明　細　書

発明の名称 ： 幼若ブタ由来幹細胞およびその調製方法

技術分野

[0001] 本発明は、幼若ブタ由来幹細胞およびその調製方法に関し、より詳細には、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞に分化可能である幼若ブタ由来の間葉系幹細胞およびその調製方法に関する。

背景技術

[0002] 近年の間葉系幹細胞をはじめとする体性幹細胞研究の進歩により、体性幹細胞の臨床応用は、既に基礎的な研究段階から開発段階へ移行している。体性幹細胞は、大きく３つの機能（多分化能、免疫調節能、細胞外環境のリモデリング能）をもち、難治性疾患の治療用細胞として期待されている。

[0003] １つ目の多分化能については、体性幹細胞が直接骨、軟骨などに分化する能力であり、投与された体性幹細胞が失われた細胞を補完したり、機能が不十分な細胞に置換したりすることで治療効果を発揮する。

２つ目の免疫調節能は、体性幹細胞からの抗炎症性サイトカイン、ケモカイン、エクソソームなどの分泌を介し、あるいは、細胞間の接着因子などを介し、患者の免疫担当細胞に働きかけ、炎症や移植片対宿主病などの免疫反応を抑制することで治療効果を発揮する。

３つ目の細胞外環境のリモデリング能については、虚血性疾患における梗塞部位や、炎症によって引き起こされた線維化部位などに対し、体性幹細胞からの血管誘導因子、成長因子、抗線維化因子などの分泌により治療効果を発揮するものである。

[0004] 間葉系幹細胞は、哺乳類の骨髄、脂肪、膵島、臍帯血等に存在し、中胚葉性組織（間葉）に由来する体性幹細胞であり、間葉系に属する細胞への分化能を有する。近年、移植片対宿主病、心血管障害、自己免疫疾患、変形性関節症、骨形成不全、肝障害、呼吸器疾患、脊髄損傷、脳梗塞、腎不全等の疾患に対して臨床治験が行われている（非特許文献１）。

[0005] 間葉系幹細胞は、様々な臨床応用が期待されているが、ドナー確保、ドナーに対する侵襲、ドナーごとのウイルス否定検査等の安全性の担保などの課題がある。また、得られる間葉系幹細胞の効力は、ドナーやその年齢等の条件により大きく変動し、治療用細胞の安定した品質確保も大きな課題である。患者の骨髄等由来の間葉系幹細胞を体外で増殖させて、同一患者にその細胞を用いて治療する技術は、ドナー不足で問題となっている組織・臓器移植の代替の治療法となり得る。しかし、細胞の増殖能、分化能には個人差があり、全ての患者由来の細胞が同様の挙動を示さない（非特許文献２）。以上のように、治療に十分な幹細胞を準備するには、ドナー確保、安全性の確認、幹細胞の優れた増殖、分化能が求められる。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Lemos NE, de Almeida Brondani L, Dieter C, Rheinheimer J, Boucas AP, Bauermann Leitao C, Crispim D, Bauer AC. Islets. 2017 Jul 5:e1335842. doi: 10.1080/19382014.2017.1335842

非特許文献2：大串　始、生化学、第８１巻、第２号、９９～１０４頁、２００９年2月

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 上記の通り、再生治療に幹細胞を用いる場合、ドナー確保、安全性の確認、幹細胞の優れた増殖、分化能が要求されるが、幹細胞は数継代を経るとその増殖能・分化能が低下するため、治療に十分な幹細胞を調製するにはコストおよび時間を要するという問題がある。したがって、本発明は、安定供給や病原体の管理が可能となる幼若医療用ブタをドナーソースとし、優れた増殖能及び分化能を有する幹細胞を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、幼若ブタの骨髄より調製した間葉系幹細胞は、従来の間葉

系幹細胞と比較して、顕著に増殖速度が速く増殖能に優れ、細胞サイズが小さいという優れた特性を有していることを見出し、本発明を完成させた。

[0009] すなわち、本発明は下記に関する。

１．幼若ブタより単離された、幹細胞。

２．平均直径が１７μｍ以下である前記１に記載の幹細胞。

３．対数増殖期における倍加時間が３６時間以下である前記１または２に記載の幹細胞。

４．間葉系幹細胞である前記１～３のいずれか１に記載の幹細胞。

５．幼若ブタがヒトへ細胞移植することができる幼若ブタである前記１～４のいずれか１に記載の幹細胞。

６．幼若ブタの骨髄または膵島より単離された前記１～５のいずれか１に記載の幹細胞。

７．移植用幹細胞である前記１～６のいずれか１に記載の幹細胞。

８．ヒト移植用幹細胞である前記７に記載の幹細胞。

９．フィーダー細胞用幹細胞である前記１～６のいずれか１に記載の幹細胞。

１０．ヒト移植用幹細胞を増殖するためのフィーダー細胞用幹細胞である前記９に記載の幹細胞。

１１．幼若ブタから細胞を単離する工程を含む、幹細胞の調製方法。

１２．幹細胞を播種後３～１２日後に継代する工程を含む、前記１１に記載の幹細胞の調製方法。

１３．幼若ブタから単離する細胞が単核球細胞画分の細胞である前記１１または１２に記載の幹細胞の調製方法。

１４．幼若ブタからの細胞の単離が、幼若ブタの骨髄または膵島からの細胞の単離である前記１１～１３のいずれか１に記載の幹細胞の調製方法。

１５．単離した単核球細胞画分の細胞を凍結する工程を含む、前記１３または１４に記載の幹細胞の調製方法。

発明の効果

[0010] 本発明の幹細胞は、従来の幹細胞と比較して、増殖速度が顕著に速く増殖能に優れ、且つ細胞サイズが小さい、という利点を有する。本発明の幹細胞は増殖速度が顕著に速いことにより、短時間且つ安価に移植用・フィーダー細胞用等の用途に用いる幹細胞を大量に取得することができる。また、幹細胞の投与により該幹細胞が肺に詰まり肺塞栓を起こす場合があるが、本発明の幹細胞は細胞サイズが小さいことにより、このような肺塞栓の形成を防止することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図１Ａは、本発明の幹細胞を培養したときの、特定の培養期間（日）における全細胞量を示す図である。図１Ｂは、本発明の幹細胞を培養したときの、特定の培養期間（日）における全細胞増殖率を示す図である。図１Ａおよび図１Ｂにおいて、点線および黒丸は幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）を、実線および白丸はヒト骨髄由来間葉系幹細胞（ｈＢＭ－ＭＳＣ）を示す。

[図2]図２Ａおよび図２Ｂは、それぞれヒト骨髄由来間葉系幹細胞（ｈＢＭ－ＭＳＣ）および幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）についての脂肪細胞への分化を示す図である。

[図3]図３Ａおよび図３Ｂは、それぞれヒト骨髄由来間葉系幹細胞（ｈＢＭ－ＭＳＣ）および幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）についての骨細胞への分化を示す図である。

[図4]図４Ａおよび図４Ｂは、それぞれヒト骨髄由来間葉系幹細胞（ｈＢＭ－ＭＳＣ）および幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）についての骨細胞への分化を示す図である。

[図5]図５Ａおよび図５Ｂは、幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）についての軟骨細胞への分化を示す図である。

[図6]図６は、間葉系幹細胞のマーカーであるＣＤ４４を用いて幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）の細胞表面抗原解析をした結果を示す図である。

[図7]図７は、間葉系幹細胞のマーカーであるＣＤ９０幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）の細胞表面抗原解析をした結果を示す図である。

[図8]図８Ａ～図８Ｄは、間葉系幹細胞のマーカーであるＣＤ２９を用いて幼若ブタ膵島由来間葉系幹細胞（ｎｐＩＳＬＥＴ－ＭＳＣ）の細胞表面抗原解析をした結果を示す図である。図８Ａはサンプル１１（膵島調製直後の凍結無し）、図８Ｂはサンプル１２（膵島調製直後の凍結有り）、図８Ｃはサンプル１３（膵島調製後培養３日目の凍結無し）、図８Ｄはサンプル１４（膵島調製後培養３日目の凍結有り）の結果を示す。

[図9]図９Ａ～図９Ｄは、間葉系幹細胞のマーカーであるＣＤ４４を用いて幼若ブタ膵島由来間葉系幹細胞（ｎｐＩＳＬＥＴ－ＭＳＣ）の細胞表面抗原解析をした結果を示す図である。図９Ａはサンプル１１（膵島調製直後の凍結無し）、図９Ｂはサンプル１２（膵島調製直後の凍結有り）、図９Ｃはサンプル１３（膵島調製後培養３日目の凍結無し）、図９Ｄはサンプル１４（膵島調製後培養３日目の凍結有り）の結果を示す。

[図10]図１０Ａ～図１０Ｄは、間葉系幹細胞のマーカーであるＣＤ９０を用いて幼若ブタ膵島由来間葉系幹細胞（ｎｐＩＳＬＥＴ－ＭＳＣ）の細胞表面抗原解析をした結果を示す図である。図１０Ａはサンプル１１（膵島調製直後の凍結無し）、図１０Ｂはサンプル１２（膵島調製直後の凍結有り）、図１０Ｃはサンプル１３（膵島調製後培養３日目の凍結無し）、図１０Ｄはサンプル１４（膵島調製後培養３日目の凍結有り）の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明の幹細胞は、幼若ブタから単離された幹細胞である。なお、後述する実施例に記載の幹細胞は、幼若ブタの骨髄または膵島から分離されたが、例えば、幼若ブタの皮膚、脂肪など由来の幹細胞も本発明に含まれる。

[0013] 本発明において、「幼若ブタ」とは、胎児から生後１ヶ月未満、好ましくは生後２５日未満のブタを示す。幼若ブタは医療用であることが好ましく、ヒトへ細胞移植することができる幼若ブタであることがより好ましい。ブタ

の種類は特に限定されないが、例えば、ランドレース種（例えば、デンマーク・ランドレース種、アメリカン・ランドレース種、ブリティッシュ・ランドレース種、オランダ・ランドレース種、スウェディッシュ・ランドレース種）、大ヨークシャー種、バークシャー種、デュロック種、ハンプシャー種、中ヨークシャー種、ミニブタが挙げられ、中でもランドレース種が好ましい。

[0014] 一般的に、「幹細胞」とは、自己複製能及び分化・増殖能を有する未熟な細胞を意味する。幹細胞には、分化能力に応じて、多能性幹細胞（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ）、複能性幹細胞（ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ）、単能性幹細胞（ｕｎｉｐｏｔｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ）等の亜集団が含まれる。

[0015] 多能性幹細胞とは、それ自体では個体になることが出来ないが、生体を構成する全ての組織や細胞へ分化し得る能力を有する細胞を意味する。複能性幹細胞とは、全ての種類ではないが、複数種の組織や細胞へ分化し得る能力を有する細胞を意味する。単能性幹細胞とは、特定の組織や細胞へ分化し得る能力を有する細胞を意味する。

[0016] 本発明の幹細胞としては、複能性幹細胞が好ましい。複能性幹細胞としては、例えば、間葉系幹細胞、造血系幹細胞、神経系幹細胞、骨髄幹細胞、生殖幹細胞等の体性幹細胞等が挙げられ、好ましくは間葉系幹細胞である。

[0017] 本発明の幹細胞は、幼若ブタから単離された幹細胞であれば、その初代培養細胞、該初代培養細胞を継代培養した細胞であって、各種分化マーカーを発現する各種細胞を生じることができる幹細胞も本発明の幹細胞に含まれる。また、本発明の幹細胞が間葉系幹細胞である場合は、細胞マーカーである、ＣＤ４４及びＣＤ９０がともに６０％以上陽性であることが好ましく、より好ましくは７０％以上、さらに好ましくは８０％以上陽性である。また、細胞マーカーであるＣＤ２９が６０％以上陽性であることが好ましく、より好ましくは７０％以上、さらに好ましくは８０％以上陽性である。

[0018] 本発明の幹細胞は、対数増殖期における倍加時間が３６時間以下であるこ

とが好ましく、より好ましくは３２時間以下、さらに好ましくは２８時間以下、特に好ましくは２４時間以下、最も好ましくは２０時間以下である。また、対数増殖期における倍加時間は１４時間以上であることが好ましく、１６時間以上であることがより好ましい。

[0019] 本発明の幹細胞の対数増殖期における培養は、例えば、後述のビタミンＣを含有する培地（例えば、ＭＳＣ培地）に本発明の幹細胞を播種し、３７℃にて５％CO_2存在下で、培養用インキュベーターで培養することにより行うことができる。対数増殖期における倍加時間が短いほど、短時間且つ安価に大量の幹細胞を調製することが可能となる。

[0020] 本発明の幹細胞は、平均直径が１７μｍ以下であることが好ましく、より好ましくは１６．５μｍ以下であり、さらに好ましくは１６μｍ以下であり、特に好ましくは１５．５μｍ以下であり、最も好ましくは１５μｍ以下である。平均直径は１０μｍ以上であることが好ましく、１２μｍ以上であることがより好ましい。平均直径が小さいほど、幹細胞の投与による肺塞栓の形成を防止することができる。平均直径は、例えば、Ｎｕｃｌｅｏ Ｃｏｕｎｔｅｒ ＮＣ－２００（商標）を用いて計測することができる。ここで、平均とは相加平均を意味する。

[0021] 本発明の間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化は、例えば、インスリン、ＭＣＧＳ（血清成分、Ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｇｒｏｗｔｈ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ）、デキサメタゾン、インドメタシン、イソブチルメチルキサンチン等の存在下で本発明の間葉系幹細胞を培養することで、脂肪細胞へ分化誘導することができる。

[0022] 脂肪細胞への分化および維持には市販のキットまたは培地等を用いてもよく、例えば、Ｌｏｎｚａ Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ社製ｈＭＳＣ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ＢｕｌｌｅｔＫｉｔ（商標）－ａｄｉｐｏｇｅｎｉ(ＰＴ－３００４)、Ｌｏｎｚａ Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ社製ｈＭＳＣ ａｄｉｐｏｇｅｎｉｃ ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ ｍｅｄｉｕｍ（ＰＴ－３１０２Ｂ）、Ｌｏｎｚａ Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ社製ｈＭＳＣ ａｄｉ

ｐｏｇｅｎｉｃ ｍａｉｎｔｅｎａｎｃｅ ｍｅｄｉｕｍ（ＰＴ－３１０２Ｂ）等が挙げられる。間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化は市販のキットを用いて確認することができ、例えば、Ｌｏｎｚａ社製Ａｄｉｐｏ Ｒｅｄ（商標） ａｓｓａｙ ｒｅａｇｅｎｔが挙げられる。

[0023] 本発明の間葉系幹細胞から骨細胞の分化は、例えば、デキサメタゾン、アスコルビン酸塩、ＭＣＧＳ、β－グリセロリン酸等の存在下で本発明の間葉系幹細胞を培養することで、骨細胞へ分化誘導することができる。また、市販のキットを用いてもよく、例えば、Ｌｏｎｚａ Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ社製ｈＭＳＣ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ＢｕｌｌｅｔＫｉｔ（商標）－ｏｓｔｅｏｇｅｎｉｃ、ＰＴ－３００４等が挙げられる。間葉系幹細胞から骨細胞への分化は、市販のアルカリフォスファターゼ染色キット（例えば、コスモ・バイオ社製等）、市販の石灰化染色キット（例えば、コスモ・バイオ社製等）等により確認することができる。

[0024] 本発明の間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化は、例えば、ＴＧＦ－β３、デキサメタゾン、インスリン－トランスフェリン－亜セレン酸（ＩＴＳ）、ピルビン酸ナトリウム、プロリン、アスコルビン酸塩、の存在下で本発明の間葉系幹細胞を培養することで、軟骨細胞へ分化誘導することができる。また、市販のキットを用いてもよく、例えば、Ｌｏｎｚａ Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ社製ｈＭＳＣ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ＢｕｌｌｅｔＫｉｔ（商標）－ｃｏｎｄｒｏｇｅｎｉｃ、ＰＴ－３００３等が挙げられる。間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化は、アルシアンブルー染色等により確認することができる。

[0025] 幹細胞の移植は、幹細胞の浮遊液を宿主体に注入することにより容易に行うことができる。注入は、再生治療しようとする臓器若しくはその近傍、または静脈内等に対して行うことができる。また注入する幹細胞の数は特に限定されず、症状、宿主の体重または投与方法等に応じて適宜選択できるが、通常10^{2}～10^{10}個程度とする。

[0026] 本明細書において、「フィーダー細胞」とは、増殖や分化を起こさせよう

とする目的の細胞の培養条件を整えるために用いる、補助役を果たす他の細胞種を示す。

[0027] フィーダー細胞として用いる場合には、通常増殖しないようにあらかじめガンマ線照射や抗生物質によって処理しておくことが好ましい。幹細胞のフィーダー細胞としては、主にマウス胎仔由来の線維芽細胞が用いられるが、実験の目的や細胞によって３Ｔ３やＳＮＬなどの線維芽細胞など様々な細胞種がフィーダー細胞として用いられている。本発明の幹細胞は、好ましくは、ヒトへ細胞移植することができる幼若ブタから単離することにより、ヒト移植用幹細胞のフィーダー細胞として用いることができる。

[0028] 本発明の幹細胞の調製方法は、幼若ブタから細胞を単離する工程を含むことを特徴とする。本発明の幹細胞の調製方法の一実施態様としては、例えば、以下の工程を含む方法が挙げられる。

（１）幼若ブタから細胞を採取する工程

（２）工程（１）において採取した細胞を培養し、幼若ブタ由来幹細胞を調製する工程

以下、各工程について説明する。

[0029] （１）幼若ブタから細胞を採取する工程

工程（１）では幼若ブタの骨髄、脂肪、皮膚、膵臓等から細胞を採取する。

具体的には例えば、幼若ブタの骨髄から細胞を採取する場合、幼若ブタの大腿骨、腸骨稜及び胸骨などから骨髄細胞を採取することができる。例えば、幼若ブタから大腿骨を回収し、両端を切断して針を挿入し、ヘパリンを添加した生理的緩衝液（例えば燐酸緩衝液、以後ＰＢＳとも言う）で洗い流し、反対側の場所から流出液を骨髄液として回収する。流出液の量が減少したら、骨を逆にして針を反対側に挿入し、ＰＢＳで再び洗い流して、細胞含有溶液である骨髄液を調製する。

[0030] さらに、上記において調製した細胞含有溶液を通常遠心分離することにより幼若ブタ由来単核球細胞画分を単離してもよい。上記において調製した細

胞含有溶液をＰＢＳ等で希釈し、ヒトリンパ球分離用の媒体（例えば、ＧＥヘルスケアライフサイエンス社製Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ　ＰＬＵＳ等）を入れたチューブ内の該媒体層の上に希釈した細胞含有溶液を入れる。

[0031] 前記チューブを遠心分離して分層させ、幼若ブタ由来単核球細胞を含む層を回収する。回収した溶液をさらに遠心分離し、上清を除去した後、ＰＢＳ等で希釈して再度遠心分離し、単核球細胞画分を単離する。このようにして単離した単核球細胞画分の細胞は、培養前に凍結保存してもよい。単離した幼若ブタ由来単核球細胞画分の細胞を凍結することにより凍結融解の影響を受けにくい細胞を選択的に調製できる。培養前に凍結保存する場合、温度は－８０℃以下であることが好ましく、より好ましくは－１５０℃以下である。

[0032] また、例えば、幼若ブタの膵臓から細胞を採取する場合、幼若ブタから膵島を回収し、更に、場合によってはその膵島を浮遊培養することにより、幹細胞を調製する目的で接着培養に使用する細胞塊を調製する。

[0033] また、例えば、幼若ブタの脂肪から細胞を採取する場合、幼若ブタから脂肪を採取してはさみで細かく刻んだ後、酵素処理を行う。セルストレーナーでフィルターをかけ、低速で遠心をする。チューブ底に沈降した細胞を培養に用いる。また、例えば、幼若ブタの皮膚（毛を含む）から細胞を採取する場合、幼若ブタから皮膚を採取し、酵素処理を行う。酵素処理後皮膚より毛を抜きＢｕｌｇｅ部分を採取して培養に用いる。培養を行う際は３Ｔ３フィーダー細胞を用いる。

[0034] （２）工程（１）において採取した細胞を培養し、幼若ブタ由来幹細胞を調製する工程

上記工程（１）で採取した細胞、細胞画分、または細胞塊には、幹細胞以外の目的外の細胞が多く含まれる。通常、これらの目的外細胞の生存に必須である、ビタミンＣを含まない基礎培地（例えば、後述のＭＳＣ基礎培地）を用いることで、これらの細胞を除去する培養方法が用いられている。

[0035] 本発明の工程（２）においては、上記工程（１）で採取した細胞、細胞分

画、または細胞塊を、好ましくは３５～３９℃、より好ましくは３６～３８℃、最も好ましくは３７℃にて、好ましくは４～６％の、より好ましくは４．５～５．５％の、最も好ましくは５％の、CO_2存在下で培養用インキュベーターにて培養することにより、幹細胞以外の目的外の細胞を除去するとともに、本発明の幹細胞を増殖させる。

[0036] 本発明の幹細胞は、増殖速度が顕著に速いことから、上記の目的外の細胞を除去する培養のために、ビタミンＣを含まない基礎培地を用いず、ビタミンＣを含む培地（例えば、後述のＭＳＣ培地）のみを用いても、本発明の幹細胞を調製することができる。なお、上記の目的外の細胞を除去するために、ビタミンＣを含まない基礎培地を用いて培養した後、ビタミンＣを含む培地に交換して本発明の幹細胞を増殖させることにより、本発明の幹細胞を調製することもできる。

[0037] 本発明の幹細胞は、具体的には例えば、次の方法で培養する。ゼラチンでコートした培養用容器（例えば、０．１％ゼラチンでコートしたプレート）またはゼラチンコート無しの培養用容器（例えば、プレート）を用いてビタミンＣを含まない基礎培地（例えば、後述のＭＳＣ基礎培地）、またはビタミンＣを含む培地（例えば、後述のＭＳＣ培地）を用いて、好ましくは５．０×１０^{5}個～５．０×１０^{7}個の細胞／９．６ｃｍ^{2}を播種し、例えば３７℃にて５％CO_2、９０％湿度の条件下でインキュベートして初代培養細胞を得る。初代培養細胞を得るための培養期間は、播種後、好ましくは３～１２日、より好ましくは３～１１日、最も好ましくは３～１０日である。初代培養細胞は継代してもよい。継代して得られた幹細胞を継代培養細胞ともいう。初代培養細胞または継代培養細胞の継代は、幹細胞を播種後、好ましくは２～６日後、より好ましくは２～５日後、さらに好ましくは２～４日後、最も好ましくは３日後に、幹細胞が、３０％～１００％コンフルエントに、好ましくは５０％～９５％コンフルエントに、より好ましくは６０％～９０％コンフルエントに、最も好ましくは７０％～８５％コンフルエントに達した以降に行う。幹細胞の播種は、ゼラチンでコートした培養用容器（例えば、０

．１％ゼラチンでコートしたプレート）またはゼラチンコート無しの培養用容器（例えば、プレート）を用いてビタミンＣを含む培地（例えば、後述のＭＳＣ培地）を用いて、好ましくは５．０×１０^{5}個～５．０×１０^{7}個の細胞／９．６ｃｍ^{2}を播種する。幹細胞の培養は、例えば３７℃にて５％CO_2、９０％湿度の条件下で培養する。幹細胞の培養の間、必要に応じて培地交換して本発明の幹細胞を増殖させる。

[0038] ＭＳＣ基礎培地およびＭＳＣ培地としては、従来公知のものを用いることができ、市販のものを用いてもよい。ＭＳＣ基礎培地としては、例えば、５００ｍＬのＧｉｂｃｏ社製ＭＥＭα（Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ、ｎｏ Ａｓｃｏｒｂｉｃ ａｃｉｄ）に５５ｍＬのＧｉｂｃｏ社製Ｆｅｔａｌ ｂｏｖｉｎｅ ｓｅｒｕｍ （ＦＢＳ）及び５．５ｍＬのＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎを添加した培地が挙げられる。また、ＭＳＣ培地としては、例えば、５００ｍＬのＧｉｂｃｏ社製ＭＥＭα（ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ）に５５ｍＬのＧｉｂｃｏ社製Ｆｅｔａｌ ｂｏｖｉｎｅ ｓｅｒｕｍ（ＦＢＳ）、５．５ｍＬのＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ及び２２．２μＬ のＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製ＦＧＦ－Ｂａｓｉｃ，ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ，ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ ｉｎ Ｅ．ｃｏｌｉ，ｓｕｉｔａｂｌｅ ｆｏｒ ｃｅｌｌ ｃｕｌｔｕｒｅ（ｆｉｎａｌ ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｉｏｎ：１ｎｇ／ｍＬ）を添加した培地が挙げられる。

[0039] 継代は少なくとも１回以上実施することが好ましい。継代回数は本発明の幹細胞が得られる限り特に限定されないが、好ましくは１～３回であり、より好ましくは１～２０回である。

[0040] 本発明の幹細胞は凍結保存が可能である。凍結保存のタイミングは特に限定されないが、好ましくは継代１～２０回の後であり、より好ましくは継代２～１０回の後である。凍結保存および解凍の方法は従来公知の方法を用いることができる。

[0041] 幹細胞の凍結保存方法としては、具体的には例えば、凍結保存液に分散さ

せ、必要になるまで冷凍庫にて－８０℃以下または液体窒素中で凍結保存することができる。凍結保存液としては、例えば、ＯＰＦ－３０１［３％トレハロース及び５％デキストランを含有する乳酸リンゲル液（国際公開第２０１４／２０８０５３号）］とジメチルスルフォキサイド（ＤＭＳＯ）を９：１の比率で混合した溶液、動物細胞の凍結保存に使用可能な血清含有若しくは無血清保存液、または市販の細胞凍結保存用試薬［好ましくは、タカラバイオ社製ＣＥＬＬＢＡＮＫＥＲ（登録商標）等のセルバンカー］が挙げられる。

実施例

[0042] 試験例１

〔幼若ブタ由来骨髄細胞の回収〕

幼若ブタの大腿骨から骨髄を採取した。幼若ブタ（生後２３日の医療用ランドレース種ブタ）から大腿骨を回収し、両端を切断して１２Ｇ針を挿入し、５０ｍＬのヘパリン処理したＰＢＳ（３ｍＬのヘパリン（１０００Ｕ／ｍＬ）、４７ｍＬのＰＢＳ）で洗い流し、反対側の場所から５０ｍＬの骨髄の流出液（以下、骨髄液とも略す）を回収した。流出液の量が減少したら、骨を逆にして針を反対側に挿入し、ＰＢＳで再び洗い流して骨髄液を収集した。カウント用の１５ｍＬコニカルチューブで１９５０μＬのＰＢＳ（４０倍希釈）に５０μＬのサンプルを取り、セルカウンターで細胞数を測定した。

[0043] 〔幼若ブタ由来単核球細胞（ｎｐＭＮＣ）画分の単離〕

上記手順で得られた骨髄液を静かに再懸濁した。骨髄液全体を５０ｍＬチューブ４本に各１０ｍＬずつに分け、各々ＰＢＳで３０ｍＬに希釈し、細胞がチューブに付着していないことを確認してよく混合した。１０ｍＬのＦｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ　ＰＬＵＳ（ＧＥヘルスケアライフサイエンス社製）を４本の新しい５０ｍＬチューブに加え、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ　ＰＬＵＳ層の上にＰＢＳと混合した３０ｍＬの骨髄液を入れた。

[0044] 前記チューブを２０℃にて３０分間４００×ｇで遠心分離し、ゆっくりとブレーキなしで加速させ（フルスピードの１／３）、３つの異なる層を形成

させた。単核球細胞画分は浮遊白色リングに配置されているため、白色リング全体を２５ｍＬのＰＢＳを含む５０ｍＬチューブ（×４）に回収した。室温にて４００×ｇで７分間遠心分離し、上清を除去した。ＰＢＳを４０ｍＬまで加え、室温にて４００×ｇで７分間再び遠心分離した。上記と同様に細胞数を測定したところ、骨髄細胞全体のうち２５～３０％の細胞が単核球細胞画分として、それぞれ（２０～３０）×10^6個単離された。

[0045] 〔幼若ブタ由来単核球細胞（ｎｐＭＮＣ）画分の細胞の凍結保存〕

単離された単核球細胞画分の細胞を、10^7細胞／ｍＬのＤＭＳＯを混合したＦＢＳ（９０％ＦＢＳと１０％ＤＭＳＯ）を含むクライオバイアルに入れ、細胞懸濁液の全容量を１ｍｌとした［細胞数／１０×10^6＝ＤＭＳＯを混合したＦＢＳの容量（ｍＬ）とした］。クライオバイアルを－２０℃にて１時間保存し、続いて－８０℃にて２４時間保存後、最終的に長期保存用の液体窒素タンクに移した。

[0046] 〔幼若ブタ由来単核球細胞（ｎｐＭＮＣ）画分の細胞の培養および幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）の調製〕

３７℃の水浴でクライオバイアルに冷凍保存していた幼若ブタ由来単核球細胞（ｎｐＭＮＣｓ）画分の細胞を含む細胞懸濁液を素早く解凍し、マイクロピペットを用いて、解凍した細胞懸濁液を３０ｍＬの温度平衡（３７℃）に調整したＭＳＣ基礎培地［５００ｍＬのＧｉｂｃｏ社製ＭＥＭα（Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ、ｎｏ Ａｓｃｏｒｂｉｃ ａｃｉｄ）に５５ｍＬのＧｉｂｃｏ社製Ｆｅｔａｌ ｂｏｖｉｎｅ ｓｅｒｕｍ （ＦＢＳ）及び５．５ｍＬのＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎを添加した培地、以下同様］に静かに加えた。室温にて５分間、５００×ｇで遠心分離し、ペレットを４ｍＬの温度で平衡化したＭＳＣ基礎培地に再懸濁し、上下に穏やかにピペッティングした。総細胞数および生細胞数を計測した結果、総細胞数４．１８×10^6個、生細胞数６．６×10^5個、生存率：１５．８％であった。

[0047] ０．１％ゼラチンで６ウェルプレートをコートし、インキュベーター（３

７℃、５％CO_2）中に１０～１５分間静置後、使用前にゼラチンを除去した。調製した各０．１％ゼラチン被覆６－ウェルプレートに細胞懸濁液を加え、穏やかに揺動させて増殖表面（ゼラチンコート）上に細胞懸濁液を分散させ、２ｍＬのＭＳＣ基礎培地中に２．０９×10^6個の細胞／１ウェルを播種した。CO_2インキュベーター中で、３７℃にて５％CO_2、９０％湿度の条件下で培養し、３日後にＭＳＣ培地［５００ｍＬのＧｉｂｃｏ社製ＭＥＭα（ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ）に５５ｍＬのＧｉｂｃｏ社製Ｆｅｔａｌ ｂｏｖｉｎｅ ｓｅｒｕｍ（ＦＢＳ）、５．５ｍＬのＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ及び２２．２μＬのＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製ＦＧＦ－Ｂａｓｉｃ，ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ，ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ ｉｎ Ｅ．ｃｏｌｉ，ｓｕｉｔａｂｌｅ ｆｏｒ ｃｅｌｌ ｃｕｌｔｕｒｅ（ｆｉｎａｌ ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｉｏｎ：１ｎｇ／ｍＬ）を添加した培地、以下同様］に交換して細胞を増殖させ、以後、３日間に１回、ＭＳＣ培地の交換を行った。１０日後に幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）がコンフルエントとなった。なお、ゼラチンコート無しのプレートを用いた場合についても、同様に１０日後に幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）がコンフルエントとなった。

[0048] 〔継代〕

幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）がほぼ１００％コンフルエンスに達した後、２ウェルから細胞を回収し、０．１％ゼラチンコート有りまたは無しでＴ７５フラスコにそれらを再播種した。

[0049] ２ｍＬのＰＢＳ（カルシウム及びマグネシウム不含）で細胞を洗浄し、１ウェル当たり０．２５％トリプシン３２０μＬを加えてインキュベーターに数分間静置し、細胞が剥がれたら、１６８０μＬのＭＳＣ培地で中和した。１ｍＬピペットを用いて細胞懸濁液を５０ｍＬチューブに採取し、１６ｍＬ（８ｍＬ×２ウェル）のＭＳＣ培地を添加した後、室温にて５分間、５００×ｇで遠心分離した。ピペットを用いて、得られたペレットを温度平衡化し

たＭＳＣ培地（２ｍＬ）に穏やかに再懸濁した。総細胞数および生細胞数を計測した結果、総細胞数２．０５×１０^{6}個、生細胞数２．０２×１０^{6}個、生存率：９８．５％であった。

[0050] ＭＳＣ培地を０．１％ゼラチンコート有りおよび無しのＴ７５フラスコに加え、４．５×１０^{5}生細胞／フラスコＴ７５フラスコとなるように再播種し、CO_2インキュベーター中で、３７℃にて５％CO_2、９０％湿度の条件下で培養した。これらの細胞を第１継代とした。第１継代を播種した３日後に、０．１％ゼラチンコートの有無にかかわらず、１００％コンフルエントに達した。

[0051] 〔幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）の調製〕

幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）がほぼ１００％コンフルエンスに達した後、０．１％ゼラチンコートを含むまたは含まないＴ７５フラスコの２つのフラスコから細胞を回収した。８ｍＬのＰＢＳ（－）で細胞を洗浄し、１ウェルあたり０．２５％のトリプシン２．４ｍＬを加え、インキュベーターに数分間静置し、細胞が剥がれたら１２．６ｍＬのＭＳＣ培地で中和した。細胞懸濁液を５０ｍＬのチューブに集めて、室温にて５分間、５００×ｇで遠心分離した。

[0052] 得られたペレットに温度平衡化したＭＳＣ培地（１０ｍＬ）を添加し、ピペットで上下に静かに再懸濁し、総細胞数および生細胞数を計測した結果を下記に示す。

０．１％ゼラチンコートされたフラスコ（×２）からの細胞：総細胞数１．６２×１０^{7}個、生細胞数１．６０×１０^{7}個、生存率：９８．８％

ゼラチンコートなしのフラスコ（×２）からの細胞：総細胞数１．４８×１０^{7}個、生細胞数１．４６×１０^{7}個、生存率：９８．６％

[0053] 〔幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）の凍結保存〕

上記した培養とは別に、早期継代の幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）を凍結して細胞ストックを作製した。所望の濃度のＣＥＬＬＢＡＮＫＥＲ（登録商標）１またはＯＰＦ－３０１［３％トレハロース及び

５％デキストランを含有する乳酸リンゲル液（国際公開第２０１４／２０８０５３号）］とＤＭＳＯを９：１の比率で混合した溶液中でトリプシン処理したｎｐＢＭ－ＭＳＣペレットを再懸濁し、１．５×１０^{6}細胞／１ｍＬ／バイアルとした。バイアルをバイセルに入れて－８０℃にて２４時間保存した後、細胞を－８０℃から液体窒素に移して長期保存した。

[0054] 〔ＣＦＵアッセイ〕

幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）（Ｐ２）を、２１ｃｍ^{2}培養ディッシュ（ゼラチンコート無しまたは０．１％ゼラチンコート）に６３０細胞を３０細胞／ｃｍ^{2}の密度で播種し、ＭＳＣ培地中で培養した。ＭＳＣ培地は３日毎に交換した。６日間の培養後、接着細胞を４ｍＬのＰＢＳで２回洗浄し、４ｍＬの氷冷メタノールで４℃にて１５分間固定した。コロニーを可視化するために、リン酸緩衝液で１：１９に希釈した４ｍＬのギムザで３０分間細胞を染色後、室温（ＲＴ）で洗浄し、H_2Oで２回洗浄した。

[0055] 次いで、５０個を超える細胞のコロニー数を計測し、細胞のコロニー形成効率を計算した。細胞のコロニー形成効率は、１ディッシュ当たりのコロニー数を、１ディッシュ当たり播種した細胞数（６３０個）で割ることによって計算した。結果を表１に示す。なお、表１の値は平均値±ＳＤ（ｎ＝３）を示す。

[0056] [表1]

細胞のコロニー形成効率（%）

０．１％ゼラチンコート	21.1±3.3
ゼラチンコート無し	23.1±3.7

[0057] 表１に示すように、ＣＦＵアッセイの結果、得られた幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）は、ゼラチンコートの有無にかかわらず、コロニー形成し得ることがわかった。

[0058] 〔細胞の平均直径〕

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（ｈＢＭ－ＭＳＣ、継代回数Ｐ４）および得られた幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）について、細胞の

平均直径を計測した結果を表２に示す。細胞の平均直径はＮｕｃｌｅｏ　Ｃｏｕｎｔｅｒ　ＮＣ－２００（商標）を用いて計測し、平均値（ｎ＝３）を算出した。

[0059] [表2]

細胞の平均直径

npBM-MSC	13.2μm
hBM-MSC	17.5μm

[0060] 表２に示すように、得られた幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）は、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞と比較して、平均直径が小さいことがわかった。

[0061] 〔増殖速度の評価〕

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（ｈＢＭ－ＭＳＣ）および幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）について、細胞をＴ２５フラスコ中で５０００細胞／ｃｍ^2（１．２５×１０^{5}細胞／フラスコ）の密度で播種し、ＭＳＣ培地を用いて培養した。ＭＳＣ培地は３日毎に交換した。培養開始から１、２、４および８日後に生存可能な細胞および死んだ細胞の総数を数えた。結果を表３および表４、並びに図１Ａおよび図１Ｂに示す。なお、表３および表４の値は平均値±ＳＤ（ｎ＝４）である。

[0062] [表3]

全細胞量（×10^{4}細胞）

群	懸濁直後	1日目	2日目	4日目	8日目
npBM-MSC	12.7	32.5 ±2.7	86.9 ±7.7	207.9 ±38.2	448.0±73.6
hBM-MSC	12.5	12.5±0.8	22.3 ±2.9	37.4 ±3.8	50.5±5.7

[0063] [表4]

全細胞増殖率（%）

群	懸濁直後	1日目	2日目	4日目	8日目
npBM-MSC	100	257 ±22	687±61	1643± 302	3542 ±581
hBM-MSC	100	100 ±7	178 ±23	299 ±31	404±46

[0064] 表３および表４、並びに図１Ａおよび図１Ｂに示すように、得られた幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）は、ヒト骨髄由来間葉系幹

細胞と比較して、細胞の増殖速度が顕著に速いことがわかった。

[0065]〔脂肪細胞への分化〕

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（ｈＢＭ－ＭＳＣ）および幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）について、ｈＭＳＣ　ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ　ＢｕｌｌｅｔＫｉｔ（商標）－ａｄｉｐｏｇｅｎｉ、ＰＴ－３００４（Ｌｏｎｚａ　Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ社製）を用いて、プロトコールに従って脂肪細胞への分化を誘導した。誘導開始後１７日目にＳｉｇｍａ－Ａｌｄｏｒｉｃｈ社製Ｏｉｌ　Ｒｅｄを用いて染色した結果をそれぞれ図２Ａおよび図２Ｂに示す。

[0066] 図２Ａおよび図２Ｂに示すように、得られた幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）は、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞と同様に、脂肪細胞に分化し得ることがわかった。

[0067]〔骨細胞への分化〕

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（ｈＢＭ－ＭＳＣ）および幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）について、ｈＭＳＣ　ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ　ＢｕｌｌｅｔＫｉｔ（商標）－ｏｓｔｅｏｇｅｎｉｃ、ＰＴ－３００２（Ｌｏｎｚａ　Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ社製）を用いて、プロトコールに従って骨細胞への分化を誘導した。誘導開始後１４日目に、コスモ・バイオ社製アルカリフォスファターゼ染色キットを用いて染色した結果をそれぞれ図３Ａおよび図３Ｂに、コスモ・バイオ社製石灰化染色キットを用いて染色した結果をそれぞれ図４Ａおよび図４Ｂに示す。

[0068] 図３Ａおよび図３Ｂ、並びに図４Ａおよび図４Ｂに示すように、得られた幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）は、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞と同様に、骨細胞に分化し得ることがわかった。

[0069]〔軟骨細胞への分化〕

幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）について、ｈＭＳＣ　ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ　ＢｕｌｌｅｔＫｉｔ（商標）－ｃｈｏｎｄｒｏｇｅｎｉｃ、ＰＴ－３００３（Ｌｏｎｚａ　Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌ

Ｉｅ社製）を用いて、プロトコールに従って骨細胞への分化を誘導した。誘導開始後１９日目に、ＨＥ染色した結果およびアルシアンブルー染色した結果をそれぞれ図５Ａおよび図５Ｂに示す。

[0070] 図５Ａおよび図５Ｂに示すように、得られた幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）は、軟骨細胞に分化し得ることがわかった。

[0071] 試験例２

〔幼若ブタ由来単核球細胞（ｎｐＭＮＣ）画分の細胞の培養および幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）調製〕

ＭＳＣ基礎培地またはＭＳＣ培地は、使用前にインキュベーター（３７℃、５％CO_2）中に１０～１５分間静置した。試験例１と同様に、３７℃の水浴でクライオバイアルに冷凍保存していた幼若ブタ由来単核球細胞（ｎｐＭＮＣ）画分の細胞を含む細胞懸濁液を素早く解凍した。マイクロピペットを用いて、解凍した細胞懸濁液を３０ｍＬの温度平衡（３７℃）ＭＳＣ基礎培地に静かに加え、５０ｍＬのチューブ２本に１５ｍＬずつ分注した。

[0072] 室温にて５分間、５００×ｇで遠心分離し、ペレットを２ｍＬの温度平衡ＭＳＣ基礎培地またはＭＳＣ培地に再懸濁し、上下に穏やかにピペッティングした。総細胞数および生細胞数を計測した結果を下記に示す。

２ｍＬのＭＳＣ基礎培地：総細胞数２．６０×10^6個、生細胞数４．８×10^5個、生存率１８．５％

２ｍＬのＭＳＣ培地：総細胞数２．５５×１０個、生細胞数４．５×10^5個、生存率１７．６％

[0073] 播種細胞数が下記となるように計算された量の細胞懸濁液を各ウェルにつき下記培地を入れた６ウェルプレート（ゼラチンコート無し）に加え、穏やかに揺り動かして増殖表面上に細胞懸濁液を分散させた。

２ｍＬのＭＳＣ基礎培地：２．６０×10^6個／１ウェルの細胞を播種

２ｍＬのＭＳＣ培地：２．５５×10^6個／１ウェルの細胞を播種

[0074] CO_2インキュベーターに入れ、３７℃にて、５％CO_2、９０％湿度の条件下でインキュベートした。播種して３日後及び６日後にＭＳＣ培地にて培

地交換して細胞を増殖させて、播種後８日目に継代した。

[0075]〔継代〕

幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）がほぼ５０～６０％コンフルエントに達した後、１ウェルから細胞を回収し、ゼラチンコートなしでＴ７５フラスコにそれらを再播種した。

[0076] ２ｍＬのＰＢＳ（－）で細胞を洗浄し、１ウェル当たり０．２５％トリプシンを３２０μＬ加えてインキュベーターに数分間静置し、細胞が剥がれたら１６８０μＬのＭＳＣ培地で中和した。細胞懸濁液を５０ｍＬチューブに集めて８ｍＬのＭＳＣ培地を加え、室温にて５分間、５００×ｇで遠心分離した。

[0077] 得られたペレットに温度平衡化したＭＳＣ培地（２ｍＬ）を添加して、ピペットで上下に穏やかに再懸濁し、総細胞数および生細胞数の計測した結果を下記に示す。

Ｐ０播種時にＭＳＣ基本培地の群：総細胞数５．０×１０^{5}個、生細胞数５．０×１０^{5}個、生存率：１００％

Ｐ０播種時にＭＳＣ培地の群：総細胞数３．３×１０^{5}個、生細胞数３．３×１０^{5}個、生存率：１００％

[0078] １５ｍＬのＭＳＣ培地をＴ７５フラスコ（ゼラチンコート無し）に加え、下記細胞数となるように、幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）を再播種した、インキュベーターにて培養した。これらの細胞を第１継代とした。

Ｐ０播種時にＭＳＣ基礎培地の群：生細胞数５．０×１０^{5}個／フラスコ

Ｐ０播種時にＭＳＣ培地の群：生細胞数３．３×１０^{5}個／フラスコ

[0079]〔幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）の調製〕

前記手順により再播種した細胞がほぼ８０～９０％のコンフルエンスに達した後、Ｔ７５フラスコ（ゼラチンコート無し）の１フラスコから細胞を集めた。８ｍＬのＰＢＳ（－）で細胞を洗浄し、０．２５ｍＬ／１ウェルのトリプシン２．４ｍＬを加え、インキュベーターに数分間静置し、細胞が剥が

れたら１２．６ｍＬのＭＳＣ培地で中和した。細胞懸濁液を５０ｍＬのチューブに集めて、室温にて５分間、５００×ｇで遠心分離した。

[0080] 得られたペレットに温度平衡化したＭＳＣ培地（５ｍＬ）を添加し、ピペットで上下に静かに再懸濁して総細胞数および生細胞数を計測した結果を下記に示す。

１つのフラスコからの細胞（Ｐ０の播種後の３日間のＭＳＣ基礎培地）：総細胞数５．１２×１０^{6}個、生細胞数５．０９×１０^{6}個、生存率：９９．５％

１つのフラスコからの細胞（Ｐ０の播種時からＭＳＣ培地）：総細胞数４．７６×１０^{6}個、生細胞数４．７３×１０^{6}個、生存率：９９．４％

[0081] 〔幼若ブタ骨髄由来間葉系幹細胞（ｎｐＢＭ－ＭＳＣ）の凍結保存〕

上記した培養とは別に、試験例１と同様にして、早期継代の細胞を凍結して細胞ストックを作製した。

[0082] 試験例３

試験例１および試験例２で調製した幼若ブタ由来単核球細胞（ｎｐＭＮＣ）の細胞表面抗原を解析した。解析に用いた各サンプルの調製方法について、表５に示す。表５において、「Ｓｗｉｔｃｈ」とは、初期培養時はＭＳＣ基礎培地（ビタミンＣフリー）を用い、増殖培養時には増殖培地であるＭＳＣ培地（ビタミンＣ含有）に変更して培養したことを示す。

[0083] [表5]

各サンプルの調製法

サンプル No.	培地	0.1%ゼラチンコート		凍結条件
		初期培養時	増殖培養時	
1	Switch	○	○	CELLBANKER（登録商標）
2	Switch	○	○	OPF-301(10% DMSO)
3	Switch	○	−	CELLBANKER（登録商標）
4	Switch	○	−	OPF-301(10% DMSO)
5	Switch	−	−	OPF-301(10% DMSO)
6	MSC培地のみ	−	−	OPF-301(10% DMSO)

[0084] 〔細胞表面抗原の解析〕

各細胞サンプルを液体窒素タンクより取出して蓋を緩めて圧を抜き、再び

ふたを閉め、３７℃に予め加温しておいた恒温槽で１～２分間軽く撹拌しながら融解した。Ｓｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＢＤ社製）５ｍＬを入れた１５ｍＬ遠沈管に融解させた各細胞を移し、４℃にて５００×ｇ、５分間遠心し、上清を取り除いた。５ｍＬのＳｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒを入れ、４℃にて５００×ｇ、５分間遠心し、２回洗浄した。

[0085] ２ｍＬのＳｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＢＤ社製）で再懸濁し、生細胞数をカウントした。再遠心（５００×ｇ、５分間、４℃）を行い、細胞数１×１０^{7}個／ｍＬとなるようＳｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＢＤ社製）で再懸濁し、２０μＬ（細胞数２×１０^{5}個）ずつ１．５ｍＬチューブに分注し、非染色コントロール、ＣＤ４４、ＣＤ９０、Ｉｓｏｔｙｐｅ　Ｃｏｎｔｒｏｌの計４本ずつ調製した。

[0086] ４μＬのＡｎｔｉ－ＣＤ４４，Ｍｏｕｓｅ（ＭＥＭ－２６３），ＰＥ（ＧｅｎｅＴｅｘ社製）、１μＬのＰＥ　Ｍｏｕｓｅ　Ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　ＣＤ９０（ＢＤ社製）（ブタとの交差性あり）、４μＬのＰＥ　Ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ１，κ　Ｉｓｏｔｙｐｅ　Ｃｏｎｔｒｏｌ（ＢＤ社製）をそれぞれのチューブに添加し、遮光氷上で４５分間インキュベートした。非染色コントロールも氷上で保管した。

[0087] 各チューブにＳｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＢＤ社製）を１ｍＬずつ入れて、４℃にて５００×ｇで５分間遠心し、２回洗浄した。細胞ペレットをタッピングしてほぐし、５００μＬのＳｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＢＤ社製）で再懸濁し、解析直前にフィルターを通してフローサイト用のテストチューブに移した。解析までの間は遮光氷上で保管し、フローサイトメトリーを用いて解析した。ＣＤ４４の結果を図６に、ＣＤ９０の結果を図７に示す。

[0088] 図６および図７に示すように、いずれのサンプルにおいても間葉系幹細胞のマーカーであるＣＤ４４およびＣＤ９０が陽性であった。また、初期培養時にゼラチンによるコーティングを行わなくても、目的とする間葉系幹細胞が樹立することができたと考えられる。なお、いずれの場合もＩｓｏｔｙｐｅ　Ｃｏｎｔｒｏｌの測定では非特異な反応は見られなかった。

[0089] 試験例４

〔幼若ブタ膵島由来間葉系幹細胞の調製〕

幼若ブタから膵島を回収し、浮遊培養することにより細胞塊を調製した後、試験例１と同様にして、冷凍保存した。３７℃の水浴でクライオバイアルに冷凍保存していた幼若ブタ膵島を素早く解凍した。

[0090] マイクロピペットを用いて、解凍した膵島懸濁液を３０ｍＬの温度平衡（３７℃）に調整したＭＳＣ基礎培地に静かに加えた。４℃にて１分間、２１０×ｇで遠心分離した。なお、膵島を凍結しない場合は、室温にて、自然落下で膵島が沈殿後、上清を除去した。ペレットを４ｍＬの温度で平衡化したＭＳＣ基礎培地に再懸濁し、上下に穏やかにピペッティングした。

[0091] ６－ウェルプレートに膵島懸濁液を加え、穏やかに揺動させて増殖表面（ゼラチンコートなし）上に細胞懸濁液を分散させ、２ｍＬのＭＳＣ基礎培地中に１６５０ＩＥＱ～２１２５ＩＥＱの範囲の膵島／１ウェルを播種した。

[0092] CO_2インキュベーター中で、３７℃にて５％CO_2、９０％湿度の条件下で培養し、３日後にＭＳＣ培地に交換して細胞を増殖させ、以後、３日間に１回、ＭＳＣ培地の交換を行った。表６にサンプルの調製条件を示す。初期凍結の有無にかかわらず、播種してから６日後に１００％コンフルエントに達した。

[0093] [表6]

サンプルNo.	由来	条件	P0での凍結*	凍結時の継代回数*	液量(mL)	細胞濃度 (X 10^6 total cells/mL)
7	膵島	膵島調製当日(day 1)	無し	P2 (OPF-301)	1	2.23
8	膵島	膵島調製後3日目 (day 4)	無し	P2 (OPF-301)	1	1.22
9	膵島	膵島調製当日(day 1)	有り (OPF-301)	P2 (OPF-301)	1	3.25
10	膵島	膵島調製後3日目 (day 4)	有り (OPF-301)	P2 (OPF-301)	1	2.3

*括弧内は10%DMSO溶液の種類

[0094] 〔継代〕

幼若ブタ膵島由来間葉系幹細胞（ｎｐＩＳＬＥＴ－ＭＳＣ）が約８０％～ほぼ９５％コンフルエンスに達した後、２ウェルから細胞を回収し、ゼラチンコートなしでＴ７５フラスコにそれらを再播種した。

[0095] ２ｍＬのＰＢＳ（カルシウム及びマグネシウム不含）で細胞を洗浄し、１

ウェル当たり０．２５％トリプシン３２０μＬを加えてインキュベーター内に数分間静置し、細胞が剥がれたら１６８０μＬのＭＳＣ培地で中和した。１ｍＬピペットを用いて細胞懸濁液を５０ｍＬチューブに採取し、１６ｍＬ（８ｍＬ×２ウェル）のＭＳＣ培地を添加した後、室温にて５分間、５００×ｇで遠心分離した。ピペットを用いて、得られたペレットを温度平衡化したＭＳＣ培地（２ｍＬ）に穏やかに再懸濁した。

[0096] 〔細胞の平均直径〕

２０ｍＬの前記ＭＳＣ培地をゼラチンコート無しのＴ７５フラスコに加えて再播種し、CO_2インキュベーター中で、３７℃にて５％CO_2、９０％湿度の条件下で培養した。これらの細胞を第１継代とした。第１継代を播種した３日後に、初期凍結の有無にかかわらず、１００％コンフルエントに達した。このことから、幼若ブタの膵島から調製した間葉系幹細胞の増殖速度は、幼若ブタの骨髄から調製した間葉系幹細胞の増殖速度と同程度であることがわかった。得られた幼若ブタ膵島由来間葉系幹細胞の平均直径を表７に示す。

[0097] [表7]

サンプル No.	11	12	13	14
調製条件	膵島調製直後の凍結無し	膵島調製直後の凍結有り	膵島調製後培養3日目の凍結無し	膵島調製後培養3日目の凍結有り
凍結時10% DMSO溶液の種類	－	OPF-301	－	OPF-301
平均直径	12.1 μm	12.2 μm	12.0 μm	12.3 μm

[0098] 表７に示すように、膵島の調製における凍結条件に関わらず、幼若ブタ膵島由来間葉系幹細胞を調製可能であり、凍結有りの場合、凍結無しの場合に関係なく平均直径は同程度であることがわかった。

[0099] 〔細胞表面抗原の解析〕

各細胞サンプルを液体窒素タンクより取出して蓋を緩めて圧を抜き、再びふたを閉め、３７℃に予め加温しておいた恒温槽で１～２分間軽く撹拌しながら融解した。Ｓｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＢＤ社製）５ｍＬを入れた１５

ｍＬ遠沈管に融解させた各細胞を移し、４℃にて５００×ｇ、５分間遠心し、上清を取り除いた。５ｍＬのＳｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒを入れ、４℃にて５００×ｇ、５分間遠心し、２回洗浄した。

[0100] ２ｍＬのＳｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＢＤ社製）で再懸濁し、生細胞数をカウントした。再遠心（５００×ｇ、５分間、４℃）を行い、細胞数１×１０^{7}個／ｍＬとなるようＳｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＢＤ社製）で再懸濁し、２０μＬ（細胞数２×１０^{5}個）ずつ１．５ｍＬチューブに分注し、非染色コントロール、ＣＤ２９、ＣＤ４４、ＣＤ９０の計４本ずつ調製した。

[0101] １μＬのＭｏｕｓｅ　Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７　Ｍｏｕｓｅ　Ａｎｔｉ－Ｐｉｇ　ＣＤ２９（ＢＤ社製）、４μＬのＡｎｔｉ－ＣＤ４４，Ｍｏｕｓｅ（ＭＥＭ－２６３），ＰＥ（ＧｅｎｅＴｅｘ社製）、１μＬのＰＥ　Ｍｏｕｓｅ　Ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　ＣＤ９０（ＢＤ社製）（ブタとの交差性あり）をそれぞれのチューブに添加し、遮光氷上で４５分間インキュベートした。非染色コントロールも氷上で保管した。

[0102] 各チューブにＳｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＢＤ社製）を１ｍＬずつ入れて、４℃にて５００×ｇで５分間遠心し、２回洗浄した。細胞ペレットをタッピングしてほぐし、５００μＬのＳｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＢＤ社製）で再懸濁し、解析直前にフィルターを通してフローサイト用のテストチューブに移した。解析までの間は遮光氷上で保管し、フローサイトメトリーを用いて解析した。

[0103] ＣＤ２９の結果を図８Ａ～図８Ｄに、ＣＤ４４の結果を図９Ａ～図９Ｄに、ＣＤ９０の結果を図１０Ａ～図１０Ｄに示す。図８Ａ、図９Ａ、図１０Ａは、サンプル１１（膵島調製直後の凍結無し）；図８Ｂ、図９Ｂ、図１０Ｂはサンプル１２（膵島調製直後の凍結有り）；図８Ｃ、図９Ｃ、図１０Ｃはサンプル１３（膵島調製後培養３日目の凍結無し）；図８Ｄ、図９Ｄ、図１０Ｄはサンプル１４（膵島調製後培養３日目の凍結有り）の結果を示す。

[0104] 図８Ａ～図１０Ｄに示すように、いずれのサンプルにおいても間葉系幹細胞のマーカーであるＣＤ２９、ＣＤ４４およびＣＤ９０について高い陽性率

が観察された。また、初期培養時における凍結の有無によらずに、目的とする間葉系幹細胞が樹立することができたと考えられる。

[0105] 本発明を特定の態様を参照して詳細に説明したが、本発明の精神と範囲を離れることなく様々な変更および修正が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願は、２０１７年９月８日付けで出願された米国仮出願（ＵＳ６２／５５５，９１３）に基づいており、その全体が引用により援用される。また、ここに引用されるすべての参照は全体として取り込まれる。

請求の範囲

[請求項1] 幼若ブタより単離された、幹細胞。

[請求項2] 平均直径が１７μｍ以下である請求項１に記載の幹細胞。

[請求項3] 対数増殖期における倍加時間が３６時間以下である請求項１または２に記載の幹細胞。

[請求項4] 間葉系幹細胞である請求項１～３のいずれか１項に記載の幹細胞。

[請求項5] 幼若ブタがヒトへ細胞移植することができる幼若ブタである請求項１～４のいずれか１項に記載の幹細胞。

[請求項6] 幼若ブタの骨髄または膵島より単離された請求項１～５のいずれか１項に記載の幹細胞。

[請求項7] 移植用幹細胞である請求項１～６のいずれか１項に記載の幹細胞。

[請求項8] ヒト移植用幹細胞である請求項７に記載の幹細胞。

[請求項9] フィーダー細胞用幹細胞である請求項１～６のいずれか１項に記載の幹細胞。

[請求項10] ヒト移植用幹細胞を増殖するためのフィーダー細胞用幹細胞である請求項９に記載の幹細胞。

[請求項11] 幼若ブタから細胞を単離する工程を含む、幹細胞の調製方法。

[請求項12] 幹細胞を播種後３～１２日後に継代する工程を含む、請求項１１に記載の幹細胞の調製方法。

[請求項13] 幼若ブタから単離する細胞が単核球細胞画分の細胞である請求項１１または１２に記載の幹細胞の調製方法。

[請求項14] 幼若ブタからの細胞の単離が、幼若ブタの骨髄または膵島からの細胞の単離である請求項１１～１３のいずれか１項に記載の幹細胞の調製方法。

[請求項15] 単離した単核球細胞画分の細胞を凍結する工程を含む、請求項１３または１４に記載の幹細胞の調製方法。