明　細　書

発明の名称 ： 神経幹細胞の自己複製促進剤およびその使用方法

技術分野

[0001] 本発明は、神経幹細胞の自己複製促進剤およびその使用方法に関する。

背景技術

[0002] 神経幹細胞は、脊椎損傷をはじめとする神経損傷等に起因する重篤な神経の機能不全に対する移植療法のドナー細胞として治療効果を有し、再生医療への応用が期待されている（例えば、Okano H, Ogawa Y, Nakamura M, kaneko S, Iwanami A, Toyama Y. (2003), Seminars in Cell& Developmental Biology 14(3): 191-198 参照）。例えば、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）や人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）等の未分化細胞から神経幹細胞を作製し（例えば、Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Enoki R, Koizumi A, Ishii S, Itoyama Y, Sobue G, Okano H. (2008), Stem Cells 2008 Dec 26(12): 3086-3098 参照）、これを患者に移植することも検討されている。しかし、ＥＳ細胞の臨床応用は倫理的な観点からの問題や、移植時の拒絶反応などの問題があり、また、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）についても癌化等の問題が解決されておらず、治療に応用するには解決すべき課題が多い。

[0003] 一方、生体が脳に有している神経幹細胞を活性化させてその数を増やすことができれば、他個体からの神経幹細胞移植を行わずに神経の機能不全を改善することができると考えられるため、少なくとも拒絶反応や癌化などの問題は生じないと思われる。

[0004] しかし、現在のところ、神経幹細胞の活性化、あるいは自己複製の促進にかかわる因子については、主に増殖因子や細胞分化系譜の調節因子が検討されているだけで、確実に同定されているわけではない。従って、神経幹細胞の増殖を人為的に制御できているとはいえず、内在性の神経幹細胞数を増やすことは実現が困難となっている。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] そこで、本発明は、神経幹細胞の自己複製促進剤およびその使用方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、以下の実施例に示すように、骨髄由来血管内皮前駆細胞の培養上清に含まれるＥＣＦ－Ｌによって神経幹細胞の自己複製が促進されることを見出し、本発明の完成に至った。

[0007] すなわち、本発明に係る促進剤は、神経幹細胞の自己複製を促進するための促進剤であって、ＥＣＦ－ＬまたはＥＣＦ－Ｌを発現する発現ベクターを有効成分として含むことを特徴とする。

[0008] ここで、本発明に係る促進剤に含まれる前記ＥＣＦ－Ｌは、ヒトacidic chitinase、ヒトchitotriosidase、ヒトoviductal glycoprotein 1 precursor、ヒトchitinase 3-like 2 またはヒトchitinase 3-like 1であることが好ましい。

[0009] また、本発明に係る神経幹細胞を培養する方法は、ＥＣＦ-Ｌ存在下で神経幹細胞を培養することを特徴とする。

[0010] ここで、本発明に係る神経幹細胞を培養する方法において、前記ＥＣＦ－Ｌはヒトacidic chitinase、ヒトchitotriosidase、ヒトoviductal glycoprotein 1 precursor、ヒトchitinase 3-like 2 またはヒトchitinase 3-like 1であることが好ましい。

[0011] 本発明に係る医薬組成物は、神経幹細胞の自己複製を促進するための医薬組成物であって、ＥＣＦ－ＬまたはＥＣＦ－Ｌを発現する発現ベクターを含有することを特徴とする。ここで、本医薬組成物は、神経の機能不全をもたらす疾患の治療用医薬組成物であることが好ましい。このような疾患は、脳梗塞、脊髄損傷、筋委縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、進行性核上性麻痺、ハンチントン病、多系統萎縮症、脊髄小脳変性症、脳出血、または、くも膜下出血であってもよい。また、神経の機能不全は加齢に起因してもよい。

[0012] ここで、本発明に係る医薬組成物において、前記ＥＣＦ－Ｌはヒトacidic chitinase、ヒトchitotriosidase、ヒトoviductal glycoprotein 1 precursor、ヒトchitinase 3-like 2 またはヒトchitinase 3-like 1であることが好ましい。

[0013] 本発明に係る医薬剤は、上記いずれかの医薬組成物を含有することを特徴とする。

[0014] ＝＝クロスリファレンス＝＝

本出願は、２０１０年４月２６日付で出願した日本国特許出願２０１０－１０１４１５に基づく優先権を主張するものであり、当該基礎出願を引用することにより、本明細書に含めるものとする。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]本実施例の一実施形態においてマウス脳内にＥＰＣ－ＣＭを注入した際の、ＢｒｄＵ長期群、ＢｒｄＵ短期群、ＢｒｄＵ短期１ｄ群における処理の工程を示す図である。

[図2]本発明の一実施形態において、マウス脳内にＥＰＣ－ＣＭを注入した際に、ＢｒｄＵにより標識される細胞数を示したグラフである。

[図3]本発明の一実施形態において行ったニューロスフェアアッセイ（実施例２、５、７）のフローチャートである。

[図4]本発明の一実施形態において、神経幹細胞の１回目の継代後の培地としてＥＰＣ－ＣＭ、ＧＦ含有ＥＰＣ－ＣＭ、ＭＳＣ－ＣＭ、あるいは、ＧＦ含有ＭＳＣ－ＣＭを用いた場合の、ニューロスフェア形成率を示すグラフである。

[図5]本発明の一実施形態において、神経幹細胞の１回目の継代後の培地としてＥＰＣ－ＣＭあるいはＭＳＣ－ＣＭを用いた場合の、ニューロスフェア形成率を示すグラフである。

[図6]本発明の一実施形態において、ＥＰＣ－ＣＭとＭＳＣ－ＣＭに含有される各増殖因子量を示すグラフである。

[図7]本発明の一実施形態において、抗体無添加ＥＰＣ-ＣＭ群、ＥＰＣ－Ｃ

Mに含有される増殖因子を抗体により中和した群（ＥＰＣ－ＣＭ＋抗ＧＦ群）、および増殖因子添加ＭＨＭ群（ＭＨＭ＋ＧＦ群）のニューロスフェア形成率を示すグラフである。

[図8]本発明の一実施形態において、ＥＰＣ－ＣＭおよびＭＳＣ－ＣＭを二次元電気泳動に供した際の、展開されたタンパク質のスポットを示すゲルの写真である。ここに示されるスポットは、ＭＳＣ－ＣＭ／ＥＰＣ－ＣＭが１／４より小さい（ｐ＜０．０１）スポットである。

[図9]本発明の一実施形態において、ＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質を発現するように遺伝子導入されたＨＥＫ２９３Ｔ細胞、対照遺伝子導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、および非遺伝子導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞の培養上清のウエスタンブロットの結果を示す図である。

[図10]本発明の一実施形態において、胎仔マウス由来二次ニューロスフェアにおけるニューロスフェアアッセイを行った場合の、１回目継代後にＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質含有ＭＨＭで培養した群（ＲｃＥＣＦ－Ｌ）、ＥＰＣ-ＣＭで培養した群、ＥＣＦ－Ｌ枯渇ＥＰＣ－ＣＭで培養した群、および、ＭＨＭで培養した群におけるニューロスフェア形成率を示すグラフである。

[図11]本発明の一実施形態において、胎仔マウス由来三次ニューロスフェアにおけるニューロスフェアアッセイを行った場合の、１回目継代後にＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質含有ＭＨＭで培養した群（ＲｃＥＣＦ－Ｌ）、ＥＰＣ-ＣＭで培養した群（ＥＰＣ－ＣＭ）、増殖因子を添加ＭＨＭで培養した群（ＭＨＭ＋ＧＦ）におけるニューロスフェア形成率を示すグラフである。

[図12]本発明の一実施形態において、成体マウス由来神経幹細胞のシングル細胞培養を行った場合の、１回目継代後にＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質含有ＭＨＭで培養した群（ＲｃＥＣＦ－Ｌ）、増殖因子を添加したＭＨＭで培養した群（ＭＨＭ－ＧＦ）におけるニューロスフェア形成ウェル率を示したグラフである。

[図13]本発明の一実施形態において、海馬におけるＥＣＦ－Ｌの局在（Ａ、Ｂ、Ｃ（ＸＺ軸断面）、Ｄ（ＹＺ軸断面））、および、ＣＤ３１の局在（Ｅ

、Ｆ（ＸＺ軸断面）、Ｇ（ＹＺ軸断面））と、ＥＣＦ－ＬとＣＤ３１の共局在（Ｈ、Ｉ（ＸＺ軸断面）、Ｊ（ＹＺ軸断面））を示す顕微鏡写真である。

[図14]本発明の一実施形態において、側脳室周囲におけるＥＣＦ-Ｌの局在（Ａ、Ｆ）、ＣＤ３１の局在（Ｂ、Ｇ）、ＧＦＡＰ（ｍｏＧＦＡＰ）の局在（Ｃ）、ＡＱＰ４の局在（Ｈ）ＥＣＦ－ＬとＣＤ３１の共局在（Ｄ、Ｉ）、ＣＤ３１とＧＦＡＰの共局在（Ｅ）、ＣＤ３１とＡＱＰ４の共局在（Ｊ）を示す顕微鏡写真である。

[図15]本発明の一実施形態において、側脳室におけるＣＤ３１の局在（Ａ）、ＧＦＰ（骨髄由来細胞）とＣＤ３１の局在（Ｂ）、ＥＣＦ－Ｌの局在（Ｃ）、ＥＣＦ－Ｌ、ＧＦＰおよび核の局在（Ｄ）を示す顕微鏡写真である。

[図16]本発明の一実施形態において、大脳皮質におけるＣＤ３１の局在（Ａ）、ＥＣＦ－Ｌの局在（Ｂ、陰性）、ＥＣＦ－Ｌ、ＧＦＰ（陰性）、核の局在（Ｃ）を示す顕微鏡写真である。

[図17]本発明の一実施形態において、ニューロスフェアを１回継代した後に、ＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質含有ＭＨＭ（ＲｃＥＣＦ－Ｌ群）、増殖因子を加えたＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質含有ＭＨＭ（ＲｃＥＣＦ－Ｌ＋ＧＦ群）、ＥＰＣ-ＣＭ（ＥＰＣ－ＣＭ群）、ＥＣＦ－Ｌ枯渇ＥＰＣ－ＣＭに増殖因子を加えたＭＨＭ（ＥＣＦ－Ｌ枯渇ＥＰＣ－ＣＭ＋ＧＦ群）、あるいは、増殖因子を加えたＭＨＭ（ＭＨＭ＋ＧＦ群）において培養した場合の、三次ニューロスフェアから分化させた細胞におけるβＩＩＩ－チューブリン（Ａ、Ｅ、Ｉ、Ｍ、Ｑ）、Ｏ４（Ｂ、Ｆ、Ｊ、Ｎ、Ｒ）、およびＧＦＡＰ（Ｃ、Ｇ、Ｋ、Ｏ、Ｓ）の標識を示す顕微鏡写真と、βＩＩＩ－チューブリン陽性細胞、Ｏ４陽性細胞、ＧＦＡＰ陽性細胞の割合（Ｄ、Ｈ、Ｌ、Ｐ、Ｔ）を示すグラフである。

[図18]本発明の一実施形態において、ｉｎ ｖｉｖｏ でＥＣＦ－Ｌ（ＲｃＥＣＦ－Ｌ）あるいはＭＨＭを注入した個体の線条体から単離した細胞を、ＢｒｄＵを含有したＭＨＭ（１％ＦＢＳ含有）において培養して分化させた細胞における、βＩＩＩ－チューブリン陽性細胞（Ａ、Ｃ）とＢｒｄＵ陽性細

胞（Ｂ、Ｄ）の顕微鏡写真、および、ＢｒｄＵ陽性細胞数を示すグラフ（Ｅ）、βＩＩＩ－チューブリンとＢｒｄＵの二重陽性細胞（新生神経細胞）数を示すグラフ（Ｆ）である。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、上記知見に基づき完成した本発明の実施の形態を、実施例を挙げながら詳細に説明する。

[0017] 実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Ltd.等の標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いる場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコールを用いる。

[0018] なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的な実施例等は、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図ならびに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々に修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

[0019] ＝＝ＥＣＦ－Ｌ＝＝

本明細書においてＥＣＦ－Ｌとは、配列番号１に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、配列番号１に示すアミノ酸配列を有するタンパク質のホモログ、または配列番号１に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子のオーソログがコードするアミノ酸配列を有するタンパク質である。ここで、ホモログは、配列番号１に示すアミノ酸配列と、６０％以上相同であることが好ましく

、７０％以上相同であることがより好ましく、８０％以上相同であることがさらに好ましく、９０％以上相同であることがさらに好ましく、９５％以上相同であることがさらに好ましい、というように、相同性が高いほど好ましい。ＥＣＦ－Ｌのアミノ酸配列は、いずれの動物種のＥＣＦ－Ｌに由来するものであってもよく、神経幹細胞の自己複製促進機能を有する範囲で制限されないが、自己複製を促進させる対象となる神経幹細胞が由来する動物種と同じであることが好ましく、例えば、ヒト由来の神経幹細胞の自己複製を促進する場合には、ヒト由来のアミノ酸配列を有するＥＣＦ－Ｌを用いることが好ましい。ここで、ヒト由来のアミノ酸配列を有するＥＣＦ－Ｌ、すなわち、ＥＣＦ－ＬのヒトホモログとしてＥ、例えば、acidic chitinase （isoform a（ＮＣＢＩアクセッション番号: NP_068569.2)及びisoform c（ＮＣＢＩアクセッション番号: NP_970615.2)）、chitotriosidase（ＮＣＢＩアクセッション番号: NP_003456.1)、oviductal glycoprotein 1 precursor（ＮＣＢＩアクセッション番号: NP_002548.3)、chitinase 3-like 2 （isoform a（ＮＣＢＩアクセッション番号: NP_003391.2)、isoform b（ＮＣＢＩアクセッション番号: NP_001020368.1)、及びisoform c（ＮＣＢＩアクセッション番号: NP_001020370.1)) chitinase 3-like 1（ＮＣＢＩアクセッション番号: NP_001267.2)が挙げられる。

[0020] このＥＣＦ－Ｌは、その神経幹細胞自己複製促進機能を失わない範囲で変異を有していていてもよく、例えばそのアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、挿入、または置換されているものも含む。また、その神経幹細胞自己複製促進機能を失わない範囲で、糖鎖修飾等の翻訳後修飾がなされていてもよい。

[0021] ＝＝神経幹細胞の自己複製促進剤とその製造方法＝＝

ＥＣＦ－Ｌ存在下で神経幹細胞を培養すると、神経幹細胞の自己複製を促進することができる。従って、ＥＣＦ―Ｌを有効成分として含有する薬剤は、神経幹細胞の自己複製促進剤として有効である。

[0022] ＥＣＦ－Ｌは、所望の自己複製促進機能を有する範囲でその取得、調製法

によって特に制限されず、天然由来ＥＣＦ－Ｌであっても、あるいは、人工ＥＣＦ－Ｌであってもよい。天然由来のＥＣＦ－Ｌは、例えば、周知のタンパク質の単離、精製法を適宜組み合わせることにより、ＥＣＦ－Ｌを発現している動物組織から取得することができる。人工ＥＣＦ－Ｌは、例えば、周知の遺伝子組換え技術や化学合成法を用いて製造することができる。遺伝子組換え技術の場合、例えば、ＥＣＦ－ＬをコードするＤＮＡの塩基配列を好適な発現ベクターに導入した後、培養細胞等の宿主に対してその発現ベクターをトランスフェクトし、ペプチドを発現させ、培地からＥＣＦ－Ｌを単離するか、培地をそのまま用いることもできる。一方、化学合成法としては、例えば、Ｆｍｏｃ法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）やｔＢｏｃ法（ｔ-ブチルオキシカルボニル法）等が挙げられる。また、各種市販のペプチド合成機を利用してＥＣＦ－Ｌを製造することもできる。

[0023] あるいは、神経幹細胞の自己複製促進剤は、ＥＣＦ―Ｌを発現する発現ベクターを含有しても良い。この発現ベクターは、神経幹細胞内でＥＣＦ－Ｌを発現させるための適切なプロモーター、および、その下流にＥＣＦ－ＬをコードするＤＮＡを有しており、この発現ベクターが細胞内に導入されることにより、ＥＣＦ―Ｌが発現する。このため、この発現ベクターを含有する薬剤は、神経幹細胞に対し、ＥＣＦ－Ｌを含有する薬剤と同じ自己複製促進効果をもたらす。

[0024] この促進剤は、ＥＣＦ－Ｌ以外の物質であって、神経幹細胞に作用して自己複製を促進する物質、神経幹細胞を維持するために有効な物質、または、神経幹細胞の増殖を促進する物質を一種類、または複数種含有してもよい。このような物質として、例えば、ＥＧＦ、ＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＢＤＮＦ、ＰＥＤＦ、ＨＧＦ、ＩＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0025] この促進剤は、必要に応じて、上記有効成分以外の、当業者に周知の担体、希釈剤、腑形剤等の製剤用添加物等を用いて剤形化することができる。その形態は促進剤として適切な剤形であれば特に制限されず、錠剤、カプセル

、乳剤、液剤、顆粒、粒剤散剤、ペースト剤等に剤形化することができる。

[0026] ＝＝神経幹細胞の培養方法＝＝

神経幹細胞とは、自己複製能及び神経細胞とグリア細胞への多分化能を有する細胞である。神経幹細胞を、ＥＣＦ－Ｌ存在下で培養することにより、神経幹細胞の非対称分裂およびそれに伴うグリア前駆体への分化を抑制し、神経幹細胞のみを効率よく自己複製させることができる。

[0027] 増殖させるべき神経幹細胞は、その取得方法によって制限されない。例えば、神経幹細胞を単離する材料となる組織は、神経幹細胞を含有している組織であれば制限されず、動物の中枢神経組織、中でも海馬や側脳室やその周辺が好ましい。この動物の発生、発達段階は、所望の神経幹細胞が得られる範囲内で制限されず、胎仔（胎児）、未成熟個体、成体等のいずれであってもよい。神経幹細胞が由来する動物種は特に制限されないが、ヒトまたはヒト以外の哺乳動物であることが好ましい。

[0028] 神経幹細胞を組織から調製する際、組織材料に対し、適切な前処理を行ってもよい。例えば、神経幹細胞を巻き込んだ細胞塊になっている場合には、含まれている細胞を解離するために、材料に対してピペッティング等による物理的処理や、酵素等による化学的処理を行えばよい。酵素としては、トリプシン、コラゲナーゼ等、常法で用いられている酵素が挙げられる。

[0029] あるいは、神経幹細胞を胚性幹細胞（ＥＳ細胞）や人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）から分化させても良い。例えば、まず、ＥＳ細胞やｉＰＳ細胞を、低濃度レベル（10^{-9} Ｍ～10^{-6} Ｍ）のレチノイン酸存在下で培養し、embryoid body（ＥＢ）を形成させる。あるいは、分化細胞由来多能性幹細胞の培地にノギン（Ｎｏｇｇｉｎ）タンパク質を添加することによりＥＢを形成させることもできる。具体的には、アフリカツメガエル・ノギンを哺乳類培養細胞に導入し、一過性にノギン蛋白質を発現させた培養上清をそのまま（１～５０％（ｖ／ｖ））使用してもよく、リコンビナントノギン蛋白質（１μｇ／ｍｌ程度）を用いてもよい。こうして得られたＥＢを解離して、ｂＦＧＦ（１０～１００ ｎｇ／ｍｌ）を添加した無血清培地で培養することによっ

てニューロスフェアとして神経幹細胞を分化させることができる。

[0030] このようにして得られた神経幹細胞を遠心分離（５００～２０００ｒｐｍ、３～１０分）し、沈殿させた細胞に培地を入れて細胞浮遊液を調製した後、細胞を１００００～２００００／ｃｍ^{2}でプレートに播種し、３７℃、５％CO_2インキュベーターで培養する。

[0031] ここで用いる培地は、神経幹細胞を培養することができる培地であれば特に制限されず、例えば、α－ＭＥＭ（α－minimum essential medium）、ＤＭＥＭ（Dulbecco’s modified Eagle’s medium）、ＩＭＤＭ（Isocove’s modified Dulbecco’s medium）等が挙げられる。神経幹細胞の自己複製を促進するために、培地には有効量のＥＣＦ－Ｌを含有する神経幹細胞の自己複製促進剤を添加しておく。ここで、ＥＣＦ－Ｌの有効量は特に制限されず、培養する神経幹細胞に合わせて当業者が適宜決定することができる。

[0032] また、培地は、ＥＣＦ－Ｌまたは神経幹細胞の自己複製促進剤以外に、通常細胞培養に用いられる、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質や神経幹細胞の維持や増殖促進に有効な成長因子（例えば、ＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＧＦ－α、ＬＩＦ等）を含んでいてもよい。

[0033] ＝＝自己複製された神経幹細胞の使用＝＝

本発明に係る培養方法によって自己複製した神経幹細胞は、再生医療分野において高い利用価値を有する。例えば、自己複製した神経幹細胞を、神経の機能不全が生じた神経組織に必要量移植することにより、移植部位において新たな神経細胞が分化し、組織再生することができる。この場合、移植細胞である神経幹細胞の由来動物種（ドナー）と、移植を受ける動物種（レシピエント）は同一であることが好ましく、同一個体であることがさらに好ましいが、これに制限されない。また、自己複製された神経幹細胞の移植前調製法は特に制限されず、当業者が適宜決定できるが、例えば、培地やバッファーに懸濁して調製しても、あるいは、細胞塊や細胞シートに調製してもよい。ここで、上記レシピエントの疾患は、神経幹細胞の移植によって病状の改善が期待される疾患であれば特に制限されないが、神経の機能不全をもた

らす疾患であることが好ましく、例えば、脊髄損傷などの外傷性疾患、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、進行性核上性麻痺、ハンチントン病、多系統萎縮症、脊髄小脳変性症等の神経変性疾患、脳出血、くも膜下出血、脳梗塞等による神経細胞の壊死等が挙げられる。また、神経の機能不全が加齢に起因する場合も、自己複製された神経幹細胞の移植によって治療することができる。

[0034] ＝＝ＥＣＦ－Ｌを含有する医薬組成物＝＝

本発明に係る、神経幹細胞を増殖するための医薬組成物は、ＥＣＦ－ＬまたはＥＣＦ－Ｌを発現する発現ベクターを含有することを特徴とする。

[0035] ＥＣＦ－Ｌ存在下で神経幹細胞を培養すると、神経幹細胞の自己複製を促進することができる。従って、ＥＣＦ—Ｌを有効成分として含有する医薬組成物を、神経の機能不全をもたらす疾患に罹患する患者に投与すると、患者自身の神経幹細胞の自己複製を促進することにより、神経幹細胞を増殖させることができる。そして、この神経幹細胞が新たな神経細胞を生み出し、組織再生につながる。

[0036] 神経の機能不全をもたらす疾患として、例えば、脊髄損傷などの外傷性疾患、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、進行性核上性麻痺、ハンチントン病、多系統萎縮症、脊髄小脳変性症等の神経変性疾患、脳出血、くも膜下出血、脳梗塞等による神経細胞の壊死等が挙げられる。また、神経幹細胞の機能不全は、加齢に起因してもよい。

[0037] 本発明に係る医薬組成物は、ＥＣＦ－Ｌを有効成分として含む。この医薬組成物に含有されるＥＣＦ－Ｌの濃度は、神経幹細胞を増殖させるために必要な最終濃度を考慮し、当業者が適宜決定できる。また、この医薬組成物は、ＥＣＦ－Ｌ以外の物質であって、神経幹細胞に作用して自己複製を促進する物質、神経幹細胞を維持するために有効な物質、または、神経幹細胞の増殖を促進する物質を一種類、または複数種含有してもよい。このような物質として、例えば、ＥＧＦ、ＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＢＤＮＦ、ＰＥＤＦ、ＨＧＦ、ＩＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0038] ＥＣＦ－Ｌを有効成分として含む医薬組成物を剤形化して製造された医薬剤は、神経細胞の機能不全をもたらす疾患の治療に用いることができる。

[0039] この医薬剤は、必要に応じて薬学的に許容される担体を含有し、製剤化される。ここで用いられる薬学的に許容される担体は、調製される医薬組成物の形態に応じて、慣用されている担体の中から適宜選択して用いることができる。医薬剤の形態は、治療に適切な剤形であれば特に特定されず、例えば、経口剤として、錠剤、カプセル、顆粒、散剤、シロップ、腸溶剤、徐放性カプセル、カシュー、咀嚼錠、ドロップ、丸剤、内用液剤、菓子錠剤、徐放錠、徐放性顆粒等に剤形化してもよい。また、注射剤に剤形化してもよく、例えば、溶液性注射剤、乳濁性注射剤、または固形注射剤等が挙げられる。本医薬剤には、上記製剤用添加物の他、異なる医薬組成物を配合することもできる。

[0040] なお、本医薬剤は、有効成分として本発明に係る上記医薬組成物の一種類を含有していても、あるいは複数種を含有していても制限はなく、当業者が適宜選択することができる。本医薬剤に含有される医薬組成物は、ＥＣＦ－Ｌが投与対象と同じ動物種に由来することが好ましい。たとえば、医薬剤をヒトに投与する場合には、ヒト由来のＥＣＦ－Ｌを含有する医薬組成物を選択することが好ましい。

[0041] 本発明の医薬剤の投与法は、安全とされている投与量の範囲内において、投与対象の動物に対し、必要量を、適した方法で投与することができる。本発明の治療用医薬剤の投与量は、剤形の種類、投与方法、投与対象の年齢や体重、投与対象の病状の等を考慮して、最終的には医師または獣医師の判断により適宜決定することができる。

[0042] 本発明に係る医薬剤を投与する対象となる動物は、上記のような神経幹細胞の増殖により病状の改善が期待される疾患に罹患した動物であれば制限されないが、ヒト又はヒト以外の哺乳動物であることが好ましく、ヒトであることがより好ましい。

実施例

[0043] [実験方法]

＝＝生細胞計数法＝＝

１０μｌのトリパンブルーと１０μｌの骨髄由来血管内皮前駆細胞懸濁液を混合し、これを血球計算盤に滴下し、１６エリア（１エリアは２５０×２５０μｍ）における非染色細胞を計数した。なお、トリパンブルーは死細胞を染色するため、非染色細胞は生細胞である。

[0044] ＝＝マウスの組織固定法＝＝

マウスをジエチルエーテルで麻酔し、その左心室に５０ｍｌＰＢＳで満たした灌流ポンプに接続した２３Ｇニードルを用いてＰＢＳを緩やかに注入し、灌流を行った。肝臓の色が赤から灰色に変色した後、ＰＢＳに代えて５０～７５ｍｌの４％パラホルムアルヒド（ｐＨ７．４）を還流し、組織を固定した。

[0045] ＝＝凍結切片作製法＝＝

上記のように固定した脳組織を単離し、４℃で一晩４％パラホルムアルデヒドで後固定し、３０％ショ糖-ＰＢＳ液中で一晩インキュベートした。なお、増殖細胞の陽性対照として、胸腺組織を同様に処理した。

[0046] 上記脳組織から前脳を単離し、O.C.T. compound（Tissue Tek、Sakura Finetec U.S.A.社）に包埋した。鼻部に近い側の前脳から第三脳室までの１．２ｍｍの組織において１４μｍ厚の冠状断凍結切片を８５枚作製した。この切片は、ＭＡＳコーティングスライドグラス（松浪硝子工業株式会社）にマウントした。

[0047] ＝＝免疫組織化学的染色法＝＝

切片をＰＢＳで１０分間洗浄し、０．３％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００－ＰＢＳを１５０μｌ滴下して３分間インキュベートした。この切片を、ブロッキングバッファーで希釈した一次抗体を用いて４℃で一晩、あるいは３７℃で３時間インキュベートした。免疫染色の対照として、対照切片は、ブロッキングバッファーのみでインキュベートした。ＰＢＳで１０分間ずつ３回洗浄し、二次抗体を用いて室温で１時間インキュベートした。ＰＢＳで１０分間

ずつ３回洗浄した後、ＰＢＳで１０００倍に希釈したHoechest 33258（Sigma社）で１０分間インキュベートすることにより核を対比染色した。この切片をＰＢＳで１０分間ずつ２回洗浄し、さらに滅菌蒸留水で５分間洗浄した。切片を封入剤を用いて封入し、蛍光顕微鏡、もしくは、共焦点レーザースキャン顕微鏡下で観察した。

[0048] [実施例１]

本実施例では、マウス骨髄由来血管内皮前駆細胞の培養上清（Endotherial progenitor cell-conditioned medium、ＥＰＣ－ＣＭ）が、ｉｎ ｖｉｖｏにおいて神経幹細胞の自己複製を促進する効果、およびその子孫細胞の数を増加させる効果を有することを示す。

[0049] ＝＝骨髄由来細胞の単離法＝＝

成体マウス（Ｃ５７ＢＬ/６Ｊ、オス、８～１０週齢、ｎ＝１０）を、ジエチルエーテルを用いて麻酔した後、断頭、もしくは、頚椎脱臼することにより屠殺した。このマウスをアルコール消毒した後、腿骨および脛骨を単離し、氷上で冷却した６ｃｍディッシュのＰＢＳ中で維持した。これらの骨から、７０％エタノールを含んだキムワイプ（日本製紙クレシア株式会社）を用いて、筋肉組織および腱を除去した後、１０個体分の骨を６ｍｌのαＭＥＭ／ＦＢＳ（１０％ＦＢＳ、１００ユニット／ｍｌペニシリン、１００μｇ／ｍｌストレプトマイシン添加αＭＥＭ）で満たした乳鉢に入れ、すりつぶした。この粉砕骨溶液を７０μｍフィルター（cell strainer 2350、ファルコン社）を用いて遠心分離によりろ過し、ろ過された細胞懸濁液を回収した。回収した細胞懸濁液を２８０×ｇで８分間遠心し、得られた細胞ペレットを、ピペッティングにより、５ｍｌαＭＥＭ／ＦＢＳに再懸濁した。

[0050] ＝＝フィコールによる単核細胞群の単離法＝＝

冷却したフィコール（Ficoll-Paqie Plus（１０７７ｇ／ｍｌ）、ＧＥヘルスケア・バイオサイエンス社）を５ｍｌ加え、ここに５ｍｌの細胞懸濁液を重層した。これを、４℃、７８０×ｇで１５分間遠心した。上層を２ｍｌ残して吸引により除去した。さらに、８ｍｌのαＭＥＭ／ＦＢＳを満たしたピ

ペットを、残留した上層表面の下部に挿入して、約２ｍｌの中間層（単核細胞層）を回収した。この中間層を２８０×ｇで８分間遠心した後、上層を除去して細胞ペレットを２ｍｌのEGM-2 BulletKit 培地（Lonza社）にピペッティングにより再懸濁し、これを骨髄単核細胞懸濁液とした。

[0051] ここで、生細胞計数法に従い、細胞計数を行った。

[0052] ＝＝骨髄由来血管内皮前駆細胞の培養法＝＝

まず、６ウェルプレートの各ウェルに、３ｍｌずつフィブロネクチン溶液（１ｍｇ／ｍｌのフィブロネクチンストック溶液５０μｌを２５ｍｌＰＢＳで希釈）を加えた。これを、３７℃で一晩インキュベートし、ＰＢＳで洗浄してフィブロネクチンコーティングプレートとした。

[0053] 次に、上記フィコールによる単離法により得られた骨髄単核細胞を１×１０^{6}／ｍｌの濃度で、EGM-2 BulletKit 培地で６ウェルのフィブロネクチンコーティングプレートに播種し、５％CO_2、３７℃で培養した。播種２４時間後、７日後、および１４日後に３ｍｌの新しいEGM-2 BulletKit 培地と交換し、接着性の細胞がコンフルエントになるまで、培養を続けた。血管内皮細胞の増殖に適した本培養方法によって、培養２１日後には骨髄単核細胞から血管内皮前駆細胞のみが選択的に増殖した。それらの細胞は、４％パラホルムアルデヒド固定後、ＣＤ３１、およびVE-cadherinに対する免疫染色の陽性反応を確認することによって、ならびに、細胞固定前に培養液にDilによりラベルしたアセチル化LDLを添加し、その取り込み能を細胞内のDilの蛍光により確認することによって、血管内皮前駆細胞と同定した。

[0054] ＝＝骨髄由来血管内皮前駆細胞培養上清の回収＝＝

播種後２１日目に、骨髄由来血管内皮前駆細胞の培養液を吸引し、細胞を１ｍｌのＭＨＭ培地（DMEM-F12 (1:1)、 glucose (0.6 %)、 glutamine (2 mM)、 sodium biocarbonate (13.4 mM)、 HEPES (5 mM)、 insulin (25 μg/ml)、 transferrin (100 μg/ml)、 progesterone (20 nM)、 sodium selenate (30 nM)、 purescine (60 μM)、Murayama et al., Journal of Neuroscience Research, 69: 837-847, 2002）で洗浄した後、１ｍｌのＭＨＭを加え、

さらに２４時間培養を続けた。その後、この培地を回収し、これを０．４５μｍのフィルターでろ過し、血管内皮前駆細胞培養上清（ＥＰＣ－ＣＭ）とした。必要に応じ、使用時まで－２０℃で保存した。

[0055] ＝＝骨髄由来血管内皮前駆細胞培養上清の調製＝＝

上記回収されたＥＰＣ－ＣＭを、Amicon Ultra 15 centrifuge filter devices（10K NMWL、UFC9010、Millipore 社）を用いて、２３８０×ｇ、３０分間遠心してろ過し、フィルター上に残留した培養上清をピペットで回収した。これによりＥＰＣ－ＣＭは約４５倍濃縮された。これを濃縮ＥＰＣ－ＣＭとし、必要に応じて使用まで－２０℃で保存した。

[0056] ＝＝マウス脳への注入装置の設置＝＝

マウス脳室への濃縮ＥＰＣ－ＣＭの注入は、Alzet Brain Infusion Kit3（0008851、Alzet 社）、およびAlzet osmotic pump（1007D、Alzet 社）を用いて行った。まず、この注入装置のカテーテルチューブを２ｃｍの長さに切り、一端を脳注入用カニューレに、もう一端をAlzet pump flow modulatorに接続し、これらの接続点をシアノアクチレート接着剤でそれぞれ接着した。さらに、脳注入用カニューレに、０．５ｍｍ厚の深度調節用スペーサーを取り付け、シアノアクチレート接着剤で接着した。これにより、３ｍｍであったカニューレチューブの深度が２．５ｍｍに調節された。Alzet osmotic pumpに濃縮ＥＰＣ－ＣＭ、あるいは、αＭＥＭ（担体、対照）を満たした。適当な長さに切った残りのカテーテルチューブを用い、このニードルの先をAlzet pump flow modulator の開放側に接続して、注入装置にシリンジ内の濃縮ＥＰＣ－ＣＭ、あるいは同様に濃縮したαＭＥＭ（対照）を注入した。その後、シリンジと、シリンジに接続されたカテーテルチューブを取り外し、Alzet flow modulatorの開放側にAlzet osmotic pump を接続した。

[0057] マウス（Ｃ５７ＢＬ/６Ｊ、オス、８週齢）を吸入麻酔（４%イソフルランで導入し、０．３５ Ｌ/分 N_2O、０．１５ Ｌ/分 O_2で麻酔を維持）し、保温パッド上で固定具を設置した。眼のやや後方から切開し、頭蓋骨を露出させた。その後、スパチュラを用いて頭蓋骨に結合している骨膜性結合組織

を取り除いた。

[0058] 次にマウスの背側の肩中心部に皮下ポケットを作成し、このポケットに浸透流ポンプを挿入した。なお、この浸透流ポンプには脳注入用カニューレチューブに繋がるカテーテルチューブに接続している。

[0059] 頭蓋骨計測点のブレグマおよびラムダを決定し、さらに、これらの点を参考にして脳注入用カニューレの挿入位置を決定した（ブレグマを起点にし、前後方向に０ｍｍ、内外方向にー１．２ｍｍ、背腹方向にー２．３ｍｍ）。この位置において、電気ドリルを用いて頭蓋骨に１ｍｍ程度の穴を開けた。

[0060] 頭蓋骨を乾燥させ、穴の周囲にシアノアクチレート接着剤を数滴滴下した。脳注入用カニューレを穴から挿入し、このカニューレが接着剤により定位置で接着された後、カニューレを保持するために使用していたタブを切除し、頭皮を縫合した。

[0061] 固定具から取り外したマウスを麻酔から回復させた後ケージに戻し、濃縮ＥＰＣ－ＣＭあるいは濃縮αＭＥＭ培地を毎時０．５μｌの速度でAlzet osmotic pumpで注入しながら、７日間飼育を続けた。

[0062] ＝＝ＢｒｄＵによる分裂細胞の標識とＢｒｄＵ標識された分裂細胞の検出＝＝

これらのマウスに対し、以下に詳細に説明するように、ＢｒｄＵを投与して、神経幹細胞及びその子孫細胞を検出した。

[0063] 神経幹細胞から産生された分裂能を持つ子孫細胞は増殖速度が速く、神経幹細胞は増殖速度が遅いことが知られている。ＢｒｄＵは、投与中に新たに合成されたＤＮＡに取り込まれるため、投与中にＤＮＡ合成が行われた細胞を標識するが、このＢｒｄＵ標識細胞は、ＢｒｄＵを取り込んだ細胞が分裂を繰り返すうちに希釈される。従って、増殖速度が速い子孫細胞においては、ＢｒｄＵ投与からより短い期間で標識細胞は希釈され、増殖速度の遅い神経幹細胞においては、より長い期間ＢｒｄＵ標識が保持される。

[0064] この事実を利用し、図１に示す様にＢｒｄＵ短期群、ＢｒｄＵ－短期１ｄ群、ＢｒｄＵ長期群の各スケジュールでＢｒｄＵ投与を行うことにより、神

経幹細胞及びその子孫細胞を個別に検出した（F. Doetsch, I. Caille, D. A. Lim, J. M. Garcia-Verdugo, A. Alvarez-Buylla (1999), Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell 97, 703-716.; C. M. Morshead, C. G. Craig, D. van der Kooy (1998), In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. Developmen t 125, 2251-2261 参照）。すなわち、ＢｒｄＵ短期群、およびＢｒｄＵ－短期１ｄ群では、ＢｒｄＵを一度投与し、増殖速度の速い子孫細胞のみを標識して検出した。一方、ＢｒｄＵ長期群では、ＢｒｄＵを長期投与し、その間にＤＮＡ合成した子孫細胞および神経幹細胞を共に標識したが、その後、ＢｒｄＵ非投与期間を設けることにより、標識された子孫細胞が希釈され、標識された神経幹細胞のみを検出した（例えば、Kawaguchi et al., Molecular Cell Neuroscience, 17: 259-273, 2001参照）。以下に、実験方法を具体的に説明する。

[0065] まず、０．００７ＮのＮａＯＨを含む０．９％ＮａＣｌ １ｍｌあたり２５ｍｇのＢｒｄＵ（Ｂ５００２、Sigma 社）を溶解してＢｒｄＵストック溶液を調製した。

[0066] 脳に注入装置を設置してから計１４日間、マウスに水２００ｍｌあたり８ｍｌのＢｒｄＵストック溶液を加えて調製した飲料水を与え、その後１週間、ＢｒｄＵを含まない通常の飲料水を与えた（図１、ＢｒｄＵ長期群、濃縮ＥＰＣ－ＣＭ投与と濃縮αＭＥＭ投与のそれぞれｎ＝７）。

[0067] または、注入装置設置７日後、体重１ｇあたりの投与量が５０μｇになるように、上記ＢｒｄＵストック溶液を腹腔内注射した後、３時間飼育を続けた（図１、ＢｒｄＵ短期群、濃縮ＥＰＣ－ＣＭ投与と濃縮αＭＥＭ投与のそれぞれｎ＝３）。

[0068] あるいは、注入装置設置７日後、吸入麻酔（４％イソフルランで導入し、０．３５ｌ/分 N_2O、０．１５ｌ/分 O_2、１．５％イソフルランで麻酔を維持）によりマウスを麻酔し、注入装置設置の際の縫合部位を切開した。こ

こで、注入装置のチューブを切断した後、注入カニューレチューブに接続した切断面をシアノアクリレート接着剤を用いて閉鎖し、切開部位を再び縫合した。その次の日、体重１ｇあたりの投与量が５０μｇになるように、上記ＢｒｄＵストック溶液を腹腔内注射した後、３時間飼育を続けた（図１、ＢｒｄＵ－短期１ｄ群、濃縮ＥＰＣ－ＣＭ投与ｎ＝４、濃縮αＭＥＭ投与ｎ＝５）。

[0069] ここで、ＢｒｄＵ投与の３時間後に屠殺したＢｒｄＵ短期群、およびＢｒｄＵ－短期１ｄ群では、ＢｒｄＵ投与の時点でＤＮＡ合成した細胞、すなわち増殖速度の速い子孫細胞のみが標識される。ＢｒｄＵ長期群では、１４日間のＢｒｄＵ投与期間にＤＮＡ合成した子孫細胞および神経幹細胞が共に標識されるが、この標識細胞のうち、増殖速度が速い子孫細胞においては、ＢｒｄＵ投与終了後１週間で細胞分裂により分配され、標識細胞は希釈される。一方、標識細胞のうち、増殖速度の遅い神経幹細胞においては、ＢｒｄＵ投与終了後１週間経過してもＢｒｄＵ標識は保持される。

[0070] このようにしてＢｒｄＵを投与されたマウスにおいて、マウスの組織固定法に従って組織固定を行い、以下のようにしてＢｒｄＵ標識された分裂細胞を検出した。

[0071] まず、カニューレチューブを頭蓋骨から取り外し、続いて、脳組織を頭蓋骨から単離し、凍結組織切片を作製した。この切片を１Ｎ ＨＣｌで３０分間、３７℃でインキュベートした後、免疫組織化学的染色法に従い、標識を行った。この際、ブロッキングバッファーとして１０%正常ロバ血清含有ＰＢＳを用い、一次抗体として抗ＢｒｄＵヒツジ抗体（20-BS17、Fitzgerald 社、５００倍希釈）、二次抗体として、Alexa Fluor 568 標識抗ヒツジＩｇＧロバ抗体 （A-21099、Molecular Probes社、１０００倍希釈）を用いて、ＢｒｄＵを検出した。また、封入剤は、PermaFluor Mounting Medium （Lab vision corp. 社）を用いた。

[0072] 作成された冠状断凍結切片８５枚のうち、１０枚毎に８枚を選択した。Hoechest 33258にて染色される細胞の核を指標に、側脳室周囲の細胞が密集する

側脳室下帯を計数の対象領域として、濃縮ＥＰＣ－ＣＭまたはαＭＥＭ注入側のＢｒｄＵ標識細胞を、蛍光顕微鏡を用いて計数した。各群の、濃縮ＥＰＣ－ＣＭ投与とαＭＥＭ投与におけるＢｒｄＵ標識細胞数についてｔ検定により統計処理した。

[0073] 図２に示すように、ＢｒｄＵ長期群では、濃縮ＥＰＣ－ＣＭを注入した群において、側脳室周囲で、濃縮αＭＥＭ注入群に比較してＢｒｄＵ標識細胞数が有意に多かった。これは、濃縮ＥＰＣ－ＣＭを注入した群で神経幹細胞が増加したことを示す。一方、ＢｒｄＵ短期群では、濃縮αＭＥＭ注入群に比較して濃縮ＥＰＣ－ＣＭを注入した群で、ＢｒｄＵ標識細胞数が有意に少なかった。これは、濃縮ＥＰＣ－ＣＭを注入した群で子孫細胞が少ないことを示す。また、ＢｒｄＵ短期－１ｄ群では、濃縮αＭＥＭ注入群に比較して濃縮ＥＰＣ－ＣＭを注入した群において、ＢｒｄＵ標識細胞数が有意に多かった。これは、濃縮ＥＰＣ－ＣＭの注入を終了してから１日経った群において、子孫細胞が多いことを示す。

[0074] 以上の結果は、濃縮ＥＰＣ－ＣＭの注入によって、側脳室周囲の神経幹細胞の自己複製が促進されること、および、子孫細胞を産生する非対称分裂が抑制されることを示している。加えて、濃縮ＥＰＣ－ＣＭ注入を終了してから１日後には、自己複製により増加した神経幹細胞が分裂し、子孫細胞数が増加することも示している。

[0075] このように、ＥＰＣ－ＣＭには、神経幹細胞の自己複製を促進する効果を有する物質が含有されている。そして、神経幹細胞の自己複製による増加の結果、神経幹細胞の子孫細胞数も増加する。

[0076] ［実施例２］

本実施例では実施例１で回収されたＥＰＣ－ＣＭが、ｉｎ ｖｉｔｒｏで神経幹細胞の自己複製を促進することを示す。

[0077] ＝＝骨髄間質細胞培養上清の調製＝＝

骨髄由来血管内皮前駆細胞の培養上清（ＥＰＣ－ＣＭ）の比較対照として、骨髄由来血内皮前駆細胞と同様に骨髄由来で増殖因子を分泌する骨髄間質

細胞の上清（ＭＳＣ－ＣＭ）を調製した。まず、以下のように、骨髄間質細胞を培養した。実施例１と同様に、成体マウス（Ｃ５７ＢＬ/６Ｊ、オス、８～１０週齢、ｎ＝２）の粉砕骨溶液を遠心分離して得られた細胞ペレットをαＭＥＭ／ＦＢＳに再懸濁した。

[0078] さらに、生細胞計数法に従い、１６エリアにおける生細胞を計数した。なお、計数に際し、１０μｌのトリパンブルーに対して、４０μｌの細胞懸濁液を混合した。

[0079] 次に、この細胞懸濁液の細胞密度を５×１０^{6}細胞／ｍｌの濃度で、実施例１に記載のフィブロネクチンコーティング６ウェルプレートにおいてαＭＥＭ／ＦＢＳ培地に播種し、５％CO_2、３７℃で培養した。播種後２４時間後、７日後、および１４日後に３ｍｌの新しいαＭＥＭ／ＦＢＳ培地と交換し、細胞がコンフルエントに達するまで、培養を続けた。

[0080] 初代培養細胞がコンフルエントに達した後、細胞をＰＢＳで洗浄し、１ｍｌのトリプシン／ＥＤＴＡ（０．２５％）を加えて約１５分間３７℃で処理した。その後、１０ｍｌのαＭＥＭ／ＦＢＳで細胞を洗浄し、酵素反応を停止させた。セル・スクレーパー（541070、Greiner 社）で細胞を掻き取り、ピペットを用いて５０ｍｌ遠心管に移した。２８０×ｇで８分間遠心し、上清を除去した後、細胞ペレットを２ｍｌαＭＥＭ／ＦＢＳに再懸濁した。ここで得られた細胞懸濁に含まれる生細胞数を、生細胞計数法に従って計数し、新しい培養皿に約８０００細胞／ｃｍ^{2}の密度で播種し、継代培養を行った。

[0081] 上記継代培養後に細胞がコンフルエントに達した後、実施例１と同様にして骨髄間質細胞培養上清（Bone marrow stromal cell-conditioned medium、ＭＳＣ－ＣＭ）を回収した。

[0082] ＝＝マウス胎仔由来ニューロスフェアアッセイ＝＝

大脳半球の線条体から単離した細胞をｉｎ ｖｉｔｒｏで浮遊培養することにより、神経幹細胞および神経前駆細胞からなる浮遊細胞塊（ニューロスフェア）を形成させることができる。以下に、ＥＰＣ－ＣＭで培養することに

より継代培養後のニューロスフェアの形成率を増加させることができることから、神経幹細胞の自己複製を促進させる物質がＥＰＣ－ＣＭに含まれていることを示す。

[0083] まず、妊娠成体マウス（ＩＣＲ Ｅ１４、メス）から、子宮を摘出し、氷冷したＰＢＳＧ（０．６％（ｖ／ｖ）グルコース含有ＰＢＳ）の入った１０ｃｍディッシュに入れた。クリーンベンチ内で、子宮から摘出した同腹８胎仔の頭部を単離し、これを氷冷したＰＢＳＧの入った新しい１０ｃｍディッシュに入れた。

[0084] 実体顕微鏡下で、各頭部において頭蓋骨と眼球部の間で左右対称に皮膚と頭蓋骨を切開し、さらに脳組織を開いて側脳室を露出させた。この側脳室内腔に認められる灰色の線条体を眼科用ハサミおよびピンセットを用いて単離し、氷冷したＰＢＳＧの入った新しい１０ｃｍディッシュに入れた。

[0085] このように単離された脳組織を８００μｌのＭＨＭの入った遠心管に移し、ピペッティングによって粉砕した。ここで、生細胞計数法を用いて細胞を計数した。

[0086] このようにして得られた細胞を、２０ｎｇ／ｍｌ ｂＦＧＦ（Peprotech 社）

と２０ｎｇ／ｍｌ ＥＧＦ（共に最終濃度）を添加したＭＨＭを含む７５ｃｍ^{2}フラスコに２×１０^{5}細胞／ｍｌの密度で播種し、５％CO_2、３７℃で培養した。

[0087] 播種後３日目ごろにニューロスフェアの形成が認められ、播種後７日目にはニューロスフェアのほとんどは直径１００μｍ以上の大きさに達した。

[0088] こうして得られたニューロスフェア（初代ニューロスフェア）を用いて、ＥＰＣ－ＣＭとＭＳＣ－ＣＭが神経幹細胞の自己複製に与える効果を調べた。具体的なニューロスフェアアッセイの手順を図３に示す。

[0089] 本アッセイでは、初代ニューロスフェアの１回目の継代後に様々な条件下で培養を行い、２回目の継代後に至適条件で培養を行った。

[0090] （継代１回目）

フラスコ内の初代ニューロスフェアを遠心管に移し、４００ｒｐｍで５分間遠心した。上清を除去し、細胞ペレットに２ｍｌＭＨＭを加えてニューロスフェアを再懸濁した。ピペッティングにより、ニューロスフェアを粉砕し、細胞懸濁液を調製した。数分間、この懸濁液を静置することにより、残った細胞塊を沈下させ、単細胞のみを含む上澄み部分（１．５ｍｌ）を新しい遠心管に移した。さらに、細胞塊を含む下層に１．５ｍｌのＭＨＭを加え、再びピペッティングにより細胞塊を粉砕した。これを２分間静置し、この上澄み１．５ｍｌを１回目に回収した上澄みに混合した。ここに２ｍｌＭＨＭを加え、８００ｒｐｍで５分間遠心した。上清を吸引除去し、細胞ペレットに１ｍｌＭＨＭを加えて細胞を再懸濁した。

[0091] ここで、生細胞計数法に従って細胞数を計数し、ＥＰＣ－ＣＭあるいはＭＳＣ－ＣＭを用いて細胞密度を１５×１０^{4}細胞／３ｍｌに調製し、６ウェルプレート（3471 Ultra Low Cluster、Coster 社）に播種した。ニューロスフェア形成率の解析用には、細胞密度を２０００細胞／２００μｌに調製し、９６ウェルプレート（3474 Ultra Low Cluster、Coster 社）にＥＰＣ－ＣＭ、ＭＳＣ－ＣＭを用い、それぞれ３６ウェル播種した。ここで、増殖因子添加群のウェル（ＥＰＣ－ＣＭ、ＭＳＣ－ＣＭ、それぞれ１８ウェル）には、２０ｎｇ／ｍｌ ｂＦＧＦと２０ｎｇ／ｍｌ ＥＧＦ（共に最終濃度）を添加し、５％CO_2、３７℃で培養した。

[0092] 播種後３日目ごろから二次ニューロスフェアの形成が認められた。

[0093] （継代２回目）

さらに、６ウェルプレートに播種した二次ニューロスフェアを、継代１回目と同様に継代した。細胞数を計数した後に得られた細胞ペレットを、２０ｎｇ／ｍｌ ｂＦＧＦと２０ｎｇ／ｍｌ ＥＧＦ（共に最終濃度）を添加したＭＨＭ／初代培養ニューロスフェアの培養上清（１：１）に再懸濁し２０００細胞／２００μｌの細胞密度に調製した。これを９６ウェルプレートに播種し、５％CO_2、３７℃で１０日間培養した。

[0094] （ニューロスフェア形成率の解析）

上記１回目あるいは２回目の継代後の培養で得られた、各ウェルにおける直径が５０μｍより大きなニューロスフェアを計数した。計数した三次ニューロスフェア数の、播種した細胞数に対する百分率をニューロスフェア形成率とした。

[0095] ニューロスフェアは、それぞれ一個の神経幹細胞に由来する、自己複製した神経幹細胞と神経前駆細胞からなる細胞塊であり、ニューロスフェアの培養の至適条件下では、播種した細胞中に含まれていた神経幹細胞がそれぞれニューロスフェアを形成する。本実施例における２回目継代後の培養条件は、ニューロスフェア培養の至適条件であるので、そのニューロスフェア形成率は、１回目継代後の培養条件で得られた二次ニューロスフェアに含まれていた神経幹細胞の割合を表す。すなわち、１回目継代後の培養条件で神経幹細胞の自己複製が促進された場合は、２回目継代後の三次ニューロスフェアの形成率が上昇する。

[0096] 図４に示すように、１回目の継代後増殖因子（ＧＦ）を含むＥＰＣ－ＣＭで培養した群（ＥＰＣ－ＣＭ＋ＧＦ群）とＥＰＣ－ＣＭで培養した群（ＥＰＣ－ＣＭ群）では増殖因子（ＧＦ）を含むＭＳＣ－ＣＭで培養した群（ＭＳＣ－ＣＭ＋ＧＦ群）とＭＳＣ－ＣＭで培養した群（ＭＳＣ－ＣＭ群）に比較してそれぞれニューロスフェア形成率が有意に高かった（ｔ検定）。

[0097] また、図５に示すように、１回目の継代後にＭＳＣ－ＣＭで培養した群と比較し、１回目の継代後にＥＰＣ－ＣＭで培養した群では、三次ニューロスフェアの形成率が有意に高かった（ｔ検定）。

[0098] これらの結果は、ＥＰＣ－ＣＭで培養することにより神経幹細胞の自己複製が促進されることを示している。この自己複製は、添加した増殖因子以外の有効物質によって促進され、ＭＳＣ－ＣＭには含まれず、ＥＰＣ－ＣＭにのみ含有されている有効物質が存在していることがわかる。

[0099] ［実施例３］

本実施例では、ＥＰＣ－ＣＭに含まれる神経幹細胞の自己複製促進物質が、既知の増殖因子以外の物質であることを示す。

[0100] 上記実施例１および２で得られたＥＰＣ－ＣＭとＭＳＣ－ＣＭに含まれる増殖因子（ｂＦＧＦ、ＥＧＦ、ＶＥＧＦ、ＢＤＮＦ）の含有量をＥＬＩＳＡ法により調べた。測定にはQuantikine FGF basic DFB50、Quantikine EGF MEG00、Quantikine VEGF MMV00、Quantikine BDNF DBD00（R & D 社）のＥＬＩＳＡキットを使用し、製造者の使用説明書に記載の方法に従った。

[0101] 図６に示すように、ＥＰＣ－ＣＭとＭＳＣ－ＣＭにはＢＤＮＦ以外の各増殖因子が含まれている。実施例１、２において神経幹細胞の自己複製促進効果が示されたＥＰＣ－ＣＭでより多く含まれるのはｂＦＧＦおよびＥＧＦであった。

[0102] そこで、これらの増殖因子に対する抗体（Anti-basic FGF（#05-117、upstate社）、Anti-EGF（#06-102、upstate社）をそれぞれ最終濃度１０μｇ／ｍｌと２０μｇ／ｍｌをＥＰＣ－ＣＭに加えることによって各因子を中和し、実施例２に記載のニューロスフェアアッセイを行った。なお、対照群には、２０ｎｇ／ｍｌ ｂＦＧＦと２０ｎｇ／ｍｌ ＥＧＦ（共に最終濃度）を添加したＭＨＭを用いた。

[0103] 図７に示すように、抗体添加ＥＰＣ－ＣＭ群（ＥＰＣ－ＣＭ＋抗ＧＦ）における２回継代後の三次ニューロスフェア形成率は、抗体無添加のＥＰＣ－ＣＭより低かったものの、増殖因子添加ＭＨＭ群（ＭＨＭ＋ＧＦ）より有意に高かった（ｔ検定）。

[0104] この結果は、ＥＰＣ－ＣＭには既知の増殖因子以外にも神経幹細胞の自己複製促進物質が含まれていることを示す。

[0105] [実施例４]

本実施例では、ＥＰＣ－ＣＭに含まれる神経幹細胞自己複製促進タンパク質であるＥＣＦ－Ｌを単離する。

[0106] ＝＝蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動＝＝

蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動（財団法人化学物質評価研究機構　安全性評価技術研究所に委託、試験番号９３７－０７－Ｐ－１０２２）によって、ＥＰＣ－ＣＭには含まれるが、ＭＳＣ－ＣＭには含まれない物

質を検索した。以下に具体的な実験法を説明する。

[0107] （本実施例で用いた試薬および入手先）

尿素、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）、ファーマライト、グリセロール、ラウリル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸塩（Ｔｒｉｓ）、Ｃｙ－ＤｙｅはＧＥヘルスケア・バイオサイエンス社、{3-〔(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio〕-1- propanesulfonate}ＣＨＡＰＳ、ヨードアセトアミドは同仁化学、リジンはシグマ社、酢酸、蟻酸（精密分析用）は和光純薬、メタノール（ＨＰＬＣグレード）は和光純薬工業、トリプシンはプロメガ社、マルチプルアフィニティーリムーバルスピンカートリッジ、Ｍｓ－３（０．４５ｍｌ pack)はアジレント・テクノロジー社、Ｓｙｐｒｏ ＲｕｂｙはMolecular Probes 社より、それぞれ購入した。

[0108] （サンプルの前処理および標識反応）

マルチプルアフィニティーリムーバルスピンカートリッジを用いて、サンプル（ＥＰＣ－ＣＭ、および、ＭＳＣ－ＣＭ）中のアルブミン、ＩｇＧ、トランスフェリンをアジレント社の提供しているプロトコールに従って除去した。除去処理後のタンパク質溶液に対して２倍量の冷アセトンを添加した後にディープフリーザー（－８０℃）で1時間保持し、析出したタンパク質を２００００×ｇで２０分間遠心した。沈降物をプロテアーゼインヒビターを添加したＬｙｓｉｓ Ｂｕｆｆｅｒ （ＬＢ）（４％（w/v）ＣＨＡＰＳ、２M thiourea, ８M ウレア、１０mM Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ ８．８)で溶解したものを解析用サンプルとした。タンパク質濃度については、濃縮処理後ＬＢに再溶解したサンプルのタンパク質濃度をブラッドフォード法に従って定量した。処理後のＥＰＣ－ＣＭとＭＳＣ－ＣＭの両サンプルをタンパク質量として等量ずつ混合したものをプールサンプルとした。

[0109] タンパク質１００μｇ当り２００ｐｍｏｌのＣｙ－Ｄｙｅ（ＤＭＦ溶液、１μｌ）を添加後氷上にて３０分間静置した。反応終了後に過剰量のリジン溶液（１０mM溶液、１μｌ）を添加して１０分間保持し反応を終了し、最

後に等量の２×サンプルバッファー（８Ｍウレア、４％（ｗ/ｖ）ＣＨＡＰＳ、２０ｍｇ／ｍｌ ＤＴＴ、２％（ｖ/ｖ） ファーマライト）を添加してさらに１０分間氷上に保持した。

[0110] プールサンプルをＣｙ２で、ＥＰＣ－ＣＭをＣｙ３、ＭＳＣ－ＣＭをＣｙ５でラベルした。ラベリング効率は、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲルにて泳動したゲルイメージの各レーンの平均蛍光強度で確認した。

[0111] （二次元電気泳動）

二次元電気泳動を、以下の条件に従って、３枚のゲルにおいて行った（トリプリケート）。各２００μｇのサンプルを展開した。

[0112] 一次元目電気泳動は、Ｍｕｌｔｉｐｈｏｒｅ ＩＩ（ＧＥヘルスケア バイオサイエンス社）、およびＩＰＧ（Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ ｐＨ Ｇｒａｄｉｅｎｔ） Ｓｔｒｉｐｓ（２４ｃｍ、ｐＩ３－１０、ＧＥヘルスケア バイオサイエンス社） を用い、サンプルはカップローディングホルダーから添加した。フォーカシングは、トータルで４０ｋＶｈ行った。泳動後、平衡化溶液（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ、ｐＨ８．８、６Ｍウレア、３０％グリセロール、２％ＳＤＳ）に０．２５％（ｗ/ｖ） ＤＴＴを添加したＡ液及び同様に４．５％ （ｗ/ｖ） ヨードアセトアミドを添加したＢ液に対して各々１０分間ずつ平衡化を行った。

[0113] 二次元目電気泳動は、平衡化終了後、Ｅｔｔａｎ ＤＡＬＴ ＩＩシステム（ＧＥヘルスケア バイオサイエンス社）および１２％均一ゲルを用いて二次元目のＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動により行った。泳動は、３Ｗ（１５℃）一定で泳動先端が完全に溶出するまで（約１５時間）行った。

[0114] 電気泳動後のゲルは、直ちにＴｙｐｈｏｏｎ（アマシャム・バイオサイエンス社）にて画像の取り込みを行った（Ｃｙ２：励起 ４８０ｎｍ、 蛍光 ５３０ｎｍ；Ｃｙ３：励起 ５４０ｎｍ、 蛍光 ５９０ｎｍ；Ｃｙ５：励起 ６２５ｎｍ、 蛍光 ６８０ｎｍ）。取り込んだゲル画像をＴＩＦＦファイルに変換後、Ｄｅｃｙｄｅｒ ＤＩＡソフト（アマシャム・バイオサイエンス社）を用いて、取り込んだ画像のスポット認識、ノイズデータのフィルタリング

および同一ゲル内の各スポットにおけるＣｙ色素間でのスポットボリュームの比較により定量解析を行った。また、Ｄｅｃｙｄｅｒ ＢＶＡソフト（アマシャム・バイオサイエンス社）を用いてゲル間のスポットマッチングおよび統計解析を行った。

[0115] 図８に二次元電気泳動ゲルのイメージを示す。この図中に示されるスポットは、上記のように取り込まれたＭＳＣ－ＣＭを示す蛍光の強度と、ＥＰＣ－ＣＭを示す蛍光の強度とを標準化対数度数（standardized log abundance）で表した値の比（ＭＳＣ－ＣＭ／ＥＰＣ－ＣＭ比）が１／４より小さい（ｐ＜０．０１）スポットである。ここに示される各スポットについて、３枚のゲルから得られたＭＳＣ－ＣＭ／ＥＰＣ－ＣＭ値平均、検定結果のｐ値を表１に示す。

[0116]

[表1]

MSC－CM／EPC－CM＜1／4（p＜0．01）の各スポットのデータ

スポット.	MSC－CM／EPC－CM値平均*	t-検定（p値）
1302	-22.3	0.0005
822	-20.37	0.0022
840	-11.91	0.00091
84	-9.56	0.0068
252	-9.13	0.0071
821	-8.69	0.001
988	-7.05	0.0021
117	-6.66	0.0025
1219	-6.55	0.0051
960	-6.47	0.0013
1231	-6.35	0.005
992	-5.96	0.0027
538	-5.87	0.0017
546	-5.23	0.0026
411	-4.94	0.0095
1387	-4.8	0.0047
1705	-4.68	0.0029
819	-4.39	0.0094
220	-4.25	0.0048
244	-4.24	0.0065
1770	-4.17	0.003
1394	-4.08	0.0084
955	-4.06	0.0031
1088	-4.05	0.0056

*表中、ＭＳＣ－ＣＭ／ＥＰＣ－ＣＭ値に関しては、Ｄｅｃｙｄｅｒ ＢＶＡソフトに従い、（ｘ分の一）を（－ｘ）と表示している。

[0117] ＝＝質量分析によるスポット中のタンパク質の同定＝＝

上記二次元ディファレンスゲルの方法に従い、同条件下で６００μｇのタンパク質を含むサンプルを泳動した。泳動後、固定化液（メタノール１０％、酢酸７％）に室温で３０分浸漬してタンパク質を固定化した。固定化後、

２００ｍｌのＳｙｐｒｏ Ｒｕｂｙ液（モレキュラープローブ社）中に室温で３時間浸漬した。染色が終了したら、脱色液（メタノール１０％、酢酸７％）で余分な染色液を洗った。

[0118] ＭａｓｔｅｒＩｍａｇｅｒ（アマシャム・バイオサイエンス社）を用いてＳｙｐｒｏ Ｒｕｂｙの励起波長（４８０ｎｍ）および蛍光波長（６２０ｎｍ）で画像を取得した。染色後に解析用のゲルに対してＤｅｃｙｄｅｒ ＢＶＡソフト（アマシャム・バイオサイエンス社）を用いてマッチングし、上記図８および表１の１３０２番のスポットをスポットピッカー（Ettan Spot Picker、アマシャム・バイオサイエンス社）でピッキングした。得られたゲルプラグは、各ゲルあたり０．１μｇのトリプシン（プロメガ社）で酵素消化（３０℃、一晩）した後にｎａｎｏ ＬＣ－ＥＳＩ－ＭＳ （ｃａｐ－ＬＣ（ウォーターズ社）、Ｑ－Ｔｏｆ ｍｉｃｒｏ（マイクロマス社））を用いて解析した。ＬＣおよびＭＳの分析条件を以下に示した。

ＬＣ条件：

カラム：ＰｅｐＭａｐ１００（７５μｍＩＤ×１５ｃｍ、３μｍ、１００Å、Ｓ/Ｎ ３１８１７）

カラム温度：室温

移動相：Ａ液 ９５／５ 水／アセトニトリル ０．１%蟻酸

Ｂ液 ５／９５ 水／アセトニトリル ０．１%蟻酸

流速：２．５μL／分

グラジェント条件：表２

[表2]

時間（分）	移動相組成(B%)
3	5
35	40
36	80
41	80

ＭＳの条件：

ＭＳ測定はＭａｓｓｌｙｎｘ ソフトウェア（マイクロマス社）のサーベイ

モードで行った。

キャピラリー電圧：３３００ Ｖ

コーン電圧：４５ Ｖ

Collision-induced dissociation （ＣＩＤ）ガス：アルゴン

コリジョンエネルギー：２５-３５ ｅＶ

[0119] （データベース検索）

ＭＳ/ＭＳ解析により得られたデータは、ＭａｓｓＬｙｎｘ（マイクロマス社）によりデコンボリューション処理を行った。得られたピークリストファイル（ｐｋｌファイル）をＭａｓｃｏｔ（マトリックスサイエンス社）を用いてＮＣＢＩｎｒ(20070727: 5325920 sequences; 1842455067 residues)およびＳｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ(50.8: 234112 sequences; 85963701 residues)のデータベースに対して検索を行った。修飾に関する検索条件は、カルバミドメチル化とメチオニンの酸化を標準とした。

[0120] Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ検索結果およびＮＣＢＩｎｒ検索結果をそれぞれ表３および４に示す。どちらの検索においても、７種のペプチドが検出結果として示され、これらのアミノ酸配列から相当するタンパク質が同定された。なお、下記表３および４におけるトータルスコアは統計的な確率に基づいて計算され、異なるタンパク質がランダムヒットにより同定される確率Ｐの場合のスコアは－１０´ｌｏｇ１０（Ｐ）で表示される。スコアがより高いほど信頼性が高い。

[表3]

Swiss－Prot(動物種:マウス)の検索結果

スポット	タンパク質名	アクセッション番号	分子量	pI	スコア
1302	Chitinase 3-like protein 3 precursor (Secretory protein Ym1) (Eosinophil chemotactic cytokine) (ECF-L).	O35744	44772	5.42	370

[表4]

NCBInr(動物種:マウス)の検索結果

スポット	タンパク質名	gi 番号	分子量	pI	スコア
1302	chitinase 3-like 3 [Mus musculus]	gi|6753416	44772	5.42	370

[0121] 以上の結果は、ＥＰＣ－ＣＭ特異的に含まれるタンパク質が分子量約４５ｋＤａのＥＣＦ－Ｌであることを示している。

[0122] [実施例５]

本実施例では、実施例４で同定されたＥＣＦ－Ｌが、神経幹細胞自己複製促進物質であることを示す。

[0123] ＝＝ＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質の調製＝＝

マウスChitanase 3-like 3（ＥＣＦ－Ｌ）をコードするｃＤＮＡが挿入されたｐＤＮＲ－ＬＩＢ ベクターを有する大腸菌 ＤＨ１０Ｂ ＴｏｎＡ（30298306、imaGenes 社）をクロラムフェニコール（３０ｍｇ／ｍｌで１００％エタノールに希釈）選択ＬＢ培地に播種し、３７℃で培養した。翌日、コロニーをピックアップし、さらにクロラムフェニコール選択ＬＢ液体培地で一晩振盪培養した後、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen 社)を用いてプラスミドを回収した。

[0124] ここで得られたプラスミドを、pLP-CMV-Myc Acceptor Vector（カタログ番号 631603、Clontech 社）に導入するため、反応液（蒸留水、７．５μｌ；１０× Cre Reaction Buffer (Clontech 社）、２μｌ；１０×ＢＳＡ、２μｌ；２００ｎｇ Donor Vector、７．０μｌ；２００ｎｇ Acceptor Vector、０．５μｌ; Cre Recominase (Clontech 社）、１μｌ）を調製した。これを、室温で１５分インキュベートした後、５分間７０℃に加熱して反応を停止させた。この反応液１μｌを用い、ＤＨ５αコンピテント細胞に混合し、１５分間氷上でインキュベートした後、４２℃で３０秒ヒートショックを与え、さらに２分間氷上でインキュベートすることにより形質転換を行った。このＤＨαコンピテント細胞を、クロラムフェニコール選択ＬＢ培地に播種し

て一晩培養した。培養後、得られたコロニーのうち大きなコロニーをピックアップし、下記プライマーを用いたコロニーＰＣＲによってプラスミドの組換えを確認した。

ＣＭＶ－Ｆ：GCTCACCGTCTTTCATTGCC（配列番号２）

ＣＭＶ－Ｒ：TGTATCTTATCATGTCTGGATC（配列番号３）

[0125] このようにして組換えが確認されたコロニーについて、QIAprep Spin Miniprep Kit （Qiagen 社）を用いてプラスミドを回収し、インサートＤＮＡのシークエンスを確認した。タンパク質発現用細胞のトランスフェクションに先立ち、この所望のプラスミドをQIAprep Spin Maciprep kit（Qiagen 社）を用いてスケールアップした。

[0126] トランスフェクション前日、１０ｃｍのＰｏｌｙ－ｏ－コーティングディッシュあたり１５～２５×１０^{5}個のＨＥＫ２９３Ｔ細胞を播種した後、５％CO_2、３７℃で一晩培養し、５０～８０％コンフエルエントに達した。

[0127] ８００μｌの培地（Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ）を滅菌チューブに入れ、ここに１８μｌのGeneJuice Transfection Regent（Novagen 社）を加えた。これをボルテックスで懸濁し、５分間インキュベートした。ここに、６μｇのプラスミドＤＮＡを加え、ピペッティングにより混合した。その後、５～１５分室温でインキュベートし、上記ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に滴下した。５％CO_2、３７℃で２４時間インキュベートした。その後、トランスフェクションミクスチャーを除去し、ＭＨＭ（トランスフェリン無添加）で３回洗浄したのち、新たなＭＨＭ（トランスフェリン添加／無添加）を１ウェルにつき１ｍｌを加えた。

[0128] ＝＝ウエスタンブロット法によるＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質の検出＝＝

得られたＥＣＦ－Ｌ遺伝子導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞の培養上清にＥＣＦ－Ｌが分泌されていることを確認するため、ウエスタンブロット法によりＥＣＦ－Ｌ遺伝子導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞の培養上清に含まれるＥＣＦ－Ｌを検出した。まず、ＥＣＦ－Ｌ遺伝子導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞の培養上清１ｍｌを回収し、AmiconUltra-4 Centrifugal Filter Devices（１０ｋ ＮＭＷＬ

、UFC801008、Millipore 社)を用いてろ過することにより濃縮した。

[0129] この濃縮培養上清をサンプルとして、１レーン当たり７００ｎｇのタンパク質をＳＤＳ－ポリアクリスアミドゲルにおいて電気泳動を行い、分離されたタンパク質をＰＶＤＦ膜にブロットした。

[0130] ブロッティング後、膜を５%スキムミルク（ＴＢＳＴ（Ｔｗｅｅｎ ２０添加Ｔｒｉｓ緩衝生理食塩水）に希釈）を用いて室温で１時間ブロッティングし、抗マウスＥＣＦ-Ｌラットモノクローナル抗体（MAB2446、R&D systems社、２５０倍希釈）を用いて室温で１時間、あるいは、４℃で一晩インキュベートした。その後、膜を５～１０分ＴＢＳＴで洗浄し、ホースラディシュペルオキシダーゼ標識抗ラットＩｇＧヤギ抗体（Jackson ImmunoResearch 社、５０００倍希釈）で室温で１時間インキュベートした。膜を再びＴＢＳＴで洗浄した後、ECL Plus Western Blotting Detection System (RPN2132、ＧＥ社)を用いてシグナルを検出した。

[0131] 図９に示すように、４５ｋＤａ付近において、抗ＥＣＦ－Ｌ抗体で検出される特異的バンドが検出された。一方、同様の工程により蛍光蛋白質のvenusを発現させた対照遺伝子導入群、および、ｐＤＮＲ－ＬＩＢベクターによるpLP-CMV-Myc Acceptor Vectorの組換えを行わず、その他の工程を同様に行った非遺伝子導入群においては、このバンドが検出されなかった。この結果は、トランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞が組換えＥＣＦ－Ｌを発現し、このＥＣＦ－Ｌが培養上清に分泌されていることを示している。

[0132] ＝＝マウス胎仔由来神経幹細胞自己複製におけるＥＣＦ－Ｌの効果＝＝

以下、組換えＥＣＦ－Ｌが、神経幹細胞の自己複製に対する促進効果があることを検証した。

[0133] まず、実施例２に記載の「マウス胎仔由来ニューロスフェアアッセイ」を行った（図３参照）。この際、１回目の継代の後、６ウェルプレート（９．６ｃｍ^2）の各ウェルにおいて、ＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質を含有するＭＨＭ（ＲｃＥＣＦ－Ｌ）、ＥＰＣ-ＣＭ、ＥＣＦ－Ｌ枯渇ＥＰＣ－ＣＭ、あるいは、ＭＨＭ３ｍｌに１０～１５×１０^{4}細胞を含むように調製して播種した。

なお、ＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質を含有するＭＨＭには、本実施例の「ＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質の調製」に従って得られたＥＣＦ－Ｌ発現ＨＥＫ２９３Ｔ細胞の培養上清を用いた。

[0134] ＥＣＦ－Ｌ枯渇ＥＰＣ－ＣＭは、実施例１で１４日間培養された骨髄由来血管内皮前駆細胞（ＥＰＣ）にx-tremeGENE siRNA Transfetion Reagent（04 476 093 001、Roche 社）を用いて下記のｓｉＲＮＡを導入し、その後１週間培養した後に回収した培養上清である。なお、siＲＮＡはSigma Genosys siRNA serviceで作製した。

Sense strand: 5’-GAUCAAGUUCAACGGUUUUUC（配列番号４）

Anti sense strand: 5’-AAAACCGUUGAACUUGAUCUU（配列番号５）

[0135] 図１０に示すように、ＲｃＥＣＦ－Ｌ群、ＥＰＣ－ＣＭ群でのみ１回目の継代後の二次ニューロスフェアの形成が認められた。一方で、ＥＣＦ－Ｌ枯渇ＥＰＣ－ＣＭ群、および、ＭＨＭ群ではニューロスフェアが形成されなかった。（ｎ＝１２）。ＥＰＣ－ＣＭ群ではニューロスフェア形成が認められ、ＥＣＦ－Ｌ枯渇ＥＰＣ－ＣＭ群ではニューロスフェア形成が認められなかったこと、および、ＲｃＥＣＦ－Ｌ群においてニューロスフェア形成が認められたことは、ＥＣＦ－Ｌがニューロスフェア形成に作用することを示す。

[0136] さらに、図１１に示すように、三次ニューロスフェアの形成率は、ＲｃＥＣＦ－Ｌ群およびＥＰＣ－ＣＭ群で同程度に高く、増殖因子添加ＭＨＭ群（ＭＨＭ＋ＧＦ）に比較して有意に高かった（ｔ検定）。

[0137] ＝＝成体マウス由来神経幹細胞自己複製におけるＥＣＦ－Ｌの効果＝＝

ここでは、組換えＥＣＦ－Ｌが、成体の線条体から得られた神経幹細胞の自己複製促進効果を有することを検証する。

[0138] まず、成体マウス（Ｃ５７ＢＬ/６Ｊ、オス、８～１０週齢）を、ジエチルエーテルを用いて麻酔した後、断頭、もしくは、頚椎脱臼することにより屠殺した。このマウスをアルコール消毒した後、頭皮を、首から眼窩まで切開し、さらに頭蓋骨を切開した。頭蓋骨をはがし取り、露出した脳組織を氷冷したＰＢＳＧに維持した。線条体を眼科用ハサミおよびピンセットで単離し

、これを新しい氷冷ＰＢＳＧに維持した。この線条体を遠心管に移し、ＰＢＳＧをトリプシン溶液（トリプシン（T-1005、Sigma 社）４０ｍｇ、ヒアルロニダーゼ（H-6254、Sigma 社）２０ｍｇ、kynucreic acid（K-3375、Sigma 社）６ｍｇを３０ｍｌＭＨＭに溶解し、フィルター滅菌）に交換し、ピペッティングによって組織を粉砕した。３７℃で１５分間消化した後、再びピペッティングによって組織を粉砕した。ここにトリプシン阻害剤溶液（Trypsin inhibitor（ovomucoid）T-2011 Sigma社）８．４ｍｇを１２ｍｌ ＭＨＭに溶解し、フィルター滅菌）を加え、６００ｒｐｍで５分間遠心した。上清を除去した後、ペレットに５ｍｌのトリプシン阻害剤溶液を加え、ピペッティングにより再懸濁した。６００ｒｐｍで５分間遠心し、上清を除去し、ペレットを１ｍｌのＭＨＭに再懸濁した。ここで、生細胞計数法に従い、細胞を計数した。

[0139] このようにして得られた細胞を、２０ｎｇ／ｍｌ ｂＦＧＦ（Peprotech 社）と２０ｎｇ／ｍｌ ＥＧＦ（共に最終濃度）を添加したＭＨＭを含む７５ｃｍ^{2}フラスコに３０００～５０００細胞／ｍｌの密度で播種し、５％CO_2、３７℃で培養した。

[0140] 約１週間で、ほとんどの初代ニューロスフェアは直径１００μｍ以上の大きさに達した。

[0141] この初代ニューロスフェアを、実施例２と同様に継代し、６ウェルプレート（９．６ｃｍ^2）の各ウェルにおいて、ＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質を加えたＭＨＭ（ＲｃＥＣＦ－Ｌ）、あるいは、増殖因子添加ＭＨＭ３ｍｌに１０～１５×１０^{4}細胞を含むように調製して播種し、５％CO_2、３７℃で７日間培養した。

[0142] ここで得られた二次ニューロスフェアを４００ｒｐｍで５分間遠心した後、ペレットを回収し、上清を０．４５μｍフィルターでろ過した。ペレットにろ過した上清（ろ過培地）２ｍｌを加え、ピペッティングによって二次ニューロスフェアを粉砕し、細胞懸濁液を調製した。数分間、この懸濁液を静置することにより、残った細胞塊を沈下させ、単細胞のみを含む上清部分（

１．５ｍｌ）を新しい遠心管に移した。さらに、細胞塊を含む下層に１．５ｍｌのろ過培地を加え、再びピペッティングにより細胞塊を粉砕した。これを２分間静置し、この上澄み１．５ｍｌを１回目に回収した上澄みに混合した。ここに２ｍｌのろ過培地を加え、８００ｒｐｍで５分間遠心した。上澄みを吸引除去し、細胞ペレットに１ｍｌの２０ｎｇ／ｍｌ ｂＦＧＦと２０ｎｇ／ｍｌ ＥＧＦ（共に最終濃度）を添加したＭＨＭ／初代培養ニューロスフェアの培養上清（１：１）を加えて細胞を再懸濁した。

[0143] 生細胞計数法に従い細胞数を計数した後、二次ニューロスフェアを構成する細胞をＭＨＭ－ＣＭ培地を用いて２～８×１０^{6}細胞／ｍｌの密度に調製した。この細胞懸濁液に、２μｇ／ｍｌPropidium Iodide（Sigma 社）を加え、死細胞を標識した。この懸濁液において、ＦＡＣＳで生細胞を分離し、以下のシングル細胞培養に用いた。

[0144] このようにして得られた生細胞を、９６ウェルプレートの各ウェルに１細胞ずつ播種し、１％ペニシリンＧ、硫酸ストレプトマイシン、および２０ｎｇ／ｍｌ ｂＦＧＦと２０ｎｇ／ｍｌ ＥＧＦ（共に最終濃度）を添加したＭＨＭ／初代培養ニューロスフェアの培養上清（１：１）において、５％CO_2、３７℃で１０日間培養した。細胞を播種したウェルの数に対して、直径が５０μｍより大きなニューロスフェアが形成されたウェルの数の百分率を、ニューロスフェア形成ウェル率とした。

[0145] 図１２に示すように、１回目の継代後にＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質を含有するＭＨＭで培養した群（ＲｃＥＣＦ－Ｌ）では、増殖因子添加ＭＨＭ群（ＭＨＭ＋ＧＦ）と比較してニューロスフェア形成ウェル率が高かった。なお、シングル細胞の上記条件下の培養では一定の割合の神経幹細胞がニューロスフェアを形成することが知られるため、上記ニューロスフェア形成ウェル率は、上記生細胞における神経幹細胞率を相対的に示している。

[0146] 本実施例における以上の結果は、ＥＣＦ－Ｌが、マウス胎仔および成体マウスから得られた神経幹細胞の自己複製促進効果を有することを示す。従って、このＥＣＦ－Ｌは神経幹細胞の自己複製促進のための促進剤、医薬組成

物などに用いることができ、さらに、この医薬組成物は神経細胞の機能不全に起因する疾患の治療のために用いることができる。

[0147] [実施例６]

本実施例では、神経幹細胞が存在する海馬および脳室下帯においてＥＣＦ－Ｌが局在しており、ＥＣＦ－Ｌが生理的に神経幹細胞に作用している可能性があることを示す。

[0148] ＝＝ＧＦＰ標識細胞移植マウスの作製＝＝

ＣＡＧ－ＥＧＦＰマウスから、前述の骨髄由来細胞の単離法に基づいて骨髄細胞を取得した。この骨髄細胞を、レシピエント個体（Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ、オス、８～１０週齢）あたり２×１０^{6}細胞ずつ移植した後、レシピエント個体を１０．５Ｇｙの放射線に曝露した。その後、４週間以上飼育した。

[0149] 未処理の成体マウス（Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ、オス、８～１０週齢）、あるいは、前記のようにＧＦＰ標識骨髄由来細胞を移植されたマウスについて、前述のマウスの組織固定法、および、凍結切片作成法に従ってマウス脳の冠状断凍結切片を作成した。次に、前述の免疫組織化学的染色法に従い、各タンパク質の標識を行った。この際、ブロッキングバッファーとして１０%正常ヤギもしくはロバ血清含有ＰＢＳを用いた。ＥＣＦ－Ｌの検出のため、一次抗体として抗マウスＥＣＦ－Ｌラットモノクローナル抗体（MAB2446、R&D systems 社、５０倍希釈）または抗マウスＥＣＦ－Ｌヤギ抗体（AF2446、R&D 社、１０００倍希釈）を用いた。ＣＤ３１の検出のため、一次抗体として抗マウスＣＤ３１ラット抗体（550274、BD Biosciences 社、１０倍希釈）を用いた。なお、ＣＤ３１は血管内皮細胞に局在することが知られる。また、ＧＦＡＰ（Glial fibrillary acidic protein）の検出のため、一次抗体として抗ＧＦＡＰマウスモノクローナル抗体（G3893、Sigma-Aldrich 社、１００倍希釈）を用いた。なお、このＧＦＡＰマウスモノクローナル抗体により、側脳室の脳室下帯では、神経幹細胞を検出することができる。また、アクアポリン４（ＡＱＰ４）の検出のため、一次抗体として抗アクアポリン４ウサギ抗体（AB3594、Millipore 社、２００倍希釈）を用いた。ＡＱＰ４は脳にお

いて、血管周囲のアストロサイトの突起終末に特に局在し、局在部位における脳血液関門の存在を示すことが知られる。なお、二次抗体として、Alexa Fluor 488 標識抗ラットＩｇＧヤギ抗体 (A-11006、Molecular Probes社、５００倍希釈）、Alexa Fluor 488 標識抗ヤギＩｇＧロバ抗体 (A-11055、Molecular Probes社、５００倍希釈）、Alexa Fluor 350 標識抗マウスＩｇＧヤギ抗体 (A-11045、Molecular Probes社、５００倍希釈）、Alexa Fluor 350 標識抗ウサギＩｇＧヤギ抗体 (A-11046、Molecular Probes社、５００倍希釈）、Alexa Fluor 633 標識抗ヤギＩｇＧロバ抗体 (A-21100、Molecular Probes社、５００倍希釈）を適宜使用し、ＣＤ３１についてはTyramide Signal Amplification (Renaissance TSA fluorescence system、 NEL702-705、Perkin Elmer社)によるシグナル増強を行った。また、必要に応じ、Ｈｏｅｃｈｓｔ３３２５８(94403、Sigma-Aldrich)により核の対比染色を行った。

[0150] 図１３に示すように、海馬において、ＣＤ３１の局在する血管内皮細胞でＥＣＦ－Ｌの局在が認められた（Ａ～Ｊ、矢印）。さらに、図１４に示すように、側脳室の脳室下帯では、ＣＤ３１（Ｂ）の局在する血管内皮細胞の、特にＧＦＡＰ（Ｃ、図中ｍｏＧＦＡＰ）陽性の神経幹細胞が接触している部位にＥＣＦ－Ｌが共局在していた（Ａ～Ｅ）。さらに、側脳室の脳室下帯および脈絡叢において、ＣＤ３１（Ｇ）およびＥＣＦ－Ｌ（Ｆ）が共局在する血管内皮細胞で、脳血液関門のマーカーであるＡＱＰ４（Ｈ）の局在は認めらなかった（Ｆ～Ｊ、矢印）ことから、脈絡叢におけるＥＣＦ－Ｌは、脳血液関門の存在しない血管内皮細胞で発現していると考えられる。また、図１５に示すように、ＣＤ３１が局在するＧＦＰで標識された骨髄由来血管内皮細胞において、ＥＣＦ－Ｌの発現が認められた（Ａ～Ｄ、矢じり）。ＧＦＰで標識された骨髄由来血管内皮細胞は、ＧＦＰ標識骨髄細胞がレシピエントに移植された後にできた新生血管であるため、新生血管にＥＣＦ－Ｌが発現していることが理解できる。一方、図１６に示すように、大脳皮質においては、骨髄由来細胞とＣＤ３１が局在する血管内皮細胞において、移植された骨髄由来の新生血管であることを示すＧＦＰの標識、ならびに、ＥＣＦ－Ｌ

の局在は認められなかった（Ａ～Ｃ）。

[0151] このように、ＥＣＦ－Ｌは、海馬および脳室下帯において、新生血管内皮細胞で特異的に発現している。海馬および脳室下帯は、主に神経幹細胞が存在する領域であり、この発現パターンは、生理的にも、ＥＣＦ－Ｌが神経幹細胞に作用していることを裏付けるものである。

[0152] [実施例７]

本実施例では、ＥＣＦ－Ｌをｉｎ ｖｉｔｒｏで作用させて調製したニューロスフェアが、高効率で神経細胞に分化することを示す。

[0153] 実施例５の「成体マウス由来神経幹細胞自己複製におけるＥＣＦ－Ｌの効果」の記載に従って成体マウスから単離した線条体の細胞から初代ニューロスフェアを調製し（ｎ＝８）、継代を１回行った。この１回目の継代の後、６ウェルプレート（９．６ｃｍ^2）の各ウェルにおいて、ＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質を含有したＭＨＭ（ＲｃＥＣＦ－Ｌ群）、増殖因子（２０ｎｇ／ｍｌ ｂＦＧＦと２０ｎｇ／ｍｌＥＧＦ）を加えたＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質含有ＭＨＭ（ＲｃＥＣＦ－Ｌ＋ＧＦ群）、ＥＰＣ-ＣＭ（ＥＰＣ－ＣＭ群）、ＥＣＦ－Ｌ枯渇ＥＰＣ－ＣＭに増殖因子を加えたＭＨＭ（ＥＣＦ－Ｌ枯渇ＥＰＣ－ＣＭ＋ＧＦ群）、あるいは、増殖因子を加えたＭＨＭ（ＭＨＭ＋ＧＦ群）のいずれか３ｍｌに１０～１５×１０^{4}細胞を含むように調製して播種し、５％CO_2、３７℃で７日間培養した。なお、ＥＣＦ－Ｌ枯渇ＥＰＣ－ＣＭは実施例５の記載に従い調製した。また、ＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質含有ＭＨＭには、実施例５の「ＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質の調製」に従って得られたＥＣＦ－Ｌ発現ＨＥＫ２９３Ｔ細胞の培養上清を用いた。

[0154] 次に、得られた二次ニューロスフェアについて、実施例５の「成体マウス由来神経幹細胞自己複製におけるＥＣＦ－Ｌの効果」の記載に従って、細胞塊の粉砕、細胞数の計数を行い、さらに１細胞ずつ９６ウェルプレートに播種して、三次ニューロスフェアを形成させた。

[0155] この三次ニューロスフェアを、poly-L-ornithine と fibronectin でコーティングされたチャンバースライド(#5732-008, Iwaki)において、１％ＦＢ

Ｓ添加ＭＨＭに１×１０^{4}細胞／ｍｌの密度で播種し、５％CO_2、３７℃で培養し、分化させた（図３参照）。培養開始から４日後に培地を除去し、細胞を４％パラホルムアルデヒドにより固定した。

[0156] 固定された細胞を、前述の免疫組織化学的染色法に従い標識した。この際、ブロッキングバッファーとして１０％正常ヤギ血清含有ＰＢＳを用いた。βＩＩＩ－チューブリンの検出のため、一次抗体として、抗マウスβＩＩＩ－チューブリンマウスモノクローナル抗体（T8660、Sigma-Aldrich 社、１０００倍希釈）、二次抗体として、Alexa Fluor 555 標識抗マウスＩｇＧヤギ抗体 （A-11031、Molecular Probes社、１０００倍希釈）を用いて免疫組織化学的染色を行った。また、Ｏ４の検出のため、一次抗体として、抗Ｏ４マウスモノクローナル抗体（MAB345、Millipore 社、１０００倍希釈）、二次抗体として、Alexa Fluor 488 標識抗マウスＩｇＭヤギ抗体 （A-21042、Molecular Probes社、５００倍希釈）を用いた。ＧＦＡＰの検出のため、一次抗体として抗ＧＦＡＰウサギ抗体（Z0334、Dako 社、２０００倍希釈）、二次抗体として、Alexa Fluor 350 標識抗ウサギＩｇＧヤギ抗体 （A-21068、Molecular Probes社、５００倍希釈）を用いた。なお、βＩＩＩ－チューブリンは、幼若神経細胞に局在し、Ｏ４はオリゴデンドロサイトに局在し、ＧＦＡＰはアストロサイトに局在することが知られる。

[0157] 定量的解析のため、顕微鏡下で５視野についてβＩＩＩ－チューブリン陽性細胞、Ｏ４陽性細胞、ＧＦＡＰ陽性細胞を計数した。

[0158] 図１７に示すように、三次ニューロスフェアを培養して分化させた細胞において、１回目の継代後の培地によって、βＩＩＩ－チューブリン陽性細胞、Ｏ４陽性細胞、ＧＦＡＰ陽性細胞の分化が異なっていた。ＲｃＥＣＦ－Ｌ群（Ａ～Ｄ）、ＲｃＥＣＦ－Ｌ＋ＧＦ群（Ｅ～Ｈ）、ＥＰＣ－ＣＭ群（Ｉ～Ｌ）では、ＭＨＭ＋ＧＦ群（Ｑ～Ｔ）と比較して、βＩＩＩ－チューブリン陽性細胞の割合が高く、ＧＦＡＰ陽性細胞の割合が低かった。一方、ＥＣＦ－Ｌ枯渇ＥＰＣ－ＣＭ＋ＧＦ群では、βＩＩＩ－チューブリン陽性細胞およびＧＦＡＰ陽性細胞の割合はＨＭＨ＋ＧＦ群と同程度であった。一方、全て

の群において、Ｏ４陽性細胞の割合に相違は認められなかった。

[0159] このように、１回目の継代後の培養においてＥＣＦ－ＬあるいはＥＰＣ－ＣＭを作用させることによって、三次ニューロスフェアから分化させた細胞の神経細胞への分化率を高めることができる。培養条件下では、時間と共に非対称分裂によってグリア前駆体が分化する傾向が強くなるが、この結果は、ＥＣＦ－ＬあるいはＥＰＣ－ＣＭが非対称分裂およびそれに伴うグリア前駆体への分化を抑制し、自己複製を促進する結果として、分化後の神経細胞の割合が増えることを示している。

[0160] [実施例８]

本実施例では、ＥＣＦ－Ｌがｉｎ ｖｉｖｏでも、神経幹細胞の自己複製を促進する効果を有すること、並びに、脳室にＥＣＦ－Ｌが注入されたマウスの線条体から得られた神経幹細胞は、高効率で神経細胞に分化することを示す。

[0161] まず、実施例１の「マウス脳への注入装置の設置」に従ってマウス脳室にＥＣＦ－Ｌを注入するための注入装置を設置し、実施例５で調製され、約４５倍に濃縮されたＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質含有ＭＨＭを毎時０．５μｌ注入しながら、７日間飼育した（ｎ＝５）。なお、対照群のマウスには、濃縮ＥＣＦ－Ｌ含有ＭＨＭの代わりに、同容量の濃縮ＭＨＭを注入した。ＥＣＦ－Ｌ組換えタンパク質含有ＭＨＭと培地の濃縮は、Amicon Ultra 15 centrifuge filter devices（10K NMWL、UFC9010、Millipore 社）を用い、２３８０×ｇ、３０分間、遠心ろ過して行った。

[0162] 続いて、実体顕微鏡下で、各頭部において頭蓋骨と眼球部の間で左右対称に皮膚と頭蓋骨を切開し、さらに脳組織を開いて側脳室を露出させた。この側脳室内腔に認められる灰色の線条体を眼科用ハサミおよびピンセットを用いて単離し、氷冷したＰＢＳＧの入った新しい１０ｃｍディッシュに入れた。このように単離された脳組織を８００μｌのＭＨＭの入った遠心管に移し、ピペッティングによって粉砕した。ここで、生細胞計数法を用いて細胞を計数した。

[0163] このようにして得られた細胞を、poly-L-ornithine および fibronectin でコーティングされたチャンバースライド (#5732-008, Iwaki)において、１％ＦＢＳ添加ＭＨＭに１×１０^{4}細胞／ｍｌの密度で播種し、５％CO_2、３７℃で培養した。この培地には、新たに増殖した細胞を標識するために１μＭ ＢｒｄＵを加えた。培養開始から４日後に培地を除去し、細胞を４％パラホルムアルデヒドにより固定した。

[0164] 次に、固定された細胞を１Ｎ ＨＣｌで３０分間、３７℃でインキュベートした後、免疫組織化学的染色法に従い、標識を行った。この際、ブロッキングバッファーとして１０％正常ヤギ血清含有ＰＢＳを用い、一次抗体として抗ＢｒｄＵヒツジ抗体（20-BS17、Fitzgerald 社、５００倍希釈）、二次抗体として、Alexa Fluor 568 標識抗ヒツジＩｇＧロバ抗体 （A-21099、Molecular Probes社、１０００倍希釈）を用いて、ＢｒｄＵを検出した。また、同じ試料におけるβＩＩＩ－チューブリンの局在を調べるため、一次抗体として、抗マウスβＩＩＩ－チューブリンマウスモノクローナル抗体（T8660、Sigma-Aldrich 社、１０００倍希釈）、二次抗体として、Alexa Fluor 555 標識抗マウスＩｇＧヤギ抗体 （A-11031、Molecular Probes社、１０００倍希釈）を用いて免疫組織化学的染色を行った。なお、βＩＩＩ－チューブリンは、幼若神経細胞のマーカーであることが知られている。

[0165] 定量的解析のため、顕微鏡下で５視野についてＢｒｄＵ陽性細胞、および、βＩＩＩ－チューブリン陽性細胞を計数した。

[0166] 図１８に示すように、ＥＣＦ－Ｌ注入群（ＲｃＥＣＦ－Ｌ）では、対照群（ＭＨＭ）と比較して、より多くのＢｒｄＵ陽性細胞が認められた（Ｂ、Ｄ、Ｅ）。βＩＩＩ－チューブリンは幼若神経細胞を標識し、ＢｒｄＵは新生細胞を標識するから、βＩＩＩ－チューブリン陽性（Ａ、Ｃ）かつＢｒｄＵ陽性（Ｂ、Ｄ）である細胞は、新生した幼若神経細胞である。このような新生幼若神経細胞の、全新生細胞に対する割合（全ＢｒｄＵ陽性細胞に対する二重陽性細胞の割合）は、ＥＣＦ－Ｌ群において対照群よりも有意に高かった（Ｆ）。

[0167] このように、ｉｎ ｖｉｖｏにおいても、ＥＣＦ－Ｌは非対称分裂およびそれに伴うグリア前駆体への分化を抑制し、神経幹細胞の自己複製を促進することで神経幹細胞数を増加させる効果を有する。さらに、ＥＣＦ－Ｌを作用させた神経幹細胞では、神経細胞への分化率も上昇する。

産業上の利用可能性

[0168] 本発明によって、神経幹細胞の自己複製促進剤とその使用法を提供できるようになった。

請求の範囲

[請求項1] 神経幹細胞の自己複製を促進するための促進剤であって、

ＥＣＦ－ＬまたはＥＣＦ－Ｌを発現する発現ベクターを有効成分として含むことを特徴とする、促進剤。

[請求項2] 前記ＥＣＦ－Ｌがヒトacidic chitinase、ヒトchitotriosidase、ヒトoviductal glycoprotein 1 precursor、ヒトchitinase 3-like 2 またはヒトchitinase 3-like 1であることを特徴とする、請求項１に記載の促進剤。

[請求項3] 神経幹細胞を培養する方法であって、

ＥＣＦ－Ｌ存在下で神経幹細胞を培養することを特徴とする、方法。

[請求項4] 前記ＥＣＦ－Ｌがヒトacidic chitinase、ヒトchitotriosidase、ヒトoviductal glycoprotein 1 precursor、ヒトchitinase 3-like 2 またはヒトchitinase 3-like 1であることを特徴とする、請求項３に記載の方法。

[請求項5] 神経幹細胞の自己複製を促進するための医薬組成物であって、

ＥＣＦ－ＬまたはＥＣＦ－Ｌを発現する発現ベクターを含有することを特徴とする医薬組成物。

[請求項6] 前記ＥＣＦ－Ｌがヒトacidic chitinase、ヒトchitotriosidase、ヒトoviductal glycoprotein 1 precursor、ヒトchitinase 3-like 2 またはヒトchitinase 3-like 1であることを特徴とする、請求項５に記載の医薬組成物。

[請求項7] 神経の機能不全をもたらす疾患の治療用医薬組成物であることを特徴とする、請求項５または６に記載の医薬組成物。

[請求項8] 前記疾患が、脳梗塞、脊髄損傷、筋委縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、進行性核上性麻痺、ハンチントン病、多系統萎縮症、脊髄小脳変性症、脳出血、または、くも膜下出血であることを特徴とする、請求項７に記載の医薬組成物。

[請求項9] 前記神経の機能不全が、加齢に起因することを特徴とする、請求項７に記載の医薬組成物。

[請求項10] 請求項５～９のいずれかに記載の医薬組成物を含有することを特徴とする、医薬剤。