

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7102397号

(P7102397)

(45)発行日 令和4年7月19日(2022.7.19)

(24)登録日 令和4年7月8日(2022.7.8)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/0775(2010.01)

C 1 2 N 5/0775

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09

Z

請求項の数 7 (全33頁)

(21)出願番号	特願2019-511270(P2019-511270)	(73)特許権者	000000941
(86)(22)出願日	平成30年4月3日(2018.4.3)		株式会社カネカ
(86)国際出願番号	PCT/JP2018/014326		大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号
(87)国際公開番号	WO2018/186421	(74)代理人	110002572
(87)国際公開日	平成30年10月11日(2018.10.11)		特許業務法人平木国際特許事務所
審査請求日	令和3年3月18日(2021.3.18)	(72)発明者	稲生 湊太
(31)優先権主張番号	特願2017-73984(P2017-73984)		兵庫県神戸市中央区港島南町6-7-3
(32)優先日	平成29年4月3日(2017.4.3)		株式会社カネカ 神戸MI R&Dセンター内
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)	(72)発明者	喜田 悠太
			兵庫県神戸市中央区港島南町6-7-3
			株式会社カネカ 神戸MI R&Dセンター内
		審査官	山本 晋也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 間葉系幹細胞を含む細胞集団とその製造方法、及び医薬組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

間葉系幹細胞を含む細胞集団の製造方法であって、
間葉系幹細胞を含む試料において、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であることを満たすという条件を指標として、間葉系幹細胞を含む細胞集団を識別する識別工程を含む、前記製造方法。

【請求項2】

前記識別した細胞集団を選択的に分離する分離工程をさらに含む、請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】

前記識別工程において、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL4A5遺伝子の相対発現量が0.4以下であることを満たすという条件をさらに指標とする、請求項1又は2に記載の製造方法。

【請求項4】

前記識別工程において、SDHA遺伝子の発現量に対するVCAN遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、SDHA遺伝子の発現量に対するDCN遺伝子の相対発現量が3.0以下であること、又はSDHA遺伝子の発現量に対するLUM遺伝子の相対発現量が6.0以下であることの何れか一以上を満たすという条件をさらに指標とする、請求項1

から3の何れか一項に記載の製造方法。

【請求項5】

前記識別工程において、SDHA遺伝子の発現量に対するGPC4遺伝子の相対発現量が0.5以下であることを満たすという条件をさらに指標とする、請求項1から4の何れか一項に記載の製造方法。

【請求項6】

前記識別工程で識別された細胞集団において、CDH6が陽性を呈する間葉系幹細胞の比率が30%以上である、請求項1から5の何れか一項に記載の製造方法。

【請求項7】

前記間葉系幹細胞を含む試料が、胎児付属物に由来するものである、請求項1から6の何れか一項に記載の製造方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、間葉系幹細胞を含む細胞集団の製造方法に関する。さらに本発明は、間葉系幹細胞を含む細胞集団、及び上記細胞集団を含む医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

間葉系間質細胞(Mesenchymal stromal cells)ともよばれる間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪組織、歯髄などに存在することが報告されている体性幹細胞であり、最近では、胎盤、臍帯、卵膜などの胎児付属物にも存在することが明らかになっている。間葉系幹細胞は、骨、軟骨及び脂肪などに分化する能力を有するため、再生医療における有望な細胞ソースとして注目されている。

20

【0003】

また、間葉系幹細胞は、分化能だけでなく免疫抑制能を有するため、経静脈的に投与することにより免疫関連疾患や炎症性疾患等の治療が可能であることが報告されている。

【0004】

特許文献1には、羊膜間葉系細胞組成物の製造方法及び凍結保存方法、並びに治療剤について記載されている。特に、ジメチルスルホキシドを5～10質量%含有し、ヒドロキシエチルデンプンを5～10質量%又はデキストランを1～5質量%含有する溶液中に羊膜間葉系細胞を含む混合物を凍結保存することによって、凍結保存された羊膜間葉系細胞を移植に至適化した細胞製剤として製造できることが記載されている。

30

【0005】

特許文献2には、(D)哺乳動物の羊膜から間葉系細胞の細胞集団を採取するステップと、(E)前記採取された細胞集団を400～35000/cm²の細胞濃度において播種し、2～3日間初期培養するステップと、(F)前記初期培養の1/5000以上1/10未満の細胞濃度において播種し、1週間に2回の培地交換を行う継代培養を3～4回繰り返すステップと、(G)前記継代培養において紡錘状の形態を有する細胞のコロニーが形成されたとき、細胞がコンフルエントになるまで同一の培養皿で培養を維持するステップとを含む、羊膜間葉系幹細胞集団を調製する方法が記載されている。

40

【0006】

特許文献3には、ヒト間葉系幹細胞のプロテオームの解析により、ヒト間葉系幹細胞がCOL11A1及びCOL16A1を分泌することが確認されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【文献】特開2015-61520号公報

国際公開WO2013/077428号公報

特表2010-500047号公報

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

近年、胎児付属物に由来する間葉系幹細胞には、分化能や増殖能、サイトカイン産生能が異なる様々な細胞を含むヘテロな細胞集団であることが分かってきた。安定した品質の細胞製剤を製造するために、純化された均一性の高い細胞集団を調製する必要がある。また、間葉系幹細胞を含む細胞懸濁液を経静脈的に投与した場合、投与された間葉系幹細胞からなる細胞凝集塊が毛細血管やそれより太い血管に詰まることで塞栓を引き起こす危険性があると指摘されている。従って、細胞治療剤としての安全性を向上させる観点から、より細胞凝集性の低い間葉系幹細胞を取得する必要がある。

【0009】

特許文献1には、羊膜間葉系細胞を含む混合物を、特定の凍結保存液にて凍結保存することにより、解凍後の羊膜間葉系細胞の生存率減少を抑制し、凍結保存された羊膜間葉系細胞を移植に至適化した細胞製剤として製造できることは記載されている。しかしながら、間葉系幹細胞の中から特定の優れた特徴を有する間葉系幹細胞を選択的に調製すること、具体的には、細胞製剤を経静脈的に投与するのに有用な細胞凝集性が低い間葉系幹細胞を多く含む細胞集団を、間葉系幹細胞の特性を指標として選択的に調製することについては、一切記載されていない。また、特許文献2には、低密度で細胞を播種することによって、高い増殖能と分化能を有する間葉系幹細胞集団を調製しているものの、間葉系幹細胞集団に含まれる間葉系幹細胞の特性を指標として、細胞凝集性が低い間葉系幹細胞を多く含む細胞集団については記載も示唆もない。

特許文献3には、間葉系幹細胞がCOL11A1及びCOL16A1を分泌することが記載されている。しかし、特許文献3には、COL11A1及びCOL16A1の発現強度は記載されておらず、細胞凝集性が低い間葉系幹細胞を多く含む細胞集団を間葉系幹細胞の特性を指標として選択的に調製することについては記載も示唆もない。

【0010】

本発明は、細胞製剤を経静脈的に投与するのに有用な、細胞凝集性の低い間葉系細胞を含む細胞集団及びその製造方法、並びに上記細胞集団を含む医薬組成物を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、胎児付属物から採取した細胞を含む細胞集団の中にCOL11A1遺伝子及びCOL16A1遺伝子の発現量が少ない間葉系幹細胞が含まれていることを見出し、さらに、上記した細胞特性を有する間葉系幹細胞を含む細胞集団は、細胞凝集が抑制されていることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて完成したものである。

【0012】

すなわち、本明細書によれば、以下の発明が提供される。

〔1〕 間葉系幹細胞を含む細胞集団の製造方法であって、以下に示す細胞特性を有する細胞集団を取得することを含む、製造方法：

前記細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であることを満たす。

〔2〕 間葉系幹細胞を含む細胞集団であって、以下に示す細胞特性を有する細胞集団：前記細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であることを満たす。

〔3〕 前記細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL4A5遺伝子の相対発現量が0.4以下であることを満たす〔2〕に記載の細胞集団。

〔4〕 前記細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するVCAN遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、SDHA遺伝子の発現量に対するDCN遺伝子の相対発現量が

10

20

30

40

50

3.0以下であること、又はSDHA遺伝子の発現量に対するLUM遺伝子の相対発現量が6.0以下であることの何れか一以上を満たす、[2]又は[3]に記載の細胞集団。

[5] 前記細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するGPC4遺伝子の相対発現量が0.5以下であることを満たす、[2]から[4]の何れか一に記載の細胞集団。

[6] 前記細胞集団において、CDH6が陽性を呈する間葉系幹細胞の比率が30%以上である、[2]から[5]の何れか一に記載の細胞集団。

[7] 前記間葉系幹細胞が、胎児付属物に由来するものである、[2]から[6]の何れか一に記載の細胞集団。

[8] [2]から[7]の何れか一に記載の細胞集団と、製薬上許容し得る媒体とを含む、医薬組成物。

[9] ヒトへの間葉系幹細胞の1回の投与量が 10^9 個/kg体重以下である、[8]に記載の医薬組成物。

[10] 前記医薬組成物が、液剤である、[8]又は[9]に記載の医薬組成物。

[11] 前記医薬組成物が、注射用液剤である、[8]から[10]の何れか一に記載の医薬組成物。

[12] 免疫関連疾患、虚血性疾患、下肢虚血、脳血管虚血、腎臓虚血、肺虚血、神経性疾患、移植片対宿主病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、放射線腸炎、全身性エリテマトーデス、紅斑性狼瘡、膠原病、脳卒中、脳梗塞、脳内血腫、脳血管麻痺、肝硬変、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、乾癬、表皮水疱症、糖尿病、菌状息肉腫、強皮症、軟骨等の結合組織の変性及び／又は炎症から起こる疾患、関節軟骨欠損、半月板損傷、離弾性骨軟骨症、無腐性骨壊死、変形性膝関節症、炎症性関節炎、関節リウマチ、眼疾患、血管新生関連疾患、虚血性心疾患、冠動脈性心疾患、心筋梗塞、狭心症、心不全、心筋症、弁膜症、創傷、上皮損傷、線維症、肺疾患、及び癌から選択される疾患の治療剤である、[8]から[11]の何れか一に記載の医薬組成物。

[0013]

[13] [1]に記載の製造方法により得られる、細胞集団。

[14] 医薬組成物の製造のための、[2]から[7]の何れか一に記載の細胞集団の使用。

[15] 前記医薬組成物が、ヒトへの間葉系幹細胞の1回の用量が 10^9 個/kg体重以下である医薬組成物である、[14]に記載の使用。

[16] 前記医薬組成物が、液剤である、[14]又は[15]に記載の使用。

[17] 前記医薬組成物が、注射用液剤である、[14]から[16]の何れか一に記載の使用。

[18] 免疫関連疾患、虚血性疾患、下肢虚血、脳血管虚血、腎臓虚血、肺虚血、神経性疾患、移植片対宿主病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、放射線腸炎、全身性エリテマトーデス、紅斑性狼瘡、膠原病、脳卒中、脳梗塞、脳内血腫、脳血管麻痺、肝硬変、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、乾癬、表皮水疱症、糖尿病、菌状息肉腫、強皮症、軟骨等の結合組織の変性及び／又は炎症から起こる疾患、関節軟骨欠損、半月板損傷、離弾性骨軟骨症、無腐性骨壊死、変形性膝関節症、炎症性関節炎、関節リウマチ、眼疾患、血管新生関連疾患、虚血性心疾患、冠動脈性心疾患、心筋梗塞、狭心症、心不全、心筋症、弁膜症、創傷、上皮損傷、線維症、肺疾患、及び癌から選択される疾患の治療剤である、[14]から[17]の何れか一に記載の使用。

[0014]

[19] 疾患の治療において使用するための、[2]から[7]の何れか一に記載の細胞集団。

[20] ヒトへの間葉系幹細胞の1回の用量が 10^9 個/kg体重以下である、[19]に記載の細胞集団。

[21] 液剤である、[19]又は[20]に記載の細胞集団。

[22] 注射用液剤である、[19]から[21]の何れか一に記載の細胞集団。

[23] 疾患が、免疫関連疾患、虚血性疾患、下肢虚血、脳血管虚血、腎臓虚血、肺虚

10

20

30

40

50

血、神経性疾患、移植片対宿主病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、放射線腸炎、全身性エリテマトーデス、紅斑性狼瘡、膠原病、脳卒中、脳梗塞、脳内血腫、脳血管麻痺、肝硬変、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、乾癬、表皮水疱症、糖尿病、菌状息肉腫、強皮症、軟骨等の結合組織の変性及び／又は炎症から起こる疾患、関節軟骨欠損、半月板損傷、離弾性骨軟骨症、無腐性骨壊死、変形性膝関節症、炎症性関節炎、関節リウマチ、眼疾患、血管新生関連疾患、虚血性心疾患、冠動脈性心疾患、心筋梗塞、狭心症、心不全、心筋症、弁膜症、創傷、上皮損傷、線維症、肺疾患、及び癌から選択される疾患である、〔19〕から〔22〕の何れかーに記載の細胞集団。

〔0015〕

〔24〕 〔2〕から〔7〕の何れかーに記載の細胞集団を、治療を必要とする患者に投与することを含む、疾患の治療方法。

10

〔25〕 ヒトへの間葉系幹細胞の1回の用量が10⁹個／kg体重以下である、〔24〕に記載の疾患の治療方法。

〔26〕 液剤である、〔24〕又は〔25〕に記載の疾患の治療方法。

〔27〕 注射用液剤である、〔24〕から〔26〕の何れかーに記載の疾患の治療方法。

〔28〕 疾患が、免疫関連疾患、虚血性疾患、下肢虚血、脳血管虚血、腎臓虚血、肺虚血、神経性疾患、移植片対宿主病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、放射線腸炎、全身性エリテマトーデス、紅斑性狼瘡、膠原病、脳卒中、脳梗塞、脳内血腫、脳血管麻痺、肝硬変、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、乾癬、表皮水疱症、糖尿病、菌状息肉腫、強皮症、軟骨等の結合組織の変性及び／又は炎症から起こる疾患、関節軟骨欠損、半月板損傷、離弾性骨軟骨症、無腐性骨壊死、変形性膝関節症、炎症性関節炎、関節リウマチ、眼疾患、血管新生関連疾患、虚血性心疾患、冠動脈性心疾患、心筋梗塞、狭心症、心不全、心筋症、弁膜症、創傷、上皮損傷、線維症、肺疾患、及び癌から選択される疾患である、〔24〕から〔27〕の何れかーに記載の疾患の治療方法。

20

〔0016〕

〔29〕 〔2〕から〔7〕の何れかーに記載の細胞集団と、媒体とを含む、組成物。

〔0017〕

〔30〕 間葉系幹細胞を含む細胞集団において、

SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量を測定し、以下に示す細胞特性を指標として間葉系幹細胞の細胞凝集性を評価する方法。

30

前記細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であることを満たす。

〔31〕 ドナーから間葉系幹細胞を含む細胞集団を採取し、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量を測定し、以下に示す細胞特性を指標として評価する、ドナー及び／又はドナーから採取した試料の評価方法。

前記細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であることを満たす。

40

〔32〕 ドナーから採取した試料を酵素処理して得られた細胞集団に対して、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量を測定し、以下に示す細胞特性を指標として評価する、前記試料の最適な酵素処理条件を判断及び／又は予測する方法。

前記細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であることを満たす。

〔発明の効果〕

〔0018〕

50

本発明によれば、細胞凝集性の低い間葉系細胞を含む細胞集団を取得することができる。また、本発明によれば、細胞凝集性の低い間葉系幹細胞を含む細胞集団形成の指標として、各種遺伝子のハウスキーピング遺伝子に対する相対発現量を使用することができる。これにより、経静脈的に投与するのに有用な細胞製剤（医薬組成物）を効率的に製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】実施例1で培養した羊膜MSCに関し、フローサイトメーターを用いてCDH6に対して陽性となる細胞の比率を測定した結果を示す。

【図2】比較例1で培養した羊膜MSCに関し、フローサイトメーターを用いてCDH6に対して陽性となる細胞の比率を測定した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

以下、本発明の実施形態について具体的に説明するが、下記の説明は本発明の理解を容易にするためのものであり、本発明の範囲は、下記の実施形態に限られるものではなく、当業者が下記の実施形態の構成を適宜置換した他の実施形態も本発明の範囲に含まれる。

【0021】

〔1〕用語の説明

本明細書における「胎児付属物」は、卵膜、胎盤、臍帯及び羊水を指す。さらに「卵膜」は、胎児の羊水を含む胎嚢であり、内側から羊膜、絨毛膜及び脱落膜からなる。このうち、羊膜と絨毛膜は胎児を起源とする。「羊膜」は、卵膜の最内層にある血管に乏しい透明薄膜を指す。羊膜の内層（上皮細胞層ともよばれる）は分泌機能のある一層の上皮細胞で覆われ羊水を分泌し、羊膜の外層（細胞外基質層ともよばれ、間質に相当する）は間葉系幹細胞を含む。

【0022】

本明細書における「間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSC)」は、下記の定義を満たす幹細胞を指し、「間葉系間質細胞(Mesenchymal stromal cells)」と区別なく用いられる。本明細書において、「間葉系幹細胞」は「MSC」と記載されることがある。

【0023】

間葉系幹細胞の定義

i) 標準培地での培養条件で、プラスチックに接着性を示す。

ii) 表面抗原CD105、CD73、CD90が陽性であり、CD45、CD34、CD11b、CD79alpha、CD19、HLA-DRが陰性。

【0024】

本明細書における「間葉系幹細胞集団」は、間葉系幹細胞を含む細胞集団を意味し、その形態は特に限定されず、例えば、細胞ペレット、細胞凝集塊、細胞浮遊液又は細胞懸濁液などが挙げられる。

【0025】

本明細書における「羊膜間葉系幹細胞」は、羊膜に由来する間葉系幹細胞を指し、「羊膜間葉系間質細胞」と区別なく用いられる。本明細書において、「羊膜間葉系幹細胞」は「羊膜MSC」と記載されることがある。

【0026】

本明細書における「細胞凝集」とは、複数の単細胞同士が付着して一群となることをいう。細胞凝集は、例えば、顕微鏡を用いた観察、又はセルカウンターを用いた細胞計数、凝集率測定、サイズ分布測定等により評価することができる。

【0027】

本明細書における「CDH6が陽性を呈する間葉系幹細胞の比率」とは、後記する実施例に記載の通り、フローサイトメトリーによって解析した上記表面抗原について陽性である細胞の比率を示す。本明細書において、「CDH6が陽性を呈する間葉系幹細胞の比率」

は「陽性率」と記載されることがある。

【0028】

〔2〕間葉系幹細胞を含む細胞集団

本発明により提供される間葉系幹細胞を含む細胞集団は、以下に示す細胞特性を有する細胞集団である：

前記細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であることを満たす。

上記の条件を満たすと、細胞凝集性の低い間葉系細胞を含む細胞集団を形成する。そのため、本発明においては、前記条件を細胞凝集性の低い細胞集団形成の指標とすることができる。

【0029】

SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量の上限は、5.5以下、5.0以下、4.5以下、4.0以下、3.5以下、3.0以下、2.9以下、2.8以下、2.7以下、2.6以下、2.5以下、2.4以下、2.3以下、2.2以下、2.1以下、2.0以下、1.9以下、1.8以下、1.7以下、1.6以下、1.5以下、1.4以下、1.3以下又は1.2以下でもよい。また、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量の下限は、0.1以上、0.2以上、0.3以上、0.4以上、0.5以上、0.6以上、0.7以上、0.8以上、0.9以上又は1.0以上でもよい。

SDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量の上限は、1.4以下、1.3以下、1.2以下、1.1以下、1.0以下、0.9以下、0.8以下、0.7以下、0.6以下、0.5以下、0.4以下、0.3以下又は0.2以下でもよい。また、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量の下限は、0.02以上、0.04以上、0.06以上又は0.08以上でもよい。

【0030】

本発明の一態様によれば、本発明により提供される間葉系幹細胞を含む細胞集団においては、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL4A5遺伝子の相対発現量が0.4以下であることを満たしていてもよい。

【0031】

SDHA遺伝子の発現量に対するCOL4A5遺伝子の相対発現量の上限は、0.38以下、0.36以下、0.34以下、0.32以下、0.30以下、0.30以下、0.28以下、0.26以下、0.24以下又は0.22以下でもよい。また、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL4A5遺伝子の相対発現量の下限は、0.02以上、0.04以上、0.06以上、0.08以上又は0.10以上でもよい。

【0032】

本発明の一態様によれば、本発明により提供される間葉系幹細胞を含む細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するVCAN遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、SDHA遺伝子の発現量に対するDCN遺伝子の相対発現量が3.0以下であること、又はSDHA遺伝子の発現量に対するLUM遺伝子の相対発現量が6.0以下であることの何れか一以上を満たし、好ましくは上記の何れか二以上を満たし、より好ましくは上記の全てを満たす。

【0033】

SDHA遺伝子の発現量に対するVCAN遺伝子の相対発現量の上限は、5.5以下、5.0以下、4.5以下、4.0以下、3.9以下、3.8以下、3.7以下、又は3.6以下でもよい。SDHA遺伝子の発現量に対するVCAN遺伝子の相対発現量の下限は、1.0以上、1.5以上、2.0以上、2.5以上、又は3.0以上でもよい。

【0034】

SDHA遺伝子の発現量に対するDCN遺伝子の相対発現量の上限は、2.9以下、2.8以下、2.7以下、2.6以下、2.5以下、2.4以下、2.3以下、2.2以下、

10

20

30

40

50

2.1以下、2.0以下、又は1.9以下でもよい。SDHA遺伝子の発現量に対するDCN遺伝子の相対発現量の下限は、1.0以上、1.1以上、1.2以上、1.3以上、1.4以上、1.5以上、1.6以上、又は1.7以上でもよい。

【0035】

SDHA遺伝子の発現量に対するLUM遺伝子の相対発現量の上限は、5.5以下、5.0以下、4.5以下、4.0以下、3.5以下、3.0以下、又は2.5以下でもよい。SDHA遺伝子の発現量に対するLUM遺伝子の相対発現量の下限は、1.0以上、1.1以上、1.2以上、1.3以上、1.4以上、1.5以上、1.6以上、1.7以上、1.8以上、1.9以上、2.0以上、又は2.1以上でもよい。

【0036】

本発明の一態様によれば、本発明により提供される間葉系幹細胞を含む細胞集団においては、SDHA遺伝子の発現量に対するGPC4遺伝子の相対発現量が0.5以下であることを満たしていてもよい。

【0037】

SDHA遺伝子の発現量に対するGPC4遺伝子の相対発現量の上限は、0.45以下、0.40以下、0.35以下、0.30以下、0.25以下、0.20以下又は0.15以下でもよい。また、SDHA遺伝子の発現量に対するGPC4遺伝子の相対発現量の下限は、0.02以上、0.04以上、0.06以上又は0.08以上でもよい。

【0038】

SDHA遺伝子の発現量に対する各遺伝子の相対発現量の測定方法としては、マイクロアレイを用いた測定を使用することができる。マイクロアレイは、具体的には、以下の手順(1)～(5)にて行なうことができる。なお、以下の手順(3)～(5)は、株式会社理研ジェネシスに委託して実施することができる。

(1)対象となる細胞が接着細胞の場合、プラスチック製培養容器から、セルスクレーパー(コーニング社製)を用いて非酵素的に接着細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収する。対象となる細胞が非接着細胞の場合、遠心分離により細胞を回収する。

(2)RNA安定化試薬(RNAlater(Thermo Fisher Scientific社製))を用いて細胞を安定保存した後、RNA抽出キット(RNeasy Plus Miniキット(QIAGEN社製))を用いてトータルRNAを抽出、精製する。

(3)精製したトータルRNAを鋳型として用いて逆転写反応によりcDNAを合成し、さらに合成されたcDNAからin vitro transcriptionによりcRNAに転写してビオチン標識を行う。

(4)ビオチン標識cRNAをハイブリダイゼーションバッファーに加え、Human Gene Genome U133A 2.0 Array(Affymetrix社製)上で16時間のハイブリダイゼーションを行う。GeneChip Fluidics Station 450(Affymetrix社製)にて洗浄し、フィコエリスリン染色後、GeneChip Scanner 3000 7G(Affymetrix社製)にてスキャンを行い、AGCC(Affymetrix GeneChip Command Console Software)(Affymetrix社製)にて画像解析し、Affymetrix Expression Console(Affymetrix社製)を用いて数値化する。

(5)数値データファイルを、解析ソフトGeneSpring GX(アジレント・テクノロジー社製)を用いて比較解析する。各細胞におけるSDHA遺伝子の発現量に対する各遺伝子の相対発現量を算出する。

【0039】

SDHA(Succinate dehydrogenase complex, subunit A)遺伝子の配列は、National Center for Biotechnology Informationの遺伝子データベースにID:6389として登録されている。

10

20

30

40

50

V C A N (V e r s i c a n) 遺伝子の N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o m a t i o n の遺伝子データベースに I D : 1 4 6 2 として登録されている。

D C N (D e c o r i n) 遺伝子の N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o m a t i o n の遺伝子データベースに I D : 1 6 3 4 として登録されている。

L U M (L u m i c a n) 遺伝子の N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o m a t i o n の遺伝子データベースに I D : 4 0 6 0 として登録されている。

【 0 0 4 0 】

G P C 4 (G l y p i c a n - 4) 遺伝子の N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o m a t i o n の遺伝子データベースに I D : 2 2 3 9 として登録されている。

【 0 0 4 1 】

C O L 1 1 A 1 (c o l l a g e n t y p e X I a l p h a 1 c h a i n) 遺伝子の N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o m a t i o n の遺伝子データベースに I D : 1 3 0 1 として登録されている。

C O L 1 6 A 1 (c o l l a g e n t y p e X V I a l p h a 1 c h a i n) 遺伝子の N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o m a t i o n の遺伝子データベースに I D : 1 3 0 7 として登録されている。

C O L 4 A 5 (C o l l a g e n T y p e I V A l p h a 5 C h a i n) 遺伝子の N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o m a t i o n の遺伝子データベースに I D : 1 2 8 7 として登録されている。

【 0 0 4 2 】

上記した遺伝子発現量を測定するタイミングは、特に限定されないが、例えば、生体試料から細胞を分離した直後、培養工程の途中、培養工程における純化後、N 回継代した直後（N は 1 以上の整数を示す）、維持培養の途中、凍結保存前、解凍後、製剤化する前、又は製剤化した後などが挙げられる。

【 0 0 4 3 】

本発明の一態様によれば、本発明により提供される間葉系幹細胞を含む細胞集団は、C D H 6 が陽性を呈する間葉系幹細胞の比率が 3 0 % 以上である。

【 0 0 4 4 】

C D H 6 は、C a d h e r i n 6 を意味し、カドヘリンスーパーファミリーの一員である。V C A N は、V e r s i c a n を意味する。D C N は、D e c o r i n を意味する。L U M は、L u m i c a n を意味する。

【 0 0 4 5 】

細胞集団において C D H 6 が陽性を呈する間葉系幹細胞の比率は、3 1 % 以上、3 2 % 以上、3 3 % 以上、3 4 % 以上、3 5 % 以上、3 6 % 以上、3 7 % 以上、3 8 % 以上、3 9 % 以上、又は 4 0 % 以上でもよい。

【 0 0 4 6 】

各表面抗原マーカーは、当該技術分野において公知の任意の検出方法により検出することができる。表面抗原マーカーを検出する方法としては、例えばフローサイトメトリー又は細胞染色が挙げられるが、これらに限定されない。蛍光標識抗体を用いるフローサイトメトリーにおいて、ネガティブコントロール（アイソタイプコントロール）と比較してより強い蛍光を発する細胞が検出された場合、当該細胞は当該マーカーについて「陽性」と判定される。蛍光標識抗体は、当該技術分野において公知の任意の抗体を使用することができ、例えば、イソチオシアン酸フルオレセイン（F I T C）、フィコエリスリン（P E）、アロフィコシアニン（A P C）等により標識された抗体が挙げられるが、これらに限定されない。細胞染色において、着色するか若しくは蛍光を発する細胞が顕微鏡下にて観察された場合、当該細胞は当該マーカーについて「陽性」と判定される。細胞染色は、抗体

10

20

30

40

50

を使用する免疫細胞染色であってもよく、抗体を使用しない非免疫細胞染色であってもよい。

【0047】

各表面抗原マーカーに対して陽性である細胞の比率（陽性率）は、具体的には、フローサイトメリーのドットプロット展開解析を用いて、以下の手順（１）～（８）にて測定することができる。

（１）対象となる細胞が接着細胞の場合、プラスチック製培養容器から、トリプシン－EDTA（Thermo Fisher Scientific社）を用いて接着細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収する。対象となる細胞が非接着細胞の場合、遠心分離により細胞を回収する。

（２）４％パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定した後、リン酸バッファー（PBS）にて細胞を洗浄し、２％BSA／PBSにて 1.0×10^6 個／mLとなるように細胞懸濁液を調製する。前記細胞懸濁液を $100 \mu\text{L}$ ずつ分注する。

（３）分注した細胞懸濁液を遠心分離し、得られた細胞ペレットに０．５％BSA／PBSを $100 \mu\text{L}$ ずつ添加する。次いで、各表面抗原マーカーに対応する抗体、又はそのアイソタイプコントロール用抗体を添加する。なお、表面抗原マーカーであるCDH6を解析する場合は、次いで２次抗体としてMouse IgG（H＋L）を添加する。各反応液をVortexにて混和した後、４℃にて２０分間静置する。

（４）０．５％BSA／PBSを添加し、遠心分離により細胞を洗浄した後、０．５％BSA／PBSにて細胞を懸濁し、セルストレーナー（ $35 \mu\text{m}$ ナイロンメッシュフィルター）（コーニング社／品番：３５２２３５）にてフィルターろ過する。

（５）フィルターろ過により得られた細胞懸濁液を、BD Accuri™ C6 Flow Cytometer（ベクトン・ディッキンソン社）にてALL Event 10000で解析する。

（６）測定結果を、縦軸にSSC（側方散乱光）（数値範囲：０以上 16777215 以下）、横軸を抗体に標識された色素の蛍光強度（数値範囲： 10^1 以上 $10^7 \cdot 2$ 以下）としたドットプロットで展開する。

（７）ドットプロット展開図において、アイソタイプコントロール用抗体で測定した総細胞のうち、より蛍光強度が強い細胞集団が１．０％以下となる全ての領域（ゲート）を選択する。

（８）表面抗原マーカーに対応する抗体で測定した総細胞のうち、（７）で選択したゲート内に含まれる細胞の割合を算出する。

【0048】

なお、各表面抗原に対して陰性である細胞の比率（陰性率）は、以下の式により算出する。
陰性率（％）＝ $100 - \text{陽性率}$

【0049】

上記した表面抗原マーカーを検出するタイミングは、特に限定されないが、例えば、生体試料から細胞を分離した直後、培養工程の途中、培養工程における純化後、N回継代した直後（Nは１以上の整数を示す）、維持培養の途中、凍結保存前、解凍後、製剤化する前、又は製剤化した後などが挙げられる。

【0050】

細胞集団の細胞凝集性は、以下の手順（１）～（６）にて細胞凝集率を算出することにより評価することができる。

（１）細胞集団を、 2.0×10^5 個／mLとなるように培地（例えば、１０％ウシ胎児血清（FBS）（非働化済み）及び $1 \times \text{Antibiotic-Antimycotic}$ （Thermo Fisher Scientific社製）を含む αMEM （Alpha Modification of Minimum Essential Medium Eagle））にて懸濁し、細胞懸濁液を調製する。

（２）調製した細胞懸濁液を、浮遊培養用６ウェルプレート（住友ベークライト社／品番：MS－８００６R）に 4 mL ずつ播種する。

10

20

30

40

50

(3) 浮遊培養用6ウェルプレートを、インキュベーター内用シェーカーOrbital Shaker OS-762 (オプティマ社) の上に設置し、3%以上5%以下のCO₂濃度、37℃環境、90rpmの条件下にて24時間巡回培養(浮遊培養)を行う。

(4) 巡回培養により得られた細胞懸濁液を回収し、セルストレーナー(35μmナイロンメッシュフィルター)(コーニング社/品番:352235)にてフィルターろ過し、細胞凝集塊をメッシュ上にトラップする。

(5) フィルターろ過していない細胞懸濁液(すなわち、細胞凝集塊とシングル細胞を含む)と、フィルターろ過により得られた細胞懸濁液(細胞凝集塊を含まない)とを、トリパンブルーにて染色し、自動セルカOUNTER Countess II FL (Thermo Fisher Scientific社)を用いて細胞計数を行う。

10

(6) 以下の式により、細胞凝集率を算出する。

細胞凝集率(%) = $100 - (\text{フィルターろ過により得られた細胞懸濁液} 1 \text{ mL あたりの細胞数} / \text{フィルターろ過していない細胞懸濁液} 1 \text{ mL あたりの全細胞数})$

【0051】

上記した細胞凝集性を評価するタイミングは、特に限定されないが、例えば、生体試料から細胞を分離した直後、培養工程の途中、培養工程における純化後、N回継代した直後(Nは1以上の整数を示す)、維持培養の途中、凍結保存前、解凍後、製剤化する前、又は製剤化した後などが挙げられる。

【0052】

本発明により提供される間葉系幹細胞を含む細胞集団は、継代されていてもよい。継代回数下限は、好ましくは1回以上、さらに好ましくは2回以上、さらに好ましくは3回以上、さらに好ましくは4回以上、さらに好ましくは5回以上である。また、継代回数上限は、好ましくは25回以下、さらに好ましくは20回以下、さらに好ましくは15回以下、さらに好ましくは10回以下である。

20

【0053】

本発明により提供される間葉系幹細胞を含む細胞集団は、集団倍加されていてもよい。集団倍加回数下限は、好ましくは5回以上、さらに好ましくは10回以上、さらに好ましくは15回以上、さらに好ましくは20回以上、さらに好ましくは25回以上、さらに好ましくは30回以上である。また、集団倍加回数上限は、好ましくは60回以下、さらに好ましくは55回以下、さらに好ましくは50回以下である。

30

【0054】

集団倍加回数とは、ある一定の培養期間において細胞集団が分裂した回数であり、 $[\log_{10}(\text{培養終了時の細胞数}) - \log_{10}(\text{培養開始時の細胞数})] / \log_{10}(2)$ の計算式にて算出される。継代培養を行った場合は、継代毎の集団倍加回数を上記の式で計算した後、累積することによって、総集団倍加回数が算出される。

【0055】

間葉系幹細胞の由来は特に限定されないが、例えば、胎児付属物、骨髄、脂肪、又は歯髄に由来する間葉系幹細胞を使用することができる。間葉系幹細胞は、好ましくは、胎児付属物に由来する間葉系幹細胞であり、より好ましくは、羊膜に由来する間葉系幹細胞である。間葉系幹細胞は、自己、同種異系又は異種の生体試料から単離された間葉系幹細胞であり、好ましくは、同種異系の生体試料から単離された間葉系幹細胞である。

40

【0056】

間葉系幹細胞は、遺伝子組み換えされた又は遺伝子組み換えされていない間葉系幹細胞であり、好ましくは、遺伝子組み換えされていない間葉系幹細胞である。

【0057】

本発明の細胞集団は、任意の数の間葉系幹細胞を含むことができる。本発明の細胞集団は、例えば、 1.0×10^1 個、 1.0×10^2 個、 1.0×10^3 個、 1.0×10^4 個、 1.0×10^5 個、 1.0×10^6 個、 1.0×10^7 個、 1.0×10^8 個、 1.0×10^9 個、 1.0×10^{10} 個、 1.0×10^{11} 個、 1.0×10^{12} 個、 1.0×10^{13} 個以上又は以下の間葉系幹細胞を含むことができるが、これらに限定されない。

50

【0058】

本発明の細胞集団は、間葉系幹細胞以外に、任意の成分を含んでもよい。上記の成分としては、例えば、塩類、多糖類（例えば、ヒドロキシエチルデンプン（HES）、デキストランなど）、タンパク質（例えば、アルブミンなど）、DMSO、アミノ酸、培地成分（例えば、RPMI 1640培地に含まれる成分など）などを挙げることができるが、これらに限定されない。

【0059】

本発明の細胞集団は、使用直前まで凍結状態にて保存することができる。上記の細胞集団は、間葉系幹細胞以外に、凍結保存液を含んでもよい。上記の凍結保存液としては、市販の凍結保存液を用いてもよい。例えば、CP-1（登録商標）（極東製薬工業社製）、BAMBANKER（リンフォテック社製）、STEM-CELLBANKER（日本全薬工業社製）、ReproCryo RM（リプロセル社製）、CryoNovo（Akrion Biotechnology社製）、MSC Freezing Solution（Biological Industries社製）、CryoStor（HemaCare社製）などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0060】

本発明の細胞集団は、媒体と組み合わせた組成物として提供してもよい。媒体としては、好ましくは液体媒体（例えば、培地、DMSO、凍結保存液、又は後記する製薬上許容し得る媒体など）を使用することができる。

【0061】

本発明の細胞集団と媒体とを含む組成物は、任意の細胞濃度とすることができる。本発明の細胞集団と媒体とを含む組成物の細胞濃度は、例えば、 1.0×10^1 個/mL、 1.0×10^2 個/mL、 1.0×10^3 個/mL、 1.0×10^4 個/mL、 1.0×10^5 個/mL、 1.0×10^6 個/mL、 1.0×10^7 個/mL、 1.0×10^8 個/mL、 1.0×10^9 個/mL、 1.0×10^{10} 個/mL以上又は以下の細胞濃度とすることができるが、これらに限定されない。

【0062】

【3】 間葉系幹細胞を含む細胞集団の製造方法

本発明による間葉系幹細胞を含む細胞集団の製造方法は、以下に示す細胞特性を有する細胞集団を取得することを含む方法である：

前記細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であることを満たす。

【0063】

即ち、本発明による間葉系幹細胞を含む細胞集団の製造方法は、間葉系幹細胞を含む細胞集団を、上記の細胞特性（間葉系幹細胞を含む細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であることを満たすという条件）を維持する条件下において調製する工程を含む方法である。上記の条件は、細胞凝集性の低い間葉系幹細胞を含む細胞集団形成の指標であり、本発明の製造方法は、前記指標を満たせば特に制限されない。

【0064】

本発明の製造方法は、間葉系幹細胞を含む試料（例えば、羊膜などの胎児付属物など）を酵素処理することにより、間葉系幹細胞を含む細胞集団を取得する細胞集団取得工程を含むものでもよい。上記の細胞集団取得工程は、羊膜を帝王切開により得る工程を含む工程でもよい。また、上記の細胞集団取得工程は、間葉系幹細胞を含む試料を洗浄する工程を含むものでもよい。

【0065】

羊膜は、上皮細胞層と細胞外基質層からなり、後者には羊膜間葉系幹細胞が含まれている。羊膜上皮細胞は、他の上皮細胞同様、特徴として上皮カドヘリン（E-cadherin）

10

20

30

40

50

n : C D 3 2 4) 及び上皮接着因子 (E p C A M : C D 3 2 6) を発現しているのに対し、羊膜 M S C はこれら上皮特異的表面抗原マーカーを発現しておらず、フローサイトメトリーで容易に区別可能である。

【 0 0 6 6 】

本発明における間葉系幹細胞を含む細胞集団は、好ましくは胎児付属物から採取した上皮細胞層と細胞外基質層とを含む試料を少なくともコラゲナーゼで処理して得た細胞集団である。

【 0 0 6 7 】

胎児付属物から採取した試料（好ましくは上皮細胞層と細胞外基質層とを含む試料）の酵素処理は、好ましくは、胎児付属物の細胞外基質層に含まれる間葉系幹細胞を遊離することができ、かつ上皮細胞層を分解しない酵素（又はその組み合わせ）による処理である。かかる酵素としては、特に限定されないが、例えば、コラゲナーゼ及び／又は金属プロテイナーゼを挙げることができる。金属プロテイナーゼとしては、非極性アミノ酸の N 末端側を切断する金属プロテイナーゼであるサーモリシン及び／又はディスパーゼを挙げることができるが、特に限定されない。

【 0 0 6 8 】

コラゲナーゼの活性濃度は、好ましくは 5 0 P U / m l 以上、より好ましくは 1 0 0 P U / m l 以上、さらに好ましくは 2 0 0 P U / m l 以上、さらに好ましくは 3 0 0 P U / m l 以上、さらに好ましくは 4 0 0 P U / m l 以上である。また、コラゲナーゼの活性濃度は、特に限定されないが、例えば、1 0 0 0 P U / m l 以下、9 0 0 P U / m l 以下、8 0 0 P U / m l 以下、7 0 0 P U / m l 以下、6 0 0 P U / m l 以下、5 0 0 P U / m l 以下である。ここで、P U (P r o t e a s e U n i t) とは、p H 7 . 5、3 0 ° C において、F I T C - c o l l a g e n 1 u g を 1 分間で分解する酵素量と定義する。

【 0 0 6 9 】

金属プロテイナーゼ（例えば、サーモリシン及び／又はディスパーゼ）の活性濃度は、好ましくは 5 0 P U / m l 以上、より好ましくは 1 0 0 P U / m l 以上、さらに好ましくは 2 0 0 P U / m l 以上、さらに好ましくは 3 0 0 P U / m l 以上、さらに好ましくは 4 0 0 P U / m l 以上である。また、金属プロテイナーゼの活性濃度は、好ましくは 1 0 0 0 P U / m l 以下、より好ましくは 9 0 0 P U / m l 以下、さらに好ましくは 8 0 0 P U / m l 以下、さらに好ましくは 7 0 0 P U / m l 以下、さらに好ましくは 6 0 0 P U / m l 以下、さらに好ましくは 5 0 0 P U / m l 以下である。ここで、金属プロテイナーゼとしてディスパーゼを用いた態様において、P U (P r o t e a s e U n i t) とは、p H 7 . 5、3 0 ° C において、乳酸カゼインから 1 分間に 1 u g のチロシンに相当するアミノ酸を遊離する酵素量と定義される。上記の酵素濃度の範囲において、胎児付属物の上皮細胞層に含まれる上皮細胞の混入を防止しながら、細胞外基質層に含まれる間葉系幹細胞を効率よく遊離させることができる。コラゲナーゼ及び／又は金属プロテイナーゼの好ましい濃度の組み合わせは、酵素処理後の胎児付属物の顕微鏡観察や、取得した細胞のフローサイトメトリーにより決定することができる。

【 0 0 7 0 】

生細胞を効率的に回収する観点から、コラゲナーゼ及び金属プロテイナーゼを組み合わせ、胎児付属物を同時一括に処理することが好ましい。この場合の金属プロテイナーゼとしては、サーモリシン及び／又はディスパーゼを使用することができるが、これらに限定されない。コラゲナーゼ及び金属プロテイナーゼを含有する酵素液を用いて胎児付属物を一回のみ処理することにより、間葉系幹細胞を簡便に取得することができる。また、同時一括に処理することにより、細菌やウィルス等のコンタミネーションのリスクを低減することができる。

【 0 0 7 1 】

胎児付属物の酵素処理は、生理食塩水やハanks平衡塩溶液等の洗浄液を用いて洗浄した羊膜を酵素液に浸漬し、攪拌手段によって攪拌しながら処理することが好ましい。かかる攪拌手段としては、胎児付属物の細胞外基質層に含まれる間葉系幹細胞を効率よく遊離さ

10

20

30

40

50

せる観点から、例えば、スターラー又はシェーカーを使用することができるが、これらに限定されない。攪拌速度は、特に限定されないが、スターラー又はシェーカーを用いた場合、例えば、5 rpm以上、10 rpm以上、20 rpm以上、30 rpm以上、40 rpm以上又は50 rpm以上である。また、攪拌速度は、特に限定されないが、スターラー又はシェーカーを用いた場合、例えば、100 rpm以下、90 rpm以下、80 rpm以下、70 rpm以下又は60 rpm以下である。酵素処理時間は、特に限定されないが、例えば、10分以上、20分以上、30分以上、40分以上、50分以上、60分以上、70分以上、80分以上又は90分以上である。また、酵素処理温度は、特に限定されないが、例えば、15℃以上、16℃以上、17℃以上、18℃以上、19℃以上、20℃以上、21℃以上、22℃以上、23℃以上、24℃以上、25℃以上、26℃以上、27℃以上、28℃以上、29℃以上、30℃以上、31℃以上、32℃以上、33℃以上、34℃以上、35℃以上又は36℃以上である。また、酵素処理温度は、特に限定されないが、例えば、40℃以下、39℃以下、38℃以下又は37℃以下である。

【0072】

本発明の製造方法において、所望により、遊離した間葉系幹細胞を含む酵素溶液からフィルター、遠心分離や中空糸分離膜、セルソーター等の公知の方法により遊離した間葉系幹細胞を分離及び／又は回収することができる。好ましくは、フィルターによって遊離した間葉系幹細胞を含む酵素溶液を濾過する。前記酵素溶液をフィルターによって濾過する態様においては、遊離した細胞のみがフィルターを通過し、分解されなかった上皮細胞層はフィルターを通過できずにフィルター上に残るため、遊離した間葉系幹細胞を容易に分離及び／又は回収することができるだけでなく、細菌やウィルス等のコンタミネーションのリスクも低減することができる。フィルターとしては、特に限定されないが、例えば、メッシュフィルターを挙げることができる。メッシュフィルターのポアサイズ（メッシュの大きさ）は、特に限定されないが、例えば、40 µm以上、50 µm以上、60 µm以上、70 µm以上、80 µm以上、又は90 µm以上である。また、メッシュフィルターのポアサイズは、特に限定されないが、例えば、200 µm以下、190 µm以下、180 µm以下、170 µm以下、160 µm以下、150 µm以下、140 µm以下、130 µm以下、120 µm以下、110 µm以下、又は100 µm以下である。濾過速度に関しては特に限定されないが、メッシュフィルターのポアサイズを上記の範囲とすることにより、間葉系幹細胞を含む酵素溶液を自然落下により濾過することができ、これにより細胞生存率の低下を防止することができる。

【0073】

メッシュフィルターの材質としては、ナイロンが好ましく用いられる。研究用として汎用されるFalconセルストレーナーなどの40 µm、70 µm、95 µm又は100 µmのナイロンメッシュフィルターを含有するチューブが利用可能である。また、血液透析などで使用されている医療用メッシュクロス（ナイロン及びポリエステル）が利用できる。さらに、体外循環時に使用される動脈フィルター（ポリエステルメッシュフィルター、ポアサイズ：40 µm以上120 µm以下）も利用可能である。他の材質、例えば、ステンレスメッシュフィルター等も用いることが可能である。

【0074】

間葉系幹細胞をフィルター通過させる場合、自然落下（自由落下）が好ましい。ポンプ等を用いた吸引など強制的なフィルター通過も可能であるが、細胞に損傷を与えることを避けるため、できるだけ弱い圧力とすることが望ましい。

【0075】

フィルターを通した間葉系幹細胞は、倍量又はそれ以上の培地又は平衡塩緩衝液で濾液を希釈した後、遠心分離により回収することができる。平衡塩緩衝液としては、ダルベッコリン酸バッファー（DPBS）、アール平衡塩溶液（EBSS）、ハンクス平衡塩溶液（HBSS）、リン酸バッファー（PBS）等を用いることができるが、これらに限定され

ない。

【0076】

上記の細胞集団取得工程で得られた細胞集団は、

前記細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であることを満たすという条件下において調製する。前記条件は、細胞凝集性の低い間葉系幹細胞を含む細胞集団を取得する際の指標として有用である。調製方法としては、前記指標を満たすものであれば、特に限定されない。そのような方法としては、例えば、セルソーターにてSDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であることを満たす細胞集団を分取し、次いで、得られた細胞集団について、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であることを満たす細胞集団を選択してもよいし、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であることを満たす細胞集団を選択し、次いで、得られた細胞集団について、セルソーターにてSDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であることを満たす細胞集団を分取してもよい。また、前記指標を満たす細胞集団の他の調製方法としては、細胞集団を、上記の2つの条件（前記細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であること）を満たす条件下において培養することが挙げられる。

【0077】

前記指標を満たす培養方法としては、例えば、細胞集団を、コーティングしていないプラスチック製培養容器に400～5,000細胞/cm²の密度で播種し、培養することを複数回繰り返す工程を挙げることができる。細胞集団を播種する際の密度はさらに好ましくは500細胞/cm²以上であり、さらに好ましくは600細胞/cm²以上であり、さらに好ましくは700細胞/cm²以上であり、さらに好ましくは800細胞/cm²以上であり、さらに好ましくは900細胞/cm²以上であり、さらに好ましくは1000細胞/cm²以上であり、さらに好ましくは1100細胞/cm²以上であり、さらに好ましくは1200細胞/cm²以上であり、さらに好ましくは1300細胞/cm²以上であり、さらに好ましくは1400細胞/cm²以上であり、さらに好ましくは1500細胞/cm²以上であり、さらに好ましくは1600細胞/cm²以上であり、さらに好ましくは1700細胞/cm²以上であり、さらに好ましくは1800細胞/cm²以上であり、さらに好ましくは1900細胞/cm²以上であり、さらに好ましくは2000細胞/cm²以上である。細胞集団を播種する際の密度はさらに好ましくは4800細胞/cm²以下であり、さらに好ましくは4600細胞/cm²以下であり、さらに好ましくは4400細胞/cm²以下であり、さらに好ましくは4200細胞/cm²以下であり、さらに好ましくは4000細胞/cm²以下であり、さらに好ましくは3800細胞/cm²以下であり、さらに好ましくは3600細胞/cm²以下であり、さらに好ましくは3400細胞/cm²以下であり、さらに好ましくは3200細胞/cm²以下であり、さらに好ましくは3000細胞/cm²以下であり、さらに好ましくは2800細胞/cm²以下であり、さらに好ましくは2600細胞/cm²以下であり、さらに好ましくは2400細胞/cm²以下であり、さらに好ましくは2200細胞/cm²以下である。

【0078】

前記指標を満たす他の培養方法としては、例えば、細胞集団を、コーティング剤によりコーティングしたプラスチック製培養容器に400～5,000細胞/cm²の密度で播種し、培養することを複数回繰り返す工程を挙げることができる。細胞集団を播種する際の密度の好ましい条件は、上記した条件と同様である。

【0079】

コーティング剤としては、例えば、細胞外基質、フィブロネクチン、ビトロネクチン、オ

ステオポンチン、ラミニン、エンタクチン、コラーゲンI、コラーゲンII、コラーゲンIII、コラーゲンIV、コラーゲンV、コラーゲンVI、ゼラチン、ポリ-L-オオルニチン、ポリ-D-リジン、マトリゲル（登録商標）マトリックスを挙げることができるが、これらに限定されない。

【0080】

前記指標を満たすさらに他の培養方法としては、例えば、培養に用いる基礎培地に、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を添加して培養することが挙げられる。塩基性線維芽細胞増殖因子の濃度は、好ましくは2 ng/mL以上であり、さらに好ましくは4 ng/mL以上であり、さらに好ましくは6 ng/mL以上であり、さらに好ましくは8 ng/mL以上であり、さらに好ましくは10 ng/mL以上である。塩基性線維芽細胞増殖因子の濃度は、好ましくは20 ng/mL以下であり、さらに好ましくは18 ng/mL以下であり、16 ng/mL以下であり、さらに好ましくは14 ng/mL以下であり、さらに好ましくは12 ng/mL以下である。塩基性線維芽細胞増殖因子を添加するタイミングは、特に限定されないが、例えば、培養工程の最初、培養工程の途中、培養工程における純化後、N回継代した直後（Nは1以上の整数を示す）、維持培養の途中、凍結保存前、又は解凍後などが挙げられる。

【0081】

上記の1回の培養の培養期間としては、例えば4～10日間を挙げることができる。より具体的には、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間又は10日間を挙げることができる。

【0082】

上記の培養に用いる培地は、任意の動物細胞培養用液体培地を基礎培地とし、必要に応じて他の成分（血清、血清代替試薬、増殖因子など）を適宜添加することにより調製することができる。

【0083】

基礎培地としては、BME培地、BGJb培地、CMRL1066培地、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地（Iscove's Modified Dulbecco's Medium）、Medium 199培地、Eagle MEM培地、αMEM（Alpha Modification of Minimum Essential Medium Eagle）培地、DMEM培地（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）、ハムF10培地、ハムF12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、及びこれらの混合培地（例えば、DMEM/F12培地（Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham））等の培地を使用することができるが、特に限定されない。

【0084】

また、上記の培養に用いる培地は、一般的に市販されている無血清培地を用いても良い。例えば、STK1やSTK2（DSファーマバイオメディカル社）、EXPREP MSC Medium（バイオミメティクスシンパシズ社）、Corning stemgro ヒト間葉系幹細胞培地（コーニング社）などが挙げられるが、特に限定されない。

【0085】

前記基礎培地に対して添加する他の成分としては、例えば、アルブミン、血清、血清代替試薬又は増殖因子などが挙げられる。前記基礎培地にアルブミンを添加する態様においては、アルブミンの濃度は0.05%より多く5%以下が好ましい。また、前記基礎培地に血清を添加する態様においては、血清の濃度は5%以上が好ましい。増殖因子を添加する態様においては、増殖因子を培地中で安定化させるための試薬（ヘパリンなど）を、増殖因子に加えてさらに添加してもよいし、増殖因子をあらかじめゲルや多糖類などで安定化しておき、その後、安定化した増殖因子を前記基礎培地に対して添加してもよい。

【0086】

間葉系幹細胞の培養は、例えば、以下のような工程にて行うことができる。まず、細胞懸

10

20

30

40

50

濁液を遠心分離し、上清を除去し、得られた細胞ペレットを培地にて懸濁する。次に、コーティングしていないプラスチック製培養容器に細胞を播種し、3%以上5%以下のCO₂濃度、37℃環境にて、培地を用いてコンフルエント率95%以下となるように培養する。上記の培地としては、例えば、αMEM、M199、或いはこれらを基礎とする培地を挙げることができるが、これらに限定されない。上記のような培養により取得した細胞は、1回培養した細胞である。

【0087】

上記の1回培養した細胞は、例えば、以下のようにさらに継代し、培養することができる。まず、1回培養した細胞を、細胞剥離手段にて処理した後にトリプシンにて処理してプラスチック製培養容器から剥離させる。次に、得られた細胞懸濁液を遠心分離し、上清を除去し、得られた細胞ペレットを培地にて懸濁する。最後に、コーティングしていないプラスチック製培養容器に細胞を播種し、3%以上5%以下のCO₂濃度、37℃環境にて、培地を用いてコンフルエント率95%以下となるように培養する。上記の培地としては、例えば、αMEM、M199、或いはこれらを基礎とする培地を挙げることができるが、これらに限定されない。上記のような継代及び培養により取得した細胞は、1回継代した細胞である。同様の継代及び培養を行うことにより、N回継代した細胞を取得することができる（Nは1以上の整数を示す）。継代回数Nの下限は、細胞を大量に製造する観点から、例えば、1回以上、好ましくは2回以上、より好ましくは3回以上、さらに好ましくは4回以上、さらに好ましくは5回以上、さらに好ましくは6回以上、さらに好ましくは7回以上、さらに好ましくは8回以上、さらに好ましくは9回以上、さらに好ましくは10回以上、さらに好ましくは11回以上、さらに好ましくは12回以上、さらに好ましくは13回以上、さらに好ましくは14回以上、さらに好ましくは15回以上、さらに好ましくは16回以上、さらに好ましくは17回以上、さらに好ましくは18回以上、さらに好ましくは19回以上、さらに好ましくは20回以上、さらに好ましくは25回以上である。また、継代回数Nの上限は、細胞の老化を抑える観点から、例えば、50回以下、45回以下、40回以下、35回以下、30回以下であることが好ましい。

【0088】

上記の細胞剥離手段として、例えば、細胞剥離剤を使用してもよい。細胞剥離剤としては、トリプシン、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）等を使用することができるが、特に限定されない。細胞剥離剤として、市販の細胞剥離剤を用いてもよい。例えば、トリプシン-EDTA溶液（Thermo Fisher Scientific社製）、TrypLE Select（Thermo Fisher Scientific社製）、Accutase（Stemcell Technologies社製）、Accumax（Stemcell Technologies社製）などが挙げられるが、これらに限定されない。また、細胞剥離手段として、物理的な細胞剥離手段を使用してもよく、例えば、セルスクレーパー（コーニング社製）を使用することができるが、これに限定されない。細胞剥離手段は、単独で使用してもよく、複数を組み合わせて使用してもよい。

【0089】

本発明の製造方法によれば、細胞凝集性の低い間葉系幹細胞を含む細胞集団を得ることができる。これにより経静脈的に投与するのに有用な細胞製剤（医薬組成物）を製造することができる。培養1バッチあたりの取得細胞数（単位表面積あたり、単位培養日数あたりの得られる細胞数）の下限は、播種細胞数、播種密度等によって異なるが、例えば、 1.0×10^5 （個/cm²/day）以上、 2.0×10^5 （個/cm²/day）以上、 3.0×10^5 （個/cm²/day）以上、 4.0×10^5 （個/cm²/day）以上、 5.0×10^5 （個/cm²/day）以上、 6.0×10^5 （個/cm²/day）以上、 7.0×10^5 （個/cm²/day）以上、 8.0×10^5 （個/cm²/day）以上、 9.0×10^5 （個/cm²/day）以上又は 10.0×10^5 （個/cm²/day）以上である。また、培養1バッチあたりの取得細胞数の上限は、特に限定されないが、例えば、 10.0×10^8 （個/cm²/day）以下、 9.0×10^8 （個

／ cm^2/day) 以下、 8.0×10^8 (個／ cm^2/day) 以下、 7.0×10^8 (個／ cm^2/day) 以下、 6.0×10^8 (個／ cm^2/day) 以下、 5.0×10^8 (個／ cm^2/day) 以下、 4.0×10^8 (個／ cm^2/day) 以下、 3.0×10^8 (個／ cm^2/day) 以下、 2.0×10^8 (個／ cm^2/day) 以下又は 1.0×10^8 (個／ cm^2/day) 以下である。

【0090】

本発明の製造方法によれば、細胞凝集性の低い間葉系幹細胞を含む細胞集団を得ることができる。また、本発明の製造方法によって得られる間葉系幹細胞は、生体外での培養開始後、好ましくは40日以降まで、さらに好ましくは45日以降まで、50日以降まで、55日以降まで、60日以降まで、65日以降まで、70日以降まで、75日以降まで、80日以降まで、85日以降まで、90日以降まで、95日以降まで、100日以降まで、105日以降まで、又は110日以降まで、培養することが可能である。

10

【0091】

また、本発明の製造方法によって得られる間葉系幹細胞は、生体外での培養開始後、倍加回数が好ましくは10回以上、さらに好ましくは15回以上、20回以上、25回以上、30回以上、35回以上、40回以上、45回以上、又は50回以上になるまで培養することが可能である。

【0092】

本発明の製造方法は、前記細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であることを満たすという条件を指標として、細胞凝集性の低い間葉系細胞を含む細胞集団を識別する識別工程を含むものでもよい。

20

【0093】

前記間葉系幹細胞を含む細胞集団を識別するための手段は、好ましくは、フローサイトメトリー、マイクロアレイ及び／又は定量RT-PCRである。

【0094】

SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子及びCOL16A1遺伝子の相対発現量は、マイクロアレイを用いて、本明細書中において上記で述べた手順に従って測定することができる。

【0095】

上記した識別を行うタイミングは、特に限定されないが、例えば、生体試料から細胞を分離した直後、培養工程の途中、培養工程における純化後、N回継代した直後（Nは1以上の整数を示す）、維持培養の途中、凍結保存前、解凍後、製剤化する前、又は製剤化した後などが挙げられる。

30

【0096】

また、本発明の製造方法は、上記の条件を指標として前記間葉系幹細胞を含む細胞集団を識別した後に、識別した細胞集団を選択的に分離する工程を含むことができる。前記識別した細胞集団を選択的に分離するための手段は、特に限定されないが、例えば、セルソーターによる細胞集団の分取、培養による細胞集団の純化などが挙げられる。

【0097】

また、本発明の製造方法は、前記間葉系幹細胞を含む細胞集団を凍結保存する工程を含むことができる。前記細胞集団を凍結保存する工程を含む態様においては、前記細胞集団を解凍後、必要に応じて前記細胞集団を識別、分離、回収及び／又は培養してもよい。また、前記細胞集団を解凍後、そのまま使用してもよい。

40

【0098】

前記間葉系幹細胞を含む細胞集団を凍結保存するための手段は、特に限定されないが、例えば、プログラムフリーザー、ディープフリーザー、液体窒素への浸漬などが挙げられる。プログラムフリーザーを用いた場合、凍結する際の温度は、好ましくは -30°C 以下、 -40°C 以下、 -50°C 以下、 -60°C 以下、 -70°C 以下、 -80°C 以下、 -90°C 以下、 -100°C 以下、 -110°C 以下、 -120°C 以下、 -130°C 以下、 -140°C 以

50

下、 -150°C 以下、 -160°C 以下、 -170°C 以下、 -180°C 以下、 -190°C 以下、又は -196°C （液体窒素温度）以下である。プログラムフリーザーを用いた場合、凍結する際の好ましい凍結速度は、例えば、 $-1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $-2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $-3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $-4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $-5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $-6^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $-7^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $-8^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $-9^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $-10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $-11^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $-12^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $-13^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $-14^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 又は $-15^{\circ}\text{C}/\text{分}$ である。かかる凍結手段としてプログラムフリーザーを用いた場合、例えば、 $-2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上 $-1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以下の凍結速度で -50°C 以上 -30°C 以下の間の温度（例えば、 -40°C ）まで温度を下げ、さらに $-11^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上 $-9^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以下（例えば、 $-10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ）の凍結速度で -100°C 以上 -80°C 以下の温度（例えば、 -90°C ）まで温度を下げるができる。また、かかる凍結手段として液体窒素への浸漬を用いた場合、例えば、 -196°C まで急速に温度を下げて凍結させた後、液体窒素（気相）中で凍結保存することができる。

10

【0099】

上記の凍結手段により凍結する際、上記の細胞集団は、任意の保存容器に入った状態で凍結されてもよい。かかる保存容器としては、例えば、クライオチューブ、クライオバイアル、凍結用バッグ、輸注バッグなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0100】

上記の凍結手段により凍結する際、上記の細胞集団は、任意の凍結保存液中で凍結されてもよい。かかる凍結保存液として、市販されている凍結保存液を用いても良く、例えば、BAM BANKER（リンフォテック社製）、STEM-CELL BANKER（日本全薬工業社製）、ReproCryo RM（リプロセル社製）、CryoNovo（Akron Biotechnology社）、MSC Freezing Solution（Biological Industries社）、CryoStor（HemaCare社）などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0101】

上記の凍結保存液は、所定濃度の多糖類を含有することができる。多糖類の好ましい濃度は、例えば、1質量%以上、2質量%以上、3質量%以上、4質量%以上、5質量%以上、6質量%以上、7質量%以上、8質量%以上、9質量%以上、10質量%以上、11質量%以上又は12質量%以上である。また、多糖類の好ましい濃度は、例えば、40質量%以下、35質量%以下、30質量%以下、25質量%以下、20質量%以下、19質量%以下、18質量%以下、17質量%以下、16質量%以下、15質量%以下、14質量%以下又は13質量%以下である。多糖類としては、例えば、ヒドロキシルエチルデンプン（HES）又はデキストラン（Dextran 40など）などを挙げることができるが、これらに限定されない。

30

【0102】

上記の凍結保存液は、所定濃度のジメチルスルホキシド（DMSO）を含有することができる。DMSOの好ましい濃度は、例えば、1質量%以上、2質量%以上、3質量%以上、4質量%以上、5質量%以上、6質量%以上、7質量%以上、8質量%以上又は9質量%以上である。また、DMSOの好ましい濃度は、例えば、20質量%以下、19質量%以下、18質量%以下、17質量%以下、16質量%以下、15質量%以下、14質量%以下、13質量%以下、12質量%以下、11質量%以下又は10質量%以下である。

40

【0103】

上記の凍結保存液は、0質量%より多い所定濃度のアルブミンを含有するものでもよい。アルブミンの好ましい濃度は、例えば、0.5質量%以上、1質量%以上、2質量%以上、3質量%以上、4質量%以上、5質量%以上、6質量%以上、7質量%以上又は8質量%以上である。また、アルブミンの好ましい濃度は、例えば、40質量%以下、35質量%以下、30質量%以下、25質量%以下、20質量%以下、15質量%以下、10質量%以下又は9質量%以下である。アルブミンとしては、例えば、ウシ血清アルブミン、マウスアルブミン、ヒトアルブミン等を挙げることができるが、これに限定されない。

【0104】

本発明の製造方法は、前記間葉系幹細胞を含む細胞集団を洗浄する工程を含むことができ

50

る。上記の間葉系幹細胞を含む細胞集団を洗浄する工程において使用される洗浄液としては、例えば、生理食塩液、ダルベッコリン酸バッファー（ＤＰＢＳ）、アール平衡塩溶液（ＥＢＳＳ）、ハンクス平衡塩溶液（ＨＢＳＳ）、リン酸バッファー（ＰＢＳ）等を挙げることができるが、これらに限定されない。細胞集団を洗浄することにより、アレルゲン、エンドトキシン等を低減又は除去することができる。上記のアレルゲンとしては、例えば、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、ブタトリプシン、ブタヘパリンなどを挙げることができるが、これらに限定されない。

【０１０５】

本発明の製造方法は、前記間葉系幹細胞を含む細胞集団を保存容器に充填する工程を含むことができる。上記の保存容器としては、例えば、クライオチューブ、クライオバイアル、凍結用バッグ、輸注バッグなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０６】

〔４〕間葉系幹細胞の細胞凝集性を評価する方法、ドナー及び／又はドナーから採取した試料の評価方法、並びに最適な酵素処理条件の判断及び／又は予測方法

【０１０７】

本発明においては、間葉系幹細胞を含む細胞集団において、前記細胞集団が、ＳＤＨＡ遺伝子の発現量に対するＣＯＬ１１Ａ１遺伝子の相対発現量が６．０以下であること、及びＳＤＨＡ遺伝子の発現量に対するＣＯＬ１６Ａ１遺伝子の相対発現量が１．５以下である、という条件を指標として測定することによって（好ましくは経時的に測定することによって）、間葉系幹細胞の細胞凝集性を評価することができる。前記評価が必要な工程としては、例えば、培養する工程、凍結保存する工程、及び／又は製剤化する工程である。

【０１０８】

例えば培養する工程においては、指標を経時的に測定することで、間葉系幹細胞の細胞凝集性の変化を迅速かつ簡便に把握且つ予測することができる。上記指標を満たす間葉系幹細胞を含む細胞集団においては、間葉系幹細胞が低い細胞凝集性を維持することが分かる。一方、上記指標から値が逸脱した培養状態が継続している場合には、間葉系幹細胞の細胞凝集性が増加しつつあることが予測できる。細胞凝集性が増加しつつあることを指標から読み取った場合には、培養条件（播種密度、培地、増殖因子、血清の変更など）を必要に応じて適切に変更することによって、細胞凝集を抑制することができる。また、上記指標を満たさない場合には、例えばセルソーティング技術を利用することによって、上記指標を満たす間葉系幹細胞を含む細胞集団のみを分取することができる。その後、前記細胞集団における間葉系幹細胞を再度播種して継代培養することによって、細胞凝集を抑制することができる。なお、培養初期段階においては、その工程の最終段階において前記指標を満たすように培養条件（播種密度、培地、増殖因子、血清の変更など）を設計して、少なくとも最終段階においては、上記指標を満たすことができればよい。

【０１０９】

本発明においては、ドナーから間葉系幹細胞を含む細胞集団を取得し、ＳＤＨＡ遺伝子の発現量に対するＣＯＬ１１Ａ１遺伝子の相対発現量、及びＳＤＨＡ遺伝子の発現量に対するＣＯＬ１６Ａ１遺伝子の相対発現量を測定し、前記細胞集団が、ＳＤＨＡ遺伝子の発現量に対するＣＯＬ１１Ａ１遺伝子の相対発現量が６．０以下であること、及びＳＤＨＡ遺伝子の発現量に対するＣＯＬ１６Ａ１遺伝子の相対発現量が１．５以下である、という条件を指標として測定することによって、当該ドナー自体及び／又はドナーから採取した試料の品質を評価することができる。上記指標を満たす間葉系幹細胞を含む細胞集団が得られる場合（好ましくは容易に得られる場合）には、前記ドナー及び／又はドナーから採取した試料の品質が良好であることを確認できる。一方、前記間葉系幹細胞を含む細胞集団における上記相対発現量が、上記指標から逸脱している場合には、ドナーから採取した試料に含まれる細胞集団が細胞凝集を起こしやすい可能性が高いため、培養条件（播種密度、培地、増殖因子、血清の変更など）を適切に変更することによって、細胞凝集を抑制することができる。また、前記間葉系幹細胞を含む細胞集団における上記相対発現量が、上記指標から逸脱している場合には、例えばセルソーティング技術を利用することによって

、上記指標を満たす間葉系幹細胞を含む細胞集団を分取し、前記細胞集団における間葉系幹細胞を播種して培養することによって、細胞凝集を抑制することができる。培養初期段階においては、その工程の最終段階において前記指標を満たすように培養条件（播種密度、培地、増殖因子、血清の変更など）を設計して、少なくとも最終段階においては、上記指標を満たすことができる。なお、ドナーから採取した試料の品質を確認する場合については、試料の調製及び処理方法、細胞集団の培養方法は特に限定されず、任意の方法を採用することができる。

【0110】

本発明においては、ドナーから採取した試料を酵素処理して得られた細胞集団に対して、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量を測定し、前記細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下である、という条件を指標として評価することで、前記試料の最適な酵素処理条件を判断及び／又は予測することができる。上記指標を満たす間葉系幹細胞を含む細胞集団が得られる場合（好ましくは容易に得られる場合）には、ドナーから採取した試料の酵素処理方法が適切であることを判断及び／又は予測することができる。一方、上記指標から値が逸脱した培養状態が継続している場合には、ドナーから採取した試料の酵素処理方法が不適切であることを判断及び／又は予測することができる。なお、最適な酵素処理方法を判断及び／又は予測する場合については、試料の調製及び処理方法、細胞集団の培養方法は特に限定されず、任意の方法を採用することができる。

【0111】

上記の指標は必要なタイミングで測定すればよく、特に限定されないが、生体試料から細胞を分離した直後、培養工程の途中、培養工程における純化後、N回継代した直後（Nは1以上の整数を示す）、維持培養の途中、凍結保存前、解凍後、製剤化する前、又は製剤化した後などが挙げられる。

【0112】

〔5〕医薬組成物

本発明による間葉系幹細胞を含む細胞集団は、医薬組成物として使用することができる。即ち、本発明によれば、本発明による細胞集団と、製薬上許容し得る媒体とを含む、医薬組成物が提供される。

【0113】

本発明の医薬組成物は、好ましくは液剤であり、より好ましくは注射用液剤である。

本発明の医薬組成物は、細胞治療剤、例えば、難治性疾患治療剤として使用することができる。

本発明の医薬組成物は、免疫関連疾患、虚血性疾患、下肢虚血、脳血管虚血、腎臓虚血、肺虚血、神経性疾患、移植片対宿主病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、放射線腸炎、全身性エリテマトーデス、紅斑性狼瘡、膠原病、脳卒中、脳梗塞、脳内血腫、脳血管麻痺、肝硬変、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、乾癬、表皮水疱症、糖尿病、菌状息肉腫、強皮症、軟骨等の結合組織の変性及び／又は炎症から起こる疾患、関節軟骨欠損、半月板損傷、離弾性骨軟骨症、無腐性骨壊死、変形性膝関節症、炎症性関節炎、関節リウマチ、眼疾患、血管新生関連疾患、虚血性心疾患、冠動脈性心疾患、心筋梗塞、狭心症、心不全、心筋症、弁膜症、創傷、上皮損傷、線維症、肺疾患、及び癌から選択される疾患の治療剤として使用することができる。本発明の医薬組成物を治療部位に効果が計測できる量投与することで、上記疾患を治療することができる。

【0114】

本発明によれば、医薬組成物のために使用される、本発明による間葉系幹細胞を含む細胞集団が提供される。

本発明によれば、細胞治療剤のために使用される、本発明による間葉系幹細胞を含む細胞集団が提供される。

【0115】

本発明によれば、免疫関連疾患、虚血性疾患、下肢虚血、脳血管虚血、腎臓虚血、肺虚血、神経性疾患、移植片対宿主病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、放射線腸炎、全身性エリテマトーデス、紅斑性狼瘡、膠原病、脳卒中、脳梗塞、脳内血腫、脳血管麻痺、肝硬変、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、乾癬、表皮水疱症、糖尿病、菌状息肉腫、強皮症、軟骨等の結合組織の変性及び／又は炎症から起こる疾患、関節軟骨欠損、半月板損傷、離弾性骨軟骨症、無腐性骨壊死、変形性膝関節症、炎症性関節炎、関節リウマチ、眼疾患、血管新生関連疾患、虚血性心疾患、冠動脈性心疾患、心筋梗塞、狭心症、心不全、心筋症、弁膜症、創傷、上皮損傷、線維症、肺疾患、及び癌から選択される疾患の治療のために使用される、本発明による間葉系幹細胞を含む細胞集団が提供される。

10

【0116】

本発明によれば、患者又は被験者に投与して、心筋の再生、心筋細胞の産生、血管新生、血管の修復、又は、免疫応答の抑制のために使用される、本発明による間葉系幹細胞を含む細胞集団が提供される。

【0117】

本発明によれば、患者又は被験者に、本発明による間葉系幹細胞を含む細胞集団の治療有効量を投与する工程を含む、患者又は被験者に細胞を移植する方法、並びに患者又は被験者の疾患の治療方法が提供される。

【0118】

本発明によれば、医薬組成物の製造のための、本発明による間葉系幹細胞を含む細胞集団の使用が提供される。

20

本発明によれば、細胞治療剤の製造のための、本発明による間葉系幹細胞を含む細胞集団の使用が提供される。

【0119】

本発明によれば、免疫関連疾患、虚血性疾患、下肢虚血、脳血管虚血、腎臓虚血、肺虚血、神経性疾患、移植片対宿主病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、放射線腸炎、全身性エリテマトーデス、紅斑性狼瘡、膠原病、脳卒中、脳梗塞、脳内血腫、脳血管麻痺、肝硬変、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、乾癬、表皮水疱症、糖尿病、菌状息肉腫、強皮症、軟骨等の結合組織の変性及び／又は炎症から起こる疾患、関節軟骨欠損、半月板損傷、離弾性骨軟骨症、無腐性骨壊死、変形性膝関節症、炎症性関節炎、関節リウマチ、眼疾患、血管新生関連疾患、虚血性心疾患、冠動脈性心疾患、心筋梗塞、狭心症、心不全、心筋症、弁膜症、創傷、上皮損傷、線維症、肺疾患、及び癌から選択される疾患の治療剤の製造のための、本発明による間葉系幹細胞を含む細胞集団の使用が提供される。

30

【0120】

本発明によれば、患者又は被験者に投与して、心筋の再生、心筋細胞の産生、血管新生、血管の修復、又は、免疫応答の抑制に必要な治療剤の製造のための、本発明による間葉系幹細胞を含む細胞集団の使用が提供される。

【0121】

本発明の医薬組成物は、間葉系幹細胞を含む細胞集団を、製薬上許容し得る媒体により希釈したものでもよい。上記の製薬上許容し得る媒体は、患者又は被験者に投与し得る溶液であれば特に限定されない。製薬上許容し得る媒体は、輸液製剤であってもよく、例えば、注射用水、生理食塩液、5%ブドウ糖液、リンゲル液、乳酸リンゲル液、酢酸リンゲル液、重炭酸リンゲル液、アミノ酸液、開始液（1号液）、脱水補給液（2号液）、維持輸液（3号液）、術後回復液（4号液）、Plasma-Lyte A（登録商標）等を挙げることができるが、これらに限定されない。

40

【0122】

本明細書における「患者又は被験者」とは、典型的にはヒトであるが、他の動物であってもよい。他の動物としては、例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、サル（カニクイザル、アカゲザル、コモンマーモセット、ニホンザル）、フェレット、ウサギ、げっ歯類（マウス、ラット、スナネズミ、モルモット、ハムスター）等の哺乳動物、

50

ニワトリ、ウズラ等の鳥類が挙げられるが、これらに限定されない。

【0123】

本明細書における「免疫関連疾患」としては、患者又は被験者の免疫応答に関わる疾患であれば特に限定されないが、例えば、移植片対宿主病（GVHD）、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病、潰瘍性大腸炎、放射線腸炎、糖尿病、全身性エリテマトーデス、膠原病、菌状息肉症、多発性硬化症、乾癬、自己免疫性水疱症、関節リウマチ等を挙げることができる。

【0124】

本発明の医薬組成物は、患者又は被験者の治療の際に用いられる任意の成分を含んでもよい。上記の成分としては、例えば、塩類、多糖類（例えば、ヒドロキシセルロース（HES）、デキストランなど）、タンパク質（例えば、アルブミンなど）、DMSO、アミノ酸、培地成分（例えば、RPMI 1640培地に含まれる成分など）などを挙げることができるが、これらに限定されない。

【0125】

本発明の医薬組成物は、保存安定性、等張性、吸収性、及び／又は粘性を増加するための種々の添加剤、例えば、乳化剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、湿潤剤、抗酸化剤、キレート剤、増粘剤、ゲル化剤、pH調整剤等を含んでもよい。前記増粘剤としては、例えば、HES、デキストラン、メチルセルロース、キサントガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等が挙げられるが、これらに限定されない。増粘剤の濃度は、選択される増粘剤によるが、患者又は被験者に投与した場合に安全であり、かつ所望の粘性を達成する濃度の範囲で、任意に設定することができる。

【0126】

発明の医薬組成物のpHは、中性付近のpHであれば特に限定されないが、例えば、pH 6.5以上又はpH 7.0以上とすることができ、またpH 8.5以下又はpH 8.0以下とすることができる。

【0127】

本発明の医薬組成物は、好ましくは液剤であり、より好ましくは注射用液剤である。注射用液剤としては、例えば、国際公開WO 2011/043136号公報、特開2013-256510号公報などにおいて、注射に適した液体調製物が知られている。本発明の医薬組成物も、上記文献に記載されている注射用液剤とすることができる。

【0128】

また、本発明の一態様によれば、本発明の医薬組成物は、他の疾患治療目的に、細胞塊又はシート状構造の移植用製剤、或いは任意のゲルと混合したゲル製剤として用いることも可能である。

【0129】

本発明の医薬組成物の投与量としては、患者又は被験者に投与した場合に、投与していない患者又は被験者と比較して疾患に対して治療効果を得ることができるような細胞の量である。具体的な投与量は、投与形態、投与方法、使用目的、及び患者又は被験者の年齢、体重及び症状等によって適宜決定することができる。ヒトへの間葉系幹細胞の1回の投与量は、特に限定されないが、例えば、 10^4 個/kg体重以上、 10^5 個/kg体重以上又は 10^6 個/kg体重以上である。また、ヒトへの間葉系幹細胞の1回の投与量は、特に限定されないが、例えば、 10^9 個/kg体重以下、 10^8 個/kg体重以下又は 10^7 個/kg体重以下である。

【0130】

本発明の医薬組成物の投与方法は、特に限定されないが、例えば、皮下注射、リンパ節内注射、静脈内注射、動脈内注射、腹腔内注射、胸腔内注射又は局所への直接注射、又は局所に直接移植することなどが挙げられる。医薬組成物の投与方法については、例えば、特開2015-61520号公報、Onken JE, et al. American College of Gastroenterology Conference 2006 Las Vegas, NV, Abstract 121., Garcia-Olmo D

, et al. Dis Colon Rectum 2005; 48: 1416-23. などにおいて、静脈内注射、点滴静脈注射、局所への直接注射、局所への直接移植などが知られている。本発明の医薬組成物も、上記文献に記載されている各種方法により投与することができる。

【0131】

本発明の医薬組成物は、使用直前まで凍結状態にて保存することができる。凍結保存の温度は、好ましくは -30°C 以下、 -40°C 以下、 -50°C 以下、 -80°C 以下、 -90°C 以下、 -100°C 以下、 -150°C 以下、 -180°C 以下、又は -196°C （液体窒素温度）以下である。本発明の医薬組成物を患者又は被験者に投与する際には、 37°C で急速に解凍して使用することができる。

【0132】

以下の実施例にて本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0133】

<比較例1>

（工程1：羊膜の採取）

インフォームドコンセントを得た待機帝王切開症例の妊婦（ドナー）から、胎児付属物である卵膜及び胎盤を無菌的に採取した。得られた卵膜及び胎盤を生理食塩水が入った滅菌バットに収容し、卵膜の断端から羊膜を手動的に剥離した。羊膜をハックス平衡塩溶液（Ca・Mg不含有）にて洗浄し、付着した血液及び血餅を除去した。

【0134】

（工程2：羊膜の酵素処理及び羊膜MSCの回収）

上皮細胞層と細胞外基質層とを含む羊膜を、 $300\text{PU}/\text{mL}$ コラゲナーゼと $200\text{PU}/\text{mL}$ ディスパーゼIとを含有するハックス平衡塩溶液（Ca・Mg含有）に浸し、 37°C にて90分間、 50rpm の条件にて振盪攪拌することにより羊膜を酵素処理した。酵素処理後の溶液を目開き $95\mu\text{m}$ のナイロンメッシュでろ過することにより羊膜の未消化物を取り除き、羊膜MSCを含む細胞懸濁液を回収した。得られた細胞懸濁液に關し、フローサイトメーターを用いて、MSCの代表的な陽性マーカーとして知られている表面抗原の一つであるCD90の発現が陽性である細胞の比率を解析し、高純度で羊膜から羊膜MSCを分離できていることを確認した。

【0135】

表面抗原解析は、ベクトン・ディッキンソン（BD）社のBD Accuri™ C6 Flow Cytometerを用い、測定条件は解析細胞数： $10,000\text{cells}$ 、流速設定：Slow（ $14\mu\text{L}/\text{min}$ ）とした。CD90抗原に対応する抗体としてFITC Mouse Anti-Human CD90（BD社／型番：561969）を、そのアイソタイプコントロール用抗体としてFITC Mouse IgG1, κ Isotype Control（BD社／型番：349041）を使用した。

【0136】

（工程3：羊膜MSCの凍結保存）

上記の「工程2：羊膜の酵素処理及び羊膜MSCの回収」で得られた細胞集団を、 1.0×10^7 個/ mL となるようにバンバンカー（リンフォテック社）に懸濁し、クライオチューブに分注した。クライオチューブをバイセル（凍結処理容器）（日本フリーザー社）に入れ、 -80°C にて12時間保存の後、液体窒素温度にて凍結保存した。

【0137】

（工程4：羊膜MSCの培養）

上記の「工程3：羊膜MSCの凍結保存」で得られた細胞集団を、コーティングしていないプラスチック製培養容器に播種し、10%ウシ胎児血清（FBS）（非働化済み）及び $1 \times \text{Antibiotic-Antimycotic}$ （Thermo Fisher Scientific社製）を含む αMEM （Alpha Modification of

10

20

30

40

50

Minimum Essential Medium Eagle) にてサブコンフルエントになるまで接着培養した。その後、TrypLE Select (1×) (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて細胞を剥離し、1/4 量の細胞を先の培養と同じスケールのコーティングしていないプラスチック製培養容器に播種することにより、継代培養を行った。培地交換は週 2 回の頻度で実施した。このようにして継代培養を続けた。

【0138】

<実施例 1>

(工程 1: 羊膜の採取)

比較例 1 におけるドナーとは異なるドナーから、胎児付属物である卵膜及び胎盤を無菌的に採取した以外は、比較例 1 の工程 1 と同様の手法にて羊膜を取得した。

【0139】

(工程 2: 羊膜の酵素処理及び羊膜 MSC の回収)

比較例 1 の工程 2 と同様の手法にて羊膜 MSC を含む細胞懸濁液を回収した。得られた細胞懸濁液に関し、フローサイトメーターを用いて比較例 1 と同様にして、MSC の代表的な陽性マーカーとして知られている表面抗原の一つである CD90 の発現が陽性である細胞の比率を解析し、高純度で羊膜から羊膜 MSC を分離できていることを確認した。

【0140】

(工程 3: 羊膜 MSC の凍結保存)

上記の「工程 2: 羊膜の酵素処理及び羊膜 MSC の回収」で得られた細胞集団を、比較例 1 の工程 3 と同様の手法にて凍結保存した。

【0141】

(工程 4: 羊膜 MSC の培養)

上記の「工程 3: 羊膜 MSC の凍結保存」で得られた細胞集団を、比較例 1 の工程 4 と同様の手法にてサブコンフルエントになるまで接着培養した。継代培養は、比較例 1 の工程 4 と同様の手法にて行った。

【0142】

<CDH6 発現の解析>

比較例 1 及び実施例 1 で培養した 6 継代目の細胞集団に関し、フローサイトメーターを用いて CDH6 に対して陽性となる細胞の比率を測定した。

【0143】

本測定では、CDH6 抗原に対応する 1 次抗体として Anti-CDH6-Mouse Mono IgG1 (R&D Systems 社/型番: MAB2715)、アイソタイプコントロール用抗体として Mouse Mono IgG1 (R&D Systems 社/型番: MAB002)、CDH6 抗原に対応する 1 次抗体及びそのアイソタイプコントロール用抗体に対応する 2 次抗体として Mouse F(ab)2 IgG (H+L) APC-conjugated Antibody (R&D Systems 社/型番: F0101B) を使用した。

【0144】

解析の結果を図 1 及び図 2 に示す。比較例 1 の細胞集団と比べて、実施例 1 の細胞集団では CDH6 の陽性率が向上した。また、比較例 1 の細胞集団では、CDH6 が陽性を呈する間葉系幹細胞の比率が 30% 未満 (具体的には 20.1%) であるのに対して、実施例 1 の細胞集団では、CDH6 が陽性を呈する間葉系幹細胞の比率が 30% 以上 (具体的には 40.2%) であった。

【0145】

<遺伝子発現の解析>

比較例 1 及び実施例 1 で培養した 6 継代目の細胞集団に関し、マイクロアレイ解析により、VCAN 遺伝子、DCN 遺伝子、LUM 遺伝子、GPC4 遺伝子、COL11A1 遺伝子、COL16A1 遺伝子、COL4A5 遺伝子及びSDHA 遺伝子の発現を解析した。

【0146】

10

20

30

40

50

以下の手順（１）～（５）によりマイクロアレイ解析を実施した。なお、以下の手順（３）～（５）は、株式会社理研ジェネシスに委託して実施した。

（１）比較例１及び実施例１で培養した６継代目の細胞集団を、セルスクレーパー（コーニング社製）を用いてプラスチック製培養容器から剥離し、遠心分離により回収した。

（２）得られた細胞ペレットにRNA Later（Thermo Fisher Scientific社製）を添加してRNAを安定保存した後、RNeasy Plus Miniキット（QIAGEN社製）を用いてトータルRNAを抽出、精製した。

（３）１００ngのトータルRNAから逆転写反応によりcDNAを合成し、cDNAからin vitro transcriptionによりcRNAに転写してビオチン標識を行った（３' IVT PLUS Reagent Kitを使用）。

（４）１０．０μgの標識cRNAをハイブリダイゼーションバッファーに加え、Human Gene Genome U133A 2.0 Array（Affymetrix社製）上で１６時間のハイブリダイゼーションを行った。GeneChip Fluidics Station 450（Affymetrix社製）にて洗浄、フィコエリスリン染色後、GeneChip Scanner 3000 7G（Affymetrix社製）にてスキャンを行い、AGCC（Affymetrix GeneChip Command Console Software）（Affymetrix社製）にて画像解析し、Affymetrix Expression Console（Affymetrix社製）を用いて数値化した。

（５）数値データファイルを、解析ソフトGeneSpring GX（アジレント・テクノロジー社製）を用いて解析した。

【０１４７】

各遺伝子の発現レベルを、SDHA遺伝子の発現レベルに対する相対発現量として求めた。結果を下記表に示す。

【０１４８】

【表１】

		COL11A1	COL16A1	COL4A5	VCAM	DCN	LUM	GPC4
実施例１の細胞集団	蛍光強度	1055.7	592.1	167.4	3554.3	1827.0	2208.7	104.1
	相対発現量*	1.1	0.6	0.2	3.6	1.9	2.2	0.1
比較例１の細胞集団	蛍光強度	9135.5	2136.3	656.8	7602.6	5243.0	8647.6	1144.8
	相対発現量*	8.7	2.0	0.6	7.2	5.0	8.2	1.1

*：SDHA遺伝子の発現量に対する各遺伝子の相対発現量

【０１４９】

表１より、比較例１の細胞集団と比べて、実施例１の細胞集団は、COL11A1遺伝子及びCOL16A1遺伝子の相対発現量が少ないことが分かり、具体的には、実施例１の細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が６．０以下であり、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が１．５以下であることが分かった。一方、比較例１の細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が６．０以下より多く、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が１．５より多いことが分かった。

【０１５０】

また、表１より、比較例１の細胞集団と比べて、実施例１の細胞集団は、COL4A5遺伝子の相対発現量が少ないことが分かり、具体的には、実施例１の細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL4A5遺伝子の相対発現量が０．４以下であることが分かった。一方、比較例１の細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL4A5遺伝子の相対発現量が０．４より多いことが分かった。

【0151】

また、表1より、比較例1の細胞集団と比べて、実施例1の細胞集団は、VCAN遺伝子、DCN遺伝子及びLUM遺伝子の相対発現量が少ないことが分かり、具体的には、実施例1の細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するVCAN遺伝子の相対発現量が6.0以下であり、SDHA遺伝子の発現量に対するDCN遺伝子の相対発現量が3.0以下であり、SDHA遺伝子の発現量に対するLUM遺伝子の相対発現量が6.0以下であることが分かった。一方、比較例1の細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するVCAN遺伝子の相対発現量が6.0より多く、SDHA遺伝子の発現量に対するDCN遺伝子の相対発現量が3.0より多く、SDHA遺伝子の発現量に対するLUM遺伝子の相対発現量が6.0より多いことが分かった。

10

【0152】

また、表1より、比較例1の細胞集団と比べて、実施例1の細胞集団は、GPC4遺伝子の相対発現量が少ないことが分かり、具体的には、実施例1の細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するGPC4遺伝子の相対発現量が0.5以下であることが分かった。一方、比較例1の細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するGPC4遺伝子の相対発現量が0.5より多いことが分かった。

【0153】

<細胞凝集性の評価>

細胞凝集性を以下の手順(1)～(6)により評価した。

(1) 比較例1及び実施例1で培養した6継代目の細胞集団を、 2.0×10^5 個/mLとなるように、10%ウシ胎児血清(FBS)(非働化済み)及び1×Antibiotic-Antimycotic(Thermo Fisher Scientific社製)を含むαMEM(Alpha Modification of Minimum Essential Medium Eagle)にて懸濁し、細胞懸濁液を調製した。

20

(2) 調製した細胞懸濁液を、浮遊培養用6ウェルプレート(住友ベークライト社/品番:MS-8006R)に4mLずつ播種した。

(3) 浮遊培養用6ウェルプレートを、インキュベーター内用シェーカーOrbital Shaker OS-762(オプティマ社)の上に設置し、3%以上5%以下のCO₂濃度、37℃環境、90rpmの条件下にて24時間巡回培養(浮遊培養)を行った。

(4) 巡回培養により得られた細胞懸濁液を顕微鏡にて観察し、細胞凝集塊が形成されていることを確認した。巡回培養により得られた細胞懸濁液を回収し、セルストレーナー(35μmナイロンメッシュフィルター)(コーニング社/品番:352235)にてフィルターろ過し、細胞凝集塊をメッシュ上にトラップした。

30

(5) フィルターろ過していない細胞懸濁液(すなわち、細胞凝集塊とシングル細胞とを含む)と、フィルターろ過により得られた細胞懸濁液(細胞凝集塊を含まない)とを、トリパンブルーにて染色し、自動セルカウンターCountess II FL(Thermo Fisher Scientific社)を用いて細胞計数を行った。

(6) 以下の式により、細胞凝集率を算出した。

細胞凝集率(%) = $100 - (\text{フィルターろ過により得られた細胞懸濁液} 1 \text{ mL あたりの細胞数} / \text{フィルターろ過していない細胞懸濁液} 1 \text{ mL あたりの全細胞数})$

40

【0154】

測定結果を下記表に示す。

【0155】

【表 2】

	非凝集細胞数 ($\times 10^5$ 個/mL)	全細胞数 ($\times 10^5$ 個/mL)	細胞凝集率 (%)
実施例1の 細胞集団	4. 1	7. 9	47. 7
比較例1の 細胞集団	3. 2	9. 1	65. 1

10

【0156】

表2より、比較例1の細胞集団の細胞凝集率は65.1%、実施例1の細胞集団の細胞凝集率は47.7%であった。以上より、比較例1の細胞集団と比べて、実施例1の細胞集団は、細胞凝集性が低いことが明らかになった。

【0157】

よって、以下に示す細胞特性を有する細胞集団は、細胞凝集性が低いことが分かった。前記細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であることを満たす。

20

【0158】

さらに、細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL4A5遺伝子の相対発現量が0.4以下であることを満たす場合も、細胞凝集性が低いことが分かった。さらに、細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するVCAN遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、SDHA遺伝子の発現量に対するDCN遺伝子の相対発現量が3.0以下であること、又はSDHA遺伝子の発現量に対するLUM遺伝子の相対発現量が6.0以下であることの何れか一以上を満たす場合も、細胞凝集性が低いことが分かった。さらに、細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するGPC4遺伝子の相対発現量が0.5以下であることを満たす場合も、細胞凝集性が低いことが分かった。

30

【0159】

つまり、細胞凝集性の低い細胞集団を取得するための指標として、少なくとも上記の条件（SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であること）を満たすことが有効であり、上記の条件を指標とすることによって、細胞凝集性の低い間葉系幹細胞を含む細胞集団を取得することができることが明らかとなった。これにより、本発明により得られた細胞凝集性の低い間葉系幹細胞を含む細胞集団により細胞製剤を製造すれば、塞栓を引き起こす危険性を低減した安全性の高い細胞製剤を製造することができる。

【0160】

40

<実施例2>

インフォームドコンセントを得た待機的帝王切開症例の妊婦（比較例1及び実施例1とは異なるドナー）から、実施例1と同様に、「工程1：羊膜の採取」、「工程2：羊膜の酵素処理及び羊膜MSCの回収」、「工程3：羊膜MSCの凍結保存」及び「工程4：羊膜MSCの培養」を行った。羊膜MSCの培養においては、継代ごとに細胞集団の一部を採取し、採取したそれぞれの細胞集団について下記（a）及び（b）の条件を評価した。前記条件の評価は、上記「CDH6発現の解析」及び「遺伝子発現の解析」と同様の手法を使用した。

（a）前記細胞集団において、CDH6が陽性を呈する間葉系幹細胞の比率が30%以上であり、かつ

50

(b) 前記細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するVCAN遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、SDHA遺伝子の発現量に対するDCN遺伝子の相対発現量が3.0以下であること、又はSDHA遺伝子の発現量に対するLUM遺伝子の相対発現量が6.0以下であることの何れか一以上を満たす。

【0161】

採取した細胞集団には、(a)及び(b)の条件を満たす細胞集団と満たさない細胞集団が存在したため、前記2種類の細胞集団について段落0153に記載の「細胞凝集性の評価」と同様の手法にて細胞凝集性を評価した。

【0162】

評価結果を下記表に示す。

【0163】

【表3】

	非凝集細胞数 ($\times 10^5$ 個/mL)	全細胞数 ($\times 10^5$ 個/mL)	細胞凝集率 (%)
(a)及び(b)の条件を満たす細胞集団	4.2	7.4	43.7
(a)及び(b)の条件を満たさない細胞集団	2.3	7.4	69.0

【0164】

表3より、上記(a)及び(b)の条件を満たさない細胞集団の細胞凝集率は69.0%、上記(a)及び(b)の条件を満たす細胞集団の細胞凝集率は43.7%であった。上記(a)及び(b)の条件を満たさない細胞集団と比べて、上記(a)及び(b)の条件を満たす細胞集団は、細胞凝集性が低いことから、上記(a)及び(b)の条件を満たす細胞集団は、細胞凝集性の低い細胞集団を選択的に取得することができる。

また、上記(a)及び(b)の条件を満たす細胞集団と満たさない細胞集団について、下記(c)及び(d)の条件についても評価を実施した。

(c) 間葉系幹細胞を含む細胞集団が、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及び

(d) SDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であることを満たす。

(a)及び(b)の条件を満たす細胞集団については、(c)及び(d)の条件を満たし、一方、(a)及び(b)の条件を満たさない細胞集団については、(c)及び(d)の条件を満たさなかった。

【0165】

以上より、培養工程においてSDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であること、及びSDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であるという条件を満たす細胞集団は、上記条件を満たさない細胞集団と比較して細胞凝集性が低いことから、前記条件を指標とすることによって、間葉系幹細胞の細胞凝集性を評価することができる。また、上記条件を指標とすれば、細胞凝集性の低い細胞集団を選択的に取得することができる。さらに、本発明によれば、前記指標を測定することによって(あるいは経時的に測定することによって)、間葉系幹細胞の細胞凝集性の変化を迅速に把握し、予測することができる。これにより、経静脈的に投与するのに有用な細胞製剤を製造することができる。

【0166】

<実施例3：医薬組成物の製造>

10

20

30

40

50

上記の実施例 1 で得られた細胞集団の一部を医薬組成物の調製に供する。羊膜 MSC 4.0 × 10⁸ 個、HES 800 mg、DMSO 0.7 mL 及びヒト血清アルブミン 800 mg を含有する RPMI 1640 培地 20 mL からなる医薬組成物（細胞製剤）を調製する。当該医薬組成物を凍結用バッグに封入し、凍結状態で保存する。尚、使用時に医薬組成物を解凍し、患者に供することができる。

【0167】

<実施例 4>

（工程 1：羊膜の採取及び羊膜 MSC の取得）

比較例 1、実施例 1 及び実施例 2 とは異なるドナー 2 名（ドナー X、Y）から、胎児付属物である卵膜及び胎盤を無菌的に採取した以外は、比較例 1、実施例 1 及び実施例 2 の工程 1 と同様の手法にて羊膜を取得した。2 名の胎児付属物から得られた羊膜 MSC はそれぞれ # X、# Y とする。

上記で得られる # X、# Y の羊膜 MSC を含む細胞集団を比較例 1、実施例 1 及び実施例 2 の工程 3 と同様の手法にて凍結保存し、下記の方法で培養した。

【0168】

（工程 2：羊膜 MSC の培養）

上記で得られた細胞集団を、コーティングしていないプラスチック製培養容器に播種し、10% の FBS 及び 1 × Antibiotic-Antimycotic を含む αMEM にてサブコンフルエントになるまで接着培養した。継代培養は、比較例 1、実施例 1 及び実施例 2 の工程 4 と同様の手法にて行った。

【0169】

（遺伝子発現解析）

上記の「工程 2：羊膜 MSC の培養」で得られた 6 継代目の細胞集団の一部を採取し、マイクロアレイ解析に供して下記の条件を満たすか確認するとともに、残りの細胞集団をマイクロアレイ解析の結果が得られるまで凍結保存した。

間葉系幹細胞を含む細胞集団が、SDHA 遺伝子の発現量に対する COL11A1 遺伝子の相対発現量が 6.0 以下であること、及び SDHA 遺伝子の発現量に対する COL16A1 遺伝子の相対発現量が 1.5 以下であることを満たす。

【0170】

<遺伝子発現解析>

6 継代目の細胞集団における各遺伝子の解析結果を表 4 に示す。

【0171】

【表 4】

		COL11A1	COL16A1	VCAN	DCN	LUM	GPC4
ドナー X の 細胞集団	蛍光強度	2629.7	419.5	5555.8	2064.08	2467.6	90.5
	相対発現量*	2.6	0.4	5.5	2.0	2.4	0.1
ドナー Y の 細胞集団	蛍光強度	2745.7	110.5	4681.7	2181.9	2850.0	182.9
	相対発現量*	2.9	0.1	4.9	2.3	3.0	0.2

*：SDHA 遺伝子の発現量に対する各遺伝子の相対発現量

【0172】

表 4 に示すように、ドナー X に由来する細胞集団は、SDHA 遺伝子の発現量に対する COL11A1 遺伝子の相対発現量が 2.6、SDHA 遺伝子の発現量に対する SDHA 遺伝子の発現量に対する COL16A1 遺伝子の相対発現量が 0.4 であった。また、ドナー Y に由来する細胞集団は、SDHA 遺伝子の発現量に対する COL11A1 遺伝子の相対発現量が 2.9、SDHA 遺伝子の発現量に対する COL16A1 遺伝子の相対発現量が 0.1 であった。

【0173】

よって、ドナーX及びYに由来する細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が1.5以下であり、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が6.0以下であることが分かった。具体的には、本実施例における細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL16A1遺伝子の相対発現量が0.5以下であり、SDHA遺伝子の発現量に対するCOL11A1遺伝子の相対発現量が3.0以下であることが分かった。

【0174】

また、表4より、ドナーXに由来する細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するVCAN遺伝子の相対発現量が5.5、SDHA遺伝子の発現量に対するDCN遺伝子の相対発現量が2.0、SDHA遺伝子の発現量に対するLUM遺伝子の相対発現量が2.4であった。また、ドナーYに由来する細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するVCAN遺伝子の相対発現量が4.9、SDHA遺伝子の発現量に対するDCN遺伝子の相対発現量が2.3、SDHA遺伝子の発現量に対するLUM遺伝子の相対発現量が3.0であった。

10

【0175】

よって、ドナーX及びYに由来する細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するVCAN遺伝子の相対発現量が6.0以下であり、SDHA遺伝子の発現量に対するDCN遺伝子の相対発現量が3.0以下であり、SDHA遺伝子の発現量に対するLUM遺伝子の相対発現量が6.0以下であることが分かった。具体的には、本実施例における細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するVCAN遺伝子の相対発現量が5.5以下であり、SDHA遺伝子の発現量に対するDCN遺伝子の相対発現量が2.5以下であり、SDHA遺伝子の発現量に対するLUM遺伝子の相対発現量が4.0以下であることが分かった。

20

【0176】

さらに、表4より、ドナーXに由来する細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するGPC4遺伝子の相対発現量が0.1であった。また、ドナーYに由来する細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するGPC4遺伝子の相対発現量が0.2であった。

【0177】

よって、ドナーX及びYに由来する細胞集団は、SDHA遺伝子の発現量に対するGPC4遺伝子の相対発現量が0.5以下であることが分かった。具体的には、本実施例における細胞集団は、GPC4遺伝子の相対発現量が0.3以下であることが分かった。

30

【0178】

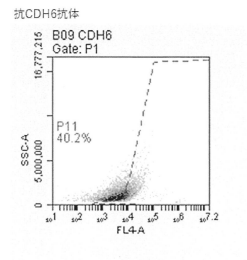
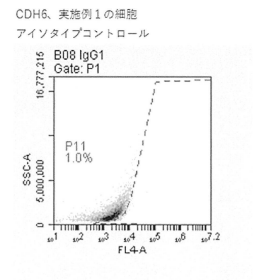
以上より、比較例1、実施例1及び実施例2とは異なるドナーから取得した細胞集団においても、上記の細胞特性を有する細胞集団を取得できることが確認された。実施例1及び実施例2において、上記の細胞特性を有する細胞集団は細胞凝集性が低いことが示されていることから、本実施例（実施例4）において得られた細胞集団も細胞凝集性が低いことが推測できる。

40

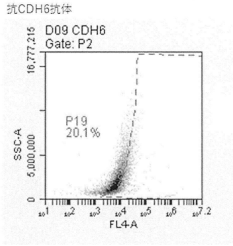
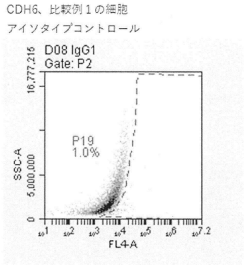
50

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (56)参考文献 特表2015-500810 (JP, A)
国際公開第2015/025810 (WO, A1)
特開2008-178403 (JP, A)
特表2010-538681 (JP, A)
特表2010-500047 (JP, A)
STEINERT A. F., et al., Mesenchymal Stem Cell Characteristics of Human Anterior Cruciate Ligament Outgrowth Cells, TISSUE ENGINEERING: Part A, 2011年, Vol. 17, Nos. 9 and 10, pp. 1375-1388, Abstract、Table 1等
MOON J. H., et al., Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells, Human Reproduction, 2008年, Vol. 23, No. 8, pp. 1760-1770, Introduction第2段落、Materials and Methods、Fig. 4、Table III
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N
A61K
A61P
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)