

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6670831号
(P6670831)

(45) 発行日 令和2年3月25日(2020.3.25)

(24) 登録日 令和2年3月4日(2020.3.4)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851	Z N A Z
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	M
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/50	Z
請求項の数 16 (全 34 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-520005 (P2017-520005)	(73) 特許権者	517001192 メタフォラ、バイオシステムズ
(86) (22) 出願日	平成27年7月3日(2015.7.3)		フランス国, エフ-91058 エプリー
(65) 公表番号	特表2017-526380 (P2017-526380A)		セデックス, 4 リュピエール フォ
(43) 公表日	平成29年9月14日(2017.9.14)		ンテーヌ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/065256	(74) 代理人	100114775 弁理士 高岡 亮一
(87) 国際公開番号	W02016/001431	(74) 代理人	100121511 弁理士 小田 直
(87) 国際公開日	平成28年1月7日(2016.1.7)	(74) 代理人	100202751 弁理士 岩堀 明代
審査請求日	平成30年6月29日(2018.6.29)	(74) 代理人	100191086 弁理士 高橋 香元
(31) 優先権主張番号	14175534.8		
(32) 優先日	平成26年7月3日(2014.7.3)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】細胞老化を評価するための生体外アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞の細胞老化を評価、判断、監視および/または予測するための生体外方法であって、前記細胞上の少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体の発現レベルを測定する工程を含み、前記少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体にはX P R 1が含まれる、方法。

【請求項 2】

測定した発現レベルを基準発現レベルと比較する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の生体外方法。

【請求項 3】

前記少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体はX P R 1およびG L U T 1である、請求項 1 または請求項 2 に記載の生体外方法。

【請求項 4】

前記細胞は動物細胞である、請求項 1 ~ 3 のいずれか1項に記載の生体外方法。

【請求項 5】

前記細胞は幹細胞であり、但し、前記細胞はヒト胚性幹細胞ではない、請求項 1 ~ 4 のいずれか1項に記載の生体外方法。

【請求項 6】

前記細胞は成体幹細胞である、請求項 1 ~ 5 のいずれか1項に記載の生体外方法。

【請求項 7】

前記細胞は、造血幹細胞、間葉系幹細胞(M S C)、乳房幹細胞、腸幹細胞、内皮幹細胞

10

20

胞、神経幹細胞、嗅覚成体幹細胞、神経堤幹細胞、精巢幹細胞および筋肉幹細胞を含む群において選択される成体幹細胞である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の生体外方法

。【請求項 8】

前記発現レベルは RNA レベルで評価される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の生体外方法。

【請求項 9】

前記発現レベルはタンパク質レベルで評価される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の生体外方法。

【請求項 10】

少なくとも 1 種の細胞表面栄養輸送体の発現レベルの評価は、細胞表面上の前記少なくとも 1 種の細胞表面栄養輸送体の検出および定量化に対応する、請求項 9 に記載の生体外方法。

【請求項 11】

細胞表面上の前記少なくとも 1 種の細胞表面栄養輸送体の検出および定量化は、前記細胞表面栄養輸送体へのリガンドの結合の検出および/または定量化に対応する、請求項 10 に記載の生体外方法。

【請求項 12】

前記リガンドは抗体であるか、あるいはエンベロープウイルスの糖タンパク質の可溶性部分に由来する受容体結合ドメイン (RBD) の一部または全体を含む受容体結合ドメイン (RBD) リガンドである、請求項 11 に記載の生体外方法。

【請求項 13】

前記 RBD リガンドは Xeno-RBD であり、配列番号 1 のアミノ酸配列またはその断片を含むか、あるいは配列番号 1 のアミノ酸配列またはその断片からなる、請求項 12 に記載の生体外方法。

【請求項 14】

細胞群の品質を評価するための、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の生体外方法。

【請求項 15】

細胞老化もしくは老化のバイオマーカーとしての、ならびに/または細胞分裂の累積のバイオマーカーとしての、または細胞の増殖能および/もしくは分化能のバイオマーカーとしての、または細胞の幹細胞性のバイオマーカーとしての、または細胞群の品質のバイオマーカーとしての、または再生医療もしくは生体外スクリーニングアッセイで使用される細胞群の品質のバイオマーカーとしての、XPR1 の使用。

【請求項 16】

少なくとも 1 種の細胞表面栄養輸送体の発現レベルを決定または測定する工程を含む、細胞老化に影響を与える化合物を同定するためのスクリーニング方法であって、前記少なくとも 1 種の細胞表面栄養輸送体には XPR1 が含まれる、スクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞老化の評価方法および細胞老化を減速または加速させる化合物（すなわち、それぞれ老化防止剤または老化促進剤）のスクリーニング方法に関する。特に、本発明は、細胞老化のバイオマーカーとしての細胞表面栄養輸送体、特に XPR1 に関する。

【背景技術】

【0002】

再生医療とは、生体の機能性細胞または組織を作製して、年齢、疾患、損傷または先天性欠損により失われた細胞、組織または臓器機能を修復および置換するプロセスを指す。これは、損傷した要素を置換することを含むが、より一般的には、損傷した組織または臓器を修復および/または置換するために生体内で増殖および/または分化する細胞の投与に対応している。従って、再生医療は、以前に修復できなかった組織または臓器の修復を

10

20

30

40

50

可能にし、移植のために入手可能な臓器の不足という問題を克服する。

【0003】

幹細胞は、それらの自己複製特性（すなわち、細胞分裂（有糸分裂）周期を多数経ても未分化状態を維持することができる能力）ならびに分化される細胞種を生じることができる能力によって定められる。

【0004】

幹細胞は、それらの潜在能力、すなわちそれらの分化能に従って分類することができる。全能性幹細胞は全ての細胞種に分化し、それにより完全な生存可能生物を構築することができる。それらは、卵子および精子細胞の融合により生じる。全能性細胞の分化により生じる細胞は多能性細胞であり、これらは3つの胚葉のあらゆる細胞種に分化することができる。多能性幹細胞は、一般にそれらの位置の組織の子孫の限られた数の細胞種に分化することができる。少能性幹細胞は、例えばリンパ系または骨髄系幹細胞などの数種の細胞種にのみ分化することができる。最後に、単能性幹細胞は、それら自身の細胞種のみを生じることができる。

10

【0005】

胚性幹細胞とは対照的に、成体幹細胞は、発生後に体内中の分化された組織において見られる。成体幹細胞の供給源としては、例えば、骨髄、血液、角膜および網膜、脳、骨格筋、歯髄、肝臓、皮膚、消化管または膵臓などが挙げられる。

【0006】

幹細胞のうち、間葉系幹細胞（MSC）は、骨芽細胞、筋細胞、軟骨細胞および脂肪細胞などの系統に容易に分化することができる多能性幹細胞である。成体MSCの臨床的可能性は最近になって完全に文書化され、これらの細胞は世界中で何百回もの臨床試験に現在使用されている。治療のために、MSCの2つの主要源を使用することができる。第1に、細胞は治療される対象の自己由来の細胞であってもよく、細胞を前記対象から採取し、特定の培養条件下で増殖させて選択的に分化を誘導し、さらにその対象に再投与する。第2に、その対象に投与される細胞の調製に関連する時間および費用を減らすために、同種異系MSCを使用することができる。従って、同種異系細胞群を構築して、治療で使用するために培養で増殖しなければならない。

20

【0007】

但し、成体幹細胞が自己複製能および分化能を示したとしても、これらの特性は永久的なものではない。実際、培養継代を重ねるにつれて、通常老化と呼ばれる非分裂状態になるまで、細胞の倍加時間は増加する傾向がある。さらに、幹細胞の分化能は継代と共に低下する。さらに、ドナー年齢の上昇と共に、MSCの増殖能および分化能の有意な低下が観察された。

30

【0008】

そこで、MSCの増殖能および分化能を評価する、すなわち細胞の細胞老化を評価するためのシステムが必要とされている。従って、そのようなシステムにより患者への投与前に細胞の治療可能性を確認することができる。

【0009】

米国特許第8,574,852号は、コフィリンの発現レベルを測定することにより細胞老化を評価する方法について記載している。コフィリンは、アクチンフィラメントに結合して運動性、発生、極性または細胞質分裂のためのそれらのダイナミクスを促進することができる細胞内タンパク質である。当該発明者らは、標的細胞におけるコフィリンの発現レベルと前記標的細胞の細胞年齢との相関を実証した。

40

【0010】

さらに、欧州特許第2533042号は、細胞老化を監視するためのPW1の検出について記載している。

【0011】

しかし、先行技術の細胞老化を評価するためのアッセイでは通常、細胞内タンパク質の検出を行い、従って直接検出することはできない。実際、細胞の透過処理が必要であるた

50

め、この検出方法の複雑性は増してしまう。従って、細胞表面で発現し、かつその発現が前記細胞の年齢に依存する細胞老化マーカーが必要である。

【0012】

さらに、細胞老化の早期バイオマーカー、すなわち細胞老化時、特に老化のあらゆる兆候の発生前にその発現または発現における変化を早期に検出することができるバイオマーカーが依然として必要とされている。

【0013】

本発明では、本発明者らは、XPR1細胞表面栄養輸送体の発現レベルが細胞老化と関連することを実証した。従って、本発明は、XPR1の細胞老化のバイオマーカー（特に早期バイオマーカー）としての使用、および細胞老化を逆行、減速または加速させる化合物（すなわち、それぞれ老化防止剤または老化促進剤）の同定を目的としたスクリーニングアッセイにおけるXPR1の使用に関する。

10

【発明の概要】

【0014】

従って、本発明は、細胞表面上の少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体の発現レベルを測定する工程を含む、細胞の細胞老化を生体外で評価、判断、監視および/または予測する方法に関する。一実施形態では、本発明の方法は、測定した発現レベルを基準発現レベルと比較する工程をさらに含む。

【0015】

一実施形態では、前記少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体は、XPR1および/またはGLUT1、好ましくはXPR1である。

20

【0016】

一実施形態では、前記細胞は、動物細胞、好ましくはヒトまたはウマの細胞である。別の実施形態では、前記細胞は、前記細胞がヒト胚性幹細胞ではない限り、幹細胞、好ましくは成体幹細胞、より好ましくはMSCである。

【0017】

一実施形態では、前記発現レベルを、好ましくはRT-PCR、RT-qPCR、ノーザンブロットおよび/またはハイブリダイゼーション法により、RNAレベルにおいて評価する。別の実施形態では、前記発現レベルをタンパク質レベルにおいて評価し、好ましくは少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体の発現レベルの測定は、細胞表面上の前記少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体の検出および定量化に対応している。一実施形態では、細胞表面上の少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体の前記検出および定量化は、リガンドの細胞表面栄養輸送体への結合の検出および/または定量化に対応し、好ましくは、前記リガンドは抗体であるか、あるいはエンベロープウイルスの糖タンパク質の可溶性部分由来の受容体結合ドメイン(RBD)の一部または全体を含む受容体結合ドメイン(RBD)リガンドである。一実施形態では、前記RBDはXeno.RBDであり、配列番号1のアミノ酸配列またはその断片を含むかそれらからなる。

30

【0018】

一実施形態では、前記方法は、細胞群、好ましくは、再生医療または生体外スクリーニングアッセイで使用される細胞群の品質を評価するためのものである。

40

【0019】

本発明は、細胞老化または老化のバイオマーカーおよび/または細胞分裂の累積のバイオマーカーとして、好ましくは細胞の増殖能および/または分化能のバイオマーカーまたは細胞の幹細胞性のバイオマーカーとして、あるいは細胞群、特に再生医療または生体外スクリーニングアッセイで使用される細胞群の品質のバイオマーカーとしての、細胞表面栄養輸送体、好ましくはXPR1および/またはGLUT1の使用にも関する。

【0020】

本発明の別の目的は、少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体の発現レベルを決定または測定する工程を含む、細胞老化に影響を与える化合物を同定するためのスクリーニング方法である。一実施形態では、前記少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体は、XPR1およ

50

び/またはGLUT1、好ましくはXPR1である。

【0021】

本発明はさらに、少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体の発現レベルを決定または測定するための手段を含む、本発明の生体外方法または本発明に係るスクリーニング方法を実施するためのキットに関する。一実施形態では、少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体の発現レベルを決定または測定するための前記手段は、前記少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体に特異的なPCRプライマー対、前記少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体に特異的な抗体および/または前記少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体に特異的なRBDである。

【0022】

定義

本発明では、以下の用語は以下の意味を有する。

【0023】

「細胞老化 (cell aging)」とは、連続的な細胞分裂および/または環境条件 (例えば、培地組成、酸素濃度など) による細胞の表現型の進行性変化を指す。特に、本明細書で使用される「細胞老化」という用語は、細胞能力の喪失に反映される細胞の表現型の有意な変化を指す。特にMSCでは、細胞老化とは、分化能の喪失 (例えば、脂肪細胞系統、骨芽細胞系統、筋細胞系統および/または軟骨細胞系統に分化する能力の進行性喪失) および/または増殖能の喪失 (最終的に細胞が活発に分裂することが完全にできなくなることを特徴とする) を指してもよい。一実施形態では、「細胞老化」という用語は、MSCの分化能の喪失を指し、すなわち細胞老化を克服している (overcoming) MSCが、脂肪細胞系統、骨芽細胞系統、筋細胞系統および軟骨細胞系統から選択される1種 (または少なくとも1種) の系統に分化する能力を喪失している。一実施形態では、細胞老化を克服しているMSCは、脂肪細胞系統、骨芽細胞系統、筋細胞系統および軟骨細胞系統から選択される2種の系統に分化する能力を喪失している。別の実施形態では、細胞老化を克服しているMSCは、脂肪細胞系統、骨芽細胞系統、筋細胞系統および軟骨細胞系統から選択される3種の系統 (好ましくは脂肪細胞系統、骨芽細胞系統および軟骨細胞系統) に分化する能力を喪失している。別の実施形態では、細胞老化を克服しているMSCは、脂肪細胞系統、骨芽細胞系統、筋細胞系統および軟骨細胞系統に分化する能力を喪失している。一実施形態では、細胞老化により老化が生じ、「老齢細胞」とは、老化が始まった細胞、すなわち老化の兆候 (例えば、後で列挙される老化の後期の兆候など) を示す細胞である。一実施形態では、「細胞老化」という用語は、MSCの増殖能の喪失を指し、好ましくはMSCが老化し始める前の細胞分裂数は最大で20回であり、より好ましくは最大で15、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1回の細胞分裂である。

【0024】

本明細書で使用される「老化 (senescence)」すなわち「複製老化」とは細胞の老化 (cellular senescence) を指し、ここで、細胞の老化とは、形態学的変化 (例えば、拡大したり不規則な細胞形状など) および最終的に増殖の停止を特徴とする細胞の状態を指す。老化は複雑な現象であり、その原因は恐らく複数であり、未だに大部分が知られていない。特に、老化は、テロメアの短縮またはテロメア構造の変化ならびにDNA損傷の蓄積を暗示する場合がある。老化の後期の兆候の例としては、限定されるものではないが、倍加時間の増加、顕微鏡検査によって容易に検出することができる形態学的変化 (例えば、細胞の肥大化、核の肥大化、不規則形状、扁平形状、顆粒状細胞質など)、脂肪細胞系譜、骨芽細胞系譜、筋細胞系譜および/または軟骨細胞系譜に沿った分化能の喪失、リソソーム - ガラクトシダーゼまたはpH6 - ガラクトシダーゼ (SAGal) の発現の増加、細胞のトランスクリプトームの変化、例えば限定されるものではないが、ヒトの糖タンパク質NMB、再生関連筋肉プロテアーゼ相同体 (RAMPS)、PMP-22関連p53アポトーシスエフェクター (PERP)、リンパ球抗原96 (LY96)、シグナル伝達兼転写活性化因子1 (STAT1)、プリオンタンパク質 (PRNP)、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤2Aおよびプラスミノゲン活性化因子阻害剤1型

10

20

30

40

50

を含むリストから選択される少なくとも1種の遺伝子の発現の上方制御、またはヒアルロン酸合成酵素1 (HAS1)、ID1 (inhibitor of DNA binding 1) およびオステオプロテゲリンリガンド (TNFSF11) を含むリストから選択される少なくとも1種の遺伝子の発現の下方制御、あるいは極小RNA、例えば、has-mir-371、has-mir-369-5P、has-mir-29c、has-mir-499 および has-let-7f を含む群から選択される極小RNAなどの上方制御が挙げられる。

【0025】

「幹細胞性」は、例えば、それらの自己複製特性 (すなわち、細胞分裂 (有糸分裂) の周期を多数経ても未分化状態を維持することができる能力) ならびに分化される細胞種を生じる能力などの幹細胞の一般的な特性を指す用語である。

10

【0026】

「増殖能 (proliferation capacity)」または「増殖能 (proliferation potential)」 (これらは同義で使用することができる) とは、細胞の活発に分裂する能力を指す。

【0027】

「分化能 (differentiation capacity)」または「分化能 (differentiation potential)」 (これらは同義で使用することができる) とは、細胞の少なくとも1種の系統に分化する能力を指す。一実施形態では、当該細胞はMSCであり、「分化能 (differentiation capacity)」または「分化能 (differentiation potential)」とは、前記MSCの骨芽細胞系統、筋細胞系統、軟骨細胞系統または脂肪細胞系統のうちの少なくとも1種に分化する、骨芽細胞系統、軟骨細胞系統および脂肪細胞系統の3種に分化する、またはこれら4系統全てに分化する能力を指す。

20

【0028】

「XPR1」とは、異種栄養性マウス白血病ウイルス (MLV)、多栄養性 (polytropic) MLV および異種栄養性マウス白血病ウイルス関連ウイルス (XMRV) (Giovannini et al, Cell Reports 3, 1866-1873, 2013) による受容体として使用される、後生動物、特にヒトによって発現されるリン酸排出輸送体を指す。一実施形態では、XPR1は、配列番号22 (受入番号: BC041142.1) によってコードされるヒトのXPR1 (受入番号: AAH41142、配列番号21) である。一実施形態では、XPR1は、配列番号21と少なくとも70%の配列同一性、好ましくは配列番号21と少なくとも75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%またはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含むかそれらからなる。一実施形態では、XPR1は、配列番号22と少なくとも70%の配列同一性、好ましくは配列番号22と少なくとも75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%またはそれ以上の配列同一性を示すヌクレオチド配列によってコードされる。一実施形態では、XPR1は、配列番号21の断片、好ましくは、少なくとも約100個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも約150、200、250、300、350、400、450、500、550または600個のアミノ酸の断片を含むかそれらからなる。

30

【0029】

本明細書で使用される「同一性」という用語は、2つ以上のポリペプチド配列または2つ以上のDNA配列間の関係において使用される場合、それぞれ2つ以上のアミノ酸残基または2つ以上のヌクレオチド残基からなる配列間の一致数によって決定される (それぞれ) ポリペプチドまたはDNA配列間の配列関連性 (sequence relatedness) の程度を指す。「同一性」とは、特定の数学モデルまたはコンピュータプログラム (すなわち「アルゴリズム」) によって扱われるギャップアラインメント (存在すれば) を有する2つ以上の配列のより短い配列間の完全な一致率の尺度である。関連するポリペプチドまたはDNA配列の同一性は、公知の方法によって容易に計算することができる。そのような方法としては、限定されるものではないが、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988、Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993、Computer Analysis

40

50

of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994、Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987、Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991、およびCarillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988)に記載されているものが挙げられる。同一性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間の最大の一致を与えるように設計されている。同一性の決定方法は、公的に入手可能なコンピュータプログラムに記述されている。好ましいコンピュータプログラムによる2つの配列間の同一性の決定方法としては、GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. 12: 387 (1984)、Genetics Computer Group、ウィスコンシン大学、ウィスコンシン州マディソン)、BLASTP、BLASTNおよびFASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990))などのGCGプログラムパッケージが挙げられる。BLASTXプログラムは、国立生物工学情報センター(NCBI)および他の提供源(BLAST Manual, Altschul et al., NCB/NLM/NIH, メリーランド州ベセスダ, 20894; Altschul et al., 上記)から公的に入手可能である。また、周知のSmith Watermanアルゴリズムを使用して同一性を決定してもよい。

【0030】

「GLUT1」とは、特にヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV)によって受容体として使用される、後生動物、特にヒトによって発現されるグルコース取り込み輸送体を指す。一実施形態では、GLUT1は、配列番号24(受入番号: NM_006516.2)によってコードされるヒトGLUT1(受入番号NP_006507.2、配列番号23)である。一実施形態ではGLUT1は、配列番号23と少なくとも70%の配列同一性、好ましくは配列番号23と少なくとも75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%またはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含むかそれらからなる。一実施形態では、GLUT1は、配列番号24と少なくとも70%の配列同一性、好ましくは配列番号24と少なくとも75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%またはそれ以上の配列同一性を示すヌクレオチド配列によってコードされる。一実施形態では、GLUT1は、配列番号23の断片、好ましくは少なくとも約100個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも約150、200、250、300、350、400または450個のアミノ酸の断片を含むかそれらからなる。

【0031】

「リガンド」とは、細胞表面栄養輸送体と複合体を形成するあらゆる物質を指す。典型的なリガンドとしては、限定されるものではないが、ポリペプチドおよびタンパク質が挙げられる。本明細書で使用される「ポリペプチド」とは、ペプチド結合によって互いに結合されたアミノ酸(好ましくは少なくとも50個のアミノ酸)の線状ポリマーを指す。タンパク質とは具体的には、1つ以上のポリペプチドおよび任意で非ポリペプチド共同因子から形成された機能的実体を指す。

【0032】

数字の前の「約」は、前記数字の値の $\pm 10\%$ を意味する。

【発明を実施するための形態】

【0033】

本発明は、細胞表面上の少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体の発現レベルを決定または測定する工程を含む、好ましくは細胞の細胞老化を生体外で評価、判断、監視および/または予測する方法に関する。

【0034】

一実施形態では、前記方法は、測定した発現レベルを基準発現レベルと比較する工程をさらに含む。

【0035】

時間と共に、細胞の倍加時間は増加する傾向があり、その分化能は低下する傾向がある。さらに、MSCの増殖能および分化能の有意な低下は、ドナー年齢の上昇と共に観察さ

10

20

30

40

50

れた。

【0036】

従って、一実施形態では、本発明の方法は、細胞の増殖能を測定、評価または決定するためのものである。特定の実施形態では、本発明の方法は、老化の発生前または老化の第1の兆候の発生前、特に細胞分裂が行われなくなる前または老化の後期の兆候の発生前に、培養継代数または細胞分裂数を決定するためのものである。

【0037】

老化の後期の兆候の例としては、限定されるものではないが、細胞分裂が行われなくなることは倍加時間の増加（例えば、細胞の倍加時間の少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30、40または50%の増加）、顕微鏡検査によって容易に検出することができる形態学的変化（例えば、細胞の肥大化、核の肥大化、不規則形状、扁平形状、顆粒状細胞質など）、リソソーム - ガラクトシダーゼレベルの上昇（例えば、米国のCell Signaling社によって提供されているような、老化関連 - ガラクトシダーゼ染色キットを用いて測定することができる）、例えば、RT-qPCR（mRNAレベルにおける発現の検出）またはウェスタンブロット（タンパク質レベルにおける発現の検出）などの当業者によって知られている方法により検出することができる、リソソーム - ガラクトシダーゼまたはpH6 - ガラクトシダーゼ（SA - gal）の発現の増加、容易に（例えばRT-PCRなどにより）評価することができる細胞のトランスクリプトームの変化、例えば、限定されるものではないが、ヒトの糖タンパク質NMB、再生関連筋肉プロテアーゼ相同体（RAMP）、PMP-22関連p53アポトーシスエフェクター（PERP）、リンパ球抗原96（LY96）、シグナル伝達兼転写活性化因子1（STAT1）、プリオンタンパク質（PRNP）、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤2Aおよびブラスミノゲン活性化因子阻害剤1型を含むリストから選択される少なくとも1種の遺伝子の発現の上方制御、またはヒアルロン酸合成酵素1（HAS1）、ID1およびオステオプロテゲリンリガンド（TNFSF11）を含むリストから選択される少なくとも1種の遺伝子の発現の下方制御、容易に（例えばRT-PCRなどにより）評価することができる極小RNA、例えば、has-mir-371、has-mir-369-5P、has-mir-29c、has-mir-499およびhas-let-7fを含む群から選択される極小RNAなどの上方制御、および、例えば脂肪細胞系統、骨芽細胞系統、筋細胞系統および/または軟骨細胞系統などの特定の系統に分化する能力の喪失が挙げられる。

【0038】

MSCの脂肪細胞系譜、骨芽細胞系譜および/または軟骨細胞系譜に沿って分化する能力を評価する方法は当業者によく知られている。

【0039】

MSCの脂肪生成経路に沿って分化する能力を評価する方法の非限定的な例は、以下のとおりである。すなわち、細胞を $2 \cdot 10^4$ 個の細胞/cm²で播種し、10% FCS、0.5 mMのイソブチルメチルキサンチン（IBMX）、1 μMのデキサメタゾン、10 μMのインスリン、200 μMのインドメタシンを含むDMEM中で培養し、21日後にOil Red-O染色を行い、プレートリーダーを用いて595 nmで半定量的に分析する。

【0040】

MSCの骨形成経路に沿って分化する能力を評価する方法の非限定的な例は、以下のとおりである。すなわち、細胞を $2 \cdot 10^4$ 個の細胞/cm²で播種し、10% FCS（Invitrogen社）、10 mMのβ-グリセロリン酸、 10^{-7} Mのデキサメタゾンおよび0.2 mMのアスコルビン酸を含むDMEM中で3週間培養し、3~4日ごとに培地の変化を観察する。21日後に、Alcaline phosphatase von Kossaまたはアリザリンレッド染色により細胞を分析する。アリザリンレッド染色を、プレートリーダーを用いて595 nmで半定量的に分析する。

【0041】

MSCの軟骨形成経路に沿って分化する能力を評価する方法の非限定的な例は、以下の

10

20

30

40

50

とおりである。すなわち、 2.2×10^5 個の細胞を含むペレットを分化培地（例えば、OriCell（商標）間葉系幹細胞軟骨分化培地（Cyagen社）または間葉系幹細胞軟骨分化培地（Promocell社）など）で3週間培養し、その後、1%アルシアンプルー（Chroma社、ドイツのKongen）により酸性ムコ多糖類を10~30分間評価する。

【0042】

さらに、一実施形態では、本発明の方法は、細胞の分化能を測定、評価または決定するためのものである。特定の実施形態では、本発明の方法は、細胞の分化能の消失前に前記細胞がなし得る培養継代数または細胞分裂数を決定するためのものである。例えば、本発明の方法は、1種の特定の系統（脂肪細胞系統、骨芽細胞系統、筋細胞系統または軟骨細胞系統）、以下の3種の系統、脂肪細胞系統、骨芽細胞系統および軟骨細胞系統に分化する能力の喪失前、または細胞の分化能の完全な喪失（すなわち、脂肪細胞系統、骨芽細胞系統、筋細胞系統および軟骨細胞系統に分化する能力の喪失）前の、培養継代数または細胞分裂数を決定するためのものであってもよい。

10

【0043】

一実施形態では、当該細胞は、動物細胞、例えば、哺乳類細胞、齧歯類細胞、ネコの細胞、イヌの細胞、ウマの細胞または霊長類細胞、好ましくはヒトの細胞である。

【0044】

一実施形態では、当該細胞は幹細胞、好ましくは成体幹細胞またはそれらの誘導体である。成体幹細胞の例としては、限定されるものではないが、造血幹細胞、乳房幹細胞、腸幹細胞、間葉系幹細胞（MSC）、内皮幹細胞、神経幹細胞、嗅覚成体幹細胞、神経堤幹細胞、精巣幹細胞および筋肉幹細胞が挙げられる。一実施形態では、成体幹細胞は、骨髄、乳腺、腸（特にリーベルキューン腺）、胎盤、脂肪組織、肺、血液、臍帯のハウートンゼリー、歯、脳（例えば、脳室下帯、歯状回または新皮質など）、鼻（嗅覚成体幹細胞は鼻粘膜の嗅覚粘膜細胞から効率的に採取することができる）、毛包、消化管、坐骨神経、心臓流出路、脊髄神経節および交感神経節または精巣に由来している。

20

【0045】

一実施形態では、当該幹細胞は多能性幹細胞、例えば、MSCまたはそれらの誘導体、例えば、骨芽細胞、軟骨細胞、筋細胞（例えば心筋細胞）または脂肪細胞などである。一実施形態では、MSCは、骨髄、臍帯血、ハウートンゼリー（例えば、臍帯中に存在するハウートンゼリーなど）、胎盤、肺、脂肪組織、成体筋肉、角膜基質、歯（例えば、脱落乳歯の歯髓など）、羊水、末梢血などに由来する。一実施形態では、当該細胞はMSC由来のhESC-SA001である。別の実施形態では、当該細胞は骨髄から単離され、かつ/または由来するヒトの初代MSCである。別の実施形態では、当該細胞はウマのMSCである。

30

【0046】

別の実施形態では、当該幹細胞は単能性幹細胞またはそれらの誘導体、例えばケラチノサイトなどである。

【0047】

一実施形態では、当該細胞は胚性幹細胞またはiPSCなどの多能性幹細胞に由来し、ここでiPSCとは人工多能性幹細胞を表す。iPSCは、特定の化学物質（例えば、バルプロ酸、BIX-01294、DZnep、SB431412、PD0325901、チアゾピビンおよびそれらの混合物など）に曝露し、かつ/または形質移入または形質導入（例えば、遺伝子Oct4（Pou5f1）、Sox2、cMy cおよびKlf4のセット）により成体細胞から直接生じることができる多能性幹細胞の一種である。

40

【0048】

一実施形態によれば、当該細胞はヒト胚性幹細胞ではなく、かつ/または当該細胞の採取はヒトの胚の破壊を必要としない。

【0049】

一実施形態では、当該細胞は神経細胞ではない。別の実施形態では、当該細胞はグリア

50

細胞ではない。

【0050】

一実施形態では、当該細胞は、早老症候群、好ましくは早老症細胞を有する患者から採取した細胞である。早老症候群は早期老化に似た稀な遺伝性疾患群であり、その定義は広範囲の疾患に適用することができる。家族性アルツハイマー病および家族性パーキンソン病は年配の個体においてより頻繁に生じる2つのよく知られている加齢促進疾患であるが、早老症（ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群（HGPS）ともいう）は、幼児期の非常に稀な進行性疾患である。この疾患は、早期老化（早老症）の特徴、低身長および低体重をもたらす通常は生後一年間で始まる成長障害、皮膚の真下の脂肪層（皮下脂肪組織）の減少、および特徴的な頭蓋顔面異常、例えば、前頭隆起、発育不十分な顎（小顎症）、異常に突き出た目および/または小さい「くちばしのような」鼻を特徴とする。

10

【0051】

一実施形態では、当該細胞は培養物中の細胞であり、好ましくは細胞株であり、かつ/または初代細胞に由来する、すなわち組織からすぐに単離された細胞である。一実施形態では、当該細胞は、例えば生検により得られる個体の試料から採取される。好ましくは、個体からの試料採取工程は、本発明の方法の一部ではない。

【0052】

従って、一実施形態によれば、本発明の方法は、培養物における細胞株または初代細胞の品質を評価するためのものであり、特定の時間における細胞の増殖能および/または分化能を評価する工程を含んでもよい。従って、本実施形態によれば、本発明の方法は、細胞群またはバッチの品質の確認を目的とした品質管理方法に対応してもよい。前記方法は、例えば、再生医療で使用される幹細胞の増殖および分化能を確認する、または生体外スクリーニングアッセイで使用される細胞の増殖および分化能を確認するのに有用であり得る。

20

【0053】

本明細書で使用される「細胞表面栄養輸送体」という用語は、細胞の血漿膜に固定された栄養輸送体を指す。哺乳類細胞は必要な栄養を「栄養輸送体」を介して細胞表面に取り込み、カタボライトおよび他の成分を排出する。栄養および代謝産物またはカタボライトは、例えば、炭水化物、アミノ酸、無機リン酸、ヌクレオシド、脂質、ビタミン、ヘム、イオンなどである。栄養輸送体は、機能の受動または能動機構に基づいて分類することができる。受動（または促進）輸送体は、それらの電気化学的勾配により溶質を膜全体に拡散させることができる。能動輸送体は、例えばATP合成または加水分解などの多様なエネルギー共役機構を利用して、膜全体に溶質勾配を作り出す。一実施形態では、細胞表面栄養輸送体はSLC系に属し、ここでSLCとは溶質輸送体（Solute Linked Carrier）を表す。

30

【0054】

細胞表面栄養輸送体の例としては、限定されるものではないが、例えば、グルコース取り込み輸送体（例えば、GLUT1など）などのグルコース輸送体、例えば無機リン酸取り込み輸送体（例えば、PiT1もしくはPiT2など）または無機リン酸排出輸送体（例えば、XPR1など）などの無機リン酸輸送体、例えば、中性アミノ酸輸送体（例えば、中性アミノ酸取り込み輸送体（例えば、ASCT1もしくはASCT2など）など）またはカチオン性アミノ酸輸送体（例えば、CAT1など）などのアミノ酸輸送体、ヘム輸送体（例えば、FLVCR1など）、例えばミオイノシトール輸送体（例えば、SMIT1など）などのイノシトール輸送体、および、例えば、リボフラビン取り込み輸送体（例えば、RFT1、RFT3、PAR1もしくはPAR2など）などのリボフラビン輸送体が挙げられる。

40

【0055】

一実施形態では、細胞表面栄養輸送体は、例えば無機リン酸排出輸送体（例えば、XPR1など）などの無機リン酸輸送体、または、例えばグルコース取り込み輸送体（例えば

50

、GLUT1など)などのグルコース輸送体である。

【0056】

一実施形態では、本発明の方法は、XPR1および/またはGLUT1の発現レベルを測定する工程を含む。好ましくは、本発明の方法は、XPR1の発現レベルを測定する工程を含む。一実施形態では、本発明の方法は、XPR1およびGLUT1の発現レベルを測定する工程を含む。

【0057】

別の実施形態では、少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体は、GLUT1、GLUT3および/またはGLUT4ではない。別の実施形態では、少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体はグルコース輸送体ではない。

10

【0058】

本明細書で使用される「発現」という用語は、代わりとして、細胞表面栄養輸送体の転写(すなわち、RNAの発現)または細胞表面栄養輸送体の翻訳(すなわち、タンパク質の発現)あるいは細胞の表面における細胞表面栄養輸送体の存在を指す。

【0059】

発現レベルの決定方法は当業者にはよく知られており、限定されるものではないが、細胞のトランスクリプトーム(一実施形態では、発現は栄養輸送体の転写に関する)またはプロテオーム(一実施形態では、発現は栄養輸送体の翻訳に関する)の決定が挙げられる。

【0060】

本発明の一実施形態では、細胞表面栄養輸送体の発現をRNAレベルにおいて評価する。輸送体の転写レベルの評価方法は先行技術でよく知られている。そのような方法の例としては、限定されるものではないが、RT-PCR、RT-qPCR、ノーザンブロット、例えばマイクロアレイの使用などのハイブリダイゼーション法およびそれらの組み合わせ、例えば、限定されるものではないが、RT-PCRによって得られた単位複製配列のハイブリダイゼーション、例えば次世代DNAシーケンシング(NGS)またはRNA-seq(「全トランスクリプトームショットガンシーケンシング」としても知られている)などのシーケンシングが挙げられる。

20

【0061】

XPR1の発現を評価するために使用することができるPCRまたはqPCRプライマーの例としては、限定されるものではないが、順方向プライマー: 5'-AGAGCTTGGGAGACAAAGCA-3'(配列番号25)-逆方向プライマー: 5'-GTGGACACACACATTCGCAAC-3'(配列番号26)のプライマー対が挙げられる。

30

【0062】

GLUT1の発現を評価するために使用することができるPCRまたはqPCRプライマーの例としては、限定されるものではないが、順方向プライマー: 5'-TCACTGTGCTCCTGGTTCTG-3'(配列番号27)-逆方向プライマー: 5'-CCTCGGGTGTCTTGTCACTT-3'(配列番号28)のプライマー対が挙げられる。

40

【0063】

本発明の一実施形態では、細胞表面栄養輸送体の発現をタンパク質レベルにおいて評価する。試料中のタンパク質レベルの決定方法は当該技術分野でよく知られている。そのような方法の例としては、限定されるものではないが、免疫組織化学、マルチプレックス法(Luminex)、ウェスタンブロット、酵素結合免疫吸着法(ELISA)、サンドイッチELISA、蛍光結合免疫吸着法(FELISA: fluorescent-linked immunosorbent assay)、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、フローサイトメトリー(FACS)などが挙げられる。

【0064】

本発明の一実施形態では、細胞表面栄養輸送体の発現レベルの決定は特に、細胞表面に

50

存在する前記栄養輸送体の検出および定量化に対応している。細胞表面でタンパク質の存在を分析する方法は当業者にはよく知られており、限定されるものではないが、FACS分析、免疫組織化学、細胞分画を伴うウェスタンブロット、酵素結合免疫吸着法（ELISA）、サンドイッチELISA、蛍光結合免疫吸着法（FLISA）、酵素免疫測定法（EIA）、放射免疫測定法（RIA）または画像解析、例えばハイコンテンツ解析などが挙げられる。

【0065】

一実施形態では、少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体の発現レベルの決定は、リガンドの細胞表面栄養輸送体への結合の検出および/または定量化に対応している。好ましくは、前記リガンドは受容体結合ドメインリガンドであり、本発明の方法は、前記受容体結合ドメインリガンドと細胞表面栄養輸送体との間で形成された複合体を検出および/または定量化する工程を含む。別の実施形態では、前記リガンドは前記細胞表面栄養輸送体に特異的な抗体であり、本発明の方法は、前記抗体と前記細胞表面栄養輸送体との間で形成された複合体を検出および/または定量化する工程を含む。

10

【0066】

「例えば、受容体結合ドメインリガンドなどのリガンドの細胞表面栄養輸送体への結合を検出および/または定量化する」という表現は、細胞表面栄養輸送体が存在する場合、栄養輸送体とリガンドとの間で複合体が形成されることを意味する。リガンドが、例えば、限定されるものではないが、抗体の定常断片（Fc）などの検出可能な分子または蛍光化合物（例えば、シアニン染料、アレキサ（Alexa）色素、量子ドット染色など）に共有結合されている場合に、その複合体を検出することができる。リガンドが当業者によく知られている異なる手段でタグ付けされている場合にも、その複合体を検出することができる。例えば、限定されるものではないが、本発明で使用されるタグは、ヘマグルチニンタグ、ポリアルギニン（Poly Arginine）タグ、ポリヒスチジンタグ、Mycタグ、Streptタグ、S-タグ、HATタグ、3xFlagタグ、カルモジュリン（Calmodulin）結合ペプチドタグ、SBPタグ、キチン結合ドメインタグ、GSTタグ、マルトース結合タンパク質タグ、蛍光タンパク質タグ、T7タグ、V5タグおよびExpressタグを含むかそれらからなる群から選択されるタグであってもよい。従って、リガンドの使用により、一方では使用されるリガンドに応じた細胞表面栄養輸送体の同定および検出が、他方では形成された複合体の定量化が可能になる。

20

30

【0067】

一実施形態では、フローサイトメトリー、免疫蛍光または画像解析、例えばハイコンテンツ解析によって結合の検出または定量化を行う。

【0068】

本発明のさらなる態様では、当該リガンドは受容体結合ドメインリガンドであり、ここで、前記受容体結合ドメインリガンドは、細胞表面栄養輸送体と相互作用するエンベロープウイルスの糖タンパク質の可溶性部分由来の受容体結合ドメイン（RBD）の一部または全体を含む。好ましくは、当該リガンドは可溶性であり、すなわち膜貫通ドメインを含まず、従って膜に固定されていない。

【0069】

「エンベロープウイルスの糖タンパク質の可溶性部分由来」という表現は、当該リガンドがウイルスのエンベロープに含まれる糖タンパク質の断片または部分であり、例えばクローニングにより得ることができることを意味する。

40

【0070】

「糖タンパク質」という用語は、エンベロープ糖タンパク質、外被糖タンパク質または融合糖タンパク質を意味するものとして理解されるべきであり、ここで、「糖タンパク質」という用語は、ポリペプチド側鎖に共有結合されたオリゴ糖鎖を含むタンパク質を指す。

【0071】

「細胞表面栄養輸送体と相互作用する」という表現は、糖タンパク質が細胞の表面に存

50

在する受容体を認識しやすいことを意味する。従って、一実施形態では、細胞表面栄養輸送体と相互作用するリガンドは前記細胞表面栄養輸送体と複合体を形成し、この複合体を上に記載した方法によって検出することができる。

【0072】

RBDの一部または全体を含む受容体結合ドメインリガンドを、抗体の定常断片（例えば、ウサギまたはマウス由来のFc断片など）に融合させ、かつ/または蛍光色素または蛍光化合物（例えば、シアニン染料、アレキサ色素、量子ドット染色など）を付加するために化学修飾することができる。

【0073】

RBDは、特にウイルスのエンベロープの糖タンパク質中に存在し、従って、その受容体結合ドメインリガンドは、RBD全体またはRBDの断片もしくは一部を含む。

10

【0074】

一実施形態では、前記ウイルスは、例えば、(i)例えばマウス白血球ウイルス(MLV)、ネコ白血球ウイルス(FELV)またはテナガザル白血球ウイルス(GALV)などのガンマレトロウイルス、および(ii)例えば霊長類T細胞白血球ウイルス(例えば、ヒトT細胞白血球ウイルス(HTLV)およびサルT細胞白血球ウイルス(STLV)など)またはウシ白血球ウイルス(BLV)などのデルタレトロウイルスなどのレトロウイルスを含む群から選択される。

【0075】

ガンマおよびデルタレトロウイルスは、成熟したレトロウイルス粒子中に存在するEnv糖タンパク質をコードする。Envタンパク質をプロペプチドの形態で合成し、これをフーリン(furine)ペプチダーゼによりゴルジ装置で切断し、2種類のポリペプチド、すなわち膜貫通(TM)および細胞表面(SU)成分を得る。SUドメインは2種類の主要なサブドメイン、すなわちTMドメインとの相互作用ドメインおよびRBDを含み、さらに宿主細胞膜受容体と相互しやすい。

20

【0076】

一実施形態では、可溶性受容体結合ドメインリガンドは異種栄養性マウス白血球ウイルスの糖タンパク質から単離されたものであり、本明細書ではXeno.RBDと呼ぶ。

【0077】

一実施形態では、前記Xeno.RBDは、配列番号1のアミノ酸配列またはその断片を含むかそれらからなる。

30

【0078】

一実施形態では、前記断片は、配列番号1のアミノ酸36~316を含むかそれらからなる。

【0079】

一実施形態では、前記断片は、配列番号1のアミノ酸1~297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314または315を含むかそれらからなる。

【0080】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号1のアミノ酸36~297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314または315を含むかそれらからなる。

40

【0081】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号3のDNA配列によってコードされる配列番号2を含むかそれらからなる。

【0082】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号2のアミノ酸36~296を含むかそれらからなる。

【0083】

一実施形態では、前記Xeno.RBDは、配列番号39のアミノ酸配列またはその断

50

片を含むかそれらからなる。

【0084】

一実施形態では、前記断片は、配列番号39のアミノ酸36～316を含むかそれらからなる。

【0085】

一実施形態では、前記断片は、配列番号39のアミノ酸1～297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314または315を含むかそれらからなる。

【0086】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号39のアミノ酸36～297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314または315を含むかそれらからなる。

10

【0087】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号41のDNA配列によってコードされる配列番号40を含むかそれらからなる。

【0088】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号40のアミノ酸36～296を含むかそれらからなる。

【0089】

一実施形態では、可溶性受容体結合ドメインリガンドは、異種栄養性MRVの糖タンパク質から単離されたものであり、本明細書ではXMRV・RBDと呼ぶ。一実施形態では、前記XMRV・RBDは、配列番号29のアミノ酸配列またはその断片を含むかそれらからなる。

20

【0090】

一実施形態では、前記断片は、配列番号29のアミノ酸1～234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282または283を含むかそれらからなる。

30

【0091】

一実施形態では、前記断片は、配列番号29のアミノ酸33～234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282または283を含むかそれらからなる。

【0092】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号35（配列番号29のアミノ酸1～233に対応する）を含むかそれらからなる。

40

【0093】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号29のアミノ酸33～233を含むかそれらからなる。

【0094】

一実施形態では、可溶性受容体結合ドメインリガンドは多栄養性MLVの糖タンパク質から単離されたものであり、本明細書ではPMLV・RBDと呼ぶ。

【0095】

一実施形態では、前記PMLV・RBDは、配列番号30のアミノ酸配列またはその断

50

片を含むかそれらからなる。

【0096】

一実施形態では、前記断片は、配列番号30のアミノ酸1～230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278または279を含むかそれらからなる。

【0097】

一実施形態では、前記断片は、配列番号30のアミノ酸33～230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278または279を含むかそれらからなる。

10

【0098】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号36（配列番号30のアミノ酸1～229に対応する）を含むかそれらからなる。

20

【0099】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号30のアミノ酸33～229を含むかそれらからなる。

【0100】

別の実施形態では、前記PMLV・RBDは、配列番号31のアミノ酸配列またはその断片を含むかそれらからなる。

【0101】

一実施形態では、前記断片は、配列番号31のアミノ酸1～230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269または270を含むかそれらからなる。

30

【0102】

一実施形態では、前記断片は、配列番号31のアミノ酸33～230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269または270を含むかそれらからなる。

40

【0103】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号37（配列番号31のアミノ酸1～229に対応する）を含むかそれらからなる。

【0104】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号31のアミノ酸33～229を含むかそれらからなる。

【0105】

別の実施形態では、前記PMLV・RBDは、配列番号32のアミノ酸配列またはその断片を含むかそれらからなる。

【0106】

50

一実施形態では、前記断片は、配列番号32のアミノ酸1~230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278または279を含むかそれらからなる。

【0107】

一実施形態では、前記断片は、配列番号32のアミノ酸33~230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278または279を含むかそれらからなる。

10

【0108】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号38（配列番号32のアミノ酸1~229に対応する）を含むかそれらからなる。

【0109】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号32のアミノ酸33~229を含むかそれらからなる。

20

【0110】

一実施形態では、可溶性受容体結合ドメインリガンドはヒトT細胞白血病ウイルス-2の糖タンパク質から単離されたものであり、本明細書ではHTLV2-RBDと呼ぶ。

【0111】

一実施形態では、前記HTLV2-RBDは、配列番号4のアミノ酸配列またはその断片を含むかそれらからなる。

【0112】

一実施形態では、前記断片は、配列番号4のアミノ酸19~224を含むかそれらからなり、配列番号4のアミノ酸20~224を含むかそれらからなり、あるいは配列番号4のアミノ酸21~224を含むかそれらからなる。

30

【0113】

一実施形態では、前記断片は、配列番号4のアミノ酸1~179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222または223を含むかそれらからなる。

【0114】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号4のアミノ酸19、20または21~179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222または223を含むかそれらからなる。

40

【0115】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号6のDNA配列によってコードされる配列番号5を含むかそれらからなる。

【0116】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号5のアミノ酸19、20または21~178

50

を含むかそれらからなる。

【0117】

一実施形態では、可溶性受容体結合ドメインリガンドはヒトT細胞白血病ウイルス - 1の糖タンパク質から単離されたものであり、本明細書ではHTLV1-RBDと呼ぶ。一実施形態では、前記HTLV1-RBDは、配列番号7のアミノ酸配列またはその断片を含むかそれらからなる。

【0118】

一実施形態では、前記断片は、配列番号7のアミノ酸1～183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207または208を含むかそれらからなる。

10

【0119】

一実施形態では、前記断片は、配列番号7のアミノ酸21～183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207または208を含むかそれらからなる。

【0120】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号33（配列番号7のアミノ酸1～182に対応する）を含むかそれらからなる。

【0121】

一実施形態では、前記断片は、配列番号7のアミノ酸21～182を含むかそれらからなる。

20

【0122】

一実施形態では、可溶性受容体結合ドメインリガンドはヒトT細胞白血病ウイルス - 4の糖タンパク質から単離されたものであり、本明細書ではHTLV4-RBDと呼ぶ。一実施形態では、前記HTLV4-RBDは、配列番号8のアミノ酸配列またはその断片を含むかそれらからなる。

【0123】

一実施形態では、前記断片は、配列番号8のアミノ酸1～179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203または204を含むかそれらからなる。

30

【0124】

一実施形態では、前記断片は、配列番号8のアミノ酸21～179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203または204を含むかそれらからなる。

【0125】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号34（配列番号8のアミノ酸1～178に対応する）を含むかそれらからなる。

40

【0126】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号8のアミノ酸21～178を含むかそれらからなる。

【0127】

別の実施形態では、前記HTLV4-RBDは、配列番号42のアミノ酸配列またはその断片を含むかそれらからなる。

【0128】

一実施形態では、前記断片は、配列番号42のアミノ酸1～237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、

50

260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、
 270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、
 280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、
 290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、
 300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、
 310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、
 320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、
 330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、
 340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、
 350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、
 360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、
 370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、
 380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、
 390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、
 400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、
 410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、
 420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、
 430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、
 440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、
 450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、
 460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、
 470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、
 480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、
 490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、
 500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、
 510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、
 520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、
 530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、
 540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、
 550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、
 560、561、562、563、564、565、566、567、568、569、
 570、571、572、573、574、575、576、577、578、579、
 580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、
 590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、
 600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、
 610、611、612、613、614、615、616、617、618、619、
 620、621、622、623、624、625、626、627、628、629、
 630、631、632、633、634、635、636、637、638、639、
 640、641、642、643、644、645、646、647、648、649、
 650、651、652、653、654、655、656、657、658、659、
 660、661、662、663、664、665、666、667、668、669、
 670、671、672、673、674、675、676、677、678、679、
 680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、
 690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、
 700、710、711、712、713、714、715、716、717、718、
 719、720、721、722、723、724、725、726、727、728、
 729、730、731、732、733または734を含むかそれらからなる。

【0129】

一実施形態では、前記断片は、配列番号42のアミノ酸24~237、238、239、
 240、241、242、243、244、245、246、247、248、249

10

20

30

40

50

、 2 5 0、 2 5 1、 2 5 2、 2 5 3、 2 5 4、 2 5 5、 2 5 6、 2 5 7、 2 5 8、 2 5 9
 、 2 6 0、 2 6 1、 2 6 2、 2 6 3、 2 6 4、 2 6 5、 2 6 6、 2 6 7、 2 6 8、 2 6 9
 、 2 7 0、 2 7 1、 2 7 2、 2 7 3、 2 7 4、 2 7 5、 2 7 6、 2 7 7、 2 7 8、 2 7 9
 、 2 8 0、 2 8 1、 2 8 2、 2 8 3、 2 8 4、 2 8 5、 2 8 6、 2 8 7、 2 8 8、 2 8 9
 、 2 9 0、 2 9 1、 2 9 2、 2 9 3、 2 9 4、 2 9 5、 2 9 6、 2 9 7、 2 9 8、 2 9 9
 、 3 0 0、 3 0 1、 3 0 2、 3 0 3、 3 0 4、 3 0 5、 3 0 6、 3 0 7、 3 0 8、 3 0 9
 、 3 1 0、 3 1 1、 3 1 2、 3 1 3、 3 1 4、 3 1 5、 3 1 6、 3 1 7、 3 1 8、 3 1 9
 、 3 2 0、 3 2 1、 3 2 2、 3 2 3、 3 2 4、 3 2 5、 3 2 6、 3 2 7、 3 2 8、 3 2 9
 、 3 3 0、 3 3 1、 3 3 2、 3 3 3、 3 3 4、 3 3 5、 3 3 6、 3 3 7、 3 3 8、 3 3 9
 、 3 4 0、 3 4 1、 3 4 2、 3 4 3、 3 4 4、 3 4 5、 3 4 6、 3 4 7、 3 4 8、 3 4 9 10
 、 3 5 0、 3 5 1、 3 5 2、 3 5 3、 3 5 4、 3 5 5、 3 5 6、 3 5 7、 3 5 8、 3 5 9
 、 3 6 0、 3 6 1、 3 6 2、 3 6 3、 3 6 4、 3 6 5、 3 6 6、 3 6 7、 3 6 8、 3 6 9
 、 3 7 0、 3 7 1、 3 7 2、 3 7 3、 3 7 4、 3 7 5、 3 7 6、 3 7 7、 3 7 8、 3 7 9
 、 3 8 0、 3 8 1、 3 8 2、 3 8 3、 3 8 4、 3 8 5、 3 8 6、 3 8 7、 3 8 8、 3 8 9
 、 3 9 0、 3 9 1、 3 9 2、 3 9 3、 3 9 4、 3 9 5、 3 9 6、 3 9 7、 3 9 8、 3 9 9
 、 4 0 0、 4 0 1、 4 0 2、 4 0 3、 4 0 4、 4 0 5、 4 0 6、 4 0 7、 4 0 8、 4 0 9
 、 4 1 0、 4 1 1、 4 1 2、 4 1 3、 4 1 4、 4 1 5、 4 1 6、 4 1 7、 4 1 8、 4 1 9
 、 4 2 0、 4 2 1、 4 2 2、 4 2 3、 4 2 4、 4 2 5、 4 2 6、 4 2 7、 4 2 8、 4 2 9
 、 4 3 0、 4 3 1、 4 3 2、 4 3 3、 4 3 4、 4 3 5、 4 3 6、 4 3 7、 4 3 8、 4 3 9
 、 4 4 0、 4 4 1、 4 4 2、 4 4 3、 4 4 4、 4 4 5、 4 4 6、 4 4 7、 4 4 8、 4 4 9 20
 、 4 5 0、 4 5 1、 4 5 2、 4 5 3、 4 5 4、 4 5 5、 4 5 6、 4 5 7、 4 5 8、 4 5 9
 、 4 6 0、 4 6 1、 4 6 2、 4 6 3、 4 6 4、 4 6 5、 4 6 6、 4 6 7、 4 6 8、 4 6 9
 、 4 7 0、 4 7 1、 4 7 2、 4 7 3、 4 7 4、 4 7 5、 4 7 6、 4 7 7、 4 7 8、 4 7 9
 、 4 8 0、 4 8 1、 4 8 2、 4 8 3、 4 8 4、 4 8 5、 4 8 6、 4 8 7、 4 8 8、 4 8 9
 、 4 9 0、 4 9 1、 4 9 2、 4 9 3、 4 9 4、 4 9 5、 4 9 6、 4 9 7、 4 9 8、 4 9 9
 、 5 0 0、 5 0 1、 5 0 2、 5 0 3、 5 0 4、 5 0 5、 5 0 6、 5 0 7、 5 0 8、 5 0 9
 、 5 1 0、 5 1 1、 5 1 2、 5 1 3、 5 1 4、 5 1 5、 5 1 6、 5 1 7、 5 1 8、 5 1 9
 、 5 2 0、 5 2 1、 5 2 2、 5 2 3、 5 2 4、 5 2 5、 5 2 6、 5 2 7、 5 2 8、 5 2 9
 、 5 3 0、 5 3 1、 5 3 2、 5 3 3、 5 3 4、 5 3 5、 5 3 6、 5 3 7、 5 3 8、 5 3 9
 、 5 4 0、 5 4 1、 5 4 2、 5 4 3、 5 4 4、 5 4 5、 5 4 6、 5 4 7、 5 4 8、 5 4 9 30
 、 5 5 0、 5 5 1、 5 5 2、 5 5 3、 5 5 4、 5 5 5、 5 5 6、 5 5 7、 5 5 8、 5 5 9
 、 5 6 0、 5 6 1、 5 6 2、 5 6 3、 5 6 4、 5 6 5、 5 6 6、 5 6 7、 5 6 8、 5 6 9
 、 5 7 0、 5 7 1、 5 7 2、 5 7 3、 5 7 4、 5 7 5、 5 7 6、 5 7 7、 5 7 8、 5 7 9
 、 5 8 0、 5 8 1、 5 8 2、 5 8 3、 5 8 4、 5 8 5、 5 8 6、 5 8 7、 5 8 8、 5 8 9
 、 5 9 0、 5 9 1、 5 9 2、 5 9 3、 5 9 4、 5 9 5、 5 9 6、 5 9 7、 5 9 8、 5 9 9
 、 6 0 0、 6 0 1、 6 0 2、 6 0 3、 6 0 4、 6 0 5、 6 0 6、 6 0 7、 6 0 8、 6 0 9
 、 6 1 0、 6 1 1、 6 1 2、 6 1 3、 6 1 4、 6 1 5、 6 1 6、 6 1 7、 6 1 8、 6 1 9
 、 6 2 0、 6 2 1、 6 2 2、 6 2 3、 6 2 4、 6 2 5、 6 2 6、 6 2 7、 6 2 8、 6 2 9
 、 6 3 0、 6 3 1、 6 3 2、 6 3 3、 6 3 4、 6 3 5、 6 3 6、 6 3 7、 6 3 8、 6 3 9
 、 6 4 0、 6 4 1、 6 4 2、 6 4 3、 6 4 4、 6 4 5、 6 4 6、 6 4 7、 6 4 8、 6 4 9 40
 、 6 5 0、 6 5 1、 6 5 2、 6 5 3、 6 5 4、 6 5 5、 6 5 6、 6 5 7、 6 5 8、 6 5 9
 、 6 6 0、 6 6 1、 6 6 2、 6 6 3、 6 6 4、 6 6 5、 6 6 6、 6 6 7、 6 6 8、 6 6 9
 、 6 7 0、 6 7 1、 6 7 2、 6 7 3、 6 7 4、 6 7 5、 6 7 6、 6 7 7、 6 7 8、 6 7 9
 、 6 8 0、 6 8 1、 6 8 2、 6 8 3、 6 8 4、 6 8 5、 6 8 6、 6 8 7、 6 8 8、 6 8 9
 、 6 9 0、 6 9 1、 6 9 2、 6 9 3、 6 9 4、 6 9 5、 6 9 6、 6 9 7、 6 9 8、 6 9 9
 、 7 0 0、 7 1 0、 7 1 1、 7 1 2、 7 1 3、 7 1 4、 7 1 5、 7 1 6、 7 1 7、 7 1 8
 、 7 1 9、 7 2 0、 7 2 1、 7 2 2、 7 2 3、 7 2 4、 7 2 5、 7 2 6、 7 2 7、 7 2 8
 、 7 2 9、 7 3 0、 7 3 1、 7 3 2、 7 3 3または7 3 4を含むかそれらからなる。

【 0 1 3 0 】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号 4 2 のアミノ酸 2 2 ~ 2 3 7 を含むかそれら

からなり、配列番号 42 のアミノ酸 23 ~ 237 を含むかそれらからなり、あるいは配列番号 42 のアミノ酸 24 ~ 237 を含むかそれらからなる。

【0131】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号 42 のアミノ酸 1 ~ 236 を含むかそれらからなる。別の実施形態では、前記断片は、配列番号 42 のアミノ酸 24 ~ 236 を含むかそれらからなる。

【0132】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号 45 の DNA 配列によってコードされる配列番号 42 を含むかそれらからなる。

【0133】

一実施形態では、可溶性受容体結合ドメインリガンドはヒト T 細胞白血病ウイルス - 3 の糖タンパク質から単離されたものであり、本明細書では HTLV3 . RBD と呼ぶ。一実施形態では、前記 HTLV3 . RBD は、配列番号 43 のアミノ酸配列またはその断片を含むかそれらからなる。

【0134】

一実施形態では、前記断片は、配列番号 43 のアミノ酸 1 ~ 181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491 または 492、またははその断片を含むかそれらからなる。

【0135】

一実施形態では、前記断片は、配列番号 43 のアミノ酸 23 ~ 181、182、183

10

20

30

40

50

、 184、185、186、187、188、189、190、191、192、193
 、 194、195、196、197、198、199、200、201、202、203
 、 204、205、206、207、208、209、210、211、212、213
 、 214、215、216、217、218、219、220、221、222、223
 、 224、225、226、227、228、229、230、231、232、233
 、 234、235、236、237、238、239、240、241、242、243
 、 244、245、246、247、248、249、250、251、252、253
 、 254、255、256、257、258、259、260、261、262、263
 、 264、265、266、267、268、269、270、271、272、273
 、 274、275、276、277、278、279、280、281、282、283 10
 、 284、285、286、287、288、289、290、291、292、293
 、 294、295、296、297、298、299、300、301、302、303
 、 304、305、306、307、308、309、310、311、312、313
 、 314、315、316、317、318、319、320、321、322、323
 、 324、325、326、327、328、329、330、331、332、333
 、 334、335、336、337、338、339、340、341、342、343
 、 344、345、346、347、348、349、350、351、352、353
 、 354、355、356、357、358、359、360、361、362、363
 、 364、365、366、367、368、369、370、371、372、373
 、 374、375、376、377、378、379、380、381、382、383 20
 、 384、385、386、387、388、389、390、391、392、393
 、 394、395、396、397、398、399、400、401、402、403
 、 404、405、406、407、408、409、410、411、412、413
 、 414、415、416、417、418、419、420、421、422、423
 、 424、425、426、427、428、429、430、431、432、433
 、 434、435、436、437、438、439、440、441、442、443
 、 444、445、446、447、448、449、450、451、452、453
 、 454、455、456、457、458、459、460、461、462、463
 、 464、465、466、467、468、469、470、471、472、473
 、 474、475、476、477、478、479、480、481、482、483 30
 、 484、485、486、487、488、489、490、491または492、ま
 たはその断片を含むかそれらからなる。

【0136】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号43のアミノ酸1～180を含むかそれらからなる。別の実施形態では、前記断片は、配列番号43のアミノ酸23～180を含むかそれらからなる。

【0137】

別の実施形態では、前記断片は、配列番号44のDNA配列によってコードされる配列番号43を含むかそれらからなる。

【0138】

好ましい実施形態によれば、受容体結合ドメインリガンドは、配列番号1、2、4、5、7、8、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、42および43の配列、その断片および変異体を含む群から選択され、より好ましくは配列番号2、5、33、34、35、36、37、38および40の配列、その断片および変異体を含む群から選択される。別の実施形態によれば、受容体結合ドメインリガンドは、配列番号3、6、41、44および45の配列を含む群から選択されるDNA配列によってコードされる。

【0139】

一実施形態では、受容体結合ドメインリガンドは、配列番号1、2、4、5、7、8、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、42およ

10

20

30

40

50

び43の配列のうちの1つと少なくとも70%の配列同一性、好ましくは配列番号1、2、4、5、7、8、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、42および43の配列のうちの1つと少なくとも約75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%またはそれ以上の配列同一性を示す配列を含むかそれらからなる。

【0140】

別の実施形態では、受容体結合ドメインリガンドは、配列番号3、6、41、44および45の配列のうちの1つと少なくとも70%の配列同一性、好ましくは配列番号3、6、41、44および45の配列のうちの1つと少なくとも約75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%またはそれ以上の配列同一性を示すDNA配列によってコードされる。

10

【0141】

一実施形態では、受容体結合ドメインリガンドは、配列番号1、2、4、5、7、8、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、42および43の配列を有するポリペプチドのうちの1種の変異体である。

【0142】

本明細書で使用される用語としてのポリペプチド「変異体」は、1つ以上の置換、欠失、付加および/または挿入の点で具体的に本明細書に開示されているポリペプチドとは典型的に異なるポリペプチドである。そのような変異体は天然に生じるものであってもよく、あるいは、例えば、本明細書に記載されているように、かつ/または当該技術分野でよく知られている多くの技術のいずれかを用いて、上記ポリペプチド配列の1つ以上を修飾し、かつポリペプチドの1つ以上の生物活性を評価することにより、合成により生成したものであってもよい。修飾はポリペプチドの構造において行ってもよく、望ましい特性を有する変異体または誘導体ポリペプチドをコードする機能性分子をなお得ることができる。

20

【0143】

ポリペプチドのアミノ酸配列を変化させて、本発明のリガンドの均等物またはさらに改良された変異体または一部を生成したい場合、当業者は典型的に、コード化DNA配列のコドンの1つ以上を変化させる。例えば、細胞表面栄養輸送体に結合するその能力を大きく喪失することなく、特定のアミノ酸をタンパク質構造中の他のアミノ酸で置換してもよい。タンパク質の生物学的機能活性を定めるのはタンパク質の結合能力および性質であるため、特定のアミノ酸配列の置換は、タンパク質配列および当然ながらその基礎をなすDNAコード配列において行ってもよく、それにも関わらず、同様の特性を有するタンパク質を得ることができる。従って、ペプチド配列または前記ペプチドをコードする対応するDNA配列において、それらの生物学的有用性もしくは活性を大きく喪失することなく、様々な変化が可能であると想定される。多くの例では、ポリペプチド変異体は、1つ以上の保存的置換を含む。「保存的置換」とは、ペプチド化学の当業者がポリペプチドの二次構造および親水性/疎水性(hydrophobic nature)が実質的に変化されないことを期待するように、あるアミノ酸を同様の特性を有する別のアミノ酸で置き換える置換である。従って、上に概説したように、アミノ酸置換は一般に、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、大きさなどに基づいている。上記特性のうちの様々を考慮した例示的な置換は当業者によく知られており、アルギニンおよびリジン、グルタミン酸およびアスパラギン酸、セリンおよびトレオニン、グルタミンおよびアスパラギンならびにバリン、ロイシンおよびイソロイシンが挙げられる。さらに、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性および/または両親媒性における類似性に基づいてアミノ酸置換を行ってもよい。例えば、負に荷電したアミノ酸としてはアスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられ、正に荷電したアミノ酸としてはリジンおよびアルギニンが挙げられ、同様の親水性値を有する荷電していない極性の頭部基を有するアミノ酸としては、ロイシン、イソロイシンおよびバリン、グリシンおよびアラニン、アスパラギンおよびグルタミンならびにセリン、トレオニン、フェニルアラニンおよびチロシンが挙げられる。保

30

40

50

存的变化を表し得るアミノ酸の他の群としては、(1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr、(2) cys、ser、tyr、thr、(3) val、ile、leu、met、ala、phe、(4) lys、arg、his、および(5) phe、tyr、trp、hisが挙げられる。変異体は、さらにまたは代わりとして、非保存的变化を含んでいてもよい。好ましい実施形態では、ポリペプチド変異体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸の置換、欠失または付加により、天然配列とは異なる。変異体は、さらに(または代わりとして)、例えば、ポリペプチドの免疫原性、二次構造および親水性/疎水性に対して最小の影響を有するアミノ酸の欠失または付加によって修飾してもよい。

【0144】

一実施形態では、受容体結合ドメインリガンドは、例えばFc断片またはGFPなどの検出タグに融合された受容体結合ドメインの一部または全体を含む融合タンパク質である。Fc断片の例としては、限定されるものではないが、ウサギFc断片(配列番号10によってコードされる配列番号9のアミノ酸配列)、およびマウスFc断片(配列番号12によってコードされる配列番号11のアミノ酸配列)が挙げられる。

【0145】

一実施形態では、受容体結合ドメインリガンドは、マウスFc断片に融合されたHTLV2・RBD(配列番号13のDNA配列によってコードされる)、およびウサギFc断片に融合されたXeno・RBD(配列番号14のDNA配列によってコードされる)を含む群から選択される。

【0146】

一実施形態では、受容体結合ドメインリガンドは、例えば大腸菌、酵母、バキュロウイルス-昆虫細胞または哺乳類細胞(HEKもしくはCHOなど)発現系などの例えば当該技術分野で知られているあらゆる発現系などを用いるクローニング方法によって得られる。一実施形態では、受容体結合ドメインリガンドの配列は、N末端において前記受容体結合ドメインリガンドの分泌を可能にするペプチドシグナル配列に融合されている。ペプチドシグナル配列の例としては、限定されるものではないが、ヒトのIL-2ペプチドシグナル(配列番号15)、ヒトのアルブミンペプチドシグナル(配列番号16)、ヒトのキモトリプシノーゲンペプチドシグナル(配列番号17)、ヒトのトリプシノーゲン-2ペプチドシグナル(配列番号18)、ガウシアルシフェラーゼペプチドシグナル(配列番号19)、およびマウスIgMペプチドシグナル(配列番号20)が挙げられる。

【0147】

一実施形態では、受容体結合ドメインリガンドは、Xeno・RBD、XMRV・RBDまたはPMLV・RBDの一部または全体を含み、XPR1栄養輸送体に結合する。一実施形態では、受容体結合ドメインリガンドは、HTLV2・RBD、HTLV1・RBD、HTLV3・RBDまたはHTLV4・RBDの一部または全体を含み、GLUT1栄養輸送体に結合する。

【0148】

本明細書で使用される「基準」という用語は、測定した発現レベルに関する比較のための基準として使用することができるあらゆる好適な基準発現レベルを広く包含する。

【0149】

一実施形態では、標準的な基準は、発現レベルを決定するために使用されるものとして細胞の同じ培養物中で以前に決定した個別の基準である。

【0150】

本発明の第1の実施形態では、基準発現レベルは、本発明のアッセイを行う日の好ましくは1、2、3、4、5、6、8、9、10日またはそれ以前、1、2、3、4、5、6、7、8週間前、1、2、3、4、5ヶ月またはそれ以前、あるいは1、2、3、4、5年またはそれ以前に細胞の培養物中で測定した発現レベルである。

【0151】

第2の実施形態では、当該細胞を凍結し、その後に解凍し、基準発現レベルは凍結前に

10

20

30

40

50

測定した発現レベルである。

【0152】

これらの実施形態によれば、測定した発現レベルと個別の基準発現レベルとの差は細胞老化または老化を示している。

【0153】

本発明の一実施形態では、基準発現レベルは「若い」細胞群で測定した発現レベルである。一実施形態では、若い細胞群は、完全な分化特性（例えば、MSCの場合、若い細胞は骨芽細胞系譜、軟骨細胞系譜および脂肪細胞系譜に沿って分化することができ、かつ任意で筋細胞系統に分化することができること）を示す。別の実施形態では、若い細胞群は、正常な倍加時間（正常な倍加時間は細胞の種類に依存する）で完全な増殖能を示す。別の実施形態では、若い細胞群は老化の兆候（特に後期の兆候）を示さない（老化の後期の兆候の例は上に列挙されている）。一実施形態では、若い細胞群は、老化の兆候（特に、本発明において列挙されている老化の最後の兆候）の発生前に少なくとも10回、好ましくは少なくとも15、20、25、30、35、40、45または50回さらに分裂することができる。一実施形態では、若い細胞群は、10回以下、好ましくは9、8、7、6、5、4、3、2、1回継代されている。本実施形態によれば、測定した発現レベルと基準発現レベルとの差は細胞老化または老化を示している。

10

【0154】

本発明の一実施形態では、基準発現レベルは、「老齢」細胞群において測定した発現レベルである。一実施形態では、老齢細胞群は有意に変化した分化能を示し、例えば、当該細胞は少なくとも1種の特定の細胞系統にもはや分化することができない（例えば、MSCの場合、骨芽細胞系統、軟骨細胞系統、脂肪細胞系統または筋細胞系統のうちの少なくとも1種への分化はもはや不可能である）、あるいは以下の3種の系統：骨芽細胞系統、軟骨細胞系統および脂肪細胞系統に分化することができない、あるいはそれ以上分化することができない。別の実施形態では、老齢細胞群は、細胞分裂が行われなくなること、または倍加時間の増加（例えば、細胞の種類に応じた正常な倍加時間と比較して少なくとも20%、好ましくは少なくとも30、40または50%の倍加時間の増加）を示す細胞群である。別の実施形態では、老齢細胞群は、老化の兆候（特に後期の兆候）（その列挙について上記を参照）を示す細胞群である。別の実施形態では、老齢細胞群は10回またはそれ以上、好ましくは20、25、30、35、40、45、50回またはそれ以上継代されている。本実施形態によれば、測定した発現レベルと基準発現レベルとの差がないことは細胞老化または老化を示している。

20

30

【0155】

一実施形態では、当該基準は、アルゴリズムおよび他の統計的および階層的分類方法を用いて構築される。

【0156】

別の態様では、基準発現レベルは、格納された発現レベルを提供するためのデータベースに格納されており、格納された発現レベルを使用して発現レベルの差を決定する。当該データベースは、例えばコンピュータまたはサーバ上に格納されていてもよい。

【0157】

一実施形態では、当該発現レベルは正規化されており、すなわち当該発現レベルは、細胞表面栄養輸送体の発現と別の遺伝子またはタンパク質の発現との比に対応している。

40

【0158】

一実施形態では、細胞表面栄養輸送体はXPR1であり、正規化のために使用される他の遺伝子またはタンパク質はGLUT1である。別の実施形態では、細胞表面栄養輸送体はGLUT1であり、正規化のために使用される他の遺伝子またはタンパク質はXPR1である。

【0159】

別の実施形態では、細胞表面栄養輸送体はXPR1またはGLUT1であり、好ましくはXPR1であり、正規化のために使用される他の遺伝子またはタンパク質は、GAPD

50

H、CD29、CD44、CD73、CD105およびCD166を含む群から選択される。

【0160】

本発明では、2つの数値、特に2つの発現レベルは、第1の数値がより高い(例えば、第1の数値は第2の数値よりも約20%高い、好ましくは第2の数値よりも約30、40、50、60、70、80、90%またはそれ以上高い)あるいは、第2の数値よりも低い(例えば、第1の数値は第2の数値よりも約20%低い、好ましくは第2の数値よりも約30、40、50、60、70、80、90%またはそれ以上低い)場合、異なるものとみなされる。

【0161】

本発明の別の目的は、少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体、好ましくはXPR1および/またはGLUT1、より好ましくはXPR1およびGLUT1の発現レベルを測定するための手段を含む、本発明の方法を実施するためのキットである。

【0162】

一実施形態では、少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体の発現レベルをRNAレベルにおいて評価し、本発明のキットは、全RNA抽出のための手段、全RNAの逆転写のための手段、および少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体、好ましくはXPR1および/またはGLUT1のRNAの発現を定量化するための手段を含んでいてもよい。一実施形態では、少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体、好ましくはXPR1および/またはGLUT1のRNAの発現を定量化するための手段は、前記細胞表面栄養輸送体、好ましくはXPR1および/またはGLUT1に特異的なPCRまたはqPCRプライマーである。XPR1に特異的なPCTまたはqPCRプライマーの例としては、限定されるものではないが、順方向プライマー：5'-AGAGCTTGGGAGACAAAGCA-3'(配列番号25)-逆方向プライマー：5'-GTGGACACAACATTCGCAAC-3'(配列番号26)のプライマー対が挙げられる。GLUT1に特異的なPCTまたはqPCRプライマーの例としては、限定されるものではないが、順方向プライマー：5'-TCACTGTGCTCCTGGTTCTG-3'(配列番号27)-逆方向プライマー：5'-CCTCGGGTGTCTTGTCACTT-3'(配列番号28)のプライマー対が挙げられる。一実施形態では、当該キットは、定量的PCRを実施するための試薬(例えば、緩衝液、酵素など)も含む。一実施形態では、本発明のキットは、RNAレベルにおいて少なくとも1種の正規化遺伝子の発現レベルを検出するための手段も含んでいてもよい。

【0163】

別の実施形態では、少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体の発現レベルをタンパク質レベルにおいて評価し、本発明のキットは、少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体、好ましくはXPR1および/またはGLUT1を検出するための手段を含んでいてもよい。一実施形態では、少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体を検出するための前記手段は、前記少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体、好ましくはXPR1および/またはGLUT1に特異的な抗体である。別の実施形態では、少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体を検出するための前記手段は、本発明において定義され、かつ少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体に特異的なRBDである。一実施形態では、本発明のキットは、少なくとも1種の正規化タンパク質の発現レベルを検出するための手段も含んでいてもよい。

【0164】

本発明は、細胞老化(好ましくは、XPR1および/またはGLUT1は細胞老化の早期バイオマーカーである)または老化のバイオマーカーおよび/または細胞分裂の累積のバイオマーカーとしての、細胞表面栄養輸送体、好ましくはXPR1および/またはGLUT1にも関する。

【0165】

本発明は、細胞の増殖能および/または分化能のバイオマーカーとしての細胞表面栄養輸送体、好ましくはXPR1および/またはGLUT1にも関する。一実施形態では、細

10

20

30

40

50

胞表面栄養輸送体、好ましくはX P R 1および/またはG L U T 1は、幹細胞性のバイオマーカーである。

【0166】

本発明は、細胞群、特に再生医療に使用される細胞群または生体外スクリーニングアッセイで使用される細胞群の品質のバイオマーカーとしての、細胞表面栄養輸送体、好ましくはX P R 1および/またはG L U T 1にも関する。

【0167】

本発明は、少なくとも1種の細胞表面栄養輸送体、好ましくはX P R 1および/またはG L U T 1、より好ましくはX P R 1の発現レベルを決定または測定する工程を含む、例えば細胞老化を減速する(老化防止効果)または促進する(加齢促進または老化促進効果)

10

【0168】

化合物などの細胞老化に影響を与える化合物の生体外スクリーニング方法にも関する。一実施形態では、当該生体外方法は、早老症候群、好ましくは早老症に影響を与える化合物をスクリーニングするためのものである。早老症候群および早老症は老化促進モデルである。一実施形態では、当該生体外方法は、老化防止活性により早老症候群を治療するため、好ましくは早老症を治療するために使用することができる化合物をスクリーニングするためのものである。

【0169】

一実施形態では、当該生体外方法は、癌細胞に影響を与える化合物をスクリーニングするためのものである。癌細胞はそれらの老化回避能力を特徴とする。一実施形態では、当該生体外方法は、老化促進(または加齢促進)活性により癌細胞を治療するために使用することができる化合物をスクリーニングするためのものである。

20

【0170】

一実施形態では、本発明の方法は、測定した発現レベルを基準発現レベルと比較する工程をさらに含む。

【0171】

一実施形態では、基準発現レベルは、試験化合物の老化防止または老化促進効果についての、指標値、1つ以上のリスク予測アルゴリズムから得られたもの、または計算した指標である。基準は細胞集団研究から得られた数または値に相対的であってもよく、前記化合物の老化防止または老化促進効果を試験するために使用されるものと同じであり、かつ

30

【0172】

同じ培養条件を用いて同じ培地で培養した細胞に基づいていることが好ましい。本発明の別の実施形態では、基準発現レベルは、老化促進または老化防止効果を示さないことが知られている化合物に曝露した対照細胞試料における発現レベルの測定から得られる。本実施形態によれば、測定した発現レベルと基準発現レベルとの差は、試験した化合物の老化促進または老化防止効果を示している。

【0173】

本発明の別の実施形態では、基準発現レベルは、老化促進または老化防止効果を示すことが知られている化合物に曝露した対照細胞試料における発現レベルの測定から得られる。本実施形態によれば、測定した発現レベルと基準発現レベルとの間に差がないことは、試験した化合物の老化促進または老化防止効果を示している。

40

【0174】

本発明の一実施形態では、基準発現レベルは、試験化合物の非存在下での対照細胞培養物における発現レベルの測定から得られる。本実施形態によれば、測定した発現レベルと基準発現レベルとの差は試験化合物の老化促進または老化防止効果を示している。

【0175】

一実施形態では、細胞の培養物を用意し、第1の培養物バッチを試験化合物に曝露し(発現レベルの測定のため)、第2の培養物バッチを試験化合物に曝露しない(基準発現レベルの測定のため)、2つの異なる培養物バッチに分ける。

【図面の簡単な説明】

50

【0176】

【図1A】細胞培養継代（P：継代）によるXPR1/GLUT1比の漸進的变化を示すグラフの組み合わせである。累積分裂数および培養継代数によるhESC-SA001由来MSCの倍加時間の漸進的变化。

【図1B】細胞培養継代（P：継代）によるXPR1/GLUT1比の漸進的变化を示すグラフの組み合わせである。累積分裂数および培養継代数によるXPR1（左のパネル）およびGLUT1（右のパネル）の細胞表面発現の漸進的变化。

【図1C】細胞培養継代（P：継代）によるXPR1/GLUT1比の漸進的变化を示すグラフの組み合わせである。累積分裂数および培養継代数によるXPR1/GLUT1比の漸進的变化。

10

【図1D】細胞培養継代（P：継代）によるXPR1/GLUT1比の漸進的变化を示すグラフの組み合わせである。累積分裂数および培養継代数によるXPR1のmRNAの相対的発現レベル（GAPDHに対して正規化）の漸進的变化。

【図2】ウマの幹細胞株における培養継代数（P）によるXPR1発現を示すヒストグラムである。MESF：可溶性蛍光色素分子等量。

【図3】骨髄由来hMSC細胞株における培養継代数（P）によるXPR1発現を示すヒストグラムである。MESF：可溶性蛍光色素分子等量。* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ （スチューデントのt検定）。

【図4A】ウシ胎児血清の減少により誘導される増殖に関する減速モデルにおける、XPR1およびGLUT1発現を表す。

20

【図4B】ウシ胎児血清の減少により誘導される増殖に関する減速モデルにおける、XPR1/GLUT1比を表す。

【図4C】ウシ胎児血清の減少により誘導される増殖に関する減速モデルにおける、細胞増殖を表す。

【図5】増殖に関する老化加速モデル（マイトマイシン）および老化防止モデル（ラパマイシン）におけるXPR1/GLUT1比を表す。

【実施例】

【0177】

以下の実施例により、本発明についてさらに説明する。

【0178】

実施例1：ヒトMSCの増殖能を監視するための方法

30

【0179】

材料および方法

MSCをTrypLE Express (Life Technologies社)を用いて37℃で5分間剥離し、96ウェルV型マイクロプレートに移した。各結合のために 3×10^4 個の細胞を使用した。RBDを0.1%アジ化ナトリウムおよび1mMのEDTAを含む培地において対で(Glut1-RBD、マウスFcおよびXeno-RBD、ウサギFc)事前に混合した。RBDをMPCに添加し、37℃で20分間インキュベートした。細胞をPBS/2%FCSで1回洗浄し、次いで、 $0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ のDAPIを含む結合緩衝液(PBS/2%FCS/0.1%アジ化ナトリウム/1mMのEDTA)中で、Alexa Fluor 647ヤギ抗ウサギIgG (Invitrogen社、1:400)およびR-PEヤギ抗マウスIgG1 (Invitrogen社、1:200)抗体と共にインキュベートして当該分析を生細胞に限定した。4℃で30分間インキュベートした後、細胞を洗浄し、フローサイトメリー分析の前に結合緩衝液に再懸濁した。405、488および640nmの励起によりFACSVerseフローサイトメーター(BD Biosciences社)で蛍光シグナルを取得し、FlowJoソフトウェア(Tree Star社)を用いてデータ分析を行った。死細胞を当該分析から除外した。「Fluorescence minus one」(FMO)対照を使用してRBDチャンネルにおけるバックグラウンドレベルを確立した(R-PEおよびAF647)。製造業者の説明書に従い、校正ビーズ(R-PEおよびAF647 MESF Quantum Beads、Bangs Laboratories社)を用いて、シグナルを可溶性蛍光色素分子等量(MESF)値に変換し

40

50

た。

【0180】

結果

図1に示すように、XPR1の発現レベルは、胚性幹細胞(SA001細胞)由来のヒトMSCの累積分裂数と共に増加している。この発現の増加は、細胞表面発現(図1B)およびmRNA発現(図1D)の両方で観察される。対照的に、GLUT1の発現レベルは累積分裂数と共に減少している(図1B)。

【0181】

さらに、図1Cに示すように、XPR1/GLUT1比は、胚性幹細胞(SA001細胞)由来のヒトMSCの累積分裂数と共に増加している。

10

【0182】

これらの結果から、XPR1、GLUT1およびXPR1/GLUT1比を細胞老化のバイオマーカーとして使用できることが確認される。

【0183】

実施例2：ウマの幹細胞におけるXPR1発現

【0184】

材料および方法

MSCをTrypLE Express(Life Technologies社)を用いて37℃で5分間剥離し、96ウェルV型マイクロプレートに移した。各結合のために 3×10^4 個の細胞を使用した。0.1%アジ化ナトリウムおよび1mMのEDTAを含む培地で希釈したXeno.RBD。ウサギFcをMPCに添加し、37℃で20分間インキュベートした。細胞をPBS/2%FCSで1回洗浄し、次いで、0.3 μ g/mLのDAPIを含む結合緩衝液(PBS/2%FCS/0.1%アジ化ナトリウム/1mMのEDTA)中で、Alexa Fluor 647ヤギ抗ウサギIgG(Invitrogen社、1:400)抗体と共にインキュベートして当該分析を生細胞に限定した。4℃で30分間インキュベートした後、細胞を洗浄し、フローサイトメトリー分析の前に結合緩衝液に再懸濁した。405、488および640nmの励起によりFACSVerseフローサイトメーター(BD Biosciences社)で蛍光シグナルを取得し、Flowjoソフトウェア(Tree Star社)を用いてデータ分析を行った。死細胞を当該分析から除外した。「Fluorescence minus one」(FMO)対照を使用してRBDチャンネル(AF647)におけるバックグラウンドレベルを確立した。製造業者の説明書に従い、校正ビーズ(AF647 MESF Quantum Beads、Bangs Laboratories社)を用いてシグナルを可溶性蛍光色素分子等量(MESF)値に変換した。

20

30

【0185】

結果

図2に示すように、XPR1の発現レベルはウマのMSCにおける培養継代数と共に増加している。従って、この結果から、XPR1はウマの幹細胞における細胞老化の潜在的バイオマーカーであることも実証される。

【0186】

実施例3：XPR1発現および骨髄由来hMSCの細胞老化

【0187】

材料および方法

異なる継代数(P4、P6およびP8)における2人のドナーから採取したヒト骨髄由来MSCを解凍し、60個の細胞/cm²の細胞密度で播種した。MEM、L-グルタミン、P/Sおよび16.5%のロット選択したウシ胎児血清を含む完全培地において細胞を増殖させた。培養物が80%の集密に達したら、細胞をトリプシン(0.25%トリプシン/EDTA、Life Technologies社)により37℃で5分間剥離し、各継代数における各細胞群の数を数えて倍加時間(単位：時間)を決定した。

40

【0188】

各継代数における各バッチの 3×10^4 個の細胞を、各結合のために96ウェルV型マイクロプレートに移した。

50

【0189】

0.1%アジ化ナトリウムおよび1mMのEDTAを含む培地においてXeno.RBD.ウサギFcを調製した。Xeno.RBD.rFcをMSCに添加し、37℃で20分間インキュベートした。細胞を緩衝液B(PBS/2%FCS/0.1%アジ化ナトリウム/1mMのEDTA)で1回洗浄し、次いで、1μg/mLのDAPIを含む緩衝液B中でAlexa Fluor 647ヤギ抗ウサギIgG(Life Technologies社、1/1000)と共にインキュベートして当該分析を生細胞に限定した。暗所において4℃で30分間インキュベートした後、細胞を2回洗浄し、フローサイトメトリー分析の前に緩衝液Bに再懸濁した。405、488および640nmの励起によりFACSVerseフローサイトメーター(BD Biosciences社)で蛍光シグナルを取得し、Flowjoソフトウェア(Tree Star社)を用いてデータ分析を行った。

10

【0190】

死細胞を当該分析から除外した。AF647ヤギ抗ウサギ二次抗体のみで標識した細胞を使用してバックグラウンドレベルを確立した。製造業者の説明書に従い、校正ビーズ(AF647 MESF Quantum Beads, Bangs Laboratories社)を用いて、シグナルを可溶性蛍光色素分子等量(MESF)値に変換した。

【0191】

データはXPR1の3回の標識の平均±SDを表し、スチューデントt-検定を用いて統計的有意性を決定した。p<0.05を有意であるとみなした。

【0192】

結果

図3に示すように、XPR1発現は、細胞分裂数(継代数に反映される)および各ドナーの倍加時間と共に増加している。集団の倍加時間の増加は、細胞が複製老化し始めていることを示している。

20

【0193】

これらの結果から、XPR1の増加を骨髄由来のhMSCにおいて細胞老化のバイオマーカーとして使用できることが確認される。

【0194】

実施例4:ES由来hMSCにおけるFCSの減少によって誘導される増殖減速モデルにおけるXPR1

30

【0195】

材料および方法

胚幹(ES)細胞由来のhMSCを、増殖の減速を誘導する漸減濃度のFCS(20、5および1%)中で培養した。培養物が70~80%の集密に達したら、細胞を、TrypLE Express(Life Technologies社)を用いて37℃で5分間剥離し、数を数えて倍加時間(単位:時間)を決定した後、96ウェルV型マイクロプレートに移した。各結合のために 3.10^4 個の細胞を使用した。0.1%アジ化ナトリウムおよび1mMのEDTAを含む培地中で、RBDを対で(Glut1.RBD.マウスFcおよびXeno.RBD.ウサギFc)事前に混合した。RBDをhMSCに添加し、37℃で20分間インキュベートした。細胞を緩衝液B(PBS/2%FCS/0.1%アジ化ナトリウム/1mMのEDTA)で1回洗浄し、次いで、緩衝液B中でAlexa Fluor 647ヤギ抗ウサギIgG(Life Technologies社、1/1000)およびR-PEヤギ抗マウスIgG1(Life Technologies社、1/100)と共にインキュベートした。暗所において4℃で30分間インキュベートした後、細胞を2回洗浄し、フローサイトメトリー分析の前に緩衝液Bに再懸濁した。405、488および640nmの励起によりFACSVerseフローサイトメーター(BD Biosciences社)で蛍光シグナルを取得し、Flowjoソフトウェア(Tree Star社)を用いてデータ分析を行った。

40

【0196】

「Fluorescence minus One」対照を使用してRBDチャンネル(R-PEおよびAF647)におけるバックグラウンドレベル(すなわちノイズ)を確立し、ここで、シグナルノ

50

ノイズはXPR1およびGlut1の発現レベルを表す。データは平均±SD(3回)を表す。

【0197】

結果

図4Aに示すように、XPR1の発現はFC5の濃度の低下と共に増加している。反対に、GLUT1の発現はES由来hMSCにおいて減少している。さらに、XPR1/GLUT1比はFC5の濃度の低下と共に増加している(図4B)。倍加時間(単位:時間)はFC5の濃度の低下と共に増加しており、これは細胞増殖の減速を示している(図4C)。

【0198】

総合的に、これらのデータから、XPR1、Glut1およびXPR1/GLUT1比は細胞増殖のバイオマーカーとして使用できることが確認される。

【0199】

実施例5:ES由来hMSCにおけるマイトマイシンCによって誘導される老化加速モデルおよびES由来hMSCにおけるラパマイシンによって誘導される老化防止モデルにおけるXPR1

【0200】

材料および方法

[マイトマイシン治療]:80%集密のES細胞由来hMSCを1μg/mLまたは10μg/mLのマイトマイシンC(MMC、Sigma社)で3時間処理するか何も処理しなかった(対照細胞)。MMCのパルス後、細胞をPBSで2回洗浄し、TrypLE Expressを用いて37で5分間剥離し、フラスコにさらに4日間再播種し、その終わりにRBD標識のために細胞を剥離し、数を数えて倍加時間(単位:時間)を決定した。

【0201】

各結合のために3.10⁴個の細胞を使用し、96ウェルV型マイクロプレートに移した。0.1%アジ化ナトリウムおよび1mMのEDTAを含む培地中で、RBDを対で(Glut1、RBD、マウスFcおよびXeno、RBD、ウサギFc)事前に混合した。RBDをhMSCに添加し、37で20分間インキュベートした。細胞を緩衝液B(PBS/2%FC5/0.1%アジ化ナトリウム/1mMのEDTA)で1回洗浄し、次いで、緩衝液B中でAlexa Fluor 647ヤギ抗ウサギIgG(Life Technologies社、1/1000)およびR-PEヤギ抗マウスIgG1(Life Technologies社、1/100)と共にインキュベートした。暗所において4で30分間インキュベートした後、細胞を2回洗浄し、フローサイトメリー分析の前に緩衝液Bに再懸濁した。405、488および640nmの励起によりFACSVerseフローサイトメーター(BD Biosciences社)で蛍光シグナルを取得し、Flowjoソフトウェア(Tree Star社)を用いてデータ分析を行った。

【0202】

「Fluorescence minus One」対照を使用してRBDチャンネル(R-PEおよびAF647)におけるバックグラウンドレベルを確立した。1μg/mLおよび10μg/mLのマイトマイシンC条件のシグナル/ノイズを対照条件に対して正規化した。

【0203】

[ラパマイシン治療]:ラパマイシンは、ヒトの細胞において生体外で細胞の老化を防止し、マウスにおける老化を減速させることが文献に記載されている(Wilkinson, J.E., et al. (2012). Rapamycin slows aging in mice (ラパマイシンはマウスにおいて老化を減速させる). Aging Cell 11, 675-682)。

【0204】

ES細胞由来hMSCを5000個の細胞/cm²で播種した1日後に、0.1nMまたは10nMのラパマイシン(Sigma社)で処理した。対照として0.03%DMSOを使用した。処理から3日後、細胞をTrypLE Express(Life Technologies社)を用いて37で5分間剥離し、96ウェルV型マイクロプレートに移した。各結合のために3

10

20

30

40

50

・ 10^4 個の細胞を使用した。0.1%アジ化ナトリウムおよび1mMのEDTAを含む培地中で、RBDを対で(Glut1・RBD・マウスFcおよびXeno・RBD・ウサギFc)事前に混合した。RBDをMSCに添加し、37℃で20分間インキュベートした。細胞を緩衝液B(PBS/2%FCS/0.1%アジ化ナトリウム/1mMのEDTA)で1回洗浄し、次いで、緩衝液B中でAlexa Fluor 647ヤギ抗ウサギIgG(Life Technologies社、1/1000)およびR-PEヤギ抗マウスIgG1(Life Technologies社、1/100)と共にインキュベートした。暗所において4℃で30分間インキュベートした後、細胞を2回洗浄し、フローサイトメトリー分析の前に緩衝液Bに再懸濁した。405、488および640nmの励起によりFACSVerseフローサイトメーター(BD Biosciences社)で蛍光シグナルを取得し、Flowjoソフトウェア(Tree Star社)を用いてデータ分析を行った。

10

【0205】

「Fluorescence minus One」対照を使用してRBDチャネル(R-PEおよびAF647)におけるバックグラウンドレベルを確立した。0.1nMおよび10nMのラパマイシン条件のシグナル/ノイズを対照条件に対して正規化した。

【0206】**結果**

データは、対照条件に対して正規化された $1\mu\text{g}/\text{mL}$ または $10\mu\text{g}/\text{mL}$ のMMCまたは0.1nMまたは10nMのラパマイシンで処理したhMSCのXPR1/Glut1比を表す(図5)。

20

【0207】

老化促進剤マイトマイシンCはXPR1/Glut1比を用量依存的に増加させ、これにより、XPR1/Glut1比は、複製老化ともいう細胞の老化促進の潜在的バイオマーカーである(マイトマイシン処理細胞は細胞増殖を停止させることが知られている)ことが確認される。

【0208】

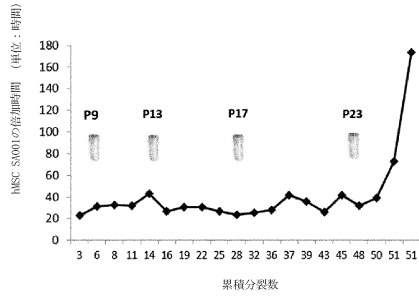
老化防止剤ラパマイシンはXPR1/Glut1比を用量依存的に減少させる。

【0209】

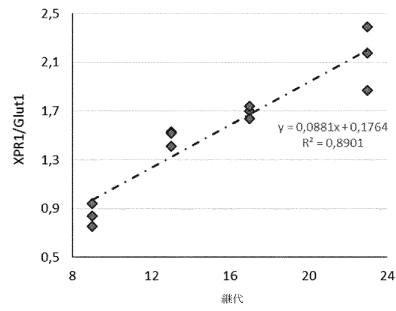
従って、これらのデータは、XPR1/GLUT1比が、老化に影響を与える薬剤、例えば老化防止剤または老化促進剤のスクリーニングおよび同定のためのバイオマーカーになり得ることを強く支持している。

30

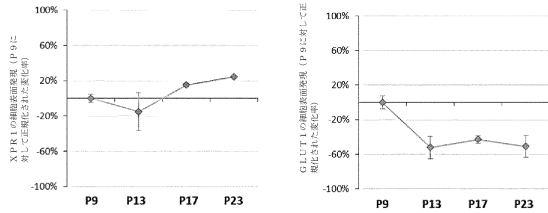
【図 1 A】



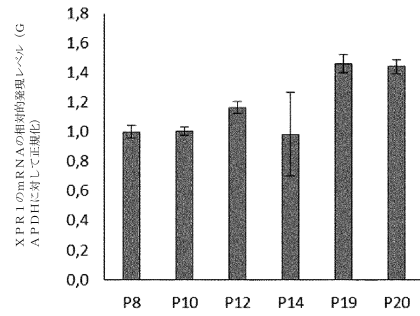
【図 1 C】



【図 1 B】



【図 1 D】



【図 2】

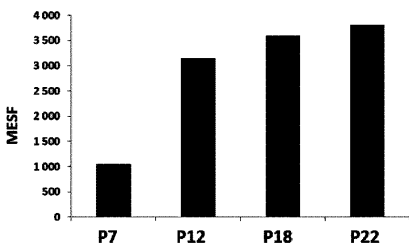
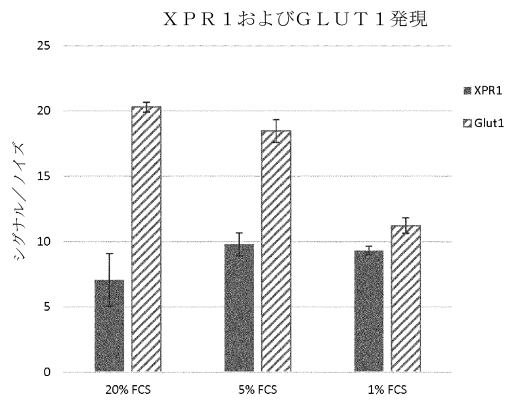
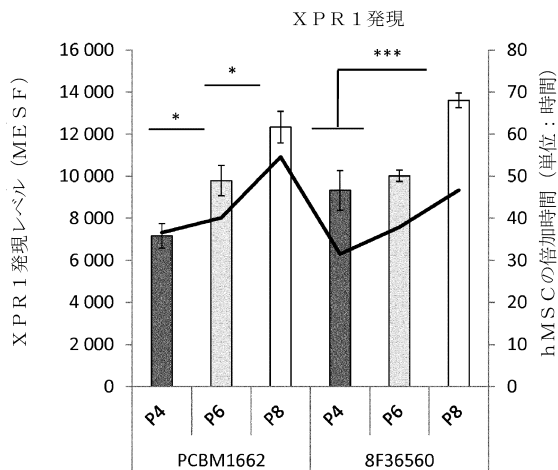


FIG. 2

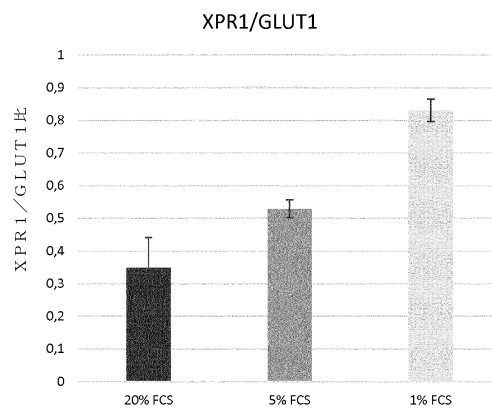
【図 4 A】




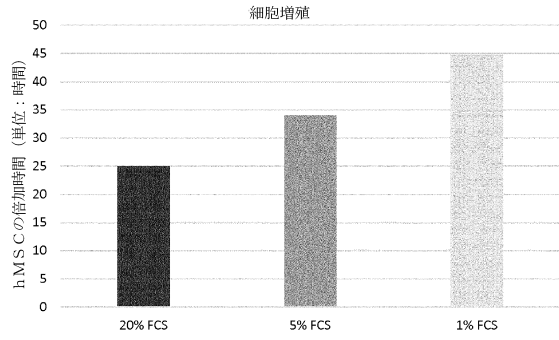
【図 3】




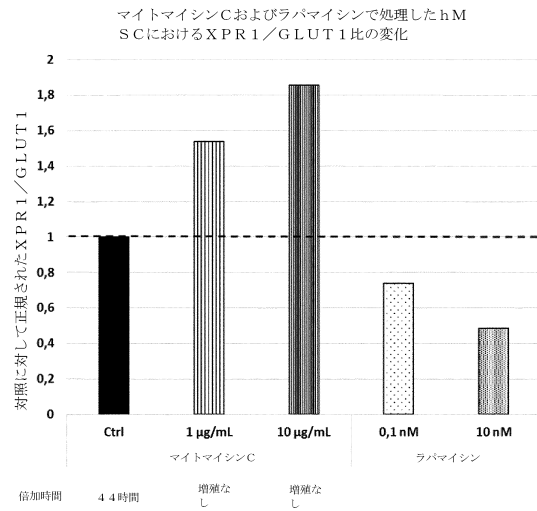
【図 4 B】



【 4 C】



【 5】



【配列表】

0006670831000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/15 Z

- (72)発明者 ファーブル, ポリーヌ
フランス国, エフ 7 5 0 1 5 パリ, 1 1 リュ ジョッベ デュバル
- (72)発明者 カズン, クリステル
フランス国, エフ 9 2 3 5 0 ル プレッシ ロビンソン, 1 5 リュ デュ ボワ デ パレ
ー
- (72)発明者 イー, グァンチー
フランス国, エフ 7 5 0 1 2 パリ, 1 0 4 クール ドゥ ヴァンセンヌ
- (72)発明者 プティ, ヴィンセント
フランス国, エフ 7 5 0 0 5 パリ, 1 1 リュ ドゥ ラ ハーブ
- (72)発明者 ドリオール, リュック
フランス国, エフ 9 2 2 0 0 ヌイイ シュル セーヌ, 1 3 7 アヴニュー デュ ルーレ

審査官 清野 千秋

- (56)参考文献 特開2011-050358(JP, A)
仏国特許出願公開第02946347(FR, A1)
特表2012-514744(JP, A)
Aging Cell, 2013年, 12, pp.1021-1031
Cell Biochemistry and Function, 2012年, 30, pp.191-197
Journal of Biomolecular Screening, 2014年, 19(8), pp.1185-1192
Laboratory Investigation, 2013年, 93, pp.611-621

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 6 8 5 1
C 1 2 Q 1 / 0 4
G 0 1 N 3 3 / 1 5
G 0 1 N 3 3 / 5 0
G 0 1 N 3 3 / 5 3
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
W P I D S / W P I X (S T N)