

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年10月21日(21.10.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/119828 A1

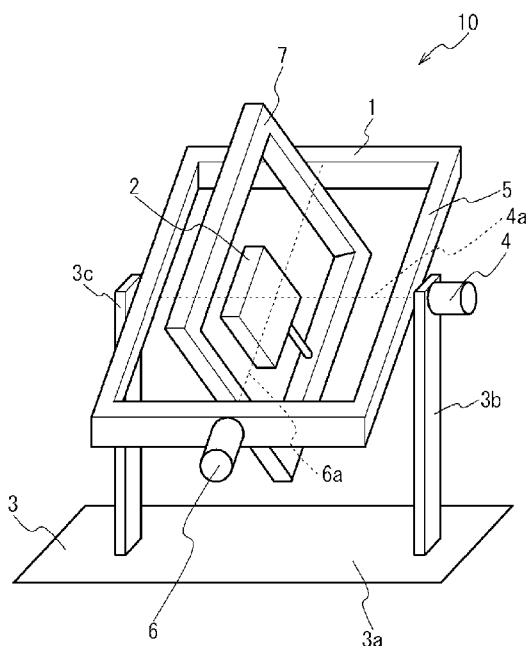
- (51) 国際特許分類:
C12N 5/0775 (2010.01) C12N 5/077 (2010.01)
A61K 35/28 (2006.01) C12M 1/10 (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 落合 俊昌
(OCHIAI Toshimasa) [JP/JP]; 〒6528585 兵庫県神戸市兵庫区和田崎町一丁目1番1号 三菱重工業株式会社神戸造船所内 Hyogo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/056503
- (22) 国際出願日: 2010年4月12日(12.04.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-097509 2009年4月13日(13.04.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱重工業株式会社(MITSUBISHI HEAVY INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒1088215 東京都港区港南二丁目16番5号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (71) 出願人: 弓削 類(YUGE Louis) [JP/JP]; 〒7300052 広島県広島市中区千田町一丁目10番1-1401号 Hiroshima (JP). 河原 裕美(KAWAHARA Yumi) [JP/JP]; 〒7391732 広島県広島市安佐北区落合南四丁目4番13号 Hiroshima (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR CULTURING BONE MARROW STROMAL CELLS AND MESENCHYMAL STEM CELLS, AND METHOD FOR PRODUCING GRAFT CELLS FOR TREATING CENTRAL NEUROLOGICAL DISEASE

(54) 発明の名称: 骨髄間質細胞及び間葉系幹細胞の培養方法、中枢神経系疾患治療用の移植細胞の製造方法

[図1]



(57) Abstract: Disclosed is a culture method whereby bone marrow stromal cells or mesenchymal stem cells are cultured in a pseudo-microgravity environment, which has been obtained by multi-axis rotation, to give bone marrow stromal cells or mesenchymal stem cells having a smaller average cell size than the average cell size of the cells before the culture. The bone marrow stromal cells or mesenchymal stem cells having been cultured by the aforesaid culture method are suitable as graft cells for treating a central neurological disease.

(57) 要約: 本発明の培養方法は、多軸回転によって生成した模擬微小重力環境下で骨髄間質細胞又は間葉系幹細胞を培養して培養前よりも平均の細胞サイズが小さい骨髄間質細胞又は間葉系幹細胞を得る。このような培養方法で培養した骨髄間質細胞又は間葉系幹細胞は、中枢神経疾患治療用の移植細胞として好適である。

WO 2010/119828 A1

(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

骨髄間質細胞及び間葉系幹細胞の培養方法、中枢神経系疾患治療用の移植細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、骨髄間質細胞の培養方法、間葉系幹細胞の培養方法、中枢神経系疾患治療用の移植細胞の製造方法に関する。

背景技術

[0002] これまで中枢神経系疾患は、神経再生ができず治療が困難とされてきたが、近年、新しい治療法としての再生医療に期待が寄せられている。この再生医療としては、従来、胚性幹細胞や胎児脳から得られた神経幹細胞を脳内に移植する方法が検討されてきたが、免疫拒絶、細胞供給の限界、倫理上の問題などが取り上げられている。

[0003] このような問題を解決する治療法の一つとして、骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cells: BMSCs)、或いは、骨髄間質細胞を精製して得られる間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells; MSCs) を移植することが提案されている。例えば、ラット脳梗塞モデルに対し、BMSCsの脳内移植治療が有効であったことが2000年にChenらにより報告され (非特許文献1)、以来、BMSCsは、中枢神経系疾患における細胞治療の候補の一つと挙げられるようになった。BMSCsは採取が容易で、自家移植が可能であるため免疫拒絶の危険性が低く、倫理的問題が少ない。

[0004] 更に、BMSCsを静脈経由で細胞移植することも検討されている。薬剤投与と同様な点滴静脈注射により行われる静脈経由での細胞移植は、非浸襲的で安全性が高いと考えられている。静脈経由での細胞移植による治療効果は、例えば、下記の非特許文献2～6に報告されており、実用化に近いと考えられている。Bang et al.によれば、既に、中大脳動脈閉塞患者にBMSCsを静脈内自家移植した臨床試験が行われ、脳萎縮を減少させ、機能的な改

善効果が見られたと報告されている（非特許文献6）。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1 : J. Chen et al, "Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat", Neuropharmacology, 39, (2000) pp. 711-716.

非特許文献2 : O. Y. Bang et al. "Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients", Ann. Neurol., 57, (2005) pp. 874-882.

非特許文献3 : J. Chen et al., "Therapeutic Benefit of Intravenous Administration of Bone Marrow Stromal Cells After Cerebral Ischemia in Rats", Stroke, 32, (2001) pp. 1005-1011.

非特許文献4 : T. Honma et al. "Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat", Exp. Neurol., 199, (2006) pp. 56-66.

非特許文献5 : D. Lu et al. "Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome", Neuroreport, 12, (2001) pp. 559-563.

非特許文献6 : T. Okazaki et al. "Intravenous administration of bone marrow stromal cells increases survivin and Bcl-2 protein expression and improves sensorimotor function following ischemia in rats", Neurosci. Lett., 430, (2008) pp. 109-114.

発明の概要

[0006] BMSCs 又は MSCs を静脈経路で細胞移植する場合、まず、BMSCs 又は MSCs を体外で未分化の状態増殖培養する必要がある。本願の発明者は、増殖培養の際に培養細胞のサイズを小さくすることができれば、血流により末梢血管まで移植細胞が行き渡らせることができるのではないかと考えた。末梢血管まで移植細胞が行き渡らせることができれば、静脈経路で

の細胞移植の際に生着率を向上させることができ、治療効果が増大すると考えられる。

[0007] そして、発明者は、試行錯誤により、BMSCs あるいはMSCs を、細胞のサイズを抑制しながら体外で未分化の状態を増殖培養する方法を見出した。

[0008] したがって、本発明の目的は、骨髄間質細胞（BMSCs）あるいは間葉系幹細胞（MSCs）を細胞のサイズを抑制しながら体外で未分化の状態を増殖培養する技術を提供することにある。

[0009] 本発明の一の観点においては、骨髄間質細胞の培養方法が、多軸回転によって生成した模擬微小重力環境下で骨髄間質細胞を培養して培養前よりも平均の細胞サイズが小さい骨髄間質細胞を得ることを含む。

[0010] 一実施形態では、前記骨髄間質細胞がマウス骨髄間質細胞であることが可能であり、他の実施形態では、前記骨髄間質細胞がラット骨髄間質細胞であることが可能である。

[0011] 本発明の他の観点においては、ヒト間葉系幹細胞の培養方法が、多軸回転によって生成した模擬微小重力環境下でヒト間葉系幹細胞を培養して培養前よりも平均の細胞サイズが小さいヒト間葉系幹細胞を得ることを含む。

[0012] 本発明の更に他の観点においては、中枢神経疾患治療用の移植細胞の製造方法が、多軸回転によって生成した模擬微小重力環境下で骨髄間質細胞を培養して培養前よりも平均の細胞サイズが小さい骨髄間質細胞を移植細胞として得ることを含む。

[0013] 本発明によれば、細胞サイズを抑制しながら骨髄間質細胞（BMSCs）あるいは間葉系幹細胞（MSCs）を未分化の状態を増殖培養することができる。また、本発明によれば、中枢神経疾患治療用に適した移植細胞を製造することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]本発明の一実施形態における3D-クリノスタットの構成の一例を示す図である。

[図2] PCRに使用したプライマーの塩基配列とPCR条件を示す表である。

[図3] Day 0、Day 7、Day 14におけるマウスBMSCsの位相差顕微鏡像である。

[図4] 培養されたマウスBMSCsの細胞サイズの変化を示すグラフである。

[図5A] Day 0、Day 7、Day 14におけるマウスBMSCsのmRNAの発現を示す像である。

[図5B] Day 0、Day 7、Day 14におけるマウスBMSCsの免疫染色像である。

[図6A] BMSCsを移植したマウスのBeam Walking試験の結果を示すグラフである。

[図6B] BMSCsを移植したマウスのRotarod試験の結果を示すグラフである。

[図7A] マウスBMSCsを移植したときのNF-Hで染色した脳組織の免疫染色像である。

[図7B] マウスBMSCsを移植したときのMAP2で染色した脳組織の免疫染色像である。

[図8A] マウスBMSCsを移植したときの単位面積当たりの移植細胞存在率を示すグラフである。

[図8B] マウスBMSCsを移植したときの脳挫傷部位における移植細胞の生着率と細胞サイズを示す表である。

[図9] マウスBMSCsを移植したときの移植細胞のCXCR4の発現を示す染色像である。

[図10] ラットBMSCsを培養したときのmRNAの発現を示す像である。

[図11] ラットBMSCsを培養したときのCXCR4のよう成立を示すグラフである。

[図12] ラットBMSCsを培養したときの細胞1個当たりの細胞接着面積を示すグラフである。

[図13A] BMSCsを移植したラットのBBB scoreを示すグラフである。

[図13B] BMSCs を移植したラットの Inclined plane score を示すグラフである。

[図14] BMSCs を移植したラットの脊髄組織における移植細胞の分布と存在率を示す像である。

[図15A] BMSCs を移植したラットの脊髄組織の H & E 染色像である。

[図15B] BMSCs を移植したラットの損傷部脊髄における空洞率を示すグラフである。

[図16] 脊髄損傷部位における移植細胞の生着率と培養細胞接着面積との関係を示す表である。

[図17A] ヒト MSCs を培養したときの培養細胞の細胞直径の変化を示すグラフである。

[図17B] ヒト MSCs を培養したときの培養細胞の細胞直径の数値を示す表である。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明の一実施形態では、骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cells: BMSCs)、又は、骨髄間質細胞を精製して得られる間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells; MSCs) が多軸回転によって形成された模擬微小重力環境下で培養される。ここで、模擬微小重力環境下とは、時間軸で積分された重力ベクトルが宇宙環境と同じく微小であるような環境のことをいう。

[0016] 模擬微小重力環境は、例えば、3D-クリノスタットを用いて作り出すことができる。3D-クリノスタットとは、直交する2軸の周りに試料を360°回転させる装置である。3D-クリノスタットを用いれば、時間軸で積分された重力ベクトルが宇宙環境と同じく微小であるような (例えば 10^{-3} G であるような) 環境を作り出すことができる。

[0017] 図1は、3D-クリノスタットの構成の一例を示す図である。図1の3次元クリノスタット1は、本体3、モータ4、外側フレーム5、モータ6、及び内側フレーム7を含む。本体3は、静止系に設置される。本体3は、基部3aと脚3b、3cを含む。基部3aには、脚3b、3cが接続されている

。脚 3 b には、モータ 4 が設けられている。モータ 4 は、外側フレーム 5 に接続され、回転軸 4 a の回りに外側フレーム 5 を回転する。外側フレーム 5 には、モータ 6 が設けられている。モータ 6 は、内側フレーム 7 に接続され、回転軸 6 a の回りに内側フレーム 7 を回転する。回転軸 6 a は、回転軸 4 a と概ね直交する。内側フレーム 7 には、既述の培養容器 2 が接続される。培養容器 2 は、回転軸 4 a と回転軸 6 a との交点の近傍にある。培養容器 2 は、内側フレーム 7 と同体に回転する。外側フレーム 5 と内側フレーム 7 とがそれぞれ回転されると、培養容器 2 は、2 軸回転する。培養容器 2 が 2 軸回転されると、培養容器 2 に封入された培養細胞に働く重力の方向が分散され、模擬微小重力環境を作り出すことができる。

[0018] 模擬微小重力環境下で BMSCs 又は MSCs を培養する手法は、中枢神経系疾患を治療するための移植細胞の製造方法として有用である。実験結果として後に詳細に記載されているように、BMSCs 又は MSCs を模擬微小重力環境下で培養することにより、BMSCs 又は MSCs の分化を抑制することができる。加えて、BMSCs 又は MSCs を模擬微小重力環境下で培養することにより、培養後の BMSCs 又は MSCs の細胞のサイズを小さくすることができる。より厳密に言えば、模擬微小重力環境下で培養することにより、培養後の BMSCs 又は MSCs の平均サイズ（細胞面積又は細胞直径）を、培養前よりも小さくすることができる。これらのことは、模擬微小重力環境下で培養した BMSCs 又は MSCs を移植細胞として使用した場合の生着率を向上させ、中枢神経系疾患に対する治療効果を増大させる。

[0019] 以下では、本発明の実施例について詳細に説明する。

[実施例 1]

[0020] 実施例 1 では、静置環境下（1 G 環境）下又は 3 D-クリノスタットによる模擬微小重力環境下でマウス骨髄間質細胞（mBMSCs）を培養し、細胞形態、神経分化マーカーの発現解析から、模擬微小重力環境下での mBMSCs の動態を検討した。模擬微小重力発生には、三菱重工業製の 3 D-ク

リノスタットを用いた。更に、臨床応用の観点から、マウス脳挫傷モデルを作製し、模擬微小重力環境下で培養したmBMSCsの移植効果を検討した。

[0021] 1. 実験手順

(マウス骨髄間質細胞の培養)

mBMSCsは、5-8週齢のC57BL/6マウスの大腿骨と脛骨より採取した。1.0×10⁸個の骨髄細胞を直径90mmの培養皿(Thermo Fisher Scientific Nunc A/S brand, Roskilde, Denmark)に播種し、48時間後、培地交換により浮遊細胞を除去し、培養皿底面に接着したmBMSCsを培養細胞として得た。増殖用培地は、10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific HyClone brand, South Logan, UT)、100 units/ml penicillin、及び、100 μg/ml streptomycin (いずれも、Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO)を添加したDulbecco's modified Eagle's medium(Sigma Aldrich Co.)を使用した。なお、細胞移植実験で使用したマウス骨髄細胞は、ドナー細胞を判別するため、GFPトランスジェニックマウス(GFP-tg mouse)の大腿骨と脛骨より同様に採取し、培養した。

[0022] 実験に必要な細胞数を確保するまで2回の継代を行ってmBMSCsを増殖させ、OptiCell™(Thermo Fisher Scientific Nunc brand, Rochester, NY)に2.0×10⁴個/cm²の密度で播種した。70%コンフルエントになった時点で、増殖を完了した。この時点のmBMSCsを、Day 0のmBMSCsと呼ぶ。増殖したmBMSCsを、異なる二つの培養環境、即ち、通常の1G環境(group 1G)の群と、3D-クリノスタットを使用して生成した微小重力環境(group CL)の群の2群に分けて培養した。このとき、各群とも、引き続き増殖用培地で培養する群(group GM)と、神経分化誘導培地に切り換えて分化誘導を行う群(group ND)の2群に分けた。したがって、実験群は、group 1G-GM、group CL-GM、group 1G-ND、group CL-NDの4群である。神経細胞への分化誘導培地としては、Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA)に、20ng/ml human fibroblast growth fact

or basic, 10ng/ml human β neural growth factor, 10ng/ml human brain derived neurotrophic factor (いずれも、PeproTech Inc., Rocky Hill, N J)、B27 supplement (Invitrogen Co.)、100 units/ml penicillin、及び 100 μ g/ml streptomycinを添加して調製した。

[0023] 培養7日後のmBMCS (Day 7のmBMCSs) を、形態変化の観察、RT-PCR (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) 及び免疫染色による解析、及び静脈経由での細胞移植に使用した。

[0024] 加えて、7日間の培養の後に、追加的に7日間の1G環境下での培養を行った試料 (Day 14のmBMCSs) も作製した。追加的に行われる7日間の培養は、全ての群について (即ち、group GLについても) 1G環境下で行われていることに留意されたい。

[0025] (形態観察)

培養したmBMCSの形態変化は、倒立型位相差顕微鏡 (Eclipse TE300; Nikon Co., Tokyo, Japan) を用いて観察し、無作為に写真撮影を行った。細胞のサイズは、次のようにして測定した。0.1% trypsinで処理して回収したmBMCSsを無作為に写真撮影し、パーソナルコンピュータに取り込んだ。撮影した写真から、各群150個の細胞を無作為に抽出し、画像処理ソフトウェア (ImageJ; National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて細胞サイズ (直径) を算出した。

[0026] (RT-PCR)

RT-PCRのためのサンプリングは、ISOGEN (NIPON GENE Co., Ltd., Toyama, Japan) を用いて行い、付属のプロトコールに従ってRNAを単離した。SuperScript™II (Invitrogen Co.) を用いて逆転写反応を行い、作製したcDNAを鋳型として、BD Advantage™ 2 PCR Kits (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) を使用してPCR反応を行った。未分化の細胞のマーカーにOct-4を用い、神経細胞の分化マーカーにはneurofilament heavy chain (NF-H) を用いた。内部標準遺伝子には、 β -actinを用いた。作製したプライマー (いずれも、Sigma-Aldrich Japan K.K., Sigma Genosys, H

okkaido, Japan) の塩基配列とPCR条件は、図2の通りである。

[0027] (神経分化マーカーの免疫染色)

mBMSCsを固定し、免疫染色を行った。観察には、多機能顕微鏡(BZ-9000; KEYENCE Co., Osaka, Japan)を使用した。神経分化マーカーであるNF-H, microtubule associated protein 2(MAP2)に対する一次抗体には、monoclonal anti-neurofilament 200, monoclonal anti-MAP2(いずれも、Sigma-Aldrich Co.)を用い、希釈倍率は1:200とした。二次抗体には、Alexa Flour(登録商標)488 goat anti-mouse IgG(H+L)(Invitrogen Co.)を用い、希釈倍率は1:100とした。核染色には、4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)を用い、希釈倍率は1:100とした。染色後の細胞を撮影して、その画像をパーソナルコンピュータに取り込み、それぞれの一次抗体について、陽性細胞数を全細胞数で除して陽性率を算出した。

[0028] (脳挫傷モデルマウスの作製と細胞移植)

レシピエントマウス(脳挫傷モデルマウス)の作製には、8週齢C57BL/6を用い、極低温を利用して脳挫傷マウスを作製した。詳細な手順は、下記の通りである:麻酔下で頭皮を頭尾軸方向に15mm切開した後、冠状縫合とラムダ縫合の間で、矢状縫合の左外側3.0mmの部位(運動野皮質部位)に頭蓋骨の上から、液体窒素を用いて冷却した金属プローブを30秒間、4回、30秒間隔で当て、直径4.0mmの脳挫傷を作製した。

細胞移植は、脳挫傷7日後に行った。具体的には、1匹あたり 3.0×10^5 個の培養細胞を100 μ lのPBS(リン酸緩衝生理食塩水)に懸濁して、後眼窩静脈叢に注射した。細胞移植を脳挫傷7日後に行うのは、損傷直後の脳細胞において発生する炎症の影響を排除するためである。炎症性細胞の浸潤は、移植細胞の生着の障害になることが考えられる。対照群であるGroup Cのマウスには、100 μ lのPBSを注射した。また、Group Sのマウスには頭部の皮膚切開のみを行った。即ち、Group Sは、シャムオペレーション群で

ある。

[0029] (運動機能評価)

運動機能検査として、Beam-Walking試験とRotarod試験を行った。

Beam-walking試験では、木製の四角柱（幅6mm、長さ120mm）の上でマウスを歩かせ、50歩中に、麻痺側である右側の後肢が踏み外した歩数を記録した。全てのマウスを、脳挫傷モデル作製前に、3日間、踏み外しが5歩以下になるよう訓練した。

Rotarod試験では、rotarod装置（KN-75; NATSUME SEISAKUSHO Co., Ltd., Tokyo Japan）を用い、20rpmで回転するロッド上でマウスを走らせ、ロッドから落ちるまでの時間を計測した。全てのマウスを、脳挫傷モデル作製前に、3日間、10rpmで回転するロッド上に100秒以上留まれるよう訓練した。

[0030] (組織学的解析)

脳損傷28日後（細胞移植21日後）、麻酔下でマウスを灌流固定し、脳組織を摘出した。脳組織をTissu-Tek（登録商標）O.C.TTM Compound（Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo Japan）で包埋し、液体窒素で瞬間凍結した。凍結した試料は、クリオスタット（Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany）にて厚さ10μmに薄切りした。薄切した脳組織は、ヘマトキシリン・エオジン染色（H&E染色）と神経分化マーカーであるNF-HとMAP2、アストロサイト分化マーカーであるglial fibrillary acidic protein（GFAP）に対する免疫染色に使用した。免疫染色の一次抗体には、NF-HとMAP2については、monoclonal anti-neurofilament 200, monoclonal anti-MAP2（いずれも、Sigma-Aldrich Co.）を用い、希釈倍率は1:200とし、GFAPについては、mouse monoclonal GFAP（Abcam plc., Cambridge, UK）を用い、希釈倍率は1:200とした。二次抗体には、Alexa Fluor（登録商標）594 goat anti-mouse IgG（H+L）（Invitrogen Co.）を用い、希釈倍率は1:100とした。染色後の脳組織の観察には、多機能顕微鏡（BZ-9000: KEYENCE Co.）を使用した。

[0031] (ケモカインレセプターの免疫染色)

ケモカインレセプターの免疫染色は、前述の神経分化マーカーの免疫染色と同様の方法で行った。ケモカインレセプターであるCXCR4に対する一次抗体には、anti CXCR4 (fusin (H-118); Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)を用い、希釈倍率は1 : 100とした。

[0032] 2. 実験結果

(模擬微小重力環境の細胞形態に対する影響)

図3は、Day 0 (培養前)、Day 7 (7日間の培養後)、Day 14 (7日間の追加培養後)のmBMSCsの細胞形態を示す画像であり、図4は、このような培養による細胞サイズの変化を示すグラフである。ここで、7日間の培養後 (Day 7) に行われる7日間の追加培養は、いずれの群についても1G環境下で行われることに留意されたい。

[0033] 図3に示されているように、培養前 (Day 0) では、紡錘形の細胞や卵円形の細胞が観察された。

[0034] 一方、7日間の培養後 (Day 7) の細胞形態は、次の通りである：増殖培地で培養し続けた群であるgroup 1G-GM及びgroup CL-GMについては、細胞形態としては著明な変化は見られなかった。即ち、分化に伴う突起や、細胞同士の接合は観察されなかった。一方、1G環境下で、且つ、神経へ分化誘導した群であるgroup 1G-NDについては、神経様の突起を長く伸ばした細胞が多く、細胞同士が接合している様子が観察された。これは、培養細胞が神経細胞に分化していることを示している。一方、模擬微小重力環境下では、神経へ分化誘導した群であるgroup CL-NDについては、神経へ分化誘導したにも関わらず、細胞形態の著明な変化は見られなかった。即ち、group CL-NDについては、突起を長く伸ばした細胞は観察されなかった。これは、模擬微小重力環境下では、mBMSCsの神経への分化が抑制された可能性を示唆するものである。

[0035] 模擬微小重力環境下で培養することによる作用を確かめる為に、7日間、模擬微小重力環境下で培養した後、追加的に、7日間、1G環境下で培養を

行った (Day 14)。その結果、group CL-NDについても、group 1G-ND (1 G 環境下で、且つ、神経へ分化誘導して培養した群) と同様に神経様の長い突起が発現した。即ち、模擬微小重力環境下での培養では分化が抑制された group CL-NDについても、その後1 G環境下で培養を行うことにより分化が発現した。この結果は、模擬微小重力環境下での培養が mBMSCs の神経への分化を抑制する作用がある可能性を一層に強く示唆するものである。

[0036] 加えて、模擬微小重力環境下で培養した群 (group CL-GM及びgroup CL-ND) については、細胞サイズが小さくなるという特性が現れた。図4は、group 1G-GM、group 1G-ND、group CL-GM、及びgroup CL-NDのそれぞれの細胞サイズの変化を示すグラフである。図4において、マークは、各群の細胞サイズの平均値を示している。7日間、模擬微小重力環境下で培養した群 (group CL-GM及びgroup CL-ND) では、細胞サイズの平均値が、減少していた。この作用は、特に、神経へ分化誘導した群 (group CL-ND) において顕著に見られた。

[0037] その後、模擬微小重力環境下で7日間培養した群 (group CL-GM及びgroup CL-ND) について、7日間、追加的に1 G環境下で培養を行ったところ、細胞サイズが元に戻る減少が現れた。このことは、模擬微小重力環境下での培養が細胞サイズを小さくする作用を有することを一層に強く示唆するものである。

[0038] (模擬微小重力環境の細胞分化に対する影響)

細胞分化に対する影響を更に検討する為に、未分化マーカーと細胞分化マーカーの発現について検討した。未分化マーカーとしてOct-4、神経分化マーカーとしてneurofilament heavy chain (NF-H) とmicrotubule associated protein 2 (MAP2) を使用した。

[0039] 図5Aは、各群のmRNAの発現を示す像であり、図5Bは、各群のNF-H及びMAP2のタンパク質発現を示す免疫染色像である。図5Bの免疫染色像のそれぞれにおける数値は、NF-H、MAP2のタンパク質発現の検出反応の陽性細胞数を全細胞数で除した数値を示す表である。図5Aに図

示されているように、Day 0では、いずれの群についても、Oct-4 mRNA発現が見られ、NF-H mRNA発現は見られなかった。

[0040] 一方、Day 7では、Oct-4 mRNA発現とNF-H mRNA発現において群によって違いが見られた。

まず、1G環境で培養した場合には、増殖培地と分化培地で差異が見られた。詳細には、group 1G-GMについてはOct-4 mRNA発現が維持され、神経分化マーカーであるNF-HやMAP2のタンパク質を発現している細胞は少なかった。一方、分化誘導が行われたgroup 1G-NDは、Oct-4 mRNA発現が弱く、NF-H mRNAが発現しており、神経に分化していることが確認された。また、図5Bに示されているように、group 1G-NDについては、NF-H及びMAP2のタンパク質発現も観察され、その陽性率には差が見られなかった。

[0041] 一方、模擬微小重力環境下で培養した場合には、増殖培地と分化培地で差異は見られなかった。即ち、増殖培地で培養されたgroup CL-GMは、group 1G-GMと同様に未分化マーカーの発現が見られ、分化マーカーの発現は見られなかった。加えて、分化誘導が行われたgroup CL-NDについても、Oct-4 mRNAが発現し、神経分化マーカーの発現は見られなかった。

[0042] その後、group CL-GMを含む全ての群について、1G環境で7日間の追加培養を行ったところ(Day 14)、図5Aに示されているように、group CL-GMについてもOct-4 mRNA発現が弱くなる一方で、NF-H mRNAの発現が強くなった。更に、図5Bに示されているように、group 1G-NDに加え、group CL-NDについてもNF-H及びMAP2のタンパク質発現も観察された。

[0043] このことは、模擬微小重力環境下の培養では、mBMSCsに神経分化誘導を行ってもなお分化が抑制されること、及び、未分化性と分化能とを維持できることを示している。

[0044] (移植による運動機能の回復と神経再生)

上述のように、模擬微小重力環境下の培養では、mBMSCsの分化が抑

制されると共に、細胞サイズが小さくなった。以下では、模擬微小重力環境下で培養されたmBMSCsを移植したときの運動機能の回復と神経再生の効果について検討する。

- [0045] 培養したmBMSCsの生体内の機能を評価するために、中枢神経系疾患モデルとしてマウス脳挫傷モデルを作製し、そのマウス脳挫傷モデルにmBMSCsを静脈経由で移植した。移植は、脳挫傷7日後に行った。その後、mBMSCs移植による運動機能の回復と神経再生の効果を確認するために、Beam-walking試験とRotarod試験を行った。実験手順は、上述の通りである。更に、組織学的解析により、移植細胞の生着について評価した。
- [0046] 図6Aは、Beam-Walking試験の結果を示すグラフである。図6Aに示されているように、Beam-Walking試験において、group CL-NDのmBMSCsが移植されたマウスは、脳挫傷11日以降にPBSのみを静注したgroup Cと比較して、14日以降にはgroup 1G-NDと比較して有意に運動機能が改善し、実験群の中で最も運動機能が回復した。また、group 1G-GM, group CL-GM, group 1G-NDは、group Cと比較して脳挫傷14日以降に有意な改善が見られた。Group 1G-NDの回復が鈍く、group CL-GMとgroup 1G-GMは同程度の回復であった。
- [0047] 図6Bは、Rotarod試験の結果を示すグラフである。Rotarod試験においても、Beam-Walking試験と同様の結果が得られた。詳細には、group CL-NDの細胞を移植したマウスは、脳挫傷14日後にはgroup Cと比較して、脳挫傷21日後にはgroup 1G-NDと比較して、また、脳挫傷28日後にはgroup CL-GM及びgroup 1G-GMと比較しても有意に運動機能が改善した。
- [0048] 図7Aは、NF-Hで染色した組織像であり、図7Bは、MAP2で染色した組織像である。group 1G-GM, group CL-GM, group 1G-ND, 及びgroup CL-NDのいずれについても、脳挫傷28日後（移植21日後）の脳損傷部にGFAPの緑色蛍光を発する移植細胞が観察された。これは、いずれの群の移植細胞についても、マウス脳挫傷モデルに細胞移植したmBMSCsが脳損傷部に到達していることを意味している。

[0049] 図7A、図7Bの組織像から、単位面積当たりのGFP陽性細胞の面積の割合を算出した。図8Aは、その結果を示すグラフであり、図8Bは、各群のGFP陽性細胞の面積の割合、及び、各群の培養細胞の直径の平均値を示す表である。1G環境で培養した細胞については、単位面積当たりのGFP陽性細胞の面積の割合は、group 1G-GMでは1.2%、group 1G-NDでは4.2%であった。一方、模擬微小重力環境で培養した細胞については、単位面積当たりのGFP陽性細胞の面積の割合は、group CL-GMでは7.3%、group CL-NDでは11.3%であった。この結果は、模擬微小重力環境で培養した細胞を移植したマウスでは、1G環境下で培養した細胞を移植したマウスと比較して（即ち、group CL-GMはgroup 1G-GMと比較して、また、group CL-NDはgroup 1G-NDと比較して）、脳挫傷部に移植細胞が多く到達したことを示している。そして、上述の細胞サイズの実験結果を考慮すると、細胞サイズの低減が、脳挫傷部に移植細胞が多く到達した要因と考えられる。

[0050] 図7A、図7Bを再度に参照して、移植細胞の一部には、NF- κ BやMAP2の発現が観察された。模擬微小重力環境で培養した細胞を移植したマウスでは、1G環境下で培養した細胞を移植したマウスと比較して（即ち、group CL-GMはgroup 1G-GMと比較して、また、group CL-NDはgroup 1G-NDと比較して）、NF- κ BやMAP2を発現している移植細胞も多く観察された。さらに、group CL-GMと比較してgroup CL-NDの方がNF- κ BやMAP2を発現している移植細胞が多く観察された。

[0051] （微小重力環境で培養した移植細胞のCXCR4発現）

移植細胞の損傷領域への遊走に関するメカニズムは解明されていないが、静脈内移植したBMSCsは、梗塞部から発せられるシグナルや細胞表面接着因子により血液脳関門を通過し、障害部位に集積すると考えられている。特に、損傷領域において損傷後産生が上昇するstromal cell derived factor 1（SDF-1）が選択的移行に関与する可能性が示唆されている。SDF-1は、濃度勾配の方向にリンパ球を遊走させることで知られるケモカインの一つで、CXC型ケモカイン受容体の一つであるCXCR4と結合する。

近年、BMSCsに含まれるMSCsもCXCR4を発現しており、脳挫傷領域におけるSDF-1の発現が、静注したMSCsの遊走を促進するとして注目されている。そこで、培養した移植細胞のCXCR4発現を解析した。

[0052] 図9は、CXCR4の免疫染色を行った組織像である。図9の組織像における数値は、移植細胞のCXCR4陽性率を示している。増殖培地で培養したgroup 1G-GMとgroup GL-GMのCXCR4陽性率は、ほぼ同等であった。一方、神経への分化誘導培地で培養したgroup 1G-NDでは、CXCR4を発現している細胞が少なかった。一方、group GL-NDでは、CXCR4を細胞膜上に発現している細胞が多く、増殖培地で培養した細胞と比較しても、陽性細胞が多く観察された。

[0053] 増殖培地で培養したmBMSCsは、MSCsのような未分化性を維持し、CXCR4を発現している細胞も存在する為、移植後に脳損傷部に移行したことが考えられる。一方、神経へ分化したgroup 1G-NDではCXCR4を発現している細胞が少なかったため、損傷部に到達した移植細胞が少なかったことが考えられる。また、group GL-NDの培養細胞では、神経に分化誘導を行っても未分化性が維持されており、CXCR4を発現している細胞も多いという結果が得られた。このことが、group GL-NDの細胞を移植したマウスにおいて、より多くの移植細胞が損傷部に生着し、運動機能を改善させた理由の一つと考えられる。

[0054] 以上の実験結果は、未分化性維持を可能とし、また、細胞のサイズを縮小させる模擬微小重力環境下での培養は、移植治療に用いる移植細胞の培養法として有用であることを示している。特に、神経への分化を誘導しながらも未分化性を維持して模擬微小重力環境下での培養を行うことにより、CXCR4を発現する細胞を増加させ、運動機能を顕著に改善させることができる。

[実施例2]

[0055] 実施例2では、模擬微小重力環境下で培養した骨髄間質細胞（BMSCs

)の脊髄損傷に対する移植効果を検討した。より具体的には、静置環境下(1G環境)下、及び、3D-クリノスタットによる模擬微小重力環境下でラットBMSCsの増殖培養を行い、細胞遊走因子受容体のmRNAやタンパク質の発現解析を行い、移植治療における移植細胞としての適性を検討した。また、脊髄損傷モデルラットを作製し、1G環境下、及び模擬微小重力環境下で培養したラットBMSCsを静脈経由で移植し、組織学的解析や運動機能評価により、細胞移植効果の検討を行った。

[0056] 1. 実験方法

5週齢ラットの大腿骨と脛骨より骨髓細胞を採取し、直径90mmの培養皿(Thermo Fisher Scientific Nunc A/S brand)にて培養した。48時間後、培地交換により浮遊細胞を除去し、培養皿底面に接着した細胞を培養細胞(ラットBMSCs)として採取した。増殖用培地は、10% fetal bovine serum(Thermo Fisher Scientific HyClone brand)、100 units/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin(いずれも、Sigma-Aldrich Co.)を添加したDulbecco's modified Eagle's medium-low glucose(Sigma-Aldrich Co.)を使用した。培養液は、3~4日に1回交換した。実験に必要な細胞数を確保するまで2回の継代を行った。増殖させたラットBMSCsは、細胞培養器Opticell™(Thermo Fisher Scientific Nunc brand)に播種した。播種後、ラットBMSCsが培養器底面に接着するよう1G環境下で1日培養を行った。この状態のラットBMSCsをDay 0のラットBMSCsと呼ぶ。実験群は、1G環境下にて培養を行った群(group 1G)と模擬微小重力環境下にて培養を行った群(group GL)の2つの群である。いずれの群の培養細胞も、7日間、増殖培地にて培養した。

[0057] 脊髄損傷モデルラットは、150-200gの成体雌ラットに対し、Weight Drop methodにより第10~11胸椎レベルで脊髄損傷を形成することによって作製された。このようにして作製された脊髄損傷モデルラットに、上記の手順で培養したgroup 1G、group GLのラットBMSCsを移植した。移植されるラットBMSCsには、移植前に、PKH26(Sigma-Aldrich Co.)で赤

色蛍光標識を付した。脊髄損傷直後に、ラットBMSCsを含む細胞懸濁液をラットの尾静脈へ注射し、1匹あたり 3.0×10^6 個の細胞を移植した。実験群は、脊髄損傷直後に生理食塩水の静脈注射を行ったラット (group C)、1G環境下で7日間培養を行ったBMSCsを移植したラット (group 1G)、模擬微小重力環境下で7日間培養を行ったBMSCsを移植したラット (group CL) の3群である。

[0058] ラットの運動機能評価は、脊髄損傷前 (Day 0)、脊髄損傷1~7日後 (Day 1-7)、14日後 (Day 14)、21日後 (Day 21) に行った。運動機能評価として、Basso-Beattie-Bresnahan locomotor rating scale (BBB score) と、Inclined plane method (Inclined plane score) を行った。ここで、Inclined plane methodとは、ラットを角度可変式の板上に乗せ、姿勢保持が可能な最大角度を測定する方法である。

[0059] 2. 実験結果

図10は、7日間の培養後のgroup 1Gとgroup CLのそれぞれにおけるOct-4及びCXCR4のmRNAの発現を示す図である。ここで、Oct-4は未分化細胞マーカーであり、CXCR4は細胞遊走因子受容体である。未分化マーカーであるOct-4のmRNAの発現は、group 1Gよりgroup CLで強かった。また、細胞遊走因子受容体であるCXCR4のmRNAについては、group 1Gでは殆ど発現が見られず、group CLでは発現が見られた。内部標準遺伝子であるG3PDHの発現は、group 1Gとgroup CLとで同様であった。

[0060] 図11は、7日間の培養後のgroup 1Gとgroup CLにおけるCXCR4の免疫染色陽性率を示すグラフである。陽性率は、各群について無作為に撮影された写真から得られたCXCR4陽性細胞数を全細胞数で除して算出した。図11に図示されているように、CXCR4の免疫染色の結果では、両群ともに、CXCR4を発現している細胞が見られた。算出したCXCR4陽性率は、group CLがgroup 1Gよりも有意に高かった。

[0061] 図12は、培養した細胞のサイズ、具体的には、細胞1個当たりの細胞接

着面積を示すグラフである。細胞 1 個当たりの細胞接着面積は、単位面積当たりの細胞接着面積を細胞数で除して算出した。細胞 1 個当たりの細胞接着面積は、group CLの方がgroup 1Gより少なかった。位相差顕微鏡像でも、group CLの細胞は、group 1Gの細胞と比較して小さく見えた。

[0062] 図 1 3 A、図 1 3 Bは、group 1Gとgroup CLのBMSCsを移植したラットの運動機能評価の結果を示す図である。詳細には、図 1 3 Aは、group 1Gとgroup CLのBMSCsを移植したラットのBBB scoreを示すグラフであり、図 1 3 Bは、Inclined plane scoreを示すグラフである。図 1 3 A、図 1 3 Bに示されているように、BBB score、Inclined plane scoreのいずれについても、group CLは、脊髄損傷 3 日後以降に、他の 2 群 (group C、group 1G) と比較して有意な改善が見られた。

[0063] また、group 1Gとgroup CLの両方について、脊髄損傷 2 1 日後の脊髄組織の組織像を観察した。図 1 4 は、脊髄損傷 2 1 日後の脊髄組織の移植細胞分布を示す像である。group 1G、group CLのいずれについても、脊髄組織の損小領域にPKH26の赤色蛍光を発する移植細胞が観察された。group 1Gと比較してgroup CLでは、移植細胞が多く観察された。

[0064] 更に、脊髄損傷 2 1 日後の損傷部脊髄のH&E染色像の観察が行われた。図 1 5 A は、脊髄組織のH&E染色像であり、図 1 5 B は、空洞率を示すグラフである。図 1 5 A の脊髄損傷 2 1 日後のH&E染色像から理解されるように、3つの群のいずれについても、脊髄後索から中心部の損傷と組織の空洞化が観察された。図 1 5 B に示されているように、脊髄損傷後 2 1 日において、損傷部脊髄の空洞率は、group Cが最も高く、group CLでは有意に低かった。

[0065] 以上に説明されているように、模擬微小重力環境下でラットBMSCsを培養すると、Oct-4のmRNA発現がみられた。これは、模擬微小重力環境下での培養により、BMSCsの未分化性が維持されることを示唆している。更に、group CLでは細胞遊走因子受容体の発現も増加した。

[0066] PKH26で標識された移植細胞は、静脈内移植から 2 1 日後のラット脊

髓の損傷領域に固定された。図16の表に示されているように、group CLでは、培養細胞接着面積がgroup 1Gと比較して約43%減少し、生着率は約28倍に増加した。模擬微小重力環境下で培養したBMSCsは、より多くの細胞が損小領域に生着し、移植を受けたラットの損傷部空洞率は有意に低下し、運動機能も有意に改善した。

[0067] 以上の結果は、模擬微小重力環境下で培養したラットBMSCsの中樞神経系疾患への移植細胞としての有用性を示している。

[実施例3]

[0068] 実施例3では、ヒト間葉系幹細胞(hMSCs)を模擬微小重力環境下で培養することによる効果を検討した。

具体的には、ヒト間葉系幹細胞(Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD)を細胞培養器OptiCell™(Thermo Fisher Scientific Nunc brand, Rochester, NY)に播種し(Day 0)、通常の1G環境下又は3Dークリノスタットで作り出した模擬微小重力環境下で7日間培養した。即ち、実験群は、1G環境下で培養したhMSCsの群(group 1G)と、模擬微小重力環境下で培養したhMSCsの群(group CL)の2つである。

[0069] 培養には増殖培地が使用された。増殖培地としては、10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific HyClone brand, South Logan, UT)、25 units/ml penicillin、25 μg/ml streptomycin (いずれも、Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO)を添加したDulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich Co.)を使用した。

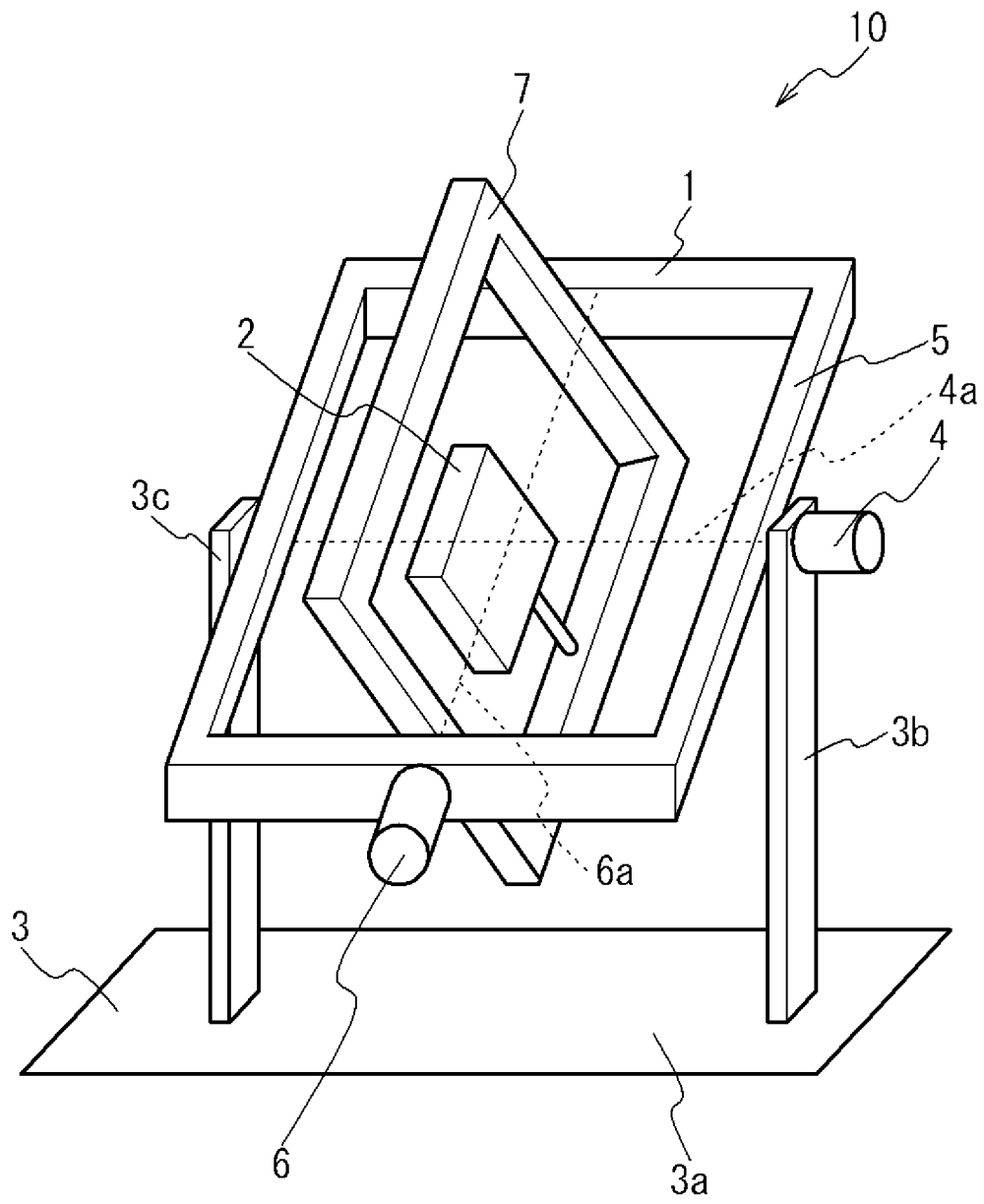
[0070] 図17Aは、7日間の培養前、及び培養後の培養細胞の細胞直径を示すグラフであり、図17Bは、平均の細胞直径の具体的数値を示す表である。培養7日後、通常の1G環境で培養したhMSCs (group 1G)と比較して、模擬微小重力環境下で培養したhMSCs (group CL)では、細胞直径が有意に小さくなった。模擬微小重力環境下で培養したhMSCs (group CL)は、更に、7日間の培養後において培養前より細胞直径が小さくなっていた。また、模擬微小重力環境下で培養することにより、未分化性が維持され、

また、細胞移植後に分化して損傷部の再生に寄与することは確認されている。このことは、模擬微小重力環境下で培養したhMSCsの再生医療における移植細胞としての優位性を示している。

請求の範囲

- [請求項1] 多軸回転によって生成した模擬微小重力環境下で骨髄間質細胞を培養して培養前よりも平均の細胞サイズが小さい骨髄間質細胞を得ることを含む
- 骨髄間質細胞の培養方法。
- [請求項2] 請求項1に記載の骨髄間質細胞の培養方法であって、前記骨髄間質細胞がマウス骨髄間質細胞である
- 骨髄間質細胞の培養方法。
- [請求項3] 請求項1に記載の骨髄間質細胞の培養方法であって、前記骨髄間質細胞がラット骨髄間質細胞である
- 骨髄間質細胞の培養方法。
- [請求項4] 多軸回転によって生成した模擬微小重力環境下でヒト間葉系幹細胞を培養して培養前よりも平均の細胞サイズが小さいヒト間葉系幹細胞を得ることを含む
- ヒト間葉系幹細胞の培養方法。
- [請求項5] 多軸回転によって生成した模擬微小重力環境下で骨髄間質細胞を培養して培養前よりも平均の細胞サイズが小さい骨髄間質細胞を移植細胞として得ることを含む
- 中枢神経疾患治療用の移植細胞の製造方法。

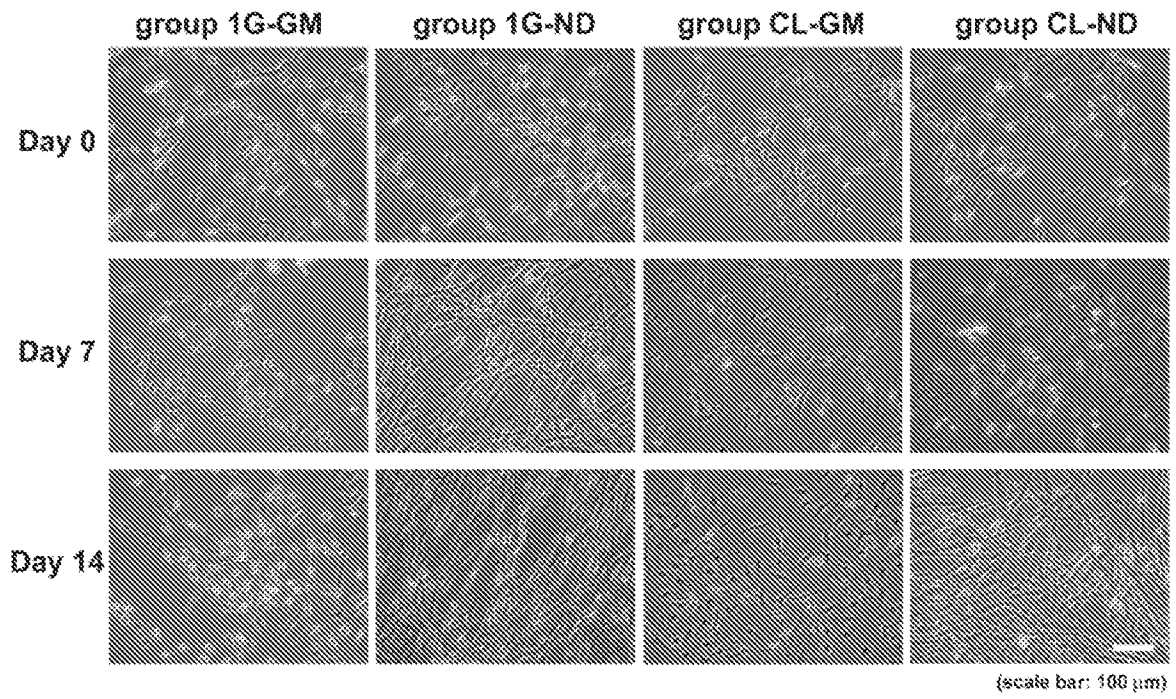
[図1]



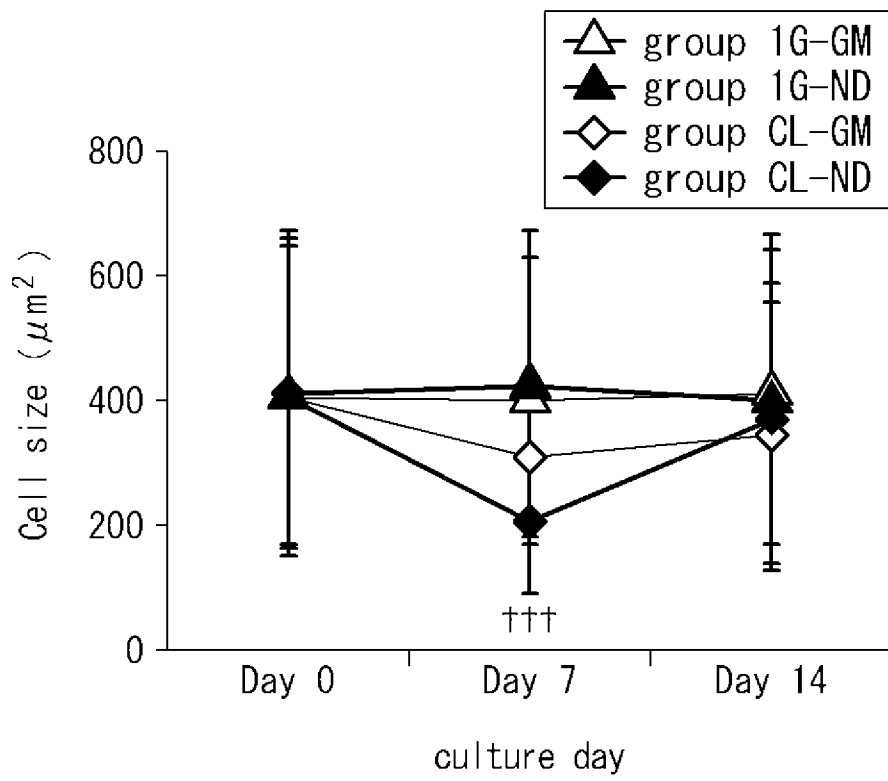
[2]

Target Gene (product size)	primer sequence (sense and antisense)	PCR condition
Oct-4 (430-bp)	5' -CCG TGA AGT TGG AGA AGG TG-3' 5' -TGA TTG GCG ATG TGA GTG AT-3'	34 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 60°C and 60 sec at 68°C
NF-H (202-bp)	5' -AGC CCA AGG ACT CTA CAG CA-3' 5' -CTT TGG CTT TTC CGT CTC TG-3'	34 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 60°C and 30 sec at 68°C
β -actin (450-bp)	5' -GAG AGG GAA ATG GTG CGT GA-3' 5' -ACA TCT GCT GGA AGG TGG AC-3'	34 cycles of 30 sec at 95°C, 45 sec at 58°C and 60 sec at 68°C

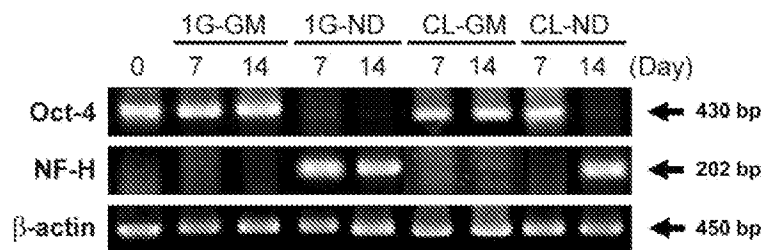
[圖3]



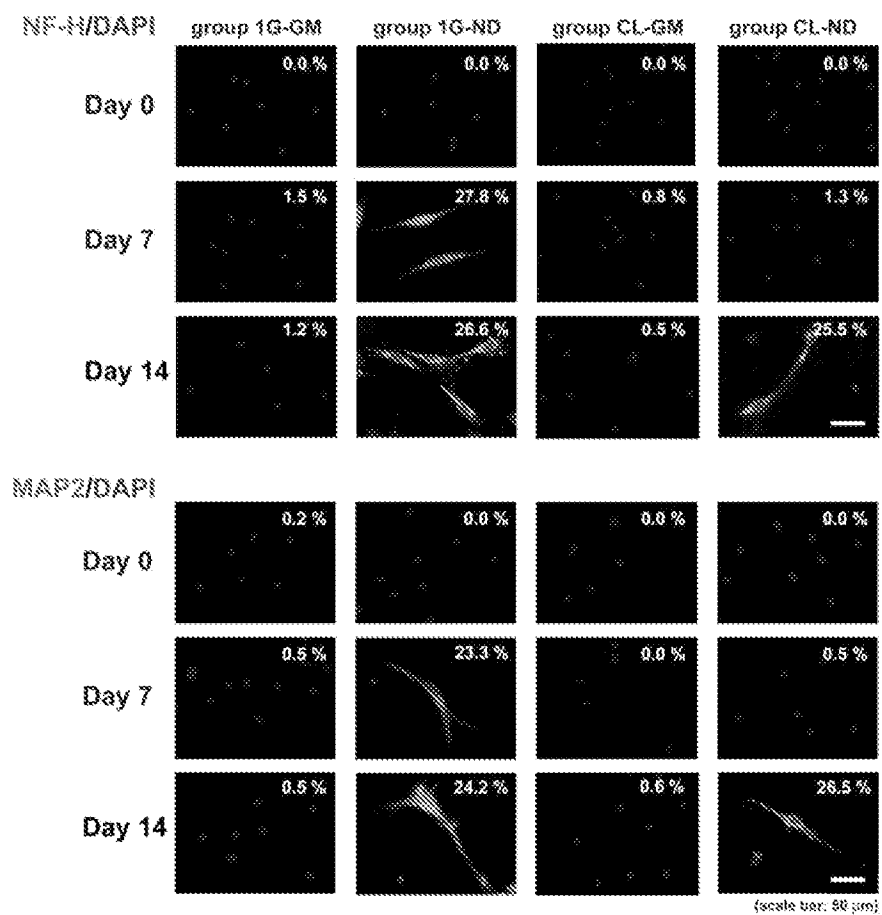
[圖4]



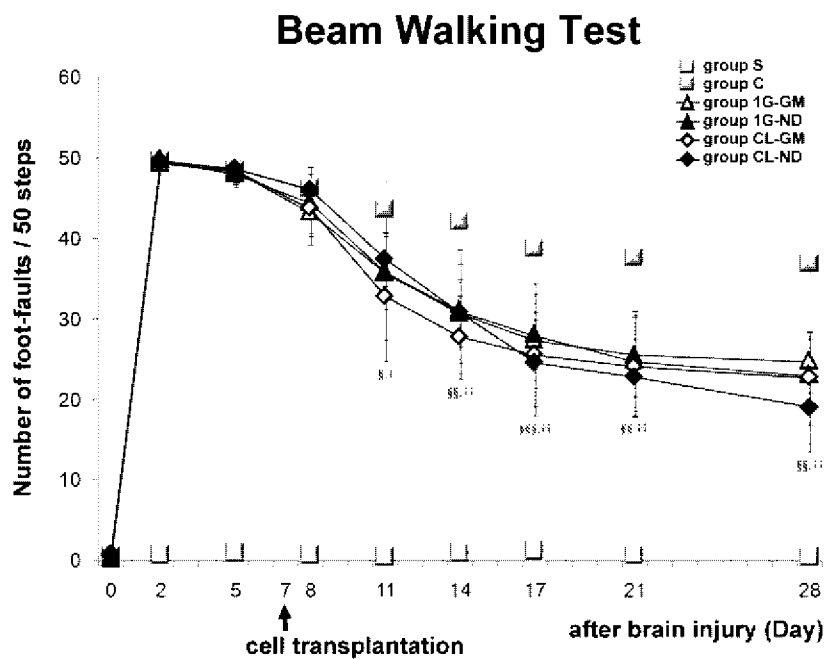
[図5A]



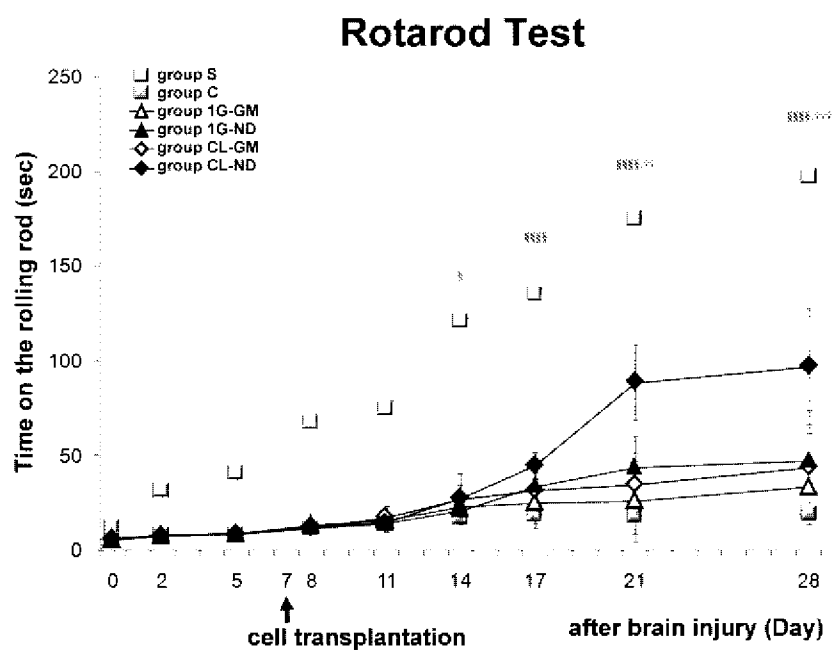
[図5B]



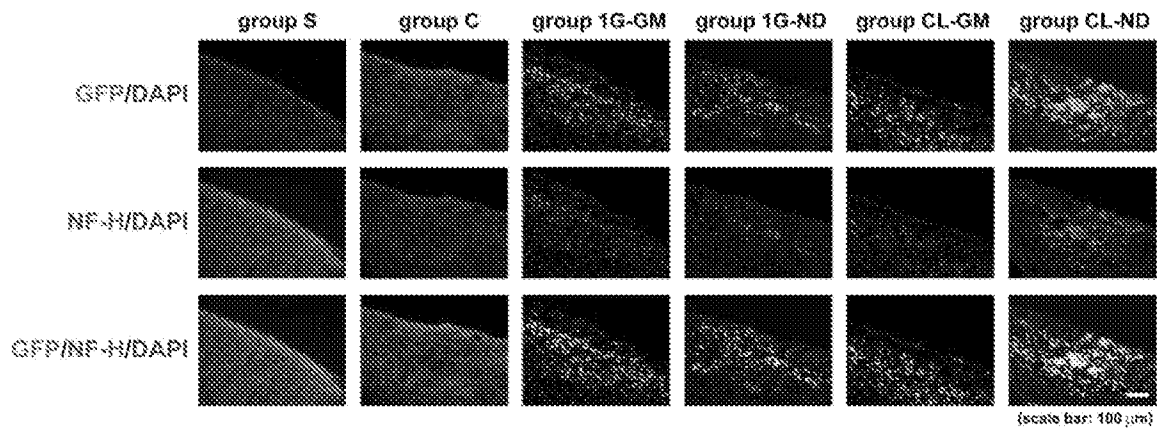
[6A]



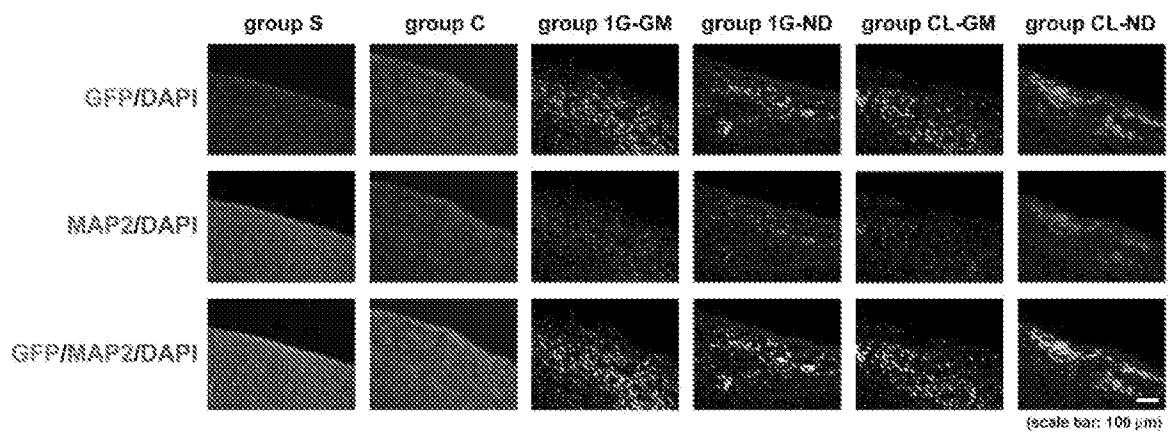
[6B]



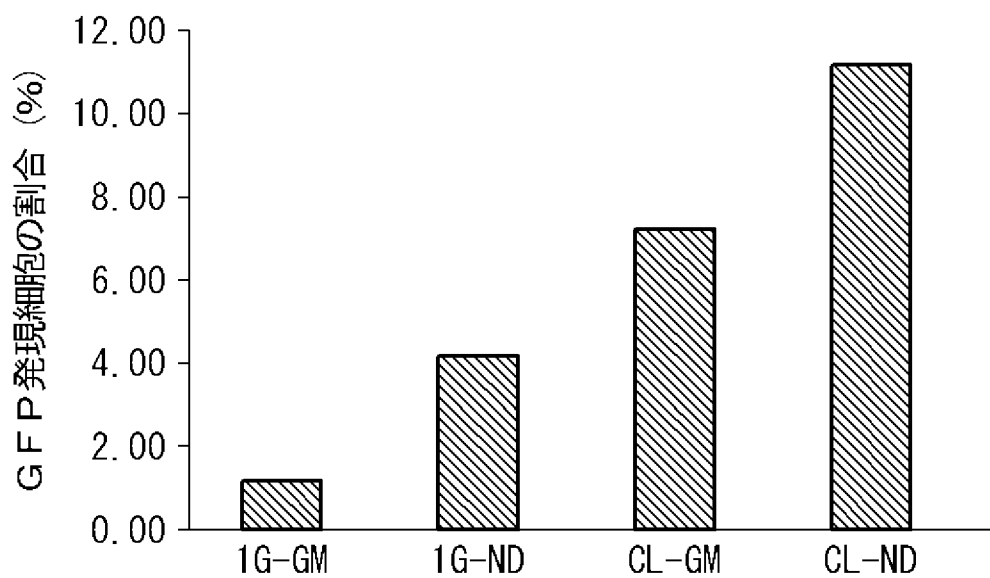
[図7A]



[図7B]



[図8A]

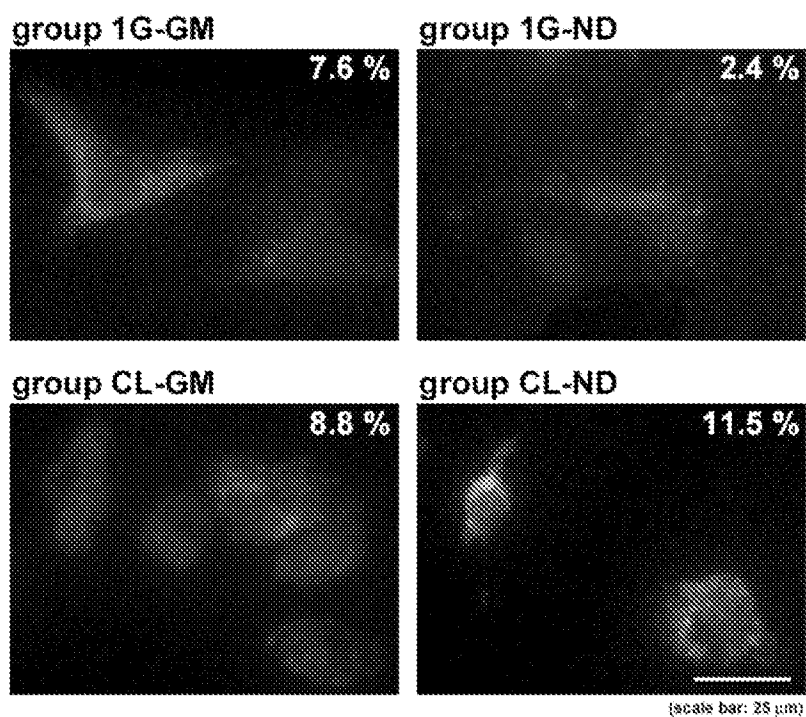


[図8B]

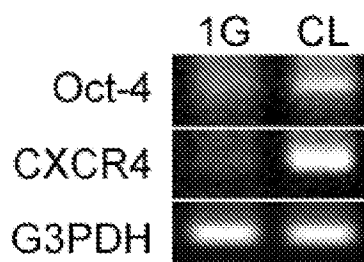
Exp. Group	Media*	GFP (%)	Diameter (μm)	% diameter
1G	GM	1.2	22.7	100 ¹⁾
	ND	4.2	23.5	100 ²⁾
CL	GM	7.3	19.9	87.7 ¹⁾
	ND	11.3	16.4	69.8 ²⁾

*GM: 増殖用培地, ND: 神経分化誘導培地, ¹⁾ 1G-GMに対するCL-GM, ²⁾ 1G-NDに対するCL-ND

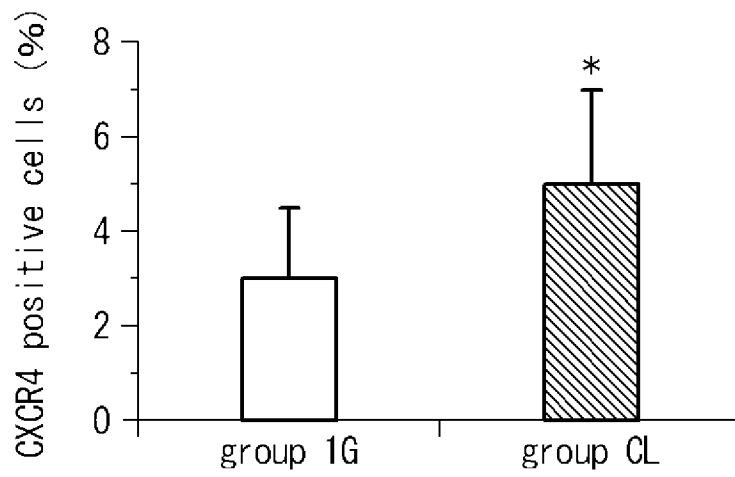
[図9]



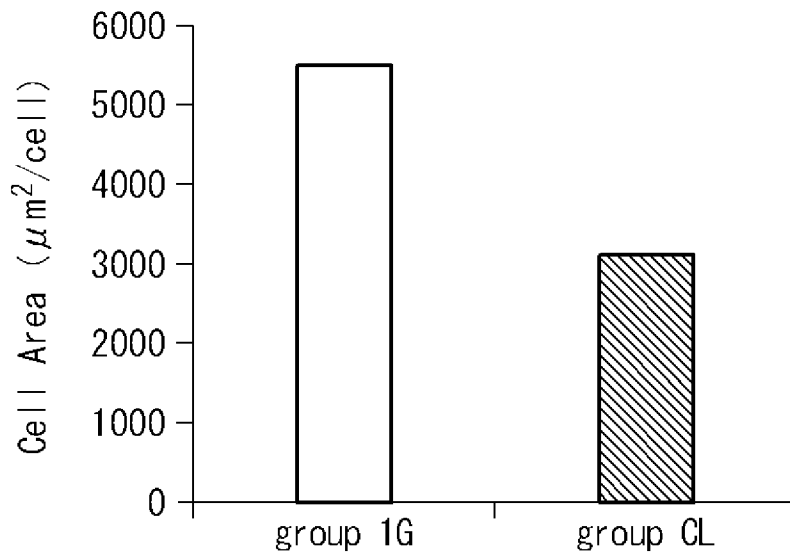
[図10]



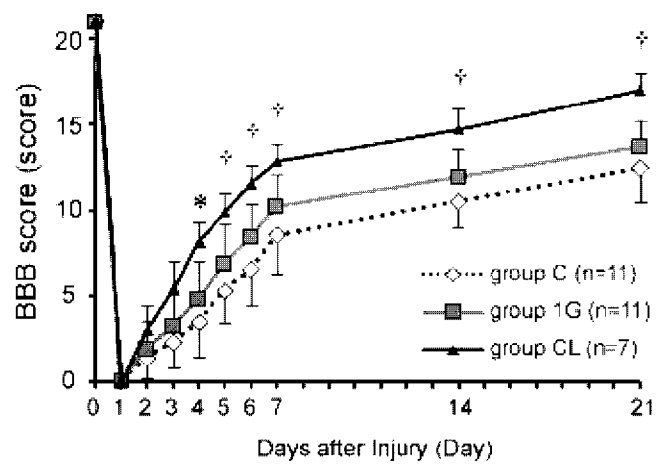
[図11]



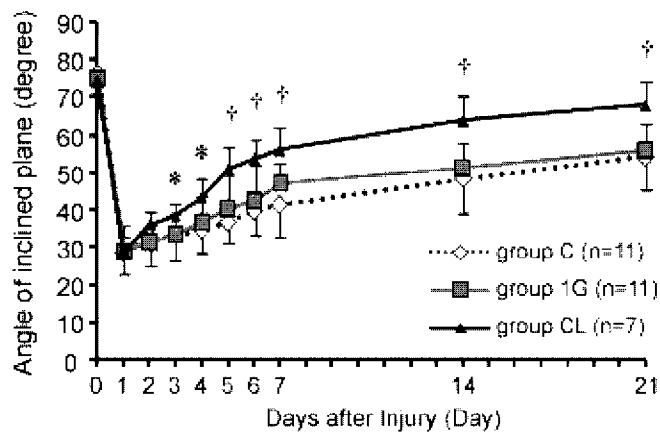
[図12]



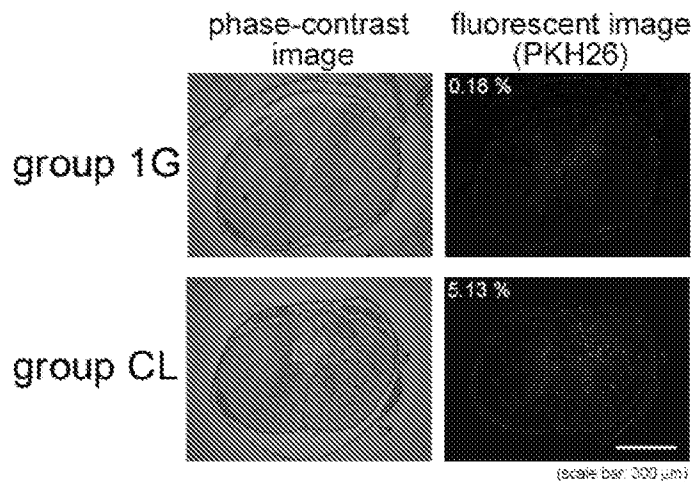
[図13A]



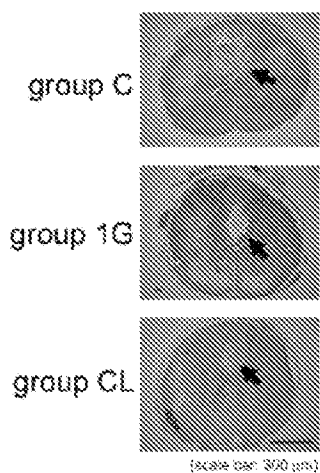
[圖13B]



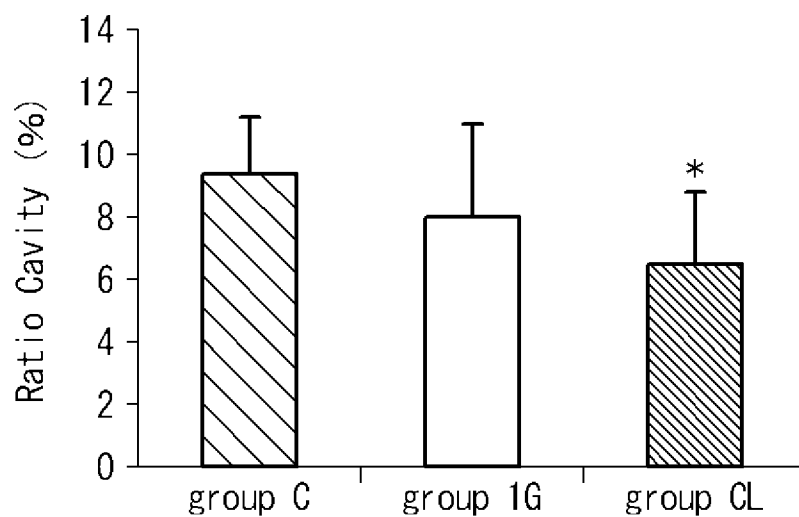
[圖14]



[圖15A]



[図15B]

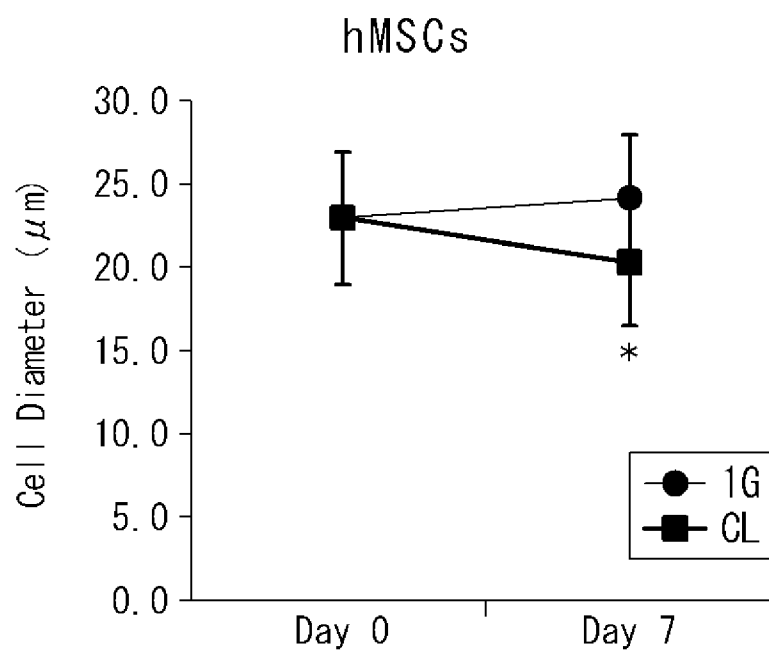


[図16]

Exp. Group	Media*	PKH26 (%)	Cell Area ($\mu\text{m}^2/\text{cell}$)	% Cell Area
1G	GM	0.18	5495	100 ¹⁾
CL	GM	5.13	3141	56.8 ¹⁾

*GM: 増殖用培地, ¹⁾1G-GMに対するCL-GM

[図17A]



[図17B]

hMSCsの直径

Cell Diameter Ave. (μm)	Day 0	Day 7
1G	22.97	24.21
CL	22.97	20.32*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/056503

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/0775(2010.01)i, A61K35/28(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, C12N5/077(2010.01)i, C12M1/10(2006.01)n, C12N15/12(2006.01)n, C12Q1/68(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/00-5/28, A61K35/28, A61L27/00, A61P25/00, C12M1/10-1/10, C12N15/00-15/90, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/SCISEARCH/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII), Igaku Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	YUGE L et al., Effectiveness of bone marrow stromal cell cultured under microgravity in neurogenesis., Space Utiliz. Res., 2009.03, vol. 25, p. 104-105	1-5/5
X/Y	YUGE L et al., Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation., Stem Cells Dev., 2006, vol. 15, p. 921-929	1-4/5
X/Y	YUGE L et al., Human mesenchymal stem cell proliferation and differentiation using a 3D-clinostat culture., Gravitational Space Biol., 2005, vol. 19, no. 1, p. 36 (Abstract [80])	1-4/5

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 May, 2010 (28.05.10)

Date of mailing of the international search report
08 June, 2010 (08.06.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/056503

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	YUGE L et al., Simulated microgravity facilitates human mesenchymal stem cell proliferation and chondrocyte differentiation after transplantation., Gravitational Space Biol., 2004, vol. 18, no. 1, p. 60 (Abstract [121])	1-4/5
A	WO 2004/061092 A1 (Mitsubishi Heavy Industries, Ltd. et al.), 22 July 2004 (22.07.2004), & US 2008/0108136 A1 & EP 1577380 A1	1-5
A	WANG Y et al., Stem cell transplantation: A promising therapy for Parkinson's disease., J. Neuroimmune Pharmacol., 2007, vol. 2, p. 243-250	5
A	JP 2007-68447 A (Hiroshima University, Mitsubishi Heavy Industries, Ltd.), 22 March 2007 (22.03.2007), (Family: none)	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/0775(2010.01)i, A61K35/28(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, C12N5/077(2010.01)i, C12M1/10(2006.01)n, C12N15/12(2006.01)n, C12Q1/68(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/00 - 5/28, A61K35/28, A61L27/00, A61P25/00, C12M1/10 - 1/10, C12N15/00 - 15/90, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/SCISEARCH/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII), 医学・薬学予稿集全文データベース

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	YUGE L et al., Effectiveness of bone marrow stromal cell cultured under microgravity in neurogenesis., Space Utiliz. Res., 2009.03, vol. 25, p. 104-105	1-5/5
X/Y	YUGE L et al., Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation., Stem Cells Dev., 2006, vol. 15, p. 921-929	1-4/5

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.05.2010

国際調査報告の発送日

08.06.2010

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中村 正展

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

3537

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	YUGE L et al., Human mesenchymal stem cell proliferation and differentiation using a 3D-clinostat culture., Gravitational Space Biol., 2005, vol. 19, no. 1, p. 36 (Abstract [80])	1-4/5
X/Y	YUGE L et al., Simulated microgravity facilitates human mesenchymal stem cell proliferation and chondrocyte differentiation after transplantation., Gravitational Space Biol., 2004, vol. 18, no. 1, p. 60 (Abstract [121])	1-4/5
A	WO 2004/061092 A1 (三菱重工業株式会社、他) 2004.07.22, & US 2008/0108136 A1 & EP 1577380 A1	1-5
A	WANG Y et al., Stem cell transplantation: A promising therapy for Parkinson's disease., J. Neuroimmune Pharmacol., 2007, vol. 2, p. 243-250	5
A	JP 2007-68447 A (国立大学法人広島大学、三菱重工株式会社) 2007.03.22, (ファミリーなし)	1-5