

明 細 書

哺乳動物体細胞用培地及びそのための添加剤

技術分野

[0001] 本発明は、哺乳動物の体細胞を体外で培養する際に用いられる培地及び該培地を構成するための添加剤に関する。

背景技術

[0002] ヒトを含む哺乳類の多分化能を有する細胞とこれらの細胞が分化した細胞とを含む体細胞は、細胞治療や再生医療に用いることができる重要な細胞である。これらの細胞を培養して増殖させることは、細胞治療用の細胞の生産性や、これらの医療の研究の進行を促進する観点から重要である。

[0003] 体細胞は、通常、10%程度の血清を添加した血清培地で増殖することが知られている。血清としては、通常、培養しようとする体細胞が由来する個体由来の血液、例えば、培養する体細胞を採取した患者の血液から得た自己由来の血清や、ウシ血清などの異種由来の血清が用いられる。

[0004] しかし、自己由来の血清を用いる場合は、患者の血液を比較的大量に用いなければならないので、患者の負担が大きいという問題がある。また、異種由来の血清を用いる場合は、未知のウイルスやプリオンなどの感染性病原体が混入している可能性があるという問題がある。

[0005] また、いずれの血清であっても、その成分が完全に解明されているわけではなく、用いる血清の起源や市販製品のロットにより含有成分が異なる可能性があるので、血清を大量に用いて培養する場合は、得られる培養細胞の品質を一定にすることが難しいという問題点もある。

[0006] よって、血清を用いないか又はその使用量をできるだけ抑えた培地で体細胞を増殖させることが望まれている。

[0007] 特表平11-506610号(特許文献1)には、最小必須培地、血清アルブミン、鉄源、インスリン及びグルタミンを含むヒト間葉系細胞用の無血清培地が開示されている。この無血清培地には、ヒト間葉系細胞の有糸核分裂促進活性を有するセロトニンを

加えてもよいことが記載されている。しかし、セロトニンを加えた無血清培地で間葉系幹細胞を培養しても、増殖が比較的遅く、また、短期間で細胞の形質が変化して増殖性が低下するという問題があった。

[0008] 特表2006-505248号(特許文献2)には、リゾリン脂質受容体、すなわち内皮細胞分化遺伝子(Edg)ファミリーレセプターのリガンド、例えばリゾホスファチジン酸(LPA)、スフィンゴシン1リン酸(S1P)などを含む、ヒト胚性幹(ES)細胞の分化を調節するための無血清培地が開示されている。LPAは、脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化を抑制する効果(J. Biol. Chem. Vol.280, 15, 14656-14662 (2005);非特許文献1)も知られている。また、LPAは細胞増殖促進効果を有することも知られている(Sci. STKE, Vol. 2005, Issue 292, pp. pe35, 12 July 2005;非特許文献2、American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. Vol. 34, pp. 274-285, 2006;非特許文献3)が、細胞増殖促進効果は血清含有培地で確認されたものであり、無血清培地又は1%以下の低血清培地での細胞増殖促進効果は知られていない。

[0009] また、WO2007/080919(特許文献3)には、ヒト骨髓由来間葉系幹細胞の無血清培地について記載されており、培養条件として、ITS添加物(インスリン、トランスフェリン、セレン含有添加物)の他に塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)、肝細胞成長因子(HGF)、トランスフォーミング成長因子(TGF- β)、血小板由来成長因子(PDGF)が必須であることが記載されているが、添加する成長因子を3種以下にすると増殖性が低下するという問題があった。

[0010] ヒトを含む哺乳類の多分化能を有する細胞の増殖には、サイトカインや成長因子が影響を与えることが知られている。例えば、血小板由来増殖因子(PDGF)、塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)、上皮細胞増殖因子(EGF)などが挙げられる(Folia Histochemica Et Cytobiologica Vol.44, No.4, pp. 215-30, 2006;非特許文献6、J Cell Biochem. Vol.64, 2, pp. 278-94, 1997;非特許文献7)。

[0011] In vitroでのヒトを含む哺乳類の体細胞の培養時に、N-アセチル-L-システイン(NAC)は、アポトーシスを阻害することで細胞死を減らす効果があることが知られている(Molecular Human Reproduction Vol.8, No3.3, pp. 228-236, 2002;非特許文献8、J Leukoc Biol. Vol.76, No.1, pp. 152-61, 2004;非特許文献9)。

[0012] 特許文献1:特表平11-506610号公報

特許文献2:特表2006-505248号公報

特許文献3:WO2007/080919

非特許文献1:J. Biol. Chem. Vol.280, 15, 14656-14662 (2005)

非特許文献2:Sci. STKE, Vol. 2005, Issue 292, p.pe35, 12 July 2005

非特許文献3:American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. Vol. 34, pp. 274-285, 2006

非特許文献4:Science. Vol. 294, pp. 1875-1878, 2001

非特許文献5:J Biol Chem. Vol. 277, No.29, pp. 25851-25854, 2002

非特許文献6:Folia Histochemica Et Cytobiological Vol.44, No.4, pp. 215-に30, 2006

非特許文献7:J Cell Biochem. Vol.64, 2, pp. 278-94, 1997

非特許文献8:Molecular Human Reproduction Vol.8, No3.3, pp. 228-236, 2002

非特許文献9:J Leukoc Biol. Vol.76, No.1, pp. 152-61, 2004

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明は、哺乳動物の体細胞を培養する際、培地への血清の添加をできるだけ抑えるか又は血清を添加せずに哺乳動物の体細胞を効果的に増殖させることができる、哺乳動物体細胞用培地及びそれを構成するための添加剤を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0014] 本願発明者らは、鋭意研究の結果、内皮細胞分化遺伝子(Edg)ファミリーレセプターに対するリガンドと、セロトニンレセプターに対するリガンドとを培地に配合することにより、培地が血清を全く又は少量しか含まない場合であっても、効果的に哺乳動物の体細胞を増殖させることができることを見出し、本発明を完成した。

[0015] すなわち、本発明は、内皮細胞分化遺伝子(Edg)ファミリーレセプターに対するリガンドと、セロトニンレセプターに対するリガンドとを含む、哺乳動物体細胞用培地を提供する。また、本発明は、内皮細胞分化遺伝子(Edg)ファミリーレセプターに対す

るリガンドと、セロトニンレセプターに対するリガンドとを含む、哺乳動物体細胞用培地の添加剤を提供する。

発明の効果

- [0016] 本発明の培地及び培地添加剤は、体細胞を培養する際に従来培地に添加されていた血清を用いないか又はその添加量を低減させた条件下で体細胞を効率的に増殖させることを可能にする。よって、血清を用いることにより発生していた問題、すなわち患者への負担、感染性病原体の混入などを解決することができる。また、血清を添加する場合でも、添加する血清のロット間のばらつきに起因する細胞の増殖性のばらつきを抑制することができる。さらに、血清としてヒト血清を用いても体細胞を効率的に増殖させることができる。また、本発明の培養方法により、血清の使用量を抑制して体細胞を培養することができるので、安定した品質の培養体細胞を提供することができる。よって、得られる培養体細胞は、感染性病原体の混入の問題が最小限に抑えられた、安定した品質の培養体細胞とすることができる。

発明を実施するための最良の形態

- [0017] 本明細書において、「体細胞」とは、多細胞生物を構成する細胞のうち生殖細胞以外の細胞であり、ある目的に特化してそれ以外の細胞にはならない分化した細胞と、何種類かの異なった機能を持つ細胞に分化する能力を持った細胞とを含む。前者の細胞は、成体の機能性細胞であり、皮膚細胞、神経細胞、筋肉細胞、血液系細胞、繊維芽細胞、肝臓細胞、軟骨細胞、脂肪細胞など生体内の各器官を形成する細胞を含む。後者は幹細胞とよばれ、上記の分化した細胞のうち少なくとも1種類以上の分化細胞へ分化転換することができる細胞であり、胚性幹細胞及び体性幹細胞を包含する。「体性幹細胞」は、何種類かの異なった機能を持つ細胞に分化する能力を有する幹細胞及び前駆細胞のうち、胚性幹細胞を除く細胞であり、誘導多機能幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞、皮膚幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞などを含む。

- [0018] 本発明の培地中で培養される細胞としては、哺乳動物の体細胞であれば何ら限定されず、好ましい例として、繊維芽細胞等の間葉系細胞、脂肪組織由来幹細胞や骨髄由来間葉系幹細胞等の体性幹細胞を挙げることができるがこれらに限定されるも

のではない。

[0019] 本発明の培地には、内皮細胞分化遺伝子(Edg)ファミリーレセプターに対するリガンドが必須成分として含まれる。ここで、Edgファミリーレセプターは、その遺伝子配列の相同性が高いGタンパク質共役型のレセプターの一群であり、現在までにヒト、マウス、ヒツジなどの哺乳類でEdg-1からEdg-8までが同定されている(非特許文献4、5)。これらのうち、Edg-2、Edg-4及びEdg-7はLPAレセプターとして機能し、Edg-1、Edg-3、Edg-5、Edg-6及びEdg-8はS1Pレセプターとして機能することが知られている。また、「レセプターに対するリガンド」とは、該レセプターと特異的に結合する物質であり、生体内に存在する天然のリガンドのみならず、アゴニストやアンタゴニストとして知られる天然又は合成された他の化合物をも包含する。

[0020] Edgファミリーレセプターに対するリガンド(以下、便宜的に「Edgリガンド」と呼ぶことがある)としては、リゾホスファチジン酸(LPA)及びその塩、スフィンゴシン1リン酸(S1P)並びにEdgファミリーレセプターのアゴニストからなる群より選択される1又は複数種の化合物が好ましい。

[0021] Edgファミリーレセプターのアゴニストとは、Edgファミリーレセプターと結合してLPA及びS1Pと同様に作用する物質であり、例えばジヒドロスフィンゴシン1リン酸、血小板活性化因子(PAF)、スフィンゴシルホスホリルコリン、アルキルLPAアナログ、FTY720などが挙げられる。

[0022] LPAとは、下記の一般式(I)：



(式中、Rは、炭素数10～30のアルキル基、炭素数10～30のアルケニル基又は炭素数10～30のアシル基である)

で表される化合物である。

[0023] 上記の式(I)のR基についてのアシル基の炭素数は、カルボニル基の炭素数を含まない。

[0024] LPAの塩としては、従来公知の塩を用いることができ、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、アンモニウム塩などが挙げられる。

[0025] LPA又はLPAの塩としては、例えば1-オレオイルリゾホスファチジン酸ナトリウム

塩、LPAカリウム塩などが挙げられる。

[0026] Edgリガンドは、単独で用いることもできるし、2種以上のものを組み合わせて用いることもできる。

[0027] 本発明の培地は、さらに、セロトニンレセプターに対するリガンド(以下、便宜的に「

セロトニンリガンド」と呼ぶことがある)を含む。セロトニンレセプターは主に中枢神経

系にあるGタンパク質結合レセプターの一つである。セロトニンリガンドとしては、セロトニン、その塩及びセロトニンアゴニストから選択される1又は複数種の化合物が好ましい。セロトニンは、5-ヒドロキシトリプタミンともよばれ、神経伝達物質として作用する

ことが知られている。セロトニンアゴニストとは、セロトニンレセプターと結合してセロトニンと同様に作用することが知られている物質であり、例えばイプサピロン、セロピシ

、ナスピロン、1-[2-(4-アミノフェニル)エチル]-4-(3-ピロロオロメチルフェニル)ピペラジン(PADD)、N,N-ジプロピル-5-カルボキシアミドトリプタミン(D

P-5CT)、 α -メチル-5-ヒドロキシトリプタミン(HT)、2-メチル-5-HTなどが挙げられる。セロトニンの塩は、従来公知の塩を用いることができ、例えば塩酸塩などが

が挙げられる。

[0028] セロトニンリガンドは、単独で用いることもできるし、2種以上のものを組み合わせて用いることもできる。

[0029] 培地中のEdgリガンドの濃度(複数種類のものが含まれる場合にはその合計濃度)

は、通常、 $0.01 \sim 100 \mu\text{M}$ 程度である。Edgリガンドが、リゾホスフアチジン酸(LPA)及びその塩から成る群より選択される少なくとも1種である場合には、その培地中の濃度は、 $0.25 \sim 10 \mu\text{M}$ が好ましい。また、Edgリガンドが、スフィンゴシン1リン酸(S1P)

である場合には、その培地中の濃度は、 $0.01 \mu\text{M} \sim 0.2 \mu\text{M}$ が好ましい。また、培地中のセロトニンリガンドの濃度(複数種類のものが含まれる場合にはその合計濃度)は、 $0.1 \sim 100 \mu\text{M}$ が好ましく、 $0.25 \sim 20 \mu\text{M}$ がさらに好ましい。

[0030] 本発明の培地は、抗酸化剤をさらに含むことが好ましい。抗酸化剤の好ましい例と

しては、N-アセチルシス테인(NAC)、L-シス테인、カタラーゼ、スーパーオキシジスムタマーゼ及び2-メルカプトエタノールから成る群より選ばれる少なくとも1種、さらに好ましくは、N-アセチルシス테인及びL-シス테인から成る群より選ばれ

る少なくとも1種を挙げることができる。これらの抗酸化剤は、アポトーシス阻害作用を有することが知られており、従って、培養細胞の維持、増殖に有効である。抗酸化剤は、単独で用いることもできるし、2種以上のものを組み合わせて用いることもできる。

[0031] 培地中の抗酸化剤の濃度(複数種類のものが含まれる場合にはその合計濃度)は、0.01mM～10mMが好ましく、さらに好ましくは0.1mM～1mMである。

[0032] 本発明の培地は、動物血清アルブミンをさらに含むことが好ましい。アルブミンは、血清の主要成分であり、血液中では薬物の輸送等の役割を担っていることが知られている。動物血清アルブミンを含むことにより、培養細胞の増殖が一層促進される。動物血清アルブミンの好ましい例として、ヒト血清アルブミン(HSA)および遺伝子組換えヒト血清アルブミン(rHSA)、ウシ血清アルブミン(BSA)などが挙げられる。これらのアルブミンは、単独で用いることもできるし、2種以上のものを組み合わせて用いることもできる。

[0033] 培地中のアルブミンの濃度(複数種類のものが含まれる場合にはその合計濃度)は、0.0001～10重量%が好ましく、0.0001～1重量%がさらに好ましい。

[0034] 本発明の培地は、成長因子をさらに含むことが好ましい。成長因子を含むことにより、培養細胞の増殖が一層促進される。成長因子の好ましい例としては、上皮成長因子(EGF)、インスリン様成長因子(IGF)、トランスフォーミング成長因子(TGF)、神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、エリスロポエチン(EPO)、トロンボポエチン(TPO)、肝細胞増殖因子(HGF)等を挙げることができ、さらに好ましい例として、血小板由来成長因子(PDGF)、塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)及び上皮成長因子(EGF)を挙げることができる。これらの成長因子自体は、いずれもこの分野において周知である。成長因子は、単独で用いることもできるし、2種以上のものを組み合わせて用いることもできる。特に、下記実施例に具体的に示されるように、成長因子として血小板由来成長因子(PDGF)と塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)の2種類のみを含むものでも間葉系幹細胞の増殖が十分に達成されるので、間葉系幹細胞の培養に用いられる培地では、培地中に含まれる成長因子は、これら2種類の成長因子だけでも十分

である。

[0035] 本発明の培地は、さらに、血小板由来成長因子レセプター (PDGFR) に対するリガンド (PDGF) を含んでいてもよく、特に、間葉系幹細胞を培養する培地では、これを含むことが好ましい。PDGFRは、主に間葉系細胞にあるチロシンキナーゼ関連型受容体の一種であり、これに対するリガンドを含むことにより、間葉系幹細胞を効率良く細胞を増殖させることができる。PDGFRのリガンドとしては、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC、PDGF-DDなどが挙げられ、これらはいずれも周知である。PDGFRのリガンドは、単独で用いることもできるし、2種以上のものを組み合わせて用いることもできる。

[0036] 本発明の培地は、塩基性線維芽細胞成長因子レセプター (FGFR) に対するリガンド (FGF) を含んでいてもよく、特に、間葉系幹細胞を培養する培地では、これを含むことが好ましい。FGFRは、主に間葉系細胞に存在することが知られており、これに対するリガンドを含むことにより、間葉系幹細胞の寿命を改善させる。PDGFRのリガンドとしては、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) と酸性線維芽細胞成長因子 (aFGF) など、計20種以上存在することが知られている。例えば、FGF-1、FGF-4などが挙げられる。特に、bFGFは組織の形成に強く関与していることが知られている。これらはいずれも周知である。

[0037] 成長因子の濃度 (複数種類のものが含まれる場合にはその合計濃度) は、0.1~100ng/mLが好ましく、1~10ng/mLがさらに好ましい。

[0038] 本発明の培地は、界面活性剤をさらに含んでいてもよい。低濃度の界面活性剤を含むことにより、細胞膜への悪影響を減じる効果等があると考えられる。一方、高濃度の界面活性剤を培地に添加すると、細胞増殖阻害や細胞死の誘導をすることが知られている。界面活性剤としては、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル (商品名 Tween 20、Tween 40、Tween 60、Tween 80等)、アルキルフェノキシポリエチレングリコール (商品名 Triton X-100等)、アルキルフェニルポリエチレングリコール (商品名 Triton X-114、NP-40等) の非イオン性界面活性剤が好ましい。界面活性剤は、単独で用いることもできるし、2種以上のものを組み合わせて用いることもできる。

[0039] 界面活性剤の濃度 (複数種類のものが含まれる場合にはその合計濃度) は、通常、

0.1～100ng/mLであり、好ましくは1～10ng/mLである。

[0040] 本発明の培地は、通常の哺乳動物細胞用培地と同様に血清を含んでもよいが、Edgリガンド及びセロトニンリガンドの両者を含むことにより、血清を含まないか低濃度でしか含まない培地であっても細胞を効率的に増殖させることができるので、培地が無血清培地又は低血清培地である場合に本発明の威力が最もよく発揮される。すなわち、本発明の培地における血清の含有量は、培地全量に対して0～5重量%が好ましく、より好ましくは0～1重量%である。なお、本明細書及び特許請求の範囲において、血清を含むがその含有量が5重量%以下、好ましくは1重量%の培地を低血清培地と呼ぶ。

[0041] 本発明の培地は、上記したEdgリガンド及びセロトニンリガンド、好ましくは、さらに、上記した抗酸化剤、動物血清アルブミン、成長因子及び界面活性剤の1種以上を含むことを除き、公知の哺乳動物細胞用培地と同様でよい。従って、基本的に、公知の基礎培地、好ましくは無血清又は低血清基礎培地に、上記した2種類の必須成分、好ましくはさらに上記した好ましい成分の1種以上を添加することにより、本発明の培地を得ることができる。

[0042] 従来公知の無血清基礎培地としては、イーグル培地のような最小必須培地(MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、最小必須培地 α (MEM- α)、間葉系細胞基礎培地(MSCBM)、Ham's F-12及びF-10培地、DMEM/F12培地、Williams培地E、RPMI-1640培地、MCDB培地、199培地、Fisher培地、Iscove改変ダルベッコ培地(IMDM)、McCoy改変培地などが挙げられる。

[0043] 本発明の培地は、さらに、哺乳動物細胞用培地に含ませることが周知である種々の添加剤を含んでもよい。このような周知の添加剤として、アミノ酸類、無機塩類、ビタミン類、及び炭素源や抗生物質等の他の添加剤を挙げることができる。

[0044] アミノ酸類としては、グリシン、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-シスチン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン及びL-バリンを挙げることができる。

- [0045] 無機塩類としては、塩化カルシウム、硫酸銅、硝酸鉄(III)、硫酸鉄、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カリウム、炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、硫酸亜鉛及びセレン酸を挙げることができる。
- [0046] ビタミン類としては、コリン、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB4、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB12、ビタミンB13、ビタミンB15、ビタミンB17、ビタミンBh、ビタミンBt、ビタミンBx、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンF、ビタミンK、ビタミンM及びビタミンPを挙げることができる。
- [0047] これらの添加剤を哺乳動物細胞用の培地に添加すること自体は公知であり、各添加剤の添加量も公知の培地と同様でよく、また、ルーチンな試験により適宜設定することもできる。例えば、アミノ酸類の添加量は、通常、各アミノ酸毎に5mg/L～500mg/L程度、好ましくは10mg/L～400mg/L程度であり、無機塩類の添加量は、通常、各無機塩類毎に0 mg/L～10 g/L程度、好ましくは、0.01 mg/L～7 g/L程度であり、ビタミン類の添加量は、各ビタミン毎に0.01 mg/L～500 mg/L程度、好ましくは0.05 mg/L～300 mg/L程度である。
- [0048] 他の添加剤としては、(1)コルチコステロン、プロゲステロン等の増殖因子、(2)ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン及びカナマイシン等の抗生物質、(3)グルコース、ガラクトース、フルクトース及びスクロース等の炭素源、(4)マグネシウム、鉄、亜鉛、カルシウム、カリウム、ナトリウム、銅、セレン、コバルト、スズ、モリブデン、ニッケル及びケイ素等の微量金属、並びにアデノシン 5'-リン酸、コルチコステロン、エタノールアミン、インスリン、還元型グルタチオン、リポ酸、ヒポキサンチン、フェノールレッド、プロゲステロン、ブトレシン、ピルビン酸、チミジン、トリヨードチロニン、トランスフェリン及びラクトフェリン等の他の添加剤を挙げることができる。これらの添加剤の添加量も従来と同様でよく、また、各添加剤の目的に応じ、ルーチンな試験により適宜設定することもできる。通常、0.001 mg/L～5 g/L、特に0.1～3 g/L程度である。
- [0049] 本発明の培地は、体細胞の増殖又は維持のための培養に用いることができる他、培養する細胞が幹細胞の場合には、幹細胞の分化誘導のために用いることもできる。幹細胞の分化誘導に用いる場合には、分化誘導剤がさらに添加される。分化誘導

剤としては、サイトカイン(種々のインターロイキン、エリスロポエチン、トロンボポエチンなど)、コロニー刺激因子(例えばG-CSFなど)、ステロイドホルモン(デキサメタゾンなど)、インドール(インドメタシンなど)、チアゾリジン誘導体(ロシグリタゾンなど)などが挙げられる。これらの1又は複数種を用いることができる。分化誘導剤の添加量も従来と同様でよく、通常、培地全量に対して $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$ 重量%程度加えられる。

[0050] 本発明の培地は、上記した各種添加剤の1種又は複数種を含むことができ、通常、複数の添加剤を組み合わせる。

[0051] 本発明の培地中での哺乳動物体細胞の培養自体は、従来と同様な方法で行なうことができ、通常、 $30 \sim 37^{\circ}\text{C}$ の温度、及び5% CO_2 環境下、及び5~21% O_2 環境下で行なわれる。

[0052] 本発明はまた、上記した本発明の培地を構成するための添加剤をも提供する。従って、本発明の添加剤は、上記したEdgリガンド及びセロトニンリガンドを含む。さらに、好ましくは、上記した好ましい各種成分を含む。さらに、上記した各種添加剤の1種又は複数種を含んでいてもよい。本発明の添加剤は、水又は基礎培地に溶解することにより、上記した本発明の培地を与える組成を有するものが簡便で好ましい。この場合には、添加剤に含まれる各種成分の配合比率は、培地における各成分の含有量の比率と同じになる。なお、基礎培地としては、従来から哺乳動物細胞の培養に用いられている、上記した各種培地が挙げられる。

[0053] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。なお、「%」は特に断りがない限り、「重量%」を意味し、各種添加物の濃度は、培地中での終濃度を意味する。従って、例えば、「2.5ng/mLの塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)を加えた低血清培地C」は、bFGFの低血清培地C中での終濃度が2.5ng/mLになる量加えたことを意味する。

実施例 1

[0054] 実施例1:ヒト脂肪組織由来幹細胞(hMADS)の培養

(1-1)リガンドの製造

セロトニンリガンドとして、2.1mgのセロトニン塩酸塩(Sigma社製)を10mLのDME

M(LONZA社製)に溶解して、リガンド1(S-1)を製造した。また、Edgリガンドとして、2.3mgの1-オレイルリゾホスファチジン酸ナトリウム塩(LPA:CAYMAN社製)を10mLのPBSに溶解して、リガンド2(S-2)を製造した。さらに、2.1mgのセロトニン塩酸塩及び2.3mgのLPAを10mLのPBSに溶解して、リガンド3(S-3)を製造した。

[0055] (1-2)hMADSの増殖

アミノ酸類(上記した全アミノ酸類)、無機塩類(上記した全無機塩類)、ビタミン類(上記した全ビタミン類)及び他の添加剤(アデノシン 5'-リン酸、コルチコステロン、エタノールアミン、D-ガラクトース、D-グルコース、インスリン、還元型グルタチオン、リボ酸、ヒポキサンチン、フェノールレッド、プロゲステロン、ブトレシン、ピルビン酸、チミジン、トリヨードチロニン及びトランスフェリン)を含む培地に、 $7 \times 10^{-4}\%$ の2-メルカプトエタノール(2-Me)、100U/mLのペニシリン・ストレプトマイシン(GIBCO社製)、0.5%のウシ胎児血清(FCS)及び2.5ng/mLの塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)を加えた低血清培地Cを得た。

[0056] 低血清培地Cに、(1-1)で製造したS-1及び/又はS-2を様々な濃度で添加した低血清培地を得た。具体的には、以下の濃度でS-1及び/又はS-2を加えた。

低血清培地Cに0%のS-1及び0.2%のS-2を添加した低血清培地(0.2% S-2)、

低血清培地Cに0.001%のS-1及び0.2%のS-2を添加した低血清培地(0.2% S-2, 0.001% S-1)、

低血清培地Cに0.01%のS-1及び0.2%のS-2を添加した低血清培地(0.2% S-2, 0.01% S-1)、

低血清培地Cに0.1%のS-1及び0.2%のS-2を添加した低血清培地(0.2% S-2, 0.1% S-1)、

低血清培地Cに1%のS-1及び0.2%のS-2を添加した低血清培地(0.2% S-2, 1% S-1)、

低血清培地Cに10%のS-1及び0.2%のS-2を添加した低血清培地(0.2% S

- 低血清培地Cに0.1%のS-1及び0%のS-2を添加した低血清培地(0.1% S-1)、
低血清培地Cに0.1%のS-1及び0.002%のS-2を添加した低血清培地(0.1% S-1, 0.002% S-2)、
低血清培地Cに0.1%のS-1及び0.02%のS-2を添加した低血清培地(0.1% S-1, 0.02% S-2)、
低血清培地Cに0.1%のS-1及び0.2%のS-2を添加した低血清培地(0.1% S-1, 0.2% S-2)、
低血清培地Cに0.1%のS-1及び0.5%のS-2を添加した低血清培地(0.1% S-1, 0.5% S-2)、
低血清培地Cに0.1%のS-1及び1%のS-2を添加した低血清培地(0.1% S-1, 1% S-2)、
低血清培地Cに0.1%のS-1及び2%のS-2を添加した低血清培地(0.1% S-1, 2% S-2)、
低血清培地Cに1%のS-1及び0%のS-2を添加した低血清培地(1% S-1)、
低血清培地Cに0%のS-1及び1%のS-2を添加した低血清培地(1% S-2)、
低血清培地Cに1%のS-1及び1%のS-2を添加した低血清培地(1% S-1, 1% S-2)。
なお、1%のS-1は約 10^{-6} M、1%のS-2は約 5×10^{-6} Mに相当する。
- [0057] DMEM/F12に、1%非必須アミノ酸(GIBCO社製)、 7×10^{-4} %の2-ME、100 U/Lのベニシリン・ストربتマイシン、10%FCS、2.5 ng/mLのbFGFを加えて、従来の血清含有培地を得た(従来培地)。
- [0058] これらの培地10mLを、それぞれ直径100mmの培養皿に入れ、初期細胞数10,000細胞/mLでhMADSを播種し、37°Cにて5%CO₂環境下で培養を行った。
- [0059] 培養開始から21日の間の集団倍化数(n)の変化を、細胞継代毎の細胞数を血球計測盤を用いて計測した結果から計算した。集団倍化数とは、細胞分裂が行われた回数(n)のことである。細胞分裂では1つの細胞が2つに分裂するので、n回の分裂

が行われると細胞数は 2^n となる。集団倍化数は、以下の式に基づいて求められる。

$$\text{集団倍化数}(n) = \text{Log}_{(2)} [(P1 \text{計測細胞数} / P1 \text{播種細胞数}) \times (P2 \text{計測細胞数} / P2 \text{播種細胞数}) \times \dots]$$

(上記の式中、P1、P2・・・は、第1継代、第2継代・・・を表す。)

[0060] 集団倍化数が1回多いことは、細胞数が2倍多いことを示し、2回多いことは、細胞数が4倍多いことを示すので、集団倍化数がx回多ければ細胞数は 2^x 倍多いことを示す。

[0061] 結果を、図1～3に示す。

図1は、S-2の濃度を一定にした場合の集団倍化数の変化を示す。

図1では、従来培地(○)、低血清培地C(▲)、0.2% S-2(×)、0.2% S-2, 0.001% S-1(―)、0.2% S-2, 0.01% S-1(*), 0.2% S-2, 0.1% S-1(+), 0.2% S-2, 1% S-1(△)、及び0.2% S-2, 10% S-1(◆)の集団倍化数を示す。

[0062] 図2は、S-1の濃度を一定にした場合の集団倍化数の変化を示す。

図2では、従来培地(○)、低血清培地C(▲)、0.1% S-1(×)、0.1% S-1, 0.002% S-2(―)、0.1% S-1, 0.02% S-2(*), 0.1% S-1, 0.2% S-2(+), 0.1% S-1, 0.5% S-2(△)、0.1% S-1, 1% S-2(◆)、及び0.1% S-1, 2% S-2(◇)の集団倍化数を示す。

[0063] さらに、上記の低血清培地Cに、S-3を1%加えた場合の結果を図3に示す。

図3では、従来培地(○)、低血清培地C(▲)、1% S-1(◆)、1% S-2(■)及び1% S-3(●)の集団倍化数を示す。

[0064] (1-3) hMADSの脂肪細胞への分化

(1-2)の従来培地及び低血清培地CにS-3を加えた培地を用いて数継代維持した細胞を、 $21000 \text{細胞}/\text{cm}^2$ の細胞密度で、脂肪細胞分化培地(DMEM、10% FCS、 $500 \mu\text{M}$ イソブチルメチルキサンチン(IBMx)、 $1 \mu\text{M}$ デキサメタゾン、 $1 \mu\text{M}$ インスリン、 $1 \mu\text{M}$ ロシグリタゾン) 0.1mLを含む96穴培養プレートのウェルに移し、 37°C 、5% CO_2 で10日間培養することにより、脂肪細胞への分化誘導を行った。脂肪細胞への分化は、オイルレッドO染色により確認した。結果を、図4(A)に示す。

[0065] (1-4)hMADSの骨細胞への分化

(1-2)の従来培地及び低血清培地CにS-3を加えた培地を用いて数継代維持した細胞を、10000細胞/cm²の細胞密度で、骨細胞分化培地(DMEM、10%FCS、200 μM アスコルビン酸、0.1 μMデキサメタゾン、10mM β-グリセロホスフェート)0.5mLを含む24穴培養プレートのウェルに移し、37°C、5%CO₂で15日間培養することにより、骨細胞への分化誘導を行った。骨細胞への分化は、アリザリンレッドS染色により確認した。結果を、図4(B)に示す。

[0066] 図4の結果から、低血清培地CにS-3を加えた培地で培養したhMADSは、10%血清を含む従来培地で培養した細胞と同程度に染色され、従って、同程度に脂肪細胞及び骨細胞に分化したことがわかる。よって、これらの培地で培養した細胞はいずれも、未分化性維持能を有しており、幹細胞としての分化能に差がないことがわかる。

また、(1-2)で用いたFCSの代わりにヒト血清を用いても、図1~4で示す増殖及び分化の傾向は変わらないことが確認された。

実施例 2

[0067] 実施例2:ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の培養

(2-1)リガンドの製造

セロトニンリガンドとして、2.1mgのセロトニン塩酸塩(Sigma社製)を10mLのDMEM(LONZA社製)に溶解して、リガンド1(S-1)を製造した。

また、Edgリガンドとして、2.3mgの1-オレイルリゾホスファチジン酸ナトリウム塩(LPA:CAYMAN社製)を10mLのPBSに溶解して、リガンド2(S-2)を、1.9mgのスフィンゴシン-1-リン酸(S1P:CAYMAN社製)を10mLのDMEMに溶解して、リガンド2(S-2')を製造した。

さらに、2.1mgのセロトニン塩酸塩及び2.3mgのLPAを10mLのPBSに溶解して、リガンド3(S-3)を製造した。

[0068] (2-2)hMSCの増殖

実施例1で調製した基礎培地からヒポキサンチン及びチミジン並びに一部の無機塩類(硫酸銅、硝酸鉄(III)、硫酸鉄、塩化マグネシウム、リン酸水素二ナトリウム、硫酸

亜鉛)を除外した基礎培地に、100U/mLのペニシリン・ストレプトマイシン(GIBCO社製)及び0.5%のFCSを加えた低血清培地C1を得た。また、前記基礎培地に、100U/mLのペニシリン・ストレプトマイシン(GIBCO社製)及び1.0%のFCSを加えた低血清培地C2を得た。

- [0069] 低血清培地C1に、(2-1)で製造したS-1及び／又は2を様々な濃度で添加した低血清培地を得た。具体的には、以下の濃度でS-1及び／又はS-2を加えた。
- 低血清培地C1に0%のS-1及び0.2%のS-2を添加した低血清培地(0.2% S-2)、
- 低血清培地C1に0.001%のS-1及び0.2%のS-2を添加した低血清培地(0.2% S-2, 0.001% S-1)、
- 低血清培地C1に0.01%のS-1及び0.2%のS-2を添加した低血清培地(0.2% S-2, 0.01% S-1)、
- 低血清培地C1に0.1%のS-1及び0.2%のS-2を添加した低血清培地(0.2% S-2, 0.1% S-1)、
- 低血清培地C1に1%のS-1及び0.2%のS-2を添加した低血清培地(0.2% S-2, 1% S-1)、
- 低血清培地C1に10%のS-1及び0.2%のS-2を添加した低血清培地(0.2% S-2, 10% S-1)、
- 低血清培地C1に0.1%のS-1及び0%のS-2を添加した低血清培地(0.1% S-1)、
- 低血清培地C1に0.1%のS-1及び0.002%のS-2を添加した低血清培地(0.1% S-1, 0.002% S-2)、
- 低血清培地C1に0.1%のS-1及び0.02%のS-2を添加した低血清培地(0.1% S-1, 0.02% S-2)、
- 低血清培地C1に0.1%のS-1及び0.2%のS-2を添加した低血清培地(0.1% S-1, 0.2% S-2)、
- 低血清培地C1に0.1%のS-1及び1%のS-2を添加した低血清培地(0.1% S-1, 1% S-2)、

低血清培地C1に0.1%のS-1及び2%のS-2を添加した低血清培地(0.1% S-1, 2% S-2)、

低血清培地C1に1%のS-1及び0%のS-2を添加した低血清培地(1% S-1)、

低血清培地C1に0%のS-1及び1%のS-2を添加した低血清培地(1% S-2)、

低血清培地C1に1%のS-1及び1%のS-2を添加した低血清培地(1% S-1, 1% S-2)、

低血清培地C1に0.5%のFCS、1%のS-1及び1%のS-2を添加した低血清培地(1% S-3, 1% FCS)。

[0070] 低血清培地C2に、(2-1)で製造したS-1及び／又は2'を様々な濃度で添加した低血清培地を得た。具体的には、以下の濃度でS-1及び／又はS-2'を加えた。

低血清培地C2に1%のS-1及び0.1%のS-2'を添加した低血清培地(0.1% S-2', 1% S-1)、

低血清培地C2に1%のS-1及び0.02%のS-2'を添加した低血清培地(0.02% S-2', 1% S-1)、

低血清培地C2に1%のS-1及び0.01%のS-2'を添加した低血清培地(0.01% S-2', 1% S-1)、

低血清培地C2に1%のS-1及び0.002%のS-2'を添加した低血清培地(0.002% S-2', 1% S-1)、

低血清培地C2に1%のS-1及び0.0002%のS-2'を添加した低血清培地(0.0002% S-2', 1% S-1)。

[0071] 10%FCS、L-グルタミン及び抗生物質を含むヒト間葉系幹細胞専用培地キット(hMSC Bullet Kit、LONZA社製)を、従来培地とした。

[0072] これらの培地10mLを、それぞれ直径100mmの培養皿に入れ、初期細胞数10,000細胞/mLでhMSCを播種し、37℃にて5%CO₂環境下で培養を行った。

[0073] 図5～7については培養開始から19日の間の集団倍化数(n)の変化を、図8については培養開始から18日の間の集団倍化数(n)の変化を、細胞継代毎の細胞数を血球計測盤を用いて計測した結果を用いて計算した。結果を、図5～8に示す。

図5は、S-2の濃度を一定にした場合の集団倍化数の変化を示す。

図5では、従来培地(○)、低血清培地C1(▲)、0.2% S-2(×)、0.2% S-2, 0.001% S-1(-)、0.2% S-2, 0.01% S-1(*), 0.2% S-2, 0.1% S-1(+), 0.2% S-2, 1% S-1(△)、0.2% S-2, 10% S-1(◆)、1% S-1(□)、1% S-2(■)及び1% S-1, 1% S-2(●)の集団倍化数を示す。

[0074] 図6は、S-1の濃度を一定にした場合の集団倍化数の変化を示す。

図6では、従来培地(○)、低血清培地C1(▲)、0.1% S-1(×)、0.1% S-1, 0.002% S-2(-)、0.1% S-1, 0.02% S-2(*), 0.1% S-1, 0.2% S-2(+), 0.1% S-1, 1% S-2(◆)、0.1% S-1, 2% S-2(◇)、1% S-1(□)、1% S-2(■)及び1% S-1, 1% S-2(●)の集団倍化数を示す。

[0075] さらに、上記の低血清培地C1に、S-3を1%加えた場合の結果を図7に示す。

図7では、従来培地(○)、低血清培地C1(▲)、1% S-1(◆)、1% S-2(■) 1% S-3(●)及び1% S-3, 1% FCS(◇)の集団倍化数を示す。

[0076] 図8は、S-1の濃度を一定にした場合の集団倍化数の変化を示す。

図8では、従来培地(○)、0.1% S-2', 1% S-1(△)、0.02% S-2', 1% S-1(◆)、0.01% S-2', 1% S-1(■)、0.002% S-2', 1% S-1(◇)、0.0002% S-2', 1% S-1(□)の集団倍化数を示す。

[0077] (2-3)hMSCの脂肪細胞への分化

(2-2)の従来培地及び1% S-3, 1% FCSを用いて数継代維持した細胞を、20000細胞/cm²の細胞密度で、脂肪細胞分化培地(DMEM、10%FCS、500 μM イソブチルメチルキサンチン(IBMx)、1 μM デキサメタゾン、1 μM インスリン、1 μM ロシグリタゾン)0.1mLを含む96穴培養プレートのウェルに移し、37°C、5% CO₂で14日間培養することにより、脂肪細胞への分化誘導を行った。脂肪細胞への分化は、オイルレッドO染色により確認した。結果を、図9(A)に示す。

[0078] (2-4)hMSCの骨細胞への分化

(2-2)の従来培地及び1% S-3, 1% FCSを用いて数継代維持した細胞を、

3000細胞/cm²の細胞密度で、骨細胞分化培地(DMEM、10%FCS、200 μM アスコルビン酸、0.1 μMデキサメタゾン、10mM β-グリセロホスフェート)0.5 mLを含む24穴培養プレートのウェルに移し、37°C、5%CO₂で14日間培養することにより、骨細胞への分化誘導を行った。骨細胞への分化は、アリザリンレッドS染色により確認した。結果を、図9(B)に示す。

[0079] 図9の結果から、1% S-3, 1% FCSで培養したhMSCは、10%血清を含む従来培地で培養した細胞と同程度に染色され、従って、同程度に、脂肪細胞及び骨細胞に分化したことがわかる。よって、これらの培地で培養した細胞はいずれも、未分化性維持能を有しており、幹細胞としての分化能に差がないことがわかる。

また、(2-2)で用いたFCSの代わりにヒト血清を用いても、図5～9で示す増殖及び分化の傾向は変わらないことが確認された。

さらに、Edgリガンドとして、LPAの代わりにS1Pを用いても、分化の傾向は変わらないことが確認された。

実施例 3

[0080] アミノ酸類(上記した全アミノ酸類)、無機塩類(上記した全無機塩類)、ビタミン類(上記した全ビタミン類)及び他の添加剤(アデノシン 5'-一りん酸、コルチコステロン、エタノールアミン、D-ガラクトース、D-グルコース、インスリン、還元型グルタチオン、リポ酸、ヒポキサンチン、フェノールレッド、プロゲステロン、プトレシン、ピルビン酸、チミジン、トリヨードチロニン及びトランスフェリン)を含む培地に、 $7 \times 10^{-4}\%$ の2-ME、100U/Lのペニシリン・ストレプトマイシン、0.5%FCS、2.5ng/mLbFGF及び1%の(1-1)で製造したS-3を加えた低血清培地3(1% S-3 LS)を得た。

[0081] また、FCSを含まない以外は上記の低血清培地3と同様の組成で、無血清培地3(1% S-3 SF)を得た。

[0082] DMEM/F12に、1mg/Lの非必須アミノ酸(GIBCO社製)、 $7 \times 10^{-4}\%$ の2-ME、100U/Lのペニシリン・ストレプトマイシン、10%FCS、2.5ng/mLのbFGFを加えて、従来の血清含有培地を得た(従来培地)。

[0083] これらの培地10mLを、それぞれ直径100mmの培養皿に入れ、初期細胞数10,000細胞/mLでhFBを播種し、37°Cにて5%CO₂環境下で培養を行った。

[0084] 培養開始から22日の間の集団倍化数(n)を、細胞継代毎の細胞数を血球計測盤を用いて計測した結果を用いて計算した。結果を、図10に示す。

図10では、従来培地(○)、1% S-3 LS(●)及び1% S-3 SF(▲)の集団倍化数を示す。

実施例 4

[0085] 実施例4:血清ロット差の軽減効果(hMSCの培養)

(4-1)リガンドの製造

2. 1mgのセロトニン塩酸塩及び2. 3mgのLPAを10mlのPBSに溶解して、リガンド3(S-3)を製造した。

[0086] (4-2)hMSCの増殖

実施例1で調製した基礎培地からヒポキサンチン及びチミジン並びに一部の無機塩類(硫酸銅、硝酸鉄(III)、硫酸鉄、塩化マグネシウム、リン酸水素二ナトリウム、硫酸亜鉛)を除外した基礎培地に、100U/mlのペニシリン・ストレプトマイシン(GIBCO社製)、及びロットの異なるFCSを各々1. 0%加えた低血清培地C2(FCS1~4)を得た。

[0087] 低血清培地C2(FCS1~4)に、(4-1)で製造した1%のS-3を添加して、低血清培地(1% S-3, 1% FCS(1~4))を得た。

[0088] DMEMに、L-グルタミン、抗生物質、及び上記4種類のロットに対応するFCS(1~4)を各々10%加えて、従来の血清含有培地を得た(従来培地(FCS1~4))。

[0089] これらの培地10mLを、それぞれ直径100mmの培養皿に入れ、初期細胞数10,000細胞/mLでhMSCを播種し、37°Cにて5%CO₂環境下で培養を行った。

[0090] 培養開始から18日の間の集団倍化数(n)の変化を、細胞継代毎の細胞数を血球計測盤を用いて計測した結果を用いて計算した。FCSのロットを変えた時の集団倍化数の変化を、図11~14に示す。図11~14では、従来培地(FCS1~4)を(○)で、低血清培地(1% S-3, 1% FCS(1~4))を(●)で示した。

[0091] また、従来培地(FCS1~4)及び低血清培地(1% S-3, 1% FCS(1~4))を用いて、14日間培養したときの集団倍化数(n)を、まとめて図15に示す。

[0092] 図11~15の結果から、低血清培地(1% S-3, 1% FCS)では、10%血清を含

む従来培地と比較して、FCSの製造ロット差による細胞増殖への影響が低減していることがわかる。

実施例 5

[0093] 実施例5:ヒト血清での培養(hMSCの培養)

(5-1)リガンドの製造

2. 1mgのセロトニン塩酸塩及び2. 3mgのLPAを10mlのPBSに溶解して、リガンド3(S-3)を製造した。

[0094] (5-2)hMSCの増殖

実施例1で調製した基礎培地からヒポキサンチン及びチミジン並びに一部の無機塩類(硫酸銅、硝酸鉄(III)、硫酸鉄、塩化マグネシウム、リン酸水素二ナトリウム、硫酸亜鉛)を除外した基礎培地に、100U/mlのペニシリン・ストレプトマイシン(GIBCO社製)、及びロットの異なるヒト血清HSを各々1. 0%加えた低血清培地C3(HS1, 2)を得た。

[0095] 低血清培地C3(HS1, 2)に、(5-1)で製造した1%のS-3を添加して、低血清培地(1% S-3, 1% HS(1, 2))を得た。

[0096] DMEMに、L-グルタミン、抗生物質、及び上記2種類のロットに対応するヒト血清HS(1, 2)を各々10%加えて、従来血清含有培地を得た(従来培地(HS1, 2))。

[0097] これらの培地10mLを、それぞれ直径100mmの培養皿に入れ、初期細胞数10,000細胞/mLでhMSCを播種し、37°Cにて5%CO₂環境下で培養を行った。

[0098] 培養開始から18日の間の集団倍化数(n)の変化を、細胞継代毎の細胞数を血球計測盤を用いて計測した結果を用いて計算した。HSのロットを変えた時の集団倍化数の変化を、図16, 17に示す。従来培地(HS1, 2)を(○)で、低血清培地(1% S-3, 1% HS(1, 2))を(●)で示した。

[0099] 図16, 17の結果から、ヒト血清を用いた低血清培地(1% S-3, 1% HS)での培養も可能であることがわかる。

実施例 6

[0100] 実施例6:ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の培養2

水中に、アミノ酸類(上記した全アミノ酸類)、無機塩類(硫酸銅、硝酸鉄(III)、硫酸

鉄、塩化マグネシウム、リン酸水素二ナトリウム、硫酸亜鉛を除外した上記した全無機塩類)、ビタミン類(上記した全ビタミン類)及び他の添加剤(アデノシン 5'-リン酸、コルチコステロン、エタノールアミン、D-ガラクトース、D-グルコース、インスリン、還元型グルタチオン、リポ酸、フェノールレッド、プロゲステロン、プトレシン、ピルビン酸、トリヨードチロニン及びトランスフェリン)を含む基礎培地に1ng/mlの血小板由来増殖因子(PDGF)、2.5ng/mlの塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)、0.02重量%のヒト血清アルブミンおよび500 μ MのN-アセチルシステイン(NAC)、100U/mlのペニシリン・ストレプトマイシン(GIBCO社製)、及び1%の(1-1)で製造したS-3を加えた無血清増殖培地Aを得た。

[0101] DMEMに100U/mLのペニシリン・ストレプトマイシンおよび10%FBSを加えて、従来の血清含有培地を得た(従来培地A)。

[0102] これらの培地10mLを、それぞれ直径100mmの培養皿に入れ、初期細胞数15,000細胞/mLでhMSCを播種し、37°Cにて5%CO₂環境下で培養を行った。

[0103] 培養開始から18日間の集団倍化数(n)の変化を、継代培養毎の細胞数を血球計測盤を用いて計測した結果を用いて計算した。

[0104] 結果を、図18に示す。図18に示されるように、本発明の無血清増殖培地A中で培養すると、無血清であるにもかかわらず、また、成長因子を2種類しか含んでいないにも関わらず、集団倍加数は、血清を含む従来培地Aで培養した場合と同等であった。

[0105] hMSCの脂肪細胞への分化

従来培地A及び無血清増殖培地Aで数継代維持した細胞を、30000細胞/cm²の細胞密度で、脂肪細胞分化培地(DMEM、10%FCS、500 μ MのIBMX、1 μ Mのデキサメタゾン、1 μ Mのインスリン、1 μ Mのロシグリタゾン)0.3mLを含む48穴培養プレートのウェルに移し、37°C、5%CO₂で14日間培養することにより、脂肪細胞への分化誘導を行った。脂肪細胞への分化は、オイルレッドO染色により確認した。

[0106] 結果を図19(A)に示す。図19(A)に示されるように、本発明の無血清増殖培地Aで細胞を数継代維持した後、分化誘導をかけた場合には、血清を含有する従来培

地Aで数継代維持した場合よりもやや少ないながらも、概ね従来培地と同程度に細胞が染色され、脂肪細胞への明らかな分化が確認された。

[0107] hMSCの骨細胞への分化

従来培地及び無血清増殖培地Aで数継代維持した細胞を、 $3000 \text{細胞}/\text{cm}^2$ の細胞密度で、骨細胞分化培地(DMEM、10%FCS、 $200 \mu\text{M}$ のアスコルビン酸、 $0.1 \mu\text{M}$ のデキサメタゾン、 10mM の β -グリセロホスフェート) 0.7mL を含む12穴培養プレートウェルに移し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ で21日間培養することにより、骨細胞への分化誘導を行った。骨細胞への分化は、アリザリンレッドS染色により確認した。

[0108] 結果を図19(B)に示す。図19(B)に示されるように、本発明の無血清増殖培地Aで細胞を数継代維持した後、分化誘導をかけた場合には、血清を含有する従来培地Aで数継代維持した場合と同程度に染色され、骨細胞への分化が確認された。

実施例 7

[0109] 実施例7:ヒト骨髓由来間葉系幹細胞(hMSC)の培養3

水中に、アミノ酸類(上記した全アミノ酸類)、無機塩類(硫酸銅、硝酸鉄(III)、硫酸鉄、塩化マグネシウム、リン酸水素二ナトリウム、硫酸亜鉛を除外した上記した全無機塩類)、ビタミン類(上記した全ビタミン類)及び他の添加剤(アデノシン 5'-一りん酸、コルチコステロン、エタノールアミン、D-ガラクトース、D-グルコース、インスリン、還元型グルタチオン、リポ酸、フェノールレッド、プロゲステロン、プトレシン、ピルビン酸、トリヨードチロニン及びトランスフェリン)を含む基礎培地に 0.02% のヒト血清アルブミンおよび $500 \mu\text{M}$ のN-アセチルシステイン(NAC)、 $100\text{U}/\text{ml}$ のペニシリン・ストレプトマイシン(GIBCO社製)、及び 1% の(1-1)で製造したS-3を加えた無血清増殖培地Bを得た。

[0110] 得られた無血清増殖培地B並びに実施例6で調製した無血清増殖培地A及び従来培地Aの各培地 10mL を、それぞれ直径 100mm の培養皿に入れ、初期細胞数 $20,000 \text{細胞}/\text{mL}$ でhMSCを播種し、 37°C にて $5\%\text{CO}_2$ 環境下で培養を行った。

[0111] 培養開始から21日間の集団倍化数(n)の変化を、継代培養毎の細胞数を血球計測盤を用いて計測した結果を用いて計算した。

[0112] 結果を、図20に示す。図20に示されるように、成長因子を含まない本発明の無血

清培地B中で培養した場合でも、成長因子を含む本発明の無血清培地B中で培養した場合や従来培地A中で培養した場合よりも集団倍化数は減少するが、細胞は増殖可能であった。

[0113] hMSCの脂肪細胞への分化

従来培地A又は無血清増殖培地A若しくは無血清増殖培地Bで数継代維持した細胞を、 $30000 \text{ 細胞}/\text{cm}^2$ の細胞密度で、脂肪細胞分化培地(DMEM、10%FCS、 $500 \mu\text{M}$ のIBMX、 $1 \mu\text{M}$ のデキサメタゾン、 $1 \mu\text{M}$ のインスリン、 $1 \mu\text{M}$ のロシグリタゾン)0.3mLを含む48穴培養プレートのウェルに移し、 37°C 、5% CO_2 で14日間培養することにより、脂肪細胞への分化誘導を行った。脂肪細胞への分化は、オイルレッドO染色により確認した。

[0114] 結果を図21(A)に示す。図21(A)に示されるように、3種類の培地のそれぞれで継代維持した後分化誘導をかけた細胞は、同程度に染色され、成長因子を含まない本発明の無血清培地B中で継代維持した後に分化誘導かけた場合でも、血清を含む従来培地と同等に分化が確認された。

[0115] hMSCの骨細胞への分化

従来培地A又は無血清増殖培地A若しくは無血清増殖培地Bで数継代維持した細胞を、 $3000 \text{ 細胞}/\text{cm}^2$ の細胞密度で、骨細胞分化培地(DMEM、10%FCS、 $200 \mu\text{M}$ のアスコルビン酸、 $0.1 \mu\text{M}$ のデキサメタゾン、 10mM の β -グリセロホスフェート)0.7mLを含む12穴培養プレートのウェルに移し、 37°C 、5% CO_2 で21日間培養することにより、骨細胞への分化誘導を行った。骨細胞への分化は、アリザリンレッドS染色により確認した。

[0116] 結果を図21(A)に示す。図21(A)に示されるように、無血清増殖培地A若しくは無血清増殖培地Bで数継代維持した後、分化誘導をかけた細胞は、従来培地Aで数継代維持した場合と同程度に染色され、骨細胞への分化が確認された。本発明の無血清増殖培地は、成長因子を含まない場合でも、骨細胞への分化能を維持することが明らかになった。

図面の簡単な説明

[0117] [図1]実施例1で得られたヒト脂肪組織由来幹細胞(hMADS)の集団倍化数の変化

を示すグラフである。

[図2]実施例1で得られたヒト脂肪組織由来幹細胞(hMADS)の集団倍化数の変化を示すグラフである。

[図3]実施例1で得られたヒト脂肪組織由来幹細胞(hMADS)の集団倍化数の変化を示すグラフである。

[図4]ヒト脂肪組織由来幹細胞(hMADS)の脂肪細胞への分化(A)、及び骨細胞への分化(B)を示す。

[図5]実施例2で得られたヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の集団倍化数の変化を示すグラフである。

[図6]実施例2で得られたヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の集団倍化数の変化を示すグラフである。

[図7]実施例2で得られたヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の集団倍化数の変化を示すグラフである。

[図8]実施例2で得られたヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の集団倍化数の変化を示すグラフである。

[図9]ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の脂肪細胞への分化(A)、及び骨細胞への分化(B)を示す。

[図10]実施例3で得られたヒト繊維芽細胞(hFB)の集団倍化数の変化を示すグラフである。

[図11]実施例4で得られたヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の集団倍化数の変化を示すグラフである。

[図12]実施例4で得られたヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の集団倍化数の変化を示すグラフである。

[図13]実施例4で得られたヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の集団倍化数の変化を示すグラフである。

[図14]実施例4で得られたヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の集団倍化数の変化を示すグラフである。

[図15]実施例4で得られた、異なるロットのウシ胎児血清(FCS)を含む培地で14日

間培養したヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の集団倍化数を示す図である。

[図16]実施例5で得られた、ヒト血清を含有する培地で培養したヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の集団倍化数の変化を示すグラフである。

[図17]実施例5で得られた、ヒト血清を含有する培地で培養したヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の集団倍化数の変化を示すグラフである。

[図18]実施例6で得られたヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の集団倍化数の変化を示すグラフである。

[図19]実施例6で得られたヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の脂肪細胞への分化(A)、及び骨細胞への分化(B)を示す。

[図20]実施例7で得られたヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の集団倍化数の変化を示すグラフである。

[図21]実施例7で得られたヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の脂肪細胞への分化(A)、及び骨細胞への分化(B)を示す。

請求の範囲

- [1] 内皮細胞分化遺伝子(Edg)ファミリーレセプターに対するリガンドと、セロトニンレセプターに対するリガンドとを含む、哺乳動物体細胞用培地。
- [2] 無血清又は低血清培地である請求項1記載の培地。
- [3] 内皮細胞分化遺伝子ファミリーレセプターに対する前記リガンドの培地中の濃度が $0.01 \sim 100 \mu\text{M}$ 、セロトニンレセプターに対する前記リガンドの培地中の濃度が $0.1 \sim 100 \mu\text{M}$ である請求項1又は2記載の培地。
- [4] 内皮細胞分化遺伝子ファミリーレセプターに対する前記リガンドが、リゾホスファチジン酸(LPA)及びその塩、スフィンゴシン1リン酸(S1P)並びに内皮細胞分化遺伝子(Edg)ファミリーレセプターのアゴニストから成る群より選択される少なくとも1種である請求項1ないし3のいずれか1項に記載の培地。
- [5] 内皮細胞分化遺伝子ファミリーレセプターに対する前記リガンドが、リゾホスファチジン酸(LPA)及びその塩から成る群より選択される少なくとも1種であり、その培地中の濃度が $0.25 \sim 10 \mu\text{M}$ 、セロトニンレセプターに対する前記リガンドの培地中の濃度が $0.25 \sim 20 \mu\text{M}$ である請求項1又は2記載の培地。
- [6] セロトニンレセプターに対する前記リガンドが、セロトニン、その塩及びセロトニンレセプターのアゴニストから成る群より選択される少なくとも1種である請求項1ないし5のいずれか1項に記載の培地。
- [7] 抗酸化剤をさらに含む請求項1ないし6のいずれか1項に記載の培地。
- [8] 前記抗酸化剤が、N-アセチルシステイン及びL-システインから成る群より選ばれる少なくとも1種である請求項7記載の培地。
- [9] 前記抗酸化剤の培地中の濃度が $0.01\text{mM} \sim 10\text{mM}$ である請求項7又は8記載の培地。
- [10] 動物血清アルブミンをさらに含む請求項1ないし9のいずれか1項に記載の培地。
- [11] 前記血清アルブミンの培地中の濃度が $0.0001 \sim 10$ 重量%である請求項1ないし10のいずれか1項に記載の培地。
- [12] 成長因子をさらに含む請求項1ないし11のいずれか1項に記載の培地。
- [13] 前記成長因子が、血小板由来成長因子(PDGF)、塩基性繊維芽細胞成長因子(

bFGF) 及び上皮成長因子(EGF)からなる群より選択される少なくとも1種である請求項12記載の培地。

- [14] 培地中に含まれる前記成長因子が、血小板由来成長因子(PDGF) 及び塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)の2種類である請求項13記載の培地。
- [15] 前記成長因子の培地中の濃度が0.1～100ng/mLである請求項12ないし14のいずれか1項に記載の培地。
- [16] 内皮細胞分化遺伝子(Edg)ファミリーレセプターに対するリガンドと、セロトニンレセプターに対するリガンドとを含む、哺乳動物体細胞用培地の添加剤。
- [17] 内皮細胞分化遺伝子ファミリーレセプターに対する前記リガンドが、リゾホスファチジン酸(LPA) 及びその塩、スフィンゴシン1リン酸(S1P) 並びに内皮細胞分化遺伝子(Edg)ファミリーレセプターのアゴニストから成る群より選択される少なくとも1種である請求項16記載の添加剤。
- [18] セロトニンレセプターに対する前記リガンドが、セロトニン、その塩及びセロトニンレセプターのアゴニストから成る群より選択される少なくとも1種である請求項16又は17記載の添加剤。
- [19] 抗酸化剤をさらに含む請求項16ないし18のいずれか1項に記載の添加剤。
- [20] 動物血清アルブミンをさらに含む請求項16ないし19のいずれか1項に記載の添加剤。
- [21] 成長因子をさらに含む請求項16ないし20のいずれか1項に記載の添加剤。
- [22] 水又は基礎培地に溶解することにより請求項1ないし15のいずれか1項に記載の培地を与える組成を有する請求項16ないし21のいずれか1項に記載の添加剤。
- [23] 請求項1ないし15のいずれか1項に記載の培地中で、哺乳動物体細胞を培養することを含む、哺乳動物体細胞の培養方法。