

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5240715号  
(P5240715)

(45) 発行日 平成25年7月17日(2013.7.17)

(24) 登録日 平成25年4月12日(2013.4.12)

(51) Int. Cl. F I  
**A 6 1 K 35/12 (2006.01)** A 6 1 K 35/12  
**A 6 1 P 13/12 (2006.01)** A 6 1 P 13/12  
**A 6 1 P 13/10 (2006.01)** A 6 1 P 13/10  
**A 6 1 P 19/10 (2006.01)** A 6 1 P 19/10

請求項の数 9 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2008-528826 (P2008-528826)	(73) 特許権者	504139662 国立大学法人名古屋大学
(86) (22) 出願日	平成19年8月7日(2007.8.7)		愛知県名古屋市千種区不老町1番
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/065431	(74) 代理人	100114362 弁理士 萩野 幹治
(87) 国際公開番号	W02008/018450	(72) 発明者	尾崎 武徳 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大 学法人名古屋大学内
(87) 国際公開日	平成20年2月14日(2008.2.14)	(72) 発明者	安田 香 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大 学法人名古屋大学内
審査請求日	平成22年6月4日(2010.6.4)	(72) 発明者	丸山 彰一 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大 学法人名古屋大学内
(31) 優先権主張番号	特願2006-216234 (P2006-216234)		
(32) 優先日	平成18年8月8日(2006.8.8)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2007-30456 (P2007-30456)		
(32) 優先日	平成19年2月9日(2007.2.9)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有する細胞製剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

脂肪組織から分離した細胞集団を低血清条件下で培養したときに増殖した、CD34陰性、CD90陽性及びCD117陰性の脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有し、尿細管障害を伴う急性若しくは慢性腎不全、腹圧性尿失禁又は骨粗しょう症治療用の細胞製剤であって、尿細管障害を伴う急性若しくは慢性腎不全の治療には腎皮膜下に投与され、腹圧性尿失禁の治療には膀胱頸部に投与され、骨粗しょう症の治療には経静脈投与される、細胞製剤。

【請求項2】

前記脂肪組織由来多分化能幹細胞が、脂肪組織から分離した細胞集団を800~1500rpm、1~10分間の条件下で遠心処理したときに沈降する沈降細胞集団を低血清条件下で培養したときに増殖した細胞である、請求項1に記載の細胞製剤。

【請求項3】

前記低血清条件が、培養液中の血清濃度が5%(V/V)以下の条件である、請求項1又は2に記載の細胞製剤。

【請求項4】

前記沈降細胞集団が、以下の(a)又は(b)の沈降細胞集団である、請求項1に記載の細胞製剤：

(a) 脂肪組織をプロテアーゼ処理した後、濾過処理に供し、次いで濾液を遠心処理することによって沈渣として回収される沈降細胞集団；

(b) 脂肪組織をプロテアーゼ処理した後、濾過処理を経ることなく遠心処理することによって沈渣として回収される沈降細胞集団。

【請求項 5】

前記プロテアーゼがコラゲナーゼである、請求項 4 に記載の細胞製剤。

【請求項 6】

前記遠心処理が、800～1500rpm、1～10分間の条件下で実施される、請求項 4 に記載の細胞製剤。

【請求項 7】

前記脂肪組織がヒトの脂肪組織である、請求項 1～6 のいずれかに記載の細胞製剤。

【請求項 8】

凍結状態である、請求項 1～7 のいずれかに記載の細胞製剤。

【請求項 9】

尿細管障害を伴う急性若しくは慢性腎不全、腹圧性尿失禁又は骨粗しょう症治療用の細胞製剤を製造するための、脂肪組織から分離した細胞集団を低血清条件下で培養したときに増殖した、CD34 陰性、CD90 陽性及びCD117 陰性の脂肪組織由来多分化能幹細胞の使用であって、

前記細胞製剤は、尿細管障害を伴う急性若しくは慢性腎不全の治療には腎皮膜下に投与され、腹圧性尿失禁の治療には膀胱頸部に投与され、骨粗しょう症の治療には経静脈投与される、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は細胞製剤に関する。詳しくは、本発明は虚血性疾患、腎機能障害、創傷、尿失禁又は骨粗しょう症に対する処置に有効な細胞製剤に関する。

【背景技術】

【0002】

様々な細胞に分化することが可能な多分化能幹細胞を利用して、損傷を受けた組織を再建しようとする試みが世界的な規模で行われている。例えば、多分化能幹細胞の一つである間葉系幹細胞 (MSCs) は骨細胞、軟骨細胞、心筋細胞など、様々な細胞への分化能を有し、その臨床応用に注目が集まっている。従来、多分化能幹細胞は一般に骨髄から採取されていた。しかしながら、骨髄中に含まれる多分化能幹細胞の量は少なく、臨床応用を視野にいれば、十分な細胞数を得るために全身麻酔下で数百mlもの骨髄を採取しなければならない場合も想定され、患者への負担が大きい。少ない量の骨髄液から必要な量の多分化能幹細胞を得ることを可能にする培養技術も開発されているが、それには通常大量の血清 (例えば10%程度) が必要とされる。このことが、臨床応用する際に重要な、異種動物原料を完全に排斥した製造プロセスの確立にとって足枷となっている。尚、骨髄由来多分化能幹細胞については様々な臨床応用の可能性が検討されており、例えば腎虚血再灌流障害に対して間葉系幹細胞が有効であることが示された (非特許文献 1、2)。

最近になって、多分化能幹細胞源として脂肪組織が有望であることがいくつかの研究グループによって報告された (非特許文献 3)。また、脂肪組織から分離した細胞を10%FCS含有培養液で培養することで増殖した間葉系幹細胞が下肢虚血の病変改善に有効であることが示された (非特許文献 4)。しかしながら、10%という大量の血清の使用は、臨床応用を視野にいれたときに大きな問題となる。一方、北川らによって、脂肪組織より、多分化能を示す細胞集団を簡便な操作で大量に調製することが可能であることが報告されるとともに、得られた細胞が脂肪組織への分化能を有し、脂肪組織の再建に有効であることが示された (特許文献 1)。

【特許文献 1】国際公開第 2006/006692 A 1号パンフレット

【非特許文献 1】Am J Physiol Renal Physiol 289:F31-F42,2005

【非特許文献 2】Mesenchymal Stem Cells Are Renotropic, Helping to Repair the Kidney and Improve Function in Acute Renal Failure. J Am Soc Nephrol : 15 1794-1804

10

20

30

40

50

, 2004

【非特許文献3】 Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells. Circulation 109:1292-1298, 2004

【非特許文献4】 Circulation. 2004;109:656-663

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

簡便な操作で大量に採取が可能であることや採取の際の患者への負荷が少ないことなどの理由から、骨髄よりも脂肪組織の方が多分化能幹細胞源として有望であると考えられ、その臨床応用への期待が高まっている。このように再生医療において脂肪組織は大きな可能性を秘める材料であるものの、これまでに脂肪組織由来の多分化能幹細胞を用いて実際に組織の再建に成功したとの報告は少なく、その有効な用途が明らかにされることが切望されていた。

10

そこで本発明は、脂肪組織由来の多分化能幹細胞の新規な用途を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0004】

上記課題を解決すべく本発明者らはいくつかの疾患を選択し、それらに対する脂肪組織由来多分化能幹細胞の有効性を検証した。その結果、下肢虚血動物モデル、腎機能障害動物モデル、創傷動物モデル、尿失禁動物モデル、骨粗しょう症動物モデルを用いた各移植実験によって、脂肪組織由来多分化能幹細胞が組織の再建を良好に促し、高い治療効果を発揮することが確認された。この知見によって、これらの疾患に関して、脂肪組織由来多分化能幹細胞の臨床応用の途が拓かれた。一方、本発明者らは、脂肪組織由来多分化能幹細胞を含む細胞集団（SVF画分）の新たな調製法の開発に成功するとともに、SVF画分の凍結・融解に対する耐性が高いことを明らかにした。

20

主として上記成果に基づき、本発明は以下の細胞製剤などを提供する。

[1] 脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有し、虚血性疾患、腎機能障害、創傷、尿失禁又は骨粗しょう症に対する細胞製剤。

[2] 前記脂肪組織由来多分化能幹細胞が、脂肪組織から分離した細胞集団を低血清条件下で培養したときに増殖した細胞である、[1]に記載の細胞製剤。

30

[3] 前記脂肪組織由来多分化能幹細胞が、脂肪組織から分離した細胞集団を800~1500rpm、1~10分間の条件下で遠心処理したときに沈降する沈降細胞集団を構成する細胞、又は前記沈降細胞集団を低血清条件下で培養したときに増殖した細胞である、[1]に記載の細胞製剤。

[4] 前記低血清条件が、培養液中の血清濃度が5%(V/V)以下の条件である、[2]又は[3]に記載の細胞製剤。

[5] 前記脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有する細胞集団である、以下の(a)又は(b)の沈降細胞集団を含有する、[1]に記載の細胞製剤：

(a) 脂肪組織をプロテアーゼ処理した後、濾過処理に供し、次いで濾液を遠心処理することによって沈渣として回収される沈降細胞集団；

40

(b) 脂肪組織をプロテアーゼ処理した後、濾過処理を経ることなく遠心処理することによって沈渣として回収される沈降細胞集団。

[6] 前記プロテアーゼがコラゲナーゼである、[5]に記載の細胞製剤。

[7] 前記遠心処理が、800~1500rpm、1~10分間の条件下で実施される、[5]に記載の細胞製剤。

[8] 前記脂肪組織がヒトの脂肪組織である、[1]~[7]のいずれかに記載の細胞製剤。

[9] 凍結状態である、[1]~[8]のいずれかに記載の細胞製剤。

[10] 以下のステップ(1)~(3)を含む、沈降細胞集団の調製法：

(1) 脂肪組織をプロテアーゼ処理するステップ；

50

(2) 前記ステップの後、濾過処理を経ることなく遠心処理するステップ；

(3) 沈渣を沈降細胞集団として回収するステップ。

[11] 以下のステップ(4)を更に含む、[10]に記載の調製法：

(4) 回収した沈降細胞集団を凍結するステップ。

[12] 虚血性疾患、腎機能障害、創傷、尿失禁又は骨粗しょう症に対する細胞製剤を製造するための脂肪組織由来多分化能幹細胞の使用。

[13] 虚血性疾患、腎機能障害、創傷、尿失禁又は骨粗しょう症に対する細胞製剤を製造するための、請求項5に記載の沈降細胞集団の使用。

[14] 虚血性疾患、腎機能障害、創傷、尿失禁又は骨粗しょう症の患者に対して、脂肪組織由来多分化能幹細胞を投与することを含む治療法。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

本発明の第1の局面は特定の疾患に適用される細胞製剤に関する。本発明の細胞製剤は脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有する。好ましくは、本発明の細胞製剤は細胞成分として脂肪組織由来多分化能幹細胞のみを含有する。本発明において「脂肪組織由来多分化能幹細胞」とは脂肪組織を出発材料として調製された多分化能幹細胞をいう。本発明の脂肪組織由来多分化能幹細胞は、分離、精製、培養、濃縮、回収等の工程の中の一つ以上を経ることによって、単離された状態に調製される。ここでの「単離された状態」とは、その本来の環境（即ち生体の一部を構成した状態）から取り出された状態、即ち人為的操作によって本来の存在状態と異なる状態で存在していることを意味する。

【0006】

(適用疾患)

本発明の細胞製剤は虚血性疾患、腎機能障害、創傷、尿失禁又は骨粗しょう症に対して使用される。本発明において「虚血性疾患、腎機能障害、創傷、尿失禁又は骨粗しょう症に対する」とは、本発明の細胞製剤の適用対象疾患が虚血性疾患、腎機能障害、創傷、尿失禁又は骨粗しょう症であることを意味する。換言すれば、本発明の細胞製剤は虚血性疾患の予防又は治療、腎機能障害の予防又は治療、創傷の治療、尿失禁の予防又は治療、或いは、骨粗しょう症の予防又は治療に使用される。従って通常は、虚血性疾患の患者（又は潜在的患者）、腎機能障害の患者（又は潜在的患者）、創傷を有する患者、尿失禁の患者（又は潜在的患者）、又は骨粗しょう症の患者（又は潜在的患者）に対して本発明の細胞製剤が投与されることになる。但し、その効果を確認・検証することなどの実験目的で本発明の細胞製剤を使用することもできる。

【0007】

ところで、虚血は臓器や組織への血流の停止や血流量の低下により引き起こされる。虚血時間が短ければ血流の再開（再灌流）によって臓器の機能は回復する。虚血時間が長いと再灌流により臓器等が不可逆的な損傷（虚血再灌流障害）を受け、機能不全に陥る。このような虚血又は虚血再灌流が原因となる疾患のことを「虚血性疾患」と呼ぶ。例えば閉塞性動脈硬化症（下肢閉塞性動脈硬化症など）、虚血性心疾患（心筋梗塞、狭心症など）、脳血管障害（脳梗塞など）、肝臓の虚血障害等が虚血性疾患に該当する。本発明の細胞製剤の適用対象疾患の一つはこのような虚血性疾患である。好ましい適用対象は閉塞性動脈硬化症又は虚血性心疾患であり、特に好ましい適用対象は閉塞性動脈硬化症である。

【0008】

本発明において「腎機能障害」とは、腎組織が何らかの傷害を受け、腎臓が本来の機能を果たさなくなった状態をいう。例えば急性腎不全、慢性腎不全、溶血性尿毒症候群、急性尿細管壊死、間質性腎炎、急性乳頭壊死、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、膠原病に伴う腎炎、血管炎に伴う腎障害、腎盂炎、腎硬化症、薬剤性腎障害、移植に伴う腎障害などが腎機能障害に該当する。本発明の細胞製剤の適用対象疾患の一つはこのような腎機能障害である。好ましい適用対象は急性腎不全又は慢性腎不全であり、特に好ましい適用対象は急性腎不全である。

【0009】

10

20

30

40

50

「創傷」とは体表面組織が物理的な損傷を受けた状態をいう。創傷は外的要因又は内的要因によって引き起こされる。創傷は形状や要因によって切創、裂創、刺創、咬創、挫創、挫傷、擦過傷、熱傷、褥瘡などに分類される。本発明の細胞製剤が適用される創傷の種類は特に限定されない。また、創傷の部位も特に限定されるものではない。

【0010】

「尿失禁」とは、排尿機能（蓄尿及び排尿）が正常な状態を逸し、自分の意志とは無関係に尿が漏れてしまう状態をいう。尿失禁は真性尿失禁及び仮性尿失禁（腹圧性尿失禁、切迫性尿失禁、反射性尿失禁など）に大別される。

【0011】

「骨粗しょう症」とは、骨量・骨密度の減少によって骨が脆くなる疾患であり、骨変形や骨折の原因となる。骨粗しょう症はその原因によって原発性骨粗鬆症（退行期骨粗鬆症、特発性骨粗鬆症）及び続発性骨粗鬆症（特定の病気（関節リウマチ、糖尿病、甲状腺機能亢進症、性機能異常など）や薬剤によっておこる骨粗鬆症）に分類される。

【0012】

（投与対象、投与方法）

本発明の細胞製剤が投与される対象はヒト、又はヒト以外の哺乳動物（ペット動物、家畜、実験動物を含む。具体的には例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、サル、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ等）である。好ましくは、本発明の細胞製剤はヒトに対して使用される。

本発明の細胞製剤は好ましくは患部への局所注入により投与される。但し、本発明の細胞製剤中の有効成分である多分化能幹細胞が患部に送達される限り、投与経路はこれに限られるものではない。投与スケジュールとしては例えば一日一回～数回、二日に一回、或いは三日に一回などを採用できる。投与スケジュールの作成においては、対象（レシピエント）の性別、年齢、体重、病態などを考慮することができる。

【0013】

（脂肪組織由来多分化能幹細胞の調製法）

以下、脂肪組織由来多分化能幹細胞の調製法の一例を説明する。

（1）脂肪組織からの細胞集団の調製

脂肪組織は動物から切除、吸引などの手段で採取される。ここでの用語「動物」はヒト、及びヒト以外の哺乳動物（ペット動物、家畜、実験動物を含む。具体的には例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、サル、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ等）を含む。

免疫拒絶の問題を回避するため、本発明の細胞製剤を適用する対象（レシピエント）と同一の個体から脂肪組織を採取することが好ましい。但し、同種の動物の脂肪組織（他家）又は異種動物の脂肪組織の使用を妨げるものではない。

脂肪組織として皮下脂肪、内臓脂肪、筋肉内脂肪、筋肉間脂肪を例示できる。この中でも皮下脂肪は局所麻酔下で非常に簡単に採取できるため、採取の際の患者への負担が少なく、好ましい細胞源といえる。尚、通常は一種類の脂肪組織を用いるが、二種類以上の脂肪組織を併用することも可能である。また、複数回に分けて採取した脂肪組織（同種の脂肪組織でなくてもよい）を混合し、以降の操作に使用してもよい。

脂肪組織の採取量は、ドナーの種類や組織の種類、或いは必要とされる多分化能幹細胞の量を考慮して定めることができ、例えば培養するのであれば0.5gから可能であり、培養しないのであれば200g程度である。ヒトをドナーとする場合にはドナーへの負担を考慮して一度に採取する量を約1000g以下にすることが好ましい。

採取した脂肪組織は、必要に応じてそれに付着した血液成分の除去及び細片化を経た後、以下の酵素処理（プロテアーゼ処理）に供される。尚、脂肪組織を適当な緩衝液や培養液中で洗浄することによって血液成分を除去することができる。

【0014】

酵素処理は、脂肪組織をコラゲナーゼ、トリプシン、ディスパーゼ等のプロテアーゼによって消化することにより行う。このような酵素処理は当業者に既知の手法及び条件によ

10

20

30

40

50

り実施すればよい(例えば、R.I. Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4th Edition, A John Wiley & Sons Inc., Publication参照)。好ましくは、後述の実施例に記載の手法及び条件によってここでの酵素処理を行う。

以上の酵素処理によって得られた細胞集団は、多分化能幹細胞、内皮細胞、間質細胞、血球系細胞、及び/又はこれらの前駆細胞等を含む。細胞集団を構成する細胞の種類や比率などは、使用した脂肪組織の由来や種類に依存する。

#### 【0015】

##### (2) 沈降細胞集団(SVF画分:stromal vascular fractions)の取得

細胞集団は続いて遠心処理に供される。遠心処理による沈渣を沈降細胞集団(本明細書では「SVF画分」ともいう)として回収する。遠心処理の条件は、細胞の種類や量によって異なるが、例えば1~10分間、800~1500rpmである。尚、遠心処理に先立ち、酵素処理後の細胞集団を濾過等に供し、その中に含まれる酵素未消化組織等を除去しておくことができる。濾過には例えば孔径100 $\mu$ m~2000 $\mu$ m、好ましくは、培養を介す場合、孔径100 $\mu$ m、培養を介さない場合250~2000 $\mu$ mのフィルターを使用すればよい。

ここで得られた「沈降細胞集団(SVF画分)」は、多分化能幹細胞、内皮細胞、間質細胞、血球系細胞、及び/又はこれらの前駆細胞等を含む。沈降細胞集団を構成する細胞の種類や比率などは、使用した脂肪組織の由来や種類、酵素処理の条件などに依存する。SVF画分は、CD34陽性且つCD45陰性の細胞集団と、CD34陽性且つCD45陰性の細胞集団を含む点によって特徴付けられる(国際公開第2006/006692A1号パンフレット)。

#### 【0016】

##### (3) 低血清培養(低血清培地での選択的培養)

この工程では、沈降細胞集団を低血清条件下で培養し、目的の多分化能幹細胞を選択的に増殖させる。低血清培養法では用いる血清が少量で済むことから、本発明の細胞製剤を投与する対象(レシピエント)自身の血清を使用することが可能となる。即ち、自己血清を用いた培養が可能となる。自己血清を使用することによって、製造工程中から異種動物材料を排斥し、安全性が高く且つ高い治療効果を期待できる細胞製剤が提供される。

ここでの「低血清条件下」とは5%以下の血清を培地中に含む条件である。好ましくは2%(V/V)以下の血清を含む培養液中で沈降細胞集団を培養する。更に好ましくは、2%(V/V)以下の血清と1~100ng/mlの線維芽細胞増殖因子-2を含有する培養液中で沈降細胞集団を培養する。

血清はウシ胎仔血清に限られるものではなく、ヒト血清や羊血清等を用いることができる。好ましくはヒト血清、更に好ましくは本発明の細胞製剤を適用する対象の血清(即ち自己血清)を用いる。

#### 【0017】

培地は、使用の際に含有する血清量が低いことを条件として、通常の動物細胞培養用の培地を使用することができる。例えば、Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM)(日水製薬株式会社等)、 $\alpha$ -MEM(大日本製薬株式会社等)、DMED:Ham's F12混合培地(1:1)(大日本製薬株式会社等)、Ham's F12 medium(大日本製薬株式会社等)、MCDB201培地(機能性ペプチド研究所)等を使用することができる。

#### 【0018】

以上の方法で培養することによって、多分化能幹細胞を選択的に増殖させることができる。また、上記の培養条件で増殖する多分化能幹細胞は高い増殖活性を持つので、継代培養によって、本発明の細胞製剤に必要な数の細胞を容易に調製することができる。

尚、SVF画分を低血清培養することによって選択的に増殖する細胞はCD13、CD90及びCD105陽性であり、CD31、CD34、CD45、CD106及びCD117陰性である(国際公開第2006/006692A1号パンフレット)。

#### 【0019】

##### (4) 細胞の回収

上記の低血清培養によって選択的に増殖した細胞を回収する。回収操作は常法に従えばよく、例えば酵素処理(トリプシンやディスパーゼ処理)後の細胞をセルスクレイパーや

10

20

30

40

50

ピペットなどで剥離することによって容易に回収することができる。また、市販の温度感受性培養皿などを用いてシート培養した場合は、酵素処理をせずにそのままシート状に細胞を回収することも可能である。

#### 【0020】

##### (5) 製剤化

回収された多分化能幹細胞を生理食塩水や適当な緩衝液（例えばリン酸系緩衝液）等に懸濁することによって細胞製剤を得ることができる。所望の治療効果が発揮されるように、一回投与分の量として例えば $1 \times 10^6$ 個～ $1 \times 10^8$ 個の細胞を含有させるとよい。細胞の含有量は、適用対象（レシピエント）の性別、年齢、体重、患部の状態、細胞の状態などを考慮して適宜調整することができる。

10

多分化能幹細胞の他、細胞の保護を目的としてジメチルスルフォキシド（DMSO）や血清アルブミン等、細菌の混入を阻止する目的で抗生物質等、細胞の活性化や分化を促すことを目的としたビタミン類やサイトカイン等を本発明の細胞製剤に含有させてもよい。さらに、製剤上許容される他の成分（例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水など）を本発明の細胞製剤に含有させることにしてもよい。

#### 【0021】

以上の方法では、SVF画分を低血清培養して増殖した細胞を用いて細胞製剤が構成されるが、脂肪組織から得た細胞集団を直接（SVF画分を得るための遠心処理を介することなく）低血清培養することによって増殖した細胞を用いて細胞製剤を構成することもできる。即ち本発明の一態様では、脂肪組織から得た細胞集団を低血清培養したときに増殖した細胞を有効成分とした細胞製剤が提供される。

20

#### 【0022】

本発明の一態様では、選択的培養（上記（4）及び（5））によって得られる多分化能幹細胞ではなく、SVF画分（脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有する）をそのまま用いて細胞製剤を構成する。従って、この態様の細胞製剤は、（a）脂肪組織をプロテアーゼ処理した後、濾過処理に供し、次いで濾液を遠心処理することによって沈渣として回収される沈降細胞集団（SVF画分）、又は（b）脂肪組織をプロテアーゼ処理した後、濾過処理を経ることなく遠心処理することによって沈渣として回収される沈降細胞集団（SVF画分）を含有することになる。

30

尚、ここでの「そのまま用いて」とは、選択的培養を経ることなく細胞製剤の有効成分として用いること、を意味する。

#### 【0023】

SVF画分と、SVF画分を選択的培養して得られる細胞（多分化能幹細胞）を比較すれば、SVF画分は（1）調製に要する時間が短い、（2）調製に要する費用が少ない、（3）培養を介さないため癌化や感染のリスクが少ない、（4）不均質な（heterogeneous）細胞集団であり組織の再構築に有利であると考えられる、（5）より未分化な細胞集団であることから移植後に移植先の組織に適した細胞へと分化することを期待できる等、多くの利点を有する。

#### 【0024】

40

本発明者らはSVF画分の凍結・融解に対する耐性を調べた（後述の実施例を参照）。その結果、凍結・融解によって細胞増殖能、サイトカイン分泌能、及び細胞表面抗原が実質的な影響を受けなかった。つまり、凍結・融解処理に対して高い耐性をSVF画分が示した。換言すれば、その特性の実質的な変化を伴うことなくSVF画分を凍結保存することが可能であるとの知見が得られた。この知見に基づけば、細胞製剤による治療を繰り返し（2回以上）実施する場合において、治療の度に脂肪を採取しSVF画分を調製する必要がなく、患者及び施術者の負担が軽減し、細胞製剤の調製に要する時間及び手間も削減される。

本発明の一態様では、上記知見に基づき、細胞製剤を構成するSVF画分として凍結保存されたものを使用する。また、本発明の他の一態様では、細胞製剤自体を凍結状態で提供

50

する。

【0025】

本発明者らはSVF画分の調製法についても検討した（後述の実施例を参照）。即ち、脂肪組織のプロテアーゼ処理後に濾過処理を行った上で遠心処理する調製法（従来法）と、脂肪組織のプロテアーゼ処理後に濾過処理を経ることなく遠心処理する調製法（改良法）を比較した。その結果、改良法の方が多くの細胞を得ることが可能であること、及びいずれの方法で得られた沈降細胞集団であっても良好な治療効果を発揮することがわかり、改良法の優位性が示された。改良法によれば、調製時間の短縮化が可能となることはもとより、濾過処理に伴うコンタミネーションの問題もなくなる。

【0026】

本発明は他の局面として、SVF画分の凍結・融解に対する耐性に関する上記知見及びSVF画分の調製法に関する上記知見に基づき、SVF画分の新たな調製法を提供する。本発明の調製法では、採取された脂肪組織をプロテアーゼ処理した後、濾過処理を経ることなく遠心処理し、沈渣を沈降細胞集団（SVF画分）として回収する。遠心処理の条件は例えば1～10分間、800～1500rpmである。本発明の調製法の一態様では、回収した沈降細胞集団（SVF画分）を凍結することにし、凍結状態の沈降細胞集団を得る。ここでの「凍結」の条件としては、細胞の凍結に頻用される条件を採用することができる。例えば、-180℃以下、好ましくは-196℃以下で凍結することにする。

【0027】

本発明の更なる局面では、脂肪組織由来多分化能幹細胞又はSVF画分を、脂肪組織または血中脂肪に影響を及ぼす薬剤のスクリーニングに利用する。例えば、脂肪から分泌される善玉物質の量を指標として薬剤のスクリーニングを行うことができる。具体的には、脂肪組織由来多分化能幹細胞又はSVF画分を被験物質の存在下で培養し、アディポネクチン（脂肪細胞から分泌される善玉物質であり、内蔵脂肪が増えると減少する。また、血管の損傷の修復にも関与する。さらには、メタボリックシンドローム、動脈硬化、或いはがんの進行の遅延にも有効であるとされる）の産生量を評価する。この評価系は、善玉脂肪の増加促進作用を発揮する薬剤を見出すために有効といえる。

また、脂肪組織由来多分化能幹細胞又はSVF画分を被験物質の存在下で培養し、細胞増殖率に対する被験物質の効果・影響を評価する。この評価系は、脂肪増加促進又は抑制の効果を発揮する薬剤を見出すために有効といえる。

被験物質としては様々な分子サイズの有機化合物（核酸、ペプチド、タンパク質、脂質（単純脂質、複合脂質（ホスホグリセリド、スフィンゴ脂質、グリコシルグリセリド、セレブロシド等）、プロスタグランジン、イソプレノイド、テルペン、ステロイド等））又は無機化合物を用いることができる。被験物質は天然物由来であっても、或いは合成によるものであってもよい。後者の場合には例えばコンビナトリアル合成の手法を利用して効率的なスクリーニング系を構築することができる。尚、細胞抽出液、培養上清などを被験物質として用いてもよい。

【実施例1】

【0028】

< 脂肪由来多分化能幹細胞の調製 >

1. 脂肪組織からの沈降細胞集団（SVF画分）の調製

以下の手順でヒト脂肪組織からSVF画分を調製した。

- (1) ヒト22歳男性より、手術時に皮下脂肪をメスで切除することによって採取した。
- (2) DMEM/F12液（ダルベッコ変法イーグル培地とF12培地を等量混合した培地（シグマ））30mlにて脂肪組織を3回洗浄し、付着した血液などを除去した。
- (3) 滅菌培養皿内で、脂肪組織を手術用メスで細片化した。
- (4) 50mlの遠心チューブ（ファルコン）に脂肪組織を入れ、その重量を計測した（約1g）。
- (5) 1mg/mlのコラゲナーゼtype1（Worthington）溶液を上記の遠心チューブに2ml入れた後、37℃、120回/minの条件下、1時間振盪させた。



(6)続いて、遠心チューブにDMEM/F12液を10ml入れ、ピペティングした。

(7)ピペティング後の細胞懸濁液を孔径100 $\mu$ mのフィルター（ファルコン）で濾過した。

(8)得られた濾液を常温で1200rpm、5分間遠心処理した。沈渣を回収し、SVF画分とした。

【0029】

## 2. SVF画分の低血清培養

以下の手順でSVF画分を低血清培養した。

(1)SVF画分中の有核細胞 $3.8 \times 10^5$ 個を6mlの低血清培養液に懸濁し、ファイブロネクチンコート25cmフラスコ（ファルコン）に播種した。低血清培養液は以下の通り調製した（a~e）。

(a)DMEM（日水製薬）5.7g、MCDB201（シグマ）7g、L-グルタミン（シグマ）0.35g、 $\text{NaHCO}_3$ （シグマアルドリッチジャパン）1.2g、0.1mMアスコルビン酸（和光純薬工業）1ml、抗生物質（100,000units/mlペニシリン及び100mg/mlストレプトマイシン）0.5mlを980mlの蒸留水に溶解する。

(b)10N NaOHにてpHを7.2に調整する。

(c)濾過・滅菌する。

(d)リノール酸-アルブミン（シグマ）10mlと100 $\times$ ITS（インスリン10mg、トランスフェリン5.5mg、亜セレン酸ナトリウム5 $\mu$ g、シグマ）10mlを添加する。

(e)100 $\mu$ g/ml bFGF（ペプロテック）1 $\mu$ lを加える（最終濃度10ng/ml）。

【0030】

(2)2日毎に培地を全量交換した。

(3)コンフルエントに達したら1mM EDTA含有PBSで洗浄後、0.05~0.25%トリプシン溶液で処理して細胞を剥離して回収し、回収した細胞を $8 \times 10^3$ 個/cm<sup>2</sup>の密度で同様にファイブロネクチンコートプレート（シグマ社のヒトファイブロネクチンを用いて作成）に播種した。

(4)以上の継代培養を必要に応じて繰り返した（以降の実験では5~6継代後の細胞を使用した）。

【0031】

尚、F344ラット（日本エスエルシー株式会社より入手）の皮下脂肪からも全く同様の方法（SVF画分の調製の後、低血清培養）で、脂肪組織由来多分化能幹細胞を調製した。

【実施例2】

【0032】

<ヒト脂肪組織由来多分化能幹細胞の下肢虚血に対する効果>

### 1. 下肢虚血モデルの作製

10週齢のメスCB-17 SCIDマウス（日本クレア株式会社より入手）の左足から大腿部にかけて除毛クリームにて除毛した。除毛部分の皮膚を切開し、左大腿動静脈を結さつ切離することによってマウス下肢虚血モデルとした。このモデルは高率に下肢が壊死して脱落する。

【0033】

### 2. 実験（治療）プロトコール

(1)実施例1の方法で調製したヒト脂肪組織由来多分化能幹細胞 $6.7 \times 10^6$ 個を300 $\mu$ lのDME M培地（シグマ）に懸濁した後、マウス下肢虚血モデルの左大腿及び下腿の筋肉内へ注入した（治療群）。コントロール群にはDMEM培地のみを同一条件下で注入した。

(2)処置後、左下肢の壊死、脱落を経時的に観察した。尚、左下肢の一部の脱落若しくは壊死により骨が露出した場合を下肢死と判定した。

【0034】

### 3. 結果

治療群及びコントロール群の下肢累積生存率を図1に示す。図1のグラフに示されるように、治療群では下肢生存率の明らかな改善が認められる。尚、処置後7日目の各マウスモデル（代表例）の状態を図2に示す。コントロール群では左下肢が黒く壊死しているが

10

20

30

40

50

、治療群では血色がよい。

以上のように、マウス下肢虚血モデルに対して脂肪組織由来多分化能幹細胞を用いた治療実験を行ったところ、治療群では下肢生存率に明らかな改善が認められた。この結果より、脂肪組織由来多分化能幹細胞治療は下肢虚血病変に有効であることが示された。

#### 【実施例 3】

##### 【0035】

< ヒト脂肪組織由来多分化能幹細胞の腎不全に対する効果 1 >

##### 1. ラット急性腎不全モデルの作製

16週齢のオスのヌードラット（日本クレア株式会社より入手）に対して葉酸250mg/kgを腹腔内投与し、ラット急性腎不全モデルとした。この葉酸腎不全モデルは急性尿細管障害による急性腎不全モデルであり、数々の報告がなされている確立したモデルである。このモデルでは腎機能改善後も一部の間質に線維化などの慢性の障害を残すと報告されている（図3）。

##### 【0036】

##### 2. 実験（治療）プロトコール

(1) 実施例1の方法で調製したヒト脂肪組織由来多分化能幹細胞 $3.8 \times 10^6$ 個を2.0mlの生理食塩水に懸濁した後、ラット急性腎不全モデルに対して左内頸動脈より投与した（治療群）。この際、内頸動脈よりカテーテルを挿入し、下行大動脈内へ細胞を投与することにし、細胞がより腎臓へ到達しやすいように工夫した。尚、コントロール群には同量の生理食塩水を同一条件下で投与した。

(2) 上記処置後0日、1日、2日、4日、13日に採血を行い、血中尿素窒素（BUN）を測定した。

(3) 上記処置後13日目にラットを屠殺し、腎組織を採取し、PAS染色およびMasson trichrome

染色にて腎組織を評価した。

##### 【0037】

##### 3. 結果

血中尿素窒素の測定結果を図4に示す。治療群では有意に腎機能の改善が認められる。一方、PAS染色及びMasson trichrome染色の結果をそれぞれ図5及び図6に示す。コントロール群では尿細管の拡張や尿細管上皮細胞の脱落などが認められるが、治療群ではそのような像はほとんど認められない（PAS染色）。また、コントロール群では尿細管の萎縮や間質の線維化が認められるが、治療群ではそのような所見はほとんど認められない（Masson trichrome染色）。

以上のように、ラット急性腎不全モデルに対して脂肪組織由来多分化能幹細胞を用いた治療実験を行ったところ、治療群では腎機能に有意な改善が認められた。さらに、急性腎不全治癒後に残存する慢性の腎障害（腎間質の線維化など）も治療群では軽減していた。以上の結果より、脂肪組織由来多分化能幹細胞治療が急性腎不全に有効であることが示された。

#### 【実施例 4】

##### 【0038】

< ヒト脂肪組織由来多分化能幹細胞の腎不全に対する効果 2 >

##### 1. ラット急性腎不全モデルの作製

14週齢のオスのヌードラット（日本クレア株式会社より入手）の右腎臓を摘出し、1週間後に葉酸200mg/kgを尾静脈より投与し、急性腎不全モデルを作製した。

##### 【0039】

##### 2. 実験（治療）プロトコール

(1) 葉酸投与7時間後に、実施例1の方法で調製したヒト脂肪組織由来多分化能幹細胞 $4.0 \times 10^6$ 個を、ラット急性腎不全モデルの左腎皮膜下に注入した（治療群）。コントロールは生理食塩水のみを注入した。

(2) 上記処置後0日、1日、2日、6日、14日に採血を行い、血中尿素窒素（BUN）を測定した

10

20

30

40

50

。(3)上記処置後3日目にペンシル型CCDカメラにて腎尿管周囲毛細血管の血流を測定した(図7~9)。

(4)上記処置後14日目にラットを屠殺し、腎組織を採取し、ヒト特異的抗体にて免疫染色を行った。

#### 【0040】

##### 3. 結果

血中尿素窒素の測定結果を図10に示す。治療群ではコントロール群に比べ有意に腎機能の改善を認めた。また、免疫染色の結果(図11)より、投与した細胞の腎実質内への移動はみられず、腎皮膜下に生着していた。尚、腎組織の採取及び免疫染色を処置後1月及び3月にも実施した結果、投与した細胞が長期に亘って腎皮膜下に残存することが示された(図12及び13)。図12は処置後1月目の免疫染色の結果、図13は処置後3月目の免疫染色の結果である。投与した細胞が処置後3月後も腎皮膜下に残存していることがわかる。

以上のように治療群では、投与した細胞が腎皮膜下に良好に生着し、葉酸腎症を改善した。この結果より、脂肪組織由来多分化能幹細胞治療が急性腎不全に有効であることが示された。

一方、図14に示すように、治療群で有意に尿管周囲毛細血管の血流が速かった。注入した細胞が分泌するVEGF等のサイトカインによって腎臓内のNOが増加し、血管拡張し、そして血流が増加したと考えられる。

#### 【実施例5】

#### 【0041】

<ラット脂肪組織由来多分化能幹細胞の創傷に対する効果>

##### 1. ラット皮膚欠損モデルの作製(図15)

7週齢のオスのF344ラットの背部を除毛クリームにて除毛した。1.5cm×1.5cm、厚さ0.45mmの塩化ビニールを除毛箇所のほぼ中央にあて、マーキングした。ポピドンヨードで消毒後、マーキングに沿って皮膚を全層切除し、ラット皮膚欠損モデルとした。

#### 【0042】

##### 2. 実験(治療)プロトコール

(1)実施例1の方法で調製したF344ラット皮下脂肪由来多分化能幹細胞 $1.1 \times 10^7$ 個をDMEM培地(シグマ)で全量が800 $\mu$ lとなるように懸濁した後、ラット皮膚欠損モデルの、切除した皮膚の周囲の皮下に26G注射針を用いて注入した(低血清治療群)。その後、創部にテガダーム(3M社製)を貼布した。尚、F344ラットの皮下脂肪から調製したSVF画分中の有核細胞を高血清条件下(20%FBS含有DMEMを使用)で培養して得られた細胞(高血清培養細胞)を同一の条件下で注入した群(高血清治療群)と、DMEM培地のみを同一の条件下で注入した群(コントロール群)を比較対照とした。

(2)処置後0日、2日、7日、14日、18日に創部の面積を測定した。面積の測定法は次の通りとした。まず、厚さ0.45mmの塩化ビニールシートを創部にあてて創縁をマーキングした後、マークに沿って切り抜く。切り抜かれた塩化ビニールシートの重量を測定し、測定値を面積に換算する。

(3)また、処置後3日の皮膚組織を採取し、組織中のVEGF、HGF濃度をELISA法にて測定した。

#### 【0043】

##### 3. 結果

各群の皮膚欠損エリアの変化を図16のグラフで比較した。また、処置後14日目の創部の状態を図17に示す。低血清治療群(右上)では、コントロール群(左上)に比較して、一週目以降、有意に皮膚欠損エリアの改善が認められた。また、図17から明らかなように、治療群では迅速な創傷治癒が進行し、癒痕組織の状態も良好である。低血清治療群(右上)と高血清治療群(左下)を比較すれば、前者により高い創傷治癒促進効果が認め

られる。

一方、図18のグラフに示すように、低血清治療群ではコントロール群に比べ有意に創部組織中のVEGF濃度の上昇を認めた。HGF濃度については両者の間で差がなかった。尚、創部の免疫染色の結果(図示せず)より、低血清治療群では注入した細胞が処置後14日目においても皮下に残存し、且つ血管へ分化していないことが示された。

以上のように、ラット皮膚欠損モデルに対して脂肪組織由来多分化能幹細胞を用いた治療実験を行ったところ、低血清治療群では有意に創傷治癒の促進が認められた。以上の結果より、脂肪組織由来多分化能幹細胞治療は創傷治癒に有効であることが示された。また、脂肪組織由来多分化能幹細胞は、高血清条件下で培養して得られた細胞に比べ、高い創傷治癒促進効果を発揮することが示された。

10

#### 【実施例6】

##### 【0044】

<ヒト脂肪組織由来多分化能幹細胞のサイトカイン分泌能>

##### 1. 実験材料及び方法

高血清(20%FBS含有DMEM)、bFGF添加高血清(20%FBS及びbFGF(10ng/ml)含有DMEM)、低血清(実施例1で使用したbFGF(10ng/ml)含有低血清培養液)の3種類の培養液でヒト脂肪組織由来SVF画分を培養し、上清中のサイトカインをELISA法にて測定した。コントロール群にはヒト腎線維芽細胞(HEK293)を用いた。実験はすべて4~5代継代培養した細胞を使用した。また、培養は25cm<sup>2</sup>フラスコを用い、培養液は5mlとした。

セミコンフルエントの状態それぞれの培養液を吸引除去し、PBSで2回洗浄後、10%FBS含有DMEMにて24時間培養した。その際、正常酸素と低酸素(1%O<sub>2</sub>)の2群に分けることにした。これは、虚血組織への細胞治療を想定し、低酸素環境下でもサイトカイン分泌が保たれるかどうかを検討するためである。24時間後に培養上清を回収し、ELISA法にてサイトカインを測定した。同時に、トリプシンにて細胞を剥離し、細胞数も計測した。細胞10<sup>6</sup>個当たりのサイトカイン分泌量に基づき比較検討した。

20

##### 【0045】

##### 2. 結果

図19及び20に示すように、低血清培養群はコントロール群に比べ数多くの増殖因子を分泌する。また、低血清培養群では高血清培養群及びbFGF添加高血清培養群に比べVEGF-A分泌量(図21)、FGF-7(KGF)分泌量(図22)及びFGF-2分泌量(図23)が多い。低酸素環境下ではVEGF-Aの分泌量が大幅に増加した。その他のサイトカインについては正常酸素下とほぼ同様の分泌量であった。一方、VEGF-C分泌量及びHGF分泌量は各群の間に差を認めなかった(図24)。低血清培養群はTGF- $\beta$ 、IL-6、IL-10及びIL-8も分泌し、その分泌量は高血清群及びbFGF添加高血清培養群に比べて多い(図25)。

30

以上の通り、脂肪組織由来SVF画分を低血清培養して得られる細胞は従来の培養方法で得られる細胞に比べサイトカイン分泌能が高いことが明らかとなった。即ち、低血清培養により、従来よりもサイトカイン分泌能の非常に高い細胞を選択的に分離増殖できることが明らかとなった。

#### 【実施例7】

##### 【0046】

<ラット脂肪組織由来多分化能幹細胞の尿失禁に対する効果>

##### 1. 実験方法

F344メスラット(体重150g程度)に、実施例1の方法で調製したF344ラット皮下脂肪由来多分化能幹細胞3×10<sup>6</sup>個をDMEM培地(シグマ)で伸展して全量50 $\mu$ lとした後、これを30Gインスリン用注射器(マイジェクター、登録商標)で膀胱頸部に注入した。このように処置したラットを治療群とした。一方、コントロール群のラットには細胞懸濁液の代わりにDMEMを50 $\mu$ l注入した。注入処置から2週間後、下記方法で膀胱内圧を測定した。

まず、各群のラットをウレタン0.8g/kg, i.p.で麻酔した後、排尿反射を消失させる目的で脊髄をT8-9レベルで切断した。開腹後、カテーテル(PE-90)を膀胱内に留置し、膀胱カテーテルの他方の端を生理食塩水のリザーバ(60mlシリンジ)に接続した。生理食塩水

40

50

のリザーバを一定の高さに位置させることで膀胱内圧を90秒間上昇させ、尿道口よりの生理食塩水漏出の有無を観察した。尚、膀胱内圧は2.5 cmH<sub>2</sub>O毎に上昇させ、また、90秒の観察期間後は、一旦、膀胱内圧を0 cmH<sub>2</sub>Oに戻し、その後、次のステップへ移行した。尿道口より生理食塩水の漏出が観察された時の膀胱内圧を漏出時圧 (leak point pressure : LPP) とした。LPPの測定を3回繰り返し、その平均値を各個体の代表値とした。LPP測定を骨盤神経両側切除の前後で行い、それぞれについてスチューデントのt検定 (Student's t-test) を用いて治療群 (細胞注入群) とコントロール群 (培地注入群) との間で平均値を比較検定した。

一方、LPP測定後に膀胱頸部より組織標本を作製し、HE染色及びマッソントリクローム染色に供した。

10

【0047】

## 2. 結果

骨盤神経の切除前及び切除後のいずれにおいても、治療群とコントロール群との間に有意差 ( $p < 0.01$ ) を認めた (図26)。即ち、細胞注入によって、少なくとも器質的に尿道内圧を上昇せしめる状態になったことが示唆された。この結果は、膀胱頸部の壁が何らかの形で肥厚している事を示唆するとともに、壁肥厚による圧上昇の可能性と、筋肉への分化・細胞が放出するサイトカインによる筋収縮力の上昇の可能性を示唆する。

一方、HE染色の結果 (図27)、治療群 (図27左) では尿道12時の位置に脂肪細胞と思われる集塊による、こぶ形成を認めた。マッソントリクローム染色の結果 (図28)、こぶ形成の部位は、大部分が繊維性成分からなる膠原繊維と思われる組織で構成されていた (図28左)。この結果、脂肪由来多分化能幹細胞が膠原繊維を産生している可能性が示唆された。

20

【実施例8】

【0048】

< SVF画分の腎障害に対する効果1 >

### 1. 実験 (治療) プロトコール (図29)

(1) 実施例1に示した方法に従い、F344ラットの皮下脂肪よりSVF画分を調製した。

(2) 1週間前に片腎摘をしたF344ラット (8週齢、オス) に対して0日目にシスプラチン (7mg/kg) を投与し、シスプラチン腎障害ラット (尿管壊死のモデル) とした。1日目にSVF画分 (100  $\mu$ l、細胞数  $1 \times 10^6$ ) を被膜下に注入した (治療群、6匹)。コントロール群 (6匹) には同量の生理食塩水を同一条件で投与した。

30

(3) シスプラチン投与後0日、2日、4日、6日、8日に採血し、血清クレアチニン (Cr) 値を測定した。

(4) シスプラチン投与後4日目にペンシル型CCDカメラにて腎血流を測定した。

【0049】

## 2. 結果

治療群では、シスプラチン腎障害のピークとなる4日目~6日目において障害の軽減が見られた (図30。  $p < 0.05$  対コントロール群)。このように、SVF画分の投与によって腎障害に対する治療効果を認めた。

一方、治療群で有意に ( $p < 0.01$ ) 腎血流が速かった (図31~33)。

40

【実施例9】

【0050】

< SVF画分の腎障害に対する効果2 >

### 1. 実験 (治療) プロトコール (図34)

(1) ヌードラット (8週齢、オス) の両腎を30分間クランプ (IRI) して作製した虚血再環流腎障害モデルの腎臓に、実施例1に示した方法でヒト脂肪組織より調製したSVF画分 (100  $\mu$ l、細胞数  $1 \times 10^6$ ) を直接注入した (治療群)。コントロール群には同量の生理食塩水を同一条件で投与した。

(2) SVF注入後0日、1日、2日に採血し、血清クレアチニン (Cr) 値を測定した。

【0051】

50

## 2. 結果

治療群では、1日目 ( $p=0.053$  対コントロール群) 及び2日目 ( $p=0.075$  対コントロール群) において血清クレアチニン値がコントロール群に比べ低下しており、腎障害の軽減を認めた (図35)。

### 【実施例10】

#### 【0052】

< マウス脂肪組織由来多分化能幹細胞の骨粗しょう症に対する効果 >

#### 1. 実験 (治療) プロトコール

(1) OCIF (OPG) KOマウス (9週齢、メス) に、実施例1に示した方法に準じてC57BLマウス (9週齢、メス) より調製したマウス脂肪組織由来多分化能幹細胞 (100  $\mu$ l、細胞数  $1 \times 10^6$ ) を尾静注した (OCIF治療群)。また、OCIF (OPG) KOマウスに同量のリン酸緩衝液を同一条件で投与した (OCIFコントロール群)。C57BLマウスに対しても同量のリン酸緩衝液を同一条件で投与した (C57BLコントロール群)。

(2) マウス脂肪組織由来多分化能幹細胞を注入後0日、2日、4日、6日、8日、10日に大腿骨の骨密度を測定した。

#### 【0053】

## 2. 結果

OCIF治療群では、細胞投与後の早い段階から骨密度が上昇するとともに、経時的な骨密度の上昇も認められる (図36)。コントロール群 (OCIFコントロール群、C57BLコントロール群) では骨密度の変化は認められない。この結果より、骨粗しょう症の治療に対しても脂肪組織由来多分化能幹細胞が有効であることが判明した。

### 【実施例11】

#### 【0054】

< SVF画分の調製法の検討 >

ヒト皮下吸引脂肪 (800g) を等分し (各400g)、片方を以下の (1) の調製法に使用し、他方を以下の (2) の調製法に使用した。

#### (1) 従来法

吸引脂肪 (400g) をコラゲナーゼ処理 (37 $^{\circ}$ C、1時間) した後、孔径250~2000  $\mu$ mのフィルターを用いて濾過した。続いて、濾液を遠心処理 (1200rpm、5分間) に供した。沈渣に培地を添加し、SVF画分とした。

#### (2) 改良法

吸引脂肪 (400g) をコラゲナーゼ処理 (37 $^{\circ}$ C、1時間) した後、遠心処理 (1200rpm、5分間) に供した。沈渣に培地を添加し、SVF画分とした。

#### 【0055】

従来法で得られたSVF画分には  $5.4 \times 10^7$  個の細胞が含まれていた。一方、改良法で得られたSVF画分には  $1.12 \times 10^8$  個の細胞が含まれていた。このように、従来法よりも改良法の方が多くの細胞を回収することができた。尚、改良法によれば、フィルター処理を省略することによって、より短時間 (処理量にもよるが、1~2時間程度で可能である) でSVF画分を得ることが可能であるとともに、より閉鎖系に近い条件で一連の操作を行える。

#### 【0056】

次に、改良法で得られたSVF画分の治療効果を調べるため、シスプラチン腎障害ラットを用いた移植実験を施行した。実施例8 (SVF画分の腎障害に対する効果1) と同様の実験プロトコールを採用し (但し、0日、2日、4日、6日に採血をした)、改良法で得られたSVF画分の治療効果と従来法で得られたSVF画分の治療効果を比較した。

実験結果 (血清クレアチニン値の経時変化) を図37に示す。改良法で得られたSVF画分は、従来法で得られたSVF画分と同等の治療効果を示した。

### 【実施例12】

#### 【0057】

< SVF画分の凍結・融解に対する耐性の検討 >

凍結・融解処理によって、SVF画分の細胞増殖能、サイトカイン分泌能、及び表面抗原

10

20

30

40

50

が変化するか否かを調べた。

#### 1. 実験方法

実施例10の(1)の方法で調製したSVF画分を-80のディープフリーザー内に移し、凍結させた。30日後に37の恒温槽に移し、融解させた。このように凍結・融解処理を経たSVF画分(以下、「凍結処理SVF画分」と呼ぶ)の細胞増殖能及びサイトカイン分泌能について、コントロールのSVF画分(調製後に凍結・融解処理をしていないもの)と比較した。また、凍結処理SVF画分の細胞表面抗原をFACSで解析した。

【0058】

#### 2. 結果

凍結処理SVF画分とコントロールSVF画分との間に細胞増殖能の差は認められなかった(図38)。サイトカイン(VEGF-A、VEGF-C)の分泌能についても、凍結処理SVF画分とコントロールSVF画分との間に差は認められなかった(図39、40)。一方、凍結処理SVF画分の細胞表面抗原(CD34、CD13)は、これまでの報告におけるSVF画分のそれと同様であった(図41)。

以上の結果より、凍結・融解処理に対してSVF画分が高い耐性を有することが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0059】

本発明の細胞製剤は虚血性疾患、腎機能障害又は創傷の治療等に対して使用される。本発明の細胞製剤によれば、その有効成分である脂肪組織由来の多分化能細胞による良好な組織再建効果が得られる。細胞源を脂肪組織に求めたことによって、患者に過度の負担をかけることなく必要な量の細胞を得ることができる。従って、本発明は患者への負担の少ない細胞製剤となる。

一方、本発明の細胞製剤の一態様では低血清培養によって増殖した細胞を使用する。低血清培養では使用する血清量が少ないことから、異種動物の血清によらずとも必要な血清量を確保できる。つまり、患者自身(又は必要に応じて他家)の血清のみを使用した培養によって本発明の細胞を得ることができる。従ってこの態様では、異種動物材料を排斥した製造プロセスによって得られた、安全性の高い細胞製剤を提供することが可能となる。

【0060】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】マウス下肢虚血モデルに対してヒト脂肪組織由来多分化能幹細胞を注入した群(治療群)とコントロール群の間で、下肢累積生存率(Kaplan-Meier法による)の経時的変化を比較したグラフ。

【図2】処置後7日目のマウス下肢虚血モデルの状態(代表例)を示す図。左欄のコントロール群では左下肢が黒く壊死している。これに対して右欄の治療群では血色がよい。

【図3】実施例で使用したラット腎不全モデル(葉酸腎不全モデル)の特性を示した図。左欄は当該モデルの血中尿素窒素量の経時的変化を示すグラフであり、右欄は葉酸投与一日後に採取した腎組織のPAS染色像である。

【図4】ラット腎不全モデルに対してヒト脂肪組織由来多分化能幹細胞を注入した群(治療群)とコントロール群の間で、血中尿素窒素量の経時的変化を比較したグラフ。

【図5】処置後13日目のラット腎不全モデルの腎組織の状態を示す図(PAS染色像)。左欄のコントロール群では尿細管の拡張や尿細管上皮細胞の脱落が認められる。これに対して右欄の治療群ではそのような像はほとんど認められず、正常組織に近似する。

【図6】処置後13日目のラット腎不全モデルの腎組織の状態を示す図(Masson trichrome

10

20

30

40

50

染色像)。左欄のコントロール群では尿細管の萎縮や間質の線維化が認められる。これに対して右欄の治療群ではそのような像はほとんど認められず、正常組織に近似する。

【図7】腎尿細管周囲毛細血管の血流を測定する方法を模式的に示した図。

【図8】腎尿細管周囲毛細血管の血流を示す図(コントロール群)。

【図9】腎尿細管周囲毛細血管の血流を示す図(治療群)。

【図10】ラット腎不全モデルに対してヒト脂肪組織由来多分化能幹細胞を注入した群(治療群)とコントロール群の間で、血中尿素窒素量の経時的变化を比較したグラフ。

【図11】処置後14日目のラット腎不全モデルの腎組織の状態を示す図(免疫染色像)。投与した細胞の腎実質内への移動はみられず、腎皮膜下に良好に生着している。

【図12】処置後1月目のラット腎不全モデルの腎組織の状態を示す図(免疫染色像)。投与した細胞が腎膜下に残存している。

【図13】処置後3月目のラット腎不全モデルの腎組織の状態を示す図(免疫染色像)。投与した細胞が腎膜下に残存している。

【図14】ラット腎不全モデルに対してヒト脂肪組織由来多分化能幹細胞を注入した群(治療群)とコントロール群の間で腎尿細管周囲毛細血管の血流を比較したグラフ。

【図15】ラット皮膚欠損モデルの作製プロトコルを示した図。

【図16】ラット皮膚欠損モデルに対してラット脂肪組織由来多分化能幹細胞を注入した群(低血清治療群)、高血清条件下で培養して得られた細胞を注入した群(高血清治療群)、及びコントロール群の間で、皮膚欠損エリアの経時的变化を比較したグラフ。

【図17】処置後14日目のラット皮膚欠損モデルの創部の状態を示す図。コントロール群(左上)に比較して低血清治療群(右上)では迅速な創傷治癒が進行していることがわかる。また、低血清治療群では癒痕組織の状態も良好である。高血清治療群(左下)と比較しても、低血清治療群の創傷治癒促進効果は高い。

【図18】処置後3日目の皮膚組織中のサイトカイン濃度。上段に示すように、肉芽、辺縁部内側及び辺縁部外側の間でサイトカイン濃度を比較した。下段左はVEGF濃度を比較したグラフであり、同右はHGF濃度を比較したグラフである。

【図19】各種サイトカインの分泌量の比較。ヒト脂肪組織由来SVF画分を低血清条件下で培養して得られた細胞(低血清培養群)ではコントロール群(HEK293)に比べVEGF-A分泌量、HGF分泌量、VEGF-C分泌量及びFGF-7(KGF)分泌量が多い。

【図20】FGF-2分泌量の比較。低血清培養群はコントロール群(HEK293)よりも多くのFGF-2を分泌する。

【図21】VEGF-A分泌量の比較。低血清培養群では高血清培養群及びbFGF添加高血清培養群に比べVEGF-A分泌量が多い。

【図22】FGF-7(KGF)分泌量の比較。低血清培養群では高血清培養群及びbFGF添加高血清培養群に比べFGF-7(KGF)分泌量が多い。

【図23】FGF-2分泌量の比較。低血清培養群では高血清培養群及びbFGF添加高血清培養群に比べFGF-2分泌量が多い。

【図24】VEGF-C分泌量及びHGF分泌量の比較。VEGF-C分泌量及びHGF分泌量は各群の間で顕著な差はない。

【図25】TGF- $\beta$ 分泌量、IL-6分泌量、IL-10分泌量及びIL-8分泌量の比較。低血清培養群では高血清群及びbFGF添加高血清培養群に比べTGF- $\beta$ 分泌量、IL-6分泌量、IL-10分泌量及びIL-8分泌量が多い。

【図26】ラット脂肪組織由来多分化能幹細胞の尿失禁に対する効果。骨盤神経切除前と切除後について、治療群(細胞投与群)とコントロール群の漏出時圧が比較される。平均 $\pm$ 標準誤差。N=7、\*\*p<0.01(スチューデントのt検定による)。

【図27】ラット脂肪組織由来多分化能幹細胞の尿失禁に対する効果。膀胱頸部のHE染色像を示す。左は治療群(上段の倍率は400倍、下段の倍率は50倍)、右はコントロール群(倍率は50倍)。

【図28】ラット脂肪組織由来多分化能幹細胞の尿失禁に対する効果。膀胱頸部のマッソントリクローム染色像を示す。左は治療群(上段の倍率は400倍、下段の倍率は50倍)、

10

20

30

40

50



右はコントロール群（倍率は50倍）。

【図29】シスプラチン腎障害モデルを用いた実験のプロトコール。

【図30】治療群（シスプラチン腎障害モデルにSVF画分を投与）とコントロール群の血清クレアチニン値の比較。

【図31】腎血流を示す図（コントロール群）。

【図32】腎血流を示す図（治療群）。

【図33】コントロール群と治療群の腎血流の比較。

【図34】虚血再環流腎障害モデルを用いた実験のプロトコール。

【図35】治療群（虚血再環流腎障害モデルにSVF画分を投与）とコントロール群の血清クレアチニン値の比較。

【図36】脂肪組織由来多分化能幹細胞の骨粗しょう症に対する効果。骨粗しょう症モデルであるOCIF（OPG）KOマウスにマウス脂肪組織由来多分化能幹細胞を尾静注し（OCIF治療群）、大腿骨の骨密度の経時的変化を調べた。OCIFコントロール群には同量のリン酸緩衝液を尾静注した。また、C57BLマウスに対しても同量のリン酸緩衝液を尾静注した（C57BLコントロール群）。

【図37】改良法で得られたSVF画分の腎障害に対する効果。改良法で得られたSVF画分をシスプラチン腎障害ラットに投与し（rSVF改良法）、血清クレアチニン値の経時的変化を、従来法で得られたSVF画分を同様に投与した場合（rSVF従来法）と比較した。コントロール群には細胞の代わりに同量の生理食塩水を投与した。

【図38】凍結・融解処理を経たSVF画分（凍結処理SVF画分）と、コントロールSVF画分の細胞増殖能の比較。

【図39】凍結・融解処理を経たSVF画分（凍結処理SVF画分）と、コントロールSVF画分のサイトカイン（VEGF-A）分泌能の比較。凍結処理SVF画分はコントロールSVF画分と同等のVEGF-A分泌能を有する。

【図40】凍結・融解処理を経たSVF画分（凍結処理SVF画分）と、コントロールSVF画分のサイトカイン（VEGF-C）分泌能の比較。凍結処理SVF画分はコントロールSVF画分と同等のVEGF-C分泌能を有する。凍結処理SVF画分及びコントロールSVF画分のいずれについても低酸素培養によってVEGF-C分泌能の低下が認められる。

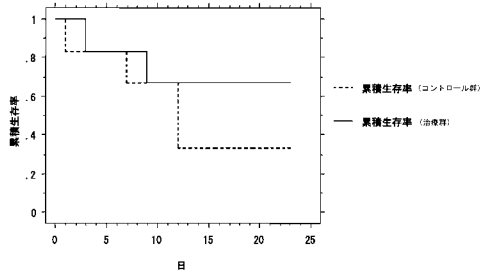
【図41】凍結・融解処理を経たSVF画分の細胞表面抗原のFACS解析結果。過去の報告における一般的なSVF画分と同様のCD34陽性率（左）及びCD13陽性率（右）を示した。

10

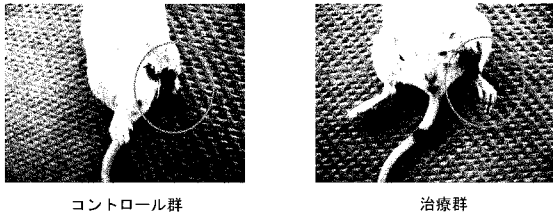
20

30

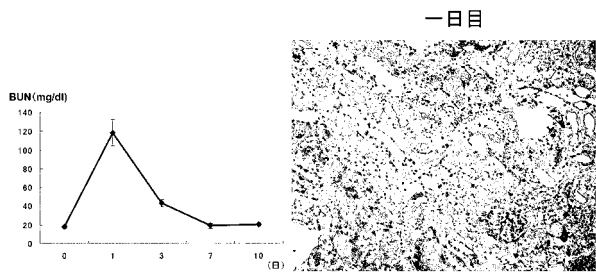
【図1】



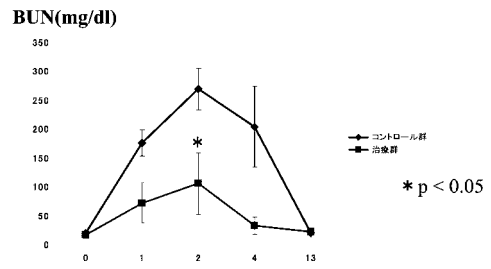
【図2】



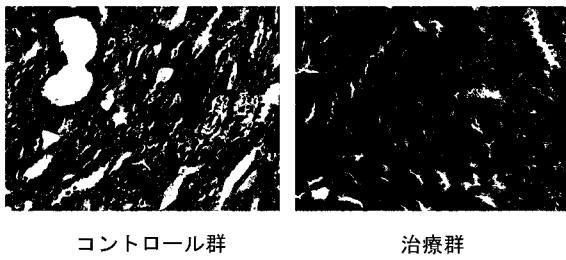
【図3】



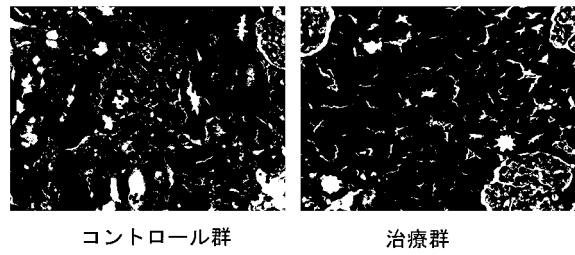
【図4】



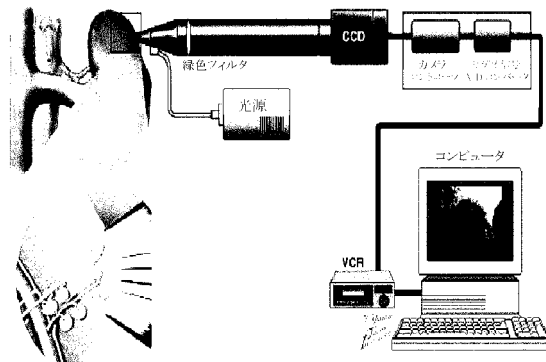
【図5】



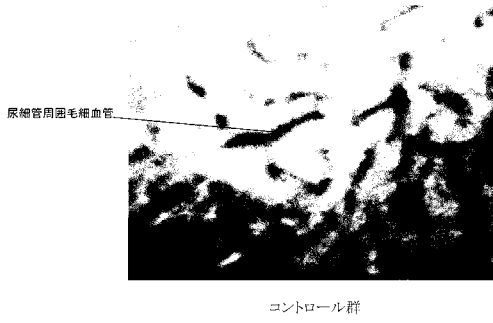
【図6】



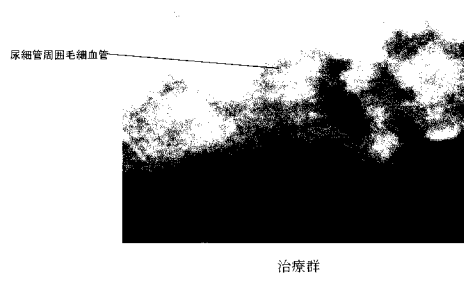
【図7】



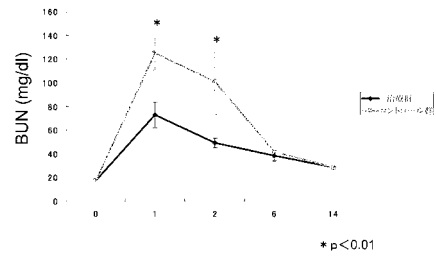
【図 8】



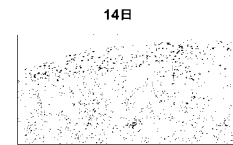
【図 9】



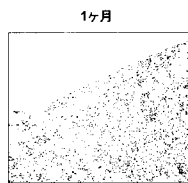
【図 10】



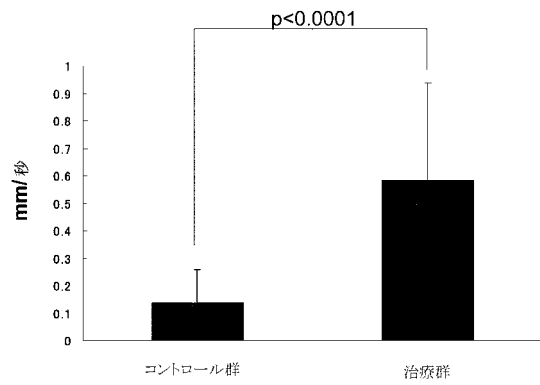
【図 11】



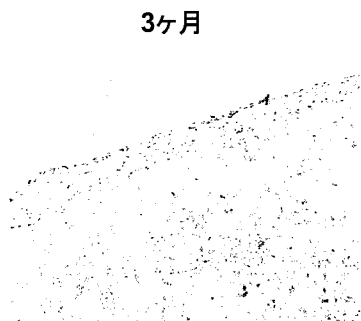
【図 12】



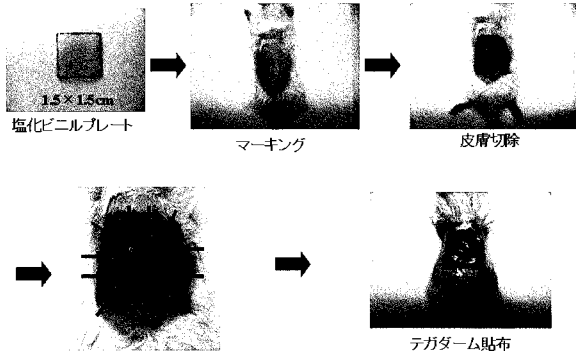
【図 14】



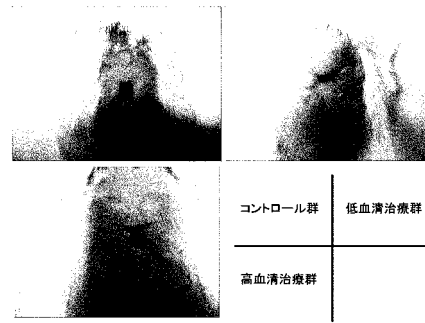
【図 13】



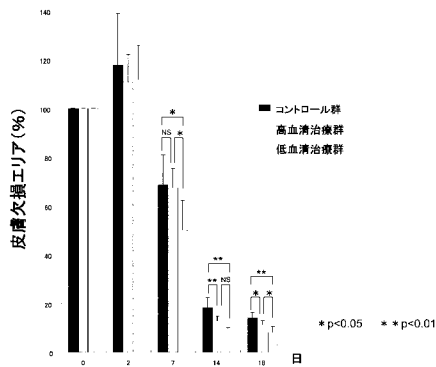
【図15】



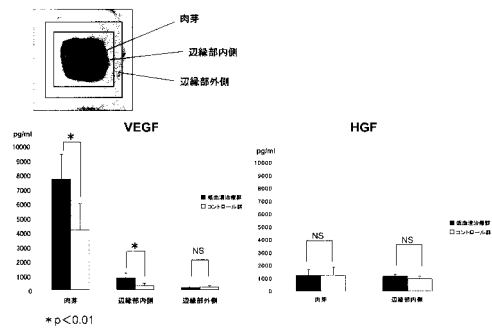
【図17】



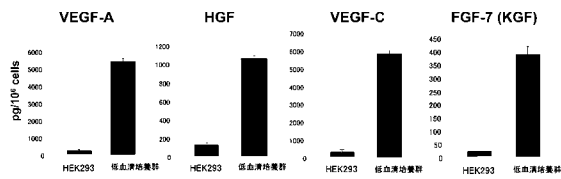
【図16】



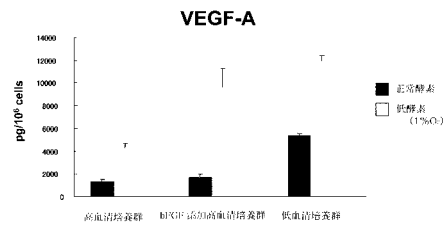
【図18】



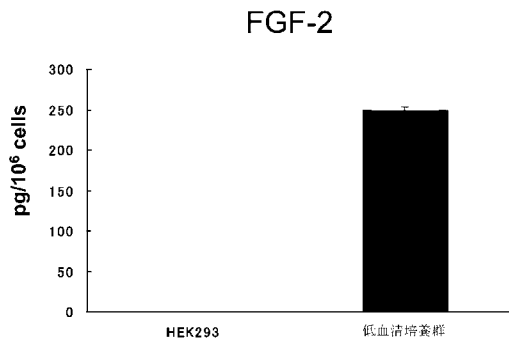
【図19】



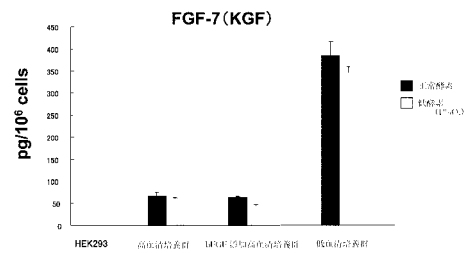
【図21】



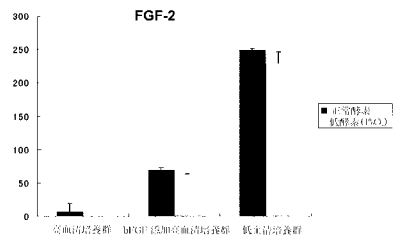
【図20】



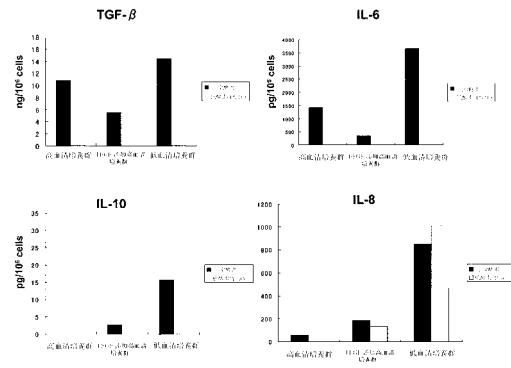
【図22】



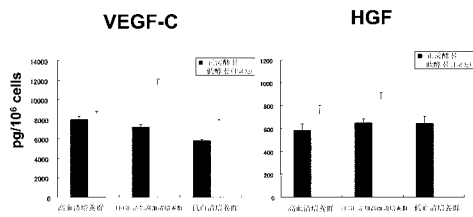
【図 23】



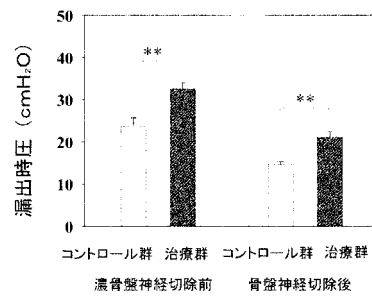
【図 25】



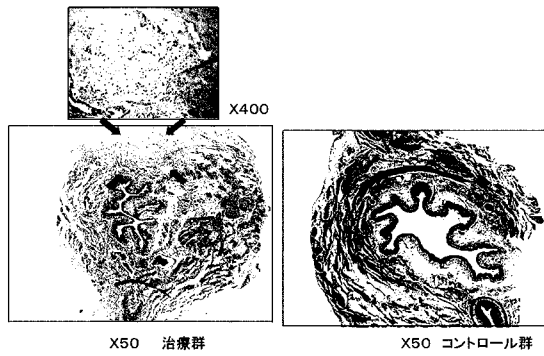
【図 24】



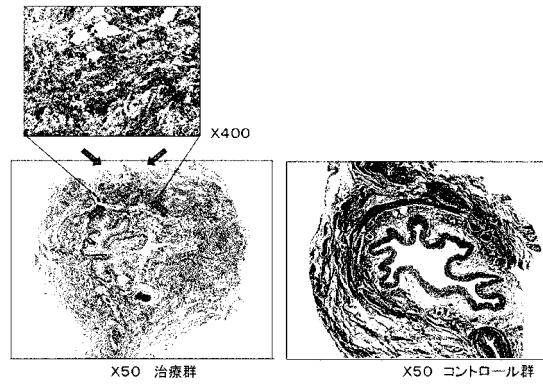
【図 26】



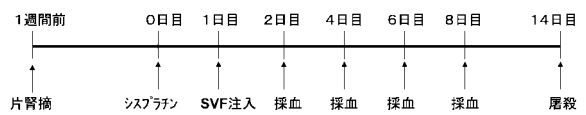
【図 27】



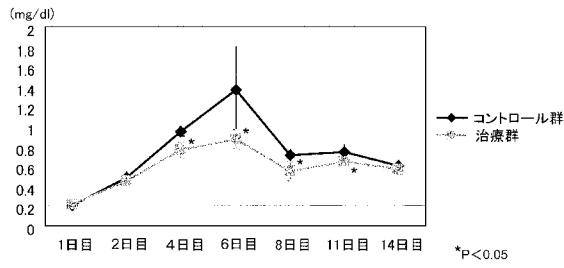
【図 28】



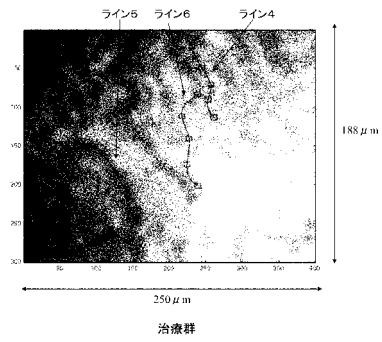
【図 29】



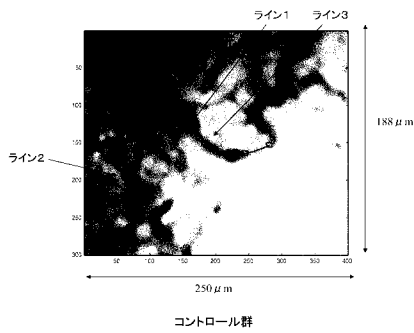
【図30】



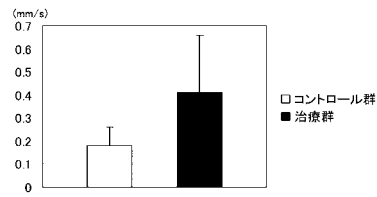
【図32】



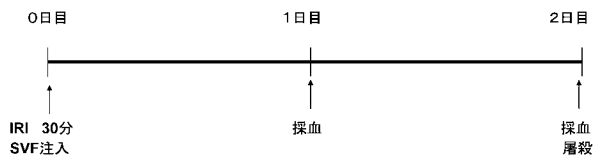
【図31】



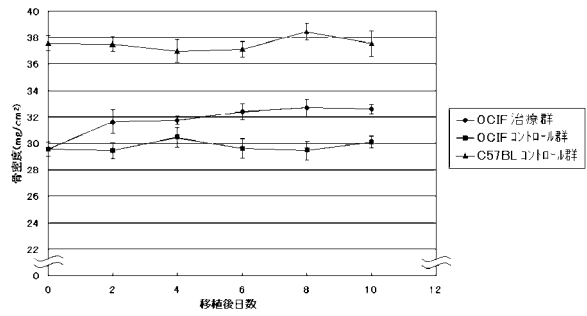
【図33】



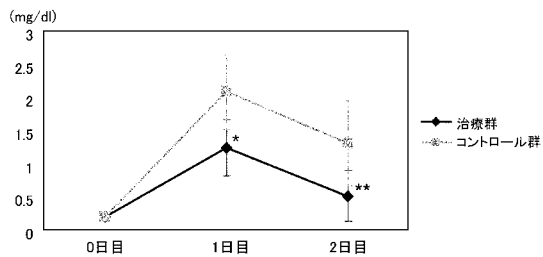
【図34】



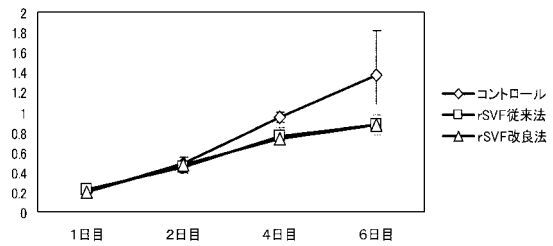
【図36】



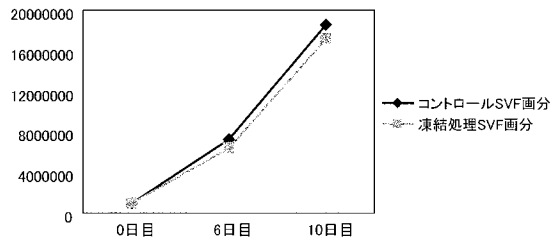
【図35】



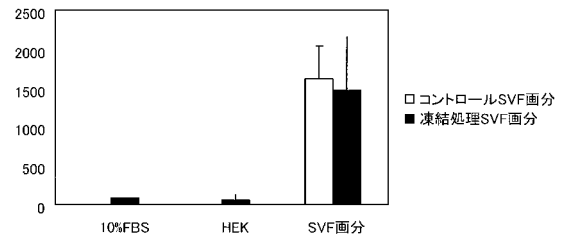
【図37】



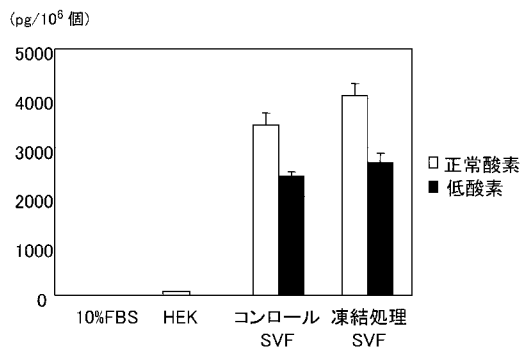
【図 38】



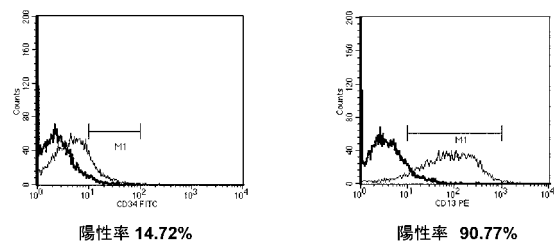
【図 39】



【図 40】



【図 41】



## フロントページの続き

- (72)発明者 山本 徳則  
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内
- (72)発明者 後藤 百万  
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内
- (72)発明者 松尾 清一  
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内
- (72)発明者 北川 泰雄  
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

審査官 川崎 洋祐

- (56)参考文献 国際公開第2006/074075(WO, A1)  
国際公開第2005/042730(WO, A1)  
特表2005-519883(JP, A)  
国際公開第2005/011569(WO, A1)  
松尾清一他, 体性幹細胞を用いた新たな腎再生医療の開発に関する研究, 平成17年度 総括・分担研究報告書, 2006年 5月, pp.34-52  
北川泰雄他, 脂肪組織からの体性幹細胞の分離, The Lipid, 2006年 1月, Vol.17 No.1, pp.69-75  
小堀雅登他, ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の低血清培養法の開発, 再生医療, 2005年, Vol.4 Suppl., p.191, P2-031  
Planat-Benard V et al., Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives., Circulation, 2004年 2月10日, Vol.109 No.5, pp.656-663  
Adamiak A and Rechberger T, Potential application of stem cells in urogynecology, Endokrynol Pol., 2005年12月, Vol.56 No.6, pp.994-997

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/00 - 35/76  
A61K 38/00 - 38/58  
A61K 41/00 - 45/08  
A61K 48/00  
A61P 1/00 - 43/00  
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)