

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 2 月 6 日(06.02.2014)



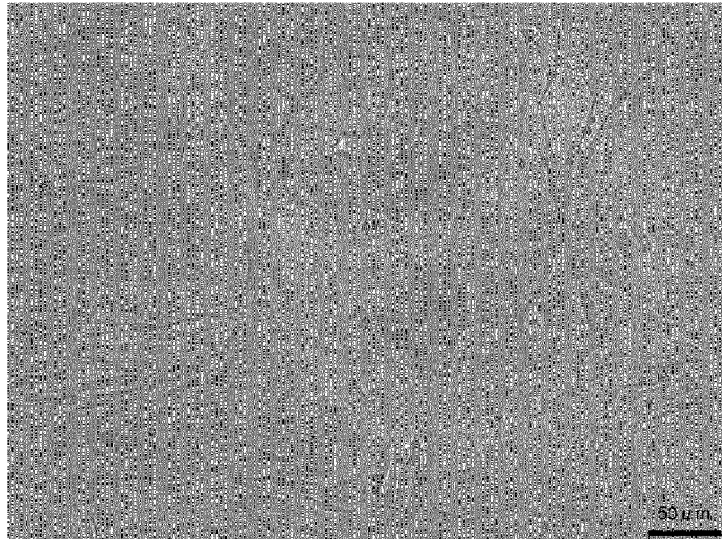
(10) 国際公開番号
WO 2014/021329 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/070627
- (22) 国際出願日: 2013 年 7 月 30 日(30.07.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-169378 2012 年 7 月 31 日(31.07.2012) JP
- (71) 出願人: 独立行政法人海洋研究開発機構(INDEPENDENT ADMINISTRATIVE INSTITUTION, JAPAN AGENCY FOR MARINE-EARTH SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒2370061 神奈川県横須賀市夏島町 2-1-5 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: 鶴若 祐介(TSURUWAKA, Yusuke); 〒2370061 神奈川県横須賀市夏島町 2-1-5 独立行政法人海洋研究開発機構内 Kanagawa (JP). 小川 智久(OGAWA, Tomohisa); 〒2370061 神奈川県横須賀市夏島町 2-1-5 独立行政法人海洋研究開発機構内 Kanagawa (JP). 秦田 勇二
- (74) 代理人: 森本 敏明(MORIMOTO, Toshiaki); 〒1070052 東京都港区赤坂 2-2-1-15 赤坂 O S ビル 5 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロシヤ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

[続葉有]

(54) Title: CELL STRAIN DERIVED FROM MONACANTHIDAE

(54) 発明の名称: カワハギ由来の細胞株



(57) Abstract: The first purpose of the present invention is to provide an immortalized cell strain derived from *Monacanthidae*. The first purpose of the present invention is solved by means of a cell strain derived from a body part of a *Monacanthidae* fish which can be subcultivated without essentially any restrictions, or by means of a passage strain of said cell strain. The second purpose of the present invention is to provide a pluripotent stem cell derived from *Monacanthidae*. The second purpose of the present invention is solved by means of a cell strain derived from a body part of a *Monacanthidae* fish in which at least one type of cell marker from among TRA-1-60, OCT4, and SSEA-3 is positive, or by means of a passage strain of said cell strain.

(57) 要約: 本発明の第 1 の目的は、カワハギに由来する不死化細胞株を提供することにある。本発明の第 1 の目的は、実質的に制限なく継代培養が可能である、カワハギ科(Monacanthidae)魚類の生体部位に由来する細胞株またはその継代株により解決される。また、本発明の第 2 の目的は、カワハギに由来する多能性幹細胞を提供することにある。本発明の第 2 の目的は、TRA-1-60、OCT4 および SSEA-3 からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の細胞マーカーが陽性である、カワハギ科魚類の生体部位に由来する細胞株またはその継代株により解決される。

WO 2014/021329 A1



GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,
NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

— 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出され
た、寄託された生物材料に関する表示（規則
13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii)）

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

明 細 書

発明の名称：カワハギ由来の細胞株

関連出願の相互参照

[0001] 本出願は、2012年7月31日出願の日本特願2012-169378号の優先権を主張し、その全記載はここに開示として援用される。

技術分野

[0002] 本発明は、線維芽細胞様の形態を呈する、カワハギ科 (*Monacanthidae*) 魚類の生体部位に由来する細胞株またはその継代株に関する。

背景技術

[0003] 魚類に由来する魚類細胞は、哺乳動物に由来する動物細胞と類似する性質が多い。また、魚類細胞は、一般的に、比較的低い温度で培養が可能であり、増殖可能な温度範囲が広い。したがって、魚類細胞は、動物細胞に代替するものとして、生体由来物質の生産などの工業的用途や研究用途における培養細胞として有望視されている。

[0004] 魚類の培養細胞としては、チョウザメの眼球上皮細胞由来の株化細胞やカサゴの尾鰭由来の株化細胞などが知られている（たとえば、下記特許文献1および2を参照、該文献の記載はここに開示として援用される）。これらの株化された細胞株は、動物細胞に代替可能な細胞としてだけではなく、それぞれチョウザメやカサゴの生態の解明や養殖の実現に資することが期待されている。

[0005] カワハギ (*Stephanolepis cirrifer*) を含むフグ目カワハギ科 (*Monacanthidae*) の魚類は、全身が丈夫な皮膚で覆われており、調理に際しては皮膚全体を一度に剥がすことができる。カワハギ科の魚類の中でもカワハギは生食用または調理用の食材として広く嗜まれている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2004-24192号公報

特許文献2：特開2008-220198号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] カワハギは、食材として広く愛用されているが、現在市場におかれているものは天然のカワハギであり、その取れ高は季節により変動する。また、カワハギの養殖技術はこれまでに確立されておらず、現在に至るまで種々の試みがなされている。

[0008] 魚類の養殖では、細菌やウイルスなどの感染症、化学物質や重金属などの細胞毒性などに起因する養殖魚の斃死が問題となっている。そこで、養殖魚の斃死の問題を解決するために、魚類の細胞株は、ウイルス感染症の診断、ウイルス感染症に対して有効なワクチンの製造、細胞毒性試験などに寄与する可能性がある。そこで、本発明者らは、カワハギの不死化細胞株があれば、カワハギ養殖魚の斃死の問題を解決する糸口を探り出すことができ、カワハギの養殖開発において著しい進展を遂げるのではないかと考えた。特に、魚類の細胞株は、一般的に、低温での培養が可能であるものの、哺乳動物の細胞株に比べて増殖速度が小さいという性質を有する。したがって、低温培養が可能であり、かつ、増殖速度が哺乳動物の細胞株と同程度であるカワハギの不死化細胞株は、簡便かつ迅速に培養ができるものであることから、カワハギの養殖技術の開発において、急速な進歩をもたらすことが期待できる。

[0009] 一方、カワハギに限らず、魚類の多能性幹細胞があれば、特定の細胞へ分化誘導することにより、従前は採取することが困難であった組織細胞を得ることができ、魚類の疾病の病因や発症メカニズムを研究することができるようになる。また、分化誘導後に特定の疾病を発症させた細胞を用いれば、その疾病に対する薬剤の効果や毒性を評価することが可能となる。したがって、魚類の多能性幹細胞もまた、魚類の養殖技術の発展に寄与することが期待できる。

[0010] 上記したように、カワハギの不死化細胞株や多能性幹細胞を用いれば、カワ

ハギの養殖技術の研究開発を格段に進められる可能性がある。しかし、これまでに、樹立されたカワハギの細胞株や多能性幹細胞は知られていない。

[0011] そこで、本発明の第1の目的は、カワハギに由来する不死化細胞株を提供することにある。また、本発明の第2の目的は、カワハギに由来する多能性幹細胞を提供することにある。さらに、本発明の第3の目的は、カワハギに由来する細胞株の製造方法および利用方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、まず、魚類細胞は低温下で培養が可能という点に着目して、魚類細胞の株化を検討した。そこで、タイ、アジ、サメなどの種々の魚類の鰭を用いて、様々な組織細胞の増殖を試みた。しかし、増殖速度の大きい細胞を得どころか、継代培養さえできないものがほとんどであった。そこで、本発明者らは、魚類の種類や継代培養方法などを適宜変更して、さらに鋭意研究を積み重ねた結果、カワハギの背鰭から継代培養が可能な不死化細胞株を製造することに成功した。しかも、驚くべきことに、得られた細胞株は、25℃という室温と変わらない温度で培養した場合であっても、哺乳動物の細胞株と同程度又はそれ以上の増殖速度で培養が可能なものであった。さらに驚くべきことには、本発明者らが得たカワハギ由来の細胞株は、分化多能性を示す細胞マーカーの一部を発現するものであり、さらに培養条件を変えることにより形態の異なる種々の細胞へ変化するものであった。本発明は、これらの成功例や知見に基づいて完成された発明である。

[0013] したがって、本発明によれば、下記(1)の性質を有する、カワハギ科(Monacanthidae)魚類の生体部位に由来する細胞株またはその継代株が提供される。

(1) 実質的に制限なく継代培養が可能である

[0014] 本発明において、好ましくは、さらに下記(2)の性質を有する。

(2) 線維芽細胞様の形態を呈する

[0015] 本発明において、好ましくは、さらに下記(3)の性質を有する。

(3) 多層構造を形成した培養が可能である

[0016] 本発明において、好ましくは、さらに下記（４）の性質を有する。

（４）最大値は６６本であり、最小値は３２本であり、およびモードは３３本である度数分布に従った染色体数を有する

[0017] 本発明において、好ましくは、前記（４）の性質において、モードである３３本の染色体の度数が度数分布における全度数の約９０％である。

[0018] 本発明において、好ましくは、さらに下記（５）の性質を有する。

（５）初期細胞数を約 1.0×10^6 cells/ml として、 75 cm^2 の底面積を有する培養容器内で１０％ FBS を含む Leibovitz' s L-15 培地を用いて、 CO_2 非存在下で 25°C にて培養した際の倍加時間は、約１４～２８時間である

[0019] 本発明の別の側面によれば、または本発明の好ましい態様として、TRA-1-60、OCT4 および SSEA-3 からなる群から選ばれる少なくとも１種の細胞マーカーが陽性である、カワハギ科魚類の生体部位に由来する細胞株またはその継代株が提供される。

[0020] 本発明において、好ましくは、前記細胞株またはその継代株は、線維芽細胞様の形態を呈する細胞株またはその継代株である。

[0021] 本発明において、好ましくは、前記細胞株またはその継代株は、筋細胞および筋細胞様細胞、上皮細胞および上皮細胞様細胞、神経細胞および神経細胞様細胞、脂肪細胞および脂肪細胞様細胞、免疫細胞および免疫細胞様細胞ならびに肝臓細胞および肝臓細胞様細胞からなる群から選ばれる少なくとも１種の細胞に分化する能力を有する。

[0022] 本発明において、好ましくは、前記カワハギ科魚類が、カワハギ属 (*Stephanolepis*) 魚類、ウマヅラハギ属 (*Thamnaconus*) 魚類、メガネウマヅラハギ属 (*Cantherhines*) 魚類、ウスバハギ属 (*Aluterus*) 魚類およびアミメハギ属 (*Rudarius*) 魚類からなる群から選ばれる魚類である。

[0023] 本発明において、好ましくは、前記カワハギ科魚類が、カワハギ (*Stephanolepis cirrifer*) である。

- [0024] 本発明において、好ましくは、前記生体部位は、背部、胸部、腹部、尻部または尾部にある鰭である。
- [0025] 本発明の別の側面によれば、または本発明の好ましい態様として、受託番号がN I T E B P - 1 3 6 9である、カワハギの背鰭に由来する細胞株またはその継代株が提供される。
- [0026] 本発明の別の側面によれば、カワハギ科魚類の生体部位から単離した細胞を70回以上の継代培養に供する工程を含む、本発明の細胞株またはその継代株を製造する方法が提供される。
- [0027] 本発明の別の側面によれば、本発明の細胞株またはその継代株に外来遺伝子を導入してなる、形質転換体が提供される。
- [0028] 本発明の別の側面によれば、本発明の細胞株またはその継代株に外来遺伝子を導入して形質転換体を得る工程を含む、形質転換体を製造する方法が提供される。
- [0029] 本発明の別の側面によれば、本発明の細胞株またはその継代株に外来遺伝子を導入してなる形質転換体から該外来遺伝子の発現産物を得る工程を含む、外来遺伝子の発現産物を製造する方法が提供される。
- [0030] 本発明の別の側面によれば、本発明の細胞株またはその継代株と、ベクターと、トランスフェクションのための器材とを含む、形質転換体を製造するためのキットが提供される。
- [0031] 本発明の別の側面によれば、または本発明の好ましい態様として、本発明の細胞株またはその継代株と、培地と、培養容器とを含む、分化細胞を製造するためのキットが提供される。
- [0032] 本発明において、好ましくは、さらに血清を含む。
- [0033] 本発明において、好ましくは、前記血清が、哺乳類血清、魚類血清および血清代替物からなる群から選ばれる少なくとも1種の血清である。
- [0034] 本発明において、好ましくは、前記培地は、哺乳動物細胞用培地、昆虫細胞用培地および魚類細胞用培地からなる群から選ばれる少なくとも1種の培地である。

- [0035] 本発明において、好ましくは、前記培養容器が、底面が細胞接着分子でコーティングされた培養容器および底面が細胞接着分子でコーティングされていない培養容器からなる群から選ばれる少なくとも1種の培養容器である。
- [0036] 本発明の別の側面によれば、本発明の細胞株またはその継代株を、底面が細胞接着分子でコーティングされた培養容器または底面が細胞接着分子でコーティングされていない培養容器の中で、血清を含有していない、または哺乳類血清、魚類血清もしくは血清代替物を含有した哺乳動物細胞用培地、昆虫細胞用培地または魚類細胞用培地を用いて培養する工程を含む、分化細胞を製造する方法が提供される。
- [0037] 本発明の別の側面によれば、本発明の細胞株またはその継代株からなる培養細胞シートが提供される。
- [0038] 本発明の別の側面によれば、本発明の細胞株またはその継代株から、アルカリフォスファターゼ活性の染色により識別され、かつ、NANOG、OCT4、TRA-1-60およびSEA-3陽性である細胞または該細胞によって形成される巨大繭状コロニーを製造する工程を含む、巨大繭状コロニーを製造する方法が提供される。

発明の効果

- [0039] 本発明の細胞株またはその継代株によれば、カワハギの生体を用いることなく、かつ、カワハギの生体から特定の細胞を単離することなく、カワハギの生態解明のための研究や実験を繰り返し実施することが可能である。そのような研究等として期待されるものは、細菌やウイルスなどの感染性微生物に対するカワハギの感受性（感染性）の検査、化学物質や重金属などの細胞毒性物質に対するカワハギの影響を調べるための細胞毒性試験、環境変化要因に対するカワハギの応答性試験、感染性微生物に感染したカワハギの治療または予防に有効な薬剤およびワクチンの開発などが含まれる。本発明の細胞株またはその継代株によれば、カワハギの生態解明を通して、カワハギの養殖技術のさらなる発展に寄与することが期待できる。
- [0040] 本発明の細胞株またはその継代株は、哺乳動物の細胞株と同程度の増殖速度

で培養可能な細胞株を包含する。このような本発明の細胞株またはその継代株は、室温下での培養が可能なものであることから、哺乳動物の細胞株に代替して、研究用途や工業生産用途などに使用することが期待できる。

図面の簡単な説明

[0041] [図1A]図 1 Aは、カワハギの背鰭片から遊走する細胞を示した図である。

[図1B]図 1 Bは、カワハギの尾鰭片から遊走する細胞を示した図である。

[図1C]図 1 Cは、カワハギの尻鰭片から遊走する細胞を示した図である。

[図1D]図 1 Dは、カワハギの腹鰭片から遊走する細胞を示した図である。

[図2]図 2は、初代細胞（初代培養時）、第 1 継代細胞（継代 1）、第 1 0 継代細胞（継代 1 0）、第 2 0 継代細胞（継代 2 0）および第 3 0 継代細胞（継代 3 0）の各細胞を凍結および解凍した際の細胞生存率を示した図である。

[図3A]図 3 Aは、K S C細胞の形態を倍率×4 6 0にて光学顕微鏡を用いて観察した図である。

[図3B]図 3 Bは、2層を形成したK S C細胞の形態を倍率×4 6 0にて光学顕微鏡を用いて観察した図である。

[図3C]図 3 Cは、多層を形成したK S C細胞の形態を倍率×4 6 0にて光学顕微鏡を用いて観察した図である。

[図4]図 4は、ヒトーA Pを発現した細胞を示した図である。

[図5]図 5は、ヒトーA Pの発現産物の活性を示した図である。

[図6]図 6は、P O NとH a l o t a gの融合タンパク質による発現を示した図である。

[図7A]図 7 Aは、蛍光融合タンパク質であるシアン・フルオレセント・プロテインーイエロー・フルオレセント・プロテインおよびカルモジュリンを発現させた細胞を観察した図である。

[図7B]図 7 Bは、蛍光融合タンパク質であるレッド・フルオレセント・プロテインおよびベジキュラー・ストマティティス・ウイルスのG糖タンパク質を発現させた細胞を観察した図である。

[図7C]図7Cは、蛍光タンパク質であるグリーン・フルオレセント・プロテインを発現させた細胞を観察した図である。

[図8]図8は、各細胞をリポフェクタミン法により遺伝子導入した後の細胞毒性を検証した図である。

[図9A]図9Aは、KSC細胞が多能性幹細胞に特有の細胞マーカーであるTRA-1-60陽性の細胞であることを示した図である。上側は光学顕微鏡観察結果、下側は蛍光顕微鏡観察結果を示す。

[図9B]図9Bは、KSC細胞が多能性幹細胞に特有の細胞マーカーであるOCT4陽性の細胞であることを示した図である。上側は光学顕微鏡観察結果、下側は蛍光顕微鏡観察結果を示す。

[図9C]図9Cは、KSC細胞が多能性幹細胞に特有の細胞マーカーであるSSEA-3陽性の細胞であることを示した図である。上側は光学顕微鏡観察結果、下側は蛍光顕微鏡観察結果を示す。

[図10A]図10Aは、KSC細胞が線維芽細胞様を呈することを示した図である。

[図10B]図10Bは、KSC細胞が筋細胞様の細胞に分化したことを示した図である。

[図10C]図10Cは、KSC細胞が上皮細胞様の細胞に分化したことを示した図である。

[図10D]図10Dは、KSC細胞が神経細胞様の細胞に分化したことを示した図である。

[図10E]図10Eは、KSC細胞が肝臓様細胞の細胞に分化したことを示した図である。

[図10F]図10Fは、KSC細胞が繊維細胞様の細胞に分化したことを示した図である。

[図10G]図10Gは、KSC細胞が脂肪様細胞の細胞に分化したことを示した図である。

[図10H]図10Hは、KSC細胞が免疫細胞の可能性のあるバラの枝状の細胞

に分化したことを示した図である。

[図10I]図10Iは、KSC細胞が巨大繭状の細胞に分化したことを示した図である。

[図11A]図11Aは、KSC細胞から誘導した巨大繭状の融合細胞が未分化細胞に特有の細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼの活性が陽性である細胞であることを示した図である。

[図11B]図11Bは、KSC細胞から誘導した巨大繭状の融合細胞が未分化細胞に特有の細胞マーカーであるNANOG陽性の細胞であることを示した図である。

[図11C]図11Cは、KSC細胞から誘導した巨大繭状の融合細胞が未分化細胞に特有の細胞マーカーであるTRA-1-60陽性の細胞であることを示した図である。

[図11D]図11Dは、KSC細胞から誘導した巨大繭状の融合細胞が未分化細胞に特有の細胞マーカーであるOCT4陽性の細胞であることを示した図である。

[図11E]図11Eは、KSC細胞から誘導した巨大繭状の融合細胞が未分化細胞に特有の細胞マーカーであるSSEA-3陽性の細胞であることを示した図である。

[図12]図12は、KSC細胞を培養することによって得られた細胞シートを示した図である。

発明を実施するための形態

[0042] 以下、本発明の詳細について説明する。

1. 本発明の第1の細胞株

本発明の第1の細胞株またはその継代株は、カワハギ科 (Monacanthidae) 魚類の生体部位に由来するものである。

[0043] 本明細書において「細胞株」とは、当業者によって最も広義に理解されるものであり、株化細胞、樹立細胞系などともよばれ、連続的に継代培養が可能な細胞系であれば特に限定されない。また、本明細書において「継代株」と

は、細胞株を継代培養して得られるすべての細胞を意味する。本明細書において、細胞株と継代株との間には厳密な区別はなく、便宜上、株化したと評価できる細胞を細胞株とよび、その後細胞株を継代培養して得られるものを継代株とよぶ。以下では、細胞株および継代株をまとめた総称として、単に「細胞株」とよぶ。

[0044] 本発明の第1の細胞株は、カワハギ科魚類から摘出した組織や臓器などの生体部位から単離した細胞に基づいて製造することができる。カワハギ科魚類は、その名が示すとおり、身体全体を覆う皮（外皮）を容易に剥がすことができるという特徴を有する魚類である。たとえば、皮の一部に包丁などで切り込みを入れると、特殊な器具を用いることなく、手などで簡単に皮を剥がすことができる。本発明の第1の細胞株の由来生物は、上記した特徴を有するカワハギ科魚類であれば特に限定されないが、たとえば、カワハギ属（*Stephanolepis*）魚類、ウマヅラハギ属（*Thamnaconus*）魚類、メガネウマヅラハギ属（*Cantherhines*）魚類、ウスバハギ属（*Aluterus*）魚類およびアミメハギ属（*Rudarius*）魚類を挙げることができる。本発明の目的において、カワハギ科魚類の好適な具体例としては、カワハギ（*Stephanolepis cirrhifer*）、ウマヅラハギ（*Thamnaconus modestus*）およびウスバハギ（*Aluterus monoceros*）を挙げることができ、より好ましいのはカワハギ（*Stephanolepis cirrhifer*）である。

[0045] 本発明の第1の細胞株を製造するために使用されるカワハギ科魚類の生体部位は、魚体中の特定の一部分のみを指すものではなく、魚体中の2以上の組織や臓器などの部位を含み、さらには魚体全部を含み得る。本発明の目的において、カワハギ科魚類における好適な生体部位は、鰭にあたる部位であり、たとえば、背部、胸部、腹部、尻部または尾部にある鰭が好ましく、背部にある鰭である背鰭がより好ましい。

[0046] 本発明の第1の細胞株をカワハギ科魚類の生体部位から製造する方法は特に

限定されるものではなく、当業者により知られる生体から細胞株を取得する方法、たとえば、生体から組織や臓器を摘出する手法、切除した組織等から細胞を単離する手法、単離した細胞を培養して初代培養細胞を得る手法、初代培養細胞を継代培養して細胞株およびその継代株を得る手法などを適宜組み合わせた方法を実施することにより製造することができる。

[0047] 本発明の第1の細胞株を製造する方法のうち、初代培養細胞を得る工程の具体例は、たとえば、次の手順からなる。すなわち、カワハギの鰭部を、皮を剥ぐことなく、適当な大きさの角片として切除する。切除した角片を適当な方法で洗浄し、次いで種々の濃度の抗生物質を用いて1～数回に分けて処理する。処理後の切片を、無菌的にトリプシンなどのタンパク質分解酵素溶液の存在下で微小片となるように細かく刻む。ここまでの操作は低温下、好ましくは氷冷下で実施する。次いで、トリプシン溶液に浸漬させた微小片を室温で静置する。静置後の微小片を遠心分離等によって回収し、回収した微小片をLeibovitz's L-15培地などの非CO₂環境下での細胞増殖に適した培地を用いて数回繰り返し洗浄する。この際、微小片をCO₂環境下で洗浄する場合は、RPMI 1640培地やIMDM培地（ともにライフテクノロジーズ社）などの標準的な哺乳動物細胞用培地が使用可能である。次いで、血清含有培地を含むコラーゲンコートされた培養容器に微小片を播き、底着させた後、25℃にするなどの適当な培養条件で、細胞が培養容器の底面の約80%以上を覆うようになるまで培養する。この際の微小片に集まった細胞を初代培養細胞とする。次いで、培養容器中の培地を除去し、容器底面に付着している培養細胞を適当な方法で洗浄した後、適当な方法で底面から培養細胞を剥離および回収し、2～3等分して新しい培養容器にて継代培養を実施する。新しい培養容器に播いた細胞を第1継代培養細胞とする。

[0048] 本発明の第1の細胞株を製造する方法のうち、初代培養細胞を継代培養して本発明の第1の細胞株を得る工程の具体例は、たとえば、次の手順からなる。すなわち、初代培養細胞から本発明の第1の細胞株を得るための継代培養

は、たとえば、初代培養細胞を得る工程と同じようにして、血清含有培地を用いて適当な培養条件により達成される。培養開始時の細胞数は 4×10^5 cells/ml であり、培養終了時の目安は 90% 以上のコンフルエントになったときであり、および培地の交換時期は死滅細胞により培養液が汚れたときなどとすることができるが、これらは特に限定されるものではない。

[0049] 本発明の第 1 の細胞株は、当業者により知られる通常の方法で保存および増殖させることができ、その方法は特に限定されるものではない。本発明の第 1 の細胞株を凍結保存する方法は、たとえば、細胞株に市販の培地を加えた後、細胞を遠心分離するなどして回収し、次いで回収した細胞へ市販の無血清培養細胞用の細胞凍結保存液を加えて、凍結保存することにより達成し得る。凍結させた本発明の細胞株は、室温で半解凍状態にし、新鮮な無血清培地で適当な回数置換することにより細胞を融解させることができる。融解後の細胞に血清含有培地を加えることによって、上記の継代培養を実施できる。

[0050] 本発明の第 1 の細胞株が製造できたことを判定する方法は特に限定されるものではないが、初代培養細胞を 30 回以上、好ましくは 50 回以上、より好ましくは 70 回以上、さらに好ましくは 100 回以上の継代培養に供することによって、そのような継代培養後の細胞を本発明の第 1 の細胞株であると判定できる。

[0051] 本発明の第 1 の細胞株は、連続的に継代培養が可能な細胞系ではあれば特に限定されないが、実質的に制限なく継代培養が可能であるものであることが好ましい。すなわち、本発明の第 1 の細胞株の一態様は、当業者が有する相応の注意力および技術力をもって、上記した継代培養の方法に従って培養すれば、何世代にも渡って繰り返し培養できるものである。

[0052] 本発明の第 1 の細胞株は、種々の性質を有し得るが、線維芽細胞様の形態を呈するものであることが好ましい。線維芽細胞は、扁平で長目の外形、しばしば見られる不規則な突起、楕円形の核などの特有の形態を呈する。本発明の第 1 の細胞株が線維芽細胞様の形態を呈するものである場合、本発明の第

1の細胞株は、線維芽細胞に特有のいずれかの形態を有するものであれば特に限定されないが、少なくとも扁平で長目の外形を有するものであることが好ましい。本発明の第1の細胞株が線維芽細胞様の形態を呈することは、当業者により知られる細胞の形態を観察する種々の方法により確認することができ、たとえば、適当な倍率にセットした光学顕微鏡下で本発明の第1の細胞株を観察することにより確認することができる。

[0053] 本発明の第1の細胞株が、実質的に制限なく継代培養が可能であるものである場合は、たとえば、分裂回数を30回以上、好ましくは50回以上、より好ましくは70回以上、さらに好ましくは100回以上とすることができるものである。この場合の本発明の第1の細胞株は、不死化細胞とみなし得る。本発明の第1の細胞株が、実質的に制限なく継代培養が可能であるものか否かは、たとえば、本発明の細胞株を上記した継代培養に供して、継代回数が上記の回数に達することを確認することにより判定できる。

[0054] 倍加時間は、当業者により知られているとおり、細胞数が2倍に達する時間をいう。倍加時間は、増殖期にある細胞については、原則的に細胞周期と一致する。本発明の第1の細胞株の倍加時間を測定する方法は特に限定されないが、たとえば、上記した継代培養に供した場合、すなわち、10% FBSを含むLeibovitz's L-15培地を用いて25℃で培養した場合に、増殖期にある細胞について2～数点、好ましくは3点以上を選んで計測した細胞数から求められ得る。

[0055] 本発明の第1の細胞株の倍加時間は特に限定されないが、たとえば、初期細胞数を約 $1.0 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 、好ましくは $0.1 \sim 1.5 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 、より好ましくは $0.4 \sim 1.0 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ として、 75 cm^2 の底面積を有する培養容器内で10% FBSを含むLeibovitz's L-15培地を用いて、 CO_2 非存在下で25℃にて培養した場合、初代培養細胞より短く、好ましくは10～48時間、より好ましくは12～36時間、さらに好ましくは14～28時間、なおさらに好ましくは16～24時間、特に好ましくは約18時間である。細胞数からの

倍加時間を算出する方法は特に限定されないが、たとえば、TC10 Automated Cell Counter（バイオラッド）などの細胞数計測機器を用いて計測した細胞数に基づいて、観測点（時間）と細胞数とから単位時間あたりの細胞量の増加を計測するソフトウェア（<http://www.doubling-time.com/compute.php?lang=en>など）を用いて算出する方法を挙げることができる。また、細胞の計測は、たとえば、培養容器の底面にあらかじめ指標（マーカー）を付し、本発明の第1の細胞株を培養に供した後、該マーカー付近における細胞の数を倒立型ルーチン顕微鏡で撮影観察することにより計測することができる。この際、接眼レンズに付された複数の四方マス（たとえば、1mm×1mmのマス）の中の各細胞数の平均を細胞数としてもよい。培養した細胞を経時的に観察すると、細胞の増殖曲線が得られる。増殖曲線からは、細胞の増殖過程における遅延期、対数増殖期、定常期、死滅期の増殖サイクルを知ることができる。対数増殖期の細胞数が2倍になる為に必要な時間（倍加時間）を以下の計算式より算出することができる。

$$\text{倍加時間} = (t - t_0) \log 2 / (\log N - \log N_0)$$

t : 時間 [h]、 N : t 時の細胞数

t_0 : 初期時間 [h]、 N_0 : t_0 時の細胞数

[0056] 培養細胞を培養容器の底面に接着させた状態で培養すると、通常は、培養細胞は底面全体を覆うコンフルエントな状態に達すると増殖を停止する。すなわち、培養細胞は、培養容器の底面の上に単層の細胞層を形成するまで増殖し得る。しかし、本発明の第1の細胞株の一態様は、単層の細胞層を形成した後もさらに増殖を続けることにより、単層の細胞層の上に別の細胞層を形成し得るものであり、好ましくは多層構造を形成した培養が可能であるものである。したがって、本発明の第1の細胞株は、細胞層が重なり合った三次元的構造を形成した培養が可能であるものを含む。本発明の第1の細胞株が多層構造を形成し得るものであることは、本発明の第1の細胞株がコンフルエントな状態になった後さらに培養を進め、当業者により知られる方法で培

養細胞の構造を観察することにより確認することができる。なお、多層構造とは、単層の細胞層の上に別の細胞層を形成した構造であれば特に限定されず、2層または3層以上の層構造である。

[0057] 本発明の第1の細胞株の染色体数は、由来生物であるカワハギ科魚類の種類や雌雄によって変化することから特に限定されないが、たとえば、カワハギのメスの背鰭から取得したものである場合、その染色体数は66本、33本および32本であり得る。また、本発明の第1の細胞株は、一個の独立した細胞だけではなく、一群の細胞集団としてみなせる場合がある。その場合、本発明の第1の細胞株が、カワハギのメスの背鰭から取得したものである場合は、染色体数が66本、33本または32本である細胞株の集団であり得る。また、この場合の本発明の第1の細胞株は、好ましくは最大値が66本であり、最小値が32本であり、およびモード（最頻値）が33本である度数分布に従った染色体数を有する細胞株の集団であり、該度数分布において、モードである33本の染色体の度数が全度数の約90%である細胞株の集団であることがより好ましい。本発明の第1の細胞株の染色体数を解析する方法としては、当業者により知られる細胞の染色体数を解析する方法を特に限定することなく採用することができるが、たとえば、後述する実施例に記載されている方法により解析することができる。

[0058] 本発明の第1の細胞株の具体例は、カワハギ科魚類の生体部位に由来する細胞株であって、下記（1）～（5）の性質のいずれか1つ以上の性質を有するもの、好ましくは下記（1）の性質を有し、かつ、下記（2）～（5）のいずれか1つ以上の性質を有するもの、より好ましくは下記（1）および（2）の性質を有し、かつ、下記（3）～（5）のいずれか1つ以上の性質を有するもの、さらに好ましくは下記（1）～（3）の性質を有し、かつ、下記（4）および（5）のいずれか1つ以上の性質を有するもの、なおさらに好ましくは下記（1）～（5）の性質を有するものである。

（1）実質的に制限なく継代培養が可能である

（2）線維芽細胞様の形態を呈する

(3) 多層構造を形成した培養が可能である

(4) 最大値は66本であり、最小値は32本であり、およびモードは33本である度数分布に従った染色体数を有する、ただし、該度数分布はモードである33本の染色体の度数が全度数の約90%であることが好ましい

(5) 初期細胞数を約 1.0×10^6 cells/mlとして、75 cm²の底面積を有する培養容器内で10% FBSを含むLeibovitz's L-15培地を用いて、CO₂非存在下で25℃にて培養した際の倍加時間は、約14～28時間である

[0059] 2. 本発明の第2の細胞株

本発明の細胞株の別の態様として、本発明の第2の細胞株は、TRA-1-60、OCT4およびSSEA-3からなる群から選ばれる少なくとも1種の細胞マーカーが陽性である、カワハギ科魚類の生体部位に由来する細胞株またはその継代株である。本発明の第2の細胞株は、本発明の第1の細胞株と同様の方法によって、カワハギ科魚類の生体部位から製造することができる。本発明の第2の細胞株は、線維芽細胞様の形態を呈することが好ましい。

[0060] TRA-1-60、OCT4またはSSEA-3が陽性である細胞株とは、それぞれヒトTRA-1-60、ヒトOCT4またはヒトSSEA-3に対する抗体が認識するエピトープを発現している細胞株をいう。

[0061] TRA-1-60に対する抗体は、未分化ヒト胚性幹（ES）細胞、胚性癌（EC）細胞および胚性生殖（EG）細胞に発現するタンパク質（エピトープ）と反応し、該エピトープは細胞分化により失われることが知られている。OCT4はES細胞に高発現する転写因子であり、ES細胞の未分化性の維持や多分化能の維持に関与しているといわれている。SSEA-3はES細胞などの多能性幹細胞の細胞マーカーとして知られている。TRA-1-60、OCT4およびSSEA-3をコードする遺伝子配列は、たとえば、National Center for Biotechnology Information（NCBI）の公共のデータベースであるGenB

a n k により、それぞれ A C C E S S I O N 番号として、T R A - 1 - 6 0 は N M _ 0 0 1 0 1 8 1 1 1 または N M _ 0 0 5 3 9 7、O C T 4 は N M _ 0 0 2 7 0 1、および S S E A - 3 は N M _ 0 3 3 1 4 9（アミノ酸配列の A C C E S S I O N 番号は Q 9 J I 6 7）として登録されている。

[0062] T R A - 1 - 6 0、O C T 4 および S S E A - 3 は、それぞれ多能性を示す細胞マーカーであり、分化後の細胞表面には見られないものであることで共通する。これらのことから、T R A - 1 - 6 0、O C T 4、S S E A - 3 またはこれらの細胞マーカーの2種もしくは3種が陽性である細胞株は、種々の細胞に分化する能力である多能性を備えたものであると推測され得る。したがって、本発明の第2の細胞株は、多能性を有する細胞株である蓋然性が高い。ただし、本明細書においては「多能性」という用語は、限定的に解釈されるものではなく、学術用語としての多能性（p l u r i p o t e n c y、m u l t i p o t e n c y）の意味に加えて、全能性（t o t i p o t e n c y）の意味をも含み、多能性や全能性があること、またはその蓋然性があることなどと解釈すればよく、このことに係わらず最も広義に解釈されるものである。

[0063] 細胞株が T R A - 1 - 6 0、O C T 4 および S S E A - 3 からなる群から選ばれる少なくとも1種の細胞マーカーが陽性であることは、当業者により知られている特定の細胞マーカーを調べる手法を応用して確認できるが、たとえば、次の手順による免疫化学的手法により確認できる。すなわち、培養細胞を培養容器の底面に固定化し、ブロッキング処理などした後、T R A - 1 - 6 0、O C T 4 または S S E A - 3 に対する一次抗体を加えて一次抗体反応を実施する。次いで、未反応の一次抗体を除いた後に、蛍光標識された一次抗体に対する二次抗体を加えて二次抗体反応を実施する。次いで、未反応の二次抗体を除去した後、蛍光標識された細胞を観察することにより、T R A - 1 - 6 0 陽性、O C T 4 陽性または S S E A - 3 陽性の細胞を確認することができる。なお、一次抗体の構造（グロブリンタイプや断片化構造など）、二次抗体についての一次抗体の認識特異性、蛍光標識の波長などを

適宜変えることにより、一度または二度の操作で、細胞が T R A - 1 - 6 0、O C T 4 および S S E A - 3 について陽性であることを確認できるが、細胞を 3 つの集団に分割してそれぞれの集団について T R A - 1 - 6 0、O C T 4 または S S E A - 3 が陽性であることを確認することが好ましい。また、本発明の第 2 の細胞株は、T R A - 1 - 6 0、O C T 4 および S S E A - 3 以外の多能性幹細胞において特異的に発現する細胞マーカーを発現し得るものであってもよい。

[0064] 本発明の第 2 の細胞株は、ヒト抗 N A N O G 抗体に対する親和性が小さく、バックグラウンドの状況や画像処理法によっては、N A N O G について弱陽性ともいえるし、実質的に陰性であるともいえる。

[0065] 本発明の第 2 の細胞株は、上記細胞マーカーを発現するものであることから、多能性を有する細胞株である蓋然性が高い。したがって、本発明の第 2 の細胞株の一態様は、たとえば、筋細胞および筋細胞様細胞、上皮細胞および上皮細胞様細胞、神経細胞および神経細胞様細胞、脂肪細胞および脂肪細胞様細胞、肝臓細胞および肝臓細胞様細胞などの細胞に分化し得る細胞株である。

[0066] 本発明において、細胞の分化とは、T R A - 1 - 6 0、O C T 4 および S S E A - 3 からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の細胞マーカーの発現が消失すること、分化細胞に特有の細胞マーカーを発現することなどに加えて、単なる形態変化も含まれる。また、筋細胞様細胞、上皮細胞様細胞、神経細胞様細胞、脂肪細胞様細胞および肝臓細胞様細胞とは、筋細胞等に完全には分化していないが、分化の途中にある細胞や分化細胞に類似する形態を呈する細胞を包含し得る。

[0067] 本発明の第 2 の細胞株の好ましい一態様は、筋細胞および筋細胞様細胞、上皮細胞および上皮細胞様細胞、神経細胞および神経細胞様細胞、脂肪細胞および脂肪細胞様細胞、免疫細胞および免疫細胞様細胞ならびに肝臓細胞および肝臓細胞様細胞からなる群から選ばれる 1 種、好ましくは 2 種以上、より好ましくは 3 種以上、さらに好ましくは 4 種以上の細胞に分化する能力を有

する細胞株である。ただし、これらの分化細胞は例示であり、他の細胞に分化する能力を有するものも本発明の第2の細胞株に含まれる。

[0068] 本発明の第2の細胞株における各細胞への分化は、当業者により知られる多能性幹細胞を各細胞へ分化させる手法により達成できるが、たとえば、培養容器のコーティングの有無および種類、血清の種類および有無、培地の種類などを種々設定することによっても達成し得る。たとえば、図10B～Hに示されている通り、本発明の第2の細胞株から筋細胞または筋細胞様細胞、上皮細胞または上皮細胞様細胞、神経細胞または神経細胞様細胞、肝臓細胞または肝臓細胞様細胞、繊維細胞または繊維細胞様細胞、脂肪細胞または脂肪細胞様細胞、免疫細胞または免疫細胞様細胞を得ることができる。

[0069] これらの細胞について、図10Bに示す細胞は、細長い紡錘状または線維状の形態を呈し、かつ、増殖能がある筋細胞様の細胞である。図10Cに示す細胞は、個々の細胞は周縁が不定の扁平な形態を呈し、かつ、細胞同士が密になって増殖する上皮細胞様の細胞である。図10Dに示す細胞は、伸長性のある軸索または樹状突起を有する細胞形態を呈し、かつ、増殖能がない神経細胞様の細胞である。図10Eに示す細胞は、細胞質内に脂肪滴らしきものを有する形態を呈し、かつ、有限的に分裂可能な肝臓細胞様の細胞である。図10Fに示す細胞は、筋細胞と同程度またはそれ以上の繊維状の形態を呈し、かつ、増殖能を有する繊維細胞様の細胞である。図10Gに示す細胞は、多数の空洞を有し、中には伸展性の軸索を有する形態を呈し、かつ、増殖能がない脂肪細胞様の細胞である。図10Hに示す細胞は、伸長性がある先端が尖った突起物を有するバラの枝状の形態を呈し、増殖能がなく、かつ、近接する細胞と連結する樹状の免疫細胞様の細胞である。また、本発明の第2の細胞株からは、図10Iに示すような、ゴム様に伸縮し、増殖能を有する細胞同士が融合して、巨大な蕨様の構造体を形成する融合細胞が得られる。本融合細胞は、図11Aに示すようにアルカリフォスファターゼ活性陽性であり、かつ、図11Bに示すようにNANOG陽性である。さらに、本融合細胞は、図11C～Eにそれぞれ示すように、TRA-1-60、OC

T4 および SSEA-3 についても陽性である。上記の TRA-1-60、OCT4 および SSEA-3 をコードする遺伝子配列に加えて、NANOG は、たとえば、NCBI の公共のデータベースである GenBank により、それぞれ ACCESSION 番号として、NM_024865 として登録されている。

[0070] 細胞株が分化したことは、継代培養時の線維芽細胞様の形態、たとえば、図 10A に示すような形態と見比べることによる形態の変化により確認することができるが、当業者により知られる分化細胞の判定手法によっても確認することができる。たとえば、各分化細胞の細胞マーカーや各分化細胞が産生する物質を指標として、細胞株が分化したことを確認してもよい。

[0071] 本発明の第2の細胞株から各分化細胞を製造する方法が、本発明の別の態様として提供される。すなわち、本発明の分化細胞を製造する方法は、本発明の第2の細胞株を、底面が細胞接着分子でコーティングされた培養容器または底面が細胞接着分子でコーティングされていない培養容器の中で、血清を含有していない、または哺乳類血清、魚類血清もしくは血清代替物を含有した哺乳動物細胞用培地、昆虫細胞用培地または魚類細胞用培地を用いて培養する工程を含む。

[0072] 本発明の別の態様として、本発明の第2の細胞株を含む、分化細胞を製造するためのキットが提供される。分化細胞を製造するためのキットには、血清、培地および培養容器などを含むことが好ましく、これらに加えて緩衝剤（バッファー）や pH 調整剤などを含むことがより好ましい。本発明の第2の細胞株は、上記した分化細胞以外の細胞に分化する可能性があることから、血清、培地、培養容器、緩衝剤および pH 調整剤は特に限定されず、種々のものが用いられ得る。

[0073] たとえば、本発明の分化細胞を製造するためのキットに含まれる血清としては、哺乳類血清、魚類血清および血清代替物を用いることができ、ウシ胎児血清（ギブコ；No. 26140-087 など）、ウマ血清（ギブコ；No. 16050-130 など）、ヤギ血清（ギブコ；No. 16210-06

4 など)、ウサギ血清(ギブコ; No. 16120-099 など)、マウス(ケーエーシー; No. AS3054 など)、ニワトリ血清(ギブコ; No. 16110-082 など)、仔ヒツジ血清(ギブコ; No. 16070-096 など)、ブタ血清(ギブコ; No. 26250-084 など)、イヌ(ケーエーシー; No. AS3070 など)、サル血清(ケーエーシー; No. AS3076 など)、サケ血清 Sea Grow (イーストコーストバイオ; JJ80-N2751 など) などに加えて、タイやブリなどの他の魚類の血清を用いることができる。また、本発明の分化細胞を製造するためのキットに含まれる血清は、1 種であっても2 種以上であってもよい。血清を入手する方法は特に限定されず、市販されているものを用いてもよい。

[0074] 本発明の分化細胞を製造するためのキットに含まれる血清として、血清代替物を用いることができる。血清代替物としては、たとえば、Knockout (登録商標) Serum Replacement (KSR)、ラクトアルブミン水解物、魚由来細胞培養培地用添加剤 Hy-Fish (マルハチ村松)、Nu-Serum (BD; No. BSE 355100)、SERUM PLUS (シグマ; No. 14008C-500ML)、L-Glutamine 溶液(シグマ; No. 59202C-100ML)などを挙げることができる。これらの中の1 種または2 種以上の血清代替物を用いることができる。

[0075] 本発明の分化細胞を製造するためのキットに含まれる培地としては、たとえば、L-15 (ギブコ; No. 11415-064)、AIM V (ライフテクノロジーズ; No. 087-0112DK)、IMDM (ギブコ; No. 12440-053)、RPMI (ギブコ; No. 11835030)、EX-CELL 420 with L-glutamine (ニチレイ; No. 14420C、昆虫用)、D-MEM (ギブコ)、mTeSR1 (ステムセル; No. ST-05850、幹細胞用)、Ham's F-12 (ギブコ; No. 11765-054)、霊長類 ES/iPS 細胞用培地(リプロセル; No. RCHEMD001)を挙げることができる。これらの中の

1種または2種以上の培地を用いることができる。

[0076] 本発明の分化細胞を製造するためのキットには、培地に加えて、増殖因子や培地添加剤を構成成分として含めることができる。増殖因子や培地添加剤としては、たとえば、上皮細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子、神経成長因子、インスリン様増殖因子、血小板由来増殖因子、血管内皮細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、サイトカイン、幹細胞因子、T-S-TIM培養添加物、IL-3カルチャーサプリメント、血管内皮細胞グロースサプリメント、MITO+ シーラム・エクステンダー、ITS培養添加物を挙げることができる。これらの中の1種または2種以上の培地を用いることができる。増殖因子や培地添加剤を入手する方法は特に限定されず、市販されているものを用いてもよく、たとえば、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社（BD；<http://www.bdj.co.jp/falcon/products/1f3pro00000c64gx.html>、該文献の記載はここに開示として援用される）などの製造業者によって市販されているものを使用することができる。

[0077] 本発明の分化細胞を製造するためのキットに含まれる培養容器は、底面がコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ポリ-D-リシン、ポリ-L-リシン、ゼラチン、ストレプトアビジンなどの細胞接着分子でコーティングされた培養容器、底面が細胞接着分子でコーティングされていない培養容器またはこれらの中の2種以上の培養容器であることが好ましい。底面が細胞接着分子でコーティングされた培養容器を入手する方法は特に限定されないが、市販のコーティング済培養容器を用いてもよいし、非コーティング培養容器および細胞接着分子を別途用意し、当業者により知られる手法で培養容器の底面を細胞接着分子でコーティングすることにより作製したものを用いてもよい。細胞接着分子の入手方法は特に限定されず、たとえば、コラーゲンI（サーモ：132706）、IV（コスモバイオ：354534）などのコラーゲン；ポリ-D-リシン（サーモ：132703）；ゼラチン（CR：354654）；フィブロネクチン（BD：356242）；ポリ-L-

リシン（サーモ）；ポリ－Ｌ－オルニチン（バイオコート）；ラミニン（BD）；マトリゲルバイオコート（BD）；３次元培養用足場 *AtelioCell*（コーケン；No. CSM－50）などを用いることができる。培養容器の形状や素材は特に限定されないが、ポリスチレン製のフラスコ、シャーレおよびマルチウェルプレートが好ましい。

[0078] 本発明の分化細胞を製造するためのキットに含まれる各構成成分は、市販されている培地（液体および固形）、血清（液体および固形）、血清代替物質、増殖因子、培地添加剤（各種アミノ酸含む）、培養容器が一般的に用いられるが、特に限定されるものではない。たとえば、培地は、製造業者により開示されている組成を参考にして作製したものを用いてもよい。

[0079] 本発明の第１の細胞株および第２の細胞株のより好ましい態様は、本発明の第１の細胞株および第２の細胞株の特性を併せ持った細胞株であり、たとえば、後述する実施例に記載のカワハギ（*Stephanolepis cirrifer*）の背鰭に由来するKSC細胞である。KSC細胞は、微生物の識別の表示を「KSC」とし、かつ、受託番号を「NITE BP－1369」として、独立行政法人製品評価技術基盤機構の特許微生物寄託センター（〒292－0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2－5－8）に2012年6月1日付けの受託日より寄託されている。

[0080] 本発明の別の側面によれば、本発明の第１の細胞株および／または第２の細胞株を培養することにより得られる、これらの細胞株からなる培養細胞シートが提供される。本発明の培養細胞シートは、高級魚類の治療への応用が期待できるものである。特に、養殖魚は免疫が弱く傷害致死率が高いことから、本発明の培養細胞シートは、養殖魚の傷害致死率の低下に寄与し得るものである。また、本発明の培養細胞シートは、合成高分子やセロファンなどの人工的な物質は物質の選択的透過性が制限されることから、これを克服するものとして生体由来選択膜としての利用が期待できる。さらに、本発明の培養細胞シートは、個々の細胞がコラーゲンやフィブロネクチンを産生することからヒト培養細胞シートを形成する際の足場としての利用、細胞に由来す

る免疫性および抗菌性の観点から生体内への物質輸送カプセル素材、絆創膏、貼付剤などの医療的利用、がん細胞動向の試験への利用、免疫試験への利用、魚類成分を分泌する化粧品としての美容パックとしての利用などに期待できる。また、本発明の培養細胞シートは、シート形成時に底面から剥がれ、浮遊状態で培養を継続できる。本発明の培養細胞シートは、浮遊状態で培養ができるという利点を有する。

[0081] 3. 本発明の細胞株の製造方法

本発明の細胞株の製造方法は、本発明の第1の細胞株および本発明の第2の細胞株を製造する方法であり、たとえば、カワハギ科魚類の生体部位から単離した細胞を30回以上、好ましくは50回以上、より好ましくは70回以上の継代培養に供する工程（以下、継代培養工程ともよぶ。）を含む方法が挙げられる。継代培養工程は、最終的に本発明の細胞株が得られる工程であれば特に限定されるものではなく、たとえば、上記した「1. 本発明の第1の細胞株」および「2. 本発明の第2の細胞株」に記載の事項に基づいて、使用する材料、方法、条件、製造物の判定などを決定して実施することができる。また、本発明の細胞株の製造方法は、本発明の細胞株を製造するという目的を達成し得る限り、継代培養工程を実施している途中で細胞を保存および復帰するなど、継代培養工程の前、途中および後に適当な工程を設けることができる。

[0082] 4. 本発明の形質転換体、製造方法およびキット

本発明の形質転換体は、本発明の細胞株に外来遺伝子を導入してなるものである。また、本発明の形質転換体の製造方法は、本発明の細胞株に外来遺伝子を導入して形質転換体を得る工程を含む方法である。本発明の外来遺伝子産物の製造方法は、本発明の形質転換体から外来遺伝子の発現産物を得る工程を含む方法である。

[0083] 本発明の細胞株に外来遺伝子を導入する手法は特に限定されず、たとえば、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、バキュロウィルスを用いる手法などの当業者に

より知られているトランスフェクション手法を採用できる。また、細胞株への外来遺伝子の導入は、外来遺伝子そのものを本発明の細胞株の核内へ導入してもよいし、ベクターなどの遺伝子導入用物質を利用して、たとえば、外来遺伝子を導入した組換えベクターの形で本発明の細胞株内へ導入してもよい。

[0084] ベクターは、自律的に複製することが可能なベクターであれば特に限定されないが、たとえば、市販されている哺乳類細胞用のベクター、より具体的には p c D N A 3. 1、F l e x i H a l o T a g、p c D N A 3. 2、p c D N A 4、p c D N A 5、p c D N A 6、p C M V などのプラスミドベクターや； λ ファージ、RSVなどのウイルスベクター；アフリカツメガエル由来 E F 1 α プロモーターを有する両生類由来のベクターなどが挙げられる。

[0085] 導入すべき外来遺伝子は特に限定されず、たとえば、機能性タンパク質、食用タンパク質、酵素、マーカー用タンパク質、標識用タンパク質などの、所望のタンパク質をコードする遺伝子であればよい。本発明の細胞株は、魚類由来の細胞株であることから、魚類特有のタンパク質をコードする遺伝子を外来遺伝子とすることもできる。外来遺伝子は、所望のタンパク質のアミノ酸配列の情報に基づいて作製でき、市販のものを適宜改変して使用することができる。外来遺伝子がコードするタンパク質は1種類でも2種類以上でもよい。たとえば、所望のタンパク質と抗生物質耐性マーカーとをコードする外来遺伝子であれば、遺伝子導入後に抗生物質選択性により外来遺伝子が導入された形質転換体のみを効率よく取得することが可能である。

[0086] 本発明の形質転換体の製造方法および本発明の外来遺伝子産物の製造方法の具体例は、特に限定されるものではないが、後述する実施例の「6. K S C 細胞への外来遺伝子の導入および発現」に記載の方法を挙げることができる。本発明の方法を実施するために用いられる遺伝子工学的手法や分子生物学的手法は、これまでに知られている手法を制限なく用いることができ、たとえば、M o l e c u l a r C l o n i n g : A l a b o r a t o r y

Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989やCurrent Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997) (これらの文献の記載はここに開示として援用される) などに記載されている方法を参照することができる。

[0087] 本発明の形質転換体の製造方法によって形質転換体を得られたか否かは、導入した外来遺伝子の発現産物の有無を指標に確認できる。同様に、本発明の外来遺伝子産物の製造方法によって外来遺伝子産物を得られたか否かは、外来遺伝子の発現産物の有無を指標に確認できる。本発明の外来遺伝子産物の製造方法では、本発明の形質転換体を培養することにより外来遺伝子を発現させて外来遺伝子産物を得てもよいし、本発明の形質転換体を培養して増殖させた後、外来遺伝子発現を誘導して外来遺伝子産物を得てもよい。また、外来遺伝子産物は、外来遺伝子の種類に応じて、本発明の形質転換体内に蓄積した発現産物または培養液中に蓄積した発現産物として得ることができる。外来遺伝子産物の確認は、当業者により知られる特定のタンパク質の存在を知る手法であれば特に限定されないが、たとえば、外来遺伝子産物の分子量や外来遺伝子産物に対する抗体などを用いたウエスタンブロット法、イムノアッセイ法、クロマトグラフィー法などを採用することができる。

[0088] 本発明の形質転換体を製造するためのキットは、本発明の細胞株を含めば特に限定されないが、本発明の細胞株に加えて、外来遺伝子を導入するためのベクターとトランスフェクションのための器具、試薬、装置などの器材とを含むことが好ましい。

[0089] トランスフェクションのための器材は、各トランスフェクション手法を実施する際に使用されるものであれば特に限定されず、たとえば、トランスフェクション手法がリポフェクション法である場合は、リポソーム、培地、緩衝液などの試薬および培養容器などの器具であることが好ましい。

[0090] 5. 本発明の細胞株の用途

本発明の細胞株の用途は特に限定されず、たとえば、上記した用途以外にも、魚類の細胞生理、魚類遺伝子とその発現系、魚病ウイルス、水環境汚染評価の実験系などの合目的な研究に加え、生理活性物質の評価、魚類ウイルスとの組合せによる抗ウイルス剤のスクリーニングなどにも利用することができる。たとえば、本発明の細胞株は、本発明の細胞株の培養系に被験物質を導入し、次いで被験物質の生細胞に対する影響を評価する工程を含む、被験物質評価方法；本発明の細胞株の培養系にウイルスを接種し、当該ウイルスの増殖に適した栄養培地でウイルスを増殖させる工程を含む、ウイルス増殖方法；ウイルス増殖方法においてウイルスの増殖している培地中に被験物質を導入し、次いで被験物質のウイルスに対する作用を評価する工程を含む、ウイルス治療剤をスクリーニングする方法などに利用できる。さらにこれらの方法を応用して、ウイルス感染症を診断する方法、ウイルス感染症に対して有効なワクチンを製造する方法、細胞毒性を評価する方法などに本発明の細胞株を利用できる。たとえば、本発明の細胞株の生存数と、被験物質を接触させた後の細胞株の生存数とを比較することにより、被験物質の細胞毒性を評価することが期待できる。また、被験物質と本発明の細胞株とを接触させる工程および筋細胞、皮膚細胞、神経細胞または脂肪細胞を検出することにより、被験物質を分化誘導物質と判定する工程によれば、分化誘導物質をスクリーニングすることが期待できる。

[0091] 以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例

[0092] 1. カワハギ組織からの細胞の単離

カワハギ (*Stephanolepis cirrifer*) の各鰭部を、皮を剥ぐことなく 5 mm 角に切り取ったものを 1.5 ml の滅菌したチューブに入れて、氷冷下で水道水、PBS (和光純薬) の順で洗浄した。洗浄した鰭片を、10% ペニシリン/ストレプトマイシン (MP バイオメディカルズ) 含有 PBS を用いて氷冷下で 3 度置換し、30 分静置した。なお、

「置換」とは、PBSが適量入ったチューブを用意し、そのPBS含チューブに鱈片を入れて攪拌した後、鱈片を別のPBS含チューブに入れる操作をいう。

[0093] 静置後の鱈片を、1% ペニシリン／ストレプトマイシン含有PBSを用いて氷冷下で3度置換した。処理後の鱈片を、クリーンベンチ内で、1% ペニシリン／ストレプトマイシン含有PBSの代わりに、トリプシンEDTA (MPバイオメディカルズ) を加え、氷冷下で組織片を1mm角に細かく刻み、次いで室温で20分間静置した。静置後の組織片を遠心分離機に数秒間かけた後、上清を取り除いた。沈殿した組織片にLeibovitz' s L-15培地 (ライフテクノロジーズ) で数回処理した。すなわち、チューブ内の組織片を遠沈させ、上清を除いた後、新鮮培地を加えて攪拌した。その後、組織片を再度遠沈させ、上清を除いた後、再度新鮮培地を加えて攪拌した。この操作を2〜3回繰り返した。Leibovitz' s L-15培地の組成は表1のとおりである (http://ja.invitrogen.com/site/jp/ja/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation_80.html、該文献の記載はここに開示として援用される)。

[表1]

成分	分子量	濃度 (mg/L)	mM
アミノ酸			
グリシン	75	200	2.67
L-アラニン	89	225	2.53
L-アルギニン	174	500	2.87
L-アスパラギン	132	250	1.89
L-システイン	121	120	0.992
L-グルタミン	146	300	2.05
L-ヒスチジン	155	250	1.61
L-イソロイシン	131	250	1.91
L-ロイシン	131	125	0.954
L-リジン	146	75	0.514
L-メチオニン	149	75	0.503
L-フェニルアラニン	165	125	0.758
L-セリン	105	200	1.9
L-スレオニン	119	300	2.52
L-トリプトファン	204	20	0.098
L-チロシン	181	300	1.66
L-バリン	117	100	0.855
ビタミン			
塩化クロリン	140	1	0.00714
D-パントテン酸カルシウム	477	1	0.0021
葉酸	441	1	0.00227
ナイアシンアミド	122	1	0.0082
塩酸ピリドキシン	206	1	0.00485
リボフラビン 5'-リン酸ナトリウム	478	0.1	0.000209
チアミンモノリン酸塩	442	1	0.00226
i-イノシトール	180	2	0.0111
無機塩			
塩化カルシウム (CaCl ₂) (無水)	111	140	1.26
塩化マグネシウム (無水)	95	93.7	0.986
硫酸マグネシウム (MgSO ₄) (無水)	120	97.67	0.814
塩化カリウム (KCl)	75	400	5.33
リン酸二水素カリウム (KH ₂ PO ₄)	136	60	0.441
塩化ナトリウム (NaCl)	58	8000	137.93
リン酸水素二ナトリウム (Na ₂ HPO ₄)	142	190	1.34
その他の成分			
D+ガラクトース	180	900	5
フェノールレッド	398	10	0.0251
フェノールレッド	376.4	10	0.0266
ビルビン酸ナトリウム	110	550	5

[0094] 処理後の組織片を、10% FBS（ギブコ）を含む Leibovitz's L-15 培地の入った 25 cm² Collagen I カルチャーフラスコ（サーモ）内に播き、底着させた後、25℃で培養した。図1A～Dは、各鰭片を中心として、フラスコ全体に遊走した細胞が展開した様相を示す。以下では、背鰭片から摘出した細胞の継代培養手順について述べる。

[0095] 2. 継代培養

カルチャーフラスコ中の培地を除去し、フラスコ底面に付着している細胞をPBSで3回洗浄した。TrypLE Express（ギブコ）を用いて38℃で10分間処理して、細胞を剥離および回収した。回収した細胞に、10% FBSを含むLeibovitz's L-15培地を加え、25℃で培養した。

[0096] 細胞の保存は、回収した細胞に培地を加えた後、室温、1,100rpmで4分間遠心し、次いで上清を除去した後、セルバンカー2（十慈フィールド）を用いて、-80℃で保存した。また、凍結細胞を起こす手順として、まず、凍結細胞を室温で半解凍状態にし、Leibovitz's L-15培地で2回培地の置換を行った。この置換は、半解凍状態のチューブから液体部分を取り、15mlの遠沈管にうつした後、L-15培地4mlを加え攪拌し遠心分離を行った。次いで、上清を除き再度L-15培地を4ml加え攪拌し遠心分離を行った。次いで、上清を除いた後、細胞に10% FBSを含むLeibovitz's L-15培地を加えて、継代培養に供した。

[0097] 3. 細胞の株化の評価および25cm²フラスコにおける増殖速度

図1に示す組織周縁に集まった初代培養細胞は、通常、50～80回の分裂後に細胞の分裂限界に達する（Hayflick limit; Hayflick L, Moorhead PS, 1961, Exp Cell Res. 25: 585-621を参照、該文献の記載はここに開示として援用される）。しかし、中には、上記分裂回数を過ぎても、倍加時間（Doubling time）を低下させず、分裂を繰り返す細胞がある。そのような細胞が、不死化細胞（株化細胞、細胞株など）と定義されている。

[0098] 本発明者らは、上記1および2を実施した結果、継代回数が70回以上であり、かつ、分裂回数が276回以上である細胞を得ることに成功した。この細胞をKSC細胞と名づけた。KSC細胞は、倍加時間について、第1継代培養細胞とほとんど変化がなかった。したがって、KSC細胞は、株化されたと評価した。これは、JRCB細胞バンクの定義（<http://cell>

lbank.nibio.go.jp/visitercenter/whatculture/cellculture03.html、該文献の記載はここに開示として援用される）に従うものである。

[0099] 細胞の増殖率は、細胞の密度（濃度）や培養面積など条件によって大きく変動することが知られている。そこで、KSC細胞と、哺乳類細胞の株化細胞の中でも比較的増殖率の高いCHO細胞との倍加時間を比較した。CHO細胞のデータは、細胞バンク規模で世界第2位であり、かつ、世界で唯一詳細な細胞データを完備して信頼性が高いと思われるドイツのDSMZ (<http://www.dsmz.de/>、該文献の記載はここに開示として援用される)のデータを利用した。

[0100] DSMZの細胞データより、CHO細胞は、約 80 cm^2 に 10^6 cells/ml の細胞を播種すると72～96時間でコンフルエンス（細胞がフラスコ底面全体に展開するまでに増殖した状態）に達し、倍加時間は24時間として計算される。それに対して、KSC細胞は、約 80 cm^2 に 10^6 cells/ml の細胞を播種すると、48～72時間でコンフルエンスに達し、倍加時間は18.34時間として算出された。したがって、KSC細胞は、CHO細胞と同程度またはそれより優れた増殖能をもった細胞であることがわかった。

[0101] また、KSC細胞について、約 $0.4 \times 10^6\text{ cells/ml}$ の細胞を 75 cm^2 の面積に播き、10% FBSを含むLeibovitz's L-15培地を用いて、 CO_2 非存在下で 25°C にて、コンフルエントに達する48時間後まで培養した際の全細胞数をTC10 Automated Cell Counter（バイオラッド）を用いて計測したところ、培養24時間後の細胞数は約 $1.0 \times 10^6\text{ cells/ml}$ であり、培養48時間後の細胞数は約 $2.5 \times 10^6\text{ cells/ml}$ であった。ウェブ上の倍加時間計測ソフトウェア (<http://www.doubling-time.com/compute.php?lang=en>) を用いて、播いた直後の細胞数と培養48時間後の細胞数とから倍加時間を算出したところ、18.

16時間であった。同様に、播いた直後の細胞数と培養24時間後の細胞数とから算出された倍加時間は18.16時間であり、培養24時間後の細胞数と培養48時間後の細胞数とから算出された倍加時間は18.16時間であった。

[0102] 4. 凍結状態からの復帰

セルバンカー2を用いて凍結保存したKSC細胞について、解凍後の細胞生存率を評価した。図2は、継代回数に係わらず、解凍後のKSC細胞は75%以上の生存率であったことを示す。

[0103] 5. 細胞の形態観察

株化したKSC細胞は、線維芽細胞様の形態を示した（図3Aを参照）。また、KSC細胞をフラスコ底面で培養すると、コンフルエントになった後、2層構造を形成した（図3Bを参照）。さらに、この状態で培養を続けると多層構造を形成した（図3Cを参照）。

[0104] 6. KSC細胞への外来遺伝子の導入および発現

(1) 方法

哺乳類細胞で使われている各種遺伝子導入法（トランスフェクション法）がKSC細胞で適用可能であることを、リポフェクタミン法を含むリポフェクション法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法およびバキュロウィルスを用いた手法により検証した。各手法の詳細は、下記に示す各製造業者の指示に準じた：http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/lipofectamine2000_man.pdf; http://www.invitrogen.jp/transfection/pdf/Neon_quickguide_JPN.pdf; <http://www.eppendorf.de/int/img/na/lit/pdf/8301-C109F-07.pdf#search=%27FemtoJetMicroinjector%27>; <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp10582.pdf#searc>

h=%27celllight%20pdf%27、該文献の記載はここに開示として援用される。

[0105] (2) 材料

外来遺伝子を導入する際に使用した組換え用遺伝子として、Flexi HaloTag Vector (プロメガ)、Flexi HaloTag Clone (プロメガ) およびpcDNA3.1 Vector (ライフテクノロジーズ) を用いた。

[0106] 各トランスフェクション法では、次の試薬等を用いた: Lipofectamine 2000 Reagent および PLUS Reagent (ライフテクノロジーズ); Neon Transfection System (ライフテクノロジーズ); FemtoJet-Microinjector (エッペンドルフ); CellLight (ライフテクノロジーズ)。

[0107] (3) 遺伝子導入結果

哺乳動物の細胞系で通常に使用されている上記方法を用いることにより、KSC細胞へ外来遺伝子の導入が可能であることが確認された。

[0108] (4) 外来遺伝子産物であるヒトアルカリホスファターゼ (ヒト-AP) の発現

KSC細胞へ導入した外来遺伝子の遺伝子産物であるFlexi HaloTag ヒト-APの発現をHaloTag Oregon Green Ligandにより蛍光検出した (図4を参照)。生産されたヒト-APの活性は、Ziva Ultra SEAP Plus Detection Kit (フナコシ) を用いて測定した (図5を参照)。図4および図5が示すとおり、KSC細胞へ導入された外来遺伝子の発現が確認され、さらに発現産物は活性があるものであった。

[0109] (5) 外来遺伝子産物であるヒトパラオキシナーゼ (PON) の発現

KSC細胞へ導入した外来遺伝子の遺伝子産物であるFlexi HaloTag PONの発現をTMR-Ligandにより蛍光検出した (図6を参照)。図6が示すとおり、KSC細胞へ導入された外来遺伝子の発現が確

認された。

[0110] (6) 外来遺伝子産物である蛍光タンパク質の発現

KSC細胞へ導入した外来遺伝子の遺伝子産物である蛍光タンパク質のシアン・フルオレセント・プロテイン－イエロー・フルオレセント・プロテイン (Cyan Fluorescent Protein－Yellow Fluorescent Protein) およびカルモジュリン；レッド・フルオレセント・プロテイン (Red Fluorescent Protein) およびベシキュラー・ストマティティス・ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus) のG糖タンパク質；ならびにグリーン・フルオレセント・プロテイン (Green Fluorescent Protein) を発現させた細胞を蛍光顕微鏡により観察した (図7A～Cを参照)。図7A～Cが示すとおり、KSC細胞へ導入された外来遺伝子の発現が確認された。

[0111] 7. トランスフェクション (遺伝子導入) における細胞安定性の評価

上記Lipofectamine法による遺伝子導入における細胞毒性 (耐性) をKSC細胞、ラット間葉系幹細胞 (MSC)、ヒト急性T細胞性白血病細胞株 (Jurkat) およびマウス胚性腫瘍細胞 (P19) を用いて比較検証した。その結果、KSC細胞は、外来遺伝子導入前 (コントロール) との比較から、遺伝子導入後 (トランスフェクト済) の生存率は90%以上であり、他の細胞に比べて優れた細胞安定性を示すことがわかった (図8)。

[0112] 8. KSC細胞の高密度培養の可能性検証

KSC細胞の浮遊培養の可能性を検証した。その結果、スピナーフラスコを用いて、10% FBSを含むLeibovitz's L-15培地で、CO₂非存在下、100rpm、25℃で培養したところ、細胞の増殖が確認された。本条件の浮遊培養では、TC10 Automated Cell Counter (バイオラッド) を用いて細胞数を計測することにより、KSC細胞は約26時間に1回の割合で細胞分裂することが確認された。

[0113] 9. 無血清培養の可能性検証

KSC細胞の無血清培養における倍加時間を検証した。25 cm² CollaGen Iカルチャーフラスコを用いて、Leibovitz's L-15培地のみの培養（無血清培養）およびLeibovitz's L-15培地および血清代替添加物（KSR；ライフテクノロジーズ）の培養（血清代替物培養）について、KSC細胞の倍加時間を検証した。無血清培養では、FBS血清を添加する通常培養と比べて、倍加時間が大きくなるものの、KSC細胞の増殖は確認できた。また、KSC細胞は、血清代替添加物を使用することによって、通常培養と変わらない増殖速度での培養が可能であった。

[0114] 10. 染色体解析

(1) 試薬

コルセミド溶液として、KaryoMAX-COLCEMID-PBS溶液（10 μg/ml）（ライフテクノロジーズ）を用いた。低張液として、0.075 M KClを用いた。固定液として、メタノール：酢酸＝3：1溶液を用時調製して用いた。

[0115] (2) 染色体標本の作成

コルセミドは細胞周期をM期で止めることから、コルセミド処理によりM期の細胞数が増える。しかし、処理時間を長くすると、染色体が短縮して、解析ができなくなる可能性がある。そこで、80～90%程度のコンフルエンスに達した細胞の中から、対数増殖期の細胞に対して0.02 μg/mlになるようにコルセミド溶液を添加した後、約5時間培養を継続してコルセミド処理を実施した。

[0116] 次いで、処理後の細胞をトリプシン処理して剥離した後、細胞剥離液を15 mlチューブに入れて、1,100 rpmで4分間遠心し、上清を除去して細胞を回収した。本操作は、細胞がコルセミド処理時間に影響することから、迅速に行った。

[0117] 次いで、回収した細胞を含む15 mlチューブに、ピペットで少量の低張液

を加え、静かにピペッティングすることにより、細胞を分散させた。分散後の細胞を含む15 mlチューブに、最終容量が1.5 mlになるまで低張液を加えた後、ピペッティングにより再度細胞を分散させた。低張液に分散した細胞を、室温にて20分間放置して低張処理を行った。

[0118] 次いで、総量が10 ml程度になるようにゆっくりと固定液を加え、静かに攪拌し細胞を固定化した。さらに1,100 rpmで4分間遠心して上清を除去し、新たな固定液を遠心沈降した細胞に数滴加えて、ピペッティングにより細胞を分散させた。さらに10 ml程度の固定液を加えた後、全体を攪拌した。この作業をさらに2回繰り返し、細胞を完全に固定した。固定した細胞を、ヘキスト・キナクリン（和光純薬）を用いて染色し、光学顕微鏡で観察した。

[0119] 観察の結果、KSC細胞の細胞集団として、染色体が32個、33個および66個の3タイプの細胞株を含むことが分かった。通常のカワハギは、メス33個、オス34個の染色体を有する。KSC細胞の細胞集団の90%は、カワハギのメスと同じく、染色体数が33個であった。しかし、細胞集団の残り10%の細胞は、32個および66個の染色体を持つ細胞であった。

[0120] 11. 幹細胞マーカーによる多分化能解析

(1) 方法

以下の手順に従い、KSC細胞を免疫化学染色した。なお、ブロッキング・バッファーには、10% FBSおよび0.1% Triton X-100を含むPBS溶液を用いた。また、抗体希釈バッファーには、3% ヤギ血清および0.1% Triton X-100を含むPBS溶液を用いた。

[0121] まず、KSC細胞を培養フラスコ内でコンフルエントにまで培養した後、培地を除き、細胞を室温にてPBSで2回洗浄した。細胞に4% パラホルムアルデヒドを加えて、20分間室温で静置して細胞を固定化した。パラホルムアルデヒドを除き、10分間隔で3回PBSを用いて固定化細胞を洗浄した。ブロッキング・バッファーを加えて、1時間室温で静置した。ブロッキ

ング・バッファーを除き、ブロッキング処理後の細胞をPBSで1回洗浄した。抗体希釈バッファーを用いて100倍に希釈した一次抗体（ES/iPS Cell Characterization Kit；フナコシ）を加えて、4℃にてオーバーナイトで一次抗体反応を実施した。翌日、一次抗体を除いた後、10分間隔で5回、反応後の細胞をPBSで洗浄した。次いで、抗体希釈バッファーで希釈した二次抗体を加えて、室温で1時間静置して二次抗体反応を実施した。二次抗体について、抗TRA-1-60抗体に対してAnti-IgG+IgM（H+L），Mouse，Goat-Poly，FITC；抗SSEA-3抗体に対してAnti-RAT IgM（mu chain）（GOAT），DyLight 488；抗NANOG抗体に対してAnti-IgG（H+L），Rabbit，Goat-Poly，DyLight 488；抗OCT4抗体に対してAnti-IgG（H+L），Rabbit，Goat-Poly，DyLight 488を用いた。この際、細胞を固定化させたプレートを光から保護した。次いで、二次抗体を取り除き、反応後の細胞をPBSにより10分間隔で4回洗浄した。この際にも、プレートを光から保護した。洗浄後の細胞をFLoidセルイメージングステーション（ライフテクノロジーズ）を用いて観察した。

[0122] （2）結果

観察結果を図9A～Dに示す。KSC細胞の大部分は、TRA-1-60、OCT4およびSSEA-3を発現しており陽性であった。発現強度は、TRA-1-60、OCT4およびSSEA-3の順であった。それに対して、KSC細胞はNANOG陰性または発現していたとしても非常に微かな量であった。

[0123] 若尾昌平らの文献（Shohei Wakao et al.、PNAS、June 14, 2011、vol. 108、no. 24、pp. 9875－9880、該文献の記載はここに開示として援用される）には、多分化能を有するヒト皮膚線維芽細胞（Muse細胞）の存在が報告されている。以

上の結果より、KSC細胞は、TRA-1-60、OCT4およびSSEA-3といった多能性幹細胞に特有の細胞マーカーを発現する線維芽細胞様細胞であることから、多能性を有する細胞株であると推測される。

[0124] 12. 分化誘導実験

KSC細胞が多能性を有する細胞株であると推測されたことから、培地や培養条件を変えることにより、種々の細胞への分化を試みた。細胞の形態は、光学顕微鏡により460倍の倍率で観察した。

[0125] (1) KSC細胞の形態（分化誘導前）

KSC細胞をコラーゲンコートフラスコにて10% (v/v) FBSを含むLeibovitz's L-15培地を用いて培養した。培養後の細胞の観察結果を図10Aに示す。図10Aに示す線維芽細胞様の形態は、KSC細胞が他の細胞へ分化する前の形態であるものと推測される。

[0126] (2) 筋細胞様細胞への分化

KSC細胞を、25 cm²または75 cm²のコラーゲンコートフラスコにて、10% (v/v) FBSを含むAIM V培地（ライフテクノロジーズ；No. 087-0112DK）を用いて、CO₂非存在下で、初期細胞数を1~4×10⁵ cells/mlとして、25℃にて90%以上のコンフルエント状態に達するまで培養した。培養後の細胞は、筋細胞様の形態を呈するものであった（図10Bを参照）。また、培養後の細胞は、増殖能を有するものであった。

[0127] (3) 上皮細胞様細胞への分化

KSC細胞を、25 cm²または75 cm²の非コーティングフラスコにて、10% (v/v) FBSを含むLeibovitz's L-15培地を用いて、CO₂非存在下で、初期細胞数を1~4×10⁵ cells/mlとして、25℃にて90%以上のコンフルエント状態に達するまで培養した。培養後の細胞は、上皮細胞様の形態を呈するものであった（図10Cを参照）。また、培養後の細胞は、増殖可能なものであった。

[0128] (4) 神経細胞様細胞への分化

KSC細胞を、 25 cm^2 または 75 cm^2 の非コーティングフラスコにて、無血清のLeibovitz's L-15培地を用いて、 CO_2 非存在下で、初期細胞数を $1\sim4\times10^5\text{ cells/ml}$ として、 25°C にて90%以上のコンフルエント状態に達するまで培養した。培養後の細胞は、神経様軸索および融合した細胞体を形成するものであった（図10Dを参照）。また、培養後の細胞は、増殖性がなく、かつ、伸長性を有するものであった。さらに、培養後の細胞は、神経細胞に特有の細胞マーカー陽性の細胞であった。

[0129] 同様にして、KSC細胞を種々の培養容器、血清および培地の組み合わせを用いて培養することや、KSC細胞について分化誘導したところ、脂肪細胞様細胞、繊維細胞様細胞、肝臓細胞様細胞、バラの枝状の免疫細胞様細胞および巨大繭状の融合細胞を得ることができた（図10E～Iを参照）。特に、図10Iに示される融合細胞は、アルカリフォスファターゼ活性陽性であり（図11Aを参照）、かつ、NANOG陽性であった（図11Bを参照）。さらに、本融合細胞は、TRA-1-60、OCT4およびSSEA-3についても陽性であった（図11C～Eを参照）。

[0130] 13. 培養細胞シートの作製

10% FBS含有Leibovitz's L-15培地を用いて、コーゲンIコートフラスコにKSC細胞（ $1\times10^5\text{ cells/ml}$ ）を播いた。3日に1度程度の培地交換を繰り返して、1～3カ月間培養を続けたところ、薄膜状の培養細胞シートが形成された（図12を参照）。また、培地に増殖因子・培地添加剤として分化誘導剤Noggin（ヒューマンザイム）またはG-CSF（ヒューマンザイム）を終濃度 500 pg/ml となるように添加したところ、シート形成効率を高めることができ、培養細胞シートの形成速度が促進された。形成された培養細胞シートは、細胞同士が結合してシート状または薄膜状の形態であり、キメが細かく目視では細胞の形を認識できないという特徴を有するものであった。

受託番号

[0131] S t e p h a n o l e p i s c i r r h i f e r K S C N I T E B
P - 1 3 6 9

請求の範囲

- [請求項1] 下記（１）の性質を有する、カワハギ科（*Monacanthidae*）魚類の生体部位に由来する細胞株またはその継代株。
- （１）実質的に制限なく継代培養が可能である
- [請求項2] さらに下記（２）の性質を有する、請求項１に記載の細胞株またはその継代株。
- （２）線維芽細胞様の形態を呈する
- [請求項3] さらに下記（３）の性質を有する、請求項１または２に記載の細胞株またはその継代株。
- （３）多層構造を形成した培養が可能である
- [請求項4] さらに下記（４）の性質を有する、請求項１～３のいずれか１項に記載の細胞株またはその継代株。
- （４）最大値は６６本であり、最小値は３２本であり、およびモードは３３本である度数分布に従った染色体数を有する
- [請求項5] 前記（４）の性質において、モードである３３本の染色体の度数が度数分布における全度数の約９０％である、請求項４に記載の細胞株またはその継代株。
- [請求項6] さらに下記（５）の性質を有する、請求項１～５のいずれか１項に記載の細胞株またはその継代株。
- （５）初期細胞数を約 1.0×10^6 cells/ml として、 75 cm^2 の底面積を有する培養容器内で１０％ FBS を含む Leibovitz' s L-15 培地を用いて、 CO_2 非存在下で 25°C にて培養した際の倍加時間は、約１４～２８時間である
- [請求項7] TRA-1-60、OCT4 および SSEA-3 からなる群から選ばれる少なくとも１種の細胞マーカーが陽性である、カワハギ科魚類の生体部位に由来する細胞株またはその継代株。
- [請求項8] 前記細胞株またはその継代株は、線維芽細胞様の形態を呈する細胞株またはその継代株である、請求項７に記載の細胞株またはその継代株

。

- [請求項9] 前記細胞株またはその継代株は、筋細胞および筋細胞様細胞、上皮細胞および上皮細胞様細胞、神経細胞および神経細胞様細胞、脂肪細胞および脂肪細胞様細胞、免疫細胞および免疫細胞様細胞ならびに肝臓細胞および肝臓細胞様細胞からなる群から選ばれる少なくとも1種の細胞に分化する能力を有する、請求項7または8に記載の細胞株またはその継代株。
- [請求項10] 前記カワハギ科魚類が、カワハギ属 (*Stephanolepis*) 魚類、ウマヅラハギ属 (*Thamnaconus*) 魚類、メガネウマヅラハギ属 (*Cantherhines*) 魚類、ウスバハギ属 (*Aluterus*) 魚類およびアミメハギ属 (*Rudarius*) 魚類からなる群から選ばれる魚類である、請求項1～9のいずれか1項に記載の細胞株またはその継代株。
- [請求項11] 前記カワハギ科魚類が、カワハギ (*Stephanolepis cirrifer*) である、請求項1～9のいずれか1項に記載の細胞株またはその継代株。
- [請求項12] 前記生体部位は、背部、胸部、腹部、尻部または尾部にある鰭である、請求項1～11のいずれか1項に記載の細胞株またはその継代株。
- [請求項13] 受託番号がNITE BP-1369である、カワハギの背鰭に由来する細胞株またはその継代株。
- [請求項14] カワハギ科魚類の生体部位から単離した細胞を70回以上の継代培養に供する工程を含む、
請求項1～13のいずれか1項に記載の細胞株またはその継代株を製造する方法。
- [請求項15] 請求項1～13のいずれか1項に記載の細胞株またはその継代株に外来遺伝子を導入してなる、形質転換体。
- [請求項16] 請求項1～13のいずれか1項に記載の細胞株またはその継代株に外来遺伝子を導入して形質転換体を得る工程を含む、形質転換体を製造

する方法。

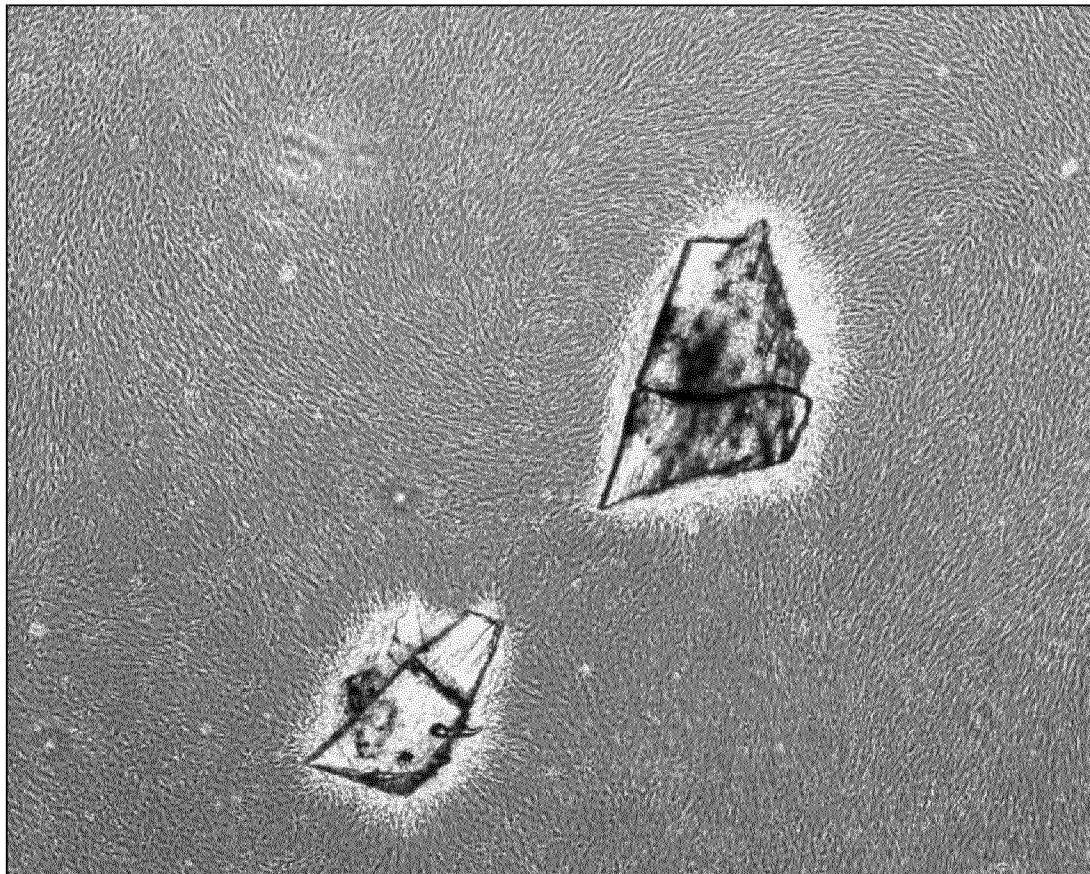
- [請求項17] 請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の細胞株またはその継代株に外来遺伝子を導入してなる形質転換体から該外来遺伝子の発現産物を得る工程を含む、外来遺伝子の発現産物を製造する方法。
- [請求項18] 請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の細胞株またはその継代株と、ベクターと、トランスフェクションのための器材とを含む、形質転換体を製造するためのキット。
- [請求項19] 請求項 7 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の細胞株またはその継代株と、培地と、培養容器とを含む、分化細胞を製造するためのキット。
- [請求項20] さらに血清を含む、請求項 19 に記載のキット。
- [請求項21] 前記血清が、哺乳類血清、魚類血清および血清代替物からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の血清である、請求項 20 に記載のキット。
- [請求項22] 前記培地は、哺乳動物細胞用培地、昆虫細胞用培地および魚類細胞用培地からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の培地である、請求項 19 ～ 21 のいずれか 1 項に記載のキット。
- [請求項23] 前記培養容器が、底面が細胞接着分子でコーティングされた培養容器および底面が細胞接着分子でコーティングされていない培養容器からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の培養容器である、請求項 19 ～ 22 のいずれか 1 項に記載のキット。
- [請求項24] 請求項 7 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の細胞株またはその継代株を、底面が細胞接着分子でコーティングされた培養容器または底面が細胞接着分子でコーティングされていない培養容器の中で、血清を含有していない、または哺乳類血清、魚類血清もしくは血清代替物を含有した哺乳動物細胞用培地、昆虫細胞用培地または魚類細胞用培地を用い

て培養する工程を含む、
分化細胞を製造する方法。

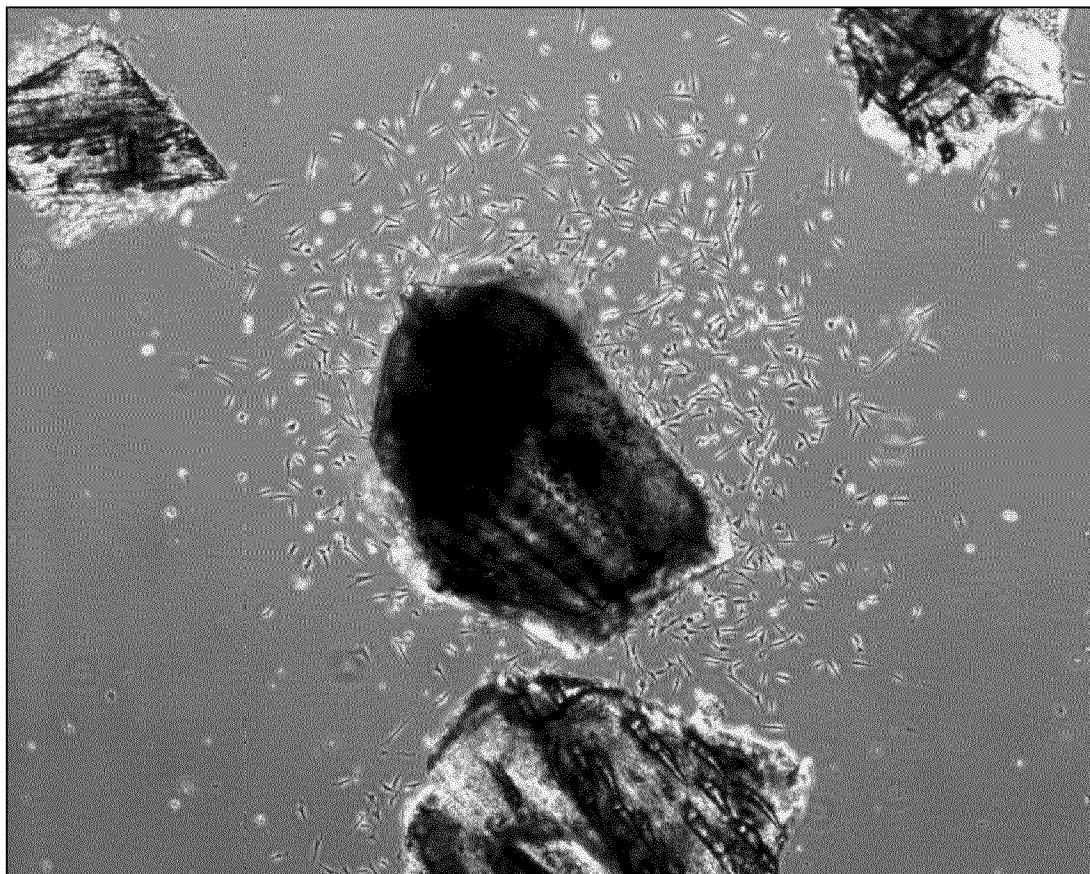
[請求項25] 請求項1～13のいずれか1項に記載の細胞株またはその継代株からなる培養細胞シート。

[請求項26] 請求項1～13のいずれか1項に記載の細胞株またはその継代株から、アルカリフォスファターゼ活性の染色で識別され、かつ、NANO G、OCT4、TRA-1-60およびSSEA-3陽性である細胞または該細胞によって形成される巨大繭状コロニーを製造する工程を含む、
巨大繭状コロニーを製造する方法。

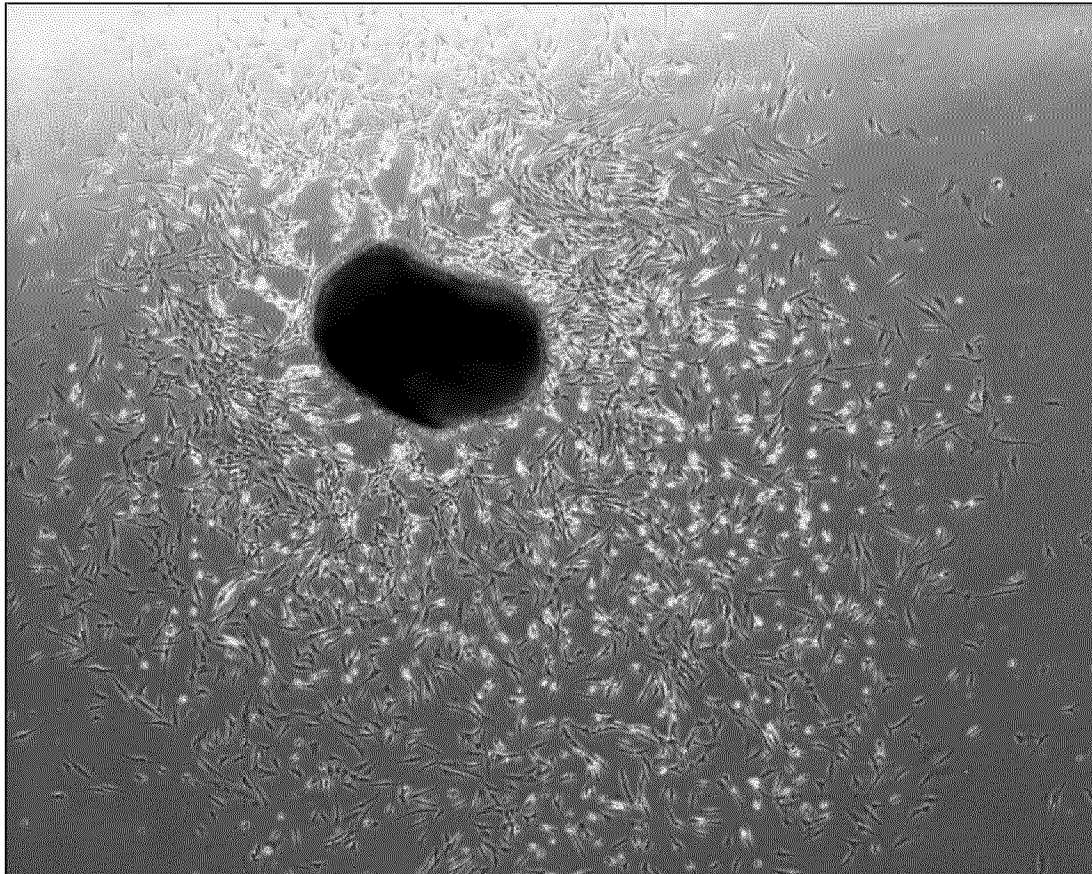
[図1A]



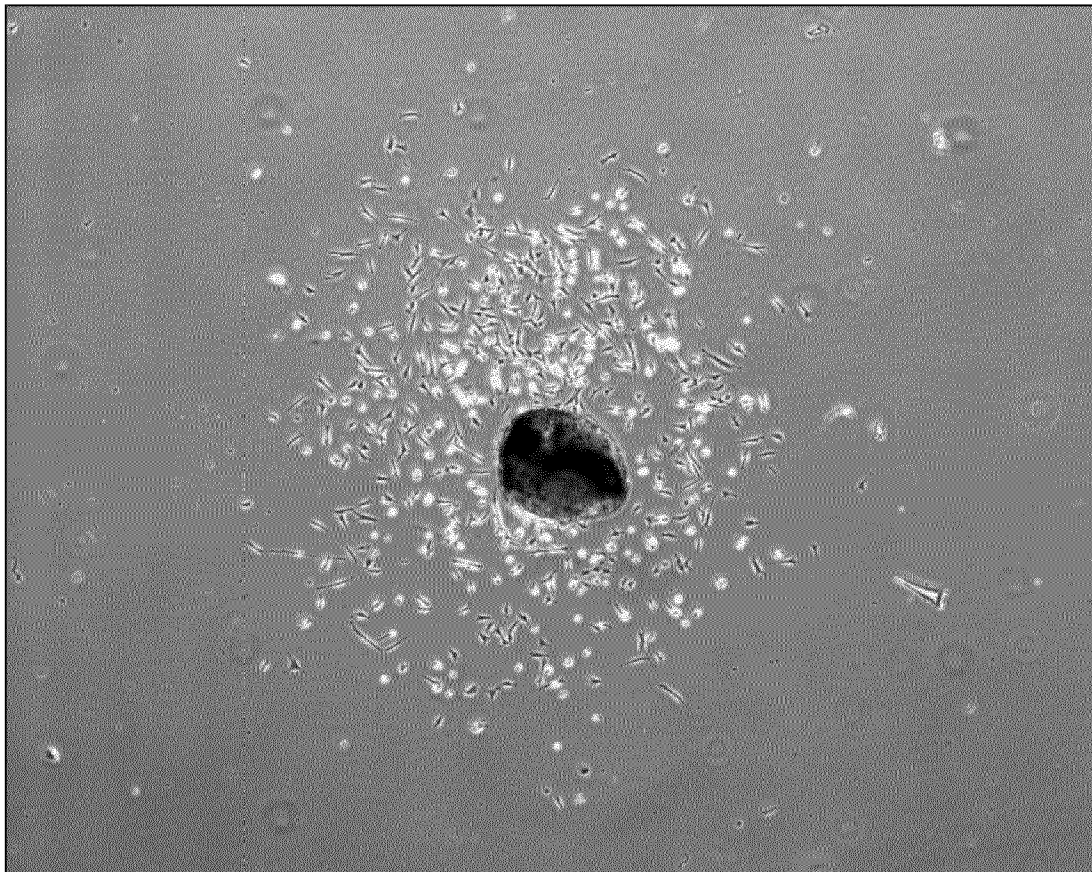
[図1B]



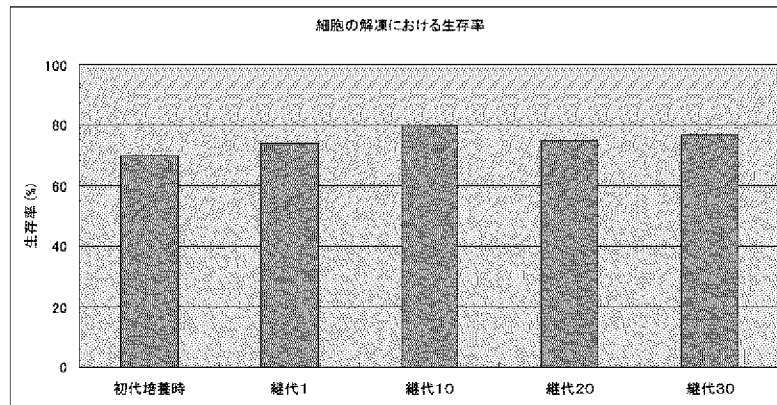
[図1C]



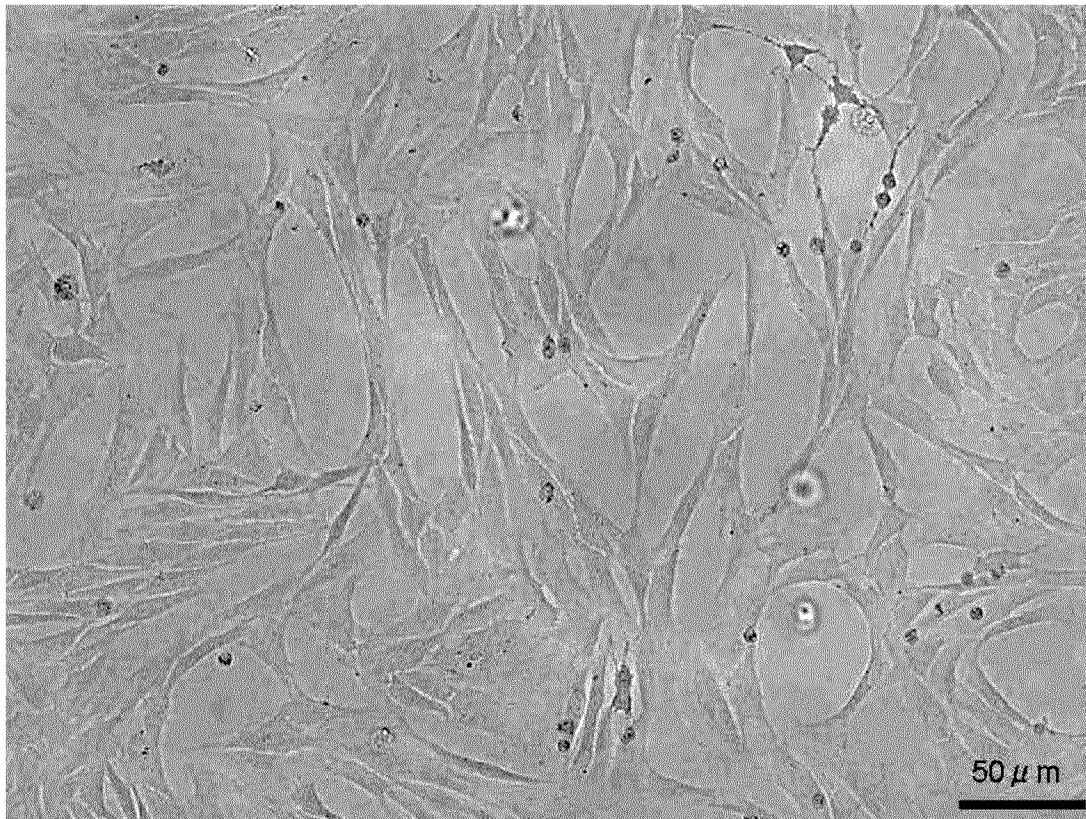
[図1D]



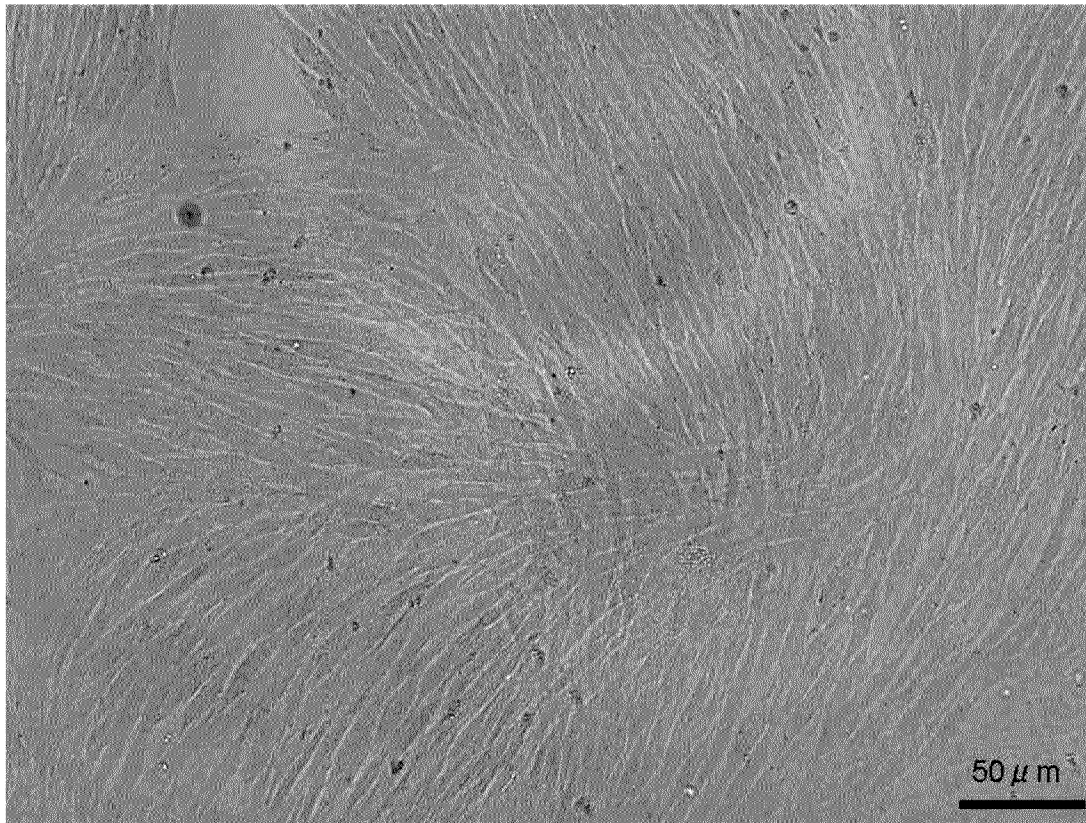
[図2]



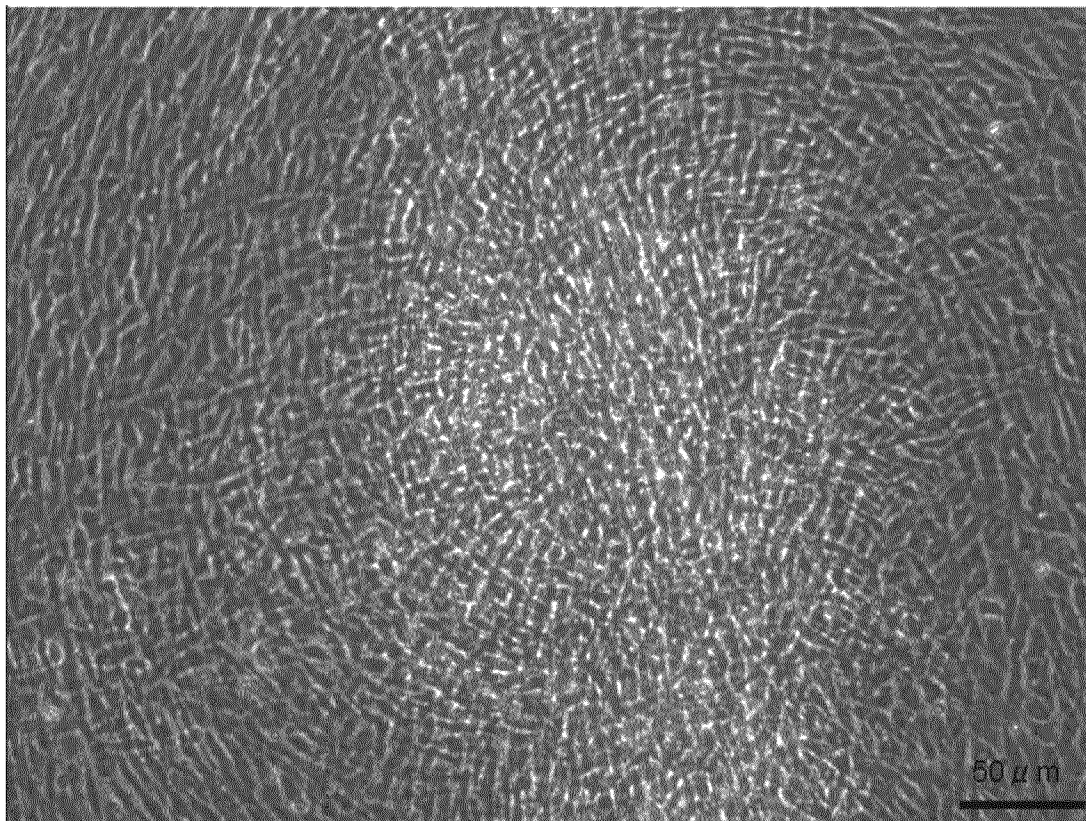
[図3A]



[図3B]



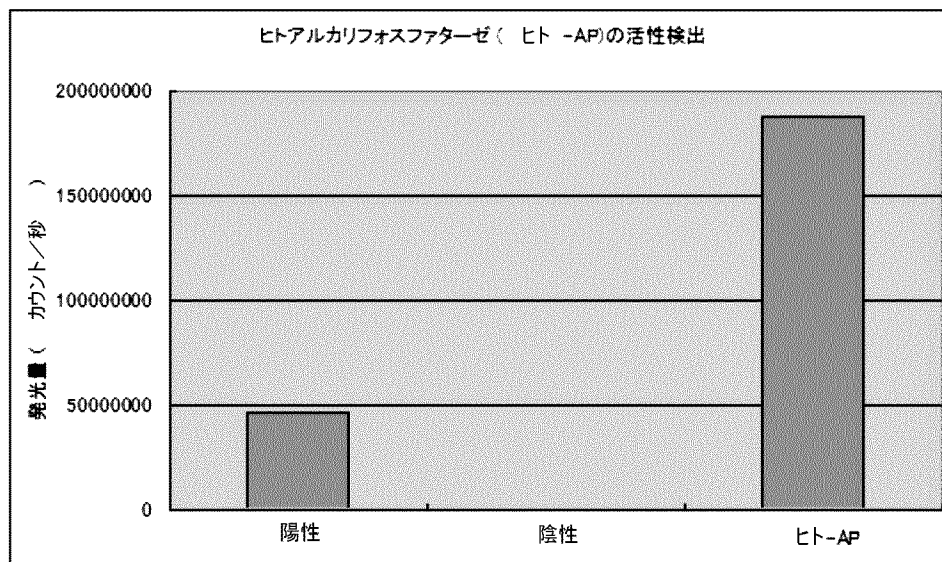
[図3C]



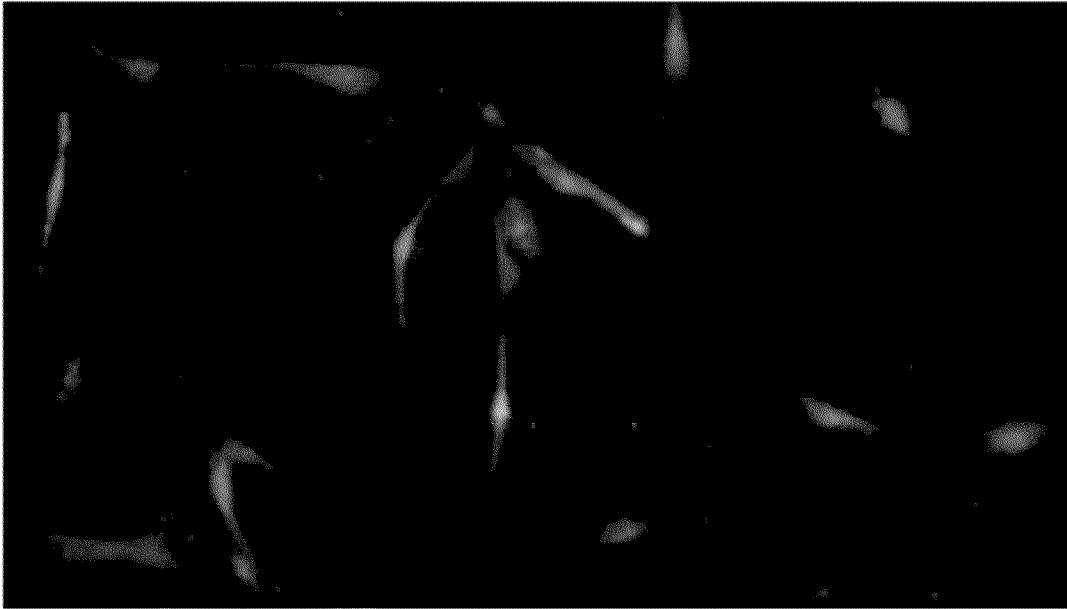
[図4]



[図5]



[図6]



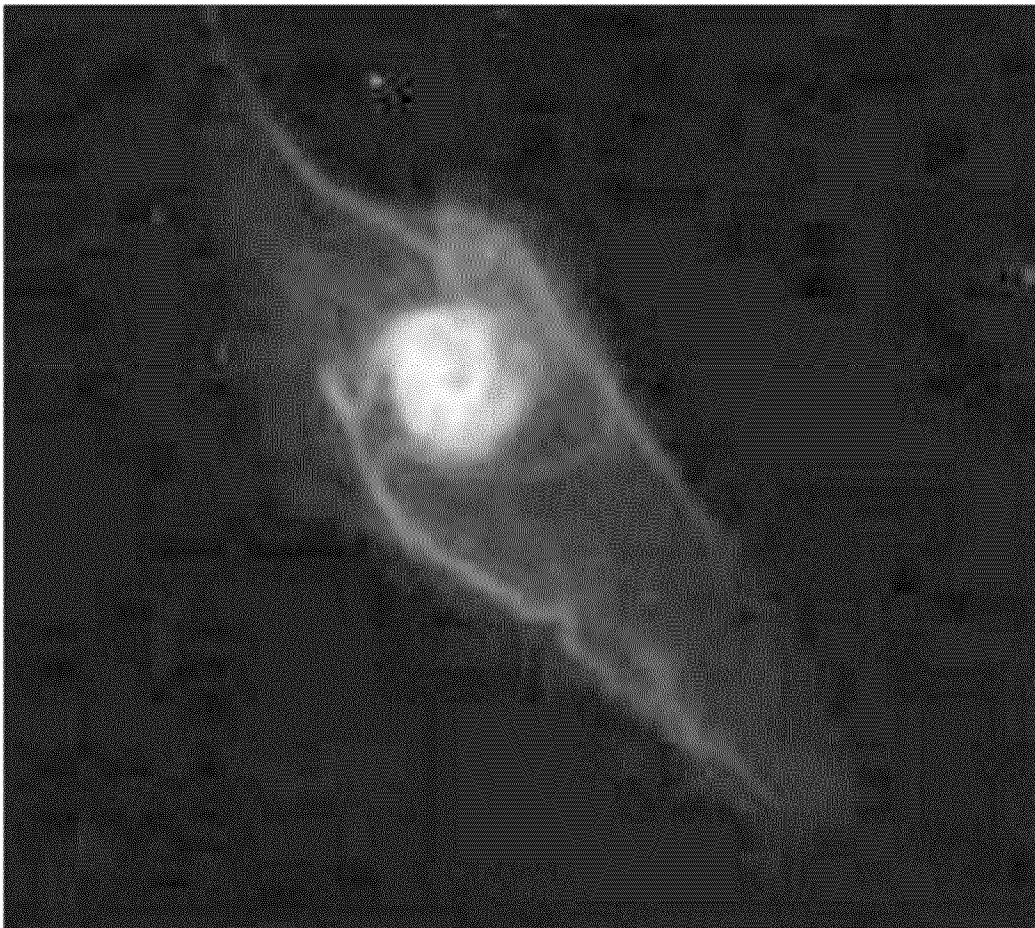
[図7A]



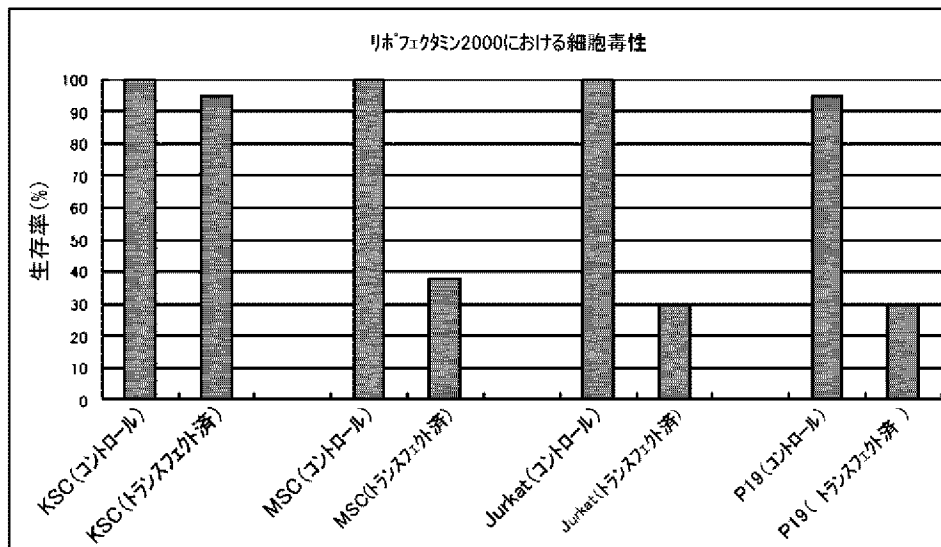
[図7B]



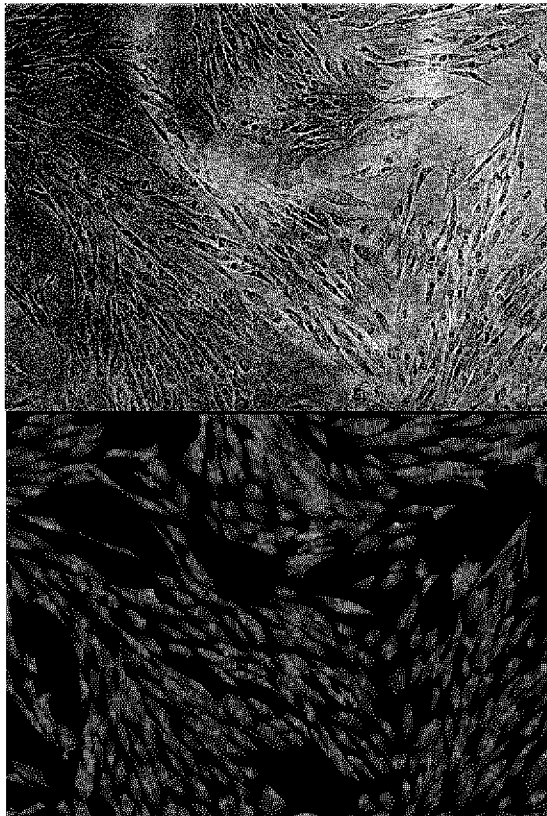
[図7C]



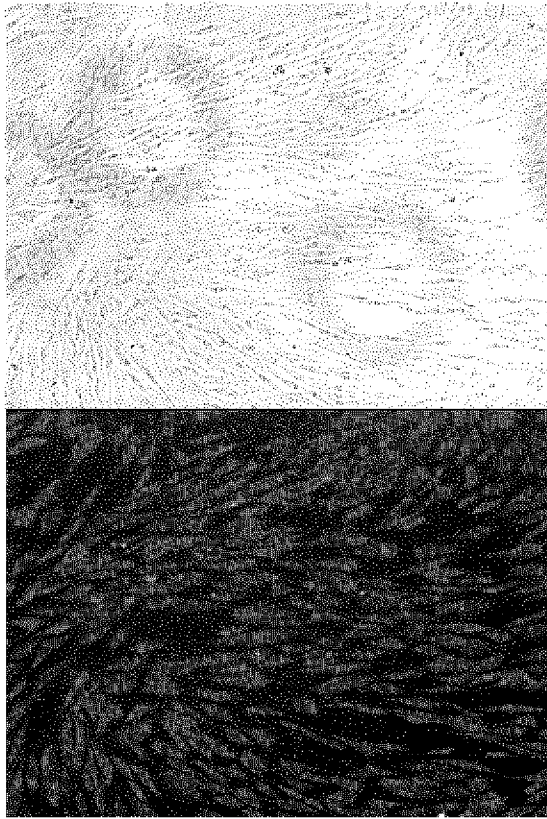
[図8]



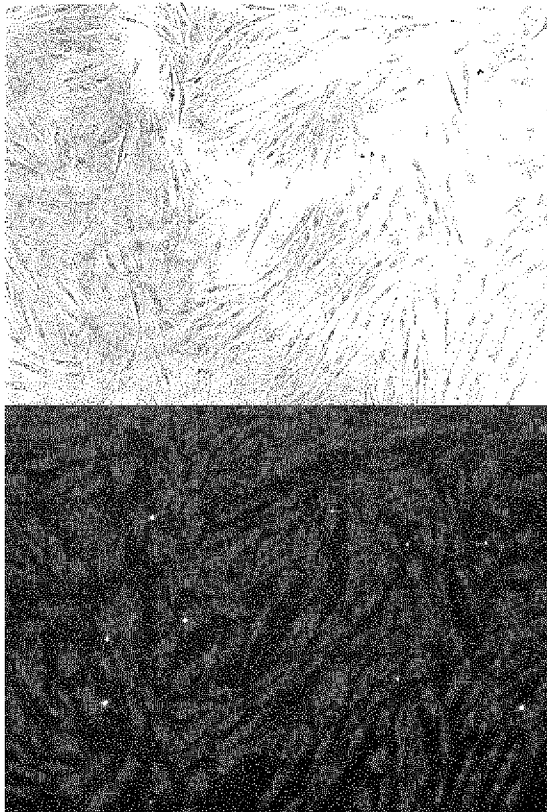
[図9A]



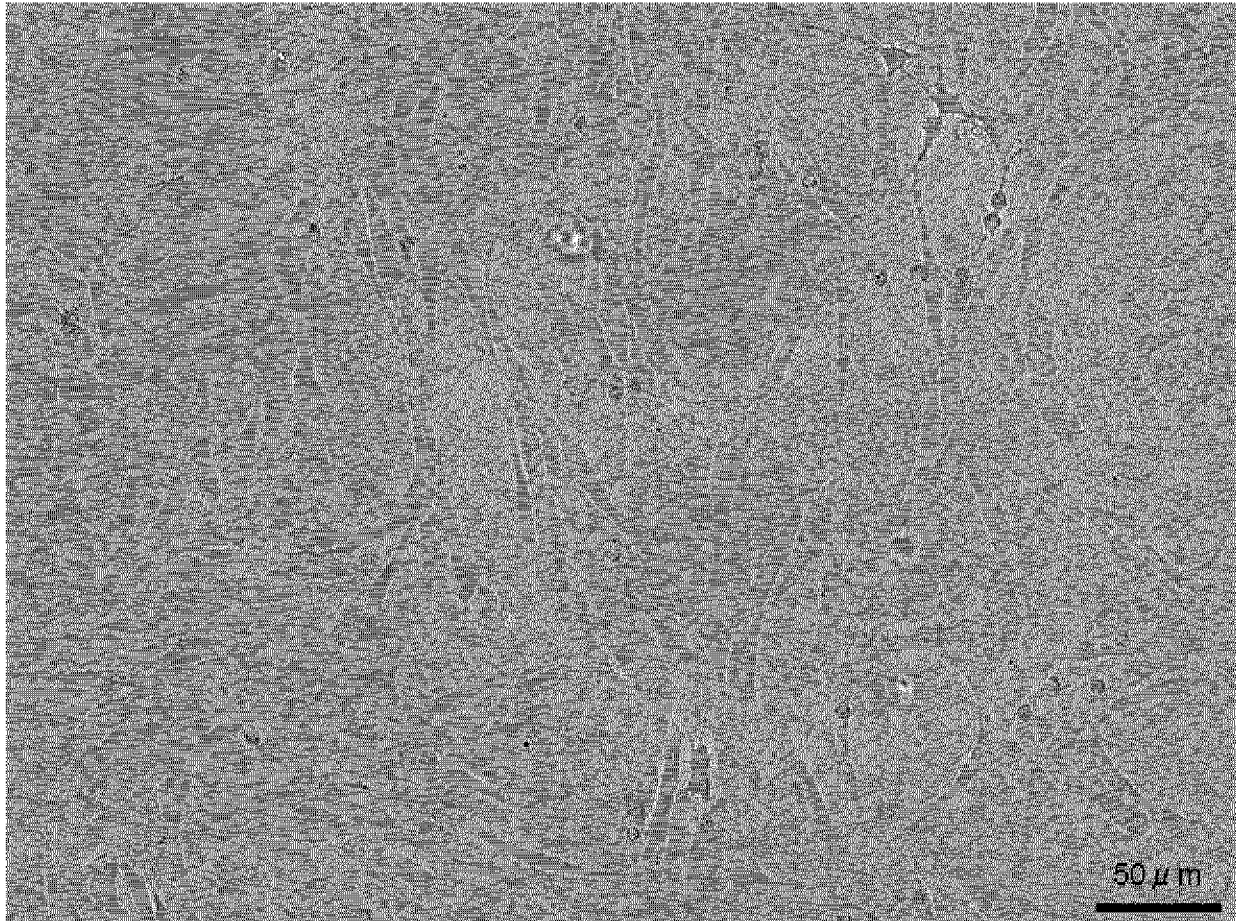
[図9B]



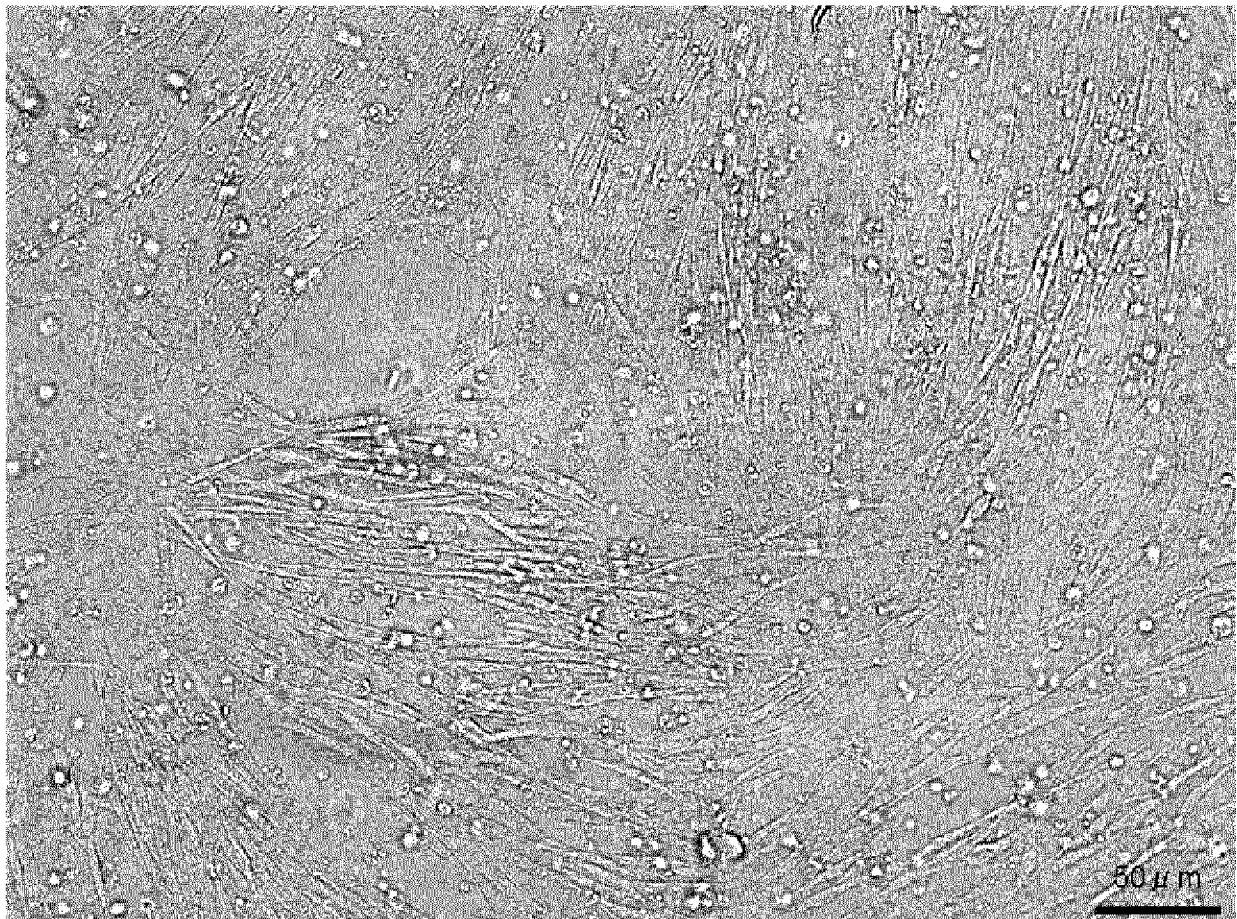
[図9C]



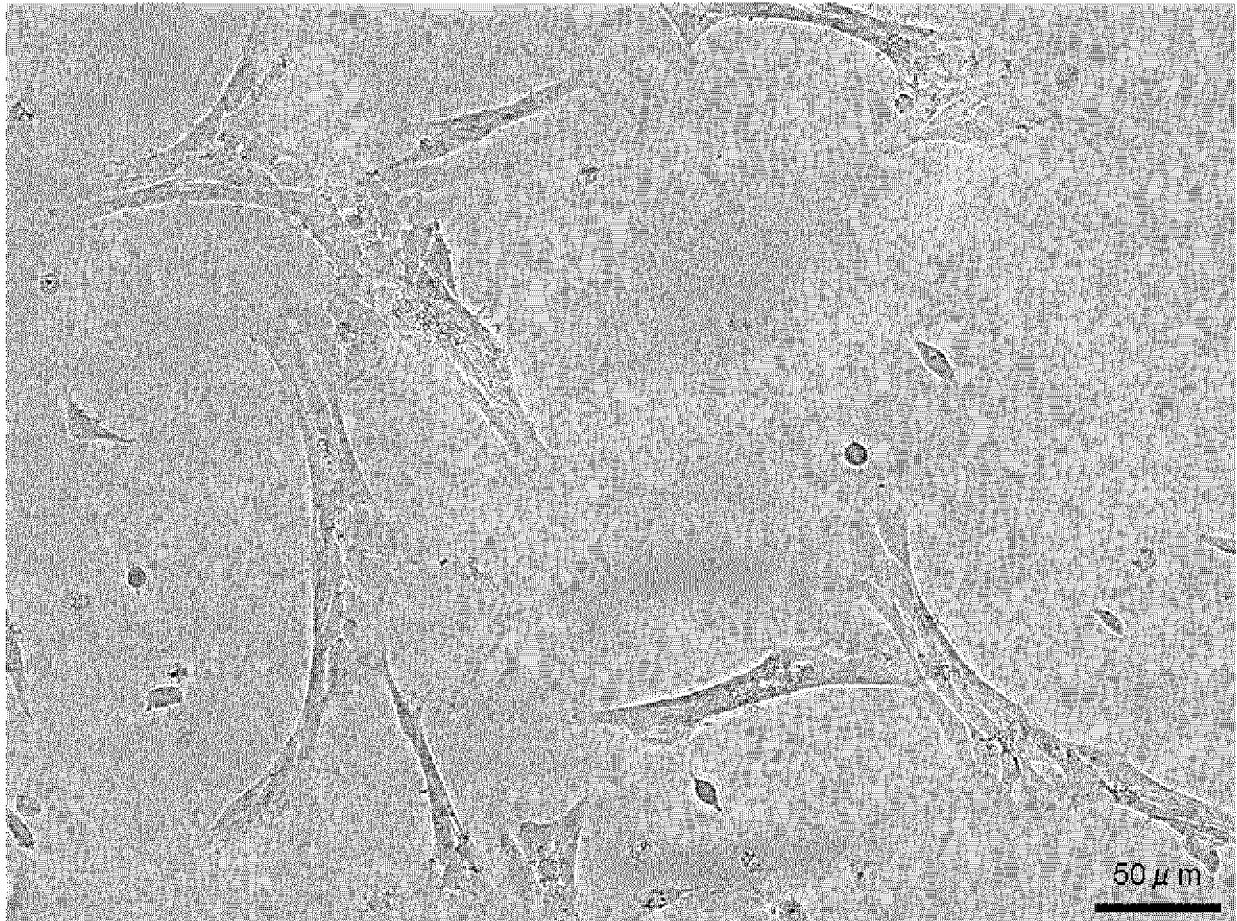
[図10A]



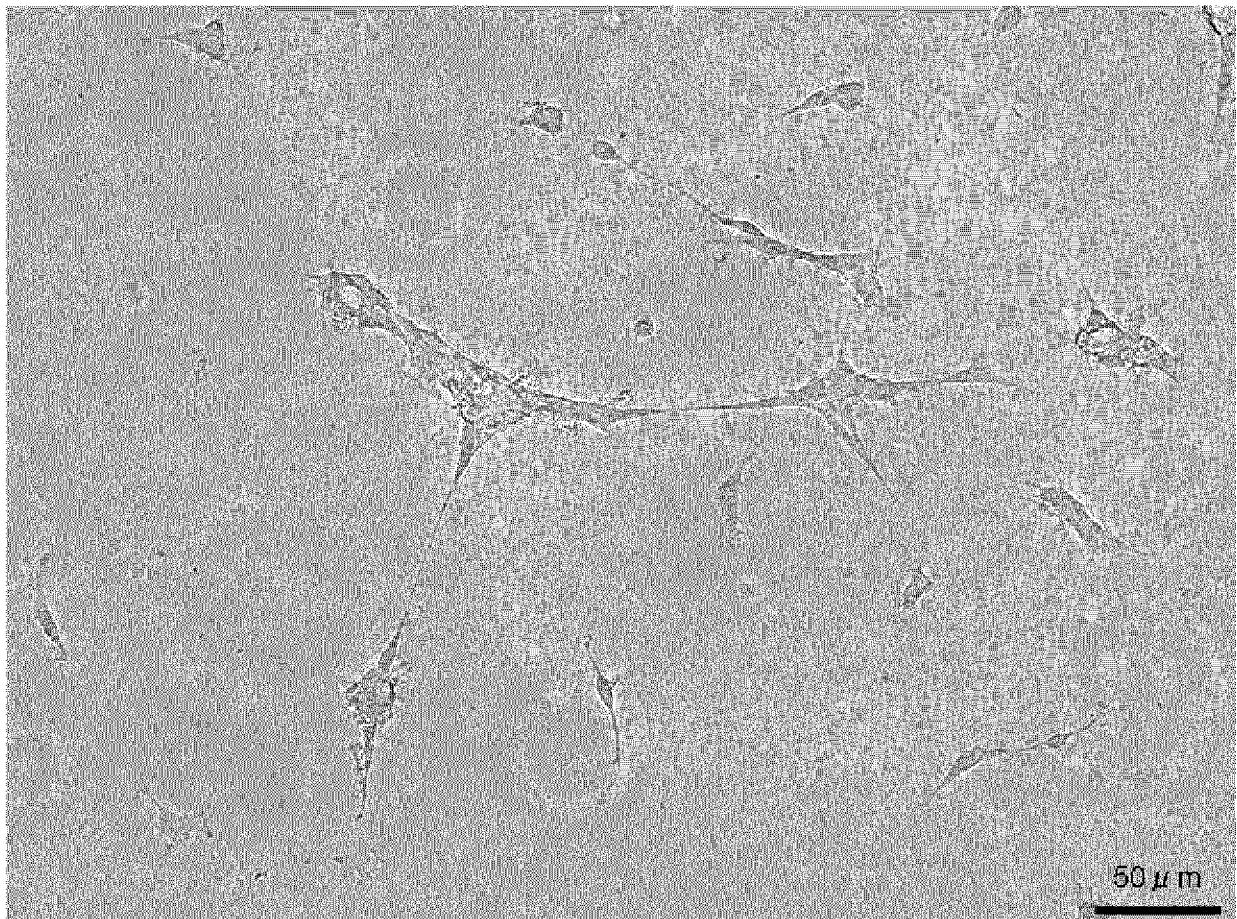
[図10B]



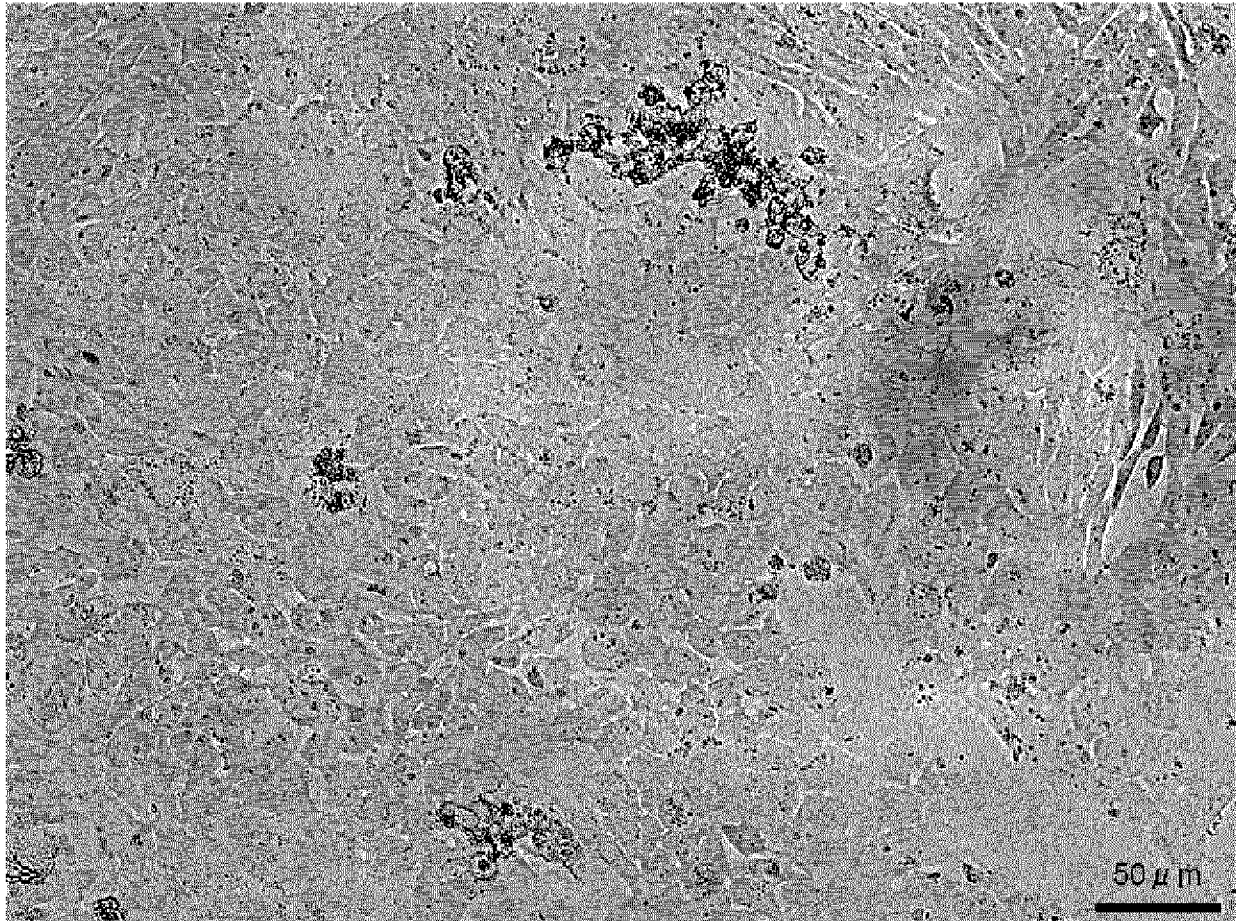
[図10C]



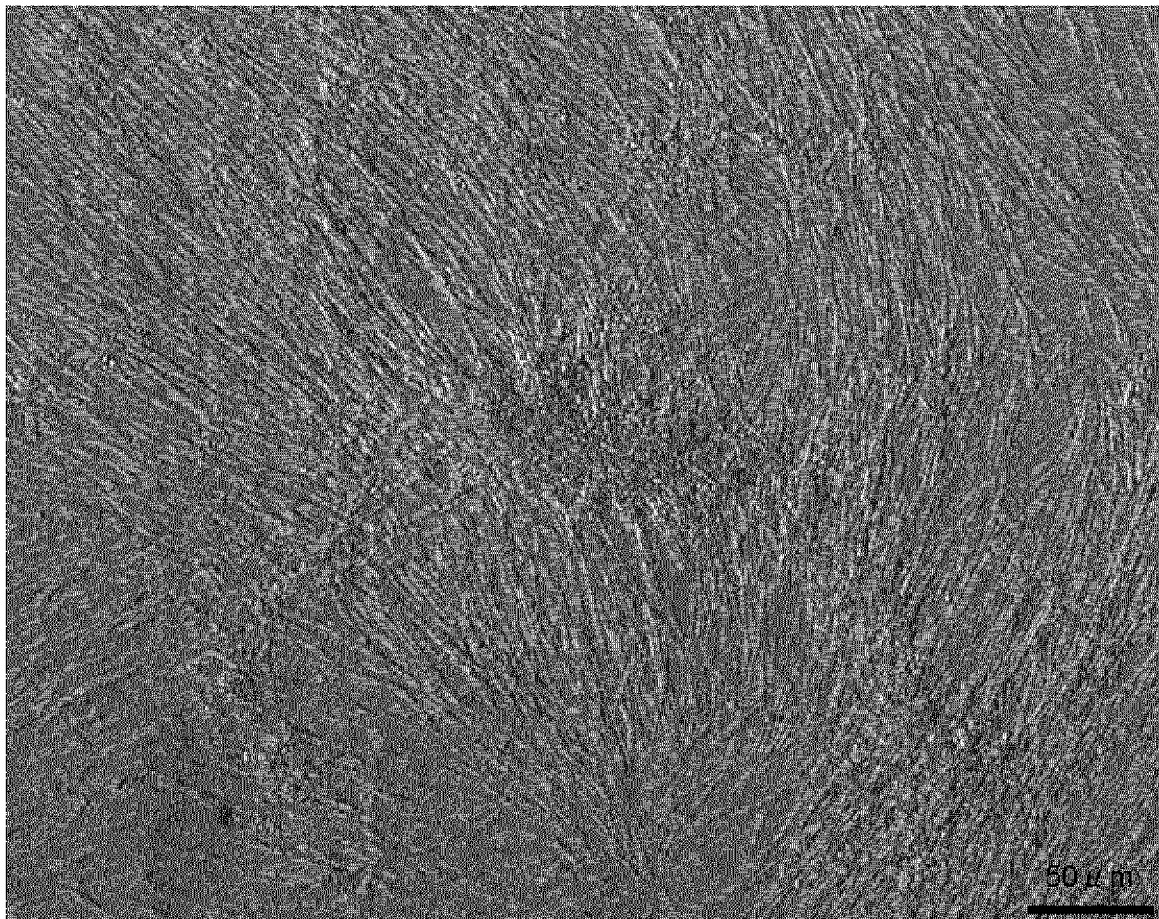
[図10D]



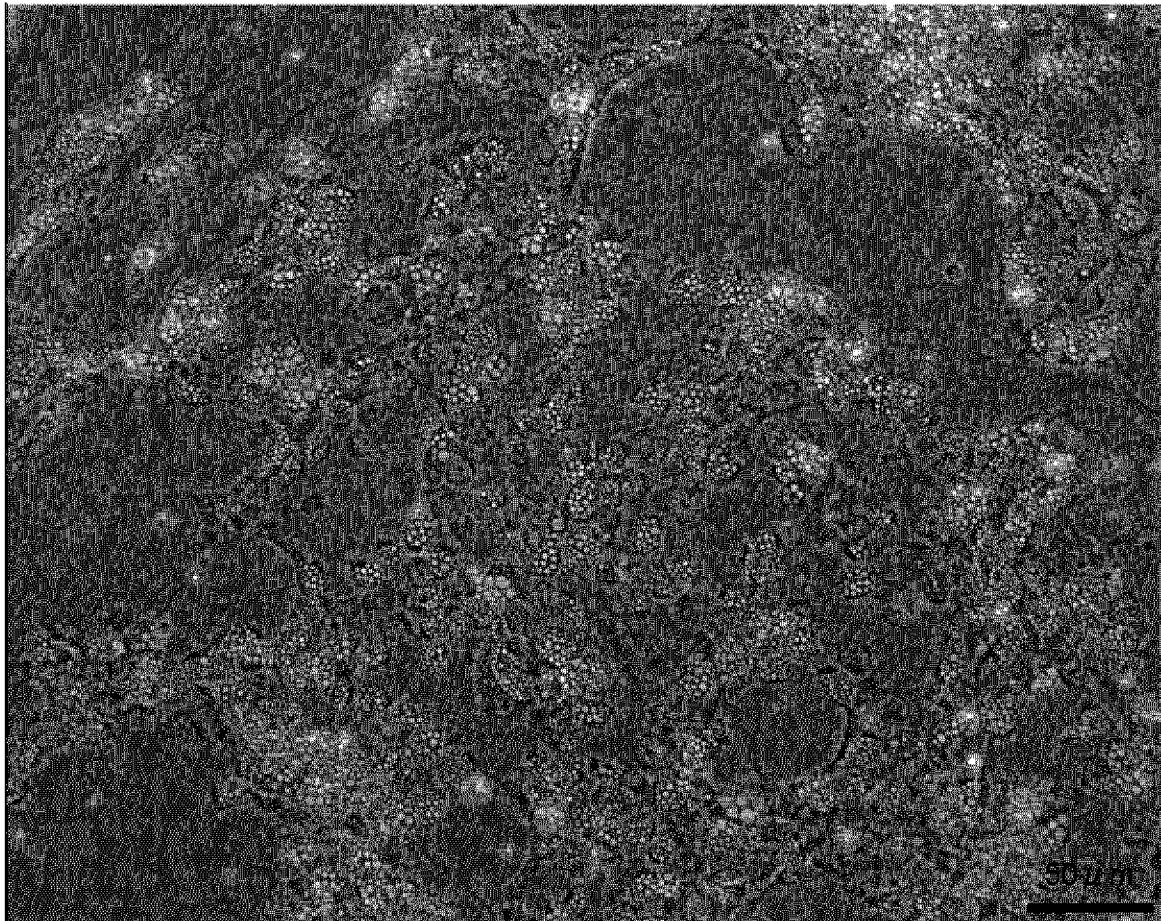
[図10E]



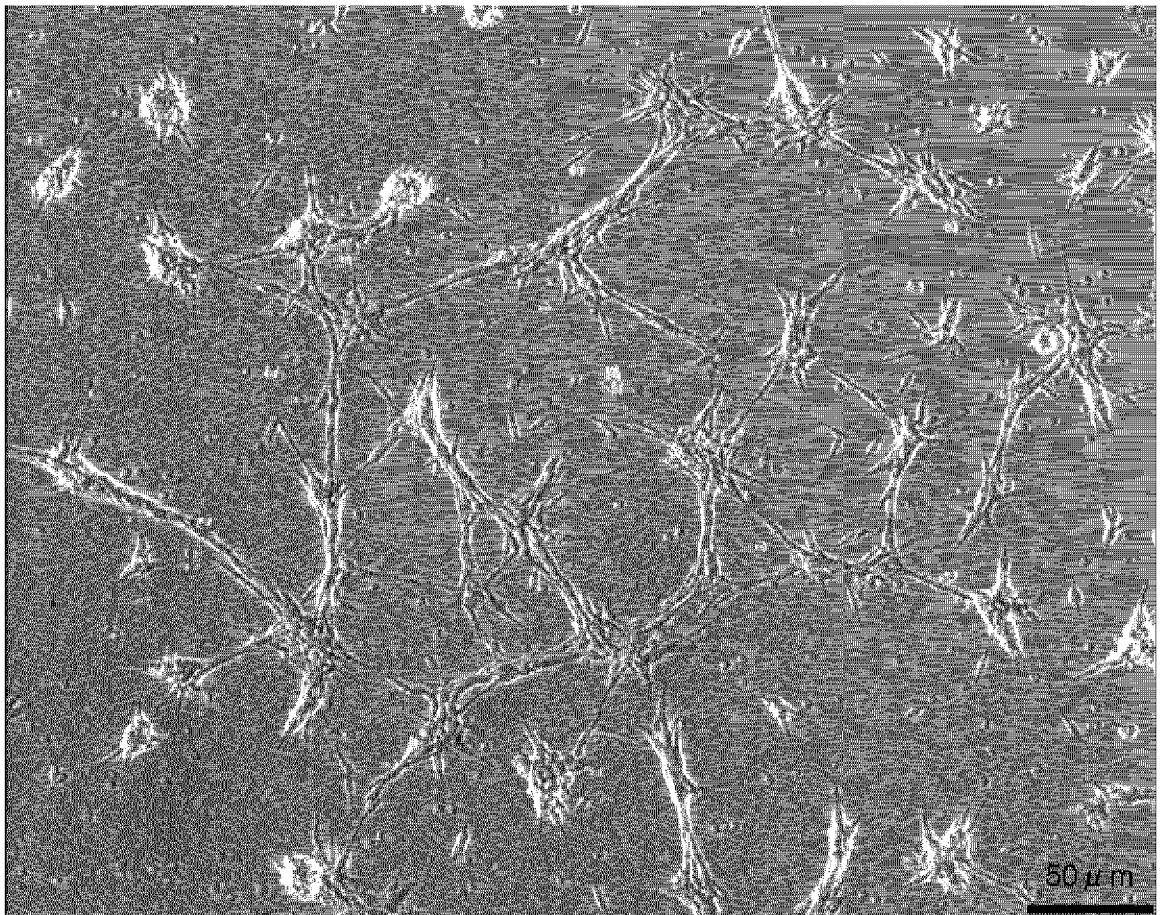
[図10F]



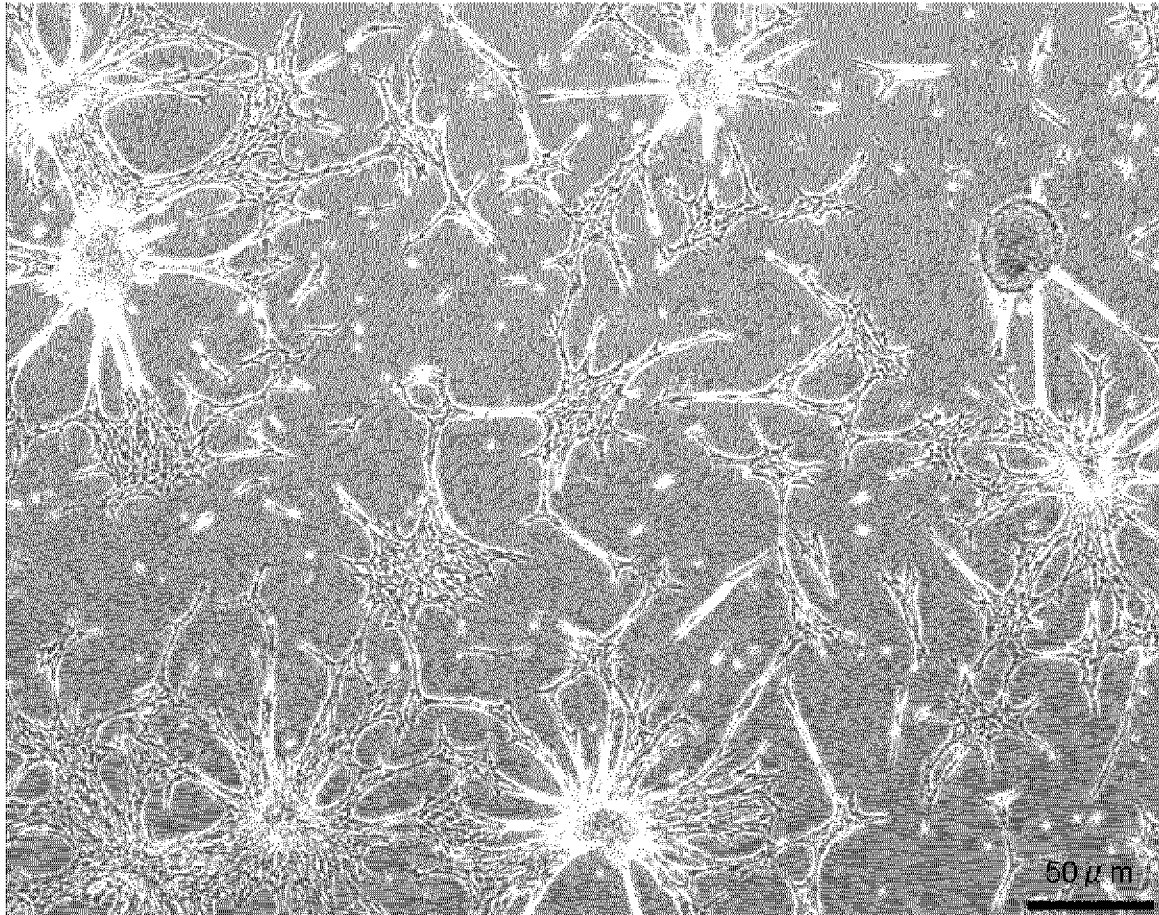
[図10G]



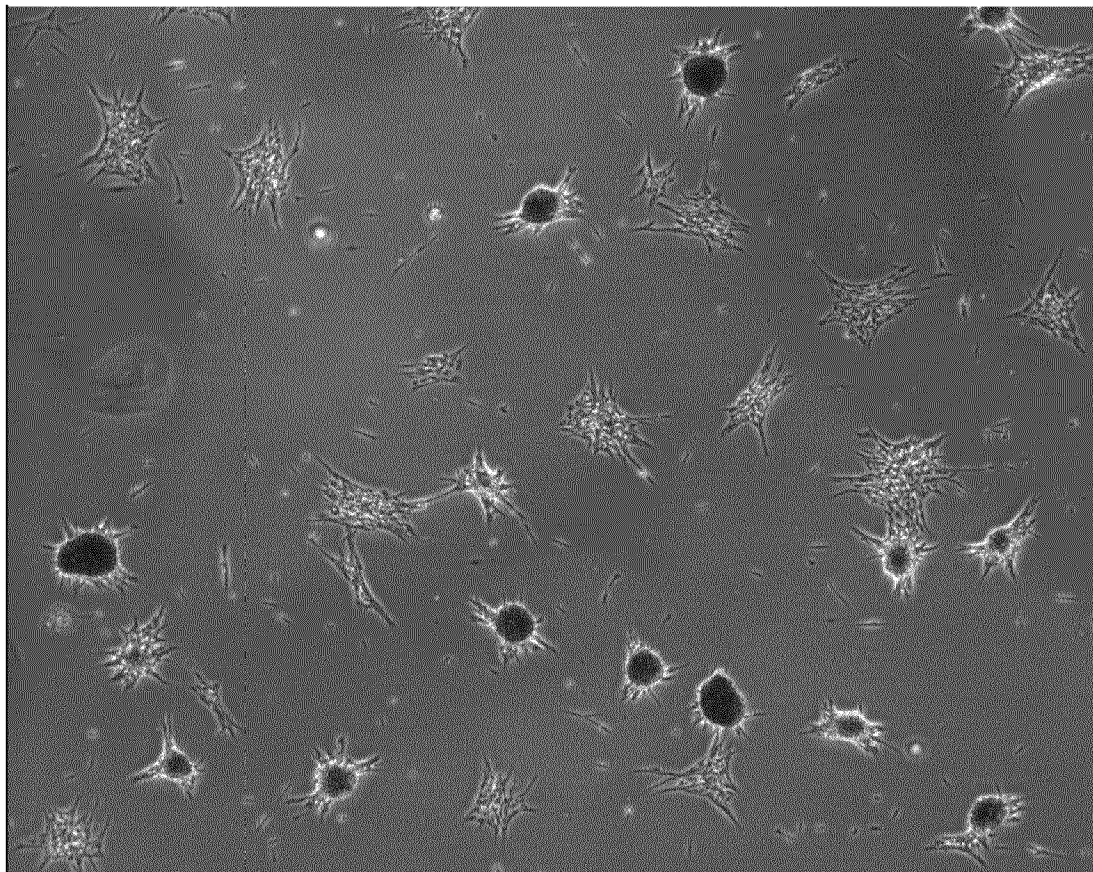
[図10H]



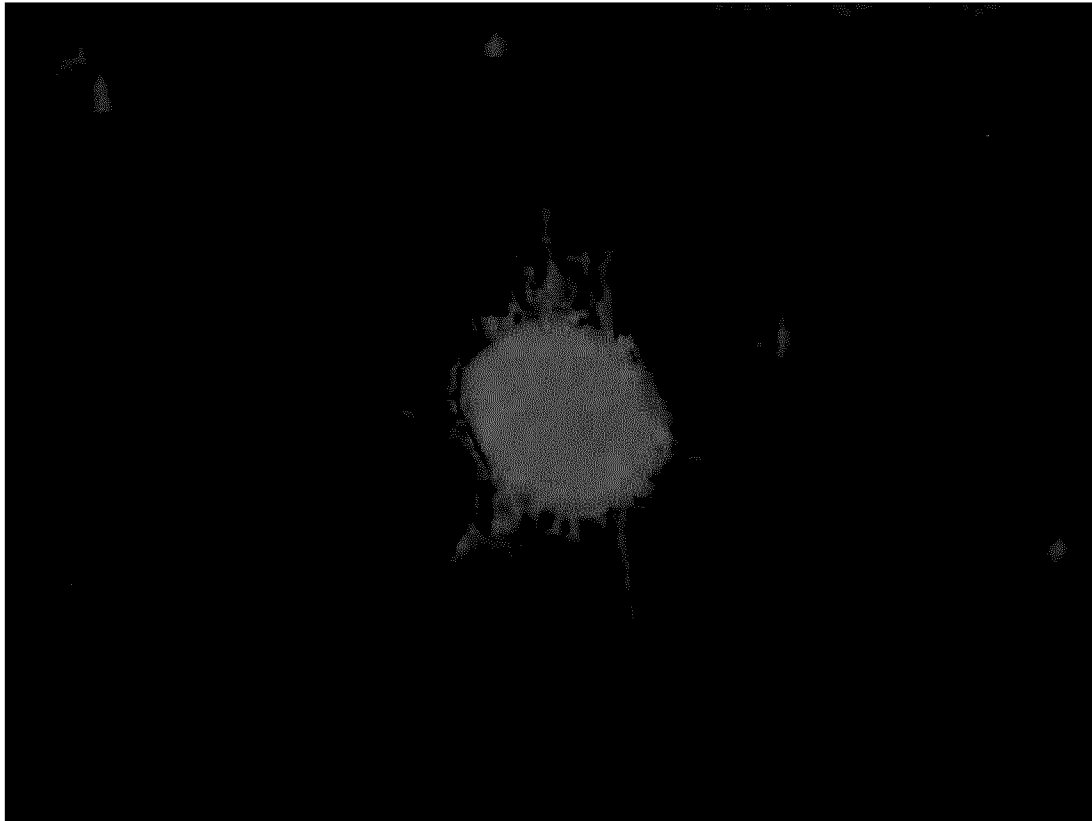
[図10I]



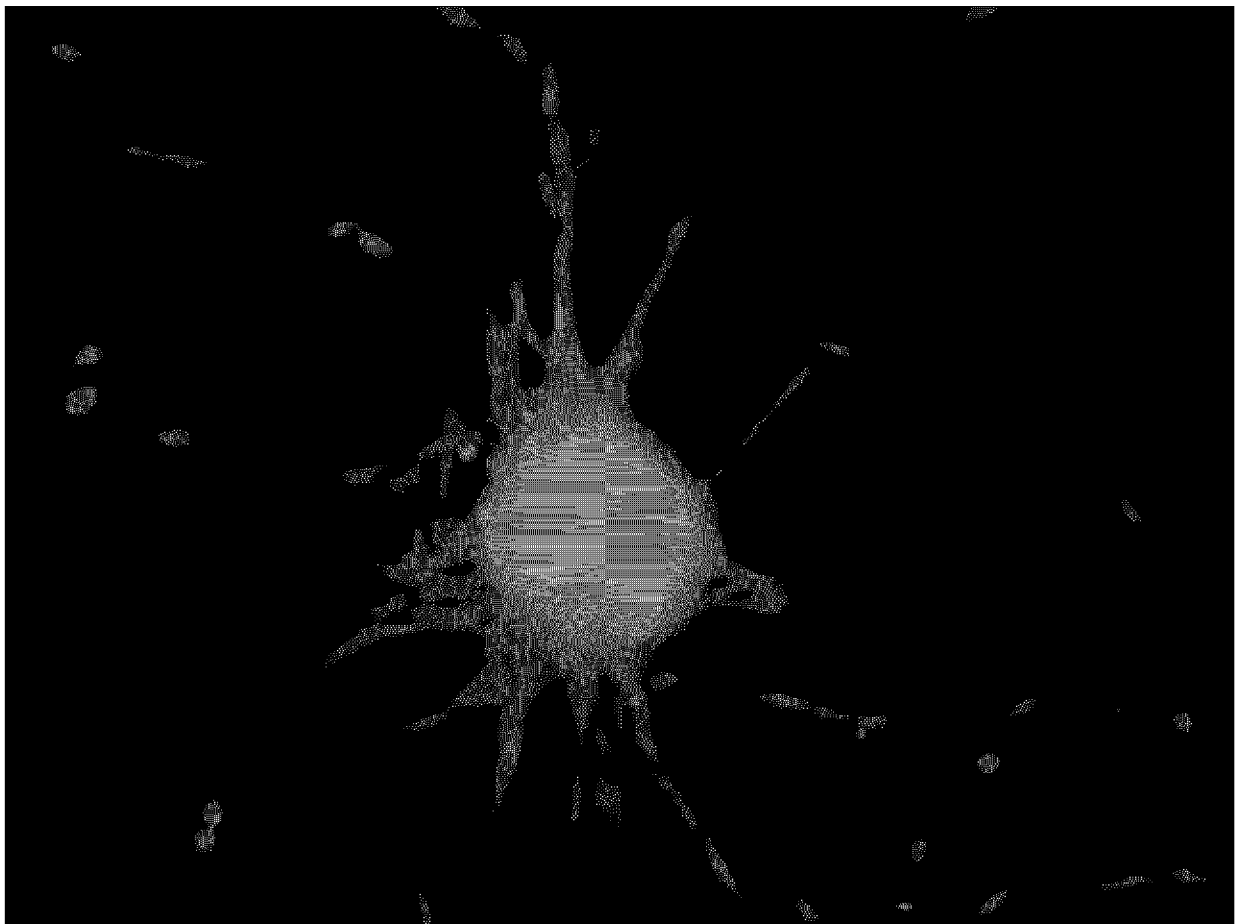
[図11A]



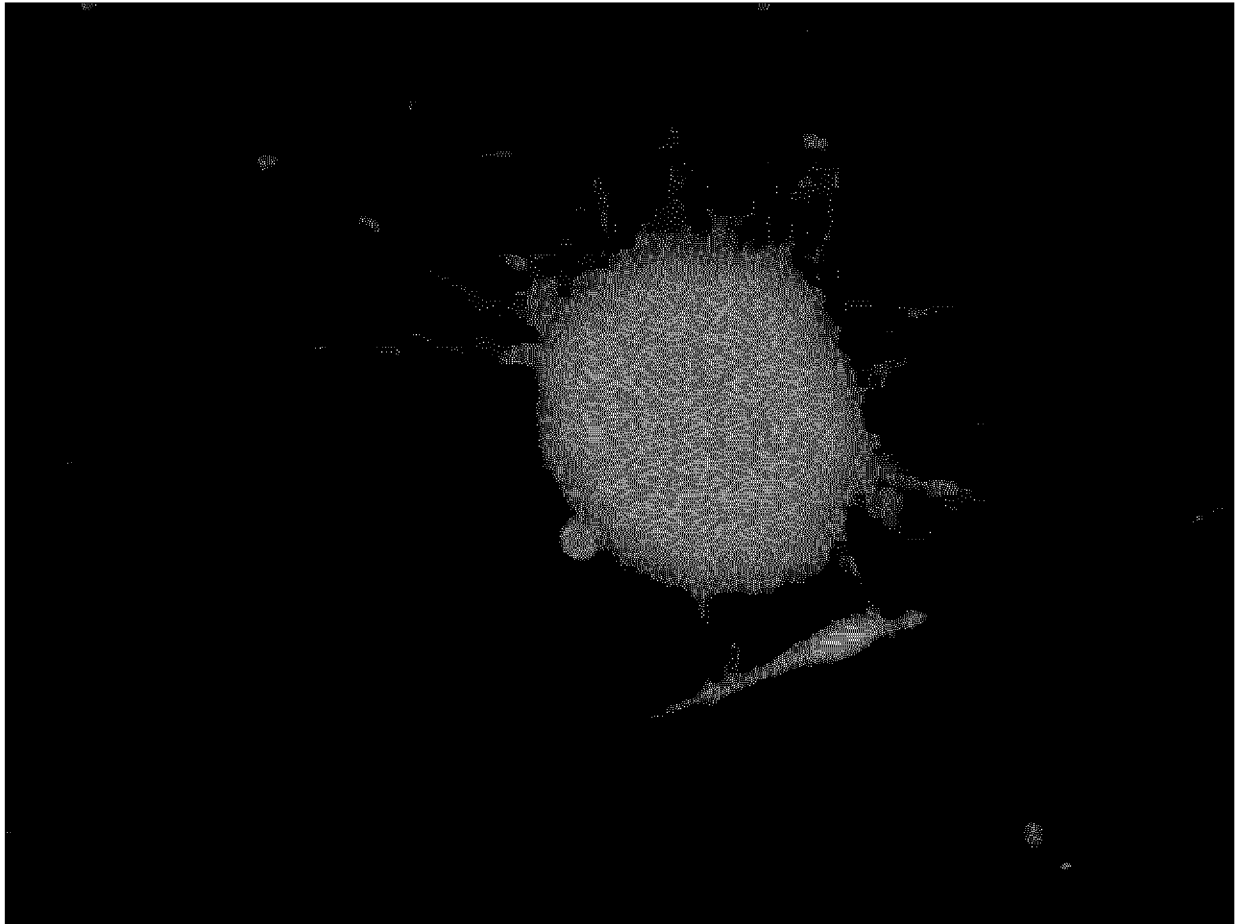
[図11B]



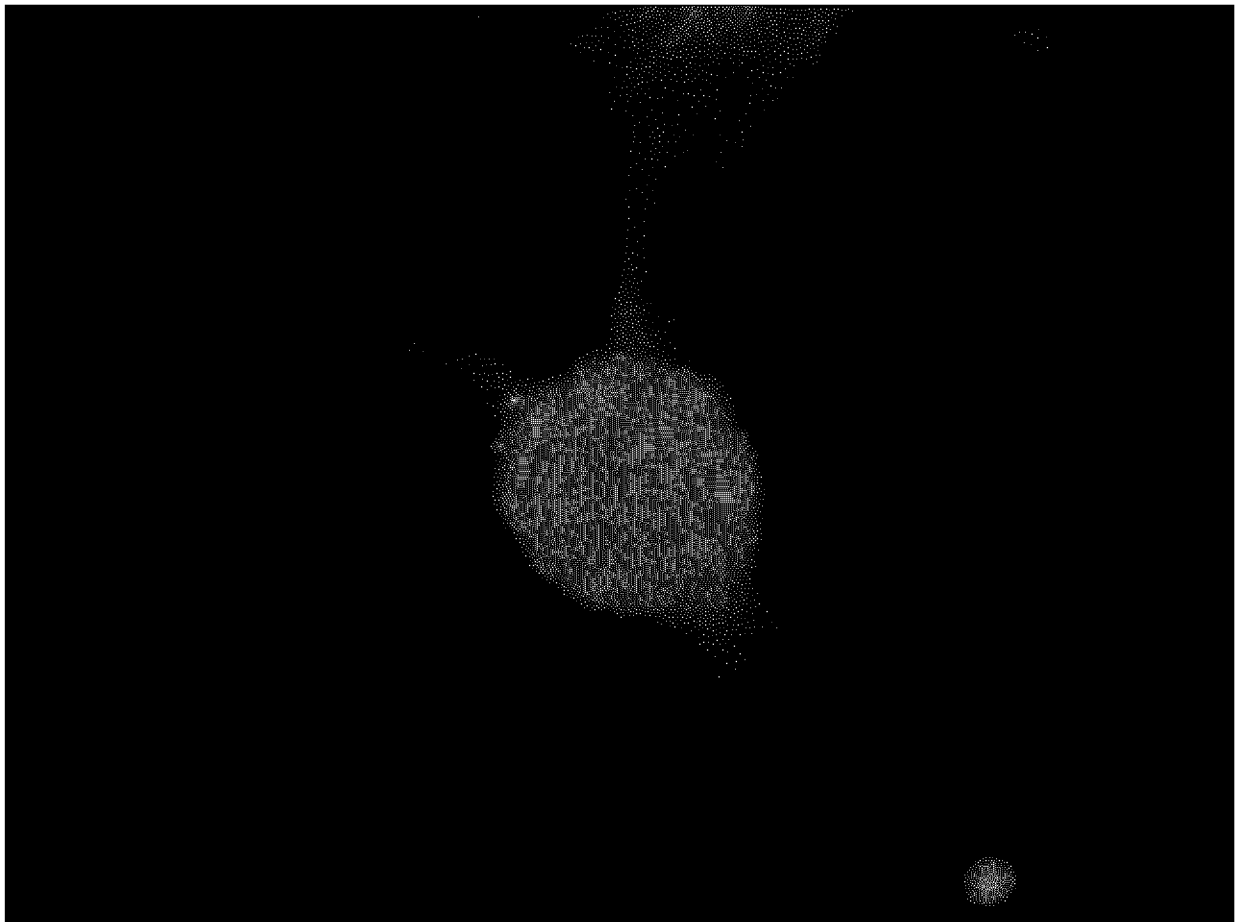
[図11C]



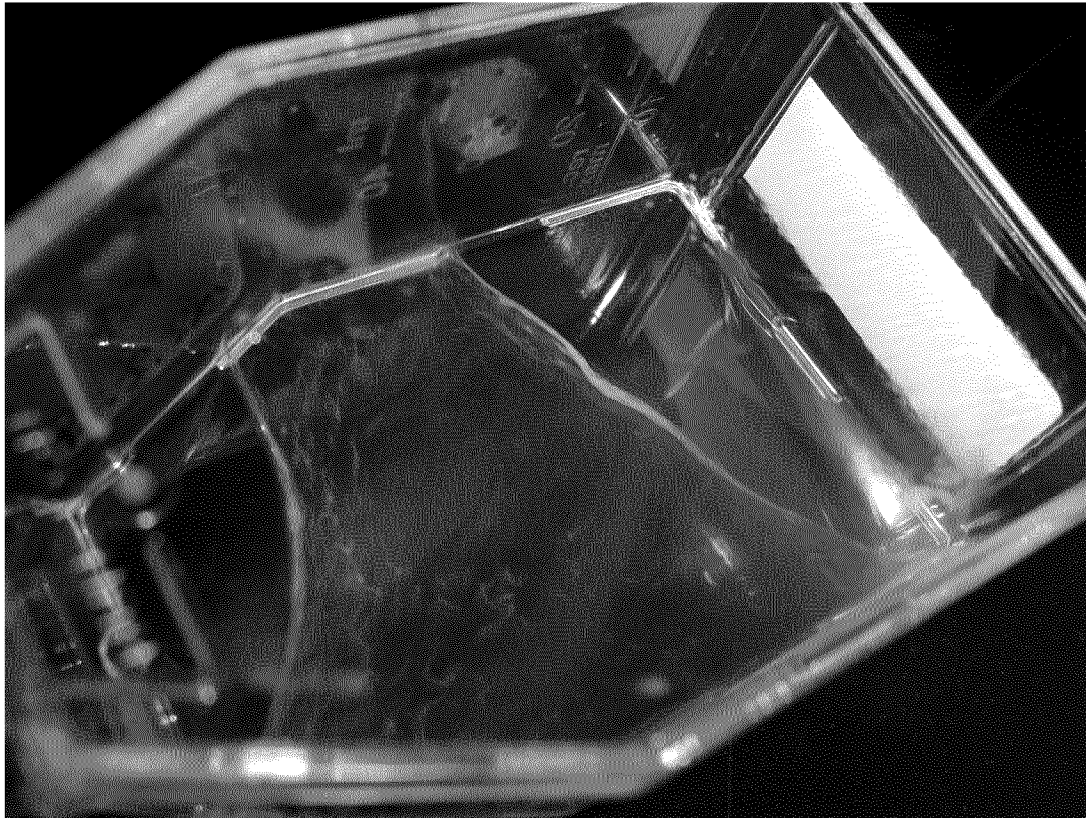
[図11D]



[図11E]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/070627

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/071(2010.01)i, C12N5/074(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/071, C12N5/074, C12N5/10, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yuki NAKATANI, <Heisei 22 Nendo The Zoological Society of Japan OM-sho Poster Happyo Yoshi> "Shu no Kotonaru Gyoruikan de Harabire no Tayosei o Motarasu Mechanism no Kaimei", The Zoological Society of Japan Dai 81 Kai Taikai Yokoshu Program [online], 2010; The Zoological Society of Japan Gakkai Jimukyoku, Tokyo-To Bunkyo-Ku, [retrieved on 24 October 2013 (24.10.2013)], Retrieved from the Internet:<URL: http://www.zoology.or.jp/annual-meeting/2/img/f_users/r_1005407img20100813185906.pdf >, page 24	1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 October, 2013 (24.10.13)

Date of mailing of the international search report
05 November, 2013 (05.11.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/070627

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Makiko KIKUCHI et al., "Kasago Saibokabu no Sangyo Riyo o Mezashita Baiyo Joken no Kento", Kanto Gakuin University Kogakubu Kenkyu Happpyō Koen Ronbunshu, 2009, vol.2009, pages 170 to 171	1-26
Y	Nobuo EGAMI, "Gyorui no Bunshi Seibutsugaku Sakana no Saibo Baiyo", Protein, nucleic acid and enzyme, 1989, vol.34, no.3, pages 186 to 192	1-26
Y	HASEGAWA S et al., A Cell Line (CFK) from Fin of Isogeneic Ginbuna Crusian Carp., Fish pathology, 1997, Vol.32, No.2, p.127-128	1-26
Y	MEGURO Y et al., A Cell Line Derived from the Fin of Japanese Flounder, Paralichthys olivaceus., Fish pathology, 1991, Vol.26, No.2, p.69-75	1-26
Y	FAN TING-JUN et al., Establishment of a turbot fin cell line and its susceptibility to turbot reddish body iridovirus., Cytotechnology, 2010, Vol.62, No.3, p.217-223	1-26
Y	EBITANI N et al., An established marine fish cell line with high plating efficiency., Zool Sci, 1988, Vol.5, No.1, p.183-186	1-26

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N5/071(2010.01)i, C12N5/074(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N5/071, C12N5/074, C12N5/10, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	中谷友紀, <平成 22 年度日本動物学会 0M 賞ポスター発表要旨>種の異なる魚類間で腹ビレの多様性をもたらすメカニズムの解明, 社団法人 日本動物学会第 81 回大会予稿集・プログラム[online], 2010; 社団法人 日本動物学会学会事務局, 東京都文京区, [retrieved on 24 Oct 2013] Retrieved from the Internet:<URL : http://www.zoology.or.jp/annual-meeting/2/img/f_users/r_1005407img20100813185906.pdf>, p. 24	1-26

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 4 . 1 0 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

0 5 . 1 1 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

上條 肇

4 B

9 4 5 3

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	菊池真紀子 他, カサゴ細胞株の産業利用を目指した培養条件の検討, 関東学院大学工学部研究発表講演論文集, 2009, Vol. 2009, p. 170-171	1-26
Y	江上信雄, 魚類の分子生物学 魚の細胞培養, 蛋白質 核酸 酵素, 1989, Vol. 34, No. 3, p. 186-192	1-26
Y	HASEGAWA S et al., A Cell Line (CFK) from Fin of Isogeneic Ginbuna Crusian Carp., 魚病研究, 1997, Vol. 32, No. 2, p. 127-128	1-26
Y	MEGURO Y et al., A Cell Line Derived from the Fin of Japanese Flounder, Paralichthys olivaceus., 魚病研究, 1991, Vol. 26, No. 2, p. 69-75	1-26
Y	FAN TING - JUN et al., Establishment of a turbot fin cell line and its susceptibility to turbot reddish body iridovirus., Cytotechnology, 2010, Vol. 62, No. 3, p. 217-223	1-26
Y	EBITANI N et al., An established marine fish cell line with high plating efficiency., Zool Sci, 1988, Vol. 5, No. 1, p. 183-186	1-26