

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)特許公報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3536076号

(P 3 5 3 6 0 7 6)

(45)発行日 平成16年 6 月 7 日(2004.6.7)

(24)登録日 平成16年 3 月 26 日(2004.3.26)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C12N 5/06

C12N 5/00

E

請求項の数 2 (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平10 - 61889

(22)出願日 平成10年 2 月 27 日(1998.2.27)

(65)公開番号 特開平11 - 187867

(43)公開日 平成11年 7 月 13 日(1999.7.13)

審査請求日 平成12年 4 月 17 日(2000.4.17)

(31)優先権主張番号 特願平9 - 306360

(32)優先日 平成 9 年 10 月 22 日(1997.10.22)

(33)優先権主張国 日本 (J P)

微生物の受託番号 F E R M B P - 6 2 5 3

微生物の受託番号 F E R M B P - 6 2 5 4

微生物の受託番号 F E R M B P - 6 2 5 5

(73)特許権者 501203344

独立行政法人農業・生物系特定産業技術
研究機構

茨城県つくば市観音台 3 - 1 - 1

(73)特許権者 000195568

生物系特定産業技術研究推進機構

埼玉県さいたま市北区日進町 1 丁目 40 番
地 2

(72)発明者 辻 顕光

静岡県榛原郡金谷町金谷 2769 - 28 - 401
号

(72)発明者 山本 万里

静岡県掛川市旭台 3 - 16

(74)代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎 (外 1 名)

審査官 鈴木 美葉子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】融合細胞株とその取得方法

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト T 細胞性白血病細胞株 P E E R から、8 - アザグアニン耐性クローンを選択し、さらに無血清培養可能にした変異株である I C L U - T を親細胞株とするヒト免疫担当融合細胞株。

【請求項 2】 ヒト細胞融合用親細胞株 I C L U - T とヒト免疫担当細胞を用いて融合細胞を作成する際に、ポリエチレングリコールとレシチンの存在下に行うことを特徴とするヒト免疫担当融合細胞株の取得方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】本発明は、融合細胞株とその取得方法に関する。詳しくは、ヒト細胞株を用いた免疫系の諸現象、すなわちアレルギー、ガンなどのメカニズム解明、それらの疾病の予防、診断、治療等を目的とし

2

た食品機能の検索、新規医薬品の探索、製造に使用するためのヒト免疫担当細胞株の取得に関するものである。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】一般に、ヒトの体内から分離した細胞を体外で培養するには、困難を伴うことが多い。例えば、ヒトの体内から分離したリンパ球などの細胞を体外で無限増殖させることは困難である。通常、これら細胞を培養液中で培養しても、2 週間から数ヶ月程度で死滅してしまう。ガン細胞や上皮細胞のある種のもは、培地組成によっては体外での継代培養が可能であるが、研究等に用いるために必要十分な量を確保することは難しい。さらに、体内細胞を体外において増殖させるには、細胞に何らかの刺激を与える必要がある。そのために、培養液に種々の生理活性物質を添加しなければならないが、その適切な物質の選択等に問題があり、かなりの労力を

10

要する。

【 0 0 0 3 】近年では、このような問題点を解消する方法として、目的とする細胞に発ガン物質等の薬剤を添加したり、紫外線や放射線を照射する等の処理を行い、目的の細胞に突然変異を生じさせる（トランスフォーム）方法が提案されている。このような処理を行うことにより、無限増殖が可能な細胞株（変異株）を取得することができる。また、遺伝子導入法（細胞に特定の遺伝子を導入する方法）を用いて、株化したい細胞に、不死化遺伝子を導入して形質転換を生じさせ、無限増殖する細胞を取得する方法も報告されている。

【 0 0 0 4 】さらに、このようにトランスフォームを利用した方法のほかに、リンパ球などのように体内で抗体や免疫調節因子（リンフォカイン）を産生する細胞を、無限増殖する細胞と融合して、体外でもその抗体や免疫調節因子を産生する融合細胞（ハイブリドーマ）として樹立する方法も知られている。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、これらの従来の方法では、次のような問題点があった。まず、薬剤を添加する方法や紫外線等の照射を利用する方法においては、獲得した変異形質およびその他の細胞機能が安定した細胞株として樹立するために、数カ月から数年もの長期間を要し、樹立した細胞株が利用できるようになるまでにかなりの期間が必要であった。また、処理に供した細胞数あたりの取得される変異株数（変異効率）が低く、目的細胞を容易に株化することが困難であった。

【 0 0 0 6 】また、細胞融合によって株化する方法は、モノクローナル抗体やリンフォカイン等の細胞由来物質の安定生産系としては有用である。しかしながら、この方法で得られる融合細胞株は、生体内で生じる種々の免疫反応に対しては、その細胞応答が低下もしくは消失していると言われている。したがって、これらの方法を用いても、生体内での細胞の相互作用を生体外でも再現可能な樹立細胞系として用いるためには多くの困難が伴った。

【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、株化細胞の取得法について検討を重ね、細胞融合法による株化がその他の方法に比較して、細胞をトランスフォームさせる効率が比較的高い点に着目した。ただし、細胞融合して得られる株細胞の性質は、融合に供した生体由来の免疫担当細胞ばかりでなく、他方のパートナーであるヒト親細胞株に大きく依存していることが知られている。

【 0 0 0 8 】そこで、種々のヒト由来の免疫担当細胞を細胞機能を保持したまま効率よく株化するために、本発明者らは親細胞株について研究し、変異株であるヒト T 細胞性白血病細胞株 I C L U - T を樹立した。このヒト親細胞株を用いて、生体内の各種ヒト免疫担当細胞と細胞

融合することにより得られる融合細胞は、該細胞が生体内で有していたと考えられる細胞機能を保持する性質を残していることが分かった。

【 0 0 0 9 】また、この細胞融合用親細胞株である I C L U - T は、よく知られている細胞融合促進剤（ポリエチレングリコール、以下 P E G と記載する。）および融合細胞のみを増殖させる融合細胞選択培地（H A T 培地）では、効率的な細胞融合を行うことは不可能であることが判明した。そこで、本発明者らは、I C L U - T を親細胞株として利用し、融合細胞を得るための手段について検討した結果、P E G とリン脂質であるレシチンを混合した融合促進剤を開発すると共に、ヒポキサンチンとアメソプテリンで構成される選択培地を開発した。その結果、これらを用いることにより、効率よく細胞融合を行うことができることを見出した。なお、本発明で用いるヒト細胞融合用親細胞株 I C L U - T は、必ずしも免疫担当細胞とのみ融合可能なわけではなく、その他の組織由来の細胞とも融合可能である。

【 0 0 1 0 】請求項 1 記載の本発明は、ヒト T 細胞性白血病細胞株 P E E R から、8 - アザグアニン耐性クローンを選択し、さらに無血清培養可能にした変異株である I C L U - T を親細胞株とするヒト免疫担当融合細胞株である。

【 0 0 1 1 】また、請求項 2 記載の本発明は、ヒト細胞融合用親細胞株 I C L U - T とヒト免疫担当細胞を用いて融合細胞を作成する際に、P E G とレシチンの存在下に行うことを特徴とするヒト免疫担当融合細胞株の取得方法である。

【 0 0 1 2 】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。融合細胞の性質は、前記したように、融合に供した生体由来の免疫細胞だけでなく、親細胞株にも大きく依存している。そこで、本発明者らは、種々のヒト由来の免疫担当細胞を細胞機能を保持したまま効率よく株化するために用いることができるヒト細胞融合用親細胞株を樹立した。すなわち、ヒト免疫細胞由来細胞から、次のようにして親細胞株を取得した。ヒト T 細胞性白血病細胞株（P E E R）は 8 - アザグアニン（終濃度 2 0 μg/ml）を含む 1 0 % 牛胎児血清（以下、F B S と記載する。）を含む E R D F 培地（極東製薬工業（株）製）で培養した。なお、1 0 % の濃度で F B S を添加した E R D F 培地を、以下 1 0 % F B S - E R D F 培地と記載する。

【 0 0 1 3 】3 週間程度培養した後、増殖してきたクローンを分取し、クローニングを行った。クローニングは、9 6 穴培養プレートの 1 穴につき 1 個の細胞が入るように、1 0 % F B S - E R D F 培地を用いて細胞懸濁液を稀釈して巻き込む限界稀釈法に従った。9 6 穴培養プレートに細胞をまきこんで 2 4 ~ 3 0 時間後に、プレートの各穴を鏡し、細胞が 2 個になっている穴に印をいれた。さらに、2 4 ~ 3 0 時間後（すなわち、まきこ

んでから 4 8 ~ 6 0 時間後) に、印がついている穴を検鏡し、細胞が 4 個になっている穴に印をいれた。まきこんでから 2 0 日後に、2 つの印がついている穴を検鏡し、細胞が増殖していることを確認して細胞数を血球計算板で計測した。最も細胞数が多かった穴の細胞を、さらに上記と同様の方法で再クローニングした。

【 0 0 1 4 】親細胞株が樹立された後、細胞融合で得られる融合細胞が無血清培養可能となるように、クローニングで得られたクローンをインスリン (終濃度 1 0 μg/ml)、トランスフェリン (終濃度 2 0 μg/ml)、エタノールアミン (終濃度 2 0 μM)、亜セレン酸ナトリウム (終濃度 2 5 nM) を含む E R D F 培地 (極東製薬工業 (株) 製) で、9 6 穴培養プレートに、1 穴につき 1 個の細胞が入るように希釈して 2 週間程度培養した。増殖してきた各穴の細胞数を計測し、最も細胞数が多かった順に各穴の細胞の一部をアミノプテリン (終濃度 0 . 4 mM) を含む 1 5 % F B S - E R D F 培地で培養した。培養後 3 日目 ~ 5 日目に検鏡し、細胞が死滅したクローンの 3、4 株を親細胞株の候補として樹立した。

【 0 0 1 5 】得られた親細胞株の候補となるクローンをを用いて実際に細胞融合した。その結果、使用した各クローンの細胞数を 1 0⁵ 細胞としたときの取得した融合細胞数 (融合効率) を指標として、この値が最も高いクローンを樹立親細胞株とした。このようにして樹立した親細胞株、すなわち P E E R 由来の親細胞株をヒト T 細胞性白血病細胞株 (I C L U - T) と命名した。このようにして樹立された親細胞株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その受託番号は、I C L U - T が F E R M B P - 6 2 5 5 である。この親細胞株を、ヒト末梢血リンパ球のようなヒト免疫担当細胞と融合操作を行うことにより、請求項 1 記載の融合細胞株を得ることができる。

【 0 0 1 6 】親細胞株とヒト免疫担当細胞との融合操作は、例えば以下のようにして行うことができる。まず、上記の親細胞株とヒト免疫担当細胞とを混合する。ここで、親細胞株と融合させる他方のヒト免疫担当細胞としては、ヒトリンパ球などのヒトの生体内で免疫機能を有する細胞であればいずれも使用できる。親細胞株に対するヒト免疫担当細胞の使用割合は、例えば親細胞株として I C L U - T を使用する場合は 0 . 8 ~ 1 . 2 倍とするのが好ましい。

【 0 0 1 7 】また、ヒト免疫担当細胞の代わりに、その他のヒト組織由来の細胞、例えばヒトガン細胞などを用いて融合させることも可能である。ガン細胞を用いる場合、該細胞の由来する組織の種類は特に限定されず、例えば胃ガン細胞や乳ガン細胞など、いずれも同じよう可以使用することができる。この場合、親細胞株に対するこれら細胞の使用割合は、上記と同様でよい。

【 0 0 1 8 】親細胞株とヒト免疫担当細胞等の混合物を遠心分離することにより、培養上清と細胞ペレットとに

分離し、このうちの培養上清を除去する。残った細胞ペレットに、融合促進剤である P E G を基本合成培地で希釈したもの (通常は、4 0 ~ 5 0 % に希釈) を添加する。ここで用いる培地としては、例えば基本合成培地として E R D F 培地、R P M 1 1 6 4 0 培地、ダルベッコ変法イーグル培地 (D M E M) などが使用可能である。これらの培地と共に、成長因子として牛胎児血清 (F B S) を併用したり、インスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウムなどの無血清培養用成長因子を併用することもできる。また、融合促進剤である P E G としては、平均分子量が 4, 0 0 0 ~ 6, 0 0 0 程度のもを使用できるが、融合効率の点から平均分子量 4, 0 0 0 程度のものが好ましく、I C L U - T の場合は平均分子量 4, 0 0 0 程度のものが特に好ましい。

【 0 0 1 9 】ところで、親細胞株として I C L U - T 細胞を用いた場合は、融合促進剤として P E G にレシチンを混合したものを使用する必要がある。P E G にレシチンを混合せずに、I C L U - T 細胞の細胞融合操作を行った場合、I C L U - T の細胞膜破壊が顕著に生じ、残存する生細胞数が減少する上に、目的とする融合細胞を効率よく得ることができない。レシチンは、細胞膜の主たる構成成分であるリン脂質の一種である。このレシチンを混合すると、I C L U - T 細胞を用いた融合操作を行った場合に、細胞膜の主成分であるリン脂質を保護し、P E G による細胞膜破壊を極力抑えることができる。

【 0 0 2 0 】培地で希釈された融合促進剤を添加した細胞ペレットを遠心分離した後、該細胞ペレットの中から融合細胞を選択する。

【 0 0 2 1 】I C L U - T を親細胞株として用いた場合の融合細胞の選択は、ヒポキサンチンおよびアミノプテリン (代わりに、アミノプテリンでもよい。以下、同じ) を含むが、チミジンを含まない培地で構成された選択培地を使用する。I C L U - T 細胞を親細胞とする場合、選択培地にチミジンが存在すると、増殖阻害が生じるため、チミジンの添加を避けるべきである。融合後 2 4 ~ 3 0 時間経過した後、懸濁液にヒポキサンチンとアミノプテリンを含有した選択培地 (例えば、1 5 % F B S - E R D F 培地) を添加する。この培地は、上記と同様に、数日おきに半量ずつ交換する。このようにして 2 週間程度培養することにより、融合細胞を取得することができる。親細胞から融合操作を経て得られる融合細胞は、生体内において当該免疫担当細胞が発現していた特定の免疫反応 (細胞機能) を、生体外でもそのまま保持することができる。

【 0 0 2 2 】

【実施例】次に、本発明を詳細に説明するために代表的な実施例を挙げるが、本発明はこれらに限定されるものではない。実施例 1 [I C L U - T を用いたヒトリンパ球の株化] I C L U - T (F E R M B P - 6 2 5 5)

を 4×10^6 個、ヒト末梢血リンパ球を 4×10^6 個で混合した。この混合物を遠心分離し、培養上清と細胞ペレットとに分離した後、培養上清を除去した。細胞ペレットに基本培地である ERDF 培地（極東製薬工業（株）製）と 1% レシチンで調製した 40% PEG（平均分子量：4000）を 1ml 添加した。さらに、ERDF 培地 9ml を添加して、全量を 10ml とした。これを再び遠心分離して得られた細胞のペレットを、ERDF 培地 85%、FBS 15% になるように調製された 15% FBS - ERDF 培地 25ml で懸濁した。懸濁液は、96 穴培養プレートの各穴に $100 \mu\text{l}$ ずつ添加した。この融合操作の 4 日後に、 $133 \mu\text{M}$ ヒポキサンチン、 $0.26 \mu\text{M}$ アメソプテリン含有 15% FBS - ERDF 培地を 96 穴培養プレートの各穴に $100 \mu\text{l}$ ずつ添加した。次いで、4、5 日おきに、 $67 \mu\text{M}$ ヒポキサンチン、 $0.13 \mu\text{M}$ アメソプテリン含有 15% FBS - ERDF 培地と半量ずつ培地交換した。培養開始から 2 週間程度経過後に、形成された ICLU-T とヒト末梢血リンパ球との融合細胞の出現ウェル数および融合効率を測定した。結果を第 1 表に示す。また、ICLU-T (F

10

20

ERM BP - 6255) 5×10^6 個とヒト末梢血リンパ球 5×10^6 個とを用いたこと以外は、上記と同様の条件で細胞融合を行った。その結果も第 1 表に示す。

【0023】次に、得られた融合細胞株の性質を、下記のようにして検討した。まず、蛍光標識した抗 B 細胞抗体、抗 T 細胞抗体および抗単球抗体を用いて、融合細胞がいずれの抗体に反応するかを検討した。この判別結果により、融合細胞が、B 細胞性、T 細胞性および単球性のいずれであるかを知ることができる。この抗体による検討の結果、融合細胞が B 細胞性であった場合は、抗体 (Ig) 産生能を有するか否かについてさらに検討した。また、融合細胞が T 細胞性であった場合は、さらにもどのようなサブクラスに分類されるかについて検討した。融合細胞が単球性であった場合は、食細胞作用等を有するかについても検討した。上記 2 回の融合操作により得られた融合細胞の細胞種とその比率等の平均値を第 2 表に示す

【0024】

【表 1】第 1 表

	親細胞株の種類	親細胞株の数	融合細胞の出現ウェル数	融合効率 (親細胞 10^6 個当たり)
実施例 1	ICLU-T	4×10^6	8	0.5
		5×10^6	9	0.18

【0025】

【表 2】第 2 表

	親細胞株	得られた融合細胞株の細胞種とその比率	備考
実施例 1	ICLU-T	B 細胞 : 11.1% T 細胞 : 77.8% 単球 : 11.1%	・ヘルパー型

【0026】第 1 表より、親細胞株として ICLU-T を用いた場合、2 週間程度の培養で、高い効率のヒト末梢血リンパ球との融合細胞を得ることができる。また、第 2 表より、以下のことがわかる。まず、親細胞株は生体内の各種の免疫担当細胞を株化することができることが明らかである。ICLU-T を細胞融合の親細胞株として使用した場合、主として T 細胞系の融合細胞を得ており、これらの T 細胞種の融合細胞は、ヘルパー型を示す。したがって、細胞融合に供した末梢血リンパ球のうち、T リンパ球の性質を受け継いでいることが明らかである。

【0027】実施例 2 (親細胞株 ICLU-T を用いて細胞融合を行う場合の融合促進剤の検討) ICLU-T 細胞 (ERM BP - 6255) とヒト末梢血リンパ球とを、細胞数が約 1 : 1 (具体的な数値は第 3 表に示

40

50

した) となるように混合した。この混合物を遠心分離し、培養上清と細胞ペレットとに分離し、培養上清を除去した。次に、細胞ペレットに基本培地である ERDF 培地（極東製薬工業（株）製）と 1% レシチンで調製した 1% レシチン - 40% PEG（平均分子量：4000）を 1ml 添加した。さらに、ERDF 培地 9ml を添加して全量を 10ml とした。これを再び遠心分離して得られた細胞のペレットを、ERDF 培地 85%、FBS 15% になるように調製された 15% FBS - ERDF 培地 50ml で懸濁した。懸濁液は、96 穴培養プレートの各穴に $100 \mu\text{l}$ ずつ添加した。この融合操作の 4 日後に、 $133 \mu\text{M}$ ヒポキサンチン、 $0.26 \mu\text{M}$ アメソプテリン含有 15% FBS - ERDF 培地を 96 穴培養プレートの各穴に $100 \mu\text{l}$ ずつ添加した。次いで、4、5 日おきに、 $67 \mu\text{M}$ ヒポキサンチン、 0.13

μ M アメソプテリン含有 1 5 % F B S - E R D F 培地と半量ずつ培地交換した。培養開始から 2 週間程度経過後に、形成された I C L U - T とヒト末梢血リンパ球との融合細胞の出現ウェル数および融合効率を測定した。結果を第 3 表に示す。一方、対照として、レシチンを添加しない E R D F 培地で希釈して調製した 4 0 % P E G (平均分子量 : 4 0 0 0) を用いた他は上記と同様に細胞融合を行った。その結果も第 3 表に併せて示す。

【 0 0 2 8 】

【表 3】第 3 表

融合促進剤の組成	融合に供した細胞数 (個)	融合細胞の出現ウェル数	融合効率 [*]
P E G + レシチン	4 × 1 0 ⁵	8	0 . 5 0
	5 × 1 0 ⁵	9	0 . 1 8
P E G のみ	1 × 1 0 ⁷	2	0 . 0 2
	5 × 1 0 ⁶	0	0
	7 × 1 0 ⁵	1	0 . 0 1

* 親細胞 1 0⁵ 個当たり

【 0 0 2 9 】 第 3 表より、融合促進剤として P E G のみを用いても、融合細胞が全く得られないか、あるいは得られる場合でもその効率は非常に低いことがわかる。一

フロントページの続き

(72) 発明者 長田 和浩
静岡県島田市 8704 - 1 葵ハイツ 101 号

(72) 発明者 川原 浩治
静岡県島田市横井 2 - 12 - 61 サンライズ横井 301 号

方、レシチンと P E G の両方を用いた場合は、融合細胞を効率よく得ることができることが明らかである。この結果から、I C L U - T を親細胞として細胞融合を行う際は、融合促進剤として P E G の他にレシチンも添加する必要があることがわかる。

【 0 0 3 0 】

【発明の効果】 I C L U - T を親細胞株として用いて作成された本発明のヒト免疫担当融合細胞株は、生体内において当該免疫担当細胞が元来有していた免疫機能、その他の性質を生体外においてそのまま発現するものである。また、請求項 2 記載の本発明方法のように、ポリエチレングリコールとレシチンの存在下において、I C L U - T とヒト免疫担当細胞から融合細胞を作成すると、生体内における免疫機能をそのまま保持した融合細胞を効率よく株化することができる。本発明の融合細胞株は、生体内での細胞間相互作用を、生体外で研究するために好適に利用することができる。本件は、(旧) 独立行政法人農業技術研究機構と (旧) 生物系特定産業技術研究推進機構との共同出願でありましたが、平成 1 5 年 1 0 月 1 日付けで両者が統合され、特許出願人欄に記載の名称となりました。なお、(旧) 生物系特定産業技術研究推進機構の名称変更届は関係書類が整い次第提出いたします。

(56) 参考文献 特開 昭 61 - 234778 (J P , A)
特開 昭 61 - 271986 (J P , A)
特開 昭 61 - 271984 (J P , A)
Biochem Biophys Res Commun (1988) , Vol . 152 , No . 3 , p . 1401 - 1409
日本農芸化学会誌 (1997) , Vol . 71 , 臨時創刊号 , p . 274 41a2
Kitasato Arch . of Exp . Med (1988) , Vol . 61 , No . 4 , p . 225 - 235
日本臨床免疫学会会誌 (1988) , Vol . 11 , No . 4 , p . 346 - 356
J . Fac . Agr . Kyusyu Univ . (1995) , Vol . 40 , No . 1 - 2 , p . 223 - 231

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12N 5/00

MEDLINE (STN)

BIOSIS/WPI (DIALOG)

JSTPlus (STN)