

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7205928号

(P7205928)

(45)発行日 令和5年1月17日(2023.1.17)

(24)登録日 令和5年1月6日(2023.1.6)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/0797(2010.01)

C 1 2 N 5/0797

請求項の数 3 (全12頁)

(21)出願番号	特願2020-549677(P2020-549677)	(73)特許権者	519229677
(86)(22)出願日	平成31年1月30日(2019.1.30)		メディノ インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2021-518118(P2021-518118 A)		M E D I N N O I N C .
(43)公表日	令和3年8月2日(2021.8.2)		大韓民国 キョンギ - ド 1 6 4 1 9 ス
(86)国際出願番号	PCT/KR2019/001288		ウォン - シ チャンアン - グ ソプ - ロ、
(87)国際公開番号	WO2019/177270		2 0 6 6、カレッジ オブ メディスン
(87)国際公開日	令和1年9月19日(2019.9.19)		ソンギュングァン ユニバーシティー、
審査請求日	令和2年11月12日(2020.11.12)	(74)代理人	3 1 0 7 - ホ
(31)優先権主張番号	10-2018-0031101		110000729
(32)優先日	平成30年3月16日(2018.3.16)	(72)発明者	弁理士法人ユニアス国際特許事務所
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		ジュ、ギョン ミン
(31)優先権主張番号	10-2019-0011226		大韓民国 0 8 0 0 0 ソウル、ヤンチョ
(32)優先日	平成31年1月29日(2019.1.29)	(72)発明者	ン - グ、モクトンドン - ロ、2 5 0、2
最終頁に続く			0 1 - 4 1 0
			ナム、ヒョン
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 神経幹細胞の高効率分離培養方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脳組織を酵素溶液に入れて酵素処理する段階と、
酵素処理された脳組織から物理的に細胞クランプ (c l u m p) を分離する段階と、
前記細胞クランプをサイズに応じて分離し、不純物を除去する段階と、
前記細胞クランプを培養皿に接種して継代培養する段階と、
を含み、
前記細胞クランプは、70 ~ 100 μ mのサイズを有するものである、
神経幹細胞の高効率分離培養方法。

【請求項 2】

前記酵素溶液は、パパイン (p a p a i n) と、DNase I と、システイン (c y s t e i n e) と、を含む、請求項 1 に記載の神経幹細胞の高効率分離培養方法。

【請求項 3】

前記脳組織は、成人の脳組織である、請求項 1 に記載の神経幹細胞の高効率分離培養方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経幹細胞を分離培養する方法を単純化して分離培養時間を短縮し、神経幹細胞の獲得歩留まりを増大させることができる神経幹細胞の高効率分離培養方法に関する。

10

20

【背景技術】

【0002】

21世紀の生命工学は、人間の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、近年、幹細胞の利用技術は、難病治療の新たな場として浮上している。以前までは人間の難病治療のために臓器移植や遺伝子治療などが提示されたが、免疫拒否と供給臓器の不足、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遅れていた。

【0003】

これにより、幹細胞研究に対する関心が高まり、増殖と分化を通じて全ての器官を形成する能力を持つ全能性幹細胞が、殆どの疾病治療はもちろん、臓器の毀損を根本的に解決できるものと認識されてきた。幹細胞 (stem cell) とは、自己複製能力を持ちながら、2つ以上の細胞に分化する能力を持つ細胞をいい、全能性幹細胞 (totipotent stem cell)、全分化能性幹細胞 (pluripotent stem cell)、多分化能性幹細胞 (multipotent stem cell) に分類できる。多くの科学者が、人体のほぼ全ての臓器の再生はもちろん、難病だったパーキンソン病、各種のがん、糖尿病や脊髄損傷などの治療に至るまで、多様に幹細胞の適用可能性を提示してきた。

10

【0004】

神経幹細胞は、神経細胞 (neuron)、星状膠細胞 (astrocyte)、希突起膠細胞 (oligodendrocyte) に分化可能な幹細胞であって、げっ歯類であるマウスで初めて発見された。その後、ヒトの脳にも神経幹細胞が存在し、一生の間、脳細胞の再生に関与すると知られている。したがって、近年、退行性神経系疾患の治療のため、神経幹細胞を活用した治療剤の開発が注目されている。

20

【0005】

ヒト由来の神経幹細胞の研究の初期には、胎児の脳から神経幹細胞を分離培養した。このような研究に基づいて、近年、脳卒中や脊髄損傷の治療のための臨床研究が進められてきた。また、胚性幹細胞から神経幹細胞を分離培養する研究が進められてきた。胚性幹細胞は、自然に外胚葉に分化すると知られており、神経幹細胞に分化する方法が明らかになった。近年、逆分化幹細胞から神経幹細胞に分化する方法が研究され、自己移植が可能な神経幹細胞の培養への期待が高まっている。

30

【0006】

しかし、胎児や胚性幹細胞から由来した神経幹細胞は、倫理的な問題点と腫瘍原性の安全性に対する懸念があった。また、逆分化幹細胞から由来した神経幹細胞も腫瘍原性の安全性に対する問題点を有しているため、このような幹細胞の臨床適用のためには、生物学的安全性に対する検証と根本的な解決策が必要なのが実情であった。

【0007】

従来の研究では、神経幹細胞分離培養に対して脳組織から単一細胞に分離培養する方法が一般的に使用されてきた。

【0008】

しかし、パーコール (Percoll) を使用する単一細胞分離段階を経る神経幹細胞分離培養方法は、時間がかかりすぎ、神経幹細胞の獲得歩留まりに問題があった。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、神経幹細胞を分離培養する方法を単純化して分離培養時間を短縮し、神経幹細胞の獲得歩留まりを増大させることができる神経幹細胞の高効率分離培養方法を提供するものである。

【0010】

しかし、本発明が解決しようとする技術的課題は、以上で言及した課題に制限されず、言及されていないもう一つの課題は、下記の記載から当該技術分野の通常の知識を有する

50

者に明確に理解されるであろう。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明の一側面によると、脳組織を酵素溶液に入れて酵素処理する段階と、酵素処理された脳組織から物理的に細胞クランプ (c l u m p) を分離する段階と、前記細胞クランプをサイズに応じて分離し、不純物を除去する段階と、前記細胞クランプを培養皿に接種して継代培養する段階と、を含む神経幹細胞の高効率分離培養方法が提供される。

【0012】

そして、前記酵素溶液は、パパイン (p a p a i n) ; D N a s e I ; 及び D、L - システイン (c y s t e i n e) を含んでもよい。

10

【0013】

また、前記細胞クランプは、40 ~ 70 μ m サイズ、または70 超過 ~ 100 μ m 以下のサイズであってもよい。

【0014】

そして、前記脳組織は、成人の脳組織であってもよく、前記神経幹細胞の分離培養方法は、パーコール (p e r c o l l) を用いた単一細胞分離段階を含んでいなくてもよい。

【発明の効果】

【0015】

本発明による神経幹細胞の高効率分離培養方法は、神経幹細胞を分離培養する方法を単純化して分離培養時間を短縮し、神経幹細胞の獲得歩留まりを増大させることができる。また、分離培養時間の短縮により細胞の生存率を高めることができ、短時間に多くの細胞数を獲得して神経幹細胞の培養成功率を高めることができるという長所がある。

20

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、パーコールを使用する神経幹細胞の従来の分離培養方法と、本発明による分離培養方法であるクランプ培養 (C l u m p c u l t u r e) に対する模式図である。

【図2a】図2aは、従来の分離培養方法 (P e r c o l l) と本発明の一側面による分離培養方法 (C l u m p c u l t u r e) による脳組織の重量 (g) あたり細胞の収得率を比較したグラフである。

30

【図2b】図2bは、従来の分離培養方法 (P e r c o l l) と、本発明の一側面による分離培養方法 (C l u m p) によって獲得した神経幹細胞の継代培養による細胞の成長を確認した結果を示したグラフである。

【図3a】図3aは、従来の分離培養方法 (P e r c o l l) と、本発明の一側面による分離培養方法 (C l u m p c u l t u r e) によって分離培養された神経幹細胞の形態を示したものである。

【図3b】図3bは、従来の分離培養方法 (P e r c o l l) と、本発明の一側面による分離培養方法 (C l u m p) によって分離培養された神経幹細胞の分化条件における分化様相を示したものである。

【図4a】図4aは、クランプ培養方法において、クランプの最適なサイズの条件を探すためのクランプの分離方法を簡略に示したものである。

40

【図4b】図4bは、4つのタイプのクランプ (クランプ I ~ I V) の形状を顕微鏡で観察したものである。

【図5a - 5b】図5a 及び 5b は、2名の患者 (N S 1 8 - 0 0 7 T L、N S 1 8 - 0 0 8 T L) から由来したクランプタイプ I ~ I V を培養した後、3日及び6日後に培養皿の底で観察されるコロニーの数字を測定した結果である。

【図5c】図5cは、クランプタイプ I ~ I V を培養後、3日及び6日目に培養皿で観察されるコロニーの形状を確認した結果である。

【図6a】図6aは、クランプタイプ I I を使用して培養された細胞の成長曲線を、従来のパーコール (P e r c o l l) を用いた単一細胞培養の成長曲線と比較したグラフであ

50

る。

【図 6 b】図 6 b は、クランプタイプ I I を用いた継代培養で細胞の形態を観察したものである。

【図 6 c】図 6 c は、クランプタイプ I I を用いて培養した神経幹細胞が神経分化能力を維持しているかを確認するため、分化後に免疫蛍光染色を行った結果である。

【図 7 a】図 7 a は、クランプタイプ I I 神経幹細胞の新生血管形成能力について実験した結果である。

【図 7 b】図 7 b は、移植された神経幹細胞の位置を確認するため、 α -SMA 及び CD31 を免疫蛍光染色によって観察した結果である。

【発明を行うための最良の形態】

10

【0017】

本発明は、神経幹細胞を分離培養する方法を単純化して分離培養時間を短縮し、神経幹細胞の獲得歩留まりを増大させることができる神経幹細胞の高効率分離培養方法を提供することを目的としたものである。

【0018】

本発明の一実施例では、本発明の方法 (Clump culture) によって神経幹細胞を培養した結果、従来のパーコールを用いた場合よりも同一脳組織重量あたり、より多くの神経幹細胞を獲得することができることを確認した (実施例 1 参照)。

【0019】

本発明の他の実施例では、本発明の方法 (Clump culture) によって培養された神経幹細胞の場合も神経分化能力が維持されることを確認した (実施例 3 参照)。

20

【0020】

本発明のさらに他の実施例では、クランプのサイズに応じて分離して培養した結果、クランプタイプ I I (70 μ m ~ 100 μ m) の場合、最も優れた効率を示すことを確認した (実施例 4 及び 5 参照)。

【0021】

本発明のさらに他の実施例では、本発明の方法 (Clump culture) によってクランプタイプ I I の培養時、最初の継代培養まで所要する時間が短縮され、細胞の形態も正常的であり、神経分化能もやはり正常的で、幹細胞の特性をよく維持することを確認した (実施例 6 参照)。

30

【0022】

本発明のさらに他の実施例では、クランプタイプ I I に由来する神経幹細胞が新生血管形成能力があることを確認した (実施例 7 参照)。

【0023】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0024】

本発明は、脳組織を酵素溶液に入れて酵素処理する段階と、酵素処理された脳組織から物理的に細胞クランプ (clump) を分離する段階と、前記細胞クランプをサイズに応じて分離し、不純物を除去する段階と、前記細胞クランプを培養皿に接種して継代培養する段階と、を含む神経幹細胞の高効率分離培養方法を提供する。

40

【0025】

従来のパーコールを使用する単一細胞の分離段階を経る神経幹細胞の分離培養方法は、時間がかかりすぎ、神経幹細胞の獲得歩留まりに問題点があった。そこで、本発明者らは、パーコールを使用して、単一細胞を分離する段階を含めず、クランプに分離する段階を導入する場合、分離培養時間を短縮し、神経幹細胞の獲得歩留まりを増大させることができるという点を実験を通じて確認して発明を完成した。

【0026】

本発明の一側面によると、脳組織を酵素溶液に入れて酵素処理する段階と、酵素処理された脳組織から物理的に細胞クランプ (clump) を分離する段階と、前記細胞クランプをサイズに応じて分離し、不純物を除去する段階と、前記細胞クランプを培養皿に接種

50

して継代培養する段階と、を含む神経幹細胞の高効率分離培養方法が提供される。

【0027】

前記酵素溶液は、特に制限されるものではないが、パパイン (papain) と、DNase I と、D, L - シス테인 (cysteine) と、を含んでもよい。

【0028】

また、前記細胞クランプは、脳組織から分離された後、メッシュを用いてサイズ別に分離する段階をさらに経ることができる。細胞クランプは、40 ~ 70 μm サイズ、または70 超過 ~ 100 μm 以下のサイズであってもよい。

【0029】

そして、前記脳組織は、好ましくは、成人の脳組織であってもよい。

10

【0030】

一方、上述したように、本発明による神経幹細胞の分離培養方法は、パーコール (percoll) を用いた単一細胞の分離段階を含んでいないことを特徴とする。本発明による神経幹細胞の高効率分離培養方法は、パーコールを用いた単一細胞分離段階を省略して神経幹細胞を分離培養する方法を単純化して分離培養時間を短縮し、神経幹細胞の獲得歩留まりを増大させることができ、分離培養時間の短縮により細胞の生存率を高めることができ、短時間で多くの細胞数を獲得して神経幹細胞の培養の成功率を高めることができるという長所がある。

【0031】

以下、本発明の理解を助けるために好ましい実施例を提示する。しかし、下記の実施例は、本発明をより容易に理解するために提供されるものであり、下記の実施例により、本発明の内容が限定されるものではない。

20

【発明を実施するための形態】

【0032】

[実施例]

【0033】

実施例 1 . 神経幹細胞の一次培養

ヒトの脳組織の重量を測定した後、2 ~ 3 回 PBS を使用してウォッシングを行った。組織を適切なサイズに切り取った後、エンザイム溶液 (10 units / ml of papain, 0.1 mg / ml of DNase I, 4 mg / ml of D, L - cysteine) に入れた後、ブレードと手術用はさみを使用して、物理的に小片に切り取った。37 で30 分間処理後、使い捨てピペット (disposable pipette) を使用して組織を細かく破碎した後、70 μm メッシュを使用してろ過した後、PBS (Phosphate Buffered Saline) を使用してウォッシングを行った。

30

【0034】

パーコールを使用する場合、10 倍の濃縮 PBS とパーコールを1 : 9 の割合で混合してパーコール溶液を準備し、20 mL の細胞懸濁液と10 mL のパーコールを混合した後、20,000 rpm で18 で遠心分離し、細胞層から細胞を分離した後、再び PBS を使用して2 回ウォッシングを行った後、poly - L - Ornithine (PLO) をコーティングしたディッシュで培養した。

40

【0035】

70 ~ 80 % コンフルエンス (confluency) に達すると、Accutase を使用して細胞を剥がした後、継代培養を行った。トリパンブルー (Trypan blue) 溶液を使用して細胞の数と生存率を計算し、Population doubling length (PDL) を測定して細胞成長曲線を描いており、分離培養された神経幹細胞の形態を顕微鏡で観察した。

【0036】

その結果、図 2 a に示すように、本発明による分離培養方法 (Clump culture) の場合、パーコールを用いた方法よりも同一の脳組織重量あたり、より多くの神経

50

幹細胞を獲得できることを確認し、図 2 b に示すように、本発明による分離培養方法 (Clump culture) を用いた場合、パーコールを用いた従来の方法よりも細胞の成長効果が全般的に優れていることを確認した。

【0037】

また、図 3 a に示すように培養された細胞を観察した結果、本発明による分離培養方法 (Clump culture) を使用した場合にも、パーコールを用いた従来の方法を用いた場合と細胞の形態が類似していることを確認した。

【0038】

実施例 2 . 神経分化条件における分化誘導

神経幹細胞を 70 ~ 80 % 程度のコンフルエンスで培養した後、PBS で 2 回ウォッシングした。神経分化条件である DMEM / F12、0.5 % FBS、B27、0.5 mM IBMX、P / S を処理した後、48 時間後に細胞を固定した後、免疫染色を行った。

【0039】

実施例 3 . 免疫染色

神経幹細胞は、PLO がコーティングされた 8 well chamber slide (thermo) に培養した後、4 % パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde) に 5 分間固定させた。0.1 % Triton - X100 が希釈されている PBS (0.1 % PBST) で水洗した後、ブロッキング (blocking) 溶液 (5 % normal goat serum、5 % normal donkey serum) で 1 時間程度処理した後、1 次抗体を処理して一晩の間 (overnight) 反応させ、翌日、PBS で 2 回ウォッシング後、Alexa488 または Alexa594 が結合された 2 次抗体を 1 時間の間処理した。DAPI でカウンターステイニング (counter staining) を行った後、マウンティング後に蛍光顕微鏡で観察した。

【0040】

その結果、図 3 b に示すように、神経幹細胞の分化後には、Nestin の発現が減少し、神経細胞 (Tuj1、MAP2)、星状膠細胞 (GFAP) の発現が増加することが確認できた。

【0041】

実施例 4 . クランプのサイズ別分離及び形態を観察

クランプ培養方法の最適条件を探すために、ヒトの脳組織にエンザイム溶液を処理し、物理的に細かく分割した後、様々なサイズのメッシュ (mesh) にかけてサイズ別にクランプを獲得した (図 4 a 参照)。クランプをサイズ別に下記のようにタイプ I ~ タイプ IV を決めて、その形態を顕微鏡で観察した。

【0042】

クランプタイプ I > 100 μ m
70 μ m < クランプタイプ II < 100 μ m
40 μ m < クランプタイプ III < 70 μ m
クランプタイプ IV < 40 μ m

【0043】

その結果、図 4 b に示すように、各タイプに合わせて均一なサイズのクランプに分離されたことが確認できた。

【0044】

実施例 5 . クランプタイプ I ~ IV の分離培養時の効果比較

クランプのサイズ別分離培養効果を比較するため、前記実施例 1 の方法によって 2 名の患者から由来したクランプタイプ I ~ IV を培養してコロニーの数字を確認し、顕微鏡でコロニーの形状などを観察した。

【0045】

その結果、図 5 a 及び図 5 b に示すように、分離培養 3 日及び 6 日目に全てクランプタイプ II で最も多くのコロニーを観察し、クランプタイプ II が最も培養効率が優れていることを確認した。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 6 】

実施例 6 . クランブタイプ I I の継代培養及び神経分化能力を確認

本発明による方法でクランブタイプ I I を培養した場合とパーコールを用いた単一細胞培養時の効果を比較するため、前記実施例 1 の方法によって細胞を培養し、培養成長曲線を作成し、クランブタイプ I I の継代培養による細胞の形態を顕微鏡で観察した。

【 0 0 4 7 】

また、クランブタイプ I I の方法で培養された神経幹細胞が神経分化能力を維持しているかを確認するため、神経分化後、前記実施例 3 の方法によって免疫蛍光染色法を用いた。

【 0 0 4 8 】

その結果、図 6 a に示すように、クランブタイプ I I を培養する場合、初めて継代培養まで所要する時間が短縮され、 10^9 個の細胞まで到達する時間もやはり短縮され、図 6 b に示すように、クランブタイプ I I の継代培養時に細胞の形状がよく維持されることが確認できた。

【 0 0 4 9 】

また、免疫蛍光染色の結果、図 6 c に示すように、神経に分化される前には未分化マーカーである Nestin が強く発現するが、分化後には殆ど観察されず、神経細胞のマーカーである Tuj 1 と Map 2 の発現も分化前には観察されなかったが、分化後には観察され、星状膠細胞マーカーである GFAP も分化前には殆ど観察されなかったが、分化後には観察された。

【 0 0 5 0 】

前記結果は、クランブタイプ I I で培養された神経幹細胞は、幹細胞の特性をよく維持することを意味する。

【 0 0 5 1 】

実施例 7 . クランブタイプ I I に由来する神経幹細胞の新生血管形成能力を確認

臍帯由来の血管内皮細胞は、Promocell から購入し、供給者の専用培地を使用した。 $200\mu\text{L}$ の Phenol red - free Matrigel (BD) に 1×10^6 血管内皮細胞と 1×10^6 神経幹細胞を混ぜた後、4 - 6 週齢の Balb c - nu マウスの皮下に移植した。3 - 4 日後に Matrigel 除去した後、4 % PFA で 24 時間の間固定した後、ブロックを製作した。組織学的分析のためにヘマトキシリン & エオジン (H & E) 染色を行い、Matrigel 内に生成された新生血管を染色するため、血管内皮細胞と神経幹細胞を区別するために CD 3 1 と α - smooth muscle actin (α - SMA) で免疫蛍光染色を行った。

【 0 0 5 2 】

その結果、図 7 a に示すように、神経幹細胞単独では血管を殆ど形成できなかったが、血管内皮細胞と神経幹細胞をともに混ぜて移植した場合には、血管形成が確認できた。また、図 7 b に示すように、血管周辺に神経幹細胞が位置して血管形成に寄与したことを確認した。

【 0 0 5 3 】

前述の本発明の説明は、例示のためのものであり、本発明が属する技術分野の通常の知識を有する者は、本発明の技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態に容易に変形が可能であることを理解できるであろう。したがって、以上で記述した実施例は、全ての面で例示的なものであり、限定的ではないと理解しなければならない。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 5 4 】

本発明による神経幹細胞の高効率分離培養方法は、神経幹細胞を分離培養する方法を単純化して分離培養時間を短縮し、神経幹細胞の獲得歩留まりを増大させることができる。また、本発明は、分離培養時間の短縮により細胞の生存率を高めることができ、短時間に多くの細胞数を獲得して神経幹細胞の培養の成功率を高めることができるという長所があるため、神経幹細胞を使用して直接、間接的な神経再生効果を得ようとする中枢神経系疾患の治療に寄与できるものと期待される。これに加えて、本発明は、神経幹細胞から分泌

10

20

30

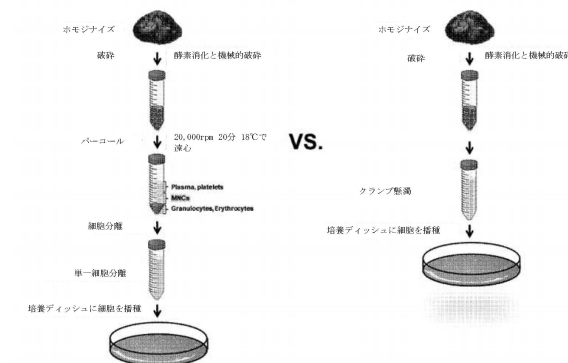
40

50

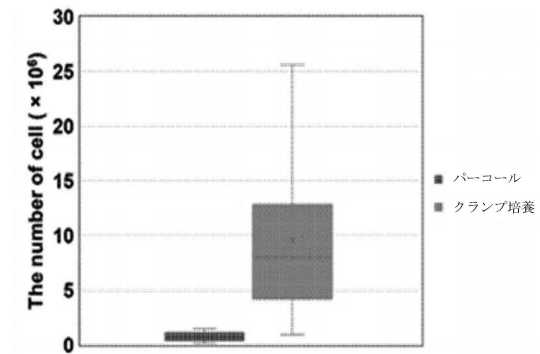
されるタンパク質または酵素による直接、間接的な神経再生関連分野（条件培地の精製、エクソソームの開発など）にも使用できるものと期待される。

【図面】

【図 1】



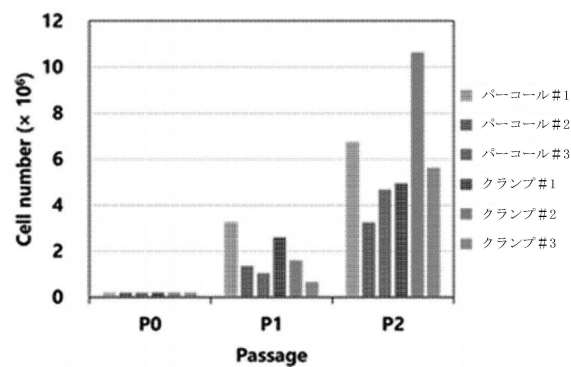
【図 2 a】



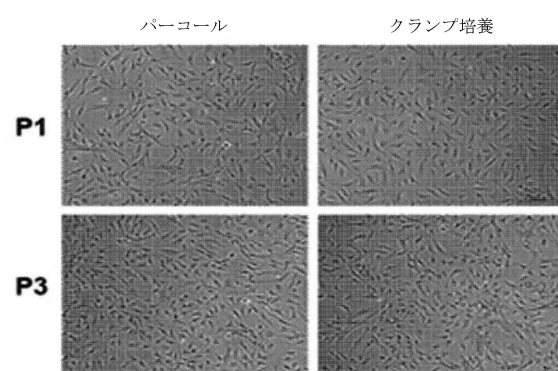
10

20

【図 2 b】



【図 3 a】

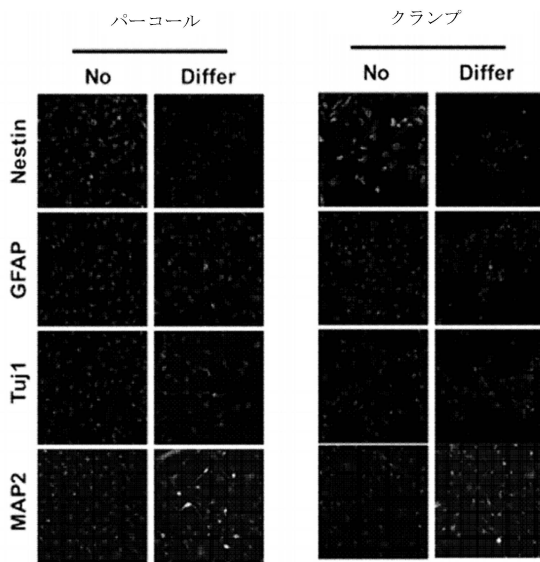


30

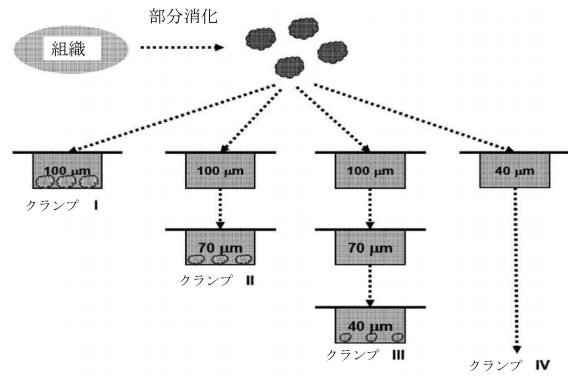
40

50

【図 3 b】



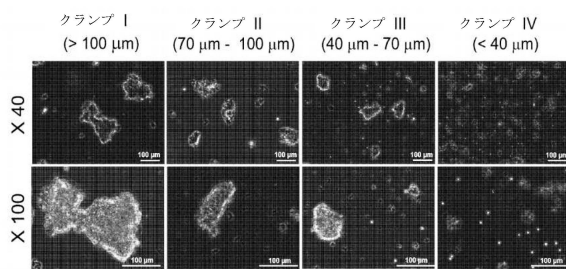
【図 4 a】



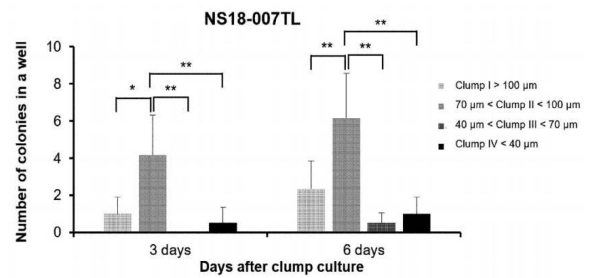
10

20

【図 4 b】



【図 5 a】

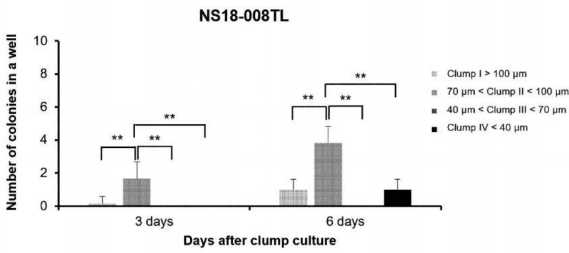


30

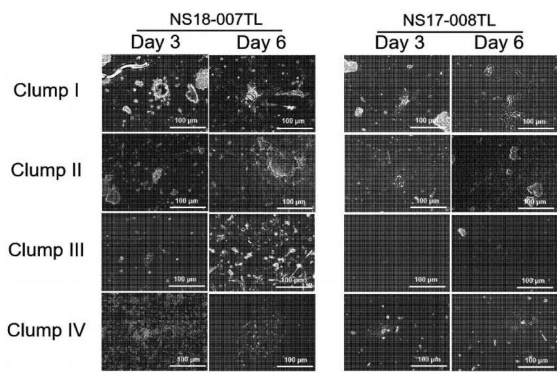
40

50

【 5 b 】



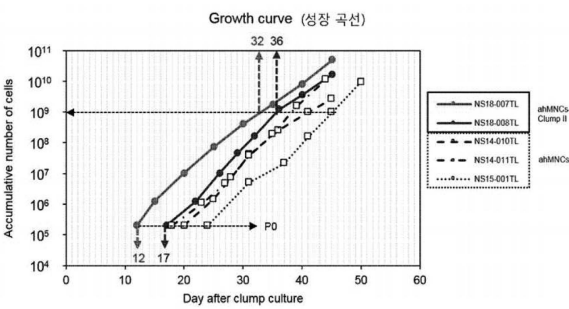
【 5 c 】



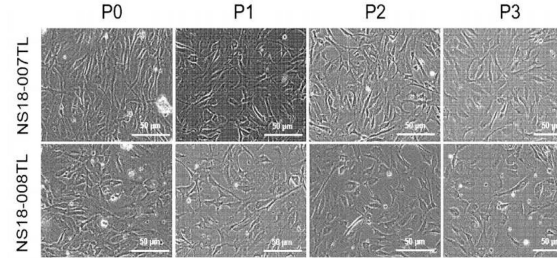
10

20

【 6 a 】



【 6 b 】

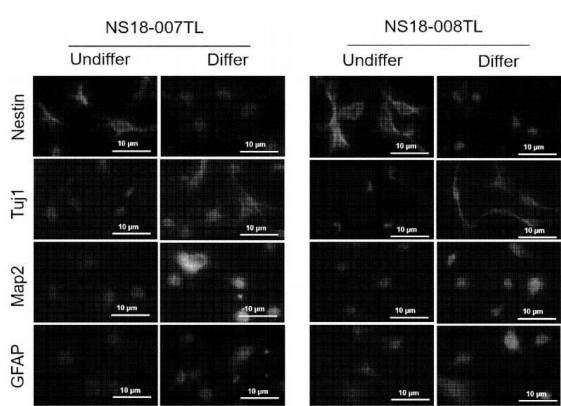


30

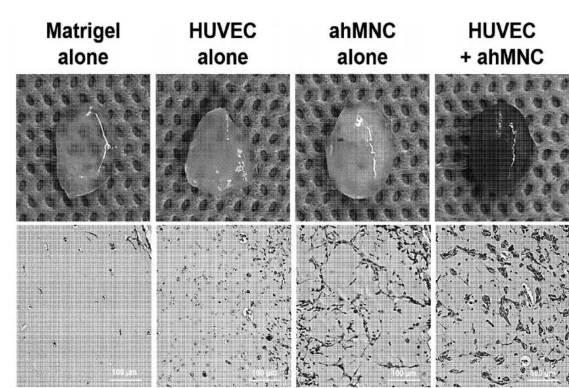
40

50

【 6 c 】



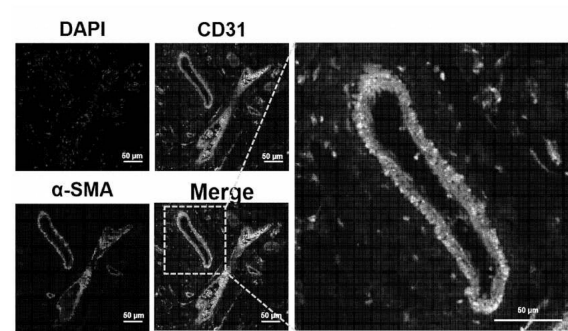
【 7 a 】



10

20

【 7 b 】



30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

韓国(KR)

大韓民国 1 0 0 7 7 キョンギ - ド、キムポ - シ、キムボハンガン 1 1 - 口、3 7、1 1 1 - 1
2 0 2

審査官 市島 洋介

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 2 9 5 3 4 8 (U S , A 1)

Exp. Anim. , 2002年 , Vol.51, No.4 , pp.383-390

Nat. Protoc. , 2011年 , Vol.6, No.12 , pp.1981-1989

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 5 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)