

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5758891号
(P5758891)

(45) 発行日 平成27年8月5日(2015.8.5)

(24) 登録日 平成27年6月12日(2015.6.12)

(51) Int.Cl.

C 12 N 5/071 (2010.01)

F 1

C 12 N 5/00 202 A

請求項の数 12 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2012-520985 (P2012-520985)
 (86) (22) 出願日 平成22年7月2日 (2010.7.2)
 (65) 公表番号 特表2013-500003 (P2013-500003A)
 (43) 公表日 平成25年1月7日 (2013.1.7)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2010/059478
 (87) 國際公開番号 WO2011/009706
 (87) 國際公開日 平成23年1月27日 (2011.1.27)
 審査請求日 平成25年5月16日 (2013.5.16)
 (31) 優先権主張番号 0955216
 (32) 優先日 平成21年7月24日 (2009.7.24)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 512019457
 オンコビオテク
 O N C O B I O T E K
 フランス国, エフーO 6 3 9 0 シャトーヌフーヴィルヴィエイユ, アレ デ リュシオール 138
 138 Allee des lucioles, F-06390 Chateau neuf-Villevieille, France
 (74) 代理人 110000338
 特許業務法人HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】筋線維芽細胞を取得する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

筋線維芽細胞を取得する方法であって、
 線維芽細胞を必須として含有し、かつ、筋線維芽細胞を含有する、細胞腫である細胞試料を、M E G M 培地及びM C D B 1 7 0 培地から選択される乳腺上皮細胞用培地である無血清培地中で培養する段階を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

上記無血清培地が、さらに、インスリン、ヒドロコルチゾン、E G F、ウシ下垂体抽出物および抗生物質から選択される、少なくとも 1 つの補充物を含有する、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

生物組織である生物学的試料から細胞懸濁液を取得し、そして、
 線維芽細胞の成長にとって有利に作用する培地において得られる細胞に対して初期培養を実施する段階を含む、請求項 1 から 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

生物組織である生物学的試料から細胞懸濁液を取得し、そして、
 細胞の亜集団を精製して、線維芽細胞を必須として含有する上記細胞試料を得る段階を含む、請求項 1 から 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法によって得られる筋線維芽細胞の細胞培養

物であって、含有する細胞のうち少なくとも 80 % が筋線維芽細胞であることを特徴とする、細胞培養物。

【請求項 6】

血清を含有しない、請求項 5 に記載の細胞培養物。

【請求項 7】

含有する細胞のうち少なくとも 95 % が筋線維芽細胞である、請求項 5 または 6 に記載の細胞培養物。

【請求項 8】

含有する細胞のうち少なくとも 80 % が筋線維芽細胞である細胞培養物を得るために、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法を使用する使用方法。 10

【請求項 9】

上記細胞が無血清培地中に存在する、請求項 8 に記載の使用方法。

【請求項 10】

上記細胞培養物に含有される細胞のうち少なくとも 95 % が筋線維芽細胞である、請求項 9 に記載の使用方法。

【請求項 11】

線維芽細胞を必須として含有し、かつ、筋線維芽細胞を含有する、細胞腫である細胞試料から筋線維芽細胞を取得するために、ヒト乳腺上皮細胞を培養するために開発された MEGM 培地及び MCD B 170 培地から選択される無血清培地を使用する使用方法。 20

【請求項 12】

上記無血清培地が、インスリン、ヒドロコルチゾン、EGF、ウシ下垂体抽出物および抗生物質から選択される、少なくとも 1 つの補充物を含有している、請求項 11 に記載の使用方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、筋線維芽細胞を取得する方法に関する。

【0002】

以下の記載において、大括弧 “[]” で鉄まれた数字は、本明細書の末尾に記載する先行技術文献一覧での文献番号を指している。 30

【0003】

筋線維芽細胞とは、CAF (carcinoma-associated fibroblast) と呼ばれる特定のタイプの線維芽細胞であり、換言すれば、細胞腫に関連する線維芽細胞である。CAFは、組織リモデリングなどのさまざまな生物学的プロセスにも関与する。

【0004】

CAFは、平滑筋 アクチン (SMA; muscle alpha-actin) マーカーを発現させる。

【0005】

以下の記載において、線維芽細胞という用語は広い意味で用い、線維芽細胞（ここでは“厳密な意味での”線維芽細胞と呼ぶ）だけを含めるのではなく、活性化された線維芽細胞、CAF、筋線維芽細胞などの線維芽細胞の誘導体をも含める。したがって、腫瘍のプロセスに関与する線維芽細胞を含めることになり、さらに、筋線維芽細胞が関与するその他の任意の生物学的プロセスに関与する線維芽細胞も含められる。 40

【0006】

特に、腫瘍を酵素消化することによって、線維芽細胞を腫瘍から取得することが知られており、取得後に 1 つ以上の精製段階を実施することもある (Orimo et al., Cell 2005, 121: 335-348 [1] or Alilinen et al., Cancer Cell 2004, 6:17-32 [2])。

【0007】

従来、線維芽細胞の培養は、血清を含有する培地中で実施され（通常血清の 5 % ~ 20 50

%)、筋線維芽細胞をさまざまな割合で含有している。

【0008】

例えは、5%の血清を含有する培地中のCAF(Asternand社)(簡単に視覚で観察することによってそうであると判定される)が、市販されている。

【0009】

学術研究を目的とする研究室では、10%の血清を含有する培地内でCAFの集団を產生する。これらの細胞の表現型は、平滑筋 アクチンマーカーを測定することによって決定される。したがって、これらの集団はさまざまな割合のCAFを含有し、平均すると多くとも30%のCAFを含有する。

【0010】

また、20%の血清を含有する培地中のヒトの肝臓の筋線維芽細胞(Dominion Pharmakine社)も市販されており、このうちのわずか50%~60%だけが平滑筋 アクチン(SMA)マーカーを発現させる。肝臓において、また、脾臓においても、筋線維芽細胞が誘導される細胞は、培養されるとSMAマーカーの発現をともなう自発性の活性化を示すという特定の性質を有する星状細胞である(Kinnman et al., Lab Invest 2001, 81:1709-1716 [3]; Omary et al., JCI 2007, 117:50-59 [4])。

【0011】

しかしながら、胎生期ウシ血清または新生仔ウシ血清などの血清の使用には、以下のような欠点がある

- ・血清の収集に関連する倫理的な問題
- ・血清は組成が変化しうる生物的な液体である
- ・血清の正確な組成は不明であり、細胞が必要とする条件を精密に規定することは不可能である
 - ・血清は、医薬品産業培養中の細胞に対して用いる試験に干渉する可能性がある因子(増殖因子、拮抗薬など)を含有する
 - ・血清中で成長することに慣らされている細胞は、培地がなくなると、表現型を変化させる、あるいは、死んでしまう

要約すると、従来公知であって、かつ、インビトロで研究された、病理学的組織から単離された線維芽細胞の集団は、

- ・異種起源であり、
- ・さまざまな割合の筋線維芽細胞を含有し、
- ・血清を含有する培地内で成長するが、血清の存在は上述のような欠点がある。

【0012】

以上のことを踏まえて、本発明が扱う主な目的は、筋線維芽細胞、特にできるだけ純粋な筋線維芽細胞の集団の任意の研究をも促進する特性を有する、筋線維芽細胞の集団を得ることである。

【0013】

この目的を達成するために、本発明は、筋線維芽細胞を取得する方法であって、
(a) 線維芽細胞を必須として含有する細胞試料を準備する段階と、
(b) この細胞試料を無血清培地内で培養する段階と、を含むことを特徴とする方法に関する。

【0014】

線維芽細胞を必須として含有する上記細胞試料とは、該試料が含有する細胞のうち少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%が線維芽細胞であることを意味している。何れの場合であっても、当業者であれば、本発明を実施するためには上記細胞試料が必ず含有していかなければならない線維芽細胞の割合を通例の実験によってどのように評価すればよいかが理解できるであろう。

【0015】

本発明には、先行技術に比べてより純粋で、血清を含有しない培地内で成長する筋線維芽細胞の集団を产生するという効果がある。

10

20

30

40

50

【0016】

したがって、本発明に係る方法によって得られる筋線維芽細胞は、例えば、これらの細胞の生物学を精密に、かつ、再現性よく研究すること、および、潜在的な治療標的を特定することを可能にする。

【0017】

血清が存在しないので、本発明に係る方法によって得られる筋線維芽細胞は、さらに、細胞が必要とする条件を研究すること、および、例えば分化を誘起したり、表現型の維持を可能にしたり、増殖を維持したり、および／または、これらの細胞の早期老化に関与したりする因子を明らかにすること、をも可能にする。

【0018】

無血清培地中における1または2の継代の終了時に、本発明に係る方法で得られる筋線維芽細胞の集団は、筋線維芽細胞の95%を超える量になる。

【0019】

上記無血清培地は、好ましくは、上皮細胞用培地である無血清基本培地を含有する。実際には、このような基本培地から得られる培地によって、非常に良好な筋線維芽細胞の成長が実現できるようになる。

【0020】

この無血清基本培地は、具体的にはヒト乳腺上皮細胞用培地である。あるいは、一例をあげれば、該無血清基本培地は、気管支上皮細胞、胎盤上皮細胞、または、腎臓上皮細胞の培養に用いる、公知の無血清培地であってもかまわない。

【0021】

この無血清基本培地を、細胞培養において通常使用される1種類以上の補充物で補充物してもかまわない。補充物の例としては、ホルモン、増殖因子、マイトジエン、抗生物質などが挙げられる。

【0022】

したがって、上記無血清基本培地は、例えば、インスリン、ヒドロコルチゾン、上皮増殖因子（“EGF”：epidermal growth factor）、ウシ下垂体抽出物（“BPE”：bovine pituitary extract）、および、抗生物質から選択される少なくとも1つの補充物を含有してもかまわない。

【0023】

この抗生物質は細胞の良好な成長にとって必須ではないが、存在すれば微生物の混入を防止することができる。

【0024】

上記抗生物質は、例えば、ゲンタマイシンおよびアンホテリシンBを含有するGA-1000、つまりノルモシンであればよい。細胞培養において通例として使用される任意の抗生物質も、本発明において使用可能である。例としては、ペニシリン、 streptomyces、アンピシリン、カナマイシン、タイロシンなどが挙げられる。

【0025】

例えば、本発明に係る無血清培地は、ヒト乳腺上皮細胞用培地、例えばMEGM（Mary Epithelial Growth Medium）（Cambrex社）という名称で市販されている培地であってもかまわない。

【0026】

あるいは、例をあげれば、本発明に係る無血清培地は、気管支上皮細胞、胎盤上皮細胞、または、腎臓上皮細胞の培養に用いる、公知の無血清培地であってもかまわない。

【0027】

MEGMの開始時の組成は、培地MCD 170の開始時の組成である（Hammond et al., PNAS 1984, 81: 5435-5439 [5]）。この培地MCD 170、さらにMEGMは、正常ヒト乳腺上皮細胞を培養するという特定の目的のために開発され、従来はこの目的で使用してきた。

【0028】

10

20

30

40

50

本発明において、該培地を使用することは、筋線維芽細胞の培養にとって非常に有利である。

【0029】

上記培地は、その正確な組成がM E B M 培地 (M am m a r y E p i t h e l i a l B a s a l M e d i u m) という名称で知られている基本培地、および5種類の補充物(インスリン、ヒドロコルチゾン、E G F、ウシ下垂体抽出物、および、G A - 1 0 0 0 (抗生物質))を含んで成る。

【0030】

エタノールアミンおよびホスホエタノールアミンは、M C D B 1 7 0 の基本組成およびM E G M に含まれる脂質前駆体である。

10

【0031】

本発明において使用可能な無血清基本培地のもう1つの例を、表1に示す。左側の縦列には、該無血清基本培地の組成物に含まれる生成物をリストアップしている。右側の縦列には、生成物ごとに、該培地中における生成物のモル濃度を培地1リットル当たりのモル数で示している。

【0032】

この無血清基本培地は、実際には、D M E M 培地とH a m F 1 2 (I n v i t r o g e n社) 培地との1:1の比率の混合物を含有する。

【0033】

該基本培地は、E G F (P e p r o t e c h社)、ヒドロ-コルチゾン (S I G M A社)、B P E (I n v i t r o g e n社)、I T S - X (I n v i t r o g e n社)(インスリン、トランスフェリン、および、セレンを含む)、および、抗生物質(例えばノルモチン(I n v i v o g e n社))と混合され、本発明において使用可能な無血清培地を形成する。得られた該培地を、“無血清D M E M / H a m F 1 2 培地”と呼ぶ。

20

【0034】

D M E M およびH a m F 1 2 の組成物は、例えば、R. Ian Freshney, “Culture of Animal Cells A Manual of Basic Technique”, 2005 [6]に記載されている。

【0035】

【表1】

| 成分 | モル濃度 | |
|-------------|----------------------|----|
| L-アラニン | 5×10^{-5} | |
| L-アルギニン | 7×10^{-4} | |
| L-アスパラギン | 5×10^{-5} | |
| L-アスパラギン酸 | 5×10^{-5} | |
| L-システィン | 10^{-4} | 10 |
| L-シスチン | 10^{-4} | |
| L-グルタミン酸 | 5×10^{-5} | |
| L-グルタミン | 2.5×10^{-3} | |
| グリシン | 2.5×10^{-4} | |
| L-ヒスチジン | 1.5×10^{-4} | |
| L-イソロイシン | 4.2×10^{-4} | |
| L-ロイシン | 4.5×10^{-4} | |
| L-リジンHCl | 5×10^{-4} | |
| L-メチオニン | 1.2×10^{-4} | 20 |
| L-フェニルアラニン | 2.2×10^{-4} | |
| L-プロリン | 1.5×10^{-4} | |
| L-セリン | 2.5×10^{-4} | |
| L-スレオニン | 4.5×10^{-4} | |
| L-トリプトファン | 4.4×10^{-5} | |
| L-チロシン | 2.1×10^{-4} | |
| L-バリン | 4.5×10^{-4} | |
| ビオチン | 1.5×10^{-8} | |
| 塩化コリン | 6.4×10^{-5} | 30 |
| 葉酸 | 6×10^{-6} | |
| ミオイノシトール | 7×10^{-5} | |
| ニコチンアミド | 1.7×10^{-5} | |
| D-Cαパントテン酸塩 | 9.4×10^{-6} | |

| | |
|-------------------------------|-----------------------------|
| ピリドキサールH C 1 | 1 0 \sim 5 |
| ピリドキシンH C 1 | 1 . 5 \times 1 0 \sim 7 |
| リボフラビン | 5 . 8 \times 1 0 \sim 7 |
| チアミン | 6 . 4 \times 1 0 \sim 6 |
| ビタミンB 1 2 | 5 \times 1 0 \sim 7 |
| C a C 1 2 | 1 . 1 \times 1 0 \sim 3 |
| K C 1 | 4 . 2 \times 1 0 \sim 3 |
| M g S O 4 | 4 \times 1 0 \sim 4 |
| N a C 1 | 1 . 2 \times 1 0 \sim 1 |
| N a H C O 3 | 2 . 9 \times 1 0 \sim 2 |
| N a H 2 P O 4 | 4 . 5 \times 1 0 \sim 4 |
| N a 2 H P O 4 | 5 \times 1 0 \sim 4 |
| C u S O 4 \cdot 5 H 2 O | 7 . 8 \times 1 0 \sim 9 |
| F e (N O 3) 3 \cdot 9 H 2 O | 1 . 2 \times 1 0 \sim 7 |
| F e S O 4 \cdot 7 H 2 O | 1 . 5 \times 1 0 \sim 6 |
| Z n S O 4 \cdot 7 H 2 O | 1 . 5 \times 1 0 \sim 6 |
| ヒポキサンチン | 1 . 5 \times 1 0 \sim 5 |
| チミジン | 1 . 5 \times 1 0 \sim 6 |
| D - グルコース | 1 . 8 \times 1 0 \sim 2 |
| ピルビン酸ナトリウム | 1 0 \sim 3 |
| リノール酸 | 1 . 5 \times 1 0 \sim 7 |
| リポ酸 | 5 . 1 \times 1 0 \sim 7 |
| フェノールレッド | 3 . 6 \times 1 0 \sim 5 |
| ブトレシン | 5 \times 1 0 \sim 7 |

10

20

30

40

【0036】

本発明の一実施形態によれば、段階(a)は、例えば生物組織などの生物学的試料から細胞懸濁液を取得し、そして、線維芽細胞の成長にとって有利に作用する培地、例えば血清を含む培地において得られる細胞に対して初期培養を実施することを含む。

【0037】

本発明の別の実施形態によれば、段階(a)は、例えば生物組織などの生物学的試料から細胞懸濁液を取得し、そして、細胞の亜集団を精製して、線維芽細胞を必須として含有する上記細胞試料を得ることを含む。

【0038】

上記生物学的試料からの細胞懸濁液の取得は、酵素消化によって、または、例えば機械的分離もしくはセルストレーナーなどの任意の方法によって、実施可能である。

【0039】

酵素消化は、単純かつ効果的であるので好ましい。

【0040】

上記生物学的試料は、例えば、生物学的試料が線維芽細胞を必須として含有することを可能にする任意の起源を有するものであってもよい。

【0041】

したがって、上記生物学的試料は、哺乳類の任意の種から得られるものであってもかまわない。

【0042】

具体的には、上記生物学的試料は、腫瘍、好ましくは細胞腫であればよい。あるいは、

50

上記生物学的試料は、その他の任意の病理学的組織（例えばリモデリングを受けた任意の組織）であってもかまわない。

【0043】

本発明にとって必須の特徴は、上記生物学的試料が線維芽細胞、特に筋線維芽細胞を含有することである。

【0044】

上記生物学的試料中の筋線維芽細胞の割合は、平滑筋 アクチンについて免疫組織化学的に標識することによって、組織部を対象として評価する。

【0045】

例えば、筋線維芽細胞表現型を有する線維芽細胞が少なくとも30%、より好ましくは少なくとも50%を占める線維芽細胞を含む生物学的試料から開始することが好ましい。 10

【0046】

したがって、培養に用いる出発物質は筋線維芽細胞を含有する任意の哺乳類の組織であればよく、腫瘍（例えば細胞腫）であっても、例えば線維症、肝硬変、瘢痕、または、創傷の場合に組織リモデリングまたは修復を受けた組織であってもかまわない。上記筋線維芽細胞は、実際には、これらすべてのプロセスにおいて鍵となる役割を果たす。

【0047】

上記線維芽細胞の成長にとって有利に作用する培地は、通常は血清を含有する培地であって、例えば、RPMI、DMEM、または、HAM F12を基にした培地である。 20

【0048】

細胞の亜集団を精製して線維芽細胞を必須として含有する上記細胞試料を得るために、Allinen et al [2]またはOrimo et al [1]に記載されたプロトコルを、一例として採用する。

【0049】

本発明では、予め精製せずに、上皮細胞と間質細胞との混合物から開始することができる。ただし、血清を含有する培地において初期培養すれば、線維芽細胞中の培養物を豊富にすることが可能である。

【0050】

本発明は、さらに、本発明に係る方法によって得られる筋線維芽細胞の細胞培養物であって、細胞培養物が含有する細胞のうち少なくとも80%、好ましくは少なくとも95%が筋線維芽細胞であることを特徴とする、細胞培養物にも関する。 30

【0051】

本発明に係る上記細胞培養物は、好適には血清を含有しない。

【0052】

このような細胞培養物によって、例えば治癒しない創傷または血管新生障害の場合に、細胞の活性を刺激する効果を研究したり、反対に、例えば特に癌、線維症、または、肝硬変の場合に、細胞の活性を阻害する効果を研究したりすることが可能になる。

【0053】

本発明は、さらに、含有する細胞のうち少なくとも80%、好ましくは少なくとも95%が筋線維芽細胞である細胞培養物を得るために、本発明に係る方法を使用する使用方法にも関する。 40

【0054】

この細胞培養物は、好適には無血清培地中に存在する。

【0055】

本発明は、さらに、線維芽細胞を必須として含有する細胞試料から筋線維芽細胞を取得するために、ヒト乳腺上皮細胞を培養するために開発された無血清培地を使用する使用方法にも関する。

【0056】

この無血清培地は、例えばインスリン、ヒドロコルチゾン、EGF、ウシ下垂体抽出物、および、抗生物質から選択される、少なくとも1つの補充物を含有しても構わない。 50

【 0 0 5 7 】

本発明では、上記細胞培養は、ディッシュやフラスコにおいて懸濁液中や基板上で、任意の適切な手段を用いて実施されればよい。当業者であれば、自身の有する一般的な知識から、これらの手段を選択することができる。

【 0 0 5 8 】

したがって、本発明の適用事例としては、筋線維芽細胞のバイオマーカーの特定、治療標的の特定、抗癌性化合物の特定および検証、医薬品や化粧品用化合物をスクリーニングするためのインビトロモデル、およびインビトロ毒性学などが挙げられる。

【 0 0 5 9 】

本発明の他の特性および効果は、図1を参照する下記の詳細な説明から明らかになるであろう。なお、下記の詳細な説明は、例示にすぎず、決して制限事項を加えるものではない。また、図1は、本発明にしたがって得られる筋線維芽細胞が生成するVEGFの量を、培地1ミリリットル当たりのピコグラムを単位として表わす棒グラフを示している。

【 0 0 6 0 】

〔本発明に従って筋線維芽細胞を取得する方法の例〕

開始点は哺乳類から採取した腫瘍、この場合にはイヌから採取した細胞腫である。

【 0 0 6 1 】

例として、1つの変形は、硬変肝から開始して、この病理過程に関与する筋線維芽細胞の集団を得ることであろう。

【 0 0 6 2 】

腫瘍の鏡検を実施すれば、例えば、ホルマリン中で予め固定しておいた組織を免疫組織化学的に標識することによって、腫瘍中の筋線維芽細胞の割合を評価することができる。

【 0 0 6 3 】

理想的には、開始点は、筋線維芽細胞を高率で含有する（すなわち、好ましくは線維芽細胞のうちの少なくとも30%が筋線維芽細胞である）腫瘍である。

【 0 0 6 4 】

腫瘍の酵素消化を実施するが、この酵素消化に続いて、細胞の亜集団の精製を行っても、行わなくても構わない。

【 0 0 6 5 】

酵素消化は細胞懸濁液を得ることを可能にする他の任意のプロセスに置き換え可能であり、酵素消化に続いて以下の1)~3)の3つの異なる手順を実施してもかまわない。

【 0 0 6 6 】

1)まず、腫瘍の鏡検を実施する際に、検査結果を待つあいだ組織を4度維持しておく。欠点は、組織が劣化する可能性があることである。

【 0 0 6 7 】

2)細胞の亜集団の精製とともに、または、精製は行わずに、組織の酵素消化を実施する。次に、鏡検の結果を待つあいだ細胞を凍結させておく。

【 0 0 6 8 】

3)組織の酵素消化を実施し、同じ日に培養を開始する。

【 0 0 6 9 】

酵素消化後は、細胞の亜集団の精製を実施しなくても構わない。この場合、培養は、線維芽細胞の成長にとって有利に作用するように、培地中において開始する。第1継代では、細胞を無血清M E G M 培地に移し変える。

【 0 0 7 0 】

あるいは、酵素消化後に、細胞の亜集団の精製を実施しても構わない。この場合、この精製後に、線維芽細胞および誘導体を含有する画分を、無血清M E G M 培地中で直接成長させる。

【 0 0 7 1 】

継代ごとに、免疫細胞化学法を用いて、S M A マーカーに対してプラスを示す細胞の割合を決定してもよい。

10

20

30

40

50

【0072】

上記M E G M 培地は、正常ヒト乳腺上皮細胞を培養するという特定の目的のために開発されたものである。

【0073】

各継代または2継代ごとの終了時に、95%を超えるかつ100%以下がS M A マーカーに対してプラスの筋線維芽細胞の培養物が得られる。

【0074】

このようにして得られた細胞は、特に、培養物中で自己の表現型を維持し、約4継代にわたって活発に成長するという効果を有する。第5継代になって初めて、細胞死または老化の徴候が現れる。

10

【0075】

M E G M 培地を上述の無血清D M E M / H a m F 1 2 培地に置き換える以外は、上記の例と同一の手順を実施すると、M E G M 培地を用いて得られた結果と同様の結果が得られる。具体的には、各継代または2継代ごとの終了時に、95%を超えるかつ100%以下がS M A マーカーに対してプラスの筋線維芽細胞の培養物が得られる。ただし、この無血清D M E M / H a m F 1 2 培地を用いた場合には、細胞は第4継代以降の成長が芳しくない。

【0076】

〔本発明にしたがって筋線維芽細胞を取得する方法の実施形態で遂行する実験プロトコルの例〕

20

開始点は、例えば適切な輸送培地中に保存した乳房腫瘍である。

【0077】

試料を、リン酸緩衝食塩水 (P B S : s a l i n e p h o s p h a t e b u f f e r) で洗浄する。

【0078】

組織の小片を、コラゲナーゼとヒアルロニダーゼとがD M E M 培地中に存在する酵素力カクテルを含有する培養皿に移し変える。

【0079】

この組織を、2本の小刀で切って小さな断片にして、ピペットを用いて十分に混ぜる。

【0080】

得られた断片を37°のインキュベーターに少なくとも2時間入れる。

30

【0081】

組織と酵素カクテルとの混合物にD M E M を添加し、これを十分に混ぜる。

【0082】

この組織と酵素カクテルおよびD M E M の混合物を、40 μ mのナイロンフィルタを通して濾過する。

【0083】

上記混合物を遠心分離機にかけて、細胞ペレットを得る。

【0084】

得られた細胞をP B S で洗浄し、再度遠心分離機にかける。

40

【0085】

必要であれば、赤血球溶解液を用いて赤血球を除去し、細胞をP B S で洗浄し、再度遠心分離機にかけて、細胞ペレットを得る。

【0086】

細胞をペレットから採取して、小量のP B S 中へ移す。

【0087】

この段階で、細胞の生存率を、例えばトリパンブルーで染色することによって評価してもよい。また、細胞をカウントしても構わない。

【0088】

次に、上記細胞の培養を、通常の培養フラスコ中で、血清を含有する培地 (R P M I 培

50

地と 10 % の熱失活したウシ胎仔血清 (F B S) 中に 1 ミリリットル当たり 10^5 個の細胞を入れて開始する。

【 0 0 8 9 】

次の日に、浮遊細胞を取り除くために、培地を取り替える。

【 0 0 9 0 】

細胞が 80 % のコンフルエンスに達した際に、無血清培地への移し替えを、第 1 繼代から行ってもかまわない。

【 0 0 9 1 】

M E G M 培地に通常含まれる抗生物質は、抗生物質であるゲンタマイシンおよびアンホテリシン B を含有する G A - 1000 である。これらの抗生物質を、特にノルモシン (I n v i v o g e n 社) に換えてもかまわない。10

【 0 0 9 2 】

そして、無血清培地を約 3 日～4 日ごとに交換する。

【 0 0 9 3 】

上述のように、本発明によって、血清を含有しない培地中で成長する筋線維芽細胞を高率（最大で 95 % を超える）で含む細胞集団が、得られるようになる。

【 0 0 9 4 】

このようにして得られる細胞は、特に、培養物中で自己の表現型を維持し、約 4 繼代にわたって活発に成長するという効果を有する。

【 0 0 9 5 】

さらに、これらの細胞は、主要な血管新生促進性分子である血管内皮細胞増殖因子（“ V E G F ” : vascular endothelial growth factor ）を大量に生成する。20

【 0 0 9 6 】

図 1 は、本発明に従って得られる筋線維芽細胞によって V E G F が大量に生成されることを示している。

【 0 0 9 7 】

図 1 は、第 5 繼代の、 M E G M 培地における、1 日目（図面右寄りの「筋線維芽細胞」と記した左側のバー）および 2 日目（図面右寄りの「筋線維芽細胞」と記した右側のバー）の、筋線維芽細胞の上清中のイヌ V E G F の濃度を示している。図面左寄りの「コントロール」と記した箇所はコントロール（対照）として、培地だけで測定を実施した結果である。30

【 0 0 9 8 】

上記測定は、イヌ V E G F E L I S A キット (R & D Systems 社) を用いて実施した。

【 0 0 9 9 】

この図面から、まず、筋線維芽細胞が、主要な血管新生促進性分子である V E G F の実質的な供給源であることが確認できる。腫瘍は、実際には、自己を確立してあるサイズを越えて成長するためには、血管を補充する必要がある。この目的を達成するために、基質の細胞が腫瘍によって転用されていることが分かる。さらに、新しい血管の補充は、組織の修復において鍵となる段階である。40

【 0 1 0 0 】

図 1 は、さらに、本発明によって得られる細胞によって、抗血管新生活性を有する医薬品の化合物をスクリーニングすることが可能であることをも示している。

【 0 1 0 1 】

〔先行技術文献一覧〕

[1] Orimo et al., Cell 2005, 121: 335-348

[2] Allinen et al., Cancer Cell 2004, 6:17-32

[3] Kinnman et al., Lab Invest 2001, 81:1709-1716

[4] Omary et al., JCI 2007, 117:50-59

[5] Hammond et al., PNAS 1984, 81: 5435-5439

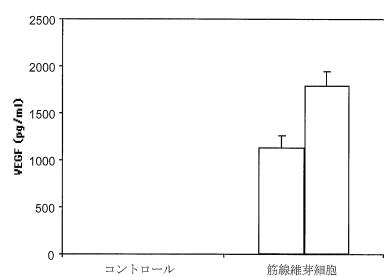
[6] R. Ian Freshney, "Culture of Animal Cells A Manual of Basic Technique", 2005

【図面の簡単な説明】

【0102】

【図1】本発明に基づいて取得された筋線維芽細胞によって生成されたVEGFの量を示す図である。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 ルイ・ニコラ・ジャック
フランス国、エフ - 0 6 3 3 0 ロックフォール レ パン, セデックス 4 0 8 , シュマン デ
ュ カムイユ 1 0 1 0

(72)発明者 バルテル, ロベール
フランス国、エフ - 0 6 3 9 0 シャトーヌフ - ヴィルヴィエイユ, アレ デ リュシオレ 1 3
8

審査官 上條 肇

(56)参考文献 Mol.Biol.Cell, 2007年, Vol.18, No.7, p.2716-2727
Carcinogenesis, 1999年, Vol.20, No.7, p.1185-1192

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 5 / 0 0 - 5 / 2 8
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)
W P I