



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113748213 A

(43) 申请公布日 2021. 12. 03

(21) 申请号 202080017694.3

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

(22) 申请日 2020.03.27

代理人 周莎

(30) 优先权数据

2019-066625 2019.03.29 JP

(51) Int.Cl.

C12Q 1/02 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12Q 1/6851 (2006.01)

2021.08.30

G01N 33/15 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

G01N 33/50 (2006.01)

PCT/JP2020/015255 2020.03.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/204149 JA 2020.10.08

(71) 申请人 公立大学法人横滨市立大学

地址 日本神奈川县

申请人 武田药品工业株式会社

(72) 发明人 武部贵则 佐伯宪和 仁尾泰德

川上绘理

权利要求书1页 说明书17页

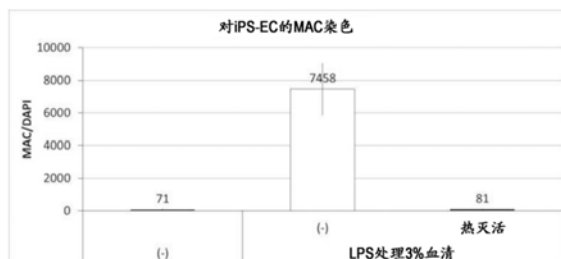
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

筛选方法及毒性评价方法

(57) 摘要

本发明提供以与补体相关联的细胞杀伤性标志物作为指标,筛选补体过度激活相关性疾病的治疗药的方法,所述方法包括:步骤(1a),向从干细胞制备的细胞添加补体,使与补体相关联的细胞杀伤性标志物形成;和步骤(2a),添加治疗药候选物质,选择使该细胞杀伤性标志物的量减少的物质。



1. 以与补体相关联的细胞杀伤性标志物作为指标, 筛选补体过度激活相关性疾病的治疗药的方法, 所述方法包括以下步骤:

步骤 (1a), 向从干细胞制备的细胞添加补体, 使与补体相关联的细胞杀伤性标志物形成; 和

步骤 (2a), 添加治疗药候选物质, 选择使该细胞杀伤性标志物的量减少的物质。

2. 如权利要求1所述的方法, 所述方法包括在步骤 (1a) 中进一步添加补体激活因子。

3. 以与补体相关联的细胞杀伤性标志物作为指标, 对被测物质的由补体过度激活导致的细胞杀伤性进行评价的方法, 所述方法包括以下步骤:

步骤 (1b), 向从干细胞制备的细胞添加被测物质;

步骤 (2b), 测定与补体相关联的细胞杀伤性标志物的生成量; 和

步骤 (3b), 根据该细胞杀伤性标志物的生成量对由补体过度激活导致的细胞杀伤性进行评价。

4. 如权利要求1或3所述的方法, 其中, 从干细胞制备的细胞为血管内皮细胞、肝窦内皮细胞、神经细胞、少突胶质细胞、肝细胞或视网膜色素上皮细胞。

5. 用于筛选补体过度激活相关性疾病的治疗药的试剂盒, 其包含:

(i-a) 从干细胞制备的细胞;

(ii-a) 补体或者补体供给源; 和

(iii-a) 对与补体相关联的细胞杀伤性标志物进行检测的试剂。

6. 用于评价由补体过度激活导致的细胞杀伤性的试剂盒, 其包含:

(i-b) 从干细胞制备的细胞; 和

(ii-b) 对与补体相关联的细胞杀伤性标志物进行检测的试剂。

筛选方法及毒性评价方法

技术领域

[0001] 本发明涉及以与补体相关联的细胞杀伤性标志物作为指标,对补体过度激活相关性疾病的治疗药进行筛选的方法。此外,本发明还涉及以与补体相关联的细胞杀伤性标志物作为指标,对被测物质的由补体过度激活导致的细胞杀伤性进行评价的方法。

背景技术

[0002] 补体不仅是自然免疫的重要效应子,还涉及获得性免疫应答、炎症、凝血、肿瘤发展的促进。作为基于补体激活的异物排斥机制,可举出调理作用、产生过敏毒素(C5a,C3a)、形成作为终产物的膜攻击复合物(membrane attack complex of complements;MAC)。补体的激活一方面作为生物防御发挥功能,另一方面,具有在病理状态下发挥生物体杀伤性的危险性。例如,在肾脏中,补体在肾组织上沉积会引起膜增生性肾小球肾炎(MPGN)、链球菌感染后急性肾小球肾炎(PSAGN)、狼疮性肾炎。此外,通过激活补体,形成膜攻击复合物(MAC),MAC的形成使得在细胞膜内产生结构孔。结果导致了渗透压流体的移动和阳离子的流入,并发生细胞死亡。如上所述,由于补体激活的异常可引起各种疾病,因此,一直以来,以补体激活作为指标,着眼于溶血作用,对与该补体的过度激活相关的疾病的治疗药进行筛选,但这些现有方法中,并未对由于补体激活而实际发生的血管损伤等细胞损伤加以考虑。

[0003] 另外,非专利文献1中报道,MAC的沉积发生在各种癌组织中,使用正常人血清(NHS)能够激活骨肉瘤细胞中的补体体系的旁路途径,并且使促进人内皮细胞的血管新生的生长因子的产生得到增强。然而,该文献还报道,除人骨肉瘤上皮细胞U2-OS以外,在HUVEC(人脐带静脉内皮细胞)等中,于“正常人血清”和“经加热处理而灭活的人血清”条件下未确认到MAC生成水平的差异。

[0004] 现有技术文献

[0005] 非专利文献

[0006] 非专利文献1:Jeon H.等,Sci Rep(2018),8(1):5415

[0007] 发明概述

[0008] 发明所要解决的课题

[0009] 本发明的课题为提供以与补体相关联的细胞杀伤性标志物作为指标对补体过度激活相关性疾病的治疗药进行筛选的方法、用于该筛选的试剂盒。

[0010] 用于解决课题的手段

[0011] 本申请的发明人发现,使从人工多能干细胞分化诱导的血管内皮细胞与含有补体的正常人血清(NHS)或者与为了使补体灭活而进行了加热处理的NHS接触后,基于补体活性的有无,膜攻击复合物(MAC)沉积量产生显著差异。该见解与非专利文献1中公开的利用人脐带静脉内皮细胞的情况的结果不同,这是出乎意料的。并且,还发现使用有活性的补体的情况下的MAC的沉积量随依库珠单抗(Eculizumab)的施予而剂量依赖性地减少,其中,所述单抗是针对补体激活级联的末端的补体成分C5的抗体,也可用作非典型溶血性尿毒综合征

(aHus) 的治疗药。基于上述见解,本申请的发明人对血管内皮细胞以外的多种细胞也以与血管内皮细胞同样的方式从人工多能干细胞进行分化诱导,并使用该细胞与补体实施MAC的沉积实验,结果发现无论是何种细胞,有活性的补体均使MAC发生沉积,以及,该MAC的沉积量随依库珠单抗的施予而剂量依赖性地减少。本申请的发明人基于上述发现不断进行研究,从而完成了本发明。

[0012] 即,本发明为了解决上述课题,提供了以下[1]~[6]。

[0013] [1]

[0014] 以与补体相关联的细胞杀伤性标志物作为指标,筛选补体过度激活相关性疾病的治疗药的方法,所述方法包括以下步骤:

[0015] 步骤(1a),向从干细胞制备的细胞添加补体,使与补体相关联的细胞杀伤性标志物形成;和

[0016] 步骤(2a),添加治疗药候选物质,选择使该细胞杀伤性标志物的量减少的物质。

[0017] [2]

[0018] 如上述[1]所述的方法,所述方法包括在步骤(1a)中进一步添加补体激活因子。

[0019] [3]

[0020] 以与补体相关联的细胞杀伤性标志物作为指标,对被测物质的由补体过度激活导致的细胞杀伤性进行评价的方法,所述方法包括以下步骤:

[0021] 步骤(1b),向从干细胞制备的细胞添加被测物质;

[0022] 步骤(2b),测定与补体相关联的细胞杀伤性标志物的生成量;和

[0023] 步骤(3b),根据该细胞杀伤性标志物的生成量对由补体过度激活导致的细胞杀伤性进行评价。

[0024] [4]

[0025] 如上述[1]或[3]所述的方法,其中,从干细胞制备的细胞为血管内皮细胞、肝窦内皮细胞、神经细胞、少突胶质细胞、肝细胞或视网膜色素上皮细胞。

[0026] [5]

[0027] 用于筛选补体过度激活相关性疾病的治疗药的试剂盒,其包含:

[0028] (i-a) 从干细胞制备的细胞;

[0029] (ii-a) 补体或者补体供给源;和

[0030] (iii-a) 对与补体相关联的细胞杀伤性标志物进行检测的试剂。

[0031] [6]

[0032] 用于评价由补体过度激活导致的细胞杀伤性的试剂盒,其包含:

[0033] (i-b) 从干细胞制备的细胞;和

[0034] (ii-b) 对与补体相关联的细胞杀伤性标志物进行检测的试剂。

[0035] 发明的效果

[0036] 根据本发明,提供了以与补体相关联的细胞杀伤性标志物作为指标,筛选补体过度激活相关性疾病的治疗药的方法。已经确认了上述疾病的已知的治疗药使得上述细胞杀伤性标志物的形成减少,因此,通过以该细胞杀伤性标志物作为指标,可期待反映了实际上在生物体内生成的补体导致的血管损伤的影响、可靠度更高的筛选。

附图说明

[0037] 图1:图1示出了从人多能干细胞制备的血管内皮细胞中的、在含有补体供给源(人血清和类器官的培养上清液)的培养基中培养后的MAC的形成。图中,-示出了未使用补体供给源的实验的结果,LPS处理3%血清(3% serum with LPS)示出了使用(对3%人血清和类器官的培养上清液进行LPS处理而得的物质)作为补体供给源的实验的结果。热灭活示出了将该补体供给源在55°C下静置30分钟至60分钟而失活的物质的结果。MAC免疫染色结果进行定量,并将以同样经过定量的核染色(DAPI)校正后的结果作为结果使用。

[0038] 图2:图2示出了从人多能干细胞制备的血管内皮细胞中的、在含有补体供给源(人血清和类器官的培养上清液)的培养基中培养后的MAC的形成。图中,-示出了未使用补体供给源的实验的结果,并示出了将各种浓度的C5抗体依库珠单抗(Eculizumab)添加至LPS处理3%血清(对3%人血清和类器官的培养上清液进行LPS处理而得的物质)中而使MAC形成的实验的结果。将MAC免疫染色结果进行定量,并将以同样经过定量的核染色(DAPI)校正后的结果作为结果使用。

[0039] 图3:图3示出了用于检测将从人多能干细胞制备的各种细胞(神经细胞、肝细胞和视网膜色素上皮细胞)在含有补体供给源(人血清和类器官的培养上清液)的培养基中培养后的MAC形成的免疫染色图。图中,-示出了未使用补体供给源的实验的结果,+NHS示出了使用补体供给源的实验的结果。

[0040] 图4:图4示出了通过施予已知会引起肝窦内皮细胞损伤的奥沙利铂(Oxaliplatin),细胞数量显著减少(A),而由人血清导致的MAC形成量增加(B)。

具体实施方式

[0041] -1、筛选补体过度激活相关性疾病的治疗药的方法-

[0042] 本发明提供了以与补体相关联的细胞杀伤性标志物(下文中有时被简称为“细胞杀伤性标志物”)作为指标,筛选补体过度激活相关性疾病的治疗药的方法(下文有时被称为“本发明的筛选方法”)。

[0043] 本发明的筛选方法包括:

[0044] 步骤(1a) 向从干细胞制备的细胞添加补体,使细胞杀伤性标志物形成;和

[0045] 步骤(2a) 添加治疗药候选物质,选择使该细胞杀伤性标志物的量减少的物质。

[0046] 在本说明书中,“包含(comprise/comprises)或者含有(comprising)”意指包含与该词句接续的要素,但不限于此。因此,其暗示了包含与该词句接续的要素,但并未暗示排除任何其他要素。

[0047] 作为补体过度激活相关性疾病,可举出例如非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)、阿兹海默病、多发性硬化症(MS)、非酒精性脂肪肝(NASH)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、产志贺毒素大肠杆菌肠出血性大肠溶血性尿毒综合征(Shiga toxin-producing Escherichia coli-hemolytic uremic syndrome)(STEC-HUS)、急性体液排斥反应(AHR)(急性抗体介导排斥反应(AMR))、重症肌无力、视神经脊髓炎、膜增殖性肾小球肾炎(MPGN)、致密物沉积病(DDD)、冷凝集素病、恶性抗磷脂抗体综合征(CAPS)等。

[0048] 在本说明书中,作为细胞杀伤性标志物,可举出例如MAC、乳酸脱氢酶(LDH)、细胞介导的细胞损伤(BrdU摄入)、细胞内ATP、DNA片段化、Caspase-3/7、8、9还原能力(NADH等)

等。另外,在本说明书中,形成细胞杀伤性标志物意指较之与补体进行接触前的细胞、接触失活的补体的细胞、或不与补体接触的细胞而言,细胞杀伤性标志物(例如:MAC)的形成(沉积)量增加。

[0049] 如下述实施例所示,证实了在从干细胞制备而得的多种细胞中,具有活性的补体使得MAC沉积发生,以及该MAC的沉积量由于依库珠单抗的施予而剂量依赖性地减少。该结果不同于非专利文献1中公开的人脐带静脉内皮细胞的结果。产生了上述差异的理由可能在于,非专利文献1中使用的细胞群是从生物体分离的细胞群,因此根据分离方法而成为具有多种特性的细胞混合存在的非均质细胞群。由于可以通过从干细胞制备所使用的细胞来避免上述非均质的问题,因此,只要是从小于干细胞制备的细胞种类即可适用于本发明的筛选方法,没有特殊限定。作为所述细胞种类,可示例例如神经细胞、少突胶质细胞、红细胞、单核细胞(mononuclear cell)(例如:淋巴细胞(NK细胞、B细胞、T细胞、单核细胞(monocyte)、树状细胞等))、粒细胞(例如:嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞)、巨核细胞)、上皮细胞(例如:视网膜色素上皮细胞等)、内皮细胞(例如:血管内皮细胞、肝窦内皮细胞等)、肌细胞、成纤维细胞(例如:皮肤细胞等)、毛细胞、肝细胞、胃粘膜细胞、肠细胞、脾细胞、胰腺细胞(例如:胰腺外分泌细胞等)、脑细胞、肺细胞、肾细胞和脂肪细胞等分化后的细胞,或者它们的未成熟细胞等。其中,优选血管内皮细胞、神经细胞、少突胶质细胞、肝细胞、视网膜色素上皮细胞及其它们的未成熟细胞。

[0050] 从干细胞制备(诱导分化)上述细胞的方法可以根据靶细胞的种类,适当选择本身已知的方法。例如,作为制备血管内皮细胞的方法,可举出例如Yamashita J.等,Nature,408(6808):92-96(2000)中记载的方法、Narazaki G.等,Circulation,29;118(5):498-506(2008)中记载的方法等;作为制备神经细胞的方法,可举出例如Yan Y.等,Stem Cells Trans Med,2:862-870(2013)中记载的方法、Kondo T.,等,Cell Stem Cell,12:487-496(2013)中记载的方法、W02015/020234中记载的方法、Doi D.,等,Stem Cell Reports,2(3):337-50(2014)中记载的方法等;作为制备少突胶质细胞的方法,可举出例如Kawabata S.等,Stem Cell Reports,6(1):1-8(2016)中记载的方法等;作为制备肝细胞的方法,可举出例如Cai J.等,Hepatology,45:1229-1239(2007)中记载的方法、Cai J.等,Hepatology,45:1229-1239(2007)中记载的方法等;作为制备视网膜色素上皮细胞的方法,可举出例如Yan Y.等,Stem Cells Trans Med,2:862-870(2013)中记载的方法、W0 2015053375中记载的方法;作为制备造血祖细胞的方法,可举出例如W02013/075222中记载的方法、W02016/076415中记载的方法、Liu S.等,Cytotherapy,17:344-358(2015)中记载的方法等;作为制备红细胞或者红细胞祖细胞的方法,可举出例如Miharada K.等,Nat.Biotechnol.,24:1255-1256(2006)中记载的方法、Kurita R.,等,PLoS One,8:e59890(2013)中记载的方法等;作为制备巨核细胞或者血小板的方法,可举出例如Yamamizu K.等,J.Cell Biol.,189:325-338(2010)中记载的方法、Laflamme M.等,Nat.Biotechnol.,25:1015-1024(2007)中记载的方法等;作为制备T细胞的方法,可举出例如W02016/076415中记载的方法、W02017/221975中记载的方法等;作为制备骨骼肌细胞的方法,可举出例如W02013/073246中记载的方法、Uchimura T.等,Stem Cell Research,25:98-106(2017)中记载的方法、Shoji E.等,Science Reports,5:12831(2015)中记载的方法等;作为制备心肌细胞的方法,可举出例如Shimoji K.,等,Cell Stem Cell,6:227-237(2010)中记载的方法等。

[0051] 具体而言,为了从干细胞制备血管内皮细胞,例如,将干细胞在含有血清替代物(例如:B-27)、BMP4和GSK-3抑制剂(例如:CHIR99021)的培养基中培养、诱导为中胚层谱系细胞,然后将该细胞在含有VEGF和Folskolin的培养基中培养,由此可以制备血管内皮细胞。另外,为了从干细胞制备肝细胞,在含有Wnt蛋白质(例如:Wnt3a)和激活素A的培养基中进行培养而诱导为内胚层谱系细胞,然后将该细胞在含有血清替代物(B-27)和FGF2的培养基中培养,由此可以制备肝细胞。

[0052] 作为上述“干细胞(stem cell)”,可举出例如多能干细胞(pluripotent stem cell)。在本说明书中,“多能干细胞(pluripotent stem cell)”是指如下干细胞,所述干细胞能够分化为生物体的具有各种不同形态、功能的组织、细胞,具有能分化为三胚层(内胚层、中胚层、外胚层)中任一谱系的细胞的能力。作为多能干细胞,没有特殊限定,可举出例如人工多能干细胞(在本说明书中有时也被称为“iPS细胞”)、胚胎干细胞(ES细胞)、来源于通过核移植得到的克隆胚胎的胚胎干细胞(nuclear transfer Embryonic stem cell: ntES细胞)、多能性生殖干细胞、胚胎生殖干细胞(EG细胞)等。在本说明书中,“专能干细胞(multipotent stem cell)”是指具有能向多个有限数量的谱系的细胞分化的能力的干细胞。另外,作为“专能干细胞(multipotent stem cell)”,可举出例如牙髓干细胞、来源于口腔粘膜的干细胞、毛囊干细胞、来源于培养成纤维细胞、骨髓干细胞的成体干细胞等。优选的多能干细胞(pluripotent stem cell)为ES细胞和iPS细胞。上述多能干细胞为ES细胞或者来源于人胚胎的任意细胞时,该细胞可以是破坏胚胎而制得的细胞,也可以是不破坏胚胎而制得的细胞,优选为不破坏胚胎而制得的细胞。上述干细胞优选来源于哺乳动物(例如:小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、狗、猴子、猩猩、黑猩猩、人),更优选来源于人。

[0053] “人工多能干细胞”是指,通过将特定因子(核重编程因子)导入哺乳动物体细胞或者未分化干细胞进行重编程而得到的细胞。目前,“人工多能干细胞”存在各种细胞,除了由山中通过向小鼠成纤维细胞导入Oct3/4 • Sox2 • Klf4 • c-Myc这4种因子而建立的iPS细胞(Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126:663-676)以外,也可使用将同样的4种因子导入人成纤维细胞而建立的来源于人细胞的iPS细胞(Takahashi K, Yamanaka S.等, Cell, (2007) 131:861-872.)、导入上述4种因子之后以Nanog的表达作为指标分选而建立的Nanog-iPS细胞(Okita, K., Ichisaka, T., 和Yamanaka, S. (2007). Nature 448, 313-317.)、通过不含c-Myc的方法制备的iPS细胞(Nakagawa M, Yamanaka S.等, Nature Biotechnology, (2008) 26, 101-106)、通过无病毒方法导入6种因子而建立的iPS细胞(Okita K等, Nat. Methods 2011May; 8(5):409-12, Okita K等, Stem Cells. 31(3):458-66.)。另外,也可使用由Thomson等制备的导入OCT3/4 • SOX2 • NANOG • LIN28这4种因子而建立的人工多能干细胞(Yu J., Thomson JA.等, Science (2007) 318:1917-1920.)、由Daley等制备的人工多能干细胞(Park IH, Daley GQ.等, Nature (2007) 451:141-146)、由樱田等制备的人工多能干细胞(日本特开2008-307007号)等。

[0054] 此外,也可使用已公开的全部论文(例如,Shi Y., Ding S.等, Cell Stem Cell, (2008) Vol3, Issue 5, 568-574; Kim JB., Scholer HR.等, Nature, (2008) 454, 646-650; Huangfu D., Melton, DA.等, Nature Biotechnology, (2008) 26, No 7, 795-797)、或专利(例如,日本特开2008-307007号、日本特开2008-283972号、US2008-2336610、US2009-047263、W02007-069666、W02008-118220、W02008-124133、W02008-151058、W02009-006930、W02009-

006997、W02009-007852) 中记载的该领域中已知的人工多能干细胞中的任何。作为人工多能细胞株,可利用NIH、理研、京都大学等建立的各种iPS细胞株。例如,为人iPS细胞株时,可举出理研的HiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株、京都大学的253G1株、201B7株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株等。

[0055] ES细胞为从人、小鼠等哺乳动物的早期胚胎(例如囊胚)的内细胞团建立的、具有多能性和基于自复制的增殖能力的干细胞。ES细胞是1981年在小鼠中发现的(M.J.Evans和M.H.Kaufman(1981),*Nature* 292:154-156),之后,在人、猴子等灵长类中也建立了ES细胞株(J.A.Thomson等(1998),*Science* 282:1145-1147;J.A.Thomson等(1995),*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,92:7844-7848;J.A.Thomson等(1996),*Biol.Reprod.*,55:254-259;J.A.Thomson和V.S.Marshall(1998),*Curr.Top.Dev.Biol.*,38:133-165)。ES细胞可以通过从对象动物的受精卵的囊胚中取出内细胞团、将内细胞团在成纤维细胞的饲养层上培养来建立。对于建立和维持人和猴子的ES细胞的方法,记载于例如USP5,843,780;Thomson JA等(1995),*Proc Natl.Acad.Sci.U S A*.92:7844-7848;Thomson JA等(1998),*Science*.282:1145-1147;Suemori H.等(2006),*Biochem.Biophys.Res.Commun.*,345:926-932;Ueno M.等(2006),*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,103:9554-9559;Suemori H.等(2001),*Dev.Dyn.*,222:273-279;Kawasaki H.等(2002),*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,99:1580-1585;Klimanskaya I.等(2006),*Nature*.444:481-485等中。或者,ES细胞也可以仅使用囊胚期之前的卵裂期胚胎的单个分裂球建立(Chung Y.等(2008),*Cell Stem Cell* 2:113-117),还可以使用停止了发育的胚胎建立(Zhang X.等(2006),*Stem Cells* 24:2669-2676.)。作为“ES细胞”,为小鼠ES细胞时,可使用inGenious targeting laboratory公司、理研(理化学研究所)等建立的各种小鼠ES细胞株,为人ES细胞时,可使用威斯康星大学、NIH、理研、京都大学、日本国家儿童健康与发展中心和Cellartis公司等建立的各种人ES细胞株。例如,为人ES细胞株,可使用ESI Bio公司出售的CHB-1~CHB-12株、RUES1株、RUES2株、HUES1~HUES28株等、WiCell Research出售的H1株、H9株等、理研出售的KhES-1株、KhES-2株、KhES-3株、KhES-4株、KhES-5株、SSES1株、SSES2株、SSES3株等。

[0056] nt ES细胞是来源于通过核移植技术制备的克隆胚胎的ES细胞,具有与来源于受精卵的ES细胞几乎相同的特性(Wakayama T.等(2001),*Science*,292:740-743;S.Wakayama等(2005),*Biol.Reprod.*,72:932-936;Byrne J.等(2007),*Nature*,450:497-502)。即,通过将未受精卵的核替换为体细胞的核而得到克隆胚胎,从来源于所述克隆胚胎的囊胚的内细胞团建立的ES细胞为nt ES(nuclear transfer ES)细胞。为了制备nt ES细胞,使用了核移植技术(Cibelli J.B.等(1998),*Nature Biotechnol.*,16:642-646)和ES细胞制备技术(如上所述)的组合(若山清香等(2008),*实验医学*,第26卷,第5期(增刊),第47~52页)。在核移植中,通过将体细胞的核注入哺乳动物的去核的未受精卵中,培养数小时,可以实现重编程。

[0057] 多能生殖干细胞为来源于生殖干细胞(GS细胞)的多能干细胞。该细胞与ES细胞同样能够诱导分化为各种谱系的细胞,并具有例如移植到小鼠囊胚后能创出嵌合小鼠等性质(Kanatsu-Shinohara M.等(2003)*Biol.Reprod.*,69:612-616;Shinohara K.等(2004),*Cell*,119:1001-1012)。其在含有胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF))的培养液中能够进行自复制,并且能够通过在与ES细胞相同

的培养条件下重复传代来获得生殖干细胞(竹林正则等(2008),实验医学,第26卷,第5期(增刊),第41~46页,羊土社(日本东京))。

[0058] EG细胞是从胚胎期(viviparous stage)的原始生殖细胞建立的、具有与ES细胞相同的多能性的细胞。可以通过在存在LIF、bFGF、干细胞因子(stem cell factor)等物质的条件下培养原始生殖细胞来建立(Matsui Y.等(1992),Cell,70:841-847;J.L.Resnick等(1992),Nature,359:550-551)。

[0059] -使细胞杀伤性标志物形成的步骤(步骤(1a)) -

[0060] 作为用于上述步骤(1a)中的补体,只要能够形成细胞杀伤性标志物即可,没有特殊限定,可举出例如血清(例如:人血清、牛血清、马血清、绵羊血清、山羊血清、猪血清、羊驼血清、狗血清、鸡血清、驴血清、猫血清、兔血清、豚鼠血清、仓鼠血清、大鼠血清、小鼠血清等)中所含的补体、肝脏、血管内皮细胞(包括器官的类器官)的培养上清液中所含的补体、或各补体成分(例如:C1q、C1r、C1s、C2、C4、C3、C3a、C5s、C3b、C5a、C5b6789及它们的组合等)等。下文中,有时将上述血清和培养上清液等含有补体的溶液等称为“补体供给源”。本申请发明人确认了通过与多种补体供给源组合,较之与各单一类型组合的情况而言促进细胞杀伤性标志物的形成,因此,优选将多种补体或者补体供给源组合(例如:血清和器官类器官的培养上清液的组合)。

[0061] 本步骤中使用的补体或者补体供给源可以通过本身已知的蛋白质合成方法(例如:固相合成法、液相合成法等)、自生物体分离的方法来制得,也可以使用市售的商品。或者,通过将编码补体的基因导入大肠杆菌等宿主细胞、使其产生蛋白质,也可以获得补体。编码补体的基因可以通过下述方法得到:使用从具有该基因的细胞提取的基因组DNA,或从提取的mRNA制备cDNA,并以该DNA作为模板通过PCR法扩增所期望的长度的核酸;或者,通过使用市售的DNA/RNA自动合成仪等进行化学合成。如此得到的蛋白质可以通过已知的纯化方法、例如溶剂提取、蒸馏、柱层析、液相层析、重结晶、它们的组合等来进行纯化分离。

[0062] 另外,本申请发明人之前已确认了人工制备的类器官分泌补体。因此,上述类器官的培养上清液也可以作为补体供给源使用。作为所述类器官,可举出例如从血管内皮细胞单独制备的三维结构体、从血管内皮细胞和肝细胞制备的三维结构体(其特征是在于在肝细胞间具有由血管内皮细胞形成的脉管网络)等。这些类器官通常通过本身已知的培养法(例如,Nature Cell Biology 18,246-254(2016))制备。具体而言,作为类器官的制备方法,可举出例如Nahmias Y.等,Tissue Eng.,12(6),2006,pp.1627-1638中记载的方法等。

[0063] 用于制备上述类器官的血管内皮细胞可以是造血性血管内皮细胞(hemogenic endothelial cell;HEC),也可以是非造血性血管内皮细胞(non-hemogenic endothelial cell;non-HEC)。HEC是能够产生造血干细胞(具有造血能力)的血管内皮细胞,也被称为血细胞生产型血管内皮细胞。另外,可以使用HEC或者non-HEC中的任一者,也可以使用HEC和non-HEC这两者,也可以使用它们的祖细胞,或者还可以使用HEC、non-HEC、及它们的祖细胞的任意组合。作为上述血管内皮细胞的祖细胞,可举出存在于从Flk-1(CD309、KDR)阳性的血管内皮细胞的祖细胞(例如,侧板中胚层谱系细胞)至HEC细胞为止的分化过程中的细胞(参见Cell Reports 2,553-567,2012)。

[0064] 用于所述类器官制备的肝细胞可以是分化后的肝细胞(分化肝细胞),也可以是决定了向肝细胞分化的命运但尚未分化为肝细胞的细胞(未分化肝细胞)、即所谓肝祖细胞

(例如,肝脏内胚层细胞)。分化肝细胞或者未分化肝细胞可以从生物体采集(从生物体内的肝脏分离)的细胞,也可以是使ES细胞、iPS细胞等多能干细胞、肝祖细胞、其他具有向肝细胞分化的能力的细胞分化而得的细胞。能够向肝细胞分化的细胞可以根据例如K. Si-Taiyeb等,Hepatology,51(1):297-305(2010),T.Touboul等,Hepatology.51(5):1754-65.(2010)进行制备。

[0065] 另外,在上述类器官的制备中,可以使用间充质干细胞。所述间充质干细胞可以是分化后的细胞(分化间充质细胞),也可以是决定了向间充质细胞分化的命运但尚未分化为间充质细胞的细胞(未分化间充质细胞)、即所谓间充质干细胞。本领域技术人员所使用的间充质干细胞(mesenchymal stem cells)、间充质祖细胞(mesenchymal progenitor cells)、间充质细胞(mesenchymal cells)(R.Peters等,PLoS One.30;5(12):e15689.(2010))等术语所指代的对象相当于本说明书中的“间充质细胞”。

[0066] 对用于制备上述类器官的血管内皮细胞和肝细胞的细胞数量的比率而言,可以基于例如使回收的培养上清液中所含的成分符合期望等观点而在合适的范围进行调整。在本发明的一个实施方案中,血管内皮细胞和肝细胞的细胞数量的比率(血管内皮细胞:肝细胞)典型的为1:0.1~5,优选为1:0.1~2。在使用间充质干细胞的情况下,也可以适当调整所述比例,作为优选的实施方式,可使用7:10:1作为细胞数量的比率(血管内皮细胞:肝细胞:干细胞)。

[0067] 制备类器官时,优选使用将用于血管内皮细胞的培养基与用于肝细胞的培养基(培养液)按合适的比例(例如1:1)混合而成的类器官用培养基。作为用于血管内皮细胞的培养基,可以含有选自例如DMEM/F-12(Gibco)、Stempro-34 SFM(Gibco)、Essential 6培养基(Gibco)、Essential 8培养基(Gibco)、EGM(Lonza)、BulletKit(Lonza)、EGM-2(Lonza)、BulletKit(Lonza)、EGM-2 MV(Lonza)、VascuLife EnGS Comp Kit(LCT)、Human Endothelial-SFM Basal Growth Medium(Invitrogen)、人微小血管内皮细胞增殖培养基(TOYOBO)等。用于血管内皮细胞的培养基可含有选自B27Supplements(GIBCO)、BMP4(骨形成因子4)、GSK β 抑制剂(例如CHIR99021)、VEGF(血管内皮细胞生长因子)、FGF2(成纤维细胞生长因子,Fibroblast Growth Factor(也称为bFGF(碱性成纤维细胞生长因子,basic fibroblast growth factor)))、Forskolin、SCF(干细胞因子,Stem Cell Factor)、TGF β 受体抑制剂(例如SB431542)、Flt-3L(Fms相关酪氨酸激酶3配体,Fms-related tyrosine kinase 3 ligand)、IL-3(白介素3)、IL-6(白介素6)、TPO(血小板生成素)、hEGF(重组人上皮细胞生长因子)、氢化可的松、抗坏血酸、IGF1、FBS(胎牛血清)、抗生素(例如,庆大霉素、两性霉素B)、肝素、L-谷氨酰胺、酚红、BBE等中的一种以上的添加物。这些添加物的添加量可以由本领域技术人员参考用于培养血管内皮细胞的常规培养条件而适当确定。

[0068] 作为用于肝细胞的培养基,可举出例如RPMI(Fujifilm)、HCM(Lonza)等。用于肝细胞的培养基可含有选自Wnt3a、激活素A、BMP4、FGF2、FBS(胎牛血清)、HGF(肝细胞增殖因子)、抑瘤素M(OSM)、地塞米松(Dex)等的一种以上的添加物。这些添加物的添加量可以由本领域技术人员参考用于培养肝细胞的常规培养条件而适当确定。或者,作为用于肝细胞的培养基,可使用含有选自抗坏血酸、BSA-FAF、胰岛素、氢化可的松和GA-1000中的至少一种的用于肝细胞的培养基、从HCM BulletKit(Lonza)中去除hEGF(重组人上皮细胞生长因子)而得的培养基、向RPMI1640(Sigma-Aldrich)中添加1%B27 Supplements(GIBCO)和10ng/

mL hHGF (Sigma-Aldrich) 而得的培养基、向将GM BulletKit (Lonza) 与从HCM BulletKit (Lonza) 中去除hEGF (重组人上皮细胞生长因子) 而得的培养基按1:1混合而得的混合物中添加地塞米松、抑瘤素M和HGF而得的培养基等。

[0069] 通过回收培养有以上述方法制备的类器官的培养基上清液,可以获得类器官的培养上清液。另外,所回收的培养上清液可以根据需要而进行浓缩。

[0070] 步骤(1a)中的、向从干细胞制备的细胞添加补体的方法、或使该细胞与补体接触的方法没有特殊限定,可以通过如下方法实施,例如,向培养有该细胞的培养基中添加补体或补体供给源,或者将该细胞移入或接种至预先添加有该补体或补体供给源的培养基中,等等。

[0071] 另外,细胞杀伤性标志物的形成没有特殊限定,可以通过例如在含有从干细胞制备的细胞和补体的培养基中培养该细胞来形成。作为通常在上述培养中使用的培养基,可举出例如BME培养基、BGJb培养基、CMRL 1066培养基、Glasgow MEM培养基、改良MEM (IMEM) 培养基、改良MDM (IMDM) 培养基、Medium 199培养基、Eagle MEM培养基、 α MEM培养基、DMEM培养基(高糖、低糖)、DMEM/F12培养基、Ham培养基、RPMI 1640培养基、Fischer's培养基、它们的混合培养基等。另外,可以使用上述的用于血管内皮细胞的培养基、用于肝细胞的培养基、类器官用培养基、或它们的混合培养基。

[0072] 除上述成分外,上述培养基可以根据需要添加氨基酸、L-谷氨酰胺、GlutaMAX (制品名)、非必需氨基酸、维生素、抗生素(例如,Antibiotic-Antimycotic(本说明书中,有时称为AA)、青霉素、链霉素、或它们的混合物)、抗菌剂(例如,两性霉素B)、抗氧化剂、丙酮酸、缓冲剂、无机盐类等。

[0073] 对于培养时间,只要能够形成细胞杀伤性标志物即可,没有特殊限定,例如优选0.5小时~96小时,更优选4小时~48小时。培养温度也没有特殊限定,优选在30~40°C(例如:37°C)实施。另外,作为培养容器中的二氧化碳浓度,可举出例如5%左右。

[0074] 对于检测或测定细胞杀伤性标志物的量的减少而言,没有特殊限定,可以利用使用抗体(例如:能够检测MAC的抗MAC、C9抗体、抗ATP抗体、抗Caspase 3、7抗体、抗CD59抗体、抗LDH抗体等)的免疫学分析、例如ELISA、免疫染色、Western印迹、流式细胞术来实施。为了基于免疫染色、Western印迹等的结果定量表达量,可以使用图像处理软件(例如:ImageJ等)由得到的图像数据进行数值化。另外,细胞杀伤性标志物如LDH这样具有酶活性时,也可以将该酶活性作为指标,根据需要使用试剂盒(例如:LDH细胞杀伤性分析试剂盒(LDH Cytotoxicity Assay Kit) (Funakoshi) 等)等,检测或测定该细胞杀伤性标志物。

[0075] 使用血清作为补体供给源时,培养基中的血清浓度优选为1% (v/v) ~50% (v/v),更优选为3% (v/v) ~20% (v/v)。另外,使用器官类器官的培养上清液作为补体供给源时,培养基中的培养上清液的浓度优选为1% (v/v) ~50% (v/v),更优选为3% (v/v) ~20% (v/v)。本领域技术人员可以配合所使用的补体的种类、供给的形态等而确定适当的浓度。

[0076] 另外,在步骤(1a)中,为了促进细胞杀伤性标志物的形成,可以通过向培养基中进一步添加补体激活因子,使从干细胞制备的细胞与补体接触。例如,可以向培养有从干细胞制备的细胞的培养基中添加补体激活因子、或将该细胞移入或者接种至预先添加有补体激活因子的培养基中来实施。另外,补体激活因子的添加可以在向从干细胞制备的细胞添加补体或补体供给源之前实施,也可以在添加之后实施。作为所述补体激活因子,只要能够促

进细胞杀伤性标志物的形成即可,没有特殊限定,可举出例如LPS(脂多糖, Lipopolysaccharide)、酵母的细胞壁的多糖酵母聚糖(zymosan)等。

[0077] -选择使该细胞杀伤性标志物的量减少的治疗药候选物质的步骤(步骤(2a)) -

[0078] 作为用于步骤(2a)中的治疗药候选物质,可示例例如细胞提取物、细胞培养上清液、微生物发酵产物、来源于海洋生物提取物、植物提取物、纯化蛋白质或者粗蛋白质、肽、非肽化合物、合成小分子化合物、和天然化合物。

[0079] 步骤(2a)中使用的治疗药候选物质还可以使用包括(1)生物文库、(2)应用去卷积的合成文库法、(3)“1珠1化合物(one-bead one-compound)”文库法、和(4)使用亲和层析筛选的合成文库法在内的本技术领域已知的组合文库法中的多种途径之中任一者得到。使用亲和层析筛选的生物文库法限于肽文库,而其他四种途径可适用于肽、非肽寡聚物、或者化合物的小分子化合物文库(Lam(1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145-67)。分子文库的合成方法的例子可在本技术领域寻得(DeWitt等, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909-13; Erb等, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422-6; Zuckermann等, (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678-85; Cho等, (1993) *Science* 261:1303-5; Carell等, (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell等, (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; Gallop等, (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233-51)。化合物文库可以制成溶液(参见Houghten (1992) *Bio/Techniques* 13:412-21)或者珠(Lam(1991) *Nature* 354:82-4)、芯片(Fodor (1993) *Nature* 364:555-6)、细菌(美国专利第5,223,409号)、孢子(美国专利第5,571,698号、美国专利第5,403,484号、和美国专利第5,223,409号)、质粒(Cull等, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-9)或噬菌体(Scott和Smith(1990) *Science* 249:386-90; Devlin(1990) *Science* 249:404-6; Cwirla等, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-82; Felici(1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-10; 美国专利申请第2002103360号)的形式。

[0080] 步骤(2a)中的、添加治疗候选物质的方法、或使从干细胞制备的细胞与治疗候选物质接触的方法没有特殊限定,可以通过例如向含有实施了步骤(1a)之后的该细胞的培养基中添加治疗候选物质、将该细胞移入或接种至预先添加有该治疗候选物质的培养基中来实施。在步骤(2a)中,可以将使细胞杀伤性标志物的量减少的治疗候选物质选为针对补体过度激活相关性疾病的治疗药、或者将其判断为该治疗药。

[0081] 或者,可以向实施步骤(1a)之前的培养基中预先添加治疗候选物质,使用该培养基实施步骤(1a)。此时,例如,与未添加治疗候选物质的对照或者添加了不具有治疗效果的物质的对照相比,细胞杀伤性标志物的形成量低的情况下,可以选择该治疗候选物质作为补体过度激活相关性疾病的治疗药或者将其判断为该治疗药。

[0082] 另外,实施本发明的筛选方法时,可以使用已经针对补体过度激活相关性疾病具有治疗效果的物质(例如:依库珠单抗等)等阳性对照、及/或安慰剂等阴性对照。

[0083] -2、对由补体过度激活导致的细胞杀伤性进行评价的方法 -

[0084] 本发明提供了以细胞杀伤性标志物作为指标,对被测物质的由补体过度激活导致的细胞杀伤性进行评价的方法(下文有时称为“本发明的评价方法”)。本发明的评价方法包括:

[0085] 步骤(1b),向从干细胞制备的细胞添加被测物质;

[0086] 步骤(2b),测定细胞杀伤性标志物的生成量;和

[0087] 步骤(3b),根据该细胞杀伤性标志物的生成量对由补体过度激活导致的细胞杀伤性进行评价。

[0088] 如下述实施例所示,将已知引起肝窦内皮细胞损伤的奥沙利铂施予至人肝窦内皮细胞,结果,细胞数量显著减少,而由人血清导致的MAC形成量增加,即,显示了可以基于MAC的形成量来评价奥沙利铂的细胞杀伤性。因此,通过本发明的评价方法,可以对被测物质是否具有由补体激活导致的细胞杀伤性进行评价·预测等,例如,当被测物质为任意的疾病的治疗药或者治疗药候选物质时,可以对这些物质以细胞杀伤性标志物作为指标就是否引发补体激活、即是否具有补体激活介导的毒性(副作用)进行评价·预测等。作为所述被测物质,可示例例如细胞提取物、细胞培养上清液、微生物发酵产物、来源于海洋生物的提取物、植物提取物、纯化蛋白质或者粗蛋白质、肽、非肽化合物、合成小分子化合物、和天然化合物。

[0089] 上述被测物质还可以使用包括(1)生物文库、(2)应用去卷积的合成文库法、(3)“1珠1化合物(one-bead one-compound)”文库法、和(4)使用亲和层析筛选的合成文库法在内的本技术领域已知的组合文库法中的多种途径之中任一者得到。使用亲和层析筛选的生物文库法限于肽文库,而其他四种途径可适用于肽、非肽寡聚物、或者化合物的小分子化合物文库(Lam(1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145-67)。分子文库的合成方法的例子可在本技术领域寻得(DeWitt等,(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909-13; Erb等,(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422-6; Zuckermann等,(1994) *J. Med. Chem.* 37:2678-85; Cho等,(1993) *Science* 261:1303-5; Carell等,(1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell等,(1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; Gallop等,(1994) *J. Med. Chem.* 37:1233-51)。化合物文库可以制成溶液(参见Houghten(1992) *Bio/Techniques* 13:412-21)或者珠(Lam(1991) *Nature* 354:82-4)、芯片(Fodor(1993) *Nature* 364:555-6)、细菌(美国专利第5,223,409号)、孢子(美国专利第5,571,698号、美国专利第5,403,484号、和美国专利第5,223,409号)、质粒(Cull等,(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-9)或噬菌体(Scott和Smith(1990) *Science* 249:386-90; Devlin(1990) *Science* 249:404-6; Cwirala等,(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-82; Felici(1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-10; 美国专利申请第2002103360号)的形式。

[0090] 对于细胞杀伤性标志物的定义和具体例子如上述1.中所记载。对于从干细胞制备的细胞,可示例与上述1.中所记载的相同的细胞。

[0091] 步骤(1b)中的、向从干细胞制备的细胞添加治疗候选物质的方法、或使该细胞与治疗候选物质接触的方法没有特殊限定,可以通过如下方法实施,例如,向培养有该细胞的培养基中添加治疗候选物质,或者将该细胞移入或者接种至预先添加有该治疗候选物质的培养基中,等等。

[0092] 步骤(2b)中的杀伤性标志物的生成量的测定可以通过与上述1.的步骤(2a)中记载的方法相同的方法实施。

[0093] 步骤(3b)中,例如,与未添加被测物质的对照、与添加了不具有过度激活补体的能力的物质的对照、或者与添加被测物质之前的细胞相比,细胞杀伤性标志物的生成量增加的情况下,可以评价为被测物质具有由补体过度激活导致的细胞杀伤性,细胞杀伤性标志物的生成量未确认到变化的情况、或者生成量减少的情况下,可以评价为被测物质不具有

由补体过度激活导致的细胞杀伤性。

[0094] -3、用于筛选补体过度激活相关性疾病的治疗药的试剂盒-

[0095] 另外,本发明提供用于筛选补体过度激活相关性疾病的治疗药的试剂盒(下文有时称为“本发明的筛选用试剂盒”)。可以使用本发明的筛选用试剂盒来实施本发明的筛选方法。本发明的筛选用试剂盒中包含:

[0096] (i-a) 从干细胞制备的细胞;

[0097] (ii-a) 补体或者补体供给源;和

[0098] (iii-a) 对细胞杀伤性标志物进行检测的试剂。

[0099] 作为补体过度激活相关性疾病,可示例与上述1.中所记载的疾病相同的疾病。作为上述(i-a)的从干细胞制备的细胞,可示例与上述1.中所记载的相同的细胞。作为上述(ii-a)的补体或者补体供给源,也可示例与上述1.中所记载的相同的补体或者补体供给源。作为上述(iii-a)的试剂,可举出例如识别细胞杀伤性标志物的抗体(例如:可检测MAC的抗MAC、C9抗体、抗ATP抗体、抗Caspase 3、7抗体、CD59抗体、抗LDH抗体等)等。当上述试剂包含两种以上抗体时,该试剂可作为在分开的试剂中包含各抗体的试剂盒提供。本发明的试剂中所含的抗体可以以例如结合于荧光色素、金属同位素或者珠子(例如:磁珠)的形态提供。

[0100] 除上述(i-a)~(iii-a)以外,本发明的筛选用试剂盒还可包括用于治疗药筛选的其他物质。这些其他物质只要对反应没有不良影响即可,可以以与上述(i-a)~(iii-a)共存的状态提供,或者可以与其他试剂同时提供。作为上述其他的物质,可举出例如上述1.中所述的补体激活因子、上述1.中所述的治疗药候选物质、上述1.中所述的培养基、上述1.中所述的阳性对照及/或阴性对照、反应缓冲液、竞争抗体、被标记的二抗(例如,当一抗为兔抗体时,被过氧化物酶、碱性磷酸酶等标记的小鼠抗兔IgG等)、封闭液、ELISA用板等。另外,本发明的筛选用试剂盒中可包括记载了该试剂盒、试剂的使用方法的说明书。

[0101] 4、用于评价由补体过度激活导致的细胞杀伤性的试剂盒

[0102] 另外,本发明提供用于对被测物质的由补体过度激活导致的细胞杀伤性进行评价的试剂盒(下文有时称为“本发明的评价用试剂盒”)。可以使用本发明的评价用试剂盒来实施本发明的评价方法。本发明的评价用试剂盒中包含:

[0103] (i-b) 从干细胞制备的细胞;和

[0104] (ii-b) 对与补体相关联的细胞杀伤性标志物进行检测的试剂。

[0105] 作为上述(i-b)的从干细胞制备的细胞,可示例与上述1.中所记载的相同的细胞。作为上述(ii-b)的试剂,可示例与上述3.的(iii-a)中所记载的相同的试剂。当上述试剂包含两种以上的抗体时,该试剂可作为在分开的试剂中包含各抗体的试剂盒进行提供。本发明的试剂中所含的抗体可以以例如结合于荧光色素、金属同位素或者珠子(例如:磁珠)的形态提供。

[0106] 除上述(i-b)和(ii-b)以外,本发明的评价用试剂盒可还包含用于细胞杀伤性的评价的其他物质。这些其他物质只要对反应没有不良影响即可,可以以与上述(i-b)和(ii-b)共存的状态提供,或者可以与其他试剂同时提供。作为上述其他物质,可举出例如上述2.中记载的被测物质、上述1.中记载的培养基、上述1.中记载的阳性对照及/或阴性对照、反应缓冲液、竞争抗体、经标记的二抗(例如,当一抗为兔抗体时,经过氧化物酶、碱性磷酸酶

等标记的小鼠抗兔IgG等)、封闭液、ELISA用板等。另外,本发明的评价用试剂盒中可包含记载了该试剂盒、试剂的使用方法、评价标准等的说明的说明书。

[0107] 以下实施例中对本发明进行了更具体的说明,但其并非是对本发明的限定。

[0108] 实施例

[0109] 在以下实施例中,细胞标记物的确认通过流式细胞术、免疫染色、及/或定量PCR实施。

[0110] (CD31、CD73和CD144标志物的确认)

[0111] CD31、CD73和CD144标志物是通过使细胞与进行了荧光标记的抗CD31抗体(FITC小鼠抗人CD31,BD Pharmingen)、抗CD73抗体(CD73-PE,人,Miltenyi Biotec或CD73-APC,人,Miltenyi Biotec)、和抗CD144抗体(PE小鼠抗人CD144,BD Pharmingen)反应后基于流式细胞术(FACS Fortessa (BD))而确认的。作为标志物阴性试样,使用未分化人iPS细胞(1383D2;京都大学iPS研究所)。另外,制备了与如下抗体反应而得的阴性对照,所述抗体与标记抗体为同一同种型(isotype)且不识别目标标志物。

[0112] (HNF4 α 标志物的确认)

[0113] HNF4 α 标志物是通过免疫染色和定量PCR而确认的。

[0114] (免疫染色法)

[0115] 将细胞在4%多聚甲醛(PFA)的PBS中于室温固定15分钟,用驴和山羊血清进行封闭后,用抗HNF4 α 抗体(santa-cruz)和与该抗体结合的荧光标记二抗(Novex驴抗山羊IgG(H+L)二抗(invitrogen))进行免疫染色,然后通过荧光显微镜进行确认。

[0116] (定量PCR)

[0117] 使用PureLink RNA小量试剂盒(invitrogen),从细胞提取RNA,使用高容量cDNA反转录试剂盒(invitrogen)合成cDNA。使用THUNDERBIRD Probe qPCR Mix(TOYOBO)和QuantStudio 7Flex实时PCR系统(Applied Biosystems),实施定量PCR。所使用的PCR引物(Fw:正向引物;Rv:反向引物)和探针如下:

[0118] HNF4 α

[0119] Fw 5' -TCAGACCCTGAGCCACCT-3' (序列号1)

[0120] Rv 5' -AGCAACGGACAGATGTGTGA-3' (序列号2)

[0121] 探针:Universal ProbeLibrary Probe 027 (Roche)

[0122] AFP

[0123] Fw 5' -TCCTTGTAAGTGGCTTCTTGAAC-3' (序列号3)

[0124] Rv 5' -TGTACTGCAGAGATAAGTTTAGCTGAC-3' (序列号4)

[0125] 探针:Universal ProbeLibrary Probe 061 (Roche)

[0126] ALB

[0127] Fw 5' -CTTCCCTTCATCCCGAAGTT-3' (序列号5)

[0128] Rv 5' -AATGTTGCCAAGCTGCTGA-3' (序列号6)

[0129] 探针:Universal ProbeLibrary Probe 027 (Roche)

[0130] 18s rRNA (内参对照)

[0131] EUK 18s rRNA (20x) (ABI)

[0132] [实施例1]

[0133] 使用了来源于iPS细胞的肝类器官培养上清液与人血清的、来源于iPS细胞的人血管内皮细胞中的膜攻击复合物的检测

[0134] (1-1) 制备iPS人非造血性血管内皮细胞 (human non-hemogenic endothelial cell)

[0135] 将人iPS细胞 (1383D2; 京都大学iPS研究所) 在添加1%B-27Supplements (GIBCO)、BMP4 (25ng/ml)、CHIR99021 (8 μ M) 的DMEM/F-12 (Gibco) (10ml) 中于5%CO₂、37°C培养3天, 由此诱导中胚层谱系细胞。然后, 向Stempro-34 SFM (Gibco) (10ml) 中添加VEGF (200ng/ml)、Folskolin (2 μ M), 于5%CO₂、37°C培养7天, 获得CD31阳性、CD73阳性和CD144阳性的人非造血性血管内皮细胞群。

[0136] (1-2) 制备人肝脏内胚层细胞 (human Hepatic Endoderm; HE)

[0137] 将人iPS细胞 (1383D2; 京都大学iPS研究所) 在添加Wnt3a (50ng/mL)、激活素A (100ng/ml) 的RPMI (Fujifilm) (2ml) 中于5%CO₂、37°C培养5天, 由此诱导内胚层谱系细胞。将得到的内胚层谱系细胞在添加了1%B27 Supplements (GIBCO)、FGF2 (10ng/ml) 的同一培养基中于5%CO₂、37°C继续培养5天, 由此得到AFP、ALB和HNF4 α 为阳性的人肝脏内胚层细胞群。

[0138] (1-3) 制备人间充质干细胞 (human Mesenchymal Stem Cell; MC)

[0139] 将人iPS细胞 (1383D2; 京都大学iPS研究所) 在添加1%B-27Supplements (GIBCO)、BMP4 (25ng/ml)、CHIR99021 (8 μ M) 的DMEM/F-12 (Gibco) (10ml) 中于5%CO₂、37°C培养3天, 由此诱导中胚层谱系细胞。然后, 添加PDGFBB (10ng/ml)、激活素A (2ng/ml), 于5%CO₂、37°C继续培养3天。然后, 向DMEM/F-12 (Gibco) (10ml) 中添加1%B-27Supplements (GIBCO)、FGF (10ng/ml)、BMP4 (12ng/ml), 于5%CO₂、37°C继续培养3天, 由此得到CD31阴性、CD73阳性的人间充质干细胞。

[0140] (1-4) 制备类器官 (三维结构体)

[0141] 通过将制备得到的人肝脏内胚层细胞 (HE)、人非造血性血管内皮细胞 (non-HEC) 与人间充质干细胞 (human Mesenchymal Stem Cell; MC) 按10:7:1的比例的细胞数量 (总数18 \times 10⁶个) 进行混合, 在三维培养容器Elplasia (KURARAY CO.LTD.) 上于5%CO₂、37°C共培养1天, 制备聚集体。该共培养中, 培养基使用将向HCM (Lonza) 中加入FBS (5%)、HGF (10ng/ml)、OSM (20ng/ml)、Dex (100nM) 而得的肝细胞用培养基 (A)、与向Stempro-34 SFM (Gibco) 加入VEGF (50ng/ml)、FGF2 (10ng/ml) 而得的血管内皮细胞用培养基 (A) 按1:1的体积比混合而得的培养基 (本说明书中称为“类器官用培养基 (A)”)。之后的每一天, 用该培养基进行培养基更换, 回收第14天的培养上清液, 作为补体成分使用。本申请发明人确认到, 使用人血清和上述培养上清液的任一者作为补体供给源均能观察到MAC的形成, 以及, 较之单独使用的情况, 联用这些补体供给源进一步提高了MAC的形成效果。因此, 在以下实施例, 使用人血清和上述培养上清液作为补体供给源。

[0142] (1-5) 来源于iPS细胞的人非造血性血管内皮细胞中的膜攻击复合物的检测

[0143] 将iPS细胞 (1383D2; 京都大学iPS研究所) 以4000个细胞接种至96孔板 (corning), 根据上述1-1的方法在板上制备来源于iPS的人非造血性血管内皮细胞。按100 μ l/96孔的容量添加含有CD59抗体 (1 μ g/ml) 的该细胞培养基, 于37°C孵育1小时, 然后, 向该细胞培养基中添加等量的同一培养基 (含有6% (v/v) 人血清 [BIOPREDIC Inc. SER018A050F018]、

20% (v/v) 的 (1-4) 中回收的培养上清液、LPS (脂多糖, Lipopolysaccharide) 2 μ g/ml) (因此, 添加后的培养基中的人血清浓度成为3% (v/v), (1-4) 中回收的培养上清液的浓度成为10% (v/v)), 于37 $^{\circ}$ C 孵育24小时。第二天, 去除培养基, 用PBS (-) (GIBCO) 洗涤1次, 然后, 向细胞以50 μ l/96孔添加4% 多聚甲醛, 于室温放置15分钟。之后, 用PBS (-) 洗涤3次, 于4 $^{\circ}$ C 保藏过夜。之后, 向细胞以50 μ l/96孔的容量添加PROTEIN BLOCK SERUM-FREE封闭溶液 [DAKO, X909], 于室温放置60分钟, 实施封闭。之后, 以50 μ l/96孔的容量添加一抗溶液 (1/200抗末端补体复合物, HCB Hycult Biotech, PBS (-) 中含1% 封闭溶液的HM2167), 于室温静置60分钟或者于4 $^{\circ}$ C 静置过夜。接下来, 用PBS (-) 洗涤3次, 然后以50 μ l/96孔的容量添加二抗溶液 (1/1000, Alexa Flour 555, 1/1000 DAPI-HCB Hycult Biotech, PBS (-) 中含1% 封闭溶液的HM2167), 于37 $^{\circ}$ C 孵育60分钟。之后, 用PBS (-) 洗涤3次, 然后用In cell analyzer 6500HS (GE healthcare) 实施定量分析。得到的数值以相对于4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 的相对值的形式算出。使用失活血清作为阴性对照。结果示于图1中。

[0144] [实施例2]

[0145] 测试了补体第五因子C5抗体依库珠单抗 (AB00296, Absolute Antibody Ltd) 针对使用了来源于iPS细胞的肝类器官培养上清液和人血清的、来源于iPS细胞的非造血生人血管内皮细胞中的膜攻击复合物形成的作用。除了将依库珠单抗按2.028~676nmol/L的浓度与血清同时添加这一点以外, 依照上述 (1-5) 中记载的方法形成膜复合物并实施检测。结果示于图2中。

[0146] [实施例3]

[0147] 来源于iPS细胞的人神经细胞中的膜攻击复合物的检测

[0148] (3-1) 制备来源于iPS细胞的人神经细胞

[0149] 根据Yan Y等, Stem Cells Trans Med, 2:862-870. (2013), 使用PSC Neural Induction Medium (Thermo Fisher Scientific), 将人iPS细胞 (253G1; 京都大学iPS研究所) 诱导分化为来源于iPS细胞的人神经干细胞和神经细胞。

[0150] (3-2) 来源于iPS细胞的人神经细胞中的膜攻击复合物的检测

[0151] 根据上述3-1的方法, 在96孔板上实施15天诱导分化, 制备来源于iPS细胞的人神经细胞。根据上述 (1-5) 的方法, 实施对伴随补体激活的膜攻击复合物的检测。结果示于图3 (上图) 中。通过使用人血清, 观察到MAC的形成。

[0152] [实施例4]

[0153] 来源于iPS细胞的人肝细胞中的膜攻击复合物的检测

[0154] (4-1) 制备来源于iPS细胞的人肝细胞

[0155] 人iPS细胞 (1383D2; 京都大学iPS研究所) 根据上述1-2的方法, 诱导分化10天后, 获得AFP、ALB和HNF4 α 为阳性的人肝脏内胚层细胞群。进一步地, 向HCM培养基 (LONZA) 中添加5% FBS、HGF (10ng/mL)、OSM (20ng/mL)、Dex (100nM), 于5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养11天, 由此诱导来源于iPS细胞的人肝祖细胞。

[0156] (4-2) 来源于iPS细胞的人肝细胞中的膜攻击复合物的检测

[0157] 根据上述3-1的方法, 在96孔板上实施诱导分化21天, 制备来源于iPS细胞的人肝细胞。根据上述 (1-5) 的方法, 对伴随补体激活的膜攻击复合物进行检测。结果示于图3 (中图) 中。通过使用人血清, 观察到MAC的形成。

[0158] [实施例5]

[0159] 来源于iPS细胞的人视网膜色素上皮细胞中的膜攻击复合物的检测

[0160] (5-1) 制备来源于iPS细胞的人视网膜色素上皮细胞

[0161] 将人iPS细胞(253G1;京都大学iPS研究所)根据WO 2015053375 A1的制备方法诱导分化为来源于iPS细胞的人视网膜色素上皮细胞。

[0162] (5-2) 来源于iPS细胞的人视网膜色素上皮细胞中的膜攻击复合物的检测

[0163] 根据上述3-1的方法,在96孔板上实施诱导分化21天,制备来源于iPS细胞的人视网膜色素上皮细胞。根据上述(1-5)的方法,对伴随补体激活的膜攻击复合物进行检测。结果示于图3(下图)中。通过使用人血清,观察到MAC的形成。

[0164] [实施例6]

[0165] 来源于iPS细胞的人肝窦内皮细胞中的、施予奥沙利铂时的膜攻击复合物的检测

[0166] (6-1) 制备来源于iPS细胞的人肝窦内皮细胞

[0167] 将人iPS细胞(625A4;京都大学iPS研究所)在AK02N(味之素)(8ml)中于5%CO₂、37℃培养6~7天,由此使其形成直径500-700μm的iPS细胞集落。将得到的集落在向Essential 8培养基(Gibco)(8ml)中添加BMP4(80ng/ml)、VEGF(80ng/ml)和CHIR99021(2μM)而得的培养基中于5%CO₂、37℃培养2天。之后,更换为向Essential 6培养基(Gibco)(8ml)中添加VEGF(80ng/ml)、FGF2(25ng/ml)、SCF(50ng/ml)和SB431542(2μM)而得的培养基,于5%CO₂、37℃继续培养2天,诱导侧板中胚层谱系细胞。之后,更换为向Stempro-34 SFM(Gibco)(8ml)中添加VEGF(80ng/ml)、SCF(50ng/ml)、Flt-3L(50ng/ml)、IL-3(50ng/ml)、IL-6(50ng/ml)和TPO(5ng/ml)而得的培养基,于5%CO₂、37℃培养2天,然后更换为从上述组成的培养基中去除VEGF而得的培养基,于5%CO₂、37℃培养1天,由此诱导为CD34阳性、CD73阴性的造血性血管内皮细胞。通过TrpLE Express(Gibco)解离该造血性血管内皮细胞,重新接种于利用以PBS稀释至50倍的Matrigel(BD Pharmingen)进行了薄层包被的96孔板上,在向Stempro-34 SFM(Gibco)(150μl)中添加Rock抑制剂(10μM)、VEGF(10ng/ml)、SCF(50ng/ml)、Flt-3L(10ng/ml)、IL-3(10ng/ml)、IL-6(10ng/ml)、TPO(10ng/ml)、IL-11(5ng/ml)、IGF-1(25ng/ml)和EPO(2Unit/mL)而得的培养基中培养24小时,然后更换为从上述组成的培养基中去除Rock抑制剂而得的培养基,于5%CO₂、37℃培养2天,由此得到CD34阳性、CD32阳性、因子VIII阳性的肝窦内皮细胞。

[0168] (6-2) 来源于iPS细胞的人肝窦内皮细胞中的膜攻击复合物的检测

[0169] 根据上述6-1的方法在96孔板上制备来源于iPS细胞的人肝窦内皮细胞。以100μl/96孔的容量添加含有CD59抗体(1μg/ml)的该细胞培养基,于37℃孵育1小时,然后,向该细胞培养基中添加等量的同一培养基(含有6%(v/v)人血清[BIO-PREDIC Inc.SER018A050F018]、20%(v/v)的(1-4)中回收的培养上清液、和2mM奥沙利铂(最终浓度20μM)或相同溶剂(乙醇))(因此,添加后的培养基中的人血清浓度成为3%(v/v),(1-4)中回收的培养上清液的浓度成为10%(v/v)),于37℃孵育24小时。随后,根据上述(1-5)的方法对伴随补体激活的膜攻击复合物进行检测,然后DAPI作为指标定量细胞数。结果示于图4(上图)中。观察到由于奥沙利铂导致细胞数量显著减少(图4A),而由人血清带来的MAC的形成量显著地增加(图4B)。

[0170] 产业上的可利用性

[0171] 本发明通过以与补体相关联的细胞杀伤性标志物作为指标,从而能够实施考虑了由于补体的激活而在生物体内发生的血管损伤的、该激活所涉及的疾病的治疗药的筛选,因此能够实现可靠度更高的创新药物筛选。

[0172] 本申请以在日本提出申请的日本特愿2019-066625(申请日:2019年3月29日)为基础,其内容通过在本文中引用而全部包括在本说明书中。

序列表

	<110> 公立大学法人横浜市立大学 武田药品工业株式会社	
	<120> 筛选方法及毒性评价方法	
	<130> 093019	
	<150> JP 2019-066625	
	<151> 2019-03-29	
	<160> 6	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工的序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物	
[0001]	<400> 1 tcagaccctg agccacct	18
	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工的序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 2 agcaacggac agatgtgtga	20
	<210> 3	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工的序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 3 tccttgtaag tggcttcttg aac	23

	<210> 4	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 4	
	tgtactgcag agataagttt agctgac	27
	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工的序列	
[0002]	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 5	
	cttccttca tcccgaagtt	20
	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工的序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 6	
	aatggtgcca agctgctga	19

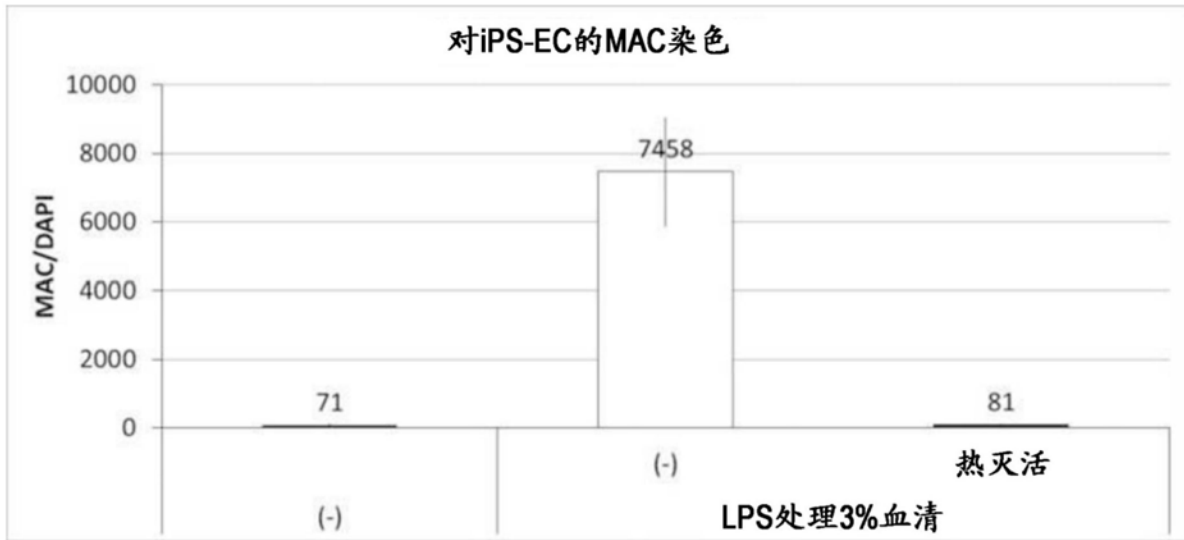


图1

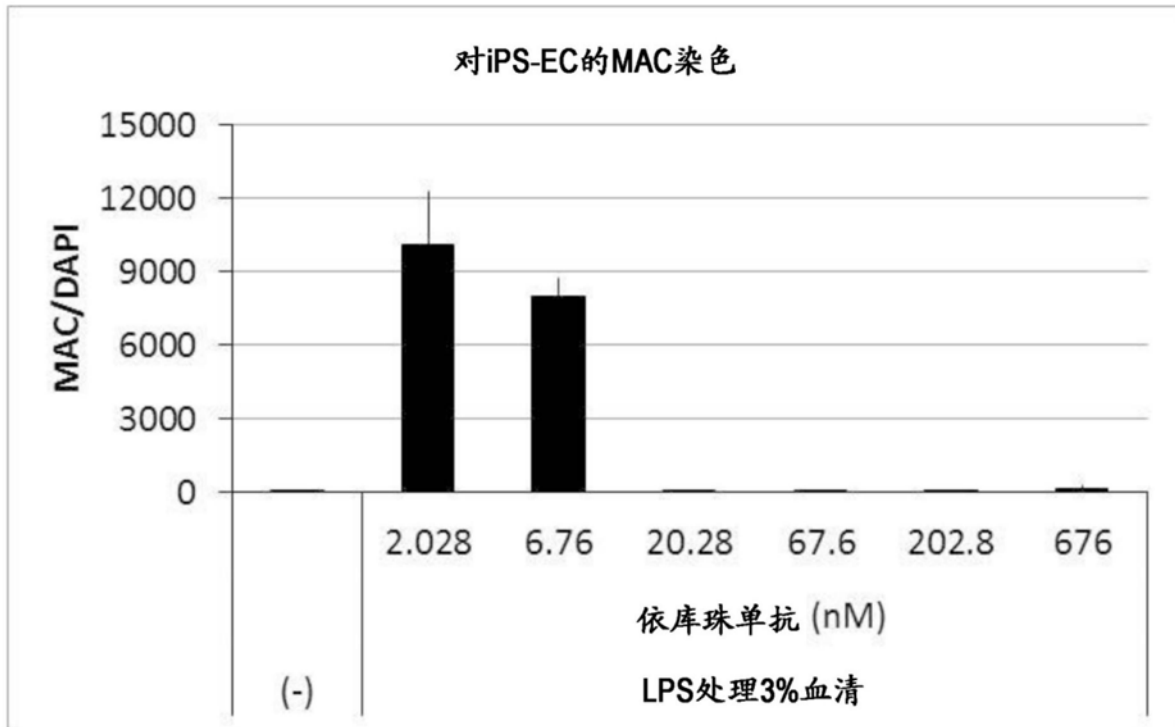


图2

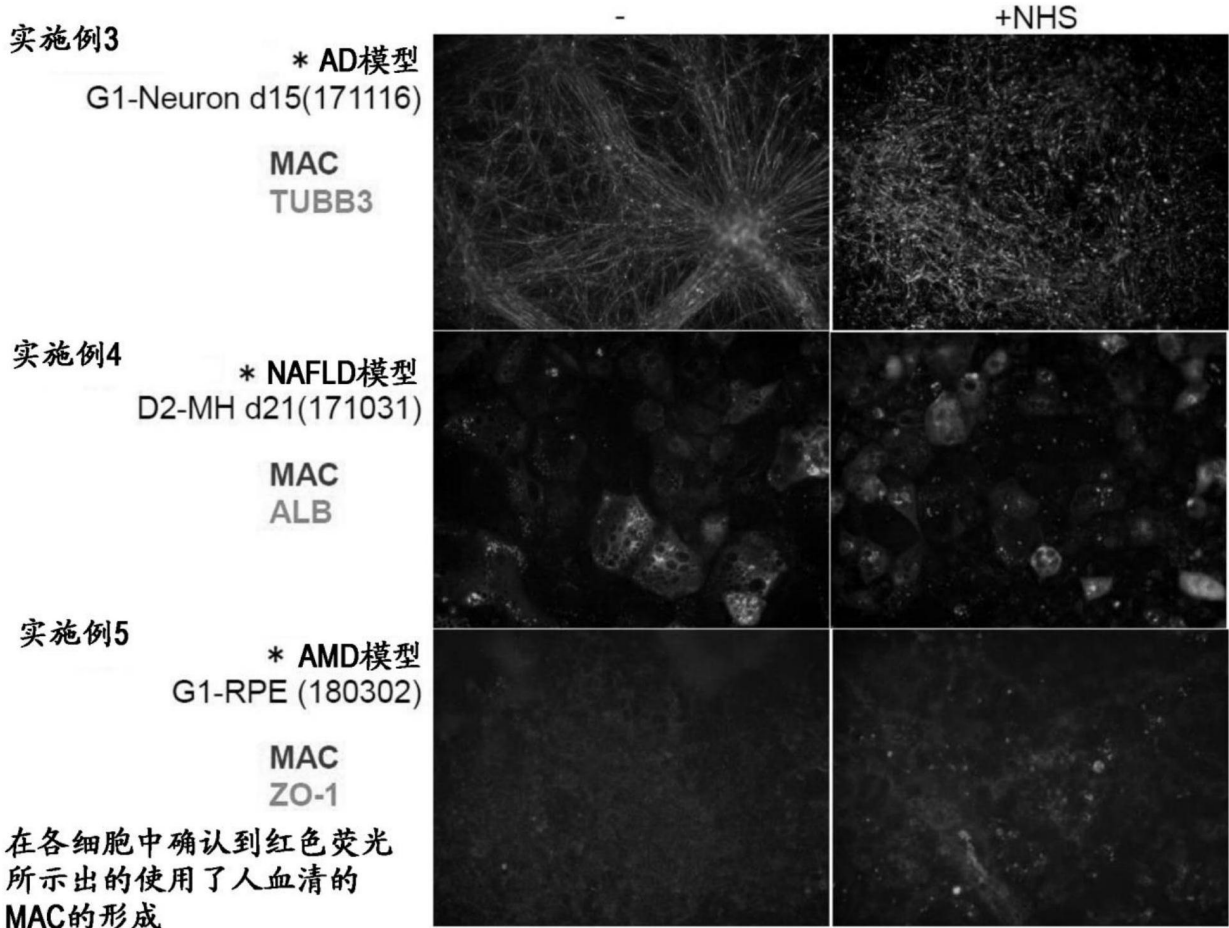
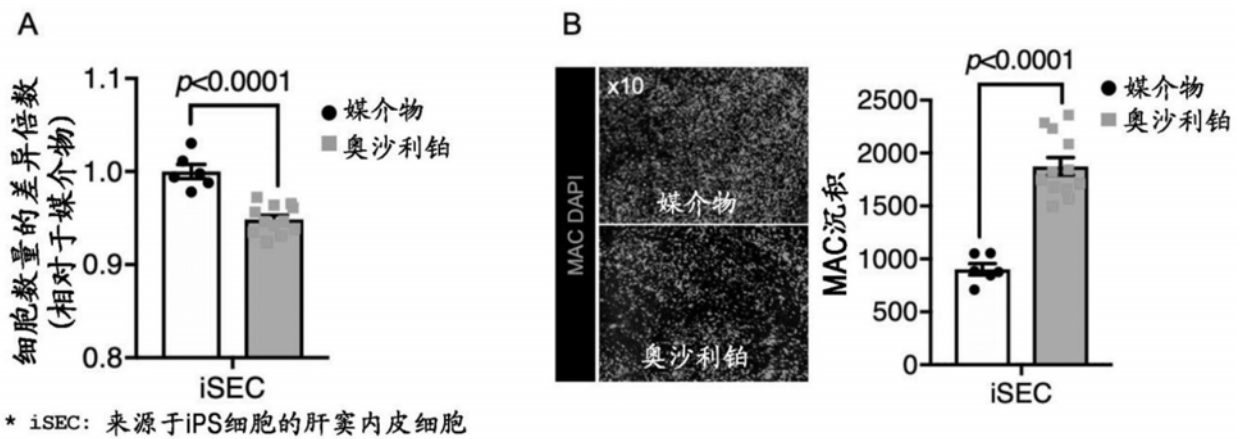


图3



施予已知会引起肝窦内皮细胞损伤的奥沙利铂，结果，细胞数量显著减少(A)，而人血清带来的MAC形成量增加(B)。

图4