

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4374469号
(P4374469)

(45) 発行日 平成21年12月2日(2009.12.2)

(24) 登録日 平成21年9月18日(2009.9.18)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 35/30 (2006.01)	A 6 1 K 35/30	
A 6 1 K 35/48 (2006.01)	A 6 1 K 35/48	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	E

請求項の数 4 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2003-559527 (P2003-559527)	(73) 特許権者	503360115 独立行政法人科学技術振興機構 東京都千代田区四番町5-3 サイエンス プラザ5F
(86) (22) 出願日	平成14年10月15日(2002.10.15)	(73) 特許権者	899000079 学校法人慶應義塾 東京都港区三田2丁目1番45号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2002/010647	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(87) 国際公開番号	W02003/059365	(74) 代理人	100068700 弁理士 有賀 三幸
(87) 国際公開日	平成15年7月24日(2003.7.24)	(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄
審査請求日	平成17年8月10日(2005.8.10)	(74) 代理人	100096736 弁理士 中嶋 俊夫
(31) 優先権主張番号	特願2002-2433 (P2002-2433)		
(32) 優先日	平成14年1月9日(2002.1.9)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 記憶障害治療剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

胚性幹細胞をノギン蛋白質の存在下又は非存在下で浮遊培養して胚様体を形成させ、次いでこれを繊維芽細胞増殖因子及びソニックヘッジホッグ蛋白質の存在下で浮遊培養することにより得られる胚性幹細胞由来神経幹細胞培養物を含有する記憶障害治療剤。

【請求項2】

胚性幹細胞由来神経幹細胞培養物が、胚性幹細胞をノギン蛋白質1~50%(v/v)の存在下で浮遊培養して胚様体を形成させ、次いでこれを繊維芽細胞増殖因子5~50ng/mL及びソニックヘッジホッグ蛋白質1~20nMの存在下で浮遊培養することにより得られる神経幹細胞培養物である請求項1記載の記憶障害治療剤。

【請求項3】

神経幹細胞培養物が、ニューロスフェアである請求項1又は2記載の記憶障害治療剤。

【請求項4】

記憶障害が、アルツハイマー病、頭部外傷後の脳萎縮、脳卒中又は脳手術後遺症に基づく記憶障害である請求項1~3の何れか1項記載の記憶障害治療剤。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明はアルツハイマー病に代表される脳疾患による記憶障害の治療薬に関する。

背景技術

アルツハイマー病〔いわゆるアルツハイマー病(A D)及びそれ以後に発病するアルツハ

イマー型老年痴呆 (S D A T) を含む) は、痴呆、すなわち記憶障害を主症状とする知的機能障害である。その原因としては、老人斑の主成分である - アミロイドタンパク質のもつ神経毒性がシナプスの脱落やニューロン死を起こすという - アミロイド説が有力となってきた。

アルツハイマー病治療薬としては、コリンエステラーゼ阻害剤であるタクリン (t a c r i n e) 及びドネペジル (d o n e p e z i l) が知られているが、その効果は満足できるものではない。

従って本発明の目的は、アルツハイマー病等における記憶障害に対する新たな治療薬を提供することにある。

発明の開示

10

そこで本発明者は、記憶障害モデル動物を用いて、種々の細胞に分化する能力を有する胚性幹細胞の移植療法を検討したところ、従来から報告されているとおり、移植部で腫瘍性増殖を示し移植ドナー細胞としては適さなかったが、胚性幹細胞から培養法によって誘導された神経幹細胞を移植したところ、有意な記憶障害改善効果が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、胚性幹細胞由来神経幹細胞培養物の、記憶障害治療薬製造のための使用を提供するものである。

また本発明は、胚性幹細胞由来神経幹細胞培養物の有効量を投与することを特徴とする記憶障害の処置方法を提供するものである。

発明を実施するための最良の形態

20

本発明に用いられる神経幹細胞は、胚性幹細胞から誘導することにより得られる。胚性幹細胞 (E S 細胞) から神経幹細胞の誘導法としては、例えば、胚性幹細胞をノギン蛋白質の存在下又は非存在下で浮遊培養して胚様体 (E m b r y o i d b o d y : E B) を形成させ、次いでこれを繊維芽細胞増殖因子及びソニックヘッジホッグ蛋白質の存在下で浮遊培養する方法が挙げられる。このようにして得られた神経幹細胞培養物を用いるのが、記憶障害治療効果の点で特に好ましい。

本発明に用いられる E S 細胞としては、既に培養細胞として確立されている E S 細胞を使用することができる。例えば、マウス、ハムスター、ブタ、ヒト等の E S 細胞株を使用することができる。具体例としては、129/Ola系マウス由来の E S 細胞、E B 3、E 14tg2等が挙げられる。当該 E S 細胞は、血清を含む G M E M 培地等にて培養継代しておくのが好ましい。

30

E S 細胞から胚様体の形成には、ノギン (N o g g i n) 蛋白質を添加した培地で浮遊培養すると、E S 細胞から神経幹細胞への分化誘導効率が向上する。ノギン蛋白質は、例えばアメリカツメガエルノギンを使用することができるが、アメリカツメガエルノギンの全長 c D N A を C O S 7 細胞に導入し、一過性にノギン蛋白質を発現させた培養上清をそのまま使用してもよい。ノギン蛋白質の培地中の濃度は、この培養上清換算で 1 ~ 50 % (v / v) 程度が好ましい。E S 細胞の浮遊培養は、例えば E S 細胞を血清含有 - M E M 培地にて 1×10^5 c e l l s / m L 程度の濃度で 4 ~ 8 日間行えばよい。ここで血清としてはウシ血清、ブタ血清などが挙げられ、その濃度は 5 ~ 15 %、特に 8 ~ 12 % が好ましい。また - M E M 培地には 2 - メルカプトエタノールを 0 . 01 ~ 0 . 5 m M、特に 0 . 05 ~ 0 . 2 m M となるように添加するのが好ましい。培養は 5 % C O ₂ 条件下、35 ~ 40 °C で行うのが好ましい。

40

なお、ノギン蛋白質の添加は胚様体形成時、すなわち培養 1 ~ 6 日目に添加しておくのが特に好ましい。

前記のように形成された胚様体を経由して E S 細胞から得られた神経幹細胞を増幅するには、繊維芽細胞増殖因子に加えてソニックヘッジホッグ蛋白質を含有する神経幹細胞増殖培地で浮遊培養する。

繊維芽細胞増殖因子 (F G F) としては、F G F - 2、F G F - 8 が好ましい。培地中の F G F の含有量は 5 ~ 50 n g / m L、特に 10 ~ 40 n g / m L が好ましい。また、ソニックヘッジホッグ蛋白質としては、例えばマウスソニックヘッジホッグ蛋白質が好まし

50

い。培地中のソニックヘッジホッグ蛋白質の含有量は1~20 nM、特に1~10 nMが好ましい。

培地としては、上記成分の他にグルコース、グルタミン、インスリン、トランスフェリン、プロジェステロン、プトレシン、塩化セレン、ヘパリン等を添加したDMEM培地を用いるのが好ましい。DMEM:F12培地を用いるのが特に好ましい。培養は5%CO₂条件下、35~40で行うのが好ましい。培養時間は7~9日間が好ましい。

上記の浮遊培養により、ニューロスフェア(neurosphere)と呼ばれる単一細胞由来の細胞凝集塊が形成する。得られたニューロスフェアは、神経幹細胞のみに由来するものであり、前記培養法による神経幹細胞への誘導効率率は極めて高いことがわかる。

本発明においては、このようにして得られた神経幹細胞のニューロスフェアの形態で使用するの
10

が好ましい。また神経幹細胞培養物中には、種々の緩衝液の他、BDNF、CNTF、NGF、NT-3、NT-4などの神経栄養因子が含まれていてもよい。

神経幹細胞培養物は、アルツハイマー病の他、頭部外傷後の脳萎縮、脳卒中や脳腫瘍などの脳内占拠性病変などの術後などにしばしば起るコリン作動性神経細胞脱落に起因する記憶障害を著明に改善する効果を有する。その投与方法は、脳の損傷部位、例えばアルツハイマー病であれば老人斑のある部分への移植が好ましい。移植にあたっては、予めMRI、CTスキャン等の手段により損傷部位を確認したうえで行うのが好ましい。神経幹細胞の移植量は、患者の症状、損傷部位の大きさ等により異なるが、通常成人1人1回あたり
20

1×10⁶~10⁸細胞が好ましい。本発明の記憶障害治療薬による治療においては、他の記憶障害治療剤、例えばタクリン、ドネペジル等を併用してもよい。

実施例

次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

製造例

A.材料及び方法

(1)マウスES細胞の培養継代と胚様体の形成

129/Ola系マウス由来のES細胞、E14tg2a及びそのOct3/4遺伝子座にプラストジニン耐性遺伝子を挿入し未分化ES細胞を選択できるEB3は、10%仔牛胎児血清、非必須アミノ酸、1mMピルビン酸ナトリウム、0.1mM 2-メルカプトエタノール及び1000U/mL白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor、LIF)を含むGlasgow minimum essential medium(GMEM)培地にて定法(5%CO₂、37、以下、単に「培養」というときは、この条件)によって培養継代した。
30

ES細胞からの胚様体(Embryoid body:EB)の形成は以下のようにして行った。ES細胞をPBSで洗浄後、0.25%トリプシン-1mM EDTA処理及びその停止を行い、ピペティングによって分散させた細胞を、10%仔牛胎児血清及び0.1mM 2-メルカプトエタノールを含むMEM培地で満たしたバクテリア用培養皿中に1×10⁵ cells/mLの濃度で播種し、ノギン蛋白質(アフリカツメガエル
40

Nogginの全長cDNAをCOS7細胞に導入し、一過性に発現させた培養上清)存在下及び非存在下で4~8日間浮遊培養してEBを形成させた。

(2)EBからの神経幹細胞の選択的培養による分離

上記のようにして形成されたEBは培養液とともに遠心チューブに移し、10分間静置することによってチューブ底に集め上清を除去しPBS中に再懸濁し、再び10分間静置する。上清を除去した後、EBは0.25%トリプシン-1mM EDTA溶液中に再懸濁し37で5分間インキュベートし、10%仔牛胎児血清を含むMEM培地で蛋白質分解反応を停止させた後、ピペットで細胞を分散させた。分散させた細胞はMEM培地にて遠心操作により2回洗浄し、グルコース(0.6%)、グルタミン(2mM)、インスリン(25µg/mL)、トランスフェリン(100µg/mL)、プロジェステロ
50

ン(20 nM)、プトレシン(60 μM)、塩化セレン(30 nM)、FGF-2(20 ng/mL)、ヘパリン(2 μg/mL)を添加したDulbecco's modified Eagle's medium(DMEM):F12(1:1)培地中(神経幹細胞増殖培地)に、あるいはそこへさらにマウスソニックヘッジホッグ蛋白質mouse sonic hedgehog(5 nM)を加えた培地に 5×10^4 cells/mLの濃度で播種し、7~9日間浮遊培養することによって、ニューロスフェア(neurosphere)と呼ばれる単一細胞由来の細胞凝集塊を形成させた(neurosphere法)。これらニューロスフェアは上記の神経幹細胞増殖培地よりFGF-2とヘパリンを除いた分化培地で遠心洗浄した後、そのままあるいはピペティングにより分散させた細胞を、分化培地で満たしたポリ-L-オルニチン(poly-L-ornithin)でコートした培養皿に播種し、ソニックヘッジホッグ蛋白質(5 nM)存在下あるいは非存在下で5~7日間培養することによって分化させた。また上記のようにして得たニューロスフェアを再び単一細胞に分散し、神経幹細胞増殖培地で7日間継代培養し2次ニューロスフェアを形成させ、これらも上記と同様に分化させる。

10

B. 実験結果

(1) EBからの神経幹細胞の選択的培養法による分離精製

まずEBの形成によるES細胞の初期分化において、神経幹細胞が培養のどの時期に出現してくるのかを検討した。具体的には、培養4~8日のEBを単一細胞に分散し、神経幹細胞培地にて7日間培養し、ニューロスフェアを形成させた。これらニューロスフェアは分化培地に移し分化させ、その分化能を検定するとともに、継代することによって自己複製能も検定した。

20

図1には、浮遊培養によるEBの形成開始後6及び8日後、EBを単一細胞に分散し、神経幹細胞の選択的培養(neurosphere法)を行った結果を示した。なお得られたニューロスフェアの数はEB中に出現した神経幹細胞の数とした。その結果、本方法で同定される(ニューロスフェアを形成できる)神経幹細胞は、EBの培養4日目まではほとんど検出できず、培養6日目で全細胞中0.25%、8日目で1.1%と次第に増加していくことが分かった。

(2) ノギン蛋白質による神経幹細胞の分化誘導の効率化

ノギン蛋白質をEB形成時(6日間)に添加することによって神経幹細胞の分化誘導の効率化を試みた。ノギンは、アフリカツメガエルノギンの全長cDNAをpEF-BOS発現ベクターに組み込みCOS7細胞に導入し、一過性に発現させた培養上清をノギン溶液とし、発現ベクターのみを導入したCOS7細胞の培養上清を対照とした。図2に示すように、ノギン培養上清の量に依存してEB中で分化誘導されるニューロスフェアを形成する神経幹細胞の数は増加し、1/10倍容でピークに達した。

30

実施例1

雄性9週齢のマウスの中隔核にイボテン酸10 μgを外科的に投与しコリン作動性ニューロンを破壊して、記憶障害モデルマウスを作成した。この記憶障害マウスの海馬に、GFP(green fluorescence protein)遺伝子を導入したES細胞から分化誘導させた神経幹細胞を移植し、記憶障害改善効果を検討した。具体的には、雄性9週齢のマウスを用い、以下の4群に分けてイボテン酸投与による記憶障害モデルマウスを作成した。

40

(1) コントロール群

中隔核に1 μl PBS投与 + 海馬に1 μl PBS投与

(2) 未治療群

中隔核に1 μg イボテン酸投与 + 海馬に1 μl PBS投与

(3) ES細胞移植群

中隔核に1 μg イボテン酸投与 + 海馬にES細胞移植

(4) ES細胞分化神経幹細胞移植群

中隔核に1 μg イボテン酸投与 + 海馬に1 μl 神経幹細胞移植

これらの各群について、Morrisのwater maze test(WMT)(1

50

．8 m直径の円形水槽の水面下に直径10 cmのプラットホームを置き、水槽の任意の場所に浮かせたマウスがそのプラットホームまで達する時間を繰り返し測定し、記憶学習能力を測定する)により、記憶障害改善効果を検討した。その結果、図3に示すように、神経幹細胞のニューロスフェアを移植した群は、コントロール群と同等にまで記憶障害が回復していた。これに対し、ES細胞を移植した群は、従来の報告と同様、腫瘍性増殖を示し、移植ドナー細胞として適さないことが判明した。

また、移植部について免疫組織化学染色を行い、神経細胞の再生状態を検討した。

免疫染色には、移植した細胞およびその子孫細胞を同定するために抗GFP抗体を、移植した細胞が、分裂するかどうかを確認するために抗BrdU抗体(移植後ホストのマウスにBrdUを120 mg/kg投与し、BrdUを取り込んだ細胞を検出する)を、ニューロンに分化しているかどうかを確認するために抗Hu抗体を、コリン作動性ニューロンに分化しているかどうかを確認するために抗ChAT抗体を、GABAニューロンに分化しているかどうかを確認するために抗GAD67抗体を、アストロサイトグリアに分化しているかどうかを確認するために抗GFAP抗体を、そして移植細胞由来のニューロンがシナプスを形成しているかどうかを確認するためには抗Synaptophysin抗体を、それぞれ用いて染色した。

その結果を図4～図12に示す。図4から明らかなように、イボテン酸を投与した記憶障害マウスの中隔核においては、ChAT陽性細胞(コリン作動性ニューロン)はほとんど存在しなかった。図5から明らかなように、移植した細胞(GFP陽性細胞)の多くがBrdUを取り込んでおり、移植後に分裂することが分かる。図6は移植した細胞がHu陽性のニューロンに分化できることを示している。図7は移植した細胞が、ChAT陽性のコリン作動性ニューロンに分化することを示している。図8は移植した細胞群の中にわずかながらGAD67陽性のGABA作動性ニューロンがあることを示している。図9は海馬に移植した細胞はほとんどアストロサイトに分化しないことを示している。図10は移植細胞由来のニューロンがシナプスを形成する能力があることを示している。図11は、移植6ヶ月後の移植部の免疫組織化学染色結果を示したものであり、海馬に移植した細胞は、Hu陽性ニューロン、そしてChAT陽性のコリン作動性ニューロンに分化し、移植から6ヶ月を経てもなお生存していた。図12は、ES細胞を*in vitro*で分化させずに移植すると、腫瘍を形成することがあることを示している。

産業上の利用可能性

本発明によれば、アルツハイマー病等による記憶障害を治療できる。

【図面の簡単な説明】

図1は、胚様体の培養日数とニューロスフェア形成との関係を示す図である。

図2は、ノギン蛋白質の添加効果を示す図である。

図3は、イボテン酸による記憶学習能力の低下と細胞移植後の回復をMorrisのwater maze test(WMT)で測定した結果を示す図である。

図4は、イボテン酸をマウス中隔核に投与するとChAT陽性細胞(コリン作動性ニューロン)が消滅することを示す図である(正常で存在し、イボテン酸投与群で消滅)。

図5は、海馬に移植したES細胞由来の神経幹細胞が分裂していることを示す図である(GFP、BrdU及び(GFP+BrdU)の対比による)。

図6は、海馬に移植したES細胞由来の神経幹細胞がニューロンに分化することを示す図である(GFP、Hu及び(GFP+Hu)の対比による)。

図7は、海馬に移植したES細胞由来の神経幹細胞がコリン作動性ニューロンに分化することを示す図である(左は右の染色部の拡大図である)。

図8は、海馬に移植したES細胞由来の神経幹細胞はGABA作動性ニューロンにはほとんど分化しないことを示す図である(GFP、GAD及び(GFP+GAD)の対比による)。

図9は、海馬に移植したES細胞由来の神経幹細胞はアストロサイトにはほとんど分化しないことを示す図である(GFP、GFAP及び(GFP+GFAP)の対比による)。

図10は、海馬に移植したES細胞由来の神経幹細胞はニューロンに分化しシナプスを形

10

20

30

40

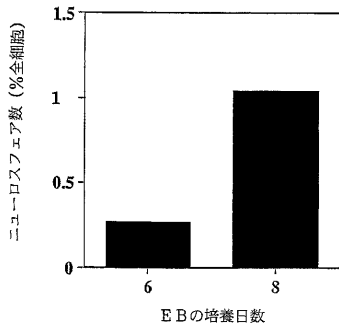
50

成することが可能であることを示す図である（GFP、シナプトフィシン及び（GFP + シナプトフィシン）の対比による）。

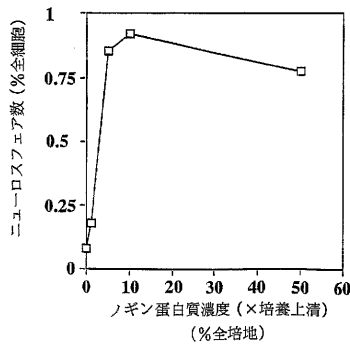
図11は、移植後6ヶ月後の移植部の免疫組織化学染色結果を示す図であり、海馬に移植したES細胞由来の神経幹細胞は、Hu陽性ニューロン（GFP、Hu及び（GFP + Hu）の対比による）、そしてChAT陽性のコリン作動性ニューロン（GFP、ChAT及び（GFP + ChAT）の対比による）に分化して、6ヶ月後も生存していることを示した図である。

図12は、未分化なES細胞を海馬に移植すると移植部位において腫瘍を形成したことを示す図である（左（A）は肉眼観察、右（B）は切片の図である）。

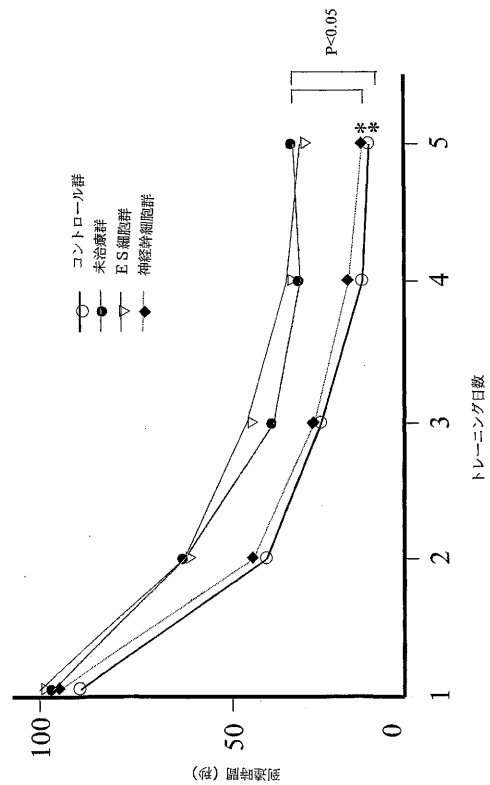
【図1】
図1



【図2】
図2



【図3】
図3



【 図 4 】

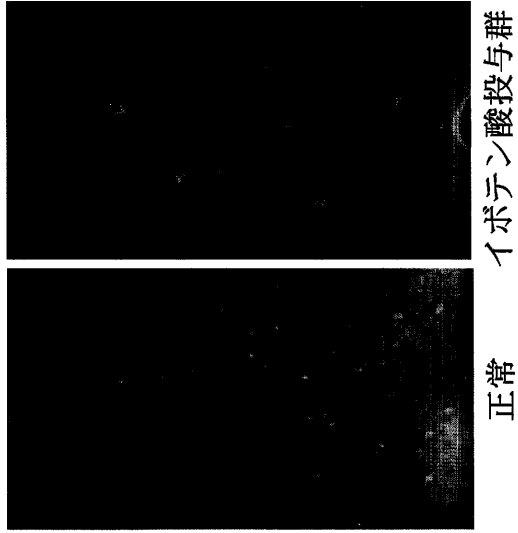


図 4

【 図 5 】

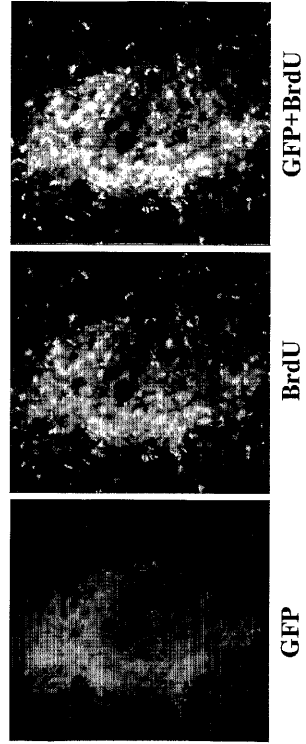


図 5

【 図 6 】

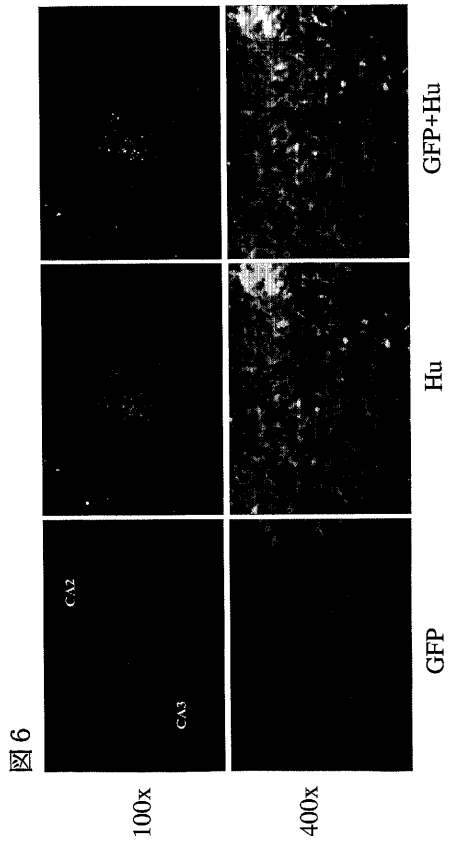


図 6

【 図 7 】

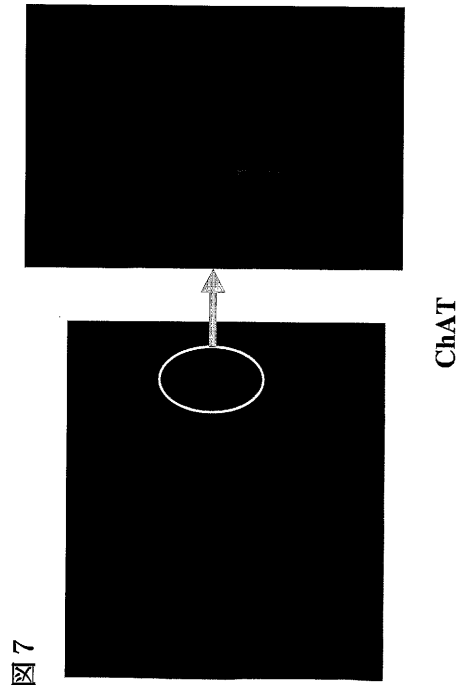
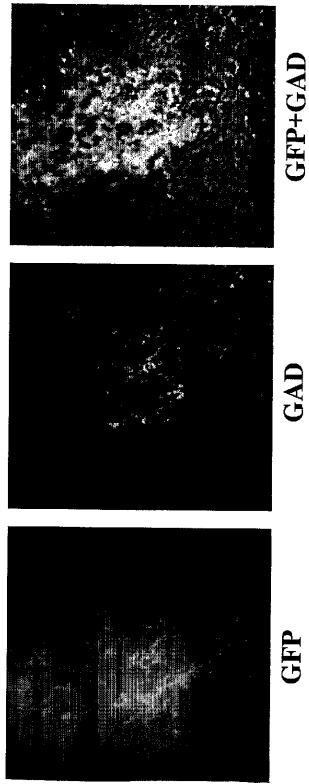


図 7

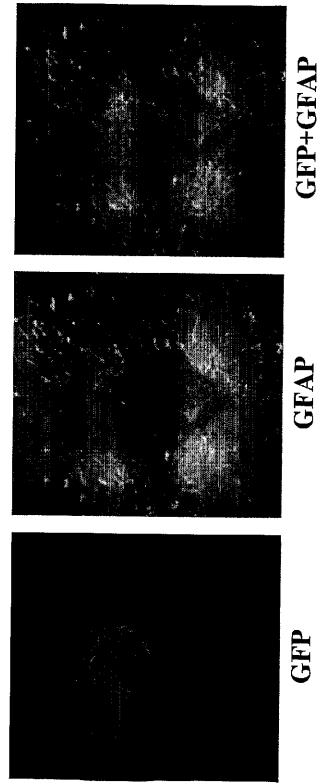
【 図 8 】

図 8



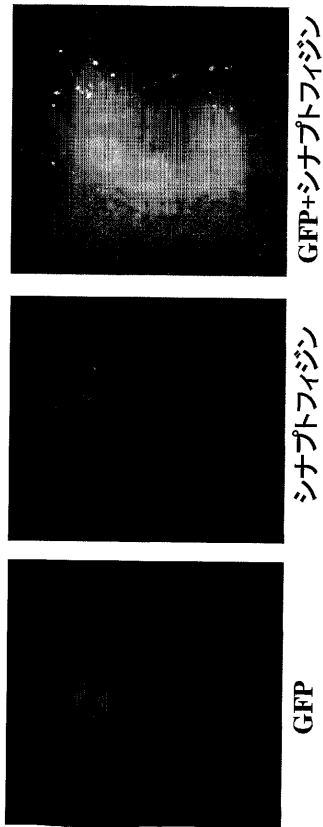
【 図 9 】

図 9



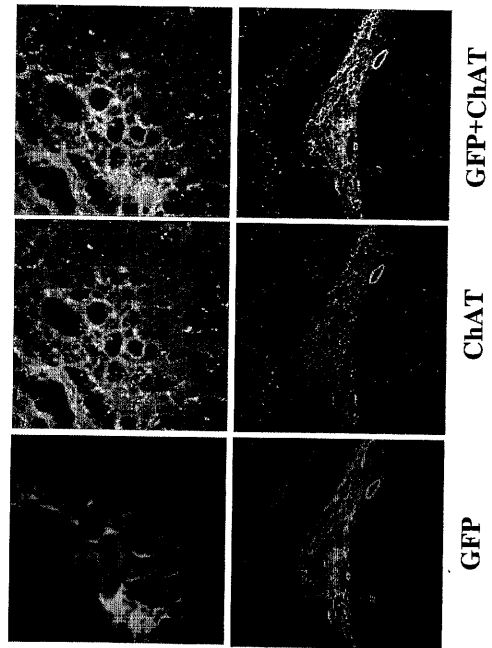
【 図 10 】

図 10



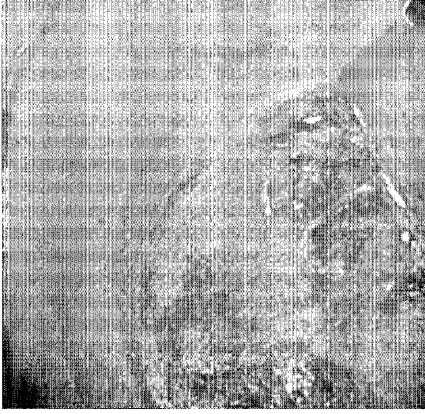
【 図 11 】

図 11



【 図 1 2 】

(B)



(A)

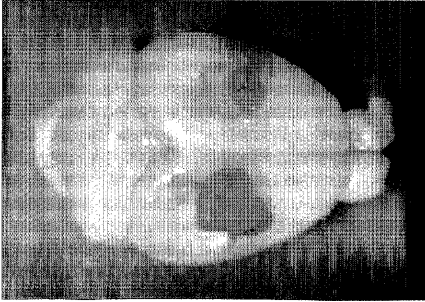


図 1 2

フロントページの続き

- (74)代理人 100117156
弁理士 村田 正樹
- (74)代理人 100111028
弁理士 山本 博人
- (74)代理人 100089048
弁理士 浅野 康隆
- (74)代理人 100101317
弁理士 的場 ひろみ
- (72)発明者 岡野 栄之
東京都文京区本駒込6丁目13-15-104
- (72)発明者 島崎 琢也
東京都国分寺市東戸倉2丁目23-5-B202
- (72)発明者 長尾 省吾
香川県木田郡三木町池戸1239-2-B-301
- (72)発明者 松本 義人
香川県木田郡牟礼町牟礼3720-394

審査官 瀬下 浩一

- (56)参考文献 国際公開第01/083715(WO, A1)
国際公開第99/011758(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/30
A61K 35/48
A61P 25/00
A61P 25/28
CABIus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPIus/JMEDPIus(JDreamII)