

(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2019-162118

(P2019-162118A)

(43) 公開日 令和1年9月26日(2019.9.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/06 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/06	2 G 0 4 5
<b>G O 1 N 33/48 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/48	M 4 B 0 6 3
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53	Y 4 B 0 6 5
<b>G O 1 N 33/542 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/542	A
<b>C 1 2 N 5/071 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/071	

審査請求 有 請求項の数 12 O L (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2019-85695 (P2019-85695)  
 (22) 出願日 平成31年4月26日 (2019. 4. 26)  
 (62) 分割の表示 特願2016-500983 (P2016-500983)  
                   の分割  
           原出願日 平成26年3月10日 (2014. 3. 10)  
 (31) 優先権主張番号 61/798, 385  
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
                   米国 (US)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON

(71) 出願人 302057661  
           ラッシュ・ユニバーシティ・メディカル・  
           センター  
           アメリカ合衆国 60612 イリノイ州  
           , シカゴ, ウェスト コンGRESS パーク  
           ウェイ 1653  
 (74) 代理人 100095832  
           弁理士 細田 芳徳  
 (72) 発明者 ヘイズ, トリスタン  
           アメリカ合衆国 フロリダ 33772  
           セミノル, 96ティーエイチ プレース  
           12134

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 有足突起培養物およびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】系球体疾患に關与する分子経路の研究に適した有足突起培養物の培養方法および腎臓疾患を治療するための候補化合物を同定する方法の提供。

【解決手段】有足突起細胞の第1の培養物(例えば、始原有足突起または条件付きで不死化された有足突起細胞株などの有足突起細胞株)を、許容条件または増殖条件下で維持して有足突起の集団を産生する工程、該有足突起の集団(またはその画分)を、非許容条件または分化条件下で、部分的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間、維持する工程、および次いで該部分的に分化した有足突起(またはその画分)を、非許容条件または分化条件下で、最終的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間、第2の培養物において維持する工程を含む方法。該培養物を使用した腎臓疾患を治療するための候補化合物を同定する方法。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

腎臓疾患を治療するための候補化合物を同定する方法であって、該方法が、

(a) 複数のユニットを含むアレイを提供する工程、ここで、それぞれのユニットは、

(i) 有足突起細胞を、許容条件下で、有足突起細胞が少なくとも1回倍加するのに十分な時間、第1の細胞培養物において維持し、それにより有足突起の集団を産生する工程；

(ii) (i)で得られた該有足突起の集団を、非許容条件下で、部分的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間維持する工程；および

(iii) (ii)で得られた該部分的に分化した有足突起を再度播種し、(ii)で得られた該部分的に分化した有足突起を、非許容条件下で、最終的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間、第2の細胞培養物において維持する工程

を含む、インビトロで有足突起を培養する方法により得られる1つ以上の最終的に分化した有足突起を含む；

(b) 候補化合物と、1つまたは複数の前記最終的に分化した有足突起を、該アレイ中の少なくとも1ユニットにおいて接触させる工程；および

(c) 1つまたは複数の最終的に分化した有足突起の細胞特性を決定する工程

を含み、ここで、適切な対照に対する細胞特性の変化が、前記化合物が腎臓疾患を治療するための候補であることを示す、方法。

10

## 【請求項 2】

細胞特性が、膜透過性、形態、生存力、または有足突起マーカーの発現である、請求項 1 記載の方法。

20

## 【請求項 3】

前記アレイが、マルチウェルプレートを含み、それぞれのウェルが、1つ以上の最終的に分化した有足突起を含む、請求項 1 または 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

前記有足突起マーカーが、F-アクチンである、請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 5】

F-アクチンの発現レベルが、蛍光部分にコンジュゲートしたF-アクチン特異的結合剤を使用した蛍光染色により決定される、請求項 4 記載の方法。

## 【請求項 6】

F-アクチンの発現レベルが、ELISAまたはウエスタンブロットにより決定される、請求項 4 記載の方法。

30

## 【請求項 7】

前記形態が、アクチン細胞骨格の平均長さである、請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 8】

細胞形態が、光学顕微鏡検査または電子顕微鏡検査により分析される、請求項 7 記載の方法。

## 【請求項 9】

前記候補化合物が、最終的に分化した有足突起の生存力を向上させる、請求項 1 ~ 8 いずれか記載の方法。

40

## 【請求項 10】

有足突起培養物において、健常な最終的に分化した有足突起を同定する方法であって、

(a) 蛍光部分にコンジュゲートしたF-アクチン特異的結合剤を使用した、全細胞に対するF-アクチン張力線維の平均蛍光強度割合、ここで、約0.75以下の平均蛍光強度割合は、健常な最終的に分化した有足突起を示す；

(b) 1細胞当たりの区分けされたF-アクチン張力線維の平均数、ここで、1細胞当たり少なくとも約100の区分けされたF-アクチン張力線維は、健常な最終的に分化した有足突起を示す；

(c) 1ウェル当たりの区分けされたF-アクチン張力線維の平均数、ここで、前記ウェルは、約0.32cm<sup>2</sup>の表面積を有し、1ウェル当たり少なくとも約100,000の区分けされたF-アク

50

チン張力線維は、健常な最終的に分化した有足突起を示す；

(d) 1細胞当たりの分けられたF-アクチン張力線維の総面積、ここで、1細胞当たり少なくとも約2000  $\mu\text{m}^2$ のアクチン細胞骨格の平均面積は、健常な最終的に分化した有足突起を示す；

(e) 蛍光部分にコンジュゲートしたF-アクチン特異的結合剤を使用した、全細胞に対する有足突起接着点の平均蛍光強度割合、ここで、約0.835以下の蛍光強度割合は、健常な最終的に分化した有足突起を示す；

(f) 有足突起接着点の平均数、ここで、(1)1細胞当たり、少なくとも約100の分けられた接着点の平均または(2)1ウェル当たり、少なくとも約280,000の分けられた接着点の平均は、健常な最終的に分化した有足突起を示し、前記ウェルは、約0.32 $\text{cm}^2$ の表面積を有する；および/または

(g) 平均有足突起細胞丸さ、ここで、0.7以下の平均有足突起細胞丸さ値は、健常な最終的に分化した有足突起を示す、

を決定する工程を含み、前記最終的に分化した有足突起が

(i) 有足突起細胞を、許容条件下で、有足突起細胞が少なくとも1回倍加するのに十分な時間、第1の細胞培養物において維持し、それにより有足突起の集団を産生する工程；

(ii) (i)で得られた該有足突起の集団を、非許容条件下で、部分的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間維持する工程；および

(iii) (ii)で得られた該部分的に分化した有足突起を再度播種し、(ii)で得られた該部分的に分化した有足突起を、非許容条件下で、最終的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間、第2の細胞培養物において維持する工程

を含む、インビトロで有足突起を培養する方法により得られる、方法。

#### 【請求項11】

腎臓疾患について被験体を診断する方法であって、該方法は、

(a) (i) 有足突起細胞を、許容条件下で、有足突起細胞が少なくとも1回倍加するのに十分な時間、第1の細胞培養物において維持し、それにより有足突起の集団を産生する工程；

(ii) (i)で得られた該有足突起の集団を、非許容条件下で、部分的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間維持する工程；および

(iii) (ii)で得られた該部分的に分化した有足突起を再度播種し、(ii)で得られた該部分的に分化した有足突起を、非許容条件下で、最終的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間、第2の細胞培養物において維持する工程

を含む、インビトロで有足突起を培養する方法により得られる1つ以上の最終的に分化した有足突起を含む有足突起培養物を提供する工程；

(b) 前記有足突起培養物を、前記被験体由来の血清試料の存在下で維持する工程；

(c) 1つまたは複数の最終的に分化した有足突起の細胞特性を決定する工程

を含み、ここで、適切な対照に対する細胞特性の変化は、前記被験体が、腎臓疾患を有するかまたは腎臓疾患の素因があることを示す、方法。

#### 【請求項12】

腎臓疾患について被験体を診断する方法であって、該方法は、

(a) 前記被験体由来の組織試料を提供する工程、ここで、前記組織試料は1つ以上の有足突起を含む；

(b) 1つまたは複数の前記有足突起を、許容条件下で、1つまたは複数の有足突起が少なくとも1回で倍化するのに十分な時間、第1の細胞培養物において維持し、それにより有足突起の集団を産生する工程；

(c) (b)で得られた該有足突起の集団を、非許容条件下で、部分的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間維持する工程；

(d) (c)で得られた該部分的に分化した有足突起を再度播種し、(c)で得られた該部分的に分化した有足突起を、非許容条件下で、最終的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間、第2の細胞培養物において維持する工程；および

10

20

30

40

50

(e) 最終的に分化した有足突起の細胞特性を決定する工程

を含み、ここで、適切な対照に対する細胞特性の変化は、前記被験体が、腎臓疾患を有するか、または腎臓疾患の素因があることを示す、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、有足突起培養物およびその使用に関する。

【0002】

関連出願

この出願は、2013年3月15日に出願された米国特許出願第61/798,385号の利益を主張し、該出願の全教示は、参照により本明細書に援用される。

10

【背景技術】

【0003】

発明の背景

腎不全(末期腎臓疾患、ESRD)は、治療または療法がない衰弱性疾患である。ESRDに苦しむ患者は、透析に進み、腎臓機能を回復するために腎臓移植を必要とする。大部分の腎臓疾患およびESRDは、糸球体で始まり、蛋白尿を伴う。ESRDは、患者に大きな負担を負わせ、世界的な医療管理系は効果的な療法およびより良い治療選択肢のための緊急の必要性を要する。

【0004】

20

腎臓疾患の研究は、しばしば開始が検出できず、自然では、疾患は急性または慢性であり得、宿主の遺伝的性質は様々な臨床的な兆候を引き起こし、かつしばしば複数の臓器が同時に関与するために複雑である。疾患の罹病性、機構、予後および有力な療法を研究するために、細胞培養および動物モデルが必要である。腎臓の研究において、実験動物モデルの使用は非常に貴重であることが明らかになっている。しかしながら、動物モデルは、常に十分にヒトの疾患を模倣するわけではないので、しばしば制限される。例えば、糖尿病腎症の現在のマウスモデルは、キンメルスティール-ウィルソン結節などのヒトの疾患の特徴を典型的に示さない。

【0005】

30

腎臓学における研究進歩の最も速く移動する領域の1つは、健全性および疾患における内臓の糸球体上皮細胞(以降、有足突起と称する)の重要性の認識であった。有足突起は、糸球体における血液のための最終濾過障壁を形成し、最終的にESRDを生じる糸球体疾患において中心的な役割を担う(非特許文献1)。有足突起は、最終的に分化した周皮細胞様の細胞であり、糸球体基底膜の外側表皮に存在し、小足(FP)として知られる構造に枝分かれする長くて大きな突起を生じる。隣接する有足突起細胞のFPは、互いに入り込み、スリット隔膜(slit diaphragm)(SD)として知られる構造である狭い濾過スリット(filtration slit)を形成し、タンパク質を血中に残し低分子および他の因子を原尿腔へと濾過するために身体が使用する分子的なふるいを形成する。したがって、有足突起の損傷は、多くの蛋白尿性腎臓疾患において共通のテーマである(非特許文献1)。さらに、健全な腎臓機能を維持する有足突起のこの中心的な役割により、有足突起は、種々の腎臓疾患を治療するための新規の療法の開発のための重要なターゲットとなる。

40

【0006】

有足突起は、健全な状態において蛋白尿を防ぐために重要な役割を担うので、種々の腎臓疾患における損傷において重要な標的であり、結果の重要な決定因子である。有足突起生物学の理解の向上は、2つの主要な領域からもたらされ、第1は、希少な形態の先天的なネフローゼ症候群をもたらす一遺伝子障害の分子遺伝学であり、第2は、インビボおよびインビトロにおけるこの特殊化された細胞型の注目された研究である。研究はまた、創薬努力、診断薬および治療薬のための良好な標的となる有足突起における特定のタンパク質、RNAおよび細胞シグナル伝達機構に注目している(shed light)。例えば最近の研究は、インビトロおよびインビボの両方における有足突起アクチン細胞骨格の安定化は、有足突

50

起を有意に保護し得、インビボにおいて蛋白尿を改善し得ることを示し、これはかかる作用因がヒトにおける蛋白尿を治療するための治療能力を有し得ることを示唆する。

【0007】

有足突起培養物はインビボ環境を充分には模倣しないが、いくつかの主要な利点を有する。これらは、機械的な事象を直接的に研究するための能力、特定の仮説を試験し得るような環境を調節するための能力、および複数の実験を行って最初の観察を実証し得る能力を含む。

【0008】

現在、有足突起培養の使用における大きな制限は、有足突起を取り扱うこと、および培地またはハイスループットアッセイ環境において有足突起を使用することが困難であることである(非特許文献2)。有力な薬剤のライブラリーの系統的なハイスループットスクリーニングのためのアッセイは利用可能ではない。有足突起は、かかるアッセイにおける使用のための有望な細胞型である。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Mundel P. and Reiser J. *Kidney Int* 2010, 77: 571-80

【非特許文献2】Reiser, Gupta et al, *Kidney Int.* (2010) 77, 662

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0010】

薬物スクリーニング(例えばハイスループット薬物スクリーニング)、および糸球体疾患に關与する分子経路の研究に適した有足突起培養を開発する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

発明の概要

発明は一般的に、インビトロで有足突起を培養する方法に關する。該方法は、有足突起細胞の第1の培養物(例えば、始原有足突起または条件付きで不死化された有足突起細胞株などの有足突起細胞株)を、許容条件または増殖条件下で維持して有足突起の集団を産生する工程、該有足突起の集団(またはその画分)を、非許容条件または分化条件下で、部分的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間、維持する工程、および次いで該部分的に分化した有足突起(またはその画分)を、非許容条件または分化条件下で、最終的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間、第2の培養物において維持する工程を含む。

30

【0012】

該培養物および該培養物から得られた最終的に分化した有足突起は、薬物スクリーニング(例えば、培地またはハイスループット薬物スクリーニング)、糸球体疾患に關与する分子経路の研究、ならびに腎臓疾患または腎臓疾患の素因についての患者の診断およびスクリーニングなどの様々な目的に使用され得る。発明はまた、有足突起の健全性を分析するための方法を提供する。

40

【0013】

即ち、本発明の要旨は、

(1) 腎臓疾患を治療するための候補化合物を同定する方法であって、該方法が、

(a) 複数のユニットを含むアレイを提供する工程、ここで、それぞれのユニットは、

(i) 有足突起細胞を、許容条件下で、有足突起細胞が少なくとも1回倍加するのに十分な時間、第1の細胞培養物において維持し、それにより有足突起の集団を産生する工程；

(ii) (i)で得られた該有足突起の集団を、非許容条件下で、部分的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間維持する工程；および

(iii) (ii)で得られた該部分的に分化した有足突起を再度播種し、(ii)で得られた該部分的に分化した有足突起を、非許容条件下で、最終的に分化した有足突起の集団を得るの

50

に十分な時間、第2の細胞培養物において維持する工程

を含む、インピット口で有足突起を培養する方法により得られる1つ以上の最終的に分化した有足突起を含む；

(b) 候補化合物と、1つまたは複数の前記最終的に分化した有足突起を、該アレイ中の少なくとも1ユニットにおいて接触させる工程；および

(c) 1つまたは複数の最終的に分化した有足突起の細胞特性を決定する工程

を含み、ここで、適切な対照に対する細胞特性の変化が、前記化合物が腎臓疾患を治療するための候補であることを示す、方法、

〔2〕細胞特性が、膜透過性、形態、生存力、または有足突起マーカーの発現である、〔1〕記載の方法、

〔3〕前記アレイが、マルチウェルプレートを含み、それぞれのウェルが、1つ以上の最終的に分化した有足突起を含む、〔1〕または〔2〕記載の方法、

〔4〕前記有足突起マーカーが、F-アクチンである、〔2〕記載の方法、

〔5〕F-アクチンの発現レベルが、蛍光部分にコンジュゲートしたF-アクチン特異的結合剤を使用した蛍光染色により決定される、〔4〕記載の方法、

〔6〕F-アクチンの発現レベルが、ELISAまたはウエスタンブロットにより決定される、〔4〕記載の方法、

〔7〕前記形態が、アクチン細胞骨格の平均長さである、〔2〕記載の方法、

〔8〕細胞形態が、光学顕微鏡検査または電子顕微鏡検査により分析される、〔7〕記載の方法、

〔9〕前記候補化合物が、最終的に分化した有足突起の生存力を向上させる、〔1〕～〔8〕いずれか記載の方法、

〔10〕有足突起培養物において、健常な最終的に分化した有足突起を同定する方法であって、

(a) 蛍光部分にコンジュゲートしたF-アクチン特異的結合剤を使用した、全細胞に対するF-アクチン張力線維の平均蛍光強度割合、ここで、約0.75以下の平均蛍光強度割合は、健常な最終的に分化した有足突起を示す；

(b) 1細胞当たりの区分けされたF-アクチン張力線維の平均数、ここで、1細胞当たり少なくとも約100の区分けされたF-アクチン張力線維は、健常な最終的に分化した有足突起を示す；

(c) 1ウェル当たりの区分けされたF-アクチン張力線維の平均数、ここで、前記ウェルは、約0.32cm<sup>2</sup>の表面積を有し、1ウェル当たり少なくとも約100,000の区分けされたF-アクチン張力線維は、健常な最終的に分化した有足突起を示す；

(d) 1細胞当たりの区分けされたF-アクチン張力線維の総面積、ここで、1細胞当たり少なくとも約2000μm<sup>2</sup>のアクチン細胞骨格の平均面積は、健常な最終的に分化した有足突起を示す；

(e) 蛍光部分にコンジュゲートしたF-アクチン特異的結合剤を使用した、全細胞に対する有足突起接着点の平均蛍光強度割合、ここで、約0.835以下の蛍光強度割合は、健常な最終的に分化した有足突起を示す；

(f) 有足突起接着点の平均数、ここで、(1)1細胞当たり、少なくとも約100の区分けされた接着点の平均または(2)1ウェル当たり、少なくとも約280,000の区分けされた接着点の平均は、健常な最終的に分化した有足突起を示し、前記ウェルは、約0.32cm<sup>2</sup>の表面積を有する；および/または

(g) 平均有足突起細胞丸さ、ここで、0.7以下の平均有足突起細胞丸さ値は、健常な最終的に分化した有足突起を示す、

を決定する工程を含み、前記最終的に分化した有足突起が

(i) 有足突起細胞を、許容条件下で、有足突起細胞が少なくとも1回倍加するのに十分な時間、第1の細胞培養物において維持し、それにより有足突起の集団を産生する工程；

(ii) (i)で得られた該有足突起の集団を、非許容条件下で、部分的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間維持する工程；および

10

20

30

40

50

(iii) (ii)で得られた該部分的に分化した有足突起を再度播種し、(ii)で得られた該部分的に分化した有足突起を、非許容条件下で、最終的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間、第2の細胞培養物において維持する工程

を含む、インビトロで有足突起を培養する方法により得られる、方法、

〔11〕腎臓疾患について被験体を診断する方法であって、該方法は、

(a) (i) 有足突起細胞を、許容条件下で、有足突起細胞が少なくとも1回倍加するのに十分な時間、第1の細胞培養物において維持し、それにより有足突起の集団を産生する工程；

(ii) (i)で得られた該有足突起の集団を、非許容条件下で、部分的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間維持する工程；および

(iii) (ii)で得られた該部分的に分化した有足突起を再度播種し、(ii)で得られた該部分的に分化した有足突起を、非許容条件下で、最終的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間、第2の細胞培養物において維持する工程

を含む、インビトロで有足突起を培養する方法により得られる1つ以上の最終的に分化した有足突起を含む有足突起培養物を提供する工程；

(b) 前記有足突起培養物を、前記被験体由来の血清試料の存在下で維持する工程；

(c) 1つまたは複数の最終的に分化した有足突起の細胞特性を決定する工程

を含み、ここで、適切な対照に対する細胞特性の変化は、前記被験体が、腎臓疾患を有するかまたは腎臓疾患の素因があることを示す、方法、

〔12〕腎臓疾患について被験体を診断する方法であって、該方法は、

(a) 前記被験体由来の組織試料を提供する工程、ここで、前記組織試料は1つ以上の有足突起を含む；

(b) 1つまたは複数の前記有足突起を、許容条件下で、1つまたは複数の有足突起が少なくとも1回で倍化するのに十分な時間、第1の細胞培養物において維持し、それにより有足突起の集団を産生する工程；

(c) (b)で得られた該有足突起の集団を、非許容条件下で、部分的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間維持する工程；

(d) (c)で得られた該部分的に分化した有足突起を再度播種し、(c)で得られた該部分的に分化した有足突起を、非許容条件下で、最終的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間、第2の細胞培養物において維持する工程；および

(e) 最終的に分化した有足突起の細胞特性を決定する工程

を含み、ここで、適切な対照に対する細胞特性の変化は、前記被験体が、腎臓疾患を有するか、または腎臓疾患の素因があることを示す、方法に関する。

【発明の効果】

【0014】

本発明により、有足突起培養物およびその使用が提供され得る。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、培地~ハイスループット、ハイコンテツスクリーニング(HCS)において使用される例示的な表現型有足突起アッセイを説明するフローチャートである。培地~ハイスループット環境における細胞変化の自動検出のために、HCSアッセイにおいて、培養された有足突起が使用され得る。この方法において、有足突起は、培養フラスコ中で部分的に分化され、次いでマルチウェルアッセイプレートに移され、その後さらなる分化時間に供される。次いで細胞を、以降のアッセイに使用して、高度に頑強であり、再現性があり、かつ変動性が低い細胞表現型を得る。

【図2】図2は、培地~ハイスループット、ハイコンテツスクリーニング(HCS)に使用される表現型有足突起アッセイのための例示的な方法を説明するフローチャートである。マルチウェルプレート中の有足突起は、ハイコンテツスクリーニング画像化装置(imager)を使用して分析される。次いで画像を分析する。このアプローチの下、1つの重要な工程

10

20

30

40

50

は、健常および損傷または疾患の有足突起を区別するためのパラメーターの同定である。健常有足突起と損傷または疾患有足突起を区別する複数のパラメーターを使用することによってもロバスト解析方法が提供された。

【図3】図3は、有足突起の表現型分析に有用な種々のパラメーターを示す。A~B. 384ウェルマルチウェルプレートで培養された健常有足突起に供された種々の分析を示すグラフ。異なる数の細胞をプレートの異なるウェルに播種し、分析して、細胞数の影響も研究した。A. F-アクチン蛍光染色(蛍光標識されたファロイジン)を用いて測定された、(1細胞基準あたりで)標準化された、1ウェル当たりの数が減少する有足突起を含むウェルにおけるF-アクチンの強度を示すグラフ(ウェル#1中最大、該ウェル中約500細胞を分析した)。データがかなり高い変動性を示す場合、該グラフは、細胞数が約100~200よりも高ければ、標準化されたF-アクチン強度を細胞分析のための定量的な特性として使用し得ることを明らかに示す。B. 蛍光核染色を使用して決定した、1ウェル当たりの有足突起の数を示すグラフ(ウェル#1中最大、該ウェル中約500細胞を分析した)。グラフは、500~100の分析された細胞/ウェルの間の、384ウェルプレートのウェルにおける細胞数の直線的な相関を示し、それ未満ではデータはかなり高い変動性を示す。C. パラメーター、画像面積当たりのアクチン細胞骨格の平均長さの測定を示すグラフであり、健常細胞対損傷細胞における特性について有意な収束を示す。健常細胞は、損傷細胞(約0.19)に対してより長い骨格長さ(約0.22)を示す。

【図4】図4は、PAN用量応答曲線を示す。培養された有足突起における強度およびアクチン線維の数を含む種々の細胞パラメーターに対する、有足突起損傷薬物ピューロマイシンアミノヌクレオシド(PAN)の濃度増加の効果を示す用量応答曲線。分化した有足突起を96ウェルマルチウェルプレート中で培養した。細胞は、正常細胞培養培地中で維持したが、または濃度増加のPANで37、48時間処理した。続いて、細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、Alexa Fluor 594標識ファロイジンを使用して、線維性アクチン(F-アクチン)線維を染色した。PerkinElmer OPERAハイコンテンツスクリーニング顕微鏡を使用して細胞を画像化し、PerkinElmer Columbus分析システムを使用して画像を分析し、マルチウェルプレートの各ウェル中の1細胞当たりのF-アクチン線維を計測した。図4Aおよび4Bは、未処理(A)およびPAN処理(B)有足突起のそれぞれの画像を示す。図4Cは、PAN濃度に対するパラメーター「バックグラウンド強度に対する相対スポット」(区分けされた(sectioned)F-アクチン線維の強度の割合を1細胞基準あたりでの細胞の強度と対比し、ウェルについての平均を計算した測定値)のグラフを示す。図4Dは、PAN濃度に対するパラメーター「全細胞線維-対象の数」(閾値に対する1ウェルあたりの区分けされたF-アクチン線維の数を計測する)のグラフを示す。該方法により、化合物ピューロマイシンアミノヌクレオシドすなわちPANで処理した場合の有足突起アクチン細胞骨格に基づくこれらのパラメーターを使用した、用量応答様式における有足突起損傷の定量的評価が可能になった。これら2つのパラメーターは、インビトロ有足突起損傷剤としてのPANについての再現性のあるIC50値ももたらした。それぞれのデータの点は、1ウェル由来(約500~2000細胞/ウェル由来)の1細胞当たりの平均F-アクチン線維数を表す。

【図5】図5. ミゾリビン(mizouribine)は用量依存的に有足突起損傷を防ぐ。培養された有足突起における強度およびアクチン線維の数などの種々の細胞パラメーターに対するPANおよび有足突起保護薬物ミゾリビンの共処理の効果を示す用量応答曲線。分化した有足突起を96ウェルマルチウェルプレート中で培養した。細胞は、濃度増加のミゾリビンの非存在下または存在下で、37、48時間、PANで処理した。続いて、細胞をパラホルムアルデヒドで固定して、Alexa Fluor 594標識ファロイジンを使用して、繊維状アクチン(F-アクチン)線維を染色した。PerkinElmer OPERAハイコンテンツスクリーニング顕微鏡を使用して細胞を画像化し、PerkinElmer Columbus分析システムを使用して画像を分析してマルチウェルプレートの各ウェル中の1細胞当たりのF-アクチン線維を計測した。図5Aおよび5Bは、PAN損傷有足突起(A)、ならびにPANおよびミゾリビン共処理健常有足突起(B)の代表的な画像を示し、これは、ミゾリビンが有足突起を保護し、アクチン線維をPAN損傷から保護することを示す。図5Cは、ミゾリビン濃度に対するパラメーター「バックグラウンド

強度に対する相対スポット」(区分けされたF-アクチン線維の強度の割合と、1細胞基準当たりでの細胞の強度を対比し、ウェルについての平均を計算した測定値)のグラフを示す。図5Dは、ミゾリピン濃度に対するパラメーター「全細胞線維-対象の数」(閾値に対する1ウェル当たりの区分けされたF-アクチン線維の数を計測する)のグラフを示す。該方法により、PANおよびミゾリピンで処理した場合の有足突起アクチン細胞骨格に基づいてこれらのパラメーターを使用した、用量応答様式での有足突起損傷の保護の定量的評価が可能になった。これらの2つのパラメーターによって、インビトロ有足突起保護剤としてのミゾリピンの再現性のあるIC50値ももたらされた。それぞれのデータの点は、1ウェル由来(約500~2000細胞/ウェル由来)の1細胞当たりの平均F-アクチン線維数を表す。

【図6】図6. PAN処理は接着点(focal adhesion)の低下をもたらす。ここで、用量応答曲線は、培養された有足突起についての細胞パラメーターとしての接着点の数および強度に対する、有足突起損傷薬ピューロマイシンアミノヌクレオシド(PAN)の濃度増加の効果を示す。分化した有足突起を96ウェルマルチウェルプレートで培養した。細胞は、正常細胞培養培地中で維持したか、または濃度増加のPANで37、48時間処理した。続いて、細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、抗パキシリン抗体を使用して接着点を染色した。PerkinElmer OPERAハイコンテックスクリーニング顕微鏡を使用して細胞を画像化し、PerkinElmer Columbus分析システムを使用して画像を分析して、マルチウェルプレートの各ウェルにおける1細胞当たりのF-アクチン線維を計測した。図6Aおよび6Bは、未処理(A)およびPAN処理(B)有足突起の代表的な画像を示す。図6Cは、PAN濃度に対する、パラメーター「バックグラウンド強度に対する相対スポット」(区分けされた接着点の強度の割合と、1細胞基準当たりでの細胞の強度を対比し、ウェルについて計算した平均の測定値)のグラフを示す。図6Dは、PAN濃度に対する、パラメーター「FA-対象の数」(閾値に対する1ウェル当たりの区分けされた接着点の数を計測する)のグラフを示す。該方法により、化合物ピューロマイシンアミノヌクレオシドすなわちPANで処理した場合、有足突起接着点に基づいてこれらのパラメーターを使用した、用量応答様式での有足突起損傷の定量的な評価が可能になった。これらの2つのパラメーターにより、インビトロ有足突起損傷剤としてのPANについての再現性のあるIC50ももたらされた。それぞれのデータの点は、1ウェル由来(約500~2000細胞/ウェル由来)の1細胞当たりの平均数を表す。

【図7】図7. ミゾリピンによる接着点保護。ミゾリピンは、用量依存的に有足突起損傷を保護する。培養された有足突起における接着点の数などの種々の細胞パラメーターに対するPANおよび有足突起保護薬物ミゾリピンの共処理の効果を示す用量応答曲線。分化した有足突起を96ウェルマルチウェルプレートで培養した。細胞は、濃度増加のミゾリピンの非存在下または存在下、PANで37、48時間処理した。続いて、パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、蛍光標識したパキシリンを使用して接着点を染色した。PerkinElmer OPERAハイコンテックスクリーニング顕微鏡を使用して細胞を画像化し、PerkinElmer Columbus分析システムを使用して画像を分析してマルチウェルプレートの各ウェル中の1細胞当たりのF-アクチン線維を計測した。図7Aおよび7Bは、PAN損傷有足突起(A)ならびにPANおよびミゾリピン共処理健全有足突起(B)の代表的な画像を示し、これらは、ミゾリピンが有足突起を保護し、PAN損傷から接着点を保護することを示す。図7Cは、ミゾリピン濃度に対する、パラメーター「バックグラウンド強度に対する相対スポット」(区分けされた接着点の強度の割合と、1細胞基準当たりでの細胞の強度を対比し、ウェルについて平均を計算した測定値)のグラフを示すパラメーターのグラフを示す。図7Dは、ミゾリピン濃度に対する、パラメーター「FA-対象の数」(閾値に対する1ウェル当たりの区分けされた接着点の数を計測する)のグラフを示す。該方法により、化合物PANおよびミゾリピンで処理した場合の、有足突起接着点に基づいてこれらのパラメーターを使用した、用量応答様式での有足突起保護の定量的な評価が可能になった。これらの2つのパラメーターにより、インビトロ有足突起保護剤としてのミゾリピンの再現性のあるIC50値ももたらされた。それぞれのデータの点は、1ウェル由来(約500~2000細胞/ウェル由来)の1細胞当たりの平均数を表す。

【図8】図8. 複数のパラメーターによる集団分類。ここに示される結果は、複数の分析

10

20

30

40

50

パラメーターを組み合わせることにより、健常有足突起と損傷有足突起の間の量的な違いをさらに向上し得ることを示す。分化した有足突起を96ウェルマルチウェルプレートで培養した。細胞は、正常細胞培養培地中で維持したか、または単一濃度のPAN(20 µg/mL)で37、48時間処理した。続いて、細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、Alexa Fluor 594 標識ファロイジンを使用して、繊維状アクチン(F-アクチン)線維を染色した。PerkinElmer OPERAハイコンテツスクリーニング顕微鏡を使用して細胞を画像化し、PerkinElmer Columbus分析システムを使用して画像を分析してマルチウェルプレートの各ウェル中の1細胞当たりのF-アクチン線維を計測した。細胞形態も分析した。図8Aおよび8Bは、細胞の集団を分類するために使用したパラメーターの2つの例を示す。両方の図において、点線は、群の間の最良の分離を作製するための健常(緑色点線)および損傷(赤色点線で表される)の有足突起の集団の間のカットオフを表し、その後のプレート計算について細胞の集団を2つに分ける(bin)ために使用され得る。

10

【図9】図9. 複数のパラメーターによる集団比較によりアッセイの頑強性が示される。ここに示す結果は、複数の分析パラメーターを組み合わせることにより、健常および損傷した有足突起の間の量的な違いをさらに向上し得、培地~ハイスルーブットアッセイ環境において高度に適用可能な、頑強であり、再現性があり変動性が低いアッセイをもたらし得ることを示す。分化した有足突起を96ウェルマルチウェルプレート中で培養した。細胞は、正常細胞培養培地中で維持したか、または単一濃度のPAN(20 µg/mL)で37、48時間処理した。続いて、パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、Alexa Fluor 594標識ファロイジンを使用して、繊維状アクチン(F-アクチン)線維を染色した。PerkinElmer OPERAハイコンテツスクリーニング顕微鏡を使用して細胞を画像化し、PerkinElmer Columbus分析システムを使用して画像を分析してマルチウェルプレートの各ウェル中の1細胞当たりのF-アクチン線維を計測した。細胞形態も分析した。示されるグラフは、ウェル中の健常有足突起のパーセンテージに基づいたPAN損傷細胞対未処理細胞の群で、複数のパラメーター集団分類を使用したアッセイの頑強性の試験の結果を示す。健常細胞の定量数と損傷細胞の定量数の間には明確な分離があった。それぞれの点で、データは、平均±1SD(線の暗い方の組)および平均±3SD(明るい方の線)である。

20

【発明を実施するための形態】

【0016】

発明の詳細な説明

30

#### 1. 概要

発明は一般的に、インビトロにおいて有足突起を培養する方法に関する。該方法は、有足突起細胞の第1の培養物(例えば、始原有足突起、増殖有足突起、有足突起前駆細胞または有足突起細胞株、例えば条件付きで不死化された有足突起細胞株)を、許容条件または増殖条件下で維持して有足突起の集団を産生する工程、有足突起の集団(またはその画分)を、非許容条件または分化条件下で、部分的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間、維持する工程、次いで該部分的に分化した有足突起(またはその画分)を、非許容条件または分化条件下で、最終的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間、第2の培養において維持する工程を含む。

【0017】

該培養物および培養物から得られた最終的に分化した有足突起は、薬物スクリーニング(例えば、培地またはハイスルーブット薬物スクリーニング)、糸球体疾患に関する分子経路の研究、および腎臓疾患についての患者または腎臓疾患についての素因の診断スクリーニングなどの種々の目的に使用し得る。

40

【0018】

発明はまた、有足突起の健常性を分析するための方法を提供する。

【0019】

有足突起培養の使用における大きな制限は、有足突起の取り扱いにおける困難さおよび培地またはハイスルーブットアッセイにおける有足突起の使用における困難さにある。有足突起はインビトロ培養において不均一な形態を示し、異なるウェル、プレートおよび異

50

なる日数の間に、頑強であり、再現性があり、変動性が低いデータを得ることを困難にする。インビトロにおけるこれらの細胞の増殖および分化には長い培養時間が必要になるので、1ウェルあたりの有足突起の数も、ウェルごと、プレートごとに変動性が非常に高い。また、分化した有足突起は、限定された増殖能力を示す。

#### 【0020】

本明細書において記載および例示されるように、発明者らは、インビトロにおいて有足突起を培養する新規の方法を開発し、それにより他の目的の中でも培地またはハイスループットアッセイに適した有足突起培養物が産生される。例えば、図1に例示されるように、第1に、条件付きで不死化された有足突起を、許容条件下で、所望の細胞数に達するまで増殖させた(この例においては、100%コンフルエント)。第2に、細胞を、非許容条件下で、部分的な分化を誘導するように維持した。第3に、これらの部分的に分化した細胞を、再度マルチウェルプレートに播種し、その中で部分的に分化した細胞を、非許容条件下で、最終的に分化した有足突起が産生されるように維持した。この方法を使用して、頑強であり、再現性がありかつ均一なマルチウェル形式の有足突起培養が達成された。該方法はまた、有足突起の質を有意に向上させるので、ウェルごとおよびプレートごとの変動性が低い。この方法により産生される有足突起は、培地およびハイスループットアッセイ(例えば薬物スクリーニング)における使用に特に適している。

10

#### 【0021】

明細書に記載され、例示されるように、発明者はまた、膜透過性、形態、生存力または有足突起マーカーの発現などの最終的に分化した有足突起の細胞特性および生理学的特性を分析するアッセイおよび方法を開発した。例えば、インビトロにおける有足突起のアクチン細胞骨格、接着点および形態の特定の測定結果を使用して有足突起の健全性(health)を決定する画像分析アルゴリズムを開発した。一例において、該方法は、損傷剤、または損傷剤と共に有足突起の健全性を維持もしくは向上する薬剤により生じる有足突起の変化を定量するために使用された。別の例において、発明者は、1ウェル中の異なる集団サブタイプを分離するために複数のパラメーターを使用して有足突起の変化を定量した。

20

#### 【0022】

### 2. 定義

明細書において使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、内容が明確にそうではないと指示しなければ、複数の参照物を含む。

30

#### 【0023】

明細書で使用する場合、用語「約」は、値の+/-10%をいう。

#### 【0024】

「条件付きで不死化された」有足突起は、有足突起の有糸分裂増殖が、適切な条件下で活性化または不活性化され得る、不死化された有足突起をいう。「許容条件」下で、細胞は、有糸分裂増殖により進行し、「非許容条件」下で、細胞は分化するように進行する。条件付きで不死化された有足突起株は、いくつかの方法で構築され得る。例えば、ポリオマー大型T抗原などの温度感受性不死化分子をコードする外来遺伝子を、細胞のゲノムに組み込み得る。得られた細胞株は、不死化分子が活性である温度か、または該分子が不活性化になる温度、例えば約30 ~ 40 で生育され得る。

40

#### 【0025】

条件付きで不死化されたヒト有足突起細胞株は、SV40大型T抗原(SV40)の温度感受性変異体U19<sub>1</sub>A58およびhTERTテロメラーゼ遺伝子の触媒性必須サブユニットの両方を使用したトランスフェクションにより開発された。hTERTベクターは、テロメアの長さを維持するためにテロメラーゼ活性を発現し、複製による老化の発生を防ぐ。SV40Tを用いた細胞のトランスフェクションにより、33 の「許容」温度で細胞が増殖することが可能になる。37 の「非許容」温度に移すことで、遺伝子発現にわずかな変化を有する大型T抗原の不活性化が生じる。次いで、有足突起は成長拘束に入り、有足突起タンパク質、ネフリン、ポドチン、CD2APおよびシナプトポジン(synaptopodin)ならびにスリット膜ZO-1、および カテニンおよびPカドヘリンの公知の分子などのインビボの分化した有足突起

50

マーカーを発現する。例えば、Ni et al., Podocyte culture: Tricks of the trade, *Nephrology* 17 (2012) 525-531参照。

【0026】

明細書において使用する場合、用語「許容条件」は、明白な最終的な分化を誘導せずに、有足突起が分裂して増殖することを可能にする細胞培養条件をいう。例えば、条件付きで不死化されたマウス有足突起細胞株(Mundel, Reiser et al., *Experimental Cell Research*, 236, p248 (1997))は、33 および10U/mlリコンビナントマウス インターフェロンを含む培地(許容条件)で増殖され得る。

【0027】

明細書で使用する場合、用語「非許容条件」は、有足突起の最終的な分化を誘導する細胞培養条件をいい、これは、例えば腎臓において十分に分化した有足突起において典型的に発現されるマーカーの発現により表され得る。例えば、条件付きで不死化されたマウス有足突起細胞株(Mundel, Reiser et al., *Experimental Cell Research*, 236, p248 (1997))は、細胞を33 から37 の細胞培養環境に移し、培地からリコンビナントマウス インターフェロンを取り除く(非許容条件)ことにより分化され得る。

【0028】

「最終的に分化した」有足突起は、典型的に有糸分裂細胞周期には入らず、樹枝状分岐を有する外観、大きな細胞サイズ、組織化されたアクチン細胞骨格および有足突起特異的マーカーをさらに特徴とする細胞をいう。最終的に分化した有足突起についてのマーカーとして、以下のタンパク質： 3 1インテグリン、 -アクチン-4、CD2AP、ネフリン、ポドカリキシン、ポドシン、シナプトポジン、VEGF、WT-1が同定されている。例えば、Shankland et al., Podocytes in culture: past, present, and future, *Kidney International* (2007) 72, 26-36; doi:10.1038/sj.ki.5002291; and Pavenstadt et al., *Cell Biology of the Glomerular Podocyte*, *Physiol. Rev.*, (2003) 83, 253-307; doi: 10.1152/physrev.00020.2002参照。

【0029】

「部分的に分化した」有足突起は、条件付きで不死化された有足突起、増殖有足突起または有足突起前駆細胞由来の分化した細胞をいうが、最終的には分化していない。部分的に分化した有足突起は、表現型的に、条件付きで不死化された有足突起、増殖有足突起、有足突起前駆細胞および最終的に分化した有足突起とは異なり、分化有足突起マーカーの部分的な発現および表現型のみをさらに特徴とし得る。一般的に、許容条件下で、不死化した有足突起は、典型的な丸石形態を示す。細胞を非許容条件に移すことにより、典型的に、始原有足突起培養物について記載されるものと同様に、増殖の拘束、不規則な形状への細胞体の拡大、および短くてより丸く、かつ長くて紡錘状の突起の形成が生じる。「部分的に分化した」有足突起は、「最終的に分化した」有足突起において通常存在するマーカーの部分的な発現を示す。これは、シナプトポジンおよびポドシンなどのタンパク質を含む。「部分的に分化した」有足突起におけるこれらのタンパク質の発現レベルは、「最終的に分化した」有足突起中に通常存在するレベルよりも低い。

【0030】

始原細胞培養物は、細胞を生物または組織試料から直接単離して、継代することなく適切な条件下で増殖させた細胞培養物をいう。

【0031】

有足突起培養について「増殖条件」は、明らかな最終的な分化を誘導することなく、有足突起が分裂して増殖することを可能にする条件をいう。典型的に、始原有足突起は、培養物の細胞密度が約50%コンフルエント未満である場合(接着培養物として増殖した場合)、増殖性のままである。

【0032】

有足突起培養について「分化条件」は、有足突起の最終的な分化を誘導する条件をいう。典型的に、始原有足突起は、培養物の細胞密度が約50%コンフルエントを超えた場合(接着培養物として増殖した場合)、分化を開始する。

10

20

30

40

50

## 【0033】

最終的に分化した有足突起は、有足突起が生存性であり、正常な有足突起の他の特徴を有する場合「健常(healthy)」である。典型的に、健常な有足突起は、当該技術分野で公知の、正常な最終的に分化した有足突起の典型的なレベルで、マーカータンパク質ポドシンおよびシナプトポジンを発現する。

## 【0034】

## 3. 有足突起培養物

一局面において、発明は、インビトロにおける有足突起培養物およびかかる培養物を使用して産生される有足突起に関する。該有足突起は、哺乳動物(例えば、ネズミ科(マウス、ラット)、ヒト)または魚類(例えば、ゼブラフィッシュ)もしくは昆虫(例えば、ショウジョウバエ)などの非哺乳動物などの任意の所望の動物種由来であり得る。

10

## 【0035】

一局面において、発明は、インビトロにおいて有足突起を培養する方法であって、(a) 有足突起細胞(例えば、始原有足突起、増殖有足突起、有足突起前駆細胞または条件付きで不死化された有足突起細胞株などの有足突起細胞株)を、許容条件または増殖条件下で、条件付きで不死化された有足突起が、少なくとも1回倍加するのに十分な時間、第1の培養において維持し、それにより有足突起の集団を産生する工程；(b) (a)で得られた該有足突起の集団を、非許容条件または分化条件下で、部分的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間維持する工程；および(c) (b)で得られた部分的に分化した有足突起を、非許容条件または分化条件下で、最終的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間、第2の細胞培養において維持する工程を含む、方法を提供する。

20

## 【0036】

特定の態様において、第1の細胞培養物は、始原有足突起、有足突起前駆体、増殖性有足突起または有足突起細胞株を含む。典型的に、始原有足突起は、培養の細胞密度が約50%コンフルエント未満である場合(接着培養として増殖した場合)増殖性のままであり、培養の細胞密度が約50%コンフルエントを超える場合(接着培養として増殖した場合)分化を開始する。より具体的な態様において、第1の細胞培養物は、条件付きで不死化された有足突起細胞株を含む。

## 【0037】

野生型およびノックアウトのマウス細胞株、ならびに野生型および遺伝的に改変されたヒト有足突起株を含むいくつかの有足突起細胞株は、利用可能であり、明細書に記載される方法に使用され得る。表1は、使用され得るいくつかの有足突起細胞株を要約する。

30

## 【0038】

## 【表 1】

表 1 例示的な有足突起細胞株

有足突起細胞株	参考文献
野生型マウス	Mundel P, Reiser J, Borja AZ <i>et al.</i> Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. <i>Exp Cell Res</i> 1997; <b>236</b> : 248–258 and Schiwiek D, Endlich N, Holzman L <i>et al.</i> Stable expression of nephrin and localization to cell–cell contacts in novel murine podocyte cell lines. <i>Kidney Int</i> 2004; <b>66</b> : 91–101
$\alpha 3$ インテグリン <sup>-/-</sup>	Reiser J, Von Gersdorff G, Loos M <i>et al.</i> Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. <i>J Clin Invest</i> 2004; <b>113</b> : 1390–1397.
CD2AP <sup>-/-</sup>	Schiffer M, Mundel P, Shaw AS <i>et al.</i> A novel role for the adaptor molecule CD2-associated protein in TGF-beta-induced apoptosis. <i>J Biol Chem</i> 2004; <b>279</b> : 37004–37012
FGF2 <sup>-/-</sup>	Davidson G, Dono R, Zeller R. FGF signalling is required for differentiation-induced cytoskeletal reorganisation and formation of actin-based processes by podocytes. <i>J Cell Sci</i> 2001; <b>114</b> : 3359–3366
サイクリン I <sup>-/-</sup>	Griffin SV, Olivier JP, Pippin JW <i>et al.</i> Cyclin I protects podocytes from apoptosis. <i>J Biol Chem</i> 2006; <b>281</b> : 28048–28057.
p21 <sup>-/-</sup>	Wada T, Pippin JW, Terada Y <i>et al.</i> The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is required for TGF-beta1-induced podocyte apoptosis. <i>Kidney Int</i> 2005; <b>68</b> : 1618–1629 and Petermann AT, Pippin J, Durvasula R <i>et al.</i> Mechanical stretch induces podocyte hypertrophy <i>in vitro</i> . <i>Kidney Int</i> 2005; <b>67</b> : 157–166.
p27 <sup>-/-</sup>	Petermann AT, Pippin J, Durvasula R <i>et al.</i> Mechanical stretch induces podocyte hypertrophy <i>in vitro</i> . <i>Kidney Int</i> 2005; <b>67</b> : 157–166.
シナプトポジン <sup>-/-</sup>	Asanuma K, Kim K, Oh J <i>et al.</i> Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. <i>J Clin Invest</i> 2005; <b>115</b> : 1188–1198
HIV トランスジェニック	Schwartz EJ, Cara A, Snoeck H <i>et al.</i> Human immunodeficiency virus-1 induces loss of contact inhibition in podocytes. <i>J Am Soc Nephrol</i> 2001; <b>12</b> : 1677–1684
野生型ヒト	Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J <i>et al.</i> A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. <i>J Am Soc Nephrol</i> 2002; <b>13</b> : 630–638
DDS 変異体ヒト	Viney RL, Morrison AA, Van den Heuvel LP <i>et al.</i> A proteomic investigation of glomerular podocytes from a Denys–Drash syndrome patient with a mutation in the Wilms tumour suppressor gene WT1. <i>Proteomics</i> 2007; <b>7</b> : 804–815.

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 9 】

条件付きで不死化された有足突起細胞株は、許容条件下で培養した場合、増殖性である。非許容条件は、数日のうちに大部分の有足突起に増殖拘束を引き起こし、分化した有足突起の多くの特徴を誘導する。

## 【 0 0 4 0 】

培養中の未分化始原有足突起と同様に、許容条件下で生育する活発に増殖する条件付きで不死化された有足突起は、上皮形態を示す。それらはサイズが小さく、多角形または「丸石」の外見を示し、比較的小さな細胞質体積を有する。有足突起を非許容条件においた場合、再度、始原分化有足突起と同様に、有足突起は実質的にサイズが大きくなり、複製を停止し、インビボにおける濾過スリットと同等の細胞構造の形成を含むより複雑な樹枝状分岐形態をとる。有足突起は通常、非許容条件で、5,000 ~ 10,000細胞/cm<sup>2</sup>の濃度で平板培養される。

## 【 0 0 4 1 】

当該技術分野において現在利用可能な条件付きで不死化された有足突起細胞株に加えて、始原培養物からも条件付きで不死化された有足突起細胞株が作製され得る。有足突起を単離して始原培養物を産生し、有足突起を不死化する方法は当該技術分野で公知である。例えば、Ni *et al.*, Podocyte culture: Tricks of the trade, *Nephrology* 17 (2012) 525-531参照。

## 【 0 0 4 2 】

増殖有足突起および分化有足突起の両方は、WT-1を発現する。分化の際に、アクチン線維および微小管の整列されたアレイは、細胞プロセスの形成まで拡大され始め、インビボ

における有足突起プロセスを暗示する。始原培養物と同様に、細胞骨格再配列およびプロセス形成は、シナプトポジン発現の開始を伴った。さらに、電気生理学的研究により、分化したマウス有足突起が、細胞内カルシウム濃度の変化によりブラジキニンに応答することが示された。

【0043】

典型的に、最終的に分化した有足突起は、有糸分裂細胞周期には入らず、分枝状分岐の外観、大きな細胞サイズ、組織化されたアクチン細胞骨格および有足突起特異的マーカーをさらに特徴とする。表2は、最終的に分化した有足突起の特定の特徴を要約する。これらの特徴は、有足突起の分化状態を決定するために個々に使用され得るかまたは組み合わせて使用され得る。

【0044】

【表2】

表2. 最終的に分化した有足突起についての選択された基準

特性	詳細
形態	樹枝状分岐の外観
	細胞体から伸長するプロセス
	大きな細胞質対核の体積比
	張線維形成
タンパク質発現	WT-1
	シナプトポジン
	ネフリン
	ポドシン
	CD2AP
	エズリン
細胞周期	VEGF 産生
	DNA 合成がない(BrdU, PCNA, サイクリン E および A について陰性; cdk2 活性なし)
	有糸分裂がない(サイクリン B について陰性, cdc2 活性なし; 有糸分裂像なし)
	p27 および p57 の発現
機能的応答	細胞周期を抜けるために細胞同士の接触を必要としない
	TGF- $\beta$ , PAN により誘導されるアポトーシス
	移動性
	ATRA により誘導されるプロセス
	デキサメタゾンが形状変化および高い生存性を誘導する

ATRA, 全トランスレチノイン酸; PAN, ピューロマイシニアミノヌクレオシド; PCNA, 増殖細胞核抗原; TGF, トランスホーミング増殖因子; VEGF, 血管内皮増殖因子。

【0045】

典型的に、工程(a)において、第1の有足突起培養は、許容条件(例えば、条件付きで不死化された(amortized)細胞について)または増殖条件(例えば始原有足突起、有足突起前駆体または他の型の増殖性有足突起について)下で、約3日~約30日、約5日~約20日または約7日~約14日間維持される。

【0046】

第1の有足突起培養は、懸濁培養または接着培養などの任意の所望の型の培養であり得る。特定の態様において、第1の有足突起培養は接着培養である。特定の態様において、有足突起の集団は、少なくとも約50%コンフルエント、少なくとも約60%コンフルエント、少なくとも約70%コンフルエント、少なくとも約80%コンフルエント、または少なくとも約90%コンフルエントで、部分的な分化が開始される前に接着培養で維持される。

【0047】

典型的に、工程(b)において、部分的分化段階の間、有足突起の集団は、(例えば、条件

10

20

30

40

50

付きで不死化された細胞について)非許容条件、または(例えば、始原有足突起、有足突起前駆体または他の型の増殖性有足突起について)分化条件下で、約1日～約12日、約3日～約10日、約4日～約8日、約5日～約7日の間維持される。培養は、懸濁培養または接着培養などの任意の所望の型の培養であり得る。

【0048】

典型的に、工程(c)において、最終的な分化段階の間、部分的に分化された有足突起は、(例えば、条件付きで不死化された細胞について)非許容条件、または(例えば、始原有足突起、有足突起前駆体または他の型の増殖性有足突起について)分化条件下で、約3日～約30日、約5日～約20日または約6日～約15日の間維持される。培養は、懸濁培養または接着培養などの任意の所望の型の培養であり得る。

10

【0049】

明細書に記載される有足突起培養は、他の目的の中でも培地～ハイスループットスクリーニングに適している。したがって、部分的に分化した有足突起は、スクリーニングまたは他の目的に適した任意の所望の形式である第2の細胞培養物に再度播種され得る。スクリーニングのために、部分的に分化した有足突起を、例えばマルチウェルプレート中で第2の細胞培養物のアレイに再度播種し得る。例えば96ウェルプレート、384ウェルプレートまたは1536ウェルプレートなどのマルチウェルプレートは、ハイスループットスクリーニングに適し得る。

【0050】

#### 4. スクリーニング

20

##### A. 候補化合物のスクリーニング

明細書に記載される有足突起培養を利用して、腎臓疾患を治療するための候補化合物をスクリーニングし得る。

【0051】

一局面において、本発明は、腎臓疾患を治療するための候補化合物を同定する方法を提供する。一般的な局面において、該方法は、(a)最終的に分化した有足突起の培養を提供する工程；(b)候補化合物と、前記最終的に分化した有足突起(1つまたは複数)を接触させる工程；および(c)該最終的に分化した有足突起(1つまたは複数)の細胞特性または生理学的特性を決定する工程を含む。適切な対照に対する細胞特性または生理学的特性の変化は、前記化合物が腎臓疾患を治療するための候補であることを示す。適切な細胞特性または生理学的特性としては、例えば、膜透過性、形態、生存力または有足突起マーカーの発現が挙げられる。

30

【0052】

より具体的な局面において、該方法は、(a)複数の単位(例えば培養物)を含むアレイを提供する工程、それぞれの単位(例えば培養物)は、1つ以上の最終的に分化した有足突起を含む；(b)候補化合物と、前記最終的に分化した有足突起(1つまたは複数)とを、アレイの少なくとも一単位(例えば培養物)において接触させる工程；および(c)最終的に分化した有足突起(1つまたは複数)の細胞特性を決定する工程を含む。適切な対照に対する細胞特性の変化は、前記化合物が腎臓疾患を治療するための候補であることを示す。適切な細胞特性としては、例えば、膜透過性、形態、生存力または有足突起マーカーの発現が挙げられる。好ましくは、アレイ中の実質的に全ての単位(例えば培養物)は、対照であるか、または同じもしくは異なる候補化合物と接触される。

40

【0053】

特定の態様において、細胞特性または生理学的特性は、セクションBにおいて明細書に記載されるパラメータを使用して決定される最終的に分化した有足突起の健全性である。

【0054】

特定の態様において、該アレイは、マルチウェルプレートを含み、それぞれのウェルは、1つ以上の最終的に分化した有足突起を含む。

【0055】

50

この方法のために種々の対照を使用してもよい。公知の健常有足突起由来の対応する細胞特性または生理学的特性が対照として使用され得る。対照は、有足突起を候補化合物の非存在下で培養する並行アッセイ(parallel assay)由来の細胞特性または生理学的特性であり得る。さらに他の適切な対照は、データベースまたは文献中に示されるデータまたは細胞特性であり得る。一般的に、適切な対照は、候補化合物には曝露されないが、候補化合物を試験するために使用される任意の溶媒、ビヒクルまたは希釈剤には任意に曝露される培養物から得られる。

#### 【0056】

#### B. 有足突起の健常性の評価

別の局面において、発明は、明細書に記載される培養方法により産生された有足突起を含む最終的に分化した有足突起などの健常な有足突起を同定する方法を提供する。好ましい態様において、該方法は、明細書に記載される培養などの培養中の健常な有足突起(例えば、最終的に分化した有足突起)を同定するために使用される。該方法は、個々にまたは任意の所望の組合せのいずれかで、セクションB1~B6に記載されるパラメーターの1つ以上を決定する工程を含む。

#### 【0057】

1. 平均F-アクチン張力線維蛍光強度割合。健常有足突起を同定するための1つのパラメーターは、F-アクチン特異的薬剤(例えば、ファロイジン、F-アクチン特異的抗体またはその抗原結合断片またはLifeAct(Riedl J, et al. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. Nat Methods. 2008 Jul;5(7):605-7. doi: 10.1038/nmeth.1220)参照)を使用した、免疫蛍光による、全細胞に対するF-アクチン張力線維の平均蛍光強度割合である。該F-アクチン特異的薬剤は、蛍光部分にコンジュゲートされる。

#### 【0058】

1つの標準的なアッセイにおいて、F-アクチン張力線維は、蛍光強度の閾値に基づいて区分けされる(Columbus「find spots」ブロック、方法B、検出感度約0.4、スプリット係数約0.505)。この強度割合は、細胞の全ての区分けされたF-アクチン張力線維の全てのピクセル由来の、バックグラウンドを超える平均強度の割合として計算され、次いでこれを細胞のバックグラウンド強度で割る。一例において、蛍光強度は、適切なレーザーおよびフィルターを用いて、フルオロフォアAlexa fluor 594のピクセル飽和度により決定される。一例において、アクチン細胞骨格測定値およびフルオロフォアとしてAlexa fluor 594を使用した約0.75未満の平均蛍光強度割合は、健常な有足突起を示す。健常な有足突起を同定するための平均蛍光強度割合の許容される上限は、約0.6~0.9の範囲である。異なる励起/放出波長を有する異なる蛍光部分を使用する場合、該割合は、本明細書に示される合理的解釈に基づいて調整され得る。

#### 【0059】

2. 区分けされたF-アクチン張力線維の平均数。健常な有足突起を同定するための別のパラメーターは、区分けされたF-アクチン張力線維の平均数を計測することである。F-アクチン張力線維は、Alexa fluor 594などの蛍光部分にコンジュゲートされたF-アクチン特異的薬剤(例えば、ファロイジン、F-アクチン特異的抗体またはLifeAct)を使用して、免疫蛍光検査により検出され得る。F-アクチン張力線維は、(例えば、Columbusソフトウェアの「find spots」ブロック、方法Bを使用して)蛍光強度の閾値に基づいて区分けされる。典型的な検出閾値は、0.4の感度値および0.505のスプリット係数を使用する。この方法を使用して、1細胞当たりで計測した場合、1細胞当たり少なくとも約100の区分けされたF-アクチン張力線維は、健常有足突起を示す。健常有足突起を同定するための1細胞当たりのF-アクチン張力線維の許容される下限は、1細胞当たり少なくとも約80~少なくとも約120の区分けされたF-アクチン張力線維の範囲である。

#### 【0060】

1ウェル当たりの区分けされたF-アクチン張力線維の平均数は、同様に使用され得、96ウェルプレート(典型的に1ウェル当たり約0.32cm<sup>2</sup>の表面積を有する)の1ウェル当たり少なくとも約100,000のF-アクチン張力線維は、健常な有足突起を示す。健常な有足突起を

10

20

30

40

50

同定するための1ウェル当たりF-アクチン張力線維の許容される下限は、96ウェルプレート(典型的に1ウェル当たり約 $0.32\text{cm}^2$ の表面積を有する)の1ウェル当たり少なくとも約80,000~少なくとも約120,000の区分けされたF-アクチン張力線維の範囲である。

【0061】

3. 1細胞当たりの平均アクチン線維面積。健全な有足突起を同定するための別のパラメーターは、1細胞当たりの区分けされたF-アクチン張力線維の総面積である。F-アクチン張力線維は、Alexa fluor 594などの蛍光部分にコンジュゲートされたF-アクチン特異的薬剤(例えばファロイジン、F-アクチン特異的抗体またはLifeAct)を使用して免疫蛍光検査により検出され得る。F-アクチン張力線維は、(例えば、Columbusソフトウェアの「find spots」ブロック、方法Bを使用して)蛍光強度の閾値に基づいて区分けされる。典型的な検出閾値は、0.4の感度値および0.505のスプリット係数を使用する。この方法を使用して、1細胞当たりで計測した場合、1細胞当たり少なくとも約 $2000\mu\text{m}^2$ のアクチン細胞骨格の平均面積は、健全な有足突起を示す。健全な有足突起を同定するためのアクチン細胞骨格の平均面積の許容される下限は、1細胞当たり少なくとも約 $1600\mu\text{m}^2$ ~1細胞当たり少なくとも約 $2400\mu\text{m}^2$ の範囲である。

10

【0062】

4. 平均有足突起接着点蛍光強度割合。健全な有足突起を同定するための別のパラメーターは、パキシリン特異的抗体またはピンクリン特異的抗体などの接着点タンパク質特異的抗体を使用した、免疫蛍光検査による、全細胞強度に対する接着点の蛍光強度割合である。かかる抗体は、フルオロフォアで標識され得るか、蛍光部分にコンジュゲートされた二次抗体によりさらに検出され得る。接着点は、(例えば、Columbusソフトウェアの「find spots」ブロック、方法Bを使用して)蛍光強度の閾値に基づいて区分けされる。典型的な検出閾値は、0.4の感度値および0.505のスプリット係数を使用する。接着点蛍光強度割合は、細胞の全ての区分けされた接着点の全てのピクセル由来のバックグラウンドを超える平均強度の割合として計算され、次いでこれを、細胞のバックグラウンド強度で割る。一例において、蛍光強度は、適切なレーザーおよびフィルターを使用して、フルオロフォア alexa fluor 488のピクセル飽和度により決定された。この方法を使用して、1細胞当たりで計測した場合、接着点測定を使用した0.835未満の蛍光強度割合は、健全な有足突起を示す。健全な有足突起を同定するための平均蛍光強度割合の許容される上限は、約0.668~1.002の範囲である。異なる励起/放出波長を有する異なる蛍光部分を使用した場合、割合は、本明細書に示される合理的解釈に基づいて調整され得る。

20

30

【0063】

5. 有足突起接着点の平均数。健全な有足突起を同定するための別のパラメーターは、パキシリン特異的抗体またはピンクリン特異的抗体などの接着点タンパク質特異的抗体を使用した、免疫蛍光検査による有足突起接着点の平均数である。かかる抗体は、フルオロフォアで直接標識され得るか、または蛍光部分にコンジュゲートされた抗体によりさらに検出され得る。接着点は、(例えば、Columbusソフトウェアの「find spots」ブロック、方法Bを使用して)蛍光強度の閾値に基づいて区分けされる。典型的な検出閾値は、0.4の感度値および0.505のスプリット係数を使用する。接着点の平均数は、細胞の全ての区分けされた接着点の全てのピクセル由来のバックグラウンドを超える平均強度を有する接着点の数として計算される。一例において、蛍光強度は、適切なレーザーおよびフィルターを使用して、フルオロフォア alexa fluor 488のピクセル飽和度により決定された。この方法を使用して、1細胞当たりで計測した場合、1細胞当たり少なくとも約100の区分けされた接着点の平均は、健全な有足突起を示す。健全な有足突起を同定するための1細胞当たりの区分けされた接着点の許容される下限は、1細胞当たり約80の区分けされた接着点~1細胞当たり少なくとも約120の区分けされた接着点の範囲である。

40

【0064】

1ウェル当たりの区分けされた接着点の平均数は同様に使用され得、96ウェルプレート(典型的に1ウェル当たり約 $0.32\text{cm}^2$ の表面積を有する)の1ウェル当たり少なくとも約280,000の区分けされた接着点の平均は、健全な有足突起を示す。健全な有足突起を同定するた

50

めの1ウェルあたりの区分けされた接着点の許容される下限は、1ウェル当たり少なくとも約224,000の区分けされた接着点～1ウェル当たり約336,000の区分けされた接着点の範囲である。

【0065】

6. 平均有足突起細胞丸さ。健常な有足突起を同定するための別のパラメーターは、細胞の平均丸さである。細胞の形態は、免疫蛍光検査(例えば、CellMask Blue蛍光色素)を使用して、ならびにColumbusソフトウェアの「Find Nuclei」分析モジュール、方法Cおよび0.85～0.90の共通閾値および $190\mu\text{m}^2$ ～ $250\mu\text{m}^2$ より大きい面積を使用して、細胞の核/細胞質を検出することにより決定され得る。細胞質は、「Find Cytoplasm」分析モジュール、方法Dおよび0.20の個々の閾値を使用して検出され得る。これらのパラメーターに基づいて、一例において、平均細胞丸さは、「calculate morphology properties」構築(building)ブロックを使用して計算された。この方法を使用して、0.7未満の平均有足突起細胞丸さ値は、健常な有足突起を示す。健常な有足突起を同定するための平均有足突起細胞丸さ値の許容される上限は、約0.56～約0.84の範囲である。

10

【0066】

### C. 腎臓疾患の診断

本発明はまた、患者における、腎臓疾患または腎臓疾患の素因の診断に関する。

【0067】

一局面において、被験体由来の有足突起は、明細書に記載される方法を使用して培養され得、該有足突起の細胞特性(例えば健常性)は、明細書に記載される方法を使用して決定し得る。被験体由来の健常でない有足突起(例えば、明細書に記載の方法を使用して産生された最終的に分化した有足突起の集団中)の存在は、被験体が腎臓疾患を有するかまたは腎臓疾患の素因を有することを示す。

20

【0068】

別の局面において、血清または他の適切な生物学的試料(例えば体液)は、診断またはスクリーニングされる被験体から得られる。適切な生物学的試料の血清を、有足突起の培養物(例えば、明細書に記載の方法を使用して産生される最終的に分化した有足突起集団)に添加して、十分な時間の後、明細書に記載の方法を使用して有足突起の健常性を決定する。培養物中の健常でない有足突起の存在は、被験体が、腎臓疾患を有するかまたは腎臓疾患の素因を有することを示す。一般的に、有足突起は、血清または他の適切な生物学的試料と、少なくとも約6時間、好ましくは少なくとも12時間または少なくとも約24時間培養される。

30

【実施例】

【0069】

ここで一般的に記載される発明は、本発明の特定の局面および態様の例示目的のためだけに含まれ、発明の限定を意図しない以下の実施例を参照して、より容易に理解されよう。

【0070】

### 導入

培養された有足突起は、げっ歯類およびヒトの糸球体疾患の重大な局面を信頼性高く再現する、実証されたモデル系を提供する。しかしながら、有足突起をインビトロで培養することは、培地またはハイスループットアッセイ環境における有足突起の使用を妨げるいくつかの問題により長い間妨げられていた。有足突起は、インビトロでの培養では不均一な形態を示し、頑強であり、再現性が高く、異なるウェル、プレートおよび異なる日数の間で変動性が低いデータを得ること困難にする。インビトロでこれらの細胞を成育させて適切に分化させるためには長い培養時間が必要であるので、有足突起細胞数はまた、ウェルごと、およびプレートごとに大きく変動する。さらに、分化した有足突起は、現在使用されている細胞培養系において、制限された増殖する能力を示した。これらおよび他の問題は、培地またはハイスループットアッセイ環境における使用にこれらの細胞を適用することを妨げてきたので、新規の薬物および薬物候補、シグナル伝達経路の発見のために、

40

50

および疾患を有する患者の体液を用いるこれらの細胞を治療することによる疾患の診断において、これらの細胞を用いてハイスループットスクリーニング(HTS)および他のかかるアッセイを実施し得る。

【0071】

以前の研究により、有足突起の傷害は、有足突起細胞死の増加、培養細胞の運動性の増加および細胞中のアクチン張力線維(並行アクチン束)の消失に反映されることが示された。したがって、かかる細胞「表現型」または機能を救うことは、有力な治療剤を決定および同定する方法であると示唆されている。インビトロにおいてアクチン張力線維を救うことは、抜粋されたいくつかの公表された研究において、インビボにおけるFPの欠如および蛋白尿を防ぐことにも良く対応している。また、有足突起標的化薬物を同定するために、レポーター系アッセイは有用であり得る。Yamauchiらは、ネフリンプロモーターの制御下における分泌型アルカリ性ホスファターゼをコードするレポーター遺伝子が安定にトランスフェクトされた、不死化されたマウス有足突起を使用した(Yamauchi K, Takano Y, Kasai A et al. Screening and identification of substances that regulate nephrin gene expression using engineered reporter podocytes. *Kidney Int* 2006; 70: 892-900)。確立されたレポーター細胞を、種々の物質に曝露し、培養培地を分泌型アルカリ性ホスファターゼアッセイに供してネフリン遺伝子発現の制御因子を同定した。しかしながら、定量的レポーター系アッセイに固有の問題は、有足突起を十分に分化させるように培養するには長い時間が必要であり、それによりウェルごとおよびプレートごとの高い変動性も潜在的に引き起こされ得るということである。ここで、発明者らは、細胞をどのように定量的に分析するかということにも有意な改善をもたらした。

10

20

【0072】

発明者らは、有足突起を、培地およびハイスループットアッセイ環境における使用に適するのに適したアッセイおよび方法を開発した。特有の培養技術、アッセイ法、画像分析法およびアルゴリズムを使用した。発明者らはまた、培地およびハイスループットアッセイにおける使用の特定の目的のために、これらの細胞をインビトロで培養するための方法を最適化した。図1に記載されるように、第1に、細胞を、より大きな細胞培養皿で生育させ、次いで培地およびハイスループットアッセイにおける使用のためにマルチウェルプレートに移した。第2に、発明者らは、これらの細胞を大きな培養皿において部分的に分化させ、続いてマルチウェルプレート中でそれらの分化を完了させた。これらの段階により、頑強であり、再現性が高く均一な細胞が、マルチウェルプレートで生じる。これらの段階はまた、細胞形態の質を有意に向上したので、ウェルごとおよびプレートごとの変動性も低くなる。

30

【0073】

以前に記載された取扱い方法は、不死化マウス有足突起細胞株をプレート中で14日間分化させることを必要としたが、発明者らは、有足突起アッセイに従って、部分的に分化した細胞について細胞を再度播種することを使用して、均一性および表現型を達成または制御し得ることを見出した。

【0074】

発明者らはまた、細胞をどのように定量的に分析するかについて有意な向上をもたらした。発明者らは、インビトロにおける有足突起のアクチン細胞骨格、接着点および形態の特定の測定結果を使用して、有足突起の健全性を決定するための画像分析法を開発した。一アプローチにおいて、発明者らは、接着点および/またはアクチン細胞骨格に基づいたハイコンテツアプローチを使用して、損傷剤または有足突起の健全性を維持もしくは向上する薬剤を用いた処理により誘導される有足突起の変化を定量した。別のアプローチにおいて、発明者らは、1ウェル中の異なる集団サブタイプを良好に分離するために複数のパラメーターを使用して、有足突起の変化を定量した。

40

【0075】

さらに、複数のウェルおよび複数の細胞に対してデータを平均化して、1細胞当たりの平均として値を示すようにデータを標準化することにより、全体的なデータの質および統

50

計が大きく向上した。

【0076】

結果

F-アクチン張力線維の強度および数により、有足突起アクチン細胞骨格における変化を測定した。画像からF-アクチン張力線維を分けし、細胞の残りの強度と対比して、強度の割合を得た。1細胞当たりの分けられたF-アクチン張力線維の数による細胞に対するF-アクチン張力線維の強度割合により、PANにより誘導された有足突起の変化を定量化し得た。前記のパラメーターを使用して、有足突起接着点の変化もモニタリングし、PANに対する用量応答様式の変化も定量化し得た。また、有足突起アクチン細胞骨格および接着点の定量化のための前述のパラメーターも、ミゾリピンによる用量応答様式のPAN処理からの保護を測定することが見出された。

10

【0077】

さらに、これらのパラメーターは、組み合わせた場合、健全な有足突起表現型と、損傷された有足突起表現型を良好に区別することが見出された。複数のパラメーターによる分析の一例は、細胞を健全な集団 対 損傷した細胞集団に分類するための、細胞に対する分けられたF-アクチン張力線維強度と、分けられたF-アクチン張力線維の細胞の総面積との間の二次元比較であった。この複数のパラメーターによる方法は、1つのパラメーターを使用すること以上にアッセイの感度を上げることが見出された。このアッセイは全体的に、インビトロでの有足突起の健全性を決定するための頑強性がある定量的な方法であり、有足突起の健全性の定性的な観察である現在の技術分野に対して著しい向上をもたらすものである。

20

【0078】

方法

有足突起細胞培養

ヒトおよびマウス有足突起を、以前に記載されたように培養した(Saleem et al., JASN 13, 630-638 (2002); Mundel, Reiser et al., Experimental Cell Research, 236, p248 (1997))。例えば、マウス系統H-2K<sup>b</sup>-tsA58由来のマウス有足突起を、ラット尾部コラーゲンコート皿上、10%熱不活性化FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシン(100U/ml)、ならびに10U/mlのリコンビナントマウス インターフェロンを補充したRPMI培地中、許容条件下、33 で培養した。次いで細胞をトリプシン処理し、 インターフェロンを含まない培地中、37 での分化のために再度平板培養した。細胞を0~7日間分化させて、96ウェルおよび384ウェルプレートについてそれぞれ1500/ウェルまたは500/ウェルの密度で、ラット尾部コラーゲンコートマルチウェルプレートに再度播種した。次いで、細胞を、固定および分析の前に、種々の試薬を用いたその後の実験のために、マルチウェルプレート中でさらに5~14日間分化させた。始原有足突起を単離および培養するための方法は当該技術分野で周知である。例えば、Kabgani et al., Primary Cultures of Glomerular Parietal Epithelial Cells or Podocytes with Proven Origin, Plos One, PLoS ONE (2012) 7(4): e34907. doi:10.1371/journal.pone.0034907. 参照。

30

【0079】

蛍光顕微鏡検査

分化した有足突起を96ウェルまたは384ウェルマルチウェル(multiwell)光学プレート(ParkinElmer, Boston, MA)で培養し、様々な量のピューロマイシン、PAN、LPS、アドリアマイシンおよび他の薬剤で処理した。いくつかの場合において、細胞は、損傷剤(例えばPAN)による損傷を防ぐために、化学物質および他の薬剤(例えばミゾリピン)で共処理した。他の場合において、傷害発生剤の添加の0~48時間後に救済剤を添加した。続いて、4%パラホルムアルデヒドおよび2%スクロース(細胞を破壊または培養培地を除去しないように細胞培養培地に直接添加した)を含む溶液で細胞を固定し、1時間後、PBS中0.3% Triton X-100を用いて10分間、室温で透過性処理を行った。Alexa fluor 594ファロイジン(Invitrogen)でF-アクチンを可視化し、核/細胞質染色のためにHCS CellMask Blue (Invitrogen)を使用し、接着点を検出するために抗パキシリン抗体クローンY113を使用した。alex

40

50

fluor 488コンジュゲート二次抗体を使用して、抗パキシリン抗体をさらに検出した。適切なフィルターと共にOpera XL (Perkin Elmer)を使用して共焦点顕微鏡検査を行った。種々の細胞パラメーターの定量化のために、その後の画像分析に画像を使用した。アッセイの頑強性のためにウェルを複製してアッセイを行った。

【 0 0 8 0 】

画像分析

Columbus 2.3.2ハイコンテックスクリーニング画像データ保存および分析システム(PerkinElmer)を使用して画像を分析した。「Find Nuclei」分析モジュール、方法C、ならびに0.85~0.90の共通の閾値および $190\mu\text{m}^2$ ~ $250\mu\text{m}^2$ より大きい面積を使用して、CellMask Blue染色された核を検出した。「Find Cytoplasm」分析モジュール、方法D、ならびに0.20の個々の閾値を使用して、細胞質を検出した。100の最少平均細胞強度および細胞面積について $1500\mu\text{m}^2$ を有する細胞を、分析のために選択した。「Find Spots」分析モジュール、方法B、ならびにそれぞれ0.40および0.505の検出感度およびスプリット係数を使用してF-アクチン線維を区別した。いくつかの場合において、それぞれ0.45および0.46のスプリット係数を適用した。「Select Populations」分析モジュールを使用して、パラメーター「バックグラウンドに対する相対スポット」および「総スポット面積」パラメーターにより、健常細胞集団と損傷細胞集団を分類した。次いで、1ウェルあたりの健常な細胞のパーセンテージを決定するために、健常細胞集団 対 損傷細胞集団を使用した。1ウェル当たり約100~1500個の細胞を分析した。

【 0 0 8 1 】

統計分析のために、高等分析アド-インと共にGraphPad Prismおよびマイクロソフトエクセルを使用してデータを分析し、スチューデントt検定を使用して比較した。P値<0.05はかなり有意であった。

【 0 0 8 2 】

明細書中に引用される参照の教示に照らして、明細書はほぼ全体を通じて理解される。明細書中の態様は、発明の態様の例示を提供し、発明の範囲を限定するものと解されるべきではない。多くの他の態様が本発明に包含されることを当業者は容易に理解する。この開示に引用される全ての文献および特許およびNCBI Entrezまたは遺伝子ID配列は、それらの全体において参照により援用される。参照により援用される物質がこの明細書と矛盾するかまたは一致しない程度まで、明細書において任意のかかる物質は取り換えられるであろう。明細書中の任意の参照の引用は、かかる参照が本発明に対する先行技術であることを容認するものではない。

【 0 0 8 3 】

当業者は、常套的な実験以下のものを使用して、明細書に記載の発明の特定の態様に対する多くの均等物を認識するかまたは確かめ得るであろう。かかる均等物は、以下の態様に包含されることを意図するものである。

【 0 0 8 4 】

本発明の態様として、以下のものが挙げられる。

[ 1 ] インビトロで有足突起を培養する方法であって、

(a) 有足突起細胞を、許容条件または増殖条件下で、条件付きで不死化された有足突起が少なくとも1回倍加するのに十分な時間、第1の細胞培養物において維持し、それにより有足突起の集団を産生する工程；

(b) a)で得られた該有足突起の集団を、非許容条件または分化条件下で、部分的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間維持する工程；および

(c) b)で得られた該部分的に分化した有足突起を、非許容条件または分化条件下で、最終的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間、第2の細胞培養物において維持する工程

を含む、方法。

[ 2 ] 前記第2の細胞培養物が、マルチウェルプレート内に含まれる、[ 1 ] 記載の方法

。

10

20

30

40

50

[ 3 ] 前記マルチウェルプレートが、ハイスループットスクリーニングに適している、[ 2 ] 記載の方法。

[ 4 ] 前記有足突起細胞を、接着培養において維持する、[ 1 ] ~ [ 3 ] いずれか記載の方法。

[ 5 ] 前記有足突起細胞が、条件付きで不死化された有足突起である、[ 1 ] ~ [ 4 ] いずれか記載の方法。

[ 6 ] 前記条件付きで不死化された有足突起が、マウス細胞またはヒト細胞である、[ 5 ] 記載の方法。

[ 7 ] 工程(a)において、前記有足突起の集団を、少なくとも約60%コンフルエントである接着培養において維持する、[ 5 ] または [ 6 ] 記載の方法。

[ 8 ] 工程(a)において、前記条件付きで不死化された有足突起を、許容条件下で、約5日~約20日の間維持する、[ 5 ] ~ [ 7 ] いずれか記載の方法。

[ 9 ] 工程(a)において、前記条件付きで不死化された有足突起を、許容条件下で、約7日~約14日の間維持する、[ 5 ] ~ [ 8 ] いずれか記載の方法。

[ 10 ] 工程(b)において、前記有足突起の集団を、非許容条件下で、約4日~約8日の間維持する、[ 5 ] ~ [ 9 ] いずれか記載の方法。

[ 11 ] 工程(c)において、前記部分的に分化した有足突起を、非許容条件下で、約5日~約20日の間維持する、[ 5 ] ~ [ 10 ] いずれか記載の方法。

[ 12 ] 工程(c)において、前記部分的に分化した有足突起を、非許容条件下で、約6日~約15日の間維持する、[ 5 ] ~ [ 11 ] いずれか記載の方法。

[ 13 ] 腎臓疾患を治療するための候補化合物を同定する方法であって、該方法が、

(a) 複数のユニットを含むアレイを提供する工程、それぞれのユニットは、1つ以上の最終的に分化した有足突起を含む；

(b) 候補化合物と、前記最終的に分化した有足突起(1つまたは複数)を、少なくとも1ユニットのアレイ中で接触させる工程；および

(c) 最終的に分化した有足突起(1つまたは複数)の細胞特性を決定する工程を含み、ここで、適切な対照に対する細胞特性の変化が、前記化合物が腎臓疾患を治療するための候補であることを示す、方法。

[ 14 ] 細胞特性が、膜透過性、形態、生存力、または有足突起マーカーの発現である、[ 13 ] 記載の方法。

[ 15 ] 前記アレイが、マルチウェルプレートを含み、それぞれのウェルが、1つ以上の最終的に分化した有足突起を含む、[ 13 ] または [ 14 ] 記載の方法。

[ 16 ] 前記有足突起マーカーが、F-アクチンである、[ 14 ] 記載の方法。

[ 17 ] F-アクチンの発現レベルが、蛍光部分にコンジュゲートしたF-アクチン特異的結合剤を使用した蛍光染色により決定される、[ 16 ] 記載の方法。

[ 18 ] F-アクチンの発現レベルが、ELISAまたはウエスタンブロットにより決定される、[ 16 ] 記載の方法。

[ 19 ] 前記形態が、アクチン細胞骨格の平均長さである、[ 14 ] 記載の方法。

[ 20 ] 細胞形態が、光学顕微鏡検査または電子顕微鏡検査により分析される、[ 19 ] 記載の方法。

[ 21 ] 前記候補化合物が、最終的に分化した有足突起の生存力を向上させる、[ 13 ] ~ [ 20 ] いずれか記載の方法。

[ 22 ] 前記最終的に分化した有足突起が、[ 1 ] 記載の方法により得られる、[ 13 ] ~ [ 21 ] いずれか記載の方法。

[ 23 ] 有足突起培養において、健全な最終的に分化した有足突起を同定する方法であって、

(a) 蛍光部分にコンジュゲートしたF-アクチン特異的結合剤を使用した、全細胞に対するF-アクチン張線維の平均蛍光強度割合、ここで、約0.75以下の平均蛍光強度割合は、健全な最終的に分化した有足突起を示す；

(b) 1細胞当たりの区分けされたF-アクチン張線維の平均数、ここで、1細胞当たり少な

10

20

30

40

50

くとも約100の区分けされたF-アクチン張線維は、健常な最終的に分化した有足突起を示す；

(c) 1ウェル当たりの区分けされたF-アクチン張線維の平均数、ここで、前記ウェルは、約0.32cm<sup>2</sup>の表面積を有し、1ウェル当たり少なくとも約100,000の区分けされたF-アクチン張線維は、健常な最終的に分化した有足突起を示す；

(d) 1細胞当たりの区分けされたF-アクチン張線維の総面積、ここで、1細胞当たり少なくとも約2000 μm<sup>2</sup>のアクチン細胞骨格の平均面積は、健常な最終的に分化した有足突起を示す；

(e) 蛍光部分にコンジュゲートしたF-アクチン特異的結合剤を使用した、全細胞に対する有足突起接着点の平均蛍光強度割合、ここで、約0.835以下の蛍光強度割合は、健常な最終的に分化した有足突起を示す；

10

(f) 有足突起接着点の平均数、ここで、(1)1細胞当たり、少なくとも約100の区分けされた接着点の平均または(2)1ウェル当たり、少なくとも約280,000の区分けされた接着点の平均は、健常な最終的に分化した有足突起を示し、前記ウェルは、約0.32cm<sup>2</sup>の表面積を有する；および/または

(g) 平均有足突起細胞丸さ、ここで、0.7以下の平均有足突起細胞丸さ値は、健常な最終的に分化した有足突起を示す、  
を決定する工程を含む、方法。

[ 2 4 ] 腎臓疾患について被験体を診断する方法であって、該方法は、

(a) 1つ以上の最終的に分化した有足突起を含む有足突起培養物を提供する工程；

20

(b) 前記有足突起培養物を、前記被験体由来の血清試料の存在下で維持する工程；

(c) 最終的に分化した有足突起(1つまたは複数)の細胞特性を決定する工程

を含み、ここで、適切な対照に対する細胞特性の変化は、前記被験体が、腎臓疾患を有するかまたは腎臓疾患を有する疑いがあることを示す、方法。

[ 2 5 ] 腎臓疾患について被験体を診断する方法であって、該方法は、

(a) 前記被験体由来の組織試料を提供する工程、ここで、前記組織試料は1つ以上の有足突起を含む；

(b) 前記有足突起(1つまたは複数)を、増殖条件下で、有足突起(1つまたは複数)が少なくとも1回で倍化するのに十分な時間、第1の細胞培養物において維持し、それにより有足突起の集団を産生する工程；

30

(c) (b)で得られた該有足突起の集団を、分化条件下で、部分的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間維持する工程；

(d) (c)で得られた該部分的に分化した有足突起を、分化条件下で、最終的に分化した有足突起の集団を得るのに十分な時間、第2の細胞培養物において維持する工程；

(e) 最終的に分化した有足突起の細胞特性を決定する工程

を含み、ここで、適切な対照に対する細胞特性の変化は、前記被験体が、腎臓疾患を有するか、または腎臓疾患を有する疑いがあることを示す、方法。

【 図 1 】

Figure 1: アッセイ法

- 1- 33°C増殖段階
- ↓
- 2- 37°C、プラスチック内での部分的な分化 (0~7日)
- ↓
- 3- プレートに再接種
- ↓
- 4- 37°C、プレート中の最終的な分化 (7~14日)
- ↓
- 5- 細胞処理
- ↓
- 6- 細胞固定
- ↓
- 7- 画像取得
- ↓
- 8- 画像分析

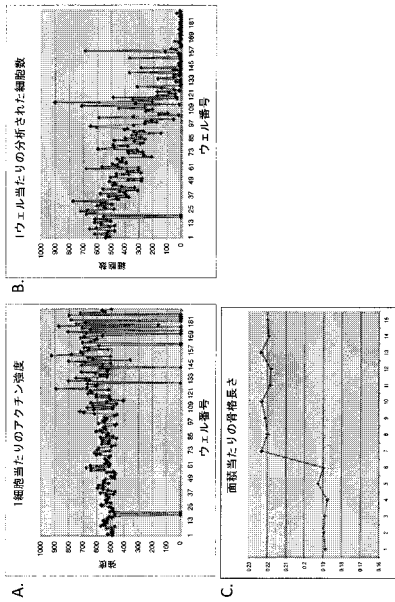
【 図 2 】

Figure 2: 画像分析法

- 1- 細胞の区別化：核および細胞質の検出
- ↓
- 2- アクチン線維区分け
- ↓
- 3- アクチン線維および細胞形態パラメーター計算
- ↓
- 4- 健康な有足突起集団 対 損傷した有足突起集団を分類
- ↓
- 5- プレート計算

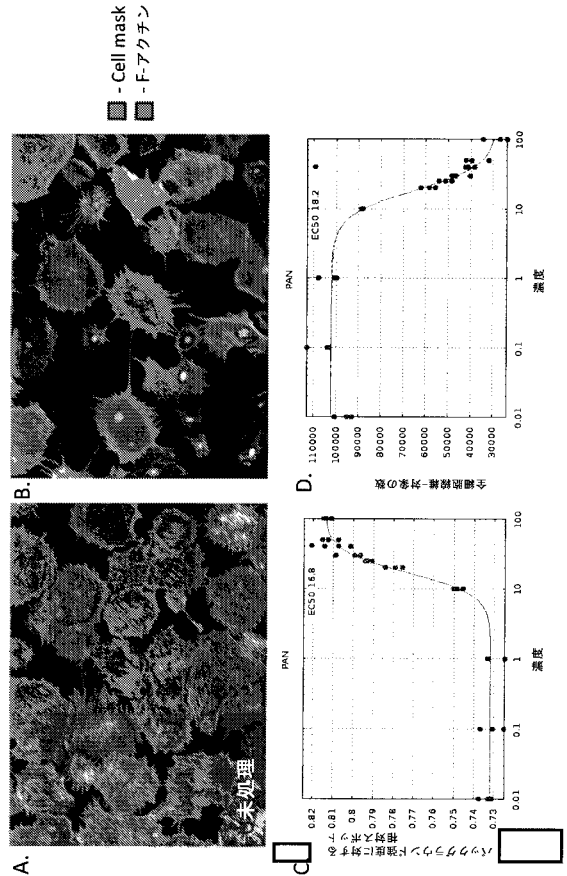
【 図 3 】

Figure 3: 表現型分析のための種々のパラメーター



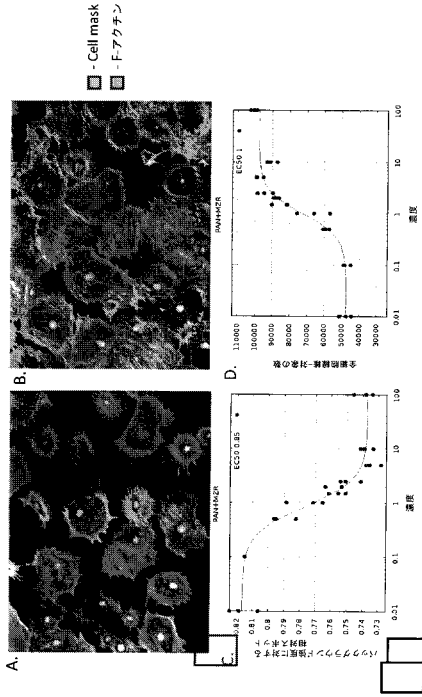
【 図 4 】

Figure 4: PAN用量応答曲線



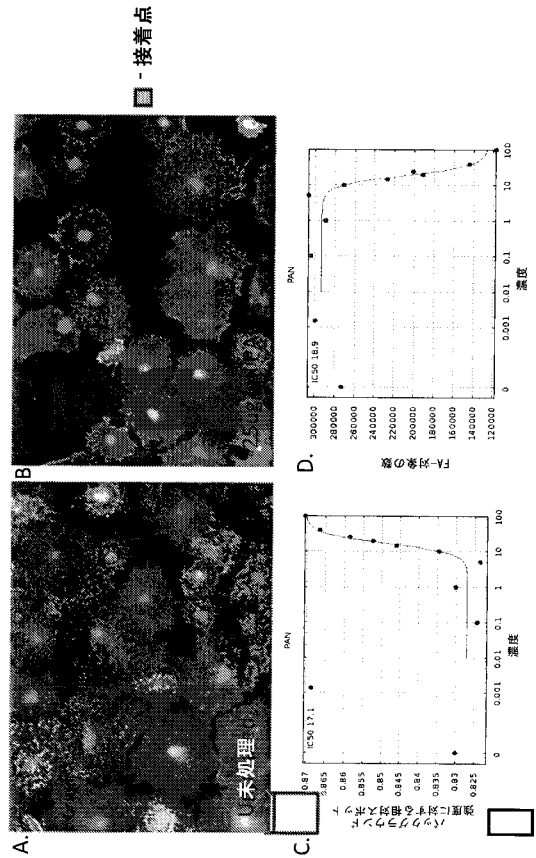
【 図 5 】

Figure 5: ミゾリピンは用量依存的に有足突起の損傷を防ぐ



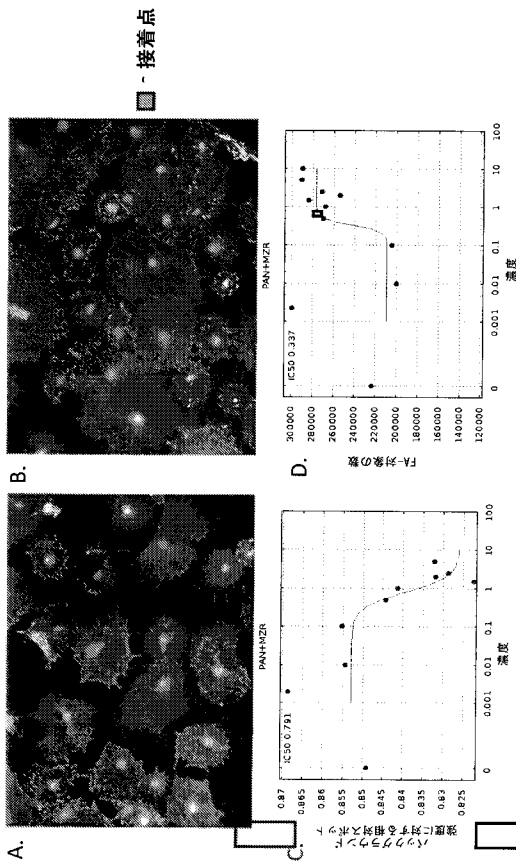
【 図 6 】

Figure 6: PAN処理は接着点の低下をもたらす



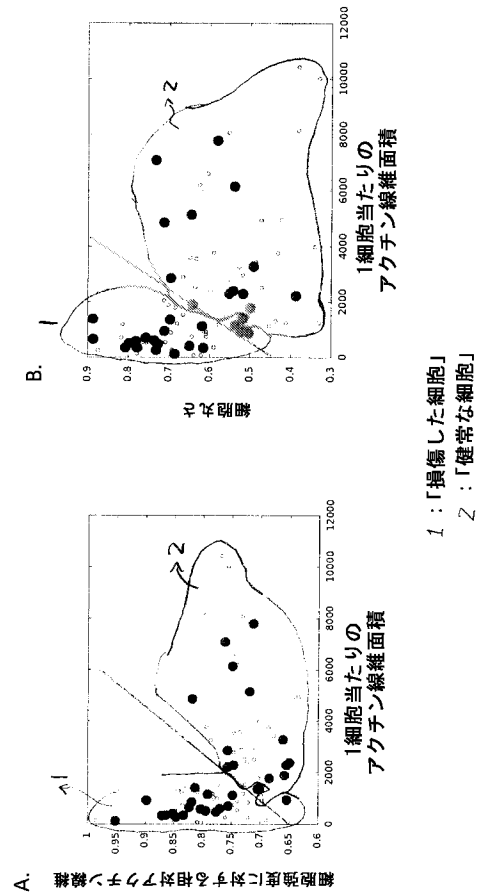
【 図 7 】

Figure 7: ミゾリピンによる接着点保護



【 図 8 】

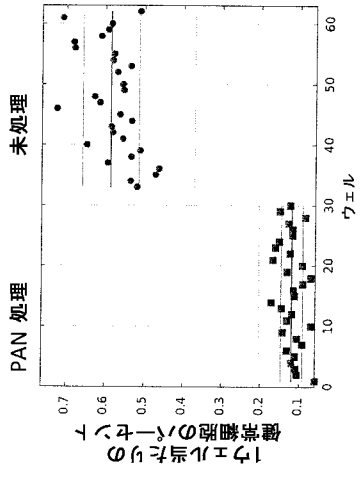
Figure 8: 複数のパラメーターによる集団分類



1 : 「損傷した細胞」  
2 : 「健全な細胞」

【 図 9 】

Figure 9: 複数のパラメータによる集団比較によりアッセイの頑強性が示される



---

フロントページの続き

(72)発明者 ライザー, ヨッヒェン

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 5 2 1 ハイન્ズデール, エス. パーク アベニュー 1 3 2

(72)発明者 グプタ, ビネート

アメリカ合衆国 フロリダ 3 3 1 5 6 パインクレスト, エスタブリユ 7 2 ペース 1 1 9  
5 0

Fターム(参考) 2G045 AA25 CB01 DA36 FB03 FB12

4B063 QA01 QA18 QR48 QR77 QS33 QS40 QX01

4B065 AA90X AC20 BA30 BD21 CA44 CA46

专利名称(译)	足细胞培养物及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019162118A</a>	公开(公告)日	2019-09-26
申请号	JP2019085695	申请日	2019-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	拉什大学医学中心		
申请(专利权)人(译)	拉什大学医学中心		
[标]发明人	ヘイズトリスταν ライザーヨッヒエン グプタビネート		
发明人	ヘイズ,トリスταν ライザー,ヨッヒエン グプタ,ビネート		
IPC分类号	C12Q1/06 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/542 C12N5/071		
CPC分类号	C12N5/0687 C12N2510/04 C12N5/0686 G01N33/502 G01N33/5023 G01N33/5026 G01N33/5044 G01N33/56966 G01N2333/4712 G01N2800/347		
FI分类号	C12Q1/06 G01N33/48.M G01N33/53.Y G01N33/542.A C12N5/071		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063 /QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS40 4B063/QX01 4B065/AA90X 4B065/AC20 4B065/BA30 4B065/BD21 4B065/CA44 4B065/CA46		
优先权	61/798385 2013-03-15 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**  
 提供用于培养适于研究肾小球疾病涉及的分子途径的足细胞的方法和鉴定用于治疗肾脏疾病的候选化合物的方法。解决方案：本文公开了一种方法，其包括以下步骤：维持足细胞（例如原代足细胞或在允许条件或增殖条件下产生有条件的永生足细胞的细胞系以产生足细胞群；在非允许条件或分化条件下维持足细胞或其部分的种群足够的时间，以获得部分分化足细胞的种群；然后在非允许或分化条件下，在第二次培养中将部分分化的足细胞或其部分维持足够的时间，以获得最终分化的足细胞。还公开了使用该培养物鉴定用于治疗肾脏疾病的候选化合物的方法。

(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2019-162118 (P2019-162118A)
	(43) 公開日	令和1年9月26日 (2019. 9. 26)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/06 (2006.01)	C12Q 1/06	2G045
G01N 33/48 (2006.01)	G01N 33/48	4B063
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	Y 4B065
G01N 33/542 (2006.01)	G01N 33/542	A
C12N 5/071 (2010.01)	C12N 5/071	
	審査請求 有	請求項の数 12 O L (全 28 頁)
(21) 出願番号	特願2019-85695 (P2019-85695)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成31年4月26日 (2019. 4. 26)	ラッシュ・ユニバーシティ・メディカル・センター
(62) 分割の表示	特願2016-500983 (P2016-500983)の分割	アメリカ合衆国 60612 イリノイ州、シカゴ、ウエスト・コンgress パークウェイ 1653
原出願日	平成26年3月10日 (2014. 3. 10)	(74) 代理人
(31) 優先権主張番号	61/798, 385	100095832
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013. 3. 15)	弁理士 稲田 秀徳
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	ヘイズ, トリスταν アメリカ合衆国 フロリダ 33772 セミノール, 96ティールイッチ プレース 12134
(特許庁注：以下のものは登録商標)	I. TRITON	

(54) 【発明の名称】 有足突起培養物およびその使用

最終頁に続く