明　細　書

発明の名称 ： 間葉系幹細胞を含む細胞製剤及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、間葉系幹細胞を含む細胞製剤及びその製造方法に関し、さらに当該製造方法に用いられる培地用添加剤、培養培地及びキット、並びにこれらを用いた培養方法に関する。

背景技術

[0002] 間葉系幹細胞（Ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ、ＭＳＣ）は、骨髄、脂肪、滑膜、歯槽骨、歯根膜等の成人の組織からだけでなく、胎盤、臍帯血、臍帯の種々の細胞等から単離することができ、しかも生体外で培養し増幅できる。さらに、間葉系幹細胞は、複数の間葉系（骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞）だけでなく、非間葉系（神経前駆細胞、肝細胞）の系譜の細胞に分化可能な多分化能を有することから、再生医療や細胞治療の細胞源としての利用が期待されている。

[0003] 従来、間葉系幹細胞の培養には、ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含有する培地が用いられている。ウシの血清にはロット差があるだけでなく、異種動物由来の血清タンパク質が間葉系幹細胞に混入し、移植の際に免疫応答を引き起こしてしまうという問題がある。仮に、ヒト血清を用いて培養したとしても、個体差により安定した培養が困難であり、またドナーの肉体的負担が大きい上に、高額となってしまう。

[0004] したがって、より安全で安定した品質の間葉系幹細胞を供給するためには、その培養過程で、異種動物由来のタンパク質の混入が少ない無血清培地を用いるのがよいことが知られている。つまり間葉系幹細胞を無血清で培養して増殖させることが好ましい。特許文献１及び非特許文献１には、間葉系幹細胞の無血清培養が記載されている。特許文献１及び非特許文献１に記載のとおり間葉系幹細胞を無血清培養することによって、５～１５％ＦＢＳ含有培地における間葉系幹細胞の培養よりも優れた増殖促進効果が得られる上に

、この培養により多分化能を維持（こう進）した間葉系幹細胞が得られる。

[0005] また、間葉系幹細胞は、自身の免疫原性が低いだけでなく、様々な免疫エフェクター細胞（Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞）の機能に影響を及ぼすことが示されている（非特許文献２～５）。したがって、免疫反応が関わる種々の疾患の治療に、間葉系幹細胞を応用することが期待されている（非特許文献６）。非特許文献７には、マウスリンパ球混合反応（ＭＬＲ）によるＴ細胞の増殖を、間葉系幹細胞が抑制することが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開ＷＯ２００７／０８０９１９号パンフレット（２００７年７月１９日公開）

非特許文献

[0007] 非特許文献1：加藤幸夫、第五回医療機器フォーラム予稿集、33-35, 2007

非特許文献2：Keating, A., Cell Stem Cell, 2, 106-108, 2008

非特許文献3：Corcione, A. et. al., Blood 107, 367-372, 2006

非特許文献4：Ramasamy, R. et. al., Transplantation 83, 71-76, 2007

非特許文献5：Aggarwal, S. et. al., Blood 105, 1815-1822, 2005

非特許文献6：Le Blanc K. et. al., J Intern Med., 262, 509-525, 2007

非特許文献7：Djouad, F. et. al., Blood 102, 3837-3844, 2003

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 再生医療においては、移植時の免疫学的拒絶反応が重要な問題であり、これを抑えるために免疫抑制剤が使用されている。しかしながら、免疫抑制剤の副作用等が問題となっていた。一方で、間葉系幹細胞は免疫抑制能を有するため、これを利用すれば、免疫抑制剤を使用する必要がない。したがって、異種タンパク質、合成培地が混入の危険性の低い無血清又は低血清培養によって、免疫抑制能を有する間葉系幹細胞を得ることができれば有利である

。特に、ＦＢＳ含有培地は、ウシ血清アルブミンの量のみならず、アレルギー性を有する他の可溶性物質が混在していることからも問題があり、これを含まない培養培地の使用が不可欠である。

[0009] 本発明は、上記問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、免疫抑制能を維持した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を、無血清又は低血清培養により製造するための製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記の課題を解決するために、間葉系幹細胞の免疫抑制能に及ぼす無血清培養の影響について鋭意検討した結果、特定の添加剤を含む無血清培地で培養した間葉系幹細胞が免疫抑制能を維持している、さらには、その免疫抑制効果が向上していることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0011] すなわち、本発明に係る間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法は、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ－β、ＨＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を含有する無血清培地Ａにおいて、間葉系幹細胞を増殖させる増殖工程と、上記増殖工程後の間葉系幹細胞から、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞をスクリーニングするスクリーニング工程とを包含することを特徴としている。

[0012] 本発明に係る間葉系幹細胞を含む細胞製剤は、上述した製造方法によって製造されたことを特徴としている。

[0013] 本発明に係る培地用添加剤は、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を製造するための無血清の培地用添加剤であって、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ－β、ＨＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を含有することを特徴としている。

[0014] 本発明に係る培養培地は、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を製造するための無血清の培養培地であって、上記培地用添加剤を含有していることを特徴としている。

[0015] 本発明に係る培養方法は、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を

含む細胞製剤を製造するための培養方法であって、上記培養培地において間葉系幹細胞を培養する工程を包含することを特徴としている。

[0016] 本発明に係るキットは、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を製造するためのキットであって、上記培地用添加剤を少なくとも備えていることを特徴としている。

発明の効果

[0017] 本発明に係る間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法は、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ－β、ＨＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を含有する無血清培地Ａにおいて、間葉系幹細胞を増殖させる増殖工程と、上記増殖工程後の間葉系幹細胞から、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞をスクリーニングするスクリーニング工程とを包含しているので、無血清又は低血清培養によって、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を製造することが可能である。

[0018] 本発明の他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分分かるであろう。また、本発明の利点は、添付図面を参照した次の説明で明白になるであろう。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]ＭＳＣＧＭ培地においてマウス由来活性化Ｔ細胞とｈＭＳＣとを共培養したときの、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８刺激Ｔ細胞増殖反応に対するｈＭＳＣの免疫抑制効果を示すグラフである。

[図2]本発明の一実施形態に係る無血清培地Ａにおいてマウス由来活性化Ｔ細胞とｈＭＳＣとを共培養したときの、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８刺激Ｔ細胞増殖反応に対するｈＭＳＣの免疫抑制効果を示すグラフである。

[図3]ＭＳＣＧＭ培地においてマウス由来活性化Ｔ細胞とｈＭＳＣとを共培養したときの、マイトジェン刺激Ｔ細胞増殖反応に対するｈＭＳＣの免疫抑制効果を示すグラフである。

[図4]本発明の一実施形態に係る無血清培地Ａにおいてマウス由来活性化Ｔ細胞とｈＭＳＣとを共培養したときの、マイトジェン刺激Ｔ細胞増殖反応に対

するｈＭＳＣの免疫抑制効果を示すグラフである。

[図5]マウスリンパ混合反応刺激Ｔ細胞増殖反応に対するｈＭＳＣの免疫抑制効果を示すグラフ（培養３日目の結果）である。

[図6]マウスリンパ混合反応刺激Ｔ細胞増殖反応に対するｈＭＳＣの免疫抑制効果を示すグラフ（培養４日目の結果）である。

[図7]培養開始から８日目の脂肪組織由来ｈＭＳＣの増殖状態を示す図である。

[図8]初期の滑膜由来ｈＭＳＣに対する培地１および培地２の増殖促進効果を示す図であり、（ａ）は、培養開始から１２日目の滑膜由来ｈＭＳＣの細胞数を示すグラフであり、（ｂ）は、培養開始から１２日目の滑膜由来ｈＭＳＣの増殖状態を示す図である。

[図9]培養開始０日目から６８日目までの滑膜由来ｈＭＳＣの細胞数の経時的な変化を示すグラフである。

[図10]培養開始から５日目の骨髄由来ｈＭＳＣ（細胞１）の増殖状態を示す図である。

[図11]培養開始から５日目の骨髄由来ｈＭＳＣ（細胞２）の増殖状態を示す図である。

[図12]培養開始から５日目の骨髄由来ｈＭＳＣ（細胞３）の増殖状態を示す図である。

[図13]正常ヒト皮膚線維芽細胞およびヒト軟骨肉腫細胞株の増殖に対する培地１の効果を示すグラフであり、（ａ）は、培養開始から１４日目の正常ヒト皮膚線維芽細胞のコロニー数を示すグラフであり、（ｂ）は、培養開始から１４日目のヒト軟骨肉腫細胞株のコロニー数を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、本発明の実施の形態について、詳細に説明する。ただし、本発明はこれに限定されるものではなく、記述した範囲内で種々の変形を加えた態様で実施できるものである。なお、本明細書において特記しない限り、数値範囲を表す「Ａ～Ｂ」は、「Ａ以上、Ｂ以下」を意味する。

[0021] 上述したように、特許文献１及び非特許文献１には、血清を含まない培地（無血清培地）において増殖性を失わせることなく細胞を培養するための培地が記載されている。この培地は、特定の増殖因子群、リン脂質及び脂肪酸の複合物を基礎培地に添加したものであり、これを用いることにより、無血清条件下であっても１０％血清の場合と同等以上の細胞増殖促進効果を導いている。また、この培地においては、間葉系幹細胞を、分化能を維持し、かつその維持能を高めたまま無血清培養することが可能である。さらに、この培地においては、骨髄由来のＭＳＣ、脂肪由来のＭＳＣ、滑膜由来のＭＳＣの無血清培養が可能である。

[0022] 本発明によれば、このような、無血清条件下において間葉系幹細胞を大量に増殖させることが可能な培地のさらなる効果として、免疫抑制能の維持又はこう進した間葉系幹細胞の培養を実現するものであり、再生医療用途に特に有用な、間葉系幹細胞を含む細胞製剤を製造することを可能にする。

[0023] （１）間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法

本発明は、無血清条件下において免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法を提供する。本発明に係る細胞製剤の製造方法は、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ－β、ＨＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を含有する無血清培地Ａにおいて、間葉系幹細胞を増殖させる増殖工程と、上記増殖工程後の間葉系幹細胞から、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞をスクリーニングするスクリーニング工程とを包含している。

[0024] （増殖工程）

本発明に係る製造方法の増殖工程においては、間葉系幹細胞を、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ－β、ＨＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を含有する無血清培地Ａにおいて培養し、間葉系幹細胞を増殖させる。

[0025] 本明細書中で使用される場合、「無血清培地」とは、血清を含まない培地であることが意図され、「無血清培養」とは、血清を用いない培養であるこ

とが意図される。また、「低血清培養」とは、一般的な血清含有培地（例えば、１０％ＦＢＳ含有培地）よりも、含有する血清量が少ない培地を用いた培養、及び一般的な血清含有培地を用いた培養よりも、血清含有培地を用いた培養期間が短い培養であることが意図される。

[0026] 本明細書中において、「細胞製剤」は、再生医療用材料として再生医療等に用いられる、細胞を製剤化した治療薬であり、細胞を元の状態のまま機能を変化させることなく製剤化したもののみならず、特定の条件の下で培養及び増殖させることによって、分化能、免疫抑制能等の機能を向上させた細胞を製剤化したものも含む。

[0027] また、本明細書中において、「間葉系幹細胞」は、骨髄、脂肪細胞、滑膜細胞、歯槽骨、歯根膜等の成人の組織からだけでなく、胎盤、臍帯血、胎児の種々の細胞等から単離されるものも含み、ヒト間葉系幹細胞であることが好ましいが、ラット、マウス等の非ヒト動物由来間葉系幹細胞であってもよい。

[0028] 増殖工程において用いる無血清培地Ａを構成するための基礎培地は、当該分野において周知の動物細胞用培地であれば特に限定されず、好ましい基礎培地としては、例えば、Ｈａｍ’ｓ　Ｆ１２培地、ＤＭＥＭ培地、ＲＰＭＩ－１６４０培地、ＭＣＤＢ培地などが挙げられる。これらの基礎培地は、単独で使用されても、複数を混合して使用されてもよい。一実施形態において、無血清培地Ａを構成するための基礎培地は、ＭＣＤＢとＤＭＥＭとを１：１の比率で混合した培地が好ましい。

[0029] 一実施形態において、上記の基礎培地に、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ－β、ＨＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を添加した無血清培地Ａを増殖工程に用いればよい。基礎培地に対するＦＧＦの含有量は、終濃度で、０．１～１００ｎｇ／ｍｌであることが好ましく、さらに好ましくは３ｎｇ／ｍｌである。基礎培地に対するＰＤＧＦの含有量は、終濃度で、０．５～１００ｎｇ／ｍｌであることが好ましく、さらに好ましくは１０ｎｇ／ｍｌである。基礎培地に対するＴＧＦ－βの含有量

は、終濃度で、０．５～１００ｎｇ／ｍｌであることが好ましく、さらに好ましくは１０ｎｇ／ｍｌである。

[0030] 基礎培地に対するＨＧＦの含有量は、終濃度で、０．１～５０ｎｇ／ｍｌであることが好ましく、さらに好ましくは５ｎｇ／ｍｌである。基礎培地に対するＥＧＦの含有量は、終濃度で、０．５～２００ｎｇ／ｍｌであることが好ましく、さらに好ましくは２０ｎｇ／ｍｌである。基礎培地に対するリン脂質の総含有量は、終濃度で、０．１～３０μｇ／ｍｌであることが好ましく、さらに好ましくは１０μｇ／ｍｌである。基礎培地に対する脂肪酸の総含有量は、基礎培地の１／１０００～１／１０であることが好ましく、さらに好ましくは１／１００である。

[0031] このような無血清培地Ａを使用することによって、異種タンパク質の混入を防ぎつつ、血清含有培地と同等以上の増殖促進効果が得られ、間葉系幹細胞を所望の通り増殖させることができる。

[0032] 本発明に係る製造方法の増殖工程において、無血清培地Ａが含有しているリン脂質としては、例えば、フォスファチジン酸、リゾフォスファチジン酸、フォスファチジルイノシトール、フォスファチジルセリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルコリン及びフォスファチジルグリセロールなどが挙げられ、これらのリン脂質を単独で含有しても組み合わせて含有してもよい。一実施形態において、無血清培地Ａは、フォスファチジン酸とフォスファチジルコリンとを組み合わせて含有していてもよく、これらのリン脂質は、動物由来であっても、植物由来であってもよい。

[0033] 無血清培地Ａが含有している脂肪酸としては、例えば、リノール酸、オレイン酸、リノレイン酸、アラキドン酸、ミリスチン酸、パルミトイル酸、パルミチン酸及びステアリン酸等が挙げられ、本実施形態に係る培地用添加剤はこれらの脂肪酸を単独で含有しても組み合わせて含有してもよい。また、本実施形態に係る無血清培地Ａは、上記脂肪酸以外にさらにコレステロールを含有していてもよい。

[0034] 本明細書中で使用される場合、ＦＧＦは、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ：

ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ）ファミリーから選択される増殖因子が意図され、ＦＧＦ－２（ｂＦＧＦ）であることが好ましいが、ＦＧＦ－１など他のＦＧＦファミリーから選択されてもよい。また、本明細書中で使用される場合、ＰＤＧＦは、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ：ｐｌａｔｅｌｅｔ　ｄｅｒｉｖｅｄ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ）ファミリーから選択される増殖因子が意図され、ＰＤＧＦ－ＢＢまたはＰＤＧＦ－ＡＢであることが好ましい。さらに、本明細書中で使用される場合、ＴＧＦ－βは、トランスフォーミング増殖因子－β（ＴＧＦ－β：ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－β）ファミリーから選択される増殖因子が意図され、ＴＧＦ－β３であることが好ましいが、他のＴＧＦ－βファミリーから選択されてもよい。

[0035] 本明細書中で使用される場合、ＨＧＦは、肝細胞増殖因子（ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ）ファミリーから選択される増殖因子が意図され、ＥＧＦは、上皮増殖因子（ＥＧＦ：ｅｐｉｄｅｒｍａｌ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ）ファミリーから選択される増殖因子が意図される。

[0036] また、一実施形態において、無血清培地Ａは、結合組織増殖因子（ＣＴＧＦ：ｃｏｎｎｅｃｔｉｖｅ　ｔｉｓｓｕｅ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ：ｖａｓｃｕｌａｒ　ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ）及びアスコルビン酸化合物からなる群より選択される少なくとも２つの因子をさらに含有していてもよい。

[0037] 本明細書中で使用される場合、アスコルビン酸化合物は、アスコルビン酸（ビタミンＣ）もしくはアスコルビン酸２リン酸、またはこれらに類似する化合物が意図される。

[0038] なお、無血清培地Ａに含有されている上述した増殖因子は、天然のものであっても、遺伝子組換えによって製造されたものであってもよい。

[0039] １つの局面において、無血清培地Ａは、脂質酸化防止剤を含有していることが好ましい。一実施形態において、無血清培地Ａに含有される脂質酸化防

止剤は、ＤＬ－α－トコフェロールアセテート（ビタミンＥ）であり得る。無血清培地Ａはまた、界面活性剤をさらに含有していてもよい。一実施形態において、無血清培地Ａに含有される界面活性剤はＰｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ－６８またはＴｗｅｅｎ　８０であり得る。

[0040] 無血清培地Ａは、インスリン、トランスフェリンおよびセレネートをさらに含有していてもよい。本明細書中で使用される場合、インスリンは、インスリン様増殖因子であってもよく、天然の細胞由来であっても、遺伝子組換えによって製造されたものでもよい。本発明に係る培地用添加剤はさらに、デキサメタゾン、あるいは他のグルココルチコイドを含有していてもよい。

[0041] 増殖工程においては、上述した無血清培地Ａに、ヒト等の動物組織又は細胞から従来公知の方法により単離された間葉系幹細胞を播種し、所望の数に増殖するまで培養する。培養条件として、培地１ｍｌに対して１～２×１０^{4}個の間葉系幹細胞を播種することが好ましく、培養温度は３７℃±１℃、培養時間は４８～９６時間、かつ５％CO_2下であることが好ましい。このように培養することによって、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を効率よく大量に得ることができる。

[0042] 増殖工程では、培養に用いる培養容器は、間葉系幹細胞が増殖し得るものであれば特に限定されない。例えば、ファルコン製７５ｃｍ^{2}フラスコ、住友ベークライト製７５ｃｍ^{2}フラスコ等を好適に用いることができる。但し、細胞によっては、用いる培養容器の種類によって細胞の増殖が影響を受ける場合がある。このため、間葉系幹細胞をより効率よく増殖させるために、増殖工程において増殖させる対象となる間葉系幹細胞（以下、「増殖対象細胞」ともいう）毎に、増殖に適した培養容器を用いて増殖工程を行うことが好ましい。

[0043] 増殖対象細胞の増殖に適した培養容器の選択方法としては、例えば、最適な培養容器を増殖対象細胞に選択させる方法を挙げることができる。具体的に説明すると、複数種類の培養容器を準備し、培養容器の種類が異なる以外は同一の培養条件で増殖対象細胞を増殖させ、培養開始から２週間後の細胞

数を公知の方法によって計測し、細胞数が多いものから順に増殖対象細胞の増殖に適した培養容器であると判断することができる。また、増殖対象細胞の増殖速度が速い場合は、培養開始から２週間経過する前であっても、コンフルエント状態の８０～９０%の細胞数に達する期間が短いものから順に増殖対象細胞の増殖に適した培養容器であると判断することができる。

[0044] 本発明に係る製造方法の増殖工程においては、増殖対象細胞の増殖に適した培養容器が既に明らかになっている場合は、その培養容器を用いればよい。これに対して、増殖対象細胞の増殖に適した培養容器が明らかになっていない等の場合には、本発明に係る製造方法は、増殖対象細胞の増殖に適した培養容器を選択するための「培養容器選択工程」（後述する）を増殖工程の前にさらに包含していてもよい。

[0045] なお、間葉系幹細胞の増殖には、細胞が培養容器に接着することが必須条件であるので、培養容器に対する増殖対象細胞の接着が弱い場合は、増殖工程において、上記無血清培地Ａに、細胞接着分子をさらに含有させることが好ましい。上記「細胞接着分子」としては、例えば、フィブロネクチン、コラーゲン、ゼラチン等を挙げることができる。これらの細胞接着分子は、一種類を単独で用いてもよく、複数種類を組み合わせて用いてもよい。

[0046] 無血清培地Ａに対する細胞接着分子の含有量は、終濃度で、１～５０μｇ／ｍｌであることが好ましく、さらに好ましくは５μｇ／ｍｌである。一実施形態において、細胞接着分子としてフィブロネクチン用いる場合は、無血清培地Ａに対するフィブロネクチンの終濃度が５μｇ／ｍｌとなるように添加することによって、培養容器に対する増殖対象細胞の接着効率を向上させることができる。

[0047] また、増殖工程では、間葉系幹細胞を少なくとも１回継代してもよい。間葉系幹細胞は足場依存的に増殖するので、間葉系幹細胞が局所的に偏って増殖している等の場合に、増殖工程の途中で間葉系幹細胞を継代することによって培養条件を改善することができる。

[0048] 間葉系幹細胞の継代方法としては特に限定されず、従来公知の間葉系幹細

胞の継代方法を用いて継代することできる。継代後の間葉系幹細胞の状態が良好であることから、上記増殖工程では、継代を行う場合に哺乳類および微生物由来の成分を含有していない細胞剥離剤を用いて上記間葉系幹細胞を剥離することが好ましい。上記「哺乳類および微生物由来の成分を含有していない細胞剥離剤」としては、例えば、ＡＣＣＵＴＡＳＥ（Innovative Cell Technologies, Inc.）を挙げることができる。

[0049] ここで、上記「哺乳類および微生物由来の成分を含有していない細胞剥離剤」としてＡＣＣＵＴＡＳＥを用いる場合の継代方法の一例を説明する。(i)～(vi)の手順によって間葉系幹細胞を剥離し、継代する。なお、以下に説明する継代方法では、培養容器としてＴ－２５フラスコ（ファルコン製）を用いたと仮定する。

(i)細胞層をＰＢＳ（－）５ｍＬを用いて洗浄する。

(ii)ＡＣＣＵＴＡＳＥを２ｍＬ添加する。

(iii)室温にて２分程度静置し、細胞の剥離を確認のうえ遠心管に細胞浮遊液を移す。

(iv)培養容器にＰＢＳ（―）を７ｍＬ添加し、フラスコ底面をリンスする。

(v)上記(iii)の遠心管に上記(iv)の溶液を移し、１５００ｒｐｍ（２００×ｇ）で５分間遠心する。

(vi)上清を除き、５，０００個／ｃｍ^{2}の播種濃度にて、無血清培地Ａを用いて播種する。

[0050] なお、増殖工程には、ヒト等の動物組織から採取してから継代１回目（Ｐ１）以降の間葉系幹細胞を供することが好ましい。

[0051] （スクリーニング工程）

本発明に係る製造方法のスクリーニング工程（「第１スクリーニング工程」ともいう。）においては、上記増殖工程後の間葉系幹細胞から、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞をスクリーニングする。上述した無血清培地Ａにおいて増殖した増殖工程後の間葉系幹細胞は、免疫抑制能が少なくとも維持されており、さらに免疫抑制能がこう進している。したがって、こ

のような間葉系幹細胞を、免疫抑制能を基準としてスクリーニングすることによって、免疫抑制能を維持または向上した間葉系幹細胞を選別することができる。そして、選別した間葉系幹細胞を細胞製剤として使用することによって、免疫抑制剤を併用することなく、免疫学的拒絶反応を抑制した間葉系幹細胞の移植治療が実現する。

[0052] 上述した無血清培地Ａは異種タンパク質を含まず、さらに当該培地で培養した間葉系幹細胞は幹細胞としての機能を維持している。また、上述した無血清培地Ａで培養した間葉系幹細胞は、ウシ胎児血清含有培地で培養した間葉系幹細胞と比較して、増殖能が高く、かつ免疫抑制効果を示す活性も高い。したがって、上述した無血清培地Ａで培養した間葉系幹細胞を移植治療に用いた場合、その特性を保持する細胞が増加すると共に、個々の細胞の活性も高いことから、相乗効果が期待できる。

[0053] 一方、本発明者らは、上述した無血清培地Ａの増殖能の効果から懸念される造腫瘍性について、ｉｎ ｖｉｔｒｏの軟寒天培養法とｉｎ ｖｉｖｏの高感度免疫不全マウス（ＮＯＧマウス）による造腫瘍性試験法とによりそれぞれ検討した。具体的には、３ロットの滑膜由来のヒト間葉系幹細胞と、１ロットの骨髄由来のヒト間葉系幹細胞とを上述した無血清培地Ａで培養し、培養細胞１，０００，０００個を軟寒天培養用の培地及びＮＯＧマウスの皮下１０ヵ所に移植した。その結果、軟寒天培養ではＨｅｌａ細胞１，０００個の移植で腫瘍コロニーが認められるのに対し、間葉系幹細胞の３ロットはいずれも陰性であった。一方、ＮＯＧマウスでは、わずか１個のＨｅｐＧ２細胞が混在していても腫瘍結節が検出されるような実験条件下であっても、何れの移植組織においても腫瘍結節が認められなかった（データ示さず）。このことからも、本発明により製造した細胞製剤が移植治療における有用性は明確である。

[0054] 本明細書中において、「免疫抑制能」とは、異種又は同種の細胞等を他家移植した際に生じる免疫拒絶反応を抑制する能力であり、Ｔ細胞の増殖を抑制する等、様々な免疫エフェクター細胞の機能に影響を及ぼすことによって

これらに起因する免疫反応を抑制する能力を意図している。これは抗炎症能の一部である。本明細書中において、「免疫抑制能を維持した」とは、間葉系幹細胞が本来有する免疫抑制能が上記増殖工程によって失われていないことを意図しており、「免疫抑制能を向上した」とは、上記増殖工程の前後で間葉系幹細胞が有する免疫抑制能が向上していることを意図している。

[0055] スクリーニング工程においては、上記増殖工程後の無血清培地Ａにおいて、増殖した間葉系幹細胞と免疫細胞とを共培養し、共培養後の培地中の免疫細胞数を評価することによって、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞をスクリーニングすることができるが、これに限定されない。例えば、免疫細胞としてＴ細胞を用いた場合には、後述する実施例に示すように、Ｔ細胞の増加量又はサイトカインの産生量を評価し、免疫細胞としてＢ細胞又は活性化ＮＫ細胞を用いた場合には、これらの細胞の増加量を評価することによって、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞をスクリーニングすることができる。また、免疫細胞として樹状細胞を用いた場合には、その分化、成熟、活性化等を評価することによって、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞をスクリーニングすることができる。このようなスクリーニングに用いる免疫細胞は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、又は活性化ＮＫ細胞であることが好ましく、より好ましくはＴ細胞又はＢ細胞であり、最も好ましくはＴ細胞である。

[0056] （第２スクリーニング工程）

本発明に係る製造方法は、上記増殖工程後の間葉系幹細胞から、造腫瘍性を有していない間葉系幹細胞をスクリーニングする第２スクリーニング工程をさらに包含していてもよい。

[0057] 上述した無血清培地Ａにおいて増殖した増殖工程後の間葉系幹細胞は、造腫瘍性を有していない間葉系幹細胞が選択的に増加している。したがって、このような間葉系幹細胞を、造腫瘍性を基準としてスクリーニングすることによって、造腫瘍性を有していない間葉系幹細胞を選別することができる。そして、選別した間葉系幹細胞を細胞製剤として使用することによって、造

腫瘍性を有していない間葉系幹細胞の移植治療が実現する。それゆえ、本発明は、無血清条件下において造腫瘍性を有していない間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法を提供することもできる。

[0058] 間葉系幹細胞が造腫瘍性を有しているか否かについては、上記「スクリーニング工程」において説明したように、従来公知のｉｎ ｖｉｔｒｏの軟寒天培養法、ｉｎ ｖｉｖｏの高感度免疫不全マウス（ＮＯＧマウス）による造腫瘍性試験法等によって確認することができるが、これらに限定されない。すなわち、本明細書中において、「造腫瘍性を有していない間葉系幹細胞」とは、上述した造腫瘍性の有無を確認する方法によって造腫瘍性を有さないことが確認された間葉系幹細胞を意図している。

[0059] なお、本発明に係る製造方法において、第２スクリーニング工程をさらに包含する場合、上記第１スクリーニング工程と当該第２スクリーニング工程とを行う順序は特に制限されない。すなわち第２スクリーニング工程の前に第１スクリーニング工程を行ってもよく、第２スクリーニング工程の後で第１スクリーニング工程を行ってもよい。

[0060] （血清培養工程）

本発明に係る製造方法は、さらに、増殖工程後の間葉系幹細胞を、スクリーニング工程の前に、血清含有培地において培養する血清培養工程を包含していてもよい。血清培養工程においては、増殖工程において無血清培養した間葉系幹細胞を、血清含有培地において培養する。血清培養工程を行う場合、血清培養工程後の間葉系幹細胞をスクリーニング工程に供する。

[0061] 血清培養工程において使用する血清含有培地としては、従来公知の血清含有培地を使用することが可能であり、上述した基礎培地に１０％ＦＢＳを添加した１０％ＦＢＳ含有培地を血清含有培地として使用してもよい。血清培養工程においては、このような血清含有培地に、増殖工程で得られた間葉系幹細胞を播種して培養する。培養条件として、培地１ｍｌに対して間葉系幹細胞の数が１～２×１０^{4}個であることが好ましく、培養温度は３７℃±１℃、培養時間は４８～９６時間、かつ５％CO_2下であることが好ましい。この

ように培養することによって、より早期に免疫抑制能を発揮する間葉系幹細胞を効率よく大量に得ることができる。

[0062] そして、血清含有培地において培養した間葉系幹細胞をスクリーニング工程に供し、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を選別する。

[0063] このように、間葉系幹細胞を、無血清培地Ａにおいて前培養した後、血清含有培地において本培養することによって、前培養及び本培養共に血清含有培地で培養した場合と同等以上の免疫抑制効果が得られる上に、間葉系幹細胞の免疫抑制効果をより早期に発揮させることができる。また、血清を使用するのは本培養時だけなので、血清の含有量が少なく、低血清培養を実現できる。

[0064] （前増殖工程）

本発明に係る製造方法は、上記増殖工程の前に、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を含有する無血清培地Ｂにおいて、間葉系幹細胞を増殖させる前増殖工程をさらにしていてもよい。

[0065] ここで、上記「無血清培地Ｂ」は、ＨＧＦおよびＴＧＦ－βを含有していない点で、上記「増殖工程」の項で説明した無血清培地Ａとは異なる。ＨＧＦおよびＴＧＦ－β以外の成分（ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸）および基礎培地については、上記「増殖工程」の項で無血清培地Ａに関して説明したとおりであるので、ここでは説明を省略する。

[0066] また、１つの局面において、無血清培地Ｂは、無血清培地Ａと同様、脂質酸化防止剤を含有していることが好ましい。また、無血清培地Ｂは、界面活性剤をさらに含有していてもよい。また、無血清培地Ｂは、インスリン、トランスフェリンおよびセレネートをさらに含有していてもよい。また、無血清培地Ｂは、さらに、デキサメタゾン、あるいは他のグルココルチコイドを含有していてもよい。これらの成分についても、上記「増殖工程」の項で無血清培地Ａに関して説明したとおりであるので、ここでは説明を省略する。

[0067] なお、無血清培地Ｂに含有されている上記成分の含有量は、上記「増殖工程」の項で無血清培地Ａに関して説明した含有量の範囲内であれば、無血清培地Ａに含有されている各成分の含有量と同じであってもよく、異なっていてもよい。

[0068] 前増殖工程においては、上述した無血清培地Ｂに、ヒト等の動物組織から従来公知の方法により単離された間葉系幹細胞を播種し、所望の数に増殖するまで培養する。培養条件として、培地１ｍｌに対して１～５００ｍｇの組織片（ＭＳＣを含む）を分離し、間葉系幹細胞を播種することが好ましく、培養温度は３７℃±１℃、培養時間は３～１４日間、かつ５％CO_2下であることが好ましい。

[0069] 前増殖工程に供される間葉系幹細胞に特に制限はないが、初期の間葉系幹細胞、すなわち、ヒト等の動物組織から採取してから一度も継代培養を経ていない細胞であることが好ましい。後述する実施例に示すように、増殖工程に供する前に無血清培地Ｂにおいて初期の間葉系幹細胞を予め増殖させることによって、増殖工程において得られる間葉系幹細胞の数を極めて顕著に増幅させることが可能となる。

[0070] 一実施形態において、前増殖工程における間葉系幹細胞の培養方法としては、例えば、２×１０^{5}個／ｃｍ^{2}の播種濃度にて無血清培地Ｂにおいて間葉系幹細胞を播種し、その後１週間程度は、播種時培養液量の１０％の無血清培地Ｂを２日毎に追加して添加し、細胞数がコンフルエント状態の７０～８０％となるまで細胞を増殖させる。このように無血清培地Ｂにおいて予め培養した間葉系幹細胞を増殖工程に供することによって、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を効率よく大量に得ることができる。

[0071] また、前増殖工程において間葉系幹細胞をより効率よく増殖させるために、前増殖工程において増殖させる対象となる間葉系幹細胞（以下、「前増殖対象細胞」ともいう）毎に、増殖に適した培養容器を用いて前増殖工程を行うことが好ましい。前増殖対象細胞の増殖に適した培養容器の選択方法としては、上記「増殖工程」の項で説明したとおりであるのでここでは説明を省

略する。

[0072] また、増殖工程と同様に、前増殖工程では、培養容器に対する前増殖対象細胞の接着が弱い場合に、上記無血清培地Ｂに、細胞接着分子をさらに含有させてもよい。上記細胞接着分子については、上記「増殖工程」の項で説明したとおりであるのでここでは説明を省略する。

[0073] また、増殖工程と同様に、前増殖工程では、間葉系幹細胞を少なくとも１回継代してもよい。前増殖工程の途中で間葉系幹細胞を継代することによって培養条件を改善することができる。なお、前増殖工程は、初代培養（Ｐ０）～継代３回目（Ｐ３）までの期間行うことが好ましい。前増殖工程の途中で間葉系幹細胞を継代する方法および前増殖工程後の細胞を増殖工程に供する際の継代方法については、上記「増殖工程」の項で説明したとおりであるのでここでは説明を省略する。

[0074] （培養容器選択工程）

本発明に係る製造方法は、上記増殖工程の前（または上記前増殖工程の前）に、間葉系幹細胞の増殖に適した培養容器を選択する培養容器選択工程をさらに包含していてもよい。間葉系幹細胞の増殖に適した培養容器の選択方法としては、上記「増殖工程」の項で説明したとおりであるのでここでは説明を省略する。

[0075] （２）細胞製剤を製造するための無血清の培地用添加剤

本発明は、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を製造するための無血清の培地用添加剤を提供する。本発明に係る培地用添加剤は、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ－β、ＨＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を含有している。本発明に係る培地用添加剤は、従来公知の基礎培地に添加して、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を製造するための無血清培地（無血清培地Ａ）として使用することができる。

[0076] 本発明に係る培地用添加剤が含有しているリン脂質としては、例えば、フォスファチジン酸、リゾフォスファチジン酸、フォスファチジルイノシト一

ル、フォスファチジルセリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルコリン及びフォスファチジルグリセロールなどが挙げられ、本発明に係る培地用添加剤はこれらのリン脂質を単独で含有しても組み合わせて含有してもよい。一実施形態において、本発明に係る培地用添加剤はフォスファチジン酸とフォスファチジルコリンとを組み合わせて含有している。また、これらのリン脂質は、動物由来であっても、植物由来であってもよい。

[0077] 本実施形態に係る培地用添加剤が含有している脂肪酸としては、例えば、リノール酸、オレイン酸、リノレイン酸、アラキドン酸、ミリスチン酸、パルミトイル酸、パルミチン酸及びステアリン酸等が挙げられ、本実施形態に係る培地用添加剤はこれらの脂肪酸を単独で含有しても組み合わせて含有してもよい。また、本実施形態に係る培地用添加剤は、上記脂肪酸以外にさらにコレステロールを含有していてもよい。

[0078] 本明細書中で使用される場合、ＦＧＦは、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ：ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ）ファミリーから選択される増殖因子が意図され、ＦＧＦ－２（ｂＦＧＦ）であることが好ましいが、ＦＧＦ－１など他のＦＧＦファミリーから選択されてもよい。また、本明細書中で使用される場合、ＰＤＧＦは、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ：ｐｌａｔｅｌｅｔ ｄｅｒｉｖｅｄ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ）ファミリーから選択される増殖因子が意図され、ＰＤＧＦ－ＢＢまたはＰＤＧＦ－ＡＢであることが好ましい。さらに、本明細書中で使用される場合、ＴＧＦ－βは、トランスフォーミング増殖因子－β（ＴＧＦ－β：ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ－β）ファミリーから選択される増殖因子が意図され、ＴＧＦ－β３であることが好ましいが、他のＴＧＦ－βファミリーから選択されてもよい。

[0079] 本明細書中で使用される場合、ＨＧＦは、肝細胞増殖因子（ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ）ファミリーから選択される増殖因子が意図され、ＥＧＦは、上皮増殖因子（ＥＧＦ：ｅｐｉｄｅｒｍａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ）ファミリーから選択される増殖因子が意図され

る。

[0080] また、一実施形態において、無血清培地Ａは、結合組織増殖因子（ＣＴＧＦ：ｃｏｎｎｅｃｔｉｖｅ ｔｉｓｓｕｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ：ｖａｓｃｕｌａｒ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ）及びアスコルビン酸化合物からなる群より選択される少なくとも２つの因子をさらに含有していてもよい。

[0081] 本明細書中で使用される場合、アスコルビン酸化合物は、アスコルビン酸（ビタミンＣ）もしくはアスコルビン酸２リン酸、またはこれらに類似する化合物が意図される。

[0082] なお、本発明に係る培地用添加剤に含有されている増殖因子は、天然のものであっても、遺伝子組換えによって製造されたものであってもよい。

[0083] １つの局面において、本発明に係る培地用添加剤は、脂質酸化防止剤を含有していることが好ましい。一実施形態において、本実施形態に係る培地用添加剤に含有される脂質酸化防止剤は、ＤＬ－α－トコフェロールアセテート（ビタミンＥ）であり得る。本発明に係る培地用添加剤はまた、界面活性剤をさらに含有していてもよい。一実施形態において、本実施形態に係る培地用添加剤に含有される界面活性剤はＰｌｕｒｏｎｉｃ Ｆ－６８またはＴｗｅｅｎ ８０であり得る。

[0084] 本発明に係る培地用添加剤は、インスリン、トランスフェリンおよびセレネートをさらに含有していてもよい。本明細書中で使用される場合、インスリンは、インスリン様増殖因子であってもよく、天然の細胞由来であっても、遺伝子組換えによって製造されたものでもよい。本発明に係る培地用添加剤はさらに、デキサメタゾン、あるいは他のグルココルチコイドを含有していてもよい。

[0085] （３）動物細胞を無血清培養するためのキット

本発明は、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を製造するための無血清の培地用添加剤を提供する。本発明に係る培地用添加剤（培地用添加剤Ａ）は、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ－β、ＨＧＦ、ＥＧＦ

、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を含有している。また、本発明に係る培地用添加剤は、細胞接着分子をさらに含有していてもよい。

[0086] 本発明に係る培地用添加剤キットは、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ－β、ＨＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸とを同一容器内に備えていても、これらの成分を別々に備えていてもよい。また、本発明に係る培地用添加剤キットは、細胞接着分子をさらに含有していてもよい。

[0087] 上記細胞接着分子については、本明細書における上記「（１）間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法」の項の「増殖工程」において説明したとおりであるのでここでは説明を省略する。

[0088] 本発明に係る培地用添加剤キットは、従来公知の基礎培地に添加して、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を製造するための無血清培地（無血清培地Ａ）として使用することができる。

[0089] 本明細書中で使用される場合、「組成物」は各主成分が一物質中に含有されている形態であり、「キット」は各主成分の少なくとも１つが別物質中に含有されている形態であることが意図される。よって、本発明に係る培地用添加剤キットに備えられている増殖因子、リン脂質及び脂肪酸は、培地用添加剤について上述したものと同一であることが容易に理解される。

[0090] また、本発明にかかるキットは、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を製造するためのキットであって、本発明にかかる培地用添加剤（培地用添加剤Ａ）を少なくとも備えている。また、本発明にかかるキットは、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を含有する培地用添加剤Ｂをさらに備えていてもよい。なお、「無血清培地Ｂ」についての説明を「培地用添加剤Ｂ」についての説明として読み替えることができる。

[0091] （４）細胞製剤を製造するための無血清の培養培地

本発明は、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を

製造するための無血清の培養培地を提供する。本発明に係る培養培地は、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ－β、ＨＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を含有している。本発明に係る培養培地は、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を製造するための無血清培地（無血清培地Ａ）として使用することができる。

[0092] 本発明に係る培養培地は、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ－β、ＨＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を含有していればよく、これらの成分は基礎培地に同時に添加されても別々に添加されてもよい。すなわち、本発明に係る培養培地は、上述した培地用添加剤に含有されている成分または培地用添加剤キット中に備えられている成分を含んでいればよいといえる。

[0093] 本発明に係る培養培地を構成するための基礎培地は、当該分野において周知の動物細胞用培地であれば特に限定されず、好ましい基礎培地としては、例えば、Ｈａｍ’ｓ　Ｆ１２培地、ＤＭＥＭ培地、ＲＰＭＩ－１６４０培地、ＭＣＤＢ培地などが挙げられる。これらの基礎培地は、単独で使用されても、複数を混合して使用されてもよい。一実施形態において、本発明に係る培養培地を構成するための基礎培地は、ＭＣＤＢとＤＭＥＭとを１：１の比率で混合した培地が好ましい。

[0094] （５）細胞製剤を製造するための培養方法

本発明は、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を製造するための培養方法を提供する。本発明に係る培養方法は、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ－β、ＨＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を含有している無血清培地（無血清培地Ａ）中において間葉系幹細胞を培養する工程（培養工程Ａ）を包含している。本発明に係る培養方法は、間葉系幹細胞を培養する際に、上述した無血清の培養培地を用いればよいといえる。

[0095] また、本発明に係る培養方法は、上記培養工程Ａの前に、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を含

有する無血清培地Ｂにおいて、間葉系幹細胞を培養する工程（培養工程Ｂ）をさらに包含していてもよい。

[0096] なお、上記「培養工程Ａ」および上記「培養工程Ｂ」は、本発明に係る間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法における「増殖工程」および「前増殖工程」にそれぞれ対応している。このため、本明細書における上記「（１）間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法」の項の「増殖工程」および「前増殖工程」についての説明を、それぞれ、「培養工程Ａ」および「培養工程Ｂ」についての説明として読み替えることができる。

[0097] 一実施形態において、本発明に係る培養方法は、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ－β、ＨＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を、基礎培地に同時に添加する工程を包含してもよい。また、一実施形態において、本発明に係る培養方法は、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を、基礎培地に同時に添加する工程を包含してもよい。上記基礎培地は、上述したように当該分野において周知の動物細胞用培地であれば特に限定されない。

[0098] （６）さらなる用途

上述したように、本発明によれば、無血清又は低血清培地であっても血清含有培地において培養した場合と同等又はそれ以上の速度で、間葉系幹細胞を増殖させることが可能である上に、増殖させた間葉系幹細胞の免疫抑制能が維持又は向上している。さらに、本発明において増殖させた間葉系幹細胞は、造腫瘍性を有していない間葉系幹細胞が選択的に増加している。さらに、本発明において増殖させた間葉系幹細胞は、分化能が維持又は向上している（特許文献１参照のこと）。したがって、このような間葉系幹細胞を含む細胞製剤を患者に投与した場合、間葉系幹細胞による優れた移植治療が実現できるのみならず、移植治療の大きな問題の１つである免疫拒絶反応を効果的に抑制し、患者の負担を軽減すると共に、安定した治療を実現し得る。また、血清を用いて製造した従来の細胞製剤と比較して、血清のロット差を考慮する必要がなく、移植治療において安定した治癒率を実現できる。

[0099] さらに、本発明により製造した細胞製剤に含まれる間葉系幹細胞は、間葉系幹細胞が本来有する免疫エフェクター細胞に影響を及ぼす機能を維持していると言えるので、さらに、当該間葉系幹細胞は免疫調節作用及び免疫寛容作用を有し、これらの作用を期待した治療にも本発明により製造した細胞製剤を適用することが期待できる。さらに、本発明により製造した細胞製剤によれば、間葉系幹細胞の抗炎症作用により、移植治療における抗炎症剤としての機能も期待できる。また、本細胞製剤には、抗炎症作用による老化抑制効果も期待される。

[0100] さらに、本発明により製造した細胞製剤は、間葉系幹細胞の移植を必要とする箇所に投与（局所投与）する局所疾患の治療のみならず、静脈内等に投与して全身に運搬させる全身投与により、骨髄移植等により引き起こされる急性ＧＶＨＤ等による強い免疫拒絶反応に対する治療をより効果的に行い、ヒトの救命率を著しく向上させること期待される。また、本発明により製造した細胞製剤は、無血清培養により製造したものであるので、有用な成長因子や分化因子が血清タンパク質と共に、セラミックス等の移植材料に非特異的に吸着されることがない。したがって、本発明により製造した細胞製剤の移植による組織再生能力は一段と高く、その結果、治療効果も高い。さらに、局所投与と全身投与とを併合した治療も行い得ることは言うまでもない。

[0101] また、本発明により製造した細胞製剤に含まれる間葉系幹細胞は、免疫抑制能を維持又は向上しており、移植時の免疫拒絶反応を抑制するので、自己以外の組織及び細胞を他人に移植する（ドナーとレシピエントとが異なる）他家移植による治療に適用することが可能である。さらに、ヒト組織又はヒト細胞を用いたアロ移植（同種移植）のみならず、ヒト以外の動物組織又は動物細胞を用いたゼノ移植（異種移植）にも好適に使用可能であると言える。

[0102] さらに、本発明により製造した細胞製剤は、従来の血清含有培地のみを用いて得られた間葉系幹細胞よりも早期に免疫抑制効果を発揮させるので、移植時に治療効果を早期に発現させることが期待され、治癒率の増加が見込ま

れる。

[0103] また、本発明に係る間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法は、上記増殖工程後の間葉系幹細胞を、上記スクリーニング工程の前に、血清を含む培地において培養する血清培養工程をさらに包含していてもよい。

[0104] また、本発明に係る間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法は、上記増殖工程の前に、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を含有する無血清培地Ｂにおいて、間葉系幹細胞を増殖させる前増殖工程をさらに包含していることが好ましい。

[0105] 上記増殖工程後の間葉系幹細胞から、造腫瘍性を有していない間葉系幹細胞をスクリーニングする第２スクリーニング工程をさらに包含していてもよい。

[0106] また、本発明に係る間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法は、上記増殖工程において、上記間葉系幹細胞の増殖に適した培養容器を用いて当該間葉系幹細胞を増殖させることが好ましい。

[0107] また、本発明に係る間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法は、上記増殖工程において、上記無血清培地Ａに、細胞接着分子をさらに含有させることが好ましい。

[0108] また、本発明に係る間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法は、上記増殖工程において、上記間葉系幹細胞を少なくとも１回継代してもよい。

[0109] また、本発明に係る間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法は、上記増殖工程において、継代を行う場合に、哺乳類および微生物由来の成分を含有していない細胞剥離剤を用いて上記間葉系幹細胞を剥離することが好ましい。

[0110] また、本発明に係る間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法は、上記増殖工程の前に、間葉系幹細胞の増殖に適した培養容器を選択する培養容器選択工程をさらに包含していてもよい。

[0111] さらに、本発明に係る間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法において、上記リン脂質が、フォスファチジン酸、リゾフォスファチジン酸、フォスファチジルイノシトール、フォスファチジルセリン、フォスファチジルエタノ

ールアミン、フォスファチジルコリン、及びフォスファチジルグリセロールからなる群より選択されることを特徴としている。

[0112] また、本発明に係る間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法において、上記脂肪酸が、リノール酸、オレイン酸、リノレイン酸、アラキドン酸、ミリスチン酸、パルミトイル酸、パルミチン酸、及びステアリン酸からなる群より選択されることを特徴としている。

[0113] また、本発明にかかる培地用添加剤は、細胞接着分子をさらに含有していてもよい。

[0114] また、本発明にかかるキットは、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＥＧＦ、少なくとも１つのリン脂質、及び少なくとも１つの脂肪酸を含有する培地用添加剤Ｂをさらに備えていてもよい。

[0115] なお、発明を実施するための形態の項においてなした具体的な実施態様および以下の実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、当業者は、本発明の精神および添付の特許請求の範囲内で変更して実施することができる。

[0116] また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

実施例

[0117] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

[0118] 〔実施例１〕

以下の実験を行った。

[0119] （１．細胞培養）

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（骨髄由来ｈＭＳＣ）は、Ｌｏｎｚａ Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ，Ｉｎｃ．（以下、Ｌｏｎｚａ社）より購入し、Ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ（ＭＳＣＢＭ）（Ｌｏｎｚａ社）にＭｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｇｒｏ

ｗｔｈ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（ＭＣＧＳ）（Ｌｏｎｚａ社）を加えた血清含有培地（ＭＳＣＧＭ培地）、又は表１に示す無血清の培地１で培養した。

[表1]

	Source	Effective concentration	Optimum concentration
基礎培地			
DMEM/MCDB201	Sigma:D6046/M6770	1:1	
Supplement A (基礎因子)			
(human recombinant) Basic fibroblast growth factor (bFGF)	Pepro Tech:100-18B	0.1～100ng/ml	3ng/ml
Dexamethasone (Dex)	Sigma:D1756	10^{-6}～10^{-10}M	10^{-8}M
(human recombinant) Insulin	Wako:090-03446	0.5～50μg/ml	6.25μg/ml
Transferrin	Sigma:T0665	0.5～50μg/ml	6.25μg/ml
Selenous acid	Sigma:21,117-6	0.1～50ng/ml	6.25ng/ml
Bovine serum albumin(BSA)	Sigma:A8806	0.1～50mg/ml	1.25mg/ml
Supplement B-1 (基礎脂質1)			
Chemically defined lipid concentrate (CD)	Gibco:11905-031	1/1000～1/10	1/100
(原液濃度: Arachidonic Acid 2.0μg/ml, Cholesterol 220.00μg/ml, DL-α-Tocopherol-Acetate 70.00μg/ml, Linoleic Acid 540.00μg/ml, Linolenic Acid 10.00μg/ml, Myristic Acid 10.00μg/ml, Oleic Acid 10.00μg/ml, Palmitoleic Acid 10.0μg/ml, Palmitic Acid 10.0μg/ml, Stearic Acid 10.00μg/ml)			
Supplement B-2 (基礎脂質2)			
Lecithin from Soybean (LS)	Waco:120-00832	0.5～50μg/ml	10μg/ml
cholesterol lipid concentrate (chol)	Gibco:12531-018	0.1～30μg/ml	3μg/ml
(+α)-Tocopherol-Acetate (VE)	Sigma:T1157	0.1～50μg/ml	2μg/ml
Supplement C			
(human recombinant) Hepatocyte growth factor (HGF)	Sigma:H1404	0.1～50ng/ml	5ng/ml
(human recombinant) Transforming growth factor-β_3 (TGF-β_3)	Pepro Tech:100-36	0.5～100ng/ml	10ng/ml
(human recombinant) Platelet derived growth factor (PDGF-BB)	Waco:160-19741	0.5～100ng/ml	10ng/ml
Others			
(human recombinant) Epidermal growth factor (EGF)	Waco:050-07141	0.5～200ng/ml	20ng/ml
Ascorbic acid (VC)	Sigma:A8960	0.5～200μg/ml	50μg/ml
Phosphatidylcholine (PC)	Wako:163-21181	0.5～100μg/ml	10μg/ml
Phosphatidic acid sodium salt (PA)	Sigma:P9511	0.5～100μg/ml	10μg/ml
(human recombinant) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	Sigma:V3388	0.5～100ng/ml	10ng/ml
(human recombinant) Connective Tissue Growth Factor (CTGF)	Wako:036-19471	0.1～20μg/ml	1μg/ml

[0120] マウス脾細胞（ｓｐｌｅｎｏｃｙｔｅ）として、日本チャールズリバー株式会社より購入したＢＡＬＢ／ｃ（Ｈ－２ｄ）の脾臓をすりつぶして溶血させた後、１％ＦＢＳ／Ａｄｖａｎｃｅｄ ＰＲＭ１（ＧＩＢＣＯ社）に懸濁したものを実験に用いた。

[0121] （２．脾臓細胞の活性化）

＜２－１：マイトジェンによる刺激＞

９６ウエルプレートの各ウエルに、マウス脾臓細胞（１×１０^5）を播種し、２．５ｎｇ／ｍｌ Ｐｈｏｒｂｏｌ １２－ｍｙｒｉｓｔａｔｅ １３－ａｃｅｔａｔｅ（以下、ＰＭＡと称する）、１２５ｎｇ／ｍｌ ｉｏｎｏｍｙｃｉｎで刺激した。

[0122] ＜２－２：ａｎｔｉ－ＣＤ３／ａｎｔｉ－ＣＤ２８による刺激＞

９６ウエルプレートの各ウエルにマウス脾臓細胞（１×１０^5）を播種し、２．５μｇ／ｍｌ ａｎｔｉ－ＣＤ３、０．５μｇ／ｍｌ ａｎｔｉ－ＣＤ２８で刺激した。

[0123] （３．活性化脾臓細胞と骨髄由来ｈＭＳＣとの共培養）

骨髄由来ｈＭＳＣの前処理として、９６ウエルプレートの各ウエルに、骨髄由来ｈＭＳＣ１×１０^{4}を播種し、張り付いたのを確認してから（数時間から一晩培養）、ガンマセル４０イグザクターを用いてガンマ線照射を行い、細胞分裂を阻害した。その上に、上述したように活性化したマウス脾臓細胞を播種し、骨髄由来ｈＭＳＣと共培養した。

[0124] （４．細胞増殖測定）

共培養開始から３日目及び４日目に、各ウエルに[^{3}Ｈ]－Ｔｈｙｍｉｄｉｎｅを加え、さらに８時間培養した。培養細胞をガラスフィルターに吸着させた後、液体シンチレーションカウンターでＴｈｙｍｉｄｉｎｅの取り込みを測定し、細胞増殖を測定した。

[0125] （５．結果）

骨髄由来ｈＭＳＣとマウス由来活性化Ｔ細胞との共培養を、１０％ＦＢＳ含有のＭＳＣＧＭ培地又は無血清培地Ａである培地１（ＳＴＫ２（登録商標

））で培養した結果を、図１～４に示す。図１～４おいて、値は平均±標準偏差で示している。同様の結果が、３回以上の独立した実験結果から得られた。＃４及び＃５は、それぞれ独立した骨髄由来ｈＭＳＣの結果を示している。

[0126] 図１は、ＭＳＣＧＭ培地においてマウス由来活性化Ｔ細胞と骨髄由来ｈＭＳＣとを共培養したときの、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８刺激Ｔ細胞増殖反応に対する骨髄由来ｈＭＳＣの免疫抑制効果を示すグラフであり、図２は、培地１においてマウス由来活性化Ｔ細胞と骨髄由来ｈＭＳＣとを共培養したときの、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８刺激Ｔ細胞増殖反応に対する骨髄由来ｈＭＳＣの免疫抑制効果を示すグラフである。

[0127] 図３は、ＭＳＣＧＭ培地においてマウス由来活性化Ｔ細胞と骨髄由来ｈＭＳＣとを共培養したときの、ＰＭＡ及びイオノマイシン刺激（マイトジェン刺激）Ｔ細胞増殖反応に対する骨髄由来ｈＭＳＣの免疫抑制効果を示すグラフであり、図４は、培地１においてマウス由来活性化Ｔ細胞と骨髄由来ｈＭＳＣとを共培養したときの、ＰＭＡ及びイオノマイシン刺激（マイトジェン刺激）Ｔ細胞増殖反応に対する骨髄由来ｈＭＳＣの免疫抑制効果を示すグラフである。

[0128] 図１～４に示すように、培地１で培養した骨髄由来ｈＭＳＣは、血清を含有するＭＳＣＧＭ培地で培養した骨髄由来ｈＭＳＣと同様に、マイトジェン刺激により活性化したＴ細胞及び抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８刺激により活性化したＴ細胞の増殖を抑制した。すなわち、無血清の培地１を用いて培養した骨髄由来ｈＭＳＣが、免疫抑制作用を維持していることが示された。

[0129] 〔実施例２〕

マウスリンパ球混合反応（ＭＬＲ）によるＴ細胞増殖に対する骨髄由来ｈＭＳＣの免疫抑制効果を調べた。実験方法、並びに使用した細胞及び培地は、実施例１と同様である。骨髄由来ｈＭＳＣの前処理として、９６ウエルプレートの各ウエルに２×１０^{4}の骨髄由来ｈＭＳＣを播種し、実施例１と同様に行った。また、マウス脾臓細胞の活性化を、９６ウエルプレートの各ウエ

ルにおいて、マウス脾臓細胞（２×１０^5）とマウス骨髄由来樹状細胞（ＢＭＤＣ）（３．３×１０^4）とを共培養することによって行った（ＭＬＲ刺激）。

[0130] なお、ＢＭＤＣは、日本チャールズリバー株式会社より購入したＣ３Ｈ（Ｈ－２ｋ）から骨髄細胞を回収して溶血させた後、ＧＭ－ＣＳＦを入れた１％ＦＢＳ／Ａｄｖａｎｃｅｄ　ＰＲＭＩ（ＧＩＢＣＯ社）で一日おきに培地を交換し、培養６日目に１００ｎｇ／ｍｌ　ＬＰＳで刺激を与えて一晩培養した後洗浄し、ガンマセル４０イグザクターを用いてガンマ線照射を行い、細胞分裂阻害したものを実験に用いた。

[0131] 骨髄由来ｈＭＳＣをＭＳＣＧＭ培地及び培地１でそれぞれ前培養した後、前培養後のそれぞれの骨髄由来ｈＭＳＣと、上記のように活性化したマウス脾臓細胞とを、ＭＳＣＧＭ培地で共培養した。結果を図５及び６に示す。図５及び６は、ＭＬＲによるＴ細胞増殖に対する骨髄由来ｈＭＳＣの免疫抑制効果を示すグラフである。値は平均±標準偏差で示している。同様の結果が、３回以上の独立した実験結果から得られた。図５は、培養３日目の結果を示し、図６は、培養４日目の結果を示している。図中、ＭはＭＳＣＧＭ培地で前培養した後に血清含有培地で培養した場合の結果を示しており、Ｓは培地１で前培養した後に血清含有培地で培養した結果を示している。

[0132] 図５及び６に示すように、培地１で前培養した骨髄由来ｈＭＳＣは、ＭＳＣＧＭ培地で前培養した骨髄由来ｈＭＳＣと同様に、活性化Ｔ細胞増殖抑制効果を維持していた。また、ＭＳＣＧＭ培地で前培養した骨髄由来ｈＭＳＣは、共培養開始から４日目に免疫抑制効果を示したのに対して、培地１で前培養した骨髄由来ｈＭＳＣは、共培養開始から３日目にすでに免疫抑制効果を示した。すなわち、培地１で前培養した骨髄由来ｈＭＳＣのほうが、より早期に免疫抑制効果を示した。さらに、データを示していないが、マイトジェン刺激Ｔ細胞増殖及び抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８刺激Ｔ細胞増殖に対しても、培地１で前培養した骨髄由来ｈＭＳＣは、同様の結果を示した。

[0133] 実施例１及び２の結果に示すように、培地１で培養した骨髄由来ｈＭＳＣ

は、活性化Ｔ細胞の細胞増殖抑制効果を維持しているだけでなく、ＭＳＣＧＭ培地（血清含有培地）で培養した骨髄由来ｈＭＳＣよりも早期に活性化Ｔ細胞の細胞増殖抑制効果を発揮することが確認できた。また、ＭＳＣＧＭ培地で前培養した骨髄由来ｈＭＳＣと活性化マウス脾臓細胞とを共培養した場合、骨髄由来ｈＭＳＣが免疫抑制効果を示すより前のＴ細胞の増殖が、コントロール培地（骨髄由来ｈＭＳＣを含まない活性化マウス脾臓細胞の培養培地）におけるＴ細胞の増殖よりも活発になる時期があった。

[0134] このように、培地１において骨髄由来ｈＭＳＣを培養すると、短期間で必要な数の細胞を増殖させるのに有利であるだけでなく、免疫抑制効果も維持されていることが示された。このことから、培地１は、特に臨床応用を目指した骨髄由来ｈＭＳＣの培養に有効であると言える。

[0135] 〔実施例３〕

以下の実験を行った。

[0136] （１．細胞培養）

ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞（脂肪組織由来ｈＭＳＣ）は、以下の(i)～(vii)の手順にて分離し、培養した。

(i)ヒトから脂肪組織を採取し、無血清ＤＭＥＭ培地を用いて脂肪組織を２～３回洗浄した。

(ii)洗浄後の脂肪組織を、ハサミを用いて細かく切断した（１mm^3）。

(iii)０．１～０．２%コラゲナーゼ（GIBCO 17100-017）溶液を用いて、スターラーバーで攪拌しながら脂肪組織を処理した（３７℃、３０～６０分）。

(iv)１００ｍｍのフィルターを用いてコラゲナーゼ処理後の脂肪組織を濾過した後、１００×ｇ、１０分間遠心分離を行い、脂肪組織由来ｈＭＳＣを分離した。

(v)Red lysis buffer（sigma R7757）を用いて、スターラーバーで攪拌しながら遠心分離後の細胞を処理した（５～１０分）。

(vi)Red lysis buffer処理後の細胞を、無血清ＤＭＥＭ培地を用いて２～３

回洗浄した。

(vii)洗浄後の細胞を培養用プレート（BECTON, DICKINSON （Falcon）353047）に播種し、表１に示した無血清の培地１、又は１０％ＦＢＳを含有するＭＥＭ培地（sigma D6046）（「１０％ＦＢＳ－ＭＥＭ」と称する。）を用いて培養した。

[0137] （２．細胞増殖測定）

培養開始から８日目に、細胞の増殖状態を光学顕微鏡を用いて目視で観察した。

[0138] （３．結果）

結果を図７に示す。図７は、培養開始から８日目の脂肪組織由来ｈＭＳＣの増殖状態を示す図である。図７では、脂肪組織由来ｈＭＳＣを４０倍に拡大して観察した。図７に示すように、培地１で培養した脂肪組織由来ｈＭＳＣは、１０％ＦＢＳ－ＭＥＭで培養した脂肪組織由来ｈＭＳＣと比較して、顕著に（２～３倍）細胞数が増加していることが示された。

[0139] 〔実施例４〕

以下の実験を行った。

[0140] （１．細胞培養）

ヒト滑膜由来間葉系幹細胞（滑膜由来ｈＭＳＣ）は、以下の(i)～(iii)の手順にて分離した。

(i)ヒトから滑膜を採取した。

(ii)得られた滑膜細胞をＰＢＳで洗浄後、組織を０．４％コラゲナーゼ溶液１０ｍｌ中に加えて混和し、３７℃で１～４時間反応させた。

(iii)フィルタリング後、遠心分離した。

[0141] 遠心分離によって得られた初期の滑膜由来ｈＭＳＣを、以下の培地を用いて培養した。なお、無血清培地Ｂである培地２は、表１に示した培地１からＨＧＦおよびＴＧＦ－βを除いた培地である。

・１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ（１０％ＦＢＳ－ＤＭＥＭ）（sigma D6046、FBS;Hyclone, PS(+)）

・培地１

・培地２

培養は、３７℃に保った炭酸ガスインキュベータ内（95% air and 5% CO_2）で行った。

[0142] （２．細胞増殖測定）

培養開始から１２日目（継代０回目）に、細胞の増殖状態を光学顕微鏡を用いて目視で観察した。また、細胞の数をコールターカウンターによって測定した。

[0143] （３．結果）

結果を図８に示す。図８は、初期の滑膜由来ｈＭＳＣに対する培地１および培地２の増殖促進効果を示す図であり、（ａ）は、培養開始から１２日目の滑膜由来ｈＭＳＣの細胞数を示すグラフであり、（ｂ）は、培養開始から１２日目の滑膜由来ｈＭＳＣの増殖状態を示す図である。図８の（ｂ）では、滑膜由来ｈＭＳＣを１０倍に拡大して観察した。

[0144] 図８の（ａ）のグラフに示したように、初期の滑膜由来ｈＭＳＣに対しては、培地２の増殖促進効果が顕著に（培地１を用いた場合の８倍、１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭを用いた場合の４０倍以上）高いことが確認された。

[0145] 〔実施例５〕

以下の実験を行った。

[0146] （１．細胞培養）

ヒト滑膜由来間葉系幹細胞（滑膜由来ｈＭＳＣ）は、実施例４の「１．細胞培養」の項に示した(i)～(iii)の手順によって分離した。

[0147] 遠心分離によって得られた初期の滑膜由来ｈＭＳＣを、培地２を用いて１１日間培養し、その後、以下の培地を用いて培養した。

・１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ（１０％ＦＢＳ－ＤＭＥＭ）（sigma D6046、FBS;Hyclone, PS(+)）

・培地１

・培地２

培養は、３７℃に保った炭酸ガスインキュベータ内（95% air and 5% CO_2）で行った。

[0148] （２．細胞増殖測定）

細胞の数をコールターカウンターによって測定した。

[0149] （３．結果）

結果を図９に示す。図９は、培養開始０日目から６８日目までの滑膜由来ｈＭＳＣの細胞数の経時的な変化を示すグラフである。

[0150] 図９のグラフに示したように、初期の滑膜由来ｈＭＳＣに対しては、培地２を用いて培養し、その後、培地１を用いて滑膜由来ｈＭＳＣを培養することによって、滑膜由来ｈＭＳＣを効率よく増幅させ得ることが確認された（培養開始から４８日目において、培養開始から１１日目より１０％ＦＢＳ－ＤＭＥＭを用いた場合の１０万倍、培養開始０日目から６８日目まで培地２を用いた場合の１万倍）。

[0151] 〔実施例６〕

以下の実験を行った。

[0152] （１．細胞培養）

ヒト滑膜由来間葉系幹細胞（滑膜由来ｈＭＳＣ）は、実施例４の「１．細胞培養」の項に示した(i)～(iii)の手順によって分離した。

[0153] 滑膜由来ｈＭＳＣを分離・増殖するために、遠心分離によって得られた滑膜由来ｈＭＳＣをフラスコに移し、初代培養（Ｐ０）から継代３回目（Ｐ３）までは培地２を用い、継代１回目（Ｐ１）～継代４回目（Ｐ４）の間では表１に示した培地１を用いて培養した。培養は、３７℃に保った炭酸ガスインキュベータ内（95% air and 5% CO_2）で培養した。

[0154] 培養中の培地の交換は週に２回行った。細胞の継代は、７～２１日間隔で行った。滑膜由来ｈＭＳＣは、培地１ｍｌに対して１～２×１０^{4}個の間葉系幹細胞を播種し、３７℃、５％CO_2培養条件下にて増殖させた。

[0155] （２．結果）

１ｇの滑膜組織から培地２と培地１を組み合わせて培養することによって

、３～４週間で１０００人分（変形性関節症の最大移植細胞数：１．５×１０^{9}個）の増殖を取得することができた。

[0156] 〔実施例７〕

以下の実験を行った。

[0157] （フラスコ）

以下のフラスコを用いた。

・フラスコ１：ファルコン製７５ｃｍ^{2}フラスコ

・フラスコ２：住友ベークライト製７５ｃｍ^{2}フラスコ

（培養液）

以下の培養液を用いた。

・１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ（１０％ＦＢＳ－ＤＭＥＭ）（sigma D6046、FBS;Hyclone, PS(+)）

・培地１

・培地１＋フィブロネクチン（終濃度５μｇ／ｍＬ）

（細胞）

以下の骨髄由来間葉系幹細胞（骨髄由来ｈＭＣＳ）を用いた。

・細胞１（Ｐ２）：１×１０^{6}個、細胞を起して培養１２日目に継代したもの。

・細胞２（Ｐ３）：１×１０^{6}個、細胞を起して培養３０日目に継代したもの。増殖スピードが遅い。

・細胞３（Ｐ１）：１×１０^{6}個、細胞を起して培養１２日目に継代したもの。

[0158] （培養方法）

５，０００個／ｃｍ^{2}の播種密度で、以下の条件にてそれぞれの骨髄由来ｈＭＣＳ（細胞１～細胞３）を培養した。なお、培養液３を用いる場合は、播種時のみフィブロネクチンを添加した。

・条件Ａ：フラスコ１＋１０％ＦＢＳ－ＤＭＥＭ（ポジティブコントロール）

・条件Ｂ：フラスコ１＋培地１

・条件Ｃ：フラスコ１＋培地１＋フィブロネクチン

・条件Ｄ：フラスコ２＋１０％ＦＢＳ－ＤＭＥＭ（ネガティブコントロール）

・条件Ｅ：フラスコ２＋培地１

・条件Ｆ：フラスコ２＋培地１＋フィブロネクチン

（２．細胞増殖測定）

＜細胞１＞

継代３回目になった時点でフラスコに細胞を播種し、培養を開始した。培養開始から５日目に、細胞の増殖状態を光学顕微鏡を用いて目視で観察した。

[0159] ＜細胞２＞

継代４回目になった時点でフラスコに細胞を播種し、培養を開始した。培養開始から５日目に、細胞の増殖状態を光学顕微鏡を用いて目視で観察した。

[0160] ＜細胞３＞

継代２回目になった時点でフラスコに細胞を播種し、培養を開始した。培養開始から５日目に、細胞の増殖状態を光学顕微鏡を用いて目視で観察した。

[0161] （３．結果）

＜細胞１＞

結果を図１０に示す。図１０は、培養開始から５日目の骨髄由来ｈＭＳＣ（細胞１）の増殖状態を示す図である。図１０では、骨髄由来ｈＭＳＣを４０倍に拡大して観察した。

[0162] 図１０に示すように、条件Ａおよび条件Ｄでは、死細胞が認められるが、３割前後の接着した細胞も認められた。また、条件Ｂおよび条件Ｅでは、局所的に細胞が増殖していた。条件Ａおよび条件Ｄで培養した細胞とは、細胞の接着状態が明らかに異なり、２割前後の細胞の接着が認められた。さらに

、条件Ｃおよび条件Ｆでは、条件Ｂおよび条件Ｅと同様に、局所的に細胞が増殖していた。条件Ｆでは、フラスコごとに細胞のバラつきが認められるが、条件Ｂおよび条件Ｅと同様に、２割前後の細胞の接着が認められた。

[0163] ＜細胞２＞

結果を図１１に示す。図１１は、培養開始から５日目の骨髄由来ｈＭＳＣ（細胞２）の増殖状態を示す図である。図１１では、骨髄由来ｈＭＳＣを４０倍に拡大して観察した。

[0164] 図１１に示すように、条件Ａおよび条件Ｄでは、細胞２は、順調に増殖し、コンフルエント状態の約７割程度に増殖した。細胞の状態は良好であった。また、条件Ｂでは、細胞２は、コンフルエント状態の７～８割程度に増殖し、条件Ｅでは、コンフルエント状態の９割程度に増殖し、ほぼコンフルエント状態になっていた。条件Ｂおよび条件Ｅでは、条件Ａおよび条件Ｄと比較して、細胞が萎縮して穴のような空間ができていた。さらに、条件Ｃおよび条件Ｆでは、共に、細胞２は、コンフルエント状態の８割程度に増殖した。細胞の接着状態は、条件Ｂおよび条件Ｅと同じ状態であったが、細胞の数はやや少なめであった。

[0165] ＜細胞３＞

結果を図１２に示す。図１２は、培養開始から５日目の骨髄由来ｈＭＳＣ（細胞３）の増殖状態を示す図である。図１２では、骨髄由来ｈＭＳＣを４０倍に拡大して観察した。

[0166] 図１２に示すように、条件Ａおよび条件Ｄでは、細胞３は、コンフルエント状態の８～９割程度に増殖し、ややコンフルエントの状態になっていた。また、条件Ｂおよび条件Ｅでは、条件Ｂにおいて細胞の剥離が一部認められたが、それ以外は、コンフルエント状態の８～９割程度に増殖した。さらに、条件Ｃおよび条件Ｆでは、条件Ｂおよび条件Ｅと比較して、細胞の剥離が認められず、コンフルエント状態の９割程度に増殖していた。

[0167] 以上の結果から、条件Ｂおよび条件Ｅでは、細胞１～３の何れの細胞株を用いた場合であっても、条件Ｅの方が、細胞増殖能が高いことが確認された

。すなわち、細胞１～３の増殖には、フラスコ１よりもフラスコ２の方が適していることが確認された。

[0168] また、条件Ｃおよび条件Ｆのように、細胞接着分子としてのフィブロネクチンを添加することによって細胞の接着率が向上することが確認された。

[0169] 〔実施例８〕

以下の実験を行った。

[0170] （１．軟寒天コロニー法）

９６ウェルプレートを用いて、各ウェルに軟寒天培地（ＤＭＥＭ－１０％ＦＣＳ－０．６%寒天）を加え、ゲル化した後に細胞を懸濁した軟寒天培地（ＤＭＥＭ－１０％ＦＣＳ－０．４%寒天）を添加した。細胞は、ヒト軟骨肉腫細胞株（ＯＵＭＳ－２７、ＪＣＲＢ細胞バンクから購入）、正常ヒト皮膚線維芽細胞（ＮＨＤＦ、ロンザ社から購入）を用いて、ウェルあたりの細胞播種数は０～１００００個とした。ヒト軟骨肉腫細胞株は、間葉系の細胞がガン化したものである。軟寒天培地上に添加する培養液の血清含有量が１０%、２０%の群を作製した。なお、本実験において培養液に血清を添加したのは、細胞がより活発に増殖すると考えられる条件とするためである。

[0171] 培養開始から２週間後に、コロニーをp-iodonitrotetrazolium Violet (Sigma product.)によって染色し、顕微鏡下で各ウェル内に形成されたコロニー数を数えた。コロニーの直径が２５μｍ以上のものを形成されたコロニーとして数えた。

[0172] （培養液）

以下の培養液を用いた。

・４．５ｇ／Ｌグルコース含有ＤＭＥＭ（ＤＭＥＭ　４．５ｇ／Ｌ　ｇｌｕｃｏｓｅ）

・培地１（表１を参照）

なお、４．５ｇ／Ｌグルコース含有ＤＭＥＭにおいて、グルコースは、コロニー形成・増殖促進を目的として添加している。ＯＵＭＳ－２７は、低濃度のグルコース培地（１ｇ／ｍｌ）ではコロニー形成が悪いと考え、高濃度

グルコース含有培地（市販品）を選んで、培養に使用した。

[0173] （２．結果）

図１３は、正常ヒト皮膚線維芽細胞およびヒト軟骨肉腫細胞株の増殖に対する培地１の効果を示すグラフであり、（ａ）は、培養開始から１４日目の正常ヒト皮膚線維芽細胞のコロニー数を示すグラフであり、（ｂ）は、培養開始から１４日目のヒト軟骨肉腫細胞株のコロニー数を示すグラフである。なお、図１３では、大きさが２５μｍ以上のコロニーの数を示す。

[0174] 図１３の（ａ）のグラフに示したように、正常ヒト皮膚線維芽細胞では、培地１を用いて正常ヒト皮膚線維芽細胞を培養した場合に、４．５ｇ／ＬグルコースDMEMを用いて培養した場合と比較して形成されるコロニーの数が顕著に増加した。一方、図１３の（ｂ）のグラフに示したように、ヒト軟骨肉腫細胞株では、培地１を用いて正常ヒト皮膚線維芽細胞を培養した場合に、４．５ｇ／ＬグルコースDMEMを用いて培養した場合と比較して形成されるコロニーの数が顕著に減少した。

[0175] この結果から、培養液として培地１を用いて細胞を培養した場合、正常ヒト皮膚線維芽細胞にある幹細胞、すなわち造腫瘍性を有していない細胞は、増殖が促進され、一方、ヒト軟骨肉腫細胞株のような造腫瘍性を有している細胞は、増殖が抑制されることが明らかになった。すなわち、培養液として培地１を用いて細胞を培養することによって、造腫瘍性を有している細胞の増殖を選択的に抑制しつつ、造腫瘍性を有していない正常な細胞を選択的に効率よく増殖させ得ることが明らかになった。

[0176] さらに、この結果から、培養液が異なる以外は同一の条件で軟寒天コロニー法を行った場合に、培養液として４．５ｇ／ＬグルコースDMEMを用いた方が、培養液として培地１を用いた場合よりも形成されるコロニーの数が有意に多い場合に、その細胞は造腫瘍性を有している細胞であると判断し、培養液として４．５ｇ／ＬグルコースDMEMを用いた方が、培養液として培地１を用いた場合よりも形成されるコロニーの数が有意に少ない場合に、その細胞は造腫瘍性を有していない細胞であると判断できることが

示唆された。

[0177] 本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

産業上の利用可能性

[0178] 本発明を用いれば、間葉系幹細胞を用いたより安全かつ利用価値の高い移植治療材料を提供することができるので、間葉系幹細胞を用いた移植治療等の再生医療に好適に利用可能である。

請求の範囲

[請求項1] ＦＧＦ、
ＰＤＧＦ、
ＴＧＦ－β、
ＨＧＦ、
ＥＧＦ、
少なくとも１つのリン脂質、及び
少なくとも１つの脂肪酸を
含有する無血清培地Ａにおいて、間葉系幹細胞を増殖させる増殖工程と、
上記増殖工程後の間葉系幹細胞から、免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞をスクリーニングするスクリーニング工程と
を包含することを特徴とする間葉系幹細胞を含む細胞製剤の製造方法。

[請求項2] 上記増殖工程後の間葉系幹細胞を、上記スクリーニング工程の前に、血清を含む培地において培養する血清培養工程をさらに包含することを特徴とする請求項１に記載の製造方法。

[請求項3] 上記増殖工程の前に、
ＦＧＦ、
ＰＤＧＦ、
ＥＧＦ、
少なくとも１つのリン脂質、及び
少なくとも１つの脂肪酸を
含有する無血清培地Ｂにおいて、間葉系幹細胞を増殖させる前増殖工程をさらに包含することを特徴とする請求項１又は２に記載の製造方法。

[請求項4] 上記増殖工程後の間葉系幹細胞から、造腫瘍性を有していない間葉系幹細胞をスクリーニングする第２スクリーニング工程をさらに包含

することを特徴とする請求項１～３の何れか１項に記載の製造方法。

[請求項5] 上記増殖工程では、上記間葉系幹細胞の増殖に適した培養容器を用いて当該間葉系幹細胞を増殖させることを特徴とする請求項１～４のいずれか１項に記載の製造方法。

[請求項6] 上記増殖工程では、上記無血清培地Ａに、細胞接着分子をさらに含有させることを特徴とする請求項１～５のいずれか１項に記載の製造方法。

[請求項7] 上記増殖工程では、上記間葉系幹細胞を少なくとも１回継代することを特徴とする請求項１～６の何れか１項に記載の製造方法。

[請求項8] 上記増殖工程では、継代を行う場合に、哺乳類および微生物由来の成分を含有していない細胞剥離剤を用いて上記間葉系幹細胞を剥離することを特徴とする請求項７に記載の製造方法。

[請求項9] 上記増殖工程の前に、間葉系幹細胞の増殖に適した培養容器を選択する培養容器選択工程をさらに包含していることを特徴とする請求項５に記載の製造方法。

[請求項10] 上記リン脂質が、フォスファチジン酸、リゾフォスファチジン酸、フォスファチジルイノシトール、フォスファチジルセリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルコリン、及びフォスファチジルグリセロールからなる群より選択されることを特徴とする請求項１～９のいずれか１項に記載の製造方法。

[請求項11] 上記脂肪酸が、リノール酸、オレイン酸、リノレイン酸、アラキドン酸、ミリスチン酸、パルミトイル酸、パルミチン酸、及びステアリン酸からなる群より選択されることを特徴とする請求項１～１０のいずれか１項に記載の製造方法。

[請求項12] 請求項１～１１のいずれか１項に記載の製造方法によって製造された間葉系幹細胞を含む細胞製剤。

[請求項13] ＦＧＦ、

ＰＤＧＦ、

ＴＧＦ－β、

ＨＧＦ、

ＥＧＦ、

少なくとも１つのリン脂質、及び

少なくとも１つの脂肪酸を

含有することを特徴とする免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を製造するための無血清の培地用添加剤。

[請求項14] 細胞接着分子をさらに含有していることを特徴とする請求項１３に記載の培地用添加剤。

[請求項15] 請求項１３又は１４に記載の培地用添加剤を含有していることを特徴とする免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を製造するための無血清の培養培地。

[請求項16] 請求項１５に記載の培養培地において間葉系幹細胞を培養する工程を包含することを特徴とする免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を製造するための培養方法。

[請求項17] 請求項１３又は１４に記載の培地用添加剤Ａを少なくとも備えていることを特徴とする免疫抑制能を維持又は向上した間葉系幹細胞を含む細胞製剤を製造するためのキット。

[請求項18] ＦＧＦ、

ＰＤＧＦ、

ＥＧＦ、

少なくとも１つのリン脂質、及び

少なくとも１つの脂肪酸を

含有する培地用添加剤Ｂをさらに備えていることを特徴とする請求項１７に記載のキット。