(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7466218号
(P7466218)

(45)発行日　令和6年4月12日(2024.4.12)

(24)登録日　令和6年4月4日(2024.4.4)

(51)国際特許分類
Ｃ１２Ｎ　5/0775(2010.01)

ＦＩ
Ｃ１２Ｎ　5/0775

請求項の数　15　（全11頁）

(21)出願番号　特願2021-570631(P2021-570631)
(86)(22)出願日　令和2年4月6日(2020.4.6)
(86)国際出願番号　PCT/JP2020/016228
(87)国際公開番号　WO2021/145002
(87)国際公開日　令和3年7月22日(2021.7.22)
審査請求日　令和4年4月8日(2022.4.8)
(31)優先権主張番号　PCT/JP2020/002197
(32)優先日　令和2年1月16日(2020.1.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　516385996
ＰｕＲＥＣ株式会社
島根県出雲市塩冶町８９番地１
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄
(72)発明者　松崎 有未
島根県出雲市塩冶町８９番１　ＰｕＲＥＣ株式会社内
(72)発明者　陶山 隆史
島根県出雲市塩冶町８９番１　ＰｕＲＥＣ株式会社内
審査官　鈴木 崇之

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　高純度間葉系幹細胞

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１)が陽性、又はＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１)及びＴｈｙ-１（ＣＤ９０)が共陽性の高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団であって、前記細胞集団が、以下の（ａ）の特徴を満たす、細胞集団：

（ａ）フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が３５％以下である。

【請求項２】

変動係数が３０％以下である、請求項１に記載の細胞集団。

【請求項３】

平均細胞サイズが２０μｍ以下である、請求項１又は２に記載の細胞集団。

【請求項４】

平均細胞サイズが１４μｍ～１８μｍである、請求項３に記載の細胞集団。

【請求項５】

ＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１)が陽性、又はＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１)及びＴｈｙ-１（ＣＤ９０)が共陽性の高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団の品質を評価する方法であって、以下の（ａ）の特徴を満たす細胞集団を、高品質であると判定する、前記方法：

（ａ）フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が３５％以下である。

【請求項６】

変動係数が３０％以下である、請求項５に記載の方法。

【請求項７】

平均細胞サイズが20μm以下である、請求項５又は６に記載の方法。
【請求項８】
平均細胞サイズが14μm～18μmである、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
LNGFR（CD271)が陽性、又はLNGFR（CD271)及びThy-1（CD90)が共陽性の高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団から、臨床に適用可能な細胞集団を選抜する方法であって、以下の（ａ）の特徴を満たす細胞集団を、治療用間葉系幹細胞集団として選抜する、前記方法：
（ａ）フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が35％以下である。
【請求項１０】
変動係数が30％以下である、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
平均細胞サイズが20μm以下である、請求項９又は１０に記載の方法。
【請求項１２】
平均細胞サイズが14μm～18μmである、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
ヒト間葉系幹細胞の臨床に適用可能な細胞集団を同定する方法であって、
（ａ）LNGFR（CD271)が陽性、又はLNGFR（CD271)及びThy-1（CD90)が共陽性の間葉系幹細胞の集団を得るステップ、
（ｂ）前記間葉系幹細胞のクローンを単一細胞培養するステップ、
（ｃ）増殖が速いクローンを回収し、拡大培養するステップ、
（ｄ）フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数を測定するステップ、及び
（ｅ）フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が35％以下である場合に、臨床に適用可能な細胞集団を同定するステップ、
を含む方法。
【請求項１４】
（ａ）平均細胞サイズが20μm以下である、及び／又は
（ｂ）フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が30％以下である、
請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
平均細胞サイズが14μm～18μmである、請求項１４に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、均一性を有し増殖の早いヒト間葉系幹細胞の高純度細胞集団に関する。
【背景技術】
【０００２】
間葉系幹細胞（Ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ：ＭＳＣ）は、細胞採取に伴う倫理的問題が少なく、骨・軟骨・脂肪などへの多様な分化能を持つことから、造血幹細胞に次いで臨床応用が盛んに行われている体性幹細胞の一つである。ＭＳＣは、比較的簡単な手技により分離できることから、主に試験管内で軟骨や骨などへ分化誘導後に局所へ移植するなど、バイオマテリアルの材料として広く用いられている。
そして、臨床応用を進める際には、一定の機能を維持する細胞を必要量製造できることが、製品化の必須条件となる。
【０００３】
しかしながら、出発材料（ヒト骨髄液等）の性質にばらつきがある場合、すなわちドナーに由来する性質に差異がある場合は、製品としての細胞製剤の性質は大きく影響を受ける。
このため、ばらつきの少ない高純度の間葉系幹細胞を得ることが重要である。
本発明者らは、骨髄液からＬＮＧＦＲ、Ｔｈｙ－１共陽性細胞をフローサイトメトリー

により分離し、増殖の早いクローン（Ｒａｐｉｄｌｙ Ｅｘｐａｎｄｉｎｇ Ｃｌｏｎｅ：ＲＥＣ）を得ており、ドナーに由来するＭＳＣの増殖性の差を排除できる精製分離方法を確立した（特許第６４６３０２９号、ＷＯ２０１６／０１７７９５、Ｍａｂｕｃｈｉ Ｙ．ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ １（２）：１５２－１６５，２０１３）。この方法では、例えばＲｏｒ２の発現を指標としてＲＥＣを分離選別している。

【０００４】

また、精製済み間葉系幹細胞組成物及び間葉系幹細胞組成物を精製する方法も知られており（特許６０２５３２９号）、この方法では、直径が１５０μｍ以下の間葉系幹細胞が精製されている。

しかしながら、ＲＥＣのクローンには分化能や増殖能において依然としてばらつきが観察される。また、増殖性に優れるＲＥＣといえども継代による劣化は避けられず、有効な品質管理方法が求められていた。そして、Ｒｏｒ２の発現を指標にした場合でも増殖能との相関には改善の余地があった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００５】

【文献】特許第６４６３０２９号

【文献】国際公開２０１６／０１７７９５号パンフレット

【文献】特許第６０２５３２９号

【非特許文献】

【０００６】

【文献】Ｍａｂｕｃｈｉ Ｙ Ｍｏｒｉｋａｗａ Ｓ，Ｈａｒａｄａ Ｓ；Ｎｉｉｂｅ Ｋ，Ｓｕｚｕｋｉ Ｓ，Ｒｅｎａｕｌｔ－Ｍｉｈａｒａ Ｆ，Ｈｏｕｌｉｈａｎ ＤＤ，Ａｋａｚａｗａ Ｃ，Ｏｋａｎｏ Ｈ，Ｍａｔｓｕｚａｋｉ Ｙ．ＬＮＧＦＲ＋ Ｔｈｙ－１＋ Ｖｃａｍ－１ｈｉ＋ ｃｅｌｌｓ ｒｅｖｅａｌ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｌｙ ｄｉｓｔｉｎｃｔ ｓｕｂｐｏｐｕｌａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ．Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ １（２）：１５２－１６５，２０１３．

【発明の概要】

【０００７】

［発明が解決しようとする課題］

【０００８】

そこで本発明においては、高純度で均一性の高いＲＥＣの選別方法、及び細胞性能を担保する指標を確立することが求められていた。

［課題を解決するための手段］

【０００９】

本発明者は、上記課題を解決するために検討を行った結果、ヒト骨髄液からＬＮＧＦＲ及びＴｈｙ－１が共に陽性の細胞を得て、単一の細胞から数多くのＲＥＣのクローンを製造し、分化能及び増殖能の測定を繰り返すうちに、細胞の大きさと均一性が、それぞれのクローンの分化能及び増殖能とより強く相関することを見出した。

【００１０】

また本発明者は、各クローンを構成する細胞の大きさとそのばらつきをフローサイトメトリーにおける前方散乱光（ＦＳＣ）を指標に分析し、サイズが小さくＦＳＣのＣＶ値が小さいほど、増殖能、分化能に優れることを見出し、この指標をもとに各クローンの選抜を行うことで一定の範囲内の機能を持つ細胞を製造できることを見出した。

【００１１】

すなわち、本発明は以下の通りである。

（１）ＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１）が陽性、又はＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１）及びＴｈｙ－１（ＣＤ９０）が共陽性の高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団であって、以下の（ａ）及び（ｂ）の少なくとも１つの特徴を満たす、前記細胞集団。

（ａ）フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が３５％以下である。

（ｂ）平均細胞サイズが２０μｍ以下である。
（２）変動係数が３０％以下である、（１）に記載の細胞集団。
（３）平均細胞サイズが１４μｍ～１８μｍである、（１）又は（２）に記載の細胞集団。
（４）ＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１）が陽性、又はＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１）及びＴｈｙ－１（ＣＤ９０）が共陽性の高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団の品質を評価する方法であって、以下の（ａ）及び（ｂ）の少なくとも１つの特徴を満たす細胞集団を、高品質であると判定する、前記方法。
（ａ）フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が３５％以下である。
（ｂ）平均細胞サイズが２０μｍ以下である。
（５）変動係数が３０％以下である、（４）に記載の方法。
（６）平均細胞サイズが１４μｍ～１８μｍである、（４）又は（５）に記載の方法。
（７）ＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１）が陽性、又はＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１）及びＴｈｙ－１（ＣＤ９０）が共陽性の高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団から、臨床に適用可能な細胞集団を選抜する方法であって、以下の（ａ）及び（ｂ）の少なくとも１つの特徴を満たす細胞集団を、治療用間葉系幹細胞集団として選抜する、前記方法。
（ａ）フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が３５％以下である。
（ｂ）平均細胞サイズが２０μｍ以下である。
（８）変動係数が３０％以下である、（７）に記載の方法。
（９）平均細胞サイズが１４μｍ～１８μｍである、（７）又は（８）に記載の方法。
[発明の効果]
【００１２】
本発明により、細胞の大きさに均一性を有し、しかも増殖能、分化能に優れる間葉系幹細胞集団を選抜することができた。選抜された細胞集団は臨床に適用し得る品質を有しており、心筋梗塞、脳梗塞、脊髄損傷、骨又は軟骨形成関連疾患、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）、肝硬変、表皮水泡症、下肢虚血などの治療に使用することが期待される。
【図面の簡単な説明】
【００１３】
【図１】本発明においてＲＥＣを選別する手法の概要を示す図である。
【図２】フローサイトメトリーによる前方散乱光（ＦＳＣ）のＣＶ値の測定結果を示す図である。
【図３】細胞増殖能及び脂肪分化能を評価した結果を示す図である。
【図４】ＲＥＣクローンの網羅的解析結果を示す図である。
【図５】本発明の解析結果のまとめを示す図である。
【図６】ＲＥＣクローンの網羅的解析結果を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００１４】
以下、本発明を詳細に説明する。
１．概要
本発明者は、以前の研究により、ＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１）が陽性の間葉系幹細胞（ＣＤ２７１＋細胞）、又はＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１）及びＴｈｙ－１（ＣＤ９０）が共陽性の間葉系幹細胞（ＣＤ２７１＋ＣＤ９０＋細胞）の中から、増殖が早い高速増殖性の細胞クローン（Ｒａｐｉｄｌｙ　Ｅｘｐａｎｄｉｎｇ　Ｃｌｏｎｅ：ＲＥＣ）を単離することに成功した。
このＲＥＣは、９６ウェルプレートに１個ずつ細胞を播種して培養したときに、２週間でコンフルエントに達することができる細胞であり、従来法で得た間葉系幹細胞と比較し、増殖能、分化能及び遊走能の全てが１０００倍以上の能力を有する。そして、特に遊走能を保持しているため、経静脈内投与が可能となり、骨・軟骨形成不全症等の重篤な全身性疾患への応用が期待できる。
【００１５】
しかし、このようなＲＥＣクローンであっても、中には、分化能や増殖能においてばら

つきが観察されることがある。
本発明は、このようなばらつきの少ない細胞クローン、及び当該細胞クローンの選別方法を提供するものである。
【００１６】
本発明の細胞クローンを含む細胞集団は、ＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１）及びＴｈｙ－１（ＣＤ９０）が共陽性であり、かつ、増殖が早い間葉系幹細胞クローンの集団であり、以下の（ａ）及び（ｂ）の少なくとも１つの特徴を満たす。
（ａ）フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が３５％以下である。
（ｂ）平均細胞サイズが２０μｍ以下である。
【００１７】
２．ヒト間葉系幹細胞濃縮方法
本発明において、ＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１）が陽性、又はＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１）及びＴｈｙ－１（ＣＤ９０）が共陽性の間葉系幹細胞を得るには、例えばＷＯ２００９／３１６７８号に記載の方法に従うことができる。
その方法の概要は以下の通りである。
【００１８】
まず、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、ＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１）が陽性（ＣＤ２７１＋）、又はＣＤ２７１及びＣＤ９０が共陽性（ＣＤ２７１＋ＣＤ９０＋）の細胞分画を選別することにより、間葉系幹細胞を高度に濃縮する。なお、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団に血球系細胞が含まれる場合は、非血球系の細胞を選別するために、ＣＤ４５及びＣＤ２３５ａが共陰性（ＣＤ４５－ＣＤ２３５ａ－）の細胞を選別する工程を加えてもよい。
【００１９】
間葉系幹細胞が含まれる細胞集団は、フローサイトメトリーやアフィニティー・クロマトグラフィーによって調製することができる。
この細胞集団を得るための材料は特に限定されないが、例えば、骨髄や末梢血（Ｇ－ＣＳＦ投与後の末梢血を含む）等が挙げられる。なお、骨髄は、脊椎、胸骨、腸骨等の骨髄を用いればよい。
【００２０】
細胞調製の際、材料が間葉系幹細胞を巻き込んだ細胞塊になっている場合には、必要により、材料に対してピペッティング等による物理的処理や、トリプシン、コラゲナーゼ等による酵素処理を行うことができる。また、材料に赤血球が混入している場合には、予め赤血球を溶血しておくことが好ましい。
上記の通り調製された細胞集団を用い、ＣＤ２７１＋細胞又はＣＤ２７１＋ＣＤ９０＋細胞を選別する。
【００２１】
ＣＤ２７１＋細胞又はＣＤ２７１＋ＣＤ９０＋細胞を選別する方法としては、例えば、抗体を用いる方法が挙げられる。
抗体は、ＣＤ２７１＋細胞又はＣＤ２７１＋ＣＤ９０＋細胞を選別することが可能な、抗ＣＤ２７１抗体及び／又は抗ＣＤ９０抗体である。選別にフローサイトメトリーを用いる場合には、ＦＩＴＣ、ＰＥ、ＡＰＣ等の異なる蛍光色素で標識された抗ＣＤ２７１抗体、又は抗ＣＤ２７１抗体と抗ＣＤ９０抗体を、適宜組み合わせて用いることにより、生細胞を短時間で選別することが可能になる。また、フローサイトメトリー以外にも、磁気ビーズを用いる方法やアフィニティー・クロマトグラフィーを用いる方法によって、ＣＤ２７１＋ＣＤ９０＋細胞を選別することが可能である。
なお、これらの方法を用いる前に、予め、死細胞を染色する蛍光色素（例えば、ＰＩ）を細胞集団と反応させ、蛍光で染色された細胞を除去することにより、死細胞を除去してもよい。
【００２２】
３．ＲＥＣ細胞濃縮

次に、選別したＬＮＧＦＲ陽性細胞、又はＬＮＧＦＲ及びＴｈｙ１共陽性細胞を単一細胞（クローン）培養し、増殖が速いロットを選択することで、増殖能・分化能・遊走能にすぐれた高純度ヒト間葉系幹細胞（ＲＥＣ：Ｒａｐｉｄｌｙ　Ｅｘｐａｎｄｉｎｇ　Ｃｌｏｎｅ）を得る。

図１に単クローン培養法によるＲＥＣ分離工程を例示する。

【００２３】

ヒト骨髄又は脂肪・胎盤絨毛膜から単核細胞を調製し、骨髄単核細胞を抗ＬＮＧＦＲ単独、又は抗ＬＮＧＦＲ及び抗Ｔｈｙ１で染色する。次に、フローサイトメトリー（セルソータ）を用い、ＬＮＧＦＲ陽性細胞、又はＬＮＧＦＲ陽性及びＴｈｙ１陽性細胞を９６穴培養プレートにクローンソートする。すなわち、１ウェルに細胞１個ずつ播種する。単一細胞培養２週間後に培養プレートを顕微鏡下で撮影し、コンフルエント又はセミコンフルエントになったウェルを選別し、当該ウェルに含まれる細胞をＲＥＣとする。

【００２４】

ここで、「増殖が速い」、「高速増殖性」とは、９６穴培養プレートの１ウェルに細胞１個ずつ播種して培養したときに、培養開始２週間後又はそれ以前に培養プレートがコンフルエント又はセミコンフルエントになる程度の増殖速度（倍加時間（ダブリングタイム）が２６±１時間）を有することを意味する。

コンフルエントとは、培養容器表面（培養面）の９０％以上を培養細胞が覆っている状態である。また、セミコンフルエントとは、培養容器表面（培養面）の７０～９０％を培養細胞が覆っている状態である。使用する培養器具のサイズ及び種類は、細胞の増殖速度に応じ適宜変更可能である。遅れて増殖している細胞（Ｍｏｄｅｒａｔｅｌｙ／Ｓｌｏｗｌｙ　Ｅｘｐａｎｄｉｎｇ　Ｃｅｌｌｓ）、すなわち単一細胞培養２週後になってもセミコンフルエント又はコンフルエントにならなかった細胞は破棄する。ＲＥＣとして選別した各ウェルから回収したＲＥＣを各ウェル毎に培養フラスコに移入し、さらにコンフルエントになるまで培養する（拡大培養）。その後、拡大培養した細胞を別々に回収する。１ウェル由来のＲＥＣを１ロットとし、これを後述の選別に使用する。

【００２５】

ここで、本発明の細胞は、１ウェルに細胞１個ずつ播種するクローンソートにより得られたものであるから、増殖した細胞同士の遺伝形質はすべて同じである。従って、本発明においては細胞集団全体を「クローン」と言うことも、細胞集団を構成する個々の細胞を「クローン」ということもある。

【００２６】

また、本発明において、選別に使用するためのＲＥＣは、ＲＥＣマーカー（抗Ｒｏｒ２）により予め評価しておくこともできる。例えば、前記拡大培養後、全ロットから付着増殖した細胞を回収し、各ロットの一部（１～３×10^5個程度）の細胞をとりわけて、抗Ｒｏｒ２に対するモノクローナル抗体で単一染色を行う。抗Ｒｏｒ２に対するモノクローナル抗体で単一染色を行う手法は公知である（ＷＯ２０１６／１７７９５）。要約すると、ＲＥＣマーカーを用いたフローサイトメトリー解析により、回収細胞におけるＲＥＣマーカー陽性細胞の比率を求める。比率は、定量的ＰＣＲを用いてＲｏｒ２のｍＲＮＡ発現を定量してもよいし、顕微鏡により同比率をマニュアルにより求めてもよい。上記陽性比率が一定値（例えば６５％）以上のロット（細胞集団）を合格とし、これを後述の選別に使用することもできる。

【００２７】

４．本発明の幹細胞集団の選別

本発明においては、個々のロットのＲＥＣクローンについて、細胞の増殖能、脂肪分化能、ＲＥＣ特異的マーカー発現量、細胞サイズの均一性を調べ、それぞれの相関性を解析することにより、高純度でより細胞性能の高いＲＥＣを選別することが可能となった。

本発明においては、前方散乱光の変動係数（Ｃｏｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　ｏｆ　Ｖａｒｉａｔｉｏｎ：ＣＶ値）及び細胞の平均サイズを選別の指標とする。

前方散乱光（Ｆｏｒｗａｒｄ　Ｓｃａｔｔｅｒ）とは、レーザー光の軸に対して前方向

の小さい角度で散乱する光である。前方散乱光は、細胞表面で生じるレーザー光の散乱光、回折光及び屈折光からなり、サンプルの大きさに関する情報が得られる。

【００２８】

変動係数（Ｃｏｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　ｏｆ　Ｖａｒｉａｔｉｏｎ：ＣＶ）は、標準偏差を平均値で割った値のことで、単位の異なるデータのばらつきや、平均値に対するデータとばらつきの関係を相対的に評価する際に用いる数値である。

本発明においては、上記ＣＶ値が３５％以下のものを選別する。ＣＶ値が３５％以下の細胞集団は、大きさが均一な細胞により構成されている細胞集団である。好ましくは、ＣＶ値は３０％以下、２５％以下、又は２０％以下である。

また、本発明により選別された細胞集団における細胞の平均サイズは、２０μｍ以下である。好ましくは１８μｍ以下であり、１４μｍ～１８μｍの範囲の大きさである。

【００２９】

本発明は、ＬＮＧＦＲ陽性細胞、又はＬＮＧＦＲ（ＣＤ２７１）及びＴｈｙ－１（ＣＤ９０）が共陽性の高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団の品質を評価する方法も提供する。本発明においては、以下の（ａ）及び（ｂ）の少なくとも１つの特徴、好ましくは両方の特徴を満たす細胞集団を、高品質であると判定する。

（ａ）フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が３５％以下である。

（ｂ）平均細胞サイズが２０μｍ以下である。

【００３０】

このようにして評価及び選別された細胞集団は、当該集団を構成する細胞クローンの数が限定されるものではなく、例えば１ｍｌの溶液に０．８Ｘ１０^{7}～１．２Ｘ１０^{7}個程度の細胞を有する。

また、当該細胞集団は、治療用間葉系幹細胞集団として、例えば以下の疾患の治療目的とした臨床に適用することが可能である。但し、疾患はこれらに限定されるものではない。

遺伝子疾患（表皮水泡症、低ホスファターゼ症等）

骨関節疾患（膝軟骨欠損、変形性膝関節症、椎間板ヘルニア等）

心疾患（心筋梗塞、虚血性心不全等）

肝臓疾患（肝硬変、非アルコール性脂肪性肝炎等）

【００３１】

実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の範囲はこれらの実施例により限定されるものではない。

［実施例１］

【００３２】

１．フローサイトメトリーによる前方散乱光（ＦＳＣ）のＣＶ値測定

公知方法（ＷＯ２０１６／１７７９５）及び図１に示すスキームにより予め調製しておいたＲＥＣクローン（クローン番号：１～４５）を、フローサイトメトリーによる前方散乱光のＣＶ値測定に用いた。

フローサイトメトリーにおけるＦＳＣは細胞の表面積又は大きさに比例する。本実施例では、ＦＳＣのＣＶ値を指標として細胞サイズのばらつきを評価した。図２に、フローサイトメトリーによる前方散乱光のＣＶ値測定結果を示す。

【００３３】

（ａ）個々のＲＥＣクローンに対してＰＩ染色を行い、ＰＩ陰性の生細胞集団にゲートを設定して、死細胞を解析の対象から除外した。

（ｂ）ＰＩ陰性の生細胞集団をＦＳＣ／ＳＳＣのサイトグラムで展開し、メインの細胞集団にゲート（Ｐ１）を設定して、ゴミやノイズを解析の対象から除外した。

（ｃ）Ｐ１ゲート内の細胞集団をＦＳＣのヒストグラムで展開し、マーカー（Ｍ１）を設定して、ＣＶ値を計測した。

【００３４】

２．細胞増殖能及び脂肪分化能の評価（図３）

（１）細胞増殖能の評価方法
１ｘ１０^{5}個のＲＥＣ細胞を１００mm培養皿に播種して、３７℃、５％CO_2環境下で５日間培養し、その後、セルカウンターを用いて細胞数及び平均細胞サイズを計測した。なお、培養液は、ＦＢＳ、ｂａｓｉｃ　ＦＧＦ、Ｈｅｐｅｓ、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎを添加したＤＭＥＭ培地（富士フイルム和光純薬社）を用いた。
（２）脂肪分化能の評価方法
５ｘ１０^{4}個のＲＥＣ細胞を２４穴プレートに播種して、３７℃、５％CO_2環境下で２日間培養し、その後、脂肪分化誘導培地に置換して、さらに１４日間培養した。培養１４日後にオイルレッド０染色を行い、画像解析により脂肪滴面積を算出した。なお、脂肪分化誘導培地は、（１）の培養培地にＤｅｘａｍｅｔｈａｓｏｎｅ、Ｉｎｄｏｍｅｔｈａｃｉｎ、ＩＢＭＸを添加した培地を用いた。

【００３５】
３．網羅的解析
１回のソーティングで得られたＲＥＣ、４５クローンについて網羅的解析を行った（図４）。
それぞれのＲＥＣクローンについて、ＦＳＣのＣＶ値、細胞増殖率（増殖能）、平均細胞サイズ、脂肪分化能を調べたところ、ＦＳＣのＣＶ値が低いＲＥＣクローン（＃３，＃５，＃１５，＃１６，＃１７）は、増殖能、分化能が共に高く、平均細胞サイズが小さいことがわかった。
一方で、ＦＳＣのＣＶ値が高いＲＥＣクローン（＃７，＃３２，＃３９，＃４０，＃４４）は、増殖能、分化能が共に低く、平均細胞サイズが大きいことがわかった。
ＣＶ値３０％～３５％のクローンの平均増殖率は６．４であり、ＣＶ値２５％～３０％のクローンの平均増殖率は９．２、ＣＶ値２５％以下のクローンの平均増殖率は１５．１であった。また平均細胞サイズが１８μｍ～２０μｍのクローンの平均増殖率は７．０であり、平均細胞サイズが１６μｍ～１８μｍのクローンの平均増殖率は１２．７、平均細胞サイズが１６μｍ以下のクローンの平均増殖率は２１．３であった。
これらの結果より、ＦＳＣのＣＶ値及び平均細胞サイズを指標として、増殖能、分化能が共に高い、高品質なＲＥＣクローンの選別が可能となった。

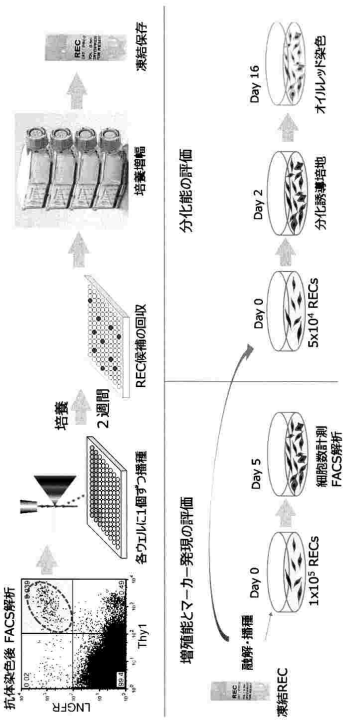
【００３６】
４．典型的解析例のまとめ（図５）
ＦＳＣのＣＶ値が低く、平均細胞サイズの小さいクローンＡは、脂肪分化能、増殖能が共に高い、高品質なＲＥＣクローンである。
ＦＳＣのＣＶ値が高く、平均細胞サイズの大きいクローンＢは、脂肪分化能、増殖能が共に低い、規格外なＲＥＣクローンである。

［実施例２］
２種の骨髄液ロット（＃　１８ＴＬ１５８１６６と＃　８Ｆ５０４０）を２つの方法（ＣＤ２７１とＣＤ９０共陽性およびＣＤ２７１単独）でソートし、得られるＣｏｌｏｎｙ、ＲＥＣ、ＭＥＣ、ＳＥＣの比率を比較した（図６）。
図６において、左パネルはセルソーティングの結果を示す。枠で囲んだ部分の細胞を９６－ｗｅｌｌのプレートに播種し、得られるコロニーの割合を右の表の“Ｃｏｌｏｎｙ”に示した。得られたコロニー中、増殖の速いコロニー（ＲＥＣ）、中程度のコロニー（ＭＥＣ）、増殖の遅いコロニー（ＳＥＣ）の割合を表中に示した。
ＬＮＧＦＲ、ＣＤ９０共陽性を指標にソートした場合に比較して、ＬＮＧＦＲ単独でソートした場合、コロニーの得られる割合は多かったが、ＲＥＣの得られる割合は低かった。
しかし、ＬＮＧＦＲ陽性単独でソートしても、ＲＥＣが分離できることがわかった。

【図面】

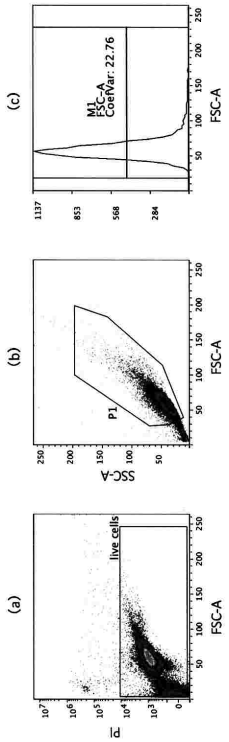
【図１】

図１



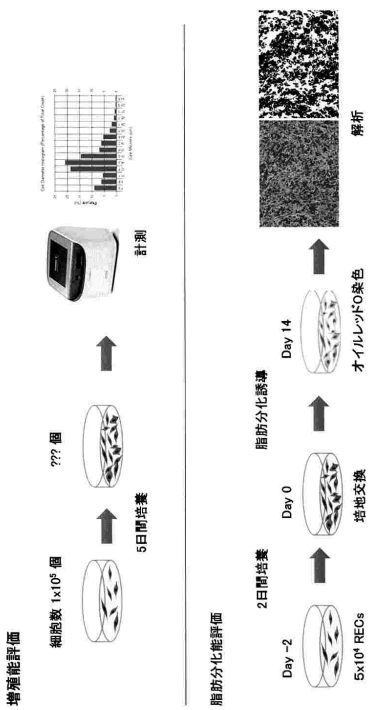
【図２】

図２



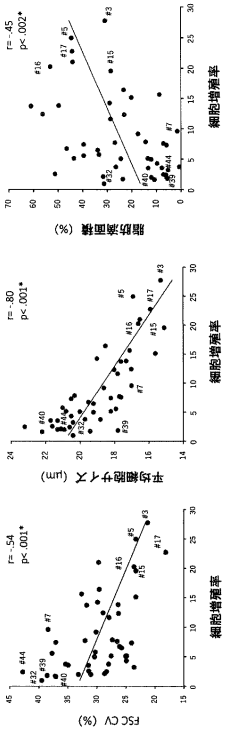
【図３】

図３



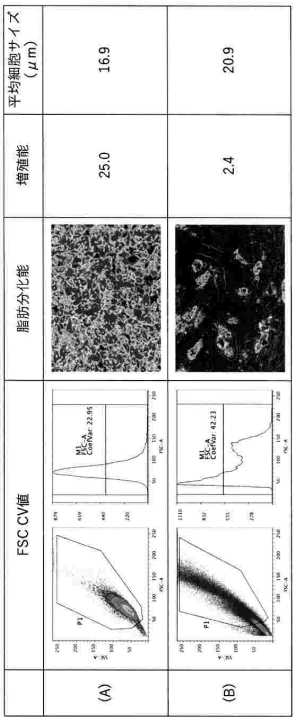
【図４】

図４



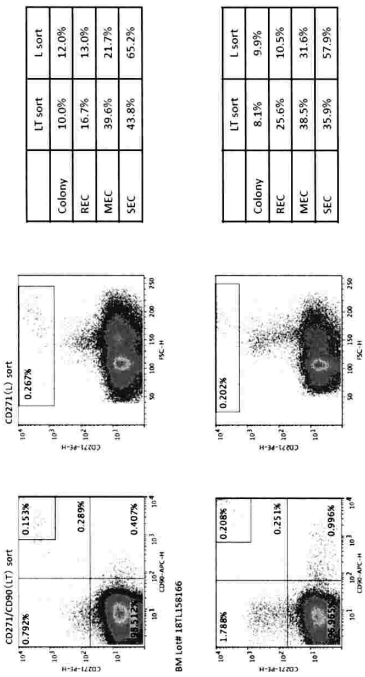
【図５】

図５


FSC CV値
脂肪分化能
増殖能
平均細胞サイズ（μm）
(A)
25.0
16.9
(B)
2.4
20.9

【図６】

図６


LT sort
L sort
Colony 10.0% 12.0%
REC 16.7% 13.0%
MEC 39.6% 21.7%
SEC 43.8% 65.2%
LT sort
L sort
Colony 8.1% 9.9%
REC 25.6% 10.5%
MEC 38.5% 31.6%
SEC 35.9% 57.9%
CD271(L) sort
0.267%
0.202%
CD271/CD90(LT) sort
0.153%
0.792%
0.289%
0.407%
0.208%
1.768%
0.251%
0.996%
BM Lot# 18TL158166

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第２０１６／０１７７９５（WO，Ａ１）
国際公開第２００９／０３１６７８（WO，Ａ１）
特表２０１２－５００２１４（ＪＰ，Ａ）
STEM CELL REPORTS，2013年08月06日，Vol. 1，pp. 152-165
PuREC 島根大学発バイオベンチャー, Research & Development, 研究シーズとそれを基に目指す製品・サービス，[オンライン], インターネット: 〈URL: https://www.purec.jp/ research_and_development/〉, 公開日: 2017.05.21 (当該公開日はインターネットアーカイブ 〈URL: https://archive.org/web/web.php〉による)，[検索日: 2020.06.19]
STEM CELLS INTERNATIONAL，2018年，Vol. 2018, Article ID 3038565，pp. 1-16

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　５／００－５／２８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＰｕｂＭｅｄ