

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4680483号
(P4680483)

(45) 発行日 平成23年5月11日 (2011.5.11)

(24) 登録日 平成23年2月10日 (2011.2.10)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 L 27/00 (2006.01)
C 1 2 N 5/07 (2010.01)
C 1 2 N 11/02 (2006.01)

A 6 1 L 27/00 G
 A 6 1 L 27/00 Z
 C 1 2 N 5/00 E
 C 1 2 N 11/02

請求項の数 10 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2002-567239 (P2002-567239)
 (86) (22) 出願日 平成14年2月22日 (2002.2.22)
 (65) 公表番号 特表2004-524029 (P2004-524029A)
 (43) 公表日 平成16年8月12日 (2004.8.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/006125
 (87) 国際公開番号 W02002/067867
 (87) 国際公開日 平成14年9月6日 (2002.9.6)
 審査請求日 平成17年2月22日 (2005.2.22)
 審判番号 不服2007-13351 (P2007-13351/J1)
 審判請求日 平成19年5月8日 (2007.5.8)
 (31) 優先権主張番号 60/271, 267
 (32) 優先日 平成13年2月23日 (2001.2.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501102988
 ユニバーシティ オブ ピッツバーグ オ
 ブ ザ コモンウェルス システム オブ
 ハイヤー エデュケーション
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア 152
 60, ピッツバーグ, サッカレイ ア
 ンド オハラ ストリーツ, ガードナー
 スティール カンファレンス センター
 200
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織および臓器の治療および修復に用いるための幹細胞マトリックスの迅速な調製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織および臓器の治療または修復における使用のための筋肉由来幹細胞バイオマトリックスを調製する迅速な方法であって、

a) 幹細胞調製物を生理学的に許容されるマトリックス材料と混合して幹細胞マトリックスを形成させる段階であって、該幹細胞調製物はpp6筋肉由来幹細胞を含む、段階；および

b) レシピエントにおける組織または臓器の治療または修復に用いる前に、約5秒間～約30分間にわたって段階 (a) の幹細胞マトリックスをインビトロで浸透させる段階、を含み、前記生理学的に許容されるマトリックス材料が固体のアルジネートである、方法

10

【請求項 2】

筋肉由来幹細胞がレシピエントに対して自家性である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

筋肉由来幹細胞がレシピエントに対して同種性である、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

幹細胞の均一または不均一な集団をマトリックス材料と混合する、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

筋肉由来幹細胞が成体、胚、または胎児の筋組織起源である、請求項 1 または 4 記載の

20

方法。

【請求項 6】

筋肉由来幹細胞が骨格筋由来である、請求項1または4記載の方法。

【請求項 7】

約 2.5×10^3 ~ 約 1×10^6 個の幹細胞をマトリックス材料中に沈着させるために、筋肉由来幹細胞を生理学的に許容されるマトリックス材料中に導入する、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

約 5×10^3 ~ 約 1×10^6 個の幹細胞をマトリックス材料中に沈着させるために、筋肉由来幹細胞を生理学的に許容されるマトリックス材料中に導入する、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

マトリックス 1cm^2 当たり約 1×10^5 個の幹細胞を沈着させるために、筋肉由来幹細胞を生理学的に許容されるマトリックス材料中に導入する、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

筋肉由来幹細胞バイオマトリックスが、創傷治癒、外科的切開部の修復、組織の補強、臓器の補強、平滑筋の修復、平滑筋以外の筋肉の修復、または血管修復を目的とする、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は一般に、細胞を基盤とする組織工学、ならびに細胞と生体適合性のあるマトリックスとの配合物を調製する方法に関する。より詳細には、本発明は、筋肉由来の幹細胞を基盤とするマトリックス組成物および製造物、ならびにこのような組成物および製造物を必要な組織または臓器部位で作製して利用する迅速な方法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

現在、細胞を基盤とする組織工学の取り組みはすべて、移植を目的とする出荷の前に、細胞をマトリックス中に均一かつ連続的に浸潤させる処理を一括して行う製造現場で行われている。細胞を基盤とする医療用具の製造は費用がかかり時間もかかる。長い時間がかかる理由の一部は、インビトロ使用の前に細胞をマトリックス中で長期間インキュベートする必要があることに起因する。例えば、細胞の足場 (scaffold) の調製に携わっているある企業の総覧には、「[細胞]を数週間かけて発生させた後に、足場上の細胞を至適条件下でバイオリアクター内に保つ。インプラントが生育する完璧な条件を整備するため、バイオリアクターを構築するのは困難である」と述べられている (Advanced Tissue Sciences, Inc., La Jolla, CA)。

【0003】

細胞組織工学には、移植前にあらかじめ構築された連続的な生体デバイスが必要なことが知られている (L. Germainら、2000, Medical & Biological Engineering & Computing, 38(2): 232-40; W.W. Minuthら、1998, Cell Tissue Res., 291(1): 1-11; G.K. Naughtonら、1999, Clin. in Plastic Surgery, 26(4): 579-86, viii)。本明細書に記載する本発明を用いる現時点までは、大部分の細胞マトリックスは非幹細胞 (non-stem cell) を用いて作られていた。しかし、これらの細胞は扱いが難しいことがわかっている (F. Berthod および O. Damour, 1997, British Journal of Dermatology, 136: 809-816)。このような非幹細胞マトリックスを作製するためには、細胞をマトリックス中に組み入れた後に長いインキュベーション期間が必要である。ある具体的な例として、線維芽細胞が足場に付着するには少なくとも3~5時間のインキュベーション期間が必要であり、集密に達するまでにさらに2~3週間のインキュベーション期間が必要であることが報告されている (J.F. Hansbroughら、1991, Surgery, 111(4): 438-446)。さらに、コラーゲンスポンジを用いるには細胞をスポンジ中で少なくとも24時間インキュベートする必要があり、

10

20

30

40

50

細胞が集密に達するまでにさらに8～10日が必要である (F. Berthodら、1993, Biomaterials, 14(10): 749-754)。

【0004】

これに加えて、現在入手しうる細胞マトリックスには注意深い監視が必要である。足場上にある細胞は、足場上の細胞が定常的な様式で成長および再生を行って最適な材料を生じると考えられる適切な代謝速度にあることを確認し、それを維持するために多くの試験を受けている (Advanced Tissue Sciences, Inc. La Jolla, CA)。

【0005】

創傷被覆に用いられる細胞マトリックス製品に関しては、連続した細胞の均一な層が、機能を備えた製品には必要であるとの一貫した見解がある (F.A. Augerら、1988, Med. Biol. Eng. Compu., 36: 801-812; S.T. Boyce, 1996, Tissue Eng., 2: 255-266; O. Damourら、1997, 「Cultured autologous epidermis for massive burn wounds: 15years of practice」、Rouabhia, M. (編): 「Skin substitute production by tissue engineering: clinical and fundamental applications」、Landes, Austin, pp. 23-45)。その一例として、連続層の重要性は、二重層の足場上で注意深く20日以上にわたり培養されて真皮および表皮の連続細胞層を形成するApligraf (登録商標) (Organogenesis, Inc., Canton, MA) という製品の販売促進活動でも強調されている。

【0006】

インビボでの組織および臓器の修復用に細胞マトリックスを製造する現在の方法は、極めてコストを要する上に時間もかかる。このような細胞マトリックスにコストがかかる理由は、これらの製品を製造するために特化された工場および/または手順が必要なためである。また、細胞マトリックス製品は生きた生物細胞/組織を含むため、輸送、それに伴う遅れなどによって製品が大きな損害を受ける。さらに、製品の性質を考慮すれば、生細胞および新たなマトリックスを基盤とする新たな製品が規制当局の認可を得ることは困難が伴う。

【0007】

したがって、コストが安価で、用途が広く、調製および/または製造が容易な細胞マトリックス組成物に対しては差し迫った需要が存在する。さらに、細胞をマトリックス中に組み入れた後の、インビトロでの長期間のインキュベーションまたは培養が必要とされない細胞マトリックス組成物に対しても需要がある。当業者は、今後解決すべき大きな問題が、最初の調製後の細胞マトリックス製品の製造遅延であることを認識している。特に、再構成皮膚を作製するために十分な量の自己ケラチノサイトおよび線維芽細胞を生じさせるには3週間の遅延を要するという問題があることが指摘されている (F. Berthod および O. Damour, 1997, British Journal of Dermatology, 136: 809-816)。本発明は、当技術分野に現在存在する上記の問題点および遅延時間に対する解決を提供する。

【発明の開示】

【0008】

発明の概要

本発明の1つの面は、組織および臓器の修復に用いるための幹細胞マトリックス、特にバイオマトリックスを調製する方法を提供する。本発明によれば、他の細胞種 (例えば、分化細胞または非幹細胞) ではなく幹細胞を用いる。さらに、使用の少し前または直前に幹細胞およびマトリックス材料を混合または配合し、それによって細胞とマトリックス材料との長期インキュベーションまたは培養の必要性を解消する。このため、本方法は迅速であり、幹細胞を基盤とするバイオマトリックス材料を必要時に調製することを可能にする。

【0009】

本発明のもう1つの面において、幹細胞バイオマトリックス材料は、この種の治療を必要とする組織および臓器を矯正、強化、または他の様式で修復するための手術に用いられるような、スリング (sling)、パッチ (patch)、ラップ (wrap) の形態であってよい。当業者には理解されるであろうが、スリングには、欠陥のある括約筋の下方に支持目的で

10

20

30

40

50

配置される材料が含まれ、これには例えば、腹圧性尿失禁を修復するためのパブバギナル・スリング (pubvaginal sling) がある。パッチには、弱い、菲薄な、または欠陥のある臓器または組織を覆って適用される材料が含まれ、これは固体でも中空性でもよく、これには例えば、心臓または膀胱の組織工学パッチがある。ラップとは外周性パッチ、例えば、血管または胃食道括約筋の周囲に配置される材料を指す。

【0010】

本発明のもう1つの面は、組織および/または臓器の治療または修復のための医療処置の直前に、「医療提供場所 (point of-service)」で、すなわちベッドサイドまたは手術室で作製しうる、インビボでの組織および/もしくは臓器の修復、または手術創もしくは創傷の治療のための幹細胞マトリックス組成物を提供する。本発明により、細胞マトリックス材料の市販品としての調製に起因する遅延時間の延長 (さらにはコストの増加) が軽減される。

10

【0011】

本発明のさらにもう1つの面は、骨格筋および皮膚などの臓器、ならびに横隔膜、膀胱、腸管、および心臓などの平滑筋の外表面に直接適用するための、幹細胞と生物学的、生理学的に適合性のある接着剤 (すなわち、生体接着剤 (bioadhesive)) および/または生体マトリックス (すなわち、バイオマトリックス) との配合物またはその組成物を提供する。加えて、これらの配合物またはその組成物を、肝臓、脾臓、胸腺、脊髄、および骨などの臓器に適用することもできる。本発明によれば、幹細胞または前駆細胞は自家性 (ヒトを含むレシピエントから入手したもの) または同種性 (ヒトを含む、レシピエント以外の宿主源から入手したもの) でありうる。

20

【0012】

本発明のさらにもう1つの面は、幹細胞および生理学的に許容される生体基質、好ましくは小腸粘膜下組織 (SIS) の調製物を含む、組織および臓器の修復のための、移植可能で神経支配が可能な、生理学的に許容される三次元的な足場 (scaffolding) を提供する。幹細胞は筋肉から入手することが好ましい。本発明によれば、本明細書に記載の幹細胞バイオマトリックス材料または幹細胞-三次元足場は収縮能があり、特に用いる幹細胞を筋肉から入手した場合にそうである。

【0013】

本発明によって与えられるそのほかの面、特徴、および利点は、本明細書の以下の詳細な説明および実施例によって明らかになると考えられる。

30

【0014】

発明の詳細な説明

本発明は、医学的または生理学的に許容されるマトリックス材料ならびに自家性および/または同種性の幹細胞、好ましくは筋肉由来の幹細胞を含む、組織および臓器の修復に用いるための幹細胞または前駆細胞マトリックスを調製する方法にかかわる。本発明は、幹細胞を、医学的または生理学的に許容されるマトリックス材料中に混合すること、例えば接種または播種すること、ならびに配合した幹細胞マトリックス組成物または製造物をほぼ直ちにインビボでの組織または臓器の治療および修復のために用いることにかかわる。

40

【0015】

本発明によれば、細胞を所定のバイオマトリックス中に接種または導入した後に幹細胞マトリックスの長期的なインビトロインキュベーションを行う必要のない、組織または臓器の治療および修復にインビボで用いるための幹細胞マトリックスを作製する。本発明とは異なり、インビボでの組織または臓器の修復用に作製された従来の細胞マトリックスは、使用前のマトリックス中での細胞のインキュベーションに依存している。非幹細胞または他の種類の細胞の代わりに、本発明の幹細胞マトリックス組成物中にある幹細胞を用いることにより、長期的なインビトロインキュベーションの必要性が解消される。

【0016】

本発明の結果として、使用時に調製してからほぼ直ちに用いる幹細胞マトリックス組

50

成物を作製する方法が今や可能である。これは、インビボでの組織および／または臓器の治療または修復のために提供される幹細胞マトリックス組成物を、組織および／または臓器の治療または修復のための医療処置を行う直前に、「医療提供場所」で、すなわちベッドサイドまたは手術室で作製しうることから重要である。マトリックス中への組み入れおよびインキュベーションのため細胞を外部の製造所に搬送した後、医療用途（例えば、インビボでの組織または臓器の治療または修復処置のため）の細胞マトリックス材料を受け取るまでに数週間待つことに起因する長い遅延時間（さらにはコストの増大）が、本発明に鑑みて解消または回避される。

【0017】

本発明によれば、細胞で不均一もしくは不規則的に覆われた足場上、および／または足場の内部で細胞を短期間混合することにより、マトリックス上および内部での幹細胞の増殖が引き起こされ、それによって細胞分化、幹細胞による因子の放出、および成果の改善がもたらされる。最初のうちは、細胞を基盤とするマトリックス組成物を作製するためには、細胞の均一および連続的な層ならびに長期にわたる注意深いインキュベーションまたは培養が必要と考えられたが、驚いたことに、幹細胞を医療提供場所で用いても幹細胞のマトリックス中での増殖が生じ、平坦な層および生体デバイスの治癒性の改善が得られることが見いだされた。さらに、生体デバイス、例えば生体マトリックスによる医療提供場所での幹細胞の適用によって機能の向上が得られることも見いだされた。例えば、幹細胞は、治療法、治療および全般的な機能を向上させる因子を放出させることが可能であった。

【0018】

本発明によれば、幹細胞を、インビボの組織または臓器部位に適用する少し前に、インビトロで細胞をマトリックス材料と混合することが可能である。または、幹細胞をまさに使用する時にマトリックス材料と混合すること、またはその上に接種することも可能である。時として、細胞起源、細胞濃度、およびマトリックス材料によっては、幹細胞とマトリックス材料との混合または幹細胞のマトリックス材料上への接種は、使用の時点で幹細胞およびマトリックスを配合するのに要する時間よりも長い時間を必要としない。

【0019】

本発明によれば、幹細胞とマトリックス材料とのインビトロインキュベーションは約5秒間から約12時間未満まで、好ましくは約5秒間から約30分間までにわたって行われる。幹細胞と本発明によるマトリックス材料とのインビトロインキュベーションは一般に約3時間未満、好ましくは約1時間未満、より好ましくは約30分間未満である。実際に、本明細書に記載した実験では、幹細胞とバイオマトリックスとの混合またはその上への接種を行った事実上直後に、幹細胞とマトリックス材料との配合物を用いることが示されている。さまざまな用途において、幹細胞マトリックス材料の配合物（すなわち、幹細胞マトリックス材料組成物）を用いて結果を達成するためには、長期にわたる（例えば、約12時間、数日、または数週を上回る）インキュベーションまたは培養期間は必要でない。このような幹細胞マトリックス配合物および組成物は、創傷治癒；外科的処置；開口部、亀裂、切開部などの封止；ならびに身体の組織および臓器の補強、充填、または再建（例えば、手術後、または疾患、障害、異常、事故、もしくは治療法の結果として伴う）に用いることができる。

【0020】

本発明の組成物は、心臓、横隔膜、消化管、および泌尿生殖路の筋収縮障害などの疾患の治療に用いることができる。本発明を、従来の手法に起因する瘢痕を軽減するために、皮膚（真皮および表皮）および軟組織、筋肉、骨、靱帯などの、さまざまな治療、修復、補強、充填、および治癒に用いることもできる。

【0021】

種々の生物性または合成性の固体マトリックス材料（すなわち、固体支持体マトリックス、生物性接着剤または被覆剤、および生物的／医学的足場）が、本発明における使用に適している。マトリックス材料は、インビボ用途における使用が許容される医学的なもの

10

20

30

40

50

であることが好ましい。このような医学的に許容される、および／または生物学的もしくは生理学的に許容される、または適合性のある材料の非制限的な例には、吸収性および／または非吸収性である固体マトリックス材料、例えば、一層または複数層の、ブタ（および他のSIS源）由来などの小腸粘膜下組織（SIS）；架橋性または非架橋性のアルギン酸塩、親水コロイド、発泡体、コラーゲンゲル、コラーゲンスポンジ、ポリグリコール酸（PGA）メッシュ、ポリグラクチン（PGL）メッシュ、フリース（fleece）、発泡体被覆剤（foam dressing）、生体接着剤（例えば、フィブリン糊およびフィブリンゲル）、および非生存性脱表皮皮膚同等物（dead de-epidermized skin equivalent）が非制限的に含まれる。生体接着剤の一例として、フィブリン糊調製物が、バクスターインターナショナル社（Baxter International, Inc.）に対する国際公開公報第93/05067号、フィブラテック社（Fibratek, Inc.）に対する国際公開公報第92/13495号、クリオライフ社（Cryolife, Inc.）に対する国際公開公報第91/09641号、ならびにG. Marxに対する米国特許第5,607,694号および第5,631,019号に記載されている。

【0022】

本発明の1つの態様において、幹細胞バイオマトリックス材料は、この種の治療を必要とする組織および臓器を矯正、強化、または他の様式で修復するための手術に用いられるような、スリング、パッチ、ラップの形態であってよい。当業者には理解されるであろうが、スリングには、欠陥のある括約筋の下方に支持目的で配置される材料が含まれ、これには例えば、腹圧性尿失禁を修復するためのパブバギナル・スリングがある。パッチには、弱い、菲薄な、または欠陥のある臓器または組織を覆って適用される材料が含まれ、これは固体でも中空性でもよく、これには例えば、心臓または膀胱の組織工学パッチがある。ラップとは外周性パッチ、例えば、血管または胃食道括約筋の周囲に配置される材料のことを指す。

【0023】

幹細胞または前駆細胞は自家性（ヒトを含むレシピエントから入手したもの）または同種性（ヒトを含む、レシピエント以外の宿主源から入手したもの）でありうる。同種性の幹細胞または前駆細胞起源の場合には、ドナーとレシピエントとの間に考えられるかぎり最も高い免疫学的適合性があることが望ましい。自家性の供給源が得られないか保証されない場合には、ドナーおよびレシピエントのクラスIおよびクラスII組織適合性抗原を分析して、最も高い適合性が得られることを判定することができる。これによって免疫拒絶反応が軽減または解消され、免疫抑制療法または免疫調節療法の必要性が少なくなる。必要であれば、免疫抑制療法または免疫調節療法を、患者に対するマトリックスの適用または導入の前、最中および／または後に開始することができる。例えば、シクロスポリンAまたは他の免疫抑制薬をレシピエントに投与することができる。免疫寛容を、当技術分野に既知の代替的な方法によって移植の前に導入することもできる（D.J. Wattら、1984, Clin. Exp. Immunol. 55: 419; D. Faustmanら、1991, Science 252: 1701）。

【0024】

本発明によれば、幹細胞または前駆細胞の調製、単離、または入手は、さまざまな源から行われる。例えば、幹細胞または前駆細胞が骨髄または筋肉（例えば、骨格筋）に由来してもよい。好ましい源は、本明細書で筋肉幹細胞（MSC）とも称する筋肉由来の幹細胞（MDSC）であり、これは国際公開公報第99/56785号（University of Pittsburgh）、ならびにM. Chancellorらに対する1999年4月30日に提出された米国特許出願第09/302,896および2000年4月14日に提出された第09/549,937号に記載された通りに単離されており、これらの内容はその全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【0025】

幹細胞マトリックス組成物中に用いる幹細胞は、異なる種類の幹細胞の組み合わせ、例えば、自家性または同種性ドナー源から入手した幹細胞の不均一な集団であってよく、またはそれらが均一な幹細胞集団（自家性または同種性の源からのもの）であってよい。さまざまな由来の幹細胞の組み合わせ（例えば、骨髄細胞と筋肉幹細胞）も想定している。幹細胞は、筋肉、脂肪、肝臓、心臓、肺、および神経系などのヒト組織を非制限的な例

として含む動物組織から入手することができる。さらに、組織は成体、胎児、または胚の組織であってよい。

【0026】

幹細胞生体接着剤もしくはバイオマトリックス配合物、またはそれらの組成物は、骨格筋および皮膚などの臓器、ならびに横隔膜、膀胱、腸管、および心臓などの平滑筋の外表面に直接適用することができる。加えて、これらの配合物またはその組成物を、肝臓、脾臓、胸腺、脊髄、および骨などの臓器に適用することもできる。

【0027】

さらに、幹細胞マトリックスがインピボで適用または導入される部位で発現され、その発現産物が産生される1つまたは複数の異種遺伝子を含む発現ベクター（例えばプラスミドまたはウイルス）を含むように、幹細胞を遺伝的に改変することもできる。したがって、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ホルモン、代謝産物、薬物、酵素などを含む1つまたは複数の活性生体分子をコードする1つまたは複数の核酸配列を含み、これらの生体分子を発現するように、細胞を遺伝的に操作することもできる。幹細胞マトリックス組成物または製造物は、さまざまな治療、例えば癌、組織の再生および再建などの種々の疾患および病態の治療のための、ならびに遺伝子産物、例えばホルモンまたは因子などの治療薬を組織または臓器部位に送達するための、長期的局所送達システムとして役立てることができる。

【0028】

幹細胞は、当業者に既知の分子的な技法および方法、例えばトランスフェクション、感染、形質導入、または直接DNA注射などによって遺伝的に操作することができる。本明細書で用いる形質導入は一般に、ウイルス性または非ウイルス性ベクターの細胞内への導入を介して外来性または異種遺伝子を含むように遺伝的に操作された細胞のことを指す。ウイルスベクターが好ましい。トランスフェクションはより一般的には、プラスミドまたは非ウイルス性ベクター中に収容された外来性遺伝子を含むように遺伝的に操作された細胞のことを指す。幹細胞に対して種々のベクターによるトランスフェクションまたは形質導入を行うことができ、このため、これらを、遺伝子産物の組織または臓器部位での発現および産生を可能にする遺伝子送達媒体として役立てることができる。

【0029】

ウイルスベクターが好ましいが、当業者は、所望のタンパク質またはポリペプチド、サイトカインなどをコードする核酸配列を含むようにさせる細胞の遺伝子操作を、例えば米国特許第5,538,722号に記載されたような当技術分野に既知の方法によって行えることも理解していると考えられ、これには、融合、トランスフェクション、DEAE-デキストラン（Gopal、1985）またはリン酸カルシウム（GrahamおよびVan Der Eb、1973, *Virology*, 52: 456-467; ChenおよびOkayama、1987, *Mol. Cell. Biol.* 7: 2745-2752; Rippeら、1990, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 689-695）による沈降を介したリポフェクション；高速微粒子発射を用いた遺伝子射入（Yangら、1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9568-9572）；微量注入（HarlandおよびWeintraub、1985, *J. Cell Biol.*, 101: 1094-1099）；電気穿孔（Tur-Kaspaら、1986, *Mol. Cell. Biol.*, 6: 716-718; Potterら、1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 7161-7165）；DNA（ベクター）を挿入したリポソーム（Fraleyら、1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3348-3352）；リポフェクタミン-DNA複合体；細胞超音波処理（Fechheimerら、1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8463-8467）；受容体を介したトランスフェクション（WuおよびWu、1987, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432; WuおよびWu、1988, *Biochemistry*, 27: 887-892）；などが含まれる。

【0030】

好ましいウイルスベクターは一般に、非必須遺伝子が関心対象の核酸配列によって置換された、細胞変性作用のない（non-cytopathic）真核生物ウイルスに由来する。細胞変性作用のないウイルスにはレトロウイルスが含まれ、これはウイルスゲノムRNAのDNAへの逆転写の後にプロウイルスの宿主細胞DNAへの組込みが起ることによって複製する。レトロウイルスはヒトの遺伝子治療の試験用に承認されている。一般にレトロウイルスは複製能

10

20

30

40

50

欠損性である、すなわち所望のタンパク質の合成を導くことはできるが感染性粒子を製造することはできない。レトロウイルスプラスミドベクターの由来となりうるレトロウイルスには、モロニーマウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルスのほか、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、ニワトリ白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、アデノウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳癌ウイルスなどのレトロウイルスが非制限的に含まれる。一般に、ウイルスベクターを作製するために用いられるレトロウイルスは、疾患の伝播を防ぐために何らかの点で衰弱または変異していることが好ましい。

【0031】

1) 外因性遺伝物質をプラスミド中に組み入れる段階、2) パッケージング細胞系にプラスミドをトランスフェクトし、パッケージング細胞系に組換えレトロウイルスを発現させる段階、3) 組織培養液からウイルス粒子を収集する段階、および4) 標的細胞をウイルス粒子に感染させる段階を含む、複製能欠損性のレトロウイルスを作製するための標準的なプロトコールが、M. Kriegler, 1990, 「Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual」、W.H. Freeman Co., NY; およびE.J. Murry編、1991, 「Methods in Molecular Biology」第7巻、Humana Press, Inc., Clifton, N.J.に記載されている。

【0032】

発現のために必要なすべての因子を含む発現ベクターは市販されており、当業者に知られている。例えば、Sambrookら、1989, 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; F.M. Ausubelら(編)、1995, 「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley & Sons, Inc., New York, NY; D.N. Glover(編)、1985, 「DNA Cloning: A Practical Approach」、第I巻およびII巻; M. L. Gait(編)、1984, 「Oligonucleotide Synthesis」; HamesおよびHiggins(編)、1985, 「Nucleic Acid Hybridization」; HamesおよびHiggins(編)、1984, 「Transcription and Translation」; R.I. Freshney(編)、1986, 「Animal Cell Culture; Immobilized Cells and Enzymes」、1986, (IRL Press); Perbal, 1984, 「A Practical Guide to Molecular Cloning; The Series, Methods in Enzymology」、Academic Press, Inc.; J. H. MillerおよびM. P. Calos(編)、1987, 「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」、Cold Spring Harbor Laboratory; WuおよびGrossman(編)、Methods in Enzymology, 第154巻; Wu(編)、「Methods in Enzymology」、第155巻を参照されたい。

【0033】

本発明の幹細胞のトランスフェクションまたは感染のための媒体またはベクター構築物の説明に役立つ例には、複製能欠損ウイルスベクター、DNAウイルスまたはRNAウイルス(レトロウイルス)ベクター、例えばアデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、およびアデノ随伴ウイルスベクターなどが含まれる。好ましいベクターはアデノウイルスベクターである。

【0034】

この種のベクターは、生体活性分子を発現するための1つまたは複数のプロモーターを含むと考えられる。用いる適したプロモーターには、アデノウイルス主要後期プロモーターなどのアデノウイルスプロモーター; またはサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターなどの異種プロモーター; 呼吸合胞体ウイルス(RSV)プロモーター; MMTプロモーター、メタロチオネインプロモーターなどの誘導性プロモーター; 熱ショックプロモーター; アルブミンプロモーター; ApoA1プロモーター; ヒトグロビンプロモーター; 単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーターなどのウイルスチミジンキナーゼプロモーター; レトロウイルスLTR(本明細書上記の改変レトロウイルスLTRを含む); -アクチンプロモーター; およびヒト成長ホルモンプロモーターが非制限的に含まれる。プロモーターが、ポリペプチドをコードする核酸配列を制御する本来のプロモーターであってもよい。

【0035】

ベクターは一般に、原核生物DNAを実質的に含まず、さまざまな異なる機能的核酸配列

10

20

30

40

50

を含みうる。このような機能的配列の例には、食道または小腸の細胞内で作用するプロモーター（例えば、強力プロモーター、誘導性プロモーターなど）およびエンハンサーを含む、転写および翻訳の開始および終結を調節する配列を含む、核酸、例えばDNAまたはRNAの配列が含まれる。機能的配列の一部として同じく含まれるものに、関心対象のタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（核酸配列）がある。位置指定組込みのために隣接配列を含めてもよい。状況によっては、例えば転写のレベルを上昇または低下させるために誘導性または非誘導性転写を付与する目的で、5'-隣接配列によって相同組換えを行わせ、それによって転写開始領域の性質を変化させることが可能と思われる。

【0036】

一般に、生体マトリックス中の幹細胞によって発現させようとする核酸配列は、送達媒体として利用する細胞に対して異種性であり、また所望のタンパク質またはポリペプチド産物をコードする構造遺伝子、または遺伝子の機能的断片、区域、もしくは部分の核酸配列である。コードされるまたは発現される産物は細胞内のもの、すなわち細胞の細胞質、核、もしくはオルガネラの内部に保たれるものでもよく、または細胞から分泌されてもよい。分泌のためには、構造遺伝子中に存在する天然のシグナル配列を維持してもよく、または構造遺伝子中に自然には存在しないシグナル配列を用いてもよい。ポリペプチドまたはペプチドが、より大型のタンパク質の断片である場合には、分泌およびプロセッシング部位でのプロセッシングにおいて所望のタンパク質が天然の配列を有するように、シグナル配列を付与するとよい。本発明に従って用いられる関心対象の遺伝子の例には、細胞増殖因子、抑制性分子、細胞分化因子、細胞シグナル伝達因子、およびプログラム細胞死因子をコードする遺伝子が含まれる。

【0037】

ベクター構築物を含む細胞の選択のためにマーカーが存在することが好ましい。マーカーは誘導性でも非誘導性遺伝子でもよく、それぞれ一般には誘導下または非誘導下での陽性選択が可能になると考えられる。よく用いられるマーカー遺伝子の例には、ネオマイシン、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、グルタミン合成酵素などが含まれる。用いられるベクターは一般に、当業者によってルーチン的に用いられる、複製起点および宿主細胞における複製のために必要な他の遺伝子も含む。例えば、複製起点および特定のウイルスによってコードされる複製にかかわる任意のタンパク質を含む複製システムを、構築物の一部として含めることができる。

【0038】

複製システムは、複製のために必要な産物をコードするが幹細胞の根本的な形質転換を行わないものを選択することが好ましい。このような複製システムは、例えばG. Acsadiら、1994, Hum. Mol. Genet. 3: 579-584に記載された通りに構築された複製能欠損アデノウイルスに、またはエプスタイン-バーウイルスに代表される。複製能欠損ベクター、特に複製能が欠損したレトロウイルスベクターの例は、Priceら、1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 156; およびSanesら、1986, EMBO J., 5: 3133に記載されている。

【0039】

最終的な遺伝子構築物が1つまたは複数の関心対象の遺伝子、例えば、生体活性代謝分子をコードする遺伝子またはp53などの抑制分子をコードする遺伝子を含みうることは理解され则认为られる。さらに、cDNA、合成的に作製されたDNAまたは染色体DNAを、当業者に既知であり実施されている方法およびプロトコールを利用して用いてもよい。ベクターは、当技術分野に既知の任意の手段によって細胞内に形質転換的に導入することができる。このような方法には、電気穿孔、リポソームおよびリン酸カルシウム沈殿が非制限的に含まれる。これに代わるものとして、レトロウイルスまたはプラスミドベクターをリポソーム中に封入、または脂質と結合させ、その後に細胞に導入することも可能である。細胞にはエクスピボの手法でプラスミドまたはウイルスベクターを含むように操作することが好ましい。

【0040】

幹細胞は、当業者に既知の様々な方法により、生体適合性のあるマトリックスと混合すること、またはその中に導入することができる。例えば、マトリックスが懸濁液中の細胞と容易に混合しない固体または半固体の物質を含む場合には接種を用いることができる。別の例として、幹細胞の懸濁液を適した生物性または合成性の接着剤（生体接着剤）マトリックスと混合し、その配合物を、インサイチューでのゲル化または凝固などによって幹細胞マトリックスを形成させる組織または臓器部位上に展着、噴霧、塗布または別のやり方で適用することもできる。したがって、幹細胞バイオマトリックス配合物は、組織または臓器表面などの表面の医学的な被覆に適した小型のはけ、スパーテル、ナイフ、または他の道具といった展着または被覆の手段を用いた展着、塗布または被覆によって適用することができる。さらに、創傷または生体表面上で幹細胞バイオマトリックス混合物または懸濁液の噴霧または発泡化を行うために圧縮空気を用いてもよい。

10

【0041】

本発明のさらにもう1つの面においては、別の種類のバイオマトリックス材料、例えば、限定的ではないもののフィブリン糊またはゲルなどの生物性接着剤（生体接着剤）を用いて、幹細胞をバイオマトリックスに付着させる、導入する、または適用する。ある種の生体接着剤およびフィブリン糊は、光活性化、または温度もしくはカルシウムによる活性化が可能であり、これらも使用に適している。さらに、約 2.5×10^3 ~ 約 1×10^6 個、好ましくは約 5×10^3 ~ 約 1×10^6 個の幹細胞を、医学的または生理学的に許容されるマトリックス材料と混合する、またはその表面もしくは中に接種、播種または他の様式で導入するために用いることができる。マトリックス材料 1cm^2 当たり約 1×10^5 個の幹細胞を付着させることが好ましい。

20

【0042】

本発明の1つの態様においては、生物性接着剤による幹細胞の独特な処理、および幹細胞組織工学の独特な応用を提供する。現在の組織工学アプローチ、特に心臓および血管の組織工学の大きな限界は、細胞の体血管への注射または心臓内の特定の部分への直接的な針接種が必要な点である。前記の手法にはそれぞれ大きな欠点がある。本発明によれば、本明細書の実施例の項で例示および説明するように、幹細胞の標的臓器外表面への付着を可能にする方法を提供する。したがって、本発明は、心臓および血管の組織工学の手法に現在存在する限界を克服する。

【0043】

もう1つの態様においては、幹細胞および生体マトリックス組成物を、骨、軟骨、靱帯、脊髄、脳、心臓、肺、腎臓、消化器、および泌尿生殖器を非制限的に含む数多くの部位に対する、侵襲性の低い光ファイバースコープ（例えば、腹腔鏡）によって適用することができる。幹細胞組織工学のためには、筋肉幹細胞（MSC）および生体接着剤またはバイオマトリックス材料を、例えば、治癒を促進して狭窄を予防する目的で、腎臓または尿管の外科的吻合部に対する噴霧または被覆を行うために腹腔鏡によって適用する。もう1つの例としては、損傷または衰弱した骨または関節円板（disk）の外側を、治癒および強度の向上および/もしくは改善ならびに/または変性の予防を目的として被覆するための整形外科用内視鏡により、MSCと生体接着剤またはバイオマトリックス材料との配合物を適用する。治療、修復、または治癒の過程にある部位で骨因子または増殖因子をコードする遺伝子の発現産物を送達しうる特別に操作された幹細胞も、同じくこの態様に含まれる。

30

40

【0044】

組織および臓器の治療および修復に用いるための幹細胞マトリックスを調製するための迅速な方法が、本発明により具体化される。1つの面において、本発明の方法は、レシピエントの組織または臓器における使用の前に、幹細胞調製物を生理学的に許容されるマトリックス材料と混合して幹細胞マトリックスを形成させ、幹細胞マトリックスをインビトロで約5秒間から約12時間未満までにわたってインキュベートすることを含む。本方法には、例えばアルギン酸塩、フィブリン糊、フィブリンゲル、小腸粘膜下組織（SIS）などの、任意の適した生理学的に許容されるマトリックス材料を用いることができる。

【0045】

50

もう1つの面において、本発明の方法は、幹細胞調製物を第1の生理学的に許容されるマトリックス材料と混合して第1の幹細胞マトリックス配合物を形成させること；第1の幹細胞マトリックス配合物を第2の生理学的に許容されるマトリックス材料上に導入して第2の幹細胞マトリックス材料を形成させること、この際には、第1の幹細胞マトリックス配合物および第2の生理学的に許容されるマトリックス材料をインビトロで約5秒から12時間未満までの範囲にわたってインキュベートする；および、第2の幹細胞マトリックス材料をレシピエントの組織または臓器部位の表面または内部に適用すること、を含む。本方法において、第1の医学的に許容されるマトリックス材料は、フィブリン糊またはゲルなどの生体接着剤であることが好ましい。続いて、幹細胞-フィブリン糊バイオマトリックスを、第2の医学的に許容されるバイオマトリックス材料、例えばSISなどに対して適用する（実施例3）。幹細胞の調製物または懸濁液を生体接着剤材料と同時に、シリンジなどにより、第2の医学的に許容されるバイオマトリックス材料に対して適用した上で、この材料への展着または被覆を行い、その後に組織または臓器部位の治療に用いることができる。または、幹細胞および生体接着剤材料を合わせて混合した後に幹細胞生体接着剤混合物を第2のマトリックス材料に対して適用することもできる。

10

【0046】

本発明は、通常の規制障壁により拒絶される可能性が低い方法も提供する。医用デバイスおよび細胞療法を含む、費用対効果の高い併用療法に対しては需要がある。医用デバイスおよび幹細胞を、医療提供場所（例えば、ベッドサイドまたは使用場所）で配合するまで別個に保つことにより、この需要に対する解答が得られる。本発明の大きな利点は、幹細胞生体組織工学を、工場のような商業的製造現場から、幹細胞マトリックス製造物を「現場」で調製して用いる「医療提供場所」に移すことにある。

20

【0047】

本発明による幹細胞生体マトリックス製造物は、使用の直前または使用時に迅速に調製される。実施者による適用または導入の前に、細胞およびマトリックス材料を長期間、例えば数日または数週間にわたってインキュベートまたは培養する必要はない。さらに、幹細胞マトリックス材料は配合後に新たな構造を形成させることができるが、これは予想外のことであった。バイオマトリックス配合物中の幹細胞は生物学的足場の生体力学特性を変化させて、組織、筋肉、および臓器の新たな二次元的または三次元的な構造を作り出すことができる。例えば、筋肉幹細胞は、血管インターベンションの目的で、SIS組織特性が改善されるように医療提供場所でブタ小腸粘膜下組織（SIS）に播種されることが示されている（実施例2）。生物性または合成性のマトリックスに播種する幹細胞は、さまざまな外科的処置および治療手法への本発明の使用に利点をもたらす。

30

【0048】

本発明によれば、筋肉幹細胞を、筋肉のものと類似した様式で振る舞うことが示されている足場上に添加し、神経筋受容体による神経支配を得ることが可能である（実施例8~10）。このため、本発明により、尿道、胃食道約筋、肛門括約筋を含む括約筋などの種々の組織および臓器に対する、さらには膀胱、腸管および胃、血管および心臓、横隔膜、腱、筋肉および靱帯を含むラップおよびパッチに対する三次元的な筋肉修復が可能となり、それによって本発明の利点は、例えば組織修復を目的とするMSC/SISパッチの組織工学だけでなく、筋肉幹細胞を利用する三次元的な修復性足場の工学も含むように拡張される。

40

【0049】

実施例

以下に述べる実施例は本発明を例示するために提供するものであり、本発明を限定するために含めたものではない。

【0050】

実施例1

筋肉幹細胞 / アルジネート被覆材組成物

筋肉幹細胞（MSC）をラット後肢筋肉からプレプレート法（国際公開公報第99 / 56785号を参照のこと）を用いて採取した。後期プレート（すなわち、PP5後、好ましくはPP6）細

50

胞集団を入手した後に、LacZを含むレトロウイルスベクターによる形質導入を行った100,000個の細胞を、200 μ lのハンクス緩衝塩類溶液 (HBSS; Gibco BRL, Grand Island, NY) 中に使用のために懸濁化した。アルジネート (Alginate) (Johnson & Johnson Medical, Arlington, TX) の1cm² 片を切り出してMSC懸濁液中に浸漬してアルジネート + MSC組成物を調製し、これを直ちにラット背側上部の1cm² の全層創傷欠損部の上に置いた。1週間後に、完全に治癒した創傷を採取して染色した。その結果、アルジネート + MSCによる治癒はアルジネートのみによる場合よりも美容の点で優れていることが示された。1週後の時点で、創傷は正常皮膚に完全に覆われていた。組織学的な検査によると、アルジネート + MSCは創傷閉鎖がより良好であり、深部創傷内部に線維化領域がみられた。さらに、真皮および上皮層には「新たな」真皮細胞および上皮細胞の形成がみられるように思われた。この種の所見は、本発明による創傷の修復に用いた場合に、MSCが秩序立った様式で、上皮細胞および真皮細胞の分化および発生を実際に行わせることを示している。

【 0 0 5 1 】

実施例2

筋肉幹細胞 / SIS組成物

単層SIS (Cook Biologic, Inc., Indianapolis, IN) をまずハンクス緩衝塩類溶液中にて37 °Cで1時間インキュベートした。100,000個の後期プレプレート (例えば、PP6) (M. Chancellorらに対する、国際公開公報第99 / 56785号 ; ならびに1999年4月30日に提出された米国特許出願第09 / 302,896号および2000年4月14日に提出された同第09 / 549,937号を参照のこと) ラットMSC細胞 (Lac Zを含むレトロウイルスベクターによる形質導入を行ったもの) を、直径1cmの円形SISの上に載せて、MSC-SISマトリックス組成物を形成させた。このMSC-SISマトリックスを24ウェル培養プレートの中に置いた。続いて、37 °Cでの細胞の生存性を評価するために、10%ウマ血清および10%ウシ胎仔血清を含むように添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY) の培地を毎日交換しながら、SISおよびMSCのさまざまな調製物をそれぞれ3日、1週間、および2週間インキュベートした。適当な間隔をおいて、SIS + MSCマトリックス配合物を回収し、切片化して染色した。すべての時点で、細胞の生存性は明らかであった。MSCはすべての時点で増殖および筋管形成 (ミオシン重鎖染色により明らかとなる) を続けていた。これらの実験により、MSCがSIS上で増殖すること、およびSISがこれらの細胞に対して有毒でないことが確認された。後期プレプレート細胞は秩序立った集密様式で増殖した。

【 0 0 5 2 】

実施例3

筋肉幹細胞 / フィブリン糊組成物

プレプレート法を用いて (M. Chancellorらに対する、国際公開公報第99 / 56785号 ; ならびに1999年4月30日に提出された米国特許出願第09 / 302,896号および2000年4月14日に提出された同第09 / 549,937号を参照のこと)、後期プレプレート (PP6) からラットMSCを入手した。フィブリン糊はバクスターヘルスケア社 (Baxter Healthcare Corporation) (Glendale, CA) から入手した。フィブリン糊は、FDAに承認された密封材であり、ヒトトロニン、塩化カルシウム、ウシ線維素溶解阻害剤溶液およびヒト密封性タンパク質濃縮物から構成される。成分を使用前に配合し、針付きシリンジを用いて注入する。100,000個の細胞および0.5ccのフィブリン糊を同時に用いて、幹細胞およびフィブリン糊を障壁性挿入物を用いずにSIS上に接種した。1日後にこの系を回収し、切片化した。フィブリン糊およびMSCをSIS上に同時に速やかに配置することにより、MSCがSISとより迅速に接着しただけでなく、細胞の生存性も維持された。フィブリン糊はSISの生存性には影響を及ぼさなかった。この実験により、マトリックスおよび足場に対するより迅速な接着を可能にするためにフィブリン糊および幹細胞を用いることの実現可能性が示された。

【 0 0 5 3 】

実施例4

筋肉幹細胞 / 動脈組成物

プレプレート法を用いて (M. Chancellorらに対する、国際公開公報第99 / 56785号 ; なら

らびに1999年4月30日に提出された米国特許出願第09 / 302,896号および2000年4月14日に提出された第09 / 549,937号を参照のこと)、ラットMSCを入手した。単層SISに対してMSCを接種した。インビトロで1日インキュベートした後に、MSC / SISマトリックス組成物を巻いて血管様管腔とした。長期間のインキュベーション(すなわち、2週間)後も細胞の生存性は損なわれておらず、血管様管腔の全体にわたって播種がみられた。

【0054】

実施例5

種々の浸透時間を用いた筋肉幹細胞 / アルジネート被覆材

MSCを、組織または臓器部位での適用および使用の1分、5分、1時間、6時間または12時間前にアルジネートの小片(1~2cm²)に浸透させる効果を評価するための実験を行った。MSCをアルジネートに浸透させる時間が長いほどアルジネートが軟化し、アルジネートの溶解が生じることが明らかになった。アルジネートの軟化はそれが含水して間もなく始まり、最終的には浸透期間が6時間以内で溶解の証拠が認められた。これらの試験の結果から、MSCを医療提供場所で即時的または短期的に浸透させるだけで、生理的な結果が首尾良く得られることが示された。

【0055】

本実施例に記載した実験は、アルジネートマトリックス材料1cm²当たり約10,000~500,000個という濃度の幹細胞で、生理的な結果を実現するのに十分であることを示している。幹細胞バイオマトリックス法を用いたところ、マトリックス材料全体にわたる細胞濃度に大きなばらつきがあって細胞の分布が不均一であっても、良好な生理的な結果および改善を得ることが可能であった。

【0056】

実施例6

アルジネートに浸透させた筋肉細胞と線維芽細胞との比較

筋肉幹細胞(MSC)をアルジネートと組み合わせたものの創傷治癒における有効性を、線維芽細胞をアルジネートと組み合わせたものの有効性と比較するための実験を行った。皮膚全層に及ぶ1cm²の創傷を、麻酔ラットの胴体上部の背側に作製した。実験はすべて、アルジネートに筋肉幹細胞または線維芽細胞を即時的に浸透させることによって行った。100,000個の後期プレートMSC細胞(すなわち、PP6。M. Chancellorらに対する、国際公開公報第99 / 56785号; ならびに1999年4月30日に提出された米国特許出願第09 / 302,896号および2000年4月14日に提出された同第09 / 549,937号を参照のこと)および100,000個の初期プレート(すなわち、PP1)細胞を、アルジネートの2つの1cm²片に対して用いた。2つの皮膚全層創傷を作製した後に、2つの1cm²アルジネート片にPP1細胞またはPP6 MSC細胞を5秒間浸透させた。続いて、この系を創傷欠損部の上に直接配置して縫合した。これらの実験の結果により、MSC-アルジネート配合物による創傷治癒の方が美容の点で優れることが示された。これに対して、線維芽細胞-アルジネート組成物では治癒の外観は変化しなかったが、対照(アルジネートのみ)よりも治癒は迅速であった。このため、本発明によれば、創傷の治癒の改善をもたらすために、細胞とアルジネートマトリックス材料との長期間のインキュベーションは必要でない。

【0057】

実施例7

インビトロ筋肉幹細胞 / SIS組成物

後期プレプレートMSC(例えば、PP6。M. Chancellorらに対する、国際公開公報第99 / 56785号; ならびに1999年4月30日に提出された米国特許出願第09 / 302,896号および2000年4月14日に提出された同第09 / 549,937号を参照のこと)のSIS生体足場(コラーゲンが1層および4層のSISの両方)に対する接着性および存続性を評価するための実験を行った。その結果から、後期プレプレートMSC(すなわち、PP6)の接着性が初期プレプレート細胞(すなわち、PP1~4)よりも優れることが示された。

【0058】

100,000個/cm²の幹細胞濃度を用いたところ、初期および後期プレート細胞に関して

、細胞の生存性は3日後、1週後、および2週後に確認された。初期プレート細胞 + SISマトリックスは、細胞集団内の線維芽細胞が多いためにうまく筋管を形成しなかった。これがSIS上にもたらした集密性は低かった。後期プレート幹細胞 (MSC) + SISは均一にうまく増殖し、SIS上に筋管を形成した。初期プレート細胞と比較して後期プレートMSC細胞によって実現された望ましい結果は、細胞増殖、筋管への分化、および集密性であった。初期プレート細胞では細胞数を1,000,000 / cm² に増やしても、初期プレート細胞のSIS上での結果は変わらなかった；しかし、後期プレートMSC細胞では、この細胞数の増加により、多層SIS上でのMSCの増殖が可能になった。

【 0 0 5 9 】

実施例8

筋肉幹細胞はSISの生体力学的特性を変化および改善させる

本実施例で行った実験から、上記の実施例の記載のようにして単離した筋肉幹細胞 (MSC) は、SISの再構築をもたらし、本来のSISと比べて生体力学特性を変化させることが示された。SIS (およびMSC + SISマトリックス) の生体力学特性を、二軸試験を用いて評価した。二軸試験に関しては、当業者に既知の方法を用い、両側が2つの滑車システムに連結された4個の細いフックを用いて、算出した応力をSISの全四方から加えた。加えた応力により、SIS試料の内部に歪みが生じる。データを分析し、材料の弾性、クリープおよびコンプライアンスなどの生体力学的特性を容易に得ることができる。二軸試験によれば、本来のSIS (すなわち、筋肉幹細胞を含まないSIS) は、縦方向と比べて横方向 / 断面弾性の低下を示した。これに対して、MSCとSISとの配合物を含む組成物では、SISの横方向 / 断面方向の弾性も増加し、縦方向とほぼ等しくなった。本試験は、インビトロの培養皿で10日および20日間培養したSIS + MSCを用いて行った。このため、これらの結果は、MSCによるSISの能動的な再構築の証拠を示している。

【 0 0 6 0 】

より詳細には、30枚のSIS (商標) シート (軟組織凍結乾燥移植片、Cook Biotech Incorporated, West Lafayette, IN) をこの実験のために調製した。SIS材料は試験時まで密封した状態に保った。試験の前にシートを、特別にデザインした滅菌細胞培養ウェルに適合する適切なサイズに切った。MSC ($1 \times 10^5 \sim 10^6$ 個) をSISの上に載せ、培地 (SMEM) を加えた。培地は24時間毎に交換した。この細胞培養挿入物を10日または20日にわたり37でインキュベートした。この後に、試験片を25mm角の小片に切り、二軸機械試験装置の中に置いた (例えば、K.L. BilliarおよびM.S. Sacks, 2000, 「Biaxial mechanical properties of the natural and glutaraldehyde treated aortic valve cusp--Part I: Experimental results」、J. Biomech. Eng., 122(1): 23およびM.S. Sacks, 1999, 「A Method for planar biaxial mechanical testing that includes in-plane shear」、J. Biomech. Eng., 121(5): 551-555を参照のこと)。

【 0 0 6 1 】

二軸機械試験に関しては、試験片の両側を二軸機械試験装置の駆動台に対して、水平共通軸の両側の2つの子型プーリーに巻き付けて縫合することによって取り付け付けた。この軸は縦方向の旋回ロッドと連結しており、このために三次元方向にほぼ摩擦のない回転が可能になる。各縫合線の両側には試験片との連結用の外科用ステープルを取り付け、試験片の各側に合計4つのステープルを配した。各々のプーリーにより、各線の末端に加わる力が等しくなる；旋回ロッドにより、各対に対する力が等しくなる。マウントした試料が中立的に浮遊するように、小さな浮きを各ステープルに取り付けた。2つの直交軸に対する荷重を2つの荷重計によってモニタリングし、試験片の表面に固定された4つの黒マーカの重心を算出することによって面内歪みを決定する。各試験軸方向のグリーン歪み (E) を、以下の式を用いて延伸比 () から算出した：

$$E = (\lambda^2 - 1) \div 2$$

【 0 0 6 2 】

5mm角の領域をなす4つの黒鉛マーカのリアルタイムの移動を、リアルタイムビデオマーカー追跡を用いて観測することにより、組織の変形を測定した。マーカの変位から2D

10

20

30

40

50

面内グリーン有限歪みテンソルを計算したが、ここでELおよびETはそれぞれ縦方向および横方向のグリーン歪みを表す。試験中の両軸の荷重および変形を12～15Hzで連続的に記録した。すべての調製物の試験をハンクス緩衝塩類溶液（HBSS）中で室温にて行った。各試験では20～30秒のサイクルを連続して10回行い、これを合計7回繰り返した。試験は等二軸方向での前準備を最大応力レベルまで行うことによって開始した。その後試験を5回連続して行い、応力の軸比を0.5: 1、0.75: 1、1: 1、1: 0.75および1: 0.5に保った。これらの比を選択したのは、広範囲の応力状態にわたる機械的挙動を判定するためである。最後の等二軸試験は、機械的挙動が試験中に変化しなかったことを確認する目的で行った。各試験片に対する試験時間の合計は約60分であった。

【0063】

機械試験時には3つの異なる局面で光学マーカーの位置を記録した。第1の測定値は、試験片を水浴中に自由浮遊させた非荷重条件で入手した。第2のセットのマーカー位置は、試料を装置に取り付けて0.5gmの荷重を両軸に加えた後に記録した。前準備時の基準状態で最も安定した応力-歪み反応が得られたため、これを最も生理学的に近い状態とみなした。このため、第1の前準備試行の後に記録されたマーカー位置を、以降のすべての歪み計算に用いた。

【0064】

試験片のコンプライアンスの評価には面積歪みを用いた。面積歪みは二軸荷重下での組織コンプライアンスの指標であり、組織に二方向に同じ荷重を加えた場合の組織面積の変化を表す。面積歪みは以下の式を用いて測定した：

$$\text{面積歪み} = (U_1 \times U_2 - 1) \times 100$$

（ここで、 U_1 : X_1 軸方向の延伸； U_2 : X_2 軸方向の延伸）

【0065】

SISをインキュベートしていない対照群（ $n=5$ ）における平均（ \pm S.D.）面積歪みは 20.80 ± 5.9 であった（図1参照）。10日間のインキュベーションを行った場合のMSC / SISにおける平均（ \pm S.D.）面積歪み（ 29.15 ± 5.4 、 $n=5$ ）は、SIS単独での値（ $17.98 \pm n=6$ ）よりも有意に高かった（ $p=0.01$ ）（図1参照）。同じく、20日間のインキュベーションを行った場合も、SIS単独とMSC / SIS調製物との間には有意差が認められた。これらの結果は、MSC / SIS調製物の10日および20日でのコンプライアンス特性が、SIS単独よりも優れていることを示している。

【0066】

さらに、線維方向および非線維方向の延伸変化を比較したところ、MDSC / SISにおける延伸変化は、試験片の線維方向よりも非線維方向の方が顕著であった。このように、二軸試験の結果から、古典的な生体的非線形応力-歪み反応が示された。試験片はほぼ純粋な二軸歪みの状態にあり、剪断は無視しうる程度であった。

【0067】

実施例9

SIS足場中に組み入れた筋肉幹細胞（MSC）の収縮性

25個のMDSC / SIS調製物および25個のSISのみの対照調製物を37℃で1、4、または8週間インキュベートした。続いて試験片を、37℃のクレブス溶液（mmol / L単位で、NaCl、113；KCl、4.7；CaCl₂、1.25；MgSO₄、1.2；NaHCO₃、25；KH₂PO₄、1.2、およびグルコース、11.5）5mlを入れ、95%O₂および5%CO₂の混合ガスを満たした温度制御式の水浴中にマウントした。TBM4歪みゲージ増幅器と組み合わせた歪みゲージ変換素子を用いて、等尺性収縮の頻度および振幅を測定し、データ収集プログラム（Windaq, DATA Instruments Inc. Akron, OH）を用いてコンピュータに記録した。60分間の平衡化期間をおいた後に、電場刺激（10Hz、150ボルト、0.5ms、60秒）を水浴中に加えた。サクシニルコリン（S-Chol）（4、10、および20μM）；カルパコール（10および20μM）；KCl（7%、1M）；EGTAを加えたCa⁺⁺非含有クレブス溶液（200μM）；または蒸留水のそれぞれを30分間隔で逐次的に水浴に加えることにより、薬理的な評価を行った。試験片の収縮の頻度、振幅およびパターンを各群間で比較した。

【0068】

MDSC / SIS試験片はすべて屈曲した形となり、このことから持続性収縮活性が示唆された。これに対して、SIS単独の試験片は屈曲した形状をとらなかった（図2）。SISのみの対照群の1週（ $n=11$ ）、4週（ $n=6$ ）、および8週（ $n=8$ ）培養試験片はいずれも水浴中で全く活性を示さなかった。MDSC / SIS調製物の4週（6つの試験片のうち5つ）および8週培養物（8つの試験片のうち7つ）には自発収縮活性が観察された。しかし、MDSC / SISの1週培養物では自発収縮は観察されなかった（11個の試験片のうちゼロ）。

【0069】

MDSC / SISの8週調製物における自発収縮活性（SCA）の頻度および振幅は、S-Chol（ $10 \mu\text{M}$ ）によってすべての（8件中8つ）試験片で低下し、S-Chol（ $20 \mu\text{M}$ ）の投与後には8つの試験片中5つでブロックされた。MDSC / SISの4週調製物におけるSCAの頻度および振幅は、S-Chol（ $10 \mu\text{M}$ ）によって5つの試験片中2つで低下し、S-Chol（ $20 \mu\text{M}$ ）によって5つの試験片中5つで低下、および5つの試験片中2つでブロックされた。観察された抑制効果は薬剤の洗い流しにより可逆的であった。S-Chol（ $4 \mu\text{M}$ ）は、いずれの調製物の自発的活性の頻度、振幅、およびパターンも変化させなかった。

【0070】

EGTA（ $200 \mu\text{M}$ ）を加えた Ca^{++} 非含有クレブス溶液および蒸留水の双方により、すべてのMDSC / SIS試験片で自発収縮活性がブロックされた。しかし、電場刺激、カルバコール、およびKClはMDSC / SIS試験片における自発収縮活性の頻度、振幅およびパターンをいずれも変化させなかった。したがって、8週での結果は、MDSC / SIS足場が、 Ca^{++} 依存性でニコチン性受容体によって調節される収縮活性を生じることを示唆する（図2）。

【0071】

実施例10

ラットにおけるMDSC / SIS尿道下スリング留置の有効性

雌性ラットにおけるMDSC / SIS尿道下スリング留置の有効性を評価するために、腹圧性尿失禁（SUI）の両側近位坐骨神経離断（PSNT）モデルを用いた。両側陰部神経離断または陰部神経破砕のいずれによっても排尿行動パターンが変化し、尿道横紋筋萎縮という顕著な組織学的変化が生じる。SISスリング留置に関する初期試験では、坐骨神経の比較的近位レベル（陰部神経の分岐前）での離断を用い、これを垂直チルトテーブルおよび漏出時圧（LPP）に関する膀胱内圧クランプ法と組み合わせた。

【0072】

5匹のハロタン麻酔ラットに対して、両側坐骨神経離断術およびSIS / MDSCパッチを用いた尿道周囲スリング留置術を施した。スリングは、長さ14mmで幅3mmの寸法のSIS片を含む。このスリングを経腹的アプローチによって尿道の後方に留置し、4.0プロレンを用いて恥骨の恥骨結合部の6mm側方に両側性に縫合した。リングによって閉塞が起こらないように、スリング留置縫合を行う前に尿道内カテーテル（PE20）を挿入した。本来の膀胱 / 尿道角度が変化しないように注意を払った。偽処置ラット（ $n=2$ ）には、両側近位坐骨神経離断術および同一の尿道周囲解剖を行ったが、SIS / MDSCスリングの留置は行わなかった。その後、ラットを尿閉の徴候について観察し、抗生物質療法を3日毎に行った。

【0073】

手術から2週間後に、ラットに対して、垂直チルトテーブル / 膀胱内圧クランプ法を用いる漏出時圧（LPP）試験を行った（O. Matthewら、2000, 「Creation of a new stress in continence model in the rat by using vertical tilt table and surgical or pharmacological manipulation of internal and external sphincter activity with measurement of leak point pressure（LPP）」、2000 Annual Meeting of the AUA, J. Urol., 163: 76）。対照ラット（ $n=5$ ）に対しても、事前に処置を行わずに同じLPP試験を行った。スリングを留置したPSNTラットにおけるLPPと、対照ラットでの値との間に有意差はなかった（それぞれ、 51.23 ± 1.60 、 46.11 ± 1.83 ）。重要なこととして、PSNTスリング留置ラットには尿閉の徴候が認められた（除神経ラットにおける1週時点のLPPは $28.6 \pm 0.8 \text{ cm H}_2\text{O}$ ）。すなわち、これらの所見により、SIS / MDSCスリングによってSUIのPSNTラットモデ

ルにおけるLPPが正常対照ラットにおけるLPPのほぼ近くに回復することが示された。本発明によるMDSC / SISは、損傷を被った括約筋の筋肉機能および神経支配を回復させる。このため、本発明に付け加えられる利点は、MDCを有する足場を調製することだけでなく、神経支配および神経筋受容体を含めて筋肉として振る舞うMDSC / SISを用いて、組織および臓器の修復にインビボで用いるための一種の三次元的筋肉代用物を実現することにもある。

【 0 0 7 4 】

本明細書に引用したすべての特許出願、公開出願、特許、教科書、および参考文献は、本発明が属する技術分野の技術水準をより詳細に説明する目的で、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

10

【 0 0 7 5 】

説明した本発明の範囲および精神を逸脱することなく上記の方法および組成物にさまざまな変更を行いうるよう、上記の説明に含まれる、添付する図面に示される、または添付する特許請求の範囲において定義されるすべての対象は、例示的であって制限的な意味ではないものと解釈されるべきである。

【図面の簡単な説明】

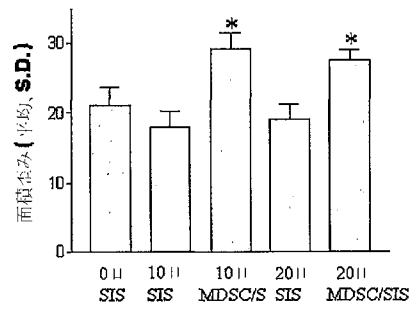
【 0 0 7 6 】

【図 1】筋肉幹細胞 (MDSC / SIS) を含む小腸粘膜下組織 (SIS) の面積歪みを検討するために行った実験の結果を、SISを含む非幹細胞 (対照) と比較して提示したものである (実施例8)。SISをインキュベートしていない対照群 ($n=5$) における平均 (\pm S.D.) 面積歪みは 20.80 ± 5.9 であった。10日間のインキュベーションを行った場合、MDSC / SISにおける平均 (\pm S.D.) 面積歪み (29.15 ± 5.4 , $n=5$) はSISのみの場合 ($17.98 \pm n=6$) よりも有意に大きかった ($p=0.01$)。同じく20日間のインキュベーションを行った場合には、SISのみの場合とMDSC / SIS調製物との間に有意差が認められた。

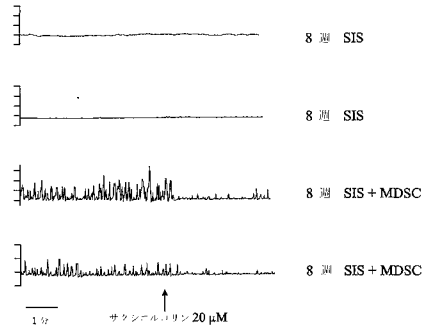
20

【図 2】SIS足場中に組み入れられた筋肉幹細胞の収縮性を検討するために行った実験の結果を提示している (実施例9)。図2に認められる通り、8週までの時点ではいずれのSIS片も全く収縮活性を示さなかった。8週間のMDSC / SIS調製物では、自発的な収縮活性が培養物で観察された (8個の標本中8個)。また、8週間のMDSC / SIS調製物では、自発的収縮活性の頻度および振幅が 20μ Mサクシニルコリンの添加によって低下した。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

- (72)発明者 チャンセラー マイケル ビー .
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 ピッツバーグ フェレー ストリート 5836
- (72)発明者 ユアール ジョニー
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 ワックスフォード ハイポイント ドライブ 711
- (72)発明者 カベリー クリストファー
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 ピッツバーグ #ジー1 フィフス アベニュー 5125
- (72)発明者 チャン スティーブ
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 ピッツバーグ #23 ボクセット ストリート 5326
- (72)発明者 サックス マイケル エス .
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 ピッツバーグ ジェイシー ドライブ 12

合議体

審判長 平田 和男

審判官 鶴飼 健

審判官 田中 耕一郎

- (56)参考文献 特表平9-500040(JP,A)
国際公開第99/56785(WO,A1)
国際公開第00/29552(WO,A1)
The Journal of Cell Biology, 152 (2001 Jan.)
p.335-348
The Journal of Urology, 165 (2001 Jan.) p.2
71-276
Developmental Biology, Vol.218, pp.115-124
(2000)
The Journal of Urology, Vol.164, pp.928-935
(2000)
Tissue Engineering, Vol.4, pp.379-387 (1998)
)
Biomaterials, Vol.27, pp.2398-2404 (2006)
Biomaterials, Vol.26, pp.443-449 (2005)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N5/00

A61L27/00

BIOSIS/WPI(DIALOG)、PubMed

JSTPlus(JDreamII)