

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4620052号
(P4620052)

(45) 発行日 平成23年1月26日 (2011.1.26)

(24) 登録日 平成22年11月5日 (2010.11.5)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q 1/04
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53

D

請求項の数 23 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2006-525584 (P2006-525584)	(73) 特許権者	506084966
(86) (22) 出願日	平成16年9月10日 (2004.9.10)		STEMCELL TECHNOLOGIES INCORPORATED
(65) 公表番号	特表2007-504808 (P2007-504808A)		カナダ国 ブリティッシュ コロンビア
(43) 公表日	平成19年3月8日 (2007.3.8)		バンクーバー ウェスト セブンス アベ
(86) 国際出願番号	PCT/CA2004/001600		ニュー 570 スイート 400
(87) 国際公開番号	W02005/026382	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成17年3月24日 (2005.3.24)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成18年8月3日 (2006.8.3)	(74) 代理人	100128048
(31) 優先権主張番号	60/502, 256		弁理士 新見 浩一
(32) 優先日	平成15年9月12日 (2003.9.12)	(72) 発明者	レイノルズ プレント エー.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		オーストラリア国 クイーンズランド ブ
(31) 優先権主張番号	60/509, 257		リスベン ザ ユニバーシティ オブ ク
(32) 優先日	平成15年10月8日 (2003.10.8)		イーンズランド ザ クイーンズランド
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ブレイン インスティテュート内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経コロニー形成アッセイ法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の段階を含む、神経幹細胞または神経前駆細胞を同定するための方法：

(a) 神経幹細胞および神経前駆細胞の増殖を促進する因子を含む培地において神経細胞を保持する段階、および、培養された神経細胞を、神経細胞の増殖を支持する半固形培地中に懸濁する段階；

(b) 半固形培地においてコロニーの産生を可能にする密度で細胞をプレーティングする段階；

(c) コロニー間で大きさの相違が識別できるまで、プレーティングした細胞を培養する段階；および

(d) より大きいコロニーは神経幹細胞によって産生された可能性が高く、かつ、より小さいコロニーは神経前駆細胞によって産生された可能性が高いことから、コロニーの大きさを評価する段階。

【請求項2】

(e) 周辺が波状のより大きなコロニーにより、コロニーが神経幹細胞によって産生された可能性の高いことが示され、かつ、周辺が滑らかなより小さいコロニーにより、コロニーが神経前駆細胞によって産生された可能性の高いことが示される、コロニーの形態を決定する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

(e) 未分化細胞に関連する抗原の発現が高レベルであること、または未分化細胞に関連

する抗原を発現するコロニー内部の細胞が多数であることにより、コロニーが神経幹細胞によって産生された可能性の高いことが示され、かつ、分化細胞の抗原の発現が高レベルであること、または分化細胞の抗原を発現するコロニー内部の細胞が多数であることにより、コロニーが神経前駆細胞によって産生された可能性の高いことが示される、コロニーの抗原発現を決定する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項4】

神経細胞が哺乳動物のものである、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項5】

神経細胞がヒト、ラット、またはマウスに由来する、請求項4記載の方法。

【請求項6】

神経細胞が初代CNS組織または培養したニューロスフェアに由来する、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】

高い増殖能を有する神経幹細胞を、低い増殖能を有するNSCと識別する、請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

半固形培地がコラーゲンに基づく、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項9】

半固形培地がメチルセルロースに基づく、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】

因子がEGFである、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項11】

段階(a)において培地が無血清である、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

段階(b)において、細胞を35 mm培養ディッシュ当たり約1000～25,000細胞の密度でプレATINGする、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

段階(c)において細胞を約10～約28日間培養する、請求項1～12のいずれか一項記載の方法。

【請求項14】

段階(d)において、コロニーの大きさが2.0 mmを超えることにより神経幹細胞であることが示される、請求項1および2～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項15】

段階(d)において、コロニーの大きさが2.0 mmであるか、それより小さいことにより神経前駆細胞であることが示される、請求項1および2～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

インサイチュー免疫染色プロトコルを用いてコロニーの抗原発現を判定する、請求項3～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項17】

摘出した、または切除した神経幹細胞コロニーまたは神経前駆細胞コロニーの免疫染色プロトコルを用いてコロニーの抗原発現を判定する、請求項3～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項18】

免疫染色において未分化細胞に対する抗体が用いられる、請求項16または17に記載の方法。

【請求項19】

抗原がネスチン(nestin)、sox1、sox2、musashi、またはLexA/SSEA-124である、請求項3～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項20】

抗原が神経細胞系統に特異的である、請求項3～18のいずれか一項記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

抗原が チューブリン、グリア線維酸性タンパク質 (GFAP)、O4、またはミエリン塩基性タンパク質 (MBP) である、請求項20記載の方法。

【請求項 2 2】

潜在的治療組成物を試験するための、請求項1～21のいずれか一項記載の方法の使用。

【請求項 2 3】

環境における薬剤の影響を評価するための、請求項1～21のいずれか一項記載の方法の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

発明の分野

本発明は、神経幹細胞および神経前駆細胞を単離、同定、および識別するための神経口二形成細胞 (NCFC) アッセイ法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

哺乳動物の中樞神経系 (CNS) の発生は胎児発生の初期に始まり、生後期間まで続く。成体CNSには、主に3種類の細胞：ニューロン、アストロサイト (astrocyte)、およびオリゴデンドロサイト (oligodendrocyte) が存在する。胚における神経発生の第1段階は細胞発生であり、これは幹細胞および前駆細胞が増殖することにより成熟CNS細胞に分化する前駆細胞を生じる、正確な時間的および空間的順列の期間である。第2段階は、神経芽細胞 (ニューロンを生じる細胞) およびグリア芽細胞 (glialblast) (アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトを生じる細胞) が分化してそれらの最終位置に移行する、細胞の分化および移行の期間である。発生の第3段階は、細胞が、特定の神経伝達物質を発現するニューロンのような、特定の成熟表現型特性を獲得する際に起こる。CNS発生の最終段階は選択的細胞死の期間であり、特定の細胞、線維、および接合が死滅および変性することにより、神経系の回路設計を「微調整」する。

20

【0003】

身体の他の多くの組織とは異なり、伝統的に哺乳動物のCNSは、損傷または疾患にตอบสนองして新たな細胞を生成する能力をほとんど示していない。しかし、成体脳における小型の増殖領域 (Alvarez-Buylla et. al., 2001) が再試験されたことに加えて (Altman, 1962; Altman and Das, 1965)、比較的最近、インビトロで幹細胞特性を示す成体CNS内の細胞が発見されたことから (Reynolds and Weiss, 1992)、成体哺乳動物のCNSが新たな細胞を生成する能力を保持すること、および、神経幹細胞が増殖性前駆体の供給源であることが確信させられることとなっている。

30

【0004】

CNSにおいて、神経幹細胞 (NSC) は、主に増殖能および分化能に基づいて前駆細胞と区別され得る。PottenおよびLoefflerの定義によれば (Potten and Loeffler, 1990)、NSCは、自己維持 (self-maintenance) を示し、多数の子孫を産生し、かつ神経組織における3種類の主要な細胞種すべての成熟細胞を産生する能力により、前駆細胞と区別され得る。

40

【0005】

幹細胞の重要な同定特性は、自己複製を示す能力、またはそれ自体をさらに生成する能力である。最も単純な定義において、幹細胞とは自己維持能を有する細胞である。しかし、多数の細胞がこの基準を満たすと見なされ得るために、この定義が問題になる場合がある。幹細胞のより厳密かつ実地的な定義が、PottenおよびLoeffler (1990) によって提供されており、彼らは幹細胞を、「a) 増殖、b) 自己維持、c) 多数の分化した機能的子孫の産生、d) 損傷後の組織の再生、およびe) これらの選択肢の使用における柔軟性、の各能力を有する未分化細胞」と定義している。

50

【0006】

培養系は、生物学的過程および系の細胞特性および分子特性を研究し、かつ理解する上で有益な手段であることが証明されている。神経幹細胞に関して、神経幹細胞の単離、増殖、および拡張、ならびに、その子孫がCNSの主要な3種類の細胞種へと引き続き分化することを可能にする組織培養法が開発された(Reynolds and Weiss, 1996)。ReynoldsおよびWeissは、機能的基準に基づいて神経幹細胞を同定した。これらの基準には、1) 多数の子孫を増殖および生成する能力、2) 長期培養において長期間にわたり自己複製する能力、および3) 神経幹細胞が得られる組織の主要な細胞種を産生し続ける能力が含まれる。ニューロスフェアアッセイ法(NA)と称されるアッセイ法は、神経幹細胞の存在およびその治療用途の可能性に関する豊富なデータを提供している。

10

【0007】

簡潔に説明すると、NAは、胚～成体のCNS組織の顕微解剖、ならびに、その後の細胞間接触の破壊および単一細胞懸濁液の生成を含む。少なくとも1種の増殖誘導増殖因子(すなわち、上皮増殖因子[EGF]、塩基性線維芽細胞増殖因子[bFGF]など)の存在下において、細胞を既知の無血清培地で組織培養容器に(典型的には低密度で)プレーティングする。これらの条件下で2～5日以内に多能性NSCが分裂し始め、ニューロスフェアと称される、クローンに由来する未分化細胞塊を生じる(図1)。増殖誘導因子の連続的存在下において、ニューロスフェア内の細胞は分裂し続け、結果としてニューロスフェアを構成する細胞の数が増大し、ひいてはニューロスフェアの大きさが増大する。ニューロスフェアを回収し、単一細胞懸濁液となるよう破壊し、細胞を再プレーティングして培養し、新たなニューロスフェアを生成することができる。この方法でNSCを継代することで、結果的に生存するCNS前駆細胞が等差的に増加する(図3)。

20

【0008】

NAは哺乳動物NSCを単離するための標準的なアッセイ法となり、かつ、神経系における幹細胞の細胞生物学および分子生物学を理解するために用いられる多くのアッセイ法の中核をなしている。例えば、NAは、幹細胞機能に及ぼす効果に関して外因性シグナル因子をスクリーニングするため(Shimazaki, et. al., 2001)、および神経幹細胞のインビボ生物学の理解を支援するため(Morshead, et. al., 1994; Alvarez-Buylla et. al., 2001)に用いられている。このアッセイ法は本分野の進歩において有益であることが証明されているが、重大な制約を受ける。

30

【0009】

ニューロスフェアは集団として少なくとも10回継代して、哺乳動物CNSにおいて見出される3種類の主要な細胞種:ニューロン、アストロサイト、およびオリゴデンドロサイトに引き続き分化し得る、多数の子孫を結果として生成することができ、それによって幹細胞の主要な要件を満たす(Reynolds and Weiss, 1996)。さらに、クローンに由来する個々のスフェア(sphere)を単一細胞へと解離することができ、分裂因子の存在下において新たなスフェアが生成され(自己維持)、かつその子孫はニューロン、アストロサイト、およびオリゴデンドロサイトへと分化し得る。現在、NAにおいて生成されたスフェアはすべてNSCに由来すると仮定されている。本発明者らは、これが事実ではないこと、およびNAにおいて生成されるニューロスフェアの増殖能が変動することを示す、予想外の結果を有する。したがって、NAはNSCを同定するものの、このアッセイ法で生成されたニューロスフェアのすべてがNSCに由来するわけではない。ニューロスフェアの一部(おそらくは大部分)は、より限定された増殖能、および、おそらく異なる分化能をも有する神経前駆細胞である可能性がある。NAにより決定されるNSCの数は過剰評価され、かつ、この結果を基にした引き続き解釈は不正確である可能性がある。例えば、図2Aおよび図2Bは、NAにおいて生成されたニューロスフェアの集団を表すものである。仮説上の例として、図2Aと図2Bとの相違点を、図2BにおいてGF-Xと称されるポリペプチド増殖因子を添加したことであるとする。この場合、GF-Xを添加したことで、ニューロスフェアの数が約34%減少する結果になったと考えられる。これは、この特定の実験における、NSCの増殖または生存に及ぼすGF-Xの負の調節効果として解釈される。もしNAにおいて生成されたすべてのニューロ

40

50

スフェアが幹細胞に由来したとすれば、この解釈は正しいと考えられるが、もしそうでないのならば、この結論は妥当ではない。そのような実験の例は、米国特許第5,851,832号の実施例43に見出すことができる。これらの場合のいずれにおいても、ニューロスフェアの数の変化はNSCに及ぼす効果を反映すると仮定されるが、NAにおいて生成するすべてのニューロスフェアが幹細胞に由来することが示されない限り、この仮定には根拠がない。したがって、NSCを研究するために現在用いられている方法には、重大な欠陥が存在する。

【0010】

したがって、インビトロでNSCを研究するための先行技術の方法に付随する上記の欠陥を考慮すると、NSCと神経前駆細胞とを区別し得るインビトロアッセイ法の必要性が当技術分野において存在する。

10

【0011】

増殖能に基づいて、異なるNSCを区別し得るアッセイ法の必要性もまた存在する。

【発明の開示】

【0012】

発明の概要

本発明は、神経幹細胞種および前駆細胞種を同定、識別、単離、および定量化するために使用し得るアッセイ法を提供する。

【0013】

本発明は、三次元半固形培地中で神経幹細胞および神経前駆細胞をインビトロ培養し、かつ増殖させる方法に関する（例えば、図12に示す方法を参照されたい）。1つの局面において、本発明は、神経幹細胞を同定する方法、および前駆細胞から神経幹細胞を区別し得る方法に関する。別の局面において、本発明は、様々な程度の増殖能を有する神経幹細胞を同定する方法、および、高い増殖能を有する神経幹細胞とより低いまたは小さい増殖能を有する神経幹細胞とを区別し得る方法に関する。別の局面において、本発明は、コロニーの大きさ、形態、および抗原発現に基づいて、NSC種と神経前駆細胞種を識別する方法に関する。

20

【0014】

したがって、本発明は、以下の段階を含む、神経幹細胞または神経前駆細胞を同定するための方法を提供する：

30

(a) 神経細胞の増殖を支持する半固形培地中に神経細胞を懸濁する段階；

(b) 半固形培地においてコロニーの産生を可能にする密度で細胞をプレーティングする段階；

(c) コロニー間で大きさの相違が識別できるまで、プレーティングした細胞を培養する段階；および

(d) より大きいコロニーは神経幹細胞によって産生された可能性が高く、かつ、より小さいコロニーは神経前駆細胞によって産生された可能性が高いことから、コロニーの大きさを評価する段階。

【0015】

別の態様として、NSC種を神経前駆細胞種から同定および識別する基準は、最初のコロニー内の細胞によって産生されるコロニーの形態に基づき得る。

40

【0016】

したがって、本発明はまた、以下の段階を含む、神経幹細胞または神経前駆細胞を同定するための方法を提供する：

(a) 神経細胞の増殖を支持する半固形培地中に神経細胞を懸濁する段階；

(b) 半固形培地においてコロニーの産生を可能にする密度で細胞をプレーティングする段階；

(c) コロニーが形成されるまで、プレーティングした細胞を培養する段階；および

(d) 波状コロニーの存在により、コロニーが神経幹細胞によって産生された可能性の高いことが示され、かつ、周辺が滑らかなコロニーの存在により、コロニーが神経前駆細胞

50

によって産生された可能性の高いことが示される、コロニーの形態を決定する段階。

【0017】

本発明の別の態様において、神経幹細胞または神経前駆細胞の存在は、コロニー上の未分化細胞または分化細胞に関連するマーカーの存在を検出することで決定され得る。したがって、本発明はまた、以下の段階を含む、神経幹細胞または神経前駆細胞を同定するための方法を提供する：

- (a) 神経細胞の増殖を支持する半固形培地中に神経細胞を懸濁する段階；
- (b) 半固形培地においてコロニーの産生を可能にする密度で細胞をプレーティングする段階；

(c) コロニーが形成されるまで、プレーティングした細胞を培養する段階；および

(d) 未分化細胞に関連するマーカーの存在により、コロニーが神経幹細胞によって産生された可能性の高いことが示され、かつ、分化細胞に関連するマーカーの存在により、コロニーが神経前駆細胞によって産生された可能性の高いことが示される、コロニーの抗原発現を決定する段階。

10

【0018】

未分化細胞および神経系統に関連する抗原発現の例には、ネスチン(nestin)、sox2、Musashi、ABCG2、LeX、PNA、CD24、および他のマーカーが含まれる。CNSの分化細胞に関連する抗原発現の例には、チューブリン、GFAP、O4、MAP2、およびMBP、および他のマーカーが含まれる。

【0019】

本発明は、神経幹細胞または神経前駆細胞およびそれらの子孫を、半固形3-D基質中で単離、増殖、および拡張するためのインビトロ法を提供する。本発明はまた、高い増殖能(HPP)を有するNSCと低い増殖能を有するNSCとを識別することを可能にする方法、および幹細胞と神経前駆細胞種とを識別する方法を提供する。

20

【0020】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかし、詳細な説明および特定の実施例は、本発明の好ましい態様を示すものの、説明のみの目的で提供されることが理解されるべきである。なぜなら、この詳細な説明から、本発明の精神および範囲内での種々の変更および修正が当業者に明らかになるからである。

【0021】

発明の詳細な説明

本発明は、胚性幹細胞(ES)、および胚性、出生後、または成体CNSに由来するNSCおよび前駆細胞の増殖を3-D半固形培地中で誘導するための方法を提供する。本発明により、増殖能に基づいて、神経幹細胞(NSC)種と前駆細胞種とを識別すること、および異なるNSCを区別することが可能になる。別の局面では、本発明により、産生するコロニーの形態に基づいて、NSC種と前駆細胞種とを識別すること、および異なるNSCと前駆細胞種とを区別することが可能になる。

30

【0022】

CNSの未分化細胞の詳細な定義は、米国特許第5,750,376号において見出すことができる。しかしながら、本明細書では簡潔に、細胞を以下のように定義し得る：

40

【0023】

神経前駆細胞：それ自体は幹細胞ではない未分化細胞。神経前駆細胞は、増殖する能力および複数種類の細胞種に分化する能力を有する。したがって、神経前駆細胞は、単分化能、二分化能、または多分化能を有し得る。神経前駆細胞の際立った特徴は、幹細胞とは異なり、限られた増殖能を有し、自己維持を示さないことである。

【0024】

神経幹細胞：本明細書で使用するこの用語は、無制限に分裂することができ、かつ、最終的にニューロン、アストロサイト、およびオリゴデンドロサイトに分化する娘細胞を産生し得る、オリゴポtent(oligopotent)または多能性の細胞を指す。神経幹細胞は自己維持することができ、かつ多数の子孫を産生できる。神経幹細胞の非幹細胞子孫は、神

50

経前駆細胞と称される。

【0025】

前駆細胞：本明細書で使用するこの用語は、神経幹細胞の子孫を指し、したがって、これには神経前駆細胞および神経幹細胞の双方が含まれる。

【0026】

CNSにおいて未分化細胞を同定する際に、これらの用語を不適切に使用すると、NSCおよび神経前駆細胞を研究する上で混乱および誤解が生じてしまう。

【0027】

1つの態様において、NSCはコロニーの大きさに基づいて神経前駆細胞と区別され得る。したがって本発明は、以下の段階を含む、神経幹細胞を同定するための方法を提供する：

- (a) 神経幹細胞の増殖を支持する半固形培地中に神経細胞を懸濁する段階；
- (b) 半固形培地においてコロニーの産生を可能にする密度で細胞をプレーティングする段階；
- (c) コロニー間で大きさの相違が識別できるまで、プレーティングした細胞を培養する段階；および
- (d) より大きいコロニーは神経幹細胞によって産生された可能性が高いことから、コロニーの大きさを評価する段階。

【0028】

本発明はまた、以下の段階を含む、神経前駆細胞を同定する方法を提供する：

- (a) 神経前駆細胞の増殖を支持する半固形培地中に神経細胞を懸濁する段階；
- (b) 半固形培地においてコロニーの産生を可能にする密度で細胞をプレーティングする段階；
- (c) コロニー間で大きさの相違が識別できるまで、プレーティングした細胞を培養する段階；および
- (d) より小さいコロニーは神経前駆細胞によって産生された可能性が高いことから、コロニーの大きさを評価する段階。

【0029】

神経細胞は任意の適切な供給源に由来し得る。好ましい態様において、神経細胞は、初代CNS組織または培養したニューロスフェアに由来する。神経細胞は、任意の動物種、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウス、ラット、またはヒトなど霊長動物または齧歯動物に由来し得る。神経細胞は、線条体、中隔、皮質、腹側中脳、中隔、中脳、小脳、または脊髄を含むがこれらに限定されない、神経軸索の任意の領域の初代胚性、出生後、または成体CNS組織から得ることができる。

【0030】

例として、神経細胞は以下の方法で生成することができる。標準的な顕微解剖法により、マウス胚（例えば14日胚）から線条体または皮質を切除する。2%グルコースを含むリン酸緩衝食塩水中に組織を回収し、次いで熱研磨したガラスピペットを使用して単一細胞懸濁液になるよう機械的に解離し、1度洗浄し、40 μ mナイロンセルストレーナー（Falcon）を通してろ過し、かつ、好ましくはEGFを補充した（例えば、10~50 ng/ml、好ましくは20 ng/ml EGF）適切な培地に約 8.0×10^4 細胞/mL~ 7.0×10^5 細胞/mL、好ましくは約 2.0×10^5 細胞/mLの濃度となるように希釈する。神経幹細胞の適切な培地の例には、NeuroCult（商標）培地（NeuroCult（商標） Basal Medium および NeuroCult（商標） Proliferation Supplements；StemCell Technologies Inc.）、ならびにグルコース、HEPES、および重炭酸ナトリウム；およびインスリン、アボトランスフェリン、プロゲステロン、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、下垂体抽出物（O'Connor et al., 1996）などの成分からなる増殖補充物を添加した基本培地（例えば、MEM、DMEM/F12、イスコフ（Iscove）、マッコイ（McKoy）、RPMI）を含む、任意の培地が含まれる。好ましい態様において、培地は無血清である。

【0031】

または、培養したニューロスフェアに由来する細胞をアッセイに使用することも可能で

10

20

30

40

50

ある。標準的な顕微解剖法を用いて、マウス胚から線条体または皮質を切除する。2%グルコースを含むリン酸緩衝食塩水中に組織を回収し、次いで熱研磨加工したガラスピペットを使用して単一細胞懸濁液になるよう機械的に解離し、かつ、約20 ng/mlのEGFを添加した完全NeuroCult (商標) 培地 (NeuroCult (商標) Basal MediumおよびNeuroCult (商標) Proliferation Supplements ; StemCell Technologies Inc.) などの適切な培地にプレーティングする。細胞を7日間培養し、NCFCアッセイにおいて使用するためのニューロスフェアを生成させる。培養物から7日目ニューロスフェアを回収し、単一細胞懸濁液となるように機械的に解離し、40 μmナイロンセルストレーナー (Falcon) を通してろ過し、かつ、好ましくは増殖因子 (例えばEGF) を含む完全NeuroCult (商標) 培地などの適切な培地に好ましくは約 2.0×10^5 細胞/mLの濃度となるように希釈する。

10

【0032】

次いで、神経細胞を半固形培地に懸濁する。細胞の増殖を支持し得る任意の半固形培地を使用することができる。好ましくは、半固形培地はコラーゲンに基づくか、またはメチルセルロースに基づく (IMDM、DMEM/F12、マッコイ、イスコフ)。半固形培地は、コラーゲンまたはメチルセルロースを添加した、神経細胞を培養するために用いられる同様の適切な培地 (例えば、サイトカインを含まないNeurocult (商標) 無血清培地 ; Neurocult (商標) Proliferation Supplements ; およびEGF) を含み得る。好ましい態様において、培地は無血清である。半固形培地中の細胞を、データを統計解析するために十分なコロニー数が得られる濃度でプレーティングする (例えば、35 mm培養ディッシュ当たり1000~25,000細胞、好ましくは2500~7500細胞)。形成されるコロニーは、神経幹細胞または前駆細胞のいずれかの単一細胞から生じる。コロニーの大きさの間で大きさおよび相違が識別できるまで (例えば、10~30日間) コロニーを培養し、コロニーを計数し、スコアリングディッシュ上のグリッドを用いてコロニーの大きさを評価する。単一の神経幹細胞から生成されたコロニーは時間と共に大きさが増大し続ける一方、神経前駆細胞から生成されたコロニーは限られた増殖能を有し、そのため時間と共に大きさが増大し続けることはない。コロニーの大きさにより、高増殖能NSC (HPP-NSC)、低増殖能NSC (LPP-NSC)、および神経前駆細胞が区別されることになる。したがって、生成されるコロニーの大きさは、コロニーが神経幹細胞から生成されたのか、または神経前駆細胞から生成されたのか、さらに、NSCが高い増殖能を有するのか、または低い増殖能を有するのかを示し得る。特に、(ディッシュ上の他のコロニーと比較して) より大きいコロニーは高い増殖能を有する神経幹細胞を示し、中程度の大きさのコロニーは低い増殖能を有する神経前駆細胞を示し、かつ、より小さいコロニーは神経前駆細胞を示す。「より大きいコロニー」または「より小さいコロニー」の実際の直径は、どれだけの期間コロニーを培養したかなど、多くの要因に依存することになる。例えば、2500細胞/ディッシュを14~28日間培養した後、直径に基づいてコロニーを4つのカテゴリーのうちの1つに分類する : (1) >2.0 mm、(2) 1~2 mm、(3) 0.5~1 mm、および(4) <0.5 mm。したがって、コロニーを少なくとも14日間培養すると仮定するならば、2.0 mmを超える直径は神経幹細胞から生成されたコロニーを示す。

20

30

【0033】

細胞種はまた、それらが生成する形態に基づいて区別され得る。したがって本発明は、以下の段階を含む、神経幹細胞を同定するための方法を提供する :

40

- (a) 神経幹細胞の増殖を支持する半固形培地中に神経細胞を懸濁する段階 ;
- (b) 半固形培地においてコロニーの産生を可能にする密度で細胞をプレーティングする段階 ;
- (c) コロニーが形成されるまで、プレーティングした細胞を培養する段階 ; および
- (d) 波状コロニーの存在によりコロニーが神経幹細胞によって産生されたことが示される、コロニーの形態を決定する段階。

【0034】

本発明はさらに、以下の段階を含む、神経前駆細胞を同定するための方法を提供する :

- (a) 神経前駆細胞の増殖を支持する半固形培地中に神経細胞を懸濁する段階 ;

50

(b) 半固形培地においてコロニーの産生を可能にする密度で細胞をプレーティングする段階；

(c) コロニーが形成されるまで、プレーティングした細胞を培養する段階；および

(d) 周辺が滑らかなコロニーの存在によりコロニーが神経前駆細胞によって産生されたことが示される、コロニーの形態を決定する段階。

【0035】

形態に基づいてNSCまたは神経前駆細胞を検出する上記のアッセイ法において、神経細胞の供給源ならびにアッセイの培地および条件は、コロニーの大きさに基づくアッセイ法について上述した通りである。

【0036】

実施例6に記載するように、異なる大きさのコロニーは異なる形態を示した。直径>2 mmのコロニーについては、場合によっては、コロニーの表面周辺は突起を含み、かつ突起の下に細胞の密集した層を有して波状形をしていた。直径>2 mmの他のコロニーは、コロニーの色の強度によって反映される種々の程度の細胞密度を有した。場合によっては、大型コロニーの中央には細胞の濃い環が存在した。異なるコロニー形態は、直径1~2 mmおよび0.5~1 mmのコロニーについても観察された。1~2 mmコロニーの特性には、毛様の辺縁部および位相差で濃く現れる高密度の中心核が含まれた。他の1~2 mmコロニーは、より均一な細胞塊を有する。直径0.5~1 mmのコロニーでは、高密度の中心および滑らかな表面を有するものもあれば、星様の外表面を有するものもあった。この大きさの範囲のいくつかのコロニーは、位相差で非常に濃く高密度に見えた。直径<0.5 mmのコロニーについて観察されたコロニー形態は、他の大きさのカテゴリーのコロニーについて観察される形態ほどは異なっていなかった。場合によって、<0.5 mmの小型のコロニーにおいて、高密度の中心核が観察された。

【0037】

別の態様において、神経幹細胞の存在は、コロニーの抗原発現を決定することによって評価され得る。したがって本発明は、以下の段階を含む、神経幹細胞を同定するための方法を提供する：

(a) 神経幹細胞の増殖を支持する半固形培地中に神経細胞を懸濁する段階；

(b) 半固形培地においてコロニーの産生を可能にする密度で細胞をプレーティングする段階；

(c) コロニーが形成されるまで、プレーティングした細胞を培養する段階；および

(d) 未分化細胞に関連するマーカーの存在により、コロニーが神経幹細胞によって産生されることが示される、コロニーの抗原発現を決定する段階。

【0038】

本発明はさらに、以下の段階を含む、神経前駆細胞を同定するための方法を提供する：

(a) 神経前駆細胞の増殖を支持する半固形培地中に神経細胞を懸濁する段階；

(b) 半固形培地においてコロニーの産生を可能にする密度で細胞をプレーティングする段階；

(c) コロニーが形成されるまで、プレーティングした細胞を培養する段階；および

(d) 特定の神経系統に関連する細胞マーカーの存在により、コロニーが神経前駆細胞によって産生されることが示される、コロニーの抗原発現を決定する段階。

【0039】

抗原発現に基づいてNSCまたは神経前駆細胞を検出する上記のアッセイ法において、神経細胞の供給源ならびにアッセイの培地および条件は、コロニーの大きさに基づくアッセイ法に関して上述した通りである。

【0040】

コロニーの抗原発現は、未分化細胞に関するマーカーに対する抗体（例えば、抗ネスチン、sox1、sox2、musashi、LexA、CD24）および分化細胞に関するマーカーに対する抗体（抗チューブリン、GFAP、O4、MAP2、MBP）で免疫細胞化学的に染色することにより決定され得る。当業者は、他の適切なマーカーを容易に決定し得る。1つの態様において、

10

20

30

40

50

コロニーは、神経幹細胞を示すネスチン発現に関して試験される。別の態様において、コロニーは、神経前駆細胞を示す チューブリン発現について試験される。

【0041】

(例えば、大きさ、形態、または抗原発現に基づいて) NSCと神経前駆細胞とを区別する本発明の上記アッセイ法はすべて、呼称を簡略化するために、本明細書ではまとめて神経コロニー形成細胞(NCFC)アッセイ法と称する。

【0042】

異なるNSCを同定し、かつ、NSCを神経前駆細胞と識別するNCFCアッセイ法の能力を考えると、NCFCアッセイ法は、有効性(NSCの特定のサブセットを標的とする薬剤)または毒性(NSC以外の組織/細胞を標的とする薬剤)について潜在的治療組成物をスクリーニングするために有用である。所望の組成物を種々の用量で培養細胞に適用し、NSCまたは前駆細胞の応答をモニターすることができる。例えば、組成物がNSCまたは神経前駆細胞の増殖に及ぼす効果を決定することができ、当技術分野において公知である任意の技法により、酵素、受容体、神経伝達物質、およびアミノ酸などのタンパク質の新たなレベルの発現または増加したレベルの発現を解析することができる。

【0043】

NCFCアッセイ法を用いて、CNSのインビボ操作の影響(遺伝的またはエピジェネティック)、ならびにそれらがNSCおよび神経前駆細胞に及ぼす影響、または非CNS細胞を処置するように設計された組成物の意図しない影響、ならびにそのような組成物がNSCおよび神経前駆細胞に及ぼし得る二次的効果もしくは副作用をも研究することができる。この例では、動物を組成物により処置し、CNSから単離された細胞およびNCFCアッセイ法を用いて、組成物がNSCおよび神経前駆細胞の増殖、遺伝子発現、およびまたはタンパク質発現に及ぼす効果を評価する。

【0044】

NCFCアッセイ法の応用例には、薬剤スクリーニング、CNSの疾患および病態の診断、照射、毒物、刺激、または環境濃縮などにより引き起こされるCNSに及ぼす環境的影響の検出、およびCNS疾患の動物モデルの評価が含まれ得る。

【0045】

NCFCアッセイ法の別の応用は、CNSに及ぼす加齢、食事摂取、および運動の影響のスクリーニングにおいてなされる。

【0046】

NCFCアッセイ法を、神経幹細胞の生物学の研究、ならびにシグナル、増殖因子、ホルモン、シグナル伝達分子、および神経伝達分子の同定において使用することができる。例えば、NCFCアッセイ法の用途には、神経発生の生物学、CNSの疾患の生物学(アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、癌、脳腫瘍転移、腫瘍進行、ハンチントン病)、CNSの損傷の生物学(脊髄、手術からの回復)、神経学的症候群(統合失調症)の生物学、ならびに加齢および記憶喪失の生物学における研究が含まれ得る。

【0047】

NCFCアッセイ法の他の用途には、脳機能の増強、疼痛の知覚、外傷後治療、依存症、記憶喪失、および行動障害の評価が含まれる。

【0048】

神経変性疾患(例えば、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病)のようなCNSの疾患または障害、およびCNS損傷(例えば、脳卒中、頭部外傷、脊髄損傷、脳性麻痺)には、神経細胞の変性、機能不全、または喪失が関与している。神経幹細胞の移植を用いることにより、そのようなCNSの疾患または障害を治療することができると期待される。したがって、本発明のNCFCアッセイ法を用いて、治療に使用する細胞調製物の質を評価することができる。本アッセイ法に従って同定されたNSCを、CNSの疾患または障害の治療に使用することもできる。

【0049】

以下の非限定的な例は、本発明を例証するものである：

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

実施例

実施例1

マウス胚齢14日線条体細胞を用いた神経コロニー形成細胞 (NCFC) アッセイ法

神経細胞は、ネズミ、齧歯動物、およびヒトの線条体、中隔、皮質、腹側中脳、中隔、中脳、小脳、または脊髄を含むがこれらに限定されない神経軸索の任意の領域の初代胚性、出生後、または成体CNS組織から得ることができる。神経細胞は、ニューロスフェアアッセイまたは神経組織培養の分野の当業者に公知である任意の方法を用いて生成されるような培養細胞から得ることもできる。神経細胞は、ES細胞を培養する任意の標準的な手順に従って、任意の段階の胚性幹細胞から得ることもできる。

10

【 0 0 5 1 】

例えば、標準的な顕微解剖法を用いて、胚齢14日CD₁アルビノマウス胚 (Charles River) から線条体および/または皮質を切除する。2%グルコースを含むリン酸緩衝食塩水中に組織を回収し、次いで熱研磨加工したガラスピペットを使用して単一細胞懸濁液となるように機械的に解離し、1度洗浄し、40 μmナイロンセルストレーナー (Falcon) を通してろ過し、完全NeuroCult (商標) 培地 (20 ng/ml EGFを添加したNeuroCult (商標) Basal MediumおよびNeuroCult (商標) Proliferation Supplements ; StemCell Technologies Inc.) において 2.17×10^5 細胞/mLの濃度となるように希釈する。

【 0 0 5 2 】

または、培養したニューロスフェアに由来する細胞をNCFCアッセイのために使用することも可能である。標準的な顕微解剖法により、胚齢14日CD₁アルビノマウス胚 (Charles River) から線条体を切除する。2%グルコースを含むリン酸緩衝食塩水中に組織を回収し、次いで熱研磨加工したガラスピペットを使用して単一細胞懸濁液となるように機械的に解離し、20 ng/ml EGFを添加した完全NeuroCult (商標) 培地 (NeuroCult (商標) Basal MediumおよびNeuroCult (商標) Proliferation Supplements ; StemCell Technologies Inc.) にプレーティングする。細胞を7日間培養し、NCFCアッセイに使用するためのニューロスフェアを生成させる。培養物から7日目ニューロスフェアを回収し、単一細胞懸濁液となるように機械的に解離し、40 μmナイロンセルストレーナー (Falcon) を通してろ過する。

20

【 0 0 5 3 】

上述した2つの実施例のいずれかによって産生された神経細胞の単一細胞懸濁液を、完全NeuroCult (商標) 培地 (StemCell Technologies Inc.) において 2.17×10^5 細胞/mLの濃度となるように希釈する。半固形NCFCアッセイ培地の溶液3.3 mlを作製するため、以下の成分を所定の順に添加する：

30

サイトカイン非含有NeuroCult (商標) NCFC無血清培地 (StemCell Technologies)	1700 μl
NeuroCult (商標) Proliferation Supplements (StemCell Technologies)	330 μl
上皮増殖因子 (10 μg/ml)	6.6 μl
細胞 (2×10^5 細胞/ml)	25 μl
コラーゲン (ウシ, StemCell Technologies)	1300 μl
全量	3361 μl

40

【 0 0 5 4 】

得られた溶液を十分に混合し、培地中に細胞が均等に分配されるようにする。最終密度が2500細胞/ディッシュとなるように、懸濁液1.5 mlを個々の35 mm組織培養プレートにプレーティングする。37 °C、100%湿度、および5% CO₂に設定した組織培養インキュベーター中に培養物を置く。14~28日目に、コロニーを数え、大きさで分類する。

【 0 0 5 5 】

50

実施例2

半固形培養（NCFCアッセイ法）および液体懸濁培養（ニューロスフェアアッセイ法）において、マウス胚齢14日線条体細胞によって生成する神経コロニーの増殖

上記の実施例1に詳述したように、初代マウスCNS組織またはニューロスフェアの7日目培養物から細胞を単離した。簡潔に説明すると、標準的な顕微解剖法を用いて、胚齢14日CD₁アルビノマウス胚（Charles River）から線条体および/または皮質を切除した。2%グルコースを含むリン酸緩衝食塩水中に組織を回収し、次いで熱研磨加工したガラスピペットを使用して単一細胞懸濁液となるように機械的に解離し、1度洗浄し、40 μmナイロンセルストレーナー（Falcon）を通してろ過し、完全NeuroCult（商標）培地（20 ng/mlのEGFを添加したNeuroCult（商標） Basal MediumおよびNeuroCult（商標） Proliferation Supplements ; StemCell Technologies Inc.）において 2.17×10^5 細胞/mLの濃度となるように希釈した。

【0056】

または、先に記載したように、培養したニューロスフェアに由来する細胞をNCFCアッセイに使用することも可能である。標準的な顕微解剖法を用いて、胚齢14日CD₁アルビノマウス胚（Charles River）から線条体を切除する。2%グルコースを含むリン酸緩衝食塩水中に組織を回収し、次いで熱研磨加工したガラスピペットを使用して単一細胞懸濁液となるように機械的に解離し、20 ng/mlのEGFを添加した完全NeuroCult（商標）培地（NeuroCult（商標） Basal MediumおよびNeuroCult（商標） Proliferation Supplements ; StemCell Technologies Inc.）にプレATINGする。細胞を7日間培養し、NCFCアッセイ法に使用するためのニューロスフェアを生成させる。培養物から7日目ニューロスフェアを回収し、単一細胞懸濁液となるように機械的に解離し、40 μmナイロンセルストレーナー（Falcon）を通してろ過する。

【0057】

上述した2つの実施例によって産生された神経細胞の単一細胞懸濁液を、完全NeuroCult（商標）培地（StemCell Technologies Inc.）で 2.17×10^5 細胞/mLの濃度となるように希釈する。半固形NCFCアッセイ培地の溶液3.3 mlを作製するため、以下の成分を所定の順に添加する：

サイトカイン非含有NeuroCult(商標)	1700 μl
NCFC無血清培地(StemCell Technologies)	
NeuroCult(商標) Proliferation Supplements(StemCell Technologies)	330 μl
上皮増殖因子(10 μg/ml)	6.6 μl
細胞(2.17×10^5 細胞/ml)	25 μl
コラーゲン(ウシ、StemCell Technologies)	1300 μl
全量	3361 μl

【0058】

得られた溶液を十分に混合し、培地中に細胞が均等に分配されるようにする。最終密度が2500細胞/ディッシュとなるように、懸濁液1.5 mlを個々の35 mm組織培養プレートにプレATINGする。37 °C、100%湿度、および5% CO₂に設定した組織培養インキュベーター中に培養物を置く。14~28日目に、コロニーの大きさおよび数を計測する。

【0059】

図4は、図の説明に列挙した培養日数後に、NCFCアッセイ法およびニューロスフェアアッセイ法で形成されたニューロスフェアの形態を示す。図5から、NCFCアッセイ法で生成されたコロニー数が、ニューロスフェアアッセイ法で生成されたコロニー数と同等であることが示される。要約すれば、NAアッセイ法およびNCFCアッセイ法において、それぞれニューロスフェアおよびコロニーが同等の数だけ形成される。このことから、NCFCアッセイ法で用いられる培養条件が、EGF応答細胞の増殖を抑制しないことが示される。

【 0 0 6 0 】

実施例3マウス胚齢14日線条体細胞を用いたNCFCアッセイ法におけるコロニーの大きさと日数との関係

上記の実施例1に詳述したように、初代マウスCNS組織またはニューロスフェアの7日目培養物から細胞を単離した。

【 0 0 6 1 】

NCFCアッセイ法でプレーティングして4~7日以内に、NSCおよび神経前駆細胞は増殖を開始して（図6A）小型のコロニーを形成する。14日目までに、これらの小型のコロニーは大きさを増し、コロニー間の相違が識別され得る（図6B）。約10~14日後、多くのコロニーは増殖が停止するように見えるが、他のコロニーは拡張し続ける。21~28日目までに、コロニーは少なくとも4つのカテゴリーに分類され得る：1) 直径2 mmを超過、2) 直径1~2 mm、3) 直径0.5~1 mm、および4) 直径0.5 mm未満（図7）。

10

【 0 0 6 2 】

実施例4マウス胚齢14日線条体細胞によるNCFCアッセイ法において生成する種々のコロニー種の大きさおよび種々の大きさのコロニーの頻度：

コロニーの大きさを分類し、かつ計数して、これらの大きさのカテゴリーそれぞれにおけるコロニーの頻度をグラフ化し得る（図8A）。これを、プレーティングした全細胞に対する割合として（図8B）、または生成された全コロニーの割合として（図8C）表現することもできる。生成されたコロニーの大部分（76%）は大きさが0.5 mm未満であり、非常に小さな割合（2.3%）が直径2 mmを超える大型のコロニーを形成する。

20

【 0 0 6 3 】

実施例5異なる大きさのコロニー内のマウス胚齢14日線条体細胞から元来生じた、異なる大きさのコロニーから解離した細胞の増殖能

異なる大きさのコロニーに含まれる細胞の増殖能を、以下の手順により測定した。4つの大きさのカテゴリーのコロニーをコラーゲン基質から切り出すことで単離し、これらを個々にコラゲナーゼの0.25%溶液中において37℃で30分間インキュベートした（図9）。次いで、切り出したコロニーをGilsonピペットチップで機械的に破壊して基質を細分化し、単一細胞懸濁液を作製した。単一コロニーに由来する細胞をすべて、EGFを添加した完全NeuroCult（商標）培地で24ウェルプレートの個々のウェルにプレーティングした（ニューロスフェアアッセイ法）。10~14日後、新たなスフェアが形成されたウェルのニューロスフェアを回収し、機械的に解離し、新鮮培地で再度プレーティングした。これを10~14日ごとに繰り返した。上に詳述したように、NCFCアッセイよりHPP-NSCコロニーが切り出された（図9）。これらの培養条件下において、増殖因子応答性細胞株（図10B~Cおよび図11）は直径2 mm以上のコロニー（HPP-NSCコロニー）から生成されたが、直径0.5 mm未満のコロニーからは生成されなかった（図11）。

30

【 0 0 6 4 】

実施例6マウス胚齢14日線条体細胞によって生成する異なるコロニー形態

上記の実施例1に詳述したように、初代マウスCNS組織またはニューロスフェアの7日目培養物から細胞を単離した。

【 0 0 6 5 】

NCFCアッセイ法においてプレーティングして4~7日以内に、NSCおよび神経前駆細胞は増殖を開始して（図6A）小型のコロニーを形成する。14日目までに、これらの小型コロニーは種々の程度に増殖し、異なる大きさのコロニーが識別され得る（図6B）。約10~14日後、多くのコロニーは増殖が停止するように見えるが、他のコロニーは拡張し続ける。21~28日目までに、コロニーは少なくとも4つのカテゴリーに分類され得る：1) 直径2 mmを超過、2) 直径1~2 mm、3) 直径0.5~1 mm、および4) 直径0.5 mm未満（図7）。21~28日

40

50

目までに、種々のコロニーの大きさのカテゴリーにおいてコロニー形態の相違も観察され得る。4つの大きさのカテゴリーに由来するコロニーの写真を顕微鏡を通して直接撮影し、形態における相違を記録した(図13~16)。次いで、4つの大きさのカテゴリーに由来するこれらのコロニーをコラーゲン基質から切り出すことで単離し、これらを個々にコラーゲナーゼの0.25%溶液中において37℃で30分間インキュベートした(図9)。次に、切り出したコロニーをGilsonピペットチップで機械的に破壊し、基質を細分化して単一細胞懸濁液を産生した。単一コロニーに由来する細胞をすべて、EGFを添加した完全NeuroCult(商標)培地で24ウェルプレートの個々のウェルにプレーティングした(ニューロスフェアアッセイ法)。10~14日後、新たなスフェアが形成されたウェルにおけるニューロスフェアを回収し、機械的に解離し、新鮮な培地に再プレーティングした。これを10~14日ごとに繰り返した。上に詳述したように、NCFCアッセイよりHPP-NSCコロニーが切り出された(図9)。これらの培養条件下において、増殖因子応答性細胞株(図10B~C)は直径2 mm以上のコロニー(HPP-NSCコロニー)から生成されたが、直径0.5 mm未満のコロニーからは生成されなかった。

【0066】

直径>2 mmのコロニーについて観察された異なるコロニー形態を図13に示す。場合によっては、コロニーの表面周辺は突起を含み、突起の下に細胞の密集した層を有して波状形をしていた(図13A)。直径>2 mmの他のコロニーは、コロニーの色の強度によって反映される種々の程度の細胞密度を有した(図13Bおよび13C)。場合によっては、大型コロニーの中央には細胞の濃い環が存在した(図13D)。

【0067】

異なるコロニー形態はまた、直径1~2 mmおよび0.5~1 mmのコロニーについても観察された(図14および15)。1~2 mmのコロニーの特性には、毛様の辺縁部(図14C)および位相差で濃く現れる高密度の中心核(図14Aおよび14B)が含まれた。他の1~2 mmのコロニーは、より均一な細胞塊を有する(図14D)。

【0068】

直径0.5~1 mmのコロニーでは(図15)、高密度の中心および滑らかな表面を有するものもあれば(それぞれ図15Aおよび15B)、星様の外表面を有するものもあった(図15C)。この大きさの範囲内のいくつかのコロニーは、位相差で非常に濃く高密度に見えた(図15D)。

【0069】

直径<0.5 mmのコロニーについて観察されたコロニー形態は、他の大きさのカテゴリーのコロニーにおいて観察される形態ほどは異なっていなかった(図16A~D)。場合によっては、<0.5 mmの小型コロニーにおいて、高密度の中心核が観察された(図16D)。

【0070】

上述したように、NSCおよび神経前駆細胞の定義において、NSCは拡張された増殖能を有するのに対して、神経前駆細胞は限定された増殖能を有する。大型コロニーが繰り返して継代され得ることから、それらが元来はNSCに由来するという結論が支持される。または、小型コロニーが、継続した増殖を示し多数の子孫を生成することができないことから、これらは幹細胞に由来するのではなく、むしろ神経前駆細胞であることが支持される。したがって、NCFCアッセイ法は、異なる増殖能、すなわち高い増殖能および低い増殖能を有する細胞を識別することができる。

【0071】

実施例7

神経コロニー形成細胞(NCFC)アッセイ法：マウス初代胚齢14日線条体CNS組織

線条体と称される神経軸索の領域の初代胚性マウスCNS組織から、神経細胞が得られた。例えば、標準的な顕微解剖法を用いて、胚齢14日CD₁アルビノマウス胚(Charles River)から線条体を切除した。2%グルコースを含むリン酸緩衝食塩水中に組織を回収し、次いで熱研磨加工したガラスピペットを使用して単一細胞懸濁液となるように機械的に解離し、1度洗浄し、40 μmナイロンセルストレーナー(Falcon)を通してろ過し、完全NeuroCul

10

20

30

40

50

t (商標) 培地 (20 ng/mlのEGFを添加したNeuroCult (商標) Basal MediumおよびNeuroCult (商標) Proliferation Supplements; StemCell Technologies Inc.) で 2.17×10^5 細胞/mLの濃度となるように希釈した。

【0072】

上記の例によって産生された神経細胞の単一細胞懸濁液を、完全NeuroCult (商標) 培地 (StemCell Technologies Inc.) において 2.17×10^5 細胞/mLの濃度となるように希釈した。半固形NSCアッセイ培地の溶液3.3 mlを作製するため、以下の成分を所定の順に添加した：

サイトカイン非含有NeuroCult NCFC無血清培地 (StemCell Technologies)	1700 μ l
NeuroCult (商標) Proliferation Supplements (StemCell Technologies)	330 μ l
上皮増殖因子 (10 μ g/ml)	6.6 μ l
細胞 (2.17×10^5 細胞/ml)	25 μ l
コラーゲン (ウシ, StemCell Technologies)	1300 μ l
全量	3361 μ l

10

【0073】

得られた溶液を混合し、培地中に細胞が均等に分配されるようにした。最終密度が2500細胞/ディッシュとなるように、懸濁液1.5 mlを個々の35 mm組織培養プレートにプレートの

20

20、100%湿度、および5% CO₂に設定した組織培養インキュベーター中に培養物を置いた。14~28日目に、コロニーを数え、大きさで分類した。

【0074】

実施例8

初代マウス胚齢14日線条体細胞を用いたNCFCアッセイ法で生成する、異なるコロニー種の大きさおよび種々の大きさのコロニーの頻度：

コロニーの大きさを分類し、計数し、かつこれらの大きさのカテゴリそれぞれにおけるコロニーの頻度を表1に要約した。この結果を、プレートの全細胞に対する割合として表現した (表1)。プレートの全細胞の0.52~1.1%が種々の程度に増殖し、異なる大きさのコロニーを形成した。プレートの全細胞のうち非常に小さな割合 (0.09%) が大型 (>2 mm) のコロニーを形成した。形成されたコロニーの大部分は、より限られた増殖能を示唆する<1 mmのコロニーを形成した (0.5%)。

30

【0075】

実施例9

異なる大きさのコロニー内の初代マウス胚齢14日線条体細胞の増殖能

異なる大きさのコロニーの増殖能を、以下の手順により測定した。4つの大きさのカテゴリのコロニーをコラーゲン基質から切り出すことで単離し、これらを個々にコラーゲナーゼの0.25%溶液中において37℃で30分間インキュベートした (図9)。次いで、切り出したコロニーをGilsonピペットチップで機械的に破壊し、基質を細分化して単一細胞懸濁液を産生した。単一コロニーに由来する細胞をすべて、EGFを添加した完全NeuroCult (商標) 培地で24ウェルプレートの個々のウェルにプレートの

40

40、10~14日後、新たなスフェアが形成されたウェルのニューロスフェアを回収し、機械的に解離し、新鮮な培地に再プレートの

50

とはなく、元来のNCFCが、背景技術の項に記載したNSCのすべての特性を有するわけではなく、前駆細胞であったことが示唆された。

【0076】

実施例10

初代マウス胚齢14日線条体細胞由来の>2 mmコロニーから生成された二次スフェアの多分化能

2 mmを超えるコロニーの多分化能を、以下の手順により測定した。>2 mmの個々のコロニーをコラーゲン基質から切り出すことで単離し、これらを個々にコラゲナーゼの0.25%溶液中において37℃で30分間インキュベートした(図9の方法図)。次いで、切り出したコロニーをGilsonピペットチップで機械的に破壊し、基質を細分化して単一細胞懸濁液を産生した。単一コロニーに由来する細胞をすべて、EGFを添加した完全NeuroCult(商標)培地で24ウェルプレートの個々のウェルにプレーティングした(ニューロスフェアアッセイ法)。10~14日後、新たなスフェアが形成されたウェルのニューロスフェアを回収し、機械的に解離し、コロニーに由来する細胞をすべて、1%血清を添加した完全NeuroCult(商標)培地0.8 mlを含む予めコーティングされたポリ-D-リジン/ラミニン #35-4688 Becton Dickinson Biocoat 8ウェル培養スライドにプレーティングした。これらの条件下において細胞は分化し、次いで以下の手順を用いて免疫染色のためにさらに処理された。6~8日後に倒立光学顕微鏡で培養物を観察し、細胞が分化し、かつ生存しているかどうかを判定する。分化手順の間に、プレーティングした細胞数および培地が酸性になったかどうか(色が黄色/オレンジ色になる)に基づいて、培地を交換した。培地は、約50%の培地を除去し、1%血清を添加した新鮮な完全NeuroCult(商標)培地に置換することで交換した。

【0077】

培養の10日後、(すべての培地を除去して固定されていない細胞が空気に曝露されることのないよう注意しながら)分化している細胞を含む各チャンバーから培地を除去し、4%パラホルムアルデヒド溶液1 mlをチャンバーに直接添加した。細胞を室温で30分間インキュベートした。真空ポンプに接続された吸引システムを用いて、パラホルムアルデヒド溶液を吸引した。試料にPBS(pH 7.2)を添加し、5分間インキュベートした。この洗浄手順をさらに2回繰り返し、合計3回の洗浄段階を行った。次に、0.3% Triton X-100を含むPBS 1 mlを各ウェルに添加し、室温で5分間インキュベートして、細胞を透過処理した。5分後、PBS/Triton X-100を吸引により除去し、5分間のPBS洗浄を2回行った。

【0078】

次に、ニューロンの特異的系統マーカー チューブリン、アストロサイトの特異的系統マーカーGFAP、およびオリゴデンドロサイトの特異的系統マーカーO4に対する一次抗体で試料を標識した。一次抗体は、10%ヤギ血清を含む希釈溶液PBSにおいて最適作業希釈度に希釈した(チューブリン抗体は1:1000で使用し;GFAP抗体は1:100で使用し、かつO4抗体は1:50で使用した)。次いで、希釈抗体250 μL量をチャンバーに直接添加し、すべての試料を37℃で2時間インキュベートした。インキュベーション期間の後、PBSを用いて5分間の洗浄を3回行って一次抗体を洗浄除去した。次いで、ヤギ抗マウスIgG(H+L) Texas Red色素結合二次抗体、ヤギ抗ウサギIgG(H+L) AMCA結合二次抗体、およびヤギ抗マウスIgM、μ鎖特異的FITC結合二次抗体を2%血清(一次抗体の希釈液として使用したのと同じ血清)を含むPBSで希釈し、各チャンバースライドに添加した。試料を二次抗体250 μlと共に37℃で30分間インキュベートした。インキュベーションした後、PBSを用いて5分間の洗浄を3回行って二次抗体を洗浄除去した。製造業者のプロトコールに従って、スライドガラスからチャンバーを外した。封入培地5 μLを各チャンバースロットに添加し、次いで気泡が全く入らないようにしながら75 mmカバーガラスで覆った。各フルオロフォアに適切なフィルターを用いて、蛍光顕微鏡下で免疫蛍光を可視化した。

【0079】

元来>2 mmのコロニーから生成された二次スフェアより単離された細胞は、CNSにおいて見出される3種類の細胞表現型:ニューロン、アストロサイト、およびオリゴデンドロサイトを産生することができ(図18)、このことから元来のNCFCがNSCであることが示唆さ

れた。

【0080】

実施例11

NCFCアッセイ法において初代マウス胚齢14日線条体細胞により生成したコロニーのインサイチュー免疫染色

コラーゲンは乾燥させ、染色することができるため、NCFCアッセイ法において形成されたコロニーを免疫細胞化学的に直接染色することも可能である。神経コロニーの増殖、脱水、固定、および染色はすべて、35 mm培養ディッシュおよび特大型(75 mm × 50 mm)スライドで行う。NCFCアッセイ法におけるコロニーのインサイチュー染色は以下の手順に従って行った。アセトン約200 mLを含む容器を氷上に最低15分間置いた。NCFCアッセイに使用した35 mm培養ディッシュをインキュベーターから取り出し、ディッシュから蓋を外した。コラーゲンおよび包埋されたコロニーを含む各培養ディッシュを、特大型75 mm × 50 mmスライド上で反転させた。予め切断したポリプロピレン隔離板を厚い白色フィルターカードと共にコラーゲン上に置き、液体をカードに染み込ませた。次いで、元のポリプロピレン隔離板はそのままにして、厚い白色カードを除去した。コラーゲンおよびスパーサーを含む全スライドを、冷アセトン約200 mLで満たした適切なプラスチック容器中に水平に置いた。スライド上のコラーゲンはそのままにして、ポリプロピレンスパーサーを浮かせて外した。スライドをアセトン中に5分間置いた。固定液からスライドを取り出し、垂直にして風乾させた。4%パラホルムアルデヒドを含むプラスチック容器中にスライドガラスを置き、試料を室温で30分間インキュベートした。パラホルムアルデヒド溶液を捨て、PBS (pH 7.2) 約20 mLを試料に添加し、5分間インキュベートした。この洗浄手順をさらに2回繰り返し、合計3回の洗浄段階を行った。次に、スライドガラスを含むプラスチック容器に0.3% Triton X-100を含むPBS 20 mlを添加し、試料を室温で5分間インキュベートして、細胞を透過処理した。5分後、PBS/Triton X-100を捨て、5分間のPBS洗浄を2回行った。

【0081】

次に、未分化神経細胞のマーカーであるネスチンに対する一次抗体で試料を標識した。抗ネスチン抗体は、10%ヤギ血清を含むPBSで1:50に希釈した。次いで、希釈抗体約500 μLをスライドガラス上の脱水したコラーゲンに直接添加し、パラフィルム片を抗体溶液上に載せた。すべての試料を37 °Cで2時間インキュベートした。インキュベーション期間の後、PBSを用いて5分間の洗浄を3回行って一次抗体を洗浄除去した。次いで、ヤギ抗マウスIgG (H+L) Texas Red結合二次抗体を、2%ヤギ血清を含むPBSで希釈し、スライドガラス上の脱水したコラーゲンに直接添加した。パラフィルム片を抗体溶液上に載せ、試料を二次抗体と共に37 °Cで30分間インキュベートした。インキュベーション後、PBSを用いて5分間の洗浄を3回行って二次抗体を洗浄除去した。封入培地5 μLを各脱水コラーゲンの中央に添加し、次いで気泡が全く入らないようにしながらカバーガラスで覆った。各フルオロフォアに適切なフィルターを用いて、蛍光顕微鏡下で免疫蛍光を可視化した。

【0082】

>2 mmのコロニー内の細胞はネスチン発現に関して高度に陽性であり、かつ、これらのコロニー内の細胞の大部分はネスチンについて染色された(図19A)。直径1~2 mm(図19B)および0.5~1 mm(図19C)のコロニーは、直径>2 mmのコロニー内の細胞と比較して、ネスチン発現について陽性の細胞をより少なく含み、直径<0.5 mmのコロニーが含むネスチン陽性細胞の数は最も少なかった(図19D)。このことから、直径>2 mmのコロニーは直径<2 mmのコロニーと比較して、NSCおよび前駆細胞を含む未分化細胞を多く含むことが示唆された。

【0083】

実施例12

マウス初代胚齢14日線条体細胞の数を多く用いた神経コロニー形成細胞(NCFC)アッセイ法

線条体と称される神経軸索の領域に由来する初代胚性マウスCNS組織から、神経細胞が

10

20

30

40

50

得られた。例えば、標準的な顕微解剖法を用いて、胚齢14日CD₁アルビノマウス胚 (Charles River) から線条体を切除した。2%グルコースを含むリン酸緩衝食塩水中に組織を回収し、次いで熱研磨加工したガラスピペットを使用して単一細胞懸濁液となるように機械的に解離し、1度洗浄し、40 µmナイロンセルストレーナー (Falcon) を通してろ過し、完全 NeuroCult (商標) 培地 (20 ng/mlのEGFを添加したNeuroCult (商標) Basal MediumおよびNeuroCult (商標) Proliferation Supplements ; StemCell Technologies Inc.) において 6.51×10^5 細胞/mLの濃度となるように希釈した。この細胞濃度は、実施例1における継代された2E14線条体ニューロスフェア、および実施例7における初代線条体細胞について用いられた濃度 (2.17×10^5 細胞/mL) よりも3倍高い。 6.51×10^5 細胞/mLの濃度は、プレーティングされた35 mmディッシュ当たり合計7500個の細胞に相当し、これはスクリーニングのために適切なコロニー数を産生することが見出された。

10

【0084】

上述の実施例によって産生された神経細胞の単一細胞懸濁液を、完全NeuroCult (商標) 培地 (StemCell Technologies Inc.) において 6.51×10^5 細胞/mLの濃度となるように希釈した。半固形NSCアッセイ培地の溶液3.3 mlを作製するため、以下の成分を所定の順に添加した：

サイトカイン非含有NeuroCult NCFC無血清培地 (StemCell Technologies)	1700 µl
NeuroCult(商標) Proliferation Supplements (StemCell Technologies)	330 µl
上皮増殖因子 (10 µg/ml)	6.6 µl
細胞 (2.17×10^5 細胞/ml)	25 µl
コラーゲン (ウシ, StemCell Technologies)	1300 µl
全量	3361 µl

20

【0085】

得られた溶液を混合し、培地中に細胞が均等に分配されるようにした。最終密度が7500細胞/ディッシュとなるように、懸濁液1.5 mlを個々の35 mm組織培養プレートにプレーティングした。37 °C、100%湿度、および5% CO₂に設定した組織培養インキュベーター中に培養物を置いた。14~28日目に、コロニーを数え、大きさで分類した。

30

【0086】

実施例13

NCFCアッセイ法で生成される異なるコロニー種の大きさおよび種々の大きさのコロニーの頻度：マウス初代胚齢14日線条体CNS組織：

実施例12に記載した通りに、初代胚性CNS組織由来の細胞をNCFCアッセイ法において培養した。コロニーの大きさを分類し、計数し、かつこれらの大きさのカテゴリーそれぞれにおけるコロニーの頻度をグラフ化した (図20)。これを、プレーティングした全細胞に対する割合として (図20C)、または生成された全コロニーに対する割合として (図20B) 表現した。生成されたコロニーの大部分 (50%) は大きさが0.5 mm未満であり、かつ16%は直径2 mmを超える大型のコロニーを形成した。プレーティングした全細胞のうち非常に小さな割合 (0.08%) が大型 (> 2 mm) のコロニーを形成した。形成されたコロニーの大部分は、より限定された増殖能を示唆する<1 mmのコロニーを形成した (0.4%)。

40

【0087】

実施例14

NCFCアッセイ法において再プレーティングした直径2 mmのコロニー由来の細胞から生成される異なるコロニー種の大きさおよび種々の大きさのコロニーの頻度：マウス初代胚齢14日線条体CNS組織：

実施例12に記載した通りに、初代胚性CNS組織由来の細胞をNCFCアッセイ法において培養した。直径>2 mmのコロニー内の細胞がNCFCに再プレーティングされた場合に異なるコロニー種を生成する能力を、以下の手順により測定した。直径>2 mmのコロニーをカラー

50

ゲン基質から切り出すことで単離し、かつ、これらを個々にコラゲナーゼの0.25%溶液中において37℃で30分間インキュベートした(図9)。次いで、切り出したコロニーをGilsonピペットチップで機械的に破壊して基質を細分化し、単一細胞懸濁液を産生した。単一コロニーに由来する細胞をすべて、EGFを添加した完全NeuroCult(商標)培地で96ウェルプレートの個々のウェルにプレーティングした(ニューロスフェアアッセイ法)。10~14日後、新たなスフェアが形成された(二次スフェア)ウェルのニューロスフェアを回収し、機械的に解離し、新鮮な培地で24ウェルプレートに再プレーティングして三次スフェアを生成させた。10~14日後、三次スフェアが形成されたウェルのニューロスフェアを回収し、機械的に解離し、トリパンプルー排除法を用いて生細胞を計数した。次に、以下の手順に従ってNCFCアッセイ法において細胞をプレーティングした。完全NeuroCult(商標)培地(20 ng/mlのEGFを添加したNeuroCult(商標) Basal MediumおよびNeuroCult(商標) Proliferation Supplements ; StemCell Technologies Inc.)において細胞濃度が 2.17×10^5 細胞/mLとなるように調整し、半固形NCFCアッセイ培地に以下を所定の順に添加した:

サイトカイン非含有NeuroCult(商標) NCFC無血清培地(StemCell Technologies)	1700 μ l
NeuroCult(商標) Proliferation Supplements(StemCell Technologies)	330 μ l
上皮増殖因子(10 μ g/ml)	6.6 μ l
細胞	25 μ l
コラーゲン(ウシ, StemCell Technologies)	1300 μ l
全量	3361 μ l

【0088】

得られた溶液を混合し、培地中に細胞が均等に分配されるようにした。最終密度が2500細胞/ディッシュとなるように、懸濁液1.5 mlを個々の35 mm組織培養プレートにプレーティングした。37℃、100%湿度、および5% CO₂に設定した組織培養インキュベーター中に培養物を置いた。14~28日目に、コロニーを数え、大きさで分類した。直径>2 mmのコロニー内の細胞は、異なる大きさのカテゴリーのコロニーを再生成することができた(図21)。

【0089】

実施例15

直径>2 mmのコロニーに由来する細胞の長期増殖能および拡張：マウス初代胚齢14日線条体CNS組織：

実施例12に記載した通りに、初代胚性CNS組織由来の細胞をNCFCアッセイ法において培養した。直径>2 mmのコロニー内の細胞が自己複製し長期ニューロスフェア培養(三次ニューロスフェアを超える)において多数の子孫を産生する能力を、以下の手順により測定した。直径>2 mmのコロニーをコラーゲン基質から切り出すことで単離し、これらを個々にコラゲナーゼの0.25%溶液中において37℃で30分間インキュベートした(図9)。次いで、切り出したコロニーをGilsonピペットチップで機械的に破壊して基質を細分化し、単一細胞懸濁液を産生した。単一コロニーに由来する細胞をすべて、EGFを添加した完全NeuroCult(商標)培地で96ウェルプレートの個々のウェルにプレーティングした(ニューロスフェアアッセイ法)。10~14日後、新たなスフェアが形成された(二次スフェア)ウェルのニューロスフェアを回収し、機械的に解離し、かつ新鮮な培地で24ウェルプレートに再プレーティングして三次スフェアを生成させた。10~14日後、三次ニューロスフェアが形成されたウェルのニューロスフェアを回収し、機械的に解離し、EGFを添加した完全NeuroCult(商標)培地を含む6ウェルプレートに細胞をプレーティングした。10~14日後、ニューロスフェアが形成されたウェルのニューロスフェアを回収し、機械的に解離し、トリパンプルー排除法を用いて生細胞を計数した。次に、EGFを添加した完全NeuroCult(商標)培地を含むT-25 cm²フラスコに全細胞をプレーティングした(第4継代)。この再プレ

ーティング過程を10～14日おきに繰り返し、長期培養物を生成した。各培養継代ごとに細胞数を計数し、かつ、各継代における全生細胞数を当該継代において播種した全生細胞数で割ることにより、拡張倍率を算出した。次いで、第6継代の開始細胞数から、全生細胞数の累積拡張倍率（第6～10継代）を算出した（図22）。直径>2 mmの4つの個々のコロニーに由来する細胞は、全生細胞数の拡張倍率の増加を示したが、細胞の増殖率は多様であった。直径>2 mmのコロニーに由来する細胞は、8継代を超えて自己複製し、多数の子孫を産生することができたが、これらは神経幹細胞の2つの重要な特徴である。

【0090】

実施例16

初代胚齢18日（E18）ラット皮質細胞を用いた神経コロニー形成細胞（NCFC）アッセイ法

神経細胞は、ネズミ、齧歯動物、およびヒトの線条体、中隔、皮質、腹側中脳、中隔、中脳、小脳、または脊髄を含むがこれらに限定されない神経軸索の任意の領域の初代胚性、出生後、または成体CNS組織から得ることができる。

【0091】

標準的な顕微解剖法を用いて、胚齢18日Sprague-Fischer 344ラット胚（BrainBits、Illinois、USA）から皮質を切除した。2%グルコースを含むリン酸緩衝食塩水中に組織を回収し、次いでプラスチック使い捨てピペットチップを伴うp200ギルソンピペットを使用して単一細胞懸濁液となるように機械的に解離し、1回洗浄し、40 μmナイロンセルストレーナー（Falcon）を通してろ過し、完全NeuroCult（商標）培地（20 ng/ml EGF、10 ng/mL 塩基性線維芽細胞増殖因子bFGF、および2 μg/mLヘパリンを添加したNeuroCult（商標）N

【0092】

以下の成分を所定の順に添加して、半固形NSCアッセイ培地の溶液3.3 mlを得た：

サイトカイン非含有NeuroCult(商標) NCFC無血清培地(StemCell Technologies)	1700 μl
NeuroCult(商標) Proliferation Supplements(StemCell Technologies)	330 μl
上皮増殖因子(10 μg/ml)	6.6 μl
塩基性線維芽細胞増殖因子(10 μg/ml)	3.3 μl
ヘパリン溶液(0.2%)	6.6 μl
細胞(6.51 × 10 ⁵ 細胞/ml)	25 μl
コラーゲン(ウシ, StemCell Technologies)	1300 μl
全量	3361 μl

【0093】

得られた溶液を十分に混合し、培地中に細胞が均等に分配されるようにした。最終密度が7500細胞/ディッシュとなるように、懸濁液1.5 mlを個々の35 mm組織培養プレートにプレートングした。37 °C、100%湿度、および5% CO₂に設定した組織培養インキュベーター中に培養物を置く。14～28日目に、コロニーを数え、大きさで分類する（図23）。

【0094】

実施例17

初代E18ラット皮質細胞のNCFCアッセイにおけるコロニーの大きさと日数との関係

上記の実施例16に詳述した通りに、初代E18ラット皮質CNS組織から細胞を単離し、NCFCアッセイ法で培養した。21～28日目までに、コロニーは少なくとも4つのカテゴリーに分類され得る：1) 直径2 mmを超過、2) 直径1～2 mm、3) 直径0.5～1 mm、および4) 直径0.5 mm未満。図23は、NCFCアッセイ法で観察された直径1～2 mmの2つのE18ラットコロニーを示す。

【0095】

実施例18

初代E18ラット皮質細胞を用いたNCFCアッセイ法で生成される異なるコロニー種の大きさおよび種々の大きさのコロニーの頻度：

コロニーの大きさを分類し、計数し、かつ、これらの大きさのカテゴリーそれぞれにおけるコロニーの頻度をグラフ化し得る（図24A～C）。これを、プレーティングした全細胞に対する割合として（図24C）、または生成された全コロニーに対する割合として（図24B）表現することもできる。生成されたコロニーの大部分（77%）は大きさが0.5 mm未満であり、非常に小さな割合（0.2%）が直径2 mmを超える大型のコロニーを形成する。

【0096】

実施例19

初代成体脳室下帯（SVZ）マウス細胞を用いた神経コロニー形成細胞（NCFC）アッセイ法

神経細胞は、増殖する神経幹細胞および前駆細胞を含む脳室下帯（SVZ）と称される神経軸索の領域の由来、成体マウスCNS組織から得ることができる。例えば、標準的な顕微解剖法を用いて、6匹の成体CD₁アルビノマウス（Charles River）からSVZ領域を切除した。2%グルコースを含むリン酸緩衝食塩水中に組織を回収し、メスで細分化し、次いでトリプシンおよびDNase溶液により37℃で15分間酵素的に処理した。15分間インキュベートした後、オボムコイドトリプシン阻害剤を細胞に添加して、穏やかに混合した。細胞懸濁液を800 rpmで5分間遠心分離し、上清を廃棄した。細胞ペレットを150 μLの完全NeuroCult（商標）培地（20 ng/ml EGF、10 ng/mL塩基性線維芽細胞増殖因子bFGF、および2 μg/mLヘパリンを添加したNeuroCult（商標）NS-A Basal MediumおよびNeuroCult（商標）Proliferation Supplements；StemCell Technologies Inc.）に再懸濁し、かつプラスチック使い捨てピペットチップを伴うp200ギルソンピペットを使用して単一細胞懸濁液となるように機械的に解離した。細胞懸濁液をさらに2回洗浄し（遠心分離）、最終的なペレットを1 mLの完全NeuroCult（商標）培地（20 ng/ml EGF、10 ng/mL塩基性線維芽細胞増殖因子bFGF、および2 μg/mLヘパリンを添加したNeuroCult（商標）NS-A Basal MediumおよびNeuroCult（商標）Proliferation Supplements；StemCell Technologies Inc.）に再懸濁し、かつ40 μmナイロンセルストレーナー（Falcon）を通してろ過した。細胞残屑、ミエリン、および他の細胞種が混入するために成体マウス細胞を計数することは非常に困難であり、したがって細胞の計数に信頼性はない。最終的な1 mL細胞懸濁液のうち150 μLをNCFCアッセイ法に使用する。以下の成分を所定の順に添加して、半固形NSCアッセイ培地を得た：

サイトカイン非含有NeuroCult(商標) NCFC無血清培地(StemCell Technologies)	1700 μl
NeuroCult(商標) Proliferation Supplements(StemCell Technologies)	330 μl
上皮増殖因子(10 μg/ml)	6.6 μl
塩基性線維芽細胞増殖因子(10 μg/ml)	3.3 μl
ヘパリン溶液(0.2%)	6.6 μl
成体SVZ細胞(1 mL中に脳6個)	150 μl
コラーゲン(ウシ, StemCell Technologies)	1300 μl
全量	3361 μl

【0097】

得られた溶液を十分に混合し、培地中に細胞が均等に分配されるようにした。懸濁液1.5 mlを4枚の35 mm組織培養プレートそれぞれにプレーティングした。37℃、100%湿度、および5% CO₂に設定した組織培養インキュベーター中に培養物を置く。14～28日目に、コロニーを数え、大きさで分類する（図25）。

【0098】

実施例20

成体脳室下帯（SVZ）マウス神経コロニー形成細胞（NCFC）

上記の実施例19に詳述した通りに、マウスCNS組織の成体SVZ細胞から細胞を単離し、か

つNCFCアッセイ法で培養した。21～28日目までに、コロニーは少なくとも4つのカテゴリーに分類され得る：1) 直径2 mmを超過、2) 直径1～2 mm、3) 直径0.5～1 mm、および4) 直径0.5 mm未満（図25）。

【0099】

実施例21

ヒト胎児皮質細胞から4代継代したニューロスフェアを用いた神経コロニー形成細胞（NFC）アッセイ法

神経細胞は、ネズミ、齧歯動物、およびヒトの線条体、中隔、皮質、腹側中脳、中隔、中脳、小脳、または脊髄を含むがこれらに限定されない神経軸索の任意の領域に由来する初代胚性、出生後、または成体CNS組織から得ることができる。

【0100】

第4継代のヒトニューロスフェアに由来する細胞をNCFCアッセイ法（方法の項を参照されたい）に使用した。簡潔に説明すると、第4継代のニューロスフェアを400 rpmで5分間遠心分離し、上清を廃棄した。細胞ペレットを200 μ Lの完全NeuroCult（商標）培地（20 ng/ml EGF、10 ng/mL塩基性線維芽細胞増殖因子bFGF、および2 μ g/mLヘパリンを添加したNeuroCult（商標）NS-A Basal MediumおよびNeuroCult（商標）Proliferation Supplements；StemCell Technologies Inc.）に再懸濁し、次いで使い捨てプラスチックピペットチップを用いて単一細胞懸濁液となるように機械的に解離し、かつ40 μ mナイロンセルストレーナー（Falcon）を通してろ過した。トリバンプルー排除法を用いて細胞計数を行い、細胞を完全NeuroCult培地（20 ng/ml EGF、10 ng/mL塩基性線維芽細胞増殖因子bFGF、および2 μ g/mLヘパリンを添加したNeuroCult（商標）NS-A Basal MediumおよびNeuroCult（商標）Proliferation Supplements；StemCell Technologies Inc.）において 2.17×10^5 細胞/mLの濃度となるように希釈した。

【0101】

以下の成分を所定の順に添加して、半固形NSCアッセイ培地の3.3 ml溶液を得た：

サイトカイン非含有NeuroCult(商標) NCFC無血清培地(StemCell Technologies)	1700 μ l
NeuroCult(商標) Proliferation Supplements(StemCell Technologies)	330 μ l
上皮増殖因子(10 μ g/ml)	6.6 μ l
塩基性線維芽細胞増殖因子(10 μ g/ml)	3.3 μ l
ヘパリン溶液(0.2%)	6.6 μ l
ヒト細胞(2.17×10^5 細胞/mL)	25 μ l
コラーゲン(ウシ,StemCell Technologies)	1300 μ l
全量	3361 μ l

【0102】

得られた溶液を十分に混合し、培地中に細胞が均等に分配されるようにした。最終密度が7500細胞/ディッシュとなるように、懸濁液1.5 mlを個々の35 mm組織培養プレートにプレートングした。37 $^{\circ}$ C、100%湿度、および5% CO₂に設定した組織培養インキュベーター中に培養物を置く。14～28日目に、コロニーを数え、大きさで分類する（図26）。

【0103】

実施例22

ヒト胎児皮質細胞により生成された異なるNCFCコロニーの大きさ

上記の実施例21に詳述した通りに、ヒト胎児ニューロスフェアの単一細胞懸濁液をNCFCアッセイ法で培養した。21～28日目までに、コロニーは少なくとも4つのカテゴリーに分類され得る：1) 直径2 mmを超過（図26A）、2) 直径1～2 mm（図26B）、3) 直径0.5～1 mm（図26C）、および4) 直径0.5 mm未満（図26D）。図26は、NCFCアッセイ法で培養したヒト皮質細胞の単一細胞懸濁液に由来する異なるコロニーの大きさを示す。NCFCアッセイ法においてヒト胎児皮質細胞により生成されたコロニーの形態は、マウス細胞（図7）およ

びラット細胞（図23）により生成されたコロニーとは異なる。異なる大きさのコロニー内の細胞は、より分散しており、直径>2mmおよび1~2 mmのコロニー内に見られる細胞は少ない。

【0104】

実施例23

異なる増殖因子を用いた神経コロニー形成細胞（NCFC）アッセイ法

胚性および成体マウスCNS中に存在すると考えられるEGF、FGF、およびEGF + FGF応答性幹細胞および前駆細胞の垂集団の存在を、NCFCアッセイ法を用いて測定した。標準的な顕微解剖法を用いて、胚齢14日CD₁アルピノマウス胚（Charles River）から線条体を切除した。2%グルコースを含むリン酸緩衝食塩水中に組織を回収し、次いで熱研磨加工したガラスピペットを使用して単一細胞懸濁液となるように機械的に解離し、1回洗浄し、かつ40 μmナイロンセルストレーナー（Falcon）を通してろ過し、完全NeuroCult（商標）培地（20 ng/mlのEGFを添加したNeuroCult（商標）Basal MediumおよびNeuroCult（商標）Proliferation Supplements；StemCell Technologies Inc.）において 6.51×10^5 細胞/mLの濃度となるように希釈した。個々の増殖因子を単独または組み合わせで添加する以外は、以下に列挙した成分を用いて、半固形NSCアッセイ培地の溶液3.3 mlを作製した：

サイトカイン非含有NeuroCult NCFC無血清培地(StemCell Technologies)	1700 μl
NeuroCult(商標) Proliferation Supplements(StemCell Technologies)	330 μl
上皮増殖因子(10 μg/ml)	6.6 μl
または塩基性線維芽細胞増殖因子(10 μg/ml)	3.3 μl
ヘパリン溶液(0.2%) - bFGFのみ添加	6.6 μl
細胞(6.51×10^5 細胞/ml)	25 μl
コラーゲン(ウシ,StemCell Technologies) - 最後に添加	1300 μl
全量	3361 μl

【0105】

得られた溶液を十分に混合し、培地中に細胞が均等に分配されるようにする。最終密度が7500細胞/ディッシュとなるように、懸濁液1.5 mlを個々の35 mm組織培養プレートにプレーティングする。37 °C、100%湿度、および5% CO₂に設定した組織培養インキュベーター中に培養物を置く。14~28日目に、EGF、FGF、およびEGF + FGFのコロニーを数え、大きさで分類した。

【0106】

実施例24

異なる増殖因子を含むNCFCアッセイ法においてE14初代マウス線条体細胞により生成された種々の大きさのコロニーの頻度

増殖因子、EGF、bFGF、およびEGF + bFGFを用いる実施例23に概説した手順に従って、E14初代マウス線条体細胞を使用してNCFCアッセイを行った。コロニーを形成した増殖因子応答性細胞の大きさを分類し、計数し、かつこれらの大きさのカテゴリーそれぞれにおけるコロニーの頻度を、プレーティングした全細胞に対してグラフ化し得る（図27）。EGF、FGF、またはEGF + FGFの存在下において、大きさが0.5 mm未満のコロニーの頻度が最も高く、非常に小さな割合（<0.1%）が直径2 mmを超える大型のコロニーを形成する。この結果から、EGFおよびFGFの存在下ではより多くのコロニーが得られるが、コロニーのほとんどは<0.5 mmであり、かつ、これらのコロニー内の細胞で実施した機能アッセイにより判定されるように前駆細胞由来であることが示される。

【0107】

実施例25分化した初代E14マウス線条体細胞に特異的なマーカーを伴う血清を重層したNCFCコロニーのインサイチュー免疫染色

NCFCアッセイ法で形成されたコロニーに血清を重層し、異なるコロニー内の細胞が成熟神経系統に分化するよう誘導し、次いでインサイチューで免疫細胞化学的に直接染色することも可能である。実施例12に概説した手順に従って、初代E14マウス線条体細胞をNCFCアッセイ法で21日間培養した。培養期間の最後の時点で、1%ウシ胎児血清を含む1 mLのNeuroCult (商標) 完全培地 (StemCell Technologies Inc.) を各NCFCディッシュの上部に重層し、10日間インキュベートした。その後、実施例11に概説した手順に従って、NCFCアッセイ法におけるコラーゲンおよび包埋されたコロニーのインサイチュー脱水、固定、および透過処理を行った。次に、未成熟および成熟ニューロンに特異的なマーカーであるチューブリンに対する一次抗体で試料を標識した。抗チューブリン抗体は、10%ヤギ血清を含む希釈溶液PBSで1:1000に希釈した。その後、希釈抗体約500 μ Lをスライドガラス上の脱水したコラーゲンゲルに直接添加し、パラフィルム片を抗体溶液上に載せた。すべての試料を37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。インキュベーション期間の後、PBSを用いて5分間の洗浄を3回行って一次抗体を洗浄除去した。次いで、ヤギ抗マウスIgG (H+L) Texas Red結合二次抗体を2%ヤギ血清を含むPBSで希釈し、スライドガラス上の脱水したコラーゲンゲルに直接添加した。パラフィルム片を抗体溶液上に載せ、試料を二次抗体と共に37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。インキュベーションした後、PBSを用いて5分間の洗浄を3回行って二次抗体を洗浄除去した。封入培地5 μ Lを各脱水コラーゲンゲルの中央に添加し、次いで気泡が全く入らないようにしながらカバーガラスで覆った。各フルオロフォアに適切なフィルターを用いて、蛍光顕微鏡下で免疫蛍光を可視化した。

【0108】

>2 mmのコロニー内の細胞には、チューブリンを発現するものはほとんどなかった (図28AおよびB)。直径1~2 mm (図28CおよびD)、0.5~1 mm (図28D)、および直径<0.5 mm (図28E) のコロニーは、直径>2 mmのコロニー内の細胞と比較して、チューブリン発現が陽性の細胞を多数含んだ。この手順により、血清に曝露した後のNCFCコロニー内の分化細胞の検出が可能になる。

【0109】

実施例26NCFCアッセイ法におけるメチルセルロースおよび初代E14マウス線条体の使用

上述したNCFCアッセイ法で使用する半固形培地はコラーゲンである。メチルセルロースなどの他の種類の半固形培地を用いて、単一細胞懸濁液から神経コロニーを生成させることもできる。マウスCNS組織から単離された神経細胞がメチルセルロースに基づく半固形培地中でコロニーを形成する能力を、コラーゲンに基づく培地の場合 (実施例1) と比較した。

【0110】

標準的な顕微解剖法を用いて、胚齢14日CD₁アルビノマウス胚 (Charles River) から線条体を切除した。2%グルコースを含むリン酸緩衝食塩水中に組織を回収し、次いで熱研磨加工したガラスピペットを使用して単一細胞懸濁液となるように機械的に解離し、1回洗浄し、かつ40 μ mナイロンセルストレーナー (Falcon) を通してろ過し、完全NeuroCult (商標) 培地 (20 ng/mlのEGFを添加したNeuroCult (商標) Basal MediumおよびNeuroCult (商標) Proliferation Supplements; StemCell Technologies Inc.) において 6.51×10^5 細胞/mLの濃度となるように希釈した。以下の成分を所定の順に添加して、半固形のコラーゲンに基づくアッセイ培地の溶液3.3 mlを作製した：

サイトカイン非含有NeuroCult NCFC無血清培地 (StemCell Technologies)	1700 μ l
NeuroCult(商標) Proliferation Supplements(StemCell Technologies)	330 μ l
上皮増殖因子(10 μ g/ml)	6.6 μ l
細胞(6.51 x 10 ⁵ 細胞/ml)	25 μ l
コラーゲン(ウシ,StemCell Technologies)	1300 μ l
全量	3361 μ l

【0111】

10

得られた溶液を十分に混合し、培地中に細胞が均等に分配されるようにした。最終密度が7500細胞/ディッシュとなるように、懸濁液1.5 mlを個々の35 mm組織培養プレートにプレATINGした。37℃、100%湿度、および5% CO₂に設定した組織培養インキュベーター中に培養物を置いた。14~28日目に、コロニーを数え、大きさで分類した。

【0112】

同時に、最終濃度1%のメチルセルロースを得るために、以下の成分を所定の順に添加し、メチルセルロースに基づくアッセイ培地の溶液を作製した：

サイトカイン非含有NeuroCult NCFC無血清培地(StemCell Technologies)	1700 μ l
NeuroCult(商標) Proliferation Supplements(StemCell Technologies)	330 μ l
上皮増殖因子(10 μ g/ml)	6.6 μ l
細胞(6.51 x 10 ⁵ 細胞/ml)	25 μ l
メチルセルロース(StemCell Technologies)	1300 μ l
全量	3361 μ l

20

【0113】

得られた溶液を十分に混合し、培地中に細胞が均等に分配されるようにした。末端が平滑な針を使用し、最終密度が7500細胞/ディッシュとなるように、懸濁液1.5 mlを個々の35 mm組織培養プレートにプレATINGした。37℃、100%湿度、および5% CO₂に設定した組織培養インキュベーター中に培養物を置いた。14~28日目に、コロニーを数え、大きさで分類した。図29は、E14線条体マウス細胞により生成された直径0.5 mm未満の3個の個別のコロニーを示す。

30

【0114】

現時点で好ましい実施例であると考えられるものを参照して本発明を説明しているが、本発明は開示した実施例に限定されないことが理解されるべきである。逆に、本発明は、添付の特許請求の範囲の精神および範囲内に含まれる種々の改変および等価な変更を網羅することを意図する。

【0115】

40

すべての刊行物、特許、および特許出願は、それぞれ個々の刊行物、特許、または特許出願が、詳細かつ個別にその全体が参照として組み入れられることが示されるのと同程度に、それらの全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【0116】

(表1) NCFCアッセイ法での、4つの大きさのカテゴリーそれぞれにおけるコロニーの相対頻度

コロニーの大きさ	NCFC頻度 (%) 平均値±SD
>2 mm	0.09 ± 0.03
1 - 2 mm	0.11 ± 0.04
0.5 - 1 mm	0.12 ± 0.11
<0.5 mm	0.38 ± 0.21
全コロニー (範囲)	0.52 ~ 1.1

初代胚性マウス線条体の単一細胞懸濁液を、EGFを含む無血清半固形培地で低密度にてプレATINGした。培養21日後に、クローンに由来するコロニーを4つの大きさのカテゴリーに割り当てた。NCFC頻度 (%) = (コロニー数 / プレATINGした全細胞数) × 100により、プレATINGした全細胞数に対するNCFCの頻度 (%) を算出した。プレATINGした全細胞の0.52 ~ 1.1%が種々の程度に増殖し、コロニーを形成した。プレATINGした全細胞の非常に小さな割合 (0.09%) が大型 (>2 mm) のコロニーを形成した。形成されたコロニーの大部分は、より限定された増殖能を示唆する<1 mmのコロニーを形成した (0.5%)。

【 0 1 1 7 】

参考文献

Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135, 1127–1129.

Altman, J. & Das, G. D. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J. Comp. Neurol.* 126, 337–390 (1966).

10

Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2:287–293.

Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071–1082.

20

Potten, C. S., and Loeffler, M. (1990). Stem cells: Attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the Crypt. *Development* 110, 1001–1020.

Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 225:1707–1710.

30

Reynolds BA, Weiss S (1996) Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 175:1–13.

Shimazaki T, Shingo T, Weiss S (2001) The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 21:7642–7653.

40

【図面の簡単な説明】

【 0 1 1 8 】

本発明を以下の図面に関連させて説明する：

【図 1】第1継代および第2継代のニューロスフェア。胚齢14日目の皮質を単一細胞懸濁液となるように解離し、EGFを含む既知の無血清培地に500,000細胞/mlの密度でプレーティングした。プレーティングの3日後に、基質に接着した小型の細胞塊が同定され得る(A)。4日後、クローンに由来するニューロスフェアが懸濁液中に浮遊しているのが認められる(B)。ニューロスフェアを回収し、単一細胞懸濁液になるように機械的に解離し、再プレーティングした。第2継代の7日目のニューロスフェア(C)。

50

【図2】ニューロスフェアアッセイ法において、マウス胚齢14日目の皮質より生成されたニューロスフェア。EGFの存在下において生成された7日目のニューロスフェアの顕微鏡写真。図2Aは200 μ lウェル中に35個のニューロスフェアを生成した培養物の顕微鏡写真であり、もう一方の培養物では23個のニューロスフェアのみが生成された(図2B)。

【図3】継代したラットE18皮質NSCの増殖曲線。第10継代後に生成された全生細胞の理論数。データは、各継代において計数したアリコートに基づく、10代連続継代の後に生成された全細胞数の概算値を表す。1 \times 10⁶個の細胞から開始し、かつ各継代において全細胞を保存しておけば、第10継代までに4.03 \times 10¹⁵個の細胞が生成されたことになる。これは、10週間で10⁹倍に増加したことを表す。

【図4】半固形のコラーゲンに基づく培地(NCFCアッセイ法)または液体懸濁培養液(ニューロスフェアアッセイ法)のそれぞれで培養した、マウス胚齢14日線条体細胞から生成されたコロニーとニューロスフェアとの増殖の比較。(A)ニューロスフェアアッセイ法では、インビトロでの2日目(2DIV)に、基質に接着した多くの小型スフェアが形成され始める。左上の挿入図は、2DIVニューロスフェアの高倍率像を示す。(B)4 DIVまでに、クローン由来の塊の大きさが増大し、大部分が基質から脱離して懸濁液中に浮遊する。4DIVニューロスフェアの高倍率像を、左上の挿入図に示す。(C)5~7 DIVまでに、ほとんどのニューロスフェアが懸濁液中に浮遊している。この段階で、ニューロスフェアを継代することができる。(D)NCFCアッセイ法における、1 DIVでの分裂細胞。(E)7 DIVまでに、NCFCアッセイ法におけるコロニーは十分明確になり、直径40 μ m~500 μ mの範囲になり得る。(F)14 DIVまでに、NCFCアッセイ法におけるコロニーの多くは比較的小型のままであるが、他のコロニーは大きさが増大し続ける。

【図5】NCFCアッセイ法およびニューロスフェアアッセイ法において、マウス胚齢14日線条体細胞により生成されたコロニー/スフェアの数は同等である。ニューロスフェアアッセイ法では、細胞の2.4 \pm 0.9%(平均値 \pm SE;スフェア数/プレーティングした全細胞数)がニューロスフェアを形成し、一方NCFCアッセイ法ではプレーティングした細胞の2.8 \pm 1.2%(平均値 \pm SE)がコロニーを形成した。

【図6】NCFCアッセイ法で増殖させたマウス胚齢14日線条体細胞によって生成された7日目および14日目のコロニー。プレーティングしてから7日後(A)および14日後(B)のコロニーの顕微鏡写真。14日目に、3つの異なるコロニーの大きさが同定され得る(矢印)。

【図7】NCFCアッセイ法においてマウス胚齢14日線条体細胞により生成されたコロニーの大きさの比較。このアッセイ法では、個々のコロニーの直径に基づき広範囲の大きさのコロニーが観察された。説明の目的のために、本発明者らは4つの分類を作成した:(A)2 mmを超過 (B)1~2 mm (C)0.5~1 mm、および (D)0.5 mm未満。

【図8】NCFCアッセイ法における、マウス胚齢14日線条体細胞により生成されるコロニーの、4つの大きさのカテゴリーそれぞれにおける相対頻度:(A)上記の通りに、2500個の細胞をNCFCアッセイ培地にプレーティングした。21日後に、4つの異なる大きさの分類におけるコロニー数を計数した。(B)図6Aのデータを全コロニー数に対する各サイズのコロニーの割合として表現した場合、70%を超えるコロニーは直径0.5 mm未満のコロニーであり、一方、大型の高増殖性コロニーは全体の約2%を占めた。(C)全細胞数に対するコロニー(図7にあるようなコロニーの大きさによって分類)の頻度(%)により、プレーティングした全細胞の3%未満が増殖し、コロニーを形成したことが示される。この3%のうち大部分(2.23%)が、より限定された増殖能を示唆する小型(直径<0.5 mm)のコロニーを産生した。これらのコロニーは小型のままであった。プレーティングした全細胞の非常に小さな割合(0.06%)が高増殖性であり、大型(>2 mm)のコロニーを形成した。

【図9】NCFCアッセイ法においてマウス胚齢14日線条体細胞により生成されたコロニーの同定および切除、ならびにコロニーから解離された細胞の、液体培地における引き続く継代。(A)関心対象のコロニーを解剖顕微鏡下で同定し、無菌条件下においてコロニーを顕微解剖ハサミにより半固形基質から切除した。(B)切除したコロニーをコラゲナーゼ溶液に移し、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。(C)コロニーを200 μ l Gilsonピペッ

10

20

30

40

50

トチップで破壊し、基質を細分化して単一細胞懸濁液を作製した。(D) EGFを含む既知の無血清培地で、細胞を24ウェルプレートの単一のウェルにプレATINGした。(E) 7~10日後、ニューロスフェアが生成された。

【図10】マウス胚齢14日線条体細胞により生成される高増殖能(HPP)コロニーからの二次スフェアおよび三次スフェアの生成：(A) 切除前のHPPコロニー(直径2.1 mm)。

(B) (A)から解離された細胞は、7DIVにおいて多数のニューロスフェア(二次コロニー)を形成した。(C) (B)の領域の高倍率像。(D) (B)のニューロスフェアを液体培養で継代し、7DIVに三次ニューロスフェアが形成された。(E) (D)の領域の高倍率像。

【図11】培養したマウス胚齢14日線条体細胞により生成され、二次および三次ニューロスフェアを生成したコロニーの割合。直径2 mmを超えるコロニーの100%が二次コロニーを生成し、1~2 mm、0.5~1 mmのコロニー、および0.5 mm未満のコロニーは、同時期にそれぞれ71%、43%、および25%の割合で二次スフェアを生成した。三次コロニーの形成は、直径2 mmを超えるコロニーおよび1~2 mmのコロニーでのみ認められた(同時期にそれぞれ100%および50%の割合)。直径1 mm未満のコロニーでは、三次スフェアの形成は認められなかった。

【図12】本発明の方法の態様の概略図である。

【図13】マウス胚齢14日線条体細胞により生成された直径>2 mmのコロニーについて観察される異なるコロニー形態。直径>2mmとして分類されたコロニーにおいて、種々のコロニー形態が観察される。

【図14】マウス胚齢14日線条体細胞により生成された直径1~2 mmのコロニーについて観察される異なるコロニー形態。直径1~2 mmとして分類されたコロニーにおいて、種々のコロニー形態が観察される。

【図15】マウス胚齢14日線条体細胞により生成された直径0.5~1 mmのコロニーについて観察される異なるコロニー形態。直径0.5~1 mmとして分類されたコロニーにおいて、種々のコロニー形態が観察される。

【図16】マウス胚齢14日線条体細胞により生成された直径<0.5 mmのコロニーについて観察される異なるコロニー形態。直径<0.5 mmとして分類されたコロニーにおいて、種々のコロニー形態が認められる。

【図17】初代マウス胚齢14日線条体細胞により生成され、二次および三次ニューロスフェアを生成したコロニーの割合。直径2 mmを超えるコロニーの100%が二次コロニーを生成し、1~2 mm、0.5~1 mmのコロニー、および0.5 mm未満のコロニーは、同時期にそれぞれ50%、36%、および17%の割合で二次スフェアを産生した。三次コロニーの形成は、直径2 mmを超えるコロニーおよび1~2 mmのコロニーでのみ認められた(同時期にそれぞれ100%および8.3%の割合)。直径1 mm未満のコロニーでは、三次スフェアの形成は認められなかった。

【図18】直径>2 mmのコロニーから生成された二次スフェアに由来するマウス胚齢14日線条体細胞の免疫染色。図の説明： チュープリン抗体で染色されるニューロンの染色を赤で示し(A)、グリア線維酸性タンパク質(GFAP)抗体で染色されるアストロサイトの染色を緑で示し(B)、O4抗体で染色されるオリゴデンドロサイトの染色を青で示す(C)。

【図19】NCFCアッセイ法においてマウス胚齢14日線条体細胞により生成されたコロニーのインサイチュー免疫染色。マウス胚齢14日線条体細胞により生成される直径>2 mm(A)、直径1~2 mm(B)、直径0.5~1 mm(C)、および直径<0.5 mm(D)のコロニー内の未分化細胞の染色であり、ネスチン抗体による染色を赤で示す。

【図20】NCFCアッセイ法における、マウス胚齢14日線条体細胞により生成されるコロニーの、4つの大きさのカテゴリーそれぞれにおける相対頻度：(A) 上記の実施例12に記載した通りに、7500個の細胞をNCFCアッセイ培地にプレATINGした。21日後に、コロニーを4つの大きさのカテゴリーに割り当て、4つの異なる大きさの分類中のコロニー数を計数した(平均値±SD)。(B) 所定の大きさのカテゴリー中のコロニー数(図20A)を、全コロニー数に対する割合として表現した場合、50%のコロニーは直径0.5 mm未満のコ

10

20

30

40

50

コロニーであり、直径>2 mmのコロニーは全コロニーの約16%を占めた（平均値±SD）。（C）全細胞数に対する（所定の大きさのカテゴリ-中の）コロニーの頻度（%）により、プレATINGした全細胞のうち0.6%未満が増殖し、コロニーを形成したことが示される。この0.6%のうちの大部分（0.29%）が、より限定された増殖能を示唆する小型（直径<0.5 mm）のコロニーを生成した。これらのコロニーは小型のままであった。プレATINGした全細胞のうち非常に小さな割合（0.08%）が高増殖性であり、大型（>2 mm）のコロニーを形成した（平均値±SD）。

【図2 1】>2 mmのコロニーを生成したマウス胚齢14日線条体細胞をNCFCアッセイから単離し、解離し、かつ液体懸濁培養（ニューロスフェアアッセイ法）で3代継代培養して三次ニューロスフェアを生成させた。三次ニューロスフェアを単一細胞懸濁液になるよう解離し、計数し、かつ2500個の細胞をNCFCアッセイ法で21日間プレート培養した。図21は、最初のNCFCアッセイにおける直径>2 mmのコロニー中の細胞により生成された三次ニューロスフェアから得られた、2500個の細胞により形成される（所定の大きさのカテゴリ-中の）コロニーの頻度を示す。直径>2 mmのコロニーに由来する細胞は、NCFCアッセイ法で再プレATINGした場合に、4つのカテゴリ-のコロニーを生成することができた。全細胞数に対する（明示された大きさのカテゴリ-中の）コロニーの頻度（%）から、プレATINGした全細胞の2.5%（平均値±SD）が増殖し、かつコロニーを形成したことが示される。この2.5%のうちの大部分（1.8%）が、より限定された増殖能を示唆する小型（直径<0.5 mm）のコロニーを生成した。これらのコロニーは小型のままであった。プレATINGした全細胞の非常に小さな割合（0.02%）が高増殖性であり、大型（>2 mm）のコロニーを形成した。

【図2 2】（NCFCアッセイ法で生成された）直径>2 mmの4つのコロニー内の細胞から開始した、液体培養（NA）におけるマウス胚齢14日線条体細胞の長期拡張。直径>2 mmの4つ（大型（L）1、L2、L3、およびL4と記載）の個々のコロニーに由来する細胞を、（3代を超える）長期ニューロスフェア培養で継代したところ、継代6代目までに高い拡張倍率が示された。

【図2 3】胚齢18日（E18）のラット皮質細胞に由来するNCFCコロニー。NCFCアッセイ法においてE18ラット皮質細胞により生成された直径1~2 mmの2つのコロニー（A、B）。

【図2 4】NCFCアッセイ法において胚齢18日（E18）のラット皮質細胞から生成される、4つの大きさのカテゴリ-それぞれにおけるコロニーの相対頻度：（A）実施例16に記載する通りに、7500個の細胞をNCFCアッセイ培地にプレATINGした。21日後に、4つの異なる大きさの分類中のコロニー数を計数した。（B）図24Aのデータを全コロニー数に対する（所定の大きさのカテゴリ-中の）コロニーの割合として表した場合、77%を超えるコロニーは直径0.5 mm未満のコロニーであり、大型の高増殖性コロニーは全体の約0.2%を占めた。（C）全細胞数に対する（特定の大きさのカテゴリ-中の）コロニーの頻度（%）。

【図2 5】NCFCアッセイ法においてマウス成体脳室下帯（SVZ）細胞により生成された異なる大きさのコロニー：（A）2 mmを超過（B）1~2 mm（C）0.5~1 mm、および（D）0.5 mm未満。

【図2 6】NCFCアッセイ法においてヒト胎児皮質細胞により生成された異なる大きさのコロニー。生成された異なるコロニー内の細胞は、成体神経細胞および胚性神経細胞により生成されたコロニーと比較してより分散している：（A）2 mmを超過（B）1~2 mm（C）0.5~1 mm、および（D）0.5 mm未満。

【図2 7】コロニーの大きさの分布を示す、EGF、FGF、またはEGF + FGFを補充したNCFCアッセイ法において初代E14マウス線条体細胞により生成されるコロニーの（プレATINGした全細胞に対する）頻度。

【図2 8】NCFCアッセイ法において初代E14マウス線条体細胞により生成されたコロニーのインサイチュー免疫染色。チューブリンに対する抗体で神経細胞を染色することにより、直径>2 mmのコロニー（A、B、コロニーの輪郭を示す）、直径1~2 mm（C、D）、直径0.5~1 mm（E）、および直径<0.5 mm（F）のコロニー内の チューブリン⁺細胞が赤色で

10

20

30

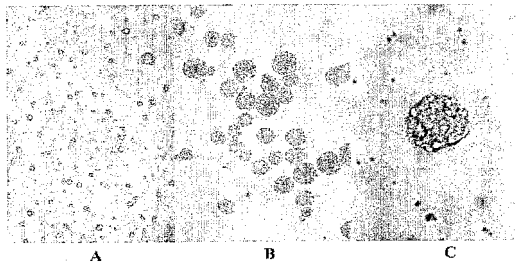
40

50

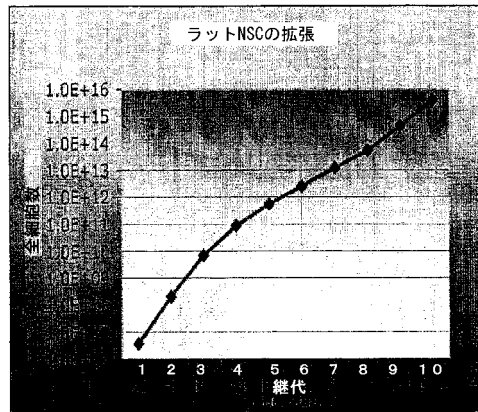
示される。

【図29】NCFCアッセイ法における半固形メチルセルロース培地および皮質E14マウス細胞の使用。皮質E14マウス細胞は、メチルセルロースを含むNCFCアッセイ法でコロニーを形成した(A: 10×倍率、B: 10×倍率、C: Bの40×倍率)。

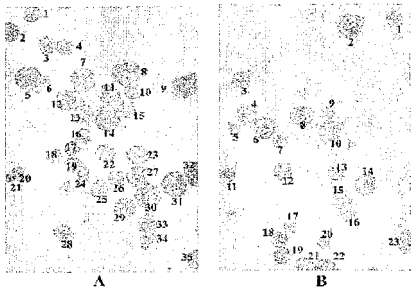
【図1】



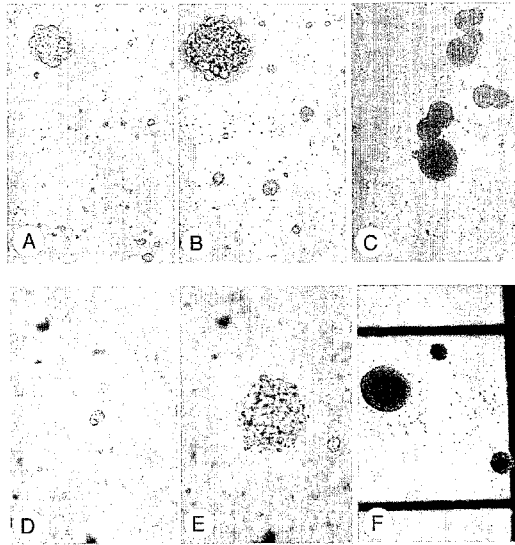
【図3】



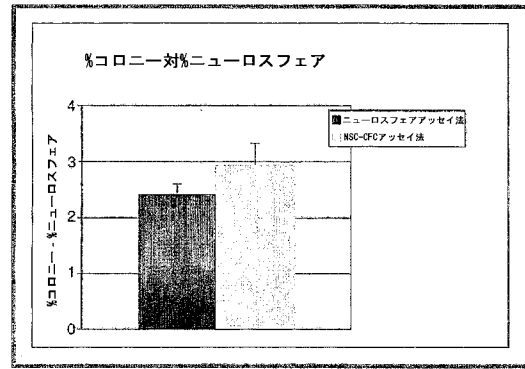
【図2】



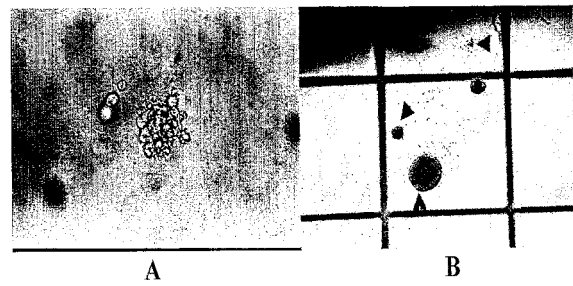
【 図 4 】



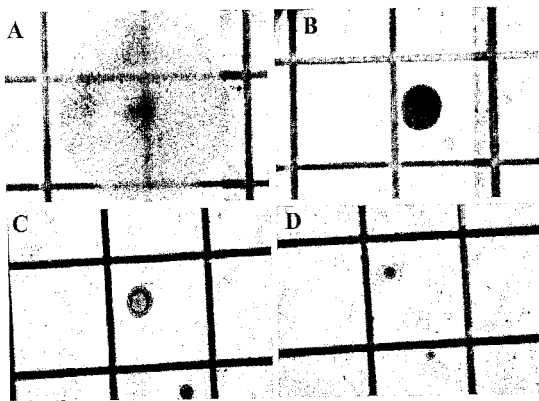
【 図 5 】



【 図 6 】

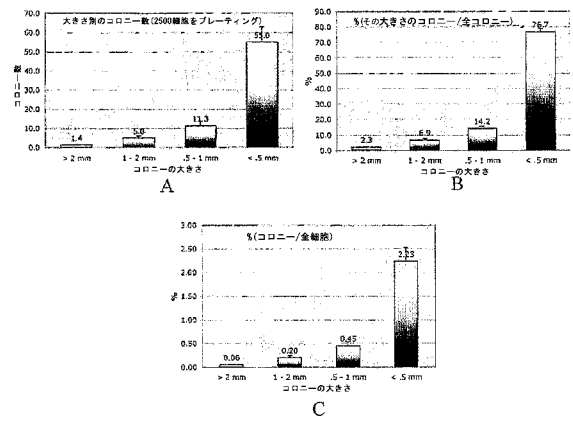


【 図 7 】

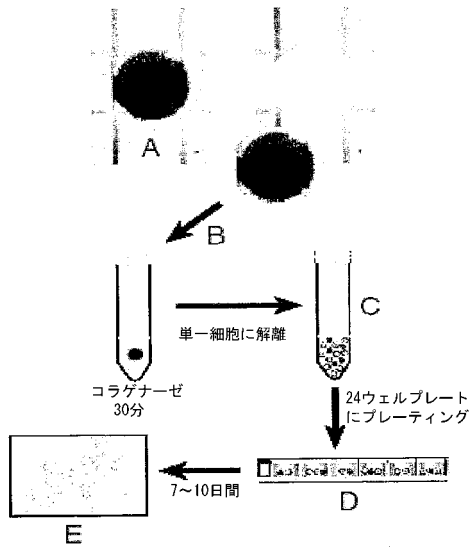


A: > 2mm
 B: 1-2 mm
 C: 0.5-1 mm
 D: < 0.5 mm

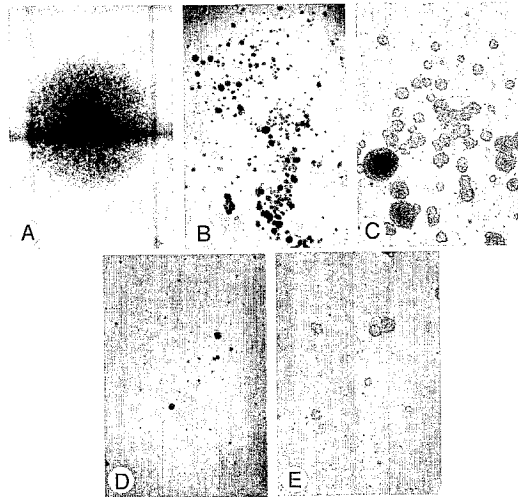
【 図 8 】



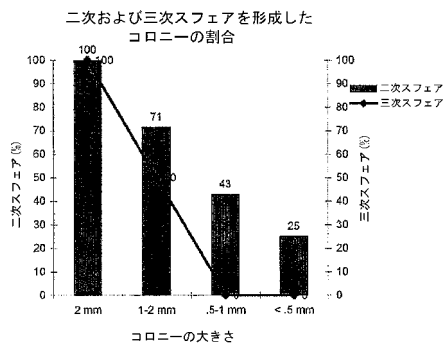
【図9】



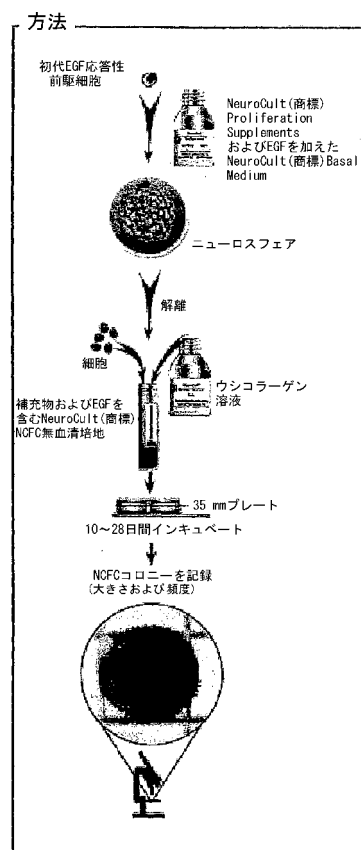
【図10】




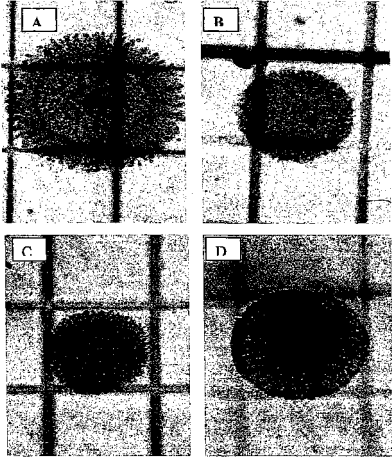
【図11】




【図12】

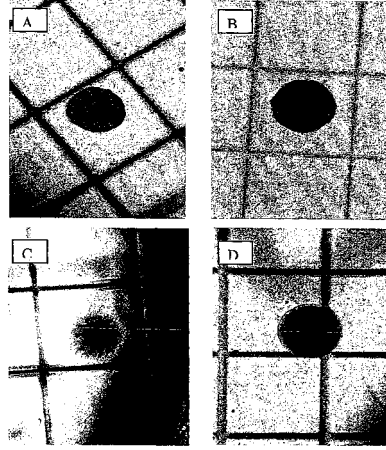


【 1 3】




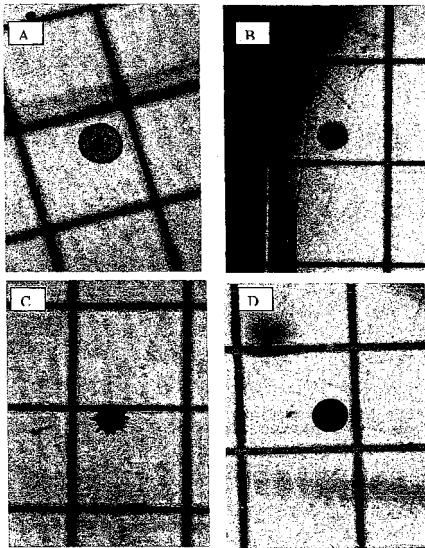
> 2mm

【 1 4】




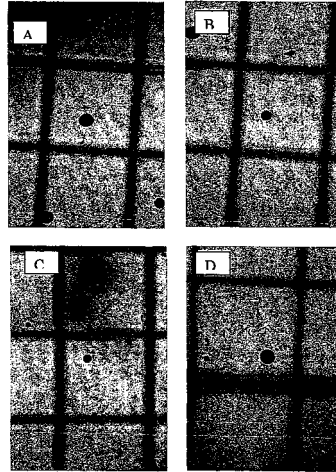
1 - 2 mm

【 1 5】



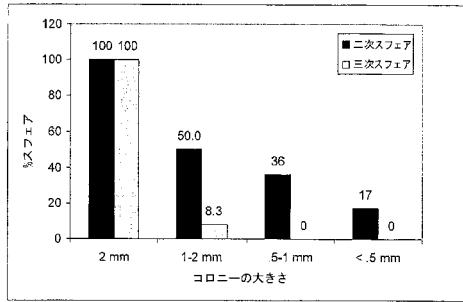
0.5 - 1 mm

【 1 6】

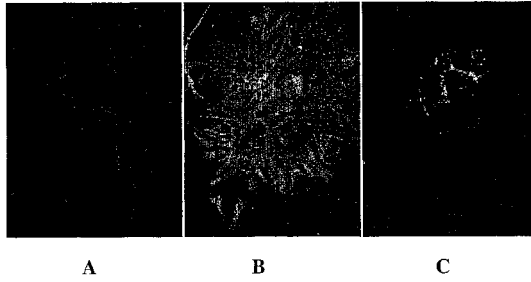


< 0.5 mm

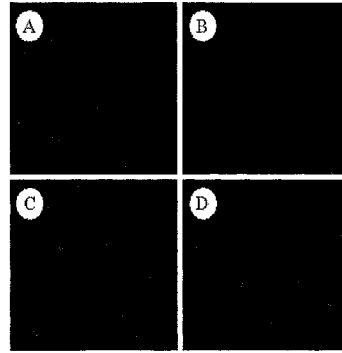
【 図 17 】



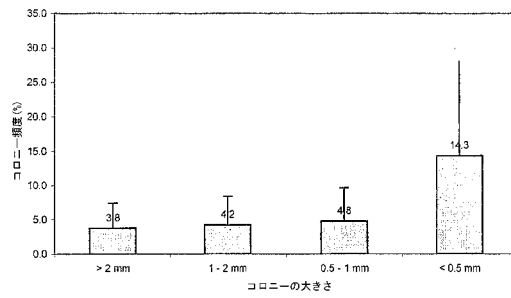
【 図 18 】



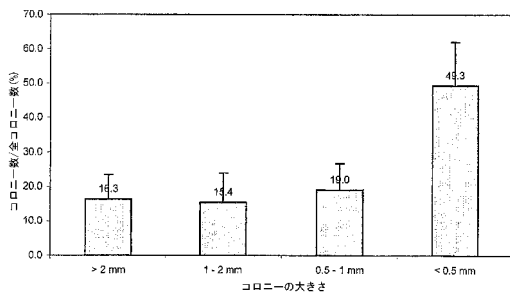
【 図 19 】



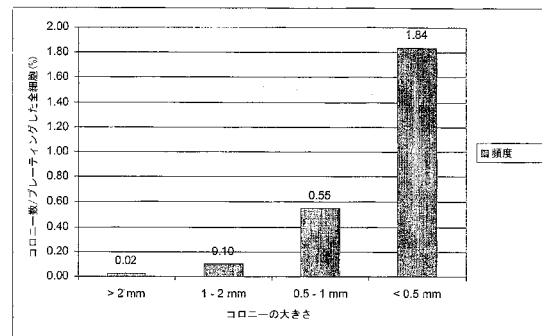
【 図 20 A 】



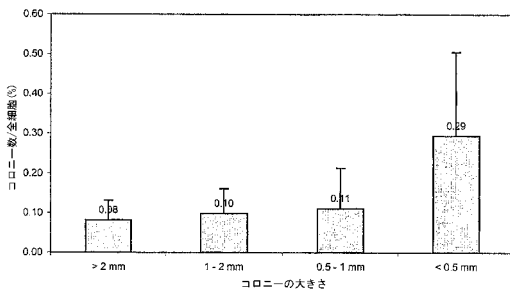
【 図 20 B 】



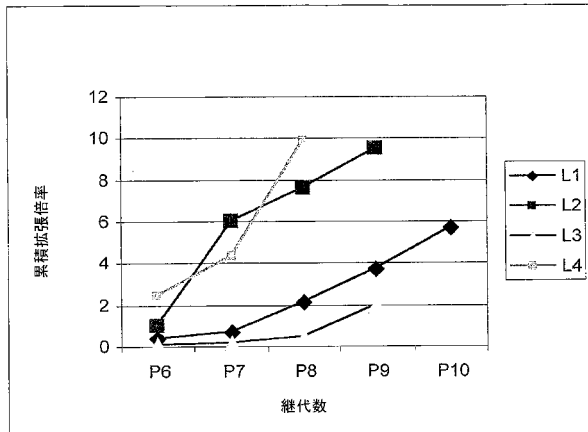
【 図 21 】



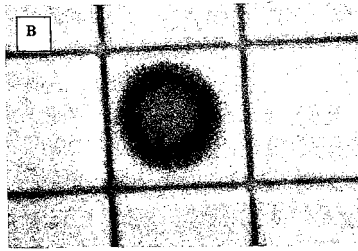
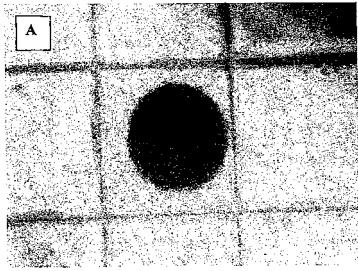
【 図 20 C 】



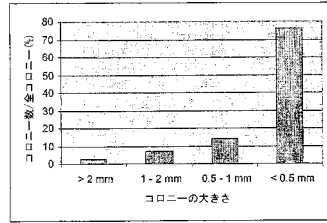
【 図 22 】



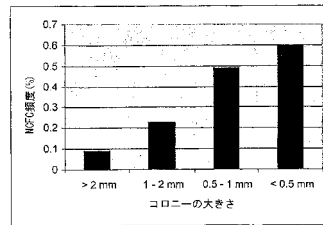
【図 2 3】



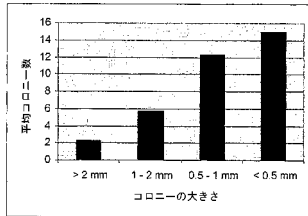
【図 2 4 B】



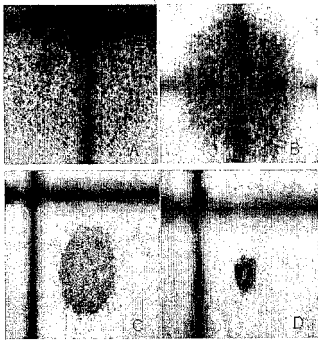
【図 2 4 C】



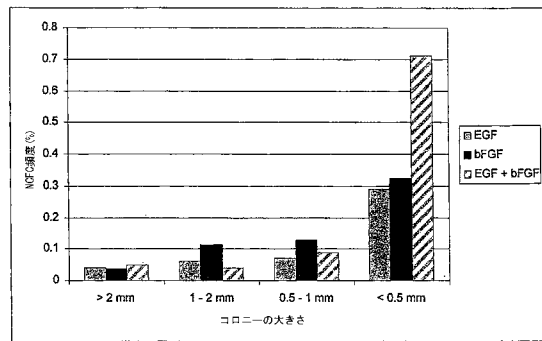
【図 2 4 A】



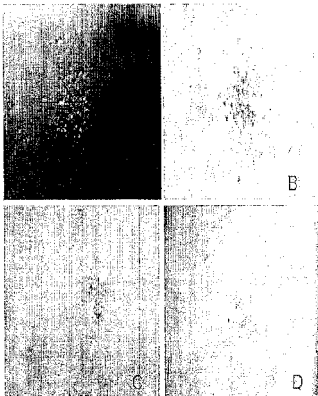
【図 2 5】



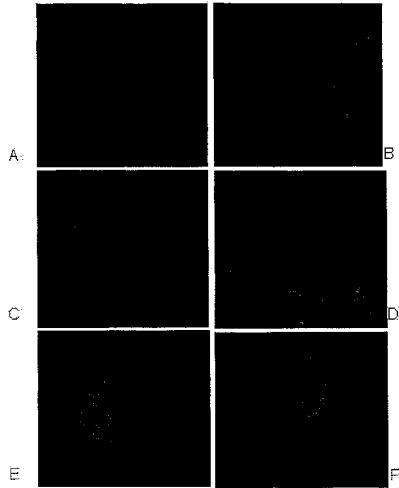
【図 2 7】



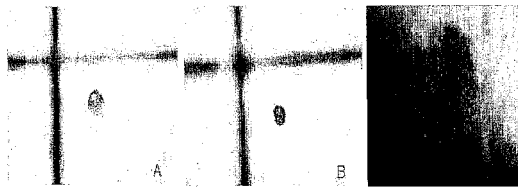
【図 2 6】



【 28 】



【 29 】



フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/545,281
(32)優先日 平成16年2月18日(2004.2.18)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/558,985
(32)優先日 平成16年4月5日(2004.4.5)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/577,599
(32)優先日 平成16年6月8日(2004.6.8)
(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ルイス シャロン エー .
カナダ国 プリティッシュ コロンビア バンクーバー カレドニア アベニュー 2396

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 Developmental Biology, (1996), Vol. 175, p. 1-13

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12Q 1/00
G01N 33/53
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed

专利名称(译)	神经集落形成试验		
公开(公告)号	JP4620052B2	公开(公告)日	2011-01-26
申请号	JP2006525584	申请日	2004-09-10
[标]申请(专利权)人(译)	干细胞技术公司		
申请(专利权)人(译)	干细胞技术公司Retiddo		
当前申请(专利权)人(译)	干细胞技术公司Retiddo		
[标]发明人	レイノルズブレントエー ルイスシャロンエー		
发明人	レイノルズブレントエー. ルイスシャロンエー.		
IPC分类号	C12Q1/04 C12Q1/02 G01N33/53 C12N5/02 C12N5/08 C12Q1/00 G01N33/50 G01N33/554 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/5073 G01N33/56966		
FI分类号	C12Q1/04 C12Q1/02 G01N33/53.D		
代理人(译)	清水初衷		
审查员(译)	三罗·哈马达		
优先权	60/502256 2003-09-12 US 60/509257 2003-10-08 US 60/545281 2004-02-18 US 60/558985 2004-04-05 US 60/577599 2004-06-08 US		
其他公开文献	JP2007504808A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了神经集落形成细胞 (NCFC) 测定。该测定使得可以区分神经干细胞和神经祖细胞。一方面, 本发明提供鉴定神经干细胞或神经祖细胞的方法, 包括以下步骤: (a) 将神经细胞悬浮在支持神经元细胞增殖的半固体培养基中 (B) 以允许在半固体培养基中产生菌落的密度接种细胞; (c) 培养接种的细胞直至可以鉴定菌落之间的大小差异; 和 (d) 评估菌落的大小作为更大的菌落更可能由神经干细胞产生, 并且较小的菌落可能由神经祖细胞产生。另一方面, 通过测定集落形态或抗原表达, 可以将NSCs与神经祖细胞区分开。

サイトカイン非含有NeuroCult(商標)	1700 µl
NCFC無血清培地(StemCell Technologies)	
NeuroCult(商標) Proliferation	330 µl
Supplements(StemCell Technologies)	
上皮増殖因子(10 µg/ml)	6.6 µl
細胞(2 x 10 ⁵ 細胞/ml)	25 µl
コラーゲン(ウシ, StemCell Technologies)	1300 µl
全量	3361 µl