

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6850944号
(P6850944)

(45) 発行日 令和3年4月14日(2021.4.14)

(24) 登録日 令和3年3月11日(2021.3.11)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 5/0775 (2010.01)	C 1 2 N 5/0775
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851 Z
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686 Z
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Y

請求項の数 10 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-538462 (P2016-538462)	(73) 特許権者 516385996 P u R E C 株式会社 島根県出雲市塩冶町89番地1
(86) (22) 出願日 平成27年7月31日(2015.7.31)	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2015/071770	
(87) 国際公開番号 W02016/017795	(74) 代理人 100092783 弁理士 小林 浩
(87) 国際公開日 平成28年2月4日(2016.2.4)	(74) 代理人 100120134 弁理士 大森 規雄
審査請求日 平成30年7月18日(2018.7.18)	(74) 代理人 100104282 弁理士 鈴木 康仁
(31) 優先権主張番号 特願2014-157367 (P2014-157367)	(72) 発明者 伊谷 有未 東京都文京区本駒込5-71-8 駒込台 ハイック202
(32) 優先日 平成26年8月1日(2014.8.1)	(72) 発明者 岡野 栄之 東京都文京区大塚5-31-10-103
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト間葉系幹細胞の品質評価方法、ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法並びに増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

初代ヒト組織由来間葉系幹細胞集団から、L N G F R T h y 1 共陽性細胞または R o r 2 陽性細胞である増殖の早いヒト間葉系幹細胞を単一細胞培養する工程1、および、
工程1で得られた細胞集団においてR o r 2を発現している細胞の存在比率を定量して
各細胞集団の合否判定を行う工程2を含む、増殖の早いヒト間葉系幹細胞の品質評価方法
。

【請求項2】

抗 R o r 2 モノクローナル抗体を用いて R o r 2 を発現している細胞を定量する請求項1に記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞の品質評価方法。

【請求項3】

定量的 P C R を用いて R o r 2 の m R N A を発現している細胞を定量する請求項1に記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞の品質評価方法。

【請求項4】

免疫染色により R o r 2 を発現している細胞を定量する請求項2に記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞の品質評価方法。

【請求項5】

初代ヒト組織由来間葉系幹細胞集団から、L N G F R T h y 1 共陽性細胞または R o r 2 陽性細胞である増殖の早いヒト間葉系幹細胞を単一細胞培養する工程1、および、
工程1で得られた細胞集団においてR o r 2を発現している細胞の存在比率を定量して

各細胞集団の合否判定を行い、合格の細胞集団のみを選別する工程 2を含む、増殖の早いヒト間葉系幹細胞の選別方法。

【請求項 6】

抗 R o r 2 モノクローナル抗体を用いて R o r 2 を発現している細胞を定量する請求項 5 に記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞の選別方法。

【請求項 7】

定量的 P C R を用いて R o r 2 の m R N A を発現している細胞を定量する請求項 5 に記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞の選別方法。

【請求項 8】

前記工程 1が、抗 L N G F R モノクローナル抗体および抗 T h y 1 モノクローナル抗体で染色した細胞をフローサイトメトリー（以下、「F C M」）で解析し、L N G F R T h y 1 共陽性細胞をセルソーティングする工程を含んでいる請求項 5 に記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞の選別方法。

10

【請求項 9】

前記工程 1が、抗 R o r 2 モノクローナル抗体で染色した細胞を F C M で解析し、R o r 2 陽性細胞をセルソーティングする工程を含んでいる請求項 5 に記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞の選別方法。

【請求項 10】

前記セルソーティングする工程が、培養プレートのウェルに陽性の各細胞を播種し、その後さらに、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別する工程を包含する請求項 8 または 9 に記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞の選別方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト間葉系幹細胞の品質評価方法、ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法、増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団、並びに、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体に関する。

【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。後述する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・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。

30

ヒト間葉系幹細胞の分離培養方法としては、非特許文献 1 で報告されている培養法が一般的に用いられる。しかし従来法で得た細胞集団には劣化した（分化・増殖・遊走能を失った）夾雑細胞が多数混入しており、この夾雑物が本来はポテンシャルを持つはずの細胞に影響し、さらなる品質の劣化をまねく要因となる。

かかる従来の実情に鑑みて、増殖能・分化能・遊走能が従来よりも優れたヒト間葉系幹細胞の分離培養方法を確立した（非特許文献 2、3、特許文献 1）。これらの非特許文献 2、3 及び特許文献 1 によれば、C D 2 7 1（L N G F R）と C D 9 0（T h y 1）に対する抗体を用い、ヒト骨髄、胎盤絨毛膜、脂肪組織、末梢血、歯髄などより L N G F R T h y 1 共陽性細胞を選別することでヒト間葉系幹細胞を濃縮することができる。

40

【0003】

また選別した L N G F R T h y 1 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（R E C：Rapidly Expanding Clone）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を得ることが可能となった。

同方法で得た高純度ヒト間葉系幹細胞（R E C）は従来法で得た間葉系幹細胞と比較し、増殖能・分化能・遊走能全てが 1 0 0 0 倍以上の能力を持っていた。

上記ヒト間葉系幹細胞の分離培養方法の特徴によれば、単一細胞培養を行うことで夾雑

50

細胞を含まない条件が形成され、細胞品質を維持した拡大培養が可能となる。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ようになった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2009-60840号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.

10

【非特許文献2】Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S, Niibe K, Suzuki S, Renault-Mihara F, Houlihan DD, Akazawa C, Okano H, Matsuzaki Y. (2013). *LNGFR+THY-1+VCAM-1hi* + Cells Reveal Functionally Distinct Subpopulations in Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Reports* 1, 152-165.

【非特許文献3】CGHアレイデータ Gene Expression Omnibus (GEO) (accession number : GSE34484)

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

不死化細胞株とは異なり、RECといえども継代培養を長期に繰り返すことによる細胞品質の劣化は避けられないが、現時点では品質劣化の明確な指標が存在しない。

【0007】

本発明では、ヒト間葉系幹細胞の品質評価方法、ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法、増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団、並びに、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供することを目的とする。

【0008】

また、RECとそれ以外の劣化したクローン(MEC: Moderately Expanding Clone, SEC: Slowly Expanding Clone)とで遺伝子発現解析を行い、REC特異的遺伝子を選別した。さらに特異的遺伝子が発現する蛋白を認識する新規モノクローナル抗体の作製を目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記目的を達成するため、本発明に係るヒト間葉系幹細胞の品質評価方法の特徴は、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び培養し、同分離、選別及び培養した細胞集団においてRor2またはFzd5を発現している細胞(の存在比率)を定量して各細胞集団の合否判定を行うことにある。同構成によれば、Ror2またはFzd5は、単独発現によりRECであるか否かを判定でき、培養細胞も利用可能であるため、判定をより簡便に行うことができる。なお、LNGFRは培養細胞ではRECであっても発現せず、Thy1は単独ではREC判定不能である。

40

【0010】

上記構成において、抗Ror2モノクローナル抗体または抗Fzd5モノクローナル抗体を用いてRor2またはFzd5を発現している細胞を定量するとよい。この場合、定量的PCRを用いてRor2のmRNA発現を定量してもよいし、免疫染色によりRor2またはFzd5を発現している細胞を定量してもよい。ただしRor2は細胞外発現であるため、FMCの適用が容易であるが、Fzd5は細胞内発現であるため、免疫染色の目視評価等が適切である。

【0011】

50

一方、上記目的を達成するため、ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法の特徴は、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び培養し、同分離、選別及び培養した細胞集団においてR o r 2 またはF z d 5を発現している細胞（の存在比率）を定量して各細胞集団の合否判定を行い、合格の細胞集団のみを選別することにある。

【 0 0 1 2 】

同構成において、抗R o r 2モノクローナル抗体または抗F z d 5モノクローナル抗体を用いてR o r 2 またはF z d 5を発現している細胞を定量するとよい。ここで、定量的PCRを用いてR o r 2のmRNAを発現している細胞を定量してもよいし、免疫染色によりR o r 2 またはF z d 5を発現している細胞を定量してもよい。

10

【 0 0 1 3 】

また、前記増殖の早いヒト間葉系幹細胞として分離、選別及び培養する工程が、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗L N G F Rモノクローナル抗体および抗T h y 1モノクローナル抗体で染色した細胞をフローサイトメトリー（以下、「FCM」）で解析し、L N G F R T h y 1共陽性細胞をセルソーティングする工程を含んでいてもよい。これに限らず、前記増殖の早いヒト間葉系幹細胞として分離、選別及び培養する工程が、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗R o r 2モノクローナル抗体で染色した細胞をFCMで解析し、R o r 2陽性細胞をセルソーティングする工程を含んでいてもよい。

【 0 0 1 4 】

さらに、上記各方法において、骨髄を始めとする各組織由来細胞から直接前記細胞集団を調製する工程を包含してもよい。一方、R o r 2陽性細胞をセルソーティングする工程を含む方法では、骨髄をはじめとする組織由来細胞を付着培養することにより、前記細胞集団を調製する工程を包含してもよい。RECの培養細胞はL N G F R陽性とならない一方、R o r 2陽性となるからである。

20

【 0 0 1 5 】

上記方法において、前記セルソーティングする工程が、培養プレートのウェルに陽性の各細胞を播種するものであり、その後さらに、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別する工程を包含させてもよい。

【 0 0 1 6 】

上記目的を達成するため、増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団の特徴は、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び培養し、同分離、選別及び培養した細胞集団においてR o r 2またはF z d 5を発現している細胞（の存在比率）を定量して各細胞集団の合否判定を行い、合格の細胞集団のみを選別することにある。

30

【 0 0 1 7 】

同特徴において、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗L N G F Rモノクローナル抗体および抗T h y 1モノクローナル抗体で染色した細胞をFCMで解析し、L N G F R T h y 1共陽性細胞をセルソーティングし、培養プレートのウェルに同共陽性の各細胞を播種し、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別した後、前記定量を行ってもよい。

40

【 0 0 1 8 】

一方、同特徴において、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗R o r 2モノクローナル抗体で染色した細胞をFCMで解析し、R o r 2陽性細胞をセルソーティングし、培養プレートのウェルに同陽性の各細胞を播種し、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別した後、前記定量を行ってもよい。

【 0 0 1 9 】

上記本発明に係る目的を達成するため、本発明に係る新規なモノクローナル抗体は、抗R o r 2モノクローナル抗体であり、クローン名が7 C 9である。また、本発明に係る他の新規なモノクローナル抗体は、抗F z d 5モノクローナル抗体であり、クローン名が6

50

F 5である。

【発明の効果】

【0020】

特定した2つの遺伝子(Fzd5, Ror2:詳細は後述)がコードする蛋白の発現はRECに特異的であり、品質が劣化した細胞集団では発現が認められない。またRECの未分化状態維持に必須の遺伝子であり、1)発現阻害により細胞性能の劣化が誘導される、2)遺伝子の強制発現により未分化状態が延長する、などの結果から単なるバイオマーカーではなく、細胞機能に密接に関与し、細胞性能を担保する有効な指標である。

【0021】

このように、本発明によれば、ヒト間葉系幹細胞の品質評価方法、ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法、増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団、並びに、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供することが可能となった。

10

【0022】

本発明の他の目的、構成及び効果については、以下の発明の実施の形態の項から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】高品質間葉系幹細胞(REC)の選別、分離、培養及び品質評価工程を示す図である。

20

【図2】REC, MEC, SECを様々なパラメータで比較した結果である。

【図3】Ror2, Fzd5がREC特異的に発現することを示す図とグラフである。

【図4】Fzd5の阻害がRECの細胞性質の劣化を誘導することを示す図とグラフである。

【図5】Fzd5の強制発現がRECの未分化性を誘導することを示す写真とグラフである。

【図6】新規に作製した抗Fzd5モノクローナル抗体の染色性を示す写真とグラフである。

【図7】新規に作製した抗Ror2モノクローナル抗体の染色性を示す写真と図である。

【図8】REC特異的抗体を用いた、培養MSCの品質評価を行う模式図である。

30

【発明を実施するための形態】

【0024】

以下、図面を参照しながら、RECの選択、分離及び培養の工程の概要について説明し、続いて、各工程の趣旨と詳細について説明する。本発明では、工程1でRECの選択、分離及び培養を行い、工程2で培養されたRECの評価を行う。工程の組み合わせを表1に例示するが、「プロセス評価欄」で「不可」とされているもの以外は実施しうる。以下、プロセス番号P1, P2のものをまず例示する。

【0025】

【表1】

プロセス 番号	工程1					工程2		コメント
	細胞源	FCM	ソーティ ング	培養	ウェル処理	細胞評価	プロセス 評価	
P1	骨髄等の組織	LNGFR Thy1共陽性	単一	2週間培養	コンフルエント のウェルを選定	Ror2陽性	◎	細胞性能を担保した評価が可能
P2	骨髄等の組織	LNGFR Thy1共陽性	単一	2週間培養	コンフルエント のウェルを選定	Fzd5陽性	○	Fzd5は細胞内発現につき、FCM判定が行 いにくい免疫染色等で細胞機能を担保 した評価が可能
P3	骨髄等の組織	LNGFR Thy1共陽性	単一	2週間培養	コンフルエント のウェルを選定	Thy1陽性	不可	THY1はMEC,SECでも発現するので評価 にならない
P4	骨髄等の組織	LNGFR Thy1共陽性	単一	2週間培養	コンフルエント のウェルを選定	LNGFR陽性	不可	LNGFRは培養された細胞では発現しない
P5	骨髄等の組織	LNGFR Thy1共陽性	複数	2週間培養	コンフルエント のウェルを選定	Ror2陽性	△	REC以外の細胞がどの程度含まれている かが定量できるが、純度は低い
P6	骨髄等の組織	Ror2陽性	単一	2週間培養	コンフルエント のウェルを選定	Ror2陽性	○	Ror2を指標としたソーティングはLNGFR THY1共陽性と比較し濃縮率が低い
P7	骨髄等の組織	Ror2陽性	単一	2週間培養	コンフルエント のウェルを選定	Fzd5陽性	○	Fzd5は細胞内発現につき、FCM判定が行 いにくい免疫染色等で細胞機能を担保 した評価が可能
P8	骨髄等の組織	Fzd5陽性	単一	2週間培養	コンフルエント のウェルを選定	Ror2陽性	不可	Fzd5は細胞内発現につき、FCMでの検出 が困難であり、細胞分離マーカーとしては 使用しにくい
P9	骨髄等の組織	Ror2陽性	複数	2週間培養	コンフルエント のウェルを選定	Ror2陽性	△	REC以外の細胞がどの程度含まれている かが定量できるが、純度は低い
P10	付着培養細胞	LNGFR Thy1共陽性	単一	2週間培養	コンフルエント のウェルを選定	Ror2陽性	不可	LNGFRは培養された細胞では発現せず、 THY1はREC以外でも発現している
P11	付着培養細胞	Ror2陽性	単一	2週間培養	コンフルエント のウェルを選定	Ror2陽性	○	細胞性能を担保した評価が可能
P12	付着培養細胞	Ror2陽性	単一	2週間培養	コンフルエント のウェルを選定	Fzd5陽性	○	Fzd5は細胞内発現につき、FCM判定が行 いにくい免疫染色等で細胞機能を担保 した評価が可能
P13	付着培養細胞	Fzd5陽性	単一	2週間培養	コンフルエント のウェルを選定	Ror2陽性	不可	Fzd5は細胞内発現につき、FCMでの検出 が困難であり、細胞分離マーカーとしては 使用しにくい
P14	付着培養細胞	Ror2陽性	複数	2週間培養	コンフルエント のウェルを選定	Ror2陽性	△	REC以外の細胞がどの程度含まれている かが定量できるが、純度は低い
P15	付着培養細胞	Ror2陽性	単一	なし	なし	なし	○	細胞評価をせずに利用

【0026】

【工程1】 図1に単クローン培養法によるREC分離工程を例示する。

1) ヒト骨髄(または脂肪・胎盤絨毛膜)より単核細胞を調製し、骨髄単核細胞を抗LNGFR、抗Thy1で染色する(LNGFR Thy1共陽性細胞をLT細胞とする。)

2) フローサイトメトリー(FCM、セルソータ)を用い、LNGFR陽性・Thy1陽性細胞を96穴培養プレートにクローンソート(1ウェルに細胞1個ずつ播種すること、表1で「単一」と表記)を行う。

なお、抗CD106モノクローナル抗体を加え、LNGFR陽性・Thy1陽性かつCD106強陽性の細胞をクローンソートしてもよい。

3) 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、コンフルエントになったウェルを選別し、各ウェルに含まれる細胞をREC(Rapidly Expanding Cells)とする。遅れて増殖しているウェルMEC/SEC(Moderately/Slowly Expanding Cells)は破棄する。

4) RECとして選別した各ウェルから細胞をウェル毎に別々に回収する。1ウェルから回収したRECを1ロットとする。

【0027】

【工程2】 図1に、さらにRECマーカー(抗Ror2・抗Fzd5)による培養細胞の評価を示す。

1) 96穴プレートから回収したRECを各ウェル毎に培養皿または培養フラスコに移入し、コンフルエントになるまで培養する(拡大培養)。

2) 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(1-3×10³個程度)の細胞をとりわけて、RECマーカー(抗Ror2・抗Fzd5)に対するモノクローナル抗体で単一染色を行う。

3) RECマーカー陽性細胞をフローサイトメトリーで解析し、回収細胞におけるREC

10

20

30

40

50

マーカー陽性細胞の比率を求める（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）。

4) 上記陽性比率が一定値（例えば65%）以上のロット（細胞集団）を合格とする。

5) 合格ロットの細胞を凍結バイアルに封入し液体窒素中で保存する。

6) 凍結細胞したものを高品質ヒト間葉系幹細胞（製品）とする。

7) ユーザーはバイアルに入った細胞を融解後、培養皿またはフラスコ上で拡大培養を行うことで、最終的に 1×10^{10} 以上の高純度間葉系幹細胞を安定して使用することが可能である。

【0028】

上記において、LT細胞をクローンソーティングする代わりに、Ror2陽性細胞をクローンソーティングしてもよい（表1、P6, 7）。また、LT細胞、Ror2陽性細胞を選定し、96穴培養プレートの各ウェルに複数個播種してもよい（表1で「複数」と表記、P5, 9, 14）が、この場合は、クローンソートよりも純度が低下する。なお、コンフレントとは培養容器表面の90%以上を培養細胞が覆っている状態である。また、セミコンフレントとは培養容器表面の70-80%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および種類は細胞の増殖速度に応じ適宜変更可能である。

10

【0029】

上記実施形態では、骨髄を始めとする各組織由来細胞から直接前記細胞集団を調製したが、Ror2陽性細胞でソーティングする場合は、骨髄をはじめとする組織由来細胞を付着培養することにより、前記細胞集団を調製してもよい（表1、P10-15、「付着培養細胞」と表記）。この場合、骨髄単核細胞を10-20%血清+bFGF添加培地（37、1-5%CO₂）上に播種して約2週間培養し、培養後に出現する繊維芽細胞様の付着細胞（CFU-F）を回収する。細胞集団を調製する工程は、骨髄をコラゲナーゼで処理する工程を包含してもよい。また、同工程は、G-CSF投与後の末梢血から細胞集団を調製するようにしてもよい。

20

【0030】

なお、出荷前の評価（工程2の2, 3）は必ずしも必要ではなく、表1プロセスP15の如く、付着培養細胞を利用し、Ror2陽性のものをFCMでソーティングにより分離し、必要に応じて拡大培養し、これを[工程2]の5)以降の処理により出荷してもよい。

30

【0031】

ここで、図2を参照しながら、RECとMEC/SECの細胞性能を比較する。REC, MEC, SECの細胞性能を様々なパラメータで比較した結果を示す。

同図Aは、ヒト骨髄単核細胞をLNGFRおよびThy1に対する抗体で染色後、FCM解析を行った結果である。楕円で囲まれた部分がLT細胞である。

同図Bは、LT細胞を96穴プレートに単一細胞分離（クローンソート）することの模式図である。

同図Cは、単一細胞培養後の細胞数を定期的に計測した結果を示すグラフである。RECはMEC/SECと比較し増殖速度が速く、約2週間で $0.5 - 1 \times 10^4$ 個まで増殖する。 $0.5 - 1 \times 10^4$ 個は96穴プレートのウェルがコンフレントになる数である。

40

同図Dは、REC・MEC・SECを骨・脂肪へ分化誘導した後、骨・脂肪細胞に特異的な遺伝子発現を定量PCRにて計測した結果を示す。RECはMEC, SECと比較し、特に脂肪分化能が高いことが示された。

同図Eは、REC・MEC・SECを再度96穴プレートにクローンソート後、2次コロニーを形成したウェルの数を比較した結果のグラフである。2次コロニーの形成は未分化状態の目安とされる自己複製能の指標である。RECの約33%が2次コロニーを形成するのに対し、MEC/SECはごく僅かなコロニーしか形成されない。

同図Fは、Luc（ルシフェラーゼ）遺伝子発現ベクターを導入した以下の細胞集団、WBM（通常法で得たMSC、WBMはWhole Bone Marrowの略称である）、REC、MEC/SEC、および陰性対照群としてルシフェラーゼで標識していないWBM（Luc(-) Cultu

50

red MSC) をそれぞれ免疫不全マウスに対し経静脈的に投与後に、Lucの基質であるルシフェリンを腹腔内投与し、ルシフェラーゼの発光を体外から検出できる装置 (IVIS) を用いて、移植 24 時間後に観察した結果を示す。上段) グラフは各マウスにおけるLuc発光量を数値化し、WBM・MSC移植した群を100%とした時の他の細胞を移植したマウスの発光比率 (%) をプロットしたものである。下段) 画像は各群のレシピエントマウスにおけるLucの発光をイメージ化したものである。いずれの結果からも、RECを移植したマウスは肺での発光量が極端に低いことから、RECは肺毛細血管にほとんどトラップされないのに対し、MEC/SECはWBM (通常上で得た培養MSC) とほぼ同等に補足され、肺中にとどまっていることがわかる。

以上の結果を総合すると、RECは増殖能・分化能・遊走能ともに優れた細胞集団であり、特に後述する難治疾患への全身投与が可能という点で、新鮮骨髄中のMSCに匹敵する遊走性を維持していることがポイントとなる。

【0032】

以上を含め、発明者らの実験によれば、RECは通常MSCと比較し以下の特徴を持つ。

1. 形態的に極めて均一な細胞集団である
2. 細胞老化が見られない
3. 分裂速度が早く、未分化性を維持したまま培養増幅が可能
4. 分化能が高く骨・脂肪へ分化させやすい細胞集団
5. 遊走性を維持している

RECはヒトMSCのうち最も未分化な細胞集団であり、骨髄中のMSCに最も近い性質を持つ。またMEC/SECあるいは通常法で得たMSCと比較し、高い分化・増殖・遊走能にすぐれた、新鮮かつ変異の少ない、細胞性能が保証された細胞集団である。

【0033】

続いて、図3を参照しながら、未分化MSC (REC) 特異的遺伝子Ror2, Fzd5の同定について説明する。

REC, MEC, SECそれぞれで発現する遺伝子の発現レベルをDNAアレイ法により比較し、Wnt (ウイント) 受容体の一つであるFzd5およびその共受容体であるRor2がREC特異的であることを確認した。

同図Aは、REC, MEC, SECそれぞれにおける定量的PCRによるRor2 mRNAの発現比較である。

同図BはREC, MEC, SECそれぞれにおける定量的PCRによるFzd5 mRNAの発現比較である。

同図Cはウエスタンブロッティング法によるFzd5蛋白発現の比較である。

同図Dは、蛍光免疫染色法によるFzd5蛋白の細胞内局在比較写真である。

以上、複数の解析方法で評価した結果、Fzd5とRor2の発現はREC特異的であることが確認できた。従ってFzd5およびRor2それぞれの発現を検出し定量化すれば、RECの細胞品質評価の指標として有効と考えられる。また、新規に作製した抗Fzd5モノクローナル抗体と抗Ror2モノクローナル抗体は、フローサイトメトリー、ウエスタンブロッティング、蛍光免疫染色いずれの手法においても対象とするタンパク抗原の検出と定量化が可能である。

【0034】

次に、図4を参照しながら、Fzd5のloss of functionによる細胞老化誘導について検討する。

RNAインタフェース法は対象とするmRNAに対し相補的な配列を持つ短いRNA (shRNA) を細胞内に導入し、対象とするmRNAを破壊することで目的遺伝子の機能を調べる手法である。Fzd5に対し相補的な配列を持つshRNA (shFZD5) によりFzd5 mRNAを破壊した場合のRECの細胞性質を対照群 (shCTRL: Fzd5に対し相補的ではないランダム配列のshRNA) と比較した一連の実験結果を示す。

同図Aは、shFZD5またはshCTRLをそれぞれRECに導入した後、Fzd5のmRNA

10

20

30

40

50

量を定量的PCR法にて定量化したグラフである。対照群（shCTRL、ショートヘアピンコントロール）における F z d 5 m R N A 量を 1 0 0 とした場合、shFZD5を強制発現した R E C では F z d 5 の m R N A 量が約 4 0 % に低下していた。

同図 B は、shFZD5またはshCTRLをそれぞれ R E C に導入した後、対照群の細胞数を 1 とした時のshFZD5強制発現群の細胞数を縦軸、shRNA導入後の日数を横軸にプロットしたグラフである。shFZD5を発現した R E C は対照群と比較し、細胞数の急激な減少が認められ、Rzd5の阻害により増殖能の低下が誘導されることが示唆された。

同図 C は、shFZD5またはshCTRLをそれぞれ R E C に導入後、脂肪細胞へ分化誘導し、培養 1 4 日目にOil-Red-Oで脂肪滴を染色した画像である。対照群と比較し F z d 5 を阻害すると脂肪分化能の低下が認められた。

同図 D は、細胞老化の指標であるSA-β-gal活性は基質であるX-galを加えると青色に染色され検出できる。shFZD5またはshCTRLをそれぞれ R E C に導入後、x-gal染色を行った画像および各細胞集団におけるSA-β-gal活性を持つ細胞頻度をプロットしたグラフを示す。

同図 E は、細胞老化の指標であるp16（INK4a）の m R N A 量を定量的PCR法により定量化したグラフである。対照群を 1 0 0 とした場合、shFZD5導入 R E C におけるp16 m R N A 量は約 3 0 0 であり、F z d 5 の発現阻害により細胞老化が誘導されることが示された。

同図 F は、shFZD5またはshCTRLをそれぞれ R E C に導入後、各細胞集団に対し抗F-actin抗体にて細胞内染色を行いStress Fiberの形成を観察した画像、および同細胞集団それぞれに含まれる各細胞の面積（細胞サイズ）の平均値をプロットしたグラフを示す。

以上の結果から、R E C における F z d 5 の機能を阻害することにより、増殖能の低下、分化能の低下、細胞老化の誘導、Stress fiber形成による遊走性の低下と細胞サイズの増大が誘導され、M E C / S E C と同じ性状に変化することから、F z d 5 は単なるパイオマーカではなく、R E C の細胞性能の維持を担保する機能分子と考えられる。

【 0 0 3 5 】

次に、図 5 を参照しながら、F z d 5 の gain of functionによる長期増殖能維持について考察する。

F z d 5 の全長cDNAを R E C に強制発現することで F z d 5 m R N A を恒常的に発現させたことによる細胞機能への影響を確認した。発現ベクターは F z d 5 cDNA と蛍光蛋白GFP（Green Fluorescent Protein、緑色蛍光タンパク質）がタンデムに連なっており、F z d 5 遺伝子導入細胞はGFPを同時に発現しているため蛍光顕微鏡を用いて導入した遺伝子の発現が確認できる。

同図 A は、蛍光顕微鏡によるGFP発現細胞の形態観察写真である。F z d 5 cDNA と GFP を導入した細胞集団（F z d 5）とGFP遺伝子のみを導入した対照群（CTRL）の遺伝子導入後 2 8 日目の細胞形態を撮影した画像である。

対照群では図中矢印で示した細胞老化の特徴であるサイズの大きい多極性細胞が多数出現しているのに対し、F z d 5 発現 R E C はほぼ全てが細胞質の小さい双極性の形態を維持していた。

同図 B は、対照群の細胞数を 1 とした時の F z d 5 発現 R E C の細胞数を縦軸、遺伝子導入後の日数を横軸にプロットしたグラフである。対照群と比較し、F z d 5 を強制的に発現させた R E C では増殖能が長期的に維持されていた。

以上の結果から、F z d 5 を介したWntシグナル刺激により、未分化性を維持した状態で長期的な培養増幅が可能になることが見込まれる。

【 0 0 3 6 】

続いて、図 6 を参照しながら、ヒト F z d 5 に対する新規モノクローナル抗体の作製について説明する。

ヒト F z d 5 抗原の細胞外領域を免疫原とし、ホストマウスを免疫後、常法に従いハイブリドーマを作製し、F z d 5 遺伝子を発現させたBa/F3細胞でスクリーニングを行うことで、新規の抗 F z d 5 モノクローナル抗体（クローン名：6 F 5）を得た。

10

20

30

40

50

本抗体を用い様々な手法でF z d 5 蛋白が検出できるか否かの確認を行った。

同図Aは、F z d 5 の細胞外領域を強制発現させたBa/F3細胞に対し、Biotin標識した6 F 5 抗体で染色後、ストレプトアビジン (SAV) -PEで蛍光標識しフローサイトメトリーで解析を行い、PEの蛍光強度を横軸にプロットしたヒストグラムを示す。図中のグレーで示したヒストグラムは一次抗体としてアイソタイプコントロールを加えた陰性コントロール、白抜きのヒストグラムは6 F 5 で染色したサンプルのPE蛍光強度である。図中の横バーで示した領域がF z d 5 陽性細胞領域であり、数値は陽性率 (%) を表す。

同図Bは、R E C の異なる3クローンより細胞内蛋白を調製し、6 F 5 を一次抗体としてF z d 5 蛋白を検出したウエスタンブロッティングの結果を示す。陰性コントロールとして、サル腎臓由来の細胞株COS7より調製した細胞内蛋白を用いた。

同図Cは、R E C 細胞に対し6 F 5 -Biotinを一次抗体として染色後、ストレプトアビジン (SAV) -Alexa555にて蛍光ラベル後に蛍光顕微鏡で観察、撮影した画像である。抗F z d 5 抗体 (6 F 5) はフローサイトメトリー、ウエスタンブロッティング、蛍光免疫染色の全てに利用可能であった。

【0037】

次に、図7を参照しながら、ヒトR o r 2 抗原に対する新規モノクローナル抗体の作製について説明する。

ヒトR o r 2 抗原を免疫原とし、新規に抗R o r 2 抗体 (クローン名: 7 C 9) を作製した。同クローンを用い、

同図AはR E C に対し、1次抗体として7 C 9 -Biotinで染色後、SAV-PEで蛍光ラベルし、フローサイトメトリーを用いてPE蛍光の検出を行った結果を示す。1次抗体としてアイソタイプコントロール抗体を加えたサンプルを陰性コントロールとする。縦軸にFITC蛍光 (染色していないため全て陰性)、横軸にPE蛍光をプロットした2次元ドットプロットである。陰性コントロール群ではPE蛍光を発する細胞がほぼ含まれない領域 (図中の台形で囲まれた部分: 0.011%) がClone 7 C 9 で染色したサンプルにおいてPE蛍光を発現している細胞集団 (69.3%) であった。

同図Bは、R E C に対し7 C 9 -Biotinを1次抗体として免疫染色を行い、Streptavidin-Alexa488で蛍光標識後にR o r 2 蛋白の発現を蛍光顕微鏡にて観察・撮影した画像である。R E C の大部分がR o r 2 蛋白を発現していることが確認された。

同図Cは、新鮮骨髄細胞に対しL N G F R -APC, T h y 1 -FITC, R o r 2 -PE (それぞれの抗原に対するモノクローナル抗体) による3重染色を行い、フローサイトメトリー解析を行った結果を示す。左はL N G F R の発現を縦軸に、T h y 1 の発現を横軸にプロットした図であり、四角枠で囲まれた部分はヒトM S C が高頻度に含まれるL N G F R T h y 1 共陽性細胞集団である。右2つの図はL N G F R T h y 1 共陽性細胞集団のみを抽出後、横軸を細胞の大きさの指標であるFSC、縦軸にSAV-PEで標識した抗R o r 2 -Biotin抗体 (7 C 9) のPE蛍光をプロットした図である。四角枠で囲まれた部分は陰性コントロールを元に設定したR o r 2 陽性領域であり、数値は陽性率 (%) を表す。Clone 7 C 9 を用いた場合、L N G F R T h y 1 共陽性細胞の92.3%がR o r 2 陽性であり、L N G F R T h y 1 に代わるMCSの選別マーカーとして用いることが可能である。

新規に作製した抗R o r 2 モノクローナル抗体を用いることで、フローサイトメトリー及び蛍光免疫染色によりR o r 2 蛋白の検出と定量化が可能である (図7A, B)。

さらに新規に作製した抗R o r 2 は骨髄中に含まれるM S C のマーカーとしても利用可能である (図7C)。

【0038】

次に、図8を参照しながら、抗R o r 2 抗体または抗F z d 5 抗体を用いた、細胞品質の評価手順について説明する。

通常法である付着培養を行ったヒトM S C (または継代培養を行ったR E C) を回収し、R E C 特異的なモノクローナル抗体 (抗R o r 2 抗体または抗F z d 5 抗体) で染色する。

フローサイトメトリーにて陽性細胞の頻度 (含有%) を計測する。その代わりに、蛍光

10

20

30

40

50

顕微鏡下で陽性細胞の頻度（含有％）を計測してもよい。これらの計測により、その細胞集団にどれだけのRECが含まれているかを定量化することができるため、対象とするMSCがどの程度の分化・増殖・遊走能を持つか、細胞品質を評価することが可能である。発明者らの実験によれば、RECのRor2陽性率は5ロットで72%±8.9%であった。よって、例えば、最低値である63%以上や、65%以上を合否判定の基準値としてもよい。

【産業上の利用可能性】

【0039】

本発明によれば、全身性疾患への治療に利用することができるヒト間葉系幹細胞を効率良く分離培養する技術を提供すること、および得られた細胞集団が移植に適しているか、薬効性を示すかの基準となる品質評価を行うことが可能になった。

10

新規に作製した高純度間葉系幹細胞に特化した染色性を示すモノクローナル抗体のうち、細胞分離に適した候補はナノ磁気微粒子と結合させることによって、間葉系幹細胞分離用試薬として製品化できる。また、分離した間葉系幹細胞の品質を検定するための細胞評価用の試薬として、蛍光物質結合抗体、細胞染色用試薬が実用化できる。

間葉系幹細胞は、従来行われてきたバイオマテリアルの材料として、あるいはその多分化能を生かし、重症筋無力症、慢性リウマチ症等への投与、さらには脊髄損傷、心・血管、慢性肝不全を始めとする重度の疾患治療に対する細胞治療を行う際に組織の場（ニッチ）を整える支持細胞として共移植するなど、様々な応用が期待される。特に、遊走性を維持しているRECを用いることにより、これまで治療法が存在しなかった低フォスファターゼ症をはじめとする全身性骨・軟骨疾患等の代謝性疾患、GVHDの治療など経静脈的に投与する必要のある全ての疾患に適用すれば、これまでにない治療効果が見込まれる。

20

本発明は以下を提供する。

[1] ヒト間葉系幹細胞の品質評価方法であって、

ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び培養し、

同分離、選別及び培養した細胞集団においてRor2またはFzd5を発現している細胞の存在比率を定量して各細胞集団の合否判定を行うヒト間葉系幹細胞の品質評価方法。

[2] 抗Ror2モノクローナル抗体または抗Fzd5モノクローナル抗体を用いてRor2またはFzd5を発現している細胞を定量する上記[1]に記載のヒト間葉系幹細胞の品質評価方法。

30

[3] 定量的PCRを用いてRor2のmRNAを発現している細胞を定量する上記[2]に記載のヒト間葉系幹細胞の品質評価方法。

[4] 免疫染色によりRor2またはFzd5を発現している細胞を定量する上記[2]に記載のヒト間葉系幹細胞の品質評価方法。

[5] ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法であって、

ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び培養し、

同分離、選別及び培養した細胞集団においてRor2またはFzd5を発現している細胞の存在比率を定量して各細胞集団の合否判定を行い、合格の細胞集団のみを選別するヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

40

[6] 抗Ror2モノクローナル抗体または抗Fzd5モノクローナル抗体を用いてRor2またはFzd5を発現している細胞を定量する上記[5]に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

[7] 定量的PCRを用いてRor2のmRNAを発現している細胞を定量する上記[6]に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

[8] 免疫染色によりRor2またはFzd5を発現している細胞を定量する上記[6]に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

[9] 前記増殖の早いヒト間葉系幹細胞として分離、選別及び培養する工程が、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗LNGFRモノクローナル抗体および抗Thy1モ

50

ノクロナール抗体で染色した細胞をフローサイトメトリー（以下、「FCM」）で解析し、LNGFR Thy 1 共陽性細胞をセルソーティングする工程を含んでいる上記 [5] に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

[1 0] 前記増殖の早いヒト間葉系幹細胞として分離、選別及び培養する工程が、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗Ror2モノクロナール抗体で染色した細胞をFCMで解析し、Ror2陽性細胞をセルソーティングする工程を含んでいる上記 [5] に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

[1 1] 骨髄、その他の各組織由来細胞から直接前記細胞集団を調製する工程を包含する上記 [9] または [1 0] 記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

[1 2] 骨髄、その他の各組織由来細胞を付着培養することにより、前記細胞集団を調製する工程を包含する上記 [1 0] 記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

[1 3] 前記セルソーティングする工程が、培養プレートのウェルに陽性の各細胞を播種するものであり、その後さらに、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別する工程を包含する上記 [9] または [1 0] 記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

[1 4] ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び培養し、

同分離、選別及び培養した細胞集団においてRor2またはFzd5を発現している細胞の存在比率を定量して各細胞集団の合否判定を行い、合格の細胞集団のみを選別した増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団。

[1 5] ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗LNGFRモノクロナール抗体および抗Thy 1モノクロナール抗体で染色した細胞をFCMで解析し、LNGFR Thy 1 共陽性細胞をセルソーティングし、培養プレートのウェルに同共陽性の各細胞を播種し、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別した後、前記定量を行うことにより得られた上記 [1 4] 記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団。

[1 6] ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗Ror2モノクロナール抗体で染色した細胞をFCMで解析し、Ror2陽性細胞をセルソーティングし、培養プレートのウェルに同陽性の各細胞を播種し、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別した後、前記定量を行うことにより得られた上記 [1 4] 記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団。

[1 7] 抗Ror2モノクロナール抗体である増殖の早いヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクロナール抗体。

[1 8] クローン名が7C9である上記 [1 7] 記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクロナール抗体。

[1 9] 抗Fzd5モノクロナール抗体である増殖の早いヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクロナール抗体。

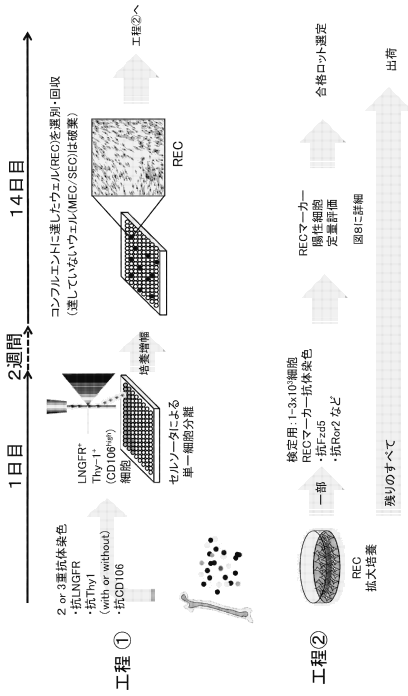
[2 0] クローン名が6F5である上記 [1 9] 記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクロナール抗体。

10

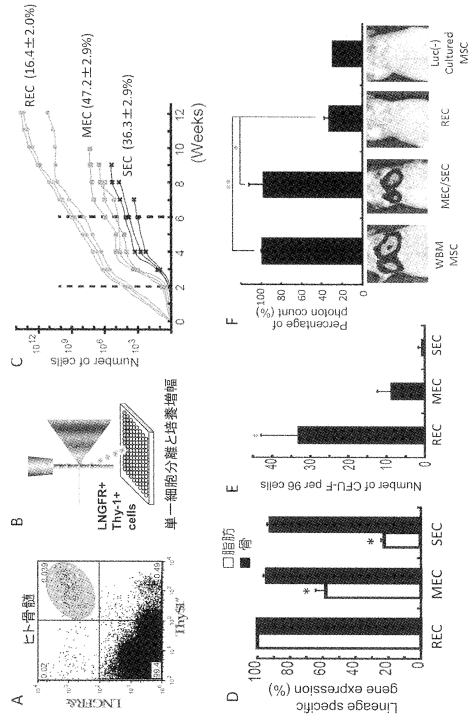
20

30

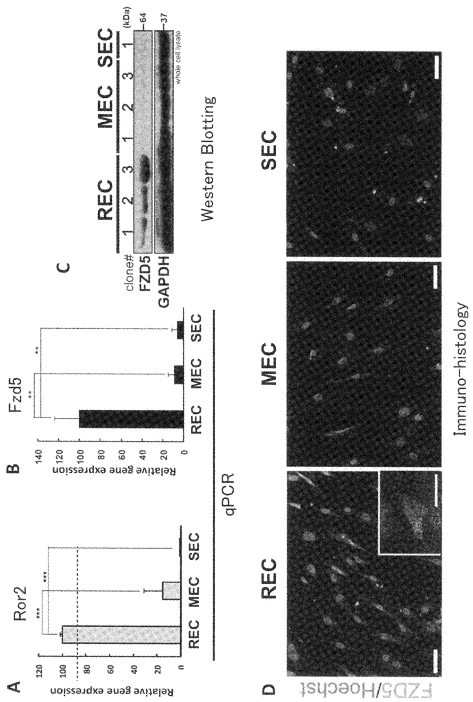
【 図 1 】



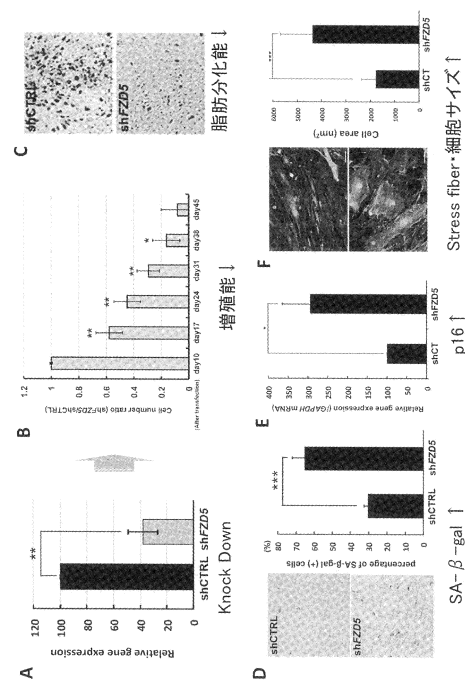
【 図 2 】



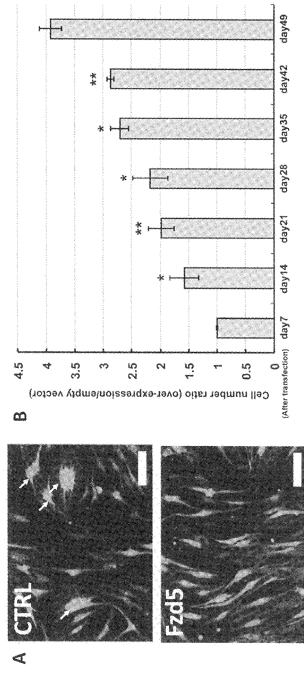
【 図 3 】



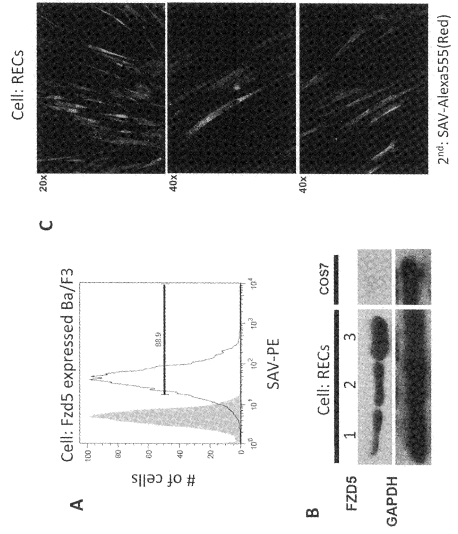
【 図 4 】



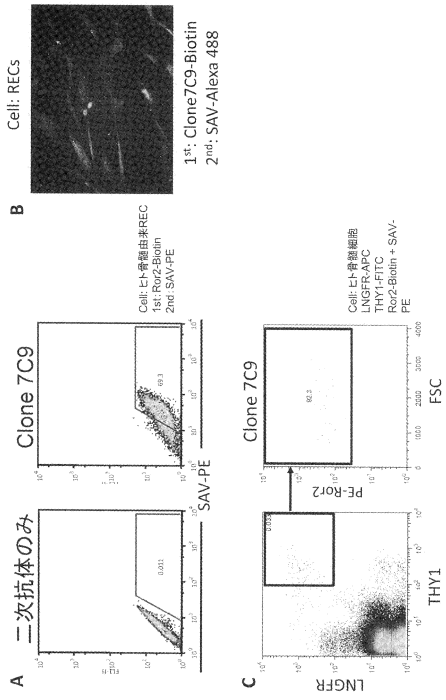
【 図 5 】



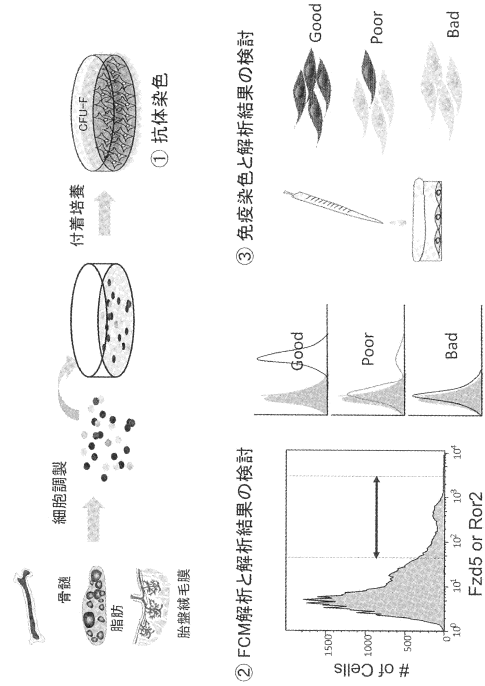
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
G 0 1 N 33/577 (2006.01)		G 0 1 N 33/48		P
C 0 7 K 16/18 (2006.01)		G 0 1 N 33/577		B
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 0 7 K 16/18		
		C 1 2 P 21/08		

(72)発明者 馬淵 洋
東京都文京区湯島 3 - 2 - 1 4 - 8 0 6

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 特表 2 0 0 9 - 5 1 3 7 0 8 (J P , A)
特開 2 0 0 9 - 0 6 0 8 4 0 (J P , A)
特開 2 0 1 3 - 0 6 6 4 1 4 (J P , A)
特表 2 0 0 9 - 5 2 7 4 8 5 (J P , A)
特表 2 0 0 6 - 5 2 4 5 0 8 (J P , A)
STEM CELL REPORTS (2013) Vol.1, pp.152-165
宮本憲一、外 4 名、ヒト間葉系幹細胞特異的miRNAによる未分化状態維持機構の解明、再生医療
増刊号、2 0 1 4 年 1 月 2 7 日、Vol.13 Suppl, p.317, P-2-040
SCIENCE (1999) Vol.284, pp.143-147
ONCOLOGY LETTERS (2014) Vo.8, pp.85-90
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE (2013) Vol.31, pp.583-588

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 5 / 0 0
C 1 2 Q 1 / 0 0
C 0 7 K 1 6 / 0 0
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S / W P I X (S T N)
P u b M e d
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)