

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4742272号  
(P4742272)

(45) 発行日 平成23年8月10日(2011.8.10)

(24) 登録日 平成23年5月20日(2011.5.20)

|                    |                  |             |     |
|--------------------|------------------|-------------|-----|
| (51) Int.Cl.       |                  | F 1         |     |
| <b>AO1K 67/027</b> | <b>(2006.01)</b> | AO1K 67/027 | ZNA |
| <b>C12N 5/10</b>   | <b>(2006.01)</b> | C12N 5/00   | IO2 |
| <b>C12Q 1/02</b>   | <b>(2006.01)</b> | C12Q 1/02   |     |
| <b>GO1N 33/15</b>  | <b>(2006.01)</b> | GO1N 33/15  | Z   |
| <b>GO1N 33/50</b>  | <b>(2006.01)</b> | GO1N 33/50  | Z   |

請求項の数 7 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-531868 (P2006-531868)  
 (86) (22) 出願日 平成17年8月19日(2005.8.19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2005/015126  
 (87) 国際公開番号 W02006/019153  
 (87) 国際公開日 平成18年2月23日(2006.2.23)  
 審査請求日 平成20年6月17日(2008.6.17)  
 (31) 優先権主張番号 特願2004-241347 (P2004-241347)  
 (32) 優先日 平成16年8月20日(2004.8.20)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 504202472  
 大学共同利用機関法人情報・システム研究  
 機構  
 東京都立川市緑町10番3号  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一  
 (72) 発明者 城石 俊彦  
 静岡県三島市東大場2-23-6  
 (72) 発明者 田村 勝  
 静岡県三島市南二日町20-43-101  
 審査官 中村 正展

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 GsdmA遺伝子の機能が抑制され、癌化関連遺伝子の機能が促進または抑制された非ヒト動物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(a)または(b)に記載のタンパク質をコードするDNAおよびTrp53遺伝子の機能が抑制されたトランスジェニックマウスであって、該DNAの機能の抑制は該DNAへの変異導入によって行なわれる、トランスジェニックマウス。

(a) 配列番号：5に記載の塩基配列からなるDNAよりコードされるタンパク質

(b) 配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

【請求項2】

癌のモデル動物である、請求項1に記載のトランスジェニックマウス。

【請求項3】

癌が皮膚癌である、請求項2に記載のトランスジェニックマウス。

【請求項4】

以下の(a)または(b)に記載のタンパク質をコードするDNAおよびTrp53遺伝子の機能が抑制されたトランスジェニックマウス細胞であって、該DNAの機能の抑制は該DNAへの変異導入によって行なわれる、トランスジェニックマウス細胞。

(a) 配列番号：5に記載の塩基配列からなるDNAよりコードされるタンパク質

(b) 配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

【請求項5】

請求項1に記載のトランスジェニックマウスから樹立された細胞。

【請求項6】

以下の ( a ) ~ ( c ) の工程を含む、請求項 1 に記載の トランスジェニックマウス の表現型を相補する化合物のスクリーニング方法。

- ( a ) 請求項 1 に記載の トランスジェニックマウス に被検化合物を投与する工程
- ( b ) 該 トランスジェニックマウス の表現型を測定する工程
- ( c ) 被検化合物を投与していない場合と比較して、表現型を相補する化合物を選択する工程

【請求項 7】

以下の ( a ) ~ ( c ) の工程を含む、請求項 4 または 5 に記載の動物細胞の表現型を相補する化合物のスクリーニング方法。

- ( a ) 請求項 4 または 5 に記載の動物細胞に被検化合物を接触させる工程
- ( b ) 該細胞の表現型を測定する工程
- ( c ) 被 検化合物 を接触させないときに比較して、表現型を相補する化合物を選択する工程

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、GsdmA 遺伝子の機能が抑制され、癌化関連遺伝子の機能が促進または抑制された非ヒト動物および動物細胞、並びに該非ヒト動物または該動物細胞の表現型を相補する化合物のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

20

【0002】

ミュータントマウスを用いた解析は、遺伝子機能、発生、癌を始めとしたヒト疾患などの理解に於いて非常に強力な解析方法である。近年本発明者らは、上皮細胞の増殖・分化、毛形成・再生などに焦点を当て、Rim3, Re<sup>de<sup>n</sup></sup>, Re などの突然変異マウスを用いて解析を行っている。Re は、1939年に Crew と Auerbach により見いだされた自然発症突然変異マウスで、カールした髭と体毛の表現型を示す(非特許文献 1 ~ 2)。Recombinant-induced mutation-3 (Rim3) と Re<sup>de<sup>n</sup></sup> は、それぞれ B10.BR(R228) と B10.129 のコンジェニック系統において 1983年、1968年に見いだされた自然発症突然変異マウスで、その表現型は、上皮の過増殖、過角化および脱毛である(非特許文献 1、3、4)。連鎖解析の結果より、Rim3 および Re<sup>de<sup>n</sup></sup> は、Re の allele であると考えられている(非特許文献 4)。これらの突然変異は、マウス第 11 番染色体に位置しており、ヒトでは 17 番染色体の 17q12 amplicon と呼ばれる癌に密接に関連する領域に相当している。

30

【0003】

染色体の不安定性は、ヒトの癌化において良く研究されている。例えば染色体の一部の欠損や増幅、及び転座は、癌細胞において顕著に観察される現象である。これらのゲノムの再構成は、DNA の二重鎖切断(DNA double strand break down)により引き起こされ、その結果、癌遺伝子の増幅や癌抑制遺伝子の欠損につながると考えられる(非特許文献 5)。

【0004】

ヒト 17 番染色体長腕、17q12 amplicon の増幅は、乳癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、及び子宮癌において良く観察される。原癌遺伝子である erbB2 は、この領域に位置しており、癌化に伴いゲノムあたりのコピー数が増幅されて、乳癌の約 20% 及び胃癌において過剰発現していることが報告されている(非特許文献 6、7)。本発明者らは、17q12 amplicon の構造的な解析を行った過程において、この領域の内 CAB1/MLN64, CAB2, ERBB2 及び GRB7 が位置する領域が癌化において一般に、もしくは主として増幅していることを見いだした。また、マウスにおいてヒトの 17q12 amplicon に相同な領域にガスダーミン(後にマウスガスダーミン A-1 (Gasdermin A-1) と名称変更)が存在していることを報告した(非特許文献 8)。

40

【0005】

尚、出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

【非特許文献 1】 Lyon M.F., Rostan S. and Brown S.D.M. Genetic Variants and Strai

50

ns of the Laboratory Mouse. 3rd edition (Oxford Univ. Press, Oxford, 1996)

【非特許文献2】Crew, F.A.E. and Auerbach, C. (1939) Rex: a dominant autosomal monogenic coat texture character in the mouse. *J. Genet.* 38, 341-344.

【非特許文献3】Snell, G.D., and Bunker, H. P. (1968) *Mouse News Lett.* 39. 28.

【非特許文献4】Sato, H., Koide, T., Masuya, H., Wakana, S., Sagai, T., Umezawa, A., Ishiguro, S., Tama, M., and Shiroishi, T. (1998) A new mutation Rim3 resembling Re(den) is mapped close to retinoic acid receptor alpha (Rara) gene on mouse chromosome 11. *Mamm Genome.*;9 (1), 20-25.

【非特許文献5】Coquelle, A., Pipiras, E., Toledo, F., Buttin, G., and Debatisse, M. (1997). Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell* 89, 215-225. 10

【非特許文献6】van de Vijver, M., van de Bersselaar, R., Devilee, P., Cornelisse, C., Peterse, J, and Nusse, R. (1987). Amplification of the neu (c-erbB-2) oncogene in human mammary tumors is relatively frequent and is often accompanied by amplification of the linked c-erbA oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2019-2023.

【非特許文献7】Yokota, J., Yamamoto, T., Miyajima, N., Toyoshima, K., Nomura, N., Sakamoto, H., Yoshida, T., Terada, M., and Sugimura, T. (1988). Genetic alterations of the c-erbB-2 oncogene occur frequently in tubular adenocarcinoma of the stomach and are often accompanied by amplification of the v-erbA homologue. *Oncogene* 2, 283-287. 20

【非特許文献8】Saeki, N., Kuwahara, Y., Sasaki, H., Satoh H., and Shiroishi, T. Gasdermin (Gsdm) localizing to mouse chromosome 11 is predominantly expressed in upper gastrointestinal tract but significantly suppressed in human gastric cancer cells. *Mammalian Genome.*, 11(9): 718-724, 2000.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明者らは、国立遺伝学研究所・哺乳動物遺伝研究室において見出されたRecombinant-induced mutation 3 (Rim3) の原因遺伝子が、マウス第11番染色体にクラスターとして存在するGasderminAクラスター（以下GsdmAクラスターと称す）内の1遺伝子であるGasderminA-3（以下GsdmA3と称す）であることを明らかとしていた（PCT/JP03/02345）。Rim3は、上皮細胞増殖異常、分化異常、過角化、並びに脱毛の表現型を示す優性の自然発症突然変異マウスである。この突然変異マウスの原因遺伝子がGsdmA3であることから考えると、GsdmA3の機能は、上皮における細胞増殖・分化、毛形成に深く関わっていることが推測される。一方、マウスGsdmAクラスターのヒト相同遺伝子は、ヒト第17番染色体に存在するヒトGasderminA（以下GSDMAと称す）遺伝子である。マウスGsdmAクラスターは、GsdmA1（GasderminA-1）、GsdmA2（GasderminA-2）、GsdmA3の3遺伝子から形成されているのに対して、ヒトではGSDMA遺伝子のみが第17番染色体に存在する。マウス第11番染色体のGsdmAクラスター存在領域とヒト第17番染色体GSDMA存在領域は、非常に良く保存されている。特にヒト第17番染色体のGSDMAが存在するこの領域は、17q12 ampliconと呼ばれ、皮膚癌、食道癌、胃癌、乳癌などでゲノムの増幅が観察されることが知られており、癌化に深く関係していることが考えられている。 40

【0007】

本発明者らは、胃癌、食道癌において、ヒトGSDMA遺伝子が癌抑制能を持つことを明らかにした。一方、マウスGsdmAクラスター遺伝子の癌抑制能については不明であった（PCT/JP03/02345）。

【0008】

Gli-2、Lef-1トランスジェニックマウスは、それぞれ、ケラチン14プロモーター支配下にGli-2遺伝子を発現するトランスジェニックマウス、ケラチン14プロモーター支配下でLef-1タンパク質のN末端領域を欠損させた遺伝子（Lef-1）を発現するトランスジェニ 50

ックマウスである。この2種類の皮膚癌発症モデル動物において非常に興味深い点は、その発癌部位である。Gli-2、Lef-1トランスジェニックマウスは、耳、手足、尾、目の縁などに皮膚癌を発症する(Grachtchouk et al., Nat Genet, 24, 216-217, 2000.; Niemann et al., Development, 129, 95-109, 2002.)。この位置は、どれも体毛の少ない領域である。このことから本発明者らは、これらトランスジェニック動物では体毛の存在する領域において、GsdmA3もしくはGsdmA1が癌の発生を抑えているのではないかと推測した。

【0009】

本発明は、以上の考察に基づきなされたものであり、その目的は、癌の表現型を示すGsdmA遺伝子の機能が抑制された非ヒト動物を作出し、該非ヒト動物とその利用法を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、GsdmA3に変異を有するRim3に、癌抑制遺伝子として知られているTrp53(p53)のノックアウトアレルを導入し、GsdmA-3<sup>Rim3</sup>/+;Trp53<sup>-</sup>/+個体(以下Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体と称す)の作製を行った。その結果、生後7ヶ月より自然発症で多発的に皮膚扁平上皮癌を引き起こし、生後12ヶ月では8割以上の個体において同様な扁平上皮癌の発症が観察された。更には、その癌細胞がリンパ節に転移することが見出され、本発明の完成に至った。

【0011】

すなわち本発明は、以下の〔1〕～〔16〕を提供するものである。

20

〔1〕GsdmA遺伝子の機能が抑制され、癌化関連遺伝子の機能が促進または抑制された非ヒト動物。

〔2〕癌化関連遺伝子が、Trp53遺伝子、Rb遺伝子、Ras遺伝子、Cyclin-D遺伝子、Cdk遺伝子、TNF- $\alpha$ 遺伝子、およびTGF- $\beta$ 遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子である、〔1〕に記載の非ヒト動物。

〔3〕癌のモデル動物である、〔1〕または〔2〕に記載の非ヒト動物。

〔4〕GsdmA1遺伝子、GsdmA2遺伝子およびGsdmA3遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子の機能が抑制され、癌化関連遺伝子の機能が促進または抑制されたマウス。

〔5〕癌化関連遺伝子が、Trp53遺伝子、Rb遺伝子、Ras遺伝子、Cyclin-D遺伝子、Cdk遺伝子、TNF- $\alpha$ 遺伝子、およびTGF- $\beta$ 遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子である、〔4〕に記載のマウス。

30

〔6〕GsdmA3遺伝子およびTrp53遺伝子の機能が抑制されたマウス。

〔7〕癌のモデル動物である、〔4〕～〔6〕のいずれかに記載のマウス。

〔8〕癌が皮膚癌である、〔7〕に記載のマウス。

〔9〕GsdmA遺伝子の機能が抑制され、癌化関連遺伝子の機能が促進または抑制された動物細胞。

〔10〕GsdmA1遺伝子、GsdmA2遺伝子およびGsdmA3遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子の機能が抑制され、癌化関連遺伝子の機能が促進または抑制されたマウス細胞。

40

〔11〕癌化関連遺伝子が、Trp53遺伝子、Rb遺伝子、Ras遺伝子、Cyclin-D遺伝子、Cdk遺伝子、TNF- $\alpha$ 遺伝子、およびTGF- $\beta$ 遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子である、〔9〕または〔10〕に記載の細胞。

〔12〕GsdmA3遺伝子およびTrp53遺伝子の機能が抑制されたマウス細胞。

〔13〕〔1〕もしくは〔2〕に記載の非ヒト動物、または〔4〕～〔6〕のいずれかに記載のマウスから樹立された細胞。

〔14〕以下の(a)～(c)の工程を含む、〔1〕もしくは〔2〕に記載の非ヒト動物、または〔4〕～〔6〕のいずれかに記載のマウスの表現型を相補する化合物のスクリーニング方法。

(a)〔1〕もしくは〔2〕に記載の非ヒト動物、または〔4〕～〔6〕のいずれかに記

50

載のマウスに投与する工程

(b) 該非ヒト動物の表現型を測定する工程

(c) 被検化合物を投与していない場合と比較して、表現型を相補する化合物を選択する工程

[15]以下の(a)~(c)の工程を含む、[9]~[13]のいずれかに記載の動物細胞の表現型を相補する化合物のスクリーニング方法。

(a) [9]~[13]のいずれかに記載の動物細胞に被検化合物を接触させる工程

(b) 該細胞の表現型を測定する工程

(c) 被験試料を接触させないときに比較して、表現型を相補する化合物を選択する工程

[16]以下の(a)~(e)のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体。

(a) 配列番号：1、3、5、7のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAよりコードされるタンパク質

(b) 配列番号：2、4、6、8のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

(c) 配列番号：2、4、6、8のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなる天然由来のタンパク質であって、配列番号：2、4、6、8のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質

(d) 配列番号：1、3、5、7のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズする天然由来のDNAよりコードされるタンパク質であって、配列番号：2、4、6、8のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質

(e) (a)~(d)のいずれかに記載のタンパク質の部分タンパク質

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】皮膚癌細胞株におけるGSDMA遺伝子の発現を示す写真である。正常皮膚組織、並びに皮膚癌組織におけるGSDMA遺伝子の発現をRT-PCR法により調べた結果、癌細胞株ではGSDMA遺伝子の発現が全てで消失していた。

【図2】Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロマウスの作出方法の模式図である。Rim3ヘテロ個体 ( $GsdmA3^{Rim3/+}$ ) とp53ノックアウトヘテロ個体 ( $Trp53^{-/+}$ ) を掛け合わせるにより、Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ、Rim3ヘテロ、p53ノックアウトヘテロ、正常マウス個体の作出を行った。

【図3】Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロマウス ( $GsdmA3^{Rim3/+}; Trp53^{-/+}$ ) における皮膚癌の発症を示すグラフである。Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロマウスにおいて、生後6ヶ月齢より皮膚癌を自然発症した。生後12ヶ月齢になるとRim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロマウスでは80%以上 (17/21) の個体において複数の皮膚癌が観察された。他の遺伝型のマウスにおいては、Rim3ヘテロ ( $GsdmA3^{Rim3/+}; Trp53^{+/+}$ ) のみにおいて皮膚癌が見られたが、その割合は10% (2/19) と低い値である。グラフの右のnは、実験に用いた各遺伝子型マウスの個体数を示す。

【図4】Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロマウスにおける皮膚癌を示す写真である。A：皮膚癌を発症したRim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロマウスの像。図中の白線はBにおける切片面を示す。B：皮膚癌切片の全体像。C：B中におけるC領域の拡大図（非癌部）。D：B中におけるD領域の拡大図（癌部）。Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロマウスの皮膚癌は典型的な扁平上皮癌像を示した。E：Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロマウスにおける皮膚癌細胞は、所属リンパ節へ転移し、リンパ節内で上皮構造、並びに過角化を引き起こした。

【図5】抗GsdmA/GSDMAポリクローナル抗体の特異性を示す写真である。ウェスタンブロット法により、抗GsdmA/GSDMAポリクローナル抗体の抗原特異性の検証を行った。その結果、正常皮膚サンプルにおいてGsdmA/GSDMAの予想される分子量50kダルトン付近に単一のバンドが検出され、抗GsdmA/GSDMAポリクローナル抗体の抗原特異性が示された。Aは分子量マーカー、Bは正常皮膚サンプルを示す。

10

20

30

40

50

【図6】Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロマウス皮膚癌におけるGsdmAタンパク質の消失を示す写真である。Aは非癌部、Cは癌部のヘマトキシリン/エオシン染色像。B、Dは、それぞれA、Cの隣接切片のGsdmA抗体による染色像である。非癌部のBにおいては、有棘細胞からGsdmA(1/3)タンパク質の局在が観察されるのに対して、典型的な扁平上皮癌細胞(図C、Dにおける\*領域)ではGsdmA(1/3)タンパク質が消失していた。

【図7】ヒト皮膚並びに皮膚癌におけるGSDMAタンパク質の発現を示す写真である。GSDMAタンパク質は、マウスGsdmAタンパク質と同様に正常皮膚(A)並びに正常毛胞(B)において発現している。また、ヒト扁平上皮癌細胞(C)、基底細胞癌細胞(D)においては、Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ皮膚癌細胞同様、GSDMAタンパク質の発現が消失していた。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明は、GsdmA遺伝子の機能が抑制され、癌化関連遺伝子(癌遺伝子とGsdmA遺伝子以外の癌抑制遺伝子)の機能が促進または抑制されている非ヒト動物、すなわち、GsdmA遺伝子の機能が抑制され、癌遺伝子の機能が促進されている非ヒト動物、またはGsdmA遺伝子の機能が抑制され、癌抑制遺伝子の機能が抑制されている非ヒト動物を提供する。

【0014】

本発明の非ヒト動物におけるGsdmA遺伝子としては、1)非ヒト動物がマウスであれば、GsdmA1遺伝子、GsdmA2遺伝子、GsdmA3遺伝子、およびこれらの変異体からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子、2)非ヒト動物がマウス以外の非ヒト動物であれば、GsdmA1遺伝子、GsdmA2遺伝子、GsdmA3遺伝子、またはGSDMA遺伝子のホモログが例示でき、マウスのように複数のGsdmA遺伝子が存在する場合は、その複数の遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子が例示できる。

20

【0015】

GsdmA1、GsdmA2、GsdmA3、またはGSDMAの生物学的機能としては、細胞の増殖異常または分化異常を抑制する機能、アポトーシス誘導能、上皮の過増殖、過角化および脱毛の抑制機能等が挙げられる。また、GsdmA1、GsdmA2、GsdmA3、またはGSDMAの生化学的機能としては、ガスダーミンファミリー間の結合、増殖分化制御タンパクによるGsdmAクラスターのリン酸化・糖鎖等の修飾、核へのタンパク輸送、細胞膜への局在、細胞外への分泌等が挙げられる。

30

【0016】

本発明の非ヒト動物においては、1または複数の癌化関連遺伝子の機能が促進または抑制されてもよい。

本発明の癌化関連遺伝子には、当業者に周知の癌化関連遺伝子が含まれ、例えば、癌遺伝子としては、Ras(Harvey rat sarcoma virus oncogene 1(Hras1):h-ras)(マウス:NM\_008284、ヒト:NM\_005343)、Cyclin-D(cyclin D1(Ccnd1))(マウス:NM\_007631、ヒト:BC000076)、Cdk(cyclin-dependent kinase 2:Cdk2)(マウス:BC005654、ヒト:BC003065)、癌抑制遺伝子としては、Trp53、Rb(retinoblastoma 1(Rb1):Retinoblastoma)(マウス:NM\_009029、ヒト:NM\_000321)、TNF-(tumor necrosis factor)(マウス:NM\_013693、ヒト:NM\_000594)、TGF-(transforming growth factor, beta 1)(マウス:BC013738、ヒト:NM\_000660)、が挙げられ、好ましくはTrp53が挙げられる。

40

【0017】

また、本発明の非ヒト動物における癌化関連遺伝子としては、1)非ヒト動物がマウスであれば、例えば、マウスTrp53遺伝子、マウスRb遺伝子、マウスRas遺伝子、マウスCyclin-D遺伝子、マウスCdk遺伝子、マウスTNF-遺伝子、マウスTGF-遺伝子、およびこれらの変異体からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子、2)非ヒト動物がマウス以外の非ヒト動物であれば、例えば、マウスTrp53遺伝子などの遺伝子(その他には、マウスRb遺伝子、マウスRas遺伝子、マウスCyclin-D遺伝子、マウスCdk遺伝子、マウスTNF-遺伝子、マウスTGF-遺伝子、ヒトTrp53遺伝子、ヒトRb遺伝子、ヒトRas遺伝子、ヒト

50

Cyclin-D遺伝子、ヒトCdk遺伝子、ヒトTNF- 遺伝子、ヒトTGF- 遺伝子) のホモログからなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子が例示できる。

【0018】

マウスTrp53、またはヒトTrp53の生物学的機能としては、DNAダメージ、テロメアの短縮、異常な増殖シグナル、活性酸素など、様々なストレスに反応して活性化する癌抑制能(DNA修復、細胞周期の停止やアポトーシスの誘導等)が挙げられる。また、マウスTrp53、またはヒトTrp53の生化学的機能としては、DNAとの結合、他の癌関連遺伝子との結合等が挙げられる。

【0019】

マウスRb、またはヒトRbの生物学的機能としては、細胞周期制御、アポトーシス制御、転写調節、また、生化学的機能としては、DNAとの結合、E2Fタンパク質との結合が挙げられる。

10

【0020】

マウスRas、またはヒトRasの生物学的機能としては、細胞周期制御、また、生化学的機能としては、GTPとの結合、GTPase活性が挙げられる。

【0021】

マウスCyclin-D、またはヒトCyclin-Dの生物学的機能としては、細胞周期制御、また、生化学的機能としては、Cdk4、Cdk6との結合、Rbタンパク質のリン酸化が挙げられる。

【0022】

マウスCdk、またはヒトCdkの生物学的機能としては、細胞周期制御、また、生化学的機能としては、Cyclin-Eとの結合、Rbタンパク質のリン酸化が挙げられる。

20

【0023】

マウスTNF- 、またはヒトTNF- の生物学的機能としては、細胞増殖制御、アポトーシス誘導、また、生化学的機能としては、TNFレセプターとの結合が挙げられる。

【0024】

マウスTGF- 、またはヒトTGF- の生物学的機能としては、細胞増殖制御、アポトーシス誘導、また、生化学的機能としては、TGF- レセプターとの結合が挙げられる。

【0025】

本発明における「非ヒト動物」とは、ヒトを含まない脊椎動物や無脊椎動物を意味する。本発明における非ヒト動物としては、非ヒト哺乳動物、鳥類、昆虫類等が挙げられるが、より好適には非ヒト哺乳動物であり、例えば、マウスやラットなどのげっ歯類、サル、ブタ、ウシなどが挙げられる。

30

【0026】

本発明の非ヒト動物は、癌のモデル動物として有用である。癌としては、皮膚癌、喉頭癌、舌癌、食道癌、胃癌、乳癌、大腸癌、卵巣癌、膀胱癌、子宮癌、膵臓癌、腎臓癌、肺癌、メラノーマ、白血病等が例示できるが、これらに限定されるものではない。

【0027】

例えば、皮膚で発現するGsdmA3遺伝子の機能が抑制されているマウスは、皮膚癌を発症する。具体的には、GsdmA3遺伝子およびTrp53遺伝子の機能が抑制されているマウスは、高頻度で多発的に皮膚癌を自然発症し、かつリンパ節への転移を起こす(実施例2)。また、GsdmA1遺伝子は、皮膚、食道、前胃(これらは全て扁平上皮)で発現する。よって、GsdmA1遺伝子およびTrp53遺伝子の機能が抑制されているマウスは、皮膚、食道、前胃において癌を発症すると考えられる。さらに、GsdmA2遺伝子は、胃の腺上皮で発現する。よって、GsdmA2遺伝子およびTrp53遺伝子の機能が抑制されているマウスは、胃癌を発症すると考えられる。また、GsdmA1、GsdmA2、GsdmA3のうち複数の遺伝子およびTrp53遺伝子の機能が抑制されているマウスは、上記種々の癌を発症すると考えられる。

40

【0028】

また、本発明はGsdmA遺伝子の機能が抑制され、癌化関連遺伝子の機能が促進または抑制されている動物細胞、すなわち、GsdmA遺伝子の機能が抑制され、癌遺伝子の機能が促進されている動物細胞、またはGsdmA遺伝子の機能が抑制され、癌抑制遺伝子の機能が抑

50

制されている動物細胞を提供する。このような細胞は、癌のモデル細胞として有用である。

【 0 0 2 9 】

本発明の動物細胞におけるGsdmAとしては、1)動物細胞がヒト細胞であれば、GSDMA遺伝子および該遺伝子の変異体からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子、2)動物細胞がマウス細胞であれば、GsdmA1遺伝子、GsdmA2遺伝子、GsdmA3遺伝子、およびこれらの変異体からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子、3)動物細胞がヒトまたはマウス以外の細胞であれば、GsdmA1遺伝子、GsdmA2遺伝子、GsdmA3遺伝子、またはGSDMA遺伝子のホモログが例示でき、マウスのように複数のGsdmA遺伝子が存在する場合は、その複数の遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子が例示できる。

10

【 0 0 3 0 】

本発明の動物細胞においては、1または複数の癌化関連遺伝子の機能が促進または抑制されてもよい。

本発明の動物細胞における癌化関連遺伝子としては、1)動物細胞がヒト細胞であれば、ヒトTrp53遺伝子、ヒトRb遺伝子、ヒトRas遺伝子、ヒトCyclin-D遺伝子、ヒトCdk遺伝子、ヒトTNF- 遺伝子、ヒトTGF- 遺伝子、およびこれらの変異体からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子、2)動物細胞がマウス細胞であれば、例えば、マウスTrp53遺伝子、マウスRb遺伝子、マウスRas遺伝子、マウスCyclin-D遺伝子、マウスCdk遺伝子、マウスTNF- 遺伝子、マウスTGF- 遺伝子、およびこれらの変異体からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子、3)動物細胞がヒトまたはマウス以外の細胞であれば、例

20

【 0 0 3 1 】

また、本発明は非ヒト動物または動物細胞のGsdmA遺伝子の機能を抑制し、かつ癌遺伝子の機能を促進する方法、またはGsdmA遺伝子の機能を抑制し、かつ癌抑制遺伝子の機能を抑制する方法を提供する。癌は、多数の癌化関連遺伝子に変異が蓄積することにより発症すると考えられている。したがってGsdmA遺伝子の機能を抑制及び癌化関連遺伝子の機能を促進または抑制することにより、非ヒト動物または動物細胞を癌化できる。

30

【 0 0 3 2 】

本発明において、GsdmA1、GsdmA2、GsdmA3、GSDMA、マウスTrp53およびヒトTrp53をコードするDNAの塩基配列を、それぞれ配列番号：1、3、5、7、9および11に、該DNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号：2、4、6、8、10および12に示す。

【 0 0 3 3 】

また、GsdmA1、GsdmA2、GsdmA3、GSDMA、マウスTrp53、ヒトTrp53の変異体、バリエーション、ホモログを、以下の(a)または(b)に示す。

(a)配列番号：2、4、6、8、10、12のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質であって、配列番号：2、4、6、8、10、12のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質

40

(b)配列番号：1、3、5、7、9、11のいずれかに記載の塩基配列を含むDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAよりコードされるタンパク質であって、配列番号：2、4、6、8、10、12のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質

【 0 0 3 4 】

ここで「機能的に同等」とは、対象となるタンパク質が、GsdmA1、GsdmA2、GsdmA3、GSDMA、マウスTrp53、またはヒトTrp53と同等の生物学的機能(生物学的役割、生物学的性

50



質)、生化学的機能(生化学的活性)を有することを指す。

【0035】

本明細書においては、マウスRb遺伝子、マウスRas遺伝子、マウスCyclin-D遺伝子、マウスCdk遺伝子、マウスTNF- 遺伝子、マウスTGF- 遺伝子、ヒトRb遺伝子、ヒトRas遺伝子、ヒトCyclin-D遺伝子、ヒトCdk遺伝子、ヒトTNF- 遺伝子、ヒトTGF- 遺伝子の変異体、バリエーション、ホモログも上記と同様に定義づけられる。

【0036】

あるタンパク質と機能的に同等な天然由来のタンパク質をコードするDNAを調製する当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術(Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989)を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者においては、GsdmA1、GsdmA2、GsdmA3、GSDMA、マウスTrp53、マウスRb、マウスRas、マウスCyclin-D、マウスCdk、マウスTNF-、マウスTGF-、ヒトTrp53、ヒトRb、ヒトRas、ヒトCyclin-D、ヒトCdk、ヒトTNF-、ヒトTGF- をコードするDNA配列(以下GsdmA1等と称す)もしくはその一部を利用して、これと相溶性の高いDNAを単離することは、周知の技術である。

【0037】

本発明には、GsdmA1等をコードするDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、GsdmA1等と機能的に同等な天然由来のタンパク質をコードするDNAが含まれる。

【0038】

GsdmA1等と機能的に同等な天然由来のタンパク質をコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件は、当業者であれば適宜選択することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば42℃、5xSSC、0.1% SDSの条件であり、好ましくは50℃、5xSSC、0.1% SDSの条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば65℃、0.1xSSC及び0.1% SDSの条件である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相溶性を有するDNAが効率的に得られると期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【0039】

また、GsdmA1等をコードするDNAの配列情報を基に合成したプライマーを用いる遺伝子増幅法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を利用して、GsdmA1等と機能的に同等な天然由来のタンパク質をコードするDNAを単離することも可能である。

【0040】

これらハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術により単離されるDNAがコードする、GsdmA1等と機能的に同等な天然由来のタンパク質は、通常、GsdmA1等とアミノ酸配列において高い相溶性を有する。本発明のタンパク質には、GsdmA1等と機能的に同等であり、かつ該タンパク質のアミノ酸配列と高い相溶性を有する天然由来のタンパク質も含まれる。高い相溶性とは、アミノ酸レベルにおいて、通常、少なくとも50%以上の同一性、好ましくは75%以上の同一性、さらに好ましくは85%以上の同一性、さらに好ましくは95%以上の同一性を指し、塩基レベルにおいて、通常、少なくとも50%以上の同一性、好ましくは75%以上の同一性、さらに好ましくは85%以上の同一性、さらに好ましくは95%以上の同一性を指す。

【0041】

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえばscore = 100、wordlength = 12とする。

また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメータはたとえばscore = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメータを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

【 0 0 4 2 】

また、GsdmA1等のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列からなり、該タンパク質と機能的に同等な天然由来のタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。このようなアミノ酸の変異は自然界においても生じうる。変異するアミノ酸数は、通常、30アミノ酸以内であり、好ましくは15アミノ酸以内であり、より好ましくは5アミノ酸以内（例えば、3アミノ酸以内）であり、さらに好ましくは2アミノ酸以内である。

10

【 0 0 4 3 】

変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、V）、親水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T）、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（G、A、V、L、I、P）、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸（S、T、Y）、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸（C、M）、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸（D、N、E、Q）、塩基含有側鎖を有するアミノ酸（R、K、H）、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸（H、F、Y、W）を挙げることができる（括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す）。

20

【 0 0 4 4 】

あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び/又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている（Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413）。

【 0 0 4 5 】

本発明におけるGsdmA遺伝子および癌抑制遺伝子の機能抑制には、完全な抑制および部分的な抑制の双方が含まれる。また、遺伝子の機能抑制には、遺伝子対の一方または双方の機能の抑制も含まれる。

30

【 0 0 4 6 】

遺伝子の機能の抑制は、遺伝子の発現抑制、および遺伝子への変異導入によって行うことができる。該変異は、その種類、その数、その部位などに制限はない。上記変異の種類としては、例えば、付加、欠失（完全欠失または部分欠失のいずれであってもよい）、置換または挿入変異などが挙げられる。また、変異は、自然界において生じた変異または人為的に導入した変異（例えば、変異原処理によって生じた変異、遺伝子改変技術によって導入した変異）のいずれであってもよい。

【 0 0 4 7 】

本発明の非ヒト動物の好ましい態様としては、GsdmA遺伝子およびTrp53遺伝子の遺伝子対の一方に変異を有する非ヒト動物（以下変異型GsdmAヘテロ・変異型Trp53ヘテロ非ヒト動物と称す）、GsdmA遺伝子の遺伝子対の一方に変異を有し、かつTrp53遺伝子の遺伝子対の双方に変異を有する非ヒト動物（以下変異型GsdmAヘテロ・変異型Trp53ホモ非ヒト動物と称す）、GsdmA遺伝子の遺伝子対の双方に変異を有し、かつTrp53遺伝子の遺伝子対の一方に変異を有する非ヒト動物（以下変異型GsdmAホモ・変異型Trp53ヘテロ非ヒト動物と称す）、GsdmA遺伝子およびTrp53遺伝子の遺伝子対の双方に変異を有する非ヒト動物（以下変異型GsdmAホモ・変異型Trp53ホモ非ヒト動物と称す）が挙げられる。

40

【 0 0 4 8 】

また、変異型GsdmAヘテロ・変異型Trp53ヘテロ非ヒト動物、変異型GsdmAヘテロ・変異型Trp53ホモ非ヒト動物、変異型GsdmAホモ・変異型Trp53ヘテロ非ヒト動物、変異型GsdmA

50

ホモ・変異型Trp53ホモ非ヒト動物としては、例えば、それぞれ、Rim3ヘテロ・Trp53ノックアウトヘテロマウス、Rim3ヘテロ・Trp53ノックアウトホモマウス ( $GsdmA-3^{Rim3}/+; Trp53^{-}/-$ )、Rim3ホモ・Trp53ノックアウトヘテロマウス ( $GsdmA-3^{Rim3}/Rim3; Trp53^{-}/+$ )、Rim3ホモ・Trp53ノックアウトホモマウス ( $GsdmA-3^{Rim3}/Rim3; Trp53^{-}/-$ ) が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0049】

変異型GsdmAヘテロ・変異型Trp53ヘテロ非ヒト動物、変異型GsdmAヘテロ・変異型Trp53ホモ非ヒト動物、変異型GsdmAホモ・変異型Trp53ヘテロ非ヒト動物、変異型GsdmAホモ・変異型Trp53ホモ非ヒト動物は、以下の(i)~(iv)の交配、および、この交配によって得られた個体同士を交配することにより得ることができる。

(i) 変異型GsdmAヘテロ非ヒト動物と変異型Trp53ヘテロ非ヒト動物

(ii) 変異型GsdmAヘテロ非ヒト動物と変異型Trp53ホモ非ヒト動物

(iii) 変異型GsdmAホモ非ヒト動物と変異型Trp53ヘテロ非ヒト動物

(iv) 変異型GsdmAホモ非ヒト動物と変異型Trp53ホモ非ヒト動物

また、本発明においては、自然界において生じた変異を有する非ヒト動物と人為的に導入した変異を有する非ヒト動物の交配、自然界において生じた変異を有する非ヒト動物同士の交配、人為的に導入した変異を有する非ヒト動物同士の交配を適宜選択しうる。

【0050】

特定の遺伝子の機能抑制は、当業者に公知の方法によって行うことができる。例えば、遺伝子改変技術(標的遺伝子部位の組み換えを促進する酵素、例えば、Cre-loxにおけるCre、の導入による条件的遺伝子改変技術も含む)を用いた方法、アンチセンスDNAを用いた方法、リボザイムをコードするDNAを用いた方法、または、RNAi技術を用いた方法等が挙げられる。

【0051】

遺伝子の機能が抑制された非ヒト動物の作製は、例えば次のようにして行うことができる。まず、標的遺伝子を含むゲノムDNA断片をクローニングして、これを基に、内在性の標的遺伝子改変のための相同組み換え用ベクターを構築する。該相同組み換え用ベクターには、標的遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも1部を欠失/変異させた核酸配列、標的遺伝子またはその発現制御領域にヌクレオチドやポリヌクレオチドが挿入された核酸配列、標的遺伝子またはその発現制御領域に他の遺伝子が挿入された核酸配列を含むが、標的遺伝子の活性が失われる核酸配列であれば、前記の欠失/変異部位および挿入部位は限定されない。

【0052】

挿入される遺伝子としては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリア毒素遺伝子等が挙げられる。また、これらの組み合わせも考えられる。該相同組み換え用ベクターの基本骨格は、特に、制限はなく、例えばpK0 Scrambler Series(レキシコン)等を用いることができる。

【0053】

構築した相同組み換え用ベクターを、個体へ分化させることが可能な非ヒト動物細胞(例えば、胚性幹細胞(ES細胞))に導入し、内因性の標的遺伝子との相同組み換えを行うことで、遺伝子改変非ヒト動物細胞を作製する。遺伝子対の片側の発現が抑制されている該細胞を作製するには、例えば、ネオマイシンで細胞を選択する方法で得ることが可能である。相同組み換え用ベクターの細胞への導入は、当業者に公知の方法によって行うことができる。具体的には、エレクトロポレーション法等を例示することができる。

【0054】

本発明において個体へ分化させることが可能な動物細胞としてES細胞を用いた場合は、例えば、該細胞を胚盤胞に注入することによりキメラ胚を作製し、偽妊娠させた動物の子宮に移植して産仔を得る。遺伝子改変ES細胞由来の組織を有するキメラ動物を選別できるようにするために、より好適には、作製された個体の外部的特徴(例えば、毛色)が、遺伝子改変ES細胞由来の組織と胚盤胞由来の組織とで異なるように、胚盤胞を選択する。

10

20

30

40

50

## 【0055】

また、遺伝子改変ES細胞由来の生殖組織を有するキメラ動物であるか否かの判定は、一般的には、該キメラ非ヒト動物と適当な系統の同種非ヒト動物との交配により得られた仔の毛色で行うが、その他の方法として、例えば、該キメラ非ヒト動物の尻尾もしくは耳から抽出したDNAを鋳型としたPCR反応を行い、挿入された遺伝子の有無を検出する方法やザンハイブリダイゼーション法を用いることも可能である。

## 【0056】

該キメラ動物と適当な系統の同種動物との交配により得られた仔が、ヘテロ接合型遺伝子改変非ヒト動物であるか否かは、例えば、該遺伝子改変動物から抽出したDNAを鋳型とするPCRやザンハイブリダイゼーションで判定することができる。また、ヘテロ接合型遺伝子改変非ヒト動物同士の交配により、ホモ接合型遺伝子改変非ヒト動物を作製することができる。交配により得られた仔が、所望の遺伝子型を有する非ヒト動物であるか否かも上記の判定法に従う。

## 【0057】

また、本発明の遺伝子改変非ヒト動物の作製は、上記の方法に制限されない。例えば、体細胞クローン動物の作製技術に従って動物を作製することもできる。具体的には、ES細胞以外の体細胞（例えば、皮膚細胞等）を用いて、ES細胞の場合と同様な方法に従って動物細胞を作製することができる。さらに、該非ヒト動物細胞から、体細胞クローン作製技術を応用し、非ヒト動物を作製することができる。

## 【0058】

遺伝子の機能が抑制された非ヒト動物の作製は、本発明の遺伝子の転写産物と相補的なRNAをコードするDNAを用いることでも行うことができる。このようなDNAとしては、アンチセンスDNAが挙げられる。

## 【0059】

アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼによって局部的に開状ループ構造がつけられた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつあるRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する。

## 【0060】

本発明で用いられるアンチセンス配列は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むDNAも、本発明で利用されるアンチセンスDNAに含まれる。使用されるアンチセンスDNAは、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製されたDNAは、公知の方法で、所望の細胞へ形質転換できる。アンチセンスDNAの配列は、形質転換する細胞が持つ内在性遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害

するには、アンチセンスDNAの長さは、少なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常、用いられるアンチセンスDNAの長さは5kbよりも短く、好ましくは2.5kbよりも短い。

#### 【0061】

本発明の遺伝子の転写産物と相補的なRNAの他の一つの態様は、本発明の遺伝子の転写産物と相補的なdsRNAである。RNAiは、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二重鎖RNA（以下dsRNA）を細胞内に導入すると、導入した外来遺伝子および標的内在性遺伝子の発現がいずれも抑制される現象である。細胞に約40～数百塩基対のdsRNAが導入されると、ヘリカーゼドメインを持つダイサー（Dicer）と呼ばれるRNaseIII様のヌクレアーゼがATP存在下で、dsRNAを3'末端から約21～23塩基対ずつ切り出し、siRNA（short interference RNA）を生じる。このsiRNAに特異的なタンパク質が結合して、ヌクレアーゼ複合体（RISC：RNA-induced silencing complex）が形成される。この複合体はsiRNAと同じ配列を認識して結合し、RNaseIII様の酵素活性によってsiRNAの中央部で標的遺伝子のmRNAを切断する。また、この経路とは別にsiRNAのアンチセンス鎖がmRNAに結合してRNA依存性RNAポリメラーゼ（RsRP）のプライマーとして作用し、dsRNAが合成される。このdsRNAが再びダイサーの基質となって、新たなsiRNAを生じて作用を増幅する経路も考えられている。

10

#### 【0062】

本発明のRNAは、標的遺伝子mRNAのいずれかの領域に対するアンチセンスRNAをコードしたアンチセンスコードDNAと、標的遺伝子mRNAのいずれかの領域のセンスRNAをコードしたセンスコードDNAより発現させることができる。また、これらのアンチセンスRNAおよびセンスRNAよりdsRNAを作成することもできる。

20

#### 【0063】

本発明のdsRNAの発現システムを、ベクター等に保持させる場合の構成としては、同一のベクターからアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる場合と、異なるベクターからそれぞれアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる場合がある。例えば、同一のベクターからアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる構成としては、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAの上流にそれぞれpolIII系のような短いRNAを発現し得るプロモーターを連結させたアンチセンスRNA発現カセット、センスRNA発現カセットをそれぞれ構築し、これらカセットを同方向にあるいは逆方向にベクターに挿入することにより構成することができる。また、異なる鎖上に対向するようにアンチセンスコードDNAとセンスコードDNAと逆向きに配置した発現システムを構成することもできる。この構成では、アンチセンスRNAコード鎖とセンスRNAコード鎖とが対となった一つの二本鎖DNA（siRNAコードDNA）が備えられ、その両側にそれぞれの鎖からアンチセンスRNA、センスRNAとを発現し得るようにプロモーターを対向して備えられる。この場合には、センスRNA、アンチセンスRNAの下流に余分な配列が付加されることを避けるために、それぞれの鎖（アンチセンスRNAコード鎖、センスRNAコード鎖）の3'末端にターミネーターをそれぞれ備えることが好ましい。このターミネーターは、A（アデニン）塩基を4つ以上連続させた配列などを用いることができる。また、このパンドロームスタイルの発現システムでは、二つのプロモーターの種類を異ならせることが好ましい。

30

40

#### 【0064】

また、異なるベクターからアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる構成としては、例えば、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAの上流にそれぞれ polIII系のような短いRNAを発現し得るプロモーターを連結させたアンチセンスRNA発現カセット、センスRNA発現カセットをそれぞれ構築し、これらカセットを異なるベクターに保持させることにより構成することができる。

#### 【0065】

本発明のRNAiにおいては、dsRNAとしてsiRNAが使用されたものであってもよい。「siRNA」は、細胞内で毒性を示さない範囲の短鎖からなる二重鎖RNAを意味し、例えば、15～49塩基対と、好適には15～35塩基対と、さらに好適には21～30塩基対とすることができる。

50

あるいは、発現されるsiRNAが転写され最終的な二重鎖RNA部分の長さが、例えば、15~49塩基対、好適には15~35塩基対、さらに好適には21~30塩基対とすることができる。

RNAiに用いるDNAは、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列の相同性を有する。

【0066】

dsRNAにおけるRNA同士が対合した二重鎖RNAの部分は、完全に対合しているものに限らず、ミスマッチ（対応する塩基が相補的でない）、バルジ（一方の鎖に対応する塩基がない）などにより不对合部分が含まれていてもよい。本発明においては、dsRNAにおけるRNA同士が対合する二重鎖RNA領域中に、バルジおよびミスマッチの両方が含まれていてもよい。

10

【0067】

本発明の遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードするDNAを利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子のことをいう。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNAの部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型や、RNasePに含まれるM1RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある。

【0068】

20

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15のC15の3'側を切断するが、活性にはU14が9位のAと塩基対を形成することが重要とされ、15位の塩基はCの他にAまたはUでも切断されることが示されている。リボザイムの基質結合部を標的部位近傍のRNA配列と相補的になるように設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することが可能である。例えば、阻害標的となる本発明の酵素のコード領域中には標的となりうる部位が複数存在する。

【0069】

また、ヘアピン型リボザイムも、本発明の目的のために有用である。ヘアピン型リボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される(J.M.Buzayan Nature 323:349,1986)。このリボザイムも、標的特異的なRNA切断を起こすように設計できることが示されている。

30

【0070】

標的を切断できるよう設計されたりボザイムは、植物細胞中で転写されるようにカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターなどのプロモーターおよび転写終結配列に連結される。しかし、その際、転写されたRNAの5'末端や3'末端に余分な配列が付加されていると、リボザイムの活性が失われてしまうことがある。このようなとき、転写されたりボザイムを含むRNAからリボザイム部分だけを正確に切り出すために、リボザイム部分の5'側や3'側に、トリミングを行うためのシスに働く別のトリミングリボザイムを配置させることも可能である(K.Taira et al. (1990) Protein Eng. 3:733、A.M.Dzianottand J.J.Bujarski (1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 86:4823、C.A.Grosshansand R.T.Cech (1991) Nucleic Acids Res. 19:3875、K.Taira et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:5125)。また、このような構成単位をタンデムに並べ、標的遺伝子内の複数の部位を切断できるようにして、より効果を高めることもできる(N.Yuyama et al. Biochem.Biophys.Res.Comm. 186:1271,1992)。このようなリボザイムを用いて本発明で標的となる遺伝子の転写産物を特異的に切断し、該遺伝子の発現を抑制することができる。

40

【0071】

本発明においては、トランスジェニック技術を用いて、遺伝子発現を抑制する上記DNAを所望の非ヒト動物に導入することで、GsdmA遺伝子および癌抑制遺伝子の機能が抑制されている非ヒト動物を作製することもできる。

【0072】

50

トランスジェニック動物の作製方法は公知である。例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 77:7380-7384(1980)に記載の方法により、トランスジェニック動物を得ることができる。具体的には、遺伝子発現を抑制する上記DNAを動物の全能細胞に導入し、この細胞を個体へと発生させる。得られた個体のうち、体細胞および生殖細胞中に導入遺伝子が組み込まれた個体を選別することによって、目的とするトランスジェニック動物を作製することができる。遺伝子を導入する全能細胞としては、受精卵や初期胚のほか、多分化能を有するES細胞のような培養細胞などが挙げられる。当業者においては、上記の方法を適宜改変して、所望の遺伝子の発現が改変されたトランスジェニック動物を作製することが可能である。

【0073】

遺伝子発現を抑制するDNAは、該DNAを導入すべき動物の細胞において発現可能なプロモーターに連結した組み換え遺伝子コンストラクト（発現ベクター）とするのが一般的である。本発明の組み換え遺伝子コンストラクトは、適当な宿主を利用してクローニング可能なベクターに、前記上記の遺伝子発現を抑制するDNAと、その上流にプロモーターとを挿入し、クローニングすることによって構築することができる。

【0074】

本発明に利用することができるプロモーターとしては、動物細胞で発現可能なプロモーターであれば特に制限されず、例えば、哺乳動物細胞由来のプロモーターや、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40（SV40）等のウィルスプロモーターを挙げることができる。例えば、SV40のプロモーターを使用する場合は、Mulliganらの方法（Nature（1990）277, 108）に従って、上記コンストラクトを作製することができる。

【0075】

また、本発明に使用可能なベクターとしては、導入遺伝子を動物の生体内で広範囲に発現誘導でき得るものであればよく、当業者において周知の発現ベクターを利用することができる。

【0076】

適当な制限酵素によって前記ベクターから切り出した組み換え遺伝子コンストラクトは、十分に精製されトランスジェニック動物の作製に用いられる。通常、トランスジェニック動物は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに、前記コンストラクトを導入することによって作製される。コンストラクトを導入する細胞としては、通常、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階、より具体的には単細胞あるいは受精卵細胞の段階で、通常8細胞期以前のもものが利用される。上記コンストラクトの導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法等が公知である。さらに、こうして得られた形質転換細胞を上述の胚芽細胞と融合させることによりトランスジェニック動物を作製することも可能である。

【0077】

マウスの場合、例えば、排卵誘発剤を投与したメスのマウスに正常なオスのマウスを交配させることにより、コンストラクトの導入が可能な受精卵を回収することができる。マウス受精卵では、一般に雄性前核へのマイクロインジェクションによりコンストラクトが導入される。コンストラクトを導入した細胞は、体外での培養の後、導入に成功したと思われる細胞が代理母の卵管に移植され、トランスジェニックキメラ動物が誕生する。代理母には、通常、精管を切断したオスと交配させて偽妊娠状態としたメスが利用される。

【0078】

生まれたトランスジェニックキメラ動物は、上記の遺伝子発現を抑制するDNAが組み込まれていることを確認した上で、F1動物の誕生のために正常な動物と交配させる。一般にコンストラクトとして導入した外来DNAは、ゲノムの同一の部分に複数コピーが直列に組み込まれる。通常はこの組み込みコピー数が多いほど、多量の遺伝子発現につながり、より明瞭な表現型が期待できる。体細胞ゲノムにおいて、上記の遺伝子発現を抑制するDNA

10

20

30

40

50

が組み込まれていることは、コンストラクトに特異的なプライマーを用いたPCRや特異的なプローブを用いたサザンブロット法によって確認することができる。

【0079】

この交配の結果誕生するF1動物の中で、体細胞に外来遺伝子（上記の遺伝子発現を抑制するDNA）を有するもの（ヘテロサイゴート）は、生殖細胞に外来遺伝子を伝えることができるトランスジェニック動物である。F1動物の中から体細胞に外来遺伝子を保持するものを選び、これらを両親とすることによって、F2動物であるホモサイゴートを得ることができる。

【0080】

また、本発明においては、トランスジェニック技術を用いて、癌遺伝子をコードするDNAを所望の非ヒト動物に導入することで、癌遺伝子の機能が促進されている非ヒト動物を作製することもできる。作製された非ヒト動物とGsdmA遺伝子の機能が抑制されている非ヒト動物を交配することで、GsdmA遺伝子の機能が抑制され、癌遺伝子の機能が促進された非ヒト動物を作製することができる。

【0081】

また、本発明においては、トランスジェニック技術を用いて、癌遺伝子をコードするDNAを、GsdmA遺伝子の機能が抑制されている非ヒト動物に導入することで、GsdmA遺伝子の機能が抑制され、癌遺伝子の機能が促進された非ヒト動物を作製することもできる。

【0082】

また、本発明はGsdmA遺伝子の機能が抑制され、癌化関連遺伝子の機能が促進または抑制されている動物細胞（GsdmA遺伝子の機能が抑制され、癌遺伝子の機能が促進されている動物細胞、またはGsdmA遺伝子の機能が抑制され、癌抑制遺伝子の機能が抑制されている動物細胞）に関する。本発明の動物細胞が由来する生物種は、特に制限はなく、ヒトを含む種々の生物種由来の細胞である。また、本発明の動物細胞としては、例えば、体細胞、受精卵、ES細胞、本発明の非ヒト動物から樹立された細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。上記非ヒト動物由来の細胞株を樹立する方法としては、公知の方法を利用することができる。例えば、げっ歯類においては、胎仔細胞の初代培養の方法を用いることが可能である（新生化学実験講座、18巻、125頁～129頁東京化学同人、およびマウス胚の操作マニュアル、262頁～264頁、近代出版）。

【0083】

本発明は、本発明の非ヒト動物の表現型を相補する化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明の方法における「被験試料」としては、特に制限はなく、例えば、天然化合物、有機化合物、無機化合物、タンパク質、ペプチド、抗体等の単一化合物、並びに、化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリー、抗体ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、原核細胞抽出物、真核単細胞抽出物もしくは動物細胞抽出物等を挙げることができる。上記被験試料は必要に応じて適宜標識して用いることができる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識等を挙げることができる。

【0084】

また、本発明におけるスクリーニング方法の第一の態様は、本発明の非ヒト動物の表現型を相補する化合物のスクリーニングに関するものである。第一の態様としては、まず、被検化合物を本発明の非ヒト動物に投与する。本発明の非ヒト動物への被検化合物の投与は、例えば、経口的または非経口的に行うことができるが、それらに限定されない。被検化合物がタンパク質である場合には、例えば、該タンパク質をコードする遺伝子を有するウイルスベクターを構築し、その感染力を利用して、本発明の非ヒト動物に該遺伝子を導入することも可能である。第一の態様としては、次いで、被検化合物が非ヒト動物の表現型を相補しているか否かを判定する。次いで、被検化合物を投与していない場合と比較して、非ヒト動物の表現型を相補する化合物を選択する。

【0085】



非ヒト動物の表現型としては、癌（例えば、皮膚癌、喉頭癌、舌癌、食道癌、胃癌、乳癌、大腸癌、卵巣癌、膀胱癌、子宮癌、膵臓癌、腎臓癌、肺癌、メラノーマ、白血病等）の発症、進行、転移等、特に皮膚癌の発症、進行、転移等が例示できる。また、非ヒト動物の表現型の相補としては、癌の発症、進行、転移等の抑制が挙げられる。

【0086】

本発明におけるスクリーニング方法の第二の態様は、本発明の動物細胞の表現型を相補する化合物のスクリーニングに関する。第二の態様としては、まず、被検化合物を本発明の動物細胞に接触させる。

【0087】

本発明において「接触」は、例えば、細胞の培養液に被験試料を添加することにより行うことができる。被験試料がタンパク質の場合には、例えば、該タンパク質をコードするDNAを含むベクターを、該細胞へ導入することも可能である。

【0088】

次いで、被検化合物が動物細胞の表現型を相補しているか否かを判定する。次いで、被検化合物を投与していない場合と比較して、動物細胞の表現型を相補する化合物を選択する。

本発明の細胞の表現型としては、増殖異常、分化異常、接着異常、移動能の亢進等が例示できる。また、細胞の表現型の相補としては、増殖異常、分化異常、接着異常、移動能の亢進等の抑制が挙げられる。

【0089】

また、本発明は、GsdmA1、GsdmA2、GsdmA3、GSDMA、もしくは、これらタンパク質の変異体、パリアント、ホモログ（以下GsdmA1、GsdmA2、GsdmA3、またはGSDMA等と称す）、または、これらの断片に結合する抗体を提供する。本発明の抗体は、癌の検査や、癌の研究等において、上記タンパク質の検出に利用することができる。該抗体の種類には、特に制限はないが、例えばモノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体の両方を利用することができる。該抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、次のようにして取得することができる。GsdmA1、GsdmA2、GsdmA3またはGSDMA等、これらとGSTとの融合タンパク質として大腸菌等の微生物において発現させたりコンビナントタンパク質、またはその部分断片をウサギ等の小動物に免疫し血清を得る。これを、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、GsdmA1、GsdmA2、GsdmA3またはGSDMA等や合成ペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することにより調製する。また、モノクローナル抗体であれば、例えば、GsdmA1、GsdmA2、GsdmA3またはGSDMA等またはその部分断片をマウス等の小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、該細胞とマウスミエローマ細胞とをポリエチレングリコール等の試薬を用いて融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、GsdmA1、GsdmA2、GsdmA3またはGSDMA等に結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、GsdmA1、GsdmA2、GsdmA3またはGSDMA等や合成ペプチドをカップ

【0090】

上記タンパク質の断片は、実施例に記載の断片、また、例えば、GsdmA1、GsdmA2、GsdmA3またはGSDMA等のC末端領域であり、このような領域としては、GsdmA3のアミノ酸第343番目から第451番目、GsdmA1のアミノ酸第334番目から第442番目、GsdmA2のアミノ酸第352番目から第460番目、GSDMAのアミノ酸第333番目から第441番目が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【実施例】

## 【 0 0 9 1 】

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

## 材料と方法

## 1 . 実験動物 ( マウス )

C57BL/6J、C57BL/10Jは、Jackson Laboratoryより購入した。突然変異マウス・Rim3は、国立遺伝学研究所において独自に系統化され、p53 (Trp53)ノックアウトマウスは、相沢慎一博士 (現・理化学研究所・発生再生科学総合研究センター)より提供された。これらのマウス系統は、国立遺伝学研究所・系統生物研究センターにおいて飼育管理され、実験には系統生物研究センターにおいて繁殖させた動物を用いた。なお動物実験は、国立遺伝学研究所・動物実験委員会の承認を得ると共にそのガイドラインに則って行った。

10

## 【 0 0 9 2 】

## 2 . Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロマウス

Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体 ( $Gsdm3^{Rim3/+}; Trp53^{-/+}$ )の作出には、Rim3ヘテロ個体 ( $Gsdm3^{Rim3/+}$ )とp53ノックアウトヘテロ個体 ( $Trp53^{-/+}$ )を自然交配することにより得た。この親系統の組み合わせにより得られる子供の遺伝型は、Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体以外にRim3ヘテロ個体 ( $Gsdm3^{Rim3/+}; Trp53^{+/+}$ )、p53ノックアウトヘテロ個体 ( $Gsdm3^{+/+}; Trp53^{-/+}$ )、正常個体 ( $Gsdm3^{+/+}; Trp53^{+/+}$ )である。これら全ての産子は、同一条件下 (明暗条件、温度、湿度、飼料、飲料水、床敷き等)で飼育し、皮膚癌発症の割合を経時的に観察した。

20

## 【 0 0 9 3 】

## 3 . 細胞系及び細胞培養

4種の皮膚癌細胞株：HSC1 (皮膚扁平上皮癌)、HSC4 (舌扁平上皮癌)、HSC5 (皮膚扁平上皮癌)、及びA431 (外陰部類上皮癌)はヒューマンサイエンス振興財団・ヒューマンサイエンス研究資源バンクから購入した。HSC1は、20%胎仔ウシ血清、及びペニシリン・ストレプトマイシンが補足されたDMEM、HSC4は、10%胎仔ウシ血清、及びペニシリン・ストレプトマイシンが補足されたMEM、HSC5は、10%胎仔ウシ血清、及びペニシリン・ストレプトマイシンが補足されたIscove's改変DMEM、A431は10%胎仔ウシ血清、及びペニシリン・ストレプトマイシンが補足されたDMEMの中で培養を行った。

## 【 0 0 9 4 】

## 4 . RT-PCR解析 ( RT-PCR )

皮膚癌培養細胞からの全RNAの調製は、ISOGEN (日本ジーン社)を使用し、供給元の推奨する手順に従って行った。ヒト正常皮膚全RNAは、Invitrogen社より購入した。各皮膚癌培養細胞から得られた全RNAは、37 °Cで30分間、DNA分解酵素で処理し、サンプル中のゲノムDNAを除去した。全RNAからcDNAの合成の手順は、以下の通りである。各皮膚癌培養細胞全RNA、並びにヒト正常皮膚全RNA、7.5 µgに10mM dNTP (10mM dATP, 10mM dCTP, 10mM dGTP, 10mM dTTP)を3 µl、Oligo(dT)<sub>12-18</sub>プライマーを1500ng加え、RNA分解酵素除去処理を行った蒸留水で、最終量39 µlに調製した。この溶液を65 °Cで5分間処理し、その後氷中にて急冷した。十分に氷温まで下がった溶液に5x First strand buffer (250mM Tris-HCl pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)を12 µl、100mM DTTを3 µl、RNA Inhibitorを3 µl、逆転写酵素 (SuperScript III Reverse Transcriptase: Invitrogen社)を3 µl加え、55 °Cで50分間、反応させた。反応終了後、更に70 °Cで15分間保温し、逆転写酵素の酵素活性除去を行って、この最終反応物をPCRに用いる各皮膚癌培養細胞、並びにヒト正常皮膚全RNAのcDNAサンプルとした。

30

40

## 【 0 0 9 5 】

各皮膚癌培養細胞、及びヒト正常皮膚サンプルにおけるGSDMA発現の確認には、PCR法により行った。使用したプライマーは、(GSDMAF:ATGACCATGTTTGAAAATGTC (配列番号: 13))と(GSDMAR:TTAGGAGGCCTTGTAAGCTG (配列番号14))のセットである。反応条件は、DNA変性反応が94 °Cで30秒間、アニーリング反応が57 °Cで30秒間、伸長反応が72 °Cで1分30秒間、反応サイクルは35サイクル、使用した機械は、バイオメトラ社のDNA増幅装置であ

50

る。反応終了後のPCRサンプルは、1%アガロースゲルにより電気泳動し、各サンプルにおけるGSDMA発現の評価を行った。

【0096】

#### 5. 抗GsdmA/GSDMA抗体の作製 (抗体作製)

抗GsdmA/GSDMA抗体は、GsdmA1タンパク質の37番目から12アミノ酸 (CLVLRKRKSTLF (配列番号: 15))、並びにGsdmA3タンパク質の248番目から14アミノ酸 (QMISEEPEEEKLIG (配列番号: 16))に相当する領域のペプチドを合成し、ニワトリに免疫することにより作製した。抗体の力価測定は、ELISA法により行った。得られた抗体をWestern blot法によりその抗原特異性について検証したところ、これらの抗体はマウスGsdmA1、GsdmA2、GsdmA3及びヒトGSDMAを全て特異的に認識する事が確認された。

10

【0097】

#### 6. 免疫組織化学 (免疫染色)

皮膚癌を自然発症したRim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロマウス個体の皮膚サンプルは、採取後4%ホルムアルデヒド溶液で12時間から16時間、固定を行った。皮膚組織はパラフィンで包埋し、厚さ5 $\mu$ mに薄切した。ヒト正常皮膚、並びに皮膚扁平上皮癌パラフィン切片は、BIOCHAIN社の製品を購入して実験に使用した。脱パラフィン化したサンプルは、抗原の賦活処理として、10 mMのクエン酸バッファー中で5分間のマイクロウェーブ処理、もしくは37 $^{\circ}$ Cで5分間、0.05% Trypsin処理を行った。また、内在性ペルオキシターゼ活性を抑えるために0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/MtOHで室温30分間、処理を行った。一次抗体は、抗GsdmA/GSDMA (50倍希釈)を、二次抗体にはペルオキシダーゼ標識ロバ抗ニワトリIgYポリクローナル抗体 (500倍希釈, Jacson ImmunoReseach)を用いた。可視化には3'-ジアミノベンシジン四塩酸塩 (和光純薬)を用いた。抗体染色後の標本は、ガバールガラスをかけて正立型光学顕微鏡 (OLYMPUS BX51)を用いて観察を行った。

20

【0098】

#### 〔実施例1〕皮膚癌におけるGSDMAの消失

マウスGsdmAクラスターのヒト相同遺伝子: GSDMAは、胃癌、食道癌においてその発現が消失し、また癌抑制能を持つことが明らかにされていた。しかしながら皮膚において、同様な発現様式並びに機能を持つかについては明らかにされていない。

【0099】

そこで、ヒトGSDMA遺伝子の皮膚での機能を明らかにする第一段階として、正常皮膚、皮膚癌におけるGSDMA遺伝子発現変化の解析を行った。正常皮膚と4種類の皮膚癌細胞株: HSC1 (皮膚扁平上皮癌)、HSC4 (舌扁平上皮癌)、HSC5 (皮膚扁平上皮癌)、及びA431 (外陰部類上皮癌)を用いてGSDMA遺伝子の発現をRT-PCR法により調べた結果、ヒト正常皮膚にはGSDMA遺伝子の発現が観察されるにもかかわらず、全ての癌細胞株においてはGSDMA遺伝子の発現が消失している事が明らかとなった (図1)。このことは、胃並びに胃癌におけるGSDMA遺伝子の発現様式と同様であり、皮膚においてもGSDMA遺伝子が癌抑制機能を持つ可能性があることを示唆する。

30

【0100】

#### 〔実施例2〕Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体は皮膚癌を自然発症する

マウスにおいてGsdmAクラスター遺伝子 (マウス11番染色体に存在)の内、GsdmA1とGsdmA3が皮膚において発現している。上皮形態形成異常突然変異マウスRim3の原因遺伝子はGsdmA3であり、Rim3の表現型から考えて、GsdmA3遺伝子の機能は、細胞増殖・分化に深く関わっていることが予想される。これらの事とヒト皮膚癌においてGSDMA遺伝子発現が消失することなどから考えて、本発明者らはマウス皮膚においてGsdmA3は癌抑制能を持つのではないかと仮説を立てた。この仮説を確かめるために、本発明者らはGsdmA3が原因遺伝子である上皮形態異常突然変異マウス・Rim3に、癌抑制遺伝子として知られているp53 (Trp53)のノックアウトアレルを導入したRim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体 (GsdmA3<sup>Rim3</sup>/+;Trp53<sup>-</sup>/+)を作製し、その動物個体における皮膚癌発症率の検証を行った。実験に用いた掛合わせの模式図を図2に示す。Rim3ヘテロ個体 (GsdmA3<sup>Rim3</sup>/+)とp53ノックアウトヘテロ個体 (Trp53<sup>-</sup>/+)を交配することによりRim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテ

40

50

口個体、Rim3ヘテロ個体、p53ノックアウトヘテロ個体、正常個体が、理論値通りの割合で得られた。これら全ての遺伝型個体を同一条件下かつ発ガン性物質の接触なしで飼育し、経時観察を行った。これらの動物において皮膚癌が発症したならば、その原因は遺伝型のみによる自然発症であると言える。経時観察の結果、全ての遺伝型において、生後6ヶ月までは皮膚癌の発症は観察されなかった。生後7ヶ月になると初めてRim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体においてのみ、皮膚癌の発症が観察された。ダブルヘテロ個体では、加齢と共にその発症率が上昇し、8ヶ月齢では38% (8/21)、10ヶ月齢では62% (13/21)、12ヶ月齢では81% (17/21)の個体で皮膚癌が発症した(図3)。興味深いことに、その皮膚癌は一個体につき複数個発症し、発症部位はヒトの皮膚癌と同様に頭部と頸部に集中していた(表1)。Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体以外の遺伝型個体：Rim3ヘテロ個体、p53ノックアウトヘテロ個体、正常個体においては、Rim3ヘテロ個体のみ、生後11ヶ月齢で皮膚癌の発症がみられたが、その発症率は生後12ヶ月齢となっても約10%と非常に低い値であった。

【0101】

【表 1】

| 遺伝子型                  |                     | 観察した<br>個体数 | 皮膚ガンを<br>発症した個体数 | 皮膚ガンの<br>数 | 個体数(%)  |         |         |       |       |
|-----------------------|---------------------|-------------|------------------|------------|---------|---------|---------|-------|-------|
|                       |                     |             |                  |            | 頭部      | 首       | 胴       | 臀部    | その他   |
| <i>Gsdm4-3</i><br>+/+ | <i>Trp53</i><br>+/+ | 21          | 0                | 0          | —       | —       | —       | —     | —     |
|                       | <i>Trp53</i><br>-/+ | 20          | 0                | 0          | —       | —       | —       | —     | —     |
| <i>Rim3</i> /+        | <i>Trp53</i><br>+/+ | 19          | 2                | 2          | —       | —       | 2 (100) | —     | —     |
| <i>Rim3</i> /+        | <i>Trp53</i><br>-/+ | 21          | 17               | 36         | 11 (31) | 16 (44) | 6 (16)  | 1 (3) | 2 (6) |

表 1 は *Rim3*/+マウスと *Trp53*<sup>-/+</sup>マウスの交配から得られた交雑マウスにおける自然発生皮膚ガンの発症率を示す。

## 【 0 1 0 2 】

〔実施例 3〕 *Rim3*ヘテロ・*p53*ノックアウトヘテロマウス発症皮膚癌の組織化学的観察

より詳しく *Rim3*ヘテロ・*p53*ノックアウトヘテロ個体において発症した皮膚癌を調べるために、組織切片を作製した。図 4 の A は、*Rim3*ヘテロ・*p53*ノックアウトヘテロ個体において発症した皮膚癌の全体像を示し、図 4 の B はその個体の癌の切片像である。図 4 A 中の白線は、図 4 B の切断面と一致する。*Rim3*ヘテロ・*p53*ノックアウトヘテロ個体にお

10

20

30

40

50

ける皮膚癌は、非常にケラチン化した領域が多く、ケラトアカントーマ様であった（図4B）。また癌組織領域を病理学的に調べると、この皮膚癌は典型的な扁平上皮癌であることが明らかとなった（図4D）。同時に、癌に隣接した非癌部領域では、細胞の過増殖が観察された（図4C）。組織化学的観察において、最も興味深いことは、Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体所属リンパ節における知見である。癌発症Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体の所属リンパ節を調べたところ、そのリンパ節内には上皮構造が形成されており、また過度な角化（ケラチン化）像が観察された（図4E）。このことは、Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体において発生した皮膚癌細胞が所属リンパ節へ転移し、そのリンパ節内に皮膚様構造を形成した事を意味する。

#### 【0103】

〔実施例4〕皮膚癌におけるGsdmA/GSDMAタンパク質の消失

ヒト皮膚癌培養細胞では、GSDMA遺伝子の発現は消失していた。しかしながらこの結果は、あくまで培養細胞系(in vitro)の実験結果である。そこでヒト並びに動物個体(in vivo)での癌部におけるGSDMAの発現が消失しているか否かについて調べる手始めとして、本発明者らはGsdmA/GSDMA抗体を作製した。GsdmA/GSDMAに対する合成ペプチドを作製し、ニワトリに免疫することにより抗GsdmA/GSDMAポリクローナル抗体の作出に本発明者らは成功した。ウェスタンブロットによる抗GsdmA/GSDMAポリクローナル抗体の特異性を図5に示す。今回作製したGsdmA/GSDMAポリクローナル抗体は、確実にGsdmA/GSDMA（マウスGsdmA1~A3、並びにヒトGSDMAタンパク質）を認識する。

#### 【0104】

この抗体を用いてRim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体に発症した皮膚癌を調べたところ、非癌部上皮組織においてはGsdmAタンパク質の存在が有棘細胞層から顆粒層、透明層にかけて確認されたが（図6A、6B）、典型的な扁平上皮癌細胞領域においてGsdmAタンパク質は消失していることが明らかとなった（図6C、6D中\*印）。同様に、ヒト正常皮膚、扁平上皮癌においてGSDMAタンパク質の検出を行った。ヒト正常皮膚においてGSDMAタンパク質は、マウス正常皮膚と同様に基底膜細胞層には発現がなく、有棘細胞層から顆粒層、透明層にかけて発現していた（図7A）。また、ヒトにおけるGSDMAタンパク質の毛胞での発現もマウスと同様であった（図7B）。ヒト皮膚癌においては、扁平上皮癌、基底細胞癌共にGSDMAタンパク質の発現が消失していることが見出された（図7C、7D）。以上の結果から、培養癌細胞株のみならずヒト、マウス個体においてもGsdmA/GSDMAタンパク質は、癌化に伴い消失することが明らかとなった。

#### 【0105】

本発明者らは、GsdmA3に変異が存在する上皮形態形成異常突然変異マウスRim3にp53 (Trp53)ノックアウトアリルを導入することにより、自然発症で皮膚癌を誘発する新たな皮膚癌モデル動物を開発した。Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体は、生後約7ヶ月齢前後で扁平上皮癌を発症し、生後12ヶ月齢になるとその割合は、80%を超えるものである。その皮膚癌発症部位は、ヒト皮膚癌において発症が多い頭部と頸部に集中し、また1個体につき複数の癌の発生が観察される。更にその癌細胞は、驚くべき事に所属リンパ節へ転移することが確かめられた。

#### 【0106】

皮膚癌の発症率が高く、1個体につき複数の癌が発症することは、皮膚癌の発症メカニズムを解析する上で、非常に有用である。また、化学誘導なしに自然発症で皮膚癌を誘発することも特筆すべき事である。Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体は、その遺伝型のみの影響により加齢と共に皮膚癌を発症する。

#### 【0107】

〔実施例5〕

Rim3単独での皮膚癌発症は、非常に低く、今回の実験では約10%であった。また、その癌も単独で発症した。データには示さないが、Rim3ホモ個体においても今回実験を行ったRim3ヘテロ個体とほぼ同様に癌の発生率は非常に低い。p53 (Trp53)ノックアウトマウスは、これまでにヘテロ、ホモ個体共に皮膚癌の自然発症報告はない。今回行った実験にお

10

20

30

40

50

いてp53ノックアウトヘテロマウスで皮膚癌が発症しなかったのは、これまでの報告（皮膚癌は自然発症しない）と一致する。この2つの遺伝子に同時に変異が存在する時のみ皮膚癌が発症する理由を、以下考察する。

【0108】

癌化関連遺伝子である癌遺伝子（oncogene）や癌抑制遺伝子（tumor suppressor gene）は、本来正常遺伝子に由来し、細胞の増殖・分化調節など極めて重要な役割を担うものが多い。何らかの原因でこの癌化関連遺伝子に変異が生じると、遺伝子の異常な機能亢進（癌遺伝子）や機能低下（癌抑制遺伝子）が生じ、細胞増殖シグナルの異常亢進や細胞周期異常を引き起こす。その結果、遺伝子修復などが不能となり、更に複数の遺伝子に変異が蓄積して、最終的に細胞が癌化すると考えられる。事実多くの場合、癌においては、複数の癌関連遺伝子に変異が蓄積している。

10

【0109】

まさにRim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体は、この癌発生機序を反映するものであると考えられる。GsdmA3、もしくはp53遺伝子単独の変異では皮膚癌を発症しない。このことは、GsdmA3遺伝子に変異が存在する場合（Rim3ホモ/ヘテロ個体）においては、p53遺伝子により癌発生が押さえられ、逆にp53遺伝子に変異が存在する場合（p53ノックアウトホモ/ヘテロ個体）には、GsdmA3遺伝子が癌発生を押さえっていると推測される。両遺伝子に変異が存在し、かつ加齢を伴うことで初めて皮膚癌が発症する。そもそもRim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体では、GsdmA3遺伝子、p53遺伝子共に1アリルは正常タイプである。即ち、野生型の半分ではあるが正常な機能を持つ。おそらく皮膚癌が発症するまでの6ヶ月の間に半分量の正常な機能では遺伝子修復などが正常に行えなくなり、多くの癌化関連遺伝子に変異が蓄積して皮膚癌発症へと繋がるものと考えられる。

20

【0110】

また、Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体では、GsdmA3遺伝子、Trp53遺伝子共に1アリルは正常タイプであるので、その表現型は緩やかなものであると考えられる。よって、Rim3ホモ・p53ノックアウトヘテロ個体（GsdmA3<sup>Rim3/Rim3</sup>;Trp53<sup>+/+</sup>）、Rim3ヘテロ・p53ノックアウトホモ個体（GsdmA3<sup>Rim3/+</sup>;Trp53<sup>-/-</sup>）は、Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体よりも早く皮膚癌が発症し、Rim3ホモ・p53ノックアウトホモ個体（GsdmA3<sup>Rim3/Rim3</sup>;Trp53<sup>-/-</sup>）は、更に早く皮膚癌が発症するものと考えられる。

30

【0111】

Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体の皮膚癌における変異蓄積癌化関連遺伝子の候補の1つは、GsdmA1である。Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体においてGsdmA1遺伝子に変異は存在していない。しかしながら、抗GsdmA/GSDMA抗体を用いた免疫染色の結果は、Rim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロ個体の皮膚癌における、本来皮膚で発現しているGsdmA1、GsdmA3両タンパク質が消失している事を明らかとした。GsdmA3のみならず、変異の存在しないGsdmA1の消失は非常に興味深い。GsdmA1とGsdmA3は、非常に相同性が高く、機能的な重複性が考えられる。GsdmA3のみに変異が存在する段階において（Rim3ホモもしくはヘテロ個体）はGsdmA1がその機能を補って癌化を抑えていると思われる。癌化には両遺伝子GsdmA1、GsdmA3の消失が必要なのであろう。また、GsdmA1、GsdmA3共に発現が抑制されるのかについても興味を持たれ、両遺伝子の転写調節に関わる因子も皮膚癌における変異蓄積癌化関連遺伝子の候補と考えられる。

40

【0112】

今回の実験において本発明者らは、皮膚特異的に発現するGsdmA3に変異の存在するRim3にp53ノックアウトアリルを導入することにより、皮膚癌自然発症モデル動物を作製した。GsdmA3はパラログとしてGsdmA1、GsdmA2を持つ。GsdmA1は皮膚、食道、前胃領域の扁平上皮に、GsdmA2は胃腺上皮に、それぞれ特異的に発現している。GsdmA1、もしくはGsdmA2に変異を導入したトランスジェニック、又はノックインマウスを作製し、さらにp53ノックアウトアリルを導入することにより皮膚癌、食道癌などを発症する扁平上皮癌モデルマウス（GsdmA1変異/p53変異）や胃腺上皮に癌を生じる胃癌モデルマウス（GsdmA2変異/p53変異）を作製可能である。

50

【産業上の利用可能性】

【0113】

これまで、皮膚癌発症モデル動物は、遺伝子欠損（ノックアウト）、遺伝子導入（トランスジェニック）技術を用いて数種類作製されているが、その多くは、皮膚癌の発症に化学誘導等が必要であり、リンパ節への転移は報告されていない（Capozza et al., Am J Pathol. 162(6). 2029-2039. 2003、Ishikawa et al., Mutat Res. 477(1-2). 41-49. 2001、Nicolas et al., Nat Genet. 33(3). 416-421. 2003）。

【0114】

p53のノックアウトホモマウスは生後3ヶ月から6ヶ月、p53のノックアウトヘテロマウスは生後10ヶ月でリンパ癌を自然発症するが、皮膚癌は発症しない（Donehower et al., Nature. 356, 215-221. 1992.）。また、本発明者らは、Rim3 ( $GsdmA3^{Rim3/+}$ 並びに $GsdmA3^{Rim3/Rim3}$ )における皮膚癌の自然発症率は極めて低いことを見出している。

10

【0115】

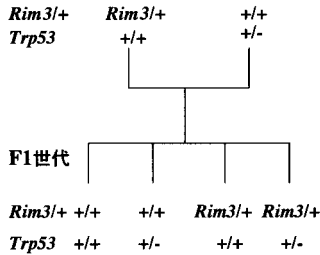
これに対し、本発明者らによって提供されたRim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロマウス ( $GsdmA3^{Rim3/+}; Trp53^{-/+}$ ) では、生後7ヶ月より自然発症で多発的に皮膚扁平上皮癌を引き起こし、生後12ヶ月では8割以上の個体において同様な扁平上皮癌の発症が観察された。更に驚くべき事に、扁平上皮癌が所属リンパ節へ転移することが確かめられた。

【0116】

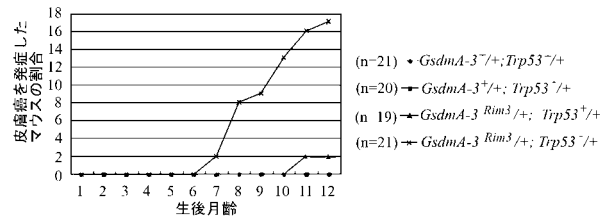
"高頻度"で"多発的"に扁平上皮癌を"自然発症"し、かつリンパ節への転移を起こすことは、本発明のRim3ヘテロ・p53ノックアウトヘテロマウスが、扁平上皮癌モデル動物として有用であり、また、扁平上皮癌発生・メカニズムの解明、並びに創薬、診断薬の開発に有用であることを示している。

20

【図2】

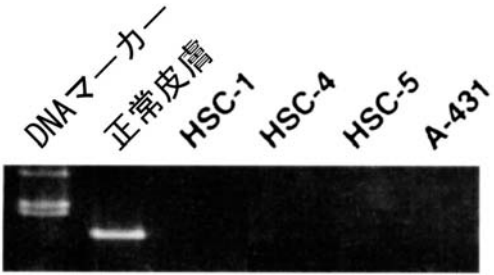


【図3】

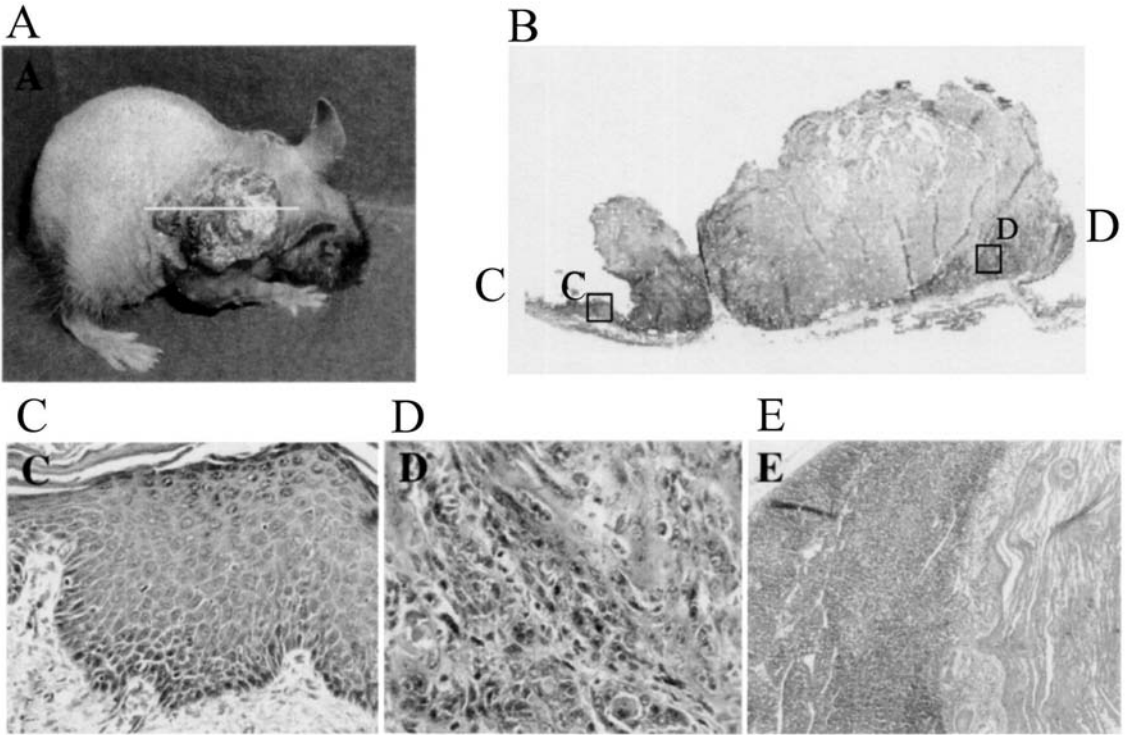




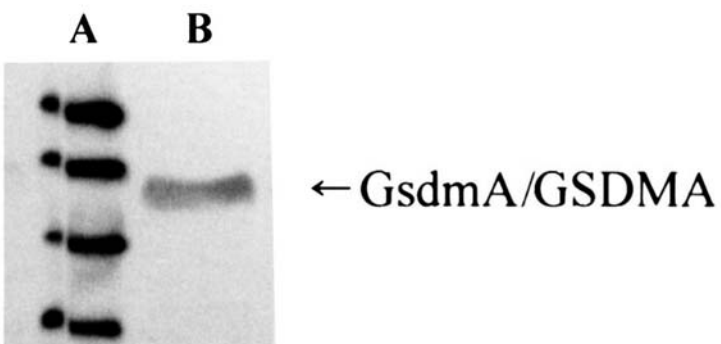
【図1】



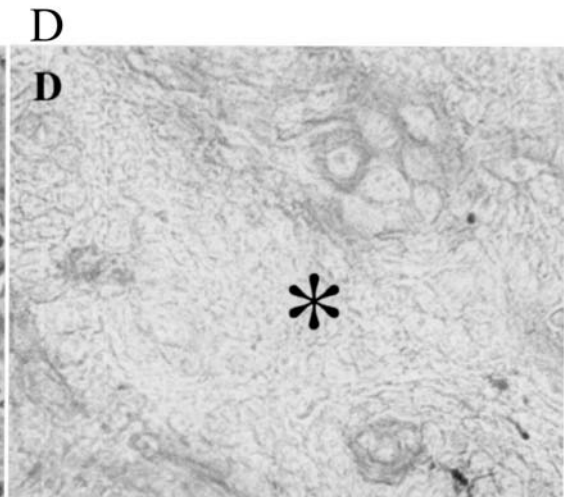
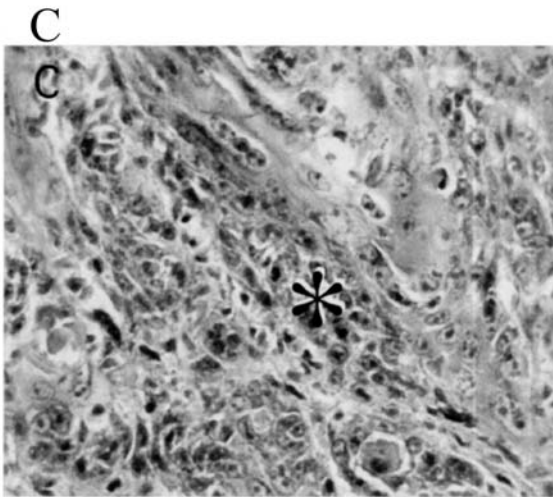
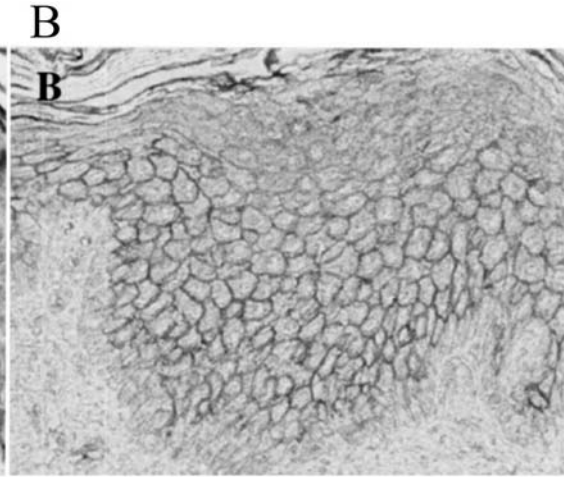
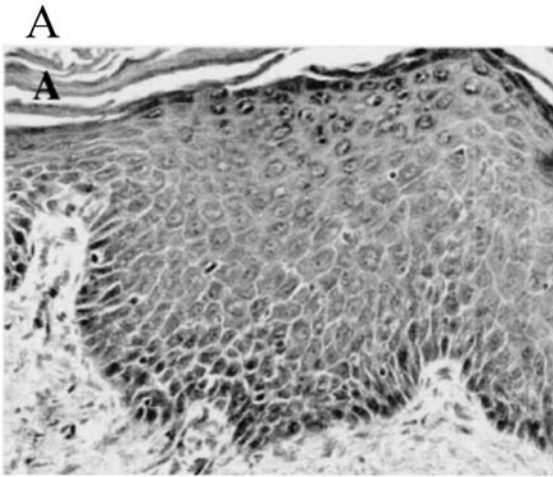
【図4】



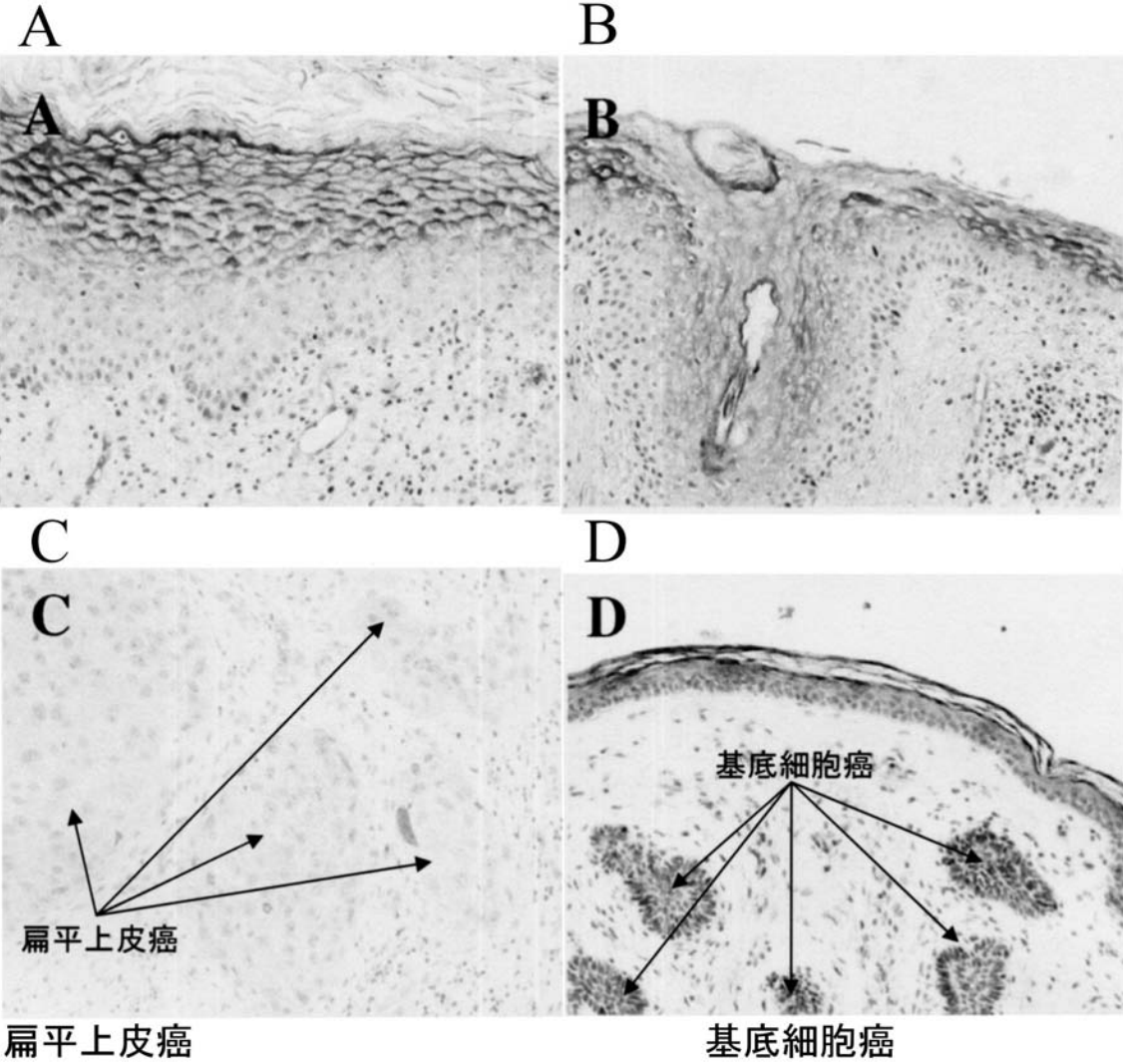
【図5】



【 図 6 】



【圖 7】



扁平上皮癌

基底細胞癌

【配列表】

[0004742272000001.app](#)

## フロントページの続き

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

- (56)参考文献 Mammalian Genome, 2 0 0 0 年, vol. 11, 718-724  
 GenBank Accession: AB093591 [gi: 29893087], 2 0 0 3 年 4 月 1 5 日, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/29893087?sat=0LD04&satkey=6072378>, U R L , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/29893087?sat=0LD04&satkey=6072378>  
 日本発生物学会大会発表要旨集, 2 0 0 3 年, vol. 36, p. 55 (Abstract 1B1715)  
 日本発生物学会大会発表要旨集, 2 0 0 3 年, vol. 36, p. 55 (Abstract 1B1730)  
 Genes Genet. Syst., 2 0 0 3 年, vol. 78, p. 447 (Abstract 1A-18)  
 第26回日本分子生物学会年会 プログラム・講演要旨集, 2 0 0 3 年, p. 880 (Abstract 3PB-084)  
 Am. J. Pathol., 2 0 0 1 年, vol. 158, 1913-1919

## (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

A01K 67/027  
 C12N 5/00- 5/28  
 C12N 15/00-15/90  
 C12Q 1/02  
 G01N 33/15  
 G01N 33/50  
 JSTPlus(JDreamII)  
 BIOSIS/DWPI(DIALOG)  
 MEDLINE(STN)  
 医学・薬学予稿集全文データベース  
 PubMed  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
 UniProt/GeneSeq