06.2008), vol.56, no.6, pages 694 to 700	1-11
A	DORN, D., C., et al., "The effect of cantharidins on leukemic stem cells", Int. J. Cancer, 2008.11.19, Vol. 124, pp.2186-2199	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/055131

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.: 12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
It pertains to a method for treatment of the human body by therapy.
2. 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. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/055131									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2010年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2010年										
日本国実用新案登録公報	1996-2010年										
日本国登録実用新案公報	1994-2010年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII), Cplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
PX	WO 2009/051238 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2009.04.23, 段落【0026】 - 【0029】 (ファミリーなし)	1-11									
X/Y	保仙直毅 他, "CD96 は白血病幹細胞特異的細胞表面マーカーである", 日本臨床免疫学会会誌, 2007, 第30巻、第4号, pp.349	3,7-9 /1-2,4-6,10- 11									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 14.04.2010		国際調査報告の発送日 27.04.2010									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 高山 敏充	4B 4153								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/055131
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	保仙直毅 他, "CD96 はヒト急性骨髄性白血病において、白血病幹細胞と正常造血幹細胞を区別するマーカーである", 第 66 回 日本癌学会学術総会記事, 2007.08.20, pp.76-77	3,7-9 /1-2,4-6,10-11
X/Y	HOSEN, N., et al., "CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2007, Vol. 104, No. 26, pp.11008-11013	3,7-9 /1-2,4-6,10-11
Y	STIREWALT, D., L. et al., "Identification of Genes with Abnormal Expression Changes in Acute Myeloid Leukemia", Genes, Chromosomes and Cancer, 2008, Vol. 47, pp.8-20	1-2,4-6, 10-11
A	JP 2007-527238 A (エラスムス ユニベルジテート ロッテルダム) 2007.09.27, 段落【0097】 - 【0133】 & US 2008/0305965 A1 & EP 1723257 A & WO 2005/080601 A2 & CA 2558366 A & CN 101088089 A & SG 155968 A	1-11
A	WO 2005/045434 A2 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 2005.05.19, Claim 1, Table 1 & US 2007/0105118 A1 & EP 1682898 A	1-11
A	熊野恵城 他, "造血器腫瘍におけるがん幹細胞研究の進展: AML 幹細胞研究の進展", 血液・腫瘍科, 2008.06.28, 第 56 巻、第 6 号, pp.694-700	1-11
A	DORN, D., C., et al., "The effect of cantharidins on leukemic stem cells", Int. J. Cancer, 2008.11.19, Vol. 124, pp.2186-2199	1-11

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 0 / 0 5 5 1 3 1

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 1 2 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、人の身体の治療による処置に該当するものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 31/7135 (2006.01)	A 6 1 K 31/7135	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
	A 6 1 K 39/395	C
	A 6 1 K 39/395	L
	A 6 1 K 48/00	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(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, SE, S I, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, I N, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM , PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74) 代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(72) 発明者 石川 文彦

神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

(72) 発明者 小原 収

神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

(72) 発明者 齊藤 頼子

神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

(72) 発明者 北村 浩

神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

(72) 発明者 土方 敦司

神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

(72) 発明者 小澤 秀俊

神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

(72) 発明者 シュルツ、レオナルド ディー。

アメリカ合衆国、メイン州バーハーバー、メイン ストリート 600、ザ ジャクソン ラボ
ラトリー内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 CA12 GA18 HA08

HA09 HA12 HA14

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR36 QR42

QR56 QR62 QR63 QR66 QR77 QR82 QS12 QS16 QS25 QS34

QX02

4C084 AA13 AA17 NA14 ZB05 ZB09 ZB27

4C085 AA13 AA14 AA26 BB01 BB11 CC21 DD62 EE01

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB05 ZB09 ZB27

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法

第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。