

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4238366号
(P4238366)

(45) 発行日 平成21年3月18日(2009.3.18)

(24) 登録日 平成21年1月9日(2009.1.9)

(51) Int.Cl. F 1
C 1 2 N 5/06 (2006.01) C 1 2 N 5/00 E

請求項の数 1 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2005-95832 (P2005-95832)	(73) 特許権者	504145320 国立大学法人福井大学 福井県福井市文京3丁目9番1号
(22) 出願日	平成17年3月29日(2005.3.29)	(74) 代理人	100093230 弁理士 西澤 利夫
(65) 公開番号	特開2006-271268 (P2006-271268A)	(72) 発明者	稲井 邦博 福井県吉田郡松岡町下合月23-3 国立 大学法人福井大学内
(43) 公開日	平成18年10月12日(2006.10.12)	(72) 発明者	高木 和貴 福井県吉田郡松岡町下合月23-3 国立 大学法人福井大学内
審査請求日	平成17年8月10日(2005.8.10)	(72) 発明者	内木 宏延 福井県吉田郡松岡町下合月23-3 国立 大学法人福井大学内
微生物の受託番号	FERM P-20424		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイトカイン産生ヒト細胞株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト胸腺癌細胞から樹立したヒト細胞株であって、インターロイキン-6、インターロイキン-8およびrantesを自立的に産生する細胞株Thy-L (FERM P-20424)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願の発明は、サイトカイン産生ヒト細胞株に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、サイトカインと、このサイトカインと協調的に作用するケモカインとを自立的に産生するヒト細胞株に関するものである。

【背景技術】

【0002】

「サイトカイン」(cytokine)は細胞で産生され、それに対する受容体を有する細胞に働く分子量が1万~数万のタンパク質群の総称である。サイトカインは、ホルモンのように産生臓器は明確ではないものの、1)ホルモン同様に微量で効果発現、2)特定の標的細胞に作用、3)一つのサイトカインが複数の効果を発現、4)複数のサイトカインが共通の機能を保有、5)一つのサイトカイン産生が他のサイトカイン産生を誘導、調節するサイトカインネットワークの構築、といった共通の特性を示し、生体内で免疫・生体防御、炎症・アレルギー、発生・分化、造血機構、内分泌系、神経系に関与している。

【0003】

このうち、生体内における様々な炎症症状を引き起こす腫瘍壊死因子 (TNF)、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-6 (IL-6) などは「炎症性サイトカイン」と呼ばれるが、特にIL-6は多彩な生理活性を有し、Castleman病、慢性関節リウマチ、Crohn病を初めとする様々な炎症性疾患の病態に関与することが知られている。

【0004】

一方、インターロイキン-8 (IL-8) やrantes (ランテス) など貪食細胞とリンパ球の遊走、活性化に関わる分子量8-14kDa程度のサイトカイン群は「ケモカイン」と呼ばれ、45種類以上の構成メンバーからなるファミリーを形成している。ケモカインは、細胞遊走性を有するサイトカインとして命名され、炎症性サイトカインなどの炎症刺激によって好中球や単球に作用し、急性や慢性炎症における白血球浸潤を誘導する生理活性物質として研究されてきた。実際に、慢性関節リウマチなどの関節炎局所で、多彩なケモカインが発現していることが明らかにされている。また近年、リンパ球や樹状細胞を標的細胞とするケモカイン群の存在が同定され、炎症や免疫応答における細胞遊走にとどまらず、免疫、癌、ウイルス感染などの分野でも重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。

10

【0005】

以上のとおり、炎症性サイトカインとケモカインとは密接に関連しており、とくにケモカイン受容体を標的にしたアンタゴニストは慢性関節リウマチ、喘息、乾癬などの免疫・アレルギー疾患を中心に、エイズ、アルツハイマー病、多発性骨髄腫などの治療薬、診断薬開発に利用されており、一部は臨床試験の段階にまで進行しているなど、将来、大きな医薬品市場を形成するものと予想されている。

20

【0006】

従って、現在のサイトカイン研究は、サイトカインやケモカインの細胞産生メカニズム、あるいはそれらのアンタゴニスト刺激に対する細胞応答の解析が中心となっており、そのための研究材料としてサイトカイン産生細胞が注目を集めている。

【0007】

例えば特許文献1には、IL-6を産生し、そのIL-6を自らが受容するというIL-6オートクライン増殖性のヒト骨髄腫細胞株が記載されている。

【0008】

しかしながら、炎症性サイトカインについては、IL-6以外の産生細胞株は少数であり、IL-8やランテスを産生する細胞株はほとんど知られていない。

30

【0009】

唯一、米国ATCCから供給されている子宮頸部 (endocervical) 由来の細胞株End1/E6E7 (ATCC No. CRL-2615) が、IL-6、IL-8、rantesを含むサイトカイン産生細胞株である。ただしこの細胞株End1/E6E7は、子宮頸部細胞にレトロウイルスベクターをトランスフェクションして作成された細胞株である。正常子宮頸部細胞は、元来サイトカインを分泌する能力を有しているが、ヒトパピローマウイルス等のウイルス感染時には、サイトカイン分泌状況が変動することが示されており、この細胞株End1/E6E7におけるサイトカイン産生は自然なサイトカイン産生とは異なり、外来性のプロモーター/エンハンサーによって制御されている可能性が高い。従って、生体内で実際に機能している炎症性サイトカインの生理活性や、あるいはそのアンタゴニストの作用効果を解析するための系としては、必ずしも適切なものではない。

40

【特許文献1】特開2004-159662号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

炎症性サイトカインとケモカインとは、炎症や免疫応答にとどまらず、癌やウイルス感染などの生体反応にも密接に関連している。従って、これらの生体反応に関わるサイトカイン・ケモカインネットワークの基礎的研究、受容体やアンタゴニストのスクリーニング、あるいはサイトカインが関連する腫瘍、炎症性疾患、アレルギー性疾患等の病態解析等

50

をさらに実効性あるものとするためには、炎症性サイトカインとケモカインをそれぞれ別個に産生する細胞だけでは不十分であり、両者を、しかも自立的に産生する細胞株の存在が不可欠である。

【0011】

この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、炎症性サイトカインと、この炎症性サイトカインと協調して作用するケモカインとを、自立的に産生する細胞株を提供することを課題としている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

この出願は、前記の課題を解決するための発明として、サイトカインとケモカインとを自立的に産生するサイトカイン産生ヒト細胞株を提供する。

10

【0013】

この発明のサイトカイン産生ヒト細胞株においては、サイトカインが炎症性サイトカインであること、さらに詳しくは、炎症性サイトカインがインターロイキン-6であることを具体的な態様の一つとしている。

【0014】

また、ケモカインがインターロイキン-8および/またはrantesであることを別の具体的な態様としている。

【0015】

さらに別の具体的な態様は、この発明のサイトカイン産生ヒト細胞株は、ヒト胸腺癌細胞から樹立したヒト細胞株である。

20

【0016】

またこの出願は、さらに具体的なサイトカイン産生ヒト細胞株として、ヒト胸腺癌細胞から樹立したヒト細胞株であって、インターロイキン-6、インターロイキン-8およびrantesを自立的に産生する細胞株Thy-L (FERM P-20424)を提供する。

【0017】

なお、この発明において、「細胞株」とは実質的に無限の継代培養によっても前記の炎症性サイトカインおよびケモカインの産生能が維持される細胞を意味する。また「自立的に産生する」とは、炎症性サイトカインIL-6、ケモカインIL-8およびケモカインrantesが、細胞株のそれぞれの内在性遺伝子からの発現産物として産生されることを意味する。

30

【発明の効果】

【0018】

この発明のサイトカイン産生ヒト細胞株は、例えば炎症性サイトカインと、この炎症性サイトカインと協調して作用するケモカインとを自立的に産生する。これによって、炎症や免疫応答、癌、ウイルス感染などの生体反応に関わるサイトカイン・ケモカインネットワークの基礎的研究、受容体やアンタゴニストのスクリーニング、あるいはサイトカインが関連する腫瘍、炎症性疾患、アレルギー性疾患等の病態解析に大きく貢献する。また、この発明の細胞株は、前記の各疾患に対する治療薬剤、診断薬剤の開発ツールとしての有用性を有してもいる。しかも、この発明によって提供される具体的な細胞株Thy-L (FERM P-20424)は、世界初のヒト胸腺癌細胞株である。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

この発明のサイトカイン産生ヒト細胞株は、例えば胸腺癌患者の癌組織から分離した細胞から、例えば1年以上に渡って安定に増殖する細胞を選択して株細胞候補とし、その候補細胞が目的のサイトカイン(例えば、炎症性サイトカインIL-6、ケモカインIL-8および/またはケモカインrantes等)を産生することを確認することによって、細胞株として樹立することができる。具体的は以下の手続に従って行うことができる。

(1) 癌細胞の分離

胸腺癌組織等の癌組織から、公知の方法に従って、非癌細胞(単核球、付着細胞、T細胞等)を除去して、癌細胞を90%以上、好ましくは95%以上、さらに好ましくは99%以上

50

に純化する。

(2) 癌細胞の株化

分離した癌細胞を、公知の哺乳動物培養培地（例えば、10～20%のウシ胎児血清を添加したRPMI 1640培地）で培養し、安定に増殖するまで定期的に培地を交換しながら培養を行う。そして、1年以上にわたって安定に増殖する培養を選択し、細胞株候補とする。

(3) サイトカイン産生の確認

株細胞候補を培養培地で培養し、その培養上清について、目的のサイトカイン（すなわち、例えば炎症性サイトカインIL-6、ケモカインIL-8および/またはケモカインrantes）が産生されていることを確認する。このような確認には、公知のウエスタンブロット、免疫沈降法、免疫組織化学的方法、フローサイトメトリー、RIA、ELISA法などが使用できる。またこれらの方法に使用する抗体は、市販の、あるいは公知の抗体作成法により適宜に作成した標識化モノクローナル抗体やポリクローナル抗体を使用することができる。標識は、酵素、放射性同位体または蛍光色素を使用することができる。酵素は、代謝回転数が大であること、抗体と結合させても安定であること、基質を特異的に着色させる等の条件を満たすものであれば特段の制限はなく、通常のエIAに用いられる酵素、例えば、ペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコース-6-リン酸化脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素等を用いることもできる。また、酵素阻害物質や補酵素等を用いることもできる。これら酵素と抗体との結合は、マレイミド化合物等の架橋剤を用いる公知の方法によって行うことができる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知の物質を使用することができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3,3',5,5'-テトラメチルベンジシンを、また酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。放射性同位体としては、 ^{125}I や ^3H 等の通常のエIAで用いられているものを使用することができる。蛍光色素としては、フルオレッセンスイソチオシアネート（FITC）やテトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）等の通常のエIA抗体法に用いられるものを使用することができる。酵素を用いる場合には、酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することによって酵素活性を求め、これを結合抗体量に換算し、標準値との比較から抗体量が算出される。放射性同位体を用いる場合には、放射性同位体の発する放射線量をシンチレーションカウンター等により測定する。また、蛍光色素を用いる場合には、蛍光顕微鏡を組み合わせた測定装置によって蛍光量を測定すればよい。また、フローサイトメーターを用いて測定することもできる。さらに、1次抗体と標識化2次抗体を用いたサンドイッチ法（標識として酵素を用いた場合には「ELISA法」）も好ましく用いることができる。また、免疫組織化学的測定には、市販のサイトカイン抗体アレイキット（例えば、Panomics社製TransSignal Human Cytokine Antibody Array）を用いることによって、広範種のサイトカイン産生を網羅的に確認することができる。

【0020】

以上の方法等によって、例えば炎症性サイトカインIL-6、ケモカインIL-8および/またはケモカインrantesを産生するサイトカイン産生細胞株を樹立することができる。

【0021】

この発明は、以上の方法によって樹立された世界で初めての胸腺癌細胞株であって、炎症性サイトカインIL-6、ケモカインIL-8およびケモカインrantesを産生する細胞株の具体例として、ThyL-6を提供する。なおこのThyL-6細胞株は、2005年2月22日付で独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受領されている（受託番号FERM P-20424）。

【実施例】

【0022】

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例によって限定されるものではない。

実施例1：細胞株の樹立

胸腺癌におよび死亡した患者（57歳、男性）から、インフォームドコンセントに基づいて癌組織を分離し、非癌細胞を除去して少なくとも95%以上に純化した癌細胞を得た。この癌細胞を10%ウシ胎児血清含有のRPMI1640培地で、約 1×10^6 細胞/mlの濃度で浮遊培養した（5%CO₂、37℃）。安定して細胞増殖するまで、3日ごとに培地を部分的に交換して培養を継続した。

【0023】

培養した細胞から、1年以上にわたって安定に増殖する細胞の存在を確認し、細胞株として樹立した。この細胞株をThyL-6と命名した。

実施例2：ThyL-6細胞株の免疫組織化学的特徴の確認

ThyL-6細胞株を8穴チャンバースライド上で培養し、付着した細胞を10%緩衝ホルマリンで固定して免疫染色を行った。

10

【0024】

結果は図1に示したとおりであり、ThyL-6細胞株は、上皮性マーカーであるEMA、ketatin、間葉性マーカー-vimentinが陽性であったが、白血球マーカー-LCA、Tリンパ球マーカー-UCHL1、Bリンパ球マーカー-L26は陰性であった。

実施例3：ThyL-6細胞株が産生するサイトカイン種の確認

ThyL-6細胞株を10%ウシ胎児血清含有のRPMI1640培地でコンフルエントまで培養し、その培養上清に含まれるサイトカインをPanomics社製TransSignal Human Cytokine Antibody Arrayキットを用いて解析した。対照には培養培地を使用した。

【0025】

20

結果は図2に示したとおりであり、ThyL-6細胞株の培養上清中にはIL-6、IL-8およびrantesが存在することから、ThyL-6細胞株がこれらのサイトカインおよびケモカインを自立的に産生していることが確認された。

実施例4：ThyL-6細胞株に発現するサイトカイン発現種の免疫組織化学的な確認

ThyL-6細胞株を8穴チャンバースライド上で培養し、付着した細胞を10%緩衝ホルマリンで固定して免疫染色を行った。

【0026】

結果は図3に示したとおりであり、実施例3で確認されたIL-6、IL-8およびrantesが、いずれもThyL-6細胞株の細胞質内に確認された。

実施例5：ThyL-6細胞株が産生するIL-6のウェスタンブロット解析

30

ThyL-6細胞株を10%ウシ胎児血清含有のRPMI1640培地でコンフルエントまで培養し、その培養上清をSDS-PAGEで電気泳動し、抗IL-6抗体をプローブとしてウェスタンブロット分析した。また、対照としては、大腸菌によって産生された市販の組換えヒトIL-6を使用した。

【0027】

結果は図4に示したとおりである。ThyL-6細胞株の培養上清中には、組換えヒトIL-6よりもやや分子量の大きいIL-6が存在することが確認された。

実施例6：ThyL-6細胞株が産生するIL-6の機能確認

ThyL-6細胞株を10%ウシ胎児血清含有のRPMI1640培地でコンフルエントまで培養し、その培養上清を、終濃度0~10%となるように10%ウシ胎児血清含有RPMI1640培地に添加した。この培養上清添加培地で、IL-6依存性多発性骨髄腫細胞株ILKM-3（Shimizu, S. et al., J. Exp. med. 169(1):339-344, 1989）を培養し、細胞株ILKM-3の増殖率をSigma社製MTT assayキットで測定した。

40

【0028】

結果は図5に示したとおりである。IL-6を不可欠の増殖因子とするILKM-3が、ThyL-6細胞株培養上清の添加量に依存して増殖することから、ThyL-6細胞株が生理活性を有するIL-6を産生していることが確認された。

【0029】

また、ThyL-6細胞株を単離した胸腺癌患者は、生前に著明な白血球増加や炎症所見を呈していたことから、ThyL-6細胞株が産生するケモカインIL-8およびrantesも生物活性を有

50

するものであることが強く示唆される。

【産業上の利用可能性】

【0030】

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、炎症性サイトカインとこの炎症性サイトカインと協調して作用するケモカインとを自立的に産生するヒト胸腺腫瘍細胞株が提供される。この細胞株は、炎症や免疫応答、癌、ウイルス感染などの生体反応に関わるサイトカイン・ケモカインネットワークの基礎的研究、受容体やアンタゴニストのスクリーニング、あるいはサイトカインが関連する腫瘍、炎症性疾患、アレルギー性疾患等の病態解析に利用できる。

【図面の簡単な説明】

10

【0031】

【図1】ThyL-6細胞株に対する免疫染色の結果を示す写真像である。

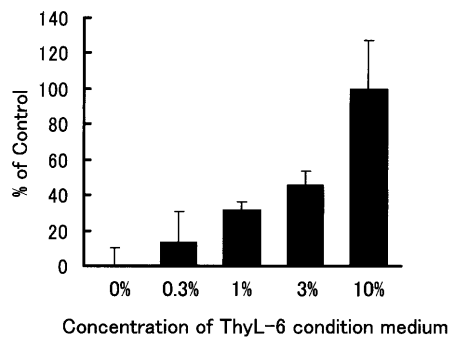
【図2】ThyL-6細胞株が産生するサイトカインを分析したサイトカイン抗体アレイ像である。

【図3】ThyL-6細胞株の細胞質に発現しているサイトカインの結果を示す写真像である。

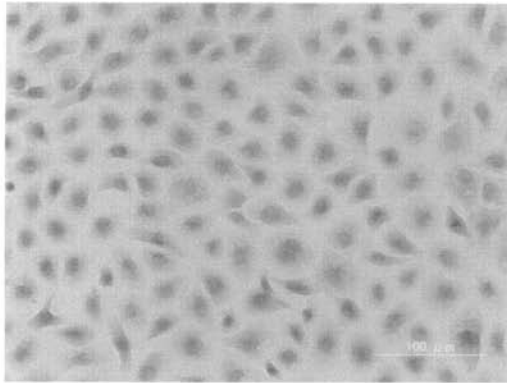
【図4】ThyL-6細胞株培養上清に含まれるIL-6をウェスタンブロット分析した結果を示す電気泳動像である。

【図5】ThyL-6細胞株培養上清の添加濃度と、細胞株ILKM-3の増殖率との関係を示すグラフである。

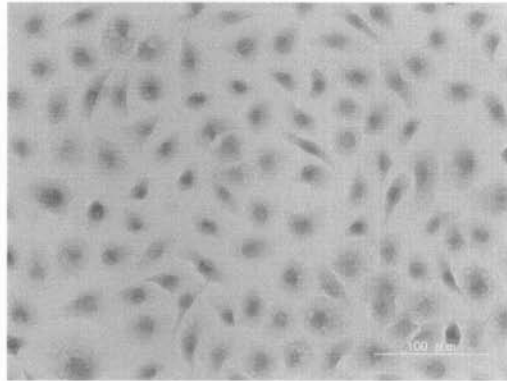
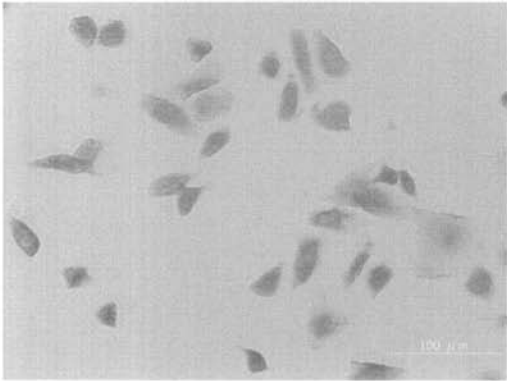
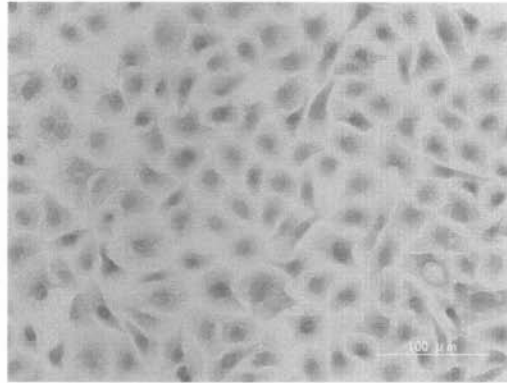
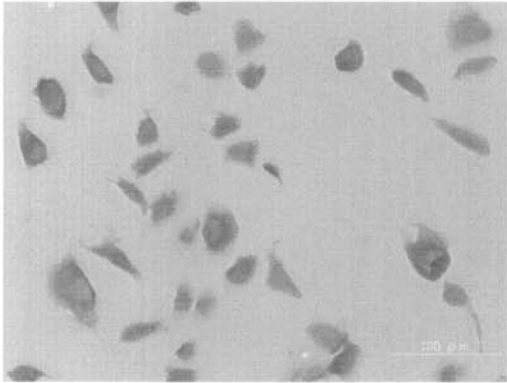
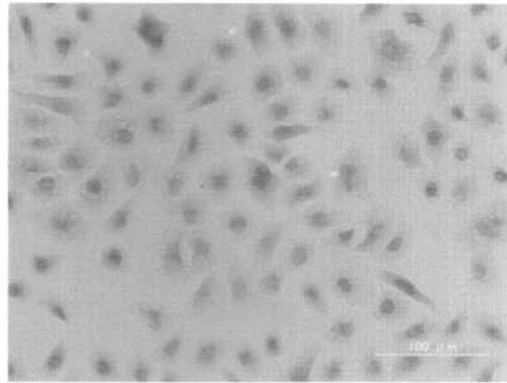
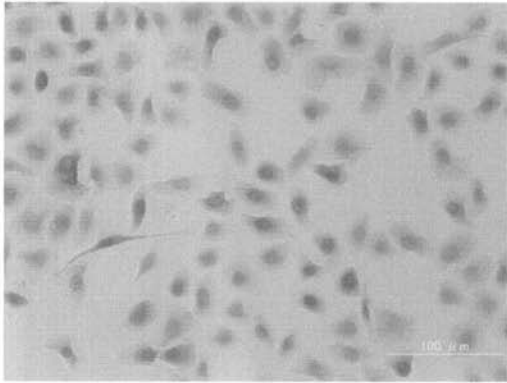
【図5】



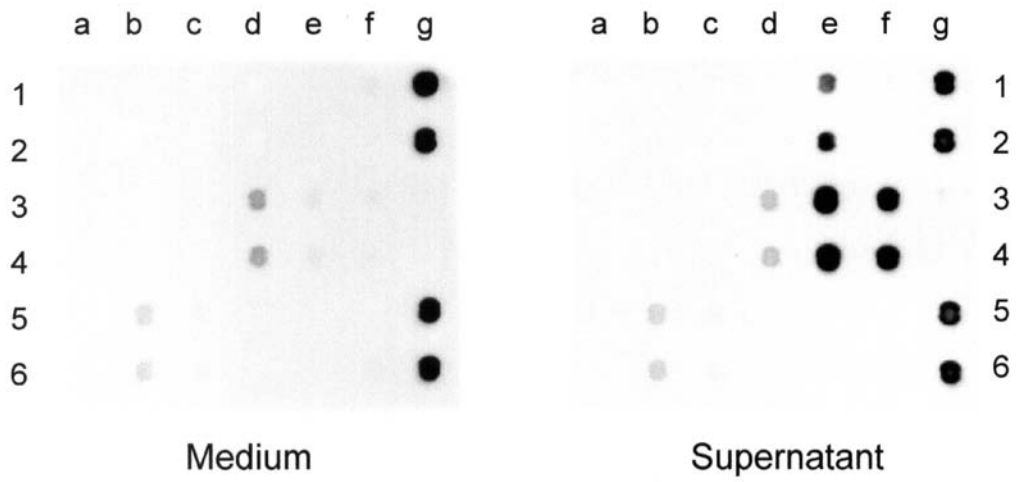
【 図 1 】



Control	
EMA	LCA
Keratin	UCHL1
Vimentin	L26

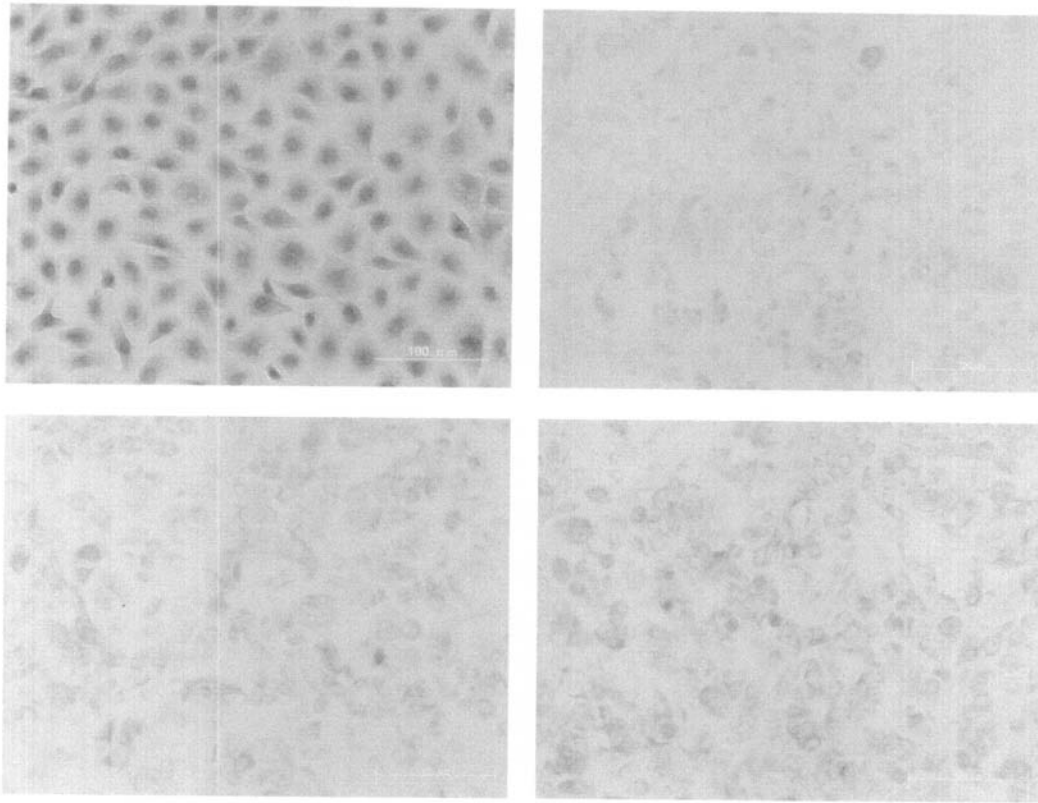


【 図 2 】



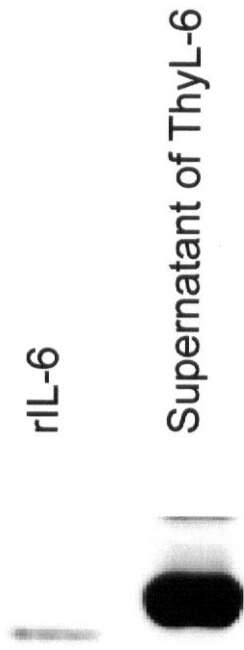
	a	b	c	d	e	f	g
1	Eotaxin	GM-CSF	IP-10	TNF α	Rantes	Leptin	pos
2	Eotaxin	GM-CSF	IP-10	TNF α	Rantes	Leptin	pos
3	IL-1 α	IL-1 β	IL-3	IL-4	IL-6	IL-8	neg
4	IL-1 α	IL-1 β	IL-3	IL-4	IL-6	IL-8	neg
5	IL-10	IL-12	IL-17	MIP1 α	MIP1 β	MIP-5	pos
6	IL-10	IL-12	IL-17	MIP1 α	MIP1 β	MIP-5	pos

【 図 3 】



Control	IL-6
IL-8	Rantes

【 図 4 】



フロントページの続き

(72)発明者 上田 孝典

福井県吉田郡松岡町下合月23-3 国立大学法人福井大学内

審査官 中村 花野子

(56)参考文献 第34回日本痛風・核酸代謝学会総会プログラム・抄録集, 2001年, p.63, 35

痛風と核酸代謝, 2001年, Vol. 25, p. 66-67

Biology of Reproduction, 1999年, Vol. 60, p. 508-514

Eur. Respir. J., 2002年, Vol. 20, p. 369-375

Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 2001年, Vol. 280, p. L493-L502

J. Allergy Clin. Immunol., 1996年, Vol. 98, p. 1080-1087

Molecular Immunology, 2000年, Vol. 37, p. 505-526

Arthritis Research, 2002年, Vol. 4, p. 126-133

Biotherapy, 1999年, Vol. 13, p. 368-374

Biotherapy, 2000年, Vol. 14, p. 583-585

Cancer Research, 1999年, Vol. 59, p. 4681-4687

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00 - 5/28

PubMed

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CAplus(STN)

JMEDPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)

JSTPlus(JDreamII)