明　細　書

発明の名称 ：

間葉系幹細胞を未分化増殖させる方法、および間葉系幹細胞を濃縮する方法

技術分野

[0001] 本発明は、臍帯血における間葉系幹細胞を濃縮し、未分化増殖させる方法、および臍帯血における間葉系幹細胞を濃縮する方法に関する。

背景技術

[0002] 間葉系幹細胞は、間葉系に属する細胞（例えば、骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞および軟骨細胞など）への分化能を有している細胞として知られている。また、近年では、間葉系幹細胞は、神経細胞および肝臓などの中胚葉性ではない組織にまで分化し得ると報告されている。このため、間葉系幹細胞には、再生医療における利用について大きな期待がかけられている。

[0003] 間葉系幹細胞は骨髄および臍帯血などに存在しているが、採取された細胞集団における間葉系幹細胞の占める割合は非常に小さい。よって、間葉系幹細胞を利用する場合、間葉系幹細胞を濃縮するか、または分離することが一般的である。例えば、間葉系幹細胞を濃縮する一例として、血液から赤血球を除去するＨＥＳ法、フィコール法およびフィルタ法などが知られている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Pittenger, M.F. et al., Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. Science, 284:143-147, 1999.

非特許文献2：Basford, C. et al., The Cord Blood Separation League Table: a Comparison of the Major Clinical Grade Harvesting Techniques for Cord Blood Stem Cells. Inter. J. Stem Cells, 3:32-45, 2010.

非特許文献3：Yasutake, M. et al., Stem cell collection filter system for human placental/umbilical cord blood processing. Vox Sang., 80:10

1-105, 2001.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかし、これまでに知られている方法では、わずかにしか含まれていない間葉系幹細胞を十分に濃縮することができない。よって、例えば濃縮したサンプルを培養しても、夾雑物が多量に含まれているために、十分な数の間葉系幹細胞を得ることができない。

[0006] よって、このような課題に鑑みて、本発明の目的は、十分な数の間葉系幹細胞を臍帯血から効率的に入手することである。

課題を解決するための手段

[0007] 上記課題を解決するために、本発明に係る方法は、間葉系幹細胞を未分化増殖させる方法であって、血球細胞を特異的に認識する抗体を用いて、臍帯血における間葉系幹細胞を濃縮したサンプルを生成する工程と、ＳＨＨ、ＦＧＦ１またはＦＧＦ２を含んでいる培地において、上記サンプルを培養する工程とを包含している。

[0008] 上記課題を解決するために、本発明に係る方法は、間葉系幹細胞を濃縮する方法であって、血球細胞と特異的に結合する抗体ビーズを用いて、臍帯血における間葉系幹細胞を濃縮する工程を包含している。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、十分な数の間葉系幹細胞を臍帯血から効率的に入手し得る。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]臍帯血から分離した細胞に間葉系幹細胞が含まれていることを確認したＦＡＣＳ解析の結果を示す図である。

[図2]本発明に係る培養方法にしたがって増殖させた細胞の数の経時的変化を示す図である。

[図3]培養１４日目に間葉系幹細胞が選択的に増殖していることを確認したＦ

ＡＣＳ解析の結果を示す図である。

[図4]培養前および培養１４日目における間葉系幹細胞を比較することによって、間葉系幹細胞が選択的に増殖していることを確認したＦＡＣＳ解析の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明に係る方法は、間葉系幹細胞を未分化増殖させる方法であって、血球細胞を特異的に認識する抗体を用いて、臍帯血における間葉系幹細胞を濃縮したサンプルを生成する工程と、ＳＨＨ、ＦＧＦ１またはＦＧＦ２を含んでいる培地において、上記サンプルを培養する工程とを包含している。

[0012] つまり、本発明に係る方法は、臍帯血に含まれている血球細胞（赤血球および白血球）の大部分を除去した後のサンプルを、特定の因子を含んでいる培地を用いて培養する方法である。後述の実施例に示すように、上記特定の因子を用いることによって、間葉系幹細胞は、未分化の状態を維持して選択的に増殖する。よって、本発明に係る方法によれば、間葉系幹細胞をわずかに含んでいる臍帯血から、医療用途に適用可能な程度の数の間葉系幹細胞を入手し得る。

[0013] 本発明に係る方法の各工程の詳細について、以下に説明する。

[0014] 〔臍帯血における間葉系幹細胞の濃縮〕

上述の通り、本発明に係る方法は、臍帯血における間葉系幹細胞を濃縮する工程を包含している。当該工程において、間葉系幹細胞は、血球細胞を特異的に認識する抗体を用いて臍帯血から血球細胞の大部分を除去することによって濃縮される。当該抗体は、磁気ビーズなどの担体に結合している。抗体と結合している担体を、臍帯血（に由来するサンプル）と混合した後に、抗体を介して血球細胞と結合している担体を回収することによって、間葉系幹細胞を濃縮したサンプルが得られる。代替的な方法として、上記抗体はビオチンによって標識され得る。当該方法では、上記抗体を標識しているビオチンに対するストレプトアビジンの相互作用を利用して、血球細胞を選択的に除去し得る。

[0015] ここで、上記抗体の例としては、抗Glycophorin A抗体、抗ＣＤ２抗体、抗ＣＤ３抗体、抗ＣＤ１１ｃ抗体、抗ＣＤ１１ｂ抗体、抗ＣＤ１４抗体、抗ＣＤ１６抗体、抗ＣＤ１９抗体、抗ＣＤ２４抗体、抗ＣＤ５６抗体、抗ＣＤ６１抗体、抗ＣＤ６６ｂ抗体および抗ＣＤ４５抗体などが挙げられる。ここに挙げた抗体は一例であり、赤血球または白血球を特異的に認識する当該分野に公知の種々の抗体が、本発明に係る方法に使用され得る。

[0016] 上述のように抗体および担体を利用して、間葉系幹細胞を濃縮する（血球細胞を選択的に除去する）方法としては、Stem Cell Technologies社が提供しているRoboSep装置と、Negative Selection Progenitor Cell Enrichment kitなどとを組み合わせた方法が挙げられる。当該方法は、臍帯血における間葉系幹細胞の濃縮を、ほぼ人間の手を介さずに自動的に実施し得るため、本発明に係る方法にとって好適である。Stem Cell Technologies社は、上記キットの他に、使用する抗体をユーザが選択して、試薬と組み合わせるキットを提供している。したがって、例として挙げた抗体と当該キットとを組み合わせることによって、RoboSep装置を利用して臍帯血における間葉系幹細胞の濃縮が可能である。

[0017] 臍帯血は、抗体を用いた間葉系幹細胞の濃縮の前に、部分的に分離されていることが好ましい。臍帯血から単核球画分を分離するフィコール溶液を用いた密度勾配遠心分離によって、臍帯血はあらかじめ分離されていることが好ましい。

[0018] 本発明に係る方法において、上述のようにして濃縮されたサンプルに含まれている間葉系幹細胞のおよその数を決定することが好ましい。これによって、濃縮されたサンプルにおける間葉系幹細胞は、何日間の培養によって所望の細胞数まで増殖され得るかについて、あらかじめ決定され得る。濃縮されたサンプルに含まれている間葉系幹細胞のおよその数は、公知のフローサイトメーター、ならびに蛍光標識された抗ＣＤ１０５抗体または抗ＣＤ７３抗体を用いた、ＦＡＣＳ解析によって確認され得る。ＦＡＣＳ解析に使用される抗体は、間葉系幹細胞の表面マーカーに特異的な抗体であればよい。

[0019] 一個体から得られる臍帯血は約１００ｍＬ程度である。日本国内では、有核細胞を十分に含んでいる量（例えば約６０ｍＬ以上）の臍帯血は、臍帯血バンクに保管されるため、他の用途に使用することが困難である。よって、より少ない量の臍帯血から、十分な数の間葉系幹細胞を得ることが好ましい。後述の実施例において証明されている通り、本発明に係る方法によれば、２５ｍＬの臍帯血から得られた間葉系幹細胞は、約２週間において10^7細胞を超えて増殖する。

[0020] 〔間葉系幹細胞の未分化増殖〕

本発明に係る方法は、間葉系幹細胞を濃縮したサンプルを培養する工程を包含している。当該工程において、上記サンプルは、増殖因子としてＳＨＨ、ＦＧＦ１またはＦＧＦ２を含んでいる培地を用いて培養される。当該培地を用いることによって、Ｆｌｔ－３Ｌ、ＩＬ－３およびＩＬ－６のみを添加した培地ではほとんど増殖しなかった（実施例を参照）間葉系幹細胞を、未分化増殖させ得る。

[0021] 上記培地は、間葉系幹細胞の未分化増殖に使用される公知の培地を基本培地として使用している。上記基本培地は、実施例に示すようにStem Cell Technologies社などによって市販されているか、市販品を部分的に改変した培地であるか、または市販品と類似の組成を有している。上記培地は、幹細胞の増殖に使用される公知のサイトカイン（例えば、Ｆｌｔ－３Ｌ、ＳＣＦ、ＩＬ－３およびＩＬ－６）を含み得る。上記培地に対する好適な他の添加物は、間葉系幹細胞の未分化増殖に使用される種々の添加物であるので、当業者に公知である。

[0022] ＳＨＨは、例えば、５～５００ｎｇ／ｍＬ、より好ましくは５０～２００ｎｇ／ｍＬ、最も好ましくは１００ｎｇ／ｍＬの濃度において、間葉系幹細胞を選択的に未分化増殖させるための培地に含まれている。ＦＧＦ１は、０．１～５０ｎｇ／ｍＬ、より好ましくは１～１０ｎｇ／ｍＬ、最も好ましくは５ｎｇ／ｍＬの濃度において、間葉系幹細胞を選択的に未分化増殖させるための培地に含まれている。ＦＧＦ２は、０．１～５０ｎｇ／ｍＬ、より好

ましくは１～１０ｎｇ／ｍＬ、最も好ましくは５ｎｇ／ｍＬの濃度において、間葉系幹細胞を選択的に未分化増殖させるための培地に含まれている。Ｆｌｔ－３Ｌは、例えば、５００～５０００ＩＵ／ｍＬ、より好ましくは１０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、最も好ましくは２０００ＩＵ／ｍＬの濃度において、間葉系幹細胞を選択的に未分化増殖させるための培地に含まれている。ＳＣＦは、例えば、１～４００ｎｇ／ｍＬ、より好ましくは１０～２００ｎｇ／ｍＬ、最も好ましくは１００ｎｇ／ｍＬの濃度において、間葉系幹細胞を選択的に未分化増殖させるための培地に含まれている。ＩＬ－３は、例えば、２００～５０００ＩＵ／ｍＬ、より好ましくは５００～２５００ＩＵ／ｍＬ、最も好ましくは１０００ＩＵ／ｍＬの濃度において、間葉系幹細胞を選択的に未分化増殖させるための培地に含まれている。ＩＬ－６は、例えば、２００～５０００ＩＵ／ｍＬ、より好ましくは５００～２５００ＩＵ／ｍＬ、最も好ましくは１０００ＩＵ／ｍＬの濃度において、間葉系幹細胞を選択的に未分化増殖させるための培地に含まれている。

[0023] 濃縮した上記サンプルは、上記培地を用いて、任意の期間（所望の数の間葉系幹細胞が得られるまで）培養される。上記期間は、得られたサンプルに含まれている間葉系幹細胞の数に応じて変更される。後述の実施例の場合を例にとれば、上記期間は、例えば、２５ｍＬの臍帯血から濃縮したサンプルが回収された場合に約１４日間である。約１４日間の培養によって上記場合のサンプルにおける間葉系幹細胞は、例えば約1×10^{7}細胞を超えて増殖可能である。

[0024] 以上の記載から明らかなように、本発明に係るＳＨＨ、ＦＧＦ１またはＦＧＦ２は、臍帯血から濃縮された間葉系幹細胞を選択的に未分化増殖させるための培地に加えられる添加剤（例えば間葉系幹細胞の増殖促進剤）である。また、本発明は、間葉系幹細胞を未分化増殖させるための培地に加えられる添加剤としてＳＨＨ、ＦＧＦ１またはＦＧＦ２を使用することに関する。

[0025] また、これまでに説明した通り、本発明に係る方法によれば、再生医療などに使用するために十分な数の間葉系幹細胞を臍帯血から得ることが可能で

ある。例えば、これまで研究用途に用いられてきた少量（例えば６０ｍＬ未満）の臍帯血を利用して、有用な間葉系幹細胞を入手し得る。

[0026] 本発明に係る方法は、ヒトから採取した臍帯血に含まれている幹細胞を分離し、増殖させる方法である。本発明にしたがって得られた間葉系幹細胞は、例えば再生医療に使用される材料である。また、本発明にしたがって得られた間葉系幹細胞は、再生医療において直接的に使用される細胞（医薬品）である。

[0027] 〔まとめ〕

本発明に係る方法は、間葉系幹細胞を未分化増殖させる方法であって、血球細胞を特異的に認識する抗体を用いて、臍帯血における間葉系幹細胞を濃縮したサンプルを生成する工程と、ＳＨＨ、ＦＧＦ１またはＦＧＦ２を含んでいる培地において、上記サンプルを培養する工程とを包含している。

[0028] また、本発明に係る方法において、上記培地はＳＣＦをさらに含んでいることが好ましい。

[0029] また、本発明に係る方法において、上記培地は、Ｆｌｔ－３Ｌ、ＩＬ－３およびＩＬ－６をさらに含んでいることが好ましい。

[0030] 本発明に係る方法は、間葉系幹細胞を濃縮する方法であって、血球細胞と特異的に結合する抗体ビーズを用いて、臍帯血における間葉系幹細胞を濃縮する工程を包含している。

[0031] また、本発明に係る方法において、上記抗体ビーズは、ビーズおよび当該ビーズに結合している抗体を含んでおり、当該抗体は、抗Glycophorin A抗体、抗ＣＤ２抗体、抗ＣＤ３抗体、抗ＣＤ１１ｃ抗体、抗ＣＤ１１ｂ抗体、抗ＣＤ１４抗体、抗ＣＤ１６抗体、抗ＣＤ１９抗体、抗ＣＤ２４抗体、抗ＣＤ５６抗体、抗ＣＤ６１抗体および抗ＣＤ６６ｂ抗体からなる群から選択されることが好ましい。

実施例

[0032] 〔１．臍帯血における間葉系幹細胞の濃縮〕

フィコール溶液（ＧＥヘルスケア社）を用いた密度勾配遠心分離（３０分

間、９００ｇ、２５℃）によって、２５ｍＬの臍帯血から単核球画分を分離した。RoboSep装置（Stem Cell Technologies社）を用いて、得られた単核球画分から血球細胞をさらに取り除いて、残りの細胞集団を濃縮した。この単核球画分からの血球細胞の除去において、NegativeSelection Progenitor Cell Enrichment kit（Stem Cell Technologies社）を試薬として用いた。当該試薬には、磁気ビーズと結合している抗Glycophorin A抗体、抗ＣＤ２抗体、抗ＣＤ３抗体、抗ＣＤ１１ｃ抗体、抗ＣＤ１１ｂ抗体、抗ＣＤ１４抗体、抗ＣＤ１６抗体、抗ＣＤ１９抗体、抗ＣＤ２４抗体、抗ＣＤ５６抗体、抗ＣＤ６１抗体および抗ＣＤ６６ｂ抗体が含まれている。したがって、当該試薬は、これらの抗体によって認識される抗原を表面発現している細胞を除去可能である。当該分離における手順および必要な他の試薬のすべてについて、上記試薬に対応しているRoboSep装置の動作プログラム、および付属のユーザマニュアルにしたがった。

[0033] 以上の操作にしたがって得られたサンプルの一部を、蛍光標識された抗ＣＤ１０５抗体（Biolegend社、間葉系幹細胞の細胞表面マーカーに対する抗体）と混合した。それから、この混合物に含まれている間葉系幹細胞の程度を、BD FACSCalibur（登録商標）フローサイトメーター（日本ＢＤ社）によって調べた。このＦＡＣＳ解析の結果を図１に示す。図１は、ＣＤ１０５陽性細胞についてＦＡＣＳ解析した、シングルリニアリージョンのヒストグラムを示す図である。図１に示すように、上記サンプルには、表面にＣＤ１０５を発現している間葉系幹細胞が含まれていることが確認できた。

[0034] 〔２．間葉系幹細胞の未分化増殖〕

（２－１．臍帯血由来の細胞の増殖に対するＳＨＨの作用）

１．において入手した細胞を次のように増殖させた。培養の０～１４日にわたって、Ｆｌｔ－３Ｌ（Cellgenix社）、ＳＣＦ（Cellgenix社）、ＩＬ－３（Miltenyi Biotec社）およびＩＬ－６（Miltenyi Biotec社）およびＳＨＨ（Miltenyi Biotec社）を補ったMesenCult-XF Medium（Stem Cell Technologies社）を用いて、５％CO_2の存在下の３７℃において細胞を増殖させた

。上記培地における各サイトカインの最終濃度はそれぞれ、２０００ＩＵ／ｍＬ（ＦＩｔ－３Ｌ）、１００ｎｇ／ｍＬ（ＳＣＦ）、１０００ＩＵ／ｍＬ（ＩＬ－３）、１０００ＩＵ／ｍＬ（ＩＬ－６）および１００ｎｇ／ｍＬ（ＳＨＨ）であった。培地に添加した因子の有効性を確認するために、上記培養と平行して、ＦＩｔ－３Ｌ、ＩＬ－３およびＩＬ－６のみを補ったMesenCult-XF Medium、およびMesenCult-XF Mediumのみを用いて、１．において入手した細胞をそれぞれ培養した。培養の０、３、６、８、１１および１４日目のそれぞれにおける総細胞数を、トリパンブルー染色によって決定した。決定した細胞数の経時的変化を図２に示す。

[0035] 図２に示すように、公知のサイトカインに加えてＳＨＨを補った培地を用いた場合（ＳＨＨ、ＦＩｔ－３Ｌ、ＳＣＦ、ＩＬ－３、ＩＬ－６添加）、０日目において０．９×10^6細胞であった細胞は、培養の１４日後に１．９４×10^7細胞まで増殖していることが確認できた。一方、ＳＨＨを加えなかった場合（ＦＩｔ－３Ｌ、ＩＬ－３、ＩＬ－６添加、および無添加）、細胞の増殖はほとんど認められなかった。

[0036] （２－２．選択的に増殖した細胞種の確認）

２－１．の培養によって増殖した細胞が間葉系幹細胞であることを確認するために、培養の１４日目において増殖している細胞の種類をＦＡＣＳ解析によって確認した。１４日目の培養物の一部は、蛍光標識された抗ＣＤ１０５抗体（Biolegend社）および蛍光標識された抗ＣＤ７３抗体（Biolegend社）を用いて調べた。すべてのＦＡＣＳ解析を、BD FACSCalibur（登録商標）フローサイトメーター（日本ＢＤ社）を用いて実施した。これらのＦＡＣＳ解析の結果を図３（抗ＣＤ１０５抗体）および図４（抗ＣＤ７３抗体）に示す。図３は、培養１４日目におけるＣＤ１０５陽性細胞についてＦＡＣＳ解析した、シングルリニアリージョンのヒストグラムを示す図である。図４は、培養前および培養１４日目におけるＣＤ７３陽性細胞についてＦＡＣＳ解析した、シングルリニアリージョンのヒストグラムを示す図である。

[0037] 図３に示すように、図１の結果と比較して、ＣＤ１０５陽性細胞（すなわ

ち間葉系幹細胞）が明らかに増殖していた。また、図４に示すように、培養前と比較して、２週間の培養によってＣＤ７３陽性細胞（すなわち間葉系幹細胞）が明らかに増殖していた。以上の結果から、２－１．において、間葉系幹細胞が未分化のまま増殖して、例えば再生医療の用途において十分な数の間葉系幹細胞を得ることができた。よって、特にＳＣＦと、本発明に係るＳＨＨとの組合せは、間葉系幹細胞の未分化増殖にとって重要な働きを示すことが明らかになった。

[0038] （２－３．臍帯血由来の細胞の増殖に対するＦＧＦ１またはＦＧＦ２の作用）

１．において入手した細胞を９６穴プレートにおいて次のように培養した。後述の表１の組合せのサイトカイン（５ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ１（Miltenyi Biotech社）、５ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ２（Miltenyi Biotech社）、１００ｎｇ／ｍＬのＳＣＦ（Cellgenix社））を補ったMesenCult-XF Mediumを用いて、５％CO_2の存在下の３７℃において細胞を増殖させた。７日間の培養の後に、顕微鏡によって細胞数を確認して、サイトカインの各組合せの、間葉系幹細胞の増殖に対する作用を評価した。

[0039] [表1]

	なし	SCF
なし	±	＋
FGF1	＋	＋＋＋
FGF2	＋	＋＋＋

※サイトカインを添加しない場合と比べて、±：変化なし、＋：やや増殖を促進した、＋＋：増殖を促進した、＋＋＋：顕著に増殖を促進した

[0040] 表１に示す通り、単独のＦＧＦ１またはＦＧＦ２の添加によって、間葉系幹細胞の増殖はやや促進された。ＦＧＦ１またはＦＧＦ２のＳＣＦとの組合せによって、間葉系幹細胞の増殖は顕著に促進された。以上の結果から、ＦＧＦ１およびＦＧＦ２は、間葉系幹細胞の増殖を促進する作用を有している

ことが明らかになった。

[0041] 本発明は、上述した各実施形態および実施例に限定されず、請求項に示した範囲において種々の変更が可能であり、実施形態および実施例に開示されている種々の技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態は、本発明の技術的範囲に含まれる。

産業上の利用可能性

[0042] 本発明は、特に間葉系幹細胞を用いた再生医療に利用することができる。

請求の範囲

[請求項1] 間葉系幹細胞を未分化増殖させる方法であって、

血球細胞を特異的に認識する抗体を用いて、臍帯血における間葉系幹細胞を濃縮したサンプルを生成する工程と、

ＳＨＨ、ＦＧＦ１またはＦＧＦ２を含んでいる培地において、上記サンプルを培養する工程とを包含している、方法。

[請求項2] 上記培地はＳＣＦをさらに含んでいる、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 上記培地は、ＦＩｔ－３Ｌ、ＩＬ－３およびＩＬ－６をさらに含んでいる、請求項２に記載の方法。

[請求項4] 間葉系幹細胞を濃縮する方法であって、

血球細胞と特異的に結合する抗体ビーズを用いて、臍帯血における間葉系幹細胞を濃縮する工程を包含している、方法。

[請求項5] 上記抗体ビーズは、ビーズおよび当該ビーズに結合している抗体を含んでおり、当該抗体は、抗Glycophorin A抗体、抗ＣＤ２抗体、抗ＣＤ３抗体、抗ＣＤ１１ｃ抗体、抗ＣＤ１１ｂ抗体、抗ＣＤ１４抗体、抗ＣＤ１６抗体、抗ＣＤ１９抗体、抗ＣＤ２４抗体、抗ＣＤ５６抗体、抗ＣＤ６１抗体および抗ＣＤ６６ｂ抗体からなる群から選択される、請求項４に記載の方法。