

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-7619

(P2018-7619A)

(43) 公開日 平成30年1月18日(2018.1.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/09 (2010.01)	C 1 2 N 5/09	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/61 (2006.01)	C 0 7 K 14/61	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2016-138981 (P2016-138981)	(71) 出願人	598015084 学校法人福岡大学 福岡県福岡市城南区七隈8丁目19番1号
(22) 出願日	平成28年7月13日 (2016.7.13)	(74) 代理人	100080160 弁理士 松尾 憲一郎
		(74) 代理人	100149205 弁理士 市川 泰央
		(72) 発明者	柳瀬 敏彦 福岡県福岡市城南区七隈八丁目19番1号 学校法人福岡大学内
		(72) 発明者	福田 高士 福岡県福岡市城南区七隈八丁目19番1号 学校法人福岡大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A I P ノックアウト成長ホルモン産生細胞株

(57) 【要約】

【課題】下垂体腫瘍細胞株 (GH3細胞株) のAIP遺伝子の機能をゲノム編集 (CRISPR-Cas9システム) を利用してノックアウトしたAIPノックアウト下垂体成長ホルモン (GH) 産生細胞株 (GH3-FTY細胞株) ならびにその樹立方法を提供すること。

【解決手段】腫瘍細胞株のAIP遺伝子をゲノム編集によりノックアウトすることにより野生型AIP遺伝子のアミノ酸配列ならびに機能とは異なるアミノ酸配列ならびに機能を有するAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株とした。また、AIP遺伝子のノックアウトにより生成される切断AIPタンパク質が配列番号2 (SEQ ID NO:2) または配列番号3 (SEQ ID NO:3) で表されるアミノ酸配列を有することにも特徴を有する。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

腫瘍細胞株のAIP (Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein) 遺伝子をゲノム編集によりノックアウトすることにより野生型AIP遺伝子のアミノ酸配列ならびに機能とは異なるアミノ酸配列ならびに機能を有するAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株。

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載のAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株であって、前記AIP遺伝子のノックアウトにより生成される切断AIPタンパク質が配列番号 2 (SEQ ID NO:2) または配列番号 3 (SEQ ID NO:3) で表されるアミノ酸配列を有することを特徴とするAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株。

10

**【請求項 3】**

請求項 1 または 2 に記載のAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株であって、前記成長ホルモン (GH) 産生細胞株がラット下垂体腫瘍由来であることを特徴とするAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株。

**【請求項 4】**

請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載のAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株であって、前記AIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株が、下垂体由来成長ホルモン (GH) 産生細胞株に比べて成長ホルモン (GH) 産生ならびに細胞増殖が増加していることを特徴とするAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株。

20

**【請求項 5】**

請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株であって、前記AIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株が、ソマトスタチン受容体タイプ 2 (Sstr 2) または ZAC1の発現が低下していることを特徴とするAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株。

**【請求項 6】**

AIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株の樹立方法であって、下垂体由来成長ホルモン (GH) 産生細胞のAIP遺伝子をCRISPR-Cas9システムによりAIP遺伝子をノックアウトすることによってAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株を樹立することを特徴とするAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株の樹立方法。

30

**【請求項 7】**

請求項 6 に記載のAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株の樹立方法であって、前記下垂体がラット下垂体であることを特徴とするAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株の樹立方法。

**【請求項 8】**

請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載のAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株を成長ホルモン (GH) 産生腫瘍のモデル細胞株として使用することを特徴とするAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株の使用法。

**【請求項 9】**

請求項 8 に記載のAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株の使用法であって、前記成長ホルモン (GH) 産生腫瘍が成長ホルモン (GH) 産生下垂体腫瘍であることを特徴とするAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株の使用法。

40

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、AIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株に関し、更に詳細には、下垂体由来AIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株およびその樹立方法ならびに使用方法に関するものである。

**【背景技術】****【0002】**

50

AIP (Aryl hydrocarbon receptor interacting protein) 遺伝子の生殖細胞変異は下垂体腺腫、主にソマトトロピノーマの素因である。これらのAIP生殖細胞変異は、家族性孤発性下垂体腺腫 (Familial isolated pituitary adenoma: FIPA) 患者の15%~20%ならびに散発性下垂体腺腫 (sporadic pituitary adenoma) 患者の3%~5%に同定されている (非特許文献1~5)。

#### 【0003】

これらの変異による有病率は家族性のソマトトロピノーマの家族のなんと40%~50%にも達している (非特許文献2、4)。また30歳未満のマクロアデノーマにおけるプロラクチン産生腺腫もしくはソマトトロピノーマの散発性症例でも、10%~15%の患者に認められる (非特許文献6)。

10

#### 【0004】

最も共通したAIP遺伝子改変では、タンパク質同士の相互作用に關与する3個のトリコペプチドリピート (TRP) を含む、特にC末端内のアミノ酸置換または切断AIPタンパク質が生じる (非特許文献7、8)。

#### 【0005】

AIP遺伝子変異を含むかかる腫瘍は、典型的には、若年期で発症し、より巨大でかつより侵襲性になり (非特許文献1~7)、また先端巨大症の第一選択治療薬、ソマトスタチン類縁体に対して抵抗性になる傾向がある (非特許文献3、4、9、10)。

#### 【0006】

AIP遺伝子は、その*in vitro*機能についてのいくつかの実験による知見から腫瘍抑制遺伝子と考えられる (非特許文献3、11-14)。つまり、強制発現系を用いた*in vitro*培養実験では、野生型AIPの細胞増殖は抑制されるが、変異AIPではこの現象は無く、siRNAによるAIPのノックダウンにより細胞増殖が増加することが明らかになった (非特許文献12-14)。

20

#### 【0007】

AIP不活性による下垂体腫瘍発生の分子機構は未だ明らかでないけれども、いくつかの機構が提案されている。例えば、AIP不活性は機能障害性Gタンパクシグナル伝達を介したサイクリック・アデノシン・モノホスフェート (cyclic adenosine monophosphate: cAMP) 産生抑制の機能を不全とするのが (非特許文献13)、AIP変異はホスホジエステラーゼとの阻害された相互作用を促進し、cAMPの産生を増加する (非特許文献14)。ソマトスタチン類縁体に対するある種のソマトトロピノーマの相対的非感受性に関しては、AIP不活性によって、抗増殖遺伝子 (アポトーシスと細胞サイクル抑止のZnフィンガーレギュレーター: ZAC-1; PLAGL1としても知られている) の発現が低下することがその機構であることが示唆されている (非特許文献15、16)。ZAC-1はアポトーシスやG1細胞サイクル抑止を引き起こすことによって抗増殖性効果を及ぼすことができる (非特許文献17)。

30

#### 【0008】

AIP作用についての上記仮説は、臨床所見と、下垂体腫瘍の変異分析ならびに免疫組織化学的研究および下垂体細胞内での野生型もしくは変異型AIPの外因発現または特にラット下垂体GH3細胞株でのAIPのsiRNAノックダウンを用いた*in vitro*実験との組み合わせに主に基づいている。しかしながら、GH産生細胞におけるAIPの完全ノックアウトの表現型はこれまで解明されていない。

40

#### 【0009】

Aipノックアウト (KO) マウスでは、ヘテロ接合マウスは下垂体腺腫を極めて発症しやすいのに対して、Aipが完全に欠損したマウスは胎生致死に至ることが報告されている (非特許文献18)。AIPを内因的に発現しない下垂体細胞株はこれまで樹立されていないので、AIPの機能が完全に欠損している下垂体細胞株を樹立することができれば、Aipの内因性機能を分析するために有用な研究モデルが提供できると考えられる。

#### 【0010】

一方、ラット下垂体腫瘍細胞株GH3は、当初はGhを分泌する均質なクローン細胞株とし

50

て記載されていたが（非特許文献19）、後になってプロラクチン（PrI）を分泌することも報告された（非特許文献20）。したがって、このGH3細胞株は、均質な細胞集団ではなく、逆溶血ブランクアッセイにより異なる刺激に应答してGhとPrIの割合が変化することからGh産生細胞とPrI産生細胞のサブセットが混在するむしろ機能的には不均質であることが示唆されている（非特許文献21）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】 Vierimaa O , Georgitsi M , Lehtonen R , Vahteristo P , Kokko A , Raitila A , Tuppurainen K , Ebeling TM , Salmela PI , Paschke R , Gundogdu S , De Menis E , Makinen MJ , Launonen V , Karhu A , Aaltonen LA. Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science* 2006;312:1228-1230. 10

【非特許文献2】 Daly AF , Vanbellinthen JF , Khoo SK , Jaffrain-Rea ML , Naves L A , Guitelman MA , Murat A , Emy P , Gimenez-Roqueplo AP , Tamburrano G , Ravero t G , Barlier A , De Herder W , Penfornis A , Ciccarella E , Estour B , Lecomte P , Gatta B , Chabre O , Sabate MI , Bertagna X , Garcia BN , Stalldecker G , Co lao A , Ferolla P , Wemeau JL , Caron P , Sadoul JL , Oneto A , Archambeaud F , Calender A , Sinilnikova O , Montanana CF , Cavagnini F , Hana V , Solano A , De lettieres D , Luccio-Camelo DC , Basso A , Rohmer V , Brue T , Bours V , Teh BT , Beckers A 2007 Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1891-1896 20

【非特許文献3】 Leontiou CA , Gueorguiev M , van der Spuy J , Quinton R , Lolli F , Hassan S , Chahal HS , Igreja SC , Jordan S , Rowe J , Stolbrink M , Christian HC , Wray J , Bishop-Bailey D , Berney DM , Wass JA , Popovic V , Ribeiro-Oliveira A , Gadelha MR , Monson JP , Akker SA , Davis JR , Clayton RN , Yoshimoto K , Iwata T , Matsuno A , Eguchi K , Musat M , Flanagan D , Peters G , Bolger GB , Chapple JP , Frohman LA , Grossman AB , Korbonits M 2008 The role of the AIP gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2390-2401 30

【非特許文献4】 Chahal HS , Chapple JP , Frohman LA , Grossman AB , Korbonits M 2010 Clinical, genetic and molecular characterization of patients with familial isolated pituitary adenomas (FIPA). *Trends Endocrinol Metab* 21:419-427

【非特許文献5】 Cazabat L, Bouligand J, Salenave S, Bernier M, Gaillard S, Parke r F, Young J, Guiochon-Mantel A, Chanson P 2012 Germline AIP mutations in apparently sporadic pituitary adenomas: prevalence in a prospective single-center cohort of 443 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 97: E663-70

【非特許文献6】 Tichomirowa MA, Barlier A, Daly AF, Jaffrain-Rea ML, Ronchi CL, Yaneva M, Urban JD, Petrossians P, Elenkova AP, Tabarin A, Desailoud R, Maiter D, Schurmeyer T, Cozzi R, Theodoropoulou M, Sievers C, Bernabeu I, Naves LA, Chabre O, Montanana CF, Hana V, Halaby G, Delemer B, Aizpun JI, Sonnet E, Longas AF , Hagelstein MT, Caron P, Stalla GK, Bours V, Zacharieva S, Spada A, Brue T, Beckers A 2011 High prevalence of AIP gene mutations following focused screening in young patients with sporadic pituitary macroadenomas. *Eur J Endocrinol* 165:509-51 40

【非特許文献7】 Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, Chahal HS, Igreja SC, Jordan S, Rowe J, Stolbrink M, Christian HC, Wray J, Bishop-Bailey D, Berney DM, Wass JA, Popovic V, Ribeiro-Oliveira A Jr, Gadelha MR, Monson JP, Akker SA, Davis JR, Clayton RN, Yoshimoto K, Iwata T, Matsuno 50

A, Eguchi K, Musat M, Flanagan D, Peters G, Bolger GB, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, Korbonits M. 2008 The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 93:2390-401

【非特許文献 8】Morgan RM, Hernandez-Ramirez LC, Trivellin G, Zhou L, Roe SM, Korbonits M, Prodromou C 2012 Structure of the TPR domain of AIP lack of client protein interaction with the C-terminal -7 helix of the TPR domain of AIP is sufficient for pituitary adenoma predisposition. *PLoS One.* 7:e53339

【非特許文献 9】Daly AF, Tichomirowa MA, Petrossians P, Heliovaara E, Jaffrain-Rea ML, Barlier A, Naves LA, Ebeling T, Karhu A, Raappana A, Cazabat L, De Menis E, Montanana CF, Raverot G, Weil RJ, Sane T, Maiter D, Neggers S, Yaneva M, Tabarin A, Verrua E, Eloranta E, Murat A, Vierimaa O, Salmela PI, et al. 2010 Clinical characteristics and therapeutic responses in patients with germ-line AIP mutations and pituitary adenomas: an international collaborative study. *J Clin Endocrinol Metab* 95:E373-E383

【非特許文献 10】Iacovazzo D, Carlsen E, Lugli F, Chiloiro S, Piacentini S, Bianchi A, Giampietro A, Mormando M, Clear AJ, Doglietto F, Anile C, Maira G, Lauriola L, Rindi G, Roncaroli F, Pontecorvi A, Korbonits M, De Marinis L 2016 Factors predicting pasireotide responsiveness in somatotroph pituitary adenomas resistant to first-generation somatostatin analogues: an immunohistochemical study. *Eur J Endocrinol* 174:241-50

【非特許文献 11】Beckers A, Aaltonen LA, Daly AF, Karhu A 2013 Familial isolated pituitary adenomas (FIPA) and the pituitary adenoma predisposition due to mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene. *Endocr Rev* 34:239-77

【非特許文献 12】Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, Chahal HS, Igreja SC, Jordan S, Rowe J, Stolbrink M, Christian HC, Wray J, Bishop-Bailey D, Berney DM, Wass JA, Popovic V, Ribeiro-Oliveira A Jr, Gadelha MR, Monson JP, Akker SA, Davis JR, Clayton RN, Yoshimoto K, Iwata T, Matsuno A, Eguchi K, Musat M, Flanagan D, Peters G, Bolger GB, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, Korbonits M 2008 The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2390-401

【非特許文献 13】Tuominen I, Heliovaara E, Raitila A, Rautiainen MR, Mehine M, Katainen R, Donner I, Aittomaki V, Lehtonen HJ, Ahlsten M, Kivipelto L, Schalin-Jantti C, Arola J, Hautaniemi S, Karhu A 2015 AIP inactivation leads to pituitary tumorigenesis through defective G $\beta$ i-cAMP signaling. *Oncogene* 34:1174-84

【非特許文献 14】Formosa R, Xuereb-Anastasi A, Vassallo J. 2013 Aip regulates cAMP signalling and GH secretion in GH3 cells. *Endocr Relat Cancer* 20:495-505

【非特許文献 15】Chahal HS, Trivellin G, Leontiou CA, Alband N, Fowkes RC, Tahir A, Igreja SC, Chapple JP, Jordan S, Lupp A, Schulz S, Ansorge O, Karavitaki N, Carlsen E, Wass JA, Grossman AB, Korbonits M. 2012 Somatostatin analogs modulate AIP in somatotroph adenomas: the role of the ZAC1 pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E1411-20

【非特許文献 16】Theodoropoulou M, Zhang J, Laupheimer S, Paez-Pereda M, Erneux C, Florio T, Pagotto U, Stalla GK 2006 Octreotide, a somatostatin analogue, mediates its antiproliferative action in pituitary tumor cells by altering phosphatidylinositol 3-kinase signaling and inducing Zac1 expression. *Cancer Res* 66:1576-1582

【非特許文献 17】Theodoropoulou M, Stalla GK, Spengler D 2010 ZAC1 target gen

10

20

30

40

50

es and pituitary tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol* 326:60-65

【非特許文献 1 8】Raitila A1, Lehtonen HJ, Arola J, Heliovaara E, Ahlsten M, Georgitsi M, Jalanko A, Paetau A, Aaltonen LA, Karhu A 2010 Mice with inactivation of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (Aip) display complete penetrance of pituitary adenomas with aberrant ARNT expression. *Am J Pathol* 177:1969-76

【非特許文献 1 9】Tashjian AH Jr, Yasumura Y, Levine L, Sato GH, Parker ML. Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone. 1968 *Endocrinology* 82:342-52

【非特許文献 2 0】Tashjian AH Jr, Bancroft FC, Levine L 1970 Production of both prolactin and growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cells. Differential effects of hydrocortisone and tissue extracts. *J Cell Biol.* Oct;47(1): 61-70. 10

【非特許文献 2 1】Boockfor FR, Hoeffler JP, Frawley LS. 1985 Cultures of GH3 cells are functionally heterogeneous: thyrotropin-releasing hormone, estradiol and cortisol cause reciprocal shifts in the proportions of growth hormone and prolactin secretors. *Endocrinology* 117:418-20

【非特許文献 2 2】Nomiya T, Kawanami T, Irie S, Hamaguchi Y, Terawaki Y, Murase K, Tsutsumi Y, Nagaishi R, Tanabe MMorinaga H, Tanaka T, Mizoguchi M, Nabeshima K, Tanaka M, Yanase T 2014 Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, attenuates prostate cancer growth. *Diabetes.* 63:3891-905. 20

【非特許文献 2 3】Avwioro G 2011. Histochemical Uses Of Haematoxylin - A Review. *JPCS* 1:24-34

【非特許文献 2 4】Kinsham A 1975 Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 66:188-193

【非特許文献 2 5】Gupta S, Wang Y, Ramos-Garcia R, Shevrin D, Nelson JB, Wang Z 2010 Inhibition of 5 $\alpha$ -reductase enhances testosterone-induced expression of U19/Eaf2 tumor suppressor during the regrowth of LNCaP xenograft tumor in nude mice. *Prostate* 70:1575-1585

【非特許文献 2 6】Lapp CA1, Stachura ME, Tyler JM, Lee YS. 1987 GH3 cell secretion of growth hormone and prolactin increases spontaneously during perfusion. *In Vitro Cell Dev Biol* 23:686-90. 30

【非特許文献 2 7】Petrulis JR1, Perdew GH. 2002 The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem Biol Interact* 141:25-40.

【非特許文献 2 8】Aggarwal BB1, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Gupta SR, Tharakan ST, Koca C, Dey S, Sung B 2009 Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci* 1171:59-76

【非特許文献 2 9】Zhou C, Jiao Y, Wang R, Ren SG, Wawrowsky K, Melmed S 2015 STAT3 upregulation in pituitary somatotroph adenomas induces growth hormone hypersecretion. *J Clin Invest* 125:1692-70 40

【非特許文献 3 0】Theodoropoulou M, Tichomirowa MA, Sievers C, Yassouridis A, Arzberger T, Hougrand O, Deprez M, Daly AF, Petrossians P, Pagotto U, Beckers A, Sallalla GK 2009 Tumor ZAC1 expression is associated with the response to somatostatin analog therapy in patients with acromegaly. *Int J Cancer* 125:2122-2126

【非特許文献 3 1】Florio T, Yao H, Carey KD, Dillon TJ, Stork PJ 1999 Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via sstr 1 (SSTR1). *Mol Endocrinol* 13:24-37

【非特許文献 3 2】Busto R, Carrero I, Zapata P, Colas B, Prieto JC 2000 Multiple regulation of adenylyl cyclase activity by G-protein coupled receptors in human foetal lung fibroblasts. *Regul Pept* 95:53-58 50

【非特許文献 3 3】Grozensky-Glasberg S, Franchi G, Teng M, Leontiou CA, Ribeiro de Oliveira A, Dalino P, Salahuddin N, Korbonits M, Grossman AB 2008 Octreotide and the mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) block proliferation and interact with the Akt-mTOR-p70S6K pathway in a neuro-endocrine tumour cell line. *Neuroendocrinology* 87:168-181

【非特許文献 3 4】Barreca A, Cariola G, Ponzani P, Arvigo M, Foppiani L, Giordano G, Minuto F 1995 Effect of octreotide on circulating IGF-I chromatographic profile: evidence for an inhibitory action on the formation of the 150-kDa ternary complex. *Clin Endocrinol (Oxf)* 42:161-167

【非特許文献 3 5】Melmed S: Acromegaly pathogenesis and treatment *J Clin Invest.* 2009 Nov 2; 119(11): 3189-3202 10

【非特許文献 3 6】Fleffe S, Morange I et al. 2011 Diabetes in Acromegaly: prevalence, risk factors and evolution: data from French Acromegaly Registry. *Eur J Endocrinol* 164: 877-884

【非特許文献 3 7】Jenkins PJ1, Mukherjee A, Shalet SM. 2006 Does growth hormone cause cancer? *Clin Endocrinol (Oxf)* 64:115-21.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

そこで、本発明者らは、AIP遺伝子の機能をよりよく理解するために、GH3細胞株からCRISPR-Cas9システムを利用してAIP遺伝子の機能をノックアウトしたAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株を作製し、得られた細胞株の細胞増殖ならびにGH分泌の *in vitro*ならびに *in vivo*での性質を元のGH3細胞株の性質と比較して調べた。さらに、この細胞株を用いて、AIP不活性が細胞増殖とGH分泌に及ぼす影響についての機構を調べた結果、AIPの機能がノックアウトしたAIPノックアウト下垂体成長ホルモン (GH) 産生細胞株は、GH産生と細胞増殖が著しく増強していることを確認して、AIPノックアウト下垂体成長ホルモン (GH) 産生細胞株が樹立していることを見出して、本発明を完成した。したがって、本細胞株は、AIP遺伝子機能を分析するための研究モデルとしても有用である。 20

【0013】

したがって、本発明は、下垂体腫瘍細胞などの腫瘍細胞株GH3のAIP遺伝子がノックアウトされたAIPノックアウト下垂体成長ホルモン (GH) 産生細胞株などのAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株を提供することを目的とする。 30

【0014】

本発明の別の目的は、下垂体腫瘍などの腫瘍細胞株GH3からCRISPR-Cas9システムを利用してAIPノックアウト下垂体成長ホルモン (GH) 産生細胞株などのAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株を作製することからなるAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株の作製方法を提供することである。

【0015】

本発明のさらに別の目的は、AIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株を、下垂体腫瘍などの腫瘍モデル細胞株として使用することからなるAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株の使用方法を提供することを目的としている。 40

【0016】

なお、本明細書で使用する用語「ノックアウト」とは、各対立遺伝子配列の一部にフレームシフト変異が生じ、該遺伝子本来の機能が欠失していることを意味している。

【課題を解決するための手段】

【0017】

上記目的を達成するために、本発明は、ラットなどの下垂体腫瘍細胞株を含む腫瘍細胞株からAIP遺伝子をゲノム編集によりAIP遺伝子をノックアウトし、野生型AIP遺伝子の機能とは異なる機能を有するAIPノックアウト下垂体成長ホルモン (GH) 産生細胞株などのAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株を提供する。 50

## 【0018】

本発明は、この具体的態様として、AIP遺伝子のフレームシフト変異により生成される切断AIPタンパク質が、野生型AIPタンパク質（配列番号1：SEQ ID NO:1）のアミノ酸配列とは完全に異なり、配列番号2（SEQ ID NO:2）または配列番号3（SEQ ID NO:3）で表されるアミノ酸配列を有するAIPノックアウト成長ホルモン（GH）産生細胞株を提供する。

## 【0019】

また、本発明は、この具体的態様として、AIPノックアウト成長ホルモン（GH）産生細胞株が、腫瘍細胞株に比べて、高い成長ホルモン（GH）産生ならびに細胞増殖を有しているAIPノックアウト成長ホルモン（GH）産生細胞株を提供する。

10

## 【0020】

さらに、本発明は、この具体的態様として、AIPノックアウト成長ホルモン（GH）産生細胞株が、腫瘍細胞株に比べて、ソマトスタチン受容体タイプ2（Sstr 2）またはZAC1の発現が低下しているAIPノックアウト成長ホルモン（GH）産生細胞株を提供する。

## 【0021】

本発明はまた、ラット下垂体腫瘍細胞株などの下垂体腫瘍細胞株を含む腫瘍細胞株GH3からCRISPR-Cas9システムを利用してAIP遺伝子をノックアウトしたAIPノックアウト下垂体成長ホルモン（GH）産生細胞株AIPノックアウト下垂体成長ホルモン（GH）産生細胞株を作製することからなるAIPノックアウト成長ホルモン（GH）産生細胞株の作製方法を提供する。

20

## 【0022】

さらに、本発明は、AIPノックアウト成長ホルモン（GH）産生細胞株を、下垂体腫瘍などの腫瘍のモデル細胞株として使用することからなるAIPノックアウト成長ホルモン（GH）産生細胞株の使用方法を提供する。

## 【発明の効果】

## 【0023】

本発明に係るAIPノックアウト成長ホルモン（GH）産生細胞株は、AIP機能が不活性であることから、AIP遺伝子変異による下垂体腫瘍発生に関わる分子機構の究明、ひいては特に下垂体腫瘍に対する創薬ならびに予防、治療に有用である。

## 【0024】

また、マウスをホモ接合Aipノックアウトすることは致命的であることが知られていることから、本発明のGH3-FTY細胞株は下垂体由来Aipノックアウト細胞株の最初のモデルであるとしても有用である。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0025】

【図1】GH3-FTY細胞株のAip遺伝子のエクソン4における正常Aip（野生型）（A）ならびに変異Aip（B、C）のヌクレオチド配列を示す。なお、GH3-FTY細胞株には、c496 bp位にアデニンの挿入ならびにc496-497の塩基2個の欠失という複合ヘテロ接合変異がそれぞれ含まれていて、両Aipアレルのコードン173(TGA)とコードン172(TGA)にそれぞれ未成熟ストップコードンの素因となっている。

40

【図2】CRISPR-Cas9システムによって作製したAip破壊GH3クローンのスクリーニング結果を示す図。AはGH3細胞株のAipタンパク質ならびに変異GH3クローン1、2のウエスタンブロット図を示す。BおよびCはGh mRNAならびにPrI mRNAのActb mRNAに対する相対的発現量をそれぞれ示す。Dはクローン1のAip mRNA（GH3-FTY細胞株）のActb mRNAに対する相対的発現量を示す。なお\*\*P<0.01 vs. GH3である。

【図3】培養GH3細胞株（A）ならびにGH3-FTY細胞株のGh分泌量、外因性Aip発現前後のGh mRNA発現レベル（B、D）および細胞内cAMP量（C）を示す図。

【図4】GH3細胞株とGH3-FTY細胞株の細胞増殖ならびに有糸分裂機構についての比較を示す図。図中、\*P<0.05、\*\*P<0.01であり、n s = 有意差なし、を意味する。Aは培養24時間後ならびに48時間後のGH3細胞株とGH3-FTY細胞株の細胞数をそれぞれ示す。Bは24時間

50

ならびに48時間BrdUアッセイ結果を示す。Cはコントロールとしての外因性Aip (LV-Aip) またはGfp (LV-Gfp) のレンチウイルス (LV) 仲介強制発現の培養GH3-FTY細胞株の細胞増殖に対する効果を示す。なお、図中LV(-)はLV非感染GH3-FTY細胞株を示す。またLV(-)とLV-Gfpの間には統計学上の差異はなく、LV-GfpとLV-Aipとの間にだけ統計学上の差異が存在した。

【図5】培養GH3細胞株とGH3-FTY細胞株のStatならびにp-Stat3 (Tyr705) についてのウエスタンブロット解析図。図4AはStatならびにp-Stat3 (Tyr705) についてのウエスタンブロット解析図であり、図4B、Cは結果の統計学的評価を示す。図4Dはコントロールとしての外因性Gfp (LV-Gfp) またはAip (LV-Aip) のLV仲介強制発現のp-Stat3発現に対する効果を示す。図4Eは結果の統計学的評価を示す。

【図6】A、C、Fは、GH3細胞株とGH3-FTY細胞株のI16受容体(I16r)、Sstr2ならびにZac1のActb mRNAに対する各mRNA発現ラベルを示す図である。図5DはSstr2についてのウエスタンブロット解析図である。図3Dはソマトスタチンに対する感受性の比較を示す図である。B、E、Gはコントロールとしての外因性Gfp (LV-Gfp) またはAip (LV-Aip) のLV仲介強制発現のI16受容体(I16r)、Sstr2ならびにZac1発現に対する効果を示す。図中、NDは非検出、\*\* $p < 0.01$ 、ns = 有意差なし。

【図7】GH3細胞株を移植したマウス (GH3マウス) またはGH3-FTY細胞株を移植したマウス (GH3-FTYマウス) の腫瘍を分析した図。Aは移植8週間後の腫瘍容量、Bは移植8週間後の腫瘍重量を示す。Cは、接種4週間後、ならびにDは8週間後のHE染色によるGH3マウスおよびGH3-FTYマウスのソマトトロフ細胞腫瘍の典型的な細胞組織図。C下段は、移植4週間後のGH3マウスおよびGH3-FTYマウスのソマトトロフ細胞腫瘍をGh染色またはDAPIで染色し免疫蛍光法による観察図。EはKi67スコアを統計学的に比較した図。図中、\* $p < 0.05$ 、ns = 有意差なし。

【図8】コントロールマウス、GH3マウスおよびGH3-FTYマウスの血漿GHレベル (A)、血漿IGF-1レベル (B) ならびに実際の表現型 (C) を示す図。

【図9】コントロールマウス、GH3マウスおよびGH3-FTYマウスの体重 (A)、体長 (B) ならびに肝重量 (C) を示す図。Aにおいて、体重は経時的に測定した。なお、体重は、コントロールマウスとGH3-FTYマウスとの間では移植46日目から有意差のある差異が認められたが、コントロールマウスとGH3マウスとの間では有意的な差異は認められなかった。図中、\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、ns = 有意差なし。図8B、8Cは、コントロールマウス、GH3マウスおよびGH3-FTYマウスに移植8週間後の体長と肝重量の比較である。

【図10】コントロールマウス、GH3マウスおよびGH3-FTYマウスの移植後のグルコース代謝を示す図。Aは血糖値、Bは血糖のAUC、Cは血漿インスリン値、Dは血漿インスリン値のAUCのそれぞれの変化を示す。図EはITT後の血糖の変化を示す。なお、ipGTT後の血漿インスリンレベルのAUCは移植6週間後、またITT後の血糖レベルの変化は移植後7週間後に測定した。図中、GH3-FTYマウスとコントロールマウスとの間では\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、またGH3-FTYマウスとGH3マウスとの間では# $p < 0.05$ 。有意差なし。

【図11】図10はGH3-FTY細胞株のエクソン4のヌクレオチド配列並びにAipタンパク質の概要図を示す図である。AはGH3-FTY細胞株のエクソン4の正常 (野生型) Aip遺伝子ならびに変異Aip遺伝子のヌクレオチド配列である。GH3-FTY細胞株の両方のアレルには、c496にアデニン挿入、またc496-497に2塩基欠失がそれぞれ存在する複合ヘテロ変異が含まれていて、それぞれ未成熟ストップコドン173(TGA)ならびにコドン172(TGA)が形成される。Bは、GH3細胞株の野生型Aip構造ならびにGH3-FTY細胞株の変異Aip構造の概要図。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明に係るAIPノックアウト成長ホルモン (GH) 産生細胞株 (以下、「GH3-FTY細胞株」ともいう) は、下垂体腫瘍などの腫瘍細胞株 (以下、「GH3細胞株」ともいう) をゲノム編集 (CRISPR-Cas9システム) によりAIP遺伝子をノックアウトして作製することができる。

【0027】

10

20

30

40

50

本発明において使用する腫瘍細胞株GH3としては、ラット下垂体由来のGH3細胞株を使用した。ラット以外のマウスなどの下垂体由来GH3細胞株も同様に使用することができる。また下垂体由来腫瘍以外の腫瘍も使用することができる。なお、本発明の実験に使用するラットGH3細胞株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)などの公的寄託機関から入手することができる。

**【0028】**

本発明において、ラット下垂体腫瘍細胞株GH3からAIP遺伝子をノックアウトする方法としては、CRISPR-Cas9システムによるゲノム編集が好ましいが、その他のゲノム編集や遺伝子改変方法も利用することができる。

**【0029】**

本発明に係るGH3-FTY細胞株は、CRISPR-Cas9システムを利用して、GH3細胞株からAip遺伝子機能をノックアウトしたAipノックアウト成長ホルモン(GH)産生細胞株である。このGH3-FTY細胞株には、フレームシフト変異の素因となり、173位と172位に未成熟ストップコドン形成する複合ヘテロ変異が含まれていて、産生される切断(truncated)Aipタンパク質は、野生型Aipとはそのアミノ酸配列が完全に異なり、またTPRドメインと、Aipの生物活性に必要と報告(非特許文献27)されている最終の5個のカルボキシル基が欠失している。また本発明のGH3-FTY細胞株では、GH3細胞株と比べて、Aip mRNAがほとんど発現していない。そのうえ、このタンパク質は、AipのN末端領域のFKBPドメインを主に認識する抗AIP抗体を用いたウエスタンブロット分析では免疫学的には未検出であった。これらの結果から、これらの変異遺伝子は転写率が低く、また翻訳されたとしても得られた切断タンパク質の安定性が低いことが示唆される。

**【0030】**

本発明のGH3-FTY細胞株は、GH3細胞株に比べて、Gh分泌が20倍から43倍という劇的に増加している。なお、GH3細胞株は基礎Gh分泌とGh/PrI分泌比が変動し不安定であることはすでに報告した(非特許文献26)。このことは、GH3細胞株が均質な細胞クローンではないことから部分的には説明できる(非特許文献21、26)。しかしながら、このようなGH3細胞株の不安定な要素が本発明の結果にある程度反映されているとしても、このGH3-FTY細胞株の強力なGh分泌能は、以前報告されたGH3細胞株の分泌能をはるかに凌ぐものであり(ほぼ2倍から6倍)(非特許文献26)、実際担がん動物モデルにおける非常に強力に安定した生物学的活性の基になっている。なお、GH3-FTY細胞株は、GH3細胞株の単一細胞からCRISPR-Cas9システムによるゲノム編集によって作製されていることから、実際に均質な細胞クローンと考えられる。

**【0031】**

本発明のGH3-FTY細胞株の細胞増殖能はGH3細胞株の細胞増殖能と大して差はないが、GH3-FTY細胞株は、GH3細胞株に比べて、BrdUアッセイではDNA合成が有意に増加している。これは、GH3-FTY細胞株の細胞サイクル分析においてG1相に相対するS相が増加するという知見によっても裏付けされている。またサブG1相が変化していないことは、細胞成長機構において細胞アポトーシスの抑制が関与していないことを示している。重要なことは、GH3-FTY細胞株に対するレンチウイルスを用いた強制発現では、Gh mRNA発現の増加が一部逆転され、また細胞増殖と細胞サイクルプロファイルがほぼ完全に逆転されることである。このGH合成増加が一部逆転する正確な理由はまだ明らかではないけれども、外因性Aipの発現レベルが十分ではないか、またはGH3細胞株のGH分泌が不均一もしくは変動することに起因している可能性がある。しかしながら、本発明においては、GH産生細胞のAip機能を完全に欠損させることにより、GH分泌と細胞増殖が増加する。

**【0032】**

ところで、マウスをホモ接合Aipノックアウトすることは致命的であることが知られているので、内因性Aip機能をこれまでin vivoで確認することは困難であった。なお、Aipノックアウトマウス胎芽繊維芽細胞(MEF)が実験用として入手できるけれども(非特許文献13)、本発明のGH3-FTY細胞株はAipノックアウト下垂体細胞株の最初のモデルとして有用である。

10

20

30

40

50

## 【0033】

また、GH分泌増加には、本発明のGH3-FTY細胞株によるcAMP産生がGH3細胞株に比べて増加していることが関与しているとの知見がある。この知見は、以前報告したように、AipノックアウトMEFまたはAip発現抑制（サイレンス）GH3細胞においてcAMP産生が増加するということが裏付けされている（非特許文献13）。

## 【0034】

11-6受容体等のタイプIサイトカイン受容体ファミリーはリガンドと結合してJanus kinase 2 (Jak2) を活性化するとともに、Tyr705でのリン酸化によってStat3を活性化する。活性化されたリン酸化Stat3 (p-Stat3) はホモ二量化と核内移行を受け、ターゲット遺伝子の転写規制を受けて細胞増殖、生存ならびに分化を調節する（非特許文献28）。下垂体ソマトトロフ腫瘍におけるSTAT3アップレギュレーションはGH過分泌と関連があるとの最近の報告がある（非特許文献29）。本発明においては、GH3-FTY細胞株は、GHがStat3リン酸化ならびに核転位を惹起し、このことがソマトトロフ腫瘍細胞におけるStat3とGH間の自己調節的陽性フィードバックループの存在を示唆している（非特許文献29）。しかしながら、Aipがこの現象に関与しているかどうかは明らかではないが、興味深いことは、本発明によって、Aipが欠損しているGH3-FTY細胞株は、Stat3の発現レベルが安定しているにもかかわらず、GH3細胞株に比べてp-Stat3が有意に増加していることである。そのうえ、レンチウイルス仲介Aip強制発現がこの現象を部分的であるが明らかに逆転している。これらの結果は、GH3細胞株のStat3活性化は、少なくとも部分的には、Aipによって仲介されていることを示唆している。したがって、Stat3とGH間の自己調節的陽性フィードバックループは、GH3細胞株よりもGH3-FTY細胞株の方がより増強されうる。

10

20

## 【0035】

ソマトスタチンに対する感受性は、GH3-FTY細胞株の方がGH3細胞株よりも低い。ソマトスタチン同族体であるオクトレオチド (octreotide) の抗増殖効果は、ZAC1発現のアップレギュレーションと関連していることが示唆されている（非特許文献16）、これはIGF-I応答と腫瘍退縮に関連していることが示されている（非特許文献30）。AIP発現が減少している下垂体腫瘍ではしばしば第一世代のソマトスタチン同族体に対して抵抗性があることが報告されている（非特許文献10、15）。しかしながら、AIP発現低下がAIP不活性と実際に関連しているかどうかは明らかではない。さらに、AIP不活性がSSTR2発現低下と関連しているかどうかは明らかではない。また、AIP変異の有無にかかわらず、SSTR2染色は下垂体ソマトトロフ腫瘍において減少しなかったとの報告がある（非特許文献3、16）。しかしながら、本発明では、GH3-FTY細胞株はGH3細胞株に比べてSstr2発現もZac1発現も低下している。つまり、Aipの不活性はZac1をダウンレギュレートできるが（非特許文献16）、Sstr2も調節できる。ソマトスタチンの抗分泌ならびに抗増殖効果はいくつかの回路を介して生じている。Sstr2を介するソマトスタチンの直接の効果としては、MAPKカスケードを変調し、チロシン/セリンホスファターゼを活性化し、アデニレートサイクラゼ (adenylate cyclase) を阻害することがある（非特許文献31-33）。間接的な効果としては、IGF-I、IGF-II、IGF結合タンパク3などの成長促進因子の放出が上げられる（非特許文献34）。したがって、GH3-FTY細胞株のソマトスタチンに対する感受性についてはその他の可能性もあるかもしれないことは留意しておくべきである。

30

40

## 【0036】

本発明のGH3-FTY細胞株の生物学的機能はGH3-FTY細胞株をヌードマウスに接種することによってin vivoで調べた。成長ホルモン (GH) は、STAT5b仲介シグナル伝達を介する肝臓を含めた身体の成長を促進し、またこの効果はSTAT5bによって仲介されることが報告されている（非特許文献35）。GH3-FTY接種担がんマウス（以下、「GH3-FTYマウス」ともいう）からのGH分泌がGH3接種担がんマウス（以下、「GH3マウス」ともいう）からの分泌より5倍も高いにもかかわらず、GH3-FTYマウスの体重は接種46日目から増加した ( $P < 0.05$  vsコントロールまたはGH3マウス)。種々の臓器もおそらく時間が経過すると増大すると考えられる。しかしながら、GH3マウスの体重は観察期間中コントロールマウスと比べてそんなには増加していない。またGH3-FTYマウスの体長や肝重量は接種8週間後にGH3マ

50

ウスより増大した。

【0037】

GH3-FTYマウスがGH3マウスよりも高い生物学的 *in vivo* 機能を有していることはグルコース代謝の評価によって確認した。接種6週間目を実施したグルコース負荷試験(GTT)によると、GH3-FTYマウスモデルのグルコース耐性はGH3マウスモデルとほとんど同等であった。しかしながら、GH3-FTYマウスの高インスリン血症はGH3マウスよりも明らかに重症であった。ただし、GH3-FTYマウスとGH3マウスのグルコース耐性がコントロールマウスに比べて良好であったことは予想外であった。しかしながら、接種7週間後に行ったインスリン負荷試験(ITT)の知見では、GH3-FTYマウスのインスリン抵抗性はGH3マウスならびにコントロールマウスに比べて明らかに高かった。これらの結果は、Ghの過分泌によって生じられたインスリン抵抗と関連するグルコース耐性の時間依存的変化を反映していると言える。また、Igf-1同時過分泌はインスリン感受性を改善することによりグルコース耐性を調節することもできる。これら2種類のマウスモデルは、GH過分泌による糖尿病に対するインスリン抵抗性から発生プロセスを調べるのに非常に有用である(非特許文献35、36)。

10

【0038】

また、GH3-FTYマウスの平均腫瘍サイズはGH3マウスよりも大きい。これはGH3-FTY細胞株の細胞増殖能が増加したことによるといえる。他の可能性としては、腫瘍から大量に分泌され循環しているGhやIgf-1によって腫瘍が自己分泌的に刺激されるからと考えられる。培養した腫瘍ならびに接種した腫瘍のGH3-FTY細胞株は、GH3細胞株よりも、N/C比が相対的に高いとか、多形核の発生頻度が高いとか、Ki67スコアが増加しているなどの有糸分裂的特性をより多く示している。

20

【0039】

かかる変化は、GH-IGF-1システムがマイトゲン活性化タンパク質(MAP)キナーゼシグナル伝達回路ならびに抗アポトーシス回路によって優先的に媒介される細胞増殖を促進することから、GH-IGF-1システムの継続的過分泌の腫瘍発生に対する効果にいくらか関連していると考えられる(非特許文献37)。しかしながら、Aipの崩壊は、腫瘍抑制遺伝子としてのAIPの機能から判断される本発明による知見に非常に関連していると考えられる(非特許文献3、11-14)。

【0040】

つまり、本発明は、内因性AipがCRISPR-Cas9システムによって完全に破壊されているGH3-FTY細胞株を樹立した。本発明のGH3-FTY細胞株においては、Aip不活性化がGH3-FTY細胞株のStat3活性化を親GH3細胞株よりも増加し、それによりソマトトロフ細胞のがん化機能を促進している。Sstr2の発現抑制がAip不活性化ソマトトロフ細胞のソマトスタチンに対する感受性を低下することを一部説明している。本発明のGH3-FTY細胞株は、Aip不活性化がソマトトロフ腫瘍発生ならびに自律的GH分泌を促進するかどうかを説明するための有用なモデルである。その上、本発明のGH3-FTY細胞株は末端巨大症の革新的創薬のスクリーニングにも有用であることから、末端巨大症の特性についてGH3-FTYマウスを詳細に研究することは非常に興味をもたれるところである。

30

【0041】

以下、本発明を、実施例によりさらに具体的に説明するが、以下の実施例は本発明をさらに具体的に説明するだけであって、本発明を限定する意図は一切ないものと理解すべきである。

40

【実施例1】

【0042】

まず、ラット下垂体腫瘍細胞株GH3のAip遺伝子の各エクソンとスプライシングサイトを含む領域について遺伝子配列を解析した。GH3細胞株はATCC社より購入し、15%ウマ血清および2.5%ウシ胎児血清を含むF-12K培地(Life Technologies)にて培養した。GH3細胞株よりWizard genomic DNA purification kit(Promega)を用いてゲノムDNAを抽出し、KOD FX(TOYOBO)を用いてラットAip遺伝子の隣接イントロンのスプライシングサイトを含む

50

各エクソンをPCR法にて増幅した。表 1 に示すプライマーを用いてシーケンスして配列を決定し、ラットAip cDNA (NM\_172327.2) と比較した。その結果、GH3細胞株のAip遺伝子の配列は、ラット Aip cDNA (NM\_172327.2) と一致し、遺伝子変異は認められなかった。

【 0 0 4 3 】

【 表 1 】

#	Target	Sense	Antisense
1	<i>Aip</i> exon1	AACCAATCACGGCTCTTTCC	TGACTAGCAGCTGCGCTT
2	<i>Aip</i> exon2	ACTGAGATGATGGGATAGAGCC	CCTGAGGATCAGACATAGAGCA
3	<i>Aip</i> exon3	CTTCTCTTGTGCCAGTGAG	GTCAAGGTGGTGATCAGTGAG
4	<i>Aip</i> exon4	TGAGAGACAAGTGGTCAGGG	GGACAGTGGAGACGATGAGA
5	<i>Aip</i> exon5	GCTGCTGCCAAGTACTACGA	TCAACTGAGGGAGATGTTAAAGC
6	<i>Aip</i> exon6	ATGGTGGGCTAGTGCCAGA	CCACTGACTACCAAGCACCTG
7	<i>growth hormone1 (Gh1)</i>	CCTTGTCAGTCTGTTTGCCAAT	CTGGGATGGTCTCTGAGAAGCAG
8	<i>ploractin (PrI)</i>	CCAAGATCGTGAGTTTATTGCCAAG	TCCAGGAGTGCACCAAAGTGA
9	<i>aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein (Aip)</i>	CATTGCCTGCCTCAAGAACC	CCGCTTGAAGTAAGCCTTGACA
10	<i>interleukin 6 receptor (Il6r)</i>	TCGTTTCAGTTCGCACAGGTGTA	CTGGTAAGGATGACCCAAGGATG
11	<i>somatostatin receptor 2 (Sstr2)</i>	GAAAGCAGCTACCCGGCAGA	GATTACATAGCGGGCAAGCACAC
12	<i>pleiomorphic adenoma gene-like 1 (Plagl1)</i>	CTTTGAAGACTCTGTATTTCCAGCA	GTCTTCAAGGGTTAGGGTACAAATG
13	<i>actin, beta (Actb)</i>	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	GACTCATCGTACTCTGCTTGCTG

No. 1-6 were used for the sequence of *Aip* gene. No. 7-13 were used for qPCR to determine the mRNA expression level of respective gene.

【 実施例 2 】

【 0 0 4 4 】

本実施例ではラット下垂体腫瘍細胞株GH3からゲノム編集のCRISPR-Cas9システムを用いてGH3細胞株のAIP遺伝子をノックアウトしてAIPノックアウトGH産生細胞株 (GH3-FTY) を作製した。

【 0 0 4 5 】

GH3細胞株からAip遺伝子をノックアウトするために、Aip遺伝子ノックアウト用オールインワンプラスミドであるGeneArt CRISPR Nuclease Vector Kit (Life technologies) をキットのプロトコルに従って使用した。このプラスミドには、遺伝子切断酵素Cas9をコードする遺伝子および遺伝子導入細胞を選別するためのマーカーCD4遺伝子が含まれている。Proto-spacer adjacent motif (PAM) はラットAip cDNA (NM\_172327.2) のc.490-492、ターゲット配列はc.493-512の20塩基とした。またTop strandとして5'-TGCCCATGGGTC TGCTGTTTT-3', Bottom strandとして5'-AGCAGGACCCATGGGCACGGTG-3' を合成し、アニー

リングした。アニーリングした2本鎖DNAをCRISPR Nuclease Vectorに組み込み、作製したCRISPR Nuclease Vector plasmidコンストラクトをGH3細胞株にAmaxa Cell Line Nucleofector (Lonza)を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入から2日後、抗CD4抗体 (Milteni Biotec)を用いてCD4陽性細胞を選別し、選別したCD4陽性細胞を96ウェルプレートの各ウェルに1細胞ずつ播種し培養した。細胞増殖後、各細胞クローンよりゲノムDNAを抽出し、Aipのエクソン4領域をPCRにて増幅し、直接シーケンスして解析した。ターゲットクロンのAipのゲノムシーケンスを行って、本発明に使用したGH3細胞株のエクソン-イントロン領域を含む他のエクソン配列は、ラットAip cDNA (NM172327.2)と完全に相同性を示し、かつ何ら変異を有しないことを確認した。

#### 【0046】

上記GH3細胞株をCRISPR-Cas9システムにてゲノム編集することにより2個のGH3細胞クローンが同定された。これらのクローンには両アレルの複合ヘテロ変異 (compound heterozygous mutations) が含まれていて、未成熟末端コドンが導入され、切断 (truncated) Aipタンパク質が生成される。得られた2個の細胞クローン、つまりクローン1ならびにクローン2には、野生型Aipを含むGH3細胞株の推定分子量37 kDaに対応するバンドは検出されなかった (図1A)。このように、得られた細胞クローンにおいては、Aip遺伝子が遺伝的に崩壊し、かつ、Aipタンパク質が完全に消失していた。

#### 【0047】

両クローンを定量的PCRすると、両クローンはGH合成ならびにPRL合成に関しては同一の表現型を示していない (図1B、1C)。このことは、おそらく、GH3細胞株では細胞が均一でないためであると考えられる (非特許文献21、26)。さらに、2個の細胞クローンのうち、1個のクローン (クローン1) だけが、GH3細胞株と比較して、GH合成が7.3倍、またPRL合成が1.3倍ほど増加していた。このクローン1 (以下、「GH3-FTY細胞株」ともいう) はソマトトロフ細胞株であり、もう一方の細胞クローン (クローン2) は、PRL合成がGH3細胞株よりも3.2倍高いレベルを示したけれども、GH合成については僅かに0.2倍であった。このことからクローン2はよりラクトロフ細胞株であることを表している。

#### 【0048】

本発明において、クローン1 (GH3-FTY細胞株) のAip遺伝子配列ならびにアミノ酸配列は図1、11に示す通りである。クローン1 (GH3-FTY細胞株) には複合ヘテロフレームシフト変異が含まれている。つまり、両アレルにはc496にアデニン挿入によりコドン173 (TGA) が形成され、またc.496-497に2塩基欠失によりコドン172 (TGA) が形成される (図1、11A)。

#### 【0049】

クローン1 (GH3-FTY細胞株) の切断Aipタンパク質は、GH3細胞株の野生型Aipとは完全に異なるアミノ酸配列 (165アミノ酸 (AA) から172AAまでと、164AAから171AAまで) を有している (図1、11A)。また、両タンパク質ではTPR部位が完全に欠如している (図11B)。興味深いことには、クローン1 (GH3-FTY細胞株) の変異Aipは、その相対mRNA発現レベルがGH3細胞株に比べて極端に低かった ( $p < 0.01$ ) (図2D)。このことはこれらの遺伝子由来のmRNAの安定性もまた低下していることを示唆している。

#### 【0050】

他方、クローン2は、クローン1同様、一方のアレルのc496にアデニン挿入、他方のアレルのc497にグアニン欠失がある複合ヘテロ変異を有し、最終的に174位にストップコドンが形成される。

#### 【0051】

上述したように、本発明のGH3-FTY細胞株 (クローン1) は、Aipの機能が欠失しているとともに、フレームシフト変異の素因となる複合ヘテロ変異を含んでいて、173位と172位に未成熟ストップコドンを形成する。その切断 (truncated) Aipタンパク質は、野生型Aipとはそのアミノ酸配列が完全に異なり、またTPRドメインと、Aipの生物活性に必要と非特許文献27で報告されている最後の5個のカルボキシル基が欠失している。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 2 】

また、上述したように、GH3-FTY細胞株（クローン1）は、GH3細胞株と比べて、Aip mRNAをほとんど発現していない（図2D）。そのうえ、この切断タンパク質は、AipのN末端領域のFKBPドメインを主に認識する抗Aip抗体を用いたウエスタンブロット分析では免疫学的に未検出であった（図2A）。これらの結果から、これらの変異遺伝子は転写率が低く、また翻訳されたとしても得られる切断タンパク質の安定性が低いことを示唆している。

## 【 実施例 3 】

## 【 0 0 5 3 】

本実施例では、GH3-FTY細胞株ならびにGH3細胞株のAip、Gh、Prl、ソマトスタチン受容体タイプ2（Sstr2）、Zac-1、Il-6受容体（Il6r）ならびにグリコプロテイン130（gp130）のmRNAレベルについて定量的PCRで評価した。

10

## 【 0 0 5 4 】

GH3-FTY細胞株ならびにGH3細胞株をそれぞれ24ウエルプレートの各ウエルに細胞を $2 \times 10^5$ 個ずつ播種し（ $n=3$ ）、24時間後にRNeasy Kit（QIAGEN）を用いて全RNAを調製した。全RNA（1 $\mu$ g）からcDNAをQuantiTect Reverse Transcription Kit（QIAGEN）を用いて調製し、Light Cycler 2.0（Roche）およびSYBR Premix Ex Taq II（TAKARA BIO）を用いて常法に従って定量的RT-PCRを行った。PCR条件は実験に対応して適宜調整した。

## 【 0 0 5 5 】

各遺伝子mRNAの内部コントロールActb（ $\beta$ -アクチン）に対する相対発現量はCt法にて算出した。また、Aipの強制発現はレンチウイルス仲介法（lentivirus-mediated method）を用いて実施した。この方法は、合成ラットAip cDNA（Eurofins Genomics Co., Ltd.）をレンチウイルスベクタープラスミド（CSII-EF-IRES2-Venus）（RIKEN BRC）中に構築し、pCAG-HIV-g/p-プラスミドならびにpCMV-VSV-G-RSV-Revプラスミドと一緒に293T細胞中に形質移入した。ラットAip cDNAがそのままの配列を保持していることはシーケンシングによって確認した。

20

## 【 0 0 5 6 】

外因性AipがGH3-FTY細胞で観察される現象を逆転するかどうかを調べるために、GH3細胞ならびにGH3-FTY細胞を培養し、コントロールとしてラットAip cDNA（LV-Aip）またはGfp cDNA（LV-Gfp）を含むレンチウイルスで感染させた。ウイルス感染は感染多重度（MOI）25で行った。

30

## 【 0 0 5 7 】

本発明のGH3-FTY細胞株の成長ホルモン（GH）分泌量はきわめて多く、GH3細胞株のGH分泌量よりも20～43倍であった（図3A； $P<0.01$ ）。また、GH3-FTY細胞株のGh mRNAレベルはGH3細胞株よりも7.3～25倍であった（図3B； $P<0.01$ ）。GH3-FTY細胞株のcAMPレベルはGH3細胞株よりも統計学上有意差があるように高かった（図3C）。重要なことは、GH3-FTY細胞株のGh mRNA増加がレンチウイルス（LV）仲介外因性Aipによって阻害されるのに対し（ $P<0.01$ ）、GH3細胞株ではGh mRNAに変化がなかったことである。このことは内因性Aip機能がGH3-FTY細胞株では破壊されていることが示唆されているからである（図3D）。

40

## 【 0 0 5 8 】

cAMP濃度の測定は、GH3細胞株またはGH3-FTY細胞株を24ウエルプレートの各ウエルに細胞密度が $2 \times 10^5$ 個になるように播種し24時間培養した後、培地を吸引し、溶菌バッファを添加し、細胞内cAMP濃度（[cAMP]<sub>i</sub>）をCyclic AMP Select EIA Kit（Cayman Chemical）を製造者のプロトコルに従って用いて測定した。

## 【 実施例 4 】

## 【 0 0 5 9 】

GH3-FTY細胞株またはGH3細胞株を24ウエルプレートの各ウエルに細胞密度が $2 \times 10^5$ 個の細胞になるように播種し、デキストランコートチャコールでそれぞれ処理した15%ウマ血清と2.5%ウシ胎児血清を含む1 mlのF-12K培地で培養した。培養24時間後、培養培地を回

50

収し、GH濃度をGrowth Hormone Rat EIA Kit (Bertin Pharma) で測定し、RNA含量で算出した。全RNAを抽出し、その含量を分光光度法で吸光度260nmを測定した。GH3-FTY細胞株からのGH分泌ならびにPRL分泌をGH3細胞株に比較して倍数で表示した。また、GH3-FTY細胞株におけるActb ( -actin) に対するGh mRNAならびにPrI mRNAの発現レベルを定量的PCRで測定し、GH3細胞株と比較した。

【実施例 5】

【0060】

本実施例では、GH3-FTY細胞株ならびにGH3細胞株の細胞増殖について調べた。細胞増殖は、GH3-FTY細胞株ならびにGH3細胞株を96ウエルプレートに各ウエルの細胞密度が $1 \times 10^4$ 個になるようにそれぞれ播種し (  $n = 3$  )、播種後0時間、24時間ならびに48時間後の細胞数をCell Counting Kit-8 ( 同人堂 ) で測定した。各時点での測定値は実験開始時 ( 0時間 ) の細胞数を基準として算出した。

10

【0061】

また、GH3細胞株ならびにGH3-FTY細胞株の増殖を評価するために、BrdU アッセイをBrdU Cell Proliferation ELISA Kit ( Abcam ) を用いてキットのプロトコルに従って行った。このBrdUアッセイは、GH3-FTY細胞株またはGH3細胞株を、完全培地を加えた96ウエルプレートの各ウエルに $1 \times 10^4$ 個ずつ注入し、BrdU溶液 ( 10 mmol/L ) を刺激の最終2時間に添加した。培養後の後処理は製造者のプロトコルに従って行い、試料の吸光度450-620 nmをマイクロプレートリーダーで測定した。

20

【0062】

本発明のGH3-FTY細胞株の培養24時間後ならびに48時間後の細胞増殖率はGH3細胞株に比べて有意に高い値を示した ( 図 4 A )。GH3-FTY細胞株の細胞増殖率がGH3細胞株に比べて有意に高いことはBrdUアッセイで確認した ( 図 4 B ;  $P < 0.01$  )。

【実施例 6】

【0063】

本実施例では、GH3-FTY細胞株とGH3細胞株の細胞周期プロフィールとアポトーシスについて評価した。細胞サイクルプロフィールはフローサイトメトリーで測定した ( 非特許文献 24 )。GH3細胞株ならびにGH3-FTY細胞株を無血清培地で24時間培養した後、血清含有培地でさらに24時間培養するか、または無血清培地で48時間培養した。細胞核をCyclet est Plus DNA Reagent Kit ( BD Biosciences, Tokyo ) で染色し、プロビジウムヨーダの蛍光をFACSVerse ( BD Biosciences ) で分析した。各試料には、G0/G1、SならびにG2/M分画測定のために $2 \times 10^4$ 個の細胞が含まれていた。またアポトーシスはサブG1分画の存在に基づいて決定した。

30

【0064】

上記の細胞周期分析により、GH3-FTY細胞では、血清刺激が存在しない場合でも、GH3細胞に対応するS相が増加し、この傾向は血清刺激が存在する場合はより明白であった。血清不在の場合は、GH3細胞株はG1相が停止している状態であった ( 表 2 )。また、アポトーシス細胞分画であるサブG1分画はGH3-FTY細胞にもGH3細胞にもいずれの条件下でも観察されなかった。

40

【0065】

【表 2】

	serum	G1 (%)	S (%)	G2 (%)
GH3	+	59.0	29.0	13.8
	-	84.6	17.7	9.58
GH3-FTY	+	47.0	34.7	12.2
	-	58.0	25.9	10.5

【実施例 7】

50

## 【 0 0 6 6 】

実施例 3 と同様にして、GH3-FTY細胞の細胞増殖増加をレンチウイルス (LV) 仲介法で調べた。その結果、GH3-FTY細胞の細胞増殖増加はAipのレンチウイルス (LV) 仲介発現によって有意に逆転されるのに対して、コントロールであるGfpのLV仲介発現によっては変化しなかったことである (図 4 C)。

## 【 実施例 8 】

## 【 0 0 6 7 】

本実施例では、GH3-FTY細胞株ならびにGH3細胞株の細胞増殖とソマトスタチンに対する感受性との関連を調べた。その結果、ソマトスタチンはGH3-FTY細胞株ならびにGH3細胞株の細胞増殖を用量依存的に抑制した (図 4 D)。またGH3-FTY細胞株はGH3細胞株に比べて細胞増殖抑制に関連するソマトスタチンに対する感受性が低かった (図 4 D)。

10

## 【 実施例 9 】

## 【 0 0 6 8 】

本実施例では、GH3-FTY細胞株の細胞増殖機構を調べるために、Aip、シグナルトランスデューサー/アクチベータートランスクリプション 3 (Signal transducer and activator of transcription 3: Stat3)、リン酸化Stat3 Y705 (p-Stat3 Y705) ならびに - アクチンのタンパク質の発現レベルをウエスタンブロット解析で調べた (図 5 参照)。GH3細胞株ならびにGH3-FTY細胞株をそれぞれ48時間培養し、細胞ライセートをRIPAバッファー (Sigma-Aldrich) に添加し沈殿した。全タンパク質 (15-20 g) をSDS-PAGEにより電気泳動し、PVDFイムノブロットメンブレン (BIO-RAD) に転写した。次いで、このメンブレンを下述する一次抗体と培養した後、HRP結合抗マウスIgG二次抗体 (Cell Signaling Technology Japan KK) と培養した。Aipタンパク質はECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて検出した。Aipに対する一次抗体はNovus Biological、p-Stat3 Y705ならびにStat3に対する一次抗体はCell Signaling Technology Japan KK から入手した。抗GHRに対する抗体はSanta Cruz Biotechnology、抗 - アクチンに対する抗体はSigma-Aldrich Japanから入手した。これらの抗体はキットのプロトコルに従って適切に希釈して使用した。

20

## 【 0 0 6 9 】

GH3-FTY細胞株の細胞増殖機構を調べたウエスタンブロット解析の結果、GH3細胞株とGH3-FTY細胞株の間ではStat3の発現には変化は見られなかったけれども、GH3-FTY細胞のp-Stat3 (Y705) はGH3細胞に比べて有意な増加が認められた (図 5 A)。重要なことは、GH3-FTY細胞におけるアップレギュレートしたp-Stat3は外因性AipのLV仲介強制発現により逆転することである (図 5 B)。

30

## 【 実施例 10 】

## 【 0 0 7 0 】

Stat3の上流受容体の1つである116受容体 (116r) ならびにその集成分のmRNA発現を定量的PCRで調べた結果、興味深いことに、GH3-FTY細胞は、116rのmRNAがGH3細胞に比べてアップレギュレートされ (図 6 A)、それらの増加が外因性AipのLV仲介強制発現により逆転される (図 6 B)。

## 【 0 0 7 1 】

また、GH3-FTY細胞株においては、GH3細胞株に比べてSstr2 mRNA発現レベルが定量的PCRによって劇的に低下していた (図 6 E)。この知見は、GH3-FTY細胞株は、GH3細胞株に比べて、細胞増殖の発現においてソマトスタチンに対する感受性が低いとの図 4 Dに示した結果の裏付けにもなっている。

40

## 【 0 0 7 2 】

さらに、GH3-FTY細胞株においては、おそらくGH産生細胞の増殖抑制やGH分泌抑制に関与する因子 (非特許文献 16) であるZac1のmRNA発現量がGH3細胞株に比べて有意に低下した (図 6 F)。

## 【 0 0 7 3 】

上記の知見から、GH3-FTY細胞株は、Sstr2ならびにZac-1の発現低下に関連してソマト

50

スタチンに対する感受性が低下した。

【実施例 1 1】

【0074】

本実施例では、実施例1で作製したGH3-FTY細胞株をヌードマウス皮下に接種しGH3-FTY担がんマウス（以下、「GH3-FTYマウス」ともいう）を作製し、GH3細胞株を接種した担がんマウス（以下、「GH3マウス」ともいう）と比較検討した。なお、本発明で使用した全ての動物実験プロトコルは福岡大学動物取扱使用委員会の承認されている。

【0075】

担がんマウスは、 $5 \times 10^5$ 個のGH3-FTY細胞またはGH3細胞をF-12K培地0.5 mlに懸濁し、ヌードマウス（5週齢、オス、BALB/c-nu、日本チャールズリバー）に皮下接種した(n=8)。対照マウスには、上記ヌードマウスにF-12K培地0.5 mlを皮下接種した(n=5)。マウスは通常食、通常飲水にて飼育し、週2回体重を測定した。担がんマウスは、その接種部位にソマトトロフ細胞腫瘍が形成された。接種8週後にマウス体長、肝重量、腫瘍重量および腫瘍体積を調べた。

10

【0076】

マウス体重は、飼育期間を通じて対照群とGH3群では体重差を認めなかったが、GH3-FTY群は、対照群ならびにGH3群と比較して接種後46日より有意な体重増加を示した。コントロールマウス、GH3マウスならびにGH3-FTYマウスの平均体重はそれぞれ28.8 +/- 2.3 g、30.8 +/- 3.0 gならびに35.3 +/- 5.3 gであった（図9A；P<0.05；GH3-FTY vs. controlまたはGH3）。

20

【0077】

マウスの体長は、小動物用X線CTスキャナSkyscan1178 (Brunker Corporation) を用いCT画像より算出した。接種後8週のGH3-FTY群マウスの体長は対照群ならびにGH3群と比較し有意に増加した。接種8週後のコントロールマウス、GH3マウスならびにGH3-FTYマウスの平均体長はそれぞれ87.9 +/- 4.8 mm、89.3 +/- 3.1 mmならびに95.8 +/- 2.4 mmであった（図9B；\*\*P<0.01；ns=有意差なし）。

【0078】

マウスの肝重量はマウスの全肝臓と接種腫瘍を摘出し、それらの重量を測定した。全肝臓重量は体重を基に算出した。接種後8週のマウス肝重量は、GH3群およびGH3-FTY群共に対照群と比較して有意に増加し（P<0.01）、さらにGH3-FTY群の肝重量はGH3群に対して有意に増加した（図9C；P<0.05）。

30

【0079】

マウスの腫瘍重量および腫瘍体積は腫瘍組織を摘出し測定した。腫瘍は長径、短径ならびに深さを測定し、以下の変形楕円体式(modified ellipsoid formula)にて腫瘍体積を算出した(非特許文献25)。

$$\text{腫瘍体積} = \text{長さ} \times \text{幅の二乗} \times 0.52$$

【0080】

接種8週後の腫瘍体積と腫瘍重量は共に、GH3-FTYマウスではGH3マウスと比較し有意に増加した。接種8週後に腫瘍体積と腫瘍重量を測定した。GH3-FTYマウスの平均腫瘍体積はGH3マウスより4.3倍大きかった（図7A；P<0.05）。GH3-FTYマウスの平均腫瘍重量はGH3マウスより3.87倍重かった（図7B；P<0.05）。

40

【実施例 1 2】

【0081】

GH3-FTYマウスまたはGH3マウスの組織切片をヘマトキシリン - エオシン(HE)染色法によって染色して組織学的分析を行った(非特許文献23)。またKi67陽性細胞または成長ホルモン(GH)の免疫組織化学染色は既報に従って行った(非特許文献22)。作製したパラフィン切片を抗Ki97抗体(ab66155; Abcam)または抗ラットGH抗体(R&D Systems, Inc.)と培養した後、Alexa Fluor 546ヤギ抗ラットIgG(A-11010; Life Technologies)を接種した。次いで切片をDAPIと対比染色し、共焦点顕微鏡で可視化した。

【0082】

50

図7Cは、GH3マウスならびにGF3-FTYマウスのソマトトロフ細胞腫瘍のHE染色図である（左側はGH3マウス、右側はGF3-FTYマウスを示す）。また、上図は接種4週後、下図は接種8週後のHE染色図を示す。腫瘍のHE染色によって、GF3-FTYマウスの腫瘍は、壊死性の組織を含んでいて、GH3マウスよりも有糸分裂的特長をより多く示すことが明らかになった。つまり、GF3-FTYマウスは、GF3マウスに比べて、接種4週後に相対的に大きな核/細胞質(N/C)比を示し、接種8週後に多形核の存在を示した。

【0083】

図7Dは、GH3マウスならびにGF3-FTYマウスのソマトトロフ細胞腫瘍の細胞組織の接種4週後の免疫蛍光図である。その結果、細胞表面の分泌顆粒はGh（緑色）、また核はDAPI（青色）で染色された。

10

【0084】

図7Eは、GF3-FTYマウスの腫瘍がKi67スコアを有意に増加していることを示している（\* $P < 0.05$ ）。この知見は図7Cの結果をさらに確認している。

【実施例13】

【0085】

本実施例では、GH3マウスおよびGH3-FTYマウスの血中GhおよびIgf-1値を評価した。GH3細胞株ならびにGH3-FTY細胞株をF-12K培地 0.5 mlに懸濁し、その懸濁液を、実施例10と同様にして、ヌードマウス（BALB/c-nu）に接種した（各グループ：n=8）。対照群のマウスには培地のみを投与した。各マウスの末梢血より血漿を分取し、血中GhおよびIgf-1濃度を測定した。Igf-1濃度はQuantikine ELISA mouse/rat IGF-1（R&D systems）にて測定した。

20

【0086】

接種後8週の血漿Gh値とIgf-1値を図8Aおよび図8Bにそれぞれ示す。図8Aに示すように、GH3マウスおよびGH3-FTYマウスのGhは対照群と比較して有意に増加し、さらにGH3-FTYマウスのGh値はGH3マウスと比較して有意に増加した。GH3マウスとGH3-FTYマウスの接種8週間後のプラズマGhレベルはそれぞれ554 +/- 456 ng/mLと2764 +/- 1456 ng/mLであった（ $P < 0.01$ ）。また、図8Bに示すように、GH3マウスおよびGH3-FTYマウスのIgf-1は、対照群と比較し有意に増加した。その血漿Igf-1レベルは、GH3マウスとGH3-FTYマウスでそれぞれ549 ng/mLと707 ng/mLであった（ $P < 0.13$ ）。しかし、この血漿Igf-1レベルは統計学的には有意な差はなかった。

30

【実施例14】

【0087】

実施例12で得られた担がんマウスについて表現型を調べた結果、GH3-FTYマウスは、コントロールマウスならびにGH3マウスに比べて明らかに大型であった（図8C）。

【実施例15】

【0088】

本実施例では、GH3マウスおよびGH3-FTYマウスに対する糖代謝の影響を検討するため、糖負荷試験(GTT)を行った。糖負荷試験は、ヌードマウスにGH3-FTY細胞株を接種し、6週間後に行った。ヌードマウスは、糖負荷試験前15時間絶食した後、2 g/kg体重のブドウ糖を腹腔内投与し、投与0分、投与15分、30分、60分および120分の血糖値を測定した。血糖値は血糖測定装置グルテストミント（Glutest Mint：三和化学）にて測定した。また、投与0分、投与15分、30分および60分後の血漿インスリン値をモリナガ超高度マウスインスリン測定キット（森永生科学研究所）にて測定した。

40

【0089】

その結果、GH3群およびGH3-FTY群では共に、絶食時、糖負荷15分後ならびに30分後の血糖値は対照群に比べて有意に低下した。GH3群とGH3-FTY群間ではいずれのタイムポイントにおいても血糖値に有意差は認められなかった（図10A；\* $P < 0.01$ ；\*\* $P < 0.01$ ）。同様に、GH3群およびGH3-FTY群は共に、対照群に比べて、血糖値の曲線下面積(AUC)も有意に少なかった。またGH3群とGH3-FTY群との間では血糖値の曲線下面積(AUC)には有意差は認められなかった（図10B；\* $P < 0.01$ ；\*\* $P < 0.01$ ；ns = 有意差なし）。

50

## 【実施例 16】

## 【0090】

本実施例では、GH3マウスおよびGH3-FTYマウスに対する糖代謝の影響を検討するため、インスリン負荷試験(ITT)を行った。インスリン負荷試験は、ヌードマウスにGH3-FTY細胞株を接種し7週間後に行った。インスリン負荷試験は、3時間絶食後、ノボリンR注(ノボノルディスクファーマ)0.75 ユニット/kg体重を腹腔内投与し、絶食時、15分、30分および60分のインスリン値を測定した。

## 【0091】

絶食時、糖負荷15分後、30分後ならびに60分後のインスリン値はいずれも、GH3群およびGH3-FTY群では対照群に比べて増加が認められ、インスリン抵抗性の増悪が認められた。さらに、GH3-FTY群では、絶食時、糖負荷15分後ならびに30分後のインスリン値は、GH3群と比較して有意に増加した(図10C)。なお、GH3群と対照群間では有意差を認めなかった。同様に、GH3群およびGH3-FTY群は共に、対照群に比べて、インスリン値の曲線下面積(AUC)も有意に高い値を示した。またGH3群とGH3-FTY群との間ではインスリン値の曲線下面積(AUC)には有意差は認められなかった(図10D; \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.01$ )。

10

## 【0092】

接種7週間後のITTの結果、GH3-FTY群はGH3群と対照群に比べて血糖値が有意に高い値を示した。このことはGH3-FTYマウスはインスリン抵抗性の存在が示唆される(図10E)。

## 【産業上の利用可能性】

20

## 【0093】

本発明に係るAIPノックアウト成長ホルモン(GH)産生細胞株(GH3-FTY細胞株)は、特に下垂体腫瘍の研究モデル細胞株として利用することができ、このモデル細胞株を利用し下垂体腫瘍の予防または治療に有効な創薬・治療法の研究開発に大いに寄与することができる。

## 【0094】

付言すれば、本発明によれば、GH3細胞株からAip遺伝子をゲノム編集(CRISPR-Cas9システム)によって遺伝子的に崩壊されたGH3-FTY細胞株が得られ、GH3-FTY細胞株は、GH3細胞株に比べて、成長ホルモン(Gh)合成が著しく増加し、また細胞増殖がわずかに増加するとともに、細胞サイクル分析するとS相のプロファイルが増加した。しかし、これらの現象はすべてAipの外因性発現で逆転される。GH3細胞株においては、Gh誘発Stat3リン酸化はGH過分泌の原因であると知られているが、興味深いことに、GH3-FTY細胞株においてはリン酸化Stat3発現がGH3細胞株より増加していて、このことがGH3-FTY細胞株におけるこの機構の強力な駆動力となっている。また、GH3-FTY細胞株は、GH3細胞株に比べて、細胞増殖抑制に際して、ソマトスタチンに対する感受性が低いけれども、これはソマトスタチン受容体タイプ2と抗増殖遺伝子Zac1/Plag11の発現低下に関連している。

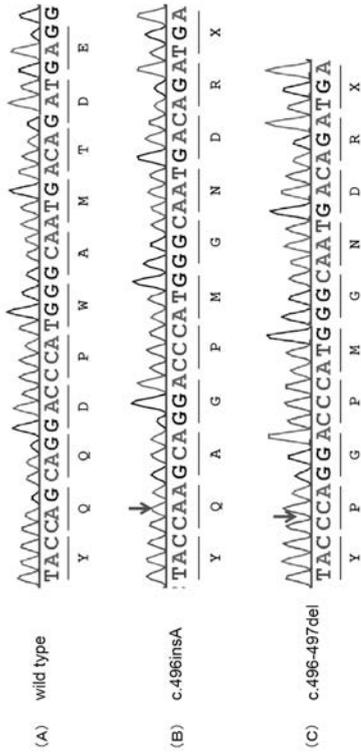
30

## 【0095】

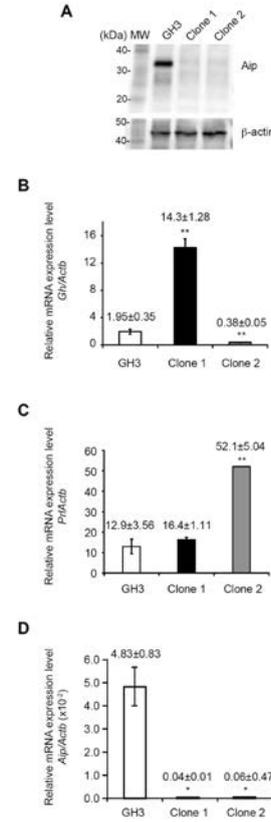
本発明のGH3-FTY細胞株をBalb/cマウスに移植したGH3-FTYマウスでは、GH3細胞株を移植したGH3マウスよりも、有糸分裂ソマトトロフ腫瘍を形成した。またGH3-FTYマウスでは、腫瘍サイズがGH3マウスよりも格段に大きく、血清Ghレベルも著しく高かった。そのうえ、インスリン耐性試験では、GH3-FTYマウスはGH3マウスよりも相対的に高いインスリン抵抗性を示した。

40

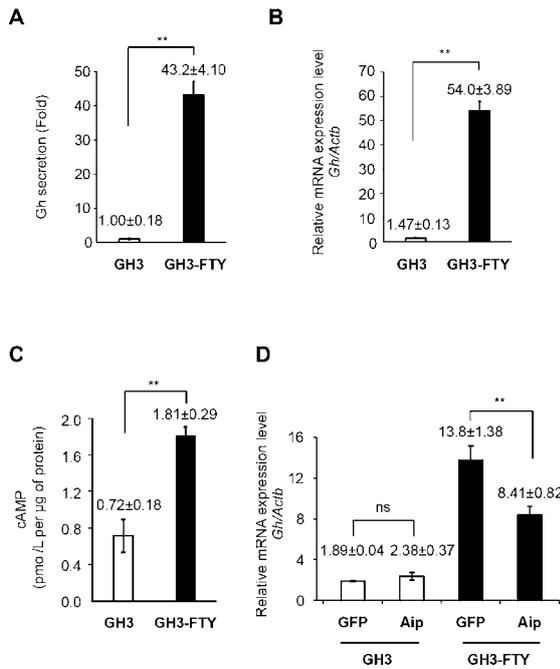
【 図 1 】



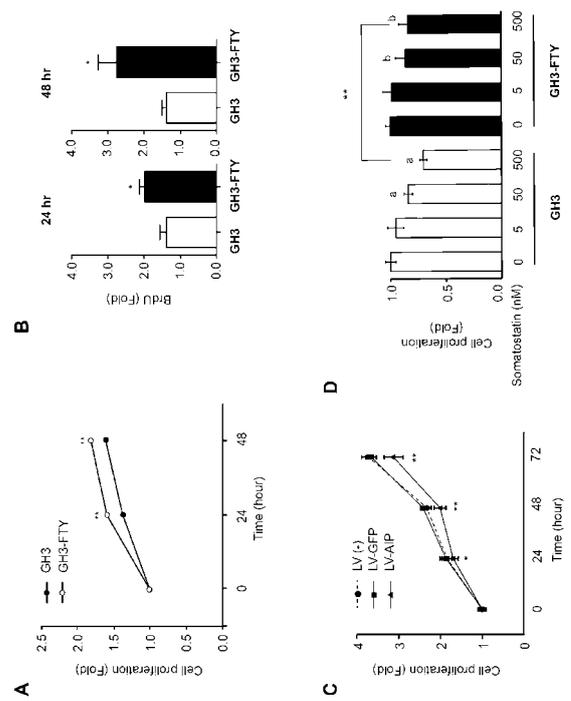
【 図 2 】



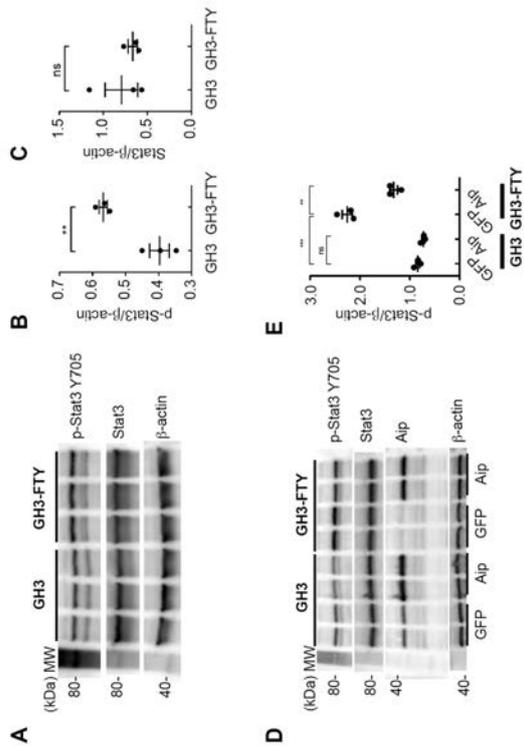
【 図 3 】



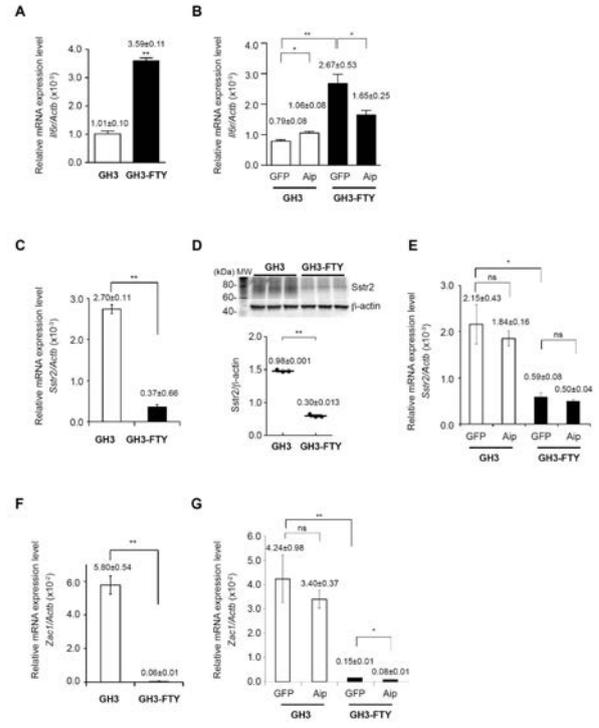
【 図 4 】



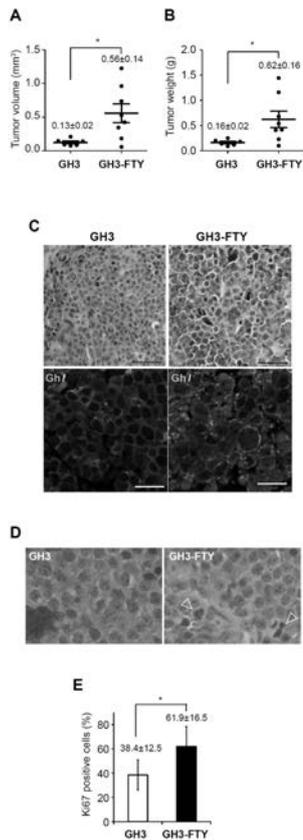
【 図 5 】



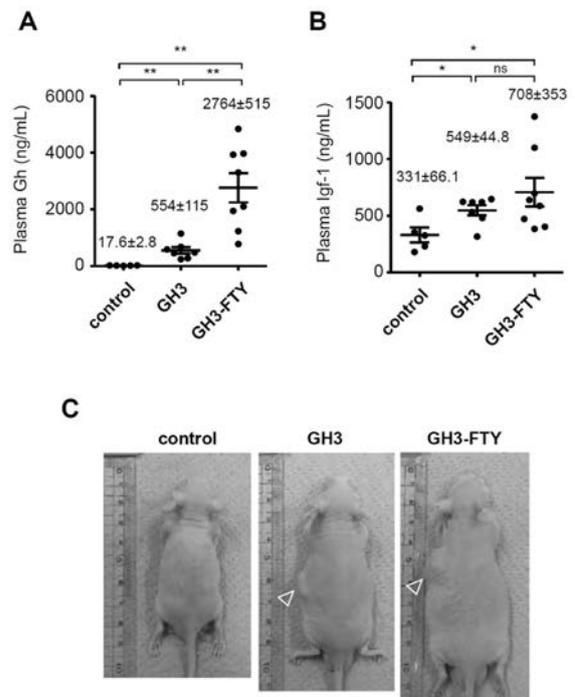
【 図 6 】



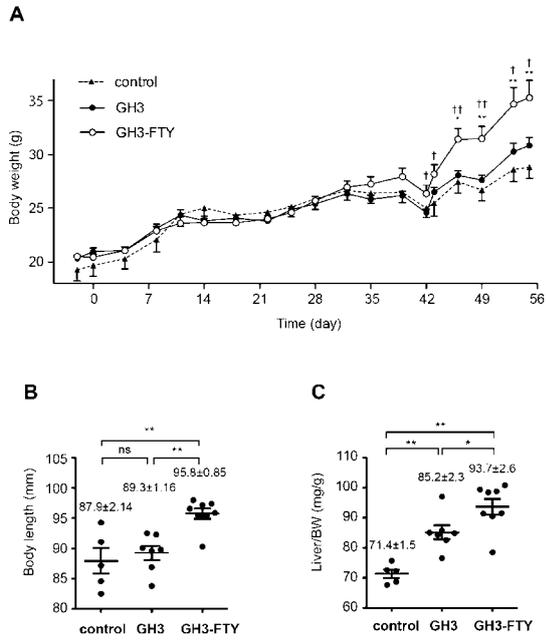
【 図 7 】



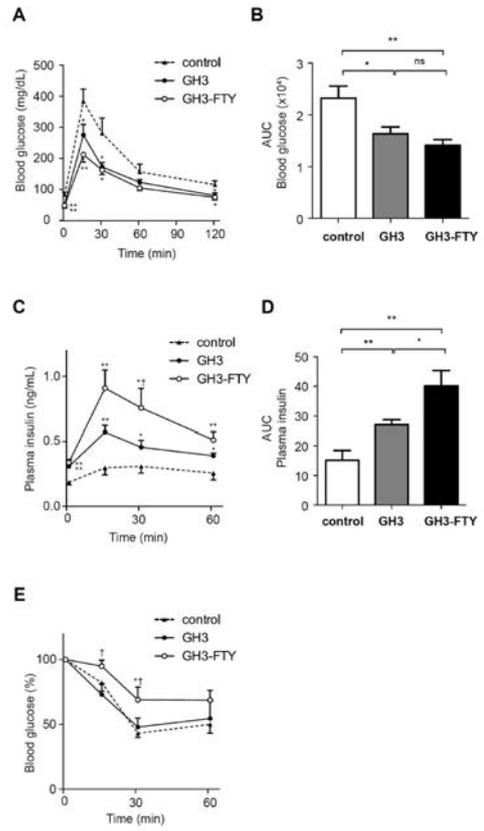
【 図 8 】



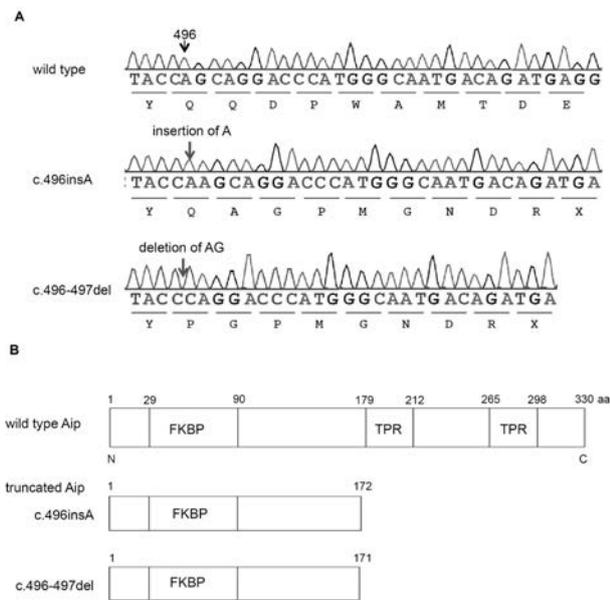
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】



【配列表】

2018007619000001.app

---

フロントページの続き

特許法第30条第2項適用申請有り 平成28年1月15日に、米国内分泌学会でのポスター発表に関するインターネット上の抄録にて、AIPノックアウト成長ホルモン産生細胞株に関する研究について公開した。平成28年4月1日に、第89回日本内分泌学会学術総会公式抄録集の第92巻1号202頁にて、AIPノックアウト成長ホルモン産生細胞株に関する研究について公開した。平成28年4月3日に、ボストンコンベンションアンドエキシビジョンセンターで開催された米国内分泌学会「ENDO2016」でのポスター発表にて、AIPノックアウト成長ホルモン産生細胞株に関する研究について公開した。平成28年4月21日に、国立京都国際会館で開催された第89回日本内分泌学会総会にて、AIPノックアウト成長ホルモン産生細胞株に関する研究について公開した。

(72)発明者 田中 智子

福岡県福岡市城南区七隈八丁目19番1号 学校法人福岡大学内

Fターム(参考) 4B065 AA93X CA24 CA44

4H045 AA50 BA10