

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-148889

(P2018-148889A)

(43) 公開日 平成30年9月27日(2018.9.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	2 G 0 4 5
C 1 2 N 5/0775 (2010.01)	C 1 2 N 5/0775	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00 B	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/04 (2006.01)	C 1 2 N 1/04	
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48 M	

審査請求 有 請求項の数 17 O L 外国語出願 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-76618 (P2018-76618)
 (22) 出願日 平成30年4月12日 (2018.4.12)
 (62) 分割の表示 特願2013-546358 (P2013-546358)
 の分割
 原出願日 平成23年12月21日 (2011.12.21)
 (31) 優先権主張番号 61/459,987
 (32) 優先日 平成22年12月22日 (2010.12.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. STYROFOAM

(71) 出願人 513154577
 ジ アドミニストレーターズ オブ ザ
 テュレーン エデュケーショナル ファン
 ド
 アメリカ合衆国 7 0 1 1 2 ルイジアナ
 州, ニューオリンズ, キャナル・ストリー
 ト 1 4 4 0, ティービー-32, オフィ
 ス オブ テクノロジー トランスファー
 アンド インテレクチュアル プロパテ
 ィ デヴェロップメント

(74) 代理人 100107766
 弁理士 伊東 忠重

(74) 代理人 100070150
 弁理士 伊東 忠彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高い増殖能を有する多能性間葉系幹細胞の識別および培養のための方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 高い増殖能を有する多能性間葉系幹細胞の識別および培養のための方法を提供する。

【解決手段】 幹細胞の分化能を、幹細胞上の抗原 C D 1 4 6 および N G 2 の分化発現を測定することによって評価する方法であって、C D 1 4 6 および N G 2 の発現と分化能および三血球系統分化能との間の相関性を調査し、所望の分化能を有する幹細胞を特異的に増幅または強化し、不均一な幹細胞集団の分化能を監視し、幹細胞培養物の分化能における不均一性を定量化し、不均一な細胞培養物から特定の分化能を有する細胞を除去する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

40%を超えるコロニー形成効率及び20時間の平均細胞増殖時間に相当する、高い増殖能力のある多能性間葉系幹細胞を識別する方法であって、

収集された間葉系幹細胞におけるNG2の発現を測定するステップと、

NG2を高発現する間葉系幹細胞を選択するステップであって、前記NG2の高発現は間葉系幹細胞の表面上のNG2量に相当し、且つ、前記NG2量は、ABC値として細胞1個あたり少なくとも100,000個の抗体分子に相当する、ステップと、を含む、方法。

【請求項 2】

以下の追加のステップ：

老化細胞のためのマーカーを前記間葉系幹細胞に付加することによって、請求項1において選択される前記間葉系幹細胞中の老化細胞を最小限に抑えるステップと、

老化細胞を示す前記マーカーを測定するステップと、

NG2の高い発現と老化細胞のための前記マーカーの低い表示とを有する細胞を選択するステップと、を含む、請求項1に記載の高い増殖能力のある多能性間葉系幹細胞を識別する方法。

【請求項 3】

以下の追加のステップ：

系統拘束された細胞のためのマーカーを前記間葉系幹細胞に付加することによって、請求項1において選択される前記間葉系幹細胞中の系統拘束された細胞を最小限に抑えるステップと、

系統拘束された細胞を示す前記マーカーを測定するステップと、

NG2の高い発現と系統拘束された細胞のための前記マーカーの低い表示とを有する前記細胞を選択するステップと、を含む、請求項1に記載の高い増殖能力のある多能性間葉系幹細胞を識別する方法。

【請求項 4】

40%を超えるコロニー形成効率及び20時間の平均細胞増殖時間に相当する、高い増殖能力のある多能性間葉系幹細胞を識別する方法であって、

NG2と結合する基質で膜をコーティングするステップと、

前記膜の片側に収集された間葉系幹細胞を配置するステップと、

前記膜の反対側に、細胞移動を促進する走化剤を配置するステップと、

前記間葉系幹細胞を、前記膜を通して移動することを可能にするステップと、

前記膜を通してより迅速に移動する前記間葉系幹細胞を収集するステップと、

を含む方法。

【請求項 5】

40%を超えるコロニー形成効率及び20時間の平均細胞増殖時間に相当する、高い増殖能力のある多能性間葉系幹細胞を識別する方法であって、

収集された間葉系幹細胞におけるCD146およびNG2の発現を測定するステップと、

CD146およびNG2を高発現する前記間葉系幹細胞を選択するステップであって、前記CD146およびNG2の高発現は間葉系幹細胞の表面上のCD146量およびNG2量に相当し、前記CD146量は、ABC値として細胞1個あたり少なくとも200,000個の抗体分子に相当し、且つ、前記NG2量は、ABC値として細胞1個あたり少なくとも100,000個の抗体分子に相当する、ステップと、を含む、方法。

【請求項 6】

以下の追加のステップ：

老化細胞のためのマーカーを前記間葉系幹細胞に付加することによって、請求項5において選択される前記間葉系幹細胞中の老化細胞を最小限に抑えるステップと、

10

20

30

40

50

老化細胞を示す前記マーカーを測定するステップと、
 C D 1 4 6 および N G 2 の高い発現と老化細胞のための前記マーカーの低い表示とを有する細胞を選択するステップと、
 を含む、請求項 5 に記載の高い増殖能力のある多能性間葉系幹細胞を識別する方法。

【請求項 7】

以下の追加のステップ：

系統拘束された細胞のためのマーカーを前記間葉系幹細胞に付加することによって、請求項 5 において選択される前記間葉系幹細胞中の系統拘束された細胞を最小限に抑えるステップと、

系統拘束された細胞を示す前記マーカーを測定するステップと、

C D 1 4 6 および N G 2 の高い発現と系統拘束された細胞のための前記マーカーの低い表示とを有する前記細胞を選択するステップと、
 を含む、請求項 5 に記載の高い増殖能力のある多能性間葉系幹細胞を識別する方法。

【請求項 8】

40% を超えるコロニー形成効率及び 20 時間の平均細胞倍增時間に相当する、高い増殖能を有する多能性間葉系幹細胞の識別および培養のための方法であって、

N G 2 の高い発現について、収集された間葉系幹細胞を免疫表現型検査するステップと

、
 N G 2 を高発現する細胞を選択するステップであって、前記 N G 2 の高発現は間葉系幹細胞の表面上の N G 2 量に相当し、且つ、前記 N G 2 量は、A B C 値として細胞 1 個あたり少なくとも 100,000 個の抗体分子に相当する、ステップと、
 を含む、方法。

【請求項 9】

以下の追加のステップ：

請求項 8 において選択される前記細胞を培養するステップ、
 を含む、請求項 8 に記載の高い増殖能を有する多能性間葉系幹細胞の識別および培養のための方法。

【請求項 10】

以下の追加のステップ：

培養した細胞を凍結保存するステップ、
 を含む、請求項 9 に記載の高い増殖能を有する多能性間葉系幹細胞の識別および培養のための方法。

【請求項 11】

以下の追加のステップ：

請求項 8 において選択される前記細胞を培養するステップと、
 N G 2 の存在を監視するステップと、
 を含む、請求項 8 に記載の高い増殖能を有する多能性間葉系幹細胞の識別および培養のための方法。

【請求項 12】

以下の追加のステップ：

請求項 8 において選択される前記細胞を培養するステップと、
 N G 2 の存在を監視するステップと、
 N G 2 を高発現する前記細胞を選択するステップと、
 前記先行ステップで選択された前記細胞をさらに培養するステップと、
 を含む、請求項 8 に記載の高い増殖能を有する多能性間葉系幹細胞の識別および培養のための方法。

【請求項 13】

40% を超えるコロニー形成効率及び 20 時間の平均細胞倍增時間に相当する、高い増殖能を有する多能性間葉系幹細胞の識別および培養のための方法であって、

C D 1 4 6 および N G 2 について、収集された間葉系幹細胞を免疫表現型検査するステ

10

20

30

40

50

ップと、

C D 1 4 6 および N G 2 を高発現する細胞を選択するステップであって、前記 C D 1 4 6 および N G 2 の高発現は間葉系幹細胞の表面上の C D 1 4 6 量および N G 2 量に相当し、前記 C D 1 4 6 量は、A B C 値として細胞 1 個あたり少なくとも 2 0 0 , 0 0 0 個の抗体分子に相当し、且つ、前記 N G 2 量は、A B C 値として細胞 1 個あたり少なくとも 1 0 0 , 0 0 0 個の抗体分子に相当する、ステップと、
を含む、方法。

【請求項 1 4】

以下の追加のステップ：

請求項 1 3 において選択される前記細胞を培養するステップ、
を含む、請求項 1 3 に記載の高い増殖能を有する多能性間葉系幹細胞の識別および培養のための方法。

10

【請求項 1 5】

請求項 1 4 に記載の高い増殖能を有する、多能性間葉系幹細胞の識別および培養のための方法であって、以下の追加のステップ：

前記培養した細胞を凍結保存するステップ、
を含む、方法。

【請求項 1 6】

以下の追加のステップ：

請求項 1 3 において選択される前記細胞を培養するステップと、
C D 1 4 6 および N G 2 の存在を監視するステップと、
を含む、請求項 1 3 に記載の高い増殖能を有する多能性間葉系幹細胞の識別および培養のための方法。

20

【請求項 1 7】

以下の追加のステップ：

請求項 1 3 において選択される前記細胞を培養するステップと、
C D 1 4 6 および N G 2 の存在を監視するステップと、
C D 1 4 6 および N G 2 を高発現する前記細胞を選択するステップと、
前記先行ステップで選択された前記細胞をさらに培養するステップと、
を含む、請求項 1 3 に記載の高い増殖能を有する多能性間葉系幹細胞の識別および培養のための方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、米国特許法第 1 1 9 条 (e) のもとに、米国特許仮出願第 6 1 / 4 5 9 , 9 8 7 号の優先権を主張し、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本発明は、National Institutes of Health により付与された認可番号 N I H - R 0 3 E B 0 0 7 2 8 1 号、ならびに National Science Foundation により付与された認可番号 N S F - B E S 0 5 1 4 2 4 2 号および同第 N S F - C B E T 1 0 6 6 1 6 7 号のもとに、政府の支援により成された。政府は、本発明にある特定の権利を有する。

40

【0 0 0 2】

本発明は、免疫表現型検査を使用して、多能性であり、コロニー形成の高く効率的な間葉系幹細胞 (M S C) を識別および単離することに関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

間葉系幹細胞 (M S C) は、再生療法に有望な種類の成熟幹細胞である。M S C の治療的可能性の実現に対する主な課題は、種々の分化能力 (または分化能) を有する、分化細胞と未分化前駆体の不均一な混合物である、M S C 培養物中のそれらの前駆体含量における変動性である。多能性 M S C は、間葉系統への分化、急速な細胞増殖、および栄養因子

50

の分泌を含む、広範な再生特性を示す。MSC療法は、間葉および非間葉組織への損傷を修復するように開発されている。これらの治療の有効性は、異なるドナーからの、および生体外増殖時の前駆体含量における変動性に強く影響される。前駆体含量の制御は、不均一な培養物中の多能性MSCを識別する免疫表現型の非存在によって妨げられる。MSCの多分化能および高効率なコロニー形成能の、特異的な細胞表面マーカーの使用は、治療的可能性を有するMSCの単離および識別に有用である。多能性および高効率のコロニー形成MSCを容易に識別および単離するための、免疫表現型に対する必要性が存在する。

【0004】

骨髄は、再生医療のための有望なMSC源として認識されている。それらは、培養物中で容易に増殖し、種々の細胞系統に分化し、免疫反応を調節し、宿主細胞の成長を促進する。脂質生成、軟骨形成、および骨形成を呈する三血球系統分化能は、治療的使用に望ましい多能性MSCを定義するための基本的基準である。したがって、MSC療法は、心筋梗塞、腎不全、および骨関節炎を含む、広範な疾患の治療のために開発中である。これらの治療用途の有効性は、MSC調製物の本質的な不均一性に高く依存する。単細胞分析は、MSCが、それらの系統拘束(lineage commitment)段階および分化範囲に差がある、細胞の不均一な混合物であることを明らかにした。分化能を定義することにおけるその重要性にも関わらず、MSCの三血球系統分化能における不均一性および根本的な階層関係について、限られた調査しか行われてこなかった。MSC系統拘束の階層は、脂質生成を保持するが軟骨形成は保持しない骨形成前駆体またはMSCをもたらす、脂質生成能および続く軟骨形成能の段階的な損失として、様々に記載されてきた。この階層における不明確性は、部分的に、不均一な培養物からの多能性MSCの単離に関する現在の問題点に起因する。

10

20

【0005】

分化能を示す特定の免疫表現型を用いて、MSCを単離するための標準的な手順は存在しない。MSCのトランスクリプトームおよびプロテオーム発現プロファイルは、それらの培養条件に高く依存し、フローサイトメトリーの際に光散乱特性に従ってMSCを分類することは、多能性細胞の部分的な識別のみを提供する。個々のMSC細胞は、単離され、その分化を評価されているが、しかしながら、多能性MSCを識別するための統計的に有意な結果を得るには、高容量のフォーマットが必要である。さらに、高容量アッセイは、軟骨細胞等、特定の系統に対する増殖および分化を評価するために開発されてきたが、それらは、多分化能を評価するわけではなく、機能を判定した後、さらなる分析のために多数の単細胞由来培養物を保持する方法を提供するわけでもない。これらの制限は、MSCの治療的使用に対する深刻な障害を代表する。

30

40

【0006】

自己MSC療法については、ドナーのMSC調製物は、各患者によって異なることになる。MSCの治療的可能性を実現することに対する障害は、異なるドナーからのMSCの再生能力における変動性である。MSC調製物におけるドナー変動性は、異なる患者間で一定した有効性を有する自己MSC療法の生成を妨害する。また、同種異系MSC選択は、高い増殖能力のある多能性細胞のスクリーニングプロセスの欠如により妨げられる。目下のところ、MSCは、間質性抗原の発現および造血性抗原の不在によって識別され、免疫表現型検査される。しかしながら、これらのマーカーは、治療的可能性を有するMSCに望ましい多分化能または高く効率的なコロニー形成とは相関しない。したがって、多分化能および高い増殖能力を有する任意の哺乳動物の幹細胞源から、MSCをスクリーニングし、単離するための方法は、治療および研究使用に望ましい。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、高い増殖能を有する多能性間葉系幹細胞の識別および培養のための方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

50

【0008】

本発明は、高い増殖能力のある多能性MSCを識別する方法を提供する。多能性細胞は、骨形成細胞、脂質生成細胞、または軟骨形成細胞に分化することができる。MSCは、治療的使用のためにドナーもしくは患者、または研究的使用のために他のドナーのいずれかから、採取することができ、本発明は、自己用途および同種異系用途の両方を有する。細胞バンクからのMSCもまた、使用可能である。指示薬と抱合されたCD146およびNG2抗原を標的とする抗体を、不均一な幹細胞の収集物に暴露する。幹細胞表面へのこれらの抗体の付着は、CD146および/またはNG2抗原の存在を示す。CD146、NG2、または両方の組み合わせを高発現するMSCを、フローサイトメトリーまたは他の選択技術を使用して選択することができる。本発明の方法を使用した細胞の識別は、細胞への最小限の損傷を与える。

10

【0009】

高い増殖能を有する多能性MSCを即座に必要とする患者については、選択した細胞を即座に使用することができる。本発明の免疫表現型検査によるMSC選択はまた、老化細胞を最小限に抑え、単一または二重組織系統に拘束されるのではなく、多能性の細胞に選択的である。CD146および/またはNG2を高発現する細胞はまた、40%を超えるコロニー形成効率を有することができ、治療的使用のためのそれらの可能性を強化する。

【0010】

高い増殖能力のある多能性MSC、より迅速な選択および単離を必要としない患者または他の用途については、CD146および/またはNG2を高発現する細胞を選択し、培養することができる。培養した細胞を監視し、所望されるCD146および/またはNG2を高発現する細胞をさらに選択し、単離することができる。CD146および/またはNG2を高発現する細胞を識別し、単離し、さらに培養して、強化された細胞集団を生成することができる。このプロセスは、所望であれば反復することができる。培養プロセス中の任意の時点で、細胞は、後の使用のために凍結保存することができる。本発明は、獣医学的療法および研究、ならびに自己および同種異系療法を含む、全ての哺乳動物に対して使用可能である。

20

【0011】

図面中の用語：CCMAは、抗生物質を伴う細胞培養培地を指し、GAGは、グリコサミノグリカンを指し、OACは、三分能性細胞を指し、OAは、骨-脂質生成細胞を指し、OCは、骨-軟骨形成細胞を指し、Oは、骨形成を指す。

30

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】親集団（薄い灰色）およびアイソタイプ対照（黒）に対する、プールした多能性MSC細胞（濃い灰色）における、NG2（A）およびCD146（B）の発現についての代表的なヒストグラム。多能性集団（C）および親集団（D）に対する、CD146発現と対比したNG2発現を表す代表的な二変量ヒストグラム。平均±平均の標準誤差として報告された、NG2発現（白）とCD146発現（黒）との平均蛍光強度比（E）（n = 4個の試料）。*親に対してP < 0.05。

【図2】多能性MSCの継代効果。NG2（A）およびCD146（B）の発現を、プールした多能性MSCに対する継代数に関して判定した。加えて、各継代における、累積倍増（C）、倍増時間（D）、および-ガラクトシダーゼの発現（E）を監視することによって、成長特性を評価した。骨形成（F）、脂質生成（G）、および軟骨形成（H）を観察し、継代中の三血球系統分化能の損失を検証した。

40

【図3】増幅MSC単細胞由来培養物の代表的な分化能。MSCの三血球系統分化能を、実験培養物の接種時に検証した。単細胞由来の3つの一致する培養物を、21日間分化培地に入れた後、骨形成（A）についてはAlizarin Red S、脂質生成（B）についてはAdipoRed、脂質、軟骨形成（C）については1,9-ジメチルメチレンブルー、硫酸化GAGで染色し、細胞外マトリックスの鉱化を検出した。陰性対照：CCMA中のMSC。無次元分化スコアを、0.19±0.04吸収ユニット（A）、22

50

00 ± 400 相対的蛍光ユニット (B)、および 0.26 ± 0.07 μg GAG / μg DNA (C) の陰性対照に対し、平均 ± 標準偏差に対して標準化した。陽性分化に対する閾値 (点線) は、陰性対照に対する確率密度の 95 パーセンタイルに相当する。中央値 (Median) (-、n = 5 MSC)。* OAC MSC に対して P < 0.05。

【図 4】三血球系統分化能の機能としての MSC 細胞のコロニー形成効率。細胞を、96 ウェルマイクロプレート内において原位置で凍結させ、解凍し、増幅させて、約 2 × 10³ 細胞を得た (3 継代)。増殖した細胞の分化能を確認した。コロニー形成効率を、CCMA を含有する 10 cm の培養皿に、100 ± 10 細胞で接種した際に、コロニーを形成する P3 MSC 細胞のパーセンテージとして計算した。2 週間の培養後、クリスタルバイオレット染色によってコロニーを検出した。中央値 (-、n = 5 個の細胞)。* OAC 細胞に対して P < 0.01。

【図 5】MSC 細胞の生体外増殖。P3 MSC 細胞を、100 ± 10 細胞 / cm² で、24 ウェルプレートに接種し、CCMA で 10 日間培養した。OAC (A)、OA (B)、OC (C)、および O (D) 細胞を接種した個別の MSC 培養物の成長プロファイル (n = 5 個の細胞)。培養表面の画像分析によって判定した 10 日目のコンフルエンスパーセント (E) (n = 30 画像 / 培養物)。A ~ D の成長プロファイルに対応する比成長速度 (F)。中央値 (-、n = 5 個の細胞)。OAC 細胞に対して、* P < 0.01 および † P < 0.001。

【図 6】三血球系統分化能の機能としての MSC 細胞における細胞老化の表現型検査。図 5 に描写される MSC 培養物の老化は、培養 4 日目に細胞がサブコンフルエントになった際に、評価した。細胞寸法 (A) を、画像分析で、培養表面上の MSC の平均投影 2D 面積として評価した (n = 30 個の画像 / 培養物)。OAC (B)、および O 細胞 (C) を接種した MSC 培養物において、pH 6.0 で、細胞寸法および老化関連 - ガラクトシダーゼ (- Gal) 活性の染色を示す、代表的な位相差画像。画像分析によって判定した - Gal 陽性 MSC のパーセンテージ (D)。中央値 (-、n = 5 個の細胞)。OAC 細胞に対して、* P < 0.01 および † P < 0.001。スケールバー：100 μm。

【図 7】間葉系幹細胞 (MSC) の組織学的染色と標準化した骨形成 (A ~ E)、脂質生成 (F ~ J)、および軟骨形成 (K ~ O) の測定値との間の相関。Alizarin Red (A ~ D)、AdipoRed (F ~ I)、および Alcian Blue (K ~ N) で染色した代表的な組織学的試料：陰性対照 (A、F、K)、骨形成 MSC 細胞の平均標準化吸光度は 4.3 (B)、3.0 (C)、および 4.4 (D)、脂質生成細胞の平均標準化蛍光は 7.3 (G)、1.90 (H)、および 5.10 (I)、ならびに軟骨形成細胞の平均標準化した μg GAG / μg DNA は 4.4 (L)、1.0 (M)、および 3.7 (N)。スケールバー：100 μm。相関グラフ：細胞は、標準化スコアが骨形成 (E) については 1.9 ± 0.2、脂質生成 (J) については 2.1 ± 0.1、軟骨形成 (O) については 1.6 ± 0.3 である 95% の信頼性レベルに基づいて、分化に対する陽性 () または陰性 () を示す。挿入したグラフは、拡大した縮尺でプロットする。陰性対照：完全培養培地中の MSC。

【発明を実施するための形態】

【0013】

1 つ以上の好ましい実施形態または方法の詳細な説明を本明細書に提供する。しかしながら、本発明は、種々の方法または形態をとり得ることを理解されたい。したがって、本明細書に開示される特定の詳細は、制限するものではなく、特許請求の範囲の基礎として、および本発明を任意の適切な方法で採用する当業者に教示するための代表的な基礎として解釈されるべきである。

【0014】

幹細胞または MSC という用語は、長期の自己再生能力を有し、少なくとも一種類の分化した子孫細胞を生成することができる細胞を指す。本明細書に使用される、分化能とは、種々の表現型を有する子孫細胞に分化する、幹細胞の能力を指す。幹細胞および MSC は、内容に応じて互換的に使用され得る。多分化能とは、複数の種類の子孫細胞、特に骨

10

20

30

40

50

形成細胞、脂質生成細胞、および軟骨形成細胞に分化する、細胞の能力を指す。単分能性幹細胞とは、1種類の子孫細胞にのみ分化する能力のある幹細胞を指し、二分能性幹細胞とは、2種類の子孫細胞にのみ分化する能力のある幹細胞を指す。老化細胞とは、もはや有糸分裂が起こり得ない細胞を指す。CD146とは、いくつかの幹細胞の表面上に発現される細胞接着分子を指す。CD146抗体とは、CD146抗原に結合する任意の抗体を指す。本発明は、CD146および/またはCD146の発現と、幹細胞の分化能およびコロニー形成効率との関連性を開示する。NG2とは、神経/神経膠抗原2を指し、幹細胞の表面上に発現される抗原である。NG2抗体とは、NG2抗原に結合する任意の抗体を指す。本発明は、NG2の発現と幹細胞の分化能との間の関連性を開示する。免疫表現型検査とは、細胞上の抗原結合を監視することによって、細胞上の抗原またはマーカーを判定するプロセスを指す。このプロセスは、不均一または任意の他の種類の細胞培養物の構成成分および特徴を分析するために使用されてもよい。指示薬または指標化合物という用語は、抗体の存在およびその抗体に結合する細胞を識別または標識化する目的で使用される、任意の化合物を指し得る。指示薬の例には、染料、蛍光剤、または検出および/または定量化可能な他の化合物が挙げられる。

10

【0015】

三分能性のMSCは、単離細胞が由来する不均一な細胞集団よりも、高いレベルのCD146およびNG2を発現する。CD146(MCAM、Mel-CAM、S-Endo-1、A32抗原、およびMUC18としても既知)は、複数の細胞型(例えば、MSC、内皮細胞、および黒色腫細胞)に発現し、異型細胞間接着に参与する。NG2は、外側の細胞膜に及ぶコンドロイチン硫酸プロテオグリカンである。三分能性MSCにおけるCD146および/またはNG2のより高い発現は、MSCの分化能に非依存的なCD44およびCD73等の他の細胞表面タンパク質の発現とは対照的である。CD146および/またはNG2の分化発現を利用して、幹細胞の所望の分化能を、特異的に増幅および/または強化し、不均一な幹細胞集団の分化能を監視し、幹細胞培養物の分化能における不均一性を定量化し、不均一な細胞培養物から特定の分化能を有する幹細胞を除去することができる。

20

【0016】

記載される本発明は、不均一な幹細胞集団の分化能を判定するための定量的および高容量アッセイを開発することによって、幹細胞技術における基礎的な欠点に取り組む。この技術は、MSCの治療的および研究的可能性に対する不均一性の重要性を考慮した多数の用途を有する。この技術により達成可能なMSC集団に関する洞察は、最終的に、組成物に対する制御、したがって、MSC療法の有効性を可能にするであろう。

30

【0017】

本方法で使用される幹細胞は、ドナーまたは患者から抽出される。あるいは、幹細胞は、培養細胞コロニーまたは不均一な培養物から得られてもよい。幹細胞上の非特異的な抗原は、アルブミンでブロックされる。細胞を、続いて、CD146抗体、NG2抗体、または両方とともにインキュベートする。CD146および/またはNG2抗体を、指標化合物と抱合する。存在する全てのCD146またはNG2抗原にCD146およびNG2抗体が結合することを可能にするのに十分な時間が経過した後、未結合の抗体を除去する。未結合の抗体を除去した後、CD146、CD146抱合指標化合物、および/またはNG2、NG2抱合指標化合物のいずれかの存在は、高い増殖能を有する多能性MSCの分化能を示すことになる。単独または組み合わせでのCD146およびNG2の高発現は、高い増殖および多分化能を有するMSCの選択に使用される。

40

【0018】

MSCの多能性分化能を、CD146およびNG2抗原発現の観察により監視する。指標化合物と抱合したCD146およびNG2抗体を、幹細胞とともにインキュベートする。CD146およびNG2抗体は、CD146およびNG2抗原を発現する幹細胞に選択的に結合することになる。MSCにおける多系統分化能の損失は、さらに、CD146およびNG2の発現における変化、ならびにCD146およびNG2の抗体結合の対応する

50

変化と関連する。未結合抗体は、連続的、または離散的時間間隔で除去することができる。抱合された指標化合物によって示され得るCD146および/またはNG2抗体の結合は、MSCの培養中に、MSCの分化能を連続的または離散的時間で監視するために使用することができる。

【0019】

細胞間通信は、細胞培養物に対する望ましくない変化を促進する幹細胞を選択的に除去することによって、制御される場合がある。単分能性細胞および老化細胞は、特に、細胞間通信を介した細胞培養の変化を促進することに関連し、それらの存在は、多能性細胞の培養に悪影響を及ぼし得る。これらの幹細胞は、それらのCD146および/またはNG2抗体結合特性の欠如によって識別され、幹細胞培養物から除去することができる。

10

【0020】

不均一なMSC培養物から多能性MSCを強化する代替の方法は、多孔質膜を通じた細胞移動を利用することができる。膜は、CD146、NG2、または2つのマーカーの組み合わせのための基質でコーティングされてもよい。基質の例は、NG2のためのコラーゲンVIであるが、当該技術分野で既知の任意の基質を使用してもよい。不均一なMSC培養物を、膜の片側(one side)に配置し、細胞移動を促進する走化剤(chemotactic agent)を、膜の反対側(the other side)に配置する。走化剤の例は、無血清MSC培養と組み合わせて使用する場合、血清である。基質に結合する抗原(すなわち、CD146、NG2、またはそれらの組み合わせ)を高発現する多能性MSCは、抗原の発現が低い系統拘束された(lineage-committed)MSCよりも、迅速に多孔質膜を通して移動する。移動した細胞は、多能性MSCの強化された培養物である。より迅速に移動するMSCを収集し、所望であれば治療法または研究に使用することができる。

20

【0021】

CD146および/またはNG2を高発現する選択された細胞は、後で使用するために凍結保存することができる。一実施形態において、幹細胞コロニーを、寒剤を含有するマイクロプレートに添加する。寒剤の一例には、65%CCMA、27%FBS、および8%DMSOが含まれる。パラフィン油を、各ウェルの上部に添加して、CO₂の脱気および培地の蒸発を防止してもよい。幹細胞コロニーを含有するマイクロプレートを凍結させる。一実施形態では、マイクロプレートの温度を、-80に維持する。使用のために幹細胞を回復させるには、プレートを解凍し、3日間回復させる。回復した幹細胞を、マイクロプレートに播種し、増幅させてもよい。

30

【0022】

本発明は、系統拘束(lineage-committed)(非多能性)および/または老化MSCを検出するために、任意の他の指示薬と組み合わせて使用してもよい。指示薬は、系統拘束MSCに対して強く、多能性MSCに対して弱いことになる。指示薬の例には、系統拘束および/または老化MSC上で上方制御される、蛍光増殖染料および細胞表面抗原が挙げられる。増殖染料は、細胞内での長期の保持能力によって特徴付けられる。各細胞分裂の際に、染料の量は、2つの娘細胞間で分割される。各後続世代は、親細胞の蛍光の半分を受容する。成長の遅い系統拘束および老化MSCは、これらの増殖染料に強く染色し、一方で、急速に分裂する多能性MSCは、弱く染色されることになる。これらの指示薬は、本発明のマーカーと組み合わせて使用することができる。多能性MSCは、CD146および/またはNG2を高発現し、系統拘束および/または老化MSC細胞の指示薬に対しては弱いことになる。この組み合わせは、不均一なMSC培養物からの系統拘束および/または老化MSCの除去、ならびにさらには不均一なMSC培養物からの多能性MSCの強化に有用であり得る。

40

【0023】

以下は、使用される免疫表現型検査プロセスであるが、このプロセスは、当業者に利用可能な任意の方法によって達成されてもよい。トリプシン処理したMSCを、PBS中で、遠心分離によって洗浄した。非特異的な抗原は、37で20分間、1%ウシ血清アルブミンを含有するPBS中で、細胞を10⁶細胞/mlでインキュベートすることによ

50

てブロッキングした。細胞懸濁液の100 μ lアリコートをし、4で20分間、蛍光色素抱合した抗ヒトモノクローナル抗体とともにインキュベートした。標識化した試料を、3つの量のリン酸緩衝食塩水(PBS)中で、遠心分離によって洗浄した。アイソタイプ対照は、各抗体に使用したのと同じ濃度で平行して行った。MSCの免疫表現型を、FC500フローサイトメーター(Beckman Coulter, Fullerton, CA (<http://www.beckmancoulter.com>))を用いて評価した。この方法のための細胞は、International Society of Cellular Therapyによって示されるMSCに対する基準を満たす。具体的には、細胞は、接着依存性であり、三血球系統分化能を示し、MSCの特徴である免疫表現型(例えば、CD73+、CD90+、およびCD105+)を発現し、造血性細胞の細胞表面エピソード指標が陰性であった(例えば、CD19-、CD34-、およびCD45-)。

【0024】

CD146およびNG2の高発現のスクリーニングに使用されるMSCは、ドナー、細胞コロニー、または異種源からのものとする事ができる。CD146およびNG2についてスクリーニングされるMSCは、NG2: R&D Systemsからの抗NG2-アロフィコシアニン、カタログ#FAB2585A、クローン#LHM-2、およびCD146: eBioscienceからの抗CD146-FITC、カタログ#11-1469、クローン#P1H12とともに、上述のようにインキュベートされる。これらの抗体の抗体結合能力(antibody binding capacity, ABC)は、MSCのコロニー形成効率ならびに多能性と相関する。ABC値は、本発明ではCD146および/またはNG2である、細胞表面上の抗原分子の量であり、使用される抗体に特異的である。

【0025】

効率的に倍増する幹細胞を提供し、幹細胞療法を必要とする患者に最良の転帰をもたらすか、または研究のための集団をもたらすのに所望されるコロニー形成効率は、40%を超える。さらに、CD146および/またはNG2を高発現する幹細胞は、前述のように、他の細胞型への所望の分化能力を有する。ABCは、ドナー、患者、または細胞バンクからの、高いコロニー形成効率を有する多能性MSCについてのスクリーニングに使用することができる。40%を超えるコロニー形成効率に関して、ABC値は、NG2については細胞1個あたり少なくとも約100,000個の抗体分子とすることができる。CD146については、この値は、細胞1個あたり少なくとも約200,000個の抗体分子とすることができる。所望のMSCのスクリーニングに使用される別の尺度は、等価可溶性蛍光色素分子(MESF)の値である。多能性MSCに関して、MESF値は、CD146については細胞1個あたり少なくとも約100,000個の蛍光色素分子であり、NG2については細胞1個あたり少なくとも約200,000個の蛍光色素分子である。

【0026】

図1は、親MSC集団(薄い灰色)およびアイソタイプ対照(黒色)に対して、プールした多能性細胞(濃い灰色)における、NG2(図1A)およびCD146(図1B)の発現についての代表的なヒストグラムである。代表的な二変量ヒストグラムは、多能性集団(図1C)および親集団(図1D)について、CD146の発現に対比したNG2の発現を描写する。多能性細胞(OAC)におけるNG2発現(白色)とCD146発現(黒色)との平均蛍光強度比(図1E)を、多能性細胞が由来する不均一な親培養物に対して、平均 \pm 平均の標準誤差と比較して示す($n=4$ 個の試料)。*親に対して $P<0.05$ 。多能性MSCにおけるCD146およびNG2の高発現を、図1に図示する。

【0027】

図2は、多能性MSCの培養中の継代効果についての研究である。NG2(図2A)およびCD146(図2B)の発現は、多能性MSCの継代数に関して判定した。図形の各線は、下記のように調製したMSCの単細胞由来培養物のプール($n=5$)を表す。さらに、成長特性を、各継代時の累積倍増(図2C)、倍増時間(図2D)、および細胞老化を判定するための α -ガラクトシダーゼの発現(図2E)を監視することによって評価し

10

20

30

40

50

た。骨形成（図2F）、脂質生成（図2G）、および軟骨形成（図2H）を観察した。CD146およびNG2の発現における減少は、培養MSCの継代中の三血球系統分化能の損失と相関する。

【0028】

CD146および/またはNG2を高発現するMSCを、即時使用のために単離することができる。別の方法では、高発現する細胞は、下記のように培養し、CD146および/またはNG2の発現について監視することができる。単離して培養した、所望のレベルのCD146および/またはNG2を有するMSCを、単離し、さらに培養して、所望の多分化能特性および高いコロニー形成効率を有する強化されたMSCを生成することができる。選択基準、培養、および保存を本明細書に記載する。図2は、最良の多能性分化能を提供するための培養中のCD146およびNG2の存在を図示する。高レベルの発現を有するMSCを、使用のためにさらに選択する、および/または強化されたMSC集団のために培養を続けることができる。さらに、強化されたMSCは、単離時に凍結保存するか、または後で使用するために培養して凍結保存することができる。

10

【0029】

CD146およびNG2のためのマーカーを用いて細胞の分化能およびコロニー形成を確認するために使用される本発明の別の方法は、ドナー、細胞コロニー、または不均一な培養物から単離可能な個々の細胞を利用する。次の文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。In Vitro High-Capacity Assay to Quantify the Clonal Heterogeneity in Tri-Lineage Potential of Mesenchymal Stem Cells Reveals a Complex Hierarchy of Lineage Commitment, Russell et al., 28 Stem Cells 788-798 (2010)、Clonal Analysis of the Proliferation Potential of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells as a Function of Potency, Russell et al., 108 Biotechnology and Bioengineering 2716-2726 (2011)。

20

【0030】

本方法は、培養用の単細胞を単離するために使用することができる。使用または研究のために、少数のMSCが望ましい場合、この代替方法を使用してもよい。多能性MSCの源は、約2~15回（10~50倍増）継代されることになる単細胞であるため、使用可能な細胞の数は、上述の方法よりも少ない。この方法はまた、CD146およびNG2に加えて、高い増殖能を有する多能性細胞を示し得る他のマーカーを識別するために使用することもできる。MSCは、Invitrogenの使用説明書に従って、5 μ のCell Tracker Green、5-クロロメチルフルオロセイン二酢酸（ex/em = 492/517 nm）を用いて、原位置で10分間、37 $^{\circ}$ Cに余熱した無血清CCMA内で、滅菌標識化した。トリプシン処理した後、MSC単細胞を、48時間MSCで馴化した50 μ l/ウェルの新鮮CCMAおよび75 μ l/ウェルのCCMAを含有する96ウェルマイクロプレートへの限界希釈によって生成し、滅菌濾過（0.2 μ mの細孔寸法）して全ての懸濁細胞を除去した。各ウェルを、蛍光Olympus IX50顕微鏡（Olympus America, Center Valley, PA, <http://www.olympusamerica.com>）で検査して、単細胞を接種したウェルのパーセンテージとして、平板効率を判定した。接種の3日後に50 μ lの新鮮CCMAを各ウェルに添加し、さらに3日後に、50 μ lの培地を新鮮CCMAと置き換えた。培養7日目に、コロニー形成効率を、単細胞を起源とするMSCコロニーのパーセンテージとして計算し、接種材料中の生存細胞の割合で除した。少なくとも300細胞/ウェルを含有する単細胞由来のコロニーを、1:4の比率で継代培養し、三血球系統分化多能性分化能を評価した。

30

40

50

【0031】

単細胞由来のMSCコロニー、またはドナーもしくは培養物由来の他の単離MSCは、50 μ lのトリプシン処理した細胞懸濁液を、50 μ l/ウェルの2倍寒剤(65%CCMA、27%FBS、および8%ジメチルスルホキシド(DMSO))を含有する新鮮96ウェルマイクロプレートに添加することにより凍結保存することができる。CO₂の脱気および培地の蒸発を阻害するために、100 μ lの濾過滅菌した軽質パラフィン油を各ウェルの表面に添加してもよく、蓋をパラフィルムで固定した。プレート(複数を含む)を、Styrofoamの箱に移し、-80で8時間凍結させ、続いて長期保管のために、-80の冷凍庫に直接入れることができる。75細胞/ウェル程の少量を、この方法で凍結させた。プレートは、37のインキュベーターで解凍し、解凍した細胞懸濁液を、1mlの新鮮CCMA/ウェルを含有する24ウェルプレートに移すことができる。接種翌日に、定期的な細胞増幅のために、培地を新鮮CCMAと交換した。

10

【0032】

単細胞から培養した凍結MSC細胞を解凍し、3日間増幅させ(約 2×10^3 細胞/単細胞コロニー)、それらの分化能を検証した。10cmの組織培養皿中に、 100 ± 10 個の細胞で接種した際のP3増幅MSC細胞のコロニー形成効率を、細胞コロニーを検出するクリスタルバイオレット染料を使用して評価した。成長動態については、単細胞から培養したP3MSC細胞を、0.5mlのCCMA/ウェルを含有する24ウェルプレートに、 100 ± 10 個の細胞/cm²で接種し、1日おきに培地を完全に交換した。細胞濃度を、血球計数によって測定し、比成長速度を、Blanch and Clark, Biochemical Engineering, New York, Marcel Dekker, p. 702. (1997)にあるように評価した。

20

【0033】

継代培養後、MSC単細胞由来コロニーを、7日間、150 μ l/ウェルのCCMAを含有する96ウェルマイクロプレートで、約75%コンフルエントになるまで増殖させた。アッセイにより、分化能の尺度として、脂質生成、軟骨形成、および骨形成を示す、MSC単細胞の三血球系統分化能を定量化した。骨形成は、10%FBS、100nMのデキサメタゾン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、10mMの-グリセロリン酸(Sigma-Aldrich)、および50 μ のL-アスコルビン酸2-リン酸(Sigma-Aldrich)を補充した低グルコースのダルベッコMEMでの培養によって誘発した。21日間の分化後、コンフルエントな単分子層を、4%パラホルムアルデヒド中に20分間固定し、1%Alizarin Red S(pH4.2, Sigma-Aldrich)で20分間染色し、鉱化した細胞外マトリックスを検出した。染料を、15分間、10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)中、100 μ l/ウェルの10%塩化セチルピリジニウムで抽出し、スペクトル吸収率を562nmで測定した。

30

【0034】

脂質生成を誘発するために、単細胞由来コロニーを、上述のように増殖させ、0.5 μ デキサメタゾン、0.5mMイソブチルメチルキサンチン(Sigma-Aldrich)、および50 μ インドメタシン(Sigma-Aldrich)を補充したCCMA中で21日間培養した。脂質は、200 μ lのPBS/ウェルにおいて、細胞の単分子層に5 μ lのAdipoRed試薬(Lonza, Walkersville, MD)を添加することにより検出した。蛍光を、485nmの励起および535nmの放出で10分後に測定した。

40

【0035】

軟骨形成については、単細胞由来コロニーを、2mlのCCMA/ウェルを含有する6ウェルプレートで、2週間近く増幅させた。200 μ l/ウェルのCCMAを含有する、96ウェルのV字底ポリプロピレンマイクロプレート(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)に、 $2 \pm 0.2 \times 10^5$ 細胞/ウェルを接種することによって、ペレット培養物を形成した。翌日に、100ng/mlの骨形成タ

50

ンパク質 - 2 (R & D Systems , Minneapolis , MN)、10 ng / ml の形質転換成長因子 - 3、100 nM デキサメタゾン、50 μ g / ml の L - アスコルビン酸 2 - リン酸、100 μ g / ml のピルビン酸塩 (Sigma - Aldrich)、40 μ g / ml のプロリン (Sigma - Aldrich)、および 10 μ l / ml の ITS + (BD Biosciences , San Jose , CA) を補充した高グルコースのダルベッコ MEM から構成される分化培地で、CCMA を置き換えた。21 日間の分化後、消化した細胞ペレット中の硫酸化グリコサミノグリカン (GAG) の量を、1,9 - ジメチルメチレンブルー (Sigma - Aldrich) を用いて、校正にコンドロイチン硫酸 A を使用して定量化した。GAG 含量は、Hoechst 33258 (Sigma - Aldrich) を用いて消化したペレット試料中の DNA の定量化による質量あたりの DNA 単位で報告し、校正基準として仔ウシ胸腺 DNA (Sigma - Aldrich) を採用する。

10

【0036】

細胞型を確認するための分化した MSC の染色組織学的試料の画像を、Olympus IX50 顕微鏡に載置した、Optronics DEI - 750 デジタルカメラ (Optronics , Goleta , CA , <http://www.optronics.com>) で取得した。染色を、染色面積パーセントおよびその光学密度の積に関して評価した。培養中の MSC の、4 つの陽性染色面積および投影 2D 面積を、Graphire 4 CTE - 640 タブレット (Wacom Technology Corp. , Vancouver , WA , <http://www.wacom.com>) を使用してトレースし、Image - Pro Plus ソフトウェアバージョン 6.1 (Media Cybernetics , Crofton , MD , <http://www.mediacy.com>) の Count / Size および Draw ツールの Area、Percent Area、および Optical Density オプションで分析した。光学密度を、Background Correction オプションを使用して、対応する陰性対照に対し、0 (白色) から 2.5 (黒色) の段階で計算した。画像化の結果を、培養試料あたり平均して 20 ~ 50 個の無作為に選択した画像からの平均値として報告する。

20

【0037】

図 3 は、上述の分化培地での 21 日間の誘発後の、骨形成 (図 3 A)、脂質生成 (図 3 B)、および軟骨形成 (図 3 C) について、培養 MSC の多分化能を要約する。陽性分化に対する閾値 (破線) は、陰性対照に対する確率密度の 95 パーセンタイルに相当する。

30

【0038】

コロニー形成効率を、これらの条件下で容易にコロニーを形成した蛍光標識化 MSC の限界希釈によって評価した。追跡用染料 Cell Tracker Green は、96 ウェルマイクロプレートでウェルにおける細胞検出を容易化した。染料は、無視できる程度の細胞毒性を有し、接種材料の生存率は $90 \pm 4\%$ であった。40% を超えるコロニー形成能を有する細胞を、識別することができる。図 4 は、多能性 MSC のより高いコロニー形成を示す。図 4 に示されるように、多能性 MSC により、しばしば、所望される 40% のコロニー形成効率を上回る。

40

【0039】

MSC 培養物中の DNA 含量を定量化するために、100 μ l のパイン消化細胞試料を、200 μ l の 0.1 M NaOH と混合し、室温で 30 分間インキュベートし、次いで、5 M NaCl、100 mM リン酸ナトリウム中の 200 μ l の 0.1 M HCl の添加によって、中和した。96 ウェルマイクロプレートにおいて、100 μ l の試料を、200 mM NaCl および 1 mM EDTA (pH 7.4) を含有する 10 mM トリス緩衝液中の 100 μ l の 0.7 μ g / ml Hoechst 33258 (Sigma - Aldrich) に添加した。蛍光を、340 nm の励起および 465 nm の放出で測定した。標準曲線を、仔ウシ胸腺 DNA (Sigma - Aldrich) を用いて作製した。

【0040】

50

MSCの単細胞由来培養物の三血球系統分化能を、上に示した分化条件を使用して評価した。単細胞コロニーを、1:4の比率で、複製マイクロプレートに継代培養し、3つのプレートは、三血球系統分化能の評価に採用し、4つ目は、後で使用するために凍結させてMSC細胞の鑄型を保存した。MSC細胞は、それらの標準化した測定値が、陰性対照に対する推定確率密度の95パーセントイルを超えた場合、分化が陽性であると指定された。値は、骨形成、脂質生成、および軟骨形成について、それぞれ、 1.9 ± 0.2 、 2.1 ± 0.1 、および 1.6 ± 0.3 標準偏差であった。

【0041】

組織培養プラスチック上での生体外増殖の際のMSC細胞の成長動態を、図5A、5B、5C、および5Dに提示する。100細胞/cm²の接種密度を選択した。接種の24時間後に培養物中に生存していたMSCの割合、および遅滞期の期間に関して、それぞれ、中央値(median values)は、4つ全ての群について60%および1日(n=20)であり、4つの分化能群の間に有意な差異は存在しなかった(図5A、5B、5C、および5D)。10日間の増殖後、三分能性MSCを接種した培養物は、200倍(n=5)、 2×10^4 細胞/cm²(図5A)に増殖し、85%~100%コンフルエント(confluent)であった(図5E)。系統拘束は、培養MSCの生体外増殖を制限した。O細胞を接種した場合、同じ期間にわたり、培養物は、蓄積が $< 10^3$ 細胞/cm²であり(図5A)、15%コンフルエント(confluent)であった(図5E)($P < 0.001$)。MSC分化能の機能としての比成長速度における傾向(図5F)は、コロニー形成効率に対するもの(図4)と類似である。4つの分化能群の中でも、OAC細胞の三分能性接種材料が、メジアン(median)比成長速度が 0.85 日^{-1} (n=5)であり、20時間の倍増時間に相当する、最も高い増殖能を呈した(図5F)。メジアン比成長速度は、O細胞を接種した培養物については5倍低かった($P < 0.01$)。二分能性接種材料は、OAおよびOCMSCと平均比成長速度が同程度であり($0.50 \sim 0.60 \text{ 日}^{-1}$)、これらの2つの両極端の間の中程度の増殖能を呈した。

【0042】

O細胞は、細胞老化の表現型表示を発現した。細胞寸法を、サブコンフルエントな培養物の表面上の、MSCの投射面積の画像分析によって推定した(n=30個の画像/培養物)。O MSCを接種したMSC培養物は、4日目に、細胞半径 $> 34 \mu\text{m}$ (図6C)に相当する、 $> 3.6 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ /細胞(n=5個の培養物)の平均投影面積で細胞を含有した(図6A)。75%を超えるこれらの系統拘束されたMSCが、pH6.0で、老化に関連する α -ガラクトシダーゼ活性に対して陽性に染色した(図6D)。サブコンフルエントなMSCにおける陽性 α -ガラクトシダーゼ染色は、コンフルエント細胞における可逆の休眠状態ではなく、老化からの不可逆の成長停止を示唆する。三分能性接種材料は、良好な形態学(図6Aおよび6B)ならびに無視できる程度の α -ガラクトシダーゼ染色(図6D)を有する培養物をもたらしたが、一方で、二分能性接種材料は、増殖能について観察されたパターン(図4および5F)と一致する老化の中間表現型(図6Aおよび6D)を呈した。

【0043】

CD146およびNG2を高発現する多能性細胞はまた、細胞の老化に関連する α -ガラクトシダーゼ活性の欠如も示す(図6D)。この特徴は、本発明のさらなる態様である。細胞を、pH6.0で試験し、成長動態について接種の4日後に、サブコンフルエントな培養物中で老化 α -ガラクトシダーゼ染色キット(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)を用いて組織化学的に検出した。

【0044】

標準化した分化測定値を分化MSCの組織学的染色と関連付けるための相関を確立した(図7)。組織学的試料は、骨形成および脂質生成(図7A~Eおよび図7F~J)については単分子層であり、軟骨形成(図7K~O)については分割したペレットであった。染色を、染色面積パーセントおよびその光学密度の積に関して評価した。この面積かける強度スコアは、骨形成については30(図7A~E)、脂質生成については10(図

10

20

30

40

50

7 F ~ J)、および軟骨形成については 25 (図 7 K ~ O)であった。骨形成および軟骨形成の高いパーセンテージは、細胞内マーカーと対比した細胞外染色、および/またはより高い分化度に起因し得る。線形回帰モデルは、全ての事例におけるデータに適合するのに十分であった。これらの等式から、陽性分化に対する 95 パーセントイルの閾値は、それを越えると単細胞由来の培養物が骨形成に陽性であることが示された、 1.0 ± 0.1 の面積かける強度スコアに対応する。脂質および軟骨形成に対するカットオフ値は、それぞれ、 0.20 ± 0.01 および 2.9 ± 0.2 のスコアに相当した。3つ全ての場合において、閾値の面積かける強度スコアは、陽性細胞に対して観察された最大値よりも、少なくとも8倍低かった。多分化能が陽性である単細胞培養物は、本明細書に記載のように、CD146およびNG2の両方を高発現する。

10

【0045】

多能性MSCの識別における現在の制限を克服するために、不均一なMSCを任意の試料で使用するための、新しい効率的な高容量アッセイを開発した。本方法を使用して、単純に、CD146およびNG2に対するマーカーを使用することにより、MSCをスクリーニングすることができる。既知の分化能の細胞を単離し、MSCの不均一性を定量化するこのアッセイの能力は、MSC療法の有効性を改善するであろう。

【0046】

フローサイトメトリーにより、平均蛍光強度に約3倍の差異 ($p < 0.05$ 、 $n = 4$)がある、親MSCと対比した多能性MSCでの細胞表面抗原NG2の高発現を確認する。CD146については、平均蛍光強度は、多能性MSCに対して、親培養物よりも約2倍大きかった ($p < 0.05$ 、 $n = 4$)。単細胞由来MSCコロニーの使用、および40%を超えるコロニー形成効率と相関する多能性細胞の単離は、所望のMSCにおけるCD146およびNG2の高発現を明らかにした。

20

【0047】

本発明は、例えば、臨床で、多能性細胞の一定した含量についてMSC調製物を監視するため、および年齢および異なる培養条件で、異なるドナー間の不均一性における変動性を判定するために、採用することができる。本発明の方法を使用して、MSCの多分化能と関連する他の因子を識別することができる。

【0048】

本発明の使用は、マーカーNG2およびCD146を使用することによって、臨床で使用するための生体外増幅の際に、不均一なMSC調製物中の多能性細胞を強化する、分化成長動態を有効利用することを可能にする。多分化能および効率的なコロニー形成を有するMSCの識別、ならびにCD146およびNG2を高発現する単離MSCのさらなる培養の容易さは、治療法および研究のためのMSC源の提供を可能にする。

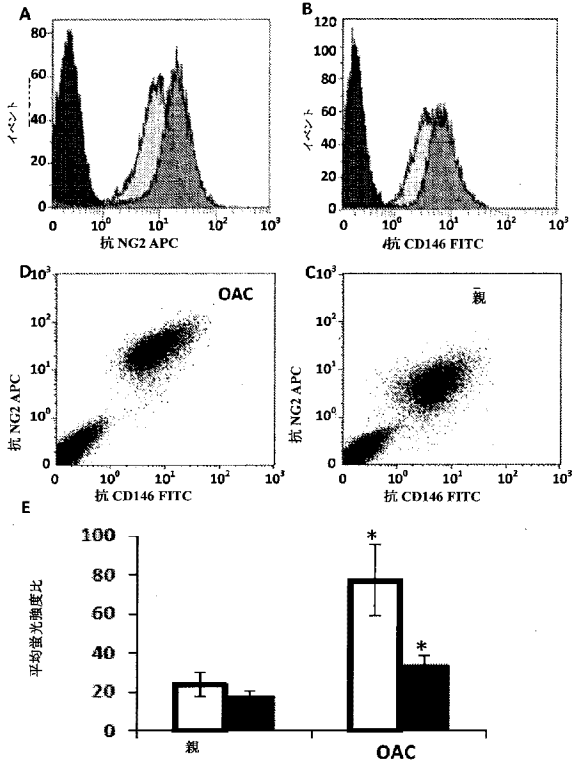
30

【符号の説明】**【0049】**

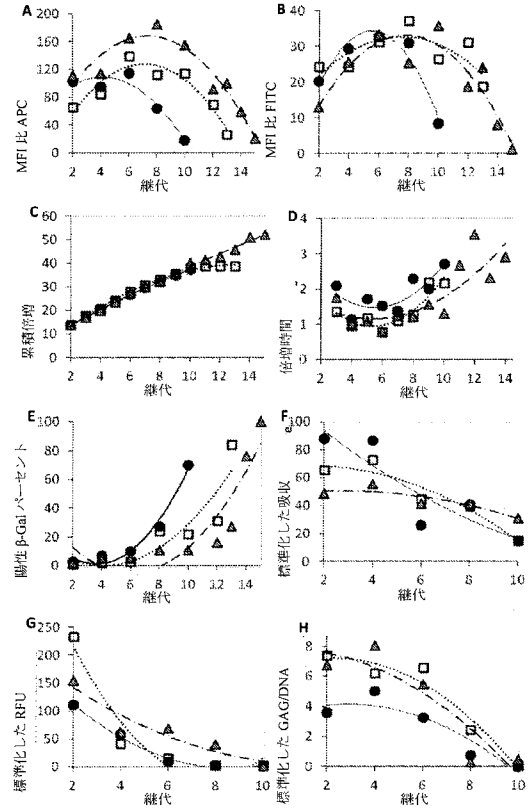
CCMAは、抗生物質を伴う細胞培養培地を指し、GAGは、グリコサミノグリカンを指し、OACは、三分能性細胞を指し、OAは、骨-脂質生成細胞を指し、OCは、骨-軟骨形成細胞を指し、Oは、骨形成を指す。

40

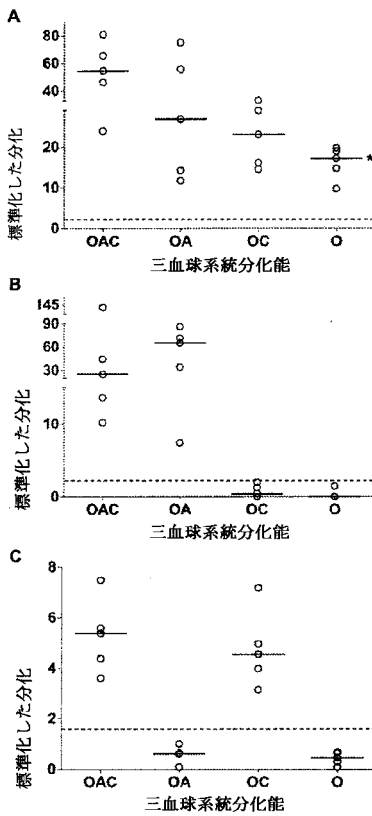
【 図 1 】



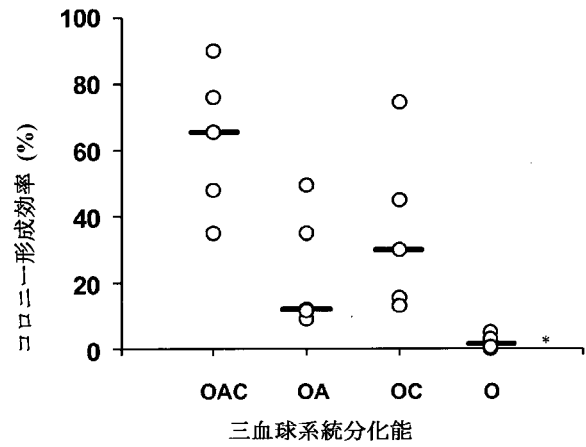
【 図 2 】



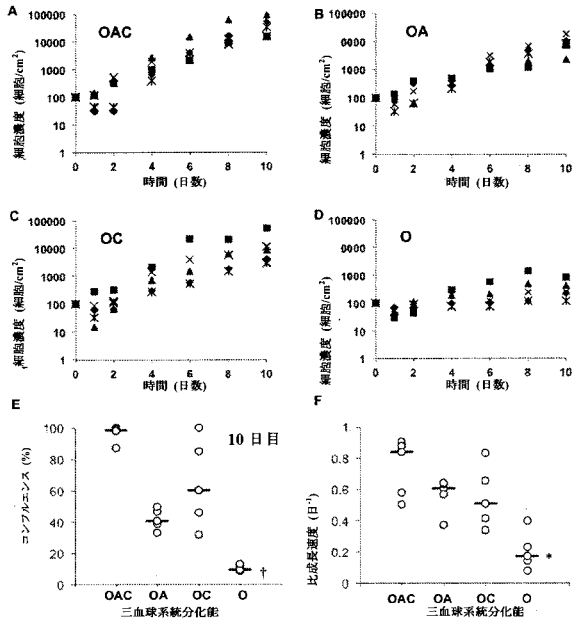
【 図 3 】



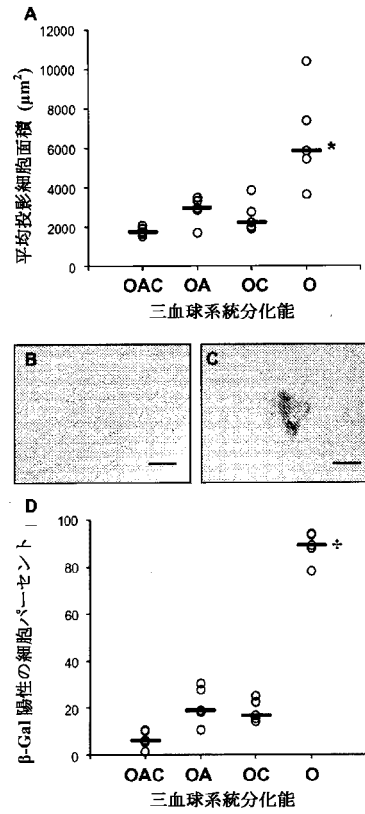
【 図 4 】



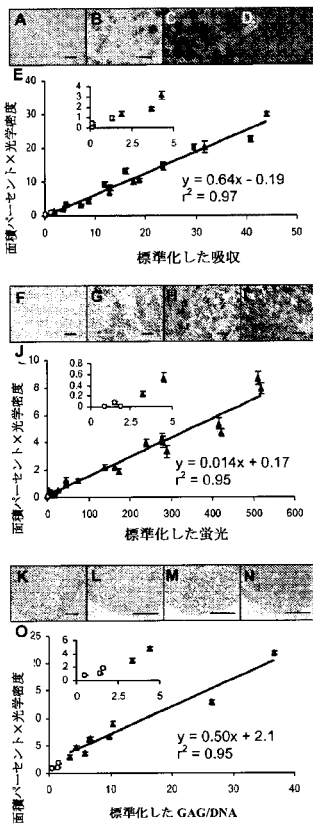
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/68	(2006.01)	G 0 1 N	33/68	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D

(74)代理人 100091214

弁理士 大貫 進介

(72)発明者 オコナー, キム

アメリカ合衆国 7 0 1 1 2 - 2 6 3 2 ルイジアナ州, ニューオリンズ, テュレーン・アヴェニ
ュー 1 4 3 0, ティービー - 3 2

(72)発明者 ラッセル, ケイティー

アメリカ合衆国 7 0 1 1 2 - 2 6 3 2 ルイジアナ州, ニューオリンズ, テュレーン・アヴェニ
ュー 1 4 3 0, ティービー - 3 2

Fターム(参考) 2G045 AA40 CB01 DA36

4B063 QA01 QA18 QQ08 QR48 QS33

4B065 AA90X AC20 BA30 BC50 BD09 CA44

【外国語明細書】

2018148889000001.pdf

专利名称(译)	鉴定和培养具有高增殖能力的多能间充质干细胞的方法		
公开(公告)号	JP2018148889A	公开(公告)日	2018-09-27
申请号	JP2018076618	申请日	2018-04-12
申请(专利权)人(译)	迪管理员的Teyuren教育基金		
[标]发明人	オコナーキム ラッセルケイティ		
发明人	オコナー,キム ラッセル,ケイティ		
IPC分类号	C12Q1/04 C12N5/0775 C12N1/00 C12N1/04 G01N33/48 G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5073 C12N5/0662 C12N5/0663 G01N33/5005 G01N2333/4722 G01N2333/70596		
FI分类号	C12Q1/04 C12N5/0775 C12N1/00.B C12N1/04 G01N33/48.M G01N33/68 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/DA36 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QS33 4B065/AA90X 4B065/AC20 4B065/BA30 4B065/BC50 4B065/BD09 4B065/CA44		
代理人(译)	伊藤忠彦		
优先权	61/459987 2010-12-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种鉴定和培养具有高增殖能力的多能间充质干细胞的方法。分化干细胞的能力，通过测量干细胞抗原CD146和NG2的差异表达，CD146和NG2表达和分化能力和三个血细胞谱系分化潜能之间评估的方法研究相关性以特异性扩增具有所需分化潜能的干细胞或增强监测异质干细胞群的分化潜能，在干细胞培养物的分化能力从异质细胞培养物除去具有特定分化潜能的细胞进行量化的异质性。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公開特許公報(A)	(11) 特許出願公開番号 特開2018-148889A (P2018-148889A)
	(43) 公開日	平成30年9月27日(2018.9.27)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04	2G045
C12N 5/0775 (2010.01)	C12N 5/0775	4B063
C12N 1/00 (2006.01)	C12N 1/00	B 4B065
C12N 1/04 (2006.01)	C12N 1/04	
G01N 33/48 (2006.01)	G01N 33/48	M
	審査請求 有	請求項の数 17 O L 外国語出願 (全 19 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2018-76618 (P2018-76618)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成30年4月12日(2018.4.12)	シ アドミニストレーターズ オブ サ
(62) 分割の表示	特願2013-546358 (P2013-546358) の分割	チュレーン エデュケーションアル ファン
原出願日	平成23年12月21日(2011.12.21)	ド
(31) 優先権主張番号	61/459,987	アメリカ合衆国 70112 ルイジアナ
(32) 優先日	平成22年12月22日(2010.12.22)	州、ニューオリンズ、キャナル・ストリー
(33) 優先権主張国	米国(US)	ト 1440、チービー-32、オフィ
(特許庁注：以下のものは登録商標)		ス オブ テクノロジー トランスファー
1. STYROFOAM		アンド インテレクチュアル プロパテ
		ィ デヴェロップメント
		(74) 代理人
		100107766
		弁理士 伊東 忠彦
		(74) 代理人
		100070150
		弁理士 伊東 忠彦
		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高い増殖能を有する多能性間葉系幹細胞の識別および培養のための方法