(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-540599
(P2023-540599A)
(43)公表日　令和5年9月25日(2023.9.25)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/19 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/19	ＺＮＡ	４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ	*15/24 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/24		
Ｃ１２Ｎ	*15/113 (2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/867 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/867	Ｚ	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全39頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-515394(P2023-515394)
(86)(22)出願日　令和3年9月7日(2021.9.7)
(85)翻訳文提出日　令和5年5月2日(2023.5.2)
(86)国際出願番号　PCT/EP2021/074612
(87)国際公開番号　WO2022/049306
(87)国際公開日　令和4年3月10日(2022.3.10)
(31)優先権主張番号　20382792.8
(32)優先日　令和2年9月7日(2020.9.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　518158123
フンダシオン インスティチュート デ インベスティガシオン サニタリア フンダシオン ヒメネス ディアス
スペイン国 ２８０４０ マドリッド アベニダ デロス レイエス カトリコス ２
(71)出願人　522289264
セントロ デ インベスティガシオネス エネルゲティカス メディオ アムビエンタレス イ テクノロジカス オー．エー．，エム．ピー．
スペイン国 ２８０４０ マドリッド アベニダ コンプルテンセ ４０
(71)出願人　522289275
コンソルシオ セントロ デ インベステ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＣＸＣＲ４及びＩＬ－１０を共発現する間葉系幹細胞並びにその使用

(57)【要約】
本発明は、ケモカイン受容体タイプ４（ＣＸＣＲ４）及びインターロイキンＩＬ－１０を安定に共発現するために、組込み発現ベクターが形質導入されていることを特徴とする間葉系幹細胞（ＭＳＣ）に関する。さらに、本発明は、特に炎症性及び／又は自己免疫性疾患の治療における、医薬品としての、上記ＭＳＣの使用に関する。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ．プロモーターと、
ｂ．ケモカイン受容体タイプ４（ＣＸＣＲ４）をコードする配列と、
ｃ．インターロイキンＩＬ－１０をコードする配列と、
を含む、ＤＮＡ発現カセット。
【請求項２】
前記ケモカイン受容体タイプ４（ＣＸＣＲ４）をコードする配列は配列番号１であり、前記インターロイキンＩＬ－１０をコードする配列は配列番号３であることを特徴とする、請求項１に記載の発現カセット。
【請求項３】
導入遺伝子発現を増大するための調節要素を更に含む、請求項１又は２に記載の発現カセット。
【請求項４】
前記調節要素が、ウッドチャック肝炎ウイルス調節要素（ＷＰＲＥ）ＲＮＡ輸出シグナル配列又はその機能的変異体若しくはフラグメントである、請求項１～３のいずれか１項に記載の発現カセット。
【請求項５】
前記ケモカイン受容体タイプ４（ＣＸＣＲ４）をコードする配列と前記インターロイキンＩＬ－１０をコードする配列との間に、自己触媒ペプチドをコードする配列を更に含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の発現カセット。
【請求項６】
前記自己触媒ペプチドは、Ｅ２Ａ、好ましくは配列番号２である、請求項１～５のいずれか１項に記載の発現カセット。
【請求項７】
前記プロモーターは、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター配列又はその機能的ホモログ若しくは変異体である、請求項１～６のいずれか１項に記載の発現カセット。
【請求項８】
５’から３’への順で、
ａ．ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター配列又はその機能的ホモログ若しくは変異体と、
ｂ．前記ケモカイン受容体タイプ４（ＣＸＣＲ４）をコードする配列と、
ｃ．前記自己触媒ペプチドＥ２Ａをコードする配列と、
ｄ．インターロイキンＩＬ－１０をコードする配列と、
ｅ．ウッドチャック肝炎ウイルス転写後制御要素（ＷＰＲＥ）と、
を含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の発現カセット。
【請求項９】
５’から３’への順で、
ａ．ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター配列又はその機能的ホモログ若しくは変異体と、
ｂ．前記ケモカイン受容体タイプ４（ＣＸＣＲ４）をコードする配列番号１と、
ｃ．前記自己触媒ペプチドＥ２Ａをコードする配列番号２と、
ｄ．インターロイキンＩＬ－１０をコードする配列番号３と、
ｅ．ウッドチャック肝炎ウイルス転写後制御要素（ＷＰＲＥ）と、
を含む、請求項１～８のいずれか１項に記載の発現カセット。
【請求項１０】
請求項１～９のいずれか１項に記載の発現カセットを含む組換え遺伝子送達組込みベクター。
【請求項１１】

レンチウイルスベクターであることを特徴とする、請求項１０に記載の組換え遺伝子送達組込みベクター。
【請求項１２】
請求項１～９のいずれか１項に記載の発現カセット、又は請求項１０若しくは１１に記載の組換え遺伝子送達組込みベクターを含む細胞。
【請求項１３】
骨髄、胎盤、臍帯、羊膜、月経血、末梢血、唾液腺、皮膚及び包皮、滑液、羊水、子宮内膜、脂肪組織、臍帯血、及び／又は歯組織に由来する間葉系幹細胞であることを特徴とする、請求項１２に記載の細胞。
【請求項１４】
請求項１０若しくは１１に記載の組換え遺伝子送達組込みベクター、又は請求項１２若しくは１３に記載の細胞と、任意選択で、薬学的に許容される添加剤又は担体とを含む医薬組成物。
【請求項１５】
医薬用である、請求項１０若しくは１１に記載の遺伝子送達組込みベクター、又は請求項１２若しくは１３に記載の細胞。
【請求項１６】
炎症性疾患の治療における、請求項１５、１０若しくは１１に記載の遺伝子送達組込みベクター、又は請求項１２若しくは１３に記載の細胞。
【請求項１７】
移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、敗血症、関節リウマチ又は炎症性腸疾患の治療における、請求項１５、１６、１０若しくは１１に記載の遺伝子送達組込みベクター、又は請求項１２若しくは１３に記載の細胞。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は医療分野に関する。特に、本発明は、ケモカイン受容体タイプ４（ＣＸＣＲ４）及びインターロイキンＩＬ－１０を安定に共発現するために、組込み発現ベクターが形質導入されていることを特徴とする間葉系幹細胞（ＭＳＣ）に関する。さらに、本発明は、特に炎症性疾患及び／又は自己免疫性疾患の治療における、医薬品としての、上記ＭＳＣの使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
ＭＳＣは、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、及び樹状細胞を含む、活性化リンパ系細胞に対して免疫調節作用を有する多能性成体間質細胞である。ＭＳＣは炎症部位に対してホーミングする能力を示し、そこで、ＭＳＣは炎症性反応を調節し、傷ついた組織の修復に貢献することができる。
【０００３】
動物モデルにおいて、ＭＳＣは、再生医療においてだけでなく、炎症性疾患モデル及び自己免疫性疾患モデルにおいてもその有効性が証明されている。ＭＳＣは、第Ｉ／ＩＩ相臨床試験にて、異なる疾患、なかでも、例えば、ステロイド抵抗性移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）、重症全身性エリテマトーデス、肛門周囲複雑瘻孔、変形性膝関節症又は慢性完全麻痺において、安全性プロファイルを証明し、臨床的有用性の予備的証拠を示してきた。動物モデル及び初期段階の臨床試験において得られた結果にもかかわらず、３つの第ＩＩＩ相臨床試験のみでしか、ＭＳＣの治療有効性は標準的な治療に対する統計的な有意性を示していない。これには、肛門周囲複雑瘻孔（ＮＣＴ００４７５４１０）、小児のステロイド不応性ＧＶＨＤ（ＮＣＴ０２３３６２３０）及び慢性進行性虚血性心不全（ＮＣＴ０１７６８７０２）の治療が含まれる。
【０００４】
ＭＳＣの治療有効性を低減させ得るパラメータの中で、これらの細胞のｅｘ　ｖｉｖｏ

での増殖が、ＭＳＣにおいて観察されるホーミング受容体の中程度の発現を低減させ、さらにこれらの細胞における老化を誘発することが示されてきたことは言及に値する。

【０００５】

したがって、本発明は、特に、炎症部位へのＭＳＣの遊走を改善し、さらに、免疫抑制性サイトカイン及び抗炎症性サイトカインを分泌することにより、ＭＳＣの治療有効性を改善すること、そして、標準的な非改変ＭＳＣの治療有効性を増強することに焦点を当てている。

【発明の概要】

【０００６】

上記に説明したように、本発明は、特に、標準的な非改変ＭＳＣと比較して、炎症部位へのＭＳＣの遊走を強化し、免疫抑制性サイトカイン及び抗炎症性サイトカインの放出を強化することにより、ＭＳＣの治療的有効性を改善することに焦点を当てている。

【０００７】

そうするために、本発明の発明者らは、ケモカイン受容体タイプ４（ＣＸＣＲ４）及びインターロイキンＩＬ－１０を共発現する組込み発現ベクターを形質導入したＭＳＣを用いた。

【０００８】

特に、ＣＸＣＲ４及びＩＬ－１０についてコードするレンチウイルスベクターを、本発明の文脈において構築した。この発現ベクターを、ＭＳＣを形質導入するために用い、そしてＣＸＣＲ４及びＩＬ－１０の両方を安定な方法で共発現させた。

【０００９】

実施例２．１は、ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０　ｍＲＮＡを遺伝子導入したＭＳＣが、局所炎症のマウスモデルにおいて抗炎症特性を発揮することを示す。それにもかかわらず、これらの細胞は、ＷＴ　ＭＳＣと比較して、抗移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）特性の強化を示さない（実施例２．２）。ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０　ｍＲＮＡを遺伝子導入したＭＳＣと比較して、ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０配列を保持するレンチウイルスベクターを形質導入したＭＳＣ（実施例２．３）は、ＷＴ　ＭＳＣと比較して、強化されたｉｎ　ｖｉｔｒｏ免疫調節特性（実施例２．４及び実施例２．５）及び局所的なｉｎ　ｖｉｖｏ抗炎症作用（実施例２．３～実施例２．６）を発揮しただけでなく、驚くべきことに、本発明の実施例２．７に示されるように、有意な抗ＧｖＨＤ作用も発現した。

【００１０】

実際、本発明に含まれるｉｎ　ｖｉｔｒｏ実験は、これらの分子の安定な共発現が、ＳＤＦ－１へのＭＳＣの遊走を効率的に強化し、これらの細胞の免疫抑制特性を改善させたことを示す。さらに、ＣＸＣＲ４及びＩＬ１０を異所的に発現するＭＳＣの、炎症パッドへの優先的なホーミングが、局所パッド炎症が誘発されたマウスモデルにおいて証明された。まとめると、これらの結果は、ヒトＭＳＣにおける特異的なホーミング分子及び抗炎症性分子、例えばＣＸＣＲ４及びＩＬ１０の安定な共発現が、ＷＴ　ＭＳＣと比較した、これらの細胞における抗炎症能の強化を与えることを証明する。ＣＸＣＲ４及びＩＬ１０を共発現する組込み発現ベクターを形質導入したこの新世代のＭＳＣの使用は、炎症性疾患及び／又は自己免疫性疾患の治療のための臨床細胞療法に有意な影響を有するであろう。

【００１１】

結果として、要するに、本明細書において、ＣＸＣＲ４及びＩＬ－１０の両方を共発現する組込み発現ベクターを形質導入したＭＳＣの、特に炎症性疾患及び／又は自己免疫性疾患の治療における、医薬品としての使用が提案される。

【００１２】

そこで、本発明の第１の実施の形態は、ａ）プロモーターと、ｂ）ケモカイン受容体タイプ４（ＣＸＣＲ４）をコードする配列と、ｃ）インターロイキンＩＬ－１０をコードする配列とを順に含むＤＮＡ配列を含む発現カセット（以下、本発明の発現カセット）に関する。好ましい実施の形態において、発現カセットは、導入遺伝子発現を増大するための

調節要素を更に含む。好ましい実施の形態において、調節要素は、ウッドチャック肝炎ウイルス調節要素（ＷＰＲＥ）ＲＮＡ輸出シグナル配列又はその機能的変異体若しくはフラグメントである。好ましい実施の形態において、発現カセットは、ケモカイン受容体タイプ４（ＣＸＣＲ４）をコードする配列とインターロイキンＩＬ－１０をコードする配列との間に、自己触媒ペプチドをコードする配列を更に含む。好ましい実施の形態において、自己触媒ペプチドは、Ｅ２Ａである。好ましい実施の形態において、プロモーターは、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター配列又はその機能的ホモログ若しくは変異体である。好ましい実施の形態において、発現カセットは、５’から３’への順で、ａ）ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター配列又はその機能的ホモログ若しくは変異体と、ｂ）ケモカイン受容体タイプ４（ＣＸＣＲ４）をコードする配列と、ｃ）自己触媒ペプチドＥ２Ａをコードする配列と、ｄ）インターロイキンＩＬ－１０をコードする配列と、ｄ）ウッドチャック肝炎ウイルス転写後制御要素（ＷＰＲＥ）とを含む。

【００１３】

好ましい実施の形態において、発現カセットは、ヒト遺伝子ＣＸＣＲ４（配列番号１）及びＩＬ１０（配列番号３）の非天然コドン最適化配列を含む。好ましい実施の形態において、自己触媒ペプチドＥ２Ａをコードする配列が、配列番号２であり、これは、両分子（ＣＸＣＲ４及びＩＬ１０）の共発現を容易にするために用いられる。

【００１４】

本発明の第２の実施の形態は、上記で定義した発現カセットを含む組換え遺伝子送達ベクター（以下、本発明の組換え遺伝子送達ベクター）に関する。好ましい実施の形態において、組換え遺伝子送達ベクターは、レンチウイルスベクターである。好ましい実施の形態において、本発明のベクターは、宿主染色体に永久的に組み込まれる組込みベクターである。

【００１５】

本発明の第３の実施の形態は、本発明の発現カセット又は組換え遺伝子送達ベクターを含む細胞（以下、本発明の細胞）に関する。好ましい実施の形態において、細胞は、骨髄、胎盤、臍帯、羊膜、月経血、末梢血、唾液腺、皮膚及び包皮、滑液、羊水、子宮内膜、脂肪組織、臍帯血、及び／又は歯組織に由来するＭＳＣである。

【００１６】

本発明の第４の実施の形態は、本発明の組換え遺伝子送達ベクター又は細胞と、任意選択で、薬学的に許容される添加剤又は担体とを含む医薬組成物に関する。

【００１７】

本発明の第５の実施の形態は、医薬品として使用される本発明の遺伝子送達ベクター又は細胞に関する。好ましい実施の形態において、本発明は、炎症性疾患及び／又は自己免疫性疾患、例えば移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、敗血症又は関節リウマチの治療において使用される本発明の遺伝子送達ベクター又は細胞に関する。代替で、この実施の形態は、炎症性疾患及び／又は自己免疫性疾患、例えば移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、敗血症又は関節リウマチを治療する方法であって、本発明の遺伝子送達ベクター若しくは細胞、又はこれらを含む医薬組成物の、治療上有効な投与量又は量を患者に投与することを含む、方法に関する。

【００１８】

本発明の目的のために、以下の用語が定義される：

「含む（comprising）」は、語「含む」の前にある（follows）全てのものを含むが、これに限定されないことを意味する。したがって、用語「含む」の使用は、列挙された要素が必要であるか、又は必須であるが、他の要素は任意選択であり、存在してもしなくてもよいことを示す。

「のみからなる（consisting of）」は、語句「のみからなる」の前にある（follows）全てのものを「含み、これに限定される」ことを意味する。したがって、語句「のみからなる」は、列挙された要素が必要であるか、又は必須であり、かつ他の要素が何ら

存在し得ないことを示す。

「薬学的に許容される添加剤又は担体」は、本発明の医薬組成物において任意選択で含まれてよい、患者に有意な有害毒性学的作用を引き起こさない添加剤を示す。

本発明において「治療上有効な投与量又は量」は、細胞又は医薬組成物が上述のように投与され、炎症性疾患又は自己免疫性疾患を有する対象においてポジティブな治療応答をもたらす場合の状況を指す。正確な必要量は、対象の種、年齢、及び一般的な状態、治療される状態の重症度、投与様式等に応じて、対象毎に変わるであろう。全ての個々のケースにおける適切な「有効」量は、本明細書中に提供される情報に基づいて、日常的な実験を用いて当業者によって決定され得る。

【図面の簡単な説明】

【００１９】

【図１】局所炎症のモデルマウスにおける、バイシストロン性ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０ ｍＲＮＡを遺伝子導入したＭＳＣのｉｎ ｖｉｖｏ有効性の証拠を示す図である。ＷＴ－ＭＳＣと比較して、ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０ ｍＲＮＡを遺伝子導入したＭＳＣの抗炎症作用の強化が観察される。

【図２】ＧＶＨＤモデルマウスにおける、バイシストロン性ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０ ｍＲＮＡを遺伝子導入したＭＳＣのｉｎ ｖｉｖｏ有効性の欠如を示す図である。Ａ）生存曲線、Ｂ）重量及びＣ）臨床スコア。

【図３】（Ａ）ＣＸＣＲ４及びＩＬ－１０を共発現するために用いたＤＮＡバイシストロン性レンチウイルスベクターのデザイン。ＷＴ－ＭＳＣと比較した、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣにおける、（Ｂ）ＣＸＣＲ４のレベル、（Ｃ）ＩＬ－１０分泌、及び（Ｄ）細胞当たりベクターコピー数（ＶＣＮ／細胞）。Ｎ．Ｄ．検出不能。

【図４】ＤＮＡ ＰＧＫ－ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０レンチウイルスベクターを形質導入したＭＳＣのｉｎ ｖｉｔｒｏ特性評価を示す図である。Ａ）ＷＴ－ＭＳＣと比較したＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの免疫表現型。Ｂ）ＷＴ－ＭＳＣと比較したＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの骨組織への分化能。Ｃ）ＷＴ－ＭＳＣと比較したＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの脂肪組織への分化能。

【図５】ＷＴ－ＭＳＣと比較した、ＤＮＡ ＰＧＫ－ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０レンチウイルスベクターを形質導入したＭＳＣの遊走能の強化を示す図である。Ａ）ＳＤＦ－１に応答したＷＴ－ＭＳＣ及びＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの遊走能の代表的な写真。Ｂ）ＳＤＦ－１に応答したＷＴ－ＭＳＣ及びＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの遊走能の定量化。

【図６】ＤＮＡ ＰＧ－ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０レンチウイルスベクターを形質導入したＭＳＣの、ｉｎ ｖｉｔｒｏ免疫抑制能の強化を示す図である。Ａ）ＭＳＣのｉｎ ｖｉｔｒｏ免疫抑制活性を評価するために用いた実験系のスキーム。Ｂ）ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣは、ＷＴ－ＭＳＣよりも改善された免疫抑制能を示した。

【図７】局所炎症のモデルマウスにおけるＤＮＡ ＰＧＫ－ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０レンチウイルスベクターを形質導入したＭＳＣのｉｎ ｖｉｖｏ有効性の強化を示す図である。Ａ）ＷＴ－ＭＳＣ及びＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣのｉｎ ｖｉｖｏ抗炎症作用を評価するために用いた実験系のスキーム。Ｂ）ＷＴ－ＭＳＣと比較した、ＰＧＫ－ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０レンチウイルスベクターを形質導入したＭＳＣの抗炎症作用の強化。

【図８】ＷＴ－ＭＳＣと比較した、ＤＮＡ ＰＧＫ－ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０ ＬＶを形質導入したＭＳＣの抗ＧｖＨＤの強化：ＧｖＨＤ臨床徴候の分析を示す図である。Ａ）ＷＴ－ＭＳＣ及びＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣのｉｎ ｖｉｖｏ抗ＧＶＨＤを評価するために用いた実験システムのスキーム。Ｂ）異なる実験群を比較するＧＶＨＤスコア。

【図９】ＷＴ－ＭＳＣと比較した、ＤＮＡ ＰＧＫ－ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０ ＬＶを形質導入したＭＳＣの抗ＧｖＨＤの強化を示す図である。Ａ）ＧＶＨＤヒト化マウスモデルにおける、異種ドナー白血球の増殖の低減を示すレシピエントマウスの末梢血中のヒトＣＤ４５$^{+}$細胞のフローサイトメトリ分析。Ｂ）ＧＶＨＤヒト化マウスモデルにおける脾臓中のヒトＣＤ４５$^{+}$細胞のフローサイトメトリ分析であり、これにより、この免疫器官における異種ドナー白血球の浸潤の低減が確認される。

【図１０】ＷＴ－ＭＳＣと比較した、ＤＮＡ　ＰＧＫ－ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０　ＬＶを形質導入したＭＳＣの抗ＧｖＨＤの強化：ＩＦＮ－ｇ又はＩＬ１０を発現するドナーリンパ球の浸潤の分析を示す図である。Ａ）ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０－ＭＳＣを注入したＮＳＧマウスの脾臓中の、ＧＶＨＤ疾患に関与するＩＮＦｇ分泌ヒトＴ細胞の含有量の低減。Ｂ）ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０－ＭＳＣで処理したＧＶＨＤを有するＮＳＧマウスの脾臓中のＩＬ１０分泌ヒトＴ細胞の含有量の増大。

【図１１】ＷＴ－ＭＳＣと比較した、ＤＮＡ　ＰＧＫ－ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０　ＬＶを形質導入したＭＳＣの抗ＧｖＨＤの強化：ｑＰＣＲによるレシピエントマウスにおけるヒト因子の定量化を示す図である。Ａ）ＷＴ－ＭＳＣ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣで処理したＮＳＧの脾臓中の炎症誘発性因子（ＩＦＮｇ、ＩＬ－１７及びＩＬ－２２）の分析。Ｂ）ＷＴ－ＭＳＣ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣで処理したＮＳＧの脾臓中の抗炎症性因子（ＩＬ－５又はＦｏｘＰ３）の分析。

【図１２】ヒト単核細胞を移植し、ＷＴ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを注入したＮＳＧマウスにおける重量及びＧＶＨＤ臨床スコアの推移を示す図である。（Ａ）０日目の重量を１００％に相当すると仮定した、経時的なパーセンテージとして示した重量の推移。（Ｂ）異なる移植群における経時的に決定した疾患の臨床スコア。総合的なＧＶＨＤスコアを、重量減少、姿勢、活動性、髪質、皮膚の完全性、及び下痢の存在に関して、評価した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図１３】ヒト単核細胞を移植し、ＷＴ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを注入したＮＳＧマウスにおける、移植後３週間での末梢血中の循環ヒト細胞のフローサイトメトリ分析を示す図である。（Ａ）循環ヒトＣＤ４５$^{+}$細胞のパーセンテージ。（Ｂ）循環ヒトＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞のパーセンテージ。（Ｃ）ヒトＣＤ４$^{+}$、ＣＤ８$^{+}$又はＣＤ４$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞としてのＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞の特性評価。各バーは、平均±ＳＥＭを表す。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図１４】ヒト単核細胞を移植し、ＷＴ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを注入したＮＳＧマウスにおける循環ヒトＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞（ナイーブ、エフェクター及びメモリーＴ細胞）の表現型特性評価を示す図である。（Ａ）ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞におけるエフェクターＴ／ナイーブＴ細胞比。（Ｂ）ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞におけるエフェクターＴ／ナイーブＴ細胞比。各バーは平均±ＳＥＭを表す。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１。

【図１５】ＮＳＧマウスにヒト単核細胞を移植し、ＷＴ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを注入した後３週間での末梢血中の循環ヒトＴ細胞における活性化マーカーのフローサイトメトリによる分析を示す図である。ＣＤ３$^{+}$ＣＤ４５$^{+}$として標識化したＴ細胞の活性化プロファイル。各バーは、２つの異なるドナーからのＭＮＣを用いた２つの異なる実験からのデータの平均±ＳＥＭを表す（ｎ＝１０匹～１２匹のマウス／群）。＊ｐ＜０．０５。

【図１６】ヒト単核細胞を有し、ＷＴ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを注入したＮＳＧマウスの３週間後の末梢血中の循環ヒトＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞における疲弊マーカーの分析を示す図である。ＣＤ３$^{+}$ＣＤ４５$^{+}$ヒトＴ細胞の阻害プロファイル。

【図１７】ヒト単核細胞を移植し、ＷＴ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを注入した後３週間でのＮＳＧ移植マウスの血清中のＧＶＨＤに関与するヒトサイトカイン及び成長因子のレベルを示す図である。各バーは平均±ＳＥＭを表す。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図１８】ヒト単核細胞を有し、ＷＴ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを注入したＮＳＧマウスの移植後３週間での脾臓におけるヒト造血細胞のフローサイトメトリによる分析を示す図である。ＣＤ３$^{+}$細胞、ＣＤ１９$^{+}$細胞、ＣＤ５６$^{+}$細胞、ＣＤ１４$^{+}$細胞及びＣＤ１５$^{+}$細胞として分布した循環ヒトＣＤ４５$^{+}$細胞のパーセンテージ。各バーは、平均±ＳＥＭを表す。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図１９】脾臓におけるＴ細胞部分母集団の表現型特性評価を示す図である。（Ａ）ＣＤ３$^{+}$ＣＤ４５$^{+}$細胞の母集団内のヒトＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞又は二重陽性Ｔ細胞の分布。（Ｂ）ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞母集団内のナイーブ、エフェクター及びメモリー部分母

集団の分布。（Ｃ）ＣＤ８＋Ｔ細胞母集団内のナイーブ、エフェクター及びメモリー部分母集団の分布。各バーは平均±ＳＥＭを表す。
【図２０】ＮＳＧマウスにヒト単核細胞を移植し、ＷＴ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを注入した後３週間での脾臓におけるヒトＴ細胞における活性化プロファイルのフローサイトメトリによる分析を示す図である。（Ａ）ＣＤ３＋ＣＤ４５＋標識化Ｔ細胞の活性化プロファイル。（Ｂ）ＣＤ４＋Ｔ細胞部分母集団の活性化プロファイル。（Ｃ）ＣＤ８＋Ｔ細胞部分母集団の活性化プロファイル。各バーは、平均±ＳＥＭを表す。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１。
【図２１】ＮＳＧマウスにヒト単核細胞を移植し、ＷＴ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを注入した後３週間での脾臓におけるヒトＴ細胞における疲弊プロファイルのフローサイトメトリによる分析を示す図である。（Ａ）ＣＤ３＋ＣＤ４５＋Ｔ細胞の阻害プロファイル。（Ｂ）ＣＤ４＋Ｔ細胞部分母集団の阻害プロファイル。（Ｃ）ＣＤ８＋Ｔ細胞部分母集団の活性化プロファイル。各バーは平均±ＳＥＭを表す。＊ｐ＜０．０５。
【図２２】脾臓におけるヒトＣＤ１９＋Ｂ細胞部分母集団（ナイーブＢ細胞ＣＤ２４－ＣＤ３８－ＣＤ２７－；移行期Ｂ細胞ＣＤ２４低／＋ＣＤ３８＋ＣＤ２７－；メモリーＢ細胞及びプラズマ細胞ＣＤ２４低／＋ＣＤ３８＋ＣＤ２７＋）の表現型特性評価を示す図である。各バーは平均±ＳＥＭを表す。＊ｐ＜０．０５。
【図２３】ヒト単核細胞を移植し、ＷＴ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを注入した後３週間でのＮＳＧマウスの脾臓における制御性Ｂ細胞に対するヒトＢ細胞分極のフローサイトメトリ分析を示す。（Ａ）各群の代表的なフローサイトメトリ分析及びＩＬ１０＋移行期Ｂ細胞パーセンテージのグラフ表示。（Ｂ）各群の代表的なフローサイトメトリ分析及びＩＬ１０＋メモリーＢ細胞パーセンテージのグラフ表示。各バーは、平均±ＳＥＭを表す。＊ｐ＜０．０５。
【図２４】ヒト単核細胞を移植し、ＷＴ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを注入したＮＳＧマウスの肺における病理組織学的分析を示す図である。（Ａ）Ｈ／Ｅ染色（左）、ヒト抗ＣＤ３免疫組織化学染色（中央）、及びヒト抗ＣＤ８免疫組織化学染色（右）の代表的な画像。（Ｂ）肺中の浸潤ＣＤ３＋Ｔ細胞の定量化。（Ｃ）肺中の浸潤ＣＤ８＋Ｔ細胞の定量化。各バーは平均±ＳＥＭを表す。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１、＊＊＊＊ｐ＜０．０００１。
【図２５】ヒト単核細胞を移植し、ＷＴ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを注入したＮＳＧマウスの肝臓における病理組織学的分析を示す図である。（Ａ）Ｈ／Ｅ染色（左）、ヒト抗ＣＤ３免疫組織化学染色（中央）、及びヒト抗ＣＤ８免疫組織化学染色（右）の代表的な画像。（Ｂ）肝臓中の浸潤ＣＤ３＋Ｔ細胞の定量化。（Ｃ）肝臓中の浸潤ＣＤ８＋Ｔ細胞の定量化。各バーは平均±ＳＥＭを表す。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１、＊＊＊＊ｐ＜０．０００１。
【図２６】ＤＳＳ誘発大腸炎に関する実験デザインを示す図である。異なる濃度のデキストラン硫酸ナトリウム（ＤＳＳ）を、７日間適宜に、飲料水中２．５％～３％の範囲で用いた。５日目にＷＴ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの単回投与量（３×１０^{6}細胞／マウス）を腹腔内注入した。長期評価のために、飲料水中ＤＳＳの７日間サイクルでの再誘発試験を１２週間後に行った。
【図２７】ＷＴ－ＭＳＣ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの腹腔内投与後のマウスのＤＳＳ誘発大腸炎の状態を示す図である。疾患活動性指標（ＤＡＩ）（Ａ）、体重の倍率変化（Ｂ）及び生存率（Ｃ）。ＤＳＳを用いた処理後１０日目の結腸組織の代表的な画像（倍率４×及び１０×）（Ｄ）。健康、ｎ＝１４；ＤＳＳ、ｎ＝２６；ＤＳＳ＋ＷＴ－ＭＳＣ、ｎ＝２１；及びＤＳＳ＋ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣ、ｎ＝２６。データは、疾患活動性指標及び体重の倍率変化の平均及び標準誤差により、０日目を基準として経時的にパーセンテージにより表す。生存率はパーセンテージにより表す。有意性は、マン－ホイットニーのＵ検定及びロングランク検定によって分析し、＊ｐ＜０．０５及び＊＊＊＊ｐ＜０．０００１　ＤＳＳ対健康；＄　ｐ＜０．０５　ＤＳＳ＋ＷＴ－ＭＳＣ対ＤＳＳ；＆ｐ＜０．０５及び＆＆　ｐ＜０．０１　ＤＳＳ＋ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣ対ＤＳＳ

及び＃　ｐ＜０．０５　ＤＳＳ＋ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣ対ＤＳＳ＋ＷＴ－ＭＳＣにより表した。結果は、５つの独立した実験に対応する。
【図２８】ＷＴ－ＭＳＣ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの投与の３ヶ月後のマウスのＤＳＳ誘発大腸炎の状態を示す図である。疾患活動性指標（ＤＡＩ）（Ａ）、体重の倍率変化（Ｂ）及び生存率（Ｃ）。健康、ｎ＝１０；ＤＳＳ、ｎ＝１５；ＤＳＳ＋ＷＴ－ＭＳＣ、ｎ＝１５；及びＤＳＳ＋ｓＣＸＣＲ４－ＩＬ１０－ＭＳＣ、ｎ＝１５。データは、疾患活動性指標及び体重の倍率変化の平均及び標準誤差により、０日目を基準として経時的なパーセントにより表す。生存率はパーセンテージにより表す。有意性は、マン－ホイットニーのＵ検定及びロングランク検定によって分析し、＊＊ｐ＜０．０１及び＊＊＊＊ｐ＜０．０００１　ＤＳＳ対健康、＆　ｐ＜０．０５　ＤＳＳ＋ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣ対ＤＳＳ及び＃　ｐ＜０．０５及び＃＃　ｐ＜０．０１　ＤＳＳ＋ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣ対ＤＳＳ＋ＷＴ－ＭＳＣにより表した。結果は３つの独立した実験に対応する。
【発明を実施するための形態】
【００２０】
本発明を、その保護範囲を限定する意図なしに、以下の実施例によって例示する。
【実施例】
【００２１】
実施例１．材料及び方法
実施例１．１．脂肪組織由来ＭＳＣ（Ａｄ－ＭＳＣ）の生成及び増殖
脂肪組織試料を、インフォームドコンセント後、健康なドナーから外科的切除により得た。脂肪組織を脱凝集し、最終濃度２ｍｇ／ｍｌでコラゲナーゼＡ（Serva、独国）を用いて、３７℃で４時間消化した。消化した試料を１００μｍのナイロンフィルタ（BD Bioscience、米国）を通して濾過し、１０分間遠心分離した。細胞ペレットを、５％血小板溶解液（Cook medical、米国）、１％ペニシリン／ストレプトマイシン（Gibco）及び１ｎｇ／ｍｌのヒト塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ、Peprotech、米国）を追加したα－ＭＥＭ（Gibco、米国）中で再懸濁した。培養フラスコ（Corning、米国）中、１００００細胞／ｃｍ^{2}の濃度で細胞を播種し、３７℃で培養した。Ａｄ－ＭＳＣの増殖のために、細胞培地を２日～４日毎に交換し、付着した細胞を、ほぼコンフルエント（７０％～９０％）に達した時点で０．２５％トリプシン／ＥＤＴＡ（Sigma-Aldrich、米国）を用いて連続継代した。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏ調査のために、Ａｄ－ＭＳＣは４継代～８継代で用いた。
【００２２】
実施例１．２．ＷＴ－ＭＳＣ及びＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの特性評価
ＷＴ－ＭＳＣ、及びＣＸＣＲ４－ＩＬ１０レンチウイルスベクターを形質導入したＭＳＣ（ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣ）を、Ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ　ｃｅｌｌ　ｋｉｔ（Immunostep、スペイン国）に記載されるようにフローサイトメトリ（Ｆｏｒｔｅｓｓａ、BD Bioscience、米国）により免疫表現型的に特性評価した。これらの調査に含まれるモノクローナル抗ヒト抗体は、以下のものであった：ＣＤ２９、ＣＤ４４、ＣＤ７３、ＣＤ９０、ＣＤ１０５、ＣＤ１６６、ＣＤ４５、ＣＤ１９、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ１４及びＣＤ３４。データはＦｌｏｗＪｏバージョンＸ（FlowJo LLC、米国）を用いて分析した。
【００２３】
Ａｄ－ＭＳＣの骨形成及び脂肪形成分化能を、それぞれＮＨ－ＯｓｔｅｏＤｉｆｆ及びＮＨ－ＡｄｉｐｏＤｉｆｆ　Ｍｅｄｉａ（Miltenyi Biotec、独国）を用いて、メーカーのプロトコルに従って決定した。アルカリフォスファターゼの沈着を、Ｆａｓｔ　ＢＣＩＰ／ＮＣＰ（Sigma-Aldrich）を用いた染色後に見て、光学顕微鏡（Nikon、独国）を用いて脂質滴を見た。
【００２４】
実施例１．３．ＤＮＡ　ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０レンチウイルスベクターの構築

レンチウイルスバックボーン及びＰＧＫプロモーターを含むフラグメント（７３６２ｂｐ）を、その制限部位がそれぞれ５’末端及び３’末端におけるブランク（blanking）ＦＡＮＣＡ導入遺伝子である、ＡｇｅＩ及びＳａｃＩＩ制限酵素（New England Biolabs、米国）を用いたｐＣＣＬ．ＰＧＫ．ＦＡＮＣＡ．Ｗｐｒｅ＊プラスミド（９０８７ｂｐ）の同時消化により得た。導入遺伝子を含まない消化されたレンチウイルスバックボーンを、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ Ｇｅｌ ａｎｄ ＰＣＲ Ｃｌｅａｎ－ｕｐ ｋｉｔ（Macherey-Nagel、独国）を用いてアガロースゲルから精製した。ヒトＣＸＣＲ４及びＩＬ１０のコドン最適化配列を含むフラグメントを、ｍＲＮＡ合成のために用いたｐＵＣ５７プラスミドをテンプレートとするポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により得た。各プラスミドのＰＣＲは、５’末端におけるＡｇｅＩ及びＳａｃＩＩ制限部位、並びに、ＣＸＣＲ４又はＩＬ１０導入遺伝子の最初又は最後の２０ｂｐを含む２つの特異的プライマーを用いて行った。増幅は、Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ ＩＩ Ｆｕｓｉｏｎ Ｅｎｚｙｍｅのプロトコル（Agilent、米国）に従って、ターゲットサイズに応じて、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を使用せず、アニーリング温度用の５８℃に安定させて、行った。ＰＣＲ生成物をＡｇｅＩ及びＳａｃＩＩを用いて同時消化し、さらにＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ Ｇｅｌ ａｎｄ ＰＣＲ Ｃｌｅａｎ－ｕｐ ｋｉｔを用いてカラムにより精製した。

【００２５】

消化したレンチウイルスバックボーン及び目的のフラグメントを、ターゲット：ベクター比を５：１に維持しつつ、Ｔ４ ＤＮＡ Ｌｉｇａｓｅ（New England Biolabs）を用いてライゲーションした。ライゲーションした生成物をＳｔａｂｌｅ３細菌に導入し、ｐＣＣＬ．ＰＫＧ－ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０．Ｗｐｒｅ＊プラスミドを得た。

【００２６】

実施例１．４．レンチウイルスベクターの生成

本作業で用いた全ての自己不活性化ＨＩＶ－１由来ベクターは、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞における第二世代パッケージングシステムにより生成し、ＶＳＶ－Ｇ偽型ウイルスを得た。前日に１５０ｍｍ径のプレート中に総量１２×10^6個の細胞をプレーティングした。遺伝子導入を、１５０ｍｍ径のプレート中で７０％～８０％コンフルエントの細胞に対して、上述の$CaCl_2$ＤＮＡ沈殿法に従って行った。簡潔には、遺伝子導入の１時間前に、培地を、１０％ＨｙＣｌｏｎｅ（GE Healthcare、米国）及び１％ペニシリン／ストレプトマイシンを含む新鮮なＤＭＥＭ－Ｇｌｕｔａｍａｘに交換した。導入遺伝子、ウイルスゲノム及びパッケージング構築物を含む３つのプラスミドの等分子混合物を新たに調製した。各プレートのＨＥＫ２９３Ｔ細胞に、２２．５μｇの遺伝子導入プラスミド、１２μｇの、異種ＶＳＶｇエンベロープを保持するｐＭＤ２．ＶＳＶｇエンベローププラスミド（PlasmidFactory、独国）、及び２７．５μｇの、ｇａｇ－ｐｏｌ－ｒｅｖウイルス遺伝子を保持するｐＣＭＶｄＲ８．７４パッケージングプラスミド（PlasmidFactory）を遺伝子導入した。これらのプラスミド混合物を最終体積３．８ｍｌの超純水H_2O中に調製し、４５０μｌの２．５Ｍ $CaCl_2$を慎重に添加した。室温で５分のインキュベーション後、３．８ｍｌの２×ハンクス平衡生理食塩水（ＨＢＳ）バッファー（１００ｍＭ ＨＥＰＥＳ（Gibco）、２８１ｍＭ ＮａＣｌ、１．５ｍＭ Na_2HPO_4、ｐＨ＝７．１３）を一滴ずつ添加し、Ca^{2+}沈殿を形成させた。この溶液を、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に添加し、これらの沈殿を統合した。５時間後、沈殿物を含む培地を新鮮な培地と交換した。遺伝子導入後４８時間で上清を回収した。これらを採取し、０．２２μｍ孔径のフィルタ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Merck KGaA、独国）を用いて濾過し、２００００ｒｐｍ、４℃で２時間の超遠心分離により濃縮した。その後、ウイルスペレットをＤＭＥＭ中に、４℃で少なくとも１時間懸濁し、遠沈して細胞の残骸を捨て、１００μｌのアリコート中－８０℃で保存した。

【００２７】

実施例１．５．Ａｄ－ＭＳＣの形質導入

付着したＭＳＣの形質導入、及び懸濁液中のＭＳＣの形質導入という２つの異なる戦略を行って、ヒトＡｄ－ＭＳＣを形質導入した。実験のこのセットでは、形質導入の有効性

を増大させることを目的として、形質導入プロセス中に形質導入エンハンサー（ＴＥ）を添加した。

【００２８】

実施例１．６．ＣＸＣＲ４及びＩＬ－１０タンパク質の共発現

Ａｄ－ＭＳＣの細胞表面上でのＣＸＣＲ４の発現を、ＰＥ結合抗ヒトＣＸＣＲ４抗体を用いた４℃で３０分の標識化後（Biolegend、米国）、フローサイトメトリにより決定した。Ａｄ－ＭＳＣにより分泌されるＩＬ１０レベルを、ｈｕｍａｎ　ＩＬ１０　Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡ　Ｋｉｔ（R&D System、米国）を用いて、培養細胞の上清中で測定した。

【００２９】

プロテアーゼ阻害剤混合物（Merck Millipore、独国）を含むＲＩＰＡバッファー（ThermoFisher Scientific、米国）を用いて、Ａｄ－ＭＳＣから総タンパク質抽出物を分離した。２０マイクログラムの各細胞溶解物を４％～１２％ポリアクリルアミドゲル（Bio-Rad、米国）中で分解し、ＰＶＤＦ膜（Bio-Rad）に移した。膜を、０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０　ＰＢＳ中の５％（ｖ／ｖ）無脂肪乾燥乳を用いて遮断した。遮断液中に希釈したウサギモノクローナル抗ヒトＣＸＣＲ４抗体（Abcam、英国）と共にインキュベートすることにより、試料をイムノブロットした。マウス抗ヒトビンキュリン（Abcam）を、負荷コントロールとして用いた。ブロットを、ＣｈｅｍｉＤｏｃ　ＭＰ　Ｓｙｓｔｅｍ及びＩｍａｇｅＬａｂソフトウェア（Bio-Rad）を用いたＣｌａｒｉｔｙ　Ｗｅｓｔｅｒｎ　ＥＣＬ基質（Bio-Rad）を用いて可視化した。

【００３０】

実施例１．７．細胞遊走アッセイ

遊走アッセイを、８μm孔のポリカーボネート膜インサート（Costar、ケンブリッジ、ＭＡ）を備えたトランスウェルにおいて行った。５×１０^{3}個のＡｄ－ＭＳＣをトランスウェルアセンブリの上方インサートチャンバ内に配置した。下方チャンバに、最終濃度１００ｎｇ／ｍｌのマウス又はヒトＳＤＦ－１（Peprotech、米国）を収容した。インキュベーション後２４時間で、膜の上部を綿棒で優しく掻き落として、非遊走細胞を除去し、ＰＢＳを用いて洗浄した。３．７％～４％ホルマリンを用いて４℃で一晩膜を固定し、ヘマトキシリンを用いて室温で４時間染色した。遊走細胞の数を、Ｎｉｋｏｎ　Ｅｃｌｉｐｓｅ　Ｅ４００顕微鏡（１０×）（Nikon、英国）の下で、ウェル毎に４つのランダムな領域のスコアリングによって決定し、Ｌｅｉｃａ　ＤＦＣ４２０カメラ（Leica、英国）を用いて写真を得た。

【００３１】

実施例１．８．ｉｎ　ｖｉｔｒｏ免疫抑制アッセイ

末梢血単核細胞（ＭＮＣ）を、インフォームドコンセント後、健康なドナーから得たヘパリン化末梢血試料からＦｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ　ＰＬＵＳ（GE Healthcare Bioscience、スウェーデン国）の密度勾配により得た。共培養の前に、ＭＮＣを、細胞内蛍光染料ＣＦＳＥ（カルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル、Molecular Probe、米国）を用いて、上述のプロトコルに従ってマーキングした。ＷＴ－ＭＳＣ及びＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを、５×１０^{4}個の細胞／ウェルの濃度で２４ウェルプレートにプレーティングした。２４時間後、５×１０^{5}個のＭＮＣを、各ウェルに１０μｇ／ｍＬのフィトヘマグルチニン（ＰＨＡ）（Sigma-Aldrich）の存在下で加え、Ｔ細胞増殖を誘発した。３日間のインキュベーション後、培養ウェルから採取した細胞をフローサイトメトリによって細胞増殖について分析した。データは、ＭｏｄＦｉｔ　ＬＴ（商標）（Verity Software House、米国）を用いて分析した。

【００３２】

実施例１．９．分泌されたサイトカイン及び因子の定量化

ＷＴ－ＭＳＣ及びＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを、６ウェルプレートに１×１０^{5}個の細胞／ウェルの濃度で播種した。４時間の遺伝子導入後、上清を回収し、分泌されたＰＧＥ２及びＴＧＦβ１をＥＬＩＳＡ（R&D System、米国）により定量化した。分泌さ

れたＩＬ－６、ＩＦＮγ及びＴＮＦαを、ＬＥＧＥＮＤｐｌｅｘ（商標）Ｈｕｍａｎ Ｔｈ Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｐａｎｅｌ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、米国）を用いて、メーカーのプロトコルに従ってフローサイトメトリにより定量化した。

【００３３】

実施例１．１０．遺伝子発現分析

ＷＴ－ＭＳＣ及びＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣからのＲＮＡを、ＲＮＡｅａｓｙ（商標）Ｐｌｕｓ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔを用いて分離し、ＲＥＴＲＯｓｃｒｉｐｔ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ウォルサム、米国）を用いて逆転写した。ＦａｓｔＳｔａｒｔ Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ Ｍａｓｔｅｒマスターミックス（Ｒｏｃｈｅ、インディアナポリス、米国）と、ヒトインターロイキン及び異なる因子用の特異的プライマーとを用いた定量的リアルタイムＰＣＲ（ｑＰＣＲ）を、ｃＤＮＡについて行った。ｑＰＣＲを、７５００ ｆａｓｔ ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ ＰＣＲ ｓｙｓｔｅｍ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）において実行した。結果を、$2^{-\Delta\Delta Ct}$法に従って、ヒトＧＡＰＤＨ発現及びコントロール試料の発現に対して正規化した。

【００３４】

実施例１．１１．ＬＰＳ誘発炎症パッドモデル

ＦＶＢ／ＮＪマウスを、ＣＩＥＭＡＴ（マドリッド、スペイン国）にある動物施設（登録番号ＥＳ２８０７９０００００１８３）において飼育した。マウスは、ＦＥＬＡＳＡの手順に従って病原体に関して定期的にスクリーニングし、水及び餌を自由に与えた。全ての実験手順は、スペイン国及び欧州の規則（スペイン国ＲＤ５３／２０１３及び法律６／２０１３、欧州指令２０１０／６３／ＵＥ）に従って行った。手順は、承認されたバイオセーフティ及び生命倫理ガイドラインに従って、ＣＩＥＭＡＴ動物実験倫理委員会により承認された。ＦＶＢ／ＮＪマウスを鎮静化させ、３０μｌのＰＢＳ中の４０μｇの大腸菌ＬＰＳを右パッドに単回注射して与えた。同様に、コントロールとして、３０μＬのＰＢＳを左パッドに注射した。Ａｄ－ＭＳＣ遺伝子導入の４時間後、5×10^{5}個のＷＴ－ＭＳＣ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを、尾静脈を介して静脈内注入した。パッドの炎症を、ＬＰＳ投与後２４時間、４８時間、７２時間にデジタルノギスを用いて厚さを測定することにより決定した。実験の最後に、マウスをCO_2吸入により　殺した。末梢血細胞を採取し、ヘマトロジーアナライザＡｂａｃｕｓ（Ｄｉａｔｒｏｎ、米国）を用いてマウスの血液学的パラメータを分析した。

【００３５】

実施例１．１２．ＮＳＧマウスにおける移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）のヒト化マウスモデル

モデルを確立するために、ＮＳＧマウスに２Ｇｙで照射し、翌日、これらに5×10^{6}個のヒトＭＮＣを移植した。３日後、１００万個のＷＴ－ＭＳＣ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを静脈内に注入した。動物は毎日重量を測定し、重量減少、猫背、毛の乱れ、下痢等のＧＶＨＤの可能性のある症状について監視した。ＧＶＨＤの重症度は、０（ＧＶＨＤなし）～８（重症のＧＶＨＤ）で段階分けした。動物は、これらが安楽死ＧＶＨＤ基準（２０％を超える重量減少又は６．５以上のスコア）を示した時点で、人道的に　殺した。

【００３６】

実施例１．１３．統計分析

統計分析は、Ｇｒａｐｈ Ｐａｄ Ｐｒｉｓｍ ７．０ソフトウェア（Ｇｒａｐｈ Ｐａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ、米国）を用いて行った。ｉｎ ｖｉｔｒｏ試験のデータは平均±標準偏差（ＳＤ）として、ｉｎ ｖｉｖｏ試験においては平均±平均の標準誤差（ＳＥＭ）として、表した。正規分布はシャピロ－ウィルク検定により分析した。３つの群以上を比較するために、正規分布についてはパラメトリック検定（一元配置ＡＮＯＶＡ）、非正規分布についてはノンパラメトリック検定（クラスカル－ウォリス検定）を用いた。平均を比較するための適切な事後分析を行った。ｐ値＜０．０５を統計的に有意であるとみなした。

【００３７】

実施例１．１４．ＧＶＨＤマウスモデルにおける病理組織学的分析
肺及び肝臓を外科的に摘出し、一晩ホルマリンを用いて固定した。固定後、組織試料を標準的な方法で処理し、ブロックの生成のためにパラフィン中に包埋した。組織の形態を評価するために、パラフィンブロックの３μｍ～５μｍの切片を、ミクロトームを用いて作成し、標準的な手法を用いてヘマトキシリン－エオシン染色を行った。先に確立したＧＶＨＤ段階分けシステムに従った組織の解釈。

【００３８】

実施例１．１５．ＧＶＨＤマウスモデルにおける免疫組織化学的分析
試料の入ったスライドを、標準的なプロトコルに従って脱パラフィン化し、再水和した。肺及び肝臓の試料を、ヒトＣＤ３及びＣＤ８を用いて標識化した。ＣＤ３標識化試料の抗原賦活化を、クエン酸ナトリウムバッファー（１．８ｍＭクエン酸一水和物及び８．２ｍＭクエン酸三ナトリウム二水和物；ｐＨ６）を用いて、圧力釜（Ｄａｋｏ、Agilent Technologies）を用いて行った。ＣＤ８を用いて染色した試料の賦活化のために、Ｔｒｉｓ－ＥＤＴＡバッファー（抗原賦活液緩衝液ｐＨ９；Ｄａｋｏ）及び同じ圧力釜を用いた。内因性ペルオキシダーゼを、メタノール中に溶解させた０．２％過酸化水素を用いて１０分間阻害した。非特異的エピトープを、ＰＢＳ中に溶解させた１０％ウマ血清を用いて、３７℃で３０分間遮断した。一次抗体を、阻害溶液中に希釈して４℃で一晩インキュベートした。ビオチンと結合した二次抗体を、遮断溶液中に希釈して室温で１時間インキュベートした。シグナルを増幅するために、ビオチン－アビジン－ペルオキシダーゼシステム（ＶＥＣＴＡＳＴＡＩＮ　ｅｌｉｔｅ　ＡＢＣ　ＨＲＰ　ｋｉｔ、Vector Laboratories）を用い、室温で３０分インキュベートした。ペルオキシダーゼ基質としてジアミノベンジジンを用いてシグナルを可視化した（ＤＡＢ　Ｋｉｔ、Vector Laboratories）。最後に、ヘマトキシリンを用いて試料を対比染色し、標準的な手順を用いて脱水し、マウント接着剤（ＣＶ　Ｍｏｕｎｔ、Leica Biosystems）を用いてマウントした。画像を光学顕微鏡（Ｏｌｙｍｐｕｓ　ＢＸ４１）及びデジタルカメラ（ＯｌｙｍｐｕｓＤＰ２１）を用いて撮影した。各試料におけるマーキングのパーセンテージの分析を、ＩｍａｇｅＪプログラムを用いて行った。

【００３９】

実施例１．１６．デキストラン硫酸ナトリウム（ＤＳＳ）誘発大腸炎の誘発及び評価
異なる濃度のデキストラン硫酸ナトリウム（ＤＳＳ；３６０００ＭＷ～５００００ＭＷ、ＭＰ Biomedicals、アーバイン　ＣＡ　米国）を、飲料水中２．５％～３％の範囲で７日間自由に用いた。５日目に天然又はＣＸＣＲ４／ＩＬ－１０改変ＭＳＣ（３×10^6個の細胞／マウス）の単回投与量を腹腔内注入した。

【００４０】

長期評価のため、飲料水中ＤＳＳの７日サイクルでの再誘発試験を行った（図２６）。

【００４１】

大腸炎スコア又は疾患活動性指標（ＤＡＩ）を、以下のように定義した：（１）体重減少（０：低減なし、１：１％～５％、２：５％～１０％、３：１０％～２０％、４：２０％を超える重量減少、及び５：生存なし）、（２）便の硬さ（０：正常な便、１：緩い便、２：水様下痢、３：血を伴う水様下痢、及び４：生存なし）、及び（３）一般的な身体活動（０：正常、１～２：中程度の活動、３：活動なし、及び４：生存なし）。体重の倍率変化を、ＤＳＳ処理開始直前の０日目の初期体重を基準として、定義された時点での体重の差によって計算し、パーセントとして表した。

【００４２】

大腸炎スコアを、結腸の組織学的分析によっても評価した。結腸を外科的に摘出し、一晩ホルマリンを用いて固定した。４８時間後に、１ｃｍの結腸組織を切り取り、パラフィン中に包埋し、ヘマトキシリン／エオシンを用いて染色した。切片を、光学顕微鏡を用いて、浸潤単核細胞、及び腸上皮及び粘膜下層の構造の分析について検査した。

【００４３】

実施例２．結果

明確にするために、バイシストロン性ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０　ｍＲＮＡを遺伝子導入したＭＳＣを基準とした、実施例２．１及び実施例２．２において提供された結果は、ＣＸＣＲ４及びＩＬ１０を共発現する組込み発現ベクターをＭＳＣに形質導入した場合に（実施例２．３～実施例２．７）、これらの結果がいかに改善されたかを示すための比較実施例としてのみ含まれていることに留意頂きたい。

【００４４】

実施例２．１．バイシストロン性ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０　ｍＲＮＡを遺伝子導入したＭＳＣは、有意な局所抗炎症作用を示す

ＬＰＳにより誘発された局所炎症モデルのモデルマウスにおいて、バイシストロン性ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０　ｍＲＮＡを遺伝子導入したＭＳＣのｉｎ　ｖｉｖｏ有効性を検証した。ＷＴ－ＭＳＣ及びＣＸＣＲ４－ＩＬ１０－ＲＮＡ－ＭＳＣの両方が、有意な抗炎症作用を示すことができたが、バイシストロン性ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０　ｍＲＮＡを遺伝子導入したＭＳＣはＷＴ－ＭＳＣと比較して有意により有効であった。図１を参照すれば、これには局所炎症のモデルマウスにおけるバイシストロン性ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０　ｍＲＮＡを遺伝子導入したＭＳＣのｉｎ　ｖｉｖｏ有効性の分析が示されている。ＷＴ－ＭＳＣと比較した、ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０　ｍＲＮＡを遺伝子導入したＭＳＣの抗炎症作用の強化が観察される。

【００４５】

実施例２．２．移植片対宿主病マウスモデルにおける、バイシストロン性ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０　ｍＲＮＡを遺伝子導入したＭＳＣのｉｎ　ｖｉｖｏ有効性の欠如

また、移植片対宿主病マウスモデルにおける、バイシストロン性ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０　ｍＲＮＡを遺伝子導入したＭＳＣのｉｎ　ｖｉｖｏ有効性を検証した。Ｃ５７Ｂｌ／６ドナーマウスからのＢＭ細胞を、あらかじめ１１Ｇｙの致死線量で照射したＢ６Ｄ２Ｆ１レシピエントマウスに移植することにより、ハプロタイプ一致造血移植のマウスモデルを導いた。全てのレシピエントに１０×１０^{6}個のＢＭドナー細胞を静脈内注射した。移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を誘発するために、レシピエントに総数２ｘ１０^{8}個のドナー脾細胞も与えた。ＧＶＨＤ誘発後１日で、マウスに、生理食塩水（ＧＶＨＤ群）、ＷＴ－ＭＳＣ又はｍＲＮＡ遺伝子導入ＭＳＣ（１×１０^{6}個）を、尾静脈を介して投与した。移植したレシピエントを、重量減少、猫背、毛の乱れ、及び下痢等のＧＶＨＤの症状について毎日観察した。ＧＶＨＤの重症度は、０（ＧＶＨＤなし）～８（重症のＧＶＨＤ）で段階分けした。動物は、これらが安楽死ＧＶＨＤ基準（２０％を超える重量減少又は６．５以上のスコア）を示したときに、人道的に　殺した。図２は、ＧＶＨＤのマウスモデルにおいて、バイシストロン性ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０　ｍＲＮＡを遺伝子導入したＭＳＣのｉｎ　ｖｉｖｏ有効性の分析を示す。Ａ）生存曲線、Ｂ）重量及びＣ）臨床スコア。図２Ａに示されるように、ＷＴ－ＭＳＣとＣＸＣＲ４－ＩＬ１０　ｍＲＮＡ　ＭＳＣとの間に、ＧＶＨＤを阻害するための差は観察されなかった。

【００４６】

実施例２．３．移植片対宿主病を阻害するためのＷＴ　ＭＳＣの有効性を改善するためのバイシストロン性ＤＮＡ　ＣＲＣＲ４－ＩＬ１０レンチウイルスベクターを形質導入したＭＳＣの生成

これらの調査において、ＣＸＣＲ４及びＩＬ１０遺伝子の最適化された配列が、ヒト生理的プロモーターＰＧＫの下でバイシストロン性レンチウイルスベクター中にクローニングされたレンチウイルスベクターを作成した（図３Ａ）。

【００４７】

異なる方法のＡｄ－ＭＳＣ形質導入及び異なる量のベクターを検証した後、改変Ａｄ－ＭＳＣ（ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣ）の母集団を得た。このＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの母集団はＣＸＣＲ４を過剰発現し、約８０％のＭＳＣがＣＸＣＲ４に対して陽性であった。ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣにより、非改変ＭＳＣ（ＷＴ－ＭＳＣ）と比較して、より高い濃度のＩＬ１０が分泌された。これらのＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣにおいて、ベクターコピー数をｑＰＣＲによって分析した（図３Ｂ）。

【００４８】
実施例２．４．ＷＴ－ＭＳＣと比較したＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣのｉｎ　ｖｉｔｒｏ特性評価
　バイシストロン性ＰＧＫ－ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０レンチウイルスベクターを用いて改変させたＭＳＣを、間葉系細胞に関してＩＳＣＴ（国際細胞治療学会）により確立された基準に従って特性評価した。
【００４９】
　ｉｎ　ｖｉｔｒｏ特性評価は、バイシストロン性レンチウイルスベクターを用いたＭＳＣの改変が、非改変間葉系細胞（ＷＴ－ＭＳＣ）と比較して、その免疫表現型（図４Ａ）にも、骨（図４Ｂ）及び脂肪組織（図４Ｃ）への分化能にも影響しないことを示した。
【００５０】
実施例２．５．ＷＴ－ＭＳＣと比較したＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣのｉｎ　ｖｉｔｒｏ機能性
　バイシストロン性レンチウイルスベクターを用いて改変させた間葉系細胞（ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣ）のｉｎ　ｖｉｔｒｏ機能性を調査するために、まず、ＣＸＣＲ４のリガンドであるＳＤＦ－１に応答する、トランスウェル遊走アッセイを行った（図５Ａ）。このアッセイの結果は、ＷＴ－ＭＳＣと比較した、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの遊走能の強化を示した（図５Ｂ）。
【００５１】
　次のｉｎ　ｖｉｔｒｏ機能特性評価の調査は、免疫抑制アッセイからなり、これにおいては、活性化単核細胞（ＭＮＣ）の増殖を阻害するＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの能力をＷＴ－ＭＳＣと比較して評価した（図６Ａ）。
【００５２】
　既に記載したように、ＷＴ－ＭＳＣは活性化ＭＮＣの増殖を阻害する高い能力を示した。しかし、この阻害は、ＭＳＣにＰＧＫ－ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０レンチウイルスベクターを形質導入した場合に有意により高かった（図６Ｂ）。これらの調査は、バイシストロン性レンチウイルスベクターを用いたＭＳＣの形質導入が、ＷＴ－ＭＳＣと比較して、これらの細胞の免疫調節能力を有意に改善することを証明する。
【００５３】
実施例２．６．ＷＴ－ＭＳＣと比較した、局所炎症を阻害するためのＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣのｉｎ　ｖｉｖｏ有効性の強化
　ＰＧＫ－ＣＸＣＲ４－ＩＬ１０レンチウイルスベクターを形質導入したＭＳＣのｉｎ　ｖｉｖｏ有効性を検証するため、ＬＰＳにより誘発した局所炎症モデルのマウスモデルにおいて、細胞を検証した。
【００５４】
　ＬＰＳを各マウスの右パッドに注射した。ＬＰＳ注射後１日で、異なるタイプのＡｄ－ＭＳＣ（ＷＴ－ＭＳＣ及びＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣ）を静脈内注入した（ｎ＝７匹～１４匹のマウス／群）。炎症を、各マウスにおけるコントロールとして左パッドを用いて、デジタルノギスを用いて肉眼で測定した（図７Ａ）。
【００５５】
　結果は、Ａｄ－ＭＳＣの注入後２４時間（ＬＰＳ注射後４８時間）で、Ａｄ－ＭＳＣを与えた全てのマウスが炎症を制御した一方、ＬＰＳ注射のみを与えたマウス群においては炎症が成長し続けたことを示した。
【００５６】
　しかし、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを与えたマウス群において、炎症の制御は統計的により高かった（図７Ｂ）。
【００５７】
実施例２．７．ＷＴ　ＭＳＣと比較した、ＤＮＡバイシストロン性レンチウイルスベクターを形質導入したＭＳＣの移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）を阻害するための有効性の改善
　バイシストロン性レンチウイルスベクターを形質導入したＭＳＣの治療有効性を、移植

片対宿主病（ＧｖＨＤ）マウスモデルにおいても、免疫不全ＮＳＧマウスへの末梢血ヒト単核細胞（ＭＮＣ）の注入に基づいて検証した（図８Ａ）。モデルを確立するために、マウスを２Ｇｙで照射し、翌日、これらに５×１０^{6}個のヒトＭＮＣを移植した。３日後、１００万個のＷＴ－ＭＳＣ又はＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを静脈内注入した。動物は毎日重量を測定し、ＧＶＨＤの可能性のある主要な徴候について監視した（図８Ｂ）。

【００５８】

図８Ｂが示すように、ＧＶＨＤスコアは、ＧＶＨＤ群だけでなく、ＷＴ－ＭＳＣ群と比較しても、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを与えたＮＳＧマウスの群において有意により良好であった。

【００５９】

ＭＮＣの注入後２週間で、ヒトＭＮＣのみを与えたマウス（ＧｖＨＤ群）は、疾患の兆候（重量減少、猫背）を示し始めた。そこで、この時点で、全３つの群のレシピエントマウスを　殺し、末梢血（ＰＢ）及び脾臓（ＳＰ）中のヒトＣＤ４５細胞のパーセンテージを分析した。ＷＴ－ＭＳＣを与えたマウスにおいては、浸潤ヒトＣＤ４５$^{+}$細胞のパーセンテージが有意に低減されたことが見出された。それにもかかわらず、ＰＢ及び脾臓の両方において観察された低減は、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを注入したマウスにおいて有意により大きかった（図９Ａ及び図９Ｂ）。

【００６０】

ＧＶＨＤ疾患の原因となるヒトＣＤ４５$^{+}$ＣＤ３$^{+}$細胞を、ＧＶＨＤヒト化マウスモデルにおいてフローサイトメトリにより分析した。注目すべきことに、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣで処理したが、ＷＴ－ＭＳＣで処理しなかったＮＳＧマウスは、ＧｖＨＤコントロール群と比較して、炎症誘発性Ｔ細胞（ＣＤ３$^{+}$ＩＦＮｇ$^{+}$）のパーセンテージの統計的な低減を示した（図１０Ａ）。さらに、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを与えたが、ＷＴ－ＭＳＣを用いなかった群においては、ＧｖＨＤコントロール群と比較して、抗炎症性Ｔ細胞（ＣＤ３$^{+}$ＩＬ１０$^{+}$）のパーセンテージにおける統計的に有意な増大が観察された（図１０Ｂ）。

【００６１】

フローサイトメトリにより観察されたこれらのデータを、ｑＰＣＲにより確認した。ＩＦＮｇ、ＩＬ－１７及びＩＬ－２２等の炎症誘発性因子は、ＧｖＨＤコントロール群と比較して、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを与え、ＷＴ－ＭＳＣを与えなかったマウスのケースにおいて、有意に低減された。ＩＬ－５又はＦｏｘＰ３等の抗炎症因子の発現レベルの定量化は、これらの因子が、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを与えたが、ＷＴ－ＭＳＣを与えなかったマウスのケースにおいて、ＧｖＨＤコントロール群を基準として統計的に増大したことを示した（図１１）。

【００６２】

実施例２．８．移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）のヒト化モデルにおいて検証したＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣのｉｎ　ｖｉｖｏ有効性

ＷＴ－ＭＳＣを基準としてＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣのｉｎ　ｖｉｖｏ有効性を検証するため、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）のヒト化モデルを開発した。最大の重量減少は、どのタイプのＡｄ－ＭＳＣも与えなかったＧｖＨＤ群において観察された。さらに、ＧｖＨＤ群において、またＷＴ－ＭＳＣを与えた群においても観察された顕著な重量減少に比較して、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを与えた群においては、重量減少は観察されなかった（図１２Ａ）。さらに、ＷＴ－ＭＳＣを与えた群は、非ＭＳＣ処理マウスと比較して、より低いＧｖＨＤスコア（より中程度の臨床徴候）を呈した一方、ＧｖＨＤスコアは、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを与えたマウスにおいて有意により低かった（図１２Ｂ）。

【００６３】

移植マウスの末梢血中のヒト白血球の分析は、Ａｄ－ＭＳＣを与えたマウスにおける有意な低減を示した（％ｈＣＤ４５細胞；図１３Ａ）。それにもかかわらず、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣで処理したマウスは、ヒト白血球の最も低い割合を示し、そのほとんど

は全ての例でヒトＣＤ３$^+$Ｔ細胞であり（図１３Ｂ）、ＣＤ４$^+$Ｔ細胞、ＣＤ８$^+$Ｔ細胞又は二重陽性Ｔ細胞の間では差がなかった（図１３Ｃ）。

【００６４】

ナイーブ、エフェクター及びメモリーＴ細胞におけるヒトＣＤ４$^+$Ｔ細胞又はＣＤ８$^+$Ｔ細胞の分布の分析は、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを与えたマウスにおいてエフェクター表現型を有するＣＤ４$^+$Ｔ細胞及びＣＤ８$^+$Ｔ細胞のパーセンテージにおける有意な低減を示した（図１４Ｃ及び図１４Ｆ）。

【００６５】

マウスの末梢血中の循環ヒトＴ細胞の活性化プロファイルを調査した。どのタイプのＡｄ－ＭＳＣを与えた群も、ＣＤ２５$^+$Ｔ細胞のパーセンテージにおける増大を示し、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣで処理したマウスにおいて統計的により高かった。さらに、これらの細胞はＣＤ２５$^+$ＣＤ４$^+$リンパ球であり、これは、この群における循環制御性Ｔ細胞の存在を示唆した（図１５）。

【００６６】

また、末梢血中の循環ヒトＣＤ３$^+$Ｔ細胞の疲弊プロファイルを、ＣＴＬＡ４、ＰＤ１、ＴＩＧＩＴ及びＴＩＭ３マーカーを用いて分析した。ＭＮＣの移植後３週間で、ＣＴＬＡ４に対して陽性な循環ＣＤ３$^+$細胞における増大が、Ａｄ－ＭＳＣを与えた２つの群において観察され、これは、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを与えたマウスのケースにおいて有意により大きかった（図１６）。

【００６７】

循環ヒトサイトカイン及びＧｖＨＤ発症に関与する因子を、これらのマウスの血清において分析した。図１７が示すように、どのタイプのＡｄ－ＭＳＣで処理した群も、ＧｖＨＤコントロール群を基準として、ＩＦＮγ、ＩＬ１７Ａ、ＩＬ１α、ＩＬ８、ＩＬ１２又はＴＮＦα等の循環炎症誘発性ヒトサイトカインのレベルにおける統計的に有意な低減を呈した。さらに、Ａｄ－ＭＳＣを与えたこれら２つの群は、ＩＬ１０、ＴＧＦβ又はＩＬ６等の循環ヒト抗炎症性因子における増大をもたらした。注目すべきことに、炎症誘発性からより抗炎症性のプロファイルへのサイトカイン分泌における変化は、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを与えたマウスにおいて、ＷＴ－ＭＳＣを与えたマウスに対して、統計的により顕著であった（図１７）。

【００６８】

これらの結果は、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの注入が、ＷＴ－ＭＳＣで処理したマウスに対応する値を基準として、末梢血中の循環ヒトＴ細胞のパーセンテージにおける有意な低減を生じることを示した。さらに、末梢血Ｔ細胞は、ＷＴ－ＭＳＣと比較して、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの注入後に、より免疫抑制的なプロファイルを示す。

【００６９】

まとめると、このデータは、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣが、ヒト白血球を移植したＮＳＧ免疫不全マウスにおいて、全身レベルでの、有意な炎症環境の低減及び免疫調節環境の強化を誘発することを示す。

【００７０】

脾臓において、異なるヒト造血系列間の分布を調査した：ＣＤ３$^+$Ｔ細胞、ＣＤ１９$^+$Ｂ細胞、ＣＤ５６$^+$ＮＫ細胞、ＣＤ１４$^+$単球及びＣＤ１５$^+$顆粒球。ＧｖＨＤ群における移植後３週間で脾臓において観察されたヒトＣＤ４５$^+$細胞の約７０％が、ヒトＣＤ３$^+$Ｔ細胞である一方（６４．９８±４．１４％）、このパーセンテージはＷＴ－ＭＳＣを与えた群においては低減し（５９．２２±４．５６％）、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを与えた群においてはより顕著に低減した（４８．６７±３．５８％）。さらに、ヒトＣＤ１９$^+$Ｂ細胞のパーセンテージを脾臓において分析した場合、ＧｖＨＤ群（６．７３±１．０３％）又はＷＴ－ＭＳＣを与えた群（８．９９±１．５３％）のいずれかと比較して、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣで処理した群において、この母集団の有意な増大が検出された（１４．６２±１．５２％）。最後に、移植マウスの脾臓におけるＣＤ５６$^+$ＮＫ細胞、ＣＤ１４$^+$単球及びＣＤ１５$^+$顆粒球のパーセンテージは非常に低く、異なる調

査群の間で差はなかった。

【００７１】

脾臓におけるＣＤ４$^{+}$細胞、ＣＤ８$^{+}$細胞又は二重陽性細胞の間のＴ細胞の分布における調査群間で有意な差は見出されなかった（図１９Ａ）。最も特徴的な部分母集団：ナイーブ、エフェクター、メモリーＴ細胞間で、ヒトＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞又はＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の分布に関して、異なる調査群間で差は観察されなかった（図１９Ｂ及び図１９Ｃ）。

【００７２】

脾臓において観察された活性化パターンは、末梢血において観察されたものと非常に類似していた。脾臓におけるＣＤ２５の発現に関してのみ、群間で差が見出された（図２０Ａ）。どのタイプのＡｄ－ＭＳＣを与えた群も、ＧｖＨＤ群を基準としてＣＤ２５$^{+}$Ｔ細胞のパーセンテージにおける有意な増大を示し、ＷＴ－ＭＳＣを与えた群と比較して、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを用いて処理したマウスにおいてより高かった。これらの細胞は、特にＣＤ２５$^{+}$ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞であり（図２０Ｂ）、脾臓におけるこれらのＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の免疫調節表現型を示した。

【００７３】

ＭＮＣの移植後３週間での、ＮＳＧ移植マウスの脾臓における阻害受容体の分析は、ＡｄＭＳＣで処理しなかったマウスのＧｖＨＤコントロール群（図２１）を基準として、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣで処理したマウスにおける、ヒトＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞における（図２３Ａ）、及び更にＣＤ４$^{+}$細胞又はＣＤ８$^{+}$細胞における（それぞれ図２１Ｂ及び図２１Ｃ）、ＴＩＭ３$^{+}$Ｔ細胞の有意な増大を示した。分析した他の疲弊マーカーを基準としては、群間で差は観察されなかった。

【００７４】

脾臓におけるＢ細胞のフローサイトメトリ分析は、非ＭＳＣ処理群とどのタイプのＡｄＭＳＣを与えている群との間でも、ナイーブＢ細胞部分母集団における変化がないことを示した。しかし、抗体産生Ｂ細胞に未だ分化していなかった移行期Ｂ細胞のパーセンテージは、ＷＴ－ＭＳＣを与えた群（２４．３±５．１８％）、及びどのＭＳＣも注入しなかったＧｖＨＤコントロール群（１７．４７±２．２１％）と比較して、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを与えたマウスにおいてより高かった（３４．７８±７．０９％）。最後に、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを与えた群においてのみ、完全に分化したＢ細胞のパーセンテージにおけるわずかな低減が観察された（図２２）。

【００７５】

これらの結果は、ＷＴ－ＭＳＣ、及びより顕著なＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣが、メモリーＢ細胞又はプラズマ細胞へのその分化を完了することなしに、Ｂ細胞母集団を移行状態に維持していたことを示唆した。

【００７６】

移行期Ｂ細胞母集団におけるＢｒｅｇ細胞のパーセンテージは、ＷＴ－ＭＳＣを与えたマウスにおいて、より高かった（図２３Ａ）。さらに、このパーセンテージは、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを注入したマウスにおいて統計的により高かった。同じパターンが、ＩＬ１０を分泌するメモリーＢ細胞の母集団の間で観察された（図２３Ｂ）。

【００７７】

まとめると、これらの結果は、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの注入が、ＷＴ－ＭＳＣを基準として免疫調節表現型を有するＴ細胞の発達を有意に促進するだけでなく、ＧｖＨＤの進行に対して有益な作用を有するＢ細胞の発達を改善することを示唆する。

【００７８】

急性ヒトＧｖＨＤの最終段階の間、ドナーエフェクターＴ細胞は、直接的な細胞傷害活性又は炎症性サイトカイン産生を通じて、異なる器官における組織傷害を媒介する。ＧｖＨＤの病理組織学的徴候を、肺又は肝臓等のこの疾患の標的器官において分析した。肺の組織学的分析は、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを与えたマウスが、疾患のないコントロール群と同様の構造を示した他の２つの群を基準として、実質におけるヒトＴ細胞の浸潤の大幅な低減を呈したことを示した（図２４Ａ）。ヒトＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細

胞の存在を定量化することにより、どのタイプのＡｄ－ＭＳＣの注入も、肺における両細胞タイプのパーセンテージを低減させたことが見出された。注目すべきことに、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣで処理したマウスにおいて、ヒトＣＤ３$^{+}$細胞（図２４Ｂ）及びＣＤ８$^{+}$細胞（図２４Ｃ）の両方について、低減はよりはるかに有意であった。

【００７９】

移植マウスの肝臓の病理組織学的分析は、実質のヒトＴ細胞浸潤レベル、及び更に血管周囲の炎症を示し、これらは、どのタイプのＡｄ－ＭＳＣの注入後にも大きく低減した。さらに、この炎症は、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣで処理したマウスにおいては実際上存在しなかった（図２５Ａ）。一方、Ａｄ－ＭＳＣの投与は、肝臓におけるヒトＣＤ３$^{+}$細胞及びＣＤ８$^{+}$細胞の存在を有意に低減させ、この低減は、マウスにＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣを与えた場合に、よりはるかに有意であった（図２５Ｂ及び図２５Ｃ）。

【００８０】

実施例２．９．デキストラン硫酸塩（ＤＳＳ）によって誘発された炎症性腸疾患（ＩＢＤ）の実験モデルにおける、ＣＸＣＲ４及びＩＬ１０を安定に発現するＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの有効性の強化

さらに、炎症の新たな実験モデル：ＤＳＳにより誘発された炎症性腸疾患（ＩＢＤ）において、ＣＸＣＲ４及びＩＬ１０を発現する遺伝子改変ＭＳＣのｉｎ　ｖｉｖｏ有効性を検証した。

【００８１】

図２６に示される実験デザイン（材料及び方法）によれば、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣの単回投与量で処理した大腸炎（colitic）マウスにおける疾患活動性指標（ＤＡＩ）は、ＭＳＣで処理しなかったマウス又はＷＴ－ＭＳＣで処理したマウスのいずれかと比較して、有意により低かった（図２７Ａ）。また、１回目の７日間のＤＳＳサイクルの間、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣ処理マウスの体重減少（図２７Ｂ）及び生存率（図２ＦＣ）を、ＷＴ－ＭＳＣ処理群及び非ＭＳＣ処理群と比較すると、有意な差が観察された。非ＭＳＣ注入大腸炎マウスを基準として、組織学的により良好に保存された結腸形態及び白血球浸潤の減弱が、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣ処理大腸炎マウスにおいて観察された（図２７Ｄ）。

【００８２】

大腸炎マウスにおけるＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣにより誘発される長期作用を調査するため、図２６に示される実験デザインに従って実験を行った。１回目のＤＳＳ処理から３ヶ月の潜伏期の後、７日間のＤＳＳサイクルでの２回目の誘発試験を行った。注入したＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣは、非ＭＳＣ注入大腸炎マウスを基準として、ＤＡＩ（図２８Ａ）の有意な低減、並びに体重（図２８Ｂ）及び生存率（図２８Ｃ）のそれほど顕著ではない減少を誘発した。

【００８３】

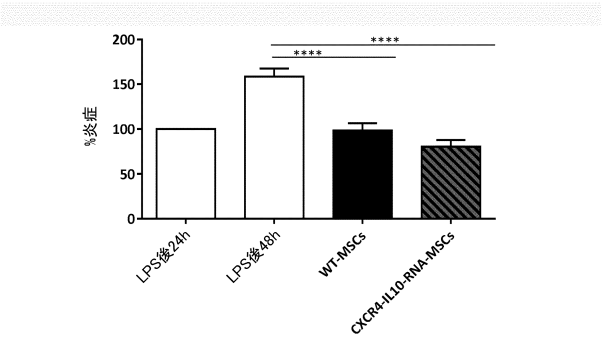
これらのデータは、ＣＸＣＲ４／ＩＬ１０－ＭＳＣが、大腸炎のＤＳＳ誘発モデルにおいてＷＴ－ＭＳＣと比較して、免疫調節特性の増大を有することを示し、これは、これらの遺伝子改変ＭＳＣが、ＷＴ　ＭＳＣと比較して、炎症性腸疾患の治療のための、より強力なＭＳＣベースの細胞治療製品であり得ることを示す。

【図面】

【図１】

FIGURES

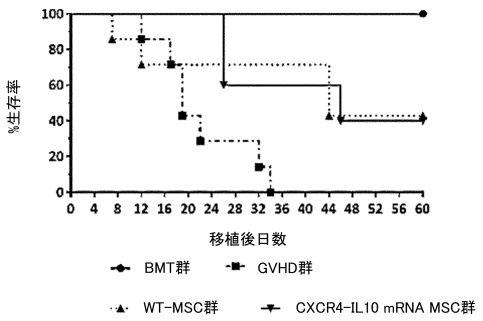
Figure 1



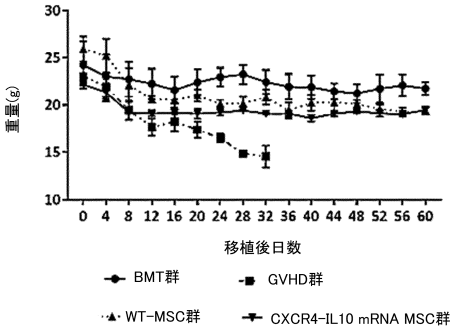
【図２－１】

Figure 2

A



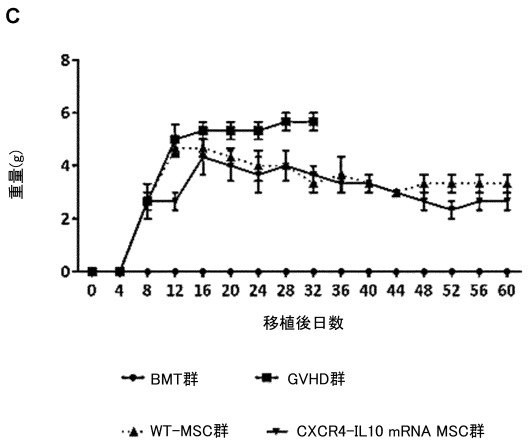
B



【図２－２】

Figure 2 (cont.)

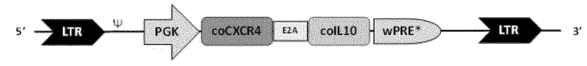
C



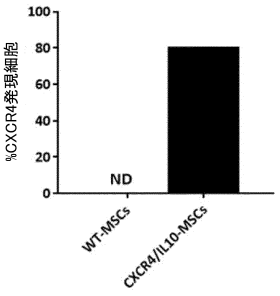
【図３－１】

Figure 3

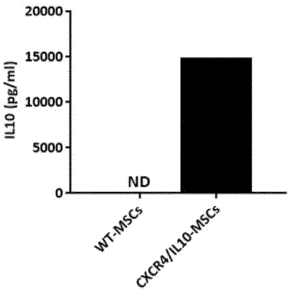
A



B

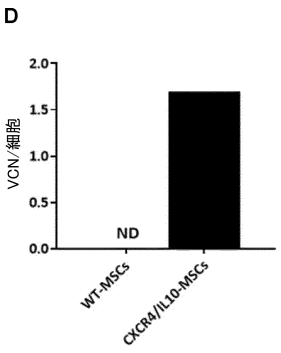


C



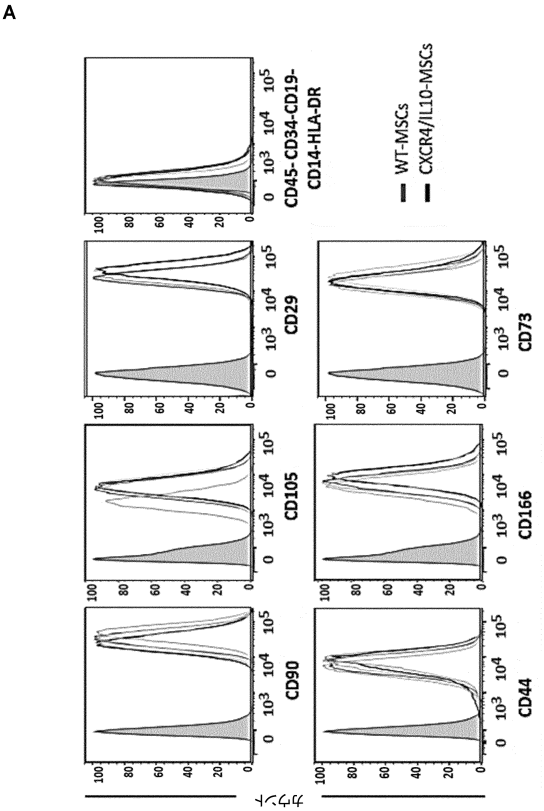
【図３－２】

Figure 3 (cont.)



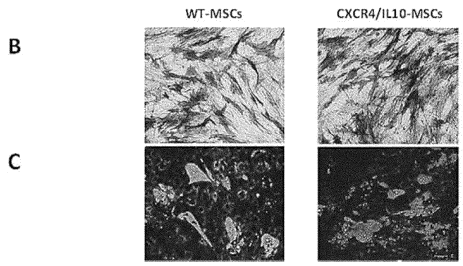
【図４－１】

Figure 4



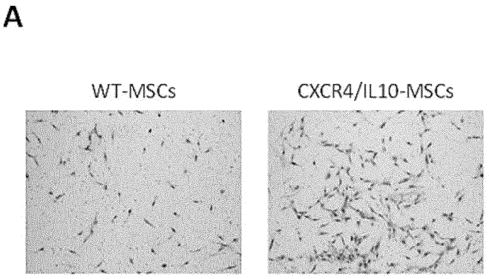
【図４－２】

Figure 4 (Cont.)



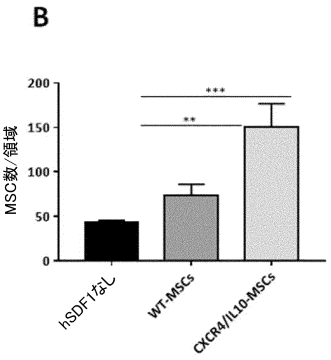
【図５－１】

Figure 5



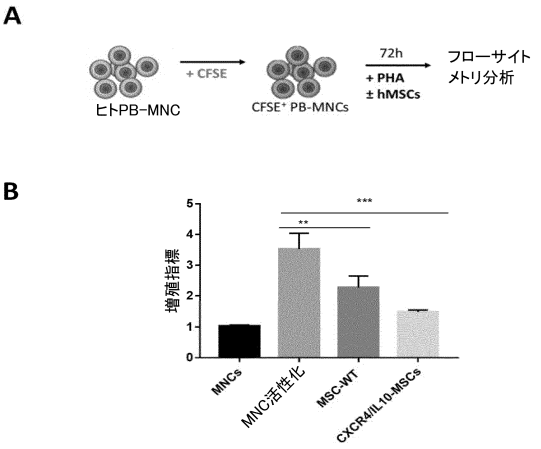
【図５－２】

Figure 5 (cont.)



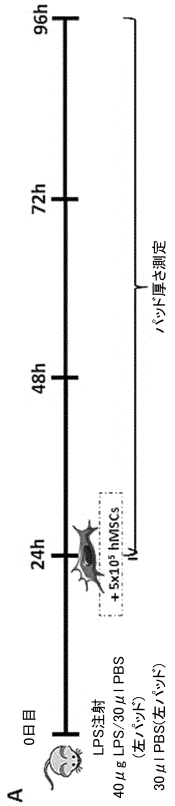
【図６】

Figure 6



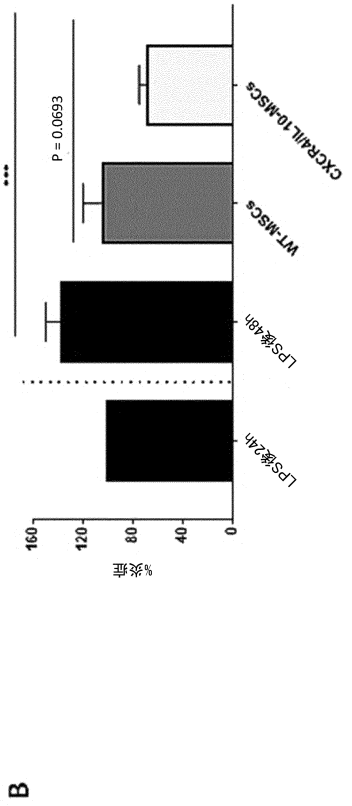
【図７－１】

Figure 7



【図７－２】

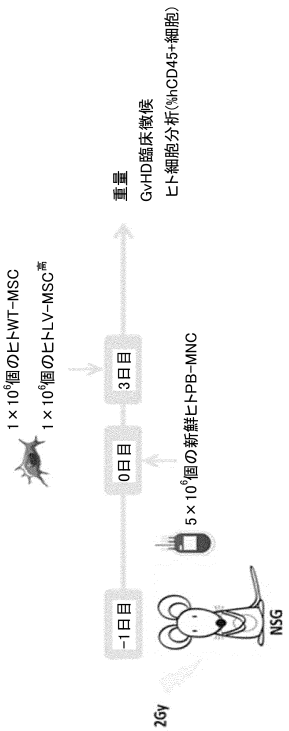
Figure 7 (cont.)



【図８－１】

Figure 8

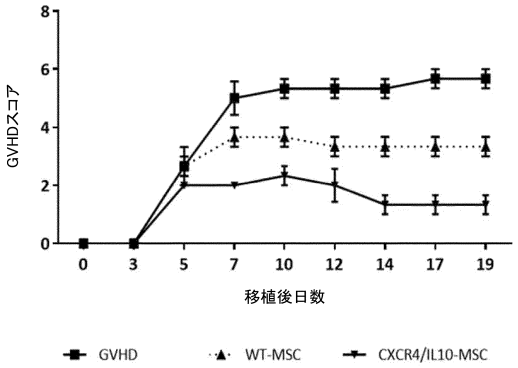
A



【図８－２】

Figure 8 (cont.)

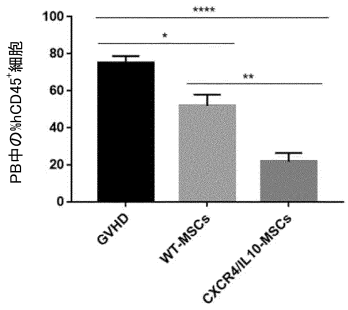
B



【図９－１】

Figure 9

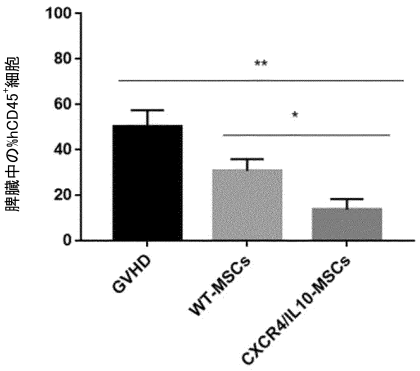
A



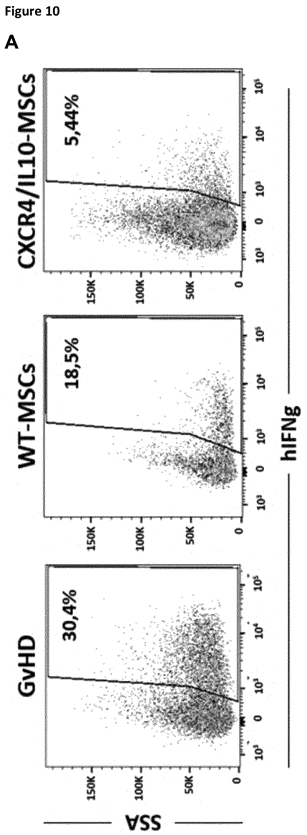
【図９－２】

Figure 9 (cont.)

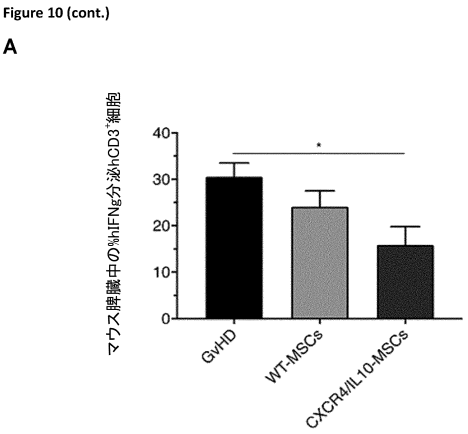
B



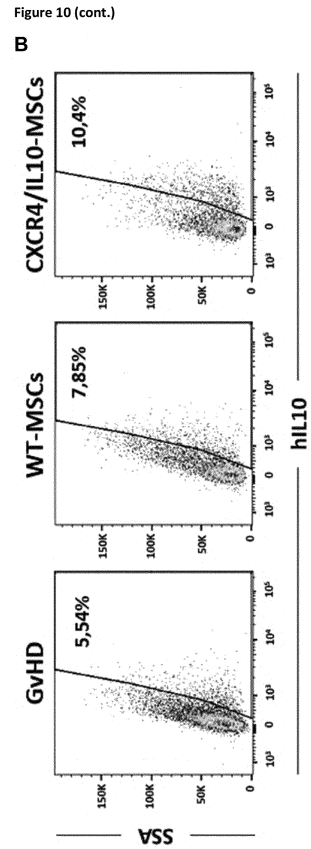
【図１０－１】



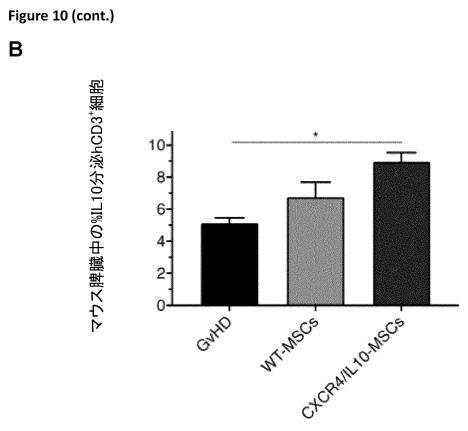
【図１０－２】



【図１０－３】

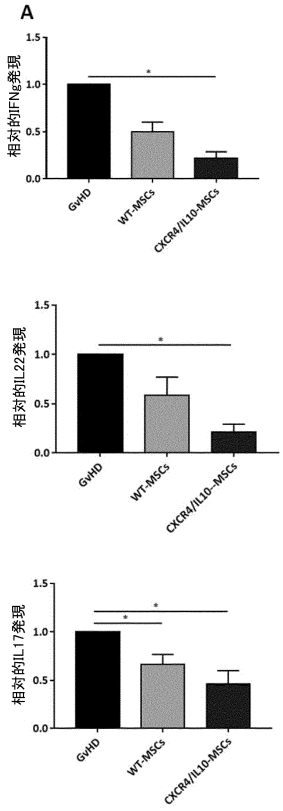


【図１０－４】



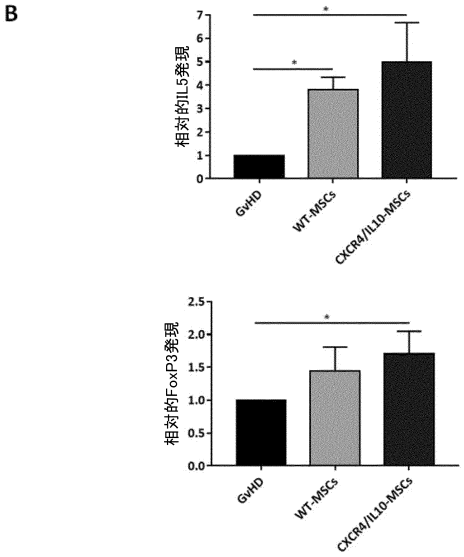
【図１１－１】

Figure 11



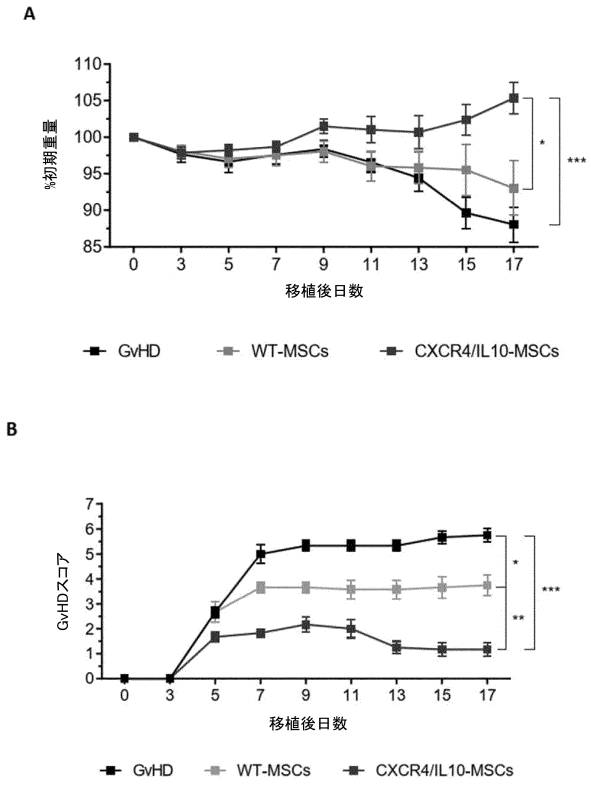
【図１１－２】

Figure 11 (cont.)



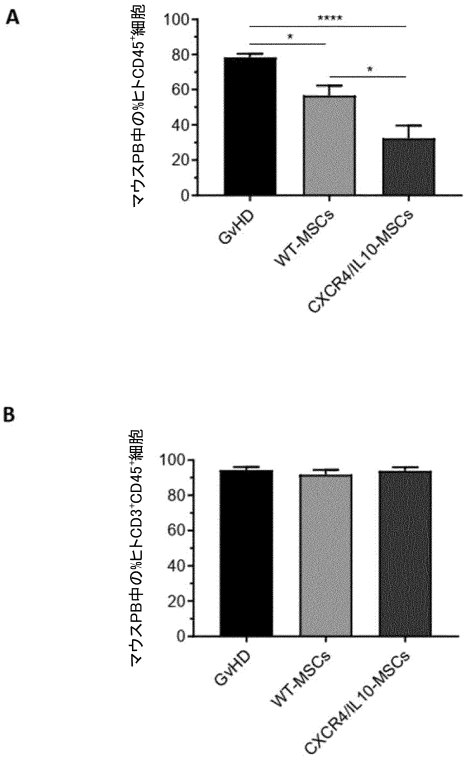
【図１２】

Figure 12



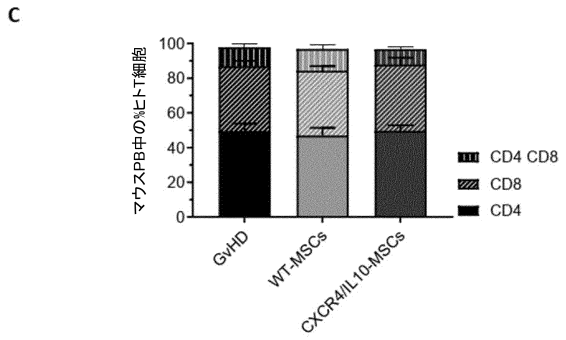
【図１３－１】

Figure 13



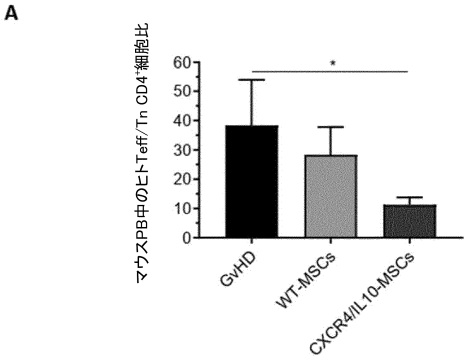
【図１３－２】

Figure 13 (cont.)



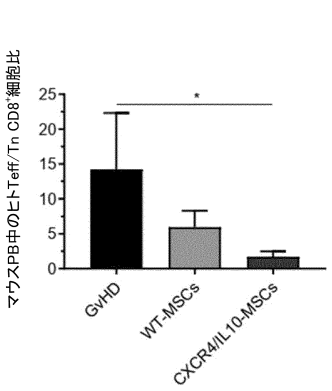
【図１４－１】

Figure 14



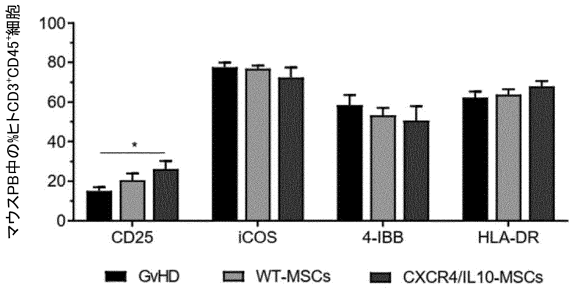
【図１４－２】

Figure 14 (cont.)



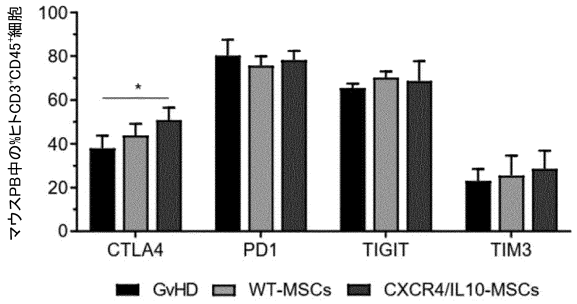
【図１５】

Figure 15



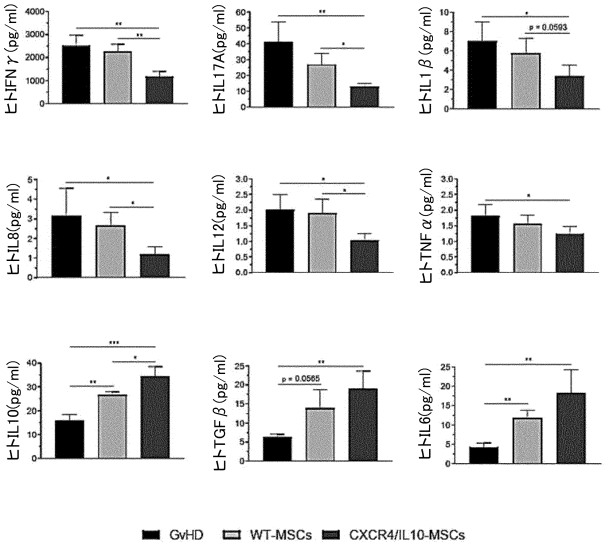
【図１６】

Figure 16



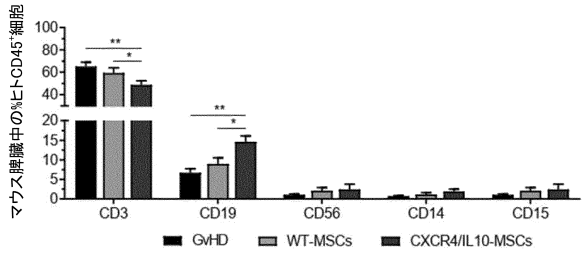
【図１７】

Figure 17



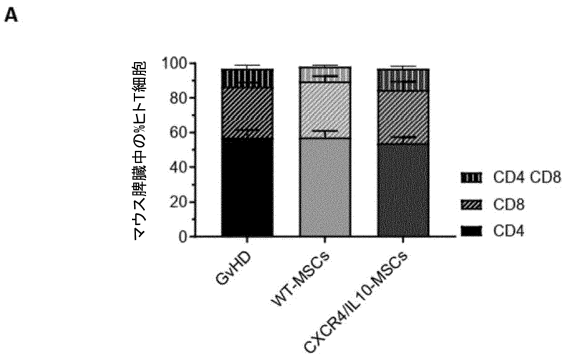
【図１８】

Figure 18



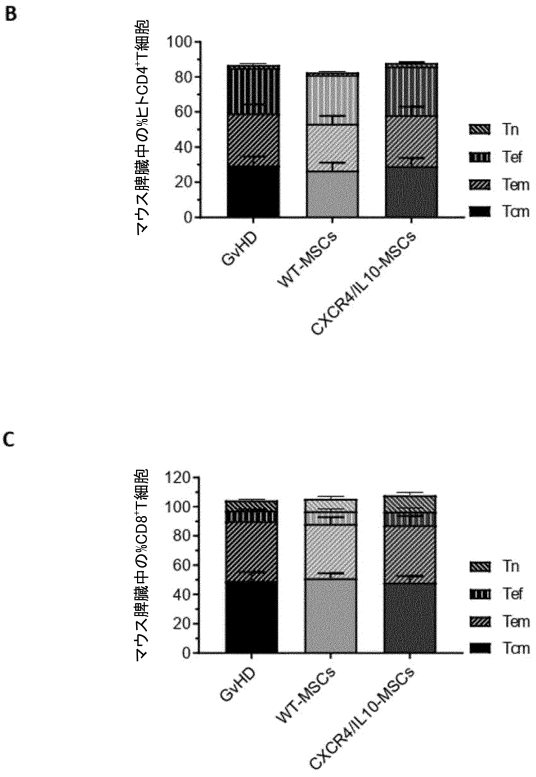
【図１９－１】

Figure 19



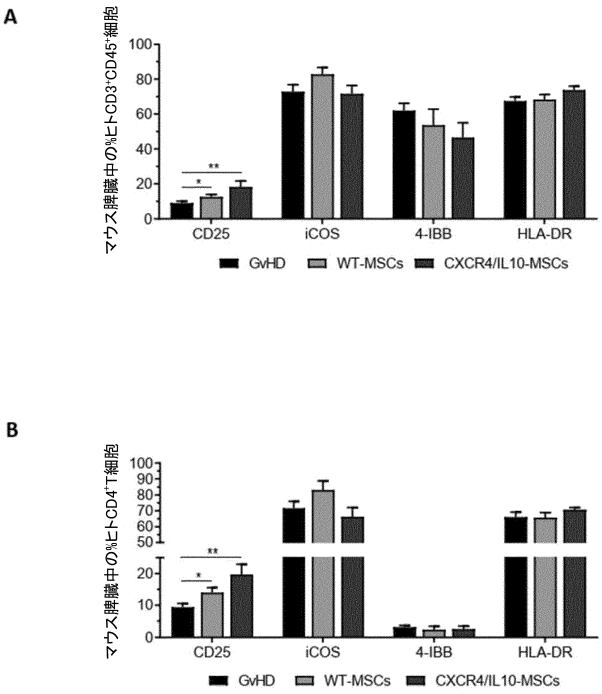
【図１９－２】

Figure 19 (cont.)



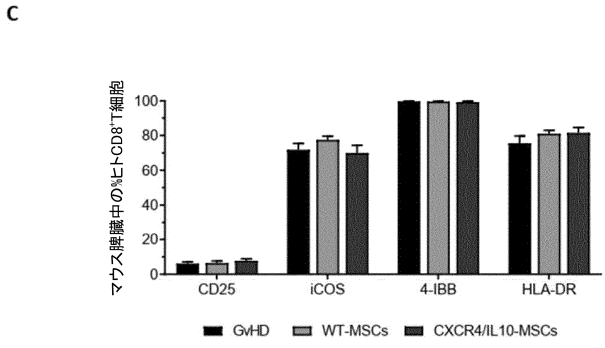
【図２０－１】

Figure 20



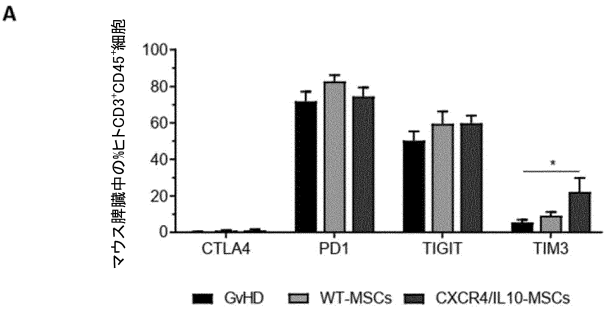
【図２０－２】

Figure 20 (cont.)



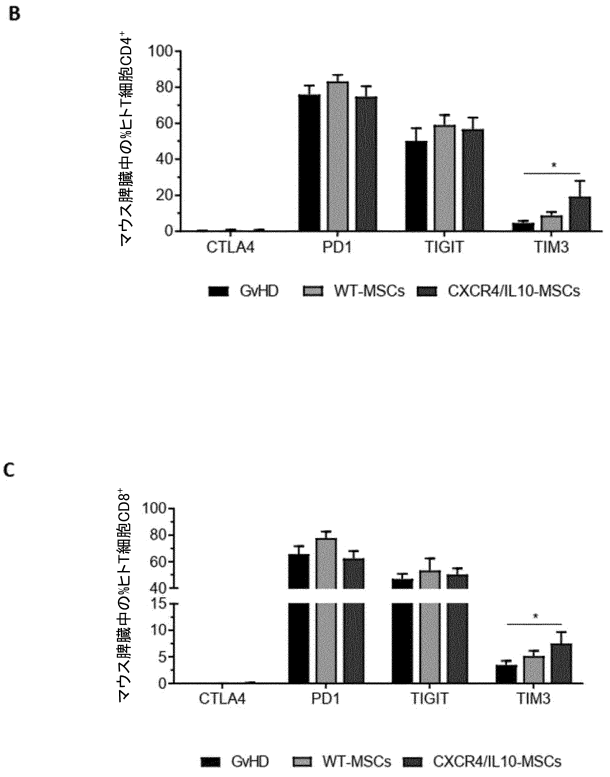
【図２１－１】

Figure 21



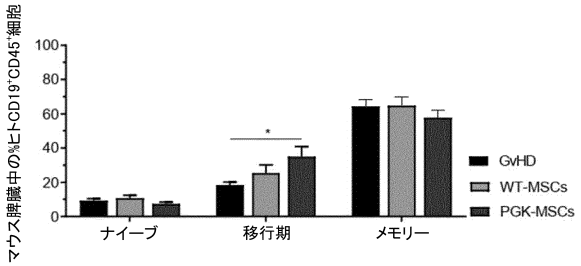
【図２１－２】

Figure 21 (cont.)



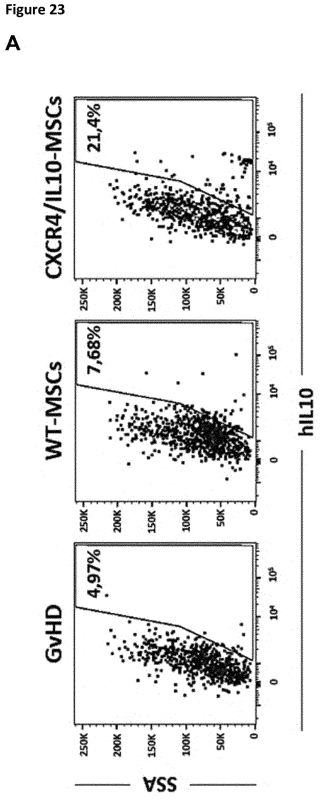
【図２２】

Figure 22



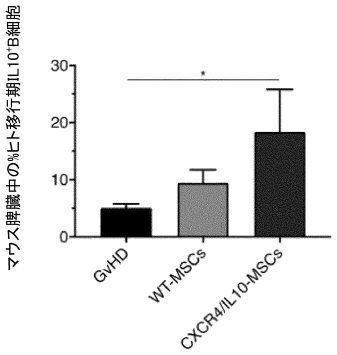
【図２３－１】

Figure 23



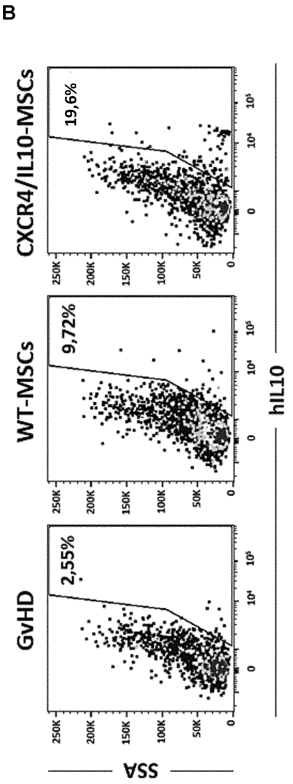
【図２３－２】

Figure 23 (cont.)



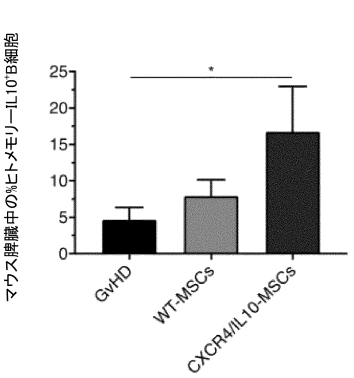
【図２３－３】

Figure 23 (cont.)



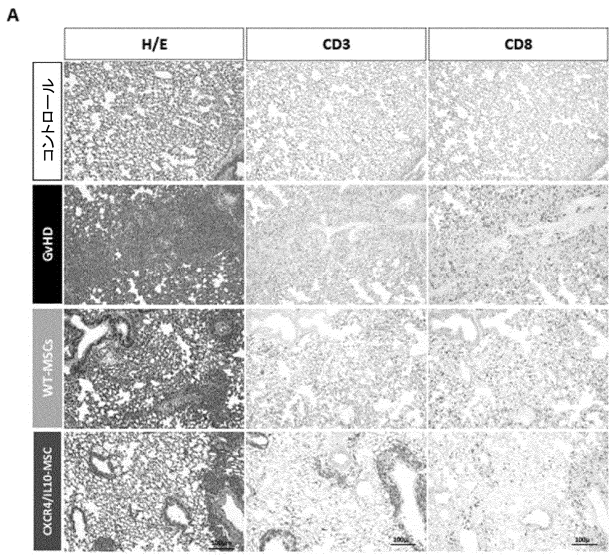
【図２３－４】

Figure 23 (cont.)



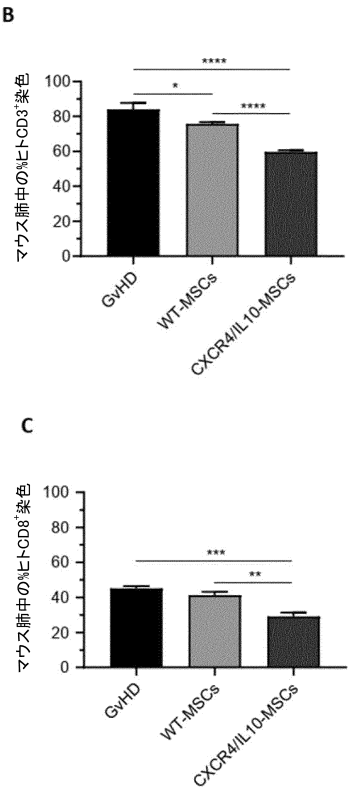
【図２４－１】

Figure 24



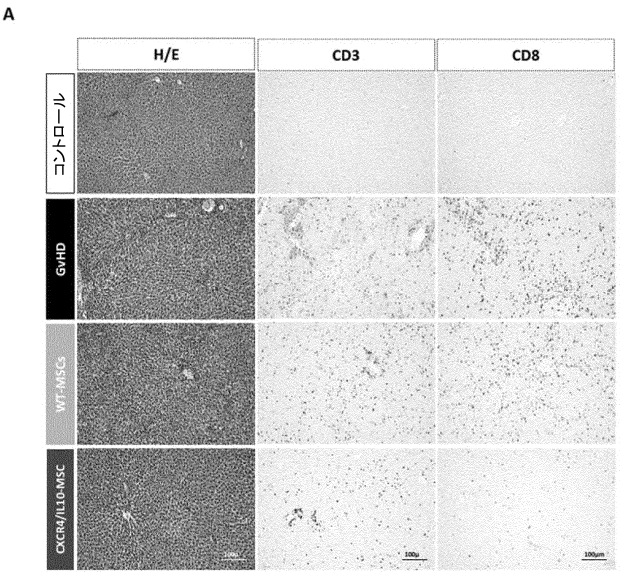
【図２４－２】

Figure 24 (cont.)



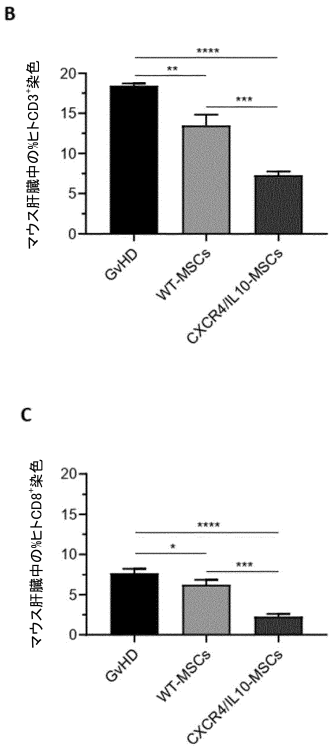
【図２５－１】

Figure 25



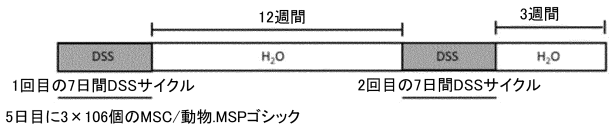
【図２５－２】

Figure 25 (cont.)



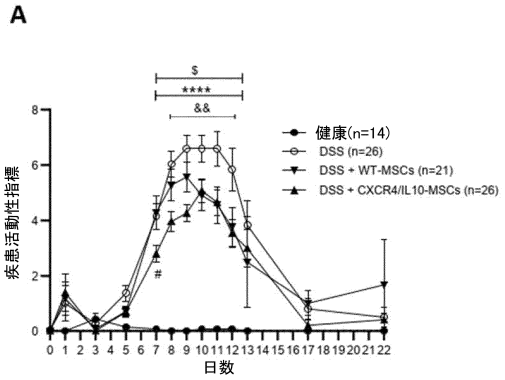
【図２６】

Figure 26



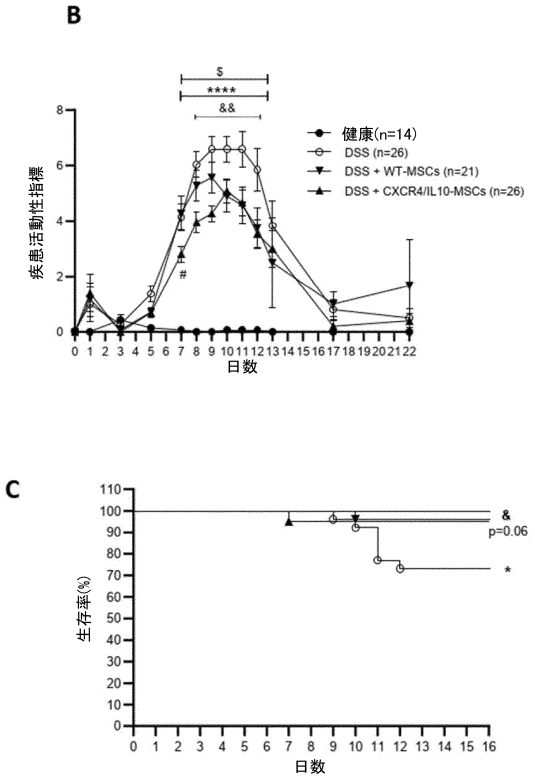
【図２７－１】

Figure 27



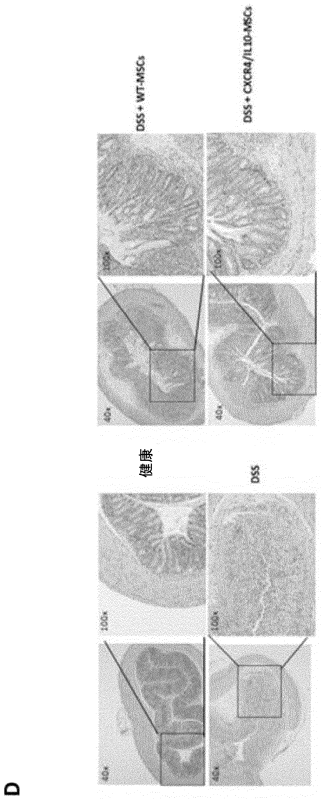
【図２７－２】

Figure 27 (cont.)



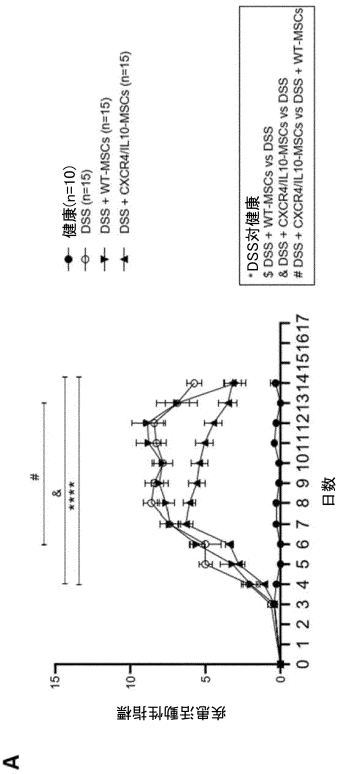
【図２７－３】

Figure 27 (cont.)



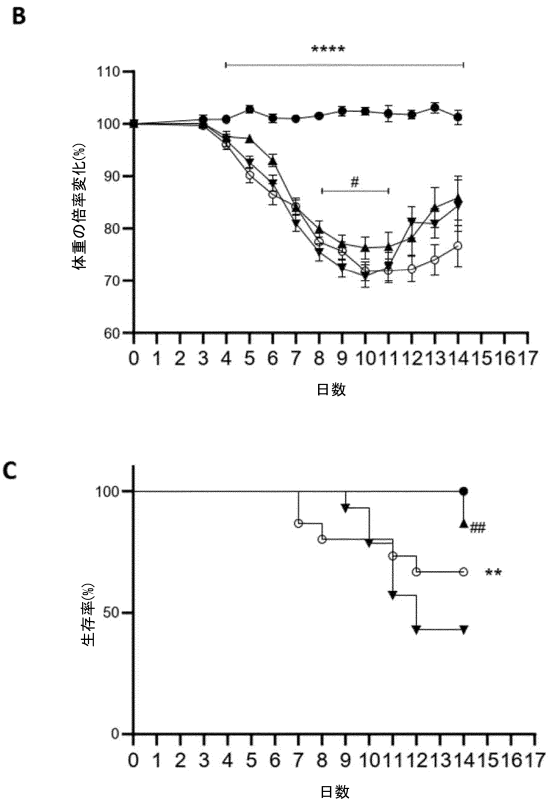
【図２８－１】

Figure 28



【図２８－２】

Figure 28 (cont.)



【配列表】
2023540599000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/074612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61P37/04 C12N5/077 C12N15/86
ADD.

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)
A61P C07K C12N

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)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C VAUBOURG: "Changing the Face of Modern Medicine: Stem Cell and Gene Therapy Organized Jointly by the European Society of Gene & Cell Therapy (ESGCT), International Society for Stem Cell Research (ISSCR) and the French Society of Gene and Cell Therapy (SFTCG) Lausanne, Switzerland October 16-19, 2018 Abstracts", HUMAN GENE THERAPY, vol. 29, no. 12, 1 December 2018 (2018-12-01), pages A1-A169, XP055668032, GB ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2018.29077.abstracts paragraph - page A168 ----- -/--	1-17

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 November 2021	03/12/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Seranski, Peter

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/074612

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/074733 A1 (MEDIN JEFFREY A [CA] ET AL) 19 March 2009 (2009-03-19) paragraph [0115] - paragraph [0117]	1-17
X	WO 2016/110565 A1 (APCETH GMBH & CO KG [DE]) 14 July 2016 (2016-07-14) figures 2, 3a; example 1	1-17
A	WO 2019/243461 A1 (FOND TELETHON [IT]; FOND CENTRO SAN RAFFAELE [IT] ET AL.) 26 December 2019 (2019-12-26) the whole document	1-17
A	GHAEDI M ET AL: "Establishment of lentiviral-vector-mediated model of human alpha-1 antitrypsin delivery into hepatocyte-like cells differentiated from mesenchymal stem cells", TISSUE AND CELL, CHURCHILL LIVINGSTONE MEDICAL JOURNALS, EDINBURGH, GB, vol. 42, no. 3, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 181-189, XP027069539, ISSN: 0040-8166, DOI: 10.1016/J.TICE.2010.03.007 [retrieved on 2010-06-04] the whole document	1-17

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2021/074612

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2021/074612

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009074733 A1	19-03-2009	CA 2566267 A1	09-06-2007
		US 2009074733 A1	19-03-2009
		US 2011014165 A1	20-01-2011
WO 2016110565 A1	14-07-2016	AU 2016206033 A1	06-07-2017
		CA 2970993 A1	14-07-2016
		CN 107208063 A	26-09-2017
		DK 3242933 T3	03-06-2019
		EP 3242933 A1	15-11-2017
		ES 2727820 T3	18-10-2019
		HU E043478 T2	28-08-2019
		IL 253063 A	30-06-2019
		JP 2018502579 A	01-02-2018
		JP 2021046416 A	25-03-2021
		LT 3242933 T	25-06-2019
		PL 3242933 T3	30-08-2019
		PT 3242933 T	05-06-2019
		SI 3242933 T1	30-08-2019
		US 2018000969 A1	04-01-2018
		US 2020282078 A1	10-09-2020
		WO 2016110565 A1	14-07-2016
WO 2019243461 A1	26-12-2019	AU 2019291069 A1	28-01-2021
		CA 3104387 A1	26-12-2019
		CN 112601811 A	02-04-2021
		EP 3810754 A1	28-04-2021
		JP 2021527447 A	14-10-2021
		US 2021277354 A1	09-09-2021
		WO 2019243461 A1	26-12-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
A61K 35/28 (2015.01)		A61K	35/28	
A61P 29/00 (2006.01)		A61P	29/00	
A61P 37/06 (2006.01)		A61P	29/00	101
A61P 19/02 (2006.01)		A61P	37/06	
A61P 1/04 (2006.01)		A61P	19/02	
A61K 35/76 (2015.01)		A61P	1/04	
		A61K	35/76	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

1．ＴＷＥＥＮ

ィガシオン ビオメディカ エン レッド
スペイン国 ２８０２９ マドリッド パベロン １１ カージェ／モンフォルテ デ レモス ３－５
(74)代理人 110000796
弁理士法人三枝国際特許事務所
(72)発明者 エルバス－サルセド ロザリオ
スペイン国 ２８０４０ マドリッド アベニダ デ ロス レイエス カトリコス ２ フンダシオン インスティチュート デ インベスティガシオン サニタリア フンダシオン ヒメネス ディアス
(72)発明者 ガルシア－オルモ ダミアン
スペイン国 ２８０４０ マドリッド アベニダ デ ロス レイエス カトリコス ２ フンダシオン インスティチュート デ インベスティガシオン サニタリア フンダシオン ヒメネス ディアス
(72)発明者 ガルシア－アランス マリアーノ
スペイン国 ２８０４０ マドリッド アベニダ デ ロス レイエス カトリコス ２ フンダシオン インスティチュート デ インベスティガシオン サニタリア フンダシオン ヒメネス ディアス
(72)発明者 エルナンド ロドリゲス ミリアム
スペイン国 ２８０４０ マドリッド アベニダ デ ロス レイエス カトリコス ２ フンダシオン インスティチュート デ インベスティガシオン サニタリア フンダシオン ヒメネス ディアス
(72)発明者 ブエレン ロンセロ フアン アントニオ
スペイン国 ２８０４０ マドリッド アベニダ コンプルテンセ ４０ エディフィシオ ７０ プランタ ０ デスパチョ １３． セントロ デ インベスティガシオネス エネルゲティカス メディオアムビエンタレス イ テクノロジカス オー．エー．，エム．ピー．
(72)発明者 ヤニェス ゴンサレス ロサ マリア
スペイン国 ２８０４０ マドリッド アベニダ コンプルテンセ ４０ エディフィシオ ７０ プランタ ０ デスパチョ １３． セントロ デ インベスティガシオネス エネルゲティカス メディオアムビエンタレス イ テクノロジカス オー．エー．，エム．ピー．
(72)発明者 フェルナンデス ガルシア マリア
スペイン国 ２８０４０ マドリッド アベニダ コンプルテンセ ４０ エディフィシオ ７０ プランタ ０ デスパチョ １３． セントロ デ インベスティガシオネス エネルゲティカス メディオアムビエンタレス イ テクノロジカス オー．エー．，エム．ピー．
(72)発明者 ロペス サンタラ メルセデス
スペイン国 ２８０４０ マドリッド アベニダ デ ロス レイエス カトリコス ２ フンダシオン インスティチュート デ インベスティガシオン サニタリア フンダシオン ヒメネス ディアス
(72)発明者 ガリン フェレイラ マリーナ インマクラダ

スペイン国 ２８０４０ マドリッド アベニダ コンプルテンセ ４０ エディフィシオ ７０ プランタ ０ デスパチョ １３． セントロ デ インベスティガシオネス エネルゲティカス メディオアムビエンタレス イ テクノロジカス オー．エー．，エム．ピー．

Ｆターム（参考） 4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 CA44
4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 CA12 NA14 ZA66 ZA96 ZB08 ZB11
ZB15