

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-531047

(P2009-531047A)

(43) 公表日 平成21年9月3日(2009.9.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 E	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B 0 6 5
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	4 C 0 8 7
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 33 頁)

(21) 出願番号	特願2009-502136 (P2009-502136)	(71) 出願人	508291803 ビジク, ヨゼフ
(86) (22) 出願日	平成19年3月30日 (2007. 3. 30)		スロバキア共和国、8 5 1 0 1 プラチス ラヴァ、イリュシノヴァ 6
(85) 翻訳文提出日	平成20年10月28日 (2008.10.28)	(71) 出願人	508291870
(86) 国際出願番号	PCT/FI2007/050179		ハルユラ, アリ
(87) 国際公開番号	W02007/113387		フィンランド国、エフアイー00100
(87) 国際公開日	平成19年10月11日 (2007.10.11)		ヘルシンキ、トーロンカトゥ 7 エー 7
(31) 優先権主張番号	60/787, 660	(71) 出願人	508291881
(32) 優先日	平成18年3月31日 (2006. 3. 31)		カンクリ, エスコ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		フィンランド国、エフアイー00670 ヘルシンキ、パロヘイナンティエ 50 エー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞を処理または選択するための方法と装置

(57) 【要約】

本発明は、細胞を処理するための方法であって、細胞を活性化した線維芽細胞と共培養することによって細胞の成長および/またはステータスを調節することを特徴とする方法に関する。線維芽細胞は、細胞が互いに接着して多細胞凝集塊、即ち、スフェロイド、を形成する条件下で培養することで活性化する。更に本発明は、骨髄穿刺などの細胞サンプルから細胞を選択するための装置であって、多細胞凝集塊を包含する装置も提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

細胞サンプルの処理、好ましくは診断または治療を目的とした処理、を行うための方法であって、

a) 線維芽細胞または間葉系細胞を、細胞が互いに接着して多細胞凝集塊を形成する条件下で培養し、そして

b) 細胞サンプル内の細胞を、上記工程 a) で形成された多細胞凝集塊と共培養し、それにより該細胞サンプル内の細胞の成長およびステータスの少なくとも一方を調節することを包含する方法。

【請求項 2】

工程 b) において、該細胞サンプルと該多細胞凝集塊との間に半透性メンブランを設け、該半透性メンブランはサイトカインや成長因子の交換を許容するが、間葉系細胞からなる凝集塊を該細胞サンプル内の細胞から隔離することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該細胞サンプル内の細胞が白血病細胞であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

該多細胞凝集塊との共培養に対して応答する細胞を該細胞サンプルから選択する工程 c) を更に包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

共培養に対して走化性運動で応答する細胞を選択することを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

該細胞を、治療または診断に用いるために選択することを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

該細胞サンプルが患者由来サンプルであり、該多細胞凝集塊が自家間葉系細胞に由来することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

該細胞サンプルが患者由来サンプルであり、該多細胞凝集塊が同種間葉系細胞に由来することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

細胞サンプルから細胞を選択するための装置であって、第 1 コンパートメントと第 2 コンパートメントを包含し、該第 1 コンパートメントは第 2 コンパートメントの内部に設けられており、該第 1 コンパートメントには、バッファー中に存在する線維芽細胞または間葉系細胞の多細胞凝集塊が収容されており、該第 1 コンパートメントは、2 つのコンパートメントの間でバッファー、サイトカインや成長因子の交換を許容する半透性メンブランによって第 2 コンパートメントから分離されており、そして第 2 コンパートメントは、細胞の移動を許容する孔径を有する第 2 メンブランによって細胞のサンプルから分離されていることを特徴とする装置。

【請求項 10】

2 つのコンパートメントと細胞のサンプルが、外部封止メンブランで囲われていることを特徴とする、請求項 9 に記載の装置。

【請求項 11】

該半透性メンブランが、2 つのコンパートメント間の細胞の交換を許容しないものであることを特徴とする、請求項 9 に記載の装置。

【請求項 12】

該半透性メンブランの孔径が $0.2 \sim 2 \mu\text{m}$ であり、該第 2 メンブランの孔径が $3 \sim 8 \mu\text{m}$ であることを特徴とする、請求項 9 に記載の装置。

10

20

30

40

50

ネモース線維芽細胞由来 HGF / SF による上皮腫瘍細胞の進行の増大に関する知見 (Kankuri et al., 2005) に基づき、我々は血液癌細胞に対するネモース由来因子の影響を解析した。ここで我々は、発現するタンパク質 (c - Met など) の違いによって細胞系の表現型が異なると、線維芽細胞ネモースに対する応答も異なることを示す。c - Met 陰性の細胞系は識別可能な成長停止、走化性および分化によって応答したが、c - Met 陽性細胞の大部分が非応答性だった。

【0006】

発明の詳細の説明

本発明は、クラスター化または凝集した線維芽細胞や他の間葉系細胞 (例えば、骨髄間葉系幹細胞) は、細胞増殖抑制性、成長阻害性および / または分化誘導性の応答を患者由来サンプルの初代細胞および細胞系 (即ち、標的細胞) において誘導することが可能であり、このような誘導は、クラスター化した細胞または凝集塊の産生したサイトカインや成長因子が標的細胞の近傍に存在するか標的細胞と接触した場合、あるいは凝集塊に由来する化合物で標的細胞を処理した場合に生じるという知見に基づく。従って本発明は、細胞サンプルの処理、あるいは細胞サンプルから細胞を単離および / または濃縮するための方法であって、

a) 線維芽細胞または間葉系細胞を、細胞同士の接触を促進または誘導して多細胞凝集塊を形成する (この現象を後述する実施例でネモースと言う) 条件下で培養し、そして

b) 細胞サンプルを上記工程 a) で形成された多細胞凝集塊と共培養し、それにより該細胞サンプル内の細胞の成長およびステータスの少なくとも一方を調節することを包含する方法を提供する。

【0007】

工程 b) は、多細胞凝集塊に由来する因子または多細胞凝集塊の産生した因子で細胞サンプルを処理することにより実施してもよい。

【0008】

共培養の際には、半透性のバリアまたはメンブランを細胞サンプルと多細胞凝集塊の間に設けることが好ましく、このようなバリアは、サイトカインや成長因子の交換を許容するが、スフェロイドを細胞サンプルから物理的に隔離するものである。このような文脈において「物理的に隔離する」という表現は、多細胞凝集塊は細胞サンプル内の細胞と直接接触していないことを意味する。半透性バリアの孔径は、好ましくは $0.2 \sim 2 \mu\text{m}$ である。半透性メンブランの材質としては、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、セルロース混合エステルやテフロンが挙げられる。

【0009】

細胞サンプルは、骨髄穿刺から単離した単核細胞を含有することが好ましい。白血病などの悪性疾患に罹患した患者の細胞サンプルであることがより好ましい。

【0010】

本願において「細胞サンプル」という用語は、公知の細胞系の細胞などの培養細胞を含有する試料、または患者由来サンプル (例えば、血液サンプル) などの生物試料を意味する。他の好ましい患者由来サンプルは骨髄穿刺である。

【0011】

上述した方法は、多細胞スフェロイドとの共培養に対して応答する細胞を細胞サンプルから選択する工程 c) を更に包含してもよい。通常、共培養に対して走化性運動によって応答する細胞を選択する。細胞を治療または診断用途のために選択することが好ましい。

【0012】

本発明の他の態様は、生細胞を含むいかなるサンプルからも細胞を選択するための装置である (詳細については図 5 を参照)。この装置は、第 1 コンパートメントと第 2 コンパートメントを包含し、該第 1 コンパートメントは第 2 コンパートメントの内部に設けられており、該第 1 コンパートメントには、バッファー中に存在する線維芽細胞または間葉系幹細胞の多細胞性スフェロイドが収容されており、該第 1 コンパートメントは、2 つのコ

10

20

30

40

50

ンパートメントの間でバッファー、サイトカインや成長因子の交換を許容する半透性メンブランによって第2コンパートメントから分離されており、そして第2コンパートメントは、細胞の移動を許容する孔径を有する第2メンブランによって細胞のサンプルから分離されている。第2メンブランの孔径は3～8 μmが好ましい。第2メンブランの材質としては、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、セルロース混合エステルやテフロンが挙げられる。

【0013】

2つのコンパートメントと細胞のサンプルが、外部封止メンブランで囲われていることが好ましい。

【0014】

半透性メンブランは、2つのコンパートメント間の細胞の交換を許容しないものが好ましい。

【0015】

本発明の1つの好ましい態様は、細胞サンプルが患者由来サンプルであり、サンプル内の細胞をこの患者の治療に用いる場合、工程a)において自家線維芽細胞を使用することである。しかし、活性化線維芽細胞は細胞サンプルと直接接触しないことが好ましいため、この直接接触がない限り、同種線維芽細胞も本発明に使用することができる。

【0016】

本明細書で引用する全ての文献については、それぞれについて個別に断らずとも、この記載を持って全ての文献の内容が参照によって本明細書に組み込まれたされたものとする。以下の実施例は、当業者が本発明とその原理および利点をよりよく理解するための助けとなるはずである。これら実施例は本発明の例証に過ぎず、何ら本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0017】

材料と方法

材料 - 免疫プロット法のための抗体は、ウサギ抗p38抗体(Ab)(sc-535)(カリフォルニア州、サンタクルス、Santa Cruz Biotechnology Inc.製)、マウス抗p-p38 Tyr182モノクローナル抗体(MAb)(sc-7973)、ウサギ抗JNK Ab(CST-0252、マサチューセッツ州、ダンバーズ、Cell Signaling Technology製)、マウス抗p-JNK Thr183/Tyr185 MAb(sc-6254)、ウサギ抗ERK1/2 Ab(sc-94)、マウス抗p-ERK1/2 Tyr204 MAb(sc-7383)、ウサギ抗Akt Ab(CST-9272)、ウサギ抗p-Akt Ser473 Ab(CST-9271)、ウサギ抗JAK1 Ab(sc-7228)、ウサギ抗JAK2 Ab(sc-294)、ウサギ抗JAK3 Ab(sc-513)、ウサギ抗TYK2 Ab(sc-169)、ウサギ抗開裂カスパーゼ-3 Asp175 Ab(CST-9661)、マウス抗全長カスパーゼ-3 Ab(sc-7272)、全長と活性化断片の両方を検出するマウス抗カスパーゼ-8 Ab(CST-9746)、全長と35/37kDa開裂断片の両方を検出するウサギ抗カスパーゼ-9 Ab(CST-9502)、ウサギ抗PARP Ab(CST-9542)、ウサギ抗BclxL Ab(sc-7195)、ヤギ抗アクチン Ab(sc-1615)、マウス抗Bax MAb(sc-7480)、マウス抗Bcl-2 MAb(sc-509)、ヤギ抗COX-1 Ab(sc-1752)およびヤギ抗COX-2 Ab(sc-1746)。インドメタシン(I7378)はSigma(ミズーリ州、セントルイス)製であり、NS-398(#70590)はCayman Chemical(ミシガン州、アン・アーバー)製である。

【0018】

フローサイトメトリー(FACS)用の抗体は、Beckman Coulter Company(フロリダ州、マイアミ)製であり、それらは、抗CD1a-PE(IM1942)、抗CD3-P

10

20

30

40

50

E (IM1282)、抗CD10-PE (IM1915)、抗CD11a-FITC (IM0860)、抗CD11b-PE (IM2581)、抗CD11c-PE (IM1760)、抗CD13-PE (IM1427)、抗CD14-FITC (IM0645)、抗CD15-FITC (IM1423)、抗CD16-FITC (IM0814)、抗CD28-FITC (IM1236)、抗CD33-PC5 (IM2647)、抗CD34-PC5 (IM2648)、抗CD38-FITC (IM0775)、抗CD40-PE (IM1936)、抗CD41-FITC (IM0649)、抗CD45-FITC (IM0782)、抗CD45RA-FITC (IM0584)、抗CD45RO-PE (IM1307)、抗CD49d-FITC (IM1404)、抗CD49e-FITC (IM1854)、抗CD51-FITC (IM1855)、抗CD54-PE (IM1239)、抗CD61-FITC (IM1758)、抗CD80-FITC (IM1853)、抗CD83-PC5 (IM3240)、抗CD86-PE (IM2729)、抗CD117-PC5 (IM2657)、抗CD152-PE (IM2282) および抗HLA-DR-FITC (IM1638) である。抗CD68-FITC (GM-4152) はCaltag Laboratories (カリフォルニア州、パーリングゲーム) 製である。

【0019】

培養細胞 - 培養した包皮由来ヒト線維芽細胞であるHFSF-132は、Bizik et al., 2004に記載されている継代数7~15のものを使用した。KG-1、THP-1、U-937、K562、JurkatおよびRajiはアメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC、バージニア州、マンサス) から入手した。全ての細胞を、RPMI 1640 培地 (スコットランド国、ペイズリー、Life Technologies製) に10%牛胎児血清 (Life Technologies製)、100 Ag/mlのストレプトマイシンおよび100単位/mlのペニシリンを添加したもので培養した。

【0020】

スフェロイド形成の開始は、Bizik et al., 2004の記載に従った。簡単に説明すると、丸底96穴プレート (マサチューセッツ州、ケンブリッジ、Costar製) を、滅菌水で調製した0.8%のLEアガロース (メイン州、ロックランド、BioWhittaker製) で処理し、薄いフィルム状の非接着表面を形成した。線維芽細胞をトリプシン/EDTAを用いて培養皿から剥がし、単一細胞懸濁液 (4×10^4 細胞/ml) を完全培地で調製した。スフェロイド形成を開始するために、250ml等量を個別のウェルに植え付け、プレートを5%CO₂雰囲気下、+37℃でインキュベートした。

【0021】

共培養とネモシス刺激実験のために、白血病細胞と24時間処理後線維芽細胞スフェロイドとの培養を、白血病細胞:線維芽細胞比が1:1の条件下で様々な培養時間で行った。成長曲線を概算する際には、ブルカーチャンパー内で細胞数を計測することで細胞数を評価した。免疫プロット法、FACSおよび接着試験の際は、残存スフェロイドを重力示差沈降法によって共培養細胞から除去した。

【0022】

共培養の96時間後の白血病細胞の形態を、位相差顕微鏡で評価した。線維芽細胞スフェロイドと96時間共培養した後の白血病細胞について、その接着率を評価した。その後、等量の細胞系を標準的な細胞培養皿に植え付け、24時間培養した。培養細胞を洗浄し、トリプシン処理によって接着細胞を回収して計数し、接着細胞のパーセンテージを計算した。

【0023】

白血病細胞の走化性測定は、24時間処理後線維芽細胞スフェロイドと共培養したナイーブ白血病細胞系と同様に、アガロース処理済の6穴プレートで行った。スフェロイドを中心とし、スフェロイドの直径の2倍の長さを半径とする範囲内に存在する白血病細胞数を、接眼レンズ用グリッドを用いて1ウェル当たり15個のスフェロイドについて測定した。

【0024】

細胞周期の解析 - DNAヒストグラムと細胞周期解析のために、白血病細胞を24時間処理後線維芽細胞スフェロイドと96時間共培養し、沈降法によって線維芽細胞クラスターから分離した。この細胞をPBSで洗浄し、1%パラホルムアルデヒドで固定し、RNA分解酵素(100 µg/ml)で処理した後、そのDNAをヨウ化プロピジウム(50 µg/ml)で染色し、FACSで解析した。

【0025】

免疫プロット法 - 完全ミニプロテアーゼ阻害剤混合物タブレット(Complete Mini-protease inhibitor mixture tablets)(ドイツ国、マンハイム、Roche製)を添加した、SDS-PAGEサンプルローディングバッファー(62.5 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)、2% SDS、20% グリセリン、5% -メルカプトエタノールと0.005% プロモフェノールブルー)中で細胞サンプルを直接溶解し、5分間煮沸した。溶解物を14,000 rpmで15分遠心して、粒状の不溶性物質を沈殿させた。サンプルをSDS-PAGE(5~15%の濃度勾配を有するポリアクリルアミドと3.5%の濃縮ゲル)で分離した。ゲルからタンパク質を電気泳動的にニトロセルロースメンブラン(ドイツ国、ダッセル、Schleicher and Schuell製)に転写し、転写効率をボンソーS染色で確認した。メンブランをTBS(20 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaClと0.1% Tween 20、pH 7.5)で調製した2.5%の低脂肪粉末牛乳溶液でブロッキングした後、特異的な一次抗体とインキュベートし、次にアルカリホスファターゼ結合二次抗体(ウィスコンシン州、マディソン、Promega製)とインキュベートした。タンパク質のバンドは製造者の推奨する方法で可視化した。

10

20

【0026】

フローサイトメトリー - フローサイトメトリーによる解析のために、白血病細胞を特定の時間に渡って共培養し、スフェロイドを除去するための示差沈降法の後、抗原特異的抗体または対照となるアイソタイプ適合抗体と共に氷上でインキュベートし、1%パラホルムアルデヒドで固定した。FACS解析はEXPO32解析プログラムを用いたEPICS ALTRAフローサイトメーター(いずれもカリフォルニア州、フラートン、Beckman Coulter Inc.製)で行った。

【0027】

酵素結合免疫測定法によるサイトカイン濃度の測定 - 線維芽細胞スフェロイド条件培地を、スフェロイド形成開始から96時間後に96穴プレートから回収した。IL-1、IL-6、IL-8、IL-11、GM-CSF、LIF、オンコスタチンMおよびTNF- α の濃度は、市販のELISAキットと試薬を製造者の説明書に従って使用して定量した。ヒトIL-1、ヒトIL-11、ヒトLIF、ヒトTNF- α およびヒトオンコスタチンMに使用したELISAはR and D Systems(ミネソタ州、ミネアポリス)製であり、ヒトIL-6とヒトIL-8に使用したELISAはオランダ赤十字の中央研究所(Central Laboratory of the Netherlands Red Cross)(アムステルダム、CLB)より入手した。ネモ-シス線維芽細胞条件培地中のサイトカインの定量には、ヒト由来のIL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、IL-13、GM-CSF、インターフェロン- γ (IFN- γ)およびTNF- α を、Bio-Plex ヒトサイトカインTh1/Th2パネル(カリフォルニア州、ハーキュリーズ、Bio-Rad Laboratories Incのカタログ番号171-A11081)を用い、Luminex 100システム(テキサス州、オースチン、Luminex Corporation製)で行った。

30

40

【0028】

結果

表現型特性および成長特性、ならびに細胞周期解析 - 白血病細胞系によるHGF/SF受容体c-Metの発現の解析においては、正常なプロセッシングを受けた形態がU-937細胞系、Jurkat細胞系、Raji細胞系およびK562細胞系に見られたが、THP-1細胞やKG-1細胞では見られなかった(図1のA)。全ての細胞をネモ-シス線維

50

芽細胞と共培養し、成長特性のスクリーニングを行った。c-Met陽性細胞系は、その増殖速度に顕著な変化は見られなかったが、c-Met陰性細胞系であるTHP-1とKG-1は認識可能な成長停止によって応答した。ネモシス線維芽細胞による刺激に関する後の実験には、c-Met陰性であるTHP-1細胞系とKG-1細胞系およびc-Met陽性であるU-937細胞系を選択した。これら細胞のネモシスによる刺激は、c-Metの発現レベルに何の影響も与えなかった(図1のB)。THP-1細胞及びKG-1細胞とU-937細胞との対比においても、接着班キナーゼ(FAK)とシクロオキシゲナーゼ-1(COX-1)の発現における違いがあった(図1のB)。しかし、これら細胞系から誘導性COX-2アイソフォームを検出することはできなかった(データは示さない)。

10

【0029】

KG-1細胞、THP-1細胞およびU-937細胞の細胞周期解析 - 共培養においてネモシス線維芽細胞は、c-Met欠損細胞に対して劇的な成長阻害を誘導したが、c-Met陽性細胞系に対しては、成長阻害を全く、若しくは殆ど誘導しなかった。図2のA~Cに、これら細胞系を線維芽細胞ネモシスに付した時の成長応答を示す。ネモシス処理による成長の低下は、KG-1細胞においては共インキュベーションの72時間後に明らかになったが、THP-1細胞系においては、48時間後に既に明らかになっており、この結果は、後者の細胞がネモシスに対してより迅速な応答と反応性を示すことを表している。96時間のインキュベーションの後、U-937細胞においては、増殖に対するわずかな遅延効果が見られただけだった。応答性細胞系のネモシスによる増殖停止は研究の間持続しており、その間に対照集団は対数増殖期後の成長平坦域に達していた。168時間後には対照細胞は成長平坦域に達しており、この間にネモシスが阻害した細胞系の増殖は、KG-1細胞で67%、THP-1細胞で83%、そしてU-937細胞で6%だった。

20

【0030】

図2のD~Eは、DNAヒストグラムで評価した白血病細胞系の細胞周期分布を示す。ネモシスで処理すると、KG-1細胞集団の30.2%およびTHP-1細胞集団の31.3%がG0G1期に蓄積された。M期とS期からの集団変化は、分化に伴う細胞周期の停止を表している。U-937細胞はその細胞周期特性を維持しており、集団変化といった、線維芽細胞ネモシスに対する目立った応答は見られなかった。更に、クラスター化した線維芽細胞を非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)であるNS-398およびインドメタシンで処理してプロスタグランジンの産生を防止しても(Bizik et al., 2004)、ネモシスによる増殖阻害に影響を与えなかった(データは示さない)。

30

【0031】

ネモシスに対する白血病細胞の応答に見られる、形態学および機能的な特性 - G0G1期における細胞周期の停止は分化誘導と関連しているため(Liu et al., 1996)、ネモシスに対する応答による白血病細胞における形態学的特性と接着性の変化を評価した。ここでも、ネモシス応答性のKG-1およびTHP-1と、対照となる非応答性細胞系U-937との差は歴然としていた。KG-1細胞とTHP-1細胞においては、ネモシスによって接着細胞の割合が19.8%と31.6%も増加した(図3のA)。これらの細胞は、細胞の伸長と星状仮足を有する樹状細胞様の表現型に見られる形態学的特性を示したが(図3のB)、U-937細胞がネモシスに対する応答として、その形態や接着パターンを変化させることはなかった(図3のB)。ネモシス応答性細胞系における接着性表現型の誘導は、細胞間接着因子-1(ICAM-1)の発現増加と関連していることを確認した(図3のC)。

40

【0032】

ネモシスによるKG-1細胞およびTHP-1細胞の接着増加は、クラスター化した線維芽細胞が細胞の運動性と走化性に影響する因子も産生することを示唆している。そこで、ネモシス線維芽細胞との共培養におけるKG-1細胞、THP-1細胞およびU-937細胞の走化性応答を評価した。分析した細胞系の応答を比較すると、KG-1とT

50

H P - 1 は共にネモシス中の線維芽細胞クラスターに向かって走化性を示したが、U - 9 3 7 細胞は非応答性であった (図 3 の D) 。ネモシスは K G - 1 細胞と T H P - 1 細胞を引き寄せ、これらの細胞は、線維芽細胞クラスターの周囲に、U - 9 3 7 細胞と比較して高密度 (それぞれ、U - 9 3 7 細胞の密度の 1 1 培および 2 2 倍) で蓄積された。

【 0 0 3 3 】

単球の成熟と分化はマクロピノサイトーシスによる抗原取り込みの低下と関連しているため (Austyn, 1996) 、機能的スケールにおける分化のパラメーターとして、ネモシスのピノサイトーシス活性に対する影響を検討した。白血病細胞系が F I T C 標識デキストランに対して反発する能力を、白血病細胞とネモシススフェロイドとの共インキュベーションから 2 4 時間後および 9 6 時間後に測定した。ネモシスで細胞系を刺激し、続いて F I T C - デキストランとインキュベートすると、フローサイトメトリーによって明確な F I T C - デキストランの取り込み阻害がネモシス処理済の K G - 1 細胞 (平均強度変化は - 1 1 . 9 2) および T H P - 1 細胞 (平均強度変化は - 3 . 8 6) が観察された。一方、U - 9 3 7 細胞では、0 . 9 1 の強度増加が観察された (データは示さない) 。このデータは、接着性の誘導と樹状細胞様仮足の存在に代表されるネモシス応答性の K G - 1 細胞および T H P - 1 細胞の形態学的特性と一致する。

【 0 0 3 4 】

ネモシス刺激済細胞系における表面抗原発現の変化 - ネモシス処理済細胞の表現型を更に特徴づけるために、細胞表面抗原の F A C S 解析を付属の表に示したように行い、対照の抗原強度をネモシス処理済細胞のものと比較した。この解析によって、5 種の細胞表面マーカーの明確な誘導パターンが得られた。興味深いことに、そして他の細胞応答と同様に、これらの抗原は K G - 1 細胞と T H P - 1 細胞においてのみ誘導された。表面抗原の誘導は U - 9 3 7 細胞では見られず、この細胞はわずかな全体的な発現の下方制御によって応答した。

【 0 0 3 5 】

このアプローチによって、ネモシス応答性細胞系による、以下の因子の誘導を同定した： 樹状細胞マーカー C D 1 1 c 、白血球共通抗原 C D 4 5 R A 、接着性分子 C D 5 4 、樹状細胞関連 T 細胞共刺激分子 C D 8 6 、および膜ペプチダーゼ C D 1 3 。時間依存的な C D 8 6 誘導 (図 4) は、K G - 1 細胞および T H P - 1 細胞における成長停止と同様の応答動力学を示し、後者の細胞系はこのパラメーターについてもより迅速に反応した。白血病細胞との共培養の前に、線維芽細胞クラスターを N S - 3 9 8 またはインドメタシンの存在下で形成しても、C D 8 6 の誘導に対する影響はなかった (データは示さない) 。

【 0 0 3 6 】

更に、種々の系統および分化ステージにおける C D 4 5 の異なる発現 (Stelzer et al. , 1993) に基づく集団解析を実施した。C D 4 5 ゲーティング法を実施することで、(高い散乱光測定値によって定義される) 高粒状性を有する新規な亜集団をネモシス処理済の K G - 1 細胞および T H P - 1 細胞から同定した。しかし、U - 9 3 7 細胞に特徴的な亜集団においては、ネモシスに対する応答による変化はなかった。発生した集団は、全てのネモシス誘導化マーカー、特に C D 1 1 c と C D 1 3 に陽性であったが、対照的に、U - 9 3 7 細胞の類似した C D 4 5 陽性集団は非応答性だった。ネモシスは、K G - 1 細胞および T H P - 1 細胞の S S C 値の低い C D 4 5 陽性集団において C D 8 6 陽性を高めた。上記を総合すると、これらの結果は、応答性細胞系においてネモシスは、樹状細胞の特性と共に抗原提示および T 細胞刺激に關与する抗原の発現を誘導することを示唆している。

【 0 0 3 7 】

ネモシス線維芽細胞によるサイトカインの産生 - 本発明者らは、ネモシス線維芽細胞は c - M e t リガンドである H G F / S F に富んだ因子源であることを以前報告した。我々のデータと N S A I D が何の影響も及ぼさないことに基づく、ネモシス応答性白血病細胞系における c - M e t の欠失が、成長停止の誘導において H G F / S F が何

10

20

30

40

50

らかの役割を果たしているという可能性を打ち消すことが明らかであると考えられた。更に、走化性応答は、化学誘引物質の関与を示唆している。そこで、走化性および白血病細胞増殖の調節と関連があることが知られているサイトカインのパターンを評価した。インターロイキン (IL) - 1、IL - 6、IL - 8、IL - 11、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子 (GM - CSF) および白血病阻害因子 (LIF) の明確な誘導がネモシススフェロイドにおいて明らかであり、一方、対応する単層培養細胞においてこれら因子が放出されたのは、培養開始から 96 時間後だった (図 6)。IL - 2、IL - 4、IL - 5、IL - 10、IL - 12、IL - 13、インターフェロン - γ 、オンコスタチン M および TNF - α のレベルは低いか検出不能のままであり、細胞培養法の影響を受けなかった。スフェロイドによって最も多量に産生されるサイトカインは IL - 6 と IL - 8 であり、誘導量 (スフェロイドによる平均産生量) は、対応する単層培養細胞の 3.7 倍 (25.4 ng/ml) と 8.0 倍 (158.7 ng/ml) だった。線維芽細胞スフェロイドにおいては、産生する IL - 1 と LIF の誘導倍率は 18.3 と 3.8 だった。ネモシス線維芽細胞は、単層培養細胞では検出不能な GM - CSF も産生した (図 6)。これらの結果は、線維芽細胞のクラスター形成によって誘導されたネモシスは、単球の機能を制御する一連のサイトカインおよび成長因子の基本源であることを示唆している。

10

【0038】

白血病細胞系における、ネモシスによるアポトーシス関連細胞内変化 - 腫瘍細胞成長の阻害は、通常、アポトーシスの誘導を伴う。そこで、THP - 1 細胞および KG - 1 細胞のネモシスに対する成長停止と分化応答における公知のアポトーシス経路を評価した。図 7 の A においては、いくつかのアポトーシス関連タンパク質の発現によって、一般的なアポトーシス実行因子であるカスパーゼ - 3 の開裂した活性型がネモシス応答性細胞系においてのみネモシスに対する応答として生じることが明らかになった。非応答性 U - 937 は何の影響も示さないということは、ネモシス応答性細胞におけるアポトーシスの活性化を示唆している。開始因子であるカスパーゼ - 8 とカスパーゼ - 9 の活性開裂型の発現の変化はいずれの細胞系からも検出されなかったが、THP - 1 細胞および KG - 1 細胞においてネモシスは全長カスパーゼ - 8 の発現を誘導した。この場合も、U - 937 細胞は何の影響も示さなかった。しかし、カスパーゼ - 3 の開裂とカスパーゼ - 8 発現の増加は、アポトーシス調節タンパク質である Bcl - xL、Bcl - 2 または Bax の発現には反映されておらず、この作用がアポトーシス非関連機構であることを示唆している。

20

30

【0039】

THP - 1 細胞および KG - 1 細胞においては、ネモシスによって生じる活性型カスパーゼ - 3 の明白な開裂と発現増加が見られることから、DNA 損傷、アポトーシスおよびカスパーゼ - 3 活性と関連のあるポリ ADP リボース - ポリメラーゼ (PARP) の開裂 (Ame et al., 2004) の程度を評価した。図 7 の A は、ネモシスに付した白血病細胞系における、全長 PARP (p116) とその開裂不活性型 p89 の発現パターンを示す。ネモシス処理は THP - 1 細胞および KG - 1 細胞における PARP 開裂を阻害したが、U - 937 細胞は非応答性のままであった。この結果は、これら細胞系においては、カスパーゼ - 3 開裂の増加は PARP の不活化に基づくアポトーシス誘導とは関連がないことを示唆した。

40

【0040】

白血病細胞系における、ネモシスのキナーゼカスケードに対する影響 - 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) 経路の制御不全は、白血病細胞の高増殖性表現型と関連付けて考えられてきた (Platanias, 2003)。白血病細胞のネモシスに対する応答性について、MAPK である c - jun N 末端キナーゼ (JNK)、細胞外シグナル調節キナーゼ p44 / p42 (ERK1 / 2) および p38 の関与を評価した (図 7 の B)。全てのナイーブ白血病細胞系において、これらの有糸分裂活性表現型を反映する上記キナーゼの構造的なリン酸化が見られた。成長停止と分化によってネモシスに応答

50

する K G - 1 細胞系および T H P - 1 細胞系においては、p 3 8 M A P K のリン酸化は劇的に抑制されており、一方、U - 9 3 7 細胞系においては、p 3 8 M A P K のリン酸化がネモーススによって変化することはなかった。類似しているが、より程度の低いリン酸化阻害が E R K 1 / 2 について明確であり、U - 9 3 7 細胞はここでもネモーススに対して非応答性だった。全ての細胞系において、J N K のリン酸化と発現のレベルの変化は比較的少なかった。U - 9 3 7 細胞が p 3 8 M A P K、J N K および E R K 1 / 2 のリン酸化について、T H P - 1 細胞系および K G - 1 細胞系と比べて高いネモースス非応答性レベルを示し、更にネモーススの影響を受けない A k t の持続性リン酸化を考え合わせると、表現型が異なるこれら白血病細胞の高増殖活性は、それぞれ異なる経路を使用することを示唆している。ネモースス応答性細胞においては、p 3 8 と E R K 1 / 2 M A P K の下方制御が成長停止と分化と関連していることも示唆している。

10

【 0 0 4 1 】

更に、単球と白血病細胞の分化と関連があることが知られている Janus タンパク質チロシンキナーゼファミリー (J A K) のメンバー (J A K 1、J A K 2、J A K 3 および T Y K 2) (Rane et al., 2002、Mangan et al., 2004) について、それらの発現を評価した。線維芽細胞ネモーススによって分化するように誘導した K G - 1 細胞および T H P - 1 細胞において、J A K 1 と J A K 3 の発現が増加した。非応答性の U - 9 3 7 細胞系において、J A K 1 の発現はネモーススによって下方制御され、J A K 3 の発現は観察されなかった (図 7 の B)。U - 9 3 7 細胞と、ネモースス応答性の K G - 1 細胞および T H P - 1 細胞との表現型の違いは、T Y K 2 の発現のみならず、J A K 3 の発現にも反映されていた。J A K 2 の発現については、成長停止及び分化のいずれとの相関関係も見られなかった (図 7 の B)。

20

【 0 0 4 2 】

考察

クラスター化した線維芽細胞は、細胞増殖抑制性、成長阻害性および分化性の応答を c - M e t 陰性白血病細胞系である T H P - 1 と K G - 1 で誘導することが可能であるが、c - M e t 陽性 U - 9 3 7 細胞系では何の効果も示さないことを示すデータを提示する。更に、ネモースス線維芽細胞は、I L - 1、I L - 6、I L - 8、I L - 1 1、L I F および G M - C S F などの血液生成と分化の調節に關与するサイトカインや成長因子 (L o t e m and Sachs, 2002、Zhu and Emerson, 2002) を豊富に産生するものであることを示す。これらの結果は、我々の過去のデータ (Bizik et al., 2004、Kankuri et al., 2005) と一致し、ネモースス線維芽細胞は大量のパラクリン仲介因子を産生することが可能であり、その効力の大部分は標的細胞の表現型と受容体発現プロファイルによって決定付けられることを示唆している。

30

【 0 0 4 3 】

細胞生存率と細胞死のバランスが崩れている腫瘍細胞は、未成熟なまたは未分化の表現型を獲得している (Bishop, 1991、Wang and Chen, 2000)。その持続性は、適応性免疫システムによる認識を避ける能力によって更に促進されている (Zou, 2005)。白血病細胞は白血球の未分化表現型を有し、樹状細胞様形態への分化を誘導することは、治療的な抗白血病性 T 細胞応答を刺激する (Charbonnier et al., 1999、Choudhury et al., 1999、Cignetti et al., 1999、Fujii et al., 1999、Claxton et al., 2001、Mohty et al., 2002、Cignetti et al., 2004)。よって新生細胞の分化は、血液癌において治療的利点をもたらすことができる (Reiss et al., 1986)。

40

【 0 0 4 4 】

成長停止の誘導に加え、ネモースス線維芽細胞が形態学的特性、機能的応答および表面抗原発現に基づく、白血病細胞の表現型依存的分化も促進することを示した。ネモーススに対する応答としての T H P - 1 細胞および K G - 1 細胞の分化は、F A C S で更に特徴付けたように、接着性の成熟抗原提示細胞様の型をはっきりと示した。フローサイトメトリーによる評価および細胞集団に基づく特徴づけに C D 4 5 ゲーティング法を用いた。C

50

D 4 5 と C D 4 5 R A は成熟赤血球とその中間前駆細胞以外の全ての造血細胞で発現されており、これら抗原レベルの増加は分化の程度と相関する (Hermiston et al., 2003)。その結果、これらの発現もリンパ球と骨髄細胞の成熟度を臨床的に特定するために有用である (van Lochem, 2004)。C D 4 5 の F A C S ゲーティングによって、散乱光値に基づく顆粒性が高く、細胞表面抗原である C D 1 1 c、C D 8 6、C D 5 4 および C D 1 3 の発現の高い新しい集団をネモースス応答性細胞系から見出した。ネモースス線維芽細胞と接触させると、これら細胞の中の S S C 値の低い集団においてさえも、特異的樹状細胞マーカー C D 1 1 c および T 細胞共刺激性 C D 8 6 の増加が明確であった。

【 0 0 4 5 】

骨髄樹状細胞のマーカーである 2 インテグリン C D 1 1 c (Osugi et al., 2002) の発現増加は、分化及び成熟と関連があり (Corbi and Lopez-Rodriguez, 1997、Noti and Reinemann, 1995)、我々はこのマーカーがネモースス応答細胞における共刺激分子 C D 8 6 の誘導と連係していることを見出した。C D 1 1 c は、細胞 - 細胞相互作用および細胞 - マトリクス相互作用を仲介する接着分子として働く (Shelley et al., 2002)。一方、C D 8 6 (B 7 - 2) は、共刺激シグナル伝達を仲介する T 細胞上の C D 2 8 分子および C T L A - 4 分子と結合し (Collins et al., 2002)、T 細胞の増殖、活性化およびクローンの増大を促進する (Coyle et al., 2001)。T 細胞 C T L A - 4 の刺激は、抗腫瘍活性を促進し、C D 2 8 の刺激は、細胞傷害性 T リンパ球の仲介する腫瘍の破壊を促進する (Zheng et al., 1998)。C D 1 1 c と同様に、白血病細胞上の C D 8 6 の発現は樹状細胞様表現型と関連付けて考えられている (Re et al., 2002)。

10

20

【 0 0 4 6 】

我々の研究は、K G - 1 細胞系と T H P - 1 細胞系は線維芽細胞ネモーススに対する応答として、より接着性の表現型を獲得することを示す。この現象は、我々の F A C S 解析によると、これら細胞における C D 1 1 c の誘導のみならず、接着性相互作用を仲介する造血系細胞と非造血細胞の両方で発現されている C D 5 4 (I C A M - 1) に対する陽性反応の増加によって説明することができる。I C A M - 1 は、例えば、2 サブファミリーインテグリンである C D 1 1 a / C D 1 8 (L F A - 1) や C D 1 1 b / C D 1 8 (M a c - 1) に結合することによって、接着性相互作用を仲介する (Marlin and Springer, 1987、Roebuck and Finnegan, 1999)。C D 1 1 c と同様に、I C A M - 1 は白血球の血管外遊走を仲介し、C D 8 6 と同様に、I C A M - 1 の結合は抗原提示における T 細胞活性化の共刺激シグナルとして機能する (Zuckerman et al., 1998、Grakoui et al., 1999、Hubbard and Rothlein, 2000)。

30

40

【 0 0 4 7 】

表現型を決定することによって、ネモースス処理が標的細胞表現型依存的に白血病細胞系における表面抗原の樹状細胞様発現を誘導するという証拠を発見した。更に我々の研究結果が示唆するところによると、ネモーススによって獲得した表現型は、マクロピノサイトーシスの活性が低い、成熟抗原提示細胞を想起させるものであった。抗原提示細胞との関連性は、主要組織適合性複合体クラス II 分子の提示のためにペプチドを開裂し、抗原処理に参加するアミノペプチダーゼである C D 1 3 が増加するという知見によって更に強化された (Larsen et al., 1996)。

【 0 0 4 8 】

我々のデータを分子細胞内レベルまで広げるために、成長停止と分化に関連する 2 つの主要な経路、即ち、アポトーシスカスケードにおいて鍵となる因子の活性化、およびいくつかの M A P キナーゼシグナル経路のリン酸化の関与について調査した。我々が知見したのは、実行因子カスパーゼ - 3 が集中的に開裂したことと、それと対照的に、B c l - 2、B c l - 2 X_L および B a x の発現に変化がなく、それに伴って開始因子カスパーゼ - 8 とカスパーゼ - 9 の開裂にも変化がなかったことである。実行因子カスパーゼが活性化にタンパク質分解性開裂を必要とするのに対し、開始因子は開裂なしに、オリゴマー化または 2 量体化することでも活性化される (Salvesen and Abrams, 2004)。従って、開裂の兆候を伴わない未開裂全長カスパーゼ - 8 レベルの増加は、ネモースス応答性細胞系で

50

あるTHP-1およびKG-1におけるカスパーゼ-8の活性化の可能性を排除するものではない。驚くべきことに、アポトーシスと、開裂によるカスパーゼ-3の活性化との間に明確な関連が存在するにもかかわらず、PARP(DNA修復に関連するカスパーゼ-3の基質)のタンパク質分解性プロセッシングの増加は起こらなかった。これは、カスパーゼ-3とカスパーゼ-8のアポトーシス非関連性分化機能を示唆している。

【0049】

PARPにはいくつかの機能があり、その活性および発現の増加は、DNAの損傷とDNA修復、細胞増殖と分化、ならびに転写制御と関連している(Ame et al., 2004)。アポトーシスの引き金となるエフェクターとしてのPARPの役割は不確かである(Leist et al., 1997)。我々はBax、Bcl-2およびBcl-2_Lのタンパク質レベルの増加がPARP発現の低下と関連付けられるという知見を得たことはなく、これはPARPの下方制御におけるアポトーシス非関連機構を示唆している。細胞分化が進行するとPARPの活性と発現は低下する(D'Amours et al., 1999、Virag and Szabo, 2002)ということは、我々の観察したPARP発現と開裂の低下が、成長停止のみならず、細胞分化と代謝阻害を反映することを示唆している。例えば、全トランス型レチノイン酸誘導性NB4細胞の好中球性分化に対する応答としてPARPは劇的に下方制御され(Bhatia et al., 1995)、この効果はPARPの過剰発現によってブロックされた(Bhatia et al., 1996)。分化の引き金となる効果が考えられるものの、我々の研究結果から、PARP発現とその活性は白血病細胞の高い有糸分裂速度を反映するという推測が導かれた。これは、成長停止後の白血病細胞は、有糸分裂の際に開かれた壊れやすいDNAを保護するための核内PARP発現とその活性をあまり必要としないためである(D'Amours et al., 1999)。

10

20

【0050】

カスパーゼ-3およびカスパーゼ-8は、単球のみならず、骨格筋細胞や骨芽細胞の分化過程の重要な調節因子である(Launay et al., 2005)。血液学および他の種類の悪性細胞において、カスパーゼ-8の下方制御は、アポトーシスに抗する手段として働く(Hopkins-Donaldson et al., 2003、Yang et al., 2003)。カスパーゼ-8の上方制御は、ここで示した白血病細胞に対する線維芽細胞ネモシスの活動のように、ネモシス応答性細胞においては上記とは逆の(より良性の)働きをすることが示唆された。更に、ネモシス処理後に細胞数の低下は検出されず、代わりに有糸分裂の劇的な停止を観察したという事実は、成長停止と、2種の細胞系の驚くほど類似した表現型との相関性をより一層強く示唆するものである。これは、ネモシス応答性表現型において、分化はアポトーシスによる細胞死よりも好まれることを意味する。

30

【0051】

JNK、ERKおよびp38の関与するMAPKカスケードの変化は、悪性細胞の増殖、分化および細胞死と関連付けて考えられてきた(Platanias, 2003)。我々の試験した細胞系においてはネモシスに対する応答としてJNKの発現やリン酸化が変化したものはなかった。しかし、p38 MAPKのリン酸化と、より低レベルであるがERK1/2のリン酸化は、ネモシスに対して分化と成長停止で応答する細胞系、即ち、THP-1細胞およびKG-1細胞、において顕著に抑制された。文献によると、細胞死および分化におけるp38 MAPKの役割は不可解であり(Platanias, 2003)、正常なおよび悪性の細胞における活性は別々に調節されているのかもしれない(Engelberg, 2004)。しかし、蓄積されていくデータは、活性化p38 MAPKは細胞の生存に対してエンハンサーとして機能することを示唆している(Villunger et al., 2000)。更に、p38はJurkat T細胞のアポトーシスを防止すること(Nemoto et al., 1998)、そして急性前骨髄性白血病細胞系の1種において全トランス型レチノイン酸誘導性分化を阻害する(Alsayed et al., 2001)という報告がある。

40

【0052】

この結果は、キナーゼ活性を反映するp38 MAPKのリン酸化に対する阻害は、ネモシスに対して分化と成長停止で応答する細胞においてのみ生じるという我々のデータ

50

と一致する。従ってこの結果は、高増殖性表現型は活性化 p 3 8 M A P K と関連があることを示唆し、これら細胞における、変化した若しくは構成的に活性化された p 3 8 経路の存在を示す。更に、応答性細胞系を線維芽細胞ネモシスに付すと、J A K キナーゼである J A K 1 と J A K 3 の誘導が生じる。これは、造血系の調節と分化において、J A K 3 (Rane and Reddy, 1994、Mangan et al., 2004) と、より低いレベルではあるが J A K 1 (Rodig et al., 1998) の発現制御が生じるという一般的な見解と一致する。ネモシス応答性細胞系における J A K の誘導は、分化の効果を仲介する際の I L - 6 と G M - C S F の関与を示唆している。

【 0 0 5 3 】

腫瘍細胞由来因子によって誘導されるように (Kankuri et al., 2005)、線維芽細胞において細胞クラスターが誘導したネモシスシグナルは、独特な種類の間質に固有の活性化能を提供する。血液学的起源の腫瘍細胞の分化に対する直接的な効果を通じて、ネモシスは免疫系の応答を悪性化するような影響を与える (図 8)。白血病細胞の樹状細胞系への分化は T 細胞の抗白血病作用を刺激するので (Charbonnier et al., 1999、Choudhury et al., 1999、Cignetti et al., 2004)、このような分化は免疫療法として提案することができる (Claxton et al., 2001、Mohty et al., 2002、Buchler et al., 2003)。我々の研究結果は、ネモシスに至る同型間質細胞 - 細胞相互作用は新生成長を調節し、抑制するのに十分なシグナルを提供するという初めての in vitro の証拠を提供する。

【 0 0 5 4 】

参考文献

Alsayed, Y., Uddin, S., Mahmud, N., Lekmine, F., Kalvakolanu, D.V., Minucci, S., Bokoch, G., and Plataniias, L.C. (2001). Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-trans-retinoic acid. *J. Biol. Chem.* 276, 4012-4019.

Ame, J.C., Spelnhauer, C., and de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *Bioessays* 26, 882-893.

Austyn, J.M. (1996). New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 183, 1287-1292.

Babusikova, O., Zeleznikova, T., Mlcakova, A., Kusenda, J., and Stevulova, L. (2005). The knowledge on the 3rd type hematogones could contribute to more precise detection of small numbers of precursor B-acute lymphoblastic leukemia. *Neoplasma* 52, 502-509.

Bendall, L.J., Daniel, A., Kortlepel, K., and Gottlieb, D.J. (1994). Bone marrow adherent layers inhibit apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Exp. Hematol.* 22, 1252-1260.

Bhatia, M., Kirkland, J.B., and Meckling-Gill, K.A. (1995). Modulation of poly(ADP-ribose) polymerase during neutrophilic and monocytic differentiation of promyelocytic (NB4) and myelocytic (HL-60) leukaemia cells. *Biochem. J.* 308, 131-137.

Bhatia, M., Kirkland, J.B., and Meckling-Gill, K.A. (1996). Overexpression of poly(ADP-ribose) polymerase promotes cell cycle arrest and inhibits neutrophilic differentiation of NB4 acute promyelocytic leukemia cells. *Cell Growth Differ.* 7, 91-100.

10

20

30

40

50

- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., and Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332-337.
- Bishop, J.M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64, 235-248.
- Bizik, J., Kankuri, E., Ristimaki, A., Taieb, A., Vapaatalo, H., Lubitz, W., and Vaheri, A. (2004). Cell-cell contacts trigger programmed necrosis and induce cyclooxygenase-2 expression. *Cell Death Differ.* 11, 183-195.
- Bradstock, K., Bianchi, A., Makrynika, V., Filshie, R., and Gottlieb, D. (1996). Long-term survival and proliferation of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells on human bone marrow stroma. *Leukemia* 10, 813-820. 10
- Buchler, T., Michalek, J., Kovarova, L., Musilova, R., and Hajek, R. (2003) Dendritic cell-based immunotherapy for the treatment of hematological malignancies. *Hematology* 8, 97-104.
- Buske, C., Hiddemann, W., and Wormann, B. (1994). Proliferation of human leukemic pre-B cells induced by human bone marrow stromal cells and murine fibroblasts. *Cell Biol. Int.* 18, 49-1058. 20
- Charbonnier, A., Gaugler, B., Sainty, D., Lafage-Pochitaloff, M., and Olive, D. (1999). Human acute myeloblastic leukemia cells differentiate in vitro into mature dendritic cells and induce the differentiation of cytotoxic T cells against autologous leukemias. *Eur. J. Immunol.* 29, 2567-2578.
- Choudhury, B.A., Liang, J.C., Thomas, E.K., Flores-Romo, L., Xie, Q.S., Agusala, K., Sutaria, S., Sinha, I., Champlin, R.E., and Claxton, D.F. (1999). Dendritic cells derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous, antileukemic T-cell responses. *Blood* 93, 780-786. 30
- Cignetti, A., Bryant, E., Allione, B., Vitale, A., Foa, R., and Cheever, M.A. (1999). CD34(+) acute myeloid and lymphoid leukemic blasts can be induced to differentiate into dendritic cells. *Blood* 94, 2048-2055.
- Cignetti, A., Vallario, A., Roato, I., Circosta, P., Allione, B., Casorzo, L., Ghia, P., and Caligaris-Cappio, F. (2004). Leukemia-derived immature dendritic cells differentiate into functionally competent mature dendritic cells that efficiently stimulate T cell responses. *J. Immunol.* 173, 2855-2865. 40
- Claxton, D.F., McMannis, J., Champlin, R., and Choudhury, A. (2001). Therapeutic potential of leukemia-derived dendritic cells: preclinical and clinical progress. *Crit. Rev. Immunol.* 21, 147-155.
- Collins, A.V., Brodie, D.W., Gilbert, R.J., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D.I., van der Merwe, P.A., and Davis, S.J. (2002). The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17, 201-210.
- Corbi, A.L., and Lopez-Rodriguez, C. (1997). CD11c integrin gene promoter activity during myeloid differentiation. *Leuk. Lymphoma.* 25, 415-425. 50

- Coyle, A.J., and Gutierrez-Ramos, J.C. (2001). The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat. Immunol.* 2, 203-209.
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., and Poirier, G. G. (1999). Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* 342, 249-268.
- Duhrsen, U., and Hossfeld, D.K. (1996). Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases. *Ann. Hematol.* 73, 53-70. 10
- Engelberg, D. (2004). Stress-activated protein kinases-tumor suppressors or tumor initiators? *Semin. Cancer Biol.* 14, 271-282.
- Fujii, S., Fujimoto, K., Shimizu, K., Ezaki, T., Kawano, F., Takatsuki, K., Kawakita, M., and Matsuno, K. (1999). Presentation of tumor antigens by phagocytic dendritic cell clusters generated from human CD34+ hematopoietic progenitor cells: induction of autologous cytotoxic T lymphocytes against leukemic cells in acute myelogenous leukemia patients. *Cancer Res.* 59, 2150-2158. 20
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.
- Greenberg, B.R., Woo, L., and Garewal, H.S. (1988). Effects of bone marrow fibroblastic cells and fibroblastic conditioned medium on HL-60 and KG-1. *Leuk. Res.* 12, 61-66.
- Griffin, J.D., and Lowenberg, B. (1986). Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood* 68, 1185-1195. 30
- Hermiston, M.L., Xu, Z., and Weiss, A. (2003). CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 107-137.
- Hopkins-Donaldson, S., Ziegler, A., Kurtz, S., Bigosch, C., Kandioler, D., Ludwig, C., Zangemeister-Wittke, U., and Stahel, R. (2003). Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell Death Differ.* 10, 356-364. 40
- Hubbard, A.K., and Rothlein, R. (2000). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1379-1386.
- Igawa, T., Kanda, S., Kanetake, H., Saitoh, Y., Ichihara, A., Tomita, Y., and Nakamura, T. (1991). Hepatocyte growth factor is a potent mitogen for cultured rabbit renal tubular epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 831-838.
- Kankuri, E., Cholujova, D., Comajova, M., Vaheri, A., and Bizik, J. (2005). Induction of hepatocyte growth factor/scatter factor by fibroblast clustering directly promotes tumor cell invasiveness. *Cancer Res.* 65, 9914-9922. 50

- Kmieciak, T.E., Keller, J.R., Rosen, E., Vande Woude, G.F. (1992). Hepatocyte growth factor is a synergistic factor for the growth of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 80, 2454-2457.
- Kubota, T., Nagao, T., and Arimori, S. (1988). Bone marrow fibroblasts-conditioned medium regulates the proliferation of leukemic cells. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 13, 45-51.
- Larsen, S.L., Pedersen, L.O., Buus, S., and Stryhn, A. (1996). T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides. *J. Exp. Med.* 184, 183-189. 10
- Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E., and Garrido, C. (2005). Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* 24, 5137-5148.
- Leist, M., Single, B., Kunstle, G., Volbracht, C., Hentze, H., and Nicotera, P. (1997). Apoptosis in the absence of poly-(ADP-ribose) polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 518-522. 20
- Liu, M., Lee, M.H., Cohen, M., Bommakanti, M., and Freedman, L.P. (1996). Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev.* 10, 142-153.
- Lotem, J., and Sachs, L. (2002). Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia. *Oncogene* 21, 3284-3294.
- Mangan, J.K., Rane, S.G., Kang, A.D., Amanullah, A., Wong, B.C., and Reddy, E.P. (2004). Mechanisms associated with IL-6-induced up-regulation of Jak3 and its role in monocytic differentiation. *Blood* 103, 4093-4101. 30
- Marlin, S.D., and Springer, T.A. (1987). Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 51, 813-819.
- Matsumoto, K., Ziober, B.L., Yao, C.C., and Kramer, R.H. (1995). Growth factor regulation of integrin-mediated cell motility. *Cancer Metastasis Rev.* 14, 205-217.
- Mayani, H., Guilbert, L.J., and Janowska-Wieczorek, A. (1992) Biology of the hematopoietic microenvironment. *Eur. J. Haematol.* 49, 225-233. 40
- Mohty, M., Olive, D., and Gaugler, B. (2002). Leukemic dendritic cells: potential for therapy and insights towards immune escape by leukemic blasts. *Leukemia* 16, 2197-2204.
- Montesano, R., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Orci, L. (1991). Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* 67, 901-908. 50

- Nemoto, S., Xiang, J., Huang, S., and Lin, A. (1998). Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 16415-16420.
- Noti, J.D., and Reinemann, B.C. (1995). The leukocyte integrin gene CD11c is transcriptionally regulated during monocyte differentiation. *Mol. Immunol.* 32, 361-369.
- Osugi, Y., Vuckovic, S., and Hart, D.N. (2002). Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes. *Blood* 100, 2858-2866. 10
- Platanias, L.C. (2003). Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 101, 4667-4679.
- Rane, S.G., Mangan, J.K., Amanullah, A., Wong, B.C., Vora, R.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Grana, X., and Reddy, E.P. (2002). Activation of the Jak3 pathway is associated with granulocytic differentiation of myeloid precursor cells. *Blood* 100, 2753-2762. 20
- Rane, S.G., and Reddy, E.P. (1994). JAK3: a novel JAK kinase associated with terminal differentiation of hematopoietic cells. *Oncogene* 9, 2415-2423.
- Re, F., Arpinati, M., Testoni, N., Ricci, P., Terragna, C., Preda, P., Ruggeri, D., Senese, B., Chirumbolo, G., Martelli, V., et al. (2002). Expression of CD86 in acute myelogenous leukemia is a marker of dendritic/monocytic lineage. *Exp. Hematol.* 30, 126-134.
- Reiss, M., Gamba-Vitalo, C., and Sartorelli, A.C. (1986). Induction of tumor cell differentiation as a therapeutic approach: preclinical models for hematopoietic and solid neoplasms. *Cancer Treat. Rep.* 70, 201-218. 30
- Roebuck, K.A., and Finnegan, A. (1999). Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 66, 876-888.
- Rogalsky, V., Zinzar, S., Golub, E., and Den, T. (1991). Fibroblast factor inducing leukemic cell differentiation and inhibiting malignant cell growth. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 628, 323-325.
- Salvesen, G.S., and Abrams, J.M. (2004). Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene* 23, 2774-2784. 40
- Shelley, C.S., Teodoridis, J.M., Park, H., Farokhzad, O.C., Bottinger, E.P., and Arnaout, M.A. (2002). During differentiation of the monocytic cell line U-937, Pur alpha mediates induction of the CD11c beta 2 integrin gene promoter. *J. Immunol.* 168, 3887-3893.
- Silzle, T., Randolph, G.J., Kreutz, M., and Kunz-Schughart, L.A. (2004). The fibroblast: sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue. *Int. J. Cancer* 50

r 108, 173-180.

Smith, R.S., Smith, T.J., Blieden, T.M., and Phipps, R.P. (1997). Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am. J. Pathol.* 151, 317-322.

Stelzer, G.T., Shults, K.E., and Loken, M.R. (1993). CD45 gating for routine flow cytometric analysis of human bone marrow specimens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 677, 265-280.

Tavassoli, M., and Friedenstein, A. (1983). Hemopoietic stromal microenvironment. *Am. J. Hematol.* 15, 195-203.

Torok-Storb, B., Iwata, M., Graf, L., Gianotti, J., Horton, H., and Byrne, M.C. (1999). Dissecting the marrow microenvironment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 872, 164-170.

van Lochem, E.G., van der Velden, V.H.J., te Marvelde, J.G., Westerdal, N.A.C., and van Dongen, J.J.M. (2004). Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry* 60B, 1-13.

Villunger, A., O'Reilly, L.A., Holler, N., Adams, J., and Strasser, A. (2000). Fas ligand, Bcl-2, granulocyte colony-stimulating factor, and p38 mitogen-activated protein kinase: Regulators of distinct cell death and survival pathways in granulocytes. *J. Exp. Med.* 192, 647-658.

Virag, L., and Szabo, C. (2002). The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol. Rev.* 54, 375-429.

Wang, H., and Sullivan, A.K. (1992). Effects of a fibroblast-derived inhibitor on the growth of normal marrow and leukemic clonogenic cells. *Leuk. Res.* 16, 693-701.

Wang, Z.Y., and Chen, Z. (2000). Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet Oncol.* 1, 101-106.

Yang, X., Merchant, M.S., Romero, M.E., Tsokos, M., Wexler, L.H., Kontny, U., Mackall, C.L., and Thiele, C.J. (2003). Induction of caspase 8 by interferon gamma renders some neuroblastoma (NB) cells sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) but reveals that a lack of membrane TR1/TR2 also contributes to TRAIL resistance in NB. *Cancer Res.* 63, 1122-1129.

Youn, B.S., Mantel, C., and Broxmeyer, H.E. (2000). Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis. *Immunol. Rev.* 177, 150-174.

Zheng, P., Wu, Y., Guo, Y., Lee, C., and Liu, Y. (1998). B7-CTLA4 interaction enhances both production of antitumor cytotoxic T lymphocytes and resistance to tumor challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6284-6289.

10

20

30

40

50

Zhu, J., and Emerson, S.G. (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 21, 3295-3313.

Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat. Rev. Cancer* 5, 263-274.

Zuckerman, L. A., Pullen, L., and Miller, J. (1998). Functional consequences of costimulation by ICAM-1 on IL-2 gene expression and T cell activation. *J. Immunol.* 160, 3259-3268.

【図面の簡単な説明】

10

【0055】

【図1-1】白血病細胞系における c - M e t 発現、およびネモースに付すために選択した細胞系の成長特性。 A : 白血病細胞系 K G - 1、T H P - 1、U - 9 3 7、Jurkat、Raji および K 5 6 2 における c - M e t 受容体の発現。矢印は、正常なプロセッシングを受けた c - M e t (1 4 5 k D a) の位置を示す。

【図1-2】 B : 白血病細胞系 K G - 1、T H P - 1 および U - 9 3 7 の増殖動力学。ネモース線維芽細胞スフェロイドとの共培養によって刺激した場合と刺激しない場合を示した。図示した時点における処理間の p 値 : * は $p < 0.05$ 、** は $p < 0.01$ 、*** は $p < 0.001$ 。

【図1-3】 C : 白血病細胞系 K G - 1、T H P - 1 および U - 9 3 7 を細胞周期 G 0 G 1 期、G 2 期および S 期に分けた時の DNA ヒストグラムデータおよびパーセンテージ。ネモース線維芽細胞スフェロイドと 9 6 時間共培養することによって刺激した場合（塗りつぶしたバー）と刺激しない場合（白抜きのバー）を示した。

20

【図2-1】レンチウイルスベクターを用いた、c - M e t による T H P - 1 細胞のトランスダクション。 A : 白血病細胞系 K G - 1、T H P - 1 および U - 9 3 7 における c - M e t の発現。ネモース線維芽細胞スフェロイドで 9 6 時間刺激した場合（+）と刺激しない場合（-）を示した。 B : 対照 G F P でトランスダクションした T H P - 1 細胞および c - M e t でトランスダクションした T H P - 1 細胞の、図示した時点における c - M e t 発現の動力学。

【図2-2】 C : 対照 G F P - レンチウイルスベクターでトランスダクションした T H P - 1 細胞および c - M e t - レンチウイルスベクターでトランスダクションした T H P - 1 細胞の増殖動力学。ネモース線維芽細胞スフェロイドとの共培養によって刺激した場合と刺激しない場合を示した。図示した時点における処理間の p 値 : * は $p < 0.05$ 、** は $p < 0.01$ 、*** は $p < 0.001$ 。

30

【図3-1】白血病細胞のネモースに対する、接着性、形態および走化性による応答。 A : 白血病細胞系 K G - 1、T H P - 1 および U - 9 3 7 について、細胞集団内の全細胞数に対して、ネモース線維芽細胞との共培養による刺激後に培養皿に接着した細胞数のパーセンテージを、未刺激細胞の場合と比較した結果。*** は、対応する対照細胞と比較した際の $p < 0.001$ 。

【図3-2】 B : ネモース線維芽細胞スフェロイドによる刺激有りまたは刺激なしの条件における、接着細胞の形態。細胞の伸長および仮足の存在は刺激した K G - 1 細胞および T H P - 1 細胞では明らかだったものの、U - 9 3 7 細胞は刺激後もその表現型を維持していた。 C : K G - 1 細胞、T H P - 1 細胞および U - 9 3 7 細胞による細胞間接着因子 - 1 (I C A M - 1) の発現。ネモース線維芽細胞スフェロイドとの共培養によって刺激した場合（+）と刺激しない場合（-）を示した。ネモース応答性細胞系である K G - 1 と T H P - 1 における I C A M - 1 発現の増加は、細胞培養皿への接着増加と関連付けられた。 D : 白血病細胞 (K G - 1、T H P - 1 と U - 9 3 7) の、共培養における線維芽細胞クラスターに対する走化性運動の定量および形態。K G - 1 細胞および T H P - 1 細胞の走化性蓄積の増加が、ネモーススフェロイドの周辺に観察されたが、U - 9 3 7 細胞は非応答性だった。*** は U - 3 9 7 細胞に対する $p < 0.001$ 。

40

50

【図4-1】CD86表面抗原発現の時間依存性。ネモシス線維芽細胞スフェロイドと共培養した白血病細胞系KG-1、THP-1およびU-937のCD86発現を図示した時点でFACSで評価した。

【図4-2】CD86表面抗原発現の時間依存性(図4-1の続き)。

【図5】患者由来サンプルから細胞を分離するための装置。

【図6】線維芽細胞のスフェロイドクラスターおよび単層からの、血液生成関連サイトカインの放出。スフェロイドまたは単層として培養した線維芽細胞が、スフェロイド形成後の対応する時間(96時間目)に産生するサイトカイン(インターロイキンIL-1、IL-6、IL-8、IL-11、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)および白血病阻害因子(LIF))の解析。***はグループ間の $p < 0.001$ 。

【図7-1】白血病細胞のアポトーシス関連タンパク質および細胞内シグナルタンパク質のイムノプロット解析。A:白血病細胞系KG-1、THP-1およびU-937によるアポトーシス関連分子の発現。ネモシス線維芽細胞スフェロイドで96時間刺激した場合(+)と刺激しない場合(-)を示した。ネモシス応答性細胞系であるKG-1とTHP-1においては、カスパーゼ-3およびカスパーゼ-8の活性関連開裂が明らかだった。カスパーゼ-9の開裂産物や、開裂型ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)の発現減少は観察されなかった。上記のネモシス応答性細胞系とネモシス非応答性細胞系U-937との表現型の差異は、アポトーシス促進性Baxタンパク質の発現レベルから明らかである。

【図7-2】B:白血病細胞系KG-1、THP-1およびU-937における、分裂促進物質-活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)であるp38、JNK、ERK1/2およびAktキナーゼのリン酸化産物発現量と全発現量の、JanusキナーゼファミリーのJAK1、JAK2、JAK3およびTYK2との比較。ネモシス線維芽細胞スフェロイドで刺激した場合(+)と刺激しない場合(-)を示した。ネモシス応答性細胞系KG-1とTHP-1においては、p38とERK1/2の脱リン酸化の増加が、JAK1とJAK3の発現増加と共に明らかだった。ネモシス非応答性細胞系U-937はこれらタンパク質の発現の変化を示さなかった。

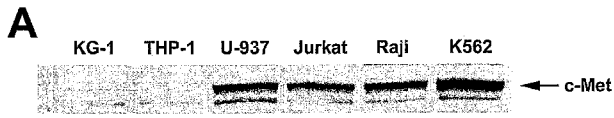
【図8】ネモシス由来シグナルの固形腫瘍細胞および造血腫瘍細胞に対する効果をまとめた模式図。線維芽細胞ネモシスの効果と、上皮性腫瘍細胞の侵襲性と共に、白血病細胞の成長停止および分化誘導を標的細胞表現型依存的に誘導する仲介物質を模式的に示した。破線は、このカスケードに関連した起こりうる生物学的および病因学的なプロセスを示す。

10

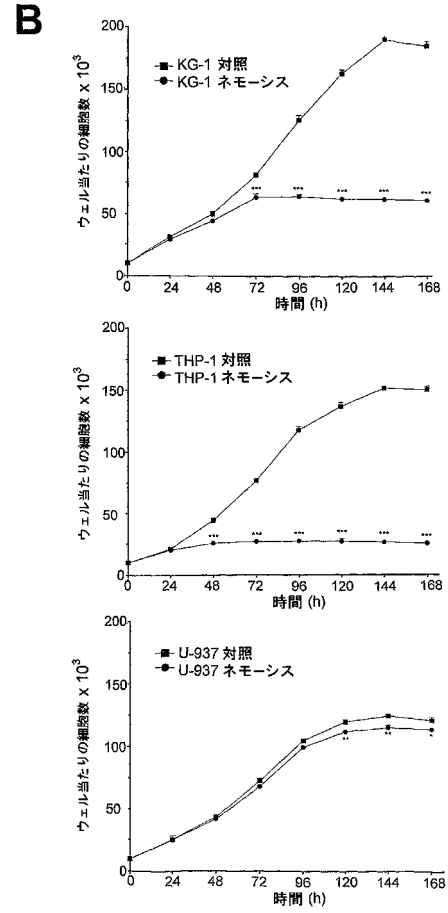
20

30

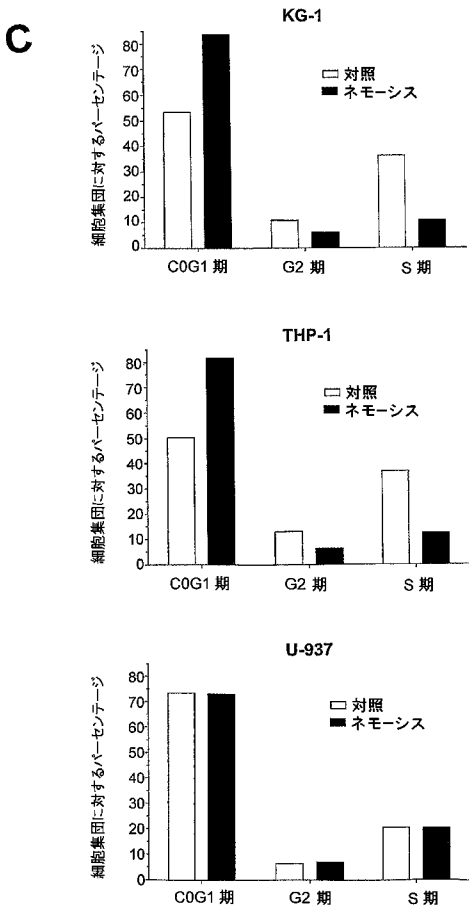
【 図 1 - 1 】



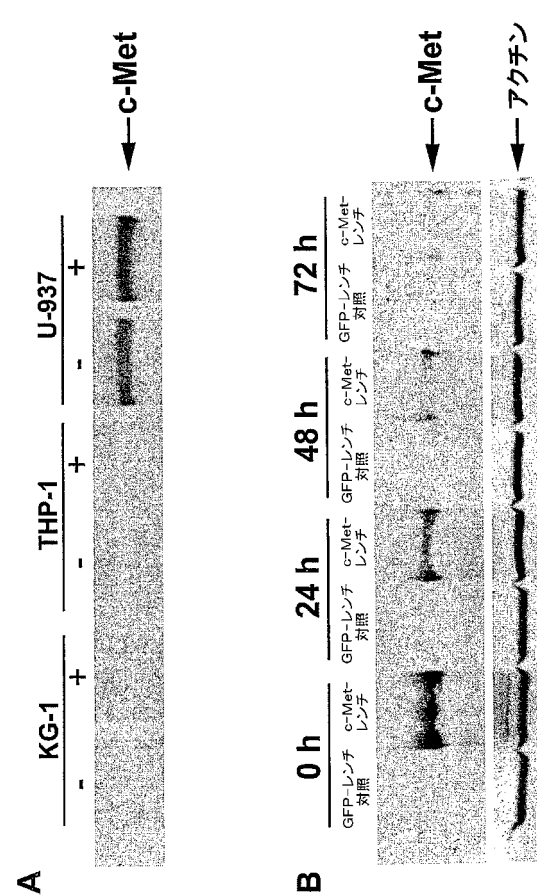
【 図 1 - 2 】



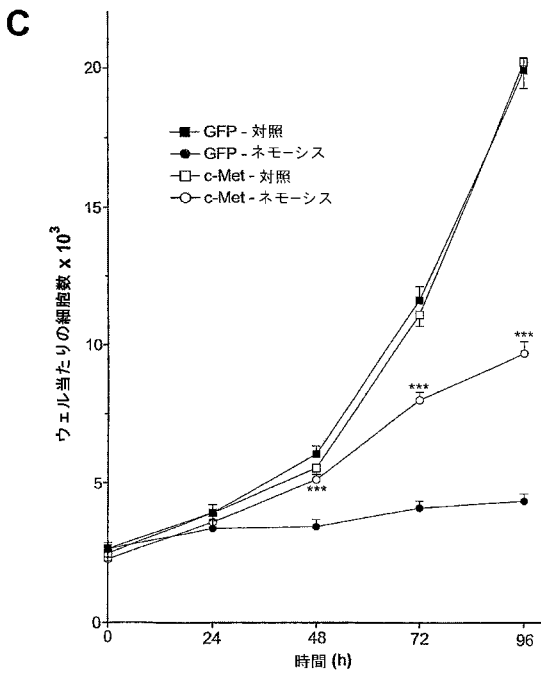
【 図 1 - 3 】



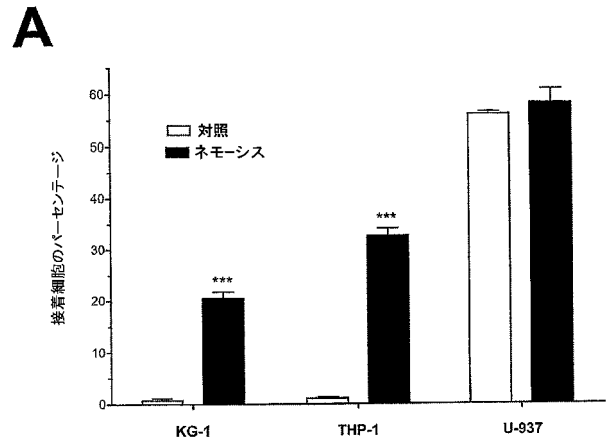
【 図 2 - 1 】



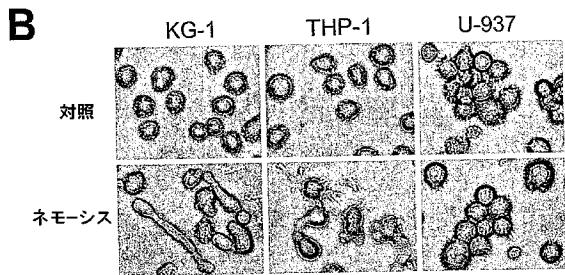
【 図 2 - 2 】



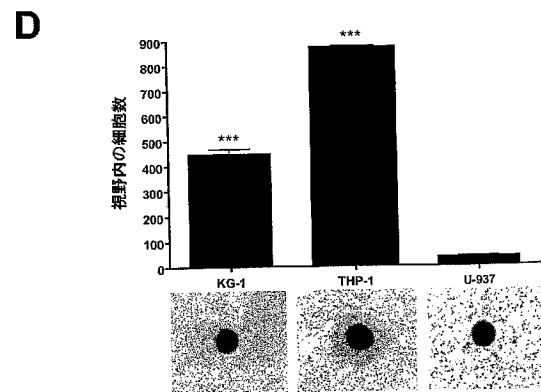
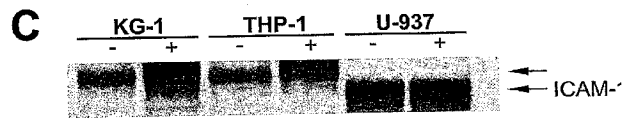
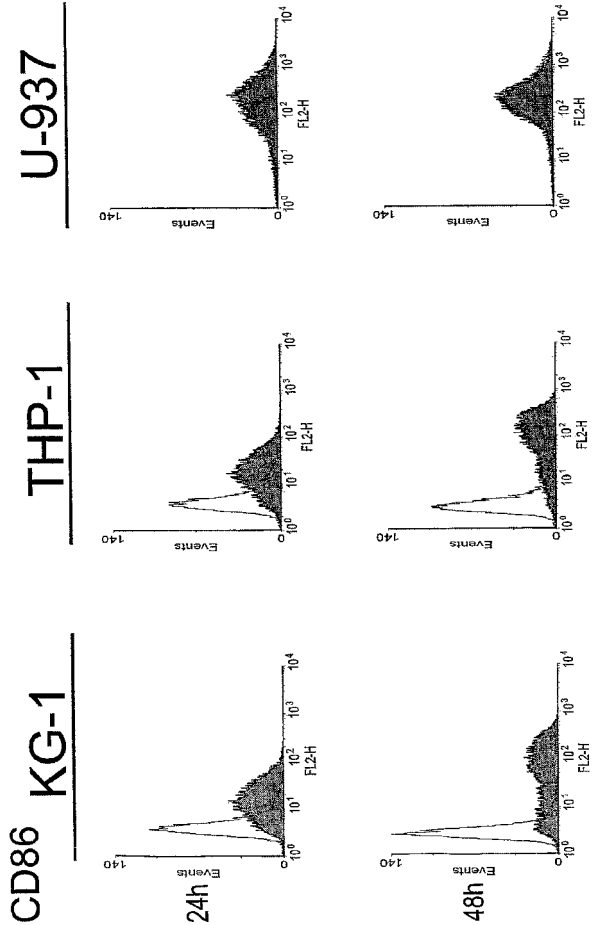
【 図 3 - 1 】



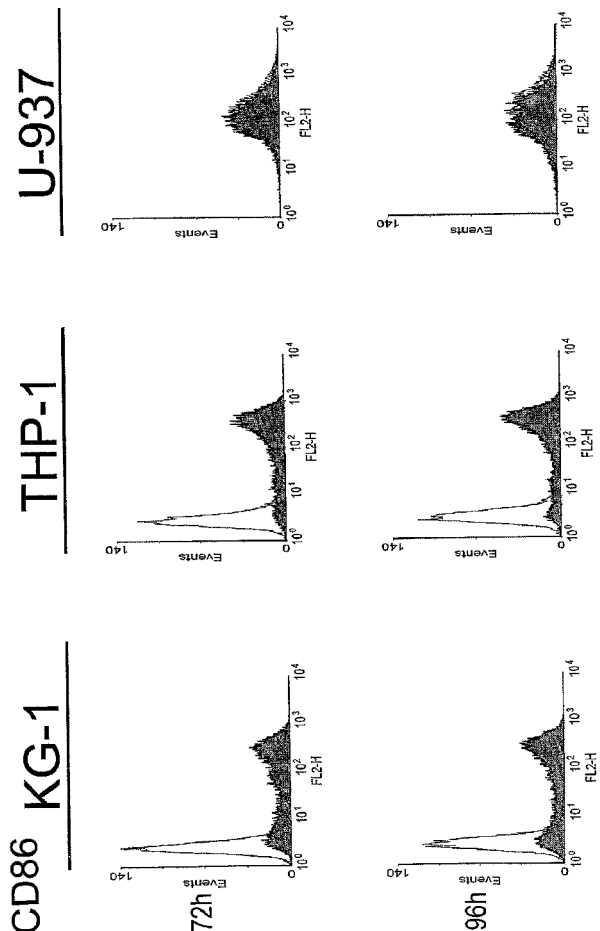
【 図 3 - 2 】



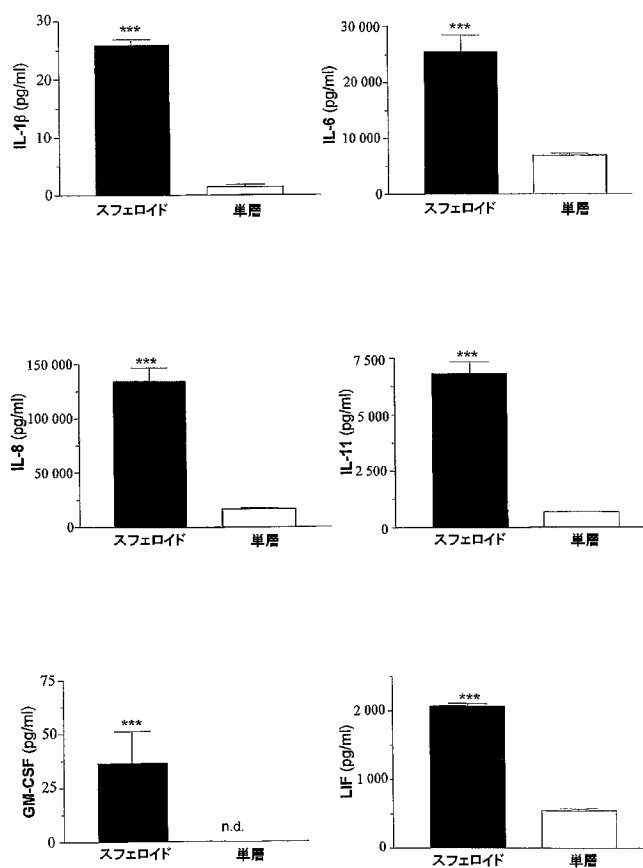
【 図 4 - 1 】



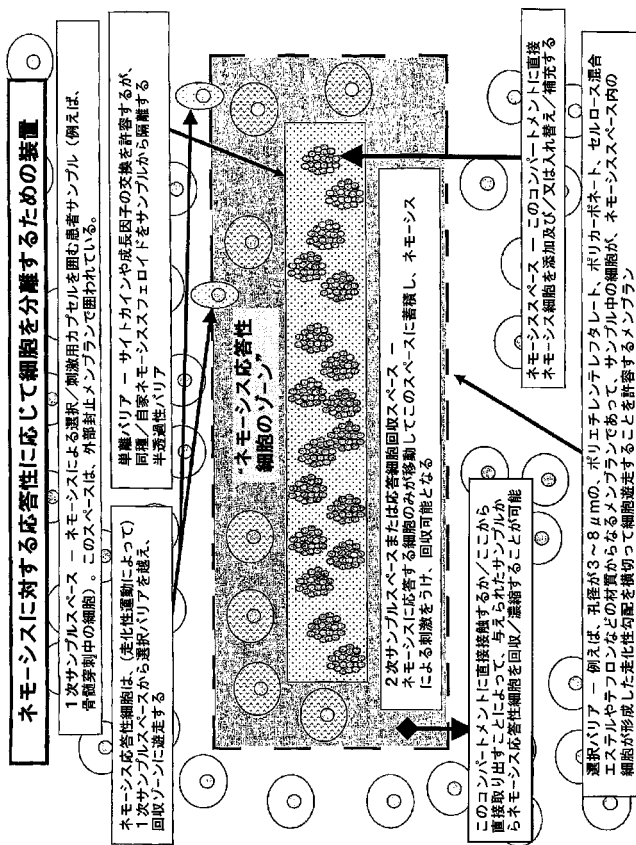
【 図 4 - 2 】



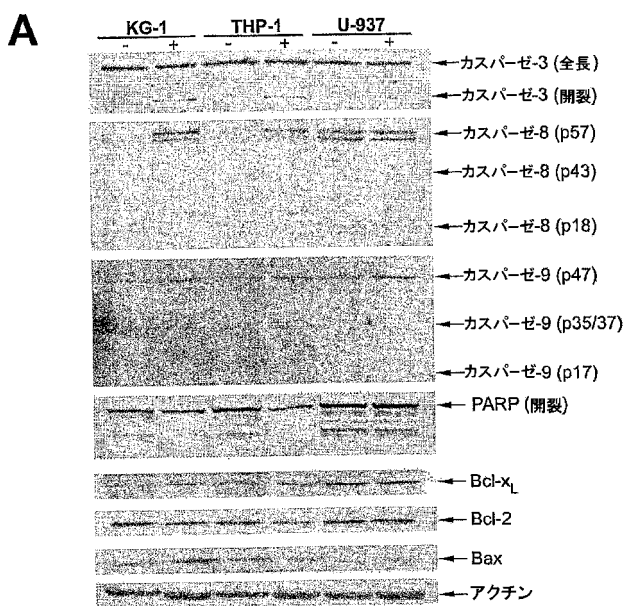
【 図 6 】



【 図 5 】

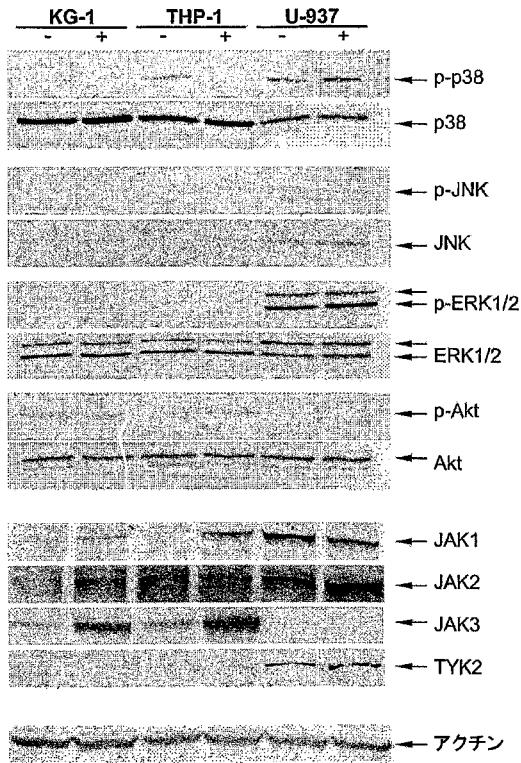


【 図 7 - 1 】

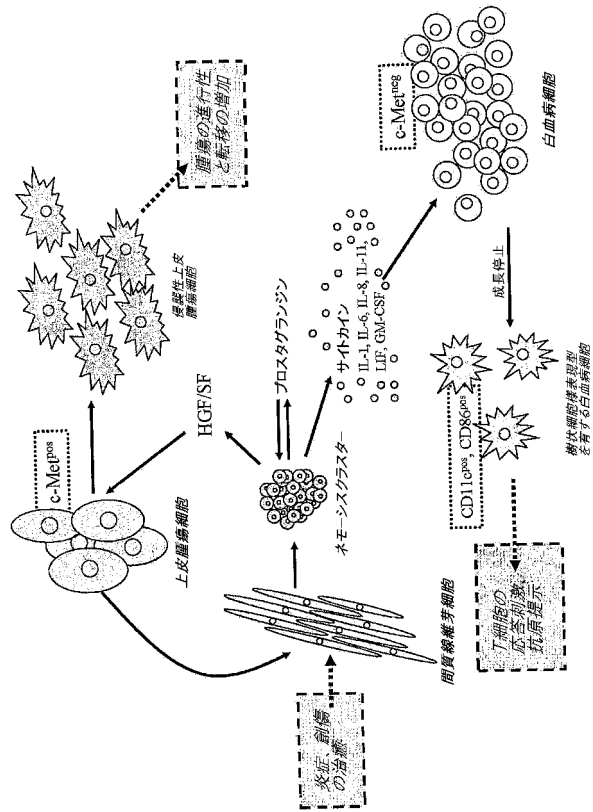


【 図 7 - 2 】

B



【 図 8 】



【 手続 補正書 】

【 提出日 】 平成 16 年 4 月 30 日 (2004.4.30)

【 手続 補正 1 】

【 補正 対象書類名 】 特許 請求 の 範囲

【 補正 対象項目名 】 全文

【 補正 方法 】 変更

【 補正 の 内容 】

【 特許 請求 の 範囲 】

【 請求 項 1 】

細胞サンプルの処理、好ましくは診断または治療を目的とした処理、を行うための方法であって、

a) 間葉系細胞を、細胞が互いに接着して多細胞凝集塊を形成する条件下で培養し、そして

b) 細胞サンプル内の細胞を上記工程 a) で形成された多細胞凝集塊または条件培地と共培養し、該細胞サンプル内の細胞の成長およびステータスの少なくとも一方を調節する

ことを包含する方法。

【 請求 項 2 】

工程 b) において、該細胞サンプルと該多細胞凝集塊との間に半透性メンブンを設け、該半透性メンブンはサイトカインや成長因子の交換を許容するが、間葉系細胞からなる凝集塊を該細胞サンプル内の細胞から隔離することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【 請求 項 3 】

該細胞サンプル内の細胞が白血病細胞であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

該多細胞凝集塊との共培養に対して応答する細胞を該細胞サンプルから選択する工程 c) を更に包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

共培養に対して走化性運動で応答する細胞を選択することを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

該細胞を、治療または診断に用いるために選択することを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

該細胞サンプルが患者由来サンプルであり、該多細胞凝集塊が自家間葉系細胞に由来することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

該細胞サンプルが患者由来サンプルであり、該多細胞凝集塊が同種間葉系細胞に由来することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

細胞サンプルから細胞を選択するための装置であって、第 1 コンパートメントと第 2 コンパートメントを包含し、該第 1 コンパートメントは第 2 コンパートメントの内部に設けられており、該第 1 コンパートメントには、バッファー及び該バッファー中に存在する線維芽細胞または間葉系細胞の多細胞凝集塊が収容されており、該第 1 コンパートメントは、2つのコンパートメントの間でバッファー、サイトカインや成長因子の交換を許容する半透性メンブランによって第 2 コンパートメントから分離されており、そして第 2 コンパートメントは、細胞の移動を許容する孔径を有する第 2 メンブランによって細胞のサンプルから分離されていることを特徴とする装置。

【請求項 10】

2つのコンパートメントと細胞のサンプルが、外部封止メンブランで囲われていることを特徴とする、請求項 9 に記載の装置。

【請求項 11】

該半透性メンブランが、2つのコンパートメント間の細胞の交換を許容しないものであることを特徴とする、請求項 9 に記載の装置。

【請求項 12】

該半透性メンブランの孔径が $0.2 \sim 2 \mu\text{m}$ であり、該第 2 メンブランの孔径が $3 \sim 8 \mu\text{m}$ であることを特徴とする、請求項 9 に記載の装置。

【請求項 13】

該サンプルが骨髓穿刺または末梢血サンプルであることを特徴とする、請求項 9 に記載の装置。

【請求項 14】

白血病細胞サンプルの処理、好ましくは診断または治療を目的とした処理、を行うための方法であって、

a) 線維芽細胞または間葉系細胞を、細胞が互いに接着して多細胞凝集塊を形成する条件下で培養し、そして

b) 白血病細胞サンプル内の細胞を上記工程 a) で形成された多細胞凝集塊または条件培地と共培養し、それにより該白血病細胞サンプル内の白血病細胞の成長およびステータスの少なくとも一方を調節することを包含する方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2007/050179

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet 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) IPC8: C12N, C12M, B01L Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched FI, SE, NO, DK Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CAPLUS	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
X Y	SILZLE T. et al. Tumor-Associated Fibroblasts Recruit Blood Monocytes into Tumor Tissue. European Journal of Immunology, 2003, vol. 33, pages 1311-1320 the whole document 1, 4-6 2
Y	MURAKAMI S. et al. Development of Co-culture System of Hepatocytes with Bone Marrow Cells for Expression and Maintenance of Hepatic Functions. The International Journal of Artificial Organs, 2004, vol. 27, no. 2, pages 118-126, page 119, right column, third paragraph 2
A	KANKURI E. et al. Induction of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor by Fibroblast Clustering Directly Promotes Tumor Cell Invasiveness. Cancer Research, November 2005, vol. 65, no. 21, pages 9914-9922 1-8
A	BIZIK J. et al. Cell-cell Contacts Trigger Programmed Necrosis and Induce Cyclooxygenase-2 Expression. Cell Death and Differentiation, 2004, vol. 11, pages 183-195 1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 26 June 2007 (26.06.2007)	Date of mailing of the international search report 25 July 2007 (25.07.2007)
Name and mailing address of the ISA/FI National Board of Patents and Registration of Finland P.O. Box 1180, FI-00101 HELSINKI, Finland Facsimile No. +358 9 6939 5328	Authorized officer Petra Vartiainen Telephone No. +358 9 6939 500

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2007/050179

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	BIZIK J. et al. Lecture NO. 21. Nemosis - Prospective Cell Based Therapy. Cancer 2006: From molecular biology processes to tumor-tailored therapy. Book of abstracts. CC ACADEMIA, Stara Lesna, High Tatras, Slovakia, 20-24 August 2006. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.exon.sk/Data/Scientific_Programme/BookOfAbstracts.pdf >, the whole document	1,3
P, A	HARJULA A. et al. Fibroblast Nemosis Induces Endothelial Tubulogenesis and Promotes Wound Healing. 55th Annual Meeting of the Scandinavian Association for Thoracic Surgery and the 26th Annual Meeting of the Scandinavian Society for Extracorporeal Technology, Reykjavik from 16 to 19 August 2006. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.scandinavian-ats-org/documents/PDF/30.pdf >	1-8
A	WO 2005/076845 A2 (THERADIGM, INC.) 25 August 2005 (25.08.2005), claims 41-43	9-13
A	US 5139951 A (BUTZ DAVID et al.) 18 August 1992 (18.08.1992), Figure 4, Column 7, fifth paragraph	9-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2007/050179

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 1-13 (all in part)
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:
See extra sheet

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:

See extra sheet

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/FI2007/050179

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members(s)	Publication date
WO 2005/076845 A2	25/08/2005	CN 1961068 A	09/05/2007
		KR 20070001171 A	03/01/2007
		NO 20063772 A	03/10/2006
		EP 1718733 A2	08/11/2006
		CA 2555376 A1	25/08/2005
		AU 2005213326 A1	25/08/2005
		US 2005176141 A1	11/08/2005
.....			
US 5139951 A	18/08/1992	WO 9207063 A2	30/04/1992
		JP 3081241B2 B2	28/08/2000
		EP 0552308 A1	28/07/1993
		DE 69126882T T2	20/11/1997
		DE 69126882D D1	21/08/1997
		US 5272083 A	21/12/1993
.....			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2007/050179

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.
C12N 5/08 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)
C12M 3/06 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2007/050179

Box No. II 2.

The definition of the term "mesenchymal cells" used in claims 1-2 and 7-9, is missing from the present application. So, the subject-matter of claims 1-13 is unclear (Article 6 PCT).

Furthermore, support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT are not fulfilled for the whole of the claimed scope. According to the description (see page 1, lines 3-4), the present invention is directed to a method of treating cells by co-culturing them with activated fibroblasts in order to regulate the growth/status of the cells. The experiments disclosed in the present application relate only to fibroblasts, not to mesenchymal cells. Therefore, the claims lack support, and the application lacks disclosure to such an extent that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Consequently, the search has been carried out on those parts of the claims, which are clear, supported and disclosed, namely on those parts relating to fibroblasts.

Box No. III

This International Searching Authority considers that this international application contains the following inventions:

1. Claims: 1-8

A method for treating a cell sample, preferably for a diagnostic or therapeutic purpose, wherein the method comprises the steps of culturing fibroblast cells or mesenchymal cells under conditions that induce the cells to adhere to each other so that multicellular aggregates are formed; and co-culturing the cells in the cell sample with the multicellular aggregates in order to regulate the growth and/or status of the cells in the cell sample.

2. Claims 9-13

A device for selecting cells from a sample of cells, the device comprising a first compartment and a second compartment, the first compartment being arranged within the second compartment, wherein the first compartment comprises multicellular aggregates of fibroblast cells or mesenchymal cell in a buffer, the first compartment being separated from the second compartment by a semi-permeable membrane allowing the exchange of buffer, cytokines and growth factors between the compartments; and wherein the second compartment is separated from the sample of cells by a second membrane having pore size allowing cells to migrate across the membrane.

フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

(74)代理人 100116838

弁理士 渡邊 潤三

(72)発明者 ビジク, ヨゼフ

スロバキア共和国、8 5 1 0 1 プラチスラヴァ、イリュシノヴァ 6

(72)発明者 ハルユラ, アリ

フィンランド国、エフアイ - 0 0 1 0 0 ヘルシンキ、トーロンカトゥ 7 エー 7

(72)発明者 カンクリ, エスコ

フィンランド国、エフアイ - 0 0 6 7 0 ヘルシンキ、パロヘイナンティエ 5 0 エー

Fターム(参考) 4B029 AA08 BB11 CC02 FA15 GB04

4B065 AA90 AC12 BC41 BC50 CA44 CA46

4C087 AA01 AA02 AA03 BB63 CA04 NA14 ZB21 ZB27