

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4948165号
(P4948165)

(45) 発行日 平成24年6月6日 (2012.6.6)

(24) 登録日 平成24年3月16日 (2012.3.16)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 5/073 (2010.01)
A 6 1 K 35/12 (2006.01)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)
A 6 1 P 9/04 (2006.01)
A 6 1 P 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 2 O 2 B
A 6 1 K 35/12
A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 9/04
A 6 1 P 9/10

請求項の数 33 (全 97 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-517787 (P2006-517787)
(86) (22) 出願日 平成16年6月25日 (2004.6.25)
(65) 公表番号 特表2007-528705 (P2007-528705A)
(43) 公表日 平成19年10月18日 (2007.10.18)
(86) 国際出願番号 PCT/US2004/020957
(87) 国際公開番号 W02005/001080
(87) 国際公開日 平成17年1月6日 (2005.1.6)
審査請求日 平成19年6月23日 (2007.6.23)
(31) 優先権主張番号 60/483,264
(32) 優先日 平成15年6月27日 (2003.6.27)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 503325941
エチコン、インコーポレイテッド
E T H I C O N , I N C .
アメリカ合衆国 08876 ニュージャ
ージー州 サマービル ルート 22 ウ
エスト ビーオーボックス 151
(74) 代理人 100104411
弁理士 矢口 太郎
(74) 代理人 100104215
弁理士 大森 純一
(74) 代理人 100099656
弁理士 山口 康明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心臓及び循環器系疾患の治療において使用するための分娩後由来細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

心臓疾患又は循環器系疾患の治療のために使用される治療用細胞組成物であって、この組成物は、実質的に均一な細胞集団を有し、この集団は、実質的に血液を含まないヒト臍帯組織から単離される、単離された臍帯組織の細胞を有し、この集団は、培養において自己複製および増殖することができ、他の表現型の細胞に分化する能力を有し、少なくとも40回の倍加能力を有し、且つ以下の、

(a) C D 1 0、C D 1 3、C D 4 4、C D 7 3、C D 9 0、P D G F r-アルファ、P D-L 2、及びH L A-A、B、Cのそれぞれを発現し、

(b) C D 3 1、C D 3 4、C D 4 5、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 1 7、C D 1 4 1、C D 1 7 8、B 7-H 2、H L A-G、又はH L A-D R、D P、D Qのいずれも発現せず、且つ

(c) 繊維芽細胞、間葉系幹細胞、または腸骨稜骨髄細胞であるヒト細胞と比較して、インターロイキン-8；レチキュロン (r e t i c u l o n) 1；及びケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド3の発現が増加している、

という特徴を有するものである、治療用細胞組成物。

【請求項 2】

請求項1記載の組成物において、前記単離された臍帯組織の細胞集団は、さらに、以下の、

(a) M C P-1、M I P 1 ベータ、I L 6、I L 8、G C P-2、H G F、K G F、

10

20

F G F、H B－E G F、B D N F、T P O、R A N T E S、及びT I M P 1の各因子を分泌し、且つ

(b) S D F－1 アルファ、T G F－ベータ 2、A N G 2、P D G F b b、M I P 1 a、及びV E G Fのいずれの因子も分泌しない、

という特徴の 1 若しくはそれ以上を有するものである、組成物。

【請求項 3】

請求項 1 記載の治療用組成物において、前記臍帯組織の細胞集団は、メタロプロテアーゼ活性、ムコ多糖類加水分解酵素活性、及び中性プロテアーゼ活性を有する 1 若しくはそれ以上の酵素活性の存在下で単離されるものである、治療用組成物。

【請求項 4】

請求項 3 記載の治療用組成物において、前記臍帯組織の細胞は、コラゲナーゼ及びディスペラーゼの存在下において単離されるものである、治療用組成物。

【請求項 5】

請求項 4 記載の治療用組成物において、前記臍帯組織の細胞集団は、ヒアルロニダーゼの存在下において単離されるものである、治療用組成物。

【請求項 6】

請求項 1 記載の治療用組成物において、前記細胞集団は、継代において正常の核型を維持するものである、治療用組成物。

【請求項 7】

請求項 1 記載の治療用組成物において、前記細胞集団は、増殖培養液中で培養された際、心原性、血管原性、血液血管性、或いは血管性経路へと自発的に分化しないものである、治療用組成物。

【請求項 8】

請求項 1 記載の治療用組成物において、前記細胞集団は、心原性、血管原性、血液血管性、或いは血管性経路に沿って幹細胞分化を刺激する 1 若しくはそれ以上の因子の存在下で培養されるものである、治療用組成物。

【請求項 9】

請求項 8 記載の治療用組成物において、前記細胞集団は、少なくとも 1 つの脱メチル化因子、B M P、F G F、T A K、G A T A、C s x、N K、M E F 2、E T－1 及びW n t 因子ファミリーのメンバー、ヘッジホッグ、C s x／N k x－2. 5、及び抗W n t 因子の存在下において培養されるものである、治療用組成物。

【請求項 10】

請求項 9 記載の治療用組成物において、前記細胞集団は、少なくとも、D N Aメチルトランスフェラーゼの阻害剤或いはヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤、或いはリプレッサー複合体の阻害剤を含む脱メチル化因子の存在下において培養されるものである、治療用組成物。

【請求項 11】

請求項 9 記載の治療用組成物において、前記細胞集団は、少なくとも、5－アザシチジン、5－アザ－2’－デオキシシチジン、D M S O、塩化ヘレリスリン、レチノイン酸及びその塩類、2－アミノ－4－（エチルチオ）酪酸、プロカインアミド、及びプロカインの少なくとも 1 つを含む脱メチル化因子の存在下において培養されるものである、治療用組成物。

【請求項 12】

請求項 1 記載の治療用組成物において、前記細胞集団は、マトリックス－細胞複合体を形成するためにマトリックス上に播種されるものである、治療用組成物。

【請求項 13】

請求項 1 2 記載の治療用組成物において、前記マトリックスは足場である、治療用組成物。

【請求項 14】

請求項 1 3 記載の治療用組成物において、前記足場は生体吸収性である、治療用組成物

10

20

30

40

50

。

【請求項 15】

心臓疾患又は循環器系疾患を有する患者の治療において使用するための治療用細胞組成物であって、この組成物は、薬学的に許容可能な担体と、実質的に均一な細胞集団とを有し、この集団は、実質的に血液を含まないヒト臍帯組織から単離される、単離された臍帯組織の細胞を有し、この集団は、培養において自己複製および増殖することができ、他の表現型の細胞に分化する能力を有し、少なくとも40回の倍加能力を有し、且つ以下の、

(a) CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr-α、PD-L2、及びHLA-A、B、Cのそれぞれを発現し、

(b) CD31、CD34、CD45、CD80、CD86、CD117、CD141、CD178、B7-H2、HLA-G、又はHLA-DR、DP、DQのいずれも発現せず、且つ

(c) 繊維芽細胞、間葉系幹細胞、または腸骨稜骨髄細胞であるヒト細胞と比較して、インターロイキン-8；レチキュロン (reticulin) 1；及びケモカイン (CX-Cモチーフ) リガンド3の発現が増加している、

という特徴を有するものである、治療用細胞組成物。

【請求項 16】

請求項 15 記載の治療用細胞組成物において、前記疾患は、心筋症である、治療用細胞組成物。

【請求項 17】

請求項 16 記載の治療用細胞組成物において、前記心筋症は、特発性である、治療用細胞組成物。

【請求項 18】

請求項 17 記載の治療用細胞組成物において、前記心筋症は、虚血性心筋症、或いは非虚血性心筋症である、治療用細胞組成物。

【請求項 19】

請求項 18 記載の治療用細胞組成物において、前記心筋症は、拡張性心筋症、肥大性心筋症、及び拘束性心筋症から選択される非虚血性心筋症である、治療用細胞組成物。

【請求項 20】

請求項 15 記載の治療用細胞組成物において、前記細胞は、心原性、血管原性、血液血管性、或いは血管性経路に沿って誘導されるものである、治療用細胞組成物。

【請求項 21】

請求項 20 記載の治療用細胞組成物において、この組成物は、in vitroで誘導される細胞を有するものである、治療用細胞組成物。

【請求項 22】

請求項 20 記載の治療用細胞組成物であって、この組成物は、in vivo（ヒトを除く）で誘導された細胞を有するものである、治療用細胞組成物。

【請求項 23】

請求項 15 記載の治療用細胞組成物において、この組成物は、心臓に存在する成人幹細胞を、分裂する或いは分化する若しくはその両方を行うように刺激する細胞を有するものである、治療用細胞組成物。

【請求項 24】

請求項 15 記載の治療用細胞組成物において、前記細胞集団は、マトリックス-細胞複合体として提供されるものである、治療用細胞組成物。

【請求項 25】

請求項 24 記載の治療用細胞組成物において、前記マトリックスは足場である、治療用細胞組成物。

【請求項 26】

請求項 25 記載の治療用細胞組成物において、前記足場は生体吸収性である、治療用細胞組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

請求項 20 記載の治療用細胞組成物において、前記単離された臍帯組織の細胞集団は、さらに、以下の、

(a) 5%～20%の酸素の存在下で増殖する能力を有し、且つ

(b) 繊維芽細胞、間葉系幹細胞、または腸骨稜骨髓細胞であるヒト細胞と比較して、ケモカイン受容体 (C-X-C モチーフ) リガンド 1、顆粒球走化性タンパク質 2 (GCP-2)、及び腫瘍壊死因子 アルファ 誘導性タンパク質 3 の発現が増加している、

という特徴を有するものである、治療用細胞組成物。

【請求項 28】

請求項 1～15 記載の治療用細胞組成物において、前記実質的に均一な細胞集団は、他の哺乳類細胞と同時に培養されるものであり、少なくとも 1 つの他の哺乳類細胞は、心筋芽細胞、血管芽細胞、或いはヘマンジオブラストであり、或いは心筋芽細胞、血管芽細胞、或いはヘマンジオブラストへと導く経路に沿って分化を誘導するものである、治療用細胞組成物。

10

【請求項 29】

請求項 15 記載の治療用細胞組成物において、前記細胞集団は、さらに、以下の、

(a) MCP-1、MIP1 ベータ、IL6、IL8、GCP-2、HGF、KGF、FGF、HB-EGF、BDNF、TPO、RANTES、及び TIMP1 の各因子を分泌し、且つ

(b) SDF-1 アルファ、TGF-β2、ANG2、PDGFbb、MIP1α、及び VEGF のいずれの因子も分泌しない、

という特徴を有するものである、治療用細胞組成物。

20

【請求項 30】

請求項 15～29 記載のいずれかの治療用細胞組成物において、この治療用細胞組成物は、注射用に製剤化されるものである、治療用細胞組成物。

【請求項 31】

請求項 15～29 記載のいずれかの治療用細胞組成物において、この治療用細胞組成物は、さらに、

1 若しくはそれ以上の抗血栓形成剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、免疫調節剤、及び抗アポトーシス剤を有するものである、治療用細胞組成物。

30

【請求項 32】

請求項 15～29 記載のいずれかの治療用細胞組成物において、前記使用は、さらに、心機能における改善を、患者において評価することを含むものである、治療用細胞組成物。

【請求項 33】

請求項 32 記載の治療用細胞組成物において、前記改善は、胸部心拍出量 (CO)、心係数 (CI)、肺動脈楔入圧 (PAWP) および心係数 (CI)、左室系短縮率 (%FS)、駆出分画 (EF)、左室駆出分画 (LVEF)、左室拡張末期径 (LVEDD)、左室末期収縮経 (LVESD)、収縮力 (例えば、dp/dt)、血圧-容積ループ (pressure-volume loop)、心機能の測定値における改善、さらには心房或いは心室機能の上昇、拍出効率の上昇、拍出効率の損失率の減少、血行動態機能の損失の減少、及び心筋症に関連する合併症の減少を含むものである、治療用細胞組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

これは、2003 年 6 月 27 日に出願された米国仮出願第 60/483,264 号明細書に対して優先権を主張し、この全体の内容はこの参照により組み込まれる。他の関連出願は、次の同一出願人による同時係属出願、米国出願第 10/877,012 号明細書 (2004 年 6 月 25 日に出願) と、米国出願第 10/877,446 号明細書 (2004

50

年6月25日に出願)と、米国出願第10/877, 269号明細書(2004年6月25日に出願)と、米国出願第10/877, 541号明細書(2004年6月25日に出願)と、米国出願第10/877, 009号明細書(2004年6月25日に出願)と、米国出願第10/876, 998号明細書(2004年6月25日に出願)と、米国仮出願第60/555, 908号明細書(2004年3月24日に出願)とを含み、これらの全体の内容はこの参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、間葉系に沿って、心筋性、血管原性、血管性表現型へと分裂及び分化する能力を有する分娩後由来細胞に関するものである。本発明は、そのような分娩後由来細胞を心臓及び循環器系疾患の治療に使用するための方法にも関連する。

10

【背景技術】

【0003】

哺乳類における心筋を構成する細胞は、分裂後の細胞であると一般的に認識されている。このことは、損傷を受けた細胞を修復することがほぼ不可能で壊死となる、外傷した或いは病的な心筋において困難を導く。そのような損傷の後、心筋の効率及び拍出量は低下し、さらなるストレスが心臓に加わり、さらなる損傷と壊死を引き起こし、最終的に心不全へと至る。

【0004】

健康な心臓から不全な心臓への下向きの螺旋は、多くの状態、すなわち身体的障害および先天性心疾患を含む心疾患、及び心臓や循環器組織の感染の結果生じ得る。心臓、循環器系疾患は、例えば心筋症のような心不全を生じる、しばしば最終的で致死的である特別な状態である。現在、大部分のそのような状態に対して治療はなく、多くの患者は、例えば心室補助装置や最終的には心臓移植などを必要とする。

20

【0005】

現在、心臓の組織損傷の修復や回復、および機能改善を補助するため、若しくは少なくとも健康な心臓組織をさらなる損失へと導く損傷のサイクルを止めるために、分裂及び分化し得る幹細胞、若しくは平滑筋や骨格筋を含む他の部分からの筋細胞を使用することに興味を持たれている。さらに、多くの循環器系疾患や損傷は、循環器系組織やそのような組織を構成する細胞への慢性或いは急性の損傷、若しくはそれらの壊死に関与する。細胞ベースの或いは細胞由来の治療は、これらの状態に対して興味深いものとなる。

30

【0006】

従って、本分野においては、損傷した心臓或いは循環器組織を治す助けとなる、若しくは患者におけるそのような損傷を修復或いは置換を生じ得る、細胞ベースの或いは細胞由来の治療に対する技術が必要とされている。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、その観点の一つにおいて、単離された分娩後由来細胞に関するものであり、それらは実質上血液を含まず、培養において自己複製および増殖能を有し、間葉系に沿って、心筋性、血管原性及び血管性表現型へと分化する、さらには心筋細胞(cardiomyocytes)、内皮細胞、心筋細胞(myocardial cells)、心外膜細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞(例えば、血管平滑筋細胞)などの細胞及び興奮性や伝導性システムの細胞、および上述の前駆或いは原始細胞へと分化する能力を有する分娩後組織に由来するものである。本発明は、別の観点において、そのような細胞を有する細胞集団、および治療用細胞組成物、さらには、心臓或いは循環器系の傷害および疾患の治療のために、前記細胞集団を使用する方法に関するものである。

40

【0008】

第1の観点において、本発明は、実質上血液を含まない分娩後組織から由来する、L-バリン要求性細胞を有する、単離された分娩後由来細胞を提供する。前記細胞は、培養において自己複製および増殖する能力を有し、他の表現型細胞、例えば心筋細胞或いはその

50

前駆細胞へと分化する能力を有する。前記細胞は、約5%～少なくとも約20%の酸素を有する空气中で増殖する能力を有し、以下の特徴、

培養系において少なくとも約40代倍加する能力、

コーティング或いは非コーティング組織培養容器上で接着及び増殖するものであって、コーティング組織培養容器は、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、ポリオルニチン、ビトロネクチン、或いはフィブロネクチンのコーティングを有するものである、

組織因子、ビメンチン、及びアルファ平滑筋アクチンの少なくとも一つを産生する、

CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFR- α 、PD-L2、及びHLA-A、B、Cの少なくとも一つを産生する、

フローサイトメトリーにより検出されたように、CD31、CD34、CD80、CD86、CD117、CD141、CD178、B7-H2、HLA-G、及びHLA-DR、DP、DQの少なくとも一つを産生しない、

インターロイキン8、レチキュロン1、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド1(メラノーマ増殖刺激活性、 α)、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド6(顆粒球走化性タンパク質2)、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド3、腫瘍壊死因子、 α 誘導性タンパク質3の少なくとも一つを発現する、

C型(カルシウム依存性、糖鎖認識ドメイン)レクチン、スーパーファミリーメンバー2(活性化誘導)、ウィルムス腫瘍1、アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリーのメンバーA2、レニン、酸化型低密度型リポタンパク質(レクチン様)受容体1、ヒトクローンIMAGE:4179671のmRNAの部分的コード領域(cds)、プロテインキナーゼCのゼータ、仮定上タンパク質DKFZp564F013、卵巣癌で下方制御されている遺伝子1、ヒトmRNA、cDNA DKFZp547K1113(クローンDKFZp547K1113から)の少なくとも一つを発現する、

低身長感受性(short stature)ホメオボックス(SHOX)2、熱ショック27kDaタンパク質2、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド12(間質細胞由来因子1)、エラスチン(大動脈弁上狭窄、Williams-Beuren症候群)、ヒトmRNA、cDNA DKFZp586M2022(DKFZp586M2022クローンから)、間柔織(mesenchyme)ホメオボックス2(成長停止特異的ホメオボックス)、sine oculisホメオボックス相同体1(ショウジョウバエ)、クリスタリン α B、形態形成のdishevelled関連性活性化因子2、DKFZp586B2420タンパク質、ニューラリン1の類似物、テトラネクチン(プラスミノゲン結合タンパク質)、src相同体3(SH3)及びシステインリッチドメイン、抗増殖性のB-Cell転座遺伝子1、コレステロール25-水酸化酵素、ラント関連性転写因子3、仮定上タンパク質FLJ23191、インターロイキン11受容体 α 、プロコラーゲンC-エンドペプチダーゼエンハンサー、縮合(frizzled)相同体7(ショウジョウバエ)、仮定上遺伝子BC008967、コラーゲンタイプVII α 1、テネイシンC(hexabrachion)、イルコイホメオボックスタンパク質5、ヘファエスチン(hephaestin)、インテグリンベータ8、シナプス小胞糖タンパク質2、ヒトcDNA FLJ12280 fisのクローンMMA1001744、サイトカイン受容体様因子1、カリウム中間体/低透過性カルシウム活性化チャネルのサブファミリーNメンバー4、インテグリン α 7、DKFZp586L151タンパク質、PDZ-結合モチーフを有する転写性活性化補助因子(TAZ)、sine oculisホメオボックス相同体2(ショウジョウバエ)、KIAA1034タンパク質、初期成長反応3、ディスタルレス(distal-less)ホメオボックス5、仮定上タンパク質FLJ20373、アルドーケト還元酵素ファミリー1メンバーC3(3- α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼタイプII)、バイグリカン、フィブロネクチン1、プロエンケファリン、インテグリンベータ様1(EGF-like反復ドメインを有する)、ヒトmRNA完全長インサートcDNAクローンEUROIMAGE1968422、EphA3、KIAA0367タンパク質、ナトリウム利尿性ペプチド受容体C/グアニル酸シクラーゼC(心房ナトリウム利尿性ペプチド

10

20

30

40

50

受容体C)、仮定上タンパク質FLJ14054、ヒトmRNA、cDNA DKFZ p564B222 (DKFZ p564B222クローンから)、小胞関連性膜タンパク質5 (ミオブレビン)、EGF含有フィブリン様細胞外基質タンパク質1、BCL2/アデノウイルスE1Bの19kDa相互作用タンパク質3様、AE結合タンパク質1、シトクロームCオキシダーゼサブユニットVIIaポリペプチド1 (筋肉)、神経芽細胞腫の腫瘍形成抑制1、インスリン様成長因子結合タンパク質2 (36kDa) の少なくとも1つの発現が、線維芽細胞、間葉系幹細胞、或いは腸骨稜骨髓細胞であるヒト細胞に関して減少している、

MCP-1、IL-6、IL-8、GCP-2、HGF、KGF、FGF、HB-EGF、BDNF、TPO、MIP1a、RANTES、及びTIMP1の少なくとも1つを分泌する、

10

ELISAで検出されたように、TGF-β2、ANG2、PDGFbb、MIP1b、I309、MDC、及びVEGFの少なくとも1つを分泌しない、の少なくとも1つを有するものである。

【0009】

特定の実施形態において、前記分娩後由来細胞は、臍帯由来細胞である。別の実施形態において、それは胎盤由来細胞である。特定の実施形態において、前記細胞は、細胞タイプPLA071003 (p8) (ATCCアクセッション番号PTA-6074)、細胞タイプPLA071003 (p11) (ATCCアクセッション番号PTA-6075)、細胞タイプPLA071003 (p16) (ATCCアクセッション番号PTA-6079)、細胞タイプUMB022803 (p7) (ATCCアクセッション番号PTA-6067)、或いは細胞タイプUMB022803 (p17) (ATCCアクセッション番号PTA-6068) のいずれか1つの同定される全ての特徴を有するものである。

20

【0010】

前記分娩後由来細胞は、例えばメタロプロテアーゼ活性、中性プロテアーゼ活性、及びムコ多糖類加水分解酵素活性などの1若しくはそれ以上の酵素活性の存在下において単離されるのが好ましい。前記細胞は、好ましくは、細胞が経代される場合でも維持される正常な核型を有する。

【0011】

好ましい細胞は、フローサイトメトリーで検出されたように、CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr-α、及びHLA-A、B、Cをそれぞれ産生し、CD31、CD34、CD45、CD117、CD141或いはHLA-DR、DP、DQのいずれも産生しない。

30

【0012】

様々な別の観点において、本発明は、上述された前記細胞を有する細胞集団を提供するものである。特定の実施形態において、前記集団は、心原性経路或いは系統に沿って幹細胞分化を刺激する1若しくはそれ以上の因子の存在下で培養される。別の実施形態において、細胞は、血管原性、血液血管性、血管性経路へ、若しくは、心筋細胞 (cardiomyocytes)、内皮細胞、心筋細胞 (myocardial cell)、心外膜細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞 (例えば、血管平滑筋細胞)、さらには刺激系及び伝導系細胞などの関連細胞へ、および、上述した細胞の前駆細胞、例えば、筋芽細胞、心筋芽細胞、ヘマンジオブラスト、血管芽細胞、その同等物、或いはそれらの前駆細胞への分化を刺激する傾向のある物質の存在下で培養される。その集団は、例えば、心筋症などの心臓或いは循環器系の疾患を患った、若しくは心筋梗塞からのような心臓損傷を患った、或いは心臓、循環器系のいかなる損傷、疾患を患った患者へ、治療的に提供されうる。現在の好ましい実施形態において、前記集団は、約50%の分娩後由来細胞を有するものである一方、他の好ましい実施形態においては、その集団は、分娩後由来細胞の実質上均一の集団である。

40

【0013】

本発明は、その別の観点において、薬学的に許容可能な担体、および実質上血液を含み

50

ないヒトの分娩後組織から派生された分娩後由来細胞からなる治療用細胞組成物を提供する。前記細胞は、培養において自己複製及び増殖する能力を有し、例えば、平滑筋或いは骨格筋表現型などの他の表現型の細胞に分化する能力を有する。好ましい実施形態において、細胞は、心筋細胞 (cardiomyocytes) の表現型と導く経路に沿って、内皮、心筋、心外膜、血管内皮の細胞、さらには平滑筋 (例えば、血管平滑筋)、及び刺激系や伝導系の細胞 (例えば、プルキンエ細胞)、及び上述した細胞の前駆細胞に分化することが可能である。前記細胞は、約5%～少なくとも約20%の酸素を含む空気中で増殖できる。前記細胞は、増殖のためにL-バリンを必要とし、培養において少なくとも約40代倍加する能力を有し、コーティング或いは非コーティング組織培養容器上で接着及び増殖するものであり、ここにおいて、コーティング組織培養容器は、ゼラチン、ラミニン或いはフィブロネクチンでコーティングされているものであり、さらに、組織因子、ビメンチン、及びアルファ平滑筋アクチンを産生し、フローサイトメトリーにより検出されたように、CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFR-α、およびHLA-A、B、Cを産生し、CD31、CD34、CD45、CD117、CD141、或いはHLA-DR、DP、DQのいずれも産生しない。

【0014】

提供される治療用細胞組成物は、心筋症、他の心臓疾患、心損傷、或いは例えば、細胞損傷或いは組織／細胞壊死に関連したいかなる循環器系疾患を患った患者において治療的に提供される。特定の実施形態において、前記治療用細胞組成物は、心原性、血管原性、血管性経路或いは系統への分化を誘導された細胞を含む。前記治療用細胞組成物は、心臓、血液、血管或いはその同等物に通常存在する成体幹細胞を、分裂或いは分化、若しくはその両方を行うように刺激する細胞或いは細胞産生物を有する。好ましくは、治療用細胞組成物は、少なくとも生存する、増殖する、成長において刺激する、血管新生或いは血管形成を刺激することができるが、ある実施形態においては、老化細胞などの生育不能な細胞でさえ治療の効果があり、ある実施形態においては、死細胞或いはそれらの分画ですら、患者に対する治療改善を提供する。

【0015】

前記治療用細胞組成物は、例えば、注入により提供される。ある好ましい実施形態において、前記治療用細胞組成物は、心腔内注入により提供される。別の実施形態においては、それらは直接、心筋の内側或いは外側に近傍して、或いは細胞-基質複合体として基質上に留置される。基質-細胞複合体の形で提供された前記治療用細胞組成物は、生体吸収可能であろうとなかろうと、液体若しくは固体にかかわらず、例えば生体適合性の骨格、格子、自己集合性 (self-assembly) 構造およびその同等物を含む基質を有する。そのような基質の多くは、組織工学、創傷治療、およびそれらと同等技術の当業者には知られている。治療用組成物は、患者への治療価値を改善する付加的な生物学的化合物や薬物を有することもでき、前記組成物は、1若しくはそれ以上の付加的な細胞或いは細胞タイプも有することができる。

【0016】

特定の実施形態において、前記治療用細胞組成物は、以下のような細胞も有しうる；

インターロイキン8、レチキュロン1、ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド1 (メラノーマ成長刺激活性、アルファ)、ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド6 (顆粒球遊走タンパク質2)、ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド3、及び腫瘍壊死因子アルファ誘導タンパク質3の少なくとも1つを発現する細胞；

C型 (カルシウム依存性、糖認識ドメイン) レクチンスーパーファミリー2 (活性誘導)、ウィルムス腫瘍1、アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリーメンバーA2、及びレニン、酸化型低比重リポタンパク質 (レクチン様) 受容体1、ヒトクローン IMAGE 4179671 mRNA部分 cds、プロテインキナーゼC-ゼータ、仮定上タンパク質

DKFZ p564F013、卵巣癌で下方制御されたタンパク質1、ヒトmRNA、及びDKFZ p547K1113 (DKFZ p547K1113クローンから) のcDNAの少なくとも1つを発現する細胞；

低身長感受性 (short stature) ホメオボックス (SHOX) 2、熱ショック 27 kDa タンパク質 2、ケモカイン (C-X-C モチーフ) リガンド 12 (間質細胞由来因子 1)、エラスチン (大動脈弁上狭窄、Williams-Beuren 症候群)、ヒト mRNA、cDNA DKFZ p586M2022 (DKFZ p586M2022 クローンから)、間柔織 (mesenchyme) ホメオボックス 2 (成長停止特異的ホメオボックス)、sine oculis ホメオボックス 相同体 1 (ショウジョウバエ)、クリスタリン アルファ B、形態形成の dishevelled 関連性活性化因子 2、DKFZ P586B2420 タンパク質、ニューラリン 1 の類似物、テトラネクチン (プラスミノゲン結合タンパク質)、src 相同体 3 (SH3) 及びシステインリッチドメイン、抗増殖性の B-Cell 転座遺伝子 1、コレステロール 25-水酸化酵素、ラント関連性転写因子 3、仮定上タンパク質 FLJ23191、インターロイキン 11 受容体 アルファ、プロコラーゲン C-エンドペプチダーゼエンハンサー、縮合 (frizzled) 相同体 7 (ショウジョウバエ)、仮定上遺伝子 BC008967、コラーゲンタイプ VII アルファ 1、テネイシン C (hexabrachion)、イルコイホメオボックス タンパク質 5、ヘファエスチン (hephaestin)、インテグリン ベータ 8、シナプス小胞糖タンパク質 2、ヒト cDNA FLJ12280 fis のクローン MMA1001744、サイトカイン受容体様因子 1、カリウム中間体/低透過性カルシウム活性化チャネルのサブファミリー N メンバー 4、インテグリン アルファ 7、DKFZ P586L151 タンパク質、PDZ-結合モチーフを有する転写性活性化補助因子 (TAZ)、sine oculis ホメオボックス 相同体 2 (ショウジョウバエ)、KIAA1034 タンパク質、初期成長反応 3、ディスタルレス (distal-less) ホメオボックス 5、仮定上タンパク質 FLJ20373、アルドーケト還元酵素ファミリー 1 メンバー C3 (3-アルファヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼタイプ II)、バイグリカン、フィブロンネクチン 1、プロエンケファリン、インテグリン ベータ様 1 (EGF-like 反復ドメインを有する)、ヒト mRNA 完全長 インサート cDNA クローン EUROIMAGE1968422、EphA3、KIAA0367 タンパク質、ナトリウム利尿性ペプチド受容体 C/グアニル酸シクラーゼ C (心房ナトリウム利尿性ペプチド受容体 C)、仮定上タンパク質 FLJ14054、ヒト mRNA、cDNA DKFZ p564B222 (DKFZ p564B222 クローンから)、小胞関連性膜タンパク質 5 (ミオブレビン)、EGF 含有フィブリン様細胞外基質タンパク質 1、BCCL2/アデノウイルス E1B の 19 kDa 相互作用タンパク質 3 様、AE 結合タンパク質 1、シトクローム C オキシダーゼサブユニット VIIa ポリペプチド 1 (筋肉)、神経芽細胞腫の腫瘍形成抑制 1、インスリン様成長因子結合タンパク質 2 (36 kDa) の少なくとも 1 つの発現が、線維芽細胞、間葉系幹細胞、或いは腸骨稜骨髄細胞であるヒト細胞に関して減少している細胞；

MCP-1、IL-6、IL-8、GCP-2、HGF、KGF、FGF、HB-EGF、BDNF、TPO、MIP1a、RANTES、TIMP1 の少なくとも 1 つを分泌する細胞、

ELISA によって検出されたように、TGF-β2、ANG2、PDGFbb、MIP1b、I309、MDC、VEGF の少なくとも 1 つを分泌しない細胞。

【0017】

その別の観点において、本発明は、心臓及び循環器系疾患或いは損傷を患った患者を治療する方法を提供し、この方法は、心臓及び循環器疾患或いは損傷を患った患者に治療用分娩後由来細胞組成物を投与する工程と、例えば心機能などにおける改善を前記患者で評価する工程とを含む。ある好ましい実施形態において、前記疾患は、特発性或いは原因既知の、また虚血性或いは非虚血性の心筋症である。

【0018】

改善の測定は、本分野におけるあらゆる手段を含むが、好ましい改善は、これに限定されるものではないが、心拍出量 (CO)、心係数 (CI)、肺動脈楔入圧 (PAWP)、心係数 (CI)、左室系短縮率 (%FS)、駆出分画 (EF)、左室駆出分画 (LVEF

10

20

30

40

50

）、左室拡張終末期径（LVEDD）、左室収縮末期圧（LVESD）、収縮力（例えば、 dP/dt ）、血圧－容積ループ（pressure－volume loop）、心機能の測定を含む血行動態の測定における改善、さらには心房、心室機能の上昇、拍出効率の上昇、拍出効率の損失率の減少、血行動態機能の損失の減少、及び心筋症に関連する合併症の減少を含む。

【0019】

現在のところ好ましい実施形態の中には、前記方法は、治療用分娩後由来細胞を、心原性、血管原性、血液血管性、或いは血管性経路に沿って、若しくは、心筋細胞（cardiomyocytes）、内皮細胞、心筋細胞（myocardial cells）、心外膜細胞、血管内皮細胞、平滑筋（例えば血管平滑筋細胞）などの細胞或いはその前駆細胞、さらには、刺激システムや伝達システムの細胞へ分化するように誘導する工程を有する。筋芽細胞、心筋芽細胞、血管芽細胞、ヘマンジオブラスト、およびそれらの同等物へ分化する細胞は、本明細書における使用を考慮されるものである。

10

【0020】

前記投与する工程は、好ましくは、*in vivo*であり、移植、移植術（grafting）、インプラント、注入、融合、カテーテルを介した運搬、或いは基質－細胞複合体としての提供、若しくは細胞治療を提供するための本分野では既知であるいかなる手段によって行われるものである。多くの適用のために、前記細胞は、例えば静脈内に単純に注入され、前記細胞は、特定の組織に関する表現型の方向性における傾倒に従って位置しとどまる。例えば、心筋原性系列に分化した細胞は、体内における任意の部分に静脈注入された場合、心筋にとどまる。

20

【0021】

本発明はさらに、別の観点において、心臓或いは循環器系疾患或いは損傷を患った患者を治療する方法も提供し、この方法は、心臓或いは循環器疾患或いは損傷を患った患者に、治療用分娩後由来細胞組成物を投与する工程と、例えば心機能などにおける改善を患者で評価する工程とを含み、ここにおいて前記投与する工程は、別の細胞タイプの集団である。共培養、混合集団、或いは別のクローニングされていない集団の投与がときに好まれる。同時に投与されうる他の細胞タイプは、ある実施形態においては幹細胞であるが、他においては、筋芽細胞、筋細胞、心筋芽細胞、心筋細胞、血管芽細胞、ヘマンジオブラスト、或いは筋芽細胞、筋細胞、心筋芽細胞、血管芽細胞、ヘマンジオブラストの前駆細胞が使用される。他の血管原性、血液血管性、および血管性細胞、或いはそのような系統からのより傾倒された細胞も同時投与に適している。

30

【0022】

本発明はさらに、心臓或いは循環器系疾患或いは損傷を患った患者を治療する方法も提供し、この方法は、心臓或いは循環器疾患或いは損傷を患った患者に、治療用分娩後由来細胞組成物を投与する工程と、例えば心機能などにおける改善を患者において評価する工程とを有し、ここにおいて、前記治療用細胞組成物は、基質－細胞複合体として投与されるものである。特定の実施形態において、前記基質は、骨格（scaffold）で、好ましくは生体吸収性であり、前記基質に加えて、少なくとも分娩後由来細胞を有するものである。

40

【0023】

他の哺乳類細胞を有する、本発明の細胞或いは培養を含む共培養も、本明細書に提供される。好ましくは、これら共培養は、例えば臍帯由来細胞の存在下で、その成長や治療能力が改善する別の哺乳類細胞を含む。ヒト細胞株は特に好ましい。そのような共培養は、*in vivo*（生体内）或いは*in vitro*（試験管内）での治療上適用に有益である。

【0024】

本発明はさらに、分娩後由来細胞、および医薬品などの別の薬剤、因子或いは生理活性剤を有する治療用組成物も提供する。そのような生理活性剤には、これに限定されるものではないが、IGF、LIF、PDGF、EGF、FGF、さらには抗トロンビン剤、抗

50

アポトーシス剤、抗炎症剤、免疫抑制剤或いは免疫調節剤、及び抗酸化剤を含む。そのような治療用組成物はさらに、PPDCs及び前記生理活性剤に加えて、1若しくはそれ以上の付加的な細胞タイプを有するものである。

【0025】

上記に加えて、前記細胞から由来した組成物が本明細書に提供される。細胞融解物、可溶性細胞分画、及び膜濃縮分画が本明細書に提供される。前記細胞から由来した細胞外基質、例えば基底膜を有する分画も、有用であり、本明細書に提供される。

【0026】

本発明の組成物は、本明細書に提供されたように条件培養液も含む。そのような培養液はまず、成長の間、1若しくはそれ以上の有用な産物を培養液に分泌する本発明の細胞或いは培養を増殖させるために使用された。これら新規細胞からの条件培養液は、例えば本発明の細胞および培養から培養液の中に分泌された成長因子或いは栄養因子を必要とする他の哺乳類細胞の成長を補助する、及び、例えば血管新生を促進するなどを含む多くの目的のために有用である。

【0027】

キットも本明細書に提供される。様々な好ましいキットは、本発明のいくつかの観点を実施するために必要とされる構成成分を提供するキットであり、例えば、前記細胞を成長及び維持するためのキット、前記細胞を単離するキット、前記細胞を共培養するキット、*in vivo*（生体内）で前記細胞および培養を利用するキット、及び*in vitro*（試験管内）で前記細胞と培養を利用するキットは、全て本明細書に提供される。例えば細胞溶解物、可溶性かつ膜濃縮分画、および細胞外分画を含む細胞に由来した細胞分画を調整するためのキットも提供される。

【0028】

本発明のこの観点及び他の観点は、以下に詳細に説明されている。

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

「定義」

本明細書および請求項を通して、使用されるさまざまな用語は以下に記載されるように定義される。

【0030】

「幹細胞」は、未分化細胞であり、自己複製し、自己複製する子孫細胞、自己複製しない子孫細胞、および、完全に分化した細胞を含む子孫細胞を産生するように分化する一つの細胞の能力により定義されるものである。幹細胞は、*in vitro*（試験管内）において、多様な胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）からさまざまな細胞系統の機能細胞へと分化し、移植後、多様な胚葉組織を生じ、すべてではないにせよ、実質上ほとんど、組織に貢献する能力によっても胚盤胞注入後、特徴付けられる。

【0031】

幹細胞は、（１）全能性、（２）多能性、（３）多分化能、（４）少分化能、（５）単能性として発生能力にしたがって分類される。全能性細胞は、すべての胚性、および胚外の細胞タイプを生じることができる。多能性細胞は、すべての胚性細胞タイプを生じることができる。多分化能細胞は、細胞の系列のサブセットを生じる能力を有するものを含むが、すべて、特定の組織、器官、生理的系統の中にある。（例えば、造血幹細胞（HSC）はHSC（自己複製する）、血液細胞限定少分化能子孫細胞、および、正常の血液成分であるすべての細胞および要素（例えば、血小板）を含む子孫細胞を産生しうる。少分化能である細胞は、多分化能細胞より限定された細胞系統のサブセットを生じることができ、単能性細胞は、一つの細胞系統（例えば、精子形成幹細胞）を生じることができる。

【0032】

幹細胞は、獲得される起源に基づいても分類される。成人幹細胞は、一般的に、多様に分化した細胞タイプを含む組織において見つけられる多様な未分化な細胞である。前記成人幹細胞は、自己複製可能である。正常環境下で、それは、分化し、起源となる特定化さ

10

20

30

40

50

れた組織の細胞タイプや、おそらくは他の組織のタイプを産生することもできる。胚性幹細胞は、胚盤胞段階の胚の内部塊からの多能性の細胞である。胎児幹細胞は、胎児組織或いは膜から生じる細胞である。分娩後由来細胞は、出生後の胚外性組織、つまり、胎盤、および臍帯から実質的に生じる多能性或いは多分化能細胞である。これら細胞は、多能性幹細胞の特徴を有することが分かっており、急速な増殖、多くの細胞系統へと分化する能力を含む。分娩後幹細胞は、血液由来（例えば、臍帯血から得られたもののよう）或いは非血液由来（例えば、臍帯および胎盤の非血液組織から得られるように）である。

【0033】

「胚性組織」は胚から生じる組織として典型的には定義される（それは、ヒトにおいては、受精から発生約6週までの期間のことを言う）。胎生組織は、胎児から生じる組織のことを言い、それは、ヒトにおいて、発生約6週から分娩までのことを言う。胚外性組織は、胚或いは胎児から生じないが、それらに付随した組織である。胚外性組織は胚外性膜（絨毛膜、羊膜、卵黄嚢、尿膜）、臍帯、および胎盤（それ自体、絨毛膜および母体側の脱落膜の底部より生じる）を含む。

10

【0034】

「分化」は、それによって、特定化されていない（拘束されていない）或いはほとんど特定化されていない細胞が例えば、神経細胞や筋細胞のような特定化された細胞の特徴を獲得する過程である。「分化した」細胞は細胞の系統の中で、より特定化された（傾倒された）位置にあるものである。「傾倒された」（committed）という用語は、分化の過程において使用された場合、分化の過程においてある地点まで進んだ細胞を指し、その地点では、正常環境において、特定の細胞タイプ或いは細胞タイプのサブセットに分化し続け、正常な環境において、別の細胞タイプに分化或いは、あまり分化していないタイプに戻ることができない。「脱分化」は細胞の系統の中で、より特定化されていない（拘束されていない）位置に細胞が戻る過程を言う。ここで使用されるように、細胞の「系統」とは、細胞の遺伝を定義し、すなわち、どの細胞から来たか、どの細胞を生じることができるかである。細胞の系統は、細胞を発生と分化の遺伝的構成の中に置く。

20

【0035】

広義において、「前駆細胞」は、それ自体よりもより分化した子孫細胞を作り出す能力を有し、なお前駆細胞のプールを補給する能力がある細胞である。前記定義により、幹細胞自体も前駆細胞であり、直前の前駆細胞も最終的に分化した細胞に対して、前駆細胞である。本発明の細胞を参照する際、以下のより詳細な記述されるように、この広義の「前駆細胞」の定義が使用される。狭義では、前駆細胞は、しばしば、分化経路の中間の途中にある細胞として定義され、すなわち、その細胞は、幹細胞から生じ、成熟した細胞タイプ或いは細胞タイプのサブセットの産生の中間細胞にある。このタイプの前駆細胞は、一般的に、自己複製できない。従って、このタイプの細胞がここに参照される際は、非複製前駆細胞、中間前駆細胞、或いは前駆細胞（precursor cell）と呼ばれる。

30

【0036】

ここに使用されるように、中胚葉、外胚葉、内胚葉系統への分化という用語は、それぞれ、特定の中胚葉系、外胚葉系、内胚葉系へ傾倒された細胞を指す。中胚葉系統への分化或いは特定の間葉系細胞を生じる細胞の例は、脂肪原性、軟骨原性、心原性、皮膚原性、造血性、血液血管性、筋原性、腎原性、泌尿生殖原性、骨原性、心膜原性、間質性の細胞のみではない。外胚葉系統への分化する細胞の例は、表皮細胞、神経原性細胞、神経膠原性細胞のみではない。内胚葉系統へと分化する細胞の例は、これに限定されるものではないが、胸膜原性、肝原性、腸の裏打ちを生じる細胞、膵臓原性、脾臓原性の細胞を生じるものである。

40

【0037】

本発明の前記細胞は、一般的に、臍帯由来細胞（UDCs）として参照される。その細胞は、時々、より一般的に、分娩後由来細胞或いは分娩後細胞（PPDCs）としてここに参照される。加えて、前記細胞は、幹細胞或いは前駆細胞として記載され、後者の用語

50

は、広義で使われる。「由来」という用語は、前記細胞が生物学的供給源から獲得され、成長或いは *in vitro*（試験管内）で操作された（例えば、成長培養液で培養され、前記集団を増殖及び或いは細胞株を産生する）ということを示すときに使用される。本発明の臍幹細胞の *in vitro*（試験管内）操作および臍帯由来細胞の独特な特徴は以下に詳細に記載される。

【0038】

さまざまな用語が培養における細胞を記載するために使用される。「細胞培養」は一般的に、生体器官から採取され、調節された条件下で成長された細胞を参照する（「培養において」或いは「培養された」）。「初代培養細胞」は最初の継代前の器官から採取された細胞、組織、器官の培養である。細胞は、細胞成長、分裂を容易にする条件下で成長培養液に置かれると培養において増殖し、結果前記細胞のより大きな集団を生じるものである。細胞が培養において増殖するとき、細胞増殖率が時々、細胞の数が2倍になるのに必要な時間により測定される。このことは、倍加時間と参照される。

10

【0039】

「細胞株」は、初代培養細胞の1若しくはそれ以上の継代により形成された細胞の集団である。継代の各回を継代（数）という細胞が継代される時、それらは「継代された」と言及される。細胞或いは細胞株の特定の集団は、時々継代された回数により参照されたり、特徴付けられる。例えば、10代継代された培養細胞の集団は10代培養（P10）と参照されうる。初代培養、すなわち、組織から細胞を単離した後の最初の培養はP0と指定される。最初の継代の後、前記細胞は、2次培養（P1或いは継代1）として記載される。2次継代の後、前記細胞は3次培養（p2或いは継代2）になり、以下同様である。当業者によって、継代の間、多くの細胞集団倍加数がある。それゆえ、培養の細胞集団倍加数は継代数よりも大きいことが理解される。継代期間中の細胞増殖（すなわち細胞集団倍加数）は多くの要因、すなわち、これに限定されるものではないが、播種時の密度、基質、培養液、成長条件、継代間の時間に限らないものに依存している。

20

【0040】

条件培養液は特定の細胞或いは集団が培養され、それから除去される培養液である。細胞が培養液の中で培養されるとき、細胞は他の細胞に栄養補助を提供しうる細胞因子を分泌する。そのような栄養因子は、これに限定されないが、ホルモン、サイトカイン、細胞外基質（ECM）、タンパク質、小胞、抗体、顆粒に限らないものを含む。前記細胞因子を含む培養液は条件培養液である。

30

【0041】

一般的に、「栄養因子」は細胞の生存、成長、増殖および／若しくは成熟を助長する、或いは細胞の活性を刺激する物質として定義される。

【0042】

培養された脊椎動物細胞を参照するとき、「老化」（複製老化或いは細胞老化）という用語は有限の細胞培養に起因する性質を参照し、すなわち、有限の細胞集団倍加数を超えて成長しないことである（時々、ヘイフリックの限界と呼ばれる）。細胞老化は、線維芽細胞様細胞を用いて、初めて記載されたが、培養において成功的に成長しうるほとんどの正常ヒト細胞は細胞老化を経る。異なった細胞タイプの *in vitro*（試験管内）寿命は異なるが、最長寿命は典型的には100集団倍加数より少ない（これは培養中のすべての細胞が老化し、培養が分裂できなくなる倍加数である）。老化は、年代順に依存せず、培養を経る、細胞分裂の数或いは細胞倍加数によって測定される。必要な成長因子を除去することにより静止状態にある細胞は、成長因子が再導入されると、再び成長、分裂し、それから、同じ細胞が継続して成長していたときと同じ倍加数を実行する能力を有する。同様に、細胞は、さまざまな細胞集団倍加数の後、液体窒素に凍結、解凍され培養されたとき、細胞は培養において未凍結維持されたときと同じ倍加数を経る。老化細胞は死んだ或いは死にそうな細胞ではなく、実際は、プログラム細胞死（アポトーシス）に抵抗性であり、3年と同じ期間、分裂しない状態で維持されている。これら細胞は、非常に生き生きとしており、代謝的に活性であるが、分裂しない。老化細胞の非分裂状態は、いかな

40

50

る生物学的、化学的、或いはウィルス物質によっても可逆的であるとは発見されていない。

【0043】

ここに使用されるように、成長培養液という用語は、一般的に臍帯由来細胞を培養するのに必要な培養液を参照する。特に、本発明中の前記細胞を培養するのに現在好まれている培養液はダルベッコ変性イーグル培地である（ここでは、DMEMとも略されるものを含む）特に、DMEM－低グルコース（ここでは、DMEM－LGとも呼ばれる）（Invitrogen、カリフォルニア州Carlsbad）が好ましい。前記DMEM－低グルコースは、好ましくは血清、さらに好ましいのは、胎児ウシ血清或いはヒト血清を補充される。典型的には、15%（v/v）胎児ウシ血清（例えば、規定胎児ウシ血清、HyClone、ユタ州ローガン）が添加され、抗生物質、抗真菌剤（好ましくは、100ユニット／ミリリットルのペニシリン、100ミリグラム／ミリリットルのストレプトマイシン、0.25マイクログラム／ミリリットルのアンフォテリシンB（Invitrogen、カルスバッド、カリフォルニア州）、0.001%（v/v）の2－メルカプトエタノール（Sigma、ミズーリ州セントルイス）も加えられるのが好ましい。場合によっては、異なった成長培養液が使われ、異なった補充物質が提供され、これらは成長培養液への補充物質として、本文中に通常、示される。ある化学的に限定された培養液中では、細胞は、まったく血清の存在がなくても、成長できる。そのような場合、細胞は特定の成長因子を必要とし、それら成長因子は、細胞を支持、維持するために培養液に加えられる。無血清培養液に加えられる現在好まれている因子は、bFGF、EGF、IGF-1、PDGFの一つ若しくはそれ以上を含む。より好まれた実施形態において、前記因子の2、3或いは4つ全てが無血清或いは化学的に限定された培養液に加えられる。別の実施形態において、細胞を支持し、成長を改善するためにLIFが無血清培養液に加えられる。

【0044】

本発明に関連し、標準成長条件という用語は、ここに使用されるように、37℃で、5%のCO₂を含む標準大気中での細胞培養を参照する。相対的湿度は約100%に維持される。前記条件が培養にとって有用である一方で、そのような条件は、細胞培養のために利用可能な選択肢を理解する熟練した当業者によって、変更される可能性があることは理解すべきである。

【0045】

以下の略語がここでは使用される。

ANG2（或いはAng2）は、アンジオポイエチン2、

APCは、抗原提示細胞、

BDNFは、脳由来栄養因子

bFGFは、塩基性線維芽細胞増殖因子、

bid（BID）は、1日2回（bis in die）、

BSPは、骨シアロタンパク質、

C：Dは、コラゲナーゼおよびディスパーゼ処理、

C：D：Hは、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、およびヒアルロニダーゼ処理、

CK18は、サイトケラチン18、

CXC リガンド3は、ケモカイン受容体リガンド3、

DAPIは、4'-6-ジアミジノー2-フェニルインドール-2塩酸、

DMEMは、ダルベッコ最小必須培養液、

DMEM：lg（或いはDMEM：Lg、DMEM：LG）は、低グルコース含有DMEM、

EDTAは、エチレンジアミンテトラアセチル酸、

EGFは、上皮細胞成長因子、

FACSは、蛍光活性細胞分類、

FBSは、胎児ウシ血清、

10

20

30

40

50

G C P-2 は、顆粒球走化性タンパク質 2、
 G C P-2 は、顆粒球走化性タンパク質 2、
 G F A P は、グリア線維性産生タンパク質、
 H B-E G F は、ヘパリン結合性上皮細胞成長因子、
 H C A E C は、ヒト冠動脈内皮細胞、
 H G F は、肝細胞成長因子、
 h M S C は、ヒト間葉系幹細胞、
 H N F-1 アルファは、肝細胞特異的転写因子、
 H U V E C は、ヒト臍帯静脈内皮細胞、

I 3 0 9 はケモカインであって、C C R 8 受容体に対するリガンドであり、T H 2 型 T 細胞の走化性に関わるものである。I 3 0 9 は、内皮細胞に結合し、これら細胞の走化性及び浸潤を刺激し、H U V E C が *i n v i t r o* (試験管内)でのマトリゲルアッセイにおいて、毛細血管様構造に分化することを促進する。さらに、I 3 0 9 は、ウサギ角膜及び鶏膀胱膜アッセイ (C A M) の両方において、*i n v i v o* (生体内)で、血管新生誘導体である

I L-6 は、インターロイキン 6、
 I L-8 は、インターロイキン 8、
 K 1 9 は、ケラチン 1 9、
 K 8 は、ケラチン 8、
 K G F は、ケラチノサイト成長因子、
 M C P-1 は、単球走化タンパク質 1、
 M D C は、マクロファージ由来ケモカイン、
 M I P 1 アルファは、マクロファージ炎症性タンパク質 1 アルファ、
 M I P b e t a は、マクロファージ炎症性タンパク質 1 ベータ、
 M S C は、間葉系幹細胞、
 N D R I は、国立疾患研究インターチェンジ (ペンシルバニア州フィラデルフィア)
 N H D F は、正常ヒト皮膚線維芽細胞、
 N P E は、神経前駆細胞増殖培養液、
 P B M C は、末梢血単核細胞、
 P B S は、リン酸緩衝食塩水、
 P D G F b b は、血小板由来成長因子、
 P D G F r / アルファは、血小板由来因子受容体アルファ、
 P D-L 2 は、プログラムされたーデスリガンド 2、
 P O (或いは *p o*) は、経口 ("*p e r o s*")、
 P P D C は、分娩後由来細胞、

R a n t e s (或いは R A N T E S) は、活性化を調節された、発現され分泌された正常 T 細胞、

r h G D F-5 は、組み換えヒト成長及び分化因子 5、
 S C は、皮下、
 S D F-1 アルファは、間質由来因子 1 アルファ、
 S H H は、ソニックヘッジホッグ、
 S O P は、標準手術法、
 T A R C は、胸腺及び活性調節ケモカイン、
 T C P は、組織培養プラスチック、
 T G F ベータ 2 は、トランスフォーミング増殖因子ベータ 2、
 T G F ベータ 3 は、ドラン巢フォーミング増殖因子ベータ 3、
 T I M P 1 は、組織マトリックスメタロプロテアーゼ阻害物質 1、
 T P O は、トロンボポエチン、
 T u J 1 は、B I I I チューブリン、
 U D C は、臍帯由来細胞、

10

20

30

40

50

VEGFは、血管内皮細胞増殖因子、
vWFは、フォンウィルブランド因子、
アルファFPは、アルファヘモグロビンタンパク質をそれぞれ表している。

【0046】

記載

さまざまな論文と引用文献がここに及び全体を通して引用され、それぞれの全体はこの参照により、ここに組み込まれる。

【0047】

上記に要約されるように、本発明は、その一つの観点において、単離された分娩後由来細胞に関するものであり、これは分娩後組織由来であり、実質上血液を含まず、培養において、自己複製及び増殖可能で、間葉系に沿って、心原性、血管原性、血管性表現系へと文化し、さらには、心筋細胞 (cardiomyocyte)、内皮細胞、心筋細胞 (myocardial cell)、心外膜細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞 (例えば、血管平滑筋細胞) などの細胞へさらには、刺激伝導系細胞、前記の前駆細胞へと分化する能力を有する。他の観点において、そのような細胞を構成する集団、治療用細胞組成物、および心臓及び循環器系の障害或いは疾患を患った患者の治療に前記治療用細胞組成物を使用する方法を提供する。前記分娩後由来細胞は、培養におけるその成長特性、細胞表面マーカー、遺伝子発現、特定の生化学的栄養因子を産生する能力、及び免疫学的特性により、特徴付けられる。

【0048】

第1の最初の観点において、発明は実質的に血液を含まない哺乳類分娩後組織由来のL型バリン要求性細胞を含む単離された分娩後由来細胞を提供する。前記細胞は、培養において自己複製および増殖で、他の表現系、例えば、心筋細胞 (cardiomyocyte) 或いはそれらの前駆細胞などの細胞に分化する能力を有する。細胞はここに提供される技術により、いかなる哺乳類の分娩後組織、例えば、臍帯或いは胎盤から単離される。ヒト細胞が現在好ましい。前記細胞は、広範囲の培養液と環境条件を含む広範囲な条件下で成長可能である。前記細胞は、少なくとも、約35℃から39℃で成長可能であり、他の条件により、広範囲な条件下で成長可能である。前記細胞は、化学的に限定された培養液、或いは哺乳類の血清、例えば、胎児ウシ血清を加えられた培養液中で成長可能である。前記細胞は、さまざまな段階で冷凍保存に耐えうる。細胞は、好ましくは-80℃以下で長期間、凍結維持、保存可能である。-90℃以下も好ましく、特別な電気冷蔵庫により、達成される。-180℃とそれ以下も好まれ、液体或いは蒸気層の窒素中で達成される。組織は細胞単離より前に保存可能である。そのような組織は、分娩完了後、数時間以内に保存されるのが好ましい。

【0049】

前記細胞は、約5%から少なくとも約20%の酸素を含む空気中で成長可能で、以下の特徴の少なくとも一つを有する。すなわち、前記細胞は、培養において少なくとも約40倍加する能力を有する。前記細胞は、接着していることが好ましく、それゆえ、コーティングされた或いはコーティングされていない組織培養容器上で接着し、増殖することが好ましく、コーティングされた組織培養容器は、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、ポリオルニチン、ポリリシン、ビトロネクチン、或いはフィブロネクチンから構成されるものである。前記細胞は、接着性で、前記細胞がある実施形態において、球状の形体の中で成長するように単離されるのが好ましい。

【0050】

分娩後組織には多くの細胞集団が存在するが、本発明の前記細胞は、組織因子、ビメンチン、及びアルファ平滑筋アクチンの少なくとも一つを産生し、より好ましくは、細胞は組織因子、ビメンチンおよびα-平滑筋アクチンのそれぞれを産生するものであり、CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-α, PDL2, HLA-A, B, Cの少なくとも一つを産生するものも好ましい。前記細胞は、フローサイトメトリーによって検出されたように、CD31, CD34, CD45, CD80, CD8

6, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, HLA-DR, DP, DQの少なくとも一つの産生を欠如することにより特徴付けられ、より好ましい細胞は、これらすべての表面マーカーのすべての産生を欠く。インターロイキン8、レチキュロン1、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド1(メラノーマ成長刺激活性アルファ)、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド6(顆粒球遊走タンパク質2)、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド3、腫瘍壊死因子アルファ誘導タンパク質3の少なくとも一つを発現する細胞も好ましい。別の実施形態において、前記細胞はC型(カルシウム依存性、糖鎖認識ドメイン)レクチ、スーパーファミリーメンバー2(活性化誘導)、ウィルムス腫瘍1、アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリーのメンバーA2、レニン、酸化型低密度リポタンパク質(レクチン様)受容体1、ヒトクローンIMAGE: 4179671のmRNAの部分的コード領域(cds)、プロテインキナーゼCのゼータ、仮定上タンパク質DKFZ p564F013、卵巣癌で下方制御されている遺伝子1、ヒトmRNA、cDNA DKFZ p547K1113(クローンDKFZ p547K1113から)の1若しくはそれ以上を発現するのが好ましい。好ましい細胞は、低身長感受性(short stature)ホメオボックス(SHOX)2、熱ショック27kDaタンパク質2、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド12(間質細胞由来因子1)、エラスチン(大動脈弁上狭窄、Williams-Beuren症候群)、ヒトmRNA、cDNA DKFZ p586M2022(DKFZ p586M2022クローンから)、間柔織(mesenchyme)ホメオボックス2(成長停止特異的ホメオボックス)、sine oculisホメオボックス相同体1(ショウジョウバエ)、クリスタリンアルファB、形態形成のdishevelled関連性活性化因子2、DKFZ P586B2420タンパク質、ニューラリン1の類似物、テトラネクチン(プラスミノゲン結合タンパク質)、src相同体3(SH3)及びシステインリッチドメイン、抗増殖性のB-Ce11転座遺伝子1、コレステロール25-水酸化酵素、ラント関連性転写因子3、仮定上タンパク質FLJ23191、インターロイキン11受容体アルファ、プロコラーゲンC-エンドペプチダーゼエンハンサー、縮合(frizzled)相同体7(ショウジョウバエ)、仮定上遺伝子BC008967、コラーゲンタイプVIIアルファ1、テネイシンC(hexabrachion)、イルコイホメオボックスタンパク質5、ヘファエスチン(hephaestin)、インテグリンベータ8、シナプス小胞糖タンパク質2、ヒトcDNA FLJ12280 fisのクローンMAMMA1001744、サイトカイン受容体様因子1、カリウム中間体/低透過性カルシウム活性化チャネルのサブファミリーNメンバー4、インテグリンアルファ7、DKFZ P586L151タンパク質、PDZ-結合モチーフを有する転写性活性化補助因子(TAZ)、sine oculisホメオボックス相同体2(ショウジョウバエ)、KIAA1034タンパク質、初期成長反応3、ディスタルレス(distal-less)ホメオボックス5、仮定上タンパク質FLJ20373、アルドーケト還元酵素ファミリー1メンバーC3(3-アルファヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼタイプII)、バイグリカン、フィブ्रोネクチン1、プロエンケファリン、インテグリンベータ様1(EGF-like反復ドメインを有する)、ヒトmRNA完全長インサートcDNAクローンEUROI IMAGE1968422、EphA3、KIAA0367タンパク質、ナトリウム利尿性ペプチド受容体C/グアニル酸シクラーゼC(心房ナトリウム利尿性ペプチド受容体C)、仮定上タンパク質FLJ14054、ヒトmRNA、cDNA DKFZ p564B222(DKFZ p564B222クローンから)、小胞関連性膜タンパク質5(ミオブレビン)、EGF含有フィブリン様細胞外マトリックスタンパク質1、BCL2/アデノウイルスE1Bの19kDa相互作用タンパク質3様、AE結合タンパク質1、シトクロームCオキシダーゼサブユニットVIIaポリペプチド1(筋肉)、神経芽細胞腫の腫瘍形成抑制1、インスリン様成長因子結合タンパク質2(36kDa)の少なくとも1つの発現が、線維芽細胞、間葉系幹細胞、或いは腸骨稜骨髄細胞であるヒト細胞に関して減少している。当業者は、広範囲の遺伝子の発現が、例えば、Affymetrix GENE CHIP上の例などのオリゴヌクレオチドアレイ上で、便利に特徴付けられることを理解

10

20

30

40

50

するだろう。

【0051】

前記細胞は、例えば成長因子、ケモカイン、サイトカイン及び同等物のようなさまざまな生化学的活性因子を分泌する。好ましい細胞は、MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1a, RANTES、およびTIMP1の少なくとも一つを分泌し、或いはより好ましい細胞はまた、ELISAによって検出されるように、TGF-β2, ANG2, PDGFbb, MIP1b, I309, MDC, VEGFの少なくとも一つの分泌を欠くことにより特徴付けられる。これら及び他の特徴は、前記細胞を同定、特徴付けし、本発明の細胞を本分野において知られている他の細胞と区別するのに有用である。

10

【0052】

好ましい実施形態において、前記細胞は上記特徴の2以上を有する。3、4、5、或いはそれ以上を有する細胞はより好ましい。前記特徴の6、7、8、或いはそれ以上を有する単離された分娩後細胞はさらにより好ましい。挙げられた特徴の9つすべてを有する細胞は、現在、より好ましい。

【0053】

組織因子、ビメンチン、アルファ平滑筋アクチンの少なくとも2つの産生をする細胞は、現在より好ましい。より好ましいのは、質組織因子、ビメンチン、アルファ平滑筋アクチンを産生する細胞である。

【0054】

20

前記熟練した当業者は、細胞マーカーが、非常に異なった成長条件の下、ある程度変化すること、および成長培養液或いはそれによる変化物におけるここに一般的に記載された特徴を理解するであろう。CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr-α、PD-L2、およびHLA-A、B、Cの少なくとも1、2、3、あるいは4を産生する分娩後由来細胞が好ましい。これら細胞マーカーの5、6、7つを産生する細胞がより好ましい。上記細胞表面マーカータンパク質の8つ全てを産生する分娩後由来細胞がさらにより好ましい。

【0055】

同様に、フローサイトメトリーによって検出された、CD31、CD34、CD45、CD80、CD117、CD141、CD178、B7-H2、HLA-G、HLA-DR、DP、DQの少なくとも1、2、3、4つのタンパク質の産生を欠く分娩後由来細胞が現在好ましい。これらマーカーの少なくとも5、6、7、8の産生を欠く細胞も好ましい。前記細胞表面マーカーの少なくとも9、或いは10の産生を欠く細胞がより好ましい。上記同定されたタンパク質の11全ての産生を欠く細胞がもっとも好ましい。

30

【0056】

現在好ましい細胞は、フローサイトメトリーによって検出されるように、CD10、CD13、CDE44、CD73、CD90、PDGFr-α、HLA-A、B、Cをそれぞれ産生し、CD31、CD34、CD45、CD117、CD141、あるいはHLA-DR、DP、DQのいずれも産生しない細胞である。

【0057】

40

分娩後由来細胞は、インターロイキン8、レチキュロン1、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド1(メラノーマ成長刺激活性アルファ)、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド6(顆粒球走化タンパク質2)、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド3、及び腫瘍壊死因子アルファ誘導タンパク質3の少なくとも1、2、3を発現することが、現在好ましい。上述の遺伝子の4、5を発現する細胞がさらに好ましく、上記遺伝子の6つすべてを発現することができる細胞はさらにより好ましい。

【0058】

ある実施形態において、前記細胞は、C型(カルシウム依存性糖認識ドメイン)レクチンスーパーファミリーメンバー2(活性誘導)、ウィルムス腫瘍1、アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリーメンバーA2、レニン、酸化型低密度リポタンパク質(レクチン様

50

）レセプター1、ヒトクローンIMAGE：4176971 mRNA部分c d s、プロテインキナーゼCゼータ、仮定上タンパク質DKFZ p 564 F 013、卵巣癌において下方制御されている遺伝子1、ヒトmRNA及びcDNA DKFZ p 547 K 1113（クローンDKFZ p 547 K 1113から）の2、3、4或いはそれ以上も発現する事が好ましい。別の実施形態において、前記細胞は上記の5、6、7或いは8つを発現するのが好ましい。前記細胞は上記シーケンスの9、10或いは全てを発現するのも好ましい。

【0059】

ある実施形態において、線維芽細胞、間葉系幹細胞、或いは腸骨稜骨髄細胞であるヒト細胞に関して、低身長感受性（short stature）ホメオボックス（SHOX）2、熱ショック27kDaタンパク質2、ケモカイン（C-X-Cモチーフ）リガンド12（間質細胞由来因子1）、エラスチン（大動脈弁上狭窄、Williams-Beuren症候群）、ヒトmRNA、cDNA DKFZ p 586 M 2022（DKFZ p 586 M 2022クローンから）、間柔織（mesenchyme）ホメオボックス2（成長停止特異的ホメオボックス）、sine oculisホメオボックス相同体1（ショウジョウバエ）、クリスタリンアルファB、形態形成のdishevelled関連性活性化因子2、DKFZ P 586 B 2420タンパク質、ニューラリン1の類似物、テトラネクチン（プラスミノゲン結合タンパク質）、src相同体3（SH3）及びシステインリッチドメイン、抗増殖性のB-Cell転座遺伝子1、コレステロール 25-水酸化酵素、ラント関連性転写因子3、仮定上タンパク質FLJ 23191、インターロイキン11受容体アルファ、プロコラーゲンC-エンドペプチダーゼエンハンサー、縮合（fizzled）相同体7（ショウジョウバエ）、仮定上遺伝子BC008967、コラーゲンタイプVIIアルファ1、テネイシンC（hexabrachion）、イルコイホメオボックスタンパク質5、ヘファエスチン（hephaestin）、インテグリンベータ8、シナプス小胞糖タンパク質2、ヒトcDNA FLJ 12280 fisのクローンMAMMA 1001744、サイトカイン受容体様因子1、カリウム中間体/低透過性カルシウム活性化チャネルのサブファミリーNメンバー4、インテグリンアルファ7、DKFZ P 586 L 151タンパク質、PDZ-結合モチーフを有する転写性活性化補助因子（TAZ）、sine oculisホメオボックス相同体2（ショウジョウバエ）、KIAA 1034タンパク質、初期成長反応3、ディスタルレス（distal-less）ホメオボックス5、仮定上タンパク質FLJ 20373、アルドーケト還元酵素ファミリー1メンバーC3（3-アルファヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼタイプII）、バイグリカン、フィブロンネクチン1、プロエンケファリン、インテグリンベータ様1（EGF-like反復ドメインを有する）、ヒトmRNA完全長インサートcDNAクローンEUROIMAGE 1968422、EphA3、KIAA 0367タンパク質、ナトリウム利尿性ペプチド受容体C/グアニル酸シクラーゼC（心房ナトリウム利尿性ペプチド受容体C）、仮定上タンパク質FLJ 14054、ヒトmRNA、cDNA DKFZ p 564 B 222（DKFZ p 564 B 222クローンから）、小胞関連性膜タンパク質5（ミオブレビン）、EGF含有フィブリン様細胞外マトリックスタンパク質1、BCL2/アデノウイルスE1Bの19kDa相互作用タンパク質3様、AE結合タンパク質1、シトクロームCオキシダーゼサブユニットVIIaポリペプチド1（筋肉）、神経芽細胞腫の腫瘍形成抑制1、インスリン様成長因子結合タンパク質2（36kDa）の少なくとも1つの発現が、減少している細胞が好ましい。線維芽細胞、間葉系幹細胞、或いは腸骨稜骨髄細胞であるヒト細胞に関して上記のものと一致する、少なくとも5、10、15、或いは20の遺伝子の発現が、減少している細胞がより好ましい。上記のものに一致する線維芽細胞、間葉系幹細胞、或いは腸骨稜骨髄細胞であるヒト細胞に関して少なくとも、25、30、35のgeneの発現が減少している細胞が、現在より好ましい。35若しくは以上、40若しくは以上或いは、上記のシーケンスの全て一致する遺伝子の少なくとも1つの発現が、減少しているそれら分岐後由来細胞が好ましい。

【0060】

10

20

30

40

50

特定の成長因子および他の細胞タンパク質の分泌するので、本発明の細胞は、特に有益となる。好ましい分娩後由来細胞は、MCP-1、IL-6、IL-8、GFP-2、HGF、KGF、FGF、HB-EGF、BDNF、TPO、MIP1a、RANTES、及びTIMP-1の少なくとも1、2、3或いは4つを分泌する。上記タンパク質の5、6、7、或いは8つ以上分泌する細胞も有益で好ましい。前記因子の少なくとも9、10、11或いはそれ以上を分泌する細胞はより好ましく、上記リストのタンパク質の12或いはそれ以上、或いは13全てを分泌する細胞も同様に好ましい。

【0061】

そのような因子の分泌が有益である一方、細胞は培養液中への因子の分泌の欠如によっても特徴付けられる。ELISAによって検出されたように、TGF- β 2、ANG2、PDGFbb、MIP1b、I309、MDC、及びVEGFの少なくとも1、2、3、4つの分泌を欠く分娩後由来細胞は使用するのに現在好ましい。上記タンパク質の5あるいは6つの分泌を欠くことにより特徴付けられる細胞は、より好ましい。上記にリストされた前記因子の7つすべての分泌を欠く細胞も好ましい。

【0062】

前記分娩後由来細胞は、1若しくはそれ以上の酵素活性の存在下で好ましく単離される。組織から細胞を単離するのに使用される広範囲な消化酵素は、本分野において知られており、弱い消化力とみなされているもの（例えば、デオキシリボヌクレアーゼ、中性プロテアーゼであるディスパーゼ）から強い消化力とみなされているもの（例えば、パパイン及びトリプシン）の範囲の酵素を含む。例えば、コラゲナーゼは組織からさまざまな細胞を単離するのに有用であると知られている。デオキシリボヌクレアーゼは、一本鎖DNAを消化することができ、単離中の細胞凝集を最小にすることができる。酵素は単独或いは組み合わせで使用される。セリンプロテアーゼは使用される他の酵素を分解するので、他の酵素を使用した後、配列において好ましく使用される。セリンプロテアーゼと接する温度及び時間は計測されなければならない。セリンプロテアーゼは血清中で、アルファ2マクロチューブリンに阻害され、それゆえ、消化のために使用される培養液は無血清が好ましい。EDTA及びDNaseは、共通して用いられ、収率あるいは効率を改善する。好ましい方法は、例えば、コラゲナーゼとディスパーゼ、或いはコラゲナーゼ、ディスパーゼ、ヒアルロニダーゼによる酵素処理を含み、そのようなある好ましい実施形態において、コラゲナーゼと中性タンパク質ディスパーゼの混合物が解離段階で使用されるような方法が提供される。粘膜溶解酵素活性、メタロプロテアーゼ、中性プロテアーゼ、セリンプロテアーゼ（トリプシン、キモトリプシン、或いはエラスターゼなど）デオキシリボヌクレアーゼが現在好ましい。メタロプロテアーゼ、中性プロテアーゼ、及び粘膜溶解活性物から選択された酵素活性物質がより好ましい。コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、及びディスパーゼの1若しくはそれ以上の活性の存在下で単離された細胞が現在好ましい。ヒストリチクス菌からのコラゲナーゼ及びプロテアーゼ活性物質、つまり、ディスパーゼとサーモリシンのいずれかの存在下で単離された細胞がより好ましい。コラゲナーゼ、ディスパーゼ酵素活性物質とともに単離された細胞がより好ましい。コラゲナーゼとディスパーゼ活性に加えて、ヒアルロニダーゼ活性の存在下で単離される細胞も好ましい。前記熟練した当業者は、さまざまな組織供給源から細胞を単離するためにその分野において多くのそのような酵素処理が知られていることを理解するだろう。本発明の特定細胞の単離のために、酵素混合剤のような商用酵素調合剤、例えば、Roche Diagnosticsから利用可能なLIBERASE Blendzymeも有用である。前記熟練した者は、単離中の酵素使用を最適化するための方法および、そのような最適化の方法に関する情報が商用酵素の会社から利用可能であるということを理解するだろう。均一な細胞集団或いはほぼ均一な細胞集団を生じる方法は好ましい。

【0063】

前記細胞は、正常な核型を有するのも好ましく、核型は前記細胞が継代されるとき、維持される。核型を調べることは、胎盤由来の母方細胞から新生児細胞を同定し、区別するのに特に有用である。核型を決定する方法は、利用可能で、当業者に知られている。

【0064】

いくつかのその観点において、本発明の使用に、現在好ましい細胞は、上記特徴を有する分娩後細胞で、特に、正常の核型を有し、継代によっても、凍結及びそれに続く解凍、使用するに当たっても正常の核型を維持する細胞がより好ましく、さらには、前記細胞は、マーカーCD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr-アルファ、HLA-A、B、Cのそれぞれを発現するものが好ましく、前記細胞は、前記列挙されたマーカーに一致する、免疫学的に検出可能なタンパク質を産生するものが好ましい。上記に加えて、フローサイトメトリーによって検出されるように、CD31、CD34、CD45、CD117、CD141、あるいはHLA-DR、DP、DQのマーカーのいずれかに一致するタンパク質を産生しない細胞がより好ましい。

10

【0065】

さまざまな表現形へと導かれるに沿って分化する能力を有するある先行技術の細胞は、安定していないため、自発的に分化する。本発明への使用に現在好まれるのは、例えば、心筋原性、血管原性、血液血管性、あるいは、血管性に沿って、自発的に分化しない細胞である。成長培養液中で増殖するとき、好ましい細胞は、それら表面で産生される前記細胞マーカーに関して、また、例えば、Affymetrix GENECHIPのようなオリゴヌクレオチドアレイを使用し決定されるさまざまな遺伝子の発現パターンに関して、実質上安定である。前記細胞は、生化学的、遺伝的及び免疫的特長において、例えば、継代後、及び、多数の細胞集団倍加を通して、細胞表面マーカーは実質上一定である。

【0066】

20

そのさまざまな別の観点において、本発明は、上記に記載された前記細胞を有する細胞集団を提供する。細胞集団は、本発明の前記方法と関連して、また、前記治療用細胞組成物及び単離された細胞よりも大量な細胞溶解液を産生することに関して有用である細胞集団を提供され得る。

【0067】

好ましい集団は、約1%の分娩後由来細胞から約10%の分娩後細胞を有する。より好ましい集団は少なくとも約10%の分娩後由来細胞を有する。より好ましい集団は少なくとも約25%の分娩後由来細胞を有する。いくつかのより好ましい集団は約50%の分娩後由来細胞も有する。そのような集団は、共培養或いは他の培養にとって有用であり、その培養では、前記細胞が、同じ密度であり、同じ速さで分裂する。或いは、前記集団が共培養或いはそれぞれ別に培養されている培養系において増殖後、それぞれの培養の約50%になるように調節されたものである。いくつかの適用に対してより好ましい集団は、少なくとも約65%の分娩後由来細胞を有するものである。少なくとも90%の分娩後由来細胞を有する集団は本発明のある観点のために非常に好ましい。より好ましい集団は、実質上、分娩後由来細胞のみを有するものである。

30

【0068】

前記集団は、分娩後由来細胞のクローン細胞株を有する。そのような集団は、非常に望ましい機能を有する細胞クローンが単離されるとき、特に有用である。新生児側および母体側の両方のクローンが有用であり、ここに提供される。培養細胞からクローン化された細胞株を単離する方法は、本分野において知られている。

40

【0069】

本発明は、前記分娩後由来細胞の集団から用意された細胞溶解液、可溶性細胞分画、及び膜濃縮細胞分画も提供する。その様な溶解液及び分画は、多くの有用性を有している。in vitro (試験管内)における細胞溶解液および特に可溶性細胞分画を使用することにより、同種異型のリンパ球を刺激或いは免疫反応の副作用或いは拒絶を引き起こさないうで、同種異型の患者に使用することができる有益な細胞内環境を可能にする。細胞を溶解する方法は、本分野においてよく知られており、機械的破壊、酵素的破壊、化学的破壊或いはそれらの組み合わせなど、さまざまな方法を含む。そのような細胞溶解液は、成長培養液における細胞から直接用意され、従って、分泌された成長因子或いは同等物を含む、或いは、PBS或いは別の溶液などの培養液を含まない液で洗浄された細胞から用意

50

されるかもしれない。前記成長培養液中の細胞から直接溶解液を作るために、細胞は、溶解液が使用される種からの血清中で成長するのが好ましく、ある実施形態においては、洗浄された細胞が好ましい。洗浄された細胞は、もし望むなら、最初の集団密度よりも大きな濃度で再懸濁される。分娩後由来細胞の集団から用意された細胞溶解液は、そのまま使用されるかもしれないし、例えば、限外濾過或いは凍結乾燥により濃縮され、或いは乾燥、濃縮、部分精製、或いは、本分野で知られる薬理学的に許容可能な担体或いは希釈剤と結合され、或いは、例えば、薬理学的に有用なタンパク質組成物のような生物物質のような他の化合物と結合される。細胞溶解物質は *in vitro* あるいは *in vivo* 内或いは生体内で、単独或いは例えば、同系の或いは自己の生きた細胞とともに使用可能である。前記溶解液は、*in vivo* 内に導入されるならば、例えば、必要とされる細胞成長因子を患者に提供する為に、治療の部位で局所的に或いは遠隔的に導入される。好ましくは、前記溶解物質は、免疫原性でなく、同系及び自己受給者の広い集団において、免疫的副作用或いは反応を起こさずに、免疫学的に寛容であるのがさらに好ましい。本発明の細胞溶解液は、例えば、成長培養液上で、成長、増殖する環境下で増殖させたどの段階或いはどの年齢の細胞からも有用である。老化した細胞でさえ溶解液の用意に有用であり、生物学的に有用な特定の因子を提供することができる。生存不可能な或いは死んだ、殺された細胞ですら溶解液及び細胞分画を用意するために利用可能である。間葉系経路に沿って、特に、心筋原性、血管原性、血液血管性、血管性系に誘導する傾向のある因子にさらされた細胞からの溶解物質も有用である。分化した細胞或いは P P D C s よりも傾倒した細胞からの細胞溶解物質も望ましい。例えば、心筋芽細胞、心筋細胞、血管芽細胞、ヘマンジオブラスト及び同等物或いはそれらの前駆細胞の特徴を有する細胞からの溶解液も有用であり、ここに使用するために意図される。

【0070】

幹細胞分化を心原性、血管原性 (*angiogenic*)、血液血管原性、血管原性 (*vasculogenic*) の経路に沿って幹細胞を刺激する1若しくはそれ以上の因子の存在下において培養された細胞集団が本明細書において提供される。そのような因子は当技術分野で周知であり、前期熟練した技術者は、分化のための適した条件の決定が日常の実験により達成されることを評価するであろう。そのような条件の最適化は統計的な実験設計および分析により達成され、例えば、反応表面方法論により、例えば、生物学的培養条件などの多様な変化を同時に最適化することが可能になる。目下好ましい因子は、これらに限定されたものではないが、成長因子、ケモカイン、サイトカイン、細胞産生物、脱メチル化剤、及び他の刺激剤などの因子を含み、それらは心原性、血管原性 (*angiogenic*)、血液血管性、血管性 (*vasculogenic*) 或いは系統に沿って、例えば幹細胞などの分化を刺激することが現在知られており、後に決定される。脱メチル化剤、BMP、FGF、TAK、GATA、Csx、NK、MEF2、ET-1のメンバーおよびWnt因子ファミリー、ヘッジホッグ、Csx/Nkx-2.5、及び抗Wntファクターの少なくとも1つから成る因子の存在下で培養される細胞が心原性、血管原性 (*angiogenic*)、血液血管性、血管性 (*vasculogenic*) に沿って分化を誘導あるいは刺激するのに現在好ましい。DNAのメチル化はある遺伝子を封じ、それらの発現を抑制することが知られており、脱メチル化により、そのような遺伝子の発現を可能にし、分化に必要ないくつかのものを含む。好ましい脱メチル化剤は、DNAメチルトランスフェラーゼの阻害剤、或いはヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤、リプレッサー複合体の阻害剤を含む。

【0071】

現在好ましい脱メチル化剤は5-アザシチジン、5-アザ-2'-デオキシシチジン、DMSO、塩化ヘレリスリン、レチノイン酸或いはそれらの塩、2-アミノ-4- (エチルチオ) 酪酸、プロカインアミド、及びプロカインの少なくとも1つを有する。そのような因子の含有は、例えば、カルジオミオシン、骨格ミオシン、GATA4の少なくとも一つの発現により；或いは、自発的或いは誘導性の拍動リズムの獲得により；或いは、不整脈を誘導することなく、患者の心筋へと少なくとも部分的に組み込む能力により決定され

る、間葉系統に沿って、心筋原性経路へと分化する前記細胞を誘導する傾向にある。

【0072】

本明細書の好ましい実施形態において、上記で同定された一つ若しくはそれ以上の因子により誘導された細胞は心筋原性、血管原性 (a n g i o g e n i c)、血液血管性、或いは血管原性 (v a s c u l o g e n i c) 細胞、或いは、それらの前駆細胞或いは原始的類縁体になりうる。好ましくは、前記細胞の少なくともいくつかは、患者の心臓或いは血管系統に少なくとも部分的に組み込まれ、それらは、これらに限定されるものではないが、心筋、心臓の血管及び他の構造、血管、及び同等物を含む。心筋原性の徴候を2つ若しくはそれ以上獲得している分化した細胞が好ましく、細胞或いは、その前駆細胞は、患者の心臓或いは血管に完全に取り込まれることができる。患者の中に置かれたとき、不整脈、心欠陥、血管の欠陥、或いは患者の循環器系或いは健康に関連する他の異常において増加をきたさない細胞がさらに好ましい。患者の心筋、血管、血液及び同等物の中に通常存在する幹細胞を刺激し、例えば心筋細胞、或いは少なくとも心筋原性、血管原性 (h e m a n g i o g e n i c)、血液血管性、或いは血管原性 (v a s c u l o g e n i c) の系統にそれらを分化することができる細胞も好ましい。前記患者の心筋、血液、血管及び同等物の中に通常存在する幹細胞を補助し、増殖し、拡大し、さらに後で分化に利用できる P P D C s が同様に好ましい。

10

【0073】

前記集団は、例えば、心臓或いは循環器疾患を患った患者に治療的に提供されうる。一般的な実施例は、本発明を限定する事を意図するものではないが、アテローム性動脈硬化症、心筋症、或いは例えば心筋梗塞、又は外傷（急性、慢性）などからの心外傷による先天性心疾患を含む。目下好ましい実施形態において、前記細胞集団は約50%の分娩後由来細胞を有する一方で、他の好ましい実施形態において、前記集団は実質的に分娩後由来細胞の均一な集団である。別の実施形態において、前記集団は、少なくとも、1、10、20、25、30、33、40、60、66、70、75、80、又は90%の分娩後由来細胞を有する。

20

【0074】

他の哺乳類細胞を使った、本発明の前記細胞又は培養物を有する共培養も本明細書において提供される。好ましくは、これらの共培養は別の哺乳類の細胞株を有し、その増殖又は治療能力は、例えば、臍帯由来細胞の存在下で改善される。ヒト細胞株が特に好ましい。そのような共培養は、i n v i t r o (試験管内) 又は i n v i v o、(生体内) において、治療的用途に有用である。

30

【0075】

分娩後由来細胞、薬学的化成物のような別の治療用物質、因子、又は生理活性物質を含む治療的組成物も本明細書において提供される。そのような生理活性物質は、これらに限ったものではないが、I G F、L I F、P D G F、E G F、F G F、抗血栓形成剤、抗アポトーシス剤、抗炎症剤、免疫抑制或いは調整剤、抗酸化剤を含む。そのような治療用の組成物は、前記 P P D C s と生理活性物質に加えて、一つ若しくはそれ以上の細胞タイプをさらに有する。

【0076】

したがって、治療用の細胞とともに、例えば抗血栓形成剤、抗アポトーシス剤、及び抗炎症剤などの別の生理活性分子が有用であってもよく、そのような化合物或いは物質を個別に又は組み合わせて、前記細胞と共に順番に或いは併用して投与されても良い。例えば、抗アポトーシス剤は、プログラム化された細胞死を最小限にするのに有用であっても良い。そのような物質は、これらに限ったものではないが、E P O、E P O 誘導体、及び類似体、及びそれらの塩、T P O、I G F-1、I G F-I I、肝細胞増殖因子 (H G F)、及びカスパーゼ阻害剤を含む。抗炎症剤は、これらに限ったものではないが、P 3 8 M A P キナーゼ阻害剤、スタチン、I L-6 及び I L-1 阻害剤、ペミロラスト、トラニラスト、レミケード、シロリムス、例えば、テポキサリン、トルメチン、スプロフェンのような非ステロイド性抗炎症剤を含む。

40

50

【0077】

本発明の前記治療用細胞とともに投与されうる他の生理活性因子或いは治療剤は例えば、抗血栓形成因子、免疫抑制剤又は免疫調整剤、及び抗酸化剤を含む。免疫抑制及び調整剤の実施例は、例えば、シクロスポリン、タクロリムスなどのカルシニューリン阻害剤、シロリムス或いはエベロリムスのようなmTOR阻害剤；アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチルのような抗増殖剤；例えばプレドニゾロン或いはヒドロコルチゾンのようなコルチコステロイド；モノクローナル抗IL-2R α 受容体抗体、バシリキシマブ、ダクリツマブのような抗体；抗胸腺細胞グロブリン抗体（ATG）、抗リンパ球グロブリン抗体（ALG）、及びモノクローナル抗T細胞抗体OKT3のようなポリクローナル抗T細胞抗体を含む。本発明の前記細胞とともに治療用に提供されうる抗血栓化合物は、例えば、ヘパリン、ヘパリン誘導体、ウロキナーゼ、及びPPack（デキシトロフェニルアラニンプロリンアルギニクロロメチルケトン）；抗トロンビン化合物、血小板受容体アンタゴニスト、抗トロンビン抗体、抗血小板受容体抗体、アスピリン、ジピリダモール、プロタミン、ヒルジン、プロスタグランジン阻害剤、及び血小板阻害剤を含む。抗酸化剤はもちろん、当業者に周知であり、いかなる薬理的に許容できる抗酸化剤は本発明の前記細胞とともに投与されても良く、抗酸化剤は、プロブコール、ビタミンA、C、及びE、補酵素Q-10、グルタチオン、Lシステイン、Nアセチルシステイン、又は抗酸化誘導体、前記の類似物質又は塩を含む。

10

【0078】

上記に加えて、前記細胞から誘導される組成物が本明細書において提供される。上記に詳細を記載したように、細胞溶解物、可溶性細胞分画、及び膜豊富細胞分画、が本明細書において提供される。前記細胞から誘導される細胞外基質は、例えば、基底膜を有しており、有用でもあり、本明細書において提供される。前記細胞から誘導される細胞溶解物質、可溶性細胞分画、膜豊富細胞分画、及び細胞外基質は全て、さらなる細胞或いは細胞タイプの有無に関わらず、本発明の前記明細と共に、適切に、或いは併用して投与される。

20

【0079】

本発明の組成物は、本明細書で提供されるような条件培地をも含む。そのような培養液は、まず本発明の前記細胞或いは培養物を増殖するために使用され、前記増殖の間、一つ若しくはそれ以上の産物を培養液中に分泌する。これら新しい細胞からの条件培養液は、多くの目的に有用であり、例えば、本発明の前記細胞或いは培養による前記培養液中に分泌される増殖因子或いは栄養因子の必要下で、他の哺乳類細胞の増殖を補助すること、および、例えば、血管新生などを促進することを含む。条件培養液を用意し、貯蔵する方法は、当業者に周知であり、主として、例えば、遠心分離による前記細胞の除去を含む。

30

【0080】

本発明は、その別の観点において、薬理的に許容できるキャリアと、実質上血液を含まない哺乳類分娩後組織から由来する分娩後由来細胞とを含む治療用の細胞組成物を提供する。前記細胞は培養中、自己複製と増殖能を有し、間葉系にそって心筋原性、血管新生、及び血管性表現型に分化し、さらに例えば心筋細胞（cardiomyocyte）、内皮細胞、心筋細胞（myocardial cell）、心外膜細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞（例えば、血管平滑筋細胞）、刺激伝導系細胞、それらの前駆細胞などの細胞に分化する能力を有する。前記細胞は、約5%から少なくとも約20%の酸素を含む空気中で増殖することができる。前記細胞は、増殖のためにLバリンも必要とし、培養中、少なくとも40回、倍增する能力を有し、コーティングされた或いはコーティングされていない組織培養容器上で接着及び増殖する能力を有する。コーティングされた組織培養容器は、ゼラチン、ラミニン、又はフィブロネクチンでコーティングされ、組織因子、ビメンチン、アルファ平滑筋アクチンを産生し、フローサイトメトリーで検出する際、CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 、及びHLA-A、B、Cの各々を産生し、CD31、CD34、CD45、CD117、CD141、HLA-DR、DP、DQのいずれも産生しない。好ましい実施形態において、前記細胞は、ヒト組織由来である。

40

50

【0081】

提供される前記治療用細胞組成物は、心筋症などの、循環器系の疾患又は他の心臓疾患或いは心外傷を患った患者に治療的に提供される。ある実施形態において、前記治療用細胞組成物は、心原性、血管原性、血液血管性、血管性の系列に沿って分化する為に、誘導された細胞を有する。前記治療用細胞組成物は、心臓、血液、血管及び同等物に存在する成人幹細胞を刺激する細胞又は細胞産物を含み、分裂或いは増殖するか、分裂して増殖する。

【0082】

前記治療用細胞組成物は、例えば、注入により提供される。ある実施形態において、前記治療用細胞組成物は心腔内注入により提供される。別の実施形態において、前記注入は、心臓の表面上、隣接する領域、或いは、より離れた領域であっても良い。好ましい実施形態において、前記細胞は、前記疾患或いは損傷のある領域にとどまり得る。特に好ましいのは、静脈内に注入された細胞が、作用するのに望ましい領域に適切にとどまることであり、例えば、心筋細胞或いはその前駆細胞が好ましくは心筋或いはその構造物にあり、とどまる能力を有する。

【0083】

前記治療用細胞組成物は、基質—細胞複合体の形態で提供されうる。基質は生体適合性の骨格、格子、自己構築構造、および同等物を含み、生体吸収性或いは非吸収性の液体、ゲル、又は固体である。そのような基質は、前記治療用細胞治療、外科的修復、組織工学、創傷治癒の技術において知られている。前記基質は、前記治療用細胞によりあらかじめ処理されるのが好ましい。前記基質は、前記基質或いはその空間に近接して細胞とともに存在するのがより好ましい。前記細胞は、一部の実施形態において、前記基質に接着し、別の実施形態において、前記細胞は、前記基質の空間に取り込まれるか含まれる。基質—細胞複合体であるものが最も好ましく、前記細胞は、前記基質と密着して増殖し、治療用で使用された場合、患者の増殖細胞は、刺激され支持され、適切な血管新生が同様に刺激され支持される。前記基質—細胞複合体は患者の体内に当業者に周知のいかなる方法でも導入され、これらに限ったことではないが、移植、注入、外科的接合、他の組織との移植、注入、および同等物を含む。一部の実施形態において、前記基質は、*in vivo*（生体内）で或いはより好ましくは *in situ*（生体内原位置）で形成され、例えば、*in situ* で重合可能なゲルが本発明にしたがって使用されうる。そのようなゲルの実施例は当業者に周知である。

【0084】

一部の実施形態において、本発明の前記細胞或いはそれらの共培養は骨格などの3次元基質の上に播種し *in vivo* で移植される。前記播種した細胞は、前記フレームワークの上或いは中で増殖するか、或いは他の細胞との協力のあるなしにかかわらず、*in vivo*（生体内）で置換組織を確立する手助けをする。

【0085】

前記3次元のフレームワーク上におけるPPDCs或いはその共培養が増殖することは、3次元組織或いはその基盤の形成をもたらすのが好ましく、それは、例えば、損傷或いは疾患のある組織の修復のために、*in vivo*（生体内）で利用されうる。例えば、前記3次元の骨格は管構造の形成のために使用されても良く、例えば、血管の修復、或いは前記循環器系或いは、冠構造の観点で使用されても良い。

【0086】

本発明の一つの観点にしたがって、PPDCs或いはその共培養は、骨格、気泡、或いはヒドロゲルのような3次元フレームワーク或いは基質の上でインキュベートされるか、(*inoculate*) 或いは播種する(*seed*)。前記フレームワークは、全体的に平坦、全体的に円柱状或いは管状のようなさまざまな形に形成され、或いは、考えられた元で、正しい構造のために必要とされる或いは望まれるように完全に自由な形態であっても良い。ある実施形態において、前記PPDCsは前記3次元構造上で増殖するが、別の実施形態において、前記細胞は、生存するのみ或いは死にさえするが、そうする中で、新

しい組織の内部成長、例えば、好ましくは血管新生を刺激又は促進する。PPDCsは心筋細胞、心筋芽細胞、血管内皮細胞、皮膚線維芽細胞、角化細胞、幹細胞を含むたの軟組織型の前駆細胞とともに投与される。この3次元構造で成長するとき、この増殖細胞は、成熟し、単離し、自然に生体内で見られる対応物に類似する成人組織の成分を適切に形成する。

【0087】

例えば、これに限ったことではないが、前記基質は、前記基質構造が、1)次に起こる分解なしに前記PPDC或いはその共培養を支持し、2)前記PPDCs或いはその共培養を、播種したときから、前記組織移植が宿主組織により再形成されるまで支持し、3)前記播種した細胞が接着、増殖し、前記基質が分解したとき、*in vitro* (生体内)でそれ自身を支持するのに十分な機械的統合性を持つ組織構造中に接着し、増殖し、発育できるように設計される。基質の設計の総説がHutmacher, J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 12(1):107-124(2001)により提供される。

10

【0088】

本明細書の使用を考慮した前記基質、骨格、気泡、自己構築システムは一つ若しくはそれ以上の、細胞、成長因子、薬剤、或いは本発明の前記細胞に加えて、組織の成長或いは治癒を促進するか、血管新生或いはその神経支配を刺激するか、或いは別の方法で本発明の治療的結果又は実践を促進或いは改善する生物活性剤などの他の組成物との組み合わせで移植される。

20

【0089】

本発明の前記細胞は、培養中で自由に成長し、前記培養から除去され、3次元フレームワーク上に播種する。例えば、1ミリリットルあたり約 10^6 から 5×10^7 のある細胞濃度で、前記3次元のフレームワークを、好ましくは、3次元の支持が比較的短時間に確立する。さらにある用途においては、希望する結果に応じて、多く或いは少ない数の細胞が使用されることが望ましい。

【0090】

ある実施形態において、*in vivo* (生体内)で見られる前記細胞微小環境を培養中で再形成することが有用であり、*in vivo* (生体内)に移植される前に、又は*in vitro* (試験管内)での使用前に前記細胞が増殖する程度は変化しうる。PPDCs或いはその共培養は、例えば、ロープ、管状、フィラメント状及び同等物のような移植の望ましい形体に形作られる前後に前記フレームワークの上に播種されても良い。前記フレームワーク上に前記細胞を播種した後、前記フレームワークは適切な成長培地で培養されるのが好ましい。培養期間中、前記培養された細胞は、成長し、フレームワークに発育し、例えば、それらの間質性の任意の空間に橋渡しをするか、或いは部分的に橋渡しする(隙間を埋める)かもしれない。前記細胞が、修復され或いは再生される組織の生体内における細胞密度を反映する適切な程度まで成長するのが好ましいが、必要ではない。別の実施形態において、PPDCsの存在は、前記フレームワーク上で比較的少数であっても、他の健康な細胞の内部成長を促し、例えば、創傷或いは壊死組織の治癒を容易にする。

30

40

【0091】

例えば、本発明の観点のために使用される骨格など基質の実施例は、マット(織られた、編まれた、より好ましくは織られていない)、極性のある或いは半極性の気泡、自己構築ペプチド、およびその同種を含む。織られていないマットは、例えば、天然の或いは合成のポリマーからなる繊維を使用して形成されても良い。好ましい実施形態において、商品名VICRYL(エチコン社、ニュージャージー州Somerville)として販売されているグルコール酸及び乳酸の吸収性共重合体(PGA/PLA)はマットを形成するために使用される。例えば、ポリ(ε-プロピオン-カプロラクトン)/ポリ(グリコール酸)(PCL/PGA)共重合体からなる気泡が、それは、米国特許第6,355,699号公報で議論されているように、凍結-乾燥或いは凍結乾燥のような処理により形成さ

50

れるが、骨格としても機能しうる。ゲルも本明細書において使用されるように、適切な基質を形成する。実施例は例えば、自己構築ペプチドから成る *in situ* で重合可能なゲル、ハイドロゲルを含む。これら物質は、組織の成長のための支持として、しばしば使用される。*in situ* 形成分解可能なネットワークも本発明において使用するために適している。(例えば Anseth, K. S. et al., 2002, J. Controlled Release 78:199-209; Wang, D et al., 2003, Biomaterials 24:3969-3980; U. S. Patent Publication 2002/0022676 to He et al. を参照) これら物質は、注入するために適した液体として処方され、その後、さまざまな方法(例えば、温度、pH、光への露出の変化)により誘導され、分解可能なハイドロゲルネットワークを *in vivo* (生体内) 或いは *in situ* に形成する。

10

【0092】

好ましい実施形態によると、前記フレームワークはフェルトで、例えば、PGA、PLA、PCL 共重合体或いは混合物、或いはヒアルロン酸のような生理吸収可能な材料から作られたマルチフィラメント糸からなりうる。前記糸は圧着、切り取り、カーディング、及び縫うことからなる標準的な織物加工技術を使用してフェルトになる。別の好ましい実施形態において、本発明の前記細胞は複合構造である気泡骨格上に播種される。さらに、前記 3 次元フレームワークは、生体内での特殊な構造のような利用可能な形に成形され、修復され、置換され、あるいは増大されうる。

【0093】

前記フレームワークは、細胞接着を高めるために、本発明の前記細胞を播種する前に処理されても良い。例えば、本発明の前記細胞を播種する前に、ナイロン基質は、0.1 モル濃度の酪酸で処理され、前記ナイロンを被覆するため、ポリリシン、PBS、及び／又ははコラーゲンの中で培養される。ポリスチレンは硫酸を用いて同様に処理されうる。

20

【0094】

さらに、前記 3 次元フレームワークの外表面は細胞の接着又は成長、及び組織の分化を改善するために修飾され、それは、前記フレームワークをプラズマ被覆することにより、又は、1 つ若しくはそれ以上のタンパク質(例えば、コラーゲン、弾性線維、網状線維)、糖タンパク、グリコサミノグリカン(例えば、ヘパリン硫酸、コンドロイチン-4-硫酸、コンドロイチン-6-硫酸、デルマタン硫酸、ケラチン硫酸)、細胞基質、及び／又は、これに限ったものではないが、特にゼラチン、アルギン酸、寒天、アガロース、及びプラントガムなどの他の材料を加えることにより修飾されうる。

30

【0095】

一部の実施形態において、前記骨格は、非血栓形成性にする物質を含むか或いは前記物質で処理される。これら処理及び物質は、内皮細胞の成長、移動、細胞外基質の沈着を促進かつ維持もする。これら物質と処理の実施例は、これらに限ったものではないが、ラミニン及び 4 型コラーゲンのような基底膜タンパク質のような天然材料、ePTFE のような合成物質、及び PURSPAN (The Polymer Technology Group, Inc.、カリフォルニア州バークリー) のような分節されたポリウレタンウレアシリコンを含む。これら物質は、前記骨格を非血栓性にするためにさらに処理される。そのような処理は、ヘパリンのような抗血栓剤、プラズマコーティングのような前記物質の表面電化を変化させる処理を含む。

40

【0096】

例えば、前記フレームワーク上に沈着したような、さまざまなタイプのコラーゲンのさまざまな比率は、後に前記フレームワーク上に播種されるか、*in vivo* (生体内) の構造上で成長する特異的な細胞組織或いは他の細胞の成長に影響しうる。例えば、3 次元皮膚培養システムに対しては、I 型及び III 型コラーゲンが、前記最初の基質内に沈着するのが好ましい。或いはまた、前記フレームワークは、望まれる適切なタイプのコラーゲンを合成する細胞の混合物とともに播種されうる。したがって、培養される組織によって、前記フレームワーク上に播種される、或いは、その上に播種される細胞により産生

50

される適切なコラーゲンタイプが選択される。例えば、前記フレームワークに存在するある程度の量のコラーゲン線維及び弾性線維は最初の接種材料中のコラーゲン産生細胞に対するエラスチン産生細胞の割合を調節することにより調節される。例えば、動脈の内壁はエラスチンに富んでいるので、動脈の骨格はエラスチンを分泌する平滑筋細胞の共培養を含むべきである。

【0097】

植菌或いは播種された本発明の3次元フレームワークはさまざまな用途において使用される。これらは、これらに限ったものではないが、前記基質或いは*in vivo*（生体内）で培養された前記基質そのものから得られる前記培養細胞の移植（*transplantation*或いは*implantation*）を含む。前記3次元骨格は、本発明によると、存在する組織を置換し、増大させ、新しい或いは変えられた組織を誘導し、人工器官を修正し、生物学的な組織或いは構造をつなぎ合わせる為に使用されうる。例えば、これに限ったことではないが、本発明の特別な実施形態は、例えば、心筋の修正或いは再生のための平坦な構造及び管状の3次元組織の移植、その構造体、及び例えば、脳、及び頭蓋内の血管内構造を含むその全体の血管系列を含むがこれらに限らない。

10

【0098】

PPDCsは平坦な骨格状に播種されうる。前記骨格は移植前に培地で培養されるのが好ましい。2或いはそれ以上の平坦なフレームワークは多層フレームワークを生み出すために別のものの上に重ねられ、一緒に縫われる。

【0099】

例えば、これに限ったことではないが、前記3次元フレームワークは*in vitro*（試験管内）で、一層及び多層の管状組織を構成するために使用されても良く、それは、*in vivo*（生体内）で損傷した或いは疾患のある管状組織の代替物として働いても良い。

20

【0100】

骨格は細片に切り取られ（例えば、長方形の形）、その幅は、最終的に挿入される管状の器官の内周と大体同じであっても良い。前記細胞は骨格上に播種され、液体の培養液中で浮遊或いは懸濁して培養されても良い。適切な合流段階で、前記骨格は、長辺をお互い合わせることににより、管の中に取り込まれても良い。前記縫い目は適切な直径の適切な材料の繊維を用いて2つの端を縫い合わせることににより閉じられても良い。

30

【0101】

本発明によると、骨格は管として形成され、PPDCsと共に播種され、培養チャンバー内で培養液中に懸濁しても良い。細胞が前記管腔を塞がないために、前記管状フレームワークの片方の開放端はノズルに固定されても良い。液体培養液は、前記管状フレームワークの内側を通る流れを作り出すために、前記培養チャンバーに結合されたソースチャンバーからこのノズルを通るようにされていても良い。別の開いた端は、前記培養液がソースチャンバーから再循環するコレクションチャンバーへと導く流出口へと固定されても良い。培養が完了時において、前記管は、前記ノズルと流出口から離れても良い。この方法は、Ballermann, B. J. ら、国際出願第WO94/24484号明細書及び米国出願第08/430,768号明細書に記載されており、これらはいずれもこの参照により本明細書に完全に組み込まれる。

40

【0102】

一般的に、2つの3次元フレームワークは、任意の以下の方法を用いて、本発明に従って、一つの管の中に結合されても良い。

【0103】

2若しくはそれ以上の平坦なフレームワークは別のものの上に重ねられ、一緒に縫われても良い。その後この2層のシートは巻き上げられ、上述のように一緒に接合され、縫われても良い。

【0104】

内層として作用する一つの管状の骨格は、PPDCsと播種され、培養されても良い。

50

2番目の骨格は前記管状のフレームワークの外径よりもわずかに広い幅を持った平坦な細片として成長しても良い。適切な成長に達した後、前記平坦なフレームワークの2つの端を縫い合わせるることにより、好ましくは、平坦なフレームワークを内管に縫い合わせるることにより、前記平坦なフレームワークは、前記管状の骨格の外側の周りに包まれても良い。

【0105】

わずかに異なった直径の2若しくはそれ以上の管状メッシュは別々に成長しても良い。前記短いほうの直径を有する前記フレームワークは、長いほうの直径を有するフレームワークの中に挿入され、縫われる。

【0106】

これら方法の各々に対して、より多くの層が、前記方法を再適応することにより2重層の管へ加えられても良い。前記骨格は前記PPDCsの成長のいずれの段階で結合されても良く、結合された骨格の培養は望ましい時点まで継続されても良い。

【0107】

前記管状構造の管腔の観点から、管状の骨格の管腔表面を非血栓性にする物質からなるか、或いは前記物質によって処理される。これら処理及び物質は、内皮細胞の成長、移動、及び細胞外基質の沈着を促進し、維持しても良い。これら物質及び処理の実施例は、これらに限ったものではないが、ラミニンおよび4型コラーゲンのような基底膜たんぱく質のような天然物質、ePTFEのような合成物質、PURSPAN (The Polymer Technology Group, Inc.、カリフォルニア州バークリー) のようなセグメント化されたポリウレタンウレアシリコンを含む。これら物質は、前記管状骨格の管腔表面を非血栓性にするためにさらに処理されても良い。そのような処理は、ヘパリンのような抗血栓形成剤、及びプラズマコーティングのような前記物質の表面の電荷を変化させる処理を含む。

【0108】

上記とともに、本発明の前記細胞、細胞溶解物質及び分画、及び治療用組成物は埋め込み型装置とともに使用されても良い。例えば、前記細胞、細胞溶解物質、細胞分画は、例えば、ステント、人口弁、心室補助装置、GulglieImi着脱可能コイルおよび同等物とともに同時投与されても良い。前記装置が、そのような治療を必要とする個人に提供される有力な治療を構成する場合、前記細胞および同等物は、前記移植された装置の領域の適切な治癒を補助、刺激、促進するために、補助的或いは2次的な治療として使用されても良い。本発明の前記細胞、溶解物質、細胞分画および治療用組成物は、特定の埋め込み型装置を「前処理」するために使用されても良く、in vivo (生体内) で用いられたときに問題を最小限にする。被覆された装置を含むそのような前処理された装置は、局所或いは全身性の感染、或いは、例えば、再狭窄或いは血管のさらなる閉塞のリスクを減らすことによって、前記装置を受け入れた患者がより我慢できるものであっても良い。

【0109】

特定の実施形態において、前記治療用細胞組成物は、インターロイキン8、レチキュロン1、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド1(メラノーマ成長刺激活性、アルファ)、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド6(顆粒球遊走タンパク質2)、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド3、及び腫瘍壊死因子アルファ誘導タンパク質3の少なくとも1つを発現する細胞或いは、短成長感受性(short stature)ホメオボックス2、熱ショック27kDaタンパク質2、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド12(間質細胞由来因子1)、エラスチン(大動脈弁上狭窄、Williams-Beuren症候群)、ヒトmRNA、cDNA DKFZ p586M2022 (DKFZ p586M2022クローンから)、間柔織(mesenchyme)ホメオボックス2(成長停止特異的ホメオボックス)、眼のないホメオボックス相同体1(ショウジョウバエ)、クリスタリンアルファB、形態形成2のほつれた関連性活性化因子、DKFZ P586B2420タンパク質、ニューラリン1の類似物、テトラネクチン(プラ

10

20

30

40

50

スミノーゲン結合タンパク質)、src 相同体 3 (SH3) 及びシステインリッチドメイン、抗増殖性の B-Ce11 転座遺伝子 1、コレステロール 25-水酸化酵素、ラント関連性転写因子 3、仮想タンパク質 FLJ23191、インターロイキン 11 受容体アルファ、プロコラーゲン C-エンドペプチダーゼエンハンサー、縮合 (f r i z z l e d) 相同体 7 (ショウジョウバエ)、仮想遺伝子 BC008967、コラーゲンタイプ VII アルファ 1、テネイシン C (h e x a b r a c h i o n)、イルコイホメオボックスタンパク質 5、ヘファエスチン (h e p h a e s t i n)、インテグリンベータ 8、シナプス小胞糖タンパク質 2、ヒト cDNA FLJ12280 f i s のクローン MAMMA1001744、サイトカイン受容体様因子 1、カリウム中間体/低透過性カルシウム活性化チャネルのサブファミリー N メンバー 4、インテグリンアルファ 7、DKFZP586L151 タンパク質、PDZ-結合モチーフを有する転写性活性化補助因子 (TAZ)、眼のない (s i n e o c u l i s) ホメオボックス相同体 2 (ショウジョウバエ)、KIAA1034 タンパク質、初期成長反応 3、ディスタルレス (d i s t a l - l e s s) ホメオボックス 5、仮想タンパク質 FLJ20373、アルドーケト還元酵素ファミリー 1 メンバー C3 (3-アルファヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼタイプ II)、バイグリカン、フィブロネクチン 1、プロエンケファリン、インテグリンベータ様 1 (EGF-like 反復ドメインを有する)、ヒト mRNA 完全長インサート cDNA クローン EUROIMAGE1968422、EphA3、KIAA0367 タンパク質、ナトリウム利尿性ペプチド受容体 C/グアニル酸シクラーゼ C (心房ナトリウム利尿性ペプチド受容体 C)、仮想タンパク質 FLJ14054、ヒト mRNA、cDNA DKFZp564B222 (DKFZp564B222 クローンから)、小胞関連性膜タンパク質 5 (ミオブレビン)、EGF 含有フィブリン様細胞外基質タンパク質 1、BCL2/アデノウイルス E1B の 19kDa 相互作用タンパク質 3 様、AE 結合タンパク質 1、シトクローム C オキシダーゼサブユニット VIIa ポリペプチド 1 (筋肉)、神経芽細胞腫の腫瘍形成抑制 1、インスリン様成長因子結合タンパク質 2 (36kDa) の少なくとも 1 つの発現が、線維芽細胞、間葉系幹細胞、或いは腸骨髄細胞であるヒト細胞に関して減少している細胞を有する。

【0110】

好ましい治療用細胞組成物は、MCP-1、IL-6、IL-8、GCP-2、HGF、KGF、FGF、HB-EGF、BDNF、TPO、MIP1a、RANTES、TIMP1 の少なくとも 1 つを分泌する細胞を有し、さらに、

ELISA によって検出される、TGF-ベータ 2、ANG2、PDGFbb、MIP1b、I309、MDC、及び VEGF の少なくとも 1 つを分泌しない細胞を有する。

【0111】

別の観点において、本発明は、心臓疾患或いは損傷を患った患者を治療する方法を提供し、この方法は、心臓及び循環器の疾患或いは損傷を患った患者に治療用分娩後由来細胞組成物を投与する工程と、心機能における改善に対して前記患者を評価する工程とを含む。ある好ましい実施形態において、前記心疾患は、特発性或いは原因既知の心筋症であり、さらに虚血性或いは非虚血性の性質の心筋症である。任意の心臓或いは循環器系疾患を患った患者がそのような治療から利益を得ると同時に、任意の条件によって心筋梗塞を患った患者は以下に検討されるような本発明の前記治療用細胞組成物を受け取ることにより利益を得る可能性がある。別の好ましい実施形態において、前記心臓或いは循環器系疾患は、血管形成、不整脈、アンギナ (狭心症)、大動脈弁狭窄、大動脈炎、不整脈、動脈硬化症、動脈炎、非対称性心室中隔肥大 (ASH)、アテローム硬化、アスリート心臓症候群、心房細動及び心房粗動、細菌性心内膜症、バーロー症候群 (僧帽弁逸脱)、徐脈、バージャー病 (閉塞性血栓性血管炎) 心肥大、心筋症、心臓炎、頸動脈症、動脈縮窄、先天性心疾患 (先天性心欠損)、先天性心不全 (心不全)、冠動脈疾患、アイゼンメンゲル症候群、塞栓症、心内膜炎、肢端紅痛症、細動、線維筋性異形成症、心ブロック、心雑音、高血圧、低血圧、特発性新生児動脈石灰化症、川崎病 (皮膚粘膜リンパ節症候群、皮膚粘膜リンパ節症、新生児多発性動脈炎)、代謝症候群、微小血管アンギナ、心筋梗塞 (心発

10

20

30

40

50

作)、心筋炎、発作性心房頻拍(PAT)、結節性動脈周囲炎(多発性動脈炎、結節性多発動脈炎)、心膜炎、末梢血管障害、静脈炎、肺動脈狭窄症(pulmonic stenosis)、レイノー病、腎動脈狭窄、腎血管性高血圧、リウマチ性心疾患、中隔欠損症、無症候性虚血、X症候群、頻脈、高安病、ファロー4徴症、大血管置換症、三尖弁閉鎖症、総動脈幹、心臓弁膜症、結節性潰瘍、静脈瘤、心室中隔欠損、ウォルフパーキンソン-ホワイト症候群、心内膜床欠損の1若しくはそれ以上を有する。

【0112】

さらに別の実施形態において、前記心臓或いは循環器系疾患は、急性リウマチ熱、急性リウマチ性心外膜炎、急性リウマチ性心内膜炎、急性リウマチ性心筋炎、慢性リウマチ性心疾患、僧帽弁の疾患、僧帽弁狭窄、リウマチ性僧帽弁不全、大動脈弁の疾患、別の心内膜構造の疾患、虚血性心疾患(急性及び亜急性)、狭心症、肺循環の疾患(急性肺心疾患、肺塞栓、慢性肺心疾患)後側弯症性心疾患、心外膜炎、心筋炎、心内膜炎、心内膜線維症、心内膜線維弾性症、房室ブロック、心臓リズム障害、心筋変性症、脳血管障害を含む循環器系疾患、脳実質外動脈の閉塞及び狭窄、脳動脈の閉塞、動脈、細動脈、毛細血管の疾患(アテローム性硬化症、不整脈)、静脈及びリンパ管の疾患、及び他の循環器系疾患の1若しくはそれ以上を含む。

【0113】

本明細書において提供される前記治療用組成物を受けた患者における改善の測定は、当業者に周知のあらゆる手段を含むが、好ましい改善は、これらに限定されるものではないが、心拍出量(CO)、心係数(CI)、肺動脈楔入圧(PAWP)、心係数(CI)、左室系短縮率(%FS)、駆出分画(EF)、左室駆出分画(LVEF)、左室拡張終末期径(LVEDD)、左室収縮末期圧(LVESD)、収縮力(例えば、 dp/dt)、血圧-容積ループ(pressure-volume loop)、心機能の測定を含む血行動態の測定における改善を含み、さらには心房、心室機能の上昇、拍出効率の上昇、拍出効率の損失率の減少、血行動態機能の損失の減少、及び心筋症に関連する合併症の減少を含む。例えば、特定の細胞産生物或いは因子の産生など、改善の生化学的測定も本明細書において考慮される。例えば、特定の酵素(或いはそれらの活性)、mRNA、転写因子、タンパク質、修飾されたタンパク質、脂質、ステロール、或いは同等物などの生物学的分子の有無は、心臓或いは循環器系の健康の改善と相関することが示される可能性があり、これらの改善の測定の使用も本明細書の使用のために考慮される。有益であるとみなされる組織学的変化、例えば、血管新生或いは改善した血管の兆候も改善の兆候として本明細書において考慮される。

【0114】

目下好ましい一部の実施形態において、前記方法は、間葉系に沿って、心筋性、血管原性及び血管性表現型へと分化し、さらには心筋細胞(cardiomyocytes)、内皮細胞、心筋細胞(myocardial cells)、心外膜細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞(例えば、血管平滑筋細胞)などの細胞に分化するか、或いは興奮性や伝導性システムの細胞、および上述の前駆体或いは原始類縁体へと分化する前記治療用分挽後由来細胞の誘導を有する。そのような細胞は、上記で議論され、前記細胞の分化のための方法と因子、及び、細胞の分化への誘導の評価、及び、そのような細胞の治療用組成物のための使用は、類似している。前記治療用細胞組成物は前記患者の心臓の中に組み込まれ、或いはまた、自然に存在する心臓幹細胞の存在のための、分化に対して成長又は刺激することの支援を提供する。治療用細胞は、細胞溶解物、或いは別の同種、同系、或いは自己の細胞とともに投与される。前記治療用細胞組成物の投与において運搬される前記細胞の生存は、それらの使用の成功或いは結果の決定因子ではなく、心臓或いは循環器系の健康における改善が決定付ける結果である。従って、前記細胞は、前記患者の心臓とともに或いは血管の中に取り込まれ拍動する必要はなく、むしろ、治療前後の患者の心臓或いは循環器系の健康における改善の指標が、心臓或いは循環器系の健康の目的の測定、及び前記患者の状態の自覚的な評価(自己評価を含む)の少なくとも1つを含むのが好ましい。成功的な治療は、従って、心筋症を患った患者を、前記PPDCを有する治療用細胞組成

物により、別の種類の細胞の有無に係らず、治療することを含む。例えば、これらに限定されるものではないが、前記 P P D C が前記患者の中に少なくとも部分的に取り込まれ、増殖し、生存するのが好ましい。別の好ましい実施形態において、前記患者は、例えば、幹細胞或いは心臓に存在する前駆細胞を含む別の細胞の成長を支持する前記 P P D C s の能力からの利益、前記組織の内部成長或いは血管新生からの利益、有益な細胞因子、ケモカイン、サイトカイン及び同等物の存在からの利益など前記治療から利益を経験するが、前記細胞は前記患者において、取り込まれたり、増殖しない。別の実施形態において、前記患者は P P D C s を用いた前記治療的処置から利益を得るが、前記細胞は、患者において長期間生存しない。ある実施形態において前記細胞は、数、生存力、又は生化学的活性が徐々に減少し、別の実施形態において、細胞における前記減少は、例えば、成長、分裂、或いは生化学的活性などの活性期間が先行されても良い。別の実施形態において、老化した細胞、活性のない細胞、或いは死んだ細胞でさえ、有益な治療効果を有することができる。

10

【0115】

前記投与は、好ましくは *in vivo* (生体内) において、移植 (*transplanting*)、移植 (*implanting*)、注入、融合、カテーテルによる運搬によるものであるか、或いは、基質-細胞複合体としての提供、或いは細胞治療を提供するために当業者に周知の他の方法である。

【0116】

いかなる状況により引き起こされる心筋梗塞を患った患者も本発明の前記治療用細胞を受けることにより利益を受けうる。そのような治療は、前記心臓病が発症した後、適切な治療的期間内に提供されるのが好ましい。現在、前記心筋梗塞の 30 日以内に、本発明の前記細胞或いは組成物を用いた治療が開始されるのが好ましい。1~21 日以内の治療は好ましい。例えば、前記細胞が前記損傷を受けた領域にとどまる静脈内注入によるなどの特定の用途の有益な効果は、より迅速な治療を可能にするということも本明細書では考慮される。例えば、前記心筋梗塞或いは類似の心臓病の発症と時間的に近い関連を有する治療が有益であるということは現在熟慮される。好ましい実施形態において、前記治療用細胞組成物による治療は、前記心臓病発症 24 時間以内である。12、8 或いは 4 時間以内の治療も好ましい。2 時間以内の治療はさらに好ましい。前記発症 1 時間以内の治療はさらに好ましく、30 分以内、15 分以内の治療はさらに好ましい。心筋梗塞の治療のために使用されるキットも本明細書において提供される。前記キットは、例えば、使用のための説明書と共に薬学的に許容可能な担体、アプリケーション、をあわせることによるなど薬学的に許容可能な形式で調製されうる前記治療用細胞組成物を提供する。理想的には、前記キットは、例えば、病院で、救急医療提供者により又は心筋梗塞或いは類似の心臓病発症を有していると診断された患者に適応されるように前記分野において利用されうる。

20

30

【0117】

本発明は、別の観点において、心臓或いは循環器系疾患を患った患者の治療のための方法も提供し、治療的分娩後由来細胞組成物を心臓或いは循環器系疾患を患った患者に投与する工程、及び心機能の改善のために前記患者を評価する工程を含み、前記投与が別のタイプの細胞集団のものである。共培養、混合集、或いは別の非クローンの集団が好ましい。特定の実施形態においては、ともに投与される別のタイプの細胞は、幹細胞であるが、別の実施形態においては、筋芽細胞、筋細胞、心筋芽細胞、心筋細胞、或いは筋芽細胞、筋細胞、心筋芽細胞、心筋細胞の前駆細胞が使用される。

40

【0118】

本明細書は、心臓或いは循環器系疾患を患った患者を治療する方法を提供し、この方法は、治療用分娩後由来細胞組成物を心臓或いは循環器系疾患を患った患者に投与する工程と、心機能における改善を前記患者において評価する工程とを含み、前記治療用細胞組成物は、基質-細胞複合体として投与される。特定の実施形態において、前記基質は、少なくとも前記分娩後由来細胞を含む好ましくは生理吸収性の骨格である。

【0119】

50

本発明の細胞集団及び共培養の治療的用途のためのキットも提供される。心筋症の治療或いは別の予定された治療のために使われるとき、前記キットは基質の有無にかかわらず、及び共培養の有無にかかわらず、治療用細胞組成物を含む。前記キットは、例えば、注入により前記細胞、及び、必要であれば、前記細胞に対して薬理的許容可能な担体を投与する手段をも選択的に含む。前記キットは、前記細胞の使用のための使用説明書を含む。軍事使用のような野戦病院のために調整されるキットは、組織骨格、外科用縫合物、及び同等物を含む全ての方法供給物を含み、前記細胞は急性心損傷の修復と連携して使用される。

【0120】

本発明は、本発明の組織、細胞、細胞集団および、治療用細胞組成物の貯蔵のためにも提供される。上述したように、前記細胞は、容易に冷凍保存される。それゆえ、本発明は、前記細胞を貯蔵所に冷凍保存する方法を提供し、前記細胞は冷凍保存され、前記細胞の免疫学的、生化学的、及び遺伝的特性によって、前記細胞の完全な特徴と関連させる。前記凍結細胞は、前記方法の要求及び前記患者の必要に応じて、自系、同系、或いは同種異系の治療のために使用される。各冷凍保存されたサンプルの前記情報は、外科医、方法及び前記細胞或いは集団の特性に基づいて成された適切なマッチングを有する患者の要求に基づいた検索可能なコンピュータ上に保存されるのが好ましい。好ましくは、本発明の前記細胞は、望ましい細胞量まで成長し増殖し、前記治療用細胞組成物は、基質或いは支持体の有無にかかわらず、単離されて或いは、共培養として、調整される。ある用途に対しては、新鮮に調整された細胞を使用するのが好ましいが、別の用途に対しては、冷凍保存され、細胞を凍結することにより貯蔵可能であり、前記サンプルとコンピュータ入力事項とを関連付けるために、前記情報をコンピュータに入力する。必ずしも、供給源或いは供給者とそのような細胞の受給者をマッチさせる必要はない場合でも、免疫学的目的のために、前記貯蔵システムは、例えば、前記貯蔵された細胞の望ましい生化学的或いは遺伝的特性を前記治療の必要性へとマッチするのを容易にする。前記粒子貯蔵されたサンプルの望ましい特性をマッチングする際、前記サンプルは、回収され治療用使用のために準備される。本明細書に記述されたように調整された細胞溶解物も本発明に従って、冷凍され保存されうる。

【0121】

本発明の別の観点において、前記成長及び維持のための、臍帯由来細胞の単離及び使用のためのキットが提供される。前記細胞、細胞溶解物、可溶性細胞分画、膜分画、及び基質は例えば、培養或いは移植のためのキットなどのキットの一部として都合よく利用される。本発明は、前記UDS及び付加的組成物を含むキットを提供し、例えば、基質（例えば骨格）物質、水分補給剤（例えば、生理食塩水、準備された細胞培養液）、細胞培養基剤（たとえば、培養ディッシュ、プレート、バイアルなど）、細胞培養液（液体或いは脱水された形体にかかわらず）、抗生物質、ホルモン、及び同等物と共に、前記細胞、又は細胞溶解物の成長、又は維持、単離、使用のための使用説明書を含む。成長のためのキットは、例えば、本明細書に使用されるように、例えば、胎児ウシ血清などの血清を含む前記成長培養液の全ての組成物を含み得る。前記キットがそのようないかなる組成物を含む一方で、前記キットは、対象とする使用のために必要な全ての材料を含むのが好ましい。望むならば、前記キットは、本明細書に記載されているように前記格子に播種される細胞（典型的には冷凍保存された）を含み得る。単離のためのキットは、本明細書に提供される前記単離方法を実施するために必要な全てを含むが、例外として、前記臍組織は、単離のときに、組織貯蔵から新鮮或いは凍結状態で取得される。上記に開示された方法に対する要求に応じて或いは好ましいものとして、前記緩衝液、培養液、細胞ろ過器、及び同等物が提供されるように、前記組織を単離するための前記外科的装置、好ましい酵素或いは安定した形態における酵素の選択が提供される。選択的な工程及び、選択的或いは代替的物質の供給物のリストを有する詳細な説明書も都合よく提供される。対照細胞は例えば前記ATCCに沈着した前記UDC培養など単離された前記細胞の比較のために含まれても良い。前記臍帯由来細胞を利用するためのキットは、好ましくは前記細胞集団或いは前

記細胞、組成物及び産生物を有する治療用組成物、上記に記載された前記細胞由来の分画
或いは条件培養液を含む。ある実施形態において、前記キットは少なくともUDC及び、
薬学的許容可能な担体（液体、半固体、固体）を含む1若しくはそれ以上の細胞集団を含
んでも良い。ある実施形態における前記細胞集団は均一であるか、或いはUDCsのクロ
ーン化された細胞株である。別の実施形態において、例えば前記キットは共培養中で使用
するための別の細胞株を有する。治療用適応キットは、抗血栓形成剤、抗炎症剤、抗アポ
トーシス剤、免疫抑制組成物、或いは免疫調整組成物などの望まれた付加的生理活性物質
を含むことが好ましい。前記キットは選択的に、例えば注入により前記細胞を投与する方
法を含んでも良い。前記キットは、前記細胞の使用のための使用説明書をさらに含んでも
良い。軍事行為における医療のために調整されたキットは、組織骨格、外科的縫合物、及び
同等物を含む全方法供給物を含み、前記細胞は急性損傷の修復にあたって使用される。
本明細書において記載されるアッセイと*in vitro*方法のためのキットは、（1）
UDCs或いは分画、UDCsの組成物或いは産生物、（2）前記*in vitro*方法
の実施のための試薬、（3）例えば、共培養のために適切な別の細胞或いは細胞集団、（
4）前記*in vitro*（試験管内）方法を実施するための使用説明書、の1若しくは
それ以上を含んでも良い。細胞由来組成物の調整のためのキットは前記細胞の成長に必要な
前記組成物、及び、目的の前記細胞分画の調整に必要な前記組成物の両方と、前記細胞
から得られる望ましい前記分画を獲得するための使用説明書を含んでも良い。条件培養液
の産生及び回収のためのキットは、本明細書に提供され、細胞、培養液、回収容器、説明
書、目的の分泌分子を試験するための標準物質、及び同等物を含む。

10

20

【0122】

以下の実施例では、本発明の実施形態のいくつかの観点を詳細に説明する。これらの実
施例は、本明細書に記載される本発明の観点をさらに説明するために提供されたものであ
り、ここに記載された本発明の観点を限定するものではない。

【実施例1】

【0123】

分娩後組織からの細胞の単離

要約

分娩後細胞は、臨月及び早産の胎盤及び臍帯組織から単離された。これら組織から細胞
を単離する非常に好ましい方法は、消化酵素の組み合わせを使用することによるものであ
った。特に、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、ディスパーゼが好ましかった。この組み
合わせは良い増殖能及び分化能を有する細胞集団をもたらした。別の酵素の組み合わせを
使用しても増殖する細胞集団が得られた。

30

【0124】

序文

胎盤及び臍帯組織からの細胞集団を単離した。分娩後臍及び胎盤は臨月或いは早産の妊
娠の出産より獲得した。細胞は5つの別々の提供者の臍及び胎盤組織から集めた。（1）
異なった表現型、幹細胞に共通した特長を有する細胞に分化する能力、或いは、（2）別
の細胞及び組織に有益な重要な栄養素を提供する能力を有する細胞回収能力のために、異
なる細胞単離法で試験した。

40

【0125】

方法と材料

臍帯細胞単離

臍帯は、National Disease Research Interchan
ge（NDRI、フィラデルフィア、ペンシルバニア州）から獲得した。前記組織は正常
分娩の後、獲得した。前記細胞単離方法は、層流カバー内で無菌的に行った。血液と壊死
組織片を除去するために、前記帯は、リン酸緩衝食塩水（PBS、Invitrogen
、カールスランド、カリフォルニア州）内で、100ミリリットルのPBS中10000
ユニットの抗真菌剤及び抗生物質の存在下で洗浄した。前記組織はその後、前記組織が分
割され細くなるまで、50ミリリットルの培養液（DMEM－低グルコース或いはDM

50

EM-高グルコース、Invitrogen)の存在下で、 150 cm^2 の組織培養プレート内に機械的に単離した。裁断された組織は50ミリリットルコニカルチューブ(チューブあたり約5グラムの組織)に移した。前記組織をその後、DMEM-低グルコース或いはDMEM-高グルコースの培養液中で消化し、各培養液は100ミリリットルのPBSあたり10000ユニットの抗真菌剤及び抗生物質、及び消化酵素を含ませた。一部の実施例において、コラゲナーゼおよびディスパーゼの混合酵素物を使用した。("C:D", 500ユニット/ミリリットルのコラゲナーゼ(Sigma、ミズーリ州セントルイス)、及び50ユニット/ミリリットルのディスパーゼ(Invitrogen)、DMEM-低グルコース培養液中において)別の実施例において、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、ヒアルロニダーゼ(C:D:H)が使用された(500ユニット/ミリリットルのコラゲナーゼ、50ユニット/ミリリットルのディスパーゼ、5ユニット/ミリリットルのヒアルロニダーゼ(Sigma)、DMEM-低グルコース中において)。前記組織、培養液、消化酵素を含む前記コニカルチューブは摂氏37℃、オービタルシェーカー(Enviro, ブルックリン、ニューヨーク州)で、225rpmで2時間、培養した。

【0126】

消化後、前記組織は5分間、 $150\times g$ で遠心分離し、上清を吸引した。ペレットは20ミリリットルの成長培養液(DMEM-低グルコース、(Invitrogen)、15%(v/v)ウシ胎児血清(FBS;規定化ウシ血清;ロット#AND18475;(Hyclone、ローガン、ユタ州)、0.0001%、(v/v)2-メルカプトエタノール(Sigma)、1ミリリットル/100ミリリットルの抗生物質/抗真菌剤(1ミリリットル当たり10000ユニットのペニシリン、1ミリリットル当たり10000マイクログラムのストレプトマイシン、1ミリリットル当たり25マイクログラムのアンフォテリシンB(Invitrogen、カールスバッド、カリフォルニア州))中で、再懸濁した。前記細胞懸濁液は70マイクロメートルのナイロン細胞ろ過器(Nalge Nuncインターナショナル社、ロチェスター、ニューヨーク州)を通過した。成長培養液を含むさらなる5ミリリットルの洗浄液を前記ろ過器に通した。前記細胞懸濁液をその後、40マイクロメートルのナイロン細胞ろ過器(Nalge Nuncインターナショナル)に通し、さらに5ミリリットルの成長培養液で洗浄した。

【0127】

前記ろ過液は、成長培養液(全量50ミリリットル)で再懸濁され、5分間、 $150\times g$ で遠心分離した。前記上清は、吸引し、前記細胞を50ミリリットルの新鮮な成長培養液に再懸濁した。この過程は後2回繰り返した。

【0128】

最後の遠心分離上清を吸引し、前記細胞ペレットを5ミリリットルの新鮮成長培養液に再懸濁した。生存細胞数は、トレパンブルー染色を用いて測定した。細胞はそれから標準条件下で培養された。

【0129】

臍帯細胞から単離した前記細胞は、成長培養液において、ゼラチンコーティングしたT-75 cm^2 のフラスコ(Corning、ニューヨーク州コーニング)上に、5000細胞/ cm^2 で播種した。2日後、使用済培養液を前記フラスコからその後吸引した。細胞は破砕物と血液由来細胞を除去するためにPBSで3度洗浄した。細胞は、成長培養液を補充し、コンフルエンス(継代0から約10日)になるまで増殖させ、継代1とした。次の継代において(継代1から2等)、細胞は4~5日でサブコンフルエンス(subconfluent)(75~85%コンフルエンス)に達した。このような次の継代のために、細胞は5000細胞/ cm^2 で播種した。細胞は、5%の二酸化炭素及び20%の酸素の湿潤インキュベータで摂氏37℃で増殖させた。

【0130】

胎盤細胞単離

胎盤組織は、NDRI(フィラデルフィア、ペンシルバニア州)から獲得された。前記組織は妊婦から、正常外科的出産のときに獲得した。胎盤細胞は、臍帯細胞単離のために

記載したように単離した。

【0131】

以下の記載は、胎盤組織から、母親由来と新生児由来の集団を分けて、単離するために適応した。

【0132】

前記細胞単離方法は、層流カバー内で無菌的に行った。前記胎盤組織は、可能な限り多くの血液と壊死組織片を除去するためにリン酸緩衝食塩水（PBS；Invitrogen、カルスバド、カリフォルニア州）内で、抗生物質および抗真菌剤（10000ユニット／ミリリットルのペニシリン、10000マイクログラム／ミリリットルのストレプトマイシン、25マイクログラム／ミリリットルのアンフォテリシンB；Invitrogen）の存在下で洗浄した。前記胎盤組織は、3つの部分にこれらの部分、すなわち、新生児の観点、前記絨毛部位、前記母親の観点に解体された。

【0133】

前記分解した部分は、個別に抗生物質及び、抗真菌剤を含んだPBSで数回洗浄し、血液と壊死組織片をさらに除去した。この方法において、実質上全ての血液は除去した。各部分はその後、50ミリリットルのDMEM－低グルコース（Invitrogen）の存在下で150cm²の組織培養プレート内で機械的に単離し粉々にした。前記破砕物は、50ミリリットルのコニカルチューブに移した。各チューブは約5グラムの組織を含んだ。前記組織は100ミリリットルのPBS中に10000ユニットの抗真菌剤及び抗生物質および消化酵素を含むDMEM－低グルコース或いはDMEM－高グルコースの培養液内で消化した。1部の実施例において、コラゲナーゼ及びディスパーゼの酵素混合物（C：D）を使用し、それは、DMEM－低グルコース培養液に500ユニット／ミリリットルのコラゲナーゼ（Sigma、ミズーリ州セントルイス）及び50ユニット／ミリリットルのディスパーゼ（Invitrogen）を含ませた。別の実施例において、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、及びヒアルロニダーゼの混合物（C：D：H）を使用した。（DMEM－低グルコース培養液に500ユニット／ミリリットルのコラゲナーゼ、50ユニット／ミリリットルのディスパーゼ及び5ユニット／ミリリットルのヒアルロニダーゼ（Sigma）を含む）。前記組織、培養液、及び消化酵素を含む前記コニカルチューブは2時間、摂氏37℃でオービタルシェーカー（Environ、ブルックリン、ニューヨーク州）の中で225rpmで培養した。

【0134】

消化後、前記組織は150xgで5分間遠心分離し、結果生じた上清は吸引した。前記ペレットは20ミリリットルの成長培養液で再懸濁された。前記細胞懸濁液は、70マイクロメートルのナイロン細胞ろ過器（Nalge Nuncインターナショナル社、ロチェスター、ニューヨーク州）を通過し、成長培養液5ミリリットルで洗い流した。前記全ての細胞懸濁液はその後、40マイクロメートルのナイロン細胞ろ過器（Nalge Nuncインターナショナル）を通過し、さらに5ミリリットルの成長培養液で洗い流した。

【0135】

前記ろ過液は、成長培養液（全量50ミリリットル）で再懸濁し、5分間、150xgで遠心分離した。前記上清は、吸引し、前記細胞ペレットを50ミリリットルの新鮮な成長培養液で再懸濁した。この工程は後2度繰り返した。最後の遠心分離の後、上清を吸引し、前記細胞ペレットを5ミリリットルの新鮮な成長培養液で再懸濁した。細胞数は、トレパンブルー排除試験を用いて測定した。細胞は標準条件下で培養した。

【0136】

L I B E R A S E細胞単離

細胞はL I B E R A S E（2.5ミリグラム／ミリリットルのBlendzyme3（Roche、インディアナポリス、インディアナ州）及びヒアルロニダーゼ（5ユニット／ミリリットル、Sigma）を含むDMEM－低グルコース中で分娩後組織から単離した。前記組織の消化及び前記細胞の単離は、上記の別の消化のために記載したように、C

：D 或いは C：D：H の酵素混合物ではなくて、前記 L I B E R A S E / ヒアルロニダーゼの混合物を用いた。L I B E R A S E による組織の消化は容易に増殖する分娩後組織からの細胞集団の単離をもたらした。

【0137】

別の酵素の組み合わせを使用した細胞単離

この方法は、異なる酵素の組み合わせを使用して臍帯からの細胞単離に対して比較したものである。消化のために比較した酵素は、i) コラゲナーゼ、ii) ディスパーゼ、iii) ヒアルロニダーゼ、iv) コラゲナーゼ、ディスパーゼ混合 (C：D)、v) コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ混合 (C：H)、vi) ディスパーゼ、ヒアルロニダーゼ混合 (D：H) vii) コラゲナーゼ、ディスパーゼ、ヒアルロニダーゼ混合 (C：D：H) を含む。これら異なった酵素消化条件を利用した細胞単離において違いが観察された (表 1-1)。

10

【0138】

前記臍帯における残留する血液からの単離

臍帯からの細胞貯蔵物を単離するために異なる方法によって別の試みを行った。一つの例においては、臍帯をスライスし、成長培養液で洗浄し、血液塊およびゼラチン状物質を除去した。血液、ゼラチン状物質及び成長培養液の前記混合物を集め、150 x g で遠心分離した。前記ペレットを、再懸濁した、成長培養液を含むゼラチンコーティングされたフラスコ上に播種した。容易に増殖する細胞集団を単離した。

20

【0139】

臍帯血からの細胞の単離

細胞は N D R I から得られた臍帯血サンプルから単離した。本明細書において使用した前記単離方法は、H o r a による国際特許出願第 W O 0 3 / 0 2 5 1 4 9 号のものであった。臍帯血 (N D R I、フィラデルフィア、ペンシルバニア州) のサンプル (それぞれ、50 ミリリットル及び 10.5 ミリリットル) は溶解緩衝液 (ろ過滅菌した 155 ミリモル濃度の塩化アンモニウム、10 ミリモル濃度の炭酸水素カリウム、pH を 7.2 に緩衝された 0.1 ミリモル濃度の E D T A で (全ての組成物は、S i g m a、ミズーリ州セントルイス)) と混合した。細胞は臍帯と溶解緩衝液の割合が 1：20 の割合で溶解した。前記得られた細胞懸濁を 5 秒間ボルテックスし、2 分間、外界温度で培養した。前記溶解物質は遠心分離した (10 分、200 x g)。前記細胞ペレットを、10% ウシ胎児血清 (H y c l o n e、ローガン、ユタ州)、4 ミリモル濃度のグルタミン (M e d i a t e c h、バージニア州ヘルンドン)、100 ユニット / 100 ミリリットルのペニシリン及び 100 マイクログラム / 100 ミリリットルのストレプトマイシン (G i b c o、カールスバッド、カリフォルニア州) を含む完全最小培養液 (G i b c o、カールスバッド、カリフォルニア州) 中に再懸濁した。前記再懸濁された細胞は、遠心分離した (10 分、200 x g)、前記上清を吸引し、前記細胞ペレットを完全培養液で洗浄した。この細胞を T 7 5 フラスコ (C o r n i n g、ニューヨーク)、T 7 5 ラミネンコーティングされたフラスコ或いは T 1 7 5 フィブロンectinコーティングされたフラスコ (ともにベクトンディキンソン社、ベドフォード、MA) 中に直接播種した。

30

【0140】

異なった酵素の組み合わせ及び成長条件を用いた分娩後細胞の単離

細胞集団を、異なった条件で単離し、さまざまな条件の下で、単離直後に増殖可能かどうかを決定するために、細胞は、上記に提供した方法に従って、前記 C：D：H 酵素の組み合わせを使用し、0.001% の (v/v) 2-メルカプトエタノール (S i g m a、ミズーリ州セントルイス) の有無にかかわらず、成長培養液中で消化した。このように単離した胎盤細胞を様々な条件下で播種した。全ての細胞はペニシリン / ストレプトマイシンの存在下で増殖させた。(表 1-2)。

40

【0141】

異なった酵素の組み合わせ及び成長条件を使用した分娩後細胞の単離

試験した全ての条件において、細胞は接着し、約継代 0 から 1 までよく増殖した。(表

50

1～2)。条件5～8及び13～16のもとで細胞は播種した後、継代4までよく増殖し、その時点で細胞を冷凍保存した。全ての細胞は、後の実験のために貯蔵した。

【0142】

結果

異なった酵素の組み合わせを使用した細胞単離

前記C：D：Hの酵素の組み合わせは、単離された後、最良の細胞産生を提供し、前記別の条件よりも培養においてより多くの世代へと増殖する細胞を産生した（表1）。増殖可能な細胞集団は、コラゲナーゼ或いはヒアルロニダーゼ単独の使用では達成しなかった。この結果が、試験したコラゲナーゼに対して特異的であるかどうかを決めるための試みはしなかった。

10

【0143】

異なった酵素の組み合わせ及び成長条件を使用した分娩後細胞の単離

細胞は、酵素消化及び成長のために試験された全ての条件の下で約継代0から1までよく接着し、増殖した（表1-2）。実験的条件5～8、及び13～16において、細胞は、播種後、4継代までよく増殖し、その時点で、冷凍保存した。全ての細胞は更なる実験のために貯蔵した。

【0144】

前記臍帯の残留血液からの細胞単離

有核の細胞は接着し、素早く増殖した。これら細胞はフローサイトメトリーで分析し、酵素消化により得られた細胞に類似していた。

20

【0145】

臍帯からの細胞の単離

調整物は赤血球と血小板を含むものであった。有核の細胞は、最初の3週間、接着も分裂もしなかった。前記培養液は播種後、3週後に取替え、細胞の接着も成長も観察されなかった。

【0146】

考察と結論

細胞集団は臍及び胎盤組織から、コラゲナーゼ（メタロプロテアーゼ）、ディスパーゼ（中性プロテアーゼ）及びヒアルロニダーゼ（ヒアルロン酸を分解する粘膜溶解酵素）の酵素の組み合わせを使用して最も効果的に単離された。コラゲナーゼと別のプロテアーゼの商用混合物である、LIBERASE Blendzymeを、使用した。本研究では、コラゲナーゼ（4Wunsch ユニット／g）及びテルモリシン（1714カゼイン ユニット／g）を含むBlendzyme 3もまた細胞を単離するためにヒアルロニダーゼとともに使用した。これら酵素を用いて単離した細胞は、例えば、ゼラチンコーティングされたプラスチック上の成長培養液中で培養した場合、数継代にわたりよく増殖した。

30

【0147】

細胞は、前記臍帯中の残留血液からも単離されたが、臍帯血からは単離しなかった。前記使用条件下で接着し、増殖させた、前記組織から洗い流された血液塊中の細胞の存在は、前記解体過程で放出された細胞によるかもしれない。別の説明は、前記基質から細胞が移動したことを含むかもしれない。

40

【0148】

推奨

分娩後組織から細胞集団を単離するためにはC：D：Hの酵素の組み合わせの使用が好ましい。この酵素の組み合わせを使用して単離した細胞は、広く特徴付けられ、多くの望ましい特性を有している。LIBERASEで抽出した細胞及び別の酵素の組み合わせにより処理した細胞は増殖能を有する細胞を提供する。前記組織を最小限に取り扱い移動するのを手助けする細胞単離のための過程や方法を選択することは有益である。そのような方法は、例えば、ブレンダー、組織ホモジナイザー、及び同等物などの機械的消化を含んでもよい。

【0149】

50

参照

S1. HO, Tony. W. ; KOPEN, Gene, C; RIGHTER, William, F. ; RUTKOWSKI, J. , Lynn; HERRING, W. , Joseph; RAGAGLIA, Vanessa; WAGNER, Joseph WO2003025149A2 CELL POPULATIONS WHICH CO-EXPRESS CD49C AND CD90, NEURONYX, INC. Application No. PCT/US02/029971, Filed 20020920, A2 Published 20030327, A3 Published 20031218

【0150】

【表1】

10

表 1-1: 様々な酵素の組み合わせを用いた臍帯組織からの細胞単離

酵素消化	単離された細胞	細胞の増殖
コラゲナーゼ	X	X
ディスパーゼ	+ (>10 時間)	+
ヒアルロニダーゼ	X	X
コラゲナーゼ:ディスパーゼ	++ (<3 時間)	++
コラゲナーゼ:ヒアルロニダーゼ	++ (<3 時間)	+
ディスパーゼ:ヒアルロニダーゼ	+ (>10 時間)	+
コラゲナーゼ:ディスパーゼ:ヒアルロニダーゼ	+++ (<3 時間)	+++

Key: += 良い, ++ = 非常に良い, +++ = 最高, X = 失敗

20

【0151】

30

【表 2】

表 1-2. 様々な条件下での胎盤細胞の単離及び培養増殖:

条件	培養液	FBS	BME	ゼラチン	O ₂	成長因子
1	DMEM-Lg	15%	Y	Y	20%	N
2	DMEM-Lg	15%	Y	Y	5%	N
3	DMEM-Lg	15%	Y	N	20%	N
4	DMEM-Lg	15%	Y	N	5%	N
5	DMEM-Lg	2%	Y	N (ラミニン)	20%	EGF/FGF (20 ng/ml)
6	DMEM-Lg	2%	Y	N (ラミニン)	5%	EGF/FGF (20 ng/ml)
7	DMEM-Lg	2%	Y	N (フィブロネクチン)	20%	PDGF/VEGF
8	DMEM-Lg	2%	Y	N (フィブロネクチン)	5%	PDGF/VEGF
9	DMEM-Lg	15%	N	Y	20%	N
10	DMEM-Lg	15%	N	Y	5%	N
11	DMEM-Lg	15%	N	N	20%	N
12	DMEM-Lg	15%	N	N	5%	N
13	DMEM-Lg	2%	N	N (ラミニン)	20%	EGF/FGF (20 ng/ml)
14	DMEM-Lg	2%	N	N (ラミニン)	5%	EGF/FGF (20 ng/ml)
15	DMEM-Lg	2%	N	N (フィブロネクチン)	20%	PDGF/VEGF
16	DMEM-Lg	2%	N	N (フィブロネクチン)	5%	PDGF/VEGF

【実施例 2】

【0152】

分娩後細胞の成長特性

要約

市販の細胞の産生物は、前記治療を必要とする患者に対して、治療的処置を提供するために十分な量で産生されなければならない。分娩後細胞はそのような目的のために培養中で増殖可能であった。培養中での分娩後細胞の成長は、間葉系幹細胞を含む別の細胞集団の成長と比較した。前記データは本明細書に開示したような分娩後細胞株が、例えば、前臨床的貯蔵のために、十分な細胞数を提供するために40倍加数以上増殖することができることを示した。さらに、これら分娩後由来細胞は低或いは高密度の播種からでも、よく増殖しうるものであった。この研究は、対照的に、間葉系幹細胞は増殖し、大量の細胞を獲得することはできなかった。

【0153】

序文

前記分娩後細胞の増殖能力を、別に単離した幹細胞の集団と比較した。細胞が増殖し老化する本技術はヘイフリックの限界 (Hayflick L. 老化の戦略 Gerontologist 14 (1): 37-45, 1974) として参照される。老化は、細胞分裂が完全に止まる時点、すなわち、前記細胞が増殖及び拡大する能力を失う時点として定義される。分娩後由来細胞は、それらは十分な細胞数へと容易に増殖することができるた

めの治療用使用のために非常に適しているからである。

【0154】

材料と方法

ゼラチンコーティングされたフラスコ

組織培養プラスチックフラスコは20ミリリットルの2% (w/v) ゼラチン (タイプ B: 225 ブルーム, Sigma、ミズーリ州セントルイス) 溶液を各T75フラスコ (Corning、ニューヨーク州コーニング) に室温、20分でコーティングした。前記ゼラチン溶液を除去した後、10ミリリットルのリン酸緩衝食塩水 (PBS) (Invitrogen、カールスバッド、カリフォルニア州) を加え、その後吸引した。

【0155】

分娩後細胞と別の幹細胞及び非幹細胞集団の増殖能の比較

成長増殖能の比較のために、以下の細胞集団、1) 間葉系幹細胞 (MSC; Cambrex、ウォークースビル、MD)、2) 脂肪由来細胞 (US6555374B1; 米国特許出願第US20040058412)、3) 正常皮膚線維芽細胞 (cc-2509ロット#9F0844; Cambrex、ウォークースビル、MD)、4) 臍帯由来細胞、及び5) 胎盤由来細胞を利用した。この細胞は、まず、ゼラチンコーティングしたT75フラスコ上の成長培養液中に5000細胞/cm²で播種した。

【0156】

次の継代のために、細胞培養液を次のように処理した。トリプシン処理後、生細胞をトレパンブルー染色後に数えた。細胞懸濁液 (50マイクロリットル) をトレパンブルー (50ml, Sigma、ミズーリ州セントルイス) と混合した。生細胞数は血球計算板を用いて測定した。

【0157】

計測後、細胞はゼラチンコーティングしたT75フラスコ上に、25mlの新鮮成長培養液中5000細胞/cm²で播種した。細胞は、標準空気条件下 (5%二酸化炭素) 37℃で、20%の酸素及び75%の窒素の存在下で増殖させた。前記成長培養液は、週に2度変えた。細胞が約85%コンフルエンスになった時点で継代した。この工程は、前記細胞が老化に達するまで繰り返した。

【0158】

各継代において、細胞をトリプシン処理して数えた。前記生細胞収率、集団倍加数および倍加時間を計算した。適正な細胞増加を測定する目的のために、継代あたりの総細胞収率は前の継代に対する前記総収率に各継代に対する増加因子を掛けることにより決定した (すなわち、増加因子 = 最終細胞 / 最初の細胞)。

【0159】

低密度での貯蔵細胞の増殖能

10継代で貯蔵した細胞の増殖能も試験した。異なった条件設定を使用した。正常皮膚線維芽細胞 (cc-2509ロット#9F0844; Cambrex、ウォークースビル、MD)、臍帯由来細胞、及び胎盤由来細胞について検討した。これらの細胞集団は、先に10継代で貯蔵し、各継代で、5000細胞/cm²で培養した。細胞が10継代で解凍した後、前記細胞集団の細胞密度の効果を検討した。細胞を標準な条件の下で解凍し、トレパンブルー染色を用いて数を数えた。解凍した細胞はその後、成長培養液中に1000細胞/cm²で播種した。細胞は標準空気条件下37℃で増殖させた。成長培養液は週に2度取り替えて、細胞が85%のコンフルエンスに達したときに継代した。細胞は老化、すなわち、それ以上増殖できないまで、継代した。細胞は各継代において、トリプシン処理し、数を数えた。前記細胞収率、集団倍加数、倍加時間を測定した。継代あたりの総細胞収率は、前の継代に対する前記総収率に各継代に対する増加因子を掛けることにより決定した (すなわち、増加因子 = 最終細胞 / 最初の細胞)。

【0160】

最初の細胞播種から低密度での分娩後細胞の増殖

低細胞播種条件下で新鮮に単離した分娩後細胞培養物の増殖能は別の実験において検

10

20

30

40

50

討した。臍及び胎盤細胞は本明細書に記載されているように単離した。細胞は上述のように1000細胞/cm²で播種し、老化まで継代した。細胞は標準空気条件下、37℃で増殖させた。成長培養液は週に2度取り替えた。細胞は約85%のコンフルエンスに達するように継代した。各継代において、細胞をトリプシン処理し、トレパンブルー染色により数を数えた。前記細胞収率、集団倍加数、及び倍加時間は各継代対して計算した。継代あたりの総細胞収率は、前の継代に対する前記総収率に各継代に対する増加因子を掛けることにより決定した（すなわち、増加因子＝最終細胞／最初の細胞）。細胞は、ゼラチンコーティングした、およびゼラチンコーティングしていないフラスコ上で増殖させた。

【0161】

クローン性新生児胎盤細胞の増殖

クローニングは、胎盤組織からうまく得られた新生児細胞集団を増殖するために使用した。前記胎盤からの3つの異なった細胞集団を単離した後（本明細書に記載されるように）、これら細胞集団を標準成長条件下で増殖し、その後前記単離した細胞集団の同一性を明らかにする為に核型を決めた。これら細胞は男児を出産した母親から単離したので、分裂中期伸展を行うことにより、男女の染色体を区別することは非常に単純であった。これらの実験は、前記新生児の観点から単離した細胞が、主に新生児表現型に対して核型陽性であり、前記母体の観点から単離した細胞が、主に母体細胞に対して核型陽性であり、前記絨毛部位から単離した細胞は、新生児及び母体の表現型に対して核型陽性であることを示した。新生児及び母体の観点に由来する集団のサブクローニングは、クローン性集団が、新生児及び母体の両方の細胞で得られることを確実にするために、必要とされる。

【0162】

低酸素培養条件における細胞増殖

低酸素細胞培養条件はある環境において細胞増殖を改善しうることが示されている（Csete, Marie; Doyle, John; Wold, Barbara J; McKay, Ron; Studer, Lorenz. 中枢神経系前駆細胞の低酸素培養 US 20040005704）。細胞培養条件を変えることにより、分娩後由来細胞の増殖が改善するかどうかを決定するために、臍帯由来細胞の培養物を低酸素条件中で増殖させた。細胞は、ゼラチンでコーティングフラスコ上に、成長培養液中5000細胞/cm²で播種した。初めは細胞を5継代まで標準空気条件下で培養し、この時点で低酸素（5%酸素）培養条件に転換した。

【0163】

別の成長条件

別の実験において、細胞は非コーティング、コラーゲンコーティング、フィブロネクチンコーティング、ラミニンコーティング、及びマトリジェルコーティングされたプレート上で増殖した。培養物は、これら異なった基質上でよく増殖することが示された。

【0164】

結果

分娩後細胞と、他の幹細胞及び非幹細胞の増殖能の比較

臍由来及び胎盤由来細胞の両方は40継代以上増殖し、60日で1E17細胞以上の細胞収率を生み出した。対照的に、MSCs及び線維芽細胞は、それぞれ、25日以内、および、60日以内に老化した。脂肪由来及び、大網細胞の両方が、ほぼ60日間増殖したが、それらは、それぞれ、4.5E12及び4.24E13の全細胞収率を生み出した。従って、前記利用した実験条件下で5000細胞/cm²播種した場合、分娩後由来細胞は、前記同じ条件下で、前記別のタイプの細胞に比べかなり多く増殖した（表1）。

【0165】

低密度における貯蔵細胞の増殖能

臍帯由来細胞、胎盤由来細胞、及び線維芽細胞は10継代以上増殖し、60日で1E11細胞以上の細胞収率を生み出した。これらの条件下で、前記線維芽細胞は、60日後に老化したが、前記臍由来及び胎盤由来細胞集団は、80日後に老化し、それぞれ50以上、及び40以上の集団倍加数に達した。

【0166】

最初の細胞播種からの低密度における分娩後細胞の増殖

胎盤由来細胞は低密度（1000細胞/cm²）で、ゼラチンコーティング及び非コーティングしたプレート或いはフラスコ上で増殖した。このような条件下でこれら細胞の成長能は良いものであった。前記細胞は対数成長で増殖した。細胞増殖率は、胎盤由来細胞をゼラチンコーティングフラスコ上において成長培養液中5000細胞/cm²で播種した場合に観察されるものと類似していた。非コーティング或いはゼラチンコーティングされたフラスコ上での培養において、細胞増殖能に違いは観察されなかった。しかしながら、ゼラチンコーティングフラスコ上で細胞はより小さい表現型を現し、非コーティングされたフラスコ上でより大きな細胞表現型が観察された。

10

【0167】

クローン性新生児及び母胎盤細胞の増殖

前記胎盤の前記新生児及び母体の観点から単離された胎盤由来細胞の細胞集団の増殖を研究した。新生児及び母体の観点に由来する集団は連続的に希釈し、96ウェルゼラチンコーティングプレート内において1細胞/ウェルで増殖するために、成長培養液中、ゼラチンコーティングプレート上に播種した。この最初のクローニングから増殖するクローンを同定し、トリプシン処理し、成長培養液中、12ウェルゼラチンコーティングプレート内に再び播種し、その後成長培養液中5000細胞/cm²でT25ゼラチンコーティングフラスコ上で継代した。その後、クローン性細胞集団が同一であることを確実にするためにサブクローニングを行った。サブクローニングの実験のために、細胞をトリプシン処理し、0.5細胞/ウェルで再び播種した。その後、よく増殖させた前記サブクローンは、5,000細胞/cm²でゼラチンコーティングT25フラスコにおいて増殖させた。細胞はT75フラスコ内で5000細胞/cm²で継代した。そのように誘導したクローンは新生児或いは母体の性質であることが核型により確認された。

20

【0168】

低酸素培養条件における細胞増殖

細胞は低減酸素条件下において良く増殖したが、低酸素条件下の培養物は分娩後由来細胞に対する細胞増殖において顕著な効果を有しているようには思われなかった。このような結果は、低減酸素の効果に関してなされた任意の最終的結論が、最初の単離から低酸素において細胞成長する実験から得られるデータを含むべきであるという意味では、予備的なものである。標準的な空気条件は既に十分な細胞数の成長の成功を証明しており、低酸素培養は分娩後由来細胞の成長に耐えうるが必要なものではない。

30

【0169】

考察と結論

約5000細胞/cm²の密度で、成長培養液中、ゼラチンコーティング或いは非コーティングされたフラスコ上、標準空気酸素下で単離させた分娩後由来細胞が成長する細胞増殖条件は、11継代で多数の細胞を産生するのに十分である。さらに、前記データは、前記細胞がより低密度培養条件（例えば、1000細胞/cm²）の使用で、容易に増殖できることを提案している。これらの条件を成長のために利用する場合、細胞増殖能における増加的改善は見られないが、低酸素条件下における分娩後由来細胞の増殖は細胞増殖を促進する。現在、標準空気条件下における分娩後由来細胞の培養は、細胞の大きな貯蔵を生み出すために好ましい。しかしながら、前記細胞条件を変える場合、分娩後由来細胞の増殖は同様に变化しうる。この方法は、このような細胞集団の増殖及び分化の能力を高めるために使用されうるものである。

40

【0170】

前記利用条件下で、MSC及び脂肪由来細胞の前記増殖が限定されているとき、分娩後由来細胞は容易に多く増殖する。

【0171】

推薦：

分娩後由来細胞培養の増殖及びスケールアップを最適化するために、細胞増殖のための

50

新しい方法、培養液条件、細胞接着と細胞密度のための細胞外基質を用いた更なる作業は有益であろう。しかしながら、これら全ての変化により、前記細胞能は、再び決定されなければならない。

【0172】

参照

1) Hayflick L. The Longevity of cultured human human cells. J Am Geriatr Soc. 1974 Jan, 22 (1) : 1-12

2) Hayflick L. The strategy of senescence. Gerontologist. 1974 Feb; 14 (1) : 37-45

3) 特許US20040058412

4) 特許US20040048372

5) (Csete, Marie; (Ann Arbor, MI); Doyle, John (South Pasadena, CA); Wold, Barbara J; (San Marino, CA); McKay, Ron (Bethesda, MD); Studer, Lorenz; (New York, NY). Low oxygen culturing of central nervous system progenitor cells. US20040005704)

【0173】

【表3】

10

20

表 3-1. 老化まで培養された異なる細胞集団の成長特性

細胞タイプ	老化	集団倍加の総数	全細胞数
MSC	24 日	8	4.72 E7
脂肪	57 日	24	4.5 E12
繊維芽細胞	53 日	26	2.82 E13
臍帯	65 日	42	6.15 E17
胎盤	80 日	46	2.49 E19

30

【0174】

【表 4】

表 3-2. 継代10から老化までの低密度成長増幅を用いた異なる細胞集団群の成長特性

細胞タイプ	老化	集団倍加の総数	全細胞数
繊維芽細胞 (P10)	80 日	43.68	2.59 E11
臍帯(P10)	80 日	53.6	1.25 E14
胎盤(P10)	60 日	32.96	6.09 E12

10

【実施例 3】

【0175】

D-バリンを含む培養液中における分娩後細胞の成長
要約

L-バリンイソ型ではなく、D-バリンを含む培養液は、培養中で線維芽細胞葉細胞の増殖を選択的に阻害すると報告されている。分娩後由来細胞がD-バリンを含む培養液中で成長できるかどうかを決定するために、胎盤及び臍帯由来細胞はD-バリンを含む培養液中で4週間増殖させた。前記細胞は増殖せず、最終的に死滅した。D-バリンを含む培養液は分娩後由来細胞の選択的な成長に適さない。L-バリンは分娩後由来細胞の増殖及び長期生存に必要である。

20

【0176】

序文

前記正常L-バリンイソ型の代わりにD-バリンを含む培養液が、培養中で線維芽様細胞の成長を選択的に阻害するために使用されることが報告されている。(Hongpaian, 2000; Sordilloら。1988) 分娩後由来細胞がD-バリンを含む培養液中で成長できるかどうかは、以前に知られていなかった。

30

【0177】

方法と材料

胎盤由来細胞(P3)、線維芽細胞(P9)、臍帯由来細胞(P5)はゼラチンコーティングされたT75フラスコ(Corning、ニューヨーク州コーニング)に 5×10^3 細胞/cm²で播種した。24時間後、前記培養液を除去し、前記細胞をリン酸緩衝食塩水(PBS)(Gibco、カールスバド、カリフォルニア州)で洗浄し、残留培養液を除去した。前記培養液は、修正成長培養液(D-バリン(Gibcoからの特注)、15%透析胎児ウシ血清(Hyclone、ローガン、ユタ州)、0.001%ベータメルカプトエタノール(Sigma)、ペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco)を含むDMEM)で置き換えた。

40

【0178】

結果

胎盤由来細胞、臍帯由来細胞、及び線維芽細胞は透析血清を含む成長培養液に播種した細胞と異なり、D-バリンを含む培養液中で増殖しなかった。線維芽細胞は、形態学的に変化し、大きさを増し、形状が変化した。全ての細胞は死滅し、結果的に4週後にフラスコ表面からはがれた。

【0179】

考察と結論

分娩後由来細胞は細胞成長及び長期生存率を維持するためにL-バリンを必要とする。

50

従って、L-バリンは、分娩後由来細胞のために前記成長培養液から除去するべきではない。

【0180】

参照

Hongpaisan J. (2000) Inhibition of contaminating fibroblasts by D-valine in culture of smooth muscle cells from human myometrium. Cell Biol Int. 24:1-7

Sordillo LM, Oliver SP, Akers RM. (1988) Culture of bovine mammary epithelial cells in D-valine modified medium: selective removal of contaminating fibroblasts. Cell Biol Int Rep. 12:355-64.

10

【実施例4】

【0181】

PPDCsの核型分析

細胞治療に使用される細胞株は、均一で、いかなるの細胞タイプも混入していないことが好ましい。細胞治療に使用される細胞は正常の染色体数(46)および構造を有するべきである。均一で、非分娩後由来組織起源を含まない分娩後胎盤及び臍帯細胞株を同定するために、細胞サンプルの核型を分析した。

20

【0182】

方法と材料

新生男児の分娩組織からのPPDCを成長培養液で培養した。新生男児(X, Y)からの分娩後組織は、新生児細胞と母体由来細胞(X, X)を区別可能にするために選択した。細胞はT25フラスコ(Corning、コーニング、ニューヨーク)内で成長培養液中に、5000細胞/cm²で播種し、80%コンフルエンスに増殖した。細胞を含むT25フラスコはそのネックのところまで成長培養液で満たされた。サンプルは、臨床細胞遺伝学研究室へ宅配業者により配達した(研究室から研究室への推定輸送時間は1時間)。染色体分析は、ニューヨーク州、ニューアーク、ニュージャージー医科大学にあるヒト及び分子遺伝センターにおいて行った。細胞は、染色体がもっとも視覚化される分裂中期の間に分析した。計測した分裂中期中の20細胞のうち、5つは正常均一核数(2)のために分析された。2つの核型が観察される場合に、細胞サンプルは均一であるとして特徴付けた。2つ以上の核型が観察される場合に、細胞サンプルは、不均一であるとして特徴付けた。不均一な核数(4)が同定された場合、さらに分裂中期細胞を計測し分析した。

30

【0183】

結果

染色体分析のために送った全ての細胞サンプルは、遺伝学研究室のスタッフにより、正常型であるとして解釈された。分析した16の細胞株のうち3つは、不均一な表現型(XX及びXY)を示し、そのことは、新生児及び母体起源の両方の細胞の存在を示唆する(表4-1)。胎盤-N組織由来細胞は胎盤の前記新生児観点から単離した。0継代の時点で、この細胞株は均一なXYを現した。しかしながら、9継代の時点で、前記細胞株は、不均一(XX/XY)を示し、このことは、以前は検出不可能であった母体起源の細胞の存在を示す。

40

【0184】

【表 5】

表 4-1. PPDCs の核型結果

組織	継代	計数された中期の細胞	分析された中期の細胞	核型数	ISCN 核型
胎盤	22	20	5	2	46,XX
臍帯	23	20	5	2	46,XX
臍帯	6	20	5	2	46,XY
胎盤	2	20	5	2	46,XX
臍帯	3	20	5	2	46,XX
胎盤-N	0	20	5	2	46,XY
胎盤-V	0	20	5	2	46,XY
胎盤-M	0	21	5	4	46,XY[18]/46,XX[3]
胎盤-M	4	20	5	2	46,XX
胎盤-N	9	25	5	4	46,XY[5]/46,XX[20]
胎盤-N C1	1	20	5	2	46,XY
胎盤-N C3	1	20	5	4	46,XY[2]/46,XX[18]
胎盤-N C4	1	20	5	2	46,XY
胎盤-N C15	1	20	5	2	46,XY
胎盤-N C20	1	20	5	2	46,XY

キー: N-新生児側、V-絨毛域、M-母性側、C-クローン

【0185】

要約

臨床細胞遺伝学研究室によって解釈されたように、染色体分析によって核型が正常と思われる胎盤及び臍帯由来 PPDCs を同定した。均一核型を決定したように、核型分析によって母細胞を含まない細胞株も同定した。

【実施例 5】

【0186】

フローサイトメトリーによる分娩後由来細胞表面マーカーの評価

要約

蛍光モノクローナル抗体で標識した培養細胞株のフローサイトメトリーによる細胞表面タンパク質発現或いは、"マーカー"の特徴は、細胞株の識別の測定を可能にする。胎盤及び臍由来分娩後細胞は、フローサイトメトリーにより、CD10、CD13、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD117、CD141、PDGFr-アルファ、HLA-A、B、C、及びHLA-DR、DP、DQの細胞表面マーカーの発現により特徴付けた。胎盤及び臍由来のいずれの分娩後細胞も、CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr-アルファ、HLA-A、B、Cを陽性に発現し、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD117、CD141、及びHLA-DR、DP、DQを陰性に発現した。この発現パターンは、単離において使用した、細胞ドナー、継代、培養容器表面コーティング、及び消化酵素などの変数を超えて、一貫していた。この発現パターンは、前記胎盤の母体観点、新生児観点、及び絨毛領域から単離された細胞においても一貫していた。

【0187】

序文

フローサイトメトリーによる細胞表面タンパク質或いは"マーカー"の特徴は細胞株の識別を測定するために使用されうる。前記発現の一貫性は、多数のドナーから、及び異なった工程及び培養条件に暴露した細胞において測定できる。前記胎盤及び臍から単離した分娩後細胞株は、(フローサイトメトリーにより)特徴付けられ、これらの細胞株の同定の

ための分析結果が提供された。

【0188】

材料と方法

培養液

細胞は成長培養液中で培養した。

【0189】

培養容器

細胞はコンフルエンスになるまで、プラズマ処理したT75、T150、及びT225組織培養フラスコ（Corning、ニューヨーク州コーニング）中で培養した。前記フラスコの成長表面は、2%（w/v）ゼラチン（Sigma、ミズーリ州セントルイス）を20分間、室温で培養することによりゼラチンでコーティングした。

10

【0190】

抗体染色

フラスコに接着した細胞は、リン酸緩衝食塩水（PBS）（Gibco、カールスバド、ミズーリ州）で洗浄し、トリプシン／EDTA（Gibco、カールスバド、ミズーリ州）ではがした。細胞を収穫し、遠心分離し、3%（v/v）FBSを含むPBSで 1×10^7 ／ミリリットルとなるように再懸濁した。前記製造者の規格に従い、目的の細胞表面マーカーに対する抗体（以下を参照）を100マイクロリットルの細胞懸濁に加え、この混合物を前記暗室で30分間、4℃で培養した。培養後、細胞をPBSで洗浄し、結合していない抗体を除去するために遠心分離した。細胞は500マイクロリットルのPBSに再懸濁し、フローサイトメトリーにより分析した。

20

【0191】

フローサイトメトリー分析

フローサイトメトリー分析は、FACSカリバーインストルメント（Becton Dickinson、カリフォルニア州、サンホセ）によって行った。

【0192】

細胞表面マーカーに対する抗体

細胞表面マーカーに対して以下の抗体を使用した。

【0193】

【表 6】

表 5 細胞表面マーカーに対する抗体

抗体	製造業者	カタログ番号
CD10	BD Pharmingen (サンディエゴ、カリフォルニア州)	555375
CD13	BD Pharmingen (サンディエゴ、カリフォルニア州)	555394
CD31	BD Pharmingen (サンディエゴ、カリフォルニア州)	555446
CD34	BD Pharmingen (サンディエゴ、カリフォルニア州)	555821
CD44	BD Pharmingen (サンディエゴ、カリフォルニア州)	555478
CD45RA	BD Pharmingen (サンディエゴ、カリフォルニア州)	555489
CD73	BD Pharmingen (サンディエゴ、カリフォルニア州)	550257
CD90	BD Pharmingen (サンディエゴ、カリフォルニア州)	555596
CD117	BD Biosciences (サンホセ、カリフォルニア州)	340529
CD141	BD Pharmingen (サンディエゴ、カリフォルニア州)	559781
PDGFr-アルファ	BD Pharmingen (サンディエゴ、カリフォルニア州)	556002
HLA-A, B, C	BD Pharmingen (サンディエゴ、カリフォルニア州)	555553
HLA-DR, DP, DQ	BD Pharmingen (サンディエゴ、カリフォルニア州)	555558
IgG-FITC	シグマ (セントルイス、ミズーリ州)	F-6522
IgG- PE	シグマ (セントルイス、ミズーリ州)	P-4685

【0194】

胎盤と臍の比較

胎盤細胞は8継代のときに臍帯細胞と比較した。

【0195】

継代間での比較

胎盤と臍は8、15、20継代において分析した。

【0196】

ドナー間での比較

ドナー間での違いを比較するために、異なったドナーからの胎盤細胞をお互いに比較し、異なったドナーからの臍をお互いに比較した。

【0197】

表面コーティング比較

ゼラチンコーティングフラスコ上で培養した胎盤を、非コーティングフラスコ上で培養した胎盤と比較した。ゼラチンコーティングフラスコ上で培養した臍は、非コーティングフラスコ上で培養した臍と比較した。

【0198】

消化酵素比較

細胞の単離及び準備のために使用した4つの処理を比較した。1) コラゲナーゼ、2)

10

20

30

40

50

コラゲナーゼ／ディスパーゼ、3) コラゲナーゼ／ヒアルロニダーゼ、及び4) コラゲナーゼ／ヒアルロニダーゼ／ディスパーゼ、により処理した胎盤から単離した細胞を比較した。

【0199】

胎盤層比較

胎盤組織の母体観点から単離した細胞は、胎盤組織の絨毛領域から単離した細胞と、新生児胎児の観点から単離した細胞とを比較した。

【0200】

結果

胎盤対臍の比較

フローサイトメトリーにより分析した胎盤及び臍帯由来細胞は、CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 、及びHLA-A、B、Cの陽性発現を示し、それらはIgG対照に対して上昇した蛍光値を示した。これら細胞は、CD31、CD34、CD45、CD117、CD141、及びHLA-DR、DP、DQの検出可能発現は陰性であり、それらは前記IgG対照に相当する蛍光値を示された。陽性曲線の蛍光値における変化を計算した。前記陽性曲線の間値（すなわちCD13）及び範囲（すなわちCD90）はいくつもの変化を示したが、前記曲線は正常に見え、均一な集団を確認した。両曲線は、個別に、前記IgG対照以上の値を示した。

【0201】

継代間比較－胎盤

フローサイトメトリーにより分析した8、15、20継代の分娩後由来細胞は全て、IgG対照に対して蛍光値の上昇により反映されたように、CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 、及びHLA-A、B、Cの発現は陽性であった。前記細胞は、IgG対照と一致した蛍光値を有する、CD31、CD34、CD45、CD117、CD141、及びHLA-DR、DP、DQの発現は陰性であった。前記陽性曲線の蛍光検出値における変化を計算した。前記陽性曲線の範囲（すなわちCD10）は変化したが、前記曲線は正常であり、均一な集団を確認し、各曲線は、個別に前記IgG対照よりも大きい値を示した。

【0202】

継代間比較－臍帯

フローサイトメトリーにより分析した8、15、20継代の臍帯由来細胞は全て、IgG対象に対して蛍光値の上昇を示し、CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 、及びHLA-A、B、Cを発現した。これらの細胞は、IgG対照と一致した蛍光値を有する、CD31、CD34、CD45、CD117、CD141、及びHLA-DR、DP、DQの発現は陰性であった。前記陽性曲線の蛍光検出値における変化は予想された範囲内であった。前記陽性曲線の間値（すなわちCD13）は変化したが、すべての曲線は個別に前記IgG対照よりも大きい値を示した。

【0203】

ドナー間比較－胎盤

フローサイトメトリーにより分析した別々のドナーから単離した胎盤由来細胞はそれぞれ、IgG対象に対してな蛍光値の上昇とともに、CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 、及びHLA-A、B、Cを発現した。前記細胞は、IgG対照と一致した蛍光値により示されるように、CD31、CD34、CD45、CD117、CD141、及びHLA-DR、DP、DQの発現は陰性であった。前記陽性曲線の蛍光検出値における変化は予測された範囲であった。前記陽性曲線の範囲（すなわちCD44）は変化したが、前記曲線は正常であり、均一な集団を確認し、両曲線は、個別に前記IgG対照よりも大きい値を示した。

【0204】

ドナー間比較－臍

フローサイトメトリーにより分析した別々のドナーから単離した臍帯由来細胞のそれぞ

10

20

30

40

50

れは、I g G対象に対する相対的な蛍光値の上昇において反映するように、CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr-アルファ、及びHLA-A、B、Cの陽性発現を示した。これらの細胞は、I g G対照と一致した蛍光値を有していたので、CD31、CD34、CD45、CD117、CD141、及びHLA-DR、DP、DQの発現は陰性であった。前記陽性曲線の蛍光検出値における変化を計算した。前記陽性曲線の間値（すなわちCD10）は変化したが、両曲線は個別に前記I g G対照よりも大きい値を示した。

【0205】

分娩後由来細胞におけるゼラチン表面コーティングの前記効果

フローサイトメトリーで分析したゼラチンコーティング或いは非コーティングフラスコ上で増殖した胎盤由来細胞はすべて、I g G対照に対する相対的な蛍光値の上昇において反映するように、CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr-アルファ、及びHLA-A、B、Cの陽性発現を示した。これらの細胞は、I g G対照と一致した蛍光値を有していたので、CD31、CD34、CD45、CD117、CD141、及びHLA-DR、DP、DQの発現は陰性であった。

【0206】

前記細胞の準備及び単離のために使用した前記酵素消化は前記細胞表面マーカー特性に影響を与えるか？

フローサイトメトリーにより分析した様々な消化酵素を使用して単離した胎盤由来細胞は全て、I g G対照に対する相対的な蛍光値の上昇により示されるように、CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr-アルファ、及びHLA-A、B、Cを発現した。これらの細胞は、I g G対照と一致した蛍光値を有していたので、CD31、CD34、CD45、CD117、CD141、及びHLA-DR、DP、DQの発現は陰性であった。前記CD13中間蛍光値における変化が見られた。コラゲナーゼ処理細胞のCD13中間蛍光値は別のCD13曲線より低かったが、前記コラゲナーゼ処理曲線は正常であり、均一な集団を確認し、それは、個別に前記I g G対照よりも大きい値を示した。

【0207】

胎盤層比較

フローサイトメトリーにより分析した前記胎盤の前記母体、絨毛及び新生児の層から単離した細胞は、それぞれI g G対照に対する相対的な蛍光値の上昇により示されるように、CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr-アルファ、及びHLA-A、B、Cを発現した。これらの細胞は、I g G対照と一致した蛍光値を有していたので、CD31、CD34、CD45、CD117、CD141、及びHLA-DR、DP、DQの発現は陰性であった。陽性曲線の蛍光検出値における変化が見られた。前記陽性曲線の間値及び範囲（すなわちCD10、CD70）は変化したが、曲線は正常であり、均一な集団を確認し、全ての曲線は個別に前記I g G対照よりも大きい値を示した。

【0208】

結論

フローサイトメトリーによる胎盤及び臍由来分娩後由来細胞の分析はこれら細胞株の同定を確立した。胎盤及び臍由来分娩後由来細胞は、CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr-アルファ、HLA-A、B、Cに対して陽性であり、CD31、CD34、CD45、CD117、CD141、HLA-DR、DP、DQに対して陰性であった。この同定は、前記ドナー、継代、培養容器表面コーティング、消化酵素、及び胎盤層を含様々な変数間において一貫していた。個別の蛍光値ヒストグラムの間値及び範囲においてある変化が観察されたが、全ての試験された条件下で、全ての陽性曲線は、正常で、I g G対照よりも大きい蛍光値を発現した。従って、前記細胞は均一な集団を含み、前記マーカーの陽性発現を有したことが確認された。

【実施例6】

【0209】

オリゴヌクレオチド配列を用いた分娩後組織由来細胞の分析

オリゴヌクレオチド配列は、臍及び胎盤由来細胞と、線維芽細胞、ヒト間葉系幹細胞、及びヒト骨髄由来の別細胞株との遺伝子発現特性を比較するために使用した。この分析は前記分娩後由来細胞の特徴を提供し、これら細胞に特異的な分子マーカーを同定した。

【0210】

材料と方法

細胞の単離と培養

分娩後組織由来細胞

ヒト臍帯および胎盤はNational Disease Research Int
erchange (NDR I、フィラデルフィア、ペンシルバニア州) より、患者の同意
が得られた正常満期妊娠者から獲得した。実施例1に記載されているように、前記組織を
受け取り、細胞を単離した。細胞はゼラチンコーティング組織培養プラスチックフラスコ
上で成長培養液内で培養した。前記培養は37℃、5%二酸化炭素で培養した。

10

【0211】

線維芽細胞

ヒト皮膚線維芽細胞は、Cambrex社(ウォークースビル、MD;ロット番号9F
0844)及びATCC CRL-1501(CCD39SK)より購入した。両細胞株
は、10%胎児ウシ血清(Hyclone)及びペニシリン/ストレプトマイシン(In
vitrogen)を含むDMEM/F12培養液(Invitrogen、カリフォル
ニア州カールスバッド)中で培養した。前記細胞は標準組織処理プラスチック上で増殖させ
た。

20

【0212】

ヒト間葉系幹細胞(hMSC)。hMSCはCambrex社(ウォークースビル、M
D;ロット番号2F1656及び2F1657)より購入され、MSCGM培養液(C
ambrex)中、前記製造者の規格に従って培養した。前記細胞は37℃、5%二酸化
炭素で、標準組織培養プラスチック上で増殖させた。

【0213】

ヒト腸骨稜骨髄細胞(ICBM)

ヒト腸骨稜骨髄はNDR Iから患者の同意を得て受け取った。前記骨髄は、Hōら(W
O 03/025149)により概要が述べられた前記方法に従って、処理した。前記骨髄
は、1骨髄に対して20溶解緩衝液の比率で緩衝液(155ミリモル濃度のNH₄Cl、
10ミリモル濃度のKHCO₃、及び0.1ミリモル濃度のEDTA、pH7.2)と混
合した。前記細胞懸濁液はボルテックスし、外気温で2分間培養し、10分間、500x
gで遠心分離した。前記上清を捨て、前記細胞ペレットを、10%(v/v)胎児ウシ血
清及び4ミリモル濃度のグルタミンを補充した最小必須培養液アルファ(Invi tro
gen)で再懸濁した。前記細胞を再び遠心分離し、前記細胞ペレットを新鮮培養液で再
懸濁した。前記生存単核細胞はトレパンブルー排除(Sigma、ミズーリ州セントルイ
ス)を使用して、計測した。前記単核細胞は組織培養プラスチックフラスコ内に5×10⁴
細胞/cm²で播種した。前記細胞は37℃、5%二酸化炭素、及び標準空気酸素或い
は5%酸素で培養した。細胞は培養液の交換をせずに5日間培養した。培養5日後に培養
液及び非接着性細胞を除去した。前記接着生細胞は培養内で維持した。

30

40

【0214】

mRNAの単離およびGENECHIP分析

活動的に成長している細胞の培養は細胞スクレーパーを用いて、冷えたPBS内で前記
フラスコから除去した。前記細胞は5分間300xgで遠心分離した。前記上清は除去さ
れ、前記細胞は、新鮮PBSで再懸濁され、再び、遠心された。前記上清を除去し、前記
細胞ペレットを直ちに凍結し、-80℃で保存した。細胞mRNAを抽出し、cDNAに
転写した。その後cDNAはcRNAへと転写し、ビオチン標識した。前記ビオチン標識
されたcRNAをアフィメトリックスGENECHIP HG-U133Aオリゴヌクレ

50

オチドアレイ（アフィメトリックス社、サンタクララ、カリフォルニア州）にハイブリダイズした。前記ハイブリダイゼーション及びデータの回収は、前記製造者の規格に従って行った。データ分析はマイクロアレイの有意解析（SAM）1.21版コンピュータソフトウェア（Tusher, V. G et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 5166~5171）を使用して行った。

【0215】

結果

14の異なった細胞の集団を本研究で分析した。継代情報、培養基質、培養液に沿った前記細胞は表6-1に載せた。

【0216】

【表7】

表 6-1. マイクロアレイ研究により解析された細胞。前期細胞株は、解析時の継代数、細胞増殖基質、及び増殖培地に沿って、識別コードによりリストされている。

細胞集団	継代	基質	培地
臍帯 (022803)	2	ゼラチン	DMEM, 15% FBS, BME
臍帯 (042103)	3	ゼラチン	DMEM, 15% FBS, BME
臍帯 (071003)	4	ゼラチン	DMEM, 15% FBS, BME
胎盤 (042203)	12	ゼラチン	DMEM, 15% FBS, BME
胎盤 (042903)	4	ゼラチン	DMEM, 15% FBS, BME
胎盤 (071003)	3	ゼラチン	DMEM, 15% FBS, BME
ICBM (070203) (5% O ₂)	3	プラスチック	MEM 10% FBS
ICBM (062703) (基準 O ₂)	5	プラスチック	MEM 10% FBS
ICBM (062703) (5% O ₂)	5	プラスチック	MEM 10% FBS
hMSC (ロット 2F1655)	3	プラスチック	MSCGM
hMSC (ロット 2F1656)	3	プラスチック	MSCGM
hMSC (ロット 2F1657)	3	プラスチック	MSCGM
h線維芽細胞 (9F0844)	9	プラスチック	DMEM-F12, 10 % FBS
h線維芽細胞 (ATCC CRL-1501)	4	プラスチック	DMEM-F12, 10 % FBS

【0217】

前記データは主成分分析により評価した。この分析により、試験した前記細胞において、異なった相対量で発現する290の遺伝子が明らかとなった。この分析により、前記集団間での相対比較を提供した。

【0218】

表6-2は前記細胞対を比較するために計算したユークリッド距離を示す。前記ユークリッド距離は前記細胞タイプ間で発現が異なる290の遺伝子に基づく比較に基づいた。前記ユークリッド距離は前記290の遺伝子発現間の類似性と逆相関である。

【0219】

【表 8】

表 6-2 細胞ペアのユークリッド距離。前記ユークリッド距離は、前記細胞タイプにより異なって発現された 290 遺伝子を用い、前記細胞タイプについて計算された。同様に前記細胞間には、前記ユークリッド距離に反比例している。

細胞ペア	ユークリッド距離
ICBM-hMSC	24.71
胎盤-臍帯	25.52
ICBM-線維芽細胞	36.44
ICBM-胎盤	37.09
線維芽細胞-MSC	39.63
ICBM-臍帯	40.15
線維芽細胞-臍帯	41.59
MSC-胎盤	42.84
MSC-臍帯	46.86
ICBM-胎盤	48.41

10

20

【0 2 2 0】

表 6-3、6-4、及び 6-5 は胎盤由来細胞において増強した遺伝子（表 6-3）、臍帯由来細胞において増強した遺伝子（表 6-4）、及び、臍帯及び胎盤由来細胞において減少した遺伝子（表 6-5）の発現を示す。

【0 2 2 1】

【表 9】

表 6-3 他のアッセイした細胞系と比べ、前記胎盤由来細胞で特異的に発現が上昇することが示された遺伝子

胎盤由来細胞で上昇した遺伝子		
プローブセット ID	遺伝子名	NCBIアクセッション番号
209732_at	C型 (カルシウム依存性、炭水化物認識ドメイン) レクチン、スーパーファミリーメンバー2 (活性化誘導)	AF070642
206067_s_at	ウィルムス腫瘍1	NM_024426
207016_s_at	アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリー、メンバーA2	AB015228
206367_at	レニン	NM_000537
210004_at	酸化低密度リポ蛋白質 (レクチン様) 受容体1	AF035776
214993_at	ホモ・サピエンス、クローンIMAGE:4179671、mRNA、部分コード	AF070642
202178_at	プロテインキナーゼC、ゼータ	NM_002744
209780_at	仮定上タンパク質DKFZp564F013	AL136883
204135_at	卵巣癌で下方制御された遺伝子1	NM_014890
213542_at	ホモ・サピエンスmRNA; cDNA DKFZp547K1113 (クローンDKFZp547K1113より)	AI246730

【 0 2 2 2 】

【表 10】

表 6-4 他のアッセイした細胞系と比べ、臍帯由来細胞
で特異的に発現が上昇することが示された遺伝子。

臍帯由来細胞で上昇した遺伝子		
プローブセ ットID	遺伝子名	NCBI アクセッション番号
202859_x_a t	インターロイキン8	NM_000584
211506_s_a t	インターロイキン8	AF043337
210222_s_a t	レチキュロン1	BC000314
204470_at	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド1 (メラノーマ増 殖刺激活性)	NM_001511
206336_at	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド6 (顆粒球走化 性蛋白質2)	NM_002993
207850_at	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド3	NM_002090
203485_at	レチキュロン1	NM_021136
202644_s_a t	腫瘍壊死因子、 α -誘導蛋白質3	NM_006290

10

20

【 0 2 2 3 】

【表 1 1 - 1】

表 6-5 アッセイされた別の細胞株に比べて、臍帯由来細胞及び胎盤細胞において特異的に発現が減少している遺伝子

臍帯及び胎盤由来細胞で減少している遺伝子		
プローブセットID	遺伝子名	NCBIアクセッション番号
210135_s_at	低身長感受性(short stature)ホメオボックス(SHOX)2	AF022654.1
205824_at	熱ショック27kDaタンパク質2	NM_001541.1
209687_at	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド12(間質細胞由来因子1)	U19495.1
203666_at	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド12(間質細胞由来因子1)	NM_000609.1
212670_at	エラスチン(大動脈弁上狭窄、Williams-Beuren症候群)	AA479278
213381_at	ヒトmRNA、cDNA DKFZp586M2022(DKFZp586M2022クローンから)	N91149
206201_s_at	間葉ホメオボックス2(成長停止特異的ホメオボックス)	NM_005924.1
205817_at	sine oculisホメオボックス相同体1(ショウジョウバエ)	NM_005982.1
209283_at	クリスタリン、アルファB	AF007162.1
212793_at	形態形成のdishevelled関連性活性化因子2	BF513244
213488_at	DKFZP586B2420タンパク質	AL050143.1
209763_at	ニューラリン1の類似体	AL049176
205200_at	テトラネクチン(プラスミノーゲン結合タンパク質)	NM_003278.1
205743_at	src相同体3(SH3)及びシステインリッチドメイン	NM_003149.1
200921_s_at	抗増殖性のB-Cell転座遺伝子1	NM_001731.1
206932_at	コレステロール 25-水酸化酵素	NM_003956.1
204198_s_at	ラント関連性転写因子3	AA541630
219747_at	仮定上タンパク質FLJ23191	NM_024574.1
204773_at	インターロイキン11受容体アルファ	NM_004512.1
202465_at	プロコラーゲンC-エンドペプチダーゼエンハンサー	NM_002593.2
203706_s_at	縮合(frizzled)相同体7(ショウジョウバエ)	NM_003507.1
212736_at	仮定上遺伝子BC008967	BE299456
214587_at	7型コラーゲンアルファ1	BE877796
201645_at	テネイシンC(hexabrachion)	NM_002160.1
210239_at	イルコイ相同体タンパク質5	U90304.1

【0 2 2 4】

【表 1 1 - 2】

203903_s_at	ヘファエスチン(hephaestin)	NM_014799.1
205816_at	インテグリンベータ8	NM_002214.1
203069_at	シナプス小胞糖タンパク質2	NM_014849.1
213909_at	ヒトcDNA FLJ12280 fisのクローンMAMMA100 1744	AU147799
206315_at	サイトカイン受容体様因子1	NM_004750.1
204401_at	カリウム中間体/低透過性カルシウム活性化チャネル のサブファミリーNメンバー4	NM_002250.1
216331_at	インテグリンアルファ7	AK022548.1
209663_s_at	インテグリンアルファ7	AF072132.1
213125_at	DKFZP586L151タンパク質	AW007573
202133_at	PDZ-結合モチーフを有する転写活性化補助因 子(TAZ)	AA081084
206511_s_at	sine oculisホメオボックス相同体2(ショウジョウバエ)	NM_016932.1
213435_at	KIAA1034タンパク質	AB028957.1
206115_at	初期成長反応3	NM_004430.1
213707_s_at	distal-lessホメオボックス5	NM_005221.3
218181_s_at	仮定上タンパク質FLJ20373	NM_017792.1
209160_at	アルドーケト還元酵素ファミリー1メンバーC3(3-アル ファヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼタイプII)	AB018580.1
213905_x_at	バイグリカン	AA845258
201261_x_at	バイグリカン	BC002416.1
202132_at	PDZ-結合モチーフを有する転写活性化補助因 子(TAZ)	AA081084
214701_s_at	フィブロネクチン1	AJ276395.1
213791_at	プロエンケファリン	NM_006211.1
205422_s_at	インテグリンベータ様1(EGF-like反復ドメインを有 する)	NM_004791.1
214927_at	ヒトmRNA完全長インサートcDNAクローンEUROI MAGE1968422	AL359052.1
206070_s_at	EphA3	AF213459.1
212805_at	KIAA0367タンパク質	AB002365.1
219789_at	ナトリウム利尿性ペプチド受容体C/グアニル酸シク ラーゼC(心房ナトリウム利尿性ペプチド受容体C)	AI628360
219054_at	仮定上タンパク質FLJ14054	NM_024563.1
213429_at	ヒトmRNA、cDNA DKFZp564B222(DKFZp56 4B222クローンから)	AW025579

【表 1 1 - 3】

204929_s_at	小胞関連性膜タンパク質5(ミオブレビン)	NM_006634.1
201843_s_at	EGF含有フィブリン様細胞外基質タンパク質1	NM_004105.2
221478_at	BCL2/アデノウイルスE1Bの19kDa相互作用タンパク質3様	AL132665.1
201792_at	AE結合タンパク質1	NM_001129.2
204570_at	シトクロームCオキシダーゼサブユニットVIIaポリペプチド1(筋肉)	NM_001864.1
201621_at	神経芽細胞腫の腫瘍形成抑制1	NM_005380.1
202718_at	インスリン様成長因子結合タンパク質2(36kDa)	NM_000597.1

10

【0 2 2 6】

表 6 - 6、6 - 7、及び 6 - 8 はヒト線維芽細胞（表 6 - 6）、I C B M細胞（表 6 - 7）、及び M S C s（表 6 - 8）で増強した遺伝子発現を示す。

【0 2 2 7】

20

【表 1 2】

表 6-6. アッセイされた他の細胞株と比べ、線維芽細胞で発現が増加することが示された遺伝子。

線維芽細胞で増加した遺伝子	
二重特異的ホスファターゼ 2	
KIAA0527 タンパク質	10
ヒト cDNA: FLJ23224 fis, クローン ADSU02206	
ダイニン、細胞質、中間ポリペプチド 1	
アンキリン 3、ランヴィエ絞輪(アンキリン G)	
インヒビン、 β A (アクチビン A、アクチビン AB α ポリペプチド)	
エクトヌクレオチドピロフォスファターゼ/ホスホジエラターゼ 4 (推定上の機能)	
KIAA1053 タンパク質	
微小管関連タンパク質 1A	
亜鉛フィンガータンパク質 41	
HSPC019 タンパク質	20
ヒト cDNA: FLJ23564 fis, クローン LNG10773	
ヒト mRNA; cDNA DKFZp564A072 (DKFZp564A072 クローンより)	
LIM タンパク質 (ラットタンパク質キナーゼ C-結合 <i>enigma</i> と類似)	
B細胞における κ L鎖ポリペプチド遺伝子エンハンサーの阻害剤、キナーゼ複合体関連タンパク質	
仮想上タンパク質 FLJ22004	
ヒト (クローン CTG-A4) mRNA 配列	
ESTs, サイトカイン受容体様因子2に中程度に類似、サイトカイン受容体 CRL2 前駆体[ヒト]	
トランスフォーミング成長因子, ベータ 2	30
仮想上タンパク質 MGC29643	
モノクローナル抗体 MRC OX-2 によって同定された抗原	
推定上 X 連結網膜症タンパク質	

【0 2 2 8】

10

ICBM 細胞で増加した遺伝子

- ・心臓性アンキリン反復タンパク質
- ・MHC クラス I 領域 ORF
- ・インテグリン, アルファ 10
- ・仮定上タンパク質 FLJ22362
- ・UDP-N-アセチル-アルファ-D-ガラクトサミン:ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素 3 (GalNAc-T3)
- ・インターフェロン誘導性タンパク質 44
- ・SRY (性決定領域 Y)- ボックス 9 (屈曲肢異形成症、常染色体性転換)
- ・ケラチン関連性タンパク質 1-1
- ・ヒポカルシン (hippocalcin) 様 1
- ・jagged 1 (Alagille 症候群)
- ・プロテオグリカン 1, 分泌顆粒

20

MSC 細胞で増加した遺伝子

- ・インターロイキン 26
- ・マルターゼーグルコシダーゼ (アルファーグルコシダーゼ)
- ・核受容体サブファミリー 4, グループ A, メンバー 2
- ・v-fos FBJ マウス骨肉種ウイルス癌遺伝子相同体
- ・仮想上タンパク質 DC42
- ・核受容体サブファミリー4, グループ A, メンバー 2
- ・FBJ マウス骨肉種ウイルス癌遺伝子相同体 B
- ・WNT1 誘導性シグナル伝達経路タンパク質 1
- ・MCF.2 細胞株由来トランスフォーミング配列
- ・カリウムチャネル, サブファミリー K, メンバー 15
- ・軟骨対一クラスホメオタンパク質 1
- ・ヒト cDNA FLJ12232 fis, クローン MAMMA1001206
- ・ヒト cDNA FLJ34668 fis, クローン LIVER2000775
- ・jun B プロトオンコジーン
- ・B-細胞 CLL/リンパ腫 6 (亜鉛フィンガータンパク質 51)
- ・亜鉛フィンガータンパク質 36, C3H タイプ, 相同体 (マウス)

50

、2つの異なる線維芽細胞株、3つの間葉系幹細胞株、及び3つの腸骨稜骨髄細胞株も含んだ。これらの細胞により発現したmRNAは22,000遺伝子に対してオリゴヌクレオチドプローブを含むGENECHIPオリゴヌクレオチド配列上で分析した。

【0231】

前記分析により、290の遺伝子への転写がこれら5つの異なる細胞タイプで異なる量で存在していたことが明らかとなった。これらの遺伝子は、前記胎盤由来細胞において特異的に上昇していた10の遺伝子と、前記臍帯由来細胞において特異的に上昇していた7つの遺伝子とを含む。54の遺伝子が、胎盤及び臍帯において特異的に低下した発現を有することが見出された。

【0232】

選択した遺伝子の前記発現はPCRにより確認された（実施例7を参照）。これらの結果は、前記分娩後由来細胞が、例えば、骨髄由来細胞及び線維芽細胞と比較すると、異なった遺伝子発現プロファイルを有していることを示す。

【実施例7】

【0233】

分娩後由来細胞の細胞マーカー
要約

ヒト胎盤及びヒト臍帯に由来する細胞を調べるために、アフィメトリックスジーンチップ（GENECHIP）を使用して、それらの遺伝子発現プロファイルを別の起源に由来する細胞の遺伝子プロファイルと比較した。この技術を通して、分娩後細胞において高度に発現した6つの遺伝子を同定した：酸化型LDL受容体1、インターロイキン8、レニン、レチキュロン、ケモカイン受容体リガンド3（CXCR3）、及び顆粒球走化性タンパク質2（GCP-2）。これら遺伝子のうち4つ（酸化型LDL受容体1、レニン、レチキュロン、及びインターロイキン8、）は分娩後細胞において、mRNAレベルで異なって調節されていた。IL-8は前記タンパク質レベルでも異なって調節されていた。

【0234】

ビメンチン及びアルファ平滑筋アクチンの発現も調査し、それらは以前、間質由来細胞と関連していた。単離直後（0継代）、前記ヒト胎盤由来細胞は、アルファ平滑筋アクチン及びビメンチンの両方に対して陽性に染色した。このパターンは、11継代の細胞でも観察された。前記結果は、細胞におけるビメンチン及びアルファ平滑筋アクチンの発現が前記成長培養液中の継代中で維持されていることを示唆する。

【0235】

0継代の前記ヒト臍帯に由来する細胞は、ビメンチン及びアルファ平滑筋アクチンタンパク質の発現について調査し、11継代に至るまで染色パターンが維持される可能性を伴って、ビメンチン及びアルファ平滑筋アクチンに対して陽性であった。

【0236】

前記mRNAデータは、前記マイクロアレイの実験から得られたデータを少なくとも部分的に実証する。

【0237】

序文

前記ヒト胎盤及び前記ヒト臍帯に由来する細胞における類似性及び差異は、（アフィメトリックスジーンチップ（GENECHIP）を使用して）それらの遺伝子発現プロファイルを別の起源に由来する細胞ものと比較することにより評価した。6つの「有意な」遺伝子を同定した：酸化型LDL受容体1、インターロイキン8、レニン、レチキュロン、ケモカイン受容体リガンド3（CXCR3）、及び顆粒球走化性タンパク質2（GCP-2）。これら「有意」な遺伝子は、分娩後由来細胞において、比較的高いレベルで発現した。

【0238】

本研究は、前記マイクロアレイデータを実証し、遺伝子とタンパク質の発現の相関を決

10

20

30

40

50

定し、胎盤及び臍帯由来細胞に対する固有の識別子を同定する検出するために信頼できる一連のアッセイを確立するために行った。

【0239】

方法と材料

細胞

胎盤由来細胞（核型分析によって同定した場合に優位に単離された新生児のものを含む3つの単離物）、臍帯由来細胞（4つの単離物）、及び正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF；新生児及び成人）は成長培養液中、ゼラチンコーティングT75フラスコ内で増殖させた。間葉系幹細胞（MSCs）は間葉系幹細胞成長培養液プレート（Bullet）キット（MSCGM、Combrex、Walkerville、メリーランド州）中で増殖させた。

10

【0240】

IL-8の実験のために、細胞は液体窒素から解凍し、ゼラチンコーティングフラスコ内に、5000細胞/cm²で播種し、成長培養液中で48時間成長され、その後さらに8時間、10ミリリットルの血清欠乏培養液〔DMEM-低グルコース（Gibco、カールスバッド、カリフォルニア州）、ペニシリン/ストレプトマイシン（Gibco、カールスバッド、カリフォルニア州）及び、0.1%ウシ血清アルブミン（BSA；Sigma、ミズーリ州セントルイス）〕内で増殖させた。この処理の後、RNAを抽出し、上清を150xgで5分間遠心分離し、細胞破砕物を除去した。その後この上清は、ELISA分析のために-80℃で凍結した。

20

【0241】

ELISAアッセイのための細胞培養

胎盤及び臍帯に由来する分娩後細胞及び新生児包皮に由来する線維芽細胞は成長培養液中、ゼラチンコーティングT75内で培養した。細胞を11継代において液体窒素中凍結した。細胞を解凍し、15ml遠心チューブに移した。150xg、5分間の遠心分離後、前記上清を捨てた。この細胞を4ml培養液に再懸濁し、数を数えられた。この細胞は、15ml成長培養液を含む75cm²のフラスコ内で、1フラスコあたり375,000細胞で24時間、増殖させた。前記培養液は、8時間、血清欠乏培養液に変えた。血清欠乏培養液は、前記培養の最後に集めて、14,000xgで5分間遠心分離した。（そして、-20℃で貯蔵した）。

30

【0242】

各フラスコ内の細胞数を予測するために、2ミリリットルのトリプシン/EDTA（Gibco、カールスバッド、カリフォルニア州）を各フラスコに加えた。前記フラスコから細胞を剥がした後、8ミリリットルの成長培養液を用いてトリプシン活性を中和した。細胞は15ミリリットル遠心チューブに移し、150xgで5分間遠心分離した。上清を除去し、1ミリリットルの成長培養液を各チューブに加え、前記細胞を再懸濁した。細胞数は血球計算板を使用して推定した。

【0243】

ELISAアッセイ

前記細胞により、血清欠乏培養液中に分泌されたIL-8の量をELISAアッセイ（R&D Systems、ミネアポリス、ミネソタ州）を用いて分析した。全てのアッセイは、前記製造者により提供された使用説明書に従って試験した。

40

【0244】

全RNA単離

RNAはコンフルエンスな分娩後由来細胞及び線維芽細胞から抽出するか、IL-8の発現のためには、上記のように処理した細胞から抽出した。細胞は、使用製造者の説明書（RNeasy ミニキット、Qiagen、バレンシア、カリフォルニア州）に従って、ベーターメルカプトエタノール（Sigma、ミズーリ州セントルイス）を含む350マイクロリットルのRLT緩衝液に溶解した。RNAは製造者の使用説明書（RNeasy ミニキット、Qiagen、バレンシア、カリフォルニア州）に従って抽出し、DN

50

ase処理（2.7 U／サンプル）にさらした。RNAは50マイクロリットルのDEPC処理水によって溶出し、−80℃で貯蔵した。

【0245】

逆転写

RNAはヒト胎盤及び臍帯からも抽出した。組織（30mg）はベータメルカプトエタノールを含む700マイクロリットルのRLT緩衝液に懸濁した。サンプルは機械的にホモジナイズし、さらに前記RNA抽出物は製造者の使用説明書に従って進めた。RNAは50マイクロリットルのDEPC処理水に抽出し、−80℃で貯蔵した。RNAはタクマン（TaqMan（登録商標））逆転写試薬（Applied Biosystems, Foster City, CA）とともに、ランダムヘキサマー（random hexamer）を使用して、25℃で10分間、37℃で60分間、95℃で、10分間逆転写した。サンプルは−20℃で貯蔵した。

10

【0246】

cDNAマイクロアレイによって分娩後由来細胞に特異的に調節されていることを確認した遺伝子（酸化型LDL受容体1、インターロイキン8、レニン、及びレチキュロンを含む特別な遺伝子）は、リアルタイムPCR及び従来型PCRを使用してさらに調査した。

【0247】

リアルタイムPCR

PCRは、Assays-on-Demand（商標）遺伝子発現産物を使用して、cDNAサンプル上で行い、酸化型LDL受容体（Hs00234028）、レニン（Hs00166915）、レチキュロン（Hs00382515）、CXCリガンド3（Hs00171061）、GCP-2（Hs00605742）、IL-8（Hs00174103）、及びGAPDH（Applied Biosystems, Foster City, CA）は、ABI Prism7000SDSソフトウェア（Applied Biosystems, Foster City, CA）を有する7000の配列検出システムを使用して、製造者の使用説明書（Applied Biosystems, Foster City, CA）に従って、cDNAとTaqMan Universal PCRマスターミックスと混合した。熱サイクル条件は、まず、50℃で2分間、95℃で10分間であり、続いて、95℃で15秒間及び60℃で1分間の40サイクルであった。PCRデータは、製造者の使用説明書（ABI Prism7700Sequence Detection Systemに対するApplied Biosystemsの使用者掲示板#2）に従って分析した。

20

30

【0248】

古典的PCR

古典的PCRはリアルタイムPCRからの結果を確認するために、ABI Prism7700（Perkin Elmer Applied Biosystems, Botton, Massachusetts, USA）を使用して行った。PCRは、2マイクロリットルのcDNA溶液、1×AmpliTag GoldユニバーサルミックスPCR反応緩衝液（Applied Biosystems, Foster City, CA）を使用して行い、最初の変性は94℃で5分であった。増幅は各プライマーセットに最適化した。IL-8、CXCリガンド3、及びレチキュロンに対して（94℃で15秒、55℃で15秒、及び72℃で30秒を30サイクル）；レチンに対して（94℃15秒、55℃15秒、及び72℃30秒、38サイクル）、レニンに対して（94℃15秒、53℃15秒、72℃30秒、38サイクル）、酸化型LDL受容体及びGAPDHに対して（94℃15秒、55℃15秒、及び72℃30秒、33サイクル）であった。増幅に使用されたプライマーは表7-1に記載した。前記最終PCR反応のプライマー濃度は、0.5 μMのGAPDHを除いては、1 μMであった。GAPDHプライマーは、製造者のTaqMan（登録商標）プローブを前記最終PCR反応に添加しなかったことを除いては、リアルタイムPCRと同じであった。サンプルは2%アガロースゲル上で流し、エチジ

40

50

ウムブロマイド (Sigma、ミズーリ州セントルイス) で染色した。画像は、焦点距離ポラロイドTMカメラ (VWR International, South Plainfield, NJ) を使用した667 Universal Twinpackフィルム (VWR International, South Plainfield, NJ) を使用して獲得した。

【0249】

【表15】

表 7-1: 使用したプライマー

プライマー名	プライマー
酸化型 LDL 受容体	S: 5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3' (SEQ ID NO:1) A: 5'-AGAATGGAAAAGTGAATAGG-3' (SEQ ID NO:2)
レニン	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC-3' (SEQ ID NO:3) A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG-3' (SEQ ID NO:4)
レチキュロン	S: 5'-TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3' (SEQ ID NO:5) A: 5'-AGTAAACATTGAAACCACAGCC-3' (SEQ ID NO:6)
インターロイキン8	S: 5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3' (SEQ ID NO:7) A: 5'-CTTCAAAAACTTCTCCACAACC-3' (SEQ ID NO:8)
ケモカイン (CXC) リガンド3	S: 5'-CCCACGCCACGCTCTCC-3' (SEQ ID NO:9) A: 5'-TCCTGTCAGTTGGTGCTCC-3' (SEQ ID NO:10)

【0250】

免疫蛍光

分娩後細胞は、冷却4%パラフォルムアルデヒド (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を用いて10分間、室温で固定した。、それぞれ0継代 (P1) (単離直後) 及び11継代 (P11) (胎盤由来細胞の2つの単離物、臍帯由来の細胞の2つの単離物) の臍由来及び胎盤由来細胞、及び線維芽細胞 (継代11) のそれぞれの単離物を使用した。免疫細胞化学は以下のエピトープに対する抗体を使用して行った: ビメンチン (1:500, Sigma、セントルイス、ミズーリ州)、デスミン (ウサギに対して産生-Sigma 1:150、或いはマウスに対して産生-Chemicon、テメクラ、カリフォルニア州、1:300、)、アルファ平滑筋アクチン (SMA, 1:400, Sigma)、サイトケラチン18 (CK18, 1:400, Sigma) Willebrand Factor (vWF, 1:200, Sigma)、及びCD34 (ヒトCD34クラスIII, 1:100, DAKOCytomation, カーピンテリア、カリフォルニア州)。さらに、以下のマーカーを11継代の分娩後細胞上で試験した: 抗ヒトGROアルファ-PE (1:100, Becton Dickinson、フランクリンレイク、ニュージャージー州)、抗ヒトGCP-2 (1:100, Santa Cruz Biotech、サンタクルス、カリフォルニア州)、抗ヒト酸化型LDL受容体1 (ox-LDL R1, 1:100, Santa Cruz Biotech)、及び抗ヒトNOGA-A (1:100, Santa Cruz Biotech)。

【0251】

培養はリン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄し、PBS、4% (v/v) ヤギ血清 (Chemicon、テメクラ、カリフォルニア州)、及び、0.3% (v/v) Triton (Triton-X, Sigma、セントルイス、ミズーリ州) を含むタンパク質ブロッキング溶液に30分間、暴露し、細胞内抗原を評価した。目的エピトープが前記細胞表面に局在している場合 (CD34、ox-LDL受容体1)、TritonX-100はエピトープの損失を防ぐために、本法のすべての段階で省いた。さらに、前記1次抗体がヤ

10

20

30

40

50

ギに対して産生される場合 (G C P-2, o x-L D L R 1, N O G O-A)、3 % (v / v) ロバ血清をヤギ血清の代わりに使用した。ブロッキング溶液に希釈した一次抗体は、その後、前記培養に、1 時間、室温で適用した。前記 1 次抗体溶液を除去し、ヤギ抗マウス I g G T e x a s - R e d (1 : 2 5 0、M o l e c u l a r P r o b e s, E u g e n e, O R) 及び/或いはヤギ抗ウサギ I g G A l e x a 4 8 8 (1 : 2 5 0、M o l e c u l a r P r o b e s) 或いはロバ抗ヤギ I g G F I T C (1 : 1 5 0、S a n t a C r u z B i o t e c h) と共にブロッキング剤を含む 2 次抗体溶液の処理 (1 時間、室温) の前に前記培養を P B S で洗浄した。その後、培養物を洗浄し、1 0 μ M D A P I (M o l e c u l a r P r o b e s) で 1 0 分間処理し、細胞核が視覚化した。

10

【0252】

免疫染色の後、蛍光は、オリンパス逆落斜型蛍光顕微鏡 (O l y m p u s、メルビル、ニューヨーク) 上で適切な蛍光フィルターを使用して視覚化した。全ての例において、上記において概説したすべての方法において対照染色上に蛍光シグナルを示す陽性染色は、1 次抗体溶液 (1 の対照なし) の適用の除去をその後行った。現された画像はデジタルカラービデオカメラ及びイメージプロ (I m a g e P r o) ソフトウェア (M e d i a C y b e r n e t i c s、カリフォルニア州カールスバッド) を使用して獲得した。3 重染色サンプルのために、各画像は、一度に一つの発光フィルターのみを使用して撮った。その後層化モンタージュは、A d o b e P h o t o s h o p ソフトウェア (A d o b e、カリフォルニア州サンホセ) を使用して調整した。

20

【0253】

F A C S 分析のための細胞の調整

フラスコに接着性の細胞は、リン酸緩衝食塩水 (P B S) (G i b c o、カリフォルニア州カールスバッド) で洗浄し、トリプシン/EDTA (G i b c o、カリフォルニア州カールスバッド) で剥がした。細胞を収穫し、遠心分離し、3 % (v / v) F B S を含む P B S 1 ミリリットルあたり 1×10^7 細胞となるように再懸濁した。1 0 0 マイクロリットルの分割量で各コニカルチューブに分注した。細胞内抗原のために染色した細胞は、P e r m / W a s h 緩衝液 (B D P h a r m i n g e n、サンディエゴ、カリフォルニア州) に浸透可能であった。製造者の規格のように抗体を分割物に加え、前記細胞を暗室中、3 0 分間室温で培養した。培養後、細胞を P B S で洗浄し、過剰な抗体を除去するために遠心分離した。2 次抗体を必要とする細胞は、3 % F B S 1 0 0 マイクロリットル中に再懸濁した。製造者の規格どおりに 2 次抗体を加え、前記細胞を暗室中、3 0 °C で 4 分間培養した。培養後、細胞は 0. 5 マイクロリットルの P B S で再懸濁し、フローサイトメトリーにより分析した。以下の抗体を使用した: 酸化型 L D L 受容体 1 (s c - 5 8 1 3、S a n t a C r u z, B i o t e c h)、G R O a (5 5 5 0 4 2、B D P h a r m i n g e n, B e d f o r d, M A)、マウス I g G 1 カップ (P - 4 6 8 5 及び M 5 2 8 4、S i g m a)、ロバ抗ヤギ I g G (s c - 3 7 4 3, S a n t a C r u z, B i o t e c h)。

30

【0254】

F A C S 分析

フローサイトメトリー分析は F A C S c a l i b u r (B e c t o n D i c k i n s o n、カリフォルニア州サンホセ) を用いて行った。

40

【0255】

結果

ヒト胎盤に由来する細胞、成人及び新生児線維芽細胞、及び間葉系幹細胞 (M S C s) からの c D N A 上で行われた、選択された「有意な」遺伝子のためのリアルタイム P C R の結果によると、酸化型 L D L 受容体及びレニンの両方は、他の細胞と比較して、胎盤由来細胞において、高いレベルで発現していた。リアルタイム P C R から得られた前記データは前記 Δ Δ C T 方法により分析し、対数尺度で表した。レチキュロン及び酸化型 L D L 受容体発現のレベルは他の細胞と比較して、臍帯由来細胞において高かった。C X C リガ

50

ンド3及びG C P-2の前記発現レベルにおいて分娩後細胞と対照間の有意な差はなかった。リアルタイムPCRの前記結果は、従来のPCRにより確認した。PCR産物の配列はこれらの観察結果をさらに立証した。C X Cリガンド3の発現レベルに有意な差がないことが、表7-1に記載した従来のPCR C X Cリガンド3プライマーを用いた分娩後細胞とコントロールの間で見出された。

【0256】

分娩後細胞におけるサイトカイン、IL-8の前記発現は、成長培養液培養と血清欠如分娩後由来細胞の両方において上昇していた。リアルタイムPCRのデータは全て、従来のPCRを用いてPCR産物の配列により立証された。

【0257】

無血清培養液中で増殖させた細胞の上清においてIL-8の存在を試験した場合、臍帯細胞及び胎盤細胞の単離物の一部から得た培養液中で、最も多く検出された(表7-2)。ヒト皮膚線維芽細胞に由来する培養液中では、IL-8は検出されなかった。

【0258】

【表16】

表 7-2:ELISA により測定された IL-8 タンパク質の発現

細胞タイプ	IL-8
h 線維芽細胞	ND
胎盤分離株 1	ND
UMBC 分離株 1	2058.42±144.67
胎盤分離株 2	ND
UMBC 分離株 2	2368.86±22.73
胎盤分離株 3 (正常 O ₂)	17.27±8.63
胎盤分離株 3 (低 O ₂ , W/O BME)	264.92±9.88
胎盤と臍帯由来細胞、およびヒト皮膚線維芽細胞で実施されたインターロイキン-8 (IL-8) の ELISA アッセイ結果。ここに示した値は、pg/100 万細胞、n=2、sem。	

ND: 未検出

【0259】

胎盤由来細胞は、酸化型LDL受容体、G C P-2、及びG R Oアルファの発現をFACS分析によっても調べた。

【0260】

胎盤細胞は、免疫細胞化学的分析によって選択したタンパク質の発現のために試験した。単離直後(0継代)、前記ヒト胎盤に由来する細胞は4%パラホルムアルデヒドを用いて固定し、6つのタンパク質、すなわち、フォンウィルブランド因子、CD34、サイトケラチン18、デスミン、アルファ平滑筋アクチン、及びビメンチンに対する抗体に暴露した。細胞はアルファ平滑筋アクチン及びビメンチンの両方に陽性に染色した。このパターンは、11継代まで維持していた。0継代では、極少数(<5%)の細胞がサイトケラチン18に対して陽性に染色した。

【0261】

0継代における前記ヒト臍帯由来細胞は、免疫細胞化学的分析により、選択されたタンパク質の発現を検証した。単離直後(0継代)、細胞をパラホルムアルデヒドを用いて固定し、6つのタンパク質、すなわち、フォンウィルブランド因子、CD34、サイトケラチン18、デスミン、アルファ平滑筋アクチン、ビメンチンに対する抗体に暴露した。臍

帯由来細胞はアルファ平滑筋アクチン及びビメンチンに対して陽性であり、前記染色パターンは、11継代まで一貫していた。

【0262】

11継代における胎盤由来及び臍帯由来細胞は、GROアルファ、GCP-2、酸化型LDL受容体1、及びレチキュロンの発現に対して、免疫細胞化学的によっても調べた。このような実験結果はすべて、まだ係属中である。

【0263】

考察と結果

これまで、マイクロアレイ及びPCR（リアルタイム及び従来型の両方）間による計測した遺伝子発現レベルの一致は、4つの遺伝子、すなわち、酸化型LDL受容体1、レニン、レチキュロン、及びIL-8において、確立してきた。これら遺伝子の前記発現は、分娩後細胞においてmRNAレベルで異なって調節されており、IL-8も、タンパク質レベルで異なって調節されていた。酸化型LDL受容体の存在は、前記胎盤に由来する細胞におけるFACS分析により、前記タンパク質レベルで検出されなかった。GCP-2及びCXCR3の異なった発現は、mRNAレベルで確認されなかったが、前記胎盤由来細胞におけるFACS分析により前記タンパク質レベルで、GCP-2は検出された。これらデータとマイクロアレイ実験から得られたデータの間の相違は、前記方法の感受性の違いによるものかもしれない。

【0264】

単離直後（0継代）、前記ヒト胎盤に由来する細胞は、アルファ平滑筋アクチン及びビメンチンの両方に陽性に染色した。このパターンは、11継代の細胞においても観察された。これら結果は、アルファ平滑筋アクチン及びビメンチンが、少なくとも本明細書で使用される成長培養液内では、継代を通して保存されることを示唆するものである。

【0265】

0継代における前記ヒト臍帯由来細胞はアルファ平滑筋及びビメンチンに対して検証したところ、両方に陽性であった。前記染色パターンは11継代まで保存されていた。

【0266】

結論として、完全なmRNAデータについて、前記マイクロアレイ実験から得られた前記データをすくなくとも一部確証した。さらなるタンパク質実験が完了するときに、mRNAとタンパク質の発現間の関係がより包括的に理解されるだろう。

【実施例8】

【0267】

PPDC表現型の免疫細胞化学的特性

ヒト分娩後組織、すなわち、臍帯及び胎盤内で見出される細胞の前記表現型は免疫組織化学により分析した。

【0268】

材料と方法

組織の準備

ヒト臍帯及び胎盤組織は、回収され、4%（w/v）パラホルムアルデヒドにより4℃で、一晚、液浸固定された。免疫組織化学は、次のエピトープ（表8-1を参照）に対する抗体を使用して行われた。すなわち、ビメンチン（1:500、Sigma、ミズーリ州セントルイス）、デスミン（1:150、ラビットに対して産生、Sigma、或いは1:300、マウスに対して産生、Chemicon、カリフォルニア州テメクラ）、アルファ平滑筋アクチン（SMA, 1:400、Sigma）、サイトケラチン18（CK18, 1:400、Sigma）フォンビルブランドファクター（vWF, 1:200、Sigma）及びCD34（ヒトCD34クラスIII, 1:100、DAKO Cytomat Inc, カリフォルニア州カーピンテリア、）である。さらに、次のマーカーが試験された。すなわち、抗ヒトGROアルファ-PE（1:100、Becton Dickinson、ニュージャージー州フランクリンレイク）、抗ヒトGCP-2（1:100、サンタクルスバイオテック社、カリフォルニア州サンタクルス）、抗ヒト酸化型LD

10

20

30

40

50

L受容体1 (ox-LDL R1、1:100、サンタクルスバイオテック社)、及び抗ヒトNOGO-A (1:100、サンタクルスバイオテック社)である。固定された検体は、メスで調べられ、OCT包埋組成物(ティッシュテックOCT, サクラ、カリフォルニア州トランス)の中で、エタノールを含むドライアイス浴上に置かれた。凍結されたブロックは、それから、標準クライオスタット(ライカマイクロシステムズ社)を使用して、切片にされ(100µmの厚さ)染色のためにガラススライド上に乗せられた。

【0269】

【表17】

表 8-1: 使用された一次抗体のまとめ

抗体	濃度	供給メーカー
ビメンチン	1:500	Sigma, St. Louis, ミズーリー州
デスミン (rb)	1:150	Sigma
デスミン (m)	1:300	Chemicon, Temecula, カリフォルニア州
アルファ-平滑筋アクチン (SMA)	1:400	Sigma
サイトケラチン 18 (CK18)	1:400	Sigma
フォンウィルブランド因子(vWF)	1:200	Sigma
CD34 III	1:100	DakoCytomation, Carpinteria, カリフォルニア州
GRO アルファ-PE	1:100	BD, Franklin Lakes, ニュージャージー州
GCP-2	1:100	Santa Cruz Biotech
Ox-LDL R1	1:100	Santa Cruz Biotech
NOGO-A	1:100	Santa Cruz Biotech

【0270】

免疫組織化学

免疫組織化学は以前の研究(例えば、Messinaら(2003) Exper. Neurol. 184: 816-829)に類似して行われた。組織セクションは、リン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄され、PBS, 4% (v/v) ヤギ血清(Chemicon、カリフォルニア州テメクラ)及び、0.3% (v/v) Triton (Triton X-100, Sigma)を含むタンパク質ブロッキング溶液に1時間曝され、細胞内抗原にアクセスした。前記関係のあるエピトープが前記細胞表面に局在している場合(CD34, ox-LDL R1)、Tritonは、エピトープの消失を防ぐために、全ての方法の段階で省略された。さらに、前記一次抗体がヤギに対して産生されている場合(GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A)、3% (v/v) ロバ血清がヤギ血清の代わりに、前記方法を通して使用された。一次抗体はブロッキング溶液に希釈され、それから、4時間、室温で、前記セクションに処理された。一次抗体は除去され、培養はPBSで洗浄され、ヤギ抗マウスIgG-テキサスレッド(1:250, Molecular Probes、オレゴン州ユーজন)及び/或いは、ヤギ抗ラビットIgG-アレクサ488(1:250, Molecular Probes)或いは、ロバ抗ヤギIgG-F

10

20

30

40

50

I T C (1 : 1 5 0、サンタクルスバイオテック) とともにブロックを含む2次抗体溶液 (1時間、室温) で処理された。培養は洗浄され、10 μ MのDAPI (M o l e c u l a r P r o b e s) は細胞核を視覚化するために10分間処理された。

【0271】

免疫染色の後、蛍光は、オリンパス逆落斜型蛍光顕微鏡 (O l y m p u s、ニューヨーク州メルビル) 上で適切な蛍光フィルターを使用して、視覚化された。陽性染色は、コントロール染色の上の蛍光信号により表された。表された画像は、デジタルカラービデオカメラ及びイメージプロ (I m a g e P r o) ソフトウェア (M e d i a C y b e r n e t i c s、カリフォルニア州カールスバッド) を使用して取り込まれた。各画像は、一度に一つのエミッションフィルターののみを使用して撮られた。層化された、モンタージュは、それからAdobe P h o t o s h o pソフトウェア (A d o b e、カリフォルニア州サンホセ) を使用して準備された。

10

【0272】

結果

臍帯特徴化

ビメンチン、デスミン、SMA、CK18、vWF、及びCD34マーカーは、臍帯血中に発見された細胞のサブセットの中に発現していた。特に、vWF及びCD34の発現は前記臍帯の中に含まれる血管に限定されていた。CD34陽性細胞は、最も内側の層 (内腔側) 上にあった。ビメンチンの発現は、前記帯の前記基質及び血管を通して見られた。SMAは、前記動脈及び静脈の前記基質及び外壁に限定されており、前記血管自体には含まれていなかった。CK18及びデスミンは、前記血管のみに観察され、デスミンは前記真ん中及び外側の層に限定していた。

20

【0273】

胎盤の特徴化

ビメンチン、デスミン、SMA、CK18、vWF、及びCD34は、すべて、前記胎盤及び領域特異的に観察された。

【0274】

GROアルファ、GCP-2、ox-LDL R1、及びNOGO-A組織発現

臍帯或いは胎盤組織内に、これらのマーカーは観察されなかった。

【0275】

要約

ビメンチン、デスミン、アルファ平滑筋アクチン、サイトケラチン18、フォンウィルブランド因子、及びCD34はヒト臍帯及び胎盤内の細胞に発現する。

30

【実施例9】

【0276】

胎盤及び臍帯から由来する分娩後細胞による栄養因子の分泌

PPDCsから由来する胎盤及び臍帯からの選択的栄養因子の分泌が測定された。血管原性活性 (すなわち、肝細胞成長因子 (HGF) (Rosenら (1997) Ciba Found. Symp. 212 : 215 ~ 26)、単球走化タンパク質1 (MCP-1) (Salcedoら (2000) Blood. 96 ; 34 - 40)、インターロイキン8 (IL-8) (Liら (2003) J. Immunol. 170 : 3369 ~ 76)、角化細胞成長因子 (KGF)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、血管内皮成長因子 (VEGF)、(Hughesら (2004) Ann. Thorac. Surg. 77 : 812 - 8) 組織マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤1 (TIMP1) アンジオポイエチン2 (ANG2)、血小板由来成長因子 (PDGF-bb)、トロンボポエチン (TPO)、ヘパリン結合上皮細胞成長因子 (HB-EGF)、間質由来因子1アルファ (SDF-1アルファ))、及び、神経栄養性/神経保護性活性 (脳由来神経栄養因子 (BDNF) (Chengら (2003) Dev. Biol. 258 ; 319 - 33)、インターロイキン6 (IL-6)、顆粒球走化タンパク質-2 (GCP-2)、腫瘍壊死因子ベータ2 (TGFbeta2)) 或いはケモカイン活性 (マクロファージ炎症タンパク質1

40

50

アルファ (M I P 1 a)、マクロファージ炎症タンパク質 1 ベータ (M I P 1 b)、単球化学遊走物質-1 (M C P-1)、R a n t e s (活性化が制御された、発現され分泌されている正常 T 細胞)、I 3 0 9、胸腺及び活性調節ケモカイン (T A R C)、エオタキシン (E o t a x i n)、マクロファージ由来ケモカイン (M D C)、I L-8) を有する因子が分泌された。

【0277】

方法と材料

細胞培養

胎盤及び臍帯から由来する P P D C s 及びヒト新生児包皮から由来するヒト線維芽細胞はゼラチンコーティング T 7 5 フラスコ上で成長培養液内で培養された。細胞は継代 1 1 で冷凍凍結され、液体窒素に貯蔵された。前記細胞を解凍後、成長培養液が加えられ、1 5 ミリリットル遠心チューブに移され、1 5 0 x g で 5 分間遠心された。前記上清は捨てられた。前記細胞ペレットは、4 ミリリットルの成長培養液で再懸濁され、細胞は数えられた。細胞は、1 5 ミリリットルの成長培養液を含むフラスコ内で、3 7 5 0 0 0 細胞 / 7 5 c m ² で播種し、2 4 時間培養された。前記培養液は、無血清培地 (D E M E-低糖 (G i b c o)、0. 1 % (w / v) ウシ血清アルブミン (S i g m a)、ペニシリン / ストレプトマイシン (G i b c o)) に 8 時間、変えられた。条件無血清培地は、1 4 0 0 0 x g、5 分間の遠心により回収され、- 2 0 °C で貯蔵された。各フラスコ内の前記細胞数を推定するため、細胞はリン酸緩衝食塩水 (P B S) で洗浄され、2 ミリリットルのトリプシン / E D T A (G i b c o) を使用して、はがされた。トリプシン活性は、8 ミリリットルの成長培養液を加えることにより阻害された。細胞は、1 5 0 x g で、5 分間遠心された。上清は除去され、細胞は 1 ミリリットルの成長培養液内で再懸濁された。細胞数は血球計数板を使用して推定された。

【0278】

E L I S A アッセイ

細胞は 3 7 °C、5 % C O ₂ 及び空气中酸素内で増殖させた。胎盤由来 P P D C s (1 0 1 5 0 3) は 5 % 酸素或いはベータメルカプトエタノール (B M E) 内でも増殖させた。各細胞サンプルにより産生された、M C P-1、I L-6、V E G F、S D F-1 アルファ、G C P-2、I L-8、及び T G F ベータ 2 の前記量が、E L I S A アッセイ (R & D S y s t e m s、メネソタ州ミネアポリス) により測定された。全てのアッセイは、前記製造者の説明書に従って行われた。表される値は、p g / m l / 百万細胞 (n = 2、s e m) である。

【0279】

サーチライト (S e a r c h L i g h t (登録商標)) m u l t i p l e x E L I S A アッセイ

ケモカイン (M I P 1 a、M I P 1 b、M C P-1、R a n t e s、I 3 0 9、T A R C、エオタキシン (E o t a x i n)、M D C、I L-8)、B D N F、及び血管原性因子 (H G F、K G F、b F G F、V E G F、T I M P 1、A N G 2、P D G F-b b、T P O、H G-E G F) はサーチライトプロテオームアレイ (ピアースバイオテクノロジー社) を使用して測定された。前記プロテオームアレイは、各ウェル、2 から 1 6 のタンパク質の量的測定のための多発性サンドウィッチ E L I S A である。前記アレイは、9 6 ウェルプレートの各ウェルの中に、4-1 6 の異なったキャプチャー抗体の、2 x 2、3 x 3、或いは 4 x 4 パターンをスポットすることにより産生される。サンドウィッチ E L I S A 方法の次に、前記プレート全体は、前記プレートの各ウェル内の各スポットで産生される化学蛍光信号を捕らえるために画像化される。各スポットで産生される信号の前記量は、前記標準或いはサンプルにおける目標タンパク質の前記量と相関する。

【0280】

結果

E L I S A アッセイ

M C P-1 及び I L-6 は胎盤及び臍帯由来 P P D C s 及び皮膚線維芽細胞により分泌

された（表 9-1）。SDF-1 アルファは、5%酸素で培養された胎盤由来 PPD Cs、及び線維芽細胞により分泌された。GCP-2 及び IL-8 は BME 或いは 5%酸素の存在下で培養された臍帯由来 PPD Cs 及び胎盤由来 PPD Cs により分泌された。GCP-2 はヒト線維芽細胞によっても分泌された。TGF-β2 は ELISA アッセイによって、検出不能であった。

【0281】

【表 18】

表 9-1:ELISA アッセイ結果

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1 α	GCP-2	IL-8	TGF-β2
線維芽細胞	17±1	61±3	29±2	19±1	21±1	ND	ND
胎盤 (042303)	60±3	41±2	ND	ND	ND	ND	ND
臍帯 (022803)	1150±74	4234±289	ND	ND	160±11	2058±145	ND
胎盤 (071003)	125±16	10±1	ND	ND	ND	ND	ND
臍帯 (071003)	2794±84	1356±43	ND	ND	2184±98	2369±23	ND
胎盤 (101503) BME	21±10	67±3	ND	ND	44±9	17±9	ND
胎盤 (101503) 5% O ₂ , W/O BME	77±16	339±21	ND	1149±137	54±2	265±10	ND

キー:ND:未検出

【0282】

サーチライト (Search Light (登録商標)) multiplexed ELISA アッセイ

TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1b、MCP1、Rantes、I309, TARC, MDC, 及び IL-8 は臍帯由来 PPD Cs から分泌された（表 9-2 及び 9-3）。TIMP1, TPO, KGF, HGF, HBEGF, BDNF, MIP1a、MCP-1, Rantes、TARC, エオタキシン (Eotaxin)、及び IL-8 は胎盤由来 PPD Cs から分泌された（表 9-2 及び 9-3）。Ang2, VEGF, 或いは PDGF-bb は検出されなかった。

【0283】

10

20

30

【表 19】

表 9-2: SearchLight (登録商標) Multiplexed ELISA アッセイ結果

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
hFB	19306.3	ND	ND	230.5	5.0	ND	ND	27.9	1.3	ND
P1	24299.5	ND	ND	546.6	8.8	16.4	ND	ND	3.81.3	ND
U1	57718.4	ND	ND	1240.0	5.8	559.3	148.7	ND	9.3	165.7
P3	14176.8	ND	ND	568.7	5.2	10.2	ND	ND	1.9	33.6
U3	21850.0	ND	ND	1134.5	9.0	195.6	30.8	ND	5.4	388.6

キー: hFB (ヒト線維芽細胞)、P1 (胎盤由来 PPDC (042303))、U1 (臍帯由来 PPDC (022803))、

P3 (胎盤由来 PPDC (071003))、U3 (臍帯由来 PPDC (071003))、ND: 未検出

10

【0284】

【表 20】

表 9-3: SearchLight (登録商標) Multiplexed ELISA アッセイ結果

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	I309	TARC	Eotaxin	MDC	IL8
hFB	ND	ND	39.6	ND	ND	0.1	ND	ND	204.9
P1	79.5	ND	228.4	4.1	ND	3.8	12.2	ND	413.5
U1	ND	8.0	1694.2	ND	22.4	37.6	ND	18.9	51930.1
P3	ND	ND	102.7	ND	ND	0.4	ND	ND	63.8
U3	ND	5.2	2018.7	41.5	11.6	21.4	ND	4.8	10515.9

キー: hFB (ヒト線維芽細胞)、P1 (胎盤由来 PPDC (042303))、U1 (臍帯由来 PPDC (022803))、

P3 (胎盤由来 PPDC (071003))、U3 (臍帯由来 PPDC (071003))、ND: 未検出

20

【0285】

要約

臍帯及び胎盤由来細胞は多くの栄養因子を分泌した。HGF、bFGF、MCP-1、及びIL-8などのこれら栄養因子のいくつか、血管新生において重要な役割を果たす。BDNFおよびIL-6のような別の栄養因子は神経再生において重要な役割を果たす。

【実施例 10】

【0286】

生体内 (In vivo) 免疫学

分娩後由来細胞は、これらの細胞が、生体内 (in vivo) での移植を引き出す前記免疫学的反応を予測するために、試験管内 (in vitro) での、それらの免疫学的特徴を見積もられた。分娩後細胞は、HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQ、CD80、CD86、およびB7-H2の発現のためにフローサイトメトリーによりアッセイされた。3つのタンパク質は抗原提示細胞 (APC) により発現され、未処理T細胞の直接刺激に必要とされた (Abbas&Lichtman、細胞及び分子免疫学、5版、(2003) Saunders、フィラデルフィア、p171)。前記細胞株はHLA-G (Abbas&Lichtman、細胞及び分子免疫学、5版、(2003) Saunders、フィラデルフィア、p171)、CD178 (Coumansら、(1999) Journal of Immunological Methods 224、185-196)、及びPD-L2 (Abbas&Lichtman、細胞及び分子免疫学、5版、(2003) Saunders、フィラデルフィア、p171; Brownら (2003

30

40

50

） The Journal of Immunology 170, 1257～1266
) の前記発現のため、フローサイトメトリーにより分析された。胎盤組織に属する細胞による3つのタンパク質の前記発現は、子宮の胎盤組織の前記免疫を免除された状態を成立すると考えられる。どの程度、分娩後胎盤及び臍帯由来細胞株が生体内 (in vivo) で免疫反応を引き起こすかを予測するために、前記細胞株は、一方通行混合リンパ球反応 (MLR) で試験された。

【0287】

材料と方法

細胞培養

細胞は2%ゼラチン (Sigma、ミズーリ州セントルイス) によりコーティングされたT75フラスコ (Corning、ニューヨーク州コーニング) 内でコンフルエンスになるまで成長培養液中で培養された。

10

【0288】

抗体染色

細胞は、リン酸緩衝食塩水 (PBS) (Gibco、カリフォルニア州カールスバッド) で洗浄され、トリプシン/EDTA (Gibco、カリフォルニア州カールスバッド) によりはがされた。細胞は回収され、遠心され、3% (v/v) FBSを含むPBSで、 1×10^7 細胞/ミリリットルの細胞数で再懸濁された。抗体 (表10-1) は製造者の規格のように、100マイクロリットルの細胞懸濁液に加えられ、4℃で30分、室温で、培養された。培養後、細胞はPBSで洗浄され、結合していない抗体を除去するために遠心された。細胞は500マイクロリットルのPBSで再懸濁され、FACSCalibur instrument (Becton Dickinson、カリフォルニア州サンホセ) を使用して、フローサイトメトリーにより分析された。

20

【0289】

【表21】

表 10-1. 抗体

抗体	製造業者	カタログ番号
	BD Pharmingen (San Diego, カリフォルニア州)	
HLA-DR,DP,DQ		555558
CD80	BD Pharmingen	557227
CD86	BD Pharmingen	555665
B7-H2	BD Pharmingen	552502
HLA-G	Abcam (Cambridgeshire, 英国)	ab 7904-100
	Santa Cruz (San Cruz, カリフォルニア州)	
CD178		sc-19681
PD-L2	BD Pharmingen	557846
マウス IgG2 α	Sigma (St. Louis, ミズーリー州)	F-6522
マウス IgG1 κ	Sigma	P-4685

30

40

【0290】

混合リンパ球反応

細胞株Aとして標識された継代10の臍帯由来PPDCs及び、細胞株Bと標識された継代11の胎盤由来PPDCsの冷凍保存されたバイアルはドライアイス上で、CTBR (カナダ国ケベック州、セネビル) に送られ、CTBR SOP番号CAC-031を使用して、混合リンパ球反応が行われた。末梢血単核細胞 (PBMCs) は男性及び女性の

50

ボランティアドナーから集められた。刺激者（ドナー）同種P B M C，自己P B M C、及び分娩後細胞株は、マイトマイシンCで処理された。自己及びマイトマイシンで処理された刺激細胞は反応（レシピエント）P B M Cに加えられ、4日間培養された。培養後、[³H]チミジンが各サンプルに加えられ、18時間培養された。前記細胞を回収した後、放射標識されたDNAは抽出され、[³H]ーチミジンの取り込みはシンチレーターカウンターを使用して測定された。

【0291】

前記同種ドナーに対する刺激インデックス（S I A D）は、前記受給者及びマイトマイシンC処理同種ドナーの増殖の中間値を前記受給者の増殖のベースラインで割った値として計算された。前記分娩後細胞の前記刺激インデックスは、前記受給者及びマイトマイシンC処理分娩後細胞株の増殖の中間値を前記受給者の増殖のベースラインで割った値として計算された。

10

【0292】

結果

混合リンパ球反応－胎盤

7人のボランティア血液ドナーはスクリーンされ、別の5人の血液ドナーとの混合リンパ球反応において、急激な増殖反応を示すような一人の同種ドナーが、同定された。このドナーは前記同種陽性コントロールドナーとして選択された。前記残りの6人の血液ドナーはレシピエントとして選択された。前記同種陽性コントロール及び胎盤細胞株は、マイトマイシンCで処理され、前記6人の同種受給者と混合リンパ球反応内で培養された。反応は、1プレートにつき、3受給者をのせて、2つの細胞培養プレートを使用して、三つ組みで行われた。（表10－2）前記平均刺激インデックスは、1.3（プレート2）から3（プレート1）の範囲で、前記同種ドナー陽性コントロールは、46.25（プレート2）から279（プレート1）の範囲であった（表10－3）。

20

【0293】

【表 2 2 - 1】

表 10-2: 混合リンパ球反応データ-細胞株 B (胎盤)

増殖アッセイの DPM							
プレート ID: プレート1							
分析 番号	培養 システム	多重検査			平均	SD	CV
		1	2	3			
IM03- 7769	受容体の増殖ベースライン	79	119	138	112.0	30.12	26.9
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	241	272	175	229.3	49.54	21.6
	MLR 同種異型ドナーIM03- 7768 (マイトマイシンC処理済 み)	23971	22352	20921	22414.7	1525.97	6.8
	細胞株との MLR (マイトマイ シンC処理済み細胞タイプ B)	664	559	1090	771.0	281.21	36.5
SI (ドナー)					200		
SI (細胞株)					7		
IM03- 7770	受容体の増殖ベースライン	286	134	262	200.7	64.17	32.0
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	1091	602	524	739.0	307.33	41.6
	MLR 同種異型ドナーIM03- 7768 (マイトマイシンC処理済 み)	45005	43729	44071	44268.3	660.49	1.5
	細胞株との MLR (マイトマイ シンC処理済み細胞タイプ B)	533	2582	2376	1830.3	1128.24	61.6
SI (ドナー)					221		
SI (細胞株)					9		
IM03- 7771	受容体の増殖ベースライン	157	87	128	124.0	35.17	28.4
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	293	138	508	313.0	185.81	59.4
	MLR 同種異型ドナーIM03- 7768 (マイトマイシンC処理済 み)	24497	34348	31388	30077.7	5054.53	16.8
	細胞株との MLR (マイトマイ シンC処理済み細胞タイプ B)	601	643	a	622.0	29.70	4.8
SI (ドナー)					243		
SI (細胞株)					5		
IM03- 7772	受容体の増殖ベースライン	56	98	51	68.3	25.81	37.8
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	133	120	213	155.3	50.36	32.4
	MLR 同種異型ドナーIM03- 7768 (マイトマイシンC処理済 み)	14222	20076	22168	18822.0	4118.75	21.9
	細胞株との MLR (マイトマイ シンC処理済み細胞タイプ B)	a	a	a	a	a	a
SI (ドナー)					275		
SI (細胞株)					a		
IM03- 7768 (同 種異型ド ナー)	受容体の増殖ベースライン	84	242	208	178.0	83.16	46.7
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	361	617	304	427.3	166.71	39.0
細胞株タ イプ B	受容体の増殖ベースライン	126	124	143	131.0	10.44	8.0
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	822	1076	487	794.7	294.95	37.1

【0 2 9 4】

【表 2 2 - 2】

プレート ID: プレート2								
分析 番号	培養 システム	多重検査			平均	SD	CV	
		1	2	3				
IM03- 7773	受容体の増殖ベースライン	908	181	330	473.0	384.02	81.2	
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	269	405	572	415.3	151.76	36.5	
	MLR 同種異型ドナーIM03- 7768(マイトマイシンC処理済 み)	29151	28691	28315	28719.0	418.70	1.5	
	細胞株との MLR(マイトマイ シンC処理済み細胞タイプ B)	567	732	905	734.7	169.02	23.0	
SI(ドナー)					61			
SI(細胞株)					2			
IM03- 7774	受容体の増殖ベースライン	893	1376	185	818.0	599.03	73.2	
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	261	381	568	403.3	154.71	38.4	
	MLR 同種異型ドナーIM03- 7768(マイトマイシンC処理済 み)	53101	42839	48283	48074.3	5134.18	10.7	
	細胞株との MLR(マイトマイ シンC処理済み細胞タイプ B)	515	789	294	532.7	247.97	46.6	
SI(ドナー)					59			
SI(細胞株)					1			
IM03- 7775	受容体の増殖ベースライン	1272	300	544	232	199	484	
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	232	199	484	305.0	155.89	51.1	
	MLR 同種異型ドナーIM03- 7768(マイトマイシンC処理済 み)	23554	10523	28965	21014.0	9479.74	45.1	
	細胞株との MLR(マイトマイ シンC処理済み細胞タイプ B)	768	924	563	751.7	181.05	24.1	
SI(ドナー)					30			
SI(細胞株)					1			
IM03- 7776	受容体の増殖ベースライン	1530	137	1046	904.3	707.22	78.2	
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	420	218	394	344.0	109.89	31.2	
	MLR 同種異型ドナーIM03- 7768(マイトマイシンC処理済 み)	28893	32493	34746	32044.0	2952.22	9.2	
	細胞株との MLR(マイトマイ シンC処理済み細胞タイプ B)	a	a	a	a	a	a	
SI(ドナー)					35			
SI(細胞株)					a			

【表 2 3】

表 10-3. 6 種類の同種間レシーパーとの混合リンパ球反応における胎盤細胞及び同種間ドナーの平均刺激指数

平均刺激指数

	レシピエント	胎盤
プレート(レシーパー1~3)	279	3
プレート(レシーパー4~6)	46.25	1.3

10

【0 2 9 6】

混合リンパ球反応—臍

6 人のボランティア血液ドナーはスクリーンされ、別の 6 人の血液ドナーとの混合リンパ球反応において、急激な増殖反応を示すような一人の同種ドナーが、同定された。このドナーは前記同種陽性コントロールドナーとして選択された。前記残りの 5 人の血液ドナーはレシピエントとして選択された。前記同種陽性コントロール及び胎盤細胞株は、マイトマイシン C で処理され、前記 5 人の同種受給者と混合リンパ球反応内で培養された。反応は、1 プレートにつき、3 受給者をのせて、2 つの細胞培養プレートを使用して、三つ組みで行われた。(表 10-4) 前記平均刺激インデックスは、6.5 (プレート 1) から 9 (プレート 2) の範囲で、前記同種ドナー陽性コントロールは、42.75 (プレート 1) から 70 (プレート 2) の範囲であった (表 10-5)。

20

【0 2 9 7】

【表 2 4 - 1】

表 10-4. 混合リンパ球反応データー細胞株A(臍帯)

増殖アッセイの DPM							
プレート ID: プレート1							
分析 番号	培養 システム	多重検査			平均	SD	CV
		1	2	3			
IM04- 2478	受容体の増殖ベースライン	1074	406	391	623.7	390.07	62.5
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	672	510	1402	861.3	475.19	55.2
	MLR 同種異型ドナーIM04- 2477(マイトマイシンC処理済 み)	43777	48391	38231	43466.3	5087.12	11.7
	細胞株との MLR(マイトマイ シンC処理済み細胞タイプ B)	2914	5622	6109	4881.7	1721.36	35.3
SI(ドナー)					70		
SI(細胞株)					8		
IM04- 2479	受容体の増殖ベースライン	530	508	527	521.7	11.93	2.3
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	701	567	1111	793.0	283.43	35.7
	MLR 同種異型ドナーIM04- 2477(マイトマイシンC処理済 み)	25593	24732	22707	24344.0	1481.61	6.1
	細胞株との MLR(マイトマイ シンC処理済み細胞タイプ B)	5086	3932	1497	3505.0	1832.21	52.3
SI(ドナー)					47		
SI(細胞株)					7		
IM04- 2480	受容体の増殖ベースライン	1192	854	1330	1125.3	244.90	21.8
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	2963	993	2197	2051.0	993.08	48.4
	MLR 同種異型ドナーIM04- 2477(マイトマイシンC処理済 み)	25416	29721	23757	26298.0	3078.27	11.7
	細胞株との MLR(マイトマイ シンC処理済み細胞タイプ B)	2596	5076	3426	3699.3	1262.39	34.1
SI(ドナー)					23		
SI(細胞株)					3		
IM04- 2481	受容体の増殖ベースライン	695	451	555	567.0	122.44	21.6
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	738	1252	464	818.0	400.04	48.9
	MLR 同種異型ドナーIM04- 2477(マイトマイシンC処理済 み)	13177	24885	15444	17835.3	6209.52	34.8
	細胞株との MLR(マイトマイ シンC処理済み細胞タイプ B)	4495	3671	4674	4280.0	534.95	12.5
SI(ドナー)					31		
SI(細胞株)					8		

【0 2 9 8】

【表 2 4 - 2】

プレート ID: プレート2								
分析 番号	培養 システム	多重検査				平均	SD	CV
		1	2	3				
IM04- 2482	受容体の増殖ベースライン	432	533	274		413.0	130.54	31.6
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	1459	633	598		896.7	487.31	54.3
	MLR 同種異型ドナーIM04- 2477 (マイトマイシンC処理済 み)	24286	30823	31346		28818.3	3933.82	13.7
	細胞株との MLR (マイトマイ シンC処理済み細胞タイプ B)	2762	1502	6723		3662.3	2724.46	74.4
SI (ドナー)						70		
SI (細胞株)						9		
IM04- 2477 (同 種異型ド ナー)	受容体の増殖ベースライン	312	419	349		360.0	54.34	15.1
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	567	604	374		515.0	123.50	24.0
細胞株タ イプA	受容体の増殖ベースライン	5101	3735	2973		3936.3	1078.19	27.4
	自己刺激のコントロール(マ イトマイシンC処理済み自己 細胞群)	1924	4570	2153		2882.3	1466.04	50.9

【 0 2 9 9】

【表 2 5】

表 10-5. 5 種類の同種間レシーバーとの混合リンパ球反応における臍
帯細胞及び同種間ドナーの平均刺激指数

平均刺激指数

	レシピエント	胎盤
プレート(レシーバー1~4)	42.75	6.5
プレート(レシーバー5)	70	9

【 0 3 0 0】

抗原提示細胞マーカー 胎盤

フローサイトメトリーにより分析された胎盤細胞のヒストグラムは、前記 I g G コント
ロールと一致した蛍光値により、認識されるように、HLA-DR、DP, DQ, CD 8
0, CD 8 6 及び、B 7-H 2 の陰性の発言を示し、胎盤細胞株は、CD 4 陽性 T 細胞を
直接刺激するのに必要な、前記細胞表面分子を欠くことを示す。

【 0 3 0 1】

免疫調節マーカー 胎盤

フローサイトメトリーにより分析された胎盤細胞のヒストグラムは、前記 I g G コント
ロールに比較して、前記上昇した蛍光値により認識されたように、PD-L 2 の陽性発現

を示し、前記 I g G コントロールと一致した蛍光値により、認識されるように、C D 1 7 8 及び H L A - G の陰性の発現を示す。

【0302】

抗原提示細胞マーカー—臍帯

フローサイトメトリーにより分析された臍帯細胞のヒストグラムは、前記 I g G コントロールと一致した蛍光値により、認識されるように、H L A - D R、D P、D Q、C D 8 0、C D 8 6 及び、B 7 - H 2 の陰性の発現を示し、臍帯細胞株は、C D 4 陽性 T 細胞を直接刺激するのに必要な、前記細胞表面分子を欠くことを示す。

【0303】

免疫調節マーカー—臍帯

フローサイトメトリーにより分析された臍帯細胞のヒストグラムは、前記 I g G コントロールと比較して、前記上昇した蛍光値により認識されたように、P D - L 2 の陽性発現を示し、前記 I g G コントロールと一致した蛍光値により、認識されるように、C D 1 7 8 及び H L A - G の陰性の発現を示す。

【0304】

要約

胎盤細胞株と行われた前記リンパ球混合反応において、前記平均刺激インデックスは 1 . 3 ~ 3 の範囲であり、前記同種陽性コントロールのそれは、4 6 . 2 5 ~ 2 7 9 の範囲であった。臍帯細胞株と行われた前記リンパ球混合反応において、前記平均刺激インデックスは 6 . 5 ~ 9 の範囲であり、前記同種陽性コントロールのそれは、4 2 . 7 5 ~ 7 0 の範囲であった。胎盤及び臍帯細胞株は、フローサイトメトリーにより測定されたように、前記刺激因子、H L A - D R、H L A - D P、H L A - D Q、C D 8 0、C D 8 6 及び B 7 - H 2、の発現は陰性であった。胎盤及び臍帯細胞株は、フローサイトメトリーにより測定されたように、免疫調節タンパク質である H L A - G 及び C D 1 7 8 の発現は陰性であった。同種ドナー P B M C s は、H L A - D R、D P、D Q、C D 8 0、C D 8 6 及び B 7 - H 2 を発現する抗原提示細胞を含み、従って、未処置 T 細胞の前記刺激を可能とする。未処置 T 細胞の前記直接刺激に必要な、胎盤及び臍帯由来細胞上の抗原提示細胞表面マーカーの前記欠如、及び P D - L 2、免疫調節タンパク質の存在は、同種コントロールと比較して、M L R 内でのこれら細胞により表される低い刺激インデックスの原因かもしれない。

【実施例 11】

【0305】

血漿凝固アッセイ

細胞治療は、細胞が作動部位を標的とすることができる特定の適応に、系統的に注入される。注入された細胞は、致命的となるような血栓症を引き起こさないことが重要である。組織因子である、膜結合凝血源糖タンパクは生体内 (i n v i v o) での前記優位な凝結経路である、外因性凝血経路の作動因子である。組織因子は、例えば、前記原始的血管壁の形成 (B r o d s k y ら (2 0 0 2) E x p . N e p h r o l . 1 0 : 2 9 9 ~ 3 0 6) におけるような、塞栓性血管形成において重要な役割も果たす。P P D C s が凝血を開始する能力があるかどうかを決定するために、臍帯及び胎盤由来 P P D C s は組織因子の発現及び血漿凝血を開始する能力が評価された。

【0306】

方法と材料

ヒト組織因子

ヒト組織因子 (O r g a n o n , T e k a i l c a C o r p o r a t i o n , ノースカロライナ州 D u r h a m) である S I M P L A S T I N は、2 0 ミリリットルの希釈された水と再構成された。前記原液は、8 本のチューブに連続的に希釈された (1 : 2) 。正常ヒト血漿 (G e o r g e K i n g B i o - M e d i c a l 、カンザス州オーバーランド) は水槽で 3 7 ° C で解凍され、その後、使用前に氷上で貯蔵された。1 0 0 マイクロリットルのリン酸緩衝食塩水 (P B S) 、1 0 マイクロリットルに希釈された S I M P

10

20

30

40

50

LASTIN（ブランクウェル除いて）、30マイクロリットルの0.1M塩化カルシウム、及び100マイクロリットルの正常ヒト血漿は96ウェルプレートの各ウェルに加えられた。前記プレートは、即座に、温度制御マイクロプレートリーダーに置かれ、吸光度は405ナノメートルで、40秒の間隔で、30分間測定された。

【0307】

J-82及び分娩後細胞

J-82細胞（ATCC、メリーランド州）は10%ウシ胎児血清（FBS；Hyclone、ユタ州ローガン）、1ミリモル濃度のピルビン酸ナトリウム（Sigma Chemical、ミズーリ州セントルイス）、2ミリモル濃度のLグルタミン（Mediatech、バージニア州Herndon）、1x不必須アミノ酸（Mediatech、バージニア州Herndon）を含むIscove's修飾したDulbecco培地（IMDM；Gibco、カリフォルニア州カールスバッド）内で増殖させた。70%コンフルエンスになったとき、細胞は、100,000、50,000、25,000細胞／ウェルで、96ウェルプレートのウェルに移された。胎盤及び臍帯から由来する分娩後由来細胞は、ゼラチンコーティングされたT75フラスコ（Corning、ニューヨーク州コーニング）内で、成長培養液内で培養された。継代5の胎盤由来細胞及び、継代5及び18の臍帯由来細胞は50,000細胞／ウェルでウェルに移された。培養液は150xg、5分間の遠心の後に、各ウェルから除去された。細胞は、カルシウム及びマグネシウムを含まないPBSで懸濁された。抗組織因子抗体で培養された細胞は、20マイクログラム／ミリリットルのCNT0859（Centocor、ペンシルベニア州Malvern）で30分間培養された。塩化カルシウム（30マイクロリットル）は各ウェルに加えられた。前記プレートは、即座に、温度制御マイクロプレートリーダーに置かれ、吸光度は405ナノメートルで、40秒の間隔で、30分間測定された。

【0308】

抗体染色

細胞はPBSで洗浄され、トリプシン／EDTA（Gibco、カリフォルニア州カールスバッド）で前記フラスコからはがされた。細胞は回収され、遠心され、3%（v/v）FBSを含むPBSで 1×10^7 細胞／ミリリットルとなる細胞密度で再懸濁された。前記製造者の説明書にあるように、抗体は、100マイクロリットルの細部懸濁液に加えられ、前記細胞は4℃で30分間、暗室で培養された。細胞は、100マイクロリットルの3%FBSで再懸濁され、前記製造者の規格のように、2次抗体が加えられた。細胞は4℃で30分間、暗室で培養された。培養後、細胞は、PBSで洗浄され、遠心されて、結合していない2次抗体が除去された。洗浄された細胞は、500マイクロリットルのPBSで再懸濁され、フローサイトメトリーで分析された。

【0309】

フローサイトメトリー分析

フローサイトメトリー分析は、FACSCalibur instrument（Becton Dickinson、カリフォルニア州サンホセ）を使用して行われた。

【0310】

結果

フローサイトメトリー分析は、胎盤及び臍帯由来分娩後細胞のいずれも、組織因子を発現することを明らかにした。血漿凝固アッセイは、組織因子が活性であることを示した。胎盤及び臍帯由来細胞のいずれも、前記半最高吸光度時間（ $T^{1/2}$ to max；表11-1）により示されるように、凝血率は上昇した。凝血は、初期（P5）及び後期（P18）のいずれにおいても観察された。前記 $T^{1/2}$ to max（半最高吸光度時間）は、J82細胞の前記数と逆相関である。臍帯細胞のCNT0859（組織因子への抗体）のプレインキュベーションが、前記凝血反応を阻害したことによって、組織因子が凝血の原因であることを示した。

【0311】

【表 2 6】

表 11-1: ヒト組織因子 (SIMPLASTIN)、胎盤由来細胞 (Pla)、臍帯由来細胞 (Umb) が凝固血漿に与える効果が評価された。プレートでの半値吸光度までの時間 ($T_{1/2}$ から最大値) (秒) が測定単位として用いられた。

Simplastin® 希釈	$T_{1/2}$ から最大値 (秒)
1:2	61
1:4	107
1:8	147
1:16	174
1:32	266
1:64	317
1:128	378
0 (ネガティブコントロール)	1188
J-82 細胞	
100,000	122
50,000	172
25,000	275
Pla P5	
50,000	757
Umb P5	
50,000	833
Umb P18	
50,000	443

【0 3 1 2】

要約

胎盤及び臍帯由来 P P D C s は組織因子を発現した。抗体を組織に付加することにより、組織因子は阻害された。組織因子は、不活性の高次構造の細胞上で、通常見られるが、機械的或いは化学的ストレス（例えば、L P S）により活性化される。（S a k a r i a s s e n ら（2001）Thromb. Res. 104:149-74; Engstad ら（2002）Int. Immunopharmacol. 2:1585-97）。従って、P P D C s の前記準備の過程中、ストレスを最小化することにより、組織因子の活性化を防ぐことができる。前記血栓形成活性に加えて、組織因子は、血管原性活性と関連する。従って、組織因子活性は、臍帯或いは胎盤由来 P P D C s が組織内に移植されるとき、有益であるが、P P D C s が静脈内に注入されるとき、阻害されるべきである。

【実施例 1 2】

【0 3 1 3】

分娩後細胞の心筋細胞表現型への分化

虚血性心疾患及び先天性心不全などの心疾患の進行を遅らせ、及び／或いは治癒する治療の十分な必要性がある。不整脈を起こすことなく、心筋細胞に分化し、前記患者の心筋に完全に取り込まれる細胞が強く望まれている。5-アザシチジンで処理されたマウス間葉系幹細胞は、心筋細胞のマーカーを発現していることが示されている。（Fukuda ら（2002）C. R. Biol. 325:1027-38）。同様のことは、成人幹細胞では示されていない。付加的因子が幹細胞の分化のために使用されてきており、付加的因子は、低酸素（Storch（1990）Biochim. Biophys. Acta 1055:126-9）、レチノイン酸（Wobus ら（1997）J. Mol. Ce

11 Cardio1. 29:1525~39)、DMSO (Xuら (2002) Circ. Res. 91:501~8)、及び塩化ヘレリスリン (国際PCT公報番号第WO03/025149号) を含み、PKCが前記細胞質から形質膜へと移動するのに影響を与え、PKC活性の阻害剤である。本研究において、PPDCs (継代10) は5-アザシジン単独、或いはDMSO若しくは塩化ヘレリスリンとの併用で処理され、心筋細胞のマーカーがリアルタイムPCRにより測定された。

【0314】

方法と材料

細胞

冷凍保存された臍帯由来細胞 (継代10) 及び胎盤由来細胞 (継代24) はゼラチンコーティングされたフラスコ内で、成長培養液中で増殖させた。細胞は、96ウェルプレート内に成長培養液中で24時間、 5×10^4 細胞/ウェルに播種された。前記培養液は、0, 3, 10、及び30 μ Mの5-アザシジン (Sigma、ミズーリ州セントルイス) 単独或いは、5 μ Mの塩化ヘレリスリン (Sigma)、1% (v/v) ジメチルスルホキシド (DMSO) (Sigma) 或いはMEM-アルファ中 (Sigma) の1 μ M レチノイン酸 (Sigma)、インスリン、トランスフェリン、及びセレンウム (ITS, Sigma)、及び10% (v/v) ウシ胎児血清、ペニシリン及びストレプトマイシンに変えられ、細胞は37°C、5% (v/v) 酸素で、48時間或いは72時間で培養された。培養液の後、MEM-アルファ、インスリン、トランスフェリン、セレンウム、10% (v/v) ウシ胎児血清、ペニシリン及びストレプトマイシンに変えられ、37°C、5% (v/v) 酸素で14日間培養された。

【0315】

RNA抽出及び逆転写

細胞は、前記製造者説明書 (RNeasy 96キット、Qiagen、バレンシア、カリフォルニア州) に従って、 β -メルカプトエタノール (Sigma、ミズーリ州セントルイス) を含む150マイクロリットルのRLT緩衝液で溶解され、-80°Cで貯蔵された。細胞溶解物は解凍され、前記製造者説明書 (RNeasy 96キット、Qiagen、バレンシア、カリフォルニア州) に従って、RNAは、2.7 U/サンプルのDNase処理 (Sigma、ミズーリ州セントルイス) で抽出された。RNAはDEPC処理された50マイクロリットルの水に溶出され、-80°Cで貯蔵された。RNAは前記タクマン (TaqMan (登録商標)) 逆転写試薬 (アプライドバイオシステムズ、カリフォルニア州フォスター) とともに、ランダム六量体を使用して、25°Cで10分間、37°Cで60分間、および95°Cで10分間、逆転写された。サンプルは-20°Cで貯蔵された。

【0316】

PCR

PCRは、Assays-on-Demand (商標) 遺伝子発現産物を使用して、cDNAサンプル上で実行され、心臓ミオシン (Hs00165276ml)、骨格ミオシン (Hs00428600)、GATA4 (Hs00171403ml)、及びGAPDH (アプライドバイオシステムズ、カリフォルニア州フォスター) は、ABIプリズム7000 SDSソフトウェア (アプライドバイオシステムズ、カリフォルニア州フォスター) とともに、7000のシークエンス検出システムを使用して、前記製造者 (Assays-on-Demand (商標)) での説明書に従って、cDNAとTaqManユニバーサルPCDマスターミックスとが混合された。熱サークル条件は、最初に、50°C2分、95°C10分で、続いて、95°C15分で、95°C15秒及び、60°C、1分を40サイクルであった。心臓及び骨格筋からのcDNA (Ambion Austin TX) はコントロールとして使用された。

【0317】

結果

心筋からのRNAの分析は、心臓ミオシン及びGATA4の発現を示した。骨格筋RN

10

20

30

40

50

A分析は、骨格ミオシン及び心臓ミオシンの発現は示したが、GATA4の発現は示さなかった。因子と共に72時間処理され、更に14日間増殖した胎盤由来細胞（継代24）はGATA4を発現したが、骨格ミオシン或いは心臓ミオシンは発現しなかった。48時間、因子で処理され、さらに14日間培養された臍帯由来細胞（継代12）はGATA4の低レベルの発現を示したが、骨格ミオシン或いは心臓ミオシンは発現しなかった。分析された胎盤及び臍帯細胞の付加的サンプルは前記試験された条件の下で、GATA4の発現を示した。

【0318】

要約

処理されていない胎盤及び臍帯由来細胞は、恒常的に、GATA4、心筋細胞、セルトリ細胞、及び肝細胞での核転写因子を発現する。

10

【実施例13】

【0319】

齧歯（げっし）類の冠状動脈連結における分娩後細胞に基づいた心血管治療の評価

心不全の動物モデルは、我々の疾患の病態生理学の理解を深め、先天性心疾患（CHD）のための新治療の発展に寄与してきた。冠動脈閉塞、或いは前記心臓組織に供給する血管の遮断は、ネズミにおいて、ヒトにおける急性心筋梗塞の病態生理に非常に類似し、CHFのための薬理学的介入の研究に、成功のうちに使用されてきた。心臓病変へのヒト細胞の移植は、CHFのための潜在的な実行可能な治療上の処置である。

20

【0320】

この研究の目的は、心筋虚血／拘束のネズミモデルにおいて、冠動脈閉塞15分後に投与された際の心腔内ヒト細胞治療の効果を決定するためである。

【0321】

方法と材料

チャールズブリバーウォーセスター（マサチューセッツ州）試験施設は、国際研究動物保護評価及び認定団体（Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, International: AAALAC）により、認定されており、米国農務省により実験動物において研究を実行できるように登録されている。全ての試験条件は、動物保護法（9CFR）およびその改正案に順守している。前記プロトコルは、研究開始前に、前記国際動物保護及使用委員会（Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC）により、規則に準拠して前記試験設備で検査され認可された。

30

【0322】

表13-1に同定される特徴を有する前記動物は、オートクレーブされたベッド上でマイクロアイソレーターケージ内で個別に飼育された。前記ケージは、実験動物の保護と使用の指導書に規定された基準を遵守している。

【0323】

【表 27】

表 13-1. 動物特性

種: *Rattus norvegicus*
 系統: Rnu
 源: Charles River Laboratories
 投与時の週齢: 6～8 週間
 投与時の体重: ~200-250 グラム
 雄の数(予備を含む):40 + 10

10

【0324】

フリーナ公認食事（放射済み）が前記動物に適宜提供された。この食事は、栄養組成物及び環境汚染物に関して前記製造者により定期的に分析された。前記製造者の分析の結果は、前記試験施設に記録されている。

20

【0325】

オートクレーブされ、ろ過された水道水が適宜提供された。前記ろ過された水のサンプルは総溶解物質、硬質、特定の微生物、及び選択された環境汚染物に関して分析された。これら分析の結果は、前記試験施設に記録されている。

【0326】

環境調節は、18～26℃（64～79°F）の温度、30%～70%の相対湿度に維持されるように設定された。12時間ごとの明かり、暗闇のサイクルが維持された。前記動物部屋において、1時間につき10回以上の空気交換が維持された。本研究での使用のために受領時及び前に、前記動物は、前記実験動物の試験施設標準手技方法、受領、環境、及び隔離（Test Facility Standard Operating Procedure, Receipt, Conditioning, and Quarantine of Laboratory Animals）に記載されているように、前記試験施設発売人管理プログラム（Test Facility Vendor Management Program）に従った環境に、最低4日間、収容された。

30

【0327】

動物はそれぞれ、独自の番号で同定され、この番号は、耳パンチにより表示された。動物の各体重は、動物が体重の順序分布によりグループに任意に割り当てられることにより、中間値より増減20%を越えないものである。

【0328】

前記動物は、ペントバルビタールナトリウム（40ミリグラム／キログラム）及びブプレノルフィン（0.05ミリグラム／キログラム）を筋肉内（IM）に与えられる一度の混合薬として、麻酔された。前記麻酔の確立後、動物は、18～16ゲージ、2インチの長さの血管カテーテル或いは適当な大きさの血管カテーテルを使用して挿管され、室内空気呼吸（酸素を供給され）、及び前記外科的方法を通して、陽圧人工呼吸装置で維持された。付加的麻酔は、必要な際に、増加的に与えられた。術前抗生物質治療も行われた。ベンザシン／プロカイン ペニシリンG、40000ユニット／キログラム、筋肉内（IM）。付加的抗生物質治療は48時間ごとに投与された。

40

【0329】

電極板は使用可能な心電図信号を受け取るために前記動物の前記適切な足の周囲に配置された。動物は前記方法を通して、体温を維持するのを助けるために、ヒーティングパッ

50

ド上に置かれた。直腸温プローブが前記動物に挿入され、体温が測定された。眼科用軟膏が各眼に投与された。手術部位（胸部）の過剰な毛を除去し、70%イソプロピルアルコールに浸された乾燥したスポンジで前記部位を穏やかにふき取ることにより無菌手術の準備がされた。Medi Sepps（商標）或いは類似溶液が、その後、前記部位に添加され、乾燥させた。前記部位は、完全な無菌手術のために、適切にドレープされた。

【0330】

外科的切開は、第4肋間上の皮膚に行われた。前記筋層を通して、鈍的切開が胸腔に接近するために使用された。開創器は前記第4肋間に注意深く挿入され、前記内腔への到達を可能にするために開けられた。心膜は、滅菌生理食塩水に湿らされた綿棒で穏やかにほぐして、注意深く開けられた。湿った綿棒は、心臓の先部を開口部位に穏やかに押すために使用され、開口部位では、6-0の長さの絹糸が、前記心臓の操作のために、前記心膜に付着された。前記心臓が回復するのを許可する中断の後、先部に置かれた縫合は、胸腔から心臓を和らげ余裕、前記心臓に十分な緊張を与えて前記上部心臓及び前記左前下行冠動脈（LAD）に入るのを許容するために使用された。別の6-0の長さの絹糸は前記LADを取り囲むように前記心膜の中に留置された。前記尖端の縫合上の圧力は緩められ、前記心臓が前記胸腔の前記内部へと戻ることを許容する。

【0331】

前記心拍及びECGが基準値に戻ると、前記LADの周りの前記結紮糸は前記LADを閉塞するために、縛られた。これは、縛られた前記縫合による永久閉塞で、末端は切られた。前記結紮糸が縛られると、外科医は、成功的な閉塞の次の可能性のあるものを探す。すなわち、前記結紮糸直下の前記心臓部位の色が、前記部位への前記終末血流の結果として、白/灰色、白へと変化すること及び、前記LADの閉塞に一致したECGの優位な変化である。不整脈は、前記閉塞の最初の10分以内に発症するかもしれない。ラットは、蘇生が必要であるこの期間、よく監視された。深刻な不整脈及び正常洞リズムへと戻ることができない場合、心臓マッサージにより、補助が与えられた。前記LAD閉塞の開始約15分後、前記虚血された左室の前記部位は、前記虚血性心膜内に直接注入することにより、基剤或いは試験薬剤により処置された。治療は、前記虚血心膜部位への3-10回の心膜内注入を含んだ。

【0332】

ヒト細胞は、ゼラチンコーティングされたT300フラスコ内で成長培養液内で培養させた。細胞は、リン酸緩衝食塩水（PBS、Gibco、カリフォルニア州カールスバッド）で、洗浄され、トリプシン/EDTA（Gibco、カリフォルニア州カールスバッド）でトリプシン処理された。前記トリプシン処理は、成長培養液を加えることにより停止された。前記細胞は、150xgで遠心され、上清は除去され、前記細胞ペレットは、百万細胞につき約1ミリリットルの成長培養液で再懸濁された。細胞の一定量は、除去され、トレパンプル（Sigma、ミズーリ州セントルイス）に加えられた。前記生細胞の数は血球計数板を使用して見積もられた。前記細胞懸濁は、遠心され、10%（v/v）DMSO（ハイブリマックス、Sigma、ミズーリ州セントルイス）/5百万細胞を含む1ミリリットルの成長培養液中に再懸濁され、クライオバイアル（Nalgene）に移された。前記細胞は、「Mr Frosty」容器（Nalgene、ニューヨーク州、ロチェスター）を使用して、約1℃/分、-80℃の冷凍庫で一晩冷却された。細胞のバイアルは液体窒素に移された。バイアルは、CBAT、ニュージャージー州Somervilleからチャールズリバー、ウォセスター、MAにドライアイス上で、輸送され、-80℃で貯蔵された。前記動物に細胞を注入する約1-2時間前に、細胞のバイアルは、BSL2バイオセーフティーな容器内で無菌条件下で、37℃の水槽内で急速に解凍され、細胞は、マグネシウム及びカルシウム（Sigma、ミズーリ州セントルイス）を含む40ミリリットルのPBSに加えられ、150xgで5分間遠心された後、前記細胞ペレットは、10ミリリットルのPBS内で再懸濁された。前記細胞の数及び生存力は、上記に記載されたように推定された。前記細胞は、150xgで5分間遠心され、最終濃度が10⁶生細胞/100マイクロリットルとなるようにPBSで再懸濁された。前記細胞懸

濁は、30 G 針を使用して1ミリリットルのシリンジに流され、氷上に置かれた。生存能力は、氷上で5時間まで、再び評価された。

【0333】

処理（表13-2）の前記投与及び前記心臓の安定化の後、外科医は、前記外科的切開を閉じ始めた。前記開創器は除去された。前記肺は、3～4呼吸の間、過膨張させ、前記肺が完全に再膨張するか確実にするために可能な限り、視覚的に検査された。これは、回復後気胸を予防するために必要な陰圧を作り出した。前記腔を閉じた後に、前記胸腔から液体及び過剰な空気を逃すために、静脈内カテーテル（すなわち、20ゲージ、2mmの長さ）は、前記皮膚及び筋層を通して、前記先端が前記胸腔にとどまるように、留置された。前記先端が前記肺或いは心臓を突き刺さないように注意が払われた。前記分けられた肋骨及び関連する筋は適切な縫合で縫合された。前記皮膚は、水平マットレスパターンを使用して4-0絹糸で閉じられた。10ミリリットルのシリンジが、前記胸腔内に先に留置された前記静脈内カテーテルに装着され、前記プランジャーはゆっくりと逆流し、液体及び空気を前記腔から引いた。同時に、前記カテーテルは、前記部位全体からゆっくり引き抜かれることによって、前記周囲の筋塊及び皮膚が、前記穿刺を閉じるようにした。前記外科的ドレープは除去され、液体（すなわち、乳酸リンガー液、25ミリリットル/キログラムを皮下〔SC〕或いは腹腔内〔IP〕に）は与えられた。

【0334】

【表28】

表 13-2: 処理投与計画

Gr. No.	雄の 数	テスト対象	投与量レベル (細胞/動物)	投与濃度 (細胞/ミリ リットル)	経路/投与量 計画	治療投与の時 間	剖検日
1	8	溶媒	0	0	心臓左室の虚 血部位への、3 ～10回の全量1 00 μ Lの心臓内 注入を含む直 接注入	冠動脈結さつ 後15分	28 日 ($\pm$ 1 日)
2	8	胎盤 #4 (P10) (A)	100 万	1000 万			
3	8	臍 (P10) (B)					
4	8	胎盤 #3 (P10) (C)					
5	8	ヒト線維芽細胞 1F1853 (P10) (D)					

Gr. = 群; No. = 数; Conc. = 濃度

【0335】

各ラットが被験物質による治療を受け、前記切開が縫合された後、前記動物は心電図（ECG）検査を受けた。麻酔は、エコー検査が完了するまで維持された。前記エコー検査の際、人工呼吸器が取り外され、前記ラットは、前記回復領域に戻され、暖められ酸素処理されたケージ内で回復した。

【0336】

それぞれの生存している動物の2度目のエコー検査は、終了に先立って、本研究の最後（治療後約28日目）、に行われた。前記2度目の検査の間、前記動物は、先に記載されたように麻酔された。

【0337】

各エコー検査のために、前記左胸部は、毛をそられ、暖められ、前記変換機との接触を高めるために、超音波ゲルが前記皮膚に貼付された。電極板は、ECG信号を受け取るた

めに前記適切な四肢の周りに配置された。心エコー画像は、心室腔次元、収縮性、血管を通しての血流、壁の厚さを決定するために、短軸、長軸図を含んだ。これらが像は、更なる分析のために、光学ディスクに保存された。試験後、前記ゲル液は、前記皮膚から、ガーゼ或いはペーパータオルにより除去された。ラットは、前記人工呼吸器から取り外され、動き出すまで、暖められた回復ケージの中に置かれた。

【0338】

前記手術手技の最後に、人工呼吸器が止められた。前記動物は、ペダル反射に関して観察された。直腸プローブ及びECGが、次に除去され、前記動物は、チューブをはずされ、暖められた、酸素処理された回復ケージ内におかれた。麻酔から完全に回復した後、前記動物は、ブプレノルフィン（0.05ミリグラム／キログラム，SC）を投与された。前記動物が、完全に動き、植物及び水に興味を示すまで、定期的に観察された。前記動物は、その後、清潔な飼育ケージに移され、前記動物飼育部屋に戻された。動物は、術後、一日に2度、手術創の回復に関して、監視された。

10

【0339】

鎮痛剤（すなわち、ブプレノルフィン、0.05ミリグラム／キログラム，SC）は術後及びそれ以後必要の応じて、4日間、一日に2度投与された。術後痛の視覚的指標は、正常姿勢及び動態の欠如（例えば、動物が体を丸めた姿勢でいる）、反感、飲食の欠如、グルーミングの欠如を含む。

【0340】

体重は、最初の治療前、その後、週ごと、及び前記剖検日に、動物それぞれに記録された。死が確認された動物は、体重を量り、剖検された。

20

【0341】

前記心臓を回収するために、それぞれのラットは、手術のためにされたように麻酔をされた。頸静脈は、カニューラされた。前記心臓は、前記頸静脈カニューラを経て融合した塩化カリウムで、拡張期に停止させた。限定された剖検は前記心臓上で行われ、その後、前記心臓は、10%中性緩衝ホルマリン内に置かれた。各死体の前記残りは、さらなる評価をせずに廃棄された。

【0342】

死んでいる或いは安楽死され瀕死であるとみなされた全ての動物の心臓は、評価されるまで、4%パラフォルムアルデヒド内に置かれた。各死体の残りは、更なる評価をせずに廃棄された。

30

【0343】

組織学及び画像分析

ステンレス鉄製冠状心臓基質（Harvard Apparatus、マサチューセツチ州Holliston）により薄切りにされた固定された組織は、4つの、2ミリメートルの厚さの連続組織セクションを産生した。セクションは、決まった方法を使用して処理され、パラフィンに包埋された。マイクロトームにより、5マイクロンのセクションが得られ、製造者の方法を使用して、結合組織のためにMasson'sトリクローム染色された（Poly Scientific、ニューヨーク州Bay Shore）。電子顕微鏡写真は取り込まれ、フェイズ3イメージングシステム（ペンシルベニア州グレンミルズ）により開発された画像分析法を使用して、分析された。トリクローム染色セクションの顕微鏡写真は、前記心室及び自由壁の全体部及び前記鑑別染色の前記部位を電子的に決定するために、色計測的に分析された。

40

【0344】

結果

氷の上に置かれたとき、前記基剤に5時間以上置かれた細胞の最初の生存力に消失はなかった。細胞は、前記梗塞巣に、1～3の針入部で、針の進行方向を様々に変化させて注入された。

【0345】

前記梗塞処置されたラットからのエコー検査測定は、前記結果を評価するためであった

50

。前記左室分画短縮及び駆出率が同様に利用された。これらの値は、Sahnら（1978）Circulation 58:1072~1083により記載されているように計算された。前記基質処置された動物の前記分画短縮は、0日目の47.7%±8.3%から、28日目の23.5%±30.2%（ $p<0.05$ ）へと有意に減少した。分娩後由来細胞で処置された前記動物は、0日目と28日目の間で、前記分画短縮の間に、わずかな、非有意な差を示した。0日目でグループ間での前記分画短縮の間に、有意な差はなかった。各グループは、前記開始時、8動物を有していたが、いくつかは実験を生き残れなかった。前記線維芽細胞処置動物は、PPDCsで処置されたグループよりも高い死亡率（80%）を経験した。

【0346】

10

本研究終了時に集められた心臓は、組織学的分析を受けた。前記心臓は、拡張期に停止され、固定された。前記結果は、前記梗塞を有する全心臓領域のパーセントを見積もるためのアルゴリズムから計算された。前記基質処置された動物の前記梗塞サイズは、心臓領域の22.9%±6.7%である一方、分娩後由来細胞（単離1）処置された心臓では、前記梗塞サイズは、13.9%±3.7%であり、臍帯細胞では、12.5%±2.5%、胎盤由来細胞（単離2）では、12.9%±3.4%で、線維芽細胞では、19.3%±8.0%であった。基質処置された動物に比較して、細胞処置された動物の梗塞サイズの前記差異は、スチューデントのt検定或いはNOVAにより、統計学的に有意ではなかった。

【0347】

20

要約

本研究の前記結果は、前記分娩後由来細胞が、ラットにおいて、外科的に誘導される心筋梗塞の損傷を減少するという利点があることを示唆している。前記基質処置された動物は、分画短縮により測定されたように、0日目と比較して、28日目で、心機能における有意な低下を示し、一方で前記胎盤及び臍帯由来細胞に処置された動物は、最小の変化を示したが、2動物しか本研究を生き残れなかった。梗塞サイズの評価は、28日目に、前記基質コントロールと比較して、前記分娩後由来細胞に処置された動物における前記梗塞サイズの中程度だが、統計学的に有意ではない減少があることを示唆した。総合すれば、これらデータは、心筋梗塞からの損傷を減少させることにおいて、前記分娩後由来細胞の効果を立証する。

30

【実施例14】

【0348】

PPDCsは、基質-細胞複合体として注入可能である

前記分娩後臍帯から由来する細胞は再生治療のために有用である。生体分解性材料とともに、SCIDマウスに移植される分娩後由来細胞により産生される前記組織が、評価された。前記評価された材料は、Vicryl不織、35/65 PCL/PGA発泡体、及びRAD16自己集合性ペプチドハイドロゲルであった。

【0349】

方法と材料

細胞培養

40

臍帯由来細胞は、ゼラチンコーティングされたフラスコ内で成長培養液中で培養された。

【0350】

試料調製

百万の生細胞は、15ミリリットル成長培養液中で、直径5mm、2.25mmの太さのVicryl不織骨格（64.33mg/cc；ロット番号#3547-47-1）或いは直径5mm、35/65 PCL/PGA発泡体（ロット番号#3415-53）上に播種された。細胞は、前記骨格を覆うために成長培養液をより加える2時間前に、接着させた。細胞のない骨格も培養液中で培養された。

【0351】

50

RAD16自己集合性ペプチド(3D Matrix、マサチューセッツ州ケンブリッジ、材料輸送同意に基づいて)無菌1%(w/v)溶液として得られ、溶液は、使用直前に、10%(w/v)ショ糖(Sigma、ミズーリ州セントルイス)及びダルベッコ変法イーグル培地(DMEM; Gibco)に10ミリモル濃度のHEPES中の 1×10^6 細胞と1:1で混合された。RAD16ハイドロゲル中の細胞前記最終濃度は、 1×10^6 細胞/100マイクロリットルであった。

【0352】

試験材料(N=4/Rx)

1. Vicryl不織+ 1×10^6 臍帯由来細胞
2. 35/65PCL/PGA発泡体+ 1×10^6 臍帯由来細胞
3. RAD16自己集合性ペプチド+ 1×10^6 臍帯由来細胞
4. 5/65PCL/PGA発泡体
5. Vicryl不織

10

【0353】

動物調製

本研究で利用された前記動物は、前記動物保護法の現在の規則に従って、扱われ、維持された。上記一般法律の順守は、前記動物保護規則(9CFR)に忠実であること及び、実験動物の保護と使用のための指導書(Guideline for Care and Use of Laboratory Animals)第7版に公表されている現在の基準に従うことにより達成された。

20

【0354】

マウス(Mus Musculus)/フォックスチェイスSCID/オス(Harlan Sprague Dawley社、インディアナ州インディアナポリス)、5週齢。前記SCIDマウスの全ての取り扱いは、ドラフト内で行われた。前記マウスは、個別に体重を測定され、60ミリグラム/キログラムのKETASET(ケタミンハイドロクロライド、Aveco、アイオワ州Fort Dodge)及び10ミリグラム/キログラムのROMPUN(xylazine, Mobay社、カンザス州Shawnee)及び生理食塩水の混合を腹腔内注入で麻酔された。麻酔導入後、背側頸部から背側腰仙部までの前記動物の全背部は電気動物クリッパーを使用して、毛のない部分をクリップした。前記部位は、それから、クロルヘキシジン溶液でゴシゴシ洗われ、アルコールですすぐれ、乾燥させられ、1%の利用可能な液体ヨード溶液で塗られた。眼科用軟膏は前記麻酔期間中、前記組織が乾燥するのを防ぐために前記眼に添加された。

30

【0355】

皮下移植技術

4皮膚切開、それぞれ約1.0cmの長さ、が前記マウスの背側に作られた。2頭蓋部位は、背側側胸部を超えて横断し、前記肩甲骨の触手可能な下端まで約5mm尾側で、一つは前記脊柱の左側、一つはその右側に設けられた。別の2つは、尾側腰仙レベルの臀筋部位を横断して、触手可能な腸骨稜へ約5mm尾側に、一方を他方の真ん中に設けた。移植は、無作為にこれら部位に置かれた。前記皮膚は、下にある結合組織から分けられ、小さなポケットを作り、前記移植は前記切開創へ約1cm尾側に置かれた(或いはRAD16を注入された)。前記適切な試験材料は、前記皮下の空間に移植された。前記皮膚切開創は金属クリップで閉じられた。

40

【0356】

動物飼育

マウスは、本研究のコースを通して、64°F~79°Fの温度の範囲で、30%~70%の相対湿度で、マイクロアイソレーターの中で個別に飼育され、12時間は光、12時間は暗いサイクルで適切に維持された。前記温度及び相対湿度は、一定の範囲で、可能な最大程度までで維持された。食事は、放射性Pico Mouse Chow5088(Purina社、コロラド州)及び水が自由に与えられた。

【0357】

50

組織学

移植された切除された皮膚は、10%中性緩衝ホルマリン (Richard-Allan、ミシガン州 Kalamazoo) で固定された。組織の上であって、近接するサンプルは、中心を二分され、パラフィン化され、包埋され、決まった方法を使用して、表面を切られた。5マイクロンの組織セクションはマイクロトームにより得られ、決まった方法を使用して、ヘマトキシリン及びエオジン (Poly Scientific、ニューヨーク州 Bay Shore) で染色された。

【0358】

結果

30日後、SCIDマウスに皮下に移植された発泡体内で、組織の成長は最小であった。対照的に、臍帯由来細胞とともに移植された発泡体で満たされた拡張した組織があった。

10

【0359】

Vicryl不織の骨格内で増殖させたいくつかの組織があった。臍帯由来細胞を播種された不織骨格は、基質の沈着の増加及び成熟した血管を示した。

【0360】

要約

本研究の目的は、免疫欠損マウス内で、骨格の中で、ヒト臍帯から由来する細胞により形成された組織のタイプを決定することである。合成吸収性の不織／発泡体状のディスク (5.0mm直径、1.0mm厚さ) 或いは自己集合性ペプチドハイドロゲルはヒト臍帯由来細胞とともに播種され、SCIDマウスの背側脊椎部位に、皮下に、両側に移植された。本研究は、分娩後由来細胞が生体分解性の骨格において、良質の組織形成を劇的に増加することを示す。

20

【実施例15】

【0361】

内皮ネットワーク形成：PPDCsはIn Vitro (試験管内) で血管新生を促進する

血管新生或いは新血管の形成は、新しい組織の成長のために必要である。血管新生の誘導は、多くの病態生理学的条件において、重要な治療の目標である。本研究は、前記分娩後細胞のin vitroアッセイにおける血管新生の活性能を同定することを目的とされた。本研究は、内皮細胞を、基底膜抽出物でコーティングされた培養プレート上に播種し (Nicosia及びOttinetti (1990) In Vitro Cell Dev. Biol. 16 (2) : 119~28)、よく確立された方法に従った。血管新生因子とともに細胞外基質上に内皮細胞を処理することは、前記細胞が、毛細血管に類似したネットワークを形成することを刺激する。本研究は、培養ウェルインサート上に播種された前記分娩後細胞を有する共培養システムを利用する。前記透過性インサートは、前記内皮と前記分娩後培養液間の培養組成物の能動的交換を可能にする。

30

【0362】

材料と方法

細胞培養

分娩後組織由来細胞。ヒト臍帯及び胎盤は、上述したように (例1)、受け取られ、単離された。細胞は、ゼラチンコーティングされた培養プラスチックフラスコ上で成長培養液内で培養された。前記培養は、37℃、5%CO₂で培養された。実験に使用された細胞は、約継代4~12であった。

40

【0363】

活発に成長する分娩後細胞は、トリプシン処理され、数えられて、Costar (商標) Transwell (商標) 6.5mm直径の組織培養インサート (Corning、ニューヨーク州コーニング) に15,000細胞／インサートで播種された。細胞は、前記インサート上で、48~72時間の成長培養液内で37℃、5%CO₂で培養された。

【0364】

50

ヒト間葉系幹細胞 (hMSC)。hMSCsは、Cambrex (メリーランド州ウォーカースビル) から購入され、MSCGM (Cambrex) 内で培養された。前記培養は、37℃、5%CO₂で培養された。

【0365】

活発に成長するMSCsは、トリプシン処理され、数えられて、Costar (商標) Transwell (商標) 6.5mm直径組織培養インサート (Corning、ニューヨーク州コーニング) に15,000細胞/インサートで播種された。細胞は、前記インサート上で、48~72時間、成長培養液内で37℃、5%CO₂で培養された。

【0366】

ヒト臍静脈内皮細胞 (HUEC)

10

HUECは、Cambrex (メリーランド州ウォーカースビル) から得られた。細胞は、EBM或いはEGMいずれかで、内皮細胞培養液 (Cambrex) 内で分けられた培養で増殖させた。細胞は、標準組織培養プラスチック上で、37℃、5%CO₂で成長された。前記アッセイで使用された細胞は約継代4~10であった。

【0367】

ヒト冠動脈内皮細胞 (HCAEC)

HCAECはCambrex社 (メリーランド州ウォーカースビル) から購入された。前記細胞は前記EBM或いはEGM培地製剤のいずれかにおいて分けられた培養液中で維持された。細胞は標準組織培養プラスチック上で、37℃、5%CO₂で成長された。実験に使用された細胞は、約継代4~8であった。

20

【0368】

Matrigel (商標) アッセイ

培養プレートは、製造者の規格に従って、Matrigel (商標) でコーティングされた。つまり、Matrigel (商標) (BD Discovery Labware、マサチューセッツ州Bedford) は4℃で解凍され、約250ミリリットルに分注され、冷却された24ウェル培養プレート (Corning) の各ウェルに均等に分配された。前記プレートは、それから、前記材料が硬くなるように、37℃で30分間培養された。活発に成長している内皮細胞培養は、トリプシン処理され、数えられた。細胞は、遠心、再懸濁、及び前記上清を吸引することにより2%FBSを含む成長培養液で2度洗浄された。細胞は前記コーティングされたウェル上に、2%FBSを含む約0.5ミリリットルの成長培養液内に、20000細胞/ウェルで播種された。細胞は、その後、細胞が定着するように約30分間培養された。

30

【0369】

内皮培養細胞は、その後、内皮細胞反応のための陽性コントロールとして、働くために、10ナノモル濃度のヒトbFGF (Peprotech、ニュージャージー州Rocky Hill) 或いは10ナノモル濃度のヒトVEGF (Peprotech, Rocky Hill, NJ) で処理された。分娩後細胞が播種されたトランスウェルインサートは、前記インサート内に2%FBSを含む成長培養液で満たされた適切なウェルに加えられた。培養は37℃、5%CO₂で、約24時間培養された。前記ウェルプレートは、前記培養器から取り除かれ、前記内皮細胞培養の画像は、オリンパス逆落斜型蛍光顕微鏡 (Olympus, Melville, ニューヨーク州) で回収された。

40

【0370】

結果

胎盤由来細胞或いは臍帯由来細胞を含む共培養システムにおいて、HUECは、細胞ネットワークを形成する。HUEC細胞は、hMSC及び、10ナノモル濃度のbFGFを含む共培養実験において限定された細胞ネットワークを形成する。いかなる処置も施されないHUEC細胞は、ネットワーク形成をほとんど或いはまったく示さなかった。これらの結果は、前記分娩後細胞が前記HUECを刺激する血管新生因子を放出することを示唆する。

【0371】

50

胎盤由来細胞或いは臍帯由来細胞を含む共培養システムにおいて、CAECsは細胞ネットワークを形成する。

【0372】

表15-1は、成長培養液中で前記分娩後細胞により放出される既知の血管新生因子のレベルを示している。分娩後細胞は、上記のように、インサート上に播種された。前記細胞は、37℃、空气中酸素で、前記インサート上で48時間培養され、その後、2%FBS培養液に変えられ、24時間37℃で戻された。培養液は除去され、即座に凍結され、-80℃で貯蔵され、前記サーチライト (SearchLight (登録商標)) マルチプレックスELISAアッセイ (Pierce Chemical社、イリノイ州Rockford) により分析された。示された結果は、二つ組の測定の平均である。前記結果は、前記分娩後細胞が、検出可能なレベルの血小板由来成長因子-bb (PDGF-bb) 或いはヘパリン結合上皮細胞成長因子 (HBEGF) を放出しないことを示す。前記細胞は、測定可能な量のメタロプロテアーゼ-1組織阻害剤 (TIMP-1)、アンギオポイエチン2 (ANG2)、トロンプオエチン (TPO)、角化細胞成長因子 (KGF)、幹細胞成長因子 (HGF)、線維芽細胞成長因子 (FGF)、及び血管内皮成長因子 (VEGF) を放出する。

【0373】

【表29】

表 15-1:分娩後由来細胞から放出された可能性のある血管由来因子。分娩後由来細胞は空气中の酸素で2%FBSを用いた培養中、24時間培養された。SearchLight (登録商標) multiplex ELISA アッセイ (Pierce) により、培地が除去され、アッセイされた。結果は繰り返し分析の方法である。値は、培地 1 ミリリットル当たりのピコグラムで報告された培地中の濃度である。

	TIMP1	ANG2	PDGFBB	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF
	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)
胎盤 (P4)	91655.3	173.5	<2.0	275.5	3.0	58.3	7.5	644.6	<1.2
胎盤 (P11)	1592832.4	28.1	<2.0	1273.1	193.3	5960.3	34.8	12361.1	1.7
臍帯(P4)	81831.7	<9.8	<2.0	365.9	14.1	200.2	5.8	<4.0	<1.2
培養液のみ	<9.8	25.1	<2.0	<6.4	<2.0	<3.2	<5.4	<4.0	<1.2

【0374】

表15-2は、前記分娩後細胞により放出される既知の血管新生因子のレベルを示す。分娩後細胞は、上記のように、インサート上に播種された。前記細胞は、37℃、5%酸素で、前記インサート上で48時間培養され、その後、2%FBS培養液に変えられ、24時間37℃で戻された。培養液は除去され、即座に凍結され、-80℃で貯蔵され、前記サーチライト (SearchLight (登録商標)) マルチプレックスELISAアッセイ (Pierce Chemical社、イリノイ州Rockford) により分析された。示された結果は、二つ組の測定の平均である。前記結果は、前記分娩後細胞は、検出可能なレベルの血小板由来成長因子-bb (PDGF-bb) 或いはヘパリン結合上皮細胞成長因子 (HBEGF) を放出しないことを示す。前記細胞は、測定可能な量の、メタロプロテアーゼ1組織阻害剤 (TIMP1)、アンギオポイエチン2 (ANG2)、

トロンボポエチン（TPO）、角化細胞成長因子（KGF）、幹細胞成長因子（HGF）、線維芽細胞成長因子（FGF）、及び、血管内皮成長因子（VEGF）を放出する。

【0375】

【表30】

表 15-2:分娩後由来細胞から放出された可能性のある血管由来因子。
分娩後由来細胞は酸素 5%で 2% FBS を用いた培養中、24 時間培養された。SearchLight (登録商標) multiplex ELISA アッセイ (Pierce) により、培地が除去され、アッセイされた。結果は繰り返し分析の方法である。値は、培地 1 ミリリットル当たりのピコグラムで報告された培地中の濃度である。

	TIMP1	ANG2	PDGFBB	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF
	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)
胎盤 (P4)	72972.5	253.6	<2.0	743.1	2.5	30.2	15.1	1495.1	<1.2
胎盤 (P11)	458023.1	55.1	<2.0	2562.2	114.2	2138.0	295.1	7521.3	1.8
臍帯 (P4)	50244.7	<9.8	<2.0	403.3	10.7	156.8	5.7	<4.0	<1.2
培養液のみ	<9.8	25.1	<2.0	<6.4	<2.0	<3.2	<5.4	<4.0	<1.2

【0376】

要約

分娩後細胞は、in vitro Matrigel (商標) アッセイにおいて、ネットワークを形成するために、ヒト臍静脈及び冠動脈内皮細胞の両方を刺激することができる。この効果は、このアッセイシステムにおける既知の血管新生因子を有するものに類似し、前記分娩後細胞は、in vivo で血管新生を刺激するために有益であることを示唆する。

【0377】

分娩後由来細胞及び培養の生物学的委託

本明細書に提供された前記詳細な記載及び記述された例と一致して、本発明の臍帯由来細胞の例は、アメリカ培養細胞系統保存機関 (ATCC、バージニア州 Manassas) とともに、2004 年 6 月 10 日に委託され、ATCC アクセッション番号が次のように割り当てられた。(1) 細胞株名 UMB 022803 (P7) はアクセッション番号 PTA-6067、(2) 細胞株名 UMB 022803 (P17) はアクセッション番号 PTA-6068 である。

【0378】

前記臍帯由来細胞のように、本発明の胎盤由来細胞の例も、アメリカ培養細胞系統保存機関 (ATCC、バージニア州 Manassas) に委託され、ATCC アクセッション番号は以下のものである。(1) 細胞株名 PLA 071003 (P8) は 2004 年 6 月 15 日に委託され、アクセッション番号 PTA-6074 が割り当てられ、(2) 細胞株名 PLA 071003 (11) は 2004 年 6 月 15 日に委託され、アクセッション番号 PTA-6075 が割り当てられ、(3) 細胞株名 PLA 071003 (P16) は 2004 年 6 月 16 日に委託され、アクセッション番号 PTA-6079 が割り当てられた。

【配列表】

0004948165000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 L 27/00	(2006.01)	A 6 1 L 27/00	Z
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A

- (72)発明者 ハリス、イアン、ロス
アメリカ合衆国、08502 ニュージャージー州、ベレ ミード、ハドナット レーン 42
- (72)発明者 ハーモン、アレクサンダー、エム.
アメリカ合衆国、08890 ニュージャージー州、クリントン、ヒルサイド ドライブ 17
- (72)発明者 キーム、アンソニー、ジェイ.
アメリカ合衆国、08540 ニュージャージー州、プリンストン、チコピー ドライブ 22イ
ー
- (72)発明者 メシーナ、ダリン、ジェイ.
アメリカ合衆国、08876 ニュージャージー州、サマービル、アパートメント 219、ニュ
ー ストリート 11
- (72)発明者 ミストリー、サンジェイ
アメリカ合衆国、07921 ニュージャージー州、ベッドミンスター、ウッド ダック ポンド
ロード 5
- (72)発明者 セイダ、アグニーズカ
アメリカ合衆国、08901 ニュージャージー州、ニュー ブランズウィック、アパートメント
16ジェイ、ジョージ ストリート 1050
- (72)発明者 イ、チンフェン
アメリカ合衆国、08844 ニュージャージー州、ヒルズボロウ、ビーチウッド サークル 8
6
- (72)発明者 ゴシェウスカ、アンナ
アメリカ合衆国、08558 ニュージャージー州、スキルマン、レッド フォックス コート
39

審査官 中村 正展

- (56)参考文献 国際公開第98/017791 (WO, A1)
国際公開第03/047607 (WO, A1)
国際公開第95/023216 (WO, A1)
Blood, 2001年, vol. 98, no. 11, p. 147b (Abstract #4260)
Stem Cells, 2003年 1月, vol. 21, 105-110
Cell Biol. Int. Rep., 1989年, vol. 13, 569-575
Exp. Cell Res., 1984年, vol. 155, 241-251
WANG, BLOOD, 2001年11月16日, V98, P183A
Ann. Thorac. Surg., 2002年, vol. 73, 1919-1926
J. Clin. Invest., 1999年, vol. 103, 697-705

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 5/00- 5/28
A61K 35/12
A61L 27/00
A61P 9/00- 9/10
A61P 43/00
C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)
MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
WPIDS(STN)
CA/CONFSCI/SCISEARCH(STN)