

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4905719号  
(P4905719)

(45) 発行日 平成24年3月28日(2012.3.28)

(24) 登録日 平成24年1月20日(2012.1.20)

(51) Int.Cl. F I  
**C 1 2 N 5/0797 (2010.01)** C 1 2 N 5/00 2 O 2 T  
 A O 1 K 67/027 (2006.01) A O 1 K 67/027

請求項の数 12 (全 47 頁)

(21) 出願番号	特願2007-502657 (P2007-502657)	(73) 特許権者	800000057 公益財団法人新産業創造研究機構 兵庫県神戸市中央区港島南町1丁目5-2
(86) (22) 出願日	平成18年2月10日(2006.2.10)	(73) 特許権者	803000056 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 東京都千代田区岩本町二丁目11番1号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2006/302350	(74) 代理人	100065215 弁理士 三枝 英二
(87) 国際公開番号	W02006/085612	(74) 代理人	100108084 弁理士 中野 睦子
(87) 国際公開日	平成18年8月17日(2006.8.17)	(72) 発明者	松山 知弘 日本国京都市京都市北区小山東花池町5-1
審査請求日	平成21年1月28日(2009.1.28)		
(31) 優先権主張番号	特願2005-35032 (P2005-35032)		
(32) 優先日	平成17年2月10日(2005.2.10)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経幹細胞の調製法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

F K 5 0 6 及びシクロスポリン A からなる群から選択される免疫抑制剤、および、脳梗塞後のヒト又は動物から採取した血清を添加して骨髄細胞を培養することにより分化誘導し、神経幹細胞を調製する方法。

【請求項2】

脳梗塞後のヒト又は動物から採取した骨髄細胞を、F K 5 0 6 及びシクロスポリン A からなる群から選択される免疫抑制剤を添加して培養することにより分化誘導し、神経幹細胞を調製する方法。

【請求項3】

F K 5 0 6 及びシクロスポリン A からなる群から選択される免疫抑制剤、および、CINC-1 もしくは T N F ( tumor necrosis factor- : 腫瘍壊死因子 ) を添加して骨髄細胞を培養することにより分化誘導し、神経幹細胞を調製する方法。

【請求項4】

サイトカインとして、T N F を添加する、請求項3記載の方法。

【請求項5】

神経幹細胞として、ニューロスフェア ( neurosphere ) またはニューロスフェア様細胞塊を調製する、請求項1 ~ 4 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

請求項1 ~ 4 のいずれか1項に記載の方法により神経幹細胞を生産する方法。

## 【請求項 7】

請求項 6 記載の神経幹細胞をさらに培養することにより分化誘導し、神経細胞を生産する方法。

## 【請求項 8】

請求項 1 記載の方法において、神経幹細胞の調製に用いる骨髄細胞および血清には、治療対象の患者から採取したものを使用方法。

## 【請求項 9】

請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法において、神経幹細胞の調製に用いる骨髄細胞には、治療対象の患者から採取したものを使用方法。

## 【請求項 10】

免疫不全マウスの母系マウスに F K 5 0 6 及びシクロスポリン A からなる群から選択される免疫抑制剤を投与して免疫不全状態にした後結紮処理により作成した脳梗塞モデルマウスに結紮処理後も F K 5 0 6 及びシクロスポリン A からなる群から選択される免疫抑制剤を継続して投与し、その後採取した骨髄細胞を培養することにより分化誘導し、神経幹細胞を調製する方法。

10

## 【請求項 11】

免疫不全マウスが、C.B-17/lcrCrIBRマウスを母系とする S C I D マウスである、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

免疫不全マウスが、BALB/cAJclマウスを母系とするヌードマウスである、請求項 10 に記載の方法。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、神経幹細胞の調製法に関し、より詳細には、骨髄から神経幹細胞を誘導・調製する方法と、神経再生治療への応用に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

脳梗塞などの脳血管障害や神経変性疾患は、超高齢社会を迎えつつあるわが国にとって解決すべき最重要課題のひとつである。しかし、これまでの神経細胞死抑制などに焦点をあてた治療法開発の努力にもかかわらず、有効な治療法の開発に結びつく成果は未だ十分に得られていない。

30

## 【0003】

神経再生療法は、既に障害をうけている脳機能を再生神経により改善できる可能性があり、新たな神経疾患治療法として期待されている。既に米国では、パーキンソン病などの神経変性疾患において胎児脳より採取された神経幹細胞移植による神経再生治療が行われている。しかし、この治療法には倫理上の問題など解決すべき課題が少なくない。

## 【0004】

脳梗塞治療を目的とした E S 細胞由来の神経幹細胞移植も行われているが、E S 細胞の機能解析が不十分で、かつその入手が倫理的にも制度的にも現状困難という問題がある。また、E S 細胞の神経への分化誘導法は未だ確立しておらず、生体内で生着・機能するかどうか不確かである。

40

## 【0005】

神経再生医療への利用が期待される神経幹細胞は、上述のように胎児脳や E S 細胞に由来するもののほか、成熟脳由来の脳室下帯組織 (subventricular zone: S V Z) から採取可能である。胎児脳由来の神経幹細胞は、神経細胞に分化する。一方、成熟脳 S V Z 由来の神経幹細胞は、グリア細胞に高率に分化し、通常の培養条件では神経細胞に分化しない。成熟脳 S V Z 由来の神経幹細胞を神経細胞に分化させるためには栄養因子の添加や、分化誘導因子 (N o t c h 1 など) の遺伝子導入が必要である。

## 【0006】

50

神経再生医療において、このような培養神経幹細胞を移植する方法としては、直接細胞を脳内に注入・移植する方法が主に施行されている。しかし、この方法は手技が煩雑であり、移植法は未だ確立されたものとはいえない。一方、このように直接脳内に移植する方法以外に、脳梗塞急性期に骨髄単核球細胞を静脈内に投与する治療法が試みられている。もっとも、この治療法は神経幹細胞を投与するものではなく、未分化の骨髄細胞を静脈内投与するものであるため、神経再生の効果がどの細胞によって生じているのかなどメカニズムが不明で効果の予測・評価が困難である。

【 0 0 0 7 】

骨髄間質細胞に遺伝子導入することによって、あるいは数種類の成長因子を添加しながら骨髄間質細胞を培養することによって、骨髄細胞から神経細胞を作り出すことができたとの報告がある。また最近になって、ヒトやマウスの骨髄細胞から神経幹細胞であるニューロスフェア (neurosphere) が得られたとの報告がある (下記の非特許文献 1・2 参照)。しかし、これらの方法は、(1) ニューロスフェアおよび分化可能な神経幹細胞を作成するまでの培養期間が 2 ヶ月から 6 ヶ月程度かかり、長期間を要する、(2) 最終的に神経細胞あるいはグリア細胞に分化させるのに BDNF や PDGF などの栄養因子による刺激が必要である、などの難点がある。

10

【 0 0 0 8 】

また、本発明者らは、ヒト臍帯血由来の幹細胞 (CD34 陽性細胞) を脳梗塞モデルマウスに静脈内投与することで、脳内での血管再生、さらに神経再生が起こることを見出し、これを報告している (下記の非特許文献 3 参照)。

20

【 0 0 0 9 】

【非特許文献 1】Hermann A, Gastl R, Liebau S, Oana Popa M, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R, Storch A (2004) J Cell Sci 117:4411-4422.

【非特許文献 2】Kabos P, Ehtesham M, Kabosova A, Black KL, Yu JS (2002) Generation of neural progenitor cells from whole adult bone marrow. Exp Neurol 178:288-293.

【非特許文献 3】Taguchi, A., Soma, T., Tanaka, H., Kanda, T., Nishimura, H., Yoshikawa, H., Tsukamoto, Y., Iso, H., Fujimori, Y., Stern, D.M., Naritomi, H., Matsuyama, T. (2004) Administration of CD34+ cells post-stroke enhances angiogenesis and neurogenesis in a murine model. J. Clin. Invest., 114:330-338.

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 0 】

脳梗塞などの脳血管障害やその後遺症、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患に対しては、神経機能を回復させる有効な治療法がない。神経機能の再生をめざした治療法確立のためには再生する神経細胞が提供されなければならない。神経再生治療への応用が期待される神経幹細胞は、上述したように現在まで、胎児脳由来の神経幹細胞、成体脳由来の神経幹細胞、ES細胞由来の神経幹細胞、骨髄成体多能性幹細胞 (multipotent adult progenitor cell: MAPC) 由来の神経幹細胞などが報告されている。しかし、その供給源や神経細胞への分化効率、さらに移植脳への生着性、機能発揮性など問題点が山積している。また、骨髄細胞に遺伝子を導入するなど、神経細胞を人為的に作成する手法なども考案されているが、発がん性や生着、機能性などに問題がある。

40

【 0 0 1 1 】

理想的には、まず倫理的にも、また移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) 回避のためにも、神経再生治療に使用される神経幹細胞は、患者本人の細胞であること、つまり自家移植 (Autograft) であることが望ましい。また、神経細胞に高率に分化し (Neurogenesis)、神経機能を保ち (Functional)、かつ必要な時期に (Timely)、簡単に (easy)、大量に (Amplify)、作成される幹細胞であること、即ち、これらの特徴をあわせもったいわば「FANTASY」であることが望ましい。

50

## 【 0 0 1 2 】

ところで、生体には組織あるいは臓器障害時に際して様々な修復機能が備わっている。これらは主に消化管上皮や肝臓、血管内皮細胞など組織固有の細胞の分裂や増殖を介して行われているものであるが、最近種々の骨髄由来の幹細胞がこれに関与することが知られてきた。しかしながら、ほとんどの病態において骨髄が組織修復にどの程度関与するかの検討はなされていないのが実情である。神経幹細胞移植による神経再生治療法の開発に際して、このような生体内で通常起こっているホメオスタシス維持機構の一環としての修復機構のメカニズムを研究した上で、その機構に添った治療法を考案することが有効・適切と考えられる。

## 【 0 0 1 3 】

本発明は、上記の問題点に鑑みなされたものであって、その目的は、脳梗塞などの脳血管障害や神経変性疾患に対する新たな神経再生治療法を開発・確立すること、そのため、神経再生治療又はその治療法開発において好適に用いられ、簡便かつ短期間に調製可能であり、しかもその移植により良好に神経細胞を脳患部に生着、機能させることが期待できる神経幹細胞の調製法等を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 1 4 】

本発明者らは、上記の課題に鑑み鋭意研究を進めた結果、まず免疫不全の S C I D マウスを処置して脳梗塞モデルマウスを作出し、脳梗塞 1 週間後の当該マウスより採取した骨髄細胞を培養することで、骨髄細胞から神経幹細胞（ニューロスフェア）に分化誘導できることを明らかにした。さらに、後述するように再生と免疫に関する重要な知見が得られ、骨髄から短期間（2 週間程度）に神経幹細胞を誘導・調製する技術を確立した。この方法によって、実際にヒトの正常骨髄から神経幹細胞を誘導・調製することにも成功した。この方法により、患者骨髄から神経幹細胞を調製し、これを自家移植として静脈内投与することによって、再生神経を良好に脳患部に生着、機能させる神経再生治療法が実現可能であること等を見出し、本発明を完成させるに至った。

## 【 0 0 1 5 】

即ち、本発明は、産業上および医学・医療上有用な発明として、下記（ 1 ）～（ 4 8 ）の発明を包含するものである。

（ 1 ）免疫抑制剤、および、脳梗塞その他脳障害後のヒト又は動物から採取した血清を添加して骨髄細胞を培養することにより分化誘導し、神経幹細胞を調製する方法。

ここで、脳障害とは、脳の血管の狭窄、閉塞、結紮又はその他の原因で脳の一部分が虚血状態になっていること、すなわち脳虚血障害を意味する。

（ 2 ）脳梗塞その他脳障害後のヒト又は動物から採取した骨髄細胞を、免疫抑制剤を添加して培養することにより分化誘導し、神経幹細胞を調製する方法。

（ 3 ）免疫抑制剤、および、ケモカイン（もしくはその他のサイトカイン）を添加して骨髄細胞を培養することにより分化誘導し、神経幹細胞を調製する方法。

（ 4 ）ケモカインとして、インターロイキン - 8（ I L - 8 ）ファミリーのケモカインを添加する、上記（ 3 ）記載の方法。

（ 5 ）サイトカインとして、 T N F（ tumor necrosis factor- ：腫瘍壊死因子）を添加する、上記（ 3 ）記載の方法。

（ 6 ）ケモカイン（もしくはその他のサイトカイン）であり、骨髄細胞から神経幹細胞への分化を直接的又は間接的に誘導する分化誘導因子。

（ 7 ）上記（ 6 ）記載の分化誘導因子を用いて、培養細胞から神経幹細胞を調製する方法。

（ 8 ）上記（ 6 ）記載の分化誘導因子と免疫抑制剤とからなる神経幹細胞分化誘導剤。

（ 9 ）神経幹細胞として、ニューロスフェア（neurosphere）またはニューロスフェア様細胞塊を調製する、上記（ 1 ）～（ 5 ）又は（ 7 ）のいずれかに記載の方法。

（ 1 0 ）上記（ 1 ）～（ 5 ）又は（ 7 ）のいずれかに記載の方法により神経幹細胞を生産する方法。

10

20

30

40

50

(11) 上記(10)記載の神経幹細胞をさらに培養することにより分化誘導し、神経細胞を生産する方法。

(12) 上記(10)記載の神経幹細胞もしくは上記(11)記載の神経細胞を、脳梗塞治療または他の神経再生治療に使用する方法。

(13) 上記(10)記載の神経幹細胞もしくは上記(11)記載の神経細胞を、静脈内投与などの方法により投与する、脳梗塞治療法または他の神経再生治療法。

(14) 上記(1)記載の方法において、神経幹細胞の調製に用いる骨髓細胞および血清には、治療対象の患者から採取したものを使用する方法。

(15) 上記(2)~(5)又は(7)のいずれかに記載の方法において、神経幹細胞の調製に用いる骨髓細胞には、治療対象の患者から採取したものを使用する方法。

10

(16) 上記(1)~(5)又は(7)のいずれかに記載の方法において、神経幹細胞の調製に用いる免疫抑制剤に、FK506(タクロリムス)、シクロスポリン、抗CD28抗体および抗ICOS抗体などのT細胞機能を抑制する免疫抑制剤を使用する方法。

ここで、抗CD28抗体および抗ICOS抗体とは、それぞれCD28、ICOSの作用を阻害し、T細胞機能を抑制するブロッキング抗体を意味し、T細胞を刺激し活性化するものではない。

(17) 上記(13)記載の神経再生治療法において、神経(幹)細胞の投与と同時または異時に、免疫抑制剤を投与する方法。

(18) 上記(13)記載の神経再生治療法において、神経(幹)細胞の投与と同時または異時に、ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞、血管内皮前駆細胞(EPIC)などの血管形成能を有する細胞を投与する方法。

20

(19) 上記(10)記載の神経幹細胞もしくは上記(11)記載の神経細胞を含む脳梗塞治療剤。

(20) 上記(10)記載の神経幹細胞もしくは上記(11)記載の神経細胞を含む神経再生治療剤。

(21) 免疫不全マウス(SCIDマウスおよびヌードマウスを含む)、その母系マウス、又はこれらのマウスから作成した脳梗塞モデルマウスの骨髓細胞を培養することにより分化誘導し、神経幹細胞を調製する方法。

(22) 免疫不全マウスの骨髓細胞を、脳梗塞モデルマウスから採取した血清、又はケモカイン(もしくはその他のサイトカイン)を添加して培養する、上記(21)記載の方法

30

。 (23) 免疫不全マウスの母系マウスの骨髓細胞を、脳梗塞モデルマウスから採取した血清(又は、ケモカインもしくはその他のサイトカイン)と免疫抑制剤とを添加して培養する、上記(21)記載の方法。

(24) 免疫不全マウスの母系マウスから作成した脳梗塞モデルマウスの骨髓細胞を、免疫抑制剤を添加して培養する、上記(21)記載の方法。

(25) 免疫不全マウスから作成した脳梗塞モデルマウスの骨髓細胞を培養することにより神経幹細胞を調製する、上記(21)記載の方法。

(26) 免疫不全マウスの母系マウスに免疫抑制剤を投与して免疫不全状態にした後作成した脳梗塞モデルマウスの骨髓細胞を培養することにより神経幹細胞を調製する、上記(21)記載の方法。

40

(27) 免疫不全マウスが、C.B-17/lcrCrIBRマウスを母系とするSCIDマウスである、上記(21)~(26)のいずれかに記載の方法。

(28) 免疫不全マウスが、BALB/cAJclマウスを母系とするヌードマウスである、上記(21)~(26)のいずれかに記載の方法。

(29) 上記(21)~(28)のいずれかに記載の方法により調製された神経幹細胞。

(30) SCIDマウスの母系マウスの脳の血管を結紮してなる脳梗塞モデル動物。

(31) SCIDマウスの母系マウスの脳の血管が、中大脳動脈である上記(30)記載の脳梗塞モデル動物。

(32) SCIDマウスの母系マウスが、C.B-17/lcrCrIBRマウスである上記(30)又

50

は(31)記載の脳梗塞モデル動物。

(33)ヌードマウス又はその母系マウスの脳の血管を結紮してなる脳梗塞モデル動物。

(34)ヌードマウス又はその母系マウスの脳の血管が、中大脳動脈である上記(33)記載の脳梗塞モデル動物。

(35)ヌードマウスの母系マウスが、BALB/cAJclマウスである上記(33)又は(34)記載の脳梗塞モデル動物。

(36)上記(30)～(35)のいずれかに記載の脳梗塞モデル動物に、被検薬物を投与して、当該被検薬物の脳梗塞に対する有効性をスクリーニングする方法。

(37)上記(30)～(35)のいずれかに記載の脳梗塞モデル動物に、神経(幹)細胞又は他の細胞を移植して、当該移植治療の脳梗塞に対する有効性をスクリーニングする方法。

10

(38)免疫抑制作用を有する物質を有効成分とする神経再生治療剤。

(39)免疫抑制作用を有する物質が、T細胞機能を抑制する物質である、上記(38)記載の神経再生治療剤。

(40)免疫抑制作用を有する物質が、FK506(タクロリムス)、シクロスポリン、抗CD28抗体および抗ICOS抗体のいずれかである、上記(39)記載の神経再生治療剤。

(41)ケモカインその他のサイトカイン、又はこれらの骨髄細胞から神経幹細胞への分化を誘導する作用を促進する物質を有効成分とする神経再生治療剤。

(42)ケモカインが、インターロイキン-8(IL-8)ファミリーのケモカインである、上記(41)記載の神経再生治療剤。

20

(43)サイトカインが、TNF(tumor necrosis factor- :腫瘍壊死因子)である、上記(41)記載の神経再生治療剤。

(44)脳梗塞又は他の神経疾患の治療に用いられる、上記(38)～(43)のいずれかに記載の神経再生治療剤。

(45)脳梗塞又は他の神経疾患の治療に用いられる神経再生治療剤のスクリーニング方法であって、骨髄細胞から神経幹細胞への分化を誘導し、又はその分化を促進する作用を有するかどうかを指標に、候補物質を探索することを特徴とする神経再生治療剤のスクリーニング方法。

(46)ヒト又は動物から採取した骨髄細胞の培地に被検物質を投与し、当該被検物質が、骨髄細胞から神経幹細胞への分化を誘導し、又はその分化を促進する作用を有するかどうかを調べることを特徴とする上記(45)記載の神経再生治療剤のスクリーニング方法。

30

(47)免疫抑制作用を有する物質群の中から、候補物質を探索することを特徴とする上記(45)又は(46)記載の神経再生治療剤のスクリーニング方法。

(48)ケモカインその他のサイトカイン、又はこれらの活性もしくは産生を調節する作用を有する物質群の中から、候補物質を探索することを特徴とする上記(45)又は(46)記載の神経再生治療剤のスクリーニング方法。

【発明の効果】

【0016】

40

本発明の神経幹細胞調製法は、簡易かつ短期間に、骨髄細胞から神経幹細胞を調製することができる。得られた神経幹細胞は、神経細胞に高効率に分化可能であり、生体への移植により脳患部において良好に神経細胞を生着、機能発揮させることが期待できるので、神経再生治療、あるいは脳梗塞モデルマウス等を用いた治療法開発の目的に使用できる。また、材料となる骨髄細胞は生体からの採取が比較的容易であるので、例えば脳梗塞後の患者から骨髄を採取し、免疫抑制剤の存在下に培養を行って神経幹細胞を調製し、これを静脈内投与などで患者に移植する自家移植治療に本発明を利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】胎生期マウス脳由来のニューロスフェアおよび神経細胞等(A, B, C)と、脳

50

梗塞 S C I D マウス骨髄由来のニューロスフェア様細胞塊および神経細胞等 ( D , E , F ) を比較して示す図面に代わる写真である。原図の C ・ F では、M A P 2 陽性の神経細胞は赤で、G F A P 陽性のグリア細胞は緑で表示される。

【図 2】脳梗塞 S C I D マウス骨髄由来のニューロスフェア様細胞塊形成に関して、脳梗塞後骨髄を採取するまでの期間や骨髄細胞の培養期間が、細胞塊形成にどのように影響するか等を検討した結果を示すグラフである。

【図 3】骨髄由来のニューロスフェア様細胞塊から神経細胞、グリア細胞への分化を免疫染色により検討した結果を示す図面に代わる写真である。

【図 4】骨髄由来のニューロスフェア様細胞塊の神経細胞への分化能、分化効率を検討した結果を示すグラフである。

【図 5】偽手術 S C I D マウスの骨髄に脳梗塞 S C I D マウス ( M C O 1 W ) の血清を添加するとニューロスフェア様細胞塊ができ ( A ・ B )、さらに神経細胞にも分化した ( C ・ D ) ことを示す図面に代わる写真である。

【図 6】S C I D マウスと C . B 1 7 マウスにおける中大脳動脈結紮後 1 6 日目に摘出した脳を比較して示す図面に代わる写真である。

【図 7】S C I D マウスと C . B 1 7 マウスにおける中大脳動脈結紮後 1 日目に摘出した脳切片の T T C 染色の結果を比較して示す図面に代わる写真である。脳梗塞領域が白く示される。

【図 8】脳梗塞 S C I D マウスおよび脳梗塞 C . B 1 7 マウスの脳梗塞後における脳 ( 皮質 ) 再生の有無を、C I 値をもとに検討した結果を示すグラフである。

【図 9】脳梗塞 S C I D マウスの梗塞下組織では N e u N 陽性の神経前駆細胞が多数観察されたが ( A )、脳梗塞 C . B 1 7 マウスの梗塞下組織ではほとんど観察されなかった ( B ) ことを示す図面に代わる写真である。

【図 1 0】脳梗塞 S C I D マウスの骨髄からはニューロスフェア様細胞塊が形成され ( A ・ B )、一方、脳梗塞 C . B 1 7 マウスの骨髄からは培養開始 7 日目までにわずかにニューロスフェア様細胞塊が形成された ( C ・ D ) ことを示す図面に代わる写真である。

【図 1 1】脳梗塞 S C I D マウス ( A ) および脳梗塞 C . B 1 7 マウス ( B ) の骨髄由来ニューロスフェア様細胞塊におけるアポトーシスを検討した結果を示す図面に代わる写真である。原図では、ネクローシス細胞が赤で、アポトーシス細胞が緑で表示される。

【図 1 2】脳梗塞 S C I D マウスと脳梗塞 C . B 1 7 マウスの脳梗塞下組織からの神経幹細胞の形成を検討した結果を示すグラフである。

【図 1 3】C . B 1 7 マウスの脳梗塞作成前 3 日間と後 7 日間に F K 5 0 6 を連日腹腔内投与し、その後、骨髄と脳梗塞下組織 ( 脳梗塞瘢痕部位 ) を採取して培養したところ、骨髄 ( A ・ B ) および脳梗塞瘢痕部位 ( C ) からニューロスフェア様細胞塊が形成されたことを示す図面に代わる写真である。

【図 1 4】脳梗塞 C . B 1 7 マウスの骨髄を、F K 5 0 6 を添加して培養したところ、ニューロスフェア様細胞塊 ( A ・ B ) が形成されたことを示す図面に代わる写真である。

【図 1 5】脳梗塞 C . B 1 7 マウス骨髄由来のニューロスフェア様細胞塊の形成に対する F K 5 0 6 の影響を検討した結果を示すグラフである。

【図 1 6】脳梗塞を起こしていない偽手術 C . B 1 7 マウスの骨髄を、脳梗塞 S C I D マウスの血清および F K 5 0 6 を添加して培養したところ、ニューロスフェア様細胞塊が形成され ( B ・ C )、脳梗塞 S C I D マウスの血清のみ添加して培養した場合は一旦ニューロスフェア様細胞塊が形成されるが ( A )、すぐに排除されたことを示す図面に代わる写真である。

【図 1 7】上記方法により F K 5 0 6 を添加してニューロスフェア様細胞塊を形成させ、さらに培養後 7 日目に、N e s t i n と M A P 2 に対する免疫組織化学 ( 二重染色間接蛍光抗体法 ) を行った結果を示す図面に代わる写真である。

【図 1 8】脳梗塞後 S C I D マウスにおいて、骨髄由来の神経幹細胞が脳組織へ生着し、分化したことを示す図面に代わる写真である。骨髄由来の G F P 陽性細胞 ( 原図では緑 ) は脳梗塞下組織に広く認められ、同時に P S A - N C A M 陽性 ( 原図では赤 ) で、神経前

10

20

30

40

50

駆細胞であった (Merge)。

【図19】脳梗塞患者の血清と F K 5 0 6 存在下で培養した正常ヒト骨髄細胞から得られたニューロスフェア様細胞塊 (A)、およびさらに培養して得られた神経細胞 (B) を示す図面に代わる写真である。

【図20】脳梗塞 S C I D マウスの骨髄由来の神経幹細胞を、別の脳梗塞 S C I D マウスに移植した場合の脳再生に与える影響、脳梗塞治療効果について検討した結果を示す図面に代わる写真である。「B M - N S C」は骨髄由来の神経幹細胞を投与した結果、「P B S」はコントロールで P B S を投与した結果、である。

【図21】C . B 1 7 マウス骨髄由来のニューロスフェア様細胞塊の形成における抗 C D 2 8 抗体、抗 I C O S 抗体の影響を検討した結果を示す図面に代わる写真である。脳梗塞を起こしていない偽手術 C . B 1 7 マウスの骨髄を、脳梗塞後 1 週間目の S C I D マウスの血清を添加して培養した。これにさらに、F K 5 0 6 (A)、あるいは、抗 C D 2 8 抗体 (B) 又は抗 I C O S 抗体 (C) を各々添加した。培養 9 日目には F K 5 0 6、抗 C D 2 8 抗体、抗 I C O S 抗体を添加して培養した骨髄細胞からニューロスフェア様細胞塊が形成され、血清のみを添加して培養した場合 (D) はニューロスフェア様細胞塊は形成されなかった。

10

【図22】脳梗塞を起こしていない偽手術 C . B 1 7 マウス骨髄に C I N C - 1 と F K 5 0 6 を添加して培養すると、培養 5 日目に細胞塊が形成され (A・B)、培養 7 日目にはニューロスフェア様細胞塊が形成された (C・D) ことを示す図面に代わる写真である。B は A の、D は C の拡大像である。

20

【図23】C I N C - 1 により刺激誘導されたニューロスフェア様細胞塊形成における F K 5 0 6 の影響を検討した結果を示す図面に代わる写真である。脳梗塞を起こしていない偽手術 C . B 1 7 マウス骨髄に C I N C - 1 を添加、あるいは C I N C - 1 と F K 5 0 6 を添加して培養した。C I N C - 1 と F K 5 0 6 を添加すると培養 5 日目以内にすでに細胞塊が形成され、7 日目以降にはニューロスフェア様細胞塊が形成された (A)。一方、F K 5 0 6 を添加しない場合は、細胞塊は形成されるが、排除されるか、あるいは細胞塊の状態で止まっており (B)、ニューロスフェア様にはならなかった。A・B はいずれも培養 9 日目の像である。

【図24】C . B 1 7 マウスの骨髄 (a) および脳梗塞下組織 (脳梗塞瘢痕部位) (b) 由来ニューロスフェア形成における免疫抑制剤 (F K 5 0 6 とシクロスポリン A) の影響を検討した結果を示すグラフである。縦軸は、1 dishあたりの培養 9 日目の nestin 陽性ニューロスフェア数を示す (各群 4 匹ずつ)。\* P < 0.001, student t test

30

【図25】ヌードマウスの骨髄由来および脳梗塞下組織 (脳梗塞瘢痕部位) 由来ニューロスフェア形成能を検討した結果を示すグラフである。縦軸は、培養 9 日目の骨髄 (a) と脳梗塞下組織 (b) から形成された nestin 陽性ニューロスフェア数を示す (各群 4 匹ずつ)。培養 1 dishあたりのニューロスフェア数はヌードマウスではそれぞれ  $13 \pm 4$  個、 $42 \pm 5$  個であったのに対し、コントロールでは  $1.5 \pm 1.5$  個、 $2.0 \pm 1.5$  で、有意にヌードマウスで多かった。\* P < 0.001, student t test

【図26】サイトカイン (C I N C - 1 と T N F ) の骨髄由来ニューロスフェア形成に及ぼす影響を検討した結果を示すグラフである。縦軸は、1 dishあたりの培養 9 日目に形成された nestin 陽性ニューロスフェア数を示す (各群 4 匹ずつ)。\* P < 0.001, student t test

40

【図27】C . B 1 7 マウス骨髄由来のニューロスフェア様細胞塊の形成における抗 C D 2 8 抗体、抗 I C O S 抗体の影響を検討した結果を示すグラフである。縦軸は、培養 1 dishあたりの nestin 陽性ニューロスフェアの数を示す (各群 4 匹ずつ)。\* P < 0.001, student t test

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

以下、本発明の具体的態様、技術的範囲等について説明する。

[ 1 ] 骨髄からの新たな神経幹細胞調製法の開発

50



本発明者らは最近、良好な再現性を示し、しかも長期間生存可能な脳梗塞モデルマウスを開発した(特願2004-108500号)。この脳梗塞モデルマウスは、後述するように、免疫不全マウスであるSCIDマウスの中大脳動脈を結紮することにより、中大脳動脈の皮質枝の血流を選択的に途絶させ、再現性のよい均一な脳梗塞を作成したものである。興味深いことに、この脳梗塞SCIDマウスでは、虚血後の脳梗塞の進展(delayed infarct expansion)は脳梗塞後3日で終了し、その後は脳萎縮の進展ではなく、脳形態上はむしろ回復する。免疫組織化学による検討の結果、このマウスの脳梗塞下組織(脳梗塞周囲の瘢痕部位)において脳梗塞後多数の神経幹細胞の出現が観察され、これが正常神経組織に生着して脳再生、脳機能改善に貢献していること、さらに、この神経幹細胞は骨髄に由来するものであることを明らかにした。

10

**【0019】**

そこで、上記脳梗塞SCIDマウスから脳梗塞1週間後に採取した骨髄細胞を培養したところ、上述のように、神経幹細胞(ニューロスフェア)に分化誘導することができた(図1D)。またその後も培養を続けると、神経幹細胞は分裂・増殖し、神経細胞に分化誘導された(同図E)。さらに、神経再生と免疫に関する下記(1)~(6)の重要な知見が得られた(なお、各実験の詳細については後述する)。

**【0020】**

(1) 脳梗塞を起こしていない正常SCIDマウスの骨髄を培養しても神経幹細胞は誘導されないが、この骨髄に脳梗塞モデルマウスの血清を添加すると神経幹細胞が誘導され(図2、図5A・B)、神経幹細胞は神経細胞にも分化した(図5C・D)。このことより、脳梗塞後の血清中に、骨髄細胞を神経幹細胞に分化誘導させる刺激因子(differentiation factor)が存在し、生体ではこの刺激因子が血流を介して骨髄に伝えられ、神経幹細胞が産生されると考えられる。

20

さらに解析の結果、この刺激因子、換言すれば神経幹細胞への分化誘導因子のひとつは、インターロイキン-8(IL-8)ファミリーのケモカインである、CINC-1/GRO(cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1/growth-related oncogene)であることを明らかにした(図22、23)。

**【0021】**

(2) SCIDマウスの母系である免疫機能が正常なC.B-17/1crCrIBRマウスの中大脳動脈を結紮して脳梗塞モデルを作成した後、その骨髄を採取して培養すると、神経幹細胞が一旦形成されるが(図10C・D)、これらは2週間以内にすべて消失してしまう(図15)。

30

**【0022】**

(3) 一方、上記C.B-17/1crCrIBRマウスに対して、免疫抑制剤FK506(タクロリムス)を投与して免疫不全状態にし、脳梗塞を起こさせた後も免疫抑制剤の投与を続け、その後当該マウスから採取した骨髄細胞を培養したところ、神経幹細胞に分化誘導させることができた(図13)。他の免疫抑制剤であるシクロスポリンA(CsA)を投与した場合も同様の結果が得られた(図24)。また、C.B-17/1crCrIBRマウスを脳梗塞後、その骨髄を採取し、免疫抑制剤FK506を添加して培養すると、神経幹細胞が形成された(図14、図15)。

40

**【0023】**

(4) 脳梗塞を起こしていない正常C.B-17/1crCrIBRマウスの骨髄細胞を異なる条件下で培養したところ、免疫抑制剤FK506および脳梗塞モデルマウスの血清を添加した場合にのみ、神経幹細胞が形成された(図16)。FK506の代わりに、T細胞機能を抑制する抗体(抗T細胞抗体)を添加しても同様に神経幹細胞が形成された(図21、図27)。

**【0024】**

(5) さらに、ヒトの正常骨髄細胞を、免疫抑制剤FK506および脳梗塞患者の血清を添加して培養したところ、神経幹細胞に分化誘導させることができた(図19A)。これをさらに培養すると、神経細胞に分化した(同図B)。

50

## 【0025】

(6) 脳梗塞SCIDマウスの骨髄から調製された神経幹細胞を、別の脳梗塞SCIDマウスに静脈内投与してその脳梗塞治療効果を調べたところ、脳形態上の回復が観察され、神経再生の促進効果が認められた(図20)。

## 【0026】

本発明は、これらの知見に基づき、(1)正常骨髄細胞を神経幹細胞へ分化させるためには、脳梗塞後の血清中に存在する刺激因子と、骨髄培養液中の免疫反応を抑制させる免疫抑制剤の添加が重要であり、(2)脳梗塞後の患者又は免疫正常なモデル動物から採取した骨髄細胞を神経幹細胞へ分化させるためには、免疫抑制剤の添加が重要であること、および、(3)上記の刺激因子(分化誘導因子)のひとつは、IL-8ファミリーのケモカインCINC-1/GROであることを見出し、以下の第1~第3の神経幹細胞調製法を提供するものである。

10

## 【0027】

第1の神経幹細胞調製法：免疫抑制剤、および、脳梗塞その他脳障害後のヒト又は動物から採取した血清を添加して骨髄細胞を培養することにより分化誘導し、神経幹細胞を調製する方法。

第2の神経幹細胞調製法：脳梗塞その他脳障害後のヒト又は動物から採取した骨髄細胞を、免疫抑制剤を添加して培養することにより分化誘導し、神経幹細胞を調製する方法。

第3の神経幹細胞調製法：免疫抑制剤、および、ケモカイン(好ましくは、IL-8ファミリーのケモカイン)を添加して骨髄細胞を培養することにより分化誘導し、神経幹細胞を調製する方法。

20

## 【0028】

第1(および第3)の調製法において、常法にしたがってヒト又は動物から採取した骨髄は、免疫抑制剤および脳障害後の血清(又は、当該血清の代わりにケモカイン)を添加する以外、従来の神経幹細胞の培養方法と同様の方法により培養可能である。また、第2の調製法においても、免疫抑制剤を添加する以外、従来の神経幹細胞の培養方法と同様の方法により培養可能である。従来の培養方法としては、ニューロスフェア(neurosphere)法、低密度単層培養法、高密度単層培養法などが例示され、このうち好ましい培養法としては、ニューロスフェア法が挙げられる。後述の実施例においては、このニューロスフェア法を用いて、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF, 50 µg/ml)および上皮成長因子(EGF, 20 µg/ml)存在下骨髄細胞を培養し、神経幹細胞を調製した。

30

## 【0029】

以下、本発明の調製法において使用する免疫抑制剤、血清および分化誘導因子であるケモカインについて説明する。

## [1-A] 免疫抑制剤

培養液に添加する免疫抑制剤は、実施例で用いたFK506(タクロリムス)およびシクロスポリンを使用することができるが、そのほかに、バシリキシマブ、アザチオプリン、ムロモナブCD3、ミゾリピン、ミコフェノール酸モフェチル、など公知の免疫抑制剤の使用が考えられる。免疫抑制剤は、T細胞機能など細胞性免疫を抑制する作用・性質を有するものが好ましく、免疫抑制機能を有する限りにおいて、抗体(例えば抗CD28抗体、抗ICOS抗体)などの物質も広く本発明の「免疫抑制剤」に含まれる。

40

培養液への免疫抑制剤の添加量は、特に限定されないが、0.01 µg/ml~1.0 µg/ml程度の濃度で添加することが好ましい。後述の実施例では、0.1 µg/mlの濃度でFK506を培養液に添加した。

## 【0030】

## [1-B] 血清

第1の調製法において、培養液へ添加する血清の量も特に限定されるものではないが、5 µl/ml~25 µl/ml程度の濃度で添加することが好ましい。上述のように、脳梗塞後の血清中には、骨髄細胞を神経幹細胞に分化誘導させる分化誘導因子が存在し、この分化誘導因子は、虚血侵襲や他の原因により脳神経細胞が一部障害を受けることによ

50

て、生体の有する修復機構の一環として産生されるものと考えられる。したがって、脳梗塞後の血清に限らず、事故等により脳組織が一部障害を受けた後の血清中にもこの分化誘導因子は出現し、当該血清を添加して骨髄細胞を培養することで同様の効果が得られると考えられる。

また、例えば脳梗塞後の血清を使用して調製した本発明の神経幹細胞を、脳梗塞の治療に限らず、他の神経疾患の再生治療に利用してもよい。

「動物」から採取した血清を使用して、治療法の開発用などに神経幹細胞を調製する場合、当該動物としてはマウスやラットのほか、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスターなどの哺乳動物が例示される。マウスは、SCIDマウス以外のものを使用してもよい。

10

なお、後述の実施例に示すように、ヒトおよびマウスの場合、脳梗塞後1週間目に採取した血清を使用することで良好に神経幹細胞を調製できたので、本発明の第1の調製法においては、脳梗塞後（または他の脳障害後）5日～10日の血清を使用することが好ましい。

#### 【0031】

##### [1-C] 分化誘導因子

第3の調製法は、免疫抑制剤とともに、分化誘導因子としてケモカインを添加して骨髄細胞を培養する方法である。

上述のように、脳梗塞後の血清中には、骨髄細胞を神経幹細胞へ分化させる何らかの分化誘導因子が存在し、この分化誘導因子が血流を介して骨髄に伝えられ、神経幹細胞が産生されると考えられる。本発明者は、この分化誘導因子の探索に際して、SCIDマウスの免疫反応の特徴に注目した。すなわち、SCIDマウスはT細胞が欠落しているがNK細胞は十分存在しているため、SCIDマウスがC.B17マウスより骨髄での神経幹細胞産生に適した条件を備えているとすると、NK細胞にその原因を求めるのが妥当と考えた。さらに、骨髄細胞の分化に関与し、かつ虚血などの生体への侵襲刺激に際して血中に放出される因子を探索した。

20

#### 【0032】

CINC-1/GRO (cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1/growth-related oncogene) は、インターロイキン-8 (IL-8) ファミリーのケモカインであり、コルヒチン刺激などのnoxious stimulationにより脳の視床下部神経で産生亢進され、下垂体後葉を経て血中に放出される (Neurosci. Res. (1997) 27:181-184.)。CINC-1は、NK細胞からも産生されて子宮の脱落膜を介した受精卵の免疫反応に関与し (Biochem. Biophys. Res. Commun. (1994) 200:378-383.)、また骨髄間質 (stroma) 細胞からも産生される (Exp. Cell Res. (2004) 299:383-392.)。さらに、本発明者は独自に、脳虚血負荷に際しても視床下部や下垂体後葉においてCINC-1産生が亢進するという調査結果を得ていた。

30

そこで、CINC-1が神経幹細胞への分化誘導因子である可能性を検討した。その結果、脳梗塞を起こしていない正常C.B-17/IcrCrIBRマウスから採取した骨髄に、免疫抑制剤FK506およびCINC-1を添加して培養すると、骨髄から神経幹細胞へ分化誘導させることができた (図22、23)。この結果から、CINC-1が分化誘導因子のひとつであることが示された。また、CINC-1は、培養中の骨髄細胞を凝集させる作用を有しており (図23B)、この凝集した細胞塊が核となってニューロスフェアが形成されると考えられる。したがって、このような凝集作用を有する他のケモカインもCINC-1と同様に分化誘導因子として作用すると考えられる。このようなケモカインの作用が骨髄中の幹細胞に直接作用しているのか、あるいは間質細胞などを介して間接的に作用しているのかは今後更なる解析を必要とするが、いずれにせよ、ケモカインを免疫抑制剤とともに培養骨髄中に添加することで、神経幹細胞への分化誘導が可能である。

40

#### 【0033】

ケモカインはIL-8ファミリーのケモカインの使用が好ましく、ヒト、ラット又はマウス由来のIL-8ファミリーのケモカイン、あるいは他の哺乳動物のカウンターパート

50

から選ばれるケモカインを添加する方法が挙げられる。ヒト由来 I L - 8 ファミリーのケモカインとしては、I L - 8 / C X C L 8、G R O - 、G R O - 及び G R O - などが例示され、ラット由来は、C I N C - 1、C I N C - 2、C I N C - 2、C I N C - 3、マウス由来は、K C、M I P - 2 などが例示される。その他の C X C ケモカインの使用も考えられる。

#### 【 0 0 3 4 】

培養液へのケモカインの添加量は、特に限定されないが、 $0.1 \mu\text{g/ml} \sim 1.0 \mu\text{g/ml}$  程度の濃度で添加することが好ましい。後述の実施例では、 $10^{-5}\text{M}$  の濃度で C I N C - 1 を培養液に添加した。

上述のように、ケモカインは、免疫抑制剤とともに培養骨髄中に添加することによって、神経幹細胞への分化誘導が可能であるので、ケモカインと免疫抑制剤とを組み合わせ、神経幹細胞分化誘導剤として提供できる。また、免疫抑制剤の添加は培養下の T 細胞機能を抑制するためであるから、あらかじめ T 細胞を除去するなどして他の方法で T 細胞機能を抑制することができれば、免疫抑制剤を添加せずにケモカインのみで培養細胞から神経幹細胞を調製することも可能と考えられる。

#### 【 0 0 3 5 】

さらに後述するように、本発明者らによる探索の結果、上記ケモカイン以外に、サイトカインである T N F ( tumor necrosis factor- ) が、骨髄細胞から神経幹細胞への分化誘導作用を有することを明らかにした ( 図 2 6 )。従って、本発明の上記第 3 の調製法において、ケモカインの代わりに、T N F 又は I L 1 8 などその他のサイトカインを分化誘導因子として使用してもよい。T N F などのサイトカインを分化誘導因子として使用する場合も、上記ケモカインと同様の方法・条件で使用可能であり、骨髄細胞から神経幹細胞への調製に利用することができる。

#### 【 0 0 3 6 】

本発明の神経幹細胞調製法は、次のような利点・特徴を有する。

( 1 ) 簡便かつ短期間に、神経幹細胞の誘導・調製が可能である。後述の実施例に示すように、実際に骨髄から短期間 ( 2 週間程度 ) で神経幹細胞を誘導・調製することができ、得られた神経幹細胞はその後分裂・増殖して、神経細胞に高効率に分化した。

神経再生治療に応用する場合、治療開始は 2 週間以内 ( 即ち、幹細胞の産生および生着に最も適した時期である急性期 ) が好ましく、従来この期間内に大量の幹細胞を準備・調製することは困難であった。短期間に幹細胞の調製可能な本発明の方法は、神経再生治療の臨床応用に最も適した方法といえる。

#### 【 0 0 3 7 】

( 2 ) 脳患部において良好に神経細胞を生着、機能発揮させることが期待できる。実際に、本方法により調製された神経幹細胞を移植 ( 静脈内投与 ) したところ、脳形態上の回復が観察され、幹細胞移植により神経細胞が脳組織に生着したものと考えられる。

上述のように、本発明者らは、脳梗塞 S C I D マウスにおいて、脳梗塞後多数の神経幹細胞の出現が観察され、これが正常神経組織に生着して脳再生、脳機能改善に貢献していること、および、この神経幹細胞は骨髄に由来するものであることを明らかにした。本発明は、このように脳梗塞修復時に特異的に産生され、神経を再生する骨髄由来の神経幹細胞を調製するものであり、生体が要求する細胞を大量に提供することができ、生体機構に沿った移植治療が可能になると考えられる。

#### 【 0 0 3 8 】

( 3 ) 骨髄細胞は比較的採取が容易であるので、例えば脳梗塞後の患者から骨髄を採取し、免疫抑制剤の存在下に培養を行って神経幹細胞を調製し、これを静脈内投与などで患者に移植する自家移植も十分実現可能である。

細胞移植は、基本的に自家移植が倫理的にも医学的にも最良の方法と考えられる。本発明は、生体への生着性と機能発揮性の点で最良ともいえる患者自身の骨髄由来神経幹細胞を提供することができ、再生医療に適している。ただし、本発明は、自家移植への利用のみに限定されるものではなく、他家移植用に他者由来の骨髄から神経幹細胞を調製する方

10

20

30

40

50

法にも利用可能である。

【 0 0 3 9 】

( 4 ) 分化誘導因子であるケモカイン（もしくはその他のサイトカイン）の使用によって、より簡便かつ安全性を向上できる。また、慢性期などの患者で骨髄又は血清中に分化誘導因子としてのケモカインやサイトカインがまったく或いは殆ど存在しない場合に、ケモカインなどのサイトカインを添加して神経幹細胞を調製する方法は極めて効果的である。そのほか、他家移植用に他者由来の骨髄から神経幹細胞を調製する方法においても、血清の代わりにケモカインやサイトカインを使用することは、安全性の面から非常に望ましい方法である。

【 0 0 4 0 】

( 5 ) 本発明は、脳梗塞の治療に限らず、その他の脳血管障害、脳虚血性疾患、神経変性疾患に対する神経移植治療にも利用可能であり、神経再生治療に広く利用可能性を有する。

【 0 0 4 1 】

( 6 ) 本発明は、神経再生治療へ直接利用可能であるほか、治療法開発においても利用可能であり、例えば本発明により得られた神経幹細胞を様々な条件下、脳梗塞モデルマウスに移植してその治療効果を確認することで、更なる治療法開発・研究進展が期待できる。

【 0 0 4 2 】

また、本発明により調製した神経（幹）細胞を神経再生治療剤として患者に移植・投与する方法としては、例えば、静注、点滴静注などによって投与する。このような注射剤は常法に従って製造され、希釈剤として一般に生理食塩水、細胞培養液などを用いることができる。さらに必要に応じて、殺菌剤、防腐剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤などを加えてもよい。これら製剤中の神経（幹）細胞の配合量は特に限定されるものではなく、疾患の種類、症状の程度、患者の年齢、体重などに応じて決定すればよい。また、本発明の神経（幹）細胞を、数回にわたり患者に投与してもよいし、1回当たりの投与量、投与間隔などを診断結果に応じて決定してもよい。

【 0 0 4 3 】

神経（幹）細胞に対する患者の免疫応答を抑制するため、神経（幹）細胞の投与と同時にまたはその投与前（もしくは投与後）に、免疫抑制剤を投与することが望ましい。投与方法は、神経（幹）細胞の投与と異なる方法であってもよい。

【 0 0 4 4 】

また、脳内での血管再生、神経再生を向上させるため、神経（幹）細胞の投与と同時にまたはその投与前（もしくは投与後）に、ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞（J.Clin. Invest. 114:330-338（2004）参照）、血管内皮前駆細胞（EPC）などの血管形成能を有する細胞を投与する方法は、好ましい方法である。

【 0 0 4 5 】

以上のように、神経（幹）細胞を神経再生治療剤として用いることができるが、これ以外に、後述の実施例の結果から、*in vitro*において、また*in vivo*においても、骨髄由来神経幹細胞の形成を維持・促進し、神経再生治療を実現するためには、免疫機能を抑制すること、特にT細胞機能を抑制することが重要であることが示されたので、免疫抑制物質（特にT細胞機能を抑制する物質）を神経再生治療剤として用いることが可能である。

【 0 0 4 6 】

例えば、FK506（タクロリムス）、シクロスポリン、抗CD28抗体および抗ICOS抗体など、T細胞の活性を抑制する物質を神経再生治療剤として用いることができる。

【 0 0 4 7 】

そのほか、前述のように、骨髄細胞から神経幹細胞への分化誘導作用を有するCINC-1、TNFといったケモカイン、サイトカインについても、これらの分化誘導因子を投与することによって、*in vitro*と同様に、*in vivo*での骨髄由来神経幹細胞の形成が促

10

20

30

40

50

進されると考えられるので、神経再生治療剤としての応用が可能である。

【0048】

さらに、これらケモカイン、サイトカインの分化誘導作用を促進する物質（これらケモカイン、サイトカインの産生を促進する物質を含む）も神経再生治療剤としての応用が可能である。このような物質は、例えば後述する本発明のスクリーニング系を利用して探索することができる。

【0049】

本発明のこれら免疫抑制物質、ケモカイン、サイトカイン等を有効成分とする神経再生治療剤は、経口剤でもよいし、注射剤、坐剤、塗布剤等の非経口剤でもよい。錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤等の経口剤は、例えば、デンプン、乳糖、白糖、トレハロース、マンニト、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を用いて常法に従って製造される。これらの製剤中の有効成分の配合量は特に制限されるものではなく適宜設定できる。この種の製剤には、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を適宜に使用することができる。

【0050】

非経口剤の場合は、例えば、静注、点滴静注、皮下注射、筋肉注射などによって投与する。この非経口剤は常法に従って製造され、希釈剤として一般に注射用蒸留水、生理食塩水等を用いることができる。また、この非経口剤は安定性の点から、バイアル等に充填後冷凍し、通常の凍結乾燥処理により水分を除き、使用直前に凍結乾燥物から液剤を再調製することもできる。さらに必要に応じて、殺菌剤、防腐剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤などを加えてもよい。これら製剤中の有効成分の配合量は特に制限されるものではなく、前述の神経（幹）細胞を投与する場合と同様に、疾患の種類、症状の程度、患者の年齢、体重などに応じて決定すればよい。また、本発明の神経再生治療剤を、数回にわたり患者に投与してもよいし、1回当たりの投与量、投与間隔などを診断結果に応じて決定してもよい。

【0051】

[2] 脳梗塞モデル動物の開発

上述した本発明の神経幹細胞調製法の開発に伴い、免疫不全マウス（SCIDマウス）の母系マウスの脳の血管を結紮してなる新たな脳梗塞モデル動物を開発した。この脳梗塞モデル動物は、SCIDマウスの代わりに、その母系マウスを使用すること以外、特願2004-108500号記載の方法と同様に作製可能である。

【0052】

SCIDマウスの母系マウスとしては、現在市販されている（例えば、FOX Chase Cancer Centerなど参照のこと）SCIDマウス、または、この改良型のマウスの母系マウスであればよい。結紮する脳の血管としては、脳内の脳梗塞を発症させることができる血管であれば、いずれの血管であっても特に制限はないが、発症例の多い血管や、また実験の行いやすい表皮側の血管が好ましい。好ましい血管としては、中大脳動脈、内頸動脈、椎骨脳底動脈などが例示される。

【0053】

また、結紮する部位としても特に制限はないが、結紮部位によっては、虚血領域の選択性が悪くなることもあることから、選択性を確保できる部位を設定することも必要である。例えば、結紮部位として、中大脳動脈が嗅索を通過した直後、すなわち遠位側M1部位（distal M1 portion）を選択することにより、中大脳動脈の皮質枝の血流を選択的に途絶させることが可能である。

【0054】

脳の血管を結紮する手法としては、脳梗塞が発症できる結紮方法であれば特に制限はなく、例えば、クリップ法、血管の凝固・切断法、血管内栓子法などの各種の手法を使用することができる。虚血を一過性にするか、永久的にするかにより、結紮方法を選定することも必要である。例えば、凝固用ピンセットにて電気凝固後に切断する永久結紮法、動脈瑠結紮用クリップを用いた一過性結紮法などが挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 5 】

具体的な結紮方法としては、例えば、ハロセンなどでマウスを麻酔し、マウスの左頬骨を切除し、頭蓋底を露出させ、中大脳動脈走行部位に直径1～5mm程度の骨窓を歯科用ドリルで作成し、硬膜、クモ膜を剥離し、中大脳動脈を分離して結紮を行うことができる。

## 【 0 0 5 6 】

上記方法にしたがって、実際にSCIDマウスの母系マウスであるC.B-17/1crCrIBRマウスの脳の血管を結紮することにより、良好な再現性を示し、しかも長期間生存可能な脳梗塞モデルマウスを作製することができた（後述の実施例2参照）。

## 【 0 0 5 7 】

さらに、上記脳梗塞モデルマウスの作製方法と同様に、無胸腺マウスであるヌードマウス（BALB/cAJcl-nu）およびその母系マウスの左中大脳動脈をそれぞれ結紮することにより、良好な再現性で脳梗塞モデルマウスを作製することができた（後述の実施例7参照）。

## 【 0 0 5 8 】

SCIDマウスと同様に、ヌードマウスは、そのT細胞機能が抑制された免疫不全マウスであり、上記方法でヌードマウスから脳梗塞モデルを作製後、その骨髄および脳梗塞下組織（脳梗塞痕跡部位）から採取した細胞をそれぞれ培養したところ、nestin陽性のニューロスフェアが多数形成された（図25）。対照的に、その母系マウス（コントロール）から脳梗塞モデルを作製後、その骨髄および脳梗塞下組織から採取した細胞をそれぞれ培養したところ、nestin陽性のニューロスフェアは殆ど形成されなかった。この結果からも、T細胞が骨髄あるいは脳梗塞下組織におけるニューロスフェア形成に抑制的機能を果たしていることがわかる。

## 【 0 0 5 9 】

従って、（1）T細胞機能を抑制する免疫抑制剤を利用することによって、SCIDマウスの母系マウスの骨髄細胞から神経幹細胞を調製したのと同様の方法で、ヌードマウスの母系マウスの骨髄細胞から神経幹細胞を調製することができると考えられる。さらに、（2）SCIDマウスおよびヌードマウス以外のT細胞機能不全マウスの骨髄からも、SCIDマウス等からと同様の方法で、神経幹細胞を調製することができると考えられる。

## 【 0 0 6 0 】

また、本発明は、（1）本発明の脳梗塞モデル動物に、被検薬物を投与して、当該被検薬物の脳梗塞に対する有効性をスクリーニングする方法、および、（2）本発明の脳梗塞モデル動物に、神経（幹）細胞又は他の細胞を移植して、当該移植治療の脳梗塞に対する有効性をスクリーニングする方法、を提供するものである。

## 【 0 0 6 1 】

本発明のスクリーニング方法としては、例えば、本発明の脳梗塞モデル動物に、被検薬物を投与、あるいは神経幹細胞等を移植して、カーボンブラック灌流法、脳の大きさの測定、MRIなどによる機器分析などにより脳梗塞の病巣部の大きさや容積の変化、形態学的検討（左右大脳皮質幅の比、TUNEL染色によるアポトーシスの程度、BrdU標識による再生神経や再生血管内皮細胞数）、行動テスト（オープンフィールドテストや驚愕反射、迷路学習、回避学習）などを測定し、これを対照群と比較して脳梗塞病巣部の拡大の阻止、脳機能の回復などの程度を評価する方法が挙げられる。

## 【 0 0 6 2 】

さらに、本発明は、脳梗塞などの脳虚血性疾患、又はその他の神経疾患の治療に用いられる神経再生治療剤のスクリーニング方法として、骨髄細胞から神経幹細胞への分化を誘導し、又はその分化を促進する作用を有するかどうかを指標に、候補物質を探索するスクリーニング方法を提供するものである。

## 【 0 0 6 3 】

例えば、後述の実施例記載の培養系において、ヒト又は動物から採取した骨髄細胞の培地に被検物質を投与し、当該被検物質が、骨髄細胞から神経幹細胞への分化を誘導し、又

10

20

30

40

50

はその分化を促進する作用を有するかどうかを調べることによって、候補物質を探索する。培養条件は、使用する骨髄細胞の起源などに応じて、(1)免疫抑制剤を添加したもの、(2)分化誘導因子(又は脳障害後に採取した血清)を添加したもの、(3)免疫抑制剤と分化誘導因子(又は脳障害後血清)の両者を添加したもの、(4)両者とも添加しないもの、など種々の条件の中から適切な条件を設定すればよい。

【0064】

実際に、後述の実施例記載の培養系を用いて、骨髄細胞から神経幹細胞への分化を誘導する物質を探索したところ、サイトカインであるTNFがこのような分化誘導作用をもつことを見出すことができ、本発明のスクリーニング方法の有効性が認められた。

【0065】

本発明のスクリーニング方法において、免疫抑制作用を有する物質群の中から、神経再生に有用な候補物質の探索を行ってもよいし、ケモカインなどのサイトカイン、あるいはこれらの活性や産生を調節する物質群の中から、神経再生に有用な候補物質の探索を行ってもよい。

【0066】

また、本発明のスクリーニング方法は、後述の実施例記載の培養系を用いたスクリーニング系に制限されるものではなく、その他のスクリーニング系を用いても勿論よい。例えば、分化誘導因子として同定されたCINC-1やTNFなどの物質を標的分子として、これらの分子の活性や産生を調節する物質を既存の様々な系で調べることができ、これにより、骨髄細胞から神経幹細胞への分化を促進し、神経再生治療に有効な候補物質を探索することができる。

【実施例】

【0067】

以下、図面を参照しながら本発明の実施例について説明するが、本発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

〔実施例1：脳梗塞SCIDマウス骨髄由来の神経幹細胞の調製〕

[1-1] 脳梗塞SCIDマウスの作成

特願2004-108500号の明細書記載の方法にしたがって、免疫不全マウスであるSCIDマウス(5週齢)の中大脳動脈を結紮し、脳梗塞モデルマウスを作成した。

具体的には、3%ハロセン麻酔下にマウス左頬骨を切除し、頭蓋底を露出した。中大脳動脈走行部位に直径1.5mmの骨窓を歯科用ドリルで作成した。硬膜、クモ膜を剥離し、中大脳動脈を分離して結紮準備とした。中大脳動脈結紮法としては、凝固用ピンセットにて電気凝固後に切断する永久結紮法、動脈溜結紮用クリップを用いた一過性結紮法などが可能である。結紮部位は、動脈が嗅索を通過した直後、すなわちdistal M1 portionである。この部位を結紮することにより、中大脳動脈の皮質枝の血流を選択的に途絶させることが可能である。

【0068】

このような中大脳動脈結紮法により、SCIDマウス左中大脳動脈のdistal M1 portionを結紮して作成した脳梗塞モデルマウス(脳梗塞SCIDマウス)の脳梗塞領域を、実際に2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウム(2,3,5-triphenyltetrazolium(TTC))染色法にて検討した。TTC染色法は、中大脳動脈結紮後(MCO)1, 3, 7日目にそれぞれマウス脳を摘出し、brain slicerにて作成した冠状脳スライスを用いて施行した。図7左には、この染色法によって、結紮後(MCO)1日目に摘出した脳の染色結果が示される。この方法により、左中大脳動脈皮質枝領域に選択的に梗塞(白い部分)が観察され、再現性のよい均一な脳梗塞を作成することができる(特願2004-108500号参照)。なお脳梗塞は、上記方法による結紮後(MCO)3日でほぼ完成する。

【0069】

[1-2] ニューロスフェア(neurosphere)様細胞塊の形成

上記方法により作成した脳梗塞SCIDマウスを結紮後7日目にクリーンベンチ内で断頭し、大腿骨から骨髄を採取した。その後、DMEMとN-2の基本培養液内(250μ

10

20

30

40

50



1) で単細胞になるまでピペティングし、10 ml の培養液を加えて600 rpmで5分間遠心した。細胞を3 ml の培養液にて再浮遊させ、bFGF (50 µg/ml) とEGF (20 µg/ml) 存在下にlow cell bindingプレート上で10 - 28日間培養を行った。その結果、図1Dに示すように、7日目以降にはニューロスフェア (neurosphere) 様細胞塊が細胞顕微鏡下で観察された。

#### 【0070】

比較のため、胎生2週目のC57B/6マウスから採取した線条体細胞をlow cell binding プレート上で10日間培養を行ったところ、図1Aに示すように、ニューロスフェアが形成された。これをhigh bindingプレート上でさらに培養すると3日後には分化し(同図B)、発現蛋白を免疫組織化学法(二重染色間接蛍光抗体法)にて検討すると、MAP2陽性の神経細胞と、GFAP陽性のグリア細胞に分化していた(同図C参照)。

10

#### 【0071】

一方、脳梗塞SCIDマウスから採取した骨髄細胞をlow cell binding プレート上で10日間培養すると、上述のように、胎生期マウス脳(線条体)由来のニューロスフェアとよく似たニューロスフェア様細胞塊が形成された(同図D)。これをhigh bindingプレート上でさらに培養すると3日後には突起を持った細胞に分化し(同図E)、一部はMAP2陽性の神経細胞と、GFAP陽性のグリア細胞に分化していた(同図F参照)。

#### 【0072】

さらに、SCIDマウスに対して偽手術(骨窓まで開き、結紮はしない処置)を施行した脳梗塞を生じさせていない偽手術SCIDマウス(sham SCIDマウス)から骨髄を採取し、同様の条件で培養を行ったが、ニューロスフェア様細胞塊はほとんど形成されなかった。

20

#### 【0073】

##### [1-3] ニューロスフェア様細胞塊の形成効率

脳梗塞SCIDマウス骨髄由来のニューロスフェア様細胞塊形成に関して、脳梗塞後(結紮後)骨髄を採取するまでの期間や骨髄細胞の培養期間が、細胞塊形成にどのように影響するかを検討した。

#### 【0074】

脳梗塞作成後(結紮後)1, 2, 3週目のSCIDマウスから採取した骨髄をそれぞれ28日間培養し、新たに形成されるニューロスフェア様細胞塊数を数えた。その結果、図2に示すように、脳梗塞後1週目(MCO1W)に採取した骨髄が最も多くのニューロスフェア様細胞塊を形成し、培養後10 - 13日目に形成能がピークとなることが明らかになった。

30

#### 【0075】

一方、偽手術SCIDマウスの培養骨髄からは、ニューロスフェア様細胞塊は培養1ヶ月を経過してもほとんど形成されなかった(Sham control)。しかし、偽手術SCIDマウスの骨髄に脳梗塞SCIDマウス(MCO1W)から採取した血清を添加して培養すると、ニューロスフェア様細胞塊が形成された(Sham control + Serum)。

#### 【0076】

##### [1-4] 神経幹細胞・神経細胞への分化能

40

脳梗塞SCIDマウス(MCO1W)の骨髄を培養し、10日目に培養液に浮遊しているニューロスフェア様細胞塊を採取してhigh bindingプレート上でさらに培養した。3 - 7日後に分化した細胞をパラフォルムアルデヒドを含む固定液にて固定して免疫染色を行い、発現蛋白の検討を行った。その結果、細胞塊の中心にはNestin陽性の神経幹細胞が高率に観察された(図3左)。また、周囲には分化したMAP2陽性の神経細胞(同図中央)、GFAP陽性のグリア細胞(同図右)が観察された。

#### 【0077】

次に、骨髄由来のニューロスフェア様細胞塊の神経細胞への分化能、分化効率を検討した。その結果、図4に示すように、脳梗塞SCIDマウス(MCO1W)の骨髄を培養して得られたニューロスフェア様細胞塊の約60%がNestin陽性の神経幹細胞であり

50

、そのうち67%（全体のニューロスフェア様細胞塊の約40%）がMAP2陽性、NeuN陽性の神経細胞に分化した。また、MAP2陽性の神経細胞を産生した細胞塊には、ほぼ100%の確率で同時にGFAP陽性のグリア細胞が観察された。

【0078】

[1-5] 神経幹細胞へ分化誘導させる刺激因子の存在

上述のように、脳梗塞SCIDマウスの骨髄を培養することで、神経幹細胞が産生された。このように脳梗塞SCIDマウスの骨髄から神経幹細胞が分化誘導されるメカニズムを検討する目的で、脳梗塞を起こしていない偽手術SCIDマウスの培養骨髄液に別のマウスの血清（30 $\mu$ l）を添加した。

【0079】

その結果、偽手術SCIDマウスの骨髄に別の偽手術SCIDマウスの血清を添加してもニューロスフェア様細胞塊はまったく形成されなかったが、偽手術SCIDマウスの骨髄に脳梗塞SCIDマウス（MCO1W）の血清を添加するとニューロスフェア様細胞塊ができ（図5A・B、図2）、これは神経細胞にも分化した（図5C・D）。以上の結果から、脳梗塞を起こした後の血清には、骨髄細胞を神経幹細胞へ分化させる何らかの刺激因子（differentiation factor）が存在し、この刺激因子が血流を介して骨髄に伝えられ、神経幹細胞が産生されると考えられる。

【0080】

[1-6] 本実施例の結果と考察

以上のように、免疫不全マウスであるSCIDマウスの中大脳動脈を結紮して脳梗塞モデルマウスを作成し、脳梗塞発症後（結紮後）に骨髄細胞を採取、培養することで、神経幹細胞塊（ニューロスフェア）を誘導・調製することができた。また、このニューロスフェアが神経細胞に分化することを明らかにした。

【0081】

一方、脳梗塞を起こしていない偽手術SCIDマウスの骨髄からはニューロスフェアは形成されなかったが、これに脳梗塞モデルマウスの血清を添加して培養することでニューロスフェア形成がみられたことから、ニューロスフェア形成には脳梗塞が誘因となって産生される刺激因子が必要と考えられる。

【0082】

〔実施例2：脳梗塞後骨髄からの神経幹細胞産生と免疫不全との関連性検討〕

[2-1] 免疫正常マウスからの脳梗塞モデルの作成

上述のように、免疫不全マウスであるSCIDマウスの脳梗塞モデルから採取した骨髄を培養することで、多くの神経幹細胞（ニューロスフェア）が形成された。そこで、この現象がマウスの免疫不全と関係があるかどうかを検討する目的で、SCIDマウスの母系マウスである免疫正常なC.B-17/lcrCrIBRマウス（以下、「C.B17マウス」という。）に対して、同様の方法で脳梗塞モデルを作成して脳梗塞SCIDマウスと比較し、その骨髄から神経幹細胞が分化誘導されるか等について検討した。

【0083】

C.B17マウスからの脳梗塞モデルの作成は、上述の脳梗塞SCIDマウスの作成方法と同様である。すなわち、3%ハロセン麻酔下にマウス左頬骨を切除し、頭蓋底を露出した。中大脳動脈走行部位に直径1.5mmの骨窓を歯科用ドリルで作成した。硬膜、クモ膜を剥離し、中大脳動脈を分離して結紮準備とした。中大脳動脈結紮法としては、凝固用ピンセットにて電気凝固後に切断する永久結紮法、動脈瑠結紮用クリップを用いた一過性結紮法などが可能である。結紮部位は、動脈が嗅索を通過した直後、すなわちdistal M1 portionである。この部位を結紮することにより、中大脳動脈の皮質枝の血流を選択的に途絶させることが可能である。

【0084】

このような中大脳動脈結紮法により、C.B17マウス左中大脳動脈のdistal M1 portionを結紮して作成した脳梗塞モデルマウス（脳梗塞C.B17マウス）の脳梗塞領域を、実際にTTC染色法にて検討した。TTC染色法は、結紮後（MCO）1, 3, 7日目

10

20

30

40

50

にそれぞれマウス脳を摘出し、brain slicerにて作成した冠状脳スライスを用いて施行した。その結果、各群4匹、計12匹はすべて左中大脳動脈皮質枝領域に選択的に梗塞が作成され、脳梗塞部位は極めて均一であった。図7には、結紮後(MCO)1日目に摘出した脳の染色結果が、脳梗塞SCIDマウスのもので対比して示される(白い部分が梗塞部位)。

#### 【0085】

C・B17マウス、およびSCIDマウスにおける中大脳動脈閉塞後の脳梗塞の様子を摘出脳で観察した。マウス左中大脳動脈のdistal M1 portionを結紮し、3, 7, 16, 28日目にマウスを経心的にPLP固定液で灌流固定後、脳を摘出した。その結果、摘出脳は全例中大脳動脈領域の欠損が観察され(図6には、結紮後16日目のものが示される)、SCIDマウスの母系であるC・B17マウスを用いた場合も、SCIDマウスと同様に再現性のよい均一な脳梗塞モデルを作成できることが明らかになった。

10

#### 【0086】

ところで、SCIDマウスから作成した脳梗塞モデルマウスでは、虚血後の脳梗塞の進展(delayed infarct expansion)は脳梗塞後3日で終了し、その後は脳萎縮の進展ではなく、脳形態上はむしろ回復することが認められている(特願2004-108500号参照)。このことは、脳梗塞SCIDマウスが脳梗塞モデルマウスとしてのみならず、脳再生モデルとしても適していることを示している。

#### 【0087】

そこで次に、脳梗塞C・B17マウスにおいても、このような脳形態上の回復が認められるか検討した。上述のように、C・B17マウスおよびSCIDマウスの左中大脳動脈のdistal M1 portionを結紮し、3, 7, 14, 28日目にマウスを経心的にPLP固定液で灌流固定後、脳を摘出し、残存大脳皮質の大きさを定量化することで、脳欠損の程度、回復・再生の有無を観察した。具体的には、梗塞側大脳皮質の大脳裂から梗塞部位までの幅(a)を正常側(b)と比較し、その比(a/b)をcortical width index(CI値)として算出した(図20参照)。その結果、図8に示すように、脳梗塞SCIDマウス、脳梗塞C・B17マウスともCI値は3日目から7日目までは0.34とほぼ一定であった。しかし、SCIDマウスでは28日目に0.37と増加し、回復・再生が認められたのに対し、C・B17マウスでは28日目でも0.34と一定であった。この結果から、脳梗塞C・B17マウスでは、脳梗塞SCIDマウスとは異なり、脳形態上の回復は認められず、脳再生モデルとはいえなかった。

20

30

#### 【0088】

##### [2-2] 脳梗塞C・B17マウスにおける神経幹細胞等の発現検討

脳梗塞C・B17マウスは、CI値では脳再生が認められなかったが、梗塞後のマウス脳に神経幹細胞等が形成されているかどうかを、神経幹細胞や神経細胞、グリア細胞の各種マーカーを用いた免疫組織化学で検討した。

#### 【0089】

具体的には、神経幹細胞に対しては抗ムサシ1(Musashi1)抗体を用い、未熟神経細胞の同定にはDoublecortin(DCX)を用いた。オリゴデンドロサイト前駆細胞はPlatelet-derived Growth Factor Receptor(PDGFR)とNG2をマーカーとし、前および未熟オリゴデンドロサイトに対してはO4とMyelin-associated Glycoprotein(MAG)を用いた。アストロサイトは抗GFAP抗体で同定した。さらに、未熟神経細胞や軸索伸長過程にある神経のマーカーとしてPSA-NCAMを用いた。PSA-NCAMは、培養神経幹細胞の細胞膜に発現することが確認されている。また、Nカドヘリン(N-cadherin)もニューロスフェアに発現することが確認されている。これらは、ニューロスフェアの分化誘導シグナル調節に深く関与している。

40

#### 【0090】

上述の各種マーカーを用いて、脳梗塞C・B17マウスの脳室下帯組織(subventricular zone: SVZ)、および脳梗塞下の組織における神経幹細胞等の産生について検討した。なお、脳梗塞下の組織とは、梗塞組織(脳梗塞瘢痕部位)および梗塞組織と白質(脳

50

梁)とが接する脳梗塞周囲の部位のことである。この脳梗塞下の組織は、脳室下帯組織(SVZ)とともに、脳梗塞SCIDマウスにおいて多数の神経幹細胞の出現(即ち、脳再生)が観察された部位である(特願2004-108500号参照)。また、この脳梗塞下の組織における神経幹細胞は、骨髄に由来するものであった。

#### 【0091】

##### [2-3] 脳室下帯組織(SVZ)における神経幹細胞等の発現

脳梗塞C.B17マウス作成後1, 7, 14, 35日目にマウスを経心的にPLP固定液で灌流固定後、脳を摘出し、ピプラトームを用いて脳切片を作成し、その後、免疫組織化学を行った。

#### 【0092】

梗塞後1日目には、SVZの各種マーカー発現はすべて正常側と差はなかった。7日目になると、Musashi1陽性、PSA-NCAM陽性の細胞が、SVZに増殖するようになった。14日目になると、これらの神経幹細胞は脳室膨大部から白質内に侵入するようみられた。35日目には、SVZでの発現細胞は減少しコントロールレベルとなったが、脳室下の白質には多数のMusashi1陽性、PSA-NCAM陽性の細胞が認められた。同部位には、DCX陽性の未熟神経細胞や、小型のNeuN陽性細胞もみられた。また、梗塞後7日目よりSVZにはNG2陽性、PDGFR陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞も発現するようになった。これらは成熟オリゴデンドロサイトマーカーを有しておらず、14日目までみられたが、35日目には減少した。

#### 【0093】

このように、SVZでは梗塞後7日目以降、14日目をピークに神経幹細胞の増殖がみられ、以後減少する。神経幹細胞としては脳室下の白質に35日目までは存在するが、以後は成熟して神経となるか、あるいは死滅してしまうと考えられる。SVZには梗塞後7日目にはNotch1陽性細胞がみられたが、それ以降はみられなかったことから、SVZ細胞の分化増殖シグナルは、梗塞後1週間程度で終了すると考えられた。

#### 【0094】

##### [2-4] C.B17マウス梗塞下組織における神経幹細胞の発現抑制

C.B17マウスおよびSCIDマウスに対して脳梗塞作成後21日目のマウス脳のピプラトーム切片を用いて、NeuNに対する免疫組織化学を施行した。その結果を図9に示す。脳梗塞SCIDマウスの梗塞下組織(白質領域)には多数の小型NeuN陽性細胞(神経前駆細胞)が観察されたが(同図A)、脳梗塞C.B17マウスの梗塞下組織は、ほとんどマクロファージで占拠されており、PSA-NCAM陽性の神経幹細胞や小型のNeuN陽性細胞は梗塞後35日目までほとんど認められなかった(同図B)。このことは、C.B17マウスの正常な免疫反応が、梗塞下組織(脳梗塞瘢痕部位を含む)における神経幹細胞発現・神経再生に抑制的に作用していることを示唆するものである。

#### 【0095】

次に、脳梗塞下組織から採取した細胞を培養して神経幹細胞が形成されるかどうか検討した。結紮後7日目の脳梗塞C.B17マウスおよび脳梗塞SCIDマウスの梗塞下組織を採取し、その後、DMEMとN-2の基本培養液内(250 $\mu$ l)で単細胞になるまでピペティングし、10mlの培養液を加えて600rpmで5分間遠心した。細胞を3mlの培養液にて再浮遊させ、bFGF(50 $\mu$ g/ml)とEGF(20 $\mu$ g/ml)存在下にlow cell bindingプレート上で29日間培養を行い、新たに形成されるニューロスフェア様細胞塊数を数えた。その結果、図12に示すように、脳梗塞SCIDマウスの梗塞下組織からは培養5日目以降にニューロスフェア様細胞塊の形成が観察されたが、脳梗塞C.B17マウスの梗塞下組織からはニューロスフェア様細胞塊は全く形成されなかった。

#### 【0096】

##### [2-5] C.B17マウスにおける骨髄由来ニューロスフェア様細胞塊の形成

脳梗塞作成後7日目のSCIDマウスとC.B17マウスの骨髄を28日間培養し、ニューロスフェア様細胞塊が形成されるかどうかを観察した。その結果、SCIDマウスの

10

20

30

40

50

骨髄からは培養2週間目までにニューロスフェア様細胞塊が形成された(図10A・B)。一方、C・B17マウスの骨髄からは培養開始7日目までにわずかにニューロスフェア様細胞塊が形成されたが(同図C・D)、これらは2週間以内にすべて消失した。

#### 【0097】

そこで、ニューロスフェア様細胞塊における細胞死のメカニズムを探る目的で、培養後同時期のSCIDマウス由来とC・B17マウス由来のニューロスフェア様細胞塊をAnexinVで標識してアポトーシスを検討した。その結果、SCIDマウス由来のニューロスフェア様細胞塊では、細胞中心部が少しネクローシスに陥っているのみであったが(図11A参照)、C・B17マウス由来のニューロスフェア様細胞塊では、内側の細胞はほとんどがネクローシスで、外側の細胞はすべてアポトーシスに陥っていた(同図B参照)。この結果から、脳梗塞C・B17マウス由来のニューロスフェア様細胞塊は、アポトーシスで消滅することが示された。

10

#### 【0098】

また、脳梗塞を起こしていない偽手術C・B17マウスの骨髄からは、ニューロスフェア様細胞塊は全く形成されなかった。さらに、偽手術C・B17マウスから採取した骨髄を、脳梗塞C・B17マウスの血清を添加して培養すると、ニューロスフェア様細胞塊が一旦形成されるがすぐに排除され、ニューロスフェア様細胞塊を得ることはできなかった。

#### 【0099】

##### [2-6] 本実施例の結果と考察

以上のように、免疫不全マウスであるSCIDマウスの脳梗塞モデルから採取した脳梗塞下組織(脳梗塞瘢痕部位)や骨髄からは、大量のニューロスフェアが形成された。これに対して、その母系マウスである免疫正常なC・B17マウスの脳梗塞モデルから採取した脳梗塞瘢痕部位や骨髄からは、ニューロスフェアはほとんど形成されなかった。これらの結果から、正常な免疫反応が骨髄および脳梗塞瘢痕部位における神経幹細胞(ニューロスフェア)の発現に抑制的に作用していると考えられる。

20

#### 【0100】

〔実施例3：免疫抑制剤を用いた骨髄・脳梗塞下組織(脳梗塞瘢痕部位)からの神経幹細胞調製法〕

上述のように、脳梗塞後の神経再生(神経幹細胞の発現・形成)に免疫の関与が考えられたので、この推論を確かめるため、脳梗塞後の骨髄・脳梗塞瘢痕部位からの神経幹細胞の形成に対する免疫抑制の効果をin vivoとin vitro双方で検討した。

30

#### 【0101】

[3-1] 免疫抑制剤を投与したC・B17マウス骨髄・脳梗塞下組織(脳梗塞瘢痕部位)からのニューロスフェア形成

C・B17マウスに免疫抑制剤FK506(1.0mg/kg)を前投与すなわち3日間連日腹腔内投与し、その後、左中大脳動脈閉塞による脳梗塞を作成した。脳梗塞後(結紮後)もFK506(1.0mg/kg)投与を継続し、脳梗塞後7日目に骨髄と脳梗塞瘢痕部位とを採取してDMEMとN-2の基本培養液内(250μl)で単細胞になるまでピペティングし、10mlの培養液を加えて600rpmで5分間遠心した。細胞を3mlの培養液にて再浮遊させ、bFGF(50μg/ml)とEGF(20μg/ml)存在下にlow cell bindingプレート上で10-28日間培養を行った。図13に示すように、培養7日目以降には骨髄(A・B)と脳梗塞瘢痕部位(C)からニューロスフェア様細胞塊が細胞顕微鏡下で観察された。

40

一方、偽手術C・B17マウスにFK506(1.0mg/kg)を10日間連日腹腔内投与しただけの培養骨髄からはニューロスフェア様細胞塊はほとんど形成されなかった。

#### 【0102】

[3-2] 脳梗塞C・B17マウス骨髄に免疫抑制剤を添加した場合のニューロスフェア形成

50

次に、脳梗塞作成後7日目のC・B17マウス骨髄を培養する際に免疫抑制剤FK506 (0.1 µg/ml) を培養液に添加してニューロスフェア様細胞塊が形成されるかどうかを観察した。すなわち、骨髄細胞をDMEMとN-2の基本培養液内(250 µl)で単細胞になるまでピペティングし、10 mlの培養液を加えて600 rpmで5分間遠心した。細胞をFK506 (0.1 µg/ml) を含む3 mlの培養液にて再浮遊させ、low cell bindingプレート上で10-28日間培養を行った。すると、培養4日目以降にニューロスフェア様細胞塊が細胞顕微鏡下で観察された(図14A・B)。

#### 【0103】

即ち図15に示すように、脳梗塞作成後7日目のC・B17マウス骨髄を培養しても、ほとんどニューロスフェア様細胞塊は形成されなかったが(C.B (MC01W))、上述のように、FK506 (0.1 µg/ml) を培養液に添加するとニューロスフェア様細胞塊が形成された(C.B (MC01W) + FK506)。これは培養4日目以降に観察され、SCIDマウスの脳梗塞後における形成(SCID (MC01W))よりも早期に見られた。

10

#### 【0104】

一方、脳梗塞を起こしていない偽手術C・B17マウス骨髄に対しては、  
 (1) bFGF (50 µg/ml) とEGF (20 µg/ml) のみ、  
 (2) bFGF (50 µg/ml) とEGF (20 µg/ml) + 脳梗塞後1週間目のSCIDマウスの血清(50 µl)、  
 (3) bFGF (50 µg/ml) とEGF (20 µg/ml) + 脳梗塞後1週間目のSCIDマウスの血清(50 µl) + FK506 (0.1 µg/ml)、  
 の3種類の培養液を用意した。

20

#### 【0105】

すると、培養4日目以降に上記(3)の培養液中にのみニューロスフェア様細胞塊が細胞顕微鏡下で観察された(図16B・C)。一方、上記(2)の培養液からはニューロスフェア様細胞塊が一旦形成されるが、すぐに排除されニューロスフェアは得られなかった。これらのことから、骨髄におけるニューロスフェア形成に抑制的に作用している免疫反応を排除することにより神経幹細胞が形成されること、骨髄から異所性に神経幹細胞が形成されるためにはT細胞機能など細胞性免疫が抑制されなければならないことが明らかになった。

30

#### 【0106】

[3-3] C・B17マウス骨髄に抗T細胞抗体を添加した場合のニューロスフェア形成

CD28およびICOS (inducible costimulatory molecule) は、多くのT細胞依存性免疫反応における受容体であり、そのブロック抗体である抗CD28抗体および抗ICOS抗体は、T細胞機能を抑制することが知られている(Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (1997) 16:335-342.; J. Immunol. (2000) 165:5035-5040.等)。そこで、FK506以外に、このようなT細胞機能を抑制する抗体(抗T細胞抗体)を添加した場合も、FK506を添加した場合と同様に神経幹細胞が形成されるかどうかを検討した。

#### 【0107】

脳梗塞を起こしていない偽手術C・B17マウス骨髄に対して、  
 (1) bFGF (50 µg/ml) とEGF (20 µg/ml) + 脳梗塞後1週間目のSCIDマウスの血清(50 µl) + FK506 (0.1 µg/ml)、  
 (2) bFGF (50 µg/ml) とEGF (20 µg/ml) + 脳梗塞後1週間目のSCIDマウスの血清(50 µl) + 抗CD28抗体(2 µg/ml, BD Biosciences)、  
 (3) bFGF (50 µg/ml) とEGF (20 µg/ml) + 脳梗塞後1週間目のSCIDマウスの血清(50 µl) + 抗ICOS抗体(4 µg/ml, BD Biosciences)、  
 および、コントロールとして、  
 (4) bFGF (50 µg/ml) とEGF (20 µg/ml) + 脳梗塞後1週間目のSCIDマウスの血清(50 µl) + 生理食塩水(saline)、  
 の4種類の培養液を用意した。

40

#### 【0108】

50

すると、培養4日目以降に上記(4)以外の培養液中にニューロスフェア様細胞塊が細胞顕微鏡下で観察された(図21)。さらに、浮遊しているニューロスフェア様細胞塊を採取してhigh bindingプレート上で更に培養した。7日後に分化した細胞をパラフォルムアルデヒドを含む固定液にて固定し、nestin陽性のニューロスフェア数を計測したところ、1dishあたりのnestin陽性ニューロスフェア数は、上記(4)のsaline群に比しFK506添加群(1)や抗CD28抗体添加群(2)、抗ICOS抗体添加群(3)で有意に多かった(図27)。

以上の結果から、T細胞機能を抑制する抗T細胞抗体を添加することにより、FK506を添加した場合と同様に神経幹細胞が形成されること、および、骨髄から神経幹細胞が形成されるためにはT細胞機能を抑制することが重要であることが明らかになった。

#### 【0109】

[3-4] C . B 1 7 マウスから調製されたニューロスフェア様細胞塊の神経細胞への分化能

脳梗塞を起こしていない偽手術C . B 1 7 マウス骨髄にFK506と血清を添加して培養し、10日目に浮遊しているニューロスフェア様細胞塊を採取してhigh bindingプレート上でさらに培養した。3 - 7日後に分化した細胞をパラフォルムアルデヒドを含む固定液にて固定して、NestinとMAP2に対する免疫組織化学(二重染色間接蛍光抗体法)を行った。その結果、これらの中にはNestin陽性の神経幹細胞が高率に観察された(図17)。同図に示すように、細胞塊の中心はNestin陽性(明灰色)で神経幹細胞であり、周囲にはより分化したMAP2陽性の神経細胞(暗灰色)が観察された。また、上記ニューロスフェア様細胞塊について神経への分化能を検討した結果、骨髄培養から得られたニューロスフェア様細胞塊の約60%がNestin陽性の神経幹細胞で、そのうち67%がMAP2陽性の神経細胞に分化した。

#### 【0110】

[3-5] C . B 1 7 マウスの骨髄と脳梗塞下組織(脳梗塞瘢痕部位)から形成されるニューロスフェアの相違

上述のように、C . B 1 7 マウスの脳梗塞後の骨髄からはニューロスフェア様の細胞塊が一旦は形成されるが、脳梗塞瘢痕部位からはニューロスフェア様細胞塊の痕跡すら認められなかった。このことは、骨髄では脳梗塞後に血清中の刺激因子を介して神経幹細胞産生への誘導が生じるものの、正常なT細胞機能があるとその影響により幹細胞が排除され、脳に到達できないものと考えられる(図12)。

#### 【0111】

[3-6] 本実施例の結果と考察

以上のように、C . B 1 7 マウスに免疫抑制剤であるFK506を前投与し、T細胞機能を十分抑制してから脳梗塞を作成すると、骨髄および脳梗塞瘢痕部位からニューロスフェアが形成された。また、脳梗塞を起こしていない偽手術C . B 1 7 マウスの骨髄に脳梗塞後1週間目のSCIDマウスの血清とFK506を添加して培養するとニューロスフェアが形成された。さらに、T細胞機能抑制の目的でFK506の代わりに抗CD28抗体あるいは抗ICOS抗体を添加して培養すると、同様に骨髄からニューロスフェアが形成された。

#### 【0112】

このことより、骨髄から異所性に神経幹細胞が形成されるためにはT細胞機能など細胞性免疫が抑制されなければならないこと、正常マウスでも免疫を調節(抑制)すれば骨髄で神経再生が生じ、アポトーシスによる細胞死を回避して、脳梗塞瘢痕部位に移行生着し、そこで分化して神経になることが示唆された。

#### 【0113】

[実施例4:脳梗塞SCIDマウス骨髄由来の神経幹細胞の移植と脳組織への生着・分化]

脳梗塞SCIDマウスの骨髄由来の神経幹細胞が生理的に脳梗塞巣に侵入して脳組織へ生着、分化するかどうかを確認するため、以下の実験を行った。

10

20

30

40

50

## 【0114】

即ち、骨髄由来の神経幹細胞がSCIDマウスの脳梗塞後に生じる神経再生に与するかどうかを、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescence protein: GFP) を発現する GFPトランスジェニックマウスの骨髄を移植したSCIDマウス脳梗塞モデルで検討した。

## 【0115】

まず、SCIDマウスに200radの放射線照射による骨髄抑制を施した後にGFPトランスジェニックマウスの骨髄細胞(10万個)を移植した。移植後2週間目に脳梗塞を作成し、さらに脳梗塞後16日目にマウスを経口的にPLP固定液で灌流固定した。脳を摘出し、ピラトームを用いて脳切片を作成した。その後脳切片をGFPとPSA-NCAM

10

## 【0116】

具体的には、脳切片をラットモノクローナル抗GFP抗体とマウスモノクローナル抗PSA-NCAM抗体を含むリン酸緩衝液(2000倍希釈)にて12時間反応させ(第一反応)、洗浄後FITC標識ヤギ抗ラットIgGとビオチン標識ヤギ抗マウスIgG(第二反応)、次いでアビジン標識Cy3と反応させた。GFPとPSA-NCAMの可視化は共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察した。GFP陽性細胞は脳梗塞下組織に広く認められ、一部はPSA-NCAM陰性でミクログリアの形態を示していたが(図18B参照)、梗塞下の白質外側および大脳皮質断面(本発明者らがステムロード(Stem Road)と称する部位)に沿って広く認められたGFP陽性細胞群は、同時にPSA-NCAM陽性で

20

## 【0117】

以上の結果から、上記ステムロードには骨髄細胞由来の神経幹細胞が梗塞後に発現して脳実質内に侵入すること、すなわち、骨髄由来の神経幹細胞が脳梗塞下の組織へ生着し、神経に分化することが示された。

## 【0118】

〔実施例5：ヒトへの応用と神経幹細胞移植による脳梗塞治療効果〕

## 〔5-1〕ヒトの骨髄由来神経幹細胞調製法

以上の知見をヒトに応用し、ヒト骨髄由来の神経幹細胞の調製が可能かどうかを検討した。

30

脳梗塞を起こしていない正常ヒト骨髄を採取し、その後、DMEMとN-2の基本培養液内(250 $\mu$ l)で単細胞になるまでピペティングし、10mlの培養液を加えて600rpmで5分間遠心した。細胞を3mlの培養液にて再浮遊させ、low cell bindingプレート上で10-28日間培養を行った。培養液は、

(1) bFGF(50 $\mu$ g/ml)とEGF(20 $\mu$ g/ml)のみ、

(2) bFGF(50 $\mu$ g/ml)とEGF(20 $\mu$ g/ml)+脳梗塞後1週間目の患者の血清(50 $\mu$ l)、

(3) bFGF(50 $\mu$ g/ml)とEGF(20 $\mu$ g/ml)+脳梗塞後1週間目の患者の血清(50 $\mu$ l)+FK506(0.1 $\mu$ g/ml)

40

の3種類を用意した。

## 【0119】

すると、培養7日目以降に上記(3)の培養液中にのみニューロスフェア様細胞塊が細胞顕微鏡下で観察された。培養10日目に形成されたニューロスフェア様細胞塊(図19A)をhigh bindingプレート上でさらに5日間培養すると、神経細胞に分化した(同図B)。

## 【0120】

## 〔5-2〕脳梗塞SCIDマウス骨髄由来の神経幹細胞の移植

脳梗塞SCIDマウスから得られた骨髄由来の神経幹細胞を、別の脳梗塞SCIDマウスに移植した場合の脳再生に与える影響、脳梗塞治療効果について検討した。

50



## 【 0 1 2 1 】

即ち、脳梗塞 S C I D マウスの骨髄から調製されたニューロスフェア様細胞塊を単細胞に分離して、その 10 万個を別の脳梗塞 S C I D マウス（脳梗塞後 2 日目）に静脈内投与した。そして、その脳梗塞後 16 日目に当該マウスを経心的に P L P 固定液で灌流固定後、脳を摘出した。摘出脳は、全例中大脳動脈領域の欠損が観察された。

## 【 0 1 2 2 】

梗塞側大脳皮質の大脳裂から梗塞部位までの幅（a）を正常側（b）と比較し、その比（a/b）をcortical width index（C I 値）として算出すると、C I 値は、骨髄由来神経幹細胞（B M - N S C）投与マウスでは 0.48 で、P B S を投与したコントロールマウスでは 0.36 であった（図 20）。このように、神経幹細胞を移植されたマウスの脳は、コントロールマウスの脳より残存大脳皮質が拡大していた。

10

## 【 0 1 2 3 】

上述のように、S C I D マウスから作成した脳梗塞モデルマウスでは、虚血後の脳梗塞の進展（delayed infarct expansion）は脳梗塞後 3 日で終了し、その後は脳萎縮の進展ではなく、脳形態上はむしろ回復するが、神経幹細胞を移植するとさらに回復が進むことを示している。このことは、本神経幹細胞の移植が脳梗塞後の神経再生を促進することを示している。

## 【 0 1 2 4 】

〔実施例 6：分化誘導因子の発見とこれを用いた骨髄由来神経幹細胞の調製〕

C I N C - 1 が神経幹細胞への分化誘導因子である可能性が考えられたので、以下の実験により C I N C - 1 が骨髄細胞分化に及ぼす影響を検討した。

20

## 【 0 1 2 5 】

脳梗塞を起こしていない偽手術 C . B 1 7 マウス骨髄に C I N C - 1（ $10^{-5}$  M：ペプチド研究所）と F K 5 0 6（ $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）を添加して培養した。すると培養 5 日目以内にすでに多くの細胞塊が形成された（図 22 A・B）。これらはまだ細胞密度が低い細胞凝集塊であり、ニューロスフェアとは異なっていたが、培養 7 日目以降になると、ニューロスフェア様細胞塊が形成された（図 22 C・D）。

## 【 0 1 2 6 】

また、F K 5 0 6 の影響を検討した結果、C I N C - 1（ $10^{-5}$  M）と F K 5 0 6（ $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）を添加して培養した場合には、上述のように、培養 7 日目以降にニューロスフェア様細胞塊が形成された（図 23 A）のに対して、C I N C - 1（ $10^{-5}$  M）のみを添加し、F K 5 0 6 を添加しない場合は、細胞塊は形成されるが、殆どが排除されてしまうか、あるいは細胞塊の状態では止まっており（図 23 B）、ニューロスフェア形成は認められなかった。

30

## 【 0 1 2 7 】

以上の結果は、脳虚血刺激で産生亢進し、N K 細胞でも作られる C I N C - 1 が骨髄細胞の神経幹細胞への分化誘導因子のひとつであることを示すと同時に、T 細胞機能の抑制もその形成維持には重要であることを示している。

## 【 0 1 2 8 】

〔実施例 7：神経幹細胞の形成における免疫抑制の重要性と免疫抑制物質の神経再生治療への応用〕

40

これまでの実験結果から、in vitroにおいて、また in vivoにおいても、骨髄由来神経幹細胞の形成を維持・促進し、神経再生治療を実現するためには、免疫機能を抑制すること、特に T 細胞機能を抑制することが重要であると考えられた。このことをさらに確かめるため、以下の実験を行った。

## 【 0 1 2 9 】

〔7-1〕F K 5 0 6 以外の免疫抑制剤を用いたニューロスフェアの形成

C . B 1 7 マウスに F K 5 0 6（tacrolimus hydrate:  $1.0 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ ）あるいは F K 5 0 6 と同じく T 細胞機能を抑制する免疫抑制剤であるシクロスポリン A（C s A:  $10 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ ）を 3 日間連日腹腔内投与し、左中大脳動脈閉塞による脳梗塞を作成した（3 匹

50

ずつ)。その後もFK506 (1.0 mg/kg)あるいはCsA (10mg/kg/day)投与を継続し、脳梗塞後7日目に骨髄と脳梗塞下組織(脳梗塞瘢痕部位)を採取してDMEEMとN-2の基本培養液内(250 µl)で単細胞になるまでピペティングし、10mlの培養液を加えて600rpmで5分間遠心した。細胞を3mlの培養液にて再浮遊させ、bFGF(50 µg/ml)とEGF(20 µg/ml)存在下にlow cell bindingプレート上で10-28日間培養を行った。7日目以降にはFK506とCsA投与群の骨髄(BM)と脳梗塞下組織からニューロスフェア様細胞塊が細胞顕微鏡下で観察された。一方、生理食塩水(saline)を10日間連日腹腔内投与しただけの培養骨髄からはニューロスフェア様細胞塊はほとんど形成されなかった。浮遊しているニューロスフェア様細胞塊を採取してhigh bindingプレート上でさらに培養した。7日後に分化した細胞をパラフォルムアルデヒドを含む固定液にて固定し、nestin陽性のニューロスフェア数を計測したところ、FK506およびCsA投与群ではコントロールに比し、有意にnestin陽性ニューロスフェアが多かった(図24)。

10

以上のことより、T細胞機能を抑制する免疫抑制剤を投与することで脳梗塞後に骨髄で神経再生が生じ、アポトーシスによる細胞死を回避して、脳梗塞部位に移行生着し、そこで分化して神経になることが示唆された。

#### 【0130】

##### [7-2] T細胞機能欠如マウス(ヌードマウス)のニューロスフェア形成

無胸腺マウスであるヌードマウス(BALB/cAJcl-nu)とその母系マウス(コントロール)の左中大脳動脈閉塞による脳梗塞作成後、7日目に骨髄細胞と脳梗塞下組織(脳梗塞瘢痕部位)を採取、培養して神経幹細胞塊(ニューロスフェア)を作成した。すなわち、マウスをクリーンベンチ内で断頭し、大腿骨から骨髄細胞を、脳梗塞瘢痕部より細胞を採取した。その後、DMEEMとN-2の基本培養液内(250 µl)で単細胞になるまでピペティングし、10mlの培養液を加えて600rpmで5分間遠心した。細胞を3mlの培養液にて再浮遊させ、bFGF(50 µg/ml)とEGF(20 µg/ml)存在下にlow cell bindingプレート上で10-28日間培養を行った。7日目以降にはニューロスフェア様細胞塊が細胞顕微鏡下で観察されたが、T細胞が正常なコントロールマウスの培養骨髄と脳梗塞瘢痕部からはニューロスフェア様細胞塊はほとんど形成されなかった。浮遊しているニューロスフェア様細胞塊を採取してhigh bindingプレート上でさらに培養した。7日後に分化した細胞をパラフォルムアルデヒドを含む固定液にて固定し、nestin陽性のニューロスフェア数を計測したところ、ヌードマウスではコントロールに比し、有意にnestin陽性ニューロスフェアが多かった(図25)。

20

30

以上のことより、T細胞の存在がなければ、脳梗塞後に骨髄で神経再生が生じ、アポトーシスによる細胞死を回避して、脳梗塞部位に移行生着し、そこで分化して神経になることが示唆された。

#### 【0131】

本実施例の結果から、T細胞が骨髄あるいは脳梗塞瘢痕部におけるニューロスフェア形成に抑制的機能を果たしていること、換言すれば、ニューロスフェアの形成を維持・促進するためにはT細胞機能を抑制することが重要であることが示された。すなわち、in vivoでのFK506やCsAなどの免疫抑制剤の効果、SCIDマウス、ヌードマウスの効果などは、免疫抑制が神経幹細胞作成に重要であることを示すものであると同時に、in vivoで免疫抑制が脳梗塞治療効果に結びつくことを明らかとしている点で、免疫抑制物質が脳梗塞治療など神経再生治療に有効であることを示すものといえる。

40

#### 【0132】

##### [実施例8：新たな分化誘導因子の発見と本スクリーニングの有効性]

実施例6で分化誘導因子のひとつとして見出されたCINC-1は、ケモカインに分類されるサイトカインであるが、分化誘導因子として作用する分子が他のサイトカインにも存在する可能性が考えられたので、前記と同様の培養系を用いたスクリーニングによって他の分化誘導因子を探索した結果、以下のように、サイトカインのTNFが、骨髄細胞から神経幹細胞への分化誘導作用を有することを見出した。

50

【 0 1 3 3 】

脳梗塞を起こしていない偽手術 SCID マウス骨髄に CINC - 1 (10<sup>-5</sup> M) を添加、あるいは TNF (0.1 ng/ml) を添加して培養した。CINC - 1、TNF を添加すると培養5日目以内にすでに細胞塊が形成され7日目以降にはニューロスフェア様細胞塊が形成されたが、これらを添加していないもの (saline添加) はほとんど細胞塊形成がみられなかった。浮遊しているニューロスフェア様細胞塊を採取してhigh bindingプレート上でさらに培養した。7日後に分化した細胞をパラフォルムアルデヒドを含む固定液にて固定し、nestin陽性のニューロスフェア数を計測したところ、CINC - 1のみならずTNF 添加群でもコントロールに比し、有意にnestin陽性ニューロスフェアが多かった (図 26)。

10

【 0 1 3 4 】

以上のことから、TNF で骨髄が刺激されると、骨髄で神経再生が生じることが示され、TNF も骨髄細胞から神経幹細胞への分化誘導因子のひとつであること、および、神経幹細胞培養系を用いた本スクリーニング法が、神経幹細胞の誘導物質のスクリーニング、さらには当該物質を用いた神経再生治療剤の開発に有効であることが示された。

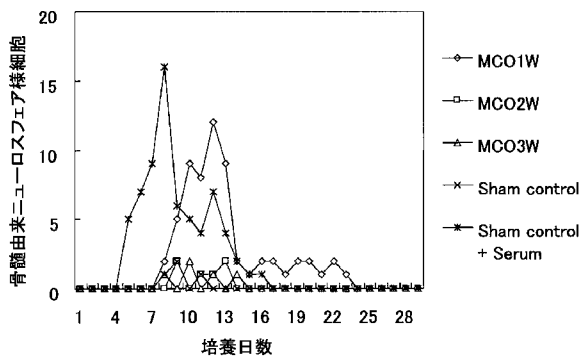
【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 3 5 】

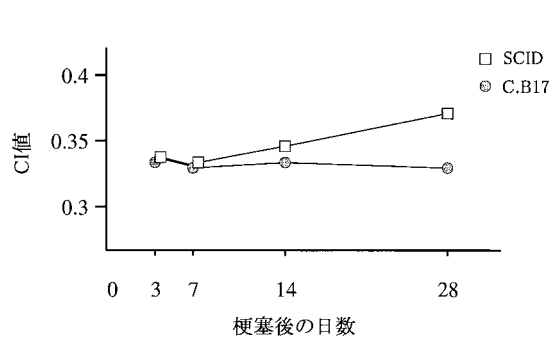
以上のように、本発明は、骨髄から簡易かつ短期間に神経幹細胞を調製する方法等を提供するものであり、細胞移植による脳梗塞発症後の速やかな脳機能の回復、脳梗塞以外の脳血管障害、神経変性疾患に対する神経再生治療、またはそのための治療法開発など神経再生医療の分野において広く利用可能性を有し、再生医療などに取り組む各種の医療関連産業において有用である。

20

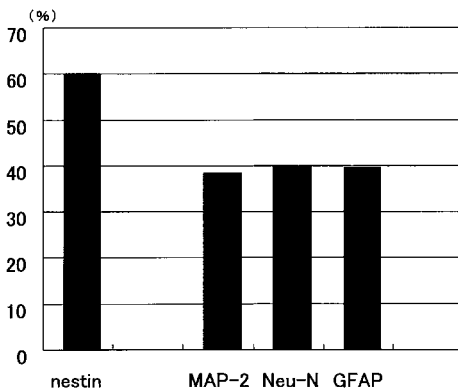
【 図 2 】



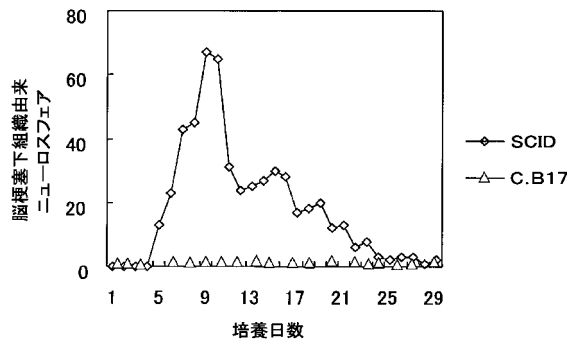
【 図 8 】



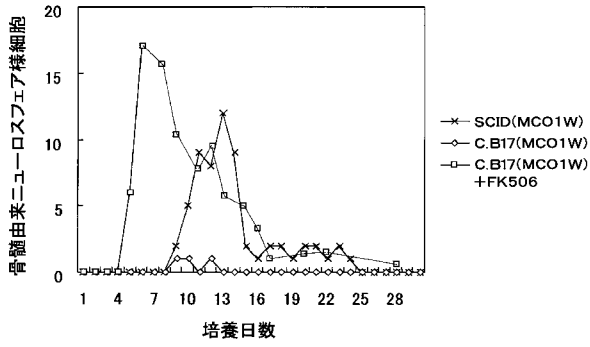
【 図 4 】



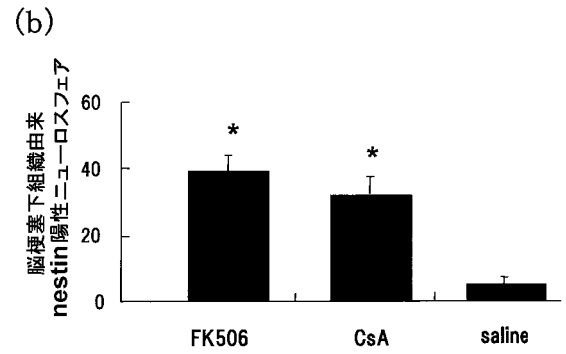
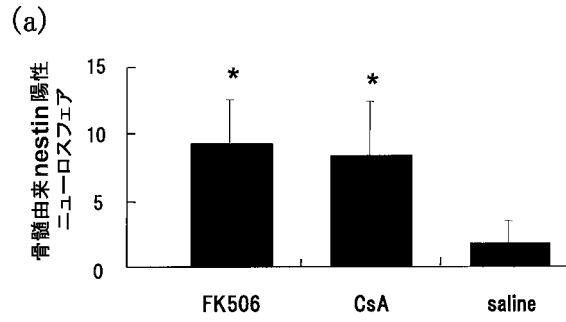
【 図 1 2 】



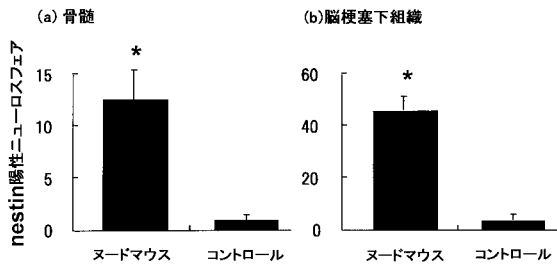
【 図 1 5 】



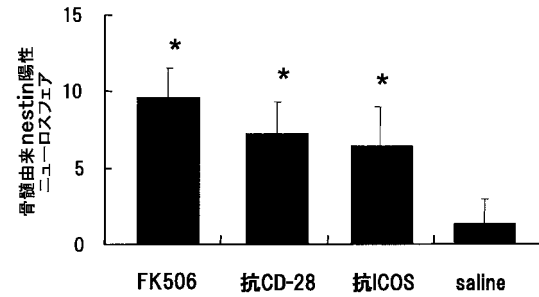
【 図 2 4 】



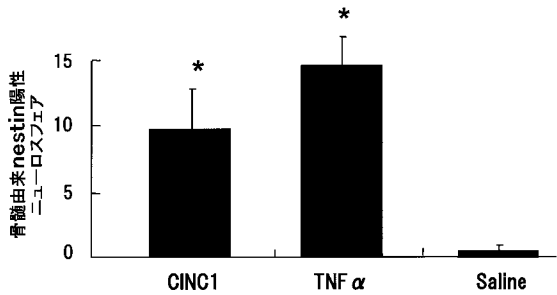
【 図 2 5 】



【 図 2 7 】

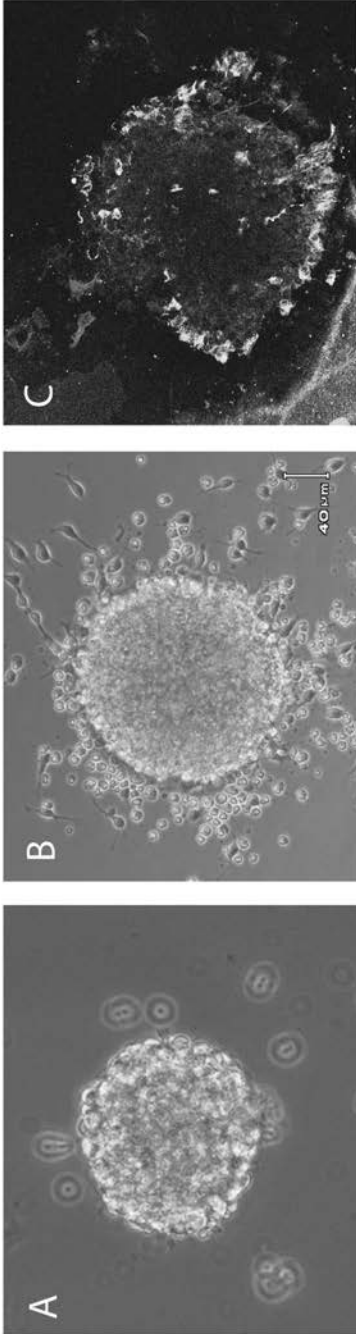


【 図 2 6 】

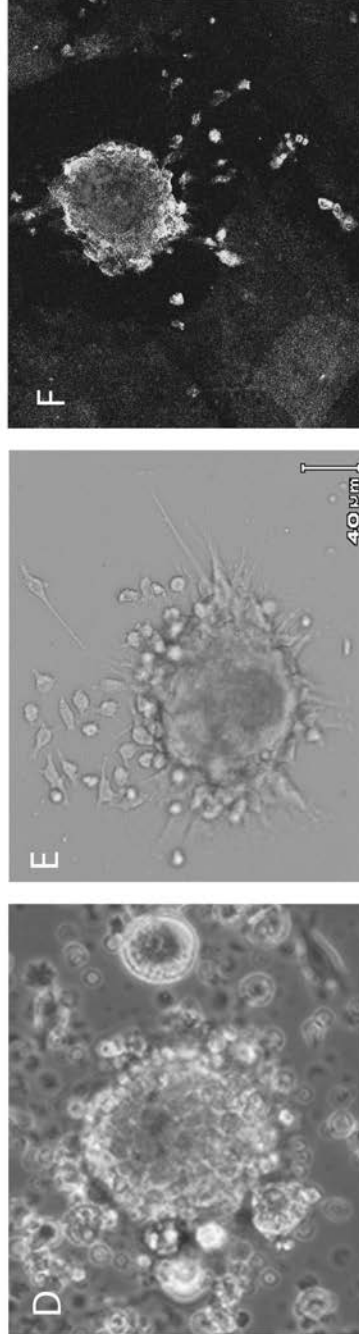


【 図 1 】

胎生神経幹細胞（マウス胎生期線条体より採取）

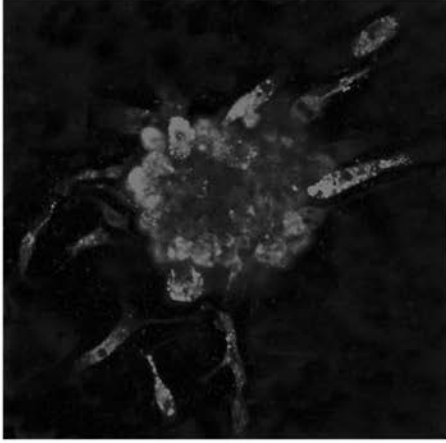


成体骨髄由来神経幹細胞（脳梗塞1週間後のマウスより採取）

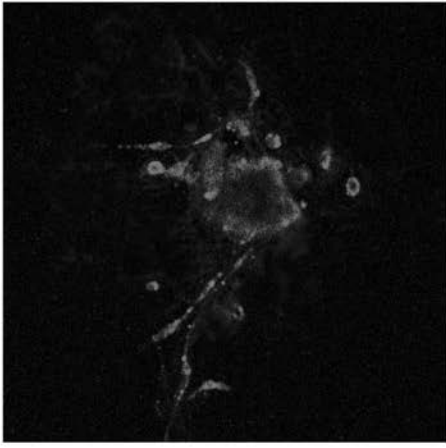


【 図 3 】

GFAP



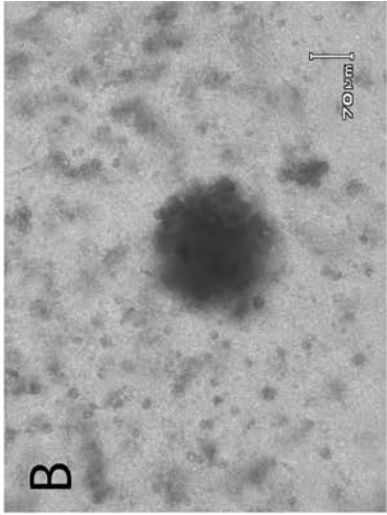
MAP-2



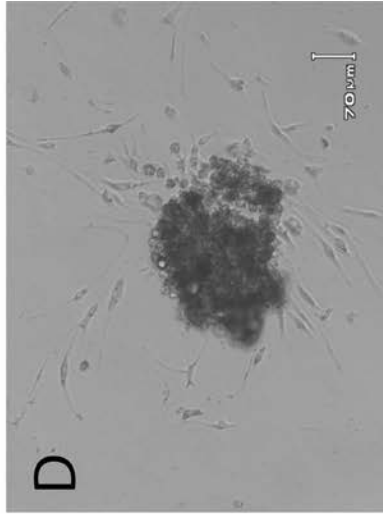
Nestin



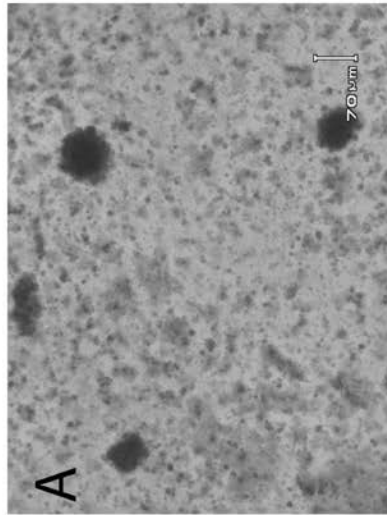
【 図 5 】



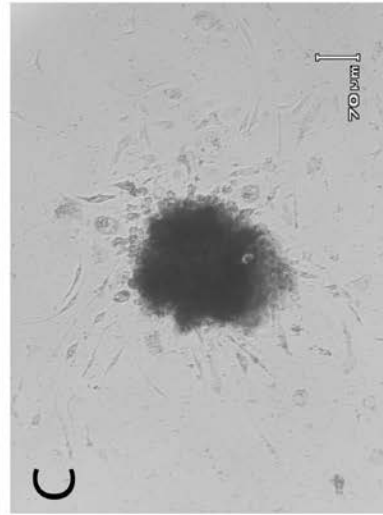
×200



×200



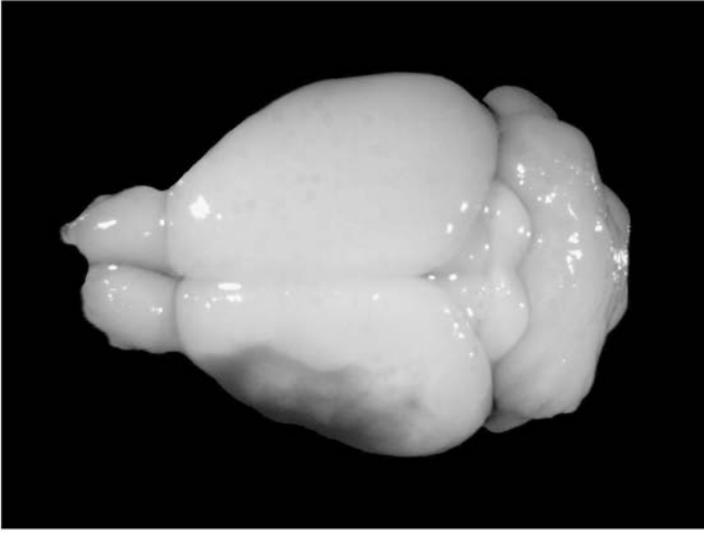
×40



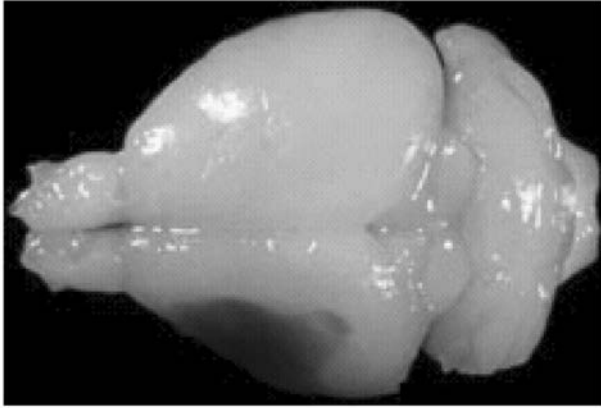
×200

【 図 6 】

(MCO16H)



C.B17

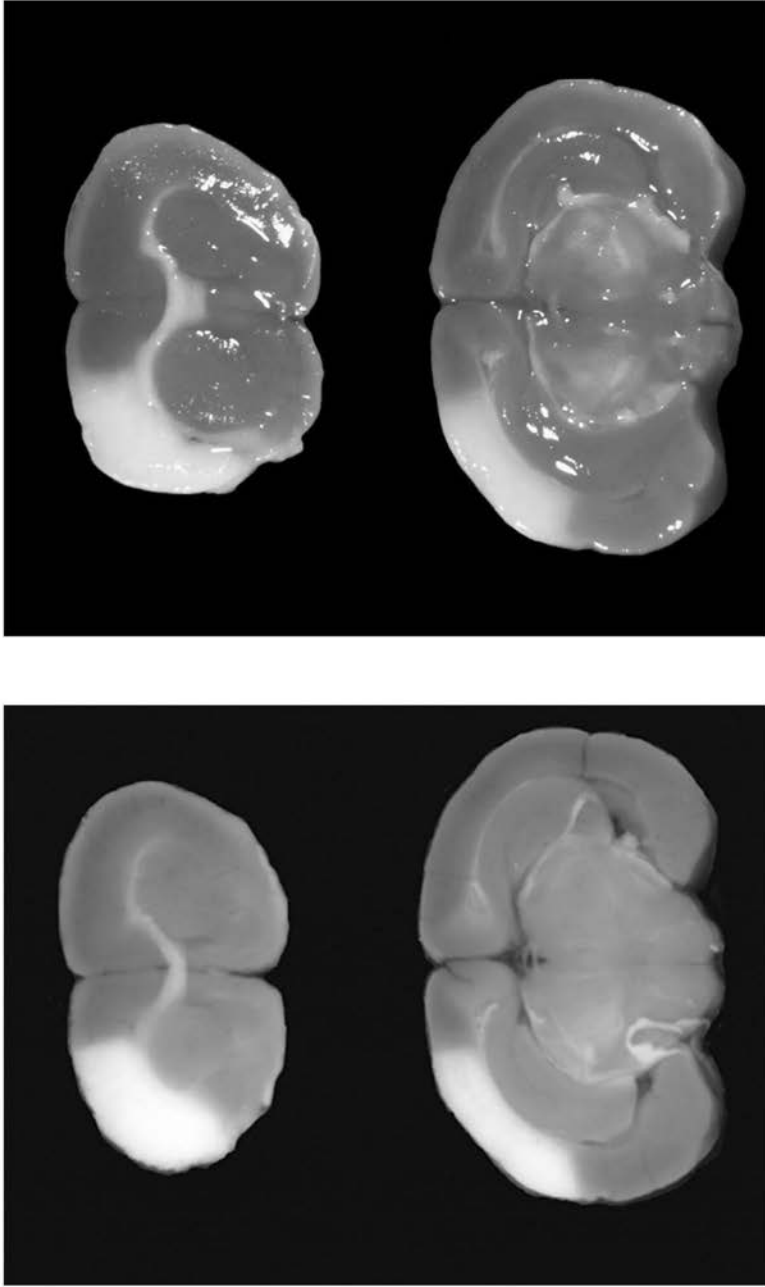


SCID



【 図 7 】

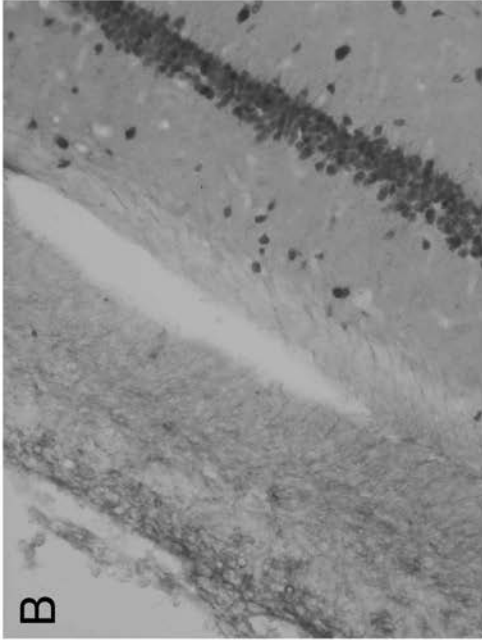
(MCO1H)



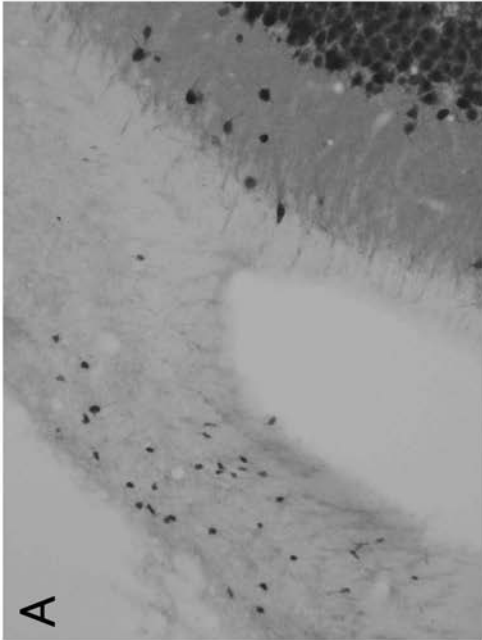
C.B17

SCID

【 図 9 】

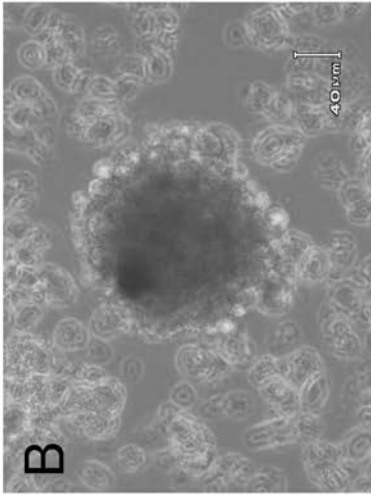


C.B17



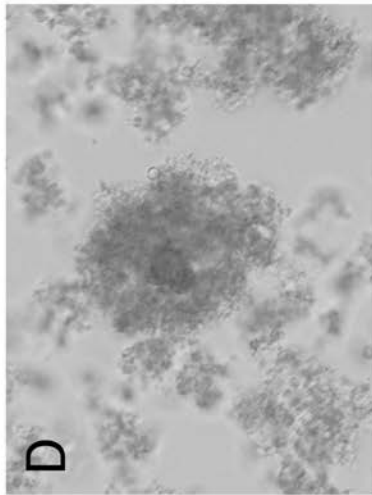
SCID

【 図 10 】



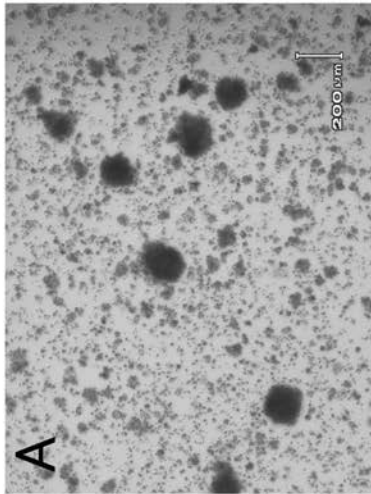
B

SCID  
× 200



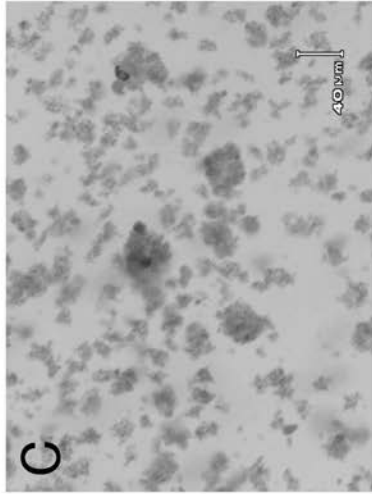
D

C.B17  
× 200



A

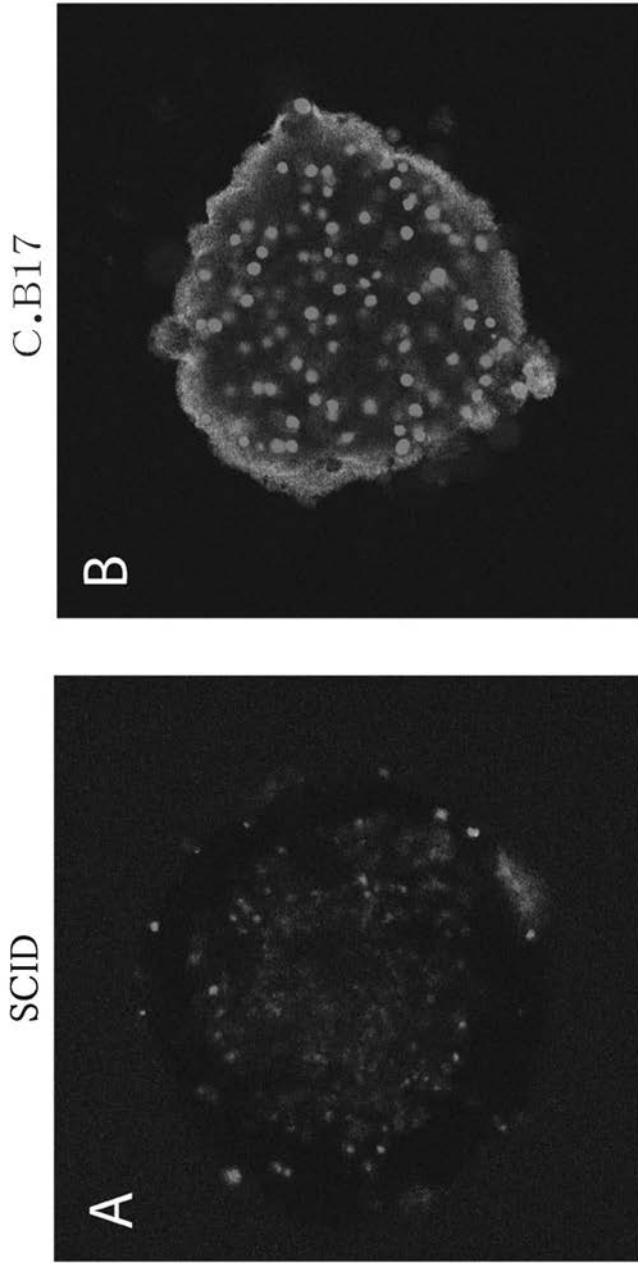
SCID  
× 40



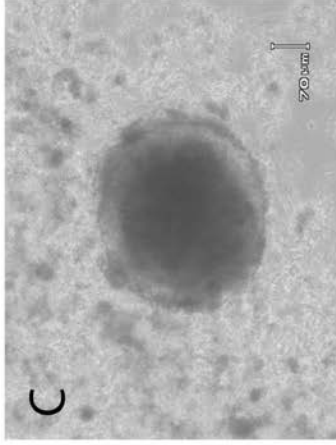
C

C.B17  
× 40

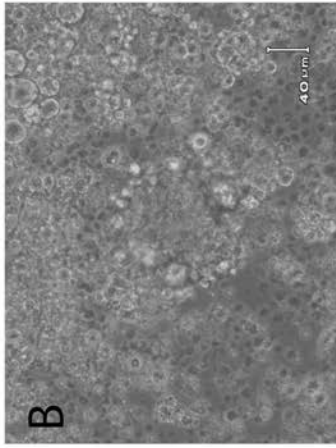
【 図 1 1 】



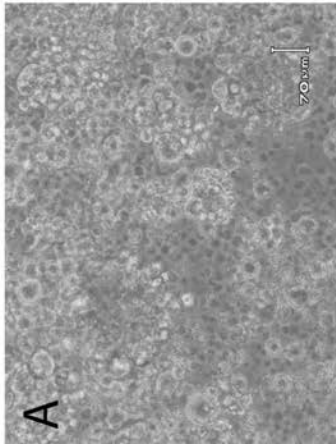
【 図 1 3 】



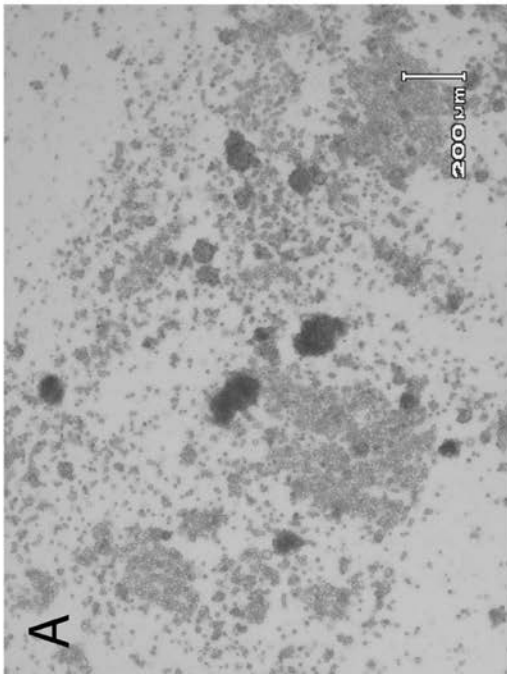
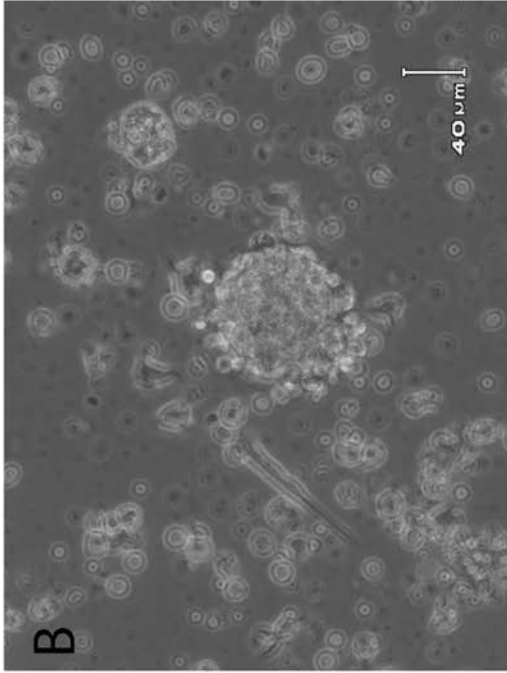
脳梗塞下組織



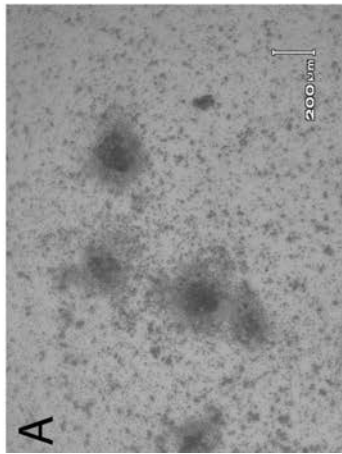
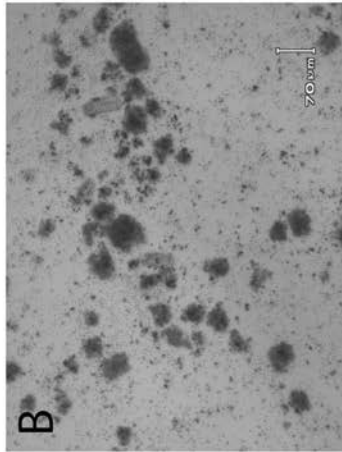
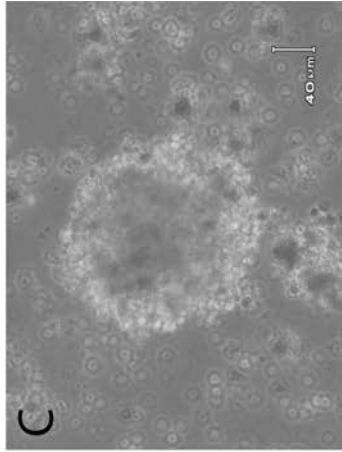
骨髄



【 図 1 4 】



【 図 16 】

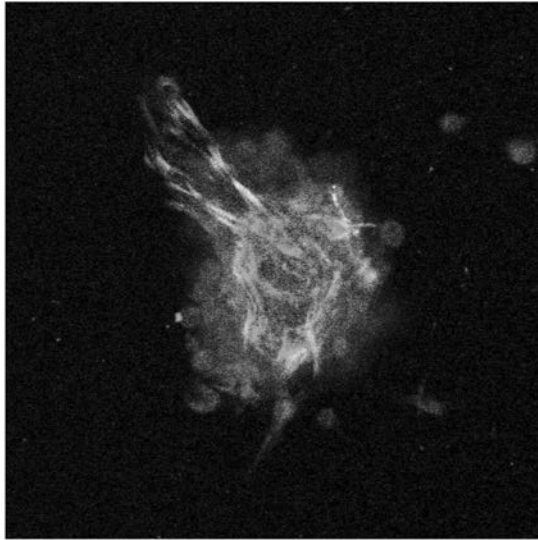


血清+FK506

血清のみ

【図 17】

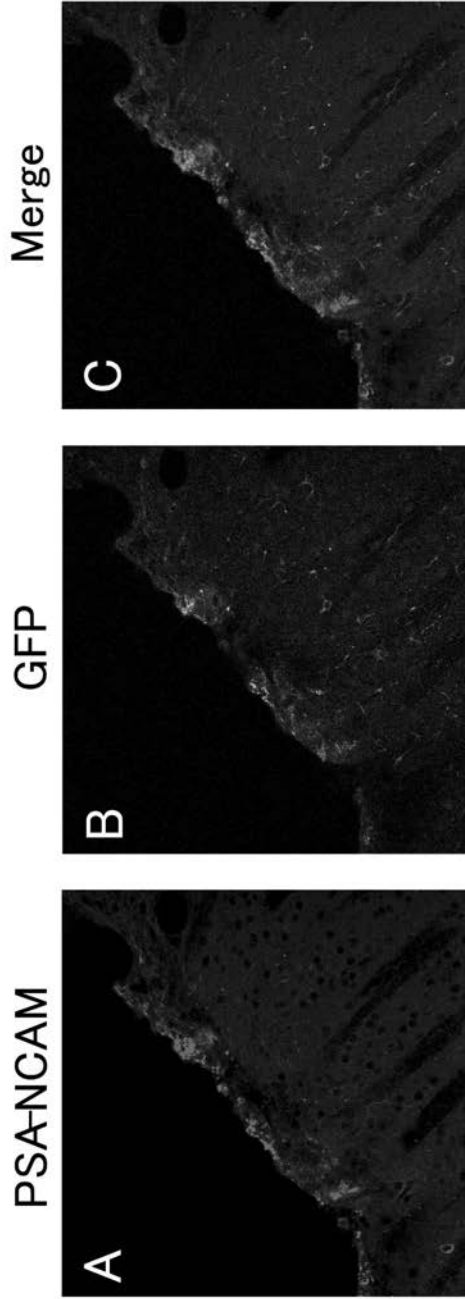
培養  
7日目



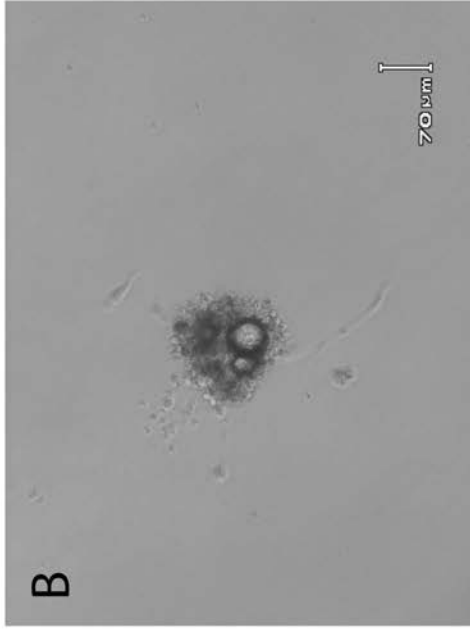
MAP2 (暗灰色) / Nestin (明灰色)



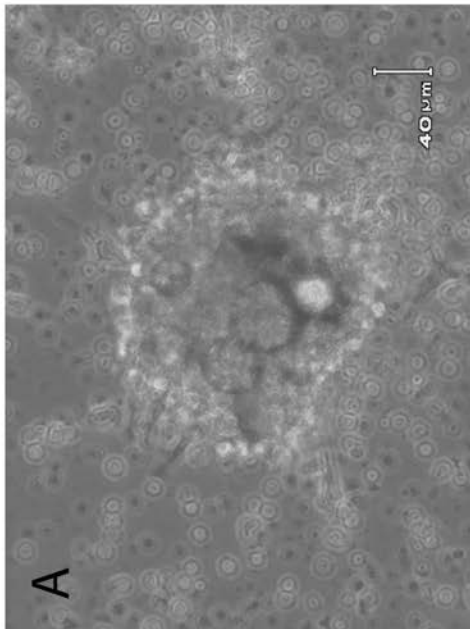
【 18 】



【 図 19 】



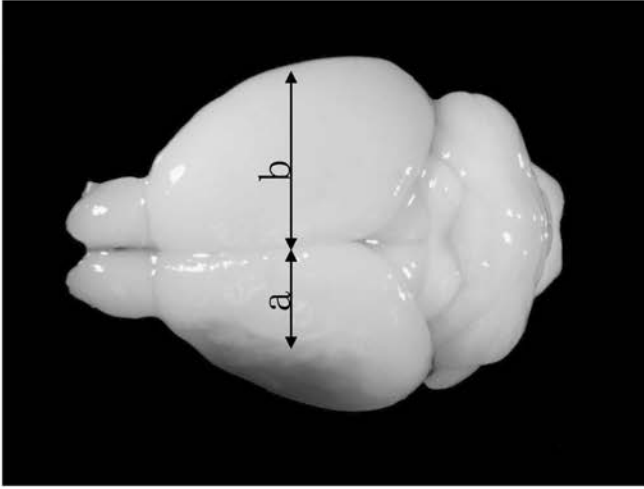
分化後



分化前

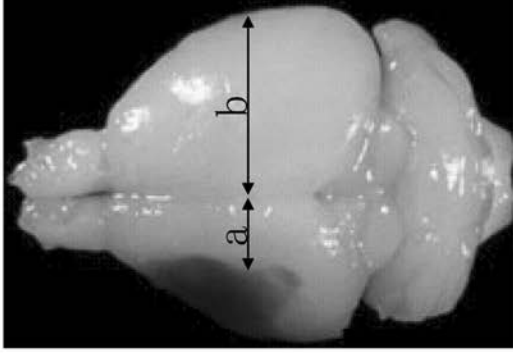
【 図 20 】

(MCO 16 日)



$$\frac{a}{b} = 0.48$$

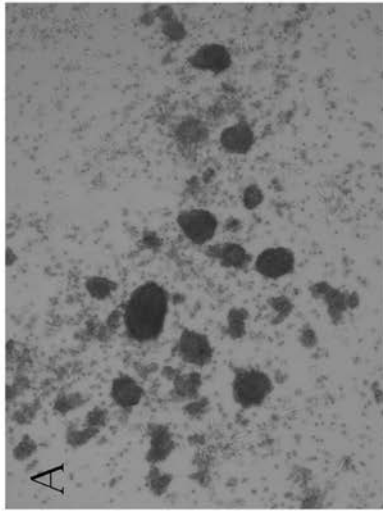
BM - NSC



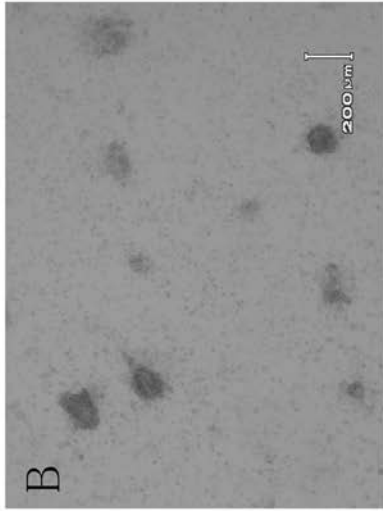
$$\frac{a}{b} = 0.36$$

PBS

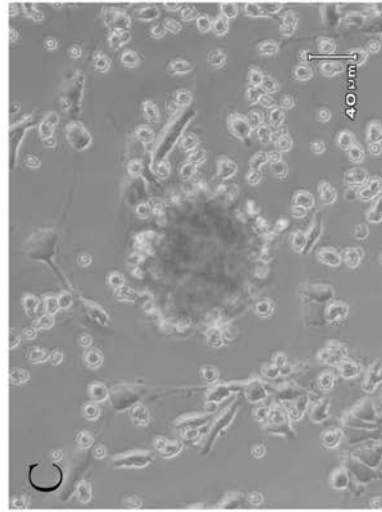
【 図 2 1 】



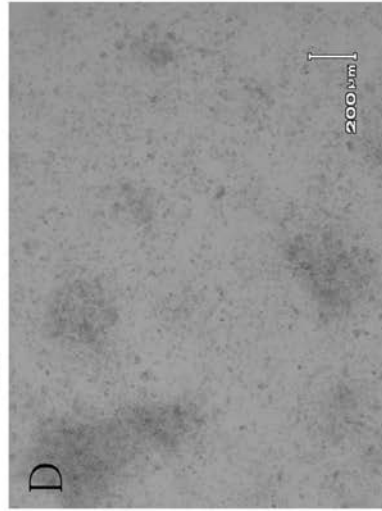
血清 + FK506 x40



血清 + anti-CD28 x40

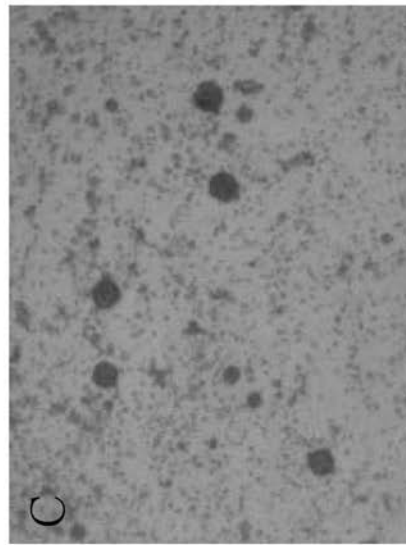
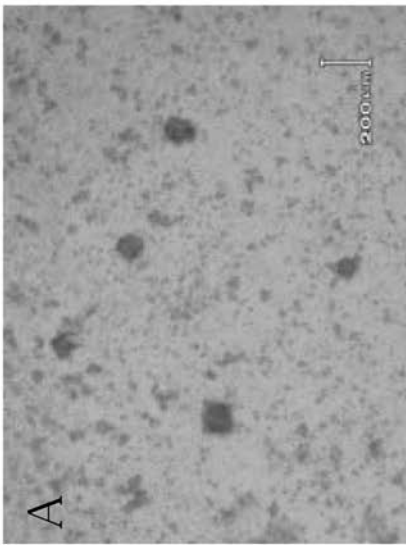
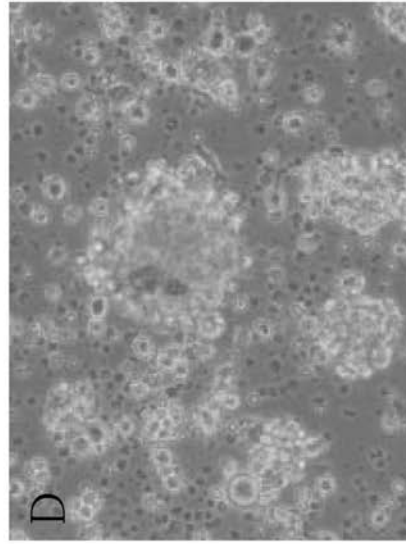
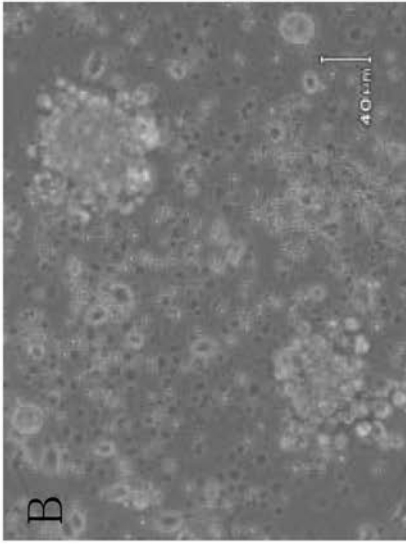


血清 + anti-ICOS x200



血清のみ x40

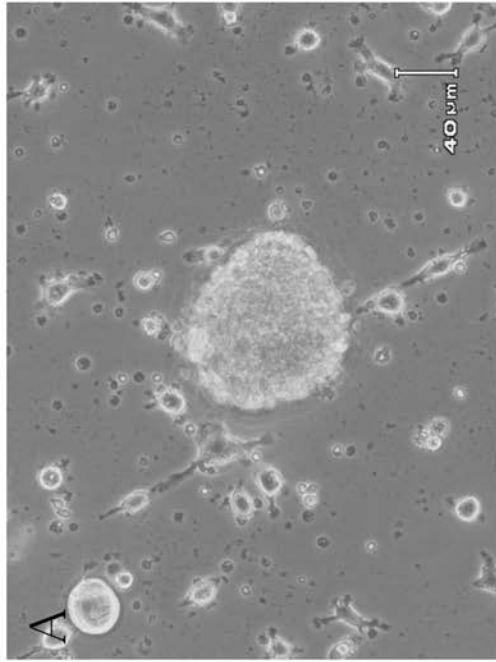
【 図 2 2 】



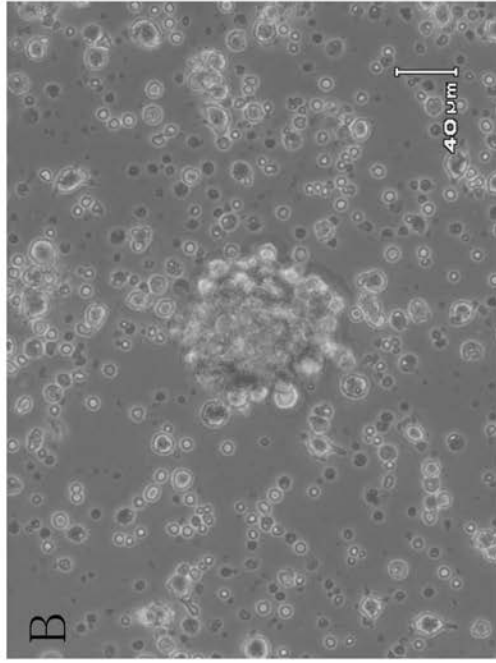
培養  
5日目

培養  
7日目

培養9日目



CINC-1 + FK506



CINC-1のみ

## フロントページの続き

- (72)発明者 田口 明彦  
日本国大阪府豊中市新千里東町2 - 4 - D5 - 506
- (72)発明者 芳川 浩男  
日本国兵庫県西宮市甲陽園山王町1 - 8

審査官 中村 正展

- (56)参考文献 国際公開第03/038075 (WO, A1)  
国際公開第03/035855 (WO, A1)  
J. Cell Sci., 2004年, Vol. 117, 4411-4422  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001年, vol. 98, 4710-4715  
Stroke, 2002年, vol. 33, 1362-1368  
J. Clin. Invest., 2004年, Vol. 114, 330-338  
Nature, 1994年, vol. 371, 336-339  
Brain Res., 1999年, vol. 839, 283-291  
Ann. Hematol., 1995年, Vol. 71, 301-306

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 5/00- 5/28  
A01K 67/027  
C12N 15/00-15/90  
JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)  
医学・薬学予稿集全文データベース  
MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
CA/CONFSCI/SCISEARCH(STN)  
WPIDS(STN)  
PubMed