

明 細 書

発明の名称：

不死化間葉系幹細胞の上清を含む脱髄疾患治療用医薬組成物、及びその組成物を有効成分とする医薬製剤

技術分野

[0001] 本発明は、不死化間葉系幹細胞の培養上清を含む脱髄疾患治療用医薬組成物、及びその組成物を有効成分とする医薬製剤に関する。より詳細には、ギラン・バレー症候群等の感染や自己免疫反応などによって惹起される脱髄疾患又はがんの化学療法などの他の疾病の治療の副作用として惹起される脱髄疾患の治療用医薬組成物、及びその組成物を有効成分として含む医薬製剤に関する。

背景技術

[0002] 近年、間葉系幹細胞（以下、「MSC」と略すことがある。）を用いた細胞療法が盛んに検討されている。ここで、「細胞療法」とは、細胞自体を治療の手段として用いる方法であり、自己の細胞（自家）又は非自己の細胞（第三者、すなわち他家）を用いて、種々の病気の治癒を目指す方法と定義することができる。近年の細胞・遺伝子工学技術などの進歩に伴って様々な細胞療法が開発されており、例えば、（１）投与した細胞をそのまま用いて疾患の治療を行う方法、（２）投与した細胞によって治療用の細胞を体内で作り出し、それらを用いて治療を行う方法、（３）生体内から取り出した細胞を人工的に加工して、治療効果を発揮させる細胞療法等を挙げることができる。

（１）としては輸血療法を挙げることができ、（２）は骨髄移植等を挙げることができる。また、（３）としては、CAR-T細胞療法又はiPS細胞療法等を挙げることができる。

[0003] MSCをある組織の障害された部位に投与した場合、投与された細胞が種々のサイトカインを分泌することも知られている。そして、分泌されたサイトカイン等のパラクリン効果によって、障害された組織の修復、又は、免疫抑制

が生じることが知られている。一方で、MSCの細胞培養上清（Conditioned Medium、以下、「CM」と略することがある。）から細胞を除くと、組織適合抗原に起因する免疫拒絶を考慮する必要がなくなり、また、後述するように安全性も高いため注目されている（非特許文献1、以下、「従来技術1」という。）。

[0004] 神経組織は、脳と脊髄から成る中枢神経と、脳および脊髄から末梢へ延びる末梢神経に大別することができる。神経ネットワークは神経細胞の細胞体から伸びる軸索と樹状突起からなり、軸索は髄鞘と呼ばれる絶縁性の構造体に覆われることで、遠くの細胞に素早く情報伝達を行うことが可能となっている。髄鞘を構成する細胞は中枢神経ではオリゴデンドロサイト、末梢神経ではシュワン細胞とされている。

上記髄鞘は様々な原因により変性又は脱落してしまうことがある。このように髄鞘の変性又は脱落に起因する疾患を総称して脱髄疾患と呼ぶ。脱髄疾患の原因は免疫性、遺伝性、虚血性、感染症性、薬剤性など多岐にわたることが知られている。例えば、中枢神経性の脱髄疾患として多発性硬化症、視神経脊髄炎、急性散在性脳脊髄炎、アトピー性脊髄炎、進行性多巣性白質脳症、HTLB-1関連脊髄症、HIV関連白質脳症、亜急性硬化性全脳炎、浸透圧性脱髄症候群、薬剤性白質脳症等が挙げられる。例えば、末梢神経性の脱髄疾患としてギラン・バレー症候群、Fisher症候群、糖尿病性ニューロパチー、慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー、多巣性運動ニューロパチー及び帯状疱疹等が挙げられる。

[0005] 上記免疫性の脱髄疾患の原因として、自己免疫の異常がよく知られている。生体には生体防御機構としての免疫系が備わっており、免疫系が正常に機能していれば、異物（自己以外と認識されたもの）は攻撃されて排除されるが、自己の組織の抗原に対しては反応せず、自己の組織が攻撃されることはない。しかし、免疫系の正常な機能が破綻し、自己の組織を異物と認識するようなT細胞の誘導や自己抗体と呼ばれる抗体が産生されると、免疫細胞が特定の細胞や組織を標的にして攻撃するようになり、自己を対象とした免疫

反応が起こる。こうした自己免疫反応が、神経組織で起こると、自己免疫性神経炎（以下、「E A N」と略すことがある）と呼ばれる神経障害を起こすことが知られている。特に、自己の髄鞘が攻撃されるような免疫異常が、脱髄疾患を発生させる。

- [0006] E A Nに起因する脱髄疾患としては、多発性硬化症、急性に進行するギラン・バレー症候群及びフィッシャー症候群、慢性に進行する慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー（以下、「C I D P」と略すことがある）、M A G抗体陽性ニューロパチー及び多巣性運動ニューロパチー（以下、「M M N」と略すことがある）等を挙げることができ、いずれも末梢神経障害を伴っている。
- [0007] 上記の疾患のうち、ギラン・バレー症候群は、手足の先にしびれや力の入りにくさ等の症状を発生し、こうした症状が出た後、数日から2週間のあいだに急速に症状が進行し、神経症状が出てから2～4週間で症状はピークに達する。重症化すると四肢麻痺が進んで歩行に介助が必要となり、また、十数%の患者では呼吸筋にも麻痺が及んで人工呼吸器が必要となることが知られている。患者の約半数には、顔面神経麻痺、複視、嚥下障害といった脳神経障害が生じる。重症化の原因は脱髄に付随した軸索の変性と言われ、早期の治療が重要と言われている。
- [0008] ギラン・バレー症候群の原因の60%は、抗ガングリオシド抗体の産生と言われている。このため、抗ガングリオシド抗体の効果を減弱させることを目的として、経静脈的免疫グロブリン療法や血漿浄化療法が行われる（非特許文献2、以下、「従来技術2」という。）。しかし、こうした治療法では効果がでない患者も存在する。これは上記抗体以外、例えばT細胞などが含まれる細胞性免疫に関わる細胞が原因だと言われることもあるが、詳細は知られていない。
- [0009] 末梢神経障害は、脳および脊髄から起始し、末梢へ延びる神経（末梢神経）が損傷したときに引き起こされる一連の症状であり、様々な原因によって手足の痺れや痛みが現れる病気である。感染症や糖尿病等の疾患で惹起されるが、そのほかにも種々の薬剤の副作用でも惹起されることが知られている。

。

[0010] こうした薬剤の例としては、高脂血症治療薬、抗ウイルス薬、抗結核薬などが挙げられるが、特にがん治療薬が問題となっている。昨今国民の半数ががん罹患し、死因の1/3をがんが占めるといわれるが、がん治療の際に多くの患者に末梢神経障害がみられることが知られている。すなわち、がん治療では、化学療法剤が使用されることが多いが、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン等のプラチナ系薬剤、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン等のビンカアルカロイド系薬剤、パクリタキセル、ドセキセル等のタキサン系薬剤、代謝拮抗薬であるシタラビン、アルキル化剤であるイホスファミド等が投与されたときに、末梢神経障害が副作用として出やすいことが知られている。

[0011] 例えば、上記のビンカアルカロイド系薬剤又はタキサン系薬剤は、がん細胞内の微小管に作用するが、同時に神経細胞の微小管にもダメージを与え、神経症状を引き起こすと考えられている。また、上記プラチナ系薬剤は、神経細胞に直接ダメージを与え、神経細胞の軸索に障害を来すと考えられている。

また、アミオダロン塩酸塩、インターフェロン- α 、タクロリムスなどのがん治療薬では、軸索を覆うシュワン細胞が障害されるために末梢神経障害を発症すると言われている。この場合、軸索と細胞体は比較的正常に保たれていることが多く、早期の薬剤投与中止により良好な回復が見込まれるが、障害が進行すると軸索が二次的に変性してしまい、回復が見込めないこともある。

[0012] 以上のような末梢神経障害は、がん治療の化学療法でよく見られる副作用であり、化学療法誘発性末梢神経障害（以下、「CIPN」ということがある）として知られている。神経の構造、神経細胞及びその変性については後述する。

[0013] 上記CIPNの場合には、抗がん剤を一時休薬する、カルシウム／マグネシウムを併用する、漢方薬又はビタミン製剤（ビタミンB6、ビタミンB12、ビタミン

ン複合剤等）を投与するといった手段によって、手足のしびれなどといった末梢神経症状の緩和が図られている（非特許文献3、以下、従来技術3という）。

先行技術文献

非特許文献

[0014] 非特許文献1: Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 25;18(9):1852. doi: 10.3390/ijms18091852.

非特許文献2: Dimachkie MM, Barohn RJ. Guillain-Barre syndrome and variants. *Neurol Clin*. 2013 May;31(2):491-510. doi: 10.1016/j.ncl.2013.01.005.

非特許文献3: Tsai CH, Lin YH, Li YS, Ho TL, Hoai Thuong LH, Liu YH. Integrated Medicine for Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 26;22(17):9257. doi: 10.3390/ijms22179257.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 従来技術1は、細胞を含まないMSCのCMを使用するため、免疫拒絶を考慮する必要がないこと、及び細胞療法で問題とされる倫理規制、及び懸念される塞栓又は腫瘍形成の可能性が低いという点で安全性が高く、優れた技術である。しかし、不死化していないMSCを培養した場合には、細胞老化により多くても10代程度の継代で増殖能が低下する。そのため、再度ドナーよりMSCを調製する必要があり、安定した成分を含有するCMを継続的に供給するといった品質管理が難しい。

[0016] 従来技術2は、上述したギラン・バレー症候群の治療において、標準的に用いられる方法であり、経静脈的免疫グロブリン療法（以下、「IVIg」ということがある）又は血漿浄化療法がある。これらの治療法は抗ガングリオン

ド抗体の効果を減弱させる目的で行われる。しかし、これらの治療法では効果が出ない患者も存在し、その原因は不明である。そのため、ギラン・バレー症候群を含む脱髄疾患に対して、こうした方法よりも効果が高い、新たな治療薬に対する強い社会的要請があった。

[0017] また、上述したように、がんに対する化学療法は、大半のがん患者に対して行われる治療法であり、投与量を最大耐容量まで増やすことができるようになった。しかし、薬剤の投与量が増加すると、その副作用としてCIPNが頻発する。従来技術3は、CIPNの症状をある程度緩和することができるという点では優れた方法である。しかし、対症療法であるため、症状の緩和が上手くできない場合には、投与量の減量、休薬、又は投薬中止が必要となることがあり、それによって癌の症状が進行するといった問題につながる。また、CIPNが緩和されないときには、患者のQOLを下げるといった問題ともなる。

[0018] 以上から、安全性が高い細胞フリー療法に使用することができ、脱髄疾患を根本的に治療することができる医薬組成物、及びそのような組成物を有効成分とする医薬製剤に対する強い社会的要請があった。

課題を解決するための手段

[0019] 本願発明の発明者らは、以上のような状況の下で鋭意研究を進め、本願発明を完成したものである。本願発明は、特定の遺伝子を組み込んだ不死化間葉系幹細胞の培養上清を有効成分とする、脱髄疾患の治療に使用できる医薬組成物、脱髄疾患の医薬製剤を提供することを目的とする。

[0020] 本発明の第1の態様は、Bmi-1遺伝子、HPV16-E6遺伝子及びHPV16-E7遺伝子からなる群から選ばれる2つ又は3つの遺伝子と、テロメラーゼ逆転写酵素（TERT）遺伝子のセットを導入した間葉系不死化幹細胞の培養上清を含む組成物であって、髄鞘の再生又はシュワン細胞の増殖を誘導することができる組成物である。ここで髄鞘の再生とは、シュワン細胞が脱落したことで裸となった軸索を、本発明のシュワン細胞増殖効果により再髄鞘化させることや、薄くなってしまった髄鞘を元の厚さに戻すことを指す。

- [0021] また、前記遺伝子のセットはB m i -1 遺伝子、H P V 1 6 -E 6 遺伝子、H P V 1 6 -E 7 遺伝子、及びT E R T 遺伝子であることが好ましい。
- [0022] ここで、前記間葉系幹細胞は歯髄幹細胞であることが好ましく、前記歯髄幹細胞はヒト由来歯髄幹細胞であることが好ましい。また、ウイルスベクターを用いて前記遺伝子を前記幹細胞に導入して不死化し、得られた不死化幹細胞を無血清培地で24～96時間、好ましくは48～80時間培養することで得られる培養上清を含む組成物であることが好ましい。より好ましくは、上記培養時間は約72時間である。
- [0023] また、前記組成物は、少なくとも肝細胞増殖因子（HGF）の受容体c-METに作用する成分を含むものであることが好ましく、それがHGFであることがさらに好ましい。
- [0024] 本発明の別の態様は、前記組成物を有効成分として含む、脱髄疾患の治療用医薬製剤である。ここで、製剤の総重量を100%としたときに10～90重量%含むものであることが好ましい。より好ましくは25～75重量%含むものである。
- [0025] 前記脱髄疾患が中枢神経性疾患であって、多発性硬化症、視神経脊髄炎、急性散在性脳脊髄炎、アトピー性脊髄炎、進行性多巣性白質脳症、HTLB-1関連脊髄症、HIV関連白質脳症、亜急性硬化性全脳炎、浸透圧性脱髄症候群及び薬剤性白質脳症からなる群から選ばれるいずれかの障害であることが好ましい。
- また、前記脱髄疾患が末梢神経性疾患であって、ギラン・バレー症候群、Fisher症候群、糖尿病性ニューロパチー、慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー、多巣性運動ニューロパチー、化学療法剤誘発性末梢神経障害及び帯状疱疹からなる群から選ばれるいずれかであることが好ましい。
- [0026] 前記治療用製剤は、粉末、錠剤、カプセル剤、液剤、注射剤、及び貼付剤からなる群から選ばれるいずれかの剤形であることが好ましい。
- [0027] 本発明の第2の態様は、B m i -1 遺伝子、H P V 1 6 -E 6 遺伝子及びH P V 1 6 -E 7 遺伝子からなる群から選ばれる2つ又は3つの遺伝子と、

テロメラーゼ逆転写酵素（TERT）遺伝子のセットを組み込んだ間葉系不死化幹細胞の培養上清を含む組成物を有効成分とする、化学療法剤誘発性末梢神経障害治療用医薬製剤である。ここで、前記化学療法剤は抗がん剤であることが好ましく、ビンカアルカロイド系製剤又はタキサン系製剤であることがさらに好ましい。

発明の効果

[0028] 本願発明の脱髄疾患の治療剤によれば、Bmi-1、HPV-E6、HPV-E7、及びTERT遺伝子を組み込んだ不死化間葉系幹細胞の培養上清を有効成分とすることによって、脱髄疾患や末梢神経障害、特にギラン・バレー症候群やCIPNの症状を緩和、又は速やかな回復を促すことができる。

また、本願発明の脱髄疾患の治療用組成物によれば、シュワン細胞の増殖を促すことができ、それにより神経機能の低下を回復させることができる。

図面の簡単な説明

[0029] [図1]図1は、正常、ギラン・バレー症候群、及び化学療法誘発性末梢神経障害の神経細胞の髄鞘及び神経伝達の状態を示す図である。（A）正常な神経細胞の髄鞘及び神経伝達の状態を示す。（B）ギラン・バレー症候群を発症した神経細胞の髄鞘及び神経伝達の状態を示す。（C）化学療法誘発性末梢神経障害を発症した神経細胞の髄鞘及び神経伝達の状態を示す。

[図2]図2は、ギラン・バレー症候群の患者の場合の末梢神経障害発生と、免疫系との関係を模式的に示す図である。

[0030] [図3]図3は、自己免疫性神経炎マウスの作製方法と、その自己免疫神経炎マウスにSHED-CMを腹腔内投与した時の、臨床スコアの変化を示した図である。図3(A)は、C57BL/6マウスに、P0(180-199)を投与して自己免疫性神経炎モデルマウスを作製し、DMEM又はSHED-CMを投与したときの投与スケジュールを示す。また、図3(B)は、上記図3(A)の投与スケジュールで治療したときの臨床徴候スコアの変化を示す。

[図4]図4は、図3で作製した自己免疫性神経炎マウスの腹腔内にDMEM（図4(A)）又はSHED-CM（図4(B)）を投与した時の、神経細胞軸索及び髄鞘のトルイ

ジン・ブルー染色した光学顕微鏡画像（図4(A1,2)及び4(B1,2)）、及び電子顕微鏡画像（図4(A3)及び(B3)）を示す。電子顕微鏡画像中の黒いバーは、スケール（10 μ m）である。

[0031] [図5]図5は、定量PCRによる発現解析を行った結果を示す。図5(A)の縦軸は、Myelin Basic Protein（以下、「MBP」と略すことがある）の発現量を、内部標準遺伝子であるHypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase（以下、「HPRT」と略すことがある）で除したときの相対比とするグラフである。図5(B)は、MBP又はActinの発現量に対するSHED-CMの効果を示す、ゲル電気泳動後のウェスタンブロットの結果である。

[図6]図6は、SHED-CMを投与した時の神経細胞におけるTNF- α 、IFN- γ 、及びIL-17A遺伝子の発現量を示す図である。図6(A1)～(A3)は、坐骨神経細胞における上記遺伝子の発現量を示す。図6(B1)～(B3)は、馬尾神経細胞における上記遺伝子の発現量を示す。

[0032] [図7]図7は、坐骨神経細胞におけるリン酸化c-Metのタンパク質量がSHED-CMの投与によって増加することを示す、ゲル電気泳動後ウェスタンブロットした結果である。

[図8]図8は、野生型（以下、「WT」と略すことがある）マウスから作製した自己免疫性神経炎モデルマウスに対する各種SHED-CMの治療効果を示す。図8(A)は、WTマウスを用いた自己免疫性神経炎モデルマウスの作製と、上記モデルマウスへのSHED-CM投与スケジュールとを示す。図8(B)は、上記モデルマウスへのSHED-CMの効果が、抗HGF抗体の同時投与により低下する傾向があることを示したグラフである。

[0033] [図9]図9は、シュワン細胞株であるIMS32をDMEM又はSHED-CMを含むDMEM培地で培養した時の様子を示す光学顕微鏡像である。図9(A)は実験開始前、図9(B1)は10%(v/v)のDMEMを含む対照、図9(B2)は30%(v/v)のDMEMを含む対照、図9(C1)は10%(v/v)のSHED-CMを含むサンプル1、及び図9(C2)は30%(v/v)のSHED-CMを含むサンプル2のIMS32細胞の形状の変化をそれぞれ示す光学顕微鏡像である。

[0034] [図10]図10は、SHED-CMを含む培地で培養した時のIMS32の細胞増殖の変化を示すグラフである。図10(A)は、1～30%(v/v)のDMEM又はSHED-CMを含むDMEMで培養した時のIMS32の細胞増殖を比較した図である。図10(B)は、図10(A)で使ったのと同じ培地に、抗HGF及びそのコントロール抗体を添加した時の細胞増殖の変化を示す図である。

[図11]図11は、ウシ胎児血清（以下、「FBS」と略することがある。）の存在下又は非存在下における、10～50%(v/v)のSHED-CM又は0.1-50 ng/mLのHGFを含むDMEMで培養したときの細胞の増殖を示すグラフである。図11(A)はFBS非存在下、図11(B)は1%FBS存在下のときのIMS32の細胞増殖の変化を示す。

[0035] [図12]図12は、SHED-CM又はHGFで刺激した際のIMS32における各タンパク（c-met、ERK1/2、またはAKT）のリン酸化および全タンパク質の量を示す、電気泳動後にウェスタンブロットした結果である。

[図13]DMEM（5% FBS含有）で培養しているIMS32をSHED-CM、HGF、NRG1、DBcAMP、又はNRG1+DBcAMPで刺激した際の、MBP及びp75のタンパク質量を示す、電気泳動後にウェスタンブロットした図である。

[図14]図14は、WTマウスから作製した化学療法誘発性末梢神経障害モデルマウスに対するSHED-CMの治療の効果を示すグラフである。80 µg/200 µLのパクリタキセルを一日おきに腹腔投与した際、モデルマウスへSHED-CMを投与すると、神経障害が緩和され、対照培地であるDMEMを投与したコントロール群よりも早く回復している事示す。

[図15]図15は、フィラメントの圧の強さや付随する情報を示す表である（Dynamic Global, LLC解説書より引用）。

[図16]図16は、von Frey filament testの計算に用いる、kの値を示す表1である。

[図17]図17は、von Frey filament testの計算に用いる、kの値を示す表2である。

発明を実施するための形態

[0036] 以下、本願発明の一実施形態を、図1～図17を参照して説明する。なお、

以下の説明及び図面においては、同一又は同等の要素には同一符号を付し、重複する説明を省略する。

- [0037] 本願発明の第一の態様である間葉系幹細胞の培養上清（CM）を用いた治療用組成物は、以下の手順で作成される。すなわち、（S1）ヒト歯髄幹細胞に特定の遺伝子のセットを組み込んで不死化幹細胞を作製し、（S2）得られた上記不死化幹細胞を培養して、その培養上清を調製し、（S3）上記培養上清を有効成分とする、髄鞘の再生又はシュワン細胞の増殖を誘導することができる組成物を作製する。
- [0038] ここでは、間葉系幹細胞の例として歯髄幹細胞を使用する態様を記載する。歯髄幹細胞とは、歯の神経に含まれる再生能を有する幹細胞の一種をいう。歯という硬質の材料に保護されているため、紫外線や放射線に暴露されないため、遺伝子が傷つきにくいという特徴を有する。
- [0039] また、上記遺伝子のセットは、bmi-1、HPV-E6、HPV-E7、及びTERTからなる。TERTはテロメア修復酵素の遺伝子であり、bmi-1はポリコム複合体を構成するたんぱく質の1つであるBmi-1の遺伝子である。ここで、Bmi-1は造血幹細胞の維持に必要であり、活性増強により造血幹細胞を増やすことができるという作用を有する。E6及びE7はHPV-16又はHPV-18のDNAの初期遺伝子である。
- [0040] まず、ヒト脱落乳歯を、例えば、クロロヘキシジン、イソジン溶液その他の消毒薬で消毒した後、歯冠部を分割し、歯科用リーマーにて歯髄組織を回収する。採取した歯髄組織を、基本培地、例えば、5～15%ウシ血清（以下、「CS」ということがある。）及び50～150ユニット/mLの抗生物質を含有するダルベッコ変法イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagle's Medium、以下、「DMEM」という。）に懸濁する。ついで、1～5mg/mLのコラゲナーゼ及び1～5mg/mLのディスパーゼを用いて、37℃で、0.5～2時間処理する。
- [0041] 上記基本培地としては、DMEMの他、イスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）（GIBCO社等）、ハムF12培地（HamF12）（SIGMA社、GIBCO社等）、RPMI1640培地等を用いることができる。二種以上の基本培地を併用することにしても

よい。混合培地の一例として、IMDMとHamF12を等量混合した培地（例えば商品名：IMDM/HamF12（GIBCO社）として市販される）を挙げることができる。

- [0042] また、基本培地に添加するものとしては、ウシ胎仔血清（以下、「FCS」と言うことがある。）、ヒト血清、羊血清その他の血清、血清代替物（Knockout serum replacement(KSR)など）、ウシ血清アルブミン（以下、「BSA」と言うことがある。）、ペニシリン、ストレプトマイシンその他の抗生物質、各種ビタミン、各種ミネラルを挙げることができる。

上記の基本培地は、後述する細胞選別用の培養、及び選別後の細胞の培養に使用することもできる。

- [0043] 酵素処理の後、3～10分間の遠心操作（3,000～7,000回転／分）を行い、歯髄幹細胞を回収する。必要に応じて、セルストレーナーを用いて細胞の選別を行う。選別された細胞を、例えば、3～6mLの上記基本培地で再懸濁し、直径4～8cmの付着性細胞培養用ディッシュに播種する。

- [0044] 次いで、培養液、例えば、10%FCSを含有するDMEMを添加した後、5%CO₂インキュベータにて、37℃で2週間程度培養する。上記培養液を除去した後、PBS等で細胞を1～数回洗浄する。培養液の除去及び細胞の洗浄に代えて、コロニーを形成した接着性の歯髄幹細胞を回収することもできる。接着性の歯髄幹細胞は、例えば、0.025～0.1%のトリプシンと0.3～1mMのEDTAにて、数分間、37℃で処理してディッシュから剥離させ、次いで細胞を回収する。

- [0045] 次に、上記のように選別された接着性細胞を培養する。例えば、上記のようにして得た歯髄幹細胞を付着性細胞培養用ディッシュに播種し、5%CO₂、37℃の条件でインキュベータにて培養する。

継代培養は、例えば、肉眼で観察してサブコンフレント又はコンフレントに達したときに、上述のように、トリプシンとEDTAとを用いて細胞を培養容器から剥離させて回収し、再度、培養液を入れた培養容器に播種する。

- [0046] ここで、サブコンフレントとは、培養容器中の細胞付着面の約70%に細胞が付着した状態をいう。例えば、継代培養を1～8回行い、選別された細胞を、必要な細胞数、例えば約 1×10^7 個/mLまで増殖させる。以上のように培養し

た後に、細胞を回収して液体窒素中にて保存する。様々なドナーから回収した細胞を歯髄幹細胞バンクの形態で保存してもよい。

[0047] 次いで、前記幹細胞を初代培養して得られた初代培養細胞に、3又は4種類の遺伝子を導入して遺伝子導入細胞を作製する。ここへ導入する遺伝子は、hTERTと、bmi-1、E6及びE7からなる群から選ばれる2又は3つの遺伝子であることが、より個体数倍加回数の多い不死化幹細胞を得られることから好ましい。ここで、hTERTは、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素の遺伝子であり、bmi-1は幹細胞の自己複製や分化制御に関わっているポリコム群遺伝子である。E6及びE7は、ヒトパピローマウイルスが自己複製のために使用する初期遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム中に存在する遺伝子である。

[0048] こうした遺伝子の導入は、以下のようにして行うことができる。

目的とする上記の遺伝子を組み込むためのプラスミドを調製し、これをシャトルベクター、例えば、pSuttle2に組み込んで、上記の遺伝子をクローニングする。このシャトルベクターで大腸菌を形質転換し、カナマイシン耐性形質転換体を選択する。選択したカナマイシン耐性形質転換体のプラスミドDNAを精製し、制限酵素部位を解析して組換え体を同定する。

[0049] 1. DNA断片の作製及びウイルスベクター作製工程

1. 1 ウイルス組込み用DNA断片の作製

まず、ウイルスにDNA断片を組み込むために使用するベクターの配列情報を入手する。本発明で、遺伝子導入用ベクターとして使用するウイルスは、レンチウイルス、アデノウイルス、レトロウイルスからなる群から選ばれるいずれかのものであることが、導入した遺伝子が一過性ではなく発現されることから好ましい。

[0050] 以下に、レンチプラスミドベクター（pLVSiN）を使用した場合を例に挙げて説明する。pLVSiNの配列情報を、例えば、タカラバイオウェブカタログからダウンロードし、マルチクローニングサイトを確認する。

[0051] 次いで、以下のようにしてDNA断片を作製する。本発明では、上記DNA断片

に2～4遺伝子を組み込んで、不死化幹細胞を作製する。使用する細胞は、哺乳類から得られる幹細胞であれば特に限定されないが、入手が容易で、かつ、形質が安定した不死化幹細胞を得ることができることから、ブタ歯髄組織、ブタ脂肪組織、及びヒト歯髄組織を使用することが好ましい。

[0052] また、ここで導入する遺伝子は、2つのパピローマウイルスの初期遺伝子、テロメラーゼ逆転写酵素（TERT）、及びbmiからなる群から選ばれる少なくとも2以上の遺伝子のセットであることが、安定した形質を有する不死化幹細胞を作製できることから好ましい。また、前記パピローマウイルスの初期遺伝子は、ヒトパピローマウイルス（以下「HPV」と略すことがある）E6、ヒトパピローマウイルスE7であることが、発現効率の点から好ましい。TERTは、human TERT（以下「hTERT」と略すことがある。）を使用することが遺伝子の発現効率の点から好ましい。

[0053] 上記遺伝子のうち、TERTは加齢に従って短くなるテロメア配列を伸長させる酵素をコードする遺伝子である。ヒトパピローマウイルスE6及びE7はいずれも、ヒトパピローマウイルスの初期遺伝子であり、E6は、TERTの再活性化やPDZドメインを持つタンパク質を分解することが知られている。bmi-1は、ポリコム群遺伝子であり、幹細胞の自己複製や分化制御に関わっていることが知られている。

[0054] 以下に、レンチウイルスベクターを作製して、3つの遺伝子を導入する場合を例に挙げて説明する。ヒトパピローマウイルスE6遺伝子、ヒトパピローマウイルスE7遺伝子、そしてテロメラーゼ逆転写酵素（TERT）を組み込むために、配列情報に従って、例えば、EcoRI/KoZaI/E6/T2A3/E7/T2A4/hTERT/BamHIの二本鎖DNA（配列表の配列番号1）を標準的な手順で合成する。得られたDNA断片を、上記のレンチプラスミドベクター（pLVSIN-CMV Neo）のマルチクローニングサイトに標準的な手順でクローニングし、上記3つの遺伝子を組み込んだレンチウイルス用のプラスミドベクター（E6E7T）を得ることができる。

[0055] レトロウイルスの場合には、レンチウイルスベクターの場合とは異なって

、個別の遺伝子を組み込んだベクターを作製して共感染により導入を行なう。例えば、開始コドンの上流にKozak配列（gccacc）を付加した5種類の不死化遺伝子（hTERT（配列表の配列番号2）、ヒトパピローマウイルスのE6（配列表の配列番号3）及びヒトパピローマウイルスのE7（配列表の配列番号4）、pigTERT（配列表の配列番号5）、及びhBmi-1（配列表の配列番号6））を常法に従って調製し、pDON-5 NEO DNA（TaKaRa Code 3657）のPmaC I-Hpa Iサイトに常法に従ってクローニングし、レトロウイルスプラスミドベクター（pDON-5 Neo hTERTベクター、pDON-5 Neo HPV16E6ベクター、pDON-5 Neo HPV16 E7ベクター、pDON-5 Neo pHRTERTベクター及びpDON-5 Neo hBmi1ベクター）を調製することができる。

[0056] その後、上記のようにして作製した5種類のプラスミドDNAを用いて常法に従って大腸菌を形質転換させ、得られた形質転換体をCO₂インキュベータ中で培養して、トランスフェクショングレードのプラスミドDNAを得ることができる。

[0057] 次に、5.5～6.5x10⁶個/dishでG3T-hi細胞を所望のプレートに播種し、5% CO₂インキュベータ中、約37℃で約20～28時間培養し、所望の量のトランスフェクション試薬（例えば、0.3～0.5mLのTransIT-293）を加えて、上記の5種類プラスミドベクターのうちからヒト又はブタ由来TERTのいずれかを含む4種類を選択し、pGP及びpE-Ampho（いずれもRetrovirus Packaging Kit Amphoに付属するベクター）を共導入し、さらに同じ条件の下で40～56時間培養を行なうことで、これらの遺伝子を導入することができる。

[0058] 1. 2 ベクター産生細胞の調製

上記の作業と並行して、組換えレンチウイルスベクター産生細胞を準備する。こうした細胞株としては、例えば、Lenti-X 293T（クロンテック社製、コード番号：632180）その他の市販の細胞株を使用することができる。Lenti-X 293Tの培養には、ウシ胎児血清及び抗生物質を含む培地を使用することができる。こうした培地としては、例えば、最小培地（MEM）、DMEM等を挙げることができる。例えば、5～15%のウシ胎児血清（FBS、ハイクローン社製）、

0.5～2%の抗生物質（ペニシリン／ストレプトマイシン、ギブコ社製）を含有するDMEM（SIGMA社製, St. Louis, MO）等を使用することが、細胞の増殖効率の点から好ましい。

[0059] 例えば、10%ウシ胎児血清及び1%ペニシリン／ストレプトマイシンを含有するDMEMを調製し、この培地を基本培地として使用することもできる。以下、本明細書中では、この培地を「293T基本培地」という。

[0060] 例えば、上記の細胞株としてLenti-X 293Tを使用する場合には、 $1 \sim 5 \times 10^5$ cells/mLの細胞懸濁液を調製して、10cmディッシュにこの懸濁液を10mL入れ、5%CO₂インキュベータ中にて約24時間培養し、その後、使用するまで、細胞の状態に合わせて継代する。使用に際しては、まず、継代を続けた細胞の培養上清を除去してPBSで洗浄し、市販の剥離剤を加えて細胞をディッシュから剥離させて回収する。次いで、約3～5倍希釈した細胞懸濁液を所望量とってトリパンブルー染色液を加え、血球計算盤を用いて生細胞数を計数する。上記基本培地を加えて約 5×10^5 cells/mLの細胞懸濁液を調製し、例えば、所望の濃度でディッシュに播種し、所望の条件で培養する。例えば、直径6cmのコラーゲンコートディッシュに、 $1 \sim 4 \times 10^6$ cells/4mLで上清細胞を播種し、その後、5%CO₂インキュベータ中にて約37℃にて約24時間培養し、培地を交換してさらに培養を続ける。

[0061] また、レトロウイルス調製細胞として、ヒト腎臓由来の細胞株293T（G418耐性）にハイグロマイシン耐性遺伝子を用いてヒトN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ III（N-acetylglucosaminyltransferase III : GnT-III）を導入したGnT-III高発現細胞株である、G3T-hi細胞を使用することが好ましい（タカラバイオ（株）製）。

[0062] 上記G3T-hi細胞は、Retrovirus Packaging Kit Eco又はAmpho（タカラバイオ（株）製、製品コード 6160、6161）を用いて、gag-pol、env遺伝子の発現ベクタープラスミドと目的遺伝子を組み込んだ組換えレトロウイルスベクタープラスミドを共導入することにより、迅速かつ一過性に高力価の組換えウイルスを産生できるようデザインされている。そして、上記G3T-hi細胞は293

T由来であるため、SV40のT抗原遺伝子が導入されており、この遺伝子の働きによってレトロウイルスのRNAが増幅され、高力価ウイルス液が得られるからである。通常、Retrovirus Packaging Kitを用いた一過性発現では $10^5 \sim 10^7$ cfu/mLのウイルスを含む溶液が得られる。

[0063] 上記G3T-hi細胞では、細胞膜糖鎖がGnT-IIIにより修飾される。発芽するレトロウイルスは宿主細胞膜を纏うため、上記G3T-hi細胞より得られた組換えレトロウイルスの膜タンパク質の糖鎖は、GnT-IIIにより修飾を受けていると推測される。この糖鎖修飾により、上記G3T-hi細胞を用いて調製したレトロウイルスは、RetroNectin（組換えヒトフィブロネクチンフラグメント）への親和性が高くなっているため、培養器のコート剤としてRetroNectinを用いることにより標的細胞への遺伝子導入効率が大きく向上する。RetroNectinは、特に、血球系細胞を標的とした遺伝子導入に有効である。

[0064] G3T-hi細胞を使用する場合には、上記293T基本培地に代えて、グルコース（4.5 g/L）及びL-グルタミン（584 mg/L）を含むDMEMに、10%FBS及び1%ペニシリン／ストレプトマイシンを添加した培地を使用することが、レトロウイルスの産生効率の面から好ましい。

[0065] 1. 3 ウイルスベクターの作製

以下に、レンチウイルスベクターの場合を例に挙げて説明する。

以上説明したように培養している細胞の入ったディッシュに、上記のようにして作製したレンチウイルスベクタープラスミドを加えてコトランスフェクションを行なう。こうしたコトランスフェクションには、市販のパッケージングシステム、例えば、Lenti-X HTXパッケージングシステム（クロンテック社製）等を使用することができる。具体的な手順は、こうしたシステムに付属しているマニュアルに従えばよい。

[0066] コトランスフェクション終了後に、培地を新鮮な完全培地に交換し、約37℃で24～48時間培養する。ウイルスベクターの力価測定を行って回収のタイミングを決定し、ウイルス力価が最大となった時点でウイルスベクターを含む培養上清を回収する。ウイルスベクターの力価測定には、市販の簡易力価

測定キットを使用することができ、こうしたキットとしては、例えば、Lenti-X GoStix（クロンテック社製）等を挙げることができる。

- [0067] 例えば、培地を交換した翌日に、上記のシャーレの培養上清を所望の大きさのシリンジで吸い取って回収し、回収した培養上清を濾過してウイルスベクターを得る。例えば、10mLのディスポーザブルシリンジ（テルモ(株)製）で培養上清を吸い取り、その後、このシリンジに、例えば、0.45 μ mのフィルター（MILEX-HV、ミリポア社製）を装着し、シリンジ内の培養上清をろ過しながら、例えば、15mLチューブに、ウイルスベクター溶液を回収する。
- [0068] 次いで、市販の簡易力価測定キットに含まれている試薬を用いて、組換えレンチウイルスベクターの存在を確認する。例えば、上記のLenti-X GoStixのSに、所望量のウイルスベクター溶液、例えば20 μ Lを加え、さらにChase Buffer 1を添加して室温にて所望の時間、例えば10分間反応させ、バンドの有無によって、組換えレンチウイルスベクターの存在を確認することができる。
- [0069] 以上のようにして得られたE6E7Tのプラスミドを含む細胞を寒天培地上にストリークし、形成されたコロニーを取って、所望量の培地、例えば、抗生物質を含む約2 mLのLB培地に播種し、約37°Cで約8時間、激しく攪拌しながら振盪培養する。次いで、異なる抗生物質、例えば、アンピシリン、を含むLB培地、例えば、約50 mL中に、上記のように培養した細胞の培養液を所望量、例えば100 μ L移植し、約37°Cで約14～18時間、激しく攪拌しながら振盪培養する。
- [0070] 市販のキット、例えば、MN NucleoBond Xtra Mid Kit（クロンテック社製）を用いて水で溶出させたプラスミドの量を測定する。これとともに、所望のゲル、例えば、約1%のアガロースゲルで分析を行ない、組み込まれたDNAがそれぞれ異なるものであることを確認する。ゲル電気泳動分析のマーカーとしては、例えば、スーパーコイルのDNAラダー、 λ -Hind III消化DNA等を使用することができる。以上のようにして、ウイルスベクターを作製することができる。

[0071] 2. 哺乳類の幹細胞の調製

2. 1 ブタ歯髓幹細胞の調製

生後5～6ヶ月のブタの顎骨（下顎歯のついた下顎骨）を入手する。以下の手順に従って、上記のブタの歯と下顎骨とからブタの歯髓幹細胞を得る。

[0072] まず、上記ブタの歯と下顎骨を、適当な消毒剤、例えば、イソジンで消毒する。その後、例えば、歯科用ダイヤモンドポイントを用いて、下顎歯の歯冠を水平方向に切断、次いで、垂直方向に切削して天蓋を除去する。歯冠及び歯根部より、例えば、歯科用手術用スケーラーを用いて歯髓を採取する。

[0073] 得られた歯髓を、例えば、眼下用穿刀を用いてチョッピングし、所望の濃度、例えば、1～3 mg/mLのコラゲナーゼ溶液に懸濁させ、約37℃の恒温槽中に所望の時間、例えば、1時間置いて細胞を単離する。単離した細胞を、所望の培地、例えば、10%FBS及び1%Anti-Anti (Antibiotic-Antimycotic, Invitrogen社製, Carlsbad, CA) を含むDMEM中にて、約37℃にて、5%CO₂インキュベータ中で予備培養し、継代用の細胞を得る。

[0074] まず、サブコンフルエントになるまで、週2～3回の頻度で培地を交換しながら培養し、サブコンフルエントとなった細胞を、剥離剤、例えば、0.05%トリプシンを含むHepes溶液を用いて剥離させ、所望の条件、例えば、室温にて1,500rpmで約3分間遠心して集める。得られた細胞を新鮮な培地に移し、上記と同様の条件の下で、所望の量、例えば、全量を用いて継代培養を行う。

[0075] 2. 2 ヒト乳歯歯髓幹細胞の調製

健常児から得られた脱落乳歯又は抜歯した乳歯を入手する。こうした乳歯を、適当な消毒剤、例えば、イソジン溶液で消毒した後、ブタの歯髓を得たのと同様にして歯髓組織を回収する。得られた歯髓組織を、所望の濃度のコラゲナーゼ及びディスパーゼ、例えば、約3 mg/mLのI型コラゲナーゼ及び約4 mg/mLのディスパーゼの溶液中、所望の温度で所望の時間、例えば、約37℃にて約1時間、消化する。ついで、この溶液を、例えば、70mmの細胞ストレーナ（Falcon社製）を用いて濾過し、細胞を濾別する。

- [0076] このように濾別した細胞を、所望量、例えば、4 mLの上記培地に再懸濁し、所望の径、例えば、直径6 cmの付着性細胞培養用ディッシュに播種する。ここに、所望の培地、例えば、約10%FCSを含有するDMEMを添加し、5 %CO₂、37℃に調整したインキュベータにて、所望の期間、例えば2週間程度培養する。コロニーを形成した接着性細胞（歯髄幹細胞）を、所望の剥離剤、例えば、約0.05%トリプシンを含む約0.2mM EDTAにて所望の時間、例えば、5分間、約37℃で処理し、ディッシュから剥離した細胞を回収する。
- [0077] 次に、上記のようにして回収した接着性細胞を、例えば、付着性細胞培養用ディッシュ（コラーゲンコートディッシュ）に播種し、例えば、5 %CO₂、37℃に調整したインキュベータ中にて一次培養し、初代培養細胞とする。肉眼観察でサブコンフルエント又はコンフルエントになったときに、上記と同様の剥離剤を用いて同様に処理し、ディッシュ内包の細胞を回収する。
- [0078] その後、一次培養細胞を上記の培地を用いて所望の濃度、例えば、約1 × 10⁴ cells/cm²濃度で継代培養し、1～3回程度継代した細胞を実験に用いる。以上のようにして、ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞（SHED）を得ることができる。
- [0079] 必要に応じて、上記のようにして得られたブタ乳歯歯髄幹細胞及びヒト乳歯歯髄幹細胞をそれぞれバイアルに入れ、マイナス80度で凍結保存してもよい。
- [0080] 3. 遺伝子導入細胞の作製
3. 1 レンチウイルスベクターによる遺伝子導入
- 以上のようにして得られたブタ歯髄幹細胞及びヒト歯髄幹細胞を上記と同様に培養し、約70～90%コンフルエントになったところで、市販のキットを用いてマイコプラズマチェックを行なう。こうしたキットとしては、例えば、MycoAlert Mycoplasma Detection Kit（Lonza社製、LT07-318）等を使用することができる。次いで、ポリブレン試薬を用いて、上記のようにして作製したレンチウイルスベクターを上記の各幹細胞に感染させ、薬剤選択を行なって目的遺伝子の安定発現株を選択する。
- [0081] 上記のように培養した各幹細胞の培養上清を除去し、例えば、PBS（pH 7.4

）で洗浄した後に、所望の剥離剤を使用して細胞を剥離させ、個別に回収する。こうした剥離剤としては、例えば、ブタ乳歯髄幹細胞に対してはStemPro（登録商標：GIBCO社製）、ヒト乳歯髄幹細胞に対してはTrypsin - EDTA等を使用することができる。

[0082] 得られた細胞を定法に従って計数し、例えば、組織培養処理（T. C. treatment）した6ウェルプレート（CORNING社製）の各wellに、約 1×10^5 cells/wellとなるように播種し、約37℃のCO₂インキュベータ内で約24時間培養し、細胞が全体に均一に存在していることを確認する。

[0083] その後、培養上清を除去し、ブタ乳歯髄幹細胞に対しては、所望の濃度のポリブレンを含む所望の培地、例えば、約8 µg/mLのポリブレン及び約10% FBSを含むDMEM培地を所望量、例えば、750 µL/wellずつ添加する。次いで、各ウェルに上記のようにして得られたレンチウイルスベクター溶液を、例えば、約250 µL/wellずつ添加する。

[0084] ヒト乳歯髄幹細胞の場合は、上記と同様のポリブレン及びFBSを含むDMEMを、所望の量、例えば、約1.2 mL/wellずつ添加し、次いで、各ウェルに上記レンチウイルスベクター溶液を所望量、例えば、約400 µL/wellずつ添加する。

[0085] 以上のようにウイルスベクターを添加したそれぞれのプレートを、所望の条件、例えば、約1,000×gで約30分間、約32℃にて遠心し、細胞にウイルスを感染させる。その後、所望の条件、例えば、約37℃のCO₂インキュベータ内で約4～約6時間培養し、その後、各ウェル中に培養培地を所望の量、例えば、約1 mL/wellずつ添加し、さらに所望の条件、例えば、37℃のCO₂インキュベータ内で約24時間培養し、遺伝子導入を行なう。

[0086] 3. 2 薬剤選択

以上のように培養した幹細胞（ブタ歯髄幹細胞及びヒト歯髄幹細胞）の培養プレートの各ウェルから培養上清を除去し、所望の濃度の選択薬剤、例えば、約0.4 mg/mL又は約0.8 mg/mLのGENETICIN（G418、GIBCO社製）を含む選択培地を、所望の量、例えば、約2 mL/well各ウェルに加え、選択培地に交換

する。以後、培地交換を行いながら所望の期間、例えば、約3～約5日間培養し、遺伝子導入細胞の選択を行う。

[0087] 上記の各培養細胞の一部をクローニングに供し、残りはプール細胞として選択用培地で培養を続ける。クローニングは以下のように行うことができる。

抗生物質を含まない選択培地、例えば、ペニシリン、ストレプトマイシン及びG418を含まない選択培地、を用いて細胞を希釈し、所望の濃度、例えば、約 1×10^3 cells/4mL又は約 5×10^3 cells/4mLを、各ディッシュに播種し、次いで、約37℃のCO₂インキュベータ内で約24時間培養する。形成されたコロニーをディッシュの裏側からマーキングし、コロニー数が所望の数、例えば、約100個になったところで培養上清を除去してPBSで洗浄する。クローニングリングをディッシュにセットし、剥離剤を用いて剥がしたコロニーの細胞を、それぞれ所望の量、例えば、約1mLの培地を入れた48ウェルプレートの各ウェルに別々に入れる。

[0088] 3. 3 総RNAの調製

遺伝子発現の確認用に、例えば、NucleoSpin RNA II (MACHEREY- NAGEL社製のキット)を用いて総RNAを調製する。以下で使用する種々のバッファー、リングフィルター等は上記のキットに付属するものを使用し、キットに付属するマニュアルに従って、操作を行なうことが、高純度の総mRNAを得られることから好ましい。

[0089] 所望の数、例えば、約 5×10^5 個の細胞で作製した細胞ペレットを溶解させて溶解液を調製し、紫色のリングフィルターにこの溶解液を入れ、所望の条件、例えば、約11,000×gで約1分間遠心する。遠心後、フィルターを捨てて、コレクションチューブに所望量のエタノール、例えば、約350 µLの約70%エタノールを加えて、所望の回数、例えば、約5回ピペッティングを行なう。

[0090] 次いで、得られた溶液を所望量、例えば、約700 µL取ってコレクションチューブにセットした薄青のリングカラムにロードし、所望の条件、例えば、約11,000×gで約30秒間遠心してRNAを結合させる。遠心後、このカラムを新

しいコレクションチューブにセットし、所望量の試薬、例えば、約350 μ LのMDBを加えて、所望の条件、例えば、約11,000 $\times$ gで約1分間遠心分離を行い、脱塩する。

[0091] 遠心後、所望量、例えば、約10 μ LのrDNaseと約90 μ LのDNase用反応バッファーとを軽く混ぜてDNA反応混合液を調製し、所望量、例えば、約95 μ Lをこのカラムに加え、所望の条件、例えば、室温で約15分間インキュベートしてDNAを消化する。引き続き、所望量、例えば、200 μ LのバッファーRA2をカラムに加え、所望の条件、例えば、約11,000 $\times$ gで約30秒間遠心して洗浄する。引き続き、カラムを新しいコレクションチューブにセットし、所望量、例えば、約700 μ LのバッファーRA3をこのカラムに加え、所望の条件、例えば、約11,000 $\times$ gで、さらに約30秒間遠心して洗浄する。

[0092] 引き続き、コレクションチューブに流出した溶液を捨て、再度、所望量、例えば、約250 μ LのバッファーRA3をこのカラムに加え、さらに所望の条件、例えば、約11,000 $\times$ gで約2分間遠心し、このカラムのシリカメンブレンを風乾させる。このカラムを、所望の大きさ、例えば、約1.5mLのコレクションチューブにセットし、所望量、例えば、約60 μ LのRNAase-free水をこのカラムに加え、所望の条件、例えば、約11,000 $\times$ gで約1分間遠心して、総RNAサンプルを得る。

[0093] 3. 4 逆転写反応

上記のようにして得られた総RNAサンプルから逆転写を行ない、引き続きリアルタイムPCRを行なってPCR産物を得る。逆転写には、例えば、PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real time、TaKaRa Bio社製)等の市販品を使用し、こうしたキットに付属しているマニュアルに従って逆転写を行なえばよい。

[0094] リアルタイムPCRは、例えば、SYBR Premix Ex Taq等の市販のキットを使用しておこなうことができる。また、ここで使用する標準遺伝子としては、例えば、ブタ β -アクチン、ヒト β -アクチン等を挙げることができ、プライマーとして、例えば、配列表の配列番号7~12に示すようなプライマーを調製

して使用することができる。

- [0095] まず、所望量、例えば、約350 μL のSYBR Premix Ex Taq II (x2) と、約28 μL のPrimer mixと、約266 μL の滅菌蒸留水と、を混合してリアルタイムPCR用Premixを調製する。ついで、所望量、例えば、上記のPremixを約23 μL ずつリアルタイムPCR用チューブに分注し、各チューブに鋳型cDNAを約2 μL ずつ加える。次いで、所望の条件、例えば、約95℃で約30秒、約95℃で約5秒と約60℃で約30秒のサイクルを約40サイクルという条件で、リアルタイムPCRを行なう。引き続き、約95℃で約15秒、約60℃で約30秒、約95℃で約15秒という条件で解離させ、融解曲線を求める。ヒト歯髄幹細胞についても同様の操作を行う。
- [0096] 以上のようにして作成した検量線から、各ウイルスベクターで遺伝子を導入した細胞における各遺伝子の発現量を求めることができる。内部標準遺伝子の発現量で補正を行なうことにより、精度のよい結果を得ることができる。
- [0097] 遺伝子を導入した各幹細胞において、導入された遺伝子が発現されていることを確認する。この確認によって、上述したように作製した各ウイルスベクターによる遺伝子の導入効率を求めることができる。次いで、以上のようにして得られた遺伝子導入細胞（以下、「導入遺伝子安定発現細胞集団」又は「プール細胞」ということがある。）から、細胞のシングルセルクロニングを行なう。
- [0098] まず、上記のプール細胞を、所望の大きさのディッシュに所望の個数、例えば、60mmディッシュに約 1×10^3 個/ディッシュの細胞濃度で播種し、CO₂インキュベータ中にて、所望の温度で所望の時間、例えば、37℃にて24時間培養する。その後、上述した選択薬剤を含む生育培地に培地を交換し、培養を継続してコロニーを形成させる。形成されたコロニーを、クローニングリング及び剥離剤を用いてコロニーごとに剥離させ、それぞれ所望のプレート、例えば、24ウェルプレートに播種する。
- [0099] 播種した細胞を増殖させた後に、培養用ディッシュ等に播種して増殖させ

、拡大培養を行なうことにより、導入遺伝子安定細胞をシングルクローンとして得ることができる。次いで、得られたクローンを、上述したのと同様に培養し、増殖させて総mRNAを得る。得られた総RNAを鋳型として、所望のキット、例えば、PrimeScript RT reagent Kitを用いて逆転写反応を行い、鋳型cDNAを得る。

[0100] その後、例えば、cDNA（逆転写産物）を鋳型とし、上述したSYBR Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus)、プライマー（導入遺伝子及び内部標準遺伝子のそれぞれに特異的なプライマー、例えば、配列表の配列番号7～12に示すプライマー）を用いて、上記と同様にしてリアルタイムPCRを行なう。

[0101] 上記リアルタイムPCRの二次微分曲線から算出したCt値をX軸に、総RNAの相対値をY軸にそれぞれプロットして、各遺伝子の発現量測定用の検量線を作成する。プール細胞の発現量を1としたときの、ブタ歯髄幹細胞由来の導入遺伝子及びヒト歯髄幹細胞由来の導入遺伝子の発現量の相対値を求めることにより、導入した遺伝子がすべて発現されているか、また、それらの発現量を求め、目的とするクローンを選択する。

[0102] 以上のようにして、所望の遺伝子を導入した不死化幹細胞の集団、及びその集団からクローニングされた不死化幹細胞のクローンを得ることができる。

得られた形質転換体の中から、例えば、アンピシリンを用いて、アンピシリン耐性異質転換体（以下、「Amp+」という。）を選択して精製し、制限酵素部位を解析して組換え体を同定する。次いで、例えば、Pac Iで組換えアデノウイルスを消化し、得られた断片をHEK293細胞にトランスフェクトして増殖させ、これを集めて上記ウイルスの力価を測定する。常法に従って上記ウイルスを精製し、標的細胞である歯髄幹細胞に感染させる。

[0103] ウイルス感染後のHEK293の細胞群を常法に従ってFITCで染色し、フローサイトメーターを用いて、STRO-1陽性細胞を検出する。ここで、STRO-1は、骨髓における多分化能を有する間葉系幹細胞のマーカーの1つとして考えられており、細胞の不死化の指標となる。以上の手順によって、歯髄由来の不死

化幹細胞を得ることができる。

- [0104] 次に、得られた不死化幹細胞を、上述した基本培地、例えば、10%FBSを加えたDMEMを用いて、5%CO₂、37℃の条件下に、24～48時間培養し、培養上清を得る。培養上清の回収は、例えば、コマゴメピペット等を使用することができる。
- [0105] また、上記不死化幹細胞は、インスリン様成長因子（IGF）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、組織メタロプロテアーゼ（TIMPs）、及び肝細胞増殖因子（HGF）その他の成長因子を培養上清中に分泌する。ここで、「成長因子」とは、細胞分裂を促進させたり、形態の変化や肥大をもたらしたりするポリペプチドの総称である。成長因子を産生する細胞の種類によって因子は異なり、上皮成長因子（EGF）、繊維芽細胞成長因子（FGF）、神経成長因子（NGF）、腫瘍増殖因子（TGF）などに大別される。
- [0106] さらに、各細胞の細胞膜にある受容体はチロシンキナーゼ活性をもち、成長因子が結合すると、たんぱく質のチロシン残基がリン酸化され、細胞の増殖や分化を引き起こす。成長因子が個体発生において中胚葉誘導物質となっている例がいくつか知られている。また、免疫系を調節するリンホカインが個体発生において中胚葉誘導物質となっている例がいくつか知られている。こうした成長因子は、公知のELISA法、マイクロアレイ法等で定量することができる。
- [0107] 上記IGFは、インスリンと配列が高度に類似したポリペプチドであり、細胞培養でインスリンと同様に有糸分裂誘発等の反応を引き起こす。神経細胞の成長にも影響することが知られている。また、上記VEGFは、胚の形成期に、血管がないところに新たな血管を形成する脈管形成及び既存の血管から分枝伸長して血管を形成する血管新生に関与する一群の糖タンパクである。HGFは、肝細胞のみならず様々な細胞に対して、細胞運動促進、抗アポトーシス（細胞死）、形態形成誘導、血管新生その他の組織・臓器の再生と保護を担う多才な生理活性を有している。
- [0108] 上述した各種幹細胞を、例えば、15%FCSを添加したDMEM中で、37℃にて所

定の期間、培養することにより、上記の成長因子を含む培養上清を得ることができる。なお、上記幹細胞の培養上清には、IGF、VEGF、及びHGF以外にも、多くのタンパクが含まれる。

[0109] 得られた培養上清のうち15mLを、Amicon Ultra Centrifugal Filter Units -10K(ミリポア社製)に入れ、4,000 x gで約60分間遠心し、約200 μ Lまで濃縮する。次いで、このチューブに培養上清と同量の滅菌PBSを投入し、再度、4,000 x gで約60分間遠心し、溶媒をPBSに置換する。得られた200 μ Lの溶液をマイクロテストチューブへ回収し、濃縮幹細胞培養上清とする。

[0110] 上記のAmiconを使用する方法に代えて、エタノール沈殿法で濃縮することもできる。例えば、5 mLの培養上清に対して45 mLの100%エタノールを加えて混和し、-20℃で60分間放置する。その後、15,000 x gで15分間、4℃にて遠心して、上澄みを除去する。

次いで、例えば、10 mLの90%エタノールを加えてよく攪拌し、再び、15,000 x gで5分間、4℃にて遠心する。上澄みを除去し、得られたペレットを、例えば、500 μ Lの滅菌水に溶解することができる。溶解後、全量をマイクロテストチューブに回収し、濃縮幹細胞培養上清とする。以上のようにして得られた培養上清を常法に従って凍結乾燥すれば、用時調製の脱髄疾患及び末梢神経障害治療用組成物である粒子粉末を得ることができる。

[0111] 上記組成物は、髄鞘の再生又はシュワン細胞の増殖を誘導することができるものであることが、脱髄疾患及び末梢神経障害を回復又は症状を緩和できるという理由から好ましい。ここで、「シュワン細胞」とは、末梢の神経細胞軸索の周辺に存在し、その軸索や軸索終末を覆っている細胞をいい、「髄鞘（ミエリン）」とは、前記シュワン細胞が神経細胞軸索を巻いてできた構造であり、絶縁効果により神経細胞の電気的情報伝達を補助するものをいう。また、上記の絶縁効果以外にも、シュワン細胞が分泌するサイトカインが神経細胞の再生に関わっていることも知られている。シュワン細胞は、各種実験動物からの初代培養や、IMS32又はIFRS等の市販の細胞株を購入する等して入手することができる。

- [0112] 前記不死化間葉系幹細胞として、歯髄幹細胞、骨髓間葉系幹細胞、脂肪間葉系幹細胞、臍帯および臍帯血間葉系幹細胞等を挙げることができるが、神経への分化能が高いという理由から、歯髄幹細胞を使用することが好ましい。特に、乳歯を使用すると、得られる未分化な細胞が多く、上記の髄鞘の再生又はシュワン細胞の再生効果が高いことから好ましい。
- [0113] また、上記のようにして得られた髄鞘の再生又はシュワン細胞の増殖を誘導することができる組成物（以下、単に「再生用組成物」ということがある。）は、少なくとも肝細胞増殖因子（HGF）の受容体c-METに作用する成分を含むものであることが、HGF等がシュワン細胞を活性化し末梢神経の再生を促進するために好ましい。
- [0114] 本発明の脱髄疾患及び末梢神経障害の治療用医薬製剤は、上記再生用組成物を有効成分として含むものであることが、治療効果が高いことから好ましい。また、上記再生用組成物の含有量は、製剤の総重量を100%としたときに10～90重量%であることが好ましい。上記再生用組成物の含有量は、製剤の総重量を100%としたときに25～75重量%であることがさらに好ましい。
- [0115] 前記医薬製剤は、例えば、感染により誘導された病原体に対する抗体やT細胞など免疫細胞が髄鞘や軸索にも反応するような自己免疫反応によって惹起される脱髄疾患又は他の疾病の治療の副作用として惹起される末梢神経障害に対して、好適に使用することができる。上記脱髄疾患としては、例えば、ギラン・バレー症候群、フィッシャー症候群、慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー、MAG抗体陽性ニューロパチー、多巣性運動ニューロパチー、糖尿病性ニューロパチー、及び帯状疱疹後神経痛などを挙げることができる。また、前記医薬製剤は、他の疾病の治療の副作用として惹起される末梢神経障害、例えば、癌の化学療法によって誘発される末梢神経障害に対しても好適に使用することができる。
- [0116] 本発明の上記医薬製剤の剤形は特に限定されず、剤形に応じて、薬理的に許容される適当な賦形剤、充填剤、滑沢剤、pH調整剤等を添加し、又は吸収促進剤、基剤等と混合して、粉剤、錠剤、カプセル剤、液剤、注射剤、及

び貼付剤等の剤形とすることができる。こうした製剤を調製するために、上記再生用組成物を凍結乾燥粉末としてもよい。また、必要に応じて、徐放性の製剤としてもよい。以上のようにして、本発明の医薬製剤を製造することができる。

実施例

[0117] 以下に、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0118] (実施例1) 不死化SHED作成用ウイルスベクターの調製

1. アデノウイルス導入用ベクターの作製

(1) 試薬等

(1-1) プラスミド抽出用試薬

カナマイシン (Kan)、アンピシリン (Amp)、LB液体培地及びLB寒天培地、グリコーゲン、アガロース、滅菌水、酢酸アンモニウム、酢酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム及びRNase Aを使用した。50mg/mLのカナマイシン (Kan) 及びアンピシリン (Amp) を調製し、ストック溶液として -20°C で保存した。グリコーゲンは20mg/mLに調製した。10mg/mLのRNase Aを調製し -20°C で保存した。10M (飽和) 酢酸アンモニウム (NH_4OAc)、3 Mの酢酸ナトリウム (NaOAc ; pH 5.2) を調製した。

[0119] (1-2) 制限酵素等

大腸菌コンピテントセル (Supercharge EZ10 Electrocompetent Cells、製品コード 636756)、Swa I (製品コード 1111A、Smi Iが同等品)、Xho I (製品コード 1094A)、T4 DNA Ligase (製品コード 2011A)、NucleoBond Xtra Midi (製品コード 740410.10/.50/.100)、NucleoSpin Plasmid (製品コード 740588 10/50/250) は、いずれもタカラバイオ (株) より購入した。Pac IはNew England Biolabsより購入した。

[0120] (1-3) バッファー等

1×TE Buffer (1mMのEDTAを含む10mM Tris-HCl [pH8.0])、100mM Tris-HCl (pH8.0) で飽和したフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (2

5 : 24 : 1、以下、「PCI混液」という。)を調製した。エタノールは、100%及び70%で使用した。ミニスケールでの組換えで使用するpAdeno-X プラスミドDNAの精製用に、以下のバッファー 1 ~ 4 を調製した。

[0121] バッファー 1 : 10mM EDTA及び50mM グルコースを含む25mM Tris-HCl (pH8.0)

(オートクレーブ後、4℃で保存)

バッファー 2 : 1 %SDSを含む0.2M NaOH (使用直前に用時調製、密封し、室温保存)

バッファー 3 : 5 M KOAc (オートクレーブ後、4℃で保存)

バッファー 4 : 1mM EDTA、20 µg/mL RNaseを含む10 mM Tris-HCl (pH8.0)

(使用直前にRNaseを添加する。-20℃で保存)

[0122] (2) アデノウイルス精製及びβ-galアッセイ用試薬

ヒト5型アデノウイルスで形質転換したヒトHEK293細胞 (ATCC #CRL1573)を使用した。HEK293細胞は完全培地で培養した。完全培地の組成は、100 unit/mLのペニシリンGナトリウムと100 µg/mLのストレプトマイシン、4 mMのグルタミン及び10%FBSを添加したDMEM (Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium、基本培地)とした。ペニシリンGナトリウム溶液は10,000 units/mL、硫酸ストレプトマイシン溶液は10,000 µg/mLで調製し、ストック溶液として保存した。培養には、60 mmプレート、100 mmプレート、6-ウェルプレート、T75及びT175フラスコを使用した。

[0123] トリプシン-EDTA (製品コード CC-5012) はタカラバイオ (株) より購入した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、Ca²⁺及びMg²⁺不含) 及びDulbecco' s リン酸緩衝生理食塩水 (DPBS、Ca²⁺及びMg²⁺含有) を調製した。また、0.33%のニュートラルレッド染色液、0.4%トリパンブルー染色液を使用した。β-galアッセイには、Luminescent β-gal Detection Kit II (製品コード 631712、タカラバイオ (株) 製) を使用した。

[0124] (3) 予備試験

(3-1) lacZ を含む組換えアデノウイルスベクター (pAdeno-X-lacZ) の

構築

10mLの上述した完全培地に、解凍後、DMSOを除去したHEK293細胞を再懸濁し、全量を直径100mmの培養プレートに移した。HEK293細胞が付着した後に培養液を除去し、細胞を滅菌PBSで一度洗浄し、1 mLのトリプシン-EDTA溶液を加えて約2分間処理した。次に、10mLの完全培地を加えてトリプシンの反応を止め、穏やかに懸濁した。バイアブルカウントを行って、培養液10mLを入れた直径100mmのプレートに 10^5 個の細胞を移し、均一に拡げた。

[0125] pShuttle2-lacZ (Adeno-X Expression System 1に含まれている陽性対照ベクター) とキットに含まれているAdeno-X Viral DNA (PI-Sce I及びI-Ceu I digested) とを使用し、キットに添付されているプロトコルに従って、lacZを含む組換えアデノウイルスを構築した。標的細胞であるSHEDに感染させ、 β -ガラクトシダーゼの発現をアッセイし、ベクターが構築されていることを確認した。

[0126] (3-2) 組換えpShuttle 2プラスミドの構築

組換えpShuttle 2 Vector (以下、「rpShuttle 2 Vector」という。) の構築前に、キットに含まれているpShuttle 2 Vector及びpShuttle 2-lacZ VectorでDH5 α 大腸菌を形質転換した。50 μ g/mLのカナマイシンを含有するLB寒天プレート (以下、「LB/Kan」という。) 上で形質転換体を選択し、単一コロニーからとった菌体を新しいLB/Kanに画線し、37°Cで一晩インキュベートした。

[0127] 次に、hTERT、bmi-1、HPV-E6、HPV-E7を、pShuttle 2へ以下の手順でクローニングした。これらの遺伝子に適した制限酵素でpShuttle 2 Vectorを切断した。次に、上記のキットに添付されているpShuttle 2 Vector Information Packet (PT3416-5) を参照し、挿入するDNAに合致するマルチクローニングサイトを決定した。制限酵素処理済みの上記プラスミドをアルカリホスファターゼで処理して精製した。

[0128] 常法に従って、標的DNA断片を調製し精製した。上記の制限酵素で消化したベクターと上記の遺伝子断片とをライゲーションし、DH5 α 細胞 (コンピテン

ト細胞)を、ライゲーション産物で形質転換した。上記コンピテント細胞の一部をとり、キットに含まれている対照ベクターpShuttle2-lacZ Vectorで形質転換して陽性対照とした。

[0129] 形質転換した大腸菌を含む混合液を、LB/Kan寒天プレートに接種し、カナマイシン耐性 (Kan^r) の形質転換体 (コロニー) を選択した。5 ~ 10個のKan耐性クローンを選択し、少量の液体培地に接種して増幅した。これらのクローンがrpShuttle 2 Vectorを有していることを確認した後に、一晩インキュベートした。その後、市販のシリカ吸着カラムを用いて、常法に従い、構築されたプラスミドDNAを精製した。

[0130] このプラスミドDNAを制限酵素で処理して、1 %アガロースゲル電気泳動を行い、目的の組換えプラスミドを同定した。シーケンシングによって、挿入した断片の方向と挿入部位を確認し、ポジティブクローンを同定した。組換えpShuttle 2プラスミドDNA (以下、「rpShuttle2プラスミドDNA」という。) をターゲット細胞に直接にトランスフェクトし、ウエスタンブロットを行って目的タンパク質の発現を予備的にチェックした。

[0131] (3-3) rpShuttle 2プラスミドDNAのPI-Sce I/I-Ceu I二重消化

上記のようにして作製したrpShuttle2 プラスミドDNAから、導入した遺伝子の発現カセットをPI-Sce I及びI-Ceu Iで切り出した。キットに添付されたプロトコルに記載されたin vitroライゲーション法に従って、切り出した発現カセットをAdeno-X Viral DNAに組み込んだ。rpShuttle 2プラスミドDNAのPI-Sce I/I-Ceu I二重消化液を30 μ l調製し、下記の表1に記載した試薬を1.5 mLの滅菌済みマイクロ遠心チューブに入れて混合した。

[0132]

[表1]

試 薬 等	液量 (μ L)	
	チューブ1	チューブ2 (lacZ対照)
滅菌水	19.5	19.5
10×二重消化液	3.0	3.0
rpShuttle 2プラスミドDNA (500ng/ μ L)	2.0	—
pShuttle 2-lac Zプラスミド (500ng/ μ L)	—	2.0
PI-Sce I (1unit/ μ L)	2.0	2.0
I-Ceu I (5unit/ μ L)	0.5	0.5
10×BSA	3.0	3.0

[0133] 次いで、十分に混和した後にマイクロ遠心チューブに入れて軽く遠心し、その後、37℃にて3時間インキュベートした。1kbラダー（DNAサイズマーカー）と共に上記二重消化後の反応液（5 μ L）を1%アガロース/EtBrゲルで泳動した。

[0134] （3－4）フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール抽出

遠心チューブに、上述した二重消化液の残り（25 μ l）に、70 μ Lの1×TE Buffer (pH8.0) と100 μ LのPCI混液とを添加し、ボルテックスで十分に攪拌した。次いで、微量遠心機を用いて、4℃にて14,000rpmで5分間遠心し、水層を清浄な1.5mLのマイクロ遠心チューブに移した。ここに、400 μ Lの95%エタノール、25 μ Lの10M 酢酸アンモニウム、及び1 μ Lのグリコーゲン（20mg/mL）を添加し、ボルテックスで十分に攪拌した。

[0135] 次いで、4℃にて14,000rpmで5分間遠心し、上清を吸引して除去し、ペレットを得た。このペレットに300 μ Lの70%エタノールを加え、室温にて14,000rpmで2分間遠心した。上清を注意深く吸引して除去し、ペレットを室温にておよそ15分間風乾した。

ペレットが乾燥した後に、これを10 μ Lの滅菌した1×TE Buffer (pH8.0) に溶解し、使用するまで−20℃にて保存した。

[0136] （4）組換えAdeno-X プラスミドDNAの構築

（4－1）Adeno-X ウイルスゲノムへの発現カセットのサブクローニング

下記の表2に示す試薬を、順番通りに1.5mLの滅菌済マイクロ遠心チューブに入れ、穏やかに混和し、軽く遠心した後に、16℃にて一晩インキュベート

した。

[0137] [表2]

試 薬 等	液量 (μL)
PI-Sce I/I-Ceu I消化済みpShuttle 2プラスミドDNA	2.0
PI-Sce I/I-Ceu I 消化済みpShuttle 2-lac Z プラスミドDNA	—
滅菌水	3.0
10× DNA Ligation Buffer	1.0
Adeno-X Viral DNA (250ng/μL)	3.0
DNA Ligase (1unit/μL)	1.0
合 計	10.0

[0138] 各サンプルに、90 μLの1×TE Buffer (pH8.0) と100 μLのPCI混液とを加えて、ボルテックスで穏やかに攪拌した。4℃にて14,000 rpmで5分間遠心し、水層を清浄な1.5mLのマイクロ遠心チューブに移し、ここに400 μLの95%エタノール、25 μLの10M酢酸アンモニウム、及び1 μLのグリコーゲン (20mg/mL) を加えて、ボルテックスで穏やかに攪拌した。

[0139] 4℃にて5分間、14,000rpmで遠心し、上清を吸引により除去してペレットを得た。以下のエタノール沈殿操作は、上記(3-4)と同様に行った。ペレットが乾燥した後に、これを15 μLの滅菌脱イオン水に溶解した。

[0140] (4-2) 組換えAdeno-X プラスミドDNAのSwa I消化

下記表3に示す消化液を調製し、遠心チューブに入れた各サンプルに加えて、2時間、25℃にて、インキュベートした。

[0141] [表3]

試 薬 等	液量 (μL)
ライゲーション産物	15.0
10×Swa I Digestion Buffer	2.0
10× BSA	2.0
Swa I (10 units/μL)	1.0
合 計	20.0

[0142] 各サンプルに、80 μLの1×TE Buffer (pH 8.0) と100 μLのPCI混液とを加え、ボルテックスで穏やかに攪拌した。マイクロ遠心チューブ、4℃にて5分間、14,000rpmで遠心した。以下のエタノール沈殿の操作は、上記(3-4)

）と同様に行い、ペレットの溶解液は使用まで -20°C にて保存した。

[0143] (4-3) 組換えAdeno-XプラスミドDNAによる大腸菌の形質転換の確認

エレクトロポレーション用コンピテントセル（大腸菌）を、Supercharge E Z10Electrocompetent Cell（製品コード 636756）を使用して、上記（4-2）で得たSwa I消化産物で形質転換した。形質転換混合液を、LB培地にアンピシリン（終濃度 $100\mu\text{g/mL}$ ）を加えた寒天プレート（以下、「LB/Amp寒天プレート」という。）に播種し、 37°C で一晩インキュベートした。アンピシリン耐性（Ampr）形質転換体として、約 10^6 個のコロニーを得た。得られたコロニーを、製品に付属のAdeno-X System PCR Screening Primer Setでチェックした。

[0144] 5 mLの新鮮なLB/Amp液体培地に単一のコロニーからの菌体を接種し、一晩培養した。翌日、後述するミニスケール法に従って、Adeno-X プラスミドDNAを精製した。

[0145] (5) 組換えAdeno-XプラスミドDNAのミニスケール調製

対数増殖にある培養液5 mLを、 $14,000\text{rpm}$ で30秒間遠心し、上清を除去した。ペレットを再度 $10,000\text{rpm}$ で1分間遠心し、マイクロピペットを用いて、上清を除去した。ここに、 $150\mu\text{L}$ の上記バッファー1を加えて穏やかにピペッティングし、再懸濁した。この細胞懸濁液に、 $150\mu\text{L}$ のバッファー2を添加し、穏やかに転倒混和し、氷上に5分間放置した。冷却した細胞懸濁液に、 $150\mu\text{L}$ のバッファー3を加えて、再度転倒混和し、氷上に5分間放置した。

[0146] この細胞懸濁液を、 4°C にて $14,000\text{rpm}$ で5分間遠心し、透明な上清を清浄な1.5 mLの遠心チューブに移した。この上清に、 $450\mu\text{L}$ のPCI混液を添加し、転倒混和して攪拌した。その後、 4°C にて $14,000\text{rpm}$ で5分間遠心し、水層を清浄な1.5 mLのマイクロ遠心チューブに移した。

[0147] 以下のエタノール沈殿の操作は、上記（4-1）と同様に操作を行い、ペレットの溶解液は、使用まで -20°C にて保存した。目的のrDNAは、後述する制限酵素による解析及びPCRにより同定した。

[0148] (6) 得られたrAdeno-XプラスミドDNAの制限酵素部位解析

PI-Sce I及びI-Ceu Iを用いて解析を行った。下記の表4に示す試薬を、1.5mLの滅菌済みマイクロ遠心チューブに入れ、30 μ LのPI-Sce I/I-Ceu I二重消化反応液を加えて、十分に攪拌し、軽く回転させて内容物を集めた。37℃にて3時間インキュベートし、制限酵素処理を行った。この処理後の反応液を1%アガロース/EtBr(臭化エチジウム)ゲルで泳動した。

[0149] [表4]

試 薬 等	液量 (μ L)
滅菌水	19.5
10 × 二重消化液	3.0
rpAdeno-X DNA (500 ng/ μ l) (500ng/ μ L)	2.0
pShuttle 2-lac Zプラスミド (500ng/ μ L)	—
PI-Sce I (1unit/ μ L)	2.0
I-Ceu I (5unit/ μ L)	0.5
10 × BSA	3.0
合 計	30.0

[0150] (7) 組換えアデノウイルスの産生

(7-1) HEK293細胞トランスフェクト用rAdeno-XプラスミドDNAの調製

下記表5に示す試薬等を、1.5mLの滅菌済み遠心チューブに入れて混合し、微量遠心機で軽く遠心した。その後、37℃にて2時間、インキュベートし、rAdeno-XプラスミドDNAのPac I制限酵素処理を行った。

[0151] [表5]

試 薬 等	液量 (μ L)
滅菌水	20
pAdeno-X プラスミドDNA (500ng/ μ L)	10
10 × Pac I Digestion Buffer	4
10 × BSA	4
Pac I (10units/ μ L)	2
合 計	40

[0152] 60 μ Lの1×TE Buffer (pH 8.0) と、100 μ LのPCI混液とを添加し、ボルテックスで穏やかに攪拌し、微量遠心機で、4℃にて5分間、14,000rpmで遠心した。水層を、清浄な1.5mLの滅菌済み遠心チューブに注意深く移した。

[0153] 以下のエタノール沈殿の操作は、上記(3-4)と同様に操作を行い、ペ

レットの溶解液は、使用まで -20°C にて保存した。

(7-2) Pac I消化Adeno-XプラスミドDNAのHEK293細胞へのトランスフェクション

上記プラスミドDNAのトランスフェクションの24時間前に、直径60mmの培養プレートあたりの細胞数が $1\sim 2\times 10^6$ (およそ100cells/mm²) になるよう、HEK293細胞を播種し、 37°C 、5%CO₂存在下でインキュベートした。

[0154] 各培養プレートに、Pac I消化した10 μL のAdeno-XプラスミドDNAをトランスフェクトし、標準的なトランスフェクション法 (CalPhos Mammalian Transfection Kit 製品コード 631312、タカラバイオ (株) 製) に従って、HEK293細胞にAdeno-X DNAを導入した。トランスフェクションの翌日から、CPE (細胞変性効果) が起きているかどうかを確認した。1週間後に、培養プレートの底面や側面に付着している細胞を穏やかに攪拌して遊離させた。得られた細胞懸濁液を15mLの滅菌済みの円錐遠心チューブに移し、室温にて5分間、1,500 $\times g$ で遠心した。

[0155] 得られた沈殿を、500 μL の滅菌PBSに懸濁した。ドライアイス/エタノール中で凍結させ、 37°C の恒温槽で融解させるという凍結融解操作を3回繰り返して、細胞を十分に融解させたライセートを得た。次いで、軽く遠心して浮遊物を除き、上清を滅菌した別のチューブに移して、直ちに使用した。直ちに使用しない分は、 -20°C で保存した。60mmプレートの培養細胞に250 μL の上記ライセートを加えて、培養を続けた。なお、Adeno-X Rapid Titer Kit (製品コード 631028、タカラバイオ (株) 製) に含まれる抗Hexon 抗体を用いて、このキットの取扱説明書 (PT3651-1) に従い、アデノウイルスの力価を測定した。

[0156] (7-3) 高力価ウイルス調製のためのウイルスの増幅

この力価測定を始める約24時間前に、HEK293細胞をT75フラスコに播種し、 37°C 、5%CO₂存在下で一夜培養し、50~70%コンフルエントになっていることを確認した。

翌日、ウイルスを含む新しい培地と交換し、MOI=10で感染させた。 37°C 、

5 %CO₂存在下で90分間培養した後にフラスコを取り出し、10mLの培地を加えた。

[0157] 37℃、5 %CO₂存在下で3～4日間培養し、CPEを確認した。50%の細胞が剥がれたところで、上記と同様にして遊離細胞懸濁液とし、15mLの滅菌済円錐遠心チューブに移した。上記と同様の凍結融解操作を行い、細胞を融解させた。Adeno-X Rapid Titer Kit (製品コード 631028) を使用し、10⁷PFU/mLの力価を得た。ウェスタンブロッティングを行い、パッケージングされたアデノウイルスゲノムが、目的遺伝子に特異的な転写単位のコピーを、機能する形で持っているかを確認した。

[0158] (8) 標的細胞へのアデノウイルス感染

(8-1) 標的細胞への感染

感染の24時間前に6-ウェルプレートに1×10⁶個のSHEDを播種した。播種の翌日に培地を取り除き、ウイルスを含む1.0mLの培地を各プレートの中心に添加した。この溶液をSHEDが形成した単層全体に均一に広げた。

37℃、5 % CO₂存在下で4時間培養し、ウイルスをSHEDに感染させた。次いで、新鮮な培地を添加し、さらに、37℃、5 %CO₂存在下で培養した。感染24時間後～48時間後にかけて導入遺伝子の発現を経時的に解析した。

[0159] (8-2) 感染細胞のβ-ガラクトシダーゼ発現の解析

Adeno-X-lacZを感染させた接着性細胞におけるβ-ガラクトシダーゼの発現は、Luminescent β-galDetection Kit II (製品コード 631712、クロンテック社製) を使用してアッセイした。

[0160] 2. レトロウイルスベクターの作製

(1) 試薬等

G3T-hi細胞 (タカラバイオ製、製品コード6163)、TransIT-293 (トランスフェクション試薬、タカラバイオ製、製品コードMIR2704)、Retrovirus Packaging Kit Amphi (タカラバイオ製、製品コード6161)、Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) (タカラバイオ製、製品コード6166)、One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time、タカラバイオ製、製品コ

ードRR066A)を使用した。また、リアルタイムPCR装置Thermal Cycler Dice Real System (タカラバイオ製、形式TP800)を使用した。

[0161] (2) プラスミド作製

レトロウイルスベクター調製用レトロウイルスプラスミドを作製するために、pDON-5 Neo (タカラバイオ製、カタログ番号3657)を使用した。不死化遺伝子として、TERT (ヒト又はブタ、以下、「hTERT」又は「pTERT」と略することがある。)、ヒトパピローマウイルスのE6及びE7、hBmi-1の開始コドンの上流に、Kozak配列 (gccacc) を常法に従って付加した。

[0162] Kozak配列を付加した上記5種類の不死化遺伝子を、上記pDON-5 Neo DNAのPmac I-Hpa Iサイトにクローニングして、pDON-5 Neo hTERT Vector (SYN5587-1-4)、pDON-5 Neo HPV16E6 Vector (SYN5587-2-10)、pDON-5 Neo HPV16 E7 Vector (SYN5587-3-7)、pDON-5 Neo pigTERT Vector (SYN5587-4-9)、pDON-5 Neo hBmi1 Vector (SYN5587-5-1)を搭載した組換えレトロウイルスベクター (Amphotropic Envelope) を各10mL調製した。

[0163] 以上のようにして得られたプラスミドDNAについて、片鎖解析により挿入遺伝子配列を確認した。上記プラスミドDNAを用いて、大腸菌を形質転換し形質転換体を得た。得られた形質転換体を培養した後に、常法に従ってトランスフェクショングレードのプラスミドDNA (約50 µg) を精製し、滅菌水に溶解したDNA溶液としてプラスミドDNA溶液を得た。

[0164] (3) 組換えレトロウイルスベクターの産生

5枚の組織培養ディッシュ (直径100mm) を用い、1枚当たり 6×10^6 個のG3T-hi細胞を播種して、37℃にて約24時間培養を行い、トランスフェクション試薬を用いてディッシュ1枚当たりレトロウイルス産生用プラスミド3種 (pDON-5 Neo hTERT ベクター、pDON-5 Neo HPV16E6 ベクター、pDON-5 Neo HPV16E7ベクター、pDON-5 Neo pigTERTベクター

[0165] 一、及びpDON-5 Neo hBmi1ベクターとからなる群から選ばれるいずれかのベクター、Retrovirus Packaging Kit Amphiに付属のpGP及びpE-Amphi) を共導入し、37℃で48時間さらに培養を行った。

培養終了後、上記のレトロウイルスベクターが含まれる培養上清を回収し、 $0.45\mu\text{m}$ フィルター（ミリポア）でろ過滅菌し、ろ液を1mLずつ滅菌チューブに分注した。

[0166] （４）組換えレトロウイルスベクターの力価の算出

組換えレトロウイルスベクターの力価を、Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) 及びOne Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) を用い、キット付属の説明書に従って定量した。下記表6及び7に、レトロウイルスベクターの力価測定時の鋳型処理及びリアルタイムPCRの反応条件を示す。

下記表6には、レトロウイルスベクターの力価測定時の鋳型処理（鋳型のDnase Iによる処理）の際に使用した反応液の組成を示す。下記表7には、反応条件を示す。すなわち、下記表6に示す溶液を37℃にて30分インキュベートし、その後、70℃に昇温して10分間保持し、4℃に急冷した。

[0167] [表6]

Dnase I処理	
試薬	使用量/反応
組換えレトロウイルスベクター溶液	12.5 μL
10XDNase I buffer	2.5 μL
DNase 15 (5 U/ μL)	2.0 μL
RNase Inhibitor (40 U/ μL)	0.5 μL
RNase Free dH ₂ O	7.5 μL
Total	25.0 μL

[0168] リアルタイムPCRは、下記表7に示す溶液を用いて、以下の反応条件で行った。（s1）42℃で5分、（s2）95℃で10秒、その後（s3）95℃で5秒及び60℃で30秒を40サイクルとし、Dissociation curveを作成した。

[0169]

[表7]

試薬	使用量/反応
2 x One Step SYBR RT-PCR buffer III	12.5 μ L
TaKaRa ExTaq HS (5 U/ μ L)	0.5 μ L
PrimeScript RT Enzyme Mix II	0.5 μ L
Forward Titer Primer FRT-1 (10 pmol/ μ L)	0.5 μ L
Reverse Titer Primer FRT-1 (10 pmol/ μ L)	0.5 μ L
RNase Free dH ₂ O	8.5 μ L
鋳型	2 μ L
Total	25.0 μ L

[0170] キット付属のRNA Control Templateのコピー数をX軸に、二次微分曲線 (2nd Derivative) から算出したCt値をY軸にプロットして検量線を作成した。下記表8にリアルタイムPCRの検量線のCt値を示す。また、下記表中、例えば、「1.00E+08」は、「 1.00×10^8 」を表す。以下、同様である。

[0171] [表8]

STD	コピー数/ μ L	Ct(SDM)	Ct Ave.
1	1.00E+08	15.43	15.40
		15.37	
2	1.00E+07	19.12	19.12
		19.12	
3	1.00E+06	22.72	22.78
		22.84	
4	1.00E+05	26.30	26.33
		26.35	
5	1.00E+04	29.85	29.72
		29.59	
6	1.00E+03	33.19	33.12
		33.04	

[0172] 上記のCt値は2nd1Derivative Maximum (SDM)法により算出し、算出されたCt値より、傾き-3.54、切片43.88、増幅効率91.6及び決定係数0.999を得た。この検量線より、被検サンプルの力価を算出し、表9にその結果を示す。

[0173]

[表9]

サンプル名*	希釈率	Ct (SDM)	算出コピー数(copies/ μ L)	力価** (copies/mL)	平均力価 (copies/mL)
R1601_pDON-5 Neo hTERT	100	26.85	6.45E+04	1.29E+10	1.46E+10
	100	26.89	6.28E+04	1.26E+10	
	500	28.96	1.63E+04	1.63E+10	
	500	28.94	1.66E+04	1.66E+10	
R1601_pDON-5 Neo HPV16E6	100	27.16	5.27E+04	1.05E+10	1.15E+10
	100	27.15	5.30E+04	1.06E+10	
	500	29.37	1.25E+04	1.25E+10	
	500	29.39	1.24E+04	1.24E+10	
R1601_pDON-5 NeoHPV16E7	100	25.06	2.06E+05	4.13E+10	4.05E+10
	100	25.14	1.96E+05	3.92E+10	
	500	27.49	4.25E+04	4.25E+10	
	500	27.62	3.91E+04	3.91E+10	
R1601_pDON-5 Neo pigTERT	100	26.94	6.08E+04	1.22E+10	1.27E+10
	100	26.97	5.96E+04	1.19E+10	
	500	29.26	1.35E+04	1.35E+10	
	500	29.30	1.31E+04	1.31E+10	
R1601_pDON-5 Neo hBmi1	100	25.73	1.34E+05	2.67E+10	2.83E+10
	100	25.82	1.26E+05	2.52E+10	
	500	27.88	3.30E+04	3.30E+10	
E.D.	I	35.92	1.77E+02	—	—
	I	33.94	6.41E+02	—	

[0174] 上記表中、E.D. は、希釈用バッファーEAST Dilution (for Real Time PCR) を用いたことを示す。また、力価 (コピー数/mL) は、算出されたコピー数 (コピー数/ μ L) $\times$ 2 (Dnase I処理時の希釈倍率) $\times$ リアルタイムPCR反応時の希釈倍率 (100又は500) $\times$ 1,000 (μ L からmLへの換算) として求めた。

[0175] リアルタイムPCTによる測定結果より、pDON-5 Neo hTERTは 1.46×10^{10} コピー/mL、pDON-5 Neo HPV16E6は 1.15×10^{10} コピー/mL、pDON-5 Neo HPV16E7は 4.05×10^{10} コピー/mL、pDON-5 Neo pigTERTは 1.27×10^{10} コピー/mL、又はpDON-5 Neo hBmi1は 2.83×10^{10} コピー/mLの力価を示した。

[0176] (実施例2) 不死化SHED及びその培養上清の作成

10歳の健常男児から得られた脱落乳歯を使用した。この脱落乳歯をイソジン溶液で消毒した後、歯科用ダイヤモンドポイントを用いて、歯冠を水平方向に切断し、歯科用リーマーを用いて歯髄組織を回収した。得られた歯髄組

織を、3 mg/mLのⅠ型コラゲナーゼ及び4 mg/mLのディスパーゼの溶液中で37℃にて1時間消化した。ついで、この溶液を70mmの細胞ストレーナ（Falcon社製）を用いて濾過した。

- [0177] 濾別した細胞を、4 mLの上記培地に再懸濁し、直径60mmの付着性細胞培養用ディッシュに播種した。10%FCSを含有するDMEM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）をこのディッシュに添加し、5 %CO₂、37℃に調整したインキュベータにて2週間程度培養した。コロニーを形成した接着性細胞（歯髄幹細胞）を、0.05%トリプシン・0.2mM EDTAにて5分間、37℃で処理し、ディッシュから剥離した細胞を回収した。
- [0178] 次に、上記のようにして選抜した接着性細胞を、付着性細胞培養用ディッシュ（コラーゲンコートディッシュ）に播種し、5 %CO₂、37℃に調整したインキュベータ中にて、一次培養し初代培養細胞とした。肉眼観察でサブコンフルエント（培養容器の表面の約70%を細胞が占める状態）又はコンフルエントになったときに、0.05%トリプシン・0.2mM EDTAにて5分間、37℃で処理して細胞を培養容器から剥離して回収した。こうして得られた細胞を、再度、上記の培地を入れたディッシュに播種し、継代培養を数回行って、約1×10⁷個/mLまで増殖させた。得られた細胞を、液体窒素中で保存した。
- [0179] その後、一次培養細胞を上記の培地を用いて約1×10⁴細胞/cm²濃度で継代培養した。1～3回継代した細胞を実験に用いた。以上のようにして、ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞（SHED）を得た。得られたSHEDを、FACSTARPLUS（ベクトン・ディキンソン社製）を用いて、各試料について、約1×10⁶個のSTR0-1陽性細胞を以下のようにしてソートした。
- [0180] ブロモデオキシウリジンBrdU染色キットのメーカー（Invitrogen社製）の取扱説明書に従いBrdUを12時間取り込ませ、SHEDの増殖速度を評価した（各群についてn=3）。実験は5回繰り返した。1元配置分散分析後に、Tukey-Kramer検定を行い、統計的有意差を評価した。
- [0181] STR0-1を免疫蛍光で検出するために、SHEDを3%パラホルムアルデヒドで固定し、その後PBSで2回リンスし、100 mMのグリシンで20分間処理した。次

いで、これらの細胞を0.2%のTriton-X (Sigma-Aldrich社製) で30分間透過処理し、その後、5%のロバ血清及び0.5%のウシ血清アルブミンの混合物中で20分間インキュベートした。

[0182] 次に、細胞を一次抗体のマウス抗ヒトSTR0-1抗体 (1:100、R&D社製) と一緒に1時間インキュベートし、二次抗体のヤギ抗マウス免疫グロブリンM-FITC抗体 (1:500、Southern Biotech社製) と一緒に30分間インキュベートし、ベクタシールドDAPI (Vector Laboratories Inc.) を用いてマウントした。その後、15%FBSを添加した α -MEMを6ウェルプレートに入れ、ソートした細胞をクローン作製用に播種した。増殖した細胞の中から約300コロニーを試験用にプールした。

[0183] (2) 遺伝子の導入

(2-1) アデノウイルスベクターによる遺伝子導入

上述したように、bmi-1, E6, E7及びhTERTの4つの遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込み、これらの遺伝子産物を発現するウイルスベクターを作製した。対照として、これらの遺伝子を組み込んでいない対照ベクターを作製した。

[0184] SHEDを直径100mmのコラーゲンコートディッシュに 1×10^6 個を播種し、10% FBSを添加したDMEMを加えてサブコンフレントまで培養した。この培地を吸引除去して上記培地で希釈したウイルス溶液500 μ Lを加え (MOI=10)、37℃にて、5%CO₂インキュベータ中で1時間培養し、上記ウイルスベクターを感染させた。感染48時間後、ピューロマイシン (1 pg/mL) を加えた上記の培地中に感染細胞を移して10日間培養して選択し、500~600個の耐性クローンをプールした。3~4日ごとに約 0.5×10^5 個のSHEDを直径100mmの培養シャーレに播種し、継代した。遺伝子が導入されたSHEDをSHED-T、遺伝子が導入されないSHEDをSHED-Cとした。

[0185] (2-2) レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

上記のようにして得られたレトロウイルスベクターをヒト歯髄由来細胞 (KA_01_W14_P5D3) 又はヒト歯髄由来細胞 (KA_02_W4-6_P4D3) に感染させ、葉

剤耐性プール細胞（以下、単に「プール細胞」という。）を得た。得られたプール細胞をリアルタイムPCRに供して解析を行い、挿入遺伝子の数を確認した。リアルタイムPCRには、下記表10に記載したプライマー（配列番号13～16、いずれもタカラバイオ製）を使用した。

[0186] [表10]

遺伝子	カタログ番号	ヌクレオチド配列	配列番号
目的遺伝子	CH000987_F	GCACTGCCCTCAGACTTCA AGA	13
	CH000987_R	GCGGGACTATGGTTGCTGA C	14
標準遺伝子 (ヒト β アクチン)	HA067803_F	TGGCACCCAGCACAATGAA	15
	HA067803_R	CTAAGTCATAGTCCGCCTA GAAGCCA	16

[0187] コーニング製の接着性細胞培養用ディッシュ（直径6cm又は10cmのCell culture Dish、TC treated surface）に、上記KA_01_W14_P5D3を、37℃にて5%CO₂インキュベータ中にて培養した。これらの細胞を起床して播種したときの継代数を[0]（以下、「+P0」と表示）とし、1回継代のときは「+1」、2回継代のときは「+2」のように表示した。

上記ディッシュ中の細胞が約80%コンフレントに達した時点で培養上清を除去し、PBSで2～3回洗浄し、その後、剥離剤として0.25%トリプシン-EDT A溶液(1x)（フェノールレッド含有）（Thermo Fisher Scientific製、25200-056）を加えて3分間、5%CO₂インキュベータ中、37℃にてインキュベートして、付着細胞をディッシュ底面から剥離させた。

ここに適当量の培地を加えピペティングを行ってシングルセルの細胞浮遊液を調製した。細胞浮遊液を適当量に希釈して新しいディッシュに継代した。これ以降、同様の方法で培養を継続し、細胞の増殖及び細胞の形態に異常がないことを確認した。また、継代時に採取した培養上清について、MycoAlert Mycoplasma Detection Kit（Loza製、製品コードLT07-318）を用いて、マイコプラズマ汚染がないことを確認した。

[0188] （3）薬剤耐性濃度の検討

遺伝子導入細胞を薬剤によって選択するため、標的細胞のG418耐性濃度を検討した。コーニング社の6ウェルプレート（6 Well Clear TC-Treated Multiple Well Plate、製品コード3516）を使用し、1ウェル当たり対数増殖期にある細胞 2.0×10^4 個を播種した。5%CO₂インキュベータ中、37℃にて約24時間培養し、その後、ウェルの底面への細胞の接着を確認した。各ウェルの培地を、異なる濃度のG418を添加した培地に交換した。薬剤選択開始から、4日後、8日後及び10日後の細胞の状態を撮影し、薬剤耐性濃度を検討した。

[0189] 薬剤選択開始から4日後には薬剤濃度が250 μ L/mL以上のウェルでは細胞の増殖活性が失われ、11日後には薬剤濃度が500 μ L/mL以上のウェルではほとんどの細胞が死滅していることが確認された。以上より、標的細胞のG418選択薬剤濃度を、十分な選択効果を示す500 μ L/mLと決定した。

[0190] レトロウイルスベクター溶液をポリブレン法にて標的細胞に感染させ、培地Bにより不死化遺伝子安定発現株の選択を行った。上記6ウェルプレートに、1ウェル当たり対数増殖期にある細胞 1.40×10^5 個を播種し、5%CO₂インキュベータ中、37℃にて約24時間培養した。その後、培地Aで4倍又は10倍に希釈した組換えレトロウイルスベクター溶液にポリブレン（Hexadimethrine bromide、シグマ-アルドリッチ製、製品コードH9268）を終濃度8 μ g/mLとなるように添加し、各ウェルに同量ずつ加えて細胞にウイルスを感染させた。ウイルス感染から約4時間後に、培地Aを1.0mLずつ各ウェルに添加した。このプレートを5%CO₂インキュベータ中、37℃にてインキュベートし、24時間後に培地Bに交換し、薬剤選択を開始した。

[0191] 薬剤選択開始10日目以降に、薬剤耐性となって増殖してきた細胞を集め、1 mLのCELLBANKER 1 Plus（日本全薬工業製、製品コードCB021）を加えて、 1×10^6 個/mLを含む懸濁液とし、これを凍結細胞ストックとして-80℃で保存した。同時に、リアルタイムPCR解析用に 5×10^5 個/バイアルの細胞ペレットを調製し、-80℃で保存した

[0192] （4）不死化幹細胞の培養上清の調製

上記で作製した不死化歯髄幹細胞 2×10^5 個/mLを、10 mLの10%FBSを添加し

たDMEMを入れた培養デッシュ (55 cm²) に入れ、37℃にて70%コンフレントになるまで (4日~6日間)、5 %CO₂インキュベータ中で培養した。

[0193] 70%コンフレントになったことを顕微鏡で確認し、その後、培養フラスコ中の培養上清を、アスピレータを用いて除去し、血清無添加のDMEMを用いて2回洗浄した。次いで、この培養フラスコ中に、血清無添加のDMEM (以下、「Plain DMEM」ということがある。) を10mL加えた。添加後、直ちに回収した培養上清をコントロールとした。添加後、37℃にて、5 %CO₂インキュベータ中で72時間培養した。培養上清を15 mLの滅菌遠心チューブに集め、440 × gで3分間遠心し、遠心上清を0.22mm PVDFフィルター (ミリポア社製) に通して、不死化SHEDの培養上清 (以下、単に「SHED-CM」ということがある。) を得た。

[0194] (実施例3) 培養上清中に含まれる因子の解析

(1) 不死化幹細胞の培養上清の調製

上記実施例1及び2で作製した不死化幹細胞 2×10⁵個/mLを、10 mLの10%ウシ胎児血清 (以下、「FBS」と略することがある。) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium、以下、「DMEM」と略することがある。) を入れた培養デッシュ (55 cm²) に入れ、37℃にて70%コンフレントになるまで (4日~6日間)、5 %CO₂インキュベータ中で培養した。

[0195] 70%コンフレントになったことを顕微鏡で確認し、その後、培養フラスコ中の培養上清を、アスピレータを用いて除去し、血清無添加のDMEMを用いて2回洗浄した。次いで、この培養フラスコ中に、血清無添加のDMEM (以下、「Plain DMEM」ということがある。) を10mL加えた。添加後、直ちに回収した培養上清をコントロールとした。添加後、37℃にて、5 %CO₂インキュベータ中で72時間培養した。培養上清を15 mLの滅菌遠心チューブに集め、1,500rpm (約 440 × g) で3分間遠心し、遠心上清を0.22mm PVDFフィルター (ミリポア社製) に通して、SHED-CMの培養上清を得た。

[0196] (2) 定量的発現解析

以上のようにして得たSHED-CM中にどのようなサイトカインが発現されてい

るかについて、Quantibody（登録商標）Human Cytokine Antibody Array 1000（RayBiotech Inc., カタログ番号QAH-CAA-1000）を用いて、添付の説明書に従い、以下の手順で定量的発現解析を行った。

[0197] まず、上記SHED-CMとアレイ上に固定化された抗体とを1～2時間接触させ、洗浄後、ビオチン化抗体のカクテルを各ウェルに加えて1～2時間インキュベートした。引き続き、標識したストレプトアビジンを加えて2時間インキュベートし、標識のシグナルを検出し、GenePix（登録商標）4400A（Molecular Devices, LLC）を用いてデータ解析を行った。その結果80種類のサイトカインが検出され、それらを下記表11に示した。

[0198] [表11]

No.	サイトカイン名	No.	サイトカイン名	No.	サイトカイン名
1	BLC/BCA-1/CXCL13	28	M-CSF	55	Growth Hormone
2	Eotaxin/CCL11	29	MIG/CXCL9	56	HB-EGF
3	Eotaxin-2/CCL24	30	MIP-1 α /CCL3	57	HGF
4	G-CSF	31	MIP-1 β /CCL4	58	IGFBP-1
5	GM-CSF	32	MIP-1 δ /CCL15	59	IGFBP-2
6	I-309/CCL1	33	PDGF-BB	60	IGFBP-3
7	ICAM-1	34	RANTES/CCL5	61	IGFBP-4
8	IFN γ	35	TIMP-1	62	IGFBP-6
9	IL-1 α	36	TIMP-2	63	IGF- I
10	IL-1 β	37	TNF α	64	Insulin(pro & mature)
11	IL-1ra	38	TNF β	65	M-CSF R
12	IL-2	39	sTNF R I /TNFRS1A	66	NGF R
13	IL-4	40	sTNF R II /TNFRS1B	67	NT-3
14	IL-5	41	Amphiregulin(AR)	68	NT-4
15	IL-6	42	BDNF	69	Osteoprotegerin(OPG)
16	IL-6 sR	43	bFGF/FGF-2	70	PDGF-AA
17	IL-7	44	BMP-4	71	PIGF
18	IL-8/CXL8	45	BMP-5	72	SCF
19	IL-10	46	BMP-7	73	SCF R
20	IL-11	47	β -NGF	74	TGF α
21	IL-12p40	48	EGF	75	TGF β 1
22	IL-12p70	49	EGF R	76	TGF β 3
23	IL-13	50	EG-VEGF	77	VEGF
24	IL-15	51	FGF-4	78	VEGF R2
25	IL-16	52	FGF-7/KGF	79	VEGF R3
26	IL-17	53	GDF-15	80	VEGF-D
27	MCP-1/CCL2	54	GDNF		

[0199] インスリン様成長因子結合タンパク質である、IGFBP-4、IGFBP-6及びIGFBP

-2、メタロプロテイナーゼ組織阻害剤であるTIMP-1及びTIMP-2の含有量が比較的多いことが示された。インスリンは、今回正しく測定されなかったので除く。

[0200] (3) 定性的発現解析

以上のようにして得たSHED-CM中にどのようなサイトカインが発現されているかについてRayBio (登録商標) Human Cytokine Antibody Array G-Series 4000 (RayBiotech Inc., カタログ番号AAH-CYT-G4000-4)を用いて、添付の説明書に従い、以下の手順で定性的発現解析を行った。

まず、上記SHED-CM又は標準タンパクカクテルをガラススライドに固定化された抗体のアレイと1～2時間接触させ、その後、ビオチン化抗体のカクテルと共に1～2時間インキュベートした。引き続き、Cy3等量の標識ストレプトアビジンと1時間インキュベートし、GenePix (登録商標) 4400A (Molecular Devices, LLC) を用いてスキャン、データ抽出及びデータ解析を行った。

[0201] この定性的解析により、264種類のサイトカイン (下記表12～16) が検出され、そのうちコントロールに対する相対発現強度が1.5以上となったものが77種類あった。

[0202] [表12]

サイトカイン名称					
Angiogenin	BDNF	BLC	BMP-4	BMP-6	CKb8-1
CNTF	EGF	Eotaxin	Eotaxin-2	Eotaxin-3	FGF-6
FGF-7	FLT-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	GM-CSF
I-309	INF-Gamma	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-4	IGF-1
IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1alpha	IL-1beta
IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6
IL-7	Leptin	LIGHT	MCP-1	MCP-2	MCP-3
MCP-4	M-CSF	MDC	MIG	MIP-1 delta	MIP-3 alpha
NAP-2	NT-3	PARC	PDGF-BB	RANTES	SCF
SDF-1	TARC	TGF-beta1	TGF-beta3	TNF-alpha	TNF-beta

[0203]

[表13]

サイトカイン名称					
Acrp30	AgRP	Angiopoietin-2	Amphiregulin	Axl	bFGF
b-NGF	BTC	CCL-28	CTACK	Dtk	EGF-R
ENA-78	Fas/TNFRSF6	FGF-4	FGF-9	GCSF	GITR-Ligand
GITR	GRO	GRO-alpha	HCC-4	HGF	ICAM-1
ICAM-3	IGFBP-3	IGFBP-6	IGF-I SR	IL-1 R4/ST2	IL-1 RI
IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-17	IL-2 Rapha	IL-6 R
IL-8	I-TAC	Lymphotactin	MIF	MIP-1 alpha	MIP-1 beta
MIP-3 beta	MSP-alpha	NT-4	Osteo -protegerin	Oncostatin M	PIGF
sgp130	sTNF RII	sTNF-RI	TECK	TIMP-1	TIMP-2
Thrombo -poietin	TRAIL R3	TRAIL R4	uPAR	VEGF	VEGF-D

[0204] [表14]

サイトカイン名称					
Activin A	ALCAM	B7-1(CD80)	BMP-5	BMP-7	Cardiotrophin-1
CD14	CXCL-16	DR6 (TNFRSF21)	Endoglin	ErbB3	E-Selectin
FAS Ligand	ICAM-2	IGF-II	IL-1RII	IL-10 Rbeta	IL-13 Ralpha2
IL-18 BPalpa	IL-18 Rbeta	IL-2 Ralpha	IL-2 Rbeta	IL-2 Rgamma	IL-21R
IL-5 Ralpha	IL-9	IP-10	LAP	Leptin R	LIF
I-Selectin	M-CSF R	MMP-1	MMP-13	MMP-9	MPIF-1
NGF R	PDGF AA	PDGF-AB	PDGF Ralpha	PDGF Rbeta	PECAM-1
Prolactin	SCF R	SDF-1beta	Siglec-5	TGF-alpha	TGF beta2
Tie-1	Tie-2	TIMP-4	VE-Cadherin	VEGF R2	VEGF R3

[0205]

[表15]

サイトカイン名称				
Adipsin	BCAM	CD30	CD40	FcγRIIB/C
Ferritin	FLRG/FSTL3	Follistatin	Furin	Galectin-7/ LGALS7
GDF-15/MIC-1	Growth Hormone(GH)	IL-10 R α	IL-22	IL-28A/ IFN-γ2
IL-29	IL-31	Insulin (pro & mature)	LH	LIMP II /SR-B2
LYVE-1	Marapsin/ Pancreasin	MICA	MICB	MMP-2
MMP-7	MMP-8	MMP-10	NCAM-1/CD56	Nidogen-1/ Entactin
NrCAM/Bravo	NRG1 beta 1	Osteopontin (OPN)	PAI-1	PF4
PSA(total)	RAGE/AGER	RANK/ TNFRSF11A	Resistin	Serum Amyloid A (SAA)
Siglec-9	TACE/ CD156b	TIM-1/HAVCR	TRAIL R3 /TNFRSF10B	Trappin-2
TREM-1	TSH	TSLP	VCAM-1	VEGF-C
XEDAR	—	—	—	—

[0206] [表16]

サイトカイン名称				
4-1BB	ACE-2	Alpha-fetoprotein	Angiopoietin-1	Angiostatin (ANG)
ANGPTL4	Beta-2 Microglobulin	BCMA/TNFRSF17	beta-IG-H3/TGFB1	CA125
CA15-3	CA19-9	Carbonic Anhydrase IX	Cathepsin S	CCL14a/ HCC-1
CCL21/6CKine	CD23/Fc epsilon-R II	CD40 Ligand	CEA/CD66e	CEACAM-1
Cripto-1/CR1	CRP	DAN/NBL1	Decorin(DCN)	Dickkopf-1 (Dkk-1)
Dickkopf-3 (Dkk-3)	Dickkopf-4 (Dkk-4)	DPPIV/CD26	E-Cadherin	EDA-A2
EG-VEGF	Ep-CAM/CD326	ErbB2/HER2	Erythropoietin R (Epo R)	FSH
HB-EGF	hCGα (intact)	HVEM/TNFRSF14	IL-13 R α-1	IL-17B
IL-17C	IL-17F	IL-17R	Procalcitonin (PCT)	PSA(free)
S100b	Shh N	Thyroglobulin(TG)	Ubiquitin+1	—

[0207] 以上の結果、NGF、ILファミリー（IL-6、IL-8、IL6R、IL-17C、IL-17R等）

等の相対発現強度は、10未満となった。

[0208] (実施例4) 自己免疫性神経炎に対するSHED-CMの効果の検証

ギラン・バレー症候群の疾患モデルマウスである実験的自己免疫性神経炎 (EAN) マウスを用いて、上記で作成したSHED-CMの治療効果を検証した。上記モデルマウスは、6週齢のC57BL/6マウス雄 (三協ラボサービス社より購入) を使用し、明暗12時間、室温で、水及び飼料は自由に摂取させて1週間の馴化飼育を行い、陰性対照群と治療群とに分けた (n=5)。

馴化飼育後、髄鞘の主要な構成タンパク質の一つであるP0の一部 (P0ペプチド (バイオロジカ社)) をPBSで2mg/mlとなるように溶解したP0ペプチド溶液と、不完全フロイントアジュバント (Difco Laboratories 社) に20mg/mLとなるように結核菌の加熱死菌H37RAを加えた完全フロイントアジュバントを調製し、これら2種類を等容で混合して乳化させたアジュバントを作製 (以下、「P0(180-199)/CFA」という。) した。

[0209] 免疫用溶液の投与スケジュール及び治療のスケジュールを図3(A)に示す。

図3(A)中、P0(180-199)/CFAの最初の投与日を試験開始日 (以下、「Day 0」という。) とした。百日咳毒素 (#180 List Biological Laboratories社、図3(A)中、PTと表示。) 及び上記実施例2で得たSHED-CMの投与日は、Day 0から起算して、Day 3, Day 8のように記載した。PTは百日咳毒素の投与日を示す。

上記陰性対照群及び治療群の各マウスに、50 μ LのP0(180-199)/CFAを左後肢と尾の間の背側に皮下注射し (0日目)、8日目に1回目と反対側に再度、同量皮下投与した。さらに、上記マウスに百日咳毒素をDay -1に400ng/匹、Day 1及びDay 3にそれぞれ300ng/匹で腹腔内投与することで、EANモデルマウスを作製した。免疫後のマウスは2日から3日おきに臨床徴候を下記の基準にしたがってスコア化した。

[0210] スコア 0 : 臨床徴候なし

スコア 1 : 活動性の低下

スコア 2 : 尾の麻痺もしくは軽度の後肢麻痺

スコア 3 : 軽度の運動障害もしくは後肢麻痺

スコア 4 : 重度の運動障害

[0211] 上記で作成したEANモデルマウスに、Day 15、Day 17、Day 20、Day 22、及びDay 24の5回、200 μ LのDMEM又はSHED-CMを腹腔内投与した。臨床徴候スコアは、上記の基準に従ってスコア化し、平均値 $\pm$ SDとして算出し、有意差の有無をスチューデントt検定で確認した。 $p < 0.05$ のときを*、 $p < 0.01$ のときを**、 $p < 0.001$ のときを***とした。結果を図3(B)に示す。

陰性対象群ではDMEMの投与後 (Day 15以降) も、臨床徴候スコアの緩やかな上昇がみられた。それに対して治療群では、SHED-CMの投与から2日目 (Day 17) にはスコアの低下傾向が見られ、5日目 (Day 20) 以降は陰性対象群と比較して有意なスコアの低下が記録された (図3(B)中)。この結果から、SHED-CMが自己免疫性神経炎であるギラン・バレー症候群に対して治療効果を持つことが示唆された。

[0212] (実施例5) 自己免疫性神経炎の治療におけるSHED-CMの作用機序の検討

上記両群の坐骨神経を取り、光学顕微鏡及び電子顕微鏡で観察する組織病理学検査並びにウエスタンブロットに供することで、EANマウスにおけるSHED-CM投与の効果を調べた。

(1) 組織病理学的検査

Day 31にマウスを安楽殺して坐骨神経を採取し、カルノフスキー固定液で神経を固定しエポキシ包埋した。厚さ0.5 μ mに薄切後、トルイジンブルー染色を行い、光学顕微鏡 (図4(A1)及び4(B1)は $\times 100$ 倍、図4(A2)及び4(B2)は $\times 200$ 倍、Thermo Fisher Scientific社製、カタログ番号EVOS Cell Imaging Systems) 及び電子顕微鏡 (図4(A3)と(B3)は $\times 500$ 倍、日本電子社製、カタログ番号JEM-1400Flash) を用いて観察を行った。その結果を図4(A1)～(B3)に示す。陰性対象群では坐骨神経のシュワン細胞で構成される髄鞘 (ミエリン) の厚みが薄く、シュワン細胞の大きさが不揃いで小さいものが多い (図4(A)) のに対し、SHED-CM投与群では神経が太く髄鞘が厚いシュワン細胞が多いことが見て取れた (図4(B))。この結果は、SHED-CMが髄鞘の厚さ、つまりシュ

ワン細胞に直接的又は間接的に作用していることを意味している。

[0213] (2) 定量PCR及びウエスタンブロット

上記実施例4と同様の方法でEANモデルマウスを作製し、陰性対照群(4匹)、治療群(5匹)に分けた。Day 13、Day 15、Day 17、Day 20、及びDay 22の5回、200 μ LのSHED-CMを腹腔内に投与し、2～3日おきに臨床徴候を上記の基準にしたがってスコア化した。Day 23にマウスを安楽殺し、その後、坐骨神経及び馬尾神経を採取し、得られた試料をそれぞれ2等分した。

等分した組織の一方からは、RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社、キットに添付されたプロトコルに従って実施)を用いて総RNAを抽出し、Thermo Fisher Scientific社の逆転写酵素SuperScript VIを用いてcDNAを作製後、Myelin Basic Protein (MBP)、TNF- α 、IFN- γ 、IL-17Aの各遺伝子のmRNAを対象とする定量PCRによる発現解析を行った。PCR条件は上記と同様とした。内部標準遺伝子として、Hypoxanthine guanine phospho-ribosyl- transferase (HPRT)を用いて、その相対比で表し、平均値 $\pm$ SDとして算出した。その結果を図5(A)及び図6に示す。図6中統計検定の結果として、 $p < 0.05$ を*、 $p < 0.001$ を***と示した。図6(B)の馬尾神経におけるTNF- α /HPRT及びIL-17A/HPRTのグラフ中の「0.07」は、それぞれ上記の統計処理を行ったときのp値を示す。また、定量PCRに使用したプライマーセットを下記表17に示す。

[0214] [表17]

プライマー名	配 列	配列番号
Mouse MBP sense	TGATTTTCGAGCGTGGCAGAG	17
Mouse MBP antisense	ACATTTGGCGGCCACACATA	18
Mouse TNF- α sense	TATGGCCCAGACCCTCACA	19
Mouse TNF- α antisense	GGAGTAGACAAGGTACAACCCATC	20
Mouse IFN- γ sense	CGGCACAGTCATTGAAAGCCTA	21
Mouse IFN- γ antisense	GTTGCTGATGGCCTGATTGTC	22
Mouse IL-17A sense	CTGATCAGGACGCGCAAAAC	23
Mouse IL-17A antisense	TCGCTGCTGCCTTCACTGTA	24
Mouse HPRT sense	TTGTTGTTGGATATGCCCTTGACTA	25
Mouse HPRT antisense	AGGCAGATGGCCACAGGACTA	26

[0215] また、等分した組織の他方からは、プロテアーゼ阻害剤(品名Protease In

hibitor Cocktail、シグマアルドリッチ社）とホスファターゼ阻害剤（品名P
rotease/Phosphatase Inhibitor Cocktail、Cell Signaling社）とを含む界面活性剤1% Nonidet p40（NP40）溶液を用いて細胞溶解液を調製し、TaKaRa
BCA Protein Assay Kit（タカラバイオ社）を用いて蛋白量を一定にした。その後、SDS-PAGEによる電気泳動に供し、抗MBP抗体、抗Phospho-c-met 抗体
（Cell Signaling 社）、抗アクチン抗体（Santa Cruz社）を用いて、ウェスタンブロット解析を行った。結果を図5(B)及び図7に示す。

[0216] 図5(A)より、SHED-CMの投与によってMBPのmRNA発現量が上昇していることが分かった。また、図5(B)より、SHED-CMの投与によってMBPのタンパク質量も増加していることがわかった。MBPは髄鞘を構成する主要タンパク質であり、その量が増加したという結果は、髄鞘が厚くなっていたという顕微鏡観察の結果（図4）と一致するものである。

[0217] また図6に示す定量PCRの結果から、いずれの神経組織においても、各種炎症性サイトカインの発現量が低下していること、及び図7からc-Metのリン酸化レベルが上昇していることがわかる。c-Metは肝細胞増殖因子(HGF)の受容体であり、HGFを受容することによってリン酸化することが知られている。このため、以上の結果はSHED-CMに含まれるHGFなどが抗炎症作用を持ち、自己免疫性神経炎の改善に関わっていること（奏効すること）を示唆している。

[0218] （3）SHED-CMに含まれるHGFの作用の確認

SHED-CM内のHGFが自己免疫性神経炎の奏効に関与しているのかを調べるため、上記実施例4と同様に、EANモデルマウスを図8(A)に示すアジュバント及び抗原の投与スケジュールに従って作製し、陰性対照群、陽性対照群1、陽性対照群2、及び試験群に分けた（各n=5）。図8(A)中の略号は、図3(A)と同じである。統計処理は、上記実施例4と同様に行った。

治療には、陰性対照群にDMEMを投与し、陽性対照群1にはSHED-CMを投与した。また、陽性対照群2には、SHED-CMとIsotype IgGとを同時に投与し、試験群には、SHED-CMとHGFの中和抗体である抗HGF抗体とを同時に投与した。

結果を図8に示す。なお、陽性対照群2及び試験群の臨床徴候スコアの経時変化のみを示す。

- [0219] 試験群では、陽性対象2に比べ、SHED-CM投与による臨床徴候スコアの改善が見られなかった。この結果から、少なくともSHED-CMに含まれるHGFが自己免疫性神経炎の症状緩和に関与していることが示唆される。

以上の結果から、SHED-CMが髄鞘の損傷修復や再生を増強すること、及び炎症を抑制するが明らかになり、これらのことがEANからの回復に寄与していると考えられる。

- [0220] (実施例6) シュワン細胞に対するSHED-CMの作用

SHED-CMがシュワン細胞に対してどのような効果を持つのかを詳細に調べるため、マウスシュワン細胞株であるIMS32を用いたIn vitro実験を行った。IMS32を10cmディッシュでIMS32用培地(コスモ・バイオ社)を用いて、37℃にて5%CO₂インキュベータ中にて、80%コンフルエントになるまで培養した。次に、血清を含まないDMEMのみの培地にSHED-CM(1%、3%、10%、又は30%(v/v))と抗HGF抗体(1μg/mL)又はアイソタイプIgG(1μg/mL)とのいずれかを加えた培地に交換し、37℃にて72時間、5%CO₂インキュベータ中で培養した後に、IMS32の増殖を観察した。結果を図9に示す。光学顕微鏡像に示されるように、通常は無血清培地(DMEM)中で培養したIMS32は、実験前(図9(A))と同様に細胞が丸いままでほとんど増殖していないことがわかった(図9(B1)及び(B2))。これに対し、SHED-CMを加えた培地で72時間培養すると、IMS32細胞が伸長した形態となっており、よく増えていることがわかる(図9(C1)及び(C2))。

- [0221] IMS32の増殖の程度を定量するために、CellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assay (Promega社)を用いて、培養したIMS32のATPの産生量を計測した。計測器として、GloMaxDiscover Microplate Reader GM3000 (Promega社)を使用した。結果を図10に示す。図10中、N/Cは、DMEMのみで培養した対照を示す。また、統計処理はone-way ANOVA とDunnett検定を用いて行い、 $p < 0.05$ を*、 $p < 0.01$ を**、 $p < 0.001$ を***として示した。

図10(A)から、SHED-CM含有培地で培養することによって、IMS32の増殖能がSHED-CMの濃度依存的に、有意に増強されていることがわかった。また、SHED-CM含有培地に抗HGF抗体を加えるとコントロール抗体に比べIMS32の増殖能が有意に低下することから（図10(B)）、SHED-CMの増殖能増強効果の一部は少なくともHGFの作用によるということもわかった。

[0222] HGFのみでシュワン細胞の増殖を増強することができるのかについて、上記と同様の培養実験をIMS32を用いて行った。この実験では、SHED-CM（10%、30%、50% (v/v)）又はリコンビナントヒト（rh）HGF（0.1、1、10、50 ng/mL）（R&D社）を加えたDMEM培地を使用して、37°C 72時間、5%CO₂インキュベータ中でIMS32を培養した。そして上記と同様に、培養後のIMS32のATP産生量を定量し、これを指標としてIMS32の増殖能を調べた。その結果を図11（A）に示す。図11中統計検定の結果として、 $p < 0.05$ を*、 $p < 0.001$ を***と示した。SHED-CMでは細胞増殖能の増強が見られたのに対し、HGFだけを添加した培地では増殖能の増強が見られなかった（図11(A)）。

[0223] さらに、上記と同じ実験を1%ウシ胎児血清（FBS）（シグマアルドリッチ社）含有のDMEMに条件を変えて行った。その結果を図11(B)に示す。FBS非存在下ではHGFで増殖能の増強は見られなかったが、FBS存在下ではHGFだけでもIMS32の増殖能が増強された。

これらの結果はHGFだけでなく、SHED-CMや血清に含まれる未同定分子Xがシュワン細胞の増殖能増強に必要であることを示唆している。

[0224] 次に、SHED-CM及びHGFがどのようにしてシュワン細胞の増殖を促しているのかを知るために、細胞内シグナル伝達経路を調べた。まず、SHED-CM及び陰性対象群であるDMEMを、Amicon Ultra Centrifugal Filter Units-10 k（メルク株式会社）を用いて、分子量が10,000以下の物を除去しつつ約10倍に濃縮した。無血清のDMEM 50 μ LにIMS32（ 2×10^6 cells）を懸濁してから、この濃縮した培地50 μ Lを加えることにより、IMS32細胞を5分間刺激した。なお、陽性対照として、DMEMで50 ng/mLに調製したrhHGF 50 μ Lも使用した。その後、上記のように刺激した細胞をそれぞれ溶解し、それらの溶解液を用いてSDS

ーPAGE及びウエスタンブロットを行った。

ここでは抗体として抗 Phospho-c-met 抗体、抗 c-met 抗体（シグマアルドリッチ社）、抗 Phospho-Erk1/2 抗体（Cell Signaling 社）、抗Erk1/2 抗体（Cell Signaling 社）、抗 Phospho-AKT 抗体（Cell Signaling 社）、抗 AKT 抗体（Cell Signaling 社）を使用した。結果を図12に示す。

[0225] SHED-CM及びrhHGFは、ERK1/2とAKTのリン酸化を誘導した。ERK1/2及びAKTは、HGFの受容体であるc-METの下流に位置し、細胞増殖の誘導に重要なシグナルである。このことは、SHED-CMの神経炎症状の緩和効果には、SHED-CM中のHGFによるシュワン細胞の増殖及び/又は再生誘導が重要であることを示唆している。

[0226] 次に、SHED-CMによるシュワン細胞の増殖及び再生を定性的に評価した。ここではIMS32を50% SHED-CM、50 ng/mL rhHGF、50 ng/mL NRG1（BioLegend社）、1 mM DBcMP（シグマアルドリッチ社）、又は50 ng/mL NRG1 + 1 mM DBcAMPと、5 % FBSを含むDMEMで培養し、その後上記同様にウエスタンブロットを行った。ウエスタンブロットには抗MBP抗体、抗 p75抗体（GeneTex社）、抗アクチン抗体（Santa Cruz社）を使用した。結果を図13に示す。

[0227] SHED-CM、HGF及びNRG1含有培地で培養したIMS32では、髄鞘の主要構成成分であるMBPの量が増えていることが図13上段からわかる。一方で、SHED-CM含有培地で培養したIMS32のみで、神経栄養因子の受容体であるp75の量が増えていることが、図13の中段からわかる。これらの結果はSHED-CMがシュワン細胞の成熟を促進する能力を持つことを示唆している。

また、SHED-CMがシュワン細胞の増殖及び髄鞘の再生を促進することから、SHED-CMは脱髄疾患全般に対して効果を奏するものであると考えられる。したがって、本発明は脱髄疾患の治療に供する医薬製剤に使用することができる。

[0228] （実施例7）CIPNの治療におけるSHED-CMの作用機序の検討

最後に、化学療法剤の投与により人為的に末梢神経障害を発症させたCIPNモデルマウスに対して、SHED-CMの投与により症状の改善がみられるかを調

べた。

(1) 行動学的疼痛試験

Day0, 2, 4, 6の計4回のパクリタキセル(80 µg/200 µL)腹腔内投与によって末梢神経障害を発症させた。また、CIPNの治療としてDay1, 3, 5, 7とその後、連日にわたりSHED-CMまたは対照培地DMEMを200 µL腹腔内投与した。そして、治療効果の確認のため、微細フィラメントによる非侵害刺激に対する逃避反応の変化を比較した(von Frey filament test)。逃避反応の変化は、刺激強度が固定された微細フィラメントで後ろ足をつついて刺激し、足を引いて逃避するかしないかを○または×で記録することで、下記計算式から逃避刺激に必要な最小の刺激強度の平均を50%閾値(g)として算出して比べている。

[0229] 上記50%閾値は以下の式によって表される。

$$50\% \text{ 閾値} = (10 [X_f + k \delta]) / 10000$$

X_f : 最後に用いたフィラメント(Aesthesio (登録商標) ; DanMic. Global, Campbell, USA)の圧の強さ。フィラメントの圧の強さや付随する情報は図15を参照 (Dinamic Global, LLC解説書より引用)。

k : ○ / ×の配列によって決まる値。 k の値は図16及び図17を参照 ([" Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw" ; S.R. Chaplan et al; Journal of Neuroscience Methods; Jul;53(1):55-63.1994: doi: 10.1016/0165-0270(94)90144-9.]より引用)

δ : フィラメントの偏差 (0.224を使用)

[0230] 解析した結果を図14に示す。パクリタキセルを投与していない陰性対照群マウスは概ね1.0から1.5gの閾値を推移しているが、パクリタキセル投与によるCIPNモデルマウスは低い刺激に敏感になり、0.5g以下の低い刺激にも反応していた。これに対し、SHED-CMを投与したCIPNモデルマウスは、投与を続けるにつれて陰性対照群マウスと同様の刺激を与えないと逃避に至らないようになった。この結果は、SHED-CMの投与が神経障害であるCIPNの緩和または治療に有用である事を意味している。

産業上の利用可能性

[0231] 本発明は医薬の分野、特に、神経炎の治療に関連する医薬の分野において有用である。

配列表フリーテキスト

[0232] 配列番号 1 : 細胞に導入する遺伝子を含むDNA断片の塩基配列 (1) である。

配列番号 2 : 細胞に導入する遺伝子を含むDNA断片の塩基配列 (2) である。

配列番号 3 : 細胞に導入する遺伝子を含むDNA断片の塩基配列 (3) である。

配列番号 4 : 細胞に導入する遺伝子を含むDNA断片の塩基配列 (4) である。

配列番号 5 : 細胞に導入する遺伝子を含むDNA断片の塩基配列 (5) である。

[0233] 配列番号 6 : 細胞に導入する遺伝子を含むDNA断片の塩基配列 (6) である。

配列番号 7 : PCR用プライマー (1) である。

配列番号 8 : PCR用プライマー (2) である。

配列番号 9 : PCR用プライマー (3) である。

配列番号 10 : PCR用プライマー (4) である。

[0234] 配列番号 11 : PCR用プライマー (5) である。

配列番号 12 : PCR用プライマー (6) である。

配列番号 13 : PCR用プライマー (7) である。

配列番号 14 : PCR用プライマー (8) である。

配列番号 15 : PCR用プライマー (9) である。

[0235] 配列番号 16 : PCR用プライマー (10) である。

配列番号 17 : PCR用プライマー (11) である。

配列番号 18 : PCR用プライマー (12) である。

配列番号 19 : PCR用プライマー (13) である。

配列番号 20 : PCR用プライマー (14) である。

[0236] 配列番号 21 : PCR用プライマー (15) である。

配列番号 22 : PCR用プライマー (16) である。

配列番号 23 : PCR用プライマー (17) である。

配列番号 24 : PCR用プライマー (18) である。

配列番号 25 : PCR用プライマー (19) である。

配列番号 26 : PCR用プライマー (20) である。

請求の範囲

- [請求項1] B m i - 1 遺伝子、H P V 1 6 - E 6 遺伝子及びH P V 1 6 - E 7 遺伝子からなる群から選ばれる2つ又は3つの遺伝子と、テロメラーゼ逆転写酵素（T E R T）遺伝子のセットを導入した間葉系不死化幹細胞の培養上清を含む組成物であって、髄鞘の再生又はシュワン細胞の増殖を誘導することができる組成物。
- [請求項2] 前記遺伝子のセットがB m i - 1 遺伝子、H P V 1 6 - E 6 遺伝子、H P V 1 6 - E 7 遺伝子、及びh T E R T 遺伝子のセットであることを特徴とする、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 前記間葉系不死化幹細胞は、歯髄幹細胞から調製されるものであることを特徴とする、請求項1又は2に記載の組成物。
- [請求項4] 前記歯髄幹細胞は、ヒト由来歯髄幹細胞であることを特徴とする、請求項3に記載の組成物。
- [請求項5] ウイルスベクターを用いて前記遺伝子のセットを前記間葉系幹細胞に導入して不死化し、前記不死化間葉系幹細胞を無血清培地中で60～84時間培養することで得られる培養上清を含むことを特徴とする、請求項4に記載の組成物。
- [請求項6] 少なくとも肝細胞増殖因子（HGF）の受容体c-METに作用する成分を含むことを特徴とする、請求項4に記載の組成物。
- [請求項7] 請求項4に記載の組成物を有効成分として含む、脱髄疾患の治療用医薬製剤。
- [請求項8] 前記組成物を、製剤の総重量を100%としたときに10～90重量%含むことを特徴とする、請求項7に記載の医薬製剤。
- [請求項9] 前記脱髄疾患が中枢神経性であって、多発性硬化症、視神経脊髄炎、急性散在性脳脊髄炎、アトピー性脊髄炎、進行性多巣性白質脳症、HTLB-1関連脊髄症、HIV関連白質脳症、亜急性硬化性全脳炎、浸透圧性脱髄症候群及び薬剤性白質脳症からなる群から選ばれるいずれかであることを特徴とする、請求項7に記載の医薬製剤。

- [請求項10] 前記脱髄疾患が末梢神経性であって、ギラン・バレー症候群、Fisher症候群、糖尿病性ニューロパチー、慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー、多巣性運動ニューロパチー、化学療法剤誘発性末梢神経障害及び帯状疱疹からなる群から選ばれるいずれかであることを特徴とする、請求項7に記載の医薬製剤。
- [請求項11] 粉末、錠剤、カプセル剤、液剤、注射剤、及び貼付剤からなる群から選ばれるいずれかの剤形であることを特徴とする、請求項7に記載の医薬製剤。
- [請求項12] Bmi-1 遺伝子、HPV16-E6 遺伝子及びHPV16-E7 遺伝子からなる群から選ばれる2つ又は3つの遺伝子と、テロメラーゼ逆転写酵素（TERT）遺伝子のセットを組み込んだ間葉系不死化幹細胞の培養上清を含む組成物を有効成分とする、化学療法剤誘発性末梢神経障害治療用医薬製剤。
- [請求項13] 前記化学療法剤が抗がん剤であることを特徴とする、請求項12に記載の医薬製剤。
- [請求項14] 前記抗がん剤がビンカアルカロイド系製剤又はタキサン系製剤であることを特徴とする、請求項13に記載の医薬製剤。