(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2012-120545
(P2012-120545A)
(43)公開日　平成24年6月28日(2012.6.28)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12N	5/071	(2010.01)	C12N	5/00	202A	4B065
C12N	5/00	(2006.01)	C12N	5/00	ZNA	
C12N	5/0797	(2010.01)	C12N	5/00	202T	

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　（全 40 頁）

(21)出願番号　特願2012-70492(P2012-70492)
(22)出願日　平成24年3月27日(2012.3.27)
(62)分割の表示　特願2008-271668(P2008-271668)の分割
原出願日　平成14年5月31日(2002.5.31)
(31)優先権主張番号　PR 5403
(32)優先日　平成13年6月1日(2001.6.1)
(33)優先権主張国　オーストラリア(AU)

(71)出願人　503319102
ザ　ユニバーシティ　オブ　クィーンズランド
オーストラリア国，クイーンズランド　４０７２，セント　ルシア
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊
(74)代理人　100128048
弁理士　新見　浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林　智彦
(74)代理人　100130845
弁理士　渡邊　伸一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞を精製する方法

(57)【要約】
【課題】幹細胞及びその前駆体即ち前駆細胞の実質的に均一な集団の精製に関し、具体的には、神経幹細胞（ＮＳＣ）の集団を提供し、哺乳動物を含む動物における中枢神経系と関連する組織などの組織の修復又は再生のためのＮＳＣ及び／又は前駆細胞の使用を意図する細胞の精製方法を提供する。
【解決手段】組織破砕処理にかけてＮＳＣを含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞がある特定範囲のサイズに収まる細胞の集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を幹細胞表面マーカー識別処理にかけて、表現型がＰＮＡloＨＳＡloである実質的に均一な神経幹細胞の集団を作成する工程を含む方法により調製される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
生体試料から実質的に均一な未分化細胞の集団を作成する方法であって、該生体試料又はその部分試料を組織分裂処理にかけて精製対象の未分化細胞を含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞がある特定範囲の大きさである細胞の集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を細胞表面マーカー識別処理にかけて実質的に均一な未分化細胞の集団を作成する工程を含む方法。
【請求項２】
未分化細胞が未分化又は半未分化な神経幹細胞（ＮＳＣ）である請求項１記載の方法。
【請求項３】
実質的に均一な細胞集団が同じ型のＮＳＣである細胞を少なくとも約５０％含むものである、請求項２記載の方法。
【請求項４】
組織破砕処理が結合している細胞外基質（ＥＣＭ）組織から個々の細胞を分離する工程を含むものである、請求項１記載の方法。
【請求項５】
約５から約５０ミクロンまでの細胞が懸濁液中で得られるものである、請求項４記載の方法。
【請求項６】
約１２ミクロンより大きな細胞が懸濁液中で得られるものである、請求項５記載の方法。
【請求項７】
該細胞の表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である、請求項１又は請求項５又は請求項６記載の方法。
【請求項８】
生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけて未分化細胞を含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞がある特定範囲の大きさに収まる細胞集団を得る工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を未分化細胞表面マーカー識別処理にかけて実質的に均一な未分化細胞集団を作成する工程を含む方法により調製された、実質的に均一な未分化細胞集団。
【請求項９】
該細胞がＮＳＣである、請求項８記載の実質的に均一な未分化細胞集団。
【請求項１０】
該細胞の少なくとも約５０％が同じ型である、請求項９記載の実質的に均一な未分化細胞集団。
【請求項１１】
該細胞の少なくとも約８０％が同じ型である、請求項１０記載の実質的に均一な未分化細胞集団。
【請求項１２】
該組織破砕処理が個々の細胞をＥＣＭから解離させる工程を含むものである、請求項８記載の実質的に均一な未分化細胞集団。
【請求項１３】
該細胞が約５から約５０ミクロンまでのサイズのものである、請求項１２記載の実質的に均一な未分化細胞集団。
【請求項１４】
該細胞が約１２ミクロンより大きいサイズのものである、請求項１２記載の実質的に均一な未分化細胞集団。
【請求項１５】
該細胞の表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である、請求項９又は請求項１３又は請求項１４記

載の実質的に均一な未分化細胞集団。
【請求項１６】
生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけてＮＳＣを含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞がある特定範囲のサイズに収まる細胞の集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を幹細胞表面マーカー識別処理にかけて実質的に均一なＮＳＣの集団を作成する工程を含む方法により調製された実質的に均一なＮＳＣ集団。
【請求項１７】
該動物が哺乳動物である、請求項１６記載の方法。
【請求項１８】
該哺乳動物がヒトである、請求項１７記載の方法。
【請求項１９】
細胞置換療法が脳に関するものである、請求項１６又は請求項１７又は請求項１８記載の方法。
【請求項２０】
細胞置換療法が器官に関するものである、請求項１６又は請求項１７又は請求項１８記載の方法。
【請求項２１】
細胞置換療法が神経系に関するものである、請求項１６又は請求項１７又は請求項１８記載の方法。
【請求項２２】
該神経幹細胞の表現型が$PNA^{lo}HSA^{lo}$である、請求項１６記載の方法。
【請求項２３】
該神経系が中枢神経系（ＣＮＳ）である、請求項２１記載の方法。
【請求項２４】
該治療法がアルツハイマー病、パーキンソン病、急性脳傷害及びＣＮＳ機能不全から選択されるＣＮＳ障害に関するものである、請求項２３記載の方法。
【請求項２５】
生体試料から実質的に均一なＮＣＳ集団を作成する方法により調製した実質的に均一なＮＳＣ集団を含む、細胞置換療法に用いる組成物であって、該方法が該生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけて幹細胞を含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞がある特定範囲の大きさに収まる細胞の集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を未分化細胞表面マーカー識別処理にかけて実質的に均一な幹細胞集団を作成する工程を含むものである、組成物。
【請求項２６】
該細胞が$PNA^{lo}HSA^{lo}$の表現型である、請求項２５記載の組成物。
【請求項２７】
生体試料から実質的に均一なＮＳＣ集団を作成する工程を含む、動物の神経組織又は非神経組織を置換する方法であって、該生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけて該細胞を含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団を細胞サイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞がある特定範囲の大きさに収まる細胞集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を細胞表面マーカー識別処理にかけて実質的に均一なＮＳＣ集団を得る工程、次いで該細胞の該実質的に均一な集団を上記の同じ動物又は該細胞を受容できる動物に導入する工程を含む方法。
【請求項２８】
該動物が哺乳動物である、請求項２７記載の方法。
【請求項２９】
該哺乳動物がヒトである、請求項２８記載の方法。
【請求項３０】

該ＮＳＣがＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}の表現型である、請求項２７記載の方法。
【請求項３１】
請求項１６記載の方法に従って作成した均一なＮＳＣ集団を用いて同定された成長因子を含む組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、一般的に均一な未分化細胞集団を生産する方法に関する。より具体的には、本発明は幹細胞及びその前駆体即ち前駆細胞の実質的に均一な集団の精製に関する。更に具体的には、本発明は神経幹細胞（ＮＳＣ）の集団を提供する。本発明は、哺乳動物などの動物における中枢神経系の発生、維持又は修復に必要な細胞及び細胞系統に分化する能力を持つＮＳＣ及び前駆細胞に特に向けられている。本発明は更に、増殖でき、ニューロン、希突起神経膠細胞、グリア並びに星状細胞など、これらに限定されないが、の多数の細胞系統に増殖及び分化できる、ＮＳＣ及び前駆体及び／又は前駆細胞に向けられている。本発明は更に、哺乳動物を含む動物における中枢神経系と関連する組織などの組織の修復又は再生のためのＮＳＣ及び／又は前駆細胞の使用を意図する。本発明のＮＳＣは、サイトカインなどの自然発生する分子、並びに自然産物のスクリーニング又はＮＣＳの増殖を誘発する化合物ライブラリーのスクリーニングから得られる分子を同定するのに用いても良い。このような分子は治療法の開発に有益である。
【背景技術】
【０００２】
本明細書における先行技術の参照は、その先行技術がどの国においても共通する一般知識の一部を形成することを認識、又は示唆するものではなく、そのように解釈されるべきでもない。
【０００３】
幹細胞は、増殖及び自己維持ができ、広範囲の機能的な分化した子孫を形成する能力及び可能性を有し、傷害後に組織の再生を開始する刺激に応答することができる未分化の細胞である。胚形成の間及び誕生後、幹細胞は血球及び皮膚細胞などの最終にまで分化した細胞の高い代謝回転率を持つ組織に存在する。幹細胞はまた、代謝回転率が小さい分化細胞を持つ組織にも存在することも分かっている。低い代謝回転率を示す哺乳動物組織の１例は、成熟哺乳動物の中枢神経系又は中枢神経系（ＣＮＳ）である［非特許文献１～４］。
【０００４】
成熟した動物又はヒトでの幹細胞の推定上の役割は、自然な細胞死、傷害又は疾病によって失われる細胞を補充することである。今日まで、欠損した又は損傷を受けた器官又は組織を修復する処置は主に、同種移植及び、同種移植した（ allographed）物質が移植者に適合しなかった場合に生じる免疫反応を低減するために医薬化合物を投与することにより実現されてきた。近年、組織移植という概念は多くの疾患の治療に適用されている。同種移植の工程において、器官はまるごと取替えるか移植するか、皮膚移植などのように組織の小片を移植するかのいずれかであって良い。より最近では、多能性幹細胞を同種移植に使用することが提案されている。この種の同種移植戦略では、特定の組織型に分化する能力を有する幹細胞が受容者に移植される。
【０００５】
一般的に、幹細胞は次いで、周囲の組織からのシグナル又はその他の形の刺激を受けて最終的に成熟細胞に分化する。このような工程では、特定の経路に沿って所望の成熟細胞に発達する能力を持つ幹細胞を単離する必要がある。これを達成するためには、多数の胚幹細胞を単離する必要がある。一般的に大量の幹細胞が必要である。十分な数の幹細胞の適切な供給源は、胚及び／又は成熟体の供給源から取得できる。しかしながら、現在の幹細胞の培養プロトコルは厄介で、組織の交換療法で求められる十分な数の肝細胞を調達できないことがしばしばある。実際、造血性肝細胞は培養で増やすことができない。ＮＳＣ

は確かに培養で増える能力があるが、本発明が登場するまではＮＳＣの均一集団を用いて培 養を開始することはできなかった。こうして、幹細胞による組織交換療法の発展には、既知の経路に沿って分化する幹細胞を適当な量で単離し培養する能力が求められる。

【０００６】

受精卵はそこから他の全ての細胞系統が派生する究極の幹細胞である。発生が進行するにつれ、初期の胚細胞は細胞が発生的成熟に達するまで細胞の発生能力を徐々に狭める成長シグナル及び分化シグナルに反応し、最終分化型となる。これらの最終分化細胞は特化した機能及び特性を有し、ある特定の細胞への前駆細胞分化の多段階工程の最終段階を表す。細胞分化のある段階から次の段階への移行は、成熟に達するまで細胞分化の進行を徐々に制御する特異的な生化学的メカニズムによって支配される。組織及び細胞の分化が、最終分化状態に達するまで特殊な段階をたどる段階的な過程であることは明らかである。従って幹細胞は、通常な生命過程であろうと傷害若しくは損傷に応答してであろうと、組織の維持に使用できる未分化細胞の供給源を表している。

【０００７】

幹細胞及び前駆細胞並びに所望の分化表現型を供給できるであろう最終まで分化していない分化細胞の拡大貯蔵は、組織置換を含む療法において大きな価値があるであろう。細胞置換療法を臨床分野で広く適用できるようにするためには、相当な努力で特定の細胞型に分化できる補充幹細胞に適切な量の供給という問題に取り組まなければならない。

【０００８】

ＣＮＳの発生の間、多能性前駆細胞、即ちＮＳＣは増殖し、成熟脳を構成する細胞型に最終的に分化する前駆細胞の一時的な分裂を生じる。一部のＮＳＣも造血細胞及び筋細胞を生じる能力を有することが示された（非特許文献５～６）。ＮＳＣは古典的には自己再生能力、増殖能力を持つと定義され、ニューロン、星状細胞、及び希突起神経膠細胞を含む複数の異なる表現型系統に分化することが示された。ＮＳＣ活性は、マウス、ラット、非ヒト霊長類及びヒトを含む今日までに研究された哺乳動物種全てから検出された。

【０００９】

多能性ＮＳＣを取得し培養する方法は以前に記載されているが、その結果得られた細胞集団についての主な問題は、それらから得られるＮＳＣのパーセンテージが極めて低いことである。重要なことは、得られた細胞集団は混合物であり、他の細胞型を含んでいることである。このような細胞集団は、移植に用いられるのであればＮＳＣの割合を増やすために複雑な濃縮を行う必要があるであろう。しかしながら、このような培養手順は多様な分化特性を有する集団中で混ざった細胞に異質性が存在するものを扱わない。通常は、神経組織から得られる細胞の０．１％未満が多能性幹細胞である。従って、均一性に向けてこれらの多様性幹細胞の精製を可能にする方法が明らかに必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００１０】

【非特許文献１】レイノルズ，Ｂ．Ａ．及びワイス，Ｓ．， Science 255: 1707-1710, 1992。

【非特許文献２】リチャーズら， Natl. Acad. Sci. USA89: 8591-8595, 1992。

【非特許文献３】マッケイ，Ｒ．， Science 276: 66-71, 1997。

【非特許文献４】ゲージ，Ｆ．Ｈ．， Science 287: 1433-1438, 2000。

【非特許文献５】クラーク，Ｄ．Ｌ．， Science 288: 1660-1663, 2000。

【非特許文献６】ビョーンソンら、 Science 283: 534-537, 1999。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１１】

本発明に至るまでの研究では、本発明者らは未分化細胞、特に幹細胞、更に具体的にはＮＳＣの実質的に均一な集団を単離する方法を提供しようと努力した。本発明者らは、ＮＳ Ｃの集団を実質的に均一なものに精製するために、細胞の大きさに基づいて細胞を分

類する方法と組み合わせて細胞表面マーカーを利用した。驚いたことに、本発明者らは極めて均一なＮＳＣの集団が哺乳動物脳組織から単離できることを確定した。更に、本発明者らはＮＳＣを増殖させそして成熟した細胞系統に分化する能力を保持するＮＳＣの高度に均一な集団を形成させるプロトコル及び方法を開発した。従って、本発明は精製した形で未分化細胞を生産するという困難さを克服する。本発明の均一な細胞集団は、損傷及び／又は機能障害を受けた組織の修復及び置換による治療上のアプローチにおける移植方法、組織の増強、治療用サイトカインの送達を含む遺伝子分子及びタンパク質性分子の送達、その阻害因子を含む分化及び／又は増殖を制御する因子の同定、及び診断上及び治療上のマーカーの同定を含む様々な状況に有用である。更に、ＮＳＣ集団を同定し精製することにより、どの因子（単数又は複数）が生体位でＮＳＣの増殖特性、自己維持特性及び分化特性を調節し、それによりドナー細胞の移植の必要性を克服するかを判断できる。ＮＳＣの生体位での活性化は、大手術及び組織拒絶の問題を回避するという点で、移植療法に優る大きな利点を有する。

【課題を解決するための手段】

【００１２】

発明の概要

本明細書を通じて、論旨が別意を要求しない限り、語「含む（ comprise）」、又はその変化形である「含む（ comprises）若しくは「含む（ comprising）」などは、述べられた要素若しくは整数又は要素若しくは整数の群を含むことを意味するが他の如何なる要素若しくは整数又は要素若しくは整数の群の排除を意味するものではないと解する。

【００１３】

ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は配列同定子の番号（配列番号：）により引用する。配列番号：は配列同定子<４００>１（配列番号：１）、<４００>２（配列番号：２）などに数字で対応する。配列表は特許請求の範囲の後に添付する。

【００１４】

本発明は、複数の成熟細胞系統に分化できる幹細胞などの未分化細胞の実質的に均一な集団の精製に関する。とりわけ、本発明は変性した組織の置換又は修復のための移植戦略に用いられるＮＳＣを提供する。均一な幹細胞集団を今生産することができることは更に、インビボで幹細胞の増殖、分化及び自己維持を刺激するのに用いられうる因子の同定を可能にする。本発明は特に、動物、哺乳動物及びヒトの中枢神経系と関連する組織の発生、維持又は修復に必要な細胞及び細胞系統に分化する能力を持つＮＳＣ及び神経前駆体及び神経前駆細胞に向けられている。本発明は更に、ＣＮＳの機能細胞を構成する別々の機能を持つ子孫に増殖及び分化できるＮＳＣの精製法を供する。本発明のＮＳＣに由来する細胞型はニューロン、希突起神経膠細胞、グリア及び星状細胞を含むがこれらに限定されない。細胞型はまた、他の非神経細胞の中でも骨髄細胞を含む。本発明は更に、ＣＮＳと関連する組織の修復又は再生のためのＮＳＣの使用、並びに組織の増強、動物又はヒトを対象とした遺伝子治療及び治療のための薬物標的化におけるＮＳＣの使用を意図する。本発明のＮＳＣ及びその前駆体又先駆物質は更に、動物又は人などの哺乳動物の組織の修復及び／又は再生のための方法において有用である。本発明は更に、動物又はヒトなどの哺乳動物におけるＮＳＣの移植及び分化に有用である。本発明は、神経変性障害の予防及び治療のための方法、及び神経性機能障害及び／又は外傷を矯正する方法を供する。更に、本発明に従って調製したＮＳＣ培養は、幹細胞の発育及び分化に影響を与え得る分子のスクリーニングに有用である。このような分子を内因性活性化因子と称する。内因性活性化因子を使用すると、幹細胞を被験体に移植する必要性が回避される。

【００１５】

従って、本発明は部分的に、実質的に均一な未分化細胞の集団を作成する方法の開発に基づいている。未分化細胞には、複数の細胞系統に分化及び増殖でき、自己再生できる神経組織から単離できる始原細胞が含まれる。

【００１６】

従って、本発明は生体試料から実質的に均一な未分化細胞の集団を作成する方法であっ

て、該生体試料又はその部分試料を組織破壊処理にかけて精製対象の未分化細胞を含む混合集団を得る工程、該細胞混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞が特定範囲の大きさに収まる細胞集団を形成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を細胞表面マーカー識別処理にかけて未分化細胞の実質的に均一な集団を作る工程を含む方法を意図する。

【００１７】

より具体的には、本発明は生体試料から多能性ＮＳＣの実質的に均一な集団を作成する方法であって、該生体試料又はその部分試料を組織破壊処理にかけて精製対象のＮＳＣを含む混合集団を得る工程、該細胞混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞が特定範囲の大きさに収まる細胞集団を形成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を細胞表面マーカー識別処理にかけて未分化細胞の実質的に均一な集団を作る工程を含む方法を供する。

【００１８】

本発明の別の一側面は、ＮＳＣを含んでも含まなくてもよい特定の細胞集団を特徴付け及び／又は選択するために、細胞表面タンパク質及び内部タンパク質及び核酸マーカーを用いる。本質的に、これらの三つの細胞集団は、熱安定性抗原（ＨＳＡ）及びピーナッツ凝集素（ＰＮＡ）のレベルに基づいて特徴付けられる。低レベルのＨＳＡ及びＰＮＡ（即ち、$HSA^{lo}PNA^{lo}$）を持つ集団は本質的に全てのＮＳＣを含む。高レベルのＨＳＡと低レベルのＰＮＡ（即ち、$HSA^{hi}PNA^{lo}$）を含む集団は一部の前駆細胞を含む。表現型が$HSA^{lo}PNA^{hi}$又は$HSA^{hi}PNA^{hi}$である集団は分化した細胞を含む。

【００１９】

実質的に均一なＮＳＣ集団（即ち表現型としては$HSA^{lo}PNA^{lo}$）は、ＥｐｈＡ４、ＴｒｋＡ、ＴｒｋＣ、ＬＩＦＲβ、ζ１、ＳＯＣＳ２、ＳＯＣＳ３、Ｐａｘ６、Ｔｂｒ１、Ｐｌｘ２、ＳＣＬ、Ｂｃｒｐ１及びＳｃａ－１を欠いたものとして、且つ低減したレベルのｐ７５及びＴｒｂβを持つものとして、及びＤＣＣ、ネオゲニン、Ｎｏｔｃｈ１、２、３、Ｄｌｘ１及びＳｏｘ２を発現するものとして、更に特徴付けられることがある。

【００２０】

細胞のレベルが低いときに表現型が$HSA^{lo}PNA^{lo}$である他の有益な$HSA^{lo}PNA^{lo}$マーカーには、ＣＤ３ｅ、ＣＤ４、ＣＤ８ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１９、ＣＤ２４（ＨＳＡと等価）、ｍｃＤ３０．１、ＣＤ１、ＣＤ３４、ＣＤ４１、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ４５ＲＢ、ＣＤ４５ＲＣ、ＣＤ４５ＲＯ、ＣＤ８９、ＣＤ９０．２、ＣＤ９９Ｒ、ＣＤ１１７、ＣＤ１３５、$H-2K^{b}$及びＳｃａ－１が含まれる。

【００２１】

本発明は、ニューロンなどの神経細胞になる定めにあるＮＳＣを同定する。従って本発明は、本ＮＳＣに作用して特定の神経細胞への増殖及び／又は分化を容易にする、如何なる薬物即ち自然に生ずる分子又は自然に生じない分子にも及ぶ。

【００２２】

本明細書で用いられる省略形の一覧を表１に挙げる。

【００２３】

【表１】

省略形	定　義
Ｃ１Ｃ１２	Ｃ２細胞株のサブクローンと高速融合する筋芽細胞株
ＤＡＰＩ	４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール、二塩酸塩
ＦＡＣＳ	蛍光標示式細胞分取法
ＧＦＰ	緑色蛍光タンパク質
ＨＳＡ	熱安定性抗原（ｍＣＤ２４ａ）
HSA^{lo}	ＨＳＡ表面抗原が低いか存在しないＮＳＣ
ＨＳＣ	造血幹細胞
ＮＳＣ	神経幹細胞
ＰＮＡ	ピーナッツ凝集素
PNA^{lo}	ＰＮＡ表面抗原が低いか存在しない神経幹細胞
ＭｙＨＣ	ミオシン重鎖
ＴＲＩＴＣ	伝統的なローダミンイソチオシアン酸
ＦＩＴＣ	蛍光イソチオシアン酸
PNA^{hi}	高レベルのＰＮＡ表面抗原を持つＮＳＣ
HSA^{hi}	高レベルのＨＳＡ表面抗原を持つＮＳＣ

【００２４】
本明細書を通して用いられる配列同定子を表２に掲載する。
【００２５】

【表２】

配列番号：	説　明
１	５’→３’センスｍβ－アクチンプライマー
２	５’→３’アンチセンスｍβ－アクチンプライマー
３	５’→３’センスｈβ－アクチンプライマー
４	５’→３’アンチセンスｈβ－アクチンプライマー
５	５’→３’センスｍＥｐｈＡ４プライマー
６	５’→３’アンチセンスｍＥｐｈＡ４プライマー
７	５’→３’ｍＤＣＣプライマー
８	５’→３’アンチセンスｍＤＣＣプライマー
９	５’→３’センスｍＲｙｋプライマー
１０	５’→３’アンチセンスｍＲｙｋプライマー
１１	５’→３’センスｍネオゲニンスプライス＃１プライマー
１２	５’→３’アンチセンスｍネオゲニンスプライス＃１プライマー
１３	５’→３’センスｍネオゲニンスプライス＃２プライマー
１４	５’→３’アンチセンスｍネオゲニンスプライス＃２プライマー
１５	５’→３’センスｍネオゲニンスプライス＃４プライマー
１６	５’→３’アンチセンスｍネオゲニンスプライス＃４プライマー
１７	５’→３’センスｍＴｒｋＡプライマー
１８	５’→３’アンチセンスｍＴｒｋＡプライマー
１９	５’→３’センスｍＴｒｋＢプライマー
２０	５’→３’アンチセンスｍＴｒｋＢプライマー
２１	５’→３’センスｍＴｒｋＣプライマー
２２	５’→３’アンチセンスｍＴｒｋＣプライマー
２３	５’→３’センスｍｐ７５プライマー
２４	５’→３’アンチセンスｍｐ７５プライマー

【００２６】

【表２－１】

配列番号：	説　明
２４	５’→３’アンチセンスｍｐ７５プライマー
２５	５’→３’センスｍＬＩＦＲβプライマー
２６	５’→３’アンチセンスｍＬＩＦβプライマー
２７	５’→３’センスｍｇｐ１３０プライマー
２８	５’→３’アンチセンスｍｇｐ１３０プライマー
２９	５’→３’センスｍＮＲ６プライマー
３０	５’→３’アンチセンスｍＮＲ６プライマー
３１	５’→３’センスｍＮｏｔｃｈ１プライマー
３２	５’→３’アンチセンスｍＮｏｔｃｈ１プライマー
３３	５’→３’センスｍＮｏｔｃｈ２プライマー
３４	５’→３’アンチセンスｍＮｏｔｃｈ２プライマー
３５	５’→３’センスｍＮｏｔｃｈ３プライマー
３６	５’→３’アンチセンスｍＮｏｔｃｈ３プライマー
３７	５’→３’センスｍζ１プライマー
３８	５’→３’アンチセンスｍζ１プライマー
３９	５’→３’センスｍＳＯＣＳ１プライマー
４０	５’→３’アンチセンスｍＳＯＣＳ１プライマー
４１	５’→３’センスＳＯＣＳ２プライマー
４２	５’→３’アンチセンスＳＯＣＳ２プライマー
４３	５’→３’センスＳＯＣＳ３プライマー
４４	５’→３’アンチセンスＳＯＣＳ３プライマー
４５	５’→３’センスｍＰａｘ６プライマー
４６	５’→３’アンチセンスｍＰａｘ６プライマー
４７	５’→３’センスｈＰａｘプライマー
４８	５’→３’アンチセンスｈＰａｘプライマー
４９	５’→３’センスｍＴｂｒ１プライマー
５０	５’→３’アンチセンスｍＴｂｒ１プライマー
５１	５’→３’センスｈＴｂｒ１プライマー
５２	５’→３’アンチセンスｈＴｂｒ１プライマー

【００２７】

【表２－２】

配列番号：	説　明
５３	５’→３’センスｍＳｖｅｔ１プライマー
５４	５’→３’アンチセンスｍＳｖｅｔ１プライマー
５５	５’→３’センスｍＮｋｘ２．１プライマー
５６	５’→３’アンチセンスｍＮｋｘ２．１プライマー
５７	５’→３’センスｍＤｌｘ１プライマー
５８	５’→３’アンチセンスｍＤｌｘ１プライマー
５９	５’→３’センスｍＤｌｘ２プライマー
６０	５’→３’アンチセンスｍＤｌｘ２プライマー
６１	５’→３’センスｍＳｏｘ１プライマー
６２	５’→３’アンチセンスｍＳｏｘ１プライマー
６３	５’→３’センスｍＳｏｘ２プライマー
６４	５’→３’アンチセンスｍＳｏｘ２プライマー
６５	５’→３’センスｍＥｍｘ１プライマー
６６	５’→３’アンチセンスｍＥｍｘ１プライマー
６７	５’→３’センスｈＥｍｘ１プライマー
６８	５’→３’アンチセンスｈＥｘｍ１プライマー
６９	５’→３’センスｍＥｍｘ２＃１プライマー
７０	５’→３’アンチセンスｍＥｍｘ２＃１プライマー
７１	５’→３’センスｍＥｍｘ２＃２プライマー
７２	５’→３’アンチセンスｍＥｍｘ２＃２プライマー
７３	５’→３’センスｈＥｘｍ２プライマー
７４	５’→３’アンチセンスｈＥｘｍ２プライマー
７５	５’→３’センスＳＣＬプライマー
７６	５’→３’アンチセンスＳＣＬプライマー
７７	５’→３’センスｍＢｃｒｐ１プライマー
７８	５’→３’アンチセンスｍＢｃｒｐ１プライマー
７９	５’→３’センスＣＤ３４プライマー
８０	５’→３’アンチセンスＣＤ３４プライマー
８１	５’→３’センスＣＤ４５プライマー

【００２８】

【表２－３】

配列番号：	説　明
８２	５’→３’アンチセンスＣＤ４５プライマー
８３	５’→３’センスＳｃａ－１プライマー
８４	５’→３’アンチセンスＳｃａ－１プライマー
８５	５’→３’センスｃ－Ｋｉｔプライマー
８６	５’→３’アンチセンスｃ－Ｋｉｔプライマー

【図面の簡単な説明】

【００２９】

【図１Ａ】図１Ａは、前方散乱光（<７μｍ、７～１２μｍ、及び>１２μｍ）及びＰＮＡ発現（PNA^{lo}ボックス、PNA^{mid}ボックス及びPNA^{hi}ボックス）による生細胞のＦＡＣＳ選別を示すドットプロットのグラフ表示である。

【図１Ｂ】図１Ｂは、ＰＮＡ発現及びＨＳＡ発現による生細胞のＦＡＣＳ選別（>１２μｍ又は９０単位）を示すドットプロットのグラフ表示である。ゲート領域は$PSA^{lo}HSA^{lo}$細胞を示す。

【図１Ｃ】図１Ｃは、図１Ｂで示したゲート領域の$PSA^{lo}HSA^{lo}$細胞のＦＡＣＳ等高線プロットを示すグラフ表示である。

【図２Ａ】図２Ａは、ＰＮＡ発現及びＨＳＡ発現による生細胞のＦＡＣＳ選別（>１２μｍ又は９０単位）を示すドットプロットのグラフ表示である。これらの細胞は、図２Ｂで用いたクエルコフ（querkoph)突然変異マウスと比較して個々の野生型の同腹子対象マウスから採取した。ゲート領域内の値は、全体の生細胞数に対するこの領域内に含まれる細胞のパーセンテージを示す。例えば、$PNA^{lo}HSA^{lo}$細胞は生細胞全体の０．２８％を示すが、$PNA^{lo}HSA^{mid-hi}$細胞は１．４３％を示す。

【図２Ｂ】図２Ｂは、ＰＮＡ発現及びＨＳＡ発現による生細胞のＦＡＣＳ選別（>１２μｍ又は９０単位）を示すドットプロットのグラフ表示である。これらの細胞は個々のクエルコフ突然変異マウスから採取した。ゲート領域内の値は、全体の生細胞数に対するこの領域内に含まれる細胞のパーセンテージを示す。例えば、$PNA^{lo}HSA^{lo}$細胞は全体の生細胞の０．０５％を表すが、一方$PNA^{lo}HSA^{mid-hi}$細胞は１．２１％を示す。

【図３Ａ】図３は、未分化神経細胞型（神経球）及び分化神経細胞型及び筋細胞型を生じる$PNA^{lo}HSA^{lo}$成体ＮＳＣの写真表示である。単一の$PNA^{lo}HSA^{lo}$細胞は、増殖して神経球［３Ａ］を形成する。その子孫には、分化条件［３Ｂ］に移された場合、ニューロン（赤色、β－III －チューブリン）及び星状細胞（青色、ＧＦＡＰ）及び希突起神経膠細胞（緑色、０４）が含まれる。Ｃ２Ｃ１２細胞と共培養した場合、新たに単離した$GFP^{+ve}PNA^{lo}HSA^{lo}$のＮＳＣは、紡錘様の形態をとり［３Ｃ～Ｄ］、しばしば筋細胞を連想させる多数の$DAPI^{+ve}$核を所有する（［３Ｄ］矢印）。ＮＳＣの筋原性への転換は、GFP^{+ve}核及び細胞質を含む抗ＭｙＨＣ発達性－（［３Ｅ］赤）、抗－α－アクチニン２－（［３Ｆ］赤）及び抗２型高速ＭｙＨＣ－（［３Ｇ、Ｈ］赤）免疫反応性細胞により確認した。殆どの場合、免疫染色法は細胞質ＧＦＰの強度を検出可能レベル以下に減少させ、従ってＧＦＰ発現は主に核内で見られた。バー：（ａ）＝８０μｍ、（ｂ、ｃ、ｇ）＝４０μｍ、（ｄ）＝２０μｍ、（ｅ、ｈ）＝１０μｍ及び（ｆ）＝１５μｍ。この写真のカラー版は特許権者から入手できる。

【図３Ｂ】図３は、未分化神経細胞型（神経球）及び分化神経細胞型及び筋細胞型を生じる$PNA^{lo}HSA^{lo}$成体ＮＳＣの写真表示である。単一の$PNA^{lo}HSA^{lo}$細胞は、増殖して神経球［３Ａ］を形成する。その子孫には、分化条件［３Ｂ］に移された場合、ニューロン（赤色、β－III －チューブリン）及び星状細胞（青色、ＧＦＡＰ）及び希突起神経膠細胞（緑色、０４）が含まれる。Ｃ２Ｃ１２細胞と共培養した場合、新たに単離したGFP^{+ve} $PNA^{lo}HSA^{lo}$のＮＳＣは、紡錘様の形態をとり［３Ｃ～Ｄ］、しばしば筋

細胞を連想させる多数のＤＡＰＩ$^{+ve}$核を所有する（［３Ｄ］矢印）。ＮＳＣの筋原性への転換は、ＧＦＰ$^{+ve}$核及び細胞質を含む抗ＭｙＨＣ発達性－（［３Ｅ］赤）、抗－α－アクチニン２－（［３Ｆ］赤）及び抗２型高速ＭｙＨＣ－（［３Ｇ、Ｈ］赤）免疫反応性細胞により確認した。殆どの場合、免疫染色法は細胞質ＧＦＰの強度を検出可能レベル以下に減少させ、従ってＧＦＰ発現は主に核内で見られた。バー：（ａ）＝８０μｍ、（ｂ、ｃ、ｇ）＝４０μｍ、（ｄ）＝２０μｍ、（ｅ、ｈ）＝１０μｍ及び（ｆ）＝１５μｍ。この写真のカラー版は特許権者から入手できる。

【図３Ｃ】図３は、未分化神経細胞型（神経球）及び分化神経細胞型及び筋細胞型を生じるＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}成体ＮＳＣの写真表示である。単一のＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}細胞は、増殖して神経球［３Ａ］を形成する。その子孫には、分化条件［３Ｂ］に移された場合、ニューロン（赤色、β－III －チューブリン）及び星状細胞（青色、ＧＦＡＰ）及び希突起神経膠細胞（緑色、０４）が含まれる。Ｃ２Ｃ１２細胞と共培養した場合、新たに単離したＧＦＰ$^{+ve}$ ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}のＮＳＣは、紡錘様の形態をとり［３Ｃ～Ｄ］、しばしば筋細胞を連想させる多数のＤＡＰＩ$^{+ve}$核を所有する（［３Ｄ］矢印）。ＮＳＣの筋原性への転換は、ＧＦＰ$^{+ve}$核及び細胞質を含む抗ＭｙＨＣ発達性－（［３Ｅ］赤）、抗－α－アクチニン２－（［３Ｆ］赤）及び抗２型高速ＭｙＨＣ－（［３Ｇ、Ｈ］赤）免疫反応性細胞により確認した。殆どの場合、免疫染色法は細胞質ＧＦＰの強度を検出可能レベル以下に減少させ、従ってＧＦＰ発現は主に核内で見られた。バー：（ａ）＝８０μｍ、（ｂ、ｃ、ｇ）＝４０μｍ、（ｄ）＝２０μｍ、（ｅ、ｈ）＝１０μｍ及び（ｆ）＝１５μｍ。この写真のカラー版は特許権者から入手できる。

【図３Ｄ】図３は、未分化神経細胞型（神経球）及び分化神経細胞型及び筋細胞型を生じるＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}成体ＮＳＣの写真表示である。単一のＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}細胞は、増殖して神経球［３Ａ］を形成する。その子孫には、分化条件［３Ｂ］に移された場合、ニューロン（赤色、β－III －チューブリン）及び星状細胞（青色、ＧＦＡＰ）及び希突起神経膠細胞（緑色、０４）が含まれる。Ｃ２Ｃ１２細胞と共培養した場合、新たに単離したＧＦＰ$^{+ve}$ ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}のＮＳＣは、紡錘様の形態をとり［３Ｃ～Ｄ］、しばしば筋細胞を連想させる多数のＤＡＰＩ$^{+ve}$核を所有する（［３Ｄ］矢印）。ＮＳＣの筋原性への転換は、ＧＦＰ$^{+ve}$核及び細胞質を含む抗ＭｙＨＣ発達性－（［３Ｅ］赤）、抗－α－アクチニン２－（［３Ｆ］赤）及び抗２型高速ＭｙＨＣ－（［３Ｇ、Ｈ］赤）免疫反応性細胞により確認した。殆どの場合、免疫染色法は細胞質ＧＦＰの強度を検出可能レベル以下に減少させ、従ってＧＦＰ発現は主に核内で見られた。バー：（ａ）＝８０μｍ、（ｂ、ｃ、ｇ）＝４０μｍ、（ｄ）＝２０μｍ、（ｅ、ｈ）＝１０μｍ及び（ｆ）＝１５μｍ。この写真のカラー版は特許権者から入手できる。

【図３Ｅ】図３は、未分化神経細胞型（神経球）及び分化神経細胞型及び筋細胞型を生じるＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}成体ＮＳＣの写真表示である。単一のＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}細胞は、増殖して神経球［３Ａ］を形成する。その子孫には、分化条件［３Ｂ］に移された場合、ニューロン（赤色、β－III －チューブリン）及び星状細胞（青色、ＧＦＡＰ）及び希突起神経膠細胞（緑色、０４）が含まれる。Ｃ２Ｃ１２細胞と共培養した場合、新たに単離したＧＦＰ$^{+ve}$ ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}のＮＳＣは、紡錘様の形態をとり［３Ｃ～Ｄ］、しばしば筋細胞を連想させる多数のＤＡＰＩ$^{+ve}$核を所有する（［３Ｄ］矢印）。ＮＳＣの筋原性への転換は、ＧＦＰ$^{+ve}$核及び細胞質を含む抗ＭｙＨＣ発達性－（［３Ｅ］赤）、抗－α－アクチニン２－（［３Ｆ］赤）及び抗２型高速ＭｙＨＣ－（［３Ｇ、Ｈ］赤）免疫反応性細胞により確認した。殆どの場合、免疫染色法は細胞質ＧＦＰの強度を検出可能レベル以下に減少させ、従ってＧＦＰ発現は主に核内で見られた。バー：（ａ）＝８０μｍ、（ｂ、ｃ、ｇ）＝４０μｍ、（ｄ）＝２０μｍ、（ｅ、ｈ）＝１０μｍ及び（ｆ）＝１５μｍ。この写真のカラー版は特許権者から入手できる。

【図３Ｆ】図３は、未分化神経細胞型（神経球）及び分化神経細胞型及び筋細胞型を生じるＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}成体ＮＳＣの写真表示である。単一のＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}細胞は、増殖して神経球［３Ａ］を形成する。その子孫には、分化条件［３Ｂ］に移された場合、ニューロン（赤色、β－III －チューブリン）及び星状細胞（青色、ＧＦＡＰ）及び希突起神

経膠細胞（緑色、０４）が含まれる。Ｃ２Ｃ１２細胞と共培養した場合、新たに単離したＧＦＰ$^{+ve}$ ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}のＮＳＣは、紡錘様の形態をとり［３Ｃ～Ｄ］、しばしば筋細胞を連想させる多数のＤＡＰＩ$^{+ve}$核を所有する（［３Ｄ］矢印）。ＮＳＣの筋原性への転換は、ＧＦＰ$^{+ve}$核及び細胞質を含む抗ＭｙＨＣ発達性－（［３Ｅ］赤）、抗－α－アクチニン２－（［３Ｆ］赤）及び抗２型高速ＭｙＨＣ－（［３Ｇ、Ｈ］赤）免疫反応性細胞により確認した。殆どの場合、免疫染色法は細胞質ＧＦＰの強度を検出可能レベル以下に減少させ、従ってＧＦＰ発現は主に核内で見られた。バー：（ａ）＝８０μｍ、（ｂ、ｃ、ｇ）＝４０μｍ、（ｄ）＝２０μｍ、（ｅ、ｈ）＝１０μｍ及び（ｆ）＝１５μｍ。この写真のカラー版は特許権者から入手できる。

【図３Ｇ】図３は、未分化神経細胞型（神経球）及び分化神経細胞型及び筋細胞型を生じるＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}成体ＮＳＣの写真表示である。単一のＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}細胞は、増殖して神経球［３Ａ］を形成する。その子孫には、分化条件［３Ｂ］に移された場合、ニューロン（赤色、β－III －チューブリン）及び星状細胞（青色、ＧＦＡＰ）及び希突起神経膠細胞（緑色、０４）が含まれる。Ｃ２Ｃ１２細胞と共培養した場合、新たに単離したＧＦＰ$^{+ve}$ ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}のＮＳＣは、紡錘様の形態をとり［３Ｃ～Ｄ］、しばしば筋細胞を連想させる多数のＤＡＰＩ$^{+ve}$核を所有する（［３Ｄ］矢印）。ＮＳＣの筋原性への転換は、ＧＦＰ$^{+ve}$核及び細胞質を含む抗ＭｙＨＣ発達性－（［３Ｅ］赤）、抗－α－アクチニン２－（［３Ｆ］赤）及び抗２型高速ＭｙＨＣ－（［３Ｇ、Ｈ］赤）免疫反応性細胞により確認した。殆どの場合、免疫染色法は細胞質ＧＦＰの強度を検出可能レベル以下に減少させ、従ってＧＦＰ発現は主に核内で見られた。バー：（ａ）＝８０μｍ、（ｂ、ｃ、ｇ）＝４０μｍ、（ｄ）＝２０μｍ、（ｅ、ｈ）＝１０μｍ及び（ｆ）＝１５μｍ。この写真のカラー版は特許権者から入手できる。

【図３Ｈ】図３は、未分化神経細胞型（神経球）及び分化神経細胞型及び筋細胞型を生じるＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}成体ＮＳＣの写真表示である。単一のＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}細胞は、増殖して神経球［３Ａ］を形成する。その子孫には、分化条件［３Ｂ］に移された場合、ニューロン（赤色、β－III －チューブリン）及び星状細胞（青色、ＧＦＡＰ）及び希突起神経膠細胞（緑色、０４）が含まれる。Ｃ２Ｃ１２細胞と共培養した場合、新たに単離したＧＦＰ$^{+ve}$ ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}のＮＳＣは、紡錘様の形態をとり［３Ｃ～Ｄ］、しばしば筋細胞を連想させる多数のＤＡＰＩ$^{+ve}$核を所有する（［３Ｄ］矢印）。ＮＳＣの筋原性への転換は、ＧＦＰ$^{+ve}$核及び細胞質を含む抗ＭｙＨＣ発達性－（［３Ｅ］赤）、抗－α－アクチニン２－（［３Ｆ］赤）及び抗２型高速ＭｙＨＣ－（［３Ｇ、Ｈ］赤）免疫反応性細胞により確認した。殆どの場合、免疫染色法は細胞質ＧＦＰの強度を検出可能レベル以下に減少させ、従ってＧＦＰ発現は主に核内で見られた。バー：（ａ）＝８０μｍ、（ｂ、ｃ、ｇ）＝４０μｍ、（ｄ）＝２０μｍ、（ｅ、ｈ）＝１０μｍ及び（ｆ）＝１５μｍ。この写真のカラー版は特許権者から入手できる。

【図４】図４は成人の脳室周囲領域から採取したＣＮＳ細胞のＦＡＣＳ選別を示すドットプロットのグラフ表示である。細胞は前方散乱光（０～８０、８０～１２０、>１２０単位）に基づいて選別する。幹細胞活性はＲ３（領域３）に限定される。総細胞のパーセンテージを下に記す。

【図５Ａ】図５は成人の脳室周囲領域から採取した生ＣＮＳ細胞のＦＡＣＳ選別を表すドットプロットのグラフ表示である。（Ａ）相棒は前方散乱光（>１００単位）及びＰＮＡ結合能力に基づいて選別する。マウス幹細胞とは異なり、成人の幹細胞活性はＲ２（領域２）に限定される。>１００単位である生細胞を選別する場合ＦＳＣはＰＮＡ結合及びＨＳＡ発現に基づいている。

【図５Ｂ】図５は成人の脳室周囲領域から採取した生ＣＮＳ細胞のＦＡＣＳ選別を表すドットプロットのグラフ表示である。（Ｂ）本発明者らはＲ５から採取することにより幹細胞活性を濃縮できる。Ｒ３の細胞は幹細胞活性がなく、一方、Ｒ４の細胞は殆どが分化した神経細胞型を含む。総細胞のパーセンテージを下に記す。

【発明を実施するための形態】

【００３０】

本発明は、部分的に未分化細胞の実質的に均一な集団を生産する方法の開発に基づいている。未分化細胞には、自己再生だけでなく複数の細胞型又は複数の細胞系統に分化及び増殖できる少能性（ oligopotent）細胞又は多能性（ pluripotent）細胞が含まれる。好ましい未分化細胞はＮＳＣである。

【００３１】

本発明は、動物又はヒトなどの哺乳動物において組織の修復、再生及び／又は増強する方法におけるＮＳＣ及びその子孫の使用を更に意図する。このようなアプローチには、細胞の変性及び老化の遅延が含まれる。本発明は更に、神経変性障害を予防及び治療するため、及び神経性機能障害及び／又は外傷を矯正するための、動物又はヒトなどの哺乳動物におけるＮＳＣの移植又は分化に向けられている。幹細胞又はその前駆物質の精製された標品を生産できれば、細胞の増殖及び／又は分化に影響を与え又はそうでなければ容易にする分子及び化合物及び遺伝子因子をスクリーニングできるようになる。とりわけ本発明は、幹細胞の成長、増殖及び／又は分化に影響を与えることができる分子をスクリーニングするための、精製した幹細胞の使用を提供する。このような分子は幹細胞の増殖及び分化を可能にし、それにより培養中に細胞を増殖しそれを被験体に移植する必要性を回避する。更に、精製した幹細胞は抗体を含むリガンドと相互作用できる細胞表面マーカーの同定を可能にする。このようなマーカーは、幹細胞及び／又は治療プロトコルの有効性をモニターするのに有益である。重要なことには、本発明は神経細胞になる定めにあるＮＳＣの集団を同定する。従って本発明は、これらの細胞に作用して増殖及び／又は更なる分化を容易にする何らかの薬物又は物質に及ぶ。

【００３２】

本明細書で言う細胞の「集団」とは二つ以上の細胞を意味する。「均一な細胞」とは実質的に一つの細胞型のみを含む集団を意味する。「細胞型」とは同じ系統の又は実質的に同じ生理学的状態を有する亜類型の細胞であっても良い。

【００３３】

従って、本発明は生体試料から未分化細胞の実質的に均一な集団を産生する方法であって、該生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけて精製対象の未分化細胞を含む混合集団を得る工程、該細胞混合集団をサイズ識別処理にかけ、実質的に全ての細胞が特定範囲の大きさに収まる細胞集団を形成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を細胞表面マーカー識別処理にかけて未分化細胞の実質的に均一な集団を作成する工程を含む方法を意図する。

【００３４】

これらの未分化細胞は神経幹細胞（ＮＳＣ）であることが好ましい。

【００３５】

本明細書の「実質的に均一な集団」とは、細胞総集団のうちの相当の数が同じタイプ及び／又は同じ分化状態にある細胞集団を指す。未分化細胞の「実質的に均一な集団」は、少なくとも約５０％が同じ細胞型である細胞集団を含むのが好ましく、少なくとも約７５％ が同じ細胞型であるのが更に好ましく、８５％が同じ細胞型であるのがさらに好ましく、細胞の少なくとも９５％が同じ型であるのがもっと好ましく、９７％（例えば、９８％、９９％又は１００％）が同じ細胞型であるのが更にもっと好ましい。

【００３６】

用語「組織破砕処理」は、組織の結合細胞外基質（ＥＣＭ）からの個々の細胞の解離を含む。単一細胞の懸濁液を作成することが好ましい。個々の細胞は最小サイズが約５から約５０ミクロンまで又は約７から約３０ミクロンまで又は約７から約２０ミクロンまででであるのことが好ましい。該細胞は約１２ミクロンより大きいことが最も好ましい。

【００３７】

「未分化」とは、分化及び増殖して生理学的、生化学的、形態学的、解剖学的、免疫学的、生理学的又は遺伝的に原始状態とは異なり得る子孫細胞を生産できる単一又は複数の細胞の始原状態を意味する。上で述べたとおり、好ましい未分化細胞は幹細胞であり、複数の細胞系統を生ずることができ、分化及び増殖でき、自己再生できるＮＳＣｓは更に好

ましい。最も好ましいＮＳＣは神経細胞を生ずる。ＮＳＣは、多能性ＮＳＣ、又は非多能性ＮＳＣ、又はその両者の混合であって良い。

【００３８】

「生体試料」は、上皮組織、肝臓組織、筋組織、脂肪組織、結合組織、骨髄、血液又は神経組織などの組織または器官であるが、これらに限定しない。「部分試料」とは、生体組織検査、又は器官若しくは組織の一部分などの、組織の一部である場合がある。細胞のインビトロ培養も生体試料とみなされる。

【００３９】

本発明の別の実施態様では、生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけて未分化細胞を含む混合集団を得る工程、該細胞混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞が特定範囲の大きさに収まる細胞集団を形成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を未分化細胞表面マーカー識別処理にかけて未分化細胞の実質的に均一な集団を生産する工程を含む方法によって調製した未分化細胞の実質的に均一な集団を提供する。

【００４０】

上で用いた及び本明細書の他の箇所で用いる用語「含む」は、細胞の混合集団が、他の潜在能力のある細胞型の中でも特に、未分化細胞を含むことを意味する。

【００４１】

逐次的及び／又は同時とは、同じ時に（即ち、同時）又は数マイクロセカンド、数秒、数分、数時間又は数日内（即ち、逐次的）を意味する。従って、サイズ識別及び細胞表面マーカー識別は、互いに同時又は数秒、数分、数時間又は数日内に行うことができる。

【００４２】

本発明の別の実施態様では、生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけてＮＳＣを含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞がある特定範囲の大きさに収まる細胞集団を生産する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に実質的に均一なＮＳＣ集団を産生するために該集団を幹細胞表面マーカー識別処理にかけて実質的に均一なＮＳＣ集団を生産する工程を含む方法によって調製した実質的に均一なＮＳＣ集団を提供する。

【００４３】

従って本発明は、複数の細胞系統を生じることができる均一なＮＳＣ集団を生産する方法を供する。これは遺伝子治療、増強療法、及び老化した神経組織及び非神経組織の修復、補充療法、及び老化遅延療法のための手段を提供する。これは、成長因子、及び内因性細胞の増殖及び／又は分化を促進できる他の物質の同定をも可能にする。

【００４４】

従って本発明は、一つの実施態様では、動物における細胞置換療法のための方法であって、生体試料から実質的に均一なＮＳＣ集団を産生する工程を含み、且つ、該生体試料若しくはその部分試料を組織破砕処理にかけてＮＳＣを含む混合集団を得る抗体、該細胞混合 集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞がある特定範囲の大きさに収まるＮＳＣ集団を生産する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を細胞表面マーカー識別処理にかけて実質的に均一なＮＳＣ集団を生産する工程、次いで該均一な細胞集団を上述の同じ動物又は該ＮＳＣを受容できる動物に導入する工程を含む方法を提供する。

【００４５】

本明細書で言う「細胞置換療法」は、未分化細胞を戦略的にインビボ又はインビトロに配置してある特定の細胞系統又は複数の細胞系統に分化させ増殖させるプロセスを一つの形で含む。従って、細胞置換療法では、未分化細胞が器官若しくは組織の置換を含め細胞機能の修復、再生及び置換を提供するために適切に分化することが求められる。「細胞置換療法」には増強療法も含まれる。後者には既存の細胞又は組織を取り出し、培養で増殖させ、次いで置換する工程を含む。これは、１個又は少数のＮＳＣが培養で多数のＮＳＣに増殖できる本発明の格別の利点である。これは培養で増殖できない造血幹細胞の特性で

はない。精製した幹細胞又はその子孫が「細胞置換療法」又は組織の修復の目的で移植される被験体、又は幹細胞がそれに由来する被験体は、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどを含む動物であるのが好ましいがこれらに限定するものではなく、霊長類などの哺乳動物であるのが好ましく、ヒトが最も好ましい。

【００４６】

「組織」とは、類似構造又は類似機能を有する多くの細胞から成る生体の一部を意味する。例えば神経組織は、ニューロン、グリア、希突起神経膠細胞、星状細胞、及び上衣細胞を含むがこれらに限定されない一つ以上の細胞型を含む多数の細胞から成る。本明細書で器官とは組織を含むことを意図し、脳は器官という用語に包含され、部分－試料は神経組織であるがこれに限定されない組織又は脳などであるがこれに限定されない器官の生検材料を含む。

【００４７】

本明細書で言う「動物」は、哺乳動物、爬虫類、両生類、魚類又は鳥類、又は家畜動物を指す。この動物は、ヒト又は霊長類などの哺乳動物であることがより好ましい。

【００４８】

本発明は実質的に均一なＮＳＣ集団を含む、細胞置換療法のための組成物を提供する。

【００４９】

ＮＳＣは多能性又は少能性であって良く、神経細胞発生に委ねられても良く、又は上記の二つ以上の組み合わせであっても良い。

【００５０】

この実施態様では、本発明は細胞置換療法に使用するための組成物であって、該組成物が実質的に均一なＮＳＣ集団を生体試料から作成する方法によって調製した実質的に均一なＮＳＣの集団を含み、該方法が該生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけてＮＳＣの混合集団を得る工程、該細胞混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞がある特定範囲の大きさに収まる細胞集団を生産する工程、サイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を未分化細胞表面マーカー識別処理にかけて実質的に均一なＮＳＣ集団を作成する工程を含むものである組成物を提供する。

【００５１】

本発明は、細胞の増殖能力を破壊せず、細胞の分化を抑制しないように、最終分化していない細胞又は未分化細胞を精製する方法に向けられている。本明細書で用いるとき、「多能性細胞」とは最終分化していない全ての細胞を意味する。未分化細胞はＮＳＣであることが好ましい。

【００５２】

「幹細胞」は、より多くの幹細胞又はより多くの分化した子孫又はより多くの成熟した細胞型を含む（これらに限定されないが）が、一方で親の発生能力（ parental developm ent al potential）を持つ一つ以上の細胞をも保持する子孫の増殖及び形成を誘発できる未分化細胞である。言い換えれば、幹細胞は自己再生でき且つ複数の細胞系統に分化できる多 能性細胞である。多くの生物学的事例では、幹細胞は二つ以上の異なる組織型の子孫を生産できるので多能性であると考えられてもいる。幹細胞が自身を自己再生する能力は、本明細書で用いる幹細胞の定義の本質的な側面である。幹細胞は非対称的に分裂して、幹細胞状態を保持する一方の娘細胞と、最初に述べた娘細胞とは異なる特異的な機能及び／又は表現型を発現するもう一方の娘細胞となる。また、集団内の幹細胞の一部は二つの幹細胞に対照的に分裂でき、従って全体としてその集団で同じ幹細胞を維持することができ、一方この集団の他の細胞は分化した子孫のみを生じる。幹細胞として始まった細胞は分化した表現型に進むかも知れないが、次いで逆転して幹細胞表現系を発現することが可能である。幹細胞は、複数の特有の分化経路に沿って分化できる細胞だけでなく、分裂して別の幹細胞を生産できる（即ち、自己再生能力を有する）細胞をも意味する機能上の用語である。分化系統を持つある特定の細胞がより分化程度の少ない親から派生し、さらに分裂してより分化程度の高い細胞子孫を生じ得るということがよくある。本発明の好ましい実施態様では、未分化細胞の集団は幹細胞であり、より好ましくは多能性ＮＳＣであ

る。
【００５３】
本発明の均一集団内のＮＳＣは生存可能な状態であり、従って様々な治療プロトコル、特にＣＮＳ障害の治療において可能性がある。
【００５４】
ＣＮＳ障害は、神経変性病（例えば、アルツハイマー病及びパーキンソン病）、急性脳傷害（例えば、脳卒中、頭部外傷、脳性麻痺）及び多くのＣＮＳ機能不全（例えば、鬱病、癲癇、精神分裂）などの多数の苦悩を包含する。近年、神経変性病は、これらの障害の最大のリスクを持つ高齢人口の増加のため、重要な問題となってきた。アルツハイマー病、多発性硬化症（ＭＳ）、ハンチントン舞踏症、筋萎縮性側索硬化症及びパーキンソン病を含むこれらの疾病は、これらの細胞又は脳領域が意図する機能を実行できないようにするＣＮＳの特定部位にある神経細胞の変性に結びつけられている。脳幹神経節として知られる脳領域における変性は、正確な部位に応じて、様々な認知症状及び運動症状を持つ疾病を引き起こし得る。脳幹神経節は、線条体（尾状核及び果核から成る）、淡蒼球、黒質、無名質、腹部淡蒼球、マイネルトの基底核、腹部被蓋野及び視床下部核を含む、多くの別々の領域から成る。ＮＳＣの分化は神経組織及び／又は非神経組織の損傷を修復できることが好ましい。多能性ＮＳＣは、数ある方法論の中でも、細胞置換療法、組織増強療法、遺伝子治療で用いられることが好ましい。また、ＮＳＣの精製培養を用いて同定された成長因子は、インビボで細胞のＮＳＣの増殖及び／又は分化を刺激するために用いられる。
【００５５】
従って本発明は、一つの実施態様で、生体試料から実質的に均一なＮＳＣ集団を作成する工程を含む、動物の神経組織又は非神経組織を置換する方法であって、該生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけて該細胞を含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団を細胞サイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞がある特定範囲の大きさに収まる細胞集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を細胞表面マーカー識別処理にかけて実質的に均一なＮＳＣ集団を生産する工程、次いで該細胞の該実質的に均一な集団を上記の同じ動物か又は該細胞を受容できる動物に導入する工程を含む方法を提供する。
【００５６】
用語「動物」は数ある動物の中でも、ヒト、霊長類、家畜動物、実験動物、鳥類及び魚類を含む。
【００５７】
好ましい実施態様では、本発明は神経組織置換療法に使用する組成物であって、該組成物が生体試料から実質的に均一なＮＳＣ集団を生産する方法によって調製した実質的に均一なＮＳＣ集団を含むものであり、該方法が該生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけて該細胞を含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団を細胞サイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞がある特定範囲の大きさに収まる細胞集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を細胞表面マーカー識別処理にかけて実質的に 均一なＮＳＣ集団を作成する工程を含むものである組成物を提供する。
【００５８】
異なる集団の細胞を含む懸濁液から細胞を精製又は取り出すための細胞単離、細胞分離及び細胞除去（cell purging）戦略は知られている。細胞分離方法は、細胞を単離するため又は細胞懸濁液若しくは細胞集団を浄化するために用いられ、通常三つの広いカテゴリーの一つに分類される。物理的な分離方法は、通常は細胞の大きさや密度など細胞種間の物理的特性上の差異を利用する（例えば、遠心分離法又は懸濁分離法）。化学物質に基づく方法は、通常は一つ以上の望ましくない細胞型を選択的に死滅させ又は取り除く薬物を利用する。親和性に基づく方法は、通常は所望の若しくは望ましくない細胞型の細胞膜表面のマーカーリガンドに選択的に結合する選択結合能力を持つ抗体若しくは分子を利用する。この抗体はその後、細胞を懸濁液から単離又は取り除くことができるものである。Ｎ

ＳＣの細胞精製法を一つの方法に限定することは意図しないが、しかしながら、物理的分離法は所望の細胞に過度の損傷を与えることなく、ある特定の特性の細胞を分離できるという点で有利である。この点では、実質的に均一な未分化細胞集団が直径約１２ミクロン以上のＮＳＣを含むよう、実質的に均一なＮＳＣ集団をサイズ識別処理にかけることが好ましい。

【００５９】

従って本発明は、生体試料から直径が約１２ミクロンより大きな未分化細胞の実質的に均一な集団を産生する方法であって、該生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけて精製対象の細胞を含む混合集団を得る工程、該細胞混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞が直径約５から約５０ミクロンまでである細胞集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を未分化細胞表面マーカー識別処理にかけて直系が約５から約５０ミクロンまでである実質的に均一な未分化細胞の集団を作成する工程を含む方法を意図する。

【００６０】

未分化細胞の集団は幹細胞を含むのが好ましく、ＮＳＣであれば更に好ましい。

【００６１】

従って本発明の好ましい実施態様では、生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけてＮＳＣを含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞が直径約５から約５０ミクロンまでの細胞集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団をＮＳＣ表面マーカー識別処理にかけて直系約５から約５０ミクロンまでである実質的に均一なＮＳＣ集団を生産する工程を含む方法により調製した、直径約５から約５０ミクロンまでの実質的に均一なＮＳＣの集団を提供する。

【００６２】

神経組織の置換又は修復に用いるＮＳＣの集団は直径約５から約５０ミクロンまでであることが好ましい。

【００６３】

従って、本発明は、生体試料から直径約５から約５０ミクロンまでの実質的に均一なＮＳＣ集団を作成する工程を含む、動物における神経組織を置換する方法であって、生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけてＮＳＣを含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞が直径約５から約５０ミクロンまでである細胞集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を細胞表面マーカー識別処理にかけて直系約５から約５０ミクロンまでである実質的に均一なＮＳＣ集団を作成する工程、そして次いで直系約５から約５０ミクロンまでである実質的に均一な該ＮＳＣ集団を該同一動物若しくは該ＮＳＣを受容できる動物に導入する工程を含む方法を提供する。

【００６４】

本発明の組成物は、神経組織で増殖及び／又は分化できる直径約５から約５０ミクロンまでであるＮＳＣを含むことが好ましい。

【００６５】

この実施態様では、本発明は神経組織置換療法で使用する組成物であって、該組成物が生体試料から直径約５から約５０ミクロンまでであるＮＳＣの実質的に均一な集団を作成する方法により調製された直径約５から約５０ミクロンまでである実質的に均一なＮＳＣ集団を含むものであり、該方法が生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけてＮＳＣを含む混合集団を得る工程、該細胞混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞が直径約５から約５０ミクロンまでである細胞集団を生産する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を細胞表面マーカー識別処理にかけて実質的に均一なＮＳＣ集団を作成する工程を含むものである組成物を提供する。

【００６６】

本明細書で言う「約」は、＋／－３ミクロンの値を指す。細胞の大きさは約７から約３

０ミクロンであるのが好ましく、約７から約２０ミクロンであるのが更に好ましい。一般的に、約１２ミクロン以上の大きさが特に有用である。

【００６７】

神経細胞の混合集団の分離の目的が実質的に均一なＮＳＣ集団を生産することである場合、抗体及び、ＮＳＣ上に存在する細胞固有の表面マーカーは成熟した細胞型に分化できるＮＳＣ集団を同定及び分類するのに使用できる。このような未分化又は部分的に分化したＮＳＣを分離及び精製した後、該細胞は生理学的緩衝液又は培養培地中で培養でき、適切な因子の存在下で培養して分化を誘発することができる。例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子を添加してＮＳＣを分裂及び増殖及び／又は分化させることができる。このような増殖因子はＮＳＣ分化のパターンを変える能力がある。細胞を、例えば緩衝化食塩水で洗浄し、再懸濁し、好ましくは静脈内投与により患者に再び導入することができる。該細胞はまた、内因性幹細胞の増殖、分化及び／又は維持を誘発するために使用できる新しい増殖因子（被験体で自然発生するか又は自然産物のスクリーニング若しくは化学ライブラリーのスクリーニングの後に得られるかのいずれか）を同定するのにも使用できる。

【００６８】

ＮＳＣを含む神経細胞の集団からインビトロでＮＳＣを分離及び精製する分離技術が利用できる。ＮＳＣは治療される動物又は患者に内生しても良く、非内因性の供給源から誘導しても良い。神経組織から誘導された細胞集団などの細胞集団を含む最初のＮＳＣは、当業者らに良く知られる標準的な手法を用いて得ることができる。ＮＳＣの特に有用な供給源は、霊長類、ヒト、家畜動物（例えば、ヒツジ、ウシ、ウマ、ブタなど）及び実験動物（例えばマウス、ラット）などのある範囲の動物由来の脳又はＣＮＳ、ブタ及びウシの脳を含むがこれらに限定されず、ＮＳＣ精製のための潜在的な出発材料として利用できる。この集団は多能性ＮＳＣ、又は多能性ＮＳＣ若しくは非多能性ＮＳＣの混合物を含んでも良く、又は実質的にコミットされたＮＳＣすべてを含んでも良い。

【００６９】

神経組織の出発材料を取得するとすぐ、ＮＳＣを例えば抗体及び細胞表面マーカーを利用する様々な方法によって取り出すことができ、こうして選択的に分離及び精製できる。これらの方法においては、抗体又は分子は目的のＮＳＣ集団上に存在する特異的マーカー分子に選択的に結合するが、出発材料内の他の細胞には結合しない。この結合した分子は次いで適切なＮＳＣタイプの同定を表す付箋として作用する。このような技術には、例えば、蛍光標示式細胞分取法（ＦＡＣＳ）及び特異的な蛍光色素を用いたフローサイトメトリー、細胞表面マーカー特異的抗体に結合させたビオチンとアフィニティー・カラム・マトリックス又はプラスチック表面などの固形の支持体に結合したアビジン又はストレプトアビジンを用いたビオチン－アビジン若しくはビオチン－ストレプトアビジンン分離、又は抗体で被覆された磁気ビーズを用いた磁気分離が含まれる。

【００７０】

別の方法では、これは特に本発明の実施に有効であるが、ネガティブ選択プロトコルを採用する。ネガティブ選択ではマーカーはＮＳＣ以外の細胞型上にある。結果的に非ＮＳＣが除去される。

【００７１】

従って細胞表面マーカー識別による分離では、選択的に特定のマーカーを結合する抗体又はその他の分子を利用し、ネガティブ選択若しくはポジティブ選択手法によって達成できる。ネガティブ分離では所望しない細胞上にあるマーカーに特異的な抗体が用いられる。例えば、非多能性ＮＳＣの数を減少させることが望ましいと思われる多能性ＮＳＣ集団の場合である。この場合、抗体は多能性ＮＳＣ上には存在しない細胞外領域のタンパク質に向けられるであろう。このような細胞表面識別法に適した細胞表面マーカーには、他にも多くある中でも（下記参照）、Ｓ１００、III型β－チューブリン及びＯ４などが含まれるがこれらに限定されない。また、神経細胞集団から多能性若しくは非多能性ＮＳＣを直接選択することも望ましいであろう。この場合、細胞表面タンパク質の外部領域に選択的に結合する抗体又は他の分子を用いることができる。このような細胞表面マーカーに対

するこのような抗体が結合した細胞は選別でき、残りの細胞は除去し、所望の混合物を残すことができる。

【００７２】

細胞識別処理に用いる細胞表面マーカーは、蛍光性化合物で標識しても良い。選択結合能力を持つ蛍光で標識した抗体又は分子は適切な波長の光に当てると、蛍光によってその存在が検出できる。最も一般的に用いられる蛍光標識化合物は、イソチオシアン酸フルオレスセイン、ローダミン、イソチオシアン酸、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、ｏ－フタルアルデヒド、及びフルオレサミンである。選択的結合能力を有する抗体又は分子はまた、^{152}Ｅｕ又は他のランタン系列などの蛍光発光金属を用いて検出できるよう標識することもできる。これらの金属は、選択的結合能力を有する抗体又は分子に、ジエチレントリアミン５酢酸（ＤＴＰＡ）又はエチレンジアミン４酢酸（ＥＤＴＡ）などの金属キレート基を用いて付着できる。抗体は化学発光化合物に結合することにより、検出できるように標識することもできる。化学発光で標識した選択結合能力のある抗体又は分子の存在は、次いで化学反応の過程の間に生じる発光の存在を検出することによって測定できる。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、テロマティック・アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びシュウ酸エステルである。同様に、生物発光化合物が選択結合能力を持つ本発明の抗体又は分子を標識するのに使用できる。生物発光は、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を上昇させる、生物系で見られる化学発光の一つのタイプである。生物発光性タンパク質の存在は発光の存在を検出することにより測定される。標識のための重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、及びエクオリンである。選択結合能力のある抗体又は分子を標識するこのような方法は全て、本発明により意図される。

【００７３】

増殖及び／又は分化できるＮＳＣはサイズ識別された細胞集団から選択しても良い。サイズ選択は細胞表面識別処理と同時又は逐次的に行なってもよい。細胞表面識別に有用な特に好ましい細胞表面マーカーには、ＰＮＡ及びＨＳＡが含まれるがこれらに限定されない。約５から約５０ミクロンまでのサイズ識別されたＮＳＣは、同時に又は逐次的に細胞表面マーカー識別処理にかけるのが好ましい。直径約５から約５０ミクロンまでのＮＳＣはまた、表現型的にＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}でもある。

【００７４】

特に、本発明者らは三つの細胞集団を同定した。その一つはＮＳＣが実質的に均一であり、もう一つは一部前駆細胞を含み、三つめは実質的に全て分化した細胞を含む、

【００７５】

その集団は、表現型的に次のように表される：

ＨＳＡ^{lo} ＰＮＡ^{lo}	ＮＳＣについて実質的に均一
ＨＳＡ^{hi} ＰＮＡ^{lo}	前駆細胞を一部含む
ＨＳＡ^{lo} ＰＮＡ^{hi}	実質的に均一
ＨＳＡ^{hi} ＰＮＡ^{hi}	分化細胞

ＨＳＡ^{lo}ＰＮＡ^{lo}の細胞集団は、更に表３に挙げる低レベルのマーカーを持つという特徴を有する。低レベルの細胞内マーカーには、III型β－チューブリン及び０４が含まれる。

【００７６】

【表３】

ＮＳＣ集団上で低いＰＮＡ^{lo} ＨＳＡ^{lo}細胞表面マーカー

細胞表面マーカー	説　明
ＣＤ３ｅ	Ｔ細胞受容体
ＣＤ４	Ｔ細胞及びリンパ球（ヘルパーＴ細胞）
ＣＤ８ａ	Ｔ細胞
ＣＤ１１ｂ	顆粒球、マクロファージ、樹状細胞、ＮＫ細胞 （ＭＡＣ－１としても知られる）
ＣＤ１９	Ｂ細胞
ＣＤ２４	ＲＢＣ、顆粒球、単球、リンパ球
ｍＣＤ３０．１	活性化Ｔ細胞（ＴＮＦ受容体ファミリー）
ＣＤ３１	内皮細胞（血小板内皮ＣＡＭ－１）
ＣＤ３４	推定ＨＳＣマーカーとして作用する グリコシル化膜貫通糖タンパク質
ＣＤ４１	血小板、巨核球
ＣＤ４５Ｒ	Ｂリンパ球（ａｋａ Ｂ２２０）
ＣＤ４５ＲＡ	Ｂリンパ球
ＣＤ４５ＲＢ	Ｂリンパ球
ＣＤ４５ＲＣ	Ｂリンパ球
ＣＤ４５ＲＯ	Ｂリンパ球
ＣＤ８９	顆粒球、単球／マクロファージ
ＣＤ９０．２	Ｔ細胞（ａｋａ Ｔｈｙ１．２）
ＣＤ９９Ｒ	Ｔ細胞接着分子
ＣＤ１１７	幹細胞／鉄／肥満細胞因子受容体（ａｋａ ｃ－Ｋｉｔ）は ＨＳＣに対して共分裂促進因子として作用する
ＣＤ１３５	ｃ－Ｋｉｔ（ａｋａ Ｆｌｋ－２／Ｆｌｔ－３）に関連する タンパク質チロシンキナーゼ
Ｈ－２Ｋ^{b}	ＭＨＣクラスＩ抗原（Ｃ５７Ｂ１／６Ｊ）
Ｓｃａ－１	マウスＨＳＣ（ａｋａ Ｌｙ－６Ａ／Ｅ）上に発現

【００７７】

従って本発明は、直径が約５から約５０ミクロンまでで、表現型的にＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である実質的に均一なＮＳＣ集団を生体試料から作成する方法であって、該生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけて精製対象のＮＳＣを含む混合集団を得る工程、該細胞混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞が直径約５から約５０ミクロンまでである細胞集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団をＮＳＣ表面マーカー識別処理にかけて直径が約５から約５０ミクロンまでで表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である実質的に均一なＮＳＣ集団を作成する工程を含む方法を意図する。

【００７８】

表３に挙げたような他のマーカーもまた、ＮＳＣを特徴付けるため又はＮＳＣを精製するためのいずれかに用いられる。加えて、表現型がＨＳＡ^{lo}ＰＮＡ^{lo}である細胞は、ＤＣＣ、ネオゲニン、Ｎｏｔｃｈ１、２、３、Ｐｌｘ１及びＳｏｘ２を発現する。これらの細胞は減少したレベルのｐ７５とＴｒｋβを有し、これらの細胞はＥｐｈＡ４、ＴｒｋＡ、ＴｒｋＣ、ＬＩＦＲβ、ｇｐ１３０、ζ１、ＳＯＣＳ２、Ｐａｘ６、Ｔｂｒ１、Ｄｌｘ２、ＳＣＬ、Ｂｕｒｐ１及びＳｃａ－１を発現しないか又は極めて低レベルで発現する。

【００７９】

本明細書で言う「表現型的に」とは、その遺伝子構成要素と環境との相互作用により決まる生物又は細胞の物理的な構成を指す。「表現型的」特性は検出可能であり、類似の特性を持つ細胞又は生物の同定と分類を可能にする。本発明では、ＮＳＣの細胞表面特性の表現型はＮＳＣを更に分化した又はコミットした細胞型から識別するのに用いられる。

【００８０】

本明細書で言うＰＮＡ^{lo}及び／又はＨＳＡ^{lo}は、表面ＰＮＡ及び／又は表面ＨＳＡが少ないか又は存在しない表現型を持つＮＳＣを指す。

【００８１】

本発明の別の実施態様では、生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけてＮＳＣを含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞が直径約５から約５０ミクロンまでである細胞集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団をＮＳＣ表面マーカー識別処理にかけて直径が約５から約５０ミクロンまでで表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である実質的に均一なＮＣＳ集団を作成する工程を含む方法で調製された、直径が約５から５０ミクロンで表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である実質的に均一なＮＳＣ集団が提供される。

【００８２】

神経組織又は非神経組織を置換または修復するのに用いられるＮＳＣ集団は、直径が約５から約５０ミクロンまでで、表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}であるものが好ましい。

【００８３】

従って本発明は、直径が約５から約５０ミクロンまでで表現型的にＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である実質的に均一なＮＳＣ集団を生体試料から作成する工程を含む、動物における神経組織又は非神経組織を置換する方法であって、該生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけてＮＳＣを含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞が直径約５から約５０ミクロンまでである細胞集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を細胞表面マーカー識別処理にかけて表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である直径が約５から約５０ミクロンまでの実質的に均一なＮＳＣ集団を作成する工程、次いで直径が約５から約５０ミクロンまでで表現型的にＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である該同種なＮＳＣ集団を、上記の同じ動物又は該ＮＳＣを受容できる動物に導入する工程を含む方法を意図する。

【００８４】

ここでも、「動物」は中でもヒト又は霊長類を含む。

【００８５】

神経変性疾患及び急性脳傷害は、神経細胞の損失、影響を受けた脳領域の不適切な働き、及びその結果生じた行動異常を結果として生ずることが多い。恐らくＣＮＳ機能障害の最大の領域は（障害を受けた人々の数に関して）、神経細胞の喪失によってではなく、むしろ存在する神経細胞の異常な働きによって特徴付けられるであろう。これは、ニューロンの不適切な刺激伝導、又は神経伝達物質の異常な合成、放出、及び処理のせいである場合 がある。これらの機能障害は、鬱病及び癲癇などの良く研究され特徴付けられた障害、又は神経症及び精神病などのあまり良く分かっていない障害の結果であることもある。本発明は、神経組織を置換するためのＮＳＣを含む組成物を意図する。好ましくは、神経系に分化し、直径が約５から約５０ミクロンまでで表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}であるＮＳＣを再生する細胞の組成物である。

【００８６】

この実施態様では、本発明は神経組織置換療法で用いる組成物であって、該組成物が生体試料から直径が約５から約５０ミクロンまでで表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である実質的に均一なＮＳＣの集団を作成する方法によって調製された直径が約５から約５０ミクロンまでで表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である実質的に均一なＮＳＣの集団を含むものであり、該方法が該生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけてＮＳＣを含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞が直径約５から約５０ミクロンまでである細胞集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐

次的に該集団を細胞表面マーカー識別処理にかけて直径が約５から約５０ミクロンまでで表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である実質的に均一なＮＳＣの集団を作成する工程を含むものである組成物を提供する。

【００８７】

損傷を受けた組織又は機能障害を持つ神経組織は、ＮＳＣの適切な増殖及び／又は分化及び／又は自己再生により置換又は再生できる。損傷を受けた神経組織の面積が増加するとそれを置換又は修復するためには、ますます多くのＮＳＣなどの未分化細胞が必要となる。本発明のこの側面では、遺伝子改変されたＮＳＣには、薬物耐性としての付加的な遺伝子特性又は増幅の間に細胞の寿命を延ばす特性が与えられる。従って本発明は、直径が約５から約５０ミクロンまでで表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である遺伝子改変されたＮＳＣの実質的に均一な集団の作成を意図する。

【００８８】

従って本発明は、生体試料から直径が約５から約５０ミクロンまでで表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である実質的に均一な遺伝子改変ＮＳＣの集団を作成する方法であって、該生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけて精製すべき遺伝子改変ＮＳＣを含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団を細胞サイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞が直径約５から約５０ミクロンまでである細胞集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団をＮＳＣ表面マーカー識別処理にかけて直径が約５から約５０ミクロンまでで表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である実質的に均一なＮＳＣ集団を作成する工程を含む方法を意図する。

【００８９】

本明細書で用いる用語「遺伝子改変ＮＳＣ」は、その中に外来性（即ち、自然に発生したものではない）核酸、例えば、ＤＮＡが導入されるＮＳＣを指す。外来性核酸は、リン酸カルシウムで媒介したトランスフェクション、ＤＥＡＥで媒介したトランスフェクション、ミクロインジェクション、レトロウイルスによる形質転換、プロトプラスト融合及びリポフェクションを含むが、これらに限定しない様々な技術で導入して良い。遺伝子改変した細胞は、一時的または長期的のいずれかで外来性核酸を発現しうる。一般的に、一時的な発現は外来性ＤＮＡがトランスフェクトされた細胞の染色体ＤＮＡに安定して組み込まれない場合に発生する。対照的に、外来性ＤＮＡの長期間発現は、外来性ＤＮＡがトランスフェクトされた細胞の染色体ＤＮＡに安定して組み込まれた場合に発生する。

【００９０】

好ましい側面では、ＮＳＣは表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である。

【００９１】

本発明の別の実施態様では、生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけて遺伝子改変ＮＳＣを含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団を細胞サイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞が直径約５から約５０ミクロンまでである細胞の集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団をＮＳＣ表面マーカー識別処理にかけて直径が約５から約５０ミクロンまでで表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である実質的に均一な遺伝子改変ＮＳＣ集団を作成する工程を含む方法で調製した、直径が約５から約５０ミクロンまでで表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である実質的に均一な遺伝子改変ＮＳＣを提供する。

【００９２】

関連する実施態様では、本発明は、直径が約５から約５０ミクロンまでで表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である実質的に均一な遺伝子改変ＮＳＣ集団を生体試料から作成する工程を含む、動物における神経組織を置換する方法であって、該生体試料又はその部分試料を組織破砕処理にかけて遺伝子改変ＮＳＣを含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団を細胞サイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞が直径約５から約５０ミクロンまでである細胞集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時にまたは逐次的に該集団を細胞表面マーカー識別処理にかけて直径が約５から約５０ミクロンまでで表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である実質的に均一な遺伝子改変ＮＳＣを作成する工程、次いで直径が約５から約５０

ミクロンまでで表現型がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}である該同種な遺伝子改変ＮＳＣ集団を、上記の同じ動物又は該ＮＳＣを受容できる動物に導入する工程を含む方法を提供する。

【００９３】

上述のとおり、１２ミクロンより大きなサイズが特に有用であるが、約７から約３０ミクロンまでのサイズが好ましい。

【００９４】

本明細書に記載の実質的に均一なＮＳＣ集団は、神経組織の修復又は置換を含む神経系の障害の治療又は改善のために、治療上効果的な用量で患者に投与できる。治療上効果的な量とは、神経系障害の症状の改善をもたらすのに十分な実質的に均一なＮＳＣ集団の量を指す。

【００９５】

実質的に均一なＮＳＣ集団の毒性及び治療上の効力は、細胞培養又は実験動物における標準的及び改良された薬学的手法により、例えば、LD_{50}（集団の５０％に対する致死的な用量）及びED_{50}（集団の５０％に治療上効果的な用量）の測定などで測定できる。毒性と治療効果の間の用量比は治療係数であり、比率LD_{50}／ED_{50}で表される。大きな治療係数を示す実質的に均一なＮＳＣ集団が好ましい。ＮＳＣが免疫反応を誘発して毒性のある副作用を示す可能性があることは当然であり、有害な免疫反応を防ぐ送達システムを設計するよう気をつけなければならない。

【００９６】

細胞培養検定及び動物研究で得られたデータをヒトに使用する際の用量範囲を設定するのに用いることができる。このような実質的に均一な多能性ＮＣＳ集団の用量は毒性が殆どないか全くないEC_{50}を含む濃度範囲内であることが好ましい。この投与量は採用する投与剤形（dosage）及び利用する投与経路に応じて、この範囲内で変化できる。本発明の方法で用いられる実質的に均一なＮＳＣ集団のいずれについても、治療上効果的な用量は最初は細胞培養検定から見積もることができる。

【００９７】

本発明に基づいて用いる医薬組成物は、一つ以上の薬学的に許容できる担体又は賦形剤を用いて従来の方法で処方できる。従って、実質的に均一なＮＳＣ集団及びその薬学的に許容できる塩及び溶媒は注射又は経口投与を含む様々な経路で投与するために処方できる。

【００９８】

本明細書に記載するように、本方法で作成したＮＳＣ集団は様々な用途がある。本発明で意図する他の用途には、ＮＳＣ上又はＮＳＣ内にマーカーを置き、次いでこれを用いて身体中でＮＳＣ及び／又はその子孫を追跡しその生理学的変化を監視する方法が含まれる。これにより複数の標的に対して治療を行なう能力が与えられる。精製したＮＳＣ集団は、遺伝子及びタンパク質の発見、特に分化及び増殖に関わるメカニズムの発見にも有用である。これは様々な疾病状態において治療のための新しいニューロンの生産を可能にする。

【００９９】

更に本発明のＮＳＣは、例えば内因性幹細胞活性化を介したサイトカイン送達、及びＮＳＣの選択的移動及びその傷害部位への進行に有用である。

【０１００】

本ＮＳＣのこのような使用は全て、本発明により意図される。

【０１０１】

精製した幹細胞はまた、幹細胞の成長、増殖及び／又は分化に影響を与えることができる分子のスクリーニングにも用いられることがある。このような因子の重要性は、

１.「純粋でない」集団では、その効果が幹細胞に直接的なものであって他の分子を介していないことを確定できない、

２.この情報により、内因性幹細胞が新しいニューロン又はグリアなどに分化するよう活性化するために使用できる治療法の発展が可能になる、

ことである。
【０１０２】
従って、本発明のこの側面は移植を行なう必要がない。しかしながら、このような分子は移植療法の成功後に重要となるであろう。
【０１０３】
従って、本発明は更にＮＳＣの成長、増殖及び／又は分化を促進する成長因子であって、本明細書で記載した方法に基づいて調製した均一なＮＳＣ集団から得られ得る成長因子の単離に向けられる。
【０１０４】
更に、本発明は神経細胞になるＮＳＣの集団を同定する。従って、本発明は自然発生するアゴニスト（例えばサイトカイン）又は自然産物スクリーニングにより又は細胞の本集団に作用する化学ライブラリーのスクリーニングによって見つかる分子を包含する。
【実施例】
【０１０５】
本発明は更に、次の限定的でない実施例により説明する。
【実施例１】
【０１０６】
組織の調製
成体のマウス（生後８～１０週）を頸部転位で犠牲にし、ＣＮＳ組織をロイス及びアルバレス－バイラに完全に従ってヘペス緩衝化イーグル培地（ＨＥＭ）中で切り割いた（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ 90: 2074-2077, 1993）。成体ＣＢＡマウスの側脳室壁の脳室ゾーン及び副脳室ゾーンの両方をＮＳＣ源として用いた。ＣＮＳ組織を賽の目に切り、Mg^{++}／Ca^{++}を含まないＨＢＳＳ（１０ｍＭのヘペス、２００ｇ／ｍｌのＥＤＴＡ、０．５ｍＭのトリプシン、０．００１％ｗ／ｖのＤＮアーゼを含む）に移しｐＨ７．６，３７℃で１０分間放置した。ＨＥＭ＋５％ｖ／ｖのウシ胎児血清（ＦＣＳ）を６ｍｌ添加し、その組織片を遠心分離（１００ｘｇで７分）で採取した。上清は除去し、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）中でペレット粉砕して単細胞懸濁液を作成し、続いて７０μＭの細胞ストレーナー（ファルコン）を通して組織片を除去した。
【０１０７】
酵素による解離に続いて、単細胞懸濁液を様々な抗体及びレクチンで染色し、次いでＦＡＣＳII（ベクトン－ディキンソン、米国）フローサイトメーターを用いて分類した。
【実施例２】
【０１０８】
ＦＡＣＳ分析
免疫染色のため、結果的に得られた懸濁液を２０分間４℃でＦＩＴＣ結合ＰＮＡ（１：２００、ヴェクタ、バーリンゲーム、カリフォルニア州）、又はＰＥ結合ｍＣＤ２４ａと混合したＰＮＡ－ＦＩＴＣ（１：２００、クローンＭ１／６９、ファーミンゲン）と共にインキュベートした。インキュベーションに続き、細胞懸濁液を遠心分離によりＰＢＳで２度すすぎ、死滅細胞を標識するため、最後にＰＢＳ＋１％ｖ／ｖＦＣＳヨウ化プロピジウム（Ｐ．Ｉ．、１００ｐｇ／ｍｌ、モレキュラープローブ）ですすいだ後、ＧＡＣＳ分析を行なった。細胞生存能力は通常は９５％より大きく、全てのＦＡＣＳゲートは未標識細胞を用いて設定した。
【０１０９】
最初のＮＳＣ濃縮工程は前方散乱光（ＦＳＣ）［図１Ａ］で評価した大きさに基づいて生存可能な細胞を選別して行った。選別していない集団に存在する総ＮＳＣの>８０％が直径>１２μｍの細胞に含まれる（>９０単位ＦＳＣ）ことが分かった。次にレクチン、ピーナッツ凝集素（ＰＮＡ）の差別的結合を用いてＮＳＣを選択的に濃縮した。細胞の直径（ＦＳＣ）を比較するＦＡＣＳプロファイル及びＰＮＡ染色強度から、ＮＳＣの含量を査定するために三つの集団、PNA^{hi}、PNA^{lo}及びPNA^{mid}画分が選択された［図１Ａ］。>１２μｍのPNA^{lo}画分は、約２％の未選別集団を表し、ＮＳＣ１につき約１：７

の細胞という最大のＮＳＣ活性を含んでいた。

【０１１０】

最終の濃縮工程は、ＰＮＡ^{lo}細胞の部分集団で効果的にＮＳＣを濃縮するため、熱安定性抗原［ＨＳＡ］（ｍＣＤ２４ａ）を用いた。ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}部分集団［図１Ｂ及び図１Ｃ］、即ち未選別集団の０．２７±０．０７％（平均ＳＥ、ｎ＝３）を表す別の集団が、殆ど排他的にＮＳＣを含むことが分かった。

【実施例３】

【０１１１】

ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}のＮＳＣのＦＡＣＳ分析及び特性決定

ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}のＮＳＣの表現型をより詳細に検討するため、選別した細胞は他の神経性マーカーについて免疫染色した。ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}のＮＳＣは、推定上の神経幹細胞及び神経前駆細胞のマーカーであるネスチンを発現したが（カラオラら、 Neuroscience 73:581-594 1996）、しかしながら、これらのＮＳＣは細胞型に特異的な神経マーカー（III型βチューブリン、０４又はＧＦＡＰ）は発現しなかった。

【実施例４】

【０１１２】

形態学的分析

ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}ＮＳＣは、以前はＮＳＣの起源と考えられた上衣細胞の繊毛形態を持たなかった。更に、上衣細胞は以前に高レベルのＨＳＡを発現することが示されていたため、大部分の幹細胞がＳＶＺに残留するという他の研究者らの結論（トロペペら、 Ｊ．Neuro sci．17: 7850-7859, 1997）を有利にする。

【実施例５】

【０１１３】

この段落は欠落している。

【実施例６】

【０１１４】

神経球の作成

ＣＮＳ組織から収穫した選別された細胞の幹のような性質を評価するため、神経球を以前に記載されたように作成した（グリッティら、 Ｊ．Neurosci．19: 3287-3297, 1999）。本質的に、選別された細胞は、ＦＧＦ－２（ウシ２０組換え体の１０ｎｇ／ｍｌ、ボーリンジャー　マンハイム）及びＥＧＦ（受容体グレードの２０ｎｇ／ｍｌ、コラボラティブ・リサーチ）をＮＳＣの頻度と濃縮を確かめるために１０生細胞／ｃｍ^{2}の濃度で、又は正確なＮＳＣ頻度を測定するために１ウェルにつき１細胞のいずれかで含む、成長因子を含まないと定義されたＮＳ－Ａ培地（基本培地、ダルベッコ修飾イーグル培地（ＤＭＥＭ）と栄養補給剤Ｆ１２（ギブコ）（１；１）から成り、０．６％のグルコース、３ｍＭのＮａＨＣＯ$_3$、５ｍＭのＨＥＰＥＳ、及び２ｍＭのＬ－グルタミン、０．１ｍｇ／ｍｌのアポ－トランスフェリン、２５μｇ／ｍｌのインスリン、６０μＭのプトレッシン（putres cene）、３０μＭの亜セレン酸ナトリウム（sodium selenite）及び２０ｎＭのプロゲステロン（シグマ）を含む）（１、１０）中で培養した。培養された細胞の数と比較してイン・ビトロで７日（７ＤＩＶ）後に形成された球体の数を数えるとＮＳＣ頻度が得られた。

【０１１５】

１ウェルにつきＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}細胞を１つ入れると、約８０％の細胞（１：１．２８）が神経球を生じた。更に、ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}集団は未選別集団に存在するＮＳＣ活性の>６３％を含み｛回収率％＝細胞総数の％（未選別ＮＳＣ頻度＝選別ＮＳＣ頻度）｝、成体マウスの脳室ゾーン中のＮＳＣの大多数がこの表現型であることを強く示唆した。

【０１１６】

続く一次球体の継代は、収穫した球体を機械的に解離させて単細胞懸濁液とし（１００ｘｇで１０分遠心分離）、レイノルズら、 1992（再掲。グリッティら、Ｊ．Neurosci．16: 1091-1100）で記載されたように、ＥＧＦ＋ＥＧＦ－２（完全培地）を含む基礎培地

で再培養することにより実施した。

【実施例７】

【０１１７】

ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}細胞の神経細胞ポテンシャル

ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}細胞からクローンとして誘導された球体［図３Ａ］は、基礎培地で１日、次に基礎培地＋１％ｖ／ｖのＦＣＳで５～６日間、ポリ－Ｌ－オルニチンで被覆したカバーガラスへ移動して分化させ、次いでニューロン及びグリアの存在を免疫細胞化学（ＩＣＣ）により評価した。１００％のケースで、クローンとして誘導された球体はグリア繊維状酸性タンパク質に陽性（ＧＦＡＰ$^{+ve}$）の星状細胞及び（III型β－チューブリンに陽性（β－ｔｕｂ$^{+ve}$）のニューロン及び０４$^{+ve}$のオリゴヌクレオチドを含んでいた［図３Ｂ］。

【０１１８】

ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}細胞からクローンとして誘導された球体が、連続した増殖後にこのポテンシャルを維持するかどうかを判定するため、二次球体を３ヶ月間５～７ＤＩＶごとに継代し、次に分化する条件に移した。再度、ＧＦＡＰ$^{+VE}$及び３－チューブリン$^{+ve}$細胞及び０４$^{+VE}$細胞は検討した全ての球体に存在した。

【実施例８】

【０１１９】

細胞の特性決定

新たに単離したＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}ＮＳＣが非神経細胞型を生じる可能性があるかどうかを判定するため、個々のＮＳＣの筋を生ずる能力の定量的評価を可能にする最近開発された検定システムを用いた（ガリら、 Nature Neuroscience 3: 2000）。Ｃ２Ｃ１２細胞中のＮＳＣを容易に同定するため、ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}ＮＳＣを、常にｌａｃＺ（２２）及び増大したＧＦＰの両方を発現するＢＵ５Ｘ形質転換マウスから単離した（ハジャントナキスら、 Mech. Dev. 76: 79-90, 1998）。ＢＵ５Ｘマウスから得られたＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}ＮＳＣは、ＣＢＡから得たものと同じ特性を示した。

【０１２０】

新たに単離したＮＳＣは、クローン濃度（clonal density）でインビトロで２日間、２０％ｖ／ｖの熱不活性化ＦＣＳを含むＤＭＥ培地（ギブコ）中でＣ２Ｃ１２筋原細胞（５×１０^{3}細胞／ｃｍ^{2}）と共培養し、次に１％ｖ／ｖの正常なウマの血清（ＣＳＬ、オーストラリア）を補充したＤＭＥ中で更に２～４ＤＩＶ共培養してその筋原能力を評価した。次いで培地を４％ｖ／ｖのパラホルムアルデヒドで５分間固定し、その後ＧＦＰ$^{+ve}$細胞の表現型を評価した。

【０１２１】

神経由来の筋細胞は、高速ＭｙＨＣ又は発達性ＭｙＨＣ（それぞれＮＣＬ－ＭＨＣｆ又はＮＣＬ－ＭＨＣｄ、共に１：１０、ノボカストララブズリミティッド）、又はα－アクチニン－２２５（１：７５０、Ｅ．ハーデマン）に対するマウス単クローン抗体で同定した内因性ＧＦＰ及び筋細胞型の同時検出により同定した。これらの抗原は、適切なＴＲＩＴＣ結合ＩｇＧ二次抗体（１：２００、サザンバイオテック）で検出した。筋細胞に分化した神経細胞の割合は、筋原性マーカーを発現するＧＦＰ$^{+ve}$の数を培養したＮＳＣの数（培養後６時間後に数えた）で割った値を計算することにより求めた。

【０１２２】

ＧＦＰを発現する細胞は、紡錘形、筋細胞様の形であり［図３Ｃ～Ｄ、しばしば筋管に特徴的な複数核を含む［図３Ｄ、矢印］。これらの細胞の筋表現型は、<９９％の紡錘形細胞及び筋管を、α－アクチン－２［図３Ｆ）］及びＭｙＨＣの２つのイソ型［図３Ｅ、Ｇ及びＨ］に対する筋原性特異的抗体で染色することにより確認した。ＧＦＰは筋原性マーカー［図３Ｅ－Ｈ］で標識された細胞中で共発現されることが見出されたことは最も重要である。筋管の場合、輝ＧＦＰ$^{+ve}$核が一つだけがいくつかの非ＧＦＰ$^{+ve}$核の中にあったことがしばしばある［図３（ｈ）］、これはＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}のＮＳＣの一部が筋細胞に分化したか又はＣ２Ｃ１２細胞と融合して筋管を形成したことを明確に示すものである

。

【０１２３】

選別したＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}ＮＳＣの培養後に発生した有意な細胞分裂（ＧＦＰ$^{+ive}$細胞を蛍光顕微鏡観察で絶えず監視して確認した）の証拠がないため、筋原性の能力を持つＮＳＣの頻度は直接測定できた。培養したＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}ＧＦＰ$^{+ve}$ＮＳＣの５７±５．６７％（平均±ＳＥ、ｎ＝３）が、紡錘型、ＭＨＣ$^{+ve}$筋細胞、又は筋管（筋管中のＧＦＰ$^{+ve}$を数えて測定）に分化したことが分かった。

【実施例９】

【０１２４】

機能的幹細胞

下の例は、単離された細胞がインビボで機能的ＮＳＣとして作用することを示す。その結果は表４に示す。これらのデータは、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子に突然変異を有する突然変異マウス、クエルコフ（querkopf）を採用して引き出した（トーマスら、 Development 127: 2537, 2000）。この研究の対象となる観察は、出生以降の野生型と比較した場合のクエルコフの嗅球の大きさにおける進行性の欠陥である。嗅球は、最終的に嗅小球及び糸球体周辺のニューロンに分化する副脳質領域幹細胞から誘導された細胞の連続的な移動のため、出生後一貫して成長することを思い出されたい。従って、本発明者らはクエルコフにおける欠陥が脳室周囲の領域での幹細胞の損失を反映するものかどうか、そしてもしそうであれば、どの選別集団にそれらが存在するのかを検討した。本発明者らはＦＡＣＳ分析により、突然変異及び野生型プロフィールがＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}集団における約６倍の減少を除き、全く同じであることを発見した（図２）。野生型ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}集団及び突然変異ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}集団の両方における幹細胞活性の頻度には有意な程の差がなく、ＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}幹細胞の機能的能力には本質的な差はないがその全体的な数には劇的な減少があることを示した。更に、他の選別集団では幹細胞活性における変化が見られなかったので、これは幹細胞表現型における変化では説明できなかった。従ってこれらのデータは、クエルコフマウスにおける生後の嗅球ニューロンの形成における欠陥がＰＮＡ^{lo}ＨＳＡ^{lo}集団の特異的な欠乏のためであることを強く示唆し、これらの細胞の生体位での機能的役割を更に支持する。

【０１２５】

【表４】

大きさと表面マーカーに基づいた新しいＮＳＣのフローサイトメトリー分析を示す

細胞表現型	ＮＳＣ頻度*
未選別	１：３００
＜７μｍ	０
７～１２μｍ	１：５３８
＞１２μｍ	１：１４９
＞１２μｍ PNA^{hi}	１：１６６７
＞１２μｍ PNA^{mid}	１：８７．９
＞１２μｍ PNA^{lo}	１：６．７７
＞１２μｍ PNA^{lo} HSA^{mid-lo}	１：１５．４±２．８３
＞１２μｍ PNA^{lo} HSA^{lo}	１：１．２８±０．１１

【０１２６】

これらの細胞は回収し、神経球を生産することで知られている培養条件に移した。ＮＳ

Ｃ頻度*は培養した生細胞につき７回分裂した後に形成された神経球の数を表し、生細胞は４時間培養の後に数えた。

【実施例１０】

【０１２７】

細胞集団を規定するマーカー

様々なマーカー（外部及び内部）を定義する広範囲のプライマーを用いて、細胞の集団を評価し細胞集団を表現型により特徴付けた。マーカー及び使用したプライマーのヌクレオチド配列は表５に示す。

【０１２８】

三つの細胞集団はＨＳＡ及びＰＮＡの発現に基づき同定する。各集団は次いで表５に挙げたマーカーについて評価する。その結果を表６に示す。

【０１２９】

表現型が$PNA^{lo}HSA^{lo}$である細胞はＮＳＣの均一集団であることの特徴であるマーカーを示す（表６）。表現型が$PNA^{lo}HSA^{lo}$である細胞はいくつかの前駆体を含むが、一方で$HSA^{lo}PNA^{hi}$／$HSA^{hi}PNA^{hi}$である細胞は実質的に全て分化した細胞である（表６）。

【０１３０】

【０１３１】

【表５】

分子の同定に用いるプライマー

標的ＤＮＡ	プライマー配列（５’→３’）	産物のおよその大きさ(bp)	＋ｖｅ対照	参照番号
mβ－アクチン	S－CTG AAG TAC CCC ATT GAA CAT GGC［配列番号：1］ AS－CAG AGC AGT AAT CTC CTT CTG CAT［配列番号：2］	740		
hβ－アクチン	S－ACC GCG AGA AGA TGA CCC AGA T［配列番号：3］ AS－CAC CTT CAC CGT TCC AGT TTT T［配列番号：4］			
mEphA4	S－GCC AAA GAA ATC GAT GCA TCC TGC［配列番号：5］ AS－GAC GCT GCT CAA AAT CTT ATT CTG［配列番号：6］			235
mDCC	S－CCC AGT CCA AGG TTA CAG ATT［配列番号：7］ AS－GAG GTG TCC AAC TCA TGA TG［配列番号：8］	570	E14.5 全胚	720
mRyk	S－GCC ACA AAG TTG TTC ACT TGG［配列番号：9］ AS－GCT GAC ACA CCC AAC AAT GC［配列番号：10］	500		-
mネオゲニンスプライス＃1	S－GGG GGA TGT GGT TAT CCC CA［配列番号：11］ AS－GAT GCA GGT GTA CGC CAT GTC［配列番号：12］	330 & 390	E14.5 全胚	
mネオゲニンスプライス＃2	S－GGC GAA GGC ATC CCC CTT TAT［配列番号：13］ AS－GGG AGT TGT CTG CCC AGG TAA［配列番号：14］	140 & 190	E14.5 全胚	
mネオゲニンスプライス＃4	S－AGG GCA TGA GTC AGA GGA CAG［配列番号：15］ AS－AGT CTT CCT CTT GGG AGC TGG［配列番号：16］	225 & 380	E14.5 全胚	
mTrkA	S－TGC GCT GGT TGT TCA ACG GC［配列番号：17］ AS－CCC ACT TGA GAA TGA TGT CC［配列番号：18］			-
mTrkB	S－ACA CAC AGG GCT CCT TAA GG［配列番号：19］ AS－CAT AGA CCG AGA GAT GCT CC［配列番号：20］			-
mTrkC	S－TGC CAT CAA CTT GAC CCT CG［配列番号：21］ AS－AGC AAG TCC GAC TGC TAT GG［配列番号：22］			-

【表５－１】

標的ＤＮＡ	プライマー配列（５’→３’）	産物のおよその大きさ(bp)	＋ｖｅ対照	参照番号
mp75	S－GTG CAC CGA GTG CCT GGG CC [配列番号：23] AS－CAC AGC AGC CAA GAT GGA GC [配列番号：24]	530	指数 p75 プラスミド cDNA	-
mLIFRβ	S－GCT GTC ATT GTT GGC GTG G [配列番号：25] AS－TTC ATT TCC AAT GTT TTA AGA GC [配列番号：26]	160	E11.5 全胚	934 及び 935
mgp130	S－GCC CTT GGG AAT GTC TCC TCA GAG [配列番号：27] AS－TCT TCC ATA TGA GCC GTG CAG ACC [配列番号：28]	450	E11.5 全胚	933 及び 935
mNR6	S－GGA TCG GGA GCC CAC ACA GC [配列番号：29] AS－AGC GGC ACG TGA GAT CCT TC [配列番号：30]	360		-
mNotch1	S－TTA CAG CCA CCA TCA CAG CCA CAC C [配列番号：31] AS－ATG CCC TCG GAC CAA TCA GA [配列番号：32]	380	E11.5 全胚	928
mNotch2	S－GAG GCG ACT CTT CTG CTG TTG AAG A [配列番号：33] AS－ATA GAG TCA CTG AGC TCT CGG ACA G [配列番号：34]	475	E11.5 全胚	928
mNotch3	S－ACA CTG GGA GTT CTC TGT [配列番号：35] AS－GTC TGC TGG CAT GGG ATA [配列番号：36]	470	E11.5 全胚	928
mζ1	S－TGT GAC GAG GAC TAC TAC GGA GAA G [配列番号：37] AS－AGT AGT TCA GGT CTT GGT TGC AGA A [配列番号：38]	330	E11.5 全胚	928
mSOCS1	S－CTC GAG TAG GAT GGT AGC ACG CAA [配列番号：39] AS－CAT CTT CAC GCT GAG CGC GAA GAA [配列番号：40]	350	E9.5 全胚	931
mSOCS2	S－GGA ATG GAG CGG ACA GGA CG [配列番号：41] AS－GTA CTC AAT CCG CAG GTT AGT C [配列番号：42]	270	E14.5 全胚	-
mSOCS3	S－ACC AGC GCC ACT TCT TCA CG [配列番号：43] AS－GTG GAG CAT CAT ACT GAT CC [配列番号：44]	450	E14.5 全胚	-
mPax6	S－AAG TCC AGG TGC TGG ACA ATG [配列番号：45] AS－GCT GTG GGA TTG GCT GGT AG [配列番号：46]	790	E11.5 全胚	
hPax6	S－CTC CAC CCG GCA GAA GAT TGT AGA [配列番号：47] AS－CCG GTG TGG TGG GTT GTG GA [配列番号：48]			

【０１３２】

【表５－２】

標的ＤＮＡ	プライマー配列（５’→３’）	産物のおよその大きさ(bp)	＋ｖｅ対照	参照番号
mTbr1	S－CTG ACT CCA AGG ACT CAC CAG [配列番号：49] AS－TCC AGT GAG CCC CAG TGT TG [配列番号：50]	690	E11.5 全胚	
hTbr1	S－CCC GCC TGC ATG TGG TGG AAG T [配列番号：51] AS－GGG CGG CCT AGC TGT GCG AGT A [配列番号：52]			
mSvet1	S－CCC TCT GGC GGT ATA GGG AA [配列番号：53] AS－GGC CTC TTC CTC TCA TAC CTG [配列番号：54]	860		
mNkx2.1	S－GAC GTG AGC AAG AAC ATG GC [配列番号：55] AS－GCT GGA GAC CTG GCC CTG C [配列番号：56]			
mDlx1	S－AAG AAC ACC TGG CCA AGA AGA AAA AT [配列番号：57] AS－CCC CCA AGA TAC AAA GCA ATA AG [配列番号：58]	450	E9.5 全胚	
mDlx2	S－AAC ACT CCC GTA GCT CCT TCA TCC A [配列番号：59] AS－CTA CGT CGC AGC TTT CAC AAC TCG [配列番号：60]	320	E9.5 全胚	
mSox1	S－GCC GCG CCG CAA GAC CAA GAC [配列番号：61] AS－CGC CGT AAG GGA TGC CGC CGT AGC [配列番号：62]	480		
mSox2	S－CGG GGG CAG CGG CGT AAG AT [配列番号：63] AS－GGG TGC CCT GCT GCG AGT AG [配列番号：64]	540	E9.5 全胚	
mEmx1	S－AAT CAC TAC GTG GTG GGA GC [配列番号：65] AS－CCC TTC CTC TTC CAG CTT CT [配列番号：66]	130		929
hEmx1	S－CGT GTT CCC CGA GGC CAT GAA CCA [配列番号：67] AS－GAT GTC CTC CCC ATT GGC CTG CTT [配列番号：68]			
mEmx2 #1	S－CCG AGA GTT TCC TTT TGC ACA ACG C [配列番号：69] AS－GCC TGC TTG GTA GCA ATT CTC CAC C [配列番号：70]	310		-
mEmx2 #2	S－CCC AGC TTT TAA GGC TAG AG [配列番号：71] AS－CTC CGG TTC TGA AAC CAT AC [配列番号：72]	130		929
hEmx2	S－CGC CCA CCC CCT ACC CTC CTC [配列番号：73] AS－ACC CTG TGC CCT CGC TGT CCA [配列番号：74]			

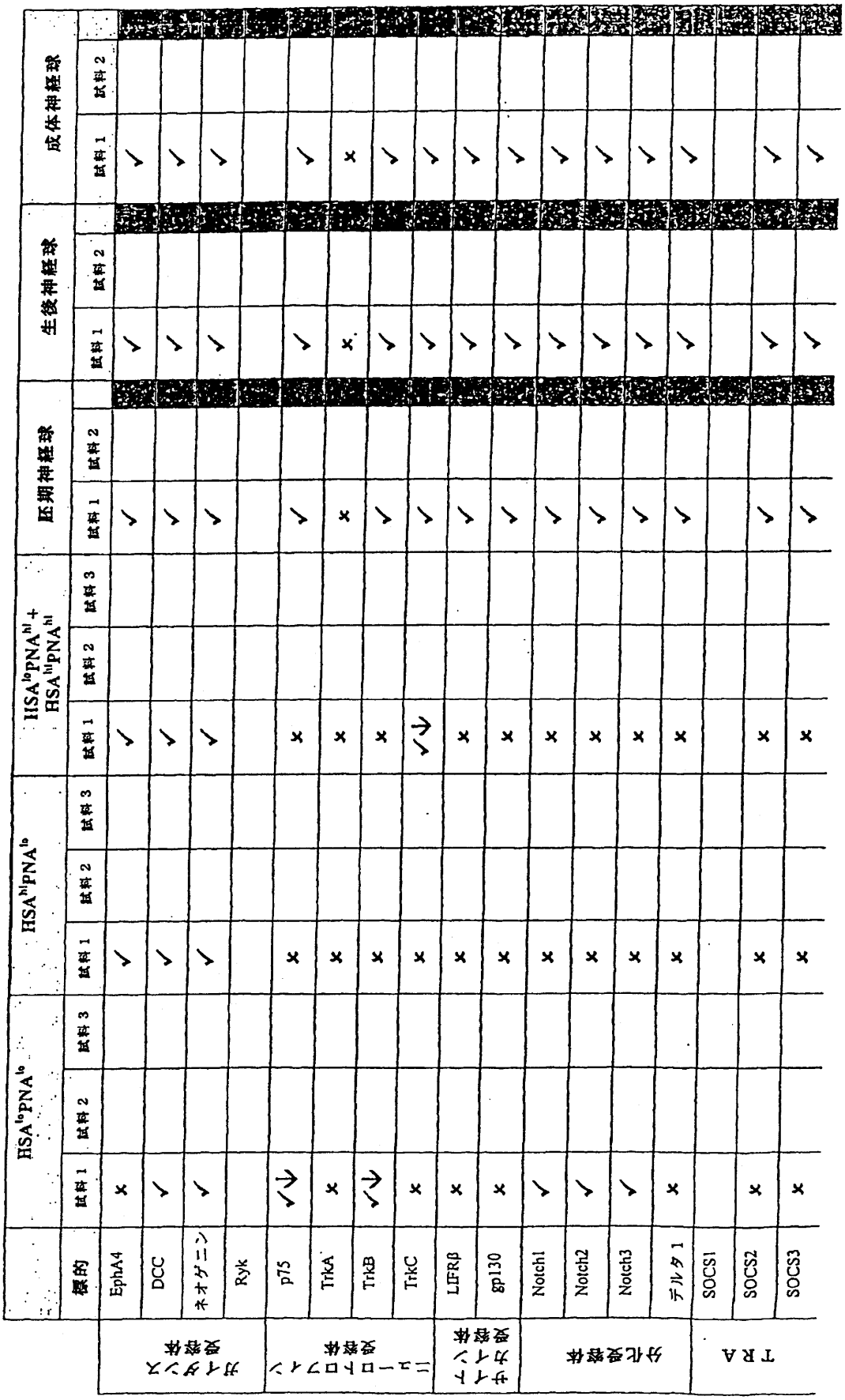
【０１３３】

【表５－３】

標的ＤＮＡ	プライマー配列（５’→３’）	産物のおよその大きさ (bp)	＋ｖｅ対照	参照番号
hEmx2	S－CGC CCA CCC CCT ACC CTC CTC [配列番号：73] AS－ACC CTG TGC CCT CGC TGT CCA [配列番号：74]			
SCL	S－TAT GAG ATG GAG ATT TCT GAT G [配列番号：75] AS－GCT CCT CTG TGT AAC TGT CC [配列番号：76]			
mBcrp1	S－CCA TAG CCA CAG GCC AAA GT [配列番号：77] AS－GGG CCA CAT GAT TCT TCC AC [配列番号：78]	330		930
CD34	S－GGG TAT CTG CCT GGA ACT AA [配列番号：79] AS－TTG CCA CCC AAC CAA ATC A [配列番号：80]			937
CD45	S－ACC ATG GGT TTG TGG CTC AA [配列番号：81] AS－GTA ATG TTC CCA AAC ATG GC [配列番号：82]			938
Sca-1	S－ACT GTG CCT GCA ACC TTG TCT GAG A [配列番号：83] AS－GTC CAG GTG CTG CCT CCA TT [配列番号：84]			932
c-Kit	S－GAA AGA CCA CAG CTT AAG ACT ACG GTC ACG [配列番号：85] AS－ATG GAA TTC CTT ATG ATC ACA AAT GG [配列番号：86]			939

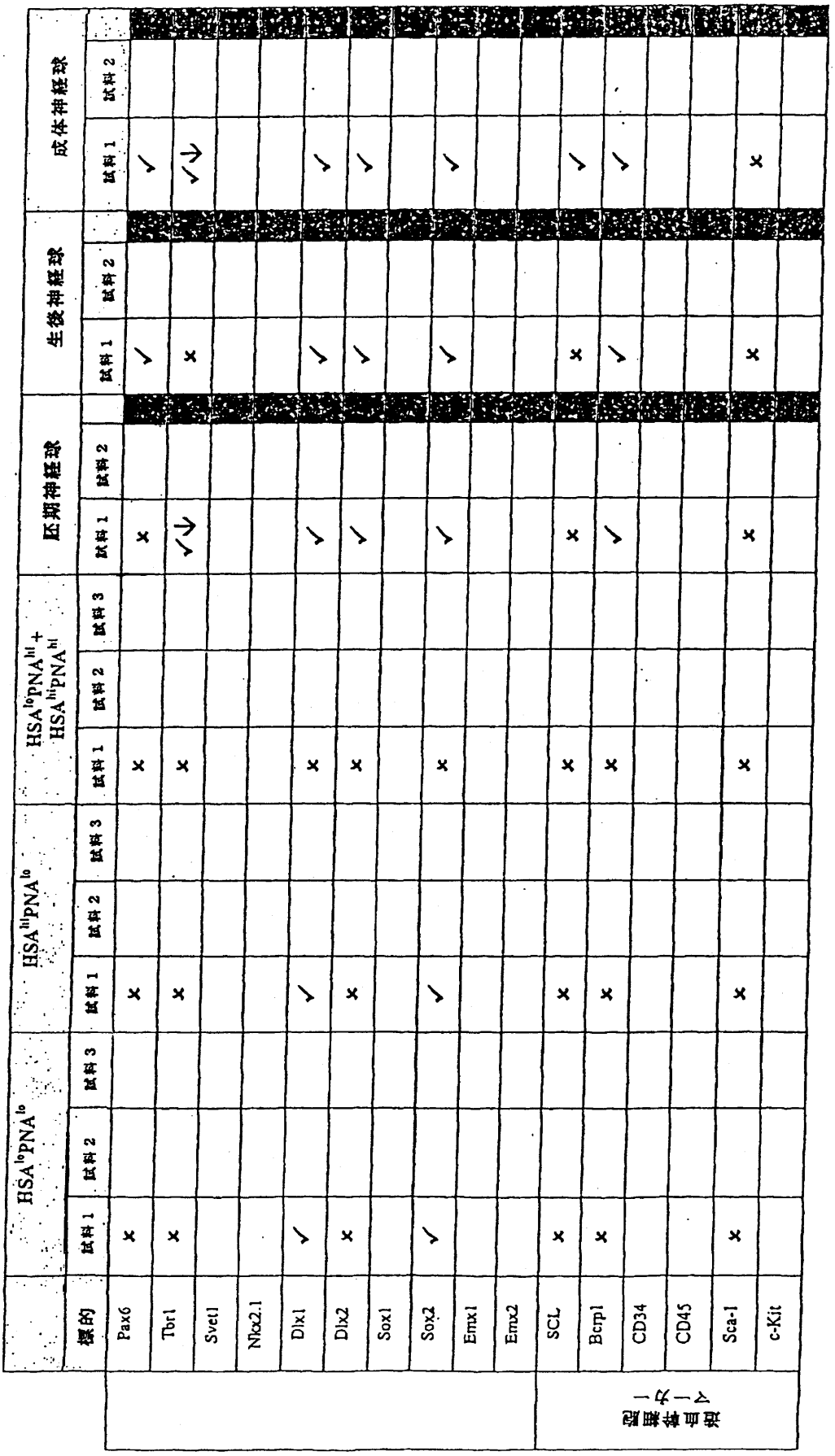
【０１３４】

【表６】



【０１３５】

【表６－１】

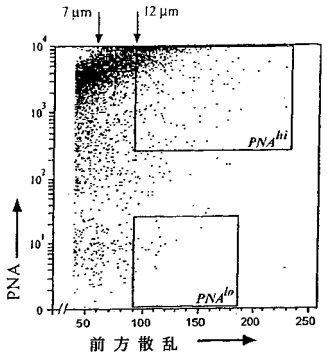


【０１３６】

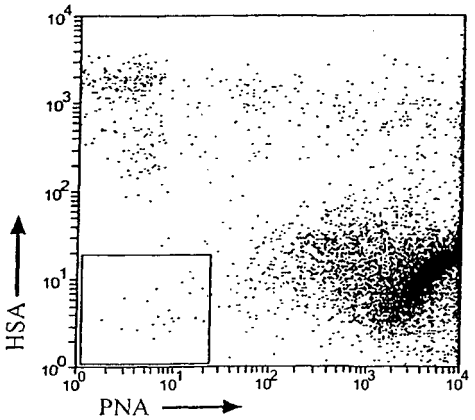
当業者らは、本明細書に記載された発明が特に記載されたもの以外のものに変形及び改

良が可能であることを認めるであろう。本発明はそのような全ての変形及び改良を含むことを理解されるべきである。本発明はまた、本明細書で個々に又は集合的に言及し又は示した全ての工程、特性、組成物及び化合物、そして該工程又は特性のいずれか二つ以上の組み合わせのいずれか及び全てを含む。

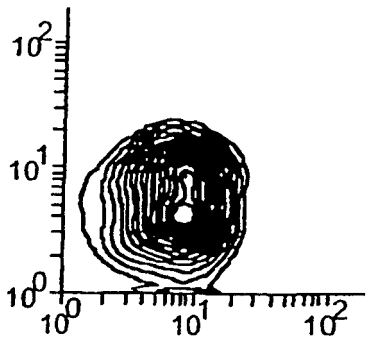
【図１Ａ】



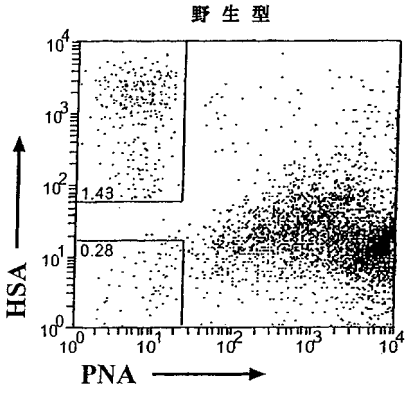
【図１Ｂ】



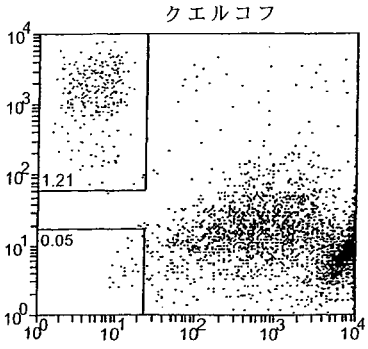
【図１Ｃ】



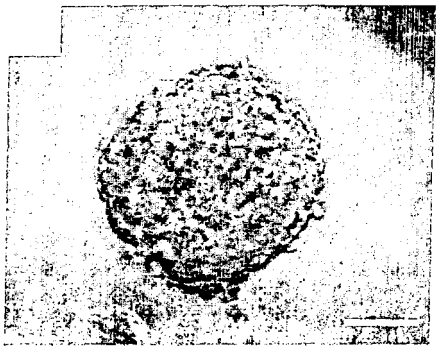
【図２Ａ】



【図２Ｂ】



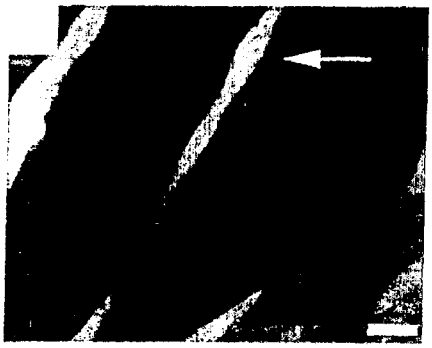
【図３Ａ】



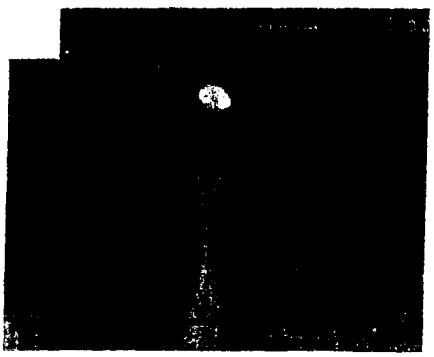
【図３Ｂ】

【図３Ｃ】

【図３Ｄ】

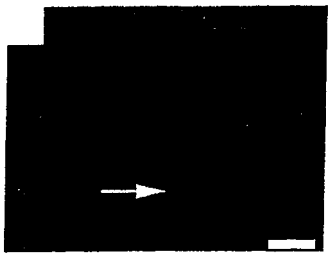


【図３Ｅ】



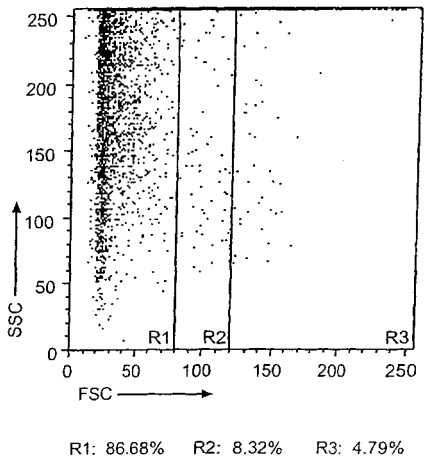
【図３Ｆ】

【図３Ｇ】

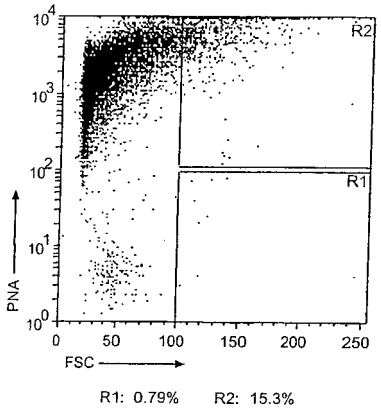


【図３Ｈ】

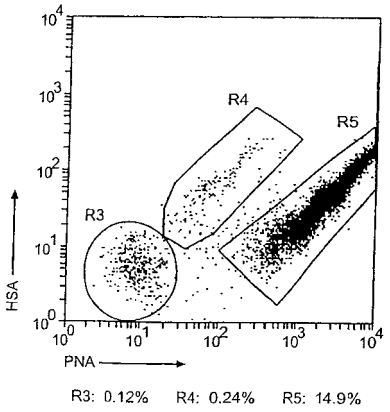
【図４】



【図５Ａ】



【図５Ｂ】



【配列表】

2012120545000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成24年3月29日(2012.3.29)

【手続補正１】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項１】

生体試料から実質的に均一な未分化細胞の集団を作成する方法であって、該生体試料又はその部分試料を組織分裂処理にかけて精製対象の未分化細胞を含む混合集団を得る工程、該細胞の混合集団をサイズ識別処理にかけて実質的に全ての細胞がある特定範囲の大きさである細胞の集団を作成する工程、このサイズ識別工程と同時に又は逐次的に該集団を細胞表面マーカー識別処理にかけて実質的に均一な未分化細胞の集団を作成する工程を含む方法。

フロントページの続き

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(72)発明者 バートレット，ペリ，フランシス
オーストラリア国，ビクトリア ３０５４，ノース カールトン，ドラモンド ストリート ７５０
(72)発明者 リーツェ，ロンドネー，リー
オーストラリア国，ビクトリア ３０５６，ブランズウィック，ローラ ストリート ２５

Ｆターム(参考) 4B065 AA91X AC12 BA25 CA44