明　細　書

発明の名称 ： 多能性幹細胞による周産期脳障害の改善及び治療

技術分野

[0001] 本発明は、再生医療における細胞製剤に関する。より具体的には、多能性幹細胞を含有する、周産期脳障害の治療に有効な細胞製剤及び新規な治療方法に関する。

背景技術

[0002] 周産期脳障害は、胎児期と新生児期に発生した何らかの異常に起因した脳性麻痺、精神発達遅延、てんかん、知覚障害などの脳障害をいうが、その発生原因や病態について明らかにされていない点が多い。昨今では、周産期医学において、胎児の低酸素症に関する研究が進められ、低酸素を障害因子として重要視されてきた。この低酸素症が進行すると、胎児は様々な代謝反応を示し、さらには代謝不全に陥り、脳をはじめとする臓器障害が発生し、死に至るケースも想定される。そこで、分娩時における低酸素症を予防することが、強いては脳性麻痺をはじめとる周産期脳障害の予防へと繋がると考えられている。しかしながら、分娩時の低酸素症を予防することは困難であることも相まって、脳性麻痺のうち約２０％が低酸素症を発症するとも言われている（非特許文献１）。

[0003] 近年、再生医療分野において、幹細胞を用いた細胞療法が様々な疾患に対して研究が行われ、臨床への応用も行われつつある中で、周産期脳障害の改善や治療に幹細胞の適用が期待されている（非特許文献２）。周産期脳障害に関連する中枢神経疾患において、臨床応用への可能性が期待されている幹細胞として、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）、神経幹／前駆細胞（ＮＳＰＣ）、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）、臍帯血幹細胞（ＵＣＢＣ）が知られている。これまで、本発明者らは、周産期低酸素性虚血性脳症（ＨＩＥ）モデルラットに、ラット胎仔脳から培養し、増殖させたＮＳＰＣとコンドロイチン硫酸分解酵素の共投与を脳室内に行ったところ、梗塞面積は、無処理群及び神

経幹細胞単独投与群に比べて有意に減少することを見出している（非特許文献３）。さらに、本発明者らにより、ＨＩＥモデルラットの腹腔内にＵＣＢＣを投与したところ、低酸素性虚血性脳障害を一時的に低下することが確認されている。

[0004] また、骨髄間葉系細胞画分（ＭＳＣ）は、成体から単離され、例えば、骨、軟骨、脂肪細胞、神経細胞、骨格筋等に分化する能力を有することが知られている（非特許文献４及び５）。しかしながら、ＭＳＣは様々な細胞を含む細胞群であり、その分化能の実体が分かっておらず、治療効果にバラつきが大きい。また、成体由来の多能性幹細胞としてｉＰＳ細胞（特許文献１）が報告されているが、ｉＰＳ細胞の樹立には、間葉系細胞である皮膚線維芽細胞画分に特定の遺伝子や特定の化合物を体細胞に導入するという極めて複雑な操作を必要とすることに加え、ｉＰＳ細胞が高い腫瘍形成能力を有することから、臨床応用への極めて高いハードルが存在している。

[0005] 本発明者らの一人である出澤氏の研究により、間葉系細胞画分に存在し、誘導操作なしに得られる、ＳＳＥＡ－３（Ｓｔａｇｅ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ Ａｎｔｉｇｅｎ－３）を表面抗原として発現している多能性幹細胞（Ｍｕｌｔｉｌｉｎｅａｇｅ－ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｎｇ Ｓｔｒｅｓｓ Ｅｎｄｕｒｉｎｇ ｃｅｌｌｓ；Ｍｕｓｅ細胞）が間葉系細胞画分の有する多能性を担っており、組織再生を目指した疾患治療に応用できる可能性があることが分かってきた。また、Ｍｕｓｅ細胞は、間葉系細胞画分を種々のストレスで刺激することにより濃縮できることもわかってきた（特許文献２；非特許文献６）。しかしながら、周産期脳障害の改善及び／又は治療にＭｕｓｅ細胞を使用し、期待される治療効果が得られることを明らかにした例はない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許第４１８３７４２号公報

特許文献2：国際公開第２０１１／００７９００号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：池田智明、脳と発達、４３巻、２０６－２１０頁、２０１１年

非特許文献2：佐藤義朗、周産期医学、４１巻、１５３１－１５３６、２０１１年

非特許文献3：Ｓａｔｏ，Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｒｅｐｏｒｔ　Ｓｃｉ．，Ｖｏｌ．１５，ｐ．６１３－６２０（２００８）

非特許文献4：Ｄｅｚａｗａ，Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，Ｖｏｌ．１１３，ｐ．１７０１－１７１０（２００４）

非特許文献5：Ｄｅｚａｗａ，Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，Ｖｏｌ．３０９，ｐ．３１４－３１７（２００５）

非特許文献6：Ｗａｋａｏ，Ｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，Ｖｏｌ．１０８，ｐ．９８７５－９８８０（２０１１）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、再生医療において、多能性幹細胞（Ｍｕｓｅ細胞）を用いた新たな医療用途を提供することを目的とする。より具体的には、本発明は、Ｍｕｓｅ細胞を含む、周産期脳障害の治療に有効な細胞製剤及び医薬組成物、並びに新規な治療方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、周産期低酸素性虚血性脳症（hypoxic-ischemic encephalopathy; HIE）モデルラットを作製し、低酸素処理から７２時間後に静脈注射によりＭｕｓｅ細胞を投与することによって、周産期脳障害（例えば、学習障害、運動障害）が改善されることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0010] すなわち、本発明は、以下の通りである。

［１］生体の間葉系組織又は培養間葉系細胞から分離されたＳＳＥＡ－３陽性の多能性幹細胞を含む、周産期脳障害を改善及び／又は治療するための

細胞製剤。

［２］外部ストレス刺激によりＳＳＥＡ－３陽性の多能性幹細胞が、濃縮された細胞画分を含む、上記［１］に記載の細胞製剤。

［３］前記多能性幹細胞が、ＣＤ１０５陽性である、上記［１］又は［２］に記載の細胞製剤。

［４］前記多能性幹細胞が、ＣＤ１１７陰性及びＣＤ１４６陰性である、上記［１］～［３］のいずれかに記載の細胞製剤。

［５］前記多能性幹細胞が、ＣＤ１１７陰性、ＣＤ１４６陰性、ＮＧ２陰性、ＣＤ３４陰性、ｖＷＦ陰性、及びＣＤ２７１陰性である、上記［１］～［４］のいずれかに記載の細胞製剤。

［６］前記多能性幹細胞が、ＣＤ３４陰性、ＣＤ１１７陰性、ＣＤ１４６陰性、ＣＤ２７１陰性、ＮＧ２陰性、ｖＷＦ陰性、Ｓｏｘ１０陰性、Ｓｎａｉ１陰性、Ｓｌｕｇ陰性、Ｔｙｒｐ１陰性、及びＤｃｔ陰性である、上記［１］～［５］のいずれかに記載の細胞製剤。

［７］前記多能性幹細胞が、以下の性質の全てを有する多能性幹細胞である、上記［１］～［６］のいずれかに記載の細胞製剤：

（ｉ）テロメラーゼ活性が低いか又は無い；

（ｉｉ）三胚葉のいずれの胚葉の細胞に分化する能力を持つ；

（ｉｉｉ）腫瘍性増殖を示さない；及び

（ｉｖ）セルフリニューアル能を持つ。

［８］周産期脳障害が、学習障害、運動障害、脳性麻痺、行動異常、精神発達異常、知覚障害、言語障害、てんかん、嚥下障害、及び呼吸調節異常からなる群から選択される、上記［１］～［７］のいずれかに記載の細胞製剤。

［９］前記多能性幹細胞が脳組織に生着する能力を有する、上記［１］～［８］のいずれかに記載の細胞製剤。

［１０］ヒト新生児、乳児又は幼児対象に前記多能性幹細胞を治療上有効量として約１×１０^{5}細胞／個体～約１×１０^{8}細胞／個体で投与する、上記

［１］～［９］のいずれかに記載の細胞製剤。

［１１］ヒト新生児、乳児又は幼児対象に前記多能性幹細胞を治療上有効量として、該対象一個体あたり約３×１０^{4}細胞／ｋｇ～約３×１０^{7}細胞／ｋｇを体重換算した細胞量を投与する、上記［１］～［１０］のいずれかに記載の細胞製剤。

発明の効果

[0011] 本発明は、周産期脳障害を患っている対象（小児）に対し、Ｍｕｓｅ細胞を静脈等から投与することにより、障害脳組織に選択に集積させ、その組織内でＭｕｓｅ細胞が脳組織を構成する細胞に分化するという脳組織再生メカニズムによって、周産期脳障害を劇的に縮小させることができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]ＨＩＥモデルラットに投与されたＭｕｓｅ細胞の脳組織への生着を確認した結果を示す。

[図2]Ｍｕｓｅ細胞投与群（「Ｍｕｓｅ」）、細胞懸濁液（生理食塩水）のみを添加した群（「ビヒクル」）、及びシャムオペ群（「シャム」）のＨＩＥモデルラットの運動機能についてロータロッド試験を行った結果を示す。

[図3]Ｍｕｓｅ細胞投与群（「Ｍｕｓｅ」）、細胞懸濁液（生理食塩水）のみを添加した群（「ビヒクル」）、及びシャムオペ群（「シャム」）のＨＩＥモデルラットの情動行動（多動性など）についてオープンフィールド試験を行った結果を示す。

[図4]Ｍｕｓｅ細胞投与群（「Ｍｕｓｅ」）、細胞懸濁液（生理食塩水）のみを添加した群（「ビヒクル」）、及びシャムオペ群（「シャム」）のＨＩＥモデルラットの学習障害の改善についてシャトルアボイダンス試験を行った結果を示す。

[図5]Ｍｕｓｅ細胞投与群（「Ｍｕｓｅ」）、細胞懸濁液（生理食塩水）のみを添加した群（「ビヒクル」）、及びシャムオペ群（「シャム」）のＨＩＥモデルラットの記憶学習や視覚的認知記憶の改善について新奇対象認識試験を行った結果を示す。

[図6A]Ｍｕｓｅ細胞投与群（「Ｍｕｓｅ」）、細胞懸濁液（生理食塩水）のみを添加した群（「ビヒクル」）、及びシャムオペ群（「シャム」）のＨＩＥモデルラットの運動機能改善についてシリンダー試験を行った結果を示す。

[図6B]Ｍｕｓｅ細胞投与群（「Ｍｕｓｅ」）、細胞懸濁液（生理食塩水）のみを添加した群（「ビヒクル」）、及びシャムオペ群（「シャム」）のＨＩＥモデルラットの運動機能改善についてシリンダー試験を行った結果を示す。

[図7]Ｍｕｓｅ細胞投与群（「Ｍｕｓｅ」）、非Ｍｕｓｅ細胞投与群（「ｎｏｎ　Ｍｕｓｅ」）、細胞懸濁液（生理食塩水）のみを添加した群（「ビヒクル」）、及びシャムオペ群（「シャム」）のＨＩＥモデルラットの運動機能についてロータロッド試験を行った結果を示す。

[図8]Ｍｕｓｅ細胞投与群（「Ｍｕｓｅ」）、非Ｍｕｓｅ細胞投与群（「ｎｏｎ　Ｍｕｓｅ」）、細胞懸濁液（生理食塩水）のみを添加した群（「ビヒクル」）、及びシャムオペ群（「シャム」）のＨＩＥモデルラットの情動行動（多動性など）についてオープンフィールド試験を行った結果を示す。

[図9]Ｍｕｓｅ細胞投与群（「Ｍｕｓｅ」）、非Ｍｕｓｅ細胞投与群（「ｎｏｎ　Ｍｕｓｅ」）、細胞懸濁液（生理食塩水）のみを添加した群（「ビヒクル」）、及びシャムオペ群（「シャム」）のＨＩＥモデルラットの学習障害の改善についてシャトルアボイダンス試験を行った結果を示す。

[図10]Ｍｕｓｅ細胞投与群（「Ｍｕｓｅ」）、非Ｍｕｓｅ細胞投与群（「ｎｏｎ　Ｍｕｓｅ」）、細胞懸濁液（生理食塩水）のみを添加した群（「ビヒクル」）、及びシャムオペ群（「シャム」）のＨＩＥモデルラットの記憶学習や視覚的認知記憶の改善について新奇対象認識試験を行った結果を示す。

[図11]Ｍｕｓｅ細胞投与群（「Ｍｕｓｅ」）、非Ｍｕｓｅ細胞投与群（「ｎｏｎ　Ｍｕｓｅ」）、細胞懸濁液（生理食塩水）のみを添加した群（「ビヒクル」）、及びシャムオペ群（「シャム」）のＨＩＥモデルラットの運動機能改善についてシリンダー試験を行った結果を示す。

[図12]Ｍｕｓｅ細胞投与群（「Ｍｕｓｅ」）、非Ｍｕｓｅ細胞投与群（「ｎｏｎ　Ｍｕｓｅ」）のＨＩＥモデルラットへの投与後２週後の各組織での生着量を測定した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明は、ＳＳＥＡ－３陽性の多能性幹細胞（Ｍｕｓｅ細胞）を含む、周産期脳障害を改善及び／又は治療するための細胞製剤及び医薬組成物、並びに新規な治療方法に関する。本発明を以下に詳細に説明する。

[0014] １．適用疾患とその診断

本発明は、ＳＳＥＡ－３陽性の多能性幹細胞（Ｍｕｓｅ細胞）を含む細胞製剤又は医薬組成物を用いて、周産期脳障害の改善及び治療を目指す。一般的には、「周産期脳障害」とは、周産期（ヒトでは妊娠２２週から出生後７日未満の時期）に生じた脳障害をいい、例えば、分娩時の低酸素性虚血性脳症、又はウイルス若しくは細菌感染などに続発する全身炎症反応症候群などに関連付けられる脳障害を意味する。しかしながら、本発明では、低酸素性虚血性脳症に起因した脳性麻痺が症状として具現化する時期（例えば、ヒトでは満２～３歳）も適用範囲とする。より具体的には、本発明によれば、周産期脳障害であって、ヒト新生児（生後２８日以内）、乳児（生後１年未満）、及び幼児（生後１～６年）に生じた脳障害を改善及び治療の対象とする。

[0015] 「低酸素性虚血性脳症」とは、動脈血の低酸素と血流低下による脳障害をいい、新生児死亡、脳性麻痺、精神遅滞の原因となる。原因は、胎児期の母体の麻酔、心不全、一酸化炭素中毒による低酸素症、腰椎麻酔や子宮による下大動脈圧迫の低血圧、オキシトシン（陣痛誘発剤）過量投与による子宮弛緩不全、臍帯血流障害、胎盤機能不全、胎盤早期剥離などによる。また、出生後の重篤な出血、ショック状態、脳障害、麻酔、外傷、先天性心疾患、肺機能不全などの低酸素症による。成熟児（ヒトでは、母胎内で１０カ月を経過後、胎外で生活できる状態に発育してから出生した体重約３，０００ｇ、身長約５０ｃｍ程度の新生児を指す。）では、大脳皮質壊死や傍矢状性阻血

、未熟児では、脳室周囲性軟化や脳室内出血を起こす。重症例では、脳浮腫を伴う。皮膚の蒼白、チアノーゼ、無呼吸、徐脈、筋緊張低下、刺激に対する無反応は本症の徴候である。生後２４時間以内に脳浮腫が生じ、脳幹部圧迫を来す場合もある。予後は悪く、死亡、脳性麻痺、精神発達遅滞、重症心身障害を残す。

[0016] 「脳性麻痺」とは、脳の発育期（ヒトでは、妊娠１３日目から生後４８日齢を指す。）に生じた不可逆性の脳障害をいい、非進行性の病変を持ち、その症候は運動系の機能障害を基本とし、多くが３歳までに発症する。具体的には、新生児期までに生じる脳障害を一般に指す。その原因については、障害の生じる時期により分けられており、（ａ）出生前原因としては、胎内感染、胎盤機能不全、胎児期の脳血管障害、遺伝性など、（ｂ）出生時原因としては、分娩時の機械的損傷、脳出血、無酸素症、低酸素症、脳循環障害など、（ｃ）出生後原因としては、重症黄疸（核黄疸）、頭蓋内感染症、脳出血などがある。分類は、麻痺の内容によってされる。筋緊張の内容には、強（痙）直、強剛、失調、アテトーゼ（ある姿勢を維持したり、運動を行おうとする時に現れる不随意運動）、無緊張などがあり、麻痺の広がりには、四肢麻痺、片麻痺、両麻痺、対麻痺、二重片麻痺、単麻痺などがある。合併症候には、知能障害（学習障害を含む。）、てんかん発作、脳神経障害、言語障害などがある。成熟児の低酸素性虚血性脳症による脳の病変としては、大脳皮質層状壊死、基底核壊死、脳梗塞、白質軟化、橋鈎状回壊死が多く、脳幹の壊死も見られるといわれ、臨床的には、基底核壊死はアテトーゼ型脳性麻痺の原因、脳梗塞は痙性四肢麻痺、片麻痺の原因となる。脳幹壊死は、予後不良で乳児期に死亡することが多く、生存しても嚥下障害や呼吸調節異常を来す。

[0017] 本発明の細胞製剤及び医薬組成物による改善及び治療の適用疾患の診断は、新生児の低酸素性虚血性脳症に低体温療法が有効とされるため、まず低体温療法エントリー基準フローチャートに則して医師により行われる。より具体的には、出生時の神経学的症状が、基準Ａ（全身低酸素・虚血の客観的所

見）、続く基準Ｂ（脳症の主観的所見）に記載の各判断項目に該当するか否かで診断される。基準Ａ及び基準Ｂにあてはまる場合に、周産期脳障害があると診断することができる。

基準Ａ：在胎３６週以上で出生し、少なくとも以下のうちひとつを満たすもの

－生後１０分のアプガースコアが５点以下

－１０分以上の持続的な新生児蘇生（気管挿管、陽圧換気など）が必要

－生後６０分以内の臍帯血、動脈、静脈、末梢毛細管）でｐＨが７．０未満

－生後６０分以内の臍帯血、動脈、静脈、末梢毛細管）でＢａｓｅ　ｄｅｆｉｃｉｔが１６ｍｍｏｌ／Ｌ以上

適応基準Ａを満たしたものは、Ｂの神経学的診察の異常の有無について評価する。

基準Ｂ：中等症から重症の脳症（Ｓａｒｎａｔ分類２度以上に相当）、すなわち意識障害（傾眠、鈍麻、昏睡）および少なくとも以下のうちひとつを認めるもの（新生児低酸素性虚血性脳症に詳しい新生児科医もしくは小児神経科医が診察することが望ましい）

－筋緊張低下

－“人形の目”反射もしくは瞳孔反射異常を含む異常反射

－吸啜の低下もしくは消失

－臨床的けいれん

[0018] さらに必要に応じて、脳の生理学的所見を得るために、例えば、頭部超音波画像診断、ＭＲＩ、ＣＴ、脳波、及びレーザードップラー血流計を用いることができる。これらの装置を用いて異常な所見が得られた場合、周産期脳障害があると診断することができる。また、対象における学習障害や運動障害を直接観察することによって適用疾患であるかどうかを診断することができる。本発明によれば、上記の適用疾患を治療するために、後述する細胞製剤及び医薬組成物を対象に投与（以下、総じて「移植」と記述することがあ

る。）し、適用疾患の改善及び／又は治療を可能にする。ここで、「改善」とは、周産期脳障害に伴う各種の症状の緩和及び進行の抑制を意味し、好ましくは、日常生活に差し支えない程度にまで症状を緩和することを意味する。また、「治療」とは、周産期脳障害に伴う各種の症状を抑制すること又は完全に消失させることをいう。

[0019] ２．細胞製剤及び医薬組成物

（１）多能性幹細胞

本発明の細胞製剤及び医薬組成物に使用される多能性幹細胞は、典型的には、本発明者らの一人である出澤氏が、ヒト生体内にその存在を見出し、「Ｍｕｓｅ（Ｍｕｌｔｉｌｉｎｅａｇｅ－ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｎｇ Ｓｔｒｅｓｓ Ｅｎｄｕｒｉｎｇ）細胞」と命名した細胞である。Ｍｕｓｅ細胞は、骨髄液、脂肪組織（Ｏｇｕｒａ，Ｆ．，ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ Ｄｅｖ．，Ｎｏｖ ２０，２０１３（Ｅｐｕｂ）（ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｏｎ Ｊａｎ １７，２０１４））や真皮結合組織等の皮膚組織から得ることができ、各臓器の結合組織にも散在する。また、この細胞は、多能性幹細胞と間葉系幹細胞の両方の性質を有する細胞であり、例えば、それぞれの細胞表面マーカーである「ＳＳＥＡ－３（Ｓｔａｇｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ａｎｔｉｇｅｎ－３）」と「ＣＤ１０５」のダブル陽性として同定される。したがって、Ｍｕｓｅ細胞又はＭｕｓｅ細胞を含む細胞集団は、例えば、これらの抗原マーカーを指標として生体組織から分離することができる。また、Ｍｕｓｅ細胞はストレス耐性であり、間葉系組織又は培養間葉系細胞から種々のストレス刺激により濃縮することができる。本発明の細胞製剤には、ストレス刺激によりＭｕｓｅ細胞が濃縮された細胞画分を用いることもできる。Ｍｕｓｅ細胞の分離法、同定法、及び特徴などの詳細は、国際公開第ＷＯ２０１１／００７９００号に開示されている。また、Ｗａｋａｏら（２０１１、上述）によって報告されているように、骨髄、皮膚などから間葉系細胞を培養し、それをＭｕｓｅ細胞の母集団として用いる場合、ＳＳＥＡ－３陽性細胞の全てがＣＤ１０５陽性細胞である

ことが分かっている。したがって、本発明における細胞製剤及び医薬組成物において、生体の間葉系組織又は培養間葉系幹細胞からＭｕｓｅ細胞を分離する場合は、単にＳＳＥＡ－３を抗原マーカーとしてＭｕｓｅ細胞を精製し、使用することができる。なお、本明細書においては、周産期脳障害を改善及び／又は治療するための細胞製剤及び医薬組成物において使用され得る、ＳＳＥＡ－３を抗原マーカーとして、生体の間葉系組織又は培養間葉系組織から分離された多能性幹細胞（Ｍｕｓｅ細胞）又はＭｕｓｅ細胞を含む細胞集団を単に「ＳＳＥＡ－３陽性細胞」と記載することがある。また、本明細書においては、「非Ｍｕｓｅ細胞」とは、生体の間葉系組織又は培養間葉系組織に含まれる細胞であって、「ＳＳＥＡ－３陽性細胞」以外の細胞を指す。後述する実施例においては、ヒトＭｕｓｅ細胞の分離及び同定に関する国際公開第ＷＯ２０１１／００７９００号に記載された方法に準じて、ＭＳＣからＳＳＥＡ－３及びＣＤ１０５陽性細胞を除いた細胞集団を非Ｍｕｓｅ細胞として用いた。

[0020] 簡単には、Ｍｕｓｅ細胞又はＭｕｓｅ細胞を含む細胞集団は、細胞表面マーカーであるＳＳＥＡ－３に対する抗体を単独で用いて、又はＳＳＥＡ－３及びＣＤ１０５に対するそれぞれの抗体を両方用いて、生体組織（例えば、間葉系組織）から分離することができる。ここで、「生体」とは、哺乳動物の生体をいう。本発明において、生体には、受精卵や胞胚期より発生段階が前の胚は含まれないが、胎児や胞胚を含む胞胚期以降の発生段階の胚は含まれる。哺乳動物には、限定されないが、ヒト、サル等の霊長類、マウス、ラット、ウサギ、モルモット等のげっ歯類、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ロバ、ヤギ、フェレット等が挙げられる。本発明の細胞製剤及び医薬組成物に使用されるＭｕｓｅ細胞は、生体の組織から直接マーカーを用いて分離される点で、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）やｉＰＳ細胞と明確に区別される。また、「間葉系組織」とは、骨、滑膜、脂肪、血液、骨髄、骨格筋、真皮、靭帯、腱、歯髄、臍帯、臍帯血などの組織及び各種臓器に存在する組織をいう。例えば、Ｍｕｓｅ細胞は、骨髄や皮膚、脂肪組織から得ることがで

きる。例えば、生体の間葉系組織を採取し、この組織からＭｕｓｅ細胞を分離し、利用することが好ましい。また、上記分離手段を用いて、線維芽細胞や骨髄間葉系幹細胞などの培養間葉系細胞からＭｕｓｅ細胞を分離してもよい。本発明の細胞製剤及び医薬組成物においては、使用されるＭｕｓｅ細胞は、レシピエントに対して自家であってもよく、又は他家であってもよい。

[0021] 上記のように、Ｍｕｓｅ細胞又はＭｕｓｅ細胞を含む細胞集団は、例えば、ＳＳＥＡ－３陽性、及びＳＳＥＡ－３とＣＤ１０５の二重陽性を指標にして生体組織から分離することができるが、ヒト成人皮膚には、種々のタイプの幹細胞及び前駆細胞を含むことが知られている。しかしながら、Ｍｕｓｅ細胞は、これらの細胞と同じではない。このような幹細胞及び前駆細胞には、皮膚由来前駆細胞（ＳＫＰ）、神経堤幹細胞（ＮＣＳＣ）、メラノブラスト（ＭＢ）、血管周囲細胞（ＰＣ）、内皮前駆細胞（ＥＰ）、脂肪由来幹細胞（ＡＤＳＣ）が挙げられる。これらの細胞に固有のマーカーの「非発現」を指標として、Ｍｕｓｅ細胞を分離することができる。より具体的には、Ｍｕｓｅ細胞は、ＣＤ３４（ＥＰ及びＡＤＳＣのマーカー）、ＣＤ１１７（ｃ－ｋｉｔ）（ＭＢのマーカー）、ＣＤ１４６（ＰＣ及びＡＤＳＣのマーカー）、ＣＤ２７１（ＮＧＦＲ）（ＮＣＳＣのマーカー）、ＮＧ２（ＰＣのマーカー）、ｖＷＦ因子（フォンビルブランド因子）（ＥＰのマーカー）、Ｓｏｘ１０（ＮＣＳＣのマーカー）、Ｓｎａｉ１（ＳＫＰのマーカー）、Ｓｌｕｇ（ＳＫＰのマーカー）、Ｔｙｒｐ１（ＭＢのマーカー）、及びＤｃｔ（ＭＢのマーカー）からなる群から選択される１１個のマーカーのうち少なくとも１個、例えば、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個又は１１個のマーカーの非発現を指標に分離することができる。例えば、限定されないが、ＣＤ１１７及びＣＤ１４６の非発現を指標に分離することができ、さらに、ＣＤ１１７、ＣＤ１４６、ＮＧ２、ＣＤ３４、ｖＷＦ及びＣＤ２７１の非発現を指標に分離することができ、さらに、上記の１１個のマーカーの非発現を指標に分離することができる。

[0022] また、本発明の細胞製剤及び医薬組成物に使用される上記特徴を有するＭ

ｕｓｅ細胞は、以下：

（ｉ）テロメラーゼ活性が低いか又は無い；

（ｉｉ）三胚葉のいずれの胚葉の細胞に分化する能力を持つ；

（ｉｉｉ）腫瘍性増殖を示さない；及び

（ｉｖ）セルフリニューアル能を持つ

からなる群から選択される少なくとも１つの性質を有してもよい。本発明の一局面では、本発明の細胞製剤及び医薬組成物に使用されるＭｕｓｅ細胞は、上記性質を全て有する。ここで、上記（ｉ）について、「テロメラーゼ活性が低いか又は無い」とは、例えば、ＴＲＡＰＥＺＥ　ＸＬ　ｔｅｌｏｍｅｒａｓｅ　ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ｋｉｔ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社）を用いてテロメラーゼ活性を検出した場合に、低いか又は検出できないことをいう。テロメラーゼ活性が「低い」とは、例えば、体細胞であるヒト線維芽細胞と同程度のテロメラーゼ活性を有しているか、又はＨｅｌａ細胞に比べて１／５以下、好ましくは１／１０以下のテロメラーゼ活性を有していることをいう。上記（ｉｉ）について、Ｍｕｓｅ細胞は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏにおいて、三胚葉（内胚葉系、中胚葉系、及び外胚葉系）に分化する能力を有し、例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで誘導培養することにより、肝細胞、神経細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、骨細胞、脂肪細胞等に分化し得る。また、ｉｎ　ｖｉｖｏで精巣に移植した場合にも三胚葉に分化する能力を示す場合がある。さらに、静注により生体に移植することで損傷を受けた臓器（心臓、皮膚、脊髄、肝、筋肉等）に遊走及び生着し、組織に応じた細胞に分化する能力を有する。上記（ｉｉｉ）について、Ｍｕｓｅ細胞は、浮遊培養では増殖速度約１．３日で増殖するが、浮遊培養では１細胞から増殖し、胚様体様細胞塊を作り１４日間程度で増殖が止まる、という性質を有するが、これらの胚様体様細胞塊を接着培養に持っていくと、再び細胞増殖が開始され、細胞塊から増殖した細胞が広がっていく。さらに精巣に移植した場合、少なくとも半年間は癌化しないという性質を有する。また、上記（ｉｖ）について、Ｍｕｓｅ細胞は、セルフリニューアル（自己複製）能を有する

。ここで、「セルフリニューアル」とは、１個のＭｕｓｅ細胞から浮遊培養で培養することにより得られる胚様体様細胞塊に含まれる細胞から３胚葉性の細胞への分化が確認できると同時に、胚様体様細胞塊の細胞を再び１細胞で浮遊培養に持っていくことにより、次の世代の胚様体様細胞塊を形成させ、そこから再び３胚葉性の分化と浮遊培養での胚様体様細胞塊が確認できることをいう。セルフリニューアルは１回又は複数回のサイクルを繰り返せばよい。

[0023] また、本発明の細胞製剤に使用されるＭｕｓｅ細胞を含む細胞画分は、生体の間葉系組織又は培養間葉系細胞に外的ストレス刺激を与え、該外的ストレスに耐性の細胞以外の細胞を死滅させ、生き残った細胞を回収することを含む方法によって得られる、以下の性質の少なくとも１つ、好ましくは全てを有する、ＳＳＥＡ－３陽性及びＣＤ１０５陽性の多能性幹細胞が濃縮された細胞画分であってもよい。

（ｉ）ＳＳＥＡ－３陽性；

（ｉｉ）ＣＤ１０５陽性；

（ｉｉｉ）テロメラーゼ活性が低いか又は無い；

（ｉｖ）三胚葉に分化する能力を持つ；

（ｖ）腫瘍性増殖を示さない；及び

（ｖｉ）セルフリニューアル能を持つ。

[0024] 上記外的ストレスは、プロテアーゼ処理、低酸素濃度での培養、低リン酸条件下での培養、低血清濃度での培養、低栄養条件での培養、熱ショックへの暴露下での培養、低温での培養、凍結処理、有害物質存在下での培養、活性酸素存在下での培養、機械的刺激下での培養、振とう処理下での培養、圧力処理下での培養又は物理的衝撃のいずれか又は複数の組み合わせであってもよい。例えば、上記プロテアーゼによる処理時間は、細胞に外的ストレスを与えるために合計０．５～３６時間行うことが好ましい。また、プロテアーゼ濃度は、培養容器に接着した細胞を剥がすとき、細胞塊を単一細胞にばらばらにするとき、又は組織から単一細胞を回収するときに用いられる濃度

であればよい。プロテアーゼは、セリンプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、システインプロテアーゼ、金属プロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼ又はＮ末端スレオニンプロテアーゼであることが好ましい。さらに、前記プロテアーゼがトリプシン、コラゲナーゼ又はジスパーゼであることが好ましい。

[0025] また、本発明の細胞製剤に使用される上記特徴を有するＭｕｓｅ細胞は、後述するように、静脈投与等により生体に投与後、障害脳組織に生着する。その後、Ｍｕｓｅ細胞は、該組織を構成する細胞に分化し、周産期脳障害を改善及び／又は治療するものと考えられる。

[0026] （２）細胞製剤及び医薬組成物の調製及び使用

本発明の細胞製剤及び医薬組成物は、限定されないが、上記（１）で得られたＭｕｓｅ細胞又はＭｕｓｅ細胞を含む細胞集団を生理食塩水や適切な緩衝液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）に懸濁させることによって得られる。この場合、自家又は他家の組織から分離したＭｕｓｅ細胞数が少ない場合には、投与前に細胞を培養して、所定の細胞濃度が得られるまで増殖させてもよい。なお、すでに報告されているように（国際公開第ＷＯ２０１１／００７９００号パンフレット）、Ｍｕｓｅ細胞は、腫瘍化しないため、生体組織から回収した細胞が未分化のまま含まれていても癌化の可能性が低く安全である。また、回収したＭｕｓｅ細胞の培養は、特に限定されないが、通常の増殖培地（例えば、１０％仔牛血清を含むα－最少必須培地（α－ＭＥＭ））において行うことができる。より詳しくは、上記国際公開第ＷＯ２０１１／００７９００号を参照して、Ｍｕｓｅ細胞の培養及び増殖において、適宜、培地、添加物（例えば、抗生物質、血清）等を選択し、所定濃度のＭｕｓｅ細胞を含む溶液を調製することができる。ヒト対象に本発明の細胞製剤又は医薬組成物を投与する場合には、ヒトの腸骨から数ｍＬ程度の骨髄液を採取し、例えば、骨髄液からの接着細胞として骨髄間葉系幹細胞を培養して有効な治療量のＭｕｓｅ細胞を分離できる細胞量に達するまで増やした後、Ｍｕｓｅ細胞をＳＳＥＡ－３の抗原マーカーを指標として分離し、自家又は

他家のＭｕｓｅ細胞を細胞製剤として調製することができる。あるいは、例えば、Ｍｕｓｅ細胞をＳＳＥＡ－３の抗原マーカーを指標として分離後、有効な治療量に達するまで細胞を培養して増やした後、自家又は他家のＭｕｓｅ細胞を細胞製剤として調製することができる。

[0027] また、Ｍｕｓｅ細胞の細胞製剤及び医薬組成物への使用においては、該細胞を保護するためにジメチルスルフォキシド（ＤＭＳＯ）や血清アルブミン等を、細菌の混入及び増殖を防ぐために抗生物質等を細胞製剤及び医薬組成物に含有させてもよい。さらに、製剤上許容される他の成分（例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水など）や間葉系幹細胞に含まれるＭｕｓｅ細胞以外の細胞又は成分を細胞製剤及び医薬組成物に含有させてもよい。当業者は、これら因子及び薬剤を適切な濃度で細胞製剤及び医薬組成物に添加することができる。

[0028] 上記で調製される細胞製剤及び医薬組成物中に含有するＭｕｓｅ細胞数は、周産期脳障害の改善及び／又は治療において所望の効果（例えば、学習障害の改善、運動障害の改善）が得られるように、対象の性別、年齢、体重、患部の状態、使用する細胞の状態等を考慮して、適宜、調整することができる。後述する実施例３においては、周産期低酸素性虚血性脳症（ＨＩＥ）モデルラットを用いて、Ｍｕｓｅ細胞移植による各種の効果を検討したが、体重約１５～２０ｇの該モデルラットに対しては、ＳＳＥＡ３陽性細胞を１×１０^{4}細胞／頭（一個体あたり）で投与することにより、非常に優れた効果が得られた。この結果からヒト新生児（生後２８日以内）、乳児（生後１年未満）、又は幼児（生後１～６年）の一個体あたり約３×１０^{4}細胞／ｋｇ～約３×１０^{7}細胞／ｋｇを体重換算した細胞量を投与することで優れた効果が得られることが期待される。例えば、乳児の体重を約３，０００ｇとした場合、投与量としては概算で約１×１０^{5}細胞／個体～約１×１０^{8}細胞／個体が有効であると考えられる。一方で、血管への細胞投与による閉塞を防ぐために、１回投与分の量として、例えば、ＳＳＥＡ－３陽性細胞を１×１０^{7}細胞

／個体以下で細胞製剤に含有させるとよい。ここで個体はラット、ヒトを含むがこれに限定されない。また、本発明の細胞製剤及び医薬組成物は、所望の治療効果が得られるまで、複数回（例えば、２～１０回）、適宜、間隔（例えば、１日に２回、１日に１回、１週間に２回、１週間に１回、２週間に１回）をおいて投与されてもよい。したがって、対象の状態にもよるが、治療上有効量としては、例えば、一個体あたり１×１０^{4}細胞～１×１０^{7}細胞で１～１０回の投与量が好ましい。一個体における投与総量としては、限定されないが、１×１０^{5}細胞～１×１０^{8}細胞、１×１０^{5}細胞～５×１０^{7}細胞、１×１０^{5}細胞～１×１０^{7}細胞、１×１０^{5}細胞～５×１０^{6}細胞、１×１０^{5}細胞～１×１０^{6}細胞、５×１０^{5}細胞～１×１０^{8}細胞、５×１０^{5}細胞～５×１０^{7}細胞、５×１０^{5}細胞～１×１０^{7}細胞、５×１０^{5}細胞～５×１０^{6}細胞、５×１０^{5}細胞～１×１０^{6}細胞、１×１０^{6}細胞～１×１０^{8}細胞、１×１０^{6}細胞～５×１０^{7}細胞、１×１０^{6}細胞～１×１０^{7}細胞、１×１０^{6}細胞～５×１０^{6}細胞などが挙げられる。

[0029] 本発明の細胞製剤及び医薬組成物は、学習障害及び運動障害などの周産期脳障害を改善及び治療対象とするが、投与時期としては、出生時の神経学的症状、頭部超音波画像診断やＭＲＩ等により周産期脳障害と診断された後であって、診断直後から数カ月以内であってもよい。一方、本発明によれば、該細胞製剤等は、受傷直後に投与されることが好ましいが、受傷後の遅い時期、例えば、受傷から１時間後、１日後、１週間後、１カ月後、３カ月後、６カ月後であっても、本発明の細胞製剤等の効果が期待できる。また、使用されるＭｕｓｅ細胞は、他家由来の場合でも免疫応答を惹起しないことが本発明者らの実験で確認されているので、周産期脳障害の改善及び治療において所望の効果が得られるまで適宜投与されてもよい。なお、後述する実施例３において示されるように、ＨＩＥモデルラットを用いたＭｕｓｅ細胞による周産期脳障害の改善において、行動学的評価を行うと、周産期脳障害の改善は、短期（生後１カ月）の治療効果よりも長期（生後５～６カ月）の治療効果が顕著である傾向にある。

[0030] ３．周産期低酸素性虚血性脳症（ＨＩＥ）モデルラットの作製

本明細書においては、本発明の細胞製剤による周産期脳障害（例えば、学習障害、運動障害）の改善及び治療効果を検討するためにＨＩＥモデルラットを構築し、使用することができる。該モデルとして使用されるラットには、限定されないが、一般的に、Ｗｉｓｔａｒ／ＳＴ系ラット、スプラーグドーリー（ＳＤ）系ラットが挙げられる。ＨＩＥモデルラットを作製する方法は公知であり、例えば、Ｒｉｃｅら（Ａｎｎ．Ｎｅｕｒｏｌ．，ｖｏｌ．９，１３１－１４１（１９８１）、参照により本明細書に援用される）の方法に従ってＨＩＥモデルラットを作製することができる。また、上記方法によって作製されたモデルラットが、低酸素性虚血性脳障害を有するかどうかを二次元画像レーザー血流計やＭＲＩによって梗塞巣評価を行うことができる。

[0031] 本発明の細胞製剤及び医薬組成物に使用されるＭｕｓｅ細胞は、疾患部位に集積する性質を有する。したがって、細胞製剤又は医薬組成物の投与において、それらの投与部位（例えば、腹腔内、筋内、疾患部位）、投与される血管の種類（静脈及び動脈）等は限定されない。また、投与されたＭｕｓｅ細胞が疾患部位に到達し、生着したことを確認する方法としては、例えば、予め蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ））を発現するように遺伝子導入されたＭｕｓｅ細胞を作製し、生体に投与後、蛍光を検出できるシステム（例えば、ＩＶＩＳ（登録商標）Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ（住商ファーマインターナショナル株式会社））によって観察し、Ｍｕｓｅ細胞の動態を確認することができる。なお、本発明の細胞製剤及び医薬組成物に使用されるＭｕｓｅ細胞はヒト由来であるため、ラットとは異種の関係にある。モデル動物において異種の細胞等が投与される実験では、異種細胞の生体内で拒絶反応を抑制するために、異種細胞の投与前又は同時に免疫抑制剤（シクロスポリンなど）が投与されてもよい。

[0032] ４．ＨＩＥモデルラットにおけるＭｕｓｅ細胞による改善及び治療効果

本発明の実施形態では、本発明の細胞製剤及び医薬組成物は、ヒトを含む

哺乳動物における周産期脳障害及びそれに伴う各種症状を改善及び／又は治療することができる。本発明によれば、上記で作製したＨＩＥモデルラットを用いて、実験的に周産期脳障害のラットにおけるＭｕｓｅ細胞による症状の改善等を検討し、該Ｍｕｓｅ細胞の効果を評価することができる。具体的な評価方法としては、ラットを用いた脳機能を評価する一般的な実験系を用いて行うことができ、例えば、行動学的評価として、ロータロッド試験（Ｒｏｔａ Ｒｏｄ Ｔｅｓｔ）、オープンフィールド試験（Ｏｐｅｎ Ｆｉｅｌｄ Ｔｅｓｔ）、シャトルアボイダンス試験（Ｓｈｕｔｔｌｅ Ａｖｏｉｄａｎｃｅ Ｔｅｓｔ）、新規対象認識試験（Ｎｏｖｅｌ Ｏｂｊｅｃｔ Ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ Ｔｅｓｔ）、シリンダー試験（Ｃｙｌｉｎｄｅｒ Ｔｅｓｔ）、キャットウォーク試験（Ｃａｔ Ｗａｌｋ Ｔｅｓｔ）、モリス水迷路試験などが挙げられる。

[0033] 「ロータロッド試験」は、被験動物のもつ運動機能の協調性と平衡感覚を測定する装置を用いた試験である。具体的には、一定の加速ができる回転棒をもつ装置に被験動物を乗せ、ゆっくりした回転から徐々に加速してゆく。その状態で被験動物が回転棒から落下せずに、回転に合せて歩くことができる時間を調べる。繰り返しテストすることで、運動学習機能についても検査することが可能である。

[0034] 「オープンフィールド試験」は、新奇な一定の空間（例えば、６０（Ｗ）×６０（Ｄ）×４０（Ｈ）ｃｍのボックス）に被験動物を入れ、被験動物の探索行動などの情動行動を観察することに基づく。観察者が被験動物の行動を実際に記録するとともに、ビデオカメラでも撮影し、データを抽出し、活動性／情動性の指標（例えば、移動距離、静止時間、中心での滞在率）を評価することができる。

[0035] 「シャトルアボイダンス試験」は、音や光に対する被験動物の条件反応行動を観察する装置を用いた試験であり、学習障害を評価することができる。これは、被験動物が一つの部屋に音を鳴らし、また光を点灯させた後に、床に電流を流し、この電気刺激を回避するために被験動物は別の部屋に避難す

る。この繰り返しにより、被験動物における学習障害の有無を評価することができる。

[0036] 「新奇対象認識試験」は、被験動物を２つの物体を置いた空間で自由探索させた後、片方を新奇な物体と置換し、被験動物の新しい物体への探索時間の増減を測定することによって、記憶学習や視覚的認知記憶を評価することができる。

[0037] 「シリンダー試験」は、被験動物をシリンダー内に入れ、探索的にシリンダーの壁に前肢をかける自発動作の左右差を観察し、運動機能障害を評価することができる。

[0038] 「キャットウォーク試験」は、内部にＬＥＤを照射した透明なガラス板の上を被験動物に歩かせ、内部全反射の原理で接触面だけを光らせた足跡を下からビデオ撮影した画像により、パソコンのソフトウェアで解析し、被験動物の肢の動きや歩行状態の評価を行うことができる。

[0039] 以下の実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

実施例

[0040] 実施例１：周産期低酸素性虚血性脳症（ＨＩＥ）モデルラットの作製とＭｕｓｅ細胞の投与

本研究に使用された実験動物に関するプロトコールは、名古屋大学医学部動物実験委員会によって承認されたものである。Ｗｉｓｔａｒ／ＳＴラット（子）を日本エスエルシー株式会社（日本、静岡県）より入手し、食餌と水を自由に摂取できるようにしたケージに入れ、１２時間の明暗サイクル下で飼育した。動物室と実験空間を常に２３℃に維持した。

[0041] ＨＩＥモデルラットは、Ｗｉｓｔａｒ／ＳＴラット（生後７日齢）を用いて、Ｒｉｃｅら（Ａｎｎ．Ｎｅｕｒｏｌ．，ｖｏｌ．９，１３１－１４１（１９８１）に記載された手法に準じた方法で作製した。各ラットにイソフルラン吸入により麻酔を施した。その後、左頸動脈を二重に結紮し、結紮間を切離した。母獣のもとで１時間の休息後、３７℃にて６０分間、８％O_2の低

酸素環境下に置き、続いて、２３℃に維持された動物室の母獣に戻した。７２時間後、処置群に対しては、Ｍｕｓｅ細胞（１×１０^{4}細胞／個体）を右頸動脈から投与した。対照群は、処置群と同様に左頸動脈を結紮され、低酸素状態に供されたが、Ｍｕｓｅ細胞に代えて、同体積の生理食塩水のみが投与された。シャム群は、左頸動脈結紮と低酸素状態に供されなかった。

[0042] 実施例２：Ｍｕｓｅ細胞の調製と脳組織への生着確認

ヒトＭｕｓｅ細胞の分離及び同定に関する国際公開第ＷＯ２０１１／００７９００号に記載された方法に準じて、Ｍｕｓｅ細胞を得た。移植に使用されるＭｕｓｅ細胞は、脳組織に生着したことを確認するために、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を発現し、細胞がこれにより標識されるように、予めレンチウイルス－ＧＦＰ遺伝子をＭｕｓｅ細胞に導入した。ＧＦＰで標識されたＭｕｓｅ細胞又はＭｕｓｅ細胞を含む細胞集団をＧＦＰとＳＳＥＡ－３の二重の陽性細胞としてＦＡＣＳにて分離した。その後、実施例１に記載した通りに、Ｍｕｓｅ細胞を投与した。

[0043] 次に、Ｍｕｓｅ細胞が投与された日齢２０のラットの脳において、Ｍｕｓｅ細胞が脳組織に生着したことを確認した。ラットを安楽死させた後、脳を切除し、常法に従って脳組織の切片を作製した。ＧＦＰに対する一次抗体を反応させ、続いて、ペルオキシダーゼ標識した２次抗体を反応させた。ペルオキシダーゼに対する基質（四塩酸３，３’－ジアミノベンジジン）を添加し、発色により脳組織に生着したＭｕｓｅ細胞を検出した（図１）。図１の染色画像はそれぞれ、切片にした脳組織（障害を受けた左脳）の異なる領域（１と２）を観察したものである。上段の矢印で示された細胞は、移植されたＭｕｓｅ細胞である。下段は、抗体による反応を行っていない陰性対照である。これらの結果から、ラットの頸動脈から移植されたＭｕｓｅ細胞は、脳障害を受けた脳組織に生着したことが確認された。また、同様にしてＭｕｓｅ細胞及び非Ｍｕｓｅ細胞を投与した後２週間後にラットを安楽死させ、各組織における生着したＭｕｓｅ細胞を検出した（図１２）。他のＭＳＣを投与した系と比較して、Ｍｕｓｅ細胞が傷害脳組織により顕著に生着してい

ることがわかる。

[0044] 実施例３：Ｍｕｓｅ細胞移植による周産期脳障害改善の評価

Ｍｕｓｅ細胞が移植されたＨＩＥモデルラットの行動学的評価を以下のように行った。

（１）ロータロッド試験

被験動物のもつ運動機能の協調性と平衡感覚を測定する装置として一般的に知られた装置（ＵＧＯ　Ｂａｓｉｌｅ社製Ｒａｔ　Ｒｏｔａ－Ｒｏｄ　４７７００）を用いて、Ｍｕｓｅ細胞等の移植による周産期脳障害の改善を調べた。この試験の評価は、回転する台の上でラットが落下するまでの時間を測定し、繰り返す（計４回）ことによって、落下するまでの時間が長期化により運動学習機能の改善が見られたことを指標とするものである。試験したＨＩＥラットは、Ｍｕｓｅ細胞を投与した群、生理食塩水のみを投与した群、及びシャム群の３つについてであるが、短期（生後１カ月）と長期（生後５～６カ月）のそれぞれについて評価を行った。結果を図２に示す。短期及び長期のいずれにおいても、Ｍｕｓｅ細胞投与群は、生理食塩水のみを投与した群（ビヒクル）と比較して、運動学習障害機能の改善が見られたが（図２左）、短期よりも長期の方がその改善効果が顕著であった（図２右）。この結果から、Ｍｕｓｅ細胞が、周産期脳障害の１つとして運動学習障害機能を改善できることが示唆された。

[0045] 上記と同様に、新たにＭｕｓｅ細胞を投与した群、ビヒクル群、シャム群の他に、非Ｍｕｓｅ細胞を投与した群を加え、ＨＩＥラット（生後５カ月）についてロータロッド試験を行った。結果を図７に示す。Ｍｕｓｅ細胞を投与した群では、運動学習障害機能の改善が見られたが、新たに加えた非Ｍｕｓｅ細胞を投与した群においては、ビヒクルと同程度に運動学習障害機能の改善は見られなかった。Ｍｕｓｅ細胞は、非Ｍｕｓｅ細胞と比較して、このような運動学習障害機能の改善に優れた効果を示すことが示唆された。

[0046] （２）オープンフィールド試験

各種ラットを新奇な一定の空間を有するボックスに入れ、被験動物の情動

行動（多動性など）を観察した。被験動物の行動をビデオカメラ（室町機械株式会社製ＡＮＹ－ｍａｚｅ　Ｖｉｄｅｏ　Ｔｒａｃｋｉｎｇ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）で撮影し、一定時間における被験動物の移動距離、不動時間、及び中心部での滞在時間を計測した（それぞれ図３の上段、中段、下段）。新奇な空間に置かれたラットは、不安に応じて移動する距離が長くなるが、その空間での適用による移動距離が小さくなる。各ラット群を比較すると、短期ではビヒクルとＭｕｓｅ群では有意な差は見られなかったが、長期では、ビヒクル群と比較して、Ｍｕｓｅ群では活動性の低下を認め、シャム群でも同様の傾向が見られた。これは、Ｍｕｓｅ細胞の投与により、被験動物の情動行動を改善できることを示唆した。

[0047] 上記と同様に、新たにＭｕｓｅ細胞を投与した群、ビヒクル群、シャム群の他に、非Ｍｕｓｅ細胞を投与した群を加え、ＨＩＥラット（生後５カ月）についてオープンフィールド試験を行った。結果を図８に示すが、新たに被験動物の平均速度についても測定した。この平均速度については、新奇な空間に置かれたラットの移動する速度は、不安に応じて高くなり、一方で、不安がないか又は小さい場合には速度が低くなる。Ｍｕｓｅ細胞を投与した群では、いずれの試験系においても顕著な改善が見られたが、新たに加えた非Ｍｕｓｅ細胞を投与した群においては、ビヒクルと同程度に情動行動の改善は見られなかった。Ｍｕｓｅ細胞は、非Ｍｕｓｅ細胞と比較して、このような情動行動の改善に優れた効果を示すことが示唆された。

[0048] （３）シャトルアボイダンス試験

各種ラットにおける学習障害改善を評価するためにシャトルアボイダンス試験を行った。評価に使用した装置は、Ｍｅｄ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ　Ｉｎｃ．製ＭＥＤ－ＰＣ　Ｖｅｒｓｉｏｎ　ＩＶ／ＭＥＤ－ＡＰＡ－ＤＩＭであり、常法に従って、ラットによる電気刺激の回避率を計５回測定した（図４）。いずれの群のラットも刺激に対してこれを回避するように学習したが、短期及び長期のいずれでもＭｕｓｅ細胞群ではビヒクル群と比較して有意な差が認められた。また、Ｍｕｓｅ細胞群の回避率は、シャム群と同程度で

あった。このことから、Ｍｕｓｅ細胞の投与により、被験動物の学習障害が改善されることが示唆された。

[0049] 上記と同様に、新たにＭｕｓｅ細胞を投与した群、ビヒクル群、シャム群の他に、非Ｍｕｓｅ細胞を投与した群を加え、ＨＩＥラット（生後５カ月）についてシャトルアボイダンス試験を行った。結果を図９に示す。Ｍｕｓｅ細胞を投与した群では、学習障害の改善が見られたが、新たに加えた非Ｍｕｓｅ細胞を投与した群においては、ビヒクルと同程度に学習障害の改善は見られなかった。Ｍｕｓｅ細胞は、非Ｍｕｓｅ細胞と比較して、このような学習障害の改善に優れた効果を示すことが示唆された。

[0050] （４）新奇対象認識試験

新奇対象認識試験について、一般的に使用されている装置（室町機械株式会社製ＡＮＹ－ｍａｚｅ Ｖｉｄｅｏ Ｔｒａｃｋｉｎｇ Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いて行った。各種ラットを、２つの物体（馴染物体）を置いた空間で一定時間、自由探索させ、その後、片方を新奇物体と置換し、その差異のラットの新しい物体への探索時間を測定した。評価の指標としてＤＩ（Ｄｉｓｃｒｉｍｉｎａｔｉｏｎ Ｉｎｄｅｘ）（探索指向性）を用いた。具体的には、ＤＩ＝（ＴＮ－ＴＦ）／（ＴＮ＋ＴＮ）（式中、ＴＦ：馴染物体への探索時間、ＴＮ：新奇物体への探索時間）により算出した。ＤＩの数値が高いほど、その物体に対する興味度が高いことを示す。短期では、Ｍｕｓｅ細胞群はビヒクル群と比較して有意差があるが、ＤＩが０未満もあり、新奇物体への興味を示さない場合も多い。一方、長期では、Ｍｕｓｅ細胞群はビヒクル群と比較して有意差があり、シャム群と同程度に新奇物体に対する興味度が高まった（図５）。これらの結果から、Ｍｕｓｅ細胞の投与により、記憶学習や視覚的認知記憶が改善される可能性が示唆された。

[0051] 上記と同様に、新たにＭｕｓｅ細胞を投与した群、ビヒクル群、シャム群の他に、非Ｍｕｓｅ細胞を投与した群を加え、ＨＩＥラット（生後５カ月）についてシャトルアボイダンス試験を行った。結果を図１０に示す。Ｍｕｓｅ細胞を投与した群では、新奇物体に対する興味度が高いことが示されたが

、新たに加えた非Ｍｕｓｅ細胞を投与した群においては、Ｍｕｓｅ細胞を投与した群ほど顕著な効果見られなかった。Ｍｕｓｅ細胞は、非Ｍｕｓｅ細胞と比較して、このような新奇物体に対する興味度を高める効果を示すことが示唆された。

[0052] （５）シリンダー試験

各種ラットをシリンダー内（直径２０ｃｍ）に入れ、健常側（左前肢）と患側（右前肢）について探索的に前肢を壁にかける動作の左右差を確認することにより行った。評価の指標として「非損傷前肢嗜好性（ｎｏｎ－ｉｍｐａｉｒｅｄ　ｐａｗ　ｐｒｅｆｅｒｅｎｃｅ）」を用いた。具体的には、非損傷前肢嗜好性（％）＝（Ｒ－Ｌ）／（Ｒ＋Ｌ＋Ｂ）×１００（式中、Ｒ：右前肢の使用回数、Ｌ：左前肢の使用回数、Ｂ：両前肢の使用回数）により算出した。該値が高いほど、直立時に右前肢（患側）を使用する頻度が高いことを示す。長期についての結果を図６Ａに示す。この結果は、Ｍｕｓｅ細胞群は、ビヒクル群と比較して有意差があり、右前肢（患側）を使用する頻度が非常に高いことを示す。これにより、Ｍｕｓｅ細胞の投与により、運動機能改善が示唆された。

[0053] 図６Ａを論文等で使用されるより一般的な表示にすると図６Ｂとなる。具体的には、非損傷前肢嗜好性（％）＝（Ｌ－Ｒ）／（Ｒ＋Ｌ＋Ｂ）×１００（式中、Ｒ：右前肢の使用回数、Ｌ：左前肢の使用回数、Ｂ：両前肢の使用回数）により算出した。該値が高いほど、直立時に左前肢（健側）を使用する頻度が高いことを示す。

[0054] 上記と同様に、新たにＭｕｓｅ細胞を投与した群、ビヒクル群、シャム群の他に、非Ｍｕｓｅ細胞を投与した群を加え、ＨＩＥラット（生後５カ月）についてシリンダー試験を行った。この実験では、ラットにおいて、健常側が右前肢とし、患側が左前肢とした。結果を図１１に示す。Ｍｕｓｅ細胞を投与した群では、運動機能改善が見られたが、新たに加えた非Ｍｕｓｅ細胞を投与した群においては、ビヒクルと同程度に運動機能改善は見られなかった。Ｍｕｓｅ細胞は、非Ｍｕｓｅ細胞と比較して、このような運動機能改善

に優れた効果を示すことが示唆された。

産業上の利用可能性

[0055] 本発明の細胞製剤及び医薬組成物は、ＨＩＥモデルラットに投与することにより、学習障害や運動障害などの周産期脳障害の改善及び治療に応用できる。

[0056] 本明細書に引用する全ての刊行物及び特許文献は、参照により全体として本明細書中に援用される。なお、例示を目的として、本発明の特定の実施形態を本明細書において説明したが、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、種々の改変が行われる場合があることは、当業者に容易に理解されるであろう。