

(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2016-507232

(P2016-507232A)

(43) 公表日 平成28年3月10日(2016.3.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/09 (2010.01)	C 1 2 N 5/09	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00 Z	
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-555542 (P2015-555542)
 (86) (22) 出願日 平成25年5月10日 (2013.5.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年9月2日 (2015.9.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2013/075459
 (87) 国際公開番号 W02014/117454
 (87) 国際公開日 平成26年8月7日 (2014.8.7)
 (31) 優先権主張番号 201310041142.8
 (32) 優先日 平成25年2月1日 (2013.2.1)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)
 (31) 優先権主張番号 201310164388.4
 (32) 優先日 平成25年5月7日 (2013.5.7)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 515210880
 湖南省腫瘤医院
 HUNAN PROVINCIAL TUMOR HOSPITAL
 中国湖南省長沙市岳麓区咸嘉湖路582号
 No. 582, Xianjiahu Road, Yuelu District Changsha, Hunan 410013 (CN)
 (74) 代理人 110001139
 SK特許業務法人
 (74) 代理人 100130328
 弁理士 奥野 彰彦
 (74) 代理人 100130672
 弁理士 伊藤 寛之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01及びその応用

(57) 【要約】

【課題】本発明は中国典型培養物保蔵センターに寄託され、寄託番号がCCTCC NO: C201309であるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01を開示した。本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01は肝炎ウイルス感染を維持する細胞モデルとして応用することができ、ウイルス感染を維持する動物モデルの確立における応用が可能であり、さらに肝炎ウイルス用の抗ウイルス薬と抗腫瘍薬の調製、選別又は評価に用いることもでき、人工肝臓の製造に用いることもできる。

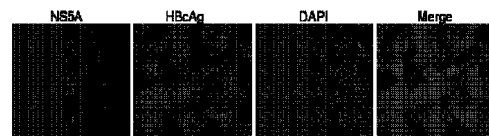


図7 / FIG.7

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

中国典型培養物保蔵センターに寄託され、寄託番号が CCTCCNO : C201309 であるヒト肝臓がん細胞系 HLCZ01。

【請求項 2】

前記ヒト肝臓がん細胞系 HLCZ01 の染色体数が 54 ~ 63 であり、前記ヒト肝臓がん細胞系 HLCZ01 に対し染色体 G バンド核型分析を行ったところ、それに染色体異数化現象が存在することが明らかになり、且つ細胞核型に一つのマーカー染色体が現れたことを特徴とする、請求項 1 に記載のヒト肝臓がん細胞系 HLCZ01。

【請求項 3】

前記ヒト肝臓がん細胞系 HLCZ01 は肝炎ウイルスに感染され得るヒト肝臓がん細胞系であることを特徴とする、請求項 1 又は請求項 2 に記載のヒト肝臓がん細胞系 HLCZ01。

【請求項 4】

前記肝炎ウイルスは B 型肝炎ウイルスや 2 a 型の C 型肝炎ウイルスを含むことを特徴とする、請求項 3 に記載のヒト肝臓がん細胞系 HLCZ01。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれかに記載のヒト肝臓がん細胞系 HLCZ01 の B 型肝炎ウイルスや 2 a 型の C 型肝炎ウイルスを含む肝炎ウイルス感染を維持する細胞モデルとしての応用。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれかに記載のヒト肝臓がん細胞系 HLCZ01 のウイルス感染を維持する動物モデルの確立における応用。

【請求項 7】

前記ウイルスは B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルスを含むことを特徴とする、請求項 6 に記載の応用。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれかに記載のヒト肝臓がん細胞系 HLCZ01 の B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルスを含む肝炎ウイルスに抗する薬物の調製、選別又は評価における応用。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれかに記載のヒト肝臓がん細胞系 HLCZ01 の抗腫瘍薬の調製、選別又は評価における応用。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれかに記載のヒト肝臓がん細胞系 HLCZ01 の人工肝臓の製造における応用。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は微生物・動物細胞の分野に関し、特にヒト肝臓がん細胞系及びその応用に関する。

【背景技術】**【0002】**

肝臓は種々の重要な生理機能を備え、主として、大量の血清タンパク質例えばアルブミンやリポタンパク質の合成と分泌、タンパク質と結合する脂質の合成と輸送、解毒機能、胆汁の合成と分泌、血糖の調節のための糖の合成、アミノ酸の分解による尿素の合成、ビタミンの活性化、グリコーゲンの合成と分解、及び、グルタチオンやメタロチオネインの合成等を含む。

【0003】

10

20

30

40

50

バイオテクノロジーの進歩に従って、遺伝子組み換えと細胞融合の方法によれば、多数の有用な生物学的製品を生産できるが、比較してみると、動物細胞培養技術は従来よりもさらに重要となる。肝臓は、細胞質タンパク質を合成し分泌する顕著な機能など、他の器官より多い生理機能を備え、且つより高いアルブミンやリポタンパク質を合成する能力、脂質、尿素、グリコーゲン、グルタチオンを輸送する能力、及びより高い代謝能力を備えると考えると、肝臓細胞で上記製品を培養し生産することについて研究者の関心を一層集めている。これにより、肝臓機能を研究し関連する生物学的製品を生産するためには、肝細胞を培養する必要がある。しかしながら、現在の細胞培養技術によれば、肝細胞の培養期間において血漿タンパク質等の生物学的製品を生産できず、正常肝細胞は生体から離れた後に活力が急速に低下することで、関連製品の取得は非常に困難である。

10

【0004】

肝臓は成人体内における数少ない再生可能な臓器の一つでもあるが、培養皿にて培養する肝細胞は継代回数の限界があって、繰り返して培養することができない。

【0005】

既存の一部の肝細胞系は非ヒト由来のものであり、又はヒト肝細胞との差異が大きいため、広く応用することができない。現在、実験動物例えばラット (Tsao et al., Exp. Cell Res., 1984, 154:38-52; Enat et al., Proc. Nat. Acad. Sci USA, 1984, 87:1411-1415) に由来する若干の肝細胞系が存在しており、無血清培地により成年ラットの肝臓に由来するラット上皮細胞を確立した (Chessebeuf and Padiou, In Vitro, 1984, 20:780-795; Enat et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1984, 81:1411-1415)。ラット肝細胞にはさらにSV40 DNAを導入することもできるが (Woodworth et al., Cancer Res., 1987, 46:4018-4026; Ledley et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1987, 84:5335-5339)、ヒトの肝細胞の代謝と異なっているため、このような細胞は人体内での薬物の代謝及び肝臓がんの生成についての研究に用いることができない。

20

【0006】

また、ヒト肝細胞の無性繁殖に関連する報告も存在しており (Kaighn and Prince, Proc. Nat. Acad. Sci., 1971, 68:2396-2400)、長期間に培養できるヒト胎児肝臓も確立されたが (Salas-Purato, M. et al., In Vitro Cell Dev. Biol., 1988, 24:230-238; Sells, M. A. et al., In Vitro Cell Dev. Biol., 1985, 21:216-220)、胎児肝臓と成人肝臓との代謝上の差異により、胎児肝臓の腫瘍生成及び毒性学の研究における応用は制限される一方、成人肝臓は腫瘍生成及び毒性学の研究により適している。

30

【0007】

肝細胞を代替する研究モデルを見出すために、研究者は肝臓がん由来し、正常肝細胞と同じ機能 (例えばアルブミンを分泌する機能) を備える細胞系を確立した。現在、種々の肝臓がん細胞系、例えば肝臓がん細胞系 HepG2 (U.S. Pat. No. 4393133) が確立されている (e.g., Knowles et al., U.S. Pat. No. 4,393,133, issued Jul. 12, 1983; Knowles B. B. et al., Science, 1980, 209:497-499; Monjardino J. and Crawford E., Virology, 1979, 96:652-655; Park J. G. et al., Int. J. Cancer, 1995, 62:276-282; Zhong et al., PNAS, 2005, 102(26):9294-9299; Fu and Cheng, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44(12):3402-3407)。HepG2のさらなる利用につ

40

50

いての研究に関連する報告も存在している (Kelly et al., *In Vitro Cell. and Dev. Biol.*, 1989, 25:217-222; U.S. Pat. No. 5,290,684; and Darlington et al., *In Vitro Cell. and Dev. Biol.*, 1987, 2-3:349-354)。また、Nakabayashiは肝臓がん細胞系Huh7を確立している (*Cancer Research*, 1982, 42:3858-3863)。これまでに出版された文献をまとめて見ると、既存の肝臓がん細胞系としては、HLF (Okayama University, medical school: 1975), HLE, c-1 (Okayama University, medical school: 1975), HuH-6 clone 5 (Okayama University, medical school: 1976), HuH-7 (Okayama University, medical school: 1979), C-HC-4 (Hokkaido University, school of medicine: 1979), HCC-M (Keio University, school of medicine: 1980), JHH-1 (The Tokyo Jikei University School of Medicine: 1980), JHH-2 (The Tokyo Jikei University School of Medicine: 1982), JHH-4 (The Tokyo Jikei University School of Medicine: 1983), KIM-1 (Kurume University, school of medicine: 1983), JHH-5 (The Tokyo Jikei University School of Medicine: 1984), JHH-6 (The Tokyo Jikei University School of Medicine: 1984), OHR (Showa University, school of medicine: 1985), KMCH-1 (Kurume University, school of medicine: 1985), KMG-A (Kurume University, school of medicine: 1985), JHH-7 (The Tokyo Jikei University School of Medicine: 1986), JHC-1 (The Tokyo Jikei University School of Medicine: 1986), KYN-1 (Kurume University, school of medicine: 1986), KYN-2 (Kurume University, school of medicine: 1987), HCC-T (Keio University, school of medicine: 1986), HPT-NT/D3 (Kyushu University, faculty of medicine: 1986), Hep-tabata (Mie University, Faculty of Medicine: 1986), HuCC-T1 (Toyama Medicine and Pharmaceutical University, faculty of medicine: 1987), 及びHuH-28 (Okayama University, medical school: 1987)などがある。上記関連データについては、ヒト細胞Vol. 1, No. 1, p. 106-126, 1988を参照することができる。

【0008】

生物反応器で肝細胞を培養して人工肝臓を製造する研究は多く存在している。人工技術は腎臓、心臓及び肺の移植で進展を見ている。人工肝臓及び他の技術により長期間に肝機能を保つことについての報告はすでに存在している (例えば、Anand A. C., *Indian J. Gastroenterol.*, 2003, 22 Suppl 2: S69-74; Ueda et al., *ASAIO J*, 2003, 49(4): 401-6; Tilles et al., *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, 2002, 9(6): 686-96; Metab. Brain Dis., 2005, 20(4): 327-35; and Park and

Lee, J. Biosci Bioeng., 2005, 99(4):311-9)。
肝臓補助装置に関連する報告も存在している(例えば、Lu et al., Tissue Eng., 2005, 11(11-12):1667-77; Pless and Sauer, Transplant Proc., 2005, 37(9):3893-5; Millis and Losanoff, Nat. Clin. Pract. Gastroenterol Hepatol., 2005, 2(9):398-405; and George J., J. Assoc. Physicians India, 2004, 52:719-22)。これらの肝臓補助装置は移植手術においてよく用いられている。例えば、人工肝臓と肝臓補助装置により、劇症肝不全患者に手術の前に意識を保持させ落ち着かせることができ、移植手術の後、特に再灌流に应答しない場合に患者を安定させることができ、そして場合によっては肝移植を代替することもできる。バイオ人工肝臓及び肝臓補助装置をより有効に利用するために、軽便でコンパクトなバイオリアクターを発明する必要がある。従って、培養される細胞は反応器にて緊急に必要な且つ十分な肝特異タンパク質を産生することが求められている。正常ヒト肝細胞の欠乏により、肝臓がん細胞はこの応用で高い潜在力がある。研究者はHep G2細胞によりこれらの装置にて抗アポトーシスタンパク質Bcl-2を生産することに成功した(Terada S., J. Biosci. Bioeng., 2003, 95(2):146-51)。

10

【0009】

肝臓がんは一般的な腫瘍であり、多くの肝臓がんは肝炎ウイルス例えばB型肝炎ウイルス(HBV)や、C型肝炎ウイルス(HCV)に起因したものであり、今はまだ有効な療法がない。HCV感染は主なヒト感染症の一つであり、予防・治療に有効なワクチンはまだない。一部の証拠から、細胞性免疫の肝炎ウイルスを取り除くことの重要性が証明されたが、患者体内の抗体に仲介される抗ウイルス反応のメカニズムはまだ明確ではない。多くの患者体内の抗体はウイルス抗原を中和できるが、血清における中和抗体の含有量と強度は未知のものであり、ウイルス感染をサポートする細胞モデル又は動物モデルが乏しいため、中和抗体に関する研究は制限されている。

20

【0010】

ヒト肝臓がん由来する若干の細胞系は存在しているが、これらの既存の細胞系の多くは低分化で肝細胞機能不全のものである。発明者らが調べたところ、現在、HBVとHCV感染をサポートする細胞系は一つもなく、それにより、抗ウイルス薬の開発と応用も制限されている。一部の研究チームは初代ヒト肝細胞により少量のHCVコピーを検出したことがあるが、野生型HCVの大量コピーをサポートする細胞系はまだない(Tagawa M. et al., J. Gastroenterol Hepatol, 1995, 10:523-527; Ito T. et al., J. Gen. Virol., 1996, 77(Pt. 5):1043-1054; Ito T. et al., Hepatology, 2001, 34:566-572)。2005年、いくつかの研究チームは細胞系において2a型HCV JFH1の生理的リズムを現すことに成功した(Heller T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, 102:2579-2583; Wakita T. et al., Nat. Med., 2005, 11(7):791-796; Zhong J. et al., PNAS, 2005, 102(26):9294-9; Lindénbach B. D. et al., Science 2005, 309(5734):623-6)。

30

40

【0011】

現在、HCV感染をサポートする唯一の動物モデルはチンパンジーである(Lanford R. E. et al., Virology, 2002, 293:1-9)。このような動物モデルの利点は、ウイルスの実際の生理的リズムを現していることであり、ヒトを感染させた病理学的表現と異なっても(Alter M. J. et al., N. Eng. J. Med., 1999, 341:556-562; Bas

50

sett S. E. et al., J. Virol., 1998, 72:2589-2599)、このようなモデルはウイルス感染後の宿主の免疫反応に対して多くの解釈を提供した。このようなモデルの利用における最大の制限はチンパンジーの供給源が少なく、費用が非常に高いことである。コモンツパイは霊長類に近い小動物で、実験室環境に非常に適応しやすい。ある研究から、コモンツパイも肝炎ウイルスを含む複数種のヒトウイルスに感染できることが明らかになった (die Z. C. et al., Virol ogy, 1998, 244:513-520)。

【0012】

HCVコアタンパク質を発現する遺伝子改変マウスは肝臓病理及び腫瘍生成の研究に用いられている (Lemon S. M. et al., Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc., 2000, 111:146-156)。多くの遺伝子改変動物は肝細胞に対する毒性を示しておらず、あるモデルはリンパ細胞炎症及び肝細胞壊死を示しており (Zhao X. et al., J. Clin. Invest., 2002, 109:221-232)、他の二種のモデルは脂肪変性及び肝臓がんを示している (Moriya K. et al., J. Gen. Virol., 1997, 78 (Pt. 7):1527-1531; Moriya K. et al., Nat. Med., 1998, 4:1065-1067)。HBV遺伝子改変マウスを利用したモデルは、HBVに起因した免疫病の発生メカニズムについての研究を非常に大きく広めた (Chisari F. V. et al., Science, 1985, 230:1157-1160; Chisari F. V. et al., Hepatology, 1995, 22:1316-1325)。遺伝子改変マウスはHCV免疫学ではまだ幅広く応用されておらず、ウイルスタンパク質に対する免疫寛容はマウスモデルを利用する研究での問題となる。

【0013】

以上の従来の研究結果から、肝臓がん類似する機能を備える肝臓がん細胞系及び動物モデルを得ることは非常に有利であることが明らかになっている。これらの細胞系の潜在的な応用としては、抗腫瘍薬物を選別し評価すること、細胞系においてHBVやHCVを培養してウイルスの自然的な感染形態をシミュレート・再現すること、抗ウイルス薬物を選別し評価すること、及び、肝細胞の代謝エネルギーを研究することを含むがこれらに限定されるものではない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明が解決しようとする技術問題は従来技術の問題点を克服して、高分化で、体外で培養でき、肝臓の機能特性を有し、肝炎ウイルスに感染され得るヒト肝臓がん細胞系HLCZ01を提供し、それに応じて当該ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01の細胞モデル、動物モデル、及び抗ウイルスと抗腫瘍薬の調製と選別等における応用をも提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0015】

上記目的を達成するため、本発明は、中国典型培養物保蔵センター (CCTCCと略称する) に寄託され、寄託番号がCCTCC NO: C201309であるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01を提供することを特徴とする。当該ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01の寄託部門は中国武漢大学に位置する中国典型培養物保蔵センターCCTCCであり、寄託日は2013年1月17日。当該ヒト肝臓がん細胞系はヒト肝臓がん細胞系HLCZ01と命名した。

【0016】

上記のヒト肝臓がん細胞系HLCZ01において、その染色体数は54~63であることが好ましい。

【0017】

10

20

30

40

50

上記のヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 において、前記のヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 に染色体 G バンド核型分析を行ったところ、それに染色体異数化現象が存在することが明らかになり、且つ細胞核型に一つのマーカー染色体が現れた。

【 0 0 1 8 】

上記のヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 は肝細胞特異遺伝子 A L B と A A T を含むだけでなく、肝細胞特異タンパク質 A L B と A A T を発現することもできる。上記のヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 は高分化のヒト肝臓がん細胞系である一方、肝炎ウイルスに感染させることができ、前記肝炎ウイルスは特に B 型肝炎ウイルス (H B V) や C 型肝炎ウイルス (H C V) を言い、 2 a 型の C 型肝炎ウイルス及び各型の B 型肝炎ウイルスを含むもののいずれにも感染され得る。 H B V と H C V は本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 において大量にコピーすることができる。

10

【 0 0 1 9 】

全体的な技術思想としては、本発明はさらに上記のヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 の B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルスを含む肝炎ウイルス感染をサポートする (特に 2 a 型の C 型肝炎ウイルス及び各型の B 型肝炎ウイルスを含むもののいずれにも感染され得る) 細胞モデルとしての応用を提供する。本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 は H B V と H C V の完全な生活環を維持し、細胞モデルにおいて H B V と H C V を培養することにより、ウイルスの自然な感染形態を再現することができる。

【 0 0 2 0 】

全体的な技術思想としては、本発明はさらに上記のヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 のウイルス感染をサポートする動物モデルの確立における応用を提供する。前記ウイルスは B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルスを含むことが好ましい。具体的には、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 は非ヒト動物モデルに用いることができ、ヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 を動物体内 (例えばマウス体内) に植え込む又は導入すれば、ウイルス感染をサポートする動物 (例えばマウス) モデルの確立に用いることが可能になる。本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 により確立された動物モデルは肝臓病理学と肝炎ウイルス学の研究に役立つ。前記のように、ヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 は H B V と H C V の完全な生活環を維持するため、ヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 において H B V と H C V の肝心な病理過程を再現でき、該ヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 を含む動物モデルは H B V と H C V に対する人体の抗ウイルス反応の研究に用いることが可能になる。

20

30

【 0 0 2 1 】

全体的な技術思想としては、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 は肝炎ウイルス感染をサポートする細胞モデルとしての応用、又はウイルス感染をサポートする動物モデルの確立における応用が可能であることで、臨床で H B V と H C V を抑制し又はそれらに介入する薬物 (ウイルスワクチン及びその他の補助試薬) を選別することに役立つため、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 は B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルスを含む肝炎ウイルスに抗する薬物の調製、選別又は評価に応用することも可能になる。

【 0 0 2 2 】

全体的な技術思想としては、本発明にかかる上記のヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 は培地にて体外培養を行うことができ、さらに細胞に対する化合物の発がん性と催奇性を予測する研究に用いることもでき、化学発がん研究により、さらに抗腫瘍薬の調製、選別又は評価に用いることが可能になる。

40

【 0 0 2 3 】

全体的な技術思想としては、本発明にかかる上記のヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 は肝臓の重要な機能と特性を有し、アンモニアを尿素に変換できるが、アンモニアを代謝して尿素とする機能により、それは人工肝臓又は肝臓補助設備を製造する有利なツールとなるため、臨床又は科学研究に用いることができる。このため、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 は人工肝臓の製造に応用することもできる。

50

【 0 0 2 4 】

上記の基本的な応用形態に加え、本発明にかかる上記のヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 はさらに、肝細胞代謝の研究（例えば、化合物の肝臓での代謝活性化作用を評価する）及びその他の代謝機能の研究、肝炎ウイルスの肝細胞での生存とコピーの研究、並びに人体寄生虫の研究等に応用することもでき、細胞に外来遺伝子を導入してその機能を研究するのに応用することもできるが、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 はチトクローム P 4 5 0 と、C y P 1 A 1、C y P 1 B 1 及び C y P 2 C 9 タンパク質とを発現できるため、大量の同原細胞実験の必要な場合、例えば薬物代謝研究に応用することもできる。

【 発明の効果 】

10

【 0 0 2 5 】

従来技術に比べて、本発明は以下の利点を有する：本発明は画期的なヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 を選別して得られたものであり、当該ヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 は高分化のヒト肝臓がん細胞系に属するだけでなく、培地にて体外培養を行うこともでき、それは肝臓の重要な機能と特性を有し、アミンを尿素に変換でき、チトクローム P 4 5 0 と、C y P 1 A 1、C y P 1 B 1 及び C y P 2 C 9 タンパク質とを発現できる。より重要なのは、肝炎ウイルスに感染させることができ、H B V と H C V がその中に大量にコピーできることであり、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 が有する特殊な性能により、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 は抗ウイルスと抗腫瘍薬の調製、開発、選別及び評価に幅広く応用することができ、生物人工肝臓等の各種の臨床治療用生物学的製品の製造に用いることができる。本発明において選別して培養したヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 は他の動物肝細胞よりもヒト肝臓の代謝機能と病気の進展過程についての研究に役立つ。

20

【 0 0 2 6 】

ヒト肝臓がん細胞系 H L C Z 0 1 の寄託機関は中国武漢大学に位置する中国典型培養物保蔵センター（C C T C C と略称する）であり、寄託番号は C C T C C N O : C 2 0 1 3 0 9、寄託日は 2 0 1 3 年 1 月 1 7 日である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 7 】

【 図 1 】本発明の実施例において、R T - P C Rにより三種類の細胞における遺伝子 A L B と A A T を検出した対照的な検出結果であるゲル撮影装置による電気泳動図である。

30

【 図 2 】本発明の実施例において、W e s t e r n B l o tにより三種類の細胞における A L B と A A T タンパク質発現を検出した対照的な検出結果である。

【 図 3 】本発明の応用実施例 1 において、ヒト肝臓がん細胞系が H C V に感染した後にウイルスのコピー量が培養時間に従って変化する曲線である。

【 図 4 】本発明の応用実施例 1 において、ヒト肝臓がん細胞系が H C V に感染した後の免疫蛍光による検出結果であり、そのうち、左の図は C 型肝炎ウイルス N S 5 A に抗する抗体によりウイルス感染細胞内のウイルスを検出することを示し、中間の図は D A P I により細胞核を対比染色することを示し、右の図は左の図と中間の図を結合した図を示す。

【 図 5 】本発明の応用実施例 2 において、H L C Z 0 1 細胞が H e p a G 2 . 2 . 1 5 細胞内に由来する H B V に感染した後に P C R により定量的に検出した結果である。

40

【 図 6 】本発明の応用実施例 3 において、二種のヒト肝臓がん細胞系が H C V に感染した後にウイルスのコピー量が培養時間に従って変化する曲線である。

【 図 7 】本発明の応用実施例 3 において、ヒト肝臓がん細胞系が H B V と H C V に感染した後の免疫蛍光による検出結果であり、そのうち、四つの図は左から右まで順に以下のとおりである：C 型肝炎ウイルスの N S 5 A 抗体により細胞内の C 型肝炎ウイルスを検出したもの、B 型肝炎ウイルスコアタンパク質抗体により細胞内の B 型肝炎ウイルスを検出したもの、D A P I により細胞核を対比染色したもの、及び、ごくわずかの細胞が二種のウイルスに同時に感染され得る左側の三つの図を結合した図である。

【 図 8 】本発明の応用実施例 1 において、H L C Z 0 1 細胞によるヒト化マウスが C 型肝炎

50

炎ウイルスに感染した後、マウス血清におけるウイルスの含有量が感染時間によって変化する曲線である。

【図9】本発明の応用実施例2において、HLCZ01細胞内のB型肝炎ウイルスの含有量がインターフェロンの使用量及び処理時間によって変化する関係図である。

【図10】本発明の応用実施例1において、HLCZ01細胞内のC型肝炎ウイルスの含有量がインターフェロンの使用量及び処理時間によって変化する関係図である。

【図11】本発明の応用実施例4において、フローサイトメトリーによりTRAILに対するHLCZ01細胞の感受性を検出した結果である。

【図12】本発明の実施形態において、ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01について染色体核型分析を行った染色体分布頻度図である。

【図13】本発明の実施形態において、ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01(2n=54)について染色体核型分析を行った結果図である。

【図14】本発明の実施形態において、ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01(2n=59)について染色体核型分析を行った結果図である。

【図15】本発明の実施形態において、ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01(2n=63)について染色体核型分析を行った結果図である。

【発明を実施するための形態】

【0028】

以下に、明細書の添付図面及び具体的な好ましい実施例と結びつけて本発明をさらに説明するが、これにより本発明の保護範囲を制限するものではない。

【0029】

下記実施例において、特に説明していない限り、いずれも一般的な方法とする。下記実施例に用いる実験材料又は生物製剤については、特に説明していない限り、いずれも市場から購入できる一般的な試薬である。以下の実施例における定量実験は、いずれについても三回の繰り返し実験を設定して、平均値を結果とする。

【0030】

実施例に用いる主な実験材料及び試薬：

【0031】

(1)細胞培養：ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01(寄託されているもの)、Huh7.5細胞(アメリカロックフェラー大学のCharles Rice教授の実験室から贈られたもの)、HCVcc(JFH1ウイルス上澄みであり、HCV材料は日本国立感染症研究所のTakaji Wakita教授の実験室から贈られたもの)、100mmの細胞培養プレート(Costar社)、60mmの細胞培養プレート(Costar社)、6ウェル型細胞培養プレート(Costar社)、DMEM培地(Invitrogen社)、ペニシリンとストレプトマイシン(Invitrogen社)、グルタミン(Invitrogen社)、羊血清(Invitrogen社)、トリプシン(Invitrogen社)、非必須アミノ酸(Invitrogen社)、1xPBS(Hyclone社)；

【0032】

(2)細胞の総RNA抽出：TRIzol(Invitrogen社)、イソプロパノール(上海生工)、無水エタノール(上海生工)、DEPC(上海生工)；

【0033】

(3)Reverse Transcription PCR及びReal Time PCR：Invitrogen RT-PCRキット(Invitrogen社)、SYBR Premix ExTaq(Taraka社)、200µL型8連PCRチューブ(Eppendorf社)；

【0034】

(4)細胞の総タンパク質抽出：RIPA溶解液(Thermo社)、プロテアーゼ阻害剤(Merck社)、タンパク質濃度測定用試薬(Bio-Rad社)；

【0035】

10

20

30

40

50

(5) Western Blot: PVDFフィルム (Bio-Rad社)、抗ALB抗体 (SANTA CRUZ)、抗AAT抗体 (SANTA CRUZ)、抗HCVNS5A抗体 (アメリカフロリダ大学から贈られたもの)、二次抗体goat anti-mouse IgG (HRP) (Invitrogen社)、Western Blot化学発光基質 (Thermo社)、Western Blot露光機 (Keda社);
【0036】

(6) 免疫蛍光: スライドガラスとカバーガラス (SPI Supplies社)、免疫組織化学染色ペン (ZLI-9305、PAPPen)、1xPBS (Hyclone社)、羊血清 (Invitrogen社)、抗HCVNS5A抗体 (自製)、二次抗体goat anti-mouse IgG (FITC) (Invitrogen社)、DAPI (Invitrogen社)。
【0037】

実施例:

【0038】

本実施例では本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01が得られる。当該ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01は中国典型培養物保蔵センターに寄託されており、寄託番号はCCTCC NO: C201309、寄託機関は中国武漢大学に位置し、寄託日は2013年1月17日である。当該ヒト肝臓がん細胞系はヒト肝臓がん細胞系HLCZ01と命名した。

【0039】

HLCZ01細胞系の確立及び培養方法

【0040】

1. 男性肝臓がん患者の手術において切除された新鮮な手術標本を採取し、PBSで一度洗浄し、組織ブロックをメスで 1mm^3 の小さなブロックに切ってコラーゲンで処理した培養皿(100ミリメートル)に敷き、8mlの新鮮な培地を加え、かつ表皮成長因子を加え、最終濃度を 10ng/ml とする。

【0041】

2. 2日培養した後新鮮な培地に取り替えてから、3日毎に新鮮な培地に取り替える。

【0042】

3. 培養皿においてクローン細胞が生じたことを観察した後、PBSで細胞を一度洗浄し、0.25%のパンクレアチンをクローン細胞に滴下し、インキュベータに1min放置してから取り出し、ピペットで新鮮な培地を吸い上げて消化されたクローン細胞を洗い流して吸い出し、12ウェルプレートに転移して培養し続ける。

【0043】

4. 12ウェルプレートにおいて細胞が一面に生じてから、6ウェルプレートに移し替え、一面に成長してから10cmの培養皿に広げる。

【0044】

5. 1×10^7 個の細胞をNOD-SCIDマウスの皮下に接種し、約45日後に著しい瘤腫が生じてから、瘤腫を取り出しヒト肝臓がん組織の培養方法に従って培養し続けてHLCZ01細胞を得る。

【0045】

RT-PCRにより、本実施例によるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01には肝細胞特異遺伝子ALBとAATが含まれていることが検出された。具体的な過程は以下のとおりである。

【0046】

ヒト肝臓がん細胞系Huh7、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01及びチャニーズハムスター卵巣細胞系CHO (アメリカATCCから購入されたもの)を、各種の細胞がそれぞれ二つのウェルを占めるように6ウェル型細胞培養プレートに敷き(30万/ウェル)、24h培養した後、三種類の細胞をそれぞれ一つのウェルから採

10

20

30

40

50

取し、TRIzolで細胞の総RNAを抽出し、そして1 μ gの総RNAを採集してcDNAに逆転写し、1 μ LのcDNAをテンプレートとしてPCRを行ってALBとAAT遺伝子を増幅した。増幅した結果は図1に示すとおりである。図1から分かるように、ヒト肝臓がん細胞系Huh7とヒト肝臓がん細胞系HLCZ01のいずれにも肝細胞特異遺伝子ALBとAATが増幅される一方、非肝臓がん細胞系CHOではこの二種の遺伝子は増幅されない。

【0047】

Western Blotにより、本実施例によるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01に肝細胞特異タンパク質ALBとAATを発現できることが実証された。具体的な過程は以下のとおりである。

【0048】

上記6ウェル型細胞培養プレートにおける余剰の三つのウェル中の三種類の細胞を採取し、RIPABufferで細胞を溶解し、細胞溶解液を氷の上に15min放置してから、13000rpmで15min(4)遠心させ、上澄みを採取して新たなEP管に移し、Lowry法でタンパク質濃度を測定し、それぞれ50 μ gのタンパク質を採取してポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行う。そしてポリアクリルアミドゲル上のタンパク質をPVDFフィルムに移し替え、最後にAnti-ALBとAnti-AAT一次抗体及びHRPラベル付き二次抗体で各タンパク質サンプルにおけるALBとAATの発現を検出した。結果は図2に示すとおりであり、図2から分かるように、ヒト肝臓がん細胞系Huh7とHLCZ01の細胞のいずれにもALBとAATタンパク質が発現している一方、非肝臓がん細胞系CHOにはこの二種のタンパク質が発現していない。

【0049】

以上の実験により、本発明において選別して得たヒト肝臓がん細胞系HLCZ01は肝細胞特異遺伝子ALBとAATを含むだけでなく、肝細胞特異タンパク質ALBとAATを発現することもできるのが実証された。

【0050】

上記本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01について染色体核型分析を行ったが、当該染色体核型分析はアメリカATCCによる動物細胞系の染色体核型分析方法を参考とする。検出に送られる細胞について一般方法で継代させ、それぞれP2、P4、P7世代の細胞(1000個の中期分裂細胞)について染色体調製を行い、一般的な核型染色体計数を行い、染色体分布頻度を計算し、Gバンドに染色して観察し、CCDで結像しVideoTest-Karyo 3.1ソフトウェアにより核型分析を行う。

【0051】

本実施例によるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01において、染色体核型分析の結果から、染色体数が54~63であることが分かり、その分布頻度は図12に示すとおりである。

【0052】

本実施例によるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01において、ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01について染色体Gバンド核型分析を行ったところ、それに染色体異数化現象が存在することが明らかになり、且つ細胞核型に一つのマーカー染色体が現れた。そのうち最も典型的な三組の染色体(2n=54、2n=59、2n=63の三組の染色体)核型分析を例とし、その分析結果は図13~図15に示すとおりであり、図13~図15から分かるように、いずれの細胞核型にも一つのマーカー染色体が現れた。

【0053】

応用実施例1：HLCZ01が肝炎ウイルスHCVに感染した場合。

【0054】

1. 本実施例によるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01及び従来のHuh7.5を6ウェル型細胞培養プレートに敷き(20万/ウェル)、24h後に培地を2%のFBSのみを含む培地に取り替え、MOI=0.2のJFH1ウイルスで細胞を感染させ、24

10

20

30

40

50

h後に新鮮な完全培地に取り替えて、細胞をそれぞれ1日、2日、3日及び6日培養し、対応する時点でTRIZOLにより二種の細胞の総RNAを抽出する。そして1µgの総RNAを採集してcDNAに逆転写し、1µLのcDNAをテンプレートとして定量PCRを行って、二種の細胞におけるHCVのRNAレベルを検出し、結果は図3に示すとおりである。

【0055】

2. 3日感染した後の上記ヒト肝臓がん細胞系の一部を別途採集して60mmの培養皿中のカバーガラスに敷き、3日培養し続ける。1×PBSにより細胞を二度洗浄した後、アイスアセトンで上記の二種のヒト肝臓がん細胞系を8min固定した。毎回の5min間において、1×PBSで固定した後に前記ヒト肝臓がん細胞系が生じたカバーガラスを3度洗浄し、羊血清を室温で30min密閉する。そしてAnti-NS5A一次抗体を加えて1h培養し、1×PBSにより3度洗浄してからFITCにマーキングされた二次抗体を加えて1h培養し、1×PBSにより3度洗浄してからDAPIで封止し、最後に蛍光顕微鏡で観察し、結果は図4に示すとおりであり、図4から、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01の細胞からウイルスタンパク質NS5Aを検出できることがさらに証明された。

10

【0056】

以上から分かるように、HCVでHLCZ01細胞を感染させてから、蛍光定量PCRにより細胞におけるHCVのRNAレベルを検出し、及び免疫蛍光により細胞におけるウイルスタンパク質の発現を検出することで、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01は肝炎ウイルスHCV(JFH1)に感染し得ることがさらに証明された。これにより、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01は肝炎ウイルスHCV感染を維持する細胞モデルとして応用することができ、HCVウイルス感染を維持する動物モデルの確立における応用も可能であり、さらにHCV肝炎ウイルス用の抗ウイルス薬の調製、選別又は評価に用いることもできる。

20

【0057】

本実施例によるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01を、肝炎ウイルス(上記C型肝炎ウイルス)感染を維持する細胞モデルとして応用する場合は図3及び図4に示すとおりである。

【0058】

本実施例によるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01を、上記C型肝炎ウイルス感染を維持する動物モデルの確立に応用する場合は図8に示すとおりであり、図8は本実施例においてヒト肝臓がん細胞系HLCZ01によるヒト化マウスがC型肝炎ウイルスに感染した後、マウス血清におけるウイルスの含有量が感染時間によって変化する曲線である。

30

【0059】

本実施例によるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01はさらにC型肝炎ウイルス用の抗ウイルス薬の調製、選別又は評価に用いることもできる。発明者らによる実験から、上記C型肝炎ウイルスで当該ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01を感染させた後、現在C型肝炎を治療するための薬物 - インターフェロンはC型肝炎ウイルスに感染した当該ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01内のウイルスの含有量を低減できることが明らかになり(図10参照)、図10はHLCZ01細胞におけるC型肝炎ウイルスの含有量がインターフェロンの使用量及び処理時間によって変化する関係を示し、このことから分かるように、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01はC型肝炎ウイルス用の抗ウイルス薬の調製、選別又は評価に用いることができる。

40

【0060】

応用実施例2：HLCZ01が肝炎ウイルスHBVに感染した場合。

【0061】

本実施例によるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01を60mmの培養皿に敷き、24h後に培地(DMEM培地)をHepaG2.2.15細胞上澄みに取り替えて完全培地と(1:1の体積比で)混合し、5日培養し続ける。5日後に細胞を継代させ、正常培

50

地に取り替えて培養し、3日毎に継代させる時に一部の細胞を採集して総細胞DNAを抽出する。テンプレートとして第46日に抽出したDNAを採集して定量PCRを行って、ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01細胞におけるHBVの含有量を検出し、結果は図5に示すとおりであり、図5から分かるように、ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01にはHBVが検出され得る。

【0062】

以上から分かるように、HBVでHLCZ01細胞を感染させてから、蛍光定量PCRにより細胞におけるHBVの含有量レベルを検出することによって、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01は肝炎ウイルスHBV(HepaG2.2.15細胞内に由来するB型肝炎ウイルス)に感染し得ることがさらに実証された。これにより、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01は肝炎ウイルスHBV感染を維持する細胞モデルとして応用することができ、HBVウイルス感染を維持する動物モデルの確立における応用も可能であり、さらにHBV肝炎ウイルス用の抗ウイルス薬の調製、選別又は評価に用いることもできる。

10

【0063】

本実施例によるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01を肝炎ウイルス(上記B型肝炎ウイルス)感染を維持する細胞モデルとして応用する場合は図5に示すとおりである。

【0064】

本実施例によるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01はさらにB型肝炎ウイルス用の抗ウイルス薬の調製、選別又は評価に用いることもできる。発明者らによる実験から、上記B型肝炎ウイルスで当該ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01を感染させた後、現在B型肝炎を治療するための薬物 - インターフェロンはB型肝炎ウイルスに感染した当該ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01内のウイルスの含有量を低減できることが明らかになり(図9参照)、図9はHLCZ01細胞におけるB型肝炎ウイルスの含有量がインターフェロンの使用量及び処理時間に従って変化する関係を示し、このことから分かるように、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01はB型肝炎ウイルス用の抗ウイルス薬の調製、選別又は評価に用いることができる。

20

【0065】

応用実施例3：HLCZ01が同時に肝炎ウイルスHBVとHCVに感染した場合。

30

【0066】

1. HBV(応用実施例2におけるHBV)で53日感染させた後のHLCZ01細胞を採集して6ウェル型細胞培養プレートに敷き(20万/ウェル)、それと同時にHBVに感染していないHLCZ01細胞を採集して6ウェル型細胞培養プレートに敷き(20万/ウェル)、24h後に完全培地を2%のFBSのみを含む培地に取り替え、MOI=0.2のJFH1ウイルスで前記の二種のHLCZ01細胞(HBVに感染され及びHBVに感染されていない二種の細胞)を感染させる。24h後に新鮮な完全培地に取り替え、細胞をそれぞれ1日、2日、3日及び6日培養し、対応する時点でTRIZOLにより細胞総RNAを抽出し、そして1ugの総RNAを採集してcDNAに逆転写し、1uLのcDNAをテンプレートとして定量PCRを行って、細胞におけるHCVのRNAレベルを検出し、結果は図6に示すとおりである。図6から分かるように、二種のHLCZ01細胞におけるHCVの含有量はいずれも感染時間に従って増加した一方、HBVに感染したHLCZ01細胞におけるHCVの含有量は感染しなかったHLCZ01細胞より低い。

40

【0067】

2. HBVに感染したHLCZ01細胞を採取し、上記方法によりHCVで6日感染させ、アセトンで細胞を固定し、それぞれHBVコアタンパク質抗原及びHCVのNS5Aタンパク質に対する抗体で細胞における肝炎ウイルスを検出し、結果は図7に示すとおりである。図7から分かるように、HLCZ01細胞はHBVとHCVの二種のウイルスタンパク質を検出でき、また同一のHLCZ01細胞で二種のウイルスタンパク質を

50

検出できる。

【0068】

以上から分かるように、HBVとHCVで同時にHLCZ01細胞を感染させてから、蛍光定量PCRにより細胞におけるHBVとHCVのRNAレベルを検出し、及び免疫蛍光により細胞におけるウイルスタンパク質の発現を検出することによって、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01は同時に肝炎ウイルスHBV（HepaG2.2.15細胞内に由来するB型肝炎ウイルス）及びHCV（JFH1）に感染し得ることがさらに実証された。これにより、本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01は肝炎ウイルスHBVとHCVによる同時感染を維持する細胞モデルとして応用することができ、HBVとHCVウイルスによる同時感染を維持する動物モデルの確立における応用も可能であり、さらに同時にHBVとHCV肝炎ウイルスに抗する薬物の調製、選別又は評価に用いることもできる（図6～図10参照）。

10

【0069】

応用実施例4：HLCZ01の抗腫瘍薬の調製、選別又は評価における応用。

【0070】

図11は、現在II段階の臨床試験に用いる薬物TRAILが当該HLCZ01細胞を誘導して死亡させ得る実験データを提供しており、これから分かるように、本実施例によるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01はさらに抗腫瘍薬の調製、選別又は評価に用いることもできる。

【0071】

20

以上の応用実施例の検出結果をまとめて見ると、本発明において確立された細胞系HLCZ01はヒト肝臓がん細胞系であり、当該ヒト肝臓がん細胞系HLCZ01はHBVやHCVに（同時に）感染し得ることが有力に証明されたが、HBVは実施例2におけるHepaG2.2.15細胞由来のHBVに限らず、HCVも2a型HCV由来のJFH1感染に限らない。本発明にかかるヒト肝臓がん細胞系HLCZ01の確立によれば、HBVとHCV等の肝炎ウイルス学、肝臓がん腫瘍学及び他の研究に対して有力なツールを提供し、幅広い応用価値及び応用の将来性がある。

【 図 1 】

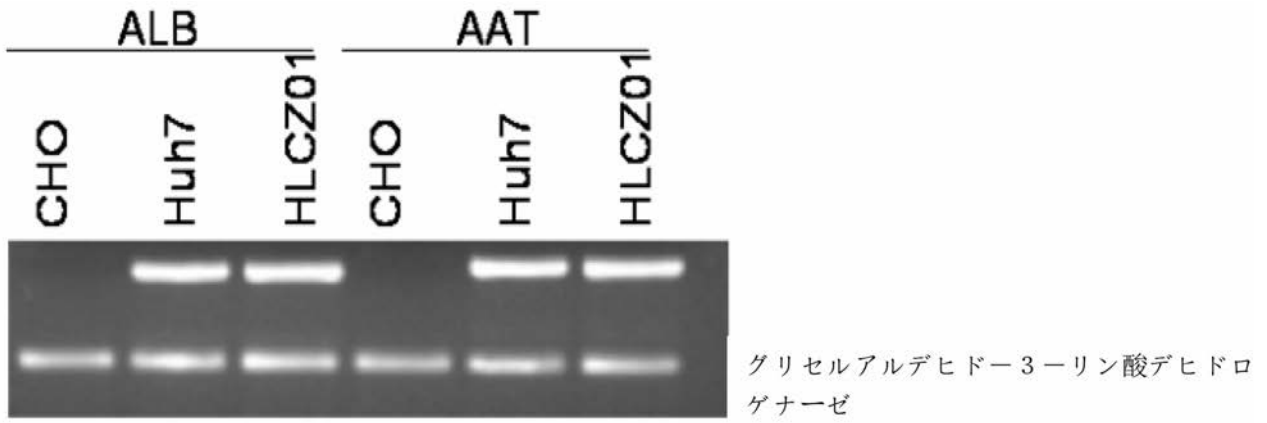


図 1

【 図 2 】

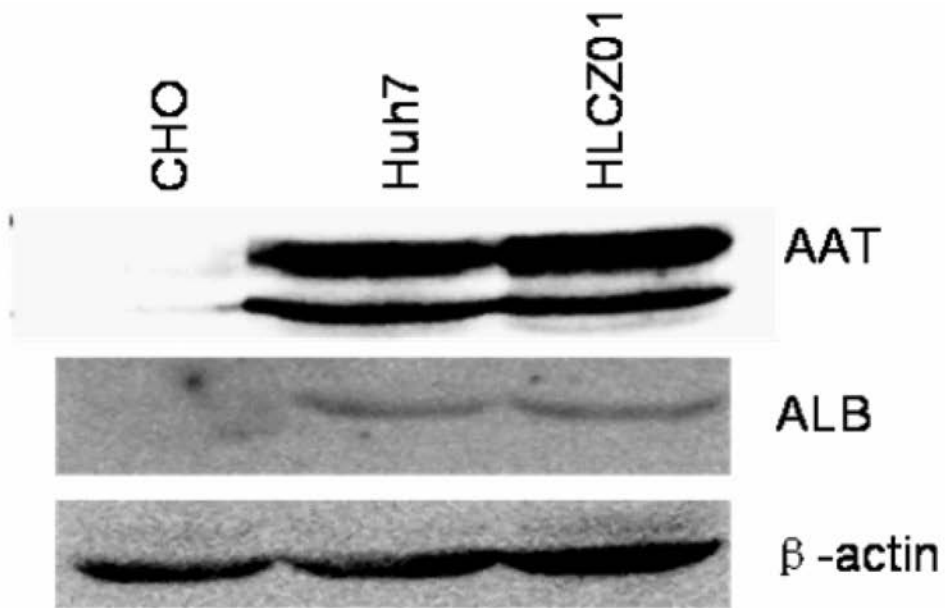


図 2

【 図 3 】

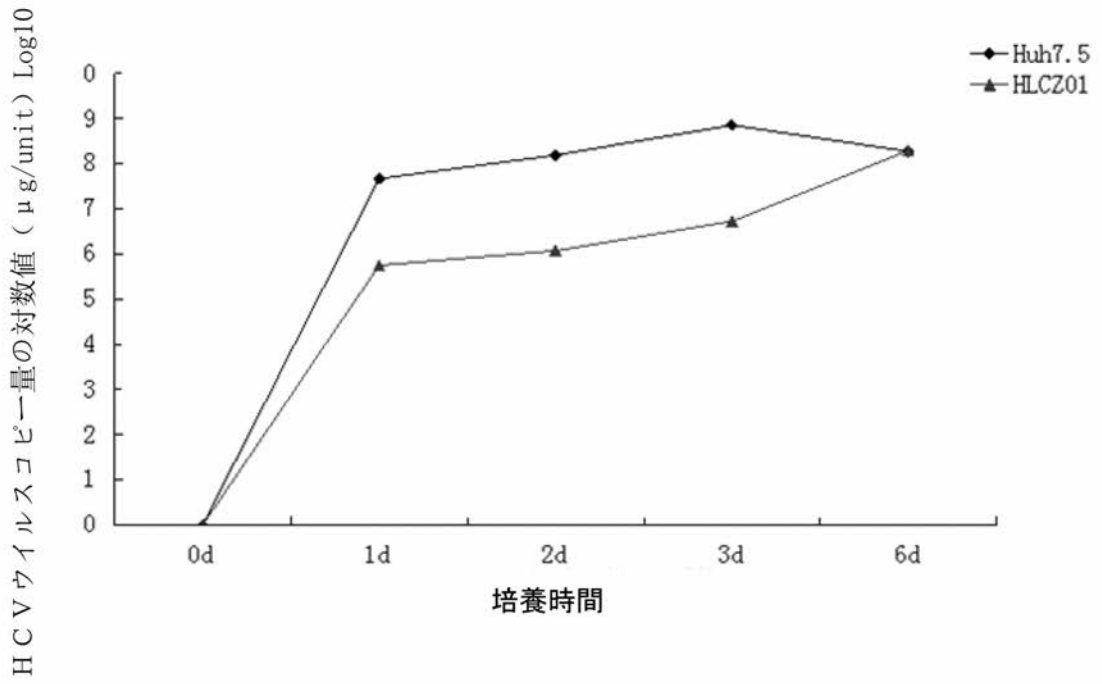


図 3

【 図 4 】

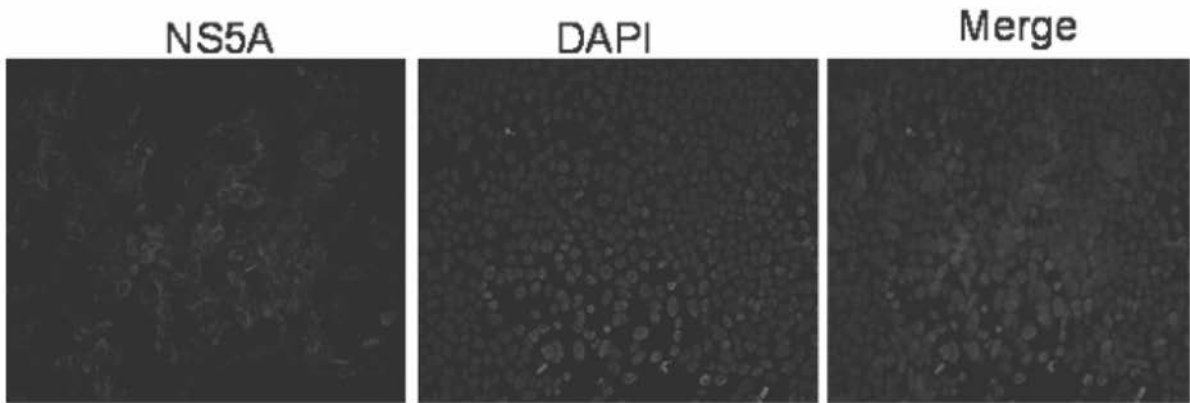


図 4

【 図 5 】

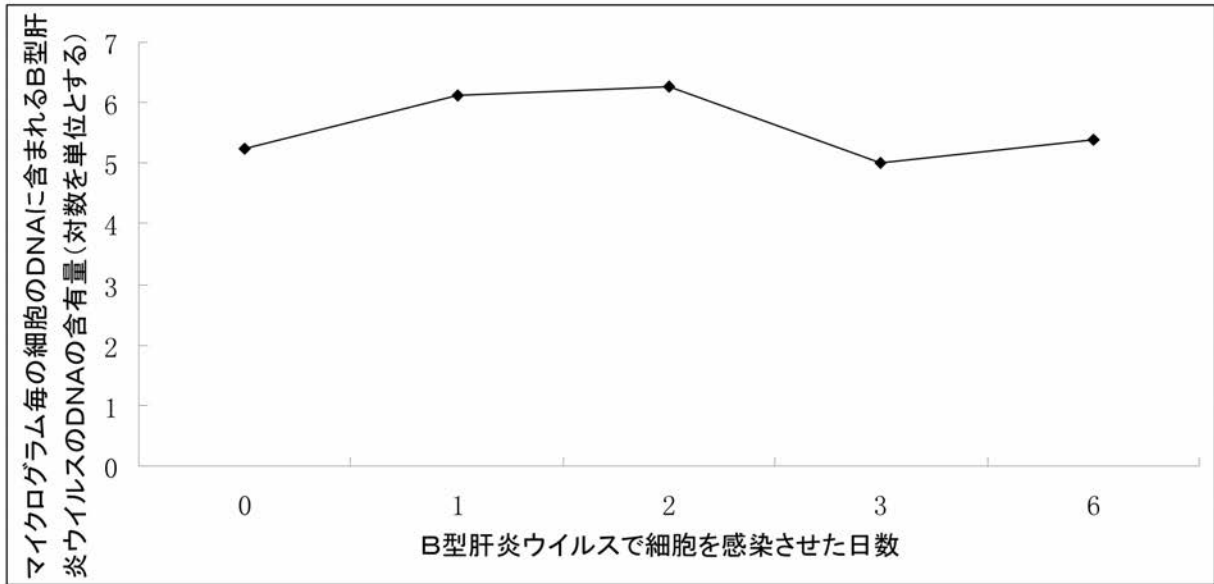


図 5

【 図 6 】

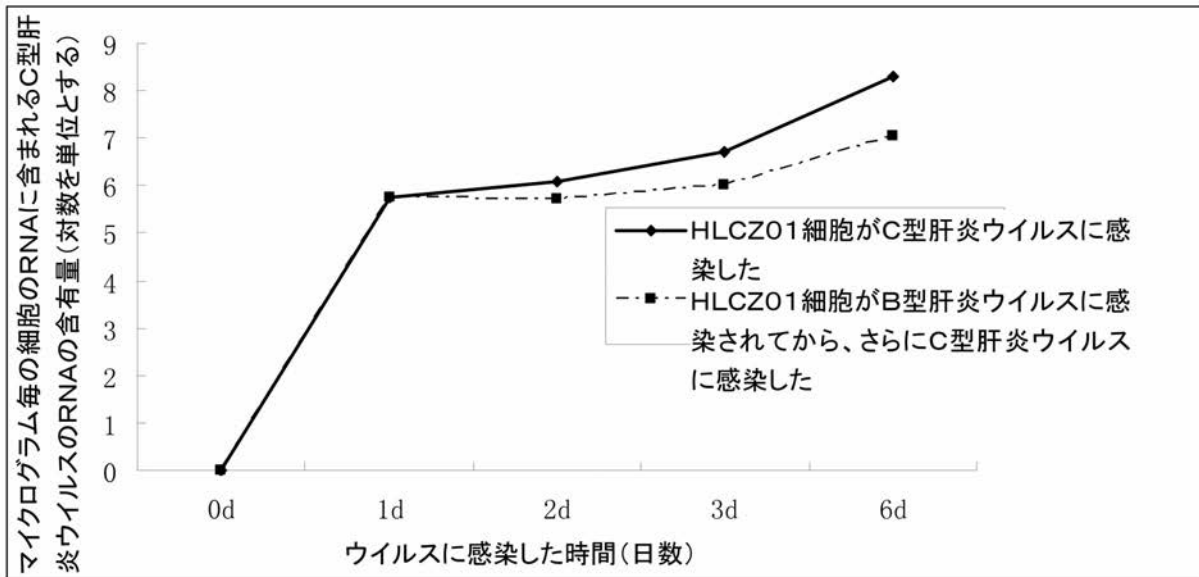


図 6

【 図 7 】

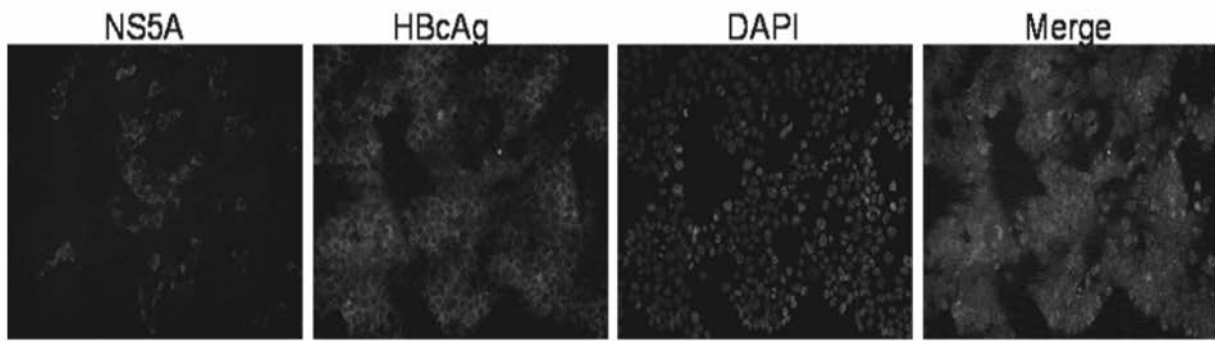


図 7

【 図 8 】

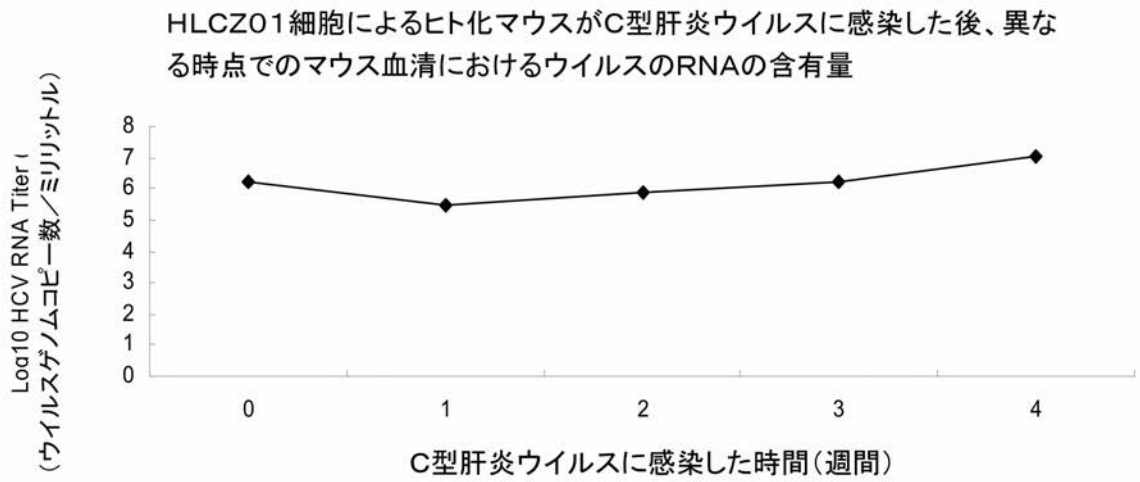


図 8

【 図 9 】

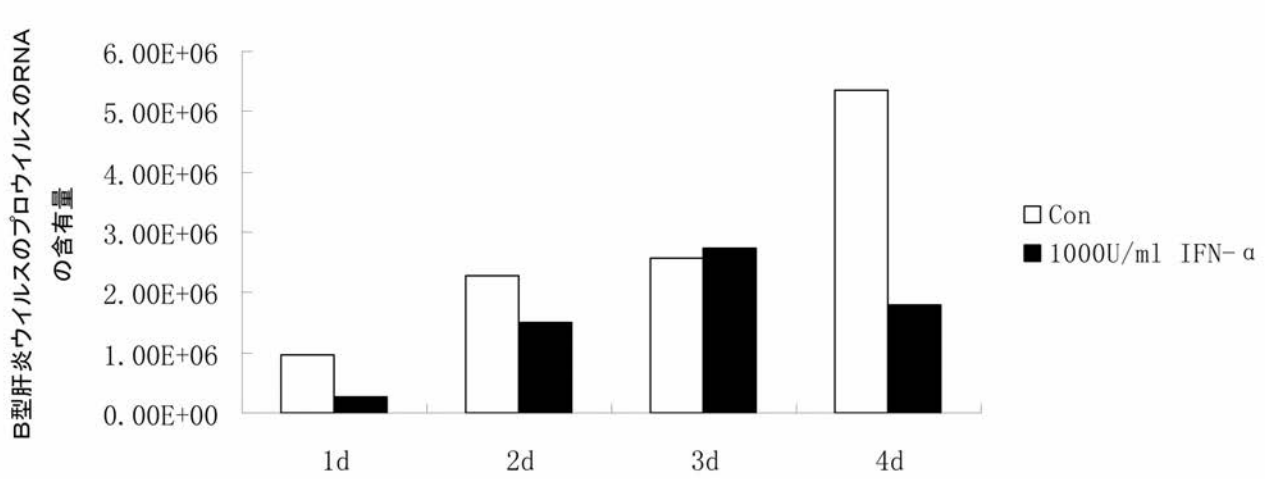
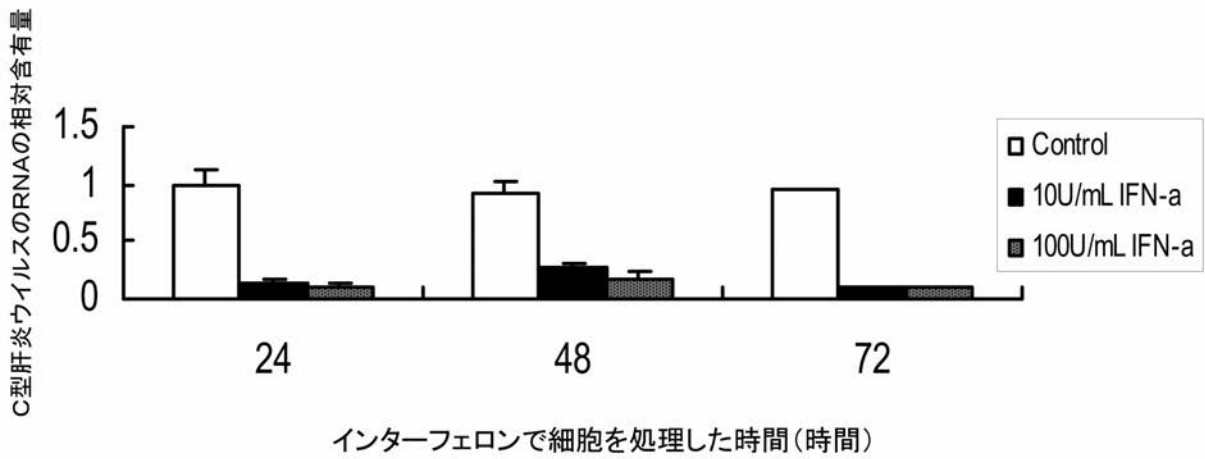


図 9

【 図 10 】



インターフェロンで細胞を処理した時間(時間)

図 10

【 図 11 】

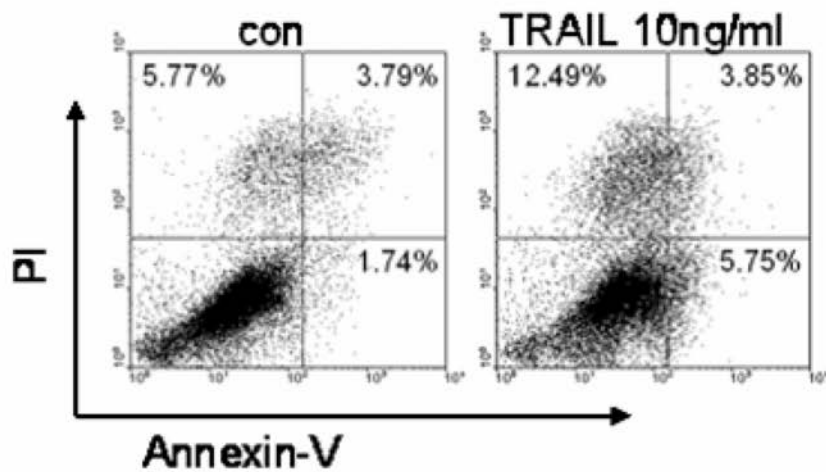


図 11

【 図 1 2 】

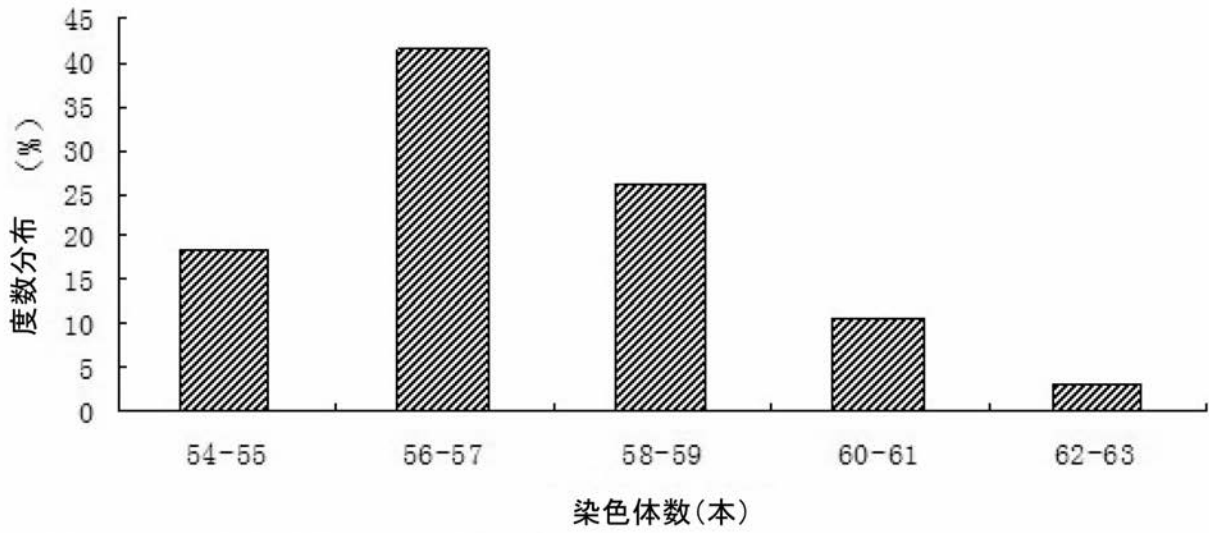


図 1 2

【 図 1 3 】

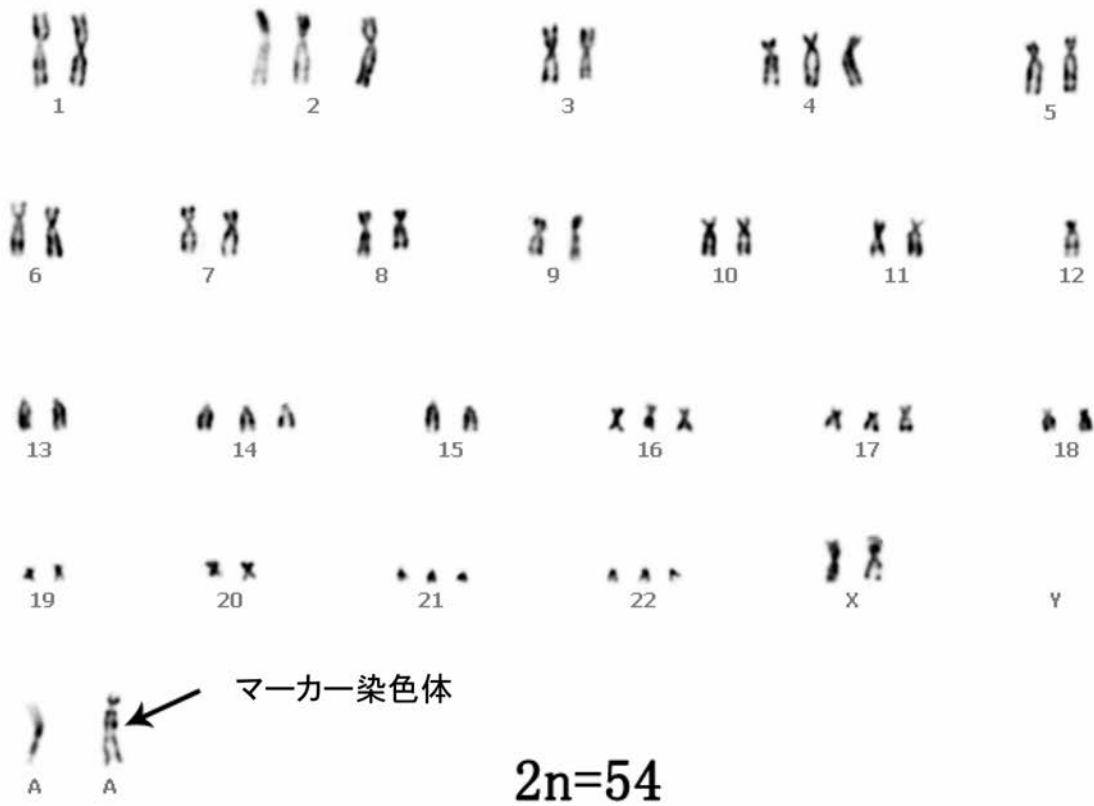


図 1 3

【 図 1 4 】

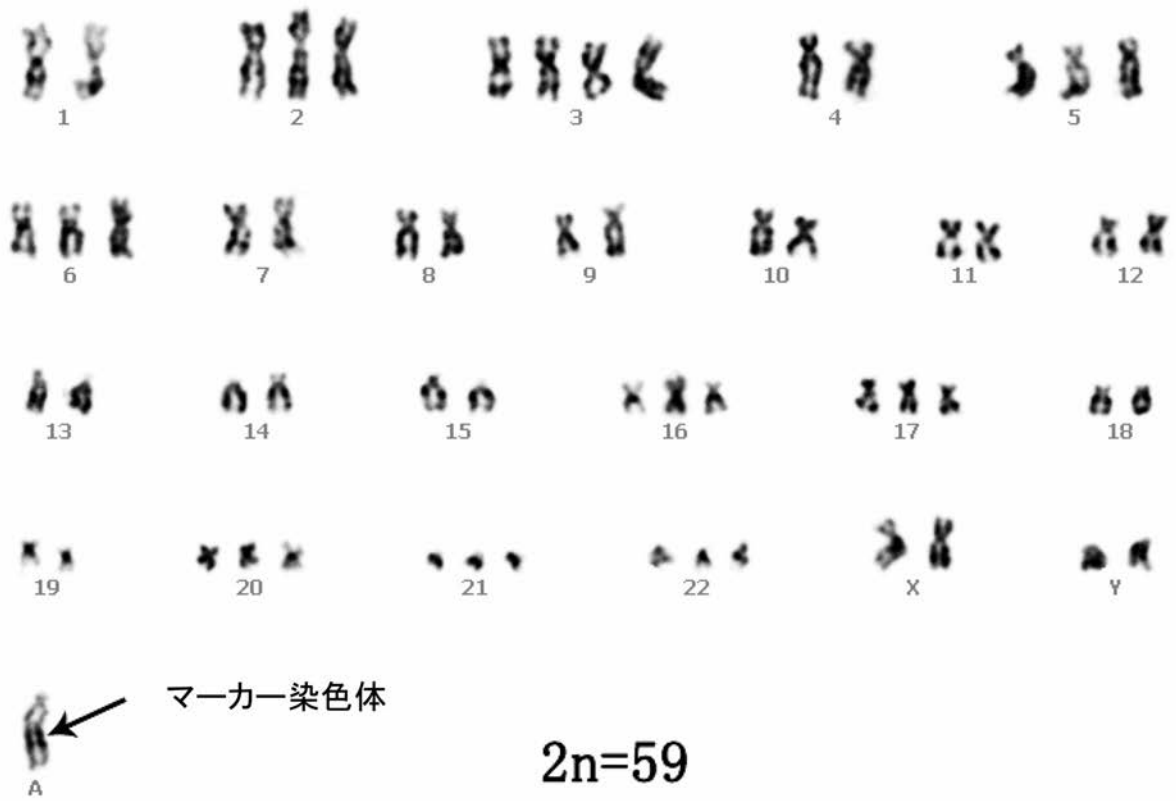


図 1 4

【 図 1 5 】

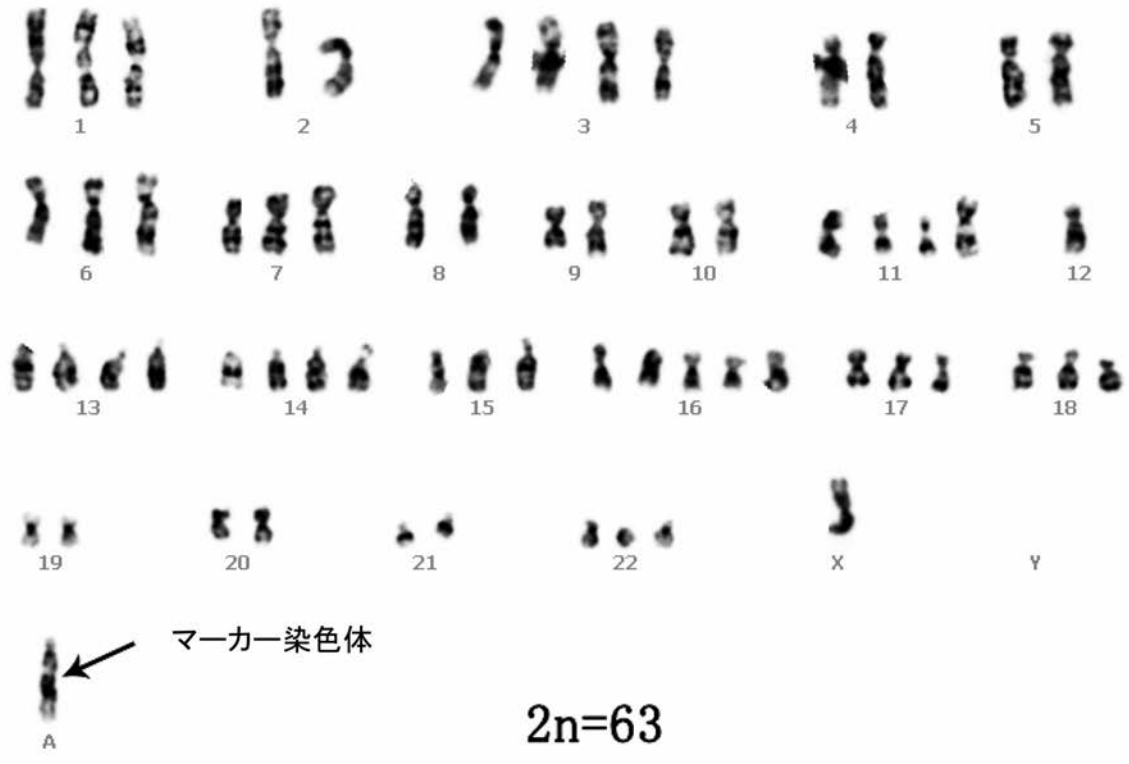


図 1 5

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2013/075459
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See the 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)		
IPC: C12N, A61K, A61P, A61L, C12R		
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)		
DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CPEA, TWABS, CNABS, JPABS, MOABS, HKABS, CNMED, TWMED, KRABS, CNTXT, USTXT, WOTXT, BPTXT, JPTXT, TWTXT, CATXT, KRTXT, AUABS, CNKI, ISI web of Knowledge, EMBASE, Google Scholar: G band, G banding, cancer of liver, hepatic cancer, hepatocarcinoma, hepatoma, liver cancer, liver carcinoma, cell line, HLCZ01, chromosome?, giemsa band, giemsa banding, ideogram, idiogram, karyogram, karyotyping, caryotype, karyotype, markerchromosome, hepacivirus, hepatitis virus, Hepatitis B virus, HBV, Hepatitis C virus, HCV		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 103087989 A (HUNAN CANCER HOSPITAL), 08 May 2013 (08.05.2013), see the whole document	1, 3-10
X	US 2005/0064594 A1, 24 March 2005 (24.03.2005), see abstract, and claims 1, 20, 22 and 28, and description, paragraphs [0031] and [0060]-[0062]	1, 3-10
<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 30 October 2013 (30.10.2013)	Date of mailing of the international search report 21 November 2013 (21.11.2013)	
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer XING, Ying Telephone No.: (86-10) 62411044	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/075459

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/08935 A1 (THE UNIVERSITY OF NORTECAROLINA AT CHAPEL HILL [US]), 05 March 1998 (05.03.1998), see abstract, and description, page 8, line 6 to page 11, line 8, and embodiment 5	1, 2, 5-10
X	CN 101381706 A (ZHONGSHAN HOSPITAL FUDAN UNIVERSITY), 11 March 2009(11.03.2009), see claim 1, and description, page 4, lines 6-13	1, 2, 5-10
X	CN 1546653 A (ZHONGSHAN HOSPITAL FUDAN UNIVERSITY), 17 November 2004 (17.11.2004), see claim 3	1, 2
X	CN 1232874 A (ZHONGSHAN HOSPITAL SHANGHAI MEDICAL UNIVERSITY), 27 October 1999 (27.10.1999), see claim 1, and description, page 2, lines 2-4, and page 3, lines 17-20	1, 2, 5-10
X	LI, Fucai, et al., Study on High Resolution Chromosome of Human Hepstoma Cell Line Rep 3B, HEREDITY AND DISEASE, 1988, vol. 5, no. 2, pages 93-95, see abstract	1, 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2013/075459

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103087989 A	08.05.2013	CN 103275933 A	04.09.2013
US 2005064594 A1	24.03.2005	WO 03004627 A2	16.01.2003
		EP 1404816 A2	07.04.2004
		JP 2004535809 A	02.12.2004
		US 7456018 B2	25.11.2008
		EP 1404816 B1	17.02.2010
		DE 60235366 E	01.04.2010
		EP 2180041 A2	28.04.2010
		EP 2180041 A3	26.05.2010
		JP 4711381 B2	29.06.2011
		WO 03004627 A3	25.09.2003
WO 9808935 A1	05.03.1998	AU 4081997 A	19.03.1998
CN 101381706 A	11.03.2009	None	
CN 1546653 A	17.11.2004	None	
CN 1232874 A	27.10.1999	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/075459

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/09 (2010.01) i

A61K 35/407 (2006.01) i

A61P 31/12 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

A61L 27/38 (2006.01) i

C12R 1/91 (2006.01) n

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2013/075459
A. 主题的分类		
见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C12N, A61K, A61P, A61L, C12R		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CPEA, TWABS, CNABS, JPABS, MOABS, HKABS, CNMED, TWMED, KRABS, CNTXT, USTXT, WOTXT, EPTXT, JPTXT, TWTXT, CATXT, KRTXT, AUABS, CNKI, ISI web of Knowledge, EMBASE, Google Scholar: 肝癌, 肝瘤, 肝部肿瘤, 肝细胞瘤, 细胞系, 染色体, G 带, G 显带, 吉姆萨显带, 染色体组型, 核型, 标记染色体, 肝炎病毒, 乙型肝炎病毒, 乙肝病毒, 丙型肝炎病毒, 丙肝病毒, cancer of liver, hepatic cancer, hepatic carcinoma, hepatoma, liver cancer, liver carcinoma, cell line, HLCZ01, chromosome?, giemsa band, giemsa banding, ideogram, idiogram, karyogram, karyotyping, caryotype, karyotype, marker chromosome, hepacivirus, hepatitis virus, Hepatitis B virus, HBV, Hepatitis C virus, HCV		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 103087989 A (湖南省肿瘤医院) 08.5 月 2013 (08.05.2013) 参见全文	1, 3-10
X	US 2005/0064594 A1 24.3 月 2005 (24.03.2005) 参见摘要, 权利要求 1, 20, 22, 28, 说明书第[0031]、[0060]-[0062]段	1, 3-10
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型:		
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利		“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)		“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件		“&” 同族专利的文件
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		
国际检索实际完成的日期 30.10 月 2013 (30.10.2013)		国际检索报告邮寄日期 21.11 月 2013 (21.11.2013)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员 幸颖 电话号码: (86-10) 62411044

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2013/075459

C(续). 相关文件		
类型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 98/08935 A1 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL [US]) 05.3 月 1998 (05.03.1998) 参见摘要, 说明书第 8 页第 6 行至第 11 页第 8 行, 实施例 5	1, 2, 5-10
X	CN 101381706 A (复旦大学附属中山医院) 11.3 月 2009 (11.03.2009) 参见权利要求 1, 说明书第 4 页第 6-13 行	1, 2, 5-10
X	CN 1546653 A (复旦大学附属中山医院) 17.11 月 2004 (17.11.2004) 参见权利要求 3	1, 2
X	CN 1232874 A (上海医科大学附属中山医院) 27.10 月 1999 (27.10.1999) 参见权利要求 1, 说明书第 2 页第 2-4 行, 第 3 页第 17-20 行	1, 2, 5-10
X	李福才, 等. 人体肝癌细胞系 Hep 3B 的高分辨染色体研究. 遗传与疾病. 1988, 第 5 卷, 第 2 期, 第 93-95 页 参见摘要	1, 2

国际检索报告 关于同族专利的信息		国际申请号 PCT/CN2013/075459	
检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 103087989 A	08.05.2013	CN 103275933 A	04.09.2013
US 2005064594 A1	24.03.2005	WO 03004627 A2	16.01.2003
		EP 1404816 A2	07.04.2004
		JP 2004535809 A	02.12.2004
		US 7456018 B2	25.11.2008
		EP 1404816 B1	17.02.2010
		DE 60235366 E	01.04.2010
		EP 2180041 A2	28.04.2010
		EP 2180041 A3	26.05.2010
		JP 4711381 B2	29.06.2011
		WO 03004627 A3	25.09.2003
WO 9808935 A1	05.03.1998	AU 4081997 A	19.03.1998
CN 101381706 A	11.03.2009	无	
CN 1546653 A	17.11.2004	无	
CN 1232874 A	27.10.1999	无	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2013/075459

主题的分类

- C12N 5/09 (2010.01) i
- A61K 35/407 (2006.01) i
- A61P 31/12 (2006.01) i
- A61P 35/00 (2006.01) i
- A61L 27/38 (2006.01) i
- C12R 1/91 (2006.01) n

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	

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

(72) 発明者 朱海珍
中国湖南省長沙市岳麓区咸嘉湖路 5 8 2 号湖南省腫瘤医院

(72) 発明者 左朝暉
中国湖南省長沙市岳麓区咸嘉湖路 5 8 2 号湖南省腫瘤医院

(72) 発明者 王小紅
中国湖南省長沙市岳麓区咸嘉湖路 5 8 2 号湖南省腫瘤医院

(72) 発明者 楊大荣
中国湖南省長沙市岳麓区咸嘉湖路 5 8 2 号湖南省腫瘤医院

(72) 発明者 劉念礼
中国湖南省長沙市岳麓区咸嘉湖路 5 8 2 号湖南省腫瘤医院

F ターム (参考) 4B063 QA07 QQ08 QR77 QX01
4B065 AA90X AC20 BA22 CA60
4C081 AB35 CD34
4C084 AA17 NA14 ZA752 ZB262 ZB332