

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/017795

発行日 平成29年6月22日 (2017.6.22)

(43) 国際公開日 平成28年2月4日 (2016.2.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 5/0775 (2010.01)	C12N 5/0775	2G045
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B063
C12N 5/071 (2010.01)	C12N 5/071	4B065
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4H045
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2016-538462 (P2016-538462)	(71) 出願人 516385996 PUREC株式会社 島根県出雲市塩冶町89番地1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/071770	(74) 代理人 100092783 弁理士 小林 浩
(22) 国際出願日 平成27年7月31日 (2015.7.31)	(74) 代理人 100120134 弁理士 大森 規雄
(31) 優先権主張番号 特願2014-157367 (P2014-157367)	(74) 代理人 100104282 弁理士 鈴木 康仁
(32) 優先日 平成26年8月1日 (2014.8.1)	(72) 発明者 伊谷 有未 東京都文京区本駒込5-71-8 駒込台 ハイック202
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 岡野 栄之 東京都文京区大塚5-31-10-103

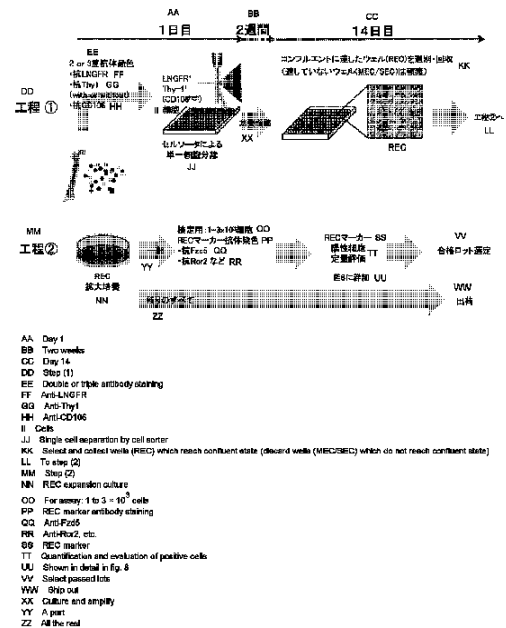
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト間葉系幹細胞の品質評価方法、ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法並びに増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団

(57) 【要約】

ヒト間葉系幹細胞の品質評価方法、ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法、増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団、並びに、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を得ること。

ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び培養する。同分離、選別及び培養した細胞集団においてRor2またはFzd5を発現している細胞の存在比率を定量して各細胞集団の合否判定を行う。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト間葉系幹細胞の品質評価方法であって、  
ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び培養し、  
同分離、選別及び培養した細胞集団において R o r 2 または F z d 5 を発現している細胞の存在比率を定量して各細胞集団の合否判定を行うヒト間葉系幹細胞の品質評価方法。

## 【請求項 2】

抗 R o r 2 モノクローナル抗体または抗 F z d 5 モノクローナル抗体を用いて R o r 2 または F z d 5 を発現している細胞を定量する請求項 1 に記載のヒト間葉系幹細胞の品質評価方法。

10

## 【請求項 3】

定量的 P C R を用いて R o r 2 の m R N A を発現している細胞を定量する請求項 2 に記載のヒト間葉系幹細胞の品質評価方法。

## 【請求項 4】

免疫染色により R o r 2 または F z d 5 を発現している細胞を定量する請求項 2 に記載のヒト間葉系幹細胞の品質評価方法。

## 【請求項 5】

ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法であって、  
ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び培養し、  
同分離、選別及び培養した細胞集団において R o r 2 または F z d 5 を発現している細胞の存在比率を定量して各細胞集団の合否判定を行い、合格の細胞集団のみを選別するヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

20

## 【請求項 6】

抗 R o r 2 モノクローナル抗体または抗 F z d 5 モノクローナル抗体を用いて R o r 2 または F z d 5 を発現している細胞を定量する請求項 5 に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

## 【請求項 7】

定量的 P C R を用いて R o r 2 の m R N A を発現している細胞を定量する請求項 6 に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

30

## 【請求項 8】

免疫染色により R o r 2 または F z d 5 を発現している細胞を定量する請求項 6 に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

## 【請求項 9】

前記増殖の早いヒト間葉系幹細胞として分離、選別及び培養する工程が、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗 L N G F R モノクローナル抗体および抗 T h y 1 モノクローナル抗体で染色した細胞をフローサイトメトリー（以下、「F C M」）で解析し、L N G F R T h y 1 共陽性細胞をセルソーティングする工程を含んでいる請求項 5 に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

40

## 【請求項 10】

前記増殖の早いヒト間葉系幹細胞として分離、選別及び培養する工程が、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗 R o r 2 モノクローナル抗体で染色した細胞を F C M で解析し、R o r 2 陽性細胞をセルソーティングする工程を含んでいる請求項 5 に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

## 【請求項 11】

骨髄、その他の各組織由来細胞から直接前記細胞集団を調製する工程を包含する請求項 9 または 10 に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

## 【請求項 12】

骨髄、その他の各組織由来細胞を付着培養することにより、前記細胞集団を調製する工程

50

を包含する請求項 10 記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

【請求項 13】

前記セルソーティングする工程が、培養プレートのウェルに陽性の各細胞を播種するものであり、その後さらに、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別する工程を包含する請求項 9 または 10 記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

【請求項 14】

ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び培養し、  
同分離、選別及び培養した細胞集団において R o r 2 または F z d 5 を発現している細胞の存在比率を定量して各細胞集団の合否判定を行い、合格の細胞集団のみを選別した増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団。

10

【請求項 15】

ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗 L N G F R モノクローナル抗体および抗 T h y 1 モノクローナル抗体で染色した細胞を F C M で解析し、L N G F R T h y 1 共陽性細胞をセルソーティングし、培養プレートのウェルに同共陽性の各細胞を播種し、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別した後、前記定量を行うことにより得られた請求項 14 記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団。

【請求項 16】

ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗 R o r 2 モノクローナル抗体で染色した細胞を F C M で解析し、R o r 2 陽性細胞をセルソーティングし、培養プレートのウェルに同陽性の各細胞を播種し、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別した後、前記定量を行うことにより得られた請求項 14 記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団。

20

【請求項 17】

抗 R o r 2 モノクローナル抗体である増殖の早いヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体。

【請求項 18】

クローン名が 7 C 9 である請求項 17 記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体。

30

【請求項 19】

抗 F z d 5 モノクローナル抗体である増殖の早いヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体。

【請求項 20】

クローン名が 6 F 5 である請求項 19 記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト間葉系幹細胞の品質評価方法、ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法、増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団、並びに、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体に関する。

40

【背景技術】

【0002】

間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells : M S C) は細胞採取に伴う倫理的問題が少なく、骨・軟骨・脂肪などへの多様な分化能を持つことから、造血幹細胞に次いで臨床応用が盛んに行われている体性幹細胞の一つである。後述する比較的簡単な手技により分離できることから、主に試験管内で軟骨・骨などへ分化誘導後に局所へ移植するなど、バイオマテリアルの材料として広く用いられている。

ヒト間葉系幹細胞の分離培養方法としては、非特許文献 1 で報告されている培養法が一

50

般的に用いられる。しかし従来法で得た細胞集団には劣化した（分化・増殖・遊走能を失った）夾雑細胞が多数混入しており、この夾雑物が本来はポテンシャルを持つはずの細胞に影響し、さらなる品質の劣化をまねく要因となる。

かかる従来の実情に鑑みて、増殖能・分化能・遊走能が従来よりも優れたヒト間葉系幹細胞の分離培養方法を確立した（非特許文献2、3、特許文献1）。これらの非特許文献2、3及び特許文献1によれば、CD271（LNGFR）とCD90（Thy1）に対する抗体を用い、ヒト骨髄、胎盤絨毛膜、脂肪組織、末梢血、歯髄などよりLNGFR Thy1共陽性細胞を選別することでヒト間葉系幹細胞を濃縮することができる。

【0003】

また選別したLNGFR Thy1共陽性細胞を単一細胞（クローン）培養し、増殖が速いロット（REC: Rapidly Expanding Clone）を選択することで、増殖能・分化能・遊走能にすぐれた高純度ヒト間葉系幹細胞を得ることが可能となった。

同方法で得た高純度ヒト間葉系幹細胞（REC）は従来法で得た間葉系幹細胞と比較し、増殖能・分化能・遊走能全てが1000倍以上の能力を持っていた。

上記ヒト間葉系幹細胞の分離培養方法の特徴によれば、単一細胞培養を行うことで夾雑細胞を含まない条件が形成され、細胞品質を維持した拡大培養が可能となる。特に遊走能を保持しているため、経静脈内投与が可能となり、骨・軟骨形成不全症等の重篤な全身性疾患への応用が期待できるようになった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2009-60840号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.

【非特許文献2】Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S, Niibe K, Suzuki S, Renault-Mihara F, Houlihan DD, Akazawa C, Okano H, Matsuzaki Y. (2013). LNGFR+THY-1+VCAM-1hi + Cells Reveal Functionally Distinct Subpopulations in Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Reports* 1, 152-165.

【非特許文献3】CGHアレイデータ Gene Expression Omnibus (GEO) (accession number: GSE34484)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

不死化細胞株とは異なり、RECといえども継代培養を長期に繰り返すことによる細胞品質の劣化は避けられないが、現時点では品質劣化の明確な指標が存在しない。

【0007】

本発明では、ヒト間葉系幹細胞の品質評価方法、ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法、増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団、並びに、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供することを目的とする。

【0008】

また、RECとそれ以外の劣化したクローン（MEC: Moderately Expanding Clone, SEC: Slowly Expanding Clone）とで遺伝子発現解析を行い、REC特異的遺伝子を選別した。さらに特異的遺伝子が発現する蛋白を認識する新規モノクローナル抗体の作製を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

10

20

30

40

50

上記目的を達成するため、本発明に係るヒト間葉系幹細胞の品質評価方法の特徴は、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び培養し、同分離、選別及び培養した細胞集団においてRor2またはFzd5を発現している細胞（の存在比率）を定量して各細胞集団の合否判定を行うことにある。同構成によれば、Ror2またはFzd5は、単独発現によりRECであるか否かを判定でき、培養細胞も利用可能であるため、判定をより簡便に行うことができる。なお、LNGFRは培養細胞ではRECであっても発現せず、Thy1は単独ではREC判定不能である。

#### 【0010】

上記構成において、抗Ror2モノクローナル抗体または抗Fzd5モノクローナル抗体を用いてRor2またはFzd5を発現している細胞を定量するとよい。この場合、定量的PCRを用いてRor2のmRNA発現を定量してもよいし、免疫染色によりRor2またはFzd5を発現している細胞を定量してもよい。ただしRor2は細胞外発現であるため、FCMの適用が容易であるが、Fzd5は細胞内発現であるため、免疫染色の目視評価等が適切である。

10

#### 【0011】

一方、上記目的を達成するため、ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法の特徴は、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び培養し、同分離、選別及び培養した細胞集団においてRor2またはFzd5を発現している細胞（の存在比率）を定量して各細胞集団の合否判定を行い、合格の細胞集団のみを選別することにある。

20

#### 【0012】

同構成において、抗Ror2モノクローナル抗体または抗Fzd5モノクローナル抗体を用いてRor2またはFzd5を発現している細胞を定量するとよい。ここで、定量的PCRを用いてRor2のmRNAを発現している細胞を定量してもよいし、免疫染色によりRor2またはFzd5を発現している細胞を定量してもよい。

#### 【0013】

また、前記増殖の早いヒト間葉系幹細胞として分離、選別及び培養する工程が、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗LNGFRモノクローナル抗体および抗Thy1モノクローナル抗体で染色した細胞をフローサイトメトリー（以下、「FCM」）で解析し、LNGFR Thy1共陽性細胞をセルソーティングする工程を含んでいてもよい。これに限らず、前記増殖の早いヒト間葉系幹細胞として分離、選別及び培養する工程が、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗Ror2モノクローナル抗体で染色した細胞をFCMで解析し、Ror2陽性細胞をセルソーティングする工程を含んでいてもよい。

30

#### 【0014】

さらに、上記各方法において、骨髄を始めとする各組織由来細胞から直接前記細胞集団を調製する工程を包含してもよい。一方、Ror2陽性細胞をセルソーティングする工程を含む方法では、骨髄をはじめとする組織由来細胞を付着培養することにより、前記細胞集団を調製する工程を包含してもよい。RECの培養細胞はLNGFR陽性とならない一方、Ror2陽性となるからである。

40

#### 【0015】

上記方法において、前記セルソーティングする工程が、培養プレートのウェルに陽性の各細胞を播種するものであり、その後さらに、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別する工程を包含させてもよい。

#### 【0016】

上記目的を達成するため、増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団の特徴は、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び培養し、同分離、選別及び培養した細胞集団においてRor2またはFzd5を発現している細胞（の存在比率）を定量して各細胞集団の合否判定を行い、合格の細胞集団のみを選別することにある。

50

## 【0017】

同特徴において、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗LNGFRモノクローナル抗体および抗Thy1モノクローナル抗体で染色した細胞をFCMで解析し、LNGFRThy1共陽性細胞をセルソーティングし、培養プレートのウェルに同共陽性の各細胞を播種し、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別した後、前記定量を行ってもよい。

## 【0018】

一方、同特徴において、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗Ror2モノクローナル抗体で染色した細胞をFCMで解析し、Ror2陽性細胞をセルソーティングし、培養プレートのウェルに同陽性の各細胞を播種し、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別した後、前記定量を行ってもよい。

10

## 【0019】

上記本発明に係る目的を達成するため、本発明に係る新規なモノクローナル抗体は、抗Ror2モノクローナル抗体であり、クローン名が7C9である。また、本発明に係る他の新規なモノクローナル抗体は、抗Fzd5モノクローナル抗体であり、クローン名が6F5である。

## 【発明の効果】

## 【0020】

特定した2つの遺伝子(Fzd5, Ror2:詳細は後述)がコードする蛋白の発現はRECに特異的であり、品質が劣化した細胞集団では発現が認められない。またRECの未分化状態維持に必須の遺伝子であり、1)発現阻害により細胞性能の劣化が誘導される、2)遺伝子の強制発現により未分化状態が延長する、などの結果から単なるバイオマーカーではなく、細胞機能に密接に関与し、細胞性能を担保する有効な指標である。

20

## 【0021】

このように、本発明によれば、ヒト間葉系幹細胞の品質評価方法、ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法、増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団、並びに、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供することが可能となった。

## 【0022】

本発明の他の目的、構成及び効果については、以下の発明の実施の形態の項から明らかになるであろう。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0023】

【図1】高品質間葉系幹細胞(REC)の選別、分離、培養及び品質評価工程を示す図である。

【図2】REC, MEC, SECを様々なパラメータで比較した結果である。

【図3】Ror2, Fzd5がREC特異的に発現することを示す図とグラフである。

【図4】Fzd5の阻害がRECの細胞性質の劣化を誘導することを示す図とグラフである。

【図5】Fzd5の強制発現がRECの未分化性を誘導することを示す写真とグラフである。

40

【図6】新規に作製した抗Fzd5モノクローナル抗体の染色性を示す写真とグラフである。

【図7】新規に作製した抗Ror2モノクローナル抗体の染色性を示す写真と図である。

【図8】REC特異的抗体を用いた、培養MSCの品質評価を行う模式図である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0024】

以下、図面を参照しながら、RECの選択、分離及び培養の工程の概要について説明し、続いて、各工程の趣旨と詳細について説明する。本発明では、工程1でRECの選択、分離及び培養を行い、工程2で培養されたRECの評価を行う。工程の組み合わせを表1

50

に例示するが、「プロセス評価欄」で「不可」とされているもの以外は実施しうる。以下、プロセス番号 P 1 , P 2 のものをまず例示する。

【 0 0 2 5 】

【 表 1 】

プロセス番号	工程1					工程2	プロセス評価	コメント
	細胞源	FCM	ソーティング	培養	ウェル処理	細胞評価		
P1	骨髄等の組織	LNGFR Thy1共陽性	単一	2週間培養	コンフルエントのウェルを選定	Ror2陽性	◎	細胞性能を担保した評価が可能
P2	骨髄等の組織	LNGFR Thy1共陽性	単一	2週間培養	コンフルエントのウェルを選定	Fzd5陽性	○	Fzd5は細胞内発現につき、FCM判定が行いにくい免疫染色等で細胞機能を担保した評価が可能
P3	骨髄等の組織	LNGFR Thy1共陽性	単一	2週間培養	コンフルエントのウェルを選定	Thy1陽性	不可	THY1はMEC,SECでも発現するので評価にならない
P4	骨髄等の組織	LNGFR Thy1共陽性	単一	2週間培養	コンフルエントのウェルを選定	LNGFR陽性	不可	LNGFRは培養された細胞では発現しない
P5	骨髄等の組織	LNGFR Thy1共陽性	複数	2週間培養	コンフルエントのウェルを選定	Ror2陽性	△	REC以外の細胞がどの程度含まれているかが定量できるが、純度は低い
P6	骨髄等の組織	Ror2陽性	単一	2週間培養	コンフルエントのウェルを選定	Ror2陽性	○	Ror2を指標としたソーティングはLNGFR THY1共陽性と比較し濃縮率が低い
P7	骨髄等の組織	Ror2陽性	単一	2週間培養	コンフルエントのウェルを選定	Fzd5陽性	○	Fzd5は細胞内発現につき、FCM判定が行いにくい免疫染色等で細胞機能を担保した評価が可能
P8	骨髄等の組織	Fzd5陽性	単一	2週間培養	コンフルエントのウェルを選定	Ror2陽性	不可	Fzd5は細胞内発現につき、FCMでの検出が困難であり、細胞分離マーカーとしては使用しにくい
P9	骨髄等の組織	Ror2陽性	複数	2週間培養	コンフルエントのウェルを選定	Ror2陽性	△	REC以外の細胞がどの程度含まれているかが定量できるが、純度は低い
P10	付着培養細胞	LNGFR Thy1共陽性	単一	2週間培養	コンフルエントのウェルを選定	Ror2陽性	不可	LNGFRは培養された細胞では発現せず、THY1はREC以外でも発現している
P11	付着培養細胞	Ror2陽性	単一	2週間培養	コンフルエントのウェルを選定	Ror2陽性	○	細胞性能を担保した評価が可能
P12	付着培養細胞	Ror2陽性	単一	2週間培養	コンフルエントのウェルを選定	Fzd5陽性	○	Fzd5は細胞内発現につき、FCM判定が行いにくい免疫染色等で細胞機能を担保した評価が可能
P13	付着培養細胞	Fzd5陽性	単一	2週間培養	コンフルエントのウェルを選定	Ror2陽性	不可	Fzd5は細胞内発現につき、FCMでの検出が困難であり、細胞分離マーカーとしては使用しにくい
P14	付着培養細胞	Ror2陽性	複数	2週間培養	コンフルエントのウェルを選定	Ror2陽性	△	REC以外の細胞がどの程度含まれているかが定量できるが、純度は低い
P15	付着培養細胞	Ror2陽性	単一	なし	なし	なし	○	細胞評価をせずに利用

10

20

【 0 0 2 6 】

【 工程 1 】 図 1 に単クローン培養法による R E C 分離工程を例示する。

30

1) ヒト骨髄 (または脂肪・胎盤絨毛膜) より単核細胞を調製し、骨髄単核細胞を抗 L N G F R、抗 T h y 1 で染色する ( L N G F R T h y 1 共陽性細胞を L T 細胞とする。 )

2) フローサイトメトリー ( F C M、セルソータ ) を用い、 L N G F R 陽性・ T h y 1 陽性細胞を 9 6 穴培養プレートにクローンソート ( 1 ウェルに細胞 1 個ずつ播種すること、表 1 で「単一」と表記 ) を行う。

なお、抗 C D 1 0 6 モノクローナル抗体を加え、 L N G F R 陽性・ T h y 1 陽性かつ C D 1 0 6 強陽性の細胞をクローンソートしてもよい。

3) 単一細胞培養 2 週間後に培養プレートを顕微鏡下で撮影し、コンフルエントになったウェルを選別し、各ウェルに含まれる細胞を R E C ( Rapidly Expanding Cells ) とする。遅れて増殖しているウェル M E C / S E C ( Moderately/Slowly Expanding Cells ) は破棄する。

40

4) R E C として選別した各ウェルから細胞をウェル毎に別々に回収する。 1 ウェルから回収した R E C を 1 ロットとする。

【 0 0 2 7 】

【 工程 2 】 図 1 に、さらに R E C マーカー ( 抗 R o r 2 ・抗 F z d 5 ) による培養細胞の評価を示す。

1) 9 6 穴プレートから回収した R E C を各ウェル毎に培養皿または培養フラスコに移入し、コンフルエントになるまで培養する ( 拡大培養 ) 。

2) 拡大培養後、全ロットから付着増殖した細胞を回収し、各ロットの一部 ( 1 - 3 × 1

50

0<sup>3</sup>個程度)の細胞をとりわけて、RECマーカー(抗Ror2・抗Fzd5)に対するモノクローナル抗体で単一染色を行う。

3) RECマーカー陽性細胞をフローサイトメトリーで解析し、回収細胞におけるRECマーカー陽性細胞の比率を求める(定量的PCRを用いてRor2のmRNA発現を定量してもよいし、顕微鏡により同比率をマニュアルにより求めてもよい)。

4) 上記陽性比率が一定値(例えば65%)以上のロット(細胞集団)を合格とする。

5) 合格ロットの細胞を凍結バイアルに封入し液体窒素中で保存する。

6) 凍結細胞したものを高品質ヒト間葉系幹細胞(製品)とする。

7) ユーザーはバイアルに入った細胞を融解後、培養皿またはフラスコ上で拡大培養を行うことで、最終的に $1 \times 10^{10}$ 以上の高純度間葉系幹細胞を安定して使用することが可能である。

10

#### 【0028】

上記において、LT細胞をクローンソーティングする代わりに、Ror2陽性細胞をクローンソーティングしてもよい(表1、P6, 7)。また、LT細胞、Ror2陽性細胞を選定し、96穴培養プレートの各ウェルに複数個播種してもよい(表1で「複数」と表記、P5, 9, 14)が、この場合は、クローンソートよりも純度が低下する。なお、コンフレントとは培養容器表面の90%以上を培養細胞が覆っている状態である。また、セミコンフレントとは培養容器表面の70-80%を培養細胞が覆っている状態である。使用する培養器具のサイズおよび種類は細胞の増殖速度に応じ適宜変更可能である。

#### 【0029】

上記実施形態では、骨髄を始めとする各組織由来細胞から直接前記細胞集団を調製したが、Ror2陽性細胞でソーティングする場合は、骨髄をはじめとする組織由来細胞を付着培養することにより、前記細胞集団を調製してもよい(表1、P10-15、「付着培養細胞」と表記)。この場合、骨髄単核細胞を10-20%血清+bFGF添加培地(37、1-5%CO<sub>2</sub>)上に播種して約2週間培養し、培養後に出現する繊維芽細胞様の付着細胞(CFU-F)を回収する。細胞集団を調製する工程は、骨髄をコラゲナーゼで処理する工程を包含してもよい。また、同工程は、G-CSF投与後の末梢血から細胞集団を調製するようによい。

20

#### 【0030】

なお、出荷前の評価(工程2の2), 3)は必ずしも必要ではなく、表1プロセスP15の如く、付着培養細胞を利用し、Ror2陽性のものをFCMでソーティングにより分離し、必要に応じて拡大培養し、これを[工程2]の5)以降の処理により出荷してもよい。

30

#### 【0031】

ここで、図2を参照しながら、RECとMEC/SECの細胞性能を比較する。REC, MEC, SECの細胞性能を様々なパラメータで比較した結果を示す。

同図Aは、ヒト骨髄単核細胞をLNGFRおよびThy1に対する抗体で染色後、FCM解析を行った結果である。楕円で囲まれた部分がLT細胞である。

同図Bは、LT細胞を96穴プレートに単一細胞分離(クローンソート)することの模式図である。

40

同図Cは、単一細胞培養後の細胞数を定期的に計測した結果を示すグラフである。RECはMEC/SECと比較し増殖速度が速く、約2週間で $0.5 - 1 \times 10^4$ 個まで増殖する。 $0.5 - 1 \times 10^4$ 個は96穴プレートのウェルがコンフレントになる数である。

同図Dは、REC・MEC・SECを骨・脂肪へ分化誘導した後、骨・脂肪細胞に特異的な遺伝子発現を定量PCRにて計測した結果を示す。RECはMEC, SECと比較し、特に脂肪分化能が高いことが示された。

同図Eは、REC・MEC・SECを再度96穴プレートにクローンソート後、2次コロニーを形成したウェルの数を比較した結果のグラフである。2次コロニーの形成は未分化状態の目安とされる自己複製能の指標である。RECの約33%が2次コロニーを形成するのに対し、MEC/SECはごく僅かなコロニーしか形成されない。

50

同図 F は、Luc (ルシフェラーゼ) 遺伝子発現ベクターを導入した以下の細胞集団、W B M (通常法で得た M S C、W B M は Whole Bone Marrow の略称である)、R E C、M E C / S E C、および陰性対照群としてルシフェラーゼで標識していない W B M (Luc(-) Cultured MSC) をそれぞれ免疫不全マウスに対し経静脈的に投与後に、Luc の基質であるルシフェリンを腹腔内投与し、ルシフェラーゼの発光を体外から検出できる装置 (IVIS) を用いて、移植 2 4 時間後に観察した結果を示す。上段) グラフは各マウスにおける Luc 発光量を数値化し、W B M ・ M S C 移植した群を 100% とした時の他の細胞を移植したマウスの発光比率 (%) をプロットしたものである。下段) 画像は各群のレシピエントマウスにおける Luc の発光をイメージ化したものである。いずれの結果からも、R E C を移植したマウスは肺での発光量が極端に低いことから、R E C は肺毛細血管にほとんどトラップされないのに対し、M E C / S E C は W B M (通常法で得た培養 M S C) とほぼ同等に補足され、肺中にとどまっていることがわかる。

10

以上の結果を総合すると、R E C は増殖能・分化能・遊走能ともに優れた細胞集団であり、特に後述する難治疾患への全身投与が可能という点で、新鮮骨髄中の M S C に匹敵する遊走性を維持していることがポイントとなる。

#### 【0032】

以上を含め、発明者らの実験によれば、R E C は通常 M S C と比較し以下の特徴を持つ。

1. 形態的に極めて均一な細胞集団である
2. 細胞老化が見られない
3. 分裂速度が早く、未分化性を維持したまま培養増幅が可能
4. 分化能が高く骨・脂肪へ分化させやすい細胞集団
5. 遊走性を維持している

20

R E C はヒト M S C のうち最も未分化な細胞集団であり、骨髄中の M S C に最も近い性質を持つ。また M E C / S E C あるいは通常法で得た M S C と比較し、高い分化・増殖・遊走能にすぐれた、新鮮かつ変異の少ない、細胞性能が保証された細胞集団である。

#### 【0033】

続いて、図 3 を参照しながら、未分化 M S C (R E C) 特異的遺伝子 R o r 2, F z d 5 の同定について説明する。

R E C, M E C, S E C それぞれで発現する遺伝子の発現レベルを DNA アレイ法により比較し、Wnt (ウイント) 受容体の一つである F z d 5 およびその共受容体である R o r 2 が R E C 特異的であることを確認した。

30

同図 A は、R E C, M E C, S E C それぞれにおける定量的 PCR による R o r 2 m R N A の発現比較である。

同図 B は R E C, M E C, S E C それぞれにおける定量的 PCR による F z d 5 m R N A の発現比較である。

同図 C はウエスタンブロッティング法による F z d 5 蛋白発現の比較である。

同図 D は、蛍光免疫染色法による F z d 5 蛋白の細胞内局在比較写真である。

以上、複数の解析方法で評価した結果、F z d 5 と R o r 2 の発現は R E C 特異的であることが確認できた。従って F z d 5 および R o r 2 それぞれの発現を検出し定量化すれば、R E C の細胞品質評価の指標として有効と考えられる。また、新規に作製した抗 F z d 5 モノクローナル抗体と抗 R o r 2 モノクローナル抗体は、フローサイトメトリー、ウエスタンブロッティング、蛍光免疫染色いずれの手法においても対象とするタンパク抗原の検出と定量化が可能である。

40

#### 【0034】

次に、図 4 を参照しながら、F z d 5 の loss of function による細胞老化誘導について検討する。

RNA インタフェース法は対象とする m R N A に対し相補的な配列を持つ短い RNA (shRNA) を細胞内に導入し、対象とする m R N A を破壊することで目的遺伝子の機能を調べる手法である。F z d 5 に対し相補的な配列を持つ shRNA (shFZD5) により F z d 5 m R N

50

Aを破壊した場合のRECの細胞性質を対照群（shCTRL：Fzd5に対し相補的ではないランダム配列のshRNA）と比較した一連の実験結果を示す。

同図Aは、shFZD5またはshCTRLをそれぞれRECに導入した後、Fzd5のmRNA量を定量的PCR法にて定量化したグラフである。対照群（shCTRL、ショートヘアピンコントロール）におけるFzd5 mRNA量を100とした場合、shFZD5を強制発現したRECではFzd5のmRNA量が約40%に低下していた。

同図Bは、shFZD5またはshCTRLをそれぞれRECに導入した後、対照群の細胞数を1とした時のshFZD5強制発現群の細胞数を縦軸、shRNA導入後の日数を横軸にプロットしたグラフである。shFZD5を発現したRECは対照群と比較し、細胞数の急激な減少が認められ、Rzd5の阻害により増殖能の低下が誘導されることが示唆された。

10

同図Cは、shFZD5またはshCTRLをそれぞれRECに導入後、脂肪細胞へ分化誘導し、培養14日目にOil-Red-Oで脂肪滴を染色した画像である。対照群と比較しFzd5を阻害すると脂肪分化能の低下が認められた。

同図Dは、細胞老化の指標であるSA-β-gal活性は基質であるX-galを加えると青色に染色され検出できる。shFZD5またはshCTRLをそれぞれRECに導入後、x-gal染色を行った画像および各細胞集団におけるSA-β-gal活性を持つ細胞頻度をプロットしたグラフを示す。

同図Eは、細胞老化の指標であるp16（INK4a）のmRNA量を定量的PCR法により定量化したグラフである。対照群を100とした場合、shFZD5導入RECにおけるp16 mRNA量は約300であり、Fzd5の発現阻害により細胞老化が誘導されることが示された。

20

同図Fは、shFZD5またはshCTRLをそれぞれRECに導入後、各細胞集団に対し抗F-actin抗体にて細胞内染色を行いStress Fiberの形成を観察した画像、および同細胞集団それぞれに含まれる各細胞の面積（細胞サイズ）の平均値をプロットしたグラフを示す。

以上の結果から、RECにおけるFzd5の機能を阻害することにより、増殖能の低下、分化能の低下、細胞老化の誘導、Stress fiber形成による遊走性の低下と細胞サイズの増大が誘導され、MEC/SECと同じ性状に変化することから、Fzd5は単なるパイオマーカではなく、RECの細胞性能の維持を担保する機能分子と考えられる。

#### 【0035】

次に、図5を参照しながら、Fzd5のgain of functionによる長期増殖能維持について考察する。

30

Fzd5の全長cDNAをRECに強制発現することでFzd5 mRNAを恒常的に発現させたことによる細胞機能への影響を確認した。発現ベクターはFzd5 cDNAと蛍光蛋白GFP（Green Fluorescent Protein、緑色蛍光タンパク質）がタンデムに連なっており、Fzd5遺伝子導入細胞はGFPを同時に発現しているため蛍光顕微鏡を用いて導入した遺伝子の発現を確認できる。

同図Aは、蛍光顕微鏡によるGFP発現細胞の形態観察写真である。Fzd5 cDNAとGFPを導入した細胞集団（Fzd5）とGFP遺伝子のみを導入した対照群（CTRL）の遺伝子導入後28日目の細胞形態を撮影した画像である。

対照群では図中矢印で示した細胞老化の特徴であるサイズの大きい多極性細胞が多数出現しているのに対し、Fzd5発現RECはほぼ全てが細胞質の小さい双極性の形態を維持していた。

40

同図Bは、対照群の細胞数を1とした時のFzd5発現RECの細胞数を縦軸、遺伝子導入後の日数を横軸にプロットしたグラフである。対照群と比較し、Fzd5を強制的に発現させたRECでは増殖能が長期的に維持されていた。

以上の結果から、Fzd5を介したWntシグナル刺激により、未分化性を維持した状態で長期的な培養増幅が可能になることが見込まれる。

#### 【0036】

続いて、図6を参照しながら、ヒトFzd5に対する新規モノクローナル抗体の作製について説明する。

50

ヒト F z d 5 抗原の細胞外領域を免疫原とし、ホストマウスを免疫後、常法に従いハイブリドーマを作製し、F z d 5 遺伝子を発現させたBa/F3細胞でスクリーニングを行うことで、新規の抗 F z d 5 モノクローナル抗体（クローン名：6 F 5）を得た。

本抗体を用い様々な手法で F z d 5 蛋白が検出できるか否かの確認を行った。

同図 A は、F z d 5 の細胞外領域を強制発現させたBa/F3細胞に対し、Biotin標識した 6 F 5 抗体で染色後、ストレプトアビジン（SAV）-PEで蛍光標識しフローサイトメトリーで解析を行い、PEの蛍光強度を横軸にプロットしたヒストグラムを示す。図中のグレーで示したヒストグラムは一次抗体としてアイソタイプコントロールを加えた陰性コントロール、白抜きのヒストグラムは 6 F 5 で染色したサンプルのPE蛍光強度である。図中の横線で示した領域が F z d 5 陽性細胞領域であり、数値は陽性率（%）を表す。

10

同図 B は、R E C の異なる 3 クローンより細胞内蛋白を調製し、6 F 5 を一次抗体として F z d 5 蛋白を検出したウエスタンブロッティングの結果を示す。陰性コントロールとして、サル腎臓由来の細胞株COS7より調製した細胞内蛋白を用いた。

同図 C は、R E C 細胞に対し 6 F 5 -Biotinを一次抗体として染色後、ストレプトアビジン（SAV）-Alexa555にて蛍光ラベル後に蛍光顕微鏡で観察、撮影した画像である。抗 F z d 5 抗体（6 F 5）はフローサイトメトリー、ウエスタンブロッティング、蛍光免疫染色の全てに利用可能であった。

#### 【0037】

次に、図 7 を参照しながら、ヒト R o r 2 抗原に対する新規モノクローナル抗体の作製について説明する。

20

ヒト R o r 2 抗原を免疫原とし、新規に抗 R o r 2 抗体（クローン名：7 C 9）を作製した。同クローンを用い、

同図 A は R E C に対し、1 次抗体として 7 C 9 -Biotinで染色後、SAV-PEで蛍光ラベルし、フローサイトメトリーを用いてPE蛍光の検出を行った結果を示す。1 次抗体としてアイソタイプコントロール抗体を加えたサンプルを陰性コントロールとする。縦軸にFITC蛍光（染色していないため全て陰性）、横軸にPE蛍光をプロットした 2 次元ドットプロットである。陰性コントロール群ではPE蛍光を発する細胞がほぼ含まれない領域（図中の台形で囲まれた部分：0 . 0 1 1 %）がClone 7 C 9 で染色したサンプルにおいてPE蛍光を発現している細胞集団（6 9 . 3 %）であった。

同図 B は、R E C に対し 7 C 9 -Biotinを 1 次抗体として免疫染色を行い、Streptavidin-Alexa488で蛍光標識後に R o r 2 蛋白の発現を蛍光顕微鏡にて観察・撮影した画像である。R E C の大部分が R o r 2 蛋白を発現していることが確認された。

30

同図 C は、新鮮骨髄細胞に対し L N G F R -APC, T h y 1 -FITC, R o r 2 -PE（それぞれの抗原に対するモノクローナル抗体）による 3 重染色を行い、フローサイトメトリー解析を行った結果を示す。左は L N G F R の発現を縦軸に、T h y 1 の発現を横軸にプロットした図であり、四角枠で囲まれた部分はヒト M S C が高頻度に含まれる L N G F R T h y 1 共陽性細胞集団である。右 2 つの図は L N G F R T h y 1 共陽性細胞集団のみを抽出後、横軸を細胞の大きさの指標であるFSC、縦軸にSAV-PEで標識した抗 R o r 2 -Biotin抗体（7 C 9）のPE蛍光をプロットした図である。四角枠で囲まれた部分は陰性コントロールを元に設定した R o r 2 陽性領域であり、数値は陽性率（%）を表す。Clone 7 C 9 を用いた場合、L N G F R T h y 1 共陽性細胞の 9 2 . 3 % が R o r 2 陽性であり、L N G F R T h y 1 に代わるMCSの選別マーカーとして用いることが可能である。

40

新規に作製した抗 R o r 2 モノクローナル抗体を用いることで、フローサイトメトリー及び蛍光免疫染色により R o r 2 蛋白の検出と定量化が可能である（図 7 A , B）。

さらに新規に作製した抗 R o r 2 は骨髄中に含まれる M S C のマーカーとしても利用可能である（図 7 C）。

#### 【0038】

次に、図 8 を参照しながら、抗 R o r 2 抗体または抗 F z d 5 抗体を用いた、細胞品質の評価手順について説明する。

通常法である付着培養を行ったヒト M S C（または継代培養を行った R E C）を回収し

50

、REC特異的なモノクローナル抗体（抗Ror2抗体または抗Fzd5抗体）で染色する。

フローサイトメトリーにて陽性細胞の頻度（含有％）を計測する。その代わりに、蛍光顕微鏡下で陽性細胞の頻度（含有％）を計測してもよい。これらの計測により、その細胞集団にどれだけのRECが含まれているかを定量化することができるため、対象とするMSCがどの程度の分化・増殖・遊走能を持つか、細胞品質を評価することが可能である。発明者らの実験によれば、RECのRor2陽性率は5ロットで72%±8.9%であった。よって、例えば、最低値である63%以上や、65%以上を合否判定の基準値としてもよい。

【産業上の利用可能性】

【0039】

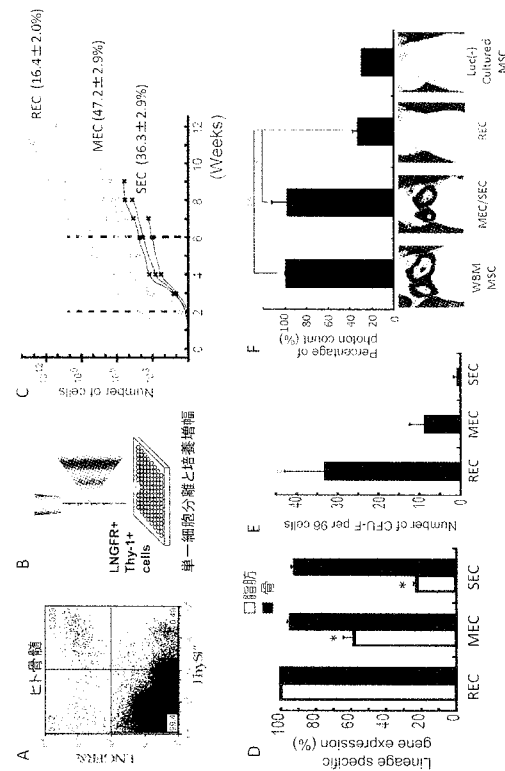
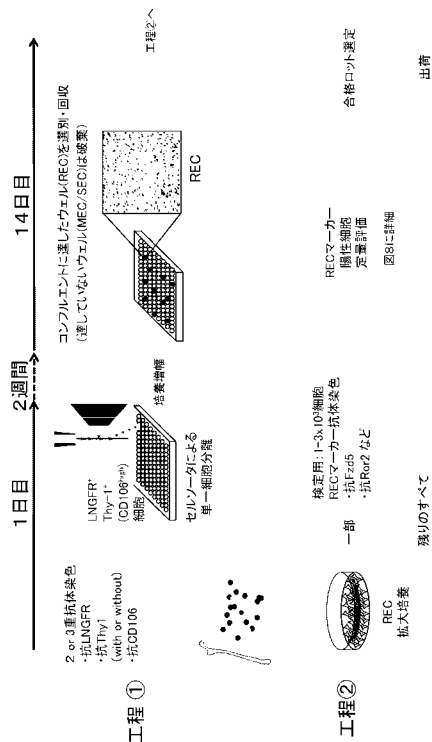
本発明によれば、全身性疾患への治療に利用することができるヒト間葉系幹細胞を効率良く分離培養する技術を提供すること、および得られた細胞集団が移植に適しているか、薬効性を示すかの基準となる品質評価を行うことが可能になった。

新規に作製した高純度間葉系幹細胞に特化した染色性を示すモノクローナル抗体のうち、細胞分離に適した候補はナノ磁気微粒子と結合させることによって、間葉系幹細胞分離用試薬として製品化できる。また、分離した間葉系幹細胞の品質を検定するための細胞評価用の試薬として、蛍光物質結合抗体、細胞染色用試薬が実用化できる。

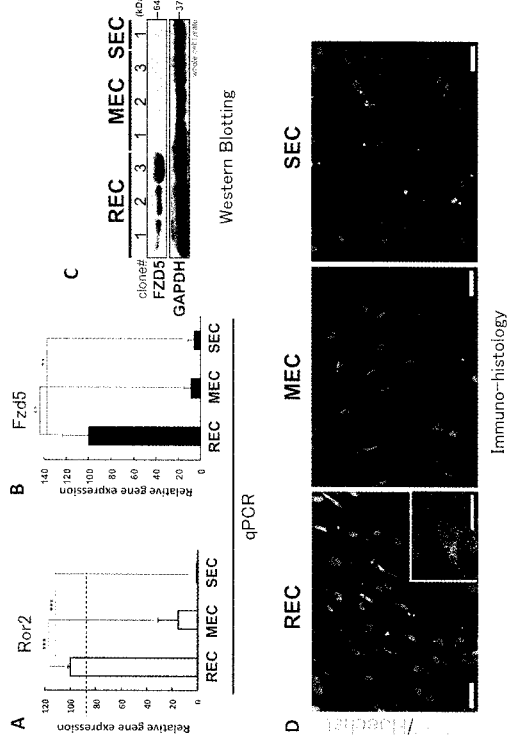
間葉系幹細胞は、従来行われてきたバイオマテリアルの材料として、あるいはその多分化能を生かし、重症筋無力症、慢性リウマチ症等への投与、さらには脊髄損傷、心・血管、慢性肝不全を始めとする重度の疾患治療に対する細胞治療を行う際に組織の場（ニッチ）を整える支持細胞として共移植するなど、様々な応用が期待される。特に、遊走性を維持しているRECを用いることにより、これまで治療法が存在しなかった低フォスファターゼ症をはじめとする全身性骨・軟骨疾患等の代謝性疾患、GVHDの治療など経静脈的に投与する必要のある全ての疾患に適用すれば、これまでにない治療効果が見込まれる。

【図1】

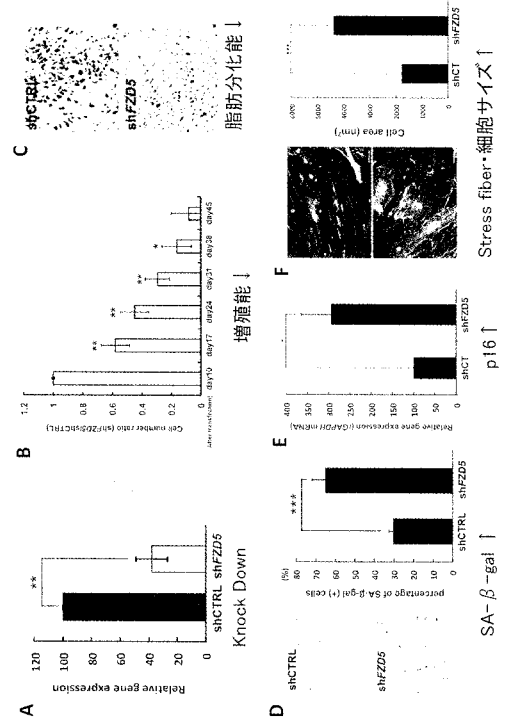
【図2】



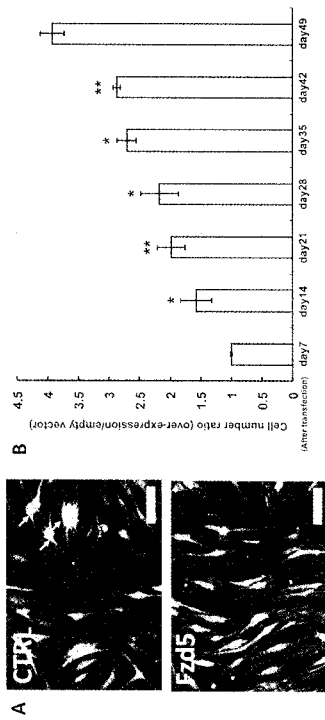
【 図 3 】



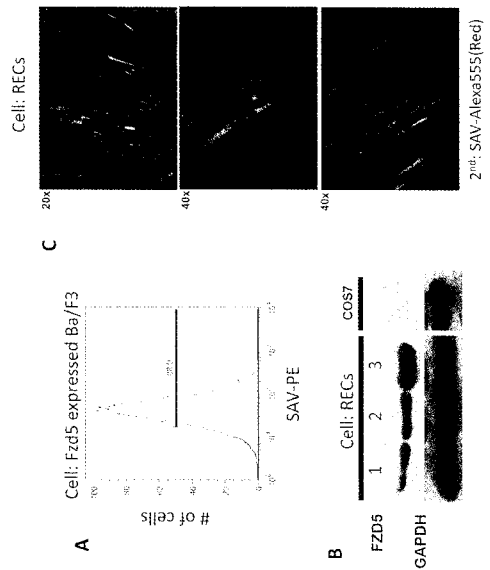
【 図 4 】



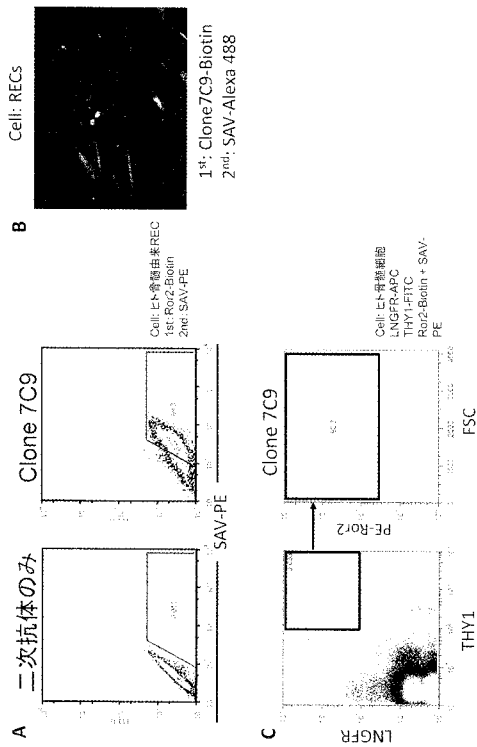
【 図 5 】



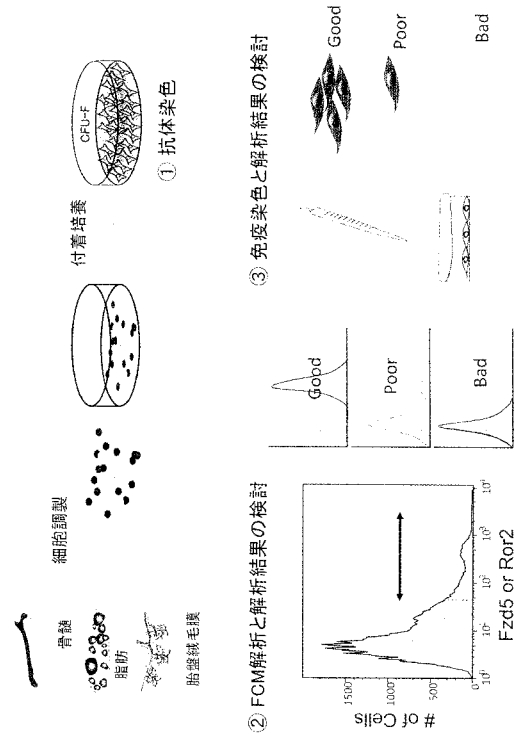
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成28年6月1日 (2016.6.1)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

ヒト間葉系幹細胞の品質評価方法であって、  
 ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び培養し、  
 同分離、選別及び培養した細胞集団において R o r 2 を発現している細胞の存在比率を定量して各細胞集団の合否判定を行うヒト間葉系幹細胞の品質評価方法。

【 請求項 2 】

抗 R o r 2 モノクローナル抗体を用いて R o r 2 を発現している細胞を定量する請求項 1 に記載のヒト間葉系幹細胞の品質評価方法。

【 請求項 3 】

定量的 P C R を用いて R o r 2 の mRNA を発現している細胞を定量する請求項 2 に記載のヒト間葉系幹細胞の品質評価方法。

【 請求項 4 】

免疫染色により R o r 2 を発現している細胞を定量する請求項 2 に記載のヒト間葉系幹細胞の品質評価方法。

【 請求項 5 】

ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法であって、

ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び培養し、  
同分離、選別及び培養した細胞集団においてRor2を発現している細胞の存在比率を定量して各細胞集団の合否判定を行い、合格の細胞集団のみを選別するヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

【請求項6】

抗Ror2モノクローナル抗体を用いてRor2を発現している細胞を定量する請求項5に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

【請求項7】

定量的PCRを用いてRor2のmRNAを発現している細胞を定量する請求項6に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

【請求項8】

前記増殖の早いヒト間葉系幹細胞として分離、選別及び培養する工程が、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗LNGFRモノクローナル抗体および抗Thy1モノクローナル抗体で染色した細胞をフローサイトメトリー（以下、「FCM」）で解析し、LNGFR Thy1共陽性細胞をセルソーティングする工程を含んでいる請求項5に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

【請求項9】

前記増殖の早いヒト間葉系幹細胞として分離、選別及び培養する工程が、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗Ror2モノクローナル抗体で染色した細胞をFCMで解析し、Ror2陽性細胞をセルソーティングする工程を含んでいる請求項5に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

【請求項10】

その他の各組織由来細胞から直接前記細胞集団を調製する工程を包含する請求項8または9に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

【請求項11】

骨髄、その他の各組織由来細胞を付着培養することにより、前記細胞集団を調製する工程を包含する請求項10に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

【請求項12】

前記セルソーティングする工程が、培養プレートのウェルに陽性の各細胞を播種するものであり、その後さらに、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別する工程を包含する請求項8または9に記載のヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法。

【請求項13】

ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗Ror2モノクローナル抗体で染色した細胞をFCMで解析し、Ror2陽性細胞をセルソーティングし、培養プレートのウェルに同陽性の各細胞を播種し、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別した後、

同分離及び選別した細胞集団においてRor2を発現している細胞の存在比率を定量して各細胞集団の合否判定を行い、合格の細胞集団のみを選別した増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団。

【請求項14】

ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗Ror2モノクローナル抗体で染色した細胞をFCMで解析し、Ror2陽性細胞をセルソーティングし、培養プレートのウェルに同陽性の各細胞を播種し、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別した後、

同分離及び選別した細胞集団においてFzd5を発現している細胞の存在比率を定量して各細胞集団の合否判定を行い、合格の細胞集団のみを選別した増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団。

【請求項15】

前記合否判定が前記存在比率が63%以上の細胞を合格とするものである請求項13または14記載の増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0001】

技術分野

[0001]

本発明は、ヒト間葉系幹細胞の品質評価方法、ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法並びに増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団に関する。

背景技術

[0002]

間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells:MSC)は細胞採取に伴う倫理的問題が少なく、骨・軟骨・脂肪などへの多様な分化能を持つことから、造血幹細胞に次いで臨床応用が盛んに行われている体性幹細胞の一つである。後述する比較的簡単な手技により分離できることから、主に試験管内で軟骨・骨などへ分化誘導後に局所へ移植するなど、バイオマテリアルの材料として広く用いられている。

ヒト間葉系幹細胞の分離培養方法としては、非特許文献1で報告されている培養法が一般的に用いられる。しかし従来法で得た細胞集団には劣化した(分化・増殖・遊走能を失った)夾雑細胞が多数混入しており、この夾雑物が本来はポテンシャルを持つはずの細胞に影響し、さらなる品質の劣化をまねく要因となる。

かかる従来の実情に鑑みて、増殖能・分化能・遊走能が従来よりも優れたヒト間葉系幹細胞の分離培養方法を確立した(非特許文献2、3、特許文献1)。これらの非特許文献2、3及び特許文献1によれば、CD271(LNGFR)とCD90(Thy1)に対する抗体を用い、ヒト骨髄、胎盤絨毛膜、脂肪組織、末梢血、歯髄などよりLNGFR Thy1共陽性細胞を選別することでヒト間葉系幹細胞を濃縮することができる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0003

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0003】

発明が解決しようとする課題

[0006]

不死化細胞株とは異なり、RECといえども継代培養を長期に繰り返すことによる細胞品質の劣化は避けられないが、現時点では品質劣化の明確な指標が存在しない。

[0007]

本発明では、ヒト間葉系幹細胞の品質評価方法、ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法並びに増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団を提供することを目的とする。

[0008]

また、RECとそれ以外の劣化したクローン(MEC: Moderately Expanding Clone, SEC: Slowly Expanding Clone)とで遺伝子発現解析を行い、REC特異的遺伝子を選別した。さらに特異的遺伝子が発現する蛋白を認識する新規モノクローナル抗体の作製を目的とする。

課題を解決するための手段

[0009]

上記目的を達成するため、本発明に係るヒト間葉系幹細胞の品質評価方法の特徴は、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び

培養し、同分離、選別及び培養した細胞集団においてRor2を発現している細胞（の存在比率）を定量して各細胞集団の合否判定を行うことにある。同構成によれば、Ror2は、単独発現によりRECであるか否かを判定でき、培養細胞も利用可能であるため、判定をより簡便に行うことができる。なお、LNGFRは培養細胞ではRECであっても発現せず、Thy1は単独ではREC判定不能である。

[0010]

上記構成において、抗Ror2モノクローナル抗体を用いてRor2を発現している細胞を定量するとよい。この場合、定量的PCRを用いてRor2のmRNA発現を定量してもよいし、免疫染色によりRor2を発現している細胞を定量してもよい。ただしRor2は細胞外発現であるため、FMCの適用が容易である。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0004】

[0011]

一方、上記目的を達成するため、ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法の特徴は、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、増殖の早いヒト間葉系幹細胞を分離、選別及び培養し、同分離、選別及び培養した細胞集団においてRor2を発現している細胞（の存在比率）を定量して各細胞集団の合否判定を行い、合格の細胞集団のみを選別することにある。

[0012]

同構成において、抗Ror2モノクローナル抗体を用いてRor2を発現している細胞を定量するとよい。ここで、定量的PCRを用いてRor2のmRNAを発現している細胞を定量してもよいし、免疫染色によりRor2を発現している細胞を定量してもよい。

[0013]

また、前記増殖の早いヒト間葉系幹細胞として分離、選別及び培養する工程が、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗LNGFRモノクローナル抗体および抗Thy1モノクローナル抗体で染色した細胞をフローサイトメトリー（以下、「FCM」）で解析し、LNGFR Thy1共陽性細胞をセルソーティングする工程を含んでもよい。これに限らず、前記増殖の早いヒト間葉系幹細胞として分離、選別及び培養する工程が、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗Ror2モノクローナル抗体で染色した細胞をFCMで解析し、Ror2陽性細胞をセルソーティングする工程を含んでもよい。

[0014]

さらに、上記各方法において、骨髄を始めとする各組織由来細胞から直接前記細胞集団を調製する工程を含んでもよい。一方、Ror2陽性細胞をセルソーティングする工程を含む方法では、骨髄をはじめとする組織由来細胞を付着培養することにより、前記細胞集団を調製する工程を含んでもよい。RECの培養細胞はLNGFR陽性とならない一方、Ror2陽性となるからである。

[0015]

上記方法において、前記セルソーティングする工程が、培養プレートのウ

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0005】

エルに陽性の各細胞を播種するものであり、その後さらに、培養によりコンフルエントと

なったウェルの細胞を分離及び選別する工程を包含させてもよい。

[ 0 0 1 6 ]

上記目的を達成するため、増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団の特徴は、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗 R o r 2 モノクローナル抗体で染色した細胞を F C M で解析し、R o r 2 陽性細胞をセルソーティングし、培養プレートのウェルに同陽性の各細胞を播種し、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別した後、同分離及び選別した細胞集団において R o r 2 を発現している細胞（の存在比率）を定量して各細胞集団の合否判定を行い、合格の細胞集団のみを選別することにある。

[ 0 0 1 7 ]

また、増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団の他の特徴は、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、抗 R o r 2 モノクローナル抗体で染色した細胞を F C M で解析し、R o r 2 陽性細胞をセルソーティングし、培養プレートのウェルに同陽性の各細胞を播種し、培養によりコンフルエントとなったウェルの細胞を分離及び選別した後、同分離及び選別した細胞集団において F z d 5 を発現している細胞（の存在比率）を定量して各細胞集団の合否判定を行い、合格の細胞集団のみを選別することにある。

[ 0 0 1 8 ]

なお、上記各細胞集団の特徴において、前記合否判定を前記存在比率が 6 3 % 以上の細胞を合格とするものとしてもよい。

[ 0 0 1 9 ]

発明の効果

[ 0 0 2 0 ]

特定した 2 つの遺伝子（ F z d 5 , R o r 2 : 詳細は後述）がコードする蛋白の発現は R E C に特異的であり、品質が劣化した細胞集団では発現が認められない。また R E C の未分化状態維持に必須の遺伝子であり、1) 発現阻害により細胞性能の劣化が誘導される、2) 遺伝子の強制発現により未分

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 0 0 6 】

化状態が延長する、などの結果から単なるバイオマーカーではなく、細胞機能に密接に関与し、細胞性能を担保する有効な指標である。

[ 0 0 2 1 ]

このように、本発明によれば、ヒト間葉系幹細胞の品質評価方法、ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法並びに増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団を提供することが可能となった。

[ 0 0 2 2 ]

本発明の他の目的、構成及び効果については、以下の発明の実施の形態の項から明らかになるであろう。

図面の簡単な説明

[ 0 0 2 3 ]

[ 図 1 ] 高品質間葉系幹細胞（ R E C ）の選別、分離、培養及び品質評価工程を示す図である。

[ 図 2 ] R E C , M E C , S E C を様々なパラメータで比較した結果である。

[ 図 3 ] R o r 2 , F z d 5 が R E C 特異的に発現することを示す図とグラフである。

[ 図 4 ] F z d 5 の阻害が R E C の細胞性質の劣化を誘導することを示す図とグラフである。

[ 図 5 ] F z d 5 の強制発現が R E C の未分化性を誘導することを示す写真とグラフである。

[ 図 6 ] 新規に作製した抗 F z d 5 モノクローナル抗体の染色性を示す写真とグラフである。

[ 図 7 ] 新規に作製した抗 R o r 2 モノクローナル抗体の染色性を示す写真と図である。

[ 図 8 ] R E C 特異的抗体を用いた、培養 M S C の品質評価を行う模式図である。

発明を実施するための形態

[ 0 0 2 4 ]

以下、図面を参照しながら、R E C の選択、分離及び培養の工程の概要について説明し、続いて、各工程の趣旨と詳細について説明する。本発明では、工程 1 で R E C の選択、分離及び培養を行い、工程 2 で培養された R E C

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/JP2015/071770
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N5/0775(2010.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, C12P1/00(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/0775, C07K16/28, C12N15/02, C12P1/00, C12Q1/04, C12P21/08  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAlplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/WPIX(STN), PubMed, JSTPlus(JDreamIII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	MABUCHI Y. et al., LNGFR <sup>+</sup> THY-1 <sup>+</sup> VCAM-1 <sup>hi+</sup> cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells, STEM CELL REPORTS (2013), Vol.1, p.152-165	14-16/1,2, 4-6,8,9, 11-13
X/Y	Ken'ichi MIYAMOTO et al., "Hito Kan'yokei Kansaibo Tokuiteki miRNA ni yoru Mibunka Jotai Iji Kiko no Kaimei", Regenerative Medicine special extra issue, 07 January 2014 (27.01.2014), vol.13 suppl, page 317	14-16/1,2, 4-6,8,9, 11-13
X	JP 2009-527485 A (Wyeth), 30 July 2009 (30.07.2009), & US 2009/0047287 A1 & EP 1984395 A2 & WO 2007/098198 A2	17-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 September 2015 (11.09.15)		Date of mailing of the international search report 29 September 2015 (29.09.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/071770

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2009-513708 A (Oncomed Pharmaceuticals Inc.), 02 April 2009 (02.04.2009), & US 2007/0116701 A1 & EP 1961065 A2 & WO 2007/053577 A2	17-20/1, 2, 4-6, 8, 9, 11-13
Y	JP 2009-60840 A (Keio University), 26 March 2009 (26.03.2009), & US 2011/0053183 A1 & WO 2009/031678 A1	9
A	JP 2006-524508 A (Wyeth), 02 November 2006 (02.11.2006), & US 2005/0148506 A1 & EP 1613652 A2 & WO 2004/094641 A2	1-20
A	PITTENGER M, et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, SCIENCE (1999), Vol.284, p.143-147	1-20
A	SHEN Y, et al., Bone marrow mesenchymal stem cell-derived Wnt5a inhibits leukemia cell progression in vitro via activation of the non-canonical Wnt signaling pathway, ONCOLOGY LETTERS (2014.5.7), Vol.8, p.85-90	1-20
A	XIN H, et al., The Wnt5a/Ror2 pathway is associated with determination of the differentiation fate of bone marrow mesenchymal stem cells in vascular calcification, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE (2013), Vol.31, p.583-588	1-20

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2015/071770	
<b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b> Int.Cl. C12N5/0775(2010.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, C12P1/00(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n			
<b>B. 調査を行った分野</b> 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/0775, C07K16/28, C12N15/02, C12P1/00, C12Q1/04, C12P21/08			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAlus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/WPIX (STN), PubMed, JSTPlus (JDreamIII)			
<b>C. 関連すると認められる文献</b>			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X/ Y	MABUCHI Y. et al., LNGFR <sup>+</sup> THY-1 <sup>+</sup> VCAM-1 <sup>hi</sup> cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells, STEM CELL REPORTS (2013), Vol.1, p.152-165	14-16/ 1, 2, 4-6, 8, 9, 11-13	
X/ Y	宮本憲一, 外4名, ヒト間葉系幹細胞特異的 miRNA による未分化状態維持機構の解明, 再生医療 増刊号, 2014年1月27日, Vol.13 Suppl, p.317	14-16/ 1, 2, 4-6, 8, 9, 11-13	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 11.09.2015		国際調査報告の発送日 29.09.2015	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 大久保 智之 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	
		4B	5802

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 7 1 7 7 0
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2009-527485 A (ワイス), 2009.7.30, & US 2009/0047287 A1 & EP 1984395 A2 & WO 2007/098198 A2	17-20
X/ Y	JP 2009-513708 A (オンコメッド ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド), 2009.4.2, & US 2007/0116701 A1 & EP 1961065 A2 & WO 2007/053577 A2	17-20/ 1, 2, 4-6, 8, 9, 11-13
Y	JP 2009-60840 A (学校法人慶應義塾), 2009.3.26, & US 2011/0053183 A1 & WO 2009/031678 A1	9
A	JP 2006-524508 A (ワイス), 2006.11.2 & US 2005/0148506 A1 & EP 1613652 A2 & WO 2004/094641 A2	1-20
A	PITTENGER M, et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, SCIENCE (1999), Vol.284, p.143-147	1-20
A	SHEN Y, et al., Bone marrow mesenchymal stem cell-derived Wnt5a inhibits leukemia cell progression in vitro via activation of the non-canonical Wnt signaling pathway, ONCOLOGY LETTERS (2014.5.7), Vol.8, p.85-90	1-20
A	XIN H, et al., The Wnt5a/Ror2 pathway is associated with determination of the differentiation fate of bone marrow mesenchymal stem cells in vascular calcification, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE (2013), Vol.31, p.583-588	1-20

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>G 0 1 N 33/48 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	Y
<b>G 0 1 N 33/577 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/48	P
	G 0 1 N 33/577	B

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 馬淵 洋

東京都文京区湯島 3 - 2 - 1 4 - 8 0 6

F ターム (参考) 2G045 AA24 AA40 BA13 BA14 BB13 BB20 BB25 CB01 DA14 DA36  
 FA16 FA19 FA37 FB02 FB03 FB12 GB01 GB03 GC15  
 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35  
 QR55 QR62 QS25 QS32 QX01  
 4B065 AA90X AA90Y BA21 BA25 CA44 CA46  
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA50

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

