

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6076258号
(P6076258)

(45) 発行日 平成29年2月8日 (2017.2.8)

(24) 登録日 平成29年1月20日 (2017.1.20)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12
A 6 1 K 35/42 (2015.01)	A 6 1 K 35/42

請求項の数 66 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-538933 (P2013-538933)	(73) 特許権者	504309999
(86) (22) 出願日	平成23年11月11日 (2011.11.11)		ジョージタウン ユニヴァーシティ
(65) 公表番号	特表2014-502151 (P2014-502151A)		アメリカ合衆国、ワシントン、ディーシー
(43) 公表日	平成26年1月30日 (2014.1.30)		ー 20057、ノース ウェスト、サー
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/060378		ティセヴンス アンド オウ ストリーツ
(87) 国際公開番号	W02012/065067		(番地なし)
(87) 国際公開日	平成24年5月18日 (2012.5.18)	(74) 代理人	110000796
審査請求日	平成26年11月5日 (2014.11.5)		特許業務法人三枝国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	61/413, 291	(72) 発明者	シュレーゲル リチャード
(32) 優先日	平成22年11月12日 (2010.11.12)		アメリカ合衆国 20850 メリーラン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ド州 ロックヴィル エルムウッド コー
(31) 優先権主張番号	61/474, 901		ト 3
(32) 優先日	平成23年4月13日 (2011.4.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 上皮細胞の不死化および使用法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非ケラチノサイト上皮細胞を連続的に培養する方法であって、

a) 前記非ケラチノサイト上皮細胞を (i) フィーダー細胞で馴化されたカルシウム含有培地、又は (i i) フィーダー細胞およびカルシウム含有培地の存在下で培養すること、及び

b) 培養中に、前記非ケラチノサイト上皮細胞における R h o キナーゼ (R O C K) の活性を阻害すること、を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記非ケラチノサイト上皮細胞は、初代細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記非ケラチノサイト上皮細胞は、初代細胞ではない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記非ケラチノサイト上皮細胞は、腫瘍細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記非ケラチノサイト上皮細胞は、扁平上皮細胞、円柱細胞、腺腫細胞、および移行上皮細胞からなる群から選択される、請求項 2、3、または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記非ケラチノサイト上皮細胞は、前立腺細胞、乳房細胞、肝細胞、膵島細胞、肺上皮細胞

10

20

胞、腎細胞、膀胱細胞、胃上皮細胞、大腸上皮細胞、小腸上皮細胞、尿道上皮細胞、精巢上皮細胞、卵巣上皮細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、副腎細胞、胸腺細胞、胆嚢細胞、および下垂体細胞からなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記カルシウム含有培地は、血清または血清代替物を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記フィーダー細胞は、増殖性線維芽細胞または非増殖性線維芽細胞である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記非増殖性線維芽細胞は、マウス線維芽細胞またはヒト線維芽細胞である、請求項 8 に記載の方法。

10

【請求項 10】

前記 ROCK は、Rho キナーゼ阻害剤 1 (ROCK 1)、Rho キナーゼ阻害剤 2 (ROCK 2)、またはこれら両方である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

ROCK の活性の阻害は、前記非ケラチノサイト上皮細胞を小分子 ROCK 阻害剤の存在下で培養することを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記小分子 ROCK 阻害剤は、Y-27632、HA1100 塩酸塩、HA1077、および GSK429286 からなる群から選択される、請求項 11 に記載の方法。

20

【請求項 13】

ROCK の活性の阻害は、前記非ケラチノサイト上皮細胞を ROCK 1、ROCK 2、またはこれら両方に特異的な RNA 干渉 (RNAi) 分子の存在下で培養することを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

c) ROCK を阻害した後に、前記非ケラチノサイト上皮細胞を継代すること、及び
d) 前記継代細胞を ROCK が阻害されていない細胞培養環境下に設置すること、
をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 ROCK が阻害されていない環境は、三次元細胞培養環境である、請求項 14 に記載の方法。

30

【請求項 16】

前記 ROCK が阻害されていない環境は、前記非ケラチノサイトの分化を通常誘導しない環境である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 ROCK が阻害されていない環境は、前記非ケラチノサイトの分化を誘導する環境である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

(i) カルシウム含有培地及びフィーダー細胞、又は
(ii) フィーダー細胞で馴化されたカルシウム含有培地の存在下で条件的に不死化された非ケラチノサイト上皮細胞集団であって、前記非ケラチノサイト上皮細胞において Rho キナーゼ (ROCK) の活性が阻害されていることを特徴とする、細胞集団。

40

【請求項 19】

前記条件的に不死化された非ケラチノサイト上皮細胞は、正常な細胞、異常な細胞、又は罹患した細胞に由来する、請求項 18 に記載の細胞集団。

【請求項 20】

前記条件的に不死化された非ケラチノサイト上皮細胞は、腫瘍に由来する、請求項 18 に記載の細胞集団。

【請求項 21】

50

前記条件的に不死化された非ケラチノサイト上皮細胞は、扁平上皮細胞、円柱細胞、腺腫細胞、および移行上皮細胞からなる群から選択される細胞に由来する、請求項 19 または 20 に記載の細胞集団。

【請求項 22】

前記条件的に不死化された非ケラチノサイト上皮細胞は、前立腺細胞、乳房細胞、肝細胞、膵島細胞、肺上皮細胞、腎細胞、膀胱細胞、胃上皮細胞、大腸上皮細胞、小腸上皮細胞、尿道上皮細胞、精巣上皮細胞、卵巣上皮細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、副腎細胞、胸腺細胞、胆嚢細胞、および下垂体細胞からなる群から選択される細胞への分化を促進するその後の環境下に設置された後にそれらに分化することができる、請求項 21 に記載の細胞集団。

10

【請求項 23】

非ケラチノサイト上皮細胞の増殖を刺激する方法であって、

a) 前記非ケラチノサイト上皮細胞を (i) フィーダー細胞で馴化されたカルシウム含有培地、又は (ii) フィーダー細胞およびカルシウム含有培地の存在下で培養すること、及び

b) 培養中に、前記非ケラチノサイト上皮細胞における Rho キナーゼ (ROCK) の活性を阻害すること、を含み、

それによって、前記 Rho キナーゼの活性を阻害しながら前記非ケラチノサイト上皮細胞を培養することが、非ケラチノサイト上皮細胞の増殖を刺激する、

前記方法。

20

【請求項 24】

前記非ケラチノサイト上皮細胞は、初代細胞である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記非ケラチノサイト上皮細胞は、初代細胞ではない、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

前記非ケラチノサイト上皮細胞は、腫瘍細胞である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

前記非ケラチノサイト上皮細胞は、扁平上皮細胞、円柱細胞、腺腫細胞、および移行上皮細胞からなる群から選択される請求項 24、25、または 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記非ケラチノサイト上皮細胞は、前立腺細胞、乳房細胞、肝細胞、膵島細胞、肺上皮細胞、腎細胞、膀胱細胞、胃上皮細胞、大腸上皮細胞、小腸上皮細胞、尿道上皮細胞、精巣上皮細胞、卵巣上皮細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、副腎細胞、胸腺細胞、胆嚢細胞、および下垂体細胞からなる群から選択される、請求項 27 に記載の方法。

30

【請求項 29】

前記カルシウム含有培地は、血清、血清代替物、又は血清代用物を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記フィーダー細胞は、非増殖性線維芽細胞である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記非増殖性線維芽細胞は、マウス線維芽細胞またはヒト線維芽細胞である、請求項 30 に記載の方法。

40

【請求項 32】

前記 ROCK は、Rho キナーゼ阻害剤 1 (ROCK1)、Rho キナーゼ阻害剤 2 (ROCK2)、またはこれら両方である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

ROCK の活性の阻害は、前記非ケラチノサイト上皮細胞を小分子 ROCK 阻害剤の存在下で培養することを含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記小分子 ROCK 阻害剤は、Y-27632、HA1100 塩酸塩、HA1077、お

50

よび G S K 4 2 9 2 8 6 からなる群から選択される、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

R O C K の活性の阻害は、前記非ケラチノサイト上皮細胞を R O C K 1、R O C K 2、またはこれら両方に特異的な R N A 干渉 (R N A i) 分子の存在下で培養することを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記腫瘍細胞は、対象の血液循環から単離された、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記腫瘍細胞は、対象由来の組織から単離された、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

異常な非ケラチノサイト上皮 (N K E) 細胞の存在を特徴とする状態の治療を必要とする対象の候補治療を同定する方法であって、

a) 前記対象から得られた前記異常な N K E 細胞を (i) フィーダー細胞で馴化されたカルシウム含有培地、又は (i i) フィーダー細胞及びカルシウム含有培地、並びに少なくとも 1 つの R h o キナーゼ (R O C K) 阻害剤の存在下で培養して、生体外で異常な N K E 細胞集団を産生すること、

b) 生体外で、前記異常な N K E 細胞の少なくとも一部の応答プロファイルを決定すること、及び

c) 前記決定された応答プロファイルに基づいて、前記対象の候補治療を同定すること、を含む、前記方法。

【請求項 3 9】

前記応答プロファイルは、生体外で、前記異常な N K E 細胞から抽出される D N A の少なくとも一部の配列を同定することによって少なくとも部分的に決定される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記応答プロファイルは、生体外で、前記異常な N K E 細胞中に産生される少なくとも 1 つの m R N A を同定することによって少なくとも部分的に決定される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記応答プロファイルは、生体外で、前記異常な N K E 細胞中に産生されない少なくとも 1 つの m R N A を同定することによって少なくとも部分的に決定される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記応答プロファイルは、生体外で、前記異常な N K E 細胞が発現する 1 つ以上のタンパク質を同定することによって少なくとも部分的に決定される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記応答プロファイルは、生体外で、前記異常な N K E 細胞が発現しない 1 つ以上のタンパク質を同定することによって少なくとも部分的に決定される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記応答プロファイルは、生体外で、前記異常な N K E 細胞を化学療法剤に供し、かつ、生体外で、前記異常な N K E 細胞に対する前記化学療法剤の治療指数を決定することによって少なくとも部分的に決定される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記対象由来の前記異常な N K E 細胞は、前記対象の血液循環から得られる、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 6】

対象における異常な非ケラチノサイト上皮 (N K E) 細胞を同定する方法であって、

a) 前記対象から単離された少なくとも 1 つの異常な候補 N K E 細胞を (i) フィーダー細胞で馴化されたカルシウム含有培地、又は (i i) フィーダー細胞及びカルシウム含有

10

20

30

40

50

培地、並びに少なくとも1つのR h oキナーゼ（R O C K）阻害剤の存在下で培養して、生体外で異常な候補N K E細胞集団を産生すること、

b) 生体外で、前記異常な候補N K E細胞集団の少なくとも一部の組織起源プロファイルを決すること、及び

c) 前記異常な候補N K E細胞の少なくとも1つの特性を、前記異常な候補N K E細胞の前記決定された組織起源プロファイルの組織と同一の組織から得られる正常なN K E細胞の同一の特性と比較して、前記異常な候補N K E細胞と前記正常なN K E細胞との間に差異があるかを決定すること、を含み、

差異は、前記異常な候補N K E細胞が正常なN K E細胞と比較して異常であることを示す、
前記方法。

10

【請求項47】

前記異常な候補N K E細胞は、前記対象の血液循環から得られる、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記組織起源プロファイルは、生体外で、前記異常な候補N K E細胞中に産生される少なくとも1つのm R N Aを同定することによって少なくとも部分的に決定される、請求項46に記載の方法。

【請求項49】

前記組織起源プロファイルは、生体外で、前記異常な候補N K E細胞中に産生されない少なくとも1つのm R N Aを同定することによって少なくとも部分的に決定される、請求項46に記載の方法。

20

【請求項50】

前記組織起源プロファイルは、生体外で、前記異常な候補N K E細胞が発現する1つ以上のタンパク質を同定することによって少なくとも部分的に決定される、請求項46に記載の方法。

【請求項51】

前記組織起源プロファイルは、生体外で、前記異常な候補N K E細胞が発現しない1つ以上のタンパク質を同定することによって少なくとも部分的に決定される、請求項46に記載の方法。

30

【請求項52】

前記組織起源プロファイルは、組織学的に少なくとも部分的に決定される、請求項46に記載の方法。

【請求項53】

非ケラチノサイト上皮（N K E）細胞集団を製造する方法であって、

a) 対象から得られたN K E細胞を（i）フィーダー細胞で馴化されたカルシウム含有培地、又は（i i）フィーダー細胞及びカルシウム含有培地、並びに少なくとも1つのR h oキナーゼ（R O C K）阻害剤の存在下で培養して、生体外のN K E細胞集団を産生すること、及び

b) 前記生体外のN K E細胞集団を回収すること、
を含む、前記方法。

40

【請求項54】

前記N K E細胞は、前立腺細胞、乳房細胞、肝細胞、膵島細胞、肺上皮細胞、腎細胞、膀胱細胞、胃上皮細胞、大腸および小腸上皮細胞、尿道上皮細胞、精巢上皮細胞、卵巣上皮細胞、子宮頸部上皮細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、副腎細胞、胸腺細胞、胆嚢細胞、ならびに下垂体細胞からなる群から選択される、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

遺伝子改変された非ケラチノサイト上皮（N K E）細胞集団を製造する方法であって、a) 対象から得られたN K E細胞を（i）フィーダー細胞で馴化されたカルシウム含有培地、又は（i i）フィーダー細胞及びカルシウム含有培地、並びに少なくとも1つのR h o

50

キナーゼ（ROCK）阻害剤の存在下で培養して、生体外のNKE細胞集団を産生すること、

b) 生体外でNKE細胞集団の少なくとも一部を遺伝子改変すること、

c) 遺伝子改変された前記NKE細胞を選択すること、

d) 前記選択された遺伝子改変されたNKE細胞を (i) フィーダー細胞で馴化されたカルシウム含有培地、又は (ii) フィーダー細胞及びカルシウム含有培地、並びに少なくとも1つのRhokinase（ROCK）阻害剤の存在下で培養して、生体外の遺伝子改変されたNKE細胞集団を産生すること、及び

e) 生体外で遺伝子改変された前記NKE細胞集団を回収すること、を含む、前記方法。

10

【請求項56】

前記対象から得られる前記NKE細胞は、肝細胞、肺上皮細胞、および膵島細胞からなる群から選択される、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

前記対象から得られる前記肝細胞は、第VILI因子のコーディング領域を含む導入遺伝子を挿入することによって遺伝子改変される、請求項55に記載の方法。

【請求項58】

前記対象から得られる前記肺上皮細胞は、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（CFTR）のコーディング領域を含む導入遺伝子を挿入することによって遺伝子改変される、請求項55に記載の方法。

20

【請求項59】

前記対象由来の前記異常なNKE細胞は、前記対象由来の試料から得られる、請求項38に記載の方法。

【請求項60】

a) 胚幹細胞でない、条件的に不死化された非ケラチノサイト上皮（NKE）細胞集団、
b) カルシウム含有培地及びフィーダー細胞、又はフィーダー細胞で馴化されたカルシウム含有培地、並びに
c) カルシウム含有培地における少なくとも1つのRhokinase（Rock）阻害剤、を含む培養細胞組成物。

【請求項61】

前記条件的に不死化されたNKE細胞は、初代扁平上皮細胞、初代円柱細胞、初代腺腫細胞、及び初代移行上皮細胞からなる群から選択される細胞に由来する、請求項60に記載の培養細胞組成物。

30

【請求項62】

前記条件的に不死化されたNKE細胞は、分化を促進するその後の環境に設置された後に、不死化されていないNKE細胞が得られた組織型にのみ成熟することができ、前記不死化されていないNKE細胞が前立腺上皮細胞、乳房上皮細胞、肝細胞、膵島細胞、気道上皮細胞、腎臓上皮細胞、膀胱上皮細胞、胃上皮細胞、大腸上皮細胞、小腸上皮細胞、尿道上皮細胞、網膜上皮細胞、神経内分泌上皮細胞、精巣上皮細胞、卵巣上皮細胞、甲状腺上皮細胞、副甲状腺上皮細胞、副腎上皮細胞、胸腺上皮細胞、胆嚢上皮細胞、及び下垂体上皮細胞からなる群から選択される、請求項61に記載の培養細胞組成物。

40

【請求項63】

前記カルシウム含有培地は、血清、血清代用物、又は血清代替物を含む、請求項60に記載の培養細胞組成物。

【請求項64】

前記少なくとも1つのROCK阻害剤は、小分子Rhokinase1（ROCK1）阻害剤、小分子Rhokinase2（ROCK2）阻害剤、ROCK1を対象とするRNAi分子、ROCK2を対象とするRNAi分子、又はこれらの組合せである、請求項60に記載の培養細胞組成物。

【請求項65】

50

前記小分子阻害剤は、Y-27632、HA1100塩酸塩、HA1077、及びGSK429286から選択される、請求項64に記載の培養細胞組成物。

【請求項66】

対象への移植用である、請求項18～22のいずれかに記載の細胞集団。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2010年11月12日出願の米国仮出願第61/413,291号、および2011年4月13日出願の同第61/474,901号に対する優先権を主張するものであり、これら両方は、参照により組み込まれる。

10

【0002】

連邦支援の研究または開発に関する声明

本発明の開発中に行われた作業の一部は、米国国立衛生研究所(National Institutes of Health)の助成金交付番号R01CA106400およびR01-CA053371のもとで米国政府の資金を利用した。米国政府は、本発明においてある特定の権利を有する。

【0003】

発明の背景

本発明は、非ケラチノサイト上皮細胞を培養する方法を対象とし、方法は、培養中に、フィーダー細胞、非ケラチノサイト上皮細胞、またはこれら両方におけるRhoキナーゼ(ROCK)の活性を阻害しながら、非ケラチノサイト上皮細胞をフィーダー細胞およびカルシウム含有培地の存在下で培養することを含む。本発明は、これらの不死化された非ケラチノサイト上皮細胞を使用する方法も対象とする。

20

【背景技術】

【0004】

肺、腎臓、肝臓、膵臓、および皮膚等の生命維持に必要な器官は、とりわけ、器官特異的な分化上皮細胞の存在を特徴とする。分化上皮細胞は、言うまでもなく、それぞれのそのような器官の特定の機能に関連している。特定の機能は、例えば、肺でのガス交換、腎臓での濾過、肝臓での解毒および抱合、膵島細胞でのインスリン産生、または皮膚による危険な環境に対する保護と様々であり得る。そのような器官の疾患もしくは変性は、変性したか、または失われた器官構造が、多くの場合、十分に置換されず、かつ1つの器官の特殊化した細胞が、別の器官の機能を引き継ぐことができないため、多くの場合、生命にかかわる。

30

【0005】

腎臓上皮細胞、膵臓のランゲルハンス島中のインスリン産生細胞、ならびに真皮の腺細胞および/または毛包細胞等の分化細胞は、可能であったとしても、回復困難であり、体内環境から取り出されると、維持するのがより困難である。実際、分化上皮細胞は、培養下で極めて限られた寿命を有する。一般的に言えば、動物から採取されるケラチノサイト以外の上皮細胞を、恐らく、1継代または2継代のみ培養下で増殖させることができる。

40

【0006】

生体外の非ケラチノサイト上皮(NKE)細胞を研究するために、ウイルス性または細胞性癌遺伝子の挿入等の一種の遺伝子操作は、細胞が数継代以上生存することを可能にするために必要とされている。しかしながら、これらの遺伝子操作は、細胞が正常な上皮細胞に類似しないか、または正常な上皮細胞のように機能しなくてもよいように、細胞の遺伝的背景、ならびに生理機能を変化させる。さらに、これらの遺伝子改変された細胞は、無傷の動物への移植の候補ではない。

【0007】

細胞を遺伝子改変することなく、器官から採取されるNKE細胞を長期間培養する方法が、当技術分野で必要とされている。本発明は、遺伝子操作を必要とすることなく、NKE

50

細胞を長期間培養することに関連する問題を解決する。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、非ケラチノサイト上皮細胞を培養する方法を対象とし、方法は、培養中に、フィーダー細胞、非ケラチノサイト上皮細胞、またはこれら両方におけるR h oキナーゼ（R O C K）の活性を阻害しながら、非ケラチノサイト上皮細胞をフィーダー細胞およびカルシウム含有培地の存在下で培養することを含む。

【0009】

本発明は、条件的に不死化された非ケラチノサイト上皮細胞を産生する方法も対象とし、方法は、フィーダー細胞、非ケラチノサイト上皮細胞、またはこれら両方におけるR O C Kの活性を阻害しながら、非ケラチノサイト上皮細胞をフィーダー細胞およびカルシウム含有培地の存在下で培養することを含む。非ケラチノサイト上皮細胞をそのような条件下で培養して、条件的に不死化された非ケラチノサイト上皮細胞を産生する。

【0010】

本発明は、少なくとも部分的に分化した非ケラチノサイト上皮細胞を産生する方法も対象とし、方法は、フィーダー細胞、非ケラチノサイト上皮細胞、またはこれら両方におけるR O C Kの活性を阻害しながら、非ケラチノサイト上皮細胞をフィーダー細胞およびカルシウム含有培地の存在下である一定期間培養して、条件的に不死化された非ケラチノサイト上皮細胞を産生することを含む。条件的に不死化された非ケラチノサイト上皮細胞をこれらの条件下で培養した後、条件的に不死化された非ケラチノサイト上皮細胞は、条件的に不死化された非ケラチノサイト上皮細胞の分化を促進する条件下に設置される。

【0011】

本発明は、非ケラチノサイト上皮細胞の増殖を刺激する方法も対象とし、方法は、フィーダー細胞、非ケラチノサイト上皮細胞、またはこれら両方におけるR O C Kの活性を阻害しながら、非ケラチノサイト上皮細胞をフィーダー細胞およびカルシウム含有培地の存在下で培養することを含む。そのような条件下での非ケラチノサイト上皮細胞の培養が、非ケラチノサイト上皮細胞を刺激して増殖させるが、他の方法では、細胞は増殖することができない。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】本発明の方法の一実施形態の流れ図を示す。

【図2】様々な増殖条件下でのヒト初代前立腺細胞およびヒト初代乳房細胞の生体外増殖曲線を示す。P r E G Mは、市販の合成前立腺上皮細胞増殖培地であり、M E G Mは、市販の合成乳房上皮細胞培地であり、フィーダーは、照射されたか、またはマイトマイシンCで処理されたJ 2マウス線維芽細胞であり、R O C K阻害剤は、最初のプレーティング時およびその後に細胞に適用された10 μ Mの濃度のY 2 7 6 3 2である。Y軸は、集団倍加であり、X軸は、日数である。すべての群において、培地を3日毎に交換した。

【図3】本明細書に開示の方法および培養条件を用いて増殖させた初期継代の正常なヒト前立腺（A）および正常なヒト乳房（B）上皮細胞を示す。すべての細胞を、5%のウシ胎児血清が補充されたF培地中および10 μ Mの濃度のR O C K阻害剤Y 2 7 6 3 2の存在下で増殖させた。それぞれの図の中央の矢印は、マウス線維芽フィーダー細胞（周辺矢印）に包囲される堅固な細胞間結合を有するクラスター状に増殖する上皮細胞を強調している。

【図4】本明細書に開示の方法および培養条件を用いて、正常な後期継代ヒト前立腺上皮細胞（H P E C）（継代29）および正常なヒト乳房上皮細胞（H M E C）（継代32）の細胞表面マーカー発現を示す。樹立されたヒト前立腺癌細胞株（L N C a P）を対照として用いた。細胞を基底上皮細胞マーカーP 6 3（P 6 3列）およびDNA（D A P I列）染色した。右の列は、2つの画像の統合である。H P E CおよびH M E Cのいずれも後期継代細胞であった。これらの後期継代のH P E C細胞およびH M E C細胞は、80継代を超えた後も引き続きP 6 3マーカーを呈し、細胞が、依然として、幹様の正常な基底上

10

20

30

40

50

皮細胞に類似していることを示す。最上列の中央のパネルの右上部分の大きな円形細胞は、フィーダー細胞である。非増殖性フィーダー細胞の斑点のあるD A P I 染色は、D N A が断片化されたことを示す。

【図5】本明細書に開示の方法および培養条件を用いて培養した後の後期継代ヒト乳房上皮細胞（H M E C）およびヒト前立腺上皮細胞（H P E C）の形態学的構造を示す。m y c 変異体で形質転換された樹立された不死化ヒト乳房細胞株を対照として用いた。H M E C および H P E C は継代されており（それぞれ、3 5 継代および3 1 継代）、その後、M a t r i g e l（登録商標）ベースの三次元細胞培養物上にプレティングした。（A）5日目までに、H M E C および H P E C が、多房状の球体構造として組織化された堅固なコロニーを形成し始めた一方で、不死化されたm y c 変異体乳房細胞は、ランダムな組織化されていない塊を形成した。H P E C および H M E C のいずれも、それぞれの球体の周辺で分極単層を形成した。（B）三次元表面上での培養の5日目の細胞の代表的な堅固なコロニーの拡大図である。H M E C および H P E C の多層組織化がはっきりと見られ、m y c 変異体細胞の非組織化も見られる。（C）三次元細胞培養表面上での培養の5日後（継代3 6）の組織化されたH M E C のクラスターのβカテニン染色の共焦点顕微鏡画像。

【図6】本明細書に開示の方法および培養条件を用いた正常なヒト前立腺細胞および腫瘍原性ヒト前立腺細胞の増殖を示す。正常な細胞および腫瘍細胞のいずれも凍結されており、この図は、解凍後最初のプレティングである。（A）6日目までに、本明細書に開示の方法および培養条件を用いることによって、正常な細胞および腫瘍のいずれも順調に増殖する。（B）（A）由来の細胞を解凍後に2回継代し、その後、M a t r i g e l（登録商標）ベースの三次元細胞培養上にプレティングした。8日目までに、正常な細胞は、図5 Aにおいて見られるような球体構造として組織化された堅固なコロニーを形成し始め、腫瘍細胞は、ランダムな組織化されていない細胞塊を形成し始めた。

【図7】本明細書に開示の方法および培養条件を用いて、ヒト乳房上皮細胞（H M E C）およびヒト前立腺上皮細胞（H P E C）に適應されるそれぞれの継代における（A）平均レベルのテロメラゼ（h T E R T）発現および（B）テロメアの平均長を示す。ヒトパピローマウイルス（H P V）由来のE 6 E 7で形質転換されたヒト包皮ケラチノサイト（H F K）を対照として用い、R O C K 阻害剤を使用することなく、血清を含まない培地中で培養した。テロメラゼ活性は、H P E C および H M E C において、時間および継代数とともに増加する傾向があり、形質転換かつ不死化されたH F K細胞のテロメラゼ活性を反映する。H M E C および H P E C において、テロメア長が時間経過とともに増加するように見えるが、テロメアの平均長は時間経過とともに減少し、平均長を約2 k B に安定化させる。

【図8】本明細書に開示の方法および培養条件を用いたマウス肝上皮細胞の増殖および維持を示す。それぞれのパネルは、はっきりと異なる遺伝的背景を有するC 5 7 B L / 6 マウスから採取された肝細胞を表す。w t：継代2の野生型細胞、D：継代2のS T A T 3（シグナル伝達物質および転写3の活性化因子）の肝臓特異的なノックアウトマウス由来の肝細胞、E l f + / -：継代2の（βスベクトリンである）E L F のヘテロ接合体ノックアウトマウス由来の肝細胞、L - / -：継代2の「E L F + / -」と「D」マウスの異種交配の子孫由来の肝細胞。すべての細胞を5%のウシ胎児血清が補充されたF培地中および10 μ M の濃度のR O C K 阻害剤Y 2 7 6 3 2 の存在下で増殖させた。それぞれのパネルの中央で、上皮細胞は、マウス線維芽フィーダー細胞に包囲されるクラスター状に増殖している。

【図9】本明細書に開示の方法および培養条件を用いたマウス乳房上皮細胞の増殖および維持を示す。それぞれのパネルは、はっきりと異なる遺伝的背景を有するマウスから採取された乳房上皮を表す。m M E C F V B：継代2の野生型F V B 系統由来の乳房細胞、m M E C Δ 3：継代2のA I B 1（「乳癌増幅因子1」、ここでエクソン3が欠失された）の活性アイソフォームを過剰発現するトランスジェニックマウス由来の乳房細胞、m M E C A I B u p：継代2のT e t 誘導性A I B 1 導入遺伝子を有する構築物を含むトランスジェニックマウス由来の乳房細胞、h e r 2 / n e u：継代2のh e r 2 / n

10

20

30

40

50

e uを過剰発現するトランスジェニックマウス由来の乳房細胞。すべての細胞を、5%のウシ胎児血清が補充されたF培地中および10 μMの濃度のROCK阻害剤Y27632の存在下で増殖させた。それぞれのパネルの中央で、上皮細胞は、マウス線維芽フィーダー細胞に包囲されるクラスター状に増殖している。

【図10】本明細書に開示の方法および培養条件を用いた継代2のヒト気管—気管支上皮細胞の増殖および維持を示す。細胞を、5%のウシ胎児血清が補充されたF培地中および10 μMの濃度のROCK阻害剤Y27632の存在下で増殖させた。それぞれのパネルの中央で、上皮細胞は、マウス線維芽フィーダー細胞に包囲されるクラスター状に増殖している。

【図11】数個の代表的なROCK阻害剤の化学構造を示す。

10

【図12】対象の肺の右上葉部から採取された組織由来の匙型細胞様異型を有する扁平上皮乳頭腫の存在を示す、切除された標本の組織切片を示す。

【図13】細胞株を生成するための正常な組織および腫瘍組織の両方から採取された組織生検の処理を示す。

【図14】培養された腫瘍細胞から抽出されたDNAの分析を示す。様々な種類のヒトパピローマウイルス（HPV）およびPCRに特異的なプライマーを用いて、危険性の低いHPV（HPV-6、HPV-11）または危険性の高いHPV（HPV-16またはHPV-18）が存在するかを評価した。危険性の低いHPV-11 DNAのみが検出された。

【図15】HPV-11ウイルスがL1遺伝子を担持するかを決定するための培養された腫瘍細胞から抽出されたDNAの分析を示す。L1遺伝子の存在または不在は、抗L1ワクチンがこの患者の管理において有用であり得ることを示す。データは、全L1遺伝子（bp5775~7001）が異常なNKE細胞中で無傷であったことを示す。

20

【図16】生検中に対象から採取され、本発明の方法に従って培養された異常なNKE細胞中に産生されたmRNAの分析を示す。これらの初期および後期遺伝子がmRNAに転写されたことが立証された。図16は、初期E6およびE7形質転換遺伝子が転写されたが、L1遺伝子は転写されなかったことを示す。

【図17】シドフォビル（A）、HDAC阻害剤（SAHA、ボリノスタット）（B）、およびアルテミシニン誘導体（DHA）（C）に応答した、生検中に対象から採取され、本発明の方法に従って培養された異常なNKE細胞を用いて作成された細胞生存率曲線を示す。正常な細胞および腫瘍細胞を、指示された濃度のシドフォビル、ボリノスタット、またはDHAで24時間処理した。細胞生存率をCell Titer-Glo（登録商標）発光細胞生存率アッセイ（Promega）を用いて測定した。

30

【図18】本発明の細胞培養方法を用いたラット乳房腫瘍由来の針生検標本からの細胞の拡大を示す。2日目までに、ラット乳房腫瘍細胞は順調に増殖しており、細胞株を樹立して、生体外研究で使用する事ができた。

【図19】本発明の方法の実施形態のうちの1つの流れ図および培養下で数日後の細胞の写真を示す。

【図20】生体内で腫瘍原性である前立腺腫瘍細胞のみを示す。同一の患者由来の1×10⁶の指数関数的に増殖している正常な前立腺細胞または腫瘍前立腺細胞をトリプシン処理し、単一細胞中に分散させ、200 μLのMatrigel HC（BD Biosciences, Bedford, MA）中に懸濁させた。Matrigel中に懸濁した細胞を6週齢の雄ICR SCIDマウス（Taconic, Germantown, NY）の左側および右側（それぞれの細胞型の5匹のマウス、それぞれの細胞型の合計10個の部位）に皮下注入した。異種移植片の増殖をノギスを用いて週に1回測定した。前立腺癌細胞は、8週間以内に10個中7個の部位で腫瘍を誘導した。しかしながら、正常な前立腺細胞は、いずれの腫瘍も誘導しなかった（10個中0個の部位）。右側のパネルは、腫瘍組織学を示す。

40

【図21】培養下の気液界面（ALI）にある繊毛由来の正常な気管—気管支細胞を示す。初代気管—気管支上皮細胞から生成された代表的な細胞株を、Snapwell sin

50

A L I 培地および V e r t e x 培地にプレーティングした。コンフルエンス時（通常、5～7日目に始まる）、細胞を A L I で維持した。頂端面を P B S で洗浄し、基底コンパートメント中の培地のみを週に3回取り換えた。28日目、A L I 培養物をホルムアルデヒド中に固定し、処理し、パラフィンに包埋した。区分した後、細胞を、ヘマトキシリンおよびエオシン（H & E）（上のパネル）またはアルシアンブルー過ヨウ素酸シッフ（A B P A S）（下のパネル）染料のいずれかで染色した。わずかな纖毛細胞および粘液分泌細胞の写真が撮影されている。

【図22】循環腫瘍細胞（C T C）を単離および培養するためのプロトコルを示す。

【図23】R h o - R o c k ミオシン経路の障害が細胞の最終分化を阻止し、細胞が血清含有培地で増殖することを可能にすることを示す。通常、血清含有培地は、初代上皮細胞の最終分化を誘導し、次いで、培養下で老化を引き起こす。約5000個のヒト前立腺細胞を、R o c k 阻害剤 Y - 2 7 6 3 2（5 μ M）、H A - 1 1 0 0（20 μ M）、G S K 4 2 9 2 8 6（0.1 μ M）、ファスジル（30 μ M）、R h o 阻害剤（C 3 トランスフェラーゼ、2 μ g/mL）、またはミオシン阻害剤（一ブレビスタチン、5 μ M）を添加した F 培地中の6ウェルプレートにプレーティングした。8日後、細胞を固定し、0.05%のクリスタルバイオレットで染色した。データは、阻害剤での R h o - R o c k ミオシン経路の障害が、血清による細胞分化を抑圧することができたことを示唆する。

【図24】本明細書に記載の条件下で増殖させた前立腺細胞と比較した、合成培地におけるヒト初代前立腺細胞の生体外増殖曲線を示す。P r E G M は、市販の合成前立腺上皮細胞増殖培地であり、フィーダーは、照射されたか、またはマイトマイシン C で処理された J 2 マウス線維芽細胞であり、R O C K 阻害剤は、30 μ M の濃度のファスジルであった。Y 軸は集団倍加であり、X 軸は日数である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、非ケラチノサイト上皮細胞を培養する方法を対象とし、方法は、培養中に、フィーダー細胞、非ケラチノサイト上皮細胞、またはこれら両方における R h o キナーゼ（R O C K）の活性を阻害しながら、非ケラチノサイト上皮細胞をフィーダー細胞およびカルシウム含有培地の存在下で培養することを含む。

【0014】

本明細書で使用される「上皮」または「上皮細胞」という用語は、管腔器官を一行に並べる細胞（単数もしくは複数）、ならびに体の腺および外表面を構成する細胞（単数または複数）を指す。概して、4種類の上皮細胞、すなわち、扁平上皮細胞、円柱上皮細胞、腺腫上皮細胞、および移行上皮細胞が存在すると考えられ得る。器官および位置に応じて、上皮細胞を単層または多層に設置することができる。ケラチノサイトは、皮膚、食道、および頸部等の解剖学的部位に見られる扁平上皮を構成する細胞である。ケラチノサイトは、防護壁を形成することによって環境および感染からの保護を助ける平坦な高度に角化した非生存細胞に最終分化する。本発明は、任意の種類の非ケラチノサイト上皮細胞（「N K E 細胞」）を対象とする。N K E 細胞は、乳房、前立腺、肝臓、および消化管等に見られる体の腺上皮を形成する。N K E 細胞は、吸収および／または分泌のいずれかにおいて機能することができる機能的な生存細胞に分化し、これらの細胞は、扁平上皮細胞の特徴を示す高度に角化した構造を形成しない。「非ケラチノサイト上皮細胞」という語句は、当技術分野において十分に理解されており、当業者であれば、その用語の共通の一般的な意味を容易に理解するであろう。本発明の方法において使用される N K E 細胞は、任意の種類または起源組織であってもよい。

【0015】

本明細書で使用される用語によって包含される N K E 細胞の例には、前立腺細胞、乳房細胞、肝細胞、 β 細胞を含む膵島細胞、肺上皮細胞、腎細胞、膀胱細胞、胃上皮細胞、大腸および小腸上皮細胞、尿道上皮細胞、精巣上皮細胞、卵巣上皮細胞、子宮頸部上皮細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、副腎細胞、胸腺細胞、胆嚢細胞、下垂体細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0016】

細胞は、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、非ヒトおよびヒト霊長類等の任意の哺乳動物を含むが、これらに限定されない任意の動物由来であってもよい。本培地での培養に特に好適な哺乳類細胞には、乳房、前立腺、肝臓、脾臓、腎臓、気管支、および気管等であるが、これらに限定されない組織に由来する初代細胞であり得るヒト起源の上皮細胞が含まれる。加えて、形質転換細胞または樹立細胞株、例えば、HeLa子宮頸部上皮細胞株を使用することができる。本発明で使用される細胞は、罹患していないか、または遺伝子改変されていない正常な健康細胞であってもよく、あるいは細胞は、罹患しているか、または遺伝子改変されていてもよい。したがって、「罹患した上皮細胞」は、本明細書において、NKE細胞の一部である。「罹患した細胞」とは、細胞が、動物の血液循環、すなわち、循環腫瘍細胞(CTC)から単離された罹患した細胞を含むが、これらに限定されない、新生物形成、過形成、または悪性腫瘍もしくは良性腫瘍等に由来する異常な組織に由来することを意味する。CHO細胞、COS細胞、VERO細胞、BHK細胞(BHK-21細胞を含む)およびそれらの誘導体またはサブクローン等であるが、これらに限定されない他の哺乳類細胞も、本発明の方法に好適である。一実施形態において、細胞は、正常な組織または異常な組織の試料由来の初代または二次ヒトNKE細胞である。別の実施形態では、細胞は、樹立細胞株、形質転換細胞、以前に凍結させた回収物由来の解凍細胞等由来の細胞等の初代細胞ではない。本発明による培養用の動物細胞を、例えば、ATCC(Rockville, Md.)、Cell Systems, Inc. (Kirkland, Wash.)、Clonetics Corporation (San Diego, Calif.)、BioWhittaker(Walkersville, Md.)、またはCascade Biologicals(Portland, Oreg.)から商業的に入手することができる。

10

20

【0017】

本明細書で使用されるとき、初代細胞は、生検等の生体組織から直接採取されたか、または血液循環から単離され、継代されていないか、または1代のみ継代された細胞である。したがって、初代細胞は、多くの場合、組織消化を介して新たに単離され、プレーティングされたものである。細胞が1代以下継代された場合、初代細胞は、凍結されてもされなくてもよく、その後、しばらく経ってから解凍されてもよい。加えて、初代細胞が単離される組織は、処理の直前に他のある様式で凍結または保存されてもされなくてもよい。

30

【0018】

本発明で使用するNKE細胞は、未分化な胚幹細胞ではない。したがって、本明細書で使用する非ケラチノサイト上皮細胞という語句は、未分化胚幹細胞を自動的に排除する。本明細書および当技術分野で使用されるとき、胚幹細胞は、永久に再生または自己再生する能力を有する未分化細胞である。本明細書の方法で使用するNKE細胞は、成人幹細胞であってもなくてもよい。本明細書で使用されるとき、成人幹細胞は、動物組織から単離され、完全に分化した細胞よりも分化の程度が低いが、胚幹細胞よりも分化の程度は高い。一実施形態において、本発明の方法に従って培養されるNKE細胞は、成人幹細胞である。本発明の別の実施形態では、本発明の方法に従って培養されるNKE細胞は、成人幹細胞ではない。本発明で使用するNKE細胞は、通常、永久に自己再生する能力を有しない。さらに、NKE細胞は、NKE細胞が未分化幹細胞に典型的に関連しない細胞表面マーカーを有するか、または逆に、NKE細胞が未分化幹細胞に典型的に関連した細胞表面マーカーを有しないという点で、最初の単離およびプレーティング時は完全に未分化した細胞ではない。

40

【0019】

初代細胞を単離するとき、組織は、理想的には、標準の滅菌技術および層流安全キャビネットを用いて取り扱われるべきである。一実施形態において、単一針生検は、本発明の細胞培養方法を開始するのに十分な数の初代細胞を単離するのに十分である。組織生検の場合、組織を、滅菌器具を用いて小片に切断することができる。別の実施形態では、対象の血液循環から単離された単一細胞は、本発明の細胞培養方法を開始するのに十分な材料で

50

ある。その後、小片を、滅菌食塩水、または抗生物質もしくは他の成分が補充されてもされなくてもよいPBS等の他の緩衝液で数回洗浄することができる。洗浄後、小片は、組織基質からの細胞の解離を促進するために、多くの場合、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、またはトリプシン等であるが、これらに限定されない酵素液で処理されるが、必須ではない。

【0020】

ディスパーゼは、多くの場合、上皮を下層組織から解離するために使用される。その後、この無傷の上皮を、トリプシンまたはコラゲナーゼで処理してもよい。これらの消化ステップは、多くの場合、解離細胞および組織基質を含有するスラリーをもたらす。その後、スラリーの残りから細胞を分離するのに十分な力でスラリーを遠心分離してもよい。その後、細胞ペレットを除去し、緩衝液および／または生理食塩水および／または細胞培養培地で洗浄してもよい。遠心分離および洗浄を、何度でも繰り返してもよい。最終洗浄後、細胞を、任意の好適な細胞培養培地で洗浄してもよい。言うまでもなく、単離時に細胞が下層組織から十分に分離されない場合、例えば、針生検の場合、または血液循環から単離される場合、消化および洗浄ステップを行う必要はない。例えば、腫瘍細胞等の細胞を、特定の種類の腫瘍細胞に特異的な細胞マーカーを発現する細胞を単離する現在利用可能な技術を用いて、生物の血液循環から単離してもよい。参照により組み込まれる、Lu, J., et al., Int'l. J. Cancer, 126(3): 669-683 (2010) および Yu, M., et al., J. Cell Biol., 192(3): 373-382 (2011) を参照されたい。コールターカウンター等の電子細胞カウンターを使用して細胞を計数してもしなくてもよく、または血球計を使用して細胞を手動で計数してもよい。言うまでもなく、細胞を計数する必要は全くない。

【0021】

本発明の目的のために、細胞は、1代以上継代された後、初代細胞であるとは見なされない。加えて、1代以上継代され、かつ継代直後に凍結された細胞も、解凍されると初代細胞とは見なされない。本発明の選択実施形態において、NKE細胞は、最初は初代細胞であり、本発明の方法を用いることにより、継代後に非初代細胞になる。

【0022】

「細胞培養」または「培養」とは、人工的な生体外環境での細胞の維持を意味する。「細胞培養」という用語は、個々の細胞および組織の培養も包含する

【0023】

初代であるか否かにかかわらず、本発明に従って培養される細胞は、必要に応じて、実験条件に従って技術者によって培養およびプレーティングされてもよい。本明細書における例は、本明細書に記載の方法と併せて用いることができる少なくとも1つの機能な一連の培養条件を示す。所与の動物細胞型のプレーティングおよび培養条件が知られていない場合、日常的な実験のみを用いて、当業者が決定することができる。細胞を、付着因子を用いて培養容器の表面にプレーティングしてもしなくてもよい。付着因子が使用される場合、培養容器を、コラーゲン、フィブロネクチン、およびそれらの天然または合成断片等であるが、これらに限定されない天然組換えもしくは合成付着因子（単数もしくは複数）またはそのペプチド断片で予め被覆してもよい。

【0024】

それぞれの実験条件の細胞播種密度を、必要とされる特定の培養条件のために操作することができる。プラスチック製の培養容器内での日常的な培養について、 1 cm^2 当たり約 1×10^4 細胞から約 $1 \sim 10 \times 10^5$ 細胞の初期播種密度が極めて典型的であり、例えば、 1×10^6 細胞は、多くの場合、 75 cm^2 の培養フラスコ中で培養される。しかしながら、本発明の方法を用いて、単一の細胞さえも最初にプレーティングすることができる。したがって、最初の細胞播種に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100個、またはそれ以上の数の細胞を用いて、本発明の方法を行うことができる。言うまでもなく、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 等であるが、これらに限定されないより多い細胞播種数を使用することができる

。細胞密度を任意の継代で必要に応じて変更してもよい。

【0025】

哺乳類細胞は、典型的には、細胞インキュベータ（標準大気圧で約37℃）内で培養される。インキュベータ内の大気は、通常、加湿され、多くの場合、空中に約3～10%の二酸化炭素を含有する。温度、圧力、およびCO₂濃度を必要に応じて変更してもよいが、但し、細胞が依然として生存していることを条件とする。培養培地のpHは、約7.1～約7.6、具体的には、約7.1～約7.4、より具体的には、約7.1～約7.3の範囲内であり得る。

【0026】

細胞培養培地は、通常、1～2日毎に、または特定の細胞型が必要とするより高い頻度もしくは低い頻度で取り換えられる。NKE細胞が培養容器内でコンフルエンスに近づくと、それらは、通常、継代される。本明細書で使用される細胞継代は、当技術分野で使用されるように使用され、細胞を分割または分裂し、その細胞の一部を新たな培養容器または培養環境に移すことを意味する。本発明の方法で使用されるNKE細胞は、細胞培養表面に付着している可能性が高く、剥離する必要がある。付着細胞を培養容器の表面から剥離する方法は周知であり、一般的に採用されており、トリプシン等の酵素の使用を含んでもよい。

10

【0027】

単一継代は、技術者が細胞を1回分割または手動で分裂し、より少ない数の細胞を新たな容器または環境に移すときを指す。継代するとき、細胞が付着および増殖することを可能にする任意の比率に細胞を分割してもよい。したがって、単一継代時、細胞を、1：2、1：3、1：4、1：5等の比率に分割してもよい。したがって、細胞の継代は、集団倍加と同等ではない。本明細書で使用される集団倍加は、培養下の細胞の数が約2倍になるように、細胞が培養下で1回分裂するときである。細胞を計数して、細胞集団が他のある要因によって2倍になるか、3倍になるか、または累加されるかを決定する必要がある。言い換えると、さらに生体外で培養するために、細胞を継代してそれらを1：3の比率で分割することが、細胞集団が3倍になるということと同等であると見なされるべきではない。

20

【0028】

本発明の一実施形態において、NKE細胞は、生体外で連続的に培養される。本明細書で使用される「連続的に培養する」とは、細胞が健康状態を維持するために継代および新たな培地を必要とするように、細胞が細胞培養容器内で連続的に分裂して、コンフルエンスに達するか、またはそれに近づくという観念である。したがって、「連続的に培養する」という概念は、NKE細胞が不死化されるという概念に類似している。一実施形態において、本発明の方法および条件を用いて培養されるとき、正常なNKE細胞は、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、250、もしくは300代継代、またはそれ以上増殖および分裂し続けることができる。

30

【0029】

本発明は、NKE細胞、具体的には、正常なNKE細胞の増殖を生体外で刺激する方法も対象とし、方法は、フィーダー細胞、NKE細胞、またはこれら両方におけるROCKの活性を阻害しながら、NKE細胞をフィーダー細胞およびカルシウム含有培地の存在下で培養することを含む。そのような条件下でのNKE細胞培養が、NKE細胞を刺激して増殖または増殖させるが、他の方法では、細胞は増殖することができない。特定の一実施形態において、細胞は、堅固なクラスター状に増殖し、すなわち、細胞は、堅固に付着するようになる。一実施形態において、培養されたNKE細胞は、e-カドヘリン、非筋ミオシン、およびp120カテニンを含む接合部を形成する。これらの種類の接合部を、参照により組み込まれるLi, D. et al., J. Cell Biol., 191(3) : 631-644 (2010)に従ってアッセイすることができる。

40

【0030】

50

本明細書で使用され、かつ本明細書を通じて使用される「細胞増殖」は、1つの「母細胞」が2つの「娘細胞」に分裂するような細胞分裂を指す。本明細書で使用される「細胞増殖」は、細胞の実寸法の増加を指さない。細胞集団を時間経過とともにプロットすることによって、細胞増殖の刺激をアッセイすることができる。より急な増殖曲線を有する細胞集団は、さほど急ではない曲線を有する細胞集団よりも早く増殖していると見なすことができる。増殖曲線を、同一の細胞型間の様々な治療のために比較することができるか、または増殖曲線を、同一の状態を有する異なる細胞型のために比較することができる。

【0031】

後期継代NK細胞、具体的には、本発明の正常な後期継代NK細胞は、それらのテロメア長を特徴としてもしなくてもよい。一般に起こるように、テロメア長は、概して、細胞が分裂するときに短くなる。細胞は、通常、テロメアの平均長が臨界長、例えば、4 kb まで減少したときに分裂を停止する。本発明において、後期継代細胞のテロメアの平均長は、最短で2 kb の長さまで減少し、増殖し続けることができる。テロメアの平均長は、当技術分野において日常的な方法および技術を用いて容易に決定される。したがって、一実施形態において、本発明は、本発明の培養条件下で分裂することができるNK細胞、具体的には、正常なNK細胞を提供し、NK細胞のテロメアの平均長は、異なる培養条件または従来の日常的な培養条件下に設置されるときに通常分裂しないであろうNK細胞のテロメアの平均長よりも短い。例えば、老化したヒト前立腺上皮細胞（HPEC）のテロメアの平均長は約4 kb であり、したがって、HPECのテロメアの平均長が約4 kb まで減少すると、細胞は、通常、現在当技術分野において前立腺細胞の培養を許容できるか、またはさらにはそれに最適であると見なされる培養条件下に設置されるとき、分裂しない。しかしながら、本発明の培養条件を用いて、HPECのテロメアの平均長を、最短で2 kb、またはさらにはそれ以下の長さに減少させることができ、依然として、分裂および増殖することができる。したがって、本発明の方法は、条件的に不死化されたNK細胞、具体的には、条件的に不死化された正常なNK細胞を生成することができ、それによって、細胞は、通常分裂することができるNK細胞のテロメアの平均長よりも短いテロメアの平均長を有し、それによって、条件的に不死化されたNK細胞は、テロメア長が減少したにもかかわらず、依然として分裂することができる。明確にするために、NK細胞、具体的には、正常なNK細胞は、現在当技術分野において前立腺細胞の培養を許容できるか、またはさらにはそれに最適であると見なされる培養条件下に設置される場合であっても、通常、テロメアの平均長がある特定の長さまで減少されるとき、分裂を停止する。テロメアの平均長は、細胞型によって異なり得る。

【0032】

そのような現在許容できるか、または最適な上皮細胞の培養条件は、概して、明確に定義されたか、または合成の血清を含まない培地での細胞の培養を含む。例えば、前立腺細胞の培養は、通常、血清の添加を伴わない前立腺細胞特異的培地での培養を含む。加えて、前立腺細胞、およびすべての他のNK細胞は、概して、フィーダー細胞の不在下で培養される。したがって、「現在許容できる」または「現在最適な」培養条件は、培地が血清または血清代替物を含まず、フィーダー細胞の使用を含まない培養条件である。「現在許容できる」または「現在最適な」培養条件は、明確に定義されたか、または合成の培地、例えば、前立腺細胞に対して前立腺特異的な細胞培地の使用も含み得る。したがって、本発明の方法は、NK細胞、具体的には、正常なNK細胞を培養および継代することができるという予期せぬ結果を提供し、現在許容できる条件または現在最適な条件を用いてそのように培養および継代することができたであろう頃からずいぶん経っている。

【0033】

本明細書で使用される「条件的に不死化された」という用語は、NK細胞が、正常な老化したNK細胞のテロメアの平均長にわたって減少したテロメアの平均長を有するが、依然として、無限に増殖することができることを示すが、但し、条件的に不死化された正常なNK細胞を含むが、これに限定されない条件的に不死化されたNK細胞が、本発明の培養条件下で維持されることを条件とする。細胞が条件的に不死化されるかを決定すると

き、条件的に不死化された細胞のテロメアの平均長を、通常生体外で老化した非条件的に不死化されたNK E細胞のテロメアの平均長と比較することを必要とし得る。「通常老化した」という語句は、本明細書に概説される条件がなくとも、分裂能力を生体外でさらに低下させ、したがって、これ以上継代される必要のない細胞集団を指すために使用される。したがって、本発明は、NK E細胞、具体的には、正常なNK E細胞を条件的に不死化する方法を提供し、方法は、培養中に、フィーダー細胞、NK E細胞、またはこれら両方におけるR h oキナーゼ（R O C K）の活性を阻害しながら、NK E細胞、具体的には、正常なNK E細胞をフィーダー細胞およびカルシウム含有培地の存在下で培養することを含む。本明細書で使用される「条件的に不死化された細胞」は、誘導された多能性幹細胞（I P S細胞）ではない。誘導された多能性幹細胞は、多能性幹細胞に類似し、かつ多能性幹細胞のように機能するように再プログラミングされた細胞であり、したがって、I P S細胞は、複数の異なる組織を生成することができる。対照的に、本発明の条件的に不死化されたNK E細胞は、最終分化NK E細胞よりも分化の程度は低くなり得るが、本明細書に概説される条件下で増殖することができる。本明細書で定義されるとき、本発明の条件的に不死化されたNK E細胞は、複数の組織型に分化する能力を獲得しない。本発明の一実施形態において、本明細書に記載の方法によって生成された条件的に不死化された細胞は、初代細胞が単離された組織に戻し分化するか、またはそれを形成する能力を保持する。別の実施形態では、本明細書に記載の方法によって生成された条件的に不死化されたNK E細胞は、初代細胞が単離された組織に完全に戻し分化するか、またはそれを形成する能力を保持しない。

【0034】

NK E細胞は、生体外で増殖し、連続的な培養を必要とするようになり、かつ／またはあらゆる代に継代した後に細胞の核型を明らかに変化させることなく条件的に不死化され得る。したがって、本発明の方法は、NK E細胞、具体的には、正常なNK E細胞を連続的に培養することを含み、それによって、初代細胞または初期継代細胞の同一の種類の核型と比較して、任意の継代の細胞の核型は、変化しないか、または実質的には変化しない。細胞の核型の変化には、染色体もしくはその一部分の重複または欠失、および／または1つの染色体の一部分から別の染色体の一部分への転座が含まれるが、これらに限定されない。核型の同定およびその変化は、当技術分野において一般的な技術である。したがって、本発明の一実施形態は、後期継代NK E細胞、具体的には、正常な後期継代NK E細胞を対象とし、後期継代NK E細胞は、（a）同一の起源の初代NK E細胞の核型と比較して、変化していない核型、または（b）同一の起源の最初に解凍したNK E細胞の核型と比較して、変化していない核型を有する。本明細書で使用される後期継代NK E細胞は、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、250、もしくは300代継代、またはそれ以上の継代を経験したNK E細胞と定義される。

【0035】

本発明は、条件的に不死化されたNK E細胞、具体的には、条件的に不死化された正常なNK E細胞も対象とする。選択実施形態において、条件的に不死化されたNK E細胞、具体的には、条件的に不死化された正常なNK E細胞は、（a）同一の起源の初代NK E細胞の核型と比較して、変化していない核型、または（b）同一の起源の最初に解凍したNK E細胞の核型と比較して、変化していない核型を有する。

【0036】

本発明の方法は、フィーダー細胞の使用を含む。「フィーダー細胞」という用語は、当技術分野で使用されるように本明細書で使われる。すなわち、フィーダー細胞は、本発明のNK E細胞とともに培養される細胞である。本明細書で使われる「NK E細胞とともに培養する」とは、フィーダー細胞が同一の培地および同一の容器をNK E細胞と共有して培養されることを意味する。したがって、それら両方の組の細胞が、同一の培地を共有する同一の容器内に存在するが、フィーダー細胞は、NK E細胞と直接接触しなくてもよ

く、例えば、N K E細胞から、例えば、多孔質フィルタを用いて、物理的に分離されてもよい。一実施形態において、フィーダー細胞は、非増殖性フィーダー細胞である。本発明の一実施形態において、引き続きそれらを存続させ、かつ代謝的に活性にしながら、フィーダーの増殖を阻害するようにフィーダー細胞を処理することができる。例えば、フィーダー細胞を、ガンマ線照射で照射し、かつ／またはマイトマイシンCで処理することができる、これは、細胞分裂を停止するが、細胞を代謝的に活性な状態で維持する。細胞分裂を停止するが、代謝的に活性な状態を維持するように細胞を処理する方法は、当技術分野で周知である。別の実施形態では、フィーダー細胞は、増殖を阻害するように処理されていない。例えば、フィーダーの増殖を阻害するようにフィーダー細胞を処理することを必要とすることなく、N K E細胞との物理的接触を阻止する多孔質フィルタ上に設置されるフィーダー細胞を、N K E細胞とともに培養することができる。

10

【0037】

フィーダー細胞は、任意の哺乳動物由来であってもよく、フィーダー細胞の動物源は、培養されるN K E細胞と同一の動物源である必要はない。例えば、フィーダー細胞は、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、非ヒト、およびヒト霊長類フィーダー細胞であってもよいが、これらに限定されない。使用されるフィーダー細胞の種類は、典型的には、脾臓細胞、マクロファージ、胸腺細胞、および／または線維芽細胞である。一実施形態において、脾臓細胞、マクロファージ、胸腺細胞、および／または線維芽細胞は、それらが非増殖性であるように処理されている。本発明の方法で 사용할 ことができるフィーダー細胞の一例には、J 2細胞集団がある。J 2細胞は、樹立されたスイス3 T 3細胞株に由来するマウス線維芽細胞のサブクローンである。一実施形態において、J 2細胞は、ガンマ線照射される。別の実施形態では、J 2細胞は、マイトマイシンCで処理される。

20

【0038】

別の実施形態では、フィーダー細胞で馴化された培地が、フィーダー細胞のN K E細胞との培養の代わりに使用される。馴化培地の調製は、当技術分野では日常的である。概して、馴化培地の調製は、培地、例えば、本明細書で定義されるF培地中で細胞を数日間培養することと、この培地を回収することを含む。馴化培地は、多くの場合、希釈された様式で新たな培地と合わせられるが、必須ではない。「新たな培地」に対する馴化培地の最適な希釈比率を見出すことは日常的であるが、比率は、約1：99～約99：1の「馴化培地」：「新たな培地」であってもよい。本明細書で使用される「馴化培地」は、培地のすべてまたはある割合の培地が培養中で使用された任意の培地である。

30

【0039】

さらに別の実施形態では、フィーダー細胞抽出物を、フィーダー細胞自体の代わりに培地に添加することができる。フィーダー細胞抽出物の調製方法は一般的であり、Graham, J. and Sandall J., Biochem. J., 182:157-164 (1979)、Graham, J., Biochem. J., 130:1113-1124 (1972)、およびDickson, R., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci., U. S. A., 80:5335-5339 (1983)に記載されており、これらはすべて、参照により本明細書に組み込まれる。培地に対するフィーダー細胞抽出物の最適な希釈比率を見出すことは日常的であるが、比率は、約1：99～約99：1の抽出：培地であってもよい。

40

【0040】

本発明の細胞培養培地は、任意の水ベースの培地であってもよく、DMEM（ダルベッコ修飾必須培地）、ハムF12培地、ハムF10培地、RPMI 1640、イーグル基礎培地（EBM）、イーグル最小必須培地（MEM）、HEPES、培地199等であるが、これらに限定されない任意の「古典的な」培地を含み得る。培養培地は、DMEMおよびF12培地の組み合わせ等であるが、これらに限定されない古典的な培地のうちのいずれかの組み合わせであってもよい。

【0041】

50

さらなる成分を、本発明の方法で使用される培養培地に添加することができる。そのようなさらなる成分には、アミノ酸、ビタミン、無機塩、アデニン、エタノールアミン、D-グルコース、ヘパリン、N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジーン-N'-[2-エタンスルホン酸] (HEPES)、ヒドロコルチゾン、インスリン、リボ酸、フェノールレッド、リン酸エタノールアミン、プトレッシン、ピルビン酸ナトリウム、トリヨードチロニン (T3)、チミジン、およびトランスフェリンが含まれるが、これらに限定されない。あるいは、インスリンおよびトランスフェリンを、クエン酸第二鉄または硫酸第一鉄キレートに置き換えてもよい。これらのさらなる成分はそれぞれ市販されている。

【0042】

本発明の培地に含んでもよいアミノ酸成分には、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-トレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、およびL-バリンが含まれるが、これらに限定されない。

【0043】

添加してもよいビタミンには、ビオチン、塩化コリン、D-Ca²⁺-パントテン酸塩、葉酸、i-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、およびビタミンB12が含まれるが、これらに限定されない。

【0044】

添加してもよい無機塩成分には、カルシウム塩（例えば、CaCl₂）、CuSO₄、FeSO₄、KCl、マグネシウム塩、例えば、MgCl₂、マンガン塩、例えば、MnCl₂、酢酸ナトリウム、NaCl、NaHCO₃、Na₂HPO₄、Na₂SO₄、ならびに微量元素セレン、シリコン、モリブデン、バナジウム、ニッケル、錫、および亜鉛のイオンが含まれるが、これらに限定されない。これらの微量元素を、様々な形態、好ましくは、Na₂SeO₃、Na₂SiO₃、(NH₄)₆Mo₇O₂₄、NH₄VO₃、NiSO₄、SnCl₄、およびZnSO₄等の塩形態で提供することができる。

【0045】

さらなる成分には、ヘパリン、上皮増殖因子 (EGF)、細胞内環状アデノシン-リン酸 (cAMP) レベルを増加させる少なくとも1つの作用物質、および少なくとも1つの線維芽細胞増殖因子 (FGF) が含まれるが、これらに限定されない。ヘパリン、EGF、cAMP増加作用物質（複数を含む）およびFGF（複数を含む）を、基礎培地に添加することができるか、またはそれらを、例えば、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) の溶液中に混合し、基礎培地に添加して本発明の方法で使用する培地を作成するまで凍結状態で保管してもよい。

【0046】

ヘパリンを商業的に入手することができる。ヘパリンは、主に増殖因子成分、例えば、FGFの活性を安定化させるために、本培地に添加される。ヘパリンが使用される場合、それを約1~500 USP単位/リットルの濃度で基礎培地に添加してもよい。EGFは、市販されている。EGFが使用される場合、それを約0.00001~10 mg/Lの濃度で基礎培地に添加してもよい。

【0047】

細胞内cAMPレベルを増加させる様々な作用物質を、本発明の培地を作成する際に使用することができる。細胞内cAMPレベルの直接増加を誘導する作用物質（例えば、ジブチルcAMP）、細胞Gタンパク質との相互作用によって細胞内cAMPレベルの増加を引き起こす作用物質（例えば、コレラ毒素およびホルスコリン）、βアドレナリン受容体の作動薬として作用することによって細胞内cAMPレベルの増加を引き起こす作用物質（例えば、イソプロテレノール）、ならびにcAMPホスホジエステラーゼの活性を阻害することによって細胞内cAMPレベルの増加を引き起こす作用物質（例えば、イソブチルメチルキサンチン (IBMX) およびテオフィリン）が含まれる。これらのcAMPを増加させる作用物質は市販されている。

【0048】

本発明の方法で使用される培養培地は、カルシウム源を含む。一実施形態において、カルシウム源は、血清または血清代替物である。別の実施形態では、カルシウム源は、培地に添加されるカルシウム含有塩である。血清がカルシウム源として使用される場合、血清は、約1%～約35%の濃度（v/v）であり得る。選択実施形態において、血清は、約1%～約20%、または約1%～約15%、または約1%～約10%、または約1%～約5%の濃度である。血清代用物または血清代替物がカルシウム源として使用される場合、これらを製造業者が推奨するプロトコルに従って培地に添加することができる。血清代用物の例には、Pall CorporationのUltroser（商標）等の市販の代用物、脱脂粉乳濾過物等であるが、これに限定されない乳汁または乳汁画分が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0049】

本発明の実施形態で使用される Ca^{+2} 濃度の範囲は、細胞型によって異なり得る。一実施形態において、本発明の方法で使用される培地中の Ca^{+2} の濃度は、0.1mM～10.0mMである。より具体的な実施形態では、本発明の方法で使用される培地中の Ca^{+2} の濃度は、約0.2mM～約8mM、約0.4mM～約7mM、約0.5mM～約5mM、約0.8mM～約4mM、約1.0mM～約3mM、約1.2mM～約2.8mM、約1.4mM～約2.6mM、および約1.5mM～約2.5mMであり得る。

【0050】

本発明の方法は、培養物中でのRho関連コイルドコイルタンパク質キナーゼ（ROCK）の阻害を含む。Rhoキナーゼは、Rho、Rac1、およびCdc42キナーゼを含むRho GTPaseタンパク質ファミリーに属する。Rhoの最もよく特徴付けられたエフェクタ分子のうちの1つは、ROCKであり、これは、RhoのGTP結合形態に結合するセリン／トレオニンキナーゼである。セリン／トレオニンキナーゼの特徴を示している保存モチーフを含むROCKの触媒キナーゼドメインがN末端に見られる。ROCKタンパク質は、Rho結合ドメイン（RBD）を含む中央コイルドコイルドメインも有する。C末端は、内部高システインドメインを有するプレクストリン相同（PH）ドメインで構成されている。コイルドコイルドメインは、他の α ヘリックスタンパク質と相互作用すると考えられている。コイルドコイルドメイン内に位置するRBDは、RhoA、RhoB、およびRhoCを含む活性化したRho GTPasesのみと相互作用する。pHドメインは、アラキドン酸およびスフィンゴシルホスホリルコリン等の脂質メディエータと相互作用すると考えられており、タンパク質局在化に参与し得る。pHドメインおよびRBDのキナーゼドメインとの相互作用は、自己阻害ループをもたらす。加えて、キナーゼドメインは、ROCK活性の負の調節因子であるRhoEへの結合に参与する。

20

30

【0051】

ROCKファミリーは、現在、2つのメンバー、ROCK1（別名、ROK β またはp160ROCK）およびROCK2（別名、ROK α ）からなる。ROCK1は、約1354アミノ酸長であり、ROCK2は、約1388アミノ酸長である。ヒトROCK1およびヒトROCK2のアミノ酸配列は周知である。例えば、ROCK1およびROCK2のアミノ酸配列を、それぞれ、UniProt Knowledgebase（UniProtKB）受入番号Q13464およびO75116で見出すことができる。ヒトROCK1およびROCK2のヌクレオチド配列を、それぞれ、GenBank受入番号NM_005406.2およびNM_004850で見出すことができる。様々な動物由来のROCK1およびROCK2タンパク質のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は周知であり、UniProtおよびGenBankデータベースの両方で見出すことができる。

40

【0052】

両方のROCKアイソフォームが組織内で遍在的に発現するが、それらは、いくつかの組織において異なる強度を呈する。例えば、ROCK2が、脳および骨格筋により蔓延している一方で、ROCK1は、肝臓、精巣、および腎臓でより豊富である。両方のアイソフォームが、血管平滑筋および心臓内で発現する。休止状態にあるとき、ROCK1および

50

ROCK2のいずれも主として細胞質であるが、Rhoを活性化するとき膜に転位置する。ROCK活性は、いくつかの異なる機構によって調節され、したがって、Rho依存性ROCK活性化は、収縮性の変化、細胞透過性、移行、および増殖からアポトーシスに至るまで、高度に細胞型依存的である。少なくとも20個のROCK基質が同定されている。Hu and Lee, Expert Opin. Ther. Targets 9: 715-736 (2005)、Loirand et al, Circ. Res. 98: 322-334 (2006)、およびRiento and Ridley, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4: 446-456 (2003)を参照されたく、これらはすべて、参照により組み込まれる。

【0053】

アポトーシスシグナル伝達の調節におけるROCKの役割は、高度に細胞型依存的かつ刺激依存的である。その一方で、ROCKは、生体外および生体内細胞生存シグナルの媒介に関連している。ROCK媒介性生存促進性効果は、上皮細胞、癌細胞、および内皮細胞、ならびに他の細胞型において報告されている。気道上皮細胞において、Y-27632またはHA1077 (別名、ファスジル)での阻害は、膜の波打ち現象、アクチンストレスファイバーの喪失、およびアポトーシスを誘導する(Moore et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 30: 379-387, 2004)。

【0054】

Rho/ROCK活性化は、酸化的ストレス誘導性腸上皮細胞傷害中に生存促進の役割も果たし得る(Song et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. 290: C1469-1476, 2006)。ROCKは、甲状腺癌細胞(Zhong et al., Endocrinology 144: 3852-3859, 2003)、グリオーマ細胞(Rattan et al, J. Neurosci. Res. 83: 243-255, 2006)、ヒト臍静脈内皮細胞(Li et al., J. Biol. Chem. 277: 15309-15316, 2002)、肝星細胞(Ikeda et al., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 285: G880-886, 2003)、およびヒト神経芽腫細胞(De Sarno et al., Brain Res. 1041: 112-115, 2005)における生存促進事象にも関連している。ROCKが生存促進の役割を果たすという証拠も、例えば、管平滑筋細胞(Shibata et al, Circulation 103: 284-289, 2001)および脊髄運動ニューロン(Kobayashi et al, J. Neurosci. 24: 3480-3488, 2004)において生体内で報告されている。

【0055】

本明細書で使用されるとき、ROCKの阻害とは、ROCK1またはROCK2のうちの少なくとも1つの活性、機能、もしくは発現の低下を意味し得る。活性、機能、もしくは発現を完全に抑圧することができ、すなわち、活性、機能、もしくは発現が存在しないか、または活性、機能、もしくは発現は、処理されていない細胞と比較して処理された細胞において単に低い場合がある。概して、ROCKは、GTP結合Rhoの結合を介して活性化された後に、LIMキナーゼおよびミオシン軽鎖(MLC)ホスファターゼをリン酸化する。したがって、本発明の一実施形態は、ROCK1および/もしくはROCK2が活性化されないか、またはその活性が処理されていない細胞よりも低くなるように、ROCK1および/もしくはROCK2、例えば、GTP結合Rhoの上流経路の遮断を含む。他の上流エフェクタには、インテグリン; TGF- β およびEGFRを含むが、これらに限定されない増殖因子受容体; カドヘリン; Gタンパク質共役受容体等が含まれるが、これらに限定されない。したがって、本発明の別の実施形態は、ROCK1および/またはROCK2が任意のシグナルを伝播することができないか、または処理されていない細胞と比較して低下したシグナルのみを伝播することができるように、活性化されたROCK1および/またはROCK2の下流エフェクタ分子の活性、機能、もしくは発現の遮断

10

20

30

40

50

を含む。下流エフェクタには、ミオシンホスファターゼ標的タンパク質（MYPT）、ピメンチン、LIMK、ミオシン軽鎖キナーゼ、NHE1、コフィリン、ミオシンII等が含まれるが、これらに限定されない。例えば、Rhoの活性を阻害するROCK上流阻害剤であるC3トランスフェラーゼ、およびミオシンIIの活性を阻害するROCK下流阻害剤であるプレバスタチンのいずれも、ROCK阻害剤の代わりに本明細書に記載の培養条件下で使用されるとき、細胞が分化を回避することを可能にし、かつ生体外増殖を可能にするような様式で細胞に影響を及ぼした（図23）。直接ROCK阻害の代わりに、かつ本明細書に記載および要求される他の培養条件と併せて、ROCKの上流または下流阻害は、条件的に不死化されたNKE細胞を生成する場合もしない場合もある。

【0056】

本発明の方法は、NKE細胞、具体的には、正常なNKE細胞を培養しながら、ROCKを阻害することを含む。一実施形態において、ROCKの阻害は、ROCK阻害剤を培養培地に添加することによって達成される。ROCK阻害剤が培養培地に添加されるこの実施形態において、ROCK阻害剤がNKE細胞に加えてフィーダー細胞にも影響を及ぼし得る可能性がある。

【0057】

ROCK阻害剤の例には、Y-27632、HA1100、HA1077、チアゾピビン、およびGSK429286が挙げられるが、これらに限定されず、これらの構造は、図11に示される。これらの化合物は周知であり、市販されている。さらなる小分子Rhoキナーゼ阻害剤には、PCT公開第WO03/059913号、同第WO03/064397号、同第WO05/003101号、同第WO04/112719号、同第WO03/062225号、および同第WO03/062227号に記載されている阻害剤、ならびに米国特許第7,217,722号および同第7,199,147号、ならびに米国特許出願公開第2003/0220357号、同第2006/0241127号、同第2005/0182040号、および同第2005/0197328号に記載されている阻害剤が含まれるが、これらに限定されず、これらのすべての内容は、参照により組み込まれる。

【0058】

ROCKキナーゼを阻害する別の方法は、RNA干渉（RNAi）を用いることである。RNAi技術は周知であり、dsRNAの一方の鎖がROCK1をコードするmRNAのコード鎖に対応し、もう一方の鎖が第1の鎖に補完的である二本鎖RNA（dsRNA）に依存する。所与のヌクレオチド配列に最適なRNAi種の要件は周知であるか、または最高水準を考慮して容易に解明することができる。例えば、最適なdsRNAは、約20～25ntの長さであることが知られており、dsRNAのそれぞれの鎖の3'末端に2塩基オーバーハンドを有し、多くの場合、低分子干渉RNA（siRNA）と称される。言うまでもなく、低分子ヘアピンRNA（shRNA）等の他の周知の形状も功を奏し得る。shRNAは、分子が少なくとも一部分において二本鎖であるように一部分が自己相補的な1つの連続したRNA鎖である。細胞がshRNAをsiRNAに処理したと考えられる。本明細書で使用されるRNAi分子という用語は、dsRNAの一方の鎖がサイレンシングされる標的遺伝子をコードするmRNAのコード鎖に対応し、もう一方の鎖が第1の鎖に補完的である任意の二本鎖RNA（dsRNA）である。

【0059】

したがって、本発明の一実施形態は、ROCKの活性を阻害するために、少なくとも1つのRNAi分子および／または少なくとも1つのアンチセンス分子の使用を含む。特定の一実施形態において、RNAi分子および／またはアンチセンス分子は、ROCK1に特異的である。別の実施形態では、RNAi分子またはアンチセンス分子は、ROCK2に特異的である。さらに別の実施形態では、RNAi分子および／またはアンチセンス分子は、ROCK1およびROCK2の両方に特異的である。さらに別の実施形態では、少なくとも2つのRNAi分子および／またはアンチセンス分子が使用され、一方はROCK1に特異的であり、もう一方はROCK2に特異的である。

【0060】

RNA i 分子および／またはアンチセンス分子は、参照により組み込まれる C l e m e n s, J. C., et al., PNAS, 97 (12): 6499-6503 (2000) において報告されているように、ネイキッド RNA i 分子および／またはアンチセンス分子を有する細胞を単に浸漬することによる細胞培養物の一部であり得る。RNA i 分子および／またはアンチセンス分子は、RNA i 分子またはアンチセンス／分子を細胞に挿入するために使用され得るリボソーム複合体等の複合体の一部であり得る。

【0061】

リボソームは、2つの広範なクラスに分類される。カチオン性リボソームは、安定した複合体を形成するために負に荷電した dsRNA 分子と相互作用する正に荷電したリボソームである。正に荷電した dsRNA／リボソーム複合体は、負に荷電した細胞表面に結合し、エンドソームに内部移行される。エンドソーム内の酸性 pH により、リボソームは破裂され、それらの内容物を細胞質に放出する (Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985)。

【0062】

pH 感受性であるか、または負に荷電したリボソームは、それを有する複合体ではなく dsRNA を捕捉する。dsRNA および脂質のいずれも同様に荷電されるため、複合体形成ではなく反発が生じる。したがって、dsRNA は、これらのリボソームの水性内部に捕捉される。pH 感受性リボソームは、例えば、チミジンキナーゼ遺伝子をコードする dsRNA を培養下の細胞単層に送達するために使用されている (Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274)。リボソーム組成物の主な種類の 1 つに、天然由来のホスファチジルコリン以外のリン脂質がある。天然リボソーム組成物を、例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) またはジパルミチルホスファチジルコリン (DPPC) から形成することができる。アニオン性リボソーム組成物が、概して、ジミリスチルホスファチジルグリセロールから形成される一方で、アニオン性融合性リボソームは、主に、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) から形成される。リボソーム組成物の別の種類は、例えば、大豆 PC、および卵 PC 等のホスファチジルコリン (PC) から形成される。別の種類は、リン脂質および／またはホスファチジルコリンおよび／またはコレステロールの混合物から形成される。核酸を含むリボソームは、例えば、国際公開第 WO 96/40062 号、米国特許第 5,264,221 号、米国特許第 5,665,710 号、および Love らの国際公開第 WO 97/04787 号に記載されており、これらすべて、参照により組み込まれる。

【0063】

リボソームの別の種類であるトランスファーソームは、薬物送達ビヒクルにとって魅力的な高度に変形可能な脂質凝集体である (Cevc et al., 1998, Biochim Biophys Acta, 1368 (2): 201-15)。トランスファーソームは、高度に変形可能であるため、それらが脂質滴よりも小さい孔を貫通することができる脂質滴と称されてもよい。トランスファーソームは、それらが使用される環境に適応可能であり、例えば、それらは、形状に適応でき、自己修復性であり、高い頻度で、断片化することなくそれらの標的に達し、多くの場合、自動装填式である。例えば、表面エッジ活性剤、通常、界面活性剤を、標準のリボソーム組成物に添加することによって、トランスファーソームを作製することができる。

【0064】

ROCK1 および／または ROCK2 RNA i が細胞にアクセスすることができる本発明の方法における別の方法は、RNA i 分子および／またはアンチセンス分子をコードする DNA 発現ベクターの使用である。ある特定の実施形態は、例えば、RNA i 分子が shRNA であるとき、または対抗するプロモーターが RNA i 分子のコード配列のいずれかの端に配置されるとき、1つのみのベクターを利用する。したがって、「ROCK の活性の阻害」は、転写されるときに ROCK の活性、機能、または産生を遮断することがで

10

20

30

40

50

きるDNAの使用を含む。上述のリポソーム送達系は、RNAiおよび／またはアンチセンスをコードするDNAが細胞に進入することができる1つの手段である。

【0065】

あるいは、RNAiおよび／またはアンチセンスをコードするDNAを、細胞に進入する能力を有するウイルスベクター系において調製することができる。これらは当技術分野で周知であり、Madzak et al., J. Gen. Virol., 73:1533-36 (1992) (パポウイルスSV40)、Berkner et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:39-61 (1992) (アデノウイルス)、Moss et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:25-38 (1992) (ワクシニアウイルス)、Muzyczka, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:97-123 (1992) (アデノ随伴ウイルス)、Margulskes, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:67-93 (1992) (単純ヘルペスウイルス (HSV) およびエプスタイン・バーウイルス (EBV))、Miller, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:1-24 (1992) (レトロウイルス)、Bradyopadhyay et al., Mol. Cell. Biol., 4:749-754 (1984) (レトロウイルス)、Miller et al., Nature, 357:455-450 (1992) (レトロウイルス)、Anderson, Science, 256:808-813 (1992) (レトロウイルス)、C. Hofmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995; 92, pp. 10099-10103 (バキュロウイルス) を含む。

【0066】

別の実施形態では、ROCK1および／もしくはROCK2は、ロックアウト構築物またはドミナントネガティブ構築物のいずれかを含むトランスジェニック技術等であるが、これに限定されない遺伝子操作技術を用いて阻害される。そのような構築物は、参照により本明細書に組み込まれるKhyrul, W., et al., J. Biol. Chem., 279(52):54131-54139 (2004)に記載されている。

【0067】

上述のように、ROCKを遮断する一実施形態は、小分子阻害剤、RNAi技術、アンチセンス技術、および／または遺伝子操作等であるが、これらに限定されない本明細書に記載の方法のうちのいずれかを用いて、ROCKの上流もしくは下流エフェクタ分子を個別または集合的に遮断または阻害することである。したがって、阻害することができる任意の上流エフェクタには、インテグリン；TGF- β およびEGFRを含むが、これらに限定されない増殖因子受容体；カドヘリン；Gタンパク質共役受容体等が含まれるが、これらに限定されない。加えて、阻害することができる任意の下流エフェクタには、ピメンチン、LIMK、ミオシン軽鎖キナーゼ、NHE1、コフィリン等が含まれるが、これらに限定されない。

【0068】

本発明の条件下で培養された後、細胞をこれらの条件から除去し、フィーダー細胞を欠き、カルシウム源を欠き、かつ／またはROCK阻害剤を欠く細胞培養環境下に設置される。フィーダー細胞、カルシウム源、およびROCK阻害剤の1つ、2つ、または3つの任意の組み合わせが、その後の環境に不在であってもよい。本明細書で使用される「その後の環境」とは、胞培養環境に関連して使用されるとき、フィーダー細胞、カルシウム源、およびROCK阻害剤のうちの少なくとも1つを欠く細胞培養環境である。一実施形態において、ROCK阻害剤、カルシウム源、またはフィーダー細胞が、その後の環境に不在である。別の実施形態では、フィーダー細胞およびROCK阻害剤が、その後の環境に不在である。別の実施形態では、フィーダー細胞およびカルシウム源が、その後の環境に不在である。別の実施形態では、カルシウム源およびROCK阻害剤が、その後の環境に不在である。別の実施形態では、フィーダー細胞、ROCK阻害剤、およびカルシウム源が

、その後の環境に不在である。

【0069】

一実施形態において、N K E細胞、後期継代N K E細胞、および／もしくは条件的に不死化されたN K E細胞に対するその後の環境は、分化を促進することができ、かつ／またはN K E細胞、後期継代N K E細胞、および／もしくは条件的に不死化されたN K E細胞の永久増殖を可能にしない環境である。その後の環境は、細胞が元来由来した器官、すなわち、自家性移植片と同様または同一の生体内環境であり得る。例えば、本発明の方法に従って培養された肝細胞を、その細胞が最初に生検または単離された対象の肝臓に再導入することができる。図20は、条件的に不死化された前立腺癌細胞株を作成するために、採取して本明細書に記載の培養条件に供したヒト前立腺腫瘍細胞を示す。条件的に不死化された前立腺癌細胞は、S C I Dマウス、すなわち、その後の生体内環境下に設置され、これらの条件的に不死化された前立腺癌細胞は、マウスにおいて新たな腫瘍を生成することができた。

10

【0070】

その後の環境は、このその後の環境下に設置された時点で細胞が元来由来した器官の生化学的性質または生理学的性質により密接に類似した生体外環境であってもよい。その後の環境は、生体外での分化を促進することで知られている因子が細胞培養に添加されるような「合成環境」であってもよい。例えば、後期継代肝上皮細胞は、細胞の分化を促進するように設計されたその後の環境下に設置されると、クラスターの形成および／または成熟肝上皮細胞に類似したタンパク質の発現を開始し得る。

20

【0071】

一実施形態において、N K E細胞、後期継代N K E細胞、および／または条件的に不死化されたN K E細胞は、細胞が元来由来した器官の細胞への細胞の分化の刺激に特異的なその後の環境下に設置される。例えば、条件的に不死化された前立腺上皮細胞を本発明の条件から除去し、前立腺細胞の分化を促進するように設計された培養条件下に設置することができる。上皮細胞を培養するための様々な環境は、参照により組み込まれる、Cult ure of Epithelial Cells (Ian Freshney and Mary G. Freshney, Eds. Wiley-Liss, Inc.) (第2版、2002年)に詳述されている。

【0072】

あるいは、細胞を、その後の環境下で、天然もしくは合成三次元細胞培養表面の中に、またはその上に播種することができる。三次元表面の1つの非限定的な例は、Matrigel (登録商標)でコーティングされた培養表面である。他の三次元培養環境は、ヒドロゲル等であるが、これに限定されない任意の形状のコラーゲンゲルおよび／または合成生体高分子材料を含む表面を含む。言うまでもなく、様々な三次元培養表面を本発明の方法と同時に用いることができる。三次元培養環境が使用される場合、フィーダー細胞も同様に使用してもしなくてもよい。これらの三次元細胞培養表面環境は、分化を促進する場合もしない場合もある。

30

【0073】

一実施形態において、N K E細胞、後期継代N K E細胞、および／または条件的に不死化されたN K E細胞を、目的とするタンパク質を発現するように遺伝子改変することができる。細胞の遺伝子改変は、ウイルスタンパク質の挿入等の細胞を不死化させるように設計された改変ではない。むしろ、細胞の遺伝子改変は、例えば、タンパク質をコードする導入遺伝子を挿入するように設計される。例えば、肝細胞を、本発明の細胞培養方法を用いて単離および拡大することができる。続いて、これらの細胞を操作してもよく、細胞が第V I I I因子を産生することができるように、第V I I I因子をコードする導入遺伝子を細胞のゲノムに挿入することができる。その後、これらの細胞をその後の環境下に設置すること、例えば、自家性移植片を対象に設置することによって、細胞は、第V I I I因子を産生することができる。別の例として、肺上皮細胞を、嚢胞性線維症に罹患する対象から単離してもよい。その後、これらの細胞を、本発明の細胞培養方法を用いて拡大しても

40

50

よく、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子をコードする導入遺伝子をこれらの細胞に生体外で挿入してもよい。その後、遺伝子改変されたNKE細胞を、裸にされた気管支上皮上に再構成して、正常機能を回復させることができる。正常機能を回復させるために上皮表面の10%のみが取り換えられる必要があると推定される。偽重層円柱上皮の繊毛細胞での形成が、正常な組織の再形成を示す。参照により組み込まれる、Fulcher M. L. et al., Well-Differentiated Human Airway Epithelial Cell Cultures. Methods in Molecular Medicine, 107: Human Cell Culture Protocols, pp183-206, Second Edition Edited by: J. Picot. Humana Press Inc., Totowa, NJを参照されたい。

10

【0074】

導入遺伝子が細胞に導入される方法は、DNAの哺乳類細胞への生体外移動についての文献から既知の標準の方法、例えば、参照により組み込まれる国際公開第WO93/07283号に記載の電気穿孔法、リン酸カルシウム沈殿、または受容体媒介エンドサイトーシスに基づく方法等である。目的とする遺伝子を細胞に挿入するための他の方法および物質は、参照により組み込まれるSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Third Edition (2001)に開示されている。

20

【0075】

多種多様の目的とする遺伝子を、NKE細胞、後期継代NKE細胞、および／または条件的に不死化されたNKE細胞内で発現させることができる。これらの目的とする遺伝子は、毒素、凝固因子、酵素、プロドラッグ変換酵素、免疫応答を刺激する抗原、腫瘍壊死因子、サイトカイン、ならびに治療用途を有する様々なタンパク質（例えば、増殖ホルモンおよび調節因子）をコードする配列を含むが、これらに限定されない。

【0076】

本発明のNKE細胞、後期継代NKE細胞、および／または条件的に不死化されたNKE細胞をトランスフェクトした後、うまくトランスフェクトされたこれらの細胞を、当技術分野で周知のマーカーを用いて選択することができる。うまくトランスフェクトされた細胞を選択した後、本発明の遺伝子改変されたNKE細胞、後期継代NKE細胞、および／または条件的に不死化されたNKE細胞を、本発明の細胞培養技術を用いて培養して、遺伝子改変されたNKE細胞、後期継代NKE細胞、および／または条件的に不死化されたNKE細胞の集団を産生することができる。続いて、これらの細胞を回収し、対象に戻して設置することを含むが、これに限定されない上述のその後の環境下、すなわち、自家性移植片に設置することができる。

30

【0077】

本発明は、治療を必要とする対象のために候補治療を同定する方法も対象とし、対象は、異常なNKE細胞または罹患したNKE細胞の存在を特徴とする状態を有する。異常なNKE細胞または罹患したNKE細胞の存在を特徴とするそのような状態には、新生物形成、過形成、または悪性腫瘍もしくは良性腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。方法は、本発明の培養方法のいずれかに従って、異常なNKE細胞の試料を対象から得ることと、異常なNKE細胞を培養して、生体外の異常なNKE細胞集団を産生することを含む。例えば、循環腫瘍細胞(CTC)を生物の血液循環から単離することができ、本発明の方法を利用して、さらなる分析での使用に十分な数の細胞を得ることができ、これらの細胞は、表現型的または遺伝的に特徴付けられた細胞等であるが、これらに限定されない。CTCを単離する1つの方法が本明細書に開示されているが、本発明は、CTCが単離される任意の方法に限定されない。これまで、CTCは単離されたが、研究および分析を可能にするのに有意な期間さえも培養下で保つことができなかった。しかしながら、本発明は、最小数のCTC、さらには単一の細胞が単離およびプレーティングされることを可

40

50

能にすることによりこの問題を解決する。その後、プレーティングされたC T C（複数を含む）は、その後の遺伝分析、機能分析、および／または表現型分析を可能にするのに十分な数の細胞を達成および維持するために、本発明の発明的方法に供される。実際、十分な数の異常なN K E細胞または罹患したN K E細胞が得られると、それらの源にかかわらず、これらの細胞をアッセイして、対象の候補治療を同定するために用いることができる応答プロファイルを決することもできる。

【0078】

本明細書で使用される応答プロファイルは、異常なN K E細胞が生体内設定にある場合、例えば、臨床医に、特定の治療がそれらの異常なN K E細胞における所望の応答を産生する可能性を示す1つ以上のデータ点の収集である。応答プロファイルに関連して使用される「応答」は、任意の手段による細胞死（壊死、毒性、アポトーシス等）または異常な細胞の増殖速度の低下のいずれかであってもなくてもよい。応答プロファイルは、100%の精度で応答を予測する必要はない。応答プロファイルは、単一のデータ点であっても、データの収集であってもよい。

【0079】

任意の方法を用いて、所与の異常なN K E細胞集団の応答プロファイルを同定または決定することができる。例えば、異常な細胞から単離されるDNAまたはRNAの少なくとも一部を配列決定することにより、応答プロファイルを評価することができる。これは、ウイルス、例えば、ヒトパピローマウイルス（HPV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）が異常な状態を引き起こしている可能性を疑うときに特に有用であり得る。少なくとも1つのデータ点を応答プロファイルに提供するために、DNA/RNAのすべてが配列決定される必要はない。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を含む周知の技術を用いて、生成物が作成されるかを決定するために、PCR反応において、例えば、HPVまたはHIVが存在する疑いのあるDNA/RNAに特異的な配列を有するPCRプライマーを用いることは、現在、簡単な手順の問題である。検出可能な生成物が特定のプライマーを用いたPCR反応後に生成されない場合、PCRプライマーが特異的なウイルスの一部が存在しないかもしれないという結論を下すことが可能であり得る。同様に、特定のDNA/RNA配列の不在の決定も、応答プロファイルにおけるデータ点であり得る。この様式で、細胞から単離されたDNA/RNAの全配列の正確な配列は決定されないが、DNAまたはRNAは、本発明の目的のために「配列決定される」。したがって、本明細書で使用する「配列決定」は、単離したDNA/RNAの全ヌクレオチド配列の生成をもたらす場合も、もたらさない場合もある。サザンブロット、ノーザンブロット、RT-PCR、自動配列決定等であるが、これらに限定されない他の方法を用いて、単離したDNA/RNAの配列を決定することもできる。DNA/RNAを配列決定する方法は、当技術分野で周知であり、本明細書で繰り返す必要はない。

【0080】

同様に、生体外の異常なN K E細胞中に産生され得る1つのmRNAの少なくとも一部の存在または不在を同定することによって、応答プロファイルを評価することができる。上のDNA/RNAの配列を決定するように、mRNAの正確な配列を、細胞から単離される全mRNAにおいて決定する必要はない。単離したmRNAの配列の存在または不在を決定するために用いることができる方法には、ノーザンブロット、RT-PCR、自動配列決定等が含まれるが、これらに限定されない。少なくとも1つのmRNAの存在または不在を同定する方法は、当技術分野で周知であり、本明細書で繰り返す必要はない。

【0081】

同様に、生体外の異常なN K E細胞中に産生され得る1つのタンパク質の少なくとも一部の存在または不在を同定することによって、応答プロファイルを評価することができる。上のDNA/RNAの配列を決定するように、存在するか、または不在のタンパク質の正確なアミノ酸配列を、全タンパク質において決定する必要はない。単離したタンパク質の配列の存在または不在を決定するために用いることができる方法には、ウェスタンブロット、免疫組織化学的方法、ELISA法等が含まれるが、これらに限定されない。少なく

とも1つのタンパク質の存在または不在を同定する方法は、当技術分野で周知であり、本明細書で繰り返す必要はない。タンパク質、例えば、受容体の存在または不在は、細胞が、例えば、細胞死をもたらし得る特定の治療の影響を受けやすいことを示し得る。

【0082】

生体外の異常なNKE細胞を化学療法剤に供し、化学療法剤に対する細胞の応答を決定することによって、応答プロファイルを評価することができる。本明細書で使用される化学療法剤は、従来の癌治療に限定されないが、化学物質を用いた任意の種類の治療法を示すために使用される。一実施形態において、細胞に対する治療薬の治療指数を決定することによって、治療薬への応答を評価することができる。治療指数の決定は、当技術分野で一般的であり、単にLD₅₀/EC₅₀の比率であり、LD₅₀は、細胞上での治療薬の平均致死量を表し、EC₅₀は、その半最大用量を表す。治療薬への応答を評価する他の方法には、容量応答曲線の決定、細胞生存曲線の決定等が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態において、治療薬への異常なNKE細胞の応答を決定するために使用される治療薬は、後に対象に投与される治療薬と同一または異なる治療薬であってもよい。

【0083】

本発明は、対象における異常な非ケラチノサイト上皮(NKE)細胞を同定する方法も対象とする。これらの方法は、本発明の細胞培養方法に従って、対象から単離された少なくとも1つの異常な候補NKE細胞を培養することを含む。NKE細胞、後期継代NKE細胞、および/または条件的に不死化されたNKE細胞が拡大された時点で、細胞の組織起源プロファイルを決定して、異常な候補NKE細胞の可能性のある起源組織を決定することができる。NKE細胞、後期継代NKE細胞、および/または条件的に不死化されたNKE細胞の少なくとも1つの特性を、異常な候補NKE細胞の決定された組織起源プロファイルの組織と同一の組織から得られる正常なNKE細胞の同一の特性と比較することができる。細胞増殖特性、例えば、細胞表面、Matrigel(商標)、または他の三次元表面上でのコロニー形成を含むが、これらに限定されない、異常な細胞または罹患した細胞と正常な細胞との間の任意の差異を用いることができる。疾患した細胞と正常な細胞との間の差異を決定する他の手段は、細胞のプロテオミクスプロファイルの評価、細胞の代謝学的プロファイルの評価、ゲノムプロファイルの評価、および/または疾患した細胞もしくは異常な細胞と正常な細胞との間の差異を強調する他の生物学的アッセイの使用を含むが、これらに限定されない。異常な候補NKE細胞と正常なNKE細胞との間の検出された差異は、異常な候補NKE細胞が、正常なNKE細胞と比較して、異常であることを示す。

【0084】

応答プロファイルを評価するために使用される同一の方法を用いて、組織起源プロファイルを評価することができる。例えば、異常な候補細胞をmRNA転写産生、タンパク質発現についてアッセイすることができ、組織起源も組織学的評価を介して視覚的に評価することができる。組織起源プロファイルを評価する方法は、免疫組織化学的染色も含む。異常な候補細胞の可能性のある起源組織が樹立された時点で、細胞を同一の組織由来の正常な細胞の少なくとも1つの特性についてアッセイすることができる。例えば、異常な候補細胞が乳房組織に由来すると同定された場合、これらの細胞を、BRCA1および/またはBRCA2変異、HER-2/Neu増殖因子受容体の過剰発現等についてアッセイすることができる。異常な候補細胞がBRCA1変異を有する場合、細胞が異常な乳房細胞であると確定することができる。本発明は、起源組織を同定するために使用されるアッセイの種類にも、正常な細胞と異常である可能性のある細胞の間の差異を決定するために使用されるアッセイの種類にも限定されない。本発明の細胞培養方法は、単離した細胞を拡大するための方法を提供することにより、これらの細胞の同定を可能にする。

【0085】

本発明は、対象における疾患の進行または疾患の治療を監視する方法も対象とする。本明細書で使用される「進行を監視する」という語句は、NKE細胞および/またはそれらの細胞内容物を、進行もしくは退行の様々なマーカーについてアッセイすることによって、

個人における異常な状態が、進行（悪化）しているか、退行（改善）しているか、または停滞したままである（検出可能な変化なし）かを決定するために、対象における異常な状態が定期的にチェックされることを示すために使用される。これらの治療の有効性を監視するために、監視方法を、異常な状態の他の監視方法または治療レジメンと併せて用いてもよい。したがって、「進行を監視する」ことは、N K E細胞および／またはそれらの細胞内容物を、進行もしくは退行の様々なマーカーについて定期的にアッセイし、かつ対象における経時的な任意の差異を、異常な状態の進行、退行、または停滞と相関させることによって、治療レジメンの有効性を評価することも示すよう意図されている。例えば、本発明の方法を用いて、乳房切除術中または乳房切除術後の対象を監視することができる。具体的には、本方法を用いて、乳房切除術が成功した患者を監視することができ、したがって、本方法を用いて、C T Cを単離し、患者のC T Cにおいて様々な分析を行うのに十分な数のC T Cを生体外で培養および生成し、例えば、フォローアップマンモグラムまたはボディースキャンが必要であるかを決定することができる。監視方法を用いて、最初の治療後に好適なフォローアップ治療レジメンを決定することもできる。例えば、最初の治療後、N K E細胞を生検または単離することができ、培養方法を用いて、十分な数の細胞を生体外で生成し、残りの異常な細胞の遺伝子構造または表現型が新たな治療を保証するのに十分に異なるかを決定することができる。したがって、一実施形態において、本発明は、治療レジメンを個別化する方法を提供する。監視することは、試料が採取される2つの時点でN K E細胞における特定のマーカーのレベルを評価することも含んでもよく、またはそれは、より多くの時点を含んでもよく、所与の対象由来の1つの特定の時点でのマーカーのレベルのうちのいずれかを、それぞれ、1つ以上の他の時点で、同一の対象におけるバイオマーカーのレベルと比較することができる。

10

20

【0086】

方法は、異常なN K E細胞の試料を対象から得ることと、本発明の培養方法のうちのいずれかに従って異常なN K E細胞を培養して、生体外で異常なN K E細胞集団を産生することを含む。

【0087】

「進行を監視する」という語句は、本発明の方法を用いた対象におけるA I B 1- Δ 4ペプチドのレベルである。

【0088】

本発明は、N K E細胞を培養し、かつ／または条件的に不死化されたN K E細胞を生成するためのキットも提供する。キットは、培養容器、湿式形態もしくは乾式形態の培養培地、および／または血清もしくはいくつかの他のカルシウム源等の個々の培地成分を含んでもよい。キットは、凍結フィーダー細胞、細胞を継代するためのトリプシン等の他の化学物質等を含んでも含まなくてもよい。

30

【実施例】**【0089】**

実施例1-初代ヒト前立腺細胞（H P E C）の採取および培養

【0090】

十分に説明した上で患者または親の同意を得て、正常なヒト前立腺組織を回収した。トリプシンを用いた確立した手順に従って、初代前立腺細胞懸濁液を調製した。簡潔に、前立腺組織を採取し、トリプシンで消化した。その後、細胞を、（トリプシンを中和するために）10%の血清を含有するDMEM中に懸濁し、即座に遠心分離して、ペレット状の細胞を単離した。そのような前立腺上皮細胞の日常的な単離および培養方法は、参照により組み込まれるCulture of Epithelial Cells (Ian Freshney and Mary G. Freshney, Eds. Wiley-Liss, Inc.) (第2版、2002年)で見出される。

40

【0091】

回転させた後、ペレットを除去し、分配し、「F培地」にプレーティングした。F培地を、5%のウシ胎児血清を有する3:1 (v/v) 比率のF-12およびDMEM (Gib

50

c o)、 $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ のヒドロコルチゾン、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のインスリン、 $8.4 \text{ng}/\text{mL}$ のコレラ毒素、 $10 \text{ng}/\text{mL}$ の上皮増殖因子 (EGF)、 $24 \mu\text{g}/\text{mL}$ のアデニン、 $100 \text{U}/\text{mL}$ のペニシリン、および $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ のストレプトマイシンを混合することによって調製する。ROCK阻害剤であるY027632を、約 $10 \mu\text{M}$ の濃度でF培地に添加した。

【0092】

細胞を非増殖性フィーダー細胞の存在下でプレーティングした。この具体的な場合において、フィーダー細胞は、ガンマ線照射されたスイス3T3細胞のサブクローンである周知のマウス線維芽細胞フィーダーJ2細胞である。ガンマ線照射またはマイトマイシンCでの処理は、これらの細胞を増殖不能にする。

10

【0093】

正常細胞培養条件下 (37°C で5%の CO_2 および標準大気圧)で、細胞を標準の細胞培養容器中で培養した。培地を、増殖速度に応じて2〜3日毎に取り換えた。

【0094】

細胞がコンフルエンスに達した後、細胞を、参照により組み込まれるChapman, S. et al., J. Clin. Invest., 120 (7): 2619-2626 (2010)に記載の標準の細胞培養技術を用いて採取および継代した。

【0095】

図3Aに示されるように、初期継代HPECは単層に増殖することができ、これらの細胞は増殖し続けた。

20

【0096】

実施例2—初代ヒト乳房上皮細胞 (HMEC) の採取および培養

【0097】

十分に説明した上で患者または親の同意を得て、正常なヒト乳房組織を回収した。初代乳房細胞懸濁液を、当技術分野で確立した手順に従って調製した。簡潔に、乳房組織を採取し、ディスパーゼおよびコラゲナーゼ1Aの混合物での消化に供し、続いて、トリプシンで消化した。そのような乳房上皮細胞の日常的な単離および培養方法は、参照により組み込まれるCulture of Epithelial Cells (Ian Freshney and Mary G. Freshney, Eds. Wiley-Liss, Inc.) (第2版、2002年)で見出される。

30

【0098】

回転させた後、ペレットを除去し、分配し、「F培地」にプレーティングした。F培地を、5%のウシ胎児血清を有する3:1 (v/v) 比率のF-12 (Gibco)、 $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ のヒドロコルチゾン、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のインスリン、 $8.4 \text{ng}/\text{mL}$ のコレラ毒素、 $10 \text{ng}/\text{mL}$ の上皮増殖因子 (EGF)、 $24 \mu\text{g}/\text{mL}$ のアデニン、 $100 \text{U}/\text{mL}$ のペニシリン、および $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ のストレプトマイシンを混合することによって調製する。ROCK阻害剤であるY027632を、約 $10 \mu\text{M}$ の濃度でF培地に添加した。細胞をガンマ線照射された非増殖性J2細胞の存在下でプレーティングした。

【0099】

正常細胞培養条件下 (37°C で5%の CO_2 および標準大気圧)で、細胞を標準の細胞培養容器中で培養した。培地を、2〜3日毎に取り換えた。

40

【0100】

細胞がコンフルエンスに達した後、細胞を、参照により組み込まれるChapman, S. et al., J. Clin. Invest., 120 (7): 2619-2626 (2010)に記載の標準の細胞培養技術を用いて採取および継代した。

【0101】

図3Bに示されるように、初期継代HMECは単層に増殖することができ、これらの細胞は増殖し続けた。

【0102】

実施例3—様々な条件下におけるHMECおよびHPECの増殖曲線の比較

50

【0103】

初代HMECおよびHPECを、図2に記述される4つの異なる条件下で増殖させた。図2を参照して、PrEGM(Lifeline Cell Technology)は、血清を含有しない前立腺上皮細胞を培養するために特別に設計された合成培地(「Postallife上皮細胞培養培地」)であり、その中で、補助剤が合成であり、明確に定義される。MEGM(Lifeline Cell Technology)は、血清を含有しない乳房上皮細胞を培養するために特別に設計された合成培地(「Brochialife上皮細胞培養培地」)であり、その中で、補助剤が合成であり、明確に定義される。フィーダーは、ガンマ線照射されたJ2マウス線維芽細胞であった。ROCK阻害剤は、最初のプレティング時およびその後に細胞に適用された10 μ Mの濃度のY27632であった。Y軸は集団倍加であり、X軸は日数である。すべての群の培地を、2~3日毎に取り換えた。

10

【0104】

図2は、PrEGM中で増殖した初代前立腺細胞の増殖が約25日後に止まり、MEGM中で増殖した初代乳房細胞の増殖が約50~60日後に止まったことを示す。ROCK阻害剤を合成培地に添加しても、増殖には影響を及ぼさなかった。ROCK阻害剤を有しないF培地中のフィーダー細胞の存在下で増殖した細胞は、ほぼ同一の増殖速度を有し、すなわち、線の勾配はほぼ同一であったが、フィーダー細胞の存在下で増殖した細胞の増殖は、最終的に止まった。F培地中のフィーダー細胞の存在下で増殖し、かつROCK阻害剤が補充された初代細胞は、増殖し続けた。

20

【0105】

実施例4—後期継代HMECおよびHPECの細胞表面マーカー染色

【0106】

継代29のHPECおよび継代32のHMECを滅菌ガラス製カバースリップ上で増殖させ、4%(重量/体積)のパラホルムアルデヒド中に固定し、製造業者のプロトコルに従って、初代抗体(マウス抗p63、Santa Cruz, sc-863)および二次抗体(Alexa Fluor 488ロバ抗マウスIgG)で標識した。細胞中のDNAを、室温で3分間、PBS中の0.5 μ g/mLのHoescht(33342)で染色し、PBSで3回洗浄した。カバースリップをProLong退色防止封入剤(Invitrogen)を用いて室温で1時間ガラススライド上に載置し、4 $^{\circ}$ Cで保管した。63倍対物レンズおよびHammamatsu電荷結合素子カメラを装備したZeiss Axioskop顕微鏡(Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY)を用いて細胞を撮像した。画像をOpenlab3.0.7ソフトウェアを用いて処理した。図4は、後期継代HMECおよびHPECのいずれも基底細胞マーカーp63を発現した一方で、陰性対照細胞(LnCAP)は発現しなかったことを示す。

30

【0107】

実施例5—条件的に不死化されたHMECおよびHPECの形態学的構造

【0108】

条件的に不死化されたHPEC(継代32)、HMEC(継代36)、および遺伝的に不死化されたHMEC(MycT58A)(継代39)を、Matrigel(登録商標)ベースの三次元培養に移した。

40

【0109】

三次元培養の5日目までに、条件的に不死化された正常なHMECおよびHPECが、組織化された多房状の球体構造を形成した一方で、遺伝的に不死化されたmyc変異体乳房細胞は、ランダムな組織化されていない塊を形成した。

【0110】

三次元培養下で5日後のHMECの代表的なクラスターを、標準の技術を用いて β カテニン染色した。 β カテニンは、正常な上皮細胞層を維持するのに必要な接着結合の形成に関与するタンパク質である。HMECは、正に β カテニン染色し、組織化された多房状の球体構造を示した。

50

50

。異なる細胞型を説明するために、初代細胞懸濁液を実施例 1 の方法に従って調製し、当技術分野で確立した手順に従って必要に応じて改変した。簡潔に、組織を採取し、ディスペラーゼおよびコラゲナーゼ 1 A の混合物での消化に供し、続いて、トリプシンで消化した。

【0119】

回転させた後、ペレットを除去し、分配し、「F 培地」にプレーティングした。F 培地を、5 % のウシ胎児血清を有する 3 : 1 (v/v) 比率の F-12 および DMEM、0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヒドロコルチゾン、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のインスリン、8.4 ng/mL のコレラ毒素、10 ng/mL の上皮増殖因子 (EGF)、24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアデニン、100 U/ mL のペニシリン、および 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のストレプトマイシンを混合することによって調製する。ROCK 阻害剤である Y027632 を、約 10 μM の濃度で F 培地に添加した。細胞を J2 フィーダー細胞の存在下でプレーティングした。

10

【0120】

正常細胞培養条件下 (37°C で 5 % の CO_2 および標準大気圧) で、細胞を標準の細胞培養容器中で培養した。培地を、2 ~ 3 日毎に取り換えた。

【0121】

細胞がコンフルエンスに達した後、細胞を、標準の細胞培養技術を用いて採取および継代した。

【0122】

実施例 9 - 気管支由来のヒト上皮細胞の培養

20

【0123】

凍結細胞を Lifeline Cell Technologies から購入し、上記の本明細書で使用される F 培地中で解凍した。ROCK 阻害剤である Y027632 を、約 10 μM の濃度で F 培地に添加した。細胞をガンマ線照射された非増殖性 J2 細胞の存在下でプレーティングした。

【0124】

正常細胞培養条件下 (37°C で 5 % の CO_2 および標準大気圧) で、細胞を標準の細胞培養容器中で培養した。培地を、2 ~ 3 日毎に取り換えた。

【0125】

実施例 10 - 条件的に不死化された HPEC と正常な HPEC との間の増殖速度の比較

30

【0126】

HPEC を採取し、実施例 1 の方法に従って培養する。並行して、別の組の HPEC を採取し、フィーダー細胞を用いず、前立腺上皮細胞用に設計された合成細胞培養培地を用いて培養する。この第 2 の組の条件下で培養される細胞は、「正常な HPEC」と称される。簡潔に、正常な HPEC を、明確に定義された PRGM 血清を含まない培地または 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウシ下垂体抽出物および 0.2 ng/mL の組換え上皮増殖因子が補充されたケラチノサイト血清を含まない (KSF) 培地中に存在するフィーダー細胞を用いることなく増殖させる。

【0127】

組織の消化後、それぞれの群由来の細胞を計数し、75 cm^2 の培養フラスコ中に約 1×10^5 でプレーティングする。正常細胞培養条件下 (37°C で 5 % の CO_2 および標準大気圧) で、細胞を標準の細胞培養容器中で培養する。それぞれの群の培地を、増殖速度に応じて 2 ~ 3 日毎に取り換える。

40

【0128】

数日後、細胞を採取し、標準の細胞培養技術を用いて計数する。PRGM 培地または KSF 培地のいずれかにおいて、条件的に不死化された細胞が正常な細胞よりも多く生成され、この培養条件が現在標準の条件よりも HPEC の増殖を刺激することを示す。

【0129】

実施例 11 - 条件的に不死化された HMEC と正常な HMEC との間の増殖速度の比較

【0130】

50

HMECを採取し、実施例2の方法に従って培養する。並行して、別の組のHMECを採取し、フィーダー細胞を用いず、前立腺上皮細胞用に設計された合成細胞培養培地を用いて培養する。この第2の組の条件下で培養される細胞は、「正常なHMEC」と称される。簡潔に、正常なHMECを、明確に定義されたMEGM血清を含まない培地または25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウシ下垂体抽出物および0.2 ng/mL の組換え上皮増殖因子が補充されたケラチノサイト血清を含まない(KSF)培地中に存在するフィーダー細胞を用いることなく増殖させる。

【0131】

組織の消化後、それぞれの群由来の細胞を計数し、75 cm^2 の培養フラスコ中に約 1×10^5 でプレーティングする。細胞を1ウェル当たり合計約10,000個の細胞でプレーティングする。正常細胞培養条件下(37℃で5%の CO_2 および標準大気圧)で、細胞を標準の細胞培養容器中で培養する。それぞれの群の培地を、2~3日毎に取り換える。

10

【0132】

数日後、細胞を採取し、標準の細胞培養技術を用いて計数する。MEGM培地またはKSF培地のいずれかにおいて、条件的に不死化された細胞が正常な細胞よりも多く生成され、この培養条件が現在標準の条件よりもHMECの増殖を刺激することを示す。

【0133】

肝細胞、膵臓細胞等であるが、これらに限定されない任意の種類のNKEにおいて、実施例10および実施例11を繰り返すことができる。

20

【0134】

実施例12—個人の候補治療薬の同定

【0135】

再発性喉頭乳頭腫症に16年間罹患する22歳の男性患者をこの研究に選んだ。疾患は、徐々に喉頭を巻き込んだだけでなく、上気道(気管および気管支)、近年では、肺実質にも転移した。患者は、350回以上の手術を受けた。手術以外では、インターフェロン治療(1996~2010)、メトトレキサート(2001~03)、病巣内シドフォビル(2007~2010)、および病巣内アバスチン(2010)を含む複数の治療が失敗に終わった。2008年のCTスキャンは、複数の肺結節が存在したことを示した。2010年の10月までには、検査したそれぞれの肺病巣の大きさが増大していた。最後の外科的介入期間中、転移性腫瘍を除去するために右肺上葉の楔状切除術を行った。切除された標本の病理学的分析は、匙型細胞様異型を有する扁平上皮乳頭腫の存在を示した(図12)。そのような腫瘍の細胞空胞化は、腫瘍が感染性HPVを産生していることを示す。しかしながら、介入時、この腫瘍に関与するHPVの種類は同定されなかった。腫瘍がいくつかの異なる治療モダリティに応答しなかったため、手術後に患者をどのように治療すべきかも不明であった。

30

【0136】

手術時に肺腫瘍(および正常な肺組織)の生検を少量得て、組織を処理して細胞株を生成した(図13)。本明細書に記載の細胞培養方法を用いて、正常な組織および腫瘍組織の両方から細胞株を生成し、その後、これらを用いて、どの種類のHPVがこの腫瘍の病原体であるかを決定した。図14に示されるように、DNAを腫瘍細胞から抽出し、特定のプライマーおよびPCRを、危険性の低いHPV(HPV-6、HPV-11)または危険性の高いHPV(HPV-16またはHPV-18)が存在するかについて評価した。危険性の低いHPV-11のDNAのみが検出された。

40

【0137】

HPV-11のDNAの一部を配列決定して、ゲノムの初期領域および後期領域のいずれも無傷であるかを決定した。L1後期遺伝子(ウイルスカプシドタンパク質)と同様に、E6初期形質転換遺伝子およびE7初期形質転換遺伝子の両方が存在したことは明らかであった。「プライマー歩行法」を利用して、全L1遺伝子が存在するかについても評価した。L1遺伝子の存在または不在は、抗L1ワクチンをこの患者の治療において使用する

50

ことができるかを決定するのに有用である。図15のデータは、全L1遺伝子（bp5775～7001由来）が異常なNKE細胞において無傷であったことを示す。最終的に、これらの初期遺伝子および後期遺伝子がmRNAに転写されたことが立証された。図16は、初期E6およびE7形質転換遺伝子が転写されたが、L1遺伝子は転写されなかったことを示す。L1タンパク質が産生されなかったため、HPVワクチンの使用（L1タンパク質に基づく）がこの患者に有効ではないという理由から、これは重大な所見であった。したがって、この遺伝分析に基づいて、この腫瘍を治療する代替方法を用いるべきであると決定された。

【0138】

DNeasy血液および組織キット（Qiagen）を用いて、全DNAを患者の培養細胞または組織から単離した。Illustra TempliPhi RCAキット（GE Healthcare）を用いて、DNAを増幅した。生成物をBamHIで消化し、pUC19ベクターにクローニングした。プライマー歩行サービス（Primer Walking Services）（Genewiz）を用いてウイルスゲノムを二方向から配列決定した。

【0139】

Bio-Rad iCycler MyiQ上でTaqMan（商標）キットを用いて、HPV11 L2（センスプライマー5'-TGACACCTCACCTCACCCAC-3'、抗センスプライマー5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC-3'、およびTaqManプローブ5'-ACCCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAG-3'）の定量化のためにプライマーおよびプローブを用いて、リアルタイム定量PCRを行った。それぞれの反応において、ヒトβグロビン遺伝子を内因性の参照として使用した。すべての試料において、リアルタイムPCR反応を三重で行った。製造業者（Bio-Rad）のガイドラインに従って、正規化発現（{Delta}{Delta}CT）法を有するiQ5ソフトウェアを用いてHPV DNAのレベルを分析した。

【0140】

ほとんどのRRP症例はHPV6またはHPV11によって引き起こされる。いくつかの研究は、HPV11が、通常、より攻撃的なウイルスであると考えられており、かつ肺病変を有するRRPの大部分がHPV11によって引き起こされたことを示している。一般的なHPV検出プライマーおよびHPV型特異的プライマーをHPV分類アッセイに用いた。HPV11感染を確認するために、ローリングサークル増幅法（RCA）を用いてエピソームHPV DNAを増幅した。驚いたことに、制限消化は、典型的なHPV11のパターンと一致しなかった。原型HPV11が1つのBamHI部位を有したのに対し、原型HPV11が肺腫瘍細胞から単離されたウイルスゲノムは、2つのBamHI部位を有した。さらに重要なことに、ウイルスゲノムの大きさは、10kb以上であると推定された。ほとんどのHPVが約8kbの大きさのゲノムを有し、原型HPV11の大きさは、7931個の塩基対である。さらなる制限酵素消化は、BamHI以外に、L1-LCR-E6-E7-E1の領域中の酵素AatII、AgeI、FspI、XcmI、およびpPumIがすべて、ウイルスゲノムを1回のみではなく2回切断することを明らかにした。HPV11のすべての他の単一消化酵素部位がウイルスゲノム上に保持され、ウイルスDNAがL1-LCR-E6-E7-E1の重複を有し得ることを示唆する。重複の詳細を決定するために、全ウイルスゲノムをベクターpUC19にクローニングし、ウイルスゲノムを二方向から配列決定した。配列決定データが立証され、GenBank（受入番号JN644141）に提出された。肺腫瘍細胞中のHPV11は、10,424塩基対長のエピソームゲノムを有した。2493塩基対長の確認された重複配列は、部分L1-LCR-E6-E7-部分E1配列を含んだ。これらの重複配列を、L1（B）、LCR（B）、E6（B）、E7（B）、およびE1（B）と注釈を付けた。患者が変異ウイルスに感染したか、または変異が患者において疾患進行中に起こったかを解明するために、患者の喉頭組織由来のウイルスゲノムを単離した。喉頭由来のウイルスゲノムもクローニングし、配列決定した（GenBank受入番号JN644142）。最初の感染部

10

20

30

40

50

位のウイルスゲノムは、7933個の塩基対であり、かつ重複を有しないという点において、原型HPV11に非常に類似しており、ウイルスゲノム変異が再発性呼吸乳頭腫の腫瘍進行を併発したことを示唆する。定量リアルタイムPCRを用いてウイルス力価を測定し、肺腫瘍細胞は、喉頭病巣よりも7倍多くのHPVゲノムを含有した。肺における1細胞当たり約40.16コピーのウイルスDNA、および喉頭における1細胞当たり約5.74コピーのウイルスDNAで、ウイルスゲノムを計算した。

【0141】

以前の研究は、アルテミシニン誘導体（DHAおよびアーテスネート）ならびにHDAC阻害剤（SAHA）が危険性の高いHPVを発現する子宮頸癌細胞を効率的に死滅させることができることを示した。しかしながら、HPV-6またはHPV-11を含有する樹立された細胞株が存在しないため、これらの阻害剤の危険性の低いHPVを含有する細胞への効果を分析するデータは文献内には存在しない。細胞培養方法は、HPV-11を発現する細胞株の樹立を可能にした。さらに重要なことに、上の阻害剤に対する感受性を評価し、これを同一の患者から単離された正常な肺細胞の感受性と比較するために、この細胞株を使用した（図17）。

10

【0142】

患者由来のHPV-11含有腫瘍細胞のDHAおよびSAHAに対する感受性が、正常な肺細胞よりも約100倍高いことは明らかである。例えば、SAHAのEC₅₀は2μMであり、LD₅₀は約200μMである。治療指数は、LD₅₀/EC₅₀と定義され、この場合、それは100である。この値は、優れた治療指数を表し、SAHAが治療用の実行可能な薬剤に相当し得ることを示唆する。DHAの治療指数は100ではないが、DHAにおいても同一のことが言える。シドフォビルは、RRPの治療に使用される最も一般的な薬物である。興味深いことに、シドフォビル（図17A）は、非常に高い濃度（50～200μM）でも生体外では全く無効であった。

20

【0143】

生体外の感受性データに基づいて、患者は、2011年1月にポリノスタット治療を受けた。ポリノスタット治療は、400mg/日の4週間サイクル（3週間継続、1週間中断）から成った。その後のCTスキャンは、新たな病巣が同定されず、比較的小さい病巣が縮小し、かついくつかの比較的大きい病巣も小さくなったという非常に有望な結果を示した。より最近のCTスキャンは、すべての病巣が安定化し、かつ主な副作用が観察されなかったことを示した。したがって、本発明の細胞培養方法の使用は、異常な細胞の応答プロファイルの決定に重要であり、これは、この患者の腫瘍を治療するのに有用であり得る少なくとも2つの化学療法剤の同定を可能にした。本発明の細胞培養方法を用いて、遺伝分析および治療指数を含む応答プロファイルは、生検の1週間以内に作成された。

30

【0144】

実施例13－単一針生検由来の細胞株の樹立

【0145】

別個の実験において、ラット乳房腫瘍由来の針生検標本を本発明の細胞培養方法で利用した。ラット乳房腫瘍細胞は順調に増殖し、細胞株は樹立され、これを生体外研究で利用することができた（図18）。したがって、細胞株を生成するのに十分な数の腫瘍細胞を単一針生検で得た。これは、非常に小さい臨床試料上での遺伝学的研究、生化学的研究、および分子的研究を行う可能性を大いに拡大した。例えば、乳房腫瘍の場合において、針生検の評価は、現在に至るまで、これらの細胞を拡大および培養するいかなる方法も存在しなかったため、現在、試料のH&EおよびIHC染色に限定されている。

40

【0146】

本明細書に開示の実施形態の例は、例示目的であり、いかなる様式でも本発明の範囲を限定することを意図していない。

【0147】

実施例14－冷凍および解凍後の細胞株の樹立

【0148】

50

縮小乳房形成患者由来の新たなヒト乳房組織を、最大1～3mmの大きさに小片または薄片に細分化した。その後、組織片を、 -80°C の90%のウシ胎児血清／10%のDMSO (v/v)／5 μM のY-27632中、または液体窒素中で凍結させた。凍結させた組織を 37°C で解凍し、ペレット状にし、F培地中に懸濁して、ディスパーゼ／コラゲナーゼで短時間消化した。細胞懸濁液を上述のように培養系に供した。細胞培養の写真(図19)をプレーティングの5日後(上のパネル)および8日後(下のパネル)に撮影した。

【0149】

実施例15－循環腫瘍細胞(CTC)由来の細胞株の樹立

【0150】

7mLのヒト血液試料を健常なドナーから取り出し、CPT管(BD Vacutainer (登録商標) CPT (商標) ヘパリンナトリウムNを有する細胞調製管)に注入した。血液試料を回収した後、LnCAP(前立腺癌細胞株)細胞(総細胞数50～1000個)をスパイクした。試料を、水平ローター遠心分離機内で、1500～1800RCF(相対遠心力)で最低15分間、室温で遠心分離した。遠心分離した後、単核細胞および血小板は血漿層真下の白っぽい層内に位置した(CPT管を参照のこと)。細胞層を乱さないように注意して、血漿のおよそ半分を吸引した。その後、細胞層をパスツールピペットで回収し、蓋を有する15mLの「U」底円錐形遠心分離管に移した。ヒト系統細胞枯渇カクテル(Lineage Cell Depletion Cocktail)(カタログ番号: 51-9005225)を管に添加し、混合し、室温で約15分間静置させた。静置させた後、約12mLの1倍PBSを管に添加し、管を約1000rpmで回転させた。上清を吸引した。IMagストレプトアビジン粒子プラスDM(Becton, Dickinson: カタログ番号: 51-9003746)をボルテックスし、細胞ペレットを75 μL のIMag粒子と完全に混合した。混合物を室温で約30分間インキュベートさせた。インキュベートさせた後、1mLの1倍PBSを管に添加し、混合し、管をBD IMagnet上に6分間設置した。上清を新たな管に移した。BD IMagnetに付着した管内の残り部分を1mLのPBSと再度混合した。この第2の上清を別の新たな管に移した。これらの2つの管を沈降させ、ペレットを3mLのF培地(+Y-27632)に再懸濁し、フィーダー細胞を有する6ウェルプレートに設置した。図22は、スパイクされた腫瘍細胞が血液から回収され、本明細書に記載の培養条件に供した後、これらの細胞がコロニーを形成し始めたことを示す。

【配列表フリーテキスト】

【0151】

配列番号1: センスプライマー
配列番号2: アンチセンスプライマー
配列番号3: TaqManプローブ
配列番号4: プライマー
配列番号5: プライマー
配列番号6: プライマー
配列番号7: プライマー
配列番号8: センスプライマー
配列番号9: アンチセンスプライマー
配列番号10: TaqManプローブ

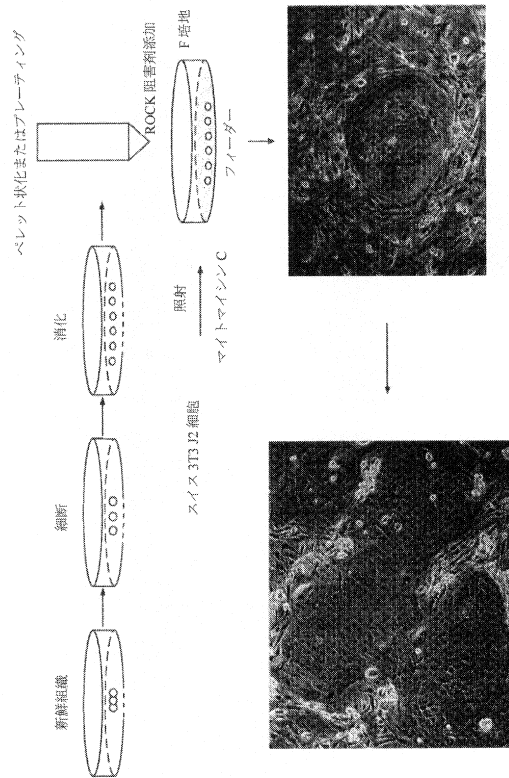
10

20

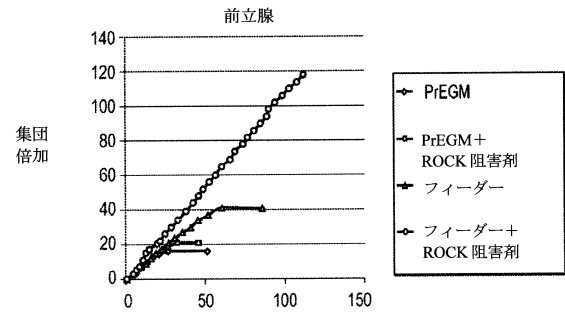
30

40

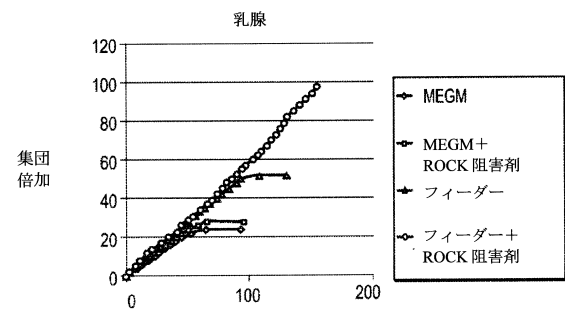
【図 1】



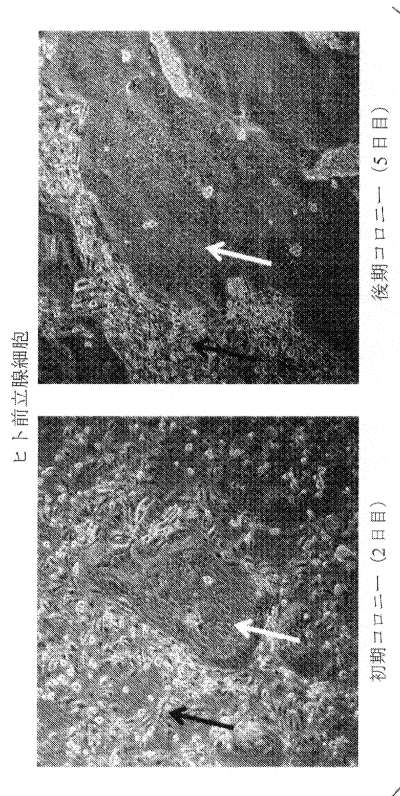
【図 2 A】



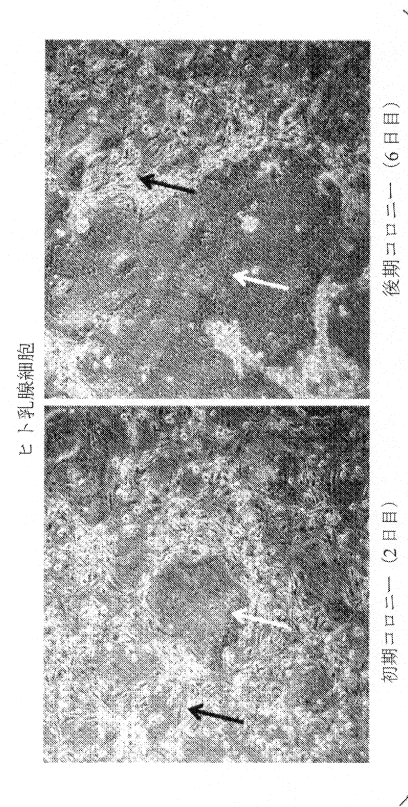
【図 2 B】



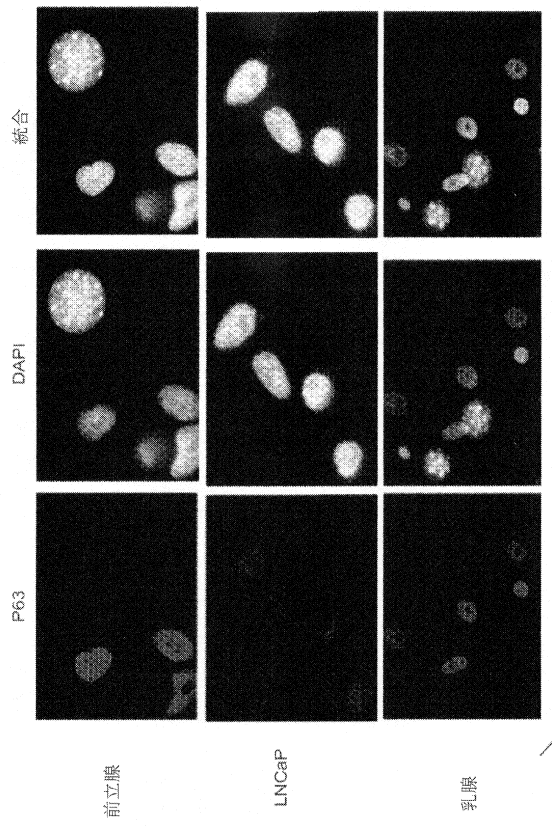
【図 3 A】



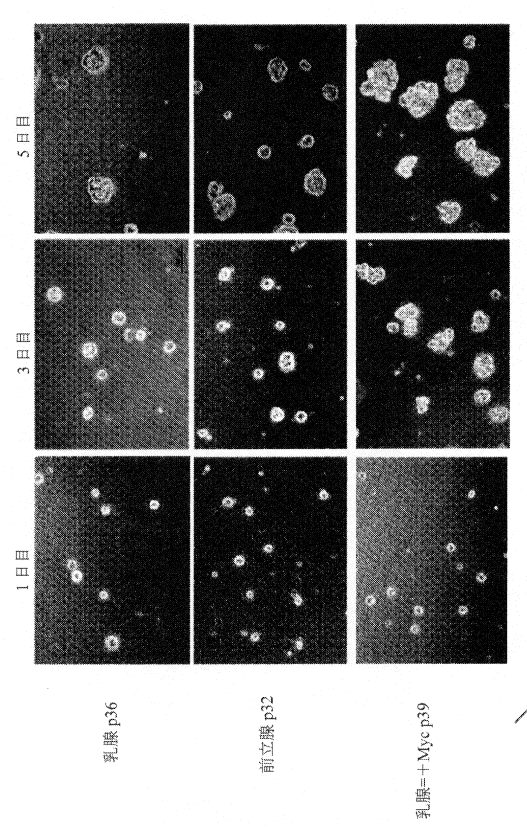
【図 3 B】



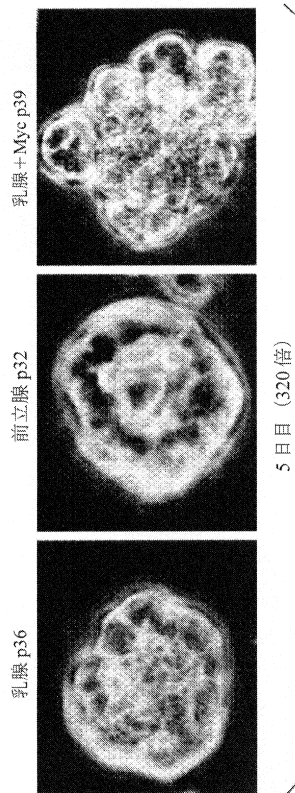
【図 4】



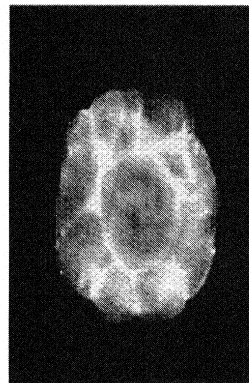
【図 5 A】



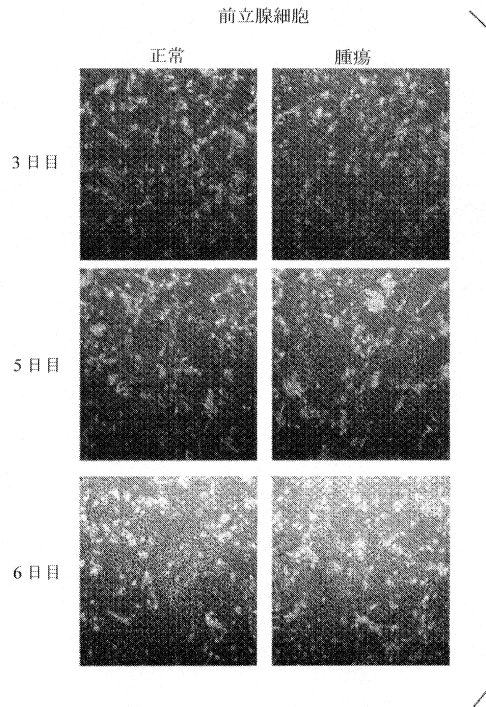
【図 5 B】



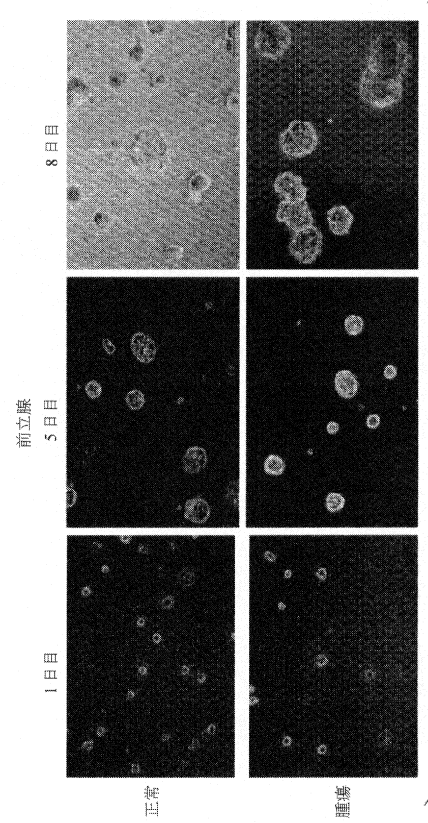
【図 5 C】



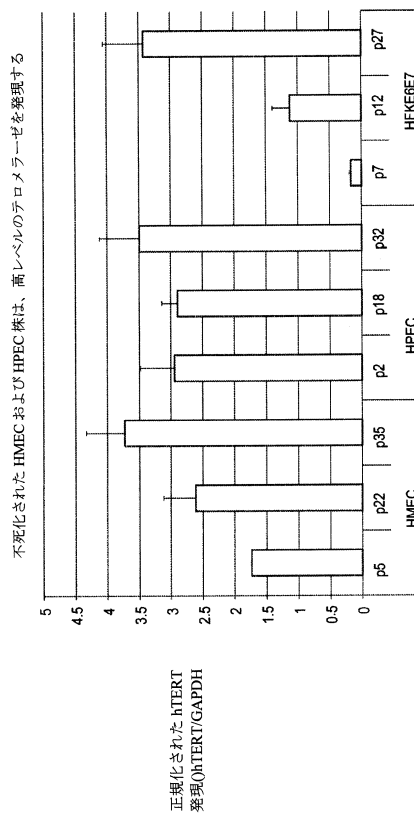
【図 6 A】



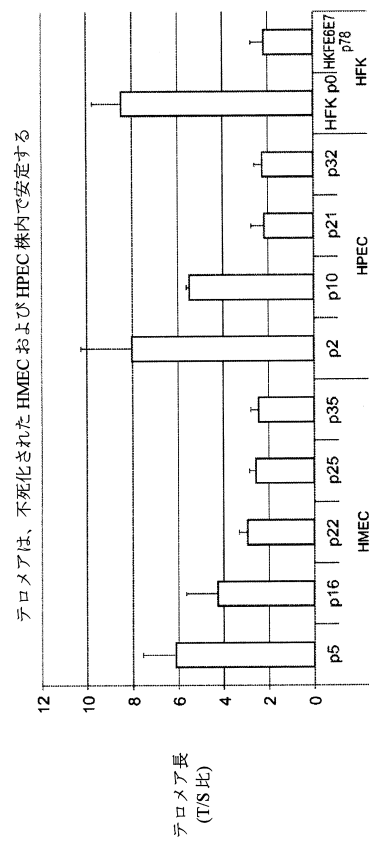
【図 6 B】



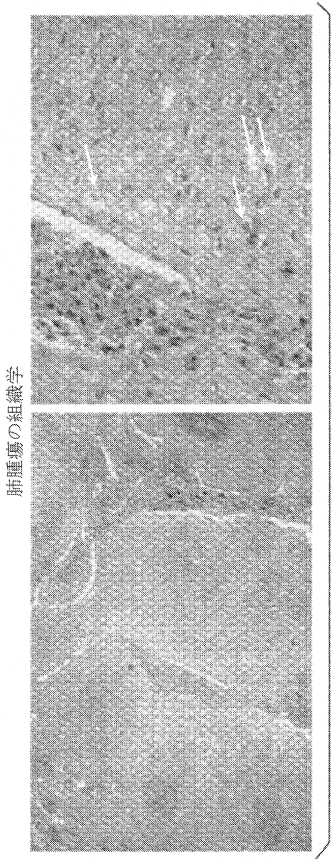
【図 7 A】



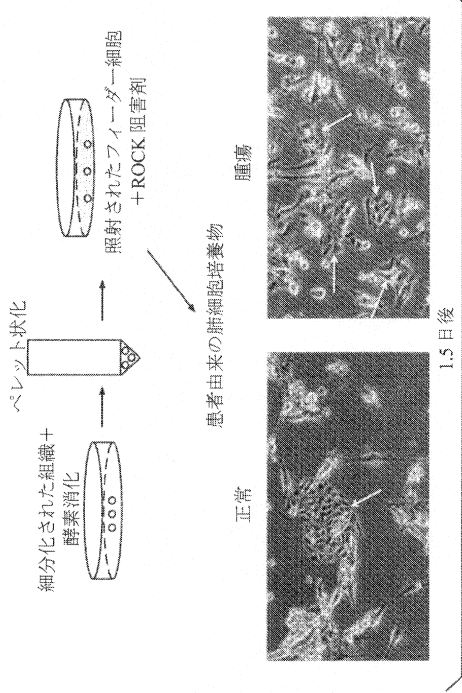
【図 7 B】



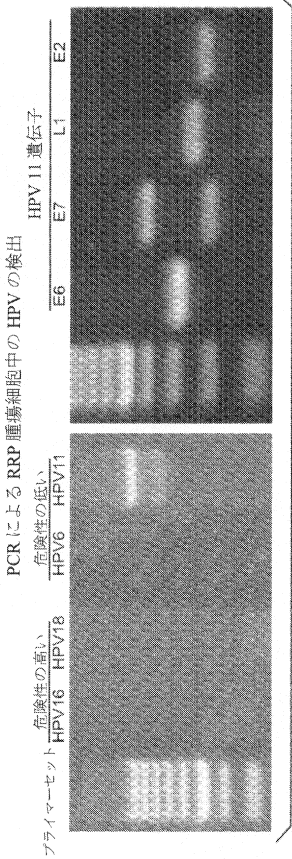
【図 1 2】



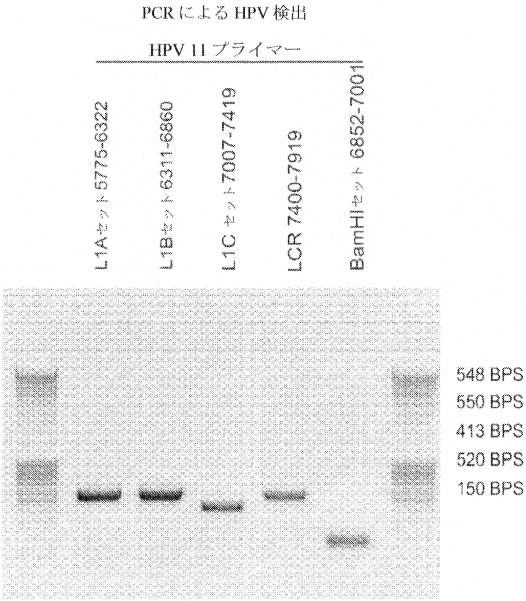
【図 1 3】



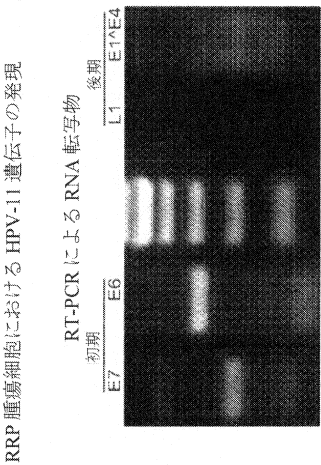
【図 1 4】



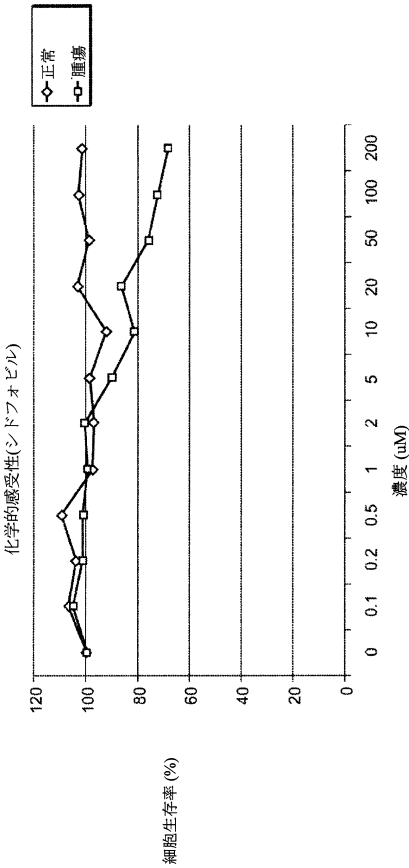
【図 1 5】



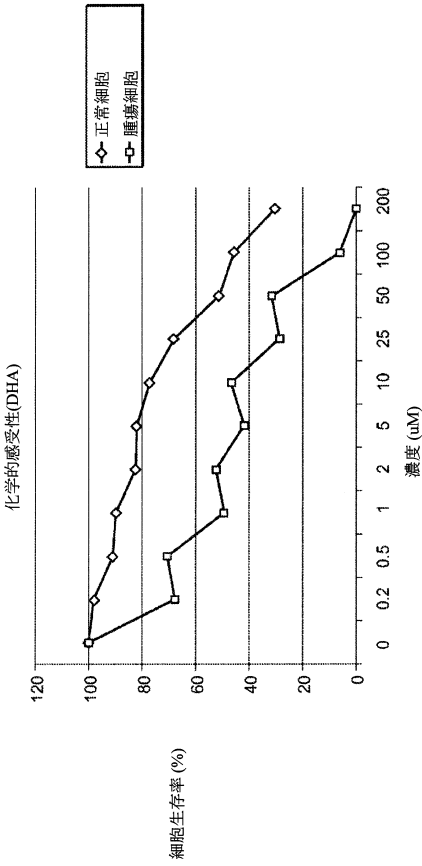
【図 1 6】



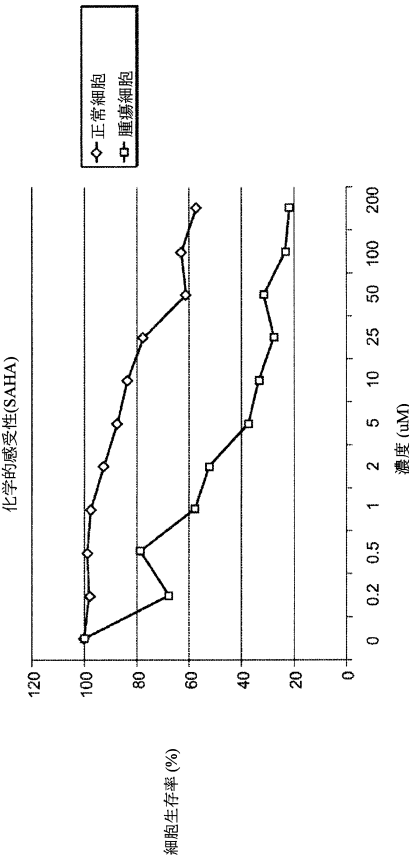
【図 1 7 A】



【図 1 7 B】

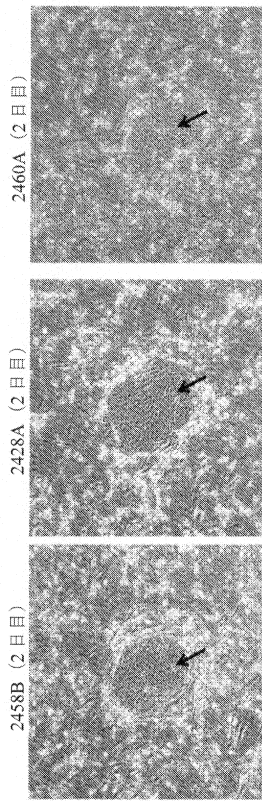


【図 1 7 C】

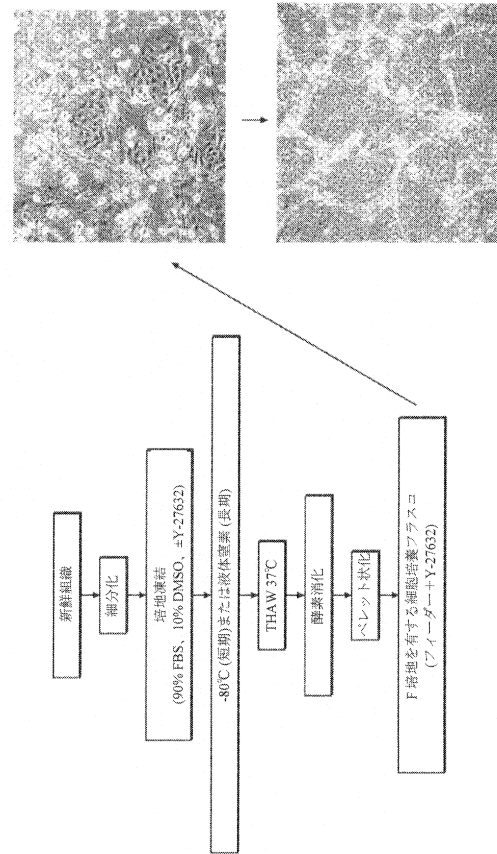


【図 18】

3つの異なるラット乳房腫瘍由来の
単一針生検由来の細胞の拡大

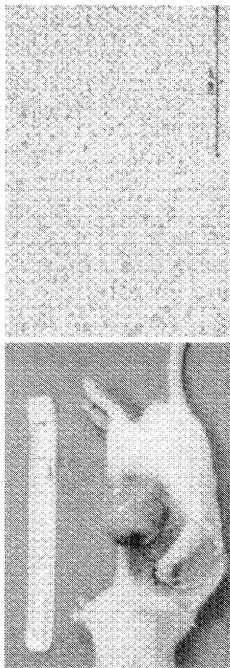


【図 19】

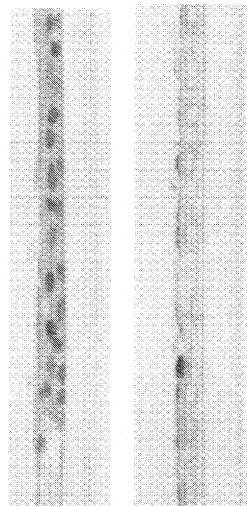


【図 20】

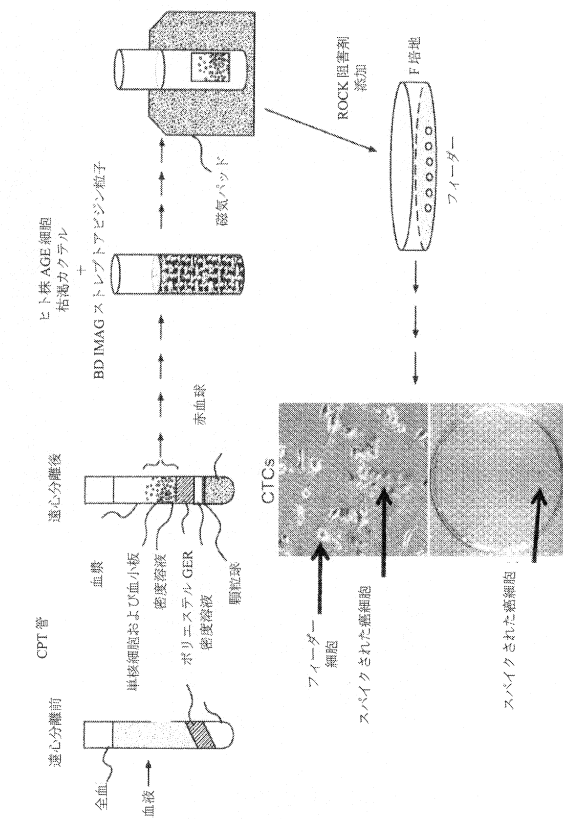
正常	腫瘍
部位	腫瘍形成
10	0
10	7



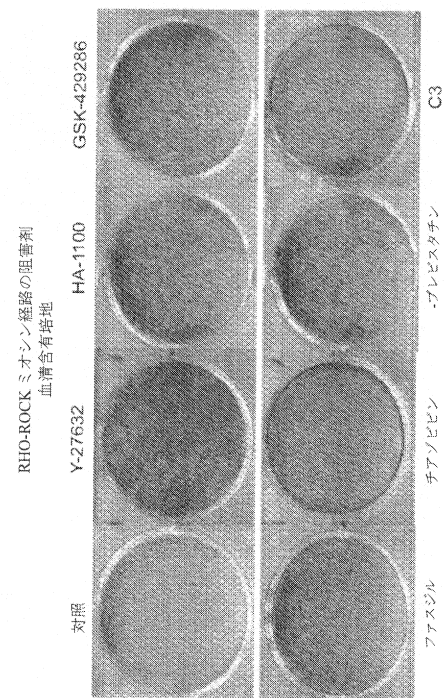
【図 21】



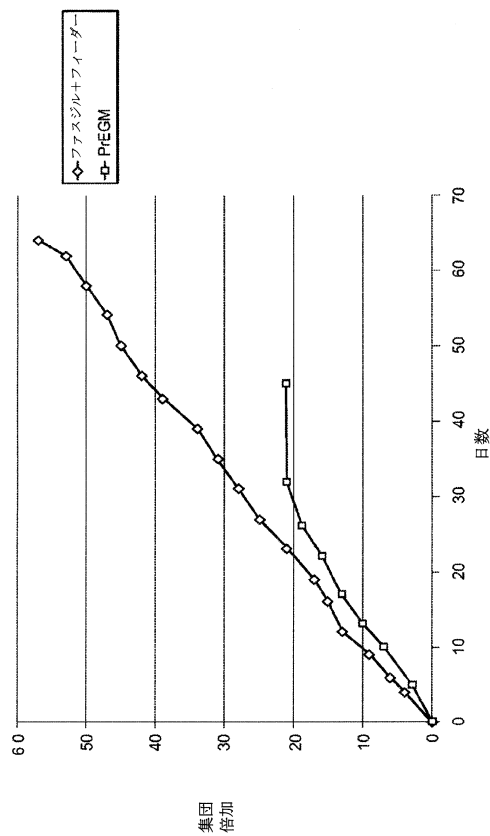
【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】



【配列表】

0006076258000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 11/00 (2006.01) A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00
 C 1 2 N 1/00 (2006.01) C 1 2 N 1/00 F

(72)発明者 リュウ シュエフォン
 アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州 ゲイザースバーグ ペブル ヒル レーン 1 4
 4 3 0

審査官 大久保 智之

(56)参考文献 米国特許出願公開第2 0 1 0 / 0 0 1 6 3 2 9 (U S , A 1)
 MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 1 9 9 0年, 10, 10, 5365-5377
 Laboratory Investigation, 2 0 0 7年, 87, 1149-1158
 Kobe Journal of Medical Sciences , 2 0 0 7年, 53, 3, 125-134
 The American Journal of Pathology, 2 0 1 2年 2月, 180, 2, 599-607

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
 C 1 2 N 5 / 0 0
 C 1 2 N 1 / 0 0
 C 1 2 Q 1 / 0 0
 A 6 1 K 3 5 / 0 0
 A 6 1 P 1 1 / 0 0
 A 6 1 P 3 5 / 0 0
 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 / W P I D S (S T N)