

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4601237号
(P4601237)

(45) 発行日 平成22年12月22日(2010.12.22)

(24) 登録日 平成22年10月8日(2010.10.8)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 5/074 (2010.01)
A 01 K 67/02 (2006.01)C 12 N 5/00 202 D
A 01 K 67/02

請求項の数 8 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2001-575157 (P2001-575157)
 (86) (22) 出願日 平成13年4月10日 (2001.4.10)
 (65) 公表番号 特表2003-530103 (P2003-530103A)
 (43) 公表日 平成15年10月14日 (2003.10.14)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2001/011713
 (87) 國際公開番号 WO2001/077303
 (87) 國際公開日 平成13年10月18日 (2001.10.18)
 審査請求日 平成18年6月8日 (2006.6.8)
 (31) 優先権主張番号 09/545,659
 (32) 優先日 平成12年4月10日 (2000.4.10)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 504258240
 レイベン バイオテクノロジーズ, インコ
 ーポレイティド
 アメリカ合衆国, カルフォルニア 940
 80, サウス サン フランシスコ, コー
 ポレイト ドライブ 1
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト卵巣中皮細胞ならびにその単離方法および使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト胎児卵巣中皮細胞の集団であって、該卵巣中皮細胞の少なくとも 85 % は、卵巣表面上皮細胞または顆粒膜細胞へと分化することが可能であり、そして該卵巣中皮細胞は、サイトケラチン 1、サイトケラチン 5、サイトケラチン 6、サイトケラチン 7、サイトケラチン 8、サイトケラチン 10、サイトケラチン 11、サイトケラチン 13、サイトケラチン 15、サイトケラチン 16、サイトケラチン 18、サイトケラチン 19 およびビメンチンからなる群より選択される細胞表面マーカーの発現によって同定可能であり、該ヒト胎児卵巣中皮細胞の集団が、以下：

- (a) ヒト胎児卵巣中皮細胞の供給源をエキソビオで顕微解剖する工程；
- (b) 該卵巣中皮細胞の寿命を維持するに十分な培養条件下で該ヒト胎児卵巣中皮細胞の供給源を栄養培地中に配置する工程であって、該栄養培地は、インスリン、トランスフェリン、上皮増殖因子、 - トコフェロール、組換えヒトヘレグリン 1、ウシ血清アルブミンおよびアプロチニンからなる栄養を含む、工程；
- (c) 該卵巣中皮細胞の供給源からの卵巣中皮細胞の該栄養培地中への移動を可能にする工程 (b) の培養条件を維持する工程；
- (d) コラゲナーゼ - ディスパーザとのインキュベーションおよびそれに続く密度勾配分離により、卵巣中皮細胞を富化させる工程；
- (e) 該卵巣中皮細胞を凝集物または単層形成物を形成させるに適切で十分な培養条件を維持する工程；ならびに

10

20

(f) 該凝集物または単層形成物を継代培養して、卵巣中皮細胞の集団を得る工程であつて、ここで該細胞の少なくとも 85% が、卵巣表面上皮細胞または顆粒膜細胞へと分化することが可能である工程、

を包含する方法によって単離される、ヒト胎児卵巣中皮細胞の集団。

【請求項 2】

栄養培地において維持される前記卵巣中皮細胞は、卵巣表面上皮細胞または顆粒膜細胞へと分化する多能性能を保持する、請求項 1 に記載のヒト胎児卵巣中皮細胞の集団。

【請求項 3】

前記卵巣中皮細胞は、立方上皮細胞の形態を有する、請求項 1 に記載のヒト胎児卵巣中皮細胞の集団。

10

【請求項 4】

ヒト胎児卵巣中皮細胞の集団を単離する方法であつて：

(a) ヒト胎児卵巣中皮細胞の供給源をエキソビオで顯微解剖する工程；

(b) 該卵巣中皮細胞の寿命を維持するに十分な培養条件下で該ヒト胎児卵巣中皮細胞の供給源を栄養培地中に配置する工程であつて、該栄養培地は、インスリン、トランスフェリン、上皮増殖因子、 - トコフェロール、組換えヒトヘレグリン 1、ウシ血清アルブミンおよびアプロチニンからなる栄養を含む、工程；

(c) 該卵巣中皮細胞の供給源からの卵巣中皮細胞の該栄養培地中への移動を可能にする工程 (b) の培養条件を維持する工程；

(d) コラゲナーゼ - ディスパーゼとのインキュベーションおよびそれに続く密度勾配分離により、卵巣中皮細胞を富化させる工程；

20

(e) 該卵巣中皮細胞を凝集物または単層形成物を形成させるに適切で十分な培養条件を維持する工程；ならびに

(f) 該凝集物または単層形成物を継代培養して、卵巣中皮細胞の集団を得る工程であつて、ここで該細胞の少なくとも 85% が、卵巣表面上皮細胞または顆粒膜細胞へと分化することが可能である工程、

を包含する、方法。

【請求項 5】

異種レシピエントに対して免疫原の供給源を提供するための組成物であつて、請求項 1 に記載のヒト胎児卵巣中皮細胞の集団を含み、該組成物は免疫応答を誘導するに有効な量での該レシピエントに対する投与に適している、組成物。

30

【請求項 6】

非ヒト哺乳動物レシピエントにおけるヒト卵巣組織モデルを生成する方法であつて、

請求項 1 に記載のヒト胎児卵巣中皮細胞の集団を該レシピエントに投与する工程であつて、該卵巣中皮細胞は、まず、基礎栄養において維持され、次いで、該レシピエント内の位置に投与され、該位置は、該卵巣中皮細胞の増殖および分化を支持し得る、工程、を包含する、方法。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの薬物の薬学的な開発のための卵巣中皮細胞特異的な生物学的成分の供給源を提供する方法であつて、

40

請求項 1 に記載のヒト胎児卵巣中皮細胞の集団からの卵巣中皮細胞またはその細胞の任意の部分を、開発の下にある該薬物の標的として使用する工程、を包含する、方法。

【請求項 8】

バイオアッセイの開発における核酸またはタンパク質の供給源を提供する方法であつて、

請求項 1 に記載のヒト胎児卵巣中皮細胞の集団から核酸またはタンパク質を単離する工程、および

該核酸またはタンパク質を、該バイオアッセイにおける 1 つ以上の主要成分として使用する工程、

50

を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、発生生物学分野および細胞生物学分野にある。詳細には、本発明は、卵巣表面上皮細胞および顆粒膜細胞に分化し得る卵巣中皮細胞集団、卵巣中皮細胞の単離の方法、卵巣中皮細胞の特徴づけ、ならびに卵巣中皮細胞の使用に関する。

【0002】

(背景技術)

卵巣癌は、女性における、癌に起因した死の、最も一般的な原因の1つである。Boring C.C.ら、CA - Cancer J. Clin. 41, 19~36 (1991)。¹⁰ 卵巣癌の約80~90%の症例において、卵巣表面上皮細胞は、癌腫形質転換が起こる組織供給源と考えられる。Nicosia S.V. Pathology of Human Neoplasms. New York: Raven Press 435~486 (1988); Scully R.E. Am. J. Pathol. 87: 686~720 (1977)。卵巣表面上皮(OSE)は、卵巣の表面を覆う単細胞層であり、卵巣の臍において、体腔の中皮と連続する。Dubeau L.ら、Anticancer Research 10: 1233~1240 (1990)。OSE細胞は、生殖腺隆線を覆う中皮細胞由来であると考えられる。中皮細胞が間質化し、卵巣の内部に遊走し、そして顆粒膜細胞になる。顆粒膜細胞(卵巣における主要な内分泌細胞型のうちの1つである)²⁰ は、最初に始原卵胞において、出生前生命の間に、卵母細胞を囲む細胞の単層として現れる。各卵胞が活性になるにつれて、この卵母細胞は大きさが大きくなり、そして顆粒膜細胞は分裂し、数が増え、そしてエストロゲンを分泌する。卵胞が成熟する場合、顆粒膜細胞は分裂を停止し、そして卵胞は、排卵として公知のプロセスにおいて卵母細胞を放出する。排卵後、次いでこの顆粒膜細胞は発達黄体の黄体細胞に分化し、プログステロンを分泌する。

【0003】

ヒト卵巣組織モデルの欠如は、癌腫増殖の供給源として卵巣表面上皮を確認する試みを困難にする。さらに、OSE細胞が単離され得、そしてその本来の特徴がまだ保持されている培養条件がまだ洗練されているので、卵形成および卵胞形成の間の卵巣表面上皮細胞の発達についての理解の欠如がある。複数の細胞の型(例えば、OSE細胞および顆粒膜細胞)に正確に分化し得る卵巣前駆体細胞の同定、単離および特徴付けは、卵巣細胞の生物学、そしてなぜ卵巣癌のような癌性形質転換が起こるのか、そしておそらく、どのようにして形質転換を予防し得るのかという理解に重要であり得る。しかし、多くの前駆体細胞のように、卵巣前駆体細胞は、数が非常に少なく、単離し難い。一旦単離されると、卵巣前駆体細胞は、その前駆体の性質を保持する範囲で培養することが困難である。顆粒膜細胞およびOSE細胞の前駆体が存在すると想定されるが、しかし現在までに、研究はOSE細胞および顆粒膜細胞を単離することのみを達成したが、細胞の両方の型の通常の前駆体細胞の単離は達成していない。³⁰

【0004】

ヒトOSE細胞の単離および培養方法のいくつかの報告がある。Kruck P.A.ら、Laboratory Investigation 63(1), 132~136 (1990); Siemens C.H.およびAuersperg N. Journal of Cellular Physiology 134, 347~356 (1988); Auersperg N.ら、In Vitro 20(10) 743~755 (1984)。これらの報告において、単離されそして培養されるヒトOSE細胞は、すでに最終的に分化した形態である。ウサギにおけるOSE細胞および顆粒膜細胞の単離および特徴付けもまた、報告されている。Piquette G.N.およびTimms B.G. In Vitro Cell. Dev. Biol. 26: 471~481 (1990)。⁴⁰ しかし、このOSE細胞は、すでに分化され、そして従って、初期OSE発生またはO⁵⁰

S E 発生の間の初期癌腫形質転換に関する研究事象は困難である。いくつかの研究の進歩が、顆粒膜細胞の前駆体を同定することを達成した。マウス卵巣における顆粒膜細胞のクローニングの前駆体の数は、ランダム X 染色体不活性化の技術に基づいて、そしてホスホグリセレートキナーゼ - 1 (PGK - 1) の X 連鎖異型酵素変形体、糖分解酵素の変形体を使用して、少ないと約 5 であることが決定される。Telifer E. ら、J. Reprod. Fertil. 84, 105 ~ 110 (1988)。卵巣顆粒膜幹細胞に関連する他の研究は、卵母細胞ではなく顆粒膜細胞が、卵巣におけるテロメラーゼ活性の供給源であることを示し、従って著者らが述べているように、これらの結果は、顆粒膜細胞が幹細胞の集団から生じるという仮説を支持すると述べている。Lavranos T. C. ら、Biol. of Reproduction 61, 358 ~ 366 (1999)。卵巣前駆体細胞研究において考えられる 1 つの方針は、成体ではなく胎児の卵巣を細胞の供給源として使用することを提唱している。なぜなら、おそらく胎児の前駆体細胞は、成体中の前駆体細胞よりもより高い活性およびより多くの数が存在するからである。この目的のために、卵巣網と称される卵巣の領域由来の胎児上皮細胞が記載されるが、しかしこれらの細胞は、任意の他の型の卵巣中皮細胞に分化する多能性の能力を有するものとして記載されていない。Dubeau ら、Anticancer Research 10 : 1233 ~ 1240 (1990)。

【 0005 】

従って、多能性の能力を有する卵巣中皮細胞を同定、単離、培養および特徴付けするための方法の必要性が存在する。本明細書中に記載される本発明は、前述の欠点の多くを克服し、そしてまた関連した進歩を提供する。

【 0006 】

(発明の開示)

本発明は、発生生物学および細胞生物学の分野に関連する。1 つの局面では、本発明は、卵巣表面上皮細胞および顆粒膜細胞に分化する多能性の能力を有する実質的に純粋なヒト卵巣中皮細胞の集団に関する。

【 0007 】

本発明の別の局面では、本発明は、卵巣表面上皮細胞および顆粒膜細胞に分化する多能性の実質的に純粋なヒト卵巣中皮細胞の集団の単離法に関する。

【 0008 】

本発明のなお別の局面では、本発明は、卵巣表面上皮細胞および顆粒膜細胞に分化する多能性の実質的に純粋なヒト卵巣中皮細胞の集団を維持する方法、ならびにこれらの卵巣中皮細胞を、その細胞が多能性の能力を保持するように維持または培養する方法に関する。

【 0009 】

本発明のさらに別の局面では、本発明は、免疫原の供給源を保持する方法および免疫原としての実質的に純粋な卵巣中皮細胞の集団の使用に関する。

【 0010 】

本発明のさらに別の局面では、本発明は、実質的に純粋なヒト卵巣中皮細胞を非ヒトの哺乳動物レシピエントに導入することによって、ヒト卵巣組織モデルを作製する方法に関する。

【 0011 】

本発明の別の局面では、本発明は、細胞治療を提供することに関し、これにより実質的に純粋なヒト卵巣中皮細胞の集団を、卵巣細胞の増殖および成長を支持し得る位置に、レシピエント中に導入する方法に関する。

【 0012 】

本発明の別の局面では、本発明は、薬学的薬物のための、実質的に純粋なヒト卵巣中皮細胞を卵巣中皮細胞組織特異的な生物学的成分の供給源を提供する方法に関し、ここで、実質的に純粋なヒト卵巣中皮細胞の集団は、1 つ以上の卵巣中皮生物学的成分が開発される薬物の標的である卵巣中皮生物学的成分の供給源である。

【 0013 】

10

20

30

40

50

本発明の別の局面では、本発明は、バイオアッセイの開発のために核酸またはタンパク質の供給源を提供する方法に關し、ここで、實質的に純粹なヒト卵巣中皮細胞は、核酸またはタンパク質の供給源として使用され、そしてこれらの核酸またはタンパク質は、バイオアッセイまたはバイオアッセイの開発における1つ以上の主成分として使用される。

【0014】

(発明を実施するための様式)

以下の発明の詳細な説明は、当業者による本発明の実施の一助を提供する。本発明の精神および範囲を逸脱することなく、当業者により本明細書中に開示の実施形態の改変がなされ得るので、この詳細な説明は、本発明を制限すると解釈されるべきではない。本開示を通して、種々の刊行物、特許、および公開された特許明細書は、参考として援用される。これらの刊行物、特許、公開特許の開示は、その全体において本明細書中で本発明の開示の参考として援用される。

10

【0015】

本発明の実施には、特記しない限り、当業者の範囲内の従来の免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、および組換えDNA技術を使用する。例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版(1989)、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F.M.Ausubelら編、(1987))、METHODS IN ENZYMOLOGYシリーズ(Academic Press, Inc.)、PCR 2:A PRACTICAL APPROACH(M.J.MacPherson, B.D.HamesおよびG.R.Taylor編、(1995))、HarlowおよびLane編(1988)、ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL、ならびにANIMAL CELL CULTURE(R.I.Freshney編(1987))を参照のこと。

20

【0016】

(定義)

本明細書中および特許請求の範囲で使用される、単数形「a」、「an」、および「the」には、文脈上特記しない限り複数形の意味が含まれる。例えば、用語「1つの細胞(a cell)」には、その混合物を含む、複数の細胞が含まれる。

30

【0017】

本明細書中および特許請求の範囲で使用される、用語「卵巣表面上皮細胞」および「OSE細胞」は交換可能であり、そしてヒト起源の「卵巣表面上皮細胞」および「OSE細胞」についていう。

【0018】

「卵巣中皮細胞」は、卵巣の性質の細胞になることがすでに確証されている中胚葉に由来するヒト細胞をいう。より詳細には、本発明の卵巣中皮細胞は、中皮細胞の段階と、卵巣表面上皮細胞または顆粒膜細胞に最終的に分化する前の段階との間の細胞について言う。これは中皮細胞である段階であり、そして本発明の卵巣中皮細胞が属する最終的に分化した卵巣中皮細胞型に傾倒するちょうど前の段階である。本発明の卵巣中皮細胞は、卵巣表面上皮細胞かまたは顆粒膜細胞かのいずれかになる多能性または多分化能の能力を有する。

40

【0019】

「多能性」および「多分化能性」は、全体を通して交換可能に使用され、細胞が複数の細胞の1つになり得るが、もはや体内の任意の型の細胞になることができない段階(すなわち、もはや全能性ではない)をいう。「多能性」細胞は、1つ以上の型の複数の細胞の前駆体であるので、「幹細胞」ではなく、むしろ「前駆細胞」をいう。

【0020】

本明細書中で使用される場合、「所定の卵巣」は、始原卵胞段階の先で、かつ最終的に分化した卵巣細胞(例えば、顆粒膜細胞または卵巣表面上皮細胞)の前の多分化能性細胞の発達段階をいう。「所定の卵巣」である細胞は、卵巣細胞になるとされているが、最終的

50

に分化した卵巣細胞に未だ発達し始めていない。異なる要因が、所定の卵巣細胞の分化の開始を引き起こす。非限定的な例としては、血清への曝露、プロゲステロン、エストロゲン、黄体ホルモン（LH）への曝露、細胞の周辺組織、微小環境との接触、ならびに周辺組織との細胞・細胞接触が含まれる。

【0021】

「抗体」は、抗原し得る免疫グロブリン分子である。本明細書中で使用されるこの用語は、インタクトな免疫グロブリン分子だけでなく、抗イディオタイプ抗体、変異体、フラグメント、融合タンパク質、ヒト化タンパク質、および必要な特異性の抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の改変物も含まれる。

【0022】

用語「抗原」は、抗体が結合し得る1つ以上のエピトープを含み得る分子である。抗原は、免疫原性の特性を有し得る（すなわち、免疫応答を誘導する）物質である。抗原は、ある型の免疫原であると考えられる。本明細書中で使用される場合、用語「抗原」は、全長タンパク質ならびに1つ以上のエピトープを含有するかまたはこれらを含むそのペプチドフラグメントを意味するとことを意図する。

10

【0023】

用語「表面抗原」および「細胞表面抗原」は、本明細書中では交換可能に使用され、これは、細胞の原形質膜成分をいう。これらの成分には、内在性および末梢性膜タンパク質、糖タンパク質、多糖類、脂質、ならびにグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）結合タンパク質が含まれるが、これらに限定されない。「内在性膜タンパク質」は、細胞の原形質膜の脂質二重層全体に伸長している膜貫通タンパク質である。典型的な内在性膜タンパク質は、一般に疎水性アミノ酸残基を含む少なくとも1つの膜全体に及ぶセグメントからなる。末梢性膜タンパク質は脂質二重層の疎水性内部まで伸長しておらず、そして他の膜タンパク質との非共有結合性相互作用によって膜表面に結合している。GPI結合タンパク質は、脂質二重層に挿入された脂質テールによって細胞表面上に保持されたタンパク質である。

20

【0024】

本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一の抗体集団を有する抗体組成物をいう。抗体の供給源または作製様式（例えば、ハイブリドーマまたは組換え合成）に関して制限されることを意図しない。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、1つの抗原部位に指向される。典型的に、異なる決定基（エピトープ）に対して指向される異なる抗体を含む従来の（ポリクローナル）抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の1つの決定基に対して指向される。

30

【0025】

「モノクローナル抗体集団」は、複数の異種モノクローナル抗体（すなわち、集団を含む個々のモノクローナル抗体は、互いに異なる抗原決定基を認識し得る）をいう。

【0026】

「免疫原」は、免疫応答を誘導する任意の物質をいう。免疫原である物質を、「免疫原性」と記載する。免疫応答の誘導には、体液性応答（例えば、抗体の产生）または細胞性応答（例えば、細胞傷害性T細胞のプライミング）の活性化、炎症性応答（例えば、白血球の漸増）、ならびにサイトカインおよびリンホカインの分泌が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0027】

免疫化または移植で使用される細胞に適用される、用語「異種」は、細胞がレシピエント由来の遺伝子型が異なる構成要素に由来することを意味する。例えば、異種細胞は、レシピエントと同一の種由来の異なる種または異なる個体に由来し得る。ある種の個体由来の胚細胞は、同一の種の成体と異種である。レシピエントに適用される「異種」は、このレシピエントが、遺伝子型的に別の供給源からレシピエント中に導入される細胞の供給原から入ることを意味する。

【0028】

50

「移植片」は、ヒト胎児から取り出された卵巣組織をいう。一般に、移植片は、卵巣細胞の供給原として使用される。細胞を移植片から単離することは、いくつかの方法によって達成され得る。1つの方法は、卵巣組織（全体の組織か、または切断したより小さな小片かのいずれか）を、規定培地の底に配置し、そして卵巣細胞を、固体組織から培地中へ遊走させることである。別 の方法は、卵巣組織を酵素的に消化するか、または細胞を固体組織から出す機械的な力をかけることに供することである。

【0029】

細胞がそれぞれ胚の3つの胚葉（外胚葉、内胚葉、または中胚葉）の1つに由来する場合、細胞は「外胚葉」、「内胚葉」、または「中胚葉」起源である。外胚葉は、表皮細胞および神経系を産生する外層である。内胚葉は、消化管およびその関連器官の裏打ちを産生する内層である。中間層である中胚葉は、いくつかの器官（心臓、腎臓、中皮および生殖腺が挙がられるが、これらに限定されない）、結合組織（例えば、骨、筋肉、腱）、および血球を産生する。

10

【0030】

本明細書中で使用される場合、卵巣中皮細胞の「実質的に純粋な」集団は、少なくとも約85%の卵巣中皮細胞、好ましくは少なくとも約90%の卵巣中皮細胞、さらにより好ましくは約95%以上を含む細胞集団である。

【0031】

用語「培地」、「細胞培養培地」、および「培養培地」は、交換可能に使用される。この用語は、哺乳動物細胞が培地中で増殖する水性微小環境を指す。培地は、物理化学的、栄養学的、およびホルモンの微小環境を含む。

20

【0032】

「規定培地」、「基礎細胞維持培地」、「栄養培地」および「基礎栄養培地」は、本明細書中で交換可能に使用され、これは、培地成分が既知となるように培地中の細胞の生存および/または増殖に必要な栄養上およびホルモンの要件を満たす培地をいう。伝統的には、規定培地は、増殖および/または生存に必要な栄養および増殖因子の添加によって処方されている。典型的には、規定培地により、以下のカテゴリーの1つ以上から少なくとも1つの成分が提供される：a) 全ての必須アミノ酸（通常、基本的な20種のアミノ酸の組+シスチン）；b) エネルギー源（通常、グルコースなどの炭水化物の形態）；c) ビタミン類および/または低濃度で必要な他の有機化合物；d) 遊離脂肪酸；およびe) 微量元素（微量元素は典型的には非常に低濃度（通常、マイクロモル範囲）で必要とされる無機化合物または天然に存在する元素と定義される場合）。規定培地はまた、必要に応じて、以下の任意のカテゴリー由來の1つ以上の成分を補充し得る：a) 1つ以上の分裂促進剤；b) 塩および緩衝液（例えば、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩）；c) ヌクレオシドおよび塩基（例えば、アデノシンおよびチミジン、ヒポキサンチンなど）；ならびにd) タンパク質および組織加水分解物。

30

【0033】

本明細書中で使用される、「馴化培地」は、卵巣細胞が増殖するインタクトな細胞を含まない培養培地をいう。栄養培地中で増殖した卵巣細胞は、卵巣中皮細胞の継続的な生存、増殖、および分化前の先在状態の維持を促進する因子を放出し得る。馴化培地を使用して、細胞ペレットを再構成するか、または培養プレートにすでに存在する細胞に添加し得る。馴化培地はまた、単独で使用され得るか、または卵巣細胞の供給に使用した栄養培地を補足し得る。

40

【0034】

「標準的なインキュベーション条件」は、細胞が存在する組織培養のために設計されたインキュベーター中の物理化学的条件をいう。一般に、標準的なインキュベーション条件は、約37℃で約5%CO₂（加湿する）である。全ての組織培養技術および機構は、滅菌条件下で行うべきである。

【0035】

「卵巣中皮細胞クラスター」、「卵巣中皮細胞球」、および「卵巣細胞クラスター」は全

50

体で交換可能に使用され、複数の卵巣中皮細胞の塊をいう。卵巣中皮細胞クラスターは、およそ球形に類似した三次元構造を形成し得る

本明細書中で使用される場合、用語「移植組換え体」は、間葉組織と共に配置された卵巣中皮細胞クラスターの組み合わせ単位をいう。間葉組織は、卵巣または非卵巣起源であり得る。間葉組織は、移植片レシピエントと異種の種由来であり得る。間葉組織はまた、卵巣中皮細胞の供給源と異種の種由来でもあり得る。移植組換え体を、基質（好ましくは、軟らかい生物基質（例えば、寒天））上に約1時間から96時間の範囲、より好ましくは約6時間から48時間の範囲、さらに好ましくは一晩（約24時間のインキュベーション時間）の範囲でインキュベートし得る。

【0036】

10

本明細書中で使用される場合、「血清」は、血液が凝固した後に残存する哺乳動物の血液の液相を指す。

【0037】

本明細書中で使用される場合、「血清生体分子」は、血清中に見出される生体組成物を指す。例として、アルブミン、1グロブリン、2グロブリン、グロブリン、およびグロブリンが挙げられるが、これらに限定されない。血清生体分子は、血清中に天然に見出されるか、または血清のプロセシングおよび操作に由来するかのいずれかの全体または部分的な生体組成物を含み得る。

【0038】

20

用語「哺乳動物」または「哺乳動物の」は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、サル、競技用動物、およびペットが含まれるが、これらに限定されない温血脊椎動物をいう。

【0039】

（ヒト卵巣中皮細胞の単離および維持）

本発明の卵巣中皮細胞をヒト胎児卵巣組織から単離する。胎児の年齢は、約1週齢ないし約40週齢の間、好ましくは約8週齢ないし約30週齢の間、さらにより好ましくは約17週齢ないし約25週齢の間である。卵巣組織を、肉眼解剖学、外観、および胎児内の位置によって同定することができる。卵巣を識別する肉眼解剖学および外観のいくつかの特徴は、三日月型で腹腔内に位置することである。卵巣は、ファローピウス管に連絡され得る。一旦同定されると、胎児卵巣組織を、基礎栄養培地で洗浄して清浄にし、次いで顕微解剖する。顕微解剖の目的は、卵巣に隣接する組織を除去し、固体卵巣組織の塊を組織全體の塊のより小さい部分に分け、それによって基礎栄養培地が、組織部分中の卵巣細胞により行き渡るようにし、そして／または卵巣組織の塊由来の卵巣細胞を分離するようにすることである。顕微解剖の非限定的な例には、機械的剪断力を付与するデバイス（すなわち、ホモジナイザー、乳鉢および乳棒、ブレンダーなど）、切断または裂くデバイス（すなわち、外科用メス、シリソ、ピンセットなど）、または超音波処理デバイスが含まれる。あるいは、胎児卵巣組織を顕微解剖する別の方法は、酵素処理の使用である。顕微解剖組織に使用される種々の酵素処理は、当該分野で既知である。1つの方法は、卵巣組織から単離した細胞の生存能力を維持する緩衝培地内で部分的に剪断した卵巣組織を消化するためのコラゲナーゼ・ディスパーゼの使用を含む。酵素量は、胎児の年齢および卵巣組織がどのくらい大きいかに依存する。1つの実施形態において、コラゲナーゼ・ディスパーゼを用いた酵素処理は、全体的な細胞収量を低下させ得る。従って、使用する酵素量は、減ずるかまたは全く用いない。他の実施形態において、酵素処理は、全体的な細胞収量を増大させ得る。従って、酵素処理は、単独または顕微解剖法と組み合せて用いられる。卵巣中皮細胞の生存を促進する液体のpH範囲を維持し、酵素消化を行うことができる範囲内のさらなる液体体積を得ることができる広範な種々の基底細胞維持培地を使用することができる。非限定的な例には、F12 / DMEM、Ham's F10 (Sigma)、CMRL-1066、最少必須培地 (MEM、Sigma)、 RPMI-1640 (Sigma)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、Sigma)、およびイスコブ改変イーグル培地 (IMEM) が含まれる。さらに、HamおよびWal l a n c e M e t h . Enz. , 58:44 (1979)、BarnesおよびSato Anal.

30

40

50

Biochem., 102: 255 (1980)、またはMather, J. P. およびRoberts, P. E.、「Induction to Cell and Tissue Culture」、Plenum Press, New Yorkに記載の任意の基礎栄養培地を使用することもできる。

【0040】

卵巣組織の小片を、基底細胞維持培地中にいれる。種々の基礎細胞維持培地が利用可能である。例として、Ham's F12培地、RPMI-1640、およびCMRL-1066が挙げられるが、これらに限定されない。卵巣中皮細胞の生存および成長を促進するより至適な条件のために、種々の栄養素を添加して基礎培地を補足することができる。例として、インスリン、トランスフェリン、上皮成長因子、-トコフェロール、組換えヒトヘレグリン(heregulin)、アプロチニン、ウシ胎児血清、およびウシ血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、以下の量の栄養素を使用して、卵巣中皮細胞の生存および成長を促進することができる：少なくとも約10ng/mlのインスリンでかつ約1mg/ml以下のインスリン、より好ましくは約10μg/mlのインスリン；少なくとも約1μg/mlのトランスフェリンでかつ約100μg/ml以下のトランスフェリン、より好ましくは約100μg/mlのトランスフェリン；少なくとも約1ng/mlの上皮成長因子でかつ約1000ng/ml以下の上皮成長因子、より好ましくは約50ng/mlの上皮成長因子；少なくとも約0.1μg/mlの-トコフェロールおよび約1mg/ml以下の-トコフェロール、より好ましくは約5μg/mlの-トコフェロール；少なくとも約0.1nMの組換えヒトヘレグリンおよび約100nM以下の組換えヒトヘレグリン、より好ましくは約10nMの組換えヒトヘレグリン；少なくとも約1μg/mlのアプロチニンおよび約100μg/ml以下のアプロチニン、より好ましくは約5μg/mlのアプロチニン；少なくとも約0.1%のウシ血清アルブミン(BSA)および約50%以下のBSA、および好ましくは約2%のBSA。

【0041】

卵巣中皮細胞は、卵巣組織から卵巣組織の置かれた培地中に遊走する。1つの実施形態において、卵巣中皮細胞は、卵巣組織から培地中に凝集体になって遊走する。別の実施形態において、卵巣中皮細胞は、卵巣組織から培地中に単一細胞の形で遊走する。別の実施形態において、卵巣組織から遊走する卵巣中皮細胞は、もはや卵巣組織に組みこまれず、組織にゆるく結合する。卵巣中皮細胞は、異なる基質上で増殖され得る。使用することができる基質の非限定的な例には、フィプロネクチン、ラミニン、コラーゲン、ポリリジン、ニトロセルロース、ナイロン、およびポリテトラフルオロエチレンが挙げられる。1つの実施形態では、卵巣中皮細胞を、ラミニン被覆組織培養プレート上の上記の好ましい栄養培地中で成長させる。好ましい実施形態において、卵巣中皮細胞は、ラミニンコートされた組織フラスコ中で上記の好ましい栄養培地中で増殖される。組織培養プレートまたはフラスコの大きさは、プレートまたはフラスコ中に置かれる卵巣組織の量に比例する。当業者は、組織培養プレートまたはフラスコの中身をより大きい大きさを、組織培養プレートまたはフラスコ内に置かれた卵巣組織の段階的な増殖により決定し得る。卵巣組織が最初に組織培養プレートまたはフラスコ中に置かれたとき、培地は、全体的な濁度において一般に透明である。卵巣中皮細胞は、卵巣組織片から遊走し、培地は、より不透明になり、より混濁する。卵巣組織から遊走した卵巣中皮細胞の量の増加または卵巣中皮細胞の増殖のために培地が非常に混濁した時点で、さらなる栄養培地をプレートまたはフラスコ中にいれ、卵巣細胞によって消費された栄養を補充する。あるいは、培地が卵巣中皮細胞の量の増加に伴い混濁した場合、少量の細胞は、組織培養プレートまたはフラスコから取り出され得、細胞の生存能を、例えば、トリパンブルー染色などを用いて確認し得る。あまりに多くの細胞で超過したプレートまたはフラスコは、細胞の生存能の低下を示し始める。次いで当業者は、組織培養プレートまたはフラスコの中身をより大きな他のプレートまたはフラスコ(例えば、より大きな体積)に移して、増加する細胞の量に順応し得る。1つの実施形態において、プレートまたはフラスコの全体の中身が別のより大きな体積のプレートまたは

10

20

30

40

50

フラスコに移される。別の実施形態において、卵巣細胞懸濁物は、いくつかの別の部分に分けられる各部分が、別のプレートまたはフラスコに入れられ、次いで、栄養培地が卵巣細胞に加えられる（「継代培養」としてまた知られる）。好ましい栄養培地で、ラミニンコートされたフラスコ中で培養する場合、卵巣中皮細胞は、細胞クラスターを形成する。組織培養フラスコヒラミニンコートとを組み合せた培養は、間葉細胞および卵巣中皮細胞細胞塊の分離を可能にする。間葉細胞は、培地の容積にわたって遊走するが、卵巣中皮細胞クラスターは、卵巣組織と物理的に密に結合している。別の実施形態において、卵巣中皮細胞は、ラミニンコートした組織培養プレート中で上記の好ましい栄養培地で増殖する。卵巣中皮細胞は、この実施形態において単層を形成する。

【0042】

10

ラミニンコートした組織培養フラスコ中で好ましい栄養培地で培養された卵巣中皮細胞は、卵巣組織で物理的に密に結合している。卵巣中皮細胞の富化が所望される場合、用いられ得る1つの方法は、酵素処理であり、卵巣中皮細胞クラスターの解離に続いて、卵巣中皮細胞を単離する。酵素処理に用いられ得る酵素の例は、コラゲナーゼ・ディスパーゼおよびトリプシンを含むが、これらに限定されない。1つの実施形態において、コラゲナーゼ・ディスパーゼを用いて、卵巣中皮細胞クラスターを培養フラスコ壁および卵巣組織から解離するが、好ましくは少なくとも約10%、より好ましくは少なくとも約1%、そして最も好ましくは、少なくとも約0.1%容量のコラゲナーゼ・ディスパーゼが用いられる。卵巣中皮細胞クラスターは、密度勾配を用いて単離される。細胞分離を達成するために用いられ得る化合物は、以下を含むが、これらに限定されない：血清（すなわち、ウシ血清アルブミン（すなわち、BSA））、オボアルブミン、ショ糖の非イオン性合成ポリマー（すなわち、FicollTM）、コロイド状ポリビニルピロリドン被覆シリカ（すなわち、PercolTM）、ポリビニルピロリドン（すなわち、PVP）、およびメチルセルロース。好ましい実施形態では、コラゲナーゼディスパーゼを中和することができる密度勾配を使用する。このような密度勾配の1つの例は、BSAである。BSAの使用量は、好ましい栄養培地に対する体積比で約50%、より好ましくは約25%、より好ましくは約10%、より好ましくは少なくとも約0.1%、最も好ましくは約1~3%である。いくつかの場合、卵巣上皮細胞の集団を富化させるのに、1つの密度勾配で十分である。他の場合、1つ以上の密度勾配の適用が必要とされる。所望される産物は、卵巣上皮細胞クラスターに実質的に乏しい集団である。

20

【0043】

30

1つの実施形態において、実質的に純粋な卵巣上皮細胞クラスター集団は、回転速度が卵巣上皮細胞クラスターをペレットにし、単一の間葉細胞を上清に残すのに十分な速度であるようなBSAの密度勾配を通して卵巣細胞を回転することによって単離される。卵巣上皮細胞を伴う細胞ペレットは、卵巣中皮細胞の寿命を維持するのに十分な栄養培地に再懸濁され、生物学的基質（例えば、ラミニン）で被覆した組織培養フラスコ中に入れられる。懸濁された卵巣中皮細胞の全体の容積を、1つのフラスコ中に置き得る。あるいは、再懸濁された卵巣中皮細胞が、非常に富んでいて、高密度の卵巣上皮細胞である場合、再懸濁された卵巣中皮細胞の容積は、いくつかの異なるフラスコに分けられて、ここに好ましい栄養培地が添加される。好ましい実施形態では、以下の量の栄養素を使用して、卵巣中皮細胞の生存および成長を促進することができる：少なくとも約10ng/mlのインスリンでかつ約1mg/ml以下のインスリン、より好ましくは約10μg/mlのインスリン；少なくとも約1μg/mlのトランスフェリンでかつ約100μg/ml以下のトランスフェリン、より好ましくは約10μg/mlのトランスフェリン；少なくとも約1ng/mlの上皮成長因子でかつ約1000ng/ml以下の上皮成長因子、より好ましくは約50ng/mlの上皮成長因子；少なくとも約0.1μg/mlの-トコフェロールおよび約1mg/ml以下の-トコフェロール、より好ましくは約5μg/mlの-トコフェロール；少なくとも約0.1nMの組換えヒトヘレグリンおよび約100nM以下の組換えヒトヘレグリン、より好ましくは約10nMの組換えヒトヘレグリン；少なくとも約1μg/mlのアプロチニンおよび約100μg/ml以下のアプロチニン、

40

50

より好ましくは約 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアプロチニン；少なくとも約 0.1 % のウシ血清アルブミン (B S A) および約 50 % 以下の B S A 、およびより好ましくは約 0.5 % の B S A 。

【 0 0 4 4 】

卵巣中皮細胞の栄養補給頻度は、1日または1日おきに1回であり得る。1つの実施形態では、卵巣中皮細胞を、古い栄養培地の構成要素の新しい栄養培地への置換によって栄養補給することができる。別の実施形態では、卵巣中皮細胞を、これらの細胞が成長した馴化培地で栄養補給することができる。特許請求の範囲に記載の卵巣中皮細胞は本発明に固有であり、かつこれらの細胞に特異的な因子を分泌するので、卵巣中皮細胞由来の馴化培地もまた固有である。本発明において、卵巣中皮細胞は、上記のように、ラミニンコートされた組織培養フラスコ中の好ましい栄養培地で増殖する場合、クラスターを形成する。組織がラミニンコートされた組織培養プレートに置かれる場合、卵巣中皮細胞は、接触した基質の単層を形成する。本発明の好ましい実施形態において、卵巣中皮細胞の細胞と細胞の接触は、卵巣中皮細胞の培養を通じ維持されて、卵巣中皮細胞の増殖を促進する。当業者は、漸増する量の馴化培地で段階的に栄養培地を補給することで、さらなる栄養培地が、卵巣中皮細胞の増殖に有利になるかを決定し得る。細胞増殖は、馴化培地の添加前後で、培地体積あたりの細胞数を数えて決定され得る。あるいは、細胞生存能（例えば、トリパンブルー）をもちいて、培養培地への馴化培地の添加が、卵巣中皮細胞の増殖に有利になるかを評価し得る。卵巣中皮細胞の生存および成長の促進に好ましい栄養補給頻度は、1週間に1回、さらにより好ましくは1週間に2回、最も好ましくは1日おきである。これら卵巣中皮細胞を最終的に分化した卵巣表面上皮細胞および顆粒膜細胞への分化を誘導することなく本発明の卵巣中皮細胞は複数回継代することができる。

10

【 0 0 4 5 】

(卵巣中皮細胞の特徴づけ)

本明細書中に開示の様式で単離した本発明の卵巣中皮細胞集団は、いくつかの定義的な特徴を有する。第1に、卵巣中皮細胞は、「予め決定された卵巣」と説明することができる段階にある。中皮前駆細胞については、いくつかは、卵巣中皮細胞になるよう予め決定されている。この発達段階においての卵巣中皮細胞の集団は、本明細書で特許請求の範囲にある。本発明の卵巣中皮細胞は、卵巣表面上皮細胞および顆粒膜細胞のいずれかになる能力を有するが、いずれの細胞型にも分化し始めない。

20

【 0 0 4 6 】

卵巣中皮細胞の同定を、形態学または特異的マーカーまたはその両技術の組み合わせによつて行うことができる。顆粒膜細胞株は、卵胞壁を形成し得る。顆粒膜細胞の形態は、立方体形状である。卵巣中皮細胞検出に用いられ得るマーカーは、以下を含むが、これらに限定されない：卵巣中皮細胞上のサイトケラチン (C K) 1、5、6、7、8、10、11、13、15、16、18、および 19、抗卵巣モノクローナル抗体 5 C 8、およびビメンチン。利用し得る C K およびビメンチンに対し特異的な抗体の例は、以下を含むが、これらに限定されない：抗サイトケラチン (C K) 抗体クローニング 4.62、クローニング 8.12、クローニング 8.13 および抗ビメンチン抗体クローニング 13.2。Sigma Chemical Company から得られる抗 C K 抗体および抗ビメンチン抗体は、免疫組織化学またはフローサイトメトリーにおいて直接または間接的に M T E 細胞の染色に用いられ得る。卵巣中皮細胞を検出するためのマーカーは、免疫蛍光染色、免疫組織染色、およびフローサイトメトリーにおいて直接または間接的に用いられ得る。

30

【 0 0 4 7 】

本発明の卵巣中皮細胞は、基礎栄養培地中で前から存在する分化前の段階に維持される。本明細書において開示される基礎細胞維持培地または好ましい栄養培地または馴化培地を用いて、インビトロで卵巣中皮細胞を培養し得る。組織培養プレート上の異なる型の基質を用いて、卵巣中皮細胞のクラスターまたは単層のいずれかを得ることができる。本明細書で開示される好ましい栄養培地で満たしたラミニンコートしたフラスコの使用は、卵巣中皮細胞のクラスターを生じ、ここで、本明細書で開示される好ましい栄養培地で満たし

40

50

たラミニンコートプレートの使用は、卵巣中皮細胞の単層を生じる。本発明の卵巣中皮細胞は、無血清の栄養培地または血清含有栄養培地で培養し得る。本発明の卵巣中皮細胞を、無血清培地または血清含有栄養培地中で培養し得る。当業者に周知であるように、血清は、通常、細胞のさらなる増殖のため栄養培地に添加される。血清は、多くの血清生体分子を含むが、本発明の卵巣中皮細胞は、複数のこれらの血清生体分子がなくても増殖し得る。卵巣中皮細胞の細胞増殖は、血清に見出される1つ以上のタンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン（すなわち、BSA））の添加により増大され得る。

【0048】

本発明の卵巣中皮細胞は、本明細書で開示される好ましい無血清栄養培地において複数回継代される能力を有する。多分化能は、各継代の間、および各継代後の任意に時点において維持され、本発明の卵巣中皮細胞は、卵巣表面上皮および顆粒膜細胞に分化し得る。さらに、各継代後の任意に時点において、卵巣中皮細胞は、免疫原として、細胞治療のため、バイオアッセイのため、ヒト卵巣モデルを樹立するため、あるいは本明細書に開示されるような薬物の発見、および／または開発のため利用され得る。10

【0049】

本発明の卵巣中皮細胞の別の特性は、レシピエント哺乳動物の腎嚢の下に移植された場合に、卵巣表面上皮細胞および顆粒膜細胞に分化する能力である。移植の前に、卵巣中皮細胞は、顆粒膜細胞または卵巣表面上皮細胞に分化する能力を有する。本明細書で開示されるように、卵巣中皮細胞は、卵巣中皮細胞クラスターまたは単層のいずれかで増殖し得、次いで、間葉組織と合わせられ、そしてレシピエント哺乳動物の腎嚢の下に移植される。好ましくは、ヒト卵巣中皮細胞クラスターは、ラット尿生殖器間葉組織と合わせられ、レシピエント哺乳動物の腎嚢の下に移植される。移植片の一部分は、マーカー、形態学、またはこれらの組み合せを用いた分析のため取り出され、卵巣細胞を同定し得る。20

【0050】

（卵巣中皮細胞の使用）

（免疫原としての使用）

卵巣中皮細胞の用途の1つが免疫原としてである。本明細書中に開示の方法で単離および培養した卵巣中皮細胞を、異種レシピエントに投与する免疫原として使用することができる。免疫原としての卵巣中皮細胞の投与を、いくつかの方法によって行うことができる。異種レシピエントへの免疫原としての卵巣中皮細胞の投与法には、以下が含まれるが、これらに限定されない：免疫化、塗布（swabbing）またはスクラッチ（scratch）装置などの直接接觸による膜への投与、エアゾールによる粘膜への投与、および経口投与。当該分野で既知のように、免疫は、受動免疫または能動免疫のいずれかであり得る。免疫法を、異なる経路（腹腔内注射、皮内注射、局所注射が含まれるが、これらに限定されない）を介して行うことができる。免疫の被験体には、マウスなどの哺乳動物を含み得る。免疫の経路およびスケジュールは、一般に、抗体刺激および産生のために確立された従来の技術（例えば、数種間にわたり週1回のマウスの足の裏に抗原を注射する）に従う。この実施形態ではマウスを使用する一方で、ヒトを含む任意の哺乳動物被験体またはそれ由來の抗体産生細胞を本発明のプロセスにしたがって操作して、哺乳動物ハイブリドーマ細胞系の産生の基礎として使用することができる。典型的には、マウスを免疫原性量の卵巣中皮細胞を用いて接種して、次いで類似の量の免疫原を追加投与する。あるいは、非生体膜基質上で成長させた細胞を、宿主哺乳動物に手術によって腹腔内に移植する。リンパ球（好ましくは、マウス由來の脾臓リンパ球）を、最後のブースト投与から数日後に回収し、細胞懸濁液を融合用にこれらから調製する。30

【0051】

ハイブリドーマをリンパ球から調製し、Buck, D.Wら、In Vitro, 18: 377-381 (1982) によって改変されたKohler, B. およびMilstein, C. Nature 256: 495-497 (1975) の一般的な体細胞ハイブリダイゼーション技法を使用して骨髄種細胞を不死化する。利用可能な骨髄腫系列（X63-Ag8.653およびSalik Institute, Cell Distr40

ibution Center, San Diego, Calif., USA 由来の系列が含まれるが、これらに限定されない)をハイブリダイゼーションに使用することができる。この技術は、ポリエチレンリコールなどの融合剤を使用するか、当業者に周知の電気的手段によって骨髄腫細胞とリンパ球を融合することを含む。融合後、細胞を融合培地から分離し、選択成長培地 (HAT 培地など) で成長させて、非ハイブリッド形成親細胞を消滅させる。本明細書中に記載の任意の培地を、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの培養に使用することができる。別の代替細胞融合技術として、EBV 不死化 B 細胞を使用して、本発明のモノクローナル抗体を產生する。ハイブリドーマを拡大またはサブクローニングし、所望ならば、上清を従来の免疫アッセイ法 (例えば、放射免疫アッセイ、酵素免疫アッセイ、または蛍光免疫アッセイ) によって抗免疫原活性についてアッセイする。

【0052】

このような抗体を產生するハイブリドーマを、既知の手順を使用してインビトロまたはインビボで成長させることができる。所望ならば、モノクローナル抗体を、従来の免疫グロブリン精製法 (硫酸アンモニウム沈殿、ゲル電気泳動、透析、クロマトグラフィー、および限外濾過) によって培養培地または体液から単離することができる。望ましくない活性が存在する場合、例えば、固相に結合した免疫原から生成された吸着物質へ調製物を流すこと、および免疫原から所望の抗体を溶出または放出することによって除去することができる。

【0053】

この様式では、卵巣中皮細胞段階に特異的な細胞表面抗原に対する新規の抗体のパネルを、本発明の卵巣中皮細胞を免疫原として使用して生成することができる。一旦卵巣中皮細胞上の細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体を、本明細書中に開示の方法によって作製すると、この抗体は、いくつかの用途に用いられ得る。抗体を、組換え抗体またはヒト化抗体を生成するために配列決定およびクローニングすることができる。卵巣中皮細胞特異的抗体の他の用途には、生物学的試験および精製 (すなわち、フローサイトメトリーまたは抗体パニングなどの方法による卵巣中皮細胞の単離)、治療用途 (すなわち、標的細胞への抗体の結合による細胞成長の促進もしくは停止、または標的細胞への抗体の結合による細胞塊の成長の促進もしくは停止)、生物マーカー (すなわち、他の卵巣細胞または非卵巣細胞の同定)、ならびに臨床診断 (すなわち、組織サンプルにおける癌性の卵巣細胞の同定) が含まれるが、これらに限定されない。

【0054】

免疫原としての別の用途は、異種レシピエントにおける全体的な免疫応答を調整することができる。当該分野で十分に実証されているように、異種レシピエントに導入された細胞または器官などの外来物質は、種々の免疫応答を誘導し得る。免疫応答は、拒絶 (例えば、器官移植)、T 細胞活性化 (例えば、交差プライミング)、アネルギー、耐性の形態であり得る。全体的な免疫応答は、全身性または局所性であり得る。局所性免疫応答が望ましい場合 (例えば、性腺領域)、卵巣中皮細胞などの免疫原を性腺領域に有効量で導入する。有効量を、漸増する量の卵巣中皮細胞を異種レシピエントに導入してその後の免疫応答を監視する段階的様式で確定することができる。全体的な免疫応答 (例えば、抗体産生、サイトカイン産生、T 細胞増殖、アネルギー、耐性など) を、多数の方法 (ELISA、増殖アッセイ、細胞表面マーカーを使用したフローサイトメトリー、および免疫組織化学が含まれるが、これらに限定されない) によってモニターすることができる。

【0055】

(薬物発見のための卵巣中皮細胞の使用)

卵巣中皮細胞の別の用途は、薬物発見に関する。多能性の予め決定された卵巣中皮細胞は、開示の様式で単離および培養されていないので、卵巣中皮細胞集団は、これまで発見または特徴付けられていなかったタンパク質を分泌することができる。したがって、卵巣中皮細胞によって分泌されたタンパク質を、薬物開発のための標的として使用することができる。1つの実施形態では、インビボで卵巣中皮細胞上に特異的タンパク質が標的される

10

20

30

40

50

ように薬物を作製することができる。薬物の結合により、卵巣中皮細胞の卵巣表面上皮細胞、または顆粒膜細胞への分化を促進することができる。このアプローチは、卵巣表面上皮細胞、または顆粒膜細胞新生が望ましい場合例えは、癌治療（例えは、化学療法、放射線療法などの場合）の後に、損傷した細胞を修復するために有用であり得る。別の実施形態において、卵巣中皮細胞の調節タンパク質に対する薬物特異性を用いて、特定の細胞型（例えは、癌（すなわち、卵巣癌、子宮癌など）の場合）の成長を止める。

【0056】

（細胞治療のための卵巣中皮細胞の使用）

別の用途では、卵巣中皮細胞系列は細胞治療に使用される。卵巣中皮細胞の移植は、このような細胞治療の一例である。異なる型の卵巣細胞（すなわち、OSE細胞または顆粒膜細胞など）が所望される場合、卵巣中皮細胞の移植が使用され得る。なぜなら、本発明の卵巣中皮細胞は多能性であり、かつ卵巣上皮細胞および顆粒膜細胞に分化することができるからである。この用途の実施のために、開示の方法を使用して卵巣中皮細胞を単離し、基礎栄養の栄養規定培地中に培養する。卵巣中皮細胞をラミニンコート組織培養フラスコ上で成長させて、卵巣中皮細胞クラスターを得る。卵巣中皮細胞クラスターを標準的なインキュベーション条件下で約半日～少なくとも約1サイクルの継代、より好ましくは少なくとも約2細胞サイクルの継代、最も好ましくは少なくとも約3細胞サイクルの継代にわたって成長させる。次いで、卵巣中皮凝集体をレシピエントに投与して、分化させることができる。あるいは、卵巣中皮凝集体を、卵巣中皮細胞を1つ以上の遺伝子でトランスフェクトし、送達デバイスに封入し、レシピエントに投与される、遺伝子治療の細胞キャリアとして使用することができる。別の実施形態では、卵巣中皮細胞凝集体を腎臓被膜下に置き、OSEまたは顆粒膜細胞に分化させる。別の実施形態では、卵巣中皮凝集体を、免疫系の応答を制限するために細胞を含み他の細胞（すなわち、Theracyte（登録商標））との接近を制限するデバイスで使用する。

【0057】

（ヒト組織モデルを作製するための卵巣中皮細胞の使用）

卵巣中皮細胞の別の用途は、非ヒト哺乳動物においてヒト卵巣組織モデルを作製することである。ヒト卵巣組織モデルを用いて、卵巣発生または卵巣の発癌の卵巣癌研究の重要な領域の多面的な研究をし得る。卵巣中皮細胞球（sphere）を、間葉組織の頂点に置いて移植組換え体を形成させる。移植組換え体を形成させるために、約1～15個の卵巣中皮細胞球、より好ましくは約5～8個の卵巣中皮細胞球を間葉組織の頂点に置く。間葉組織は、卵巣組織または非卵巣組織であり得、そして卵巣中皮細胞が単離される異なる種由来であり得る。作業の例では、ヒト卵巣中皮細胞をラット間葉精嚢組織の頂点において移植組換え体を形成する。当業者は、最初に本明細書中に開示の方法を使用してヒト卵巣中皮細胞を単離し、その後異なる器官由来の間葉組織と組み合わせることによる、段階的様式でヒト卵巣中皮細胞について至適に組み合わせを決定することができる。いくつかの実施形態では、異なる種（例えは、ラット）を、ヒト卵巣前駆細胞との組み合わせにおける間葉細胞組織の供給源として使用する。異種の使用によって、ヒト特異的マーカーを使用して分化卵巣細胞の同一性を確定することができる。ラット間葉組織を使用した場合、偽陽性の確率が減少する。同様に、脾臓間葉組織を超える精嚢間葉組織の使用により、分化したヒト卵巣細胞の同定における偽陽性の確率が減少する。好ましい実施形態では、約1～12個の卵巣中皮細胞球、さらにより好ましくは約5～8個の卵巣中皮細胞球をラット精嚢間葉組織の頂点に置く。好ましくは、約 1×10^4 ～約 5×10^6 個の間葉細胞を使用する。より好ましくは、約 2×10^5 ～約 5×10^5 個の間葉細胞を使用する。次に、間葉組織に置いた卵巣中皮細胞球を含む移植組換え体を、レシピエント哺乳動物中の腎臓被膜下に置く。可能なレシピエント哺乳動物には、マウスおよびラットが含まれるが、これらに限定されない。典型的には、移植状況では、ドナー組織は、レシピエントの免疫系による攻撃に脆弱である。移植片拒絶を軽減するために、いくつかの技術を使用することができる。1つの方法は、レシピエントに致死用量以下の放射線を照射して、移植片を攻撃し得る免疫細胞を破壊することである。別の方針は、レシピエントにシクロスボリン

10

20

30

40

50

または他のT細胞免疫抑制薬を投与することである。レシピエント哺乳動物としてマウスを使用して、移植片拒絶を緩和するための広範な種々の方法が可能である。1つのこのような方法は、免疫不全マウス（ヌードまたは重篤複合免疫不全なわちS C I D）の使用である。作業例では、ヒト卵巣中皮細胞球をラット精嚢間葉組織上に置き、免疫不全マウスの腎臓被膜下に置く。移植片組換え体は、レシピエント内で約1～約52週間、好ましくは約5～約40週間、さらにより好ましくは約6～約8週間維持し、その後移植片を回収し、卵巣中皮細胞分化について分析する。いくつかの場合、移植片の小部分が分析に必要である。卵巣表面上皮細胞および顆粒膜細胞に特異的なマーカー（サイトケラチン1、5、6、7、8、10、11、13、15、16、18、および19、卵胞刺激ホルモン（F S H）レセプター、黄体化ホルモン（L H）レセプター、およびアロマターゼを含むがこれらに限定されない）は、分化した卵巣中皮細胞の同定確認に利用し得る。マーカー確認の非限定的な方法は、免疫組織学分析、免疫蛍光法およびフローサイトメトリーで使用する。分化した卵巣中皮細胞の同定の別の方法および移植の有効性を確認することは、
17 - ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ（17 - H S D H）の存在を卵巣表面上皮細胞（O S E）または - 5 - 3 - ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの存在について染色することである。これらのマーカーを、個別または互いに組み合わせて使用することができる。さらに、1つまたは複数のこれらのマーカーの組み合わせを細胞形態学と組み合わせて使用して、移植の有効性を確定することができる。

【0058】

1つの実施形態では、ヒト卵巣モデルを、S C I D（重篤複合免疫不全）マウスにおいて生成することができる。このヒト卵巣モデルを、本明細書中に開示した方法で単離および培養したヒト卵巣中皮細胞の使用、および移植組換え体を作製するためのヒト卵巣中皮細胞の使用によって作製することができる。次いで、移植片組換え体を、マウスの腎臓被膜下に置く。腎臓被膜下での移植から約1～10週間後、好ましくは約6～8週間後に、その移植片または一部を回収し、免疫組織化学によって分析する。卵巣表面上皮細胞および顆粒膜細胞に特異的なマーカーは、以下を含むが、これらに限定されない：サイトケラチン（すなわちC K 1、5、6、7、8、10、11、13、15、16、18、および19）、卵胞刺激ホルモン（F S H）レセプター、黄体化ホルモン（L H）レセプター、およびアロマターゼ。卵巣表面上皮細胞および顆粒膜細胞に特異的なマーカーを用いて、組織モデル系の有効性を分析する。あるいは、分化した卵巣中皮細胞に特異的なマーカーを用いる。これらのマーカーの非限定的な例は、以下：サイトケラチン-19、ビメンチン、およびモノクローナル抗体5 C 8である。卵巣中皮細胞分化の結果のさらに別の評価法は、形態学によるものである。卵巣表面上皮細胞は、扁平上皮または円柱上皮細胞の外観を有する。

【0059】

（バイオアッセイにおける卵巣中皮細胞の使用）
本明細書において開示される卵巣中皮細胞は、種々のバイオアッセイにおいて使用され得る。1つの用途において、卵巣中皮細胞を使用して、どの生物学的因子が分化に必要であるかを決定する。異なる生物学的化合物（たとえば、ホルモン、特異的増殖因子など）と組み合わせて段階的な様式で卵巣中皮細胞を用いることによって、1つ以上の特異的な生物学的化合物は、卵巣中皮細胞のO S E細胞への分化を誘導することが見出され得る。同じ段階の組み合わせを用いると、1つ以上の特異的生物学的化合物は、卵巣中皮細胞の顆粒膜細胞への分化を誘導することが見出され得る。卵巣中皮細胞のためのバイオアッセイにおける他の用途は、ディフェレンシャルディスプレイ（すなわち、m R N A ディフェレンシャルディスプレイ）および卵巣中皮細胞から分泌されるタンパク質を使用するタンパク質・タンパク質の相互作用である。タンパク質・タンパク質の相互作用は、酵母のツーハイブリッド系のような技術を用いて決定され得る。卵巣中皮細胞からのタンパク質を使用して、卵巣中皮細胞と相互作用する、他の未知のタンパク質または他の細胞型を同定し得る。これらの未知のタンパク質は、以下の1つ以上であり得る：増殖因子、ホルモン、酵素、転写因子、翻訳因子、および腫瘍サプレッサー。卵巣中皮細胞およびこれらの細胞
40
50

が形成するタンパク質 - タンパク質の相互作用、およびタンパク質 - タンパク質または細胞 - 細胞の接触でさえの効果を包含するバイオアッセイを用いて、如何に周囲の組織（たとえば、間葉組織）が卵巣中皮細胞分化に寄与するかを決定し得る。

【0060】

(実施例)

(実施例1：卵巣中皮細胞の単離および培養)

在胎齢17週～25週の間の生殖ヒト胎児卵巣を、Advanced Bioscience Research (Alameda county, California) から得た。卵巣を、湿潤氷浴のもとで組織培養培地中で調達し、そして研究室に搬送した。到着後すぐ、卵巣から過剰の結合組織を除き、注意深く輪卵管から分離し、そして新鮮な組織培養培地で5回洗浄した。

10

【0061】

卵巣を、はさみで刻んだか、またはレーザーブレードを用いて小片（1mm厚未満）に切り刻んだ。各卵巣から組織片を、本明細書に開示される好ましい栄養培地10mlを伴うラミニンで新鮮にコーティングしたT75フラスコ中に直接配置した。コラゲナーゼ - ディスパーゼ（0.5%）での37～30分のこの卵巣のさらなる分離を行い得るが、この手順は、卵巣中皮細胞の回収を減少させた。この細胞を、10μg/mlインスリン、10μg/mlトランスフェリン、5μg/ml - トコフェロール、10nM組換えヒトヘレグリン 1、50ng/ml上皮増殖因子、5μg/mlアプロチニン、および2容量%BSAを補充したF12/DMEM中で標準的なインキュベーション条件で培養した。1週間以内に、細胞は、移植片から移動し、そして増殖してコンフルエントな細胞培養物を形成した。この段階での培養物は、卵巣中皮細胞および間葉細胞の両方からなった。間葉細胞は、フラスコ中にわたり移動したが、卵巣中皮細胞は、組織移植片のごく付近に保持された（図1A）。卵巣中皮細胞を富化するために、その培養物を、0.1%コラゲナーゼ - ディスパーゼとともに30分インキュベートすることによって培養フラスコから剥離した。この処理は、間葉細胞を单一の細胞へと分離したが、卵巣中皮細胞は、クラスターのままで残した。次いで、この卵巣中皮細胞をBSA勾配（F12/DMEM中の1%～3%BSA）を通じた5分間の遠心分離により分離した。ほとんどが間葉細胞を含んだ上清を吸引し、そして残りの細胞ペレットは、ほとんどが卵巣中皮細胞を含んでいた。この卵巣中皮細胞を、培養培地中に再懸濁し、そして1:5の希釈倍率（1部の細胞懸濁物：5部の総懸濁物容量）で配置した。この培養培地は、10μg/mlインスリン、10μg/mlトランスフェリン、5μg/ml - トコフェロール、10nM組換えヒトヘレグリン 1、50ng/ml上皮増殖因子、5μg/mlアプロチニン、および0.5容積%BSAを補充したF12/DMEMであった。この細胞は、クラスターとして懸濁物中で増殖した（図1B）。この細胞は、このようにして、約4継代から5継代にわたり増殖した。懸濁培養物中で増殖した細胞は、血清が培養倍地中に存在したときまたはそのプレートをラミニンでコーティングしたとき、プレートの側面に付着し得、そして卵巣中皮細胞単層として増殖した（図1C）。単層培養物は、卵巣中皮細胞が互いに接触を保たれたとき良好に継代した。

20

【0062】

(実施例2：卵巣中皮細胞株の特徴づけ)

卵巣中皮細胞を、懸濁培養物から採取した。この細胞をクラスター形態で直接染色するために、細胞クラスターを最適な切断温度（OCT）化合物で包埋し、そしてドライアイス上で凍結させた。低温切片（5～10μm厚）を、OCTブロックから切り出し、カバースリップに融解してマウントし、そして3%パラホルムアルデヒドで1時間固定した。卵巣中皮細胞の単層培養物を、2%BSAの存在下でチャンバスライド上に懸濁培養物からの細胞クラスターをプレートすることによって調製した。単層細胞培養物をインサイチュで3%パラホルムアルデヒドで1時間固定した。固定液をリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）で洗浄して除いた後、この細胞を、ブロッキング緩衝液（PBS中5%ヤギ血清および0.1%Tween 20）中で30分間インキュベートし、PBSでリنسし、次いで

30

40

50

、一次抗体中で1時間インキュベートし、PBSでリノンスし、次いで抗マウスIgセイヨウワサビペルオキシダーゼとともに1時間インキュベートした。卵巣中皮細胞を特徴付けるために用いたマーカーおよび例示の抗体は、CK19および抗サイトケラチン抗体クローン4.62(Sigma Chemical Company由来)(図3A)、CK13およびCK16ならびに抗体クローン8.12(Sigma Chemical Company由来)(図3B)、CK10、CK11およびCK18ならびに抗体クローン8.13(Sigma Chemical Company由来)(図3C)、ビメンチンおよび抗ビメンチンモノクローナル抗体クローン13.2(Sigma Chemical Company由来)(図3D)、ならびに抗卵巣上皮モノクローナル抗体5C8(図3E)であった。モノクローナル抗体5C8は、免疫原として卵巣中皮細胞を用いることによって作製した。
10

【0063】

(実施例3：卵巣中皮細胞に対するモノクローナル抗体を產生するための免疫原の供給源を提供する方法)

卵巣中皮細胞を開示されるように単離および培養し、次いで続いて卵巣中皮細胞に対するモノクローナル抗体のパネルを產生するための免疫原として使用した。マウスそれぞれに、1週間当たり、約 1×10^6 細胞の卵巣中皮細胞の1回の注射で免疫した。この免疫は、各々のマウスの足蹠中に局所化された。5回の注射の後、マウスから採血して卵巣中皮細胞の力値をチェックした。卵巣中皮細胞の力値がマウス中で1:1000(卵巣細胞:総細胞)を超えたとき、そのマウスを屠殺し、そしてリンパ節を採取した。リンパ球を、このリンパ節から調製し、そして骨髄腫細胞株と融合してハイブリドーマを生成した。ハイブリドーマを、卵巣中皮細胞に特異的に結合したモノクローナル抗体についてフローサイトメトリ(蛍光活性化細胞ソーターまたはFACS)およびこのモノクローナル抗体について免疫組織化学によりスクリーニングした。クローニ化ハイブリドーマ細胞株を、反復限界希釈によって得た。ハイブリドーマクローン5C8は、卵巣中皮細胞に結合したモノクローナル抗体であった。図2は、モノクローナル抗体クローン5C8が胎児ヒト卵巣中の卵巣中皮細胞を特異的に認識した免疫組織化学分析における結果を示す。
20

【0064】

(実施例4：ヒト卵巣組織モデルを生成するための卵巣中皮細胞の使用)

組織移植片組換え体を、それぞれ異種レシピエントへの移植の目的で作製して、異種レシピエントにおけるヒト卵巣組織モデルをそれぞれ作製した。組織移植片組換え体を作製するために、3継代の後の単層培養物から採取された卵巣中皮細胞を、ラット泌尿生殖洞間葉組織の上部に配置した。この移植片組換え体を、約24時間、寒天プレート上で培養した。次いで、この移植片組換え体を、ヌードマウス中の腎臓嚢の下に移植した。この移植物を約2ヶ月増殖させた後、移植片組換え組織を切り出し、そして組織学により分析した。この結果は、卵巣中皮細胞が囊状の構造を形成したことを示した(図4A、4Bおよび4C)。卵巣表面上皮細胞の上皮細胞裏打ちは、薄い希薄な層であり、囊のいくつかにおいて細胞が緩やかに付着していた(図4A、4Bおよび4C)。
30

【0065】

(実施例5：バイオアッセイにおける卵巣表面上皮細胞の使用)

本発明の卵巣中皮細胞を免疫原として使用することによって、卵巣中皮細胞に対して特異的なモノクローナル抗体(例えば、クローン5C8)を生成した。これらの抗体を用いて卵巣癌を伴う雌性患者からの卵巣組織の凍結切片を染色した。モノクローナル抗体5C8は、卵巣癌を伴う患者における癌性上皮細胞の強力な染色を示した(図5)。したがって、モノクローナル抗体(例えば、クローン5C8)の利用は、臨床状況において診断目的に拡張され得る。
40

【0066】

この特許の出願は、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を含むこの特許のコピーは、請求に対して、および必要な手数料の支払いの際に特許商標局によって提供される。
50

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1 Aは、固体卵巣組織由来のヒト卵巣中皮細胞増殖を示す顕微写真である。図1 Bは、懸濁培地における細胞クラスターとしてのヒト卵巣中皮細胞の増殖を示す顕微写真である。図1 Cは、単層としてのヒト卵巣中皮細胞の増殖を示す顕微写真である。

【図2】 図2は、免疫組織化学分析の結果を示し、ここで、モノクローナル抗体5C8は、ヒト胎児卵巣組織における卵巣中皮細胞を特異的に認識する。図2 Aは、 $100\times$ での倍率を示し、そして図2 Bは、 $400\times$ での倍率を示す。

【図3】 図3は、卵巣中皮細胞クラスターの免疫ペルオキシダーゼ染色の結果を示す。図3 Aは、サイトカラチン19についての卵巣中皮細胞の染色を示す。図3 Bは、サイトカラチン13および16についての卵巣中皮細胞の染色を示す。図3 Cは、サイトカラチン10、11および18についての卵巣中皮細胞の染色を示す。図3 Dは、ビメンチンについての卵巣中皮細胞の染色を示す。図3 Eは、モノクローナル抗体5C8によって認識される卵巣中皮細胞表面抗原についての卵巣中皮細胞の染色を示す。10

【図4】 図4は、組織組換え実験の結果を示し、ここで、ヒト卵巣中皮細胞を、ラット尿生殖洞間葉組織で組替え、そしてマウスに移植し。図4 A、4 B、および4 Cは、囊胞構造と類似の卵巣表面上皮細胞の形態学を示す。

【図5】 図5は、免疫組織化学分析の結果を示し、ここで、卵巣癌における癌性上皮細胞は、抗卵巣モノクローナル抗体5C8によって特異的に検出され得る（茶色、矢印で示す）。

【図1】

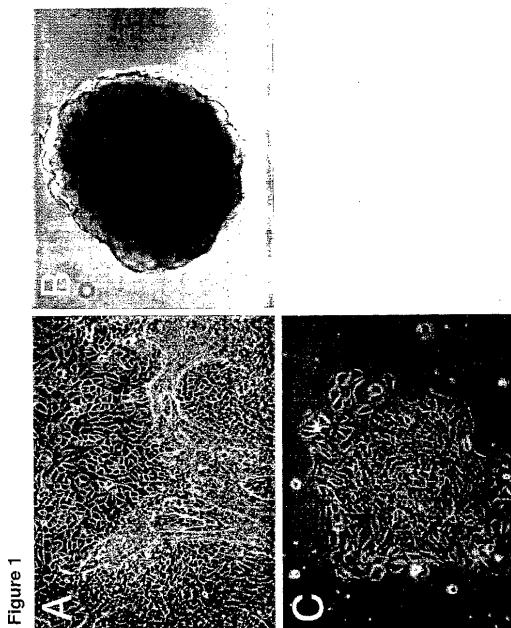


Figure 1

【図2】

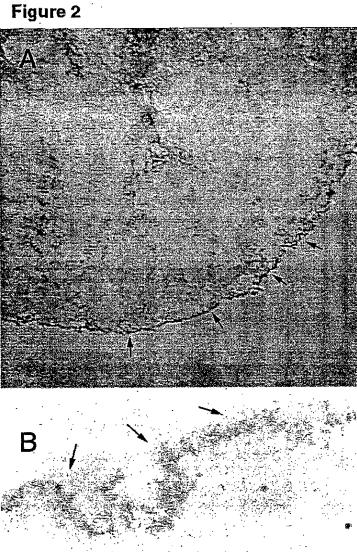
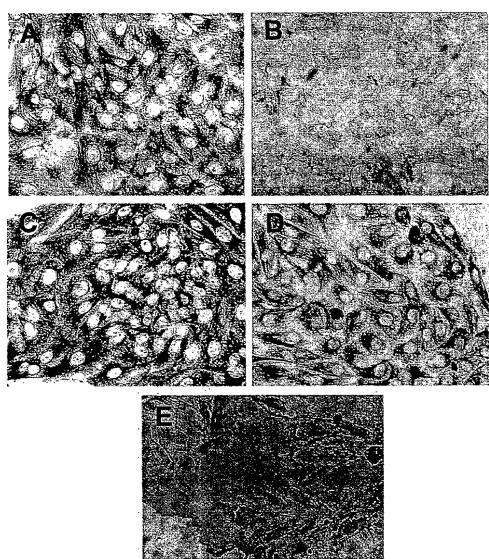
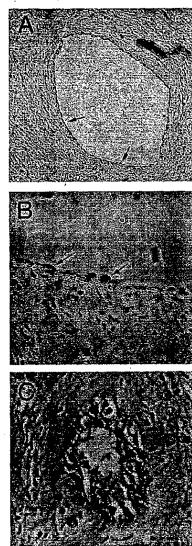


Figure 2

【図3】
Figure 3

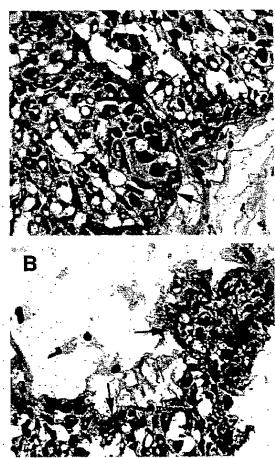


【図4】
Figure 4



【図5】

Figure 5



フロントページの続き

(72)発明者 リー , ロンハオ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002 , ベルモント , コンチネンタルズ ウェイ 1
001 , ナンバー309

(72)発明者 バルド , ローラ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94022 , ロス アルトス , ユニバーシティ アベニュー
- 761

(72)発明者 メイサー , ジェニー パウエル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94030 , ミルプレイ , ラ プレンダ ドライブ 26
9

審査官 中村 正展

(56)参考文献 Anticancer Res. , 1990年 , vol. 10 , 1233-1240

Lab. Invest. , 1990年 , vol. 63 , 132-136

In Vitro, Cell. Dev. Biol., Animal , 1993年 , vol. 29 , 9-18

Eur. J. Cell Biol. , 1985年 , vol. 37 , 175-190

In Vitro, Cell. Dev. Biol., Animal , 1995年 , vol. 31 , 300-309

Biol. Reprod. , 1996年 , vol. 54 , 660-669

J. Cell. Physiol. , 1988年 , vol. 134 , 347-356

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 5/00- 5/28

A01K 67/02-67/027

PubMed

MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

CA/SCISEARCH/DISSABS(STN)

WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

医学・薬学予稿集全文データベース