

(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2005-65697

(P2005-65697A)

(43) 公開日 平成17年3月17日(2005.3.17)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/04	C 1 2 Q 1/04	2 G O 4 5
GO 1 N 21/78	GO 1 N 21/78	C 2 G O 5 4
GO 1 N 33/48	GO 1 N 33/48	M 4 B O 6 3
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/48	P
	GO 1 N 33/53	Y
審査請求 未請求 請求項の数 20 O L 外国語出願 (全 11 頁)		

(21) 出願番号	特願2004-236635 (P2004-236635)	(71) 出願人	595117091
(22) 出願日	平成16年8月16日 (2004.8.16)		ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー
(31) 優先権主張番号	60/496, 308		BECTON, DICKINSON AND COMPANY
(32) 優先日	平成15年8月19日 (2003.8.19)		アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー O 7 4 1 7 - 1 8 8 0
(33) 優先権主張国	米国 (US)		フランクリン・レイクス ベクトン・ドライブ 1
(31) 優先権主張番号	10/913, 209		1 BECTON DRIVE, FRANKLIN LAKES, NEW JERSEY O 7 4 1 7 - 1 8 8 0, UNITED STATES OF AMERICA
(32) 優先日	平成16年8月6日 (2004.8.6)	(74) 代理人	100077481
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 谷 義一
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 血管新生能のための内皮細胞のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 初代内皮細胞集団を血管新生能についてスクリーニングする方法を提供すること。

【解決手段】 (a) V E G F R 2 陽性および C D 3 4 陽性である細胞の割合を測定し、V E G F R 2 の濃度を測定し、または細胞集団における V E G F R 1 に対する V E G F R 2 の比を測定するステップと、(b) 前記測定された割合または前記測定された比がある基準値を上回る細胞集団を選択するステップとを含む。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

初代内皮細胞集団を血管新生能についてスクリーニングする方法であって、

a) VEGFR2 陽性および CD34 陽性である細胞の割合を測定し、VEGFR2 の濃度を測定し、または前記細胞集団における VEGFR1 に対する VEGFR2 の比を測定するステップと、

b) 前記測定割合または前記測定比がある基準値を上回る前記細胞集団を選択するステップと、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

VEGFR2 陽性および CD34 陽性である細胞の割合、VEGFR2 の濃度、または前記細胞集団における VEGFR1 に対する VEGFR2 の比を測定する前記ステップは、蛍光活性化セルソーター分析を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

VEGFR2 陽性および CD34 陽性である細胞の割合、VEGFR2 の濃度、または前記細胞集団における VEGFR1 に対する VEGFR2 の比を測定する前記ステップは、免疫蛍光イメージングおよびデータ処理を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

VEGFR2 陽性および CD34 陽性である細胞の割合、VEGFR2 の濃度、または前記細胞集団における VEGFR1 に対する VEGFR2 の比を測定する前記ステップは、セルベースの固相酵素免疫検定法を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 5】

前記内皮細胞集団を、1 種または 2 種以上の二次抗体で標識するステップをさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 1 種または 2 種以上の二次抗体は、フルオレシニンまたはロドミンに結合していることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記初代内皮細胞集団はヒト皮膚微小血管内皮細胞を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 8】

前記初代内皮細胞集団はヒト肺微小血管内皮細胞を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記初代内皮細胞集団はヒト臍帯静脈血管内皮細胞を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

初代内皮細胞集団を血管新生能についてスクリーニングする方法であって、

a) 前記内皮細胞集団を、1 種または 2 種以上の VEGFR2 抗体および CD34 抗体で染色するステップと、 40

b) 前記内皮細胞集団を、1 種または 2 種以上の二次抗体で標識するステップと、

c) VEGFR2 陽性および CD34 陽性である細胞の割合を測定するステップと、

d) 前記測定された比がある基準値を上回る前記細胞集団を選択するステップと、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 11】

1 種または 2 種以上の二次抗体はフルオレシニンまたはロドミンに結合していることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

生物活性剤を同定する方法であって、

a) 1 つまたは 2 以上の内皮細胞集団において、VEGFR2 陽性および CD34 陽性で 50

ある細胞の割合を測定し、VEGFR2の濃度を測定し、または前記細胞集団におけるVEGFR1に対するVEGFR2の比を測定するステップと、

b) 前記VEGFR2陽性およびCD34陽性細胞の割合、または前記VEGFR1に対するVEGFR2の比がある基準値を上回る細胞集団を選択するステップと、

c) 前記選択された細胞集団由来の細胞を、期待される生物活性剤に接触させるステップと、

d) 前記接触による血管形成の変化を観察するステップと、を含むことを特徴とする方法。

【請求項13】

VEGFR2陽性およびCD34陽性である細胞の割合を測定し、VEGFR2の濃度を測定し、または前記細胞集団におけるVEGFR1に対するVEGFR2の比を測定する前記ステップは、蛍光活性化セルソーター分析を含むことを特徴とする請求項12に記載の方法。 10

【請求項14】

VEGFR2陽性およびCD34陽性である細胞の割合を測定し、VEGFR2の濃度を測定し、または前記細胞集団におけるVEGFR1に対するVEGFR2の比を測定する前記ステップは、免疫蛍光イメージングおよびデータ処理を含むことを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項15】

VEGFR2陽性およびCD34陽性である細胞の割合を測定し、VEGFR2の濃度を測定し、または前記細胞集団におけるVEGFR1に対するVEGFR2の比を測定する前記ステップは、セルベースの固相酵素免疫検定法を含むことを特徴とする請求項12に記載の方法。 20

【請求項16】

前記初代内皮細胞集団はヒト皮膚微小血管内皮細胞を含むことを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項17】

前記初代内皮細胞集団はヒト肺微小血管内皮細胞を含むことを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項18】

前記初代内皮細胞集団はヒト臍帯静脈血管内皮細胞を含むことを特徴とする請求項12に記載の方法。 30

【請求項19】

血管新生分析を行うためのキットであって、

多数の血管に組み込むことができ、VEGFR2陽性およびCD34陽性である細胞の割合、VEGFR2の濃度、またはVEGFR1に対するVEGFR2の比が、ある基準値を上回るものとして選択された内皮細胞集団由来の内皮細胞をそれぞれ含む、2つ以上の血管と、

前記キットで使用される内皮細胞が、血管新生能力、管腔形成能力、VEGFR2陽性およびCD34陽性である細胞の割合、またはVEGFR1に対するVEGFR2の比のうちの一つまたは2つ以上について試験され、所定の標準に合格したことを示す表示と、を含むことを特徴とするキット。 40

【請求項20】

内皮細胞集団において、VEGFR2陽性およびCD34陽性である細胞の割合、VEGFR2の発現量、VEGFR1に対するVEGFR2の比、またはVEGFR1の細胞数に対するVEGFR2陽性およびCD34陽性の細胞数比を調節する方法であって、

前記割合、量、または比について第1の値を有する第1内皮細胞集団を提供するステップと、

前記割合、量、または比について第2の値を有する第2内皮細胞集団であって、割合、量、または比のうち測定項目は、前記第1の値で使用されているものであり、前記第2 50

の値が前記第1の値より大きい、第2内皮細胞集団を提供するステップと、

前記第1細胞集団および前記第2細胞集団を、前記割合、量、または比について望ましい第3の値を得るように選択されたある割合で混合するステップと、を含むことを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、高い血管新生能を有する内皮細胞を同定する方法に関するものである。詳細には、本発明は、VEGFR2陽性およびCD34陽性である内皮細胞を定量化し、VEGFR2の量を定量化するか、またはVEGFR1に対するVEGFR2の比、もしくは、VEGFR1陽性細胞数に対するVEGFR2陽性細胞数の比を決定することを含む、血管新生能のための内皮細胞のスクリーニング方法に関するものである。

10

【背景技術】

【0002】

血管の内面を形成する内皮細胞は、局所における要求条件に適合するために細胞数および配置を調整する能力を有することがよく知られている。全ての組織は血管供給に依存しており、その血管供給は内皮細胞に依存している。血管は、体のあらゆる部位で適応可能な生命維持系を作り出す。この血管のネットワークの拡張および維持を行う内皮細胞が無ければ、組織の成長および修復は不可能であろう。

【0003】

最大の血管は動脈および静脈であり、これらは結合組織および平滑筋からなる薄く頑丈な外壁を持つ。その壁の内側は、基底膜により周囲の外層と分離された一層の薄い内皮細胞で覆われる。血管壁における結合組織の量および平滑筋の量は、血管の直径および機能により変わり得るが、内膜は常に存在する。比較的小さな毛細血管や洞様毛細血管では、その壁は内皮細胞と基底膜のみから構成される。したがって、内皮細胞は全ての血管系の内側を覆う。動脈および静脈は、内皮細胞と基底膜のみから構成される小さな血管から発達し、結合組織および平滑筋が、内皮細胞によるシグナルで必要な場所に後で加えられることが研究により明らかにされている。

20

【0004】

血管系全体を通して、内皮細胞は細胞分裂および細胞運動の能力を保持している。これは、血管系の修復および維持において重要である。例えば、血管壁の一部が損傷を受け、内皮細胞を失った場合、隣接する内皮細胞が増殖し移動して、露出表面を覆う。新たに形成された内皮細胞が、損傷した血管を交換するために外科医が使用するプラスチック製チューブの内面を覆うことも知られている。

30

【0005】

内皮細胞は、損傷した血管を修復するだけでなく、新しい血管を形成することもできる。これは、胚組織では成長を支持するために、正常な成体組織では修復および維持のために、また損傷組織では修復を補助するために行われる。この過程は血管新生と呼ばれる。

【0006】

血管新生は、新しい血管を形成する基礎的な過程である。この過程は、胚発生育、組織成長、組織再建、創傷治癒など多くの正常な生理的現象に不可欠である。血管新生は、いくつかの病理学的事象においても重要である。固形腫瘍の増殖および転移における役割に加えて、血管新生要素を伴う他の注目すべき病気は、関節炎、乾癬および糖尿病性網膜症である。血管病変および脳病変に加えて、心循環器疾患、末梢動脈障害などの他の病状において、血管新生は重要な治療基礎をもたらすことができる。損傷部位で血管新生が促されれば、損傷血管の外側で、代わりになる新たな血管(sanguineous neovessels)を形成することができる。それにより、血液が供給され、このように酸素、ならびに組織の生存に關与する必要な他の栄養素および生物学的因子が供給される。

40

【0007】

既存の血管の一部として静止状態にある内皮細胞は、血管新生の過程で増殖し、遊走性

50

増殖状態 (migratory, proliferative state) になる。この遊走性増殖状態は、細胞が最終的に毛細管に分化し、機能的な新しい血管の一部となり静止状態に戻るときに解消される。この血管新生の過程は、多数の高分子相互作用の複雑なネットワークにより組織化されている。数種の必要不可欠な血管新生因子には、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、アンジオポイエチン、サイトカイン、細胞外マトリックスタンパク質、およびマトリックスメタロプロテアーゼなどがある。これらの因子は、間質細胞 (例えば、平滑筋細胞、血管周囲細胞、線維芽細胞) およびその部位に補充される活性化白血球により局所的に産生される。内皮細胞の特徴は、適当な条件下で血管新生の一態様である管腔形成を行う能力にある。

【0008】

血管新生は、正常組織においても悪性組織においても、標的組織中および遠隔部位で生じる血管新生刺激と血管新生阻害物質のバランスにより調節される。血管内皮細胞増殖因子 A (VEGF、血管透過因子 VPF としても知られる) は主要な血管新生促進物質である。VEGF は低酸素状態および発がん性変異により誘導される多機能サイトカインであり、様々な組織がこれを産生することができる。

【0009】

血管新生は、一部の新生物 (例えば、腫瘍) により刺激され、栄養摂取の増進に利用される。しかし、吻合 (例えば血管連結) および毛細血管の成熟をもたらす正常の血管新生とは違って、新生物に関わる血管新生は継続的な過程である。血管新生に刺激を与える VEGF を分泌するだけでなく、周囲の細胞外マトリックスを分解するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) も分泌する近接の新生物細胞により、内皮細胞が活性化される。そして内皮細胞は、細胞外マトリックスに侵入して、そこで増殖し遊走し組織化して、新生物の増殖および生存を補助する新たな血管を形成する。

【0010】

新たに血管が新生された新生物は増殖し続け、さらなる栄養の欠乏を起こし、慢性的に血管新生促進 (pro-angiogenic) のシグナルを送り続ける。新生物の血管構造は、構造的不整合 (間隙) が存在すること、および血管間の結合形成比率が低いことを特徴とする。この部分的に機能不全である血管構造は、永続的に血管新生要求を刺激し続ける。追加的に、この不完全な血管構造により、新生物細胞の組織的な循環への変化を促進させると考えられる。したがって、新生物の持つ血管新生の潜在能力は、転移の潜在能力と関連がある。かなりの割合の新生物が継続的な血管新生に依存しているので、血管新生を阻害することにより、新生物の増殖が妨げられ、しばしば新生物の完全な壊死がもたらされる。

【0011】

増殖因子 (例えば、VEGF) と表面タンパク質の細胞外相互作用の相互関係は、予想可能な一連の事象を通して血管新生の過程を推進させる。血管新生促進の刺激が内皮細胞を活性化することにより、血管拡張、透過性亢進、ならびに基底膜および細胞外膜 (ECM) を分解するプロテアーゼの局所的な放出が起こる。これにより一時的なフィブリンマトリックスの形成が可能となり、これが初期の微細血管を組み立てるための初期段階の足場となる。運動性の (Motogenic) 内皮細胞は、マトリックス内に萌芽し、その先端においてマトリックスの分解を制御しながら移動する。移動に近接して増殖が起こり、原始的な管腔を形成する。新しい毛細血管が成熟し、他の萌芽と吻合する (すなわち融合し接合する) まで、広範囲にわたる血管再建が続く。

【0012】

VEGF は、血管新生の過程に極めて重要である。VEGF は、血管新生および内皮細胞増殖を誘導し、血管形成の調節に重要な役割を果たす。VEGF は、ヘパリン結合糖タンパク質であり、45 kDa のホモダイマーとして分泌される。内皮細胞自体はあまり VEGF を分泌しないが、多くの細胞型は VEGF を分泌する。VEGF は、一部には内皮細胞の一酸化窒素シンターゼによる刺激を通じて、血管透過性を上昇させ、血管拡張を引き起こすことが知られる。VEGF はまた、細胞の移動を刺激し、アポトーシスを阻害す

10

20

30

40

50

る。VEGFレセプターファミリーには3種のレセプターがある(VEGFR1、VEGFR2、およびVEGFR3)。これらのレセプターは、多数の免疫グロブリンG(IgG)様の細胞外ドメインと共通の特徴およびチロシンキナーゼ活性を有する。内皮細胞は、VEGFの補助レセプターであるニューロピリン1およびニューロピリン2も発現する。VEGF-Aは最も一般的に存在するVEGFである。VEGF-BからVEGF-Dは、出現頻度が低い。VEGF-Aは、VEGFR1およびVEGFR2、ならびにニューロピリン1およびニューロピリン2に結合する。胎盤成長因子(PIGF)およびVEGF-Bは、VEGFR1およびニューロピリン1に結合する。VEGF-CおよびVEGF-Dは、VEGFR3およびVEGFR2に結合する。VEGFR1およびVEGFR2は、一部は低酸素状態により、またVEGF-A自体にตอบสนองして、腫瘍および増殖内皮細胞において上向き調節(upregulate)を受ける。VEGFR1およびVEGFR2は、PLC、Ras、Shc、Nck、PKC、PI3キナーゼなどのタンパク質を介して、複数の下流シグナル経路と相互作用することができる。VEGFR1は、VEGFR2よりも親和性が高く、運動性および血管透過性を仲介する。VEGFR2は増殖に必要である。

10

【0013】

血管新生増殖因子の治療上の示唆は、30年以上前に初めて記載された(例えば、非特許文献1参照)。最近の研究では、心筋虚血および後肢虚血の動物モデルにおける側副動脈の発達の促進および/または増強に、血管内皮細胞増殖因子(VEGF1)などの組換え血管新生増殖因子を使用することの実現可能性が証明された(例えば、非特許文献2および非特許文献3参照)。しかしながら、血管新生を促進させる代替方法が、いくつかの理由により望まれている。例えば、生来の内皮細胞の数および/または能力は時間とともに減少低下すると考えられる。したがって、高齢者など、特定の患者集団では、血管新生タンパク質に対応する能力のある細胞が制限されるかもしれない。このような問題は、分離した内皮細胞を虚血性疾患の治療を受ける患者に投与することにより、緩和される可能性がある。しかし、本発明以前には、この方法は、費用のかかる細胞分離および細胞維持が必要とされるために非常に不経済なものであった。

20

【0014】

血管新生すなわち血管新生能とは、新しい毛細血管を形成する内皮細胞の能力をいう。高い血管新生能を持つ内皮細胞には、損傷、移植片拒絶、脳血管虚血、腎虚血、肺虚血、感染に関する虚血、肢虚血、虚血性心筋症、脳血管虚血および心筋虚血の予防または治療における使用など、広範囲な利用法がある。対象組織(impaired tissue)は、循環器系または中枢神経系を含むほとんど全ての任意の生理学上の系、例えば手足、移植片(例えば筋肉移植片や神経移植片)、または臓器(例えば心臓、脳、腎臓、肺)に関連するものであり得る。血管新生能の高い内皮細胞は、血管新生分析キットおよび内皮細胞の研究、とりわけ内皮細胞障壁の機能および透過性の研究にも利用できる。内皮細胞の血管新生能および管腔形成能力を判定するには、内皮細胞のロットごとに血管新生分析を行う必要があった。これらの分析は、多大な時間を要し、費用のかかるものである。

30

【0015】

【特許文献1】米国特許第6,582,959号明細書

40

【特許文献2】米国特許第6,524,583号明細書

【非特許文献1】Folkman, N. Engl. J. Med., 85: 1182-1186 (1971)

【非特許文献2】Takeshita, et al., Circulation, 90: 228-234 (1994)

【非特許文献3】Takeshita, et al., J Clin Invest, 93: 662-70 (1994)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

50

したがって、より安価で迅速に内皮細胞を血管新生能についてスクリーニングし、マーキングする方法が必要とされている。このような必要性は、高い血管新生能を持つ内皮細胞を同定する有効でコスト効率の高い手段を提供する本発明によって満たされる。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明は、内皮細胞集団を血管新生能についてスクリーニングする方法に関する。本発明の1つの特有な実施形態は、VEGFR2陽性およびCD34陽性である細胞の割合を測定し、VEGFR2の濃度を測定するか、または前記細胞集団におけるVEGFR2/VEGFR1の比を測定し、測定された割合または測定された比が基準値を超える前記細胞集団を選択することを含む、初代内皮細胞集団を血管新生能についてスクリーニングする方法に関するものである。好ましい実施形態では、VEGFR2陽性およびCD34陽性である細胞の割合を測定するか、または前記細胞集団におけるVEGFR2/VEGFR1比を測定するステップは、抗VEGFR2抗体および抗CD34抗体を用いて前記内皮細胞集団を染色するか、もしくは抗VEGFR2および抗VEGFR1抗体を用いて前記内皮細胞を染色することを含むことができる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

説明を簡単にし、実例を示すために、本発明の原理をその様々な実施形態を参照して説明する。本発明の好ましい実施形態を詳しくここに開示するが、当分野の技術者であれば、前記原理が他の組成および方法にも同様に適用でき、関連付けでき、かかるいかなる変形例も、本発明の範囲から逸脱しない変更の範囲内にあることを容易に理解するだろう。本発明で開示される実施形態を詳しく説明する前に、本発明は、他の実施形態でも当然ながら実施でき、ここに示すいかなる特定の実施形態の詳細な説明に、適用する際に限定されないことを理解されたい。本明細書内で使用する用語は、説明のためのものであり限定的なものではない。さらに、本明細書では、ある方法を特定の順序で示される特定のステップを参照して記載するが、多くの場合、これらのステップは当分野の技術者に理解される任意の順序で実施することができる。そして、これらの方法は、本明細書に開示するステップの特定の配置のみに限定されるものではない。

20

【0019】

内皮細胞とは、血管内部を構成する細胞である。本発明では、ヒト内皮細胞および他の哺乳動物内皮細胞の使用が好ましい。これらには、ヒト皮膚微小血管内皮細胞およびヒト肺微小血管内皮細胞(HMVEC)、ならびにヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)などが含まれるが、これらだけには限らない。

30

【0020】

血管新生能とは、新しい毛細血管を形成する内皮細胞の能力を示す。この能力の一態様は、内皮細胞の管腔を形成する能力である。この管腔の形成を、管腔形成と呼ぶ。

【0021】

本発明は、とりわけ抗VEGF抗体を用いて内皮細胞を血管新生能についてスクリーニングする方法に関する。「抗VEGF抗体」という用語は、VEGF活性を阻害する抗体を示す。このような抗体の例として、キムによって記載されたヒトVEGFに対する抗体(例えば、特許文献1参照)、またはソルペラによって記載された同抗体(例えば、特許文献2参照)がある。

40

【0022】

好ましい実施形態では、この内皮細胞スクリーニング法は、各内皮細胞集団におけるVEGFR2陽性およびCD34陽性の細胞の割合を測定するか、またはその細胞集団中のVEGFR2/VEGFR1の比を測定することを含む。その後、この測定割合または比がある基準を超える細胞集団を選択する。この細胞集団における望ましい管腔の形成特性と、その割合または比を相関させる通常の実験によって、これらの基準を決定することができる。

【0023】

50

各内皮細胞集団のVEGFR2陽性細胞は、既知の様々な方法によって定量化することができる。既知の方法としては、蛍光活性化セルソーター(FACS)分析、免疫蛍光イメージングおよびデータ処理、またはセルベースの固相酵素免疫検定法(ELISA)などが挙げられるが、これらに限定されない。このような方法に用いる抗体は、よく知られており、容易に入手できる。例えば、血管内皮細胞増殖因子レセプターに対する抗体は、MSRSCatalogの抗体(アエリー社(Aerie Corporation)、ミシガン州パーミンガム)など、様々な供給源で確認し入手することができる。さらに通常の抗体産生方法で調製することもできる。

【0024】

VEGFR2陽性およびCD34陽性の内皮細胞が多くなるか、あるいはVEGFR1に対するVEGFR2の比が高くなるほど、内皮細胞が管腔を形成する能力が高くなり、内皮細胞の血管新生能が高くなると考えられる。

【0025】

本発明の一実施形態では、内皮細胞を血管新生特性についてスクリーニングする方法は、抗VEGFR2レセプターおよび抗CD34を用いてヒト内皮細胞を染色するか、または抗VEGFR2レセプター、抗CD34、および抗VEGFR1レセプターを用いてヒト内皮細胞を染色することを含む。この内皮細胞を染色するステップの後に、好ましい実施形態では、この染色細胞を二次抗体で標識する。この二次抗体は、フルオレシニンまたはロドミン(rodamin)と結合したものが好ましい。一実施形態では、この染色し標識した内皮細胞を、例えば、FACS、蛍光イメージング、またはELISAを用いて調べ、VEGFR2陽性およびCD34陽性の細胞を同定する。好ましい実施形態では、各内皮細胞集団におけるVEGFR2陽性およびCD34陽性の細胞の割合、または前記細胞集団中のVEGFR2/VEGFR1の比を測定する。各内皮細胞集団におけるVEGFR2陽性およびCD34陽性の細胞の割合、または前記細胞集団中のVEGFR2/VEGFR1の比が特定の基準を超える内皮細胞を選択する。

【0026】

この細胞集団を選択する方法は、期待される生物活性剤を、血管新生活性の調節に適切な時間内皮細胞と接触させることによって生物活性剤を同定する方法に組み込むこともできる。生物活性剤には、細胞、組織、器官、または生物体に作用する化学薬品などの物質が含まれ、この細胞、器官、または生物体の機能に変化を与える殺虫剤または薬物(すなわち医薬品)などが挙げられるが、これらに限定されない。この時間枠は、実験により容易に決定することができる。血管新生を弱める生物活性剤は、腫瘍細胞により誘導されようとする血管細胞形成を阻害するための生物活性剤の候補となる。血管新生を促進させる生物活性剤は、虚血性事象により損傷を受けた組織、喫煙などの環境因子により血管形成が損傷を受けた組織、または心臓血管疾患、末梢動脈疾患ならびに血管および脳の病変に起因する病的因子によって血管形成が損傷を受けた組織において、血管形成を増強するための生物活性剤の候補となる。この選択方法では、細胞移動などを測定する他の血管新生分析も利用できるが、管腔の形成を測定する血管新生分析が特に適切であると思われる。有用な内皮細胞の管腔形成分析には、例えば、マトリゲル(ベクトン・ディキンソン、フランクリンレークス、ニュージャージー州)、フィブリンゲル、コラーゲンゲルなどのマトリックス上における管腔形成、ならびに、このような内皮細胞を腫瘍細胞または正常線維芽細胞と共培養させる共培養モデルにおける管腔形成などが含まれる。例えば、初代ヒト内皮細胞(例えば、HUVEC細胞やHMVEC細胞)を、腫瘍細胞U251(グリオブラストーマ細胞系)と(例えば、100:1の比で)混合することができる。この細胞を、例えば、6穴プレートに 1×10^6 /穴の密度で播種することができる。この共培養細胞は、37°C/二酸化炭素5%のインキュベーターにて、内皮細胞用培地EGM2MV(ケンプレックス・ウォカズビル、MD)中で培養することができ、この培地は11日目まで2日ごとに交換する。管腔の形成は、7日目以降に観察されるはずである。

【0027】

本発明の方法はさらに、細胞集団を混合することによって細胞集団の血管新生の潜在能

力を調節して、本発明で使用するマーカーにとって望ましい量または比を得るのに利用できる。あるいは、蛍光活性化セルソーターなどの分離装置を利用して、VEGFR2レセプターおよびCD34を発現する細胞に富む細胞集団を分離することもできる。この細胞集団を使用して、次に、本発明で使用するマーカーを発現する細胞の量および比を調節することができる。

【0028】

本発明を、本発明の特定の実施形態に重点を置いて説明してきたが、当分野の技術者なら本発明の範囲から逸脱することなく本発明に記載された実施形態に様々な変更を加えることができる。本発明を、特定の実施形態において様々な用語で説明し開示してきたが、本発明の範囲はそれによって限定されるものではなく、また限定されると見なすべきではない。また、本明細書内の教示によって示唆されるこのような他の変更形態や実施形態は、特に添付の特許請求の範囲の趣旨および範囲に含まれるものは、特に予定されている。当分野の技術者には、添付の特許請求の範囲およびその相当箇所で定義される本発明の範囲内で、これらおよびその他の変形形態が可能であることが理解されよう。

フロントページの続き

(74)代理人 100088915

弁理士 阿部 和夫

(72)発明者 ウー ミン

アメリカ合衆国 0 1 7 4 1 マサチューセッツ州 カーライル ピー . オー . ボックス 6 2 2

Fターム(参考) 2G045 CB01 FB01 FB03 FB12 JA01

2G054 AA08 CE02 EA03

4B063 QA18 QQ08 QR48 QR90 QS33 QS39 QX02

【外国語明細書】

2005065697000001.pdf

专利名称(译)	用于筛选血管生成潜能的内皮细胞的方法		
公开(公告)号	JP2005065697A	公开(公告)日	2005-03-17
申请号	JP2004236635	申请日	2004-08-16
[标]申请(专利权)人(译)	贝克顿·迪金森公司		
申请(专利权)人(译)	碧迪公司		
[标]发明人	ウーミン		
发明人	ウーミン		
IPC分类号	G01N33/48 C12Q1/04 G01N21/78 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/74		
CPC分类号	G01N33/74 G01N33/5064 G01N33/56966 G01N2333/515 G01N2333/70596 G01N2333/71		
FI分类号	C12Q1/04 G01N21/78.C G01N33/48.M G01N33/48.P G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/JA01 2G054/AA08 2G054/CE02 2G054/EA03 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR90 4B063/QS33 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	谷义 安倍晋三和夫		
优先权	60/496308 2003-08-19 US 10/913209 2004-08-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种筛选原代内皮细胞群的血管生成潜能的方法。

(A) 测量VEGFR2阳性和CD34阳性细胞的比例，测量VEGFR2的浓度，或测量细胞群中VEGFR2与VEGFR1的比例，(b) 比较测量的并选择其比例或测量比率超过某个参考值的细胞群。 【选择图】无