

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-520462

(P2007-520462A)

(43) 公表日 平成19年7月26日(2007.7.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/14 (2006.01)	A 6 1 K 35/14 Z	4 B 0 2 4
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	4 C 0 8 1
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	4 C 0 8 7
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-545543 (P2006-545543)	(71) 出願人	506209721
(86) (22) 出願日	平成16年12月20日 (2004.12.20)		バイアセル インコーポレーティッド
(85) 翻訳文提出日	平成18年7月24日 (2006.7.24)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケ
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/042743		ンブリッジ ファースト ストリート 2
(87) 国際公開番号	W02005/063303		4 5
(87) 国際公開日	平成17年7月14日 (2005.7.14)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	60/531,577		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成15年12月19日 (2003.12.19)	(74) 代理人	100128048
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 新見 浩一
		(72) 発明者	クラーク ポール ティー.
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウ
			ェルズリー ウェストン ロード 19
		(72) 発明者	ビアー マーク ディー.
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 サ
			ドベリー シルバー ヒル ロード 50
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト臍帯血由来多能性細胞の疾患の処置のための使用方法

(57) 【要約】

本発明は臍帯血由来の多能性細胞を用いる臓器組織再生の方法、これらの多能性細胞の組成物、これらの細胞をさらに形質転換する方法、およびこれらの形質転換細胞の使用を特徴とする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト臍帯血、胎盤血、またはヒト新生児からの血液試料より調製される、多能性細胞またはそれらに由来する子孫細胞を患者に投与する段階を含む、血管疾患、筋肉疾患、肝疾患、膵疾患、または神経疾患 (neural disease) を処置する方法であって、該多能性細胞は (a) SH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、および CD90 抗原マーカーを発現し； (b) CD14、CD31、CD34、CD45、CD49d、および CD106 抗原マーカーを発現せず；かつ (c) 多能性間葉系細胞、多能性造血細胞、多能性神経系細胞、または多能性内皮細胞のうちの一つまたは複数に分化可能である方法。

【請求項 2】

疾患が血管疾患である、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

疾患が平滑筋疾患または心筋疾患である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

疾患が肝疾患である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

疾患が膵疾患である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

疾患が神経疾患である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

臓器再生を行うために細胞を投与する段階を含む、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 8】

患者に体内移植される血管をインビトロで成長させるために、複数の細胞が用いられる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

多能性細胞の子孫細胞が患者に投与される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

子孫細胞を患者に投与する前に、該子孫細胞に内皮細胞マーカーの発現を誘導する段階をさらに含む、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

子孫細胞が PIH12 モノクローナル抗体で認識されるマーカーを発現する、請求項 9 記載の方法。

30

【請求項 12】

子孫細胞を患者に投与する前に、該子孫細胞に肝細胞マーカーの発現を誘導する段階をさらに含む、請求項 9 記載の方法。

【請求項 13】

子孫細胞を患者に投与する前に、該子孫細胞に膵臓細胞マーカーの発現を誘導する段階をさらに含む、請求項 9 記載の方法。

【請求項 14】

子孫細胞を患者に投与する前に、該子孫細胞に神経細胞マーカーの発現を誘導する段階をさらに含む、請求項 9 記載の方法。

40

【請求項 15】

子孫細胞を患者に投与する前に、該子孫細胞に心筋または平滑筋細胞マーカーの発現を誘導する段階をさらに含む、請求項 9 記載の方法。

【請求項 16】

試験物質が単離多能性細胞の分化を誘導するかどうか判定する方法であって、以下の段階を含む方法：

SH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、および CD90 抗原を発現し、CD14、CD34、CD45、CD49d、および CD106 抗原の発現を欠くことを特徴とする多能性細胞に、試験物質を接触させる段階；および

50

接触した多能性細胞のマーカー発現の変化を検出する段階であって、該変化は該試験物質が該単離多能性細胞の分化を誘導することを示す段階。

【請求項 17】

SH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、およびCD90抗原マーカーを発現し、CD14、CD34、CD45、CD49d、およびCD106抗原マーカーの発現を欠くことを特徴とする細胞の集団を産生する方法であって、以下の段階を含む方法：

- a) 臍帯血に由来し、多能性間葉系細胞、多能性造血細胞、多能性神経系細胞、または多能性内皮細胞に分化可能な、多能性細胞を提供する段階；
- b) 該多能性細胞を、該多能性細胞集団が増殖するのに十分な時間デキサメタゾンを含む培地で培養する段階；および
- c) 該多能性細胞を該培地から単離する段階であって、20%を超える該単離多能性細胞がSH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、およびCD90マーカーに対して陽性であり、CD14、CD34、CD45、CD49d、およびCD106マーカーに対して陰性である段階。

10

【請求項 18】

薬学的に許容される担体に懸濁されている、SH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、およびCD90マーカーに対して陽性であり、CD14、CD34、CD45、CD49d、およびCD106マーカーに対して陰性である、複数の多能性細胞を含む組成物。

【請求項 19】

SH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、およびCD90マーカーに対して陽性であり、CD14、CD34、CD45、CD49d、およびCD106マーカーに対して陰性である多能性細胞を、所望のタンパク質をコードするDNAを用いてインビボまたはエクスピボでトランスフェクトすることで得られる、多能性子孫細胞。

20

【請求項 20】

薬学的に許容される担体に懸濁されている、請求項19記載の複数の細胞を含む組成物。

【請求項 21】

薬学的に許容される担体が食塩水、ゲル、ヒドロゲル、スポンジ、および基質からなる群より選択される、請求項18または20記載の組成物。

【請求項 22】

請求項20記載の組成物の治療有効量を、それを必要とする患者に投与する段階を含む治療法。

30

【請求項 23】

細胞が患者内で治療有効量の所望のタンパク質を発現する、請求項22記載の方法。

【請求項 24】

多能性細胞が、その培地から該多能性細胞を単離する全ての細胞型に分化可能であり、20%を超える該単離多能性細胞が、SH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、およびCD90マーカーに対して陽性であり、CD14、CD34、CD45、CD49d、およびCD106マーカーに対して陰性である、請求項1記載の方法。

【請求項 25】

血管疾患、肝疾患、膵疾患、または神経疾患を処置するための薬物の調製における、臍帯血、胎盤血、またはヒト新生児から調製された血液から調製される多能性細胞またはそれらの子孫の使用であって、該多能性細胞はa) SH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、およびCD90マーカーに対して陽性であり、b) CD14、CD34、CD45、CD49d、およびCD106マーカーに対して陰性であり、かつc)多能性間葉系細胞、多能性造血細胞、多能性神経系細胞、または多能性内皮細胞のうちの一つまたは複数に分化可能である使用。

40

【請求項 26】

疾患が血管疾患である、請求項25記載の使用。

【請求項 27】

疾患が平滑筋疾患または心筋疾患である、請求項25記載の使用。

【請求項 28】

疾患が肝疾患である、請求項25記載の使用。

50

【請求項 29】

疾患が膀胱疾患である、請求項25記載の使用。

【請求項 30】

疾患が神経疾患である、請求項25記載の使用。

【請求項 31】

臓器再生のために細胞が使用される、請求項25記載の使用。

【請求項 32】

細胞がPIH12内皮細胞マーカーを発現する子孫細胞である、請求項25記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は多能性細胞を使用する疾患の処置に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

多くの型の哺乳類多能性細胞が特徴づけられている。例えば、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、成体幹細胞が公知である。Caplanら (U.S. Patent No. 5,486,359)は、間葉細胞系列の前駆細胞として働く骨髄由来のヒト間葉系幹細胞(hMSC)について記述している。これらのhMSCは細胞表面マーカーに結合するモノクローナル抗体を用いて同定される。Caplanらによれば、均質なhMSC組成物は、造血細胞または分化した間葉細胞に付随するマーカーをもたない、付着性の骨髄または骨膜細胞のポジティブ選択により得られる。単離された間葉細胞集団は、間葉系幹細胞に付随するエピトープ特性を示し、培養液中で分化せずに再生する能力を持ち、インビトロで誘導されるかインビボで組織の損傷部位に置かれると、特異的な間葉系列に分化する能力を持つ。この方法では、ドナーから骨髄または骨膜細胞を採取し、その後それらからMSCが単離される必要がある。

20

【0003】

臍帯血(umbilical cord blood, UCB)は公知の造血前駆幹細胞の別の供給源である。UCB回収のための従来技術は、針またはカニューレを使用の上で、重力の補助を得て胎盤から臍帯血(cord blood)を排出させる(すなわち、放血させる)(Anderson, U.S. Patent No. 5,372,581、およびHessel et al., U.S. Patent No. 5,415,665も参照)。針またはカニューレは通常、臍静脈に入れられ、胎盤からの臍帯血の排出を補助するために、胎盤が穏やかにマッサージされる。

30

【0004】

このようにして得られた細胞は直ちに用いられるかまたは保存される。例えば、臍帯血由来の幹細胞は、骨髄およびその他の関連移植で用いられる、広く用いられている治療手順である造血再構成で用いるために、通常凍結保存される(例えば、Boyse et al., U.S. Patent No. 5,004,681およびBoyse et al., U.S. Patent No. 5,192,553を参照)。

【0005】

Erices et al., in Br. J. Haematology 109: 235-42, 2000はヒト臍帯血由来の多能性細胞について記述している。Naughtonら (U.S. Patent No. 5,962,325)は、臍帯、胎盤組織、または臍帯血から得られる、繊維芽細胞様細胞および軟骨細胞前駆体などの、胎児多能性細胞について記述している。このようにして得られた胎児間質細胞は「一般的な」間質または軟骨組織を調製するのに使用できる。Naughtonらは、開示された方法に従って培養液中で生育された細胞および/または組織を後で受容する特定の個体に由来する繊維芽細胞を三次元基質に播種することで、「特異的な」間質組織を調製できることも開示している。

40

【0006】

臍帯血由来の多能性細胞をクローン増殖(clonogenic expansion)させて選択する方法が公知である。Krausら (U.S. Patent No. 5,674,750)は、多能性細胞に認識される表面抗原をもつビーズの表面上で、比較的未分化の細胞を生育させる系について記述している。

50

Krausら (U.S. Patent No. 5,925,567およびU.S. Patent No. 6,338,942)は、多能性細胞の所定の標的細胞集団を選択するための更なる方法を提供している。一例を挙げれば、臍帯血または末梢血由来の出発細胞試料が増殖培地に導入され、それにより標的細胞集団の細胞が分裂し、その後増殖培地中の細胞を、所定の細胞集団に親和性を有する選択因子と接触させ、増殖培地中の他の細胞から所定の標的集団の細胞を選択する。

【0007】

臍帯血または胎盤血由来の多能性細胞を単離、保存、増殖、分化、および選択する方法が存在する；これらの細胞は疾患の処置のためにさまざまな治療法に用いることができる。

【発明の開示】

10

【0008】

発明の概要

第一の局面において、本発明は、血管疾患、筋肉疾患、肝疾患、膵疾患、または神経疾患を処置するための、Erices et al., in Br. J. Haematology 109: 235-42, 2000に記述されるUCBから単離される前駆細胞などの多能性細胞の使用を特徴とする。この使用は、ヒト臍帯血、胎盤血、および/または新生児由来の血液試料に由来する多能性細胞を患者に投与する段階、または多能性細胞の子孫細胞を患者に投与する段階を含み、ここで多能性細胞はSH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、およびCD90抗原マーカーを発現し；CD14、CD31、CD34、CD45、CD49d、およびCD106抗原マーカーを発現せず；かつ多能性間葉系細胞、多能性造血細胞、多能性神経系細胞、または多能性内皮細胞に分化可能である。一つの態様では、方法には臓器の再生が含まれる。他の態様では、方法は血管のインビトロ成長を含み、これは例えば患者の損傷した血管を置換するのに用いることができる。

20

【0009】

他の態様では、方法には更に、多能性細胞の子孫に、子孫細胞を患者に投与する前に、内皮細胞マーカー、好ましくはP1H12モノクローナル抗体で認識されるマーカー；肝細胞マーカー；膵臓細胞マーカー；心筋もしくは平滑筋細胞マーカー；または神経細胞マーカーの発現を誘導することを含む。他の態様では、多能性細胞またはそれらの子孫は、創傷もしくは血管の修復に用いることが可能な細胞型へ分化するよう誘導されるか、または傷ついたもしくは損傷した組織を再生するよう誘導される。

【0010】

30

他の局面では、本発明は単離多能性細胞の分化を誘導可能な作用物質の同定方法の特徴とする。この方法は、SH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、およびCD90抗原を発現し、CD14、CD34、CD45、CD49d、およびCD106抗原を発現しないことを特徴とする多能性細胞に、試験物質を接触させ、その後、試験物質に接触させられていない多能性細胞と比較して、接触させた多能性細胞におけるマーカー発現の変化を検出する段階を含む。ここで、マーカー発現の変化は試験物質が多能性細胞の分化を誘導することを示す。方法は更に、所望の細胞型に特異的な一つまたは複数のマーカーの存在を検出することで、試験物質が多能性細胞の内皮細胞マーカー、肝細胞マーカー、膵臓細胞マーカー、心筋もしくは平滑筋細胞マーカー、または神経細胞マーカーへの分化を促進するのか判定する段階を含む。

40

【0011】

他の局面では、本発明はSH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、およびCD90抗原マーカーを発現し、CD14、CD34、CD45、CD49d、およびCD106抗原マーカーを発現しないことを特徴とする細胞の集団を産生する方法を特徴とし、方法は以下の段階を含む：(a)臍帯血に由来し、多能性間葉系細胞、多能性造血細胞、多能性神経系細胞、または多能性内皮細胞に分化可能な、多能性細胞を提供する段階；(b)段階(a)の多能性細胞を、多能性細胞集団が増殖するのに十分な時間デキサメタゾンを含む培地で培養する段階；および(c)多能性細胞を培地から単離する段階であって、ここで20%を超える該単離多能性細胞がSH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、およびCD90マーカーに対して陽性であり、CD14、CD34、CD45、CD49d、およびCD106マーカーに対して陰性である段階。

50

【0012】

他の局面では、本発明は、SH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、およびCD90マーカーに対して陽性であり、CD14、CD34、CD45、CD49d、およびCD106マーカーに対して陰性である多能性細胞、ならびに薬学的に許容される担体を含む組成物を特徴とする。

【0013】

他の局面では、本発明は、SH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、およびCD90マーカーに対して陽性であり、CD14、CD34、CD45、CD49d、およびCD106マーカーに対して陰性である多能性細胞のインビトロまたはエクスピボ形質転換から得られる多能性子孫細胞を特徴とする。この局面の態様では、形質転換された子孫細胞は、薬学的に許容される担体をも含む組成物の一部になりうる。本発明の全ての局面において、薬学的に許容される担体は食塩水、ゲル、ヒドロゲル、スポンジ、または基質でありうる。

10

【0014】

他の局面では、本発明は、SH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、およびCD90マーカーに対して陽性であり、CD14、CD34、CD45、CD49d、およびCD106マーカーに対して陰性である、UCBから得られる多能性細胞に由来する形質転換された子孫細胞を患者に投与する段階を含む、遺伝子治療の方法を特徴とし、ここで子孫細胞は関心対象の遺伝子（例えば、成長因子、基質分子などの治療用タンパク質）を発現する。

【0015】

他の局面では、本発明は、SH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、およびCD90マーカーに対して陽性であり、CD14、CD34、CD45、CD49d、およびCD106マーカーに対して陰性である、UCBから得られる多能性細胞に由来する形質転換された子孫細胞を患者に投与する段階を含む、患者に治療用タンパク質を提供する方法を特徴とし、子孫細胞は、子孫細胞が患者の体内で治療有効量の治療用タンパク質を発現するように、治療用タンパク質をコードするDNA分子で形質転換されている。

20

【0016】

「神経系細胞(neural cell)」はニューロン（例えば、感覚ニューロン、運動ニューロン、介在ニューロン）または中枢もしくは末梢神経系の支持細胞を意味する。ニューロンの例としては、錐体細胞、ベッツ細胞、星細胞、水平細胞、顆粒細胞、プルキンエ細胞、脊髄運動ニューロン、および神経節細胞が挙げられる。支持細胞の例としては、グリア細胞、乏突起神経膠細胞、星状細胞、衛星細胞、小神経膠細胞、およびシュワン細胞が挙げられる。

30

【0017】

「筋細胞」は骨格筋、平滑筋、または心筋細胞を意味する。

【0018】

「血管細胞」は内皮細胞を意味する。内皮細胞は血管およびリンパ管の内側を覆い、脳、心臓、肝臓、脾臓、肺、脾臓、胃、腸、および腎臓などの臓器に存在し、これらの発生において重要な役割を果たす。

【0019】

本発明者らは、「臍帯血細胞(umbilical cord blood cell)」、「臍帯血細胞(cord blood cell)」、または「胎盤血細胞(placenta blood cell)」により、分娩後、臍帯および胎盤に残る血液を意味する。骨髄と同様に、臍帯血は索細胞(cord cell)の豊富な供給源であることが判明している。

40

【0020】

「幹細胞」または「多能性細胞」は、同義的に用いることが可能であり、生体の2種類またはそれ以上の細胞型を生み出す能力を有する細胞を意味する。

【0021】

所望の細胞型の「マーカー」とは、細胞集団中でマーカーを有する細胞を選別することで、所望の細胞型と所望でない細胞型の両方を含む細胞集団から所望の細胞型の所望のレベルでの精製を実現することが可能となるような、十分に高い割合の所望の細胞型の細胞上に見いだされ、十分に低い割合の所望でない細胞型の細胞上に見いだされる分子であ

50

る。マーカーは、例えば、所望の細胞型の、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% またはそれ以上の細胞上に提示されていてよく、所望でない細胞型の、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、1%またはそれ以下に提示されていてよい。

【0022】

所望の細胞型の細胞表面上に、マーカーが一細胞あたり50分子未満存在している場合、所望の細胞型は細胞表面発現マーカーに対して陰性であるか、またはマーカーの発現を欠く。細胞表面発現マーカー分子を検出する技術は、当技術分野において周知であり、例えばフローサイトメトリーを含む。当業者は、少数のマーカー分子を発現する細胞とマーカー分子を発現しない細胞を区別するため、フローサイトメトリーと併せて酵素増幅染色法 (enzymatic amplification staining technique) を用いることもできる (例えば、Kaplan, Front. Biosci. 7:c33-c43, 2002; Kaplan et al., Amer. J. Clin. Pathol 116:429-436, 2001; および Zola et al., J. Immunol. Methods 135:247-255, 1990を参照)。

10

【0023】

「神経疾患 (neural disease)」は、中枢または末梢神経系に影響を及ぼすまたは関与する疾患または障害を意味する。神経疾患の例としては、多発梗塞性痴呆 (MID)、血管性痴呆、脳血管損傷、アルツハイマー病 (AD)、神経繊維腫症、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、卒中、パーキンソン病 (PD)、発生中の神経系の病状、加齢中の神経系の病状、および頭部外傷などの外傷が挙げられる。神経疾患のその他の例は、眼の眼莖、網膜層 (retinal layer)、および水晶体などの眼、ならびに内耳の組織に影響を及ぼすものである。特定の態様において、患者は神経変性疾患、外傷性損傷、神経毒性損傷、虚血、発生障害、視覚に影響を及ぼす障害、脊髄の損傷もしくは疾患、または脱髄疾患を患っている可能性がある。

20

【0024】

「筋疾患」は、心筋、平滑筋、骨格筋などの筋系に影響を及ぼすまたは関与する疾患または障害を意味する。筋疾患の例としては、筋ジストロフィー (例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD)、ベッカー型筋ジストロフィー (BMD)、肢帯筋ジストロフィー、および先天型筋ジストロフィー)、先天性ミオパシー、および重症筋無力症などの神経筋疾患; 心臓病、大動脈瘤 (マルファン病)、心虚血、うっ血性心不全、心臓弁膜症、および不整脈などの心筋症; ならびに代謝性筋疾患が挙げられる。

30

【0025】

「血管疾患」は血管系に影響を及ぼすまたは関与する疾患または障害を意味する。血管疾患の例としては、末梢血管疾患、末梢動脈疾患、静脈疾患 (深在静脈血栓症など)、虚血、心血管疾患、組織臓器移植拒絶反応、または虚血再灌流損傷の後遺症が挙げられる。さらに他の態様では、末梢血管疾患はアテローム性動脈硬化症、血栓塞栓性疾患、またはバージャー病 (閉塞性血栓性血管炎) である。更なる態様では、心血管疾患は心筋梗塞、心疾患、または冠動脈疾患である。

【0026】

詳細な説明

本発明の方法および組成物に用いられる多能性細胞は、好ましい順に、以下の供給源の範囲に由来可能である: 自己由来、同種由来、または異種由来の供給源。本発明の多能性細胞は、実施例1記載の付着性細胞の密度勾配分離段階および培養段階を含む、いくつかの方法により単離および精製が可能である。コンフルエントな (confluent) 細胞層が形成された後、本発明の細胞を得るための単離プロセスは、通常、形態 (線維芽細胞様形態) ならびに、SH2 (陽性)、SH3 (陽性)、SH4 (陽性)、CD13 (陽性)、CD29 (陽性)、CD49e (陽性)、CD54 (陽性)、CD90 (陽性)、CD14 (陰性)、CD31 (陰性)、CD34 (陰性)、CD45 (陰性)、CD49d (陰性)、およびCD106 (陰性) マーカーに対する抗体を用いる表現型解析により制御される (実施例2を参照)。

40

【0027】

本発明の方法は、CD45などの造血系列に特異的なマーカーに対して陰性の反応を示し、

50

従って胎盤臍帯血から同様に単離できる造血幹細胞とは異なる、多能性細胞を用いる。CD14は本発明の方法で用いられる多能性細胞上に検出されない、別の表面抗原である。通常、本発明の実施に有用な多能性細胞は線維芽細胞様の細胞形態を示し、付着増殖を行う。

【0028】

本発明の方法に用いられる多能性細胞は、複数存在するか、または好ましくはAC133およびCD34を発現する造血系列、間葉幹細胞、ニューロン幹細胞、内皮幹細胞、またはそれらの組み合わせなど、その他の幹細胞の前駆細胞に相当する混合物中に存在しうる。好ましくは、混合物のその他の幹細胞はSH2、SH3、SH4、CD13、CD29、CD49e、CD54、およびCD90抗原マーカーを発現し、CD14、CD31、CD34、CD45、CD49d、およびCD106抗原マーカーを発現しない細胞の子孫である。

10

【0029】

臓器 / 組織再生

本発明の多能性細胞またはそれらの子孫はさまざまな適用に用いることができる。これらは本明細書に記述されるように、接着していない形状の、または例えば三次元の骨格に接着された細胞の移植または体内移植を含むが、これらに限定されない。通常、 10^2 個~ 10^9 個の細胞が一回の手順で移植され、必要に応じて追加の移植が実施される。本発明の方法に従って産生された組織は、損傷もしくは破壊された組織を修復もしくは置換する、既存の組織を増大させる、新規のもしくは改変された組織を導入する、人工器官を修正する、または生物学的組織もしくは構造をつなぎ合わせるために用いることができる。

【0030】

多能性細胞がレシピエントの被験体に対して異種の供給源由来である場合は、免疫抑制剤であるシクロスポリンまたはFK506の投与などの、免疫抑制治療を同時に施すことができる。しかし、UCB由来の多能性細胞は未成熟な状態にあるので、そのような免疫抑制治療は必要ないかもしれない。それゆえ、一例を挙げると、UCB由来の多能性間葉系細胞を、免疫調節（例えば、免疫抑制）治療なしに、レシピエントに投与することができる。

20

【0031】

さらに、UCB由来の多能性細胞またはそれらの子孫により産生される新しい組織から調製される細胞外基質の注射を被験体に投与することができるか、またはさらなる細胞培養に用いてもよい。そのような細胞、組織、および細胞外基質は、疾患もしくは外傷により損傷された、または正常に発生しなかった内皮組織を、修復、置換または増大するのに役立つ、または美容上の目的で役立つ可能性がある。

30

【0032】

UCBまたはそれらの子孫由来の多能性間葉系細胞の製剤を、新しい組織の産生が望まれる部位に直接注射または投与することができる。例えば、以下に限定するものではないが、多能性細胞を注射用にヒドロゲル溶液に懸濁してもよい。または、細胞を含むヒドロゲル溶液を、体内移植に先立ち、内部に細胞が散在する基質を形成するために、鋳型（例えば血管または管状組織構造）内などで硬化させてもよい。基質が硬化されたら、体内移植に先立って細胞が有糸分裂的に増殖するように、細胞構成物を培養してもよい。ハイドロゲルは、共有結合、イオン結合、または水素結合を介して架橋されて三次元の開格子(open-lattice)構造を作り、それが水分子を閉じこめてゲルを形成する、有機ポリマー（天然または合成）である。ハイドロゲルを形成するのに使用できる材料としては、イオン架橋される、アルジネートおよびその塩などの多糖、ポリホスファゼン、およびポリアクリレート(polyacrylate)、または温度もしくはpHにより架橋される、ポリエチレンオキサイド-ポリエチレングリコールブロック共重合体である、PLURONICS(商標)もしくはTETRONICS(商標)(BASE Corp., Mount Olive, N.Y.)などの、ブロック重合体が挙げられる。ハイドロゲル材料の合成方法、およびそのようなハイドロゲルの調製方法は、当技術分野において公知である。

40

【0033】

そのような細胞製剤は、当技術分野において公知である一つもしくは複数の型のコラーゲンなどの選択された細胞外基質成分、ならびに/または成長因子および薬物などを含む

50

、一つまたは複数の他の成分をさらに含んでいてもよい。細胞製剤に有用に組み入れられる可能性のある成長因子としては、当技術分野において公知である、または将来的に同定される、例えばTGF-ファミリー、IGF-IおよびII、成長ホルモン、BMP-13などのBMPなど任意のメンバーであるがこれらに限定されない、一つまたは複数の組織成長因子が含まれる。または、UCB由来の多能性間葉系細胞を、BMP-13またはTGF-などの成長因子を発現および産生するように遺伝的に操作してもよい。本発明の細胞の遺伝的操作についての詳細は本明細書において提供される。細胞製剤に有用に組み入れられうる薬物としては、例えば、抗炎症化合物および局所麻酔薬が挙げられる。同様に製剤に含まれうるその他の化合物としては、例えば、適当なpHと等浸透圧性を提供する緩衝液、滑沢剤、細胞を投与部位またはその近くに保持するための粘性物質（例えば、アルジネート、寒天および植物ゴム）、および投与部位に所望の効果（例えば、組織構成もしくはその物理化学的特性の増強もしくは改変、細胞の生存の補助、または炎症もしくは拒絶反応の抑制）を及ぼす可能性のある他の細胞型が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0034】

UCB由来の多能性間葉系細胞は、直接投与してインビボで組織に接触させることで分化を誘導するか、またはそれらの投与前にインビトロ法またはエクスピボ法を用いて、間葉細胞、造血細胞、神経系細胞、または内皮細胞など所望の細胞型への分化を誘導することが可能である。このようなUCB由来の多能性間葉系細胞の子孫の素質は、細胞が患者に投与されてから、分化を完了するまでに必要な時間を短縮する可能性がある。以下に記述されているような、特定の表現型の細胞に多能性細胞を分化させる技術は、当技術分野において公知である：U.S. Patent No. 5,486,359；5,591,625；5,736,396；5,811,094；5,827,740；5,837,539；5,908,782；5,908,784；5,942,225；5,965,436；6,010,696；6,022,540；6,087,113；5,858,390；5,804,446；5,846,796；5,654,186；6,054,121；5,827,735；および5,906,934、これらは多能性細胞の形質転換について記述している。例えば、Rodgersら（U.S. Patent. No. 6,335,195）は、多能性造血細胞および多能性間葉系細胞のエクスピボ培養法、ならびにアンジオテンシノゲン、アンジオテンシンI(AI)、AI類似体、AI断片およびその類似体、アンジオテンシンII(AII)、AII類似体、AII断片もしくはその類似体、またはAII AT₂-2型受容体アゴニスト単独あるいはその他の成長因子およびサイトカインとの組み合わせの存在下で生育させることで、系列特異的な細胞増殖および分化を誘導する方法を記述している。一つの態様では、本発明の多能性細胞は、例えば当技術分野において公知である技術（例えば、Yang et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99: 8078-83, 2002；Zulewski et al., Diabetes 50: 521-33, 2001；および Bonner-Weir et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 97: 7999-8004, 2001を参照）などを用いて、インビトロで膵臓細胞、特に膵島細胞への分化を誘導することができる。同様に、当技術分野において公知である技術を用いて、本発明の多能性細胞を肝細胞（例えば、Lee et al., Hepatology 40: 1275-1284, 2004を参照）、ニューロン細胞（例えば、Thondreau et al., Differentiation 319-322-326, 2004を参照）、または内皮細胞（例えば、Kassem et al., Basic Clin. Pharmacol. & Toxicol. 95:209-214, 2004；および Pittenger and Martin, Circ. Res. 95:9-20, 2004を参照）へのインビトロでの分化を誘導することもできる。インビボでの幹細胞分化を促進するために、任意で、被験体に分化誘導剤を同時に、または後で投与することも可能である。

【0035】

UCB由来の多能性間葉系細胞またはそれらの子孫は、インビトロで新しい組織を産生するのに用いることができ、その後その組織を被験体の体内で、組織の修復、置換または増大を必要とする部位に、体内移植、移植または別の方法で挿入することができる。UCB由来の多能性間葉系細胞またはそれらの子孫を、三次元の構造物または足場上に接種または「播種」し、インビトロで増殖または生育して、インビボで体内移植できる、生きた内皮組織を形成することが可能である。三次元の構造物は、細胞がそれに接着でき（または細胞が接着できるように改変可能で）、細胞が一層を超えて生育できる、任意の材料および/または形であってよい。基質の形成には、多くの種類の材料を用いてよく、例えば以下

のものが挙げられるが、これらに限定されない：ナイロン（ポリアミド）、ダクロン（ポリエステル）、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリアクリレート、ポリビニル化合物（ポリ塩化ビニルなど）、ポリカーボネート（PVC）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE、テフロン）、サーマノックス（thermanox、TPX）、ニトロセルロース、綿、ポリグリコール酸（PGA）、コラーゲン（スポンジ、組紐、もしくは織った糸などの形状で）、腸線縫合糸、セルロース、ゼラチン、もしくはその他の生体分解性の天然材料、またはさまざまなポリヒドロキシアлкаノアート（polyhydroxyalkanoate）などの合成材料。これらの材料のうち任意のものを、織って網にして、例えば、三次元の構造物または足場を形成することが可能である。基質内の穴や空間は、基質材料内への、または基質材料を通り抜ける細胞移動を許可するまたは防ぐように、当業者が調整できる。一例を挙げれば、Naughtonら（U.S. Patent No. 6,022,743）は、幹細胞または前駆細胞（例えば、臍帯細胞、胎盤細胞、間葉系幹細胞または胎児細胞由来の間質細胞）が三次元の土台上で増殖する、組織培養系について記述している。 10

【0036】

三次元の構造物、基質、ヒドロゲルなどを、置換または修復する組織に適した形に成型することができる。例えば、血管移植片が望まれる場合、その三次元構造物を管状構造の形に成型し、本発明の内皮幹細胞のみと、または間質細胞（例えば、繊維芽細胞）と組み合わせて播種し、しかるべく培養することができる。UCB由来の多能性細胞またはそれらの子孫に加え、三次元の構造物上に形成される新しい組織の生育を増進、またはその一つもしくは複数の特性を変化させるために、その他の細胞を構造物に加えてもよい。そのような細胞として、とりわけ繊維芽細胞、血管周囲細胞、マクロファージ、単球、形質細胞、マスト細胞、および脂肪細胞が挙げられるが、これらに限定されない。 20

【0037】

または、細胞を、流体の交換は可能だが細胞間接触を妨げる、装置またはマイクロカプセル中に封入することもできる。マイクロカプセルに入れられた細胞の移植は、Balladur et al., Surgery 117: 189-94, 1995; および Dixit et al., Cell Transplantation 1: 275-79, 1992など、当技術分野において周知である。一例を挙げれば、体外装置として、体外で存続可能に維持される装置に細胞を収めることができる。好ましくは、多能性細胞が体外で機能的に維持できるように、そして臓器不全の状態を補助するよう役立つように、装置は血液循環系に接続される。他の例では、免疫抑制薬または免疫調節薬の有無によらず、長期間機能を維持するように、カプセルに入れられた細胞を体の特定区画内に置いてよい。 30

【0038】

さらに他の例では、UCB由来の多能性間葉系細胞またはそれらの子孫を、それらの細胞および結果的に生じた組織を天然の組織が通常経験する環境条件下で培養することで、天然のヒト組織の重要な生化学的、物理的および構造上の性質を有する組織構造を産生するため、「バイオリアクター」内の三次元培養系と組み合わせて用いることができる。よって、この三次元培養系は断続的および周期的な加圧下で維持され、本発明の細胞には対流により栄養分が十分に供給される。約2mm～約5mmの厚さの内皮組織構造を置換する間、本発明の細胞への栄養分の十分な供給を維持することは、構造の見掛け密度が増大するため、重要である。圧力は三次元内皮構造を通る流体の流れを促進し、それにより栄養分の供給と構造に埋め込まれた細胞からの廃棄物の除去を改善させる。バイオリアクターは多くのデザインを含みうる。通常、培養条件には、細胞を含む構造に対し、インビボで遭遇するものと同様の生理学的ストレスをかけることが含まれる。例えば、血管構造物は血管への圧力とせん断力をシミュレートする条件下で培養してもよい（例えば、参照によって本明細書に組み入れられる、U.S. Patent No. 6,121,042を参照）。 40

【0039】

本発明の方法は、疾患もしくは外傷の結果生じる、内皮組織の修復もしくは置換を要する被験体の処置、または顔立ちもしくは他の体の特徴を増大させるなどの、美容上の機能の提供に用いることができる。処置には、新しい内皮組織を産生するためにUCB由来の多 50

能性間葉系細胞もしくはそれらの子孫をインピボで使用する、または現在当技術分野で公知であるか、もしくは将来的に開発される任意の方法に従って、インピトロもしくはエクスピボで産生される内皮組織を使用することが必要である可能性がある。例えば、UCB由来の多能性細胞または単離された多能性細胞由来の組織を、それらがインピボで新しい内皮組織を産生するように、組織損傷部位に直接、体内移植、注射または他の方法で投与してもよい。

【0040】

他の例では、本発明の方法には、UCB由来の多能性間葉系細胞もしくはそれらの子孫および血管組織または移植片を用いて調製された心臓弁の置換が含まれる。他の例では、UCB由来の多能性間葉系細胞またはそれらの子孫は、被験体において新しい毛細血管または血管の形成を誘導または促進するため、血管新生因子(angiogenic factor)と組み合わせ

10

【0041】

心筋は通常修復能をもたないため、UCB由来の多能性間葉系細胞またはそれらの子孫を、疾患または変性により損傷された心横紋筋の再生または修復に用いることができる。そのような治療では、多能性細胞は心筋細胞に分化し、レシピエントの健康な組織と一体化して、死細胞または損傷細胞の機能に取って代わり、それにより全体として心筋を再生する。多能性細胞は、例えば数多くの主な適応のための心筋の再生において用いられる：(i)虚血心体内移植、(ii)うっ血性心不全患者の治療、(iii)冠動脈バイパス移植術を受けている患者でのさらなる疾患の予防、(iv)通道組織再生、(v)血管平滑筋再生、および(vi)弁の再生。

20

【0042】

心臓関連の疾患のための多能性細胞治療は、例えば以下の一連の手順に基づく：UCB由来の多能性細胞の採取、多能性細胞の単離/増殖、損傷された心臓への体内移植(安定化基質および生化学的操作はあってもなくてもよい)、およびインサイチューでの心筋形成。この手法は従来組織工学とは、組織がエクスピボで生育させられること、および最終分化形態で体内移植される点で異なる。完全に統合された機能する組織を確立するための治療計画の一部として、宿主環境からの生物学的、生体電氣的、および/または生体力学的誘因は、十分であることも、特定の状況下では増大されることもありうる。

30

【0043】

UCB由来の多能性間葉系細胞またはそれらの子孫は、膵臓または肝臓の疾患または障害の処置に有用でありうる。例えば、UCB由来の多能性間葉系細胞を、それらがインピボで新しい膵臓または肝臓組織を産生するように、損傷部位に直接、体内移植、注射または他の方法で投与してもよい。処置方法には腸外胃腸(extraintestinal gastrointestinal)障害または肝臓膵臓(hepaticopancreatic)障害を有する患者を同定すること、および障害を処置するために、UCB由来の多能性間葉系細胞またはそれらの子孫を含む組成物の治療有効量を患者に投与することが含まれる。「腸外胃腸」障害とは、主に腸の内部以外の領域に局在する胃腸管の障害である。腸外胃腸障害の非限定的な例として、肝臓膵臓障害(hepaticopancreatic disorder)、十二指腸障害、胆管障害、虫垂障害、脾臓障害、および胃障害が挙げられる。「肝臓膵臓」障害とは、膵臓および肝臓の障害である。肝臓膵臓障害の非限定的な例として、糖尿病、膵炎、肝硬変、肝炎、癌、および膵-胆管(pancreaticobiliary)疾患が挙げられる。特定の臓器または構造体の「障害」は、臓器または構造が完全でないという状況を含む。例えば、本発明の目的においては、膵臓を欠いたヒトは膵臓障害を有する。外来性の組織を体内移植する方法は周知である(例えば、膵島移植については、J. Shapiro et. al., New Engl. J. Med. 343: 230-238, 2000を参照)。

40

【0044】

50

UCB由来の多能性間葉系細胞またはそれらの子孫を、神経疾患の処置に役立てることができる。一例を挙げれば、多能性細胞は、患者に投与されて脳などの中枢神経系の神経発生またはグリア発生(gliogenesis)に作用する。そのような処置は、パーキンソン病、アルツハイマー病、または卒中もしくは外傷に罹患した患者を対象にしてもよい。グリア細胞の場合、治療は多発性硬化症またはその他のグリア関連症状の処置に向けられてもよい。生成できる組織の例としては他に、眼の眼茎、網膜層および水晶体、ならびに内耳が挙げられる。特定の方法では、患者は神経変性疾患、外傷性損傷、神経毒性損傷、虚血、発達障害、視覚に影響を及ぼす障害、脊髄の損傷もしくは疾患、または脱髄疾患に罹患していてもよい。機能障害を伴う可能性のある、神経疾患または障害を有する患者に、処置する神経疾患または障害に応じて、ニューロンを産生する治療有効量の多能性細胞、またはその他の細胞型を投与することができる。

10

【0045】

UCB由来多能性間葉系細胞のインビトロ/エクスピボでの使用

UCB由来の多能性間葉系細胞またはそれらの子孫をインビトロで用いて、内皮幹細胞への化合物、アレルゲン、成長/調節因子、薬学的化合物などの効果および/または細胞毒性をスクリーニングし、多能性細胞の生物活性(例えば増殖能、付着性)の変化を測定することにより、特定の疾患の機構を解明し、薬物および/または成長因子が内皮幹細胞の生物活性を調節するよう働く機構を研究し、遺伝子治療、遺伝子送達、またはタンパク質送達のために患者の癌を診断およびモニターし、生物活性産物を産生することができる。

20

【0046】

UCB由来の多能性間葉系細胞またはそれらの子孫は、薬剤、成長/調節因子、抗炎症剤などの効果および細胞毒性について多様な作用物質をスクリーニングするのにインビトロで用いられてもよい。このために、多能性細胞をインビトロで維持し、試験される作用物質にさらすことができる。細胞毒性物質の活性は、培養下の多能性細胞またはそれらの子孫を、損傷または殺す能力により測定することができる。これは、染色技術(例えば、トリパンブルー染色)などの、細胞生死判別アッセイ(cell viability assay)を用いることで容易に評価できる。成長/調節因子の効果は、インビトロでの生細胞の数の解析、例えば総細胞数および差細胞数により評価できる。これは、細胞型特異的細胞性抗原を規定する抗体を用いる免疫細胞化学技術の使用を含む、標準的な細胞学および/または組織学的技術を用いることで達成可能である。UCB由来の多能性細胞に対する様々な薬物の効果

30

【0047】

UCB由来の多能性間葉系細胞を、間葉細胞、造血細胞、神経系細胞、または内皮細胞の分化および成熟に関与する因子の単離および評価に用いることもできる。このように、本発明の多能性細胞を、培地(例えば、馴化培地)などの流体を、細胞増殖、例えば間葉細胞、造血細胞、神経系細胞、または内皮細胞などの増殖を促進することができる因子の存在について評価するためのアッセイに用いることもできる。本発明の多能性細胞は、間葉細胞、造血細胞、神経系細胞、または内皮細胞などの細胞型の特定の系列への分化および/または成熟を促進可能な因子の同定に用いることもできる。さまざまな系が適用可能であり、さまざまな生理学的ストレスに基づいて幹細胞の分化を誘導するよう設計することが可能である。例えば、血管組織をシミュレートするバイオリアクターなどのバイオリアクター系を、本発明の細胞とともに用いることができる。

40

【0048】

遺伝子治療

遺伝的に改変された多能性細胞は、インビボおよびインビトロで非治療的および治療的組換えタンパク質の双方を産生するのに有用である。UCB由来の多能性間葉系細胞はドナー(ヒト以外またはヒト)から実施例1に記載されるように単離され、組換えポリヌクレオチドを用いてインビトロまたはエクスピボでトランスフェクトまたは形質転換されて、レシピエントに移植またはインビトロで培養することができる。よって、遺伝的に改変された多能性細胞または子孫は、インビボまたはインビトロで所望の組換えタンパク質を産

50

生することができる。産生されたタンパク質または分子は、直接または間接的に治療有用性を有するか、あるいは診断用タンパク質または分子として有用である可能性がある。

【0049】

遺伝的に形質転換されたUCB由来の多能性間葉系細胞の治療的使用としては、心筋障害により生じる疾患および障害、循環もしくは血管の障害もしくは疾患、神経疾患もしくは障害、肝疾患もしくは障害、または膵疾患もしくは障害、ならびに組織再生および修復を含む様々な病的状態を処置するために、多能性細胞、多能性細胞集団、またはそれらの子孫を個体に移植することなどが挙げられる。上述したのと同じ技術により、本発明の方法で用いられる遺伝的に改変された多能性細胞または多能性細胞集団を、そのような細胞を必要とする、または遺伝的に改変された細胞によりコードもしくは産生されるタンパク質もしくは分子を必要とする被験体に投与することができる。

【0050】

例えば、様々な型の疾患もしくは障害（例えば、血管疾患もしくは障害）の症状を予防もしくは改善することが可能な産物を発現する遺伝子、または炎症性障害を予防もしくは促進する遺伝子を、UCB由来の多能性細胞に組み入れることができる。一例を挙げれば、これらの多能性細胞を、炎症反応による体内移植の失敗または組織内でのさらなる変性変化のリスクを低減するよう働くと考えられる、抗炎症性遺伝子産物を発現するよう遺伝的に操作する。一つまたは複数の抗炎症性遺伝子産物の発現には、例えば、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、TNF- α 、IL-1、IL-2、および他の炎症性サイトカインを中和する抗体のイディオタイプに相当するペプチドまたはポリペプチドが挙げられる。IL-1はプロテオグリカン、ならびにII型、IX型、およびXI型コラーゲンの合成を低下させることが示されている(Tyler et al., Biochem. J. 227: 69-878, 1985; Tyler et al., Coll. Relat. Res. 82: 393-405, 1988; Goldring et al., J. Clin. Invest. 82: 2026-2037, 1988; および Lefebvre et al., Biophys. Acta. 1052: 366-72, 1990)。TNF- α もプロテオグリカンおよびII型コラーゲンの合成を阻害するが、その作用はIL-1よりずっと弱い(Yaron et al., Arthritis Rheum. 32: 173-80, 1989; Ikebe et al., J. Immunol. 140: 827-31, 1988; および Saklatvala Nature 322: 547-49, 1986)。さらに、例えば、UCB由来の多能性間葉系細胞を操作して、宿主による移植片拒絶反応を防ぐヒト補体調節タンパク質をコードする遺伝子を発現させてもよい。例えば、McCurry et al., Nature Medicine 1: 423-27, 1995を参照。他の例では、UCB由来の多能性間葉系細胞は、血管新生因子を発現するか発現させる原因となる、遺伝子またはポリヌクレオチド配列を含むよう操作されうる。

【0051】

または、UCB由来の多能性間葉系細胞を遺伝的に操作して、TWEAK、TWEAKR、TNFR、他の抗炎症剤または血管新生因子などの治療的物質と同様に、VEGF、FGF、EGF、IGFなどの成長因子を発現および産生させてもよい。例えば、そのような成長因子または治療的物質の遺伝子またはコード配列を、培養物中の成長因子または物質の産生を制御できるように、調節性のプロモーターと機能的に連結して配置することが考えられる。

【0052】

他の例では、UCB由来の多能性間葉系細胞を、心横紋筋細胞の分化および/または維持に重要なタンパク質を発現する遺伝子を含むように遺伝的に改変または操作する。例えば、成長因子(TGF- β 、IGF-1、FGF)、筋原性因子(myogenic factor)(myoD、ミオゲニン、Myf5、MRF)、転写因子(GATA-4)、サイトカイン(カルジオトロフィン-1(cardiotropin-1))、ニューレグリン(neuregulin)ファミリーに属する因子(ニューレグリン1、2、および3)、およびホメオボックス遺伝子(Csx、ティンマン(tinman)、NKxファミリー)が挙げられる。

【0053】

または、形質転換された多能性細胞を遺伝的に操作して、GM-CSF、TNF、IL-1、IL-2などの炎症を促進する天然の遺伝子産物の発現を「ロックアウト」したり、拒絶反応のリスクを低くするためにMHCの発現を「ロックアウト」してもよい。さらに、移植結果を補助

するまたは向上させるために、被験体における遺伝子活性レベルを調整するための遺伝子治療に用いる目的で、細胞を遺伝的に操作してもよい。

【0054】

遺伝的に操作された多能性細胞をスクリーニングすることにより、インビボでリウマチ様疾患の症状もしくは炎症反応の改善をもたらす、かつ/または免疫学的監視および拒絶反応を回避する細胞株を選択するようスクリーニングすることも可能である。

【0055】

多能性細胞またはそれらの子孫に所望のポリヌクレオチドを導入するために、従来の組換えDNA技術が用いられる。例えば、細胞にポリヌクレオチドを導入するための物理的方法にはマイクロインジェクションおよびエレクトロポレーションが含まれる。リン酸カルシウムとの共沈およびポリヌクレオチドのリポソームへの取り込みなどの化学的方法も、哺乳類細胞へポリヌクレオチドを導入する標準的な方法である。例えば、DNAまたはRNAをマウスおよびトリレトロウイルス由来のものなどの標準的なベクターを用いて導入することができる (Gluzman et al., *Viral Vectors*, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.などを参照)。標準的な組換え分子生物学の方法は当技術分野において周知であり (Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, 1989, John Wiley & Sons, New Yorkなど参照)、遺伝子治療用のウイルスベクターが開発され、臨床的に成功裏に用いられている (Rosenberg et al., *N. Engl. J. Med.*, 323: 370, 1990)。その他の方法、例えばDNAで被覆された基質からの裸のポリヌクレオチドの取り込みなども本発明により包含される (例えば、U.S. Patent No. 5,962,427を参照; 参照によって本明細書に組み入れられる)。

10

20

【0056】

遺伝的に操作されたUCB由来の多能性間葉系細胞を、高収率で生物学的産物を産生するようにインビトロで培養することができる。例えば、対象となる特定の生物学的産物 (例えば、成長因子、調節因子、またはペプチドホルモンなど) を自然に産生するか、生物学的産物を産生するように遺伝的に操作された細胞を、クローン性増殖させることができる。細胞が生物学的産物を栄養培地に分泌する場合は、使用済み培地または馴化培地から、標準的な分離技術、例えばいくつか挙げると、タンパク質分画沈殿法 (differential protein precipitation)、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、電気泳動法、およびHPLCなどを用いて、産物を容易に単離することができる。または、対象となる生物学的産物が細胞内に残る可能性もあり、そのためその回収に細胞溶解が必要なこともある。生物学的産物はその後、上に記載された技術のうちの任意の一つまたは複数を用いて精製されてもよい。

30

【0057】

全身注入によるUCB由来多能性間葉系細胞の投与

本発明の多能性細胞は上述したように調製し単離される。多能性細胞またはこれらの細胞から増殖された分集団を、当技術分野において公知の一つまたは複数の方法を用いて、必要とする患者に投与することができる。例えば、冠動脈内注入、静脈逆行性注入 (retrograde venous infusion) (Perin and Silva, *Curr. Opin. Hematol.* 11:399-403, 2004などを参照)、心室内注入、脳室内注入、脳脊髄注入、および頭蓋内注入などにより、患者に多能性細胞を注入して投与することができる。注入による細胞の投与は処置中、一回または複数回繰り返される必要があるかもしれない。複数回の細胞注入が行われる場合は、長い時間をかけて、例えば、1日目に一回目、5日目に二回目、10日目に三回目のようにして、注入物を投与することもできる。最初の10日間の後、2週間から6か月など、細胞を投与しない期間をおくことも可能であり、その後10日間の投与プロトコルを繰り返してもよい。

40

【0058】

直接注射によるUCB由来多能性間葉系細胞の投与

本発明の多能性細胞またはこれらの細胞から増殖された分集団の、他の可能な投与経路は、処置される組織または体領域 (例えば、脳、筋肉、心臓、肝臓、脾臓、および血管系

50

）への、外科的な直接注射（例えば、心筋内または経心内膜(transendocardial)注射、頭蓋内、脳内または槽内注射、筋肉内注射、肝臓内注射、および脾臓内注射）を介する。この投与方法においても、2週間から6か月、あるいは担当医の決定した、処置の中断間隔で複数回の注射が必要なこともある。

【0059】

体内移植によるUCB由来多能性間葉系細胞の投与

UCB由来多能性間葉系細胞を、患者の疾患部位もしくは損傷部位、または疾患もしくは損傷の処置を促進する部位に体内移植することでも投与することができる。

【0060】

本発明はさらに以下の非限定的な実施例により記述される。

10

【0061】

実施例1

臍帯血(UCB)由来の多能性細胞の回収および単離

臍帯血の収集は母親のインフォームドコンセントを得て行われる。乳児の分娩後、子宮内にまだ胎盤がある状態で、臍帯を二重に留めて、臍から7cm~10cm離れて横切する。血液は臍帯の切断された末端から、防腐剤のっていないヘパリンを250U/mL含むM-199培地を10mL入れたボトルに排出させる。いかなる場合も、血液試料は採取後24時間以内に処理される。通常の血液学的解析(Cell-Dye 3500 System, Abbott)および造血前駆細胞の免疫表現型検査(immunophenotyping)のために、各血液採取物からアリコートを取分ける。

【0062】

20

臍帯血細胞は低密度画分に分離され(Hystopaque-1077; Sigma, St. Louis, USA)、単核細胞は洗浄され、培地([alpha]-MEM, USA)に懸濁されて、 1×10^6 細胞/cm²の濃度で播種(T-25フラスコおよび35 mmディッシュ)される。培養物は、5%CO₂を含む加湿された環境で37℃に維持され、7日ごとに培地が交換される。成育中の付着層中の細胞を以下の実施例に用いる。付着性幹細胞の生成の例はBeerheide et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 294: 1052-63, 2002に見られる。

【0063】

実施例2

細胞蛍光測定法(cytofluorometry)による細胞の免疫表現型検査

表面抗原を検出するためには、新鮮なUCB細胞または0.25%EDTAで分離された培養付着性細胞のアリコートを、2%FBSを含むリン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄する。細胞内抗原を検出するため、培養付着性細胞を0.25%トリプシンで分離し、PBSで洗浄して、70%エタノールで透過処理される(4℃で10分間)。直接アッセイのために、細胞を以下の抗ヒト抗体で免疫標識する: CD13-PE、CD31-FITC、CD54-PE、CD90-FITC、CD51/CD61-FITC (Pharmlingen, Los Angeles, CA, USA)、CD14-PE、CD38-FITC、CD34-PE (Dako, Glostrup, Denmark)、CD29-FITC、CD45-PerCP、CD49d-PE、CD49e FITC、CD64-FITC (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA)、および/またはCD106-FITC (R&D Systems, Abingdon, UK)。対照として、マウスIgG₁-PE、IgG₁-FITC、IgG₁-perCP、またはIgG2n-PE (Becton-Dickinson)を用いる。間接アッセイのために、細胞を以下の抗ヒト抗体で免疫標識する: SH2、SH3、SH4 (Osis Therapeutics, Baltimore, Md, USA)、フォン・ウィルブランド因子(Pharmlingen)、平滑筋アクチン、ASMA (Sigma)またはMab1470 (Chmeicon, Temecula, CA, USA)。二次抗体として、抗マウスIgGwm-FITCまたは-PE (Sigma)を用いる。標識された細胞はエピ蛍光顕微鏡(epifluorescence microscopy)またはフローサイトメトリーのどちらかにより解析される。後者の場合、CELLQUESTソフトウェアを用いるFACScanフローサイトメーター (Becton Dickinson)で、10,000件の事象を取得し、解析する。

30

40

【0064】

実施例3

UCB由来多能性間葉系細胞のインビトロ脂質生成分化

多能性細胞は 10^{-6} Mデキサメタゾン、50μg/mLアスコルビン酸、および10mM β-グリセロリン酸を含むH5100中で培養され、その結果、多能性細胞はオイルレッド染色で示され

50

るように、一部脂肪細胞に分化する (Ramirez-Zacarias et al., *Histochemistry* 97: 493-7, 1992)。

【 0 0 6 5 】

実施例 4

UCB由来多能性間葉系細胞のインビトロ神経発生分化

実施例1のように得られた単核臍帯血細胞を、通常の組織培養フラスコ (Nunc) 中で、グルタミン (0.02mM) およびペニシリン/ストレプトマイシン (100U/mL) を含む 30% ウシ胎仔血清 (FCS) を補った High Dulbecco's MEM (GibcoBRL) で培養する。分化のために、細胞を 1 mg/mL ポリ-D-リジンおよび 13 μg/mL ラミニンで被覆したカバーガラスに播種し、Dulbecco's MEM、15% 加熱非働化 FCS、100U/mL ペニシリン/ストレプトマイシン、50ng/mL 神経成長因子、10ng/mL bFGF、1mM ジブチリル cAMP、0.5mM IBMX、および 10 μM レチノイン酸を含む、XXL 分化培地中で少なくとも 14 日間インキュベートする。

【 0 0 6 6 】

誘導期間 (27 日間) の後、標準的なプロトコル (Rosenbaum et al., *Neurobiol. Dis.* 5: 55-64, 1998) に従って細胞は固定され、神経特異的抗原に対する抗体で染色される。標本は蛍光および透過型光学顕微鏡を用いて解析される。

【 0 0 6 7 】

実施例 5

UCB由来多能性間葉系細胞のインビトロ造血分化

多能性 UCB 細胞を、hu-Flt3-L (CellGenix)、hu-SCF (CellGenix)、IL-3 (Cellsystems)、hu-IL-6 (Cellsystems)、hu-TPO (CellGenix)、および hu-G-CSF (Amgen) を含む成長因子混合物を加えた、造血特異的培地の存在下で 2 週間増殖させる。0 日目と 14 日目のヒト前駆細胞コロニー形成アッセイは既製品の (ready-to-use) メチルセルロース培地を利用して行う (Methocult 4434, Stem Cell Technologies)。

【 0 0 6 8 】

実施例 6

UCB由来多能性間葉系細胞のマウスでのインビボ肝臓分化

Beerheide et al., *Biochem. Biophys. Research Comm.* 294: 1052-63, 2002 の手順の後、SCID マウス (6 週齢 ~ 10 週齢、18g ~ 22g) を、投与直前に混合した 61.5mg/kg ケタミンおよび 2.3mg/kg キシラジンの腹腔内注射により麻酔する。一つの手順において、肝切除術が、1 番肝葉 (肝臓の主要な右上葉および左上葉 (2 番葉および 3 番葉) の直下にある大きな葉) においてそれを結紮切除することにより行われる。幹細胞懸濁液 (100 μL の William's E 培地に本発明のヒト臍帯血幹細胞 2×10^5 個が懸濁されたもの) を 2 番肝葉の被膜下実質に 26 ゲージの針を用いてゆっくり注射する。他の手順では、肝切除術は行われず、幹細胞は直接 1 番肝葉に移植される。取り込まれたヒト UCB 細胞の分化転換は、幹細胞移植レシピエントの肝組織について、ヒトアルブミンと交差反応するが、マウスアルブミンとは反応しないモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学を実施することで測定できる。

【 0 0 6 9 】

実施例 7

ヒツジにおける UCB 由来多能性間葉系細胞のインビボ造血分化

Flake et al., *Science* 233: 776-8, 1986 の手順の後、免疫前ヒツジ胎仔の腹膜内に 1500 個の本発明の UCB 幹細胞を注射する。移植手順の 8 か月後に、ヒト UCB 細胞の造血細胞への分化転換を、移植レシピエント由来の心臓標本 (心房、心室、および隔壁) の交差反応性を、ヒト熱ショックタンパク質に特異的な抗 HSP27 モノクローナル抗体を用いて検査することで測定できる。

【 0 0 7 0 】

実施例 8

ヒツジにおける UCB 由来多能性間葉系細胞のインビボ肝臓分化

本発明の UCB 幹細胞を、上記の実施例 7 の手順を用いて免疫前ヒツジ胎仔の腹膜内に注射する。移植手順の 14 か月後に、ヒト UCB 細胞の肝細胞への分化転換を、移植レシピエント

10

20

30

40

50

由来の肝臓標本の交差反応性を、ヒトアルブミンと交差反応するがヒツジアルブミンとは反応しないモノクローナル抗体を用いて検査することで測定できる。

【 0 0 7 1 】

本明細書に引用される刊行物および特許は、各刊行物または特許が具体的にまた個々に参照により組み入れられことを示されるのと同様に、すべて参照により本明細書に組み入れられる。上記の発明は、理解を明確にするため、例や実施例を用いて詳しく記述したが、添付の特許請求の範囲の意図または範囲から逸脱することなく、ある種の変更および修正をそれに加えてもよいことは、本発明の開示を鑑みて、当業者には容易に明らかである。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/42743
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 48/00; C12N 5/08 US CL : 424/93.21; 435/366, 372 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/93.21; 435/366, 372 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/0180269 A1 (HAIRI) 25 September 2003 (25.09.2003), abstract, pages 1 - 6, 8, 13 - 15	1 - 32
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 27 April 2005 (27.04.2005)		Date of mailing of the international search report 11 MAY 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Mary A. Davis</i> Ruth A. Davis Telephone No. 571-272-0915

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/42743

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
WEST, PubMed, STN-CAS
search terms: cord blood, placental blood, vascular disease, muscle disease, hepatic, pancreatic, neurological disease, surface markers,
composition, pluripotent cell

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00	V
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	E
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

(72) 発明者 アダムス クリストフ エム.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レキシントン バスキン ロード 10

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA02 DA02 GA11 HA17
 4B065 AA93X AA93Y AB01 AC20 BA01 BA23 CA44 CA46
 4C081 AB01 AB11 AB31 AB36 BA12 CA081 CA151 CA181 CC02 CD041
 CD34 DA12 DA15
 4C084 AA02 AA13 NA14 ZA022 ZA162 ZA202 ZA332 ZA342 ZA362 ZA382
 ZA402 ZA452 ZA662 ZA752 ZA942 ZB082 ZB112 ZB152
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB34 BB64 BB65 MA16 MA28 NA14 ZA02
 ZA16 ZA20 ZA33 ZA34 ZA36 ZA38 ZA40 ZA45 ZA66 ZA75
 ZA89 ZA94 ZB08 ZB11 ZB15 ZC21