明　細　書

発明の名称 ： ヒト単球由来治療用幹細胞およびその誘導方法

技術分野

[0001] 本発明は、生体において正常に分化した細胞を短期間に脱分化させることにより、細胞医薬に使用できる細胞を提供する方法に関する。また、本発明は、細胞、組織もしくは器官の損傷に関係する疾患の治療剤に関する。さらに、本発明は、効率的に脱分化誘導させる細胞医薬用剤、幹細胞の生産方法、単球の脱分化誘導培地、脱分化誘導剤、細胞医薬用キットまたは脱分化細胞産生キット、医薬組成物および幹細胞に関する。

背景技術

[0002] 疾患に対する根本的な治療方法として、何らかの原因により組織において喪失した細胞を補充する手法、つまり再生医療が注目を浴びて久しい。しかしながら、近年更に幹細胞或いは組織細胞の前駆細胞を注入し、疾患部位で再生および細胞間生理活性物質の相互作用を通じて組織を修復していこうという細胞医薬の考え方が広がりを見せている。

[0003] これに呼応して、組織における分化細胞たとえば末梢血由来単球が、特定のサイトカインの存在下で培養することにより、幹細胞に脱分化するとの報告が相次いでされている。

[0004] しかしながら、細胞医薬を目的として幹細胞或いは組織前駆細胞を生体内に投与した場合でも、目的の損傷部位に細胞が到達する率が必ずしも高くなく、また一定ではない。したがって大量の細胞を準備しなくてはならないという問題がある。また、目的部位以外の部分に分布した細胞が、その部位でどのような挙動を示すのかに関して詳細な検討はなされておらず、副作用発症の点で問題を残している。さらに、治療効果を上げるためには大量の細胞を投与しなくてはならないが、自己の細胞を短期間で調達することは困難であると思われる。

[0005] 近年、損傷部位において虚血状態のもとSDF1（ストローマ細胞由来因子１

）或いはVEGF（血管内皮細胞増殖因子）が発現し、生体内修復機構の一環として本分子が誘引分子となり、これら誘引分子に対するレセプターを発現している細胞が損傷部位に引き寄せられる（所謂ホーミング）現象が生じることが明らかとなっている。これらの受容体に関しては、SDF1に対してはCXCR4であり、VEGFに対してはVEGFRである。例えば、非特許文献1は、虚血部位においてSDF1をブロックするか、またはCXCR4発現細胞を血液中から除去した場合、傷が治らなくなることを報告している。

[0006] ヒト単球を起原に脱分化誘導によって多分化能を有する幹細胞を得る技術は、ファンドリッヒ（Fandrich）やフーバーマン（Huberman）（非特許文献2、3）らによって報告されている。いずれもM-CSFをはじめ、様々なサイトカインを培養に用いている。いずれの培養方法においても、いくつかの未分化マーカーが陽性に転じていることが確かめられている。また、桑名ら（非特許文献４）は、フィブロネクチンを塗布した培養皿を用いてヒト単核球から多能性幹細胞MOMCを誘導できることを報告している。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Nat.Med.2004 Aug; 10(8):858-64

非特許文献2：Ruhnke M, Fandrich F., Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells., Gastroenterology. 128(2005)1774

非特許文献3：Yong Zhao, Eliezer Huberman, A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells, PNAS 100(2003)2426

非特許文献4：Kuwana M. et al., Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. J Leukoc Biol. 74(2003) 833

非特許文献5：Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissu

es, J. Biol. Chem., 226,497-509(1957).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は細胞医薬の分野において問題とされてきた、標的部位に効率的に到達できる幹細胞の提供、およびその短期大量製造方法、および当該細胞を誘導するための医薬組成物を提供することを目的とする。

[0009] また、本発明は、細胞、組織もしくは器官の損傷に関係する疾患の治療剤を提供することを目的とする。

[0010] さらに、本発明は、脱分化誘導培地、脱分化誘導剤、細胞医薬用キットまたは脱分化細胞産生キットおよび幹細胞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

[0011] 本発明は上記課題を解決するもので、末梢血単球を用いて、本発明脱分化誘導剤の存在下に短期間培養することにより、脱分化細胞を大量に誘導できることを見出した。また、本発明の医薬組成物を直接生体に投与することにより、損傷関連疾患が効果的に治療できることを見出した。さらに、ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種を投与することで、生体内のM-CSFとおそらくは協働して、単球を幹細胞などの細胞、組織もしくは器官の損傷を修復可能な細胞に誘導でき、それにより細胞、組織もしくは器官の損傷に関係する疾患の治療剤を提供できることを見出した。

[0012] 即ち、本発明は具体的には以下の発明を提供するものである。

項１. 単球を(i)M－CSFおよび(ii)ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種の存在下で培養し、脱分化させることにより得られる幹細胞。

項２. 水溶性植物抽出物の単球を脱分化させる有効成分が糖もしくは複合糖質である、項１に記載の幹細胞。

項３. 水溶性植物抽出物の単球を脱分化させる有効成分の分子量が1000～500000である項１に記載の幹細胞。

項４．　水溶性植物抽出物の単球を脱分化させる有効成分が、ConAカラムに吸着される、項１に記載の幹細胞。

項５．　水溶性植物抽出物の単球を脱分化させる有効成分が、アニオン交換樹脂に吸着される項１に記載の幹細胞。

項６．　水溶性植物抽出物が植物由来Folch抽出水相画分もしくはその精製物である、項１に記載の幹細胞。

項７．　単球がヒト単球である項１記載の幹細胞。

項８．　未分化マーカーNanog, Nestin, c-Kit, CD9, Oct3/4の少なくとも１種を発現しており、単球をM-CSF単独存在下培養した場合に得られた幹細胞と比較した場合、CXCR4遺伝子が有意に強く発現していることを特徴とする項１～７のいずれかに記載の幹細胞。

項９．　未分化マーカーNanog, Nestin, c-Kit, CD9, Oct3/4の少なくとも１種を発現し、かつCXCR4遺伝子が有意に強く発現していることを特徴とする幹細胞。

項１０．　単球を(i)M－CSFおよび(ii)ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種の存在下で培養することを特徴とする幹細胞の生産方法。

項１１．　培養期間が７日から１４日間である項６記載の方法。

項１２．　(i)M－CSFおよび(ii)ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種を含む単球の脱分化誘導培地。

項１３．　項１～９のいずれかに記載の幹細胞を有効成分として含有する医薬組成物。

項１４．　項１～９のいずれかに記載の幹細胞を有効成分として含有する細胞医薬用剤。

項１５．　(i)M－CSFおよび(ii)ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種を有効成分とする脱分化誘導剤。

項１６．　ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種を有効成分とする細胞、組織もしくは器官の損傷に関係する疾

患の治療剤。

項１７．　前記疾患が外傷、炎症性疾患、骨・軟骨の損傷、循環器疾患、神経疾患、肝疾患および腎疾患、糖尿病、アトピー性皮膚炎、GVHDからなる群から選ばれる、項１６に記載の治療剤

項１８．　前記疾患が外傷、膵炎、放射線損傷、皮膚筋炎、多発性筋炎、壊死性筋膜炎、慢性気管支炎、骨折、骨粗鬆症、骨軟骨骨折、骨軟骨炎、拡張型心筋症、心筋梗塞、虚血性心筋症、心不全、心筋肥大、うっ血性心不全、再狭窄、不整脈、アテローム性動脈硬化症、血管炎、末梢ニューロパシー、ニューロパシー痛、脳卒中、脳炎、髄膜炎、糖尿病性ニューロパシー、注意欠陥障害、自閉症、アルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルトーヤコブ病、脳または脊髄外傷もしくは虚血、肝硬変、慢性肝炎、慢性腎不全、糸球体腎炎、腎虚血、糖尿病、アトピー性皮膚炎、GVHDからなる群から選ばれる、項１６に記載の治療剤。

項１９．　少なくとも項１～９記載の幹細胞を必須構成成分とする細胞医薬用キット。

項２０．　(i)M－CSFおよび(ii)ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種を必須構成成分とする脱分化細胞産生キット。

項２１．　さらに単球を構成成分として含む項２０記載のキット。

項２２．　ガングリオシドがGD1a、GD1b、GD2、GD3、GM1、GM2、GM3、GT1b、およびGQ1bからなる群から選ばれる少なくとも1種である、項１～２１のいずれかに記載の幹細胞、幹細胞の生産方法、単球の脱分化誘導培地、細胞医薬用剤、治療剤、脱分化誘導剤、細胞医薬用キットまたは脱分化細胞産生キット。

発明の効果

[0013]　本発明により、組織損傷部位に到達できる幹細胞を、単球を用いて短期間に大量に供給することができる。また、当該幹細胞誘導剤を提供することもでき、細胞医薬の分野に貢献することが期待できる。

[0014] さらに、ガングリオシド及び水溶性植物抽出物、例えば植物由来Folch抽出水相画分またはその精製物が細胞、組織もしくは器官の損傷に関係する疾患の治療剤となることが明らかにされた。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]培地１～培地５で培養することにより単球から誘導された幹細胞の増殖曲線を示す。

[図2]RT-PCRによる遺伝子発現の結果を示す。

[図3]各ガングリオシド添加による幹細胞への脱分化作用を示す。

[図4]各ガングリオシド添加における細胞形態を示す。

[図5]各植物抽出画分における脱分化誘導活性を示す。

[図6]サツマイモ茎抽出物由来脱分化誘導成分の各種クロマトによる分画の活性結果を示す。

[図7]マウス肝組織における抗コラーゲン抗体染色像を示す。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明は、脱分化させる細胞として単球、例えば末梢血単球を用いる。

[0017] 本発明で使用する単球は、哺乳動物由来のものである。哺乳動物としては、ヒト、ウマ、ウシ、サル、チンパンジー、ブタ、ヒツジ、ウサギ、マウス、ラット、イヌ、ネコなどが挙げられ、好ましくは、ヒト、サル、チンパンジーなどの霊長類が挙げられ、特にヒト単球が好ましい。単球は、骨髄、血液などに由来するが、好ましくは血液、特に末梢血単球を好ましく使用できる。

[0018] 血液などのサンプルから単球を分離する方法は公知であり、例えば血球分離溶液Lymphoprep™（リンホプレップ：コスモ・バイオ社）を用いて、単核球を調製し、CD14の表面抗原を認識する抗体磁気ビーズ（ミルテニー・ バイオテク社）にて調製する方法、あるいは単核球のままでも本発明の単球の供給源として用いることができる。

[0019] あるいは、ヒト単球は市販品を用いてもよい。市販品としては、例えばPT0038（LONZA社）などが挙げられる。

[0020] 本発明において、単球は幹細胞に脱分化され、それを増殖後にヒトなどの被験体に戻すことが想定される。この場合、患者から単球を分離することになるため、できるだけ少ない量の単球から大量の幹細胞を得ることが必要になる。本発明によれば、単球を脱分化した幹細胞の増殖効率が高く、少量の単球から大量の幹細胞を調製できるため、好ましい。

[0021] 単球としては、M-CSF受容体(c-fms)を有する単球系細胞(単球、単核球、単芽球)が包含される。単核球を用いても単球だけが増殖するので、単球だけでなく単核球も脱分化の対象細胞として用いることができる。

[0022] 本明細書において、「幹細胞」とは、未分化マーカーを発現し自己複製能を有するものである。本発明の幹細胞は、単球から大量に得ることができる。また、幹細胞は、分化誘導することができ、好ましくは多能性分化能を有する。本発明で得られる幹細胞は、CD14及びCD45が陽性である。

[0023] 本発明幹細胞の特徴としては、CXCR4遺伝子の有意に強い発現とNanog, Nestin, c-Kit, CD9及び Oct3/4の少なくとも1種、好ましくは少なくとも2種、より好ましくは少なくとも3種、さらに好ましくは少なくとも4種、特に好ましくはNanog, Nestin, c-Kit, CD9および Oct3/4遺伝子全てが発現されていることが挙げられる。

[0024] 好ましい本発明の幹細胞は、単球をM-CSF単独存在下で培養した場合に得られた幹細胞と比較した場合にCXCR4遺伝子が有意に強く発現され、さらにNanog, Nestin, c-Kit, CD9 およびOct3/4遺伝子の少なくとも1種、好ましくは少なくとも2種、より好ましくは少なくとも3種、さらに好ましくは少なくとも4種、特に好ましくは5種全てが発現されたものである。

[0025] より好ましい実施形態において、本発明幹細胞の特徴を以下に列挙する：

(i)単球をM-CSF単独存在下で培養した場合に得られた幹細胞と比較した場合、CXCR4遺伝子が有意に強く発現していること、

(ii) c-Kitを発現していること、および

(iii) Nanog, Nestin, CD9およびOct3/4からなる群から選ばれる少なくとも1種の未分化マーカーを発現していること。

[0026] 本発明の単球由来幹細胞と他の脱分化幹細胞との違いを特徴付けているのは、細胞のホーミング作用に関係するCXCR4遺伝子の強い発現である。本発明幹細胞は、単球をM-CSF単独存在下に培養して得られた幹細胞と比較した場合、CXCR4遺伝子が有意に強く発現している。例えば、本発明の1つの好ましい実施形態において、本発明の幹細胞は、RT-PCRで解析した場合に、CXCR4遺伝子の発現量はM-CSF単独、M-CSF+IL-3、M-CSF+IL-6&LIFなどに対して3倍以上、特に4倍以上の発現量を有している。また、本発明の1つの好ましい実施形態において、本発明の幹細胞は、骨髄由来の間葉系幹細胞と比較してもCXCR4遺伝子が有意に強く発現し、具体的にはRT-PCRで解析した場合に、CXCR4遺伝子の発現量は骨髄由来の間葉系幹細胞の2倍以上、好ましくは3倍以上である。

[0027] 本発明の単球由来幹細胞は他の脱分化幹細胞と同様に幹細胞マーカーであるc-Kitを発現していることを特徴とする。

[0028] CXCR4受容体に対するリガンドSDF1は、骨折時の損傷組織、循環系統の疾患、或いは神経組織の損傷部位などに発現していることが判明しており、細胞医薬の観点から本細胞の損傷部位へのホーミング効果をより強く持たせる上で、効果的である。

[0029] 本発明で得られる幹細胞は、患部に直接投与／注入することにより、疾患の治療に用いることができる。患部に注入する前には、幹細胞を適切な培地で培養し、数を増やしてから患部に直接投与／注入するのが好ましい。幹細胞の培養培地としては、一般的な細胞培養用の培地を使用することができるが、本発明の脱分化誘導培地で培養することが好ましい。

[0030] 本発明の一つの態様によれば、本発明の幹細胞を用いて治療され得ると考えられる疾患は）、外傷、炎症性疾患（膵炎、放射線損傷、皮膚筋炎、多発性筋炎、壊死性筋膜炎、慢性気管支炎）、骨・軟骨の損傷(例えば骨折、骨粗鬆症、骨軟骨骨折、骨軟骨炎)、循環器疾患（例えば拡張型心筋症、心筋梗塞、虚血性心筋症、心不全、心筋肥大、うっ血性心不全、再狭窄、不整脈、アテローム性動脈硬化症、血管炎など）、神経疾患（例えば末梢ニューロパシ

一、ニューロパシー痛、脳卒中、脳炎、髄膜炎、糖尿病性ニューロパシー、注意欠陥障害、自閉症、アルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルトーヤコブ病、脳または脊髄外傷もしくは虚血）、肝疾患（肝硬変、慢性肝炎）、腎疾患（慢性腎不全、糸球体腎炎、腎虚血）、糖尿病、アトピー性皮膚炎、GVHDなどが挙げられる。

[0031] なお、本発明脱分化幹細胞は、2009年9月30日に日本国〒305-8566茨城県つくば市東１丁目１番地１ 中央第６の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託した。受領番号 FERM ABP-11184。

[0032] 上記のように単球は、(i)M－CSFおよび(ii) ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種の存在下で培養することで幹細胞に誘導することができる。

[0033] 本明細書において、水溶性植物抽出物とは、植物の全草もしくはその一部(例えば葉、茎、地下茎、根茎、塊茎、つる、根、花、つぼみ、花弁、子房、果実、さや、さく果、種子、繊維、胚珠)の抽出物を意味する。抽出溶媒は、水または含水溶媒(例えば含水メタノール、含水エタノール、含水プロパノール、などの含水アルコール、含水ＴＨＦ、含水アセトン)、ＤＭＦ、ＤＭＳＯ、ジメチルアセトアミドなどの極性溶媒が挙げられ，これらの水、含水溶媒もしくは極性物質の溶解度の大きな極性溶媒により抽出される物質を意味する。水溶性植物抽出物は、クロロホルム、塩化メチレンなどの塩素化炭化水素、メタノール、エタノール、プロパノールなどのアルコール、ベンゼン、トルエンなどの芳香族炭化水素、酢酸エチルなどのエステル、ＴＨＦ，ジエチルエーテルなどのエーテル、アセトン、メチルエチルケトンなどのケトン、ヘキサン、シクロヘキサンなどの脂肪族もしくは脂環式炭化水素などで植物を抽出し、その後水もしくは含水溶媒で目的とする水溶性物質を抽出してもよい。水もしくは含水溶媒、極性溶媒などの抽出物は、必要に応じてクロロホルム、塩化メチレンなどの塩素化炭化水素、ベンゼン、トルエンなどの芳香族炭化水素、酢酸エチルなどのエステル、ＴＨＦ，ジエチルエーテルなどのエーテル、ヘキサン、シクロヘキサンなどの脂肪族もしくは脂環式炭化

水素で脂溶性成分を洗浄除去してもよい。好ましい水溶性植物抽出物は、植物由来Folch抽出水相画分もしくはその精製物である。

[0034] Folch抽出は、植物をクロロホルム：メタノール＝２：１で抽出し、この混合溶媒を水で洗浄して水相に移行した画分を意味する。クロロホルムは塩化メチレン、四塩化炭素、１，２-ジクロロエタンなどの他の塩素化炭化水素を用いてもよく、メタノールの代わりにエタノール、ｎ-プロパノール、イソプロパノール、ブタノールなどの低級アルコールを使用してもよい。また、塩素化炭化水素とアルコールの比も上記２：１に限定されることはなく、広い範囲が例示される。ここで、塩素化炭化水素とアルコールの混合溶媒は、物質の溶解能が高く、抽出を効率的に行うことができる。塩素化炭化水素とアルコールの比率は、ここに水を加えた場合に水相と有機相に分離し、水相に活性物質を抽出できる比率が好ましい。水を加えて２相に分離しない場合には、有機溶媒を加えて二層分離させればよい。水を加えて二層分離した水相を本明細書では「植物由来Folch抽出水相画分」という。なお、「植物由来Folch抽出水相画分」は、これと同様な活性物質を有する限り、別の方法で抽出した水相画分を包含する。

[0035] 本発明の水溶性植物抽出物は、糖脂質様物質（糖脂質と糖の一方または両方を含む）を有効成分として含む。この糖脂質様物質は有機溶媒に対する溶解度が低いため、水溶性植物抽出物は、水相画分として好ましく単離される。水溶性植物抽出物は、さらに、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを用いて更に精製することができ、このような精製物を有効成分として使用してもよい。

[0036] 水溶性植物抽出物の有効成分は、糖のみから構成されてもよく、糖とそれ以外の成分（脂質など）の両方を含んでいてもよい。糖の構成成分としては、グルコース、アラビノース、キシロース、リボース、ラムノース、フコース、デオキシリボース、マンノース、フルクトース、ガラクトース、マルトース、ラクトース、セロビオース、スクロース、トレハロース、ラフィノース、メリビオース、マルトトリオース、メレジトース、ツラノース、グルク

ロン酸、ガラクツロン酸、マンヌロン酸、イズロン酸、グルコサミン、ガラクトサミン、マンノサミン、Ｎ－アセチルグルコサミン、Ｎ－アセチルガラクトサミン、N-アセチルマンノサミン、ノイラミン酸、Ｎ－アセチルノイラミン酸などが挙げられ、これらは硫酸化されていてもよい。これらは、オリゴ糖または多糖、配糖体、糖脂質になっているのが好ましい。多糖としては、具体的にはグリコサミノグリカン、α－グルカン、β－グルカン、レバン、フルクタン、ガラクタン、マンナン、キシラン、アラビナン、ペクチン酸、アルギン酸、ペクチン質、グアラン(guaran)、硫酸化多糖、１種または２種以上の糖残基が結合した多糖、あるいは上記の糖残基の1種または2種以上を繰り返し単位とする多糖、複数の糖残基が複雑に結合した多糖が挙げられる。水溶性植物抽出物は、抽出後に陽イオン交換樹脂で処理することが望ましい。1つの実施形態で、本発明の水溶性植物抽出物は、好ましくは陰イオン交換樹脂で吸着される（水中でアニオン基を有する）成分が有効成分として含まれる。別の実施形態で、本発明の水溶性植物抽出物は、好ましくはCon Aアガロースに結合する成分が有効成分として含まれる。本発明の好ましい実施形態において、水溶性植物抽出物は、陰イオン交換樹脂で吸着され、かつ、Con Aアガロースに結合する成分が有効成分として含まれる。Con Aアガロースに結合する有効成分は、グルコース残基及び/又はマンノース残基、特にマンノース残基を含む多糖もしくは糖質(糖脂質などの複合糖質を含む)が好ましい。好ましい実施形態では、水溶性植物抽出物は、糖残基を含み冷水もしくは熱水に可溶性(抽出可能)である成分を含み、分子量は、下限が500、1000、2000、3000、4000または5000程度であり、上限は、500000、300000、200000、100000、80000、60000、50000、40000、30000または20000程度の多糖または複合多糖を含むものが好ましく例示される。

[0037] ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種の存在下で培養することで幹細胞に誘導することができる。

[0038] 生体内(例えばヒト)では、Ｍ－CSFが既に存在しているので、ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種は、単球か

ら幹細胞への誘導剤として働くことができ、この幹細胞が疾患部位に到達することで、各種の疾患の治療剤として機能する。ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種を有効成分とする治療剤は、外傷、炎症性疾患（膵炎、放射線損傷、皮膚筋炎、多発性筋炎、壊死性筋膜炎、慢性気管支炎）、骨・軟骨の損傷(例えば骨折、骨粗鬆症、骨軟骨骨折、骨軟骨炎)、循環器疾患（例えば拡張型心筋症、心筋梗塞、虚血性心筋症、心不全、心筋肥大、うっ血性心不全、再狭窄、不整脈、アテローム性動脈硬化症、血管炎など）、神経疾患（例えば末梢ニューロパシー、ニューロパシー痛、脳卒中、脳炎、髄膜炎、糖尿病性ニューロパシー、注意欠陥障害、自閉症、アルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルトーヤコブ病、脳または脊髄外傷もしくは虚血）、肝疾患（肝硬変、慢性肝炎）、腎疾患（慢性腎不全、糸球体腎炎、腎虚血）、糖尿病、アトピー性皮膚炎、GVHDの治療に有用である。

[0039] ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種を有効成分とする治療剤の有効量は、その用法、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度等により適宜選択されるが、通常有効成分の量がヒト成人の体重１ｋｇあたり0.0001～100mg程度、好ましくは0.001～10mg程度、より好ましくは0.01～5mg程度である。該治療剤は１日に１～４回に分けて投与することができる。

[0040] 植物由来Folch抽出水相画分は、同様な方法で抽出した植物抽出物を広く包含する。なお、植物由来Folch抽出水相画分を含む水溶性植物抽出物の有効成分は陰イオン交換樹脂、Con Aアガロースに結合する性質を有し、陽イオン交換樹脂を通すことにより活性が上昇し得る。

[0041] 本発明の治療剤ないし医薬組成物は、これを医薬製剤として実用する場合、ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種と必要に応じてM-CSFを含む有効成分と共に製剤担体を用いて一般的な剤形(dosage form)とすることができる。該製剤担体としては剤形に応じて、通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢

剤等の希釈剤あるいは賦形剤を例示でき、これらは得られる剤形の投与単位形態に応じて適宜選択使用される。

[0042] 本発明剤形としては、各種の形態(form)が治療目的に応じて選択でき、その代表的なものとしては錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注射剤（液剤、懸濁剤等）、軟膏剤等が挙げられ、之等は何れも常法に従い、上記適当な担体を用いて調製できる。また、錠剤は必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フイルムコーテイング錠あるいは二重錠、多層錠とすることもできる。本発明薬剤が液剤、乳剤、懸濁剤等の注射剤として調整される場合、之等は殺菌され且つ血液と等張であるのが好ましく、等張性の溶液を調整するに充分な量の食塩、ブドウ糖あるいはグリセリンを本発明医薬組成物中に含有させてもよく、また通常の溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤等を添加してもよい。更に、本発明の医薬組成物には、必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他の医薬品を含有させることもできる。また、ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種とM-CSFを両方とも投与する場合には、これらは同時に投与してもよく、別々に投与してもよい。

[0043] ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種は、食品形態、例えばドリンク類やブロック(サプリメントブロック)等の形態で摂取されてもよい。このような食品組成物は、常法に従って調製でき、その調製には一般的によく知られている他の食品素材（原料成分）、賦形剤、希釈剤等を適宜利用できる。

[0044] 脱分化幹細胞は(i)M-CSFおよび(ii)ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種の共存下前述原料細胞を一定期間培養することにより脱分化誘導して得ることができる。

[0045] M-CSFは、分子量約22000の膜結合型、分子量約42000の分泌型があり、これらはジスルフィド結合により分子量約45000(22000の二量体)、約85000(42000の二量体)、85kDa型にさらにプロテオグリカンが結合した高分子量型があり

、これらのいずれを使用してもよい。好ましくは分子量約42000の分泌型、分子量約85000(42000の二量体)、85kDa型にさらにプロテオグリカンが結合した高分子量型が使用できる。また、M-CSFの由来は、哺乳動物（ヒト、ウマ、ウシ、サル、チンパンジー、ブタ、ヒツジ、ウサギ、マウス、ラット、イヌ、ネコ）が挙げられ、好ましくは、ヒト、サル、チンパンジーなどの霊長類が挙げられ、特にヒトが好ましい。M-CSFは、天然物を精製して使用してもよいが、遺伝子組換え的に製造したものが好ましく用いられる。例えばM-CSFは少なくともN末端から１５３番目辺りまでのアミノ酸があれば、天然型と同程度の比活性を有することが判明しており、このような糖鎖を持たない大腸菌発現の組換え体などを例示することが出来る。

[0046] ガングリオシドの種類としては、GM1, GD1a, GT1bなど以下に記載したものであれば特に制限はない。さらにこれらの混合物でも良くこれら混合物を使用しても問題はない。更に、植物由来抽出成分（植物由来糖脂質様物質）でも強く脱分化を誘導させることができる。また、動物組織由来抽出物（動物由来糖脂質様物質）を使用してもよい。該抽出物は、糖脂質様物質を抽出するための一般的な条件下で調製し得る。本発明の医薬の有効成分は、ガングリオシドもしくは水溶性植物抽出物であり、これらが含まれている成分であれば、植物抽出物、動物組織抽出物のいずれも使用できる。例えばガングリオシドは動物の脳・神経組織に豊富に含まれ、動物の脳・神経組織由来の抽出物がガングリオシドとして使用できる。抽出物のガングリオシドは精製したものであってもよく、ガングリオシドを含む糖脂質成分が含まれるさまざまな精製度の画分を使用できる。抽出成分としては、一般的に糖脂質様物質の抽出されてくる条件で、得られる画分を使用すればよい。天然の抽出画分としては、例えば、Folch抽出法（非特許文献５）による水相画分を挙げることができる。動物としては、哺乳動物(ウシ、ブタ、ウサギ、ヒツジ、ウマなど)が好ましく例示され、ブタの脳・神経組織由来のガングリオシドが特に好ましい。また、牛乳のような哺乳動物のミルク由来のガングリオシドを使用することもできる。

[0047] ガングリオシドもしくは糖脂質様物質の材料(material)となる水溶性植物抽出物としては、好適にはサツマイモ(sweet potato)、シモン芋(Ipomea Batatas sp)、アサガオ(morning-glory)、アサガオナ(swamp morning-glory)、モミジヒルガオ（Ivy-leaved morning glory）、ヤツデアサガオ(fingerleaf morning glory)、ホザキアサガオ(cardinal climber)、ソライロアサガオ（blue morning glory）、琉球朝顔（Ipomoea congesta）などのヒルガオ科、ハス（Nelumbo nucifera）（レンコン（lotus root））、キバナハス(Nelumbo lutea)などのハス科、アメリカイヌホオズキ(Solanum americanum)、トマト（Solanum lycopersicum)、ツノナス(Solanum mammosum)、ナス（Solanum melongena)、イヌホオズキ(Solanum nigrum)、ジャガイモ(Solanum tuberosum)、トウガラシ(Capsicum annuum)、キダチトウガラシ(Capsicum frutescens)、チョウセンアサガオ(Datura metel)、アメリカチョウセンアサガオ(Datura meteloides)、シロバナヨウシュチョウセンアサガオ(Datura stramonium)、コダチチョウセンアサガオ(Brugmansia arborea)、キダチチョウセンアサガオ(Brugmansia suaveolens)、ホオズキ(Physalis alkekengi var. francheti i)、イガホオズキ(P. japonicum)、ペチュニア(Petunia x hybrida)などのナス科の植物の抽出物を挙げることができる。上記の植物は単なる例示であり、ガングリオシドまたは糖もしくは糖脂質を有する水溶性植物抽出物を広く使用することができる。植物は、葉、茎、地下茎、根茎、塊茎、つる、根、花、つぼみ、花弁、子房、果実、さや、さく果、種子、繊維、胚珠、全草などが挙げられ、これらのいずれを抽出してもよい。

[0048] 例えば、サツマイモ、ジャガイモなどのイモ類は、必ずしも芋の部分である必要はなく葉、茎、地下茎、根茎、塊茎、つる、根、花、つぼみ、花弁、子房、果実、さや、さく果、種子、繊維、胚珠、全草などのいずれであっても良い。

[0049] 植物として、例えばガングリオシドもしくは糖脂質様物質を多く製造できるように必要な遺伝子を導入および/または必要でない遺伝子をノックアウトした遺伝子組み換え植物を使用することもできる。

[0050] ガングリオシドは、シアル酸を有するスフィンゴ糖脂質の総称であり、種類としてはGD1a、GD1b、GD2、GD3、GM1、GM2、GM3、GT1b、およびGQ1bなどがある。また、各ガングリオシドは以下の構造を有するものである。

GD1a=aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer

GD1b=bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer

GD2=bDGalpNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer

GD3=aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer

GM1=bDGalp(1-3)bDGalNAc[aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer

GM2=bDGalpNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer

GM3=aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer

GT1b=aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer

GQ1b=aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer

aNeu5Ac = 5-アセチル-α-ノイラミン酸 (5-acetyl-α-neuraminic acid)

aNeu5Ac9Ac = 5,9-ジアセチル-α-ノイラミン酸 (5,9-diacetyl-α-neuraminic acid)

bDGalp = β-D-ガラクトピラノース (β-D-galactopyranose) 7

bDGalpNAc = N-アセチル-β-D-ガラクトピラノース (N-acetyl-β-D-galactopyranose)

bDGlcp = β-D-グルコピラノース (β-D-glucopyranose)

OCer = セラミド (general N-acylated sphingoid)

[0051] 使用培地は、哺乳動物細胞用培地であれば特に制限はないが、例えばRPMI 1640, DMEM, イーグルMEM, αMEM, IMEM, M199の各培地に血清成分例えばFBS, FCS, CS, HSなどを1～20%程度加えることにより培養することが可能である。好適な事例としては１０%前後のFBSを含むDMEM培地中にての培養を挙げ

ることが出来るが、この限りではない。さらに無血清培地を使用することも可能である。無血清培地の例としては、哺乳動物培養用としてUltraCULTURE™を例示することができるが、特に制限はない。

[0052] 培養条件としては、(i)M－CSFおよび(ii)ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種を含む培地中で、好適には5%CO_2存在下、３７℃にて７日～14日程度単球を培養することにより、脱分化幹細胞を得ることができる。つまり、この培養期間で脱分化が進行し、上記本発明で特定した未分化マーカーを発現した幹細胞を得ることができる。さらに、この培養期間に本発明幹細胞を特徴付けるCXCR4遺伝子の発現が著しく上昇するが、この後培養期間を延ばした場合でもCXCR4遺伝子が高度に発現していれば、本発明幹細胞に該当する。

[0053] また、このような条件で原料細胞を培養した場合、最終的に得られる幹細胞数はM-CSF単独或いは他のサイトカインとの組合せで培養した場合に比べて約５倍の幹細胞を得ることができる。

[0054] なお、脱分化誘導剤としてM-CSFとガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種が共有結合又は非共有結合的に結合した複合体を使用することもできる。

[0055] 単球をM-CSF単独で培養した場合でも脱分化幹細胞が得られるという報告があるが、本発明は(i)M-CSFと(ii)ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種を組み合わせることにより、特にCXCR4遺伝子を強く発現した幹細胞を得ることができる。培養条件としては、M-CSFを5-100 ng/mlの濃度で使用することができ、好適には25 ng/mlで培養することが好ましい。ガングリオシドは、植物、動物などに由来する抽出物などの混合物を用いてもよく、天然のガングリオシド含有材料を精製して用いてもよく、化学合成して用いてもよい。

[0056] ガングリオシドは、最終濃度1-100 μg/ml程度で培地に使用される。水溶性植物抽出物は最終濃度0.1-100 μg/ml程度で培地に使用される。

[0057] ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも

１種の量としては、最終濃度1-100 ug/ml程度で培養することができる。なお、本明細書において「ガングリオシド」は、GD1a、GD1b、GD2、GD3、GM1、GM2、GM3、GT1b、GQ1bなどのガングリオシド単品と、これらの混合物の両方の意味に用いられる。ガングリオシドの量は、その中のガングリオシド量を意味し、ガングリオシドが複数ある場合にはその総量を意味する。

[0058] キット

本発明はまた、本発明の幹細胞を必須構成成分とする細胞医薬用キット、(i)M-CSFおよび(ii)ガングリオシド水溶性植物抽出物を必須構成成分とする脱分化細胞産生キットを提供する。

[0059] 細胞医薬用キットは、本発明の単球由来の幹細胞を必須構成成分として含み、必要に応じてさらに(i)M-CSFと(ii)ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種を含む培地、培養容器などが含まれていてもよい。あるいは、単球由来の幹細胞を注射器に充填した形態であってもよい。

[0060] 細胞医薬用キットに含まれる単球由来の幹細胞の数は、1つのキットあたり、例えば1×10^4～1×10^7個程度である。

[0061] 本発明の脱分化細胞産生キットは、(i)M-CSFおよび(ii)ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種を必須構成成分とし、さらに必要に応じて細胞培養培地、培養容器、単球などを含んでいてもよい。

産業上の利用可能性

[0062] ・本細胞の適用分野

幹細胞の適応できる分野全般に関して使用することが可能である。特に、近年話題になっている細胞医薬の分野での使用を考えることができ、このような分野での使用の場合においては、短期間に使用細胞を作製し提供する必要がある。しかも、拒絶反応の問題を考慮すれば、自己細胞を使用し脱分化幹細胞を調製した後生体に戻す手法がもっとも安全面で重要である。自己細胞を摂取した後短期間にある程度まとまった幹細胞を生産できることが重要に

なる。本発明は、このような観点からも重要である。

[0063] 本発明の具体的使用態様の一つとしては、脱分化細胞の静脈内投与を行えば良い。

[0064] 細胞の投与形態について、目的細胞を培養により得た後、使用細胞を適宜常法に従って播種することができる。例えば、トリプシン処理後細胞を回収し遠心分離により細胞を回収した後適当な等張液に分散させた後、例えば静脈内投与することも可能である。更に、その際適当な薬学的に許容できる担体を添加することにより、細胞を安定化できるのであれば使用することも可能である。

[0065] また、培養により得られた細胞は培養液中から回収後、適当な投与時期に時間差のある場合は、常法に従い液体窒素存在下或いは－８０℃において保存しておくことも可能である。好適には単球を脱分化培養開始後７日～１４日の間に細胞を回収し直ちに目的の治療に用いることが望ましい。なぜならば、CXCR4遺伝子の発現レベルがこの間最大限に達する可能性が高いからである。その意味において、当該遺伝子マーカーの発現レベルを勘案し、培養期間に限定されずに当該幹細胞の使用期間を決定することもできる。

[0066] ・治療剤／医薬組成物の適用分野

本発明は、ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種と必要に応じたM－CSFをヒトなどの哺乳動物に投与することにより、外傷、炎症性疾患、骨・軟骨の損傷、循環器疾患、神経疾患、肝疾患および腎疾患、糖尿病、アトピー性皮膚炎、GVHDなどの疾患を治療することができる。これは、投与される被験体の単球、必要に応じて更にM-CSFがガングリオシド及び植物由来Folch抽出水相画分からなる群から選ばれる少なくとも１種の作用により、前記疾患を修復可能な幹細胞に変化し、これが疾患部位に移動して治療剤として作用する。あるいは、ガングリオシド及び植物由来Folch抽出水相画分からなる群から選ばれる少なくとも１種が、単球以外の細胞に直接または間接的に作用することも否定しない。

[0067] ・キットとしての使用に関して

本脱分化誘導剤において作製された脱分化幹細胞は適当な保存処理を施された後にキットとして使用することができる。

[0068] また、同時に脱分化誘導剤に関しても、必須構成成分として含むキットとしてキット化することができる。

実施例

[0069] 以下、本発明を実施例に基づいてより詳細に説明するが、本発明がこれら実施例に限定されないことはいうまでもない。

[0070] 実施例１

ヒト単球（LONZA社、PT038）を本発明に従い、以下の添加物1から5を基礎培地に添加して培養を行った(濃度は最終濃度(以下「FC」で示す)として表す)。結果を図1に示す。図1の縦軸は、生細胞数に相当し、横軸は、培養日数である。ファンドリッヒ（Fandrich）やフーバーマン（Huberman）らによって報告された方法と比べてみても、本発明の単球由来幹細胞の増殖性は、非常に高いことが判る。

添加物1: M-CSF(FC: 25ng/ml)+Gangliosides (Bovine Brain GD1a SIGMA)（FC: 100ug/ml)

添加物2: M-CSF（FC: 5ng/ml）+IL-3（FC: 0.5ng/ml）（非特許文献２）

添加物3: M-CSF(FC: 25ng/ml)+IL-6（FC: 20ng/ml）&LIF（FC: 1000unit/ml）（非特許文献３）

添加物4: M-CSF(FC: 25ng/ml)

添加物5: M-CSF(FC: 25ng/ml)+糖脂質（植物(サツマイモ)の乾燥重量1gのFolch抽出水相画分を培地500ｍｌに溶解したもの)

[0071] なお、添加物５で用いたFolch抽出水相画分は、凍結乾燥した細胞（サツマイモ植物組織）を適量の生理食塩水で、よくホモジナイズした後に、等容量のクロロホルム・メタノール2:1溶液と激しく混ぜ合わせて、遠心分離によって有機溶媒相、変性蛋白質相、水相に分離後、上層の水溶性画分に抽出され得る成分を用いた。

[0072] 添加物はすべて、DMEM(20% Fetal Bovine Serum)に添加して、ヒト単球を1

.5x10^5/ml (200ul/well 、96well Plate)にて培養を開始した。生細胞のカウントは、プロメガ社のCellTiter-Glo™Luminescent Cell Viability Assayを用いて、定量化した。すなわち、各培養日ごとに接着していない細胞を生理食塩水にてwellを3回洗浄して除去した後に、接着・増殖した細胞を定量化した。

[0073] 一方で、本発明および従来技術による培養方法にて得られる幹細胞の遺伝子発現をRT-PCRにて解析を行った。ヒト単球は、上記条件で、1.5x10^5/ml (6ml/ Dish、直径6cm) にて培養を開始し、14日目にmRNAを回収し (Invitrogen社 : Micro Fast Track 2.0 Kit) 、引き続きRT-PCRによる発現量解析を行った。項目およびプライマーの配列情報は、下記の通りである。

Nanog F 5′-GCTTGCCTTGCTTTGAAGCA-3′ (配列番号１)
R 5′-TTCTTGACTGGGACCTTGTC-3′ (配列番号２)
Nestin F 5′-CTCTGACCTGTCAGAAGAAT-3′ (配列番号３)
R 5′-GACGCTGACACTTACAGAAT-3′ (配列番号４)
Oct3/4 F 5′-GAGCAAAACCCGGAGGAGT-3′ (配列番号５)
R 5′-TTCTCTTTCGGGCCTGCAC-3′ (配列番号６)
c-Kit F 5′-CCAAGTCATTGTTGGATAAG-3′ (配列番号７)
R 5′-CTTAGATGAGTTTTCTTTCAC-3′ (配列番号８)
CXCR4
F 5′-ATCTTCCTGCCCACCATCTACTCCATCATC-3′ (配列番号９)
R 5′-ATCCAGACGCCAACATAGACCACCTTTTCA-3′ (配列番号１０)

レーン構成(濃度は最終濃度(以下「FC」で示す)として表す)

1: M-CSF(FC: 25ng/ml)+Gangliosides (Bovine Brain GD1a SIGMA) (FC: 100ug/ml)

2: M-CSF(FC: 5ng/ml)+IL-3(FC: 0.5ng/ml) (非特許文献２)

3: M-CSF(FC: 25ng/ml)+IL-6(FC: 20ng/ml) +LIF(FC: 1000unit/ml) (非特許文献３)

4: M-CSF(FC: 25ng/ml)

5: M-CSF(FC: 25ng/ml)+ 植物由来Folch抽出水相画分

6: No Culture

7: No Culture

1-6:ヒト単球、7:ヒト骨髄（Clontech社 Human Bone Marrow Marathon-Ready cDNA）

[0074] 結果を図2に示す。図2の結果より、本発明（レーン１又はレーン５）により得られた幹細胞はCXCR4の発現量が極めて高いことが実証された。

[0075] 次いで、様々なガングリオシドによる幹細胞誘導活性の比較を行った。

[0076] 即ち、ガングリオシドを終濃度、100ug/mlになるように培地に添加し、末梢血単球を培養した。

rhM-CSFは、終濃度25ng/mlになるように添加した。その結果、培養二週間目の生細胞の数をcell-titer Glo（Promega社）によってルシフェラーゼ活性として定量化した。つまり、GM1、GD1a、GT1bおよびそれらのMixを用いて培養を行ったが、いずれにも同程度に、強い幹細胞誘導活性を示した（図３）。また、細胞の形態にも差は認められなかった（写真は培養二週間目）（図４）。

[0077] 図3のレーン構成は、以下のとおりである(濃度は最終濃度(以下「FC」で示す)として表す)。

1: GM1（FC: 25ng/ml）、

2: GD1a（FC: 25ng/ml）、

3: GT1b FC: 25ng/ml）、

4: GM1, GD1a, GT1bの等量混合物(Mix)、合計のFC: 25ng/ml）、

5: M-CSFのみ、

6: 血清のみ。

[0078] 種々の植物由来抽出物による幹細胞誘導活性

レンコン、琉球朝顔の茎からの抽出は、いずれも前述サツマイモの茎と同条件にて抽出した。尚、活性の比較は、抽出に用いた乾燥重量を元に標準化した。

[0079] 比活性は、細胞増殖活性をサツマイモ茎抽出物を100とした値である。

[0080] 図５から判るように、レンコン、琉球朝顔の茎からも同様の幹細胞誘導活性を確認した。

[0081] 本有効成分の1つの特徴は、Folchの抽出方法による水相に主に抽出されることである。水溶性植物抽出物はいくつかのカラムクロマトグラフィーにより分画、分離又は精製可能である。すなわち、水溶性植物抽出物の有効成分は、陰イオン交換樹脂（Q-Sepharose、DEAE-Sepharoseなど）、レクチン結合樹脂（Con Aなど）に広範囲なpH領域で結合することを特徴とする。

[0082] 図６は、有効成分と結合能を有する樹脂に抽出液をアプライし、素通り画分の活性を評価した結果である。すなわち、陰イオン交換樹脂、Con Aアガロースに有効成分が結合することにより、素通り画分に活性が消失することが判った。陽イオン交換樹脂により阻害因子が取り除かれたことが示唆され、活性は上昇している。

[0083] サツマイモ茎抽出物の活性を100として、算出した。陽イオン交換樹脂の素通り画分で、活性が上昇しているのは、阻害物質が取り除かれたと示唆される。陰イオン交換樹脂、レクチンのCon A樹脂の素通り画分では、活性が消失しており、活性因子が保持されたことを示しうる。

[0084] 実施例２

幹細胞投与動物モデルによる治癒効果（肝硬変モデルマウスを用いた治療試験例）

四塩化炭素（1ml/kg体重）週2回投与を12週間連続して実験用マウスに人為的に肝硬変を引き起こす。この肝硬変モデルマウスに本発明のヒト単球由来脱分化幹細胞(hMDDSC)を尾静脈より2回投与し（1投与後1週間目に2回目、1個体あたり1 x 10^5細胞）、2回目の投与後１週後（最初の投与から2週間目）に肝臓を採取し、組織切片による病理解析と生化学的分析を行った。四塩化炭素によって誘導された肝炎では、ウイルス性肝炎同様に炎症部でSDF1（Stromal cell derived factor-1）が高発現することが報告されており（Jung et al., 2006）、本発明のhMDDSCはSDF1のレセプターであるCXCR4を高発現してい

るため、これらの結合を介してhMDDSCが炎症部に集積し、組織周囲に治癒効果を及ぼすことが期待される（Kollet et al., 2003; Nervi et al., 2006）。

[0085] 血中マーカーで検出できる肝機能について、GOT/GPT値については四塩化炭素投与終了後速やかに低下して正常値に戻るため、2週間の治療処置後には既にほぼ正常値を示し、試験群間で計測値の大きな差異は認められなかった。しかし下記に示すようにこの12週間の薬物処理により肝組織中では強度の線維化が起き、肝硬変状態になっている。その肝中に発達した線維状組織の低下と除去に本発明のhMDDSCは劇的な効果を示した。

[0086] １．病理組織解析

採取固定されたマウス肝臓からパラフィン切片を作製し、抗コラーゲンI抗体で線維構造の主成分であるコラーゲン線維を検出した（図７、茶褐色）。同時に細胞核を青色に染色した（ヘマトきシレン染色）。

上段は肝硬変誘導後hMDDSC投与を行わず生理食塩水を投与した対照実験、下段はhMDDSCを2回静脈投与したのもの各3例を示した。hMDDSC投与により抗コラーゲン抗体で検出される太い線維束（上段矢印）が顕著に消失している。

[0087] また同じ肝臓切片でAzan/Mallory染色を行い、画像解析顕微鏡（KeyenceBZ 9000）により青色に染色される線維組織部分の面積計算を行った（表１）。

[0088] [表1]

表 1、Azan/Mallory 染色による線維部分画像解析結果

	Saline	hMDDSC	Normal
Blue pixels	40006.1	30676.7	5718
SE	16131.3	1813.4	1351.31

n=7, 1400000 pixels/full frame

[0089] 四塩化炭素処理をしていない正常対照群（Normal）に比べると5倍以上の数値を示しているが、hMDDSC投与群では生理食塩水投与群(Saline)よりも23%も線維組織量が減少している。

２．生化学的解析

Ａ）III型プロコラーゲンペプチド

同様マウスモデルによる肝硬変治療実験で血中のIII型プロコラーゲンペプチドの血中濃度を測定した。III型プロコラーゲンペプチド(Pro-collagen type III peptide (PIIIP)) はコラーゲン前駆体に存在する末端ペプチドであり、コラーゲン産生時に消化されてペプチドとして血中、組織中に遊離するため、コラーゲンの生産量を反映したマーカーとして用いられている (Giannini et al., 2001) 。2週間の治療試験直後のマウス尾部より血液を採取し、血漿中のPIIIPをELISA法(CUSABIO CSB-E08095)により測定した (表２) 。

[0090] [表2]

表２、血中III型プロコラーゲンペプチド量

	Saline	hMDDSC	Normal
ng/mL (血漿)	283.5	64.2	57.45
SE	144	24.15	29.1

n=7

[0091] 肝硬変誘導後に生理食塩水投与の対照群(Saline)が正常対照群(Normal)マウスの約5倍の高値を示しているのに対して、hMDDSC投与によって血中プロコラーゲン量は劇的な減少を示し、健康マウスに近い数値を示した。生理食塩水投与群が高値を示す事から、四塩化炭素刺激による肝硬変誘発の停止後もしばらくはコラーゲンの分子の異常な高生産が継続していることが伺える。しかし、hMDDSC投与によってこの異常なコラーゲン高生産が速やかに抑制され、正常レベル近くまで下がっていることがわかる。

[0092] Ｂ) ヒドロキシプロリン

肝組織内部の総線維量を組織から直接的に定量する目的で、コラーゲンの構成分子であるヒドロキシプロリンの肝組織中の含有量を測定した。2週間の治療処置後採取された肝臓を破砕均質化し、水酸化ナトリウム処理によって含有タンパク質を分解し、Chloramine T とdimethylaminobenzaldehydeのヒドロキシプロリン特異的呈色反応によりヒドロキシプロリン濃度を測定した (表3、Reddy et al, 1996) 。

[0093]

[表3]

表３、 肝組織中ヒドロキシプロリン量

	Saline	hMDDSC	Normal
ug/(g)liver	884.4	684	222
SE	90.2	67.0	8.4

n=7

[0094] 正常対照群(Normal)の数値に比べれば3倍と依然非常に高値ではあるものの、生理食塩水投与対象群(Saline)に比してhMDDSC投与群は22.6%もの減少、つまり肝線維化の改善が検出された。

[0095] 前記肝硬変モデルマウスに、サツマイモ茎のFolch抽出水相画分を6.6mg/kg尾静脈から投与したところ、肝硬変が軽減されていることを本発明者は確認した。

[0096] ３．結論

マウス肝硬変モデルにおいて本発明のhMDDSCを用いた治療はこのようにわずか2投与2週間の治療処置/期間で、大幅な線維生産の抑制と、線維組織の除去減少を引き起こすことを特徴とする。その結果、肝硬変状態からの速やかな脱出と正常肝組織への修復に働き、肝再生を促す画期的な治療システムである。

[0097] ４．引用文献

Jung YJ, Ryu KH, Cho SJ, Woo SY, Seoh JY, Chun CH, Yoo K, Moon IH, Han HS. Syngenic bone marrow cells restore hepatic function in carbon tetrachloride-induced mouse liver injury. Stem Cells Dev. 2006, 15, 687-695.

Kollet O, Shivtiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. J Clin Invest. 2003, 112, 160-169.

Nervi B, Link DC, DiPersio JF. Cytokines and hematopoietic stem cell

mobilization. J Cell Biochem. 2006, 99, 690-705.

Giannini E, Caglieris S, Ceppa P, Risso D, Lantieri PB, Testa R. Serum pro-collagen III peptide levels are related to lobular necrosis in untreated patients with chronic hepatitis C. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2001, 13, 137-141.

Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. Clin Biochem. 1996, 29, 225-229.

請求の範囲

[請求項1] 単球を(i)M－CSFおよび(ii)ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種の存在下で培養し、脱分化させることにより得られる幹細胞。

[請求項2] 水溶性植物抽出物の単球を脱分化させる有効成分が糖もしくは複合糖質である、請求項１に記載の幹細胞。

[請求項3] 水溶性植物抽出物の単球を脱分化させる有効成分の分子量が1000～500000である請求項１に記載の幹細胞。

[請求項4] 水溶性植物抽出物の単球を脱分化させる有効成分が、ConAカラムに吸着される、請求項１に記載の幹細胞。

[請求項5] 水溶性植物抽出物の単球を脱分化させる有効成分が、アニオン交換樹脂に吸着される請求項１に記載の幹細胞。

[請求項6] 水溶性植物抽出物が植物由来Folch抽出水相画分もしくはその精製物である、請求項１に記載の幹細胞。

[請求項7] 単球がヒト単球である請求項１記載の幹細胞。

[請求項8] 未分化マーカーNanog, Nestin, c-Kit, CD9, Oct3/4の少なくとも１種を発現しており、単球をM-CSF単独存在下培養した場合に得られた幹細胞と比較した場合、CXCR4遺伝子が有意に強く発現していることを特徴とする請求項１～７のいずれかに記載の幹細胞。

[請求項9] 未分化マーカーNanog, Nestin, c-Kit, CD9, Oct3/4の少なくとも１種を発現し、かつCXCR4遺伝子が有意に強く発現していることを特徴とする幹細胞。

[請求項10] 単球を(i)M－CSFおよび(ii)ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種の存在下で培養することを特徴とする幹細胞の生産方法。

[請求項11] 培養期間が７日から１４日間である請求項６記載の方法。

[請求項12] (i)M－CSFおよび(ii)ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種を含む単球の脱分化誘導培地。

[請求項13] 請求項１～９のいずれかに記載の幹細胞を有効成分として含有する医薬組成物。

[請求項14] 請求項１～９のいずれかに記載の幹細胞を有効成分として含有する細胞医薬用剤。

[請求項15] (i)M－CSFおよび(ii)ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種を有効成分とする脱分化誘導剤。

[請求項16] ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種を有効成分とする細胞、組織もしくは器官の損傷に関係する疾患の治療剤。

[請求項17] 前記疾患が外傷、炎症性疾患、骨・軟骨の損傷、循環器疾患、神経疾患、肝疾患および腎疾患、糖尿病、アトピー性皮膚炎、GVHDからなる群から選ばれる、請求項１６に記載の治療剤

[請求項18] 前記疾患が外傷、膵炎、放射線損傷、皮膚筋炎、多発性筋炎、壊死性筋膜炎、慢性気管支炎、骨折、骨粗鬆症、骨軟骨骨折、骨軟骨炎、拡張型心筋症、心筋梗塞、虚血性心筋症、心不全、心筋肥大、うっ血性心不全、再狭窄、不整脈、アテローム性動脈硬化症、血管炎、末梢ニューロパシー、ニューロパシー痛、脳卒中、脳炎、髄膜炎、糖尿病性ニューロパシー、注意欠陥障害、自閉症、アルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルトーヤコブ病、脳または脊髄外傷もしくは虚血、肝硬変、慢性肝炎、慢性腎不全、糸球体腎炎、腎虚血、糖尿病、アトピー性皮膚炎、GVHDからなる群から選ばれる、請求項１６に記載の治療剤。

[請求項19] 少なくとも請求項１～９記載の幹細胞を必須構成成分とする細胞医薬用キット。

[請求項20] (i)M－CSFおよび(ii)ガングリオシド及び水溶性植物抽出物からなる群から選ばれる少なくとも１種を必須構成成分とする脱分化細胞産生キット。

[請求項21] さらに単球を構成成分として含む請求項２０記載のキット。

[請求項22] ガングリオシドがGD1a、GD1b、GD2、GD3、GM1、GM2、GM3、GT1b、およびGQ1bからなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項１～２１のいずれかに記載の幹細胞、幹細胞の生産方法、単球の脱分化誘導培地、細胞医薬用剤、治療剤、脱分化誘導剤、細胞医薬用キットまたは脱分化細胞産生キット。