

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007 年 1 月 11 日 (11.01.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/004635 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/00 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/313285
- (22) 国際出願日: 2006 年 7 月 4 日 (04.07.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2005-195269 2005 年 7 月 4 日 (04.07.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松山 晃文 (MAT-SUYAMA, Akifumi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 澤 芳樹 (SAWA, Yoshiki) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 金倉 譲 (KANAKURA, Yuzuru) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 河宮 治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 I M P ビル青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, 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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD FOR DIFFERENTIATION CULTURE OF PREADIPOCYTE INTO ADIPOCYTE BY COCULTURE WITH MACROPHAGE, AND SCREENING OF SUBSTANCE CAPABLE OF AFFECTING THE DIFFERENTIATION PROCESS OF PREADIPOCYTE INTO ADIPOCYTE

(54) 発明の名称: マクロファージとの共培養による脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化培養方法、ならびにその分化過程に影響する物質のスクリーニング

(57) Abstract: A culture method for inducing the differentiation of a preadipocyte into an adipocyte, the method comprising co-cultivating the preadipocyte with a macrophage in a culture medium free from PPAR- γ agonist and IBMX; an adipocyte produced by the culture method; a screening method for a substance capable of affecting the differentiation process of a preadipocyte into an adipocyte, characterized by using the culture method; a substance capable of affecting the differentiation process of a preadipocyte into an adipocyte, the substance being given by the screening method; a kit for the screening; and others.

(57) 要約: 本発明は、PPAR- γ アゴニストおよび IBMX を含まない培地中で脂肪前駆細胞をマクロファージと共培養することとを特徴とする、脂肪前駆細胞を脂肪細胞に分化させる培養方法およびそれにより得ることのできる脂肪細胞、かかる培養方法を用いることを特徴とする、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程に影響する物質をスクリーニングする方法およびそれにより得ることのできる脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程に影響する物質、ならびにかかるスクリーニングのためのキットなどを提供する。



WO 2007/004635 A1

明 細 書

マクロファージとの共培養による脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化培養方法、ならびにその分化過程に影響する物質のスクリーニング

技術分野

[0001] 本発明は、脂肪前駆細胞を脂肪細胞に分化させる培養方法、該分化過程に影響する物質のスクリーニング方法などに関する。

背景技術

[0002] 近年、代謝症候群 (metabolic syndrome) に合併続発する冠動脈疾患、脳血管障害等の動脈硬化性疾患の罹患率が増加している。これは、代謝症候群が肥満、インスリン抵抗性と関連する耐糖能異常、脂質代謝異常、高血圧、ならびにPAI-1、CRPの上昇をそれぞれ示す血栓形成や炎症といったほとんどすべての動脈硬化病態と関連するためである。従って、これらの疾患を予防、治療するために、代謝症候群の発症生理の解明、そしてそれを予防、治療するための薬剤が早急に求められている。

[0003] 代謝症候群の発症には、脂肪組織、特に内臓脂肪組織の関与が示されている。脂肪組織の主要な構成細胞である脂肪細胞は、脂肪前駆細胞といわれる線維芽細胞様の間葉系細胞に由来し、前脂肪細胞、ついで脂肪細胞へと分化成熟する。この過程で、脂肪細胞は多くの分泌因子(アディポサイトカイン)を産生し、これら分泌因子が代謝症候群の発症に関与することが分かっている。従って、脂肪前駆細胞を脂肪細胞へ分化させる培養系を用いて、代謝症候群の発症機序を解明し、かかる分化過程を制御する薬剤をスクリーニングし、これを用いることで、代謝症候群の発症を制御する試みがなされている。

[0004] しかしながら、従来のヒト脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化培養方法は、生体内に存在しないPPAR- γ アゴニストおよびイソブチルメチルキサンチン (IBMX) を必須成分として添加した培地を用いている (非特許文献1参照) ため、PPAR- γ アゴニストおよびIBMXが候補薬剤と相互作用するばかりでなく、かかる系を用いて薬剤をスクリーニングする場合、特にPPAR- γ アゴニストの強力な作用により候補薬剤

の同定が困難になる。それゆえ、かかる従来の分化培養方法を用いて、薬剤のスクリーニングを行うことは適当でない。

- [0005] また、脂肪組織には血液由来の単核球が存在し、最近になって、アディポサイトカインの少なくとも一部は、脂肪組織に浸潤したマクロファージによって分泌されたものであることが報告されている(非特許文献2参照)。しかし、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化培養系、あるいはこれを用いる物質のスクリーニング系において、脂肪前駆細胞とマクロファージの相互作用は検討されていなかった。

非特許文献1:Hemmrich K et al., Differentiation 73: 28-35 (2005)

非特許文献2:Bruun JM et al., J Clin. Endocrinol Metab. 90: 2282-2289 (2005)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明の解決課題は、PPAR- γ アゴニストおよびIBMXを用いない、より生体内の状況に近い条件下で脂肪前駆細胞から脂肪細胞を分化させる培養方法、ならびにかかる分化過程に影響する物質をスクリーニングする方法などを提供することである。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者らは、上記事情に鑑み鋭意研究を重ねた結果、脂肪前駆細胞をマクロファージと共培養することで、PPAR- γ アゴニストおよびIBMXを用いることなく脂肪細胞を得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

- [0008] すなわち、本発明は、

(1) PPAR- γ アゴニストおよびIBMXを含まない培地中で脂肪前駆細胞をマクロファージと共培養することを特徴とする、脂肪前駆細胞を脂肪細胞に分化させる培養方法、

(2) 脂肪前駆細胞とマクロファージを透過性材料により隔離して共培養することを特徴とする、(1)記載の方法、

(3) 細胞がヒト由来のものである、(1)または(2)記載の方法、

(4) (1)ないし(3)のいずれか記載の方法により得ることのできる、脂肪細胞、

(5) (1)または(2)記載の培養方法を用い、候補物質を培地に添加して、脂肪前駆

細胞から脂肪細胞への分化を調べることを特徴とする、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程に影響する物質をスクリーニングする方法、
(6)細胞がヒト由来のものである、(5)記載の方法、
(7) (5)または(6)記載の方法により得ることのできる、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程に影響する物質、
(8) (1)または(2)記載の培養方法を用い、候補物質を培地に添加して、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を調べることを特徴とする、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程に影響する物質をスクリーニングするためのキット、
(9)細胞がヒト由来のものである、(8)記載のキット、
を提供するものである。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、人工物質であるPPAR- γ アゴニストおよびIBMXを用いず、より生体内の状況に近い条件下で脂肪前駆細胞を脂肪細胞に分化させる培養方法およびそれにより得ることのできる脂肪細胞、該培養方法を用いて脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程に影響する物質を効果的にスクリーニングする方法およびそれにより得ることのできる脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程に影響する物質、ならびにかかるスクリーニングのためのキットなどが提供される。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、脂肪前駆細胞をマクロファージと7日間共培養して得られた脂肪細胞をオイルレッドO染色したものの顕微鏡像である。スケールバーは49.9 μ mである。
[図2]図2は、脂肪前駆細胞をマクロファージと共培養して得られた脂肪細胞の脂質含有量を示すグラフである。
[図3]図3は、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程に対するECGCの影響を、オイルレッドO染色により示すグラフである。
[図4]図4は、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程に対するECGCの影響を、アディポネクチン、AP-2、グルコース輸送体、IRS-1、レプチン、LPL、PAI-1、TGF- β 、TNF- α 、およびレジスチンの発現により示すグラフである。白色はECGC不存在で、黒色はECGC存在下で脂肪前駆細胞をマクロファージと共培養した

ものである。

発明を実施するための最良の形態

- [0011] 本発明は、1の態様において、PPAR- γ アゴニストおよびIBMXを含まない培地中で脂肪前駆細胞をマクロファージと共培養することを特徴とする、脂肪前駆細胞を脂肪細胞に分化させる培養方法に関するものである。PPAR- γ アゴニストおよびIBMXは生体内で産生されない人工物質であるため、PPAR- γ アゴニストおよびIBMXの両方を含まない培地を用いる本発明の培養方法は、これらの物質を用いる従来の分化培養方法(例えば、ヒト脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化培養方法においてはPPAR- γ アゴニストおよびIBMXが必須であるとされ、マウス脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化培養方法においてもIBMXが必須であるとされてきた)と比較して、より生体内の状況に近い条件下で分化培養が行われるという点で非常に優れている。このことにより、例えば、ヒト脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化のメカニズムをより正確かつ詳細に調べることができる。
- [0012] 本発明に用いる脂肪前駆細胞は、当業者に公知の手段・方法により得ることができる。例えば、動物から分離されたもの、詳細には、内臓脂肪組織または皮下脂肪組織から分離されたものであってもよく、間葉系幹細胞またはES細胞の様な幹細胞から分化誘導されたものであってもよいが、これらに限らない。
- [0013] 脂肪前駆細胞が由来する動物種は特に限定されず、好ましくは、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、サルなどを含む哺乳類、より好ましくは、ヒト由来のものである。例えば、ヒトの脂肪前駆細胞を用いることで、代謝症候群の発症生理等を研究すること等も可能になる。
- [0014] 本発明の方法において脂肪前駆細胞と共培養されるマクロファージが由来する動物種も特に限定されず、脂肪前駆細胞が由来する動物種と同じであってもよいし、異なってもよい。好ましくは、同じ動物種、より好ましくは、同一個体に由来する細胞である。例えば、ヒト由来、好ましくは、同一人由来の脂肪前駆細胞およびマクロファージを用いることにより、乳癌患者の乳房切除後の再建術などにおいて、本発明によりインビトロで分化増殖させた脂肪細胞を利用することなども可能になる。
- [0015] 本明細書において共培養とは、脂肪前駆細胞とマクロファージが相互作用できるよ

うに、これらの細胞を培養することをいう。例えば、同一容器内で単に脂肪前駆細胞とマクロファージを混合して培養してもよく、あるいは脂肪前駆細胞とマクロファージを透過性材料にて隔離して培養してもよく、さらに例えば、脂肪前駆細胞とマクロファージを別個の容器に入れ、これらの容器を透過性的手段により連結して培養してもよい。ここに、透過性とは、培地成分や細胞から産生・分泌されたサイトカインのごとき物質は通過するが、細胞は通過できないような性質をいう。本発明において好ましい共培養の形態は、経済性、あるいはその後のアッセイ、操作等の利便性を考慮すれば、1の容器中において透過性材料にて脂肪前駆細胞とマクロファージが隔離されているものである。かかる培養形態は、トランスウエル (Coaster/Corning)、ミリセル (Millipore) 等の培養器を用いることで実現できる。また隔離とは、脂肪前駆細胞とマクロファージが直接接触していないことをいう。当業者は、目的や所望の条件等に応じて、種々の培養器や隔離手段を選択し、使用することができる。

[0016] 本発明で用いる培地は、当該技術分野においてよく知られた培地を使用することができ、用いる細胞、培養条件、目的に応じて適宜選択して用いることができる。例えば、10% FCS、66nM インスリン、0.033mM ビオチン、0.017mM パントテン酸を含むDMEM/F-12培地を用いてもよい。また、かかる培地中で脂肪前駆細胞は、基材に付着していてもよいし、低接着培養皿内で浮遊させた状態であってもよい。

[0017] また、マクロファージの培養上清を脂肪前駆細胞の培地に添加することによっても本発明の目的を達成できることは当業者に明らかであろう。したがって、かかる培養形態も本発明の共培養に包含される。

[0018] 本発明は、もう1つの態様において、上述の分化培養方法により得ることのできる脂肪細胞を提供する。かかる脂肪細胞は、人工物質を含まない、生体内の状況に近い条件下で分化培養されたものなので、生体内の脂肪細胞に近い性質を有する。従って、本発明により得られる脂肪細胞を用いて、インビボに近い条件でインビトロ実験を行うこと等が可能になる。

[0019] 本発明は、さらなる態様において、上述の脂肪前駆細胞を脂肪細胞に分化させる培養方法により得ることのできる脂肪細胞を対象に投与することを特徴とする、栄養

失調、るいそう、リポジストロフィー等の疾病の治療または予防方法に関するものである。例えば、リポジストロフィーの対象由来の脂肪前駆細胞を用いて上記方法を行い、得られた脂肪細胞を該対象に移植することで、治療することができる。

[0020] 本発明は、なおさらなる態様において、上述の脂肪前駆細胞を脂肪細胞に分化させる培養方法により得ることのできる脂肪細胞を用いることを特徴とする、脂肪細胞の補充が必要な症状の治療方法に関するものである。この方法を、例えば、乳房の再建術や種々の美容整形術に適用することができる。好ましくは、自己由来の脂肪前駆細胞から分化させた脂肪細胞を用いることで、副作用等の問題を回避することができる。

[0021] 本発明は、さらにもう1つの態様において、上記の培養方法を用いて、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程に影響する物質をスクリーニングする方法に関するものである。本発明の分化培養方法は、人工物質を含まない、生体内の状況に近い条件下で脂肪前駆細胞を分化させるものであるため、これを用いて行うスクリーニング方法には、得られた物質が生体内でも同様の効果を示す可能性を高めるという利点がある。

[0022] 分化過程に影響するとは、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を抑制または停止させること、あるいは促進させることを意味する。具体的には、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化速度を低下させること、該分化を遅延させること、該分化を不完全または完全に停止させること、脂肪細胞の数を減少させること、あるいは逆に、該分化速度を増加させること、脂肪細胞の数を増加させること、さらには分化した脂肪細胞を幼若化させること等が挙げられる。

[0023] 本発明の該スクリーニング方法は、上記分化培養系に候補物質を添加し、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を調べることにより行われる。候補物質としては種々のものがあり、例えば、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を抑制することが分かっている、ECGC(エピガロカテキンガレート)のアナログ、誘導体または変異体、あるいはマクロファージ活性に対して抑制的または促進的に作用することが知られている物質、あるいはそれらの変異体等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0024] 分化を調べる手段としては、例えば、顕微鏡観察により脂肪細胞の数を計算するこ

と、オイルレッドO染色により脂肪滴の大きさ、数、脂肪含量等を観察すること、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化に伴い発現が減少または増加する物質、例えば、aP2、CD36、アディポネクチン、レジスチン、GLUT4、TNF- α 、PAI-1などを定量的PCRまたは免疫ブロットなどにより測定することなどが挙げられる。本発明のスクリーニング方法においては、コントロールとして候補物質を添加しない場合の上記分化培養系における脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化も調べ、候補物質を添加した場合の分化と比較する。候補物質添加培養系において、該分化が抑制されていれば、該候補物質は該分化を抑制する物質であると考えられ、逆に該分化が促進されていれば、該候補物質は該分化を促進する物質であると考えられる。

[0025] 本発明のスクリーニング方法により、例えば、ヒト由来の脂肪前駆細胞を用いて脂肪細胞への分化を抑制する物質が見出されたならば、それは、肥満症、糖尿病、高血圧症、高脂血症、代謝症候群、動脈硬化性疾患、虚血性心疾患等の疾病の治療または予防に有用な物質であると考えられる。また、該分化を促進する物質が見出されたならば、それは、栄養失調、るいそう、リポジストロフィー等の疾病の治療または予防に有用な物質であると考えられる。本発明のスクリーニング方法は、PPA- γ アゴニストおよびIBMX不存下で行われるので、生体内の条件に近く、かつこれらの物質の影響を排除でき、かかる有用な物質を見出すための容易、効率的かつ経済的な方法であるといえる。さらに患者由来の細胞を用いて本発明のスクリーニング方法を利用すれば、テーラーメード治療のための薬剤や細胞の創出も可能になる。また、例えば、ウシ由来の脂肪前駆細胞を用い、効率よく所望の部位で脂肪細胞を誘導し、消費者のニーズに合う食肉を産生するために有用な物質をスクリーニングすることもできる。

[0026] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程に影響する物質に関するものである。例えば、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を促進する物質を、本発明の培養方法において用いて、得られる脂肪細胞の数を増大させてもよい。

[0027] 本発明は、さらにもう1つの態様において、上記の培養方法を用いることを特徴とする、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程に影響する物質をスクリーニングする

ためのキットを提供する。本発明のキットは、本発明の共培養を行うための容器、器具、培地等を含んでもよい。通常には、取扱説明書をキットに添付する。

[0028] 本発明のスクリーニング方法あるいはキットにおいて、スクリーニングの容易化、効率化を促進する手段・方法、例えば、脂肪細胞への分化を確認するためのオイルレッドO染色液、定量的PCRのためのプライマーおよび／またはプローブ、ELISA、免疫ブロットのための抗体などを用いてもよい。

[0029] 以下に実施例を示して本発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、実施例は本発明を限定するものではない。

実施例 1

[0030] A. ヒト脂肪前駆細胞の調製

ヒト脂肪組織由来脂肪前駆細胞を、基礎培地(10% FCS含有DMEM/F-12培地)に10万個/mLの濃度となるように懸濁し、この懸濁液1.5mLを6穴培養皿に播種した。翌日、そしてその後は3日毎に基礎培地を交換し、コンフルエントになるまで脂肪前駆細胞を増殖させた。

[0031] B. ヒト単球由来マクロファージの調製

末梢より、30mL ヘパリン採血を行った。比重1.066にてリンパ球を分離後、分離液15mLを50mL チューブに移した。次に、血液30mLを重層し、500g、16℃にて40分間遠心し、下から赤血球、リンパ球分離液(無色透明)、血漿(黄色透明)のほぼ3層に分離させた。リンパ球分離液と血漿の間に位置する白色の細胞層を分取し、培地に懸濁した。遠心して洗浄(3回)し、得られた細胞ペレットを10% ヒト血清含有DMEM/F-12培地に懸濁した。この懸濁液1.5mLを6穴トランスウェル(Coaster/Corning)(ボトムチャンバーには10% ヒト血清含有DMEM/F-12培地2.7mLを事前に添加)のアップパーチャンバーである、カルチャーインサートに播種した。1時間後、および翌日、そしてその後は3日毎に培地を交換した。

[0032] C. マクロファージとの共培養による脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化誘導

Aで得られた6穴培養皿の培地を、10% ヒト血清、66nM インスリン、0.033mM ビオチン、0.017mM パントテン酸含有DMEM/F12培地2.7mLと交換した。次に、Bのトランスウェルのカルチャーインサートの培地を上記培地に交換し、6

穴培養皿に挿入し、脂肪前駆細胞とマクロファージとの共培養を開始した。3日毎に培地を交換し、共培養開始後0、3、5、7、9、14日目の細胞をオイルレッドO染色し、脂質含有量を測定した。対照として、脂肪前駆細胞単独で培養したものを用いた。マクロファージと脂肪前駆細胞とを共培養した場合の細胞の脂質含有量は、脂肪前駆細胞単独で培養した場合の細胞の脂質含有量より多く、脂肪細胞への分化が確認できた(図1および図2参照)。

実施例 2

[0033] ECGCによる脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化の抑制

A. オイルレッドO染色による分化抑制の確認

実施例1に記載した方法に従い、脂肪前駆細胞とマクロファージ(MF)との共培養を開始した。培地には、ECGCをそれぞれ1、10、100 μ Mの濃度で添加した。共培養開始後7日目の細胞をオイルレッドO染色し、脂質含有量を測定した。対照として、ECGC不存下で、マクロファージと共培養したものおよび脂肪前駆細胞単独で培養したものを用いた。マクロファージとの共培養における脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化は、ECGCにより用量依存性に抑制されることが確認できた(図3参照)。

[0034] B. 定量的PCRによる分化抑制の確認

実施例1に記載した方法に従い、100 μ M ECGCを含む培地にて脂肪前駆細胞をマクロファージと共培養した。培養開始後7日目に分化誘導された脂肪細胞からRNAを抽出した。かかるRNAを鋳型とし、TaqMan[登録商標]プローブ(Applied Bio Systems)を用いてPCR(内部標準:GAPDH)を行い、アディポネクチン、AP-2、グルコース輸送体、IRS-1、レプチン、LPL、PAI-1、TGF- β 、TNF- α 、およびレジスチンを定量した。脂肪細胞への分化に伴い発現が減少することが知られているアディポネクチン、グルコース輸送体、レプチン、TGF- β の発現が、ECGC不存下で培養したものと比較して、ECGC存在下で培養した細胞において増大されることが確認できた(図4参照)。さらに、脂肪細胞への分化に伴い発現が増加することが知られているAP-2、IRS-1、LPL、PAI-1、TNF- α 、およびレジスチンの発現が、ECGC不存下で培養したものと比較して、ECGC存在下で培養した細胞において低減されることが確認できた(図4参照)。これらの結果から、本発明の共培養

系において、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化に影響する物質をスクリーニングできることがわかった。

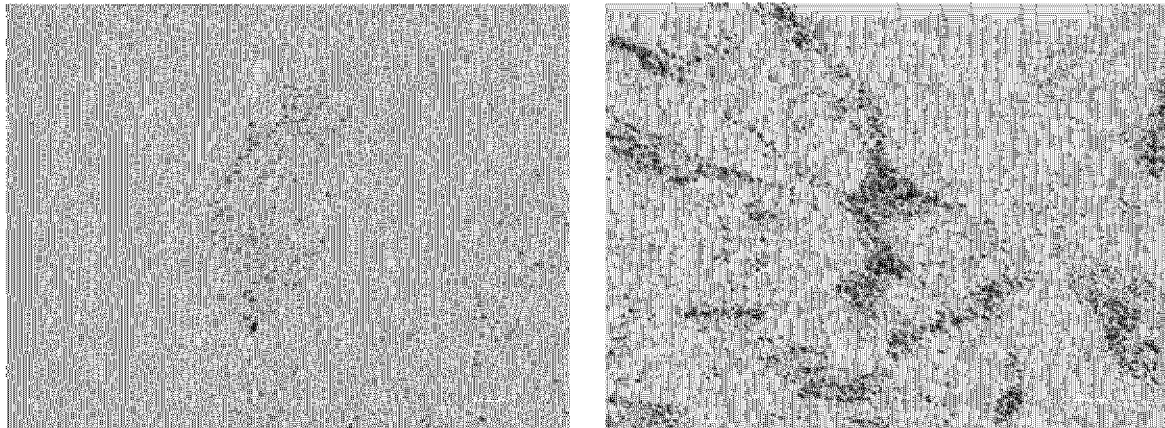
産業上の利用可能性

[0035] 本発明により、生体内に存在しないPPAR- γ アゴニストおよびIBMXを用いることなく、脂肪前駆細胞から脂肪細胞を分化させる培養方法、ならびにかかる分化過程に影響する物質のスクリーニング方法が得られるので、医薬品等の分野、例えば、代謝症候群をはじめとする疾病の予防薬、治療薬または診断薬の開発、製造分野、あるいは保健食品等の分野、さらには脂肪細胞や関連細胞の研究分野等において利用可能である。

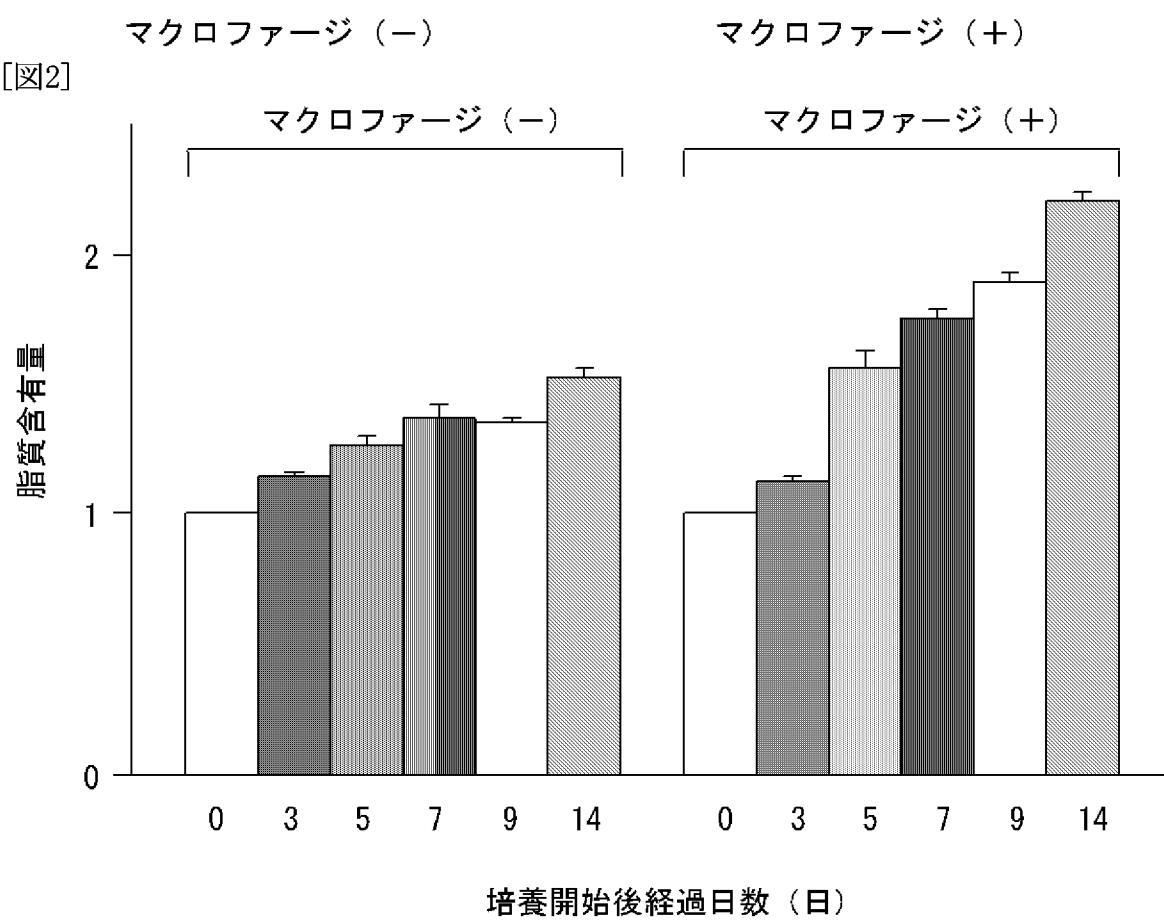
請求の範囲

- [1] PPAR- γ アゴニストおよびIBMXを含まない培地中で脂肪前駆細胞をマクロファージと共培養することを特徴とする、脂肪前駆細胞を脂肪細胞に分化させる培養方法。
- [2] 脂肪前駆細胞とマクロファージを透過性材料により隔離して共培養することを特徴とする、請求項1記載の方法。
- [3] 細胞がヒト由来のものである、請求項1または2記載の方法。
- [4] 請求項1ないし3のいずれか1項記載の方法により得ることのできる、脂肪細胞。
- [5] 請求項1または2記載の培養方法を用い、候補物質を培地に添加して、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を調べることを特徴とする、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程に影響する物質をスクリーニングする方法。
- [6] 細胞がヒト由来のものである、請求項5記載の方法。
- [7] 請求項5または6記載の方法により得ることのできる、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程に影響する物質。
- [8] 請求項1または2記載の培養方法を用い、候補物質を培地に添加して、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を調べることを特徴とする、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程に影響する物質をスクリーニングするためのキット。
- [9] 細胞がヒト由来のものである、請求項8記載のキット。

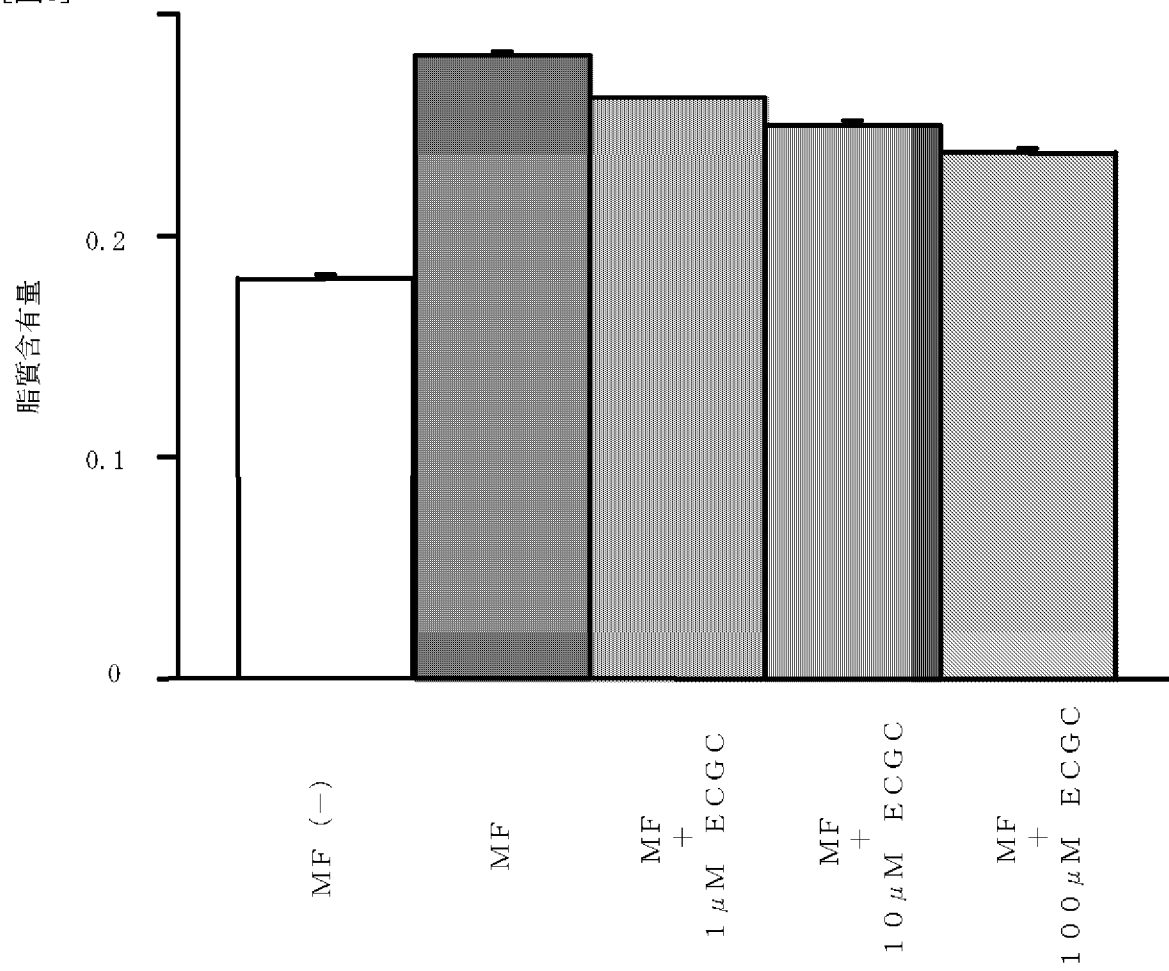
[図1]



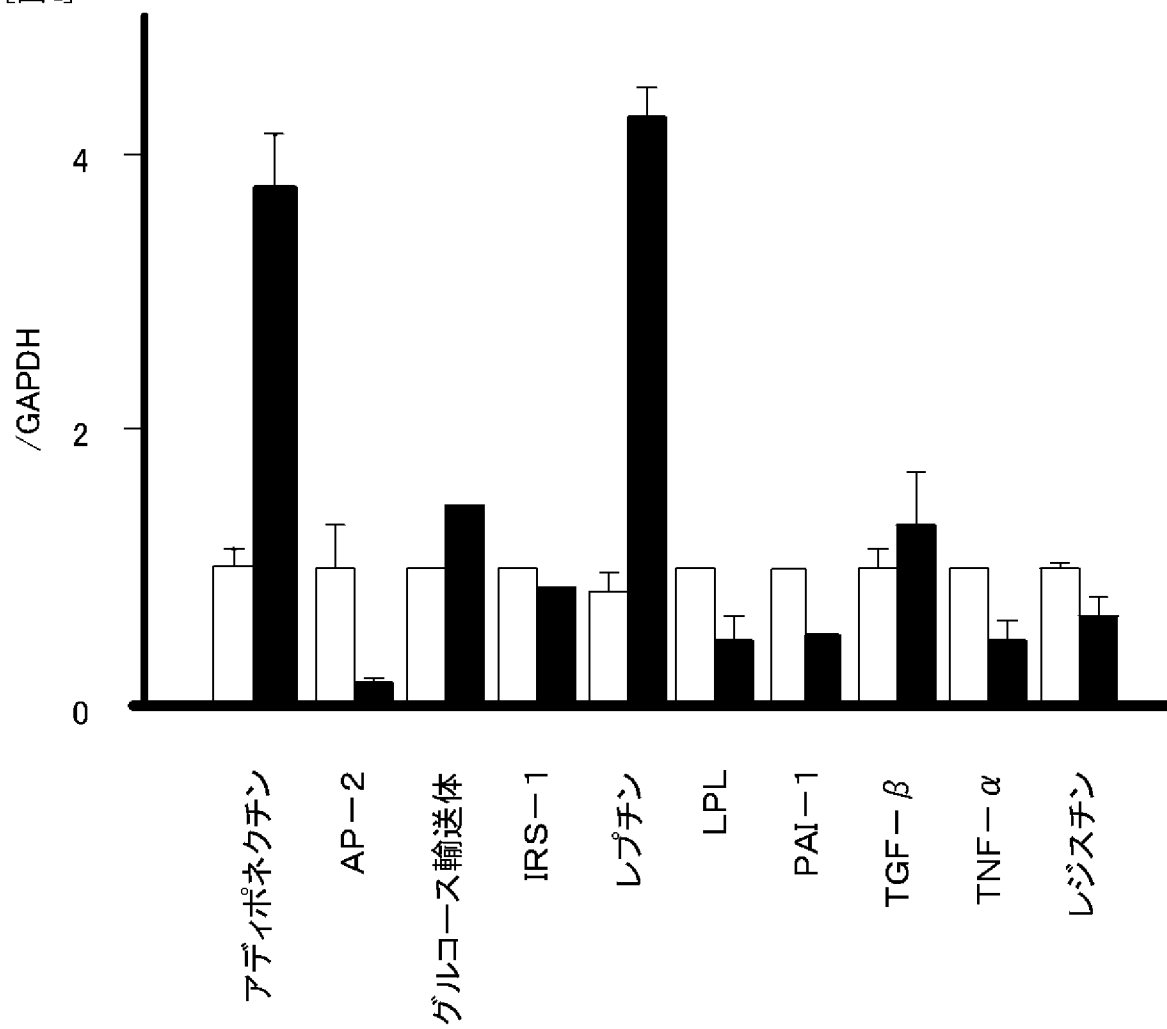
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/313285

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/00(2006.01)i, C12N5/06(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/00, C12N5/06, C12Q1/02, C12Q1/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kazuhiko UMEZONO et al., "Shibo Saibo Bunka to PPARγ no Kasseika", Experimental Medicine, 1996, Vol.14, No.16, pages 2215 to 2221; Fig. 2; chapters 2, 5	1-9
<u>Y</u> A	Bockman RS, Prostaglandin production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages: synthesis dependent on in vitro culture conditions., Prostaglandins, 1981, Vol.21, No.1, pages 9 to 31, full text	<u>1-6, 8, 9</u> 7
<u>Y</u> A	Representative editor Masami MURAMATSU, Bunshi Saibo Seibutsugaku Jiten, Kabushiki Kaisha Tokyo Kagaku Dojin, 1997, page 775	<u>1-6, 8, 9</u> 7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ 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
29 August, 2006 (29.08.06)Date of mailing of the international search report
12 September, 2006 (12.09.06)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/313285

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{Y}{A}$	Kliwer S.A. et al., A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation., Cell, 1995, Vol.83, No.5, pages 813 to 819, Fig. 1	$\frac{1-6,8,9}{7}$
$\frac{X}{A}$	JP 2000-63259 A (Shiseido Co., Ltd.), 29 February, 2000 (29.02.00), Example 1 (Family: none)	$\frac{4}{1-3,5-9}$
$\frac{X}{A}$	JP 2005-513058 A (The University of Tennessee Research Foundation), 12 May, 2005 (12.05.05), Example 1 & EP 001343390 A & WO 2002/017734 A2 & US 6384087 B1	$\frac{4}{1-3,5-9}$
$\frac{X}{A}$	JP 2003-95942 A (Ito En, Ltd.), 03 April, 2003 (03.04.03), Par. No. [0044] (Family: none)	$\frac{7}{1-6,8,9}$
$\frac{Y}{A}$	JP 2002-80362 A (Kao Corp.), 19 March, 2002 (19.03.02), Par. Nos. [0005] to [0008] (Family: none)	$\frac{7}{1-6,8,9}$
$\frac{Y}{A}$	KAWADA, T. et al., Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation, from preadipocytes to adipocytes, of 3T3-L1 cells., Comp.Biochem. Physiol., 1990, Vol.96A, No.2, pages 323 to 326, full text	$\frac{1-6,8,9}{7}$
P,X	Akifumi MATSUYAMA et al., "Koseikatu Shukabyoyaku Screening-kei no Kakuritsu-Macrophage tono Kyobaiyo ni yoru Naizo Shibo BunkaBaiyokei no Kakuritsu", The Journal of the Japanese Society of Internal Medicine, 20 February, 2006 (20.02.06), Vol.95, pages 149	1-9

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N5/00(2006.01)i, C12N5/06(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N5/00, C12N5/06, C12Q1/02, C12Q1/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	梅園和彦 他, 脂肪細胞分化と P P A R γ の活性化, 実験医学, 1996, vol. 14, no. 16, p. 2215-2221, 図 2, 第 2 章, 第 5 章	1-9
<u>Y</u> A	Bockman RS, Prostaglandin production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages: synthesis dependent on in vitro culture conditions., Prostaglandins, 1981, vol. 21, no. 1, p. 9-31, 全文	<u>1-6, 8, 9</u> 7

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 9 . 0 8 . 2 0 0 6

国際調査報告の発送日

1 2 . 0 9 . 2 0 0 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

高 美葉子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 7 5 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	村松正實 編集代表, 分子細胞生物学辞典, 株式会社東京化学同人, 1997, p. 775	<u>1-6, 8, 9</u> 7
<u>Y</u> A	Kliewer SA, et al., A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation., Cell, 1995, vol. 83, no. 5, p.813-819, figure 1	<u>1-6, 8, 9</u> 7
<u>X</u> A	JP 2000-63259 A (株式会社資生堂) 2000.02.29, 実施例 1 (ファミリーなし)	<u>4</u> 1-3, 5-9
<u>X</u> A	JP 2005-513058 A (ユニバーシティ オブ テネシー リサーチ ファウン デーション) 2005.05.12, 実施例 1 & EP 001343390 A & WO 2002/017734 A2 & US 6384087 B1	<u>4</u> 1-3, 5-9
<u>X</u> A	JP 2003-95942 A (株式会社伊藤園) 2003.04.03, 第 0044 欄 (ファミリーなし)	<u>7</u> 1-6, 8, 9
<u>Y</u> A	JP 2002-80362 A (花王株式会社) 2002.03.19, 第 0005-第 0008 欄 (ファミリーなし)	<u>7</u> 1-6, 8, 9
<u>Y</u> A	KAWADA T, et al., Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation, from preadipocytes to adipocytes, of 3T3-L1 cells., Comp. Biochem. Physiol., 1990, vol. 96A, no.2, p. 323-326, 全文	<u>1-6, 8, 9</u> 7
PX	松山晃文 他, 抗生活習慣病薬スクリーニング計の確立ーマクロファージとの共培養による 内臓脂肪分化培養系の確立, 日本内科学会雑誌, 2006.02.20, vol. 95, p.149	1-9