(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2018-33445
(P2018-33445A)
(43)公開日　平成30年3月8日(2018.3.8)

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード（参考）
C12Q	***1/02***	***(2006.01)***	C12Q	1/02	4B063
C12Q	*1/06*	*(2006.01)*	C12Q	1/06	4B065
C12N	*5/0775*	*(2010.01)*	C12N	5/0775	
C12N	*5/071*	*(2010.01)*	C12N	5/071	

審査請求 有　請求項の数 17　ＯＬ　外国語出願　（全 26 頁）

(21)出願番号　特願2017-122181 (P2017-122181)
(22)出願日　平成29年6月22日 (2017.6.22)
(31)優先権主張番号　62/381,934
(32)優先日　平成28年8月31日 (2016.8.31)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　517156610
メリディジェン・バイオテック・カンパニー・リミテッド
Ｍｅｒｉｄｉｇｅｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｃｏ．，　Ｌｔｄ．
台湾１１４タイペイ・シティ、ネイフー・ディストリクト、ネイフー・ロード、セクション１、ナンバー６８、７フロア
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100084146
弁理士　山崎　宏
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田　憲史

最終頁に続く

(54)【発明の名称】間葉性幹細胞を識別する方法および間葉性幹細胞の純度を決定する方法

(57)【要約】　（修正有）
【課題】胎盤関連組織由来の細胞培養物中の間葉性幹細胞（MSCs）を識別する方法、胎盤関連組織由来の細胞培養物中のMSCs集団の純度を増大する方法、及び、胎盤関連組織由来の細胞培養物中のMSCsの純度を評価する方法の提供。
【解決手段】MSCs上に発現されたマーカーCD146を用いて、繊維芽細胞からMSCsを単離することを含み、その際、MSCs及び、繊維芽細胞が胎盤関連組織由来の細胞培養物からのものである、繊維芽細胞から間葉性幹細胞（MSCs）を識別する方法。好ましくは、胎盤関連組織が、羊膜、絨毛用ディスク、絨毛膜及び臍帯から選択される、より好ましくは臍帯である、方法。単離工程が抗体ベース又はヌクレオチドベース又はヌクレオチドベースで、好ましくは、抗体ベースの磁気細胞分離或いはフローサイトメトリー又はヌクレオチドベースのフローサイトメトリーで行う、方法。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
繊維芽細胞から間葉性幹細胞（MSCs）を識別する方法であって、
繊維芽細胞から間葉性幹細胞（MSCs）を識別するように、間葉性幹細胞（MSCs）上に発現されたマーカーCD146を用いて繊維芽細胞から間葉性幹細胞（MSCs）を単離することを含み、その際、間葉性幹細胞（MSCs）および繊維芽細胞は胎盤関連組織由来の細胞培養物からのものである、方法。
【請求項２】
胎盤関連組織が、羊膜、絨毛膜ディスク、絨毛膜および臍帯よりなる群から選ばれる、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
胎盤関連組織が臍帯である、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
単離工程が、抗体ベースの方法またはヌクレオチドベースの方法により行われる、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
下記の予備的工程をさらに含む、請求項１に記載の方法：
間葉性幹細胞（MSCs）および繊維芽細胞を胎盤関連組織から回収し、ついで
間葉性幹細胞（MSCs）および繊維芽細胞を培地中で培養して細胞培養物を調製する。
【請求項６】
抗体ベースの単離方法が、抗体ベースの磁気細胞分離または抗体ベースのフローサイトメトリーである、請求項４に記載の方法。
【請求項７】
ヌクレオチドベースの単離方法が、ヌクレオチドベースのフローサイトメトリーである、請求項４に記載の方法。
【請求項８】
細胞培養物中の間葉性幹細胞（MSCs）集団の純度を増大する方法であって、
間葉性幹細胞（MSCs）上に発現されたマーカーCD146を用いて間葉性幹細胞（MSCs）を単離および回収し、その際、間葉性幹細胞（MSCs）は胎盤関連組織由来の細胞培養物からのものであり、ついで
間葉性幹細胞（MSCs）を培養する
ことを含む方法。
【請求項９】
胎盤関連組織が、羊膜、絨毛膜ディスク、絨毛膜および臍帯よりなる群から選ばれる、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
単離工程が、抗体ベースの方法またはヌクレオチドベースの方法により行われる、請求項８に記載の方法。
【請求項１１】
胎盤関連組織由来の細胞が間葉性幹細胞（MSCs）のための培地中で培養される、請求項８に記載の方法。
【請求項１２】
抗体ベースの単離方法が、抗体ベースの磁気細胞分離または抗体ベースのフローサイトメトリーである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１３】
ヌクレオチドベースの単離方法が、ヌクレオチドベースのフローサイトメトリーである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１４】
胎盤関連組織由来の細胞培養物中の間葉性幹細胞（MSCs）の純度を評価する方法であって、培養物中のCD146を発現する細胞のパーセントを決定することを含む方法。

【請求項１５】
CD146を発現する細胞のパーセントをフローサイトメトリーにより決定する、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
間葉性幹細胞（MSCs）の純度がCD146を発現する細胞のパーセントと正の相関を有する、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
間葉性幹細胞（MSCs）の純度が下記式によって計算される、請求項１４に記載の方法：Y = SX + I（式中、Yは間葉性幹細胞（MSCs）の純度（%）、XはCD146を発現する細胞のパーセント、Sは1.129～1.283の範囲の値、およびIは-28.676～-17.964の範囲の値）。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、胎盤関連組織由来の細胞培養物中の間葉性幹細胞（MSCs）を識別する方法に関する。本発明はまた、胎盤関連組織由来の細胞培養物中の間葉性幹細胞（MSCs）集団の純度を増大する方法に関する。さらに、本発明はまた、胎盤関連組織由来の細胞培養物中の間葉性幹細胞（MSCs）の純度を評価する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
間葉性幹または間質細胞（MSCs）は、胚性中胚葉起源の多能性細胞であり、繊維芽細胞様の形態をしている。これら細胞は、刺激および培養条件に依存して、他の細胞型の中でも脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、神経系細胞および筋細胞に分化することができる。hMSCsの可塑性および組織修復および再生におけるその役割は広範に研究されているが、最近最も興味が持たれているのは、hMSCsの免疫学的栄養特性（immunological trophic property）である[1-2]。ヒト間葉性幹細胞は様々な組織から単離されている。最も頻繁に用いられているMSCsの採取源は骨髄（BM）である。しかしながら、その単離手順は極めて侵襲的である。侵襲的な単離手順を回避するため、ヒトの臍帯および胎盤などの組織が良い候補と考えられている。なぜなら、これらは通常、分娩後に廃棄されるものだからである。臍帯または胎盤からのhMSCsの単離は、これまでの研究によって有効であることが確認されている[3]。
【０００３】
MSCsは、間葉性組織に含まれる間質細胞のより複雑な細胞組成の下集団である。間葉性幹細胞の不均一な性質および既知の特異的なバイオマーカーの不在のため、間葉性幹細胞の表現型および特性を決定することは挑戦的な課題である[4-6]。MSCsの機能、とりわけ原形質膜に対する機能を担う分子成分は大部分未知である。加えて、特異的な細胞表面マーカーの欠如は、その細胞培養に他の細胞型、とりわけ、繊維芽細胞などの成熟間質細胞との潜在的な汚染リスクをもたらす（繊維芽細胞は逆に間葉性組織に豊富に存在する）[4-6]。胎盤由来組織からのMSCsの単離プロセスにおいて、インビトロ培養の間に非MSCs（繊維芽細胞、胎盤由来上皮細胞および胎盤由来網状細胞を含む）がMSCsとしばしば共存する。特に、繊維芽細胞は主たる汚染源である。
【０００４】
繊維芽細胞は、特に結合組織に豊富に存在する成熟間葉性細胞と考えられている。それゆえ、これら細胞は多くの細胞培養系に存在する最もしばしば汚染する細胞表現型である。培養液から繊維芽細胞をうまく除去する方法を適用することが困難のみならず、同じ培養液に存在する繊維芽細胞からMSCsを識別することは特に複雑である。繊維芽細胞とMSCsとは極めてよく似た形態的外観を有する：ともによく増殖し、多くの同一の表面マーカーを共有する[7-8]。国際細胞治療学会（the International Society of Cellular Therapy（ISCT））により、MSCは現在では、CD73，CD90，CD105を発現するが造血マーカーCD14，CD34 and CD45は陰性である、可塑性で接着性の、多能性繊維芽細胞様細胞と定義されている。しかしながら、これら特性およびマーカーは繊維芽細胞も共有している。ISCTによっ

て示唆された現在の定義は、繊維芽細胞一般からMSCを識別することはできない。現在までのところ、繊維芽細胞からMSCsを識別する最良の方法は、これら２種の細胞の機能的特性の分析に基づくものである；MSCsは多能的幹細胞性（multipotent stemness）および免疫調節能（immunomodulation capacity）を保持しているが、繊維芽細胞はこれら機能的特性のいずれもより限定されていると思われる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

MSCsの同定におけるFriedensteinの先駆的業績以来[48]、一貫してかつ明白にイクスビボ培養拡張したMSCを繊維芽細胞から識別する、培養－誘導法（culture-derivation methodology）、形態学および遺伝子発現署名（gene expression signature）に明確な差異はない[9-12]。現在のところ、繊維芽細胞からMSCsを分離するための許容された基準あるいはたった一つの細胞表面マーカーも存在しない。胎盤から得た場合に繊維芽細胞がMSC培養中の一般的な混入細胞集団であるという事実のため、繊維芽細胞からMSCsを識別するバイオマーカーとしての新規な表面タンパク質が、胎盤由来MSCsの一次培養の均質性を確実にするうえで重要である。

【０００６】

血管内皮細胞の表面マーカーであるCD146（メラノーマ細胞接着分子（melanoma cell adhesion molecule, MCAM）は、細胞－細胞相互作用および血管形成を容易にすることによって機能する。最近の研究は、幾つかのMSCsがCD146を発現すること[13-14, 16]およびCD146の発現レベルが自己再生の能力または脂肪細胞への分化および骨形成の能力と関係していること[13, 15]を明らかにしている。さらに、異なる組織から単離したMSCsは異なるCD146発現レベルを示す：骨髄から単離したMSCsの約40%がCD146を発現し、その発現レベルは継代数が増えるにつれて減少する[13-15]、一方、脂肪細胞から単離したMSCsのわずか10%未満がCD146を発現する[14]。

【０００７】

米国特許第9,470,685号は、MSCs上に発現されたマーカーEphA2を用いた繊維芽細胞からのMSCsの識別方法を開示している。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

予期しないことに、間葉性幹細胞（MSCs）が、特異的な表面マーカーであるCD146（メラノーマ細胞接着分子（melanoma cell adhesion molecule, MCAM）の発現レベルに基づいて胎盤関連組織由来の細胞培養物中で識別できることが本発明で見出された。

【０００９】

従って、一つの側面において、本発明は、繊維芽細胞から間葉性幹細胞（MSCs）を識別する方法であって、繊維芽細胞から間葉性幹細胞（MSCs）を識別するように、間葉性幹細胞（MSCs）上に発現されたマーカーCD146を用いて繊維芽細胞から間葉性幹細胞（MSCs）を単離することを含み、その際、間葉性幹細胞（MSCs）および繊維芽細胞は胎盤関連組織由来の細胞培養物からのものである、方法を特徴とする。

【００１０】

本発明のある種の態様において、前記方法は下記の予備的工程をさらに含む：間葉性幹細胞（MSCs）および繊維芽細胞を胎盤関連組織から回収し、ついで間葉性幹細胞（MSCs）および繊維芽細胞を培地中で培養して細胞培養物を調製する。

【００１１】

他の側面において、本発明は、細胞培養物中の間葉性幹細胞（MSCs）集団の純度を増大する方法であって、間葉性幹細胞（MSCs）上に発現されたマーカーCD146を用いて間葉性幹細胞（MSCs）を単離および回収し、その際、間葉性幹細胞（MSCs）は胎盤関連組織由来の細胞培養物からのものであり、ついで間葉性幹細胞（MSCs）を培養することを含む方法を提供する。

【００１２】

本発明によれば、胎盤関連組織は、羊膜、絨毛膜ディスク（chorionic disk）、絨毛膜および臍帯よりなる群から選ばれる。一つの好ましい態様において、胎盤関連組織は臍帯である。

【００１３】

本発明によれば、選別工程は当該技術分野で知られたまたは開発される技術、例えば、抗体ベースまたはヌクレオチドベースの単離方法を用いて行ってよい。

【００１４】

本発明のある態様において、胎盤関連組織由来の細胞はMSCのための培地中で培養される。

【００１５】

さらなる態様において、本発明は、胎盤関連組織由来の細胞培養物中の間葉性幹細胞（MSCs）の純度を評価する方法を提供する。該方法は、培養物中のCD146を発現する細胞のパーセントを決定する工程を含む。

【００１６】

本発明によれば、MSCsの純度はCD146を発現する細胞のパーセントと正の相関を有する。本発明の好ましい態様において、CD146を発現する細胞のパーセントはフローサイトメトリーにより決定される。一つの態様において、MSCsの純度は下記式によって計算される：Y = SX + I（式中、Yは間葉性幹細胞（MSCs）の純度（%）、XはCD146を発現する細胞のパーセント、Sは1.129～1.283の範囲の値、およびIは-28.676～-17.964の範囲の値）。

【００１７】

上記の一般的記載および以下の詳細な記載はともに例示的および説明的なものにすぎず、本発明を何ら限定するものでないことが理解されなければならない。

【００１８】

上記発明の開示並びに下記の発明の詳細な説明は、添付の図面とともに読めばより良く理解されるであろう。本発明を説明する目的で、図面には現在のところ好ましい態様を示してある。

【図面の簡単な説明】

【００１９】

【図１】図１は、間葉性幹細胞（MSCs）と繊維芽細胞との混合集団のフローサイトメトリー分析の結果を示す。ドナーからの臍帯由来間葉性幹細胞（MSCs）を繊維芽細胞と異なる比で混合した。得られた結果は、フローサイトメトリーによって検出されたCD146+集団のパーセントが、増大した繊維芽細胞集団に応じて比例して低下することを示した。FB= 繊維芽細胞

【００２０】

【図２】図２は、異なる継代数での臍帯由来間葉性幹細胞（MSCs）のCD146発現についてのフローサイトメトリー分析の結果を示す。

【００２１】

【図３】図３は、胎盤関連組織由来の細胞培養物中の間葉性幹細胞（MSCs）の純度（%）とCD146を発現する細胞のパーセントとの線形回帰を示す。

【００２２】

【図４Ａ】図４Ａは、$CD146^{high}$ MSCsおよび$CD146^{low}$ MSCsのCD146発現レベルを示す。

【００２３】

【図４Ｂ】図４Ｂは、$CD146^{high}$ MSCsおよび$CD146^{low}$ MSCsからの脂肪生成分化の結果を示す。

【００２４】

【図５】図５は、PBMC増殖アッセイの結果を示す。

【００２５】

【図６】図６は、$CD146^{high}$ MSCsおよび$CD146^{low}$ MSCsのならし培地での肝細胞増殖因子（HGF）のレベルを示す。

【００２６】

【図７】図７は、CD146^{high} MSCsおよびCD146^{low} MSCsでの細胞ROS、ミトコンドリアROSおよびβ－ガラクトシダーゼ（老化マーカー）の相対レベルを示す。
【発明を実施するための形態】
【００２７】
本発明は、表面マーカーCD146によるセルソーティングにより、胎盤関連組織由来の細胞培養物中で間葉性幹細胞（MSCs）を識別することができるという予期しない知見に基づく。
【００２８】
一つの態様において、本発明は、繊維芽細胞から間葉性幹細胞（MSCs）を識別する方法を提供する。この方法は、繊維芽細胞から間葉性幹細胞（MSCs）を識別するように、間葉性幹細胞（MSCs）上に発現されたマーカーCD146を用いて繊維芽細胞から間葉性幹細胞（MSCs）を単離することを含み、その際、間葉性幹細胞（MSCs）および繊維芽細胞は胎盤関連組織由来の細胞培養物からのものである。
【００２９】
本発明のある態様において、この方法は、下記の予備的工程をさらに含む：間葉性幹細胞（MSCs）および繊維芽細胞を胎盤関連組織から回収し、ついで間葉性幹細胞（MSCs）および繊維芽細胞を培地中で培養して細胞培養物を調製する。
【００３０】
他の側面において、本発明は、細胞培養物中の間葉性幹細胞（MSCs）集団の純度を増大する方法であって、間葉性幹細胞（MSCs）上に発現されたマーカーCD146を用いて間葉性幹細胞（MSCs）を単離および回収し、その際、間葉性幹細胞（MSCs）は胎盤関連組織由来の細胞培養物からのものであり、ついで間葉性幹細胞（MSCs）を培養することを含む方法を提供する。
【００３１】
さらに他の側面において、本発明は、間葉性幹細胞（MSCs）の集団を単離する方法であって、間葉性幹細胞（MSCs）上に発現されたマーカーCD146を用いて間葉性幹細胞（MSCs）を単離および回収し、その際、間葉性幹細胞（MSCs）は胎盤関連組織由来の細胞培養物からのものであり、間葉性幹細胞（MSCs）の集団は、より高い分化能を有し、より高い抗炎症作用を奏し、より低い程度の老化を有し、および／またはより高い量の増殖因子を分泌する方法を提供する。
【００３２】
本発明によれば、細胞は当該技術分野で知られたプロトコール、例えば、Shenら[21]のプロトコールに従い、胎盤関連組織から新たに由来し、得、または回収する。ある好ましい態様において、胎盤関連組織由来の細胞はついでMSCのための培地中で培養される。MSCのための標準培地は、最小必須培地（様々なバージョンの改変にて）、ウシ胎仔血清（FBS）、L-グルタミンおよび塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を含む[3, 16-20]。
【００３３】
胎盤関連組織は、羊膜、絨毛膜ディスク（chorionic disk）、絨毛膜および臍帯よりなる群から選ばれてよい。一つの好ましい態様において、胎盤関連組織は臍帯である。
【００３４】
本発明の方法を実施するに際し、胎盤関連組織由来の細胞培養物をCD146によるセルソーティングに供する。セルソーティングは当該技術分野で知られたまたは開発される技術、例えば、抗体ベースまたはヌクレオチドベースの単離方法により行ってよい。好ましくはセルソーティングは抗体ベースの磁気細胞分離により行う。例えば、MACS法（MACS^{R} Technology, Miltenyi Biotec）。加えて、セルソーティングはフローサイトメトリー法、例えば、抗体ベースまたはヌクレオチドベースのフローサイトメトリーにより行ってよい。
【００３５】
さらに、間葉性幹細胞（MSCs）の純度がCD146を発現する細胞のパーセントと正の相関を有することが予期しないことに本発明において見出された。

【００３６】
従って、本発明はさらなる側面において、胎盤関連組織由来の細胞培養物中の間葉性幹細胞（MSCs）の純度を評価する方法を提供する。該方法は、培養物中のCD146を発現する細胞のパーセントを決定する工程を含む。
【００３７】
本発明の好ましい態様において、CD146を発現する細胞のパーセントはフローサイトメトリーにより決定する。
【００３８】
一つの態様において、間葉性幹細胞（MSCs）の純度は下記式によって計算される：
Y = SX + I（式中、Yは間葉性幹細胞（MSCs）の純度（%）、XはCD146を発現する細胞のパーセント、Sは1.129～1.283の範囲の値、およびIは-28.676～-17.964の範囲の値）。
【００３９】
本発明のある態様に従って、本発明の方法によって単離された間葉性幹細胞（MSCs）の集団は、より高い分化能を有する。一つの態様において、間葉性幹細胞（MSCs）の集団はより高い脂肪生成能を有する。
【００４０】
本発明のある態様に従って、本発明の方法によって単離された間葉性幹細胞（MSCs）の集団は、より高い抗炎症作用を奏する。一つの態様において、間葉性幹細胞（MSCs）の集団は、PBMC増殖の阻害においてより高い能力を示す。
【００４１】
本発明のある態様に従って、本発明の方法によって単離された間葉性幹細胞（MSCs）の集団は、より低い程度の老化を有する。ある態様において、間葉性幹細胞（MSCs）の集団は、より低いレベルの細胞ROS、ミトコンドリアROSまたはβ－ガラクトシダーゼを発現する。
【００４２】
本発明のある態様に従って、本発明の方法によって単離された間葉性幹細胞（MSCs）の集団は、より高い量の増殖因子を分泌する。一つの態様において、間葉性幹細胞（MSCs）の集団は、より高い量の肝細胞増殖因子（HGF）を分泌する。
【００４３】
上記の一般的記載および以下の詳細な記載はともに例示的および説明的なものにすぎず、本発明を何ら限定するものでないことが理解されなければならない。

実施例

【００４４】
本発明を以下の実施例によりさらに説明するが、これら実施例は限定ではなく実証の目的のために提供される。
【００４５】
実施例１：間葉性幹細胞（MSCs）と繊維芽細胞との混合集団のフローサイトメトリー分析
CD146が繊維芽細胞から胎盤関連組織由来の間葉性幹細胞（MSCs）を分離するバイオマーカーとして機能しうることを実証するため、臍帯由来の間葉性幹細胞（MSCs）をEppendorf管中で以下の比率（間葉性幹細胞（MSCs）：繊維芽細胞；細胞数にて）で混合した：2x10^5：0、1.8x10^5：2x10^4、1x10^5：1x10^5、2x10^4：1.8x10^5、または0：2x10^5。ついで、各Eppendorf管中のCD146+集団をフローサイトメトリーにより分析した。図１を参照すると、得られた結果は、フローサイトメトリーにより、抗CD146抗体（抗ヒトCD146-V450，BD biosciences)により検出されたCD146+集団のパーセントが繊維芽細胞集団の増加との関連で比例して減少したことを示す。
【００４６】
実施例２：CD146発現レベルは継代数が増えても維持される
臍帯由来の間葉性幹細胞（MSCs）を異なる継代数で回収し（継代数：4，6，8，10および12）、CD146の発現レベルをフローサイトメトリーにより分析した。得られた結果は、CD146の発現レベルが継代の間に維持されることを示す（図２）。

【００４７】

実施例３：間葉性幹細胞（MSCs）の純度の評価

臍帯由来の間葉性幹細胞（MSCs）をEppendorf管中で以下の比率（間葉性幹細胞（MSCs）：繊維芽細胞；細胞数にて）で混合した：$2x10^5$：0、$1.8x10^5$：$2x10^4$、$1x10^5$：$1x10^5$、$2x10^4$：$1.8x10^5$、または0：$2x10^5$。ついで、各Eppendorf管中のCD146+集団をフローサイトメトリーにより分析した。つぎに、間葉性幹細胞（MSCs）の純度（%）とCD146を発現する細胞のパーセントとの関係を単純線形回帰により分析した。その結果を図３に示す。回帰式はY = 1.206X - 3.32（式中、Yは間葉性幹細胞（MSCs）の純度（%）、XはCD146を発現する細胞のパーセント）である。得られた結果は、CD146の発現レベルと間葉性幹細胞（MSCs）の純度との間に直線関係があることを示していた。

【００４８】

実施例４：$CD146^{high}$ MSCsは$CD146^{low}$ MSCsよりも高い分化能を示す

フローサイトメトリーを用い、異なる臍帯由来の間葉性幹細胞（MSCs）をCD146の発現について調べた。２群の間葉性幹細胞（MSCs）を得た：$CD146^{high}$ MSCsおよび$CD146^{low}$ MSCs（図４Ａ）。2×10^5/ウエルのMSCsを12-ウエルプレートに播種し、一夜培養し、ついで脂肪生成添加物（adipogenesis supplement）（InvitroGen）を添加した脂肪細胞分化基礎培地（adipocyte differentiation basal medium）（InvitroGen）で培養した。14日間培養後、２群の間葉性幹細胞（MSCs）をホルマリン固定し、オイルレッドで染色し、顕微鏡下で観察して脂肪細胞の数をカウントした。図４Ｂに示すように、$CD146^{high}$ MSCsはより高い分化能を示した。

【００４９】

実施例５：$CD146^{high}$ MSCsは$CD146^{low}$ MSCsよりも高い抗炎症作用を引き起こす

$CD146^{high}$ MSCsおよび$CD146^{low}$ MSCsを実施例４と同様にして得た。MSCの免疫調節能をPBMC増殖アッセイにより分析した。カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（CFSE）標識したPBMCをフィトヘマグルチニン（PHA）で刺激し、間葉性幹細胞（MSCs）とともに培養した。増殖したPBMCsのパーセントをFACSにより分析した。蛍光細胞透過性染色（fluorescent cell permeable dye）CFSEの強度の低減を評価することにより、PBMCの増殖速度を決定した。得られた結果は、PBMCの増殖の抑制において$CD146^{high}$ MSCsが$CD146^{low}$ MSCsよりも有効であったことを示しており（図５）、$CD146^{high}$ MSCsがより高い抗炎症作用を引き起こすことを示唆した。

【００５０】

実施例６：$CD146^{high}$ MSCsは$CD146^{low}$ MSCsよりも高い量の増殖因子を分泌する

$CD146^{high}$ MSCsおよび$CD146^{low}$ MSCsを実施例４と同様にして得た。両群からのならし培地での肝細胞増殖因子（HGF）レベルをELISAにより分析し、MSC合計タンパク質をBCAアッセイにより分析した。HGFレベルは、MSC合計タンパク質の量に対するHGFの量の比として表す。図６に示すように、$CD146^{high}$ MSCsは$CD146^{low}$ MSCsよりも有意に高い量のHGFを分泌した。

【００５１】

実施例７：$CD146^{high}$ MSCsは$CD146^{low}$ MSCsよりも低い程度の老化を有する

$CD146^{high}$ MSCsおよび$CD146^{low}$ MSCsを実施例４と同様にして得た。より高いレベルの細胞ROS、ミトコンドリアROSおよびβ－ガラクトシダーゼは、老化と関連していると考えられる。本実験では、細胞ROSレベルおよびミトコンドリアROSレベルを市販キット（それぞれ、Sigma のDCFDAおよびInvitrogenのMitoSox）を用いて決定した。老化と関連するβ－ガラクトシダーゼのレベルは、C12FDG（Molecular Probes）を用いて決定した。得られた結果は、細胞ROS、ミトコンドリアROSおよびβ－ガラクトシダーゼのレベルが$CD146^{high}$ MSCsでは$CD146^{low}$ MSCsよりも低かったことを示し（図７）、$CD146^{high}$ MSCsが$CD146^{low}$ MSCsよりも低い程度の老化を有することを示唆した。

【００５２】

上記に記載した態様をその広い発明概念から逸脱することなく変更を加えることができることは当業者には評価されるであろう。それゆえ、本発明は開示した特定の態様に限ら

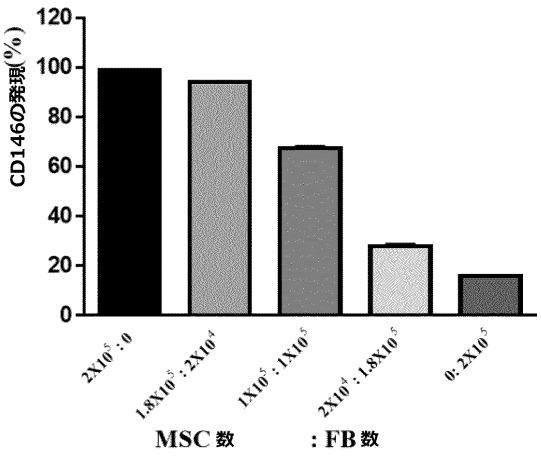
れるものではなく、添付の特許請求の範囲によって定められる本発明の趣旨および範囲内での改変をカバーすることを意図するものである。

【００５３】

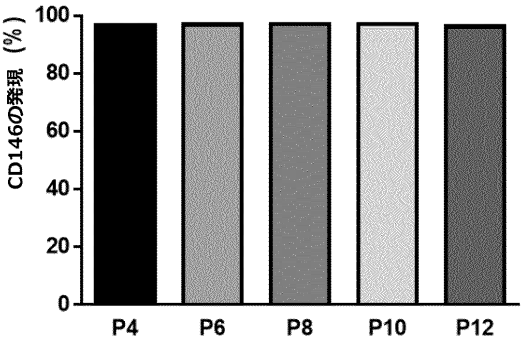
参考文献

[1] Stagg Jら、Curr Mol Med. 13(5):856-67 (2013).
[2] Casado JGら、Stem Cell Rev. 9(2):184-9 (2013).
[3] Fukuchi Yら、Stem Cells. 2004;22(5):649-58.
[4] Javazon EHら、Exp Hematol. 32(5):414-25 (2004).
[5] Nombela-Arrieta Cら、Nat Rev Mol Cell Biol. 12(2):126-31 (2011).
[6] Keating A., Cell Stem Cell. 10(6):709-16 (2012).
[7] Linge Cら、Exp Cell Res 1989, 185:519-528.
[8] Lorenz Kら、Exp Dermatol 2008, 17:925-932.
[9] Blasiら、Vascular Cell 2011, 3:5.
[10] Covasaら、Volume 36, Issue 5, Pages 642-654 (2008).
[11] Muzlifah A. Haniffaら、Haematologica 94:258-263 (2009).
[12] Pittengerら、Science Vol. 284 no. 5411 pp. 143-147(1999).
[13] Lv F.J.ら、Stem Cells. 2014;32(6):1408-19.
[14] Dmitrieva R.I.ら、Cell Cycle. 2012;11(2):377-83.
[15] Halfon S.ら、Stem Cells Dev. 2011;20(1):53-66.
[16] Miao Zら、Cell Biol Int. 2006 Sep;30(9):681-7.
[17] Malek Aら、J Stem Cells. 2011;6(2):75-92.
[18] Cavallo Cら、J Cell Biochem. 2011 May;112(5):1418-30. doi: 10.1002/jcb.23058.
[19] Shalini Vellasamyら、World J Stem Cells. Jun 26, 2012; 4(6): 53-61.
[20] Luan Xら、Tissue Cell. 2013 Feb;45(1):32-8. doi: 10.1016/j.tice.2012.09.002. Epub 2012 Oct 27.
[21] Shenら、Taiwan J Obstet Gynecol. 2015 Dec;54(6):749-56. doi: 10.1016/j.tjog.2015.10.012.

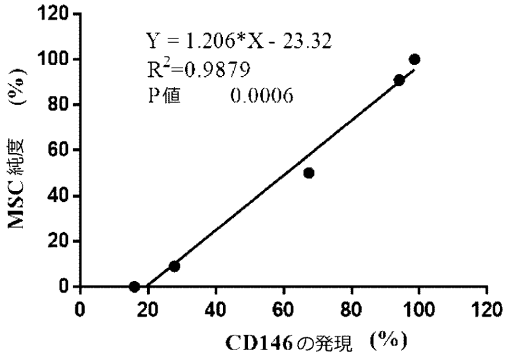
【図１】



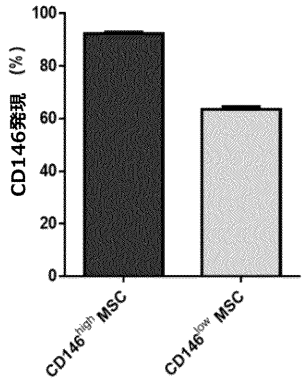
【図２】



【図３】



【図４Ａ】

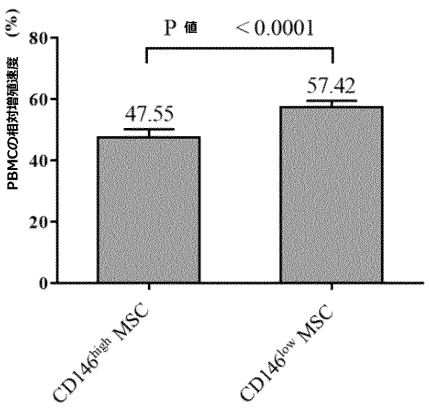


【図４Ｂ】

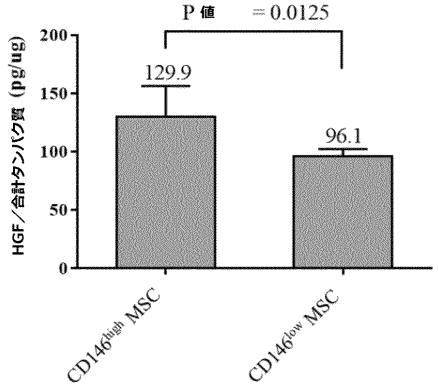
脂肪細胞数					
MSCタイプ	フィールド1	フィールド2	フィールド3	フィールド4	平均
CD146^{high} MSC	46	65	37	23	43
CD146^{low} MSC	5	3	6	6	5

フィールド当たりの平均 *MSC* 細胞数：*140.*

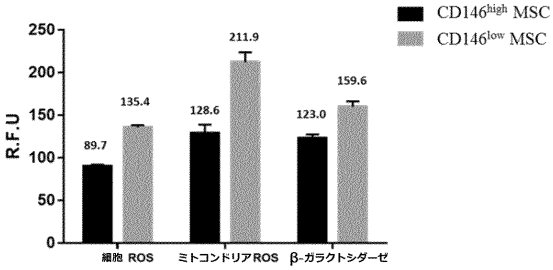
【図５】



【図６】


P 値 = 0.0125
HGF／合計タンパク質 (pg/ug)
200
150
100
50
0
129.9
96.1
CD146high MSC
CD146low MSC

【図７】


CD146high MSC
CD146low MSC
R.F.U
250
200
150
100
50
0
89.7
135.4
128.6
211.9
123.0
159.6
細胞 ROS
ミトコンドリアROS
β-ガラクトシダーゼ

フロントページの続き

(72)発明者 シュアン・チャン－ヨウ
台湾１１４タイペイ・シティ、ネイフー・ディストリクト、ネイフー・ロード、セクション１、ナンバー６８、７フロア
(72)発明者 リン・ウィリー
台湾１１４タイペイ・シティ、ネイフー・ディストリクト、ネイフー・ロード、セクション１、ナンバー６８、７フロア
(72)発明者 スー・ユー－チン
台湾１１４タイペイ・シティ、ネイフー・ディストリクト、ネイフー・ロード、セクション１、ナンバー６８、７フロア
(72)発明者 リウ・ウェイ－ティン
台湾１１４タイペイ・シティ、ネイフー・ディストリクト、ネイフー・ロード、セクション１、ナンバー６８、７フロア
(72)発明者 リィ・モン－ウェイ
台湾１１４タイペイ・シティ、ネイフー・ディストリクト、ネイフー・ロード、セクション１、ナンバー６８、７フロア
(72)発明者 ドゥ・マオ－クアン
台湾１１４タイペイ・シティ、ネイフー・ディストリクト、ネイフー・ロード、セクション１、ナンバー６８、７フロア

Ｆターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ02 QS32
4B065 AA90X BA25 CA44 CA60

【外国語明細書】

TITLE OF THE INVENTION

METHOD OF DISTINGUISHING MESENCHYMAL STEM CELLS AND METHOD OF DETERMINING PURITY OF MESENCHYMAL STEM CELLS

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention pertains to a method of distinguishing mesenchymal stem cells (MSCs) in a cell culture derived from a placenta-related tissue. The present invention also relates to a method of increasing the purity of MSC population in a cell culture derived from a placenta-related tissue. In another aspect, the invention pertains to a method of assessing purity of MSCs in a cell culture derived from a placenta-related tissue

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Mesenchymal stem or stromal cells (MSCs) are multipotent cells of embryonic mesodermal origin, with a fibroblast-like morphology. These cells can differentiate into adipocytes, osteocytes, chondrocytes, neural lineage cells, and myocytes among other cell types depending on the stimuli and culture conditions. Although the plasticity of hMSCs and their role in tissue repair and regeneration have been extensively studied, it is their immunological trophic property that has gained the most interest recently [1-2]. Human mesenchymal stem cells have been isolated from a variety of tissues. The most frequently used source of MSCs is the bone marrow (BM). However, the isolation procedure is extremely invasive. To avoid the invasive isolation procedures, tissues such as human umbilical cord and placenta have been considered as good candidates since they are normally discarded after labor. The isolation of hMSCs from umbilical cord or placenta has proven to be efficient by previous studies [3].

[0003] MSCs are a subpopulation of a more complex cell composition of stromal cells contained in mesenchymal tissue. Due to the heterogeneous nature and the absence of known biomarkers specific for mesenchymal stem cells, it is a challenging task to define MSC phenotypes and characteristics [4-6]. The molecular components responsible for MSCs functionalities, in particular, those on the plasma membrane, remain largely unknown. In addition, lack of specific cell surface markers renders the cell culture at potential contamination risk with other cell types, in particular, those mature stromal cells such as fibroblasts, which, conversely, are abundant in mesenchymal tissue [4-6]. In the process of isolation of MSCs from placenta-derived tissues, non-MSCs, including fibroblasts, placenta-derived epithelial cells, and placenta-derived reticular cells, often co-exist with MSCs during the in vitro cultivation. In particular, fibroblast is the main source of contamination.

[0004] Fibroblasts are considered mature mesenchymal cells that are particularly abundant in the connective tissue. Therefore, these cells are the most frequent contaminating cell phenotype present in many cell culture systems. Not only is it difficult to apply techniques which successfully eliminate fibroblasts from a culture, it is also particularly complex to distinguish MSCs from fibroblasts in the same culture. Fibroblasts and MSCs have an extremely similar morphological appearance; they both proliferate well and share many identical cell surface markers [7-8]. MSC are currently defined as plastic adherent, multipotent fibroblast-like cells expressing CD73, CD90, CD105 and negative for the hematopoietic markers CD14, CD34 and CD45 by the International Society of Cellular Therapy (ISCT). However, these properties and markers are also shared by fibroblasts. The current definition suggested by ISCT is thus incapable of distinguishing MSC from generic fibroblasts. Until now, the best way to distinguish MSCs from fibroblasts is based on the analysis of the functional properties of these two kinds of cells; MSCs retain multipotent stemness and immunomodulation capacity, while fibroblasts seem more limited in both of these functional properties.

[0005] Since Friedenstein's pioneering work in identification of MSCs [48], there are no distinct differences in culture-derivation methodology, morphology, and gene expression signature that consistently and unequivocally distinguish ex vivo culture-expanded MSC from fibroblasts [9-12]. Presently, there is no accepted criterion or single cell-surface marker for separating the MSCs from fibroblasts. Due to the fact that fibroblast is the common contaminant cell population in MSC culture when derived from placenta, a novel surface protein as a biomarker to distinguish MSCs from fibroblasts is crucial to ensure the homogeneity of primary culture of placenta-derived MSCs.

[0006] CD146 (melanoma cell adhesion molecule, MCAM), a surface marker of vascular endothelial cells, functions by facilitating cell-cell interactions and angiogenesis. Recent research reveals that some MSCs express CD146 [13-14, 16], and the expression levels of CD146 are associated with their abilities of self-renewal, or abilities of differentiation into adipocytes and osteogenesis [13, 15]. Further, MSCs isolated from different tissues show different CD146 expression levels: about 40% of MSCs isolated from bone marrow express CD146, and its expression levels decrease as the passage number increases [13-15], while only less than 10% of MSCs isolated from adipose tissues express CD146 [14].

[0007] US Patent No. 9,470,685 discloses a method of distinguishing MSCs from fibroblasts using a marker EphA2 expressed on the MSCs.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0008] It was unexpectedly found in the present invention that mesenchymal stem cells (MSCs) can be distinguished in a cell culture derived from a placenta-related tissue, based on their expression levels of a specific surface marker, CD146 (melanoma cell adhesion molecule, MCAM).

[0009] Accordingly, in one aspect, the present invention features a method of distinguishing mesenchymal stem cells (MSCs) from fibroblasts, comprising isolating the MSCs from the fibroblasts using a marker CD146 expressed on the MSCs so as to distinguish the MSCs from the fibroblasts, wherein the MSCs and fibroblasts are from a cell culture derived from a placenta-related tissue.

[0010] In certain embodiments of the present invention, the method further comprises the preliminary steps of: collecting the MSCs and the fibroblasts from the placenta-related tissue; and culturing the MSCs and the fibroblasts in a culture medium to prepare the cell culture.

[0011] In another aspect, the present invention provides a method of increasing a purity of mesenchymal stem cells (MSCs) population in a cell culture, comprising isolating and collecting MSCs using a marker CD146 expressed on the MSCs, wherein the MSCs are from a cell culture derived from a placenta-related tissue; and culturing the MSCs.

[0012] According to the present invention, the placenta-related tissue may be selected from the group consisting of amniotic membrane, chorionic disk, chorionic membrane, and umbilical cord. In one preferred embodiment, the placenta-related tissue is umbilical cord.

[0013] According to the present invention, the sorting step may be performed using a technique known or to be developed in the art, for example, an antibody-based or a nucleotide-based isolation method.

[0014] In certain embodiments of the present invention, the cells derived from a placenta-related tissue are cultured in a culture medium for MSC.

[0015] In a further aspect, the present invention provides a method of assessing purity of mesenchymal stem cells (MSCs) in a cell culture derived from a placenta-related tissue. Said method comprises the step of determining the percentage of cells expressing CD146 in the culture.

[0016] According to the present invention, the purity of MSCs has a positive correlation with the percentage of cells expressing CD146. In preferred embodiments of the present invention, the percentage of cells expressing CD146 is determined by a flow cytometry. In one embodiment, the purity of MSCs is calculated by the following equation: $Y = SX + I$, where Y is the purity (%) of MSCs, X is the percentage of cells expressing CD146, S is a value ranging from1.129 to 1.283, and I is a value ranging from –28.676 to –17.964.

[0017] It is to be understood that both the foregoing general description and the following detailed description are exemplary and explanatory only and are not restrictive of the invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE SEVERAL VIEWS OF THE DRAWINGS

[0018] The foregoing summary, as well as the following detailed description of the invention, will be better understood when read in conjunction with the appended drawings. For the purpose of illustrating the invention, there are shown in the drawings embodiments which are presently preferred.

[0019] In the drawings:

[0020] **Fig. 1** shows the results of flow cytometry analysis of mixed populations of MSCs and fibroblasts. MSCs derived from the umbilical cord from a donor were mixed with fibroblasts in different ratios. The results demonstrated that the percentage of CD146+ population detected by flow cytometry decreased proportionally in response to the increased fibroblast population. FB= fibroblasts.

[0021] **Fig. 2** shows the results of flow cytometry analysis on CD146 expression of MSCs derived from umbilical cord at different passage numbers.

[0022] **Fig. 3** shows the linear regression between the purity (%) of MSCs and the percentage of cells expressing CD146 in a cell culture derived from a placenta-related tissue.

[0023] **Fig. 4A** shows the CD146 expression level of $CD146^{high}$ MSCs and $CD146^{low}$ MSCs. **Fig. 4B** shows the results of adipogenesis differentiation from $CD146^{high}$ MSCs and $CD146^{low}$ MSCs.

[0024] **Fig. 5** shows the results of PBMC proliferation assay.

[0025] **Fig. 6** shows the levels of hepatocyte growth factor (HGF) in conditioned medium of $CD146^{high}$ MSCs and $CD146^{low}$ MSCs.

[0026] **Fig. 7** shows the relative levels of cellular ROS, mitochondrial ROS and β-galactosidase (a senescence marker) in $CD146^{high}$ MSCs and $CD146^{low}$ MSCs.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0027] The present invention is based on the unexpected finding that through a cell sorting by surface marker CD146, mesenchymal stem cells (MSCs) can be distinguished in a cell culture derived from a placenta-related tissue.

[0028] In one aspect, the present invention provides a method of distinguishing mesenchymal stem cells (MSCs) from fibroblasts. The method comprises isolating the MSCs from the fibroblasts using a marker CD146 expressed on the MSCs so as to distinguish the MSCs from the fibroblasts, wherein the MSCs and fibroblasts are from a cell culture derived from a placenta-related tissue.

[0029] In certain embodiments of the present invention, the method further comprises the preliminary steps of: collecting the MSCs and the fibroblasts from the placenta-related tissue; and culturing the MSCs and the fibroblasts in a culture medium to prepare the cell culture.

[0030] In another aspect, the present invention provides a method of increasing a purity of mesenchymal stem cells (MSCs) population in a cell culture, comprising isolating and collecting MSCs using a marker CD146 expressed on the MSCs, wherein the MSCs are from a cell culture derived from a placenta-related tissue; and culturing the MSCs.

[0031] In a still further aspect, the present invention provides a method of isolating a population of mesenchymal stem cells (MSCs), comprising isolating and collecting MSCs using a marker CD146 expressed on the MSCs, wherein the MSCs are from a cell culture derived from a placenta-related tissue, and the population of MSCs has a higher differentiation ability, elicits higher anti-inflammatory effects, has a lower degree of senescence, and/or secretes a higher amount of growth factors.

[0032] According to the present invention, the cells are freshly derived, obtained or collected from a placenta-related tissue following a protocol known in the art, for example, that of Shen *et al.* [21]. In certain preferred embodiments, the cells derived from a placenta-related tissue are then cultured in a culture medium for MSC. A standard medium for MSC comprises α minimal essential medium (with different versions of modification), fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, and basic fibroblast growth factor (bFGF) [3, 16-20].

[0033] The placenta-related tissue may be selected from the group consisting of amniotic membrane, chorionic disk, chorionic membrane, and umbilical cord. In one preferred embodiment of the present invention, the placenta-related tissue is umbilical cord.

[0034] In carrying out the methods of the present invention, a cell culture derived from a placenta-related tissue is subjected to a cell sorting by CD146. The cell sorting may be performed through a technique known or to be developed in the art, for example, an antibody-based or a nucleotide-based isolation method. Preferably, the cell sorting is performed by an antibody-based magnetic cell sorting. For example, the MACS method (MACS® Technology, Miltenyi Biotec). In addition, the cell sorting may be preform through a flow cytometry method, e.g. an antibody-based or a nucleotide-based flow cytometry.

[0035] Further, it was unexpected found in the present invention that the purity of MSCs has a positive correlation with the percentage of cells expressing CD146.

[0036] Accordingly, the present invention in a further aspect provides a method of assessing purity of mesenchymal stem cells (MSCs) in a cell culture derived from a placenta-related tissue.

Said method comprises the step of determining the percentage of cells expressing CD146 in the culture.

[0037] In preferred embodiments of the present invention, the percentage of cells expressing CD146 is determined by a flow cytometry.

[0038] In one embodiment, the purity of MSCs is calculated by the following equation: $Y = SX + I$, where Y is the purity (%) of MSCs, X is the percentage of cells expressing CD146, S is a value ranging from 1.129 to 1.283, and I is a value ranging from −28.676 to −17.964.

[0039] According to certain embodiments of the present invention, the population of MSCs isolated by a method of the present invention has a higher differentiation ability. In one embodiment, the population of MSCs has a higher adipogenesis ability.

[0040] According to certain embodiments of the present invention, the population of MSCs isolated by a method of the present invention elicits higher anti-inflammatory effects. In one embodiment, the population of MSCs exhibits a higher ability in inhibiting PBMC proliferation.

[0041] According to certain embodiments of the present invention, the population of MSCs isolated by a method of the present invention has a lower degree of senescence. In some embodiments, the population of MSCs expresses a lower level of cellular ROS, mitochondrial ROS, or beta-galactosidase.

[0042] According to certain embodiments of the present invention, the population of MSCs isolated by a method of the present invention secretes a higher amount of growth factors. In one embodiment, the population of MSCs secretes a higher amount of a hepatocyte growth factor (HGF).

[0043] It is to be understood that both the foregoing general description and the following detailed description are exemplary and explanatory only and are not restrictive of the invention.

[0044] The present invention is further illustrated by the following examples, which are provided for the purpose of demonstration rather than limitation.

[0045] **Examples**

[0046] **Example 1: Flow cytometry analysis of mixed populations of MSCs and fibroblast**

[0047] To demonstrate that CD146 could serve as a biomarker to separate placenta-derived MSCs from fibroblasts, MSCs derived from umbilical cord were mixed with fibroblasts in Eppendorf tubes by following ratios (MSC: fibroblasts in cell number): $2x10^5$: 0, $1.8x10^5$: $2x10^4$, $1x10^5$: $1x10^5$, $2x10^4$: $1.8x10^5$, or 0 : $2x10^5$. CD146+ population in each Eppendorf tube was then analyzed by flow cytometry. Referring to **Fig. 1**, the results shows that the percentage of CD146+ population detected by anti-CD146 antibodies (anti-human CD146-V450, BD

biosciences) via flow cytometry decreased proportionally in relation to the increase of fibroblast population.

[0048] Example 2: CD146 expression levels are maintained as the passage number increases

[0049] MSCs derived from umbilical cord were harvested at different passage numbers (passage numbers: 4, 6, 8, 10, and 12) and the expression levels of CD146 were analyzed by flow cytometry. The results show that CD146 expression levels are maintained along passages (**Fig. 2**).

[0050] Example 3: Assessment of purity of MSCs

[0051] MSCs derived from umbilical cord were mixed with fibroblasts in Eppendorf tubes by following ratios (MSC: fibroblasts in cell number): $2x10^5$: 0, $1.8x10^5$: $2x10^4$, $1x10^5$: $1x10^5$, $2x10^4$: $1.8x10^5$, or 0 : $2x10^5$. CD146+ population in each Eppendorf tube was then analyzed by flow cytometry. Subsequently, the relationship between the purity (%) of MSCs and the percentage of cells expressing CD146 was analyzed by simple linear regression, results of which are shown in **Fig. 3**. The regression equation is $Y = 1.206X - 23.32$, where Y is the purity (%) of MSCs and X is the percentage of cells expressing CD146. The results demonstrated that there is a linear relationship between the expression level of CD146 and the purity of MSCs.

[0052] Example 4: $CD146^{high}$ MSCs exhibits higher differentiation ability than $CD146^{low}$ MSCs

[0053] MSCs derived from different umbilical cords were examined for expression of CD146 using flow cytometry. Two groups of MSCs were obtained: $CD146^{high}$ MSCs and $CD146^{low}$ MSCs (**Fig. 4A**). 2 x 10^5/well MSCs were seeded into 12-well plate, cultured overnight, and then cultured in adipocyte differentiation basal medium (InvitroGen) supplemented with adipogenesis supplement (InvitroGen). After culture for 14 days, the two groups of MSCs were fixed formalin, stained with Oil Red, and observed under a microscope to count the number of adipocytes. As shown in **Fig. 4B**, $CD146^{high}$ MSCs exhibited higher adipogenesis ability.

[0054] Example 5: $CD146^{high}$ MSCs elicits higher anti-inflammatory effects than $CD146^{low}$ MSCs

[0055] $CD146^{high}$ MSCs and $CD146^{low}$ MSCs were obtained as described in Example 4. The immune modulation capability of MSC was analyzed by PBMC proliferation assay. Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labeled PBMC is stimulated by phytohemagglutinin (PHA) and co-cultured with MSCs. The percentage of proliferated PBMCs was analyzed by FACS. The proliferation rate of PBMC was determined by assessing the reduction of the intensity of the fluorescent cell permeable dye CFSE. The results show that $CD146^{high}$ MSCs were more effective

in inhibiting PBMC proliferation than $CD146^{low}$ MSCs (**Fig. 5**), suggesting that $CD146^{high}$ MSCs elicit higher anti-inflammatory effects.

[0056] Example 6: $CD146^{high}$ MSCs secretes a higher amount of growth factors than $CD146^{low}$ MSCs

[0057] $CD146^{high}$ MSCs and $CD146^{low}$ MSCs were obtained as described in Example 4. Hepatocyte growth factor (HGF) level in conditioned medium from both groups was analyzed by ELISA and MSC total protein was analyzed by BCA assay. HGF level is expressed as a ratio of HGF amount to MSC total protein amount. As shown in **Fig. 6**, $CD146^{high}$ MSCs secreted a significantly higher amount of HGF than $CD146^{low}$ MSCs.

[0058] Example 7: $CD146^{high}$ MSCs have a lower degree of senescence than $CD146^{low}$ MSCs

[0059] $CD146^{high}$ MSCs and $CD146^{low}$ MSCs were obtained as described in Example 4. Higher levels of cellular ROS, mitochondrial ROS and beta-galactosidase are considered to be related to senescence. In the present experiment, cellular ROS level and mitochondrial ROS level were determined using commercial kits (DCFDA of Sigma, and MitoSox of Invitrogen, respectively). The level of senescence-associated beta-galactosidase was determined using C12FDG (Molecular Probes). The results show that the levels of cellular ROS, mitochondrial ROS and beta-galactosidase in $CD146^{high}$ MSCs were lower than in $CD146^{low}$ MSCs (**Fig. 7**), suggesting that $CD146^{high}$ MSCs have a lower degree of senescence than $CD146^{low}$ MSCs.

[0060] It will be appreciated by those skilled in the art that changes could be made to the embodiments described above without departing from the broad inventive concept thereof. It is understood, therefore, that this invention is not limited to the particular embodiments disclosed, but it is intended to cover modifications within the spirit and scope of the present invention as defined by the appended claims.

[0061] References:

[1] Stagg J et al., Curr Mol Med. 13(5):856-67 (2013).

[2] Casado JG et al., Stem Cell Rev. 9(2):184-9 (2013).

[3] Fukuchi Y et al., Stem Cells. 2004;22(5):649-58.

[4] Javazon EH et al., *Exp Hematol.* 32(5):414-25 (2004).

[5] Nombela-Arrieta C et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 12(2):126-31 (2011).

[6] Keating A., *Cell Stem Cell.* 10(6):709-16 (2012).

[7] Linge C et al., Exp Cell Res 1989, 185:519-528.

[8] Lorenz K et al., Exp Dermatol 2008, 17:925-932.

[9] Blasi *et al.*, Vascular Cell 2011, 3:5.

[10] Covasa *et al.*, Volume 36, Issue 5, Pages 642–654 (2008).

[11] Muzlifah A. Haniffa et al., Haematologica 94:258-263 (2009).

[12] Pittenger *et al.*, Science Vol. 284 no. 5411 pp. 143-147(1999).

[13] Lv F.J. et al., Stem Cells. 2014;32(6):1408-19.

[14] Dmitrieva R.I.et al., Cell Cycle. 2012;11(2):377-83.

[15] Halfon S. et al., Stem Cells Dev. 2011;20(1):53-66.

[16] Miao Z *et al.*, Cell Biol Int. 2006 Sep;30(9):681-7.

[17] Malek A et al., J Stem Cells. 2011;6(2):75-92.

[18] Cavallo C *et al.*, J Cell Biochem. 2011 May;112(5):1418-30. doi: 10.1002/jcb.23058.

[19] Shalini Vellasamy *et al.*, World J Stem Cells. Jun 26, 2012; 4(6): 53–61.

[20] Luan X *et al.*, Tissue Cell. 2013 Feb;45(1):32-8. doi: 10.1016/j.tice.2012.09.002. Epub 2012 Oct 27.

[21] Shen et al., Taiwan J Obstet Gynecol. 2015 Dec;54(6):749-56. doi: 10.1016/j.tjog.2015.10.012.

CLAIMS

What is claimed is:

1. A method of distinguishing mesenchymal stem cells (MSCs) from fibroblasts, comprising:

isolating the MSCs from the fibroblasts using a marker CD146 expressed on the MSCs so as to distinguish the MSCs from the fibroblasts,

wherein the MSCs and fibroblasts are from a cell culture derived from a placenta-related tissue.

2. The method of claim 1, wherein the placenta-related tissue is selected from the group consisting of amniotic membrane, chorionic disk, chorionic membrane, and umbilical cord.

3. The method of claim 2, wherein the placenta-related tissue is umbilical cord.

4. The method of claim 1, wherein the isolating step is performed through an antibody-based or a nucleotide-based isolation method.

5. The method of claim 1, further comprising the preliminary steps of:

collecting the MSCs and the fibroblasts from the placenta-related tissue; and

culturing the MSCs and the fibroblasts in a culture medium to prepare the cell culture.

6. The method of claim 4, wherein the antibody-based isolation method is an antibody-based magnetic cell sorting or an antibody-based flow cytometry.

7. The method of claim 4, wherein the nucleotide-based isolation method is a nucleotide-based flow cytometry.

8. A method of increasing a purity of mesenchymal stem cells (MSCs) population in a cell culture, comprising:

isolating and collecting MSCs using a marker CD146 expressed on the MSCs, wherein the MSCs are from a cell culture derived from a placenta-related tissue; and

culturing the MSCs.

9. The method of claim 8, wherein the placenta-related tissue is selected from the group consisting of amniotic membrane, chorionic disk, chorionic membrane, and umbilical cord.

10. The method of claim 8, wherein the isolating step is performed through an antibody-based or a nucleotide-based isolation method.

11. The method of claim 8, wherein the cells derived from a placenta-related tissue are cultured in a culture medium for MSC.

12. The method of claim 10, wherein the antibody-based isolation method is an antibody-based magnetic cell sorting or an antibody-based flow cytometry.

13. The method of claim 10, wherein the nucleotide-based isolation method is a nucleotide-based flow cytometry.

14. A method of assessing a purity of mesenchymal stem cells (MSCs) in a cell culture derived from a placenta-related tissue, comprising determining the percentage of cells expressing CD146 in the culture.

15. The method of claim 14, wherein the percentage of cells expressing CD146 is determined by a flow cytometry.

16. The method of claim 14, wherein the purity of MSCs has a positive correlation with the percentage of cells expressing CD146.

17. The method of claim 14, wherein the purity of MSCs is calculated by the equation shown below:

$Y = SX + I$, where Y is the purity (%) of MSCs, X is the percentage of cells expressing CD146, S is a value ranging from 1.129 to 1.283, and I is a value ranging from –28.676 to –17.964.

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

A method of distinguishing mesenchymal stem cells (MSCs) from fibroblasts is provided. Also provided is a method of increasing a purity of mesenchymal stem cells (MSCs) population in a cell culture. The above-mentioned methods each comprise a step of sorting or isolating the cells by a marker of CD146 from a cell culture derived from a placenta-related tissue. Further provided is a method of assessing purity of mesenchymal stem cells (MSCs) in a cell culture derived from a placenta-related tissue, comprising determining the percentage of cells expressing CD146 in the culture.

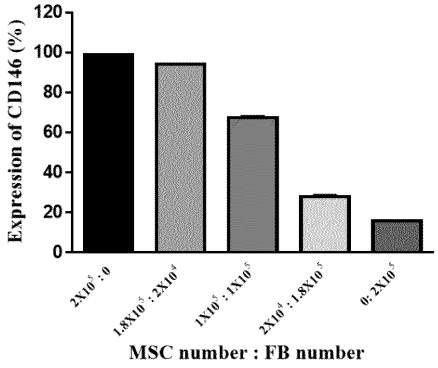


Fig. 1

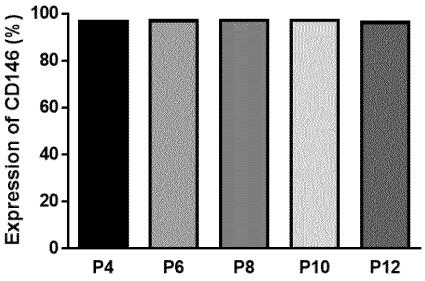


Fig. 2

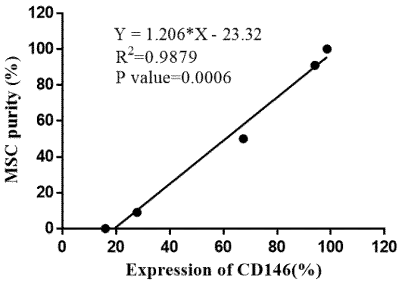


Fig. 3

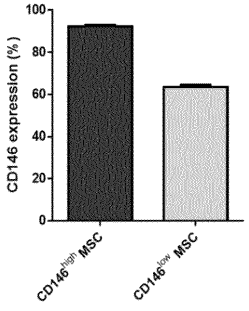


Fig. 4A

Adipocyte numbers					
MSC type	field 1	field 2	field 3	field 4	Average
$CD146^{high}$ MSC	46	65	37	23	43
$CD146^{low}$ MSC	5	3	6	6	5

Average MSC cell number per field : 140.

Fig. 4B

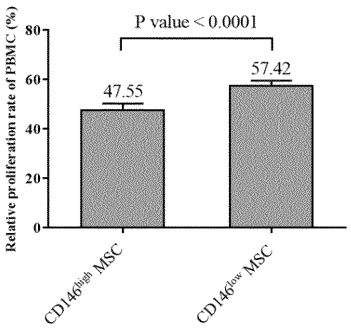


Fig. 5

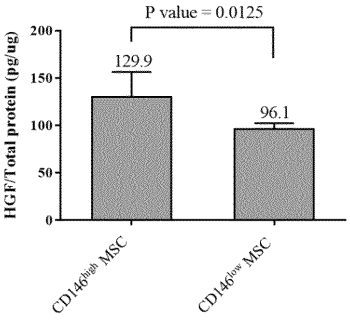


Fig. 6

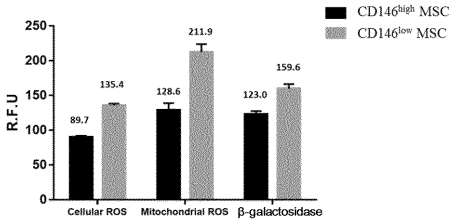


Fig. 7