

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4790592号
(P4790592)

(45) 発行日 平成23年10月12日 (2011.10.12)

(24) 登録日 平成23年7月29日 (2011.7.29)

(51) Int.Cl.

F 1

C 1 2 N 5/0775 (2010.01)

C 1 2 N 5/00 2 O 2 H

請求項の数 21 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2006-501414 (P2006-501414)	(73) 特許権者	505304023
(86) (22) 出願日	平成16年2月10日 (2004.2.10)		ダビース, ジョン・イー
(65) 公表番号	特表2006-517102 (P2006-517102A)		カナダ・オンタリオ エム6アール 1 ジ
(43) 公表日	平成18年7月20日 (2006.7.20)		エイ4・トロント・ガーデンアベニュー2
(86) 国際出願番号	PCT/CA2004/000182		8 5
(87) 国際公開番号	W02004/072273	(73) 特許権者	505304034
(87) 国際公開日	平成16年8月26日 (2004.8.26)		バクシユ, ドロレス
審査請求日	平成19年1月26日 (2007.1.26)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州0235
(31) 優先権主張番号	60/446,275		6 ノースイーストン・シェリダンストリー
(32) 優先日	平成15年2月11日 (2003.2.11)		ト255
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(73) 特許権者	505304001
			サルガサー, ラフル
			イギリス・オーエックス3 Oエイチエヌ
			・オックスフォード・ヒューアレンクレツ
			セント70

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト臍帯のウォートンジェリーからの前駆細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト前駆細胞を得る方法であって、ヒト臍帯の脈管周囲ゾーンから該細胞を抽出する工程を含んで成る、上記方法。

【請求項2】

抽出工程が、臍帯から切除された1以上の血管で行われる、請求項1記載の方法。

【請求項3】

適切な細胞抽出媒体内で酵素消化されることにより、細胞が脈管周囲ゾーンからのウォートンジェリーから抽出される、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

酵素消化が、ウォートンジェリーのコラーゲンマトリックスからの細胞の開放をもたらす、請求項3記載の方法。

【請求項5】

ヒト前駆細胞を含んでなる細胞集団の生産方法であって、請求項1～4のいずれかに記載の方法によって得られた細胞を培養する工程を含んでなる、上記方法。

【請求項6】

骨前駆細胞を富化するように該集団を処理する更なる工程を含んでなる、請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

MHCダブルネガティブ表現型を有する前駆細胞を富化するように該集団を処理する更な

10

20

る工程を含んでなる、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

MHC ダブルネガティブ表現型を有する前駆細胞を富化するために、該集団が冷凍／解凍工程を受ける、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

細胞集団が（１）ヒト臍帯の脈管周囲ゾーンのウォートンジェリーから抽出可能であり（２）脈管周囲ゾーンの外側のウォートンジェリーから抽出された他の前駆細胞集団よりも迅速に増殖し（３）骨前駆細胞を含んでなり（４）MHC ダブルネガティブ表現型を有する前駆細胞を含んでなる、ヒト前駆細胞を含んでなる単離された細胞集団。

【請求項 10】

冷凍保存状態にある、請求項 9 記載の細胞集団。

【請求項 11】

請求項 9 記載の細胞集団を骨細胞への分化を誘導する条件下で成長させる工程を含んでなる、骨細胞の生産方法。

【請求項 12】

該細胞が骨形成性の補足物の不存在下で培養される、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

請求項 9 記載の細胞集団を脂肪細胞への分化を誘導する条件下で成長させる工程を含んでなる、脂肪細胞の生産方法。

【請求項 14】

請求項 9 記載の細胞集団を筋芽細胞への分化を誘導する条件下で成長させる工程を含んでなる、筋芽細胞の生産方法。

【請求項 15】

医学的病状、疾患および障害の処置のための薬剤の製造における請求項 9 及び 10 のいずれかに記載の細胞集団の使用。

【請求項 16】

ヒト前駆細胞の集団が、帯の脈管構造から誘導される細胞を本質的に含まない、請求項 1 ～ 8 および 11 ～ 15 に記載の方法。

【請求項 17】

該集団が、帯の血管構造から誘導される細胞を本質的に含まない、請求項 9 及び 10 のいずれかに記載の単離された細胞集団。

【請求項 18】

ヒト前駆細胞を含んでなりそしてヒト臍帯の脈管構造に近接するウォートンジェリーの酵素消化により得られる、ウォートンジェリー抽出物。

【請求項 19】

臍帯血の細胞を本質的に含まない、請求項 18 記載のウォートンジェリー抽出物。

【請求項 20】

近接ウォートンジェリーを担う臍帯脈管構造を適切な細胞抽出媒体内で酵素消化させて得られる、請求項 18 または 19 記載のウォートンジェリー抽出物。

【請求項 21】

酵素消化の工程が、ウォートンジェリーのコラーゲンマトリックスから細胞の開放をもたらし、請求項 18 ～ 20 記載のウォートンジェリー抽出物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、臍帯（UC）の結合組織から迅速に増殖するヒト細胞の集団の取得；骨原性、または骨形成条件におけるかかる細胞の培養；細胞表面組織適合抗原の欠失により示される、免疫学的不適格であるそれら集団内の細胞の高い割合の証明；および各種の細胞に基づく治療のための細胞の供給源として使用されるそれら細胞の能力に関する。

【背景技術】

【0002】

UCは、腸胚形成に続いて形成される最初の構造の一つである（三つの胚芽層の形成）。折り返しが始まると、胚盤は、原始極小体（胚原始体）により原始卵黄嚢（外部胚原始体）に卵黄血管および尿膜血管を介して連結を初め、それらは一方では臍血管を形成するように発展する（非特許文献11、15、17）。それらの血管は、ウォートンジェリー（WJ）と呼ばれる初期胚外部派生物の初期間葉組織と一般に考えられているものの中に支持または囲まれている（非特許文献16）。この初期段階から、妊娠の間にUCは成長し、出産の際に見られる30～50cmの帯となる。従って、WJは、文献（下記参照）に記載の繊維芽細胞様、または筋繊維芽細胞様細胞のみならず、胚および胎児発達の間の帯の成長を支持するために必要なWJの増大する体積を細胞に与えることができる前駆細胞の集団も含むことを期待できる。

10

【0003】

WJは最初にThomas Whartonにより報告され、かれの論文Adenograpiaを1656年に発表した。それはヒアルロン酸を含むプロテオグリカンからなる無定形の基礎物質内に分散した細胞から成るゼラチン状でゆるやかな粘膜質結合組織（非特許文献13）、および各種の形式のコラーゲン（非特許文献9）としてその後定義された。マトリックス内に分散する細胞は、「繊維芽細胞様」と記述され、それは弛緩した帯では星状の形であり、増大した帯では伸長している（非特許文献10）。平滑筋細胞が最初にマトリックス中で観察された（非特許文献6）が、これにはParry（非特許文献10）の異論があり、かれは平滑筋細胞に表面的に類似したいくらか「異常な繊維芽細胞」としてそれを記述した。その後、1993年までほとんどそれら細胞を特性検討する研究はなかったが、その年にTaketira（1993）がそれら細胞の免疫組織化学研究を行った、彼らは、「無定形基礎物質（amorphous ground substance）内に長い細胞質プロセスおよびコラーゲン繊維の網目構造を有する形状の融合形または星形」である「繊維芽細胞様」と細胞を記述した（非特許文献14）。免疫組織化学的染色のために、かれらはアクチンおよびミオシン（細胞質収縮性タンパク質）、ヴィメンチン（vimentin）（胚間葉起源の繊維芽細胞の特徴）およびデスミン（desmin）（筋原性起源の細胞に独特）に対する一次抗体を、どの形式のミオシンがWJ繊維芽細胞に関連するかを決定するために使用した。彼らは、高レベルの化学的に抽出可能なアクトミオシンを観察し、そして繊維芽細胞は細胞質アクトミオシンを含有するけれども、それらはアクチンもミオシンも染色せず、一方WJ繊維芽細胞は両者を確かにに染色することを観察した。さらに、ヴィメンチンおよびデスミンの両者への確かな染色性は、WJ内のそれらの変性繊維芽細胞が初期間葉組織から誘導されたという結論に導かれると認められた（非特許文献14）。その後の最近のNanaevら（非特許文献9）による研究は、予定日前の帯内の間葉前駆細胞を増殖する分化の5工程を明らかにした。かれらの所見は、筋繊維芽細胞がWJマトリックス内に存在するという示唆を支持した。WJの細胞の免疫組織化学的特性研究は、骨形態発生における骨中の前駆細胞の主要な起源として知られる周細胞のそれとの著しい類似を示しそして培地内のコロニー形成単位骨芽細胞（CFU-O）（非特許文献1）と呼ばれる骨小結節も形成できる（非特許文献4）。

20

30

40

【0004】

最近の文献は、UC血液よりもむしろUCから細胞を採取する方法を報告している。Mitcheilら（非特許文献8）は、臍血管を最初に除去破棄して残った組織を採取する方法を記載している。次いで残存するWJ（臍血管はWJ中で完全に包囲されているので一部は血管と一緒に破棄される）および羊膜上皮の両者を含む後者をさいの目切りにして組織培養プレートに移動させる小型組織断片を作製する。次いで、それらの組織断片を、それから細胞が培養基質上を移動する一次外植片として使用する。

【0005】

別の出版物で、Romanovら（非特許文献12）は、かれらの培養物はWJからの細胞を含まなかったことは指摘しているが、帯脈管構造から間葉幹細胞様の細胞を単離す

50

ることに成功したことを指摘している。具体的には、かれらは、臍血管内から一回の15分間のコラゲナーゼ消化を利用し、これは血管内皮およびサブ内皮細胞の混合集団をもたらした。Romanovらは、7日後にこの細胞取得物から少数の繊維芽細胞様細胞が現れたことを示した。

【0006】

また、特許文献1は、ヒトUCのWJから「前-軟骨細胞」を単離する方法および軟骨を産生するためのその使用を記載している。具体的には、該方法は、帯の1インチ断片を長さ方向に切り明け、血管および「ケーシング(Casing)」を切り取り、それは廃棄し、そしてWJを滅菌容器内に集め、そこでそれを培養のための2~3mm³断片に切断する。好ましい方法では、WJの2~3mm³断片をペトリ皿の底にあるスライド

10

ガラス上に置いて細胞を単離し、それを他のスライドで覆い、そして「前-軟骨細胞」が培養皿表面に移動して出させるように10~12日間培養する。

下記の引用文献は引用することにより本明細書に編入される。

【特許文献1】米国特許第5,919,702号明細書

【非特許文献1】Aubin, JE, 1998, Bone stem cells: J Cell Biochem Suppl, v. 30-31, p. 73-82.

【非特許文献2】Beckstead, JH, D F Bainton, 1980, Enzyme histochemistry on bone marrow biopsies: reactions useful in the differential diagnosis of leukemia and lymphoma applied to 2-micron plastic sections: Blood, v. 55, p. 386-394.

20

【非特許文献3】Beckstead, JH, P S Halverson, C A Ries, D F Bainton, 1981, Enzyme histochemistry and immunohistochemistry on biopsy specimens of pathologic human bone marrow: Blood, v. 57, p. 1088-1098.

【非特許文献4】Canfield, AE, M J Doherty, B A Ashton, 2000, Osteogenic potential of vascular pericytes, in JE Davies (ed), Bone Engineering: Toronto, EM Squared, Inc., p. 143-151.

30

【非特許文献5】Caplan, AI, 1991, Mesenchymal stem cells: J Orthop. Res, v. 9, p. 641-650.

【非特許文献6】Chacko, AW, S R M Reynolds, 1954, Architecture of distended and nondistended human umbilical cord tissues, with special reference to the arteries and veins.: Carnegie Institution of Washington, Contributions to Embryology, v. 35, p. 135-150.

【非特許文献7】Friedenstein, AJ, J F Gorskaja, N N Kulagina, 1976, Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs: Exp Hematol, v. 4, p. 267-274.

40

【非特許文献8】Mitchell, KE, M L Weiss, B M Mitchell, P Martin, D Davis, L Morales, B Helwig, M Beerenstrauch, K Abou-Easa, T Hildreth, D Troyer, 2003, Matrix Cells from Wharton's Jelly Form Neurons and Glia: Stem Cells, v. 21, p. 50-60.

【非特許文献9】Nanaev, AK, G Kohnen, A P Milovanov

50

, S P Domogatsky, P Kaufmann, 1997, Stromal Differentiation and Architecture of the Human Umbilical Cord: Placenta, v. 18, p. 53-64.

【非特許文献10】Parry, EW, 1970, Some electron microscope observations on the mesenchymal structures of full-term umbilical cord: Journal of Anatomy, v. 107, p. 505-518.

【非特許文献11】Pereda, P M Motta, 2002, New advances in human embryology: morphofunctional relationship between the embryo and the yolk sac: Medical Electron Microscopy, v. 32, p. 67-78.

【非特許文献12】Romanov, YA, V A Svintsitskaya, V N Smirnov, 2003, Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord: Stem Cells, v. 21, p. 105-110.

【非特許文献13】Schoenberg, MD, A Hinman, R D Moore, 1960, Studies on connective tissue V, Fiber formation in Wharton's Jelly. : Laboratory Investigation, v. 9. p. 350-355.

【非特許文献14】Takechi, K, Y Kuwabara, M Mizuno, 1993, Ultrastructural and Immunohistochemical Studies of Wharton's Jelly Umbilical Cord Cells: Placenta, v. 14, p. 235-245.

【非特許文献15】Tuchmann-Duplessis, H, G David, P Haegel, 1972, Illustrated Human Embryology, New York, Springer-Verlag, p. 54-61.

【非特許文献16】Weiss, L, 1983, Histology: cell and tissue biology, New York, Elsevier Biomedical, p. 997-998.

【非特許文献17】Haynes worth 1998

【発明の開示】

【0007】

ヒト前駆細胞を含んでなる細胞集団を提供することが本発明の目的である。

【0008】

ヒト前駆細胞が抽出できる供給源を提供することが本発明の別の目的である。

【0009】

ヒト前駆細胞の単離のための方法を提供することが本発明のさらなる目的である。

【0010】

骨組織の産生に有用なヒト骨前駆細胞 (human osteoprogenitor cells) を提供することが本発明のさらなる目的である。

【0011】

治療に有用なヒト免疫不適格前駆細胞 (immuno-incompetent progenitor cells) を提供することが本発明のさらなる目的である。

【発明の要約】

【0012】

ヒト臍帯のウォートンゼリーから細胞を抽出する方法は考案されており、それは主要

10

20

30

40

50

組織適合マーカー（ヒト白血球抗原（H L A）ダブルネガティブ）のいずれも示さない免疫不適格細胞を含む、迅速な増殖、骨形成およびその他のヒト前駆細胞の存在を特徴とする独特の細胞集団をもたらす。細胞集団は、それから骨およびその他の結合組織を成長させ、そして治療目的で患者へ前駆細胞の自律および同種移動をさせる前駆細胞の有用な起源である。

【0013】

さらに特定し、そして本発明の一つの局面によると、抽出物がヒト前駆細胞を含んでなり、そして脈管周囲ゾーンと呼ばれる有用な領域内でヒト臍帯の脈管構造に近接するウォートンジェリーの酵素消化により得られるウォートンジェリー抽出物を提供する。抽出物は、細胞の臍帯血液からの細胞、UCおよび帯の脈管構造から誘導される外皮細胞または内皮細胞を本質的に含まない抽出物をもららすために適し、ここで血管構造は動脈または静脈の内膜、中膜、外膜として定義される。

10

【0014】

その別の一つの局面によると、本発明は、本発明に従って得られるウォートン抽出物からの細胞を単離する工程を含んでなる、ヒト前駆細胞を得るための方法を提供する。

【0015】

関連する局面では、本発明は、ウォートンジェリー抽出物内に存在する細胞の培養により得られる細胞集団を提供する。ある態様では、骨前駆細胞の集団を提供する。別の態様では、免疫不適格前駆細胞の集団を提供する。

20

【0016】

本発明により、さもないければかかる分化に必要な補足物（s u p p l e m e n t）がなくて培養された、骨細胞への分化の性質を特徴とすることを約束（c o m m i t）された骨前駆細胞の集団も提供する。

【0017】

別の局面では、本発明は、ウォートンジェリー抽出物から得られた細胞にそれらの細胞を所望の結合組織表現型に分化するように導く条件を与える工程を含んでなる、結合組織および特には骨組織を産生するための方法を提供する。この観点では、本発明は、医学的病状、疾患および障害の細胞移植媒介処置を含む、細胞に基づく治療におけるかかる細胞の使用をさらに提供する。

【0018】

本発明は、骨前駆細胞を含むヒト前駆細胞を含んでなる迅速増殖細胞集団、ならびに免疫不適格細胞の供給源としてのウォートンジェリー（W J）の抽出物を提供する。

30

【0019】

本明細書中に使用される場合、「前駆細胞」という用語は、制御および／または規定された条件下で与えられた表現型の細胞に分化する細胞を呼ぶ。従って、骨前駆細胞は、骨芽細胞系統に約束された前駆細胞であり、そしてかかる約束および分化のために確立された条件下で培養された場合に最終的には骨組織を形成する。「免疫不適格」である前駆細胞は、クラス I およびクラス II 主要組織適合複合体（M H C）と関連する表面抗原に陰性である表現型を有する細胞である。かかる前駆細胞は、本明細書中で H L A ダブルネガティブとも呼ぶ。

40

【0020】

W J から抽出された細胞集団は、「迅速増殖」も特徴とし、それは前駆細胞増大（e x p a n s i o n）に標準的な条件下で、他の既知の前駆細胞集団と比較した抽出細胞が増殖する速度を呼ぶ。本明細書中に提出する実験結果から認められるように、そして図 16 に示すように、本前駆細胞集団は、少なくとも約 25 時間、速ければ 15 時間以内に倍増でき、従って、他の既知の骨前駆細胞集団およびその他の W J から抽出された前駆細胞集団よりさらに迅速に増殖する。

【0021】

本発明の細胞および細胞集団は、ヒト臍帯の W J から抽出により得ることができる。先行技術とは異なり、本発明によると、かかる細胞は、臍脈管構造の外壁と関連すなわち近

50

接するW Jから抽出される。帯脈管構造の外表面と関連するかまたはそれに非常に近いウォートンジェリーは、脈管周囲ゾーンと呼ばれる領域内にあり、そして典型的には、ウォートンジェリーを帯から抽出するか、または帯および関連するウォートンジェリーから血管を抽出するかのいずれかのために行われるように、帯から血管が切り取られた場合に、脈管構造と関連して残る。この脈管周囲ゾーン内にありそして先行技術の慣行では典型的には破棄されるウォートンジェリーは、本明細書中に記載の特性を有する前駆細胞の豊かな供給源であることが驚いたことに見いだされた。従って、本発明は、この特定の脈管周囲ゾーンからのウォートンジェリーを有用なヒト前駆細胞の供給として開拓する。

【0022】

ヒト臍帯からかかるウォートンジェリーを抽出するために、好ましい態様では、抽出プロセスの間に、臍帯血管の細胞、U Cの外皮細胞または内皮細胞、および帯の血管構造から導かれる細胞の抽出を回避するために注意し、ここで血管構造は動脈または静脈の内膜、中膜および外膜として定義される。それらの望ましくない細胞を本質的に含まない抽出物を得ることは、切除の前の注意した臍帯のフラッシングおよび洗浄、次いで帯内からの血管の注意した切除により得られる。脈管周囲ウォートンジェリーが血管と共に除去される場合に周囲の帯組織から血管を注意して引き取ることができる。それらの望ましくない細胞抽出の回避を注意しても、それらは得られた抽出物内に少量存在するかも知れないことが認められる。これは、本明細書中に示す観察結果、すなわち間葉および特に中胚葉起源から導かれた細胞コロニーの観察、C F U-Oの形成の頻度および迅速度、および培養した集団内に観察されるH L A表現型の特性検討を妨害するには低すぎる頻度で起きる限り許容できる。

【0023】

脈管周囲ゾーンに存在するW Jは、臍脈管構造の外壁に近接するウォートンジェリーであり、典型的には血管外壁から約3 mmまで及ぶゾーン内にある。適切には、標的抽出ゾーンは、3本の血管のいずれか一つの外壁から約2 mm、例えば約1 mm内にあることができる。この領域からのW Jの抽出は、実施例中に記載の方法を用いて迅速に行える。この技術では、血管をW Jの担体として利用し、そしてジェリーを担う血管自体は前駆細胞が抽出される基盤として利用される。従って、本発明の態様では、W Jの薄い皮膜を担う帯血管は、外科的または手作業で、すべての帯血液汚染物を本質的に除去するように徹底的に洗浄された新しい臍帯から切り取られる。近接ウォートンジェリーを担う血管またはその一部を次いで約37℃で、所望の細胞が存在するW Jのコラーゲンマトリックスを消化するために適する酵素を含む抽出媒体、例えばリン酸緩衝食塩水(PBS)中でインキュベーションする。この目的で、約0.1 mg/mL~1.0 mg/mLの範囲内またはそれ以上、例えば0.5 mg/mLの濃度のコラゲナーゼを用いる消化が適当である。抽出の間に、血管の末端を結ぶかまたはクリップ止めし、そして血管内に含まれる薬剤による汚染を防ぐために抽出媒体に懸濁できる。従ってこのウォートンジェリー抽出物は、帯血液細胞および血管内皮細胞を本質的に含まないことが認められる。

【0024】

抽出媒体内の約24時間、例えば12~36時間、例えば18~24時間後に、血管を取り除き、ヒト前駆細胞を含むウォートンジェリー抽出物を残す。これらの細胞を前駆細胞の増大に標準的な条件下で増大させる。細胞は、例えば付着細胞を選択するためにポリスチレン上、例えばポリスチレン皿またはフラスコ内で選択でき、次いで適切な培養媒体内に保持される。本発明の一つの態様では、抽出された細胞を付着細胞の事前選択をするかまたはしないで増大するために、攪拌懸濁の条件下で培養し、これは例えばBakshらが国際公開(WO)第02/086104号明細書に記載のようなものであり、その開示は引用することによりすべて本明細書中に編入される。

【0025】

直接または増大の後、抽出物内に存在する細胞は、与えられた表現型の細胞を富化(enrich)された増大可能なサブ集団を与える確立された技術を用いて分別できる。従って、本発明は、さらに、骨前駆細胞を富化したEJ抽出細胞集団、免疫不適格前駆細胞

10

20

30

40

50

を富化した細胞集団、および免疫不適格である骨前駆細胞を富化した細胞集団を提供する。

【0026】

図17で明らかにしたように、前駆細胞集団内のMHCマーカーの分布は冷凍－解凍により改変できることが認められる。新しい細胞を継代 (p a s s a g e) すると、MHCダブルネガティブ細胞の頻度は相対的に一定もしくは僅かに増加する。しかし、本明細書中の実施例から認められるように、前駆細胞集団中のMHCダブルネガティブ細胞の頻度は冷凍後にプレートされた細胞中で著しく増加することが認められる。従って、本前駆細胞集団中で、MHCダブルネガティブ表現型の細胞は、冷凍後の頻度増加の性向をさらに特徴とする。かかる冷凍は、通常の方法で、最初に細胞のアリコートを作製し、次いで所望の期間細胞調製物を貯蔵して行われる。かかる細胞は、望む場合には多年にわたって貯蔵できることが認められる。

10

【0027】

一つの態様では、本発明はウォートンジェリー抽出物を本明細書に記載のようにして、または抽出物またはその画分を冷凍し、次いで冷凍細胞を培養してそのMHCダブルネガティブの富化画分を得て、MHCダブルネガティブ前駆細胞を産生するための方法をさらに提供する。上記のようにして得られた細胞は、ヒト患者内の組織形成または修復を誘導するために有用である可能性がある。

【0028】

抽出物からまたは適当に富化したその画分から得られた細胞集団は、分化した細胞集団を提供するために直接またはそれらを増大した後のいずれでも有用である。それらの分別および富化のため、およびそれらの増大のために適するすべての手順は、先行技術で確立されており、そして本明細書中に例示される。増大は、例えば因子、例えばIL-3および幹細胞因子、および当該技術分野では既知の同様の薬剤の存在下で進行できる。一つの態様では、本細胞集団、および特にはその中の骨前駆細胞は、それらから骨組織の成長のために確立された条件を用いて分化させる。注意すべきは、約束された骨前駆細胞と呼ばれる、本前駆細胞集団の培養物から生成した骨前駆細胞のサブ集団が、骨形成性補足物が存在しないでも分化する能力を示したことである。あるいは、骨前駆細胞は、1種またはそれ以上の骨形成を刺激する薬剤、例えばデキサメタゾンを補足した媒体内で培養される。さらに、前駆細胞は、軟骨、筋肉、腱、脂肪等を含む他の間葉誘導結合組織 (C a p l a n, 1991、非特許文献5) 内に、すべて当該技術分野での標準手順に従って、分化を刺激するために適する補足物と一緒に培養もできる。

20

30

【0029】

本細胞集団内の細胞のin v i t r o培養に代わる実際的な方法として、細胞は、患者内で直接所望の組織の形成を誘導するためにin v i v o移植ができることが認められる。この経路によると、骨のin s i t u形成は、特に骨折および骨粗鬆症を含む各種の骨の病状、疾患および障害に罹患している患者の利益のために、骨前駆細胞の移植により提供される。それらの移植後に予想できる拒絶反応がかなり減少するならば、細胞集団中に存在する免疫不適格前駆細胞は、これに関して特に価値がある。

【0030】

本発明の態様は、以下の実施例中に記載する。

ヒトウォートンジェリーから前駆細胞の採取

UCは、Sunnybrook & Women's College Hospital, Toronto, Canadaで出産直後の期間満了帝王切開幼児から採取された。UCは媒体 (75% α -MEM、15% ウシ胎児血清 (FBS)、10% 抗生物質) を含む滅菌容器内に外科医により移され、そして直ちにInstitute of Biomaterials & Biomedical Engineering, University of Torontoにある我々の実験室に輸送された。

【0031】

この時点以降のすべての手順は、生物学的に安全なキャビネット内で無菌状態で行われ

40

50

た。UCをリン酸緩衝食塩水(PBS) ($-Mg^{2+}$ 、 $-Ca^{2+}$) 内で3回洗浄してUC血をできるだけ除去し、そして媒体を入れた容器内に戻した。長さ約6 cmの帯を滅菌した鋏で切断しそして滅菌コルク解剖ボード上に置いた。残った帯(30~45 cm)を媒体を充填した容器に戻しそして37℃のインキュベーター内に置いた。帯の6 cm断片をそのらせんの反対に「捩じり」、そして両端をピンで止めてUC外皮の平滑で真っ直ぐな表面を現した。小型の鋏を用いて、UCをその長さに沿って深さ1~2 mmで切ってWJを現した。切断外皮のそれぞれの「フラップ」から初めて、メスの刃のない側を用いてその内面からWJを細かく切り取りそして切り取った外皮(厚さ約0.5 mm)をピンで止めた。この手順で、そしてその長軸に沿ってラセン状ではなく端から端まで直線状に走って埋まっている3本の血管と共にWJが暴露された。常に断片を37℃のPBSに浸すことに注意した。ピンセットで血管の一端を離し、それがWJマトリックスの本体から離れるまでその長さに沿ってWJから細かく切り取った。あるいは、血管の中央をマトリックスから切り取り、ピンセットで保持し、そしてその末端に向かって両方向にマトリックスから細断した。いずれかの方法で自由になると、細胞を有するWJマトリックスの約1~2 mmで血管は囲まれた。次いで切断した血管を外科用クランプ、モスキートクリップまたは縫合して両端を止めて「ループ」を作り、血管を出入りする液体の動きを遮断した。「ループ」は直ちに鋏と一緒にPBS ($-Mg^{2+}$ 、 $-Ca^{2+}$) を加えた0.5 mg/ml コラゲナーゼ溶液を含む15 ml 試験管内に入れ、そして37℃でインキュベーター内に置いた。残った2本の血管を同様に切断し、ループを作り、そして同様にインキュベーター内にコラゲナーゼ溶液中で置いた。血管除去の後、WJの断片は容易に外皮を取り去ることができそしてコラゲナーゼ溶液と一緒に15 ml 試験管内に入れた。次いで残った外皮層は生物性有害物質容器内に廃棄した。残りの30~45 cmのUCについても同じプロトコルを用いて「ループ」またはWJストリップの15~25本の試験管が得られた。

10

20

ウォートンジェリー前駆細胞培養の開始

18~24時間後に、それらに付属する懸垂クランプまたは縫合糸およびピペットを用いて「ループ」を除き、そして残った懸濁液を $T-75\text{ cm}^2$ 組織培養ポリスチレン皿上に直接置き、そして細胞をポリスチレン表面に付着させるように72時間そのままにした。次いで媒体を2日毎に交換した。

【0032】

30

付着した細胞を7日後に1%トリプシン溶液を用いて継代させ、その時点でそれらは光学顕微鏡で観察して80~90%集密を示し、そして位相差顕微鏡で観察して「無機化(mineralized)」凝集物形成の証拠があり、そして光学的性質に期待通りの変化を示した。継代の際、細胞を35 mm組織培養ポリスチレン皿または6 ウェルプレート のいずれかに、75% α -MEM、15% FBS、10% 抗生物質内で 1×10^4 細胞/ cm^2 としそして 10^{-8} M Dex、5 mM β -GPおよび50 $\mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸で処理して、それらの細胞の骨形成能力を試験した。これらのプレートは、培養の2、3、4および5日目に、CFU-O、あるいは「骨小結節」形成と呼ばれる物について培養物を観察した。

【0033】

40

ウォートンジェリー前駆細胞培養物を得るためのその他の有用な方法では、下記のプロトコルを用いた。

【0034】

1. 帝王切開患者から滅菌した臍帯(UC)を入手しそして媒体(80% α -MEM、20% 抗生物質)内の生物学的安全キャビネットに輸送し、
2. 滅菌した37℃のリン酸緩衝食塩水(PBS)で二回UCを洗浄し、
3. 鋭い鋏を用いてUCを約1~2インチの断片に切断し、
4. 滅菌37℃PBS中で二回、各UC断片を洗浄して残留臍帯血(UCB)をできるだけ除去し、
5. 乾燥した滅菌皿上にUC断片の一つを単離し、

50

6. 鉗子2組を用いて、外皮を約2 mm離れて掴み、そして互いに引き離して外皮を引裂き、

7. UC断片の長さに沿って外皮を掴み、外皮の引き裂きを続け、その下のWJを暴露し、

8. 工程6と同様に、外皮の約半分が取り去られるまで「ストリップ」状に外皮を引裂き、

9. WJを通じて臍血管が明瞭に見え、そしてUC断片の切断端に末端が遊離し、

10. 鉗子一組を用いて外皮の残った部分を掴み、そして他の鉗子で血管の端を掴み、血管を本体WJから周囲のPVWJと一緒に血管を「引き取る」ことができ、

11. 下にあるWJマトリックスから3本ともに離れるまでこの手順を各血管に反復し、

12. 離れると各血管を37℃PBS中に配置し、

13. すべての血管が滅菌37℃PBS充填ビーカー内に単離されるまでUCの各断片を用いて工程5～12を反復し、

14. 次いで、清浄で滅菌した表面上に各血管を個別に置き、ダブルノットを用いる縫合を用いて「ループ」状に末端を一緒に括ることができ、

15. すべての血管をループ状に括ると、ループを50 ml試験管の中の1 mg/ml コラゲナーゼ溶液内に入れ、

16. 50 ml試験管を37℃、5%CO₂ インキュベーター内で回転皿上に一晚置き、

17. 次の日に、1 mlウシ胎児血清(FBS) 1 mlを用いてコラゲナーゼを不活性化し、そしてループを懸濁液から取り出し

18. 残った懸濁液をPBSで希釈し、1150 rpmで5分間遠心分離し、そして上清を取り除き、

19. ペレット内に残った細胞を補足媒体(SM) (75%α-MEM、15%FBS、20%抗生物質)中に再懸濁し、そしてアリコートを血球計で計数し、

20. 次いで細胞懸濁液をT-25組織培養ポリスチレンフラスコ内にプレートしそして増殖させ、

21. 細胞がサブ集密となるまで2日毎にSMを交換し(1～2週間)、その時点でそれらをサブ培養(継代)する。

前駆体アッセイ

細胞増殖アッセイ

週毎の継代手順(6日毎に実施)の間に、 2×10^5 細胞のアリコートを20個のT-25 cm² 組織培養ポリスチレンフラスコ内にプレートした。培養の2、4、6、10および12日目に、T-25フラスコ4個を継代し、そして細胞を計数した。それらの細胞の指数関数的増殖をプロットし、それらの培養物中の細胞について平均倍增時間を算出した。結果を図16に示す。PVWJ細胞培養物の倍增時間は全培養期間を通じて約24時間であることが認められる。対数相の間に、倍增時間は注目に値する16時間である。これは、骨髓間葉細胞の約33時間(Cong et al., P. J. Minguell, 1999, Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells: Journal of Cell Physiology, V. 181, p. 67-73) および脂肪組織から誘導された間葉幹細胞の約3.2日(Sen et al., J. Cell Biochem., v. 81, p. 312-319)の文献報告の倍增時間と比較される。

【0035】

図15に示すように、脈管周囲ウォートンジェリー(PVWJ)誘導前駆細胞は、前駆細胞の異なるサブ集団を含んでなる。この集団内に、かかる分化を誘導するために通常必要な培養補足剤なし、例えばデキサメタゾンの存在なしで培養して、本明細書に示すように、骨小結節を形成する能力を特徴とするいわゆる「約束された」骨前駆細胞がある。こ

の拘束された骨前駆細胞は、骨小結節を形成するように自発的に分化する。P V W J 前駆細胞集団内にも、所要の因子、例えばデキサメタゾン、 β -グリセロリン酸およびアスコルビン酸の存在下で培養すると、骨小結節を形成するように誘導できる骨前駆細胞がある。従って、図15に図示した「全骨前駆細胞」サブ集団は、「拘束された骨前駆細胞」集団、ならびに「拘束されない骨前駆細胞」集団も含み、そして骨形成系統まで分化して誘導できる細胞の全数を示す。「拘束された」と「拘束されない」集団の間の実際の比率は約1:1であり、従って「全骨前駆細胞」集団と「拘束された骨前駆細胞」集団との間の比率は約2:1である。前駆細胞の骨形成特性の解析は、下記のように行った。

C F U - O アッセイ

週毎の継代手順の間に、試験細胞集団のアリコート、75% α -MEM、15% FBS (StemCell, バッチ番号#: S13E40)、10% 抗生物質溶液 (ペニシリンG (167単位/ml)、ゲンタマイシン (50 μ g/ml) およびアンフォテリシンB (0.3 μ g/ml) 含有)、およびDex (10⁻⁸ M)、 β -グリセロリン酸 (5 mM) およびL-アスコルビン酸 (50 μ g/ml) を含む骨形成媒体中、1 x 10⁴ 細胞/cm² の細胞接種密度で、組織培養ポリスチレン上に直接プレートした。培養物を12日間、二日目毎に再栄養供給した。骨小結節として検出される無機化小結節形成領域が観察されるまで (通常3日) 培養物を維持し、その時点で培養物に最終培養再栄養供給において媒体を含むテトラサイクリンを再供給し、次いでKarnovskyの固定液中に固定して分析に備えた。Leitz Aristoplan顕微鏡 (Esselte Leitz GmbH & Co. KG, Stuttgart, Germany) を位相コントラストならびにUV蛍光下でテトラサイクリン標識培養物を可視化するために使用し、そして加速電圧15 kVのHitachi S-2000走査電子顕微鏡を形態的に同定できる骨マトリックスの存在を証明するための画像を得るために使用した。

データ解析

テトラサイクリン染色

テトラサイクリン (9 μ g/ml) を終結の前に培養物に加えた。終結の際に、細胞をKarnovskyの固定液中で一晩固定し次いで小結節領域の無機成分のテトラサイクリン標識のUV励起蛍光画像により観察した。

走査電子顕微鏡 (SEM)

C F U - O 培養物の代表試料を最初に70%、80%、90%および95%エタノール中に1時間、次いで100%エタノールに3時間浸漬してSEMのために準備した。次いでそれらを臨界点乾燥した。約3 nm層の金層をPolaron SC515 SEM Coating Systemを用いて試料上にスパッタリング被覆し、ついでこれを加速電圧15 kVのHitachi S-2000走査電子顕微鏡で種々の倍率で検査した。得られた画像を形態的に同定できる骨マトリックスの存在を証明するために使用した。

HLA-分類のためのフローサイトメトリー

1 x 10⁵ 細胞を越える試験細胞集団を2% FBS (StemCell バッチ番号#: S13E40) を含むPBS中で洗浄しそしてPBS + 2% FBS中に下記の複合 (conjugated) マウスIgG1 HLA-A, B, C-PEおよびHLA-DR, DP, DQ-FITCの飽和濃度 (1:100希釈) で、30分間、4°Cで再懸濁した。細胞懸濁液をPBS + 2% FBSで2回洗浄し、1 μ g/ml 7-AAD (BD Biosciences) で染色しそしてExpoADCXL4ソフトウェア (Beckman-Coulter) を用いるフローサイトメトリー (XL, Beckman-Coulter, Miami, FL) の分析のためにPBS + 2% FBS中に再懸濁した。陽性の染色は、マッチしたアイソタイプ抗体 (FITC-およびPE-複合マウスIgG1、 κ モノクローナルアイソタイプ標準、BD Biosciences) を用いて染色した対照集団からの細胞の99%以上により得られたレベルを越える蛍光シグナルの発光として定義された。各試料に対して、少なくとも10,000リストモード (list mode) イベントが集められた。すべてのプロットはEXPO 32 ADC分析ソフトウェアで得られた。

結果

骨小結節コロニーの光学顕微鏡画像

図3、4および5は、3日目および5日目において培養物内に存在したCFU-Oを示す。それらは、骨マトリックスを産生する多角形細胞の「凝集」により表される小結節領域を取り巻く「繊維芽細胞様」細胞の集密層を示す。これらのCFU-Oは、Dex (+) およびDex (-) 培養物の双方で観察され、そして継続する継代でも同様の形態を示した。

CFU-O培養物のテトラサイクリン標識

培養物のテトラサイクリン標識は、骨の生物学的無機相と関連する新規形成リン酸カルシウムを標識するために使用された。培養物のテトラサイクリン標識は、無機化小結節領域と一致し、それは培養物のUV光への暴露により可視化された。図6および7は、WJ前駆細胞の培養3日目および5日目のテトラサイクリン標識CFU-O培養物を示す。それらの画像は、UV励起蛍光イメージングで発生し撮影された。

走査顕微鏡測定

CFU-Oは、SEM下で、成熟CFU-O内の高密度無機化マトリックスへのコラーゲン形成の初期段階からのCFU-Oの形成を証明する無機化コラーゲンマトリックスの形成について観察された。図8、9、10、11、12および14は、CFU-Oの走査顕微鏡画像を示す。

フローサイトメトリーおよびHLA分類

両方の主要組織適合複合体(MHC)を表す細胞表面抗原を同定するフローサイトメトリーは、MHC-/-のような単離細胞の集団の77.4%を示した。図13は、陰性対照に関連するフローサイトメトリー結果を示す。図17は、前駆細胞集団内のMHC-/-細胞の頻度に対する冷凍-解凍のインパクトを示す。冷凍-解凍の効果は、以下のよう

【0036】

1×10^5 細胞を越える試験細胞集団を2%FBSを含むPBS中で洗浄しそして下記の複合マウスIgG1 HLA-A, B, C-PE (BD Biosciences #555553, Lot M076246) (MHC I)、HLA-DR, DP, DQ-FITC (BD Biosciences #555558, Lot M074842) (MHC II) およびCD45-Cy-Cychrome (BD Biosciences #555484, Lot 0000035746) の飽和濃度(1:100希釈)を有するPBS+2%FBS中に30分間、4℃で再懸濁した。細胞懸濁液をPBS+2%FBSを用いて2回洗浄しそしてExpoADCXL4ソフトウェアを用いるフローサイトメーター(XL、Beckman-Coulter, Miami, FL)での分析のためにPBS+2%FBS中に再懸濁した。陽性の染色は、マッチしたアイソタイプ抗体(FITC-, PE-, and Cy-cychrome複合マウスIgG1、κモノクローナルアイソタイプ標準、BD Biosciences)を用いて染色した対照集団からの細胞の99%以上で得られたレベルを越える蛍光シグナルの発光として定義され、これはヒトBM試料の陽性蛍光により確認された。各試料に対して、少なくとも10,000リストモード(list mode)イベントが集められた。すべてのプロットはEXPO 3.2 ADC分析ソフトウェアで得られた。

サブ集団および細胞接種

付着した細胞は、7日後に0.1%トリプシン溶液を用いてサブ培養(継代)され、その時点で光学顕微鏡で観察して80~90%の集密を示した。継代すると、PVWJ(脈管周囲ゾーンウォートンジェリー)細胞がMHC-A, B, C、MHC-DR, DP, DQおよびCD45の発現に関するフローサイトメトリーにより観察された。次いで、それらをSM中 4×10^3 細胞/cm² でT-75組織培養ポリスチレンフラスコ中にプレートし、そして 10^{-8} M Dex、5mMβ-GPおよび50μg/mlアスコルビン酸で処理してそれらの細胞の骨原性能力を試験した。それらのフラスコを培養の2、3、4、5および6日目にCFU-Oまたは骨小結節、形成について観察した。継代手順か

らのあらゆる残留細胞は将来の使用のために冷凍保存した。

細胞の冷凍保存

1×10^6 PVWJ細胞のアリコートをし、90% FBS、10%ジメチルスルホキシド (DMSO) (Sigma D-2650, Lot # 11K2320) を含む全体積 1 ml に調製し、そして 1 ml ポリプロピレン冷凍バイアル中にピペットで移した。該バイアルを -70°C 冷凍庫中に一晩置き、そして次の日に -150°C 冷凍庫に長期保存のために移した。冷凍保存 1 週間後、PVWJ細胞を解冻しそして MHC-A, B, C, MHC-DR, DP, DQ および CD45 の発現に関するフローサイトメトリーにより観察した。第二のアリコートは、PVWJ細胞を冷凍保存 1 週間後に解冻し、1 週間再培養し、サブ培養し次いで MHC-A, B, C, MHC-DR, DP, DQ および CD45 の発現に関するフローサイトメトリーによる再分析に使用した。

10

【0037】

結果を図 17 に示す。新しい細胞集団内の MHC- / - の頻度は数回の継代を経ても維持されることが認められる。継代の後に新しい細胞を冷凍し、 -150°C で 1 週間置き、次いで MHC 表現型に関して直ちに分析すると、分析した集団は MHC- / - 表現型の細胞の著しく増えた頻度を示す。これに従って、そして本発明の態様により、MHC- / - 表現型の細胞は、冷凍により PVWJ細胞の集団から有用に富化できる。さらなる富化は、あらかじめ冷凍した細胞の培養物の継代により実現する。冷凍した PVWJ細胞自体は、そのれらが免疫不適格性であればヒト治療に非常に有用である可能性がある。

20

【0038】

上記のように、PVWJ先駆細胞集団は、かかる分化に適当な条件下で培養して、骨以外の間葉細胞および組織の増加を与えるように開発してもよい。例えば、脂肪細胞を発生させるために、前駆細胞を 10^4 細胞 / cm^2 の濃度で調製しそして 35 mm 組織培養皿にプレートする。細胞を前脂肪細胞媒体 (PM) (DMEM / Ham's F-10 (1:1, vol / vol), 10% ウシ胎児血清、15 mM HEPES, 100 U / ml ペニシリン、100 μg / ml ストレプトマイシン、0.25 μg / ml アンフォテリシン B) 中に 3 日間維持する。3 日後、PM を取り去り、そして細胞に脂肪生成媒体 (DMEM / Ham's F-10 栄養ブロス、1:1, vol / vol、HEPES 緩衝液 (15 mM)、ウシ胎児血清 (3%)、ビオチン (33 μM)、パントテン酸 (17 μM)、ヒトインスリン (100 nM)、デキサメタゾン (0.5 μM)、PPARY アゴニスト (100 nM) および抗生物質) を供給し、そして 3 日間培養する。3 日間の誘導の後、脂肪生成媒体を取り除き、そして培養物を脂肪細胞媒体 (AM) (DMEM / Ham's F-10 (1:1, vol / vol)、3% ウシ胎児血清、1 μM デキサメタゾン、100 nM ヒトインスリン、33 μM D-ビオチン、17 μM パントテン酸 Na、15 mM HEPES, 100 U / ml ペニシリン、100 μg / ml ストレプトマイシン、0.25 μg / ml アンフォテリシン B) 中に維持し、3 日毎に定期的に供給し、媒体の半分を取り除き、等量の AM を供給するように注意し、それは媒体を取り除くと脂肪細胞が浮くからである。4 回供給の後 (12 日)、細胞は脂質小滴で丸くなったように見える。脂肪細胞内への分化した間葉細胞の陽性の同定は、Oil Red O と Nile Red を用いる染色により確認できる。

30

40

【0039】

同様に、軟骨細胞は、 10^4 細胞 / cm^2 の濃度で調製された細胞懸濁液を用いそして 35 mm 組織培養皿にプレートして生成してもよい。促進するために、軟骨細胞は血清を用いずそして形質転換成長因子 $\beta 3$ を用いて培養される。細胞ペレットは、多層でマトリックスに富んだ形態を発生しそして組織学的には培養の間にプロテオグリカンに富む細胞外マトリックスの増加を示す。

【0040】

筋芽細胞を発生させるために、細胞懸濁液は、濃度 10^4 細胞 / cm^2 で 35 mm 組織培養皿にプレートして調製できる。細胞は、15% ウシ胎児血清 (FBS) を補足した MCDB 120 媒体中に 1 週間保持される (筋芽細胞増殖媒体、MPM)。1 週間で、

50

基礎媒体 (MPM) 中の血清レベルは 2 % に低下し (筋芽細胞分化媒体、MDM) そして培養を 7 日後に停止する。週に 3 回適当な培養媒体を培養物に供給する。

【0041】

このように、本発明は、骨を含む種々の結合組織の産生に有用な性質を有するヒト前駆細胞を提供し、そしてさらに、骨疾患および障害を含む結合組織病状を処置するためのヒト患者への移植のために、免疫不適格でありそして理想的な前駆細胞も提供する。ヒト前駆細胞は、帯血管の外壁の近傍にいたる脈管周囲ゾーンと呼ばれるヒト臍帯ウォートンジェリーの特定のゾーンの抽出物から生成される。このゾーンから抽出された細胞集団は、迅速な増殖、細胞形態の変化を含む顕著な性質を示し、これはすべてのサブ培養フラスコ内で 7 日以内に起きる細胞コロニーの形成 (約 7 ~ 10 回の倍増) および培地に骨形成性補足物を添加することなく骨小結節形成の出現、ならびに MHC ダブルネガティブ細胞の相対的に高い頻度、冷凍された細胞の培養の際に増加する頻度から見て取れる。

10

【0042】

以下の参考文献が引用によって加えられる。

【0043】

Aubin, JE, 1998, Bone stem cells: J Cell Biochem Suppl, v. 30-31, p. 73-82.

Beckstead, JH, D F Bainton, 1980, Enzyme histochemistry on bone marrow biopsies: reactions useful in the differential diagnosis of leukemia and lymphoma applied to 2-micron plastic sections: Blood, v. 55, p. 386-394.

20

Beckstead, JH, P S Halverson, C A Ries, D F Bainton, 1981, Enzyme histochemistry and immunohistochemistry on biopsy specimens of pathologic human bone marrow: Blood, v. 57, p. 1088-1098.

Canfield, AE, M J Doherty, B A Ashton, 2000, Osteogenic potential of vascular pericytes, in JE Davies (ed), Bone Engineering: Toronto, EM Squared, Inc., p. 143-151.

30

Caplan, AI, 1991, Mesenchymal stem cells: J Orthop. Res, v. 9, p. 641-650.

Chacko, AW, S R M Reynolds, 1954, Architecture of distended and nondistended human umbilical cord tissues, with special reference to the arteries and veins. : Carnegie Institution of Washington, Contributions to Embryology, v. 35, p. 135-150.

40

Friedenstein, AJ, J F Gorskaja, N N Kulagina, 1976, Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs: Exp Hematol, v. 4, p. 267-274.

Mitchell, KE, M L Weiss, B M Mitchell, P Martin, D Davis, L Morales, B Helwig, M Beerensrauch, K Abou-Easa, T Hildreth, D Troyer, 2003, Matrix Cells from Wharton's Jelly Form Neurons and Glia: Stem Cells, v. 21, p. 50-60.

50

Nanaev, AK, G Kohnen, A P Milovanov, S P Domogatsky, P Kaufmann, 1997, Stromal Differentiation and Architecture of the Human Umbilical Cord: Placenta, v. 18, p. 53-64.

Parry, EW, 1970, Some electron microscope observations on the mesenchymal structures of full-term umbilical cord: Journal of Anatomy, v. 107, p. 505-518.

Pereda, P M Motta, 2002, New advances in human embryology: morphofunctional relationship between the embryo and the yolk sac: Medical Electron Microscopy, v. 32, p. 67-78. 10

Romanov, YA, V A Svintsitskaya, V N Smirnov, 2003, Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord: Stem Cells, v. 21, p. 105-110.

Schoenberg, MD, A Hinman, R D Moore, 1960, Studies on connective tissue V, Feber formation in Wharton's Jelly. : Laboratory Investigation, v. 9. p. 350-355. 20

Takechi, K, Y Kuwabara, M Mizuno, 1993, Ultrastructural and Immunohistochemical Studies of Wharton's Jelly Umbilical Cord Cells: Placenta, v. 14, p. 235-245.

Tuchmann-Duplessis, H, G David, P Haegel, 1972, Illustrated Human Embryology, New York, Springer-Verlag, p. 54-61.

Weiss, L, 1983, Histology: cell and tissue biology, New York, Elseiver Biomedica i, p. 997-998. 30

【0044】

本発明のこれらおよびその他の局面は、下記の図面を参照してさらに詳細に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】ヒトUC内で示される組織の3個の明確なゾーンを示す光学顕微鏡画像である。

【図2】コラゲナーゼ溶液内のループ状血管の代表的な図である。

【図3】ポリスチレン組織培養表面に付着したWJから単離された細胞の光学顕微鏡画像である。 40

【図4】CFU-Oの初期形成を示す光学顕微鏡画像である。

【図5】成熟CFU-Oを示す光学顕微鏡画像である。

【図6】35mmポリスチレン組織培養皿上でUV蛍光下のテトラサイクリン標識CFU-Oを示す。

【図7】同じテトラサイクリン標識CFU-Oの位相差光学顕微鏡画像および蛍光顕微鏡画像を併置して示す。

【図8】組織培養ポリスチレン表面上の成熟したCFU-Oの走査電子顕微鏡画像である。

【図9】下地マトリックスが暴露されたCFU-Oの断面の走査電子顕微鏡画像である。 50

【図 1 0】 C F U - O の前端に位置する軽く無機化したコラーゲン繊維の走査電子顕微鏡画像である。

【図 1 1】 分化している骨原性細胞によるポリスチレン界面上に置いた非 - コラーゲン性マトリックス（小球として見える）の走査電子顕微鏡画像である。

【図 1 2】 成熟 C F U - O の中心を含んでなる強く無機化したコラーゲンの走査電子顕微鏡画像である。

【図 1 3】 W J 誘導細胞が 7 7 . 4 % M H C I および M H C I I 陰性であることを証明するフローサイトメトリーデータを示す。

【図 1 4】 その中に細胞が捕捉（骨細胞）されているコラーゲンの分布およびいくらかが処理細胞外マトリックスにより囲まれ始めている周囲細胞の多層性を示す骨小結節の M a s s o n の三色染色断面の黒白再現である。

【図 1 5】 約束された骨形成サブ集団および全骨形成サブ集団の拡大に関連する付着脈管周囲 W J 集団の強力な拡大を示す。

【図 1 6】 0 ~ 1 4 4 時間の脈管周囲 W J 細胞の増殖であって、0 ~ 2 4 時間の遅延相、2 4 ~ 7 2 時間の対数相、および 7 2 ~ 1 2 0 時間の平坦相を有する正常な増殖曲線を示す。全培養期間の間の倍增時間は 2 4 時間であるが、一方対数相ではこれは 1 6 時間である。および

【図 1 7】 5 継代にわたり示される W J 細胞の主要組織適合複合体（M H C）発現、自由解凍によるそれらの発現の変化、および再培養による引き続いての発現を示す。

10

【図 2】

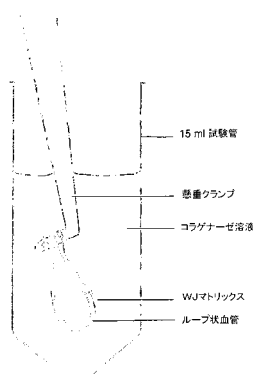


Figure 2

【図 3】

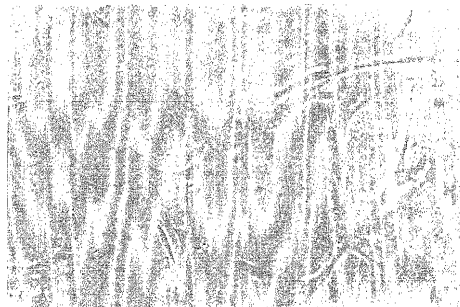


Figure 3

【図 4】

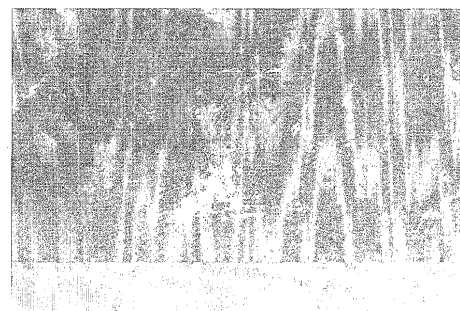


Figure 4

【図 5】

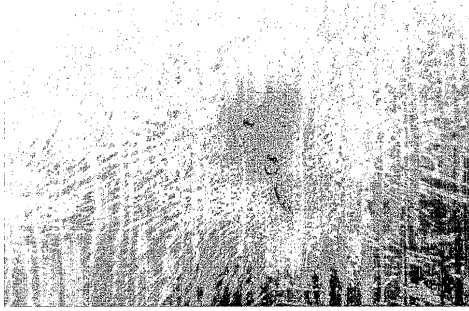


Figure 5

【図 7】

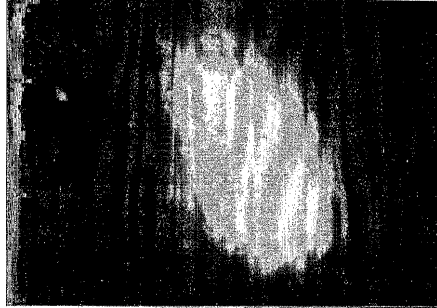


Figure 7

【図 6】

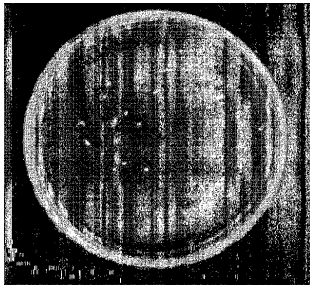


Figure 6

【図 8】



Figure 8

【図 9】

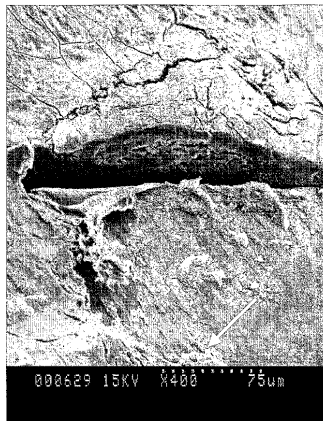


Figure 9

【図 1 0】

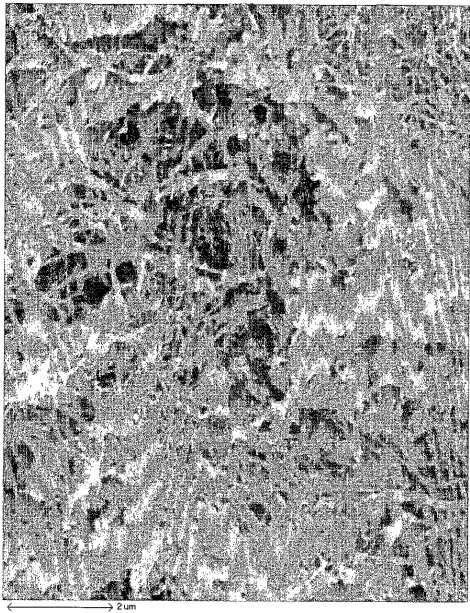


Figure 10

【図 1 1】

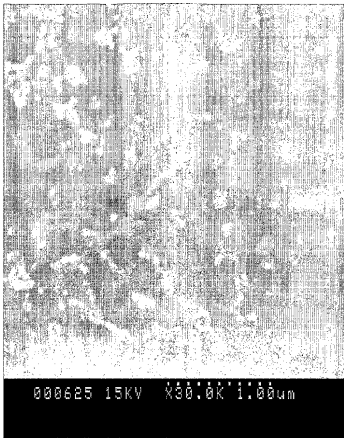


Figure 11

【図 1 2】

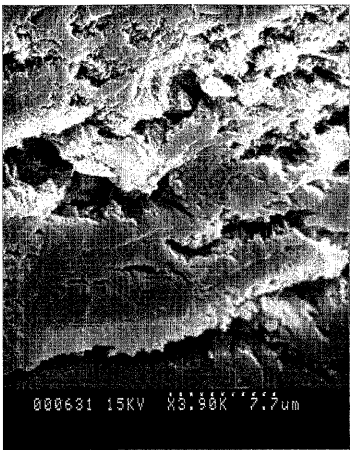


Figure 12

【図 1 5】

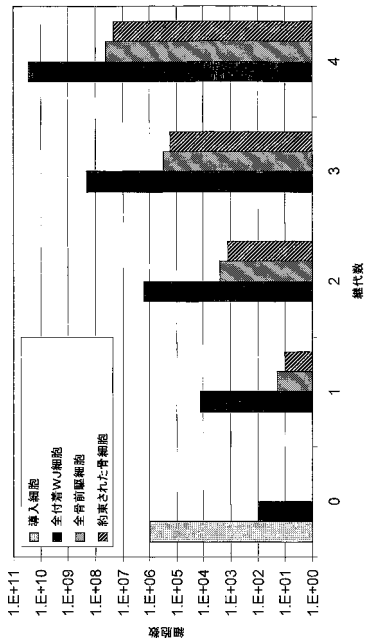


Figure 15

【図 16】

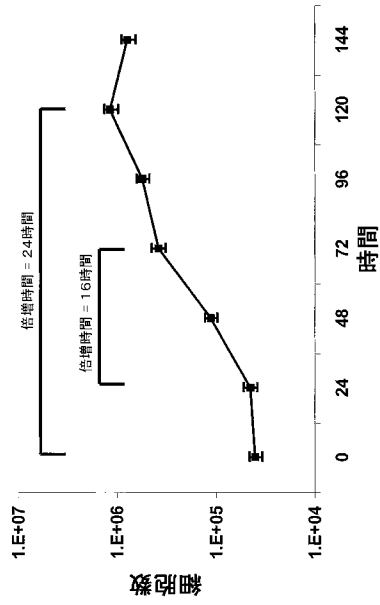


Figure 16

【図 17】

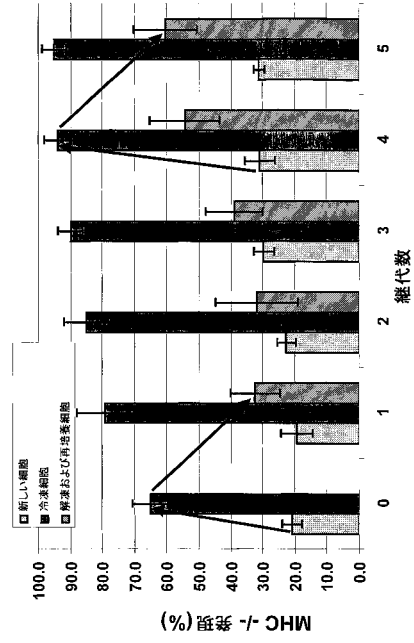


Figure 17

【図 1】



【図 13】

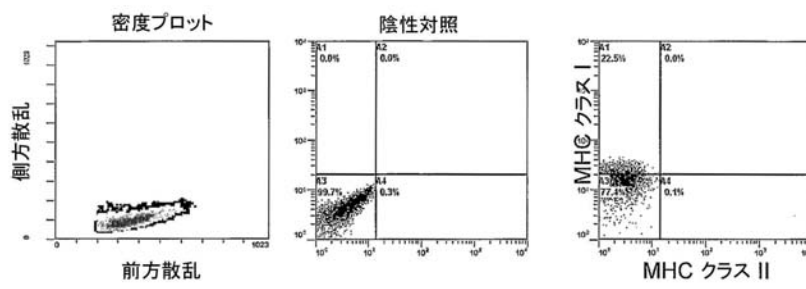


Figure 13

【図 14】

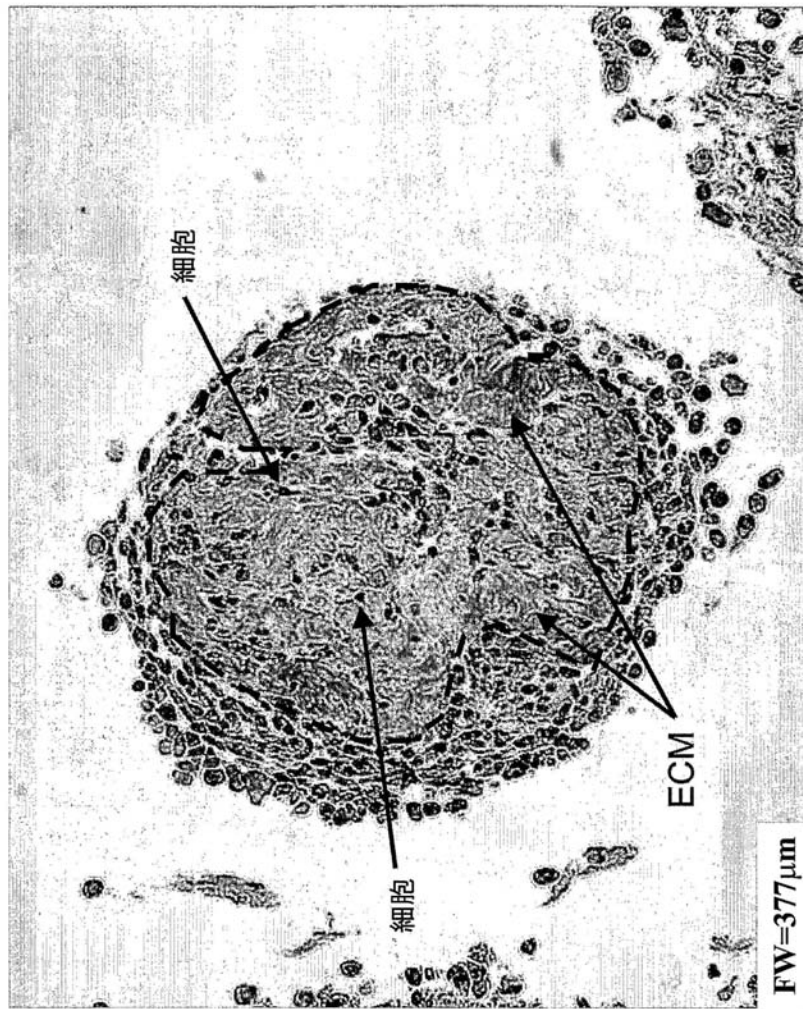


Figure 14

フロントページの続き

(73)特許権者 505304126

ホセイニ, モリス

ドイツ・デー 3 8 1 1 6 ブラウンシュバイク・ビルロトシュトラッセ 1 0

(73)特許権者 505304012

リコリシュ, アントニー・デイビド

L I C K O R I S H, A n t o n y D a v i d

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 6 0 5 ウースター・アパートメント 5 1 3・プランテーション
ストリート 5 0 5

(74)代理人 110000741

特許業務法人小田島特許事務所

(72)発明者 デイビース, ジョン・イー

カナダ・オンタリオ エム 6 アール 1 ジエイ 4・トロント・ガーデンアベニュー 2 8 5

(72)発明者 バクシュ, ドロレス

カナダ・オンタリオ エル 4 ダブリュー 3 エイチ 8・ミシソーガ・ウイローバンクトレイル 1 0
8 0

(72)発明者 サルガサー, ラフル

カナダ・オンタリオ エム 2 ジエイ 1 シー 8・トロント・リングウッドクレセント 2 7

(72)発明者 ホセイニ, モリス

ドイツ・デー 3 8 1 1 6 ブラウンシュバイク・ビルロトシュトラッセ 1 0

(72)発明者 リコリシュ, アントニー・デイビド・サットン

カナダ・オンタリオ エム 4 ワイ 1 アール 2・トロント・アパートメント 2 0 7・セントメリー
ストリート 2 5

審査官 吉森 晃

(56)参考文献 国際公開第 9 8 / 0 1 7 7 9 1 (WO, A 1)

ソ連国特許発明第 0 1 7 0 8 3 2 8 (SU, A)

ロシア国特許出願公開第 0 2 1 7 4 0 1 6 (RU, A)

仏国特許出願公開第 0 2 5 7 8 7 4 3 (FR, A 1)

Stem Cells, 2 0 0 3 年 1 月, Vol.21, pp.50-60

NAUGHTON B A, FASEB JOURNAL (FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY
) , 米国, 1 9 9 7 年 2 月 2 8 日, Vol.11, No.3, p.A19, 108

Stem Cells, 2 0 0 3 年 1 月, Vol.21, No.1, pp.105-110

Mol. Biol. Cell, 2 0 0 2 年, Vol.13, pp.4279-4295

細胞培養技術, 1 9 9 5 年, pp.115-119

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00-5/28

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE(STN)

WPI

PubMed

Science Direct

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)