

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-528019

(P2004-528019A)

(43) 公表日 平成16年9月16日(2004.9.16)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/06</b>	C 1 2 N 5/00	2 G 0 4 5
<b>A 6 1 K 35/30</b>	A 6 1 K 35/30	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 L 27/00</b>	A 6 1 L 27/00	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 P 25/16</b>	A 6 1 P 25/16	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 P 25/28</b>	A 6 1 P 25/28	4 C 0 8 1
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-563304 (P2002-563304)	(71) 出願人	302013542
(86) (22) 出願日	平成14年2月8日 (2002.2.8)		サントル ナシオナル ドゥ ラ ルシェ
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月8日 (2003.8.8)		ルシェ シアンティフィーク (セーエヌエールエス)
(86) 国際出願番号	PCT/IB2002/001226		フランス国、エフ-75794 パリ セ
(87) 国際公開番号	W02002/062967		デックス 16、リュ ミシェル-アンジュ 3
(87) 国際公開日	平成14年8月15日 (2002.8.15)	(74) 代理人	100080791
(31) 優先権主張番号	01400341.2		弁理士 高島 一
(32) 優先日	平成13年2月9日 (2001.2.9)	(72) 発明者	ルゴン、ジュヌヴィエーヴ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		フランス国、エフ-13009 マルセイユ、ブルバール デ セドル 2、クロ デ セドル、バル ティエ (番地なし)
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経下垂体からのO-2A前駆多能性細胞

## (57) 【要約】

多能性細胞を含む哺乳動物神経下垂体細胞の単離された集団が同定された。少なくともオリゴデンドロサイト及び/又はII型アストロサイト及び/又はニューロンに分化できるO-2A前駆細胞を記載する。本発明はまた、このような細胞集団の単離、培養、移植の方法、並びに、神経障害又は神経疾患用の医薬としてのそれらの使用を包含する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

多能性細胞を含む哺乳動物神経下垂体細胞の単離された集団。

## 【請求項 2】

多能性細胞は、少なくともオリゴデンドロサイト及び／又はⅠⅠ型アストロサイト及び／又はニューロンに分化できる、請求項 1 に記載の集団。

## 【請求項 3】

該集団は、構造が未だ発達している新生児神経下垂体由来であるか、又は成熟した神経下垂体由来である、請求項 1 又は 2 に記載の集団。

## 【請求項 4】

該集団は、生理的刺激後の成熟した神経下垂体由来である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の集団。

## 【請求項 5】

該集団は、適切な培養培地で培養した神経下垂体の外植体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の集団。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の細胞集団の取得方法であって、神経下垂体外植体からの懸濁液を調製する工程、該集団の成長及び／又は増殖用の適切な培地中で懸濁液を培養する工程を含む方法。

## 【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の細胞集団の単離方法であって、

- 培養で維持でき、少なくともオリゴデンドロサイト及び／又はⅠⅠ型アストロサイト及び／又はニューロンに分化する能力を有する前駆細胞を含む神経下垂体外植体を培養すること；
- 該外植体を、該外植体の前駆細胞の増殖を引き起こす薬剤と接触させること；
- 該外植体から、該薬剤に応答して増殖する前駆細胞を単離すること；

を含む方法。

## 【請求項 8】

オリゴデンドロサイト - ⅠⅠ型アストロサイト (O - 2 A) 前駆細胞及び／又はそれらの子孫の取得方法であって、

- 培養で維持でき、分化する能力を有する前駆細胞を含む神経下垂体外植体を培養すること；
- 該外植体を、該外植体の前駆細胞の増殖とオリゴデンドロサイト - 2 型及び／又はアストロサイトへの分化を引き起こす薬剤と接触させること；
- 懸濁液を、O - 2 A 前駆細胞及び／又はそれらの子孫のマーカールと接触させること；
- O - 2 A 前駆細胞及び／又はそれらの子孫を単離すること；

を含む方法。

## 【請求項 9】

O - 2 A 前駆細胞及び／又はそれらの子孫の単離技術は、磁気分離、抗体被覆磁気ビーズ、アフィニティークロマトグラフィ、マトリックス結合抗体、増殖因子への応答、特異的遺伝子発現、抗原的細胞特異的表面マーカー、基本的形態学の 1 つを含む、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 10】

神経下垂体 O - 2 A 前駆細胞を少なくとも 50 % 含む単離された細胞組成物の調製を更に含む、請求項 9 又は 10 に記載の方法。

## 【請求項 11】

神経下垂体から得られる前駆細胞の成長、増殖及び／又は分化の 1 つを調節する能力を有する化合物のスクリーニング方法であって、

- 培養で維持でき、分化する能力を有する前駆細胞を含む神経下垂体外植体を培養すること；

10

20

30

40

50

- 該外植体を、該外植体の前駆細胞の増殖を引き起こす薬剤と接触させること；  
 - 該外植体を試験化合物と接触させること；  
 - 試験化合物無しの結果と比較することによって、前駆細胞の成長、増殖及び／又は分化の1つを検出すること；  
 を含む方法。

【請求項12】

形質転換された哺乳動物多能性オリゴデンドロサイト-2型アストロサイト(O-2A)前駆細胞及び／又はそれらの子孫の単離された集団の取得方法であって、少なくとも核酸の導入を含む方法。

【請求項13】

請求項12に記載の方法に従って得られる、形質転換された哺乳動物多能性オリゴデンドロサイト-2型アストロサイト(O-2A)前駆細胞及び／又はそれらの子孫の集団。

【請求項14】

脳の少なくとも1ヶ所に神経下垂体O-2A前駆細胞及び／又はそれらの子孫を提供する方法であって、脳へのO-2A前駆細胞の体内移植を含む方法。

【請求項15】

O-2A前駆細胞は、予め形質転換されている、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

O-2A前駆細胞を含む神経下垂体外植体のインビボ発達及び分化のアッセイ方法であって、

- 新生児又は成熟した神経下垂体外植体を抽出すること；  
 - 外植体を標識し、新生児又は成熟した哺乳動物脳の周室部に外植体を移植すること；  
 - 脳内で移植細胞の分布を同定すること；

を含む方法。

【請求項17】

多能性O-2A前駆細胞及び／又はそれらの子孫を特徴付ける表面マーカーを認識できる抗体のスクリーニング方法であって、適切な培地で該細胞を培養し、試験抗体を加え、抗体-マーカー複合体を同定することを含む方法。

【請求項18】

多能性O-2A前駆細胞及び／又はそれらの子孫を特徴付ける表面マーカーを認識できる抗体の提供方法であって、該細胞で動物を免疫化し、産生された抗体を単離することを含む方法。

【請求項19】

神経下垂体から抽出され、少なくともオリゴデンドロサイト及び／又はII型アストロサイト及び／又はニューロンに分化できる単離された哺乳動物前駆細胞。

【請求項20】

請求項18に記載の少なくとも1つの単離された細胞の取得方法であって、

- 培養で維持でき、少なくともオリゴデンドロサイト及びII型アストロサイトに分化する能力を有する前駆細胞を含む神経下垂体外植体を培養すること；  
 - 該外植体から、少なくともオリゴデンドロサイト及びII型アストロサイトに分化する能力を有する少なくとも1つの前駆細胞を単離すること；

を含む方法。

【請求項21】

神経下垂体O-2A前駆細胞及び／又はそれらの子孫の集団、又は形質転換された該集団、並びに医薬上許容できるビヒクルを含有する医薬組成物。

【請求項22】

細胞集団として、O-2A前駆細胞及び／又はそれらの子孫を少なくとも50%含有する、請求項21に記載の組成物。

【請求項23】

神経障害又は神経疾患用の医薬として使用される、請求項21又は22に記載の組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 2 4】

神経障害又は神経疾患の治療用の医薬組成物の製造のための、請求項 6 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法によって得られる集団の使用。

## 【請求項 2 5】

神経障害又は神経疾患の治療用の移植片の製造のための、請求項 5 に記載の外植体の使用。

## 【請求項 2 6】

神経疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病である、請求項 2 4 又は 2 5 に記載の使用。

## 【発明の詳細な説明】

10

## 【0 0 0 1】

本発明は、神経生物学、詳細には、哺乳動物の神経下垂体から単離される多能性幹細胞の集団の単離及び使用に関する。より詳細には、本発明は、オリゴデンドロサイト - 2 型アストロサイト ( O - 2 A ) 前駆細胞に関する。

本発明はまた、特に、治療的処置及び細胞培養のための、哺乳動物多能性 O - 2 A 前駆細胞及びそれらの子孫の再生及び使用のためにこの集団を使用する方法に関する。

## 【0 0 0 2】

多能性前駆細胞は、器官の十分に分化した細胞の欠如、又は活性の喪失もしくは異常活性に付随する疾患の治療に非常に有用であり得ると考えられている。従って、多能性細胞源を見出す必要性がある。このような前駆細胞を単離するために、研究できる多くの組織が存在するが、単離方法は、前駆細胞の各源に特異的である。

20

## 【0 0 0 3】

特に、中枢神経系 ( CNS ) では、オリゴデンドロサイト - I I 型アストロサイト前駆細胞 ( O - 2 A ) と言われる多能性前駆細胞の集団が既に同定されている。この前駆体集団は、細胞系列及び細胞分化において分岐点であることが示されている。R a f f と共同研究者による研究 ( R a f f , e t a l . , N a t u r e , 3 0 3 : 3 9 0 , 1 9 8 3 ) は、ラット視神経における 2 能性グリア前駆細胞の存在を示した。それは、適切な増殖条件下、インビトロで、オリゴデンドロサイト又は I I 型アストロサイトに分化する力を有し、ある条件下、ニューロンに分化する力を有する ( K o n d o a n d R a f f , 2 0 0 0 ) 。他の神経領域からの O - 2 A 前駆体は、インビトロで 2 能性であることが示され、それは、培養培地によって、オリゴデンドロサイト又は 2 型アストロサイトを生じる ( B u t t ( 1 9 9 8 ) a n d L e v i n e ( 1 9 8 7 ) ) 。

30

## 【0 0 0 4】

CNS の細胞は、ニューロン又はグリア細胞として分類される。グリア細胞は、オリゴデンドロサイト及びアストロサイトに更に分類できる。オリゴデンドロサイトは、CNS のミエリン産生細胞である。オリゴデンドロサイトの死は、多発性硬化症に見られる脱ミエリンを誘導するらしい ( W a x m a n , S . G . , N e w E n g l . J M e d . , 3 0 6 : 1 5 2 9 , 1 9 8 2 ) 、又は、未熟児にしばしば見られる痙攣性運動や認識欠損の原因と考えられる周室部白質傷害を誘導するらしい ( O k a , e t a l . , J N e u r o s c i . , 1 3 : 1 4 4 1 , 1 9 9 3 ) 。

40

## 【0 0 0 5】

治療的移植は、多発性硬化症などの脱ミエリン化疾患に特に有望である。ラットにおいて、インビトロで成長し、増殖したオリゴデンドロサイト前駆体培養物は、動物に戻し移植できる。ミエリン産生のマウス突然変異体は、これらの細胞のレシピエントとして役立つ得るし、注目の細胞は、遊走し、移植され、分化し、レシピエントの神経線維をミエリン化するのが見られる ( E s p i n o s a d e l o s M o n t e r o s , e t a l . , D e v . N e u r o s c i . , 1 4 : 9 8 , 1 9 9 2 ) 。このような観察は、脱ミエリン化疾患、及び恐らく CNS の外傷後の治療として、移植におけるヒトオリゴデンドロサイト前駆体の使用を示唆する。更に、近年、神経変性疾患の治療として、ヒト組織を移植するという考えが、ますます注目されている ( B j o r k l a n d , N a t u r e

50

, 362:414, 1993)。

【0006】

O-2A前駆体及び子孫の単離とクローン増殖はまた、米国特許5,693,482に記載のように、神経冠から得られた。

同系で、急速に増殖でき、神経組織、即ち、脳にうまく移植される前駆細胞源を同定する必要性が依然として存在する。

【0007】

本発明の目的は、神経障害を補償するのを可能とする細胞をインビボで生じさせるために、首尾よく移植できるO-2A前駆体の他の哺乳動物源を同定することである。

別の目的は、インビボでニューロンを生じさせるために、首尾よく移植できる哺乳動物組織を同定することである。 10

別の目的は、移植アプローチはドナー組織の入手性によって限定され得ることを考慮して、モデル動物システム及びヒトにおいて、CNS及びPNSの神経学疾患の治療に有用な前駆細胞の源を提供することである。

【0008】

大規模で産生でき、時間にわたってサブカルチャーでき、神経生物学研究や神経薬学研究及びCNS薬剤発見の努力、並びに治療のために、これらの細胞に対する種々の神経活性組成物の効果をアッセイするのに使用できるO-2A前駆体及びO-2A前駆体由来の細胞の培養物を取得する必要性もある。

【0009】

更なる目的は、システムの非常な複雑性を考慮して、このような前駆体の単離と培養の条件を最適化することである。実際、CNSには多数の型の細胞が存在し、それらの成長と分化に影響を与える多数の異なる神経栄養因子が存在する。細胞の型や、細胞が存在する脳の領域に依存して、異なる神経栄養因子又は因子の特異的組合せが、インビボで細胞の生存、増殖、分化に影響を与える。各型の細胞が、神経伝達物質、神経栄養因子、及び天然環境における他の分子の異なる組み合わせに応答する。 20

【0010】

更なる目的は、問題の遺伝子を含む遺伝子工学操作されたO-2A前駆体及びそれらの子孫細胞を提供することである。

更なる目的は、インビボでO-2A前駆体及びそれらの子孫を特徴付けるマーカーを同定する方法を提供することである。 30

【0011】

記載した目的に基き、第1の局面によれば、本発明は、多能性細胞を含む哺乳動物神経下垂体(NH)細胞の単離された集団に関する。

該多能性細胞は、少なくともオリゴデンドロサイト及び/又はアストロサイト及び/又はニューロンに分化できる。

1実施態様によれば、該集団は、構造が未だ発達している新生児神経下垂体由来であるか、又は成熟した神経下垂体由来である。

1実施態様によれば、該集団は、生理的刺激後の成熟した神経下垂体由来である。

1実施態様によれば、該集団は、適切な培養培地で培養した神経下垂体の外植体である。 40

【0012】

本発明はまた、細胞集団の取得方法であって、神経下垂体外植体からの懸濁液を調製する工程、該集団の成長及び/又は増殖用の適切な培地中で懸濁液を培養する工程を含む方法に関する。

本発明はまた、細胞集団の単離方法であって、

- 培養で維持でき、少なくともオリゴデンドロサイト及び/又はII型アストロサイト及び/又はニューロンに分化する能力を有する前駆細胞を含む神経下垂体外植体を培養すること；

- 該外植体を、該外植体の前駆細胞の増殖を引き起こす薬剤と接触させること；

- 該外植体から、該薬剤に応答して増殖する前駆細胞を単離すること； 50

を含む方法に関する。

【0013】

本発明はまた、O-2A前駆細胞及び/又はそれらの子孫の取得方法であって、

- 培養で維持でき、分化する能力を有する前駆細胞を含む神経下垂体外植体を培養すること；
- 該外植体を、該外植体の前駆細胞の増殖とオリゴデンドロサイト及び/又は2型アストロサイトへの分化を引き起こす薬剤と接触させること；
- 懸濁液を、O-2A前駆細胞及び/又はそれらの子孫のマーカーと接触させること；
- O-2A前駆細胞及び/又はそれらの子孫を単離すること；

を含む方法に関する。

O-2A前駆細胞及び/又はそれらの子孫の単離技術は、例えば、磁気分離、抗体被覆磁気ビーズ、アフィニティークロマトグラフィ、マトリックス結合抗体、増殖因子への応答、特異的遺伝子発現、抗原的細胞特異的表面マーカー、基本的形態学の1つを含み得る。

方法は、神経下垂体O-2A前駆細胞及び/又はそれらの子孫を少なくとも50%含む単離された細胞組成物の調製を更に含み得る。

【0014】

本発明はまた、神経下垂体から得られる前駆細胞の成長、増殖及び/又は分化の1つを調節する能力を有する化合物のスクリーニング方法であって、

- 培養で維持でき、分化する能力を有する前駆細胞を含む神経下垂体外植体を培養すること；
- 該外植体を、該外植体の前駆細胞の増殖を引き起こす薬剤と接触させること；
- 該外植体を試験化合物と接触させること；
- 試験化合物無しの結果と比較することによって、前駆細胞の成長、増殖及び/又は分化の1つに対する効果を検出すること；

を含む方法に関する。

【0015】

本発明はまた、形質転換された哺乳動物多能性オリゴデンドロサイト-2型アストロサイト(O-2A)前駆細胞及び/又はそれらの子孫の単離された集団の取得方法であって、少なくとも核酸の導入を含む方法に関する。核酸は、同種由来又は異種由来であり得る。形質転換は、即ち遺伝子工学であり得る。

核酸は、問題の遺伝子又は遺伝子のフラグメントであり得、O-2A前駆体及び/又はそれらの子孫への導入は、異常機能を正し、又は新規特徴を誘導するであろう。核酸は、例えば、治療遺伝子、神経栄養因子もしくは生存因子の遺伝子、遊走因子の遺伝子、不死化オンコジーン、ベータガラクトシダーゼ遺伝子などのマーカー遺伝子、選択圧下での、成長する能力を同定するのを可能とする選択マーカーであろう。

本発明はまた、該方法によって得られる、形質転換された哺乳動物多能性O-2A前駆細胞及び/又はそれらの子孫の集団に関する。

【0016】

本発明はまた、脳の少なくとも1ヶ所に神経下垂体O-2A前駆細胞及び/又はそれらの子孫を提供する方法であって、脳へのO-2A前駆細胞の移植を含む方法に関する。実際、神経下垂体O-2A前駆体は、特に脳において遊走能力を有し、それによって、O-2A前駆体は、細胞が移植される第1の場所から、細胞が分化し得る、少なくとも第2の場所に遊走できることが示されている。

本発明はまた、O-2A前駆細胞は、予め形質転換されている、この方法に関する。

【0017】

本発明はまた、O-2A前駆細胞を含む神経下垂体外植体のインビボ発達及び分化のアクセシ方法であって、

- 新生児又は成熟した神経下垂体外植体を抽出すること；
- 外植体を標識し、新生児又は成熟した哺乳動物脳の周室部に外植体を移植すること；
- 脳内で移植細胞の分布を同定すること；

10

20

30

40

50

を含む方法に関する。

本発明はまた、多能性 O - 2 A 前駆細胞及び / 又はそれらの子孫を特徴付ける表面マーカーを認識できる抗体のスクリーニング方法であって、適切な培地で該細胞を培養し、試験抗体を加え、抗体 - マーカー複合体を同定することを含む方法に関する。

本発明はまた、多能性 O - 2 A 前駆細胞及び / 又はそれらの子孫を特徴付ける表面マーカーを認識できる抗体の提供方法であって、該細胞で動物を免疫化し、産生された抗体を単離することを含む方法に関する。

【 0 0 1 8 】

本発明はまた、神経下垂体から抽出され、少なくともオリゴデンドロサイト及び / 又はアストロサイト及び / 又はニューロンに分化できる単離された哺乳動物前駆細胞に関する。 10

本発明はまた、少なくとも 1 つの上記単離された細胞の取得方法であって、

- 培養で維持でき、少なくともオリゴデンドロサイト及び II 型アストロサイトに分化する能力を有する前駆細胞を含む神経下垂体外植体を培養すること；

- 該外植体から、少なくともオリゴデンドロサイト及び II 型アストロサイトに分化する能力を有する少なくとも 1 つの前駆細胞を単離すること；

を含む方法に関する。

【 0 0 1 9 】

本発明はまた、神経下垂体 O - 2 A 前駆細胞及び / 又はそれらの子孫の集団、又は形質転換された該集団、並びに医薬上許容できるビヒクルを含有する医薬組成物に関する。 20

本発明はまた、細胞集団として、O - 2 A 前駆細胞及び / 又はそれらの子孫を少なくとも 5 0 % 含有する、上記組成物に関する。

本発明はまた、神経障害又は神経疾患用の医薬として使用される、このような組成物に関する。

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、神経障害又は神経疾患の治療用の医薬組成物の製造のための、上記方法によって得られる集団の使用に関する。

本発明はまた、神経障害又は神経疾患の治療用の移植片の製造のための、神経下垂体の外植体の使用に関する。

神経疾患は、特にアルツハイマー病、パーキンソン病であり得る。

【 0 0 2 1 】

本発明の他の性質及び利点は、図面によって図示される、以下の詳細な説明から明らかであろう。 30

色は、細胞型のより良き観察を可能とする、マーカー及び蛍光化合物による染色を指す。

【 0 0 2 2 】

ここで本発明をより詳細に説明する。

用語「前駆細胞」(又は、現在、用語「幹細胞」も使用される)は、増殖でき、より前駆体の細胞を生じることができる未分化細胞を指す。より前駆体の細胞は、特殊化された特徴を示す子孫と言われる十分に分化した細胞に分化する多数の細胞を産生する能力を有する細胞である。神経下垂体 O - 2 A 前駆細胞は、神経下垂体の神経葉に存在し、分化した子孫、即ち、成熟した、機能を有するオリゴデンドロサイト及び 2 型アストロサイトを 40

生じさせる前駆細胞集団を指す。「O - 2 A 前駆体」又は「O - 2 A 前駆細胞」を区別せずに用いる。

用語「外植体」は、哺乳動物身体から取られ、人工培地中で増殖させた器官、即ち、神経下垂体の一部を指す。

用語「細胞の単離された集団」は、細胞は身体から抽出されることを意味する。例えば、神経下垂体の神経葉の解剖は、単離技術である。更に単離への工程は、細胞を少なくとも 7 5 % 含む調製物を得るための精製である。

用語「培養培地」は、生細胞の培養のための調製物である。組織培養は、構造と機能を保存するように、インビトロでの組織、即ち、外植体の維持又は増殖を指す。細胞培養は、インビトロでの細胞の増殖を指す；細胞は、増殖し、及び / 又は分化するが、組織には組 50

織化されない。

【0023】

視床下部 - 神経下垂体系は、オキシトシンとバソプレッシンを分泌し、適切な刺激にตอบสนองして、大人で顕著な可塑性を示す。下垂体後葉細胞は、下垂体の神経葉 (NH) の主要な細胞要素である。それは、グリア細胞の形態的特徴を有し、グリア線維状酸性蛋白質 (GFAP) (Salm et al., 1982)、及び初期グリアマーカーであるビメンチン (Marin et al., 1989) と S-100 (Cocchia and Miani, 1980) に対して免疫反応性である。

静止状態で、下垂体後葉細胞は、神経分泌軸索と、視床下部からの大型細胞ニューロン終末を取り囲み、血管壁と神経分泌終末との間の物理的障壁を形成し得る。例えば、分娩、泌乳、又は脱水によって刺激されるとき、軸索終末と血管の並置が増大すると、一般的循環にニューロペプチドが放出される。生理的刺激にตอบสนองして形態的变化を行う下垂体後葉細胞の能力は、ポリシアリル化神経細胞接着分子 (PSA-NCAM) の発現に依存する (Theodosis et al., 1991; Theodosis and Poulain, 1999)。NHは、ミエリン化軸索を含まず、従って成熟オリゴデンドロサイトを含まない。

10

【0024】

本出願人は、下垂体後葉細胞に加えて1つの細胞集団を同定した。それは、成熟した及び発育中のげっ歯類神経下垂体で、O-2A前駆体のインビトロとインビボの両方の表現形質マーカーを発現する。このために、本出願人は、以下の主要な方法を用いた。

20

【0025】

動物

使用した動物は、繁殖コロニーで作出されたオスのラット (Sprague-Dawley) とマウス (Swiss株) である。新生児齢は、誕生日として新生 (PN) 日0として計算した。PN0~3のラットとマウスの仔並びに成熟ラットを用いた。動物の使用を含む方法の全ては、欧州動物ケアガイドライン及び指針に従って行った。

【0026】

抗体

O-2A前駆体及びそれらの子孫の細胞集団の同定を可能とする、異なる抗体を解析に用いた。異なる抗体を以下に列挙する。

30

【0027】

【表1】

名前	種、クラス	作業希釈	購入先/提供元
GFAP	マウス IgG	切片で1:4000 細胞で1:500	Sigma, 仏国
BrdU	マウス IgG	1:100	DAKO
O4	マウス IgM	純上清	ATCC
Ga1C	マウス IgG	純上清	ATCC
ビメンチン	マウス IgM	1:200	Sigma, 仏国
A2B5	マウス IgM	純上清	ATCC
Men B	マウス IgM	純上清	我々の実験室から
S-100	ウサギ	1:300	DAKO
NG2	ウサギ	1:1000	Chemicon
NG2	マウス IgG	1:25	Chemicon
NeuN	マウス IgG	1:50	Chemicon
MBP	マウス IgG	1:50	Euromedex
CNPase	マウス IgG	1:100	Sigma, 仏国

40

【0028】

50



蛍光標識第2抗体の全ては、Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, 米国) からであった。

グリア線維状酸性蛋白質 (GFAP) (アストロサイト細胞骨格マーカー)、ガラクトセレブロシド (GalC) (オリゴデンドロサイトマーカー)、O4 (オリゴデンドロサイトマーカー) 及び A2B5 (オリゴデンドロサイト表面マーカー) は、O-2A 前駆体及びそれらの子孫を同定できる神経細胞特異的表面マーカーである。

【0029】

#### 脱水及び BrdU 組み込み実験

成熟ラットを個別に住ませ、通常飲用水又は 2% NaCl 溶液で 9 日間維持した。殺す前に、BrdU (リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS, pH 7.4) 中 10 mg/ml) (Sigma, 仏国) の 4 回の注射 (50 mg/kg) を、12 時間間隔で腹腔内に与えた。各実験で、少なくとも 3 匹の対照と 3 匹の脱水ラットを用いた。

10

切片、組織片、外植体培養物を、Mowiol (Calbiochem, USA) にマウントし、Zeiss AxioPhot 蛍光顕微鏡又は共焦点顕微鏡で検査した。

【0030】

#### 統計解析

増殖は、3 匹対照ラットと 4 匹脱水ラットの各々に関し 3 ~ 4 個の無作為選択切片で BrdU - 陽性細胞を計測することによって推定した。表面積は、Visioblab 2000 ソフトウェア (Biocom) を用いて計算し、データは、 $\mu\text{m}^2$  当り BrdU + 細胞の数として表した。

20

対照と他の条件との間の差異の有意性は、StatView - Student ソフトウェアを用い ANOVA で計算した。NG2 - 陽性細胞の数は、成熟ラットからの 2 個の無作為選択切片で計測し、TOPRO3 核マーカーによって同定される細胞総数と比較した。

【0031】

#### 免疫組織化学及び BrdU 染色方法

PBS 中 4% パラホルムアルデヒドで動物を灌流した。下垂体を、4 で PBS 中 4% PF 中で 1 時間後固定を行い、PBS で洗浄し、30% シュークローズ中で低温保護した。低温切片作製後、水平連続切片 (35  $\mu\text{m}$ ) を PBS 中に集め、4 で一晚 1 次抗体とインキュベートし、洗浄し、室温で 1 時間、適切な蛍光 2 次抗体とインキュベートした。必要な場合、透過化処理を、0.1% Triton-X100 を用いて、室温で 20 分間行った。A2B5 抗体標識に関し、新鮮な全体マウント NH 片を、室温で 1 時間、1 次抗体とインキュベートした。徹底的な洗浄と、PBS 中 4% PF 中での 10 分間固定後、片を、室温で 1 時間、適切な蛍光 2 次抗体とインキュベートした。

30

BrdU 標識のために、調製物を、漂流切片に関し 2N HCl と 0.5% Triton X-100 中 37 で 30 分間、又は組織片と外植体培養物に関し 2N HCl 中室温で 20 分間インキュベートした。0.1M の 4 ホウ酸ナトリウム中で 3 回の洗浄後、抗 BrdU 抗体とのインキュベーションを、漂流切片に関し 4 で一晚、又は外植体培養物と組織片に関し室温で 1 時間行った。洗浄後、適切な蛍光 2 次抗体とのインキュベーションを行った。2 重染色の場合、1 次抗体インキュベーション後、BrdU 標識を行った。必要な場合、TOPRO3 (Molecular Probes, PBS 中 1:1000) を用いて、マウント前に、核染色を行った。

40

【0032】

#### 神経下垂体の外植体培養物

神経下垂体の培養を、Wang ら (Wang et al., 1994) (引用により本明細書に含まれる) に記載のように行った。簡単に言うと、P0 - P3 ラット仔又は成熟ラット (記載時) からの下垂体を、Hanks BSS 中で切開した。それから脳膜を剥ぎ取り、前葉と中葉から注意深く、神経葉を分離した。ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) + 10% ウシ胎児血清 (FCS) 培地中で、各 NH を 4 ~ 6 片に分離した。次いで、0.4% メチルセルロース (Sigma, 仏国) 存在下、bFGF (10 ng/ml), PDGF-AA (10 ng/ml) 及び NT3 (10 ng/ml) を補

50

充した血清非含有培地 (DMEM-F12培地、100 µg/mlヒトトランスフェリン、5 µg/mlインスリン、100 µMブトレシン、20 nMプロゲステロン、30 nM亜セレン酸ナトリウムを補充; DMEM, GIBCO) 中、ポリ-L-リシン処理ガラスカバースリップ上で断片を体外培養した。

5% CO<sub>2</sub> 及び95% 空気雰囲気中、37 °C で培養物をインキュベートした。

全体マウント調製物に関し、上記のように、PBS中4% PFA中での10分間の固定後、インビトロ外植体培養物の標識を行った。

これらの実施の他に、特記されていなければ、本発明では、細胞培養、細胞生物学、分子生物学の従来 of 適切な技術を使用する。

O-2A前駆体のインビボとインビトロの同定に関する好適な実施態様をここで記載する。 10

#### 【0033】

##### 脳移植によるO-2A前駆体のインビボでのキャラクタリゼーション

新生児マウス神経下垂体の脳移植を以下のように行う。

移植は、以前に記載のように (Vitry et al., 1999) (引用により本明細書に含まれるものとする) 行った。簡単に言うと、新生児マウスからのNH片を、37 °C で30分間、10 µg/mlヘキスト (Hoechst) 33342を含有するDMEM-10% FCS中でインキュベートし、DMEM中で洗浄し、左大脳半球の脳室下帯の近く、新生児マウスの脳に注入した。移植後異なるときに (5、15、21日)、マウスを殺し、クリオスタット切片のために、脳を加工した。連続前後方向切片 (14 µm) を集め、ヘキスト標識細胞をUV光下検出した。ヘキスト陽性細胞を含む切片を、Vitryらによる記載のように (Vitry et al., 1999)、免疫蛍光標識のために使用した。スライドを、Fluoromountにマウントし、Wild Leitz DM蛍光顕微鏡を用い解析した。 20

#### 【0034】

第1に、本出願人は、固有のO-2A前駆体が、GalCなどの分化したオリゴデンドロサイトマーカーを発現している細胞の非存在下、成熟ラットNHに存在することを示した。これらのO-2A細胞は、下垂体後葉細胞とは異なる。

結果は以下のものである。突起担持ビメンチン - (図1a, 赤) 又はS-100 - (図1b, 赤) 陽性細胞として、成熟ラットNHの切片において、下垂体後葉細胞は明瞭に同定できた。NG2、即ち、初期グリア前駆体によって発現される内在性膜コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (Nishiyama et al., 1997) に対して陽性の細胞はまた、構造に存在していた (図1a及び1b, 緑)。NG2+細胞 (総細胞数の約9%) は、下垂体後葉細胞とは異なる細胞集団を表すビメンチン - (図1a) 及びS-100 - (図1b) 陰性であることを、2重標識は示した。 30

#### 【0035】

対照条件下に維持された成熟ラットのNHに、O-2A前駆体が存在することを明確に確認するために、A2B5抗体を、この集団に対する第2マーカーとして使用した。

非特異的染色をさけるために、記載されたように、新鮮な非固定の成熟ラットNH片で全体マウント標識を行った。A2B5抗原を発現している丸形の2極性の、又は短突起担持の、多極細胞を、組織で観察した (図1c)。更に、抗GalCを用いる切片での免疫蛍光で、抗体は、NH中に標識を示さなかった (示さず)。 40

#### 【0036】

更に、脱水の刺激に应答して、発達中、又は成熟の両方のインビボで、O-2Aは分裂できることを、本出願人は示した。

分裂O-2A前駆体が、NH中にインビボで見出せることが最初に決定された。P3ラットにBrdUを注射し、4時間後に殺した。共焦点顕微鏡を用いて、全体マウント調製物で、分析した全てのNH (n=3) で、A2B5+/BrdU+細胞の存在を明瞭に我々は観察し (図1d) た。このことは、これらの前駆体はNH発育中に存在し、正常に分裂することを示した。

## 【0037】

更に、成熟ラットにおいて、細胞増殖は、インビボで脱水刺激によって刺激されることが決定された。

飲用水の生理食塩水での置換の9日後、対の対照に対し、NHで細胞増殖は増大した。これらの実験では、対照又は9日脱水成熟ラットは、殺される2日前に4回のBrdU注射を受けた。抗BrdU抗体を用いる免疫染色を、対照及び脱水ラット(それぞれ、図1g及び1h)からのNH切片で行った。以前に記載されたように(Murugaiyan and Salm, 1995)、対照動物と比較して、脱水では、BrdU+細胞の密度は有意に増加していた(図1i)。抗A2B5又は抗NG2抗体と一緒にBrdU抗体によって、全体マウント調製物と切片の両方で2重標識を行った。対照と刺激条件の両方で、A2B5+(図1e及び1f)及びNG2+(図1j及びk)細胞が観察された。脱水ラットNHで、A2B5+/BrdU+(図1f)又はNG2+/BrdU+(図1k)細胞が明瞭に同定されたが、A2B5+/BrdU+細胞は、対照サンプルでは殆ど見つからなかった(図1e及び1j)。

10

## 【0038】

更に、他の神経領域からのO-2A前駆体のインビトロ特徴を、O-2A前駆体が見せることを示すために、培養システムを構築した。

インビトロで、成熟ラットNHからのO-2A前駆体のキャラクタリゼーションは次のように行った。

成熟NH外植体を用いるインビトロアッセイをした。ミクロ切開前に、対照及び脱水成熟ラットにBrdUを注射した。

20

## 【0039】

NHを切取し、栄養因子の非存在下、合成培地で培養したとき、外植体の周りに細胞遊走は観察されなかった(示さず)。視神経O-2A前駆体の遊走、増殖、生存を支持することが知られているbFGF、PDGF、NT3(McKinnon et al., 1990; Barres et al., 1994)が合成培地に加えられるとき、対照及び脱水NHの両方で3日後、時々細胞遊走が観察される。これらの可動性細胞は、2極性形態、丸形細胞体、2つの長い突起を有し(図2a)、A2B5+(図2b)である。対照ラット外植体では、A2B5+/BrdU+細胞は、A2B5+遊走集団の間では決して観察されない(図2c)。対照的に、脱水ラットからの外植体では、A2B5+/BrdU+遊走細胞は観察される(図2d)。

30

一緒に考えると、データは以下のことを示す。即ち、インビボで脱水後、A2B5+分裂細胞、及びインビトロで2極性の遊走細胞を与えることができる固有の細胞が、成熟NHに存在する。

## 【0040】

新生児ラットNHからのO-2A前駆体のインビトロキャラクタリゼーションは以下のように行った。

成熟NH外植体は、遊走O-2A前駆体の貧弱な源であるので、新生児NH外植体を用いて、これらの細胞のキャラクタリゼーションも行った。

第1セットの実験で、NH外植体は、10% FCSを補充したDMEMで培養した。外植体の周りに線維芽細胞と内皮細胞の広範な出現が観察された(図3a)。この単層の上の細胞の大多数はGFAP+であることを免疫蛍光標識は示した。

40

第2セットの実験で、新生児NHを、bFGF、PDGF、NT3を補充した合成培地で培養した。線維芽細胞、内皮細胞、2極性細胞(Wang et al., 1994)が、遊走細胞の中で観察され、A2B5標識を用いて、これらの細胞の中でO-2A前駆体を同定した(図3c)。オリゴデンドロサイト系列に向かう分化は、段階特異的マーカーの発現を解析することによってモニターした。体外培養24時間後、遊走2極性細胞は、PSA-NCAM+(図3d及び3e)かつA2B5+(図3f)であったが、まばらな多極細胞はO4抗原を発現した(図3g)。補充された合成培地での体外培養48時間後、PSA-NCAM+細胞がまれに見出されたが(示さず)、細胞の大部分は、多極性、

50

A 2 B 5 + ( 図 3 h 及び 3 i )、及び O 4 + ( 図 3 j ) であった。14 日後、細胞は、成熟オリゴデンドロサイトの典型的形態を有し、O 4 ( 図 3 k ) 及び Gal C ( 図 3 l ) 抗原を発現し、MBP 標識 ( 図 3 m ) を示した。これらの条件下、試験した時点のいずれでも、抗 - I I I チューブリン抗体又は抗 NeuN 抗体でモニターされるような、ニューロン表現型を発現する細胞は観察されなかった ( 示さず )。

従って、新生児ラット NH からの O - 2 A 前駆体は、インビトロで、成熟オリゴデンドロサイト又はアストロサイトを生じさせることができる。

#### 【 0 0 4 1 】

更に、本出願人は、新生児 NH 由来 O - 2 A 前駆体のインビボ遊走能及び分化能を示した。

新生児マウス NH 外植体をヘキスト標識し、上記方法のように、新生児マウス脳の周室部に移植した。14 のうち 3 つの移植脳はヘキスト + 細胞を欠いており、それ故、解析から除外された。異なるインキュベーション期間後、他のレシピエントは、注入部位の近く、即ち、脳室下帯 ( S V Z、n = 5 )、脳室背側側面壁 ( n = 2 )、ロストラル・ミグレートリイ・ストリーム ( r o s t r a l m i g r a t o r y s t r e a m ) の近位部 ( R M S、n = 1 )、並びに、脳梁、及び脳室側面に接する線条 ( それぞれ、n = 2 及び 1 ) で、ヘキスト + 細胞を含むのが見出された ( 表 2 )。S V Z 近くに移植された、まばらなヘキスト + 細胞は、嗅球まで遊走した ( 図 4 )。各場合のヘキスト + 細胞の分布を表 2 に要約する。

#### 【 0 0 4 2 】

##### 【 表 2 】

移植後、NH 由来ヘキスト + 細胞のインビボ分布

動物 n°	野生型 NH フラグメント										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
移植後日数	1	5	5	15	15	21	21	21	21	21	21
側面切片											
海馬	+	+									
脳梁		+									
脳室背側	+	G+			+	+				G+	
脳室腹側		+									
正中切片											
海馬			++	+	+				++		
線毛 / 脳弓			++	+					++		
脳梁				++	+		G		G		++
脳室下帯	G		G	+	G+	G		+			G+
線条								G			
ロストラルミグレートリイストリーム	++			G+							+
嗅球				+							+

#### 【 0 0 4 3 】

注意。新生児マウスの脳室下帯近くに移植後の新生児 NH フラグメントからのヘキスト + 細胞の時空分布。移植された脳は、移植後 1 ( n = 1 )、5 ( n = 2 )、15 ( n = 2 )、21 ( n = 6 ) 日に解析された。+ 及び ++ 記号は、各脳領域で見出されるヘキスト + 細胞の数の半定量的表示を表す。G は移植場所である。

#### 【 0 0 4 4 】

移植 NH ヘキスト + 細胞のグリア発生性質、免疫蛍光解析は、種々のマーカーを用いて行った。種々の脳場所で CNPase ( 図 5 a - 5 d ) 又は GFAP ( 図 5 e - 5 h ) を発現するヘキスト + 細胞が見出された。

この結果は、NHからの細胞は、アストロサイト及び成熟オリゴデンドロサイトの両方をインビボで生じさせることができることを示す。

非常に驚くべきことに、抗NeuN抗体(特異的ニューロンマーカー)を用い、ヘキスト+細胞の一部はまた、ニューロンとして分化することが示された。これらの細胞は、神経性大脳皮質、時には脳梁に存在し、側面壁から皮質に遊走する(図5i-5l)。従って、新生児マウス脳に移植されたNHは、ニューロン前駆体の完全な非存在下、ニューロンを産生できた。新生児脳への神経下垂体の異型移植は、ニューロン、並びにアストロサイト及びオリゴデンドロサイトを産生できる多能性細胞の存在を示した。これらのニューロンが、O-2A前駆体由来であるか、下垂体後葉細胞由来であるかは明瞭ではないが、いずれでも、単離された神経下垂体の断片の移植は、インビボでニューロンを産生する効率が高い。

#### 【0045】

本発明者によれば、NHの神経外胚葉性及び局所性起源の両方は、この構造におけるO-2A前駆体の存在と一致する。更に、分裂O-2A前駆体は、神経葉が未だ発達中の新生児ラットに存在するが、これらの細胞は下垂体の形成にあずかることが示唆される。インビボとインビトロの両方の本研究は、O-2A前駆体がNHの固有の細胞であり、この構造の主要細胞型、即ち、下垂体後葉細胞を生じさせ得ることが強く示唆されることを示した。支持として、本出願人は、NHは、A2B5+/NG2+ O-2A前駆体より他のオリゴデンドロサイト系列細胞を含まないことを示した。更に、血清存在下、これらの細胞は、下垂体後葉細胞の特徴であるGFAP+細胞に分化する。興味深いことに、周産期構造からのO-2A前駆体は、成熟NHのそれよりも速く分裂することが観察された。

#### 【0046】

上記結果の他に、本発明者は、成熟した神経下垂体に存在する幹細胞集団の同定と精製に非常に良好な進歩をなした。実際、周知の、非常に良くキャラクタライズされた幹細胞集団を用いるとき、幹細胞の効率的な培養及び/又は移植が有意に増大する。このような知見は、単離実験を計画することを可能とし、成熟したNH内の潜在性幹細胞の数を増大させるのを可能とする。図6~9に示す以下の結果は、「更なるキャラクタリゼーション」といい、成熟したラットNHに存在するグリア細胞集団をキャラクタライズするのを可能とし、刺激が、構造中のグリア細胞とO-2A前駆体の総数を調節し得る方法を解析するのを可能とした実験を要約する。

#### 【0047】

##### 成熟ラットNHにおける細胞多様性

単離への予備的工程は、どの細胞が幹細胞能を有するかをNHで同定することである。本発明者は、亜集団が区別できるかどうかを決定する観点で、NHからの通称「下垂体後葉細胞集団」をキャラクタライズした。この目的のために、グリア細胞系列の異なるマーカーを用い、共焦点顕微鏡を用い、免疫組織化学解析を行った。更に、細胞を計測し、偽陽性になり得る突起染色からサイトプラズムを明確に区別し得るために、核マーカーを用いた。

上記本文で記載したように、下垂体後葉細胞が十分に分化する時点で、O-2A前駆体が成熟ラットNHに存在することを、本発明者は示した。この集団は、NG2ガングリオシドマーカーによって特徴付けられ、総細胞数の9%を表した(図6D)。GFAP陽性細胞は、突起担持細胞として成熟ラットNHの切片で明確に同定できた(図6A)。アストロサイトマーカーGFAP(図6A)、S100(図6B)、ビメンチン(図6C)は、構造内の総細胞のそれぞれ15%、22%、13%を標識した。

#### 【0048】

2重免疫染色及び共焦点は、全集団の4%がGFAPを発現し、初期グリア分化マーカービメンチンに陽性であった(図7B)。S-100集団のほんの9%及び7%が、それぞれGFAPとビメンチンマーカーに陽性であった。結果は、下垂体に存在するグリア集団の高度の不均一性を示唆し、S100マーカーは、このグリア集団の大部分を標識するらしいことを示した。

10

20

30

40

50

表されたNG2集団は、GFAP（示さず）陽性でもビメンチン（図7D）陽性でも決してなかった。まばらなNG2細胞は、低レベルのS-100を発現していた（図7E）。成熟NHでの下垂体後葉細胞集団は、不均一であるようであり、同一系列の成熟段階を表し得る（図7F）。

Gudino-Cabrera及びNieto-Sampedro（2000）からの仕事は、下垂体の下垂体後葉細胞のマーカーとしてp75 NTRを用いた。本発明者は、2重染色及び共焦点解析を用い、この発現を再試験した。p75 NTR免疫染色は、NHに存在する細胞の小部分を標識した（図8A及びD）。この集団をより良くキャラクタライズするために、以前にキャラクタライズされたグリア集団のマーカーを用い、2重染色を行った；p75 NTRとGFAPの共存は決して観察されなかった（図8B-C）。p75 NTR集団からのまばらな細胞はNG2+であった（図8E-F）。全体的にいて、これらの結果の示唆によれば、下垂体後葉細胞は、細胞の均一集団ではなく、各亜集団は、構造内で可能性のある幹細胞を表し得る。

#### 【0049】

##### 脱水後及び再水分補給間の細胞増殖

全集団に対するNHの潜在性幹細胞の比を変える条件を見出すために、プロトコルを設計した。NH細胞増殖割合は、細胞に浸透圧挑をかけることによってモニターした。刺激されたラットを9日間脱水し、対照動物と比較した。この期間の間、BrdUの毎日の注射を行い、両方の条件で増殖細胞を推定した。脱水9日後、対照条件の11.2（+/-0.7）と比較して、29.4（+/-2）細胞がフィールド当たりBrdU+であった（図9）。増殖下垂体後葉細胞のパーセンテージは、S100マーカーによる2重染色を行うことによって解析し、対照条件の4.1%（+/-0.3）と比較して、脱水ラットの増殖細胞の17.4%（+/-1.5）が下垂体後葉細胞（BrdU+/S100+）であることが示された。細胞増殖は、脱水3日後と6日後で、それぞれフィールド当たり40.9（+/-0.9）及び28.6（+/-5.4）と推定された。対照動物で、増殖細胞の割合は、3日と6日でそれぞれ11.4及び6.6（+/-0.6）であった。脱水終了後3日と6日で対照動物のそれぞれ7%及び2.8%（+/-2.8）と比較して、脱水動物で、分裂S100+細胞のパーセンテージは、17.9%（+/-1.2）及び21.0%（+/-1.0）であることが分かった。

#### 【0050】

この解析は、脱水により成熟NH内の細胞増殖の増大が起こり、下垂体後葉細胞（S100陽性細胞）は増殖することを示す。次いで、本発明は、成熟NHの脱水に作用することによって、精製前に潜在性幹細胞の数を調節する方法を提供する。

#### 【0051】

この「更なるキャラクタリゼーション」（図6~9）に関連する結果のために使用された特別の材料及び方法は以下のものであった。

#### 【0052】

抗体。解析のために使用した異なる抗体を以下に列挙する。

#### 【0053】

##### 【表3】

名前	種、クラス	作業希釈	購入先/提供元
GFAP	マウス IgG	切片で1:4000	Sigma, 仏国
BrdU	マウス IgG	1:100	DAKO
ビメンチン	マウス IgM	1:200	Sigma, 仏国
S-100	ウサギ	1:300	DAKO
NG2	ウサギ	1:1000	Chemicon
NG2	マウス IgG	1:25	Chemicon

#### 【0054】

全ての蛍光標識2次抗体は、Jackson Immunoresearch laboratories (West Grove, PA, 米国) からであった。

#### 【0055】

##### 脱水、再水分補給及びBrdU導入実験

12匹の成熟ラットを個々に住ませ、通常飲用水(6)又は2%NaCl溶液(6)で、9日間維持した。この期間中、全てのラットは、BrdU(リン酸緩衝化生理食塩水(PBS) pH7.4中10mg/ml)(Sigma, 仏国)の毎日1回の注射(50mg/kg)を受けた。各々の対照群と脱水群で2匹のラットを殺した。全ての他の動物は通常飲用水を受け、再水分補給期間の開始後、3日又は6日で殺した。2匹の対照と2匹の脱水ラットを、各実験時点で用いた。再水分補給期間の間、BrdU注射は行わなかった。

10

#### 【0056】

##### 組織処理

実験期間の最後に、ラットを深く麻酔し、PBS中4%パラホルムアルデヒド(PF)で灌流した。下垂体を、4で1時間、PBS中4%PFで後固定し、PBSで洗浄し、30%シュクロースで低温保護した。

低温切片化を以下のように行った。水平連続切片(35µm)をPBS中に集め、4切片毎に1個の15µm切片をカバースリップに集めた。各下垂体からルーチンに得た35µm及び15µm切片の総数は約7~9であった。

#### 【0057】

##### 免疫組織化学及びBrdU染色

切片を、4で一晩1次抗体とインキュベートし、洗浄し、室温で1時間、適切な蛍光2次抗体とインキュベートした。必要な場合、透過処理を、0.1%Triton-X100を用いて、室温で20分間行った。インビトロ外植体培養物の標識は、全体マウント調製物に関し上記のように、PBS中4%PF中での10分間の固定後に行った。

BrdU標識のために、調製物を、漂流切片(35µm)に関し、2NHClと0.5%TritonX-100中、37で30分間、又は組織片と外植体培養物に関し、2NHCl中、室温で20分間インキュベートした。0.1Mの4ホウ酸ナトリウム中で3回の洗浄後、抗BrdU抗体とのインキュベーションを、漂流切片に関し4で一晩行った。洗浄後、適切な蛍光2次抗体とのインキュベーションを行った。2重染色の場合、1次抗体インキュベーション後、BrdU標識を行った。必要な場合、実験に依存して、TOPRO3(Molecular Probes, PBS中1:1000)、又はヘキスト染色を用いて、マウント前に核染色を行った。

20

30

切片を、Mowiol(Calbiochem, USA)にマウントし、Zeiss AxioPhot蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡、又はCARV Zeiss分析共焦点顕微鏡で検査した。

#### 【0058】

##### 統計解析

所定のマーカーの陽性細胞の数を、成熟ラットからの少なくとも5個の無作為選択切片で計測し、実験セットアップに依存して、TOPRO3又はヘキスト核マーカーで同定された細胞の総数と比較した。増殖は、2匹の対照ラットと2匹の脱水ラットの各々に関し5個の無作為選択切片でBrdU陽性細胞を計測することによって推定した。表面積は、Visiolab 2000ソフトウェア(Biocom)を用いて計算し、データは、フィールド当りBrdU+細胞の数として表した。1フィールドの表面積は250µm<sup>2</sup>であった。

40

対照と他の条件との差異の有意性は、StatView-Studentソフトウェアを用いてANOVAで計算した。

#### 【0059】

インビボとインビトロで、NH中のO-2A前駆体をキャラクタライズした後、このような存在の神経生物学及び治療への適用の幾つかの例を、ここで記載する。

50

上記方法を用いることによって、本発明は、NHから単離されたO-2A前駆体の細胞集団を提供できる。O-2A前駆体は、適切な条件下培養して再生、分化、即ち、オリゴデンドロサイト、アストロサイトに再生、分化できる。この培養は、適切な方法、例えば、米国特許5,693,482に記載などの適切な方法によってなされよう。本発明は、NHを意味するO-2A前駆体の新規源の使用を可能とする。例えば、培養培地は以下のようであり得る。

【0060】

基礎培地は、100  $\mu$ g/mlヒトトランスフェリン、5  $\mu$ g/mlインスリン、100  $\mu$ Mブトレシン、20 nMプロゲステロン、30 nM亜セレン酸ナトリウムを補充したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)/F12(50/50);(DMEM,GIBC O)からなる。この培地は、培養でO-2A前駆体を維持するために、bFGF(10 ng/ml)、PDGF-AA(10 ng/ml)、NT3(10 ng/ml)で補充されている。O-2A前駆体をアストロサイトに分化させるために、基礎培地は、15%ウシ胎児血清(FCS)とPDGF-AA(10 ng/ml)で補充される。O-2A前駆体のオリゴデンドロサイトへの分化は、基礎培地で得られる。培養は、37、5%CO<sub>2</sub>及び95%空気雰囲気中で維持される。

10

【0061】

本発明は、ラット由来のO-2A前駆体を用いて説明される。しかし、O-2A前駆体及びそれらの子孫は、ヒト、及び非ヒト霊長類、ウマ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタなどからのNHから単離し得る。

20

本発明は、適切な培地でのO-2A前駆体の培養、分化及び単離から得られるO-2A前駆体又はそれらの子孫の濃縮集団を含む細胞調製物を提供する。得られる調製物は、選択された集団を大部分、又は少なくとも約75%、好ましくは90~95%含む。

神経下垂体外植体から前駆細胞を単離するために、前駆細胞の増殖を引き起こす薬剤が有用であるということが思い出させる。異なる技術を用いて、増殖を評価でき(DNA合成測定、形態変化など)、外植体で増殖した前駆細胞を単離できる(機械的単離、外植体の酵素消化に続く特異的細胞表面マーカーに基づく活性化前駆細胞集団の単離など)。(分化の特異的段階に付随する表面マーカーを同定できるモノクローナル抗体を用いて)O-2A前駆体を起源とする異なる細胞集団が同定されると、分離方法には、磁気分離、クロマトグラフィ、蛍光活性化細胞選別、支持体と反応する磁気ビーズなどのマーカーを用いる直接的分離を用い得る。

30

【0062】

遺伝子工学操作された哺乳動物多能性O-2A前駆体及びそれらの子孫を調製することは、更に非常に有用であり得る。それは、インビトロ遺伝子導入のために十分な細胞数に増殖させ、次いで、インビボ移植のために、培養される。問題の遺伝子をコードする核酸配列は、遺伝子が発現する多能性O-2A前駆体に導入される。これらの遺伝子として、神経栄養因子又は生存因子、不死化オンコジーン、マーカー遺伝子が挙げられる。

O-2A前駆体は不死化され、細胞を所定の発達段階で維持し得る。不死化の現在の技術として、典型的には、細胞へのオンコジーンのトランスフェクションが挙げられる。オンコジーンのトランスフェクションは、組換えレトロウイルス、化学的又は物理的方法(リン酸カルシウム カルシウム-リン酸-媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、リポソームに存在するプラスミドの挿入)の使用を含む適切なものによって、達成できる。

40

【0063】

例えば、1つの方法は、シミアンウイルス40(SV40)又はウシパピローマウイルスなどの真核生物ウイルスベクターを用い、O-2A前駆体に一過性的に感染又は形質転換することである。

アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニア、レトロウイルスを含む種々のウイルスベクターを不死化のために利用できる。単一外来遺伝子が挿入できるレトロウイルスの例として、モロニーマウス白血病ウイルス(MoMuLV)、ハーベ

50



イマウス肉腫ウイルス (H a M u S V)、マウス乳腫瘍ウイルス (M u M T V)、ギボン類人猿白血病ウイルス (G a L V) 及びラウス肉腫ウイルス (R S V) が挙げられる。幾つかの更なるレトロウイルスベクターは、多重遺伝子を組み込み得る。これらのベクターの全ては、選択可能マーカーの遺伝子を導入又は組み込み得、形質導入細胞は同定され得、産生でき得る。

【0064】

ヘルペスウイルスをベースとするベクターはまた、O - 2 A 前駆体に遺伝子を導入するために用いられ得る：ヘルペスウイルスは、潜在性感染を確立でき、神経細胞の一部と明白な非病原性関係を確立できる。例えば、H S V - 1 に基くようなベクターが使用できる。同様に、有用な送達及び発現ベクターを開発するために、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、他のパラミクソウイルス、そして、ヒト免疫不全レトロウイルス (H I V) さえも、のような C N S 細胞に効率的に感染するヒト及び動物ウイルスを使用することが可能であり得る。

10

組換えレトロウイルスが、不死化オンコジーンを含むように操作されるとき、オンコジーンは、不死化すると知られているものの任意の1つであり得る。例えば、このような通常使用される不死化遺伝子として、m y c ファミリー (c - m y c 及び v - m y c)、アデノウイルス遺伝子 (E 1 a 1 2 s 及び E 1 a 1 3 s)、ポリオーマラージ T 抗原及び S V 4 0 ラージ T 抗原の遺伝子が挙げられる。

【0065】

E . c o l i - ガラクトシダーゼ遺伝子などのマーカー遺伝子を、O - 2 A 前駆体に導入でき、これらの細胞及びそれらの子孫の同定を可能とする。ネオマイシン ホスホリボシルトランスフェラーゼ (ネオマイシン耐性) などの選択可能マーカー遺伝子を導入し、選択圧の存在下 (即ち、ネオマイシン含有培地)、増殖できる能力によって同定される遺伝子工学操作された O - 2 A 前駆体の集団を提供できる。

20

【0066】

薬剤を同定するために、特に、レセプター分子の遺伝子を用いて、多数の有用な遺伝子を O - 2 A 前駆体及びそれらの子孫に導入できる。例えば、このようなニューロンのレセプターとして、ドーパミン、G A B A、アドレナリン、ノルアドレナリン、セロトニン、グルタメート、アセチルコリン、及び種々の他のニューロペプチドと結合するレセプターが挙げられる。特定の神経起源の O - 2 A 前駆体における特別のレセプターの導入及び発現は、O - 2 A 前駆体型やレセプターが関与する疾患の治療に有用であり得る神経活性薬剤や栄養因子の同定を可能としよう。例えば、神経伝達物質に擬似し、レセプターに結合し、アンタゴニスト効果又はアゴニスト効果を示し、よって、O - 2 A 前駆体における応答を阻害又は刺激する神経活性化化合物が同定できる。

30

【0067】

親が十分には発現しない遺伝子を組み込む O - 2 A 前駆体及びそれらの子孫の、処理される親での導入は、有用であり得る。例えば、神経成長因子 (N G F) などの神経栄養因子をコードする遺伝子は、コリン作動性ニューロンの変性を防ごう。特に、基底前脳のコリン作動性ニューロンの変性を特徴とするアルツハイマー病の治療においては、そうである。ドーパミンのプレカーサーである L - D O P A をコードする遺伝子は、中脳の黒質のドーパミンニューロンの喪失を特徴とするパーキンソン病の治療に有用であろう。

40

【0068】

導入される遺伝子はまた、例えば、脳卒中の場合に、ある部位の細胞死の責を担う因子を阻害できる遺伝子、又は腫瘍に有効な遺伝子であり得る。

本発明はまた、C N S の細胞疾患の被験体の治療方法であって、被験体に、治療有効量の O - 2 A 前駆体又はそれらの子孫を投与することを含む方法を提供する。

C N S 疾患の被験体の治療方法は、疾患を有する C N S の領域への、O - 2 A 前駆体、又は、O - 2 A 前駆体からの分化を誘導されたオリゴデンドロサイトもしくはアストロサイトもしくはニューロンの脳内移植を含む。

O - 2 A 前駆体移植は典型的には、C N S への、又は脳室洞への、又は宿主脳表面の硬膜

50

下への、細胞の移植を含む。移植のこのような方法は、Neural Grafting in the Mammalian CNS, Bjorklund and Stenevi, eds., (1985) (引用により本明細書に含まれるものとする)に記載されている。方法として特に、移植時に脳実質にくっつけられるように、宿主脳内に組織の注入、又は組織を置くことによって達成される実質内移植(即ち、宿主脳内に)が挙げられる。

【0069】

レシピエント被験体の脳の選択領域へのO-2A前駆体の投与は、  
 - マイクロシリンジの針が挿入できるように、孔を開け、硬膜を突き通すこと；  
 - O-2A前駆体又は子孫調製物を、脊髄領域内に包膜内に注入し、脳又は脊髄の任意の  
 10 所定部位へのO-2A前駆体又は子孫の移植を可能とすること；  
 によってなされ得る。

【0070】

同じ細胞懸濁液を用いて、又は異なる解剖学的領域から、幾つかの異なる部位に同時に、多重移植がなされ得る：例えば、O-2A前駆体又は子孫(オリゴデンドロサイト又はアストロサイト)は、被験体のオリゴデンドロサイトが死んでしまった、多発性硬化症の被験体のCNSに移植できる。

CNS疾患の被験体の治療方法としてはまた、CNS疾患の治療に有用な他の治療方法と組み合わせてのO-2A前駆体の移植が考えられる。例えば、O-2A前駆体は、増殖因子、ガングリオシド、抗生物質、神経伝達物質、神経ホルモン、トキシン、神経突起促進  
 20 分子、及び代謝拮抗物質、及び、ドーパミンのプレカーサーであるL-DOPAなどのこれらの分子のプレカーサーなどの薬剤と共投与できる。

【0071】

NH外植体の移植後、分化すると非常に驚くべきことに見出されたニューロンに関し、NH外植体からの移植が、本明細書記載のように、現在なされ得る。移植は、種間、例えば、ブタニューロンからヒトへの移植、でなされ得る。

【0072】

本発明はまた、O-2A前駆体が、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、ニューロンへの増殖又は分化するのを阻害又は刺激することによってなどのように、O-2A前駆体  
 又は子孫に影響を与える組成物の同定方法を提供する。  
 30

【0073】

参考文献

Barres BA, Raff MC, Gaese F, Bartke I, Dechant G, Barde YA (1994) A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. Nature 367:371-375.

Butt MA (1998) Macrogliial cell types, lineage, and morphology in the CNS. Ann N Y Acad Sci 1991:633.

Cocchia D, Miani N (1980) Immunocytochemical localization of the brain-specific S-100 protein in the pituitary gland of adult rat. J Neurocytol 9:771-782. 40

Kondo T, Raff M (2000) Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. Science 289:1754-1757.

Levine JM, Stallcup WB (1987) Plasticity of developing cerebellar cells in vitro studied with antibodies against the NG2 antigen. 50

J Neurosci 1987, 7(9): 2721-31.

【0074】

Marin F, Boya J, Lopez-Carbonell A (1989) Immunocytochemical localization of vimentin in the posterior lobe of the cat, rabbit and rat pituitary glands. Acta Anat (Basel) 134: 184-190.

McKinnon RD, Matsui T, Dubois-Dalcq M, Aaronson SA (1990) FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. Neuron 5: 603-614. 10

Raff MC, Miller RH, Noble M (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. Nature 303: 390-396.

Salm AK, Hatton GI, Nilaver G (1982) Immunoreactive glial fibrillary acidic protein in pituitary cells of the rat neurohypophysis. Brain Res 236: 471-476.

Theodosius DT, Bonhomme R, Vitiello S, Rougon G, Poulain DA (1999) Cell surface expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological neuronal and glial plasticity. J Neurosci 19: 10228-10236. 20

【0075】

Theodosius DT, Poulain DA (1999) Contribution of astrocytes to activity-dependent structural plasticity in the adult brain. Adv Exp Med Biol 468: 175-182. 30

Theodosius DT, Rougon G, Poulain DA (1991) Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurohypophysial system. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 5494-5498.

Vitry S, Avellana-Adalid V, Hardy R, Lachapelle F, Baron-Van Evercooren A (1999) Mouse oligospheres: from pre-progenitors to functional oligodendrocytes. J Neurosci Res 58: 735-751. 40

Wang C, Rougon G, Kiss JZ (1994) Requirement of polysialic acid for the migration of the O-2A glial progenitor cell from neurohypophysial explants. J Neurosci 14: 4446-4457.

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、O-2A前駆体がNH固有細胞であることを示す。

成熟NH切片での免疫組織化学を、固有細胞集団を同定するために行った。抗ビメンチン (a, 赤) 抗体又は抗S-100 (b, 赤) 抗体による標識によって、下垂体後葉細胞は 50

認識される。抗NG2抗体(O-2A細胞のマーカー)を用いる2重染色は、下垂体後葉細胞とは異なる前駆体集団(a及びb, 緑)の同定を可能とする。細胞核(a及びb, 青)を同定するために、TOPRO3マーカーを用いる。全体マウント調製物のA2B5標識は、新生児(d, 緑)及び成熟(c及びe, 緑)対照動物並びに成熟脱水(f, 緑)ラットでの前駆体の存在を示す。抗BrdU抗体による2重標識は、それらの前駆体は、発達中増殖し(d, 赤)、脱水後、大人で増殖し(f, 赤)、一方、BrdU標識は、成熟対照ラットで観察されない(e, 赤)。抗BrdU及び抗NG2を用いる切片での2重標識は、NG2+細胞は、脱水後の成熟ラットで増殖するが(k)、成熟ラット対照では増殖しない(j)ことを示す。増殖は、BrdU組み込みと、抗BrdU抗体を用いる免疫組織化学によって解析される。成熟対照(g)又は脱水(h)ラット由来のNH調製物は、脱水後増殖において3倍増加することを示す(i)(対照動物で $\mu\text{m}^2$ 当り322+/ - 20 BrdU+細胞と比べて、脱水動物で $\mu\text{m}^2$ 当り1111+/ - 45 BrdU+細胞)。

10

スケールバー: a - b, j - k, 13  $\mu\text{m}$ ; c - f, 10  $\mu\text{m}$ ; g - h, 325  $\mu\text{m}$ 。

#### 【図2】

図2は、成熟ラットNHからのO-2A前駆体のインビトロキャラクタリゼーションを示す。

インビトロで成熟NH外植体から遊走する2極性細胞(a)は、O-2A前駆体と同定される、A2B5に免疫陽性である(b)。分裂細胞に組み込まれることができるBrdUが、外植前に、対照(c)又は脱水(d)成熟ラットに注入されるとき、2重陽性A2B5+(赤)/BrdU+(緑)細胞が生理的刺激(脱水)ラット(d)由来の外植体の増殖で観察されるが、これらは対照条件では決して見出されない(c)。E: 外植体。スケールバー, 58  $\mu\text{m}$ 。

20

#### 【図3】

図3は、新生児ラットNHからのO-2A前駆体のインビトロ2能性を示す。

血清が培養培地に含まれるとき、線維芽細胞と内皮細胞の広範な増殖が、外植体の周りに観察される(a)。免疫蛍光標識は、この単層上の細胞の大部分は、GFAP+、即ちアストロサイトであることを示す(b)。合成培地で、2極性A2B5+細胞は、明瞭に同定され、外植体から外に遊走している(c)。オリゴデンドロサイト系列に向かう分化は、段階特異的マーカーの発現の解析によって追跡された。外植24時間後、遊走2極性細胞(d)は、PSA-NCAM(e)とA2B5(f)の両方に免疫反応性であり、数個の細胞はO4抗原(g)を発現する。外植48時間後、細胞の大部分は、多極性、A2B5+(h及びi)、及びO4+(j)である。14日後、細胞は、成熟オリゴデンドロサイトマーカー、O4(k)及びGalC(l)に免疫陽性であり、MBP標識(m)を示す。E: 外植体。スケールバー: a - c, f - m, 58  $\mu\text{m}$ ; d - e, 37  $\mu\text{m}$ 。

30

#### 【図4】

図4は、宿主マウス前脳でのNH由来細胞の遊走を示す。

核を同定するために、新生児下垂体の断片を、ヘキストで標識し、マウスに移植した。宿主脳番号11(表2)の模式的前後方向図(a)は、移植後21日のヘキスト陽性細胞の再分配を示す。ヘキスト+細胞を含む部位を青点で図示する。部分的に点々で示された長方形(a)は、それぞれ、断面で、脳室下帯、ロストラル・ミグレートリィ・ストリーム、及び嗅球を示す(b)、(c)及び(d)におけるヘキスト+細胞の存在を示す。スケールバー: b, 350  $\mu\text{m}$ ; c - d, 175  $\mu\text{m}$ 。移植片は、宿主脳で生存でき、遊走できる細胞を含んでいた。

40

#### 【図5】

図5は、インビボにおける新生児マウス由来細胞の分化能を示す。

宿主脳切片の免疫蛍光解析は、表現型を同定するために、新生児マウスの脳周室部へのNH由来細胞の移植後21日目に行われた。

これらの切片は、ヘキスト+細胞(青)、抗CNPase(a - c, 緑)抗体標識細胞、抗GFAP(e - g, 赤)抗体標識細胞、又は抗NeuN(i - k, 緑)抗体標識細胞を

50

含む。例は、脳梁 ( a - d ) 及び線毛 ( e - h ) での宿主脳番号 9 ( 表 2 )、及び脳梁 ( i - l ) での宿主脳番号 7 ( 表 2 ) から選択された。矢の頭は 2 重陽性細胞を示す。スケールバー : a , e , i , 83  $\mu$ m ; b - d , f - h , j - l , 33  $\mu$ m。

【 図 6 】

図 6 は、成熟ラット神経下垂体におけるグリア細胞の多様性を示す。

グリア細胞集団に特異的な種々の抗体である抗 GFAP ( A )、抗 S100 ( B )、抗ビメンチン ( C )、及び抗 NG2 ( D ) で免疫標識を行った。NG2 抗体は、典型的なアストロサイト形態を示す GFAP 陽性細胞と比較して、小突起 ( D ) を有する細胞集団を標識した。定量的解析の結果は、括弧内に記載されている。

【 図 7 】

図 7 は、成熟 NH の下垂体後葉細胞集団は不均一であることを示す。

2 重標識免疫染色の共焦点解析は、下垂体後葉細胞集団のグリアマーカの分布を解析するために、行われた。グリアマーカは以下の組合せで用いた : GFAP / S100 ( A )、GFAP / Vim5 ( B )、Vim / S100 ( C )、NG2 / vim ( D ) 及び NG2 / S100 ( E )。色コードは、どのマーカが赤又は緑で示されるかを示すために図で使用される。青染色は、核標識に対応する。所定のマーカの 2 重陽性細胞の数は、成熟ラットからの少なくとも 5 つの無作為選択切片で計測され、核標識で同定された細胞の総数と比較された。定量的解析の結果が脇に書かれている。

( F ) 同一系列の成熟段階を表すことができる、成熟 NH 中の下垂体後葉細胞集団の模式図。

【 図 8 】

図 8 は、P75 NTR 免疫染色が NH に存在する細胞の小部分を標識した ( A 及び D ) ことを示す。

グリア集団のマーカとして、GFAP ( E 及び F , 緑 ) を用いて行われた 2 重染色は、P75 NTR 染色 ( 赤 ) との重複を示さなかった。p75 NTR 集団からのまばらな細胞 ( C , 赤 ) は、NG2 陽性であった ( C , 緑 )。

【 図 9 】

図 9 は、刺激の間の分裂下垂体後葉細胞の割合を示す。

刺激された成熟ラット ( A ) 又はペアの対照動物 ( B ) の切片を、抗 BrdU ( 緑 ) 抗体及び抗 S100 ( 赤 ) 抗体で標識した。矢は 2 重陽性細胞を示した。( A ) 脱水後 9 日目に、11.2 ( + / - 0.7 ) と比較して、フィールド当り 29.4 ( + / - 2 ) 細胞が BrdU+ であることを我々は観察した。( C ) 脱水後 9 日目 ( 9 D )、再水分補給期間の開始後 3 日目 ( 3 R ) 又は 6 日目 ( 6 R ) での増殖細胞の定量的解析。増殖下垂体後葉細胞のパーセンテージは、暗黒で表されており、フィールド当り増殖細胞の総数と比較されている ( 250  $\mu$ m<sup>2</sup> × 250  $\mu$ m ) 7.4 % ( + / - 1.5 )。

10

20

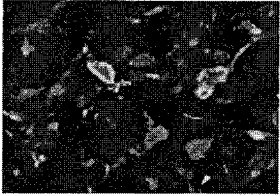
30

【 図 1 】

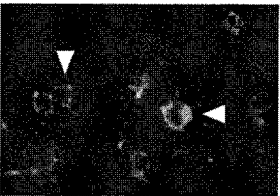
a



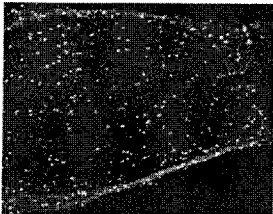
b



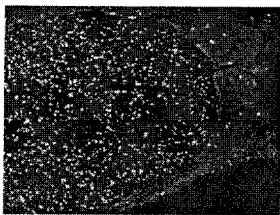
c



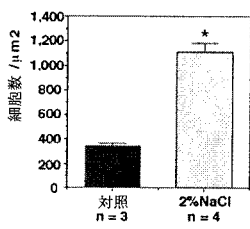
g



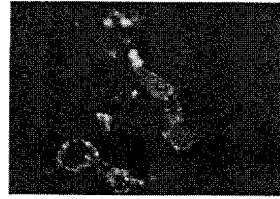
h



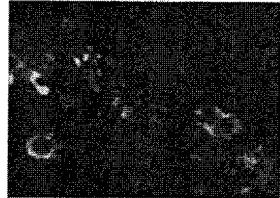
i



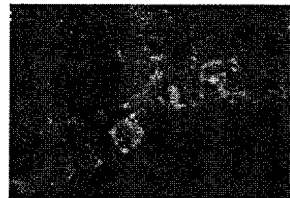
d



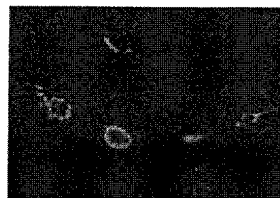
e



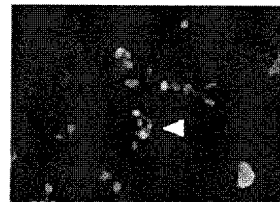
f



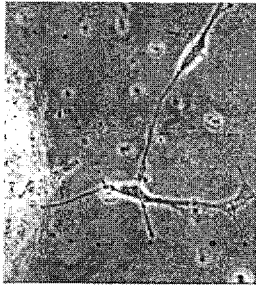
j



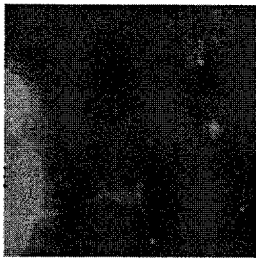
k



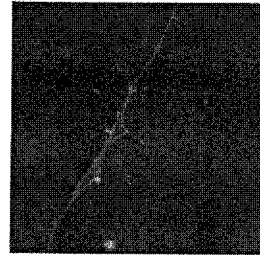
【 図 2 】  
a



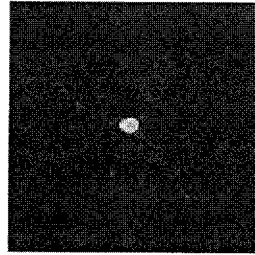
b



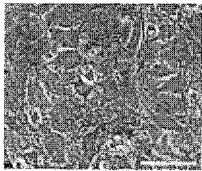
c



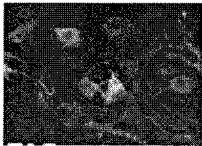
d



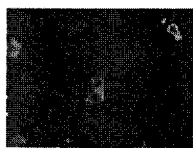
【 図 3 】  
a



b



c



d



e



f



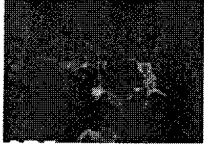
g



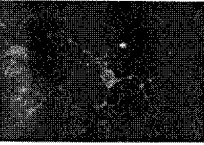
h



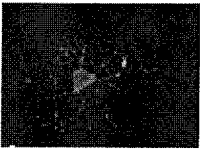
i



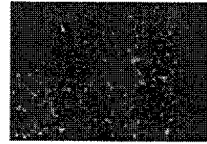
j



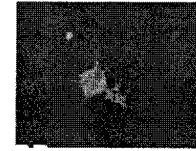
k



l

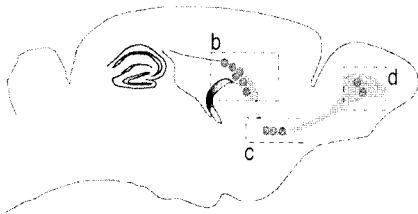


m

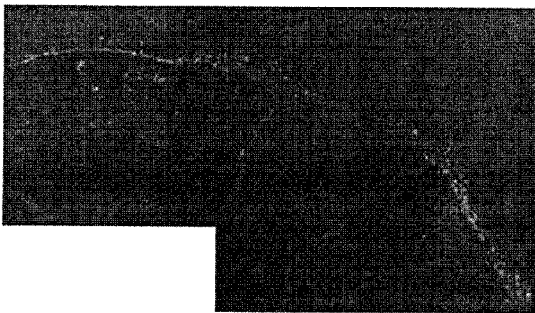


【 図 4 】

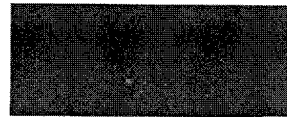
a



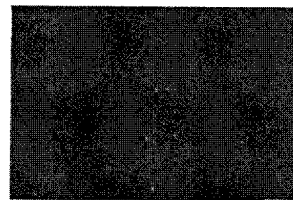
b



c



d





【 図 5 】

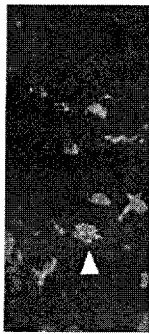
a



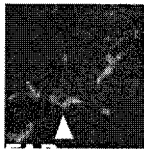
b



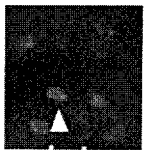
f



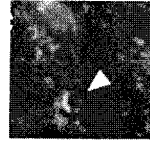
g



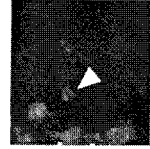
h



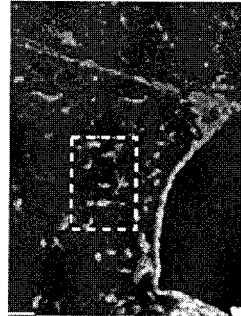
c



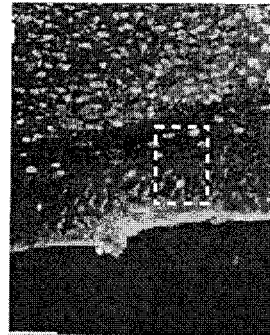
d



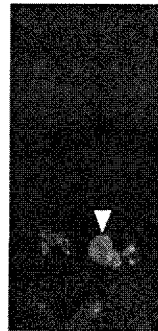
e



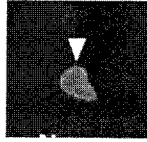
i



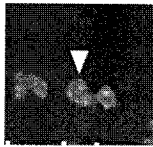
j



k

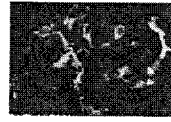


l

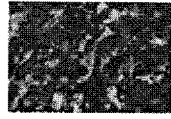


【 図 6 】

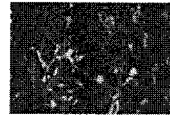
a



b



c

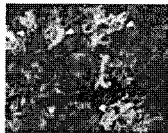


d

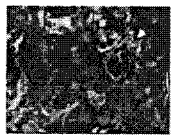


【 図 7 】

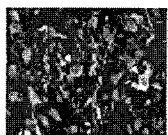
a



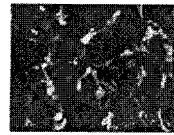
b



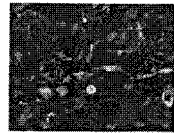
c



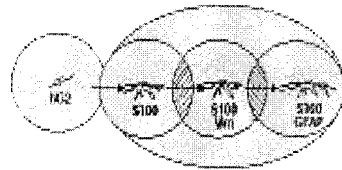
d



e

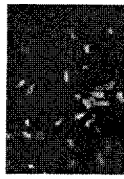


f



【 図 8 】

a



b



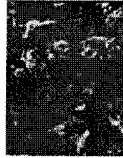
c



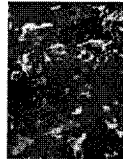
d



e

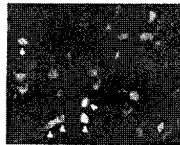


f

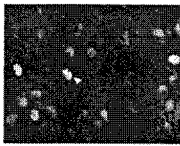


【 図 9 】

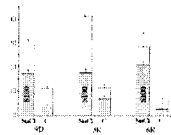
a



b



c



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
15 August 2002 (15.08.2002)

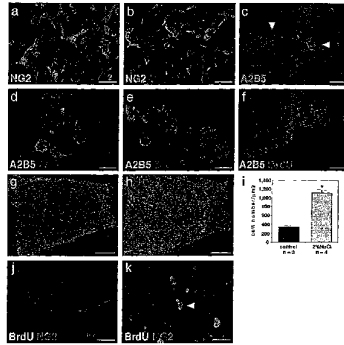
PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/062967 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 5/00 F-13006 Marseille (FR); DUBREC, Pascale [FR/FR]; Clos des Cèdres, 2, Boulevard des Cèdres, F-13009 Marseille (FR).
- (21) International Application Number: PCT/IB02/01226
- (22) International Filing Date: 8 February 2002 (08.02.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01400341.2 9 February 2001 (09.02.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): ROUGON, Geneviève [FR/FR]; Bat Le Thiais, Clos des Cèdres, 2, Boulevard des Cèdres, F-13009 Marseille (FR); COQUILLAT, Delphine [FR/FR]; 54 Rue Perrin Solliers,
- (74) Agents: MARTIN, Jean-Jacques et al.; Cabinet Regimbeau, 20, Rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: O-2A PROGENITORS MULTIPOTENT CELLS FROM NEUROHYPOPHYSIS



(57) Abstract: An isolated population of mammalian neurohypophysis cells comprising multipotent cells has been identified. O-2A progenitor cells are described which are able to differentiate into at least oligodendrocytes and/or type II astrocytes and/or neurons. The invention includes also methods for isolating, culturing, transplanting such cellular population, and their use as a medicament for a neural disorder or a neural disease.



WO 02/062967 A2

**WO 02/062967 A2** 

**Published:**

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

*O-2A PROGENITORS MULTIPOTENT CELLS FROM NEUROHYPOPHYSIS.*

This invention relates to neurobiology and specifically to the isolation and use of  
5 population of multipotent stem cells isolated from the neurohypophysis of mammals.  
More specifically the invention relates to oligodendrocyte-type 2 astrocyte (O-2A)  
progenitor cells.

The invention relates also to methods using this population in particular for regeneration  
and use of mammalian multipotent O-2A progenitor cells and their progeny for  
10 therapeutic treatments and cell cultures.

It is thought that multipotent progenitor cells could be very useful in the treatment of  
disorders associated to a lack of or a loss or abnormal activity of fully differentiated  
cells of an organ. There is thus a need for finding multipotent cells sources. There are  
15 many tissues that can be investigated in order to isolate such progenitor cells, but the  
isolation methods are specific from each source of progenitor cells.

In particular, for the central nervous system (CNS), a population of multipotent  
progenitor cells, called oligodendrocyte - type II astrocyte progenitor cells (O-2A) has  
already been identified. This progenitor population has been shown to be a bifurcation  
20 point in cell lineage and cellular differentiation. Studies by Raff and colleagues (Raff, et  
al., Nature, 303:390, 1983) showed the existence of a bipotential glial progenitor cell in  
the rat optic nerve which, *in vitro* under the appropriate growth conditions, has the  
power to differentiate into oligodendrocytes or type II astrocytes and under certain  
conditions to neurons (Kondo and Raff, 2000). O-2A progenitors from other neural  
25 regions have been shown to be bipotential *in vitro*, giving rise either to  
oligodendrocytes or type 2 astrocytes depending on the culture medium (Butt (1998)  
and Levine (1987)).

Cells of the CNS are classified as either neurons or glial cells. Glial cells can be further  
divided into oligodendrocytes and astrocytes. Oligodendrocytes are the myelin  
30 producing cells of the CNS. Death of oligodendrocytes appears to induce the  
demyelination seen in multiple sclerosis (Waxman, S. G., New Engl. J Med., 306:1529,  
1982), or periventricular white matter injury thought to underlie spastic motor and

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

2

cognitive deficits frequently seen in premature infants (Oka, et al., J Neurosci., 13:1441, 1993).

Therapeutic grafting has particular promise in demyelinating disease such as multiple sclerosis. In the rat, oligodendrocyte progenitor cultures that have been grown and expanded in vitro can be engrafted back into the animal. Mice mutant for myelin production can serve as the recipients of these cells, and marked cells can be seen to migrate, engraft, differentiate and myelinate recipient nerve fibers (Espinosa de los Monteros, et al., Dev. Neurosci., 14:98, 1992). Such observations suggest of the use of human oligodendrocyte progenitors in grafting, as a therapy in demyelinating disease, and perhaps following trauma to the CNS. Further, in recent years the idea of grafting human tissue as a therapy for neurodegenerative disease has received increased attention (Bjorkland, Nature, 362:414, 1993).

Isolation and clonal propagation of O-2A progenitors and progeny has also been obtained from neural crest, as described in US 5,693,482.

15 There is still a need to identify progenitor cells sources which are syngenic, rapidly expandable and successfully implanted in neural tissue, namely the brain.

An object of the invention is to identify other mammalian sources of O-2A progenitors capable of being successfully grafted in order to give rise in vivo to cells allowing to compensate a neural disorder.

20 Another object is to identify mammalian tissues capable of being successfully grafted in order to give rise in vivo to neurons.

An other object is, considering that a transplantation approach can be limited by the availability of donor tissue, to provide a source of progenitor cells useful for treating neurological diseases of the CNS and the PNS in model animal systems and in human.

25 There is also a need to obtain cultures of O-2A progenitors and cells derived from O-2A progenitors which can be produced at a large scale, subcultured over time, used for assaying the effects of various neuroactive compositions on these cells for neurobiological and neuropharmaceutical studies and CNS drug discovery efforts, as well as therapy.

30 A further object is to optimize the conditions of isolation and culture of such progenitor cells, considering the extreme complexity of the systems. Indeed, there are numerous types of cells in the CNS and many different neurotrophic factors which influence their

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

3

- growth and differentiation. Depending on the type of cell and the region of the brain in which the cell resides, a different neurotrophic factor or specific combination of factors affect the survival, proliferation and differentiation of the cell in vivo. Each type of cell responds to different combinations of neurotransmitters, neurotrophic factors, and other molecules in its natural environment.
- 5 A further object is to provide genetically engineered O-2A progenitors and their progeny cells containing genes of interest.
- A further object is to provide methods for identifying markers in vivo characterizing O-2A progenitors and their progeny.
- 10 In accordance with the objects cited the invention relates according to a first aspect to an isolated population of mammalian neurohypophysis (NH) cells comprising multipotent cells.
- Said multipotent cells are able to differentiate into at least oligodendrocytes and/or astrocytes and/or neurons.
- 15 According to an embodiment said population is derived from newborn neurohypophysis when this structure is still developing or from adult neurohypophysis.
- According to an embodiment said population is derived from adult neurohypophysis after a physiological stimulus.
- 20 According to an embodiment said population is an explant of neurohypophysis, cultivated in an appropriate culture medium.
- The invention relates also to a method for obtaining said cellular, comprising the steps of preparing a suspension from a neurohypophysis explant, culturing the suspension in an appropriate medium for growth and/or proliferation of said population.
- 25 The invention relates also to a method for isolating said cellular population, comprising :
- culturing a neurohypophysis explant wherein said explant is maintainable in culture and includes progenitor cells that have the ability to differentiate into at least oligodendrocytes and/or type II astrocytes and/or neurons ;
  - 30 - contacting said explant with an agent which causes proliferation of progenitor cells of said explant ;



WO 02/062967

PCT/IB02/01226

4

- isolating from said explant progenitor cells that proliferate in response to said agent.

The invention relates also to a method for obtaining O-2A progenitor cells and/or their progeny comprising :

- 5 - culturing a neurohypophyse explant wherein said explant is maintainable in culture and includes progenitor cells that have the ability to differentiate ;
- contacting said explant with an agent which causes proliferation of progenitor cells of said explant and differentiation into oligodendrocyte and/or type 2 astrocyte ;
- contacting said suspension with markers for O-2A progenitor cells and/or their  
10 progeny ;
- isolating O-2A progenitor cells and/or their progeny.

The isolation technique of O-2A progenitor cells and/or their progeny may include for instance one of magnetic separation, antibody coated magnetic beads, affinity chromatography, antibodies attached to a matrix, responsiveness to growth factors,  
15 specific gene expression, antigenic cell specific surface markers, basic morphology.

The method may further comprise the preparation of an isolated cellular composition containing at least 50 %, of neurohypophysis O-2A progenitor cells and/or their progeny.

The invention relates also to a method for screening compounds having an ability to modulate one of growth, proliferation and/or differentiation of progenitor cells obtained  
20 from neurohypophyse comprising :

- culturing a neurohypophysis explant wherein said explant is maintainable in culture and includes progenitor cells that have the ability to differentiate,
- contacting said explant with an agent which causes proliferation of progenitor cells of said explant,
- 25 - contacting said explant with a tested compound,
- detecting effect on one of growth, proliferation and/or differentiation of progenitor cells by comparing the results without the compound.

The invention relates also to a method for obtaining an isolated population of transformed mammalian multipotent oligodendrocytes-type 2 astrocytes (O-2A)  
30 progenitor cells and/or their progeny, said method comprising the introduction of at least a nucleic acid. The nucleic acid may be homologous or heterologous. The transformation may be namely genetic engineering.

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

5

The nucleic acid may be a gene or a fragment of gene of interest, which introduction in O-2A progenitors and/or their progeny will correct an abnormal function or induce a new characteristic. The nucleic acid will be for instance a therapeutic gene, a gene for neurotrophic or survival factor, a gene for migratory factor, an immortalizing oncogene, a marker gene such as beta galactosidase gene, a selective marker allowing to identify an ability to grow under a selective pressure.

The invention relates also to a population of transformed mammalian multipotent O-2A progenitor cells and/or their progeny obtainable by said method.

The invention relates also to a method for providing neurohypophysis O-2A progenitor cells and/or their progeny in at least one location of the brain, comprising the transplantation of O-2A progenitor cells in the brain. It has indeed been shown that neurohypophysis O-2A progenitors have a migratory capacity in the brain in particular, thereby O-2A progenitors are capable of traveling from a first location where the cells are implanted, to at least a second location where they may differentiate.

The invention relates also to this method wherein the O-2A progenitor cells have been prior transformed.

The invention relates also to a method to assay in vivo development and differentiation of a neurohypophysis explants containing O-2A progenitor cells, said method comprising :

- extracting a newborn or adult neurohypophysis explant ;
- labeling and transplantating the explant in the periventricular zone of newborn or adult mammalian brain ;
- identifying the distribution of transplanted cells in the brain.

The invention relates also to a method for screening antibodies capable of recognizing surface markers which characterize multipotent O-2A progenitor cells and/or their progeny, comprising culturing said cells in an appropriate medium, adding tested antibodies, identifying the complex antibody-marker.

The invention relates also to a method for providing antibodies capable of recognizing surface markers which characterize multipotent O-2A progenitor cells and/or their progeny comprising immunizing an animal with said cells, isolating the antibodies produced.

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

6

The invention relates also to an isolated mammalian progenitor cell wherein said progenitor cell is extracted from neurohypophysis and is able to differentiate into at least oligodendrocyte and/or astrocyte and/or neuron.

The invention relates also to a method for obtaining at least one of said isolated cell comprising :

- 5 - culturing a neurohypophyse explant wherein said explant is maintainable in culture and includes progenitor cells that have the ability to differentiate into at least oligodendrocytes and type II astrocytes ;
- 10 - isolating from said explant at least one progenitor cell that have the ability to differentiate into at least oligodendrocytes and type II astrocytes.

The invention relates also to a pharmaceutical composition comprising a population of neurohypophysis O-2A progenitor cells and/or their progeny, or comprising said population that has been transformed, and a vehicle pharmaceutically acceptable.

The invention relates also to this composition comprising, as a cellular population, at least 50 % of the O-2A progenitor cells and/or their progeny.

The invention relates also to such composition used as a medicament for a neural disorder or a neural disease.

The invention relates also to the use of a population obtained by the method previously mentioned for the preparation of a pharmaceutical composition for treatment of a neural disorder or a neural disease.

The invention relates also to the use of an explant of neurohypophysis for the preparation of a graft for treatment of a neural disorder or a neural disease.

The neural disease may be in particular Alzheimer's disease, Parkinson's disease.

25 Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description, illustrated by the drawings.

Colours refer to staining with markers and fluorescent compounds allowing a better view of the cell types.

30 Figure 1 shows that O-2A progenitors are NH-resident cells

Immunohistochemistry on adult NH sections was performed to identify the resident cell populations. Pituicytes are recognized by labeling with an anti-vimentin (a in red) or

anti-S-100 (b in red) antibody. Double-staining using an anti-NG2 antibody (a marker for O-2A cells) allows the identification of a population of precursors (a and b in green) distinct from pituicytes. The TOPRO3 marker is used to identify cell nuclei (a and b in blue). A2B5 labeling of a whole mount preparation shows the presence of precursors in newborn (d in green) and adult (c and e in green) control animals and in the adult dehydrated (f in green) rats. Double-labeling with an anti-BrdU antibody shows that these precursors proliferate during development (d in red) and in the adult after dehydration (f in red) while no BrdU labeling is observed in adult control rats (e in red). Double labeling on sections using anti-BrdU and anti-NG2 showed that NG2+ cells proliferate in adult rats after dehydration (k) but not in adult rat control (j). Proliferation is analyzed by BrdU incorporation and immunohistochemistry using an anti-BrdU antibody. NH preparations derived from adult control (g) or dehydrated (h) rats show a three-fold increase in proliferation after dehydration (i) (1111+/-45 BrdU+ cells per  $\mu\text{m}^2$  in dehydrated compared to 322+/-20 BrdU+ cells per  $\mu\text{m}^2$  in control animal). Scale bars : a-b, j-k, 13  $\mu\text{m}$  ; c-f, 10  $\mu\text{m}$  ; g-h, 325  $\mu\text{m}$ .

Figure 2 shows the in vitro characterization of O-2A progenitors from the adult rat NH  
Bipolar cells migrating out of the adult NH explants in vitro (a) are immunopositive for A2B5 (b) identifying them as O-2A progenitors. When BrdU, able to be incorporated by dividing cells, is injected into control (c) or dehydrated (d) adult rats prior to the explantations double positive A2B5+ (red) /BrdU+ (green) cells are observed in the outgrowth of explants derived from physiologically stimulated (dehydrated) rats (d) but these are never found in the control condition (c). E: explant. Scale bar, 58  $\mu\text{m}$ .

Figure 3 shows the in vitro bipotentiality of O-2A progenitors from neonatal rat NH  
When serum is included in the culture medium an extensive proliferation of fibroblasts and endothelial cells is observed around the explant (a). Immunofluorescence labeling shows that the majority of cells on the top of this monolayer are GFAP+ thus astrocytes (b). In defined medium, bipolar A2B5+ cells are clearly identified migrating out of the explant (c). Differentiation toward the oligodendrocyte lineage was followed by analysis of the expression of stage-specific markers. Twenty four hours after explantation, the migrating bipolar cells (d) are immunoreactive for both PSA-NCAM

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

8

(e) and A2B5 (f), a few cells express the O4 antigen (g). Forty-eight hours after explantation, the majority of cells are multipolar, A2B5<sup>+</sup> (h and i) and O4<sup>+</sup> (j). After 14 days, cells are immunopositive for the mature oligodendrocyte markers, O4 (k) and GalC (l) and they show MBP labeling (m). E: explant. Scale bars: a-c, f-m, 58  $\mu$ m; d-e, 37  $\mu$ m.

Figure 4 shows the migration of NH derived cells in host mouse forebrain  
Pieces of newborn hypophysis were labeled with Hoechst to identify their nuclei and implanted in mouse. Schematic sagittal representation (a) of the host brain number 11 (table I) showing the repartition of Hoechst positive cells 21 days after transplantation. Areas including Hoechst<sup>+</sup> cells are schematized by blue dots. Dotted rectangles in part (a) represent the areas in (b), (c) and (d) showing, in section, the presence of Hoechst<sup>+</sup> cells in the subventricular zone, the rostral migratory stream and the olfactory bulb, respectively. Scale bars: b, 350  $\mu$ m; c-d, 175  $\mu$ m. The graft contained cells able to survive and migrate in the host brain.

Figure 5 shows the differentiation potential of newborn mice NH derived cells in vivo  
Immunofluorescence analysis on sections of host brains was performed 21 days after transplantation of NH-derived cells- in the cerebral periventricular area of newborn mice to identify the phenotype.  
These sections contain Hoechst<sup>+</sup> cells (in blue), cells labeled with the anti-CNPase (a-c in green), -GFAP (e-g in red) or -NeuN (i-k in green) antibodies. Examples were selected from the host brain number 9 (table I) in the corpus callosum (a-d) and in the fimbriae (e-h) and from the host brain number 7 (table I) in the corpus callosum (i-l). Arrow heads indicate double positive cells. Scale bars : a, e, i, 83  $\mu$ m; b-d, f-h, j-l, 33  $\mu$ m.

Figure 6 shows glial cells diversity in the adult rat neurohypophysis.  
Immunolabeling was performed with anti-GFAP (A), anti-S100 (B), anti-vimentin (C) and anti- NG2 (D) various antibodies specific to glial cell population. NG2 antibody labelled a population of cells with small process (D) compared to GFAP positive cells

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

9

which showed a typical astrocyte shape. Results of quantitative analysis are written in brackets.

Figure 7 shows that the pituicyte population in the adult NH is heterogeneous

5 Confocal analysis of double labelling immunostaining was performed in order to analysed the distribution of the glial markers on the pituicytes population. Glial markers were used in the following combinations: GFAP/S100 (A), GFAP/Vim 5 (B), Vim/S100 (C), NG2/vim (D) and NG2/S100 (E). color code is use on the figure to indicated which marker is revealed in red or green. Blue staining correspond to nucleus labelling. The number of double positive cells for a given marker was counted on at least 5 randomly chosen sections from adult rat and compared to the total number of cells identified with the nuclear labelling. Results of quantitative analysis are written on the side. (F) Schematic representation of the pituicyte population in the adult NH, which could represent maturation stage of the same lineage.

15 Figure 8 shows P75 NTR immunostaining labelled a small fraction of the cells present in the NH (A and D).

Double staining performed using GFAP (E and F in green) as a marker markers for the glial populations showed no overlap with the P75 NTR staining (in red) Rare cells from the p75 NTR population (C in red ) were NG2 positive (C in green).

Figure 9 shows the proportion of dividing pituicytes during stimulation.

Sections of stimulated adult rats (A) or paired control animals (B) were labelled with anti-BrdU (in green) and anti-S100 (in red) antibodies. Arrows indicated the double positives cells. (A) Nine days after dehydration we observed that 29,4 (+/-2) cells were BrdU+ per field compared to 11.2 (+/-0.7) (C) Quantitative analysis of proliferating cells nine days after dehydration (9D), 3 days (3R) or 6 days (6R) after the beginning of the re-hydration period. The percentage of proliferation pituicytes is represented in dark and compared to the total number of proliferating cells per field a field (250  $\mu\text{m}^2$  x 250  $\mu\text{m}$ ) 7.4 % (+/-1.5).

The invention will now be described in more details.

The term progenitor cell (or stem cell, term also currently used) refers to an undifferentiated cell which is able to proliferate and to give rise to more progenitor cells having the ability to generate a high number of cells that differentiate into fully differentiated cells, that are called their progeny, exhibiting specialized characters. A neurohypophysis O-2A progenitor cells refers to a progenitor cell population arising in the neural lobe of the neurohypophysis and giving rise to a differentiated progeny, namely mature functional oligodendrocytes and type 2 astrocytes. Indifferently « O-2A progenitors » or « O-2A progenitor cells » will be used.

The term explant refers to a part in of an organ, the neurohypophysis, taken from the mammalian body and grown in an artificial medium.

The term isolated population of cell means that the cell is extracted from the body. For instance dissection of neural lobe of neurohypophysis is an isolation technique. The step further to isolation is purification in order to obtain a preparation that contains at least 75 % of the cells.

The term culture medium refers to a preparation for the culture of living cells. A tissue culture refers to the maintenance or growth of tissue, namely an explant, in vitro so as to preserve its structure and function. A cell culture refers to a growth of cells in vitro ; the cells proliferate and/or differentiate but do not get organized into tissue.

The hypothalamo-neurohypophysial system secretes oxytocin and vasopressin, and shows remarkable plasticity in the adult in response to appropriate stimulation. The pituicytes are the principal cellular element of the neural lobe of the hypophysis (NH). They have the morphological characteristics of glial cells and are immunoreactive for glial fibrillary acid protein (GFAP) (Salm et al., 1982), and for the early glial markers vimentin (Marin et al., 1989) and S-100 (Cocchia and Miani, 1980).

In the resting state pituicytes surround the neurosecretory axons and terminals of the magnocellular neurons from the hypothalamus and could form a physical barrier between the blood vessels and the neurosecretory terminals. When stimulated e.g. by parturition, lactation or dehydration, an increased juxtaposition between axonal terminals and blood vessels leads to a release of neuropeptides into the general circulation. The ability of pituicytes to undergo morphological changes in response to physiological stimuli is dependent on their expression of the polysialylated neural cell

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

11

adhesion molecule (PSA-NCAM) (Theodosis et al., 1991 ; Theodosis and Poulain, 1999). NH does not contain myelinated axons and thus does not contain any mature oligodendrocytes.

- 5 The applicant has identified a cell population additional to pituicytes, which express both *in vitro* and *in vivo* phenotypic markers of O-2A progenitors in the adult and developing rodent neurohypophysis. For this, the applicant has used the main following methods.

#### Animals

- 10 Animal used are male rats (Sprague-Dawley) and mice (Swiss strain) which were raised in breeding colonies. Postnatal age was calculated counting postnatal (PN) day 0 as the day of birth. Rat and mouse pups from PN0 to PN3 and adult rats were used. All procedures involving the use of animals were performed in accordance with the European animal care guidelines and directives.

#### Antibodies

- 15 Different antibodies were used for the analysis, allowing to identify cell populations of O-2A progenitors and their progeny, and are listed below :

Name	species, classes	Working dilution	Purchased/gifted from
GFAP	Mouse IgG	1:4000 on section 1:500 on cells	Sigma, France
BrdU	Mouse IgG	1:100	DAKO
O4	Mouse IgM	Pure supernatant	ATCC
Gal C	Mouse IgG	Pure supernatant	ATCC
Vimentin	Mouse IgM	1:200	Sigma, France
A2B5	Mouse IgM	Pure supernatant	ATCC
Men B	Mouse IgM	Pure supernatant	From our laboratory
S-100	rabbit	1:300	DAKO
NG2	rabbit	1:1000	Chemicon
NG2	Mouse IgG	1:25	Chemicon
NeuN	Mouse IgG	1:50	Chemicon
MBP	Mouse IgG	1:50	Euromedex
CNPase	Mouse IgG	1:100	Sigma, France



WO 02/062967

PCT/IB02/01226

12

All fluorescently labeled second antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA).

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) (astrocyte cytoskeletal marker), galactocerebroside (GalC) (oligodendrocyte marker), O4 (oligodendrocyte marker) and A2B5 (oligodendrocyte surface marker) are neural cell specific surface markers able to identify the O-2A progenitors and their progeny.

#### Dehydration and BrdU incorporation experiments

Adult rats were individually housed and maintained for 9 days either with normal drinking water or with 2% NaCl solution. Four injections (50 mg /kg) of BrdU (10 mg/ml in phosphate buffered saline (PBS), pH7.4) (Sigma, France) were given intraperitoneally at 12 hourly intervals before sacrifice. At least 3 control and 3 dehydrated rats were used in each experiment.

Sections, tissue pieces and explants cultures were mounted in Mowiol (Calbiotech, USA) and examined under a Zeiss Axiophot fluorescence microscope or confocal microscope.

#### Statistical analysis

Proliferation was estimated by counting BrdU-positive cells on 3 to 4 randomly chosen sections for each of the 3 control and 4 dehydrated rats. Surface area was calculated using Visiolab 2000 software (Biocom) and the data were expressed as number of BrdU + cells per  $\mu\text{m}^2$ .

The significance of the difference between control and other conditions was calculated with ANOVA using StatView-Student software. The number of NG2-positive cells was counted on 2 randomly chosen sections from adult rat and compared to the total number of cells identified with the TOPRO3 nuclear marker.

#### Immunohistochemistry and BrdU staining methods

Animals were perfused with 4 % paraformaldehyde (PF) in PBS. The pituitary glands were post-fixed for 1 hour in 4 % PF in PBS at 4°C, washed in PBS and cryoprotected in 30 % sucrose. After cryosectioning, horizontal serial sections (35  $\mu\text{m}$ ) were collected in PBS, incubated with primary antibodies overnight at 4°C, washed and incubated with appropriate fluorescent secondary antibodies 1 hour at RT. When necessary, permeabilization was performed for 20 minutes at RT with 0.1 % Triton-X100. For

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

13

A2B5 antibody labeling, fresh whole-mount NH pieces were incubated with primary antibodies for 1 hour at room temperature. After extensive washes and 10 minutes fixation in 4 % PF in PBS, pieces were incubated with appropriate fluorescent secondary antibodies for 1 hour at RT.

- 5 For BrdU labeling, preparations were incubated for 30 minutes at 37°C in 2N HCl and 0.5 % Triton-X100 for floating sections, or for 20 minutes at room temperature in 2N HCl for tissue pieces and explant cultures. After 3 washes in 0.1 M sodium tetraborate, incubation with anti-BrdU antibody was performed overnight at 4°C for floating sections or for 1 hour at room temperature for explant cultures and tissue pieces. After  
10 washes, incubation with the appropriate fluorescent secondary antibodies was performed. In the case of double staining, BrdU labeling was performed after the primary antibody incubation. When necessary, nuclear staining was performed prior to mounting using TOPRO3 (Molecular Probes, 1:1000 in PBS).

15 Neurohypophysial explant cultures

- Neurohypophysial culture was performed as described in Wang et al. (Wang et al., 1994) incorporated by reference. Briefly, pituitary glands from P0-P3 rat pups or adult rats (when stated) were dissected in Hanks BSS. They were stripped of meninges and the neural lobes carefully separated from the anterior and intermediate lobes. Each NH  
20 was sectioned into 4-6 pieces in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) plus 10 % fetal calf serum (FCS) medium. Pieces were then explanted on poly-L-lysine-treated glass coverslips in serum free medium (DMEM-F12 medium, supplemented with 100 µg/ml human transferrin, 5 µg/ml insulin, 100 µM putrescin, 20 nM progesterone, 30 nM sodium selenite ; DMEM, GIBCO) supplemented with bFGF (10 ng/ml), PDGF-AA (10  
25 ng/ml) and NT3 (10 ng/ml) in the presence of 0.4 % methylcellulose (Sigma, France). Cultures were incubated at 37°C in a 5 % CO<sub>2</sub> and 95 % air atmosphere.

Labeling of in vitro explant cultures was performed after fixation for 10 minutes in 4 % PF in PBS, as described above for whole mount preparation.

- Further to these practices, the invention uses, unless specifies, conventional and  
30 appropriated techniques of cell culture, cell biology, molecular biology.

A preferred embodiment for in vivo and vitro identification of O-2A progenitors will now be described.

In vivo characterization of O-2A progenitors by brain transplantations.

Brain transplantations of newborn mouse neurohypophyses are made as follows.

Transplantations were performed as previously described (Vitry et al., 1999) incorporated by reference. Briefly, NH pieces from newborn mice were incubated in  
5 DMEM-10 %FCS containing 10 µg/ml Hoechst 33342 for 30 minutes at 37°C, washed  
in DMEM and injected into the brains of newborn mice, close to the subventricular zone  
of the left hemisphere. Mice were sacrificed at different times after transplantation (5,  
15, 21 days) and brains were processed for cryostat sectioning. Serial sagittal sections  
(14 µm) were collected and Hoechst-labeled cells were detected under UV light.  
10 Sections containing Hoechst-positive cells were used for immunofluorescence labeling  
as described by Vitry et al. (Vitry et al., 1999). Slides were mounted in Fluoromount  
and analyzed using a Wild Leitz DM fluorescence microscope.

First the applicant showed that resident O-2A progenitors exist in the adult rat NH and  
in the absence of cells expressing differentiated oligodendrocyte markers such as GalC.  
15 These O-2A cells are different from pituicytes.

The results are as follows. Pituicytes could clearly be identified on sections of adult rat  
NH as process-bearing vimentin- (Fig. 1a red) or S-100- (Fig. 1b red) positive cells.  
Cells positive for NG2, an integral membrane chondroitin sulfate proteoglycan  
expressed by early committed glial precursors (Nishiyama et al., 1997), were also  
20 present in the structure (Fig. 1a and b in green). Double labeling showed that the NG2+  
cells (approximately 9 % of the total cell number) were vimentin- (Fig. 1a) and S-100-  
(Fig. 1b) negative representing a cell population distinct from the pituicytes.

To confirm unambiguously that O-2A progenitors are present in the NH of adult rats  
maintained under control conditions, the A2B5 antibody was used as a second marker  
25 for this population.

To avoid non-specific staining, whole-mount labeling was performed on fresh unfixed  
adult rat NH pieces, as described. Round bipolar or short process-bearing multipolar  
cells expressing the A2B5 antigen were observed in the tissue (Fig. 1c). Furthermore,  
immunofluorescence on sections using anti-GalC, antibody showed no labeling in the  
30 NH (not shown).

Further the applicant showed that O-2A progenitors are able to divide in vivo both  
during development and in the adult in response to the stimulus of dehydration.

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

15

It was first determined that dividing O-2A progenitors could be found in vivo in the NH. P3 rats were injected with BrdU and sacrificed 4 hours later. Using confocal microscopy, on whole mount preparations we clearly observed the presence of A2B5+/BrdU+ cells (Fig. 1d) in all NHs analyzed (n=3), indicating that these progenitors are present and normally divide during NH development.

Besides, in adult rat, it was determined that cell proliferation was stimulated by a dehydration stimulus in vivo.

Cell proliferation increased in the NH, relative to paired controls, after 9 days of saline substitution of the drinking water. For these experiments, control or 9 day-dehydrated adult rats received 4 BrdU injections 2 days before being sacrificed. Immunostaining using the anti-BrdU antibody was performed on NH sections from control and dehydrated rats (Figs. 1g and 1h respectively). As described previously (Murugaiyan and Salm, 1995) the density of BrdU+ cells was significantly increased in dehydrated compared to control animals (Fig. 1i). Double-labeling was performed both on whole mount preparations and on sections with a BrdU antibody together with either an anti-A2B5 or an anti-NG2 antibody. A2B5+ (Figs. 1e and 1f) and NG2+ (Fig. 1j and k) cells were observed under both control and stimulated conditions. In dehydrated rat NHs, A2B5+/BrdU+ (Fig. 1f) or NG2+/BrdU+ (Fig. 1k) cells were clearly identified whereas A2B5+/BrdU+ cells were hardly found in the control samples (Figs. 1e and 1j).

Furthermore, a culture system was made to show that O-2A progenitors display in vitro characteristics of O-2A progenitors from other neural regions.

In vitro, characterization of O-2A progenitors from the adult rat NH was made as follows.

An in vitro assay was done using adult NH explants. BrdU was injected into control and dehydrated adult rats prior to the microdissection.

When NHs were dissected out and cultured in defined medium in the absence of any trophic factors, no cellular migration was observed around the explants (not shown). When bFGF, PDGF and NT3, known to favor migration, proliferation and survival of optic nerve O-2A progenitors (McKinnon et al., 1990 ; Barres et al., 1994) are added to the defined medium, occasional cell migration is observed after 3 days for both control and dehydrated NHs. These motile cells have a bipolar morphology, round cell bodies, two long processes (Fig. 2a) and are A2B5+ (Fig. 2b).

In control rat explants, A2B5+/BrdU+ cells are never observed among the A2B5+ migratory population (Fig. 2c). In contrast, in explants from dehydrated rats, A2B5+/BrdU+ migratory cells are observed (Fig. 2d).

5 Taken together the data demonstrate that resident cells exist in the adult NH, which can yield A2B5+ dividing cells after dehydration in vivo and bipolar migrating cells in vitro.

In vitro characterization of O-2A progenitors from neonatal rat NH was made as follows.

10 Because the adult NH explants are a poor source of migrating O-2A progenitors, characterization of these cells was also made using neonatal NH explants.

In a first set of experiments, NH explants were cultured in DMEM supplemented with 10 % FCS. An extensive emergence of fibroblasts and endothelial cells around the explant (Fig. 3a) was observed. Immunofluorescence labeling showed that the majority of cells on the top of this monolayer were GFAP+ (Fig. 3b).

15 In a second set of experiments, newborn NHs were cultured in defined medium supplemented with bFGF, PDGF and NT3. Fibroblasts, endothelial and bipolar cells (Wang et al., 1994) were observed among the migrating cells and A2B5 labeling was used to identify O-2A progenitors among these cells (Fig. 3c). Differentiation toward the oligodendrocyte lineage was monitored by analyzing expression of stage-specific markers. Twenty four hours after explantation, the migrating bipolar cells were both 20 PSA-NCAM+ (Figs. 3d and 3e) and A2B5+ (Fig. 3f), whereas rare multipolar cells expressed the O4 antigen (Fig. 3g). Forty-eight hours after explantation in supplemented defined medium, PSA-NCAM+ cells were rarely found (not shown), while the majority of cells were multipolar, A2B5+ (Figs. 3h and 3i) and O4+ (Fig. 3j). After 14 days, cells 25 had the typical morphology of mature oligodendrocytes, they expressed the O4 (Fig. 3k) and GalC (Fig. 3l) antigens, and they showed MBP labeling (Fig. 3m). Under these conditions, it was not observed cells expressing a neuronal phenotype as monitored with either anti- $\beta$ -III tubulin or anti-NeuN antibodies (not shown) at any of the time point examined.

30 Thus, O-2A progenitors from newborn rat NH are able to give rise in vitro to either mature oligodendrocytes or to astrocytes.

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

17

Further, the applicant showed the in vivo migration and differentiation potential of newborn NH derived O-2A progenitors.

Newborn mouse NH explants were Hoechst-labeled and transplanted into the periventricular zone of newborn mouse brains as described in the methods. Three transplanted brains out of 14 were lacking Hoechst+ cells and were therefore excluded from the analysis. After different incubation period the other recipients were found to contain Hoechst+ cells (Table I) near the injection site i.e. the subventricular zone (SVZ, n=5), the dorsal lateral ventricle wall (n=2), the proximal part of the rostral migratory stream (RMS, n=1), and the corpus callosum and striatum bordering the lateral ventricle (n=2 and 1, respectively). Rare Hoechst+ cells grafted near the SVZ had migrated as far as the olfactory bulb (Fig. 4). The distribution of Hoechst+ cells in each case is summarized in Table I.

Table I. In vivo distribution of NH-derived Hoechst+ cells after graft.

Animal n°	Wild-type NH fragments										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Days post-graft	1	5	5	15	15	21	21	21	21	21	21
<b>Lateral sections</b>											
Hippocampus	+	+									
Corpus callosum		+									
Dorsal ventricle	+	G +			+	+				G +	
Ventral ventricle		+									
<b>Median sections</b>											
Hippocampus			++	+	+					++	
Fimbriae/fornix			++	+						++	
Corpus callosum				++	+		G		G		++
Subventricular zone	G		G	+	G +	G		+			G +
Striatum								G			
Rostral migratory stream	++			G +							+
Olfactory bulb				+							+

15

*Note.* Spatiotemporal distribution of Hoechst+ cells from newborn NH fragments after grafting near the subventricular zone of newborn mice. Grafted brains were analyzed at 1 (n=1), 5 (n=2), 15 (n=2) and 21 (n=6) days post-graft. The + and ++ symbols represent a semi-quantitative indication of the number of Hoechst+ cells found in each cerebral region. G, location of the graft.

Gliogenic properties of the grafted NH Hoechst+ cells, immunofluorescence analysis were performed using various markers. Hoechst+ cells were found which expressed CNPase (Figs. 5a-5d) or GFAP (Figs. 5e-5h) in various cerebral locations.

This result demonstrates that cells from the NH are able to give rise in vivo to both astrocytes and mature oligodendrocytes.

Very surprisingly, using an anti-NeuN antibody (a specific neuronal marker) it was shown that some Hoechst+ cells also differentiated as neurons. These cells were localized in the neurogenic cerebral cortex and sometime in the corpus callosum migrating from the lateral wall to the cortex (Figs. 5i-5l). Thus NHs grafted in newborn mouse brain could generate neurons in the complete absence of neuronal progenitors.

Heterotypic transplantations of the neurohypophysis into neonatal brain revealed the presence of pluripotent cells able to generate neurons as well as astrocytes and oligodendrocytes. It is not clear whether these neurons are derived from O-2A progenitors or from the pituicytes but in any case, the transplantation of the pieces of isolated neurohypophysis is efficient to generate neurons in vivo.

According to the inventors, both the neuroectodermal and focal origin of the NH is consistent with the presence of O-2A progenitors in this structure. Furthermore, dividing O-2A progenitors are present in neonatal rats while the neural lobe is still developing, suggesting that these cells participate in the formation of the gland. Both the present studies in vivo and in vitro show that O-2A progenitors are resident cells of the NH, strongly suggesting that they could give rise to the major cell type of this structure, the pituicyte. In support, the applicant has shown that the NH does not contain oligodendrocyte lineage cells other than the A2B5+/NG2+ O-2A progenitors.

Moreover, in the presence of serum, these cells differentiate into GFAP+ cells, a characteristic of pituicyte. Interestingly, it was observed that, O-2A progenitors from the perinatal structure divide faster than those of adult NH.

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

19

Further to the results described above, the inventors have made very good progress in the identification and purification of stem cell populations present in the adult neurohypophysis. Indeed, the efficient culture and/or transplantation of stem cells is significantly increased when using very well known and characterized stem cells populations. Such knowing allows to plan isolation experiments and to increase the number of potential stem cells within the adult NH. The following results, called "further characterization", and illustrated by drawings 6 to 9, summarize experiments having allowed to characterize the glial cell populations present in the adult rat NH and to analyse how stimulation could regulate the total number of glial cells and O-2A progenitors in the structure.

Cell diversity in the adult rat NH.

A preliminary step to their isolation, is to identify in the NH which cells have stem cell potentiality. The inventors have characterized commonly called "pituicyte population" from the NH, with the view to decide whether subpopulations can be distinguished. To this end an immunohistochemistry analysis was performed, using different markers for glial cell lineage and used confocal microscopy. Furthermore, a nuclear marker was used in order to count cells and to be able to distinguish clearly cytoplasm from processes staining which could result in false positive.

As describe in the text above, the inventors showed that O-2A progenitors exist in the adult rat NH at a time when pituicytes are fully differentiated. This population was characterised by the NG2 ganglioside marker and represented 9% of the total cell number (Figure 6D). GFAP positive cells could clearly be identified on sections of adult rat NH as process-bearing cells (Figure 6A). The astrocytic markers GFAP (Figure 6A), S100 (Figure 6B) and Vimentin (Figure 6C) labelled respectively 15%, 22% and 13% of the total cells within the structure.

A double immunostaining and confocal showed that 4% of the total population expressed GFAP and were positive for the early glial differentiation marker vimentin (Figure 7B). Only 9% and 7% of the S-100 population was positive respectively for the GFAP and vimentin markers. The results suggest a high degree of heterogeneity in the glial population present in the gland and showed that the S100 marker seems to label the majority of this glial population.



WO 02/062967

PCT/IB02/01226

20

The NG2 population represented was never GFAP (not shown) nor Vimentin (Figure 7D) positive. Rare NG2 cells were expressing low level of S-100 (Figure 7E).

The pituicyte population in the adult NH is likely to be heterogeneous and could represent maturation stage of the same lineage (Figure 7F).

- 5 A work from Gudino-Cabrera and Nieto-Sampedro (2000) has used the p75 NTR as a marker for pituicytes in the gland. The inventors re-examined this expression using double-staining and confocal analysis. P75 NTR immunostaining labelled a small fraction of the cells present in the NH (Figure 8A and D). In order to better characterize this population double stainings were performed using markers for the glial populations
- 10 previously characterised; co-localisation of the p75 NTR which GFAP was never observed (Figure 8B-C). Rare cells from the p75 NTR population were NG2+ (Figure 8E-F).

Overall, these results suggest that pituicytes are not a homogenous population of cells and each subpopulation could represent potential stem cell within the structure.

- 15 Cell proliferation after dehydration and during re-hydration.

Protocols were designed to found conditions which would change the ratio of potential stem cells in the NH over the total population. The rate of proliferation of the NH cell was monitored by osmotic challenge of the cells. Stimulated rats were dehydrated for 9 days and compared to control animals. During this period a daily injection of BrdU was

20 performed in order to estimate the proliferating cells in both conditions. 9 days after dehydration it was observed that 29,4 (+/-2) cells were BrdU+ per field compared to 11.2 (+/-0.7) in the control situation (Figure 9). The percentage of proliferation pituicytes was analysed by performing double staining with the S100 marker and it was showed that in 17.4 %(+/-1.5) of the proliferating cells in the dehydrated rats were

25 pituicytes (BrdU+/s100+) compared to 4.1% (+/- 0.3) in the control situation. Cell proliferation was estimated 40.9 (+/-0.9) and 28.6 (+/-5.4) BrdU+ per field respectively 3 and 6 days after rehydration. In control animals the rate of proliferating cells was 11.4 and 6.6 (+/-0.6) per field 3 and 6 days, respectively. The percentage of dividing S100+ cells was found to be 17.9% (+/-1.2) and 21.0% (+/-1.0) in dehydrated animal compared

30 7% and 2.8% (+/-2.8) in the control animals 3 and 6 days respectively after the end of the dehydration.

This analysis shows that dehydration leads to an increase in cell proliferation within the

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

21

adult NH and that pituicytes (S100 positive cells) proliferate. The invention further provides then a method for modulating the number of potential stem cell prior to purification, by acting on the dehydration of adult NH.

The specific material and methods used for the results relating to this "further characterization" (drawings 6 to 9) were as follows.

Antibody. The different antibodies used for the analysis are listed below :

Name	species, classes	Working dilution	Purchased/gifted from
GFAP	Mouse IgG	1:4000 on section	Sigma, France
BrdU	Mouse IgG	1:100	DAKO
Vimentin	Mouse IgM	1:200	Sigma, France
S-100	rabbit	1:300	DAKO
NG2	rabbit	1:1000	Chemicon
NG2	Mouse IgG	1:25	Chemicon

All fluorescently labelled second antibodies were from Jackson Immunoresearch laboratories (West Grove, PA, USA).

Dehydration, re-hydration and BrdU incorporation experiments.

12 adult rats were individually housed and maintained for 9 days either with normal drinking water (6) or with 2% NaCl solution (6). During this period, all rats received one daily injection (50 mg /kg) of BrdU (10 mg/ml in phosphate buffered saline (PBS), pH7.4) (Sigma, France). 2 rats were sacrificed in each control and dehydrated group. All the other animals received normal drinking water and were sacrificed 3 or 6 days after the beginning of the rehydration period. 2 control and 2 dehydrated rats were used in each experiment point. During the rehydration period, no BrdU injections were given.

Tissue processing.

At the end of the experimental period rats were deeply anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde (PF) in PBS. The pituitary glands were post-fixed for 1 hour in 4% PF in PBS at 4°C, washed in PBS and cryoprotected in 30% sucrose.

Cryosectioning was performed as follow: horizontal serial sections (35  $\mu\text{m}$ ) were collected in PBS and every four sections one 15 $\mu\text{m}$  section was collected on coverslip. The total number of 35  $\mu\text{m}$  and 15  $\mu\text{m}$  sections routinely obtained from each hypophysis was approximately 7-9.

5 Immunohistochemistry and BrdU staining.

Sections were incubated with primary antibodies overnight at 4°C, washed and incubated with appropriate fluorescent secondary antibodies 1 hour at RT. When necessary, permeabilization was performed for 20 minutes at RT with 0.1% Triton-X100. Labeling of in vitro explant cultures was performed after fixation for 10 minutes in 4% PF in PBS, as described above for whole mount preparation.

10 For BrdU labelling, preparations were incubated for 30 minutes at 37°C in 2N HCl and 0.5% Triton-X100 for floating sections (35  $\mu\text{m}$ ), or for 20 minutes at room temperature in 2N HCl for tissue pieces and explant cultures. After 3 washes in 0.1 M sodium tetraborate, incubation with anti-BrdU antibody was performed overnight at 4°C for  
15 floating sections. After washes, incubation with the appropriate fluorescent secondary antibodies was performed. In the case of double staining, BrdU labeling was performed after the primary antibody incubation. When necessary, nuclear staining was performed prior to mounting using TOPRO3 (Molecular Probes, 1:1000 in PBS) or Hoescht staining depending on the experiment.

20 Sections were mounted in Mowiol (Calbiotech, USA) and examined under a Zeiss Axiophot fluorescence microscope, confocal microscope or a CARV Zeiss analysing confocal microscope.

Statistical analysis.

The number of positive cells for a given marker was counted on at least 5 randomly  
25 chosen sections from adult rat and compared to the total number of cells identified with the TOPRO3 or hoescht nuclear marker depending on the experiment set up. Proliferation was estimated by counting BrdU-positive cells on 5 randomly chosen sections for each of the 2 control and 2 dehydrated rats. Surface area was calculated using Visiolab 2000 software (Biocom) and the data were expressed as number of BrdU  
30 + cells per field. The surface of one field was 250  $\mu\text{m}^2$ .

The significance of the difference between control and other conditions was calculated with ANOVA using StatView-Student software.

After having characterized O-2A progenitors in NH *in vivo* and *in vitro*, a few examples of applications of such presence to neurobiology and therapy will now be described.

By using the methods presented above, the present invention can provide cellular populations of O-2A progenitors isolated from NH which may be cultured in appropriate conditions to regenerate and differentiate into namely oligodendrocytes, astrocytes. This culture will be made by appropriated methods, for instance described in US 5,693,482, the invention allowing to use a new source of O-2A progenitors, meaning the NH. For instance the culture medium may be as follows.

Basal medium consists in Dubelco Modified Eagle Medium (DMEM)/F12 (50/50), supplemented with 100 µg/ml human transferrin, 5 µg/ml insulin, 100 µM putrescin, 20 nM progesterone, 30 nM sodium selenite ; (GIBCO, BRL). This medium is supplemented with bFGF (10 ng/ml), PDGF-AA (10 ng/ml) and NT3 (10 ng/ml) for the maintenance of O-2A progenitors in culture. In order to differentiate the O-2A progenitors in astrocytes the basal medium is supplemented with 15 % fetal calf serum (FCS) and PDGF-AA (10ng/ml). Differentiation of the O-2A progenitors in oligodendrocytes is obtained in basam medium. Cultures are kept ay 37°C in a 5 % CO2 and 95 % air atmosphere.

The invention is illustrated using O-2A progenitors issued from the rat. However O2-A progenitors and their progeny may be isolated from NH from human and non-human primates, equines, canines, felines, bovines, porcines, etc.

The invention provides cellular preparations comprising an enriched population of O-2A progenitors or their progeny obtained from the culture, differentiation and isolation of O-2A progenitors in appropriate medium. The preparation obtained contains a majority of or at least about 75 % of the population selected, and preferably 90 to 95 %.

It is reminded that in order to isolate progenitor cells from the neurohypophysis explant, an agent which causes proliferation of the progenitor cells is useful. Different techniques may be used to assess the proliferation (such as DNA synthesis measuring, morphological changes), and to isolate the progenitor cells having proliferated in an explant (such as mechanical isolation, enzymatic digestion of the explant followed by

the isolation of the activated progenitor cell population based on specific cell surface markers). Once the different cell populations originated from O-2A progenitors have been identified (using monoclonal antibodies able to identify surface markers associated to specific stage of differentiation), procedure for separation may use magnetic  
5 separation, chromatography, fluorescence activated cell sorting, direct separation using markers such as magnetic beads reacting with a support.

It may further be very useful to prepare genetically-engineered mammalian multipotent O-2A progenitors and their progeny, which are cultured in order to grow a sufficient number of cells for in vitro gene transfer followed by in vivo implantation. Nucleic acid  
10 sequences encoding genes of interest are introduced into multipotent O-2A progenitors where they are expressed. These genes can include neurotrophic or survival factors, immortalizing oncogenes, marker genes.

The O-2A progenitors may be immortalized to maintain the cell at a defined developmental stage. The present techniques for immortalization typically involve the  
15 transfection of an oncogene to the cell. Transfection of the oncogene can be accomplished by appropriated, including using recombinant retroviruses, chemical or physical methods (calcium phosphate calcium-phosphate-mediated transfection, microinjection, insertion of a plasmid present in liposomes).

For example, one method is to use an eukaryotic viral vector, such as simian virus 40  
20 (SV40) or bovine papilloma virus, to transiently infect or transform the O-2A progenitors.

Various viral vectors can be utilized for immortalization including adenovirus, adeno-associated virus, herpes virus, vaccinia, retrovirus. Examples of retroviral vectors in which a single foreign gene can be inserted include Moloney murine, leukemia virus  
25 (MoMuLV), Harvey murine sarcoma virus (HaMuSV), murine mammary tumor virus (MuMTV), gibbon ape leukemia virus (GaLV) and Rous Sarcoma Virus (RSV). A number of additional retroviral vectors can incorporate multiple genes. All of these vectors can transfer or incorporate a gene for a selectable marker so that transduced cells can be identified and generated.

30 Herpes virus-based vectors may also be used to transfer genes into a O-2A progenitors : herpes viruses are capable of establishing a latent infection and an apparently non-pathogenic relationship with some neural cells, such vectorbased on HSV-1, for

example, may be used. Similarly, it may be possible to use human and animal viruses that infect cells of the CNS efficiently, such as rabies virus, measles, and other paramyxoviruses and even the human immunodeficiency retrovirus (HIV), to develop useful delivery and expression vectors.

5 When a recombinant retrovirus is engineered to contain an immortalizing oncogene, the oncogene can be any one of those known to immortalize. For example, such commonly used immortalizing genes include genes of the myc family (c-myc and v-myc), adenovirus genes (E1a 12s and E1a 13s), the polyoma large T antigen and SV40 large T antigen.

10 Marker genes, such as the E.coli  $\beta$ -galactosidase gene, can be introduced into O-2A progenitors allowing the identification of these cells and their progeny. Selectable marker genes, such as the neomycin phosphoribosyltransferase (neomycin-resistance) may be introduced to provide for a population of genetically-engineered O-2A progenitors which are identified by the ability to grow in the presence of selective  
15 pressure (i. e. medium containing neomycin).

Numerous useful genes may be introduced into O-2A progenitors and their progeny for identifying drugs, in particular using genes for a receptor molecule. For example, such neuronal receptors include the receptor which binds dopamine, GABA, adrenaline, noradrenaline, serotonin, glutamate, acetylcholine and various other neuropeptides.

20 Transfer and expression of a particular receptor in O-2A progenitors of specific neural origin, would allow identification of neuroactive drugs and trophic factors which may be useful for the treatment of diseases involving that O-2A progenitors type and that receptor. For example, a neuroactive compound which mimics a neurotransmitter and binds to a receptor and exhibits either an antagonistic or agonist effect, thereby  
25 inhibiting or stimulating a response in O-2A progenitors, can be identified.

The introduction in a patient treated of O-2A progenitors and their progeny incorporating a gene unsufficiently expressed by the patient may be useful. For instance a gene encoding a neurotrophic factor, such as nerve growth factor, (NGF), would prevent from a degeneration of cholinergic neurons, in particular for treatment of

30 Alzheimer's disease which is characterized by degeneration of the cholinergic neurons of the basal forebrain. A gene encoding L-DOPA, the precursor to dopamine, would be

useful for treatment of Parkinson's disease which is characterized by a loss of dopamine neurons in the substantia-nigra of the midbrain.

The introduced gene may also be a gene capable of inhibiting factors responsible for cell death in certain areas, for example in case of a stroke, or a gene efficient against a tumor.

5

The present invention also provides a method of treating a subject with a cell disorder of the CNS which comprises administering to the subject a therapeutically effective amount of the O-2A progenitors or their progeny.

10

The method of treating a subject with a CNS disorder comprises intracerebral grafting of O-2A progenitors, or oligodendrocytes or astrocytes or neurons which have been induced to differentiate from the O-2A progenitors, to the region of the CNS having the disorder.

15

O-2A progenitors graft involves typically transplantation of cells into the CNS or into the ventricular cavities or subdurally onto the surface of a host brain. Such methods for grafting are described in Neural Grafting in the Mammalian CNS, Bjorklund and Stenevi, eds., (1985), incorporated by reference herein. Procedures include in particular intraparenchymal transplantation, (i.e., within the host brain) achieved by injection or deposition of tissue within the host brain so as to be apposed to the brain parenchyma at the time of transplantation.

20

Administration of the O-2A progenitors into selected regions of the recipient subject's brain may be made by :

- drilling a hole and piercing the dura to permit the needle of a microsyringe to be inserted ;
- injecting intrathecally into the spinal cord region O-2A progenitors or progeny preparation allowing to graft O-2A progenitors or progeny to any predetermined site in the brain or spinal cord.

25

Multiple grafting can be made simultaneously in several different sites using the same cell suspension or from different anatomical regions : for example, the O-2A progenitors or progeny (oligodendrocytes or astrocytes) may be grafted into the CNS of a subject with multiple sclerosis, wherein the subject's oligodendrocytes have died.

30

The method of treating a subject with a CNS disorder also contemplates the grafting of O-2A progenitors in combination with other therapeutic procedures useful in the

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

27

treatment of disorders of the CNS. For example, the O-2A progenitors can be co-administered with agents such as growth factors, gangliosides, antibiotics, neurotransmitters, neurohormones, toxins, neurite promoting molecules and antimetabolites and precursors of these molecules such as the precursor of dopamine, L-DOPA.

5 Concerning neurons very surprisingly found to differentiate after a graft of NH explant, the grafting from NH explant can now be made as described herein. The grafting may be done between species, for instance a graft of porcine neurons to human.

10 The invention also provides a method of identifying compositions which affect O-2A progenitors or progeny, such as by inhibiting or stimulating O-2A progenitors to proliferate or differentiate into oligodendrocytes, astrocytes, neurons.



REFERENCES

- Barres BA, Raff MC, Gaese F, Bartke I, Dechant G, Barde YA (1994) A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. *Nature* 367:371-375.
- 5 Butt MA (1998) Macroglial cell types, lineage, and morphology in the CNS. *Ann N Y Acad Sci* 1991:633.
- Cocchia D, Miani N (1980) Immunocytochemical localization of the brain-specific S-100 protein in the pituitary gland of adult rat. *J Neurocytol* 9:771-782.
- Kondo T, Raff M (2000) Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become  
10 multipotential CNS stem cells. *Science* 289:1754-1757.
- Levine JM, Stallcup WB (1987) Plasticity of developing cerebellar cells in vitro studied with antibodies against the NG2 antigen. *J Neurosci* 1987,7(9):2721-31.
- Marin F, Boya J, Lopez-Carbonell A (1989) Immunocytochemical localization of vimentin in the posterior lobe of the cat, rabbit and rat pituitary glands. *Acta Anat*  
15 (Basel) 134:184-190.
- McKinnon RD, Matsui T, Dubois-Dalcq M, Aaronson SA (1990) FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron* 5:603-614.
- Raff MC, Miller RH, Noble M (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303:390-396.
- 20 Salm AK, Hatton GI, Nilaver G (1982) Immunoreactive glial fibrillary acidic protein in pituitary cells of the rat neurohypophysis. *Brain Res* 236:471-476.
- Theodosios DT, Bonhomme R, Vitiello S, Rougon G, Poulain DA (1999) Cell surface expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological neuronal and glial plasticity. *J Neurosci* 19:10228-10236.

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

29

- Theodosis DT, Poulain DA (1999) Contribution of astrocytes to activity-dependent structural plasticity in the adult brain. *Adv Exp Med Biol* 468:175-182.
- Theodosis DT, Rougon G, Poulain DA (1991) Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule  
5 in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5494-5498.
- Vitry S, Avellana-Adalid V, Hardy R, Lachapelle F, Baron-Van Evercooren A (1999) Mouse oligospheres: from pre-progenitors to functional oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 58:735-751.
- Wang C, Rougon G, Kiss JZ (1994) Requirement of polysialic acid for the migration of  
10 the O-2A glial progenitor cell from neurohypophyseal explants. *J Neurosci* 14:4446-4457.

CLAIMS

1. An isolated population of mammalian neurohypophysis cells comprising multipotent cells.
- 5 2. A population according to claim 1 wherein the multipotent cells are able to differentiate into at least oligodendrocytes and/or type II astrocytes and/or neurons.
3. A population according to claim 1 or 2, wherein said population is derived from newborn neurohypophysis when this structure is still developing or from adult neurohypophysis.
- 10 4. A population according to anyone of claims 1 to 3, wherein said population is derived from adult neurohypophysis after a physiological stimulus.
5. A population according to claim anyone of claims 1 to 4, wherein said population is an explant of neurohypophysis, cultivated in an appropriate culture medium.
- 15 6. A method for obtaining a cellular population according to anyone of claims 1 to 5, said method comprising the steps of preparing a suspension from a neurohypophysis explant, culturing the suspension in an appropriate medium for growth and/or proliferation of said population.
7. A method for isolating a cellular population according to anyone of  
20 claims 1 to 5 comprising :
  - culturing a neurohypophyse explant wherein said explant is maintainable in culture and includes progenitor cells that have the ability to differentiate into at least oligodendrocytes and/or type II astrocytes and/or neurons ;
  - contacting said explant with an agent which causes proliferation of progenitor cells  
25 of said explant ;
  - isolating from said explant progenitor cells that proliferate in response to said agent.
8. A method for obtaining oligodendrocyte-type II astrocytes (O-2A) progenitor cells and/or their progeny comprising :
  - culturing a neurohypophysis explant wherein said explant is maintainable in culture  
30 and includes progenitor cells that have the ability to differentiate ;
  - contacting said explant with an agent which causes proliferation of progenitor cells of said explant and differentiation into oligodendrocyte-type 2 and/or astrocyte ;

- contacting said suspension with markers for O-2A progenitor cells and/or their progeny ;
  - isolating O-2A progenitor cells and/or their progeny.
9. A method according to claim 9, wherein the isolation technique of O-2A  
5 progenitor cells and/or their progeny includes one of magnetic separation, antibody coated magnetic beads, affinity chromatography, antibodies attached to a matrix, responsiveness to growth factors, specific gene expression, antigenic cell specific surface markers, basic morphology.
10. A method according to claim 9 or 10, further comprising the preparation  
of an isolated cellular composition containing at least 50 %, of neurohypophysis O-2A  
progenitor cells.
11. A method for screening compounds having an ability to modulate one of  
growth, proliferation and/or differentiation of progenitor cells obtained from  
neurohypophysis comprising :
- 15 - culturing a neurohypophysis explant wherein said explant is maintainable in culture and includes progenitor cells that have the ability to differentiate ;
  - contacting said explant with an agent which causes proliferation of progenitor cells of said explant ;
  - contacting said explant with a tested compound ;
  - 20 - detecting one of growth, proliferation and/or differentiation of progenitor cells by comparing the results without the compound.
12. A method for obtaining an isolated population of transformed  
mammalian multipotent oligodendrocytes-type 2 astrocytes (O-2A) progenitor cells  
and/or their progeny, said method comprising the introduction of at least a nucleic acid.
- 25 13. A population of transformed mammalian multipotent oligodendrocytes-type 2 astrocytes (O-2A) progenitor cells and/or their progeny obtainable according to the method of claim 12.
14. A method for providing neurohypophysis O-2A progenitor cells and/or  
their progeny in at least one location of the brain, comprising the implantation of O-2A  
30 progenitor cells in the brain.
15. A method according to claim 14 wherein the O-2A progenitor cells have  
been prior transformed.

16. A method to assay *in vivo* development and differentiation of a neurohypophysis explants containing O-2A progenitor cells, said method comprising :
- extracting a newborn or adult neurohypophysis explant ;
  - labeling and transplantating the explant in the periventricular zone of newborn or adult mammalian brain ;
  - identifying the distribution of transplanted cells in the brain.
17. A method for screening antibodies capable of recognizing surface markers which characterizes multipotent O-2A progenitor cells and/or their progeny comprising culturing said cells in an appropriate medium, adding tested antibodies, identifying the complex antibodies-markers.
18. A method for providing antibodies capable of recognizing surface markers which characterizes multipotent O-2A progenitor cells and/or their progeny comprising immunizing an animal with said cells, isolating the antibodies produced.
19. An isolated mammalian progenitor cell wherein said progenitor cell is extracted from neurohypophysis and is able to differentiate into at least oligodendrocyte and/or type II astrocyte and/or neuron.
20. A method for obtaining at least one isolated cell according to claim 18 comprising :
- culturing a neurohypophysis explant wherein said explant is maintainable in culture and includes progenitor cells that have the ability to differentiate into at least oligodendrocytes and type II astrocytes ;
  - isolating from said explant at least one progenitor cell that have the ability to differentiate into at least oligodendrocytes and type II astrocytes.
21. A pharmaceutical composition comprising a population of neurohypophysis O-2A progenitor cells and/or their progeny, or comprising said population that has been transformed, and a vehicle pharmaceutically acceptable.
22. A composition according to claim 21 comprising, as a cellular population, at least 50 % of the O-2A progenitor cells and/or their progeny.
23. A composition according to claim 21 or 22, used as a medicament for a neural disorder or a neural disease.

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

33

24. Use of a population obtained by the method according to anyone of claims 6 to 12, for the preparation of a pharmaceutical composition for treatment of a neural disorder or a neural disease.

25. Use of an explant according to claim 5 for the preparation of a graft for treatment of a neural disorder or a neural disease.

26. Use according to claim 24 or 25 wherein the neural disease is Alzheimer's disease, Parkinson's disease.

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

1/23

Figure 1a



Figure 1b

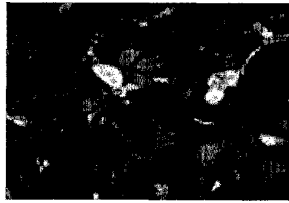
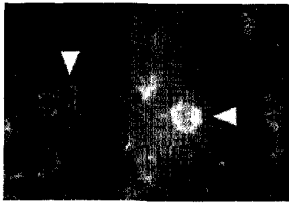


Figure 1c



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

2/23

Figure 1d

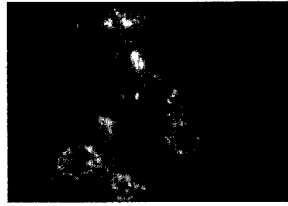


Figure 1e

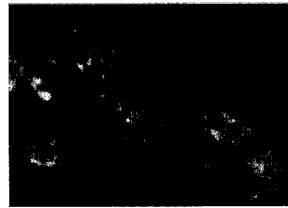


Figure 1f



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



WO 02/062967

PCT/IB02/01226

3/23

Figure 1g

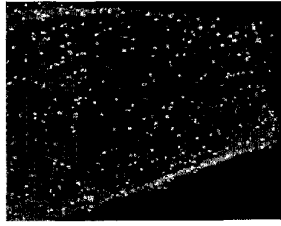


Figure 1h

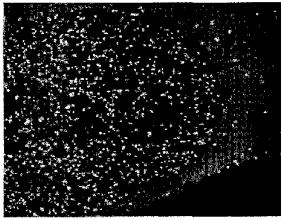
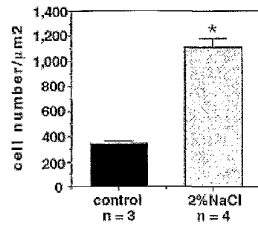


Figure 1i



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/062967

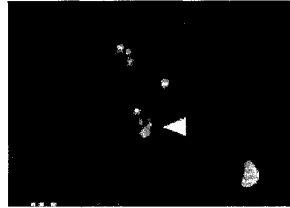
PCT/IB02/01226

4/23

Figure 1j



Figure 1k



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

5/23

Figure 2a

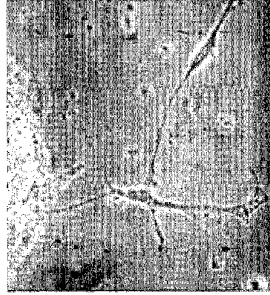


Figure 2b



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

6/23

Figure 2c

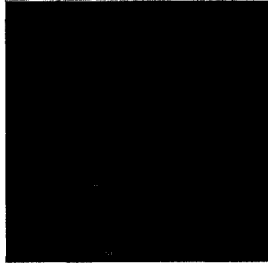
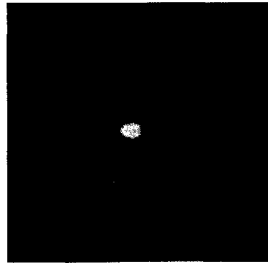


Figure 2d



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

7/23

Figure 3a



Figure 3b

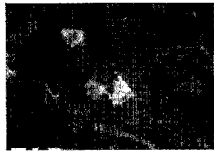


Figure 3c



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

8/23

Figure 3d



Figure 3e



Figure 3f



Figure 3g



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

9/23

Figure 3h

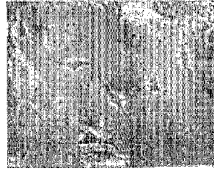


Figure 3i



Figure 3j



Figure 3k



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

10/23

Figure 3l



Figure 3m





WO 02/062967

PCT/IB02/01226

11/23

Figure 4a

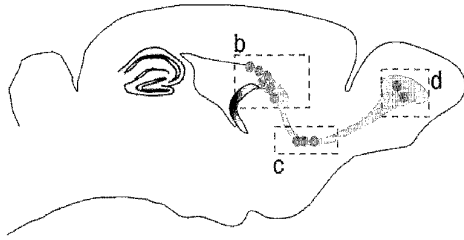
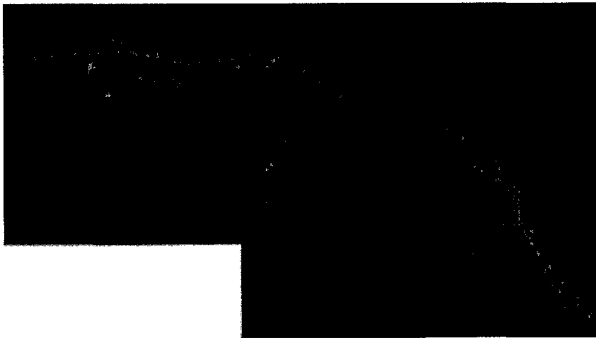


Figure 4b



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

12/23

Figure 4c



Figure 4d



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

13/23

Figure 5a



Figure 5b



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

14/23

Figure 5c



Figure 5d



Figure 5e



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

15/23

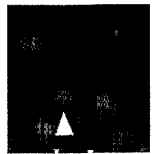
Figure 5f



Figure 5g



Figure 5h



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

16/23

Figure 5i

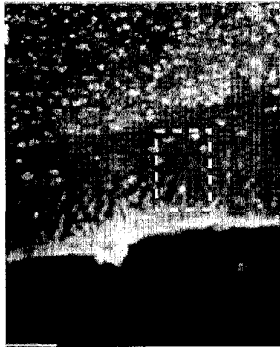
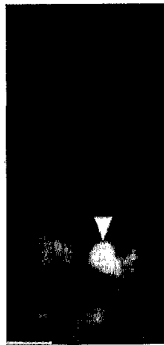


Figure 5j



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

17/23

Figure 5k

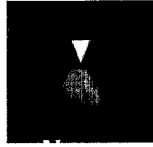
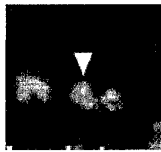


Figure 5l



WO 02/062967

PCT/IB02/01226

18/23

Figure 6a

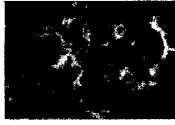


Figure 6b

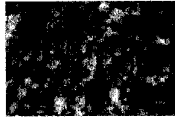


Figure 6c

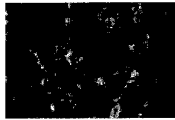
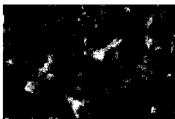


Figure 6d



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



WO 02/062967

PCT/IB02/01226

19/23

Figure 7a



Figure 7b

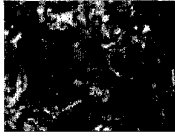
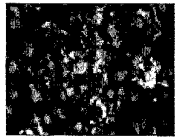


Figure 7c



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

20/23

Figure 7d

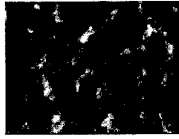


Figure 7e

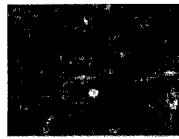
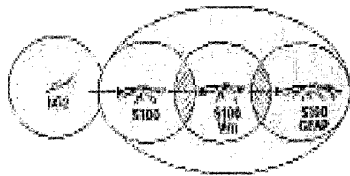


Figure 7f



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/062967

PCT/IB02/01226

21/23

Figure 8a



Figure 8b



Figure 8c



WO 02/062967

PCT/IB02/01226

22/23

Figure 8d



Figure 8e



Figure 8f



WO 02/062967

PCT/IB02/01226

23/23

Figure 9a

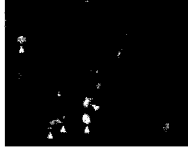


Figure 9b

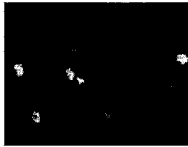
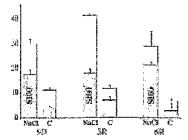


Figure 9c



## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
15 August 2002 (15.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/062967 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 5/08, A61K 35/12, C12N 5/06
- (21) International Application Number: PCT/02/01226
- (22) International Filing Date: 8 February 2002 (08.02.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01400341.2 9 February 2001 (09.02.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): ROUGON, Geneviève [FR/FR]; Bul Le Thiais, Clos des Cèdres, 2, Boulevard des Cèdres, F-13009 Marseille (FR). CO-QUILLAT, Delphine [FR/FR]; 54 Rue Perrin Solliers, F-13006 Marseille (FR). DUBREC, Pascale [FR/FR]; Clos des Cèdres, 2, Boulevard des Cèdres, F-13009 Marseille (FR).
- (74) Agents: MARTIN, Jean-Jacques et al.; Cabinet Regimbeau, 20, Rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaration under Rule 4.17:  
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- Published:  
— with international search report  
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 12 December 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/062967 A3

(54) Title: MULTIPOTENT O-2A PROGENITORS FROM THE NEUROHYPOPHYSIS

(57) Abstract: An isolated population of mammalian neurohypophysis cells comprising multipotent cells has been identified. O-2A progenitor cells are described which are able to differentiate into at least oligodendrocytes and/or type II astrocytes and/or neurons. The invention includes also methods for isolating, culturing, transplanting such cellular population, and their use as a medicament for a neural disorder or a neural disease.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IB 02/01226
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N5/08 A61K35/12 C12N5/06		
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) IPC 7 C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE		
<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	KISS JOZEF ZOLTAN: "A role of adhesion molecules in neuroglial plasticity." MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 140, no. 1-2, 25 May 1998 (1998-05-25), pages 89-94, XP002165728 ISSN: 0303-7207 the whole document --- -/-	1-26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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.		
*Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 September 2002		Date of mailing of the international search report 07/10/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2016		Authorized officer Nichogiannopoulou, A

Form PCT/ISA/E10 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/IB 02/01226

C-(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WANG CHENG ET AL: "Functional N-methyl-D-aspartate receptors in O-2A glial precursor cells: A critical role in regulating polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression and cell migration."            JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 135, no. 6 PART 1, 1996, pages 1565-1581, XP002165729            ISSN: 0021-9525            the whole document</p>	1-26
X	<p>WANG CHENG ET AL: "Requirement of polysialic acid for the migration of the O-2A glial progenitor cell from neurohypophyseal explants."            JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 14, no. 7, 1994, pages 4446-4457, XP002165730            ISSN: 0270-6474            the whole document</p>	1-26
A	<p>US 5 693 482 A (STEMPLE DEREK L ET AL)            2 December 1997 (1997-12-02)            cited in the application            the whole document</p>	1-26

Form PCT/SA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)



<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/IB 02/01226
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 14-16 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
<b>Remark on Protest</b>	
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International Application No  
PCT/IB 02/01226

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5693482 A	02-12-1997	US 5654183 A	05-08-1997
		US 5672499 A	30-09-1997
		US 5928947 A	27-07-1999
		US 5849553 A	15-12-1998
		US 6001654 A	14-12-1999
		AU 678988 B2	19-06-1997
		AU 4837593 A	14-02-1994
		CA 2140884 A1	03-02-1994
		EP 0658194 A1	21-06-1995
		JP 8500245 T	16-01-1996
		NZ 256154 A	24-02-1997
		WO 9402593 A1	03-02-1994
		US 5824489 A	20-10-1998
		US 5589376 A	31-12-1996

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1992)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00	B
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 コキヤ、デルフィヌ

フランス国、エフ - 1 3 0 0 6 マルセイユ、リュペラン ソリエール 5 4

(72) 発明者 ドゥブレック、パスカル

フランス国、エフ - 1 3 0 0 9 マルセイユ、ブルバール デ セドル 2、クロ デ セドル(番地なし)

F ターム(参考) 2G045 AA29 BB14 BB20 BB24 BB50 BB51 CB01 CB17 FA16 FB03  
 4B024 AA01 AA20 BA80 CA02 DA02 GA11 HA11 HA17 HA20  
 4B063 QA01 QA05 QA20 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ61 QQ89 QR72  
 QR77 QS31 QS40 QX01 QX10  
 4B065 AA91X AA91Y AB01 AC14 AC20 BA01 BA30 CA43 CA44 CA46  
 4C081 BA12 CD34  
 4C087 AA01 BB45 NA14 ZA02 ZA16

专利名称(译)	来自神经垂体的O-2A前体多能细胞		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004528019A</a>	公开(公告)日	2004-09-16
申请号	JP2002563304	申请日	2002-02-08
[标]申请(专利权)人(译)	中心国立拉尔外壳格哈德青色T恤的费用在习惯NTT强麦ES		
申请(专利权)人(译)	全国中心德拉RECHERCHE青色T恤费点击 ( 保存NTT耶鲁ES )		
[标]发明人	ルゴンジュヌヴィエーヴ コキヤデルフィヌ ドゥブレックパスカル		
发明人	ルゴン、ジュヌヴィエーヴ コキヤ、デルフィヌ ドゥブレック、パスカル		
IPC分类号	G01N33/50 A61K35/12 A61K35/30 A61L27/00 A61P25/16 A61P25/28 C12N5/079 C12N5/0797 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 C12N5/06		
CPC分类号	A61K35/12 A61P25/16 A61P25/28 C12N5/0622 C12N5/0623 C12N2503/02		
FI分类号	C12N5/00.E A61K35/30 A61L27/00.Z A61P25/16 A61P25/28 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.N C12N5/00.B C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/FA16 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA17 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS31 4B063/QS40 4B063/QX01 4B063/QX10 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065/BA30 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C081/BA12 4C081/CD34 4C087/AA01 4C087/BB45 4C087/NA14 4C087/ZA02 4C087/ZA16		
代理人(译)	高岛肇		
优先权	2001400341 2001-02-09 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

已经鉴定了包含多能细胞的分离的哺乳动物神经垂体细胞群。描述了O-2A祖细胞，其能够分化成至少少突胶质细胞和/或II型星形胶质细胞和/或神经元。本发明还包括分离，培养，移植这些细胞群的方法，以及它们作为神经疾病或神经疾病的药物的用途。

名前	種、クラス	作業希釈	購入先/提供元
GFAP	マウスIgG	切片で1:4000 細胞で1:500	Sigma, 仏国
BrdU	マウスIgG	1:100	DAKO
O4	マウスIgM	純上清	ATCC
GalC	マウスIgG	純上清	ATCC
ビメンチン	マウスIgM	1:200	Sigma, 仏国
A2B5	マウスIgM	純上清	ATCC
MenB	マウスIgM	純上清	我々の実験室から
S-100	ウサギ	1:300	DAKO
NG2	ウサギ	1:1000	Chemicon
NG2	マウスIgG	1:25	Chemicon
NeuN	マウスIgG	1:50	Chemicon
MBP	マウスIgG	1:50	Euromedex
CNPase	マウスIgG	1:100	Sigma, 仏国