

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-514509

(P2009-514509A)

(43) 公表日 平成21年4月9日(2009.4.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 Z N A E	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-536712 (P2008-536712)  
 (86) (22) 出願日 平成18年10月16日 (2006.10.16)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年6月17日 (2008.6.17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/040373  
 (87) 国際公開番号 W02007/047581  
 (87) 国際公開日 平成19年4月26日 (2007.4.26)  
 (31) 優先権主張番号 11/252,458  
 (32) 優先日 平成17年10月17日 (2005.10.17)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/824,265  
 (32) 優先日 平成18年8月31日 (2006.8.31)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

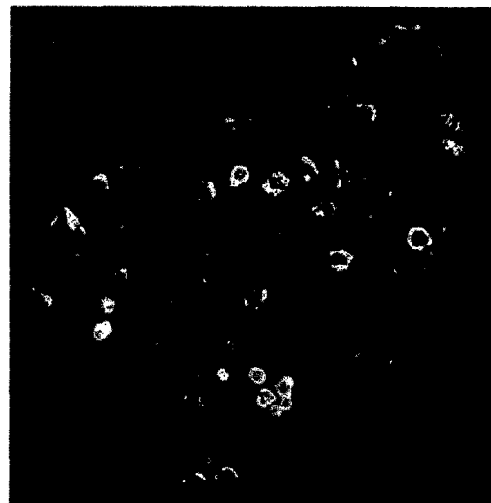
(71) 出願人 596118493  
 アカデミア シニカ  
 ACADEMIA SINICA  
 台湾, タイペイ, ナンーカン, アカデミア  
 シニカ ロード, セクション 2, 12  
 8  
 (74) 代理人 100074169  
 弁理士 広瀬 文彦  
 (72) 発明者 ユー, ジョン, チェンーポー  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92  
 037, ラ ホーヤ, ラ ホーヤ ショア  
 ス ドライブ 8480

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺幹細胞および関連の方法およびキット

(57) 【要約】

肺幹細胞の単離法、培養法、同定法および利用法を提供する。肺幹細胞は、哺乳類の肺組織自体から得られる。単離方法は、増殖遅延型コロニーの離散により最初の培養物として発生することが想定される幹細胞の同定を含んでいる。細胞は、Oct-4のような幹細胞マーカーおよび成熟した表現型に分化することにより同一性の確認が可能である。単離法および選別法は、さらに幹細胞マーカーに基づく細胞選別を含んでいる。幹細胞集団が未分化表現型を維持する間に拡張する培養法は、肺間質 (stroma) 細胞を備えた、定義された培養地、培養表面修正および相互培養の使用を含んでいる。肺幹細胞の使用方法は、さらに、細胞の生物学に関する研究である、ウイルスの感染力、ウイルスの生産および抗感染薬の試験を含むものである。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

肺組織の幹細胞を単離する方法は：

肺組織からの細胞の幹細胞の集団を含むサンプル提供すること、

肺細胞の初代培養をインビトロで育てること、

初代培養から発現する成長速度の遅いクローン化可能細胞を採取すること、

それによって培養中の他の細胞からそれらを単離すること、

また、少なくとも1つの幹細胞特性の発現を見つけることにより幹細胞として単離された細胞を確認することからなる。

10

**【請求項 2】**

前記肺組織および幹細胞は哺乳類のものからあることを特徴とする請求項 1 記載の肺組織の幹細胞を単離する方法。

**【請求項 3】**

前記肺組織および幹細胞はネズミ科の動物のものからであることを特徴とする請求項 2 記載の肺組織の幹細胞を単離する方法。

**【請求項 4】**

前記肺組織および幹細胞は人間のものからであることを特徴とする請求項 2 記載の肺組織の幹細胞を単離する方法。

**【請求項 5】**

前記幹細胞の特性は成熟した表現型に分化する能力であることを特徴とする請求項 1 記載の肺組織の幹細胞を単離する方法。

20

**【請求項 6】**

前記幹細胞の特性はOct-4の発現であることを特徴とする請求項 1 記載の肺組織の幹細胞を単離する方法。

**【請求項 7】**

肺組織が派生した細胞を成人肺幹細胞として同定する方法は、該方法が、

推定に基づく幹細胞の集団として初代培養中の肺細胞のより大きな集団内のゆっくり成長するクローン化可能細胞を同定認識すること、

推定に基づく幹細胞の集団中の幹細胞マーカーの発現の同定をすること

および、幹細胞の同定を確認して、細胞の集団が成熟した表現型に分化する能力を持つことを示すこと

30

**【請求項 8】**

前記幹細胞マーカーは遺伝子と関連付けされた幹細胞表現型の発現を表示することを特徴とする請求項 7 記載の同定方法。

**【請求項 9】**

前記遺伝子の発現はRT-PCTあるいは定量PCRのうちのどちらによってでも示されることを特徴とする請求項 8 記載の同定方法。

**【請求項 10】**

前記遺伝子と関連づけされた幹細胞表現型はOct-4 または Sca-1のための遺伝子のいずれかであるとされることを特徴とする請求項 7 記載の同定方法。

40

**【請求項 11】**

前記幹細胞マーカーは蛋白質と関連づけされた幹細胞表現型の発現を表わすことを特徴とする請求項 7 記載の同定方法。

**【請求項 12】**

前記蛋白質の発現は免疫蛍光によって示されることを特徴とする請求項 11 記載の同定方法。

**【請求項 13】**

前記蛋白質と関連づけされた幹細胞表現型はOct-4, SSEA-1, あるいはSca-1のいずれか

50

であることを特徴とする請求項 1 1 記載の同定方法。

【請求項 1 4】

前記肺組織および幹細胞はネズミ科の動物のものであり、また、発現した幹細胞マーカーはSSEA-1、Sca-1、Nanogの少なくとも1つであることを特徴とする請求項 7 記載の同定方法。

【請求項 1 5】

前記肺組織および幹細胞は人間ののものであり、発現した幹細胞マーカーはSSEA-3、SSEA-4、Sca-1、Nanogの少なくとも1つであることを特徴とする請求項 7 記載の同定方法。

【請求項 1 6】

肺幹細胞の同定法のキットの部品は、

ゆっくり単離する細胞同定のための第一識別子を含む部品と、

そして、マーカーOct-4の発現同定のための第二識別子と、

ゆっくり単離するOct-4細胞の同定をする第一識別子と第二識別子と、

インビトロでコロニーを成形することができ、かつ成熟した表現型へ分化可能な細胞と

10

からなることを特徴とする肺幹細胞に関するキット。

【請求項 1 7】

前記第一識別子はBrdUからなりまた、第二識別子は抗体とオリゴヌクレオチドからなるグループから選ばれることを特徴とする請求項 1 6 記載の肺幹細胞に関するキット。

【請求項 1 8】

前記細胞はネズミ科の動物のものであり、

また、キットは更に補足マーカー同定のための第三識別子と、

SSEA-1、SCA-1、Nanogからなるグループから選ばれた補足マーカーとからなることを特徴とする請求項 1 6 記載の肺幹細胞に関するキット。

20

【請求項 1 9】

前記細胞は人間ののものであり、また、キットは更に補足マーカーの同定法のための第三識別子、SSEA-3、SSEA-4、Sca-1、Nanogからなるグループから選ばれた補足マーカーであることを特徴とする請求項 1 6 記載の肺幹細胞に関するキット。

【請求項 2 0】

前記肺幹細胞に関するキットは、更に、成熟した表現型の同定のための第四識別子からなることを特徴とする請求項 1 6 記載の肺幹細胞に関するキット。

30

【請求項 2 1】

肺幹細胞の培養方法は、

肺組織から細胞サンプルを提供すること、

インビトロの培養媒体からなるシステムでの肺細胞の初代培養を育てること

初代培養から発現する細胞の成長速度の遅いクローンを採取すること

ゆっくり成長するクローンは肺幹細胞からなること

培養中の他の細胞から単離すること

採取されたコロニーからの細胞の更なるインビトロでの培養幹細胞集団の拡張をすることからなる。

40

【請求項 2 2】

前記肺幹細胞の培養方法は、さらに、肺幹細胞の中の質を高めるポストソート細胞集団を得るために細胞選別機で選別された幹細胞から成る成長した集団の少なくとも一部であり、細胞集団を成長させる肺肝細胞のポストソート集団を形成し、インビトロでさらに培養された細胞からなることを特徴とする請求項 2 1 記載の肺幹細胞の培養方法。

【請求項 2 3】

前記細胞選別は少なくとも1つの幹細胞特定マーカーの発現に基づいていることを特徴とする請求項 2 2 記載の肺幹細胞の培養方法。

【請求項 2 4】

前記細胞選別はOct-4の発現に基づいていることを特徴とする請求項 2 3 記載の肺幹細胞

50

胞の培養方法。

【請求項 2 5】

前記選別された幹細胞集団はあらかじめ選別された 1 つであり、選別は細胞の集団に対する連続操作であることを特徴とする請求項 2 2 記載の肺幹細胞の培養方法。

【請求項 2 6】

前記培養媒体は規定された媒体であることを特徴とする請求項 2 1 記載の肺幹細胞の培養方法。

【請求項 2 7】

前記規定媒体は発育因子、代謝ホルモンおよび細胞を供給できるアイアンソース (iron source・鉄源) のいずれかからなることを特徴とする請求項 2 6 記載の肺幹細胞の培養方法。

10

【請求項 2 8】

前記発育因子は表皮性発育因子であり、代謝ホルモンはインシュリンであり、また、供給されるアイアンソース (iron source・鉄源) はトランスフェリンであることを特徴とする請求項 2 6 記載の肺幹細胞の培養方法。

【請求項 2 9】

前記インビトロシステムは肺幹細胞の成長を促進するための処理された培養表面を含むことを特徴とする請求項 2 1 記載の肺幹細胞の培養方法。

【請求項 3 0】

前記処理された培養表面はコラーゲンでコーティングされていること、あるいは照射を受け培養された肺細胞のいずれかを含んでいることを特徴とする請求項 2 9 記載の肺幹細胞の培養方法。

20

【請求項 3 1】

前記インビトロシステムは共培養で照射を受け培養された肺間質細胞を含み、間質細胞の存在が幹細胞の未分化表現型の安定をもたらすことを特徴とする請求項 2 9 記載の肺幹細胞の培養方法。

【請求項 3 2】

肺幹細胞の感染を可能にする感染体の存在を同定する方法は、サンプル内の感染体で、サンプルと肺幹細胞集合が相互に接触すること

サンプルによって肺幹細胞集団の感染のレベルを検知すること

感染の検知されたレベルとスレシヨルド値の比較すること

細胞集団中の感染の成長を示すスレシヨルド値で示すこと

30

からなる。

【請求項 3 3】

前記感染体の存在の同定は、

さらにサンプル中の感染体レベルを数値で示すこと

レベルを数値で示すために、希釈サンプルを作り、サンプルを希釈し、培養中でサンプルと肺幹細胞集団が相互に接触すること

培養中で感染のレベルを検出すること

サンプル中の感染体のレベルを決定するために培養中での感染の相対的なレベルを判断すること

40

からなる。

【請求項 3 4】

前記感染体の存在の同定は、さらに病原体の種類を同定を含むことを特徴とする請求項 3 3 記載の肺幹細胞の感染を可能にする感染体の存在を同定する方法。

【請求項 3 5】

肺幹細胞に感染することができるウイルスの生成方法は、

インビトロのシステムで接種ウイルスと肺幹細胞集団の相互接触を含むこと、

システムは細胞培養媒体を含み、細胞培養媒体からウイルス粒子を最終の時間に集めることからなる。

50

- 【請求項 36】  
前記細胞培養媒体は規定された媒体であることを特徴とする請求項 35 記載のウイルスの生成方法。
- 【請求項 37】  
前記インビトロのシステムは、肺幹細胞の成長を促進するための培養表面の処理を含んでいることを特徴とする請求項 36 記載のウイルスの生成方法。
- 【請求項 38】  
前記ウイルスの接種物はHantaウイルス、インフルエンザウイルスあるいはSARS-CoVのいずれかであることを特徴とする請求項 36 記載のウイルスの生成方法。
- 【請求項 39】 10  
前記インフルエンザウイルスはH1N1、H1N2、H2N2あるいはH5N1のいずれかであることを特徴とする請求項 36 記載のウイルスの生成方法。
- 【請求項 40】  
前記インフルエンザウイルスは鳥インフルエンザウイルスであることを特徴とする請求項 36 記載のウイルスの生成方法。
- 【請求項 41】  
前記鳥インフルエンザウイルスはH5N1であることを特徴とする請求項 40 記載のウイルスの生成方法。
- 【請求項 42】 20  
抗感染体を同定する方法は  
病原体が感染体によって肺幹細胞の感染を妨げること  
インビトロシステムでウイルス接種物と肺幹細胞集団の相互に接触すること  
感染体によって肺幹細胞集団の感染レベルを検知すること  
感染の検知されたレベルと閾値を比較すること  
からなる。
- 【請求項 43】  
前記感染体はHantaウイルス、インフルエンザウイルスあるいはSARS-CoVのいずれかであることを特徴とする請求項 42 記載の抗感染体を同定する方法。
- 【請求項 44】 30  
前記インフルエンザウイルスはH1N1、H1N2、H2N2あるいはH5N1のいずれかであることを特徴とする請求項 43 記載の抗感染体を同定する方法。
- 【請求項 45】  
前記インフルエンザウイルスは鳥インフルエンザウイルスであることを特徴とする請求項 43 記載の抗感染体を同定する方法。
- 【請求項 46】  
前記鳥インフルエンザウイルスはH5N1であることを特徴とする請求項 45 記載の抗感染体を同定する方法。
- 【請求項 47】 40  
インビトロの肺幹細胞から分化されたインビトロ肺細胞を生成する方法は肺幹細胞をインビトロシステムで培養することからなり、幹細胞の未分化表現型の安定した状態でないシステムからなる。
- 【請求項 48】  
未分化状態のままインビトロで肺幹細胞を維持する方法は、照射された肺間質細胞の存在で肺幹細胞を培養することからなる。
- 【請求項 49】  
哺乳類組織からの幹細胞集団は、インビトロシステムで組織の初代培養から発現する集団であって、細胞のゆっくり成長するコロニーとして同定され、組織の他の細胞から単離したコロニー細胞であるとともに、Oct-4発現させる集団はインビトロで成熟した表現型に分化できることからなる。
- 【請求項 50】 50

前記哺乳類の組織は肺組織であることを特徴とする請求項 4 9 記載の幹細胞集団。

【請求項 5 1】

組織はネズミ科の肺組織であり、細胞集団は、SSEA-1, Sea- 11、Nanogの少なくとも1つを発現させることを特徴とする請求項 4 9 記載の幹細胞集団。

【請求項 5 2】

前記組織は人間のものであり、細胞集団は、SSEA-3, SSEA-4, Sea-1, Nanogの少なくとも1つを発現させることを特徴とする請求項 4 9 記載の幹細胞集団。

【請求項 5 3】

前記幹細胞の単離した集団がクローンの起源であることを特徴とする請求項 4 9 記載の幹細胞集団。

【請求項 5 4】

前記幹細胞の単離した集団はインビトロシステムで拡張し、細胞集団を成形することを特徴とする請求項 4 9 記載の幹細胞集団。

【請求項 5 5】

前記細胞集団は、幹細胞マーカーの発現細胞の有利な選択が可能で細胞選別法によって同一の肺幹細胞の質を高めることを特徴とする請求項 4 9 記載の幹細胞集団。

【請求項 5 6】

前記幹細胞マーカーはOct-4であるということを特徴とする請求項 5 5 記載の幹細胞集団。

【請求項 5 7】

前記幹細胞マーカーがSSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, Sea- 1, Nanogのいずれかであることを特徴とする請求項 5 6 記載の幹細胞集団。

【請求項 5 8】

前記初代培養および集団拡張は、特定媒体からなるインビトロシステムであることを特徴とする請求項 4 9 記載の幹細胞集団。

【請求項 5 9】

前記インビトロシステムの特定媒体は発育因子、代謝ホルモン、細胞を供給できる iron source (鉄源) のいずれかを含むことを特徴とする請求項 5 9 記載の幹細胞集団。

【請求項 6 0】

前記発育因子は表皮性発育因子であり、代謝ホルモンはインシュリンである、また、細胞を供給できる iron source (鉄源) はトランスフェリンであることを特徴とする請求項 5 9 記載の幹細胞集団。

【請求項 6 1】

前記インビトロシステムは、肺幹細胞の成長を促進するための処理された培養表面を含んでいることを特徴とする請求項 4 9 記載の幹細胞集団。

【請求項 6 2】

前記処理された培養表面は、コラーゲンの上塗りを含んでいることを特徴とする請求項 6 1 記載の幹細胞集団。

【請求項 6 3】

前記インビトロシステムは共培養で照射を受け培養された肺間質細胞を含み、間質細胞の存在が幹細胞の未分化表現型の安定をもたらすことを特徴とする請求項 4 9 記載の幹細胞集団。

【請求項 6 4】

肺組織のサンプルからの培養された幹細胞集団のコホートは、インビトロシステムで肺組織の初代培養から発現する複数個の集団、および、一つの創始細胞から個々に発生したゆっくり成長する同定可能なコロニーの細胞、他の肺細胞から単離されているコロニーの細胞、Oct-4を出現し、インビトロでの成熟した表現型に分化可能な集団、互い別々に維持されている個別のコロニーから発生する個々の集団、同一遺伝子型集団、創始細胞内に存在する初代培養と一致する表現型の変異レベルを有する集団、コホートのメンバーとされている個々のコロニーとからなる。

10

20

30

40

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本件の開示は、幹細胞の中でも特に成人肺幹細胞に関し、細胞の同定法、単理法、培養法を対象とした方法およびキット、および、該細胞のウイルス感染のモデル化とその治療法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

幹細胞は、発達の初期の段階（胚幹細胞）から成人期（成人体幹細胞）に至るまで多くの組織および臓器で見つかった。胚幹細胞は、非幹細胞とは別に単離され研究される一方、成人幹細胞は、ほとんどの場合、非幹細胞を含む大きな細胞集団の一部またはその中にあると同定されている。"成人体"あるいは"組織特異性"と呼ばれている幹細胞が、皮膚、骨髄、筋肉、脳または他の組織を含む様々な組織に存在すると報告されている。

10

## 【0003】

これらの細胞は、基本的に、初期の胚芽発生段階を超えて、生体のいかなる発展段階にも関わりがあり、例えば、それには新生児期の発展段階の生体から生じるものも含まれている。これらの組織特異性幹細胞は修復システムとして、老化する組織に正常細胞を連続的に補充する働きをする。

## 【0004】

幹細胞が新しい身体組織を作り出す能力は、例えば、パーキンソン病、糖尿病、癌およびアルツハイマー型認知症のような病気で損傷された身体組織を交換するための新しい細胞を生成する可能性を提示し、幹細胞に治療の可能性を提供している。

20

## 【0005】

再生療法のための肺組織の幹細胞の特性への関心は大きくなってきており、肺幹細胞の同定と増大させる試みがなされている。肺は、非常に複雑で、条件付き再生臓器は、少なくとも40の分化された細胞タイプ/系統から構成されており、隣接する軟骨性気管（気管と気管支）、末端の細気管支（細気管支、終末細気管支、呼吸気管支）およびガスを交換する肺胞に分けることができる。肺は、機能的に構造上独特な上皮で覆われており、おそらく、さまざまな特異なタイプの成人上皮幹/前駆細胞を含んでいる。

30

## 【0006】

上皮表面は常に開いていて損傷可能なので、幹/前駆細胞は、上皮修復の為に迅速な反応機構を装備した本来の保護皮膜としての機能を果たす。

損傷を受けた肺を修復し、組織が損傷した際に部分的に寄与することが想定される幹/前駆細胞には、粘液腺成長と気管の枝分かれした上皮再生の為に基底細胞（from PNAS：米国科学アカデミー紀要）と、細気管支のクララ細胞と、肺胞の第2型肺細胞が含まれる。

## 【0007】

ナタレンを備えた肺損傷モデルは、神経上皮細胞体あるいは細気管支肺胞の分岐管内にあるシトクロムP450マイナス(CyP450<sup>-</sup>)変異クララ細胞は、ナフタレンの毒性を回避し、次の気管支の再生に寄与することを示唆している。

40

さらに、肺気管から分離（単離）された非造血性の細胞集団は、(CyP450<sup>-</sup>)変異クララ細胞と同様の分子表現型を持つことを示唆している。

## 【0008】

近年、成人体の肺の気管支肺胞の分岐にある肺幹細胞は、クララ細胞と第2型肺細胞のそれぞれのマーカーであるクララ細胞分泌たんぱく質(CCSF)と、プロサーファクトンタンパクCたんぱく質を発現するCD34<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>PE-CAM<sup>-</sup>細胞であることが同定され、また、特徴づけられた。しかし、上記の肺幹および前駆細胞の発展的関連については明確にされる余地がある。

## 【0009】

50

肺組織は、多くの感染体の標的であり、コロナウイルス付き重症急性呼吸器症候群(SARS-CoV)のようないくつかの致命的疾病がある。2003年には、急性肺疾患損傷に起因する高い死亡率を伴う新型肺炎である重症急性呼吸器症候群(SARS)が複数の国に蔓延した。SARS(重症急性呼吸器症候群)の病原体は、VerOE6細胞の細胞変性に基づく新しい変性コロナウイルス(SARS-CoV)であることがその後確認された。多くの動物モデルが、SARS-CoV感染の病因の研究に使用されている。猿モデルは、SARSの臨床経過をある程度再現するが、ネズミモデルは、生体内で決定的な受容器官(レセプター)としてアンジオテンシン変換酵素2(ACE-2)を目的とした第1遺伝子学証拠を提供する。

#### 【0010】

猿の研究では、第1肺細胞およびこれより少ない範囲で第2肺細胞も、SARS-CoV感染の標的となる細胞であることが明らかになったが、SARS-CoVに感染したネズミの細気管支の上皮細胞の同定については明らかとなっていない。

#### 【0011】

SARS-CoVの患者は、初期に抗ウイルス療法の反応により発熱や肺炎をおこす。ウイルス価は通常、最初の感染10日後から急速に減少する。このウイルスの負荷の減少にもかかわらず、臨床的には患者の20%は3週間後までに高い死亡率を示す急性呼吸促進症候群(ARDS)を発生している。SARSに感染した肺組織は、浮腫、出血および細胞浸潤を含むびまん性肺胞障害(DAD)をおこす。ARDS治療は、炎症反応のコントロールが目的とされているが、損傷した肺の重症度と回復度は、上皮細胞の機能次第である。実際、目立った病理学的な発現は、びまん性上皮肺胞障害である。さらに肺胞上皮は肺胞の体液再吸収の場面でARDSに付随する肺繊維症の進展に重要な役割を果たす。

#### 【0012】

疾病へのかかりやすさおよび感染、疾病から回復させる作用、感染、あるいは肺の損傷における肺幹細胞の生物学に関するより良い理解は、肺の疾病を治療する薬および方法の開発において有用である。

#### 【発明の開示】

#### 【0013】

本発明の1番目の態様には、成人肺幹細胞を単離する方法が開示されている。肺に存在する成人幹細胞は、インビト(生体外または試験管内)では、ゆっくり分裂する細胞として存在し、個々のコロニーの形成とOct 4(Oct 4、たんぱく質、POUドメインファミリーの転写要因、幹細胞のマーカー)マーカーを発現する。幹細胞が分裂しているという事実は、ゆっくりであったとしても、細胞が急速に成長または分裂したとしても、分離(単離)して成長するコロニーを成形しない初代培養の中にある大部分の細胞とは識別されている。

#### 【0014】

これらの分離(単離)したコロニーは、通常、一連の分裂する単細胞から生じ、クローンの起源および娘細胞との関連で参照してみると、この単細胞は“クローン”と呼ばれる可能性があり、結果として一般的な単先駆(的)細胞から生じる。組織サンプルの初代培養から生じる細胞集団は、1つの個体から生じるため既に同一遺伝子型であると推定される可能性がある。試験管内(インビトロ)で成長または増殖するクローン細胞集団は、細胞タイプの表現型発現および分化状態に関し、通常、生物学上同一である。

#### 【0015】

肺幹細胞の単離の初期の段階は、顕微鏡でコロニーの発育を視覚的に確認ができ、次に、培養または解析のために初代培養から手動によるブラックングまたは採取により視覚的に確認ができる。そのような方法は、人間またはネズミ科からの細胞を含む哺乳類細胞の初代培養に応用できる。大きい集団から分化され採取された細胞は、さらに後述する判定基準により幹細胞であることが認定(同定)される。

#### 【0016】

成人幹細胞を確認(同定)する独特の方法は、成熟した肺細胞表現型の中で末端分化す

10

20

30

40

50

ることができることである。組織形態の幹細胞を単離する方法は、哺乳類の肺細胞に関する開示により実証されるが、他の組織の幹細胞についても同様に広範囲に応用できるのではないかと期待されている。

【0017】

本発明の第2の態様には、組織の幹細胞の同定する方法が開示されている。実施例の方法は、組織のOct-4発現細胞を同定し、同定されたOct-4発現細胞はコロニーをインビトロ（生体外）で成形することができ、同定されたOct-4発現細胞を初代培養の中で単離することにより成熟した表現型を分化することができる構成である。さらに、単離された成人組織細胞は、Oct-4の発現によって、又は、幹細胞の未分化表現型の遺伝子発現あるいはタンパク質の発現を示す幹細胞マーカーのような他の幹細胞マーカーとの結合によって同定される。

10

【0018】

遺伝子発現は、さらに詳細には、DNAが転写されmRNAが形成されるプロセスであり、RT-PCR（逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法）および定量PCR法のような方法により明らかになる。定量PCR法は、定量であるという単純な理由のため、ある目的では免疫蛍光方法より優れた利点がある方法であり、例えば、複数の型の細胞間の遺伝子発現の高分解比較にも許容される。

【0019】

例えば、そのような方法は、Oct-4、SSEA-1、Nanog、Sca-1のような遺伝子発現のマーカーを示している。たんぱく質の発現、さらに具体的には、免疫蛍光方法またはフローサイトメトリー分析手法（蛍光活性化細胞選別装置または“FACS”）で示すようなたんぱく質からのRNAの転写、そのような方法によるOct-4、SSEA-1、Nanog、Sca-1の発現が示されている。幹細胞表現型に関するマーカーは特定の種類である可能性がある。人間の肺幹細胞では、例えばSSEA-3、SSEA-4、Sca-1、Nanogが発現する。鼠の肺幹細胞では、例えばSSEA-1、Sca-1、Nanogが発現する。

20

【0020】

さらに、CXCR-4、CD54等のような幹細胞とは特に必ずしも関連を持たない他のマーカーは、前記幹細胞の特殊マーカーと関連して“FACS”の多重パラメーター分析中の成人幹細胞の同定に使用することができる。本発明の第3の態様として、肺幹細胞の同定用のキットが開示されている。

30

【0021】

キットは、成人肺幹細胞の同定および特性を調べるための器具と試薬とを包含し、試薬と器具を集合させたユニットを包含するこの方法の具体的実施形態である。肺幹細胞を同定するためのキットの実施形態は、ゆっくり分裂する細胞の同定のための第1識別子、Oct-4マーカー発現を同定する為の第2識別子とから構成され、第1識別子と第2識別子は、ゆっくり分裂するOct-4発現細胞の同定に使用されるもので、同定されたゆっくり分裂するOct-4発現細胞は、インビトロ（生体外）でコロニー（クローン）を形成し、かつ成熟した表現型を分化することができる。

【0022】

これらの各マーカーによる証拠の収集の重要性が、細胞が幹細胞であるということを認定することの正確性について、かつてないほどの信頼を作り出している。キットのいくつかの実施例として、ここで開示するように非幹細胞から幹細胞を識別するのに適切な識別子（例えばSSEA-1、Nanog、Sca-1のような他の幹細胞に特有のマーカー、あるいは、他の非特異性のマーカーとの結合するCXCR-4、CD54など）を含んでいる。

40

【0023】

本発明の第4の態様として、インビトロ（生体外）での成人肺幹細胞を培養する方法を開示する。この方法の実施例は、肺組織と、分化された肺細胞の大部分を包含する組織とを提供することからなり、さらに幹細胞の小さな集団も包含する。一般に、培養法は、関連ある幹細胞集団の単離し、反復して幹細胞を助ける為の細胞集団の質を高め又は浄化し

50

、非幹細胞の存在を減少または除去する方法を包含し、また得られた幹細胞集団をインビトロ（生体外）で増殖させる。

【0024】

肺幹細胞の培養法は、組織ソース（源）からそれらを単離することから始まるのが一般的であるが哺乳類組織ではこれに限られることなく、適切な培養地の中では単離された細胞が生まれる。単離により培養された細胞を用いることが含まれる方法の実施例では、幹細胞の特性に基づき積極的に細胞を選別する細胞分析手法により、例えばOct-4の発現で、幹細胞の中でも次第に質のよい細胞集団が得られている。

【0025】

培養の中または拡大された幹細胞集団の中で任意の時点で、ここに開示された方法で、未分化幹細胞としての確認または定量化のためにテストされる。この観点からの発明の実施例は、実験室規模の培養や、大量の細胞が研究のために求められる大規模な、基本的な細胞の生物学的な研究や、ウイルス感染のダイナミクスの研究、または抗感染症薬を含む研究の方向に向けられているであろう。

10

【0026】

本発明の5番目の態様として、肺幹細胞を感染させることのできる感染体（エージェント）を同定する方法を開示する。この方法の実施例は、上記の単離された肺幹細胞に感染体を接触させること；上記特定した肺幹細胞の感染体による感染の程度を検出すること；検出された感染の程度と、表示できるスレシールド値または感染細胞の診断法による所定のスレシールド値とを比較すること；から構成される。この点に関する本発明の実施例は、感染体を持つと思われるサンプルを感染体を同定するために使用したであろうが、そのコンテンツ（内容）は不明である。

20

【0027】

本発明の他の実施例では、定量法が使用され、感染体は既に知られているのものであろうが、レベルまたはタイター（力価）は不明であり、また、感染効率も不明である。これらの実施例では公知技術として知られているようにサンプルは、典型的に多レベルで希釈の対象となり、1つまたは複数の識別テストがコントロールのもとに行われ、統計分析される。

【0028】

本発明の6番目の態様には、感染体である特にウイルスの生産の方法が開示されている。方法の実施例は、ウイルス接種材を培養の中の肺幹細胞集団に相互に接触させ、ウイルス粒子を適宜の培養期間後に培養地から収集することからなる。

30

【0029】

特に、培養地の中でのウイルス接種材と単離した肺幹細胞集団の相互の接触は、無血清培養（確定媒体）の状態で行われる。細胞培養システムはさらに、幹細胞集団の成長または未分化状態の表現型の安定をサポートする処理された表面と共培養の存在を含むこともできる。

【0030】

ウイルス接種材は関連ある任意のウイルスであって、例えば、Hantaウイルス、SARS-CoV、他のインフルエンザウイルス（例えばインフルエンザA型、H1 N1、H1 N2、H2N2）、およびH5N1ウイルスのような鳥インフルエンザウイルスのようなものであってもよい。ここで、鳥インフルエンザの病原体種の亜型の合理的に現在のリストには、H1 N1およびH1 N2、H2N2、H3N2、H3N8、H5N1、H5N2、H5N3、H5N8、H5N9、H7N1、H7N2、H7N3、H7N4（H7N7）H9N2、H10N7が含まれている。；これらの病原体のすべて及び後に発見されるであろう同様のものは、本発明の方法の実施例に含まれるであろう。

40

【0031】

本発明のこの点に関する実施例は、研究規模の生産またはより工業規模の生産に向けられている。ワクチンの開発および生産や、抗感染体（抗感染症薬）の開発用ように、ウイルス製品は、研究のため、または遺伝子伝達手段のような治療目的のために使用されてもよい。

50

## 【0032】

本発明の7番目の態様には、感染体による肺幹細胞の感染または感染の進行を阻止する抗感染体（抗感染症薬）を識別する方法が開示されている。抗感染体（抗感染症薬）は感染の過程をあらゆる観点から阻止する合成物である。この方法の実施例は、抗感染体（抗感染症薬）の試薬と肺幹細胞集団とを相互に接触させること；肺幹細胞を感染体の試薬に接触させること；感染体により肺幹細胞の感染のレベルを検知すること；検知した感染のレベルと所定のスレシヨルドレベル、表示できる又は進展した感染細胞の診断法によるスレシヨルドレベルとを対比することからなる。

## 【0033】

細胞が感染体と抗感染体（抗感染症薬）に曝される順は、公知技術として知られているように、実施または操作の詳細によって変わるかもしれない。その例として、感染体としてはどのようなウイルスであってもよく、SARS-CoV、Hantaウイルス、またはインフルエンザA型のようなインフルエンザウイルス、およびH1N1、H1N2、H2N2またはH5N1ウイルスのような鳥インフルエンザウイルスであってもよい。抗感染体（抗感染症薬）としては、どのような化学分類のものであっても、またサイズが抗体のような小さな分子範囲から大きな分子範囲であってもよい。

10

## 【0034】

本発明のこの点に関する実施例は、比較的肯定的／否定的な同定法あるいは診断目的、またはあるいは抗感染性の効能のレベルが求められる場合にはより定量目的に向けられているであろう。実施例は、研究規模の実施または大規模であって、抗感染性治療の候補合成物を選別するような大規模に向けられるかもしれない。

20

## 【0035】

本発明の8番目の態様には、長期間インビトロ培養された肺幹細胞から単離した肺細胞を生成する方法が開示されている。成人肺幹細胞は、例4において実証するように、実験手法によって確立された肺胞2型と肺細胞1型に末端分化する能力を持っており、この能力があることが本件開示の方法によって分離（単離）された幹細胞の特質である。

## 【0036】

本方法の実施例は、肺胞2型および肺組織が生物学上の機能を実行するべき肺細胞1型の生成を含む。本発明のこの観点からの実施例は、機能的な肺細胞が求められる人工肺組織の開発または、抗感染性の治療の候補合成物を選別するための単純な代替療法に向けられるかもしれない。実施例は、研究規模の実施、あるいは治療目的に適切となるであろう大規模な実施に向けられるかもしれない。

30

## 【0037】

本発明の9番目の態様においては、成人肺幹細胞を未分化の状態で大規模インビトロ培養の中に維持する方法が開示されている。成人肺幹細胞は、未分化の状態の表現型を安定させる能力を持っている。この方法は、例えばウイルスの感染力のモデルとして使用したり、また、抗感染体（抗感染症薬）の効能を試験するためのモデルとして使用する場合の該細胞の生物学的研究に重要である。

## 【0038】

例10で提供されるように、照射された肺間質細胞がある状態での単離された成人肺幹細胞の培養は、幹細胞の未分化表現型を維持し、数週間以内にOct-4の発現を許容する。幹細胞に対する間質細胞は、平滑筋-actin（アクチン）、CD44、CD90を発現し、また部分的に含脂肪細胞になるように誘発され、これにより間葉細胞のいくつかの形式が現れる。安定した表現型を備えた幹細胞培養の長期的な強健さは、（1）基礎生物学の研究、（2）ウイルス感染過程のモデル化のためのツール、（2）抗感染体（抗感染症薬）の同定（識別）、選別、開発用のツールとして特に有用かもしれない。

40

## 【0039】

本発明の10番目の態様においては、肺組織から発生したインビトロ幹細胞集団が開示されている。この集団は、非常に低い発生率で肺組織に存在するが、優勢な非幹細胞肺細胞集団から単離することができ、インビトロ（生体外・試験管）システムで拡張している

50

。細胞集団は、人間とハツカネズミのような哺乳類ドナーからの肺細胞の初代培養から発現する、遅成長コロニーの形で同定（確認）可能である。本発明の実施例によって提供されるように、遅成長コロニーは視覚的に明白で、物理的に培養から引き抜かれるかもしれないし、細胞の集団が増えて数が拡大し、別の培養に転送されるかもしれない。そのような集団は、単に他のタイプの細胞を本質的に排除することによって物理的に捕獲するという非幹細胞肺細胞とは対照的に幹細胞の発生率において高度で豊かである。

【0040】

特に拡張の後の単離された集団は、細胞分類手続きを通じて幹細胞の区域の中でさらに浄化または豊かになるかもしれない。本発明の例示的な実施例で提供されたこれらの分類手続きは、幹細胞マーカーの細胞による発現に基づく積極的な選択を行なう。

10

【0041】

さらに本発明の10番目の態様で提供されたインビトロ培養システムは、少なくとも1つの発育因子を含む媒体で、少なくとも1つの代謝（同化）どうかホルモンであり、少なくとも1つの細胞利用可能なアイロンソース（iron source鉄源）である特定の哺乳類細胞培養媒体を含んでいる。発育因子は表皮増殖因子(EGF)であるか、あるいは、他の繊維芽細胞成長因子(FGF)のような発育因子または、他の適切な発育因子であるかもしれない。代謝（同化）ホルモンはインシュリンか、インシュリンの類似体（アナログ）か、あるいは他の適切な代謝ホルモンかもしれない。細胞利用可能なアイロンソース（鉄源）はトランスフェリン、あるいは細胞が培養中で利用することができる鉄塩の任意の組合せかもしれない。

20

【0042】

インビトロ培養システムの実施例は、初代培養の中で使用されてもよく、また、集団を拡張させる単離集団のさらなる（次代）培養の中で使用されてもよい。インビトロシステムの実施例は、さらに培養器の簡素なプラスチック表面の処理あるいは変更を含んでいる。その処理には、例えば、コラーゲンのコーティング、あるいは幹細胞集団の付属および成長をインビトロで促進する他の物質も含まれる。

【0043】

インビトロシステムは、他の特徴として集団の成長を促進するか、未分化状態で表現型の安定化を促進することも含まれる。例えばここに開示された共同培養中の照射された肺間質細胞は、未分化表現型を安定化させる。細胞集団は、Oct-4の発現や培養中で成熟した表現型を分化する能力のような幹細胞に特有の特徴を持っている。

30

【0044】

細胞集団はさらに未分化幹細胞の他のマーカーの発現であるSSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、Sca-1、Nanogを発現する。そのような肺幹細胞集団は、上述のように、研究ツールとして、特に、ウイルス感染と関係するモデルおよび診断ツールの開発のため、および抗感染薬（抗感染薬）の選別（スクリーニング）および特性付けのためにも有用である。さらに、開示された幹細胞集団は、肺傷および疾病の治療法の開発にも向けられる。

【0045】

肺幹細胞集団に関する発明の一つの観点には、幹細胞の単離法と同定法を、肺以外の器官または組織、たとえば心臓、腸あるいは腎臓に形成された幹細胞集団に適用することに関するものである。出願人は、従来は胚幹細胞のマーカーとして認識されていたOct-4が、実は他の臓器内の幹細胞に広く関連するマーカーその細胞はOct-4のマーカーに加えて、他のマーカーである特に組織あるいは臓器（マーカー）であることを創造的に発見した。

40

【0046】

肺細胞は他の組織にあり、特別なサイトあるいは少なくともいくらかの程度で分化し、幹細胞の効力だけで、肺幹細胞として、クローン化方法で増殖するかもしれないと出願人は予想する。そのような細胞は、Oct-4のような基本的幹細胞マーカー、あるいは、そのいくつかは組織に特殊であるかもしれないものを含む他のマーカーによって同定される。これらのマーカーは、表現型に関しては同種増殖のために、優性またはどちらかといえば有利な肺細胞内で、集団が質を高められるようにするための細胞選別手法で肺幹細胞の有

50

利性を選択し使用することができる手段になるであろう。

【0047】

さらに、肺細胞の集団の供給に関連ある態様を提供し、同様に同種の遺伝子型集団の一団である可能性がある。本件開示では、集団は初代培養から発現し、そして、集団は拡大して、研究、診断、スクリーニング、または治療目的として有用なクローンであって、それ自体はさらに、同一遺伝子型（特定の同じドナーからという理由）であり、また同種の表現型、反射組織あるいは分化状態同様の明確な特性をもつ組織の表現型をもつ。

【0048】

ドナーの組織またはバイオプシーは、クローン集団のような複合物を生成することができる。そのようなラインは、同胞種（姉妹細胞）あるいは集団集団であり遺伝子型同一と

10

考えられているかもしれないが、少なからず変化はあり、コロニー創始細胞自身によって違ってくる。

図面の簡単な説明

【0049】

特許出願のファイルは少なくとも1つのカラーで作成された図面からなる。カラーコピーの付いた特許または特許出願のコピーは、特許庁への請求および必要な料金の支払いによって提供されるだろう。

本件に開示した前述の特徴および目的は、以下の記述を添付の図面を参照にすることによりより明白になるだろう、参照数字は以下の通り構成要素を表わすものである。

【0050】

図1はホルマリン漬けにされたハツカネズミの新生児の肺組織のBrdU(bromodeoxyuridine)のための、注入5日経過直後の免疫組織化学染色を表しており；BrdUを保有する細胞は黒がかった灰色の染色によって表され；BrdUを保有しない細胞は灰色の染色によって表される。

20

【0051】

図2はホルマリン漬けにされたハツカネズミの新生児の肺組織のBrdUのための、BrdUにラベリングした4週間後の免疫組織化学染色の追跡を表しており；BrdUを保有する細胞は黒がかった灰色の染色と矢印によって表されており；BrdUを保有しない細胞は灰色の染色によって表されている。

【0052】

図3はBrdUにラベリングした4週間後のホルマリン漬けにされたハツカネズミの新生児の肺組織の免疫組織化学染色の追跡を表し、anti-pancytokeratin 抗体 (AE1/3)のある図2における5から10ミクロンの厚さの連続切片の断面で、気管支部分（黒がかった灰色の染色）を表示し；明るい灰色の染色は組織部分の全て細胞の核を表している。

30

【0053】

図4はOct-4に抵抗力を持つ抗体とホルマリン漬けにされたハツカネズミの新生児の肺組織の免疫組織化学染色を表しており；Oct-4の発現細胞は矢印によってとても黒い灰色の染色に表され；Oct-4の不発現細胞は灰色の染色によって表される。

【0054】

図5はホルマリン漬けにされたハツカネズミの新生児の肺組織の免疫組織化学染色の追跡を表し、抗パンサイトケラチン (anti-pancytokeratin) 抗体 (AE1/3)のある図4における5から10ミクロンの厚さの連続切片の断面で、気管支部分（黒がかった灰色の染色）を表示し；濃黒の灰色の染色は組織部分の全て細胞の核を表している。

40

【0055】

図6はホルマリン漬けにされたハツカネズミの新生児の肺組織のBrdUとOct-4のためのBrdUにラベリングした4週間後の免疫組織化学二重染色を表しており；パネルAはBrdUのための染色であってBrdUを保有する細胞は矢印によって灰色と明るい灰色の染色で表されており；パネルBはOct-4を発現する細胞を矢印によって灰色と明るい灰色の染色で表し；パネルCはパネルAとパネルBのイメージを合わせたものであり、染色は星印によって表されている。

50

図 7 はハツカネズミの新生児の肺組織からの初代培養の位相コントラストの写真によって示される。肺の上皮コロニーは矢印によって示される。

【 0 0 5 6 】

図 8 は肺組織から単離された肺細胞のフローサイトメトリック選別の結果を報告する図表であり；X軸は、細胞のサイズを示す相対数が示される；Y軸は、蛍光強度が示される。R1地域は2-bromoacetamidoethylスルフォンアミド、蛍光発生（fluorogenic）超生体の染色を備えた細胞の培養後の相対的な蛍光強度と同様に細胞のサイズを示す。R1地域は、高い蛍光強度および大きいサイズの細胞を備えた細胞のサブ集団を参照している。

【 0 0 5 7 】

図 9 は濃縮後のハツカネズミの新生児の肺組織から初代培養の位相コントラストの写真を表す；大きな肺の上皮コロニーは矢印によって表される。

10

図 1 0 は初代肺細胞培養の位相コントラストの写真を示す。

図 1 1 は図 1 0 のポリクローマル抗体anti-Oct-4の初代肺細胞培養の免疫組織化学染色を示す。Oct-4 発現細胞は灰色の染色として表される。パネル A は図 1 1 の白いボックスによって区画された領域の拡張されたイメージであり、細胞の細胞核の中にあるOct-4 発現の拡張イメージを示している。

【 0 0 5 8 】

図 1 2 は 図 1 0 の免疫染色パターンと同化した図 1 0 の免疫染色された初代肺細胞培養のDAPIを備えたカウンター染色を表す。細胞核は明るい灰色の染色として示される；Oct-4 発現細胞は濃い染色として示されている。

20

図 1 3 は初代肺細胞培養の位相コントラストの写真を示す。

図 1 4 は抗体anti-SSEA-1を備えた免疫組織化学染色を示す；SSEA-1発現細胞は灰色の染色として示される。

【 0 0 5 9 】

図 1 5 は図 1 4 の免疫染色パターンと同化した 図13の免疫染色された初代肺細胞培養のDAPIを備えたカウンター染色を表している。細胞核は明るい灰色の染色として示される。SSEA-1 発現細胞の細胞質は灰色の染色として示される。パネルAは図 1 5 の白いボックスによって区画された領域の拡張イメージであり、SSEA-1を示す拡張されたイメージは細胞の表面上と図 1 5 に示される肺のコロニー細胞の細胞質中に発見された。

30

【 0 0 6 0 】

図 1 6 は初代肺細胞培養の位相コントラストの写真を示す。

図 1 7 は抗体anti Sca-1を備えた抗体と免疫組織化学染色を示す。Sca-1 発現細胞は灰色の染色として示される。

図 1 8 は、図 1 7 の免疫染色パターンと同化した図 1 6 の免疫染色された初代肺細胞培養のDAPIを備えたカウンター染色が表されている。細胞核は明るい灰色の染色として示される。Sca-1 発現細胞の細胞質は灰色の染色として示される。パネルAは図 1 7 の白いボックスによって区画された領域の拡張イメージであり、Sca-1 を示す拡張されたイメージは細胞の表面上と図 1 7 に示される肺のコロニー細胞の細胞質中に発見された。

【 0 0 6 1 】

図 1 9 は（A）位相コントラストの写真と（B）サイトケラチン（cytokeratin）-7に対する特異抗体と共に扱われる初代肺培養のDAPIと合併したそれぞれの免疫染色が示されている。全ての細胞の核は明るい灰色の染色として示され；サイトケラチン（cytokeratin）-7陽性細胞は灰色の染色として示される。

40

【 0 0 6 2 】

図 2 0 は（A）位相コントラストの写真と（B）クララ細胞分泌タンパク質に対する特異抗体と共に扱われる初代肺培養のDAPIと同化したそれぞれの免疫染色が示されている。全ての細胞の核は明るい灰色の染色として示され；クララ細胞分泌タンパク質陽性細胞は灰色の染色として示される。

【 0 0 6 3 】

図 2 1 は（A）位相コントラストの写真と（B）それぞれの細胞質 P 4 5 0 酵素染色が

50

示されている。細胞内の細胞質 P 4 5 0 酵素の活性が灰色の染色によって示されている。

【 0 0 6 4 】

図 2 2 は肺の上皮コロニーの細胞の中にある Oct-4 の mRNA の書き換えのための RT-PCR 分析を表している。陰性調節 (negative control) のためにハツカネズミこう丸セルトリー細胞 (TM4) 上で実行された RT-PCR の結果がレーン 1 に示されている。肺の上皮コロニーから取り出された細胞上で実行された RT-PCR の結果がレーン 2 に示されている。陽性調節 (positive control) のためにハツカネズミの胚生殖細胞上で実行された RT-PCR の結果がレーン 3 に示されている。分子量のためのマーカーは M レーンに示されている。内部基準として使われるグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GADPH) の位置は星印によって示される。

10

【 0 0 6 5 】

図 2 3 は肺の上皮コロニーの細胞の中の Sca- 1 のための mRNA の書き換えのための RT-PCR 分析を示す。陰性調節 (negative control) のための VeroE 6 細胞上で実行された RT-PCR の結果がレーン 1 に示される。肺の上皮コロニーから取り出された細胞上で実行された RT-PCR の結果がレーン 2 に示される。陽性調節 (positive control) のための BW5147 細胞上で実行された RT-PCR の結果がレーン 3 に示される。分子量のためのマーカーは M レーンに示される。内部標準として使用される GADPH の位置は星印によって示される。

【 0 0 6 6 】

図 2 4 は二次培養 5 日後の細胞の位相コントラストの写真を示す。

図 2 5 はプロテイン C 抗体を備えた反界面活性剤と共に図 2 4 の初代肺細胞培養の DAPI カウンター染色と同化する免疫組織化学染色を示す。界面活性剤プロテイン C が発現する細胞は灰色の染色として示される。細胞の核はとても明るい染色として示される。

20

【 0 0 6 7 】

図 2 6 は二次培養 9 日後の細胞の位相コントラストの写真を示す。

図 2 7 は抗アクアポリン (anti-aquaporin) -5 抗体を備えた図 2 6 の初代肺細胞培養の DAPI カウンター染色と同化する免疫組織化学染色を示す。アクアポリン (aquaporin) -5 が発現する細胞は灰色の染色として示される。細胞の核はとても明るい染色として示される。

【 0 0 6 8 】

図 2 8 は 8 時間の間 SARS-CoV に汚染した肺の上皮細胞のための位相コントラストの写真である。肺の上皮コロニーは矢印によって示される。

30

図 2 9 は SARS-CoV のヌクレオキャプシドタンパク質に対する抗体を備えた図 2 8 の初代肺細胞培養の免疫組織化学染色を示す。陽性細胞は灰色の染色として示される。

【 0 0 6 9 】

図 3 0 は図 2 9 の免疫染色パターンと同化した図 2 9 の免疫染色された初代肺細胞培養の DAPI を備えたカウンター染色を示す。すべての細胞の核は明るい灰色の染色として示される。SARS-CoV ポジティブ細胞は灰色の染色として示される。パネル A は図 3 0 の白いボックスによって区画された領域の拡張イメージであり、拡張されたイメージは SARS-CoV が細胞の表面上と図 3 0 に示される肺のコロニー細胞の細胞質中に見つげられたことを示す。

40

【 0 0 7 0 】

図 3 1 は 2 4 時間の間 SARS-CoV に感染した肺の上皮細胞のための位相コントラストの写真である。肺の上皮コロニーは矢印によって示される。

図 3 2 は SARS-CoV のヌクレオキャプシドタンパク質に対する抗体を備えた図 3 1 の初代肺細胞培養の免疫組織化学染色を示す。陽性細胞は灰色の染色として示される。

【 0 0 7 1 】

図 3 3 は図 3 2 の免疫染色パターンと同化した図 3 2 の免疫染色された初代肺細胞培養の DAPI を備えたカウンター染色を示し、すべての細胞の核は明るい灰色の染色として示される。SARS-CoV ポジティブ細胞は中間の灰色の染色として示される。パネル A は図 3 3 の白いボックスによって区画された領域の拡張イメージであり、拡張されたイメージは SARS

50

-CoV が細胞の表面上と図 3 3 に示される肺のコロニー細胞の細胞質中に見つけられたことを示す。

【 0 0 7 2 】

図 3 4 は 8 時間の間インフルエンザ A 型 / WSN / 33 ウイルスに感染した肺の上皮細胞のための位相コントラストの写真である。肺の上皮コロニーは矢印によって示される。

図 3 5 は反 A 型インフルエンザウイルス特異抗体を備えた図 3 4 の初代肺細胞培養の免疫組織化学染色を示す。陽性細胞は中間の灰色の染色として示される。

【 0 0 7 3 】

図 3 6 は 図 3 5 の免疫染色パターンと同化した図 3 5 の免疫染色された初代肺細胞培養の DAPI を備えたカウンター染色を示す。細胞の核は青い染色として示される。A 型インフルエンザウイルス陽性細胞は中間の灰色の染色として示される。

10

図 3 7 は SARS-CoV の 1 6 時間のポスト感染の後の初代肺細胞培養の電子顕微鏡写真を示す。細胞質の中で膨れたゴルジ小胞は矢印によって示される。

【 0 0 7 4 】

図 3 8 は細胞の膨れたゴルジ小胞の中にある図 3 7 の高い倍率の電子顕微鏡写真を示し、細胞質は矢印によって示される。SARS Co-V はゴルジ小胞の内部の黒い粒子として示される。

図 3 9 は SARS Co-V の中にある図 3 7 のより高い倍率の電子顕微鏡写真は黒い粒子として示されている。上塗りを施した壁孔自身が經由して入る原形質膜に付着する突起性タンパク質を備えた SARS Co-V 粒子は矢印によって示される。

20

図 4 0 は肺の上皮コロニーが矢印によって示されている中の肺の上皮細胞のための位相コントラストの写真を示す。

【 0 0 7 5 】

図 4 1 は初代肺細胞培養の SARS-CoV のための推定上の受容体を特徴づける anti-ACE2 単一クローン特異抗体を備えた図 4 0 の初代肺細胞培養の免疫組織化学染色を示す。陽性細胞は染色となり暗い背景に対して白で示されている。

【 0 0 7 6 】

図 4 2 は図 4 1 の免疫染色パターンと同化した図 4 1 の免疫染色された初代肺細胞培養の DAPI を備えたカウンター染色を示す。すべての細胞の核は青い染色として示される。ACE-2 の陽性細胞は染色となり暗い背景に対して白と灰色で示される。パネル A は図 4 2 に白いボックスによって区画された領域の拡張されたイメージであり、拡張されたイメージは ACE-2 が細胞の表面上と図 4 2 に示される肺のコロニー細胞の細胞質中に見つけられたことを示す。

30

【 0 0 7 7 】

図 4 3 は肺の初代培養から生産された SARS-CoV 粒子の生物活性の報告を示す図表である。X 軸においては SARS-CoV 粒子が生産されるポスト感染時間が報告される。Y 軸においてはプラーク分析の結果がプラーク番号として表された SARS-CoV 粒子の滴定が報告される。

【 0 0 7 8 】

図 4 4 は肺の初代培養によって生産された SARS-CoV 粒子による感染後の VeroE 6 細胞の位相コントラストの写真を示す。細胞変性効果 (CPE) の情報を示す細胞は矢印によって示される。

40

図 4 5 は SARS-CoV のヌクレオキャプシドに対する抗体と共に使用された SARS-CoV のための免疫染色を示す。陽性細胞は明るい染色として示される。

【 0 0 7 9 】

図 4 6 は BrdU のラベル保持の同定とハツカネズミの肺の中の Oct-4 が発現する細胞を示す。A: 5 日間の注入直後、および BrdU ラベリングの 4 週間後のホルマリン漬けにされたハツカネズミの新生児の BrdU (bromodeoxyuridine) のための免疫組織化学染色。BrdU を保持する細胞はより暗い染色の固まりとして示される。BrdU を保持しない細胞は非常に暗い灰色の染色として示される。B: BrdU にラベリングした 4 週間後のホルマリン漬けにされた

50

ハツカネズミの新生児の肺組織の免疫組織化学染色で抗パンサイトケラチン (anti-pancytokeratin) 抗体 (AE1/3)のAにおける5から10ミクロンの厚さの連続切片の断面で、気管支部分 (中間灰色の染色) を表示し; 組織部分の全ての細胞の細胞核の中にあるより暗い灰色の染色。C: Oct-4に対する抗体を備えたホルマリン漬けにされたハツカネズミの新生児の免疫組織化学染色。Oct-4が発現する細胞は円形(ドット)の染色として矢印によって示される。Oct-4が発現しない細胞は青い染色として示される。D: BrdUにラベリングした4週間後のホルマリン漬けにされたハツカネズミの新生児の肺組織のBrdUとOct-4のための免疫組織化学二重染色。パネルBrdUはBrdUを保持する細胞が矢印によって中間の灰色の染色として示されておりBrdUのための染色を示している。パネルOct-4はOct-4が発現する細胞は矢印によって明るい染色として発現するOct-4のための染色を示す。パネルBrdU/Oct-4はパネルBrdUおよびOct-4のイメージを一緒にし、その中で染色は星印によって示される。

10

【0080】

図47は新しい培養システムによってインビトロで肺の上皮細胞を豊かにする方法のフローチャートを示す。

【0081】

図48は初代肺のクローン化可能肝細胞中の幹細胞マーカーのラベルを付ける免疫蛍光を示す。トップパネルは初代肺細胞培養の位相コントラストの写真を示す。A: ポリクローナル抗体anti-Oct-4を備えた初代肺細胞培養の免疫組織化学染色。Oct-4発現細胞は中間の灰色の輪郭および明るい灰色の中心染色として示される。細胞の核の中でOct-4の発現を拡張させたイメージ。B-D: anti-SSEA-1抗体、Sca-1およびNanogを備えた免疫組織化学染色。

20

【0082】

免疫染色するパターンと同化し免疫染色されたされた初代肺細胞培養のDAPIを備えたすべての対比染色はパネル一番下に示されている。細胞核は明るい灰色の染色として示される。幹細胞マーカーが発現する細胞は中間の灰色の染色として示される。

【0083】

図49は肺のクローン化可能肝細胞の特徴を示す。A: 初代細胞培養はサイトケラチン (cytokeratin) -7 (CK-7) に対する特異抗体を使用して検査された。B: 肺上皮コロニー内のSARS-CoVのための推定上の受容体の発現を調査するためにACE2特異抗体が適用されている。C: 細胞はCCSPの検査もされた。DとE: 他の2つの抗体はそれぞれペルオキシレドキシン (peroxiredoxin) -2(Prx-2) およびペルオキシレドキシン (peroxiredoxin) -6(Prx-6) に適用された。位相コントラストの写真およびDAPIと同化したそれぞれの免疫染色の両方が示されている。F: CyP450酵素活性が検査され示されている。

30

【0084】

図50はRT-PCRおよび定量的PCRによる肺の幹細胞中での幹細胞マーカーの発現を示す。A: 個々に引き抜かれた肺コロニーの細胞のためのRT-PCR分析。Sca-1については、以下の細胞が準備され分析された: レーン1、A549細胞ライン(陰性調節negative control); レーン2、肺上皮コロニーから引き抜かれた細胞; そしてレーン3、BW5147細胞(陽性調節positive control)。Oct-4については、レーン1はTM4細胞ライン(陰性調節negative control); レーン2は肺の上皮コロニーから採取された細胞、そしてレーンの3はハツカネズミR1の胚のライン(陽性調節positive control)。

40

【0085】

GAPDHは両方の反応のための内部標準として使用された。BそしてCは定量的RT-PCR実験の図的表示である。B: 2つのプライマー・セットはGAPDHおよびOct-4の量を同時に計るために個々のPCR反応で加えられた。2つの蛍光プロフィールはJ1を含む個々のサンプル、46c およびR1 ES細胞、肺コロニー細胞(コロニー)、ハツカネズミの胚の繊維芽細胞(MEF)および陰性調節(negative control) (H20)によって取得されるであろう。

【0086】

それぞれ、急激に上昇するカーブ(左)はGAPDHであり、そしてそれより緩いカーブ(右)はO

50

ct-4である。グラフ中太い破線の水平線はCt決定(測定?)用のスレシヨルド値を表わす。C: J1 ES細胞のためのOct-4の発現値、肺のコロニーおよびMEFはGAPDHに標準化され、棒グラフの中で示さる。D: J1、46cおよびR1の胚幹細胞に関しての肺コロニー細胞内でのOct-4発現のQ-PCR分析; 対照的に、ハツカネズミの胚の繊維芽細胞(MEF)は陰性調節(negative control)として使用された。結果は、標準偏差と3つの独立した実験の平均値を表わす。

【0087】

図51は肺の幹細胞コロニーの多分化能を示す。肺胞細胞マーカーの発現、界面活性剤タンパク質C(SPC, type-2 pneumocyteマーカー)およびアクアポリン(aquaporin)-5(Aqp-5, type-1 pneumocyteマーカー)はクローン・トランスファー後5日目、9日目あるいは11日目にそれぞれの細胞が検査された。肺上皮コロニーの細胞(Oct-4の+)は採取され、X線をあてた5日目の初期肺細胞培養の上、または馴化培地を備えるコラーゲン-1被覆板で二次培養される。

右側では、採取された細胞は、5日間放射線照射を受けた初代培養細胞および5日間観察された球状コロニーの上で再培養された。そのコロニーはOct-4ポジティブ(陽性Oct-4)で染色された。

【0088】

球状のコロニーはOct-4の発現を維持するが、11日目にはより低い発現値である。左側においては、採取した細胞が、コラーゲン-1被覆板に二次培養され、5日目においては細胞がSPCタンパク質で陽性に染色された。9日目においては、位相コントラストの写真は個々の細胞の形態が変更され細胞が平らになり、そして細胞がaquaporin-5タンパク質で陽性に染色される事を示す。

【0089】

図52はH5N1感染の初期標的として肺の幹細胞の同定を示す。融合性のある初期肺培養はP3設備内のH5N1に感染した、また2、2.5および3日間の事前感染(p.i.)では、培養は免疫染色のために行われた。肺の初代培養のための位相コントラストの写真はパネルA、DおよびGの中で示さる。コロニー内の感染細胞の免疫染色は、特にH5に対しての抗体を使用し、そしてDAPIで対比染色されたことを(緑で)示している。

【0090】

図53はA型インフルエンザウイルス感染の第一標的として肺の幹細胞の同定を示す。融合性初代肺培養はP4設備内のH1N1、H1N2およびH2N2に染され、また5日間の事前感染では、免疫染色のために培養が行われた。肺の初代培養のための位相コントラストの写真はパネルA、DおよびGの中で示さる。コロニー内の感染細胞の免疫染色はH1とH2に対してそれぞれの抗体を使用し、DAPI対比染色されたことを示している(赤)。

図54はH5N1感染細胞の電子顕微鏡写真を示す。2~3日の間、事前感染した感染細胞の電子顕微鏡写真は、ウイルス粒子の模写である。

【0091】

図55はA人間型インフルエンザA(緑、-2,6リンケージ)および鳥インフルエンザウイルス(赤、-2,3リンケージ)両方の肺幹細胞コロニー内での受容体の同定を示す。肺の初代培養位相コントラストの写真、およびA人間型インフルエンザ、NeuAc-2,6-Gal(白)、のための特定レクチンを備えた肺の幹細胞コロニーの受容体の染色、および鳥インフルエンザウイルス、NeuAc-2,3-Gal(白)、が示されている。

【0092】

図56は同じ細胞内のOct-4の核(中間の灰色の立体円)および細胞質SARS-CoVヌクレオキャプシドタンパク質(白いドーナツ形、核を囲んだ形態)の共同局在化を示す。融合性のある初代肺培養は0.5MOIでSARS-CoVに汚染させられ、また8時間の事前感染では、Oct-4およびSARSコロナウイルスの二重染色のために培養が行われた。コロニー内細胞の免疫染色(緑)はOct-4に対する抗体の使用を示しており、また、コロニー内の細胞の20-30%は、SARS-CoVのヌクレオキャプシドタンパク質に対する抗体の使用を暗い所に白く示している。Oct-4およびSARS-CoVの融合イメージ、およびDAPIで対比染色された物を示す。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 3 】

図 5 7 は肺幹細胞コロニーを囲むストロマ細胞の形質を示す。初代肺培養は抗平滑筋抗体およびCD44で染色された。さらに、培養は脂肪細胞分化のために引き起こされ、脂肪細胞のために染色された。

## 【 発明を実施するための最良の形態 】

## 【 0 0 9 4 】

## 成人肺幹細胞の同定法および単離法

第 1 の態様では、成人肺幹細胞の同定法と、インビトロ（生体外・試験管内）でその後培養するための単離法を提供する。“幹細胞”は、増殖力あるいは他の細胞タイプに分化する力をもつ初期の未分化細胞である。特にここに開示された幹細胞は、幹細胞の特性をもつ肺幹細胞の珍しい下位集団（部分母集団）であり、ネズミや人間のような哺乳動物の肺組織においても同一であることが確認されている。“組織”とは、細胞群であり、結合組織または上皮組織のような多細胞生物内の特定の機能を供給する 1 つまたはいくつかの細胞間物質（細胞）のことを言う。

10

## 【 0 0 9 5 】

同定された肺幹細胞は、ゆっくり循環する細胞で、胚幹細胞に関連のあるOct-4マーカーを発現する。“ゆっくり循環する細胞”または“ゆっくり分裂する細胞”とは、DNAの染料保持分析によれば、急速に分裂する細胞集団とは反対のものを言う。ゆっくり分裂する細胞は、培養された細胞からブラッキングまたは採取により得ることができ、可視のコロニー（クローン化可能細胞）として成長し、細胞集団の拡大の為、さまざまな方法で分析されるか、インビトロで二次培養される。この方法で初代培養により得られた細胞は、成長していく細胞タイプの中では、全体として初代培養中の細胞の最初の集団と比較して質の高いものとなる。あるがままの状態の肺幹細胞の同定法の適切な手順は例 1 に記載され、そのような細胞の単離、初代培養の開始に関する手順は例 2 に記載する。

20

## 【 0 0 9 6 】

## 幹細胞マーカーと特性

“マーカー”とは、生物学的物質の生物学的状態を示すたんぱく質、代謝物質、遺伝子、他の合成物あるいは生物学的現象（事態）を指し、“生物学的状態”とは、状況または生物学または生命プロセスに関連する状態のことを言い、“生物学的物質”とは、ウイルス、真核生物、原核生物の細胞や単細胞あるいは多細胞生物のように、適切な条件の下で、自己再生する事ができるいくつかの物質と、当業者により同定されるその他の物質を指す。

30

生物学的物質であるOct-4マーカーは、哺乳類の細胞であり、生物学的状態は、増殖または幹細胞の特性をもつ他の細胞タイプの分化する能力を保持できる第一未分化状態である。

## 【 0 0 9 7 】

マーカーとは、一般的にタンパク質でありDNA配列をもつ代謝物質あるいは生物学的現象であり、当業者によく知られているマーカー検出に特に適した識別子の使用を含む手段により検出可能である。“識別子”とは分子であり、例えば、代謝体、抗体のようなタンパク質、細胞内タンパク質であって、DNAまたはRNAオリゴヌクレオチドのようなヌクレオチドが存在し、実在するという事実を示し、またはマーカーを検知する。典型的な識別子は、第 1 と第 2 抗体と実施例に記載されているようなオリゴヌクレオチド、典型的な手法は、免疫染色法、免疫蛍光法、実施例に記載されているようなRT-PCR法である。“発現する”または“発現”とは、マーカーが細胞内で明らかにするプロセスを言い、例えば、マーカーが遺伝子コード情報から生じた場合、“発現”は、情報がマーカーに変換されたプロセスとマーカーがBrdU保持のような生物学現象が起こした時、生物学現象が開始されたプロセスを言う。

40

## 【 0 0 9 8 】

肺幹細胞はさらに、特有の細胞タイプ、細胞系統および/または細胞状態の生物学状況と関連のあるOct-4および/またはマーカーとは違った特殊マーカーにより肺細胞を発現さ

50

せることができる。“細胞タイプ”とは、形態的、機能的構造から他の細胞タイプとは異なるものを言う。“細胞系統”とは、先駆細胞(ancestral cell)と細胞タイプ生成の為に細胞分裂により生じた細胞を含む特定のタイプの起源(発端)を言う。“細胞状態”とは、一時の細胞の状態や様子を言う。マーカーの一般的な組み合わせは、人間とハツカネズミに関しての実施例に記載されている肺幹細胞により発現する。

#### 【0099】

肺幹細胞は、インビトロ(生体外・試験管内)で個々のコロニーを形成し、成熟した表現型で分化することができる。“コロニー”とは、細胞の集団で、単細胞の起源であり、従って、前細胞は“クローン”であり、実質的同一の遺伝子型をもち、そのようなコロニーは、一般的に創始細胞から外部へ接着しあって凝集した形態で成長していく。“細胞培養”とは、生きた組織から単離された細胞のインビトロ(in vitro = “試験管内”・生体外)での増殖または培養のことを言う。“分化”とは、はっきりと区別できる成熟した細胞として発育する細胞のプロセスであり、また、分化された細胞のタイプははっきりと区別できる特性と特殊機能を持つが一般的に均一でなく、分裂する可能性が低いことを言う。“表現型”とは、遺伝子型と環境間の相互作用がもたらす特殊な一連の環境要因によって全体の特性を示し、成熟した表現型は、生物が自然の成長あるいは開発により表現型を表示することを言う。肺組織からの細胞の典型的に成熟した表現型は、肺胞2型の表現型と肺細胞1型である。

10

#### 【0100】

ネズミの肺幹細胞では、肺組織の気管支肺胞の分岐にある散在性細胞としてインビトロで同定することができる。インビトロ培養では、ネズミ科の肺幹細胞は、個々のコロニーと、上皮とクララ細胞系とペルオキシレドキシニンII(ナチュラルキラー増強因子B)のマーカーと同様にOct-4を含む発現した肺細胞特異性抗原を形成する。初代培養中のネズミの肺から単離された肺細胞は、例3に例示された実験手法によって実証されたOct-4肺/前駆マーカー、SSEA-1、Nanog、Sca-1を発現する。ネズミ科の肺幹細胞は、さらにサイトケラチン7と上皮細胞のマーカーを発現し、上皮細胞の周囲の細胞内で検出することができない。さらに、ネズミ科の肺幹細胞は、クララ細胞分泌蛋白(CCSP)を発現し、シトクロムP450活性同様にペルオキシレドキシニンIIとVI(例3参照)を示す。

20

#### 【0101】

ネズミ科の肺幹細胞は、肺胞2型と肺細胞1型(例3:15, 16, 17, 18)のためのサーファクタント・タンパク質Cでもアクアポリン-5でもないマーカーサイトケラチン5/8, 18, 19のような、他の上皮肺マーカーを発現させない。ネズミ科の肺幹細胞は、例4に例示された実験手法によって実証された肺胞2型と肺細胞1型への末端分化に達する為の能力をもつ。

30

#### 【0102】

インビトロの初代培養の中で、人間の肺幹細胞は、例3に例示された1つに類似した手法に従い検知されたOct-4<sup>+</sup>、SSEA-3<sup>+</sup>、SSEA-4<sup>+</sup>、Sca-1<sup>+</sup>のような肺細胞の特異性抗原を発現させる。さらに、人間の肺幹細胞は、コロニーを成形し、例4に例示された1つに類似した手法により実証された成熟した表現型に分化する。例3に詳細に述べた実験手法の調整および/または変更には、ネズミ科細胞の代わりに人の細胞を使用して、および/または、当業者であれば本発明の開示から同定可能な実施例に示された方法以外のマーカーの検知を必要とするが、ここでは詳述をしない。

40

#### 【0103】

##### 成人幹細胞の同定

本方法の他の態様では、一般的に、肺細胞と非肺細胞からなる組織の成人幹細胞の同定法を開示する。“同定法”とは、存在、実在する事実を発見し決定する事、または示唆されたアイテムを検知することを言う。“非肺細胞”とは、細胞の圧倒的多数であり、いくつかのタイプといくつかの状態が存在し、幹細胞の特性を持っていないものを言う。成人幹細胞は、ここで実施例1として開示され例示された肺幹細胞の方法である組織の中から肺幹細胞を同定する方法により同定することができる。

50

## 【0104】

本方法の実施例には、ゆっくり分裂した組織の細胞の同定されたコロニー、肺細胞Oct-4マーカーの発現が開示されており、ゆっくり分裂するOct-4発現細胞はインビトロでコロニーを形成することができ、初代培養の単離でゆっくり分裂して同定され、成熟表現型で分化することができる。ゆっくり分裂する組織の細胞の同定は、ゆっくり分裂する細胞に関連があるマーカーの検知によって行うことができる。例えば、組織のゆっくり分裂する細胞の同定は、組織の細胞回転率の研究に基づいて、一定期間BrdU（肺組織の例1の手法を参照）のような保持剤で、細胞の検知によって行うことができる。ネズミ科の肺組織に注入後のBrdUの蓄積は、一定期間（約1週間から約5週間、一般には4週間（例1参照））モニターすることができる。他の組織は、数日間あるいは数週間となり、モニターに必要な時間は異なる可能性がある。

10

## 【0105】

本件開示内容のOct-4発現細胞の同定は、当業者に知られている方法であり、最良の識別子を使用し、細胞内でOct-4マーカーの発現の検知により行うことができる。抗体とオリゴヌクレオチドのような一般的識別子とは、RT-PCR法、定量的リアルタイムPCR法のような免疫蛍光法が一般的な方法であり例2と例3に示される。いくつかの態様では、ゆっくり分裂しOct-4マーカーが発現している同定された細胞は、ゆっくり分裂した細胞の同定、または、Oct-4発現あるいは他の胚幹細胞マーカーによりゆっくり分裂した細胞の同定により行われることが例1, 2, 3に例示されている。

## 【0106】

定量的PCR法は、量を計るため容易で、効果がある方法であり、例えば、様々な細胞相互間の遺伝子発現の高分解能比較を可能にする。免疫蛍光法のような方法は、マーカーの存在か不存在の検知や細胞の顕微鏡写真画像からの視覚情報の統合の研究方法として非常に有用であり、存在するマーカーを染色し、共同在化を示す複合マーカーを染色する特徴をもち、その伝達は非常に有用であるが、定量と定量的PCR伝達タイプの比較情報は提供しない。

20

## 【0107】

幹細胞を同定するためのキット

ゆっくり分裂する細胞の識別子と上記に記載されたマーカーの識別子は、本発明の実施例で提供されているように、特に肺組織からの幹細胞、組織内の幹細胞の同定のためのパーツのキット内で用いることができる。

30

## 【0108】

実施例の1つとしては、パーツのキットは、ゆっくり分裂する細胞の同定用第1識別子と、Oct-4マーカーの発現による同定用の第2識別子とからなり、本件開示の第1、第2識別子は肺細胞のいくつかの同定法に使われている。特に、第1、第2識別子は、組織の肺細胞の同定法に使用され、第1識別子は組織のゆっくり分裂する細胞の同定のために使われ、第2識別子は組織のOct-4マーカーの発現細胞の同定のために使われるので、インビトロ（生体外・試験管内）でコロニーを生成し、成熟した表現型内で分化できるOct-4マーカーを発現させてゆっくり分裂する組織の幹細胞となる。

## 【0109】

キットの実施例はさらに、ネズミ科肺幹細胞のSSEA-1、Nanog、Sca-1、人間の肺幹細胞中のSSEA-3、SSEA-4、Nanog、Sca-1のような組織幹細胞特殊マーカー同定のための第3の識別子を包含する。

40

## 【0110】

第1, 2, 3, 4の識別子は、本件開示の方法を実施するための適切な説明書と他の必要な試薬とともに、実施例のキット内で提供することができる。キットは、通常、別のコンテナに複合物の識別子を包含する。説明書とは、例えば、書面あるいはオーディオ指示、紙面あるいはテープやCD-ROMのような電子的サポートをいい、通常キット内に包含する。また、キットは、特定の方法と使用により、他のパッケージされた試薬、器具（洗浄バッファのような）を含む。

50

## 【0111】

成人組織のゆっくり分裂するOct-4マーカーの発現細胞の同定は、本件開示の実施例および/または本件開示内容により当業者が実施する同定法の結果、コロニーを形成し、成熟した表現型に分化する能力があるかテストすることができる。この点で、組織細胞は、培養された細胞のタイプに基づいて、本件開示内容をもとに当業者が実施する同定された組織細胞の培養のための適切な手法により、インビトロで培養される。識別子の同定の詳細に関して、さらなる成分が構成に包含され、一般的に製造され、キットはパッケージングされ、本件開示内容により当業者は同定法を実施することができる。さらに、本件開示の他の方法の少なくとも1つを行うためのパーツのキット、適切な識別子、そのような方法を行うための構成と試薬から成るキットは当業者に同定可能であるが、ここでは詳述しない。さらに上記方法のような成人幹細胞の同定方法は、当業者によれば異なる順番と追加手段によって実施可能であるが、ここでは詳述しない。

10

## 【0112】

## 幹細胞の培養

本発明のいくつかの実施例では、成人幹細胞、特に肺幹細胞は、本件開示のインビトロの成人幹細胞を培養するための方法により培養することができる。発明の実施例によって提供される肺細胞の源は、一般的には哺乳類であり、哺乳類の例として、人間と齧歯動物を含み、齧歯動物の例として実験用マウスを含む。方法は、組織細胞からなる組織を提供し、組織から組織細胞を培養することを包含する。“単離”とは、一般的に他の組織物質から組織細胞を分離（単離）する方法をいい、さらに具体的に言うと、幹細胞から単離するか、非幹細胞からそのように推定される幹細胞をいい、非幹細胞とは分化された細胞の様々なタイプを示す。組織細胞は、例2記載の組織細胞の遊離の適切な方法で組織を処理することによって単離することができる。

20

## 【0113】

遊離された組織細胞は、培養される細胞のタイプに基づいて決定されている各所要時間をかけて、適切な媒体中で培養され、好ましいコロニー細胞の数を形成することで発生する。“培養”とは、成長または発達のための最良の条件の下に細胞を置くことを言う。“媒体”とは、哺乳類の起源の細胞培養技術によって、研究所あるいは生産規模装置（つまりインビトロ）で細胞成長のための栄養を供給する物質を言う。媒体は、例えばスープ（培養液）のような液体、もしくは、寒天のような固体で、特殊な成分（アミノ酸、グルコース、ビタミン、塩および他のミネラル）からなる。本発明の実施例により提供されるこれらの方法は、哺乳類起源の細胞培養に広く適される。さらに具体的に言うと、そのような細胞は、例えば人間または齧歯動物の起源である可能性があり、典型的な齧歯動物は、実験用ネズミであり、ネズミ（から採取された）細胞は、ネズミ科動物と同じとすることができる。肺幹細胞については、培養期間が5から15日である。媒体は、組織の性質に基づいて選択することができ、細胞を培養でき、当業者の同定方法によって培養可能で、望ましくは、適切な媒体にて遠心分離、再懸濁するような、組織細胞の質を高めるための最適な方法を包含する。（例2参照）

30

## 【0114】

さらに、この方法の実施例は、フローサイトメトリ選別法（細胞選別法は、蛍光活性化細胞選別装置または“FACS”として知られている）のような細胞選別法に利用することを包含し、例2に記載されている方法により初代培養でコロニーが得られ、組織細胞が培養され、図8に示すように、肺組織、そこで肺組織以外の組織細胞はいくつかの調整あるいは一時的変異する本件開示内容により当業者によって同定される。“選別法”とは、異なる細胞を選別するまたは単離することであり、利用者（例えば、研究者）によって利用されるプロセスを言い、細胞選別法の自動化手段は、“バイオチップ”（バイオチップ中の電極上に特定の細胞タイプを集める抑制された電場の利用）、蛍光活性化細胞選別装置（FACS）、磁粉（例えば抗体に取り付けられた）などを包含する。得られたコロニーは、上述のように、成熟タイプで分化することができるOct-4発現マーカーを包含するコロニーとの同定をするための検査ができる。さらに、インビトロで成人幹細胞を培養する方法

40

50

の実施例は、本件開示の実施例記載の請求項の内容により当業者により想定可能であり、ここでは詳述しない。

【0115】

幹細胞のウイルス感染

本件開示による肺幹細胞の同定法は、多様な多数の感染体を対象としている。“感染体”とは、自己複製または自己繁殖する生物学的物質を言い、その感染体は一般的に宿主細胞の通常機能および/または生存を妨げる。感染体は、細菌、寄生植物、カビ、ウイルス、プリオンおよびピロイドを含む。ここで使用される“妨げる(interfere with)”とは、特にコントロールすること示し、影響を与える、あるいは影響を及ぼすといった一般的に逆(反対)の作用を言い、後述のように、活性剤、刺激、禁止、変更あるいは改変を含むものである。例えば、細胞の通常機能および/または生存を妨げるということは、細胞の通常機能および/または生存を特にコントロールすること示し、影響を与える、あるいは影響を及ぼすことを言い、また、細胞の通常機能および/または生存の活性剤、刺激、禁止、変更あるいは改変を含むことができる。

10

【0116】

本件開示の一般的な肺幹細胞は、例5に例示された実験手法によって実証されたSARS-CoV、例えばA型インフルエンザのようなインフルエンザのウイルスによって感染する。肺幹細胞は、例5において例示された1つの類似の手法によって実証できるように、H1N2とH3N2のような様々なタイプの鳥インフルエンザによっても感染する。本件開示の肺幹細胞は、例5に示されたようなSARS-CoVによって選択的に対象とされ、SARS-CoVは、肺コ

20

【0117】

感染体の生成

いくつかの実施例では、肺幹細胞は、ハンタウイルスのようなウイルス、H1N1、H1N2、H2N2、H5N1を含むインフルエンザウイルス、SARS、SARS-CoVのような鳥インフルエンザウイルスのような感染体の生成に使用することができる。特定の実施例の1つでは、肺幹細胞は汚染され、SARS-CoVは想定される幹細胞の選択的増殖感染を引き起こし、複製されて、例5および6に例示されている感染SARS-CoV粒子が解放排出される。従って、この方法は、培養中の単離された肺幹細胞とSARSウイルス粒子のような感染体に接触することを包含し、培養から生成されたSARSウイルス粒子を収集する。

30

【0118】

“接触する”“接触”とは、肺幹細胞を置くことを言い、感染体または生物因子は、感染体または生物因子相互間において、生物相互作用という相互空間的関係があり、肺幹細胞には適している。“生物因子”とは、たんぱく質、複合代謝物質、感染体のような生物学的物質を含む肺幹細胞の生物学的状態を妨げる(阻止する)ことのできるいくつかの物質のことを言い、“生物相互作用”とは、生物因子により、肺幹細胞の通常機能および/または生存を妨げるプロセスを言う。培養で単離された肺細胞とSARSウイルス粒子が接触することは、例5、6で例示されている、もしくは、本件開示内容により当業者により同定法する他の方法で、所定時間で、ウイルス粒子と初代融合培養の培養によって行われる。

40

【0119】

“収集する”“収集”とは、採取のような工程の拾い上げる事あるいは蓄積する事を言う。培養されたSARSウイルス粒子のような感染体の収集は、例5、6に例示されている感染の後、所定時間培養し、浮遊物を単離すること、あるいは、本件開示内容により当業者による他の同定法によって行われる。SARSウイルスのような感染体は、滴定および/または免疫蛍光法のような技術的に利用可能な方法によって浮遊物内で同定することができる。滴定は、ペロ細胞免疫蛍光法のような、細胞でプラーク測定法を行うことができ、蛍光剤に抱合されるウイルス粒子特有の抗体を使用して実施する。(例5、6参照)類似の手法としては、インフルエンザおよび鳥インフルエンザのような他のウイルスの生成のために実行することができる。

50

## 【0120】

ウイルス粒子(接種材料)の量は培養で養成され、培養期間、生成ウイルス粒子の収集の時間は、培養される細胞タイプに基づく使用者、生成するウイルス粒子のタイプ、培養の媒体使用、培養状態、生成するウイルス粒子の好ましい量および/またはインビトロで生成するウイルス粒子の他の要因によって決定され、当業者によって同定される。一般的な方法は、特に例5、6の実施例に記載されている。

## 【0121】

本件で開示した手法のさらに別の方法は、本件開示の特に実施例を精読した当業者によって想定可能であり、ここではさらに詳述はしない。さらに、別の実施例としては、SARSウイルス以外の、特に、インフルエンザ、鳥インフルエンザ、その他の感染しやすいウイルスのようなウイルスの感染体を生成することを目的とすることが可能であり、そこで、SARSウイルス以外の感染体の生成によって記載が必要な生成のいくつかの調整/一時的変異は、特に、本件開示内容内の実施例記載の請求項により当業者によって同定可能であり、ここでは詳述しない。

10

## 【0122】

感染を妨げる複合物の同定

いくつかの実施例では、肺幹細胞は、感染体、例えばSARS-CoVによって肺幹細胞の感染を妨げる複合物の同定に使用することができる。この目的を達成するために、1つ以上の候補となる伝染性妨害複合物は、感染体、例えばSARS-CoV粒子と結合した肺幹細胞を処理することができ、また、細胞を感染させる感染体としての能力の組み合わせにより候補複合物の処理の効果を決定する。“感染を妨げる”とは、特にコントロールすることを示し、影響を及ぼす、あるいは感染に影響を与え、感染に導くプロセスの活性剤、刺激、禁止、変更あるいは修正、一時的変異による調整含むことができる。“感染”とは、細胞内の感染体の成長のことを言う。

20

## 【0123】

感染体が単離された肺幹細胞を感染させる能力は、感染体と肺幹細胞との相互接触を検知することにより決定することができ、発現マーカーあるいは細胞特性は感染体による細胞の感染に関連がある。感染体がSARSであるいくつかの実施例では、SARSウイルス感染に関連する一般的なマーカーは、細胞内のウイルス粒子で満たされた液胞、ウイルスタンパク質の存在、あるいは、核酸は肺幹細胞内ウイルスの繁殖に関連がある。その他のマーカーは、本件開示内容により当業者によって同定することが可能である。

30

## 【0124】

従って、感染体がSARSウイルスである一般的な実施例では、この方法は、候補合成物と単離された肺幹細胞が接触すること、単離された肺幹細胞とSARSウイルスが接触すること、単離された肺幹細胞のSARSウイルス感染のレベルを検知すること、そして、スレシヨルド値は細胞内のSARS感染の成長を示し、あらかじめ定められたスレシヨルド値と検知した感染レベルを比較すること、から構成されている。

## 【0125】

候補複合物と単離された肺幹細胞の接触は、複合物と単離された肺幹細胞間の生物相互作用を有効にする技術的に知られている方法によって複合物の処理によって行うことができる。ここで引用される候補複合物は、自然な複合物あるいは合成的に派生した複合物であり、核酸、タンパク質、炭水化物、脂質および前述物質の派生物も包含する。従って、候補複合物は、生物学的性質、全体的あるいは部分的な規定されている情報伝達調整のような化学的性質を持つ。候補複合物は、当業者による同定法により得られる。例えば、候補複合物は、合理的な薬物設計により生成することができ、また、自然合成物質のライブラリー、または生物学的化学的または組み合わせライブラリーを含む自然複合物から選択可能である。一般的な候補複合物は、抗イディオタイプ抗体および/または触媒抗体、およびそれらの断片を含む。

40

## 【0126】

有効なやり方で細胞が候補複合物と接触するのに適した方法は、処理される候補複合物

50

の化学組成（例えばサイズであったり、分量など）や、接触する細胞タイプ、処理される複合物の状況下で決定する変数に基づいて当業者によって完成させることができる。単離された肺幹細胞とSARSウイルスとの接触は、本件開示または例示の方法のSARSウイルス粒子の培養によるか、および/または、本件開示内容により当業者によって同定を行うことができる。

【0127】

単離された肺幹細胞のSARS感染レベルの検知は、肺幹細胞のSARS感染に関連した1つ以上のマーカーの発現を質的および/または量的に確定することにより行うことができ、そのような質的および/または量的確定は、結果的には値として、特性を検知でき、あるいは特性の集約に基づく値によって決定され、一般的な値は、培養細胞の浮遊物内のウイルス粒子の集合、あるいは、細胞内で検出されたウイルス粒子を含む液胞の数となる。

10

【0128】

SARS感染のスレシヨルド値は、有効な重要な集団の中で、ウイルス感染の成長に関連しているマーカーの発現を所定の測定を行って、例えば、統計的に有効な実験方法によって判断し、値の程度は、感染の発生または感染の不発生に関連する。この判断を踏まえて、2つの値の程度を比較することによって、感染の成長を示す上のスレシヨルド値と、そのようなスレシヨルド値より下の値を感染の不発生を示すスレシヨルド値とを定めることができるであろう。

【0129】

上記の方法は、複合物の同定するための有効量であって、統計的に有効な数があれば繰り返しが可能である。複合物の“有効量”とは、達成に最低限で、より望ましくは、最適な達成であって、望ましい効果（すなわち感染体による肺幹細胞の感染の妨害）に必要な複合物の最小量をいう。既知法により使用される有効量は、特殊な状況に応じて引き起こされる不適切な実験をしなくても当業者によって、簡単に決定できる（感染体の集合やタイプ、数など）。

20

【0130】

さらに、上記方法は、本件開示内容により当業者によって想定可能であり、ここではさらに詳細しない。本実施例の感染体は、SARS以外の感染体であり、インフルエンザおよび鳥インフルエンザウイルスのような一般的ウイルスは、SARSに関する本件開示に類似した手法によって行うことができ、いくつかの調整および/または一時的変異はSARSウイルス以外の感染体のテストによって必要であり、本件開示内容の実施例記載の請求項により当業者は同定法できるので、ここではさらに詳細しない。

30

【0131】

さらに別の観点から、単離した肺幹細胞は、肺細胞を感染させることができる感染体を同定するために使用することができる。方法は、感染体と単離された肺幹細胞の接触を含み、感染体によって単離された肺幹細胞の感染のレベルを検知し、感染のレベルとあらかじめ定められた細胞の感染の成長のレベルを示すスレシヨルド値を比較することによる。

【0132】

1つまたは1以上のマーカーの発現の量的または質的分析によって決定される感染レベルとスレシヨルド値は、候補感染体による細胞の感染と関連がある。細胞の感染に関連するマーカーの発現の量的または質的分析を行うための典型的な手法は、本件開示のSARS、インフルエンザ、鳥インフルエンザおよび他の感染しやすいウイルスである。

40

【0133】

細胞と感染体の接触に適した手法は本件開示に例証されており、特に実施例の部でSARSとインフルエンザウイルスに関して記載されている。さらに、細胞と感染体の接触に適した他の手段は、例えば感染は処理できるという条件で、感染体の生物学と種類および接触された細胞の種類に基づく変更により、本件開示内容の特に実施例の部を精読した当業者によれば実現可能である。

【0134】

いくつかの実施例では、単離された肺幹細胞あるいはそれらの派生物（例えば分化され

50

た肺細胞)は、ARDSに関連した様々な条件の治療に使用することができる。特に、単離された肺幹細胞あるいはそれらの派生物は、ARDSあるいは損傷を受けた肺の組織の再生を含む他の肺疾病の治療法は同定に使用することができる。実施例の1つは、単離された肺幹細胞は、気管支鏡を使うか、または、ARDSあるいは他の肺疾病に関連した条件で特定の原因が明らかになった損傷を受けた組織の細胞を吸引する他の方法によって肺組織内に取り込むことができる。さらに別の方法では、肺幹細胞あるいはそれらの派生物は、引き渡される前は生物分解可能な付着物あるいはポリマーとして成長することができる。幹細胞あるいはそれらの派生物は、これら個々の処理を対象とした治療薬の効能のためにテストするために使用される人工肺組織として成長する。人工組織は、被害を被っている特定の病原菌株の同定に使用することができる。単離された肺幹細胞やその誘導物を肺組織の中へ引き渡す方法や、あるいはスキャフォールド(枠組・付属物)での単離肺幹細胞の成長については、本件開示内容を精読した当業者にれば同定認識可能であり、ここではさらには詳述しない。

10

#### 【実施例】

#### 【0135】

更なる詳細な発明の説明として、以下の実験的な発明の実施例が供給される。これらの例は、発明を実施するに当たって現実的に実施されている態様であり、実証が目的であって、本発明を制限するものではない。

#### 【0136】

例1：ハツカネズミ肺の中のBrdU保持OCT-4発現細胞の局在化。

20

a. ハツカネズミ肺内のBrdU保持細胞の局在化(図46)。

新生ICRハツカネズミは、リン酸エステル中12.5mg/mlの5-臭素の-2'-デオキシウリジン(BrdU)(シグマ) - 緩衝食塩水(PBS)を50mg/kg日に2回5日間、腹腔内に注射された。その後、ハツカネズミは付加的なBrdU注入なしで維持され、一日目0匹、注入の後、1、2、3、4週で犠牲となった。肺は摘出され、10%のホルマリン固定液に入れられ、パラフィンに埋め込まれた。その後、パラフィンに埋め込まれた切片は、免疫組織化学の対象にされた。

#### 【0137】

パラフィン包埋切片は脱ろうされ再水和された。BrdU染色は、(21)で説明されたように(DAB)で、1:100の反-BrdU単クローン性抗体(M 0744(Dakocytomation))および、ペルオキシダーゼ検出キット(ベクトルVIP基板キット、ベクトル)とジアミノベンゼンで、メーカーの使用説明に従った基質において実施された。結果は図1-3、また図46Aの中で示されている。

30

#### 【0138】

一日目で、活動的に分裂細胞は肺細胞を包含し、BrdU(図1および46A-0日目)の核染色を示した。標識付けした後、週2および週3で、BrdU陽性細胞の数は著しく減少した。標識付けした4週間後、まだBrdUを保持した細胞は上皮細胞中のほんの少数になった。(図2および46-4wで、BrdUを保持する細胞もまた茶色で示される)。気管支肺胞エリア中のBrdU保持細胞の局在化は、パン-サイトケラチン(図46B)(14)に対する単クローン性抗体で染色が実施されていることにより確認される。

40

#### 【0139】

b. ハツカネズミ肺(図3および図46)の中のOCT-4の発現細胞の局在化

BrdUと標識付けされた4週間後に肺のパラフィン包埋切片は取り除かれ(22)記述されるようにOCT-4発現の検出に関してテストされ、そこで、10のmMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 6.0)中で8min加熱することにより組織切片のための抗原回復が実施され、そして組織切片は、室温で更に15min培養される。組織切片はOCT-4(sc-9081(サンタクルーズ・バイオテクノロジー))に対する第一抗体と4°Cで夜通し培養され、続いてペルオキシダーゼ検出する。断片は染色されていない細胞核をマークするためにマイヤーのヘマトキシリンで対比染色される。

#### 【0140】

50

この一連の実験の結果は、図4、5および図46Cに示されている。BrdU保持細胞が特定される場所と同領域に位置する(図3、50B)少数の細胞は、抗パンサイトケラチン抗体(図5、46B)と同じ断片組織上で実行さる、免疫染色により確認された肺細胞領域内のOct-4陽性細胞の局在化でOct-4陽性細胞としても発見される

#### 【0141】

BrdUで標識付した4週間後に採取されたハツカネズミ肺の断片は、anti-BrdUおよびOct-4抗体を備えた二重染色法テストされた。組織断片は(0108~0112)で詳述したように扱われ、そこで以下の蛍光標識二次抗体が使用された: Cy3-labeled F(ab')<sub>2</sub> goat anti-rabbit IgG (H+L) and FITC-labeled F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson Immuno Research)

10

#### 【0142】

図6および図46Dの中で示される結果が、標識付けされた4週間後のハツカネズミ肺の中で、BrdU保持細胞(ライトグレーに染色された細胞、参照)とOct-4の発現細胞(ミディアムグレー染色された細胞、参照)の存在を確認している。更に、この一組の実験は、標識付けされた4週間後のハツカネズミ肺内にBrdU保持を備えたOct-4の表現の共同局在化もまた実証している。(図6および46Dでは、BrdU保持細胞とOct-4の発現細胞の合併されたイメージ表されており、星印によって示されている。)これらの結果は、肺組織中の肺胞嚢を補助する終末細気管支中のOct-4の発現上皮細胞の遅い循環の存在を示している。

#### 【0143】

更に、Oct-4+細胞およびBrdU LRCの数は確定された。分析は、気管支肺胞結合を含む、任意に選択された各肺切片中の細胞に  $2.1 \pm 8$  の2重 Oct-4の+BrdU保持細胞があることを明らかにした。二重染色法中で単一Oct-4細胞またはBrdU LRCは遭遇しない。組織学のグリッド分析によって評価されるように、新生児肺中のOct-4-表現幹細胞は、1台のスライド当たり  $\sim 1.25 \times 10^6$  の有核細胞があり、小さな集団( $\sim 0.0016 \pm 0.0006\%$ )の遅い循環の存在を示唆している。

20

#### 【0144】

例2: クローンOct-4表現幹細胞の絶縁および初代培養

例1に例証するような手段により特定された、稀なBrdU保持 Oct-4発現細胞をより良く特異化するため、これらの試験管内の肺細胞を培養する手段が開発された(図47)。

30

#### 【0145】

新生児のICRハツカネズミは殺され、また、それらの肺は取り除かれ小さく切り刻まれた。ペニシリン(100ユニット/ml)およびストレプトマイシン(100 ug/ml)を含んでいるハングの緩衝剤の中で洗った後に、組織は4の Joklik's MEM (シグマ)の中で0.1%のプロテアーゼ・タイプ-XIV(シグマ)と共に一晩中処理された。その後、組織は、肺細胞を放出させるために数回ピペットで移され、10%のFCS\_JoklikのMEMへ移動され、それから、100-umナイロン細胞ろ過器によってろ過された。放出された細胞はインシュリン・トランスフェリン・セレン補足物だけ(GIBCO)を含んでいるMCDB-201培地の中で洗浄され再保留された。

ハツカネズミの新生児の1つはこの酵素消化手順の中で楔形をしていない  $\sim 1.0 - 1.5 \times 10^6$  細胞を産出することができ、その細胞は肺組織の細胞の総数の-5%から8%に相当する。これらの細胞は、コラーゲンI(10 ug/cm<sup>2</sup>; BDバイオサイエンス)で上塗りされた培養皿の中で1ミリリッター当たり  $3 \times 10^5$  の細胞の密度で培養された。孵卵の1日後に、初代培養は付着した細胞を取り除くためMCDB-201培地で洗浄され、そしてインシュリン・トランスフェリン・セレン補足物および表皮増殖因子(1ナノグラム/ml; Invitrogen)が入った新しい培地を加えた。

40

#### 【0146】

この細胞培養ミディアムは無血清である; 血清は機能的に確定要素と入れ替えられ、合成培地と呼ばれる。特定細胞培養要素は、他の要素と同様に、成長因子、細胞内で得られる鉄、細胞分配可能型の、任意の一つまたは複数の代謝ホルモンを含むかもしれない。イ

50

ンシュリンは代謝ホルモンであり、そして、本発明の他の実施例では、類似体または変異体のインシュリン、または、これたのインシュリンに同様の効果がある他の代謝ホルモンと入れ替えられるだろう。上皮細胞増殖因子(EGF)、他の実施例では、表皮増殖因子として同様の効果がある繊維芽細胞成長因子(FGF)のような別の増殖因子で代用されるかもしれない。トランスフェリンは鉄の輸送系を表わし、他の実施例において、トランスフェリンと同様の効果のある別の鉄の輸送系に取って代わるかもしれない。

#### 【0147】

この温浸手段では、1つのハツカネズミの新生児の肺組織から、およそ $1.0 - 1.5 \times 10^6$ の細胞を産出できる。細胞は、12-well Petri (12 ウエルペトリ)タイプ1コラーゲン ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )でコーティングされたシャーレごとに  $3 \times 10^5 / \text{mL}$ の濃度で培養される。肺細胞は新生児ハツカネズミの肺組織から単離され、インシュリン、トランスフェリンおよび表皮増殖因子で補充されたMCDB-201ミディアムにおいて培養される。

10

#### 【0148】

7-10日間の培養の後、図7、47の中で示すように、ハツカネズミの新生児の肺組織の初代培養の位相差顕微鏡の写真が撮られた。位相差顕微鏡の写真は小さく、形態学的に認識しうるコロニーを示す。図47で示されるコロニー内の細胞は、高密度充填され、高反射性のリフレクティブ(reflectile)であり、そして相差顕微鏡観察法下により包囲紡錘体を形成する細胞から容易に識別可能である。

#### 【0149】

この例の(a)および(b)で詳述したように、肺組織から得られた肺細胞は、切片(a)およびこの例の(b)の中で報告されるような肺組織から得られた肺細胞は、 $2.5 \mu\text{M}$ の終末濃度の2-プロモアセトアミドエチル スルホンアミド(Dapoxyl)と同時にMCDB-201媒体中において  $1 \times 10^7 \text{ cells}/\text{mL}$ で培養される。 $37^\circ\text{C}$ で5mmに培養された後に、細胞は、5%のFCS(v/v)のMCDB-201中で遠心分離および再懸濁される。

20

#### 【0150】

蛍光活性された細胞分類は、励起のため、紫外線を発生するエンタープライズIIレーザーを用いて、FACSVantage SF機械(BDバイオサイエンス)で実施される。蛍光は505nmロングパス(LP)のフィルタを用いて集められる。標的細胞は、インシュリン、トランスフェリンおよび表皮増殖因子で充填されたMCDB-201ミディアム、1mLに選別される。細胞は、 $1 - 1.5 \times 10^5 / \text{mL}$ で培養され、また、培養の10~14日の後に多くのコロニーが発現した。これらのコロニーは、一つのコロニーにおいて、少なくとも50の細胞~何百もの細胞から成る。この結果は、濃縮の後に現われる多くの大きな肺上皮コロニーを示す図9において明らかにされている(図9の矢印を参照)。具体的には、10日間の培養の後、全細胞の8~10%から成る分類された細胞の初代培養は、大きさが、少数の細胞から数百もの細胞までである多数のコロニーを産出した(図9)。

30

#### 【0151】

我々の方法では、一匹の新生児の1つのハツカネズミは約  $1.0 - 1.5 \times 10^6$ の細胞を産出した。コロニーを数える基準として50の細胞を使用し、コロニーの数は統計的に分析された。 $3 \times 10^5$ ずつに細胞を選別したコロニーの数は、 $106 \pm 5$ であると推定された。従って、これらの肺組織から単離された全有核細胞のクローン化可能細胞の頻度は約0.002%であると推定された。

40

#### 【0152】

例3: 肺のクローン原性の幹細胞はOct-4、SSEA-1、NanogおよびSCA-1を発現する。初代培養中の肺のクローン原性のコロニーは、例2において詳述したように、胚と幹細胞抗原、Oct-4、SSEA-1、NanogおよびSca-1を使用した免疫蛍光法による肝/先駆マーカーのための分析をし、また、RT-PCRを使用した、Oct-4、Sca-1のmRNA。

#### 【0153】

##### a. 免疫蛍光法と酵素活性分析のための調査

肺のクローン化可能細胞はOct-4のため、室温で3分間メタノールアセトン(1:1)の中で、また、抗原決定のため、室温のパラホルムアルデヒド4%のPBS中で固着された。その後

50

、細胞はブロッキング溶液(PBSの中の3%のBSA)中の0.1%のトリトンX-100の中で透過され、3回洗われ、そして、ブロッキング溶液の中に1h置く。細胞は、一次抗体と4で一晚培養された。使用された一次抗体は以下である：アクアポリン-5(AB3069)；c-Kit(CBL1359)；サイトケラチン 5/8、7および18(MAB3228、3226および3234、それぞれ)；パン-サイトケラチン(AE1/3)；界面活性剤支持Cタンパク質(AB3786)；SSEA-1(MAB4301) (全てChemiconインターナショナルから)；サイトケラチン 19(IF15、発癌遺伝子研究製品)；AEC-2(MAB933)；Sca-1(AF1226)(両方、研究・開発システムから)、；CCSP(sc-9773(サンタクルーズ・バイオテクノロジー))、Nanog (Shinya山中からのギフト)およびOct-4。

#### 【0154】

以下の蛍光標識二次抗体が使用された(ジャクソンImmuno研究)：Cy3-labeled F(ab')<sub>2</sub> donkey anti-goat IgG (H+L)；F(ab')<sub>2</sub> goat anti-rabbit IgG (H+L)；F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG (H+L)；F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgM, ychain specific；F(ab')<sub>2</sub> goat anti-rat IgG (H+L)；and FITC-labeled F(ab')<sub>2</sub> donkey anti-goat IgG (H+L)；and F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG (H+L)

一次核は4、6-diamidino-2-フェニルインドール(DAPI)で対比染色された。初代培養も、AP検出キット(SCR004,Chemiconインターナショナル)を使用する標準の手続によって、アルカリ性フォスファターゼの酵素的活性のために分析された。

#### 【0155】

培養した直後はOct-4の発現はごく希れであって検知することができなかった。しかしながら、続く7～10日間の培養で、Oct-4、Nanog、SSEA-1、Sca-1の発現が包囲紡錘形細胞ではなく特に肺のコロニー細胞で検出されたことが、図10～12と図48AではOct-4について、図13～15と図48BではSSEAについて、図52DではNanogについて、図16～18と図48CでSca-1について示されている。具体的には、Oct-4およびNanogの発現は、これらの肺のコロニー細胞の核で検出された。

#### 【0156】

初期肺培養も、サイトケラチン-7およびクララ細胞分泌蛋白に対して特定の抗体を使用して検査された。パラホルムアルデヒドで固定した細胞は、PBSに3%のBSAを含んでいる、0.1%のトリトンX-100の中で浸透性になった。抗サイトケラチン-5/8、-7、-18、-19およびクララ細胞分泌蛋白抗体のための初代抗体は肺培養細胞を検出するために使用された。細胞DAPIで対比染色される。初代培養は、(16)詳述されるようなP450の酵素活性のために分析された。図19および図49A、(サイトケラチン-7)、20および49C(クララ細胞分泌蛋白)および49F(シトクロムp450酵素)の中でそれぞれ結果が示されている。結果は、サイトケラチン-7だけがコロニー細胞の中でのみ発現したが、しかしながら、他のサイトケラチン(例えばサイトケラチン5/8、18と19)は初代培養の中から検出されなかったことを示している。クララ細胞分泌蛋白およびシトクロムp450酵素活性もコロニー細胞で検出された。それらは、更にペルオキシレドキシニンIIおよびV1(図54DおよびE)、血漿中濃度(それはSARSウイルス(19)による反応について上方調整(upregulated)されることが示されている)を発現する。

#### 【0157】

合わせて考察すると、これらの発見物は、これらの肺のコロニー細胞が肝/前駆細胞の表現型特性を示し、さらに上皮およびクララ細胞のマーカーを生み出す。

#### 【0158】

##### b. RT-PCR(逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法)

初代培養中のクローン原性肺細胞のOct-4、NanogおよびSca-1 mRNAの存在は、方法論の項で詳述した培養から個々に引き抜かれたコロニーの細胞のRT-PCRと共に確認された。顕微鏡により、肺の上皮コロニーの境界を描写するために26-ゲージ針が使用され、また、コロニーは、精巧に延伸されたパスツールピペットを使用し培養から丁寧に引き抜かれた。3つのハツカネズミES細胞株、46c、R1およびJ1が、Oct-4発現の陽性対照のために使用され、またTM4細胞株(ハツカネズミ睾丸セルトリ細胞；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション)およびMEF(ハツカネズミの胎児線維芽細胞)が負の制御のために使用さ

10

20

30

40

50

れた。Sca-1については、BW5147細胞株(Tリンパ球細胞)が陽性対照のために使用され、またA549細胞系株(タイプ-2肺細胞)が負の調節のために使用された(共にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから)。Nanog分析については、MEFが負の調節のために使用され、また、ハツカネズミES細胞株J1は陽性対照のために使用された。

#### 【0159】

完全なRNAは、RNeasyマイクロ・キット(Qiagen、バレンシア、カリフォルニア)で準備され、また、逆転写はメーカーの指示によりthe Superscript first-strand synthesis system(インビトロジェン社)を使用することによりRandomプライマーで実行された。PCRについては、前と逆プライマーは以下のとおりだった:

Oct-4発現用(38)の

(i) 5'-ATGGCTGGACACCTGGCTTC-3'および5'-CCAGGTTCTCTTGCTACCTC-3'、Sca-1発現用(39)の(ii)5'-GGACACTTCTCACACTACAAAG-31  
 および5'-TAACACAGACTCCATCAGGGTAG-S'、そして両方の内部統制としてのGAPDHのための(38)(iii)5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'および5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。反応、Nanog RT-PCRのプライマーが山中伸弥によって記述されたように準備された。

#### 【0160】

図22、23、50Aに結果が示されている。Sca-1およびOct-4のためのバンドは、予期されたサイズ160 bpおよび1121 bpとそれぞれ一致していた。GADPH(グリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素)は両方の反応物の内部標準として使用された。

#### 【0161】

##### c. Oct-4発現の計量

Oct-4発現が成人細胞および組織内で報告されていなかったため、量的RT-PCRは発現レベルを評価するために実行された。単にそれが量的で、例えば、様々なタイプの細胞間の遺伝子発現のよく解決された比較を許すというだけの理由で、定量的PCR法は強力な方法である。Oct-4mRNAの存在は、Oct-4発現(図3A-C, and 50B-D)のレベルを評価するために培養培から採取されたコロニー細胞と共に実行される量的RT-PCRによって確認される。これら肺のコロニー細胞内でのOct-4発現は高く、それらES細胞系統46c、R1およびJ1内でそれぞれ発現された約51%、52%、また、88%である。(図3と50D)

#### 【0162】

この幹細胞集団のOct-4のハイ・レベルな重要性の1つの側面は、それが一般に胚幹細胞のマーカーと考えられているOct-4の発現の一般的考察の発展に寄与することであり、新生児又は成人完全に分化されたと考えられる組織の中で存在が発見されたとしても、より正確には、一般の幹細胞の特性と考えられることである。Oct-4は、例えば、ハツカネズミ心臓の細胞の中で実証された(Mendez-Ferrer, et al., "心臓中のES状の細胞", 幹細胞研究国際組合の抜粋、トロント・カナダ、2006年6月29日)。Oct-4の存在の重要性のこの広い視野の展開と、Oct-4のマーカーとしての存在と、また、同定また選択するツール(例えば細胞選別)として利用できることの特別なデモンストレーションであってより一層の重要性を持っている。ここに詳述された発明的な認識は、Oct-4による細胞の同定と選択が、特に他の多くの組織マーカーにより同定法および選択法で結合された時に、広く器官と組織から単離された単なる肺組織ではなく成人幹細胞集団へのアプローチを提供していることを知らせている。

#### 【0163】

例4: 表現しているOct-4の初代培養細胞は肺胞の肺細胞に分化することができる。

これらの肺のコロニー細胞の自己複製と分化電位に取り組むため、個々のコロニーは初代培養から採取され、あらかじめコラーゲンIでコーティングされた、あるいはX線にさらされた初代肺培養された細胞があらかじめ撒かれた培養皿に転送された。転送されたコロニーは、Oct-4、サーファクタント・タンパク質C、アクアポリン5たんぱく質の発現のためモニターされた。あらかじめX線にさらされた培養された肺細胞がある状態で、転送されたコロニーは好ましくは付随せず、5日目(図24, 25, そして51)までの大多数のコロニー細胞内で維持されたOct-4の発現が球状の集合として現われた; 11日

10

20

30

40

50

目までには、コロニー細胞は、小さくなったOct-4発現(図5 1)を示した。界面活性剤タンパク質C、もしくはアクアポリン5たんぱく質は、11日間の培養期間に転送されたコロニーで検知することができないかもしれない。対照的に、コラーゲンIでコーティングされたプレート転送される個々に採取されたコロニーはよく付随し、細胞は成長し続け、外に移動、そして希薄に広げられ平らになった細胞集団として現われた。Oct-4発現は、2日以内に急速に減少し、5日目には、サーファクタント・タンパク質Cは、特に平らになった細胞(図5 1)の核周囲領域の細胞質内で検知された。

#### 【0164】

これらの特徴は、タイプ-2肺細胞と一致している。9日目には、コロニーは、拡張し続け、希薄に広げる続けることで個々のコロニー細胞の平均直径が、親の初代上皮コロニー細胞より大きい~5-foldになった。サーファクタント・タンパク質Cの発現は減少し、しかし、アクアポリン5たんぱく質の発現、肺細胞1型のマーカーは、顕著になった(図5 1)。これらの観察は、肺の上皮コロニー細胞Oct-4<sup>+</sup> SSEA-1<sup>+</sup>, Nanog<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>は、連続して起こる方法の中で肺細胞タイプ-2と-1に区別する電位を持っている。これらの結果は、肺のコロニー内の細胞が、分化された肺胞の肺細胞の表現型特性への分化を行う容量を持っていることを示す。

10

#### 【0165】

例5: Oct-4発現細胞の初代細胞培養は、SARS-CoV感染の選択された目標である。

a. BrdU-維持Oct-4発現細胞の初代培養は、SARS-CoV感染の目標である。

初代肺細胞培養がSARS-CoV感染を受けやすいかどうか調査するために、我々は、SARS-CoV感染にこれら初代培養を露らした。SARS-CoV感染のためのすべての実験はP4設備で実行された。

20

#### 【0166】

7~10日経った上皮コロニーを備えた肺細胞の融合性のある初代培養は、室温で、8時間および24時間の間0.5(25)MOIでSCAR-CoV(Tw7素質)の接種物に育てられた。細胞は、PBSと補足物を含んでいるMCDB-201培地の中で一度洗浄された。8、16、24および48時間の事前感染では、細胞の上澄みが滴定のために集められた。その後、細胞は、PBS緩衝剤で3回洗浄され、免疫蛍光法分析の前にエタノール/アセトン(1:1)の中で処理された。SARS-CoV抗原はこの研究用のために組換えられたSARS-CoVヌクレオキャプシドタンパク質に対して生成されたハツカネズミの単クローン性抗体(1:2,000)の使用により検知された。この単クローン性抗体のエピトープは、ヌクレオキャプシド(M. D.K., 出版されていないデータ)のN末端領域に集まったと示されている。

30

#### 【0167】

結果は図28~30の中(8時間の孵卵)、図31~33の中(24時間の孵卵)で示される。8時間の孵卵では、肺コロニー内の細胞のおよそ30%が、SARS-CoV(図30)のために強い免疫蛍光を表示した。SARS-CoVの肯定的な肺のコロニー細胞のパーセンテージは、16時間目におよそ60%まで上昇して、24時間目には、肺コロニー内のほとんどすべての細胞は、SARS-CoV感染(図33)には陽性を示した。肺のコロニー細胞は、単離し始め、48時間目には細胞変性を示した。対照的に、肺コロニーを囲む細胞のどれもが、検査されたどの時点でも感染するようにはならなかった(図30、33)。

40

#### 【0168】

後に、電子顕微鏡法は肺コロニーの感染細胞の細胞質内のウイルスを積極的に模写する存在を確認するために実行された。超微細構造の分析については、肺細胞がタイプIコラーゲンでコーティングされたフィルム(Aclarフッ素共重合体フィルム、構造調査)を育てる包埋/細胞上で培養された。培養条件は、上部の例3に記述された。肺の上皮細胞は、0.5MOIでSARS-CoVに汚染された。

#### 【0169】

感染の16時間後に、肺の上皮単層培養の固定は、2時間の間2.0%のグルタルアルデヒドおよびPBSの中で4.0%のパラホルムアルデヒド中で最初に実行され、1時間の間1%の四酸化オスミウムに事前固定された。細胞は、格付けされたエタノール内で乾燥し、プロピレン

50

オキシド内で洗われ、プロピレン・オキシドとSpurrの樹脂の1:1混合内で浸透された(シグマ・オールドリッチ)。その後、細胞は、Spurrの樹脂に埋め込まれており、70℃で24時間重合された。セクションは水成酢酸ウラニルとシトラート鉛で切断、染色された。感染細胞の超薄切片は、伝達電子顕微鏡法(日立H-7000)によって観察された。結果は、図37～39の中で示されている。

【0170】

感染の後16時間では、感染細胞の細胞質は核領域(図37)のまわりに多数の膨れた空の嚢を含んでいた。より高い倍率では、ウイルス粒子で満たされた多くの拡張肥大した液胞が観察された(図38)。細胞の外部においては、成熟したウイルス粒子が観察され、また、これらの細胞外のウイルス粒子のうちいくつかは上塗りを施した膜孔(図39)(20)と提携するのが見られた。

10

【0171】

b. 初代細胞培養Oct-4を発現する細胞のウイルスの複製の証拠。

ウイルス・タイターはシリアル希釈液によって決定され、ブランク検定の単層手続きによって分析された、それはBurleson(26)から修正された。Vero-E6が6-well組織培養プレート上で合流に達した後、適切なウイルス希釈液0.5mlは、細胞上に準備され適用された。37℃で30分間の吸収に続いて、吸着されていないウイルスは、取り除かれ、DMEMを備えた寒天培養基1%と2%のFBSで上塗りされた。溶菌はんが成形する約4日まで、寒天重層は取り除かれ、また、細胞は、10分間クリスタル・バイオレット・ソリューション(10%)で染色された。最後に、溶菌はんはカウント可能であり、タイターは希釈折り目によって計算されることができ、また、サンプル・ボリュームが使用された。対生物作用分析については、融合性のあるVeroE6細胞培養が、室温で24時間2MOIの初代培養細胞の上澄みから集まったSARS-CoV粒子で混合された。ウイルス同定のための手続きは上述されている。

20

【0172】

SARS-CoVが肺のコロニー細胞内に伝染性のウイルス粒子を模写、生成しているかどうかを確認するために、培地は感染後の異なる時間帯で集められ、そしてVeroE6細胞を使用する伝染性のSARS-CoVのために分析された。結果は図43～45の中に示されている。

30

【0173】

図43の中で示されるように、感染した肺は、増大するSARS-CoV感染力を備えた培地を産出した：VeroE6感染の為の8、16、24および48時間の事前感染の後、これらの培地の滴定量は、それぞれ5、30、210および104×10<sup>4</sup>ブランク(plaques)であった。馴化培地で16～48時間感染させたVeroE6細胞は、細胞質の変性および培養皿(図44-45)のすべての細胞内でヌクレオキャプシドタンパク質の免疫染色を示している。これらの実験は、SARS-CoVが肺コロニーの中で複製活性を保持することを示している。

【0174】

c. OCT-4発現細胞の初代細胞培養はSARS-CoV感染の選択された目標である。

40

SARS-CoVの目標が肺幹細胞を分化したかどうか調査するために、次の実験は実行された。最初に、肺組織からの細胞分離直後に、肺の細胞懸濁液は、0.5から10までのMOIの範囲でSARS-CoVのinoculaで培養され、SARS-CoVヌクレオキャプシドたんぱく質の染色をする免疫蛍光法によって感染するようになるそれらの能力のために分析された。背景蛍光上に染色するヌクレオキャプシドは、観察されず、分化された肺細胞がSARS-CoVによって感染しなかった意味する。

【0175】

次に、タイプ1、タイプ2肺細胞(上記例4で議論され、図51で示されたように)へ生体外で分化を経験した肺幹細胞の培養は、同じ0.5～10MOIでSARS-CoVと培養された。生体外で分化され成熟した肺細胞は、同じ条件下での感染を受けにくいことが見つかった。

50

## 【 0 1 7 6 】

c. 主要な細胞培養BrdU保持・Oct-4発現細胞は、インフルエンザ感染の選択的な目標ではない。

肺のコロニー細胞を含んでいる培養は、この例の切片aに記述された同じ条件下での8時間で0.5のMOIでA型インフルエンザウイルスで汚染された。A型/WSN/33インフルエンザウイルスは、(27)に記述されたように(Chang-Gung大学のShieh-Shin-Ru博士からの寛大な贈り物)繁殖され維持された。A型インフルエンザウイルスの感染は、同じMOIでSARS-CoV感染と同様に実行された。細胞は、8、16および24時間の事前感染のために培養され、インフルエンザ検出キット(IMAGEN(登録商標))AおよびBインフルエンザウイルス、DakoCytomation)からのウイルスの核たんぱく質特異抗体を使用して、免疫蛍光法によって決定される感染を示す証拠のために検査された。

10

## 【 0 1 7 7 】

結果は、図34~36の中で示される。SARS-CoVとは対照的に、A型インフルエンザウイルスは、肺コロニー細胞(図34~36)に対する選択の自由のない細胞をすべて感染させ、また、細胞変性効果は、感染後に早く24時間で培養細胞中で観察された。全体として、これらの実験は、肺幹細胞がSARS-CoV感染に選択的に弱いことを実証した。

## 【 0 1 7 8 】

例6. Oct-4発現およびSARS-CoVヌクレオキャプシド感染の共同局在化

肺幹細胞がOct-4およびACE-2の両方を発現するので、Oct-4-発現細胞上のSARS-CoVの感染の直接のデモンストレーションが求められた。図56で示されたように、Oct-4-細胞の20~30%は、感染の後8時間にてSARS-CoVヌクレオキャプシドタンパク質のための細胞質の免疫染色を示した。

20

融合性のある初代肺培養は0.5MOIでSARS-CoVに汚染され、また8時間の事前感染では、培養がOct-4およびSARSコロナウイルスの二重染色のために行われた。コロニー内の細胞の免疫染色はOct-4および対しの抗体を使用して示され(緑)、そしてSARS-CoVのヌクレオキャプシドタンパク質に対しての抗体を使用して暗い背景に白い物として示されたコロニー内の細胞の20~30%として示される。Oct-4およびSARS-CoVの合わせたイメージ、またDAPIでカウンター染色された物を示す。これは同じ細胞内のOct-4核(緑)および細胞質SARS-CoVヌクレオキャプシドタンパク質(明るい灰色)の共同局在化を実証した。

## 【 0 1 7 9 】

要約として、これらの実験は、肺幹細胞はインビトロ(生体外・試験管内)でコロニーを、そしてOct-4、SSEA-1、およびSea 1抗原のような連続的発現幹細胞マーカー、を成形することができ、またクローン・トランスファーでタイプ1およびタイプ2肺細胞を成形するために分化することができる。さらに、肺幹細胞も、修復および再生にかかわり合った上皮とクララ細胞血統内で発現されることで知られるマーカーを発現する。新生児の肺気管支肺泡交点の遅く循環する肺幹細胞のまれな部分母集団の存在を実証する。

30

## 【 0 1 8 0 】

SARS-CoVへの接触は、幹細胞の選択的な増殖性感染、および複製そして伝染性のSARS-CoV粒子の放出を促す。対照的に、肺組織から準備された初期細胞懸濁液の中、あるいは、それらの初代コロニー細胞からインビトロ(生体外・試験管内)で分化した肺泡の肺細胞のいずれかは、SARS-CoV感染に抵抗力があった。

40

## 【 0 1 8 1 】

上記言及の幹細胞がペルオキシレドキシニンIIおよびVIを発現するという発見は、臨床として重要であるかもしれない。ペルオキシレドキシニンはともとは、ナチュラルキラー細胞活動を増強させる、酸化のストレスへの抵抗力を増加させる、転写活性化体タンパク質を規制する、およびHIVに対する抗ウイルス活性の提供を含む多数の機能を備えた細胞内のタンパク質であると確認された。SARSに感染した患者からの血しょうサンプルの最近のプロテオミクス分析は、ペルオキシレドキシニンIIの血しょうのレベルは、SARS(19)に感染した患者の中で著しく上がったことを実証した。

## 【 0 1 8 2 】

50

肺幹細胞がSARS-CoV感染の重要な目標かもしれないという概念を裏付ける。この肺の部分母集団の損失は、初期の傷からの回復する肺組織の能力を危うくするかもしれない、そして重要な罹患率および死亡率に関係しているSARS患者の中で臨床悪化の後期について説明することを支援するかもしれない。

【0183】

例7: 肺幹細胞は、他の多くのウイルス感染を優先的に受けやすい。

この例には、培養中の肺細胞内の肺幹細胞を選択育成法についてが記述されている。このインビトロ（生体外・試験管内）の方法は、呼吸器感染を治療する薬の選択に役立つ。これら肺のクローン化可能細胞は、優先的に、SARS-CoV、Hantavirus、いくつかのA型インフルエンザウイルス(H1N1、H1N2、H2N2)によって感染され(図64、67)、それは肺組織の悪化、およびいくつかの呼吸器のウイルス感染時の肺の修復に対する能力の明白な損失を説明している。この培養システムは、さらに呼吸器の感染のための薬品の選択に優れたモデル系であるといえる。

10

【0184】

H5N1感染細胞の電子顕微鏡写真は、図54に示され、受容器は、図55で確認された。レクチンSNAおよびMAL II、人インフルエンザに特効のA1 Neu5Ac-2,6-Gal(緑)、鳥インフルエンザウイルス、Neu5Ac-2,3-Gal(red)、を使用した肺幹細胞コロニー内の受容器の染色は図55に示される。

【0185】

例8: 上皮コロニー細胞の分化電位。

これらの肺のコロニー細胞の自己複製と分化電位に取り組むため、個々のコロニーは初代培養から採取れ、あらかじめコラーゲンIでコーティングされた、あるいは照射された初代肺培養された細胞があらかじめまかれた培養皿に転送された。転送されたコロニーは、Oct-4、サーファクタント・タンパク質C、アクアポリン5たんぱく質の発現のためモニターされた。あらかじめX線にさらされた養された肺細胞がある状態で、転送されたコロニーは好ましく付随せず、5日目(図4A)までの大多数のコロニー細胞内で維持されたOct-4の発現が球状の集合として現われた; 11日目までには、コロニー細胞は、小さくなったOct-4発現(図4B)を示した。界面活性剤タンパク質C、もしくはアクアポリン5たんぱく質は、11日間の培養期間に転送されたコロニーで検知することができないかもしれない。対照的に、コラーゲンIでコーティングされたプレート転送される個々に採取されたコロニーはよく付随し、細胞は成長し続け、外に移動、そして希薄に広げられ平らになった細胞集団として現われた。Oct-4発現は、2日以内に急速に減少し、5日目には、サーファクタント・タンパク質Cは、特に平らになった細胞(図4C)の核周囲領域の細胞質内で検知された。これらの特徴は、タイプII型肺細胞と一致している。9日目には、コロニーは、拡張し続け、希薄に広げる続けることで個々のコロニー細胞の平均直径が、母体となっている初代上皮コロニー細胞より大きい~5-foldになった。サーファクタント・タンパク質Cの発現は減少し、しかし、アクアポリン5たんぱく質の発現、肺細胞1型のマーカーは、顕著になった(図4D)。これらの観察は、肺上皮コロニー細胞Oct-4<sup>+</sup>、SSEA-1<sup>+</sup>、Sca-1<sup>+</sup>は、連続して起こる方法の中で肺細胞タイプII型とI型に区別する電位を持っている。インビトロで区別されたこれらの肺細胞タイプII型とI型が、SARS-CoV感染に弱いかどうか取り組むにあたって、個々の上皮コロニーは採取され、あらかじめコラーゲンIでコーティングされた培養皿に転送された。その後、培養はコロニー転送後5日および9日目に0.5と10のmoiでSARS-CoVに露出された。SARS-CoV感染、または免疫染色あるいはウイルス・タイタリングによって肺細胞タイプII型とI型に分化されたウイルス複製の証拠はない。

20

30

40

【0186】

例9: 周囲の支質を備えた肺幹細胞の相互作用を検討する方法。

肺細胞の初代細胞の培養中に0.004%の発生率に達する肺の幹/progenitor細胞の特性を備えた珍しいタイプの肺細胞は、幹細胞としてその表現型を維持するためにその共同培養された周囲の間充織(mesenchymal)の支質細胞と相互に作用することが最近同定された

50

。これらの細胞は、周囲のストロマ細胞との相互作用に関する研究、呼吸器感染を引き起こす可能性をもつ肺細胞を改造する過程と同様に、呼吸器感染を治療するための薬をデザインし選択するのにも役立つシステムを提供し、そのために、感染によって起こった損傷を修復する。

【0187】

定義された(血清無し)培養システムが、転写要因Oct-4には肯定的な、初代肺培養内で上皮コロニーの成長を支援する記述されている。上皮の類似コロニーは、培地内で表皮増殖因子(EGF)の低濃に10~14日間の培養した後に血清無しの状態で現われる。

【0188】

これらの形態学的に特異なコロニー細胞は、何か月もインビトロで培養され、周囲の支質細胞との相互作用を通して幹細胞の特性を維持する。他方では、周囲を囲む細胞から一度自由になると、それらは連続してより多くの成熟した肺細胞になるために分化を開始する。これらの細胞の形態(学)は、第二次培養の過程で変化し、また、それらは区別された上皮細胞の特徴を特性とするサーファクタント・タンパク質C、アクアポリンCを発現し始める。

10

【0189】

個々のコロニーから採取され、照射された支質細胞上に二次培養された細胞は、何週間もOct-4を発現し続ける(図51)。したがって、平滑筋 アクチン、CD44およびCD90(図57)を発現し、そして部分的に脂肪細胞になるように促される周囲の細胞は、間葉細胞のある形式として現われる(図51)。

20

【0190】

最後に、これら肺のコロニー細胞は、SARS-CoVだけでなくHantavirus、インフルエンザウイルス(例、H1N1、H2N2、H5N1)によっても感染可能であり、それにより、ウイルス感染に対するコロニー細胞の特別感染しやすさを示す。そのようなウイルス感染の結果は、肺組織の悪化、いくつかの呼吸器ウイルス感染後の肺の修復に対する能力の明白な損失を説明するかもしれない。これらのデータは、この培養システムが(1)ドラッグ・デザインおよび呼吸の感染のための選択、(2)周囲に支質を備えた肺細胞の相互作用の検討のために広く役立つツールであることを実証し、そのような相互作用は、肺改造の際に重要な役割を果たすだろう。

30

【0191】

支質細胞の存在による表現型の安定化は、生物研究ツール、感染そして抗感染剤の研究用のシステムとしてインビトロのシステムの強健さを増強する役目を果たしている。表現型の安定化は、培養のより大きな拡張を許し、より大きな集団、より多くの同型培養、より長い寿命を可能にしている。

【0192】

例10：新生児の肺の中でラベルを保持するBrdU細胞(LRC)はOct-4を発現する。

無血清培地培養内で成長するOct-4<sup>+</sup>の上皮コロニー細胞は新たに、または、新生児の肺の中にあるOct-4<sup>+</sup>の+細胞から発生するかどうか取り組むにあたって、パイロット免疫組織化学研究は実行され、新生児の気管支肺胞の交点の少数のOct-4-発現細胞の存在が観察された。新生児の肺内のOct-4-発現細胞の少数が、"推定上"肺幹細胞ありうるものかどうか、さらなる取り組みを確認するために、長期LRCにラベルを付けるための用品および方法に記述されるようにBrdU瞬間標識追跡実験が、実行された。毎日5日間のBrdU注入直後に、幾つかの肺胞細胞(図5A左)を含む多くの細胞は、の核染色を実証した。肺の中のBrdU陽性細胞の数は、時間と共に著しく減り、4週までに、ほんの少数の細胞だけがBrdUラベルをまだ保持していた(図5Aの右の矢印)。これらLRCは、panサイトケラチン(AE1\_3)に対する単一クローン性抗体で染色することにより明らかにされるように、肺胞嚢に隣接している終末細気管支の上皮層で唯一見つかった上皮細胞(図5B)のための一般的なマーカーである。その後、Oct-4のためのImmunohistochemical染色は実行され、また、Oct-4<sup>+</sup>細胞およびBrdU LRCの数を決定した。分析は、気管支肺胞の結合(図5D)を含んでいる任意に選択された個々の肺切片内に21±82重Oct-4<sup>+</sup>BrdU細胞を保持することを明らか

40

50

にした。単一Oct-4<sup>+</sup>細胞あるいはBrdU LRCは、遭遇しなかった。組織学のグリッド分析によって評価されるように、スライド当たり楔形をしていない $\sim 1.25 \times 10^6$ 細胞があり、新生児の肺の中の遅いサイクリングおよびOct-4-発現幹細胞の小さな個体群( $\sim 0.0016 \pm 0.0006\%$ )の存在を示唆している。

#### 【0193】

例11：ウイルス感染への肺幹細胞罹病性、間質細胞の相互作用が、幹細胞表現型の安定化をはかる際の役割を持っている。

この例は、培養中の肺細胞の中から肺幹細胞を選択し育成する方法について記述する。このインビトロの方法は、呼吸器感染を扱う薬の選択、および周囲の支質を備えたそのような細胞の相互作用を検討するのに役立つ、その相互作用は肺改造において関与する。

#### 【0194】

肺細胞の初代細胞の培養中に0.004%の発生率に達する肺の幹/progenitor細胞の特性を備えた特異なタイプの肺細胞は、幹細胞としてその表現型を維持するためにその共同培養された周囲の間充織(mesenchymal)の支質細胞と相互に作用することが最近同定された。これらの細胞は、周囲のストロマ細胞との相互作用に関する研究、呼吸器感染を引き起こす可能性をもつ肺細胞を改造する過程と同様に、呼吸器感染を治療するための薬をデザインし選択するのにも役立つシステムを提供し、そのために、感染によって起こった損傷を修復する。

#### 【0195】

定義された(血清無し)培養システムが、転写要因Oct-4には肯定的な、初代肺培養内で上皮コロニーの成長を支援する記述されている。上皮の類似コロニーは、培地内で表皮増殖因子(EGF)の低濃に10~14日間の培養した後に血清無しの状態で現われる。Oct-4 mRNAの存在は、Oct-4発現のレベルを評価するために培養培から採取されたコロニー細胞と共に実行される量的RT-PCRによって確認される。これら肺のコロニー細胞内でのOct-4発現は高く、それらES細胞系統46c、R1およびJ1内でそれぞれ発現された約51%、52%、88%である。Oct-4に加えて、これらの細胞は、さらにNanog、SSEA-1およびSca-1のような他の幹細胞マーカーを発現する、しかしc-キット、CD34又はp63は発現されない。

#### 【0196】

これらの形態学的に特異なコロニー細胞は、何か月もインビトロで培養され、周囲の支質細胞との相互作用を通して幹細胞の特性を維持する。他方では、周囲を囲む細胞から一度自由になると、それらは連続してより多くの成熟した肺細胞になるために分化を開始する。これらの細胞の形態(学)は、第二次培養の過程で変化し、また、それらは区別された上皮細胞の特徴を特性とするサーファクタント・タンパク質C、アクアポリンCを発現し始める。

#### 【0197】

個々のコロニーから採取され、X線にあてられた支質細胞上に二次培養された細胞は、何日もOct-4を発現し続ける。したがって、平滑筋 アクチン、CD44およびCD90を発現し、そして部分的に脂肪細胞になるように促される周囲の細胞は、間葉細胞のある形式として現われる。さらに、Oct-4<sup>+</sup>の存在、気管支肺胞の結合で細胞を保持する長期BrdUラベルは、生体内と生体外のOct-4<sup>+</sup>細胞の間のリンクを提供し、推定上の肺幹細胞としてそれらの同一性を強化する。したがって、これらの原始的な肺細胞は、遅い周期の集団、Oct-4<sup>+</sup>発現の細胞、気管支肺胞の結合の散乱を表示する。

#### 【0198】

最後に、これら肺のコロニー細胞は、SARS-CoVだけでなくHantavirus、インフルエンザウイルス(例、H1N1、H2N2、H5N1)によっても感染可能であり、それにより、ウイルス感染に対するコロニー細胞の特別感染しやすさを示す。そのようなウイルス感染の結果は、肺組織の悪化、いくつかの呼吸器ウイルスの感染後の肺の修復に対する能力の明白な損失を説明するかもしれない。これらのデータは、この培養システムが(1)薬物設計および呼吸の感染のための選択、(2)周囲に支質を備えた肺細胞の相互作用の検討のために広く役立つツールであることを実証し、そのような相互作用は、肺改造の際に重要な役割を果

10

20

30

40

50

たすだろう。

【0199】

間質細胞の存在による表現型の安定化は、生物研究ツール、感染そして抗感染剤の研究用のシステムとしてインビトロのシステムの強健さを増強する役目を果たしている。表現型の安定化は、培養のより大きな拡張を許し、より大きな集団、より多くの同型培養、より長い寿命を可能にしている。

【0200】

実施例に使用された方法の詳細

a. 肺初期細胞培養

新生児のICRハツカネズミは殺され、また、それらの肺は取り除かれ小さく切り刻まれた。ペニシリン(100ユニット/ml)およびストレプトマイシン(100 ug/ml)を含んでいるハツカの緩衝剤の中で洗った後に、組織は40のJoklik's MEM (シグマ)の中で0.1%のプロテアーゼ・タイプ-XIV(シグマ)と共に一晩中処理された。その後、組織は、肺細胞を放出させるために数回ピペットで移され、10%のFCS\_JoklikのMEMへ移動され、それから、100-<sub>m</sub>ナイロン細胞ろ過器によってろ過された。放出された細胞はインシュリン・トランスフェリン・セレン補足物だけ(GIBCO)を含んでいるMCDB-201培地の中で洗浄され再保留された。

ハツカネズミの新生児の1つはこの酵素消化手順の中で楔形をしていない $1.0 - 1.5 \times 10^6$ 細胞を産出することができ、その細胞は肺組織の細胞の総数の-5%から8%に相当する。これらの細胞は、コラーゲンI(10 ug/cm<sup>2</sup>; BDバイオサイエンス)で上塗りされた培養皿の中で1ミリリッター当たり $3 \times 10^5$ の細胞の密度で培養された。孵卵の1日後に、初代培養は付着した細胞を取り除くためMCDB-201培地で洗浄され、そしてインシュリン・トランスフェリン・セレン補足物および表皮増殖因子(1ナノグラム/ml; インビトロgen)が入った新しい培地を加えた。

【0201】

b. ウイルス感染および分析

SARS-CoV感染のためのすべての実験は予防医学研究所(台北、台湾)のP4設備で実行された。肺細胞の融合性のある初代培養は室温で1時間の間、様々なmoi(0.5、1、2および10)のSARS-CoV(Tw7素質)(34)で育てられた。細胞はPBSと補足物を含んでいるMCDB-201培地の中で一度洗浄された。8、16、24および48時間の間の事前感染では、培養の上澄みはウイルスの滴定のために収集され、また、細胞はPBSで洗浄され、免疫蛍光分析のためにエタノール/アセトン(1:1)の中で処理された。SARS-CoVはこの研究用の組換えSARS-CoVヌクレオキャプシドタンパク質に対して生成されたハツカネズミの単クローン性抗体(1:2,000)の使用により検知された。この単クローン性抗体のエピトープは、ヌクレオキャプシド(M. D.K., 出版されていないデータ)のN末端領域に集まった。ウイルス・タイター(ウイルス価)はVero E6細胞を使用して修正を加えたブラクを成形する分析によって決定された。簡潔に、収穫された上澄みの一連の希釈剤はVero E6細胞の融合性のある細胞へ加えられた。37°Cで30分間の孵卵の後、吸収されないウイルスは洗い流され、また、培養はDMEM内の1%の寒天培養基および2%のウシ胎児血清(FBS)に上塗りされた。ブラク成形の後、寒天培養基の上塗りを取り除かれ、細胞は10分間のクリスタル・バイオレット・ソリューション(10%)で染色された、そして、ブラクが数えられた。

【0202】

c. 電子顕微鏡法

伝達電子顕微鏡法は修正(35)と共に記載の通り実行された。肺の上皮細胞はコラーゲンIの上塗りを施したACLAR-フッ素共重合体フィルム(構造調査)上で培養された。細胞は記述通り0.5 moiでSARS-CoVに汚染された。16時間の事前感染では、細胞は2時間の間2%のグルタルアルデヒド/4%のパラホルムアルデヒド/PBSで処理され、1時間の間1%の四酸化オスミウムによってfollowedされ、次に、Spurrの樹脂に埋め込まれた。埋め込まれた細胞の超薄切片(60nm)は2%の酢酸ウラニルおよび1%のリード・シトラートで染色、準備され、H-7000電子顕微鏡(日立、東京)で分析される。また、結果は図37 ~ 39中に示

されている。

【0203】

感染の後16時間では、感染細胞の細胞質は核領域(図37)のまわりに多数の膨れた空の囊を含んでいた。より高い倍率では、ウイルス粒子で満たされた多くの拡張肥大した液胞が観察された(図38)。細胞の外部においては、成熟したウイルス粒子が観察され、また、これらの細胞外のウイルス粒子のうちのいくつかは上塗りを施した膜孔(図39)と提携するのが見られた。

【0204】

SARS-CoVが肺のコロニー細胞内に伝染性のウイルス粒子を模写、生成しているかどうかを確認するために、培地は感染後の異なる時間帯で集められ、そしてVeroE6細胞を使用する伝染性のSARS-CoVのために分析された。結果は図43~45の中に示されている。

10

【0205】

図43の中で示されたと共に、感染した肺は増加するSARS-CoV感染力を備えた培地を産出した。VeroE6感染の為の8、16、24および50時間の事前感染の後これらの培地の力価は、それぞれ5、30、210および $104 \times 10^4$ プラークであった。条件つきメディアに16~48時間感染させたVeroE6細胞は、細胞質の変更および培養皿(図44-45)の中のすべての細胞内で免疫染色するSARS-CoVヌクレオキャプシドタンパク質を実証した。これらの実験は肺のコロニー内でその再生活動を維持したSARS-CoVを実証した。

【0206】

20

d. 免疫細胞化学

初代培養中の細胞は、室温で3分間メタノール/acetone(1:1)の中で処理された。Sca-1発現の分析については、細胞が10分間4%のパラホルムアルデヒド/PBSの中で処理され、5分間PBSの中で0.1%のトリトンX-100と透過化(permeabilized)され、次に、30分間3%のBSA/PBSで粘着された。細胞は、次の抗原に対する初代抗体と共に4°Cで増殖された: ペルオキシレドキシニン2[J.H.Chen(国防医療センター)からの親切な贈り物]; ペルオキシレドキシニン6(ab16824; Abeam); CD34(クローンRAM34; BDバイオサイエンス); アクアポリン5(A B3069)、およびサイトケラチン-5<sub>8</sub>(MAB3228)、サイトケラチン-7(MAB3226)、およびサイトケラチン-18(MAB3234)、p63(MAB4135)、pan-サイトケラチン(クローンAE1\_3)、サーファクタントタンパク質C(AB3786)、およびSSEA-1(MAB4301)(すべてChemiconからの); 平滑筋アクチン(クローン1A4; DAKO); サイトケラチン19(IF15; 発癌遺伝子); c-キット(MAB1356)、およびSca-1(AF1229)(両方、研究・開発システムから); またACE-2(sc20998)、CCSP(sc9773)、およびOct-4(sc9081)(すべてサンタクルーズ・バイオテクノロジーからの)。一夜の培養後、細胞は、次のそれぞれのCy3-とラベル付けされた第2抗体と共に室温で1時間洗浄され、培養された: ロバ反ヤギ免疫グロブリンG、ヤギ反ウサギ免疫グロブリンG、ヤギ反ハツカネズミ免疫グロブリンG、ヤギ反ハツカネズミ免疫グロブリンM( $\mu$ -チェーンに特有)、およびヤギ反ネズミ免疫グロブリンG(ジャクソンImmunoResearch)。その後、細胞はDAPIでカウンター染色された。審判36に記述されるように、初代培養もAP検出キット(Chemicon)、およびCyP450を使用して、標準プロトコルによるアルカリ性フォスファターゼの酵素活性のために分析された。

30

40

【0207】

e. RT-PCRおよび量的RT-PCR

肺の上皮コロニー細胞は分析のために収集された。顕微鏡で、26-ゲージ針が肺の上皮コロニーの境界を描写するために使用され、また、コロニーは精巧に延伸された毛細管ピペットの使用により培養物から優しく採取された。3つのハツカネズミES細胞系統について、46c(37)、R1およびJ1は、Oct-4発現用の陽性調節およびTM4細胞系統(ハツカネズミの睾丸セルトリ細胞; 米国培養菌保存施設)およびMEF(ハツカネズミの胚の繊維芽細胞)は陰性調節に使用された。Sca-1については、BW5147細胞系統(Tリンパ球細胞)が陽性調節に使用され、およびA549細胞系統(タイプ-2 pneumocyte)は陰性調節(両方、米国培養菌保存施設から)に使用された。Nanog分析については、MEFが陰性調節に使用され、また、ハツカネ

50

ズミES細胞系統J1は陽性調節に使用された。

【0208】

完全なRNAは、RNeasyマイクロ・キット(Qiagen、バレンシア、カリフォルニア)で準備され、また、逆転写はメーカーの指示によりthe Superscript first-strand synthesis system(インビトロジェン社)を使用することによりRandomプライマーで実行された。PCRについては、前と逆プライマーは以下のとおりだった: Oct-4発現用(38)の(i) 5'-ATGGCTGGACACCTGGCTTC-3'および5'-CCAGGTTCTCTGTCTACCTC-3'、Sca-1発現用(39)の(ii)5'-GGACACTTCTCACACTACAAAAG-31

および5'-TAACACAGACTCCATCAGGGTAG-S'、そして両方の内部統制としてのGAPDHのための(38)(iii) 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'および5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3')。反応、Nanog RT-PCRのプライマーが山中伸弥によって記述されたように準備された

【0209】

定量PCR法は、様々なタイプの細胞の間での遺伝子発現の高解像度比較を可能にする方法である。定量RT-PCRは、メーカーの指示に従ってABIプリズム7000シーケンス検出システム(Applied Biosystems社)の使用により実行された。ハツカネズミOct-4(TaqMan遺伝子発現分析、ナンバー、Mm00658129\_gH; Applied Biosystems社)およびハツカネズミGAPDH(TaqMan遺伝子発現分析、ナンバー、Mm99999915\_g1)のプライマー調査セットが使用された。定量RTPCRは45のサイクルのために実行され、また、生のデータはABIプリズム7000 SDSソフトウェア(Applied Biosystems社)によって分析された。各サンプルのサイクルのしきい値(Ct)は、デフォルト・セッティングで生成された。各サンプルのOct-4発現レベルは、GAPDHの発現レベル内へ、次の定式に同じサンプリングによって換算された:  $Oct-4/GAPDH = 2^{-(Ct \text{ of } Oct-4 - Ct \text{ of } GAPDH)}$ 。J1細胞系統のOct-4/GAPDH比率は1.0にセットされ、また、すべての他のものの値はそれに応じて再計算された。結果は、標準偏差と共に、3つの個別実験の平均値を表わす。

【0210】

f. インビトロ(生体外・試験管内)の分化

分化電位を分析するために、細胞は、上に記述されたように個々のコロニーから採取され、そして周囲のストロマの細胞から離れる新しい培養皿、もしくは支持細胞層としてX線処理された初代培養細胞を備えた新しい培養皿のいずれかに移動される。支持細胞層のために使用された初代培養細胞は、合流の近くで成長し、そして137Cs出所(原子力、オタワ)の1,500radのX線処理であらかじめ処理された。この分析では、条件つきメディアが、両方の条件に適用された。条件つきメディアは、融合性のある肺の初代培養から収穫され、0.2-umフィルタでろ過された。

【0211】

g. BrdUにラベルを付けること、Oct-4発現およびImmunohistochemical分析。

新生児のICRハツカネズミは、5日間の間1日に2度i.p.をPBSで50mg/kgBrdU(シグマ)注入された。ハツカネズミはそれ以上のBrdU注入なしで保管され、BrdUにラベル付けのために0あるいは1、2、3、あるいは4週間の追求の後に殺された。肺は取り除かれ、10%のホルマリン固着剤で処理され、パラフィンに埋め込まれた。後、肺組織の5-um切片は、BrdUのために得られ汚された。Oct-4発現については、一般的な染色プロトコルが次の詳細を含んでいた: クエン酸ナトリウムバッファー(10 mM; pH 6.0)中で8分間の間熱することにより実行され、室温で15分間の間の孵卵が後続する。ハツカネズミ単クローンanti-BrdU(DAKO)およびウサギanti-Oct-4抗体(サンタ・クルーズ・バイオテクノロジー)がそれぞれ加えられた。その後、免疫組織化学の分析は、メーカーの指示による培養基としてdiaminobenzeneを使用することにより、ペルオキシダーゼ検出キット(ベクター研究所)で実行された。反全(Anti-pan)-サイトケラチン抗体(AE1\_3クローン; Chemicon)、および培養基としてのFast-Redを備えたアルカリ性フォスファターゼ検出キットは、bronchoalveolar結合の位置を描写するために使用された。すべての切片は、マイヤーのヘマトキシリンでカウンター染色された。

【0212】

10

20

30

40

50

anti-BrdUおよびOct-4主要抗体を備えた免疫蛍光法の二重染色法については、FITCを結合したヤギ反ハツカネズミおよびCy3を結合したヤギ反ウサギ抗体(ジャクソンImmunoResearch)が、それぞれ使用された。

【0213】

要約として、これらの実験(例6および7)が、新生児の肺の気管支肺胞交点の遅く循環する肺幹細胞のまれな部分母集団の存在を実証する。それらはインビトロでコロニーを、そしてOct-4、SSEA-1、およびSea 1抗原のような連続的発現幹細胞マーカー、を成形することができ、またクローン・トランスファーでタイプ1およびタイプ2肺細胞を成形するために分化することができる。さらに、幹細胞も、修復および再生にかかわり合った上皮とクララ細胞血統内で発現されることで知られるマーカーを発現する。

10

【0214】

SARS-CoVへの接触は、幹細胞の選択的な増殖性感染、および複製そして伝染性のSARS-CoV粒子のリリースを促す。対照的に、肺組織から準備された初期細胞懸濁液の中、あるいは、それらの初代コロニー細胞からインビトロで分化した肺胞の肺細胞のいずれかは、SARS-CoV感染に抵抗力があった。

【0215】

上記言及の幹細胞がペルオキシレドキシニンIIおよびVIを発現するという発見は、臨床として重要であるかもしれない。ペルオキシレドキシニンはともとは、ナチュラルキラー細胞活動を増強させる、酸化のストレスへの抵抗力を増加させる、転写活性化体タンパク質を規制する、およびHIVに対する抗ウイルス活性の提供を含む多数の機能を備えた細胞内のタンパク質であると確認された。SARSに感染した患者からの血しょうのサンプルの最近のプロテオミクス分析は、ペルオキシレドキシニンIIの血しょうのレベルは、SARS(19)に感染した患者の中で著しく上がったことを実証した。

20

【0216】

これらの発見物は、肺幹細胞がSARS-CoV感染の重要な目標かもしれないという概念を支援する。この肺の部分母集団の損失は、初期の傷からの回復する肺組織の能力を危うくするかもしれない、そして重要な罹患率および死亡率に関係しているSARS患者の中で臨床悪化の後期について説明することを支援するかもしれない。

【0217】

本発明の実施例とそれと等価なもの

30

請求項での要素は、"手段のための" "ステップのための" あるいは "ステップのために"の文言を明示的に含んでいる場合は35 U.S.C. §112パラグラフ6に該当することを意図されている。"のステップ" あるいは "のステップス"の文言は請求項あるいは前文の要素に含まれていたとしても35 U.S.C. §112パラグラフ6に該当することを意図していない。

【0218】

細胞集団、方法およびキットが、実用的かつ最良の実施例であるとの考えで、記述されてきており、実施例によって、本件の開示内容は限定されるものではないと理解される。本件開示は、請求範囲の範囲およびその精神の範囲内での種々の改変および類似の構造をカバーする意図であり、その範囲は、そのような修正および同様の構造をすべて包含するための最も広い解釈が与えられるべきである。

40

【0219】

本発明の理解を伝えるために記載中に使用された様々な用語は; これらの様々な用語の意味が、共通の言語または文法の変化あるいは形式まで及ぶことが理解されるであろう。さらに、用語が、例えば、設備、ハードウェア、又はソフトウェアを引き合いに出す時に商標、ブランド名、あるいは共通の名前が使用される時、これらの名前は同時代の例として提供されていることは理解されるだろう、そして発明はそのような文字の範囲によって制限されるものではない。同時代の用語の派生または同時代の用語によって包含されたものの部分集合を指定として合理的に理解されるかもしれない後の日付に導入される用語は、今の同時代の用語によって記述されることとして理解されるだろう。さらに、発明は、例

50

証の目的のために述べられた実施例に対して制限されていないことは理解されるべきである、しかし特許の出願に追加される請求項の明瞭な読解によって唯一定義されることになっている、個々の要素が与えられる同等の十分な範囲を含むものである。

【図面の簡単な説明】

【0220】

【図1】ホルマリン漬けにされたハツカネズミの新生児の肺組織のBrdU(bromodeoxyuridine)のための、注入5日経過直後の免疫組織化学染色を表す

【図2】ホルマリン漬けにされたハツカネズミの新生児の肺組織のBrdUのための、BrdUにラベリングした4週間後の免疫組織化学染色の追跡を表す

【図3】BrdUにラベリングした4週間後のホルマリン漬けにされたハツカネズミの新生児の肺組織の免疫組織化学染色の追跡を表す

【図4】Oct-4に抵抗力を持つ抗体とホルマリン漬けにされたハツカネズミの新生児の肺組織の免疫組織化学染色を表す

【図5】ホルマリン漬けにされたハツカネズミの新生児の肺組織の免疫組織化学染色の追跡を表す

【図6】ホルマリン漬けにされたハツカネズミの新生児の肺組織のBrdUとOct-4のためのBrdUにラベリングした4週間後の免疫組織化学二重染色を表す

【図7】ハツカネズミの新生児の肺組織からの初代培養の位相コントラストの写真を表す

【図8】肺組織から単離された肺細胞のフローサイトメトリック選別の結果を報告する図表

【図9】濃縮後のハツカネズミの新生児の肺組織から初代培養の位相コントラストの写真を表す

【図10】初代肺細胞培養の位相コントラストの写真を示す

【図11】図10のポリクローナル抗体anti-Oct-4の初代肺細胞培養の免疫組織化学染色を示す

【図12】図10の免疫染色パターンと同化した図10の免疫染色された初代肺細胞培養のDAPIを備えたカウンター染色を表す

【図13】初代肺細胞培養の位相コントラストの写真を示す

【図14】抗体anti-SSEA-1を備えた免疫組織化学染色を示す

【図15】図14の免疫染色パターンと同化した図13の免疫染色された初代肺細胞培養のDAPIを備えたカウンター染色を表す

【図16】初代肺細胞培養の位相コントラストの写真を示す

【図17】抗体anti Sca-1を備えた抗体と免疫組織化学染色を示す

【図18】図17の免疫染色パターンと同化した図16の免疫染色された初代肺細胞培養のDAPIを備えたカウンター染色を表す

【図19】(A)位相コントラストの写真と(B)サイトケラチン(cytokeratin)-7に対する特異抗体と共に扱われる初代肺培養のDAPIと合併したそれぞれの免疫染色を示す

【図20】(A)位相コントラストの写真と(B)クララ細胞分泌タンパク質に対する特異抗体と共に扱われる初代肺培養のDAPIと同化したそれぞれの免疫染色を示す

【図21】(A)位相コントラストの写真と(B)それぞれの細胞質P450酵素染色を示す

【図22】肺の上皮コロニーの細胞の中にあるOct-4のmRNAの書き換えのためのRT-PCR分析を表す

【図23】肺の上皮コロニーの細胞の中のSca-1のためのmRNAの書き換えのためのRT-PCR分析を示す

【図24】二次培養5日後の細胞の位相コントラストの写真を示す

【図25】プロテインC抗体を備えた反界面活性剤と共に図24の初代肺細胞培養のDAPIカウンター染色と同化する免疫組織化学染色を示す

【図26】二次培養9日後の細胞の位相コントラストの写真を示す

【図27】抗アクアポリン(anti-aquaporin)-5抗体を備えた図26の初代肺細胞培養の

10

20

30

40

50

DAPIカウンター染色と同化する免疫組織化学染色を示す

【図28】8時間の間SARS-CoVに汚染した肺の上皮細胞のための位相コントラストの写真

【図29】SARS-CoVのヌクレオキャプシドタンパク質に対する抗体を備えた図28の初代肺細胞培養の免疫組織化学染色を示す

【図30】図29の免疫染色パターンと同化した図29の免疫染色された初代肺細胞培養のDAPIを備えたカウンター染色を示す

【図31】24時間の間SARS-CoVに感染した肺の上皮細胞のための位相コントラストの写真

【図32】SARS-CoVのヌクレオキャプシドタンパク質に対する抗体を備えた図31の初代肺細胞培養の免疫組織化学染色を示す

【図33】図32の免疫染色パターンと同化した図32の免疫染色された初代肺細胞培養のDAPIを備えたカウンター染色を示す

【図34】8時間の間インフルエンザA型/WSN/33ウイルスに感染した肺の上皮細胞のための位相コントラストの写真

【図35】反A型インフルエンザウイルス特異抗体を備えた図34の初代肺細胞培養の免疫組織化学染色を示す

【図36】図35の免疫染色パターンと同化した図35の免疫染色された初代肺細胞培養のDAPIを備えたカウンター染色を示す

【図37】SARS-CoVの16時間のポスト感染の後の初代肺細胞培養の電子顕微鏡写真を示す

【図38】細胞の膨れたゴルジ小胞の中にある図37の高い倍率の電子顕微鏡写真を示す

【図39】SARS Co-Vの中にある図37のより高い倍率の電子顕微鏡写真を示す

【図40】肺の上皮コロニーが矢印によって示されている中の肺の上皮細胞のための位相コントラストの写真を示す

【図41】初代肺細胞培養のSARS-CoVのための推定上の受容体を特徴づけるanti-ACE2単一クローン特異抗体を備えた図40の初代肺細胞培養の免疫組織化学染色を示す

【図42】図41の免疫染色パターンと同化した図41の免疫染色された初代肺細胞培養のDAPIを備えたカウンター染色を示す

【図43】肺の初代培養から生産されたSARS-CoV粒子の生物活性の報告を示す図表

【図44】肺の初代培養によって生産されたSARS-CoV粒子による感染後のVeroE6細胞の位相コントラストの写真を示す

【図45】SARS-CoVのヌクレオキャプシドに対する抗体と共に使用されたSARS-CoVのための免疫染色を示す

【図46】BrdUのラベル保持の同定とハツカネズミの肺の中のOct-4が発現する細胞を示す

【図47】新しい培養システムによってインビトロで肺の上皮細胞を豊かにする方法のフローチャートを示す

【図48】初代肺のクローン化可能肝細胞中の幹細胞マーカーのラベルを付ける免疫蛍光を示す

【図49】肺のクローン化可能肝細胞の特徴を示す

【図50】RT-PCRおよび定量的なPCRによる肺の幹細胞中での幹細胞マーカーの発現を示す

【図51】肺の幹細胞コロニーの多分化能を示す

【図52】H5N1感染の初期標的として肺の幹細胞の同定を示す

【図53】A型インフルエンザウイルス感染の第一標的として肺の幹細胞の同定を示す

【図54】H5N1感染細胞の電子顕微鏡写真を示す

【図55】A人間型インフルエンザA(緑、-2,6リンケージ)および鳥インフルエンザウイルス(赤、-2,3リンケージ)両方の肺幹細胞コロニー内での受容体の同定を示す

【図56】同じ細胞内のOct-4の核(中間の灰色の立体円)および細胞質SARS-CoVヌクレオキャプシドタンパク質(白いドーナツ形、核を囲んだ形態)の共同局在化を示す

10

20

30

40

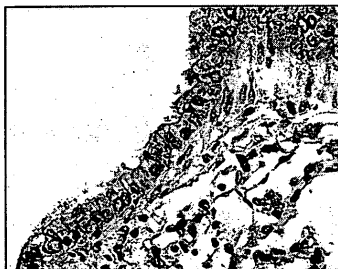
50

【図57】肺幹細胞コロニーを囲むストロマ細胞の形質を示す

【図1】



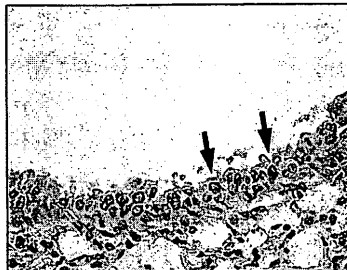
【図3】



【図2】



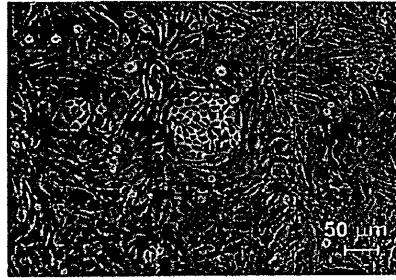
【図4】



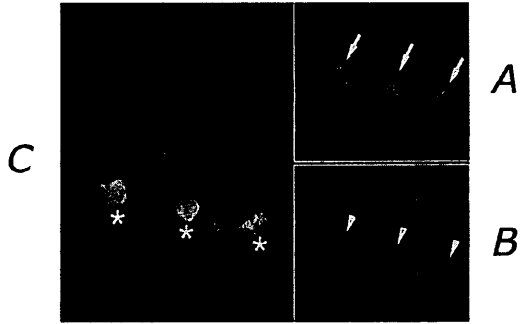
【 図 5 】



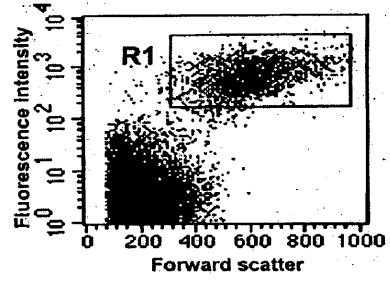
【 図 7 】



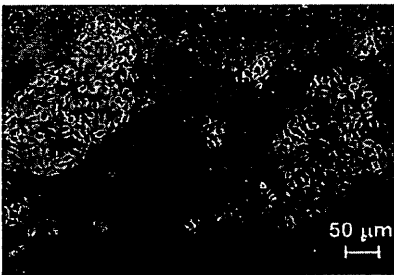
【 図 6 】



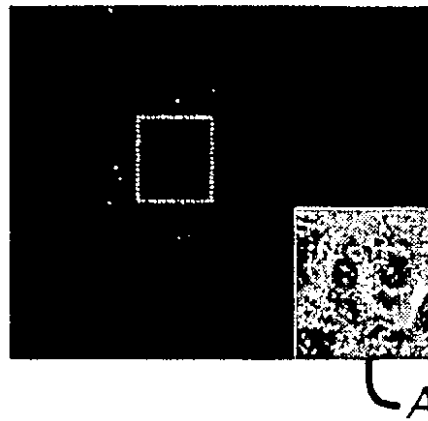
【 図 8 】



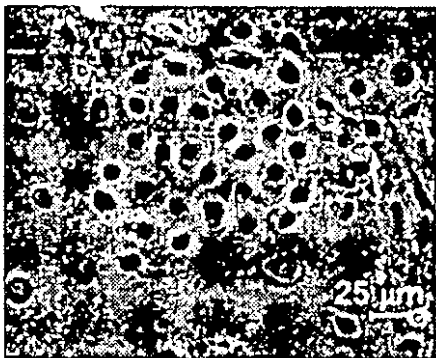
【 図 9 】



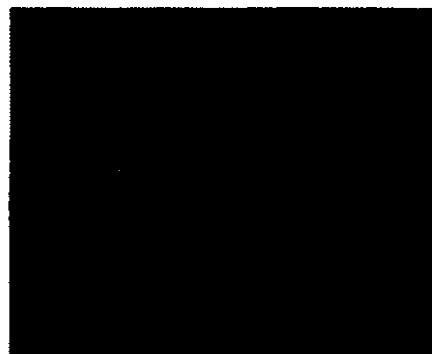
【 図 1 1 】



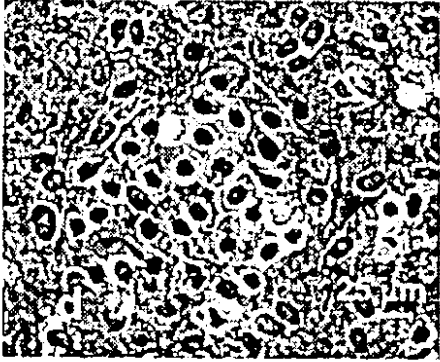
【 図 1 0 】



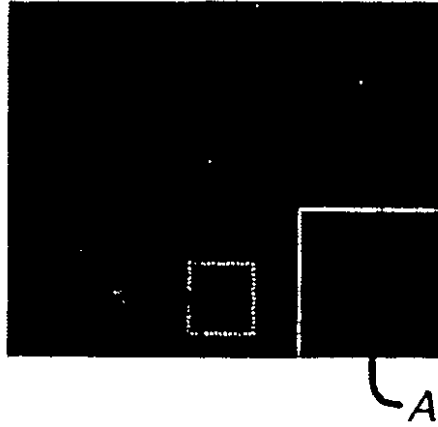
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



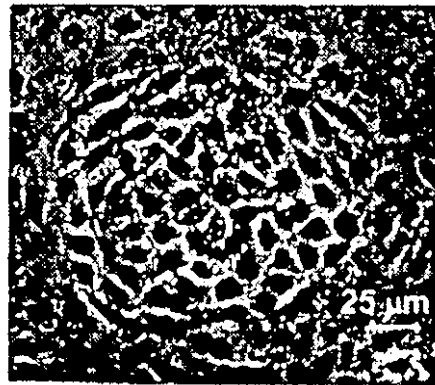
【 図 1 5 】



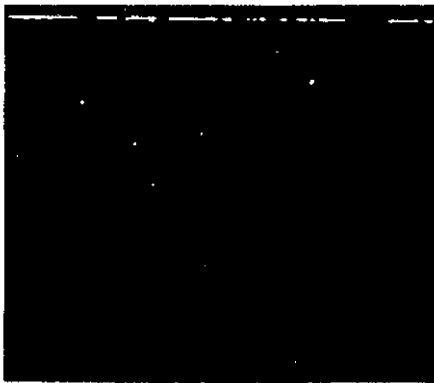
【 図 1 4 】



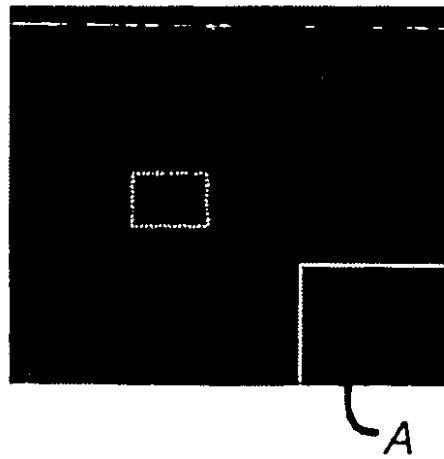
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



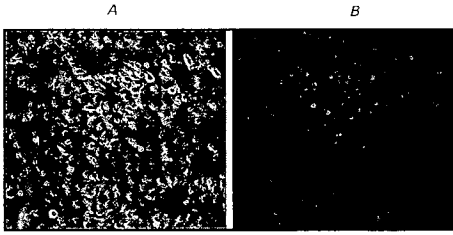
【 図 1 8 】



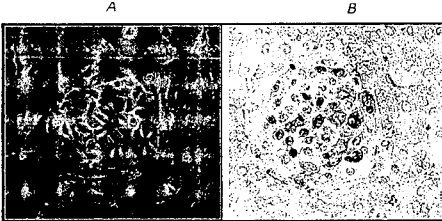
【 図 1 9 】



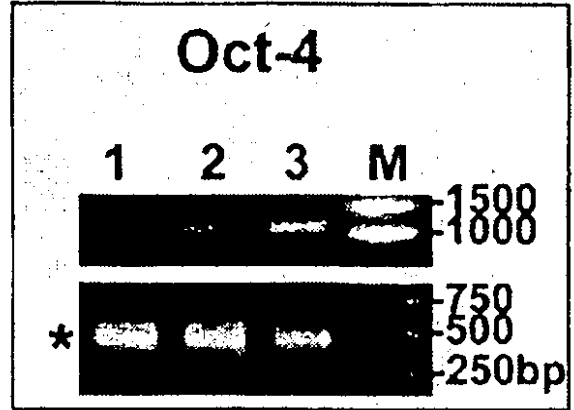
【 図 2 0 】



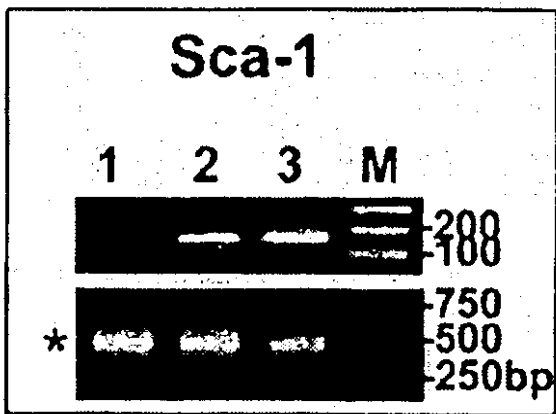
【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



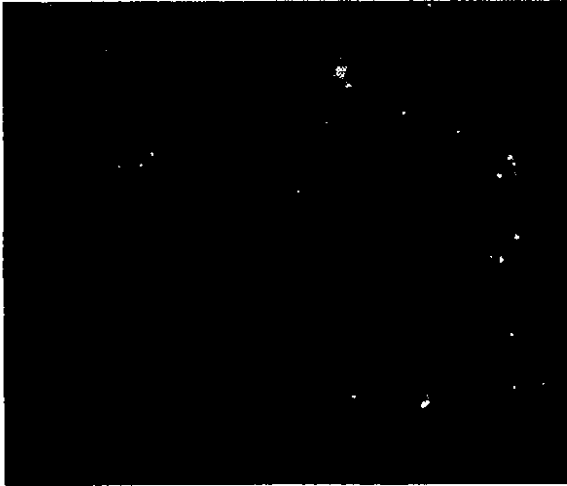
【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



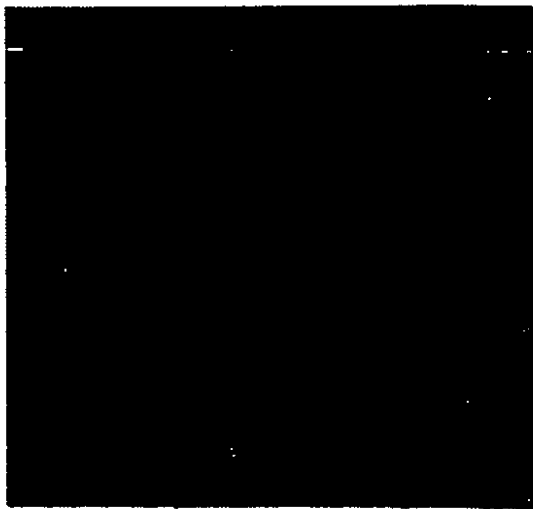
【 図 2 5 】



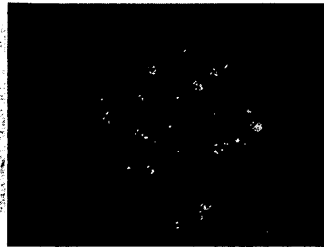
【 図 2 6 】



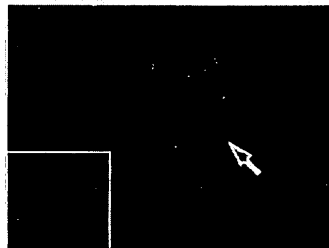
【 図 2 7 】



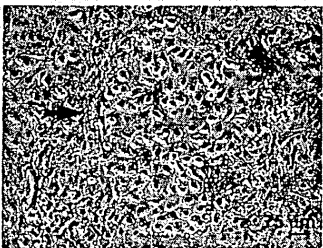
【 図 2 9 】



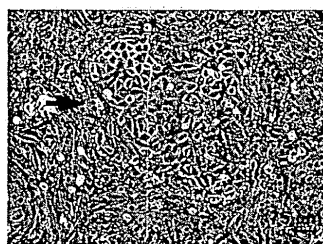
【 図 3 0 】



【 図 2 8 】



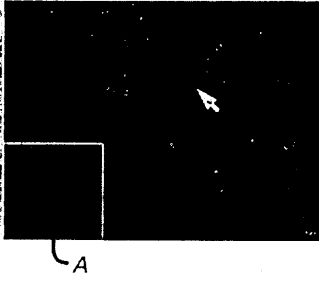
【 図 3 1 】



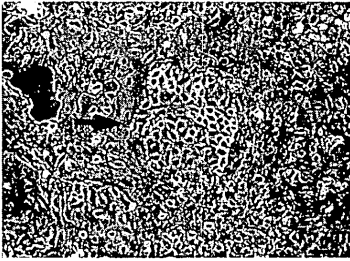
【 図 3 2 】



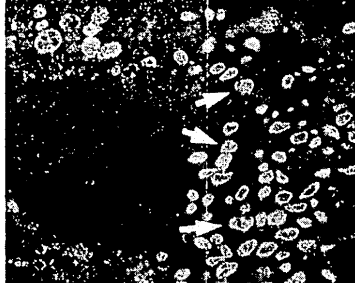
【 図 3 3 】



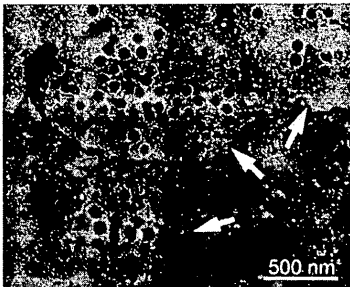
【 図 3 4 】



【 図 3 7 】



【 図 3 8 】



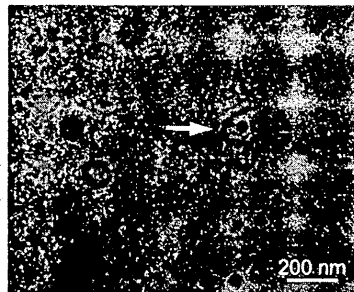
【 図 3 5 】



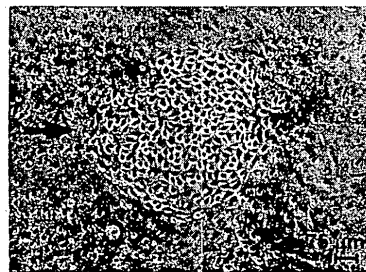
【 図 3 6 】



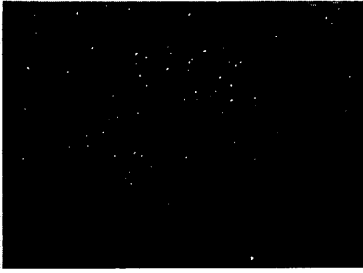
【 図 3 9 】



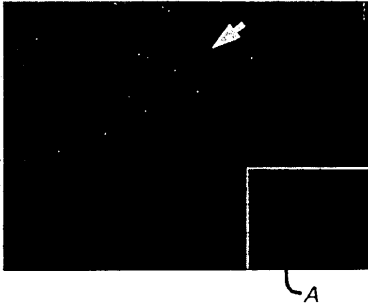
【 図 4 0 】



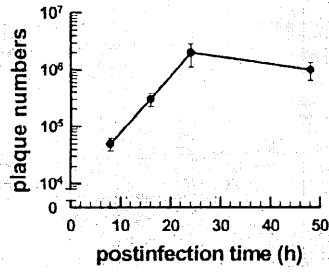
【 図 4 1 】



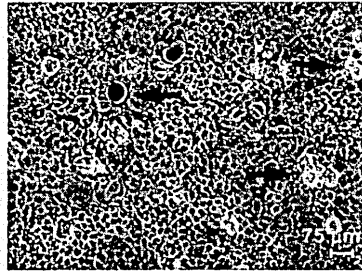
【 図 4 2 】



【 図 4 3 】



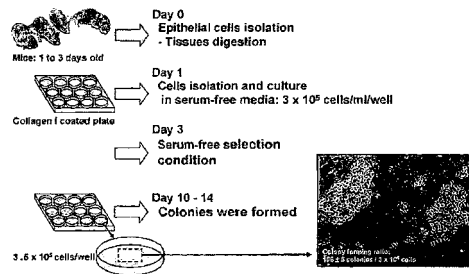
【 図 4 4 】



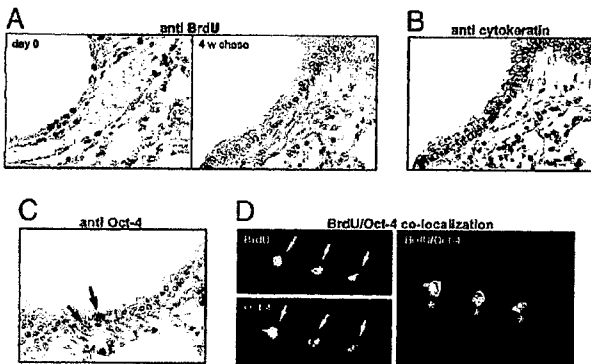
【 図 4 5 】



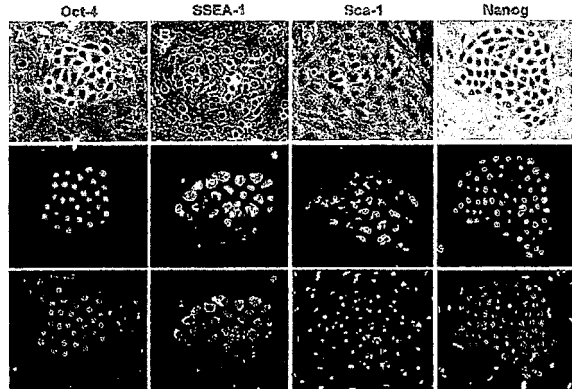
【 図 4 7 】



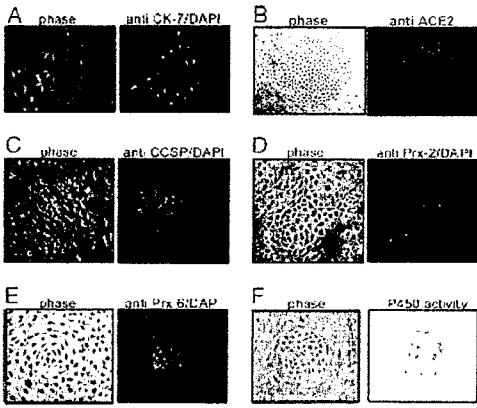
【 図 4 6 】



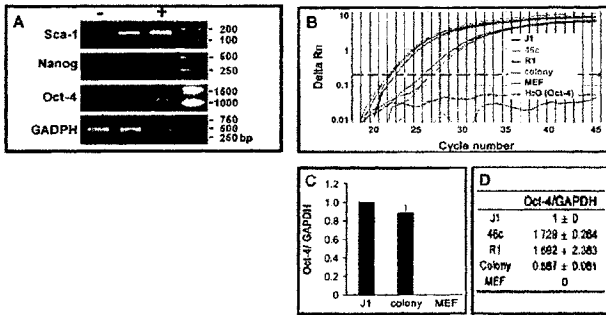
【 図 4 8 】



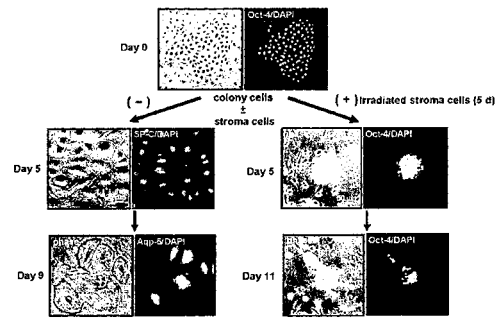
【 49 】



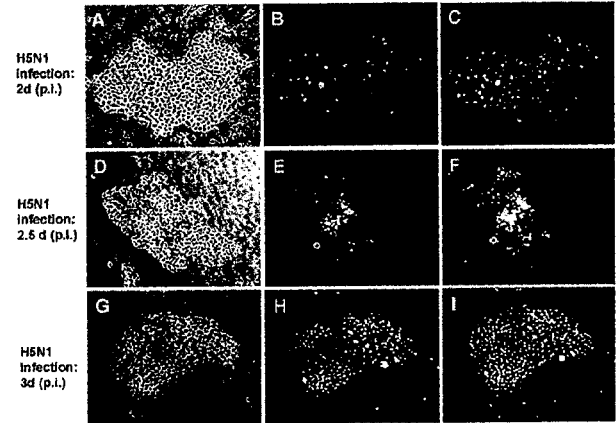
【 50 】



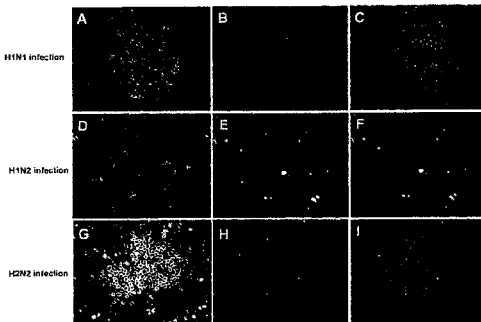
【 51 】



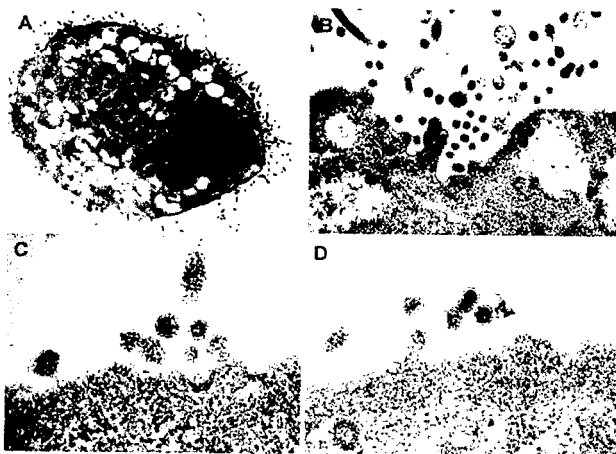
【 52 】



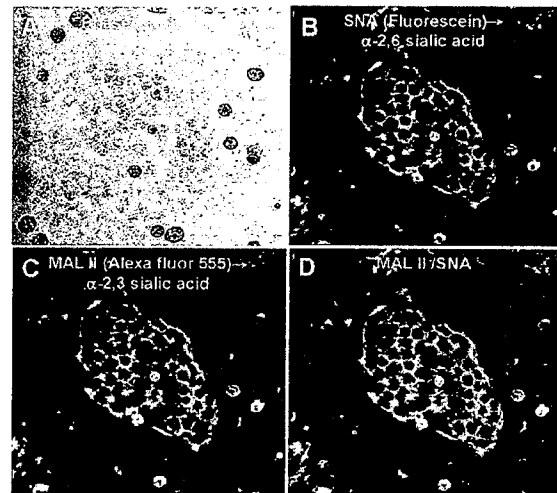
【 53 】



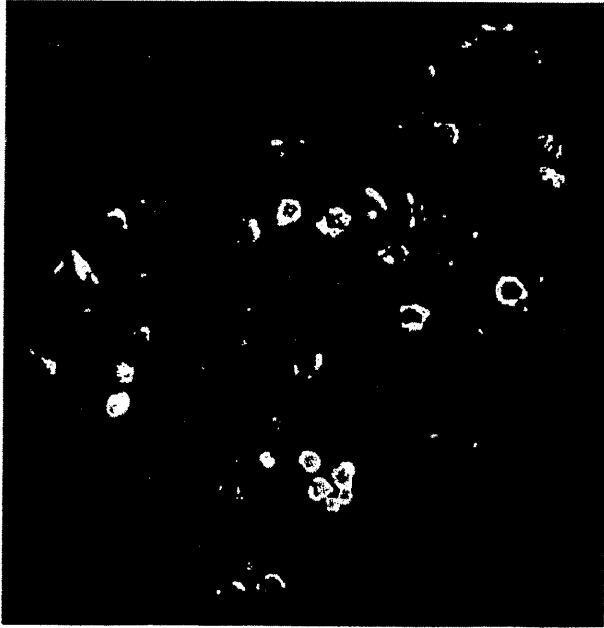
【 54 】



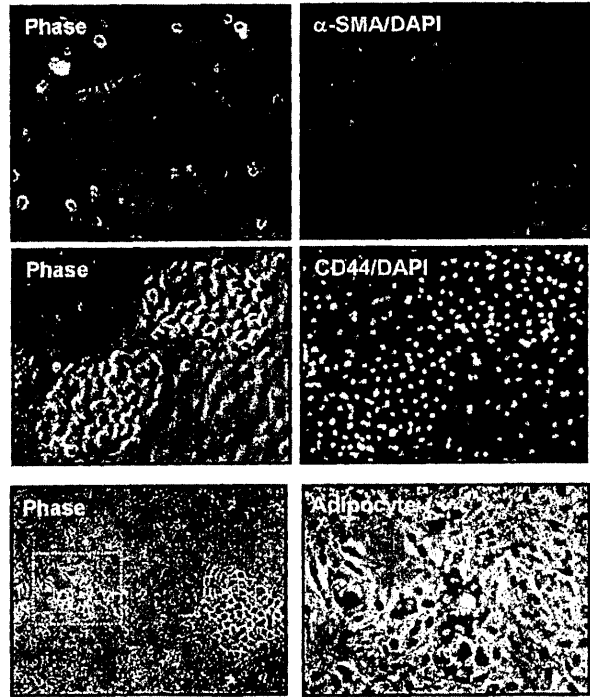
【 55 】



【 図 5 6 】



【 図 5 7 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	Y
<b>G 0 1 N 33/543 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/543	5 7 5

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ユー, アリス, リン - チン  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92037, ラ ホーヤ, ラ ホーヤ ショアズ ドライブ  
 8480

(72)発明者 リン, タイ - イェン  
 台湾, タイペイ 105, セクション 1, シン - シェン サウス ロード, レーン 97, ナン  
 バー 30

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 CA12 CA20 HA14  
 4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ53 QR08 QR62 QS25 QS34  
 4B065 AB04 AC20 CA44

专利名称(译)	肺干细胞及相关方法和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009514509A</a>	公开(公告)日	2009-04-09
申请号	JP2008536712	申请日	2006-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	中央研究院		
申请(专利权)人(译)	中央研究院		
[标]发明人	ユージョンチェンポー ユーアリスリンチン リントアイエン		
发明人	ユー,ジョン,チェン-ポー ユー,アリス,リン-チン リン,タイ-イエン		
IPC分类号	C12N5/06 C12Q1/04 C12Q1/68 C12N15/09 C12N7/00 G01N33/53 G01N33/543 C12N5/071 C12N5/074		
CPC分类号	C12N7/00 C12N5/0689 C12N2500/90 C12N2760/12151 C12N2760/16051 C12N2770/20051		
FI分类号	C12N5/00.ZNA.E C12Q1/04 C12Q1/68.A C12N15/00.A C12N7/00 G01N33/53.Y G01N33/53.D G01N33/543.575		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B065/AB04 4B065/AC20 4B065/CA44		
代理人(译)	广濑文彦		
优先权	11/252458 2005-10-17 US 60/824265 2006-08-31 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了肺干细胞的分离方法，培养方法，鉴定方法和使用方法。肺干细胞来自哺乳动物肺组织本身。分离方法涉及通过丢弃生长迟缓的菌落来鉴定预期作为初始培养物发生的干细胞。通过分化成干细胞标记物如Oct-4和成熟表型，可以确认细胞的同一性。分离和分选还包括基于干细胞标记的细胞分选。在干细胞群维持未分化表型的同时扩增的培养方法包括使用确定的培养物，培养表面修饰和与肺基质细胞的相互作用。使用肺干细胞的方法还包括检查细胞的生物学，病毒的感染性，病毒的产生和抗感染药物的检查。

