

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年10月30日(30.10.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/174899 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/07 (2010.01) C12N 5/077 (2010.01)
C12N 1/00 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/055199
- (22) 国際出願日: 2014年2月24日(24.02.2014)
- (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 2013-089994 2013年4月23日(23.04.2013) JP
特願 2013-090000 2013年4月23日(23.04.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人徳島大学(THE UNIVERSITY OF TOKUSHIMA) [JP/JP]; 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目2番地 Tokushima (JP).
- (72) 発明者; および
(71) 出願人: 船木 真理(FUNAKI, Makoto) [JP/JP]; 〒7708503 徳島県徳島市蔵本町2丁目50番地の1 国立大学法人徳島大学医学部・歯学部付属病院内 Tokushima (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,

BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロシニア (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).

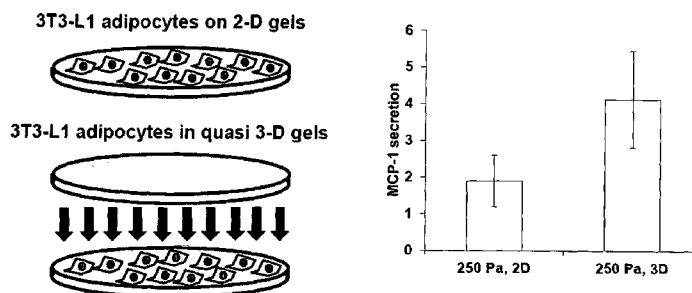
添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: COMPRESSED CELL OR COMPRESSED TISSUE AS CELL MODEL OF PATHOLOGICAL CONDITION AND MANUFACTURING METHOD THEREFOR

(54) 発明の名称: 病的状態の細胞モデルとしての圧縮細胞又は圧縮組織とその製法

図1



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide cultured cells necessary for elucidating the pathology of obesity, metabolic syndrome, diabetes, dyslipidemia, hypertension or atherosclerosis and screening diagnostic drugs/therapeutic drugs. It was discovered that cells (tissue) similar to obese fat cells of a desired pathology could be manufactured using a cell compression culturing method of compressing normal fat cells or normal fat tissue or obese fat cells or obese fat tissue and culturing. As a result, use of said compressed fat cells (tissue) makes possible a novel method with which compounds capable of treating metabolic syndrome, etc. can be screened in a system that is more similar to a living body.

(57) 要約: 本発明は、肥満症、メタボリック・シンドローム、糖尿病、脂質異常症、高血圧症又は動脈硬化の病態解明と診断薬・治療薬のスクリーニングのために必要な培養細胞の提供を目的とする。正常脂肪細胞又は正常脂肪組織、あるいは肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織を圧縮して培養するという細胞圧縮培養方法により、所望の病態の肥満脂肪細胞と同様の細胞(組織)を作製できることを見出した。その結果、この圧縮脂肪細胞(組織)を用いることにより、メタボリック・シンドローム等を治療できる化合物を、より生体に近い系でスクリーニングできる新しい方法が可能になった。



WO 2014/174899 A1

明 細 書

発明の名称

病的状態の細胞モデルとしての圧縮細胞又は圧縮組織とその製法

5 技術分野

本発明は、人工的な圧縮培養条件下で得られた新たな圧縮細胞又は圧縮組織とその製法に関するものであり、更には、この圧縮細胞又は圧縮組織を用いた、薬剤の作用若しくは副作用を評価するスクリーニング方法に関するものである。

10

背景技術

細胞は、様々な力学的刺激による影響を受け、機能や形態、運動能が変化することが知られている（非特許文献1、2）。例えば、細胞培養基板の弾性率が間葉系幹細胞の分化に影響を与えることが明らかになっている（非特許文献1）。

15

また、最近、細胞への加圧によって、分化した細胞の初期化が起るとの発表が行われ、刺激惹起性多能性獲得細胞（STAP細胞、Stimulus-Triggered Acquisition of Pluripotency cells）として、注目を浴びている（非特許文献4）。このように、細胞環境の変化が細胞に及ぼす影響を研究する細胞工学の分野に脚光が集まっている。

20

そして、このような細胞工学の応用分野として、ES細胞やiPS細胞に代表される再生医療の基礎研究が1990年代から急速に進歩し、それらを応用した細胞移植医療（再生医療）の実用化が期待されている。例えば、iPS細胞を利用した網膜再生医療が進められようとしている。そして、これらの研究の進展に伴って、細胞の増殖だけでなく、分化や3次元化（立体的な組織化）と言った細胞加工（セルプロセッシング）が必要になって来ている（非特許文献3）。

25

そこで、3次元化した培養方法が種々検討されており、培養培地として市販されているものもある（住友ベークライト社製「セルフィーユ」）。しか

しながら、一般的に使用される通常の細胞培養方法は、ゲル上での平面（2次元）培養方法であるため、種々の培養培地の力学的影響を評価する場合にも、2次元培養方法の中で評価検討されることが一般的であった（特許文献1, 2）。

- 5 そのため、培養して得られる細胞や組織は、生体に存在する細胞や組織とは異なった性状のものになるものが多く、実際の生体の細胞や組織とは異なったものとなっている。それ故、通常の培養細胞を薬剤のスクリーニング方法に使用しても、生体の反応を反映したものになりにくく、薬剤の的確な評価を得ることが難しいという状況であった。

10

先行技術文献

特許文献

特許文献1：特表2010-532166号公報

15

特許文献2：特開2012-10600号公報

非特許文献

非特許文献1：Engler et al., Cell 126, 677-689, 2006. "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification."

20

非特許文献2：水野大介ら、生物物理、51(1), 014-017(2011)「細胞の力学知覚の物理メカニズム」

非特許文献3：高木睦、生物工学会誌、第90巻、第1号、27-27(2012)「新分野セルプロセッシング工学の展開」

25

非特許文献4：小保方晴子, NATURE 505; 641-647(2014)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

本発明は、種々の疾患モデルとして薬剤のスクリーニングに使用可能な、人工的に作成された圧縮細胞又は圧縮組織とその製造方法を提供することを目的とする。特に脂肪組織の慢性炎症に基づく肥満症、糖尿病、メタボリック症候群、脂質異常症、高血圧、動脈硬化症などの治療剤のスクリーニング用の圧縮細胞又は圧縮組織を提供することを目的とする。更には、上記圧縮細胞又は圧縮組織を用いた新たな治療方法として、慢性炎症部位の肥満脂肪組織の細胞外基質タンパク密度を低下させることによる、細胞内圧の緩和・解消方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

本発明者は、既に、間葉系幹細胞を用いて、各種の弾性率を持つ2次元ゲル培地で培養することにより、色々な細胞に分化した培養細胞を作製できることを報告している（特許文献1）。更に、正常脂肪組織と同じ硬さ（250Pa）を持つ2次元ゲル培地の上で、パルミチン酸のような飽和脂肪酸の存在下に、3T3-L1脂肪細胞を培養すると、脂肪細胞が肥大化するに係らず、2次元ゲル培地の硬さが培養細胞に影響して、インスリン抵抗性が惹起されない（インスリン感受性が維持される）細胞になることを報告してきた（特許文献2）。

上記のように、本発明者は、培養細胞の性状に対して影響する力学的な因子を解明するため、2次元ゲル培地の硬さ以外の因子を探索した。その結果、細胞に圧縮を与えることにより、培養細胞の機能をコントロールできることを見出し、本発明を完成させた。即ち、細胞を加圧圧縮して培養することにより、種々の細胞機能を有する圧縮培養細胞を作製できることを見出した。例えば、生体から採取した正常脂肪細胞（組織）を加圧圧縮し培養することにより、人工的に肥満脂肪細胞の機能を持つ細胞を作製することができた。そして、この人工的肥満脂肪細胞（組織）は、細胞の形状としては正常脂肪細胞と同様の形状を示すもの（肥満脂肪細胞に見られる肥大化を伴うことがない）であるが、機能としては肥満脂肪細胞と同じ機能を示すことが明らかになった。

以上のように、培養時において、細胞に加圧圧縮を行うと、細胞の性状が変化する。例えば、正常脂肪細胞又は正常脂肪組織を使用して加圧圧縮して培養

すると、得られた脂肪細胞は、肥満脂肪細胞に見られる肥大化を伴うことなく、脂肪細胞の機能は肥満脂肪細胞と同様の機能を示すことが分かった。

5 このように、正常脂肪細胞を高カロリー状態で膨張させて肥満脂肪細胞に誘導するのではなく、驚いたことに、正常脂肪細胞を圧縮することによって肥満状態の脂肪細胞と同じ機能を示す脂肪細胞・脂肪組織が、初めて作製できた。即ち、正常脂肪細胞や正常脂肪組織の人工的な三次元圧縮によって、肥満状態の脂肪細胞と同じ機能を示す新たな圧縮脂肪細胞・圧縮脂肪組織が生み出された。

10 それ故、この圧縮培養の脂肪細胞又は脂肪組織は、肥満状態の脂肪細胞と同じ機能を示すことから、肥満脂肪細胞や肥満脂肪組織の代替として、薬剤の作用や副作用の評価スクリーニングに使用できることが分かった。本発明者は、以上の知見に基き本発明を完成した。

即ち、本発明の要旨は以下の通りである。

15 (1) 細胞又は組織を圧縮培養して作製される、病的状態の細胞モデルとしての圧縮細胞又は圧縮組織であって、

a) 上記圧縮培養における加圧が、 $0.07 \sim 1.6 \text{ g/cm}^2$ であるか、細胞や組織の圧縮率が $2 \sim 90\%$ である、

b) 上記圧縮細胞又は圧縮組織は、圧縮前の細胞と同じ容量であり、かつ、圧縮前より病的状態が亢進している細胞の機能を示すものである

20 ことを特徴とする、圧縮細胞又は圧縮組織。

(2) 上記細胞又は組織が正常脂肪細胞又は正常脂肪組織であることを特徴とする、上記(1)に記載の圧縮細胞又は圧縮組織。

25 (3) 上記病的状態が亢進している細胞の機能が、 $100 \mu\text{m} \sim 150 \mu\text{m}$ の肥満状態の脂肪細胞と同じ機能を示すものであることを特徴とする、上記(2)に記載の圧縮細胞又は圧縮組織。

(4) 上記正常脂肪細胞又は正常脂肪組織が、3T3-L1脂肪細胞、マウス脂肪細胞又は組織、ラット脂肪細胞又は組織、ヒト脂肪細胞又はヒト脂肪組織である、上記(2)又は(3)に記載の圧縮細胞又は圧縮組織。

(5) マウス脂肪組織が、マウス正常脂肪組織である、上記(4)に記載の圧

縮細胞又は圧縮組織。

(6) 上記マウス正常脂肪組織が、マウスの生殖腺脂肪組織である、上記(5)に記載の圧縮細胞又は圧縮組織。

5 (7) 上記細胞又は組織が、肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織であることを特徴とする、上記(1)に記載の圧縮細胞又は圧縮組織。

(8) 上記病的状態が充進している細胞の機能が、更に病態の悪化した肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織の機能を示すものであることを特徴とする、上記(7)に記載の圧縮細胞又は圧縮組織。

10 (9) 上記肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織が、ob/obマウスの脂肪組織である、上記(7)に記載の圧縮細胞又は圧縮組織。

(10) 上記加圧が、 1.6 g/cm^2 である、上記(7)～(9)のいずれかに記載の圧縮細胞又は圧縮組織。

(11) 上記(2)～(10)に記載の圧縮細胞又は圧縮組織を使用し、

15 更に評価薬剤との共存下で培養することにより、上記細胞又は組織における細胞機能を評価することによる、肥満症、メタボリック・シンドローム、糖尿病、脂質異常症、高血圧症または動脈硬化の病態、診断、治療に係る化合物の評価方法。

20 (12) 上記脂肪細胞機能を評価するための指標としてのアディポサイトカインが、アディポネクチン、MCP-1またはIL-12 α である、上記(11)に記載の化合物の評価方法。

(13) 薬剤と共に脂肪酸が添加されている、上記(11)または(12)に記載の化合物の評価方法。

(14) 上記脂肪酸が、飽和脂肪酸である、上記(13)に記載の化合物の評価方法。

25 (15) 上記飽和脂肪酸がパルミチン酸である、上記(14)に記載の化合物の評価方法。

(16) 細胞と細胞外基質との間に間隙を有することを特徴とする、細胞圧縮において細胞に加圧が掛からない圧縮抵抗性の細胞または組織であって、

細胞外基質タンパクの密度が30～50%減少することにより、

加圧により、細胞の生化学的な変化が生じないことを特徴とする、圧縮抵抗性の細胞または組織。

(17) 細胞外基質タンパクがコラーゲンである、上記(16)に記載の圧縮抵抗性の細胞または組織。

5 (18) 上記コラーゲンが、コラーゲンVIである、上記(16)に記載の圧縮抵抗性の細胞または組織。

(19) 圧縮認識機構が阻害されていることを特徴とする、圧縮抵抗性の圧縮細胞または組織であって、

加圧により、細胞の生化学的な変化が生じないことを特徴とする、圧縮抵抗性の圧縮細胞または組織。

10 (20) 上記圧縮認識機構がNF- κ B、Rho、ROCK、MLCKに関するものである、上記(18)に記載の圧縮細胞または組織。

(21) 細胞又は組織を圧縮培養することを特徴とする、細胞又は組織の病的状態(病態モデルの細胞又は組織)を作製する方法であって、

15 a) 上記細胞や組織の圧縮率が2~90%であるか、
b) 圧縮の加圧が、0.07~1.6 g/cm²である
ことを特徴とする、病的細胞又は組織の作製方法。

(22) 上記細胞又は組織が、正常脂肪細胞又は正常脂肪組織であることを特徴とする、上記(21)に記載の作製方法。

20 (23) 上記圧縮率が2~20%であることを特徴とする、上記(21)又は(22)に記載の作製方法。

(24) 上記圧縮培養の培地が、溶液培地または150~350 Paの硬さの2次元ゲル培地であることを特徴とする、上記(21)~(23)のいずれかに記載の作製方法。

25 (25) 上記溶液培地が、DMEM培地である、上記(24)に記載の作製方法。

(26) 上記2次元ゲル培地の硬さが250 Paである、上記(24)に記載の作製方法。

(27) 上記2次元ゲル培地がコラーゲン及び/又はフィブロネクチンでゲル

上を被覆していることを特徴とする、上記（２４）又は（２６）に記載の作製方法。

（２８）上記脂肪細胞又は脂肪組織が、３Ｔ３－Ｌ１脂肪細胞、マウス脂肪細胞又は組織、ラット脂肪細胞又は組織、ヒト脂肪細胞又はヒト脂肪組織である、
5 上記（２２）に記載の作製方法。

（２９）マウス脂肪組織が、マウス正常脂肪組織である、上記（２８）に記載の作製方法。

（３０）上記細胞又は組織の病的状態が、肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織であることを特徴とする、上記（２２）に記載の作製方法。

10 （３１）上記細胞又は組織が、病的細胞または病的組織であり、病態が更に悪化した病的細胞又は組織の作製方法であることを特徴とする、上記（２１）に記載の作製方法。

（３２）上記病的細胞又は組織が、肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織であることを特徴とする、上記（３１）に記載の作製方法。

15 （３３）上記肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織が、ob／obマウスの肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織であることを特徴とする、上記（３２）に記載の作製方法。

（３４）圧縮により細胞機能に障害が生じないように、組織の細胞外基質タンパクの密度を低下させ、細胞と細胞外基質の間に間隙を有する細胞又は組織を作製する方法。
20

（３５）細胞外基質タンパクの密度を低下させることが、コラゲナーゼ処理を行うことである、上記（３４）に記載の方法。

（３６）細胞圧縮又は細胞加圧に起因して、病的状態にある細胞又は組織において、圧縮又は加圧環境を解消することにより、細胞又は組織の病的状態を軽減あるいは解消する方法。
25

（３７）上記圧縮又は加圧環境を解消することが、細胞外基質による力学的刺激の伝達を解消することである、上記（３６）に記載の方法。

（３８）上記細胞外基質による力学的刺激の伝達を解消することが、コラーゲン、アクチンフィラメント、インテグリンの間の信号伝達阻害またはNF- κ

B、R h o、R O C K、M L C K阻害によるものである、上記（37）に記載の方法。

（39）上記細胞外基質による力学的刺激の伝達を解消することが、コラーゲン6の産生を阻害することを特徴とする、上記（37）に記載の方法。

5

発明の効果

本発明の細胞圧縮培養方法は、正常細胞又は正常組織に、力学的な負荷を与えて圧縮し、所望の病態モデル細胞を作製する方法である。そのため、例えば、脂肪細胞を用いた場合であれば、正常脂肪細胞又は正常脂肪組織から、
10 本発明方法により簡便に肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織と同様の機能を有する細胞（組織）を作製することができる。即ち、正常脂肪細胞又は正常脂肪組織を加圧圧縮して培養することにより、細胞の容量としては脂肪細胞の肥大化がないものの、肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織と同様の機能を示すものが作製できる。

15 また、加圧圧縮の程度に応じて、所望の病態の肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織と同様の機能の細胞を簡易に作製できる。そのため、それを用いて、病態に応じた薬剤のスクリーニングが容易に実施できるようになった。

更には、肥満脂肪細胞を使用して、本発明の細胞圧縮培養方法を用いることにより、より病態の悪化した肥満脂肪細胞を作製することが可能である。

20 このように、本発明の細胞圧縮培養方法により、色々な病態モデル細胞や病態モデル組織を作製し、適切な薬剤をスクリーニングすることが可能になった。

また細胞圧縮の力学的刺激の伝達メカニズムの検討から、圧縮に伴って生じている病的状態を解消するに適した薬剤をスクリーニングすることが可能
25 になった。

図面の簡単な説明

図1は3T3-L1脂肪細胞を、250Paの硬さを持つ細胞培養培地（2次元ゲル）で培養した場合のMCP-1の分泌量を示すとともに、上記2次元

ゲルを重ねて、2つのゲルに細胞を挟んで（疑似3次元ゲルで）培養した場合のMCP-1の分泌量を示した図である。MCP-1の分泌量は、疑似3次元ゲルの場合に、2次元ゲルの約2倍の分泌量を示すことが明らかになった。このことは、疑似3次元ゲルの場合、培養細胞に負荷されるゲルの重みにより、力学的なストレスが細胞に発生し、MCP-1の分泌量がより増大したことが明らかにされた。

図2はマウスの生殖腺脂肪組織に5.76 cm²のカバーガラス（0.2 g）を乗せ、それぞれ0、3、6、9 gの重石を置いて、0.2、3.2、6.2、9.2 g / 5.76 cm²の4段階の負荷を掛けて培養した。その4段階の場合に生じるMCP-1の分泌量の変化を示した図である。コントロールとして、痩せ型の野性型マウスの正常脂肪組織を使用し、ob / obマウスの肥満脂肪組織との対比を行った。正常脂肪組織に9.2 g / 5.76 cm²の負荷を掛けると、肥満脂肪組織と同様のMCP-1の分泌量を示すことが明らかとなった。

図3はマウスの生殖腺脂肪組織の動的剛性率を示した図である。痩せ型の野性型マウスの正常脂肪組織は約110 Paの値を示し、ob / obマウスの肥満脂肪組織は約260 Paの値を示すことが明らかとなった。

図4はob / obマウスの肥満脂肪組織をコラゲナーゼで処理し、肥満脂肪組織のコラーゲンを除去した。コラゲナーゼの処理時間により、肥満脂肪組織のコラーゲンの含量が低下する。図4は、肥満脂肪組織のコラーゲンの含量が低下するに従い、肥満脂肪組織の硬さが低下することを示した図である。肥満脂肪組織のコラーゲン含量が低下すれば、肥満脂肪組織の硬さが低下することが示された。

25 発明を実施するための形態

—本発明の第1態様—

本発明の第一の態様は、圧縮細胞及び圧縮組織に関するものである。

本発明の「細胞又は組織」とは、特に限定されるものではないが、生体から採取される健常または病的な状態の細胞又は組織のことであり、あるいは

動物細胞の確立された細胞株のことを言う。例えば、脂肪細胞、筋肉細胞、肝臓細胞等の分化された細胞のことを言う。

本発明の「圧縮培養」とは、加圧して（加重を掛けて）圧縮しながら培養することを言う。

5 本発明の「病的状態の細胞」とは、正常な細胞又は正常な組織と異なり、正常な代謝機能や形状を示さない細胞のことを言う。なお、病的状態にも軽度、重度と幾つかの段階があるが、細胞や組織の正常値の範囲を逸脱した形状（容量）や性質を示す細胞を病的状態の細胞という。例えば、脂肪細胞の場合、病的状態の細胞とは、肥満脂肪細胞のことをいう。従って、本発明の細胞圧縮により作製された病的状態の細胞は、病態モデルの細胞として、簡易に作製でき、スクリーニング方法に汎用することができる。

10

本発明の「病的状態が亢進している」とは、細胞の病的状態の程度が進行し、代謝機能や形状の正常域からの逸脱の程度が大きくなったことをいう。

15 本発明の「圧縮率」とは、圧縮前後の圧縮方向におけるサイズ変化のことをいい、2～90%の範囲を挙げることができる。使用する細胞によって、圧縮率の限界は異なるが、例えば正常脂肪細胞又は正常脂肪組織の場合には、2～20%が好ましい。

20

本発明の「正常脂肪細胞」とは、哺乳動物の正常脂肪細胞のことをいい、例えばマウス線維芽細胞由来の3T3-L1脂肪細胞、マウス脂肪細胞、ラット脂肪細胞、ヒト脂肪細胞の正常脂肪細胞を挙げることができる。

25 本発明の「脂肪組織」とは、上記脂肪細胞の集積した組織部分のことを言う。例えば、マウスの場合、皮下脂肪組織または生殖腺脂肪組織のことを挙げることができる。

本発明の「肥満脂肪細胞」とは、中性脂肪の貯蔵を行なって肥大化した成熟脂肪細胞のことを言う。肥大した脂肪細胞の細胞直径は、100 μ m以上であり、最大でも130～140 μ mである（杉原甫、第124回日本医学会シンポジウム記録集・肥満の科学、71～81頁（2004年））。一方、通常の脂肪細胞（BMI20～22の普通体重者）の細胞直径は、70～90 μ mであった。このように、通常の脂肪細胞と肥大化した脂肪細胞では、

細胞直径が顕著に異なっている。また、形態的にも、肥大化した脂肪細胞では、細胞が多面体の形状を取るが、通常の脂肪細胞では、脂肪細胞は球形で細胞相互間に隙間があり、例えばぶどう型の形状を示している。

5 本発明の「肥満脂肪組織」とは、例えばob/obマウスの生殖腺脂肪組織などのことを言い、肥満脂肪細胞が多数存在する組織のことを言う。

本発明の「コラーゲン」とは、例えばI～IX型のコラーゲンを挙げることができる。好ましいものとしては、コラーゲンIおよびVIを挙げることができる。

10 本発明の「加圧」とは、負荷（加重）を掛けることをいい、 $0.07 \sim 1.6 \text{ g/cm}^2$ の範囲を挙げることができる。好ましくは、 $0.07 \sim 1.1 \text{ g/cm}^2$ を挙げることができる。使用する細胞によって、加圧の限界は異なるが、例えば正常脂肪細胞又は正常脂肪組織の場合には、 5.76 cm^2 のカバーグラス（ 0.2 g 、 $2.4 \times 2.4 \text{ cm}$ ）を脂肪細胞（組織）に設置し、その上に $0.2 \sim 9 \text{ g}$ の加重を掛けることが好ましい。

15 更には、カバーグラス、寒天培地や2次元ゲル培地などの固形状の培地を使用し、それを上下のサンドイッチ状にすることにより、その間に挟まれた培養細胞に培地の自重による荷重（圧力）を与えることができる。または三次元培地内で細胞を培養し、培地に加重（圧力）を与えることができる。使用する固形状の培地は、それぞれ目的に応じて、所望の形状と自重を持つものを選択することができる。

20 本発明の「圧縮脂肪細胞又は圧縮脂肪組織」とは、圧縮培養によって新たに作製された人工的な脂肪細胞・脂肪組織のことをいう。本発明の圧縮脂肪細胞・圧縮脂肪組織では、脂肪細胞あるいは脂肪組織の脂肪細胞が肥満する際に見られる脂肪細胞の肥大化を示すことなく、細胞の機能が肥満後の脂肪細胞又は脂肪組織と同様の機能を示している。即ち、インスリン抵抗性を増大させる単球走化活性因子（MCP-1）、IL-12 α 、TNF- α 、PAI-1、レジスチンなどのアディポカインの分泌が、肥満脂肪細胞又は脂肪組織と同様に増大している。

即ち、この人工的な脂肪細胞・脂肪組織は、細胞サイズの肥大化を伴うこ

とがなく、中性脂肪の蓄積も見られない。また、細胞外基質成分も正常脂肪細胞と同じであった。しかし、この人工的な脂肪細胞・脂肪組織の機能に関しては、肥満脂肪細胞・肥満脂肪組織と同様のアディポサイトカインの合成・分泌パターンを示しており、NF κ Bの活性化が起きていた。また、低分子量GTP結合タンパクRho、ROCK、ミオシン軽鎖キナーゼの活性化も起きており、肥満脂肪細胞・肥満脂肪組織と同様の状態であった。

本発明の「培養」とは、通常の細胞培養に用いる培養のことを表わすと共に、生体内環境下で脂肪組織に加圧圧縮を掛けて留置すること、更には寒天培地や2次元ゲル培地などの二次元培養用培地を2枚重ねて（疑似3次元ゲル化し）、その間に細胞を播種して培養すること、あるいは三次元培養培地で細胞を培養することを意味し、特に限定されるものではない。例えば通常の細胞培養の場合では、DMEM培地のような一般的なものであってもよく、また、目的に応じて、脂肪酸などの添加物を加えることができる。

本発明の「圧縮抵抗性」とは、細胞圧縮時において、細胞の機能に影響が表れ難い性質のことを言う。即ち、圧縮抵抗性には、細胞圧縮の力学的刺激の伝達メカニズムが物理的に及ばない場合と、圧縮認識に関わる信号伝達物質間の情報伝達が生化学的に行われない場合の2つの原因がある。例えば、物理的に及ばない状況としては、細胞と細胞周囲の細胞外基質との間に間隙があり、間隙あるいは間隙に存在する液体などの物質が細胞外基質に加えられた圧縮による力学的負荷を吸収する事態で発生する。この場合、細胞外基質に圧縮が加えられても細胞の圧縮認識機構（インテグリン、アクチン、Rho、ROCK、MLCK、NF- κ B）の圧縮による活性化などの生化学的な変化は発生しない。本発明の「圧縮認識機構が阻害されている」とは、細胞圧縮の力学的刺激が圧縮認識に関わる信号伝達物質間の情報伝達が阻害されることをいう。例えば、NF- κ B、Rho、ROCK、MLCKに関する情報伝達メカニズムが阻害されることをいう。その結果、細胞が圧縮されても、圧縮前の細胞と生化学的な変化が発生していない圧縮細胞又は組織となっている。

—本発明の第2態様—

本発明の第2の態様は、細胞及び組織を加圧圧縮して、人工的に細胞の病態モデルを作製する細胞圧縮培養方法に関するものである。

5 本発明の「細胞又は組織の病的状態」とは、正常な細胞又は正常な組織と異なり、正常な代謝機能や形状を示さないことを言う。なお、病的状態にも軽度、重度と幾つかの段階があるが、細胞や組織の正常値の範囲を逸脱した形状(容量)や性質を示すものを病的状態という。例えば、脂肪細胞の場合、病的状態とは、肥満脂肪細胞の状態を表わすものである。

10 本発明の「病的細胞又は組織」とは、本発明の細胞圧縮により作製された病的状態を持つ細胞や組織のことを言う。それ故、本発明の「病的細胞又は組織」は、「病態モデルの細胞又は組織」として、簡易に作製でき、スクリーニング方法に汎用することができる。

本発明の「脂肪細胞」とは、例えばマウス線維芽細胞由来の3T3-L1脂肪細胞、マウス脂肪細胞、ラット脂肪細胞、ヒト脂肪細胞のことを挙げる
15 ことができる。

本発明の「脂肪組織」とは、上記脂肪細胞の集積した組織部分のことを言う。例えば、マウスの皮下脂肪組織またはマウスの生殖腺脂肪組織のことを挙げる
20 ことができる。

本発明の「溶液培地」とは、細胞培養に使用される一般的な溶液培地のこと
25 であり、特に限定されるものではない。例えばDMEM培地を挙げる
ことができる。

本発明の「2次元ゲル培地」とは、例えば特許文献1に記載の方法で作製されたポリアクリルアミドゲル、あるいは市販のチオール化ヒアルロン酸ゲル(www.glycosan.com)の樹脂、例えばポリアミド・ナノファイバー、多孔質のポリビニルフォーマル(PVF)樹脂等のことをいう。

25 本発明の「細胞圧縮培養方法」とは、例えば上記2次元ゲル培地を2枚重ねて(疑似3次元ゲル化し)、その間に細胞を播種して2次元ゲル培地の自重で圧縮培養する方法、採取した組織(例えば正常脂肪組織)を加圧して圧縮し、溶液培地にて培養する方法などが挙げられる。更には、生体内環境下で脂肪組織に加圧圧縮を掛けて留置する方法を挙げる
30 ことができる。なお、正

常脂肪細胞（組織）から、本発明の圧縮培養方法で得られた人工的な肥満脂肪細胞（組織）は、正常脂肪細胞と同様の容量で、細胞サイズの肥大化がなく、中性脂肪の蓄積も見られない。また、細胞外基質成分も正常脂肪細胞と同じである。一方、この人工的な脂肪細胞・脂肪組織の機能に関しては、一般的な肥満脂肪細胞・肥満脂肪組織と同様のアディポサイトカインの合成・分泌パターンを示しており、NF κ Bの活性化が起きている。また、低分子量GTP結合タンパクRh ρ 、ROCK、ミオシン軽鎖キナーゼの活性化も起きている。一般的な肥満脂肪細胞・肥満脂肪組織と同様の状態である。そして、インスリン抵抗性を増大させる単球走化活性因子(MCP-1)、IL-12 α 、TNF- α 、PAI-1、レジスチンなどのアディポカインの分泌が、肥満脂肪細胞と同様に増大している。

なお、本発明の第1態様と共通する用語は、同じ意味を表わす。

—本発明の第3態様—

本発明の第3の態様は本発明の圧縮細胞を用いる、糖尿病治療剤等のスクリーニング方法に関するものである。

本発明の「脂肪細胞機能」とは、脂肪細胞の代謝、分泌に関する機能のことを言う。この機能は、脂肪細胞内で発現するmRNAの発現量の変動や脂肪細胞から分泌される生理活性タンパク質の分泌量の変動を指標にして、脂肪細胞の機能を評価することができる。

本発明の「アディポサイトカイン」とは、脂肪細胞から分泌される生理活性タンパク質のことを言い、例えば動脈硬化を促進させる方向に働くTNF- α 、PAI-1、HB-EGF、と動脈硬化に予防的に働くレプチン、アディポネクチン等が含まれる。TNF- α （腫瘍壊死因子 α ）は、マクロファージより分泌される炎症性サイトカインでもあり、肥満脂肪組織から分泌され、インスリン抵抗性を引き起こす要因と見なされている。PAI-1（Plasminogen activator inhibitor-1）は肥満脂肪細胞から分泌され、血栓を形成しやすくする。HB-EGF（heparin binding-epidermal growth factor-like growth factor）は肥満脂肪細胞から分泌

され、血管平滑筋の遊走・増殖をひき起こす要因となっている。一方、レプチンは白色脂肪細胞から分泌され、視床下部の満腹中枢に働き食欲を抑制する。アディポネクチンは正常脂肪細胞から産生され、インスリン感受性を促進する等の良い要因になっている。

- 5 本発明の「化合物の評価方法」とは、培養系中に添加されている薬効成分の影響を受けて、圧縮培養して得られた正常あるいは肥満脂肪細胞由来の人工的な脂肪細胞（肥満型あるいは肥満がさらに悪化した状態に類似した機能を示す脂肪細胞）が分泌するアディポサイトカインの種類と分泌量が変化する様子を測定・評価する方法のことである。このアディポサイトカインの発
- 10 現変動は、汎用のサイトカインの定量方法を用いて行なうことができる。

本発明の「飽和脂肪酸」とは、飽和高級脂肪酸のことを言い、例えば、パルミチン酸、ステアリン酸、ラウリン酸等の炭素数12以上の飽和脂肪酸を挙げるができる。好ましいものとしては、パルミチン酸を挙げるができる。

- 15 なお、本発明の第1態様と共通する用語は、同じ意味を表わす。

実施例

次に実施例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

- 20 (実施例1) 擬似3次元の細胞培養方法と3T3-L1脂肪細胞の培養

(1) 方法

a) 250Paポリアクリルアミドゲル(ソフトゲル)の作製

- 25 Tissue Eng Part A 15 (1) : 147-154 (2009) 又は J. Med. Invest., 56, 142-149 (2009) に記載の方法に順じて作成される。例えば、250Paソフトゲル用としては、ガラス製カバースリップの表面で、3.0%アクリルアミドと0.2%ビスアクリルアミドの溶液にAPS (Ammonium persulfate) および TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine) を加えてポリアクリルアミドゲルを作成する。ゲル表面にN-コハク酸イミドあるいはSulfo-SA

N P A H (*N*-Sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoate)を用いて架橋する。このガラス製カバースリップ上に形成されたゲルをコラーゲン、フィブリノーゲンまたはその混合物の溶液に浸漬して、ゲル表面を細胞外マトリックス・リガンドで被覆した。

5 b) 3 T 3 - L 1 脂肪細胞の擬似 3 次元モデルでの細胞培養

本発明の擬似 3 次元培養モデルは、*M o l . C e l l B i o l . , 2 4 , 7 5 6 7 - 7 5 7 7 (2 0 0 4)* の方法に準じて行なわれる。例えば、3 T 3 - L 1 線維芽細胞の場合、10%CSが添加されたDMEM培地で2日間培養し、コンフルエントにする。この培養細胞を前項のソフトゲル(2.4 X 2.4 cm)に撒き、48時間培養する。培養培地は、DMEM培地に10%FBS、0.5mMIBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine)、1μMデキサメタゾン、1.7μMインスリンを含んでいる。その後、10%FBSが添加されたDMEM培地で7-9日間培養し、脂肪細胞に分化させる。その間、10%FBSを含有するDMEM培地は隔日で交換する。

15 3 T 3 - L 1 細胞が上記ソフトゲル上で脂肪細胞に分化した後、更に上記 a) のソフトゲル(0.07g/cm²)を上記培養細胞を重ねてサンドイッチ状態にした。このサンドイッチ状態の培地のことを、擬似 3 次元ソフトゲル培地という。更に、この擬似 3 次元ソフトゲル培地を、10%FBSを含有するDMEM培地に浸漬して細胞培養をする。

20 (2) 結果

ソフトゲル上(2次元モデル)で培養した3 T 3 - L 1 由来の脂肪細胞と、ソフトゲルを重ねてサンドイッチ状(擬似 3 次元モデル)で培養した3 T 3 - L 1 由来の脂肪細胞を比較すると、図1に示すように、細胞の炎症マーカーであるMCP-1の分泌量が、擬似 3 次元モデル培地で培養された脂肪細胞の場合、約2倍高くなることが明らかとなった。即ち、擬似 3 次元モデル培地での脂肪細胞の培養においては、細胞培養用のゲル培地(ソフトゲル)の硬さが培養細胞に影響するだけでなく、細胞の上にかぶせられたゲル培地(ソフトゲル)による加圧・圧縮も大きな影響を与えることが明らかとなった。

即ち、細胞外マトリックスが250 Paの弾性を持つ培養基盤（2次元ソフトゲル培地）で培養された3T3-L1脂肪細胞は、健全な白色脂肪細胞のモデルとして使用できる。更に、2次元ソフトゲル培地を重ねた本発明の疑似3次元ソフトゲル培地で得られた新たな3T3-L1脂肪細胞（圧縮脂肪細胞）は、インスリン抵抗性を有する肥満脂肪細胞のモデルとして使用できることが見出された。なお、このインスリン抵抗性を有する3T3-L1脂肪細胞において細胞の肥大化は見られなかった。

(実施例2) 圧縮と変形させた脂肪組織の性状の評価

上記実施例1に示されるように、正常脂肪細胞を加圧圧縮することにより、インスリン抵抗性を有する人工的な肥満脂肪細胞が得られた。このように、培養条件によって得られる細胞の機能が異なってくるため、一般的に培養細胞を用いて薬剤の評価を行なう場合には、生体環境と同じような力学的な環境でないと、正当な薬剤の評価が難しいことを示している。

そこで、加圧圧縮時に脂肪細胞機能がどのように影響を受けるかを評価した。そのために、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインのmRNAの発現変動とアディポサイトカインの分泌変動を測定、評価することを行なった。まず、正常マウスまたは肥満糖尿病モデルマウスから脂肪組織を採取して圧縮し、脂肪組織に対する加圧とMCP-1の分泌量について評価した。

a) 方法

正常なマウスから採取された200-250 mgの脂肪組織（コントロール群）と、肥満糖尿病モデルマウス（ob/obマウス）から採取された200-250 mgの脂肪組織（ob/ob群）を、10%CSを含有するDMEM培地で培養する。

それらの組織に対して、2.4 cm x 2.4 cm (0.2 g)のカバーガラスを載せ、更にその上に0 g、3 g、6 g、9 gの錘を載せる。これらはそれぞれ即ち0.04 g/cm²、0.56 g/cm²、1.1 g/cm²、1.6 g/cm²の加圧となる。6時間以上培養後に培地を回収し、その中に含まれるMCP-1の量を測定する。

b) 結果

5 錘を載せて6時間培養した場合、図2で示されるように、正常マウスに由来するコントロール群の脂肪組織では、加重が負荷されるに従って、MCP-1の分泌量が増大することが示された。また、ob/ob群の脂肪組織では、1.1g/cm²の加重を付加させるまでは、MCP-1の分泌量が増大したが、それを超えて、1.6g/cm²の加重を与えると、逆にMCP-1の分泌量が減少していた。

10 このことは、正常細胞の組織に加重（負荷）を掛けると、MCP-1の分泌量が増大し、組織の性状としては、肥満脂肪細胞の組織に近づいて行くことを示している。更に、肥満脂肪細胞の組織に加重（負荷）を掛けると、MCP-1の分泌量が増大するが、1.1g/cm²の加重を超えると、組織障害が強くなり、肥満細胞の機能が破綻することが明らかになった。従って、このことから、正常な脂肪組織に1.6g/cm²の加重を掛ければ、肥満脂肪細胞の組織と同様の性状を示し、肥満脂肪細胞の代替として使用できることが分かった。更に、肥満脂肪細胞の組織に1.1g/cm²以下の加重を掛けることにより、肥満脂肪細胞から更に病態の悪化した脂肪細胞を作製できることが分かった。

20 更に、圧縮培養の脂肪細胞・脂肪組織について細胞の外観を評価すると、正常脂肪細胞と同様に、細胞サイズの肥大化がなく、中性脂肪の蓄積がないことが分かった。また、細胞外基質成分が正常脂肪細胞と同じであることも分かった。

一方、圧縮培養の脂肪細胞・脂肪組織の機能は、肥満脂肪細胞・組織と同様のアディポサイトカインの合成・分泌パターンを示し、NFκBの活性化が起こり、低分子量GTP結合タンパクRho、ROCK、ミオシン軽鎖キナーゼ等の活性化が起こっていることが示された。

25 以上のことから、正常な脂肪細胞の組織や肥満脂肪細胞の組織を使用し、加圧（加重）の程度をコントロールすることにより、肥満の重症度に対応した脂肪細胞の組織を作製できることが示された。従って、これらの肥満の病態の進行度に応じた脂肪細胞の組織を使用して、薬剤の効果と副作用が評価できるようになることが分かった。

【0023】

(実施例3) コラゲナーゼ処理された脂肪組織の性状評価(1) 脂肪組織の動的剛性率 (Shear modulus) の測定a) 方法

5 特許文献1に記載の方法で測定を行った。即ち、20週令のob/obマウスと痩せた野生型のマウスの生殖腺脂肪を直径8mm切り取った。その脂肪組織をRheometrics fluids spectrometer (Rheometrics、Piscataway、NJ) にセットし、3~4%の振動ズレ歪(約2.5rad/sec、37℃)を与えて、脂肪

10 組織の動的剛性率を測定した。

b) 結果

図3に示されるように、痩せた野生型マウスの脂肪組織の動的剛性率は、約110Paであったが、Ob/obマウスの肥満脂肪組織の動的剛性率は、約260Paであった。即ち、痩せた野生型マウスから採取された正常脂肪

15 組織は柔らかく、肥満脂肪組織は正常脂肪組織の約2.4倍硬いことが示された。

なお、上記実施例2によれば、正常脂肪組織に約1.6g/cm²の負荷(加重)を掛けて培養すると、MCP-1の分泌量から、肥満脂肪組織と同じような性状の組織に変化することが示されている。このことは、Ob/ob

20 マウスを使用しなくても、他の野生型のマウスを使用して、その正常脂肪組織を採取し、例えば約1.6g/cm²の加重を掛ければ、肥満脂肪細胞モデルが作製でき、これを薬効評価に使用できることを示している。

(2) コラゲナーゼ処理をされた肥満脂肪細胞(肥満脂肪組織)の性状測定

図3に示されるように肥満脂肪細胞(肥満脂肪組織)が硬くなる(動的剛性率が高くなる)理由は、細胞外基質の中にコラーゲンが増加することであると考えられた。そこで、コラーゲンを分解すれば、肥満脂肪細胞(肥満脂肪組織)であっても、柔らかくなる(動的剛性率が低くなる)と考えられた。

25

a) 方法

20週令のob/obマウスの生殖腺脂肪(肥満脂肪組織)を直径8mm

切り取り、0.04%コラゲナーゼで処理を行った。

37℃にて0分、10分、30分の間、コラゲナーゼで処理した。処理後の脂肪組織をクリープメーター（山電製、RE2-3305B）にセットし、レオロジー測定を行い、脂肪組織のヤング率を測定した。

5 b) 結果

図4に示されるように、コラゲナーゼの処理時間が長くなれば、肥満脂肪細胞の組織であっても、組織の硬さ（ヤング率）が低下することが示された。

また、コラゲナーゼ処理により、細胞外基質がおよそ30-50%減少することが、上記ヤング率から推定された。

10

産業上の利用可能性

本発明の加圧圧縮下での細胞培養方法により、例えば正常脂肪細胞を使用して、肥満状態の脂肪細胞と同様の性状を持った細胞に変換できることを見出した。これにより、正常脂肪細胞を用いて、簡単に所望の病態を示す人工的な肥満脂肪細胞を作製できるようになった。即ち、本発明の圧縮培養された細胞は、人工的に得られた病的状態の細胞モデルとして、薬剤の評価スクリーニングに使用することができる。例えば、正常脂肪細胞を用いて得られる圧縮脂肪細胞は、生体の肥満脂肪細胞と同じ機能を示すため、薬剤の正当なスクリーニングの評価結果を得ることが出来る。

15

また、加圧、圧縮条件を変化させることにより、例えば、正常脂肪細胞あるいは肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織を用いて、簡単に所望の病態の肥満脂肪細胞を作製することができる。そのため、本発明の圧縮脂肪細胞を用いて、肥満症、メタボリック・シンドローム、糖尿病、脂質異常症、高血圧症または動脈硬化の病態生理の解明とともに、新たな診断・治療などに関わる化合物の評価が可能となった。

20

25

請求の範囲

[請求項1]

細胞又は組織を圧縮培養して作製される、病的状態の細胞モデルとしての圧縮細胞又は圧縮組織であって、

- 5 a) 上記圧縮培養における加圧が、 $0.07 \sim 1.6 \text{ g/cm}^2$ であるか、
細胞や組織の圧縮率が $2 \sim 90\%$ である、
b) 上記圧縮細胞又は圧縮組織は、圧縮前の細胞サイズの肥大化を伴うことなく、かつ、

圧縮前より病的状態が亢進している細胞の機能を示すものである

- 10 ことを特徴とする、圧縮細胞又は圧縮組織。

[請求項2]

上記細胞又は組織が正常脂肪細胞又は正常脂肪組織であることを特徴とする、請求項1に記載の圧縮細胞又は圧縮組織。

[請求項3]

- 15 上記病的状態が亢進している細胞の機能が、 $100 \mu\text{m} \sim 150 \mu\text{m}$ の肥満状態の脂肪細胞と同じ機能を示すものであることを特徴とする、請求項2に記載の圧縮細胞又は圧縮組織。

[請求項4]

- 20 上記正常脂肪細胞又は正常脂肪組織が、3T3-L1脂肪細胞、マウス脂肪細胞又は組織、ラット脂肪細胞又は組織、ヒト脂肪細胞又はヒト脂肪組織である、請求項2又は3に記載の圧縮細胞又は圧縮組織。

[請求項5]

マウス脂肪組織が、マウス正常脂肪組織である、請求項4に記載の圧縮細胞又は圧縮組織。

- 25 [請求項6]

上記マウス正常脂肪組織が、マウスの生殖腺脂肪組織である、請求項5に記載の圧縮細胞又は圧縮組織。

[請求項7]

上記脂肪細胞又は脂肪組織が、肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織であること

を特徴とする、請求項1に記載の圧縮細胞又は圧縮組織。

[請求項8]

上記病的状態が亢進している細胞の機能が、更に病態の悪化した肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織の機能を示すものであることを特徴とする、請求項7

5

[請求項9]

上記肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織が、ob/obマウスの脂肪組織である、請求項7に記載の圧縮細胞又は圧縮組織。

[請求項10]

上記加圧が、 1.6 g/cm^2 である、請求項7～9のいずれかに記載の圧縮細胞又は圧縮組織。

10

[請求項11]

上記請求項2～10に記載の圧縮脂肪細胞又は圧縮脂肪組織を使用し、更に評価薬剤との共存下で培養することにより、上記脂肪細胞又は脂肪組織における脂肪細胞機能を評価することによる、肥満症、メタボリック・シンドローム、糖尿病、脂質異常症、高血圧症または動脈硬化の病態、診断、治療に係る化合物の評価方法。

15

[請求項12]

上記脂肪細胞機能を評価するための指標としてのアディポサイトカインが、アディポネクチン、MCP-1またはIL-12 α である、請求項11に記載の化合物の評価方法。

20

[請求項13]

薬剤と共に脂肪酸が添加されている、請求項11または12に記載の化合物の評価方法。

25

[請求項14]

上記脂肪酸が、飽和脂肪酸である、請求項13に記載の化合物の評価方法。

[請求項15]

上記飽和脂肪酸がパルミチン酸である、請求項14に記載の化合物の評価方法。

[請求項 16]

細胞と細胞外基質との間に間隙を有することを特徴とする、細胞圧縮において細胞に加圧が掛からない圧縮抵抗性の細胞または組織であって、

細胞外基質タンパクが30-50%減少することにより、

- 5 加圧により、細胞の生化学的な変化が生じないことを特徴とする、圧縮抵抗性の細胞または組織。

[請求項 17]

上記細胞外基質タンパクがコラーゲンである請求項16に記載の圧縮抵抗性の細胞または組織。

- 10 [請求項 18]

上記コラーゲンが、コラーゲンVIである、請求項16に記載の圧縮抵抗性の細胞または組織。

[請求項 19]

15 圧縮認識機構が阻害されていることを特徴とする、圧縮抵抗性の圧縮細胞または組織であって、

加圧により、細胞の生化学的な変化が生じないことを特徴とする、圧縮抵抗性の圧縮細胞または組織。

[請求項 20]

- 20 上記圧縮認識機構がNF- κ B、Rho、ROCK、MLCKに関するものである、請求項18に記載の圧縮細胞または組織。

[請求項 21]

細胞又は組織を圧縮培養することを特徴とする、細胞又は組織の病的状態（病態モデルの細胞又は組織）を作製する方法であって、

- 25 a) 上記細胞や組織の圧縮率が2-90%であるか、
b) 圧縮の加圧が、0.07-1.6 g/cm²である
ことを特徴とする、病的細胞又は組織の作製方法。

[請求項 22]

上記細胞又は組織が、正常脂肪細胞又は正常脂肪組織であることを特徴とする、請求項21に記載の作製方法。

[請求項 23]

上記圧縮率が 2 ~ 20 %であることを特徴とする、請求項 21 又は 22 に記載の作製方法。

[請求項 24]

- 5 上記圧縮培養の培地が、溶液培地または 150 ~ 350 Pa の硬さの 2 次元ゲル培地であることを特徴とする、請求項 21 ~ 23 のいずれかに記載の作製方法。

[請求項 25]

上記溶液培地が、DMEM培地である、請求項 24 に記載の作製方法。

- 10 [請求項 26]

上記 2 次元ゲル培地の硬さが 250 Pa である、請求項 24 に記載の作製方法。

[請求項 27]

- 15 上記 2 次元ゲル培地がコラーゲン及び／又はフィブロネクチンでゲル上を被覆していることを特徴とする、請求項 24 又は 26 に記載の作製方法。

[請求項 28]

上記脂肪細胞又は脂肪組織が、3T3-L1 脂肪細胞、マウス脂肪細胞又は組織、ラット脂肪細胞又は組織、ヒト脂肪細胞又はヒト脂肪組織である、請求項 22 に記載の作製方法。

- 20 [請求項 29]

マウス脂肪組織が、マウス正常脂肪組織である、請求項 28 に記載の作製方法。

[請求項 30]

- 25 上記細胞又は組織の病的状態が、肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織であることを特徴とする、請求項 22 に記載の作製方法。

[請求項 31]

上記細胞又は組織が、病的細胞または病的組織であり、病態が更に悪化した病的細胞又は組織の作製方法であることを特徴とする、請求項 21 に記載の作製方法。

[請求項 3 2]

上記病的細胞又は組織が、肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織であることを特徴とする、請求項 3 1 に記載の作製方法。

[請求項 3 3]

- 5 上記肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織が、ob / ob マウスの肥満脂肪細胞又は肥満脂肪組織であることを特徴とする、請求項 3 2 に記載の作製方法。

[請求項 3 4]

- 10 圧縮により細胞機能に障害が生じないように、組織の細胞外基質タンパクの密度を低下させ、細胞と細胞外基質の間に間隙を有する細胞又は組織を作製する方法。

[請求項 3 5]

上記細胞外基質タンパクの密度を低下させることが、コラゲナーゼ処理を行うことである、請求項 3 4 に記載の方法。

[請求項 3 6]

- 15 細胞圧縮又は細胞加圧に起因して、病的状態にある細胞又は組織において、圧縮又は加圧環境を解消することにより、細胞又は組織の病的状態を軽減あるいは解消する方法。

[請求項 3 7]

- 20 上記圧縮又は加圧環境を解消することが、細胞外基質による力学的刺激の伝達を解消することである、請求項 3 6 に記載の方法。

[請求項 3 8]

- 25 上記細胞外基質による力学的刺激の伝達を解消することが、コラーゲン、アクチンフィラメント、インテグリンの間の信号伝達阻害またはNF- κ B、Rho、ROCK、MLCK阻害によるものである、請求項 3 7 に記載の方法。

[請求項 3 9]

上記細胞外基質による力学的刺激の伝達を解消することが、コラーゲン 6 の産生を阻害することを特徴とする、請求項 3 7 に記載の方法。

図 1

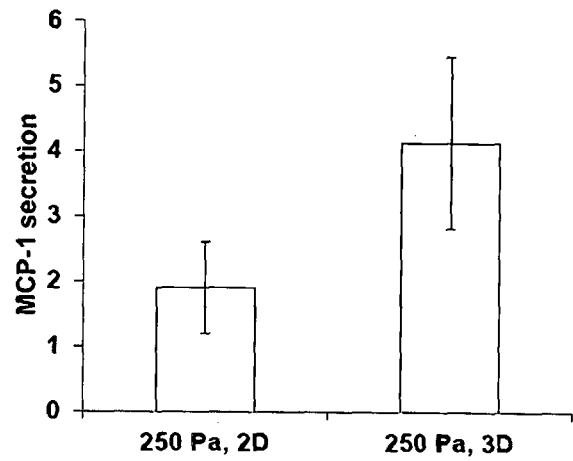
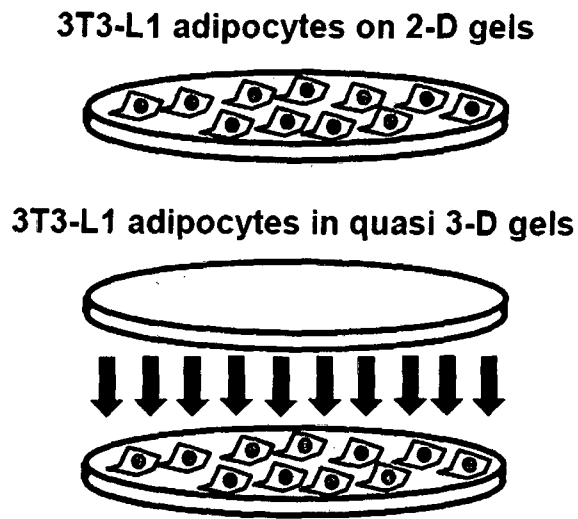
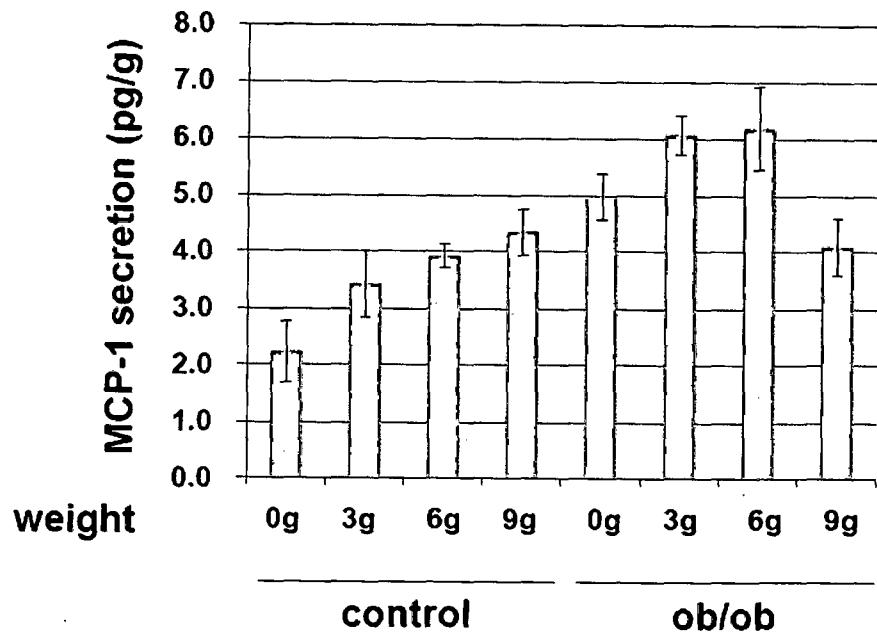
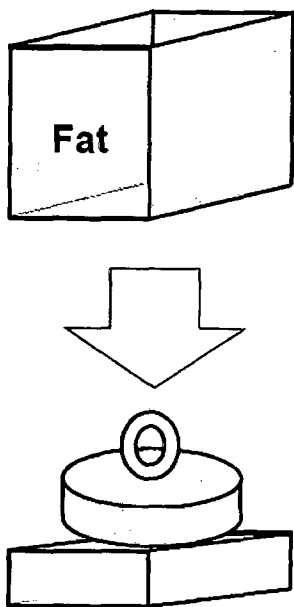
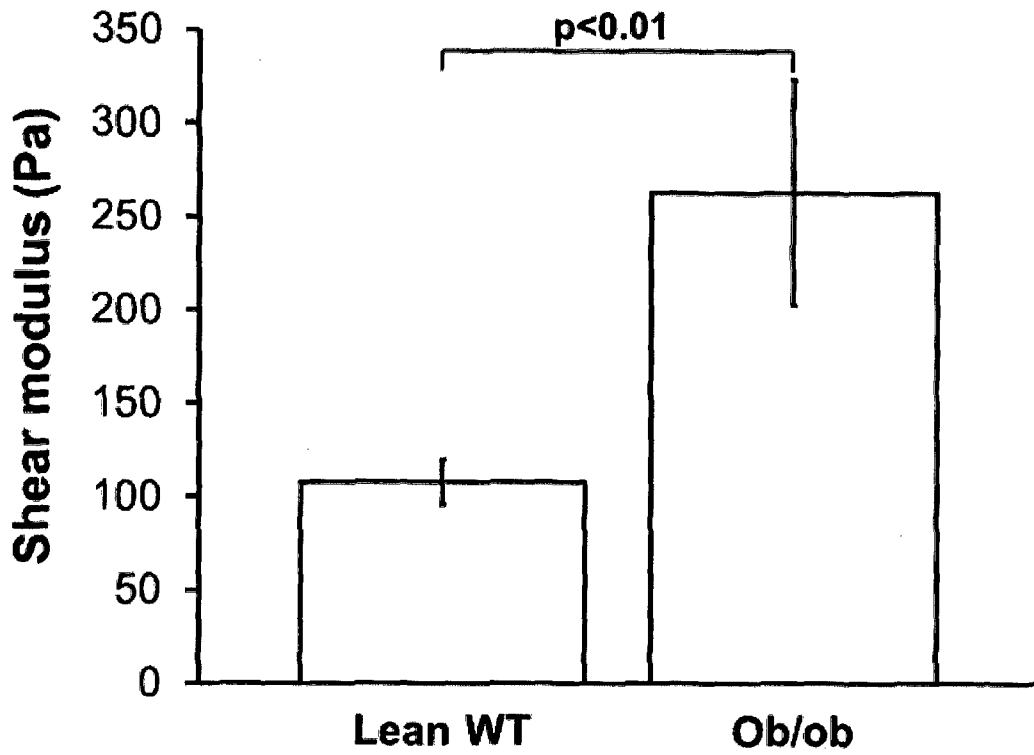


図 2

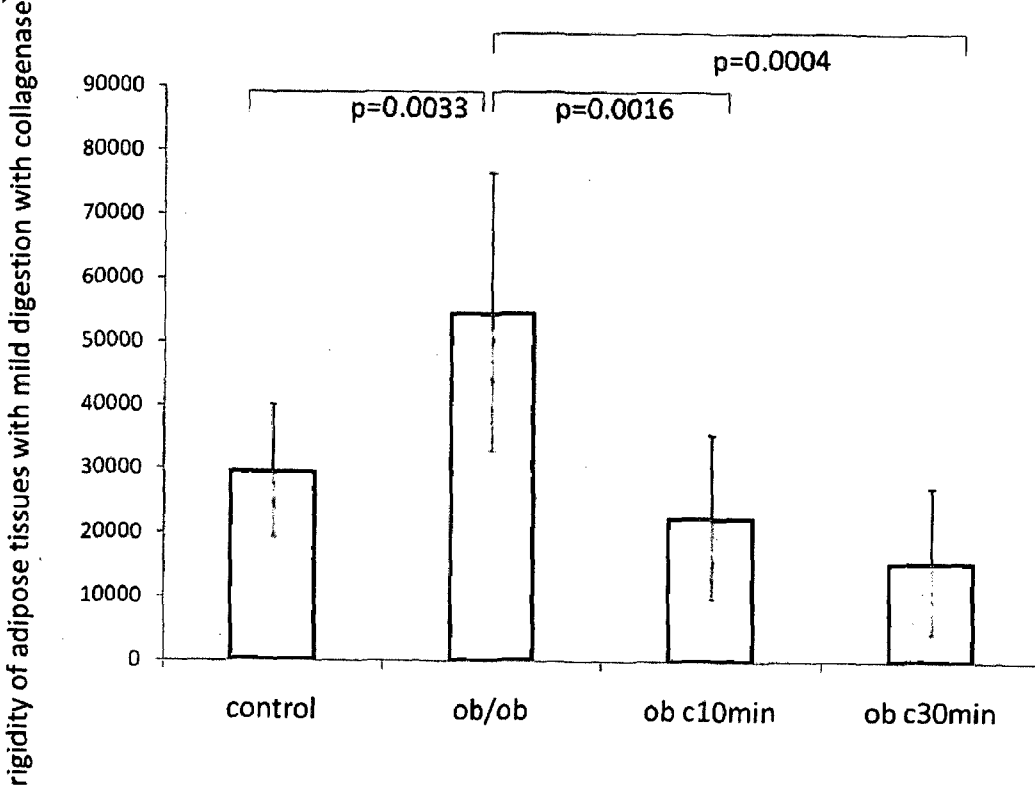


3



n=7 mice/group, 3-10 samples/mouse
(depending on tissue size)

4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/055199

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/07(2010.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N5/077(2010.01)i, C12Q1/02(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N5/07, C12N1/00, C12N5/077, C12Q1/02

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPlus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2012-10600 A (The University of Tokushima), 19 January 2012 (19.01.2012), (Family: none)	1-39
A	Ayaka ITO et al., "Role of MAPK phosphatase-1 (MKP-1) in the induction of MCP-1 during the course of adipocyte hypertrophy", Journal of Japan Society for the Study of Obesity, 2008, 14(2), pages 183 to 186	1-39
A	JP 2002-531118 A (Advanced Tissue Sciences, Inc.), 24 September 2002 (24.09.2002), & EP 1144596 A & WO 2000/034442 A2 & AU 2171900 A & IL 143564 D & CA 2353578 A	1-39

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 25 April, 2014 (25.04.14)	Date of mailing of the international search report 13 May, 2014 (13.05.14)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/055199

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011/0014597 A1 (NOVATISSUE GMBH), 20 January 2011 (20.01.2011), & EP 2254987 A & WO 2009/118141 A2 & DE 102008015633 A	1-39
A	CN 101492655 A (Seika Daigaku), 29 July 2009 (29.07.2009), (Family: none)	1-39
A	FRANGOS, J.A., et al., Shear Stress Induced Stimulation of Mammalian Cell Metabolism, Biotechnology and Bioengineering, 1988, 32, pp.1053-1060	1-39
T	PELLEGRINELLI, V., et al., Human adipocyte function is impacted by mechanical cues, The Journal of Pathology [online], 2014.03.12 [retrieved on 2014.04.24]. Retrieved from the Internet: <URL: http://dx.doi.org/10.1002/path.4347 >	1-39

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
 Int.Cl. C12N5/07(2010.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N5/077(2010.01)i, C12Q1/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
 Int.Cl. C12N5/07, C12N1/00, C12N5/077, C12Q1/02

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 1971-2014年
 日本国実用新案登録公報 1996-2014年
 日本国登録実用新案公報 1994-2014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）
 CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2012-10600 A（国立大学法人徳島大学）2012.01.19 （ファミリーなし）	1-39
A	伊藤綾香ら，脂肪細胞肥大化における MCP-1 発現誘導と MKP-1 の役割，肥満研究，2008，14(2)，pp.183-186	1-39

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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「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
「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）	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 25.04.2014	国際調査報告の発送日 13.05.2014
--------------------------	--------------------------

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） 荒木 英 則 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B	9736
--	--	----	------

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	JP 2002-531118 A (アドバンスド ティッシュ サイエンスズ, インコーポレーテッド) 2002. 09. 24, & EP 1144596 A & WO 2000/034442 A2 & AU 2171900 A & IL 143564 D & CA 2353578 A	1-39
A	US 2011/0014597 A1 (NOVATISSUE GMBH) 2011. 01. 20, & EP 2254987 A & WO 2009/118141 A2 & DE 102008015633 A	1-39
A	CN 101492655 A (清華大学) 2009. 07. 29(ファミリーなし)	1-39
A	FRANGOS, J. A., et al., Shear Stress Induced Stimulation of Mammalian Cell Metabolism, Biotechnology and Bioengineering, 1988, 32, pp.1053-1060	1-39
T	PELLEGRINELLI, V., et al., Human adipocyte function is impacted by mechanical cues, The Journal of Pathology [online], 2014. 03. 12 [retrieved on 2014. 04. 24]. Retrieved from the Internet: <URL: http://dx.doi.org/10.1002/path.4347 >	1-39