

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6552487号
(P6552487)

(45) 発行日 令和1年7月31日(2019.7.31)

(24) 登録日 令和1年7月12日(2019.7.12)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 5/095	(2010.01)
C 12 Q 1/04	(2006.01)
C 12 Q 1/02	(2006.01)
G 01 N 33/15	(2006.01)
G 01 N 33/50	(2006.01)
C 12 N	5/095
C 12 Q	1/04
C 12 Q	1/02
G 01 N	33/15
G 01 N	33/50

請求項の数 15 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2016-521251 (P2016-521251)
(86) (22) 出願日	平成26年6月18日 (2014.6.18)
(65) 公表番号	特表2016-523079 (P2016-523079A)
(43) 公表日	平成28年8月8日 (2016.8.8)
(86) 國際出願番号	PCT/SG2014/000290
(87) 國際公開番号	W02014/204406
(87) 國際公開日	平成26年12月24日 (2014.12.24)
審査請求日	平成29年4月26日 (2017.4.26)
(31) 優先権主張番号	201304704-8
(32) 優先日	平成25年6月18日 (2013.6.18)
(33) 優先権主張国	シンガポール (SG)

(73) 特許権者	508305029 エージェンシー フォー サイエンス, テクノロジー アンド リサーチ シンガポール共和国, 138632 シン ガポール フュージョンポリス ウェイ 1 コンネクシス ノース タワー #2 O-10
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕幸
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌幹細胞を培養する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞培養基質上または細胞培養基質中に癌幹細胞を導入する段階を含む、癌幹細胞集団を培養するための方法であって、該細胞培養基質が、グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの形状であり、該ゲルが0.1 kPa～4 kPaの範囲にある剛性を有し、該癌幹細胞が、該グリコサミノグリカンと相互作用し、かつ該グリコサミノグリカンの受容体であるマーカーを含み、該グリコサミノグリカンが非硫酸化グリコサミノグリカンであり、該非硫酸化グリコサミノグリカンがヒアルロン酸であり、かつ該マーカーがCD44である、方法。

【請求項 2】

前記細胞培養基質上で前記癌幹細胞をインキュベートする段階を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記細胞培養基質に付着していない癌細胞を除去する段階を含む、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

前記ゲルの貯蔵弾性率が30から100,000 Paの範囲にある、請求項1から3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

置換フェンアルキルアミンが、フェンメチルアミン、フェンエチルアミン、フェンプロ

ピルアミン、フェンプチルアミン、およびフェンペンチルアミンからなる群より選択される、請求項1から4のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

前記置換フェンエチルアミンがチラミンである、請求項5記載の方法。

【請求項7】

前記チラミンがメタチラミンまたはパラチラミンである、請求項6記載の方法。

【請求項8】

前記複合体の置換度が1から20の範囲にある、請求項1から7のいずれか一項記載の方法。

【請求項9】

前記細胞培養基質の剛性が4.0 kPa未満であるかまたはそれに等しい場合に、前記癌幹細胞が、抗癌剤に対して抵抗性となる、請求項1から8のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】

前記癌幹細胞が、前記抗癌剤の存在下で少なくとも70%の生存率を有する、請求項9記載の方法。

【請求項11】

前記抗癌剤がシスプラチニンまたはドキソルビシンである、請求項9または10記載の方法。

【請求項12】

a. グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの形状である細胞培養基質に、複数の癌細胞を供する段階であって、該ゲルが、0.1 kPa～4 kPaの範囲にある剛性を有する、段階；および

b. 癌幹細胞を前記細胞培養基質と相互作用させて、それによって前記複数の癌細胞から前記癌幹細胞を分離する段階

を含む、複数の癌細胞から癌幹細胞集団を選択的に分離するための方法であって、段階bが、受容体-リガンド結合を介して該細胞培養基質の該グリコサミノグリカンに該癌幹細胞を結合させる段階を含み、該グリコサミノグリカンがヒアルロン酸である、方法。

【請求項13】

前記癌幹細胞が、前記グリコサミノグリカンの受容体であるマーカーを含む、請求項12記載の方法。

【請求項14】

細胞培養基質上または細胞培養基質中で癌幹細胞を培養する段階を含む、癌幹細胞集団に対する薬物をスクリーニングする方法であって、該細胞培養基質が、グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの形状であり、前記ゲルが4.0 kPaに等しいまたはそれ未満である剛性を有し、該癌幹細胞が、該グリコサミノグリカンと相互作用し、かつ該グリコサミノグリカンの受容体であるマーカーを含み、該グリコサミノグリカンが非硫酸化グリコサミノグリカンであり、該非硫酸化グリコサミノグリカンがヒアルロン酸であり、かつ該マーカーがCD44である、方法。

【請求項15】

グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの、癌幹細胞集団に対して選択的である細胞培養基質としての使用であって、該癌幹細胞が、受容体-リガンド結合を介して前記グリコサミノグリカンと相互作用するマーカーを発現し、該ゲルが4.0 kPaに等しいまたはそれ未満である剛性を有し、該グリコサミノグリカンが非硫酸化グリコサミノグリカンであり、該非硫酸化グリコサミノグリカンがヒアルロン酸であり、かつ該マーカーがCD44である、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は全般的に、癌幹細胞集団を培養するための方法に関する。本発明はまた、細胞培養基質としてのゲルの使用にも関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】**【0002】****背景**

癌幹細胞 (CSC) は、特定の癌において見出される全ての細胞タイプを生じることができるという意味において通常の幹細胞と類似している癌細胞の亜集団 (腫瘍または血液の癌において見出される) である。癌幹細胞は、自己再生、癌の増殖、または様々なタイプの癌細胞への分化などの特徴を含む。そのような細胞は、腫瘍において別個の集団として存続することができ、新しい腫瘍の形成による癌の再発および転移を引き起こすと考えられる。

【0003】

10

癌治療における重要な難題の1つは、CSCの撲滅であろう。癌患者の予後不良および高い死亡率は、自己再生、転移、化学療法および放射線療法抵抗性を含むCSCの特性によって引き起こされると考えられる。従来の抗癌剤は、大部分の腫瘍細胞を殺すことができるものの、CSCを最終的に撲滅することはできない。生き残ったCSCは、増殖して、新しい腫瘍細胞を再生し、このことが患者の予後不良および再発に密接に関連している。CSCを撲滅するためのおよび新規抗癌剤をスクリーニングするための有効な方法を開発するため、種々のモノクローナル抗体によって標識された癌細胞の蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) によってCSCを同定および特徴付けすることに、多くの努力が費やされている。CD44は、最も一般的に研究されているCSCマーカーの1つである。CD44^{high}/CD24^{low}、CD44^{high}/CD133^{high}、CD44^{high}/アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリーメンバーA1 (ALDH1A1)^{high}およびCD44^{high}/上皮細胞接着分子 (EpCAM)^{high}を有する癌細胞の亜集団は、化学療法抵抗性および腫瘍形成性を示した。しかし、そのような集団は、培養中では一般的に小さく不安定であり、そのため標準的なハイスループット細胞生存率アッセイを行うことは難しい。実際に、FACSソーティングによって調製したCSCに富む集団は、インビトロ培養時に急速に減少した。

20

【0004】

上記の短所の1つまたは複数を克服するか、または少なくとも改善する、癌幹細胞を培養する方法を提供する必要がある。

【0005】

30

癌幹細胞の選択、維持、および増殖を支持することができる細胞培養基質を提供する必要がある。

【発明の概要】**【0006】****概要**

第一の局面により、細胞培養基質上でまたは細胞培養基質中に癌幹細胞を導入する段階を含む、癌幹細胞集団を培養するための方法であって、細胞培養基質がグリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの形状である、方法が提供される。

【0007】

40

有利なことに、グリコサミノグリカンと相互作用するマーカーを含む癌幹細胞がゲル上で選択的に培養されうる。マーカーの発現レベルは、ゲル上の癌細胞集団の増殖を制御しうる。

【0008】

癌幹細胞は、癌細胞株に存在しうることから、癌幹細胞を培養するための方法はまた、マーカーの高い発現を有する癌幹細胞に富む癌細胞株を培養するために用いることができる。したがって、1つの態様において、癌幹細胞集団を培養するための方法は、細胞培養基質上または細胞培養基質中に癌細胞株を導入する段階を含む、癌細胞株を培養するための方法であって、細胞培養基質が、グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの形状である、方法を含みうる。

【0009】

50

癌幹細胞または癌細胞株の生育および維持を促進するために、ゲルの剛性または架橋密度を変化させてもよい。ゲルの剛性または架橋密度はまた、選択された化学療法剤に対する癌幹細胞または癌細胞株の化学療法抵抗性にも影響を及ぼしうる。

【0010】

第二の局面により、(a)複数の癌細胞株を、グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの形状である細胞培養基質に供する段階、および(b)癌幹細胞を細胞培養基質と相互作用させて、それによって複数の癌細胞株から癌幹細胞を分離する段階を含む、複数の癌細胞株から癌幹細胞集団を選択的に分離するための方法が提供される。

【0011】

10

第三の局面により、細胞培養基質上でまたは細胞培養基質中で癌幹細胞を培養する段階を含む、癌幹細胞集団に対する薬物をスクリーニングする方法であって、細胞培養基質が、グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの形状であり、ゲルが100 kPaに等しいかまたはそれ未満である剛性を有する、方法が提供される。

【0012】

第四の局面により、グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの、細胞培養基質としての使用が提供される。

【0013】

第五の局面により、細胞培養基質上または細胞培養基質中で癌幹細胞を培養する、グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの形状である細胞培養基質の、抗癌剤をスクリーニングするための使用が提供される。

20

[本発明1001]

細胞培養基質上または細胞培養基質中に癌幹細胞を導入する段階を含む、癌幹細胞集団を培養するための方法であって、該細胞培養基質が、グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの形状である、方法。

[本発明1002]

前記細胞培養基質上で前記癌幹細胞をインキュベートする段階を含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

30

前記細胞培養基質に付着していない癌細胞を除去する段階を含む、本発明1002の方法。

[本発明1004]

前記ゲルの貯蔵弾性率を30から100,000 Paの範囲の値から選択する段階を含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1005]

前記ゲルの剛性を0.1から100 Paの範囲の値から選択する段階を含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1006]

前記グリコサミノグリカンを非硫酸化グリコサミノグリカンとして選択する段階を含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1007]

40

前記非硫酸化グリコサミノグリカンをヒアルロン酸として選択する段階を含む、本発明1006の方法。

[本発明1008]

置換フェンアルキルアミンを、フェンメチルアミン、フェンエチルアミン、フェンプロピルアミン、フェンブチルアミン、およびフェンペンチルアミンからなる群より選択する段階を含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1009]

前記置換フェンエチルアミンをチラミンとして選択する段階を含む、本発明1008の方法。

。

[本発明1010]

50

前記チラミンをメタチラミンまたはパラチラミンとして選択する段階を含む、本発明1009の方法。

[本発明1011]

前記複合体の置換度を1から20の範囲の値から選択する段階を含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1012]

前記癌幹細胞が、前記グリコサミノグリカンと相互作用するマーカーを含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1013]

前記マーカーが前記グリコサミノグリカンの受容体である、本発明1012の方法。

10

[本発明1014]

前記マーカーが、CD44、HAを介する運動性受容体（RHAMM）、および細胞内接着分子-1（ICAM-1）からなる群より選択される、本発明1012または1013の方法。

[本発明1015]

前記細胞培養基質の剛性が100 kPa未満であるかまたはそれに等しい場合に、前記癌幹細胞が、抗癌剤に対して抵抗性となる、本発明1005から1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

前記癌幹細胞が、前記抗癌剤の存在下で少なくとも70%の生存率を有する、本発明1015の方法。

[本発明1017]

20

前記抗癌剤をシスプラチンまたはドキソルビシンから選択する段階を含む、本発明1015または1016の方法。

[本発明1018]

a. グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの形状である細胞培養基質に、複数の癌細胞を供する段階；および

b. 癌幹細胞を前記細胞培養基質と相互作用させて、それによって前記複数の癌細胞から前記癌幹細胞を分離する段階

を含む、複数の癌細胞から癌幹細胞集団を選択的に分離するための方法。

[本発明1019]

30

段階（b）が、受容体-リガンド結合を介して前記細胞培養基質の前記グリコサミノグリカンに前記癌幹細胞を結合させる段階を含む、本発明1018の方法。

[本発明1020]

前記癌幹細胞が、前記グリコサミノグリカンの受容体であるマーカーを含む、本発明1019の方法。

[本発明1021]

細胞培養基質上または細胞培養基質中で癌幹細胞を培養する段階を含む、癌幹細胞集団に対する薬物をスクリーニングする方法であって、該細胞培養基質が、グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの形状であり、前記ゲルが100 kPaに等しいまたはそれ未満である剛性を有する、方法。

[本発明1022]

40

グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの、細胞培養基質としての使用。

[本発明1023]

前記細胞培養基質が、癌幹細胞集団に対して選択的である、本発明1022の使用。

[本発明1024]

前記癌幹細胞が、受容体-リガンド結合を介して前記グリコサミノグリカンと相互作用するマーカーを発現する、本発明1022または1023の使用。

[本発明1025]

細胞培養基質上または細胞培養基質中で癌幹細胞を培養する、グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの形状である細胞培養基質の、抗癌剤を

50

スクリーニングするための使用。

【図面の簡単な説明】

【0014】

添付の図面は、開示の態様を例示し、開示の態様の原理を説明するために役立つ。しかし、図面は、単なる説明を目的として作成されており、本発明の限界の定義として作成されるのではないと理解される。

【図1】癌幹細胞マーカーを含む癌細胞集団の選択および培養を支持するゲルを示す概略図である。

【図2】図2(a)は、様々な濃度の過酸化水素でのゲルの貯蔵弾性率を示すグラフである。結果を平均値±標準偏差として示す($n=3$)。図2(b)は、過酸化水素濃度を変化させて調製したHA-Tyrハイドロゲル(1.75% (w/v))の架橋密度および架橋点間分子量を示すグラフである。結果を平均値±標準偏差として示す($n=3\sim 5$)。

【図3】(a) MDA-MB-231; (b) MCF-7; および(c) BT-474癌細胞株における癌幹細胞マーカーを含む癌細胞の量のフローサイトメトリー分析(FACS)を示す複数のグラフである。アイソタイプ対照を全ての細胞株について行った。

【図4】図4(a)は、MCF-7、HCC1937、およびMDA-MB-231細胞のFACSを示すグラフである。図4(b)は、リアルタイムRT-PCRによって評価した、MCF-7、HCC1937、およびMDA-MB-231細胞におけるCD44の相対的mRNA発現レベルを示す棒グラフである。結果を平均値±標準偏差($n=3$)として示す(*P 0.005)。

【図5】インキュベーション時間の関数としての、(a) MCF-7; (b) HCC1937; (c) MDA-MB-231; および(d) BT-474癌細胞のゲルへの接着を示す複数のグラフである。結果を平均値±標準偏差($n=4$)として示す。

【図6】図6(a)は、細胞播種後24時間での、ポリスチレン対照および様々な剛性のゲルに接着したMDA-MB-231細胞の複数の位相差顕微鏡画像を示す。図6(b)は、ポリスチレン対照および様々な剛性のゲル上での細胞伸展面積の定量的分析のグラフである。結果を平均値±標準偏差($n=25$)として示す。

【図7】様々な剛性のゲル上でのMDA-MB-231の細胞増殖をインキュベーション時間の関数として示すグラフである。結果を平均値±標準偏差($n=4$)として示す。*P 0.01。

【図8】図8(a)は、細胞播種後14日でのHA-Tyrハイドロゲル(I~V、VII)、およびポリスチレン(VI)上でのMDA-MB-231細胞およびそのコロニーの一連の位相差顕微鏡画像である。様々なハイドロゲルの剛性は、0.1 kPa(I)および(VII)、0.2 kPa(II)、0.5 kPa(III)、1 kPa(IV)、4 kPa(V)である。(I)で用いたスケールは、300 μ mであるが、(VII)で用いたスケールは100 μ mである。図8(b)は、Image-Pro plus image software分析ソフトウェアを用いて位相差顕微鏡画像から測定したコロニーサイズを示す。結果を平均値±標準偏差($n=4$)として示す(*P 0.001)。

【図9】ポリスチレン対照および様々な剛性のゲル上でのMDA-MB-231細胞におけるNanog、Sox-2、およびEpCAMの相対的mRNA発現レベルを示すグラフであり、mRNA発現レベルは、リアルタイムRT-PCRによって評価した。結果を平均値±標準偏差($n=3$)として示す。

【図10】図10(a)は、CD44(CD44s、CD44v3-10、CD44v8-10)の相対的mRNA発現レベルを示すグラフである。図10(b)は、リアルタイムRT-PCRによって評価したHA-Tyrハイドロゲル上でのMDA-MB-231細胞におけるSox-2、EpCAM、およびALDH1A1などのCSCマーカーの相対的mRNA発現レベルを示すグラフである。結果を平均値±標準偏差($n=3$)として示す(*P 0.05、**P 0.01、***P 0.001)。

【図11】CD44に対するブロッキング抗体の存在によりHA-Tyrハイドロゲル上のMDA-MB-231細胞の接着が防止されたことを示すグラフである。

【図12】図12(a)は、細胞播種後1時間でPBSによって3回洗浄することによって選択されたMDA-MB-231細胞におけるCD44(CD44s、CD44v3-10、CD44v8-10)、EpCAM、およびALDH1A1の相対的mRNA発現レベルを示すグラフである。図12(b)は、14日後のHA-Tyrハイドロゲル上で、細胞播種後1時間でPBSによって3回洗浄することによって選択されたMDA-MB-231細胞におけるCD44v8-10の相対的mRNA発現レベルを示すグラフである。mRNA発現レベル

10

20

30

40

50

は、リアルタイムRT-PCRによって評価した。結果を平均値±標準偏差 ($n=3$) として示す (*P 0.05、 **P 0.01)。

【図13】図13(a)は、シスプラチンの存在下でのMDA-MB-231細胞の生存率を示すグラフである。結果を平均値±標準偏差 ($n=4$) として示す。図13(b)は、ドキソルビシンの存在下でのMDA-MB-231細胞の生存率を示すグラフである。結果を平均値±標準偏差 ($n=4$) として示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

定義

本明細書において用いられる以下の単語および用語は、表記された意味を有する。

10

【0016】

用語「癌幹細胞マーカー」または「マーカー」は、癌幹細胞を単離および同定するために用いることができる遺伝子およびそのタンパク質産物を意味すると広く解釈されるべきである。

【0017】

用語「選択」または「選択的に」ならびにその文法上の変形は、様々なタイプの癌細胞、癌幹細胞、または癌細胞株の複数または混合物からの、所望のまたは標的タイプの癌細胞または癌幹細胞の単離を意味すると広く解釈されるべきである。

【0018】

単語「実質的に」は、「全く」を除外せず、例えばYを「実質的に含まない」組成物は、Yを全く含まなくてもよい。必要であれば、単語「実質的に」を、本発明の定義から削除してもよい。

20

【0019】

特に明記されていない限り、用語「含む (comprising)」および「含む (comprise)」、ならびにその文法上の変形は、それらが記述された要素を含むが、追加の記述されていない要素もまた含めることを許可するように、「無制限の」または「包括的」語法を表すと意図される。

【0020】

本明細書において用いられる用語「約」は、製剤の成分の濃度の文脈において、典型的には記載の値の±5%を意味し、より典型的には記載の値の±4%、より典型的には記載の値の±3%、より典型的には記載の値の±2%、さらにより典型的には記載の値の±1%、およびさらにより典型的には記載の値の±0.5%を意味する。

30

【0021】

本開示を通して、ある態様は、範囲の形式で開示されうる。範囲の形式での記述は、単に利便性および簡潔性のためであり、開示の範囲の適用範囲に対する不变の制限として解釈すべきではないと理解すべきである。したがって、範囲の記述は、具体的に開示された全ての可能な小範囲ならびにその範囲内の個々の数値を有すると見なされるべきである。例えば、1~6などの範囲の記述は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6等などの具体的に開示された小範囲、ならびにその範囲内の個々の数値、例えば1、2、3、4、5、および6を有すると見なされるべきである。このことは、範囲の幅によらず当てはまる。

40

【0022】

ある態様はまた、本明細書において広く一般的に記述されうる。一般的な開示に含まれるより狭い種および亜属群のそれぞれも同様に、本開示の一部を形成する。本開示は、削除された材料が本明細書に具体的に記述されているか否かによらず、属から任意の主題を除去する但し書きまたは否定による限定を伴う、態様の全般的説明を含む。

【0023】

態様の詳細な開示

癌幹細胞集団を培養するための方法の例示的で非制限的な態様を以下に開示する。

【0024】

本方法は、グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの

50

形状である細胞培養基質上または細胞培養基質中に、癌幹細胞を導入する段階を含む。

【0025】

癌幹細胞は、マーカー（癌幹細胞マーカーとしても知られる）を含みうる。

【0026】

癌幹細胞は、癌細胞株中に存在しうることから、癌幹細胞を培養するための方法はまた、癌幹細胞マーカーの高い発現を有する癌幹細胞に富む癌細胞株を培養するために用いることもできる。したがって、1つの態様において、癌幹細胞集団を培養するための方法は、細胞培養基質上または細胞培養基質中に癌細胞株を導入する段階を含む、癌細胞株を培養するための方法であって、細胞培養基質がグリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの形状である、方法を含みうる。

10

【0027】

癌幹細胞マーカーの発現レベルは、ゲル上の癌細胞集団の増殖を制御しうる。癌幹細胞マーカーの発現レベルは、単一細胞における癌幹細胞マーカー分子の数として定義される。発現レベルは、比較される細胞と比較した場合の、癌幹細胞マーカーの相対的発現レベルの平均値として表記されうる。相対的発現レベルの平均値は、フローサイトメトリー分析（FACS）によって測定されうる。細胞（または細胞株）が、癌幹細胞マーカーの「高い」発現レベルを有するか否かを決定する場合、癌幹細胞マーカーの相対的発現レベルの平均値は、比較される細胞と比較した場合に20超の値でありうる。癌幹細胞マーカーの相対的発現レベルの平均値は、比較される細胞と比較した場合に、30超、40超、50超、60超、70超、80超、90超、100超、110超、または150超でありうる。発現レベルはまた、癌幹細胞マーカーのmRNA発現レベルを決定することによっても得られうる。例として、比較される細胞は、BT-474(ATCC(登録商標) HTB-20(商標)、Manassas, Virginia of the United States of AmericaのATCCから入手)でありうる。

20

【0028】

癌幹細胞は、細胞培養基質上でインキュベートされうる。インキュベーション条件は、湿潤大気中で、約36から約37の温度で、約5分から約24時間の期間でありうる。例として、インキュベーション条件は、5%二酸化炭素を含む37の湿潤大気中で1時間でありうる。

【0029】

インキュベーション後、細胞培養基質に付着していないかなる癌細胞も除去されうる。非付着細胞は、適した緩衝液によって細胞を複数回洗浄することによって除去されうる。細胞はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）などの例示的な緩衝液によって1から5回、または3回洗浄されうる。細胞を洗浄することによって、CD44、EpCAM、および他のマーカーなどのマーカーを高度に発現する細胞が得られうる。

30

【0030】

癌幹細胞マーカーは、ゲル中に存在するグリコサミノグリカンと相互作用しうる。癌幹細胞マーカーは、グリコサミノグリカンの受容体でありうる。マーカーは、CD44、HAを介する運動性受容体（RHAMM）、および細胞内接着分子-1（ICAM-1）からなる群より選択されうる。

【0031】

40

ゲル上で培養する場合、癌幹細胞の生育および維持は、Nanog、Sox-2、またはEpCAMのmRNA発現によって決定されうる。Nanogに関して、癌幹細胞は、ポリスチレン細胞培養プレート対照上で生育させた同じ細胞の発現レベルの少なくとも2倍のmRNA発現レベルを有しうる。Sox-2に関して、癌幹細胞は、ポリスチレン細胞培養プレート対照上で生育させた同じ細胞の発現レベルの少なくとも1.25倍のmRNA発現レベルを有しうる。EpCAMに関して、癌幹細胞は、ポリスチレン細胞培養プレート対照上で生育させた同じ細胞の発現レベルの少なくとも2.25倍のmRNA発現レベルを有しうる。

【0032】

ゲルの剛性または架橋密度は、ゲル上で培養することができる癌幹細胞（または癌細胞）の選択に対する代替のまたは追加の制御として作用しうる。ゲルの剛性または架橋密度

50

はまた、ゲル上で選択的に生育する癌幹細胞（または癌細胞）の生育および／または維持を制御しうる。ゲルの剛性または架橋密度はまた、選択された化学療法剤に対する癌幹細胞（または癌細胞）の化学療法抵抗性に影響を及ぼしうる。

【0033】

ゲルの剛性は、約0.1 kPa～約100 kPa、約0.1 kPa～約1 kPa、約0.1 kPa～約2 kPa、約0.1 kPa～約3 kPa、約0.1 kPa～約4 kPa、約0.1 kPa～約5 kPa、約0.1 kPa～約6 kPa、約0.1 kPa～約7 kPa、約0.1 kPa～約8 kPa、約0.1 kPa～約9 kPa、約0.1 kPa～約20 kPa、約0.1 kPa～約30 kPa、約0.1 kPa～約40 kPa、約0.1 kPa～約50 kPa、約0.1 kPa～約60 kPa、約0.1 kPa～約70 kPa、約0.1 kPa～約80 kPa、約0.1 kPa～約90 kPa、約1 kPa～約10 kPa、約2 kPa～約10 kPa、約3 kPa～約10 kPa、約4 kPa～約10 kPa、約5 kPa～約10 kPa、約6 kPa～約10 kPa、約7 kPa～約10 kPa、約8 kPa～約10 kPa、約9 kPa～約10 kPa、約10 kPa～約100 kPa、約20 kPa～約100 kPa、約30 kPa～約100 kPa、約40 kPa～約100 kPa、約50 kPa～約100 kPa、約60 kPa～約100 kPa、約70 kPa～約100 kPa、約80 kPa～約100 kPa、約90 kPa～約100 kPa、または約5 kPa～10 kPaの範囲から選択される値でありうる。ゲルの剛性は、約0.1 kPa、0.2 kPa、0.4 kPa、0.5 kPa、1.0 kPa、2.5 kPa、または4.0 kPaでありうる。

【0034】

ゲルの架橋密度は、約 1×10^{-6} ～約 1×10^{-3} mol/cm³、 1×10^{-5} ～約 1×10^{-3} mol/cm³、 1×10^{-4} ～約 1×10^{-3} mol/cm³、 1×10^{-6} ～約 1×10^{-5} mol/cm³、 1×10^{-6} ～約 1×10^{-4} mol/cm³の範囲から選択される値でありうる。

【0035】

ゲルの貯蔵弾性率は、約30～約100,000 Pa、約30～約1,000 Pa、約30～約10,000 Pa、約30～約50,000 Pa、約50,000～約100,000 Pa、約1,000～約10,000 Pa、または約10,000～約100,000 Paの範囲から選択される値でありうる。

【0036】

ゲルはハイドロゲルでありうる。ゲルまたはハイドロゲルは、グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体でありうる。グリコサミノグリカンは、ヒアルロン酸（HA）などの非硫酸化グリコサミノグリカンでありうる。置換フェンアルキルアミンは、置換フェンメチルアミン、フェンエチルアミン、フェンプロピルアミン、フェンブチルアミン、またはフェンペンチルアミンでありうる。

【0037】

フェンアルキルアミンがフェンエチルアミンである場合、フェンエチルアミンは、メタチラミンまたはパラチラミンなどのチラミンでありうる。ゲルは、酵素的に架橋されたゲルでありうる。ゲルは、過酸化水素などの触媒および西洋ワサビペルオキシダーゼによって触媒されるチラミン部分の酸化的カップリングを用いて形成されうるHA-チラミン複合体で構成されうる。

【0038】

ゲルにおいて、置換度（グリコサミノグリカンの反復単位100個あたりの置換フェンアルキルアミン分子の数として定義される）は、約1～約20、約1～約5、約1～約10、約1～約15、約5～約20、約10～約20、または約15～約20の範囲から選択される値でありうる。置換度は、約6でありうる。

【0039】

細胞培養基質またはゲルの剛性が、100 kPaまたは1.0 kPa未満であるか、またはそれに等しい場合、癌幹細胞は、抗癌剤に対して抵抗性となりうる。細胞は、抗癌剤の存在下で少なくとも70%の生存率を有しうる。抗癌剤はシスプラチニンまたはドキソルビシンでありうる。

【0040】

以下の段階を含む、複数の癌細胞から癌幹細胞集団を選択的に分離するための方法もまた提供される：

a. 複数の癌細胞を、グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を

10

20

30

40

50

含むゲルの形状である細胞培養基質に供する段階；および

b. 癌幹細胞を細胞培養基質と相互作用させて、それによって複数の癌細胞から癌幹細胞を分離する段階。

【0041】

癌幹細胞と細胞培養基質とを相互作用させるために、段階(b)は、受容体-リガンド結合を介して癌幹細胞を細胞培養基質のグリコサミノグリカンに結合させる段階を含みうる。受容体-リガンド結合が起こるためには、癌幹細胞は、グリコサミノグリカンの受容体であるマーカーを含む。

【0042】

癌幹細胞マーカーの発現レベルもまた、癌幹細胞(またはそのような癌幹細胞を含む癌細胞株)のグリコサミノグリカンとの結合能に影響を及ぼしうる。

10

【0043】

細胞培養基質上または細胞培養基質中で前記癌幹細胞を培養する段階を含む、癌幹細胞集団に対する薬物をスクリーニングする方法であって、前記細胞培養基質が、グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの形状であり、前記ゲルが、100 kPaに等しいかまたはそれ未満である剛性を有する、方法もまた提供される。剛性は、1.0 kPa、0.5 kPa、0.4 kPa、0.2 kPa、または0.1 kPaに等しいか、またはそれ未満でありうる。

【0044】

グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの、細胞培養基質としての使用もまた提供される。

20

【0045】

細胞培養基質は、癌幹細胞集団に関して選択的でありうる。癌幹細胞は、受容体-リガンド結合を介してグリコサミノグリカンと相互作用しうるマーカーを発現しうる。

【0046】

細胞培養基質上または細胞培養基質中で癌幹細胞を培養する、グリコサミノグリカンと置換フェンアルキルアミンとの複合体を含むゲルの形状の細胞培養基質の、抗癌剤をスクリーニングするための使用もまた提供される。

【0047】

スクリーニングされる抗癌剤は、特に制限はなく、シスプラチンまたはドキソルビシンならびに他の任意の抗癌剤を含みうる。

30

【0048】

図面の詳細な説明

図1を参照すると、癌幹細胞マーカー4を含む癌細胞集団の選択および培養を支持するためのゲル2を示す概略図が提供される。

【0049】

図1において、HA-チラミン複合体で構成されるゲル2は、過酸化水素(H_2O_2)および西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)によって触媒されるチラミン部分の酸化的カップリングを用いて形成された。複数の癌細胞(4、6)をゲル2に曝露すると、癌幹細胞マーカーの高い発現レベルを有する細胞4のみがゲル2に接着する。癌幹細胞マーカーの高い発現レベルを有しない細胞6は、ゲル2に接着しない。したがって、ゲル2の存在下で複数の癌細胞を培養することにより、低発現癌細胞6から高発現癌細胞4を選択および分離することが可能となる。

40

【実施例】

【0050】

本発明の非制限的な例を、具体的な実施例を参照してより詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲をいかなるようにも制限すると解釈してはならない。

【0051】

ヒアルロン酸ナトリウム(HA)(Mw = 90 kDa、密度 = 1.05 g/cm³)は、JNC Corporation(Tokyo, Japan)から寄贈された。塩酸チラミン(Tyr · HCl)、N-ヒドロキシスクシン

50

イミド (NHS)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (EDC・HCl)、ウシ精巣由来のヒアルロニダーゼ (400~1,000単位/mg)、およびシスプラチンは全て、Sigma-Aldrich (Minnesota of the United States of America) から購入した。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP、100単位/mg) は、Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) から購入した。過酸化水素 (H_2O_2) は、Lancasterから得た。ドキソルビシンはBoryung pharmaceutical (Seoul, South Korea) から得た。AlamarBlue、CyQUANT (登録商標) 細胞増殖アッセイキット、TRIzol (登録商標) およびTaqman (登録商標) 遺伝子発現マスターミクスはそれぞれ、Life Technologies (Singapore) から提供された。ヒトCD44に対するマウスモノクローナル抗体およびFITCコンジュゲートラット抗マウスIgG2a二次抗体は、GeneTex (Hsinchu, Taiwan) から得た。ラットモノクローナル抗-CD44抗体 (Hermes-1) は、Abcam (Cambridge, United Kingdom) から購入した。トリプシン-EDTA (0.025%) およびペニシリン/ストレプトマイシンは、PAN Biotech GmbH (Aidenbach, Germany) から購入した。熱不活化ウシ胎児血清 (FBS) は、GE Healthcare (Buckinghamshire, United Kingdom) から購入した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、150 mM、pH 7.3)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) およびRPMI-1640培地は全て、Biopolis (Singapore) の培地調製施設によって供給された。

【0052】

MDA-MB-231、MCF-7、HCC1937、およびBT-474乳癌細胞株は、American Type Culture Collection (Manassas, Virginia of the United States of America) から購入した。MDA-MB-231、HCC1937、およびBT-474細胞は、10%FBSおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むRPMI-1640培地において生育させた。MCF-7細胞は、10%FBSおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEMにおいて生育させた。細胞株は全て、ポリスチレン組織培養フラスコにおいて培養し、80%コンフルエントに達すると継代した。

【0053】

統計分析：データは全て、平均値±標準偏差 (SD) として表記した。特に明記されていない限り、値の差は、SigmaStatソフトウェア (Systat Software, Inc.) を用いてStudentのt-検定を用いて評価した。p<0.05は、統計学的に有意であると見なされた。実験は全て、1試料あたり3回ずつ行った。

【0054】

実施例1

HA-チラミンゲルの合成

HA-チラミン複合体で構成される酵素的に架橋されたHAゲルは、 H_2O_2 およびHRPによって触媒されるチラミン部分の酸化的カップリングを用いて形成された。本明細書において、HRPおよび異なる濃度の H_2O_2 (0.22 mM~1.15 mMの範囲の H_2O_2) の溶液をHA-Tyr複合体 (PBS中で3%w/v、175 µl) に添加した。混合物の全量が300 µlとなるように、適当量のPBSを混合物に加えた。HA-Tyr複合体およびHRPの最終濃度はそれぞれ、1.75% (w/v) および0.125単位/mlであった。混合物を直ちにボルテックスミキサーで攪拌した。

【0055】

置換度 (HA反復単位100個あたりのチラミン分子の数) は、¹H NMRによって決定したところ、6であった。

【0056】

ゲルの剛性およびゲル化速度は、 H_2O_2 およびHRP濃度によってそれぞれ独立して調整することができる。

【0057】

ゲルの流体力学的測定は、HAAKE Rheoscope 1レオメーター (Karlsruhe, Germany) によって、直径3.5 cmおよびコーン角0.949°のコーンプレートジオメトリを用いて行った。測定は、37°で1%の一定の変形および周波数1 Hzの動的振動モードで行った。測定時の試料の滑り落ちを防止するために、粗面のガラス底プレートを用いた。上記のように調製したゲル混合物250 µlをレオメーターの底部プレートに入れた。上部コーンを0.025 mmの測定ギャップまで下げて、実験の際の溶媒の蒸発を防止するため、シリコンオイルの層

10

20

30

40

50

を注意深くコーン周囲に適用した。流体力学的測定は、貯蔵弾性率 (G') が平衡に達するまで続行した。

【0058】

図2(a)に認められるように、HA-Tyrゲルの G' は、 H_2O_2 濃度によって良好に制御され、HA-Tyr複合体の水溶液 (1.75% (w/v)) を利用する場合、70~4,000 Paの範囲であった。 H_2O_2 濃度が0.22 mMから1.15 mMに増加すると G' が増加したことから、 H_2O_2 濃度が増加すると、より高い架橋密度が達成されることを示唆した。

【0059】

HA-Tyrハイドロゲルの架橋点間平均分子量 (M_c) および架橋密度 (v_e) を決定した。貯蔵弾性率 (G') の測定結果から、架橋点間平均分子量 (M_c) および架橋密度 (v_e) を、ゴム弾性理論によって計算した。図2(b)に示されるように、HA-Tyrハイドロゲルの M_c は H_2O_2 濃度が増加すると減少したが、HA-Tyrハイドロゲルの v_e は、 H_2O_2 濃度が増加すると増加した。

【0060】

癌細胞の接着 (実施例2)、増殖 (実施例3)、維持 (実施例4)、HA-CD44相互作用の阻害 (実施例5)、および化学療法抵抗性 (実施例6) を評価するために、様々な剛性 (必要に応じて、0.1、0.2、0.5、1.0、2.5、および4.0 kPa) の複数のゲルを用いた。以下の実施例から明らかであるように、HA-Tyrハイドロゲル上の乳癌細胞の接着は、ハイドロゲルの剛性によって強力に調節され、CD44-HA相互作用に依存した。HA-Tyrハイドロゲルは、丸い形状の細胞形態学、低い細胞増殖およびコロニー形成の維持において、ポリスチレンと比較して異なる培養環境を提供した。HA-Tyrハイドロゲルは、CD44変種イソ型、Sox-2 およびALDH1A1 mRNA発現レベルをより良好に増強することから、ポリスチレンより優れていた。ハイドロゲルの力学的特性 (ハイドロゲルの成分および剛性などの) ならびにCD44変種イソ型の発現レベルは、癌細胞の細胞接着、増殖、および悪性度に影響を及ぼす要因である。HA-Tyrハイドロゲルの剛性を制御することは、乳癌細胞の悪性度を変化させるための単純かつ有効な手段である。

【0061】

実施例2

癌細胞の接着

MDA-MB-231、MCF-7、HCC1937、およびBT-474などの4つのタイプの乳癌細胞株を調べた。これらの癌細胞株におけるCD44陽性細胞集団を試験するために、CD44の表面発現のフローサイトメトリー分析 (FACS) を行った。

【0062】

FACSにおいて、細胞をPBSで洗浄し、トリプシン-EDTAを用いて収集した。剥離させた細胞を、2%FBSを含むPBSによって洗浄して、氷中で抗CD44抗体と共に30分間インキュベートした。2%FBSを含むPBSによって洗浄後、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) にコンジュゲートさせた二次抗体を、製造元が推奨する濃度で細胞浮遊液に添加して、氷中の暗所で30分間インキュベートした。細胞を2回洗浄して、2%FBSを含むPBS 0.5 mLに浮遊させた。BD LSRIIフローサイトメトリーアナライザ (BD Biosciences, of New Jersey of the United States of America) を用いて、細胞を分析およびソーティングした。

【0063】

図3に示すように、FACSを用いてMDA-MB-231 (図3(a))、MCF-7 (図3(b))、およびBT-474 (図3(c))においてそれぞれ、99.5%、44.2%、および0.5%のCD44陽性細胞が検出されたことが認められる。MDA-MB-231、HCT116、およびMCF-7細胞のCD44タンパク質発現レベル (平均値) は、BT-474細胞の発現レベルより103、12、および5倍高かった。

【0064】

さらに、MDA-MB-231、MCF-7、HCC1937間の比較では、FACSを用いた検出により、MDA-MB-231細胞ではCD44タンパク質が高レベルで発現され、HCC1937細胞では中レベルで発現され、MCF-7細胞では低レベルで発現されることが認められる (図4(a))。CD44発現レベルは、単一の細胞におけるCD44分子の数として定義される。これらの乳癌細胞株における

10

20

30

40

50

るCD44の様々な発現レベルを、細胞表面上のタンパク質発現レベル（図4（a））ならびにmRNA発現レベル（図4（b））に基づいて評価した。MDA-MB-231およびHCC1937細胞におけるCD44のmRNA発現レベルは、MCF-7細胞の発現レベルより8.5および4.5倍高かった。これらの結果は、図4（a）に示されるようにCD44タンパク質発現レベルの結果と密接に関連した。

【0065】

次に、HA-Tyrゲルの表面に対するこれらの細胞株の癌細胞接着を調べた。異なる剛性（0.1、0.2、0.5、1.0、2.5、および4.0 kPa、必要であれば）を有するHA-Tyrゲル（250 μl）を24ウェルプレートにおいて調製した。ゲルを一晩沈降させた。次に、ゲルをPBSで3回洗浄した後、培養培地で1回洗浄した。培養培地中で細胞密度 1.0×10^5 個/mlの乳癌細胞250 μlをゲル上に播種した。 10

【0066】

プレートをインキュベーター（5%CO₂を含む37 °Cの湿潤大気中）に、1から9時間の範囲の適切な期間戻した。選択された間隔で、非付着細胞を有する培地を吸引して、細胞をPBSによって3回洗浄した。ゲルを有しない細胞培養プレートを比較のために用いた。

【0067】

MDA-MB-231、MCF-7、およびHCC1937に関して、CyQUANT（登録商標）細胞増殖アッセイキットを用いてDNAの定量を行って、付着細胞数を評価した。推奨される製造元のアッセイプロトコールに従った。HA-Tyrハイドロゲル上およびポリスチレン上の細胞を、ヒアルロンニダーゼ（1,000単位/ml）およびトリプシン-EDTAと共にそれぞれインキュベートすることによって収集した。細胞沈降物をPBSで2回洗浄して、凍結融解サイクルによって溶解した。次に、試料をCyQUANT作業溶液200 μlに溶解した。公知の密度の細胞浮遊液と共に試料溶液を蛍光測定することによって、細胞数を、検量線に基づいて決定した。蛍光測定は、480および520nmでの励起および放射波長でマイクロプレートリーダーを用いて行った。 20

【0068】

BT-474に関して、ゲルに付着した細胞を、10%Alamar Blue色素を含む培養培地中で37 °Cで4時間インキュベートした。Alamar Blue色素の蛍光測定をそれぞれ545および590 nmでの励起および放射波長でのマイクロプレートリーダーを用いて行った。次に、Alamar Blue溶液100 μlを96ウェルプレートに移して、蛍光強度を測定した。Alamar Blue色素の蛍光強度は、本試験における付着細胞数であると見なされた。 30

【0069】

図5は、HA-Tyrゲル表面上の細胞接着を示す。有意な数のMDA-MB-231細胞がHA-Tyrゲル表面に付着した（図5（c））。付着したMDA-MB-231細胞数は、HA-Tyrハイドロゲルの剛性に依存し、付着細胞数はハイドロゲルの剛性が減少すると増加した。図5（a）および図5（b）も同様に、ハイドロゲルの剛性が減少すると、MCF-7およびHCC1937の細胞接着がそれぞれ増加したことを示す。図5（a）～図5（c）は、HA-Tyrハイドロゲル上の付着細胞数が、CD44発現レベルに密接に関連するように思われることを示した（図4）。HA-Tyrハイドロゲル上での乳癌細胞の接着は、CD44の発現レベルが増加すると増加した。これらの結果は、HA-Tyrハイドロゲル上での細胞接着が、HAとCD44との相互作用に依存していたことを強く示唆している。 40

【0070】

これに対し、HA-Tyrゲルに付着したBT-474細胞はごく少数であった（図5（d））。これらの結果は、CD44発現レベルおよび/またはハイドロゲルの剛性が、ハイドロゲルへの癌細胞の接着に影響を及ぼす要因であることを示している。一般的に、CD44の発現レベルがより高く、および/またはハイドロゲルの剛性がより低ければ、ハイドロゲルに対する細胞接着の程度はより大きくなる。

【0071】

実施例3

癌細胞の増殖

付着したMDA-MB-231細胞の細胞形態学を決定するために、IX71倒立顕微鏡を備えたOlympus顕微鏡カメラ (Tokyo, Japan) を用いて位相差顕微鏡画像を得た。図6(a)を参照して、付着したMDA-MB-231細胞は全て、ゲルの剛性によらず丸いが、ポリスチレン培養フラスコ上では、他の細胞の多くが伸展していることが観察された。

【0072】

細胞伸展面積を、Image-Pro Plus画像分析ソフトウェア (Maryland of the United States of America) を用いて分析した。細胞伸展面積を図6(b)に示し、HA-Tyrゲル上では細胞伸展面積が、ポリスチレン上より有意に小さいが、様々な剛性の様々なHA-Tyrゲル上での細胞伸展に有意差はなかったことが明らかに示された。これらの結果は、CD44とHA-Tyrゲルの間の相互作用を介した細胞接着が、丸い形状のMDA-MB-231細胞を維持しうることを示した。 10

【0073】

様々なゲル (0.1、0.2、0.5、1.0、および4.0 kPa) における細胞増殖を評価するために、培養培地中で細胞密度 1.0×10^5 個/mlのMDA-MB-231細胞250 μlを、ゲル上に播種した。ゲルを有しない細胞培養ウェルプレートを比較として用いた。細胞を、5%CO₂を含む37の湿潤大気中でインキュベートした。培養培地を3日毎に交換した。ハイドロゲル上の細胞増殖を評価するために、上記のCyQUANT (登録商標) 細胞増殖アッセイキットを用いて蛍光測定を行った。

【0074】

図7に示すように、HA-Tyrゲル上で培養したMDA-MB-231細胞の生育速度は、培養プレート上で培養した細胞よりかなり低かった。剛性0.1 kPa、0.2 kPa、および0.5 kPaを有する軟らかいHA-Tyrゲルのみが、13日間の間に細胞生育を示したが、他の剛性のHA-Tyrゲルでは細胞生育は観察されなかった。 20

【0075】

HA-Tyrゲルの細胞付着および増殖を含むこれらの結果は、培養プレートの結果とは明らかに異なった。このことは、MDA-MB-231細胞において発現されたCD44が、HA-Tyrゲル中のHA鎖と相互作用したことを示唆する。

【0076】

HA-Tyrハイドロゲル上のMDA-MB-231乳癌細胞の挙動をさらに調べるために、HA-Tyrハイドロゲル上のコロニー形成を評価した(図8)。丸い形状のMDA-MB-231細胞は、14日後にHA-Tyrハイドロゲル上でコロニーを形成したが(図8a、I~V、XII)、ポリスチレン上ではコロニーは観察されなかった。HA-Tyrハイドロゲルの剛性が減少するとコロニーサイズは増加した。 30

【0077】

実施例4

HA-Tyrハイドロゲルによる癌幹細胞マーカーの発現レベルの増強

HA-Tyrゲル(剛性0.2、0.5、1.0、および4.0 kPa)上での培養13日後のMDA-MB-231細胞におけるNanog、Sox-2、およびEpCAMのmRNA発現レベルを調べた。さらに、HA-Tyrハイドロゲル(剛性0.1、0.2、0.5、1.0、および4.0 kPa)上でのMDA-MB-231細胞におけるCD44(CD44標準)、CD44v3-10(CD44変種イソ型)、CD44v8-10(CD44変種イソ型)、Sox-2、EpCAM、およびALDHD1A1遺伝子の転写レベルもまた調べた。 40

【0078】

本明細書において、培養培地中で細胞密度 1.0×10^5 個/mlのMDA-MB-231細胞250 μlをゲル上に播種した。ゲルを含まない細胞培養ウェルプレートを比較として用いた。細胞を、5%CO₂を含む37の湿潤大気中でインキュベートした。培養培地を3日毎に交換した。

【0079】

様々なHA-Tyrハイドロゲル上のMDA-MB-231細胞を、その後のRNA抽出のために、ヒアルロニダーゼ(1,000単位/ml)およびトリプシン-EDTAによって処理することによって収集した。MDA-MB-231細胞の総RNAを、培養13日後にTRIzol (Life technologies, Singapore) を用いて抽出した。cDNAを調製するために、総RNAを、RT緩衝液、ランダムヘキサマー 50

プライマー、デオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) 混合物、RNアーゼ阻害剤、および逆転写酵素を含むRT反応混合物 (Thermo Scientific, China) と共にインキュベートした後に、DNアーゼ処置を行った。

【 0 0 8 0 】

リアルタイム定量的PCRをiQ5マルチカラーレイターパーフォーマンスPCR検出システム (Bio-Rad laboratories, Singapore) を用いて行った。反応混合物 (Life technologies, Singapore) は、TaqMan PCRマスターMix 10 μL、各プライマー 1.0 μL、cDNA 2.0 μL、および蒸留水 7.0 μL を含んだ。用いた様々なプライマーは、Hs01075861_m1 (総CD44)、Hs01081473_m1 (CD44s)、Hs01081480_m1 (CD44v3 -v10)、Hs01081475_m1 (CD44v8-v10))、Nanog (Hs02387400_s1)、Sox-2 (Hs01053049_s1)、EpCAM (Hs00901885_m1)、およびALDH1A1 (Hs00946916_m1) であった。PCRのために用いた温度プロファイルは、95 で20秒、95 で3秒および60 で20秒を40サイクルであった。- Ct法を用いるその後の全ての計算において、1試料あたり3回ずつの測定の平均閾値サイクル (Ct) 値を用い、結果を内因性の参照遺伝子 (GAPDH) に対して標準化して、無処置対照 (ポリスチレンプレート) と比較した遺伝子発現の変化倍率として表記する。

【 0 0 8 1 】

図9に示すように、0.2 kPaの剛性を有するHA-TyrゲルでのNanog、Sox-2、およびEpCAMのmRNA発現レベルは、他の培養プレートの発現レベルより有意に高いことが観察された。他のゲルは、Sox-2を除き、有意に高いmRNA発現レベルを示した。NanogおよびSox-2は、stemnessマーカーであることが知られており、それらの転写因子は、抗アポトーシスタンパク質発現および化学療法抵抗性を誘導する。さらに、CSCマーカーの1つであるESAの発現が増強されたことは、HA-Tyrゲル上に接着したMDA-MB-231細胞がCSCであることを示した。

【 0 0 8 2 】

図10に示されるように、HA-Tyrハイドロゲル上でCD44v3-10およびCD44v8-10のmRNA発現レベルは、ポリスチレン上の発現レベルより有意に高かったが、CD44の発現レベルは、ポリスチレン上の発現レベルとほぼ同じであった。興味深いことに、CD44v3-10およびCD44v8-10の増強された発現レベルは、HA-Tyrハイドロゲルの剛性が増加すると増加した (図10a)。これらの結果は、HA-Tyrハイドロゲルがハイドロゲル剛性依存的にCD44v3-10およびCD44v8-10の発現レベルを増強することができるが、CD44発現レベルは増強しないことを示している。それゆえ、結果から、HA-Tyrハイドロゲルが、乳癌細胞の悪性の特性を誘導することが強く示唆される。

【 0 0 8 3 】

さらに、HA-Tyrハイドロゲル上でSox-2およびALDH1A1のmRNA発現レベルもまた、ポリスチレン上の発現レベルと比較してHA-Tyrハイドロゲル上で有意に増強された (図10b)。ALDH1A1の発現レベルは、HA-Tyrハイドロゲルのハイドロゲル剛性とは無関係であった。この結果は、CD44-HA相互作用が、剛性非依存的にALDH1A1発現を増強することを示唆した。Sox-2の場合、mRNA発現レベルは、0.2および0.5 kPa HA-Tyrハイドロゲルにおいて有意に増加した。さらに、CSCマーカーの1つであるALDH1A1発現が増強されたことは、HA-Tyrハイドロゲル上に接着したMDA-MB-231細胞がCSC特性を誘導されることを示した。

【 0 0 8 4 】

したがって、HAに基づく細胞培養基質は、CSCの選択、培養、および維持にとって有用でありうることが示される。

【 0 0 8 5 】

実施例5

抗CD44抗体を用いてHA-Tyrハイドロゲル上でMDA-MB-231細胞接着の阻害を評価した。MDA-MB-231細胞をPBSによって洗浄して、トリプシン-EDTAを用いて細胞培養フラスコから収集した。剥離した細胞を、FBSを含まないRPMI-1640培地によって洗浄して、30 μg/ml 抗CD44抗体と共に氷中で1時間インキュベートした。抗CD44抗体を有しない細胞浮遊液を比較として用いた。FBSを含まないRPMI-1640培地によって洗浄後、培養培地中に細胞密度

1.0×10^5 個/ml のMDA-MB-231細胞250 μlを、上記と同様の方法で24ウェルプレートで調製した0.1 kPa HA-Tyrハイドロゲル上に播種した。細胞を、5%CO₂を含む37 °Cの湿潤大気中で1時間インキュベートした。その後、非付着細胞を有する培地を吸引して、ウェルをPBSによって3回洗浄した。HA-Tyrハイドロゲル上の付着細胞数を評価するために、上記のCyQUANT（登録商標）細胞増殖アッセイキットを用いて、蛍光測定を行った。

【0086】

図11に示されるように、抗CD44抗体による前処置により、無処置対照と比較して0.1 kPa HA-Tyrハイドロゲルに付着した細胞の百分率が劇的に減少した。したがって、HA-Tyrハイドロゲル上の細胞接着は、ほとんどがHA鎖とCD44受容体との相互作用によって媒介されたことが認められる。

10

【0087】

実施例6

癌細胞の選択および維持

癌細胞の選択を評価するために、HA-Tyr (0.1、0.2、0.5、1.0、および4.0 kPa) 上に付着したMDA-MB-231細胞におけるCD44s、CD44v3-10、CD44v8-10、EpCAM、およびALHD1A1遺伝子の転写レベルを分析した。培養培地で細胞密度 1.0×10^5 個/ml の乳癌細胞250 μlをハイドロゲル上に播種した。細胞を、5%CO₂を含む37 °Cの湿潤大気中で1時間インキュベートした後、PBS 500 μlによって3回洗浄して、非付着細胞を除去した。本実施例では、実施例4と比較して、ここで追加の洗浄段階を用いた。HA-Tyrハイドロゲルおよびポリスチレン上の細胞をそれぞれ、ヒアルロニダーゼ (1,000単位/ml) およびトリプシン-EDTAと共にインキュベートすることによって収集した。細胞沈降物をPBSによって2回洗浄して、mRNA発現レベルの測定のために用いた。

20

【0088】

4 kPa HA-Tyrハイドロゲル上でのCD44s、CD44v3-10、CD44v8-10、EpCAM、およびALHD1A1などのCSCマーカーのmRNA発現レベルは、ポリスチレン上より有意に高かった（図12 (a)）。特に、CD44v8-10レベルは、たとえ軟らかい (0.1および0.2 kPa) HA-Tyrハイドロゲル上でもポリスチレン上のレベルより有意に高かった。CD44v8-10は、活性酸素種 (ROS) に対する抵抗性の増強により乳癌の転移との相関が十分に研究されている。EpCAMおよびALDH1A1もまた、CSC特性と相関することが周知である。それゆえ、これらの結果は、調節可能な剛性を有するHA-Tyrハイドロゲルが、CSC細胞の選択にとって有用でありうるという仮説を支持する。さらに、4 kPa HA-Tyrハイドロゲル上のCD44v8-10のmRNA発現レベルは、14日後でも維持された（図12 (b)）。0.1および0.2 kPa HA-Tyrハイドロゲルの場合、CD44v8-10のmRNA発現レベルは、14日後では有意に増強された。これらの結果は、選択された癌細胞の特性が、HA-Tyrハイドロゲル上で維持されたのみならず、増強されたことを示している。さらに、追加の洗浄段階を用いることによって、CD44、EpCAMおよび他のマーカーを高度に発現する細胞が得られた。

30

【0089】

実施例7

癌細胞の化学療法抵抗性

化学療法抵抗性を評価するために、HA-Tyrゲル上のMDA-MB-231の細胞生存率を、シスプラチニンおよびドキソルビシンなどの従来の抗癌剤の存在下または非存在下で測定した。本明細書において、培養培地で 5.2×10^3 個/ml の細胞密度のMDA-MB-231細胞250 μlを、ゲル (0.2、0.5、1.0、2.5、および4.0 kPa) に播種した。培養培地を3日毎に交換した。細胞播種の10日後、10 ~ 100 μMシスプラチニンまたはドキソルビシンを、ゲル上の培養細胞に添加して、48時間インキュベートした。次に、細胞をPBSによって洗浄して、上記のようにAlamarBlue細胞生存率アッセイを用いて蛍光強度を測定した。抗癌剤の存在下での細胞生存率を無処置対照 (0 μM) に対して標準化した。

40

【0090】

シスプラチニンの存在下では、培養プレート上のMDA-MB-231細胞の生存率は、用量依存的に減少した（図13 (a) を参照されたい）。これに対し、HA-Tyrゲルは、細胞培養プレート

50

トと比較して試験濃度範囲ではるかにより高い細胞生存率を示した。特に、0.5および1 kPaのHA-Tyrの場合、細胞生存率は、100 mMシスプラチニンであってもほぼ100%であった。

【0091】

類似の傾向が、ドキソルビシンの存在下で観察された(図13(b))。0.2および0.5 kPaゲルでは、100 μMドキソルビシンの存在下であっても、およそ80%の生存率が維持されたが、細胞培養プレートおよびHA-Tyrゲル(2.5および4.0 kPa)ではそれぞれ、およそ10および20%の細胞生存率が観察された。これらの結果は、HA-Tyr、特に軟らかいゲルが、化学療法抵抗性を有意に誘導することを示した。

【0092】

用途

10

開示の方法は、所望の癌幹細胞または癌幹細胞を含む癌細胞株を培養するために細胞培養用途において用いることができる。

【0093】

開示の方法は、様々な癌細胞の複数または混合物から所望の癌幹細胞(または癌細胞株)を選択的に分離しそうすることによって単離するために用いられる。

【0094】

開示のゲルは、所望の癌幹細胞の選択および生育を支持するために用いられる。開示のゲルは、癌幹細胞と共に、癌幹細胞がそれに対して化学療法抵抗性である抗癌剤、または癌幹細胞に対して治療効果を有する抗癌剤を決定するための、癌治療に関する薬物スクリーニングプラットフォームとして用いられる。

20

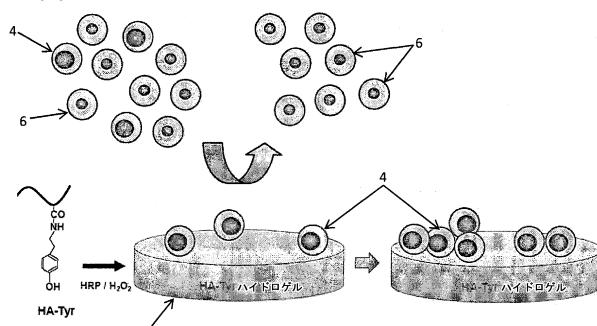
【0095】

開示の方法およびゲルは、受容体-リガンド結合によって所望のマーカーを含む癌幹細胞を選択的に単離するために用いられる。

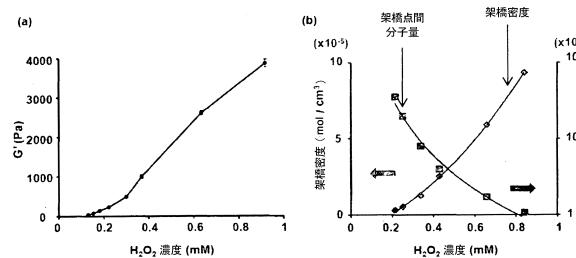
【0096】

本発明の様々な他の改変および適応が、前述の開示を読むことによって当業者に明らかとなるが、それらも本発明の精神および適用範囲に含まれ、そのような全ての改変および適応が添付の特許請求の範囲の適用範囲に含まれると意図されることは明白であろう。

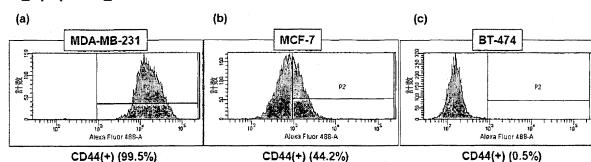
【図1】



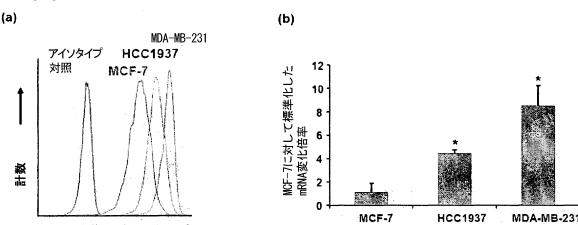
【図2】



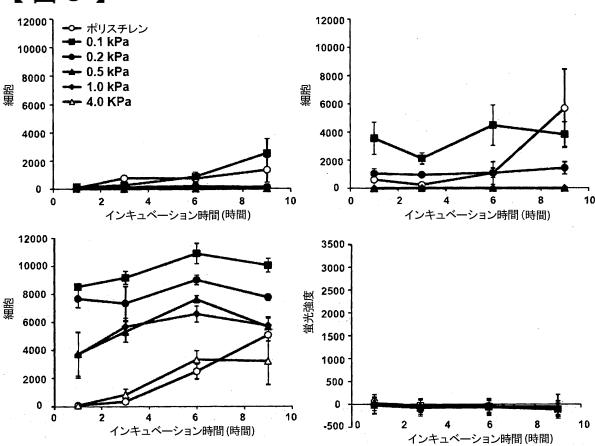
【図3】



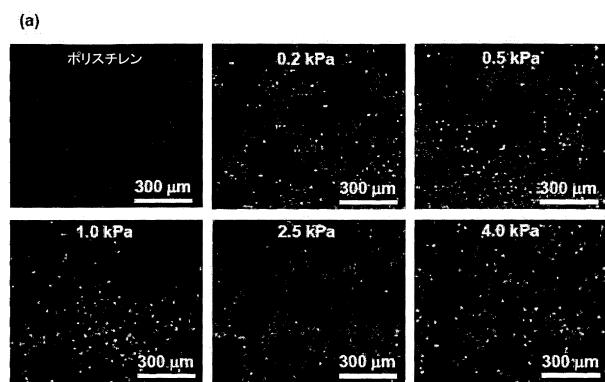
【図4】



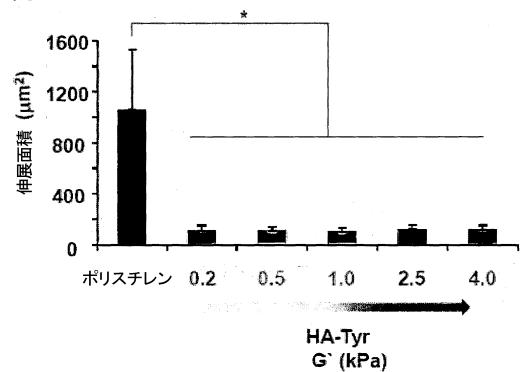
【図5】



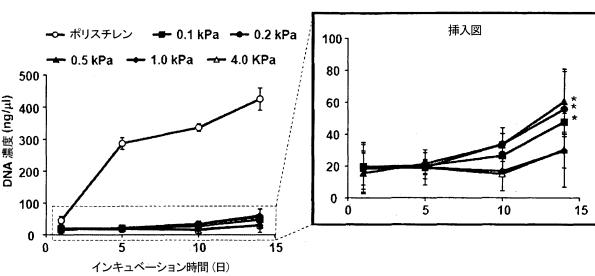
【図6】



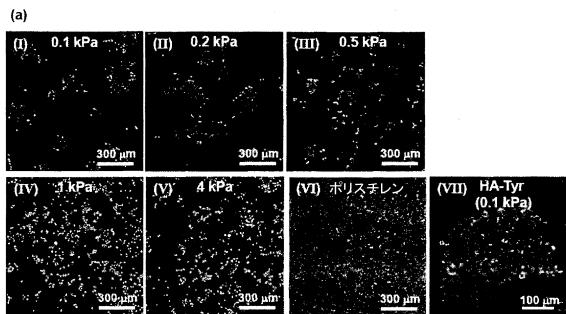
(b)



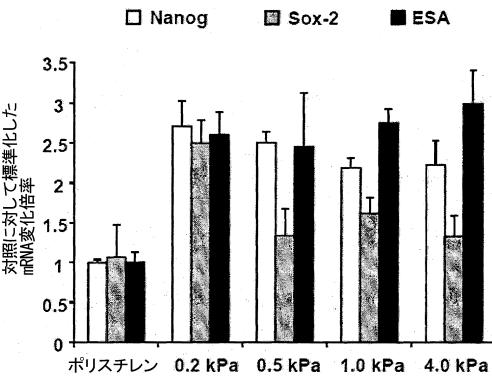
【図7】



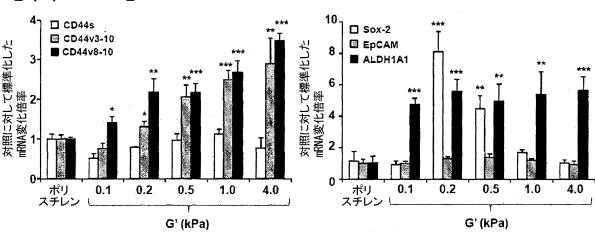
【図8】



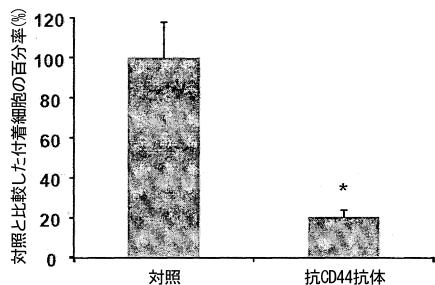
【図9】



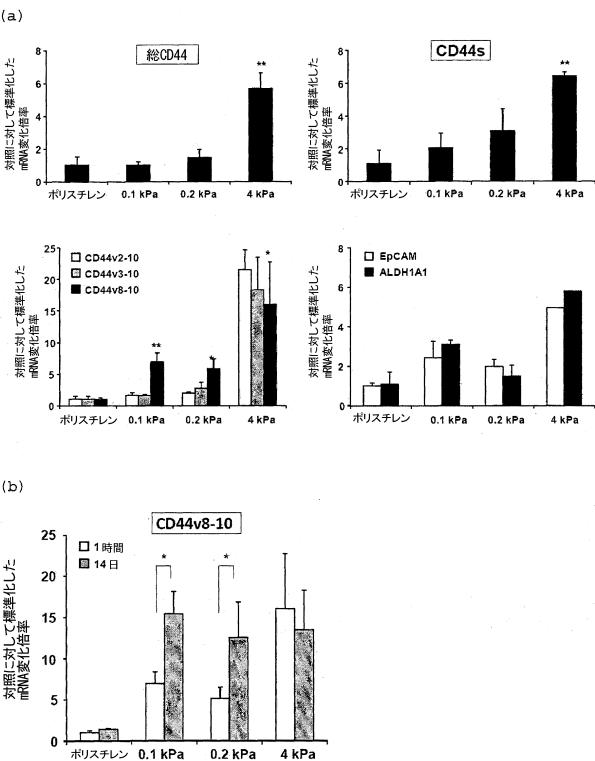
【図10】



【図11】



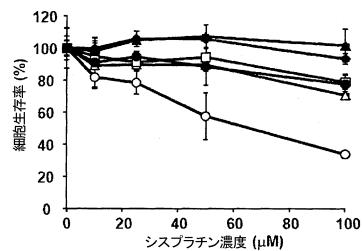
【図12】



【図 1 3】

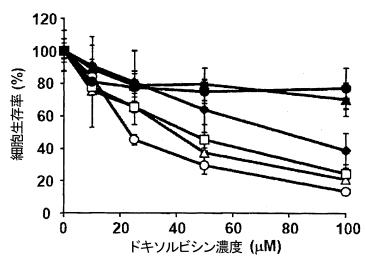
(a)

—○— ポリスチレン —●— 0.2 kPa —▲— 0.5 kPa —◆— 1.0 kPa —□— 2.5 kPa —△— 4.0 kPa



(b)

—○— ポリスチレン —●— 0.2 kPa —▲— 0.5 kPa —◆— 1.0 kPa —□— 2.5 kPa —△— 4.0 kPa



フロントページの続き

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 栗沢 元一
シンガポール共和国 シンガポール ザ ナノス バイオポリス ウェイ 31 #04-01
インスティテュート オブ バイオエンジニアリング アンド ナノテクノロジー内
(72)発明者 山下 敦
シンガポール共和国 シンガポール ザ ナノス バイオポリス ウェイ 31 #04-01
インスティテュート オブ バイオエンジニアリング アンド ナノテクノロジー内

審査官 高山 敏充

(56)参考文献 特表2011-522817 (JP, A)
国際公開第2012/168930 (WO, A2)
特表2010-532166 (JP, A)
Biochemistry Research International, 2012, Vol. 2012, Article ID 346972, pp.1-11
Biomaterials, 2012, Vol. 33, pp.3835-3845
Hepatology. 2011 April ; 53(4):1192-1205

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)