

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-12078

(P2017-12078A)

(43) 公開日 平成29年1月19日(2017.1.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/078 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 J	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 A	4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2015-132000 (P2015-132000)	(71) 出願人	504139662 国立大学法人名古屋大学 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番
(22) 出願日	平成27年6月30日 (2015. 6. 30)	(74) 代理人	100114362 弁理士 萩野 幹治
		(72) 発明者	清井 仁 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内
		(72) 発明者	富田 章裕 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内
		(72) 発明者	早川 文彦 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内

最終頁に続く

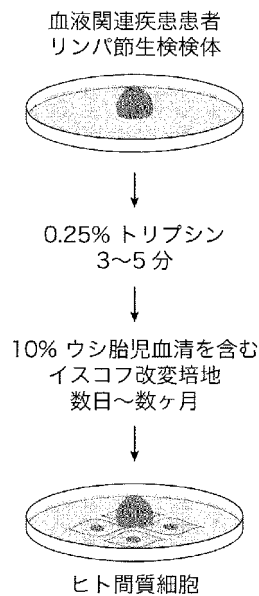
(54) 【発明の名称】 血液関連疾患患者のリンパ節由来の間質細胞

(57) 【要約】

【課題】病巣の微小環境を解明し、有効な治療法の確立を可能にすべく、リンパ増殖性疾患における微小環境を再現した培養系を提供することを課題とする。

【解決手段】(1)リンパ増殖性疾患患者のリンパ節から採取した生検試料から、血球成分を除去するステップ及び(2)血清を添加した栄養培地で培養するステップ、含む方法によって、リンパ増殖性疾患患者リンパ節由来のヒト間質細胞を調製する。

【選択図】図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下のステップ(1)及び(2)を含む、リンパ増殖性疾患患者リンパ節由来のヒト間質細胞を調製する方法；

(1)リンパ増殖性疾患患者のリンパ節から採取した生検試料から、血球成分を除去するステップ；

(2)血清を添加した栄養培地で培養するステップ。

## 【請求項 2】

プロテアーゼで処理した試料をステップ(2)の培養に供する、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記プロテアーゼがトリプシンである、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記栄養培地が、グルコースの含有量が多い高栄養培地である、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記栄養培地がイスコフ改変ダルベッコ培地である、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記血清の添加量が5%(v/v)～20%(v/v)である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記リンパ増殖性疾患が悪性リンパ腫である、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記悪性リンパ腫が、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、又は血管免疫芽球型T細胞リンパ腫である、請求項7に記載の方法。

## 【請求項 9】

請求項1～8のいずれか一項に記載の調製方法で得られたヒト間質細胞。

## 【請求項 10】

以下の(a)及び/又は(b)の特性を備える、ヒト間質細胞：

(a)リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球の増殖を支持する；

(b)リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球の治療抵抗性を高める。

## 【請求項 11】

前記リンパ球が、リンパ節から採取されたリンパ球である、請求項10に記載のヒト間質細胞。

## 【請求項 12】

請求項1～8のいずれか一項に記載の方法で得られた細胞である、請求項10又は11に記載のヒト間質細胞。

## 【請求項 13】

請求項9～12のいずれか一項に記載のヒト間質細胞と共培養することを特徴とする、リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球の培養方法。

## 【請求項 14】

前記リンパ球が、以下の方法、即ち、

リンパ増殖性疾患患者から採取されたリンパ球を該リンパ球が免疫的に許容される非ヒト動物に移植し、該非ヒト動物内で培養した後、該非ヒト動物から分離すること、

によって得られた細胞である、請求項13に記載の培養方法。

## 【請求項 15】

以下のステップ(i)及び(ii)を含む、リンパ増殖性疾患の予防・治療に有効な物質のスクリーニング方法：

10

20

30

40

50

( i ) 請求項 9 ~ 12 のいずれか一項に記載のヒト間質細胞と、リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球を、被験物質の存在下、共培養するステップ；

( i i ) 前記リンパ球に対する前記被験物質の有効性を判定するステップ。

【請求項 16】

前記リンパ球が、以下の方法、即ち、

リンパ増殖性疾患患者から採取されたリンパ球を該リンパ球が免疫的に許容される非ヒト動物に移植し、該非ヒト動物内で培養した後、該非ヒト動物から分離すること、  
 によって得られた細胞である、請求項 15 に記載のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は血液関連疾患患者のリンパ節から間質細胞を調製する方法及びその利用に関する。

【背景技術】

【0002】

リンパ性白血病や悪性リンパ腫など、リンパ増殖性の血液関連疾患では、間質細胞が腫瘍細胞に有利な環境を構築していると考えられている。血液関連疾患に対する有効な治療法を開発すべく、この環境（即ち、血液関連疾患の微小環境）を理解・解明することが望まれるが、そのためにはヒト体内での微小環境を再現した培養系が必要である。しかし現状では、腫瘍細胞の培養系にマウス由来の間質細胞（例えば、BALB/cマウスリンパ節由来間質細胞株。特許文献 1、非特許文献 1 を参照）が利用されており、実際の微小環境を再現したものとは言い難い。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】特開 2014 - 38 号公報

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】Katakai T et al. J Exp Med. 2004;200(6):783-795

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明が解決すべき、主たる課題は、病巣の微小環境を解明し、有効な治療法の確立を可能にすべく、リンパ増殖性疾患における微小環境を再現した培養系を提供することにある。また、当該培養系の各種用途の提供、及び当該培養系の実現に必要な細胞の提供も課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討した。その結果、濾胞性リンパ腫やびまん性大細胞型B細胞リンパ腫などの患者からリンパ節由来の間質細胞を調製することに成功した。分析の結果、当該間質細胞は線維芽細胞の特性を示した。一方、当該間質細胞と患者由来のリンパ球を共培養したところ、リンパ球の生存（維持）を強く支持した。また、患者由来のリンパ球の治療抵抗性も高めた。このように、微小環境の再現に有用な間質細胞の取得、及び当該細胞を用いた培養系の構築に成功した。また、当該培養系を利用しない応用する上で有益且つ重要な情報ももたらされた。

40

以下の発明は、以上の成果に基づくものである。

[ 1 ] 以下のステップ（ 1 ）及び（ 2 ）を含む、リンパ増殖性疾患患者リンパ節由来のヒト間質細胞を調製する方法；

（ 1 ）リンパ増殖性疾患患者のリンパ節から採取した生検試料から、血球成分を除去するステップ；

50

(2) 血清を添加した栄養培地で培養するステップ。

[2] プロテアーゼで処理した試料をステップ(2)の培養に供する、[1]に記載の方法。

[3] 前記プロテアーゼがトリプシンである、[2]に記載の方法。

[4] 前記栄養培地が、グルコースの含有量が多い高栄養培地である、[1]～[3]のいずれか一項に記載の方法。

[5] 前記栄養培地がイスコフ改変ダルベッコ培地である、[1]～[3]のいずれか一項に記載の方法。

[6] 前記血清の添加量が5%(v/v)～20%(v/v)である、[1]～[5]のいずれか一項に記載の方法。

[7] 前記リンパ増殖性疾患が悪性リンパ腫である、[1]～[6]のいずれか一項に記載の方法。

[8] 前記悪性リンパ腫が、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、又は血管免疫芽球型T細胞リンパ腫である、[7]に記載の方法。

[9] [1]～[8]のいずれか一項に記載の調製方法で得られたヒト間質細胞。

[10] 以下の(a)及び/又は(b)の特性を備える、ヒト間質細胞：

(a) リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球の増殖を支持する；

(b) リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球の治療抵抗性を高める。

[11] 前記リンパ球が、リンパ節から採取されたリンパ球である、[10]に記載のヒト間質細胞。

[12] [1]～[8]のいずれか一項に記載の方法で得られた細胞である、[10]又は[11]に記載のヒト間質細胞。

[13] [9]～[12]のいずれか一項に記載のヒト間質細胞と共培養することを特徴とする、リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球の培養方法。

[14] 前記リンパ球が、以下の方法、即ち、

リンパ増殖性疾患患者から採取されたリンパ球を該リンパ球が免疫的に許容される非ヒト動物に移植し、該非ヒト動物内で培養した後、該非ヒト動物から分離すること、  
によって得られた細胞である、[13]に記載の培養方法。

[15] 以下のステップ(i)及び(ii)を含む、リンパ増殖性疾患の予防・治療に有効な物質のスクリーニング方法：

(i) [9]～[12]のいずれか一項に記載のヒト間質細胞と、リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球を、被験物質の存在下、共培養するステップ；

(ii) 前記リンパ球に対する前記被験物質の有効性を判定するステップ。

[16] 前記リンパ球が、以下の方法、即ち、

リンパ増殖性疾患患者から採取されたリンパ球を該リンパ球が免疫的に許容される非ヒト動物に移植し、該非ヒト動物内で培養した後、該非ヒト動物から分離すること、  
によって得られた細胞である、[15]に記載のスクリーニング方法。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】血液関連疾患患者のリンパ節から間質細胞を調製するプロトコール。

【図2】血液関連疾患患者のリンパ節由来の細胞の形態。患者1、2：濾胞性リンパ腫患者

【図3】血液関連疾患患者のリンパ節から得られた間質細胞のフローサイトメトリー解析。線維芽細胞マーカー(ICAM-1、VCAM-1、PDPN)、濾胞樹状細胞マーカー(CD21、CD35)及び血管内皮細胞マーカー(CD31)の発現の有無を調べた。患者1、2：濾胞性リンパ腫患者

【図4】取得に成功したヒト間質細胞と血液関連疾患患者細胞の共培養。血液関連疾患患者(患者3：びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、患者4：濾胞性リンパ腫、患者5：Castlemann病、患者6：反応性病変)のB細胞をヒト間質細胞と共培養し、生存率を評価した。マウス間質細胞BLS4と共培養した場合の生存率を比較対照とした。

10

20

30

40

50

【図5】ヒト間質細胞の治療抵抗性への寄与。取得に成功したヒト間質細胞の培養上清が添加された培地でB細胞リンパ腫細胞株（パーキットリンパ腫細胞株Ramos、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫細胞株WILL2）を培養し、PI3キナーゼ阻害剤に対する抵抗性を評価した。

【発明を実施するための形態】

【0008】

#### 1. ヒト間質細胞の調製方法

本発明の第1の局面は、リンパ増殖性疾患患者リンパ節由来のヒト間質細胞を調製する方法（以下、「本発明の調製方法」と呼ぶ）に関する。間質細胞（ストローマ細胞）は、細胞外マトリクスを産生して組織構造を支える細胞である。リンパ節における間質細胞は、免疫細胞の生存や機能等にも関与する。本発明によれば、リンパ増殖性疾患患者リンパ節由来のヒト間質細胞（線維芽細胞）を調製することができる。本明細書において「リンパ増殖性疾患患者リンパ節由来」とは、リンパ増殖性疾患患者のリンパ節から採取した生体材料を出発材料として調製されることを意味する。

10

【0009】

本発明の調製方法では、以下のステップ（1）及び（2）を行う。

（1）リンパ増殖性疾患患者のリンパ節から採取した生検試料から、血球成分を除去するステップ

（2）血清を添加した栄養培地で培養するステップ

【0010】

ステップ（1）では、リンパ増殖性疾患患者のリンパ節から採取した生検試料を用いる。生検試料は予め用意しておく。即ち、本発明の実施に先立って、生検試料をリンパ増殖性疾患患者のリンパ節から採取しておく。リンパ増殖性疾患はリンパ球の異常な増殖によって特徴付けられる。リンパ増殖性疾患患者にはリンパ節の腫脹や異型リンパ球の出現が認められる。リンパ増殖性疾患の例は悪性リンパ腫である。悪性リンパ腫はホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫に大別される。非ホジキンリンパ腫の例は、濾胞性リンパ腫、MALTリンパ腫、小細胞性リンパ腫及び形質細胞性リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、B細胞性リンパ芽球性リンパ腫などのB細胞性リンパ腫、菌状息肉腫、末梢T細胞リンパ腫、血管免疫芽球型T細胞リンパ腫、鼻型NK/T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、T細胞性リンパ芽球性リンパ腫及び成人T細胞白血病リンパ腫などのT細胞性又はNK細胞性リンパ腫である。

20

30

【0011】

生検試料が採取されるリンパ節は特に限定されない。リンパ節の例として、後頭リンパ節、耳介後リンパ節、耳下腺リンパ節、顎下リンパ節、オトガイリンパ節、鎖骨上リンパ節、腋窩リンパ節、縦隔リンパ節、傍大動脈リンパ節、鼠径リンパ節を挙げることができる。

【0012】

ステップ（1）では、用意した生検試料から血球成分（リンパ球、単球、顆粒球）を除去する。この処理により、本発明の目的において不要な細胞が除かれる。血球成分を除去する方法は特に限定されないが、例えば、金属又は樹脂等の材質のメッシュフィルターを用いた処理によれば、簡便に血球成分を除去することができる。メッシュフィルターを用いた処理では、典型的には、血球成分が通過可能な径（例えば40 $\mu$ m~70 $\mu$ m）のメッシュフィルターに生検試料を押しつけるようにすることで血球成分を通過させ、メッシュフィルターを通過せずにフィルター上に残存した成分を回収する。

40

【0013】

ステップ（1）後の試料はステップ（2）の培養に供されるが、好ましくは、ステップ（1）の後、プロテアーゼで更に処理した試料をステップ（2）の培養に供する。即ち、好ましい一態様では、ステップ（2）の培養の前にプロテアーゼで試料を処理しておく。プロテアーゼ処理を施すことにより、細胞が分散し、培養により適した状態となる。プロテアーゼとしてはトリプシン、ディスパーゼ、コラゲナーゼ、エラスターゼ、パバイン等を

50

用いることができる。二つ以上のプロテアーゼを併用してもよい。処理条件（プロテアーゼの濃度、反応液のpH、反応時間など）は常法に従えばよい。プロテアーゼとしてトリプシンを使用する場合の処理条件の例を挙げれば、トリプシン濃度0.1% (w/v) ~ 0.5% (w/v)、37、1分~10分である。尚、最適な処理条件は予備実験を通して決定することができる。

#### 【0014】

ステップ(2)では、ステップ(1)後の試料（プロテアーゼ処理を行う場合にはプロテアーゼ処理後の試料）を培養に供する。本発明では、血清を添加した栄養培地を使用する。血清としては、ウシ胎仔血清、ウマ血清、羊血清、ヒト血清等を用いることができる。血清の添加量は例えば5%(v/v)~20%(v/v)とする。栄養培地の例はイスコフ改変ダルベッコ培地、ダルベッコ改変イーグル培地、ハムF12培地、D-MEM/F12培地、イーグルMEM培地、MEM培地、RPMI 1640培地である。これらの培地に各種アミノ酸、各種ビタミン、抗生物質、糖、無機物質などを更に添加したものをを用いることにしてもよい。

10

#### 【0015】

好ましくはグルコースの含有量が多い高栄養培地を用いる。該当する培地の例は、イスコフ改変ダルベッコ培地、ダルベッコ改変イーグル培地、RPMI 1640培地である。イスコフ改変ダルベッコ培地は、グルコースの含有量が多いことに加え、アミノ酸及びビタミン類を豊富且つバランス良く含有する。例えばシグマアルドリッチジャパン株式会社、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）、ロンザジャパン株式会社、倉敷紡績株式会社等が提供するイスコフ改変ダルベッコ培地を本発明に使用することができる。

20

#### 【0016】

培養期間の途中で培地を変更することにしてもよい。途中で培地を変更する場合、少なくとも培養初期（例えば初代培養及び1~3継代の培養）は高栄養培地で培養する（以降の培養は高栄養培地又は栄養培地を使用する）ことが好ましい。

#### 【0017】

培養する際の温度は、例えば30~39、好ましくは35~38、更に好ましくは約37である。CO<sub>2</sub>濃度は、例えば4~10%、好ましくは4~6%である。培養期間は細胞の生育状態に応じて設定すればよいが、例えば、10日~24月である。培養中は必要に応じて継代する。例えば、サブコンフルエント又はコンフルエントになった時点で細胞を回収し、回収した細胞の一部を別の培養容器に移して培養を継続する。

30

#### 【0018】

ステップ(2)の培養によって目的の細胞（即ち、間質細胞である線維芽細胞）が増殖する。増殖した細胞は常法（例えばプロテアーゼ処理、セルスクレーパーなどを利用した剥離など）で回収すればよい。本発明の調製方法によれば、間質細胞である線維芽細胞が得られる。増殖した細胞、或いは回収した細胞が線維芽細胞であることは形態観察、細胞表面マーカー解析、等によって確認することができる。

#### 【0019】

### 2. リンパ増殖性疾患患者リンパ節由来の間質細胞

40

後述の実施例に示す通り、本願発明者らは複数のリンパ増殖性疾患患者からリンパ節由来の間質細胞を調製することに成功した。また、検討を進め、当該間質細胞がびまん性大細胞型B細胞リンパ腫患者、濾胞性リンパ腫患者、及びCastleman病患者のリンパ節から分離したB細胞の増殖を強く支持すること、更には当該間質細胞がリンパ腫細胞の治療抵抗性を高めることを明らかにした。これらの成果に基づき、本発明の第2の局面は、以下の(a)又は(b)の特性、或いは(a)と(b)の両方の特性を備えるヒト間質細胞を提供する。

(a) リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球の増殖を支持する

(b) リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球の治療抵抗性を高める

#### 【0020】

50

特性 ( a ) 及び ( b ) は、本発明が提供するヒト間質細胞がリンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球の支持細胞として生体外で有効に機能することを意味し、以下で説明する培養方法及びスクリーニング方法において特に重要である。例えば、リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球を培養する際、( a ) の特性を示す本発明の間質細胞を共存させると、共存させない場合に比較して、増殖率の向上が認められる。従って、本発明のヒト間質細胞はリンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球を生体外で培養、増殖、維持する目的に有用である。一方、リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球を培養する際、( b ) の特性を示す本発明のヒト間質細胞を共存させると、治療抵抗性の向上 ( 換言すれば、抗腫瘍剤に対する耐性の増強 ) が認められることになる。従って、例えば、治療抵抗性を指標としてスクリーニングを実施したり、薬剤の効能等を評価したりする場合の培養系を構築する上で本発明のヒト間質細胞は特に有用といえる。

10

#### 【 0 0 2 1 】

### 3 . リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球の培養方法

本発明は更に、本発明の調製方法で得られるヒト間質細胞の用途として、リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球の培養方法を提供する。本発明の培養方法では上記の調製方法で得られたヒト間質細胞 ( 本発明のヒト間質細胞 ) を支持細胞として用いる。即ち、本発明の培養方法は、リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球 ( 以下、「患者リンパ球」と呼ぶ ) を本発明のヒト間質細胞と共培養すること、によって特徴付けられる。本発明の培養方法は、マウス由来の間質細胞を支持細胞として用いた従来 of 培養方法に比して、生体内の微小環境をより模倣 ( 再現 ) したものと見え、細胞増殖率の向上が望めることはもとより、それを利用して得られた知見は示唆に富み、治療法や診断法を開発するためのツールとしてより重要かつ有益である。

20

#### 【 0 0 2 2 】

本発明のヒト間質細胞との共培養に供する患者リンパ球は予め患者から採取しておく。細胞の採取は常法で行えばよく、例えば、病巣 ( リンパ節、骨髄や他の臓器に形成された節外病変など ) の生検試料や末梢血又はそこからリンパ球を単離したものをを用いる。患者リンパ球としてはホジキンリンパ腫又は非ホジキンリンパ腫 ( 濾胞性リンパ腫、MALTリンパ腫、小細胞性リンパ腫及び形質細胞性リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、B細胞性リンパ芽球性リンパ腫、菌状息肉腫、末梢T細胞リンパ腫、血管免疫芽球型T細胞リンパ腫、鼻型NK/T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、T細胞性リンパ芽球性リンパ腫、成人T細胞白血病リンパ腫、NK細胞性リンパ腫等 ) の患者から単離したリンパ球を用いることができる。

30

#### 【 0 0 2 3 】

患者リンパ球として、リンパ増殖性疾患患者から採取されたリンパ球を当該リンパ球が免疫的に許容される非ヒト動物に移植し、当該非ヒト動物内で培養した後、当該非ヒト動物から分離することによって得られた細胞 ( 「 P D X 細胞」と呼ぶ ) を用いることにしてもよい。この P D X 細胞は初代細胞の形質を維持しており、患者から単離した直後の細胞に近いといえる ( Sugimoto K et al. Blood (ASH Meeting Abstracts) 2012 120:Abstract 1661を参照 ) 。 P D X 細胞を用いることにより、患者から単離した細胞と同等の細胞を必要となるときに培養に供することができる。この点は、本発明の培養方法の利用形態の一つである、後述のスクリーニング方法において大きなメリットとなる。

40

#### 【 0 0 2 4 】

「リンパ球が免疫的に許容される非ヒト動物」には、人工的に免疫不全とされた、或いは本来的に免疫不全の非ヒト動物を用いることができる。免疫不全非ヒト動物は商業的に入手が可能であるほか、マウス実験の基礎知識 ( 小出 剛著、オーム社発行、(2009/03) ISBN-10: 4274502171 ) 等に基づいて用意することができる。免疫不全非ヒト動物の動物種は特に限定されないが、典型的にはマウス又はラットである。好ましくは免疫不全マウスを用いる。例えば、「免疫的に許容される非ヒト動物」としてNOGマウス、NODマウス、又はNSGマウス ( 例えば Ito R et al. Cell Mol Immunol. 2012;9(3):208-214、Ito M et al. Blood. 2002;100(9):3175-3182を参照 ) を用いることができる。

50

## 【0025】

PDX細胞を調製するためには、患者リンパ球を上記のごとき非ヒト動物の適切な部位（例えば腹腔内）に移植し、当該非ヒト動物内で培養する。非ヒト動物内における培養は、細胞移植後の非ヒト動物を通常の飼育条件下で飼育することによって実現できる。非ヒト動物内で所定期間、細胞を培養後、当該動物の腹腔内の腫瘍、腫瘍細胞が蓄積される脾臓、リンパ節などの組織又は器官を採取する。通常は、採取した組織片などから細胞を単離し、本発明の培養方法に用いる。単離後に一旦保存し（例えば凍結保存）、その後、本発明の培養方法に用いることにしてもよい。

## 【0026】

本発明のヒト間質細胞と患者リンパ球の共培養の方法は特に限定されない。例えば、本発明のヒト間質細胞を予め培養しておき、その後、患者リンパ球を播種し、培養を継続する。別の方法として、ヒト間質細胞と患者リンパ球を同時に培養容器に播種し、培養を開始する方法を挙げることができる。ここでの「同時」は厳密な同時性を要求するものではない。従って、ヒト間質細胞と患者リンパ球を混合した後に培養容器に播種する等、両細胞の播種が時間差のない条件下で実施される場合は勿論のこと、片方の播種後、速やかに他方を播種する等、両細胞の播種が実質的な時間差のない条件下で実施される場合も、ここでの「同時」の概念に含まれる。片方の播種後、所定の時間差で他方を播種する場合は、時間差を可及的に短く設定することが好ましい。尚、支持細胞として機能するという、本発明のヒト間質細胞の特徴を活かすためには、本発明のヒト間質細胞と患者リンパ球を同時に播種して培養を開始する方法、或いは、予め培養した本発明のヒト間質細胞の上に患者リンパ球を播種して培養する方法のいずれかを採用するとよい。

## 【0027】

本発明を実施する際の他の培養条件は、ヒト細胞の一般的な培養条件に準じればよい。但し、培養に供する患者リンパ球の種類を考慮して、培養条件を設定ないし調整することが望ましい。培養条件の一例は、ウシ胎仔血清やヒト血清等を所定濃度（例えば5%~20%）含有する培地を使用、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件、である。低酸素条件下での培養（酸素濃度が5%未満）、低栄養下での培養（具体的には例えば培地中にグルコースを含まない条件）を行うことにしてもよい。尚、培養中は必要に応じて継代することができる。

## 【0028】

本発明の培養方法によれば、本発明のヒト間質細胞によって患者リンパ球の増殖が支持される結果、患者リンパ球の生存ないし増殖にとって有利な効果（即ち、生存率や増殖率の向上等）が奏される。このような効果をもたらす本発明の培養方法は、患者リンパ球を長期間にわたって維持する手段として有用である。また、患者リンパ球を株化（細胞株を樹立）する手段としても有用である。実際、パーキットリンパ腫患者のリンパ球、難治性B細胞リンパ腫患者のリンパ球から細胞株の樹立に成功している（後述の実施例を参照）。

## 【0029】

## 4. リンパ増殖性疾患の予防・治療に有効な物質のスクリーニング方法

本発明は更に、本発明の培養法の利用形態の一つとして、リンパ増殖性疾患の予防・治療に有効な物質のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法は、生体内の微小環境を模倣した培養系（本発明の培養方法）を利用することから、信頼性や客観性等に優れた評価を行え、薬剤候補の効率的な同定を可能にする。

## 【0030】

本発明のスクリーニング方法では以下のステップ(i)及び(ii)を行う。

(i) 本発明のヒト間質細胞と、リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球を、被験物質の存在下、共培養するステップ

(ii) 前記リンパ球に対する前記被験物質の有効性を判定するステップ

## 【0031】

ステップ(i)では本発明のヒト間質細胞（即ち、本発明の培養方法で調製される、リンパ増殖性疾患患者リンパ節由来の間質細胞）と、リンパ増殖性疾患患者由来のリンパ球

10

20

30

40

50



(患者リンパ球)を被験物質の存在下で共培養する。患者リンパ球としてはホジキンリンパ腫又は非ホジキンリンパ腫(濾胞性リンパ腫、MALTリンパ腫、小細胞性リンパ腫及び形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、B細胞性リンパ芽球性リンパ腫、菌状息肉腫、末梢T細胞リンパ腫、血管免疫芽球型T細胞リンパ腫、鼻型NK/T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、T細胞性リンパ芽球性リンパ腫、成人T細胞白血病リンパ腫、NK細胞性リンパ腫等)の患者から単離したリンパ球を用いることができる。本発明のヒト間質細胞と患者リンパ球の共培養の詳細は、上記の本発明の培養方法の場合と同様であるため、その説明を省略する。上記の本発明の培養方法の場合と同様、患者リンパ球としてPD X細胞を用いることにしてもよい。

#### 【0032】

被験物質の添加のタイミングは特に限定されない。従って、被験物質を含まない培養液で共培養を開始した後、ある時点で被験物質を添加することにしても、予め被験物質を含む培養液で共培養を開始することにしてもよい。尚、ステップ(i)はin vitro(生体外)で行われる。

#### 【0033】

被験物質としては様々な分子サイズの有機化合物又は無機化合物を用いることができる。有機化合物の例として、核酸、ペプチド、タンパク質、脂質(単純脂質、複合脂質(ホスホグリセリド、スフィンゴ脂質、グリコシルグリセリド、セラプロシド等)、プロスタグランジン、イソプレノイド、テルペン、ステロイド、ポリフェノール、カテキン、ビタミン(B1、B2、B3、B5、B6、B7、B9、B12、C、A、D、E等)を例示できる。医薬や栄養食品等の既存成分或いは候補成分も好ましい被験物質の一つである。植物抽出液、細胞抽出液、培養上清などを被験物質として用いてもよい。2種類以上の被験物質を同時に添加することにより、被験物質間の相互作用、相乗作用などを調べることにしてもよい。被験物質は天然物由来であっても、或いは合成によるものであってもよい。後者の場合には例えばコンビナトリアル合成の手法を利用して効率的なスクリーニング系を構築することができる。

#### 【0034】

ステップ(ii)では、一つ以上の評価指標を用いて、リンパ球に対する被験物質の有効性を判定する。ここでの評価指標として、細胞数、生存率、増殖率、細胞の形態、細胞の大きさ、細胞の周囲への広がり、タンパク質等任意の生理分子の発現量・細胞内分布、任意の生理分子の取り込み・分泌量等を挙げるることができる。

#### 【0035】

基準(対照)との比較によって被験物質の有効性を判定することが好ましい。基準として、被験物質を添加しないで共培養した場合の評価(即ち陰性対照)、及び/又は培養に供する患者リンパ球に有効な特定の物質(培養に供するリンパ球に対して薬効が認められる既知の薬剤)を添加して共培養した場合の評価(即ち陽性対照)を用いることができる。前者(陰性対照)との比較に基づき判定すれば、判定結果の客観性、信頼性等が向上する。一方、後者(陽性対照)を用いることによって、特定の物質の有効性を基準に被験物質の有効性を評価することが可能となる。従って、既知の薬剤に対する優位性を判定する場合に特に有効である。

#### 【0036】

判定を経時的に行い、被験物質の有効性を評価することにしてもよい。このような経時的な判定によれば、被験物質の作用に関して有益な多くの情報(例えば持続時間や、作用メカニズムの理解に役立つ情報)を得ることができる。

#### 【0037】

一方、被験物質の添加濃度が異なる複数の試験群を設定してステップ(i)を行うことにし、ステップ(ii)では各試験群の評価を総合して被験物質の有効性を判定することにしてもよい。このようにすれば、例えば濃度依存性など、被験物質の有効性に関してより詳細な情報を得ることができる。

#### 【0038】

10

20

30

40

50

有効性が認められた複数の被験物質を用いて再度ステップ ( i ) 及び ( i i ) を行い、有効性の高い物質の絞り込みを行うことにしてもよい。

【 0 0 3 9 】

本発明のスクリーニング方法は、リンパ増殖性疾患の予防・治療に利用される薬剤又はその開発の材料 ( 典型的にはリード化合物 ) を同定する手段として有用である。本発明のスクリーニング方法によって選択された物質が十分な薬効を有する場合には、当該物質をそのまま医薬の有効成分として使用することができる。一方で十分な薬効を有しない場合には化学的修飾などの改変を施してその薬効を高めた上で、医薬の有効成分として使用することができる。勿論、十分な薬効を有する場合であっても、更なる薬効の増大を目的として同様の改変を施してもよい。

10

【 実施例 】

【 0 0 4 0 】

1 . 血液関連疾患患者由来の間質細胞の調製

リンパ節生検では、一般に、患者から採取したリンパ節を70 μm孔のフィルターに押し当てて、透過した血球を診断に使用する。フィルターを透過しなかった残片から、間質細胞を採取することを試みた ( 図 1 ) 。残片を10 mLのPBSで洗浄後、1 mLの0.25%トリプシン-PBS溶液中、37 °Cで3~5分間静置した。10%ウシ胎児血清と2 mMグルタミンを含むイスコフ改変ダルベッコ培地 ( シグマアルドリッチジャパン株式会社製 ) 14 mLを加えてリンパ節残片ごと100 mm径のディッシュ ( 製品名 : F a l c o n セルカルチャーディッシュ、コーニングジャパン株式会社製 ) に移し、37 °C、5%CO<sub>2</sub>の条件で培養した。蒸発分の培地を随時加えて培地量10 mL以上を維持し、紡錘形の接着細胞がディッシュの50~70%を覆うまで培養を続けた ( 図 2 ) 。継代方法は293T等の接着細胞株の培養方法に準じて、トリプシンで剥離させた細胞懸濁液の半量を新しいディッシュに移すことで行った。

20

【 0 0 4 1 】

以上の方法によって、血液関連疾患患者のリンパ節生検検体5例 ( 濾胞性リンパ腫3例、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫1例、Castleman病1例 ) で間質細胞の単離に成功した。濾胞性リンパ腫患者から単離された間質細胞については約1年間にわたって維持され、株化していると考えられる。

【 0 0 4 2 】

2 . 間質細胞の特性の検討

リンパ節の微小環境は、大別して、線維芽細胞、濾胞樹状細胞、血管内皮細胞の3要素で構成されており、表面抗原の発現で分類できる。研究の初期に得られた2例の濾胞性リンパ腫患者から得られた間質細胞をフローサイトメトリーで解析した結果、表面抗原の発現は下記の通りであり、いずれも線維芽細胞であることが分かった ( 図 3 ) 。尚、PDPNは、線維芽細胞の活性化に伴って発現が増加する表面抗原である。

30

線維芽細胞マーカー : ICAM-1陽性2例、VCAM-1陰性2例、PDPN陽性1例、陰性1例

濾胞樹状細胞マーカー : CD21陰性2例、CD35陰性2例

血管内皮細胞マーカー : CD31陰性2例

【 0 0 4 3 】

3 . ヒト間質細胞と血液関連疾患患者細胞の共培養系の確立

得られた間質細胞が期待どおり血液関連疾患の細胞に有利な環境を構築するか否かを、*in vitro*共培養系で検討した。まず、B細胞マーカーの抗CD19抗体を結合させた磁気ビーズを使い、血液関連疾患患者由来のリンパ節からB細胞を分離した。間質細胞 $3 \times 10^4$ とB細胞 $1 \times 10^5$ を24穴プレート内で共培養した。トリパンブルー非染色細胞を生存細胞として、共培養2、4日目の生存B細胞数を数えた。B細胞リンパ腫細胞、非腫瘍化B細胞のいずれも、既存のマウス間質細胞BLS4と共培養した場合よりも、取得に成功したヒト間質細胞と共培養した場合の方が高い生存率を示した ( 図 4 ) 。

40

【 0 0 4 4 】

4 . 間質細胞の治療抵抗性への寄与の検討

得られた間質細胞が腫瘍細胞の治療抵抗性に寄与するかを、B細胞リンパ腫細胞株とPI3

50

キナーゼ阻害剤を用いて検討した。10%ウシ胎児血清と2 mMグルタミンを含むRPMI 1640培地、または同培地で2~3日間培養した間質細胞の培養上清を用いて、PI3キナーゼ阻害剤の希釈系列を作製した。この希釈系列中でB細胞リンパ腫細胞株を3日間培養し、生存細胞をアセトキシメチルエステル化Calceinで染色し、PI3キナーゼ阻害剤の有効濃度を比較した。パーキットリンパ腫細胞株Ramos、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫細胞株WILL2(和歌山県立医科大学、園木 孝志 博士から供与。Sonoki T et al., International Journal of Hematology 2009, 89(3), 400-402を参照)のいずれも、間質細胞の培養上清中で培養した方が、PI3キナーゼ阻害剤LY294002、idelalisibの有効濃度が増大した(図5)。つまり、取得に成功したヒト間質細胞は、B細胞リンパ腫細胞のPI3キナーゼ阻害剤に対する抵抗性(治療抵抗性)に寄与することが示唆された。

10

【産業上の利用可能性】

【0045】

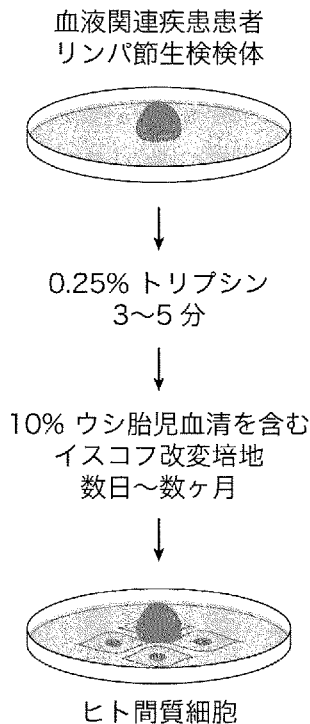
本発明は、リンパ増殖性疾患患者におけるリンパ節の微小環境構成細胞である間質細胞(線維芽細胞)を提供する。当該細胞を支持細胞とした共培養系は体内の微小環境を良好に再現するものであり、悪性リンパ腫などのリンパ球の維持、増殖に有効である。当該共培養系は例えば、薬剤の評価系としてその利用価値が高い。

【0046】

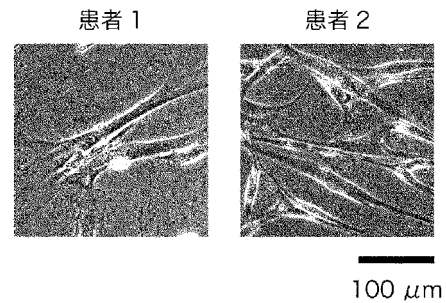
この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

20

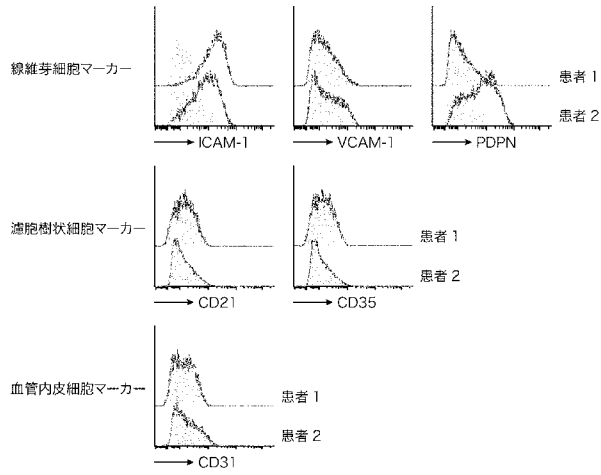
【図1】



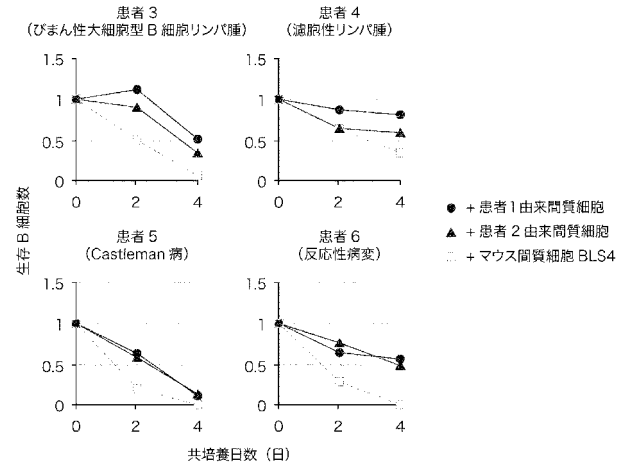
【図2】



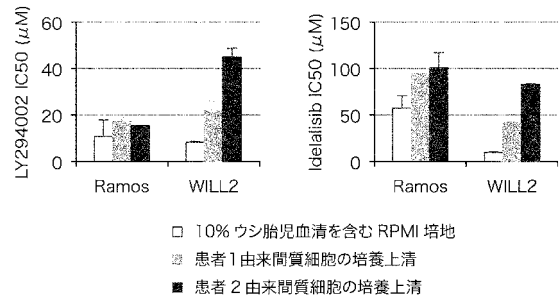
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 島田 和之

愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

(72)発明者 坂本 明彦

愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QR77

4B065 AA94X AC20 BB25 BC33 CA44 CA46