(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7222884号
(P7222884)

(45)発行日　令和5年2月15日(2023.2.15)

(24)登録日　令和5年2月7日(2023.2.7)

(51)国際特許分類		FI		
A61K 35/15 (2015.01)		A61K	35/15	Z
A61P 3/10 (2006.01)		A61P	3/10	
A61P 37/02 (2006.01)		A61P	37/02	
A61K 35/51 (2015.01)		A61K	35/51	
A61K 45/00 (2006.01)		A61K	45/00	

請求項の数　29　（全116頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-512007(P2019-512007)
(86)(22)出願日　平成29年8月29日(2017.8.29)
(65)公表番号　特表2019-531276(P2019-531276A)
(43)公表日　令和1年10月31日(2019.10.31)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/049163
(87)国際公開番号　WO2018/044914
(87)国際公開日　平成30年3月8日(2018.3.8)
審査請求日　令和2年8月20日(2020.8.20)
(31)優先権主張番号　62/380,904
(32)優先日　平成28年8月29日(2016.8.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　518283746
ハッケンサック ユニヴァーシティ メディカル センター
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07601 ハッケンサック プロスペクト アベニュー 30
(74)代理人　100094569
弁理士　田中 伸一郎
(74)代理人　100103610
弁理士　▲吉▼田 和彦
(74)代理人　100109070
弁理士　須田 洋之
(74)代理人　100119013
弁理士　山崎 一夫
(74)代理人　100123777

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　Ｔ細胞区画において自己反応性を低下させることにより免疫障害関連疾患を治療する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

教育された単核細胞生成物を含む、リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患を治療するための医薬組成物であって、前記疾患が自己免疫疾患であり、前記自己免疫疾患が１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）であり、順番に、

（１）リンパ球の自己反応性を特徴とする前記疾患に罹患している対象から単核細胞を含有する全血試料を滅菌条件下で取得することと；

（２）（１）の全血試料を処理施設に搬送することと；

（３）前記全血試料から単核細胞（ＭＮＣ）を滅菌的に精製して単核細胞調製物を形成することと；

（４）前記単核細胞調製物を、接着性臍帯血幹細胞（ＵＣ－ＳＣ）の生存可能な集団を含むバイオリアクター装置に導入することであって、前記接着性ＵＣ－ＳＣが少なくとも８０％コンフルエントである、該導入することと；

（５）終夜、滅菌条件下で、前記単核細胞調製物を前記ＵＣ－ＳＣと共培養することであって、前記教育された単核細胞生成物は、前記単核細胞調製物と前記ＵＣ－ＳＣとの、当該２種の細胞集団が相互作用することができる条件下での共培養の結果であり、

前記教育された単核細胞生成物が、

（ｉ）少なくとも1×10^{8}、少なくとも1×10^{9}、または少なくとも1×10^{10}個の単核細胞と；

（ｉｉ）T_{EM} ＣＤ４$^{+}$、T_{EM} ＣＤ８$^{+}$、T_{CM} ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{C}

$_{M}$ ＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{CM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{-}$、T_{CM} ＣＤ４$^{+}$、T_{CM} ＣＤ８$^{+}$、ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ナイーブＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{CM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４$^{+}$、T_{EM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４$^{+}$、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{-}$、T_{EM} ＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ＣＤ４$^{+}$ＨＬＡ-ＤＲ$^{+}$、およびＣＤ８$^{+}$ＨＬＡ-ＤＲ$^{+}$細胞からなる群から選択されるＴ細胞の調節された集団と
を含み、T_{CM}はセントラルメモリーＴ細胞であり、T_{EM}はエフェクターメモリーＴ細胞である、該共培養することと；
（６）前記教育された単核細胞生成物を前記バイオリアクター装置から滅菌条件下で採取することと；
（７）少なくとも10^{8}、少なくとも10^{9}、または、少なくとも10^{10}個の単核細胞を有する、前記教育された単核細胞生成物の純度、滅菌性、およびパーセント生存率を確認することと；
（８）前記教育された単核細胞生成物を前記対象への血管内注入のための臨床施設に搬送することと；
（９）治療有効量の前記教育された単核細胞生成物が前記対象に送達されるよう前記教育された単核細胞生成物を含む前記医薬組成物を前記対象に血管内注入すること；及び
（１０）必要に応じて対象の生涯にわたって、複数の注入日で、ステップ（１）から（９）を順番に繰り返すこと
を含むプロセスによって、有効成分となる前記教育された単核細胞生成物が調製されかつ前記医薬組成物が用いられ、
前記治療有効量の前記教育された単核細胞生成物は、前記対象のリンパ球の自己反応性を調節するのに有効であり得、かつリンパ球の自己反応性を特徴とする前記疾患の症状を軽減するのに有効であり得、
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、
T_{CM} ＣＤ４$^{\pm}$ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$細胞の増加した亜集団、又は
ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$Ｔ細胞の増加した亜集団
を含む、前記医薬組成物。
【請求項２】
前記対象が白人民族である、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項３】
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、
T_{CM} ＣＤ４$^{\pm}$ＣＤ４５ＲＯ$^{\pm}$ＣＣＲ７$^{\pm}$細胞の増加した亜集団、及び
ナイーブＣＤ４$^{\pm}$ＣＤ４５ＲＡ$^{\pm}$ＣＣＲ７$^{\pm}$Ｔ細胞の増加した亜集団
を含む、請求項１又は２に記載の医薬組成物。
【請求項４】
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、
T_{EM} ＣＤ４$^{\pm}$ＣＤ４５ＲＯ$^{\pm}$ＣＣＲ７$^{-}$細胞の低減した亜集団、及び／又は
T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{\pm}$ＣＤ６２Ｌ$^{-}$ＣＣＲ７$^{\pm}$細胞の増加した亜集団
を更に含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項５】
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、
T_{EM} ＣＤ４$^{\pm}$細胞の低減した亜集団およびT_{EM} ＣＤ８$^{\pm}$細胞の低減した亜集団、
T_{CM} ＣＤ４$^{\pm}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＣＲ７$^{\pm}$細胞の増加した亜集団およびT_{CM} ＣＤ８$^{\pm}$ＣＣＲ７$^{\pm}$細胞の増加した亜集団、
T_{CM} ＣＤ４$^{+}$細胞の増加した亜集団およびT_{CM} ＣＤ８$^{\pm}$細胞の増加した亜集団、
ナイーブＣＤ４$^{\pm}$ＣＣＲ７$^{\pm}$Ｔ細胞の増加した亜集団およびナイーブＣＤ８$^{\pm}$ＣＣＲ７$^{\pm}$Ｔ細胞の増加した亜集団、
T_{EM} ＣＣＲ７$^{\pm}$ＣＤ４$^{\pm}$細胞の増加した亜集団およびT_{EM} ＣＣＲ７$^{\pm}$ＣＤ８$^{\pm}$細胞の増加した亜集団、又は

ＣＤ４$^{\pm}$ＨＬＡ-ＤＲ$^{\pm}$Ｔ細胞の低減した亜集団およびＣＤ８$^{\pm}$ＨＬＡ-ＤＲ$^{\pm}$Ｔ細胞の低減した亜集団
を更に含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項６】
臍帯血単核幹細胞が単離された単核細胞と同種異系である、請求項１～５のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項７】
（ａ）健康なドナーから得られた新鮮な臍帯血ユニットを取得することと；
（ｂ）密度勾配遠心分離により臍帯血から単核細胞画分を単離することと；
（ｃ）赤血球を除去することと；
（ｄ）ＵＣ単核細胞を生理緩衝食塩水で洗浄することと；
（ｅ）バイオリアクター内で無血清培地中に少なくとも１×１０^{6}細胞の播種密度で前記ＵＣ単核細胞を播種することと；
（ｆ）前記ＵＣ単核細胞を無血清培地で培養し、２～３日ごとに半分の培地又は前記培地を交換して非接着性細胞を除去し、少なくとも１０日間、少なくとも８０％コンフルエントまで増殖させることと；
（ｇ）（ｆ）におけるコンフルエントな接着性ＵＣ－ＳＣの試料の滅菌性および生存性を確認することと
を順番に含むプロセスによって、ＵＣ－ＳＣを含む前記バイオリアクター装置を調製することをさらに含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項８】
治療量の教育された単核細胞生成物を含む、リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患を治療するための医薬組成物であって、前記疾患が自己免疫疾患であり、前記自己免疫疾患が１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）であり、有効成分となる前記教育された単核細胞生成物が、
（１）リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患に罹患している対象から単核細胞を含有する全血試料を滅菌条件下で取得することであって、前記疾患が自己免疫疾患である、該取得することと；
（２）（１）の全血試料を処理施設に搬送することと；
（３）前記全血試料から単核細胞（ＭＮＣ）を滅菌的に精製して単核細胞調製物を形成することと；
（４）前記単核細胞調製物を、接着性臍帯血幹細胞（ＵＣ－ＳＣ）の生存可能な集団を含むバイオリアクター装置に導入することであって、前記接着性ＵＣ－ＳＣが少なくとも８０％コンフルエントである、該導入することと；
（５）終夜、滅菌条件下で、前記単核細胞調製物を前記ＵＣ－ＳＣと共培養することであって、前記教育された単核細胞生成物は、前記単核細胞調製物と前記ＵＣ－ＳＣとの、当該２種の細胞集団が相互作用することができる条件下での共培養の結果である、該共培養することと
を含むプロセスによって産生され、
治療有効量の前記教育された単核細胞生成物は、前記対象のリンパ球の自己反応性を調節するのに有効であり、かつリンパ球の自己反応性を特徴とする前記疾患の症状を軽減するのに有効であり、
前記教育された単核細胞生成物が、
（ｉ）少なくとも１×１０^{8}、少なくとも１×１０^{9}、または少なくとも１×１０^{10}個の単核細胞と；
（ｉｉ）T_{EM} ＣＤ４$^{+}$、T_{EM} ＣＤ８$^{+}$、T_{CM} ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{CM} ＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{CM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{-}$、T_{CM} ＣＤ４$^{+}$、T_{CM} ＣＤ８$^{+}$、ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ナイーブＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{CM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４$^{+}$、T_{EM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４$^{+}$、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{-}$、T_{EM} ＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ＣＤ４$^{+}$ＨＬＡ-ＤＲ$^{+}$、およびＣＤ８$^{+}$ＨＬＡ-ＤＲ$^{+}$細胞からなる群から選択されるＴ細胞の調節された

集団と
を含み、T_{CM}はセントラルメモリーＴ細胞であり、T_{EM}はエフェクターメモリーＴ細胞であり、
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、
T_{CM} ＣＤ４$^{\pm}$ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$細胞の増加した亜集団、又は
ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$Ｔ細胞の増加した亜集団
を含む、医薬組成物。
【請求項９】
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、
T_{CM} ＣＤ４$^{\pm}$ＣＤ４５ＲＯ$^{\pm}$ＣＣＲ７$^{\pm}$細胞の増加した亜集団、及び
ナイーブＣＤ４$^{\pm}$ＣＤ４５ＲＡ$^{\pm}$ＣＣＲ７$^{\pm}$Ｔ細胞の増加した亜集団
を含む、請求項８に記載の医薬組成物。
【請求項１０】
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、
T_{EM} ＣＤ４$^{\pm}$ＣＤ４５ＲＯ$^{\pm}$ＣＣＲ７$^{-}$細胞の低減した亜集団、及び／又は
T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{-}$ＣＣＲ７$^{\pm}$細胞の増加した亜集団
を更に含む、請求項８又は９に記載の医薬組成物。
【請求項１１】
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、T_{EM} ＣＤ４$^{+}$細胞の低減した亜集団およびT_{EM} ＣＤ８$^{+}$細胞の低減した亜集団を含む、請求項８～１０のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項１２】
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、T_{CM} ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＣＲ７$^{+}$細胞の増加した亜集団およびT_{CM} ＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$細胞の増加した亜集団を含む、請求項８～１１のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項１３】
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、T_{EM} ＣＤ４$^{\pm}$ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{-}$細胞の低減した亜集団を含む、請求項８～１２のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項１４】
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、T_{CM} ＣＤ４$^{+}$細胞の増加した亜集団およびT_{CM} ＣＤ８$^{+}$細胞の増加した亜集団を含む、請求項８～１３のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$Ｔ細胞の増加した亜集団およびナイーブＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$Ｔ細胞の増加した亜集団を含む、請求項８～１４のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項１６】
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、T_{EM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４$^{+}$細胞の増加した亜集団およびT_{EM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ８$^{+}$細胞の増加した亜集団を含む、請求項８～１５のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項１７】
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、ＣＤ４$^{+}$ＨＬＡ-ＤＲ$^{+}$Ｔ細胞の低減した亜集団およびＣＤ８$^{+}$ＨＬＡ-ＤＲ$^{+}$Ｔ細胞の低減した亜集団を含む、請求項８～１６のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項１８】
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{-}$ＣＣＲ７$^{+}$細胞の増加した亜集団を含む、請求項８～１７のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項１９】

前記対象の調節されたリンパ球の自己反応性が、β細胞機能の改善を含む、請求項８～１８のいずれか１項に記載の医薬組成物。

【請求項２０】

β細胞機能の前記改善が、血清Ｃ－ペプチドレベルの増加を含む、請求項１９に記載の医薬組成物。

【請求項２１】

インスリン、インスリン類似体、ビグアニド、チアゾリジンジオン、分泌促進薬、スルホニル尿素、非スルホニル尿素分泌促進薬、グリニド、メトホルミン、α－グルコシダーゼ阻害剤、メグリチニド、α－グルコシダーゼ阻害剤、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）模倣体、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）アゴニスト、アミリン類似体、ジペプチジルペプチダーゼ－４阻害剤、インクレチン模倣体、胃抑制ペプチド類似体、アミリン類似体、グリコ尿、フィナステリド、デュタステリド、ミノキシジル、ケトコナゾール、スピロノラクトン、フルタミド、シクロスポリン、クロベタゾール、抗ＣＤ３抗体、インスリン受容体の小分子活性化剤、フルオシノニド、またはそれらの組み合わせからなる群から選択される治療薬をさらに含む、請求項８～２０のいずれか１項に記載の医薬組成物。

【請求項２２】

インスリン、インスリン類似体、ビグアニド、チアゾリジンジオン、分泌促進薬、スルホニル尿素、非スルホニル尿素分泌促進薬、グリニド、メトホルミン、α－グルコシダーゼ阻害剤、メグリチニド、α－グルコシダーゼ阻害剤、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）模倣体、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）アゴニスト、アミリン類似体、ジペプチジルペプチダーゼ－４阻害剤、インクレチン模倣体、胃抑制ペプチド類似体、アミリン類似体、グリコ尿、フィナステリド、デュタステリド、ミノキシジル、ケトコナゾール、スピロノラクトン、フルタミド、シクロスポリン、クロベタゾール、抗ＣＤ３抗体、インスリン受容体の小分子活性化剤、フルオシノニド、またはそれらの組み合わせからなる群から選択される治療薬と組み合わせて使用される、請求項８～２０のいずれか１項に記載の医薬組成物。

【請求項２３】

リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患の治療のための医薬の調製における教育された単核細胞生成物の使用であって、前記疾患が自己免疫疾患であり、前記自己免疫疾患が１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）であり、順番に、

（１）リンパ球の自己反応性を特徴とする前記疾患に罹患している対象から単核細胞を含有する全血試料を滅菌条件下で取得することと；

（２）（１）の全血試料を処理施設に搬送することと；

（３）前記全血試料から単核細胞（ＭＮＣ）を滅菌的に精製して単核細胞調製物を形成することと；

（４）前記単核細胞調製物を、接着性臍帯血幹細胞（ＵＣ－ＳＣ）の生存可能な集団を含むバイオリアクター装置に導入することであって、前記接着性ＵＣ－ＳＣが少なくとも８０％コンフルエントであることと；

（５）終夜、滅菌条件下で、前記単核細胞調製物を前記ＵＣ－ＳＣと共培養することであって、前記教育された単核細胞生成物は、前記単核細胞調製物と前記ＵＣ－ＳＣとの、当該２種の細胞集団が相互作用することができる条件下での共培養の結果であり、

前記教育された単核細胞生成物が、

（ｉ）少なくとも1×10^{8}、少なくとも1×10^{9}、または少なくとも1×10^{10}個の単核細胞と；

（ｉｉ）T_{EM} ＣＤ４$^{+}$、T_{EM} ＣＤ８$^{+}$、T_{CM} ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{CM} ＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{CM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{-}$、T_{CM} ＣＤ４$^{+}$、T_{CM} ＣＤ８$^{+}$、ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ナイーブＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{CM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４$^{+}$、T_{EM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４$^{+}$、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{-}$、T_{EM} ＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ＣＤ４$^{+}$ＨＬ

Ａ-ＤＲ$^{+}$、およびＣＤ８$^{+}$ＨＬＡ-ＤＲ$^{+}$細胞からなる群から選択されるＴ細胞の調節された集団と
を含み、T_{CM}はセントラルメモリーＴ細胞であり、T_{EM}はエフェクターメモリーＴ細胞である、該共培養することと；
（６）前記教育された単核細胞生成物を前記バイオリアクター装置から滅菌条件下で採取することと；
（７）少なくとも１０^{8}、少なくとも１０^{9}、または、少なくとも１０^{10}個の単核細胞を有する、前記教育された単核細胞生成物の純度、滅菌性、およびパーセント生存率を確認すること
を含むプロセスによって、有効成分となる前記教育された単核細胞生成物が調製され、
順番に、
（８）前記教育された単核細胞生成物を前記対象への血管内注入のための臨床施設に搬送することと；
（９）治療有効量の前記教育された単核細胞生成物を前記対象に血管内注入することと；
（１０）必要に応じて対象の生涯にわたって、複数の注入日で、ステップ（１）から（９）を順番に繰り返すこと
を含むプロセスによって、前記治療が行われ、
前記治療有効量の前記教育された単核細胞生成物は、前記対象のリンパ球の自己反応性を調節するのに有効であり得、かつリンパ球の自己反応性を特徴とする前記疾患の症状を軽減するのに有効であり得、
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、
T_{CM} ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$細胞の増加した亜集団、又は
ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$Ｔ細胞の増加した亜集団
を含む、前記使用。
【請求項２４】
前記対象が白人民族である、請求項２３に記載の使用。
【請求項２５】
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、
T_{CM} ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$細胞の増加した亜集団、及び
ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$Ｔ細胞の増加した亜集団
を含む、請求項２３又は２４に記載の使用。
【請求項２６】
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、
T_{EM} ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{-}$細胞の低減した亜集団、及び／又は
T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{-}$ＣＣＲ７$^{+}$細胞の増加した亜集団
を更に含む、請求項２３～２５のいずれか１項に記載の使用。
【請求項２７】
前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、
T_{EM} ＣＤ４$^{+}$細胞の低減した亜集団およびT_{EM} ＣＤ８$^{+}$細胞の低減した亜集団、
T_{CM} ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＣＲ７$^{+}$細胞の増加した亜集団およびT_{CM} ＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$細胞の増加した亜集団、
T_{CM} ＣＤ４$^{+}$細胞の増加した亜集団およびT_{CM} ＣＤ８$^{+}$細胞の増加した亜集団、
ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$Ｔ細胞の増加した亜集団およびナイーブＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$Ｔ細胞の増加した亜集団、
T_{EM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４$^{+}$細胞の増加した亜集団およびT_{EM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ８$^{+}$細胞の増加した亜集団、又は
ＣＤ４$^{+}$ＨＬＡ-ＤＲ$^{+}$Ｔ細胞の低減した亜集団およびＣＤ８$^{+}$ＨＬＡ-ＤＲ$^{+}$Ｔ細胞の低減した亜集団
を更に含む、請求項２３～２６のいずれか１項に記載の使用。
【請求項２８】

臍帯血単核幹細胞が単離された単核細胞と同種異系である、請求項２３～２７のいずれか１項に記載の使用。
【請求項２９】
（ａ）健康なドナーから得られた新鮮な臍帯血ユニットを取得することと；
（ｂ）密度勾配遠心分離により臍帯血から単核細胞画分を単離することと；
（ｃ）赤血球を除去することと；
（ｄ）ＵＣ単核細胞を生理緩衝食塩水で洗浄することと；
（ｅ）バイオリアクター内で無血清培地中に少なくとも１×１０^{6}細胞の播種密度で前記ＵＣ単核細胞を播種することと；
（ｆ）前記ＵＣ単核細胞を無血清培地で培養し、２～３日ごとに半分の培地又は前記培地を交換して非接着性細胞を除去し、少なくとも１０日間、少なくとも８０％コンフルエントまで増殖させることと；
（ｇ）（ｆ）におけるコンフルエントな接着性ＵＣ－ＳＣの試料の滅菌性および生存性を確認することと
を順番に含むプロセスによって、ＵＣ－ＳＣを含む前記バイオリアクター装置を調製することをさらに含む、請求項２３～２８のいずれか１項に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、参照によりその全ての内容が本明細書に組み込まれる、２０１６年８月２９日に出願された米国仮出願第６２／３８０，９０４号の優先権の利益を主張する。
記載される発明は、Ｔ細胞区画における自己反応性を有する患者を治療するための装置、医薬組成物、および方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
免疫応答の特徴
一般的に免疫応答は、個体と外来性抗原物質、例えば、感染性微生物との遭遇によって開始される。感染した個体は、免疫原の抗原決定基／エピトープに特異的な抗体分子の産生、ならびにサイトカインを産生する細胞と感染細胞を溶解することができるキラーＴ細胞との両方を含む、抗原特異的制御性およびエフェクターＴリンパ球の拡大および分化によって、迅速に応答する。所与の微生物による一次免疫は、微生物に見られる抗原決定基／エピトープに特異的である抗体およびＴ細胞を誘発するが、通常、無関係の微生物が発現する抗原決定基を認識することができないかまたは不十分にしか認識しない［Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia, (1999), at p. 102］。
この初期応答の結果として、免疫された個体は免疫学的記憶の状態を発達させる。同一のまたは密接に関係した微生物に再び遭遇するとき、二次応答が結果として起こる。この二次応答は、一般的により迅速でより大きな規模であり、より高い親和性で抗原に結合する抗体から構成され、生体から微生物をより効果的に除去する抗体応答、ならびに、同様に増強され、しばしばより効果的なＴ細胞応答からなる。しかしながら、感染性因子に対する免疫応答は、病原体の排除を常にもたらすわけではない（同上）。
免疫応答は反応性に関して非常に特異的であるが、免疫系によって識別することができる抗原特異性の範囲は非常に広い。
【０００３】
免疫系の細胞
免疫系の細胞は、リンパ球、単球／マクロファージ、樹状細胞、密接に関連したランゲルハンス細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、肥満細胞、好塩基球、および細胞の骨髄細胞系列の他のメンバーを含む。さらに、一連の特殊化された上皮細胞および間質細胞は

、しばしば免疫系の細胞において増殖および／または遺伝子活性化を調節する重要な因子を分泌することによって免疫が起こる解剖学的環境を提供し、これはまた、応答における誘導およびエフェクターの相において直接的な役割を果たす（同上）。

免疫系の細胞は、脾臓、リンパ節、腸のパイエル板、扁桃腺などの末梢の組織化された組織に見られる。リンパ球はまた、中枢リンパ器官、胸腺、および骨髄において見られ、そこでは、それらは成熟した免疫系の無数の応答を媒介するのに備える発達段階を経る。リンパ球とマクロファージの大部分は、血液とリンパ液に見られる細胞の再循環プールを構成し、免疫担当細胞をそれらが必要とされる部位に送達しそして局所的に発生する免疫を全身性とする手段を提供する（同上）。

用語「リンパ球」は、生体全体にわたるリンパ組織において形成され、正常な成体において、循環血中の総白血球数の約２２～２８％を構成する小さい白血球を指し、疾患に対して生体を防御することにおいて大きな役割を果たす。個別のリンパ球は、それらが限られた組の構造的に関連した抗原に応答することが決定されているという点で特殊化されている。免疫系と所与の抗原との最初の接触の前に存在するこの決定は、リンパ球の表面膜上の抗原の決定基（エピトープ）に特異的な受容体の存在によって表される。各々のリンパ球は、受容体の集団を有し、その全ては同一の結合部位を有する。リンパ球の１組、すなわちクローンは、その受容体の結合領域の構造において別のクローンと異なり、したがってそれが認識することができるエピトープにおいて異なる。リンパ球は、それらの受容体の特異性においてのみではなく、それらの機能においても互いに異なる（同上）。

２つの広いクラスのリンパ球が認識されている：抗体分泌細胞の前駆体であるＢリンパ球（Ｂ細胞）およびＴリンパ球（Ｔ細胞）。

【０００４】

Ｂリンパ球

Ｂリンパ球は、骨髄の造血細胞に由来する。成熟Ｂ細胞は、その細胞表面によって認識されるエピトープを発現する抗原によって活性化され得る。活性化プロセスは、直接的、すなわち抗原による膜Ｉｇ分子の架橋に依存する（架橋依存性Ｂ細胞活性化）か、または非直接的、すなわち、同族ヘルプ（ｃｏｇｎａｔｅ　ｈｅｌｐ）と呼ばれるプロセスにおける、ヘルパーＴ細胞との相互作用を介するものであり得る。多くの生理学的状況において、受容体架橋刺激および同族ヘルプは、協調してより活発なＢ細胞応答をもたらす［Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia, (1999)］。

【０００５】

架橋依存性Ｂ細胞活性化は、各々のＢ細胞が同一の可変領域を有するＩｇ分子を発現するので、抗原が細胞表面受容体の結合部位に相補的なエピトープの複数のコピーを発現することを必要とする。そのような要求は、微生物のきょう膜多糖またはウイルスエンベロープタンパク質などの反復するエピトープを有する他の抗原によって満たされる。架橋依存性Ｂ細胞活性化はこれらの微生物に対してもたらされる主要な防御免疫応答である［Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction", Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia, (1999)］。

【０００６】

同族ヘルプは、Ｂ細胞が受容体を架橋することができない抗原に対する応答をもたらすことを可能にし、同時に、Ｂ細胞が弱い架橋事象によって刺激されるときに不活性化からＢ細胞を救出する共刺激シグナルを提供する。同族ヘルプは、Ｂ細胞の膜免疫グロブリン（Ｉｇ）による抗原の結合、抗原のエンドサイトーシス、および細胞のエンドソーム／リソソーム区画内のそのペプチドへの断片化に依存する。生じるペプチドのいくつかは、クラスＩＩ主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子として知られる細胞表面タンパク質の特定の組の溝へとロードされる。生じるクラスＩＩ／ペプチド複合体は、細胞表面に発現し、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞として表される１組のＴ細胞の抗原特異的受容体のリガンドとして作用

する。ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、それらの表面にＢ細胞のクラスＩＩ／ペプチド複合体に特異的な受容体を有する。Ｂ細胞活性化は、Ｔ細胞とのそのＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を介した結合のみに依存するのではなく、この相互作用はまた、Ｔ細胞の活性化リガンド（ＣＤ４０リガンド）が、Ｂ細胞上のその受容体（ＣＤ４０）への結合を可能にし、Ｂ細胞活性化をシグナル伝達する。さらに、Ｔヘルパー細胞は、Ｂ細胞上のサイトカイン受容体への結合によって刺激されたＢ細胞の増殖および分化を調節するいくつかのサイトカインを分泌する［Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia, (1999)］。

【０００７】

抗体産生への同族ヘルプの間、ＣＤ４０リガンドは、活性化ＣＤ４$^{+}$Ｔヘルパー細胞上で一過性に発現し、それは、抗原特異的Ｂ細胞上のＣＤ４０に結合し、それによって二次共刺激シグナルを伝達する。後者のシグナルは、Ｂ細胞の増殖および分化に重要であり、抗原に遭遇している胚中心Ｂ細胞のアポトーシスを防ぐことによるメモリーＢ細胞の生成に重要である。Ｂ細胞とＴ細胞の両方におけるＣＤ４０リガンドの過剰発現は、ヒトＳＬＥ患者の病原性の自己抗体産生に関与している［Desai-Mehta, A. et al., "Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production," J. Clin. Invest. Vol. 97(9), 2063-2073, (1996)］。

【０００８】

Ｔリンパ球

Ｔリンパ球は、造血組織の前駆体に由来し、胸腺で分化し、そして次に末梢リンパ組織およびリンパ球の再循環プールにひろがる。Ｔリンパ球またはＴ細胞は、広範囲の免疫学的機能を媒介する。これらは、Ｂ細胞が抗体産生細胞に発達するのを助ける能力、単球／マクロファージの殺菌作用を増加させる能力、ある種の免疫応答の阻害、標的細胞の直接殺傷、および炎症応答の動員を含む。これらの効果は、それらの特異的な細胞表面分子の発現およびサイトカインの分泌に依存する［Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction", Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia, (1999)］。

【０００９】

Ｔ細胞は、それらの抗原認識の機序においてＢ細胞とは異なる。免疫グロブリン、すなわちＢ細胞の受容体は、可溶性分子または粒子表面上の個別のエピトープに結合する。Ｂ細胞受容体は、天然分子表面上に発現されるエピトープを認識する。抗体およびＢ細胞受容体が、細胞外流体中の微生物に結合し、それに対して防御するよう進化したが、Ｔ細胞は、他の細胞の表面上の抗原を認識し、これらの抗原提示細胞（ＡＰＣ）の行動と相互作用し、これを変更することによってＴ細胞の機能を媒介する。末梢リンパ器官において、Ｔ細胞を活性化することができる３つの主な種類の抗原提示細胞である樹状細胞、マクロファージ、およびＢ細胞が存在する。これらのうち最も強力なのは樹状細胞であり、その唯一の機能は、外来抗原をＴ細胞に提示することである。未熟樹状細胞は、皮膚、腸、および気道を含む、生体全体にわたる組織に存在する。それらがこれらの部位で侵入する微生物に遭遇すると、それらは病原体およびそれらの産物をエンドサイトーシスし、それらをリンパ液を介して局所リンパ節または腸管関連リンパ器官へと運搬する。病原体との遭遇は、抗原捕捉細胞から、Ｔ細胞を活性化することができる抗原提示細胞（ＡＰＣ）への樹状細胞の成熟を誘導する。ＡＰＣは、それらの表面に、Ｔ細胞がエフェクター細胞になるよう活性化することにおいて役割を有する以下の３種類のタンパク質分子を提示する：（１）外来抗原をＴ細胞受容体に提示するＭＨＣタンパク質；（２）Ｔ細胞表面上の相補的受容体に結合する共刺激性タンパク質、および（３）Ｔ細胞が活性化されるのに十分に長い期間、Ｔ細胞を抗原提示細胞（ＡＰＣ）に結合させることができる細胞間接着分子［"Chapter 24: The adaptive immune system," Molecular Biology of the Cell, Alberts, B. et al., Garland Science, NY, (2002)］。

【００１０】

Ｔ細胞は、それらが発現する細胞表面受容体に基づいて２つの異なるクラスにさらに分割される。大部分のＴ細胞は、αβ鎖からなるＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現する。小さい群のＴ細胞は、γδ鎖からなる受容体を発現する。α／βＴ細胞において２つの亜系統がある：共受容体分子ＣＤ４を発現するもの（ＣＤ４$^+$Ｔ細胞）；およびＣＤ８を発現するもの（ＣＤ８$^+$Ｔ細胞）。これらの細胞は、それらがどのように抗原を認識するかという点、およびそれらのエフェクターおよび制御性機能の点で異なる。

【００１１】

ＣＤ４$^+$Ｔ細胞は、免疫系における主要な制御性細胞である。それらの制御性機能は、Ｔ細胞が活性化されるときに発現が誘導されるＣＤ４０リガンドなどのそれらの細胞表面分子と、それらが活性化されるときに分泌される広範囲のサイトカインとの両方の発現に依存する。

Ｔ細胞はまた、重要なエフェクター機能をも媒介し、そのうちのいくつかは、それらの分泌するサイトカインのパターンによって決定される。サイトカインは、標的細胞に対して直接的に毒性であり得、強力な炎症機序を動員し得る。

【００１２】

さらに、Ｔ細胞、特にＣＤ８$^+$Ｔ細胞は、ＣＴＬによって認識される抗原を発現する標的細胞を効果的に溶解することができる細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）なることができる［Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia, (1999)］。

Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）は、クラスＩＩまたはクラスＩＭＨＣタンパク質の特殊化された溝に結合した抗原のタンパク質分解に由来するペプチドからなる複合体を認識する。ＣＤ４$^+$Ｔ細胞は、ペプチド／クラスＩＩ複合体のみを認識するが、ＣＤ８$^+$Ｔ細胞はペプチド／クラスＩ複合体を認識する［Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia, (1999)］。

【００１３】

ＴＣＲのリガンド（すなわち、ペプチド／ＭＨＣタンパク質複合体）は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）内で作製される。一般的に、クラスＩＩ　ＭＨＣ分子は、エンドサイトーシスプロセスを通じてＡＰＣに取り込まれたタンパク質に由来するペプチドに結合する。続いて、これらのペプチドがロードされたクラスＩＩ分子は、細胞表面に発現し、そこでそれらは、発現した細胞表面複合体を認識することができるＴＣＲを有するＣＤ４$^+$Ｔ細胞によって結合されるために利用可能となる。したがって、ＣＤ４$^+$Ｔ細胞は、細胞外の源に由来する抗原と反応するよう特殊化している［Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia, (1999)］。

【００１４】

対照的に、クラスＩ　ＭＨＣ分子は、ウイルスタンパク質のような内部で合成されるタンパク質に由来するペプチドが主にロードされている。これらのペプチドは、プロテオソームによるタンパク質分解によって細胞質タンパク質から産生され、粗面小胞体に転位する。そのようなペプチドは、一般的に９アミノ酸長からなり、クラスＩ　ＭＨＣ分子に結合し、細胞表面へと運ばれ、そこで、それらは、適切な受容体を発現しているＣＤ８$^+$Ｔ細胞によって認識され得る。これは、Ｔ細胞系、特にＣＤ８$^+$Ｔ細胞に、生物の残りの部分の細胞のものとは異なる（例えば、ウイルス抗原）か、もしくはよりはるかに多い量で産生されているタンパク質、または変異抗原（活動性が高い腫瘍遺伝子産物など）を発現している細胞を検出する能力をもたらし、たとえそれらの無傷な形態のこれらのタンパク質が細胞表面上に発現されず、また分泌されない場合でも検出する［Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia, (1999)］。

Ｔ細胞はまた、それらのヘルパーＴ細胞としての機能に基づいて分類できる：細胞性免

疫の誘導に関与するＴ細胞；サプレッサーＴ細胞；および細胞傷害性Ｔ細胞。

【００１５】

ヘルパーＴ細胞

ヘルパーＴ細胞は、タンパク質および他のＴ細胞依存性抗原に応答する抗体を作製するようＢ細胞を刺激するＴ細胞である。Ｔ細胞依存性抗体は、個別のエピトープが一度または限られた回数のみ現れ、その結果、Ｂ細胞の膜免疫グロブリン（Ｉｇ）を架橋することが不可能であるかまたは非効率的にそうする免疫原である。Ｂ細胞は、それらの膜Ｉｇを通じて抗原に結合し、複合体がエンドサイトーシスを経る。エンドソームおよびリソソーム区画内で、抗原はタンパク質分解酵素によってペプチドに断片化され、生成されたペプチドの１つ以上がクラスＩＩ　ＭＨＣ分子にロードされ、これがこの小胞区画を通過する。生じるペプチド／クラスＩＩ　ＭＨＣ複合体は、続いてＢ細胞表面膜にエクスポートされる。ペプチド／クラスＩＩ分子複合体に特異的な受容体を有する細胞は、このＢ細胞表面の複合体を認識する［Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia (1999)］。

【００１６】

Ｂ細胞活性化は、Ｔ細胞のこのＴＣＲを通じた結合と、Ｔ細胞のＣＤ４０リガンド（ＣＤ４０Ｌ）とＢ細胞上のＣＤ４０との間の相互作用との両方に依存する。Ｔ細胞は、構成的にＣＤ４０Ｌを発現しない。むしろ、ＣＤ４０Ｌの発現は、Ｔ細胞のＴＣＲによって認識される同族抗原とＣＤ８０またはＣＤ８６との両方を発現するＡＰＣとの相互作用の結果として誘導される。ＣＤ８０／ＣＤ８６は、一般的に、活性化されているが休止していないＢ細胞によって発現され、活性化Ｂ細胞とＴ細胞を含むヘルパー相互作用は、効率的な抗体産生をもたらし得る。しかしながら、多くの場合、Ｔ細胞上のＣＤ４０Ｌの最初の誘導は、樹状細胞などの、構成的にＣＤ８０／８６を発現するＡＰＣの表面上の抗原のそれらによる認識に依存する。続いて、そのような活性化ヘルパーＴ細胞は、Ｂ細胞と効率的に相互作用してＢ細胞を助けることができる。Ｂ細胞上の膜Ｉｇの架橋は、たとえ効率的でなくとも、ＣＤ４０Ｌ／ＣＤ４０相互作用と協調して、活発なＢ細胞活性化をもたらす。増殖、Ｉｇ分泌、および（発現しているＩｇクラスの）クラススイッチングを含むＢ細胞応答におけるその後の事象は、Ｔ細胞由来サイトカインの作用に依存するかまたはそれによって増強される［Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia, (1999)］。

【００１７】

ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、主にサイトカインＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、およびＩＬ－１０を分泌する細胞（ＴＨ２細胞）、または主にＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、およびリンホトキシンを産生する細胞（ＴＨ１細胞）に分化する傾向がある。ＴＨ２細胞は、Ｂ細胞の抗体産生細胞への発達を助けるのに非常に効果的であり、ＴＨ１細胞は、単球およびマクロファージの殺菌活性の増強、ならびに結果として起こる細胞内小胞区画における微生物を溶解する増加した効率を含む細胞免疫応答の効果的な誘導因子である。ＴＨ２細胞の表現型（すなわち、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、およびＩＬ－１０）を有するＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、効率的なヘルパー細胞であり、ＴＨ１細胞もまた、ヘルパーとなる能力を有する［Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia, (1999)］。

【００１８】

細胞性免疫の誘導に関与するＴ細胞

Ｔ細胞はまた、単球およびマクロファージの細胞内微生物を破壊する能力を増強するよう作用し得る。特に、ヘルパーＴ細胞によって産生されるインターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）は、一酸化窒素の生成および腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）産生の誘導を含む単核食細胞が細胞内細菌および寄生を破壊するいくつかの機序を増強する。T_{H1}細胞は、ＩＦＮ－γ

を産生するので殺菌作用を増強するのに効果的である。対照的に、T_{H2}細胞によって産生される主なサイトカインのうちの２つ、ＩＬ－４およびＩＬ－１０は、それらの活性を遮断する［Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia, (1999)］。

【００１９】

サプレッサーまたは制御性Ｔ（Ｔｒｅｇ）細胞

免疫恒常性は、免疫応答の開始と下方制御との間の制御されたバランスによって維持される。アポトーシスとアネルギー（Ｔ細胞が抗原遭遇の後に本質的に機能的に不活性化される寛容機序［Scwartz, R. H., "T cell anergy", Annu. Rev. Immunol., Vol. 21: 305-334 (2003)］の両方の機序は、免疫応答の下方制御に寄与する。第３の機序は、サプレッサーまたは制御性$CD4^+$Ｔ（Ｔｒｅｇ）細胞による活性化Ｔ細胞の能動的な抑制によって提供される［Kronenberg, M. et al., "Regulation of immunity by self-reactive T cells", Nature, Vol. 435: 598-604 (2005)に概説される］。ＩＬ－２受容体α（ＩＬ－２Ｒα）鎖を構成的に発現する$CD4^+$Ｔｒｅｇ（$CD4^+CD25^+$）は、天然に存在する、アネルギー性かつ抑制性のＴ細胞のサブセットである［Taams, L. S. et al., "Human anergic/suppressive $CD4^+CD25^+$ T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population", Eur. J. Immunol. Vol. 31: 1122-1131 (2001)］。$CD4^+CD25^+$Ｔｒｅｇの枯渇は、マウスにおいて全身性自己免疫疾患を引き起こす。さらに、これらのＴｒｅｇの移植は、自己免疫疾患の発症を防ぐ。ヒト$CD4^+CD25^+$Ｔｒｅｇは、それらのマウスの同等物の同様に、胸腺で生成し、細胞間接触依存性機序を通じてレスポンダーＴ細胞の増殖を抑制する能力、ＩＬ－２を産生できないこと、およびインビトロでのアネルギー性の表現型を特徴とする。ヒト$CD4^+CD25^+$Ｔ細胞は、ＣＤ２５発現のレベルに従って、抑制性（$CD25^{高}$）および非抑制性（$CD25^{低}$）の細胞に分割することができる。フォークヘッドファミリーの転写因子のメンバーであるＦＯＸＰ３は、マウスおよびヒトの$CD4^+CD25^+$Ｔｒｅｇで発現し、$CD4^+CD25^+$Ｔｒｅｇの発達を制御するマスター遺伝子であるらしいことが示されている［Battaglia, M. et al., "Rapamycin promotes expansion of functional $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ regulator T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients", J. Immunol., Vol. 177: 8338-8347, (2006)］。

【００２０】

細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）

標的細胞内で産生されたタンパク質由来のペプチドを認識する$CD8^+$Ｔ細胞は、標的細胞の溶解を導くという点で細胞傷害性の性質を有する。ＣＴＬ誘導性溶解の機序は、パーフォリン、すなわち、標的細胞の膜に挿入してその細胞の溶解を促進することができる分子のＣＴＬによる産生を含む。パーフォリン媒介性溶解は、グランザイム、すなわち活性化ＣＴＬによって産生される一連の酵素によって増強される。多くの活性ＣＴＬはまた、それらの表面に大多数のｆａｓリガンドを発現する。ＣＴＬ表面上のｆａｓリガンドと標的細胞表面上のｆａｓとの相互作用は、標的細胞のアポトーシスを開始させ、それらの細胞の死をもたらす。ＣＴＬ媒介性溶解は、ウイルス感染細胞の破壊の主な機序であるらしい。

【００２１】

抗原刺激（priming）

本明細書で使用されるとき、「抗原刺激されていない細胞」（バージン、ナイーブ、または未経験細胞とも呼ばれる）という用語は、特定の特異性の抗原受容体（Ｔ細胞の場合はＴＣＲ、Ｂ細胞の場合はＢＣＲ）を生成したが、抗原に遭遇したことは一度もないＴ細胞およびＢ細胞を指す。本明細書で使用されるとき、「抗原刺激」という用語は、Ｔ細胞およびＢ細胞の前駆体が、それらが特異的である抗原と遭遇するプロセスを指す。

【００２２】

例えば、ヘルパーＴ細胞およびＢ細胞が相互作用して特異的抗体を産生することができ

るようになる前に、抗原特異的Ｔ細胞前駆体は抗原刺激される必要がある。抗原刺激はいくつかのステップを含む：抗原取り込み、プロセシング、および抗原提示細胞によるクラスＩＩ　ＭＨＣ分子に結合した細胞表面発現、リンパ組織におけるヘルパーＴ細胞前駆体の再循環および抗原特異的捕捉、ならびにＴ細胞の増殖および分化［Janeway, CA, Jr., "The priming of helper T cells", Semin. Immunol., Vol. 1(1): 13-20 (1989)］。ヘルパーＴ細胞は、ＣＤ４を発現するが、全てのＣＤ４のＴ細胞がヘルパー細胞ではない（同上）。ヘルパーＴ細胞のクローン拡大に必要なシグナルは、他のＣＤ４のＴ細胞によって必要とされるものとは異なる。ヘルパーＴ細胞抗原刺激のための極めて重要な抗原提示細胞はマクロファージのようであり、ヘルパーＴ細胞増殖のための極めて重要な第２のシグナルは、マクロファージ生成物のインターロイキン１（ＩＬ－１）である（同上）。抗原刺激されたＴ細胞および／またはＢ細胞が、第２の共刺激シグナルを受容した場合、それらは活性化されたＴ細胞またはＢ細胞になる。

【００２３】

リンパ球活性化

「活性化」または「リンパ球活性化」という用語は、ＲＮＡ、タンパク質、およびＤＮＡの合成、ならびにリンホカインの産生をもたらす特異的抗原、非特異的マイトジェン、または同種異系細胞によるリンパ球の刺激を指し、それは、様々なエフェクターおよびメモリー細胞の増殖および分化が後に続く。例えば、成熟Ｂ細胞は、その細胞表面免疫グロブリンＩｇによって認識されるエピトープを発現する抗原との遭遇によって活性化され得る。活性化プロセスは抗原による膜Ｉｇ分子の架橋に依存する直接的なもの（架橋依存性Ｂ細胞活性化）、またはヘルパーＴ細胞との密接な相互作用と関連して最も効率的に起こる間接的なもの（「同族ヘルププロセス」）となり得る。Ｔ細胞活性化は、ＴＣＲ／ＣＤ３複合体のその同族リガンド、すなわちクラスＩまたはクラスＩＩ　ＭＨＣ分子の溝に結合するペプチドとの相互作用に依存する。受容体の結合によって動く分子事象は複雑である。いくつかのシグナル伝達経路を制御する一連の基質のチロシンリン酸化をもたらすチロシンキナーゼの活性化は、最も初期のステップ中に起こるらしい。これらには、ＴＣＲをｒａｓ経路に結び付ける一連のアダプタータンパク質、そのチロシンリン酸化がその触媒活性を高め、イノシトールリン脂質代謝経路に関与し、細胞内遊離カルシウム濃度の上昇およびプロテインキナーゼＣの活性化をもたらすホスホリパーゼＣγ１、ならびに細胞増殖および分化を制御する一連の他の酵素が含まれる。Ｔ細胞の完全な応答性は、受容体の結合に加えて、アクセサリー細胞により送達される共刺激活性、例えば抗原提示細胞（ＡＰＣ）上のＣＤ８０および／またはＣＤ８６によるＴ細胞上のＣＤ２８の結合を必要とする。活性化Ｂリンパ球の可溶性産物は免疫グロブリン（抗体）である。活性化Ｔリンパ球の可溶性産物はリンホカインである。

【００２４】

ケモカインは走化性サイトカインであり、多様な免疫および神経の機能を有する、低分子量（８～１１ｋＤａ）の構造的に関連したタンパク質のファミリーを構成し［Mackay C.R., "Chemokines: immunology's high impact factors", Nat Immunol., Vol. 2: 95-101, (2001)］；［Youn B. et al., "Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis", Immunol Rev, Vol. 177: 150-174, (2000)］、保存されたシステイン残基の相対位置に基づいて４つのサブファミリー（Ｃ、ＣＣ、ＣＸＣ、およびＣＸ３Ｃ）に分類できる［Rossi D. et al., "The biology of chemokines and their receptors", Annu Rev Immunol,, Vol. 18: 217-242, (2000)］。ケモカインは、血液、リンパ節、および組織の間の白血球の遊走を誘導するのに不可欠な分子である。それらは常に１種類の受容体に限定されるわけではないので、それらは複雑なシグナル伝達ネットワークを構成する［Loetscher P. et al., "The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3", J. Biol. Chem., Vol. 276: 2986-2991, (2001)］。ケモカインは、７回膜貫通ドメインＧタンパク質共役型受容体である表面受容体を活性化することによって細胞に影響を及ぼす。特定のケモカインに応答する白血球は、それらのケモカイン受容体の発現によって決定される。受容体に対する

ケモカインの結合は、生物学的応答の活性化をもたらすサイトカインの作用と同様に、様々なシグナル伝達カスケードを活性化する。（ＲＡＮＴＥＳ）、マクロファージ炎症性タンパク質（ＭＩＰ）－１α／およびＭＩＰ－１βを発現して分泌する正常な活性化Ｔ細胞によって調節されるＣＣＲ５受容体に対するリガンドの分泌［Schrum S. et al., "Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response", J Immunol, Vol. 157: 3598-3604, (1996)］、ならびにＣＸＣケモカイン受容体３（ＣＸＣＲ３）に対するリガンドの分泌、誘導タンパク質（ＩＰ）－１０［Taub D.D. et al., "Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells", J Exp Med., Vol. 177:1809-1814, (1993)］は、望ましくない高められたT_{H1}応答と関連している。さらに、ＩＬ－２およびＩＦＮ－γの損傷性の炎症誘発性サイトカインレベルの上昇はＴ１Ｄと相関する［Rabinovitch A. et al., "Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes", Cell Biochem Biophys, Vol. 48(2-3): 159-63, (2007)］。ケモカインは、T_{H1}の膵臓浸潤およびＴ細胞浸潤を特徴とする他の炎症性病変において観察されている［Bradley L.M. et al., "Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes", J Immunol, Vol. 162:2511-2520, (1999)］。

【００２５】

血漿中のＩＬ－１β、ＩＬ－６、およびＴＮＦ－αのような炎症誘発性サイトカインが主に検出され、インスリン抵抗性およびＴ２Ｄの発症に関与しており、これらは抗炎症性および免疫抑制性サイトカイン、ＴＧＦ－β１およびＩＬ－１０によって抑制され、調節される［Alexandraki K. et al., "Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines", Annals of the New York Academy of Sciences, 1084: 89-117, (2006)］；［Kumar N.P. et al. 2015. Eur J Immunol. doi: 10.1002/eji.201545973 ahead of print］。ＩＬ－１７Ａは、いくつかの自己免疫疾患に関与することが周知の炎症誘発性サイトカインである。

【００２６】

免疫寛容

免疫系は自己抗原に寛容であり、すなわち、それは外来物質上に発現された抗原決定基と宿主の組織により発現された抗原決定基とを識別することができる。免疫寛容または免疫学的寛容と呼ばれる、宿主抗原を無視するシステムの能力は、免疫学的寛容を通じて自己抗原を認識することができる細胞の排除または不活性化を含む能動的なプロセスである［Fundamental immunology, 4th Edn, William E. Paul, Ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, (1999), at p. 2］。

【００２７】

免疫寛容は、その状態が最初に誘導された場所、すなわち、それが胸腺および骨髄（中枢）または他の組織およびリンパ節（末梢）のいずれかであるかに依存して、１）中枢性寛容または２）末梢性寛容に分類される。これらの形態の寛容が確立される生物学的機序は異なるが、生じる効果は類似する［Raker V. K. et al., "Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man", Front Immunol, Vol., 6(569): 1-11, (2015)］。

【００２８】

免疫系が非自己分子から自己分子を識別するように教育される重要な方法である中枢性寛容は、自己反応性リンパ球クローンが完全な免疫担当細胞へと成熟する前に除去することによって確立される。それは、ＴおよびＢリンパ球について、それぞれ胸腺および骨髄におけるリンパ球発達中に起きる［Sprent J. et al., "The thymus and central tolerance", Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, Vol. 356(1409): 609-616, (2001)］。これらの組織において、成熟するリンパ球は、胸腺の上皮細胞および胸腺樹状細胞または骨髄細胞によって提示される自己抗原に曝露される。自己抗原は、内在性発現、循環血

による末梢部位からの抗原の移入、および胸腺間質細胞の場合には転写因子ＡＩＲＥの作用による他の非胸腺組織のタンパク質の発現に起因して存在する［Murphy, Kenneth. Janeway's Immunobiology: 8th ed. Chapter 15: Garland Science. (2012), pp. 611-668］；［Klein L., "Aire gets company for immune tolerance", Cell, Vol. 163(4):794-795, (2015)］。自己抗原に強く結合する受容体を有するリンパ球は、自己反応性細胞のアポトーシスによって、またはアネルギーの誘導によって除去され、これは非反応性の状態を意味する［同上、ｐｐ．２７５－３３４における］。弱い自己反応性Ｂ細胞はまた、それらが、それらのＢ細胞受容体の刺激に応答しない免疫学的不活性の状態に維持され得る。いくつかの弱く自己を認識するＴ細胞は、代替的に制御性ナチュラルＴ細胞（ｎＴｒｅｇ細胞）へと分化し、それはＴ細胞の自己反応性の起こり得る場合を低下させるために末梢で見張りとして機能する［同上、ｐｐ．６１１－６６８において］。

【００２９】

Ｔ細胞が、直接的な組織損傷を引き起こすことができる細胞の主な集団であるので、除去の閾値は、Ｂ細胞に対してよりもＴ細胞においてより厳密である。さらに、Ｂ細胞がより多様な抗原を認識するようにすることは生物にとってより有利であり、それにより、それらがより多様な病原体に対する抗体を誘発することができる。Ｂ細胞は、同じ抗原を認識する、より自己制限的なＴ細胞による確認の後にのみ完全に活性化され得るので、自己反応性はしっかりチェックされている［Murphy, Kenneth. Janeway's Immunobiology: 8th ed. Chapter 8: Garland Sciences. pp. 275-334］。

【００３０】

このネガティブセレクションのプロセスは、外来抗原を認識する能力を維持しながら、個体自身の組織に対して強力な免疫応答を起こす可能性があるＴ細胞とＢ細胞の破壊を確実にする。リンパ球教育におけるこのステップは、自己免疫を防ぐのに有害である。リンパ球の発達と教育は胎児発生において最も活発であるが、未成熟リンパ球が生成されるに伴い生涯にわたって継続し、成体期において、胸腺が変性し、骨髄が縮小するに伴い遅くなる［Murphy, Kenneth. Janeway's Immunobiology: 8th ed. Chapter 8: Garland Sciences. (2012), pp. 275-334］；［Jiang T.T., "Regulatory T cells: new keys for further unlocking the enigma of fetal tolerance and pregnancy complications", J Immunol., Vol. 192(11): 4949-4956, (2014)］。

【００３１】

末梢性寛容は、Ｔ細胞およびＢ細胞の成熟および末梢組織およびリンパ節への侵入の後に、発達する［Murphy, Kenneth. Janeway's Immunobiology: 8th ed. Chapter 8: Garland Sciences. pp. 275-334］。それは、免疫応答を調整し、抗体を産生するよう進行するためにＢ細胞が必要とする確認シグナルをＢ細胞にもたらすＴ細胞、特にＣＤ４$^{+}$ヘルパーＴ細胞のレベルでの制御を主に含む多くの重複する機序によって説明されている。胸腺において排除されなかった、正常な自己抗原に対する不適切な反応性は、胸腺を離れるＴ細胞が比較的安全だが完全に安全ではないために起こり得る。いくつかは、Ｔ細胞が胸腺において遭遇しなかった自己抗原に応答し得る受容体（ＴＣＲ）を有するであろう［Murphy, Kenneth. Janeway's Immunobiology: 8th ed. Chapter 8: Garland Sciences. (2012), pp. 275-334］。胸腺における胸腺内ネガティブセレクションを回避する自己反応性Ｔ細胞は、それらが主にｎＴｒｅｇ細胞によって末梢組織において除去されない限り、細胞傷害を与え得る。

【００３２】

ＣＣＲ７は、Ｔ、Ｂ、および樹状細胞の二次リンパ器官への遊走に重要なホーミング受容体である［Forster R. et al., "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs", Cell, Vol. 99: 23-33, (1999)］。ＣＣＲ７に関する複数の役割が記載されており［Hopken U. E. et al., "The chemokine receptor CCR7 controls lymph node-dependent cytotoxic T cell priming in alloimmune responses", Eur J Immunol., Vol. 34:461-470, (2004)］、それは、中枢性寛容および末梢性寛容の誘導および維持を含む［

Hugues S. et al., "Immunity, 16:169-181, (2002)]。ＣＤ４５白血球の２つのアイソフォームの発現に基づいて、Ｔ細胞はしばしば、ナイーブおよび／またはエフェクターＣＤ４５ＲＡ$^{+}$Ｔ細胞もしくはメモリーＣＤ４５ＲＯ$^{+}$Ｔ細胞として特徴付けられる。

胸腺髄質上皮細胞で通常発現する自己免疫調節因子（Ａｉｒｅ）は、末梢自己抗原の異所性発現を媒介し、そして自己反応性Ｔ細胞の除去を媒介することによって免疫寛容における役割を果たす［Metzger T.C. et al., "Control of central and peripheral tolerance by Aire", Immunol. Rev. 2011, Vol. 241: 89-103, (2011)］。

ある特定の抗原に対する適切な反応性はまた、反復した曝露の後の寛容の誘導によっても抑制され得る。ナイーブなＣＤ４$^{+}$ヘルパー細胞は、末梢組織において、または状況に応じて近隣のリンパ組織（リンパ節、粘膜関連リンパ組織など）において、誘導Ｔｒｅｇ細胞（ｉＴｒｅｇ細胞）へと分化する。この分化は、Ｔ細胞活性化の際に産生されるＩＬ－２、および寛容化樹状細胞（ＤＣ）または他の抗原提示細胞を含む様々な供給源のいずれかからのＴＧＦ－βによって媒介される［Curotto de Lafaille et al., "Effective recruitment and retention of older adults in physical activity research: PALS study", Immunity, Vol. 30(6): 626-635, (2009)］。

【００３３】

Ｔメモリー細胞

適応免疫応答による病原体の認識と根絶の後、Ｔ細胞の大多数（９０～９５％）がアポトーシスを起こし、残りの細胞がセントラルメモリーＴ細胞（ＴＣＭ）、エフェクターメモリーＴ細胞（ＴＥＭ）、およびレジデントメモリーＴ細胞（ＴＲＭ）と呼ばれるメモリーＴ細胞のプールを形成する［Clark, R.A., "Resident memory T cells in human health and disease", Sci. Transl. Med., 7, 269rv1, (2015)］。

【００３４】

標準的なＴ細胞と比較して、これらのメモリーＴ細胞は、特異的な表面マーカーの発現、異なるサイトカインプロファイルの迅速な産生、直接エフェクター細胞機能の能力、および固有のホーミング分布パターンなどの異なる表現型を伴い長寿命である。メモリーＴ細胞は、攻撃者の再感染を排除し、それによって免疫系のバランスを迅速に回復するために、それらの対応する抗原に再曝露する際に迅速な反応を示す。自己免疫メモリーＴ細胞が、自己免疫疾患を治療または治癒するためのほとんどの試みを妨げることを実証する証拠が増えている［Clark, R.A., "Resident memory T cells in human health and disease", Sci. Transl. Med., Vol. 7, 269rv1, (2015)］。

【００３５】

自己免疫

宿主分子上の抗原決定基／エピトープに対する組織損傷性免疫応答を引き起こす免疫学的寛容の確立の失敗または自己抗原の異常な提示は、しばしば自己免疫疾患をもたらし、これは生体の組織がそれ自身の免疫系によって攻撃されるときに起こる疾病を意味する［Round J.L. et al., "Coordination of tolerogenic immune responses by the commensal microbiota", J Autoimmun, Vol. 34(3): 220-225, (2010）］；［Choi J. et al., "The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-an update", Curr Opin Immunol, Vol. 24(6): 651-657, (2012)］。自己免疫性であるかまたは主要な自己免疫成分を有する例示的な疾患には、非限定的に、アジソン病、円形脱毛症（ＡＡ）、アミロイドーシス、セリアック病、クローン病、糸球体腎炎、橋本甲状腺炎、多発性硬化症、１型糖尿病、重症筋無力症、多発性筋炎、乾癬、関節リウマチ、強皮症、シェーグレン症候群、および全身性エリテマトーデスが含まれる。ある自己免疫疾患が存在すると、別の同時の自己免疫疾患を発症する可能性が高くなる。

【００３６】

グルコース恒常性

通常、グルコース摂取に続いて、血漿グルコース濃度の増加がインスリン放出を引き起こし、それは内臓（肝臓および胃腸組織）ならびに末梢グルコースの取り込みを刺激し、内在性（主に肝臓）のグルコース産生を抑制する。健康な成人において、血中グルコース

レベルは７０～９９ｍｇ／ｄＬの範囲内で厳密に調節され、そして代謝要求を満たすために特定のホルモン（例えば、インスリン、グルカゴン、インクレチン）、ならびに中枢神経系および末梢神経系によって維持される。脳、筋肉、消化管、肝臓、腎臓、および脂肪組織内の様々な細胞および組織もまた、取り込み、代謝、貯蔵、および分泌による血中グルコース調節に関与している［DeFronzo R.A., "Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus" Med. Clin. N. Am., Vol. 88: 787-835 (2004)］；［Gerich J.E., "Physiology of glucose homeostasis", Diabetes Obes. Metab. Vol. 2: 345-350, (2000)］。通常の生理的状況下では、高炭水化物食を摂取した後さえ、グルコースレベルが１４０ｍｇ／ｄＬを超えることはまれである。

【００３７】

強力な抗脂肪分解（脂肪分解を阻害する）ホルモンであるインスリンは、グルコースのインスリン感受性細胞への輸送を促進し、膵臓のランゲルハンス島内でのグリコーゲン生成（グルコースからグリコーゲンへの変換）および脂質生成（脂肪形成）を介した貯蔵化合物へのグルコースの変換を促進することによって血中グルコースレベルを下げることが知られ、β細胞がインスリンを産生する。

【００３８】

グルコース恒常性においても役割を果たすホルモンであるグルカゴンは、低い正常グルコースレベルまたは低血糖症に応答してランゲルハンス島内のα細胞によって産生され、そしてグリコーゲン分解を加速しそしてグルコース新生を促進することによってグルコースレベルを増加させるように作用する。グルコース含有の食事の後、グルカゴン分泌は高インスリン血症によって阻害され、これは肝臓グルコース産生の抑制および正常な食後グルコース耐性の維持に寄与する。

【００３９】

グルコース依存性インスリン分泌促進性ポリペプチド（ＧＩＰ）およびグルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）を含むインクレチンもまた、部分的にはインスリンおよびグルカゴンに対するそれらの作用によって血中グルコースの調節に関与している［Drucker D.J. et al., "The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes", Lancet, Vol. 368: 1696-1705, (2006)］。ＧＬＰ－１とＧＩＰとの両方は、グルコース依存性ホルモンと考えられ、それらは、グルコースレベルが通常の空腹時血漿グルコースレベルを超えて増加したときにのみ分泌されることを意味する。通常、これらのホルモンは食事に応答して放出され、そして膵臓β細胞上のある特定の受容体を活性化することによって、それらはインスリン分泌の刺激を助ける。しかしながら、グルコースレベルが低いとき、ＧＬＰ－１およびＧＩＰのレベル（およびそれらのインスリン分泌に対する刺激効果）は減少する［Drucker D.J., "The biology of incretin hormones", Cell Metab. Vol. 3: 153-165, (2006)］。

【００４０】

プレプログルカゴン由来ペプチドのグルカゴン、ＧＬＰ１およびＧＬＰ２は、中枢神経系、腸のＬ細胞、ならびに膵臓および胃のα細胞において発現するプレプログルカゴン遺伝子によってコードされている。プロホルモン変換酵素（ＰＣ）による翻訳後切断は、これら全てのペプチドを生成するプレグルカゴンホルモンの成熟に関与している。各組織における異なるＰＣの亜種の発現は、各々異なるペプチドの産生を媒介する。α細胞では、優勢なプロタンパク質変換酵素スブチリシン／ケキシン２型（ＰＣＳＫ２）が、産物であるグリセンチン、グリセンチン反復膵臓ポリペプチド、介在ペプチド１および主要プログルカゴン断片と共にグルカゴンの産生をもたらす［Dey A. et al., "Significance of prohormone convertase 2, PC2, mediated initial cleavage at the proglucagon interdomain site, Lys70-Arg71, to generate glucagon", Endocrinol., Vol. 146: 713-727, (2005)］。腸内分泌細胞では、ＰＣＳＫ１／３酵素がプレプログルカゴンホルモンを切断し、グリセンチン、介在ペプチド１およびオキシントモジュリンと共にＧＬＰ１およびＧＬＰ２を生成する［Mojsov S., "Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing", J.

Biol. Chem., Vol. 261: 11880-11889 (1986)］。ある特定の条件下で、膵島α細胞はＧＬＰ－１産生のための腸管外部位である［Portha B. et al., "Activation of the GLP-1 receptor signalling pathway: a relevant strategy to repair a deficient beta-cell mass", Exptl Diabetes Res. Article 376509: 1-11, (2011)］。ＧＬＰ－１の多くの観察された細胞効果のうちの１つは、電位依存性カルシウムチャネルを介するCa^{2+}流入を開始し、そしてインスリンのエキソサイトーシス放出を引き起こすβ細胞K_{ATP}チャネルの阻害である［MacDonald P.E. et al., "The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion", Diabetes, Vol. 51 (Suppl. 3): S434-S442, (2002)］。

【００４１】

細胞内へのグルコース輸送

グルコースは全ての細胞膜を通って容易に拡散することはできないので、ほとんどの細胞に入るためにはインスリンと輸送タンパク質のファミリー（促進性グルコース輸送体［ＧＬＵＴ］分子）との両方からの補助を必要とする。［Bryant, et al, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. "Regulated transport of the glucose transporter GLUT 4", Vol. 3(4): 267-277, (2002)］。ＧＬＵＴはシャトルとして作用し、そうでなければ疎水性である細胞膜を横切る水性の孔を形成し、それを通してグルコースはより容易に移動することができる。１２個の既知のＧＬＵＴ分子のうち、ＧＬＵＴ４は脂肪、筋肉、および心臓組織の主要な輸送体と考えられているが、ＧＬＵＴ１、２、３、および８は他の器官（例えば、脳、肝臓）へのグルコース流入を促進する。ＧＬＵＴ４の活性化、そして次に筋肉および脂肪組織へのグルコース拡散の促進はインスリンの存在に依存するが、一方で他のＧＬＵＴの機能はインスリンとはより独立している［Uldry M. et al., "The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters", Thorens B, Eur. J. Physiol. 2004;Vol. 447: 480-489, (2004)］。

【００４２】

末梢組織におけるグルコース取り込みの大部分（≧８０％）は筋肉内で起こり、グルコースはエネルギーのために直ちに使用されるか、またはグリコーゲンとして貯蔵され得る。骨格筋はインスリン依存性であり、したがって、グリコーゲンの産生を調節する主要な酵素であるグリコーゲンシンターゼの活性化はインスリンを必要とする。脂肪組織は、はるかに少量の末梢グルコースの取り込み（２％～５％）に関与しているが、貯蔵されたトリグリセリドからの遊離脂肪酸（これはグルコース新生を増加させる）の放出を調節することによって全身のグルコース恒常性の維持に重要な役割を果たし、筋肉および肝臓のインスリン感受性に影響を与える。

肝臓はグルコース取り込みを促進するためにインスリンを必要としないが、グルコース生産量を調節するためにインスリンを必要とする。したがって、例えば、インスリン濃度が低いと、肝臓のグルコース生産量は上昇する。さらに、インスリンは、グリコーゲンの形態で吸収されたグルコースのほとんどを肝臓が貯蔵するのを助ける。

腎臓は、循環系へのグルコースの放出（グルコース新生）、腎臓のエネルギー需要を満たすための循環系からのグルコースの取り込み、および近位尿細管でのグルコースの再吸収を介してグルコース恒常性において役割を果たす。腎臓はまた、尿中でのその排泄を促進することによって過剰なグルコース（レベルが約１８０ｍｇ／ｄＬを超えるとき、この閾値は慢性高血糖症の間に上昇する可能性がある）の排除を助ける。

【００４３】

ヒト膵島の細胞構造

ヒト膵島において、インスリン含有β細胞は、膵島内の他の細胞型と混在しており、すなわち、インスリン、グルカゴン、およびソマトスタチンを含有する細胞は、ヒト膵島全体に分布していることが見出されている［Cabrera O. et al., "The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function", Proc. Natl Acad. Sci. U.S., Vol. 103: 2334-2339, (2006)］。ヒトの膵島は明らかな細分化を示さないが、α細胞の９０％がβ細胞と直接接触しており、β細胞は膵島全体に

わたって他の内分泌細胞と自由に混在している。β、α、およびδ細胞は、膵島内の血管への同等かつランダムなアクセスを有し、異なる内分泌細胞が血管の周囲の層に組織化されている可能性を排除している。これらの結果は、膵島灌流の決められた順番が存在せず、そして任意の所与の細胞型がそれ自身の細胞型を含む他の細胞型に影響を及ぼし得るモデルを支持する［G. da Silva Xavier et al., "Per-arnt-sim (PAS) domain-containing protein kinase is downregulated in human islets in type 2 diabetes and regulates glucagon secretion", Diabetologia, Vol. 54: 819-827, (2011)］。

【００４４】

自己免疫疾患としての糖尿病

糖尿病は、高血糖症を特徴とする一群の代謝性疾患である。慢性高血糖症は、眼、腎臓、神経、心臓、および血管を含む器官の長期的な損傷、機能障害、および起こり得る不全に関連する。糖尿病を治療するための理想的な治療薬はまだ開発されていない。

【００４５】

１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）

１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）において、β細胞は、自己免疫プロセスによって破壊され、大部分がα細胞によって置き換えられている［Unger R.H. et al., "Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes", Proc. Natl Acad. Sci., U.S., Vol. 107(37): 16009-16012, (2010)］。これらのα細胞は、並置されたβ細胞からのインスリンの高局所濃度によって通常提供される持続性の制限を欠き、不適切な高グルカゴン血症をもたらし［Raskin P. et al. Glucagon and diabetes. The Medical Clinics of North America 62, 713 (1978)］；［Habener J. F. et al., "Alpha cells some of age", Trends in Endocrinology & Metabolism: TEM Vol. 24, 153-163 (2013)];[Unger R.H. et al., "Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover", J. Clinical Investig. Vol. 122(1): 4-12, (2012)］；［Vuguin P.M. et al. "Novel insight into glucagon receptor action: lessons from knockout and transgenic mouse models", Diabetes, Obesity & Metabolism, Vol. 13(1), 144-150, (2011)］、それは、グルカゴン分泌を増加させる高血糖の急増を引き起こす［Unger R.H. et al., "Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover", J. Clinical Investig. Vol. 122(1): 4-12, (2012)］。超常的インスリンレベルは、隣接するβ細胞が正常な膵島のα細胞に与えるインスリンと一致させるために必要とされる。これは生涯にわたる高インスリン血症をもたらし、それは対象を低血糖症の頻繁な発生にさらし、それは血管壁における低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）の蓄積のような続発症を増加させ、アテローム性動脈硬化症の閉塞および冠状動脈疾患を引き起こす。

【００４６】

Ｔ１Ｄの４つの病理学的特徴は血中グルコースレベル、ヘモグロビンＡ１Ｃ、グルカゴン、およびＣ－ペプチドである。

Ｔ１Ｄにおける免疫機能障害は複雑であり、膵島と膵臓外との両方に影響を及ぼす。免疫系の異なる構成要素［例えば、ＣＤ４$^{+}$、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、Ｔ制御性細胞（Ｔｒｅｇ）、Ｂ細胞、樹状細胞（ＤＣ）、単球／マクロファージ／（Ｍｏ／Ｍφ）、ナチュラルキラーＴ細胞（ＮＫＴ）］は全て、Ｔ１Ｄの自己免疫応答に能動的に寄与することが想定されているため、疾患を有する個体を超えて効果のある効果的かつ成功した治療または治療法を開発するための起こり得る努力は、難しいものとなる。いくつかの臨床治験［Bach J.F., "Anti-CD3 antibodies for type 1 diabetes: beyond expectations", Lancet., Vol. 378: 459-460, (2011)］；［Wherrett D.K. et al., "Antigen-based therapy with glutamic acid decarboxylase (GAD) vaccine in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomized double-blind trial", Lancet., Vol. 378: 319-327, (2011)］は、Ｔ１Ｄの治療法の開発および治療法の発見における障害を明らかにし、免疫系の１つまたはいくつかの構成要素の膵臓効果を標的とするよりもむしろ局所膵臓レベルと全身レベルとの両方で包括的な免疫調節をもたらすアプローチの必要性を指摘する。

【００４７】
Ｔ１Ｄにおける自己免疫の可能性のある誘因には、非限定的に、自己免疫の発症を開始または増強するために独立してまたは共同して作用し得る遺伝的、エピジェネティック、物理的、社会的、および環境的因子が含まれる。免疫系におけるＴ１Ｄ関連機能障害は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、単球／マクロファージ、樹状細胞（ＤＣ）、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、およびナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞を含む複数の細胞型および標的における機能障害に起因する［Lehuen A. et al., "Immune cell crosstalk in type I diabetes", Nat Rev Immunol. Vol. 10: 501-513, (2010)］。Ｔ１Ｄ関連自己免疫応答のポリクローナルな性質およびＴ１Ｄ患者における免疫調節の包括的な課題のために、自己免疫応答の１つまたは少数の構成要素のみを標的とする療法および治験は、Ｔ細胞に対する抗ＣＤ３　Ａｂ、Ｂ細胞に対する抗ＣＤ１９　Ａｂ、およびＧＡＤ　６５ワクチン接種を含む最近の試験が失敗したのとまったく同様に、失敗しそうである［Bach J.F., "Anti CD-3 antibodies for type 1 diabetes: beyond expectations", Lancet, Vol. 378: 459-460, (2011)];[Mathieu C. et al., "Arresting type I diabetes after diagnosis: GAD is not enough", Lancet, Vol. 378: 291-292, (2011)］。
幹細胞療法は破壊された膵島β細胞を置き換える手段として探求されてきたが、このアプローチは根本的な自己免疫応答を低下させることがなく、ほとんど役に立たない。
【００４８】
Ｔ１Ｄの根本的な自己免疫に対処する試みは成功しておらず［Zhao Y. et al., "Human cord blood stem cells and the journey to a cure for type 1 diabetes", Autoimmun Rev., Vol. 10: 103-107, (2010)］、それは、自己免疫応答のポリクローナルな性質およびＴ１Ｄ患者における免疫調節の包括的な課題のためである［Zhao Y. et al., "Human cord blood stem cells and the journey to a cure for type 1 diabetes", Autoimmun Rev., Vol. 10: 103-107, (2010)］；［Abdi R. et al., "Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes", Diabetes, Vol. 57: 1759-1767, (2008)］；［Aguayo-Mazzucato C. et al., "Stem cell therapy for type I diabetes", Nat Rev Endocrinol., Vol. 6: 139-148, (2010)］；［Uccelli A. et al., "Mesenchymal stem cells in health and disease", Nat Rev Immunol., Vol. 8: 726-736, (2008)］；［Zhao Y. et al., "Immune regulation of T lymphocyte by a newly characterized human umbilical cord blood stem cell", Immunol Lett., Vol. 108: 78-87, (2007)］。個別のアプローチの組み合わせがこれらの課題に対処するために提示された［Aguayo-Mazzucato C et al., "Stem cell therapy for type I diabetes mellitus", Nat Rev Endocrinol, Vol. 6: 139-148, (2010)］；［Zhao Y. et al., "Human cord blood stem cell-modulated regulatory T lymphocytes reverse the autoimmune-caused type 1 diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice", PLoS ONE, Vol. 4: e4226, (2009)］；［Zhao Y. et al., "Reversal of type 1 diabetes via islet β-cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells", BMC Med. Vol. 10(3), 1-11, (2012)］が、これらのアプローチに固守することは依然として複雑であり、しばしば非常に高費用である。
【００４９】
２型糖尿病
２型糖尿病（Ｔ２Ｄ）は、β細胞が存在する高血糖障害であり、したがって１型糖尿病と区別される。多数の因子がＴ２Ｄの発症に寄与しているが、中心的な欠陥は、ホルモン作用の複雑な経路における１つ以上の地点での不十分なインスリン分泌（インスリン欠乏）および／またはインスリンに対する組織応答の低下（インスリン抵抗性）である［Triplitt C.L., "Examining the mechanisms of glucose regulation", Am. J. Manag. Care, Vol. 18 (1 Suppl) S4-S10, (2012)］。高血糖症への寄与はＴ２Ｄのスペクトラム内で大きく異なり得るが、インスリン欠乏とインスリン抵抗性はしばしば共存する。
【００５０】

Ｔ２Ｄの病因が、膵島β細胞に影響を及ぼす炎症を開始させる自己免疫成分を含み、それが免疫調節によるインスリン抵抗性の機序および有望な治療への新たな洞察を提供するという証拠がある。いくつかの臨床試験は、Ｔ２Ｄ患者［Jagannathan-Bogdan M. et al., "Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes", Ｊ Immunol, Vol. 186: 1162-1172, (2011)］および肥満患者［Sumarac-Dumanovic M. et al., "Increased activity of interleukin-23/interleukin-17 proinflammatory axis in obese women", Int Ｊ Obes (Lond), Vol. 33: 151-156, (2009)］におけるＩＬ－１７産生のレベルの増加を示す。他の研究は、T_{H1}関連のサイトカインＩＬ－１２のレベルがＴ２Ｄの対象において増加することを示す［Wu H.P. et al., "High interleukin-12 production from stimulated peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes patients", Cytokine, Vol. 51: 298-304, (2010)］。

【００５１】

組織区画

多細胞生物において、共通の機能を果たすように特殊化された細胞は、通常、分泌された細胞外巨大分子である細胞外マトリックス（ＥＣＭ）の複雑なネットワークに埋め込まれた協同的集合体に組織化されて特殊化された組織区画を形成する。そのような組織区画内の個別の細胞は、ＥＣＭ巨大分子と接触している。ＥＣＭは細胞と区画を一緒に保持するのを助け、そして細胞が移動し互いに相互作用することができる組織化された格子または足場を提供する。多くの場合、区画内の細胞は、直接的な細胞間接着によって適所に保持され得る。脊椎動物において、そのような区画は４つの主要な種類：結合組織区画、上皮組織区画、筋肉組織区画、および神経組織区画であり得、これらは３つの胚性胚葉：外胚葉、中胚葉、および内胚葉に由来する。神経組織区画および上皮区画の一部は外胚葉から分化し、結合組織区画、筋肉組織区画、および上皮組織区画のさらなる部分は中胚葉に由来する［Kiecker C. et al., "Molecular specification of germ layers in vertebrate embryos", Cell Mol Life Sci., Epub ahead of print, (2015) PMID: 26667903］。

【００５２】

幹細胞ニッチ

成体組織区画は、生体内のそれらの位置に応じて決定された内胚葉性、中胚葉性、または外胚葉性の運命の多様な細胞系統に分化することができる成体幹細胞の内在性ニッチを含む。例えば、内部および外部シグナルの適切なセットの存在下で、骨髄由来成体造血幹細胞（ＨＳＣ）は、血液、内皮細胞、肝細胞、および筋肉細胞に分化する可能性を有し；脳由来神経幹細胞（ＮＳＣ）は、ニューロン、星状細胞、オリゴデンドロサイト、および血球に分化する可能性を有し；腸および表皮由来の成体上皮幹細胞（ＥｐＳＣ）は、上皮陰窩および表皮層の細胞を生じる可能性を有し；脂肪由来幹細胞（ＡＳＣ）は、脂肪、筋肉、軟骨、内皮細胞、ニューロン様細胞、および骨芽細胞を生じる可能性を有し；骨髄由来成体間葉系幹細胞（ＭＳＣ）は、骨、軟骨、腱、脂肪、筋肉、骨髄間質、および神経細胞を生じる可能性を有する［Hodgkinson T. et al., "Adult stem cells in tissue engineering", Expert Rev Med Devices, Vol. 6(6): 621-640］。

【００５３】

内在性成体幹細胞は、支持細胞と共に細胞ニッチを形成する、所与の組織区画のＥＣＭ成分内に埋め込まれている。ＥＣＭ足場内のそのような細胞ニッチは、周囲の微小環境と共に、幹細胞の単分化能前駆細胞への分化およびその後の前駆体細胞成熟を開始して特殊化した表現型および機能的特徴を有する成体組織細胞を形成するのに必要とされる増殖因子および転写因子を含む重要な生化学的および物理的シグナルに寄与する［Hodgkinson T. et al., "Adult stem cells in tissue engineering", Expert Rev Med Devices, Vol. 6(6): 621-640］。

【００５４】

増殖因子

増殖因子は、細胞表面受容体に結合し、細胞内シグナル伝達経路を誘発し、増殖、分化

、または他の細胞応答をもたらす細胞外ポリペプチド分子である。これらの経路はタンパク質および他の巨大分子の蓄積を刺激し、そしてそれらはそれらの合成速度を増加させることおよびそれらの分解速度を減少させることとの両方によってそれを実施する。増殖因子受容体によって活性化される１つの細胞内シグナル伝達経路には、ＡＴＰからのリン酸を細胞膜中のイノシトールリン脂質の３位に付加する酵素ＰＩ３－キナーゼが含まれる。ＰＩ３－キナーゼの活性化は、Ｓ６キナーゼを含むいくつかのタンパク質キナーゼの活性化をもたらす。Ｓ６キナーゼはリボソームタンパク質Ｓ６をリン酸化し、そのほとんどがリボソームの構成要素をコードするｍＲＮＡのサブセットを翻訳するリボソームの能力を増加させ、その結果、タンパク質合成が増加する。Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａにおいて Ｓ６キナーゼをコードする遺伝子が不活性化されているとき、細胞数は正常であるが、細胞サイズは異常に小さく、そして変異バエは小さい。増殖因子はｅＩＦ４Ｅと呼ばれる翻訳開始因子も活性化し、タンパク質合成と細胞増殖をさらに促進する［Farrar W.L. et al., "Hematopoietic growth-factor signal transduction and regulation of gene expression", Vol. 49: 379-410, (1990)］。

【００５５】

増殖因子刺激はまた、マイトジェンによるシグナル伝達において役割を果たす遺伝子調節タンパク質Ｍｙｃの産生増加をももたらす。Ｍｙｃは、細胞代謝および巨大分子合成に関与するタンパク質をコードするいくつかの遺伝子の転写を増加させる。このように、それは細胞代謝と細胞増殖との両方を刺激する［Grifoni D. et al., "Drosophila Myc: A master regulator of cellular performance", Vol. 1849(5): 570-581］。

【００５６】

血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）を含むいくつかの細胞外シグナルタンパク質は、増殖因子とマイトジェンとの両方として作用し、細胞増殖と細胞周期の進行との両方を刺激し得る。この機能的な重複は、これら２つのプロセスを制御する細胞内シグナル伝達経路における重複によって部分的に達成される。例えば、シグナル伝達タンパク質Ｒａｓは、増殖因子とマイトジェンとの両方によって活性化される。それは、細胞増殖を促進するためにＰＩ３－キナーゼ経路を刺激することができ、細胞周期の進行を引き起こすためにＭＡＰ－キナーゼ経路を刺激することができる。同様にＭｙｃは、細胞増殖と細胞周期の進行との両方を刺激する。増殖因子とマイトジェンとの両方として作用する細胞外因子は、細胞が増殖するにつれて細胞がその適切なサイズを維持するのを確実にするのを助ける［Kim W. S. et al., "The pivotal role of PDGF and its receptor isoforms in adipose-derived stem cells", Vol. 30(7), 793-799］。

【００５７】

多くのマイトジェン、増殖因子、および生存因子は、細胞周期の進行、細胞増殖、および細胞生存の正の調節因子であるため、それらは器官および生物のサイズを増大させる傾向がある。しかしながら、いくつかの組織において、細胞および組織のサイズはまた、正の調節因子に対抗し、それによって器官の増殖を阻害する阻害性細胞外シグナルタンパク質によっても影響を受ける。最もよく理解されている阻害性シグナルタンパク質は、ＴＧＦ－Ｉ３とその関連物である。ＴＧＦ－Ｉ３は、Ｇ１において細胞周期の進行を阻止することによって、またはアポトーシスを刺激することによって、いくつかの細胞型の増殖を阻害する。ＴＧＦ－Ｉ３は細胞表面受容体に結合し、Ｓｍａｄと呼ばれる遺伝子調節タンパク質の活性の変化をもたらす細胞内シグナル伝達経路を開始する。これは、細胞分裂および細胞死の調節因子をコードする遺伝子の転写における複雑な変化をもたらす。

【００５８】

ＴＧＦ－Ｉ３ファミリーのメンバーである骨形成タンパク質（ＢＭＰ）は、マウスの足の発達中の指の間の組織を除去するアポトーシスを引き起こすのを助ける。ＴＧＦ－１３と同様に、ＢＭＰは、細胞死を調節する遺伝子の転写における変化を刺激する［Ehrlich M., "Endocytosis and trafficking of BMP receptors: Regulatory mechanisms for fine-tuning the signaling response in different cellular contexts", Cytokine Growth Factor Rev. Epub ahead of print PMID:26776724, (2016)］。

【００５９】
線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）
線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）ファミリーは、現在、構造的に関連した１ダースを超えるメンバーを有する。ＦＧＦ１は酸性ＦＧＦとしても知られている。ＦＧＦ２は、場合によっては、塩基性ＦＧＦ（ｂＦＧＦ）とも呼ばれ、ＦＧＦ７は、場合によっては、ケラチノサイト増殖因子という名前で呼ばれることもある。脊椎動物において、１ダースを超える異なるＦＧＦ遺伝子が知られている。それらは、異なる組織においてそれらのＲＮＡスプライシングまたは開始コドンを変えることによって数百のタンパク質アイソフォームを生成することができる。ＦＧＦは、線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）と呼ばれる１組の受容体型チロシンキナーゼを活性化することができる。受容体型チロシンキナーゼは細胞膜を通って伸長するタンパク質である。パラクリン因子に結合するタンパク質の一部が細胞外側にあり、一方休眠状態のチロシンキナーゼ（すなわちＡＴＰを分割することによって別のタンパク質をリン酸化することができるタンパク質）は細胞内側にある。ＦＧＦ受容体がＦＧＦと結合すると（そしてそれがＦＧＦと結合するときにのみ）、休眠状態のキナーゼが活性化され、応答細胞内のある特定のタンパク質をリン酸化し、それらのタンパク質を活性化する［Li X. et al., "Fibroblast growth factors, old kids on the new block", Semin Cell Dev Biol. Epub ahead of print, PMID: 26768548, (2016)］。
【００６０】
ＦＧＦは、血管形成（血管の形成）、中胚葉形成、および軸索伸長を含むいくつかの発生機能と関連している。ＦＧＦはしばしば互いに代用することができるが、それらの発現パターンはそれらに別々の機能を与える。ＦＧＦ２は血管形成において特に重要であるが、一方でＦＧＦ８は中脳および四肢の発生に関与している［Peng et al., "Stems Cells and Development", Vol. 17: 761-774, (2008)］。
ＶＥＧＦ、ＩＧＦ、ＰＤＧＦ、ＨＧＦ、ＦＧＦ、ＴＧＦβ、アンジオポエチン－１、および幹細胞因子（ＳＣＦ）などの血管新生因子の発現レベルは、骨由来、軟骨由来、および脂肪由来のＭＳＣの間で異なることが見出されている［Peng et al., "Stems Cells and Development", Vol. 17: 761-774, (2008)］。
【００６１】
インスリン様増殖因子（ＩＧＦ－１）
インスリンと分子構造が似ているホルモンであるＩＧＦ－１は、生体内のほぼ全ての細胞、特に骨格筋、軟骨、骨、肝臓、腎臓、神経、皮膚、造血細胞、および肺で増殖促進効果を有する。それは小児期の成長において重要な役割を果たしており、成人において同化作用を有し続けている。ＩＧＦ－１は主に肝臓によって内分泌ホルモンとして、ならびに標的組織においてパラクリン／オートクリン様式で産生される。産生は成長ホルモン（ＧＨ）によって刺激され、栄養失調、成長ホルモン不感受性、成長ホルモン受容体の欠如、またはＳＨＰ２およびＳＴＡＴ５Ｂを含む下流のシグナル伝達分子の不全によって抑制されることがある。その主な作用は、多くの組織中の多くの細胞型に存在するその特異的受容体であるインスリン様増殖因子１受容体（ＩＧＦ１Ｒ）への結合によって媒介される。受容体型チロシンキナーゼであるＩＧＦ１Ｒへの結合により、細胞内シグナル伝達が開始され、ＩＧＦ－１は、ＡＫＴシグナル伝達経路の最も強力な天然の活性化因子の１つ、細胞増殖および増殖の刺激因子、ならびにプログラム細胞死の強力な阻害剤である。ＩＧＦ－１は成長ホルモン（ＧＨ）の効果の主要なメディエーターである。成長ホルモンは下垂体で作られ、血流中に放出され、そして次に肝臓を刺激してＩＧＦ－１を産生させる。次にＩＧＦ－１は、全身の生体の成長を刺激する。そのインスリン様効果に加えて、ＩＧＦ－１はまた、特に神経細胞における細胞の増殖および発生、ならびに細胞のＤＮＡ合成を調節することができる［Aquirre G.A. et al., "Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome, J. Trans. Med., Vol. 14(1): 1-23, (2016)］。
【００６２】
トランスフォーミング増殖因子β、ＴＧＦ－β
３０を超える構造的に関連したＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーが存在し、そ

れらは発生における最も重要な相互作用のいくつかを調節している。ＴＧＦ－βスーパーファミリー遺伝子によってコードされるタンパク質は、カルボキシ末端領域が成熟ペプチドを含むように処理される。これらのペプチドは、ホモ二量体（それ自体と共に）またはヘテロ二量体（他のＴＧＦ－βペプチドと共に）に二量体化され、そして細胞から分泌される。ＴＧＦ－βスーパーファミリーには、ＴＧＦ－βファミリー、アクチビンファミリー、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）、Ｖｇ－１ファミリー、ならびにグリア由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ、腎臓および腸管ニューロンの分化に必要）および哺乳動物の性別決定に関与するミュラー管抑制因子を含む他のタンパク質が含まれる。ＴＧＦ－βファミリーメンバーＴＧＦ－β１、２、３、および５は、細胞間の細胞外マトリックスの形成の調節および細胞分裂の調節（正と負との両方）において重要である。ＴＧＦ－β１は、コラーゲンおよびフィブロネクチン合成を刺激することによって、ならびにマトリックス分解を阻害することによって、上皮細胞が作る細胞外マトリックスの量を増加させる。ＴＧＦ－βは、上皮が分岐して、腎臓、肺、および唾液腺の管路を形成できる場所と時期を制御するのに重要である可能性がある［Aschner Y. et al., "Transforming Growth Factor-β: Master Regulator of the Respiratory System in Health and Disease", Am J Respir Cell Mol Biol, Epub ahead of print PMID: 26796672, (2016)］。

【００６３】

ＢＭＰファミリーのメンバーはもともとその骨形成を誘導する能力によって発見された。しかしながら、骨形成はそれらの多くの機能のうちの１つにすぎず、それらは細胞分裂、アポトーシス（プログラム細胞死）、細胞遊走、および分化を調節することが見出されている。ＢＭＰは、これが成熟ポリペプチド中に９個ではなく７個の保存されたシステインを有することによって、ＴＧＦ－βスーパーファミリーの他のメンバーと区別することができる。ＢＭＰには、Ｎｏｄａｌ（左右軸形成に関与）およびＢＭＰ４（神経管極性、眼の発生、および細胞死に重要）などのタンパク質が含まれる［Nettersheim D. et al., "BMP Inhibition in Seminomas Initiates Acquisition of Pluripotency via NODAL Signaling Resulting in Reprogramming to an Embryonal Carcinoma, PLOS Genet. Vol. 11(7): 1-26, (2015)］。

【００６４】

幹細胞

本明細書で使用されるとき、「幹細胞」という用語は、最終分化を経て１種を超える異なる細胞表現型へと分化することができる娘細胞を生成することができる、自己再生する能力を有する高い増殖能を有する未分化細胞を指す。幹細胞は、２つの特徴によって他の細胞型と区別される。第１に、それらは細胞分裂を通して、場合によっては、長期間の不活性の後にそれ自身を再生することができる非特殊化細胞である。第２に、ある特定の生理学的または実験的条件下において、それらは特別な機能を有する組織または器官特異的細胞になるように誘導され得る。腸および骨髄などの一部の器官において、幹細胞が定期的に分裂して磨耗または損傷した組織を修復および置換する。しかしながら、膵臓および心臓などの他の器官において、幹細胞は特別な条件下でのみ分裂する［Romito A. et al., "Pluripotent Stem Cells: Current Understanding and Future Directions", Stem Cells Int., ID 9451492, 2016)］。

【００６５】

胚性幹細胞（ＥｍＳＣ）は多能性である胚に由来する幹細胞であり、すなわちそれらはインビトロで内胚葉性、中胚葉性、および外胚葉性細胞型に分化することができる［Thomson J. A. et al., "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts", Science, Vol. 282(5391): 1145-1147, (1992)］。

【００６６】

成体（体細胞）幹細胞は、組織または器官の分化した細胞の中に見られる未分化細胞である。インビボでのそれらの主な役割は、それらが見出される組織を維持および修復することである。成体幹細胞は、脳、骨髄、末梢血、血管、骨格筋、皮膚、歯、消化管、肝臓、卵巣上皮、および精巣を含む、多くの器官および組織で同定されている。成体幹細胞は

、それらが、組織を維持するためのより多くの細胞を維持するための通常の必要性によって、または疾患もしくは組織の損傷によって活性化されるまで長期間静止状態（分裂しない）のままであり得る、幹細胞ニッチとして知られる各組織の特定の領域に存在すると考えられている。成体幹細胞の例には、造血幹細胞、および間葉系幹細胞が含まれるが、これらに限定されない［Dzierzak E. et al., "Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells", Nature Immunol., Vol. 9(2): 129-136, (2008)］。

【００６７】

造血幹細胞（ＨＳＣ）

造血幹細胞（骨髄性およびリンパ性の細胞（ＣＦＵ－Ｍ、Ｌ）、またはＣＤ３４$^{+}$細胞のコロニー形成単位としても知られる）は、生涯の血球の継続的な生産に関与する造血器官内のまれな多能性細胞である［Li Y. et al., "Inflammatory signaling regulates embryonic hematopoietic stem and progenitor cell production", Genes Dev., Vol. 28(23): 2596-2612, (2014)］。

造血幹細胞が独占的に発現する単一細胞表面マーカーは存在しないが、ヒトＨＳＣが以下の抗原性プロファイルを有することが一般に認められている：ＣＤ３４$^{+}$、ＣＤ５９$^{+}$、Ｔｈｙｌ$^{+}$（ＣＤ９０）、ＣＤ３８ｌｏｗ／－およびＣ－ｋｉｔ－／ｌｏｗ。ＣＤ４５もまた、血小板と赤血球を除くＨＳＣの一般的なマーカーである。ＨＳＣは、赤血球、好中球、好塩基球、好酸球、血小板、肥満細胞、単球、組織マクロファージ、破骨細胞、ならびにＴおよびＢリンパ球を含む様々な細胞型を生成することができる。造血幹細胞の調節は、自己複製、生存および増殖、分化系列決定および分化を含む複雑なプロセスであり、固有の細胞プログラミングならびに微小環境間質との接着相互作用およびサイトカインの作用などの外部刺激を含む多様な機序によって調整される。

【００６８】

造血幹細胞を特定の経路に沿って分化させるためには、異なるパラクリン因子が重要である。血球とリンパ球の形成に関与するパラクリン因子はサイトカインと呼ばれる。サイトカインはいくつかの細胞型によって作ることができるが、それらは造血の部位で間質（間葉系）細胞の細胞外マトリックスによって回収されそして濃縮される。例えば、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）と多系統増殖因子ＩＬ－３との両方は骨髄間質のヘパラン硫酸グリコサミノグリカンに結合する。次に、細胞外マトリックスはこれらの因子をそれらの受容体に結合するのに十分に高い濃度で幹細胞に提示する［Alvarez S. et al., "GM-CSF and IL-3 activities in schistosomal liver granulomas are controlled by stroma-associated heparan sulfate proteoglycans", J Leukoc Biol., Vol. 59(3): 435-441, (1996)］。

【００６９】

間葉系幹細胞（ＭＳＣ）

間葉系幹細胞（ＭＳＣ）（骨髄間質幹細胞または骨格幹細胞としても知られる）は、様々な組織に見られる非血液成体幹細胞である。それらは、形態学的にそれらの紡錘形によって、それらの細胞表面上の特異的マーカーの発現によって、そして適切な条件下で、最低３系統（骨形成性、軟骨形成性、および脂肪生成性）に沿って分化するその能力によって、特徴付けられる［Najar M. et al., "Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells", Cytotherapy, Vol. 18(2): 160-171, (2016)］。

【００７０】

ＭＳＣ表現型に関するコンセンサスを欠くために、インビボでＭＳＣを明確に描写する単一のマーカーは同定されていないが、ＭＳＣは、細胞表面マーカーＣＤ１０５、ＣＤ１６６、ＣＤ９０、およびＣＤ４４について陽性であること、ならびにＭＳＣが、ＣＤ４５、ＣＤ３４、およびＣＤ１４などの典型的な造血性抗原について陰性であると一般的に考えられている。ＭＳＣの分化能に関して、研究は、骨髄由来ＭＳＣの集団が、インビトロとインビボとの両方で、骨、軟骨、腱、筋肉、脂肪組織、および造血支持間質を含む最終

分化間葉表現型に発達する能力を有することを報告している。トランスジェニックおよびノックアウトマウスおよびヒト筋骨格系障害を用いた研究は、胚発生および成体の恒常性の間にＭＳＣが複数の系統に分化することを報告している［Najar M. et al., "Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells", Cytotherapy, Vol. 18(2): 160-171, (2016)］。

【００７１】

インビボプロセスを再現する適切な条件下でのＭＳＣのインビトロ分化の分析は、幹細胞の決定に不可欠な様々な因子の同定をもたらした。とりわけ、分泌分子およびそれらの受容体（例えば、トランスフォーミング増殖因子－（β）、細胞外マトリックス分子（例えばコラーゲンおよびプロテオグリカン）、アクチン細胞骨格、ならびに細胞内転写因子（例えばＣｂｆａＩ／Ｒｕｎｘ２、ＰＰＡＲγ、Ｓｏｘ９、およびＭＥＦ２）が、多分化能ＭＳＣの特定の系統への決定を促進し、それらの分化した表現型を維持するのに重要な役割を果たすことが示されている［Davis L.A. et al., "Mesodermal fate decisions of a stem cell: the Wnt switch", Cell Mol Life Sci., Vol. 65(17): 2568-2574, (2008)］。

【００７２】

骨髄は、両方が他の細胞型に分化することができる成熟血球の前駆体細胞である造血細胞と広いスペクトラムの結合組織細胞の前駆体である間質細胞を含む様々な前駆体および成熟細胞型を含む［Wang J. S. et al., "The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications", J. Thorac. Cardiovasc. Surg., Vol. 122: 699-705, (2001)］；［Tomita S. et al., "Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function", Circulation, Vol. 100 (Suppl. II): 247-256, (1999)］；［Saito, T. et al., "Myogenic Expression of Mesenchymal Stem Cells within Myotubes of mdx Mice in Vitro and in Vivo", Tissue Eng., Vol. 1: 327-343, (1995)］。未修飾（すなわち、分画されていない）骨髄細胞または血液由来細胞が、いくつかの臨床試験、例えば［Hamano K. et al., "Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary result", Japan Cir. J., Vol. 65: 845-847, (2001)］；［Strauer B. E., et al., "Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans", Circulation, Vol. 106: 1913-1918, (2002)］；［Assmus et al., "Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)", Circulation., Vol. 106: 3009-3017, (2002)］；［Dobert N. et al., "Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI) ", Eur. J. Nuel. Med. Mol. Imaging., Vol. 8: 1146-51, (2004)］；［Wollert K. C. et al., "Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial", Lancet, Vol. 364: 141-148, (2004)］において使用されてきた。骨髄の単核画分は間質細胞、造血前駆体、および内皮前駆体を含むので、観察された効果に対するこれらの集団の各々による相対的な寄与は、もし存在すれば、未知のままである。

マウスモデルはＴｒｅｇの調節が自己免疫疾患の治療を強化することができることを示唆している［Allenbach et al., "Role of regulatory T cells in a new mouse model of experimental autoimmune myositis", Am J. Pathol., Vol. 174(3): 989-998, (2014)］。

【００７３】

臍帯幹細胞

臍帯幹細胞は、上皮組織区画の細胞の例である。インビボにおいて、２種類の臍帯幹細胞、すなわち造血幹細胞（ＵＣ－ＨＳ）および間葉系幹細胞が見出され得、次にそれらは

臍帯血（ＵＣ－ＭＳ）またはワルトン膠様質（ＵＣ－ＭＭ）に見出され得る。臍帯血は、以下のようないくつかの理由で移植用幹細胞の重要な供給源として長い間研究者の注目を集めてきた：（１）それは、骨髄よりも迅速に増殖する、より多くの数の体積単位当たりの原始造血幹細胞（ＨＳＣ）を含む；（２）移植後の拒絶反応の危険性がより少ない；（３）移植は（骨髄の場合とは異なり）完全なＨＬＡ抗原の一致を必要としない；（４）ＵＣ血液はすでに先天性代謝異常の治療において成功裏に使用されている；ならびに（５）そのような方法は長い間確立されているので、臍帯血からの単核細胞の収集および貯蔵のための新しい技術の必要がない［Mihu C. et al., "Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord", Romanian Journal of Morphology and Embryology, 2008, 49(4):441-446, (2008)］。

【００７４】

臍帯（ＵＣ）管および周囲の間葉（ワルトン膠様質として知られる結合組織を含む）は、胚性中胚葉および／または胚体外の中胚葉に由来する。したがって、これらの組織、ならびに原始生殖細胞は、ＭＳＣおよび多能性を有する可能性があるいくつかの細胞さえも含む、胚の原始線条の形成時に、近位外胚葉から分化する。ＵＣマトリックス物質は、成体骨髄間葉への移行状態にある原始間葉に由来すると推測される［Mihu C. et al., "Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord", Romanian Journal of Morphology and Embryology, 2008, Vol. 49(4):441-446, (2008)］。

【００７５】

胎盤および臍帯からの血液は、抗凝固物質を含む通常の献血バッグに比較的収集しやすい。単核細胞Ｆｉｃｏｌｌ勾配上での遠心分離により分離され、そこから以下の２つの幹細胞集団が分離される：（１）ある特定の特徴的なマーカー（ＣＤ３４、ＣＤ１３３）を発現する造血幹細胞（ＨＳＣ）；ならびに（２）ある特定の条件下（例えば、ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）またはウシ胎仔血清（ＦＣＳ）を含む改変マッコイ培地および管内層）で培養物表面に接着する間葉系幹細胞（ＭＳＣ）［Munn D. et al., "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism", Science, Vol. 281: 1191-1193, (1998)］；［Munn D. et al., "Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism", J Exp Med, Vol. 189: 1363-1372, (1999)］。臍帯血ＭＳＣ（ＵＣ－ＭＳ）はサイトカインを産生することができ、それは骨髄ＭＳＣと比較して、ドナーへの移植およびインビトロでのＨＳＣ生存を促進する［Zhang X. et al., "Successful immortalization of mesenchymal progenitor cells derived from human placenta and the differentiation abilities of immortalized cells", Biochem Biophys Res Commun, Vol. 351: 853-859, (2006)］。

【００７６】

胚細胞マーカー（例えば、転写因子ＯＴ－４およびＮａｎｏｇ、ステージ特異的胎児性抗原（ＳＳＥＡ）－３およびＳＳＥＡ－４）、および白血球共通抗原ＣＤ４５を示すが、ＣＤ３４陰性であり、それによって造血幹細胞（ＨＳＣ）、間葉系幹細胞（ＭＳＣ）、および単球／マクロファージ（Ｍｏ／Ｍφ）を含む他の公知の幹細胞型から区別される非常に低い免疫原性の臍帯血由来多分化能幹細胞（ＣＢ－ＳＣ）の集団が記載されている［Zhao Y. et al., "Successful immortalization of mesenchymal progenitor cells derived from human placenta and the differentiation abilities of immortalized cells", Exp. Cell Res., Vol. 312: 2454-2464, (2006)］；［Zhao Y. et al., "Reversal of type 1 diabetes via islet β-cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells", BMC Med., Vol. 10(3), 1-11, (2012)］；［Zhao Y. et al., "Immune regulation of T lymphocyte by a newly characterized human umbilical cord blood stem cell", Immunol. Lett., Vol. 108: 78-87, (2010)］。

【００７７】

ヒト臍帯血由来幹細胞（ＣＢ－ＳＣ）および間葉系幹細胞（ＭＳＣ）はインビトロで免

疫活性を調節することが示されている［Zhao Y. et al., "Human cord blood stem cells and the journey to a cure for type 1 diabetes", Autoimmun Rev., Vol. 10: 103-107, (2010］；［Abdi R. et al., "Immunomodulation by mesenchymal stem cells, A potential therapeutic strategy for type I diabetes", Diabetes, Vol. 57: 1759-1767, (2008)］；［Aguayo-Mazzucato C. et al., "Stem cell therapy for type I diabetes", Nat Rev Endocrinol, Vol. 6: 139-148, (2010)］；［Uccelli A. et al., "Mesenchymal stem cells in health and disease", Nat Rev Immunol, Vol. 8: 726-736, (2008)］；［Zhao Y. et al., "Immune regulation of T lymphocyte by a newly characterized human umbilical cord blood stem cell", Immunol Lett., Vol. 108: 78-87, (2007)］。その後の研究は、ＣＢ－ＳＣが、非肥満性糖尿病マウス（ＮＯＤ）における免疫機能の変更およびＴ１Ｄのマーカーの改善に使用できることを実証し［Zhao Y. et al., "Human cord blood stem cell-modulated regulatory T lymphocytes reverse the autoimmune-caused type 1 diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice", PLoS ONE, Vol. 4: e4226, (2009)］、ＣＢ－ＳＣは、共培養においてＴ１Ｄ患者由来の膵島細胞特異的病原性Ｔ細胞クローンの免疫機能を調節することが示されている［Zhao Y. et al., "Human cord blood stem cells and the journey to a cure for type 1 diabetes", Autoimmun Rev., Vol. 10: 103-107, (2010)］。動物モデルにおける研究はこれらの知見を実証しており、そしてＣＢ－ＳＣ処理が幹細胞移植を伴わずに膵島β細胞の天然集団の再生を可能にし得ることを示唆している［Zhao Y. et al., "Human cord blood stem cell-modulated regulatory T lymphocytes reverse the autoimmune-caused type 1 diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice", PLoS ONE, Vol. 4: e4226, (2009)］；［Zhao Y. et al., "Human cord blood stem cells and the journey to a cure for type 1 diabetes", Autoimmun Rev., Vol. 10: 103-107, (2010］。

【００７８】

Ｚｈａｏらは、患者の血液を、全血からリンパ球を分離し、接着性ＣＢ－ＳＣの存在下でリンパ球を短時間共培養し、その後「教育された」リンパ球を患者の循環系に戻すバイオリアクター装置と呼ばれる連続閉ループシステムを通して循環させる手順を開発した［Zhao Y. et al., "Reversal of type 1 diabetes via islet beta cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells", BMC Med, Vol. 10:3, (2012)］。非盲検第１／２相試験では、Ｔ１Ｄを有するアジア人家系の１２人の患者がバイオリアクター装置による単一治療を受け、アジア人家系の３人の患者が接着性ＣＢ－ＳＣなしで（すなわち、プロセス制御のみ）バイオリアクター装置による単一治療を受けた。製造元の推奨するプロトコールに従って、１６ゲージのＩＶ針を左（または右）肘正中皮静脈に配置し、患者の血液を血球分離器ＭＣＳ＋（Ｈａｅｍｏｎｅｔｉｃｓ（登録商標）、Ｂｒａｉｎｔｒｅｅ、ＭＡ）に３５ｍＬ／分で６～７時間通して、リンパ球を単離する。収集したリンパ球を同種異系ＣＢ－ＳＣ（またはＣＢ－ＳＣを含まないプロセス対照）に曝露するために装置に移し、他の血液成分を患者に戻した。装置内で２～３時間後、リンパ球を生理食塩水と共に重力流制御（２～３ｍＬ／分）下で手の背側静脈を介して患者の循環系に戻した。手順の最中に約１０，０００ｍＬの血液を処理したことによって、リンパ球画分に対して約２回の反復教育をもたらした。患者は２日間入院して体温をモニターし、治療後の有害反応について日常的な臨床血液検査を実施した。そのような１回の治療

【００７９】

アジア人の参加者の小群に基づく最初の結果は、治療が２回の静脈穿刺からの最小の痛みと有害事象を伴わずに全ての参加者で忍容性がよく、Ｃ－ペプチドレベルを顕著に改善することができ、中央値糖化ヘモグロビンＡ１Ｃ（ＨｂＡ１Ｃ）値を低下させることができ、いくらかのβ細胞機能が残存している患者（ｎ＝６）において、インスリンの中央値１日用量を低下させることができることを示した。

【００８０】

参加者の末梢血におけるＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$ Ｔｒｅｇの割合は、バイオリアクター装置治療の４週間後に顕著に増加したが、偽治療を受けている参加者の末梢血中のＴｒｅｇの割合はベースラインから変化しなかった。偽対照と比較して、処置群の参加者は、４週間の追跡調査でＴＧＦβ１の血漿レベルの顕著な増加を示したが、ＩＬ－１０の血漿レベルの変化を示さなかった。バイオリアクター装置治療の４週間後のリンパ球において、フローサイトメトリーは、Ｔｒｅｇの確立、維持、および有効性にとって不可欠であるＣＤ２８および誘導性共刺激（ＩＣＯＳ）の増加を明らかにしたが、両方の分子のレベルは偽対照において変化しなかった［Bour-Jourdan H. et al., "Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family", Immunol. Rev., Vol. 241: 180-205, (2011)］；［Hornbach A. A. et al., "Effective proliferation of human regulatory T cells requires a strong costimulatory CD28 signal that cannot be substituted by IL-2", J. Immunol., Vol. 179: 7924-7931, (2007)］；［Hori S., "Effective proliferation of human regulatory T cells requires a strong costimulatory CD28 signal that cannot be substituted by IL-2", Eur. J. Immunol., Vol. 40: 664-667, (2010)］；［Tang Q et al., "CTLA4 Expression Is an Indicator and Regulator of Steady-State CD4^{+} FoxP3^{+} T Cell Homeostasis", J. Immunol., Vol., 171: 3348-3352, (2003)］；［Vang K.B., et al., "Cutting edge: CD28 and c-Rel-dependent pathways initiate regulatory T cell development", J. Immunol., Vol. 184: 4074-77, (2010)］；［Herman A.E. et al., "CD4^{+} CD25^{+} T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabeti clesion", J. Expt Med. Vol. 199: 1479-1489, (2004)］；［Gotsman I. et al., "Impaired regulatory T-cell response and enhanced atherosclerosis in the absence of inducible costimulatory molecule", Circulation, Vol. 114: 2047-2055, (2006)］；［Nurieva R.I. et al., "Molecular mechnisms for T cell tolerance", Immunol. Rev. Vol, 241: 133-144, (2014)］；［Rudensky A.Y., "Regulatory T cells and Foxp3", Immunol. Rev., Vol. 241: 260-268, (2011)］。ＩＬ－４およびＩＬ－１２の発現は顕著に増加し、そしてＩＬ－５およびＩＬ－１３の発現は減少した。炎症誘発性ＩＬ－１７Ａの産生もまた治療後４週間で減少した。偽治療後にこれらのサイトカインのレベルに変化は観察されなかった。

連続閉ループシステムによる治療は、示唆的ではあるが、その使用期間中は人の付き添いを必要とし、そして使用するのに費用がかかるので、インキュベーションの効率が制限されるという点で市販するには実用的ではない。

【００８１】

記載する発明は、教育された単核細胞生成物を調製するための処理施設を使用する実用的な不連続システムを提供する。治療は２回の静脈穿刺のみを必要とし、典型的な輸血よりも感染の危険性が低く、そして幹細胞または使用済み試薬を患者に導入しない。さらに、ＣＢ－ＳＣは、非常に低い免疫原性を有するので、治療前にヒト白血球抗原（ＨＬＡ）を一致させる必要性を排除する。このアプローチは、他のアプローチに関連する安全性および倫理的懸念を軽減しながら、複数の自己免疫疾患のためのＣＢ－ＳＣ媒介性免疫調節療法を提供し得る。このアプローチの相対的な単純さはまた、他のアプローチと比較してコストと時間の節約をもたらし得る。

【発明の概要】

【００８２】

一態様によると、記載された発明は、リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患を治療する方法であって、順番に、（１）リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患に罹患している対象からの単核細胞を含む全血試料を滅菌条件下で取得することと；（２）（１）の全血試料を処理施設に搬送することと；（３）全血試料から単核細胞（ＭＮＣ）を滅菌的に精製して単核細胞調製物を形成することと；（４）単核細胞調製物を、接着性臍帯血幹細胞（ＵＣ－ＳＣ）の生存可能な集団を含むバイオリアクター装置に導入することであって、

接着性ＵＣ－ＳＣが少なくとも８０％コンフルエントであることと；（５）単核細胞調製物中の単核細胞とＣＢ－ＳＣが滅菌条件下で少なくとも０．１時間、少なくとも０．２時間、少なくとも０．３時間、少なくとも０．４時間、少なくとも０．５時間、少なくとも０．６時間、少なくとも０．７時間、少なくとも０．８時間、少なくとも０．９時間、少なくとも１．０時間、少なくとも１．５時間、少なくとも２時間、少なくとも２．５時間、少なくとも３時間、少なくとも３．５時間、少なくとも４時間、少なくとも４．５時間、少なくとも５時間、少なくとも５．５時間、少なくとも６時間、少なくとも６．５時間、少なくとも７時間、少なくとも７．５時間、または少なくとも８時間相互作用することができるように単核細胞調製物をＣＢ－ＳＣと共培養して、教育された単核細胞生成物を形成することと；（６）教育された単核細胞生成物をバイオリアクター装置から滅菌条件下で採取することと；（７）少なくとも10^4、少なくとも10^5、少なくとも10^6、少なくとも10^7、少なくとも10^8、少なくとも10^9、または、少なくとも10^{10}の単核細胞を有する、教育された単核細胞生成物の純度、滅菌性、およびパーセント生存率を確認することと；（８）教育された単核細胞生成物を対象への血管内注入のための臨床施設に搬送することと；（９）治療有効量の教育された単核細胞生成物を対象に血管内注入すること；及び（１０）対象の生涯にわたって必要に応じて複数の注入日で、ステップ（１）から（９）を順番に繰り返すことを含み、治療有効量の教育された単核細胞生成物は、対象のＴ細胞区画における自己反応性を調節するのに有効であり得、かつリンパ球の自己反応性を特徴とする疾患の症状を軽減するのに有効であり得る、方法を提供する。一実施形態によると、対象は白人民族である。別の実施形態によると、リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患は、自己免疫疾患である。別の実施形態によると、自己免疫疾患は糖尿病である。別の実施形態によると、自己免疫疾患は１型糖尿病である。別の実施形態によると、自己免疫疾患は２型糖尿病である。別の実施形態によると、臍帯血単核幹細胞は単離された単核細胞と同種異系である。別の実施形態によると、方法は、（ａ）健康なドナーから取得した新鮮な臍帯血ユニットを取得することと；（ｂ）密度勾配遠心分離により臍帯血から単核細胞画分を単離することと；（ｃ）赤血球を除去することと；（ｄ）ＵＣ単核細胞を生理緩衝食塩水で洗浄することと；（ｅ）バイオリアクター内で無血清培地中に少なくとも1×10^6細胞の播種密度でＵＣ単核細胞を播種することと；（ｆ）ＵＣ単核細胞を無血清培地で培養し、２～３日ごとに半分の培地又は前記培地を交換して非接着性細胞を除去し、少なくとも１０日間、少なくとも８０％コンフルエントまで増殖させることと；（ｇ）（ｆ）におけるコンフルエントな接着性ＵＣ－ＳＣの試料の滅菌性および生存性を確認することとを順番に含むプロセスによって、ＵＣ－ＳＣを含む生物医学装置を調製することをさらに含む。

【００８３】

別の態様によると、記載された発明は、治療量の教育された単核細胞生成物を含む医薬であって、教育された単核細胞生成物が、（１）リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患に罹患している対象からの単核細胞を含む全血試料を滅菌条件下で取得することと；（２）（１）の全血試料を処理施設に搬送することと；（３）全血試料から単核細胞（ＭＮＣ）を滅菌的に精製して単核細胞調製物を形成することと；（４）単核細胞調製物を接着性臍帯血幹細胞（ＵＣ－ＳＣ）の生存可能な集団を含むバイオリアクター装置に導入することであって、接着性ＵＣ－ＳＣが少なくとも８０％コンフルエントであることと；（５）単核細胞調製物中の単核細胞とＣＢ－ＳＣが滅菌条件下で少なくとも０．１時間、少なくとも０．２時間、少なくとも０．３時間、少なくとも０．４時間、少なくとも０．５時間、少なくとも０．６時間、少なくとも０．７時間、少なくとも０．８時間、少なくとも０．９時間、少なくとも１．０時間、少なくとも１．５時間、少なくとも２時間、少なくとも２．５時間、少なくとも３時間、少なくとも３．５時間、少なくとも４時間、少なくとも４．５時間、少なくとも５時間、少なくとも５．５時間、少なくとも６時間、少なくとも６．５時間、少なくとも７時間、少なくとも７．５時間、または少なくとも８時間相互作用することができるように単核細胞調製物をＣＢ－ＳＣと共培養して、教育された単核細胞生成物を形成することとを含むプロセスによって産生され、治療有効量の教育された

単核細胞生成物は、対象のＴ細胞区画における自己反応性を調節するのに有効であり、かつリンパ球の自己反応性を特徴とする疾患の症状を軽減するのに有効であり、

【００８４】

教育された単核細胞生成物が、少なくとも１×１０^{8}、少なくとも１×１０^{9}、または１×１０^{10}の単核細胞と；（ｉｉ）T_{EM} ＣＤ４$^{+}$、T_{EM} ＣＤ８$^{+}$、T_{CM} ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{CM} ＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{CM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{-}$、T_{CM} ＣＤ４$^{+}$、T_{CM} ＣＤ８$^{+}$、ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ナイーブＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{EM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４$^{+}$、T_{EM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ８$^{+}$、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{-}$、T_{EM} ＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ＣＤ４$^{+}$ＨＬＡ$^{-}$ＤＲ$^{+}$、およびＣＤ８$^{+}$ＨＬＡ$^{-}$ＤＲ$^{+}$細胞からなる群から選択されるＴ細胞の調節された集団とを含む、医薬を提供する。一実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、未処理の対照と比較して、T_{EM} ＣＤ４$^{+}$細胞の低減した亜集団およびT_{EM} ＣＤ８$^{+}$細胞の亜集団を含む。別の実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、未処理の対照と比較して、T_{CM} ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＣＲ７$^{+}$細胞の亜集団およびT_{CM} ＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$細胞の亜集団が増加している。別の実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、未処理の対照と比較して、T_{CM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$細胞の亜集団が増加している。別の実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、未処理の対照と比較して、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{-}$細胞の亜集団が低減している。別の実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、未処理の対照と比較して、T_{CM} ＣＤ４$^{+}$細胞の亜集団およびT_{CM} ＣＤ８$^{+}$細胞の亜集団が増加している。別の実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、未処理の対照と比較して、ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$Ｔ細胞の亜集団およびナイーブＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$Ｔ細胞の亜集団が増加している。別の実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、未処理の対照と比較して、ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$Ｔ細胞の亜集団が増加している。別の実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、未処理の対照と比較して、T_{EM} ＣＤ４$^{+}$細胞の亜集団およびT_{EM} ＣＤ８$^{+}$細胞の亜集団が低減している。別の実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、未処理の対照と比較して、T_{EM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４$^{+}$細胞の亜集団およびT_{EM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ８$^{+}$細胞の亜集団が増加している。別の実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、未処理の対照と比較して、ＣＤ４$^{+}$ＨＬＡ$^{-}$ＤＲ$^{+}$Ｔ細胞の亜集団およびＣＤ８$^{+}$ＨＬＡ$^{-}$ＤＲ$^{+}$Ｔ細胞の亜集団が低減している。別の実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、未処理の対照と比較して、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{-}$細胞の亜集団が増加している。別の実施形態によると、リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患は、１型糖尿病であり、対象のＴ細胞区画において調節された自己反応性は、β細胞（β－ｂｅｌｌ）機能の改善を含む。別の実施形態によるとβ細胞機能の改善は、血清Ｃ－ペプチドレベルの増加を含む。別の実施形態によると、組成物は、インスリン、インスリン類似体、ビグアニド、チアゾリジンジオン、分泌促進薬、スルホニル尿素、非スルホニル尿素分泌促進薬、グリニド、メトホルミン、アルファ－グルコシダーゼ阻害剤、メグリチニド、アルファ－グルコシダーゼ阻害剤、グルカゴン（ｇｌｕｃａｃｇｎ）様ペプチド１（ＧＬＰ－１）模倣体、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）アゴニスト、アミリン類似体、ジペプチジルペプチダーゼ－４阻害剤、インクレチン模倣体、胃抑制ペプチド類似体、アミリン類似体、グリコ尿（ｇｌｙｃｏｓｕｒｉｃ）、フィナステリド、デュタステリド、ミノキシジル、ケトコナゾール、スピロノラクトン、フルタミド、シクロスポリン、クロベタゾール、抗ＣＤ３抗体、インスリン受容体の小分子活性化剤、フルオシノニド、またはそれらの組み合わせからなる群から選択される治療薬をさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【００８５】

【図１】記載された発明の実施形態による、自己免疫障害を治療する方法の概略図である。

【図２】本発明によるシステムにおいて使用するためのバイオリアクター装置の概略図である。

【図３Ａ】図３ａ－ｄは、患者の血液が循環し、単核細胞が全血から分離され、ＣＢ－Ｓ

Ｃの接着性集団と接触するよう短期間共培養され、続いて教育された自家細胞が患者の循環系に戻される連続閉ループ装置による治療に続く代謝制御の改善を示す。図３ａは、Ｔ２Ｄ対象における１２週間追跡調査したＨｂＡ１Ｃレベルを示す。
【図３Ｂ】図３ｂは、治療後４週間におけるＨＯＭＡ－ＩＲ　Ｃ－ペプチドによるインスリン感受性の分析を示す。
【図３Ｃ】図３ｃは、群Ｃの膵島β細胞機能障害を有するＴ２Ｄ対象における５６週間追跡調査したＣ－ペプチドレベルを示す。
【図３Ｄ】図３ｄは、治療後１２週間追跡調査したＨＯＭＡ－Ｂ　Ｃ－ペプチドによる膵島β細胞機能の分析を示す。
【図４Ａ】図４ａ－ｄは、連続閉ループ装置による治療の、抗炎症効果を示す。図４ａは、ベースラインと治療後４週間でのＴ２Ｄ患者におけるＴＧＦ－β１の血漿レベルの上方制御を示す。
【図４Ｂ】図４ｂは、治療後４週間での重要なインターロイキンに対する異なる影響を示す細胞内サイトカインのフロー解析を示す。
【図４Ｃ】図４ｃは、ベースラインと治療後４週間でのＴ２Ｄ患者におけるＣＤ８６$^{+}$ＣＤ１４$^{+}$単球の割合の下方制御を示す。
【図４Ｄ】図４ｄは、治療後４週間のＴｒｅｇの割合において変化を示さないＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$Ｔｒｅｇのフロー解析を示す。
【図５Ａ】図５ａ－ｆは、単球に対するＣＢ－ＳＣの免疫調節のインビトロ試験を示す。図５ａは、位相差顕微鏡法によって１８時間のＣＢ－ＳＣと単球との共培養を示す（左下パネル）。リンパ球とのＣＢ－ＳＣの共培養（上右パネル）は、対照としての役割を果たす。単球との共培養後の障害のあるＣＢ－ＳＣは、回復して拡大し、７～１０日後に９０～１００％コンフルエントになった（右下）。元の倍率、×１００。
【図５Ｂ】図５ｂは、ＣＢ－ＳＣと単球との１８時間の共培養からの浮遊細胞のアポトーシスの分析を示す。
【図５Ｃ】図５ｃは、ウエスタンブロットによって決定された、ＣＢ－ＳＣの４つの調製物における、細胞のアポトーシスタンパク質阻害剤（ｃＩＡＰ）１の発現を示すが、ｃＩＡＰ２は発現していない。
【図５Ｄ】図５ｄのウエスタンブロットは、ＣＢ－ＳＣの４つの調製物における、腫瘍壊死因子受容体ＩＩ（ＴＮＦＲＩＩ）の発現を示すが、ＴＮＦ－ＲＩは発現していない。
【図５Ｅ】図５ｅでは、ＴＮＦ－αが、用量依存的様式で、ＣＢ－ＳＣの増殖を抑制する。細胞増殖は、ＣｙＱＵＡＮＴＲ細胞増殖アッセイキット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，　ＯＲ）を用いて評価された。
【図５Ｆ】図５ｆは、ｉＮＯＳ阻害剤１４００Ｗによるブロッキング実験によってＣＢ－ＳＣ由来の一酸化窒素（ＮＯ）がＣＢ－ＳＣの単球に対する免疫調節に寄与することを実証することを示す。単球は、最初にリポ多糖（ＬＰＳ、１０μｇ／ｍＬ）によって８時間刺激され、続いて１４００Ｗ（１００ｎＭ）の存在下、または非存在下でＣＢ－ＳＣ：単球の１：５の比でＣＢ－ＳＣと４８時間共培養され、Ａｕｔｏｉｍｍｕｎｉｔｙ　＆　Ｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ　ＰＣＲ　Ａｒｒａｙキット（ＳＡＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｖａｌｅｎｃｉａ、ＣＡ）についてヒトＴｈ１７を用いてリアルタイムＰＣＲ解析が後に続いた。
【図６】第１／２臨床相治験における、白人Ｔ１Ｄ対象における不連続幹細胞教育（ＳＣＥ）システムによる治療および追跡調査研究のための治療計画を示す。
【図７Ａ】図７ａ－ｇは、第１／２相臨床治験における、連続ＳＣＥシステムによる治療後の、白人Ｔ１Ｄ患者における免疫マーカーの変化を示す。全ての対象は、不連続ＳＣＥシステムによる２回の治療を受けた。０時において、患者は最初の治療を受け、全ての対象は、３ケ月後に第２の治療を受けた。臨床評価および臨床検査のために、治療の２、８、１２、２６、４０、および５６週後に追跡調査来院を予定した。ベースラインおよび治療後の異なる時点でＴ１Ｄ患者におけるフローサイトメトリー解析のために、患者のリンパ球が、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ（γ＝１．０７７）によって末梢血から単離された。アイソタイプが一致したＩｇＧを対照とした。図７ａは、末梢血における免疫細胞の

定量を示した。
【図７Ｂ】図７ｂは、末梢血におけるＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$のＴ細胞の割合を示す。
【図７Ｃ】図７ｃは、末梢血におけるナイーブＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$のＴ細胞のフロー解析を示し、治療後２６週間におけるナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の割合の増加を実証する。
【図７Ｄ】図７ｄは、末梢血におけるＣＤ４$^{+}$ T_{CM}およびＣＤ８$^{+}$ T_{CM}細胞のフロー解析を示し、治療後１８週間におけるＣＤ４$^{+}$ T_{CM}細胞の割合の増加を実証する。
【図７Ｅ】図７ｅは、末梢血におけるＣＤ４$^{+}$ T_{EM}およびＣＤ８$^{+}$ T_{EM}細胞のフロー解析を示し、治療後１８週間および２６週間における、それぞれＣＤ４$^{+}$ T_{EM}およびＣＤ８$^{+}$ T_{EM}の細胞の割合の減少を実証する。
【図７Ｆ】図７ｆは、末梢血におけるＣＤ４$^{+}$ＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$のフロー解析を示し、治療後２６週間における、それらの割合の減少を実証する。
【図７Ｇ】図７ｇは、末梢血におけるＣＤ８$^{+}$ＨＬＡ$^{-}$ＤＲ$^{+}$Ｔ細胞のフロー解析を示し、治療後２６週間における、それらの割合の減少を実証する。データは、全ての統計分析（図７ａ～ｇ）、対応のあるスチューデントのｔ検定（図７ａ～ｇ）について平均±ＳＤとして示されている。
【図８Ａ】図８ａ－ｅは、第１／２相臨床治験において、ＳＣＥ治療後の白人Ｔ１Ｄ患者におけるＴ細胞上のＣＣＲ７発現の上方制御を示す。全ての対象は、ＳＣＥ装置治療による２回の治療を受けた：最初の治療はｔ＝０においてであり、第２の治療は３ケ月後であった。臨床評価および臨床検査のために、治療の２、８、１２、１８、２６、４０、および５６週後に追跡調査来院を予定した。ベースラインおよびＳＣＥ装置治療後の異なる時点でＴ１Ｄ患者におけるフローサイトメトリー解析のために、患者のリンパ球が、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ（γ＝１．０７７）によって末梢血から単離された。アイソタイプが一致したＩｇＧを対照とした。ＣＣＲ７発現のレベルは、Ｋａｌｕｚａ Ｆｌｏｗ Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅによって分析され、任意の単位（ａ．ｕ．）として提示された。図８ａは、ナイーブＣＤ４$^{+}$ Ｔ細胞におけるＣＣＲ７発現の上方制御を示す。
【図８Ｂ】図８ｂは、ナイーブ ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞におけるＣＣＲ７発現の上方制御を示す。
【図８Ｃ】図８ｃは、ＣＤ４$^{+}$ T_{CM}細胞におけるＣＣＲ７発現の上方制御を実証する。
【図８Ｄ】図８ｄは、ＣＤ８$^{+}$ T_{CM}細胞におけるＣＣＲ７発現の上方制御を示す。
【図８Ｅ】図８ｅは、ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$のT_{EM}細胞におけるＣＣＲ７発現の調節を示す。データは、全ての統計分析（図８ａ～ｅ）、対応のあるスチューデントのｔ検定（図８ａ～ｅ）について平均±ＳＤとして示されている。
【図９Ａ】図９ａ－ｃは、エクスビボ試験によってＴ細胞におけるＣＣＲ７発現の上方制御の確証を示す。図９ａは、ＣＢ－ＳＣの非存在下（左パネル）で、混合白血球反応（ＭＬＲ）における異なるサイズを有する細胞クラスターの形成を示す位相差顕微鏡写真を示すが、ＣＢ－ＳＣの存在下（右パネル）で細胞クラスターは消失した。（ｂおよびｃ）５日間の共培養の後、混合白血球反応からの細胞がフロー解析のために回収された。レスポンダー細胞（Ｒ）を、ＣＢ－ＳＣの存在下で同種異系刺激細胞（Ｓ）と共培養した。Ｒ：Ｓの比は１：２であり、ＣＢ－ＳＣ：Ｒの比は１：１０であった。
【図９Ｂ】図９ｂは、ゲートをかけたＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞におけるＣＣＲ７発現のフローサイトメトリーを示す。未処理のＣＤ４$^{+}$リンパ球は２つの集団を示した：１つはＣＣＲ７発現について陽性であり；別のものはＣＣＲ７発現について陰性（または非常に薄暗い）であった（左上パネル）。両方の集団の平均蛍光強度は、ＣＢ－ＳＣでの処理後に増加した（左下パネル）。
【図９Ｃ】図９ｃは、ゲートをかけたＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞において、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$ T_{CM}およびＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{-}$$T_{EM}$におけるＣＣＲ７発現をフローサイトメトリーによって実証する。データは、ＣＢ－ＳＣの存在下でのナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞およびＣＤ４$^{+}$$T_{CM}$の割合の増加を示した。ＣＤ４$^{+}$$T_{EM}$の割合は、ＣＢ－ＳＣによる治療後に低下した。
【図１０Ａ－Ｆ】図１０ａ－ｆは、第１／２相臨床治験において、白人Ｔ１Ｄ対象のβ細

胞機能に対するＳＣＥ治療の効果を示す。全ての対照は、ＳＣＥ装置治療による２回の治療を受けた（図１０ａ～ｆ）。Ｔ１Ｄ対象は、それぞれ最初と３ヶ月目にＳＣＥ装置治療による２回の治療を受けた。空腹時（青）およびグルカゴン刺激のＣ－ペプチドレベル（褐色）をプロトコールに従って異なる時点で調べた。グルカゴン刺激のＣ－ペプチド産生に関して、グルカゴン（１ｍｇ、ｉ．ｖ．）は、３０秒以内に投与され、６分後に、Ｕｌｔｒａｓｅｎｓｉｔｉｖｅ Ｃ－ｐｅｐｔｉｄｅ ＥＬＩＳＡキットによるＣ－ペプチド試験のために血漿試料が回収された。これらのデータは、いくらかの残存膵島β細胞機能を有する６人のＴ１Ｄ対象からのものであった（群Ａ）（図１０ａ～ｆ）。回復した空腹時およびグルカゴン刺激のＣ－ペプチドレベルは、治療後５６週目の最後の追跡調査を通して対象１～４において保持されていた（図１０ａ～ｄ）。図１０ｅ～ｆは、対象５および６が、Ｔ１Ｄの診断後１０年を超えていくらかの残像膵島β細胞機能を示したことを示す。ＳＣＥ療法を受けた後、対象５の空腹時Ｃ－ペプチドレベルは最初は減少したが、４０週後には増加し；対象６の空腹時Ｃ－ペプチドレベルは、２６週で０．０９ｎｇ／ｍＬに最初は減少したが、４０週で０．２１ｎｇ／ｍＬに改善した。それらのグルカゴン刺激のＣ－ペプチドは、空腹時Ｃ－ペプチドレベルと同様の傾向を示した。

【図１１】前向き、単群、非盲検、単一施設のパイロット試験におけるＳＣＥ治療および追跡調査の治療計画を示す。単核細胞は、アフェレーシスによって各対象から滅菌条件下で得られ、処理施設に搬送され、処理施設のＳＣＥ装置内で終夜処理され、次いで対象への再注入のために臨床施設に搬送し戻す。

【図１２Ａ－Ｂ】図１２ａ－ｃは、不連続ＳＣＥ装置の調製および使用のためのステップの概略図を示す。図１２ａは、ＳＣＥ装置（ｄｅｖｉｃｅｙ）のｃＧＭＰ製造のためのステップを示す。図１２ｂは、ｃＧＭＰ処理施設における臍帯血幹細胞（ＣＢ－ＳＣ）との終夜の共培養による、対象の単核細胞（ＭＮＣ）のエクスビボ治療のためのステップを示す。

【図１２Ｃ】図１２ｃは、処理の概要を示す。

【発明を実施するための形態】

【００８６】

「アルファ細胞」または「α細胞」という用語は、血中グルコースレベルが下がりすぎるとホルモングルカゴンを産生および放出する、膵臓内の細胞の種類を指すために本明細書では交換可能に使用される。グルカゴンは、エネルギーのために肝臓を刺激して血中にグルコースを放出させる。

【００８７】

用語「Ａ１Ｃ、糖化ヘモグロビン、グリコシル化ヘモグロビン、ヘモグロビンＡ１Ｃ、ＨｇＡ１ｃ、およびＨｂＡ１ｃ」は、過去２～３ヶ月の平均血中グルコースを反映する、糖で被覆された（糖化）ヘモグロビンの割合を測定する診断試験を記載するために本明細書で交換可能に用いられる。Ａ１Ｃレベルが高いほど、血糖制御がより悪くなり、糖尿病合併症の危険性がより高くなる。≧６．５％のＡ１Ｃにおいて糖尿病が診断される。

本明細書で使用されるとき、「投与する」という用語は、施すことまたは適用することを意味する。本明細書で使用されるとき、「投与すること」という用語は、インビボ投与、ならびにエクスビボでの組織への直接投与を含む。

用語「成人」または「成体ヒト」は、年齢にかかわらず、成熟したヒトまたは成熟したヒト細胞などの成熟した生物または成熟した細胞を指す。

本明細書で使用されるとき、「同種異系」という用語は、同一の種に属するかまたは同一の種から得られるが、遺伝的に異なることを指す。

本明細書で使用されるとき、「改善する」という用語は、何かをより良くする、もしくは何かがより良くなる、または病状を改善することを意味する。病状は、これらに限定されないが、Ｉ型糖尿病またはＩＩ型糖尿病などの炎症性状態であり得る。

【００８８】

本明細書中で使用されるとき、「類似体」は、構造的に別のものと類似しているが組成がわずかに異なる（異なる元素の原子による１原子の置き換えまたは特定の官能基の存在

におけるように）化合物を指すが、親化合物から誘導可能であってもなくてもよい。「誘導体」は、親化合物が「誘導体」を生成するための出発物質となり得、一方で親化合物が「類似体」を生成するための出発物質として必ずしも使用されなくてもよいという点で「類似体」と異なる。

本明細書で使用されるとき、「アネルギー」という用語は、外来物質に対する生体の防御機序による反応の欠如を指し、末梢リンパ球寛容の直接誘導からなる。

本明細書で使用されるとき、「アフェレーシス」という用語は、ドナーまたは患者の血液を、１つの特定の成分を分離し、残りをドナーまたは患者の循環系に戻す装置に通過させる医療技術を指す。

本明細書で使用されるとき、「適用する」という用語は、接触させること、または置くことまたは広げることを指す。

【００８９】

本明細書で使用されるとき、「曲線下面積（ＡＵＣ）」という用語は、薬物投与後の時間に対する薬物の血漿濃度のプロット下の面積を指す。面積は台形（ｔｒａｐａｚｏｉｄａｌ）則によって決定され、データ点は直線セグメントによって接続され、垂直線は横座標から各データ点へと立てられ、そのように構築された三角形と台形の面積の合計が計算される。典型的には、面積は薬物が投与されたときから出発して、血漿中の濃度が無視できる程度になったときに終了するように計算される。実際には、薬物濃度はある特定の別々の時点で測定され、台形則がＡＵＣの推定に使用される。ＡＵＣは、薬物の生物学的利用能の推定および薬物の全クリアランスの推定において有用である。

「自己分泌シグナル伝達」という用語は、細胞がそれ自体にまたは他の同一の種類の隣接細胞に作用するシグナル分子を分泌する細胞シグナル伝達の１種を指す。

【００９０】

用語「自己免疫障害」および「自己免疫疾患」は、免疫系が誤って健康な体組織の自己の構成要素を攻撃し破壊するときに生じる状態を指すために交換可能に用いられる。自己免疫障害は、１つ以上の器官または組織の種類に影響を及ぼし得る。一般に自己免疫障害によって影響を受ける器官および組織には、血管、結合組織、甲状腺または膵臓などの内分泌腺、関節、筋肉、赤血球、および皮膚が含まれる。

本明細書で使用されるとき、「ベータ細胞」または「β細胞」という用語は、インスリンを産生する膵臓細胞を指す。

本明細書で使用されるとき、「血中グルコースレベル」という用語は、所与の量の血液中のグルコースの量を指す。それはデシリットル中のミリグラムの単位で、またはｍｇ／ｄＬで表される。

本明細書で使用されるとき、「血中グルコースモニタリング」という用語は、糖尿病を管理するために定期的に血中グルコースレベルをチェックすることを指す。

本明細書で使用されるとき、細胞「培養」という用語は、典型的には細胞増殖と適合性のある、またはその生存率を維持するための、規定された境界空間および増殖条件内に細胞を提供することを指す。同様に、動詞として使用される用語「培養する」は、細胞の増殖に適した空間および増殖条件を提供するかまたはその生存率を維持するプロセスを指す。

【００９１】

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ３」（ＴＣＲ複合体）という用語は、４つの異なる鎖からなるタンパク質複合体を指す。哺乳動物では、複合体はＣＤ３γ鎖、ＣＤ３δ鎖、および２つのＣＤ３ε鎖を含み、これらはＴ細胞受容体（ＴＣＲ）およびζ鎖と会合してＴリンパ球において活性化シグナルを生成する。同時に、ＴＣＲ、ζ鎖、およびＣＤ３分子はＴＣＲ複合体を構成する。ＣＤ３　分子の細胞内尾部は、ＴＣＲのシグナル伝達能力に必須である免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ＩＴＡＭ）として知られる保存モチーフを含む。ＩＴＡＭがリン酸化されると、ＣＤ３鎖は、Ｔ細胞のシグナル伝達カスケードに関与するキナーゼであるＺＡＰ７０（ゼータ関連タンパク質）に結合することができる。

【００９２】

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ４」という用語は、Ｔヘルパー細胞、単球、マクロファージ、および樹状細胞などの免疫細胞の表面上に見出される糖タンパク質を指す。ＣＤ４は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）が抗原提示細胞と情報伝達をするのを助ける共受容体である。ＣＤ４は抗原提示細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）ＩＩ分子と直接相互作用する［Dalgleish A. G. et al., "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus", Nature, Vol. 312: 763-768, (1984)］。

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ８」という用語は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）に対する共受容体として機能する膜貫通糖タンパク質を指す。ＴＣＲと同様に、ＣＤ８は主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子に結合するが、クラスＩ　ＭＨＣタンパク質に特異的である［Leahy D. J. et al., "Crystal structure of a soluble form of the human T cell coreceptor CD8 at 2.6 A resolution", Cell, Vol. 68(6): 1145-62, (1992)］。

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ１３」という用語は、いくつかの種類の急性非リンパ性白血病において発現するペプチドからのＮＨ２末端アミノ酸の除去を触媒する亜鉛結合メタロプロテアーゼとして作用する骨髄細胞上に見出されるＩＩ型膜貫通タンパク質を指す［Xu W. et al., "Progress in the development of aminopeptidase N (APN/CD13) inhibitors", Curr Med Chem Anticancer Agents., Vol. 5(3): 281-301, (2005)］。

【００９３】

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ２０」という用語は、Ｂリンパ球抗原ＣＤ２０を指し、プロＢ期（ＣＤ４５Ｒ$^{+}$）から始まり成熟まで濃度が徐々に増加する全てのＢ細胞の表面に発現する活性化グリコシル化リンタンパク質である［Tedder T. F. et al., "Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes", Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 85(1): 208-212, (1998)］。

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ２５」という用語は、活性化Ｔ細胞、活性化Ｂ細胞、いくつかの胸腺細胞、骨髄前駆体、およびオリゴデンドロサイト上に存在し、ＣＤ１２２と会合してＩＬ－２に対する高親和性受容体として作用することができるヘテロ二量体を形成するＩ型膜貫通タンパク質を指す［Triplett, T. A. et al., European Journal of Immunology, Vol. 42(7): 1893-1898, (2012)］。

【００９４】

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ３４」という用語は、ＣＤ３４抗原としても知られる造血前駆細胞抗原ＣＤ３４を指し、これはヒトにおいて細胞間接着因子として機能するタンパク質である。それはまた、骨髄細胞外マトリックスへのまたは間質細胞への直接の幹細胞の付着を媒介し得る［Simmons　D. L. et al., "Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells", J. Immunol, , Vol. 148(1): 267-271, (1992)］。

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ３８」という用語は、リンパ球と内皮細胞との間の接着を媒介し得る、マクロファージ、樹状細胞、ならびに活性化Ｂ細胞およびＮＫ細胞上に存在するタンパク質マーカーを指す［Orciani M. et al., "CD38 is constitutively expressed in the nucleus of human hematopoietic cells", J. Cell. Biochem., Vol. 105(3): 905-912, (2008)］。

【００９５】

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ４５」という用語は、白血球共通抗原、すなわち細胞活性化を補助し、赤血球を除く全ての造血細胞に存在するＩ型膜貫通タンパク質を指し、リンパ腫、Ｂ細胞性慢性リンパ性白血病、有毛細胞白血病、および急性非リンパ性白血病で発現する。それは、赤血球および血小板を除く全ての造血細胞に存在するタンパク質チロシンホスファターゼ（ＰＴＰ）を指す［Kaplan R. et al., "Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, Vol. 87(18): 7000-7004, (1990)］。

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ５９」という用語は、補体媒介性溶解からヒト細胞を保護するグリコシルホスファチジルイノシトール（ＧＰＩ）結合膜糖タンパク質を指す［Huang Y. et al., "Defining CD59-C9 binding interaction", J. Biol. Chem., Vol. 281(37): 27398-27404, (2006)］。

【００９６】

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ６２Ｌ（Ｌ－セレクチン）」という用語は、ナイーブＴ細胞の表面に一般的に見られる細胞マーカーを指す［Kohn L. A. et al., "Lymphoid priming in human bone marrow begins before expression of CD10 with upregulation of L-selectin", Nat. Immunol., Vol. 13(10): 963-971, (2012)］。

【００９７】

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ６９（表面抗原分類（Ｃｌｕｓｔｅｒ　ｏｆ　Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ）６９）」という用語は、ＣＤ６９遺伝子によってコードされるヒト膜貫通Ｃ型レクチンタンパク質を指す。Ｔリンパ球とナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の活性化は、インビボとインビトロとの両方で、ＣＤ６９の発現を誘導する［Cambiaggi C. et al., "Constitutive expression of CD69 in interspecies T-cell hybrids and locus assignment to human chromosome 12",,Immunogenetics, Vol. 36(2): 117-120, (1992)］。

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ８０」という用語は、Ｔ細胞活性化および生存に必要な共刺激シグナルを提供する、活性化Ｂ細胞および単球上に見出されるタンパク質を指す［Zuccarino-Catania G. V. et al., "CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype", Nat Immunol., Vol. 15(7):631-637, (2012)］。

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ８６」という用語は、Ｔ細胞活性化および生存に必要な共刺激シグナルを提供する、抗原提示細胞上で発現するタンパク質を指す［Jellis C. L. et al., "Genomic organization of the gene coding for the costimulatory human B-lymphocyte antigen B7-2 (CD86)", Immunogenetics, Vol. 42: 85-89, (1995)］。

【００９８】

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ９０」（表面抗原分類９０）という用語は、もともと胸腺細胞抗原として発見された単一のＶ様免疫グロブリンドメインを有する２５～３５ｋＤａの重Ｎ－グリコシル化グリコホスファチジルイノシトール（ＧＰＩ）アンカー型の保存された細胞表面タンパク質を指す［Wetzel A. et al., "Human Thy-1 (CD90) on activated endothelial cells is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)", J. Immunol., 172: 3850-3857, (2004)］。

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ１００」という用語は、セマフォリンファミリーのタンパク質を指す。セマフォリンは、軸索成長円錐ガイダンス分子として作用する分泌タンパク質および膜タンパク質の１種である。それらは主に短距離抑制シグナルおよびマルチマー受容体複合体を介したシグナルとして作用する［Elhabazi A.., "Structure and function of the immune semaphorin CD100/SEMA4D", Crit Rev Immunol., Vol. 23(1-2): 65-81, (2003)］。

【００９９】

本明細書で使用されるとき、「ＣＤ２２３」という用語は、Ｔ細胞機能に対して多様な生物学的効果を有する細胞表面分子を指し、そのうちの１つは免疫チェックポイント受容体である［Castelli C., "Lymphocyte activation gene-3 (LAG-3, CD223) in plasmacytoid dendritic cells (pDCs): a molecular target for the restoration of active antitumor immunity", Oncoimmunology, Vol. 3(11): 1-4, (2014)］。

【０１００】

本明細書で用いられるとき、「ケモカイン」という用語は、白血球を特定の方向に遊走させるようにシグナル伝達する走化性サイトカインの１種を指す。ケモカインは、小さなサイトカイン、または細胞によって分泌されるシグナル伝達タンパク質のファミリーであ

る。それらの名称は、近くの応答性細胞において定方向の化学走性を誘導するそれらの能力に由来し、したがって、それらは走化性サイトカインである。

【０１０１】

本明細書で使用されるとき、「ケモカイン受容体７」という用語は、例えばケモカインと呼ばれるサイトカインの１種と相互作用するＴ細胞上の表面に見られるサイトカイン受容体を指す。哺乳動物においては２０の異なるケモカイン受容体が記載されている。それぞれが７回膜貫通（７ＴＭ）構造を持ち、細胞内のシグナル伝達のためにＧタンパク質に結合し、それらをＧタンパク質共役型受容体の大きなタンパク質ファミリーのメンバーとする［Griffith J. W., "Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defence and immunity", Annual Review of Immunology, Vol. 32: 659-702, (2014)］。

本明細書で使用されるとき、「走化性（ｃｈｅｍｏｔａｃｔｉｃ）」という用語は、化学的刺激に向かう方向または化学的刺激から離れる方向での化学濃度勾配に沿った細胞の遊走または配向を指す。

本明細書で使用されるとき、「化学走性（ｃｈｅｍｏｔａｘｉｓ）」という用語は、それが誘因性であると考えられる環境条件へ向かう、および／またはそれが忌避的であると考える環境から遠ざかる、運動細胞またはその一部の定方向の運動を指す。

本明細書で使用されるとき、「コロニー刺激因子」という用語は、白血球の産生を制御することを担うサイトカインを指す。種類には、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）が含まれる。

本明細書で使用されるとき、「相溶性」という用語は、通常の使用条件下で組成物の有効性を実質的に低下させるような相互作用がないような方法で組成物の成分を互いに組み合わせることができることを意味する。

本明細書で使用されるとき、「構成要素」という用語は、構成部分、要素または成分を指す。

本明細書で使用されるとき、「状態」という用語は、様々な健康状態を指し、任意の根本的な機序、障害、または傷害によって引き起こされる障害または疾患を含むことを意味する。

本明細書で使用されるとき、「結果」という用語は、以前に起こったことの効果、結果、または成果を指す。

本明細書で使用されるとき、「接触」という用語およびその全ての文法形態は、接触しているかまたは直ぐ隣もしくは局所的に近接している状態または状態（ｓｔａｔｅ　ｏｒ　ｃｏｎｄｉｔｉｏｎ）を指す。

【０１０２】

本明細書で使用されるとき、「接続ペプチド」または「Ｃペプチド」という用語は、プロインスリン分子においてインスリンのＡ鎖をそのＢ鎖に接続する短い３１アミノ酸ポリペプチドを指す。それは、糖尿病などの自己免疫疾患のマーカーとして使用されている。増加したレベルは、それらが等モル量で放出されるのでインスリン放出の指標であり、そして患者にとってより良好な成果である。非常に低いＣペプチドは、１型糖尿病およびインスリン依存性を確認し、そして高いグルコース変動性、グルコース恒常性の欠如および不良な転帰を伴う合併症の増加と関連している。Ｃ－ペプチドレベルの測定は、適切なβ細胞機能の評価によって臨床的に検証される［Wahren J. et al., "The clinical potential of C-peptide in replacement in type 1 diabetes", Diabetes, Vol. 61(4), 761-772, (2012)］。

用語「臍帯血由来幹細胞（ＣＢ－ＳＣ）」および「臍帯血単核細胞」は、用語「臍帯血単核幹細胞」と交換可能に使用される。

本明細書で使用されるとき、「培地」という用語は、一般に、生細胞の培養に使用される任意の調製物を指す。「細胞培養物」はインビトロで培養された細胞を指す。

【０１０３】

本明細書で使用されるとき、「サイトカイン」という用語は、他の細胞に対して様々な効果を有する、細胞によって分泌される小さな可溶性タンパク質物質を指す。サイトカインは、増殖、発生、創傷治癒、および免疫応答を含む多くの重要な生理学的機能を媒介する。それらは細胞膜内に位置するそれらの細胞特異的受容体に結合することによって作用し、それは細胞内で明確なシグナル伝達カスケードを開始することを可能にし、それは最終的に標的細胞における生化学的および表現型の変化をもたらす。一般に、サイトカインは局所的に作用する。それらは、多くのインターロイキン、およびいくつかの造血成長因子を包含するＩ型サイトカイン；インターフェロンおよびインターロイキン－１０を含むＩＩ型サイトカイン；ＴＮＦおよびリンホトキシンを含む腫瘍壊死因子（「ＴＮＦ」）関連分子；インターロイキン１（「ＩＬ－１」）を含む免疫グロブリンスーパーファミリーメンバー；ならびに多種多様な免疫機能および炎症機能において重要な役割を果たす分子のファミリーであるケモカインを含む。同一のサイトカインが、細胞の状態に応じて細胞に異なる影響を及ぼすことがある。サイトカインはしばしば他のサイトカインの発現を調節し、そして他のサイトカインのカスケードを誘発する。サイトカインの非限定的な例には、例えば、ＩＬ－１α、ＩＬ－β、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２／ＩＬ－２３Ｐ４０、ＩＬ－１３、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＴＧＦ－β、ＩＦＮ－γ、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｇｒｏ－α、ＭＣＰ－１、およびＴＮＦ－αが含まれる。

【０１０４】

本明細書で使用されるとき、「サイトメトリー」という用語は、単一細胞の物理的および／または化学的特性、あるいは拡張によって、他の生物学的または非生物学的粒子のほぼ同じサイズまたは段階における物理的および／または化学的特性が測定されるプロセスを指す。フローサイトメトリーでは、細胞または粒子が流体の流れの中で測定装置（フローサイトメーター）を通過するときに測定が行われる。セルソーター、またはフローソーターは、電気的および／または機械的手段を使用して、ユーザーが選択した値の範囲内に含まれる測定された特性を有する細胞（または他の小さな粒子）を方向転換させて収集するフローサイトメーターである。

【０１０５】

本明細書で使用されるとき、「分化」という用語は、それによって細胞または複数の細胞が異なる、表現型的に異なる細胞型に変化するプロセスを指す。本明細書で使用されるとき、「分化誘導因子」という用語は、細胞分化の過程の直接的または間接的な原因物質である化合物を指す。「分化誘導因子」は分化を引き起こすのに十分であるが、分化に必須ではない。

本明細書で使用されるとき、「疾患」または「障害」という用語は、健康の障害または異常な機能の状態を指す。

【０１０６】

本明細書で使用されるとき、「染料」（「蛍光色素」または「蛍光色素分子」とも呼ばれる）という用語は、分子を蛍光性にする分子の構成要素を指す。構成要素は、特定の波長のエネルギーを吸収し、そして異なる（しかし同等に特異的な）波長でエネルギーを再放出する分子中の官能基である。放出されるエネルギーの量と波長は染料と染料の化学的環境との両方に依存する。多くの染料であり、ＦＩＴＣ、Ｒ－フィコエリトリン（ＰＥ）、ＰＥ－Ｔｅｘａｓ Ｒｅｄ Ｔａｎｄｅｍ、ＰＥ－Ｃｙ５ Ｔａｎｄｅｍ、ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ ｉｏｄｅｍ、ＥＧＦＰ、ＥＹＧＰ、ＥＣＦ、ＤｓＲｅｄ、アロフィコシアニン（ＡＰＣ）、ＰｅｒＣｐ、ＳＹＴＯＸ Ｇｒｅｅｎ、クマリン、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒｓ（３５０、４３０、４８８、５３２、５４６、５５５、５６８、５９４、６３３、６４７、６６０、６８０、７００、７５０）、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ３．５、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７、Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２、ＤＡＰＩ、Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３２５８、ＳＹＴＯＸ Ｂｌｕｅ、クロモマイシンＡ３、ミトラマイシン、ＹＯＹＯ－１、ＳＹＴＯＸ Ｏｒａｎｇｅ、臭化エチジウム、７－ＡＡＤ、アクリジンオレンジ、ＴＯＴＯ－１、ＴＯ－ＰＲＯ－１、チアゾールオレンジ、ＴＯＴＯ－３、ＴＯ－ＰＲＯ－３、チアゾールオレンジ

、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）、ＬＤＳ　７５１、Ｉｎｄｏ－１、Ｆｌｕｏ－３、ＤＣＦＨ、ＤＨＲ、ＳＮＡＲＦ、Ｙ６６Ｆ、Ｙ６６Ｈ、ＥＢＦＰ、ＧＦＰｕｖ、ＥＣＦＰ、ＧＦＰ、ＡｍＣｙａｎ１、Ｙ７７Ｗ、Ｓ６５Ａ、Ｓ６５Ｃ、Ｓ６５Ｌ、Ｓ６５Ｔ、ＺｓＧｒｅｅｎ１、ＺｓＹｅｌｌｏｗ１、ＤｓＲｅｄ２、ＤｓＲｅｄ単量体、ＡｓＲｅｄ２、ｍＲＦＰ１、ＨｃＲｅｄ１、モノクロロビマン、カルセイン、ＤｙＬｉｇｈｔ　Ｆｌｕｏｒｓ、シアニン、ヒドロキシクマリン、アミノクマリン、メトキシクマリン、Ｃａｓｃａｄｅ　Ｂｌｕｅ、Ｌｕｃｉｆｅｒ　Ｙｅｌｌｏｗ、ＮＢＤ、ＰＥ－Ｃｙ５コンジュゲート、ＰＥ－Ｃｙ７コンジュゲート、ＡＰＣ－Ｃｙ７コンジュゲート、Ｒｅｄ　６１３、フルオレセイン、ＦｌｕｏｒＸ、ＢＯＤＩＤＹ－ＦＬ、ＴＲＩＴＣ、Ｘ－ローダミン、リサミンローダミンＢ、Ｔｅｘａｓ　Ｒｅｄ、ＴｒｕＲｅｄ、ＧＦＰ［Prendergast F.G. et al, "Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from Aequorea forskalea". Biochemistry, Vol. 17(17): 3448-53, (1978)］、およびそれらの誘導体を含むが、これらに限定されないことが知られている。

本明細書で使用されるとき、「教育された」という用語は、２つの細胞集団が相互作用し得るような条件下で患者の単核細胞とＵＣ－ＳＣを共培養した結果を指し、互恵的効果または互いに対する影響を有することを意味する。

本明細書で使用されるとき、「濃縮する」という用語は、所望の物質の割合を増加させること、例えば、細胞集団におけるその天然の頻度と比較して、細胞のサブタイプの相対的頻度を高めることを指す。

【０１０７】

本明細書で使用されるとき、「フローサイトメトリー」という用語は、細胞の表現型および特徴を調べるためのツールを指す。それは、感知領域を通過するレーザー（放射線の誘導放出による光増幅）／光ビームを通って、流体の流れ中の細胞または粒子が移動するときに感知する。微小粒子の相対光散乱および色識別される蛍光を測定する。細胞の分析および分化は、サイズ、粒度、および細胞が抗体または染料のいずれの形態で蛍光分子を有しているかどうかに基づく。細胞がレーザービームを通過するにつれて、光はあらゆる方向に散乱され、軸から小さい角度（０．５～１０°）で前方に散乱される光は球の半径の二乗、すなわち細胞または粒子のサイズに比例する。光が細胞に入る可能性があり、したがって、９０°光（直角、側面）散乱は蛍光色素結合抗体で標識するか、蛍光膜、細胞質、または核色素で染色することができる。したがって、細胞型の分化、膜受容体および抗原の存在、膜電位、ｐＨ、酵素活性、ならびにＤＮＡ含有量が促進され得る。フローサイトメーターはマルチパラメーターであり、各細胞についていくつかの測定値を記録し、したがって、異種集団内の同種亜集団を識別することが可能である［Marion G. Macey, Flow cytometry: principles and applications, Humana Press, 2007］。

【０１０８】

本明細書で使用されるとき、「ＦＯＸＰ３（フォークヘッドボックスＰ３；またはスクルフィン）」という用語は、免疫系応答に関与するタンパク質を指す。ＦＯＸタンパク質ファミリーのメンバーである、ＦＯＸＰ３は、制御性Ｔ細胞の発生および機能における転写因子調節因子として機能する。制御性Ｔ細胞は一般に免疫応答を低下させ、それによって自己反応性Ｔ細胞の制御に役割を果たす［Kornete M. et al., "Th1-Like ICOS+ Foxp3+ Treg Cells Preferentially Express CXCR3 and Home to β-Islets during Pre-Diabetes in BDC2.5 NOD Mice", PLoS One., Vol. 10(5): 1-16, (2015)］。

本明細書で使用されるとき、「新鮮な」という用語は、患者から少なくとも１時間以内に収集されるか、または４℃で保存される生物由来物質を指すが、生物由来物質は凍結融解されていない。生物由来物質は、非限定的に、以下の末梢血、臍帯血、バフィーコート、骨髄などから単離された白血球、単核細胞、または幹細胞であり得る。

【０１０９】

本明細書で使用されるとき、「移植片」という用語は、移植のための任意の組織または器官を指す。それには、同一の個体内のある生体部位から別の生体部位に移入された自己組織（「自己移植片」）、遺伝的に同一の個体間で移入された組織、または組織移植を可

能にするのに十分免疫学的に適合する組織（「同系移植片」）、同種の遺伝的に異なるメンバー間で移入された組織（「同種異系移植片」または「同種移植片」）、および異なる種間で移入された組織（「異種移植片」）が含まれるが、これらに限定されない。

本明細書で使用されるとき、「増殖」という用語は、細胞集団および／または細胞サイズの拡大を指す。本明細書で使用されるとき、「増殖因子」という用語は、細胞増殖の速度または度合いを誘導または調節する物質を指す。

【０１１０】

本明細書で使用されるとき、「造血幹細胞」という用語は、それ自体を再生することができ、骨髄から循環血中に動員される様々な特殊化細胞に分化することができ、プログラム細胞死（アポトーシス）を実施することができる、血液または骨髄から単離された細胞を指す。記載された発明のいくつかの実施形態によると、ヒト対象に由来する造血幹細胞は、ＣＤＳ３４、ＣＤ３８、ＨＬＡ－ＤＲ、ｃ－ｋｉｔ、ＣＤ５９、Ｓｃａ－１、Ｔｈｙ－１、および／もしくはＣＸＣＲ－４、またはそれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない少なくとも１種類の細胞表面マーカーを発現する。

本明細書で使用されるとき、「ＨＬＡ－ＤＲ」という用語は、抗原提示細胞、Ｂ細胞、単球、マクロファージ、および活性化Ｔ細胞を含むいくつかの細胞型上に存在するヒトクラスＩＩ組織適合性抗原を指す。

本明細書で使用されるとき、「ホルモン」という用語は、生体の特定の機能を誘発または調節するために生体の一部で産生されて血中に放出される化学物質を指す。

本明細書で使用されるとき、「免疫障害関連疾患」という用語は、免疫系の混乱が疾患の病因の一因となる疾患を指す。

本明細書で使用されるとき、「免疫寛容」または「免疫学的寛容」という用語は、通常は免疫応答を誘発する能力を有する物質に対する免疫系の無反応の状態を指す。

本明細書で使用されるとき、「免疫調節細胞」という用語は、ケモカイン、サイトカイン、および他の免疫応答のメディエーターを発現することによって免疫応答を増強または減少させることができる細胞を指す。

【０１１１】

本明細書で使用されるとき、「耐糖能障害（ＩＧＴ）」という用語は、血中グルコースレベルが正常よりも高いが糖尿病と診断するほど高くはない状態を指す。ＩＧＴは糖尿病前症とも呼ばれ、経口グルコース負荷試験（ＯＧＴＴ）の開始から２時間後に１４０ｍｇ／ｄＬ～１９９ｍｇ／ｄＬのレベルである。糖尿病前症を有するほとんどの個体は、２型糖尿病を発症する危険性が高い。

【０１１２】

本明細書で使用されるとき、「炎症性サイトカイン」または「炎症メディエーター」という用語は、炎症プロセスの分子メディエーターを指し、それらはその効果において炎症誘発性または抗炎症性のいずれかを調節し得る。これらの可溶性の拡散性分子は、組織の傷害および感染の部位で局所的にとより離れた部位との両方で作用する。いくつかの炎症メディエーターは炎症プロセスによって活性化され、他のものは急性炎症に応答してまたは他の可溶性炎症メディエーターによって細胞源で合成されおよび／または細胞源から放出される。炎症応答の炎症メディエーターの例には、血漿プロテアーゼ、補体、キニン、凝固および線溶タンパク質、脂質メディエーター、プロスタグランジン、ロイコトリエン、血小板活性化因子（ＰＡＦ）、ヒスタミン、セロトニン、および神経ペプチドを含むがこれらに限定されないペプチドおよびアミン、インターロイキン－１－β（ＩＬ－１β）、インターロイキン－４（ＩＬ－４）、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、インターロイキン－８（ＩＬ－８）、腫瘍壊死因子－α（ＴＮＦ－α）、インターフェロン－γ（ＩＦ－γ）、およびインターロイキン－１２（ＩＬ－１２）を含むがこれらに限定されない炎症誘発性サイトカインが含まれるが、これらには限定されない。

本明細書で使用されるとき、「注入する」という用語およびその他の文法形態は、治療目的のための、ヒトを含む対象の血管への血液以外の流体の導入を指す。

本明細書で使用されるとき、「注入溶液」という用語は、２５ＵＳＰ単位／ｍＬのヘパ

リンおよび１％のヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）を補充した無血清のリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）を含む溶液を指す。

【０１１３】

本明細書で使用されるとき、「炎症」という用語は、解毒および修復に関与する細胞が炎症メディエーターによって損傷部位に動員されるような、感染および傷害に対する生理学的応答を指す。本明細書で使用されるとき、「急性炎症」という用語は、古典的な徴候を特徴とし、血管性および滲出性のプロセスが優勢な、通常は突然発症する炎症を指す。本明細書で使用されるとき、「慢性炎症」という用語は、ゆっくりと進行し、新しい結合組織の形成によって主に特徴付けられる炎症を指す。それは急性形態または長期の低グレード形態の継続であり得、そして通常永続的な組織損傷を引き起こす。

【０１１４】

開始剤に関係なく、急性炎症に伴う生理的な変化には以下の４つの主な特徴が含まれる：（１）血流の純増加をもたらす血管拡張は、急性組織傷害に対する最も早い身体的応答の１つである；（２）炎症性刺激に応答して、細静脈の内側を覆う内皮細胞が収縮し、細胞内接合部を広げて間隙を生じさせ、血管透過性を高め、これにより血漿タンパク質および血球の血管からの漏出が可能になる；（３）炎症はしばしば、炎症部位への白血球、特に好中球（多形核細胞）の強い浸潤によって特徴付られる。これらの細胞は、血管壁または傷害を受けていない組織において有毒物質を放出することによって組織の損傷を促進し；（４）特定の刺激に応答して白血球から放出される発熱物質によって生じる発熱を促進する。

【０１１５】

炎症プロセスの間、炎症応答の可溶性炎症メディエーターは、身体的苦痛を引き起こす因子を封じ込めそして排除しようとして、細胞構成要素と共に全身的に作用する。メディエーターに関して本明細書で使用されるとき、「炎症性」または「免疫炎症性」という用語は、炎症プロセスの分子メディエーターを指す。これらの可溶性の拡散性分子は、組織の損傷および感染の部位で局所的にとより離れた部位との両方で作用する。いくつかの炎症メディエーターは炎症プロセスによって活性化され、他のものは急性炎症に応答してまたは他の可溶性炎症メディエーターによって細胞源で合成されおよび／または細胞源から放出される。炎症応答の炎症メディエーターの例には、血漿プロテアーゼ、補体、キニン、凝固および線溶タンパク質、脂質メディエーター、プロスタグランジン、ロイコトリエン、血小板活性化因子（ＰＡＦ）、ヒスタミン、セロトニン、および神経ペプチドを含むがこれらに限定されないペプチドおよびアミン、インターロイキン－１、インターロイキン－４、インターロイキン－６、インターロイキン－８、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）、インターフェロン－γ、およびインターロイキン－１２を含むがこれらに限定されない炎症誘発性サイトカインが含まれるが、これらには限定されない。

【０１１６】

本明細書で使用されるとき、「阻害する」という用語および「阻害すること」または「阻害」を含むがこれらに限定されないその様々な文法形態は、プロセスの量もしくは速度を低減すること、プロセスを完全に止めること、またはそれらの作用もしくは機能を低減、制限、もしくは遮断することを指す。阻害は、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％での、量、速度、作用、機能、または物質のプロセスの低減または低下を含み得る。

本明細書で使用されるとき、「阻害剤」という用語は、第１の分子に結合し、それによって第１の分子の活性を低下させる第２の分子を指す。阻害剤はしばしば、それらの特異性および効力によって評価される。

【０１１７】

本明細書で使用されるとき、「インスリン抵抗性」という用語は、所与の量のインスリ

ンに対する生体の正常な応答が低減している状態を指す。結果として、それがその適切な効果を有するためにはより高レベルのインスリンが必要とされる。膵臓は、生体内の要求に対して十分なインスリンをもはや生産できなくなるまで、ますます多くのインスリンを生産する。したがって、血糖が上昇する。インスリン抵抗性は２型糖尿病発症の危険因子である。

【０１１８】

本明細書で使用されるとき、「インターロイキン」という用語は、他の白血球との情報伝達の手段として白血球によって分泌されるサイトカインを指す。インターロイキンは細胞増殖、分化、運動性を調節し、炎症などの免疫応答を刺激する。インターロイキンの例には、非限定的に、インターロイキン－１（ＩＬ－１）、インターロイキン－１β（ＩＬ－１β）、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、インターロイキン－８（ＩＬ－８）、およびインターロイキン－１２（ＩＬ－１２）が含まれる。

本明細書で使用されるとき、「単離された」という用語は、その天然の環境に見られるように通常それに付随するかまたは相互作用する構成要素を実質的にまたは本質的に含まない、細胞または細胞集団などであるがこれらに限定されない物質を指す。

本明細書で使用されるとき、「白血球（ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ）」または「白血球（ＷＢＣ：ｗｈｉｔｅ　ｂｌｏｏｄ　ｃｅｌｌ）」という用語は、免疫細胞の１種を指す。ほとんどの白血球は骨髄で作られ、血液やリンパ組織に見られる。白血球は、生体が感染症や他の疾患と戦うのを助ける。顆粒球、単球、およびリンパ球は白血球である。

本明細書で使用されるとき、「リンパ球」という用語は、生体を疾患から防御するのに大きな役割を果たす小さな白血球（白血球）（ｗｈｉｔｅ　ｂｌｏｏｄ　ｃｅｌｌ　（ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ））を指す。リンパ球には主に２つの種類：Ｂ細胞およびＴ細胞が存在する。Ｂ細胞は、細菌や毒素を攻撃する抗体を作り、Ｔ細胞は体細胞自体を攻撃する。リンパ球は、他の多くの種類の細胞の機能的活性を調節する生成物（リンホカイン）を分泌し、そしてしばしば慢性炎症の部位に存在する。

【０１１９】

本明細書で使用されるとき、「マクロファージ」という用語は、骨髄中の単球性幹細胞から生じる単核の活発な食細胞を指す。これらの細胞は生体内に広く分布しており、形態と運動性が変動する。食作用活性は通常、ある特定の免疫グロブリンおよび補体系の成分を含む血清認識因子によって媒介されるが、非特異的でもあり得る。マクロファージはまた、特にリンパ球に対する抗原の提示において、抗体の産生と細胞媒介性免疫応答との両方に関与している。それらは様々な免疫調節分子を分泌する。

本明細書で使用されるとき、「主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）」という用語は、組織適合性を決定することによって全ての脊椎動物における免疫系の必須部分を制御する細胞表面分子をコードする１組の遺伝子を指す。ＭＨＣ分子の主な機能は、病原体に由来するペプチド断片に結合し、そしてそれらを適切なＴ細胞による認識のために細胞表面に提示することである。

【０１２０】

本明細書で使用されるとき、「模倣体」という用語は、ペプチドの活性を模倣する化学部分を含む化合物を指す。例えば、ペプチドが機能的活性を有する２つの荷電化学部分を含む場合、模倣体は２つの荷電化学部分を空間的配向および拘束構造に配置し、その結果、荷電化学機能が三次元空間で維持される。模倣体はそれ自体ペプチドであり得る。模倣体はまた、非ペプチドであってもよく、および／または非ペプチド結合、例えば、非限定的に、Ψ結合によって連結されたアミノ酸を含んでもよく［Benkirane, N., et al. J. Biol. Chem., Vol. 271: 33218-33224, (1996)］、米国特許第５，６３７，６７７号およびその親出願は、模倣体の産生について詳細な案内を含む。

本明細書で使用されるとき、「分裂促進性化合物」という用語は、増殖または培養に適した少なくとも１組の条件下で少なくとも１つの細胞型について細胞分裂速度に影響を及ぼすことができる化合物を指す。

本明細書で使用されるとき、「調節する」という用語は、ある特定の尺度または割合を

調節、変更、適応、または調整することを意味する。

【０１２１】

本明細書で使用されるとき、「多分化能（ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｔ）」という用語は、１種を超える細胞型に発生することができるが、多能性（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ）細胞よりも限定されている細胞を指す。成体幹細胞および臍帯血幹細胞は多分化能（ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｔ）と考えられている。

本明細書で使用されるとき、「ネガティブセレクション」という用語は、残存する対象の細胞型を除く全ての細胞型の枯渇または除去を指す。

【０１２２】

本明細書で使用されるとき、「経口グルコース負荷試験（ＯＧＴＴ）」という用語は、終夜の断食後に医療専門家によって実施される糖尿病前症および糖尿病を診断するための試験を指す。血液試料が採取され、続いて患者は高グルコース飲料を飲む。血液試料が２～３時間間隔で採取される。試験結果は標準と比較されて、生体がどのように経時的にグルコースを使用するかを示す。２時間の血中グルコースが２００ｍｇ／ｄＬ以上のときに糖尿病と診断される。

本明細書で使用されるとき、「パラクリンシグナル伝達」という用語は、隣接細胞に作用する分泌シグナル分子を介した短距離の細胞間情報伝達を指す。

本明細書で使用されるとき、「糖尿病前症」という用語は、血中グルコースレベルが正常よりも高いが糖尿病と診断するほど高くはない状態を指す。糖尿病前症を有する人々は、２型糖尿病を発症する危険性ならびに心臓病および脳卒中の危険性が高い。糖尿病前症を示す結果は：５．７％～６．４％のＡ１Ｃ、１００ｍｇ／ｄＬ～１２５ｍｇ／ｄＬの空腹時血中グルコース、および１４０ｍｇ／ｄＬ～１９９ｍｇ／ｄＬの経口グルコース負荷試験（ＯＧＴＴ）２時間の血中グルコースを含む。

【０１２３】

「多能性（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ）」という用語は、生体を構成する全ての細胞型を生じさせることができる細胞を指す。例えば、胚性幹細胞は多能性（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ）と考えられている。誘導多能性（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ）幹細胞（ｉＰＳＣ）は、胚性幹細胞の明確な特性を維持するために重要な遺伝子および因子を強制的に発現させることによって胚性幹細胞様の状態に遺伝的に再プログラムされた成体細胞である。多能性（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ）マーカーには、非限定的に、Ｏｃｔ－４、Ｎａｎｏｇ、およびＳｏｘ－２が含まれる。

本明細書で使用されるとき、「ポジティブセレクション」という用語は、標的細胞集団の単離を指す。

【０１２４】

本明細書で使用されるとき、「前駆細胞」という用語は、分化することしかできないがそれ自体はもはや成熟することはできない幹細胞の初期の子孫を指す。前駆細胞は、成熟表現型に成熟する前駆体細胞に成熟する。前駆細胞はコロニー形成単位（ＣＦＵ）またはコロニー形成細胞（ＣＦＣ）と呼ばれる。前駆細胞の特定の系統は、ＣＦＵ－Ｅ（赤血球）、ＣＦＵ－Ｆ（線維芽細胞）、ＣＦＵ－ＧＭ（顆粒球／マクロファージ）、およびＣＦＵ－ＧＥＭＭ（多能性造血前駆細胞）などの、しかしこれらに限定されない接尾辞によって示される。

本明細書で使用されるとき、「増殖する」という用語およびその様々な文法形態は、数の増加を指す。用語「増殖する」および「拡大する」は、本明細書では交換可能に使用される。

「増やす」または「増やすこと」という用語は、数または量を増加させるために複製することを指す。

本明細書で使用されるとき、「精製する」という用語は、外来物質または無関係の要素から解放することを指す。

本明細書で使用されるとき、「低減された」または「低減させる」という用語は、程度、強度、度合い、サイズ、量、密度または数の減少、低下、減衰、または軽減を指す。

本明細書で使用されるとき、「制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）」という用語は、以前はサプレッサーＴ細胞として知られており、自己抗原に対する寛容を維持して自己免疫疾患を無効にするために免疫系を調節するＴ細胞の亜集団を指す。

【０１２５】

本明細書で名詞として使用されるとき、「修復」という用語は、機能を回復させる任意の修正、強化、再調整、修復、補完、健全化、更新、補修、またはパッチ当てなどを指す。動詞として使用されるとき、それは修正すること、強化すること、再調整すること、修復すること、補完すること、健全化すること、更新すること、補修すること、パッチ当てすること、または他の形で機能を回復することを意味する。

本明細書で使用されるとき、「幹細胞」という用語は、最終分化を経て１種を超える異なる細胞表現型へと分化することができる娘細胞を生成することができる、自己再生する能力を有する高い増殖能を有する未分化細胞を指す。

【０１２６】

「対象」または「個体」または「患者」という用語は、非限定的に、ヒト、非ヒト霊長類を含む哺乳動物起源、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、およびウマなどの家畜、イヌおよびネコなどの飼育哺乳動物、マウス、ラットおよびモルモットなどのげっ歯類を含む実験動物の動物種のメンバーを指すために交換可能に用いられる。

【０１２７】

本明細書で使用されるとき、「そのような治療を必要とする対象」という用語は、（ｉ）自己免疫成分を有する障害に罹患するであろう患者、（ｉｉ）自己免疫成分を有する障害に罹患している患者、または（ｉｉｉ）自己免疫成分を有する疾患に罹患した患者を指す。いくつかの実施形態によると、この語句はまた、語句の文脈および使用がそうでないことを示さない限り、（ｉ）記載された幹細胞教育体（ＳＣＥ）治療を受けることになる患者；（ｂ）記載されたＳＣＥ治療を受けている患者；または（ｃ）記載されたＳＣＥ処理を受けた患者を指すのに使用される。

【０１２８】

本明細書で使用されるとき、「実質的」、「実質的に」、「本質的に」、または「本質的に」という用語は、これらの用語によって説明される特徴が、ある量で存在するか、または本願特許請求の範囲に係る発明の実施に関連する技術的効果をもたらす影響を有することを示す。例えば、組成物中の物質の「実質的な量」は、その物質に起因する技術的効果をもたらす量である。同様に、組成物が特定の物質を「実質的に全く含まない」と示される場合、これは、その量が組成物中の他の成分に技術的な影響を及ぼさず、それ自体が「差異を生じない」限り、組成物がわずかな量の物質を含むことが許されることを意味し、換言すると、「実質的に全く含まない」および「本質的に全く含まない」は、例えば、痕跡量または効果は、それらが全体的な技術的な影響を有さない限り存在し得るということを意味する。本明細書で使用されるとき、「本質的に含まない」または「実質的に含まない」という用語は、汚染物質、不純物、または物質をかなりまたは顕著に含まないことを指し、例えば、分析プロトコールにより決定されるとき、汚染物質、不純物、または物質は１５％未満、１４％未満、１３％未満、１２％未満、１１％未満、１０％未満、９％未満、８％未満、７％未満、６％未満、５％未満、４％未満、３％未満、２％未満、または１％未満の量で存在する。

本明細書中で使用されるとき、用語「実質的に均質」とは、細胞に適用される場合、１つ以上の分化マーカーについてのアッセイによって決定されるとき、集団中の細胞の少なくとも約７０％が同一の細胞型である細胞集団を指す。

本明細書で使用されるとき、「抑制する」という用語は、生物学的事象を阻害する、隠す、または無効にすることを意味する。

【０１２９】

「表面抗原」という用語は、細胞膜との会合などによって、典型的には細胞の外表面に局在する物質を意味する。細胞「マーカー」は、その細胞または細胞型に特徴的であるように、細胞と十分に付随する検出可能な要素である。例えば、細胞表面マーカーは、最小

限の細胞活性の破壊によって検出することができ、細胞型の特性決定、その同定、そして最終的にはその単離を促進することができる。細胞選別技術は、細胞表面マーカーがポジティブセレクションまたはネガティブセレクションのいずれかに、すなわち細胞集団からの選択または除外に使用され得る細胞バイオマーカーに基づく。

【０１３０】

本明細書で使用されるとき、「Ｔ細胞区画」という用語は、区画の細胞が互いに遊走し相互作用することができる分泌細胞外巨大分子の複雑なネットワークに埋め込まれたＴリンパ球の協同的集合体を指す。Ｔ細胞区画の例示的なメンバーには、ナイーブＴ細胞集団、抗原経験したＴ細胞集団、制御性Ｔ細胞集団（Ｔｒｅｇ）、ヘルパーＴ細胞集団、細胞傷害性Ｔ細胞集団、メモリーＴ細胞集団（T_{CM}）、エフェクターＴ細胞集団（T_{EM}）が含まれる。

【０１３１】

「治療量」、「治療有効量」、「有効な量」、「有効量」、または「薬学的有効量」という用語は、意図した治療による利益をもたらすのに十分な量を指すために交換可能に用いられる。しかしながら、曝露レベルは、傷害の種類、年齢、体重、性別、患者の病状、状態の重篤度、投与経路、および使用される特定の活性剤を含む様々な要素に基づいている。したがって、投与計画は大きく異なり得るが、標準的な方法を用いて医師によって日常的に決定され得る。さらに、用語「治療有効量」および「薬学的有効量」は、予防的または予防的な量を含む。記載された発明の予防的または予防的適用において、ＳＣＥ装置および治療は、危険性を排除または低減させるのに十分な量で、または、疾患、障害もしくは状態の生化学的、組織学的および／もしくは行動上の症状、その合併症、ならびに疾患、障害もしくは状態の発症中に現れる中間の病理学的表現型を含む、疾患、障害もしくは状態の重篤度を低下させ、もしくはその発症を遅らせるのに十分な量で、疾患、障害もしくは状態に罹患しやすいかもしくは他の危険性がある患者を治療するために使用される。

本明細書で使用されるとき、「治療成分」という用語は、ある割合の集団における特定の疾患の徴候の進行を排除、低減、または予防する治療上有効な投与量（すなわち用量および投与頻度）を指す。一般的に使用される治療成分の例はＥＤ５０であり、これは集団の５０％における特定の疾患の徴候に対して治療的に有効である特定の投与量における用量を表す。

本明細書で使用されるとき、「治療効果」という用語は、治療の結果を意味し、その結果は、望ましくかつ有益であると判断される。治療効果は、直接的または間接的な、疾患の徴候の阻止、軽減、または排除を含み得る。治療効果はまた、直接的または間接的な、疾患の徴候の進行の阻止、軽減、または排除を含み得る。

【０１３２】

「治療濃度域」という用語は、許容できない毒性を伴わずに治療有効性をもたらす濃度範囲を指す。ある用量の薬物の投与後、その効果は通常特徴的な時間的パターンを示す。薬物濃度が所望の効果のための最小有効濃度（「ＭＥＣ」）を超える前に遅延期間が存在する。応答の開始に続いて、薬物が吸収されそして分配され続けるにつれて効果の強度は増加する。これはピークに達し、その後、薬物除去は効果の強度の低下をもたらし、それは薬物濃度がＭＥＣを下回るときに消失する。したがって、薬物の作用の持続期間は、濃度がＭＥＣを超える期間によって決定される。治療目的は、最小限の毒性で所望の応答のための治療濃度域内の濃度を得て維持することである。所望の効果についてのＭＥＣ以下の薬物応答は治療量以下であろうが、有害作用については毒性の確率はＭＥＣを超えて増加するであろう。薬物投与量を増減することは、反応曲線が強度スケールの上下にシフトさせ、これは薬物の効果を調節するために使用される。服用量を増加すると、薬の作用時間も長くなるが、有害作用の可能性が高まる危険性がある。したがって、薬物が無毒でない限り、用量を増やすことは薬物の作用期間を拡張するための有用な戦略ではない。

【０１３３】

代替的に、治療濃度域内で濃度を維持するために別の用量の薬物を投与する必要がある。一般的に、薬物の治療範囲の下限は、可能な限り最大の治療効果の約半分をもたらす薬

物濃度にほぼ等しいと思われ、治療範囲の上限は、約５％以下から約１０％までの患者に毒性効果があるようなものである。これらの数値は非常に変動しやすくなり得、そしてある患者は治療範囲を超える薬物濃度から大いに恩恵を受け得るが、他の患者ははるかに低い値で顕著な毒性を被り得る。治療目的は、治療濃度域内で定常状態の薬物レベルを維持することである。ほとんどの薬物について、この所望の範囲に関連する実際の濃度が知られているわけでも知られている必要もなく、有効性および毒性が一般に濃度依存的であること、ならびに薬物投与量および投与頻度が薬物のレベルにいかに影響を及ぼすかということを理解すれば十分である。有効性と毒性をもたらす濃度の間にわずかな（２～３倍の）違いがある少数の薬物については、効果的な治療に関連する血漿中濃度範囲が定義されている。

この場合、有効性および最小の毒性に関連する薬物の所望の目標定常状態濃度（通常は血漿中）が選択され、この値を達成すると予想される投与量が計算される、目標レベル戦略が合理的である。続いて薬物濃度を測定し、必要な場合には投与量を調整して標的をより厳密に近似させる。

【０１３４】

ほとんどの臨床状況では、薬物は、治療濃度域に関連する薬物の定常状態濃度を維持するために、一連の反復用量でまたは連続注入として投与される。選択された定常状態または目標濃度（「維持用量」）を維持するために、投入速度が損失速度と等しくなるように薬物投与速度を調整する。臨床医が血漿中の薬物の所望の濃度を選択し、そして特定の患者におけるその薬物のクリアランスおよび生物学的利用能を知っている場合、適切な用量および投与間隔を計算することができる。

本明細書中で使用されるとき、「全能性細胞」という用語は、生体中のありとあらゆる細胞型に加えて胚体外細胞または胎盤の細胞を生じさせる可能性を有する細胞を指す。受精後の最初の２～３回の細胞分裂中の胚細胞は全能性細胞である。

【０１３５】

「治療する」または「治療すること」という用語は、疾患、状態、または障害の進行を無効にすること、実質的に阻害すること、緩徐化すること、または好転させること、状態の臨床的または審美的症状を実質的に改善すること、疾患、状態、または障害の臨床的または審美的症状の発症を実質的に防ぐこと、および有害または迷惑な症状から保護することを含む。本明細書で使用されるとき、「治療する」または「治療すること」という用語はさらに、以下のうちの１つ以上を達成することを指す：（ａ）障害の重篤度を低減すること；（ｂ）治療される障害に特徴的な症状の発症を制限すること；（ｃ）治療される障害に特徴的な症状の悪化を制限すること；（ｄ）以前に障害を経験したことのある患者における障害の再発を制限すること；および（ｅ）以前にその障害に対して症候性であった患者における症状の再発を制限すること。

【０１３６】

本明細書で使用されるとき、「１型糖尿病」という用語は、生体の免疫系が膵臓のインスリン産生ベータ細胞を攻撃してそれらを破壊するときに起こるインスリンの全欠乏によって引き起こされる高い血中グルコースレベルを特徴とする状態を指す。この場合、膵臓はインスリンをほとんどまたはまったく産生しない。１型糖尿病は若い人に最もよく発症するが、成人においても発生する可能性がある。

【０１３７】

本明細書で使用されるとき、「２型糖尿病」という用語は、インスリンの欠乏または生体がインスリンを効率的に使用することができないことのいずれかによって引き起こされる高い血中グルコースレベルを特徴とする状態を指す。２型糖尿病は中年およびそれ以上の成人で最も頻繁に発症するが、若い人にも発症することがある。

本明細書で使用されるとき、「臍帯（ＵＣ）単核細胞（ＭＮＣ）」、「（ＵＣ－ＭＮＣ）」という用語は、臍帯血（ＣＢ）に由来する、リンパ球、単球、幹細胞、および前駆細胞、ならびに間葉系間質細胞などの造血系統の細胞を指す。

【０１３８】

本明細書で使用されるとき、「未分化」という用語は、より特殊化された細胞の特徴を発現していない細胞を指す。「分化した」細胞は、より特殊化された細胞の特徴を有するものである。「未分化」および「分化した」という用語は互いに相対的なものである。分化細胞および未分化細胞は、例えば、相対的なサイズおよび形状などの形態学的特徴、核体積の細胞質体積に対する比、ならびに分化の既知のマーカーの検出可能な存在などの発現特性によって互いに区別される。例示的な分化マーカーには、タンパク質、炭水化物、脂質、核酸、機能的特徴、および形態学的特徴が含まれる。

【０１３９】

リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患を治療する方法

一態様によると、記載された発明は、リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患を治療する方法であって、

（１）リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患に罹患している対象からの単核細胞を含む全血試料を滅菌条件下で取得することと；

（２）（１）の全血試料を処理施設に搬送することと；

（３）全血試料から単核細胞（ＭＮＣ）を滅菌的に精製して単核細胞調製物を形成することと；

（４）少なくとも８０％コンフルエントである接着性臍帯血幹細胞（ＵＣ－ＳＣ）の生存可能な集団を含むバイオリアクター装置に単核細胞調製物を導入することと；

（５）単核細胞調製物中の単核細胞とＣＢ－ＳＣが滅菌条件下で少なくとも０．１時間、少なくとも０．２時間、少なくとも０．３時間、少なくとも０．４時間、少なくとも０．５時間、少なくとも０．６時間、少なくとも０．７時間、少なくとも０．８時間、少なくとも０．９時間、少なくとも１．０時間、少なくとも１．５時間、少なくとも２時間、少なくとも２．５時間、少なくとも３時間、少なくとも３．５時間、少なくとも４時間、少なくとも４．５時間、少なくとも５時間、少なくとも５．５時間、少なくとも６時間、少なくとも６．５時間、少なくとも７時間、少なくとも７．５時間、または少なくとも８時間相互作用することができるように単核細胞調製物をＣＢ－ＳＣと共培養して、教育された単核細胞生成物を形成することと；

（６）バイオリアクター装置から滅菌条件下で教育された単核細胞生成物を採取することと；

（７）少なくとも10^4、少なくとも10^5、少なくとも10^6、少なくとも10^7、または、少なくとも10^8の単核細胞を有する、教育された単核細胞生成物の純度、滅菌性、およびパーセント生存率を確認することと；

（８）教育された単核細胞生成物を対象への血管内注入のために臨床施設に搬送することと；

（９）治療有効量の教育された単核細胞生成物を対象に血管内注入することと；

（１０）対象の生涯にわたって必要に応じて複数の注入日で、ステップ（１）から（９）を順番に繰り返すことと

を順番に含み、

治療有効量の教育された単核細胞生成物は、対象のＴ細胞区画における自己反応性を調節するため、および免疫疾患の症状を軽減するために有効である、方法を提供する。

いくつかの実施形態によると、リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患は、１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）または２型糖尿病（Ｔ２Ｄ）からなる群から選択される。いくつかの実施形態によると、リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患は、糖尿病である。いくつかの実施形態によると、リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患は、１型糖尿病である。いくつかの実施形態によると、リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患は、２型糖尿病である。

【０１４０】

いくつかの実施形態によると、単核細胞集団は、免疫調節細胞の集団を含む。いくつかの実施形態によると、免疫調節細胞の集団は、白血球の集団を含む。いくつかの実施形態によると、白血球の集団は、リンパ球の集団、顆粒球の集団、好塩基球の集団、単球の集団、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態によると、免疫調節細胞の集

団は、抗原捕捉細胞の集団、抗原提示細胞の集団、またはその両方を含む。いくつかの実施形態によると、抗原提示細胞の集団はＣＤ８０、ＣＤ８６、またはその両方を発現する。いくつかの実施形態によると、抗原提示細胞の集団はマクロファージ、樹状細胞、またはその両方を含む。いくつかの実施形態によると、リンパ球の集団は、Ｔリンパ球の集団、Ｂリンパ球の集団、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の集団、またはそれらの組み合わせを含む。

【０１４１】

いくつかの実施形態によると、Ｔリンパ球の集団は１つ以上のＴ細胞の集団を含む。いくつかの実施形態によると、Ｔ細胞の集団は活性化Ｔ細胞を含む。いくつかの実施形態によると、活性化Ｔ細胞の集団は、ナイーブＴ細胞、抗原刺激されたＴ細胞、活性化Ｔ細胞、エフェクターＴ細胞、細胞傷害性Ｔ細胞、Ｔヘルパー細胞、メモリーＴ細胞、ＮＫ細胞、およびＴｒｅｇ細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態によると、Ｔ細胞の集団は、１つ以上の炎症メディエーター（リンホカイン）を発現するＴ細胞を含む。いくつかの実施形態によると、炎症メディエーターは、インターロイキン－１－β（ＩＬ－１β）、ＩＬ－２、インターロイキン－４（ＩＬ－４）、ＩＬ－５、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、インターロイキン－８（Ｉｌ－８）、ＩＬ－１０、腫瘍壊死因子－α（ＴＮＦ－α）、インターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）、インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）、およびリンホトキシンからなる群から選択される。いくつかの実施形態によると、Ｔリンパ球の集団は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）／ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ４０リガンド（ＣＤ４０Ｌ）、Ｆｏｘ３、ｆａｓ、ＭＨＣ　Ｉ、ＭＨＣ　ＩＩ、免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ＩＴＡＭ）、ＺＡＰ７０（ゼータ関連タンパク質からなる群から選択される１つ以上のマーカーを発現するＴ細胞を含む。

【０１４２】

いくつかの実施形態によると、Ｂリンパ球の集団は１つ以上のＢ細胞の集団を含む。いくつかの実施形態によると、Ｂ細胞の集団は活性化Ｂ細胞を含む。いくつかの実施形態によると、Ｂ細胞の集団は、ナイーブＢ細胞、活性化Ｂ細胞、プラズマプラスト（ｐｌａｓｍａｐｌａｓｔｓ）、およびメモリーＢ細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態によると、Ｂリンパ球の集団は、ＭＨＣクラスＩＩ、ＣＤ４０、免疫グロブリンからなる群から選択される１つ以上のマーカーを発現するＢ細胞を含む。

【０１４３】

全血試料から単核細胞を精製する方法は周知である。一実施形態によると、赤血球は、バフィーコートを赤血球から分離するために、例えば、Ｆｉｃｏｌｌ　Ｐａｑｕｅ分画を使用する密度勾配遠心分離によって除去される。「バフィーコート」という用語は、白血球のほとんどを含む血液試料の薄い灰色がかった白色の画分を指す。

いくつかの実施形態によると、全血試料からの単核細胞の精製は、自動アフェレーシス分離器を用いたアフェレーシスによる。手短に、全血が患者から採取され、次いで回転チャンバーを含む装置を通過する。血液は、チャンバーの壁に沿って重力によってその成分（血漿、多血小板血漿、白血球および赤血球）に分離する。単核細胞を選別し、残りの血液成分を患者の血流に再導入する。

いくつかの実施形態によると、磁気ビーズ活性化細胞選別は、末梢血単核細胞から特定の細胞集団を精製するために使用されるポジティブセレクション技術である。所望の細胞の量および活性はそのようなプロトコールの後に減少する可能性があるので、より穏やかな基質接着およびネガティブセレクションのプロトコールを好む人もいる。

【０１４４】

いくつかの実施形態によると、バイオリアクター装置は、接着性臍帯血幹細胞（ＵＣ－ＳＣ）の生存可能な集団を含む１つ以上の表面を含む。ＵＣ－ＳＣを含むバイオリアクターを調製する方法は、

（ａ）健康なドナーから取得した新鮮な臍帯血ユニットを取得することと；

（ｂ）密度勾配遠心分離により臍帯血から単核細胞画分を単離することと；

（ｃ）赤血球を除去することと；

（ｄ）ＵＣ単核細胞を生理緩衝食塩溶液で洗浄することと；
（ｅ）バイオリアクター内で無血清培地中に少なくとも１×１０^{6}細胞の播種密度でＵＣ単核細胞を播種することと；
（ｆ）ＵＣ単核細胞を無血清培地で培養し、２～３日ごとに半分の培地又は前記培地を交換して非接着性細胞を除去し、少なくとも１０日間、少なくとも８０％コンフルエントまで増殖させることと；
（ｇ）ＵＣ－ＳＣ培養の試料の滅菌性および生存性を確認することと
を順番に含むプロセスによる。

【０１４５】

ＣＢ－ＳＣの培養物は円形でありそしてバイオリアクター装置の底面に付着している。いくつかの実施形態によると、バイオリアクター装置の表面はコーティングされていないプラスチックである。いくつかの実施形態によると、バイオリアクター装置の表面は正に荷電した表面である。いくつかの実施形態によると、バイオリアクター装置の表面は疎水性表面、例えば、ポリスチレンまたはガラスである。いくつかの実施形態によると、バイオリアクター装置の表面はコーティングされている。いくつかの実施形態によると、バイオリアクター装置の表面は細胞フィーダー層を含まない。

【０１４６】

いくつかの実施形態によると、臍帯血単核細胞は、共培養の前の少なくとも１０日間で、少なくとも１１日間で、少なくとも１２日間で、少なくとも１３日間で、少なくとも１４日間で、少なくとも１５日間で、少なくとも１６日間で、少なくとも１７日間で、少なくとも１８日間で、少なくとも１９日間で、少なくとも２０日間で、または少なくとも２１日間で少なくとも８０％コンフルエントに増殖する。本発明のいくつかの実施形態によると、臍帯血単核細胞は、共培養の前の少なくとも１０日間で、少なくとも１１日間で、少なくとも１２日間で、少なくとも１３日間で、少なくとも１４日間で、少なくとも１５日間で、少なくとも１６日間で、少なくとも１７日間で、少なくとも１８日間で、少なくとも１９日間で、少なくとも２０日間で、または少なくとも２１日間で少なくとも８５％コンフルエントに増殖する。本発明のいくつかの実施形態によると、臍帯血単核細胞は、共培養の前の少なくとも１０日間で、少なくとも１１日間で、少なくとも１２日間で、少なくとも１３日間で、少なくとも１４日間で、少なくとも１５日間で、少なくとも１６日間で、少なくとも１７日間で、少なくとも１８日間で、少なくとも１９日間で、少なくとも２０日間で、または少なくとも２１日間で少なくとも９０％コンフルエントに増殖する。本発明のいくつかの実施形態によると、臍帯血単核細胞は、共培養の前の少なくとも１０日間で、少なくとも１１日間で、少なくとも１２日間で、少なくとも１３日間で、少なくとも１４日間で、少なくとも１５日間で、少なくとも１６日間で、少なくとも１７日間で、少なくとも１８日間で、少なくとも１９日間で、少なくとも２０日間で、または少なくとも２１日間で少なくとも９５％コンフルエントに増殖する。本発明のいくつかの実施形態によると、臍帯血単核細胞は、共培養の前の少なくとも１０日間で、少なくとも１１日間で、少なくとも１２日間で、少なくとも１３日間で、少なくとも１４日間で、少なくとも１５日間で、少なくとも１６日間で、少なくとも１７日間で、少なくとも１８日間で、少なくとも１９日間で、少なくとも２０日間で、または少なくとも２１日間で少なくとも９６％コンフルエントに増殖する。本発明のいくつかの実施形態によると、臍帯血単核細胞は、共培養の前の少なくとも１０日間で、少なくとも１１日間で、少なくとも１２日間で、少なくとも１３日間で、少なくとも１４日間で、少なくとも１５日間で、少なくとも１６日間で、少なくとも１７日間で、少なくとも１８日間で、少なくとも１９日間で、少なくとも２０日間で、または少なくとも２１日間で少なくとも９７％コンフルエントに増殖する。本発明のいくつかの実施形態によると、臍帯血単核細胞は、共培養の前の少なくとも１０日間で、少なくとも１１日間で、少なくとも１２日間で、少なくとも１３日間で、少なくとも１４日間で、少なくとも１５日間で、少なくとも１６日間で、少なくとも１７日間で、少なくとも１８日間で、少なくとも１９日間で、少なくとも２０日間で、または少なくとも２１日間で少なくとも９９％コンフルエントに増殖する。本発明のいくつ

かの実施形態によると、臍帯血単核細胞は、共培養の前の少なくとも１０日間で、少なくとも１１日間で、少なくとも１２日間で、少なくとも１３日間で、少なくとも１４日間で、少なくとも１５日間で、少なくとも１６日間で、少なくとも１７日間で、少なくとも１８日間で、少なくとも１９日間で、少なくとも２０日間で、または少なくとも２１日間で少なくとも９９％コンフルエントに増殖する。

【０１４７】

患者からの単核細胞調製物は、患者の単核細胞とＵＣ－ＳＣ細胞とを共培養するためにバイオリアクターに導入される。いくつかの実施形態によると、単核調製物はＵＣ－ＣＢ層から分離されている。いくつかの実施形態によると、患者の単核細胞は非接着性である。いくつかの実施形態によると、患者の単核細胞は、ＵＣ－ＣＢ層の細胞と接触している。いくつかの実施形態によると、培地は増殖因子、可溶性炎症メディエーターなどを含む。いくつかの実施形態によると、培地は、患者の単核細胞とＵＣ－ＣＢ細胞層との両方を支持するのに効果的である。いくつかの実施形態によると、培地には、患者の単核細胞およびＵＣ－ＣＢ細胞によって産生される免疫調節メディエーターと可溶性因子が含まれている。

いくつかの実施形態によると、相互作用条件はバイオリアクターの穏やかな揺動を含む。いくつかの実施形態によると、バイオリアクターの穏やかな揺動は断続的である。いくつかの実施形態によると、培地はバイオリアクターを通して循環している。

【０１４８】

患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも２時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも３時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも４時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも５時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも６時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも７時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも８時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも９時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１０時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１１時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１２時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１３時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１４時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１５時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１６時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１７時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１８時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１９時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも２０時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも２１時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも２２時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも２３時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも２４時間相互作用条件下で共培養する。

【０１４９】

いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：２の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：５の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：１０の比で共培養される。いくつかの実施形態によ

ると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：２０の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：５０の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：６０の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：７０の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：８０の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：９０の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：１００の比で共培養される。

この相互作用の結果は、教育された単核細胞生成物である。

教育された単核細胞生成物は、バイオリアクター装置から滅菌条件下で採取される。

教育された単核細胞生成物の純度、滅菌性、および生存性；パーセント生存率を確認するためのアッセイは以下を含む。

【０１５０】

いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物のエンドトキシンレベルは、約０．５エンドトキシン単位／ｍＬ未満であり、そして教育された単核細胞生成物は、グラム染色陰性である。教育された単核細胞生成物はまた、例えば、米国ＦＤＡの医薬品安全性試験実施基準の要件に従ってリアルタイムＰＣＲによって、マイコプラズマおよび滅菌性について試験される。

【０１５１】

「検出可能な応答」とは、検出試薬を用いてまたは用いずに実施することができるアッセイにおいて検出することができる任意のシグナルまたは応答を指す。検出可能な応答としては、放射性崩壊およびエネルギー（例えば、蛍光、紫外線、赤外線、可視）放出、吸収、偏光、蛍光、燐光、透過、反射、または共鳴移動が含まれるが、これらに限定されない。検出可能な応答にはまた、クロマトグラフィー移動度、濁度、電気泳動移動度、質量スペクトル、紫外線スペクトル、赤外線スペクトル、核磁気共鳴スペクトル、およびＸ線回折も含まれる。代替的に、検出可能な応答は、融点、密度、導電率、表面弾性波、触媒活性、または元素組成などの生体物質の１つ以上の特性を測定するためのアッセイの結果であり得る。「検出試薬」は、対象の物質の有無を示す検出可能な応答を生じる任意の分子である。検出試薬は、抗体、核酸配列、および酵素などの任意の様々な分子を含む。検出を促進するために、検出試薬はマーカーを含み得る。

【０１５２】

マーカーは、任意の様々な確立された方法によってアッセイすることができる。抗体に基づく技術は、蛍光標識細胞分取（ＦＡＣＳ）免疫蛍光、酵素免疫組織化学、および免疫ブロッティングを含むが、これらに限定されない。さらなるアッセイは、サイトカインレベルもしくはｍＲＮＡの検出のためのアッセイ、または特定のマーカーのコード化を検出する「ウエスタンブロット」技術を含み得る。「ウエスタンブロット」という用語は、複雑な混合物中のタンパク質を同定するための方法を指し；タンパク質はゲル媒体中で電気泳動的に分離され；対象のタンパク質に結合し、位置を特定し、そして可視化することを可能にする特異的抗体に曝露される分離されたタンパク質を含むタンパク質結合シートまたは膜にゲルから転写される。さらなるアッセイは、ポリメラーゼ連鎖反応、ブロットハイブリダイゼーション（ノーザンブロットとしても知られる）およびインサイチュハイブリダイゼーションを含み得る。これらおよび他のそのようなアッセイの詳細は、例えば、その各々が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第５，６５６，４９３号；米国特許第５，３３３，６７５号；米国特許第５，２３４，８２４号；米国特許第５，１８７，０８３号、およびJ. Sambrook and D. W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd ed., 2001; F. M. Ausubel, Ed., Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols; 5th ed., 2002およびE. Harlow and D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988を含む標準的な参照文献に記載される。

【０１５３】
いくつかの実施形態によると、検出可能なマーカーには、非限定的に、自己免疫調節因子（Ａｉｒｅ）、ＣＤ３$^{+}$、ＣＤ４$^{+}$、ＣＤ８$^{+}$、ＣＤ１４$^{+}$、ＣＤ１６$^{+}$、ＣＤ１９$^{+}$、ＣＤ２５$^{+}$、ＣＤ４５$^{+}$、ＣＤ５６$^{+}$、ＣＤ８０$^{+}$、ＣＤ８６$^{+}$、ＣＤ２７０、Ｆｏｘｐ３$^{+}$、ＩＬ－γ、ＩＬ－β、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２２、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＴＧＦ－β１、一酸化窒素（ＮＯ）、ＰＤ－Ｌ１、ＢＴＬＡ、ＴＮＦ－α、Ｔｈ１／Ｔｈ２、Ｃ－ペプチド、ＣＣＲ－７、ＯＣＴ－４、Ｎａｎｏｇ、ステージ特異的胎児性抗原（ＳＳＥＡ）－３、およびＳＳＥＡ－４が含まれる。

【０１５４】
細胞生存率は、挿入ＤＮＡ色素７－アミノアクチノマイシンＤ（７ＡＡＤ）を取り込む死滅しつつある細胞を排除することによって決定される。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、７－ＡＡＤによって少なくとも約７０％生存可能である。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、７－ＡＡＤによって少なくとも約７５％生存可能である。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、７－ＡＡＤによって少なくとも約８０％生存可能である。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、７－ＡＡＤによって少なくとも約９０％生存可能である。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、７－ＡＡＤによって少なくとも約９５％生存可能である。

【０１５５】
フローサイトメトリーによって細胞数を決定するために、末梢血試料から取得された細胞を、ＰｅｒＣＰ／Ｃｙ５．５コンジュゲート抗ＣＤ３、ＰｅｒＣＰ／Ｃｙ５．５コンジュゲート抗ＣＤ４、ＰＥコンジュゲート抗ＣＤ８、ＦＩＴＣコンジュゲート抗ＣＤ４５ＲＡ、ＰＥコンジュゲート抗ＣＤ４５ＲＯ、ＰＥコンジュゲート抗ＣＤ５６、ＡＰＣコンジュゲート抗ＣＣＲ７を含む、マウス抗ヒトｍＡｂ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）と共にインキュベートする。細胞を、ＢＤ ＭｕｌｔｉＴＥＳＴ試薬ＣＤ３ＦＩＴＣ／ＣＤ８ ＰＥ／ＣＤ４５ ＰｅｒＣＰ／ＣＤ４ ＡＰＣ およびＣＤ３ ＦＩＴＣ／ＣＤ１６＋ＣＤ５６ ＰＥ／ＣＤ４５ ＰｅｒＣＰ／ＣＤ１９ ＡＰＣ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ Ｊｏｓｅ、ＣＡ）によって免疫染色する。アイソタイプが一致したマウス抗ヒトＩｇＧ抗体（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）は、全てのフルオレセインコンジュゲートＩｇＧ ｍＡｂに対する陰性対照として役立つ。染色後、細胞を回収してＢＤ ＦＡＣＳｃａｌｉｂｕｒ（商標）Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒを用いて分析する。最終的なデータは、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ Ｐｒｏソフトウェア（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ、ＭＤ）を用いて解析する。

【０１５６】
エクスビボ試験のために、細胞を室温で３０分間染色し、次いでフロー解析の前にＰＢＳで洗浄する。細胞は、ＡＰＣ－ＡＦ７５０－コンジュゲート抗ＣＤ４、ＡＰＣ－ＡＦ７５０－またはＫｒｏｍｅ Ｏｒａｎｇｅ－コンジュゲート抗ＣＤ８、ＰＥ－またはＦＩＴＣ－コンジュゲート抗ＣＤ４５ＲＡ、ＦＩＴＣ－コンジュゲート抗ＣＤ４５ＲＯ、ＥＣＤ－コンジュゲート抗ＣＤ６２Ｌ、およびＰＥ－Ｃｙ７－コンジュゲート抗ＣＣＲ７を含むマウス抗ヒトモノクローナルＡｂ（ｍＡｂ）によって染色する。アイソタイプが一致したマウス抗ヒトＩｇＧ抗体（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）は、全てのフルオレセインコンジュゲートＩｇＧ ｍＡｂに対する陰性対照として役立つ。染色後、細胞を回収し、１０色までの同時読み取りのための３つのレーザー（４８８ｎｍ青、６３８赤、および４０５紫のレーザー）を備えたＧａｌｌｉｏｓフローサイトメーター（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）を用いて解析する。最終的なデータは、Ｋａｌｕｚａ Ｆｌｏｗ Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ Ａｎａｌｙｓｉｓソフトウェア（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）を用いて解析する。

【０１５７】
いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物中に存在するＵＣ－ＳＣは、

非限定的にＯＣＴ－４、Ｎａｎｏｇ、ステージ特異的胎児性抗原（ＳＳＥＡ）－３、およびＳＳＥＡ－４を含むバイオマーカーを用いたフローサイトメトリーによって検出されるであろう。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、２％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、１％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．９％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．８％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．７％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．６％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．５％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．４％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．３％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．２％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．１％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００９％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００８％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００７％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００６％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００５％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００４％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００３％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００２％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００１％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。

いくつかの実施形態によると、対象の血管内に注入される治療有効量の教育された単核細胞生成物は、少なくとも10^4、少なくとも10^5、少なくとも10^6、少なくとも10^7、少なくとも10^8、少なくとも10^9、または、少なくとも10^{10}の単核細胞を含む。

【０１５８】

いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入により戻すまでの最短時間は約２４時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約２５時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約２６時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約２７時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約２８時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約２９時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３０時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３１時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３２時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３３時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３４時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約

３５時間である。
【０１５９】
いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３６時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３７時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３８時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３９時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約４０時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約４１時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約４２時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約４３時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約４４時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約４５時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約４６時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約４９時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５０時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５１時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５２時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５３時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５４時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５５時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５６時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５７時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５８時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５９時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６０時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６１時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６２時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６３時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６４時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６５時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対

象に注入するまでの最短時間は約６６時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６７時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６８時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６９時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約７０時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約７１時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約７２時間である。

【０１６０】

いくつかの実施形態によると、治療有効量の教育された単核細胞生成物は、対象のＴ細胞区画における自己反応性を調節するため、および免疫疾患の症状を軽減するために有効である。いくつかの実施形態によると、生物学的効果、すなわち、Ｔ細胞区画における自己反応性を軽減することは、好適なバイオマーカーを測定することによって測定可能である。「バイオマーカー」（または「バイオシグネチャー」）という用語は、ペプチド、タンパク質、核酸、抗体、遺伝子、代謝産物、または生物学的状態の指標として使用される他の任意の物質を指す。客観的に測定され、正常な生物学的プロセス、病原性プロセス、または治療的介入に対する薬理学的応答の細胞または分子指標として評価されるのが特徴である。本明細書で使用されるとき、「指標」という用語は、時間の関数として相対的な変化を明らかにし得る一連の観察された事実に由来する任意の物質、数、もしくは比、または目に見えるシグナル、徴候、マーク、兆候、もしくは症状、あるいはその存在の証拠または存在を指す。提案されたバイオマーカーが検証されると、それは個体における疾患リスク、疾患の存在を診断するため、または個体における疾患の治療を調整するために使用され得る（薬物治療または投与計画の選択）。いくつかの実施形態によると、記載されている治療を評価する際に、生存または不可逆的な罹患率などの自然な評価項目の代用として１つ以上のバイオマーカーを使用することができる。治療がバイオマーカーを変更し、そしてその変更が改善された健康と直接関係がある場合、バイオマーカーは臨床的利益を評価するための代用評価項目として役立ち得る。臨床評価項目は、患者がどのように感じ、機能し、生き残るのかを測定するために使用できる変数である。代用評価項目は、臨床評価項目を置換することを目的としたバイオマーカーであり；これらのバイオマーカーは、規制当局および臨床界にとって許容可能な信頼レベルで臨床評価項目を予測することが実証されている。

【０１６１】

いくつかの実施形態によると、治療量の教育された単核生成物は、発症を遅らせること、進行を遅らせること、対象のＴ細胞区画における自己反応性を調節すること、免疫疾患の症状を軽減すること、またはそれらの組み合わせに有効である。いくつかの実施形態によると、調節の結果は、いくらかの残存β細胞機能を有する対象の膵臓における機能的β細胞の増殖（ｇｒｏｗｔｈ）、増殖（ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ）、またはその両方の増加を含む。いくつかの実施形態によると、調節することは、炎症誘発性サイトカイン、例えば、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１２、およびＩＬ－１７の分泌を低減することを含む。いくつかの実施形態によると、調節することは、教育された単核生成物移植片中の単核細胞の集団を変更することを含む。

【０１６２】

いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも１ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも２ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも３ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも４ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも５ヶ月間持続する

。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも６ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも７ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも８ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも９ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも１０ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも１１ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも１２ヶ月間持続する。

いくつかの実施形態によると、方法のステップは、対象の生涯にわたって必要に応じて複数の注入日に、順番に繰り返される。

いくつかの実施形態によると、方法は、残存β細胞機能を有する個体において膵島β細胞機能を維持および改善するのに有効であり得る。いくつかの実施形態によると、方法は、Ｔメモリー集団を有効に変化させ得る。いくつかの実施形態によると、方法は、教育された単核細胞生成物中のいくつかの細胞を寛容化因子に変換するのに有効であり得る。

【０１６３】

組成物

別の態様によると、記載された発明は、リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患を治療するための医薬組成物であって、治療量の教育された単核細胞生成物を含み、治療有効量の教育された単核細胞生成物は、対象のＴ細胞区画における自己反応性を調節するため、および免疫疾患の症状を軽減するために有効であり、教育された単核細胞生成物が：

（１）リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患に罹患している対象からの単核細胞を含む全血試料を滅菌条件下で取得することと；

（２）（１）の全血試料を処理施設に搬送することと；

（３）全血試料から単核細胞（ＭＮＣ）を滅菌的に精製して単核細胞調製物を形成することと；

（４）少なくとも８０％コンフルエントである接着性臍帯血幹細胞（ＵＣ－ＳＣ）の生存可能な集団を含むバイオリアクター装置に単核細胞調製物を導入することと；

（５）単核細胞調製物中の単核細胞とＣＢ－ＳＣが滅菌条件下で少なくとも０．１時間、少なくとも０．２時間、少なくとも０．３時間、少なくとも０．４時間、少なくとも０．５時間、少なくとも０．６時間、少なくとも０．７時間、少なくとも０．８時間、少なくとも０．９時間、少なくとも１．０時間、少なくとも１．５時間、少なくとも２時間、少なくとも２．５時間、少なくとも３時間、少なくとも３．５時間、少なくとも４時間、少なくとも４．５時間、少なくとも５時間、少なくとも５．５時間、少なくとも６時間、少なくとも６．５時間、少なくとも７時間、少なくとも７．５時間、または少なくとも８時間相互作用することができるように単核細胞調製物をＣＢ－ＳＣと共培養して、教育された単核細胞生成物を形成することと

を含むプロセスによって産生され、

治療有効量の教育された単核細胞生成物は、対象のＴ細胞区画における自己反応性を調節するため、および免疫疾患の症状を軽減するために有効であり、

教育された単核細胞生成物が、

（ｉ）少なくとも１×１０^{10}の単核細胞と；

（ｉｉ）T_{EM} ＣＤ４$^{+}$、T_{EM} ＣＤ８$^{+}$、T_{CM} ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{CM} ＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{CM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{-}$、T_{CM} ＣＤ８$^{+}$、ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ナイーブＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{EM} ＣＤ４$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{-}$、T_{EM} ＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ＣＤ４$^{+}$ＨＬＡ$^{-}$ＤＲ$^{+}$、およびＣＤ８$^{+}$ＨＬＡ$^{-}$ＤＲ$^{+}$細胞からなる群から選択されるＴ細胞の調節された集団とを含む、医薬組成物を提供する。

【０１６４】

いくつかの実施形態によると、単核細胞集団は、免疫調節細胞の集団を含む。いくつかの実施形態によると、免疫調節細胞の集団は、白血球の集団を含む。いくつかの実施形態

によると、白血球の集団は、リンパ球の集団、顆粒球の集団、好塩基球の集団、単球の集団、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態によると、免疫調節細胞の集団は、抗原捕捉細胞の集団、抗原提示細胞の集団、またはその両方を含む。いくつかの実施形態によると、抗原提示細胞の集団はＣＤ８０、ＣＤ８６、またはその両方を発現する。いくつかの実施形態によると、抗原提示細胞の集団はマクロファージ、樹状細胞、またはその両方を含む。いくつかの実施形態によると、リンパ球の集団は、Ｔリンパ球の集団、Ｂリンパ球の集団、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の集団、またはそれらの組み合わせを含む。

【０１６５】

いくつかの実施形態によると、Ｔリンパ球の集団は１つ以上のＴ細胞の集団を含む。いくつかの実施形態によると、Ｔ細胞の集団は活性化Ｔ細胞を含む。いくつかの実施形態によると、活性化Ｔ細胞の集団は、ナイーブＴ細胞、抗原刺激されたＴ細胞、活性化Ｔ細胞、エフェクターＴ細胞、細胞傷害性Ｔ細胞、Ｔヘルパー細胞、メモリーＴ細胞、ＮＫ細胞、およびＴｒｅｇ細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態によると、Ｔ細胞の集団は、１つ以上の炎症メディエーター（リンホカイン）を発現するＴ細胞を含む。いくつかの実施形態によると、炎症メディエーターは、インターロイキン－１－β（ＩＬ－１β）、ＩＬ－２、インターロイキン－４（ＩＬ－４）、ＩＬ－５、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、インターロイキン－８（Ｉｌ－８）、ＩＬ－１０、腫瘍壊死因子－α（ＴＮＦ－α）、インターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）、インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）、およびリンホトキシンからなる群から選択される。いくつかの実施形態によると、Ｔリンパ球の集団は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）／ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ４０リガンド（ＣＤ４０Ｌ）、Ｆｏｘ３、ｆａｓ、ＭＨＣ　Ｉ、ＭＨＣ　ＩＩ、免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ＩＴＡＭ）、ＺＡＰ７０（ゼータ関連タンパク質からなる群から選択される１つ以上のマーカーを発現するＴ細胞を含む。

【０１６６】

いくつかの実施形態によると、Ｂリンパ球の集団は１つ以上のＢ細胞の集団を含む。いくつかの実施形態によると、Ｂ細胞の集団は活性化Ｂ細胞を含む。いくつかの実施形態によると、Ｂ細胞の集団は、ナイーブＢ細胞、活性化Ｂ細胞、プラズマプラスト（ｐｌａｓｍａｐｌａｓｔ）、およびメモリーＢ細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態によると、Ｂリンパ球の集団は、ＭＨＣクラスＩＩ、ＣＤ４０、免疫グロブリンからなる群から選択される１つ以上のマーカーを発現するＢ細胞を含む。

全血試料から単核細胞を精製する方法は周知である。一実施形態によると、赤血球は、バフィーコートを赤血球から分離するために、例えば、Ｆｉｃｏｌｌ　Ｐａｑｕｅ分画を使用する密度勾配遠心分離によって除去される。「バフィーコート」という用語は、白血球のほとんどを含む血液試料の薄い灰色がかった白色の画分を指す。

【０１６７】

いくつかの実施形態によると、全血試料からの単核細胞の精製は、自動アフェレーシス分離器を用いたアフェレーシスによる。手短に、全血が患者から採取され、次いで回転チャンバーを含む装置を通過する。血液は、チャンバーの壁に沿って重力によってその成分（血漿、多血小板血漿、白血球および赤血球）に分離する。単核細胞を選別し、残りの血液成分を患者の血流に再導入する。

いくつかの実施形態によると、磁気ビーズ活性化細胞選別は、末梢血単核細胞から特定の細胞集団を精製するために使用されるポジティブセレクション技術である。所望の細胞の量および活性はそのようなプロトコールの後に減少する可能性があるので、より穏やかな基質接着およびネガティブセレクションのプロトコールを好む人もいる。

【０１６８】

いくつかの実施形態によると、バイオリアクター装置は、接着性臍帯血幹細胞（ＵＣ－ＳＣ）の生存可能な集団を含む１つ以上の表面を含む。ＵＣ－ＳＣを含むバイオリアクターを調製する方法は、

（ａ）健康なドナーから取得した新鮮な臍帯血ユニットを取得することと；

（ｂ）Ｆｉｃｏｌｌ　ＨＩＳＴＯＰＡＱＵＥを用いる密度勾配遠心分離により臍帯血から単核細胞画分を分離することと；
（ｃ）赤血球を除去することと；
（ｄ）ＵＣ単核細胞を生理緩衝食塩水で洗浄することと；
（ｅ）バイオリアクター内で無血清培地中に単核細胞を播種することであって、播種密度が少なくとも１×１０^{6}細胞である、当該播種することと；
（ｆ）単核細胞を無血清培地で培養し、２～３日ごとに半分の培地又は前記培地を交換して非接着性細胞を除去し、少なくとも１０日間、少なくとも８０％コンフルエントまで増殖させることと；
（ｇ）３７℃でバイオリアクターをインキュベートすることと；
（ｈ）ＵＣ－ＳＣ培養の試料の滅菌性および生存性を確認することと
を含む。

【０１６９】

ＣＢ－ＳＣの培養物は円形でありそしてバイオリアクター装置の底面に付着している。いくつかの実施形態によると、バイオリアクター装置の表面はコーティングされていないプラスチックである。いくつかの実施形態によると、バイオリアクター装置の表面は正に荷電した表面である。いくつかの実施形態によると、バイオリアクター装置の表面は疎水性表面、例えば、ポリスチレンまたはガラスである。いくつかの実施形態によると、バイオリアクター装置の表面はコーティングされている。いくつかの実施形態によると、バイオリアクター装置の表面は細胞フィーダー層を含まない。

【０１７０】

いくつかの実施形態によると、臍帯血単核細胞は、共培養の前の少なくとも１０日間で、少なくとも１１日間で、少なくとも１２日間で、少なくとも１３日間で、少なくとも１４日間で、少なくとも１５日間で、少なくとも１６日間で、少なくとも１７日間で、少なくとも１８日間で、少なくとも１９日間で、少なくとも２０日間で、または少なくとも２１日間で少なくとも８０％コンフルエントに増殖する。本発明のいくつかの実施形態によると、臍帯血単核細胞は、共培養の前の少なくとも１０日間で、少なくとも１１日間で、少なくとも１２日間で、少なくとも１３日間で、少なくとも１４日間で、少なくとも１５日間で、少なくとも１６日間で、少なくとも１７日間で、少なくとも１８日間で、少なくとも１９日間で、少なくとも２０日間で、または少なくとも２１日間で少なくとも８５％コンフルエントに増殖する。本発明のいくつかの実施形態によると、臍帯血単核細胞は、共培養の前の少なくとも１０日間で、少なくとも１１日間で、少なくとも１２日間で、少なくとも１３日間で、少なくとも１４日間で、少なくとも１５日間で、少なくとも１６日間で、少なくとも１７日間で、少なくとも１８日間で、少なくとも１９日間で、少なくとも２０日間で、または少なくとも２１日間で少なくとも９０％コンフルエントに増殖する。本発明のいくつかの実施形態によると、臍帯血単核細胞は、共培養の前の少なくとも１０日間で、少なくとも１１日間で、少なくとも１２日間で、少なくとも１３日間で、少なくとも１４日間で、少なくとも１５日間で、少なくとも１６日間で、少なくとも１７日間で、少なくとも１８日間で、少なくとも１９日間で、少なくとも２０日間で、または少なくとも２１日間で少なくとも９５％コンフルエントに増殖する。本発明のいくつかの実施形態によると、臍帯血単核細胞は、共培養の前の少なくとも１０日間で、少なくとも１１日間で、少なくとも１２日間で、少なくとも１３日間で、少なくとも１４日間で、少なくとも１５日間で、少なくとも１６日間で、少なくとも１７日間で、少なくとも１８日間で、少なくとも１９日間で、少なくとも２０日間で、または少なくとも２１日間で少なくとも９６％コンフルエントに増殖する。本発明のいくつかの実施形態によると、臍帯血単核細胞は、共培養の前の少なくとも１０日間で、少なくとも１１日間で、少なくとも１２日間で、少なくとも１３日間で、少なくとも１４日間で、少なくとも１５日間で、少なくとも１６日間で、少なくとも１７日間で、少なくとも１８日間で、少なくとも１９日間で、少なくとも２０日間で、または少なくとも２１日間で少なくとも９７％コンフルエントに増殖する。本発明のいくつかの実施形態によると、臍帯血単核細胞は、共培養の前の少な

くとも１０日間で、少なくとも１１日間で、少なくとも１２日間で、少なくとも１３日間で、少なくとも１４日間で、少なくとも１５日間で、少なくとも１６日間で、少なくとも１７日間で、少なくとも１８日間で、少なくとも１９日間で、少なくとも２０日間で、または少なくとも２１日間で少なくとも９９％コンフルエントに増殖する。本発明のいくつかの実施形態によると、臍帯血単核細胞は、共培養の前の少なくとも１０日間で、少なくとも１１日間で、少なくとも１２日間で、少なくとも１３日間で、少なくとも１４日間で、少なくとも１５日間で、少なくとも１６日間で、少なくとも１７日間で、少なくとも１８日間で、少なくとも１９日間で、少なくとも２０日間で、または少なくとも２１日間で少なくとも９９％コンフルエントに増殖する。

【０１７１】

患者からの単核細胞調製物は、患者の単核細胞とＵＣ－ＳＣ細胞を共培養するためにバイオリアクターに導入される。いくつかの実施形態によると、単核調製物はＵＣ－ＣＢ層から分離されている。いくつかの実施形態によると、患者の単核細胞は非接着性である。いくつかの実施形態によると、患者の単核細胞は、ＵＣ－ＣＢ層の細胞と接触している。いくつかの実施形態によると、培地は増殖因子、可溶性炎症メディエーターなどを含む。いくつかの実施形態によると、培地は、患者の単核細胞とＵＣ－ＣＢ細胞層との両方を支持するのに効果的である。いくつかの実施形態によると、培地には、患者の単核細胞およびＵＣ－ＣＢ細胞によって産生される免疫調節メディエーターと可溶性因子が含まれている。

いくつかの実施形態によると、相互作用条件はバイオリアクターの穏やかな揺動を含む。いくつかの実施形態によると、バイオリアクターの穏やかな揺動は断続的である。いくつかの実施形態によると、培地はバイオリアクターを通して循環している。

【０１７２】

患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも２時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも３時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも４時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも５時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも６時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも７時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも８時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも９時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１０時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１１時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１２時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１３時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１４時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１５時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１６時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１７時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１８時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも１９時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも２０時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも２１時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも２２時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも２３時間相互作用条件下で共培養する。患者の単核調製物とＣＢ－ＳＣを滅菌条件下で少なくとも２４時間相互作用条件下で共培養する。

【０１７３】

いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：２の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：５の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：１０の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：２０の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：５０の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：６０の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：７０の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：８０の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：９０の比で共培養される。いくつかの実施形態によると、臍帯血単核幹細胞と患者の単核細胞は少なくとも１：１００の比で共培養される。

この相互作用の結果は、教育された単核細胞生成物である。

教育された単核細胞生成物は、バイオリアクター装置から滅菌条件下で採取される。

教育された単核細胞生成物の純度、滅菌性、および生存性；パーセント生存率を確認するためのアッセイは以下を含む。

【０１７４】

いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物のエンドトキシンレベルは、約０．５エンドトキシン単位／ｍＬ未満であり、そして教育された単核細胞生成物は、グラム染色陰性である。教育された単核細胞生成物はまた、例えば、米国ＦＤＡの医薬品安全性試験実施基準の要件に従ってリアルタイムＰＣＲによって、マイコプラズマおよび滅菌性について試験される。

【０１７５】

「検出可能な応答」とは、検出試薬を用いてまたは用いずに実施することができるアッセイにおいて検出することができる任意のシグナルまたは応答を指す。検出可能な応答としては、放射性崩壊およびエネルギー（例えば、蛍光、紫外線、赤外線、可視）放出、吸収、偏光、蛍光、燐光、透過、反射、または共鳴移動が含まれるが、これらに限定されない。検出可能な応答にはまた、クロマトグラフィー移動度、濁度、電気泳動移動度、質量スペクトル、紫外線スペクトル、赤外線スペクトル、核磁気共鳴スペクトル、およびＸ線回折も含まれる。代替的に、検出可能な応答は、融点、密度、導電率、表面弾性波、触媒活性、または元素組成などの生体物質の１つ以上の特性を測定するためのアッセイの結果であり得る。「検出試薬」は、対象の物質の有無を示す検出可能な応答を生じる任意の分子である。検出試薬は、抗体、核酸配列、および酵素などの任意の様々な分子を含む。検出を促進するために、検出試薬はマーカーを含み得る。

【０１７６】

マーカーは、任意の様々な確立された方法によってアッセイすることができる。抗体に基づく技術は、蛍光標識細胞分取（ＦＡＣＳ）免疫蛍光、酵素免疫組織化学、および免疫ブロッティングを含むが、これらに限定されない。さらなるアッセイは、サイトカインレベルもしくはｍＲＮＡの検出のためのアッセイ、または特定のマーカーのコード化を検出する「ウエスタンブロット」技術を含み得る。「ウエスタンブロット」という用語は、複雑な混合物中のタンパク質を同定するための方法を指し；タンパク質はゲル媒体中で電気泳動的に分離され；対象のタンパク質に結合し、位置を特定し、そして可視化することを可能にする特異的抗体に曝露される分離されたタンパク質を含むタンパク質結合シートまたは膜にゲルから転写される。さらなるアッセイは、ポリメラーゼ連鎖反応、ブロットハイブリダイゼーション（ノーザンブロットとしても知られる）およびインサイチュハイブリダイゼーションを含み得る。これらおよび他のそのようなアッセイの詳細は、例えば、その各々が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第５，６５６，４９３号；米国特許第５，３３３，６７５号；米国特許第５，２３４，８２４号；米国特許第５，１８７，０８３号、およびJ. Sambrook and D. W. Russell, Molecular Cloning: A Laborato

ry Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd ed., 2001; F. M. Ausubel, Ed., Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols; 5th ed., 2002およびE. Harlow and D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988を含む標準的な参照文献に記載される。

【０１７７】

いくつかの実施形態によると、検出可能なマーカーには、非限定的に、自己免疫調節因子（Ａｉｒｅ）、ＣＤ３$^{+}$、ＣＤ４$^{+}$、ＣＤ８$^{+}$、ＣＤ１４$^{+}$、ＣＤ１６$^{+}$、ＣＤ１９$^{+}$、ＣＤ２５$^{+}$、ＣＤ４５$^{+}$、ＣＤ５６$^{+}$、ＣＤ８０$^{+}$、ＣＤ８６$^{+}$、ＣＤ２７０、Ｆｏｘｐ３$^{+}$、ＩＬ－γ、ＩＬ－β、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２２、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＴＧＦ－β１、一酸化窒素（ＮＯ）、ＰＤ－Ｌ１、ＢＴＬＡ、ＴＮＦ－α、Ｔｈ１／Ｔｈ２、Ｃ－ペプチド、ＣＣＲ－７、ＯＣＴ－４、Ｎａｎｏｇ、ステージ特異的胎児性抗原（ＳＳＥＡ）－３、およびＳＳＥＡ－４が含まれる。

【０１７８】

細胞生存率は、挿入ＤＮＡ色素７－アミノアクチノマイシンＤ（７ＡＡＤ）を取り込む死滅しつつある細胞を排除することによって決定される。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、７－ＡＡＤによって少なくとも約７０％生存可能である。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、７－ＡＡＤによって少なくとも約７５％生存可能である。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、７－ＡＡＤによって少なくとも約８０％生存可能である。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、７－ＡＡＤによって少なくとも約９０％生存可能である。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、７－ＡＡＤによって少なくとも約９５％生存可能である。

【０１７９】

フローサイトメトリーによって細胞数を決定するために、末梢血試料から取得された細胞を、ＰｅｒＣＰ／Ｃｙ５．５コンジュゲート抗ＣＤ３、ＰｅｒＣＰ／Ｃｙ５．５コンジュゲート抗ＣＤ４、ＰＥコンジュゲート抗ＣＤ８、ＦＩＴＣコンジュゲート抗ＣＤ４５ＲＡ、ＰＥコンジュゲート抗ＣＤ４５ＲＯ、ＰＥコンジュゲート抗ＣＤ５６、ＡＰＣコンジュゲート抗ＣＣＲ７を含む、マウス抗ヒトｍＡｂ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）と共にインキュベートする。細胞を、ＢＤ ＭｕｌｔｉＴＥＳＴ試薬ＣＤ３ ＦＩＴＣ／ＣＤ８ ＰＥ／ＣＤ４５ ＰｅｒＣＰ／ＣＤ４ ＡＰＣ およびＣＤ３ ＦＩＴＣ／ＣＤ１６＋ＣＤ５６ ＰＥ／ＣＤ４５ ＰｅｒＣＰ／ＣＤ１９ ＡＰＣ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ Ｊｏｓｅ、ＣＡ）によって免疫染色する。アイソタイプが一致したマウス抗ヒトＩｇＧ抗体（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）は、全てのフルオレセインコンジュゲートＩｇＧ ｍＡｂに対する陰性対照として役立つ。染色後、細胞を回収してＢＤ ＦＡＣＳｃａｌｉｂｕｒ（商標）Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒを用いて分析する。最終的なデータは、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ Ｐｒｏソフトウェア（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ、 ＭＤ）を用いて解析する。

【０１８０】

エクスビボ試験のために、細胞を室温で３０分間染色し、次いでフロー解析の前にＰＢＳで洗浄する。細胞は、ＡＰＣ－ＡＦ７５０－コンジュゲート抗ＣＤ４、ＡＰＣ－ＡＦ７５０－またはＫｒｏｍｅ Ｏｒａｎｇｅ－コンジュゲート抗ＣＤ８、ＰＥ－またはＦＩＴＣ－コンジュゲート抗ＣＤ４５ＲＡ、ＦＩＴＣ－コンジュゲート抗ＣＤ４５ＲＯ、ＥＣＤ－コンジュゲート抗ＣＤ６２Ｌ、およびＰＥ－Ｃｙ７－コンジュゲート抗ＣＣＲ７を含むマウス抗ヒトモノクローナルＡｂ（ｍＡｂ）によって染色する。アイソタイプが一致したマウス抗ヒトＩｇＧ抗体（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）は、全てのフルオレセインコンジュゲートＩｇＧ ｍＡｂに対する陰性対照として役立つ。染色後、細胞を回収し、１０色までの同時読み取りのための３つのレーザー（４８８ｎｍ青、６３８赤、および４０５紫のレーザー）を備えたＧａｌｌｉｏｓフローサイトメーター（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）を用いて解析する。最終的なデータは、Ｋａｌｕｚａ Ｆｌｏｗ Ｃｙｔｏ

ｍｅｔｒｙ Ａｎａｌｙｓｉｓソフトウェア（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）を用いて解析する。

【０１８１】

いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物中に存在するＵＣ－ＳＣは、非限定的にＯＣＴ－４、Ｎａｎｏｇ、ステージ特異的胎児性抗原（ＳＳＥＡ）－３、およびＳＳＥＡ－４を含むバイオマーカーを用いたフローサイトメトリーによって検出される。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、２％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、１％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．９％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．８％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．７％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．６％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．５％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．４％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．３％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．２％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．１％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００９％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００８％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００７％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００６％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００５％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００４％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００３％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００２％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。いくつかの実施形態によると、教育された単核細胞生成物は、０．００１％未満の臍帯血単核幹細胞を含む。

【０１８２】

いくつかの実施形態によると、対象の血管内に注入される治療有効量の教育された単核細胞生成物は、少なくとも10^4、少なくとも10^5、少なくとも10^6、少なくとも10^7、少なくとも10^8、少なくとも10^9、または、少なくとも10^{10}の教育された単核細胞を含む。

【０１８３】

いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約２４時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約２５時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約２６時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約２７時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約２８時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約２９時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３０時間である。

【０１８４】

いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を

同一の対象に注入するまでの最短時間は約３１時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３２時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３３時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３４時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３５時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３６時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３７時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３８時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約３９時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約４０時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約４１時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約４２時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約４３時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約４４時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約４５時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約４６時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約４９時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５０時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５１時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５２時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５３時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５４時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５５時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５６時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５７時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５８時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約５９時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６０時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６１時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６２時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育さ

れた単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６３時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６４時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６５時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６６時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６７時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６８時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約６９時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約７０時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約７１時間である。いくつかの実施形態によると、対象から全血試料を取得し、教育された単核細胞生成物を同一の対象に注入するまでの最短時間は約７２時間である。

【０１８５】

いくつかの実施形態によると、治療量の教育された単核生成物は、発症を遅らせること、進行を遅らせること、対象のＴ細胞区画における自己反応性を調節すること、免疫疾患の症状を軽減すること、またはそれらの組み合わせに有効である。いくつかの実施形態によると、Ｔ細胞区画は、$CD4^+$ T_{CM}（$CD45RA^-CCR7^+$）、Ｔｒｅｇ、$CD4^+HLA^-DR^+$、または$CD8^+HLA^-DR^+$Ｔ細胞の１つ以上を含む。いくつかの実施形態によると、調節の結果は、対象の膵臓における機能的β細胞の増殖（ｇｒｏｗｔｈ）、増殖（ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ）、またはその両方の増加を含む。いくつかの実施形態によると、調節することは、炎症誘発性サイトカイン、例えば、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１２、およびＩＬ－１７の分泌を低減することを含む。いくつかの実施形態によると、調節することは、教育された単核生成物移植片中の単核細胞の集団を変更することを含む。

【０１８６】

いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも１ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも２ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも３ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも４ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも５ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも６ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも７ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも８ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも９ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも１０ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも１１ヶ月間持続する。いくつかの実施形態によると、自己反応性の調節の期間は少なくとも１２ヶ月間持続する。

いくつかの実施形態によると、方法のステップは、対象の生涯にわたって必要に応じて複数の注入日に、順番に繰り返される。

いくつかの実施形態によると、方法は、残存β細胞機能を有する個体において膵島β細胞機能を維持および改善するのに有効である。いくつかの実施形態によると、方法は、Ｔメモリー集団を有効に変化させる。いくつかの実施形態によると、方法は、ＭＮＣを、細胞を寛容化することができる寛容化因子に変換するのに有用である。

【０１８７】

いくつかの実施形態によると、記載された発明の組成物は、溶媒を含むがこれに限定さ

れない賦形剤、担体、またはビヒクルと共に製剤化され得る。本明細書で使用されるとき、「賦形剤」、「担体」、または「ビヒクル」という用語は、本明細書に記載される組成物の製剤化および投与に適した担体物質を指す。本明細書で有用な担体およびビヒクルは、無毒であり、他の成分と相互作用しない、当技術分野において公知の任意のそのような物質を含む。本明細書中で使用されるとき、語句「薬学的に許容される担体」は、本発明の走化性造血幹細胞生成物が安定で生物学的に利用可能なままである本発明の組成物の製剤化および投与に使用可能な実質的に無毒の任意の担体を指す。

【０１８８】

薬学的に許容される担体は、治療される哺乳動物への投与に適したものにするために、十分に高純度かつ十分に低い毒性のものでなければならない。それはさらに、教育された単核細胞生成物の安定性および生物学的利用能を維持するはずである。記載された発明の組成物のための例示的な薬学的に許容される担体は、非限定的に、緩衝液、希釈剤、および他の適切な添加剤を含む。本明細書で使用されるとき、「緩衝液」という用語は、その化学的構成が、ｐＨの顕著な変化を伴わずに酸または塩基を中和する溶液または液体を指す。本発明によって企図される緩衝液の例には、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、リンゲル液、水中５％デキストロース（Ｄ５Ｗ）、通常／生理食塩水（０．９％ＮａＣｌ）が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態によると、注入溶液は対象組織に対して等張である。いくつかの実施形態によると、注入溶液は対象組織に対して高張性である。記載された発明の組成物は、滅菌水溶液、アルコールのような一般的な溶媒中の非水溶液、または液体油性基剤中の溶液のような薬学的に許容される担体を含むことができる。

【０１８９】

いくつかの実施形態によると、本発明の組成物の担体は、持続放出性担体または遅延放出型担体のような放出剤を含み得る。そのような実施形態によると、担体は、より効率的な投与を提供させて、例えば組成物の投与頻度を減らしおよび／または投与量を減らし、取り扱いの容易さを向上させ、治療、予防、または促進されている疾患、障害、状態、症候群などへの影響を持続または遅延させるために、活性物質を持続放出または遅延放出をすることができる任意の物質であり得る。そのような担体の非限定的な例には、天然ポリマーおよび合成ポリマーのリポソーム、マイクロスポンジ、マイクロスフェア、またはマイクロカプセルなどが含まれる。リポソームは、コレステロール、ステアリルアミン、またはホスファチジルコリンなどの様々なリン脂質から形成することができる。

本発明の組成物は、滅菌注射用の水性または油性の懸濁液の形態で非経口的に投与することができる。本明細書で使用されるとき、「非経口」または「非経口的に」という用語は、注入技術を含むがこれに限定されない、注射による身体への導入（すなわち、注射による投与）を指す。走化性造血幹細胞生成物を含む本発明の組成物は、選択された解剖学的構造への流体組成物（すなわち流動可能な組成物）の送達に適したバルーンカテーテルによって対象に送達される。

【０１９０】

記載された発明の滅菌医薬組成物は、無毒の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の滅菌溶液または懸濁液であり得る。溶液は一般に、２つ以上の物質の均質混合物とみなされ、それは必然ではなく、しばしば液体である。溶液中では、溶質（または溶解した物質）の分子は溶媒の分子間に均一に分布している。懸濁液は、細かく分割された種が別の種と組み合わされた分散体（混合物）であり、前者は非常に細かく分割され混合されているため、迅速に沈降しない。日常生活の中で、最も一般的な懸濁液は液体水中の固体の懸濁液である。使用され得る例示的なビヒクルおよび溶媒は、水、リンゲル液、および等張食塩水（生理食塩水）である。いくつかの実施形態によると、高張液が用いられる。加えて、滅菌の不揮発性油が、溶媒または懸濁媒体として使用され得る。非経口適用の場合、例示的なビヒクルは、溶液、例えば、油性または水性の溶液、ならびに懸濁液、エマルション、またはインプラントからなる。水性懸濁液は、懸濁液の粘度を増加させる物質を含み得、そして例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および／

またはデキストランを含む。
記載された発明のさらなる組成物は、参照により本明細書に組み込まれる、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th or 19th editions, published by the Mack Publishing Company of Easton, Pa.に記載されるような当技術分野において公知の技術を用いて容易に調製することができる。
【０１９１】
記載された発明の別の態様によると、医薬組成物はさらに、教育された単核細胞生成物によって提供されるものに加えて別の医薬効果を組成物に提供することを目的とする１つ以上の相溶性のある活性成分を含み得る。本明細書で使用されるとき、「相溶性」は、通常の使用条件下で各活性成分または組成物の有効性を実質的に低下させるような相互作用がないような方法でそのような組成物の活性成分を互いに組み合わせることができることを意味する。いくつかの実施形態によると、組み合わせ治療は、それを必要としている対象に、治療量の教育された単核細胞生成物と、免疫疾患の症状を治療するのに有効な治療薬とを含む医薬組成物を投与することを含む。例えば、免疫疾患が糖尿病である場合、治療薬は、インスリン、インスリン類似体、ビグアニド、チアゾリジンジオン、分泌促進薬、スルホニル尿素、非スルホニル尿素分泌促進薬、グリニド、メトホルミン、アルファ－グルコシダーゼ阻害剤、メグリチニド、アルファ－グルコシダーゼ阻害剤、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）模倣体、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）アゴニスト、アミリン類似体、ジペプチジルペプチダーゼ－４阻害剤、インクレチン模倣体、胃抑制ペプチド類似体、アミリン類似体、グリコ尿、フィナステリド、デュタステリド、ミノキシジル、ケトコナゾール、スピロノラクトン、フルタミド、シクロスポリン、クロベタゾール、抗ＣＤ３抗体、インスリン受容体の小分子活性化剤、フルオシノニド、またはそれらの組み合わせからなる群から選択することができる。
【０１９２】
一定の範囲の値が提供されるとき、文脈が他を明確に指示しない限り、その範囲の上限と下限との間、および、その述べられた範囲内の他の任意の述べられた値または中間の値における、各々の中間の値は、その下限の単位の１０分の１まで本発明に包含されることが理解される。独立してより小さな範囲に含まれ得るこれらのより小さい範囲の上限および下限はまた、述べられた範囲内の任意の具体的に除外された限定を有することを条件として、本発明に包含される。述べられる範囲が限界の一方または両方を含む場合、それらの含まれた限界の両方のいずれかを除外する範囲はまた、本発明に含まれる。
【０１９３】
別途定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明の所属する技術分野における当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を有する。例示的な方法および物質が記載されているが、本明細書に記載されているものと類似または均等の任意の方法および物質もまた記載されている発明の実施または試験において使用することができる。本明細書において述べられた全ての刊行物は、関連して刊行物が引用されている方法および／または物質を開示および記載するための参照により本明細書に組み込まれる。
【０１９４】
本明細書および添付の特許請求の範囲において使用されるとき、単数形「ａ」、「ａｎｄ」、および「ｔｈｅ」は、文脈が他を明確に指示しない限り、複数の指示対象を包含する。用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含むこ（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「有する」およびそれらの活用形は、「含むがこれらに限定されない」を意味する。本出願において使用される用語および語句、ならびにそれらの変形は、他に明示的に述べられていない限り、限定とは対照的にオープンエンドとして解釈されるべきである。前述の例として、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」という用語は、「非限定的に含む」などを意味すると解釈されるべきである。「例」という用語は、論じられている項目の例示的な例を提供するために使用され、それらの網羅的なまたは限定的なリストではない。例えば「従来の」、「伝統的」、「

知られている」などの形容詞および同様の意味の用語は、記載された項目を所与の期間、または所与の時点で利用可能な項目に限定すると解釈されるべきではなく、代わりに、これらの用語は、利用可能な、現在知られている、または将来の任意の時点で利用可能であり得る従来の、伝統的な、通常の、または標準的な技術を包含するように解釈されるべきである。同様に、接続詞「ａｎｄ」で連結された項目の群は、それらの項目の各々および全てが群に存在することを要求するものとして解釈されるべきではなく、特に他が明記されない限り「および／または」として解釈されるべきである。同様に、接続詞「または」で連結された項目の群は、その群内の相互排他性を要求するものとして解釈されるべきではなく、特に他が明記されない限り、「および／または」として解釈されるべきである。いくつかの場合における語句のような、「１つ以上」、「少なくとも」、「などであるがこれらに限定されない」などの拡大する単語および語句の存在は、そのような拡大する語句が存在し得ない場合、より狭いケースが意図または要求されることを意味すると解釈されない。

【０１９５】

さらに、例えば、本明細書中、本開示に記載されているシステムおよび方法の任意の順序および／または順序の時間的順番は例示的なものであり、本質的に限定的であると解釈されるべきではない。したがって、プロセスのステップは、順序または時間的順番であるとして示され説明されることがあるが、それらは必ずしも特定の順序または順番で実行されることに限定されないことを理解されたい。

【０１９６】

記載された発明はいくつかの実施形態を参照して本明細書に記載され例示されてきたが、他の実施形態が同様の機能を果たし、および／または同様の結果を達成し得ることは当業者にとって明らかであろう。したがって、開示された実施形態の開示の様々な特徴および態様は、開示された発明の様々なモードを形成するために互いに組み合わせること、または互いに置き換えることができることを理解されたい。したがって、変形、適合、修正、および均等の構成などの多くの異なる実施形態が、記載された発明の範囲および精神に含まれる。

【０１９７】

本明細書において論じられている刊行物は、記載された発明の出願日より前のそれらの開示についてのみが提供されている。本明細書中のいかなるものも、先行発明のために、記載された発明がそのような刊行物に先行する権利がないということの承認として解釈されるべきではない。さらに、提示される公開日が、実際の公開日と異なることがあり得、それは、個別に確認され得る。

【実施例】

【０１９８】

以下の実施例は、当業者に記載された発明をいかに作製および使用するかの完全な開示および説明を提供するために進められ、本願発明者が彼らの発明とみなすものの範囲を限定することを意図するものではなく、また以下の実験が実施された全部または唯一の実験であることを表すことを意図するものでもない。使用される数字に関して正確さを確実にするための努力がなされてきたが、いくつかの実験誤差および偏差が考慮されるべきである。別途示されない限り、部は質量に基づき、分子量は質量平均分子量であり、温度は摂氏であり、そして圧力は大気圧または大気圧付近である。

【０１９９】

閉ループバイオリアクター装置

閉ループバイオリアクター装置は、クラス１００Ｋクリーンルームで製造され、臍帯血単核細胞を導入する前にガンマ線を照射した。バイオリアクター装置では、患者の血液から分離されたリンパ球は、接着性臍帯血単核細胞を有する積み重ねられた物質の円板をゆっくり通過し、底板の穴を通して回収されたリンパ球は患者に戻される。装置を製造するために使用される物質は、米国薬局方（すなわち、グレードクラスＶＩプラスチック）に従ってインビボ使用について承認されている。

図１は、アフェレーシス装置１４、幹細胞バイオリアクター装置２０および流体戻し導管１８と共に、患者２から血液を抽出するための流体導管１２を有する自己免疫障害の治療のための記載された発明のいくつかの実施形態によるシステム１０を示す。使用時には、血液が対象２から流体導管１２を介して、例えば血液力学的ポンプによって抽出され、血液からリンパ球を分離するためにアフェレーシス装置１４によって処理される。血液は、流体戻し導管１８を介して患者２に戻すことができる。分離されたリンパ球はバイオリアクター装置２０に送達され、そこでリンパ球集団の一部はバイオリアクター装置２０内の臍帯血単核細胞との相互作用によって調節される。

図２は、チャンバー２２、流体入口導管２３、臍帯血単核幹細胞２６を播種した複数の基板表面層２４を含む、本発明によるバイオリアクター装置２０の概略図を提示する。層間の通路２５は、リンパ球２１が入口２３から出口２７へ流れることを可能にする。使用時に、アフェレーシス装置からのリンパ球は、リンパ球２１の調節／活性化が起こるチャンバー２２に供給される。適切な期間の後、活性化されかつ調節されたリンパ球２１は、バイオリアクター装置２０から取り出され患者２に戻され得る。

【０２００】

実施例１：中国民族の患者における１型糖尿病の治療のための接着性ＵＣ－ＳＣ細胞を含む閉ループバイオリアクター装置の使用

非盲検フェーズ１／フェーズ２試験では、長期間Ｔ２Ｄを有する中国民族の患者（Ｎ＝３６）は３つの群に分けられた（群Ａ、経口薬、ｎ＝１８；群Ｂ、経口薬＋インスリン注射、ｎ＝１１；β細胞機能障害を有する群Ｃ、経口薬＋インスリン注射、ｎ＝７）。全血から単核細胞を分離し、接着性臍帯血幹細胞（ＵＣ－ＳＣ）と短時間共培養し、そのようにして教育された自家細胞を患者の循環系に戻す閉ループシステムを通して患者の血液を循環させる装置による１つの治療を全患者が受けた［Zhao et al., "Targeting insulin resistance in type 2 diabetes via immune modulation of cord blood-derived multipotent stem cells (CB-SCs) in stem cell educator therapy: phase I/II clinical trial", BMC Med., Vol. 11: 160, (2013)］。

【０２０１】

臨床所見は、これらのＴ２Ｄ患者がこの治療後に改善された代謝制御および炎症マーカーの発現の減少を達成したことを示している。Ａ群およびＢ群の中央値ＨｂＡ１Ｃは、ベースラインにおける８．６１％±１．１２から治療後１２週間における７．２５％±０．５８（ｐ＝２．６２Ｅ－０６）、および治療後１年における７．３３％±１．０２（ｐ＝０．０００２）にまで有意に低減した。インスリン抵抗性の恒常性モデル評価（ＨＯＭＡ）（ＨＯＭＡ－ＩＲ）は、インスリン感受性が治療後に改善したことを実証した。Ｃ－ペプチドレベルの回復によって実証されるように、Ｃ群対象における膵島β細胞機能は著しく回復した。機序的試験は、この治療が単球の免疫調節およびＴｈ１／Ｔｈ２／Ｔｈ３サイトカイン産生のバランスを介して免疫機能障害を好転させることを明らかにした。

【０２０２】

Ｔ２Ｄを有する３６人の中国人患者が安全性試験でこの装置による治療を受けており、その結果はＴ１Ｄ参加者による安全性評価と同様である［Zhao Y. et al., "Reversal of type 1 diabetes via islet β-cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells", BMC Med., Vol. 10(3): 1-11, (2012)］。１年以上にわたり、治療の過程および治療後に重大な有害事象を経験した参加者はいなかった。患者の不満は、肘正中皮静脈の部位での静脈穿刺中の軽度の不快感と、アフェレーシス後迅速に解消したいくらかの腕の痛みに限定された。

【０２０３】

この装置による治療後、血糖制御がＴ２Ｄ患者で改善された。この治療を受け、病院から退院した後、患者は定期的な投薬を続けた。追跡調査試験は、Ａ群（ｎ＝１８）およびＢ群（ｎ＝１１）における中央値糖化ヘモグロビン（ＨｂＡ１Ｃ）が、ベースライン時の８．６１％±１．１２から治療後４週間目での７．９％±１．２２（ｐ＝０．０００４）に、治療後１２週間での７．２５％±０．５８（ｐ＝０．００３）に有意に低下し（図３

ａ）、Ｃ群の患者（ｎ＝７）において、治療後１年での７．３３％±１．０２（ｐ＝０．０３６）に有意に低下したことを実証した。成人糖尿病患者の治療のために米国糖尿病協会（ＡＤＡ）が推奨するＡ１Ｃ目標（＜７％）によると、Ａ群の対象の２８％（５／１８）、Ｂ群の対象の３６％（４／１１）、およびＣ群の対象の２９％（２／７）が、治療後１２週間でこの目標を達成した。全対象の３１％を超えたものが１年以上にわたって７％未満の基準を達成し、維持した。さらに、有効性基準に基づいて、治療後４週間で、Ａ群で対象１８人中１１人（６１．１％）、Ｂ群で対象１１人中８人（７２．７％）、およびＣ群で対象７人中４人（５７．１％）がＡ１Ｃ値を減少させた（＞０．５％）。Ａ群で対象１３人中１８人（７２．２％）、Ｂ群で対象１１人中９人（８１．８％）、Ｃ群で対象７人中６人（８５．７％）がＡ１Ｃ値を減少させた（＞０．５％）。全対象の３６人中２８人（７８％）のＡ１Ｃ値が、治療後１２週間で１．２８±０．６６減少した。

【０２０４】

インスリン感受性の変化を調べるために、Ａ群およびＢ群におけるインスリン抵抗性の恒常性モデル評価（ＨＯＭＡ）（ＨＯＭＡ－ＩＲ）、すなわち空腹時血漿グルコースとＣ－ペプチド（対象がインスリン注射を受けているためインスリンの代わりに）の積を決定した。データは、ＨＯＭＡ－ＩＲ　ｃ－ｐｅｐのレベルが４週間の追跡調査で著しく減少したことを明らかにし（図３ｂ）、これはインスリン感受性が治療後に改善されたことを示す。改善されたβ細胞機能と一致して、メトホルミンの中央値１日用量は治療後１２週で３３％～６７％減少し、そしてインスリンは３５％減少した。

【０２０５】

空腹時Ｃ－ペプチドレベルは、膵島β細胞機能障害を有する長期のＴ２Ｄ対象において顕著に増加した（Ｃ群、糖尿病期間、１４±６年、ｎ＝７、Ｐ＝０．００７３）（図３ｃ）。治療の１２週間後、空腹時Ｃ－ペプチドレベルは正常な生理学的レベルに達し、この測定のための最後の追跡調査（５６週間）を通して維持された（ベースラインでの０．３６±０．１９ｎｇ／ｍＬ対処理後１年での１．１２±０．３３ｎｇ／ｍＬ、ｐ＝０．０００４５、図３ｃ）。ＨＯＭＡ－Ｂ　Ｃ－ペプチドを使用することによるβ細胞機能分析は、膵島β細胞の機能が治療を受けた後のＣ群対象において顕著に増強されたことを実証する（図３ｄ）。データは、本発明者らが１型糖尿病における本発明者らの以前の研究において実証したように、Ｃ－ペプチドの回復が膵島β細胞の再生と関連し得ることを示す［Zhao Y. et al., "Reversal of type 1 diabetes via islet β-cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells", BMC Med., Vol. 10(3): 1-11, (2012)］。

【０２０６】

免疫機能障害の矯正における有効性の結果

代謝制御の改善の根底にある分子および細胞の機序を決定するために、Ｔ２Ｄにおける幹細胞バイオリアクター装置治療の抗炎症および免疫調節の効果を調べた。インスリン抵抗性およびＴ２Ｄに主に関与する、血漿中の炎症誘発性サイトカイン、ＩＬ－１、ＩＬ－６、およびＴＮＦ－αを調べるためにＥＬＩＳＡが使用された。ＩＬ－１、ＩＬ－６、およびＴＮＦ－αは、これらの長期のＴ２Ｄ対象において全てバックグラウンドレベルであり、治療後の変化を示さなかった（それぞれｐ＝０．５５７、ｐ＝０．３１６、ｐ＝０．６０３）が、これはおそらく、代謝性炎症は慢性の亜程度の炎症であるためであり［Shoelson S.E. et al., "Inflammation and insulin resistance", J Clin Invest, Vol. 116: 1793-1801, (2006)］、血清試料がＴ２Ｄ対象のリポ多糖（ＬＰＳ）－活性化単球からではなく、Ｔ２Ｄ患者の血液から直接回収されたためである［Devaraj S. et al., "Low-density lipoprotein postsecretory modification, monocyte function, and circulating adhesion molecules in type 2 diabetic patients with and without macrovascular complications: the effect of alpha-tocopherol supplementation", Circulation, Vol. 102: 191-196, (2000)］。抗炎症性および免疫抑制性サイトカインＴＧＦ－β１は、ベースラインレベルと比較して、治療後の４週間でＴ２Ｄ対象の血漿において顕著に増加した（図４ａ）。しかしながら、ＩＬ－１０は全ての参加者において変化しな

かった（ｐ＝０．４９７）。これらの知見は、ＴＧＦ－β１の上方制御がこの治療によるインスリン抵抗性の好転に寄与するという起こり得る機序であることを示している。

【０２０７】

次に、より高感度の細胞内フローサイトメトリー分析を使用して、インターロイキン－７（ＩＬ－１７、ＩＬ－１７Ａとしても知られる）およびＴｈ１／Ｔｈ２免疫応答関連サイトカインをＴ２Ｄ対象の末梢血において調べた。ＩＬ－１７Ａは自己免疫疾患に関与する周知の炎症誘発性サイトカインである。ＩＬ－１７、ＩＬ－１２、およびＴｈ２関連サイトカインＩＬ－４およびＩＬ－５の産生は、全てこの治療後に顕著に減少した（図４ｂ）。

【０２０８】

Ｔｈ１／Ｔｈ２免疫応答の調節の根底にある細胞の機序を調べるために、本発明者らはＴ２Ｄの慢性炎症および肥満関連インスリン抵抗性の発症に重要な役割を果たす単球／マクロファージ、プロフェッショナル抗原提示細胞に発現する共刺激分子ＣＤ８０／ＣＤ８６の変化に焦点を当てた。結果は、ＣＤ８６＋ＣＤ１４$^{+}$単球の割合が治療後４週間で顕著に減少したことを示した（図４ｃ、Ｐ＝０．０２１２）。ＣＤ８０$^{+}$ＣＤ１４$^{+}$単球のレベルに有意な変化はなかった（Ｐ＝０．１３）。ＣＤ８６$^{+}$ＣＤ１４$^{+}$単球／ＣＤ８０＋ＣＤ１４$^{+}$単球の比は３．８６±２．５６から１．２２±０．４８に減少した（Ｐ＝０．０１）。さらに、リンパ球で発現するＣＤ８０／ＣＤ８６、ＣＤ２８／ＣＴＬＡ－４のリガンドのさらなるフロー解析は、ＣＴＬＡ－４の発現が幹細胞バイオリアクター装置治療を受けた４週間後に顕著に増加したことを明らかにした（治療前の０．５１％±０．５対治療後の１．９８％±０．５１、Ｐ＝９．０２Ｅ－０５）。しかしながら、フロー解析は共刺激分子ＣＤ２８の発現における差異を示すことができなかった（治療前の６９．９８％±１４．１７対治療後の６１．５％±１０．８９、Ｐ＝０．２２５）。さらに、幹細胞教育体治療を受けた後のＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$Ｔｒｅｇ集団の変化を調べた。フロー解析では、ベースラインと治療後４週間または１２週間の間に際が認められなかった（図４ｄ、Ｐ＝０．６８９）。したがって、これらのデータは、この処理が、Ｔｒｅｇではなく抗原提示細胞の単球の作用を介してＴｈ１／Ｔｈ２免疫応答を調節することを示している。

【０２０９】

単球に対するＣＢ－ＳＣの免疫調節のインビトロ機序的試験

単球に対するＣＢ－ＳＣの免疫調節効果をよりよく理解するために、ヒト末梢血から精製したＣＤ１４$^{+}$単球を用いたインビトロ共培養実験を実施した。精製したＣＤ１４$^{+}$単球を、種々の比でＣＢ－ＳＣと共培養した。ＣＤ１４$^{+}$単球をＣＢ－ＳＣに添加した後に強い反応があった（図５ａ、左下パネル）。フロー解析は、１８時間のＣＢ－ＳＣとの共培養が、１：５のＣＢ－ＳＣ：単球の比で単球の顕著なアポトーシスをもたらすことを実証した（図５ｂ）。それに対応して、ＣＢ－ＳＣの細胞生存率と付着との両方が、アポトーシス性単球の存在によっても影響を受けた（図５ａ、左下パネル）。構造的に、ＣＢ－ＳＣの細胞突起は長さが減少したが、ほとんどは依然として底に付着していた（図５ａ左下パネル）。これらの障害のあるＣＢ－ＳＣは、２～３日間の共培養後に回復し、それらは絶えず拡大し、７～１０日後に９０～１００％コンフルエントとなった（図５ａ、右下パネル）。機序的試験により、ＣＢ－ＳＣが単球の細胞傷害作用からＣＢ－ＳＣを保護する、細胞のアポトーシスタンパク質阻害剤（ｃＩＡＰ）１を提示し、それらが生存し増殖することを可能にすることが明らかになった（図５ｃ）。本発明者らは、ＣＢ－ＳＣが腫瘍壊死因子受容体ＩＩ（ＴＮＦ　ＲＩＩ）を発現するがＴＮＦ　ＲＩは発現しないことを見出した（図５ｄ）。組換え型ＴＮＦは種々の用量でＣＢ－ＳＣに対して細胞毒性を示した（図５ｅ）。１：１０の比のＴＮＦ　ＲＩＩ　ｍＡｂ（２０μｇ／ｍＬ）で前処理されたＣＢ－ＳＣは、単球の毒性作用を顕著に遮断し、そして良好な細胞生存率および形態で５０％のＣＢ－ＳＣを保護した。

【０２１０】

単球に対するＣＢ－ＳＣによる免疫調節効果をさらに調べるために、リポ多糖（ＬＰＳ）刺激した精製ＣＤ１４$^{+}$単球をＣＢ－ＳＣと共培養した。リアルタイムＰＣＲアレイは、

ＣＢ－ＳＣとの共培養がシグナル伝達経路分子ＮＦ－κＢと共にケモカイン、複数のサイトカイン、およびマトリックスメタロペプチダーゼを含むＬＰＳ刺激した炎症関連遺伝子の数を有意に下方制御できることを示した（図５ｆ）。これらのデータは、単球とＣＢ－ＳＣとのインビトロ共培養が単球における炎症関連遺伝子発現の実質的な下方制御を引き起こすことを実証している。

【０２１１】

以前の研究は、ＣＢ－ＳＣが一酸化窒素（ＮＯ）産生を介してリンパ球に対する免疫調節因子として機能することを示した［Zhao Y. et al., "Immune regulation of T lymphocyte by a newly characterized human umbilical cord blood stem cell", Immunol Lett, Vol. 108: 78-87, (2007)］。ＮＯが単球に対するＣＢ－ＳＣの免疫調節に関与しているかどうかを判定するために、特異的誘導型一酸化窒素シンターゼ（ｉＮＯＳ）阻害剤１４００Ｗを共培養系に適用した。データは、ＬＰＳ刺激した単球に対するＣＢ－ＳＣの阻害効果が、ｉＮＯＳ阻害剤１４００Ｗの存在下で顕著に反転され得ることを実証した（図５ｆ）。ＣＢ－ＳＣにおけるＮＯ産生の遮断は、単球におけるケモカインＣＣＬ２０およびサイトカイン（例えば、ＩＬ－１α、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－２３、およびＴＮＦ－α）の発現を顕著に増加させる可能性がある。これらの結果は、ＣＢ－ＳＣ由来のＮＯが、単球に対するＣＢ－ＳＣの免疫調節効果および抗炎症効果において本質的な役割を果たすことを示している。

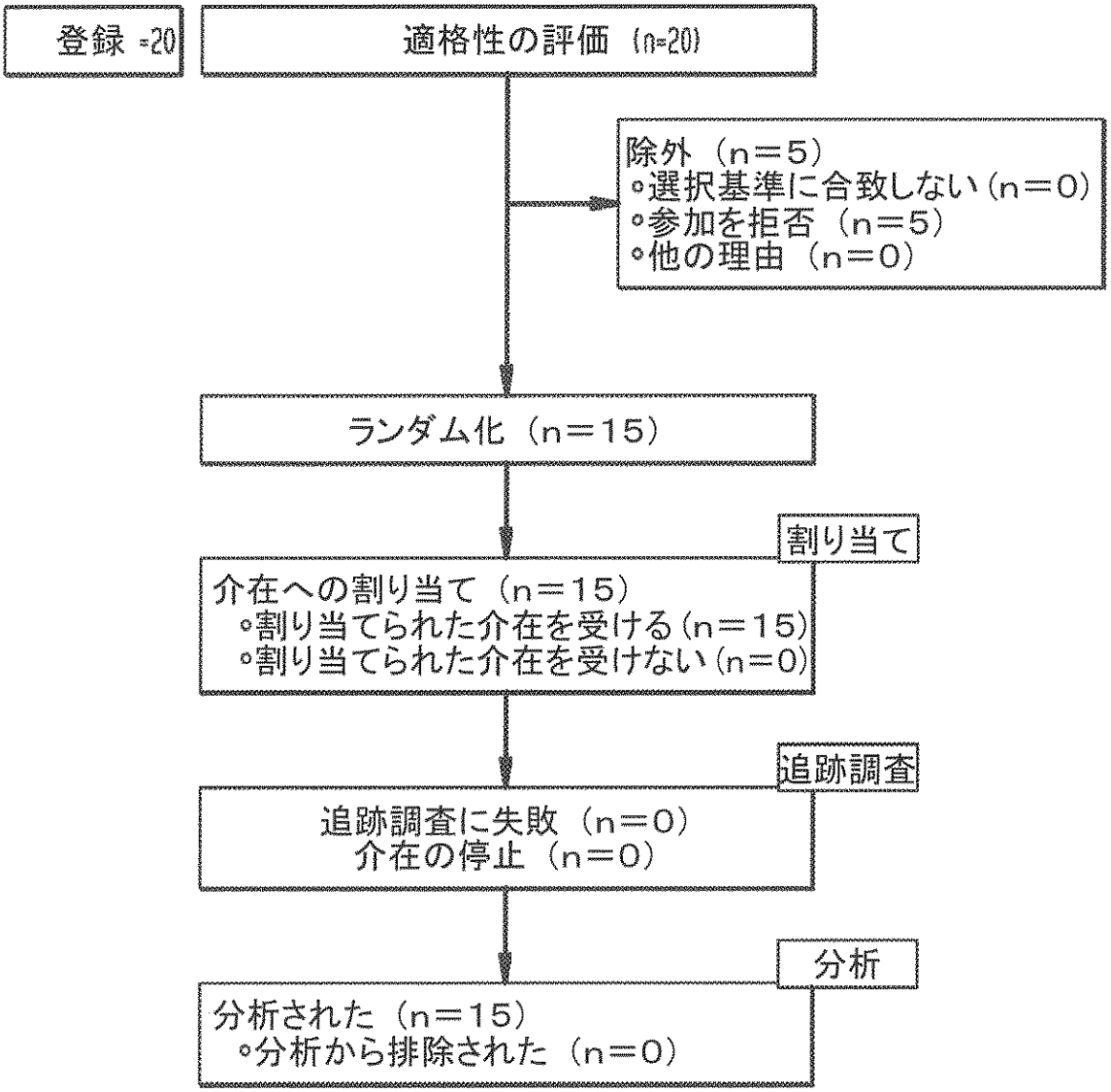
【０２１２】

実施例２：白人民族の患者における１型糖尿病の治療のための接着性ＵＣ－ＳＣ細胞を含む閉ループバイオリアクター装置の使用

白人民族の患者における１型糖尿病の治療のための接着性ＵＣ－ＳＣ細胞を含む閉ループバイオリアクター装置の免疫調節効果を評価するために、確立されたＴ１Ｄを有する１５人の対象において第１／２相臨床治験を実施した。

【０２１３】

２０１２年１１月２７日から２０１４年１０月１日までに実施されたこの第１相／第２相の非盲検臨床治験に、中央アストゥリアス大学病院（オビエド、スペイン）の内科および栄養サービスで治療を受けているＴ１Ｄ患者が登録された。主任治験責任医師は臨床治験を計画し、臨床研究治療プロトコールおよび同意書について倫理的承認を地域臨床研究倫理委員会およびＣｏｍｉｓｉｏｎ Ｐｅｒｍａｎｅｎｔｅ ｄｅ Ｔｒａｓｐｌａｎｔｅｓ ｄｅｌ Ｃｏｎｓｅｊｏ Ｉｎｔｅｒｔｅｒｒｉｔｏｒｉａｌ ｄｅ Ｓｉｓｔｅｍａ Ｎａｃｉｏｎａｌ ｄｅ Ｓａｌｕｄから受け取った。署名されたインフォームドコンセントが各参加者から得られた。臨床治験は、確立されたＴ１Ｄを有する１５人の対象において実施された（表１Ａ；残存膵島β機能を有するＡ群Ｔ１Ｄ患者および表１Ｂ；残存膵島β機能を有さないＢ群Ｔ１Ｄ患者）。下記の第１／２相臨床治験の図表フローチャート１に示されるように、そして米国糖尿病協会（ＡＤＡ）の２０１２年診断基準を満たし、そして血液検査で、膵島β細胞に対する少なくとも一つの自己抗体の存在が示された場合、対象は動員する上で適格とされた。重要な除外基準は、臨床的に重要な肝臓（ＡＳＴまたはＡＬＴ２≧×正常値の上限）、腎臓（クレアチニン≧２．０ｍｇ／ｄｌ）、または心臓病；妊娠中もしくは授乳中の母親；免疫抑制薬；ウイルス疾患による既知の活発な感染症；または免疫不全と関連している疾患；またはヘモグロビン＜１０ｇ／ｄＬもしくは血小板＜１００ｋ／ｍＬ；１ヶ月以内の免疫抑制薬の使用を含んだ。



【０２１４】

表１Ａは、第１／２相臨床治験における治療前の登録された白人の１型糖尿病患者の特徴を示す。Ａ群：残存膵島β細胞機能を有するＴ１Ｄ患者。

【表１Ａ】

患者番号	年齢	性別	経過(年)	空腹時C-ペプチド(ng/mL)	グルカゴン後C-ペプチド(ng/mL)	HbA_1C(%)	インスリン用量(U/kg体重)
1	36	M	1	0.77	1.06	7.1	0.28
2	27	F	1	0.54	0.57	6.3	0.32
3	31	F	10	0.25	0.4	9	0.52
4	20	M	3	1.05	2.18	6.2	0.18
5	37	M	14	0.26	0.36	7.8	0.4
6	52	M	10	0.23	0.27	9.2	0.61
平均(SD)	33.8 (10.9)		6.5 (5.5)	0.52 (0.34)	0.81 (0.73)	7.6 (1.3)	0.38 (0.16)

【０２１５】

表１Ｂは、第１／２相臨床治験における治療前の登録された白人の１型糖尿病患者の特徴を示す。Ｂ群：残存膵島β細胞機能を有さないＴ１Ｄ患者。

【表１Ｂ】

患者番号	年齢	性別	経過(年)	空腹時C-ペプチド(ng/mL)	グルカゴン後C-ペプチド(ng/mL)	HbA_1C(%)	インスリン用量(U/kg体重)
7	30	M	23	<0.01	<0.01	7.1	0.62
8	37	M	15	<0.01	<0.01	6.2	0.72
9	40	F	12	<0.01	<0.01	8.4	0.92
10	53	F	14	<0.01	<0.01	9.1	0.79
11	33	M	13	<0.01	<0.01	7.4	0.56
12	48	F	6	<0.01	0.04	10.1	0.58
13	32	M	6	<0.01	0.01	8.3	0.51
14	45	M	17	<0.01	<0.01	6.5	0.71
15	45	M	6	0.02	0.06	8.4	0.96
平均(SD)	40.3 (7.9)		12.4 (5.8)	0.01 (0.003)	0.02 (0.02)	7.9 (1.3)	0.71 (0.16)

【０２１６】

治療および追跡調査

この研究の全ての参加者が、接着性ＵＣ－ＳＣ細胞（Ｔｉａｎｈｅ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（登録商標）、ＵＳＡ）を含む閉ループバイオリアクターによる２回の治療を受けた。ＣＢ－ＳＣ培養物および閉ループ装置の調製は、以前に記載されたように実施した［Zhao Y. et al., "Reversal of type 1 diabetes via islet beta cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells", BMC Med, Vol. 10:3, (2012)］。簡潔には、健康な同種異系ドナー由来のヒト臍帯血ユニットをＣｅｎｔｒｏ Ｃｏｍｕｎｉｔａｒｉｏ ｄｅ Ｓａｎｇｒｅ ｙ Ｔｅｊｉｄｏｓ ｄｅ Ａｓｔｕｒｉａｓ（ＣＣＳＴ、Ｏｖｉｅｄｏ、Ｓｐａｉｎ）から入手した。全ての臍帯血試料は、ＨＩＶ Ｉ＆ＩＩ、ＨＢｓＡｇ、ＨＢｃＡｇ、ＨＣＶ、ＨＩＶＮＡＴ、ＳＴＳ、ＨＢＶＮＡＴ、ＨＣＶＮＡＴ、ＨＴＬＶ Ｉ／ＩＩ、Ｗｅｓｔ Ｎｉｌｅ、Ｃｈａｇａｓ、およびＣＭＶについてスクリーニングされ、病原体を含まない臍帯血ユニットのみが臨床治療に使用された。ヒトＣＢ－ＳＣを新鮮な臍帯血ユニットか

ら単離した（少なくとも１００ｍＬ／ユニット）。これは５０ｍＬのチューブを取得することによって実施され、それらはホルダーに入れられた。３ｍＬのＨＩＳＴＯＰＡＱＵＥ（登録商標）－１０７７を各チューブ（２０ｍＬコニカル遠心分離チューブ）に添加し、室温にしてＣＢ－ＳＣを単離した。ＨＩＳＴＯＰＡＱＵＥ（登録商標）－１０７７の上に３ｍＬの全血を注意深く重層した。遠心分離を室温で３０分間４００×ｇで実施した。遠心分離後、ＣＢ－ＳＣを含む不透明な界面から０．５ｃｍ以内まで上層を吸引した。不透明な界面を新しい清潔な２０ｍＬコニカルチューブに移した。細胞を１０ｍＬの等張リン酸緩衝食塩溶液で洗浄した。混合し２５０×ｇで数分間遠心分離することによって実施された洗浄の後、上清を廃棄し、さらに２回洗浄した後、ＣＢ－ＳＣを０．５ｍＬの等張リン酸緩衝食塩溶液に再懸濁した。ヒトＣＢ－ＳＣを生成し、臍帯血単核細胞を１５０×１５ｍｍペトリ皿（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ Ｌａｂｗａｒｅ、Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ、ＮＪ；組織培養処理皿ではない）に、ＲＰＭＩ１６４０培地中、２５ｍＬ／皿で、少なくとも１×１０^{6}細胞／ｍＬの密度で播種し、８％CO_2中３７℃でインキュベートした。臍帯血単核細胞を無血清培地（Ｌｏｎｚａ、Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ、ＭＤ）中のバイオリアクター装置に播種し、８％CO_2中、３７℃で約２～３週間インキュベートした。ＣＢ－ＳＣ細胞は円形であることが観察され、ペトリ皿の底への付着についてさらに検証された。２～３週間後、ＣＢ－ＳＣを、アフェレーシスによって単離ＭＮＣと共培養した（以下の段落［００３２７］を参照）。８０％コンフルエント（約１×１０^{7}細胞／装置）で増殖するＣＢ－ＳＣを臨床治験用に調製した。１つのバイオリアクター装置を１つの臍帯血ユニットから作製し、そして１回の治療で１人の対象に使用した。

【０２１７】

バイオリアクター装置治療のために、１６ゲージのＩＶ針を左または右肘正中皮静脈に配置し、そして患者の血液を血球分離器ＭＣＳ＋（Ｈａｅｍｏｎｅｔｉｃｓ（登録商標）、Ｂｒａｉｎｔｒｅｅ、ＭＡ）に通して単核細胞を単離した。アフェレーシスによるＭＮＣ収集の単一セッションでは、６～７時間以内に各登録対象から約１０Ｌの血液を処理し、約１×１０^{10}ＭＮＣを収集した。単離された単核細胞は同種異系ＣＢ－ＳＣによる連続治療のためにバイオリアクター装置に移され、他の血液成分は自動的に患者の循環系に戻された。バイオリアクター装置において、患者の末梢血から単離されたＭＮＣを、１：２０、１：３０、１：４０、または１：５０のＣＢ－ＳＣ：ＭＮＣ比で、接着性ＣＢ－ＳＣを有する積み重ねられた円板をゆっくり通過させた。２～３時間接触させた後、ＣＢ－ＳＣ処理した単核細胞を生理食塩水と共に手の背側静脈を介して患者の血液循環系に戻した。それは８～９時間かかった。患者は１日間入院して体温をモニターし、治療後の有害反応について血球数試験を実施した。３ヶ月後、全ての対象は、上記のように、バイオリアクター装置治療による第２の治療を受けた。臨床評価および臨床検査のために、治療の２、８、１２、１８、２６、４０、および５６週後に追跡調査来院を予定した（図６）。

【０２１８】

β細胞機能を評価するために、空腹時およびグルカゴン刺激のＣペプチドレベルをベースラインおよび接着性ＵＣ－ＳＣ細胞を含む閉ループバイオリアクター装置の治療後に調べた。グルカゴン刺激Ｃペプチド試験を実施した。ベースラインＣ－ペプチド測定のために、５～１０ｍＬの静脈血の試料を空腹状態の各対象から採取した。グルカゴン試験は、１ｍｇのグルカゴンを静脈内注射し、続いて６分後に別の静脈部位から５～１０ｍＬの２回目の採血を行うことによって実施された。グルカゴン試験のための対象の選択は、単にテストを完了させるという彼らの合意に基づいていた。

血液試料を遠心分離した後、血清を単離し、次いで－２０℃で凍結した。

【０２１９】

研究の主要評価項目は、治療後５６週間にわたる閉ループ治療の実行可能性と安全性、およびＴ１Ｄ対象における免疫マーカーの変化に対する治療の有効性の予備的評価であった。研究の副次的評価項目は、β細胞機能の改善における治療の有効性に関する予備的証拠であった。ベースライン血液試料を閉ループ治療の前に採取した。

【０２２０】

混合リンパ球反応（ＭＬＲ）とエクスビボ共培養

ヒトバフィーコート血液ユニットは、ニュージャージー州の血液センターから購入した（Ｅａｓｔ　Ｏｒａｎｇｅ、ＮＪ）。ＣＢ－ＳＣを以前に記載されたように採取した［Zhao Y. et al., "Reversal of type 1 diabetes via islet β-cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells", BMC Med., Vol. 10(3), 1-11, (2012)］；［Zhao Y. et al., "Targeting insulin resistance in type 2 diabetes via immune modulation of cord blood-derived multipotent stem cells (CB-SCs) in stem cell educator therapy: phase I/II clinical trial",BMC Med., Vol. 11: 160, (2013)］。これは５０ｍＬのチューブを取得することによって実施され、それらはホルダーに入れられた。３ｍＬのＨＩＳＴＯＰＡＱＵＥ（登録商標）－１０７７を各チューブ（２０ｍＬコニカル遠心分離チューブ）に添加し、室温にしてＣＢ－ＳＣを単離した。ＨＩＳＴＯＰＡＱＵＥ（登録商標）－１０７７の上に３ｍＬの全血を注意深く重層した。遠心分離を室温で３０分間４００×ｇで実施した。遠心分離後、ＣＢ－ＳＣを含む不透明な界面から０．５ｃｍ以内まで上層を吸引した。不透明な界面を新しい清潔な２０ｍＬコニカルチューブに移した。細胞を１０ｍＬの等張リン酸緩衝食塩溶液で洗浄した。混合し２５０×ｇで数分間遠心分離することによって実施された洗浄の後、上清を廃棄し、さらに２回洗浄した後、ＣＢ－ＳＣを０．５ｍＬの等張リン酸緩衝食塩溶液に再懸濁した。混合白血球反応（ＭＬＲ）を介したＴ細胞に対するＣＢ－ＳＣの免疫調節効果を調べるために、レスポンダー細胞を、ＣＢ－ＳＣの存在下または非存在下で、１：２のＲ：Ｓ比で、３０００ｒａｄで照射した同種異系刺激細胞と共培養した。ＣＢ－ＳＣ：レスポンダーの比は１：１０であった。４～５日間の共培養の後、細胞をＯｌｙｍｐｕｓ　ＩＸ７１倒立顕微鏡で写真撮影し、そしてフロー解析のために回収した。

ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{-}$$Ｔ_{EM}$細胞でのＣＣＲ７発現を分析するために、成体末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を無血清培地（Ｌｏｎｚａ、Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ、ＭＤ）中で１：１０のＣＢ－ＳＣ：ＰＢＭＣ比でＣＢ－ＳＣと共培養し、３７℃、８％$ＣＯ_2$中でインキュベートした。未処理のＰＢＭＣを対照とした。ＣＢ－ＳＣ処理したＰＢＭＣを、フローサイトメトリーのためにそれぞれ２４および４８時間で回収した。

【０２２１】

エクスビボ試験を実施するために、ヒト臍帯血ユニットがＣｏｒｄ：Ｕｓｅ　Ｃｏｒｄ　Ｂｌｏｏｄ　Ｂａｎｋ（Ｏｒｌａｎｄｏ、ＦＬ）によって提供された。病原体を含まない臍帯血ユニットのみをＣＢ－ＳＣの単離に使用した。ヒトＣＢ－ＳＣを新鮮な臍帯血ユニットから単離した（少なくとも１００ｍＬ／ユニット）。これは５０ｍＬのチューブを取得することによって実施され、それらはホルダーに入れられた。３ｍＬのＨＩＳＴＯＰＡＱＵＥ（登録商標）－１０７７を各チューブ（２０ｍＬコニカル遠心分離チューブ）に添加し、室温にしてＣＢ－ＳＣを単離した。ＨＩＳＴＯＰＡＱＵＥ（登録商標）－１０７７の上に３ｍＬの全血を注意深く重層した。遠心分離を室温で３０分間４００×ｇで実施した。遠心分離後、ＣＢ－ＳＣを含む不透明な界面から０．５ｃｍ以内まで上層を吸引した。不透明な界面を新しい清潔な２０ｍＬコニカルチューブに移した。細胞を１０ｍＬの等張リン酸緩衝食塩溶液で洗浄した。混合し２５０×ｇで数分間遠心分離することによって実施された洗浄の後、上清を廃棄し、さらに２回洗浄した後、ＣＢ－ＳＣを０．５ｍＬの等張リン酸緩衝食塩溶液に再懸濁した。ヒトＣＢ－ＳＣを生成し、臍帯血単核細胞を１５０×１５ｍｍペトリ皿（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　Ｌａｂｗａｒｅ、Ｆｒａｎｋｌｉｎ　Ｌａｋｅｓ、ＮＪ；組織培養処理皿ではない）に、ＲＰＭＩ１６４０培地中、２５ｍＬ／皿で、少なくとも$１×１０^{6}$細胞／ｍＬの密度で播種し、８％$ＣＯ_2$中３７℃でインキュベートした。臍帯血単核細胞を無血清培地（Ｌｏｎｚａ，　Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ，　ＭＤ）中のバイオリアクター装置に播種し、８％$ＣＯ_2$中、３７℃で約２～３週間インキュベートした。ＣＢ－ＳＣは円形であることが観察され、ペトリ皿の底への付着についてさらに検証された。８０％コンフルエント（約$１×１０^{7}$細胞／装置）で増殖するＣＢ－ＳＣを同種異系リンパ球との共培養のために調製した。

【０２２２】

臨床治験の準備として、治療前ならびに治療後それぞれ２、８、１８、２６、および５６週目に末梢血試料（対象あたり１０ｍＬ）を患者から採取した。細胞を、ＰｅｒＣＰ／Ｃｙ５．５コンジュゲート抗ＣＤ３、ＰｅｒＣＰ／Ｃｙ５．５コンジュゲート抗ＣＤ４、ＰＥコンジュゲート抗ＣＤ８、ＦＩＴＣコンジュゲート抗ＣＤ４５ＲＡ、ＰＥコンジュゲート抗ＣＤ４５ＲＯ、ＰＥコンジュゲート抗ＣＤ５６、ＡＰＣコンジュゲート抗ＣＣＲ７を含む、マウス抗ヒトｍＡｂ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）と共にインキュベートした。末梢血中の異なるサブセットの割合および絶対細胞数を試験するために、細胞をＢＤ ＭｕｌｔｉＴＥＳＴ試薬ＣＤ３ ＦＩＴＣ／ＣＤ８ ＰＥ／ＣＤ４５ ＰｅｒＣＰ／ＣＤ４ ＡＰＣおよびＣＤ３ ＦＩＴＣ／ＣＤ１６＋ＣＤ５６ ＰＥ／ＣＤ４５ ＰｅｒＣＰ／ＣＤ１９ ＡＰＣ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ Ｊｏｓｅ、ＣＡ）で免疫染色した。アイソタイプが一致したマウス抗ヒトＩｇＧ抗体（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）は、全てのフルオレセインコンジュゲートＩｇＧ ｍＡｂに対する陰性対照として役立てた。染色後、細胞を回収してＢＤ ＦＡＣＳｃａｌｉｂｕｒ（商標）Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒを用いて分析した。最終的なデータは、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ Ｐｒｏソフトウェア（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ、ＭＤ）を用いて解析した。

【０２２３】

エクスビボ試験、フローサイトメトリー解析のために、細胞を室温で３０分間染色し、次いでフロー解析の前にＰＢＳで洗浄した。本発明者らは、ＡＰＣ－ＡＦ７５０－コンジュゲート抗ＣＤ４、ＡＰＣ－ＡＦ７５０－またはＫｒｏｍｅ Ｏｒａｎｇｅ－コンジュゲート抗ＣＤ８、ＰＥ－またはＦＩＴＣ－コンジュゲート抗ＣＤ４５ＲＡ、ＦＩＴＣ－コンジュゲート抗ＣＤ４５ＲＯ、ＥＣＤ－コンジュゲート抗ＣＤ６２Ｌ、およびＰＥ－Ｃｙ７－コンジュゲート抗ＣＣＲ７を含むいくつかのマウス抗ヒトモノクローナルＡｂ（ｍＡｂ）を使用した。アイソタイプが一致したマウス抗ヒトＩｇＧ抗体（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）は、全てのフルオレセインコンジュゲートＩｇＧ ｍＡｂに対する陰性対照として役立てた。染色後、細胞を回収し、１０色までの同時読み取りのための３つのレーザー（４８８ｎｍ青、６３８赤、および４０５紫のレーザー）を備えたＧａｌｌｉｏｓフローサイトメーター（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）を用いて解析した。最終的なデータは、Ｋａｌｕｚａ Ｆｌｏｗ Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ Ａｎａｌｙｓｉｓソフトウェア（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）を用いて解析した。

【０２２４】

治療企図アプローチが用いられ、１５人の患者が接着性ＵＣ－ＳＣ細胞を含む閉ループバイオリアクター装置による治療を受けていた。全ての参加者が安全性解析に含まれた。治療の実行可能性は、治療を完了することができなかった患者の数および１２ヶ月の来院の前に追跡調査に失敗した患者の数を分析することによって評価した。有効性の主要評価項目は、ベースラインと追跡調査との間の免疫マーカーの変化であった。ベースラインと追跡調査の間の統計的有意性を判定するために、両側対応のスチューデントのｔ検定によってデータの統計分析を実施した。値は平均±ＳＤ（標準偏差）として示した。

【０２２５】

結果

白人Ｔ１Ｄ対象におけるバイオリアクター装置治療による２回の治療の安全性プロファイルと実現可能性

以前の臨床治験では、全ての対照が１回の治療を受けた［Zhao Y. et al., "Reversal of type 1 diabetes via islet β-cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells", BMC Med., Vol. 10(3), 1-11, (2012)］；［Zhao Y. et al., "Targeting insulin resistance in type 2 diabetes via immune modulation of cord blood-derived multipotent stem cells (CB-SCs) in stem cell educator therapy: phase I/II clinical trial", BMC Med,, Vol. 11: 160, (2013)］。リンパ節や他の組織にかなりの数の病原性自己免疫細胞が残っていて、処置中に血流に入ることができず、したがってＣＢ－ＳＣへの曝露を免れた可能性があるため、これらのＴ１Ｄ対象（ｎ＝１５）において、２回目の治療が最初のセッションに続いて３

ヶ月間追加された。バイオリアクター装置治療を用いた２回の治療の過程の間、または５６週間の追跡調査の間、いかなる参加者も重大な有害事象を経験しなかった。処置中、一部の参加者には静脈穿刺部位（肘正中皮静脈）での軽度の不快感といくらかの腕の痛みのみが認められた。追跡調査研究中に発熱や拒絶反応は認められなかった。

【０２２６】

白人対象のメモリーＴ細胞区画の調節における閉ループ治療の臨床有効性

閉ループ治療の免疫調節効果を評価するために、フローサイトメトリーを使用して、閉ループ治療後に１５人の参加者における免疫マーカーを調べた。臨床データは、１年間の追跡調査中に、白血球共通抗原ＣＤ４５$^{+}$有核細胞、ＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞、ＣＤ４$^{+}$細胞、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ＣＤ５６$^{+}$ＮＫ細胞、およびＣＤ２０$^{+}$Ｂ細胞を含む各細胞集団の総細胞数に変化がないことを示した（図７ａ）。末梢血中の総ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の割合を定量したところ、１年にわたって非常に安定していた（図７ｂ）。

【０２２７】

ＣＤ４５ＲＡおよびＣＣＲ７などのナイーブおよびメモリーＴ細胞の特性決定のための共通の表面マーカーを用いて、異なるＴ細胞亜集団に対する閉ループ治療の調節効果を調べた。ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ（ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$）細胞の割合は、閉ループ治療後２６週で有意に増加し（Ｐ＝０．００４２）、最終追跡調査を通して維持された（治療後５６週間、Ｐ＝０．００２１）（図７ｃ）。ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の割合は、どの追跡調査でも有意な変化を示さなかった（図７ｃ）。これらの知見は、ＳＣＥ治療がナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の再生、正常な免疫能力の必須部分を回復させることを示唆した。

メモリーＴ細胞に対する閉ループ治療の効果を調べるために、セントラルメモリーＴ細胞およびエフェクターメモリーＴ細胞（それぞれT_{CM}およびT_{EM}）をフローサイトメトリーによって調べた。これらの対象における全体的な分析は、ＣＤ４$^{+}$$T_{CM}$（ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＣＲ７$^{+}$）細胞の割合が１８週目にバイオリアクター装置治療を受けた後に顕著にそして一貫して増加したことを実証した（Ｐ＝０．０１８）（図７ｄ）。対照的に、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の割合は１８週で一時的に改善されただけであった（Ｐ＝０．０３４）が、継続的な追跡調査中にベースラインレベルに戻った（図７ｄ）。Ｂ群の対象（４／９、４４％）と比較して、Ａ群の対象（４／６、６７％）におけるＣＤ４$^{+}$$T_{CM}$細胞の割合は、１８週の追跡調査でより効率的に陽性細胞の３０％を超えて増加した（データ示さず）。T_{EM}（ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＣＲ７$^{-}$）細胞の全体的な分析は、ＣＤ４$^{+}$細胞とＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞との両方が、それぞれ１８週（Ｐ＝０．０３）および２６週（Ｐ＝０．００２４）でかなり減少したことを明らかにした（図７ｅ）。Ａ群の対象（６／６、１００％）におけるＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の割合は、２６週の追跡調査でのＢ群の対象（７／９、７８％）と比較して陽性細胞の１５％を超えてより効率的に減少し、２６週の追跡調査でのＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の減少に関して、５／６（８３％）のＡ群の対象対７／９（７８％）のＢ群の対象であった（データ示さず）。さらに、Ｔ細胞の活性化マーカーとしてＨＬＡ－ＤＲを使用して、臨床データは、ＣＤ４$^{+}$ＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$Ｔ細胞およびＣＤ８$^{+}$ＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$Ｔ細胞の割合が、ベースラインレベルと比較して２６週の追跡調査で顕著に減少したことを示した（それぞれ、Ｐ＝０．００２およびＰ＝０．００６）（図７ｆおよびｇ）。

【０２２８】

白人Ｔ１Ｄ対象における閉ループ治療後のＴ細胞でのＣＣＲ７発現の上方制御

Ｃ－Ｃケモカイン受容体７（ＣＣＲ７）は、高い内皮細静脈を介したＴ細胞のリンパ節ホーミングおよびＴ細胞恒常性の媒介において重要な役割を果たしている［Forster R. et al., "CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance", Nat Rev Immunol, Vol. 8: 362-371, (2008)］；［Moschovakis G.L. et al., "Multifaceted activities of CCR7 regulate T-cell homeostasis in health and disease", Eur J Immunol, Vol. 42: 1949-1955, (2012)］。閉ループ治療の免疫調節効果をさらに調べるために、ナイーブＴ、T_{CM}、およびT_{EM}細胞でのＣＣＲ７発現のレベルをフローサイトメトリーによって分析した。臨床データは、Ａ群とＢ群との両方の対象がナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（図８ａ）、ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞（図８ｂ）、およびＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（図８ｃ）でのＣ

ＣＲ７の発現を顕著に増加させることを明らかにした。Ａ群の対象におけるナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞の顕著な応答は、閉ループ治療後８週という早い時期に起こり、２６週のＢ群の対象における遅れた応答のものと同程度であった（図８ａ）。ナイーブＣＤ８$^+$Ｔ細胞でのＣＣＲ７発現の上方制御は、Ａ群とＢ群との両方の対象において８週間の追跡調査で同時に示された（図８ｂ）。Ａ群の対象のＣＤ８$^+$Ｔ細胞でのＣＣＲ７の発現もまた改善され、１８週の追跡調査で開始した（図８ｄ）が、Ｂ群の対照においては、５６週の追跡調査での延期された応答であった（Ｐ＝０．０４６、図８ｄ）。ＣＤ４$^+$Ｔ細胞とＣＤ８$^+$Ｔ細胞との両方でのＣＣＲ７発現のレベルは、両群で幹細胞バイオリアクター装置治療を受けた後の５６週の追跡調査で顕著に増強された（図８ｅ）。データは、ＣＤ４$^+$およびＣＤ８$^+$Ｔ細胞でのＣＣＲ７発現の上方制御が、閉ループ治療後のＴ１Ｄ対象におけるＴ細胞の再分布をもたらし得ることを示している。

【０２２９】

ＣＢ－ＳＣによる閉ループ治療後のエクスビボ試験によるＴ細胞でのＣＣＲ７発現の上方制御

ＣＣＲ７は異なるＴ細胞亜集団の特性決定のための重要なマーカーであり、その発現は複数の因子により調節され得る（Britschgi et al., 2008）。ナイーブＴ、T_{CM}およびT_{EM}細胞におけるＣＣＲ７の上方制御をさらに実証するために、混合白血球反応（ＭＬＲ）をＣＢ－ＳＣの存在下または非存在下で用いた。位相差顕微鏡法により、ＣＢ－ＳＣの非存在下で上清中に浮遊する様々なサイズの顕著な数の細胞塊が明らかになった（図９ａ、左パネル）が、ＣＢ－ＳＣ存在下ではそうはならなかった（図９ａ、右パネル）。これは、Ｔ細胞の増殖に対するＣＢ－ＳＣの抑制活性を示した。フローサイトメトリーは、ＣＤ４$^+$およびＣＤ８$^+$Ｔ細胞でのＣＣＲ７発現の全体的なレベルが、ＣＢ－ＳＣによる治療後に増加したことを示した（図９ｂ）。

【０２３０】

ゲートをかけたＣＤ４$^+$Ｔ細胞でのＣＣＲ７発現をさらに分析した。ＣＢ－ＳＣ未処理群（レスポンダーのみまたはレスポンダー＋刺激因子）と比較して、ＣＢ７－ＳＣ処理群（レスポンダー＋刺激因子＋ＣＢ－ＳＣまたはレスポンダー＋ＣＢ－ＳＣ）において、ナイーブＴ（ＣＤ４５ＲＡ$^+$ＣＣＲ７$^+$）細胞において、ＣＣＲ７発現の割合と平均蛍光強度（ＭＦＩ）との両方が増強された（図９ｃ、左パネル）。T_{CM}細胞（ＣＤ４５ＲＯ$^+$ＣＣＲ７$^+$）の割合は、ＣＢ－ＳＣ処理群において増加した。対照的に、T_{EM}細胞（ＣＤ４５ＲＯ$^+$ＣＣＲ７$^-$）の割合は、ＣＢ－ＳＣ処理群において減少した（図９ｃ、右パネル）。T_{EM}細胞（ＣＤ４５ＲＯ$^+$ＣＣＲ７$^-$）でのＣＣＲ７発現の平均蛍光強度は、ＣＢ－ＳＣ未処理群における１．８５±０．０７からＣＢ－ＳＣ処理群における２．２４±０．０１に上方制御された（Ｐ＝０．０１７）。

【０２３１】

T_{EM}細胞でのＣＣＲ７発現の上方制御をさらに確認するために、別の主要リンパ節ホーミング受容体ＣＤ６２ＬをヒトＴ$_{EM}$細胞（ＣＤ４５ＲＯ$^+$ＣＤ６２Ｌ$^-$）のマーカーとして適用した［Lefrancois et al., Immunol. Rev., Vol. 211: 93-103, (2006)］。ＣＢ－ＳＣで処理した後、ゲートをかけたＣＤ４５ＲＯ$^+$ＣＤ６２Ｌ$^-$Ｔ$_{EM}$細胞上でＣＣＲ７発現のレベルを分析した。データは、ＣＤ４５ＲＯ$^+$ＣＤ６２Ｌ$^-$Ｔ$_{EM}$細胞でのＣＣＲ７発現の平均蛍光強度が、ＣＢ－ＳＣでの処理後にベースラインレベルの１．８７±０．０４から２．０９±０．０７に上方制御されたことを実証した（Ｐ＝０．０２）。

したがって、これらのデータは、T_{EM}細胞でのＣＣＲ７発現がＣＢ－ＳＣの処理によって調節され得ることを示している。

【０２３２】

白人対象の膵臓β細胞機能改善における幹細胞バイオリアクター装置治療の臨床有効性

白人Ｔ１Ｄ対象の代謝制御における幹細胞バイオリアクター装置治療の治療的可能性を試験するために、空腹時血漿Ｃ－ペプチドおよびグルカゴン刺激のＣ－ペプチドレベルの測定を通して膵島β細胞機能を調べた。Ａ群の対象において、臨床結果は、最近発症した２人のＴ１Ｄ対象（すなわち、残存β細胞集団を有する可能性が最も高い）の１２週の時

点で、空腹時とグルカゴン刺激との両方のＣ－ペプチドレベルの上方制御を実証した（図１０ａおよびｂ）。回復した空腹時およびグルカゴン刺激のＣ－ペプチドレベルは、治療後５６週の最後の追跡調査を通して対象１に保持された（図１０ａ）。対象２のグルカゴン刺激のＣ－ペプチドレベルは１年間の追跡調査期間中安定していたが、空腹時Ｃ－ペプチドレベルはわずかに低下した（図１０ｂ）。試験の時点でＴ１Ｄを１０年有していた対象３は、空腹時Ｃ－ペプチドのベーサルの０．２５ｎｇ／ｍＬから５６週時の０．３６ｎｇ／ｍＬへの増加およびグルカゴン刺激のＣ－ペプチドレベルのベーサルの０．４ｎｇ／ｍＬから２６週時の０．５２ｎｇ／ｍＬへの増加を含む中程度の改善をなおも達成した（図１０ｃ）。試験の時点でＴ１Ｄを３年有していた対象４は、正常β細胞機能を保持し、ベースライン時の１．０５ｎｇ／ｍＬから４０週時の０．８８ｎｇ／ｍＬまでの空腹時Ｃ－ペプチドレベル、およびベースライン時の２．１８ｎｇ／ｍＬから４０週時の２．０１ｎｇ／ｍＬまでのグルカゴン刺激のＣ－ペプチドレベルと、経時的に顕著な変化を有さなかった（図１０ｄ）。対象５および６は、Ｔ１Ｄの診断後１０年を超えていくらかの残像膵島β細胞機能を示した。閉ループ治療を受けた後、対象５の空腹時Ｃ－ペプチドレベルは、最初、ベースライン時の０．２３ｎｇ／ｍＬから２６週時の０．１４ｎｇ／ｍＬに減少したが、４０週時の０．３ｎｇ／ｍＬに増加した（図１０ｅ）。対象６の空腹時Ｃ－ペプチドレベルは、最初、ベースライン時の０．２６ｎｇ／ｍＬから２６週時の０．０９ｎｇ／ｍＬに減少したが、４０週時の０．２１ｎｇ／ｍＬに改善した（図１０ｆ）。それらのグルカゴン刺激のＣ－ペプチドレベルは、空腹時Ｃ－ペプチドレベルと同様の傾向を示した。

【０２３３】

要約すると、Ａ群の参加者（すなわち、いくらかの残存膵島β細胞機能を有する対象）は、治療後５６週時に彼らの空腹時Ｃ－ペプチドレベルを維持した（０．４６±０．３３ｎｇ／ｍＬ対ベースライン時の０．５２±０．３４ｎｇ／ｍＬ、Ｐ＝０．７８）（表２Ａおよび２Ｂ）。一貫して、インスリンの中央値１日用量（０．３７±０．１６Ｕ／ｋｇ体重対ベースライン時０．３８±０．１６、Ｐ＝０．８４）および中央値糖化ヘモグロビン（ＨｂＡ１Ｃ）（７．８±１．４８対ベースライン時７．６±１．３、Ｐ＝０．８１）は治療後５６週間で安定していた。データは、Ａ群患者における残存β細胞機能が、Ｔ１Ｄの自然な経過としての顕著な直線的減少を伴わずに閉ループ治療を受けた後に救助されそして保存されたことを実証する。さらに、２回のＳＣＥ治療を受けた後に残存膵島β細胞機能を有さない重篤な長期にわたるＢ群患者の空腹時Ｃ－ペプチドレベルに変化は観察されなかった（表２Ａおよび２Ｂ）。ＳＣＥ治療に対する彼らの反応は、長期にわたる重篤な中国人Ｔ１Ｄ対象で報告されたものとは著しく異なっていた。

【０２３４】

表２Ａは、第１／２相臨床治験における１２ヶ月での、治療後の１型糖尿病患者のＣ－ペプチドレベルにおける変化を示す。Ａ群：残存膵島β細胞機能を有するＴ１Ｄ患者。

【表２Ａ】

患者番号	治療前ベーサル血糖	治療前ベーサルC-ペプチド	治療前グルカゴン後C-ペプチド	治療後12ヶ月ベーサル血糖	治療後12ヶ月ベーサルC-ペプチド	治療後12ヶ月グルカゴン後C-ペプチド
1	100	0.77	1.06	175	0.84	1.31
2	85	0.54	0.57	149	0.44	0.8
3	155	0.25	0.4	280	0.36	0.49
4	141	1.05	2.18	130	0.88	2.01
5	144	0.26	0.36	178	0.17	0.23
6	218	0.23	0.27	102	0.08	0.1
平均(SD)	140.5 (46.8)	0.52 (0.34)	0.81 (0.73)	169 (61.4)	0.46 (0.33)	0.82 (0.73)

【０２３５】

表２Ｂは、第１／２相臨床治験における１２ヶ月での、治療後の１型糖尿病患者のＣ－ペプチドレベルにおける変化を示す。Ｂ群：残存膵島β細胞機能を有さないＴ１Ｄ患者。

【表２Ｂ】

患者番号	治療前ベーサル血糖	治療前ベーサルC-ペプチド	治療前グルカゴン後C-ペプチド	治療後12ヶ月ベーサル血糖	治療後12ヶ月ベーサルC-ペプチド	治療後12ヶ月グルカゴン後C-ペプチド
7	230	<0.01	<0.01	232	0.01	0.01
8	128	<0.01	<0.01	135	0.01	0.01
9	144	<0.01	<0.01	244	0.01	0.01
10	198	<0.01	<0.01	173	0.01	0.01
11	211	<0.01	<0.01	182	0.01	0.01
12	111	<0.01	0.04	195	0.01	0.01
13	165	<0.01	0.01	174	0.01	0.02
14	69	<0.01	<0.01	123	0.01	0.01
15	243	0.02	0.06	151	0.02	0.01
平均(SD)	166.56 (58.56)	<0.01	0.037 (0.025)	178.78 (40.64)	0.01 (0.003)	0.01 (0.003)

【０２３６】

さらに、２回のバイオリアクター装置治療を受けた後に残存膵島β細胞機能を有さない重篤な長期にわたるＢ群患者の空腹時Ｃ－ペプチドレベルに変化は観察されなかった（表２Ａおよび２Ｂならびに表３Ａおよび３Ｂ）。閉ループ治療に対する彼らの応答は、長期にわたる重篤な中国人Ｔ１Ｄ対象において報告されたものと著しく異なっていた［Zhao Y. et al., "Reversal of type 1 diabetes via islet β-cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells", BMC Med., Vol. 10(3), 1-11, (2012)］および［Zhao Y., "Stem cell educator therapy and induction of immune balance", Curr Diab Rep., Vol.,12: 517-523, (2012)］。この違いの根底にある起こり得る機序はさらに調査する必要がある。

【０２３７】

【表３Ａ】

患者番号	治療前HbA1C	治療後12ヶ月のHbA1C	治療前インスリン用量(U/kg体重)	治療後12ヶ月のインスリン用量(U/kg体重)
1	7.1	7.4	0.28	0.29
2	6.3	6.3	0.32	0.30
3	9	9.3	0.52	0.52
4	6.2	5.9	0.18	0.19
5	7.8	8.96	0.4	0.3
6	9.2	9	0.61	0.6
平均(SD)	7.6 (1.3)	7.8 (1.48)	0.38 (0.16)	0.37 (0.16)

表３Ａは、第１／２相臨床治験における１２ヶ月での、治療後の１型糖尿病患者のＨｂＡ１Ｃレベルおよびインスリン用量における変化を示す。Ａ群：残存膵島β細胞機能を有するＴ１Ｄ患者。

【０２３８】

【表３Ｂ】

患者番号	治療前HbA1C	治療後12ヶ月のHbA1C	治療前インスリン用量(U/kg体重)	治療後12ヶ月のインスリン用量(U/kg体重)
7	7.1	7.5	0.62	0.63
8	6.2	6	0.72	0.74
9	8.4	7.9	0.92	0.89
10	9.1	8.4	0.79	0.8
11	7.4	7.5	0.56	0.56
12	10.1	9.2	0.58	0.57
13	8.3	6.8	0.51	0.5
14	6.5	6.6	0.71	0.72
15	8.4	8.3	0.96	0.9
平均(SD)	7.94(1.26)	7.58(1)	0.71 (0.16)	0.7 (0.15)

表３Ｂは、第１／２相臨床治験における１２ヶ月での、治療後の１型糖尿病患者のＨｂＡ１Ｃレベルおよびインスリン用量における変化を示す。Ｂ群：残存膵島β細胞機能を有さないＴ１Ｄ患者。

【０２３９】

自己免疫記憶を克服することは、Ｔ１Ｄおよび他の自己免疫疾患における自己免疫を排除するために不可欠である。記載された研究は、対象の免疫系における異なる細胞区画の数および比を大幅に変化させることなく、閉ループ治療を用いた２回の治療アプローチの安全性および実現可能性を実証した。$CD4^+T_{EM}$と$CD8^+T_{EM}$細胞との両方の割合は、ＳＣＥ治療を受けた後に欧州バックグラウンドのこれらの白人Ｔ１Ｄ対象の末梢血において実質的に減少したが、$CD4^+T_{CM}$は閉ループ治療によって有利に働くように見えた。特に、ナイーブＴ細胞およびT_{CM}細胞でのＣＣＲ７発現のレベルは、閉ループ治療後に顕著に増加し、さらにエクスビボ試験によって確認された。$CCR7^+T_{CM}$の割合は、$CCR7^-T_{EM}$を犠牲にして増加した。これらの知見はＴ１Ｄの自己免疫メモリーコンパートメントを変更する解決策を提示する。

【０２４０】

ナイーブＴ細胞は、血液とリンパ液を導管として使用して、二次リンパ組織（ＳＬＴ）

間を常に再循環する。本研究は、閉ループ治療を受けた後、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の割合がＴ１Ｄ対象において顕著に増加したことを明らかにした。１年間の追跡調査中、総ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の数は末梢血中で常に維持されていた。ほとんどのＴ細胞の寿命が短い（３ヶ月）ため、データは、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の増殖が、閉ループ治療によるＴ１Ｄ対象に対する免疫系バランスの正常な回復を表すことを示唆している。臨床的証拠は、慢性鼻副鼻腔炎［Pant et al., "Accumulation of effector memory CD8^{+} T cells in nasal polyps", Am. J. Rhinol. Allergy, Vol. 27(5): 117-126, (2013)］および長期間のＴ１Ｄ対象［Matteucci et al., "Altered proportions of naive, central memory and terminally differentiated central memory subsets among CD4^{+} and CD8^{+} T cells expressing CD26 in patients with type 1 diabetes", J. Clin. Immunol, Vol. 31: 977-984, (2011)］などの慢性炎症または自己免疫疾患においてT_{EM}の集団が増加することを実証している。さらに、ナイーブＴ細胞およびT_{CM}の割合と絶対細胞数との両方が、長期間のＴ１Ｄ対象において減少していた［Matteucci et al., "Altered proportions of naive, central memory and terminally differentiated central memory subsets among CD4^{+} and CD8^{+} T cells expressing CD26 in patients with type 1 diabetes", J. Clin. Immunol, Vol. 31: 977-984, (2011)］。特に、本臨床データは、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞およびT_{CM}の割合が全て顕著に増加したが、ＣＤ４$^{+}$$T_{EM}$およびＣＤ８$^{+}$$T_{EM}$が閉ループ治療を受けた後にこれらのＴ１Ｄ対象において低下したことを実証した。したがって、データは、閉ループ治療がT_{EM}の機能障害を矯正し、長期間のＴ１Ｄ対象におけるT_{CM}の分化を有利に働かせたことを実証している。それとは異なり、ＣＤ４$^{+}$$T_{CM}$と$T_{EM}$との両方は、ＣＤ８$^{+}$$T_{CM}$と共に（しかしＣＤ$^{8+}$$T_{EM}$は除く）、ＣＤ２$^{+}$Ｔ細胞を標的とし、除去する遺伝子改変された融合タンパク質を使用するアプローチであるＴ１Ｄ治験におけるＡｌｅｆａｃｅｐｔ治療による新たに発症したＴ１Ｄ患者の治療によって全て減少した。

【０２４１】

実施例３：Ｔ１Ｄ患者の治療のための不連続治療計画の安全性、実現可能性、および有効性を評価するための前向き、単群、非盲検、単一施設のパイロット試験

試験の目的

主要目的：Ｔ１Ｄ患者対象のパイロット群における不連続治療計画の安全性を評価すること。

副次目的

Ｔ１Ｄ患者における不連続治療の実現可能性を評価すること。

１２ヶ月までのＴ１Ｄ患者におけるβ細胞機能改善のための不連続治療の予備的有効性を評価すること。

不連続治療後のＴ１Ｄ患者における免疫機能のマーカーを評価すること。

【０２４２】

一般的な研究デザイン

これは、Ｔ１Ｄ患者の治療のための不連続治療の安全性、実現可能性、および有効性を評価するための前向き、単群、非盲検、単一施設のパイロット試験である。適格基準を満たす１０人までの患者が登録される。Ｔ１Ｄ患者は、研究の主任治験責任医師または共同研究者によって評価される。最初のスクリーニング来院時にインフォームドコンセントが得られる。最初のスクリーニング来院は、治療開始から３０日以内に実施される（表４）。２回目のスクリーニング来院は治療の７日以内に実施される。全ての基準を満たす対象には治療の予定が組まれる。登録された全ての対象の単核細胞は、接着性ＵＣ－ＳＣ細胞を含むバイオリアクター装置による治療を受ける。単核細胞は、１０～１２Ｌ（約1×10^{10}の単核細胞）の血液が－１日目に処理されるであろうアフェレーシスによって単一のセッションで回収される。次いで、各対象由来の単核細胞を含むＭＮＣ生成物を装置に１７時間かけて曝露して、幹細胞により教育されたＭＮＣ生成物を形成する。０日目に、教育されたＭＮＣ生成物を３～５時間かけて静脈内に注入して患者に戻す。全ての治療対象は、＋１日目に電話による追跡調査評価を受け、急性有害事象を＋７±１日モニターする

。追跡調査来院は治療後１、３、６、９、および１２ヶ月目（±５日）に実施される。対象は、１日インスリン用量、糖レベル、および身体活動を記録するように指示される。教育されたＭＮＣ生成品を注入した後、１日インスリン用量は医師によってモニターおよび調整される。

【０２４３】

ＣＢ－ＳＣ培養物および装置ユニットは、以前に記載されたように調製された［Zhao Y. et al., "Reversal of type 1 diabetes via islet β-cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells", BMC Med., Vol. 10(3), 1-11, (2012)］。手短に、健康な同種異系ドナーに由来するヒト臍帯血ユニットがＦＤＡに登録されたＣＯＲＤ ＵＳＥ Ｃｏｒｄ Ｂｌｏｏｄ Ｂａｎｋ（Ｏｒｌａｎｄｏ、ＦＬ）から得られるであろう。全ての臍帯血試料は、ＨＩＶ １／２、ＨＢｓＡｇ、ＨＢｃＡｇ、ＨＣＶ、ＨＩＶＮＡＴ、ＳＴＳ、ＨＢＶＮＡＴ、ＨＣＶＮＡＴ、ＡｂＳｃｒ、ＨＴＬＶ Ｉ／ＩＩ、Ｗｅｓｔ Ｎｉｌｅ、Ｃｈａｇａｓ、およびＣＭＶについてスクリーニングされ、病原体を含まない臍帯血ユニットのみが臨床治療に使用されるであろう。ヒトＣＢ－ＳＣを新鮮な臍帯血ユニットから単離するであろう（少なくとも１００ｍＬ／ユニット）。５０ｍＬチューブをホルダーに設置するであろう。３ｍＬのＨＩＳＴＯＰＡＱＵＥ（登録商標）－１０７７を各チューブ（２０ｍＬコニカル遠心分離チューブ）に添加し、室温にしてＣＢ－ＳＣを単離するであろう。ＨＩＳＴＯＰＡＱＵＥ（登録商標）－１０７７の上に３ｍＬの全血を注意深く重層するであろう。遠心分離を室温で３０分間４００×ｇで実施するであろう。遠心分離後、ＣＢ－ＳＣを含む不透明な界面から０．５ｃｍ以内まで上層を吸引するであろう。不透明な界面を新しい清潔な２０ｍＬコニカルチューブに移すであろう。細胞を１０ｍＬの等張リン酸緩衝食塩溶液で洗浄するであろう。混合し２５０×ｇで数分間遠心分離することによって実施する洗浄の後、上清を廃棄し、さらに２回洗浄の後、ＣＢ－ＳＣを０．５ｍＬの等張リン酸緩衝食塩溶液に再懸濁するであろう。ヒトＣＢ－ＳＣを生成し、臍帯血単核細胞を１５０×１５ｍｍペトリ皿（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ Ｌａｂｗａｒｅ、Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ、ＮＪ；組織培養処理皿ではない）に、ＲＰＭＩ１６４０培地中、２５ｍＬ／皿で、少なくとも１×10^6細胞／ｍＬの密度で播種し、８％CO_2中３７℃でインキュベートするであろう。臍帯血単核細胞を無血清培地（Ｌｏｎｚａ、Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ、ＭＤ）中のバイオリアクター装置に播種し、８％CO_2中、３７℃で約２～３週間インキュベートするであろう。ＣＢ－ＳＣは円形であることが観察され、ペトリ皿の底への付着についてさらに確認するであろう。８０％コンフルエント（約１×10^7細胞／装置）で増殖するＣＢ－ＳＣを臨床治験用に調製するであろう。望ましいエンドトキシンレベルは＜０．０５ＥＵ／ｍＬである。１つの装置を１つの臍帯血ユニットから作製し、そして１人の対象に使用するであろう。

【０２４４】

ＭＮＣ生成物とＣＢ－ＳＣとの終夜の共培養の後、装置で処理したＭＮＣ生成物を回収し、３時間、４時間、または５時間かけて静脈内に注入（ｉ．ｖ）して対象に戻すであろう。

表４は、前向き、単群、１型糖尿病臨床試験で使用されたＳＣＥ治療の事象のスケジュールを示す。

【表４】

手順	スクリーニング 1	スクリーニング 2	治療	安全性 1	安全性 2	FU 1	FU 2	FU 3	FU 4	FU 5
	Day -30 ～-1	Day -7 ～-1	Day 0	Day +1 ～+2	Day +6 ～+8	1月	3月	6月	9月	12月
インフォームドコンセント	x									
選択/除外基準の確認	x									
バイタルサイン (Ht/Wt/Temp/BP/HR/RR)	x		x		x		x	x	x	x
病歴	x		x		x		x	x	x	x
身体的検査	x		x		x		x	x	x	x
アフェレーシスのための静脈評価	x									
ローカルラボ										
CBC	X		x		x		x	x	x	x
CMP	X						x	x	x	x
HbA1C	X						x	x	x	x
感染症パネル	X									
尿妊娠検査		x								
自己抗体 (ICA、IAA、IA2、GAD、ZnT8)	X						x	x	x	x
EKG	X									
代謝状態										
混合食耐性試験		x					x	x	x	x
1日インスリン用量:患者日記	連続									
1日グルコースレベル:患者日記	連続									
免疫マーカー										
CD4+CD25+Foxp3+Tregs		x				x	x	x	x	x
IL-1, TNFα, IL-17		x				x	x	x	x	x
IL-10 および TGF-β1		x				x	x	x	x	x
Th1/Th2 サイトカイン(IL-4、IL-5、IL-12、IL-13)		x				x	x	x	x	x
治療										
アフェレーシス		Day -1	x	細胞注入						
安全性評価										
安全性追跡調査のための架電				x	x					
併用医療モニタリング	連続									
有害事象モニタリング	連続									

【０２４５】

研究の主要評価項目

研究の主要評価項目には、治療関連の有害事象の発生が含まれる。治療中に発生した有害事象（特に一時的または恒久的な治療中止を必要とする事象）および１２ヶ月の追跡調査期間中に発生した有害事象が評価される。

【０２４６】

研究の副次評価項目（実現可能性の評価項目）

実現可能性の評価項目には、不連続治療を完了することができなかった患者の数、および１２ヶ月の追跡調査来院の前に追跡調査に失敗した患者の数を含む。

治療の中止に関する、有害事象に関連するわけではない任意の理由が記録される（例えば、装置に関する技術的問題）。

【０２４７】

研究の副次評価項目（有効性の評価項目）

有効性の評価項目は以下を含む：

・３時間混合食耐性試験（ＭＭＴＴ）の最初の２時間にわたるＣ－ペプチド曲線下面積（ＡＵＣ）、および１２ヶ月時点のＡＵＣの評価および経時的変化；

・３時間のＭＭＴＴにわたるピーク時Ｃ－ペプチドレベル、１２ヶ月におけるピーク時Ｃ－ペプチドレベルおよび経時的変化の評価；

・１２ヶ月時における基本Ｃ－ペプチドレベルおよび経時的変化の評価；

・１日インスリン要求量の評価；

・ＨｂＡ１Ｃレベルの経時的変化の評価；ならびに

・自己抗体レベルの経時的変化の評価。

【０２４８】

研究の副次評価項目（探索的評価項目）

探索的評価項目には、ベースライン時、１、３、６、９、および１２ヶ月の通常の免疫細胞マーカーの測定、ならびにベースライン、１、３、６、９、および１２ヶ月のメモリーＴ細胞マーカーのフローサイトメトリーが含まれる。試験のための血液試料は、コロラド大学医学部のバーバラデイビス糖尿病センターにあるＮＩＨ／ＮＩＤＤＫ指定の北米自己抗体／ＨＬＡコア研究所に発送される。

【０２４９】

対象選択および離脱

この試験は、以下の適格基準を満たす合計１０名の対象を登録する：

【０２５０】

選択基準

１）成人患者（≧１８歳）。

２）糖尿病の明確化と診断のための２０１５年米国糖尿病協会の基準に基づく１型糖尿病の診断を有することが必要である。

３）膵島β細胞（ＩＣＡ、ＩＡＡ、ＩＡ２、ＧＡＤ　６５、ＺｎＴ８）に対する自己抗体が少なくとも１つ存在することを確認する血液検査が必要である。

４）空腹時Ｃ－ペプチドレベル＞０．３ｎｇ／ｍＬ。

５）アフェレーシスのための十分な静脈アクセス。

６）インフォームドコンセントを提供する能力。

７）全ての研究要件を遵守し、全ての研究来院を完了する意思があることに同意する必要がある。

【０２５１】

除外基準

次の基準のいずれかを満たす潜在的な対象は参加から除外される：

１）ＡＳＴまたはＡＬＴ２＞×正常値の上限。

２）クレアチン＞２．０ｍｇ／ｄｌ。

３）心臓専門医による心臓クリアランスが得られない限り、既知の冠状動脈疾患または冠状動脈疾患を示唆するＥＫＧ。

４）既知の活発な感染症。

５）妊娠中または授乳中の母親。

６）プレドニゾン、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス、および化学療法を含むがこれらに限定されない免疫抑制薬の登録から１ヶ月以内の使用。

１）他の任意の自己免疫疾患（ループス、関節リウマチ、強皮症など）の存在。

２）アセチルサリチル酸（ＡＳＡ）以外の抗凝固。

３）ヘモグロビン＜１０ｇ／ｄＬまたは血小板＜１００ｋ／ｍＬ。

４）インフォームドコンセントを提供することが不可能であるか、またはその意思がない。

５）治験責任医師の意見による、参加を妨げる他のいずれかの身体的または心理的な医学的状態の存在。

【０２５２】

対象動員とスクリーニング

臨床治験に参加するという対象の同意が得られた場合、上記の選択基準または除外基準を満たすために必要な診断試験が実施される。スクリーニング要件のリストには、定期的な血球数分析、膵島ベータ細胞に対する少なくとも１つの自己抗体の存在を確認するための血液検査、および臨床的に重要な肝臓、腎臓、または心臓病、妊娠；免疫抑制薬；ウイルス疾患；またはヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）に関連する疾患を除外する他の検査が含まれる。

【０２５３】

対象の早期離脱

患者への危険性は最小限であり、標準的なアフェレーシス処置に似ていると予想される。患者に戻された細胞は、ＣＢ－ＳＣによって治療（または教育）される自家細胞である。この試験では、患者はこのプロトコールから離脱することがある：

・患者がＳＣＥ処理細胞に対してある種のアレルギー反応または過敏反応を起こした場合は、生成品の注入が不可能となる。

・技術的な困難がアフェレーシスの完了を不可能にする場合。

・患者が必要な治療後追跡検査の完了を望まない場合。

この治験への参加は全ての対象にとって任意である。対象が参加しないことを決定した場合、対象は、医療施設での自身の将来のケアに影響を与えることなく、いつでも自由に彼らの同意を取り下げて参加を中止することができる。患者が上述の理由または他の予期しない何らかの理由で離脱した場合、患者は治療に関連した問題のために医療を受け続けることが認められる。

【０２５４】

離脱した対象のためのデータ収集と追跡調査

対象が試験から時期尚早に離脱し得るとしても、その後１２週間の毒性データを収集することが不可欠である。追跡調査のために対象が真に失われたことを確認するために、可能な限り全ての方法（例えば、対象への何回かの架電、可能であればＨＩＰＰＡフォームに記載されている近親者への架電、配達証明郵便など）を使用する。患者が１２ヶ月の追跡調査の前に研究から離脱した場合、代替患者の登録が行われる。

【０２５５】

試験装置

連続閉ループシステムの一部としてのリンパ球とＣＢ－ＳＣとの共培養のためのチャンバー（１６０×１６０×２００ｃｍ）［Zhao Y. et al., "Reversal of type 1 diabetes via islet β-cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells", BMC Med., Vol. 10(3), 1-11, (2012)］およびＴ２Ｄ［Zhao Y. et al., "Targeting insulin resistance in type 2 diabetes via immune modulation of cord blood-derived multipotent stem cells (CB-SCs) in stem cell educator therapy: phase I/II clinical trial", BMC Med., Vol. 11: 160, (2013)］が記載され、このパイロット試験では、不連続システム、すなわち対象から採取した全血試料を処理施設に送り、処理施設は教育されたＭＮＣ生成品を調製し、教育されたＭＮＣ生成品が放出基準を満たすと、対象への注入のために臨床施設に、教育されたＭＮＣ生成品を出荷して戻す。

【０２５６】

各バイオリアクター装置は、クラス１００Ｋクリーンルームで設計、製造、組み立て、および包装される。ガンマ線照射（Ｃｅｓｉｕｍ－１３７）で滅菌した後、各装置はＦＤＡが承認した細胞の単離と培養のための施設であるクラス１００Ｋのクリーンルームの暗室に室温で保管される。装置を製造するために使用される物質は、米国薬局方（すなわち、グレードクラスＶＩプラスチック）に従ってインビボ使用についてＦＤＡに承認されて

いる。殺菌装置は使い捨てである。ＣＢ－ＳＣは、１人の対象への適用に対して１つの臍帯血ユニットから生成される。ＣＢ－ＳＣはその独自の付着能によって、装置内部に残る［Zhao Y. et al., "Reversal of type 1 diabetes via islet β-cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells", BMC Med., Vol. 10(3), 1-11, (2012)］。

【０２５７】

治療計画

全ての基準を満たす対象は、以下の不連続な方法で治療の予定が組まれる。各対象について全血試料を採取し、単核細胞をアフェレーシスで採取し；１０～１２Ｌ（約1×10^{10}単核細胞）の血液が－１日目に処理されるであろう。単核細胞調製物は、ｃＧＭＰ処理施設に出荷されるであろう。処理施設において、単核細胞調製物は、接着性ＵＣ－ＳＣ細胞を含むバイオリアクター装置に１７時間かけて導入されるであろう。教育された単核細胞生成物は、滅菌性、生存率および純度について試験され、放出基準が満たされると、処理施設は教育された単核細胞生成物を臨床施設に送る。０日目に、生成物を静脈内に注入して患者に戻す。全ての治療対象は、＋１日目に電話による追跡評価を受け、急性有害事象をモニターする。治療を受けた全ての対象は、＋７日±１日に安全性来院に出席する。図１１に示されるように、追跡調査来院は治療後１、３、６、９、および１２ヶ月目（±５日）に実施される。対象は、１日インスリン用量、糖レベル、および身体活動を記録するように指示される。治療後、患者の１日インスリン用量は、自分の医師によってモニターおよび調整される。

【０２５８】

対象を治療群に割り当てる方法

膵島β細胞機能の指標として、空腹時Ｃ－ペプチドレベル（インスリン生合成の副産物、通常の参照範囲０．８～３．１ｎｇ／ｍＬ）に基づいて、全ての参加者が、いくらかの残存β細胞機能を有する中等度Ｔ１Ｄを有する１群として特徴付けられ割り当てられる（空腹時Ｃ－ペプチドレベル≧０．３ｎｇ／ｍＬ、ｎ＝１０）。各参加者は１回の治療を受ける。

【０２５９】

学習装置の調製と使用

ＭＮＣ調製物を処理するための接着性ＵＣ－ＳＣ細胞を含むバイオリアクター装置の使用は、ｃＧＭＰ処理施設における単核細胞およびＣＢ－ＳＣの終夜の共培養を通して１７時間まで延長されるであろう。ＳＣＥ装置の調製および使用のためのプロトコールは、図１２ａ～ｃの図として以下のステップとして示され、以下に記載する通りである。

【０２６０】

ステップ１：　ヒト臍帯血ユニットの回収

健康なドナー由来のヒト臍帯血ユニットがＦＤＡに登録されたＣＯＲＤ、ＵＳＥ　Ｃｏｒｄ　Ｂｌｏｏｄ　Ｂａｎｋ　Ｉｎｃ．によって提供されるであろう。全ての臍帯血試料は、規制当局の要求に応じて伝染病についてスクリーニングされる。

【０２６１】

ステップ２：　装置中のＣＢ－ＳＣの調製

装置にＣＢ－ＳＣを導入する前に、臍帯血単核細胞を以下のプロトコールに従って新鮮な臍帯血ユニット（少なくとも１００ｍＬ／ユニット）から単離する：

１）５０ｍＬのチューブを取り、ホルダーに入れる：通常は４本のチューブを使用する；

２）単核細胞を単離するために各チューブにＨＩＳＴＯＰＡＱＵＥ（登録商標）－１０７７を２０ｍＬ／チューブで添加する；

３）無血清培地中、単球細胞を装置（Ｔｉａｎｈｅ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｓ　Ｉｎｃ．）に1×10^{6}細胞／ｍＬ、２５～３０ｍＬ／皿で播種する；

４）細胞を３７℃、８％CO_2の条件で１０～２０日間インキュベートする；

５）細胞観察：　ＣＢ－ＳＣは丸く、皿の底に付着する。細胞密度が少なくとも８０％コンフルエントに達すると、ＣＢ－ＳＣは臨床応用のために調製することができる。

【０２６２】
ステップ３： エンドトキシンとグラム染色についてＣＢ－ＳＣ培養液を試験する
エンドトキシンについての試験
ＣＢ－ＳＣの培養物からの上清を１．８ｍＬの滅菌チューブに回収するであろう。エンドトキシンは、Ｅｎｄｏｓａｆｅ－ＰＴＳ Ｐｏｒｔａｂｌｅ Ｔｅｓｔ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ、Ｃｈａｒｌｅｓｔｏｎ、ＳＣ）およびＥｎｄｏｓａｆｅ－Ｌｉｃｅｎｓｅｄ ＰＴＳ Ｅｎｄｏｔｏｘｉｎ Ｃａｒｔｒｉｄｇｅ（０．０５ ＥＵ／ｍＬ感度、Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いることによって試験されるであろう。標準的なエンドトキシンレベルは＜０．５ＥＵ／ｍＬであろう。この規格を満たすＳＣＥ装置のみが臨床治験に使用できる。

【０２６３】
グラム染色
ＣＢ－ＳＣの培養物からの上清を１．８ｍＬの滅菌チューブに回収するであろう。グラム染色は、Ｇｒａｍ Ｓｔａｉｎキット（ＢＤ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｓｐａｒｋｓ、ＭＤ）を用いて実施されるであろう。ネガティブに染色された機器のみが臨床治験に使用できる。試験試料は、ＣＢ－ＳＣの培養物からの上清の薄くて均一なスメア標本を生じるような方法で清潔なスライドガラスに塗布される。スメアを風乾させる。スメアは、次のいずれかの方法を用いてスライドに固定される。
スライドを弱火に２～３回通すことで熱固定する。スライドを染色前に室温に冷却する。または、スライドを１～２分間無水メタノールで浸潤させてスライドを固定し、染色する前に水道水ですすぐ。

【０２６４】
試験手順
グラム染色の試験手順は以下の通りである：
・固定されたスメアを一次染色剤（グラムクリスタルバイオレット）で浸潤させ、そして１分間染色する。
・一次染色剤は冷たい水道水で穏やかに洗浄することによって除去される。
・スライドを媒染剤（グラムヨウ素または安定化グラムヨウ素）で浸潤させ、スライド上に１分間保持する。
・媒染剤は水道水で穏やかに洗浄することによって除去される。
・スライドから流れ出る溶媒が無色になるまで（３～６０秒）媒染剤を脱色する（Ｇｒａｍ Ｄｅｃｏｌｏｒｉｚｅｒ）。
・スライドを冷たい水道水で穏やかに洗浄する。
・スライドを対比染色（グラムサフラニンまたはグラム基本フクシンのいずれか）で浸潤させそして３０～６０秒間染色する。
・スライドを冷たい水道水で洗浄する。
・スライドを吸い取り紙もしくはペーパータオルで吸い取るか、または風乾させる。
・スメアを油浸レンズの下で検査する。

【０２６５】
ステップ４： バイオリアクター装置の調製
装置は、以下のステップを実行することによって処理施設で調製される：
１）装置を調製するためにＧＭＰ施設でフードを滅菌する；
２）装置の側面を７０％エタノールガーゼで拭き取り、全てのキャップを慎重に取り外す；
３）デバイス内の全ての上清を廃棄する；
４）各層に生理食塩水を２０ｍＬ／層で添加し、各層を洗浄し、浮遊細胞と破片を全て除去する；
５）生理食塩水（２０ｍＬ／層）でさらに洗浄する；
６）上部と下部からキャップを外し、Ｐｌａｓｔｉｓｏｌ Ｈｏｒｓｅｓｈｏｅ Ｙ Ｃｏｎｎｅｃｔｏｒｓと交換し、Ｍｅｄｉｃａｌ Ｄｅｖｉｃｅ Ｓｕｐｅｒ Ｇｌｕｅ（これらの接着剤は、医療機器で使用するためのＵＳＰクラス６の基準を満たしている）で密封

する；
７）各層に生理食塩水を１５～２０ｍＬ／層で添加し、キャップで閉める；
８）装置を裏返して漏れがないか確認する；
９）滅菌済み容器に入れる；
【０２６６】
ステップ５： ＣＢ－ＳＣの接着性単層を含む装置への通過による単核細胞生成物の共培養
１）－１日に、患者は、１０～１２Ｌ（約10^{10}単核細胞）の血液を処理することを最適目標として臨床施設でアフェレーシスによる定常状態の単核収集を受ける。忍容性および静脈アクセスに基づいて目標に達する前に、アフェレーシスを中止することができる。次の段階に進むには、最低６Ｌの処理が必要であろう。血漿は、アフェレーシスの終わりに収集バッグに添加され、２５０ｍＬの生成物容量を目標とする。生成品のラベル付けは、血液および骨髄移植プログラムのラベル付け方針に従って、生成品をドナーから切り離す前に実施される。
２）生成品は、血液および骨髄移植プログラムのＳＯＰに従って、ＧＭＰ施設で梱包、保管、および集荷されるであろう。
３）ＧＭＰ施設に到着すると、ＧＭＰ施設はＭＮＣ生成品を装置に曝露するであろう。
４）０日目に、教育された単核細胞（ＭＮＣ）生成品を、血液および骨髄移植プログラム細胞注入ＳＯＰに従って患者に注入するであろう。
【０２６７】
試験治療用品の受領時に、目録を作成し、装置受領ログに記入し、積荷を受け取る人によって署名されなければならない。指定された研究スタッフが積荷に積荷目録に記載されている全ての品目が含まれていることを数えて検証することが重要である。所与の積荷に含まれる損傷した、または使用できないいずれかの試験機器は、試験ファイルに記録されるであろう。治験責任医師は、治験責任医師の施設に提供された、損傷した、または使用できない任意の試験治療について試験依頼者に通知しなければならない。
装置は、細胞培養に適したＧＭＰ施設の暗室に室温で保存される。光から保護する必要はない。保管上の考慮事項には、装置の落下を避けること、または装置の上に重い重量をかけるのを避けることが含まれる。
全ての空の装置（幹細胞を含まない）は同じ品質のものである。任意の単一の装置が任意の単一の対象に割り当てられて分配される。
【０２６８】
唯一の基準は、装置内で培養されたＣＢ－ＳＣの品質であろう。細胞密度が≧８０％のコンフルエント、エンドトキシンレベル＜０．５ＥＵ／ｍＬに達する場合、ＣＢ－ＳＣを有する装置を対象に割り当て、臨床応用のために調製することができる。定期的な学習装置の照合は、装置の割り当て、使用された装置、残った装置、および不注意で損傷した装置を文書化するために実行される。この照合は、装置のアカウンタビリティフォームに記録され、試験チームによって署名され日付が記入されるであろう。
施設のバイオハザード廃棄物処理ＳＯＰに従って、治療の終了時に装置が廃棄される。試験の完了時に、出荷されたデバイス、消費されたデバイス、および残りのデバイスの最終照合が実施されるであろう。この照合は、デバイス照合フォームに記録され、署名されて日付が記入されるであろう。使用されていない試験装置の返却または破壊の前に、指摘されたいかなる矛盾も調査、解決、文書化されるであろう。現場で破壊されたいかなる装置も試験ファイルに記録されるであろう。
【０２６９】
ステップ６： エンドトキシン、グラム染色、マイコプラズマ、および幹細胞マーカーについて処理済みＭＮＣ生成品（以下、最終生成品）の試験
エンドトキシンについて試験
ＣＢ－ＳＣ処理されたＭＮＣからの試料を１．８ｍＬ滅菌チューブに回収するであろう。エンドトキシンは、Ｅｎｄｏｓａｆｅ－ＰＴＳ Ｐｏｒｔａｂｌｅ Ｔｅｓｔ Ｓｙｓｔ

ｅｍ（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ、Ｃｈａｒｌｅｓｔｏｎ、ＳＣ）およびＥｎｄｏｓａｆｅ－Ｌｉｃｅｎｓｅｄ ＰＴＳ Ｅｎｄｏｔｏｘｉｎ Ｃａｒｔｒｉｄｇｅ（０．０５ＥＵ／ｍＬ感度、Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いることによって試験されるであろう。通常のＰＴＳ ＬＡＬアッセイは、ＰＴＳ機器の簡単な指示に従うことによって実施される。以下は典型的なアッセイ手順を表す：

【０２７０】

機器の操作

・ＰＴＳキーパッドのＭＥＮＵキーを押して装置をオンにする（メニュー５で装置をオフにする）。

・ＰＴＳリーダーは、３７℃まで加熱されると「ＳＹＳＴＥＭ ＳＥＬＦ ＴＥＳＴ」を開始し、これには約５分かかる。

・ＰＴＳリーダーに「ＳＥＬＦ ＴＥＳＴ ＯＫ」と表示された後、「ＩＮＳＥＲＴ ＣＡＲＴＲＩＤＧＥ」と表示される。

【０２７１】

試料の挿入

・カートリッジを挿入する。

・カートリッジを使用前に袋中で室温に戻す。

・袋からカートリッジを取り出し、試料リザーバーを上に向けてＰＴＳリーダーの前面のスロットに挿入する。

・カートリッジをしっかりとスロットに押し込む。

【０２７２】

必要な情報を入力する

・カートリッジがＰＴＳリーダーにしっかりと挿入されると、ＰＴＳリーダーはユーザーに以下の情報を入力するように促す。

・ＯＩＤ（オペレーターＩＤ）を入力する。

・ロット番号（カートリッジロット番号）を入力する。

・キャリブレーションコードを入力する（特定のロット番号のキャリブレーションコードがすでに入力されている場合、ＰＴＳリーダーはコードの再入力を促さない。（保存されているロット番号とそれに対応するキャリブレーションコードを全て消去するには、メニュー２を選択し、続いて初期メニューから４を選択する）。

【０２７３】

ロット番号（入力されたカートリッジロット番号を確認する）

・試料ロット番号を入力する

・試料ＩＤを入力する（試料ＩＤヘッダーの下のメニューキーで選択してスクロールすると、５０個のサンプルを入力して保存できる）。

・希釈係数を入力する。

・上述の情報がＰＴＳリーダーに入力されている間、カートリッジは予熱されている。

【０２７４】

試料を分注する

・全ての試験情報が入力されると、ＰＴＳリーダーは以下を表示する：

・ＡＤＤ ＳＡＭＰＬＥ；ＰＲＥＳＳ ＥＮＴＥＲ。

・挿入したカートリッジの４つ全ての試料リザーバーに２５μＬの試料をピペットで移し、ＰＴＳリーダーキーパッドのＥｎｔｅｒキーを押す。

・ポンプが試料アリコートを試験チャネルに引き込み、それによって試験を開始する。

・結果は約１５分で得られる。テストが完了すると、ＰＴＳリーダーはアッセイが終了したことを音声で通知する。試験終了時には、エンドトキシン測定値とアッセイ許容基準が画面に表示される。

標準的なエンドトキシンレベルは＜０．５ＥＵ／ｍＬであろう。この規格を満たす最終生成物のみが臨床注入に使用できる。

【０２７５】

グラム染色
ＣＢ－ＳＣの培養物からの上清を１．８ｍＬの滅菌チューブに回収するであろう。グラム染色は、Ｇｒａｍ Ｓｔａｉｎキット（ＢＤ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｓｐａｒｋｓ、ＭＤ）を用いて実施されるであろう。ネガティブに染色された機器のみが臨床治験に使用できる。これは、ＣＢ－ＳＣの培養物からの上清の薄くて均一なスメア標本を生じるような方法で清潔なスライドガラスに試験試料を塗布することによって実施される。スメアを風乾させる。スメアは、次のいずれかの方法を用いてスライドに固定される。
スライドを弱火に２～３回通すことで熱固定する。スライドを染色前に室温に冷却する。または、スライドを１～２分間無水メタノールで浸潤させてスライドを固定し、染色する前に水道水ですすぐ。

【０２７６】
試験手順
グラム染色の試験手順は以下の通りである：
・固定されたスメアを一次染色剤（グラムクリスタルバイオレット）で浸潤させ、そして１分間染色する。
・冷たい水道水で穏やかに洗浄することによって一次染色剤を除去する。
・スライドを媒染剤（グラムヨウ素または安定化グラムヨウ素）で浸潤させ、スライド上に１分間保持する。
・水道水で穏やかに洗浄することによって媒染剤を除去する。
・スライドから流れ出る溶媒が無色になるまで（３～６０秒）脱色する（Ｇｒａｍ Ｄｅｃｏｌｏｒｉｚｅｒ）。
・スライドを冷たい水道水で穏やかに洗浄する。
・スライドを対比染色（グラムサフラニンまたはグラム基本フクシンのいずれか）で浸潤させそして３０～６０秒間染色する。
・スライドを冷たい水道水で洗浄する。
・吸い取り紙もしくはペーパータオルで吸い取るか、または風乾させる。
・油浸レンズの下でスメアを検査する。

【０２７７】
マイコプラズマ、細胞生存率、および滅菌性の試験
ＣＢ－ＳＣ処理されたＭＮＣからの試料中のマイコプラズマの滅菌性および混入汚染は、以下の方法によって評価することができる。
通常の細胞培養では、細胞生存率を位相差顕微鏡下でモニターして、マイコプラズマおよび他の細菌の混入汚染を排除することができる。
代替的に、細胞生存率は、挿入ＤＮＡ色素７－アミノアクチノマイシンＤ（７ＡＡＤ）を取り込む死滅しつつある細胞を除外することによって決定され［Brocklebank A. M. et al., "Enumeration of CD34+ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy", Cytometry. Vol. 46: 254-261, (2001)］；［Barnett D, et al., "Absolute $CD4^+$ T-lymphocyte and $CD34^+$ stem cell counts by single-platform flow cytometry: the way forward", Br. J Haematol. Vol. 106: 1059-1062, (1999)］；［Sutherland, et al., "The ISHAGE guidelines for $CD34^+$ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering", J Hematotherapy. Vol. 5: 213-226, (1996)］、ならびに米国特許第４，５２０，１１０号；米国特許第４，８５９，５８２号；米国特許第５，０５５，５５６号；欧州特許第７６．６９５号；カナダ特許第１，１７９，９４２号（ＰＥ，ＡＰＣ）；米国特許第４，８７６，１９０号（ＰｅｒＣＰ）；米国特許第５，２８６，４８６号；米国特許第５，４８６，６１６号；米国特許第５，５６９，５８７号；米国特許第５，５６９，７６６号；米国特許第５，６２７，０２７号（Ｃｙ）；米国特許第４，７１４，６８０号；米国特許第４，９６５，２０４号、米国特許第５，０３５，９９４号（ＣＤ３４）；米国特許第５，７７６，７０９号（Ｌ

ｙｓｅ／無洗浄法）；米国特許第５，７２３，２１８号および米国特許第５，１８７，２８８号（ＴｒｕＣＯＵＮＴ　Ｔｕｂｅｓ）の、これらの各々の内容は、参照によりその全てが本明細書に組み込まれる。

【０２７８】

リアルタイムＰＣＲ：　教育されたＭＮＣ生成品からの試料は、１．８ｍＬの滅菌チューブに回収され、米国ＦＤＡの医薬品安全性試験実施基準の要件（２１　ＣＦＲ　５８）．３）に従って、ＢｉｏＲｅｌｉａｎｃｅ（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）によって試験されるであろう。

滅菌試験は、ＢｉｏＲｅｌｉａｎｃｅ　Ｃｏｍｐａｎｙの直接接種法を用いて実施されるであろう。

【０２７９】

フローサイトメトリーによる幹細胞マーカーＣＤ４５およびＯＣＴ３／４についての試験

教育されたＭＮＣ生成品のＣＢ－ＳＣによる混入汚染を排除するために、ＣＢ－ＳＣマーカーＣＤ４５およびＯＣＴ３／４についての二重染色によるフローサイトメトリーが実施されるであろう。

【０２８０】

対象コンプライアンスモニタリング

対象はバイオリアクター装置を用いて１回の治療を受けるであろう。追跡調査来院は、前述のように臨床評価および臨床検査のために、治療後１、３、６、９および１２ヶ月（±５日）に予定される。細胞注入の翌日に電話による追跡調査を行う。

【０２８１】

事前および併用療法

全てのＴ１Ｄ対象は、試験前または試験中に毎日インスリン注射を受けなければならない。１日インスリン用量は、ＰＩ試験ではなく、対象自身の医師により、不連続治療後に調整される。この試験中、他の新しい糖尿病薬または治療法は許可されないであろう。

【０２８２】

包装

バイオリアクター装置は箱（４装置／箱）に梱包され、医薬品製造管理および品質管理基準（ＧＭＰ）ラベリングシステムとともにｃＧＭＰ施設に出荷される。

装置による治療の後、教育されたＭＮＣ生成品は滅菌済みのクーラーで臨床現場に出荷される。１つの臍帯血ユニットからのＣＢ－ＳＣを含む１つの装置が各対象に使用されるであろう。

【０２８３】

盲検化

この単群試験では、全ての対象から取得および濃縮されたＭＮＣ生成品は、この装置による非盲検治療を受ける。

【０２８４】

試験手順－来院１

登録のためのスクリーニング：

第１に、同意された全ての対象は、不連続治療の選択基準および除外基準に従って登録についてスクリーニングされるであろう。米国糖尿病協会の２０１５年診断基準を満たし、血液検査により膵島ベータ細胞自身に対する少なくとも１つの自己抗体の存在が確認されれば、患者は登録の資格を有するであろう。

異なる免疫細胞マーカーを用いた全血球計算（ＣＢＣ）。

ＥＫＧ．

血液および骨髄移植プログラムＳＯＰに従う静脈評価。十分な静脈アクセスがない患者は、アフェレーシス流速を維持することができる中心静脈カテーテル留置に委ねられるであろう。カテーテル留置は、アフェレーシス処置の５日前以後に行われ、教育されたＭＮＣ生成品の注入後に取り除かれるであろう。

膵島細胞質（ＩＣＡ）、インスリン自己抗体（ＩＡＡ）、インスリノーマ関連抗原－２

（ＩＡ２）、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（ＧＡＤ）、および膵臓ベータ細胞特異的亜鉛トランスポーターＺｎＴ８に対する自己抗体の存在を具体的に試験することが実施されるであろう（表４参照）。

感染性疾患（ＨＩＶ、ＨＴＬＶ、Ｈｅｐ　Ｂ、ｃＡＢ、Ｈｅｐ　Ｃ　ａｂが実施されるであろう。

施設のＳＯＰに従う静脈評価が実施されるであろう。

【０２８５】

混合食耐性試験（ＭＭＴＴ）：　ＭＭＴＴ試験は、対象が空腹下にある間の朝に行われるべきである。対象は、深夜０時以降は水以外は口から何も摂取しないであろう（ＮＰＯ）。単糖のみを含む液体は、試験前の夜間と朝の間に低血糖症を治療または予防するために使用することができる。試験開始時の目標血中グルコースレベルは、Ｔ１　ＤＭの対象で７０～２００ｍｇ／ｄＬであるべきである。

【０２８６】

インスリン適用：　Ｔ１ＤＭを有する対象は、試験前の夕方にその対象の通常用量のインスリンを服用しなければならない。Ｌａｎｔｕｓ（登録商標）またはＬｅｖｅｍｉｒ（登録商標）を投与されている対象は、その対象の通常のルーチンに従って、試験の前夜および／またはその朝にその対象の通常の注射を受けるべきである。継続的皮下インスリン注入（ＣＳＩＩ）を受けている対象は、試験前の夜間にその対象の通常の基礎設定を続けるべきである。速効型インスリン類似体の通常用量は、試験前の深夜０時までの夕方に使用されるであろう。試験開始時に血中グルコースレベル＜１５０ｍｇ／ｄＬを達成する必要がある場合は、少量の補正用量の速効型インスリン類似体を試験の４時間前までに使用することもできる。中性プロタミンＨａｇｅｄｏｒｎ（ＮＰＨ）ヒトインスリン（ｒＤＮＡ由来）および速効型インスリン類似体の通常用量は試験の朝には与えられていない。

【０２８７】

採血：－１０、０、１５、３０、６０、９０、１２０、１５０および１８０分に血漿グルコース、ｃ－ペプチド、およびグルカゴンを測定するために血液を採取する。品質管理のための分割複製試料も収集される。ＩＶラインは採血のために片腕に挿入される。

ブースト用量：　使用される混合食は、Ｂｏｏｓｔ　Ｈｉｇｈ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎａｌ　Ｅｎｅｒｇｙ　Ｄｒｉｎｋ（登録商標）（Ｍｅａｄ－Ｊｏｈｎｓｏｎ）であろう。

ＭＭＴＴの実施は１８０分かかる。０分時点で与えられるＢｏｏｓｔ　Ｈｉｇｈ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎａｌ　Ｅｎｅｒｇｙ　Ｄｒｉｎｋ（登録商標）（Ｍｅａｄ－Ｊｏｈｎｓｏｎ）混合食の用量は、６ｋｃａｌ／ｋｇ（@１ｋｃａｌ／ｍＬ＝６ｍＬ／ｋｇ）である。用量は５分以内に摂取されるべきである。

【０２８８】

試験手順－来院２

１０人の参加者が、接着性ＵＣ－ＳＣ細胞を含むバイオリアクターによる単一の治療を受ける。

【０２８９】

試験手順－来院３

追跡調査来院１は、表４に従った臨床評価（例えば、空腹時血中グルコース、Ｃ－ペプチド、およびＨｂＡ１Ｃ）および臨床検査のために治療後１ヶ月（±５日）に予定されている。

【０２９０】

試験手順－来院４

追跡調査来院２は、表４に従った臨床評価（例えば、空腹時血中グルコース、Ｃ－ペプチド、およびＨｂＡ１Ｃ）および臨床検査のために治療後３ヶ月（±５日）に予定されている。

【０２９１】

試験手順－来院５

追跡調査来院３は、表４に従った臨床評価（例えば、空腹時血中グルコース、Ｃ－ペプチド、およびＨｂＡ１Ｃ）および臨床検査のために治療後６ヶ月（±５日）に予定されている。

【０２９２】

試験手順－来院６

追跡調査来院４は、表４に従った臨床評価（例えば、空腹時血中グルコース、Ｃ－ペプチド、およびＨｂＡ１Ｃ；７５ｇ－ＯＧＴＴおよびＭＭＴＴ後のＣ－ペプチドレベル）および臨床検査のために治療後９ヶ月（±５日）に予定されている。

【０２９３】

試験手順－来院７

追跡調査来院５は、表４に従った臨床評価および臨床検査のために、治療後１２ヶ月（±５日）に予定されている。

【０２９４】

統計学的計画

統計学的方法

治療企図アプローチが用いられ、１０人の患者が不連続計画を用いた治療を受けている。全ての患者が安全性解析に含まれるであろう。

主要な有効性の評価項目は、ベースラインと追跡調査の間のＣ－ペプチド分泌の変化であろう。データの統計分析は、Ｐｏｗｅｒ　ａｎｄ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎソフトウェア（ｗｗｗ．ｐｏｗｅｒ－ａｎａｌｙｓｉｓ．ｃｏｍ）を使用してｔ検定によって実施されるであろう。対応のあるｔ検定を用いて、ベースラインと追跡調査の間の有意性を検討するであろう。空腹時血中グルコースレベルおよび血漿Ｃ－ペプチド、ならびに経口グルコース負荷試験（ＯＧＴＴ）またはＭＭＴＴ後のそれらの値をパラメーターとして使用して、２．５％の有意水準、８０％の力率、片側で効果サイズ０．８ｎｇ／ｍＬでＳＣＥ治療後の差異を検出を本発明者らは求める。本発明者らの計算によると、この差異を見出すためには１０人の対象が必要であろう。

【０２９５】

分析対象の集団

全てのプロトコールに準拠した対象集団が安全性解析に含まれるであろう。主要な有効性の評価項目は、ベースラインと追跡調査の間のＣ－ペプチド分泌の変化であろう。

【０２９６】

安全性と有害事象－定義

以下の全ての基準を満たす任意のインシデント、経験、または結果。

・性質、重篤度、または頻度において予期せぬもの（すなわち、ＩＲＢ承認プロトコールまたは同意書、治験責任医師のパンフレットなどの研究関連文書には記載されていないもの）。

・研究への参加に関連しているか、またはおそらく関連している（すなわち、おそらく関連しているとは、インシデントの経験または結果が研究に関連した手順によって引き起こされた可能性があるという合理的な可能性があることを意味する）。

・深刻（以下に定義）「深刻（ｓｅｒｉｏｕｓ）」は、等級をＡＥに適用するＣＴＣ基準で報告されている「深刻（ｓｅｖｅｒｅ）」とは異なる。

【０２９７】

有害事象

有害事象（ＡＥ）は、試験の過程で重篤度が進行するか悪化する任意の症状、徴候、疾病または経験である。併発している疾病または傷害は、有害事象とみなすべきである。診断手順の異常な結果は、以下のような異常があれば有害事象とみなされる。

・研究からの離脱の結果

・深刻な有害事象と関連している。

・臨床的徴候または症状に関連している。

・追加の治療またはさらなる診断試験に導く。

・治験責任医師によって臨床的に重大であると考えられている。
【０２９８】
深刻な有害事象
有害事象は、深刻または非深刻に分類される。深刻な有害事象は、以下の有害事象である。
・致命的。
・命にかかわる。
・入院が必要または入院が長期にわたる。
・持続的または重大な障害または無能力をもたらす。
・先天異常または先天異常。
・重要な医療事象。
【０２９９】
重要な医療事象は、即命にかかわるものではないかもしれないが、明らかに大きな臨床的に重大であるものである。それらは対象を危険にさらすかもしれず、そして上記のその他の重大な結果のうちの１つを防ぐために介入を必要とするかもしれない。例えば、薬物の過剰摂取または乱用、入院患者入院に至らなかった発作、または救急科での気管支痙攣の集中治療は、典型的には深刻と考えられる。深刻な基準のいずれにも該当しない全ての有害事象は、非深刻な有害事象とみなすべきである。
【０３００】
有害事象の報告期間
有害事象を報告しなければならない試験期間は、通常、任意の試験手順の開始から試験治療追跡調査の終了までの期間として定義される。この試験では、試験治療追跡調査は試験治療投与後３０日と定義されている。深刻な有害事象は、事象発生時から７～１０日以内に現地のＩＲＢおよびＦＤＡに報告されるべきである。些末な事象は年次報告書で報告することができる。
【０３０１】
既存の状態
既存の状態とは、試験の開始時に存在している状態である。試験期間中に状態の頻度、強度、または特徴が悪化した場合、既存の状態を有害事象として記録する必要がある。
【０３０２】
一般健診所見
スクリーニング時には、任意の臨床的に重要な異常は既存の状態として記録されるべきである。試験終了時に、有害事象の定義を満たす任意の新たな臨床的に重要な所見／異常も記録し、有害事象として文書化しなければならない。
【０３０３】
試験後の有害事象
全ての未解決の有害事象は、その事象が解決されるまで、対象が追跡不能になるまで、または有害事象が別の方法で説明されるまで、治験責任医師によって追跡されるべきである。最後に予定された来院時に、治験責任医師は、各対象に、対象または対象の主治医がこの研究への参加に合理的に関連する可能性があると考える後続の事象を報告するよう指示すべきである。治験責任医師は、対象が本試験に合理的に関連している可能性がある試験参加を中止または終了した後はいつでも（６ヶ月間の追跡調査中に）起こるいかなる死亡または有害事象についても試験依頼者に通知すべきである。この研究に参加した対象のその後に考えられた子孫において、治験責任医師ががんの発生または先天異常の発生に気付いた場合、試験依頼者にも通知されるべきである。
【０３０４】
異常な臨床検査値
臨床検査値の異常は、以下のいずれかの条件のうちの１つが満たされた場合に有害事象として文書化されるべきである：
・検査値の異常は、異常を確認するための繰り返しテストによって以外では否定されない。

・異常は疾患および／または器官の毒性を示唆する。
・異常は、例えば、用量の変更、薬物の中止、より頻繁な追跡調査の評価、さらなる診断調査などの積極的な管理を必要とする程度のものである。
【０３０５】
入院、長期入院または手術
入院または長期入院をもたらすいかなる有害事象も、このプロトコールで特に別途指示されない限り、深刻な有害事象として文書化され報告されるべきである。手術の原因であるいかなる状態も、その状態が有害事象の基準を満たす場合、有害事象として文書化されるべきである。以下の状況では、状態、入院、長期入院、手術のいずれも有害事象として報告されない：
・既存の状態に対する診断的または選択的な外科的処置のための入院または長期入院。手術の目的が選択的または診断的であり、その結果に問題がなければ、手術は有害事象の結果として報告されるべきではない。
・試験のための有効性測定を可能にするために必要な入院または長期入院。
・臨床治験責任医師によって判断された場合、それが悪化または入院の頻度の増加でない限り、研究の標的疾患の治療のための入院または長期入院。
【０３０６】
有害事象の記録
中国人および白人患者を含む２００人の対象における臨床データに基づくバイオリアクター装置を用いた閉ループ治療中、および４年間の治療後の追跡調査研究中に、重大な有害事象は見られなかった。全ての参加者は治療の過程でいかなる重大な有害事象を経験しなかった。ほとんどの患者は静脈穿刺中に軽度の不快感およびアフェレーシス中にいくらかの腕の痛みを経験したが、処置の終了後すぐに不快感および痛みが解消した。４年間閉ループ治療を受けた後、全ての対象において腫瘍形成および他の安全性の懸念はない。
【０３０７】
対象と接触するたびに、治験責任医師は具体的な質問により、また必要に応じて検討により、有害事象に関する情報を求めなければならない。全ての有害事象に関する情報は、直ちにソース文書に記録し、さらに症例報告フォーム（ＣＲＦ）の適切な有害事象モジュールにも記録する必要がある。明確に関連した全ての徴候、症状、および異常な診断手順の結果は、１つの診断にまとめられるべきであるが、ソース文書に記録されるべきである。
試験期間中に発生した全ての有害事象を記録しなければならない。各事象の臨床経過は、解決、安定化まで、または試験治療もしくは参加が原因ではないと判断されるまで追跡されるべきである。試験期間の終了時にまだ進行中の深刻な有害事象は、最終結果を決定するために追跡調査されなければならない。試験期間後に起こり、おそらく試験治療または試験参加に関連していると考えられるいかなる深刻な有害事象も、直ちに記録し報告しなければならない。
【０３０８】
深刻な有害事象および予期せぬ問題の報告
治験責任医師およびプロトコール依頼者は、彼らが責任を負う様々な事業体の有害事象報告のタイムライン、形式および要件を遵守しなければならないが、最低限報告されなければならない事象は以下のものである：
・試験参加に関連するもの、
・予期せぬもの、および
・深刻または対象もしくは他に危険性を含むもの。
【０３０９】
報告が叙述として提供されている場合、最初の報告の時点で提供される必要最低限の情報は以下を含む：
・試験の識別子。
・試験センター。
・対象番号。

・事象の説明。
・発症の日付。
・現在の状態。
・試験治療を中止したかどうか。
・事象が深刻であると分類された理由。
・事象と試験治療との関連性に関する治験責任医師による評価。
【０３１０】
治験責任医師報告：治験依頼者への通知
対象または他に害を及ぼす危険性がある試験関連のあらゆる予期せぬ問題、およびあらゆる種類の深刻な有害事象は、事象の２４時間以内に電話で治験依頼者に報告されなければならない。このような事象を報告するには、重篤有害事象（ＳＡＥ）フォームを治験責任医師が記入し、２４時間以内に治験依頼者にファックス送信する必要がある。治験責任医師は、このＳＡＥフォームのコピーを治験施設のファイルに保管する。
次の４８時間以内に、治験責任医師は深刻な有害事象または予期せぬ問題に関するさらなる情報を文書による叙述の形式で提供する必要がある。これには、記入済みの深刻有害事象のフォームのコピー、およびその事象の理解に役立つ他のいかなる診断情報も含まれている。進行中の深刻な有害事象に関する重要な新しい情報は速やかに試験依頼者に提供されるべきである。
【０３１１】
治験責任医師の報告
報告された死亡については、ＩＲＢへの最初の提出は、ＩＲＢ理事または準理事に連絡することによって行うことができる。最初の提出の追跡調査として、ＡＥ／予期せぬ問題フォームが必要である。
【０３１２】
他の報告可能な事象
臨床薬物治験については、以下の事象もＩＲＢに報告可能である：
・詳細な分析がなくても、薬物曝露がない場合にはまれである、予期せぬ深刻な有害事象（無顆粒球症、肝壊死、Ｓｔｅｖｅｎｓ－Ｊｏｈｎｓｏｎ症候群など）を表す任意の有害な経験。
・治験責任医師のパンフレット、プロトコール、もしくはインフォームドコンセントフォームを治験依頼者に修正させる、またはＩＲＢによる他の行動を促してヒト対象の保護を保証するような任意の有害事象
・重篤度または頻度の観点から、研究の危険性または潜在的な利益への変化を示す情報。例えば、
－　中間分析が、最初に予想されるよりも参加者が治療に対する応答の割合が低いことを示す。
－　安全性モニタリングが、特定の副作用が最初に予想されたよりも深刻であるか、またはより頻繁であることを示す。
－　あなたの研究試験の治療群が治療的価値がないことを示す論文が別の研究から発表される。
・ＦＤＡの安全表示の変更、または研究プロトコールで使用されている薬物、装置、または生物製剤の販売からの撤退。
・機密性の侵害。
・研究参加者への明白な即時の危険性を排除するために、事前のＩＲＢレビューなしに採用されたプロトコールへの変更。
・研究が以前にサブパートＣの下で承認されておらず、治験責任医師が研究に留まることが対象の最善の利益であると信じるときの参加者の収容。
・苦情が予期しない危険性を示しているか、または苦情が研究チームによって解決できないときの参加者の苦情。
・治験責任医師の意見では、１人以上の参加者を危険にさらしている、または対象の権利

または厚生に影響を及ぼすプロトコール違反（ＩＲＢ承認プロトコールからの偶発的または意図的でない逸脱を意味する）。

【０３１３】

臨床施設の研究サイトと提携していない治験責任医師は、彼らの現地のＩＲＢへの安全報告に責任がある。治験責任医師は、彼らの現地のＩＲＢの報告要件を遵守する責任があるが、１０営業日以内に必要な報告をＩＲＢに提出する必要がある。各報告書のコピー、およびＩＲＢの通知と領収書の文書は、治験責任医師の試験ファイルに保存される。

【０３１４】

治験依頼者の報告：　ＦＤＡへの通知

このプロトコールがＦＤＡ　ＩＮＤの下で実施されている場合、ある特定の有害事象または予期せぬ問題をＦＤＡに報告することは治験規制依頼者、すなわちＩＮＤ保有者の責任である。

【０３１５】

治験依頼者は、ある特定の試験事象を迅速にＦＤＡに報告することが義務付けられている。これらの書面による有害事象の通知は、ＩＮＤ安全性報告書と呼ばれる。以下は、報告のタイムライン別の安全報告要件と関連する種類の事象について説明する：

・７暦日以内に

以下のいずれかの試験事象

－　治験薬の使用に関連する

－　予期しない

－　致命的または命にかかわる、ならびに

・１５暦日以内に

以下のいずれかの試験事象は、

－　治験薬の使用に関連する

－　予期せぬもの、および

－　深刻であるが、致命的もしくは命にかかわるものでない　－または－

－　当初報告可能とはみなされなかったが、後に報告の基準に適合することが判明した以前の有害事象（事象が報告可能とみなされてから１５暦日以内に報告）。

実験動物での試験から以下のことを示唆する何らかの知見があった場合：

－　変異原性、催奇形性、または発がん性の報告を含む、ヒト対象に対する重大な危険性。

治験依頼者はまた、同様の有害事象に関する以前の全ての報告をＩＮＤ安全性報告書で特定し、以前の報告に照らして現在の事象の重要性を分析することも求められている。

【０３１６】

報告プロセス

有害事象はＦＤＡ　Ｆｏｒｍ　３５００Ａまたは叙述形式で提出することができる。叙述形式で提供された場合、提供すべき最小の情報は上記の通りである。

【０３１７】

治験依頼者の報告：　参加治験責任医師への通知

参加した全ての治験責任医師に、ＩＮＤ安全性報告書に、深刻かつ予想外の薬物の使用に関連した任意の有害事象、および実験動物での試験からヒト対象への重大な危険性を示唆する知見を通知するのは、試験の責任者である。さらに、治験依頼者はまた、同様の有害事象に関する以前の全ての報告を書面によるＩＮＤ安全性報告書で特定し、以前の報告に照らして現在の事象の重要性を分析することも求められている。

【０３１８】

盲検化解除手順

対象の医学的管理に不可欠である場合、または治験の進行中の実施に影響を与える可能性がある治療に関する重大な安全情報を提供する可能性がある場合（例えば、モニタリング、インフォームドコンセント）、深刻で予期せぬ出来事のために、盲検化を破棄することができる。それが必要であると考えられるそれらのまれな例では、問題となっている患者の治療の割り当てを明らかにするためのステップが整っていなければならない。そのよ

うな事象を報告するために、深刻有害事象（ＳＡＥ）フォームに記入する必要がある。そのためには、治験責任医師は、治療がブレンドされていなかった（ｕｎｂｌｅｎｄｅｄ）全ての対象について治験依頼者に通知しなければならない。盲検化解除は１日２４時間、週７日で実施され、治験依頼者への通知は電話またはファックスで２４時間以内に実施され、その後４８時間以内に事象の、文書による叙述が続く。

【０３１９】

中止規則

この単群試験では、全ての患者が１回の投与で同じ実験的治療を受けることになり、治療の安全性と有効性が評価される。したがって、安全性の主要評価項目および有効性評価項目が達成され、および／または治療の確認が安全かつ効果的である場合は、治験が終了する状況およびその後に講じられる措置を規定した中止規則によって、この治験の実施を中止することができる。

【０３２０】

医療モニタリング

自己の現場で試験の安全性を監督するのは、主任治験責任医師の責任である。この安全性モニタリングには、上記のように慎重な評価と有害事象の適切な報告、ならびに現場データおよび安全モニタリング計画の構築と実施が含まれる（監査、モニタリング、および検査を参照）。医学的モニタリングは、深刻な有害事象の数と種類の定期的な評価を含む。

【０３２１】

内部データおよび安全監視委員会またはＤＳＭＰ

スポンサーシップやサポートに関係なく、各治験がデータおよび安全性モニタリングのための適切な計画を含んでいることを確認するために新たな治験を検討することに関して、新しいプロトコールの最初の検討は、治験審査委員会（ＩＲＢ）の役割である。データおよび安全監視委員会（ＤＳＭＢ）は、連邦、機関、または業界のサポートに関係なく、臨床施設の治験責任医師によって作成された全ての治験責任医師主導型試験（ＩＩＴ）のモニタリングを担当する。これには、単一施設ＩＩＴ、ならびに主任治験責任医師によるデータ管理および施設調整を伴う臨床施設研究者により協調される多施設ＩＩＴが含まれ、施設で実施される臨床治験の全てのフェーズが含まれる。臨床施設のＤＳＭＢのメンバーは、臨床医、生統計学者、生命倫理学者、そして研究科学者である。適切な場合には、治験のために外部／独立のＤＳＭＢ（例えば、高リスク、多施設）の使用が推奨されるであろう。

【０３２２】

治験が内部ＤＳＭＢによるモニタリングに適していると判断された後は、ＤＳＭＢが試験の継続的なレビューとモニタリングを行う責任を負う。本発明者らのＤＳＭＢによるレビューと監視は、そのような治験のためにＩＲＢ承認プロトコールに記載されている。ＤＳＭＢは、以下の情報を盲検なしに分析することにより、研究の進捗状況と安全性とを監視する：

１）　見越および見越保持率

２）　有害事象（ＡＥ）および深刻有害事象（ＳＡＥ）の頻度と重篤度。

３）　必要に応じて応答率。

４）　治験に関連する新しい情報、すなわち、公表されている科学的報告書、または対象の安全性または倫理的懸念に影響を与える可能性がある他の進展。

５）　試験の継続に影響を与える可能性のある、試験の予想されるリスク／ベネフィット比に対する任意の変更。

６）　プロトコールの逸脱と違反。

７）　研究者または研究スタッフのいずれかによる深刻な誤りまたは潜在的な不正行為、すなわち機密性の侵害、研究の不正行為に関する事項。

８）　対象の不満。

９）　利益相反。

ＤＳＭＢによる治験のレビューのタイムラインは、ＩＲＢの承認を得て試験の最初に決

定される。プロトコールに要求されるＤＳＭＢレビューの頻度（すなわち、６ヶ月、年１回）は、ＰＲＭＳ管理者によって記録され、予定されたＤＳＭＢ会議の前に適切なＤＳＭＢ提出書類が研究チームから要求されるように追跡される。主任治験責任医師（ＰＩ）と臨床研究コーディネーター（ＣＲＣ）はＤＳＭＢに必要な書類を提出するためのフォームを提供される。

【０３２３】

データ処理と記録管理

機密性

試験対象に関する情報は機密保持され、１９９６年の健康保険の携帯性と説明責任に関する法律（ＨＩＰＡＡ）の要件に従って管理される。これらの規制では、次の事項を対象に通知する署名済みの対象の承認が必要である：

・誰がその情報にアクセスできるのか、そしてその理由は何か。

・誰がその情報を使用または開示するか。

・ＰＨＩの使用に対する承認を取り消すための研究対象の権利。

対象がＰＨＩの収集または使用の承認を取り消した場合、治験責任医師は規則により、対象の承認を取り消す前に収集した全ての情報を依然として使用することができる。ＰＨＩを収集または使用する承認を取り消された対象については、彼らの予定された研究期間の終了時に少なくとも生命状態（すなわち対象が生きているということ）を収集する許可を得るように試みるべきである。

【０３２４】

ソース文書

ソースデータは全ての情報、臨床所見の元の記録、所見、または治験の再構築および評価に必要な臨床治験における他の活動である。ソースデータはソース文書に含まれている。これらの原文書、データ記録の例には、臨床治験に関与する薬局、研究所、および医学技術部門に保管されている病院記録、臨床チャートおよびオフィスチャート、実験ノート、覚書、対象の日記または評価チェックリスト、薬局調剤記録、自動機器からの記録データ、確認後に正確かつ完全であると証明されたコピーまたは転記、マイクロフィッシュ、写真ネガ、マイクロフィルムまたは磁気媒体、Ｘ線、対象ファイルおよび記録が含まれる。

【０３２５】

症例報告フォーム

研究症例報告フォーム（ＣＲＦ）は、研究のための主要なデータ収集手段である。ＣＲＦで要求された全てのデータを記録する必要がある。不足しているデータは全て説明する必要がある。手順が実行されなかった、または質問されなかったためにＣＲＦのスペースが空白のままになっている場合は、「Ｎ／Ｄ」と記入する。項目が個別のケースに該当し得ない場合は、「Ｎ／Ａ」と記入する。全ての記入項目は黒インクで読みやすく印刷されるべきである。任意の記入エラーがあった場合は、そのようなエラーを訂正するために、誤った記入上に直線を１本引き、その上に正しいデータを入力する。そのような変更は全てイニシャルと日付を記入する必要がある。エラーを消したり白くしたりしてはならない。判読不能または不明確な記入項目を明確にするために、項目の上に明確化したものを印刷してから、イニシャルと日付を記入する。

【０３２６】

記録保持

自国でのマーケティングアプリケーションの最後の承認から少なくとも２年間、自国で保留中のまたは熟考されたマーケティングアプリケーションが存在しなくなるまで、または調査の生成物の臨床開発の正式な中止から少なくとも２年間が経過するまで、研究必須文書を保持するのは治験責任医師の責任である。これらの文書は、治験依頼者との合意により要求された場合には、より長期間保存されるべきである。そのような場合、いつこれらの文書を保存する必要がなくなったのかについて治験責任医師／機関に通知することは治験依頼者の責任である。

【０３２７】

試験のモニタリング、監査、および検査
試験モニタリング計画
この試験はモニタリング計画に従ってモニタリングされるであろう。
治験責任医師は、そのようなモニタリング活動に十分な時間を割り当てる。治験責任医師はまた、モニターまたは他のコンプライアンスまたは品質保証レビューアのために、上記の全ての試験関連文書および試験関連施設（例えば薬局、診断検査室など）へのアクセス、ならびにモニタリング来院を実施するための十分なスペースを確保する。
最終来院は、最後の対象の症例報告フォームが完成し、試験がＩＲＢ／ＩＥＣを見直して終了し、全ての規制問題が対処された後に行われる。この来院では、以下の問題に対処する予定である：全てのＣＲＦが完成し適切に提出されていること、モニタリング患者ログのコピー（が入手され、試験記録の維持および保持。
要約すると、モニターは試験の成功した実施において重要な役割を果たすであろう。モニターと現場スタッフとの関係は、モニターとのオープンで効果的なコミュニケーションによって強化され、参加者の権利と安全、ならびにデータ品質と規制当局の全ての適用可能な規制への準拠を確保するためのトレーニングとサポートを提供する。
【０３２８】
監査と検査
治験責任医師は、ＩＲＢ、治験依頼者、政府規制機関、ならびに臨床施設のコンプライアンスおよび品質保証グループによる、試験に関連した全ての文書（例えば、ソース文書、規制文書、データ収集機器、試験データなど）の、試験に関連するモニタリング、監査、および検査を許可する。治験責任医師は、該当する治験関連施設（例えば薬局、診断検査室など）の検査能力を確保するであろう。
この試験への治験責任医師としての参加は、政府の規制当局および該当する大学のコンプライアンスおよび品質保証局による検査の可能性の受け入れを意味する。
【０３２９】
倫理的配慮
本試験は、Ｇｏｏｄ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｐｒａｃｔｉｃｅの米国および国際基準（ＦＤＡ　Ｔｉｔｌｅ　２１　ｐａｒｔ　３１２および調和ガイドラインに関する国際会議）、適用される政府規制ならびに機関による研究方針および手順に従って実施されるものとする。
このプロトコールおよびいかなる修正も、試験実施の正式な承認のために、現地の法定時効に同意して、適切に構成された独立した倫理委員会（ＥＣ）または治験審査委員会（ＩＲＢ）に提出される。試験の実施に関するＥＣ／ＩＲＢの決定は、治験責任医師に対して書面で行われ、この決定のコピーは本試験の開始前に治験依頼者に提供される。治験責任医師は、治験依頼者にＥＣ／ＩＲＢメンバーとその関連会社のリストを提供するべきである。
この研究の全ての対象には、この研究を説明し、対象がこの研究への参加について十分な情報に基づいて決定を下すのに十分な情報を提供する同意書が提供される。
【０３３０】
本発明をその具体的な実施態様を参照して説明したが、本発明の真の精神と範囲を逸脱することなく様々な変更がなされたり、均等物と置き換えたりすることができることは当業者によって理解されるべきである。さらに、特定の状況、物質、物質の組成、プロセス、プロセスステップまたはステップを本発明の目的、精神および範囲に適合させるために多くの修正がなされ得る。全てのそのような修正は、本明細書に添付の特許請求の範囲の範囲内に入ることが意図される。
本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。
〔１〕リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患を治療する方法であって、順番に、
（１）リンパ球の自己反応性を特徴とする前記疾患に罹患している対象から単核細胞を含有する全血試料を滅菌条件下で取得することと；
（２）（１）の全血試料を処理施設に搬送することと；
（３）前記全血試料から単核細胞（ＭＮＣ）を滅菌的に精製して単核細胞調製物を形成

することと；
（４）前記単核細胞調製物を、接着性臍帯血幹細胞（ＵＣ－ＳＣ）の生存可能な集団を含むバイオリアクター装置に導入することであって、前記接着性ＵＣ－ＳＣが少なくとも８０％コンフルエントであることと；
（５）前記単核細胞調製物中の前記単核細胞とＣＢ－ＳＣが、少なくとも０．１時間、少なくとも０．２時間、少なくとも０．３時間、少なくとも０．４時間、少なくとも０．５時間、少なくとも０．６時間、少なくとも０．７時間、少なくとも０．８時間、少なくとも０．９時間、少なくとも１．０時間、少なくとも１．５時間、少なくとも２時間、少なくとも２．５時間、少なくとも３時間、少なくとも３．５時間、少なくとも４時間、少なくとも４．５時間、少なくとも５時間、少なくとも５．５時間、少なくとも６時間、少なくとも６．５時間、少なくとも７時間、少なくとも７．５時間、または少なくとも８時間、滅菌条件下で相互作用することができるように前記単核細胞調製物をＣＢ－ＳＣと共培養して、教育された単核細胞生成物を形成することと；
（６）前記教育された単核細胞生成物を前記バイオリアクター装置から滅菌条件下で採取することと；
（７）少なくとも10^4、少なくとも10^5、少なくとも10^6、少なくとも10^7、少なくとも10^8、少なくとも10^9、または、少なくとも10^{10}個の単核細胞を有する、前記教育された単核細胞生成物の純度、滅菌性、およびパーセント生存率を確認することと；
（８）前記教育された単核細胞生成物を前記対象への血管内注入のための臨床施設に搬送することと；
（９）治療有効量の前記教育された単核細胞生成物を前記対象に血管内注入すること；及び
（１０）対象の生涯にわたって必要に応じて複数の注入日で、ステップ（１）から（９）を順番に繰り返すこと
を含み、
前記治療有効量の前記教育された単核細胞生成物は、前記対象のＴ細胞区画における自己反応性を調節するのに有効であり得、かつリンパ球の自己反応性を特徴とする前記疾患の症状を軽減するのに有効であり得る、方法。
〔２〕前記対象が白人民族である、前記〔１〕に記載の方法。
〔３〕リンパ球の自己反応性を特徴とする前記疾患が自己免疫疾患である、前記〔１〕に記載の方法。
〔４〕前記自己免疫疾患が糖尿病である、前記〔３〕に記載の方法。
〔５〕前記自己免疫疾患が１型糖尿病である、前記〔３〕に記載の方法。
〔６〕前記自己免疫疾患が２型糖尿病である、前記〔３〕に記載の方法。
〔７〕臍帯血単核幹細胞が単離された単核細胞と同種異系である、前記〔１〕に記載の方法。
〔８〕（ａ）健康なドナーから得られた新鮮な臍帯血ユニットを取得することと；
（ｂ）密度勾配遠心分離により臍帯血から単核細胞画分を単離することと；
（ｃ）赤血球を除去することと；
（ｄ）ＵＣ単核細胞を生理緩衝食塩水で洗浄することと；
（ｅ）バイオリアクター内で無血清培地中に少なくとも1×10^6細胞の播種密度で前記ＵＣ単核細胞を播種することと；
（ｆ）前記ＵＣ単核細胞を無血清培地で培養し、２～３日ごとに半分の培地又は前記培地を交換して非接着性細胞を除去し、少なくとも１０日間、少なくとも８０％コンフルエントまで増殖させることと；
（ｇ）（ｆ）におけるコンフルエントな接着性ＵＣ－ＳＣの試料の滅菌性および生存性を確認することと
を順番に含むプロセスによって、ＵＣ－ＳＣを含む生物医学装置を調製することをさらに含む、前記〔１〕に記載の方法。
〔９〕治療量の教育された単核細胞生成物を含む医薬であって、前記教育された単核細胞

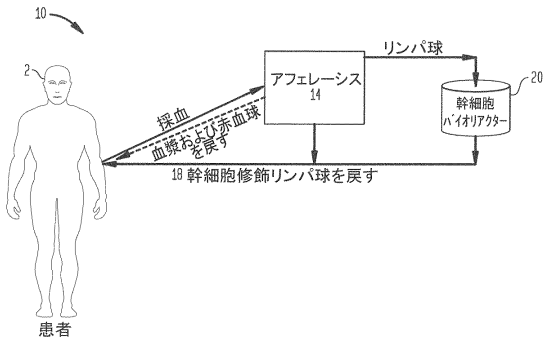
生成物が、
（１）リンパ球の自己反応性を特徴とする疾患に罹患している対象から単核細胞を含有する全血試料を滅菌条件下で取得することと；
（２）（１）の全血試料を処理施設に搬送することと；
（３）前記全血試料から単核細胞（ＭＮＣ）を滅菌的に精製して単核細胞調製物を形成することと；
（４）前記単核細胞調製物を接着性臍帯血幹細胞（ＵＣ－ＳＣ）の生存可能な集団を含むバイオリアクター装置に導入することであって、前記接着性ＵＣ－ＳＣが少なくとも８０％コンフルエントであることと；
（５）前記単核細胞調製物中の前記単核細胞とＣＢ－ＳＣが、少なくとも０．１時間、少なくとも０．２時間、少なくとも０．３時間、少なくとも０．４時間、少なくとも０．５時間、少なくとも０．６時間、少なくとも０．７時間、少なくとも０．８時間、少なくとも０．９時間、少なくとも１．０時間、少なくとも１．５時間、少なくとも２時間、少なくとも２．５時間、少なくとも３時間、少なくとも３．５時間、少なくとも４時間、少なくとも４．５時間、少なくとも５時間、少なくとも５．５時間、少なくとも６時間、少なくとも６．５時間、少なくとも７時間、少なくとも７．５時間、または少なくとも８時間、滅菌条件下で相互作用することができるように前記単核細胞調製物をＣＢ－ＳＣと共培養して、前記教育された単核細胞生成物を形成することと
を含むプロセスによって産生され、
治療有効量の前記教育された単核細胞生成物は、前記対象のＴ細胞区画における自己反応性を調節するのに有効であり、かつリンパ球の自己反応性を特徴とする前記疾患の症状を軽減するのに有効であり、
前記教育された単核細胞生成物が、
（ｉ）少なくとも1×10^{8}、少なくとも1×10^{9}、または少なくとも1×10^{10}個の単核細胞と；
（ｉｉ）T_{EM} ＣＤ４$^{+}$、T_{EM} ＣＤ８$^{+}$、T_{CM} ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{CM} ＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{CM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{-}$、T_{CM} ＣＤ４$^{+}$、T_{CM} ＣＤ８$^{+}$、ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ナイーブＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、T_{EM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４$^{+}$、T_{EM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ８$^{+}$、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{-}$、T_{EM} ＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$、ＣＤ４$^{+}$ＨＬＡ$^{-}$ＤＲ$^{+}$、およびＣＤ８$^{+}$ＨＬＡ$^{-}$ＤＲ$^{+}$細胞からなる群から選択されるＴ細胞の調節された集団と
を含む、医薬。
〔１０〕前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、T_{EM} ＣＤ４$^{+}$細胞の低減した亜集団およびT_{EM} ＣＤ８$^{+}$細胞の亜集団を含む、前記〔９〕に記載の医薬組成物。
〔１１〕前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、T_{CM} ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＣＲ７$^{+}$細胞の増加した亜集団およびT_{CM} ＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$細胞の増加した亜集団を含む、前記〔９〕に記載の医薬組成物。
〔１２〕前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、T_{CM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$細胞の増加した亜集団を含む、前記〔９〕に記載の医薬組成物。
〔１３〕前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＣＲ７$^{-}$細胞の低減した亜集団を含む、前記〔９〕に記載の医薬組成物。
〔１４〕前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、増加したT_{CM} ＣＤ４$^{+}$細胞の亜集団およびT_{CM} ＣＤ８$^{+}$細胞の亜集団を含む、前記〔９〕に記載の医薬組成物。
〔１５〕前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、増加したナイーブＣＤ４$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$Ｔ細胞の亜集団およびナイーブＣＤ８$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$Ｔ細胞の亜集団を含む、前記〔９〕に記載の医薬組成物。
〔１６〕前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｃ

Ｄ４５ＲＡ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$Ｔ細胞の増加した亜集団を含む、前記〔９〕に記載の医薬組成物。
〔１７〕前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、低減したT_{EM} ＣＤ４$^{+}$細胞の亜集団およびT_{EM} ＣＤ８$^{+}$細胞の亜集団を含む、前記〔９〕に記載の医薬組成物。
〔１８〕前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、増加したT_{EM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４$^{+}$細胞の亜集団およびT_{EM} ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ８$^{+}$細胞の亜集団を含む、前記〔９〕に記載の医薬組成物。
〔１９〕前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、低減したＣＤ４$^{+}$ＨＬＡ$^{-}$ＤＲ$^{+}$Ｔ細胞の亜集団およびＣＤ８$^{+}$ＨＬＡ$^{-}$ＤＲ$^{+}$Ｔ細胞の亜集団を含む、前記〔９〕に記載の医薬組成物。
〔２０〕前記教育された単核細胞生成物が、未処理の対照と比較して、T_{EM} ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{-}$細胞の増加した亜集団を含む、前記〔９〕に記載の医薬組成物。
〔２１〕リンパ球の自己反応性を特徴とする前記疾患が１型糖尿病であり、かつ前記対象のＴ細胞区画において調節された自己反応性が、β細胞機能の改善を含む、前記〔９〕に記載の医薬組成物。
〔２２〕β細胞機能の前記改善が、血清Ｃ－ペプチドレベルの増加を含む、前記〔２１〕に記載の医薬組成物。
〔２３〕インスリン、インスリン類似体、ビグアニド、チアゾリジンジオン、分泌促進薬、スルホニル尿素、非スルホニル尿素分泌促進薬、グリニド、メトホルミン、α－グルコシダーゼ阻害剤、メグリチニド、α－グルコシダーゼ阻害剤、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）模倣体、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）アゴニスト、アミリン類似体、ジペプチジルペプチダーゼ－４阻害剤、インクレチン模倣体、胃抑制ペプチド類似体、アミリン類似体、グリコ尿、フィナステリド、デュタステリド、ミノキシジル、ケトコナゾール、スピロノラクトン、フルタミド、シクロスポリン、クロベタゾール、抗ＣＤ３抗体、インスリン受容体の小分子活性化剤、フルオシノニド、またはそれらの組み合わせからなる群から選択される治療薬をさらに含む、前記〔９〕に記載の医薬組成物。

【図面】

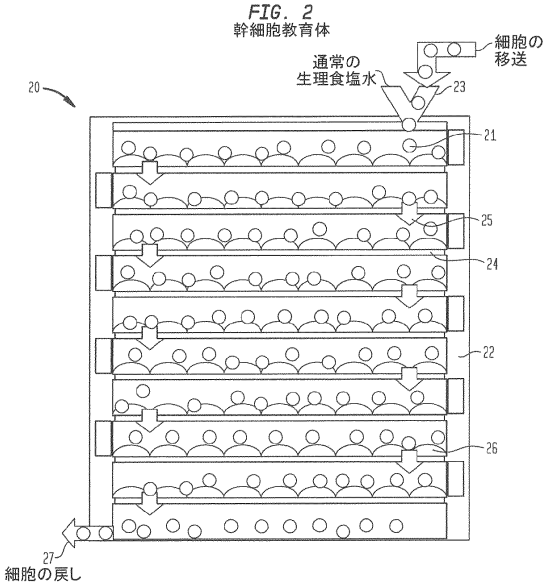
【図１】

FIG. 1



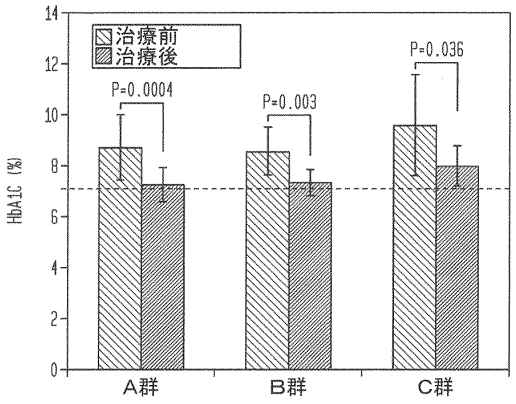
【図２】

FIG. 2



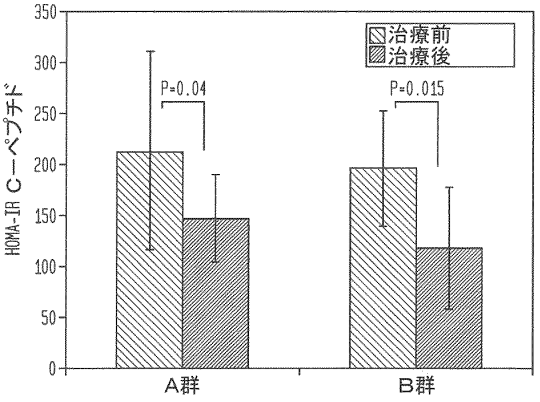
【図３Ａ】

FIG. 3A



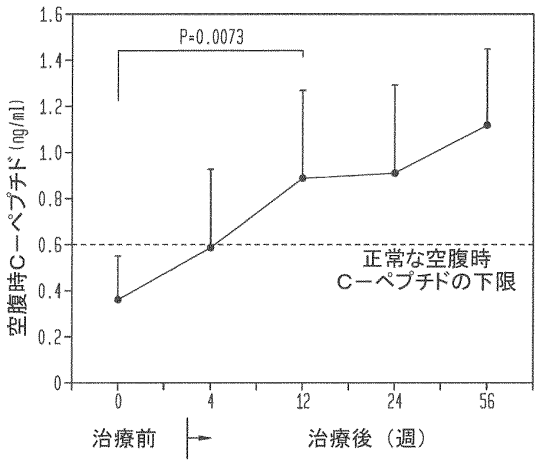
【図３Ｂ】

FIG. 3B



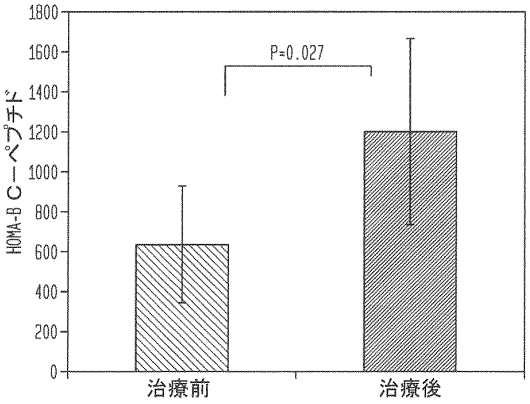
【図３Ｃ】

FIG. 3C



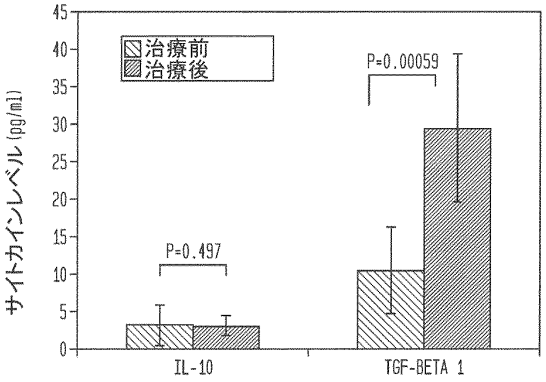
【図３Ｄ】

FIG. 3D



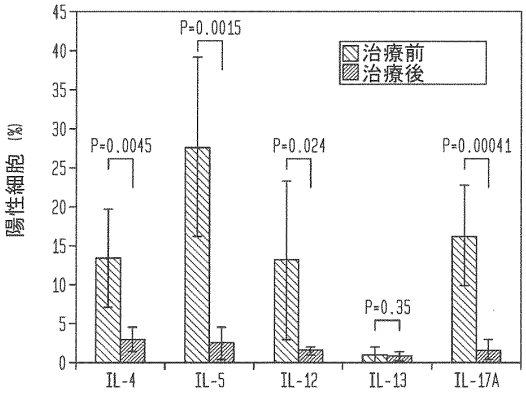
【図４Ａ】

FIG. 4A



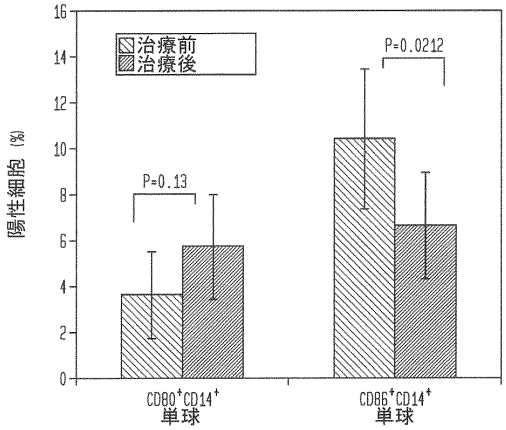
【図４Ｂ】

FIG. 4B



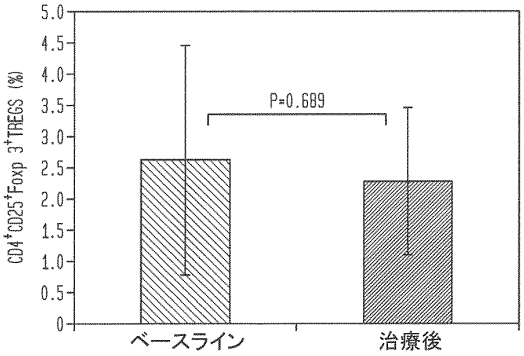
【図４Ｃ】

FIG. 4C

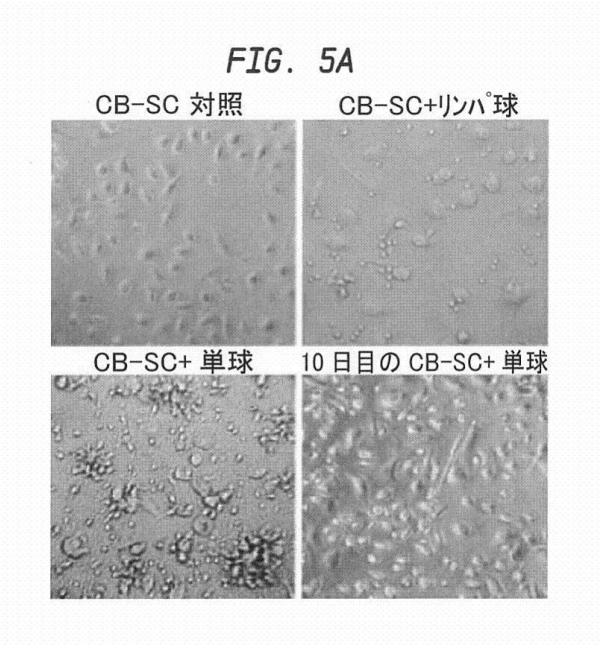


【図４Ｄ】

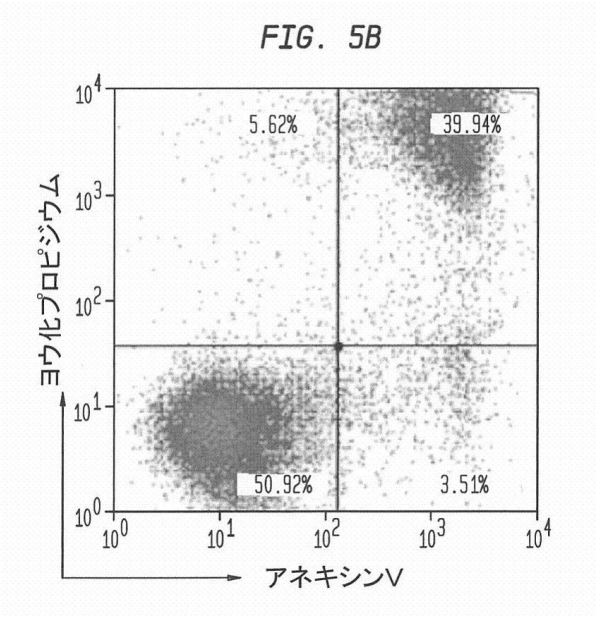
FIG. 4D



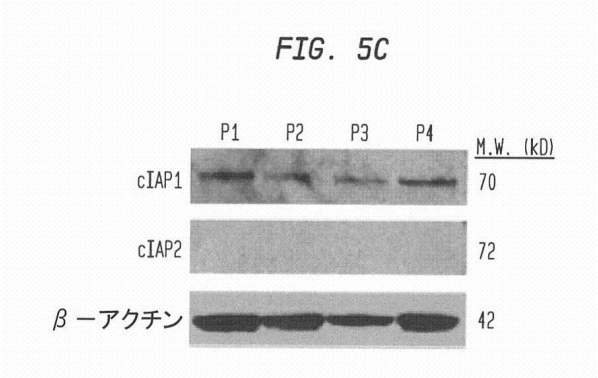
【図５Ａ】



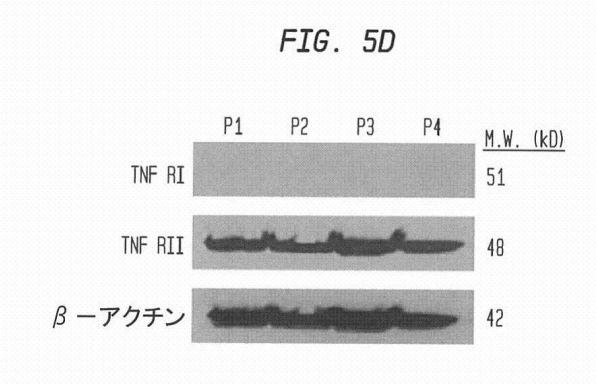
【図５Ｂ】



【図５Ｃ】

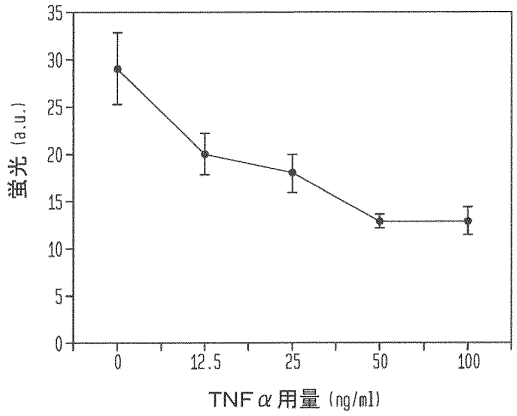


【図５Ｄ】



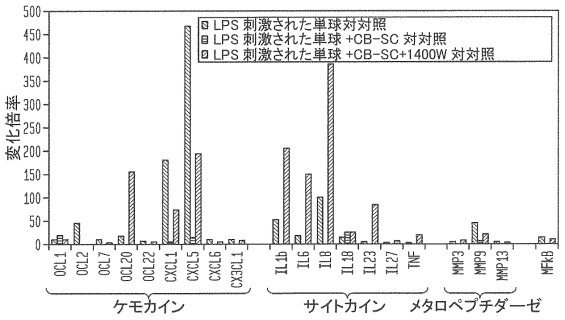
【図５Ｅ】

FIG. 5E



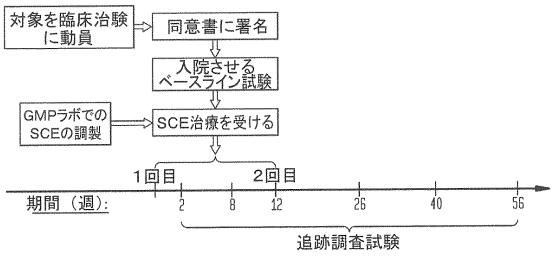
【図５Ｆ】

FIG. 5F



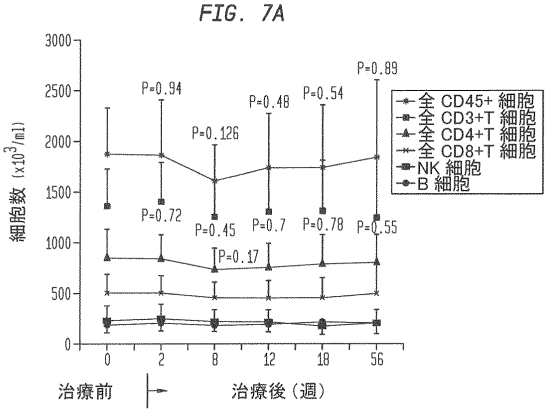
【図６】

FIG. 6



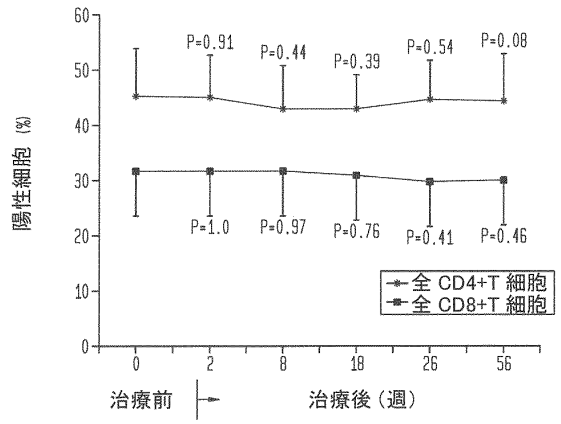
【図７Ａ】

FIG. 7A



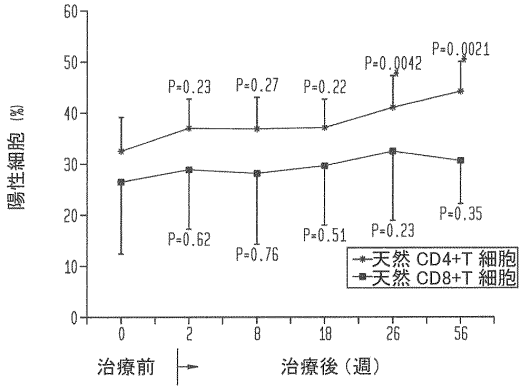
【図７Ｂ】

FIG. 7B



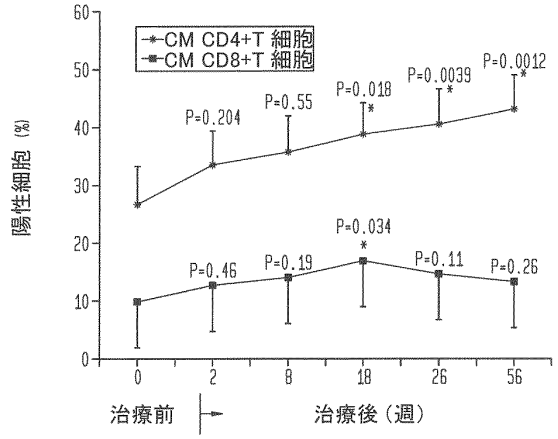
【図７Ｃ】

FIG. 7C



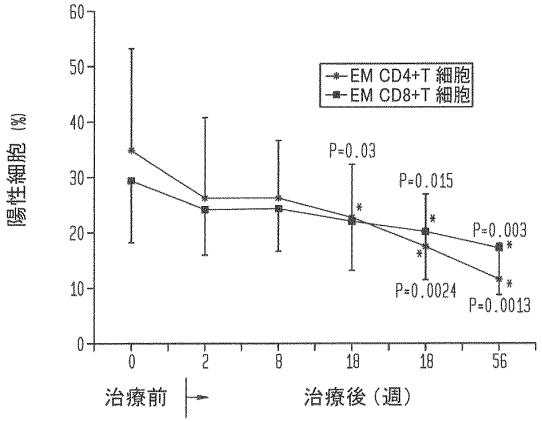
【図７Ｄ】

FIG. 7D



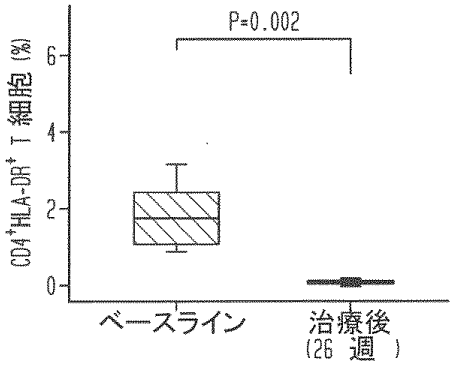
【図７Ｅ】

FIG. 7E



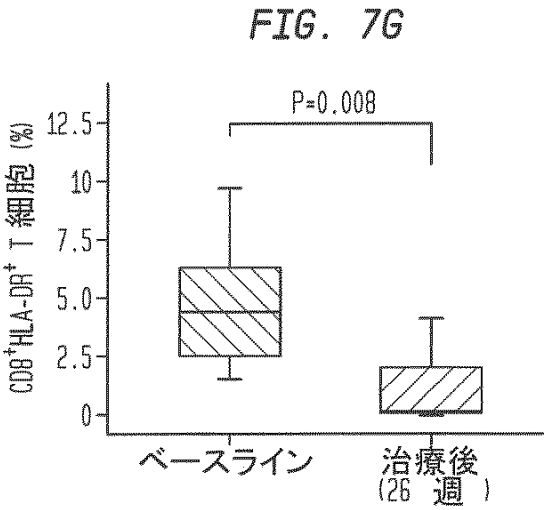
【図７Ｆ】

FIG. 7F



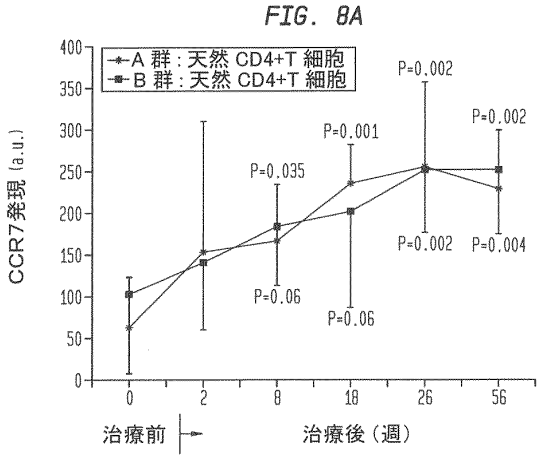
【図７Ｇ】

FIG. 7G



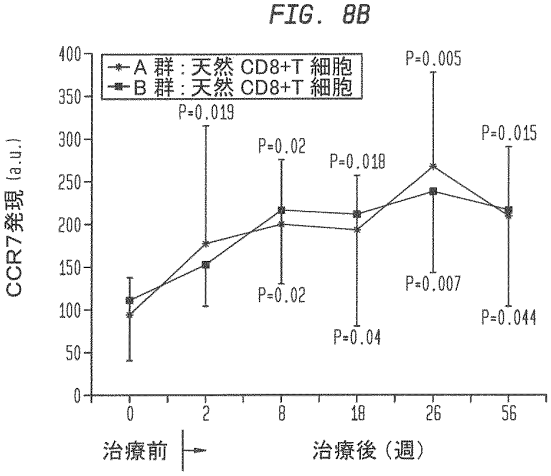
【図８Ａ】

FIG. 8A



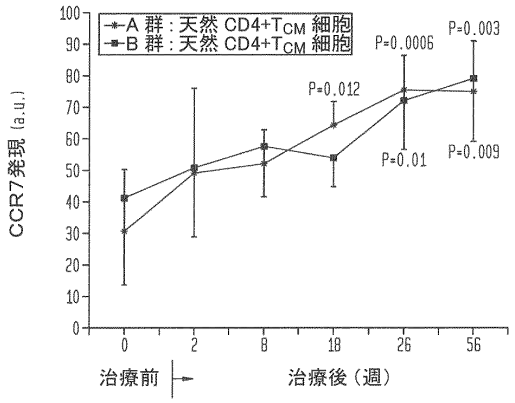
【図８Ｂ】

FIG. 8B



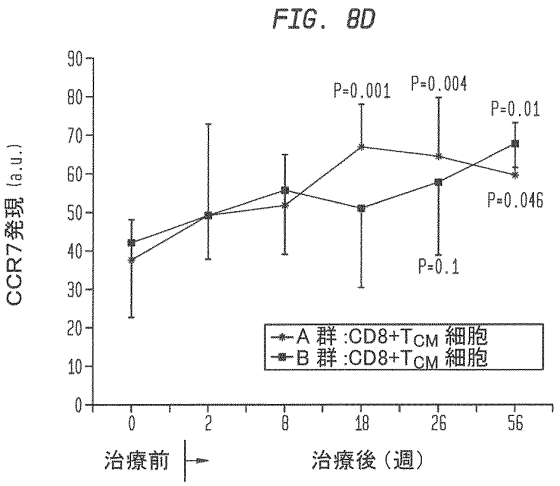
【図８Ｃ】

FIG. 8C



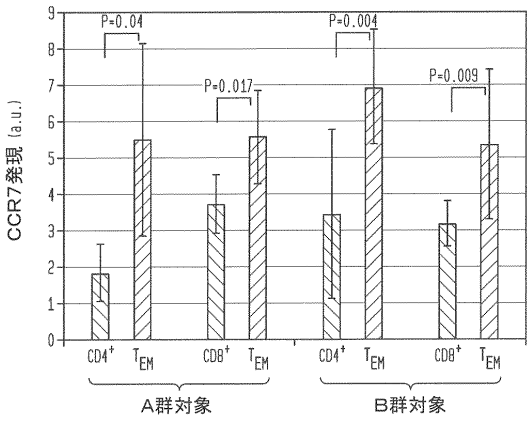
【図８Ｄ】

FIG. 8D



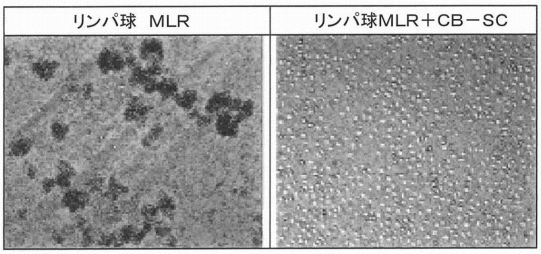
【図８Ｅ】

FIG. 8E

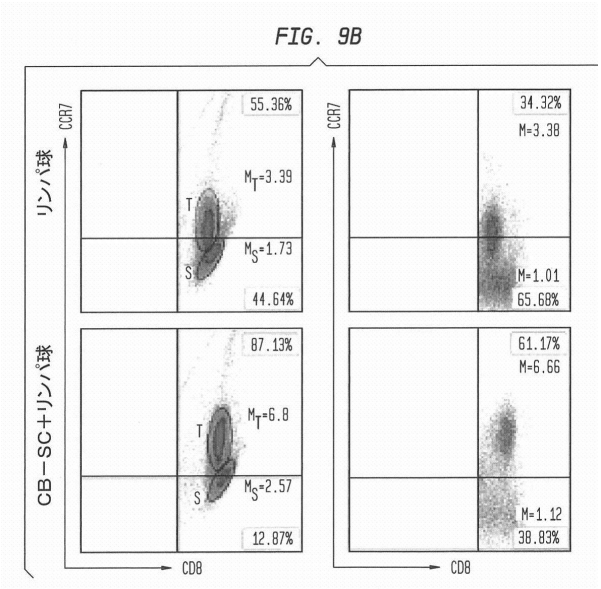


【図９Ａ】

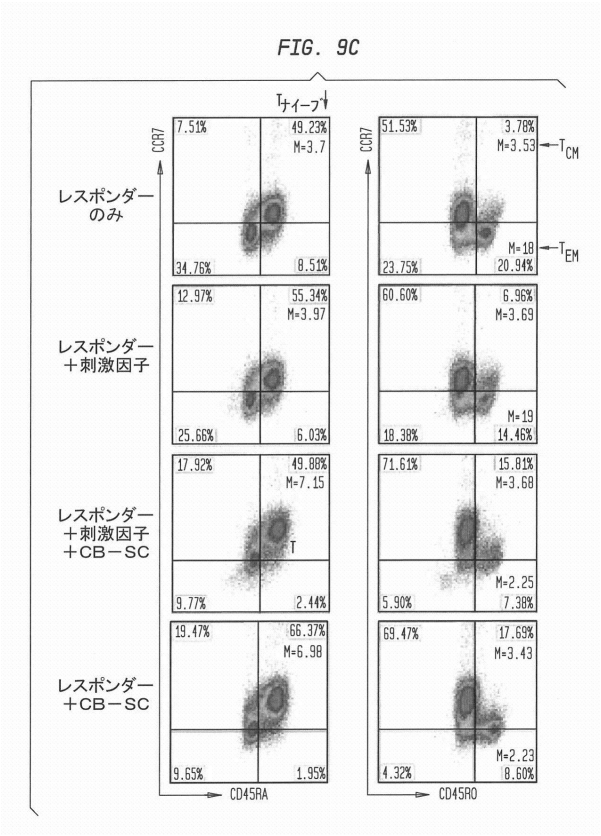
FIG. 9A



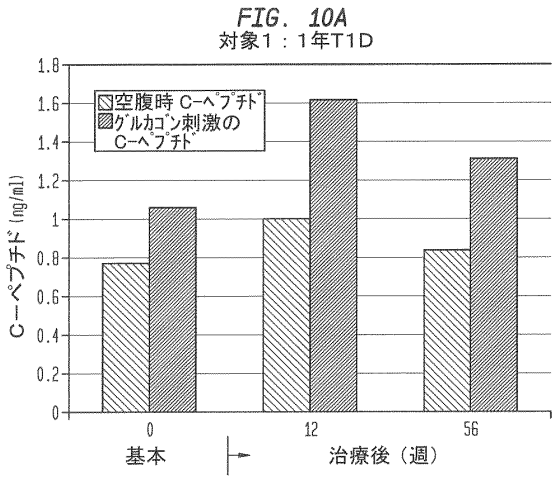
【図９Ｂ】



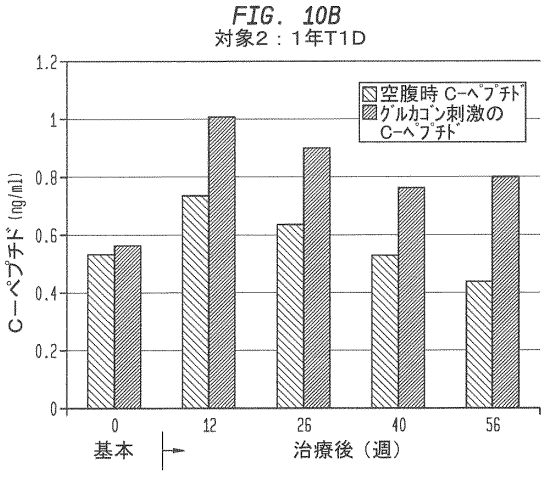
【図９Ｃ】



【図１０Ａ】

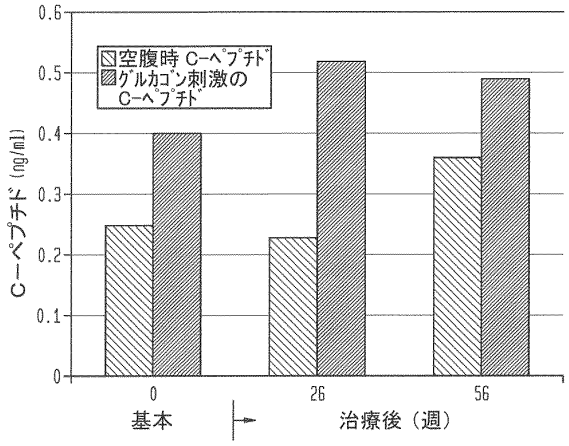


【図１０Ｂ】



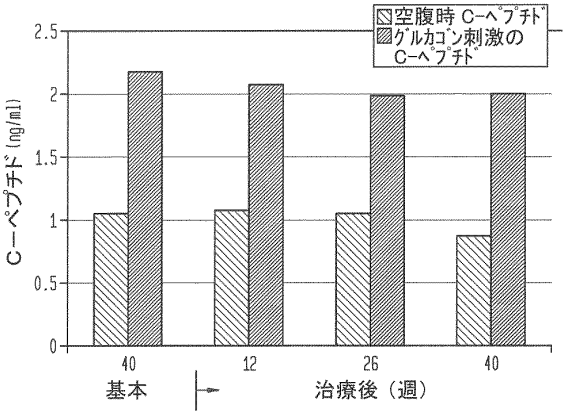
【図１０Ｃ】

FIG. 10C
対象3：10年T1D



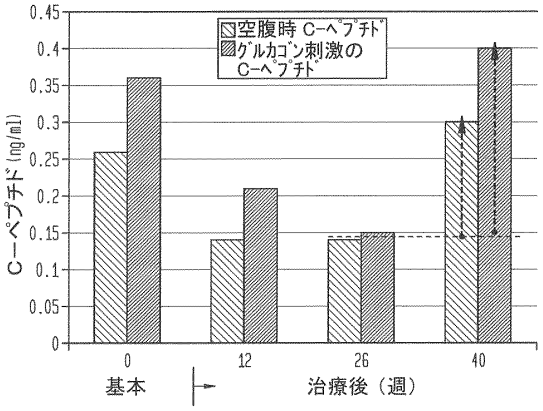
【図１０Ｄ】

FIG. 10D
対象4：3年T1D



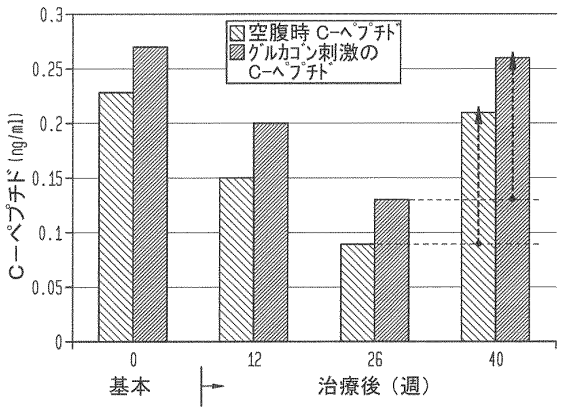
【図１０Ｅ】

FIG. 10E
対象5：14年T1D



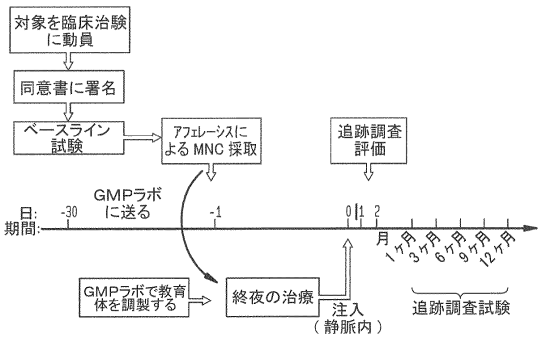
【図１０Ｆ】

FIG. 10F
対象6：10年T1D

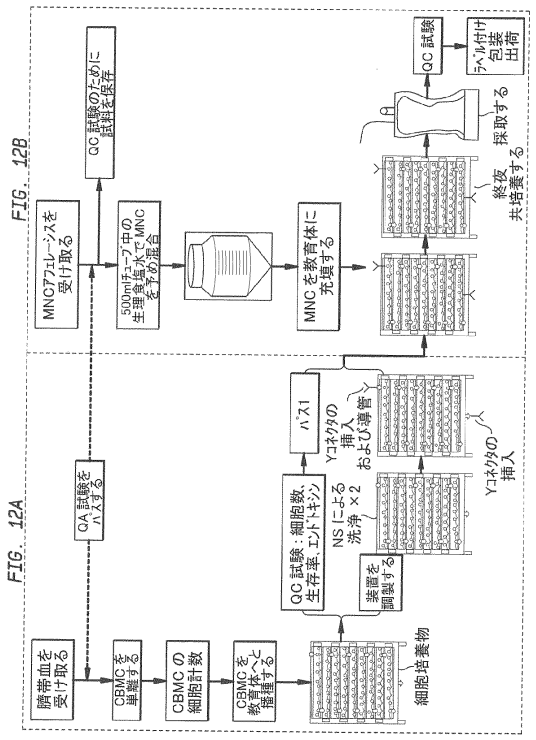


【図１１】

FIG. 11

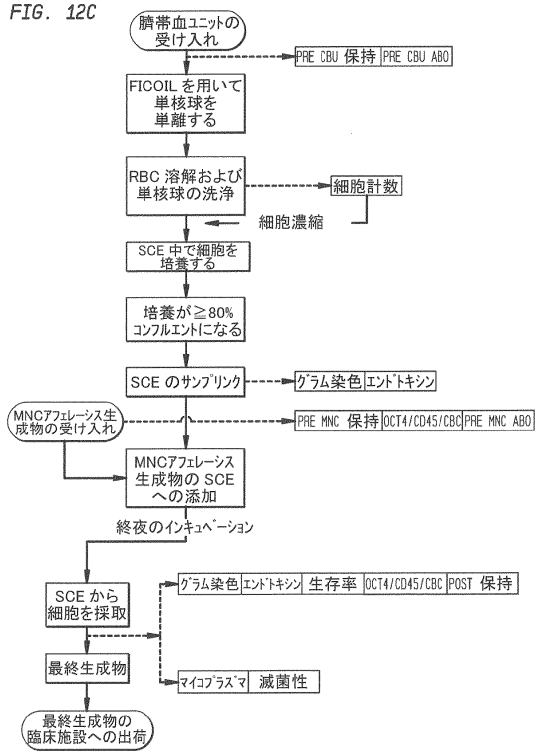


【図１２Ａ－Ｂ】



【図１２Ｃ】

FIG. 12C



フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI	
Ａ６１Ｋ	*38/28 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/28
Ａ６１Ｋ	*31/155(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/155
Ａ６１Ｋ	*31/426(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/426
Ａ６１Ｋ	*31/64 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/64
Ａ６１Ｋ	*31/58 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/58
Ａ６１Ｋ	*31/585(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/585
Ａ６１Ｋ	*31/506(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/506
Ａ６１Ｋ	*31/496(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/496
Ｃ１２Ｎ	*5/078(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/078

弁理士　市川 さつき
(74)代理人　100111796
弁理士　服部 博信
(74)代理人　100162422
弁理士　志村 将
(72)発明者　ジャオ ヨン
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ０７６６１ リバー エッジ ボガート ロード ９２２
(72)発明者　コーンゴールド ロバート
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ０７４７０ ウェイン ケンブリッジ プレイス １６
(72)発明者　ドナート ミケーレ
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ０７０３９ リビングストン エセックス コート ５

審査官　横田 倫子

(56)参考文献
BBRC., 2007, Vol.353, p.182-188
BMC Medicene, 2013, Vol.11, Article:160(p.1-13)
BMC Medicene, 2012, Vol.10, Article:3(p.1-11)
BMC Medicene, 2015, Vol.13, Article:187(p.1-11)

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　３５／００
Ａ６１Ｐ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）