

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6545690号
(P6545690)

(45) 発行日 令和1年7月17日(2019.7.17)

(24) 登録日 令和1年6月28日(2019.6.28)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/074	(2010.01)	C 1 2 N 5/074
A 6 1 K	35/50	(2015.01)	A 6 1 K 35/50
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	19/04	(2006.01)	A 6 1 P 19/04
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P 19/08

請求項の数 9 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2016-545921 (P2016-545921)	(73) 特許権者	512250119
(86) (22) 出願日	平成27年1月8日(2015.1.8)		サムスン ライフ パブリック ウェルフ エア ファウンデーション
(65) 公表番号	特表2017-502071 (P2017-502071A)		大韓民国 ソウル ヨンサン-グ イテウ オン-ロ 55-ギル 48
(43) 公表日	平成29年1月19日(2017.1.19)	(74) 代理人	110000796
(86) 国際出願番号	PCT/KR2015/000205		特許業務法人三枝国際特許事務所
(87) 国際公開番号	W02015/105357	(72) 発明者	ハ チョルウォン
(87) 国際公開日	平成27年7月16日(2015.7.16)		大韓民国 135-270 ソウル カン ナム-グ ドゴク-ロ 320 108- 1303
審査請求日	平成28年8月19日(2016.8.19)	(72) 発明者	キム ジンア
(31) 優先権主張番号	10-2014-0002316		大韓民国 461-853 キョンギ-ド ソンナム-シ スジョン-グ テピョン -ロ 28 106-1403
(32) 優先日	平成26年1月8日(2014.1.8)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		

(54) 【発明の名称】 栄養膜基底層から由来した幹細胞及びそれを含む細胞治療剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

胎盤の細部組織である栄養膜基底層(basal portion of chorionic trophoblast layer; bCT)から由来した幹細胞であり、前記栄養膜基底層は、絨毛膜と脱落膜との間に位置した栄養膜層全体中、絨毛膜に近接した部位から30%までの厚さに該当する組織であり、前記幹細胞は、CD44、CD73、CD90及びCD105に対して陽性の表面因子発現特性、並びに、CD31、CD34、CD45及びHLA-DRに対して陰性の表面因子発現特性を有することを特徴とする、幹細胞。

【請求項2】

請求項1に記載の胎盤の細部組織である栄養膜基底層(basal portion of chorionic trophoblast layer; bCT)から由来した幹細胞を有効成分として含む細胞治療剤。

【請求項3】

前記幹細胞は、軟骨細胞、脂肪細胞、骨細胞、神経細胞、靭帯細胞及び腱細胞(tenocyte)からなる群から選択された1種以上に分化されることを特徴とする、請求項2に記載の細胞治療剤。

【請求項4】

前記細胞治療剤は、軟骨損傷、軟骨欠陥、骨欠損、腱・靭帯欠損、または脂肪組織欠損治療用であることを特徴とする、請求項2または3に記載の細胞治療剤。

【請求項5】

前記軟骨欠陥は、軟骨外傷、軟骨破裂、軟骨軟化、軟骨壊死、骨軟骨炎、軟骨欠損及び骨関節炎で構成された群から選択されることを特徴とする、請求項4に記載の細胞治療剤。

【請求項6】

請求項1に記載の胎盤の細部組織である栄養膜基底層(basal portion of chorionic trophoblast layer; bCT)から由来した幹細胞を有効成分として含む組織再生用組成物。

【請求項7】

前記組織は、軟骨、脂肪、骨、神経、靭帯及び腱からなる群から選択された1種以上であることを特徴とする、請求項6に記載の組成物。

10

【請求項8】

前記軟骨は、硝子軟骨(hyaline cartilage)、繊維軟骨(fibrocartilage)または弾性軟骨(elastic cartilage)であることを特徴とする、請求項7に記載の組成物。

【請求項9】

前記軟骨は、関節軟骨(articular Cartilage)、耳軟骨、鼻軟骨、肘軟骨、半月状軟骨(meniscus)、膝軟骨、肋軟骨、足首軟骨、器官軟骨、喉頭軟骨及び脊椎軟骨からなる群から選択されることを特徴とする、請求項7に記載の組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、胎盤の細部組織である栄養膜基底層(basal portion of chorionic trophoblast layer; bCT)から由来した幹細胞及びそれを含む細胞治療剤に関する。

【背景技術】

【0002】

最近の生命工学は、ヒト福祉を最終目標として、食糧、環境、健康問題に新たな解決策の可能性を提示しており、そのうち、幹細胞を用いた技術は、難病治療の新たな地平を開いている。これまでは、ヒトの難病治療のために、臓器移植、遺伝子治療等が提示されていたが、免疫拒否と供給臓器不足、ベクター開発や疾患遺伝子に対する知識不足により、効率的な実用化が微弱であった。そこで、幹細胞への関心が高まり、増殖と分化を通して全ての器官を形成する能力を有する万能幹細胞がほとんどの疾患治療はもちろん、臓器き損を根源的に解決できるものと認識された。また、多くの科学者が、人体のほとんどの臓器再生はもちろん、難病であったパーキンソン病、各種の癌、糖尿病と脊髄損傷等の治療に至るまで幹細胞の適用可能性を多様に提示してきた。

30

【0003】

幹細胞(stem cell)とは、未分化された細胞であって、自己複製能を有し、かつ二つ以上の互いに異なる種類の細胞に分化する能力を有する細胞をいう。幹細胞は、細胞学的由来によって、胚芽幹細胞と成体幹細胞とに区別できる。胚芽幹細胞は、受精卵や発生中の胎児組織等に由来するのに対し、成体幹細胞は、胎児成長が完了した後の個体組織である骨髄、臍帯血、脂肪、胎盤、筋肉、滑液膜、脳、肝臓、すい臓等に由来する。一方、胚芽幹細胞は、倫理的に制限があるため、細胞治療剤として用いるための限界があるが、これに対し、成体幹細胞は、主に骨髄、脂肪、臍帯血及び胎盤等から獲得が可能であり、倫理的な面で問題が提起されない。

40

【0004】

このうち、胎盤由来幹細胞の場合、出産後に廃棄される胎盤を利用することにより、採取が容易で多量の幹細胞を容易に確保可能な長所がある。脂肪や骨髄由来幹細胞は、分離、抽出されるドナーの年齢や健康状態等に影響を受け、増殖力や分化能等に制限があり、

50

変動性が多いが、胎盤由来幹細胞の場合、成体幹細胞のうち最も早い時期に収得できる幹細胞であって、ドナーの年齢等の変数によって幹細胞能にほとんど影響を受けず、優れた増殖力及び分化能を有する。また、胎盤由来幹細胞は、神経系疾患、肝臓疾患、筋骨格系疾患等、様々な疾患に活用可能な幹細胞群を分離することができるという長所がある。

【0005】

上述した長所のため、胎盤由来幹細胞に関する研究が盛んに進んでいる。例えば、大韓民国特許登録第818214号には、NAC(N-acetyl-L-cysteine)含有培地を利用して羊膜または脱落膜から幹細胞を分離する方法が開示されており、大韓民国特許登録第871984号には、bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor)含有培地を利用して羊膜、漿膜、基底脱落膜及び胎盤組織から由来した幹細胞の多分化能について開示している。しかし、今まで胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞についての研究は行われていない。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、本発明者らは、胎盤由来幹細胞の中でも幹細胞能にさらに優れた幹細胞を見つけるための研究を続けた結果、胎盤の栄養膜層全体(total chorionic trophoblast layer; tCT)中、絨毛膜に連なる部位であって約25%の厚さに該当する組織層である栄養膜基底層(basal portion of chorionic trophoblast layer; bCT)を分離して、これより由来した幹細胞を製造し、前記栄養膜基底層から由来した幹細胞が、多分化能幹細胞として従来の胎盤全体または他の組織由来幹細胞に比べて均質な成長特性、優れた増殖特性及び分化特性を示し、組織欠損動物モデルで優れた組織再生効果を有していることを確認することにより、本発明を完成した。

20

【0007】

従って、本発明の目的は、胎盤の細部組織である栄養膜基底層(basal portion of chorionic trophoblast layer; bCT)から由来した幹細胞を提供することである。

【0008】

本発明の他の目的は、前記栄養膜基底層から由来した幹細胞または前記幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む細胞治療剤及び組織再生用組成物を提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

前記目的を達成するために、本発明は、胎盤の細部組織である栄養膜基底層(basal portion of chorionic trophoblast layer; bCT)から由来した幹細胞を提供する。

【0010】

また、本発明は、前記栄養膜基底層から由来した幹細胞または前記幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む細胞治療剤を提供する。

【0011】

また、本発明は、前記栄養膜基底層から由来した幹細胞または前記幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む組織再生用組成物を提供する。

40

【発明の効果】

【0012】

本発明に係る栄養膜基底層(basal portion of chorionic trophoblast layer; bCT)から由来した幹細胞は、従来の胎盤全体または他の組織由来幹細胞に比べて均質な成長特性、優れた増殖特性及び分化特性を示し、組織欠損動物モデルで優れた組織再生効果を有しており、細胞治療剤として有用に利用できる。

【図面の簡単な説明】

50

【0013】

【図1】胎盤(Pla)の細部組織である絨毛膜(chorionic membrane; CM)、絨毛-栄養膜(chorionic membrane and chorionic trophoblast layer; CMT)、栄養膜層全体(total chorionic trophoblast layer; tCT)、栄養膜上部(upper portion of chorionic trophoblast layer; uCT)及び栄養膜基底層(basal portion of chorionic trophoblast layer; bCT)の断面写真を示した図である。

【図2】本発明に係る栄養膜基底層(bCT)由来幹細胞の継代培養する前(P0)と長期間継代培養した後(P31)の細胞形態を顕微鏡で観察した写真(x100)を示した図である。

10

【図3】胎盤全体由来幹細胞の継代培養する前(P0)と長期間継代培養した後(P29)の細胞形態を顕微鏡で観察した写真(x100)を示した図である。

【図4】胎盤全体、胎盤の各細部組織及び他組織から由来した幹細胞の集団倍加時間を示した図である。

【図5】胎盤全体、胎盤の各細部組織及び他組織から由来した幹細胞の集落形成単位を示した図である。

【図6】本発明に係る栄養膜基底層(bCT)由来幹細胞の表面因子発現特性を確認するためのフローサイトメトリー結果を示した図である。

20

【図7】胎盤全体、胎盤の各細部組織及び他組織から由来した幹細胞の脂肪細胞(Adipogenesis)、軟骨細胞(Chondrogenesis)または骨細胞(Osteogenesis)への分化程度を観察するための各染色結果を示した図である。

【図8】胎盤全体、胎盤の各細部組織及び他組織から由来した幹細胞の軟骨細胞への分化程度を観察するために、Safranin-Oで染色した後、定量化した結果を示した図である。

【図9】胎盤全体、胎盤の各細部組織及び他組織から由来した幹細胞の軟骨細胞への分化程度を観察するために、Type II collagenを用いた免疫組織化学染色を行った後、定量化した結果を示した図である。

【図10】胎盤全体、胎盤の各細部組織及び他組織から由来した幹細胞の骨細胞への分化程度を観察するために、Alkaline phosphateで染色した後、定量化した結果を示した図である。

30

【図11】胎盤全体、胎盤の各細部組織及び他組織から由来した幹細胞の骨細胞への分化程度を観察するために、Alizarin red Sで染色した後、定量化した結果を示した図である。

【図12】胎盤全体、胎盤の各細部組織及び他組織から由来した幹細胞の脂肪細胞への分化を観察するために、Oil red Oで染色した後、定量化した結果を示した図である。

【図13】軟骨損傷動物モデルに臍帯血由来幹細胞(UCB)または栄養膜基底層由来幹細胞(bCT)の投与後、H&E及びSafranin-O染色を通して軟骨再生効果を

40

確認した結果を示した図である。
【図14】軟骨損傷動物モデルに臍帯血由来幹細胞(UCB)または栄養膜基底層由来幹細胞(bCT)の投与後、軟骨再生効果をICRS(International Cartilage Repair Society) macroscopic scoreを用いた定量化を通して確認した結果を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0015】

本発明は、胎盤の細部組織である栄養膜基底層(basal portion of

50

chorionic trophoblast layer; bCT) から由来した幹細胞を提供する。

【0016】

本発明において、「幹細胞」とは、自己複製能を有し、かつ二つ以上の互いに異なる種類の細胞に分化する能力を有する細胞を意味する。幹細胞は、分化能によって、万能幹細胞(totipotent stem cell)、全分化能幹細胞(pluripotent stem cells)、多分化能(多能性)幹細胞(multipotent stem cells)に分類できる。

【0017】

本発明において、「万能幹細胞(totipotent stem cells)」とは、一つの完全な個体に発生して行くことのできる万能の性質を有する細胞であって、卵子と精子の受精以後8細胞期までの細胞がこのような性質を有し、この細胞を分離して子宮に移植すれば、一つの完全な個体に発生して行くことのできる細胞を意味する。本発明において、「全分化能幹細胞(pluripotent stem cells)」とは、外胚葉、中胚葉、内胚葉層由来の様々な細胞と組織に発生できる細胞であって、受精4~5日後に現れる胚盤胞(blastocyst)の内側に位置した内部細胞塊(inner cell mass)に由来し、これを胚芽幹細胞と称し、様々な他の組織細胞に分化するが、新たな生命体を形成することはできない細胞を意味する。本発明において、「多分化能幹細胞」は、幹細胞が含まれている組織及び器官を形成する特異的な細胞のみ分化できる細胞を意味する。本発明の目的上、前記「幹細胞」は、好ましくは、多分化能幹細胞である。

10

20

【0018】

本発明において、「胎盤(placenta)」とは、妊娠中に胎児のために作られる生体内組織を意味するが、重さ500~600g、直径15~20cm、厚さ2~3cm程度の円盤形態である。胎盤の一方は、母体と当たって、他方は胎児と当たっており、その間で母体の血液と胎児の血管との間に栄養分及び酸素の伝達がなされるようになる。胎盤は、大きく羊膜、絨毛膜、脱落膜の3層に区別でき、より詳細には、羊膜上皮、羊膜、絨毛膜、栄養膜、脱落膜に区別できる。胎盤の断面図を、図1に簡略に示している。

【0019】

本発明において、「栄養膜基底層」とは、絨毛膜と脱落膜との間に位置した栄養膜層中、絨毛膜に連なる(近接した)部位の20~30%の厚さに該当する組織であって、通常、約5~6mmの厚さに該当する組織層を意味する。

30

【0020】

本発明において、「栄養膜」とは、胚胞外部に位置した胚子の外胚葉層であって、卵子を子宮壁に付着させ、胚子に栄養分を供給する組織を意味する。これより絨毛膜及び羊膜が由来し、栄養膜の内細胞層は絨毛を覆い、細胞栄養膜と称する。

【0021】

本発明において、「絨毛膜」とは、人体発生学では、胚子体最外層の細胞性膜を意味する。

【0022】

本発明において、「脱落膜」とは、娩出後に脱落する子宮の粘膜を意味する。

40

【0023】

本発明に係る栄養膜基底層から由来した幹細胞は、胎盤から分離した栄養膜基底層組織に酵素溶液を加え、酵素反応を行って得られた細胞を、成長因子を使用せずに、ウシ胎児血清及び抗生剤が添加された培地で培養した後、回収することにより取得され得る。前記酵素には、トリプシン(Trypsin)、コラゲナーゼ(collagenase)、ディスパーゼ(dispase)、DNase、RNase、プロテアーゼ(protease)、リパーゼ(lipase)、ヒアルロニダーゼ(hyaluronidase)及びエラスターゼ(elastase)等が含まれるが、これに制限されない。前記コラゲナーゼは、コラゲナーゼA、I、II、IIIまたはIV等を含む。

50

【0024】

本発明に係る栄養膜基底層から由来した幹細胞は、下記のような特徴を示す。

【0025】

- (a) 線維芽細胞 (fibroblastic cell) 形状の形態学的特徴；
- (b) 25 ~ 30 以上の継代数に達するように長期間の間増殖できる能力；
- (c) 脂肪細胞、軟骨細胞または骨細胞に分化できる能力；
- (d) 集落形成能；
- (e) CD44、CD73、CD90 及び CD105 に対して陽性の免疫学的特性；及び、

(f) CD31、CD34、CD45 及び HLA-DR に対して陰性の免疫学的特性；
本発明に係る栄養膜基底層から由来した幹細胞は、互いに異なる種類の細胞に分化でき、例えば、脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞、神経細胞、靭帯細胞または腱細胞 (tenocyte) 等、様々な種類の細胞に分化でき、これに制限されない。

10

【0026】

本発明において、「分化 (differentiation)」とは、一般的に比較的単純な系が2つ以上の質的に異なる部分系に分離される現象を意味するが、具体的には、細胞が分裂増殖して成長する間に互いに構造や機能が特殊化する現象、即ち、生物の細胞、組織等がそれぞれに与えられたことを果たすために形態や機能が変わって行く現象を意味する。相対的に、「未分化」とは、上述した分化が生じない、未だ幹細胞としての特徴を含有している状態を意味する。

20

【0027】

幹細胞を分化させる方法は、従来、公知になった方法によって行われ得、特に制限されない。例えば、前記幹細胞をデキサメタゾン (dexamethasone)、インドメタシン (indomethacin)、インスリン及び IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) を含む培地で培養して脂肪細胞に分化させる方法；前記幹細胞をデキサメタゾン、BMP-6 (bone morphogenetic protein 6)、TGF- β (Transforming growth factor beta)、アスコルビン酸 (ascorbic acid) 及び L-プロリン (L-proline) を含む培地で培養して軟骨細胞に分化させる方法；前記幹細胞をデキサメタゾン、アスコルビン酸、 α -グリクロホスフェート (α -glycrophosphate) 及びアスコルビン酸-2-ホスフェート (ascorbic acid-2-phosphate) を含む培地に培養して骨細胞に分化させる方法等を用いることが好ましい。

30

【0028】

前記方法で分化された栄養膜基底層から由来した幹細胞の分化程度を測定する方法は、特にこれに制限されないが、当該分野に公知になった技法であるフローサイトメトリー法、免疫細胞化学的方法、PCR または遺伝子-発現プロファイルを用いて細胞表面標識または形態の変化を測定する方法、光学顕微鏡または共焦点顕微鏡を用いて細胞の形態変化を調査する方法、遺伝子発現プロファイルの変化を測定する方法等を用いることができ、好ましくは、RT-PCR、Oil-red O 染色法、Safranin O 染色法、Type II collagen 免疫組織化学染色法、ALP (alkaline phosphate) 染色法または Alizarin red S 染色法等を利用することができる。

40

【0029】

本発明に係る栄養膜基底層 (basal portion of chorionic trophoblast layer, bCT) から由来した幹細胞は、従来の胎盤全体または他の組織由来幹細胞に比べて均質な成長特性、優れた増殖特性及び分化特性を示し、組織欠損動物モデルで組織再生効果に優れている。

【0030】

従って、本発明は、栄養膜基底層から由来した幹細胞または前記幹細胞から分化した細

50

胞を有効成分として含む細胞治療剤を提供する。

【0031】

前記分化した細胞は、特に制限されないが、脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞、神経細胞、靭帯細胞、腱細胞等を含み、治療目的に合わせて選択され得る。

【0032】

本発明において、「細胞治療剤 (cellular therapeutic agent)」とは、ヒトから分離、培養及び特殊な操作を通して製造された細胞及び組織で治療、診断及び予防の目的で用いられる医薬品 (米国FDA規定) であって、細胞あるいは組織の機能を復元させるために、生きている自家、同種、または異種細胞を体外で増殖選別するか、または他の方法で細胞の生物学的特性を変化させる等の一連の行為を通して、このような細胞が疾患の治療、診断及び予防の目的で用いられる医薬品を意味する。

10

【0033】

本発明の栄養膜基底層から由来した幹細胞は、身体の組織または器官が目的とする細胞群集、例えば、幹細胞または分化細胞群集の生着、移植または注入により調整、強化、治療または代替される様々な種類の治療プロトコルに用いられ得る。本発明の栄養膜基底層 (bCT) から由来した幹細胞は、存在する組織を代替または強化させ、新しいか、または変化した組織になるようにするか、または生物学的組織あるいは構造と結合させることができる。

【0034】

好ましくは、本発明の細胞治療剤は、軟骨損傷、軟骨欠陥、骨欠損、腱・靭帯欠損、脂肪組織欠損等への治療用として利用され得る。

20

【0035】

本発明において、「軟骨欠陥」とは、身体内に含まれる軟骨に損傷、欠陥 (defect) または不足のある場合を包括する意味であって、例えば、軟骨外傷、軟骨破裂、軟骨軟化、軟骨壊死、骨軟骨炎、軟骨欠損または骨関節炎等を含むが、これに制限されない。

【0036】

また、本発明の栄養膜基底層から由来した幹細胞は、関節内に投与することで関節軟骨の病変を治療するか、または腱あるいは靭帯部位に投与することで治療あるいは予防する等の目的で用いられ得る。例えば、本発明の栄養膜基底層から由来した幹細胞を関節や腱、または靭帯部位に投与することで前記組織の損傷部位に対する回復や調整を図るか、または本発明の栄養膜基底層から由来した幹細胞から由来した軟骨組織構成物等の幹細胞由来の物質を利用して関節 (例えば、膝関節等) の組織を再構成するか、または再生等の方法で治療するのに用いられ得る。

30

【0037】

本発明の細胞治療剤の最適な投与量は、個体の状態及び体重、疾患の程度、薬物形態、投与経路及び期間によって異なるが、当業者により適切に選択され得る。投与は、一日に一回投与することもでき、数回に分けて投与することもでき、前記投与量は、いかなる面でも本発明の範囲を限定するものではない。

【0038】

本発明に係る栄養膜基底層 (basal portion of chorionic trophoblast layer, bCT) から由来した幹細胞は、増殖能と分化能に優れ、組織再生効果に優れている。

40

【0039】

従って、本発明は、栄養膜基底層から由来した幹細胞または前記幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む組織再生用組成物を提供する。

【0040】

前記組織は、特に制限されないが、軟骨、脂肪、骨、神経、靭帯、腱等の組織を含む。

【0041】

前記軟骨は、硝子軟骨 (hyaline cartilage)、繊維軟骨 (fibrocartilage) または弾性軟骨 (elastic cartilage) 等を

50

含み、例えば、関節軟骨 (articular Cartilage)、耳軟骨、鼻軟骨、肘軟骨、半月状軟骨 (meniscus)、膝軟骨、肋軟骨、足首軟骨、器官軟骨、喉頭軟骨または脊椎軟骨であってよいが、これに制限されない。

【0042】

前記脂肪は、体内位置に関係なく全て含み、例えば、皮下脂肪 (subcutaneous fat)、胃腸間に位置する脂肪 (omentum, mesentery)、骨髓脂肪 (bone marrow fat)、後腹膜腔脂肪 (retroperitoneal fat) 等を含むが、これに制限されない。

【0043】

以下、下記実施例を通して、本発明をさらに詳細に説明する。これらの実施例は、本発明を詳細に説明するためのものであって、本発明の範囲は、これらの実施例により制限されるものではない。

【0044】

実施例 1：胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞の取得

胎盤は、サムスンソウル病院臨床試験倫理委員会指針書によってサムスンソウル病院で帝王切開した正常分娩で寄贈に同意した産婦から収集した。収集された胎盤は、滅菌された容器に入れて移し、胎盤組織から羊膜を剥離した後、絨毛膜 (CM) と脱落膜 (DC) との間に位置した羊膜層 (tCT) 中、絨毛膜に連なる (近接した) 部位の約 25% の厚さに該当 (約 5 ~ 6 mm の厚さ) する栄養膜基底層組織を滅菌された W ガーゼとメスを利用して注意深く分離した。分離された栄養膜基底層組織を 150 mm の皿に移した後、PBS を利用して 8 ~ 10 回洗浄し、血液及び血球細胞を除去した。前記洗浄された栄養膜基底層組織を 50 ml チューブに移した後、0.2% コラゲナーゼを添加した DMEM 培地を加え、37 °C で攪拌機を利用して 2 ~ 3 時間反応させ、栄養膜基底層から由来した細胞を取得した。取得した栄養膜基底層から由来した細胞を 70 µm メッシュにろ過して分解されない組織を除去し、ウシ胎児血清及び抗生物質が添加された DMEM 培地を加えた後、25 °C、1000 rpm で 4 分間遠心分離した。上清液を除去して残った沈殿した細胞に成長因子を含まず、ウシ胎児血清及び抗生物質が添加された DMEM 培地を加え、37 °C、5% CO₂ の条件下で培養した。前記培養物から培養容器の底に付着した細胞を選別し、栄養膜基底層から由来した幹細胞を取得した。

【0045】

比較例 1：他組織由来幹細胞の取得

1 - 1 . 胎盤全体から由来した幹細胞の取得

全体胎盤組織を細切し、PBS で洗浄して胎盤組織から血液及び血球細胞を除去した。前記洗浄された胎盤組織に 0.2% コラゲナーゼを添加した DMEM 培地を加え、37 °C で攪拌機を利用して反応させ、胎盤細胞を取得した。前記取得した胎盤細胞を 70 µm メッシュにろ過して分解されない組織を除去し、ウシ胎児血清及び抗生物質が添加された DMEM 培地を加えた後、25 °C、1000 rpm で 4 分間遠心分離した。上清液を除去して残った沈殿した細胞に成長因子を含まず、ウシ胎児血清及び抗生物質が添加された DMEM 培地を加え、37 °C、5% CO₂ の条件下で培養した。前記培養物から培養容器の底に付着した細胞を選別し、胎盤全体 (Whole placenta, Pla) 由来幹細胞を取得した。

【0046】

1 - 2 . 胎盤細部組織から由来した幹細胞の取得

胎盤から細部組織である絨毛膜 (chorionic membrane; CM)、絨毛 - 栄養膜 (chorionic membrane and chorionic trophoblast layer; CMT)、栄養膜層全体 (total chorionic trophoblast layer; tCT)、及び栄養膜上層部 (upper portion of chorionic trophoblast layer; uCT) 組織をそれぞれ分離した。より具体的には、全体胎盤組織中、滅菌された W ガーゼとメスを利用して羊膜を剥離した後、脱落膜を注意深く除去して絨毛 - 栄養膜を分

10

20

30

40

50

離し、このうち一部をまた絨毛膜及び栄養膜層全体に分離した。前記栄養膜層全体組織から栄養膜上層部を分離するために、前記実施例1の栄養膜基底層を除いた、絨毛膜(CM)と脱落膜(DC)との間に位置した羊膜層(tCT)中、脱落膜に連なる(近接した)部位の約75%の厚さに該当する組織を滅菌されたWガーゼとメスを利用して注意深く分離した。前記過程を通してそれぞれ分離された胎盤細部組織を150mmの皿に移した後、PBSを利用して8~10回洗浄し、血液及び血球細胞を除去した。前記洗浄された胎盤細部組織を50mlチューブに移した後、0.2%コラゲナーゼを添加したDMEM培地を加え、37℃で攪拌機を利用して2~3時間反応させ、絨毛膜、絨毛-栄養膜、栄養膜層全体及び栄養膜上層部から由来した細胞をそれぞれ取得した。取得した各細胞を70µmメッシュにろ過して分解されない組織を除去し、ウシ胎児血清及び抗生物質が添加されたDMEM培地を加えた後、25℃、1000rpmで4分間遠心分離した。上清液を除去して残った沈殿した細胞に成長因子を含まず、ウシ胎児血清及び抗生物質が添加されたDMEM培地を加え、37℃、5%CO₂の条件下で培養した。前記培養物から培養容器の底に付着した細胞を選別し、絨毛膜、絨毛-栄養膜、栄養膜層全体及び栄養膜上層部から由来した幹細胞をそれぞれ取得した。

10

【0047】

1-3. 骨髄由来幹細胞の分離

骨髄(Bone Marrow)を50mlチューブに移した後、同量のPBSを入れて洗浄し、25℃、2580rpmで10分間遠心分離した。前記洗浄過程を2回繰り返した後、上清液を除去して残った沈殿した骨髄を同量のPBSに懸濁した後(計5ml)、前記溶液を予め準備された25mlのFicoll溶液上にゆっくり移した後、25℃、2580rpmで30分間遠心分離した。密度差により分離された3つの層のうち、中央に位置した細胞層だけを分離して洗浄した後、再び25℃、2580rpmで5分間遠心分離した。前記過程を通して取得した細胞に成長因子を含まず、ウシ胎児血清及び抗生物質が添加されたDMEM培地を加え、37℃、5%CO₂の条件下で培養して骨髄由来幹細胞を取得した。

20

【0048】

1-4. 臍帯血由来幹細胞の分離

臍帯血(Umbilical Cord Blood)を50mlチューブに移した後、同量のPBSを入れて洗浄し、25℃、2580rpmで10分間遠心分離した。前記洗浄過程を2回繰り返した後、上清液を除去して残った沈殿した臍帯血を同量のPBSに懸濁した後(計5ml)、前記溶液を予め準備された25mlのFicoll溶液上にゆっくり移した後、25℃、2580rpmで30分間遠心分離した。密度差により分離された3つの層のうち、中央に位置した細胞層だけを分離して洗浄した後、再び25℃、2580rpmで5分間遠心分離した。前記過程を通して取得した細胞に成長因子を含まず、ウシ胎児血清及び抗生物質が添加されたDMEM培地を加え、37℃、5%CO₂の条件下で培養して臍帯血由来幹細胞を取得した。

30

【0049】

1-5. 脂肪または滑膜由来幹細胞の分離

脂肪(Adipose)または滑膜(Synovium)組織を150mmの皿に移した後、PBSを利用して2~3回洗浄し、血液及び血球細胞を除去した。前記脂肪または滑膜組織を細かく切った後、各組織を50mlチューブに移し、0.2%コラゲナーゼを添加したDMEM培地を加えた後、37℃の条件で攪拌機を利用して反応させ、脂肪または滑膜細胞を取得した。前記取得した脂肪または滑膜細胞を70µmメッシュにろ過して分解されない組織を除去し、ウシ胎児血清及び抗生物質が添加されたDMEM培地を加えた後、25℃、1000rpmで4分間遠心分離した。上清液を除去して残った沈殿した細胞に成長因子を含まず、ウシ胎児血清及び抗生物質が添加されたDMEM培地を加え、37℃、5%CO₂の条件下でそれぞれ培養して脂肪または滑膜由来幹細胞を取得した。

40

【0050】

実施例2: 胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞の継代培養

50

前記実施例1で取得した胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞をPBSで洗浄した後、成長因子を含まず、ウシ胎児血清及び抗生剤が添加されたDMEM培地を2~3日毎に取り替えながら培養した。前記幹細胞が80%以上成長した時点でトリプル(TryPLE)を処理して幹細胞を培養容器から分離し、分離された幹細胞を1/4の割合で希釈した後、他の培養容器で培養する方法で継代培養を行った。前記のような継代培養を繰り返して行いながら、それ以上継代培養されない継代数(passage number)を測定し、継代培養する前(P0)と長期間の間継代培養した後の細胞形態を顕微鏡で観察した。また、前記比較例1で取得した胎盤全体(Whole placenta、Pla)由来幹細胞を利用して、同様の方法で継代培養を行った後、継代培養する前(P0)と長期間の間継代培養した後の細胞形態を顕微鏡で観察した。その結果をそれぞれ図2及び図3に示した。

10

【0051】

図2に示したように、本発明に係る栄養膜基底層(bCT)由来幹細胞は、継代数が31に達するまで優れた増殖能を有しており、長期間培養が可能であることを確認した。

【0052】

また、図3に示したように、胎盤全体(Whole placenta、Pla)由来幹細胞は、継代培養初期から線維芽細胞形状の形態的特性を示し、一つの形態ではなく多数の互いに異なる形態の細胞が混合されていることを確認することができた。即ち、図2と比較すると、継代培養前後で栄養膜基底層から由来した幹細胞は、単一の細胞だけを特異的に維持したが、胎盤全体から由来した幹細胞は、互いに異なる形態の細胞が混合されていた。

20

【0053】

実施例3：胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞の集落形成能分析

前記実施例1で取得した胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞の集団倍加時間及び集落形成能を確認した。より具体的には、前記実施例1で取得した栄養膜基底層から由来した幹細胞を前記実施例2の方法で第一の継代培養を行い、前記継代培養が終了する時点で100mmの皿に 5×10^3 個ずつ接種(seeding)した後、10日間成長因子を含まず、ウシ胎児血清及び抗生剤が添加されたDMEM培地で培養した。P2からP6まで幹細胞の数が2倍になるのにかかる時間(集団倍加時間)を測定し、前記培養された幹細胞を対象にギムザ染色法(Giemsa stain)を実施して幹細胞でいくつの集落が形成されるかを計数した。また、前記比較例1で取得した胎盤全体、他の胎盤細部組織及び他組織由来幹細胞を利用して、同様の方法で集団倍加時間及び集落形成能を測定した。集落形成能の場合、胎盤全体由来幹細胞の結果値を100%として換算した。その結果をそれぞれ図4及び図5に示した。

30

【0054】

図4に示したように、本発明に係る栄養膜基底層(bCT)由来幹細胞は、胎盤全体、他の胎盤細部組織及び他組織由来幹細胞より集団倍加時間(population doubling time)が顕著に短く、細胞増殖が速いことを確認した。

【0055】

また、図5に示したように、本発明に係る栄養膜基底層(bCT)由来幹細胞は、胎盤全体、他の胎盤細部組織及び他組織由来幹細胞より集落形成能に顕著に優れることを確認した。

40

【0056】

実施例4：胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞の表面マーカー分析

前記実施例1で取得した胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞の免疫学的特性を確認するために、下記のような実験を行った。まず、栄養膜基底層から由来した幹細胞をPBSで洗浄し、トリプル処理した後、幹細胞を回収して1000rpmで4分間遠心分離した。上清液を除去した後、非特異的結合を抑制するために、2%FBS及びPBSの混合液を入れて幹細胞を洗浄した後、1000rpmで5分間遠心分離した。上清液を除去した後、幹細胞をPBSに浮遊させ、 1×10^5 cellずつフローサイト

50

メーター専用の丸底フラスコに分注した。ここに抗体 (P E - c o n j u g a t e d m o u s e a n t i - h u m a n m o n o c l o n a l a n t i b o d y) をそれぞれ入れて、氷で30分間インキュベーションした後、1000rpmで5分間遠心分離した。再び上清液を除去した後、PBSで洗浄し、1000rpmで5分間遠心分離した。前記過程を2回繰り返した。最後に、上清液を除去した後、幹細胞をシングル化し、フローサイトメーター (F A C S) を利用して免疫学的特性を分析した。また、同様の方法で前記比較例1で取得した胎盤全体、他の胎盤細部組織及び他組織由来幹細胞の免疫学的特性を分析した。その結果を表1及び図6に示した。

【0057】

【表1】

[表1]

	CD31	CD34	CD45	CD73	CD90	CD105	HLA-DR	CD44
Pla	0.0%	0.0%	0.0%	98.4%	92.4%	92.8%	0.0%	92.9%
CMT	0.0%	0.0%	0.0%	98.0%	91.7%	96.9%	0.0%	98.6%
CM	0.0%	0.0%	0.0%	98.6%	100.0%	96.1%	0.0%	96.6%
tCT	0.0%	0.0%	0.0%	97.6%	96.6%	98.1%	0.0%	92.7%
bCT	0.0%	0.0%	0.0%	97.9%	100.0%	100.0%	0.0%	95.6%
uCT	0.0%	0.0%	0.0%	99.1%	96.0%	96.0%	0.0%	93.2%
BM	0.0%	0.0%	0.0%	98.7%	100.0%	96.2%	0.0%	94.2%
UCB	0.0%	0.0%	0.0%	93.8%	92.4%	99.9%	0.0%	93.9%
AD	0.0%	0.0%	0.0%	98.1%	99.5%	99.3%	0.0%	92.0%
Sy	0.0%	0.0%	0.0%	99.9%	96.2%	99.6%	0.0%	80.4%

【0058】

表1及び図6に示したように、本発明に係る栄養膜基底層 (b C T) 由来幹細胞は、CD44、CD73、CD90及びCD105に対して陽性の標識因子発現特性を示し、CD31、CD34、CD45及びHLA-DRに対して陰性の標識因子発現特性を示すことを確認した。

【0059】

実施例5：胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞の軟骨細胞への分化能確認

前記実施例1で取得した胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞の軟骨細胞への分化能を確認するために、幹細胞を公知になった軟骨細胞分化誘導培地 (0 . 1 μ M デキサメタゾン、50 μ g / m l アスコルビン酸、40 μ g / m l L - プロリン、10 n g / m l T G F - 3、500 n g / m l B M P - 6、50 m g / m l I T S p r e m i x が含まれたDMEM培地) で3週間培養し、軟骨細胞への分化を誘導した。前記幹細胞の軟骨細胞への分化程度を測定するために、従来、公知になった方法によってSafra n i n - O 染色及びType I I コラーゲンをを用いた免疫化学染色法を行った。また、同様の方法で前記比較例1で取得した胎盤全体、他の胎盤細部組織及び他組織由来幹細胞の軟骨細胞への分化能を測定した。その結果を図7乃至図9に示した。

【0060】

図7乃至図9に示したように、本発明に係る栄養膜基底層 (b C T) 由来幹細胞は、胎盤全体、他の胎盤細部組織及び他組織由来幹細胞より均一に軟骨細胞に分化できる優れた軟骨細胞分化能を有していることを確認した。

【0061】

実施例6：胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞の骨細胞への分化能確認

前記実施例1で取得した胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞の骨細胞への分化能を確認するために、幹細胞を公知になった骨細胞分化誘導培地 (10 % F B

10

20

30

40

50

S、1% anti-biotics、100 μM デキサメタゾン、50 mM アスコルビン酸 - 2 - ホスフェート、10 μM - グリクロホスフェート、250 μM アスコルビン酸が含まれたDMEM培地)で4週間培養して骨細胞への分化を誘導した。このとき、分化誘導開始後、2週が経過した時点では、従来、公知になった方法によってALP (Alkaline phosphate) 染色法で染色し、4週が経過した時点では、従来、公知になった方法によってAlizarin red S染色法で染色することにより、骨細胞への分化程度を分析した。また、同様の方法で前記比較例1で取得した胎盤全体、他の胎盤細部組織及び他組織由来幹細胞の骨細胞への分化能を測定した。その結果を図7、図10及び図11に示した。

【0062】

図7、図10及び図11に示したように、本発明に係る栄養膜基底層 (bCT) 由来幹細胞は、胎盤全体、他の胎盤細部組織及び他組織由来幹細胞より均一に骨細胞に分化できる優れた骨細胞分化能を有していることを確認した。

【0063】

実施例7：胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞の脂肪細胞への分化能確認

前記実施例1で取得した胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞の脂肪細胞への分化能を確認するために、幹細胞を公知になった脂肪細胞分化誘導培地1 (10% FBS、1% Anti-biotics、1 μM デキサメタゾン、20 μM インドメタシン、10 μM インスリン、50 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) が含まれたDMEM培地)及び脂肪細胞分化誘導培地2 (10% FBS、1% Anti-biotics、10 μM インスリンが含まれたDMEM培地)を3~4日ずつ交互に加えて3週間培養し、脂肪細胞への分化を誘導した。前記幹細胞の脂肪細胞への分化程度を測定するために、従来、公知になった方法によってOil red O染色を行った。また、同様の方法で前記比較例1で取得した胎盤全体、他の胎盤細部組織及び他組織由来幹細胞の脂肪細胞への分化能を測定した。その結果を図7及び図12に示した。

【0064】

図7及び図12に示したように、本発明に係る栄養膜基底層 (bCT) 由来幹細胞は、胎盤全体、他の胎盤細部組織及び他組織由来幹細胞より均一に脂肪細胞に分化できる優れた脂肪細胞分化能を有していることを確認した。

【0065】

実施例8：胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞の軟骨損傷動物モデルで細胞治療剤としての効果検証

前記実施例1で取得した胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞の組織欠損動物モデルで細胞治療剤としての効果を検証するために、下記のような実験を行った。より具体的には、イエウサギ (rabbit) 関節軟骨損傷動物モデルを作製するために、健常なイエウサギを選択し、体重による適切な量のケタミンとキシラジンで注射麻酔した後、イエウサギが十分に全身麻酔されたことを確認し、両下肢の膝関節部位をひげそりした後、姿勢を維持させながら絆創膏で固定した。両側膝関節部位をポビドンで消毒し、膝蓋骨を触指して位置を確認した後、膝関節の上、下、膝蓋骨の内側を通る切開線に沿って傍正中アプローチ (paramedian approach) で膝関節内に達し、膝蓋骨を外側に捲って膝関節を屈曲させ、関節内部を観察した。特異な病的所見がないことを確認した後、膝蓋骨溝中央顆間窩 (interchondylar notch) の上端の先から1mm上側に尖っている錐で傷をつけた後、これを中心としてドリルで直径3mm、深さ5mmの穴を作って軟骨全層 (full thickness) に損傷を与えた。上述のように軟骨損傷を誘発してから8週と16週後に損傷部位を観察し、軟骨損傷部位が天然治癒されていないことを確認した。注射器を利用してヒアルロン酸と本発明に係る栄養膜基底層由来幹細胞を混ぜた後、500 μlを前記動物モデルの右側に作られた軟骨損傷部位に注入した (前記500 μlは、組成物の量が足りないか、または施術時

10

20

30

40

50

のミスの場合を考えて、施術の便宜上、余るように準備したものである。)。以後、膝蓋骨を元の位置に戻した後、膝蓋骨周囲の軟部組織を吸収性糸で縫合し、皮膚を非吸収性糸で縫合した。反対側脚には、陽性対照群として、ヒアルロン酸と臍帯血由来幹細胞を混ぜて同量を注入した。イエウサギが麻酔から覚めることを確認した後、自由に動けるように許容し、手術後5日間、感染を防ぐために鎮痛剤と抗生剤を投与した。8週と16週が経過した後、各イエウサギから損傷及び治療を行った関節軟骨部位の切片を得てH&E及びSafranin O染色を行い、ICRS(International Cartilage Repair Society) macroscopic scoreを用いた定量化を通して、新たに形成された軟骨を分析した。その結果を図13及び図14に示した。

10

【0066】

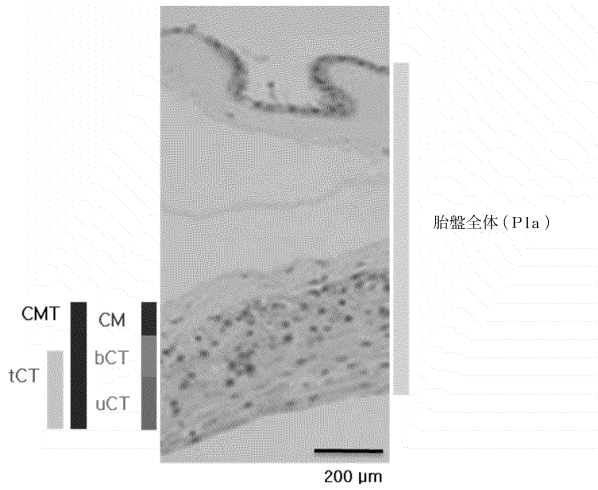
図13及び図14に示したように、本発明に係る栄養膜基底層(bCT)由来幹細胞を注入した群は、臍帯血由来幹細胞を注入した群に比べて新たに生成された軟骨細胞層の全体的な厚さが2倍以上であることを確認した。従って、栄養膜基底層(bCT)由来幹細胞は、損傷した関節軟骨部位で軟骨細胞を優れた効率で生成でき、効果的に関節軟骨損傷を治療できることを確認した。

【0067】

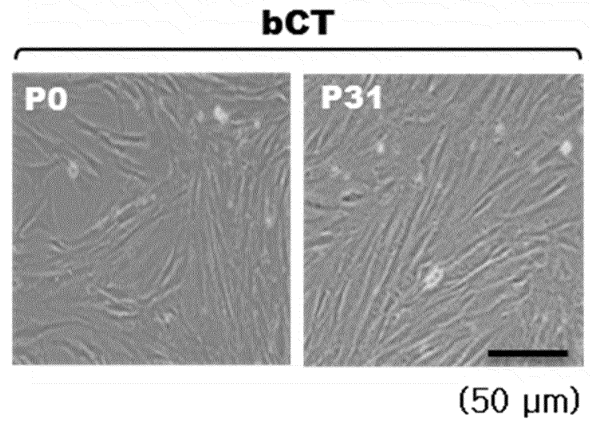
以上の実験結果を通して、従来の胎盤全体から由来した幹細胞が様々な特性を有する細部組織から由来した幹細胞が混合されており、互いに異なる細胞に分化する能力が均一に現れないのに対し、本発明に係る胎盤の細部組織である栄養膜基底層から由来した幹細胞は、優れた分化能とその他の幹細胞の種々の特性に対する均質性の側面からみると、従来の胎盤全体由来幹細胞に比べて優れた特性を示すことを確認することができた。特に、本発明に係る栄養膜基底層由来幹細胞は、他の胎盤細部組織である絨毛膜、絨毛-栄養膜、栄養膜及び栄養膜上層部由来幹細胞より成長、増殖、形態及び分化の特性で一貫した様相を示し、最も優れた幹細胞の特性を示した。従って、前記栄養膜基底層から由来した幹細胞を利用する場合、目的とする細胞への分化効率を向上させることができ、様々な疾患で細胞治療剤として有用に利用できることを確認した。

20

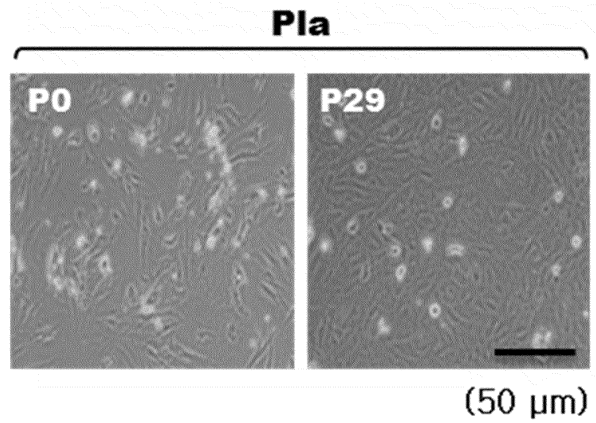
【 図 1 】



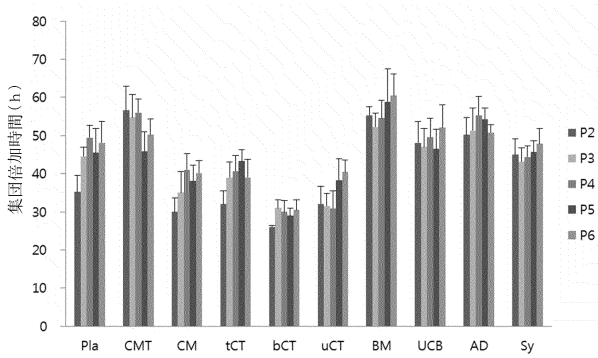
【 図 2 】



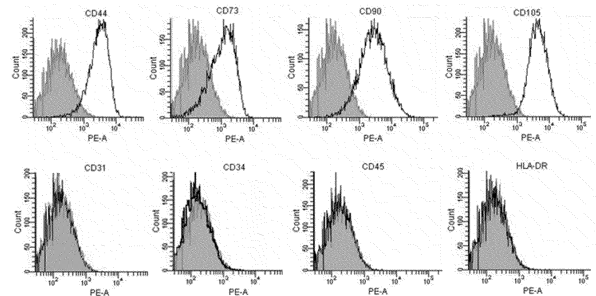
【 図 3 】



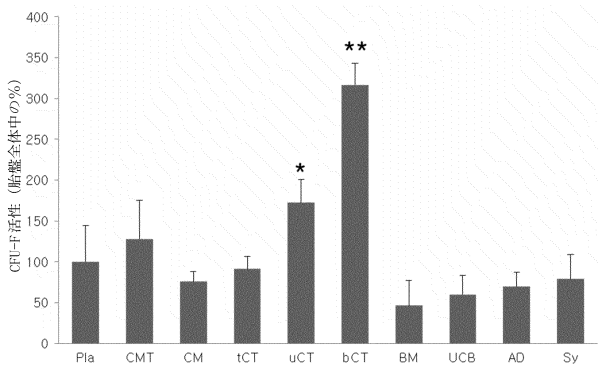
【 図 4 】



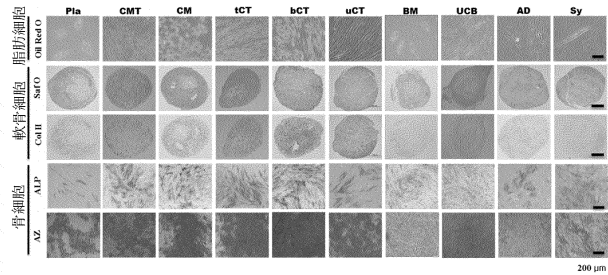
【 図 6 】



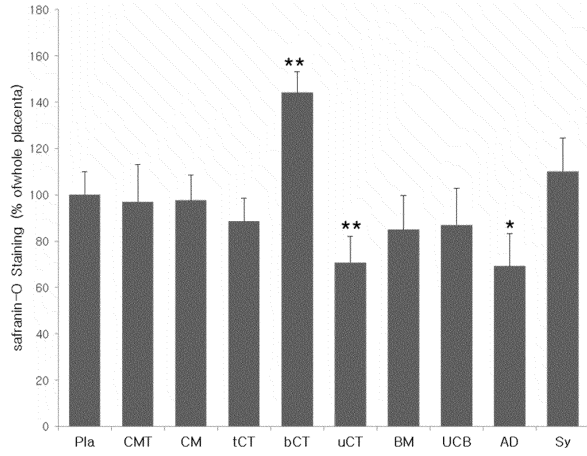
【 図 5 】



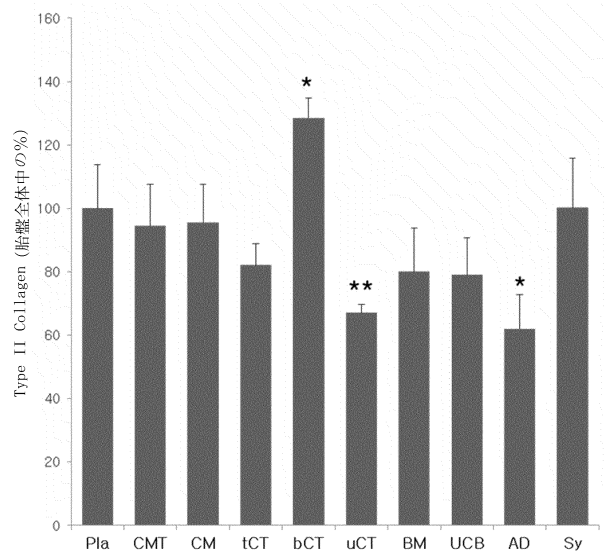
【 図 7 】



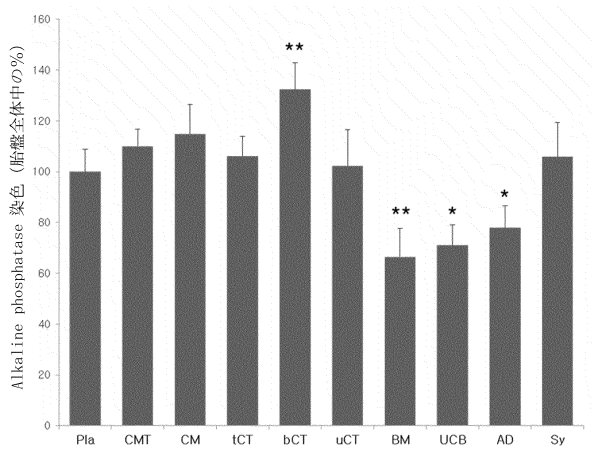
【 図 8 】



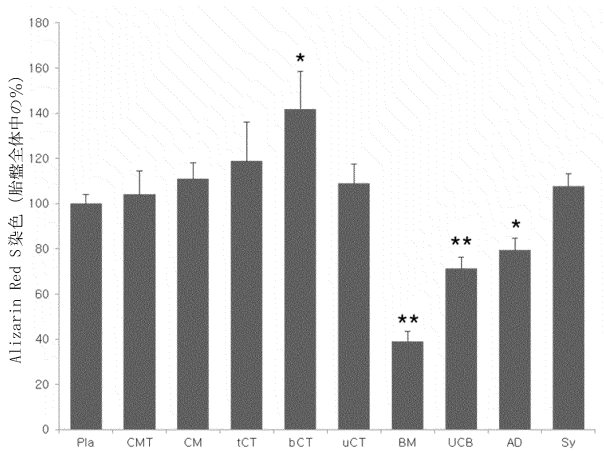
【 図 9 】



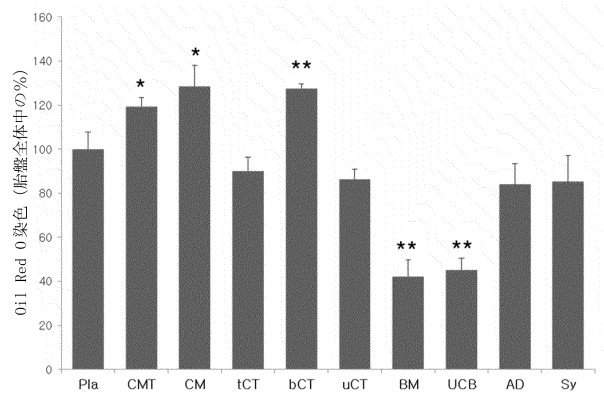
【 図 10 】



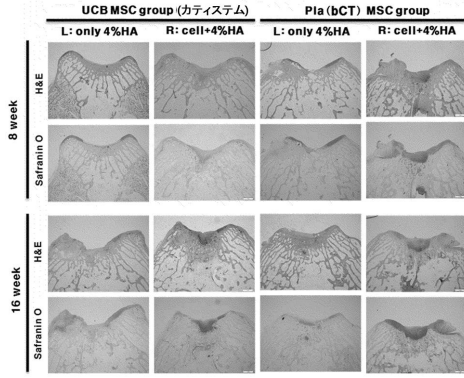
【 図 11 】



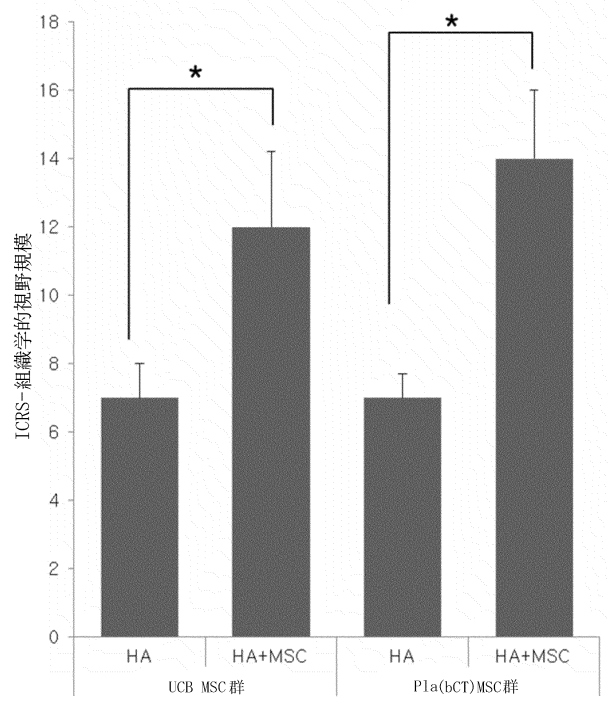
【 図 12 】



【 13 】



【 14 】



フロントページの続き

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 国際公開第2012/068170(WO,A2)
特表2010-527629(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 5/00-5/28

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/

WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed