

(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
2018年9月20日(20.09.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/169094 A1

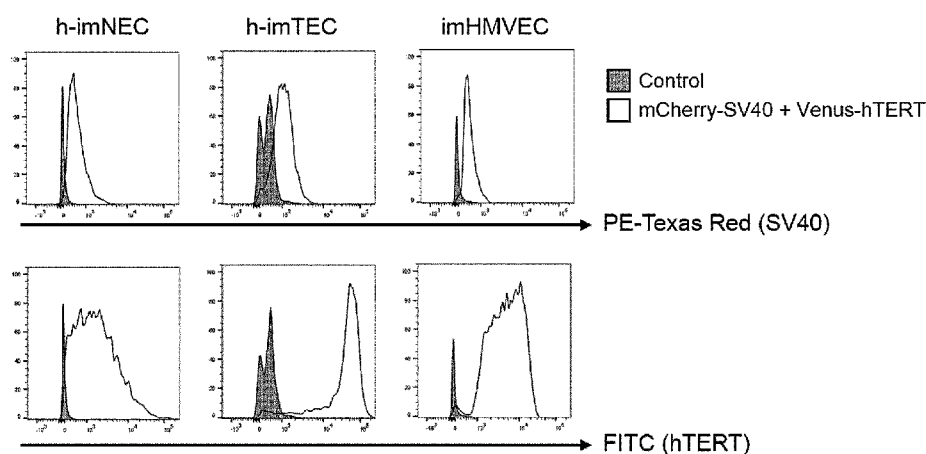
- (51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) *C12N 5/09* (2010.01)
C12Q 1/02 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/010735
- (22) 国際出願日: 2018年3月19日(19.03.2018)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2017-052042 2017年3月17日(17.03.2017) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人北海道大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808

北海道札幌市北区北8条西5丁目 Hokkaido (JP).

- (72) 発明者: 樋田 京子(HIDA Kyoko); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 樋田 泰浩(HIDA Yasuhiro); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 間石 奈湖(MAISHI Nako); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 菊地 央(KIKUCHI Hiroshi); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 大場 雄介(OHBA Yusuke); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP).

(54) Title: METHOD FOR CREATING IMMORTALIZED HUMAN-DERIVED TUMOR VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS, AND IMMORTALIZED HUMAN-DERIVED TUMOR VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS

(54) 発明の名称: 不死化したヒト由来腫瘍血管内皮細胞の樹立方法及び不死化したヒト由来腫瘍血管内皮細胞



(57) Abstract: [Problem] An objective of the present invention is to obtain immortalized human-derived tumor vascular endothelial cells which are useful in cell based experiments such as compound screening. [Solution] The present invention pertains to a method for creating a strain of immortalized tumor vascular endothelial cells by: performing cellular separation by cellular separation using magnetic beads and optionally selected flow cytometry on a cell suspension derived from tumor tissue comprising tumor vascular endothelial cells, thereby separating a cell group comprising CD31-positive cells; then combining subculturing of the separated cell group and flow cytometry to re-separate a cell group comprising CD31-positive cells; transforming the cell group by using a viral vector that can express SV40T genes, hTERT genes, and genes capable of coding fluorescent protein; and combining subculturing and flow cytometry to isolate transformed cells. The present invention makes it possible to stably provide large quantities of tumor vascular endothelial cells useful for the screening of drugs and for the development of pharmaceuticals specifically for tumor vascular endothelial cells.



(74) 代理人: 特許業務法人 I P アシスト 特許事務所(IP-ASSIST PATENT OFFICE); 〒0600002
北海道札幌市中央区北 2 条西 3 丁目 1 番地
太陽生命札幌ビル 7 階 Hokkaido (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (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, 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).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 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))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(57) 要約: 【課題】 本発明は、化合物スクリーニングなどの細胞ベースの実験に有用な不死化したヒト由来腫瘍血管内皮細胞を取得することを目的とするものである。【解決手段】 本発明は、腫瘍血管内皮細胞を含む腫瘍組織由来の細胞懸濁液に対して磁気ビーズを用いた細胞分離、及び任意選択のフローサイトメトリーによる細胞分離を行ってCD31陽性細胞を含む細胞群を分離し、さらに分離した細胞群の継代培養とフローサイトメトリーとを組み合わせることでCD31陽性細胞を含む細胞群を再分離し、SV40T遺伝子、hTERT遺伝子及び蛍光タンパク質をコードする遺伝子を発現可能に有するウイルスベクターで形質転換し、継代培養とフローサイトメトリーを組み合わせることで形質転換細胞を選抜することを含む、不死化腫瘍血管内皮細胞株を樹立する方法に関する。本発明によれば、腫瘍血管内皮細胞に特異的な薬剤のスクリーニング又は医薬の開発に有用な腫瘍血管内皮細胞を安定的かつ大量に提供することが可能となる。

明 細 書

発明の名称：

不死化したヒト由来腫瘍血管内皮細胞の樹立方法及び不死化したヒト由来腫瘍血管内皮細胞

技術分野

[0001] 本発明は、不死化したヒト由来腫瘍血管内皮細胞の樹立方法及び不死化したヒト由来腫瘍血管内皮細胞に関する。

背景技術

[0002] 腫瘍の治療法として現在広く用いられているものの多くは、がん細胞が他の正常細胞に比べて分裂や増殖が活発であるという性質を利用してがん細胞の増殖を抑制するものである。しかし、これらの治療法は正常組織でも分裂が活発な組織（毛根や骨髄など）にも作用するため、脱毛や骨髄抑制といった副作用が問題となっている。

[0003] 一方、腫瘍組織内のがん細胞等の増殖に不可欠な新生血管を標的とする血管新生阻害療法が近年では広く行われている。悪性腫瘍が増殖する際には、がん細胞の増殖に必要な栄養や酸素を得るために、がん細胞が自ら血管新生因子を分泌して、血管新生を誘導する。また、腫瘍組織内の血管は、悪性腫瘍が他の臓器や部位へ転移する場合にも使われるため、血管を標的とした治療法は、増殖抑制のみならず転移の抑制にもつながる。

[0004] 近年、vascular endothelial growth factor（VEGF）中和抗体に代表される血管新生阻害療法が様々な腫瘍の治療に用いられており、生存率が向上している。しかし、VEGFは正常組織における生理的な血管新生にも重要な分子であることから、VEGF阻害による高血圧や創傷治癒遅延等の他、ときに消化管出血や喀血など重篤な副作用が問題となり得る。その背景として、現存の血管新生阻害剤が開発された当時は、腫瘍血管は正常組織の血管と同じ性質であると考えられてきたことが挙げられる。

[0005] しかし、現在では腫瘍血管が正常血管とは形態的及び機能的に異なること、さらにその内側を構成する血管内皮細胞のレベルにおいても、腫瘍血管内皮細胞 (Tumor endothelial cell) は正常血管内皮細胞 (Normal endothelial cell) とは様々な点で異なることが知られている (非特許文献 1 及び 2)。血管新生阻害療法の副作用を最小限にし、より腫瘍血管に特異的な新しい血管新生阻害療法を開発するためには、腫瘍血管内皮細胞の特異性を利用した薬剤開発の必要性が認識されるようになってきた (例えば特許文献 1、特許文献 2)。

[0006] 新規薬剤の開発には、標的とする細胞を用いて化合物ライブラリを評価する Cell-based screening が一般的に行われている。数千、数十万に及ぶ多くの化合物を用いた網羅的な解析により、目的の細胞への阻害作用をもたらす物質を探し出す方法であるが、そのためには適切な細胞種と十分な細胞数の確保が必要である。特に、細胞の選択は非常に重要で、スクリーニングの成功に大きく影響を及ぼす。そのため、治療標的としてある疾患の病態を可能な限り in vitro で再現している細胞の確保が重要である。

[0007] 腫瘍血管内皮細胞に特異的な薬剤の開発のための、血管新生阻害活性をもつ化合物を同定するためには、腫瘍血管内皮細胞又はその形質を再現した細胞を用いてのスクリーニングが必要となる。しかし、腫瘍組織から分離できる腫瘍血管内皮細胞の収量は、腫瘍組織を単細胞化した集団のなかでわずかに 2% 足らずであり、初代培養である血管内皮細胞の大量培養には様々な限界がある。例えば、ヒトの手術摘出組織検体では、腫瘍の大きさにより、腫瘍血管内皮細胞の分取に用いることが可能な組織の量が限られている。また、組織からの分離の煩雑さ、培養にかかる高価な培地のコストなども問題となる。さらに、ヒト由来細胞の場合は、セネッセンス (老化) による増殖停止の課題があり、十分な細胞数の確保が困難となっている。一方、腫瘍血管由来の内皮細胞の特徴を備えながら不死化した細胞を取得したという報告は、これまでなされていない。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開WO 2011／16461号パンフレット

特許文献2：国際公開WO 2011／19065号パンフレット

非特許文献1：Br J Cancer. 106, 1214-23, 2012

非特許文献2：Br J Cancer. 109, 2237-2247, 2013

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、化合物スクリーニングなどの細胞ベースの実験に有用な不死化したヒト由来腫瘍血管内皮細胞株を取得することを目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、所定の条件下でヒト由来腫瘍血管内皮細胞の分離、培養を行い、Simian Virus 40 large Tをコードする遺伝子（以下、SV40T遺伝子と表す）及びヒトテロメア逆転写タンパク質をコードする遺伝子（以下、hTERT遺伝子と表す）を導入することで、ヒト腫瘍血管内皮細胞を効率的に不死化させることができることを見出し、以下の発明を完成させた。

[0011] (1) 腫瘍血管内皮細胞を含む腫瘍組織由来の細胞懸濁液に対して磁気ビーズを用いた細胞分離、及び任意選択のフローサイトメトリーによる細胞分離を行ってCD31陽性細胞を含む細胞群を分離する分離工程、

分離されたCD31陽性細胞を含む細胞群を継代培養する培養工程、

継代培養後の細胞群に対して、フローサイトメトリーを行ってCD31陽性細胞を含む細胞群を再分離することを1～2回繰り返す、任意選択の再分離工程、

培養工程又は再分離工程後の細胞群に、SV40T遺伝子、hTERT遺伝子及び蛍光タンパク質をコードする遺伝子を発現可能に有するウイルスベクターを感染させる感染工程、及び

感染した細胞群を継代培養し、次いで前記蛍光タンパク質を発現しているCD31陽性細胞群をフローサイトメトリーにより分離する細胞選抜工程を含む、不死化腫瘍血管内皮細胞株を樹立する方法。

(2) 培養工程において継代培養が1～7回行われる、(1)に記載の不死化腫瘍血管内皮細胞株を樹立する方法。

(3) 培養工程において継代時の培養基材からの細胞の剥離が複数回に分けて行われる、(1)又は(2)に記載の不死化腫瘍血管内皮細胞株を樹立する方法。

(4) 感染工程においてウイルスベクターを300～1200のMOIで感染させる、(1)～(3)のいずれか一項に記載の不死化腫瘍血管内皮細胞株を樹立する方法。

(5) 細胞選抜工程において継代培養が2～3回行われる、(1)～(4)のいずれか一項に記載の不死化腫瘍血管内皮細胞株を樹立する方法。

(6) SV40T遺伝子及びhTERT遺伝子を組換え遺伝子として有し、少なくとも50回以上の継代培養が可能な、不死化腫瘍血管内皮細胞株。

(7) ペリオスチン(Periostin)の発現が、SV40T遺伝子及びhTERT遺伝子を組換え遺伝子として有する不死化正常血管内皮細胞における発現と比較して亢進している、(6)に記載の不死化腫瘍血管内皮細胞株。

(8) さらにバイグリカン(Biglycan)及び／又はリジルオキシダーゼ(Lysyl oxidase)の発現が、SV40T遺伝子及びhTERT遺伝子を組換え遺伝子として有する不死化正常血管内皮細胞における発現と比較して亢進している、(7)に記載の不死化腫瘍血管内皮細胞株。

(9) ヒト腎癌組織由来である、(6)～(8)のいずれか一項に記載の不死化腫瘍血管内皮細胞株。

(10) 国際受託番号NITE BP-02424として寄託されている不死化ヒト腫瘍血管内皮細胞株。

(11) (6)～(10)のいずれか一項に記載の不死化腫瘍血管内皮細胞

株及び正常な血管内皮細胞に試験物質を接触させて各細胞の応答を比較する工程を含む、腫瘍血管内皮細胞に特異的に作用する物質をスクリーニングする方法。

(12) 正常血管内皮細胞が不死化された細胞株である、(11)に記載のスクリーニング方法。

(13) 不死化腫瘍血管内皮細胞株が国際受託番号NITE BP-02424として寄託されている不死化ヒト腫瘍血管内皮細胞株であり、不死化された正常な血管内皮細胞が国際受託番号NITE BP-02425として寄託されている不死化ヒト正常血管内皮細胞株である、(12)に記載のスクリーニング方法。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、腫瘍組織由来の腫瘍血管内皮細胞から少なくとも50回以上の継代培養が可能な不死化細胞株を樹立することができ、腫瘍血管内皮細胞に特異的な薬剤のスクリーニング又は医薬の開発に対して、必要量の腫瘍血管内皮細胞を安定的かつ大量に提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]SV40T遺伝子及びhTERT遺伝子を有するウイルスベクターが導入された腫瘍血管内皮細胞(h-i mTEC)及び正常腎組織由来血管内皮細胞(h-i mNEC)におけるVenus及びmCherryの発現を示すフローサイトメトリのヒストグラムである。ヒト皮膚微小血管内皮細胞株(i mHMEC)はSV40T遺伝子及びhTERT遺伝子の導入により不死化したヒト皮膚微小血管内皮細胞である。

[図2]h-i mTEC及びh-i mNECにおけるSV40T遺伝子及びhTERT遺伝子の発現をPCRで確認した結果を示すゲル写真である。ヒト皮膚微小血管内皮細胞(HMEC)はネガティブコントロール、i mHMEC及びマウス臍島血管内皮細胞(MS-1)はポジティブコントロールである。

[図3]h-i mTEC、h-i mNEC及びHMECの細胞集団倍加数(P

opulation doubling)を示すグラフである。

[図4] h-imTEC (P57)、h-imNEC (P58)、imHMVEC (P57) 及び HMVEC (P13) を老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼで染色したときの顕微鏡写真である (スケールバー=100 μ m)。HMVECはポジティブコントロールである。

[図5] 腫瘍血管内皮細胞 (h-TEC)、h-imTEC、正常血管内皮細胞 (h-NEC)、h-imNEC、imHMVEC 及び HMVEC の外観を示す顕微鏡写真である (スケールバー=100 μ m)。

[図6] h-imTEC、h-imNEC、imHMVEC 及び HMVEC における CD31 及び CD144 の発現を Regular-PCR で確認した結果を示すゲル写真である。HMVECはポジティブコントロールである。

[図7] Matrigel (登録商標) を用いた Tube formation assay による h-imTEC、h-imNEC、imHMVEC 及び HMVEC の管腔形成能を示す顕微鏡写真である (スケールバー=100 μ m)。HMVECはポジティブコントロールである。

[図8] Soft agar assay による h-imTEC 及び h-imNEC の足場依存性を示す顕微鏡写真である (スケールバー=100 μ m)。ヒトメラノーマ細胞 A375 SM はポジティブコントロールである。

[図9] h-imTEC、h-imNEC 及び imHMVEC における Biglycan (パネルA) 及び Lysyl oxidase (パネルB) の発現を Real-time PCR で測定した結果を示すグラフである。

[図10] MTS assay による h-imTEC 及び h-imNEC の細胞増殖能の比較を示すグラフである。

[図11] Scratch assay による h-imTEC 及び h-imNEC の細胞遊走能を示す顕微鏡写真である (スケールバー=100 μ m)。

[図12] h-imTEC、h-imNEC 及び imHMVEC における Periostin の発現を Real-time PCR で測定した結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明の第1の態様は、腫瘍血管内皮細胞を含む腫瘍組織由来の細胞懸濁液に対して磁気ビーズを用いた細胞分離、及び任意選択のフローサイトメトリーによる細胞分離を行ってCD31陽性細胞を含む細胞群を分離する分離工程、

分離されたCD31陽性細胞を含む細胞群を継代培養する培養工程、

継代培養後の細胞群に対して、フローサイトメトリーを行ってCD31陽性細胞を含む細胞群を再分離することを1～2回繰り返す、任意選択の再分離工程、

培養工程又は再分離工程後の細胞群に、SV40T遺伝子、hTERT遺伝子及び蛍光タンパク質をコードする遺伝子を発現可能に有するウイルスベクターを感染させる感染工程、

感染した細胞群を継代培養し、次いで前記蛍光タンパク質を発現しているCD31陽性細胞群をフローサイトメトリーにより分離する細胞選抜工程を含む不死化腫瘍血管内皮細胞株を樹立する方法に関する。

[0015] 本発明の第1の態様は、腫瘍血管内皮細胞を含む腫瘍組織由来の細胞懸濁液に対して磁気ビーズを用いた細胞分離、及び任意選択のフローサイトメトリーによる細胞分離を行ってCD31陽性細胞を含む細胞群を分離する分離工程を含む。本工程における腫瘍血管内皮細胞を含む腫瘍組織由来の細胞懸濁液は、Hidaら(Hida et al Cancer Res., 2004, 64, pp. 8249-8255; 本文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)の方法に準拠して行うことができる。具体的には、臨床的にがんと診断された患者から採取された腫瘍組織を細切し、コラゲナーゼ処理を行って単細胞化することで細胞懸濁液を調製することができる。細胞懸濁液は、溶血剤で処理することで赤血球その他の血液細胞の混入を防止しておくことが好ましい。

[0016] 本発明の第1の態様では、CD31陰性細胞の混入を抑制するために、コラゲナーゼ処理等を行って得られた細胞懸濁液に対して抗CD31抗体を担

持させた磁気ビーズを用いたCD31陽性細胞の分離が行われる。CD31抗原は、Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1)とも呼ばれ、分子量140kDaの単鎖膜糖タンパクで、血管内皮細胞において発現している細胞表面抗原の一つである。磁気ビーズを用いた細胞分離操作は、当業者に広く知られ、又は汎用されている方法にしたがって行えばよく、またMilteny Biotec社のCD31マクロビーズキット (<http://www.miltenybiotec.co.jp/ja-jp/products-and-services/macscell-separation/cell-separation-reagents/endothelial-cells/cd31-microbead-kit-human.aspx>)等の市販のキットを利用するときは、製造業者のプロトコールに従って行えばよい。

[0017] 分離工程におけるフローサイトメトリーは、前記細胞懸濁液に対して、CD31陽性を指標として、任意選択として行われる。本分離工程におけるフローサイトメトリーは、市販のフローサイトメーターを利用して行うことができるが、その際の操作条件は、処理される細胞群の細胞数を500個/秒以下、好ましくは100～300個/秒とし、流速を1～2mL/時とすることが好ましい。この操作条件によって、フローサイトメトリー内でCD31陽性細胞が分離されるポイントを流れる細胞数を低くし、分離時の血管内皮細胞以外の細胞の混入を抑制することができる。本工程におけるフローサイトメトリーは、磁気ビーズを用いた細胞分離後の細胞群におけるCD31陽性細胞の含有率が80%以上である場合には行わなくともよい。また、分離工程で磁気ビーズ及びフローサイトメトリーによる分離を繰り返すと細胞生存率が著しく低下し培養可能な細胞を得ることが困難となるため、分離工程でのこれらの操作は1回ずつとすることが好ましい。

[0018] 本発明の第1の態様は、前記分離工程で分離されたCD31陽性細胞を含む細胞群を継代培養する培養工程を含む。培養は、適当な培養基材、例えばゼラチン及びフィブロネクチンでコーティングした培養皿を用い、EGM-2MV培地等の適当な培地中に行えばよい。培養工程における継代培養の回

数は、その後の再分離工程及び感染工程においてフローサイトメトリーによる細胞分離及び感染を適切に行うことができる程度まで細胞数を増加させることができ、かつ細胞老化を生じさせない範囲で適宜設定され、例えば1～10回、好ましくは1～7回行われる。

[0019] 本発明の第1の態様においては、各継代において細胞密度が8～9割に達したところで細胞を培養基材から剥離回収して、次の継代に移行させることが好ましい。また、培養基材からの細胞剥離は、5分間程度のトリプシン処理と浮遊した細胞の回収を行った後、剥離された細胞数及びその状態を確認して、剥離が不十分であった場合には前記トリプシン処理及び細胞回収を繰り返して行うことが好ましい。かかる工夫も、腫瘍血管内皮細胞以外の細胞の増殖を抑制し、また腫瘍血管内皮細胞へのダメージを低減するために有効である。

[0020] 本発明の第1の態様は、継代培養後の細胞群に対して、フローサイトメトリーを行ってCD31陽性細胞を含む細胞群を再分離することを1～2回繰り返す、任意選択の再分離工程を含む。繰り返しとは、継代培養後の細胞群に対してフローサイトメトリーを行って回収されたCD31陽性細胞群に対して、再びCD31陽性細胞を回収するためのフローサイトメトリーを1～2回行うことをいう。再分離工程は、分離工程後の細胞群のCD31陽性細胞の含有率が80%に満たない場合に行うことが好ましく、再分離によってCD31陽性細胞群の含有率を80%以上に高めることができる。フローサイトメトリーにおける操作条件は前記分離工程における操作条件と同じである。再分離工程においてフローサイトメトリーを1回行った後に得られた細胞数が少ない場合には、任意選択で1～5回の継代培養を行ってから、さらなるフローサイトメトリーを行ってもよい。なお、分離工程後のCD31陽性細胞の含有率が80%以上である場合には再分離工程は行わなくともよい。

[0021] 分離工程後の細胞群のCD31陽性細胞の含有率は50%に満たないことが多く、ウイルスベクターを感染させても、形質転換された腫瘍血管内皮細胞

胞を取得することが事実上できないことが、本発明者らによって確認された。推測ではあるが、腫瘍血管内皮細胞の増殖能は細胞懸濁液に混在する他の細胞のそれと比較すると低いことから、細胞群に含まれる腫瘍血管内皮細胞の割合が低いとウイルスベクターに感染した腫瘍血管内皮細胞の増殖が、混在する他の細胞の増殖によって駆逐されてしまうことが原因であると推察される。本発明の第1の態様における方法は、磁気ビーズによる細胞分離、フローサイトメトリーによる細胞分離、継代培養、及びフローサイトメトリーによる再分離を適宜組み合わせることによって、ウイルスベクターを感染させる細胞群におけるCD31陽性細胞の含有率を80%以上に高めることで、上記の問題を解消することを特徴の一つとする。

[0022] また、かかるCD31陽性細胞の含有率が高い細胞群に対して、老化が起る前にウイルスベクターを感染させることにより、老化が生じていないCD31陽性細胞を多く含有する細胞群を得ることができる。この細胞群に対して後述の細胞選抜工程を行うことにより、SV40T遺伝子及びhTERT遺伝子が導入されて形質転換したCD31陽性細胞の含有率が80%以上である、老化が生じていない細胞群の取得を可能にすることも、本発明の特徴である。

[0023] 本発明の第1の態様は、CD31陽性細胞の含有率が80%以上である培養工程又は再分離工程後の細胞群に、SV40T遺伝子、hTERT遺伝子及び蛍光タンパク質をコードする遺伝子を発現可能に有するウイルスベクターを感染させる感染工程を含む。SV40T遺伝子及びhTERT遺伝子はいずれも、生体から分離された非増殖性の初代細胞に遺伝子導入されることで、当該細胞にインビトロで実質上無限に増殖する能力を与える、すなわち当該細胞を不死化する遺伝子として、当業者に広く知られ、利用されている遺伝子である。また、蛍光タンパク質は、哺乳動物細胞内で発現することができ、その蛍光を指標としたフローサイトメトリーによって蛍光タンパク質が発現している細胞を分離することを可能にするものであれば、特に制限はない。蛍光タンパク質の例としては、GFP、CFP、EGFP、YFP、

D s R e d、m C h e r r y 及び V e n u s 等を挙げることができる。これら蛍光タンパク質をコードする遺伝子は、市販の蛍光タンパク質発現ベクターから適宜組み換えて使用することができる。

[0024] ウイルスベクターは、S V 4 0 T 遺伝子、h T E R T 遺伝子及び蛍光タンパク質をコードする遺伝子を発現可能に導入することのできるものであれば、その種類に特に制限はない。本発明で使用するウイルスベクターとしては、組換え型レトロウイルスベクター、組換え型アデノウイルスベクター、組換え型アデノ随伴ウイルスベクターなどを挙げることができる。上記の中でも好ましくは組換え型レトロウイルスベクターであり、特に好ましくは組換え型レンチウイルスベクターである。

[0025] 組み換えウイルスベクターの作製は、ウイルスのパッケージングに必要なタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも1つを欠損している組換えウイルスベクタープラスミドと、該欠損するタンパク質を補給できる任意のパッケージング細胞とを用いることで、調製することができる。例えばヒト腎臓由来のH E K 2 9 3 細胞、マウス線維芽細胞N I H 3 T 3 等が、パッケージング細胞として利用される。

[0026] パッケージング細胞へのウイルスベクタープラスミドの導入法は特に限定されず、リン酸カルシウム法、リポフェクション法又はエレクトロポレーション法等の公知の遺伝子導入法で行うことができる。本発明におけるウイルスベクターの作製は、組換え型ウイルスベクターの構築、パッケージング及び遺伝子導入操作を含め、当業者の通常の実施能力の範囲で行うことができる。

[0027] 本発明の第1の態様において好ましいウイルスベクターは、例えばR P L s i n - S V 4 0 T a n t i g e n - I R E S - m C h e r r y (a d d g e n e) 及びC S I I - C M V - h T E R T - I R E S 2 - V e n u s (R I K E N B R C) 等のような、S V 4 0 T 遺伝子及びh T E R T 遺伝子並びに蛍光タンパク質をコードする遺伝子を有する組換え型レンチウイルスベクターである。

[0028] 本発明の第1の態様にかかる感染工程では、ウイルスベクターを300～1200の、好ましくは500～1000のMOI (Multiplicity of Infection) で感染させることが好ましい。上記以外のMOIでは、細胞傷害を起こしたり、感染効率が低下したりする傾向が認められる。また感染時間については、6時間だと導入効率が低くなる傾向が、また24時間だと細胞傷害が大きくなる傾向が認められることから、概ね10～14時間、特に12時間とすることが好ましい。

[0029] 本発明の第1の態様は、感染した細胞群を継代培養し、次いで前記蛍光タンパク質を発現しているCD31陽性細胞群をフローサイトメトリーにより分離する細胞選抜工程を含む。本工程における継代培養の培地、細胞密度の調節、トリプシン処理による細胞剥離操作は、前記培養工程と同様にして行うことが好ましく、フローサイトメトリーにおける操作条件も、前記分離工程における操作条件と同様にして行うことが好ましい。本工程における継代培養の回数は、フローサイトメトリーによる細胞分離を適切に行うことができる程度まで細胞数を増加させることができる範囲で適宜設定され、例えば1～5回、好ましくは2～3回行われる。この細胞選抜工程によって、SV40T遺伝子及びhTERT遺伝子が導入されて形質転換したCD31陽性細胞の含有率が80%以上である細胞群を得ることができる。

[0030] 以上の工程を経ることによって調製される形質転換細胞について、適当な培地中での細胞の増殖能の確認、及び細胞の形態学的特徴、特徴的な遺伝子の発現、その他細胞生物学的な特徴を確認することで不死化した腫瘍血管内皮細胞株の樹立を確認することができる。

[0031] 本態様にかかる方法で樹立される細胞株は、EGM-2MV培地中で増殖し、少なくとも50代、又は適切な培養条件下ではそれ以上継代培養が可能な能力を有し、その間において細胞の老化は実質的に観察されないという性質を有する。

[0032] また前記細胞株は、血管内皮細胞のマーカーとされているCD31及びCD144を安定的に発現し、血管内皮細胞が一般的に有する管腔形成能も有

しているとともに、別に樹立した正常組織由来の正常血管内皮細胞を不死化した細胞と比較して、増殖速度及び遊走能がいずれも高く、バイグリカン（*Biglycan*）や*Lysyl oxidase* の発現が亢進しているなどの、腫瘍血管内皮細胞としての特徴（非特許文献 1 及び 2）も併せ持っている細胞である。

[0033] 以上のように、本発明の第 1 の態様である方法で樹立される細胞株は、不死化腫瘍血管内皮細胞と結論付けることができる。本発明の第 1 の態様は、前記各工程を含む、不死化腫瘍血管内皮細胞の製造方法と表すこともできる。

[0034] 本発明の第 2 の態様は、SV40T 遺伝子及び hTERT 遺伝子を組換え遺伝子として有し、少なくとも 50 回以上の継代培養が可能な、不死化腫瘍血管内皮細胞株に関する。

[0035] かかる細胞株は、前記第 1 の態様にかかる本発明の方法によって製造することができる。本態様にかかる細胞は、適当な培地中で増殖し、少なくとも 50 回、又は適切な培養条件下ではそれ以上の継代培養が可能な能力を有し、その間において細胞の老化は事実上観察されないという性質を有する他、血管内皮細胞のマーカーとされている CD31 及び CD144 を安定的に発現し、血管内皮細胞が一般的に有する管腔形成能も有しており、さらに増殖速度及び遊走能が高い等の血管内皮細胞としての性質を備えている。さらに、好ましくは *Periostin* の発現が不死化正常血管内皮細胞よりも亢進している、より好ましくは *Periostin* に加えて *Biglycan* 又は *Lysyl oxidase* の発現が不死化正常血管内皮細胞よりも亢進している、さらにより好ましくは *Periostin*、*Biglycan* 及び *Lysyl oxidase* の発現が不死化正常血管内皮細胞よりも亢進しているなどの特徴を有する。

[0036] 本態様の不死化腫瘍血管内皮細胞株は、以下の（１）～（６）の特徴を有する不死化腫瘍血管内皮細胞株と表すことができる。

（１）SV40T 遺伝子及び hTERT 遺伝子を組換え遺伝子として有する

- (2) 少なくとも50回以上の継代培養が可能である
- (3) Matrigel (登録商標) を用いた tube formation assay において管腔形成能を示す
- (4) Biglycan の発現が亢進している
- (5) Lysyl oxidase の発現が亢進している
- (6) Periostin の発現が亢進している

[0037] Biglycan、Lysyl oxidase、又は Periostin の発現が亢進しているとは、当該不死化腫瘍血管内皮細胞株におけるこれらの遺伝子又はタンパク質の発現量が、不死化正常血管内皮細胞におけるこれらの遺伝子又はタンパク質の発現量と比較して多いことを意味する。

[0038] 発現量の比較対象として用いられる不死化正常血管内皮細胞は、不死化腫瘍血管内皮細胞株と同じ組織に由来するものであることが好ましいが市販の不死化正常血管内皮細胞 (imHMEC) でもよい。また、不死化正常血管内皮細胞は過度の継代により遺伝子発現等の性質が変化することがあるため、比較対象として用いられる不死化正常血管内皮細胞は、継代回数の少ないものであることが好ましい。

[0039] Biglycan、Lysyl oxidase 又は Periostin の遺伝子又はタンパク質の発現量の測定は、塩基配列又はアミノ酸配列が公知である遺伝子又はタンパク質の発現量を測定することが可能な、当業者に公知の各種方法を採用して行うことができる。典型的な方法は、Biglycan、Lysyl oxidase 又は Periostin の遺伝子の公知の塩基配列を元にして設計した塩基配列からなる核酸をプライマーとして用いる PCR 法、特にリアルタイム PCR 法、DNA microarray 法、及び上記因子タンパク質に特異的な抗体を用いる免疫学的方法、特に ELISA である。

[0040] 本発明者らは、事前同意を得た腎癌患者から摘出された腎臓の腫瘍部位から腫瘍血管内皮細胞を、同じ腎臓の正常部位から正常な血管内皮細胞を、それぞれ分離し、前述の第1の態様にかかる方法を適用して、不死化腫瘍血管

内皮細胞株及び不死化正常血管内皮細胞株を樹立した。さらに各細胞株を、日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室 独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに、2017年2月16日付で、不死化腫瘍血管内皮細胞株を受託番号NITE P-02424（識別の表示：h-imTEC_RCC01）として、正常血管内皮細胞株を受託番号NITE P-02425（識別の表示：h-imNEC_RCC01）として、それぞれ国内寄託した。また、上記各細胞株を、日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室 独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターを国際寄託機関として、2018年1月30日付けで国際寄託への移管請求を行い、不死化腫瘍血管内皮細胞株を受託番号NITE BP-02424（識別の表示：h-imTEC_RCC01）として、正常血管内皮細胞株を受託番号NITE BP-02425（識別の表示：h-imNEC_RCC01）として、それぞれ国際寄託した。

[0041] 本発明の第3の態様は、前記国際受託番号NITE BP-02424（識別の表示：h-imTEC_RCC01）として、国際寄託機関である独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに国際寄託された不死化腫瘍血管内皮細胞株に関する。

[0042] 不死化腫瘍血管内皮細胞株は、インビトロで事実上無限に増殖することができることから、腫瘍血管に特異的な新しい血管新生阻害療法の開発、特に腫瘍血管内皮細胞に対する特異的な薬剤開発において必要となる腫瘍血管内皮細胞を、安定的にかつ大量に供給することを可能にするものであり、同細胞株を用いたCell-based screeningに利用することができる。例えば、不死化腫瘍血管内皮細胞株と、正常な血管内皮細胞、特に不死化された正常血管内皮細胞とに試験物質を接触させたときの細胞の応答、典型的には試験物質を含む適当な培地中で各細胞を培養したときの細胞の形態変化、増殖能の変化、生化学反応、アポトーシスの誘導、遺伝子発現等の変動等を比較することで、腫瘍血管内皮細胞に特異的に作用する物質をスクリーニングすることが可能となる。

[0043] 特に、同一個体すなわち一患者の同一の臓器から分離された腫瘍血管内皮細胞と正常な血管内皮細胞それぞれから樹立される不死化細胞株は、同一の遺伝子背景を有する株化細胞の組み合わせとして、血管新生阻害療法の開発又は腫瘍血管内皮細胞に対する特異的な薬剤のスクリーニング又は開発において有用な研究材料となり得る。本発明は、不死化腫瘍血管内皮細胞株及び正常な血管内皮細胞に試験物質を接触させて各細胞の応答を比較する工程を含む、腫瘍血管内皮細胞に特異的に作用する物質をスクリーニングする方法を、第4の態様として提供するものである。特に正常な血管内皮細胞は不死化された細胞株であることが好ましく、したがって前記2種の寄託細胞株の組み合わせは、本発明に係るスクリーニング方法において有用な細胞株として利用することができる。

[0044] 例えば、適当な培地で増殖中の前記2種の寄託細胞株に対して試験物質を添加したときの両細胞の応答を比較することで、不死化腫瘍血管内皮細胞株に特異的に作用してその増殖を抑制したり、アポトーシスを引き起こしたりすることができる物質を効率的に探索することが、またかかる探索をいわゆるハイスループット化することが可能となる。特に、不死化腫瘍血管内皮細胞株の増殖を特異的に抑制したり、アポトーシスを引き起こしたりすることのできる物質は、抗腫瘍剤又は腫瘍転移抑制剤として利用することができると期待される。

[0045] 以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。

実施例

[0046] 1) 血管内皮細胞の分離と培養

北海道大学の自主臨床研究に関する承認及びヒトを対象とする医学系研究に関する倫理指針の下、臨床的に腎癌と診断された患者から、術前の文書同意を得て、手術切除組織から腎癌組織及び正常腎組織を採取した。

[0047] 採取された各組織を外科用剪刀を用いてハンス緩衝液（HBSS：Gibco（登録商標） Thermo Fisher Scientific）中で細切後、50mLのコニカルチューブに移し、ⅠⅠ型コラゲナーゼ（

Collagenase Type 11: Gibco (登録商標) Thermo Fisher Scientific) と DNase I (Roche) を加え、37℃で1時間攪拌して細胞懸濁液を調製した。

[0048] 氷上にチューブを立て、非働化済みの牛胎仔血清 (FBS: Hyclone (登録商標) Thermo Fisher Scientific) を該細胞懸濁液と等量入れ、コラゲナーゼの作用を止めた。

[0049] 細胞懸濁液を別の新しい50mLチューブに100 μ mメッシュサイズのセルストレーナー (Falcon (登録商標)、Corning) を通して移動させた後、1,000rpm、4℃で5分間遠心して細胞を沈殿させた。2. 5% FBS 含有 HBSS で細胞を2回洗浄し、1,000rpm、4℃で5分間遠心後、上清を除去した。2. 5% FBS 含有 HBSS で懸濁後、別の新しい50mLチューブに70 μ mメッシュサイズのセルストレーナー (Falcon (登録商標)、Corning) を通して移動させた後、1,000rpm、4℃で5分間遠心して細胞を沈殿させた。

[0050] 上清を除去後、溶血剤 (Lysing Buffer: BD Biosciences) を20mL加えて懸濁し、室温で15分間反応させた。1,000rpm、4℃で5分間遠心後、MACS buffer (脱気した0.5% BSA、2mM EDTA 含有緩衝液: Miltenyi Biotec) で細胞を2回洗浄した。MACS Buffer で懸濁後、FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec) を加え、4℃で10分間反応させた。

[0051] 抗ヒトCD31磁気ビーズ (Anti-human CD31 MicroBeads: Miltenyi Biotec) を加え、4℃で30分間反応後、MACS Buffer で細胞を洗浄し、1,000rpm、4℃で5分間遠心した。LS Column (Miltenyi Biotec) をMACSマニュアル細胞分離装置のマグネットに設置し、MACS Buffer を3回加えてキャリブレーションした後、15mLチューブをカラムの下に設置した。

- [0052] MACS Bufferで懸濁した細胞懸濁液500 μ Lをカラムに加え、MACS Buffer 3mLで3回洗浄してCD31陰性細胞として回収した。カラムをマグネットから外し、5mLのMACS Bufferを加えてカラム内に残った磁気標識されたCD31陽性細胞を、付随しているシリンジによって物理的に別の15mLチューブに押し出して回収した。
- [0053] 回収した細胞群のCD31陽性率が80%未満である場合にはさらにフローサイトメトリーによる分離を行った。フローサイトメトリーによる分離操作において、溶液中の細胞数を300個/秒以下とし、さらに流速を下限（1mL/時）に設定することで、フローサイトメトリー内でCD31陽性細胞が分離されるポイントを流れる細胞数を下げ、血管内皮細胞以外の細胞の混入を回避しながら、CD31陽性細胞を分離した。
- [0054] このようにして回収した腎癌組織由来及び非癌部正常腎組織由来のCD31陽性細胞を、1.5%ゼラチン（SIGMA-ALDRICH）、10 μ g/mLのフィブロネクチン（Corning）でコーティングした培養皿を用い、15%FBSを含むEGM-2 MV培地（Lonza）中で、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベーターで1～2回継代培養し、感染工程へとすすんだ。
- [0055] 分離工程終了後のCD31陽性細胞の含有率が80%未満であった場合は前述の条件で1～7回継代培養した後に上記の条件で再度フローサイトメトリーによる再分離を行い、80%以上の純度のCD31陽性細胞である血管内皮細胞を分離した。
- [0056] 上記の継代培養において、混入しているがん細胞や線維芽細胞などの他の細胞に血管内皮細胞が駆逐されないように、細胞密度が8～9割のところまで継代した。また、細胞を培養皿から剥離するためのトリプシン処理について、トリプシン処理開始後5分でトリプシンをクエンチして剥がれた細胞を回収し、剥がれていない細胞が多く残存している場合には追加のトリプシン処理を行うなどして、剥離状態を観察しながら行った。
- [0057] 2) ウイルス液の調製

レンチウイルス発現ベクターとして、CSII-CMV-hTERT-IRES2-Venus（国立がんセンター研究所 増富健吉博士及び石井源一郎博士より供与）及びRPLsin-SV40 T antigen-IRES-mCherry（Addgene #58993）を使用した。レンチウイルス調製には、パッケージング用プラスミドとしてpCAG-HIVgp（理化学研究所バイオリソースセンター #RDB4394）及びpCMV-VSV-G-RSV-Rev（理化学研究所バイオリソースセンター #RDB4393）を、上記プラスミドと合わせて使用した。

[0058] サブコンフルエント状態のHEK293T細胞（理化学研究所 #RCB2202）を直径60mmのType Iコラーゲンコートディッシュ（IWAKI）に $1 \times 10^6 / 4 \text{ mL}$ 10%FBS含有DMEM/dish程度播種して約24時間培養し、サブコンフルエントにした。マイクロチューブにOPTI-MEM（Thermo Fisher Scientific）200 μL 、pCAG-HIVgp 2 μg 、pCMV-VSV-G-RSV-Rev 2 μg 、上記発現ベクター4 μg 、トランスフェクション試薬FuGENE（登録商標）HD Transfection Reagent（Roche）24 μL を混和し、15分間室温で静置してDNA溶液を調製した。

[0059] HEK293T細胞にDNA溶液を加えて12時間培養後、培養上清を吸引除去し、新鮮な10%FBS含有DMEMに交換してさらに48時間培養した。ウイルス含有培養上清を回収し、0.45 μm フィルター（Corning）を通して浮遊細胞等を除去後、6,000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で16時間遠心した。上清を除去し、EGM-2MV培地で懸濁して-80 $^{\circ}\text{C}$ に保存した。ウイルスのタイター（力価）は、qPCR Lentivirus Titration Kit（abm）を用いて測定した。

[0060] 3) 血管内皮細胞への遺伝子導入

1) で分離した血管内皮細胞をEGM-2MV培地を用いて30%コンフルエント程度に培養した後、MOI500~1000に調製した2) のウイ

ルス溶液を含むE G M－2 M V培地に交換して1 2時間感染させた。

[0061] 感染後、培養上清を吸引除去し、新鮮なE G M－2 M V培地に交換して血管内皮細胞を増殖させた。2～3回継代培養を行った後、V e n u s及びm C h e r r yの蛍光及びC D 3 1を指標としたF A C S A r i a l I Iによって陽性細胞のみを分離することで、ウイルスベクターが導入された血管内皮細胞（腎癌組織由来の細胞をh－i m T E C、非癌部正常腎組織由来の細胞をh－i m N E Cと表す）を選抜した。選抜後に2～5回継代培養し培養後のC D 3 1陽性率が8 0％に満たない場合にはF A C S A r i a l I Iによる再選抜を行った。m C h e r r y及びV e n u sの蛍光輝度を解析することで遺伝子導入された細胞の純度を確認した（図1）。

[0062] 4) S V 4 O、h T E R Tの発現確認

R e l i a P r e p R N A C e l l M i n i p r e p S y s t e m (P r o m e g a)を用いて、h－i m T E C及びh－i m N E Cからt o t a l R N Aを抽出した。1 μ gのR N AからR e v e r T r a A c e、R T B u f f e r (T o Y o B o)、O l i g o d T p r i m e r、R a n d o m p r i m e r (H o k k a i d o S y s t e m S c i e n c e)及びd N T P m i x t u r e (T a k a r a)を用いて逆転写反応を行い、c D N Aを合成した。使用したプライマーの配列を以下に示す。

[0063] S V 4 O :

forward 5' -GGTGGGTAAAGGAGCATGA-3' (配列番号1)

reverse 5' -CAACTCCAGCCATCCATTCT-3' (配列番号2)

h T E R T :

forward 5' -GCATCAGGGGCAAGTCCTAC-3' (配列番号3)

reverse 5' -CCAACAAGAAATCATCCACCAA-3' (配列番号4)

h u m a n G A P D H :

forward 5' -ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3' (配列番号5)

reverse 5' -GCCCAATACGACCAAATCC-3' (配列番号6)

[0064] PCRは、GoTaq（登録商標） Green Master Mix（Promega）を用いて、イニシャルインキュベーション（95℃ 2分）、熱変性（95℃ 30秒）、アニーリング（58℃ 20秒）、伸長反応（72℃ 60秒）を行い、内部標準にはGAPDHを用いた。2%アガロースゲル（Promega）を用いて増幅産物の電気泳動を行い、エチジウムブロマイド（SIGMA-ALDRICH）を使用して紫外線光下で各バンドを確認した。その結果、h-imTEC及びh-imNECにおいてSV40T、hTERTの発現が確認された（図2）。

[0065] 5) 継代数の確認

h-imTEC及びh-imNECを 5.0×10^3 個/ウェルの密度になるようEGM-2MV培地で調整して、それぞれ24ウェルプレートに播種した。2日間培養後に培地を交換し、さらに2日間培養した。Trypsin-EDTA溶液（SIGMA-ALDRICH）で細胞を回収し、細胞数をカウントした。Population doublingは、 $\text{Population doubling} = \log(\text{培養終了時の細胞数} / \text{培養開始時の細胞数}) / \log 2$ として算出した。

[0066] 4日ごとに細胞数を計測し、細胞集団倍加数を算出したところ、図3に示す通りh-imTEC及びh-imNECにおいて、継代数50（P50）を超えても細胞増殖の維持が確認された。遺伝子導入をしていない血管内皮細胞では、P15前後で細胞が増殖しなくなった。

[0067] 6) 細胞老化の回避

h-imTEC及びh-imNECをサブコンフルエントに培養後、培養上清を除去してPBSで洗浄した。Senescence Detection Kit（老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼ（senescence associated β -galactosidase: SA- β -Gal）活性を可視化するためのキット、Abcam）に付随しているFixative Solutionを添加して15分間室温で固定した。PBSで2回洗浄後、Kitに付随しているStaining Solution

M i x (X - G a l 含有) を用いて 37℃ で染色し、倒立顕微鏡で観察した (図 4) 。

[0068] H M V E C は継代数 13 で β - ガラクトシダーゼ染色が観察されたのに対し、h - i m T E C 及び h - i m N E C は継代数 58 で染色されず、老化現象が回避されていることが示唆された。

[0069] 7) 血管内皮細胞の形質維持

h - i m T E C 及び h - i m N E C の形態を顕微鏡で観察した写真を図 5 に示す。遺伝子導入前の形態と比較してやや細長くなったが、大きな変化は見られなかった。

[0070] 8) C D 3 1 及び C D 1 4 4 の発現

h - i m T E C 及び h - i m N E C に対して、下記のプライマーを用いた P C R を前記 4) と同じ条件で行い、血管内皮細胞のマーカーである C D 3 1 及び C D 1 4 4 の発現を解析した。

[0071] h u m a n C D 3 1 :

forward 5' -GACCAGGTGAAAGACTGAACC-3' (配列番号 7)

reverse 5' -TGCAGATATACGTCCCACTGTC-3' (配列番号 8)

h u m a n C D 1 4 4 :

forward 5' -CGTGTTCGCCATTGAGAGGC-3' (配列番号 9)

reverse 5' -ACGGACGCATTGAACAACCG-3' (配列番号 10)

[0072] h - i m T E C 及び h - i m N E C いずれも、C D 3 1 及び C D 1 4 4 の発現が認められた (図 6) 。

[0073] 9) 管腔形成能

96 ウェルプレートに Growth Factor Reduced Matrigel (登録商標) (Corning) でコーティングし、37℃ で 30 分間インキュベートした後、5% FBS 含有 EBM-2 (Lonza) で懸濁した h - i m T E C 及び h - i m N E C を 1.0×10^4 個/ウェルの密度で播種した。37℃ で 9 時間インキュベート後、管腔形成を倒立顕微鏡で観察した (図 7) 。

[0074] h-i m T E C 及び h-i m N E C いずれも管腔形成が認められ、S V 4 O T 抗原及び h T E R T 遺伝子の導入は血管内皮細胞としての性質に影響を及ぼさないことが示唆された。

[0075] 1 0) 足場依存性の確認

2% A g a r (B D) を予め温めておいた E G M - 2 M V 培地で希釈して 0. 9% A g a r を作製し、6 ウェルプレートに 1. 2 m L 添加し、室温でゲル化させて S o f t a g a r を作製した。h-i m T E C 及び h-i m N E C を E G M - 2 M V 培地で懸濁し、2% A g a r に混和して終濃度 0. 3 6 % になるよう調整し、S o f t a g a r の上に播き、3 7 ° C で 2 ~ 3 週間インキュベート後、倒立顕微鏡で細胞を観察した (図 8) 。

[0076] ポジティブコントロールであるがん細胞 A 3 7 5 S M は、S o f t a g a r 上でコロニーを形成するのに対し、h-i m T E C 及び h-i m N E C はいずれもコロニーを形成せず、足場依存性を有することが確認された。

[0077] 1 1) 遺伝子発現プロファイル

継代回数 9 と 1 3 の h-i m T E C 及び h-i m N E C に対して、K A P A S Y B R F a s t q P C R K i t (日本ジェネティクス) を用いて R e a l - t i m e P C R を行い、腫瘍血管内皮細胞マーカーとして報告されている B i g l y c a n (Y a m a m o t o e t a l . , B r . J . C a n c e r , 2 0 1 2 , M a i s h i e t a l . , S c i . R e p . , 2 0 1 6) 及び L y s y l o x i d a s e (O s a w a e t a l . , B r . J . C a n c e r , 2 0 1 3) の発現を確認した。使用したプライマーの配列を以下に示す。

[0078] h u m a n B i g l y c a n :

forward 5' -GGCCATCCATCCAGTTTGGCAACTAC-3' (配列番号 1 1)

reverse 5' -CTGGCTTAGCTTCCTGGCTCTG-3' (配列番号 1 2)

h u m a n L s y l o x i d a s e (L O X) :

forward 5' -CGACCCCTTACAACCCCTACA-3' (配列番号 1 3)

reverse 5' -CAGGTCTGGGCCTTTCATAA-3' (配列番号 1 4)

[0079] Real-time PCRは、イニシャルインキュベーション（95℃ 30秒）、熱変性（95℃ 1秒）、アニーリング（58℃ 5秒）、伸長反応（58℃）を40サイクル行い、CFX Manager（Bio-Rad）で増幅産物を定量した。内部標準にはGAPDHを用い、 ΔC_t 法により相対比を比較検討した（図9）。

[0080] 継代回数9のh-imTECのBiglycan発現はh-imNECより約20倍高かった。また、Lysyl oxidaseの発現もh-imNECよりもh-imTECにおいて有意に亢進していた。

[0081] 12) MTSアッセイ

EGM-2MV培地で懸濁したh-imTEC及びh-imNECを 1.0×10^3 個/ウェルの密度で96ウェルプレートに播種した。37℃で0、24、48、72時間インキュベート後、MTS試薬（CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay: Promega）を各ウェル20 μ L添加し、37℃で1時間インキュベート後に吸光度を測定した（図10）。その結果h-imTECはh-imNECより増殖速度が速いことが確認された。

[0082] 13) Scratchアッセイ

EGM-2MV培地で懸濁したh-imTEC及びh-imNEC（ 1.0×10^5 個）を12ウェルプレートに播種し、37℃でインキュベートしてコンフルエントにした。ピペットチップの先で各ウェル中央の細胞層をスクラッチし、12時間培養してスクラッチした部分に移動してきた細胞を倒立顕微鏡で観察した（図11）。

[0083] h-imTECは、h-imNECより間隙への遊走が速く、不死化されていない腫瘍血管内皮細胞と同様の性質を維持していることが示唆された。

[0084] 14) 遺伝子発現プロファイルの解析

継代回数18と19のh-imTEC及びh-imNECから、ReliaPrep RNA Cell Miniprep System（Pro

mega)を用いてtotal RNAを抽出し、KAPA SYBR Fast qPCR Kit (日本ジェネティクス) 及び下記の塩基配列からなるプライマーDNAを用いて、Periostinの発現をReal-time PCRで測定した。内部標準は β -actin (ACTB)を選択した。

[0085] β -actin

forward 5' -TTACAGGAAGTCCCTTGCCATCC -3' (配列番号15)

reverse 5' -AAGCAATGCTATCACCTCCCCTG -3' (配列番号16)

Periostin:

forward 5' -GCACCTTCAAAGAAATCCCCGT -3' (配列番号17)

reverse 5' -AGTGTGGGTCCTTCAGTTTTGAT -3' (配列番号18)

[0086] Real-time PCRは、イニシャルインキュベーション (95℃ 30秒)、熱変性 (95℃ 1秒)、アニーリング (58℃ 5秒)、伸長反応 (58℃) を40サイクル行い、CFX Manager (Bio-Rad) で増幅産物を定量し、 ΔC_t 法により相対比を比較検討した (図12)。

[0087] 継代回数18のh-imTECにおけるPeriostinの発現はh-imNECより6倍以上亢進していた。h-imTECにおけるPeriostinの発現は、DNA microarray (Affymetrix GeneChip Human Gene 2.0 ST Array) を用いた遺伝子発現プロファイル解析においてもh-imNECの30倍以上の亢進が確認された。

産業上の利用可能性

[0088] 本発明の不死化腫瘍血管内皮細胞株を樹立する方法、不死化腫瘍血管内皮細胞株及び腫瘍血管内皮細胞に特異的に作用する物質をスクリーニングする方法は、いずれも、腫瘍血管内皮細胞を標的とした腫瘍の治療剤の探索、開発等において利用することができる。

配列表フリーテキスト

- [0089] 配列番号1 SV40フォワードプライマー
配列番号2 SV40リバーズプライマー
配列番号3 hTERTフォワードプライマー
配列番号4 hTERTリバーズプライマー
配列番号5 hGAPDHフォワードプライマー
配列番号6 hGAPDHリバーズプライマー
配列番号7 hCD31フォワードプライマー
配列番号8 hCD31リバーズプライマー
配列番号9 hCD144フォワードプライマー
配列番号10 hCD144リバーズプライマー
配列番号11 hBiglycanフォワードプライマー
配列番号12 hBiglycanリバーズプライマー
配列番号13 hLOXフォワードプライマー
配列番号14 hLOXリバーズプライマー
配列番号15 β -actinフォワードプライマー
配列番号16 β -actinリバーズプライマー
配列番号17 Periostinフォワードプライマー
配列番号18 Periostinリバーズプライマー

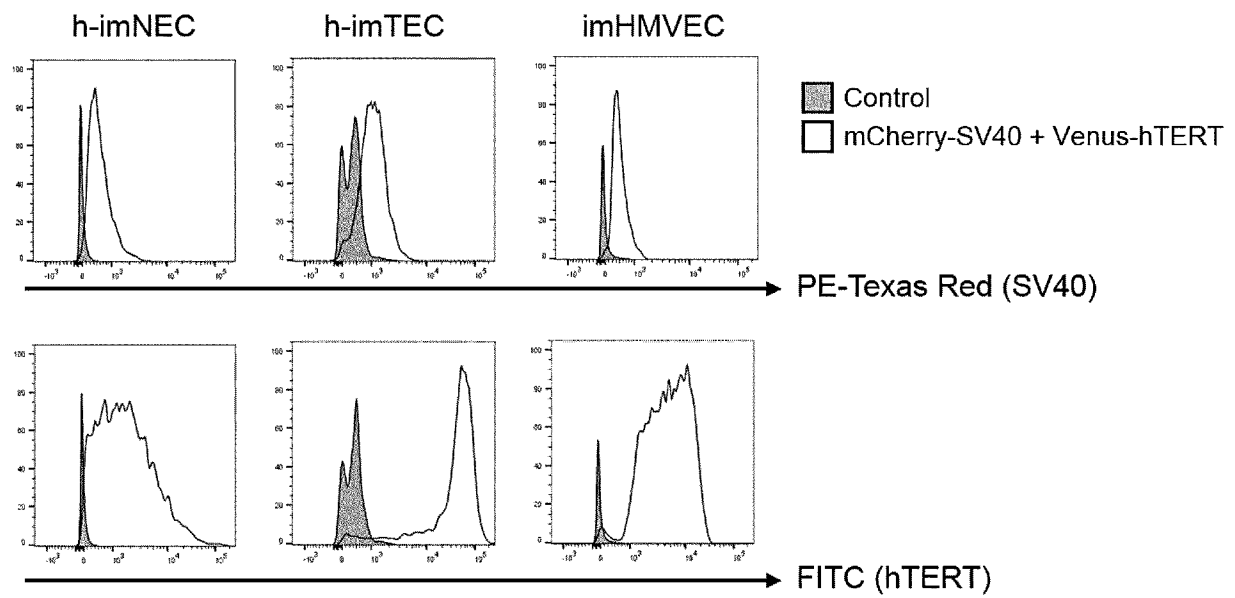
請求の範囲

- [請求項1] 腫瘍血管内皮細胞を含む腫瘍組織由来の細胞懸濁液に対して磁気ビーズを用いた細胞分離、及び任意選択のフローサイトメトリーによる細胞分離を行ってCD31陽性細胞を含む細胞群を分離する分離工程、
- 、
- 分離されたCD31陽性細胞を含む細胞群を継代培養する培養工程、
- 、
- 継代培養後の細胞群に対して、フローサイトメトリーを行ってCD31陽性細胞を含む細胞群を再分離することを1～2回繰り返す、任意選択の再分離工程、
- 培養工程又は再分離工程後の細胞群に、Simian Virus 40 large Tをコードする遺伝子、ヒトテロメア逆転写タンパク質をコードする遺伝子及び蛍光タンパク質をコードする遺伝子を発現可能に有するウイルスベクターを感染させる感染工程、及び
- 感染した細胞群を継代培養し、次いで前記蛍光タンパク質を発現しているCD31陽性細胞群をフローサイトメトリーにより分離する細胞選抜工程
- を含む、不死化腫瘍血管内皮細胞株を樹立する方法。
- [請求項2] 培養工程において継代培養が1～7回行われる、請求項1に記載の不死化腫瘍血管内皮細胞株を樹立する方法。
- [請求項3] 培養工程において継代時の培養基材からの細胞の剥離が複数回に分けて行われる、請求項1又は2に記載の不死化腫瘍血管内皮細胞株を樹立する方法。
- [請求項4] 感染工程においてウイルスベクターを300～1200のMOIで感染させる、請求項1～3のいずれか一項に記載の不死化腫瘍血管内皮細胞株を樹立する方法。
- [請求項5] 細胞選抜工程において継代培養が2～3回行われる、請求項1～4のいずれか一項に記載の不死化腫瘍血管内皮細胞株を樹立する方法。

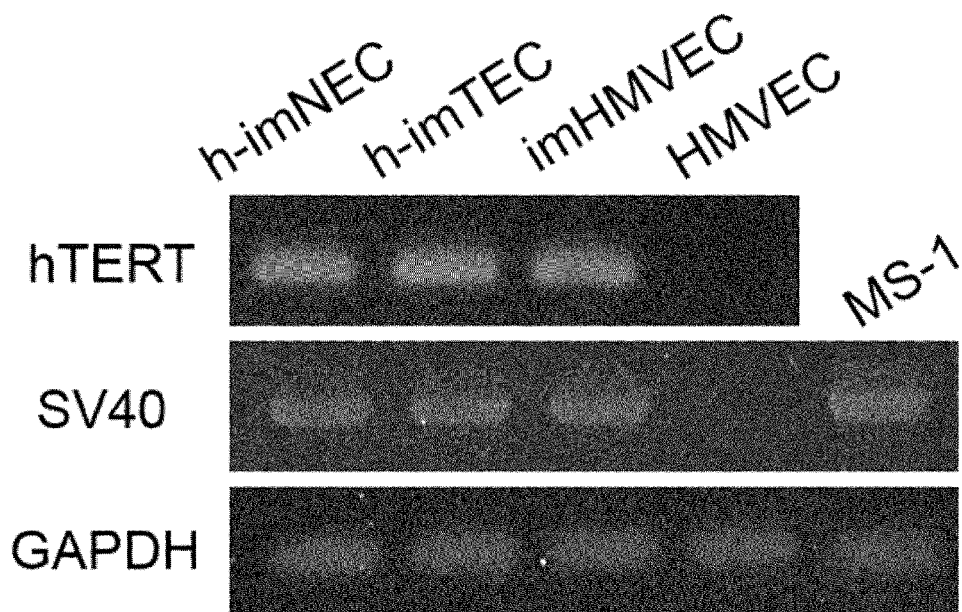
- [請求項6] Simian Virus 40 large Tをコードする遺伝子及びヒトテロメア逆転写タンパク質をコードする遺伝子を組換え遺伝子として有し、少なくとも50回以上の継代培養が可能な、不死化腫瘍血管内皮細胞株。
- [請求項7] ペリオスチン (Periostin) の発現が、Simian Virus 40 large Tをコードする遺伝子及びヒトテロメア逆転写タンパク質をコードする遺伝子を組換え遺伝子として有する不死化正常血管内皮細胞における発現と比較して亢進している、請求項6に記載の不死化腫瘍血管内皮細胞株。
- [請求項8] さらにバイグリカン (Biglycan) 及び／又はリジルオキシダーゼ (Lysyl oxidase) の発現が、Simian Virus 40 large Tをコードする遺伝子及びヒトテロメア逆転写タンパク質をコードする遺伝子を組換え遺伝子として有する不死化正常血管内皮細胞における発現と比較して亢進している、請求項7に記載の不死化腫瘍血管内皮細胞株。
- [請求項9] ヒト腎癌組織由来である、請求項6～8のいずれか一項に記載の不死化腫瘍血管内皮細胞株。
- [請求項10] 国際受託番号NITE BP-02424として寄託されている不死化ヒト腫瘍血管内皮細胞株。
- [請求項11] 請求項6～10のいずれか一項に記載の不死化腫瘍血管内皮細胞株及び正常な血管内皮細胞に試験物質を接触させて各細胞の応答を比較する工程を含む、腫瘍血管内皮細胞に特異的に作用する物質をスクリーニングする方法。
- [請求項12] 正常血管内皮細胞が不死化された細胞株である、請求項11に記載のスクリーニング方法。
- [請求項13] 不死化腫瘍血管内皮細胞株が国際受託番号NITE BP-02424として寄託されている不死化ヒト腫瘍血管内皮細胞株であり、不死化された正常な血管内皮細胞が国際受託番号NITE BP-02

4 2 5 として寄託されている不死化ヒト正常血管内皮細胞株である、
請求項 1 2 に記載のスクリーニング方法。

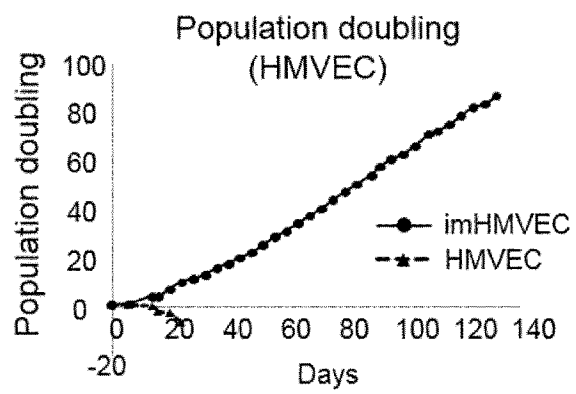
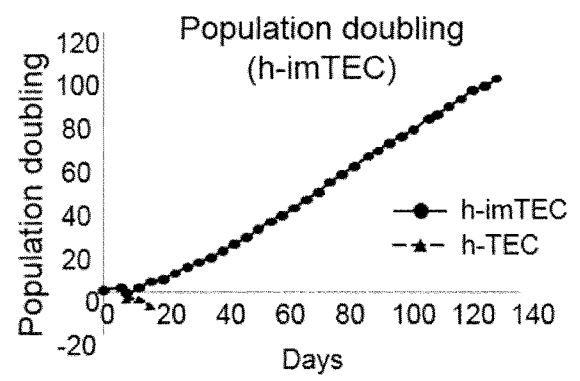
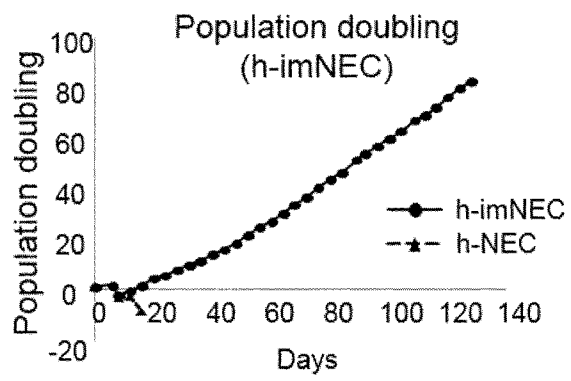
[図1]



[図2]

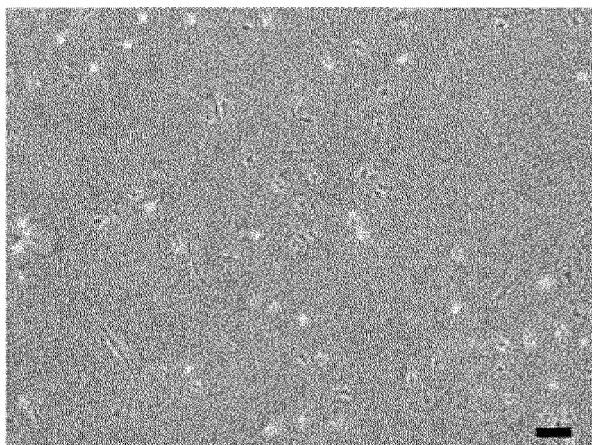


[図3]

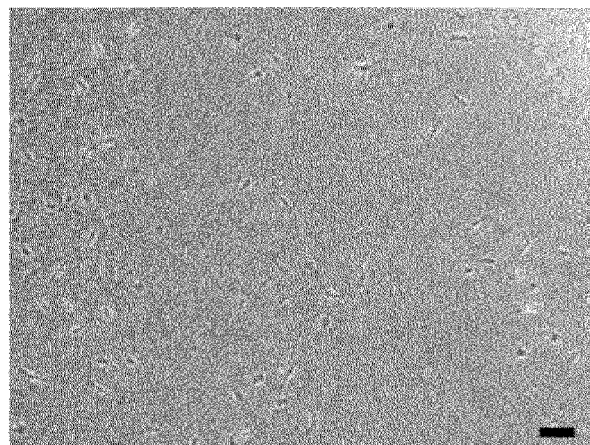


[図4]

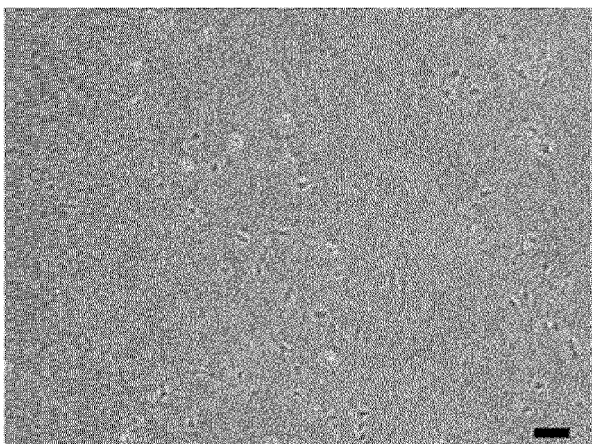
h-imNEC



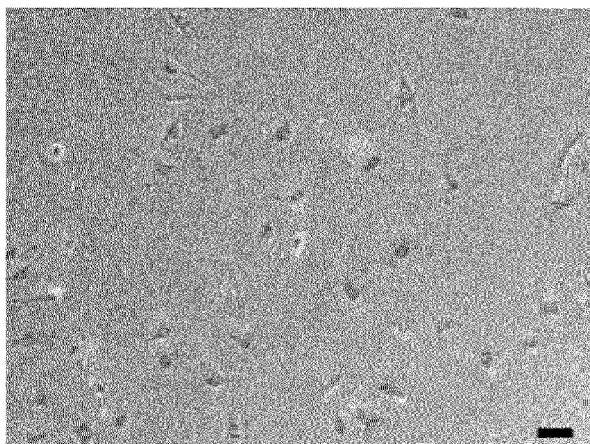
h-imTEC



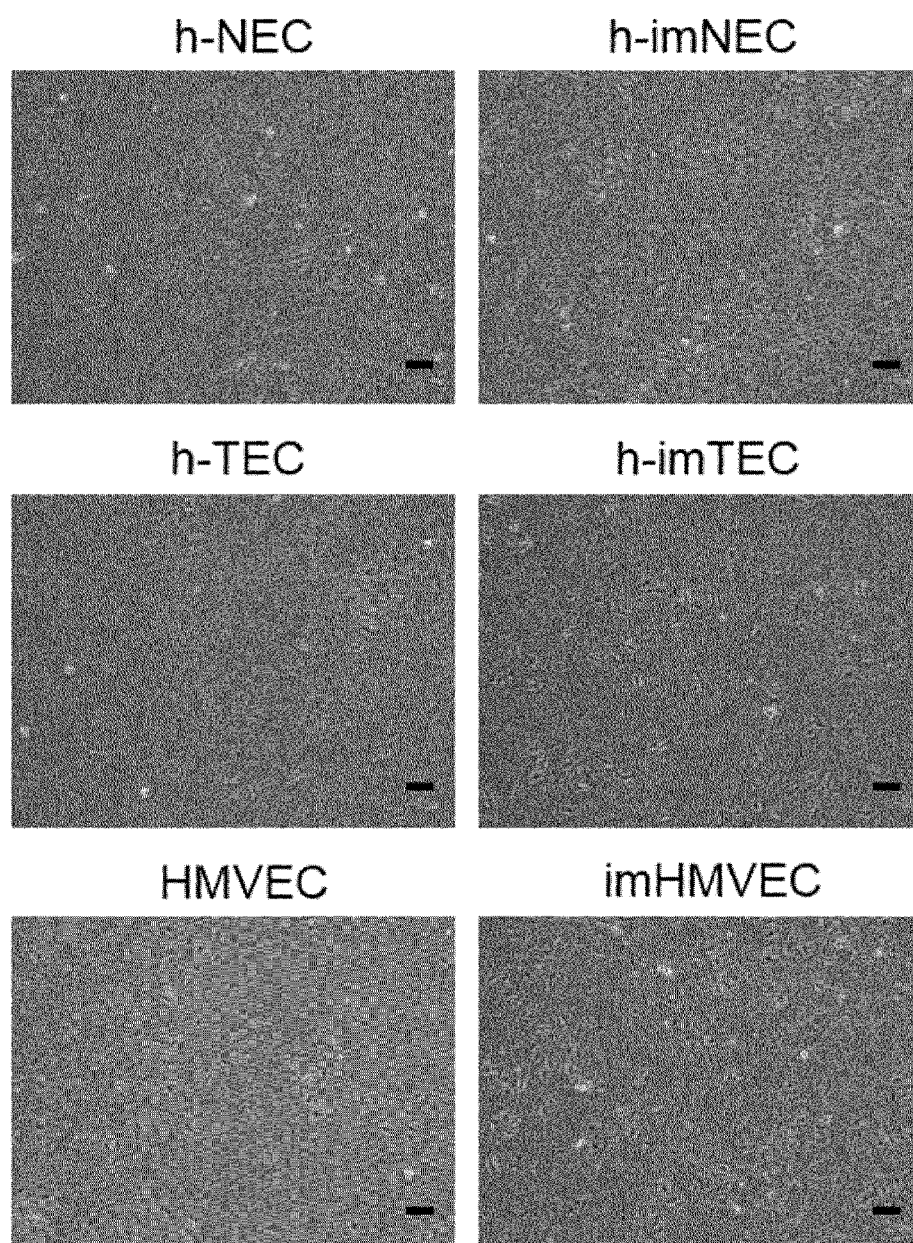
imHMVEC



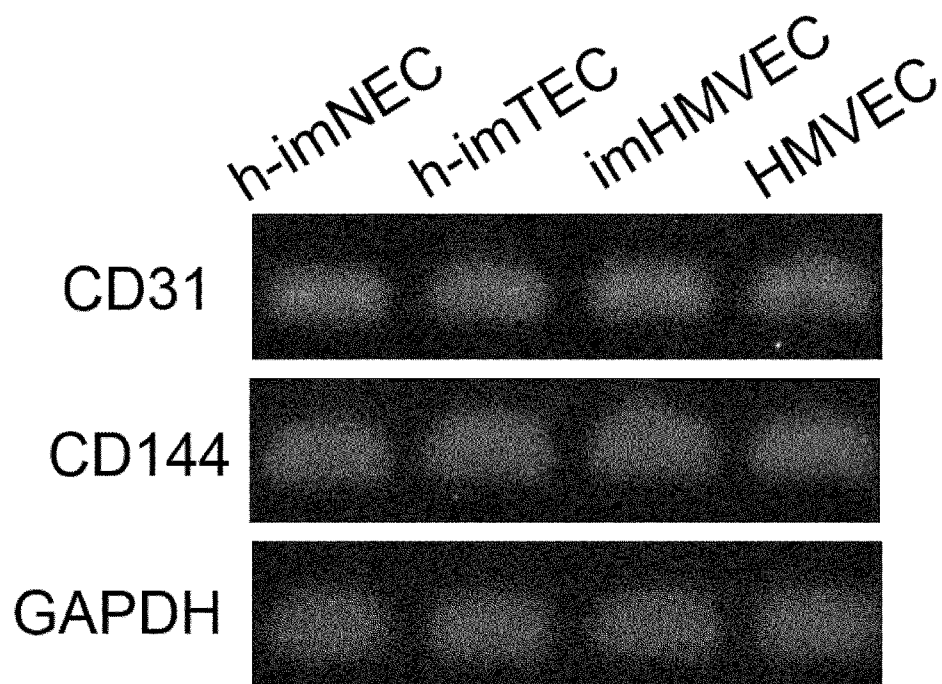
HMVEC



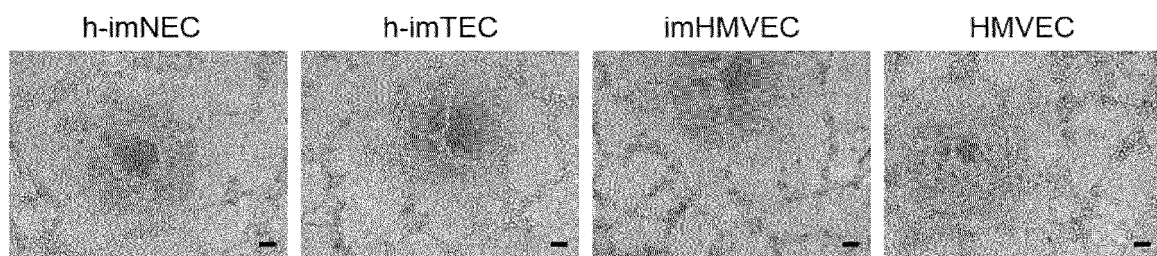
[図5]



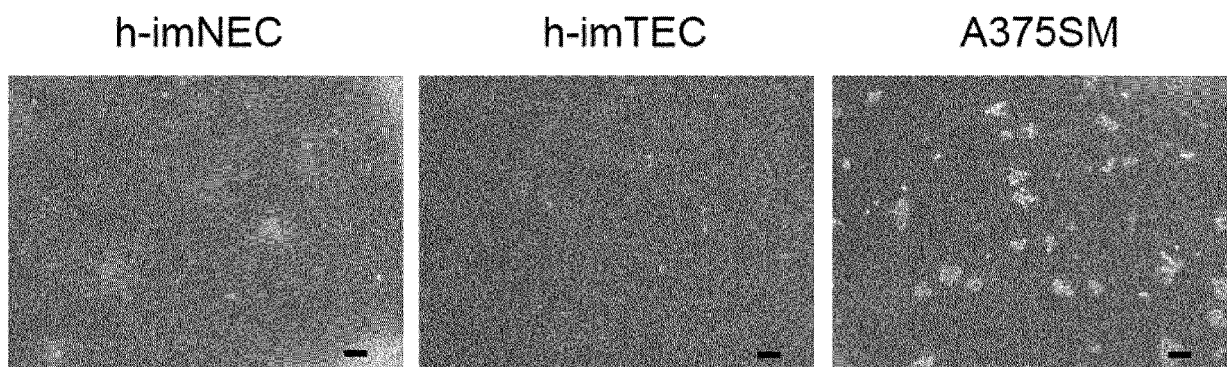
[図6]



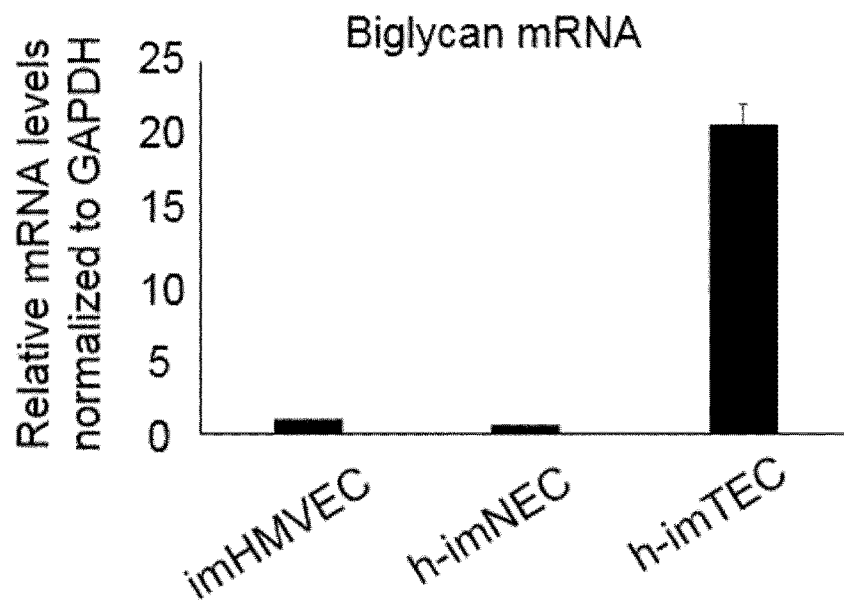
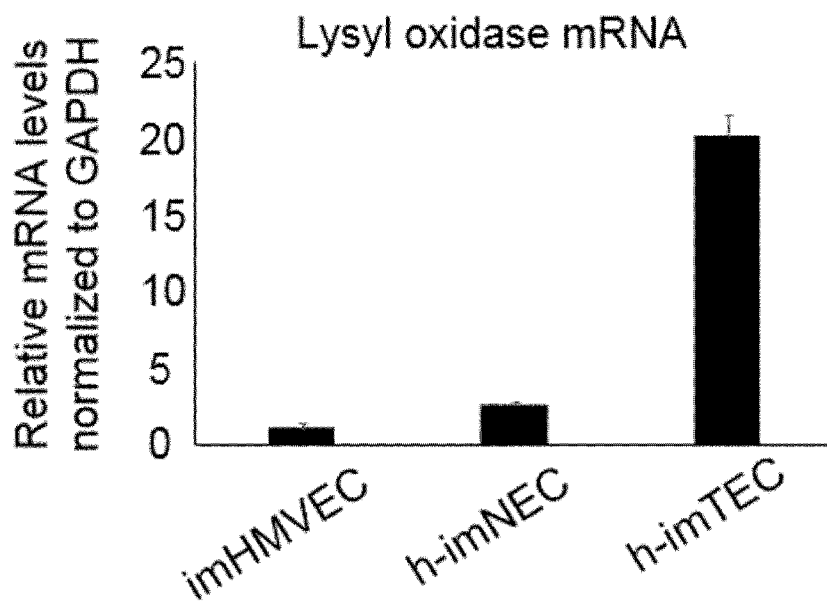
[図7]



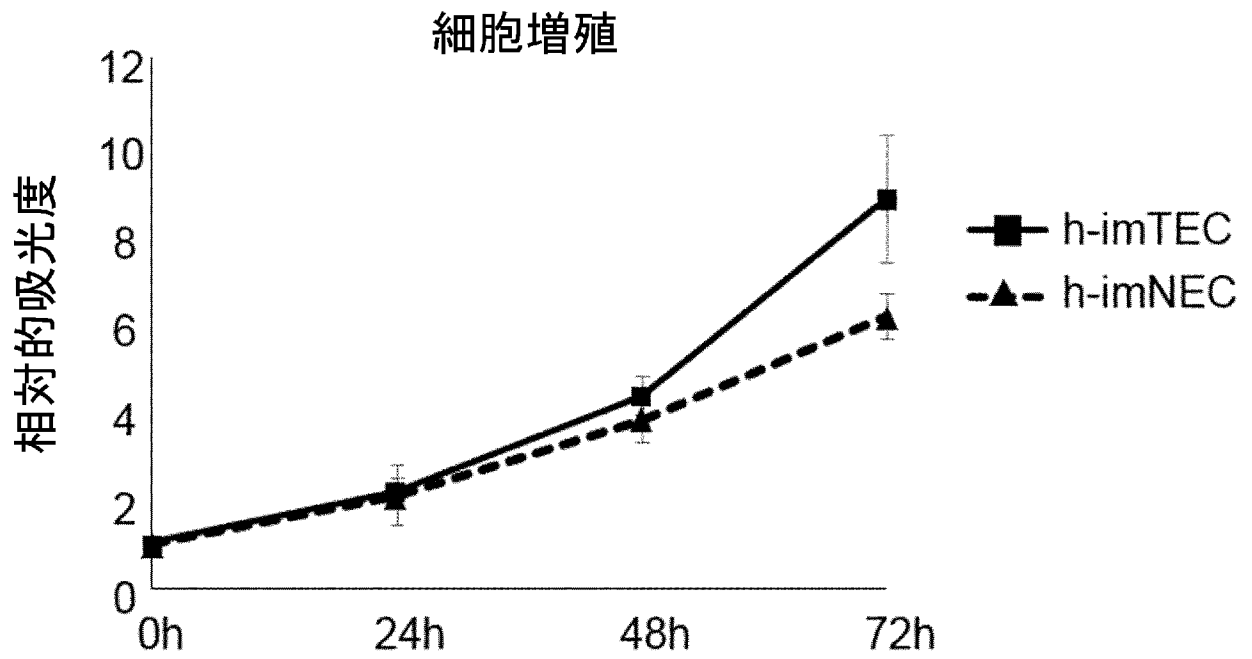
[図8]



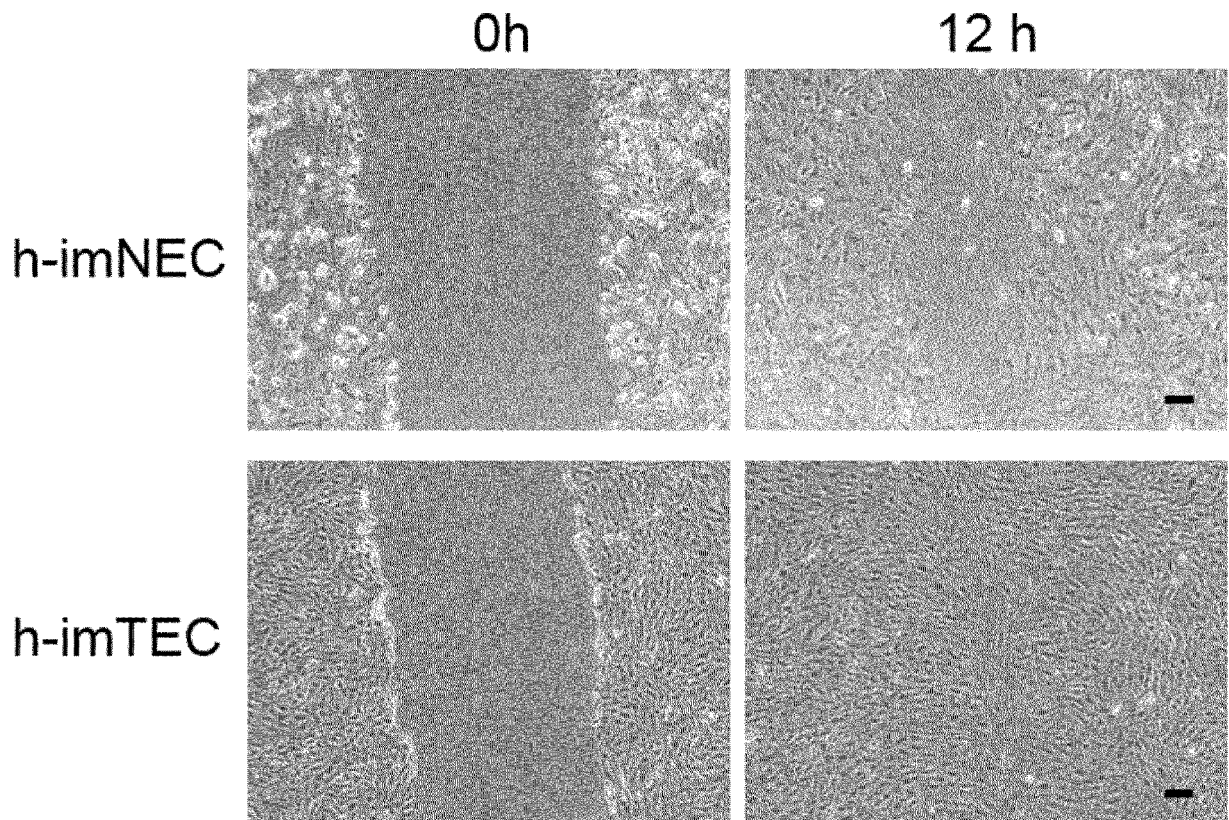
[図9]

A**B**

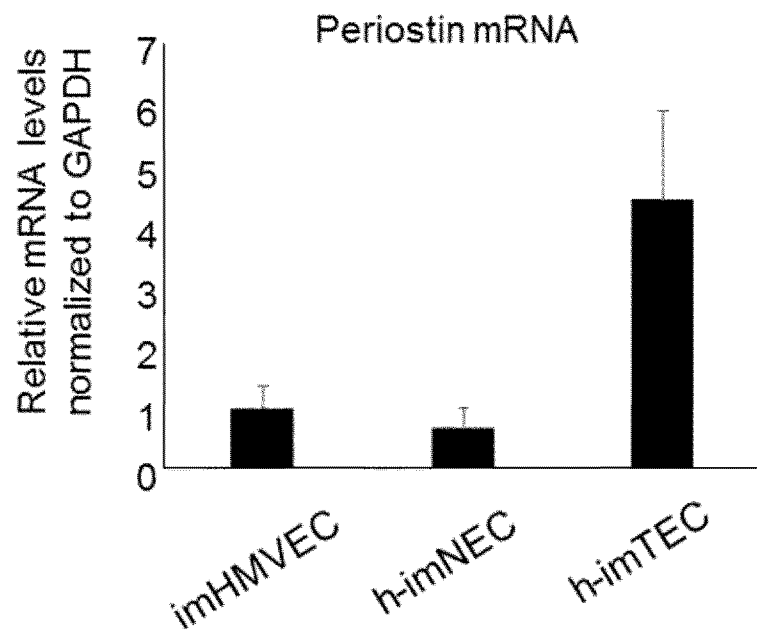
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/010735

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N5/10 (2006.01)i, C12Q1/02 (2006.01)i, C12N5/09 (2010.01)n,
C12N15/09 (2006.01)n

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)

Int.Cl. C12N5/10, C12Q1/02, C12N5/09, C12N15/09

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed,
WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	樋田 京子ほか, 腫瘍血管内皮細胞の異常と癌の悪性化との関連, 口腔腫瘍, vol. 24, 2012, pp. 88-94, (HIDA, Kyoko, et al., "Abnormality of tumor endothelial cells and cancer progression", Journal of Japanese Society of Oral Oncology)	1-13
A	樋田 京子, がん微小環境と腫瘍血管内皮細胞, Drug Delivery System, 27-1, 2012, pp. 34-39, (HIDA, Kyoko, "Tumor microenvironment and Tumor Endothelial Cells")	1-13
A	OSAWA, Takahiro, et al, "The role of Lysyl oxidase on abnormal phenotypes of tumor endothelial cells", 日本血管生物医学学術集会プログラム・抄録集, 2011, p. 108, P-029, non-official translation (Programs and abstracts of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization)	1-13



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

11 June 2018 (11.06.2018)

Date of mailing of the international search report

03 July 2018 (03.07.2018)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/010735

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HIDA, Kyoko, et al, "Aneuploidy of a murine immortalized endothelial cell line, MS1", Journal of Oral Biosciences, 05 November 2016, vol. 59, pp. 50-54	1-13
A	HIDA, Kyoko, et al, "Comparison of characteristics of mouse immortalized normal endothelial cells, MS1 and primary cultured endothelial cells.", Hokkaido J. Dent Sci., 2016, vol. 37, pp. 40-48	1-13
A	CHANG, Bian, et al, "Immortalization of human umbilical vein endothelial cells by transfected with hTERT and SV40LT", Chin J Cardiol, 2005, vol. 33, no. 2, pp. 166-169	1-13
A	TENTORI, Lucio, et al., "Generation of an immortalized human endothelial cell line as a model of neovascular proliferating endothelial cells to assess chemosensitivity to anticancer drugs", INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, 2005, vol. 27, pp. 525-535	1-13
A	CHANG, Bian, et al, "Immortalization of human umbilical vein endothelial cells with telomerase reverse transcriptase and simian virus 40 large T antigen", Journal of Zhejiang University SCIENCE, 2005, 6B, 7, pp.631-636	1-13
A	JP 2012-525825 A (SANOFI) 25 October 2012, entire text & US 2013/0171731 A1, whole documents & WO 2010/128024 A2 & EP 2248889 A1	1-13
A	HALLANI, Soufiane Ei, et al, "Research Article Tumor and Endthelial Cell Hybrids Participate in Glioblastoma Vasculature", BioMed Research International, 2014, vol. 2014, pp. 1-9	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12N5/09(2010.01)n, C12N15/09(2006.01)n

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 (IPC))

Int.Cl. C12N5/10, C12Q1/02, C12N5/09, 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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018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/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed, WPIDS/WPIX (STN)

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
A	樋田 京子ほか, 腫瘍血管内皮細胞の異常と癌の悪性化との関連, 口腔腫瘍, 第24巻, 2012, 第88~94頁	1-13
A	樋田 京子, がん微小環境と腫瘍血管内皮細胞, Drug Delivery System, 27-1, 2012, p.34-39	1-13
A	OSAWA Takahiro, et al, The role of Lysyl oxidase on abnormal phenotypes of tumor endothelial cells, 日本血管生物医学学術集会プログラム・抄録集, 2011, p.108, P-029	1-13

☑ 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

11.06.2018

国際調査報告の発送日

03.07.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

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)

中村 勇介

4 B

4872

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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
A	HIDA Kyoko, et al, Aneuploidy of a murine immortalized endothelial cell line, MS1, Journal of Oral Biosciences, 2016.11.05, Vol.59, p.50-54	1-13
A	HIDA Kyoko, et al, Comparison of characteristics of mouse immortalized normal endothelial cells, MS1 and primary cultured endothelial cells., Hokkaido J. Dent Sci., 2016, Vol.37, p.40-48	1-13
A	CHANG Bian, et al, Immortalization of human umbilical vein endothelial cells by transfected with hTERT and SV40LT, Chin J Cardiol, 2005, Vol.33, NO.2, p.166-169	1-13
A	TENTORI Lucio, et al., Generation of an immortalized human endothelial cell line as a model of neovascular proliferating endothelial cells to assess chemosensitivity to anticancer drugs, INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, 2005, Vol.27, p.525-535	1-13
A	CHANG Bian, et al, Immortalization of human umbilical vein endothelial cells with telomerase reverse transcriptase and simian virus 40 large T antigen, Journal of Zhejiang University SCIENCE, 2005, 6B, 7, p.631-636	1-13
A	JP 2012-525825 A (サノフイ) 2012.10.25, 全文 & US 2013/0171731 A1, Whole Documents & WO 2010/128024 A2 & EP 2248889 A1	1-13
A	HALLANI Soufiane Ei, et al, Research Article Tumor and Endthelial Cell Hybrids Participate in Glioblastoma Vasculature, BioMed Research International, 2014, Volume 2014, p.1-9	1-13