

明 細 書

発明の名称：褥瘡の予防剤及び／又は治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、間葉系幹細胞の培養上清を有効成分とする、褥瘡の予防剤及び／又は治療剤に関する。より詳細には、間葉系幹細胞に遺伝子を導入して作製した不死化幹細胞の培養上清を、有効成分とする褥瘡の予防剤及び／又は治療剤に関する。

背景技術

[0002] 現在の社会では、高齢化が進んだことにより、種々の疾患に罹患する高齢者が増加する傾向がある。そして、高齢者の場合、寝たきりになると、褥瘡の問題が生じる。「褥瘡」とは、寝たきり等になったことに起因して、体重で圧迫されている体の部位の血流が悪くなったり滞ったりし、それによって体重で圧迫されている部位の皮膚の一部が赤い色味を帯びたり、ただれたり、傷ができてしまうことをいう。一般的に、「床ずれ」とも言われる。

[0003] 健常人の場合、睡眠中であっても無意識のうちに寝返りを打つ、長時間椅子に座っているときはお尻を浮かせる等の動作を行って、同じ部位に長い時間の圧迫が加わらないように、「体位変換」を行っている。

しかし、自分で体位変換が行えなくなると、長時間、体重で圧迫された皮膚の細胞に十分な酸素や栄養が補給されず、これによって「褥瘡」が形成される。「褥瘡」は皮膚の表面のみならず、皮膚の中にある骨に近い組織が傷ついて形成されることもある。

[0004] 長期間寝たきりの患者のみならず、抗がん剤やステロイド等の薬の副作用で免疫力が低下している患者、うっ血性心不全、骨盤骨折、脊髄損傷、糖尿病、脳血管疾患、慢性閉塞性肺疾患等に罹患している患者は、褥瘡になりやすいため注意が必要である。これは、褥瘡の形成が細菌等の感染路となるからに他ならない。このため、どのような褥瘡が形成されているかによって、薬剤の塗布、ドレッシング材による被覆等の保存的治療、及び切除及び組織

再建等の外科的治療が行われている。

- [0005] 褥瘡の治療剤としては、亜鉛華軟膏、オルセノン（登録商標）軟膏、リフ
ラップ（登録商標）軟膏、アクトシン（登録商標）軟膏その他のマクロゴー
ル軟膏、トレチノイントコフェリル、リゾチーム塩酸塩等の化合物が、褥瘡
の部位の状態に応じて他の薬剤と併用して使用されている。
- [0006] 一方で、近年、化合物ではなく、生体物質を利用したバイオ医薬品を用い
る治療法が行われるようになってきており、2015年には、ヒト他家骨髄間葉
系幹細胞（以下、「MSC」ということがある。）が、急性移植片対宿主病の治
療に対して、国内で初めての再生医療等製品として承認されている（以下、
「従来技術1」という。）。これは、間葉系幹細胞（以下、「MSC」というこ
とがある。）は、間葉系に属する体性幹細胞で、骨髄や脂肪組織、臍帯、臍
帯血、歯髄などから採取可能で、骨芽細胞や脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞な
どの間葉系細胞への分化能を有すること、さらに、免疫抑制や、炎症部位へ
の損傷組織に集積しやすい性質を有し、組織修復・再生能を示すことに基
づくものである。これによって、MSCは再生医療の細胞療法として耳目を集めて
いる。
- [0007] ここで、厚生労働省によれば、広義の「再生医療」とは、生きた細胞を組
み込んだ機器等を患者の体内に移植等すること又は内在性幹細胞を細胞増殖
分化因子により活性化/分化させることにより、損傷した臓器や組織の自己再
生能力を活性化することで失われた機能を回復させる医療をいう。より具
体的には、患者の体外で人工的に培養した幹細胞等を、患者の体内に移植等
することで、損傷した臓器や組織を再生し、失われた人体機能を回復させる医
療、及び患者の体外において幹細胞等から人工的に構築した組織を、患者の
体内に移植等することで、損傷した臓器や組織を再生し、失われた人体機能
を回復させる医療をいう。
- [0008] 現在、褥瘡治療薬として塩基性線維芽細胞成長因子（basic fibroblast gr
owth factor、以下、「bFGF」ということがある。）が市販されている（非特
許文献1参照）。また、骨髄又は臍帯血由来のMSCを細胞療法に使用した場合

、褥瘡モデルに対して効果があるということが、既に報告されている。さらに、MSC自身が小胞体ストレスの抑制効果を以て褥瘡の治癒に参与していることも報告されている（非特許文献2参照、以下、「従来技術2」という）。ここで、小胞体ストレスとは、小胞体（以下、「ER」と略することがある。）でタンパク質が正常に折りたたまれず、変性タンパク質その他の正常に折りたたまれていないタンパク質（以下、「誤ったタンパク質」ということがある。）が蓄積することによって引き起こされる現象をいい、こうした誤ったタンパク質は、パーキンソン病やアルツハイマー病等の神経変性疾患、炎症や癌等に関与することが報告されている。また、ERストレスが発生すると、小胞体ストレス応答（UPR: unfolded protein response）と呼ばれるいくつかのシグナル伝達経路の活性化が惹起されることも知られている。

[0009] また、MSCとしてヒト乳歯由来の歯髄幹細胞を用い、不死化遺伝子（hTERTやHPV16 E6/E7、hBMI1）を導入した細胞株を作製する技術が知られている（特許文献1参照、W02017/078176参照、以下、「従来技術3」という。）

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1: W02017/078176

非特許文献

[0011] 非特許文献1: Robson M, et al. The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of chronic pressure sores Ann Surg.1992 216:401-406.

非特許文献2: Motegi S, et al., Protective effect of mesenchymal stem cells on the pressure ulcer formation by the regulation of oxidative and endoplasmic reticulum stress. Sci Rep. 2017 7(1):17186.

非特許文献3: Y. Yukie, et al. Thickness and pressure deformability of soft tissue over the sacrum in elderly and young subjects. 日本看護研究学会雑誌 vol.27, No.2 2004

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0012] 従来技術 1 は、ヒト他家MSCを、急性移植片対宿主病の治療に対して使用するという点では優れている。しかし、従来技術 1 は、用途が急性移植片対宿主病の治療に限定されていること、及び他家細胞を使用するため、免疫応答を生じさせる可能性を排除できないという問題がある。
- [0013] 従来技術 2 は、骨髓又は臍帯血由来のMSCを細胞療法に使用した場合、褥瘡モデルに対して効果があるという点では優れている。しかし、ここで使用されているMSCは細胞自体であり、従来技術 1 と同様に、免疫応答を生じさせる可能性を排除できないという問題があった。
- [0014] また、上記細胞療法でMSCを使用した場合、炎症局所に遊走し損傷細胞と入れ替わるという機序の他、細胞から分泌されるサイトカインや増殖因子などのトロフィック因子によるパラクリン効果という機序も考えられている。しかし、こうしたトロフィック因子の種類及び産生量は、使用した細胞集団によって異なるという問題があった。
- [0015] 従来技術 3 は、不死化遺伝子（hTERTやHPV16 E6/E7、hBMI1）を導入した細胞株を作製するという点では優れている。しかし、従来技術 3 では、得られた不死化幹細胞又はその培養上清を、褥瘡の予防及び/又は治療に使用することは、全く想定されていない。
- したがって、効果及び安全性が高い、褥瘡の予防及び/又は治療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

- [0016] 本願発明は、上記のような事情のもとで完成されたものであり、特定の遺伝子を組み込んだ間葉系不死化幹細胞の培養上清を有効成分とする、褥瘡の予防及び/又は治療剤を提供することを目的とする。
- [0017] すなわち、本願発明の第 1 の態様は、bmi-1遺伝子、HPV-E6遺伝子、HPV-E7遺伝子、及びTERT遺伝子を組み込んだ間葉系不死化幹細胞の培養上清を有効成分とする、褥瘡の予防及び/又は治療剤である。ここで、前記TERTは、

hTERT又はpTERTであることが好ましい。また、前記間葉系幹細胞は歯髄幹細胞であることが好ましい。さらに、前記歯髄幹細胞はヒト又はブタ由来であることが好ましい。

[0018] また、前記培養上清は、インスリン様成長因子結合タンパク質、マトロプロテイナーゼ組織阻害剤、血管内皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、腫瘍壊死因子受容体II、及びオステオプロテゲリン・破骨細胞分化抑制因子からなる群から選ばれる少なくとも3種類以上のサイトカインを、それぞれ、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ pg/mLの濃度範囲で含むことが好ましい。

[0019] さらに、前記インスリン様成長因子結合タンパク質は、IGFBP-2、IGFBP-3、及びIGFBP-4からなる群から選ばれるすくなくとも1つであることが好ましい。また、前記マトロプロテイナーゼ組織阻害剤は、TIMP-1又はTIMP-2であることが好ましい。

[0020] 前記培養上清は、凍結品、凍結乾燥粉末、及び液剤からなる群から選ばれるいずれかの形態であることが好ましい。また、前記褥瘡の予防及び/又は治療剤は、必要に応じて、賦形剤、pH調整剤、希釈剤、緩衝剤等を含むことが好ましい。

[0021] 前記褥瘡の予防及び/又は治療剤は、注射剤、軟膏、硬膏、クリーム剤、及び経皮吸収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。

発明の効果

[0022] 本願発明の褥瘡の予防及び/又は治療剤によれば、bmi-1、HPV-E6、HPV-E7、及びTERT遺伝子を組み込んだ間葉系不死化幹細胞の培養上清を有効成分とすることによって、褥瘡を予防することができ、また、褥瘡が形成された後であっても、速やかな回復を促すことができる。

また、本願発明の褥瘡の予防及び/又は治療剤によれば、上記不死化幹細胞を使用するため、培養上清中の含有成分の種類及び量を安定させることができ、品質の一定した褥瘡の予防及び/又は治療剤を製造することができる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]図 1 は、本発明で使用する間葉系不死化幹細胞の培養上清（hSHED-CM）中に一定濃度以上で含まれるサイトカインを分析した結果を示すグラフである。

[図2]図 2 は、上記hSHED-CMの調製方法を示すフローチャートである。

[図3]図 3 は、上記hSHED-CM中に含まれるサイトカインの定量的発現解析のフローチャートである。

[0024] [図4]図 4 は、上記hSHED-CM中に含まれるサイトカインの定性的発現解析のフローチャートである。

[図5]図 5 は、上記hSHED-CM中から得たエクソソーム中のマイクロRNAの発現解析のフローチャートである（その 1）。

[図6]図 6 は、上記hSHED-CM中から得たエクソソーム中のマイクロRNAの発現解析のフローチャートである（その 2）。

[0025] [図7]図 7 は、図 4 の手順で得たサイトカインの定性的発現解析結果を示すグラフである（その 1）。

[図8]図 8 は、図 4 の手順で得たサイトカインの定性的発現解析結果を示すグラフである（その 2）。

[図9]図 9 は、実験的にマウスに褥瘡を形成させる方法（A）及び形成された褥瘡（B）を示す写真である。図 9（C）及び（D）はそれら写真を表した線図である。

[0026] [図10]図 10 は、投与スケジュール 1 のときの投与部位および投与結果を示す図である。図 10（A）は投与スケジュール 1（I/R処置の翌日から 4 日連投後、1 日空けて 2 日連投）を示し、投与部位を図 10（B）に示す。また、図 10（C）は、再灌流後の障害面積の経時変化を示すグラフである。図 10（C）中、DMEMはダルベッコ変法イーグル培地を、hSHED-CMはヒト歯髄幹細胞由来の不死化幹細胞の培養上清を、また、bFGFは塩基性線維芽細胞成長因子をそれぞれ示す。

[0027] [図11]図 11 は、投与スケジュール 2 のときの投与部位および投与結果を示す図である。図 11（A）は投与スケジュール 2（I/R処置の翌日から 7 日連

投)を示し、投与部位を図11(B)に示す。また、図11(C)は、再灌流後の障害面積の経時変化を示すグラフである。図11(C)中、DMEMはダルベッコ変法イーグル培地を、hSHED-CMはヒト歯髄幹細胞由来の不死化幹細胞の培養上清をそれぞれ示す。

[0028] [図12]図12(A)は、図11(A)に示した投与スケジュールで治療したマウスの褥瘡形成部位の治癒状況を示す写真である。上段はDay 2~Day 12の間の対象群のマウスのI/R処置部位の変化を、また、下段は同じ期間内のhSHED-CM投与群の当該部位の変化をそれぞれ示した写真である。図12(B)はそれらの写真を模式的に表す線図である。

[0029] [図13]図13は、投与スケジュール3のときの投与部位および投与結果を示す図である。図13(A)はI/R処置部位を示し、赤色の矢印は、100 μ lを一方のI/R処置部位に投与したことを示す。図13(B)は、投与スケジュール3(I/R処置の翌日から7日連投)を示し、Day 4において、患部組織を図11(C)に示す部位から採取した。

[0030] [図14]図14は図13(C)に示す患部組織を採材したマウスの様子を示す写真(図14(A))、及びその部位を拡大した写真(同(B))及びその組織をホルマリン固定した状態を示す写真である(同(C))。写真の下(A)及び(B)または横(C)にその線図を示す。

[0031] [図15]図15は、図14(C)に示す採材組織をパラフィン包埋し、薄切した切片のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色と活性酸素の指標である8-OHdGの免疫組織化学染色を行った写真(図15(A))、及びその面積を定量化したグラフ(図15(B))である。図15(A)において、拡大した染色写真を模式的に表した線図を4段目に示す。線図中、白抜き部分は切片を、また斜線部は切片中8-OHdGが陽性であった部位をそれぞれ示す。

[0032] [図16]図16は、図14に示した組織をパラフィン包埋し薄切切片をHE染色とペリサイトのマーカーであるCD31に対する抗体を用いた免疫組織化学染色を行った写真(図16(A))、及びそのCD31+の面積を定量し比較した結果(同図(B))である。図16(A)において、3段目にある拡大した染色写

真の模式的な線図を4段目に示す。線図中白抜き部分は切片、またその切片中にある黒い線はmCD31陽性であった部位であり、矢印で強調されている。

[0033] [図17]図17は、図14に示した組織をパラフィン包埋し薄切した切片のHE染色とペリサイトのマーカーであるNG2に対する抗体を用いた免疫組織化学染色を行った写真(図17(A))、及びそのNG2+の面積を定量し比較した結果(同図(B))である。図17(A)において、3段目にある拡大した染色写真の模式的な線図を4段目に示す。線図中白抜き部分は切片であり、その切片中にある黒い破線は組織の境目を示し、また黒い線はmCD31陽性であった部位を示し、矢印で強調されている。

[0034] [図18]図18は、投与スケジュール4のときの投与部位および投与結果を示す図である。図18(A)は投与スケジュール4(褥瘡発症後から7日間連投)を示し、投与部位を図18(B)に示す。また、図18(C)は、障害面積の経時変化を示すグラフである。図18(C)中、矢印は、投与開始日を示す。図中、Control mediumはダルベッコ変法イーグル培地を、hSHED-CMはヒト歯髄幹細胞由来の不死化幹細胞の培養上清をそれぞれ示す。

[0035] [図19]図19(A)は、図18(A)に示した投与スケジュールで治療したマウスの褥瘡形成部位の治癒状況を示す写真である。上段はDay 2~Day 10の間の対象群のマウスの褥瘡形成処置(以下、「I/R処置」ということがある。)部位の変化を、また、下段は同じ期間内のhSHED-CM投与群の当該部位の変化をそれぞれ示した写真である。図19(B)はそれら写真を模式的に表した線図である。

[0036] [図20]図20は、I/R処置部位に、所定のサイトカインを投与する場合の実験計画を示す模式図である。図20(A)は、所定の因子を除去した培養上清の投与スケジュールを示す。また、図20(B)は、マウスへの投与部位(褥瘡部位)を示す模式図である。

[0037] [図21]図21は、図20(A)の投与スケジュールに従って、図20(B)に示す部位に各因子の投与を行ったときの創傷形成領域の大きさの経時変化を示すグラフである。図21(A)は陰性対照(コントロール抗体(control Ab))を使用した場

合、(B)はIGFBP-4を除去した上記培養上清を使用した場合、図21(C)はVFGFを除去した上記培養上清を使用した場合、及び図21(D)はHGFを除去した上記培養上清を使用した場合の結果を示す。

[図22]図22は、上記培養上清による活性酸素種（以下、「ROS」と略すことがある。）の抑制効果を示すために、褥瘡モデルの発症機序をin vitroの系で再現した実験工程の模式図である。

[0038] [図23]図23は、図22に示したin vitro実験において特異的抗体でHGF、VEGFを免疫沈降により除去した上清でNIH3T3を培養したときのROSの抑制の変化を示す蛍光顕微鏡による観察結果である。図23(A)はその観察写真、(B)はその写真を表す線図である。

[図24]図24は、図23の写真の最大輝度と最小輝度から算出したコントラストをROSの相対値として定量比較したグラフである。

[0039] [図25]図25は、マウス線維芽細胞株NIH3T3細胞を用いたときの上記培養上清による小胞体ストレスの抑制効果を示す。図25(A)は、 $1.5\mu\text{g/mL}$ ツニカマイシン（以下、「TM」と略すことがある。）を添加してリアルタイムPCRを実施するまでの工程を示す模式図である。図25(B)は、回収した処理済みNIH3T3細胞をリアルタイムPCRに供したときの、小胞体ストレスマーカーのmRNA発現量を示すグラフである。

[0040] [図26]図26は、本発明の培養上清の事前投与が褥瘡の発症抑制に効果があることを示す実験の模式図である。図26(A)は、モデルマウスへの投与スケジュールを模式的に示す図である。図26(B)はマウスへのSHED-CM投与部位を示す模式図である。

[図27]図27は、本発明の培養上清の事前投与が褥瘡の発症抑制に効果があることを示す。図27(A)は、7日間の培養上清投与後の皮膚の厚みの比較結果を示す観察像とその線図であり、図27(B)はその厚みを定量して比較した結果を示すグラフである。

[0041] [図28]図28は、図26(A)に示した投与スケジュール6のときの投与結果を示す図である。図28(A)は、障害面積の経時変化を示すグラフである。図28(B)は

、事前処置したマウスの褥瘡形成部位の治癒状況を示す写真及びそれを模式的に表した線図である。上段は対象群のマウス、下段はhSHED-CM投与群のI/R処置部位の変化をそれぞれ示す写真及び上記線図である。

発明を実施するための形態

- [0042] 以下、本願発明の一実施形態を、図1～図28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。
- [0043] 本発明の第一の態様の褥瘡の予防及び/又は治療剤は、以下の手順で作製される。すなわち、(S1) 間葉系幹細胞に特定の4遺伝子のセットを組み込んで不死化幹細胞を作製し、(S2) 得られた上記間葉系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、褥瘡の予防及び/又は治療剤を作製する
- [0044] 本願発明の不死化幹細胞を得るには、まず、哺乳類の間葉系細胞から幹細胞を単離する。上記哺乳類としては、ヒト、ブタ、ウマ、及びサルからなる群から選ばれるものであることが、ヒト細胞との遺伝的類似性が高いこと、及び感染の危険性が低いことから好ましい。
- [0045] 本明細書中、「間葉系細胞」とは、骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞等、間葉系に属する細胞への分化能を持つとされる細胞をいう。具体的な間葉系細胞としては、上記の動物の歯髄細胞、骨髓細胞、臍帯細胞及び脂肪細胞等を挙げることができる。さらに、「歯髄細胞」とは、再生能を有する歯の神経に含まれ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を通さず、遺伝子も傷つきにくいという特性を有する。
- [0046] 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。hTERTはテロメア修復酵素の遺伝子であり、bmi-1はポリコー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。

[0047] 以下に、ヒトの脱落乳歯から歯髄細胞を用いた不死化幹細胞の作製を説明する。

まず、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。

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 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」という。）、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」ということがある。）、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。

[0051] 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。

[0052] 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。

- [0053] 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。

- [0054] 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、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することにしてもよい。

- [0055] 次いで、前記幹細胞を初期培養して得られた初期培養細胞に、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、上記の通りのhTERT、bmi-1、E6及びE7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ることができ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。

- [0056] 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。

[0057] 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。本発明の方法で、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。レンチウイルスを使用することが、導入遺伝子の安定発現株の産生効率が高いことから好ましい。

[0058] 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。

[0059] 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、又はヒト歯髄組織を使用することが好ましい。

[0060] 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。

[0061] (a) ヒトパピローマウイルスE7及びテロメラーゼ逆転写酵素（TERT）；
(b) bmi及びTERT；(c) bmi、ヒトパピローマウイルスE6及びTERT；(d)
(e) ヒトパピローマウイルスE6、ヒトパピローマウイルスE7及びTERT；(f) bmi、ヒトパピローマウイルスE6、ヒトパピローマウイルスE7、及びTERT；と

いう、いずれかの遺伝子のセットを含むDNA断片を作製し、使用することがさらに好ましい。TERTは、hTERTを使用することが遺伝子の発現効率の点から好ましい。

- [0062] 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。
- [0063] 上記のような遺伝子のセットを組み込むことにより、こうした遺伝子をどのような組み合わせで導入すれば、効率よくこれらが発現され、細胞が不死化できるのかを確認することができる。
- [0064] 以下に、レンチウイルスベクターを作製して、2つの遺伝子を導入する場合を説明する。上記（a）のセットであるヒトパピローマウイルスE7の遺伝子及び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/KoZal/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2つの遺伝子を組み込んだレンチベクター（E7T）を得ることができる。
- [0065] 同様にして、異なる2つの遺伝子を導入する場合、例えば、上記（b）のセットを導入する場合には、まず、Bmi-1を含むEcoRI/KoZal/Bmi-1/T2A4/hTERT/BamHIの二本鎖DNA（配列表の配列番号2）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2つの遺伝子を組み込んだレンチベクター（BT）を得ることができる。
- [0066] 同様にして、3つの遺伝子を導入する場合には、配列情報に従ってT2A3E6の二本鎖DNAを合成し、上記（v 2）で作製したレンチウイルスベクターのBm

i-1とT2A4との間に挿入し、EcoRI/KoZaI/Bmi-1/T2A3/E6/T2A4/hTERT/BamHIの二本鎖DNAを作製する（配列表の配列番号3）。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ベクター（BE6T）を得ることができる。

[0067] 同様にして、4つの遺伝子を導入する場合には、E6T2A3の二本鎖DNAを合成し、上記（d）で作製したレンチウイルスベクター-E7TのKozak配列とE7との間に挿入し、EcoRI/KoZaI/E6/T2A3/E7/T2A4/hTERT/BamHIを作製する（配列表の配列番号4）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ベクター（E6E7T）を得ることができる。以上のようなDNA断片の合成は、DNAの合成を受託する企業に委託して行ってもよい。

[0068] 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5）、ヒトパピローマウイルスのE6（配列表の配列番号6）及びヒトパピローマウイルスのE7（配列表の配列番号7）、pigTERT（配列表の配列番号8）、及びhBmi-1（配列表の配列番号9））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 HPV16E7ベクター、pDON-5 Neo pHTERT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。

[0069] 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。

[0070] 次いで、 $5.5 \sim 6.5 \times 10^6$ 個/dishでG3T-hi細胞を所望のプレートに播種し、5% CO_2 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3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時間培養を行なって、これらの遺伝子を導入することができる。

[0071] 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）、ダルベッコ改変イーグル培地（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。

[0072] 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。

[0073] 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% CO_2 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°C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。

[0074] 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)。

[0075] 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293T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 $10^5\sim 10^7$ c.fu/mLのウイルスを含む溶液が得られる。

[0076] 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。

[0077] 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。

[0078] 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複数のディッシュに、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それぞれ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。

[0079] 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。

[0080] 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のディスプレイザブルシリンジ（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、0.45μm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。

[0081] 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20μL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。

- [0082] 以上のようにして得られた4つのプラスミド (E7T、BT、BE6T及びE6E7T) 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℃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℃で約14～18時間、激しく攪拌しながら振盪培養する。
- [0083] 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。
- [0084] 2. 哺乳類の幹細胞の調製
2. 1 ブタ歯髄幹細胞の調製
- 生後5～6ヶ月のブタの顎骨（下顎歯のついた下顎骨）及び腸間膜を入手する。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髄幹細胞（以下、「SHED」ということがある。）を得る。
- [0085] 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髄を採取する。
- [0086] 得られた歯髄を、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, Anti-myotic, 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。

[0087] 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。

[0088] 2. 2 ヒト乳歯歯髄幹細胞の調製

健康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、ブタの歯髄を得たのと同様にして歯髄組織を回収する。得られた歯髄組織を、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。

[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] 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1×1

0^4 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、ヒト脱落乳歯歯髓幹細胞（SHED）を得ることができる。

[0092] 必要に応じて、上記のようにして得られたブタ乳歯歯髓幹細胞、ブタ脂肪幹細胞及びヒト乳歯歯髓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。

[0093] 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髓幹細胞、ブタ脂肪幹細胞、及びヒト歯髓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、LT 07-318）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。

[0094] 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、ブタ乳歯歯髓幹細胞及びブタ脂肪幹細胞に対してはStemPro（登録商標：GIBCO社製）、ヒト乳歯歯髓幹細胞に対してはTrypsin - EDTA等を使用することができる。

[0095] 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。

[0096] その後、培養上清を除去し、ブタ乳歯歯髓幹細胞に対しては、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。

- [0097] ヒト乳歯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1.2mL/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 μ L/wellずつ添加する。
- [0098] 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。
- [0099] 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、ブタ脂肪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、GIBC0社製）を含む選択培地を、所望の量、例えば、約2mL/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。
- [0100] 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。
- [0101] 例えば、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。

[0102] 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。

[0103] 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 $11,000 \times g$ 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 $350 \mu\text{L}$ 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。

[0104] 次いで、得られた溶液を所望量、例えば、約 $700 \mu\text{L}$ 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 $11,000 \times g$ 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 $350 \mu\text{L}$ 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。

[0105] 遠心後、所望量、例えば、約 $10 \mu\text{L}$ のrDNaseと約 $90 \mu\text{L}$ 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 $95 \mu\text{L}$ 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、 $200 \mu\text{L}$ 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 $700 \mu\text{L}$ 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。

[0106] 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 $250 \mu\text{L}$ 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×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×gで約1分間遠心して、総RNAサンプルを得る。

[0107] 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。

[0108] 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10～15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。

[0109] まず、所望量、例えば、約350 μ LのSYBR Premix Ex Taq II (x2) と、約28 μ LのPrimer mix (約10 μ L) と、約266 μ Lの二回蒸留水と、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 μ L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 μ L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秒その後、約60℃で約30秒) 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。

[0110] 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。

。

- [0111] 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。
- [0112] 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も培地を交換し、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。
- [0113] 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。
- [0114] 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10～15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。
- [0115] 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。

[0116] 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SHED-Pに感染させる。

[0117] 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。

[0118] 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。

[0119] また、上記不死化幹細胞は、インスリン様成長因子（IGFBPs）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、組織メタロプロテイナーゼ組（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。

[0120] 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。

[0121] 上記IGFBPs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、細胞増殖促進、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。

[0122] 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、IGFBPs、VEGF、及びHGF以外にも、多くのタンパクが含まれる。

[0123] 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。

[0124] 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、15,0

00×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、500μL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。

[0125] 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、用時調製の組成物である粒子粉末13を得ることができる。

実施例

[0126] (実施例1) 不死化SHEDの作出及び培養上清の調製

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℃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℃で保存した。10M (飽和) 酢酸アンモニウム (NH₄OAc)、3Mの酢酸ナトリウム (NaOAc; pH 5.2) を調製した。

[0127] (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。

[0128] (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 (25:24:1、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。

[0129] 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)

[0130] (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。

[0131] 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、X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (25mg/mL))ジメチルホルムアミド (DMF) 溶液は−20℃で遮光保存した。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。

[0132] (3) 予備試験

(3-1) lacZ を含む組換えアデノウイルス (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。

[0133] 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。

[0134] (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。

[0135] 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。

[0136] 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。

[0137] 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。

[0138] 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。

[0139] (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。

[0140]

[表1]

試 薬 等	液量 (μL)	
	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/μL)	2.0	—
pShuttle 2-lac Zプラスミド (500ng/μL)	—	2.0
PI-Sce I (1unit/μL)	2.0	2.0
I-Ceu I (5unit/μL)	0.5	0.5
10×BSA	3.0	3.0

[0141] 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 μL）を1 %アガロース/EtBrゲルで泳動した。

[0142] （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 μL）に、70 μLの1×TE Buffer (pH8.0) と100 μL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 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）を添加し、ボルテックスで十分に攪拌した。

[0143] 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 μL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 μL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。

[0144] （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。

[0145] [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

[0146] 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。

[0147] 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。

[0148] (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。

[0149] [表3]

試 薬 等	液量 (μL)
ライゲーション産物	15
10×Swa I Digestion Buffer	2.0
10× BSA	2.0
Swa I (10 units/μL)	1.0
合 計	20.0

[0150] 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。

[0151] (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。）に接種し、 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。

[0152] 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。

[0153] (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。

[0154] 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。

[0155] 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。

[0156] (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。

[0157] [表4]

試 薬 等	液量 (μ L)
滅菌水	19.5
10 $\times$ 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 $\times$ BSA	3.0
合 計	30.0

[0158] 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ゲルで泳動した。

[0159] (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。

[0160] [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 $\times$ Pac I Digestion Buffer	4
10 $\times$ BSA	4
Pac I (10units/ μ L)	2
合 計	40

[0161] 60 μ Lの1 $\times$ 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。

[0162] 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細胞を接種し、 37°C 、5%CO₂存在下でインキュベートした。

[0163] 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。

[0164] 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。

[0165] (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フラスコに接種し、 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。

[0166] 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。

[0167] (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を接種した。接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。

[0168] 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。

[0169] (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。

[0170] 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。

[0171] (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。

[0172] 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。

[0173] 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。

[0174] (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、及びpDON-5 Neo hBmi1ベクターとか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。

[0175] （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の反応条件を示した。

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。

[0176] [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

[0177] 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。

[0178]

[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

[0179] 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。

[0180] [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	

[0181] 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。

[0182]

[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	—	

[0183] 上記表中、E.D. は、希釈用バッファ—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。

[0184] リアルタイムPCTによる測定結果より、DON-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。

[0185] (実施例2) SHEDの作製

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髓組織を回収した。得られた歯髓組

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。

- [0186] 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。
- [0187] 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。
- [0188] 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。ヒトBMMSC（骨髄間葉系幹細胞、Bone Marrow Mesenchymal stem cells）はロンザ社から購入し、メーカーの取扱説明書に従って培養した。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STRO-1陽性細胞を以下のようにしてソートした。
- [0189] 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。

[0190] 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。

[0191] 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。

[0192] (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。

[0193] 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。

[0194] (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、薬剤耐性プール細胞（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（いずれもタカラバイオ製）を使用した。

[0195] [表10]

遺伝子	カタログ番号	塩基配列	配列番号
目的遺伝子	CH000987_F	GCACTGCCCTCAGACTTCAAGA	1 6
	CH000987_R	GCGGGACTATGGTTGCTGAC	1 7
標準遺伝子 (ヒトβアクチン)	HA067803_F	TGGCACCCAGCACAAATGAA	1 8
	HA067803_R	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCCA	1 9

[0196] 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_P5103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ッ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。

[0197] （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。

[0198] 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。

[0199] 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。

[0200] 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、1mL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、これをと受ける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

[0201] （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（以下、「hSHED」ということがある。） 2×10^5 個/mLを、10 mLの10%ウシ胎児血清（以下、「FBS」と略すことがある。）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。

[0202] 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、不死化hSHEDの培養上清（以下、「hSHED-CM」ということがある。）を得た。

[0203] （2）定量的発現解析

以上のようにして得たhSHED-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（図3）。

[0204] まず、上記SHED-CM支持体にアレイ状に固定化された抗体と1～2時間接触させ、その後、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。結果を図1に示す。80種類のサイトカインを測定し、対照との差が1pg/mL以上となった36種類を濃度の高い順に示した。下記表11には、測定した80種類のサイトカインの名称を示した。

[0205] [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	30	MIP-1 α /CCL3	58	IGFBP-1
2	Eotaxin/CCL11	31	MIP-1 β /CCL4	59	IGFBP-2
3	Eotaxin-2/CCL24	32	MIP-1 δ /CCL15	60	IGFBP-3
4	G-CSF	33	PDGF-BB	61	IGFBP-4
5	GM-CSF	34	RANTES/CCL5	62	IGFBP-6
6	I-309/CCL1	35	TIMP-1	63	IGF- I
7	ICAM-1	36	TIMP-2	64	Insulin(pro & mature)
8	IFN γ	37	TNF α	65	M-CSF R
9	IL-1 α	38	TNF β	66	NGF R
10	IL-1 β	39	sTNF R I /TNFRS1A	67	NT-3
11	IL-1ra	40	sTNF R II /TNFRS1B	68	NT-4
12	IL-2	41	Amphiregulin(AR)	69	Osteoprotegerin(OPG)
13	IL-4	42	BDNF	70	PDGF-AA
14	IL-5	43	bFGF/FGF-2	71	PIGF
15	IL-6	44	BMP-4	72	SCF
16	IL-6 sR	45	BMP-5	73	SCF R
17	IL-7	46	BMP-7	74	TGF α
18	IL-8/CXL8	47	β -NGF	75	TGF β 1
19	IL-10	48	EGF	76	TGF β 3
20	IL-11	49	EGF R	77	VEGF
21	IL-12p40	50	EG-VEGF	78	VEGF R2
22	IL-12p70	51	FGF-4	79	VEGF R3
23	IL-13	52	FGF-7/KGF	80	VEGF-D
24	IL-15	53	GDF-15		
25	IL-16	54	GDNF		
26	IL-17	55	Growth Hormone		
27	MCP-1/CCL2	56	HB-EGF		
28	M-CSF	57	HGF		
29	MIG/CXCL9				

[0206] 図1に示したように、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を除く。

[0207] (3) 定性的発現解析

以上のようにして得たhSHED-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(図4)。

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。

[0208] 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）を測定したところ、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。図7と8には、上記の77種類のサイトカインのうち、相対発現強度3以上のものを示した。

[0209] [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	LJGHT	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

[0210] [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

[0211] [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
L-Selectin	M-CSF R	MMP-1	MMP-13	MMP-9	MPlF-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

[0212] [表15]

サイトカイン名称				
Adipsin	BCAM	CD30	CD40	Fcgamma RIIB/C
Ferritin	FLRG/FSTL3	Follistatin	Furin	Galectin-7/ LGALS7
GDF-15/MIC-1	Growth Hormo ne(GH)	IL-10 R alpha	IL-22	IL-28A/ IFN-gamma2
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 /TN FRSF10B	Trappin-2
TREM-1	TSH	TSLP	VCAM-1	VEGF-C
XEDAR	-	-	-	-

[0213]

[表16]

サイトカイン名称				
4-1BB	ACE-2	Alpha-fetoprotein	Angiopoietin-1	Angiostatin (ANG)
ANGPTL4	Beta-2 Micro-globulin	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	hCGa (intact)	HVEM/TNFRSF14	IL-13 R alpha-1	IL-17B
IL-17C	IL-17F	IL-17R	Procalcitonin (PCT)	PSA(free)
S100b	Shh N	Thyroglobulin(TG)	Ubiquitin+1	-

[0214] 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。

[0215] （実施例4）エクソソーム中のmicroRNA発現解析

エンドソームに由来する膜小胞であるエクソソーム中のMicroRNAの発現解析を以下の手順で行った。

まず、上記実施例2で樹立した不死化幹細胞を、上記実施例3に記載したように無血清培地で培養し、培養上清を約10mL取った。ExoQuick-TC（System Biosciences社製）を用いて、この培養上清からこのキットに添付されたマニュアルに従ってエクソソームを精製した。

[0216] miRNeasy Mini Kit（Quiagen社製造）を用いて、精製したエクソソームからmiRNA及び全RNAを抽出し、以下のようにして標識し、GeneChip（登録商標）miRNA Array（Affimetrix社）を用いてサイトカインの発現を解析した（図5）。

[0217] 上記精製エクソソームから抽出したmiRNA及び全RNAのRNA分子を、ATPの存

在下に、ポリAポリメラーゼと15分間反応させて、ポリAテイルを結合させ、ポリAテイル付きmRNAとした。次いで、Flash Tag Ligation Mix注にて30分間リガーゼと反応させて、ビオチン標識RNAと、上記ポリAテイル付きmRNAとを図6に示すように連結させ、標識分子を得た。ここで、試料としては、上記不死化幹細胞を72時間培養してたhSHED-CMを使用した。

[0218] 上記標識分子を、GeneChipを用いたアッセイに供し、蛍光標識ストレプトアビジンで検出した。検出した結果を発現の高い順に1～100まで表17に示す。上記GeneChip miRNA Arrayで分析を行った6,599種類の全microRNA中、845個が陽性であった。

[0219]

[表17]

No.	略名	No.	略名	No.	略名
1	hsa-miR-6126	35	hsa-miR-1237-5p	69	hsa-miR-6816-5p
2	hsa-miR-3960	36	hsa-miR-6125	70	hsa-miR-125b-5p
3	hsa-miR-24-3p	37	hsa-miR-6780b-5p	71	hsa-mir-6800
4	hsa-miR-3613-3p	38	hsa-miR-3178	72	hsa-miR-619-5p
5	hsa-miR-6087	39	hsa-miR-320b	73	hsa-miR-3940-5p
6	hsa-miR-7704	40	hsa-miR-3656	74	hsa-miR-6805-5p
7	hsa-miR-4787-5p	41	hsa-miR-8069	75	hsa-miR-7108-5p
8	hsa-miR-1273g-3p	42	hsa-miR-320c	76	hsa-miR-7150
9	hsa-miR-4668-5p	43	hsa-miR-100-5p	77	hsa-miR-328-5p
10	hsa-miR-23a-3p	44	HBII-85-26	78	hsa-miR-222-3p
11	hsa-miR-4484	45	hsa-miR-221-3p	79	hsa-miR-4454
12	hsa-miR-4497	46	hsa-miR-638	80	hsa-miR-320d
13	hsa-miR-3665	47	hsa-miR-3135b	81	hsa-mir-6722
14	hsa-miR-1246	48	hsa-let-7b-5p	82	hsa-miR-663a
15	hsa-miR-149-3p	49	hsa-miR-6724-5p	83	hsa-miR-4487
16	hsa-miR-6869-5p	50	hsa-miR-6786-5p	84	hsa-miR-191-5p
17	hsa-miR-2115-5p	51	hsa-miR-762	85	hsa-miR-6743-5p
18	hsa-miR-6089	52	hsa-mir-320e	86	hsa-let-7c-5p
19	hsa-miR-8075	53	hsa-miR-214-3p	87	hsa-miR-4281
20	hsa-miR-6090	54	hsa-miR-1228-5p	88	hsa-miR-6800-5p
21	hsa-miR-1908-5p	55	hsa-miR-6732-5p	89	ENSG00000238388
22	hsa-miR-6729-5p	56	hsa-miR-4687-3p	90	hsa-miR-6765-5p
23	hsa-miR-8072	57	hsa-miR-4530	91	hsa-miR-4745-5p
24	hsa-miR-3196	58	hsa-miR-6803-5p	92	hsa-miR-27a-3p
25	hsa-miR-6088	59	hsa-miR-23b-3p	93	hsa-miR-4749-5p
26	hsa-miR-4488	60	hsa-miR-1469	94	ACA57
27	hsa-miR-1915-3p	61	hsa-mir-711	95	hsa-miR-134-5p
28	hsa-miR-4508	62	HBII-85-6	96	hsa-miR-4467
29	hsa-miR-145-5p	63	hsa-miR-92a-3p	97	hsa-miR-6775-5p
30	hsa-miR-4516	64	hsa-miR-2861	98	ENSG00000238388
31	hsa-miR-320a	65	hsa-mir-320a	99	hsa-miR-6085
32	hsa-miR-6727-5p	66	hsa-miR-26a-5p	100	hsa-miR-1207-5p
33	hsa-miR-4466	67	hsa-miR-16-5p		
34	hsa-miR-5787	68	hsa-miR-130b-3p		

[0220] (実施例5) 褥瘡治癒効果の検証

(1) モデル動物の作製

虚血再灌流 (ischemia/reperfusion、I/R) 法を利用して、虚血再灌流障害の1つである褥瘡をマウスに発生させ、hSHED-CMを投与して、褥瘡が治癒する

までの経過を観察した。ここで、虚血再灌流障害とは、血流（酸素）供給が遮断されて虚血（低酸素）に陥った組織に、再度血流が灌流された際に惹起されるさまざまな障害をいう。

8週例のC57/BL6（雌）の背部皮膚を、1180ガウスの磁石で12時間挟んで虚血状態の部位（虚血部位）をつくり出し、褥瘡モデルマウスを作製した（図9参照）。ここで、磁石で挟まれた部位は強い虚血状態となっており、その部位の中で障害がおこると褥瘡等が形成されること、また、強い虚血部位の周囲でも血流が減少するため、弱い虚血状態は生じており、脱毛が生じていることが、図9からわかる。このモデルマウスへの投与スケジュール及び磁石をはずした後の褥瘡部位の時間経過による変化を以下に示す。

[0221] （2）投与スケジュール及び経過

（2－1）投与スケジュール1（I/R処置の翌日から4日連投後、1日空けて2日連投）

上記（1）で作製した褥瘡モデルマウス（陰性対象群：5匹、陽性対象群：5匹、試験群5匹）を使用した。いずれの群に対しても、虚血開始時をDay 0とし、Day 1～Day 4まで、陰性対象群にはDMEMを、また、陽性対象群にはbFGFを $1\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ を、それぞれ背部皮下に投与した。試験群には、hSHED-CMを $100\mu\text{L}$ （HGF量で250 pgに相当）、背部皮下に連日投与した。その後、Day 5にはすべての群に対して投与を行わず、Day 6及びDay 7に上記と同様の量で、上記モデルマウスの背部皮下に投与を行った（図10(A)及び(B)参照）。

[0222] 再灌流後の日数と、創傷領域（褥瘡形成領域）の割合を図10(C)に示す。対照と比較して、hSHED-CM又はbFGFを投与した群はいずれも、創傷領域の割合が速やかに縮小することが示された。

（2－2）投与スケジュール2（I/R処置の翌日から7日間連投－1）

[0223] 上記（1）で作製した褥瘡モデルマウス（陰性対象群：5匹、試験群5匹）を使用した。これらのモデルマウスの褥瘡形成部位（2箇所）に対して、上記（2－1）と同様に、DMEM又はhSHED-CMを $100\mu\text{L}$ ずつ、対象群又は試験群にそれぞれ投与した（図11(A)及び(B)参照）。結果を図11(C)に示す。hSHED-

CM投与群は、対照群と比較して、再灌流直後から創傷領域の割合の拡大傾向も有意に小さく、縮小も速やかでありday 10まで有意に縮小していることが示された（図11(C)参照）。また、褥瘡が形成された皮膚の状態を対比すると、対照群よりも速やかに回復すること、及びDay 12にはほぼ褥瘡が消失することが示された（図12参照）。

[0224] (2-3) 投与スケジュール3 (I/R処置の翌日から7日間連投-2)

上記(1)で作製した褥瘡モデルマウス(陰性対象群:5匹、試験群5匹)を使用した。これらのモデルマウスの褥瘡形成部位(2箇所)に対して、上記(2-2)と同様に、DMEM又はhSHED-CMを100 μ Lずつ、対象群又は試験群にそれぞれ投与した(図13(A)~(C))。そして、day 4に創傷領域の皮膚を採取し、ホルマリンで固定して8-OHdG、CD31及びNG2の免疫染色を行った(図14(A)~(C))。それぞれの染色の結果を図15(A)~(B)、図16(A)~(B)及び図17(A)~(B)に示す。

[0225] (2-4) 投与スケジュール4 (褥瘡発症後から7日間連投)

褥瘡発症後の治癒を確認するために、I/R処置後5日間は治療を行わず、褥瘡が形成された後のI/R処置後6日後から7日間連投を行った。

上記(1)で作製した褥瘡モデルマウス(陰性対象群:5匹、試験群5匹)を使用した。これらのモデルマウスの褥瘡形成部位(2箇所)に対して、上記(2-1)と同様に、DMEM又はhSHED-CMを50 μ Lずつ、対象群又は試験群にそれぞれ投与した(図18(A)及び(B)参照)。結果を図18(C)に示す。

[0226] hSHED-CM投与群は、対照群と比較して、hSHED-CM投与後、創傷形成領域が有意に縮小していた。また、褥瘡が形成された皮膚の状態を対比すると、対照群よりも速やかに回復すること、及びDay 10にはほぼ褥瘡が消失することが示された(図19参照)。

[0227] (2-5) 投与スケジュール5 (I/R処置直後から標的因子を除去した培養上清を7日間連投)

培養上清からサイトカインを除去した後の治癒効果を検討するために、hSHED-CMに含まれるサイトカインと、プライマリ細胞の培養上清に含まれるサイ

トカインを、実施例3のようにして成分解析を行った。プライマリー細胞としては、(株)セルテクノロジーから購入した、ヒト由来Primary歯髄幹細胞培養上清液を使用した。この結果を表13に示す。このうち、IGFBP-4、VEGF及びHGFを含有量および組織修復・再生能が高いことから、後述する免疫沈降における標的因子とした。

[0228] (2-6) 投与スケジュール6 (I/R処置7日前から7日間連投)

培養上清を事前投与することで、褥瘡の発症を抑制する効果があるのか検討するために、I/R処置前にhSHED-CMを7日間連投した。上記(1)で作製した褥瘡モデルマウス(陰性対象群:4匹、試験群4匹)を使用した。これらのモデルマウスの褥瘡形成部位(2箇所)に対して、上記(2-1)と同様に、DMEM又はhSHED-CMを100 μ Lずつ、対象群又は試験群にそれぞれ投与した(図26(A)及び(B)参照)。結果を図27及び図28に示す。

また、本発明の不死化幹細胞を培養したときの培養上清中に含まれる各種因子(サイトカイン等)の量と、初代培養細胞を培養したときのそれらの量とを下記表18にまとめた。下記表18中、初代培養細胞は、「プライマリ」と表示した。

[0229]

[表18]

No.	サイトカイン名 (略号及び名称)		培養上清中濃度 (pg/mL)		機能
			不死化	プライマリ	
1	IGFBP-4	インスリン様成長因子結合蛋白	457,262	18,592	腫瘍増殖抑制・ 血管新生阻害
2	IGFBP-6		27,919	3,907	
3	IGFBP-2		27,908	72	
4	VEGF	血管内皮細胞増殖因子	2,734	90	血管新生・発毛・ 育毛
5	HGF	肝細胞増殖因子	2,500	1,521	
6	MCP-1	ケモカイン・単球遊走因子	1,347	851	
7	TNF RII	腫瘍壊死因子受容体	1,233	6	
8	IGFBP-3	インスリン様成長因子結合蛋白	1,166	98	
9	RANTES	ケモカイン	374	36	
10	AR	アンドロゲン受容体	303	54	
11	TNFB	腫瘍壊死因子	279	0	
12	EGF R	上皮成長因子受容体	264	56	
13	IL-6	炎症性サイトカイン	193	6	
14	EGF-7	ケラチノサイト増殖因子	151	45	発毛・育毛
15	IL-8	炎症性サイトカイン・ケモカイン	104	11	
16	Eotaxin	ケモカイン・好酸球遊走因子	88	1	
17	PIGF	胎盤増殖因子	67	4	
18	GDF-15	成長分化因子15	34	39	
19	SCF R	幹細胞因子受容体	29	10	
20	MCSF	マクロファージコロニー刺激因子	22	0	

[0230] 上記実施例3に記載した条件で培養した不死化幹細胞の上清を滅菌チューブに集め、Protein G Sepharose (Cytiva社製) と、抗体 (α -IGFBP-4、 α -V EGF及び α -HGF、R&D社製) とを用いて免疫沈降を行い、上記標的因子を除去した上清を調製した。

[0231] 以上のようにして得た上清を、上記(1)で作製したモデルマウスの褥瘡形成部位(2箇所)に、100 μ Lずつ、各群2匹として投与した。陰性対照群にはDMEMを、また、陽性対照群にはhSHED-CMを投与した。ここで、本発明のhSHED-CMは、培養上清の成分解析結果に基づいて、IGFBP-4、VFGF(血管内皮細胞増殖因子)及びHGF(肝細胞増殖因子)をそれぞれの分子に対する特異的抗体を用いて免疫沈降させることで、これらを除去して使用した。図20(A)中、「免沈」は「免疫沈降」の略語である。投与スケジュールは、マウスにI/R処置を行った日をDay 0として、Day 1~Day 7まで連投とした(図20(A)参照

）。また、投与は、図20(B)に示すように、I/R処置を行ったマウスの背部2か所に100 μ Lずつとした。投与した因子及び使用した動物の数(N)は、図20(B)に示すとおりである。

[0232] 以上の投与結果を、図21(A)～(D)に示す。図21(A)は、陰性対照としてコントロール抗体(図20(B)及び図21(A)中、「control Ab」と表記。)を用いて処理した本発明の培養上清を使用した場合、図21(B)は抗IGFBP-4抗体(図20(B)及び図21(B)中、「 α -IGFBP-4」と表記。)を用いてIGFBP-4を除去した場合、図21(C)は抗VEGF抗体(図20(B)及び図21(C)中、「 α -VEGF」と表記。)を用いてVEGFを除去した場合、及び図21(D)は抗HGF抗体(図20(B)及び図21(D)中、「 α -HGF」と表記。)を用いてHGFを除去した場合をそれぞれ示す。図中、*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ 、***は $P<0.001$ を表す。

[0233] α -IGFBP-4で処理したhSHED-CM(IGFBP-4除去hSHED-CM)を投与した場合には、未処理のhSHED-CMを投与した場合と比較して、大きな差異は見られなかった。これに対し、 α -HGFで処理したhSHED-CM(HGF除去hSHED-CM)を投与した場合には、未処理のhSHED-CMを投与した場合と比べて、創傷領域が遅れて拡大し、治癒も遅くなるという傾向が見られた。 α -VEGFで処理したhSHED-CM(VEGF除去hSHED-CM)を投与した場合には、未処理のhSHED-CMを投与した場合と比べて、創傷領域が大きく拡大し、治癒も遅れるという相違が有意に見られた。以上から、褥瘡の治癒には、HGF及びVEGFが貢献しているという結論が得られた。

[0234] (2) 上記細胞の培養上清を用いた活性酸素抑制効果の検討

間葉系幹細胞(以下、「MSC」と略すことがある。)自身が、活性酸素種(以下、「ROS」と略すことがある。)の抑制効果を以て、褥瘡の治癒に関与していることが以下の文献に報告されている(Protective effect of mesenchymal stem cells on the pressure ulcer formation by the regulation of oxidative and endoplasmic reticulum stress)。このため、MSC自身ではなく、MSCの培養上清にこうした効果があるか否かを検証すべく、in vitro試験を実施した(図22参照)。

- [0235] 図22に、褥瘡モデルの発症機序をin vitroの系で再現した実験工程を示す。また、図23に示すように、HGF又はVEGFを特異的抗体で免疫沈降により除去した本発明の上清を加えてNIH3T3を培養し、各サイトカインによるROS抑制の有無を確認した。陽性対照としては、t-ブチルヒドロキシペルオキシダーゼ（以下、「TBHP」と略することがある。）を使用した。
- [0236] この実験には、NIH3T3細胞を使用し、以下の手順で行った（図22参照）。底面がクリアな8ウェルスライドチャンバーへNIH3T3細胞を 3.0×10^4 個/ウェルで播種し、一晚、DMEM培地中、37℃にて5%CO₂インキュベーター中で培養し、各ウェルの細胞の接着を顕微鏡で確認して1xPBSでウォッシュした。事前に72時間1.0%酸素下に暴露した1.0%FBS入りDMEM培地をスライドチャンバーへ添加し、1.0%酸素下で、37℃にて5%CO₂インキュベーター中で36～48時間培養した。その後、通常の20.0%酸素下の培養槽にて5～6時間、37℃にて5%CO₂インキュベーター中で培養した。
- [0237] 次いで、2',7'-dichlorofluorescein diacetate（以下、「DCFDA」と略することがある。）Cellular ROS Detection Assay kit（abcam社製）付属の1x bufferで再度洗浄し、その後、1x bufferに溶解させた10～20 μ M DCFDAを各ウェルに200 μ L加え、37℃で45分間培養して細胞にDCFDAを取り込ませた。細胞内で発生したROSを、DCF（dichlorofluorescein）の蛍光として蛍光顕微鏡を用いてEx/Em（励起波長／蛍光波長）= 480/527 nmの条件で検出した。
- [0238] 細胞に取り込ませたDCFDAがROSによって酸化され、強い蛍光を発するDCFとなり、その強さが細胞内のROSレベルと比例する性質を利用して、ROSの産生量を測定した。具体的には、ROSの発生量に比例して増加したDCFに480nmの励起光を照射し、生じた蛍光の強度から定量した。対照には155 nMのTBHPを使用し、観察結果の暗部と明部のコントラストからROSを定量した。結果を図23及び図24に示す。図23(A)の画像の最大輝度と最小輝度から算出したコントラストをROSの相対値として定量比較し、図24として示した。
- [0239] 陰性対照群として通常培養したNIH3T3を使用し、陽性対照群としてTBHP添加培地で培養したNIH3T3を使用した。いずれの対照でも、培養時の酸素濃度

は通常と同じく20.0%とした。陰性対照群では、ROSの発生を示すシグナルの Contrastive valueが約50であった。これに対し、陽性対照群では約3倍の強い数値が示された。また、1.0%酸素下で36～48時間培養後に20.0%酸素下で培養した細胞（以下、このような培養を「再酸素化」ということがある。）からは、上記陰性対照群と比較して、約2倍という強いROSのシグナルが検出された。これに対し、本発明の培養上清を添加して上記と同様に培養した細胞のROSのシグナルは、陰性対照群と同レベルであった。しかし、上記培養上清からHGF及びVEGFを除くとROSのシグナルが増加した。以上より、hSHED-CMがROSの産生抑制活性を有すること、特に、HGFとVEGFとがROSの産生抑制に重要であることが示された。

[0240] （3）上記細胞の培養上清を用いた小胞体ストレス抑制効果の検討

マウス線維芽細胞株NIH3T3細胞を用いたときの上記培養上清による小胞体ストレスの抑制効果について、MSC自身ではなく、MSCの培養上清にこうした効果があるか否かを検証すべく、in vitro試験を実施した。1.5 μ g/mL ツニカマイシン（TM）を添加してリアルタイムPCRを実施するまでの実験の概要を、図25(A)に模式的に示す。

この実験には、マウスNIH3T3細胞を使用し、培地としてはDMEMを使用して、以下の手順で行った。12ウェルプレートへ細胞を 1×10^5 個播種して一晚培養し、1.5 μ g/mL ツニカマイシンを懸濁した対照培地または50%hSHED-CM/DMEM (v/v)を、各ウェルに500 μ L加えた。37°Cで一晚培養し、上記の細胞をトリプシン処理したのちに回収し、常法に従ってRNAを抽出した。その後、逆転写酵素を用いてリアルタイムPCR（以下、「q-PCR」ということがある。）を行い、小胞体ストレスマーカー（評価の指標遺伝子）の発現量をこれらのmRNA量で定量した。評価の指標は、小胞体ストレスマーカーである、XBP-1、GRP78及びCHOPとし、内在性コントロールはHPRTとした。結果を図25(B)に示す。図25(B)中、縦軸は、対照を1としたときの発現量の相対比を示す。

[0241] ここで、XBP-1は、小胞体ストレス時に標的遺伝子の転写を遮断する負のフィードバック調節因子として知られており、小胞体ストレス時に核移行してG

RP78などの分子シャペロンのUPRに結合してシャペロン誘導に関与することが報告されている。GRP78 (HSPA5) は、「免疫グロブリン重鎖結合タンパク質 (immunoglobulin heavy chain-binding protein: BiP)」とも呼ばれる、HSP70 (熱ショックタンパク質70) ファミリーのメンバーであり、小胞体でのタンパク質アッセンブリと折りたたみに関与する。GRP78は、すべての真核生物細胞の小胞体で恒常的に発現する小胞体タンパク質であり、癌細胞増殖の阻害およびアポトーシスに関連することが報告されている。CHOPは、小胞体ストレス下で誘導される転写因子であり、DR5 (Death receptor 5) などを誘導し、caspaseカスケードを活性化してアポトーシスを起こすことが報告されている。

[0242] 添加物なしのDMEM中で培養したNIH3T3細胞の各小胞体ストレスマーカーの発現を1.0とした。DMEMに1.5 μ g/mLのツニカマイシンを加えて培養した細胞では、各マーカーの発現量は、XBP-1が約7倍、GRP78が約18倍、CHOPが4倍と有意に上昇していた。これに対して、hSHED-CMを添加した細胞では、XBP-1が約4倍、GRP78が約14倍、CHOPが約3倍であり、hSHED-CMを加えなかった細胞と比べて有意に小胞体ストレスマーカーの発現が抑制された。結果を、下記表19及び図25(B)に示す。

[0243] [表19]

	細胞培養に使用した培地			指標の発現量 (比)		
	DMEM	ツニカマイシン	hSHED	XBP-1	GRP78	CHOP
陰性対照	+	—	—	1.0	1.0	1.0
陽性対照	+	+	—	約7	約18	4
試料	+	—	+	約4*	約14*	約3*

*: 有意差あり

[0244] (4) 上記細胞の培養上清を用いた褥瘡の抑制効果の検討

図1に示すように、hSHED-CMは、コラーゲン及びエラスチンの分解酵素を抑制する作用を有するメタロプロテイナーゼ組織阻害剤TIMPを多く含有する。これまで、褥瘡に対して軟部組織が圧力を緩衝・分散させるクッションとして働くと報告されている（非特許文献3参照）ことから、hSHED-CMの投与

によって褥瘡に対する皮膚組織の抵抗性が高まるのか否かを検証するために、*in vivo*試験を実施した。

- [0245] 上記実施例5の(2-6)投与スケジュール6と同様に、対照群又は試験群の患部形成予定部位に、DMEM又はhSHED-CMを100 μ LずつI/R実施7日前より投与した(図26(A)および(B))。I/R処置前に背部皮膚組織を回収して、この部位の皮膚組織がどのように変化するかを観察した(図27(A)および(B))。その結果、hSHED-CMを投与した試験群のマウスでは、投与部位の皮膚組織が厚くなる傾向がみられた。

図28(A)に、上記の投与スケジュールで投与したときの障害面積の経時変化を示す。図中、*は $p < 0.05$ を、また、**は $p < 0.01$ を示す。また、図28(B)に、投与スケジュール6で事前処置したマウスの褥瘡形成部位の治癒状況を示す。上段はDay 2~Day 16の間の対象群を、下段は同じ期間内のhSHED-CM投与群の当該部位の変化をそれぞれ示す。I/R処置後の褥瘡形成部位(患部)の障害面積を比較すると、hSHED-CMを事前投与した群では、DMEM投与群に比べて障害面積の拡大が有意に抑制されていた(図28(A)および(B))。

- [0246] (5) まとめ

以上より、上記hSHED-CMには褥瘡の悪化を防ぐ効果があると思われた。また、褥瘡が形成される前後いずれの時期に投与した場合でも、一定の効果を発揮していることが確認された。さらに、上記hSHED-CMに含まれる種々のサイトカインのうち、HGF及びVEGFが褥瘡の予防及び治癒に関与するものと思われた。また、このことに伴って褥瘡の治癒の機序を検討したところ、hSHED-CMはROSの抑制及び小胞体ストレスの緩和を介して、組織の再生を促進するものと考えられた。

産業上の利用可能性

- [0247] 本発明は、医薬の技術分野において極めて有用である。

配列表フリーテキスト

- [0248] 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)
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)

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)

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)

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)

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)

配列番号 7 : 細胞に導入する遺伝子を含むDNA断片の塩基配列 (7)

配列番号 8 : 細胞に導入する遺伝子を含むDNA断片の塩基配列 (8)

配列番号 9 : 細胞に導入する遺伝子を含むDNA断片の塩基配列 (9)

配列番号 10 : PCR用プライマー (1) の塩基配列

配列番号 11 : PCR用プライマー (2) の塩基配列

配列番号 12 : PCR用プライマー (3) の塩基配列

配列番号 13 : PCR用プライマー (4) の塩基配列

配列番号 14 : PCR用プライマー (5) の塩基配列

配列番号 15 : PCR用プライマー (6) の塩基配列

配列番号 16 : PCR用プライマー (7) の塩基配列

配列番号 17 : PCR用プライマー (8) の塩基配列

配列番号 18 : PCR用プライマー (9) の塩基配列

配列番号 19 : PCR用プライマー (10) の塩基配列

請求の範囲

- [請求項1] b m i - 1 遺伝子、H P V - E 6 遺伝子、H P V - E 7 遺伝子、及びT E R T 遺伝子を組み込んだ間葉系不死化幹細胞の培養上清を有効成分とする、褥瘡の予防及び/又は治療剤。
- [請求項2] 前記T E R T はh T E R T 又はp T E R T である、ことを特徴とする請求項1 に記載の褥瘡の予防及び/又は治療剤。
- [請求項3] 前記間葉系幹細胞は歯髄幹細胞である、ことを特徴とする請求項1 に記載の褥瘡の予防及び/又は治療剤。
- [請求項4] 前記歯髄幹細胞はヒト又はブタ由来である、ことを特徴とする請求項1 又は3 に記載の褥瘡の予防及び/又は治療剤。
- [請求項5] 前記培養上清は、インスリン様成長因子結合タンパク質、メタロプロテイナーゼ組織阻害剤、血管内皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、腫瘍壊死因子受容体II、及びオステオプロテゲリン・破骨細胞分化抑制因子からなる群から選ばれる少なくとも3種類以上のサイトカインを、それぞれ、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ p g / m L の濃度範囲で含む、ことを特徴とする請求項1 ～4 のいずれかに記載の褥瘡の予防及び/又は治療剤。
- [請求項6] 前記インスリン様成長因子結合タンパク質は、I G F B P - 2、I G F B P - 3、I G F B P - 4、及びI G F B P - 6 からなる群から選ばれる少なくとも1つである、ことを特徴とする請求項5 に記載の褥瘡の予防及び/又は治療剤。
- [請求項7] 前記メタロプロテイナーゼ組織阻害剤は、T I M P - 1 又はT I M P - 2 である、ことを特徴とする請求項5 に記載の褥瘡の予防及び/又は治療剤。
- [請求項8] 前記培養上清は、凍結品、凍結乾燥粉末及び液剤からなる群から選ばれるいずれかの形態である、ことを特徴とする請求項1 ～7 のいずれか記載の褥瘡の予防及び/又は治療剤。
- [請求項9] さらに、賦形剤、pH調整剤、希釈剤、及び緩衝剤からなる群から選

ばれる少なくとも1つ以上を含むことを特徴とする、請求項8に記載の前記褥瘡の予防及び/又は治療剤。

[請求項10] 注射剤、注射剤、軟膏、硬膏、クリーム剤、及び経皮吸収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9に記載の褥瘡の予防及び/又は治療剤。

[請求項11] 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) 遺伝子のセットを組み込んだ間葉系不死化幹細胞を培養して得られた、インスリン様成長因子結合タンパク質、メタロプロテイナーゼ組織阻害剤、血管内皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、腫瘍壊死因子受容体II、及びオステオプロテゲリン・破骨細胞分化抑制因子からなる群から選ばれる少なくとも3種類以上のサイトカインを、それぞれ、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ p g / m L の濃度範囲で含む上記培養組成物を使用する、褥瘡組織の修復方法。

[請求項12] 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) 遺伝子のセットを組み込んだ間葉系不死化幹細胞を培養して得られた、インスリン様成長因子結合タンパク質、メタロプロテイナーゼ組織阻害剤、血管内皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、腫瘍壊死因子受容体II、及びオステオプロテゲリン・破骨細胞分化抑制因子からなる群から選ばれる少なくとも3種類以上のサイトカインを、それぞれ、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ p g / m L の濃度範囲で含む上記培養組成物を使用する、褥瘡における細胞の再生方法。