



(10) 授权公告号 CN 114846134 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 29

(21) 申请号 202080078206.X

(22) 申请日 2020.04.06

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114846134 A

(43) 申请公布日 2022.08.02

(30) 优先权数据
PCT/JP2020/002197 2020.01.16 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.05.10

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2020/016228 2020.04.06

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/145002 JA 2021.07.22

(73) 专利权人 普雷克株式会社
地址 日本岛根县

(72) 发明人 松崎有未 陶山隆史

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105
专利代理师 张涛

(51) Int.Cl.
C12N 5/0775 (2006.01)

(56) 对比文件
Yo Mabuchi et al.. “LNGFR+THY-1+VCAM-1hi+ Cells Reveal Functionally Distinct Subpopulations in Mesenchymal Stem Cells”.《Stem Cell Reports》.2013,第1卷第152-165页和补充实验材料第1-14页.

审查员 赵二双

权利要求书2页 说明书7页 附图6页

(54) 发明名称

一种间充质干细胞

(57) 摘要

一种细胞集团,其是LNGFR (CD271) 为阳性、或LNGFR (CD271) 和Thy-1 (CD90) 为双阳性的高速增殖性间充质干细胞克隆的细胞集团,所述细胞集团满足以下的 (a) 和 (b) 中的至少1个特征。(a) 流式细胞术的前向散射光的变异系数为35%以下。(b) 平均细胞尺寸为20 μ m以下。

1. 一种细胞集团,其是LNGFR (CD271) 为阳性、或LNGFR (CD271) 和Thy-1 (CD90) 为双阳性的增殖性间充质干细胞克隆的细胞集团,其中,

所述细胞集团满足以下的(a) 特征:

(a) 流式细胞术的前向散射光的变异系数为35%以下。

2. 根据权利要求1所述的细胞集团,其中,

变异系数为30%以下。

3. 根据权利要求1或2所述的细胞集团,其中,

平均细胞尺寸为20 μ m以下。

4. 根据权利要求3所述的细胞集团,其中,

平均细胞尺寸为14 μ m ~ 18 μ m。

5. 一种方法,其是对LNGFR (CD271) 为阳性、或LNGFR (CD271) 和Thy-1 (CD90) 为双阳性的增殖性间充质干细胞克隆的细胞集团的品质进行评价的方法,其中,

将满足以下的(a) 特征的细胞集团判定为高品质:

(a) 流式细胞术的前向散射光的变异系数为35%以下。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中,

变异系数为30%以下。

7. 根据权利要求5或6所述的方法,其中,

平均细胞尺寸为20 μ m以下。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中,

平均细胞尺寸为14 μ m ~ 18 μ m。

9. 一种方法,其是从LNGFR (CD271) 为阳性、或LNGFR (CD271) 和Thy-1 (CD90) 为双阳性的增殖性间充质干细胞克隆的细胞集团中选出能够适用于临床的细胞集团的方法,其中,

将满足以下的(a) 特征的细胞集团作为用于治疗间充质干细胞集团而选出:

(a) 流式细胞术的前向散射光的变异系数为35%以下。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中,

变异系数为30%以下。

11. 根据权利要求9或10所述的方法,其中,

平均细胞尺寸为20 μ m以下。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中,

平均细胞尺寸为14 μ m ~ 18 μ m。

13. 一种能够适用于人类间充质干细胞的临床的细胞集团的制造方法,其包括以下步骤:

(a) 得到LNGFR (CD271) 为阳性、或LNGFR (CD271) 和Thy-1 (CD90) 为双阳性的间充质干细胞的集团的步骤;

(b) 对所述间充质干细胞的克隆进行单一细胞培养的步骤;

(c) 回收增殖快的克隆并进行扩大培养的步骤;

(d) 通过流式细胞术对所述扩大培养后的细胞集团测定前向散射光的变异系数的步骤;

(e) 筛选出流式细胞术的前向散射光的变异系数为35%以下的细胞集团的步骤。

14. 根据权利要求13所述的制造方法, 其中,
 - (1) 平均细胞尺寸为 $20\mu\text{m}$ 以下, 和/或
 - (2) 流式细胞术的前向散射光的变异系数为35%以下。
15. 根据权利要求14所述的制造方法, 其中, 平均细胞尺寸为 $14\mu\text{m} \sim 18\mu\text{m}$ 。
16. 根据权利要求13所述的制造方法, 其中,
在所述(c)中, 所述增殖快的克隆为多个时, 该克隆被相互独立地回收并扩大培养。
17. 根据权利要求16所述的制造方法, 其中,
在所述(d)中, 所述扩大培养后的细胞集团相互独立地供给到所述流式细胞术。

一种间充质干细胞

技术领域

[0001] 本发明涉及具有均一性并且增殖快的人类间充质干细胞的高纯度细胞集团。

背景技术

[0002] 间充质干细胞(Mesenchymal Stem Cells:MSC)在细胞采集上伴随的伦理问题较少,具有向骨·软骨·脂肪等的多样的分化能力,因此是造血干细胞之后的临床应用大量实行的体性干细胞的一种。MSC可通过比较简单的手法而分离,因此主要是在试验管内进行向软骨、骨等的分化诱导后移植至局部等,作为生物材料的材料而广泛地被运用。

[0003] 此外,在推进临床应用时,能够以需要量制造保持有恒定的功能的细胞是制品化的必须条件。

[0004] 然而,在出发材料(人类骨髓液等)的性质存在波动的情况下、即在供体来源的性质存在差异的情况下,会对作为制品的细胞制剂的性质产生巨大的影响。

[0005] 因此,获得波动少的高纯度的间充质干细胞是很重要的。

[0006] 本发明者们通过流式细胞术从骨髓液中分离LNGFR、Thy-1双阳性细胞,得到增殖快的克隆(Rapidly Expanding Clone:REC),确立了能够排除供体来源的MSC的增殖性的差异的纯化分离方法(日本专利第6463029号,W02016/017795,Mabuchi Y.et al.,Stem Cell Reports 1(2):152-165,2013)。在该方法中,例如以Ror2的表达为指标而分离筛选REC。

[0007] 此外,也已知有对经过了纯化的间充质干细胞组合物以及间充质干细胞组合物进行纯化的方法(日本专利6025329号),在该方法中,纯化得到直径为150 μ m以下的间充质干细胞。

[0008] 然而,REC的克隆在分化能力、增殖能力上还是能观察到波动。此外,即使是增殖性优异的REC,也无法避免传代导致的劣化,需要有效的品质管理方法。并且,在以Ror2的表达为指标的情况下,在与增殖能力的相关性上也还有改善的余地。

[0009] 现有技术文献

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献1:日本专利第6463029号

[0012] 专利文献2:国际公开2016/017795号小册

[0013] 专利文献3:日本专利第6025329号

[0014] 非专利文献

[0015] 非专利文献1:Mabuchi Y Morikawa S,Harada S;Niibe K,Suzuki S,Renault-Mihara F,Houlihan DD,Akazawa C,OkanOH,Matsuzaki Y.LNG FR+Thy-1+Vcam-1hi+cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells.Stem Cell Reports 1(2):152-165,2013.

发明内容

[0016] 本发明所解决的技术问题

[0017] 因此在本发明中,需要:确立高纯度且均一性较高的REC的筛选方法、以及担保细胞性能的指标。

[0018] 解决问题的技术手段

[0019] 本发明者为了解决问题而进行了探讨的结果,在从人类骨髓液中得到LN GFR和Thy-1同时阳性的细胞,从单一的细胞制造多数的REC的克隆,在重复分化能力以及增殖能力的测定的过程中,发现了细胞的大小和均一性与各个克隆的分化能力以及增殖能力更强相关。

[0020] 此外,本发明者发现:以流式细胞术中的前向散射光(FSC)为指标分析构成各克隆的细胞的大小和其波动,尺寸越小FSC的CV值越小,则增殖能力、分化能力越优异,发现了通过与该指标一同进行各克隆的选出,能够制造出保持一定的范围内的功能的细胞。

[0021] 即,本发明如下:

[0022] (1)

[0023] 一种细胞集团,其是LNGFR(CD271)为阳性、或LNGFR(CD271)和Thy-1(CD90)为双阳性的高速增殖性间充质干细胞克隆的细胞集团,其中,

[0024] 所述细胞集团满足以下的(a)和(b)中的至少1个特征:

[0025] (a) 流式细胞术的前向散射光的变异系数为35%以下、

[0026] (b) 平均细胞尺寸为20 μ m以下。

[0027] (2)

[0028] 根据(1)所述的细胞集团,其中,

[0029] 变异系数为30%以下。

[0030] (3)

[0031] 根据(1)或(2)所述的细胞集团,其中,

[0032] 平均细胞尺寸为14 μ m~18 μ m。

[0033] (4)

[0034] 一种方法,其是对LNGFR(CD271)为阳性、或LNGFR(CD271)和Thy-1(CD90)为双阳性的高速增殖性间充质干细胞克隆的细胞集团的品质进行评价的方法,其中,

[0035] 将满足以下的(a)和(b)中的至少1个特征的细胞集团判定为高品质:

[0036] (a) 流式细胞术的前向散射光的变异系数为35%以下、

[0037] (b) 平均细胞尺寸为20 μ m以下。

[0038] (5)

[0039] 根据(4)所述的方法,其中,

[0040] 变异系数为30%以下。

[0041] (6)

[0042] 根据(4)或(5)所述的方法,其中,

[0043] 平均细胞尺寸为14 μ m~18 μ m。

[0044] (7)

[0045] 一种方法,其是从LNGFR(CD271)为阳性、或LNGFR(CD271)和Thy-1(CD90)为双阳性的高速增殖性间充质干细胞克隆的细胞集团中选出能够适用于临床的细胞集团的方法,其中,

[0046] 将满足以下的 (a) 和 (b) 中的至少1个特征的细胞集团作为用于治疗的间充质干细胞集团而选出:

[0047] (a) 流式细胞术的前向散射光的变异系数为35%以下、

[0048] (b) 平均细胞尺寸为20 μm 以下。

[0049] (8)

[0050] 根据 (7) 所述的方法,其中,

[0051] 变异系数为30%以下。

[0052] (9)

[0053] 根据 (7) 或 (8) 所述的方法,其中,

[0054] 平均细胞尺寸为14 μm ~ 18 μm 。

[0055] 发明的效果

[0056] 通过本发明,能够选出细胞的大小具有均一性,且增殖能力、分化能力优异的间充质干细胞集团。选出得到的细胞集团具有能够适用于临床的品质,可期待用于心肌梗塞、脑梗塞、脊髓损伤、骨或软骨形成关联疾病、移植物抗宿主病 (GVHD)、肝硬变、表皮泡沫症、下肢缺血等的治疗。

附图说明

[0057] [图1]表示本发明中的筛选REC的手法的概要的图。

[0058] [图2]表示基于流式细胞术的前向散射光 (FSC) 的CV值的测定结果的图。

[0059] [图3]表示细胞增殖能力以及脂肪分化能力的评价结果的图。

[0060] [图4]表示REC克隆的综合分析结果的图。

[0061] [图5]表示本发明的解析结果的汇总的图。

[0062] [图6]表示REC克隆的综合分析结果的图。

[0063] 本发明的具体实施方式

[0064] 以下,将对本发明进行详细的说明。

[0065] 1. 概要

[0066] 本发明者通过以前的研究,成功地从LNGFR (CD271) 为阳性的间充质干细胞 (CD271+细胞)、或LNGFR (CD271) 以及Thy-1 (CD90) 双阳性的间充质干细胞 (CD271+CD90+细胞) 中,分离出了增殖快的高速增殖性的细胞克隆 (Rapidly Expanding Clone: REC)。

[0067] 该REC是在向96孔板中分别接种1个细胞而培养时,能够以2周达到汇合的细胞,与用以往方法得到的间充质干细胞相比,增殖能力、分化能力以及迁移能力全部具有1000倍以上的能力。并且,特别是保持有迁移能力,因此可以进行经静脉内给药,可期待在骨・软骨形成不全症等严重的全身性疾病中的应用。

[0068] 但是,即使是在这样的REC克隆中,在分化能力、增殖能力上也有时会观察到波动。

[0069] 本发明提供一种这样的波动较少的细胞克隆、以及该细胞克隆的筛选方法。

[0070] 包含本发明的细胞克隆的细胞集团是LNGFR (CD271) 和Thy-1 (CD90) 为双阳性,并且,增殖快的间充质干细胞克隆的集团,满足以下的 (a) 和 (b) 中的至少1个特征。

[0071] (a) 流式细胞术的前向散射光的变异系数为35%以下。

[0072] (b) 平均细胞尺寸为20 μm 以下。

[0073] 2. 人类间充质干细胞浓缩方法

[0074] 在本发明中,为了得到LNGFR (CD271) 为阳性、或LNGFR (CD271) 和Th y-1 (CD90) 为双阳性的间充质干细胞,例如可以依照W02009/31678号所述的方法。

[0075] 该方法的概要如下。

[0076] 首先,通过从包含人类间充质干细胞的细胞集团中,筛选出LNGFR (CD 271) 为阳性 (CD271+)、或CD271和CD90为双阳性 (CD271+CD90+) 的细胞区分,将间充质干细胞高度浓缩。需要说明的是,在包含人类间充质干细胞的细胞集团中包含有血细胞类细胞的情况下,为了筛选非血细胞类的细胞,可以加入筛选CD45和CD235a为双阴性 (CD45-CD235a-) 的细胞的工序。

[0077] 包含间充质干细胞的细胞集团可以通过流式细胞术或亲和·色谱制备。

[0078] 用于得到该细胞集团的材料无特别限定,例如,可以举出骨髓、外周血 (包含G-CSF给药后的外周血) 等。需要说明的是,骨髓可以使用脊椎、胸骨、髌骨等的骨髓。

[0079] 在细胞制备时,材料变为卷入了间充质干细胞的细胞块的情况下,根据需要,可以对材料进行基于移液 (Pipetting) 等的物理处理、基于胰蛋白酶、胶原酶等的酶处理。此外,在材料中混入了红细胞的情况下,优选预先使红细胞溶血。

[0080] 使用如上所述地制备的细胞集团,筛选CD271+细胞或CD271+CD90+细胞。

[0081] 作为筛选CD271+细胞或CD271+CD90+细胞的方法,例如,可以举出使用抗体的方法。

[0082] 抗体为能够筛选CD271+细胞或CD271+CD90+细胞的、抗CD271抗体和/或抗CD90抗体。在筛选中使用流式细胞术的情况下,通过适宜组合使用以FITC、PE、APC等不同的荧光色素标记了的抗CD271抗体、或抗CD271抗体和抗CD90抗体,能够在短时间内筛选活细胞。此外,除了流式细胞术以外,通过使用磁珠的方法、使用亲和·色谱的方法,也能够筛选CD271+CD90+细胞。

[0083] 需要说明的是,可以在使用这些方法前,通过预先使染色死细胞的荧光色素 (例如,PI) 与细胞集团反应,除去被荧光染色了的细胞,来除去死细胞。

[0084] 3. REC细胞浓缩

[0085] 接下来,通过对筛选的LNGFR阳性细胞、或LNGFR以及Thy1双阳性细胞进行单一细胞 (克隆) 培养,选择增殖快的批次,而得到增殖能力·分化能力·迁移能力优异的高纯度人类间充质干细胞 (REC:Rapidly Expanding Clone)。

[0086] 图1中例示了基于单克隆培养法的REC分离工序。

[0087] 从人类骨髓或脂肪·胎盘绒毛膜中制备单核细胞,单独用抗LNGFR、或用抗LNGFR以及抗Thy1染色骨髓单核细胞。接下来,使用流式细胞术 (细胞分选器),将LNGFR阳性细胞、或LNGFR阳性且Thy1阳性细胞分选克隆至96孔培养板中。即,向1个孔中接种1个细胞。进行单一细胞培养2周后在显微镜下拍摄培养板,筛选达到汇合或半汇合的孔,以该孔中包含的细胞为REC。

[0088] 此处,“增殖快”、“高速增殖性”是指,在向96孔培养板的1个孔中接种1个细胞而培养时,具有在培养开始2周后或更早时培养板达到汇合或半汇合程度的增殖速度 (倍增时间 (Doubling time) 为 26 ± 1 小时)。

[0089] 汇合是指,培养容器表面 (培养面) 的90%以上覆盖有培养细胞的状态。此外,半汇

合是指,培养容器表面(培养面)的70~90%覆盖有培养细胞的状态。使用的培养器具的尺寸以及种类可以根据细胞的增殖速度而适宜变更。舍弃较慢增殖的细胞(Moderately/Slowly Expanding Cells),即在单一细胞培养2周后也未达到半汇合或汇合的细胞。将从认定为REC而被筛选的各孔中回收的REC,按各孔分别移入培养烧瓶中,进一步培养至汇合(扩大培养)。然后,分别回收扩大培养了的细胞。将来源于1个孔的REC作为1批,在后述的筛选中使用。

[0090] 此处,由于本发明的细胞是通过向1个孔中接种1个细胞的克隆分选而得到的,增殖的细胞彼此之间遗传形质完全相同。因此,在本发明中,有时将细胞集团整体称为“克隆,”有时将构成细胞集团的各个细胞称为“克隆”。

[0091] 此外,在本发明中,用于筛选的REC也可通过REC标记(抗Ror2)而进行预先评价。例如,所述扩大培养后,从全部批次中回收进行了附着增殖的细胞,将各批次的一部分($1 \sim 3 \times 10^5$ 个左右)的细胞分出,用针对抗Ror2的单克隆抗体进行单一染色。用针对抗Ror2的单克隆抗体进行单一染色的手法是公知的(WO2016/17795)。简而言之,通过使用了REC标记的流式细胞术解析,求出回收细胞中的REC标记阳性细胞的比例。比例可以使用定量的PCR定量Ror2的mRNA表达,也可以通过显微镜手动求得该比例。将所述阳性比例为一定值(例如65%)以上的批次(细胞集团)设为合格,其也可以在后述的筛选中使用。

[0092] 4. 本发明的干细胞集团的筛选

[0093] 在本发明中,通过对于各个批次的REC克隆,调查细胞的增殖能力、脂肪分化能力、REC特异性标记表达量、细胞尺寸的均一性,并且解析各相关性,能够筛选高纯度且细胞性能更高的REC。

[0094] 在本发明中,将前向散射光的变异系数(Coefficient of Variation:CV值)以及细胞的平均尺寸作为筛选的指标。

[0095] 前向散射光(Forward Scatter)是指,相对于激光的轴,以前方向的小角度散射的光。前向散射光包含在细胞表面产生的激光的散射光、衍射光以及折射光,可以得到关于样品的大小的信息。

[0096] 变异系数(Coefficient of Variation:CV)是标准偏差除以平均值而得到的值,是对单位不同的数据的波动、相对于平均值的数据与波动的关系进行相对性评价时使用的数值。

[0097] 在本发明中,筛选所述CV值为35%以下的。CV值为35%以下的细胞集团是由大小均一的细胞构成的细胞集团。优选CV值为30%以下、25%以下或20%以下。

[0098] 此外,通过本发明筛选出的细胞集团中的细胞的平均尺寸为20 μ m以下。优选为18 μ m以下的、14 μ m~18 μ m的范围的大小。

[0099] 本发明还提供一种对LNGFR阳性细胞、或LNGFR(CD271)和Thy-1(CD 90)双阳性的高速增殖性间充质干细胞克隆的细胞集团的品质进行评价的方法。在本发明中,将满足以下的(a)和(b)中的至少1个特征,优选为满足这两者合的特征的细胞集团判定为高品质。

[0100] (a) 流式细胞术的前向散射光的变异系数为35%以下。

[0101] (b) 平均细胞尺寸为20 μ m以下。

[0102] 就如此评价以及筛选得到的细胞集团而言,构成该集团的细胞克隆的数量不受限制,例如在1ml的溶液中具有 $0.8 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^7$ 个左右的细胞。

[0103] 此外,该细胞集团,作为用于治疗的间充质干细胞集团,例如能够适用于以下的疾病的治疗为目的的临床。但是,疾病不限于这些。

[0104] 基因疾病(表皮泡沫症、低磷酸酶症等)

[0105] 骨关节疾病(膝软骨缺损、变形性膝关节症、椎间盘突出等)

[0106] 心脏疾病(心肌梗塞、缺血性心不全等)

[0107] 肝脏疾病(肝硬化、非醇性脂肪性肝炎等)

实施例

[0108] 以下,将通过实施例对本发明进行进一步具体的说明。但是,本发明的范围不受这些实施例的限定。

[0109] [实施例1]

[0110] 1. 基于流式细胞术的前向散射光(FSC)的CV值测定

[0111] 通过公开方法(WO2016/17795)以及图1所示的方案(scheme),将预先制备的REC克隆(克隆编号:1~45)用于基于流式细胞术的前向散射光的CV值测定。

[0112] 流式细胞术中的FSC与细胞的表面积或大小成比例。在本实施例中,以FSC的CV值为指标对细胞尺寸的波动进行了评价。在图2中表示了,基于流式细胞术的前向散射光的CV值测定结果。

[0113] (a) 对各个REC克隆进行PI染色,将目标(gate)设至PI阴性的活细胞集团,将死细胞从解析的对象中除外。

[0114] (b) 将PI阴性的活细胞集团在FSC/SSC的细胞直方图中展开,将目标(P1)设定至主要的细胞集团,将垃圾、噪声排除在解析的对象之外。

[0115] (c) 将P1目标内的细胞集团在FSC的柱状图上展开,设定标记(M1),测量了CV值。

[0116] 2. 细胞增殖能力以及脂肪分化能力的评价(图3)

[0117] (1) 细胞增殖能力的评价方法

[0118] 将 1×10^5 个REC细胞接种至100mm培养皿,在37°C、5%CO₂环境下培养5天,然后,使用细胞计数器测量细胞数以及平均细胞尺寸。需要说明的是,培养液使用添加了FBS、basic FGF、Hepes、青霉素-链霉素的DMEM培养基(富士胶片和光纯药公司)。

[0119] (2) 脂肪分化能力的评价方法

[0120] 将 5×10^4 个REC细胞接种至24孔板中,在37°C、5%CO₂环境下培养2天,然后,置换为脂肪分化诱导培养基,进一步培养14天。培养14天后进行油红O染色,通过图像解析算出脂肪滴面积。需要说明的是,脂肪分化诱导培养基使用向(1)的培养培养基中添加了地塞米松(Dexamethasone)、吲哚美辛(Indomethacin)、IBMX的培养基。

[0121] 3. 综合分析

[0122] 对于1次分选中得到的REC,45克隆进行了综合分析(图4)。

[0123] 对于各个REC克隆,调查了FSC的CV值、细胞增殖率(增殖能力)、平均细胞尺寸、脂肪分化能力的结果,发现:FSC的CV值较低的REC克隆(#3、#5、#15、#16、#17)的增殖能力、分化能力都较高,平均细胞尺寸较小。

[0124] 另一方面,发现FSC的CV值较高的REC克隆(#7、#32、#39、#40、#44)的增殖能力、分化能力都较低,平均细胞尺寸较大。

[0125] CV值30%~35%的克隆的平均增殖率为6.4,CV值25%~30%的克隆的平均增殖率为9.2,CV值25%以下的克隆的平均增殖率为15.1。此外平均细胞尺寸为18 μm ~20 μm 的克隆的平均增殖率为7.0,平均细胞尺寸为16 μm ~18 μm 的克隆的平均增殖率为12.7,平均细胞尺寸为16 μm 以下的克隆的平均增殖率为21.3。

[0126] 根据这些结果,以FSC的CV值以及平均细胞尺寸为指标,能够筛选增殖能力、分化能力都较高的、高品质的REC克隆。

[0127] 4.典型解析例的总结(图5)

[0128] FSC的CV值较低、平均细胞尺寸较小的克隆A是脂肪分化能力、增殖能力都较高的、高品质的REC克隆。

[0129] FSC的CV值较高、平均细胞尺寸较大的克隆B是脂肪分化能力、增殖能力都较低的、标准外的REC克隆。

[0130] [实施例2]

[0131] 将2种骨髓液批次(#18TL158166和#8F5040)用2种方法(CD271和CD 90双阳性以及CD271单独)进行分选,对得到的Colony、REC、MEC、SEC的比例进行比较(图6)。

[0132] 在图6中,左面板表示细胞分选的结果。将框所包围的部分的细胞接种至96孔的板中,得到的群落的比例示于右表的“Colony”中。得到的群落中,增殖快的群落(REC)、中等程度的群落(MEC)、增殖慢的群落(SEC)的比例示于表中。

[0133] 与以LNGFR、CD90双阳性为指标进行分选的情况相比,单独以LNGFR进行分选时,得到的群落比例较多,但得到的REC比例较低。

[0134] 但是,发现了即使单独以LNGFR阳性进行分选,也能够分离REC。

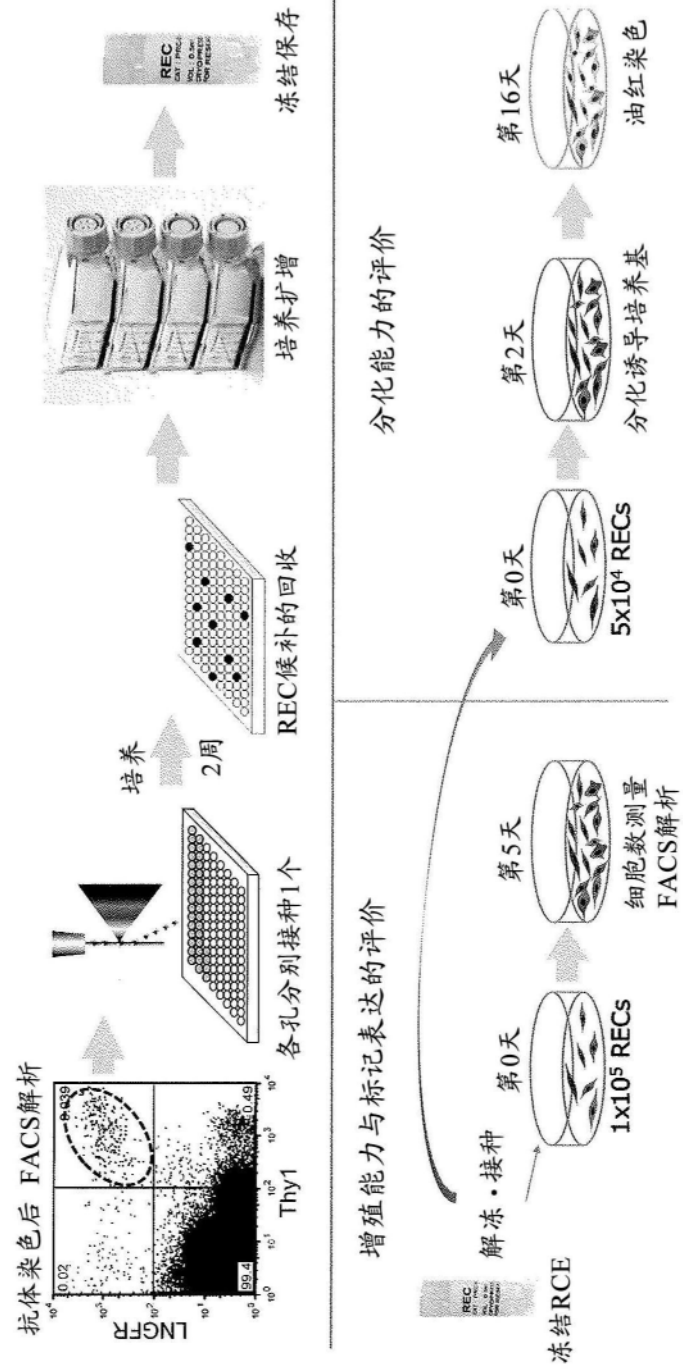


图1

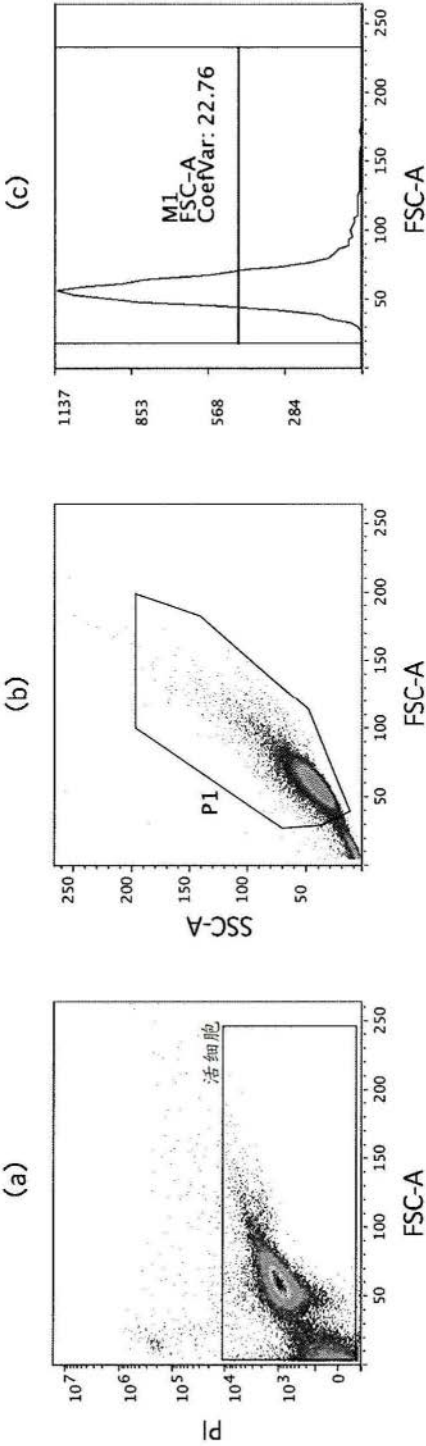


图2

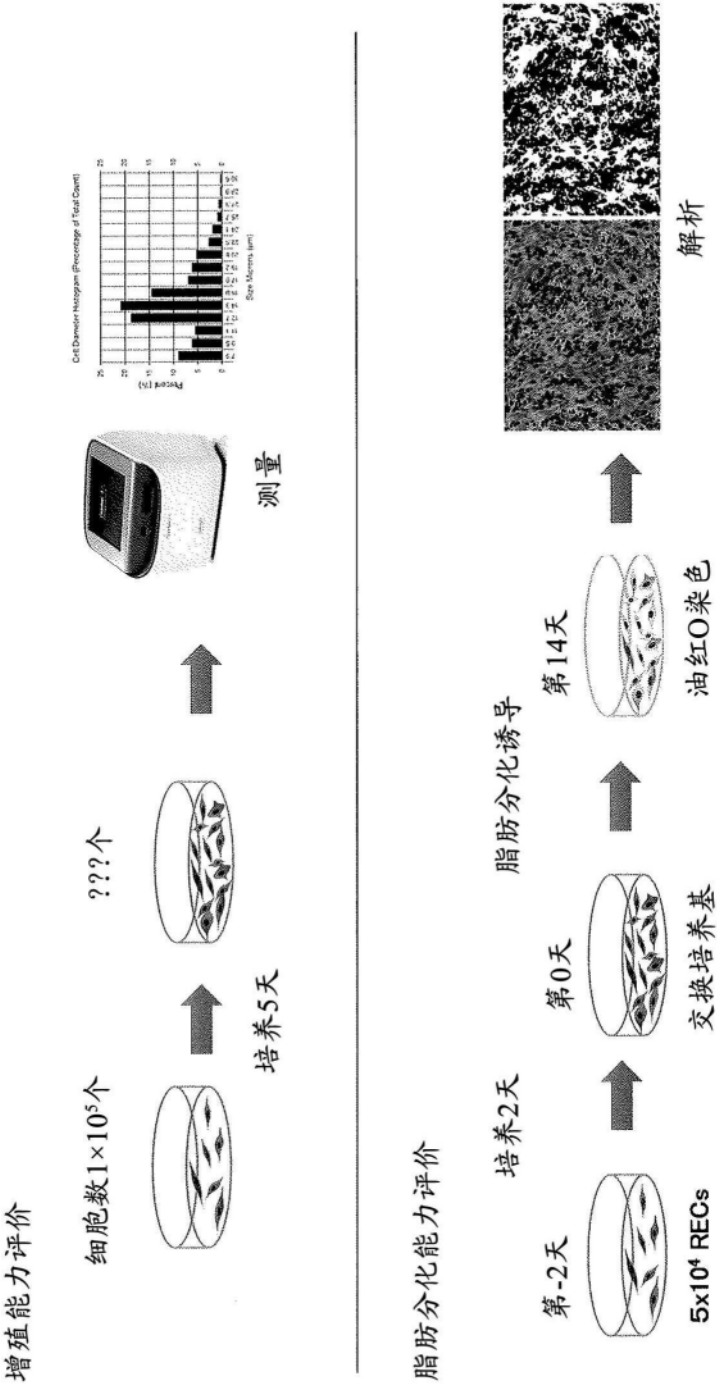


图3

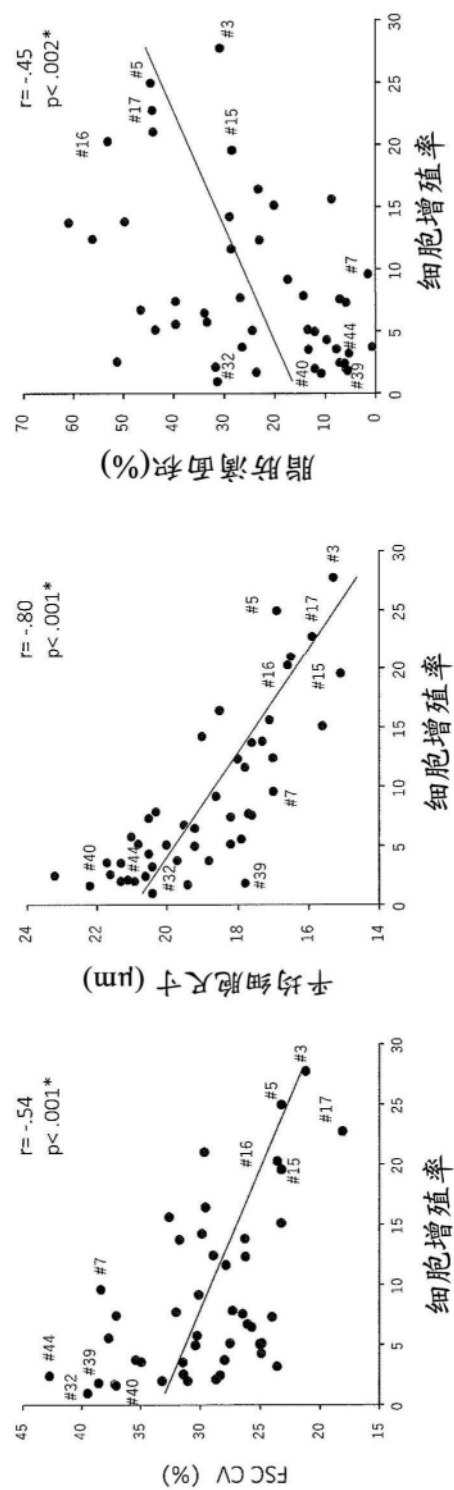


图4

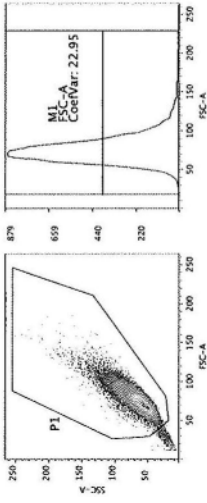
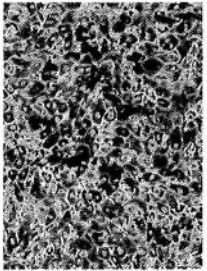
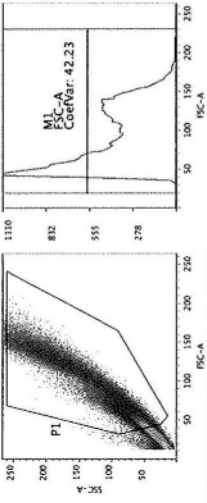
	FSC CV值	脂肪分化能力	增殖能力	平均细胞尺寸 (μm)
(A)			25.0	16.9
(B)			2.4	20.9

图5

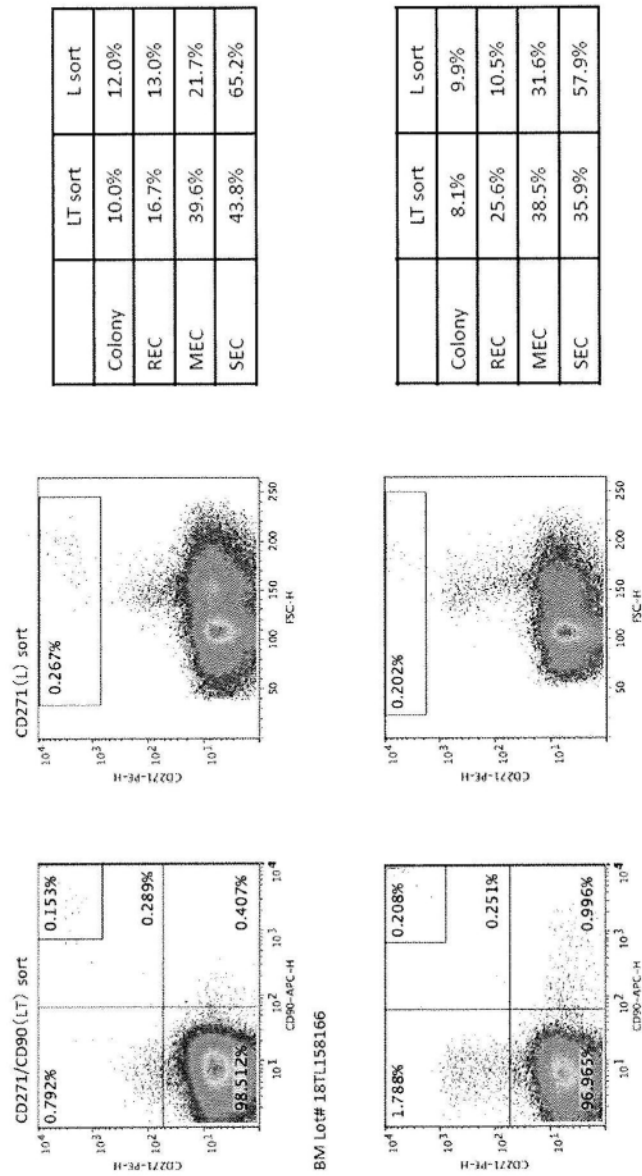


图6