

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6277187号  
(P6277187)

(45) 発行日 平成30年2月7日(2018.2.7)

(24) 登録日 平成30年1月19日(2018.1.19)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 N 5/0775 (2010.01)	C 1 2 N 5/0775	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
請求項の数 21 (全 74 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-521809 (P2015-521809)	(73) 特許権者	515005194
(86) (22) 出願日	平成25年7月11日(2013.7.11)		イムシステム バイオテクノロジー, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2015-523083 (P2015-523083A)		アメリカ合衆国, コネチカット州 06085, ユニオンヴィル, 36 リドロード
(43) 公表日	平成27年8月13日(2015.8.13)	(74) 代理人	100114775
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/050077		弁理士 高岡 亮一
(87) 国際公開番号	W02014/011881	(74) 代理人	100121511
(87) 国際公開日	平成26年1月16日(2014.1.16)		弁理士 小田 直
審査請求日	平成28年7月8日(2016.7.8)	(74) 代理人	100191086
(31) 優先権主張番号	61/684,509		弁理士 高橋 香元
(32) 優先日	平成24年8月17日(2012.8.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/670,192		
(32) 優先日	平成24年7月11日(2012.7.11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ヒト胚性幹細胞由来の間葉系様幹細胞、方法およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト胚性幹細胞 (hESC) または誘導多能性幹細胞 (iPSC) からトロホブラスト由来の間葉系幹細胞 (T-MSC) を生成する方法であって、

(a) hESC または iPSC をトロホブラストに分化させるのに十分な 1 日 ~ 5 日間の第 1 の期間の間、骨形成タンパク質 (BMP) を含む培地中で、分化効率を増加させるための TGF 阻害剤の存在下または非存在下、前記 hESC または iPSC を培養することと、

(b) トロホブラスト細胞を単一細胞に解離させることと、

(c) 前記トロホブラスト細胞を、ゼラチン、ピトロネクチン、ラミニン、フィブロネクチン、マトリゲル、またはコラーゲンでコーティングしたプレート上に再播種することと、

(d) 拡張効率を増加させるために、LIF、bFGF、またはPDGFを含有する間葉系幹細胞 (MSC) 成長培地中で、4 日 ~ 10 日間の第 2 の期間の間、前記トロホブラスト細胞を培養することと、を含む、方法。

【請求項 2】

hESC または iPSC から T-MSC を生成する方法であって、

(a) hESC または iPSC をトロホブラストに分化させるために、BMP4 を含む培地中で、または分化効率を増加させるための TGF 阻害剤と一緒に、前記 hESC または iPSC を 1 . 5 日 ~ 5 日間培養することと、

10

20

- (b) 前記トロホプラストを単離することと、
- (c) 前記単離したトロホプラストからトロホプラスト細胞を解離させることと、
- (d) 前記トロホプラスト細胞をマトリゲルコーティングしたプレート上に再播種することと、
- (e) 前記単一細胞の間葉系幹細胞への分化を誘導するのに十分な量の、血清、K O S Rを含有するM S C成長培地、または他の無血清培地中で4 ~ 10日間前記トロホプラスト細胞を培養することと、を含み、前記間葉系幹細胞の少なくとも約90%がC D 7 3を発現する、方法。

【請求項3】

前記T G F 阻害剤が、S B 4 3 1 5 4 2、A 8 3 - 0 1、またはA L K 5 阻害剤である、請求項1に記載の方法。

10

【請求項4】

請求項1に記載の第1のステップ前に、h E S Cが培養され、

(i) マトリゲルコーティングしたプレート上で約80%のコンフルエンスまで培養するステップと、

(i i) 解離させるステップと、

(i i i) 単離するステップと、

(i v) 洗浄するステップと、を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

B M P 4の濃度が1 ~ 100 ng / mlであり、B M P 2の濃度が100 ~ 500 ng / mlであり、B M P 7の濃度が100 ~ 500 ng / mlであり、増殖および分化因子5 ( G D F 5 ) の濃度が10 ~ 50 ng / mlである、請求項1に記載の方法。

20

【請求項6】

請求項1に記載の方法によって生成される、トロホプラスト由来のM S C ( T - M S C )。

【請求項7】

前記T - M S Cが、C D 7 3<sup>+</sup>、C D 105<sup>+</sup>、およびC D 90<sup>+</sup>である、請求項6に記載のT - M S C。

【請求項8】

対象において、組織または臓器移植中の免疫拒否反応を予防または抑制するための、請求項1に記載の方法によって生成されるT - M S C。

30

【請求項9】

前記T - M S Cが、少なくとも約90%のC D 7 3<sup>+</sup>である、請求項6に記載のT - M S C。

【請求項10】

自己免疫疾患を治療するための間葉系幹細胞 ( T - M S C ) を選択する方法であって、前記方法が、( i ) 群1マーカーを発現する細胞を95%超含有する、( i i ) 群2マーカーを発現する細胞を80%超含有する、( i i i ) 群3マーカーを発現する細胞を5%未満含有する、( i v ) I L - 10およびT G F を発現する、( v ) I L - 6、I L - 12、およびT N F を発現する細胞を2%未満含有する、ならびに( v i ) すべての群4マーカーを共発現する細胞を0.001%未満含有する、特性を有するT - M S Cを選択することを含み、群1マーカーが、C D 7 3、C D 90、C D 105、C D 146、C D 166、およびC D 44であり、群2マーカーが、C D 13、C D 29、C D 54、C D 49Eであり、群3マーカーが、C D 45、C D 34、C D 31、およびS S E A 4であり、群4マーカーが、O C T 4、N A N O G、T R A - 1 - 60、およびS S E A 4である、方法。

40

【請求項11】

前記細胞が、M M P 2およびR A G Eを発現しない、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記T - M S C細胞が、骨髄由来の間葉系幹細胞 ( B M - M S C ) によるI F N R 1

50

および I F N R 2 の発現と比較して、I F N R 1 および I F N R 2 の低発現を有する、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記選択された T - M S C の特性が、C D 7 3 を発現すること、および I L - 6 の低発現または非発現、の特性をさらに含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記選択された T - M S C の特性が、C D 9 0、C D 1 0 5、C D 1 3、C D 2 9、C D 5 4、C D 1 4 6、C D 1 6 6、および C D 4 4 からの少なくとも 1 つの細胞マーカーを発現すること、C D 3 4、C D 3 1、および C D 4 5 から選択された少なくとも 1 つの細胞マーカーの低発現または非発現、ならびに M M P、R A G E、I F N R 1、I F N R 2、I L - 1 2、T N F、および V C A M 1 からの少なくとも 1 つのマーカーの低発現または非発現、の特性をさらに含む、請求項 1 0 に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

前記 T - M S C が、照射にさらに供される、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 0 に記載の T - M S C の集団および薬学的に許容される担体を含む、薬学的調製物。

【請求項 1 7】

T 細胞、B 細胞、炎症性、および / または先天性免疫関連疾患の治療に用いられる、請求項 1 0 に記載の方法により選択される T - M S C。

20

【請求項 1 8】

請求項 1 0 に記載の T - M S C および担体を含む、キット。

【請求項 1 9】

解凍試薬、免疫抑制エンハンサー、および抗ヒスタミンをさらに含む、請求項 1 8 に記載のキット。

【請求項 2 0】

前記 T - M S C をガンマ線照射で照射する、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 2 1】

( i ) T - M S C を分化するステップと、

( i i ) 前記 T - M S C を誘導するステップと、

30

をさらに含む、請求項 1 に記載の方法により生成される T - M S C から、脂肪細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、神経系列細胞、筋芽細胞、間質細胞、および線維芽細胞を生成する方法

。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、2 0 1 2 年 7 月 1 1 日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 6 7 0 , 1 9 2 号および 2 0 1 2 年 8 月 1 7 日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 6 8 4 , 5 0 9 号に優先権を主張し、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0 0 0 2】

本明細書に提供される開示は、概して、間葉系様幹細胞「h E S - T - M S C」または「T - M S C」およびその幹細胞を生成する方法に関する。この方法は、胚性幹細胞がトロホブラストの中間分化を経て発育する条件下で胚性幹細胞を培養することと、h E S - T - M S C または T - M S C にトロホブラストを分化することと、を含む。T - M S C、T - M S C を含む溶液および薬学的組成物、T - M S C を作製する方法、疾患の治療および予防のために T - M S C を使用する方法が本明細書に開示され、具体的には、T - M S C は、多発性硬化症および他の自己免疫疾患を治療するための免疫抑制剤として、組織の再生 / 修復での使用のために、ならびに血液脳関門および / または血液脊髄関門を横断する薬剤の送達のために T - M S C を使用する方法に使用される。また、免疫系を調節する

50

、個人の自己抗原に対する免疫応答を抑制する、損傷した中枢神経系を修復するために、T - MSCを使用する方法も本明細書に開示される。修飾された遺伝子発現を通じて改善された免疫抑制機能を有する修飾されたT - MSCを提供する方法と同様に、免疫調節で用いるためにT - MSCを含む組成物が本明細書に開示される。

#### 【背景技術】

#### 【0003】

ヒト間葉系幹/間質細胞(MSC)は、免疫系制御および組織修復に広く使用されている。ヒト胚性幹細胞(hESC)は、高品質のヒトMSCを発生させるための信頼できる源として使用することができる。MSCにhESCを分化するための多くの方法が存在する。しかしながら、現行の方法では、高純度のMSCを高収率で生成するのに十分な様式

10

#### 【0004】

骨髄、臍帯、および脂肪組織等の成体マウスまたはヒト組織由来の間葉系幹細胞(MSC)は、多能性、すなわち、脂肪細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、神経系列細胞、筋芽細胞、間質細胞、および線維芽細胞等を含む様々な成熟細胞系統を発生させることが可能である。これらの技術は、よく特徴付けられ、特許権を有する。例えば、Caplanらの米国特許第5,486,359号(ヒト間葉系幹細胞)を参照されたい。

#### 【0005】

しかしながら、現在利用できる成体組織由来のMSCは、いくつかの潜在的な問題がある。第一に、骨髄等のドナー組織の限定された源および異なる品質は、MSCの研究および適用を制限し、大規模な臨床用途の医療用品としてMSCの標準化を阻む。第二に、成体組織から得られたMSCは、高度に混合した細胞集団であり、細胞のごく一部のみが強い免疫抑制効果を有する。臨床用途のために十分な細胞数を得るために、インビトロ拡張が必要であり、これにより、MSCの免疫抑制および帰巢能力を低下させることができる(Javazon et al., 2004)。第三に、悪性転化(Wong, 2011)およびドナーからの感染性病原体の潜在的伝播を含む成体由来のMSCの使用に関する安全性の問題がある。

20

#### 【0006】

これらの潜在的な問題を克服するために、科学者らは、様々な方法によってhESCからMSCを得ようと試みている。これらの方法は、マウスOP9細胞株を用いた共培養、または複数のサイトカインおよび化学物質を厳選し、使用することを含む(Barberiet al., 2005; Chen et al., 2012; Liu et al., 2012; Sanchez et al., 2011)。近年、TGFシグナル伝達阻害剤SB431542は、hESCをMSCに分化するために使用し、これは手順を簡便化し、効率性を向上させる(Chen et al., 2012)が、その収率および純度は、非常に低い(下述の比較試験を参照のこと)。2010年に、発明者らおよびAdvanced Cell Technologyは、多くの高価なサイトカインおよびメチルセルロース培地の使用を含む、血管芽細胞からMSCを得る別の方法を開発したが、この方法を使用する派生効率も低い。

30

#### 【0007】

hESCをMSCに分化するための現在知られている方法はそれぞれ、1つ以上の重篤な欠点および弱点を有すると特徴付けられる：OP9間質細胞を用いて共培養したhESCからのMSCの分化は、多大な時間を要する、低収率、低純度の細胞を生成する、ならびに動物支持細胞および未定義の培養条件を使用することの不利点を有する(Barberiet al., 2005)。hESCによって形成された再播種した胚様体周辺に増生した細胞からの分化は、多大な時間を要する、低収率の細胞を生成する、未定義の培養条件を使用する、および高価な方法であることの不利益を有する(Olivier et al., 2006)。コラーゲンでコーティングしたプレート上で培養されたhESCからの分化は、非常に低い収率、未定義の培養条件、および多大な時間を要するという不利点を有する(Liu et al., 2012)。TGFシグナル伝達の阻害剤で

40

50

処置されたhESCによる分化は、低純度の細胞（我々の試験による）、低い細胞収率、多大な時間を要する方法、および生成された細胞の低い免疫抑制効果を含む不利点を有する（Chen et al., 2012、Sanchez et al., 2011）。したがって、様々な疾患のための治療および予防として使用するために、MSCの制限のない、安全で高度に安定した、効率的かつ一貫した源が必要である。

#### 【0008】

多発性硬化症（MS）は、末梢性免疫細胞の損傷した血液脳関門（BBB）または血液脊髄関門（BSCB）を通過する中枢神経系（CNS）への浸潤によって引き起こされる慢性自己免疫疾患であり、これは、神経軸索周辺のエリニン鞘の炎症を引き起こし、軸索の脱髄および瘢痕化を引き起こす（McFarland and Martin (2007)）。米国多発性硬化症協会によると、Avonex（IFN-1a）、Betaseron（IFN-1b）、Gilenya（スフィンゴシン1-リン酸受容体調節薬）、酢酸グラチラマー（またはコポリマー1）、およびTysabri（ヒト化抗-α4-インテグリン抗体）を含む、MSの治療のための70超のFDAで承認された医薬品がある。しかしながら、これらは、一時的な緩和のみを提供し、感染症の増加、心臓発作、脳卒中、進行性多巣性白質脳症、不整脈、疼痛、鬱病、疲労、黄斑浮腫、および勃起不全を含む重篤な副作用と関連している（Johnston and So (2012)、Weber et al. (2012)）。

#### 【0009】

間葉系間質／幹細胞（MSC）の翻訳は、それらの免疫調節および神経再生効果（Auletta et al., (2012)、Pittenger et al. (1999)）ならびに血液脳関門を修復するための潜在的能力（Chao et al. (2009)、Menge et al. (2012)）による潜在的に魅力的な療法として現れる。MSCは、多能性を意味し、脂肪細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、およびニューロンを含む様々な細胞系統を発生させることができる。それらは、羊膜、臍帯、骨髄、および脂肪等の胎児、新生児、および成体組織に由来し得る。MSCは、これらの細胞が複数かつ潜在的な相乗作用治療的要因の担体として機能し得、メディエーターの分泌および細胞-細胞接触を通じて局所効果を発揮するために損傷組織へ遊走することができるため、現行の薬物療法を上回るいくつかの独自の利点を有する（Uccelli and Prockop (2010a)）。重要なことには、MSCは、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）に罹患しているマウス、MSのよく認識された動物モデル（Gordon et al., 2008a、Gordon et al. (2010)、Morando et al. (2012)、Peron et al. (2012)、Zappia et al. (2005)、Zhang et al. (2005)）、ならびに臨床試験におけるMS患者（Connick et al. (2012)、Karussis et al. (2010)、Mohyeddin Bonab et al. (2007)、Yamout et al. (2010)）の処置において効果的であることが見出されている。マウスおよびヒト骨髄由来のMSC（BM-MSC）の両方に問題が見られない異種発生により、EAEマウスの疾患の進行を弱めることができる（Gordon et al. (2008a)、Gordon et al. (2010)、Morando et al. (2012)、Peron et al. (2012)、Zappia et al. (2005)、Zhang et al. (2005)）。しかしながら、異なる報告においてBM-MSCにより処置されたEAEマウスにおいて、変動する効果が報告された（Gordon et al. (2008a)、Payne et al. (2012)、Zappia et al. (2005)、Zhang et al. (2005)）。疾患の処置におけるBM-MSCの有効性は、疑わしい。

#### 【0010】

これらの疾患およびその他の疾患のための治療および予防薬として使用するために、MSCの制限のない、安全で高度に安定した、効率的かつ一貫した源が強く必要である。これらの必要を満たす高効率の分化方法によって、hESCに由来するhES-T-MSC

10

20

30

40

50

が、本明細書に開示される。また、他の方法によって分化されたBM-MSCおよび他のhES-MSCと比較して、hES-T-MSCにおいて異なった形で発現されるいくつかの重要な要因が特定される場合の、マイクロアレイ分析および他の分析も、本明細書に開示される。

【発明の概要】

【0011】

トロホブラスト導入の中間ステップを通じて間葉系様幹細胞をhESCから得る方法が、本明細書に開示される。この方法によって得られるMSCは、「hES-T-MSC」または「T-MSC」と称される。T-MSCは、脂肪細胞、筋芽細胞、神経細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、軟骨細胞、間質細胞が含まれるが、これらに限定されない細胞または細胞系統、T-MSC由来の細胞もしくは細胞系統、または「T-MSC由来の系統」もしくは「T-MSC-DL」と称される、細胞または細胞系統に分化され得る。

10

【0012】

免疫抑制の特性を有するT-MSCおよび/またはT-MSC-DLを含む組成物を含む組成物が、本明細書に開示される。免疫応答を調節するためのそれらの能力に基づいて選択されたT-MSCおよび/またはT-MSC-DLの集団、ならびに免疫調節の特性を有する組成物が、本明細書に開示される。本明細書に開示される、T-MSCおよび/またはT-MSC-DLは、骨髓由来のMSCと比較してより高度な免疫抑制活性を有する。

【0013】

20

高純度および高収率のT-MSCを効率よく生成するための方法が、本明細書に開示される。本方法は、以前に報告されたものよりも比較的少ないステップかつ分化因子をあまり必要としない特性を有する。

【0014】

トロホブラストの中間分化を通じて間葉系様幹細胞を得るためのヒト胚性幹細胞(hESC)を使用する方法が、本明細書に開示される。トロホブラスト由来のMSCは、hES-T-MSCまたはT-MSCと称される。T-MSCは、免疫系を調節するために使用することができる。例えば、T-MSCは、中枢神経系中の免疫細胞によって生じた損傷を防ぐことによって多発性硬化症を治療する際に有効である。

【0015】

30

本明細書に開示される方法によって生成されるヒト胚由来の間葉系幹細胞が、本明細書に開示される。

【0016】

T-MSCのT-MSC-DLへの分化を誘導する方法が、本明細書に開示される。

【0017】

また、哺乳動物および特にヒト対象において、多発性硬化症および他の自己免疫疾患を治療するためのT-MSCおよび/またはT-MSC-DLの適用も、本明細書に開示される。

【0018】

例えば、組織または臓器移植中、免疫拒否反応の予防または抑制のために、免疫調節で用いる細胞生成物のT-MSCを提供することは、開示された本発明のさらなる目的である。免疫応答を軽減または抑制する方法の別の特定の実施形態において、免疫応答は、移植片対宿主疾患である。別の特定の実施形態において、免疫応答は、自己免疫疾患、例えば、糖尿病、紅斑性狼瘡、またはリウマチ性関節炎である。

40

【0019】

疾患の治療で用いる細胞生成物のT-MSC-DLを提供することは、開示された本発明のさらなる目的である。

【0020】

本明細書に提供されるできるだけ多くの幹細胞を使用することができる方法が、免疫応答の検出可能な抑制をもたらすために必要とされる。例えば、複数の免疫細胞を接触させ

50

るために使用される本明細書に提供される多数の幹細胞は、 $1 \times 10^5$  個の T - M S C、 $1 \times 10^6$  個の T - M S C、 $1 \times 10^7$  個の T - M S C、 $1 \times 10^8$  個の T - M S C、またはそれ以上を含むことができる。

#### 【0021】

一実施形態において、本明細書に記載される方法は、h E S C から M S C を得る（本明細書では、生成するとも称する）ための新規のプロセスである。本方法は、

a . 少なくとも1つの増殖因子の存在下でトロホブラストに分化させるために胚性幹細胞の分化を誘導するのに十分な量の無血清培地中でヒト胚性幹細胞を含む細胞培養物を培養するステップであって、一実施形態において、トロホブラストへの分化の期間は、約2～5日であり、一実施形態において、この培地は、分化効率を増加させるために、T G F 阻害剤（すなわち、S B 4 3 1 5 4 2、A 8 3 - 0 1、またはA L K 5 阻害剤等）の存在または非存在下でB M P 4を含む、ステップと、

b . 少なくとも1つの増殖因子を、トロホブラストを含む培養物に添加して、無血清培地中で培養を継続するステップであって、この増殖因子は、トロホブラストを拡張させるのに十分な量であり、一実施形態において、この培地は、B M P 4を含む、ステップ（このステップは任意である）と、

c . トロホブラストを単離し、このトロホブラストをゼラチン、ラミニン、フィブロネクチン、ピトロネクチン、コラーゲンまたはマトリゲルでコーティングしたプレート上に再播種し、プレ T - M S C を通じてトロホブラストを T - M S C に分化するのに十分な量の血清含有または無血清培地中で培養するステップと、を含み、一実施形態において、単離されたトロホブラストは、T - M S C を生成するために、4～10日間培養して、得られた T - M S C のうちの少なくとも約90%、95%、96%、97%、98%、99%は、成体 M S C に対して細胞表面マーカーを発現し、一実施形態において、この培地は、拡張効率を増加させるために、L I F、b F G F、またはP D G Fを含む。

#### 【0022】

特定の実施形態において、h E S C 由来のトロホブラストは、T r o p - 2を発現するが、C D 7 3 を発現しない。

#### 【0023】

特定の実施形態において、プレ T - M S C は、T r o p - 2および/またはC D 7 3 を発現する。

#### 【0024】

特定の実施形態において、T - M S C は、C D 7 3 + C D 1 0 5 + C D 9 0 + を発現する。h E S C を高純度の M S C に分化することが、開示される本方法の目的である。好ましい実施形態において、90%、95%、96%、97%、98%、99%よりも高い純度を有する C D 7 3 + C D 1 0 5 + C D 9 0 + の T - M S C が、生成される。

#### 【0025】

高純度を有する多数の T - M S C は、高パーセンテージの M S C が成体 M S C に対する細胞表面マーカーを発現するという観察によって示される。これらの M S C は、他の方法によって得られた M S C よりもインビトロおよびインビボの両方でより高い免疫抑制効果を有する。この現在開示されている方法によって得られた M S C は、h E S - トロホブラスト由来の M S C と称され、より簡潔には、本明細書では、T - M S C と称される。

#### 【0026】

ある特定の実施形態において、血清含有培地は、ウシ胎仔血清またはヒト A B 血清、L - グルタミンを含有し、無血清培地は、ノックアウト血清代替物（K O S R）またはウシ血清アルブミン（B S A）を含有する。

#### 【0027】

ある特定の実施形態において、1 g y ~ 2 0 0 g y の範囲に及ぶガンマ放射線で得られた T - M S C を照射するさらなるステップがある。

#### 【0028】

本発明のさらなる実施形態において、T - M S C を発生させ、拡張させるための方法に

10

20

30

40

50

より、少なくとも10,000個のT-MSC、少なくとも50,000個のT-MSC、少なくとも100,000個のT-MSC、少なくとも500,000個のT-MSC、少なくとも $1 \times 10^6$ 個のT-MSC、少なくとも $5 \times 10^6$ 個のT-MSC、少なくとも $1 \times 10^7$ 個のT-MSC、少なくとも $5 \times 10^7$ 個のT-MSC、少なくとも $1 \times 10^8$ 個のT-MSC、少なくとも $5 \times 10^8$ 個のT-MSC、少なくとも $1 \times 10^9$ 個のT-MSC、少なくとも $5 \times 10^9$ 個のT-MSC、または少なくとも $1 \times 10^{10}$ 個のT-MSCを得る。これらの方法により、10,000~100億個のT-MSCを含み得る細胞溶液を得る。ある特定の実施形態において、得られたヒト胚間葉系幹細胞のうちの少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%が、1つ以上のhES-MSC分化マーカーを発現する。ある特定の実施形態において、マーカーは、CD73、CD90、およびCD105である。

10

#### 【0029】

一実施形態において、T-MSCは、EAEマウスの疾患スコアを著しく減じ、脱髄の減少、T細胞の浸潤、およびミクログリア応答が同時に起こる。さらに、T-MSCは、骨髄由来のMSC(BM-MSC)と比較して、インビボおよびインビトロでさらに強力な免疫抑制活性を有する。また、T-MSCとBM-MSCとの間で異なって発現する重要なタンパク質/分子も、本明細書に提供される。タンパク質/分子マーカーの発現レベルを測定することによって改善された免疫抑制活性を有するT-MSCを特定する方法が、本明細書に提供される。また、T-MSCの免疫抑制活性を改善するための遺伝的修飾の方法も開示される。

20

#### 【0030】

本発明のさらなる実施形態は、少なくとも10,000個のT-MSC、少なくとも50,000個のT-MSC、少なくとも100,000個のT-MSC、少なくとも500,000個のT-MSC、少なくとも $1 \times 10^6$ 個のT-MSC、少なくとも $5 \times 10^6$ 個のT-MSC、少なくとも $1 \times 10^7$ 個のT-MSC、少なくとも $5 \times 10^7$ 個のT-MSC、少なくとも $1 \times 10^8$ 個のT-MSC、少なくとも $5 \times 10^8$ 個のT-MSC、少なくとも $1 \times 10^9$ 個のT-MSC、少なくとも $5 \times 10^9$ 個のT-MSC、または少なくとも $1 \times 10^{10}$ 個のT-MSCを含むT-MSCを含む溶液である。

#### 【0031】

ある特定の実施形態において、培養体積は、少なくとも10,000個の細胞に対して2mlから、少なくとも100,000個の細胞に対して10ml、少なくとも1,000,000個の細胞に対して100ml、少なくとも10,000,000個の細胞に対して1000ml、 $5 \times 10^8$ 個の細胞に対して培地の4000mlまでである。

30

#### 【0032】

これらの溶液は、対象に注入することができる。これらの溶液は、冷凍することができる。これらの溶液は、T-MSCの投与によって治療することができる疾患のための医薬の製造のために使用することができる。

#### 【0033】

本発明はまた、患者への注入に好適なT-MSC溶液を製造するための方法も提供し、この方法は、前述の段落に記載される細胞の溶液を単離するステップと、細胞を患者への注入に好適な溶液に入れるステップとを含む。本方法はまた、冷凍するのに好適なT-MSC溶液を製造するための方法も提供し、この方法は、前述の段落に記載される細胞を単離するステップと、冷凍するのに好適な溶液に入れるステップとを含む。

40

#### 【0034】

本発明のさらに別の実施形態は、CD73、CD90、CD105、CD13、CD29、CD54、CD44、CD146、CD166、またはこれらの組み合わせを含む細胞マーカータンパク質のうちの1つ以上を発現するT-MSCである。さらなる実施形態において、ヒト胚間葉系幹細胞は、CD34、CD31、CD45、またはこれらの組み合わせを含む1つ以上の細胞マーカータンパク質を発現しないか、または低レベルで発現する。さらなる実施形態において、ヒト胚間葉系幹細胞は、MMP2、RAGE、IFN

50



R 1、I F N R 2、I L - 1 2、T N F 、I L - 6、V C A M 1、またはこれらの組み合わせを含む1つ以上のプロ炎症性タンパク質を発現しないか、または低レベルで発現する。ある特定の実施形態において、ヒト胚間葉系幹細胞は、骨髄由来のM S Cと比較して、上記のマーカーレベルの少なくとも半分を発現した。

【0035】

本発明のさらなる実施形態は、C D 7 3、C D 9 0、C D 1 0 5、C D 1 3、C D 2 9、C D 5 4、C D 1 4 4、C D 1 4 6、およびC D 4 4を含む細胞マーカータンパク質のうちの1つ以上を発現するT - M S Cを含む細胞培養物である。さらなる実施形態において、細胞培養物中のT - M S Cは、C D 3 4、C D 3 1、およびC D 4 5を含む1つ以上の細胞マーカータンパク質を発現しないか、または低レベルで発現する。さらなる実施形態において、細胞培養物中のT - M S Cは、M M P 2、R A G E、I F N R 1、I F N R 2、I L - 1 2、T N F 、I L - 6、およびV C A M 1を含む1つ以上のプロ炎症性タンパク質を発現しないか、または低レベルで発現する。

10

【0036】

ある特定の実施形態において、細胞培養物は、少なくとも $1 \times 10^6$ 個のT - M S C、少なくとも $1 \times 10^7$ 個のT - M S C、少なくとも $1 \times 10^8$ 個のT - M S C、少なくとも $1 \times 10^9$ 個のT - M S C、または少なくとも $1 \times 10^{10}$ 個のT - M S Cを含む。

【0037】

さらなる実施形態において、細胞培養物中のT - M S Cの少なくとも約90%が、C D 7 3タンパク質を発現し、T - M S Cの少なくとも90%超が、C D 7 3タンパク質を発現し、T - M S Cの少なくとも約95%が、C D 7 3タンパク質を発現するか、またはT - M S Cの95%超が、C D 7 3タンパク質を発現する。さらなる実施形態において、細胞培養物中のT - M S Cの少なくとも約96%が、C D 7 3タンパク質を発現し、T - M S Cの少なくとも97%超が、C D 7 3タンパク質を発現し、T - M S Cの少なくとも約98%が、C D 7 3タンパク質を発現するか、または、T - M S Cの99%超が、C D 7 3タンパク質を発現する。

20

【0038】

さらなる実施形態において、細胞培養物中のT - M S Cの少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、99%が、C D 9 0、C D 1 0 5、C D 4 4、およびC D 2 9からなる群から選択された少なくとも1つの細胞マーカータンパク質を発現する。

30

【0039】

さらなる実施形態において、細胞培養物中のT - M S Cの少なくとも約80%、85%、90%、95%、99%が、発現しないか、またはC D 3 4、C D 3 1、およびC D 4 5を含む低レベルの少なくとも1つの細胞マーカーを発現する。

【0040】

さらなる実施形態において、細胞培養物中のT - M S Cの少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、99%が、M M P 2、R A G E、I F N R 1、I F N R 2、I L - 1 2、T N F 、I L - 6、およびV C A M 1を含む少なくとも1つのプロ炎症性タンパク質を発現しないか、または低レベルで発現する。ある特定の実施形態において、T - M S Cは、高レベルのC D 2 4、T G F 2、またはその両方を発現する。

40

【0041】

本明細書に記載のT - M S Cまたは細胞培養物のある特定の実施形態において、細胞は、ガンマ放射線を使用して照射される。

【0042】

本発明のさらなる実施形態は、本明細書に記載のT - M S Cまたは細胞培養物のうちのいずれか1つおよび薬学的に許容される担体を含む薬学的調製物である。

【0043】

本発明のなおさらなる実施形態は、本明細書に記載のT - M S Cまたは細胞培養物のうちのいずれか1つを含む冷凍保存された調製物である。

【0044】

50

T細胞関連自己免疫疾患の治療または予防を必要とする対象に、それを治療または予防する方法が、本明細書に提供され、本方法は、治療有効量の前述の段落に記載されるT-MSCを含む溶液、細胞培養物、または薬学的調製物を、それを必要とする対象に投与するステップを含む。T細胞関連自己免疫疾患としては、クローン病、炎症性腸疾患、移植片対宿主疾患、全身性紅斑性狼瘡、およびリウマチ性関節炎、T細胞媒介性遅延型過敏症（IV型過敏症）、すなわち、1型糖尿病、MS、RA、橋本甲状腺炎、クローン病、接触性皮膚炎、強皮症が挙げられるが、これらに限定されない。

【0045】

ある特定の実施形態において、対象は、好ましくは、哺乳動物または鳥類であり、最も好ましくは、ヒトである。ある特定の実施形態において、溶液、細胞培養物、または薬学的調製物は、照射されたまたは照射されていないT-MSCを含む。

10

【0046】

ある特定の実施形態において、疾患を治療または予防するための方法は、疾患の治療または予防のための1つ以上の治療剤を用いた併用療法を含む。

【0047】

他のある特定の実施形態において、本発明は、多発性硬化症の治療または予防を必要とする対象に、それを治療または予防するための方法を提供し、本方法は、治療有効量の前述の段落に記載されるT-MSCを含む溶液、細胞培養物、または薬学的調製物を、それを必要とする対象に投与するステップを含む。多発性硬化症は、再発/寛解型多発性硬化症、進行/再発型多発性硬化症、一次多発性硬化症、または二次多発性硬化症であり得る。対象は、好ましくは、哺乳動物、最も好ましくはヒトである。溶液、細胞培養物、または薬学的調製物は、照射されたまたは照射されていないT-MSCを含み得る。

20

【0048】

本方法は、フィンゴリモド、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、メチルプレドニゾン、デキサメタゾン、IFN-1a、IFN-1b、グリアトリアマーアセテート、シクロホスファミド、メトトレキサート、アザチオプリン、クラドリピン、シクロスポリン、ミトキサントロン、およびスルファサラジンが含まれるが、これらに限定されない、対象へのさらなる治療剤の投与をさらに含むことができる。さらに別の実施形態において、これらの治療剤のうちの1つ以上が、中枢神経系への治療剤の送達のために、血液脳および/または血液脊髄関門を横断するために、T-MSCに結合し得る。

30

【0049】

血液脳関門および/または血液脊髄関門を通して薬剤を送達する方法が、本明細書に提供され、本方法は、T-MSCに本薬剤を結合またはコンジュゲートして、複合体を形成するステップと、ヒト胚間葉系幹細胞-薬剤の複合体を、それを必要とする対象に投与するステップとを含み、T-MSCが血液脳関門および/または前記血液脊髄関門を横断することができ、この薬剤は、疾患または損傷の治療、予防、または診断を必要とする対象において、治療、予防、または診断のためのものである。T-MSCは、単一細胞、細胞培養物、溶液、または薬学的調製物の形態であり得る。薬剤には、薬物、タンパク質、DNA、RNA、および小分子が含まれるが、これらに限定されない。

【0050】

さらなる実施形態は、血液脳関門および/または血液脊髄関門を横断するための、T-MSC、およびコンジュゲート剤または接着剤を含む送達系である。

40

【0051】

本明細書に記載の方法は、多くの利点を有する。トロホブラストの中間段階によってhESCを分化することが開示される方法の目的であり、この方法は、すべての既存の方法とは異なり、以下の利点をもたらす。

【0052】

自己免疫疾患を治療するための臨床グレードのT-MSCを選択する方法が本明細書に提供され、T-MSCは、(i)群1マーカーを発現する細胞を95%超含有する、(ii)群2マーカーを発現する細胞を80%超含有する、(iii)群3マーカーを発現す

50

る細胞を5%未満含有する、(iv) IL-10およびTGFを発現する、(v) IL-6、IL-12、およびTNFを発現する細胞を2%未満含有する、ならびに(vi)すべての群4マーカーを共発現する細胞を0.001%未満含有する、特性を有し、群1マーカーは、CD73、CD90、CD105、CD146、CD166、およびCD44であり、群2マーカーは、CD13、CD29、CD54、CD49Eであり、群3マーカーは、CD45、CD34、CD31、およびSSEA4であり、群4マーカーは、OCT4、NANOG、TRA-1-60、およびSSEA4である。

#### 【0053】

T-MSCを修飾して、(i)群1マーカーを発現する細胞を95%超含有する、(ii)群2マーカーを発現する細胞を80%超含有する、(iii)群3マーカーを発現する細胞を5%未満含有する、(iv) IL-10およびTGFを発現する、(v) IL-6、IL-12、およびTNFを発現する細胞を2%未満含有する、ならびに(vi)すべての群4マーカーを共発現する細胞を0.001%未満含有する、特性を有する修飾されたMSCの集団を生成する方法が、本明細書に提供され、群1マーカーは、CD73、CD90、CD105、CD146、CD166、およびCD44であり、群2マーカーは、CD13、CD29、CD54、CD49Eであり、群3マーカーは、CD45、CD34、CD31、およびSSEA4であり、群4マーカーは、OCT4、NANOG、TRA-1-60、およびSSEA4である。

#### 【0054】

記載されるT-MSCから分泌される1つ以上の生体分子を含む、馴化培地、馴化培地の濃縮物、細胞溶解物、またはその他の誘導体が本明細書に提供される。

#### 【0055】

骨髓造血幹細胞の拡張および臍帯造血幹細胞の拡張のための支持細胞として、本明細書に記載されるT-MSCを使用する方法が、本明細書に提供される。ある特定の実施形態において、開示される方法に適したT-MSCは、Stro3を発現する。ある特定の実施形態において、T-MSCは、骨髓造血幹細胞および/または臍帯造血幹細胞と共培養される。ある特定の実施形態において、T-MSCは、間葉系間質細胞である。本明細書に記載されるT-MSCと骨髓造血幹細胞との共培養が、本明細書に提供される。本明細書に記載されるT-MSCと臍帯造血幹細胞との共培養が、本明細書に提供される。

#### 【0056】

また、本明細書に記載されるT-MSCを含むキットも開示される。ある特定の実施形態において、このキットは、T-MSCおよび細胞送達担体を含む。

#### 【0057】

一態様において、免疫応答を抑制または低下させる方法が、本明細書に提供され、本方法は、免疫応答を検出可能に抑制するのにT-MSCには十分な時間、複数の免疫細胞を複数のT-MSCと接触させることを含み、T-MSCは、混合リンパ球反応(MLR)アッセイにおいて、T細胞の増殖および/または分化を検出可能に抑制する。別の特定の実施形態において、この接触は、インビトロで行われる。別の特定の実施形態において、この接触は、インビボで行われる。さらに特定の実施形態において、インビボでの接触は、哺乳動物の対象、例えば、ヒト対象において行われる。別のさらに特定の実施形態において、この接触は、T-MSCを静脈内で、筋肉注射で、または対象における臓器(例えば、脾臓)に投与することを含む。

#### 【0058】

免疫応答を調節する(例えば、抑制する)ためのそれらの能力に基づいて選択されたT-MSCを含む細胞集団を生成する方法が、本明細書に提供される。一実施形態において、例えば、本発明は、T-MSC集団を選択する方法を提供し、本方法は、(a)混合リンパ球反応(MLR)アッセイにおいて複数のT-MSCをアッセイすることと、(b)複数のT-MSCがMLR(混合リンパ球反応)においてCD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>のT細胞増殖を検出可能に抑制する場合、複数のT-MSCを選択することと、を含み、T-MSCは、CD73、CD90、CD105、CD13、CD29、CD54、CD44を

10

20

30

40

50

発現する。一実施形態において、T - MSCは、CD34、CD31、およびCD45を発現しないか、または低レベルで発現する。一実施形態において、T - MSCは、MMP2、RAGE、IFNGR2、IL-12A、IL-6、およびVCAM1を発現しないか、または低レベルで発現する。

#### 【0059】

T - MSCを、脂肪細胞、筋芽細胞、神経系列細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、軟骨細胞、および間質細胞が含まれるが、これらに限定されない、複数の他の細胞系列に分化するための方法が、本明細書に提供される。

#### 【0060】

組織再生および/または組織修復のために、T - MSCおよびその分化した細胞生成物を使用するための方法が本明細書に提供され、本方法は、関節の再生、腱再生、結合組織の再生、神経系列細胞の再生、脂肪組織の再生、骨の再生、皮膚の再生、筋肉の再生、軟骨の再生、平滑筋の再生、心筋の再生、上皮組織の再生、靭帯の再生等が含まれるが、これらに限定されない、組織再生を促進するのに十分な量のT - MSCおよび/またはT - MSC由来の他の細胞系列を投与することを含む。

#### 【0061】

特定の実施形態において、T細胞およびT - MSCは、例えば、約20:1、15:1、10:1、5:1、2:2、1:1、1:2、1:5、1:10、または1:20、好ましくは10:1の比率でMLR中に存在する。

#### 【0062】

高収率のプロセスによって多数のMSCを効率よく生成することは、開示される方法のさらなる目的である。開示される方法は、開始時のhESCの数と比較して、約10倍多い数のMSCを生成することができる。hESCがトロホプラスト段階を通じて分化する場合、細胞消失がほとんどないのに対して、他の方法は、通常、初期分化ステップ中、90%超の開始時の細胞消失を有し、本明細書に開示される方法よりもはるかに低い細胞収率を得た。

#### 【0063】

比較的短時間でMSCを生成することができる方法を提供することが、開示される方法の目的である。本明細書に開示される全プロセスは、6~14日以内に完了させることができ、これは、開始時のhESC株に応じて異なる。

#### 【0064】

低費用である方法を提供することが、開示される方法の目的である。本明細書に記載される分化方法のみが、非常に少量の培養培地を必要とし、本方法のみが、1つのサイトカイン - BMP4を必要とし、これは低用量で開示される方法において使用される。

#### 【0065】

低費用である方法を提供することが、開示される方法の目的である。本明細書に記載される分化方法のみが、非常に少量の培養培地を必要とし、本方法のみが、1つのサイトカイン - BMP4および/またはTGF 阻害剤(すなわち、SB431542、A83-01、またはALK5阻害剤等)を必要とする。

#### 【0066】

高収率である方法を提供することが、開示される方法の目的である。本明細書に記載される分化方法は、30日以内に $1 \times 10^5$ 個のhESCから $1 \sim 5 \times 10^{10}$ 個のT - MSC細胞を生成することができるのに対して、他の方法は、30日以内に最大 $1 \times 10^8$ 個のMSC細胞しか生成することができない。

#### 【0067】

免疫抑制の高い有効性を有するMSCを提供することが、開示される方法のさらなる目的である。T - MSCは、骨髄(BM)または他の源由来のMSCよりも高い免疫抑制効果を有し、T - MSCは、他の方法によるhESC由来のMSCよりも高い免疫抑制効果を有する。

#### 【0068】

10

20

30

40

50

特定の実施形態において、T - M S C は、T - M S C の非存在下で、M L R における T 細胞の増殖と比較して、M L R における C D 4 <sup>+</sup> または C D 8 <sup>+</sup> の T 細胞の増殖を少なくとも 5 0 %、7 0 %、9 0 %、または 9 5 % 抑制する。

#### 【 0 0 6 9 】

別の特定の実施形態において、前述の組成物のうちのいずれも、マトリックスを含む。さらに特定の実施形態において、マトリックスは、三次元足場である。別のさらに特定の実施形態において、マトリックスは、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、フィブロネクチン、ペクチン、オルニチン、またはピトロネクチンを含む。別のさらに特定の実施形態において、マトリックスは、生体材料である。別のさらに特定の実施形態において、マトリックスは、細胞外タンパク質を含む。別のさらに特定の実施形態において、マトリックスは、合成化合物を含む。別のさらに特定の実施形態において、マトリックスは、生物活性化化合物を含む。別のさらに特定の実施形態において、生物活性化化合物は、成長因子、サイトカイン、抗体、または 5 , 0 0 0 ダルトン未満の有機分子である。

#### 【 0 0 7 0 】

本発明は、凍結保存した幹細胞集団、例えば、T - M S C を含む細胞集団をさらに提供し、細胞集団は、免疫調節され、このことは、本明細書に記載される。例えば、本発明は、混合リンパ球反応 ( M L R ) アッセイにおいて、T 細胞の増殖および / または分化を検出可能に抑制するものとして特定される T - M S C 集団を提供し、これらの細胞は凍結保存され、この集団を容器内に入れる。

#### 【 0 0 7 1 】

前述の凍結保存された集団のうちのいずれかの特定の実施形態において、この容器は、袋である。様々な特定の実施形態において、この集団は、ほぼ、少なくとも、または多くても  $1 \times 10^6$  個の幹細胞、 $5 \times 10^6$  個の幹細胞、 $1 \times 10^7$  個の幹細胞、 $5 \times 10^7$  個の幹細胞、 $1 \times 10^8$  個の幹細胞、 $5 \times 10^8$  個の幹細胞、 $1 \times 10^9$  個の幹細胞、 $5 \times 10^9$  個の幹細胞、または  $1 \times 10^{10}$  個の幹細胞を含む。前述の凍結保存された集団のうちのいずれかの他の特定の実施形態において、幹細胞は、ほぼ、少なくとも、または 5 回以下、1 0 回以下、1 5 回以下、または 2 0 回以下継代培養した。前述の凍結保存された集団のうちのいずれかの別の特定の実施形態において、幹細胞は、容器内で拡張する。

#### 【 図面の簡単な説明 】

#### 【 0 0 7 2 】

【 図 1 】 ( A ) トロホブラストおよびプレ T - M S C の段階によって h E S C の T - M S C への分化のためのプロトコルのフローチャート。それぞれの分化段階と関連する重要なバイオマーカーを示す。( B ) M S C 収率および品質について様々な M S C を発生するプロトコルの比較: h E S C を 3 つのプロトコルに分化した。1 ) T - M S C : トロホブラストの分化培地中で 3 日間、続いて、M S C 成長培地中で 8 ~ 1 0 日間。2 ) S B - M S C : S B 4 3 1 5 4 2 で補充した分化培地中で 3 ~ 1 0 日間、続いて、M S C 成長培地中で 1 2 日間。3 ) H B - M S C : h E S C を、血管芽細胞の中間段階によって M S C に分化し、h E S C を無血清培地中で 1 0 ~ 1 3 日間血管芽細胞に分化し、続いて、M S C 成長培地中で 1 2 日間分化した。1 0 日目、2 0 日目、および 3 0 日目の異なる培養物中の M S C 総数 ( 何百万個の細胞 )、続いて、分化手順の開始を示す。M S C 純度は、C D 7 3 + 細胞比率の F A C S 分析によって決定された。

【 図 2 】 T - M S C に分化するプロセス中における h E S C の培養物中の様々な時点で、形態変化を観察した。( A ) 2 日目: トロホブラスト、( B ) 5 日目: プレ M S C ( 中胚葉細胞 )、および ( C ) 9 日目: M S C。

【 図 3 】 h E S C の T - M S C への分化時の様々な時点でのトロホブラストマーカー T r o p - 2 ( T r p - 2 ) および M S C マーカー C D 7 3 を発現する細胞の比率の分析。( A ) 2 日目: トロホブラスト、( B ) 5 日目: プレ M S C ( 中胚葉細胞 )、および ( C ) 9 日目: M S C。

【 図 4 】 分化から 1 1 日後の T - M S C の表面マーカー発現プロファイル。( A ) T r p

10

20

30

40

50

2 は、トロホブラストに対するマーカーであり、(B)CD31 は、内皮細胞に対するマーカーであり、(C)CD34 は、造血幹細胞に対するマーカーである。(D~H)CD73、CD90、CD105、CD44、CD29 は、MSC に対するマーカーである。

【図5】T-MSC のインビトロでの免疫抑制機能。BM-MSC (G~L) または T-MSC (M~R) を、10:1 の比率で、CFSE 標識マウスリンパ球と混合した。細胞を、1 µg/ml の抗 CD28 抗体と一緒に、0.3 または 1 µg/ml の抗 CD3 抗体で刺激した。細胞増殖を、FACS 分析による CFSE 希釈によって示した。(A~F) BM-MSC を含まずに培養された T 細胞または T-MSC (標識対照) を示す。

【図6】T-MSC は、EAE マウスモデルの疾患スコアを減じる：EAE を、MOG35-55 + アジュバントおよび百日咳毒素を用いて、C57BL/6 マウスに誘発した。T-MSC、BM-MSC、または SB431542 方法を用いて hESC から得られ MSC (hES-MSC (SB)) を、EAE 誘発から 6 日後、マウスの腹膜内に注入した。疾患スコア (疾患なし 0 から重篤な疾患である 4 まで) を、MSC 注入から 27 日間記録した。

【図7】(A) 骨細胞、(B) 軟骨細胞、および (C) 脂肪細胞に分化するための T-MSC の多能性の決定。

【図8】hES-HB-MSC (hES 血管芽細胞 (hemagiolast) 由来の MSC) と T-MSC (hES トロホブラスト由来の MSC) および BM-MSC (成体骨髄由来の MSC) を比較するための遺伝子発現分析。遺伝子発現を、正規化し、任意の発現単位として示す。

【発明を実施するための形態】

【0073】

#### 5.1 定義

本明細書で使用される用語は、通常、本発明の文脈内およびそれぞれの用語が使用される特定の文脈内で、当該技術分野におけるその通常の意味を有する。ある特定の用語は、本発明の方法およびそれらの使用方法を説明する際に実施者にさらなるガイダンスを提供するために、以下または本明細書中の別の場所で議論される。さらに、同じものが、1つを超える方法で述べられ得ることが認識されるであろう。それ故に、代替の言語および同義語は、本明細書で議論される用語のうちの任意の1つ以上のために使用され得るか、または用語が本明細書で詳述または議論されるかに関わらず、その中に置かれる特別な意味はない。ある特定の用語に関する同義語が提供される。1つ以上の同義語の詳述は、他の同義語の使用を除外しない。本明細書で議論される任意の用語の例を含む本明細書中のあらゆる場所にある例の使用は、説明のみのものであり、本発明のまたは任意の例示の用語の範囲および意味を全く制限しない。同様に、本発明は、その好ましい実施形態に制限されない。

【0074】

hESC という用語は、胚、内細胞塊、割球、または細胞株から生成された多能性幹細胞を包含するヒト胚性幹細胞を意味する。

【0075】

本明細書で使用される「hES-MSC」または hES-MSC または「ヒト胚性間葉系幹細胞」または間葉系幹細胞由来のヒト胚性幹細胞 または「hES-MSC 集団」という用語は、任意の方法を使用するヒト胚性幹細胞由来または誘導多能性幹細胞 (iPSC) 由来の、間葉系様幹細胞、間葉系様間質細胞、間葉系幹細胞、または間葉系間質細胞を意味する。本明細書で使用される hES-MSC は、hES-MSC の個々の細胞、細胞株、バッチ、ロット、または集団を含む。

【0076】

「T-MSC」という用語は、細胞がトロホブラスト様形態を有する Trop-2 を発現するトロホブラストの中間段階を通じてヒト胚性幹細胞 (hESC) または誘導多能性幹細胞 (iPSC) に由来する MSC または間葉系幹/間質細胞を指す。「hES-T-MSC」という用語は、hESC から分化した T-MSC を指す。「iPS-T-MSC

10

20

30

40

50

」および「i T - M S C」という用語は、i P S Cから分化したT - M S Cを指す。本明細書に使用される「T - M S C」という用語は、トロホプラストを指さない。細胞が幹細胞の少なくとも1つの属性、例えば、少なくとも1つの他の細胞型等に分化する能力を保持する場合、細胞は、「幹細胞」と考えられる。これらの細胞は、1つ以上のマーカーの発現または発現の欠如が含まれるが、これらに限定されない、多くの構造的および機能的特性に基づいて記載することができる。h E S - T - M S Cおよびi T - M S Cの両方を含むT - M S Cは、多能性であり、他の細胞型および細胞系統を生じさせるために分化することができる。

【0077】

「h E S - H B - M S C」とおよび「H B - M S C」という用語は、血管芽細胞または血管コロニーを形成する中間ステップによるh E S Cおよびi P S Cを含むヒト多能性幹細胞に由来する間葉系幹細胞である。

10

【0078】

本明細書で使用する「臨床グレードT - M S C」という用語は、ヒト、鳥類、または他の哺乳動物のための臨床用途での使用に適している特性を含むT - M S Cを意味する。本明細書で使用する臨床グレードT - M S Cは、M S Cの個々の細胞、細胞株、バッチ、ロット、または集団を含む。

【0079】

本明細書で使用する「T - M S C集団」という用語は、治療での使用に適している特性を有する細胞および治療での使用に適している特性を有さない細胞を含むT - M S C細胞の集団を意味する。

20

【0080】

本明細書で使用する「T - M S C由来の系統」またはT - M S C - D Lという用語は、脂肪細胞、筋芽細胞、神経系列細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、軟骨細胞、および間質細胞が含まれるが、これらに限定されない、T - M S Cから分化された細胞または細胞系統を意味する。

【0081】

本明細書で使用する「治療有効量」という語句は、対象において臨床的に有意な状態の改善をもたらす、または疾患に関連する1つ以上の症状を遅延するもしくは最小限に抑えるもしくは緩和する、または対象において生理機能の所望の有利な変化を生じるのに十分な量を意味するものである。

30

【0082】

「治療する」、「治療」のような用語は、疾患の症状のうちの少なくとも1つを遅延させる、緩和する、寛解させる、もしくは軽減する、またはその発症後の疾患を逆転させるための手段を指す。

【0083】

「予防する」、「予防」のような語句は、疾患が発症するのを予防する、または疾患の程度を最小限に抑える、または発症の経過を遅延するために、明らかな疾患の発症前の行為を指す。

【0084】

40

本明細書で使用される「対象」という用語は、鳥類および哺乳動物等の免疫系を有する動物を意味する。哺乳動物には、イヌ、ネコ、齧歯動物、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、および霊長類が含まれる。鳥類には、家禽、鳴禽、および猛禽が含まれるが、これらに限定されない。したがって、本発明は、獣医学において、例えば、ペット動物、家畜、動物園の実験動物、および野生動物を治療するために使用することができる。本発明は、ヒト医学適用のために特に望ましい。

【0085】

「それを必要とする」という用語は、多発性硬化症および他のT細胞関連自己免疫疾患、または中枢神経系もしくは血液脳関門もしくは血液脊髄関門に関連する疾患が含まれるが、これらに限定されない疾患に罹患している、またはその疾患に発症する危険性がある

50

ことが知られているまたはその疑いがある対象であり得る。

【0086】

治療を必要とする対象は、疾患に既に発症しているものであり得る。予防を必要とする対象は、疾患の危険因子を有するものであり得る。

【0087】

本明細書で使用される「薬剤」は、効果をもたらす、または効果をもたらすことができる物質を意味し、化学物質、医薬品、薬物、生物製剤、小分子、抗体、核酸、ペプチド、およびタンパク質が含まれるが、これらに限定されない。

【0088】

本明細書で使用される幹細胞は、そのマーカーが検出可能である場合、特定のマーカーに対して「陽性」である。例えば、T-MSCは、例えば、CD73が（例えば、アイソタイプ対照と比較して）バックグラウンドよりも検出可能に多い量のT-MSCにおいて検出可能であるため、CD73に対して陽性である。また、そのマーカーが、その細胞と少なくとも1つの他の細胞型を区別するために使用することができる場合、または、存在するもしくは細胞によって発現する場合に、その細胞を選択または単離するために使用することができる場合に、細胞はマーカーに対して陽性である。

10

【0089】

本明細書で使用される「免疫調節」および「免疫調節の」とは、免疫応答の検出可能な変化を生じること、またはそれを生じる能力を有すること、および免疫応答の検出可能な変化を生じる能力を意味する。

20

【0090】

本明細書で使用される「免疫抑制」および「免疫抑制の」とは、免疫応答の検出可能な減少を生じること、またはそれを生じる能力を有すること、および免疫応答の検出可能な抑制を生じる能力を意味する。

【0091】

本発明は、間葉系幹細胞MSCがhESC由来のトロホブラストから分化することができる、トロホブラスト由来のMSC（T-MSC）が組織修復および免疫調節のために使用することができるという最初の発見に基づいている。開示された方法から生成されたこれらのT-MSCはすべて、T細胞増殖および分化をインビトロで著しく阻害し、疾患スコアをインビボで減じたのに対して、骨髄由来のMSC（BM-MSC）がT細胞増殖および分化をインビトロで部分的に減少し得るが、BM-MSCは、インビボで全く効果がなかった。本明細書に開示されるT-MSCは、BM-MSCと比較して、驚くほどに高い免疫抑制活性を有する。本明細書に開示される方法は、高効率であり、低価格かつ高純度である多くのT-MSCを生成することができる。本明細書に開示される方法は、バッチからバッチの変動がほとんどなく、高度に再現可能であり、臨床的必要性を満たすように容易に調節可能である。

30

【0092】

したがって、本発明は、ヒト胚性幹細胞からインビトロで間葉系幹細胞（MSC）を生成する方法を提供することによって上記の問題を克服する。本明細書に開示される方法によってhES-T-MSCを生成する能力は、多発性硬化症および他の自己免疫疾患の治療および予防を含む、様々な治療的適応に使用することができる細胞の生成を可能にする。さらに、本明細書に記載される方法によって生成されるhES-MSCは、血液脳関門（BBB）および血液脊髄関門（BSCB）を横断する能力を有し、薬物送達を含む様々な治療的適用にそれらを使用することが可能である。本発明の方法は、工業規模で実施することができる多数のhES-T-MSCの生成を可能にするという点においてさらなる実用性を提供する。

40

【0093】

5.2 T-MSCを得るためのトロホブラストによる胚性幹細胞の分化

胚性幹細胞（hES）由来のトロホブラストから間葉系様幹細胞（MSC）を発生させ、拡張させるための方法が、本明細書に開示される。これらの得られた細胞は、T-MSC

50



Cと表記される。これらのT-MSCは、単離および/または精製され得る。

【0094】

MSC様細胞は、様々な方法(Barbieri et al. (2005)、Olivier et al. (2006)、Sanchez et al. (2011)、Brown et al. (2009))によってヒト胚性幹細胞から得られている。しかしながら、これらの方法のすべては、収率および純度を制限し、様々な質の細胞をもたらす共培養および手選別する手順を含む。

【0095】

hESCは低レベルのMHC抗原を発現するが、hESCから分化した多くの細胞型が、これらの抗原(Draper et al., 2002、Drukker et al., 2006、Drukker et al., 2002)の発現を増加させ、そのため、患者に移植される場合、分化した細胞の免疫拒否反応に対して大きな懸念を生じることが見出されている。対照的に、MSCは、低レベルの共刺激分子および主要なMHC抗原を発現し、自己免疫疾患(Gordon et al., 2008b、Grinnemo et al., 2004、Rafei et al., 2009a、Rafei et al., 2009b、Tse et al., 2003)を治療するための同種または異種移植モデルにおいて使用されている。成体組織由来のMSCのように、T-MSCは、低レベルの共刺激分子およびMHC抗原を発現し、免疫抑制効果を発揮するための長期生着を必要とせず、そのため、MSCとレシピエントとの間にMHC抗原の不一致による免疫拒否反応に対する懸念がない。ある特定のhESC株が、大規模、かつ絶え間のない供給であり、品質管理が容易な、MSおよび他のT細胞に基づいた自己免疫疾患に罹患している患者を治療するための潜在的療法として産業生産に好適であるT-MSCを発生させるのに十分である。

【0096】

ヒトトロホプラストは、ヒト胚性幹細胞から発生させることができる。このような胚性幹細胞は、受精、体細胞核移植(SCNT)、単性生殖、雄性発生、または他の生殖または無性生殖手段による生成とは関係なく、例えば、胚盤胞、播種したICM、1つ以上の割球、または着床前段階の胚または胚様構造の他の部分から、またはこれらを使用して誘導される胚性幹細胞を含む。

【0097】

追加的または代替的に、トロホプラストは、他の胚由来の細胞から発生させることができる。例えば、トロホプラストは、受精、体細胞核移植(SCNT)、単性生殖、雄性発生、または他の生殖または無性生殖手段による生成とは関係なく、(必ずしも胚性幹細胞の派生ステップを経る必要はなく)播種した胚、ICM、胚盤胞、1つ以上の割球、トロホプラスト幹細胞、胚細胞、または着床前段階の胚または胚様構造の他の部分から、またはこれらを使用して生成させることができる。同様に、トロホプラストは、胚由来の細胞から部分的に分化された細胞または細胞株を使用して発生させることができる。例えば、ヒト胚性幹細胞株を使用して、発育可能性および可塑性に関して、トロホプラストよりもより発生的に原始的である細胞を生成し、このような胚性幹細胞を使用して、トロホプラストを発生させ得る。

【0098】

追加的または代替的に、トロホプラストは、臍帯、臍帯血、羊水、羊水幹細胞、および胎盤が含まれるが、これらに限定されない、他の出生前または周生期の源から発生させることができる。

【0099】

ヒト胚性幹細胞は、この方法の出発材料であり得る。胚性幹細胞は、例えば、支持細胞の存在または非存在下で、当該技術分野で知られているいずれかの方法で培養され得る。

【0100】

本明細書に記述される実施例において、H9(WiCell Research Instituteから得られる)(Thomson et al. (1998)、CT2(

10

20

30

40

50

University of Connecticut Stem Cell Core から得られる (Lin et al. (2010))、ならびに ES03-Envy (Envy、GFP 標識株、ES International から得られる) (Costa et al. (2005))、ESI-017、ESI-053、ESI-049、ESI-035、および ESI-051 の 8 つの hESC 細胞株が使用された。

#### 【0101】

T-MSC を得るためのこの方法の第一のステップにおいて、ヒト胚性幹細胞は、bFGF を含まない無血清培地中で小集団または単一細胞中で増殖される。次いで、細胞を再播種し、唯一のサイトカインとして BMP4 (1 ~ 200 ng/ml) で短時間 (2 ~ 5 日間) 培養して、それらが典型的なトロホブラストマーカー Trop2 / TACSTD2 (Trop2) を発現する場合、高度に均質なトロホブラスト集団を得る。TGF 阻害剤 (SB431542 (1 ~ 20 μM)、A83-01 (0.2 ~ 5 μM) または ALK5 阻害剤 (1 ~ 20 μM)、等) は、トロホブラストを形成する効率を増加させるために使用することができる。細胞は、2 ~ 5 日間で拡張し、トロホブラスト様形態を有するトロホブラスト細胞に分化し、ある特定の実施形態において、90% 超の細胞が Trop-2 / TACSTD2 (Trop-2) を発現する (Xuet al., 2002)。トロホブラストは、サイズによって単離され得るか、または例えば、免疫親和性カラムクロマトグラフィーによって抗体により精製され得る。

#### 【0102】

一実施形態において、トロホブラスト細胞を消化して、TrypLE、トリプシン、またはコラゲナーゼ B を用いて単一細胞を形成する。単一細胞を、2 ~ 20% のウシ胎仔血清 (FBS) もしくはヒト AB 血清 (ABHS) を含有するアルファ-MEM、2 ~ 20% の FBS もしくは ABHS を含有する DMEM 高グルコース等の間葉系幹細胞の増殖のために最適化された培地中で再懸濁し、FBS を、5 ~ 20% のノックアウト血清代替物 (KOSR) もしくはウシ血清アルブミン (BSA)、または任意の他の市販の無血清 MSC 培養培地と置き換えることができる。ある特定の実施形態において、血清、KOSR、または BSA は、約 5 ~ 20% の濃度で添加される。ある特定の実施形態において、ウシ胎仔血清が好ましい。ある特定の実施形態において、細胞は、約 10 ~ 1000 個の細胞/cm<sup>2</sup> の密度で培養される。ある特定の実施形態において、細胞は、ゼラチン、ビトロネクチン、ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲン I 等の組織の細胞外環境を模倣する環境中で培養される。ある特定の実施形態において、MSC 培養培地は、拡張効率を増加させるために、LIF (2 ~ 20 ng/ml)、bFGF (2 ~ 100 ng/ml)、または PDGF (1 ~ 50 ng/ml) を含む。

#### 【0103】

約 24 時間後、多くの細胞 (50 ~ 90%) を培養プレートに接着させ、約 2 ~ 3 日後、プレ T-MSC は、トロホブラストから分化し始め、細胞は、伸張し、透明な細胞の境界を形成した。ある特定の実施形態において、プレ T-MSC は、CD73 および Trop-2 の両方を発現する。6 ~ 10 日後、80 ~ 90% 超の細胞トロホブラストが、スピンドル様形態を有する間葉系様小細胞、ここでは、いわゆる、T-MSC に分化される。T-MSC はまた、ある特定のマーカー、例えば、CD73、CD90、CD105、CD13、CD29、CD54、CD44、CD146、および CD166 等の発現によって、ならびにある特定のマーカー、例えば、CD31、CD34、および CD45 等の非存在または低発現によって特定することもできる。ある特定の実施形態において、T-MSC は、HOX および HLA-G を発現しない。ある特定の実施形態において、T-MSC は、高レベルの CXCR7、CXCL2、CXCL12 を発現するが、低レベルの HOXB2、HOXB3、HOXB5、HOXB7、HOXB9、HOXA5、HOXA9、および他の HOX ファミリー遺伝子を発現する。T-MSC はまた、多能性であると特徴付けられ、脂肪細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、ニューロン、筋芽細胞、間質細胞、および線維芽細胞に分化することができる。

#### 【0104】

CD73、CD90、およびCD105のマーカーのうちの少なくとも1つを発現する複数の免疫抑制T-MSCを含む単離された細胞集団が、本明細書に提供される。

【0105】

本発明のさらなる実施形態において、T-MSCを照射するさらなるステップが行われる。この照射は、例えば、セシウム137ガンマ線照射、またはX線を用いた光子放射を含むが、これらに限定されない放射線を発する当該技術分野で知られている任意の方法の使用により達成され得る。投与されるべき好ましい量の放射線は、約5~20000 Gy、より好ましくは、約50~100 Gy、最も好ましくは80 Gyである。

【0106】

一実施形態において、本明細書に記載される方法は、hESCからT-MSCを得る（本明細書では、生成すると称する）ための新規のプロセスである。本方法は、

a. 少なくとも1つの増殖因子の存在下でトロホブラストに分化させるために胚性幹細胞の分化を誘導するのに十分な量の無血清培地中でヒト胚性幹細胞を含む細胞培養物を培養するステップであって、一実施形態において、トロホブラストへの分化の期間は、約2~5日であり、一実施形態において、この培地は、分化効率を増加させるために、TGF阻害剤（すなわち、SB431542、A83-01、またはALK5阻害剤等）の存在または非存在下でBMP4を含む、ステップと、

b. 少なくとも1つの増殖因子を、トロホブラストを含む培養物に添加して、無血清培地中で培養を継続するステップであって、この増殖因子は、トロホブラストを拡張するのに十分な量であり、一実施形態において、この培地は、BMP4を含む、ステップ（このステップは任意である）と、

c. トロホブラストを単離し、このトロホブラストをゼラチン、ラミニン、フィブロネクチン、ピトロネクチン、コラーゲンまたはマトリゲルでコーティングしたプレート上に再播種し、プレT-MSCを通じてトロホブラストをT-MSCに分化するのに十分な量の血清含有または無血清培地中で培養するステップと、を含み、一実施形態において、単離されたトロホブラストは、T-MSCを生成するために、6~10日間培養して、得られたT-MSCのうちの少なくとも約90%、95%、96%、97%、98%、99%が、成体MSCに対して細胞表面マーカーを発現し、一実施形態において、この培地は、拡張効率を増加させるために、LIF、bFGF、またはPDGFを含み、得られたT-MSCのうちの少なくとも約90%、95%、96%、97%、98%、99%が、成体MSCに対して細胞表面マーカーを発現する。

【0107】

図1および2に示されるように、開示される方法は、小集団または単一細胞へのhESCコロニーの分散から開始する。次いで、細胞を再播種し、唯一のサイトカインとしてBMP4およびTGF阻害剤で短時間（2~5日間）培養して、それらが典型的なトロホブラストマーカーTrop2/TACSTD2（Trp2）を発現する場合、高度に均質なトロホブラスト集団を得る（Xu et al., 2002）。次いで、トロホブラストを解離させ、ゼラチン、ラミニン、フィブロネクチン、ピトロネクチン、マトリゲル、またはコラーゲンでコーティングした上に再播種し、MSC成長培地中で4~10日間培養して、典型的なMSCの形態と同様のスピンドル様細胞を発生させる。

【0108】

本明細書に開示される方法は、他の方法とは異なって、支持細胞、細胞の選別または手選別を必要としない。初期のトロホブラスト分化ステップは、bFGFを含まない定義された無血清培地中で行われる。全プロトコルは、合計6~14日間で分化の2つのステップのみ必要として、高純度および高収率で、T-MSCを発生させる（図1）。これは、hESCからMSCを得るために今までに報告された中で最短の分化プロトコルである。T-MSCの収率および純度は、今までに報告された方法を用いて達成されたものと比較して、非常に高い。30日以内に、元のhESC数の $5 \times 10^5$ 倍のT-MSCを得ることができ、CD73+細胞のパーセンテージが高く、MSCの典型的なマーカーである一方で、他の方法は、元のhESC数の100倍未満しか産出することができず、CD73

+細胞のパーセンテージが低い。T - MSCの派生物は、CD73 / Trp - 2の二重陽性細胞の中間段階を含み、以後、プレT - MSCと称される。BMP4 + TGF 阻害剤での処置から2～3日後、細胞は、まず、高パーセンテージでTrp - 2を発現し、トロホプラストの均質な形態を示す(図2および3)。5～6日後、細胞は、Trp - 2およびCD73の両方を発現し、6～14日後、細胞は、もはやTrp2を発現しないが、CD73(98%超)、CD90(95%超)、CD105(90%超)、CD44(95%超)、CD29(80%超)を含む高パーセンテージで典型的なMSC表面マーカーを発現し、細胞は、内皮マーカーCD31ならびに造血マーカーCD34およびCD45に対して陰性である(図3および4)。

#### 【0109】

本明細書に開示される方法によって生成されたT - MSCは、下流のダウンストリーム骨形成、軟骨形成、および脂肪形成の系統に分化させることができる(図7)。したがって、T - MSCは、骨髓(BM)および他の源に由来したMSCと表現型および機能的に同様である。

#### 【0110】

##### 5.3 ヒト胚性幹細胞由来の間葉系幹細胞

骨髓由来のMSC(BM - MSC)が、多くの動物モデルおよび臨床試験において自己免疫疾患を治療するために長年使用されてきたが、免疫抑制の有効性は、BM - MSCがある特定の自己免疫疾患を効率よく治療することができないことを示すいくつかの報告と一致しない(Tyndall, 2011)。データは、T細胞受容体を刺激した後のT細胞の増殖のそれらの阻害についてBM - MSCおよびT - MSCの能力を比較するために、本明細書に提供される。図7に示されるように、BM - MSCは、低用量(0.3 μg/ml)で抗CD3抗体によって誘導されるCD4およびCD8 T細胞の増殖を阻害することができ、これは、T - MSCに相当する。しかしながら、抗CD3抗体濃度が、1 μg/mlまで増加した場合、BM - MSCは、T - MSCよりもCD4およびCD8の両方のT細胞の増殖を抑制する効力が弱い。ここで、CFSE希釈アッセイを使用して、T細胞の増殖を評価した：CFSEシグナルの低下に伴うT細胞のパーセンテージの増加は、加速した増殖を示す。図5に示されるように、抗CD3抗体が1 μg/mlまで増加した場合、59%のCD4および46%のCD8のT細胞がCFSEシグナルの低下に伴って検出された。T - MSCは、CD4およびCD8の両方のT細胞を16%まで著しく減少させる一方、BM - MSCは、それぞれ、CD4およびCD8のT細胞を32%および36%しか減少しなかった。

#### 【0111】

T - MSCのインビトロでの免疫抑制活性と一致して、本明細書に開示される方法によって生成されたT - MSCは、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)、多発性硬化症のマウスモデルを処置するのに有効であることが示された。図6に示されるように、T - MSCをEAE誘導から6日後に注入し、EAEマウスの疾患スコアは、ピヒクル注入対照と比較して、著しく低下した。

#### 【0112】

開示された方法によって生成された細胞のさらなる特徴において、T - MSCはまた、BM - MSC、およびSB431542での処置によって派生したhES - MSCよりもさらに強力な免疫抑制効果を示した(Chen et al., 2012)(図6)。いくつかの繰り返し実験において、BM - MSCは、一貫してEAEマウスの疾患スコアを減じなかった。したがって、臨床的応用で用いる開示される方法によって生成されたT - MSCとBM - MSCの置き換えは、骨髓穿刺のための危険な侵襲的手技を行う必要性を取り除き、BM寄付を待つ時間を軽減し、費用を削減し、患者1人あたりの基準でBM - MSCを調製するためのバッチ対バッチの変化を減らす。

#### 【0113】

簡潔に言えば、トロホプラストの中間段階によって、hESCから間葉系様細胞またはMSCを発生させるための高効率の方法、および自己免疫疾患を治療するためのT - M

10

20

30

40

50

Cの使用が、本明細書に開示される。マイクロアレイ分析は、T-MSCがBM-MSCのものとは同一ではない遺伝子発現プロファイルを有し（データは示さず）、その両方が同じ下流の細胞系統に分化させることができることを示唆した（図7）。加えて、T-MSCは、BM-MSCよりもインビトロおよびインビボの両方でより強力な免疫抑制能力を有する。

#### 【0114】

利用可能なデータは、開示される方法によって生成されたT-MSCが従来の成体由来のMSCとは異なることを示唆している。T細胞の増殖のそれらの強力な阻害により、BM-MSCよりもはるかに高い有効性を有するT-MSCが多発性硬化症を治療するために使用され得る。潜在的な安全性の懸念に対処するために、T-MSCを、免疫不全SCID

10

#### 【0115】

本発明のT-MSCは特有であり、様々な治療法および他の使用を有する。したがって、本発明は、薬学的調製物、およびT-MSCを含む組成物を含む様々な調製物を含む。

#### 【0116】

「T-MSC」という用語は、細胞がトロホブラスト様形態を有するTrop-2を発現するトロホブラスト中間段階を通してヒト胚性幹細胞（hESC）または誘導多能性幹細胞（iPSC）から派生するMSCまたは間葉系幹/間質細胞を指す。「hES-T-MSC」という用語は、hESCから分化したT-MSCを指す。「iPS-T-MSC」および「iT-MSC」という用語は、iPSCから分化したT-MSCを指す。本明細書に使用される「T-MSC」という用語は、トロホブラストを指さない。細胞が幹細胞の少なくとも1つの属性、例えば、少なくとも1つの他の細胞型等に分化する能力を保持する場合、細胞は、「幹細胞」であると考えられる。これらの細胞は、1つ以上のマーカーの発現または発現の欠如が含まれるが、これらに限定されない、多くの構造的および機能的特性に基づいて記載することができる。具体的には、T-MSCは、線維芽細胞の形態を有する小細胞体によって特徴付けられる。hES-T-MSCおよびiT-MSCの両方を含むT-MSCは、多能性であり、他の細胞型および細胞系統を生じさせるように分化させることができる。「T-MSC-DL」という用語は、T-MSCから分化したすべての細胞型および細胞系統を指す。

20

30

#### 【0117】

本明細書に記載される分化方法は、今までに報告された中で最も短期間である、6～14日以内に、iPS細胞からのMSCの分化を達成することができる。したがって、これらのiT-MSCは、急性心筋梗塞、急性心不全、急性脊髄損傷、急性放射線照射/火傷の処置等の非常に短期間でMSCの発生を必要とする緊急状態下で患者に特異的なiPS系の療法のために使用することができる。

#### 【0118】

1つ以上の細胞マーカーのDNA、RNA、またはタンパク質のレベルで評価される場合に、発現または発現の欠如によって、T-MSCを特定するまたは特徴付けることができる。細胞表面マーカーCD73を発現するか、または細胞表面マーカー：CD90、CD105、CD13、CD29、CD54、CD44、CD146、またはCD166のうちの少なくとも1つ以上を発現する、あるいは細胞表面マーカー：CD34、CD31、またはCD45のうちの少なくとも1つも発現しない、または低レベルで発現する場合に、T-MSCを特定することができる。

40

#### 【0119】

代替的または追加的に、1つ以上のプロ炎症性タンパク質、MMP2、RAGE、IFNGR2、TNF、IL-12A、IL-6、およびVCAM1のそれらの低レベルの発現に基づいて、T-MSCを特定するまたは特徴付けることができる。この遺伝子発現のプロファイルは、骨髄由来の間葉系幹細胞とは対照的である。具体的には、IL-6は、T-MSC中よりもBM-MSC中ではるかに高く発現した。IL-6は、炎症の発症

50

および解消を含む造血/免疫細胞と間質細胞との間のクロストークに關与する、多面的サイトカインである。

【0120】

T-MSCはまた、インビトロで刺激した後のT細胞の増殖を阻害するそれらに能力で特徴付けることができる。これらの特性は、インビトロで刺激した後のT細胞の増殖を阻害しないBM-MSCとは対照的である。

【0121】

したがって、本明細書に記載されるT-MSCは、(1)脂肪細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、ニューロン、筋芽細胞、間質細胞、および線維芽細胞に分化する、(2)線維芽細胞様形態を有する、(3)CD73、CD90、CD105、CD13、CD29、CD54、CD44、CD146、および/もしくはCD166を発現する、(4)CD34、CD31、および/もしくはCD45を低レベルで発現するか、または発現しない、(5)MMP2、RAGE、IFN R1、IFN R2、IL-12、TNF、IL-6、および/もしくはVCAM1、特に、IL-6を低レベルで発現するか、または発現しない、(6)MHC抗原HLA-Gおよび/もしくはHLA-ABCを発現し、HLA-DRおよび/もしくはCD80を低レベルで発現するか、または発現しない、ならびに(7)インビトロで刺激した後、T細胞の増殖を阻害する、特性のうちの少なくとも1つを有する。ある特定の実施形態において、T-MSCは、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または7つすべての特性を有する。

【0122】

ある特定の実施形態において、T-MSCは、今までに報告されたHB-MSCと区別することができ、T-MSCは、HB-MSCよりも少なくとも1倍高いレベルのCXCR7、CXCL2、および/もしくはCXCL12を発現するが、HB-MSCと比較して、少なくとも半分のレベルのHOXB2、HOXB3、HOXB5、HOXB7、HOXB9、HOXA5、HOXA9、および他のHOXファミリー遺伝子を発現する。

【0123】

さらに、T-MSCは、血液脳関門(BBB)および血液脊髄関門(BSCB)を横断する独特の能力を有し、それらを治療的および診断的適用に比類なく好適にする。本発明のT-MSCは、治療的および診断的薬剤の送達が含まれるが、これに限定されないCNSにおける機能を実行するために、BSCBを横断して、脊髄の血管の内外を遊走する能力を有する。これは、この能力を有さないBM-MSCとは対照的である。

【0124】

本発明の別の実施形態は、照射されるT-MSCである。この実施形態は、照射に供される少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または7つすべての特性を有する、上記の特性のうちの少なくとも1つを有するT-MSCを含み得る。

【0125】

別の実施形態において、細胞培養物は、T-MSCを含む。ある特定の実施形態において、T-MSCは、脂肪細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、ニューロン、筋芽細胞、間質細胞、および線維芽細胞に分化させる。ある特定の実施形態において、T-MSC細胞は、CD73、CD90、CD105、CD13、CD29、CD54、CD44、CD146、および/またはCD166を発現する。ある特定の実施形態において、細胞は、CD34、CD31、および/もしくはCD45を低レベルで発現するか、またはそれらを発現しない。ある特定の他の実施形態において、細胞は、MMP2、RAGE、IFN R1、IFN R2、IL-12、TNF、IL-6、および/もしくはVCAM1、特にIL-6を低レベルで発現するか、またはそれらを発現しない。ある特定の他の実施形態において、細胞は、MHC抗原HLA-Gおよび/もしくはHLA-ABCを発現し、HLA-DRおよび/もしくはCD80を低レベルで発現するか、またはそれらを発現しない。ある特定の他の実施形態において、細胞は、インビトロで刺激した後、T細胞の増殖を

阻害する。ある特定の実施形態において、細胞は、血液脳関門および血液脊髄関門を横断することができる。ある特定の実施形態において、細胞は、照射される。

【0126】

別の態様において、T-MSCを含む薬学的調製物が、本明細書に開示される。ある特定の実施形態において、T-MSCは、脂肪細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、ニューロン、筋芽細胞、間質細胞、および線維芽細胞に分化させることができる。ある特定の実施形態において、細胞は、CD73、CD90、CD105、CD13、CD29、CD54、CD44、CD146、および/またはCD166を発現する。ある特定の実施形態において、細胞は、CD34、CD31、および/またはCD45を低レベルで発現するか、またはそれらを発現しない。ある特定の他の実施形態において、細胞は、MMP2、RAGE、IFN $\gamma$  R1、IFN $\gamma$  R2、TNF $\alpha$ 、IL-12、IL-6、および/またはVCAM1、特にIL-6を低レベルで発現するか、またはそれらを発現しない。ある特定の他の実施形態において、細胞は、MHC抗原HLA-A-Gおよび/もしくはHLA-ABCを発現し、HLA-DRおよび/もしくはCD80を低レベルで発現するか、またはそれらを発現しない。ある特定の他の実施形態において、細胞は、インビトロで刺激した後、T細胞の増殖を阻害する。ある特定の実施形態において、細胞は、血液脳関門および血液脊髄関門を横断することができる。ある特定の実施形態において、細胞は、照射される。任意の薬学的に許容される担体または賦形剤を用いて、薬学的調製物を調製することができる。

10

【0127】

ある特定の実施形態において、組成物または薬学的調製物は、少なくとも少なくとも10,000個のT-MSC、少なくとも50,000個のT-MSC、少なくとも100,000個のT-MSC、少なくとも500,000個のT-MSC、少なくとも $1 \times 10^6$ 個のT-MSC、少なくとも $5 \times 10^6$ 個のT-MSC、少なくとも $1 \times 10^7$ 個のT-MSC、少なくとも $5 \times 10^7$ 個のT-MSC、少なくとも $1 \times 10^8$ 個のT-MSC、少なくとも $5 \times 10^8$ 個のT-MSC、少なくとも $1 \times 10^9$ 個のT-MSC、少なくとも $5 \times 10^9$ 個のT-MSC、または少なくとも $1 \times 10^{10}$ 個のT-MSCを含む。

20

【0128】

少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30回、またはそれ以上培養され、継代されるヒト胚性幹細胞株から直接得られ、単離されるT-MSCを含む複数のT-MSC、またはこれらの組み合わせが、本明細書に提供される。

30

【0129】

ある特定の実施形態において、そこから部分的もしくは末端が分化されたT-MSCまたは細胞の凍結保存された調製物が、本明細書に提供される。

【0130】

ある特定の実施形態において、T-MSC、または照射されたT-MSCを含むT-MSCの組成物もしくは調製物の治療的使用が、本明細書に提供される。そのような細胞および調製物は、記載される状態または疾患のうちのいずれかの治療、ならびに血液脳関門および血液脊髄関門を横断する薬剤の送達系において使用することができる。

40

【0131】

ある特定の実施形態において、本発明は、トロホブラスト、プレT-MSC、またはそこから部分的もしくは末端が分化されたT-MSC細胞の凍結保存した調製物を提供する。

【0132】

ある特定の実施形態において、本発明は、T-MSC、または照射されたT-MSCを含むT-MSCの組成物もしくは調製物の治療的使用を提供する。そのような細胞および調製物は、本明細書を通じて詳細される状態または疾患のうちのいずれかの治療、ならびに血液脳関門および血液脊髄関門を横断する薬剤の送達系において使用することができる。

50

。

## 【0133】

## 5.4 T-MSC集団の選択および生成

療法で用いる臨床グレードである高度に免疫抑制性のあるT-MSCのバイオマーカープロファイルを特定することによって高度に免疫抑制性のあるT-MSCを特定する方法が、本明細書に提供される。ある特定の実施形態において、臨床グレードのT-MSCは、(i)群1マーカーを発現する細胞を95%超含有する、(ii)群2マーカーを発現する細胞を80%超含有する、(iii)群3マーカーを発現する細胞を5%未満含有する、(iv)IL-10およびTGF $\beta$ を発現する、(v)IL-6、IL-12、およびTNF $\alpha$ を発現する細胞を2%未満含有する、ならびに(vi)すべての群4マーカーを共発現する細胞を0.001%未満含有する、特性を有し、群1マーカーは、CD73、CD90、CD105、CD146、CD166、およびCD44であり、群2マーカーは、CD13、CD29、CD54、CD49Eであり、群3マーカーは、CD45、CD34、CD31、およびSSEA4であり、群4マーカーは、OCT4、NANOG、TRA-1-60、およびSSEA4である。

## 【0134】

ある特定の実施形態において、本方法は、抗炎症性因子(「AIF」)およびプロ炎症性因子(「PIF」)をコードするマーカーの分化発現を測定することを含む。ある特定の実施形態において、AIFは、IL-10、TGF $\beta$  2である。ある特定の実施形態において、PIFは、上方調節される。ある特定の実施形態において、T-MSCは、BM-MSCと比較して、上記のマーカーの少なくとも1.5倍発現する。ある特定の実施形態において、PIFは、IL-6、IL-12、TNF $\alpha$ 、CCL2、VCAM1、RAGE、MMP2である。ある特定の実施形態において、PIFは、下方調節される。ある特定の実施形態において、T-MSCは、BM-MSCと比較して、上記のマーカーの少なくとも半分発現する。別の実施形態において、高度に免疫抑制性のあるT-MSCは、BM-MSCと比較して、IL-6<sup>+</sup>細胞のより低い比率を有する。ある特定の実施形態において、高度に免疫抑制性のあるT-MSCは、5%未満、4%、3%、2%、または1%のIL-6陽性細胞を有する。ある特定の実施形態において、T-MSCは、低レベルのIL12、TNF $\alpha$ 、RAGE、および他のPIFを発現する。ある特定の実施形態において、T-MSCは、高レベルのTGF $\beta$  2およびIL-10を発現し得る。ある特定の実施形態において、マーカーの発現が、BM-MSCの発現と比較される。

## 【0135】

臨床グレードのT-MSC集団のための適格性の手順が、本明細書に提供される。特異的マーカーの発現は、治療的使用に好適であるかどうかを判定するために、T-MSC集団において測定される。マーカーには、例えば、(1)MSC特異的マーカー(セット1):CD73、CD90、CD105、CD166、およびCD44、(2)MSC特異的マーカー(セット2):CD13、CD29、CD54、CD49E、SCA-1、およびSTRO-1、(3)造血幹/前駆体マーカー:CD45およびCD34、および内皮細胞マーカーCD31、(4)免疫原性マーカー:HLA-ABC、HLA-G、CD80、およびCD86、(5)サイトカイン:IL-10、TGF $\beta$ 、IL-6、およびIL-12、ならびに(6)多能性マーカー:OCT4、NANOG、TRA-1-60、およびSSEA-4が含まれる。ある特定の実施形態において、T-MSC集団は、少なくとも1つの群1マーカーを発現する細胞を95%、96%、97%、98%、または99%超含有する。ある特定の実施形態において、T-MSC集団は、少なくとも1つの群2マーカーを発現する細胞を80%、85%、90%、95%、または99%超含有する。ある特定の実施形態において、T-MSC集団は、少なくとも1つの群3マーカーを発現する細胞を0.1%、0.08%、0.05%、0.03%、0.02%、または0.01%未満含有する。ある特定の実施形態において、T-MSC集団は、IL-10および/またはTGF $\beta$ を発現する細胞を80%、85%、90%、95%、または99%超含有する。ある特定の実施形態において、T-MSC集団は、IL-6および/または

10

20

30

40

50



IL - 12を発現する細胞を5%、4%、3%、2%、1%未満含有する。ある特定の実施形態において、T - MSC集団は、少なくとも1つの群6マーカーを発現する細胞を0.001%未満含有する。臨床グレードのT - MSCは、陽性対照として臨床前グレードのT - MSCと比較される。ある特定の実施形態において、T - MSCは、多色フローサイトメトリー分析および/または免疫蛍光を通して特徴付けられる。ある特定の実施形態において、T - MSC集団は、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、IL - 1、IL - 2、IL - 4、IL - 6、IL - 8、IL - 10、IL - 17、TNF、TGF、IFN、GM - CSF、G - CSF、bFGF、CXCL5、VEGF、TPO、またはこれらの組み合わせを発現する。ある特定の実施形態において、T - MSC集団はまた、(1)内毒素および残留サイトカイン/成長因子等の外因性物質の存在、ならびに/または(2)ゲノム異常(染色体分析および全ゲノム配列決定による)に対して分析され得る。

10

#### 【0136】

臨床グレードのT - MSC集団のための別の適格性の手順が、本明細書に提供される。より良好な再生の潜在的および免疫抑制機能を有するT - MSCは、より低レベルCD9を発現し得、1~2継代のT - MSCのCD9発現レベルが、基礎レベルとして記録され、ある特定の継代および手順後、CD9発現レベルが2倍増加する場合、細胞が継代のために停止され得る。

#### 【0137】

T - MSCの発現プロファイルを判定するための方法は、当該技術分野で知られており、これには、フローサイトメトリー、多重マイクロアレイ、RT - PCR、ノーザンブロット、またはウエスタンブロットが含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、MSCの発現プロファイルは、サイトメトリービーズアレイベースの多重サイトカイン分析、lumine xシステムベースの多重サイトカイン分析、マイクロアレイRNA - seq、定量的RT - PCR、Elispot、Elisa、Elisaサイトカインアレイ、フローサイトメトリールシフェラーゼレポーターシステム、蛍光発光レポーターシステム、組織学染色法、および免疫蛍光染色法によって判定される。

20

#### 【0138】

##### 5.4.1 核酸バイオマーカーを検出する方法

特定の実施形態において、バイオマーカープロファイルにおけるバイオマーカーは、核酸である。そのようなバイオマーカーおよびバイオマーカープロファイルの対応する特性は、例えば、1つ以上のマーカーの発現生成物(例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド)を検出することによって生成され得る。特定の実施形態において、バイオマーカープロファイルにおけるバイオマーカーおよび対応する特性は、ハイブリダイゼーション、マイクロアレイ分析、RT - PCR、ヌクレアーゼ保護アッセイ、およびノーザンブロット分析が含まれるが、これらに限定されない当該技術分野で当業者によく知られている任意の方法を用いて、本明細書に開示されるマーカーから発現した1つ以上の核酸を検出および/または分析することによって得られる。

30

#### 【0139】

ある特定の実施形態において、本発明の方法および組成物によって検出および/または分析される核酸には、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)分子、mRNAスプライスされた変異体を含む発現されたRNA分子、ならびに調節RNA、cRNA分子(例えば、インビトロで転写されるcDNA分子から調製されたRNA分子)等のRNA分子、およびそれらの特徴的断片が含まれる。

40

#### 【0140】

特定の実施形態において、核酸は、細胞培養物中に存在する、または細胞培養物から単離されるか、または部分的に単離される核酸からインビトロで調製され、このことは、当該技術分野でよく知られており、例えば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Pres

50

s (Cold Spring Harbor, N. Y.) において、一般的に記載され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0141】

5.4.1.1 核酸アレイ

ある特定の実施形態において、核酸アレイを使用して、本明細書に記載されるマーカーのうちの任意の1つ以上の発現を検出することによって、バイオマーカープロファイル中のバイオマーカーの特徴を発生させる。本発明の一実施形態において、cDNAマイクロアレイ等のマイクロアレイを使用して、バイオマーカープロファイル中のバイオマーカーの特徴値を決定する。cDNAマイクロアレイ分析の例示的な方法は、以下に、および実施例において記載されている。

10

【0142】

ある特定の実施形態において、バイオマーカープロファイル中のバイオマーカーの特徴値は、生体試料中に存在するmRNA転写物の核酸配列を表すまたは対応する、1つ以上のプローブスポットを含むマイクロアレイのアレイ検出可能標識核酸（例えば、試料から合成された蛍光標識cDNA）にハイブリダイズすることによって得られる。

【0143】

核酸アレイ、例えばマイクロアレイを、多くの方法で製作することができ、それらのいくつかは本明細書に以下に記載されている。好ましくは、アレイは、再現可能であり、所与のアレイの複数の複製を製作することが可能であり、マイクロアレイからの結果は互いに比較可能である。好ましくは、アレイは、結合（例えば、核酸ハイブリダイゼーション）条件下で安定的である物質から作製される。当業者は、アレイ上のプローブスポットに試験プローブをハイブリダイズさせるのに好適な支持物、基材、または担体について知っているだろうし、または日常的な実験作業を使用することによりそれを確認することができるであろう。

20

【0144】

使用されるアレイ、例えばマイクロアレイは、1つ以上の試験プローブを含むことができる。いくつかの実施形態において、そのような試験プローブの各々は、検出されるRNAまたはDNAのサブ配列に相補的である核酸配列を含む。各プローブは、典型的には、異なる核酸配列を有し、アレイの固体表面上の各プローブの位置は、通常既知であるか、または決定することができる。本発明により有用なアレイは、例えば、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ、cDNAベースのアレイ、SNPアレイ、スプライスされた変異体アレイ、および本明細書に記載されるマーカーの発現の定性的、定量的、または半定量的測定を提供することができる任意の他のアレイを含むことができる。いくつかのタイプのマイクロアレイは、アドレス可能なアレイである。より具体的には、いくつかのマイクロアレイは、位置的にアドレス可能なアレイである。いくつかの実施形態において、アレイの各プローブは、固体支持体上の既定の所定位置に位置しており、そのため、各プローブの同一性（例えば、配列）は、アレイ上（例えば、支持体または表面上）のその位置から決定することができる。いくつかの実施形態において、アレイは、オーダーアレイである。マイクロアレイは、Draghici, 2003, Data Analysis Tools for DNA Microarrays, Chapman & Hall / CRC において一般的に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

40

【0145】

5.4.1.2 RT-PCR

ある特定の実施形態において、本明細書に記載されるマーカーのうちの1つ以上の発現レベルのバイオマーカープロファイル中のバイオマーカーの特徴値を決定するために、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）と組み合わせて逆転写（RT）を使用して、試料からRNAを増幅することによって、この測定値を測定する。本実施形態によると、逆転写は、定量的であっても、半定量的であってもよい。本明細書で教示されるRT-PCR法は、上記のマイクロアレイ法とともに使用してもよい。例えば、バルクPCR反応を実施してもよく、PCR生成物を分解し、マイクロアレイ上のプローブスポットとして使用してもよ

50

い。

#### 【0146】

全RNAまたはmRNAをテンプレートとして使用し、マーカー（複数を含む）の転写部分に特異的なプライマーを、逆転写を開始するために使用する。RNAをcDNAに逆転写するための方法は、よく知られており、Sambrook et al., 2001、上記に記載されている。プライマー設計は、公開されているか、またはGenBank等の任意の公的に利用可能な配列データベースから入手可能な既知のヌクレオチド配列に基づいて達成することができる。例えば、プライマーは、本明細書に記載されるマーカーのいずれのためにも設計され得る。さらに、プライマー設計は、市販のソフトウェア（例えば、Primer Designer 1.0, Scientific Software 10

#### 【0147】

PCRは、対象となる標的配列を増幅する耐熱性のDNA依存性DNAポリメラーゼによって触媒される複数のサイクルのDNA複製を使用することによって、特定の核酸配列を迅速に増幅するための方法を提供する。PCRは、増幅されるべき核酸、増幅されるべき配列を隣接する2つの一本鎖オリゴヌクレオチドプライマー、DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオチド三リン酸塩、緩衝液、および塩の存在が必要である。PCR法は、当該技術分野でよく知られている。PCRは、例えば、Mullis and Faloona, 1987, Methods Enzymol. 155: 335に記載されるように実施され、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。 20

#### 【0148】

PCRは、テンプレートDNAまたはcDNA（少なくとも10fg、より有用には、1~1000ng）、および少なくとも25pmolのオリゴヌクレオチドプライマーを使用して実施することができる。典型的な反応混合物には、以下のものが含まれる：2μlのDNA、25pmolのオリゴヌクレオチドプライマー、2.5μlの10M PCR緩衝液1（Perkin-Elmer, Foster City, Calif.）、0.4μlの1.25M dNTP、0.15μl（または2.5ユニット）のTaq DNAポリメラーゼ（Perkin-Elmer, Foster City, Calif.）、および全体積を25μlにするための脱イオン水。鉱油で被覆し、プログラム可能な熱サイクラーを使用してPCRを実施する。 30

#### 【0149】

本来定量的である定量的RT-PCR（「QRT-PCR」）は、マーカー発現レベルの定量的測定を提供するために実施することもできる。QRT-PCRでは、逆転写およびPCRを2段階で実施することができるか、またはPCRと組み合わせた逆転写を同時に実施することができる。例えば、Taqman（Perkin-Elmer, Foster City, Calif.）、またはApplied Biosystems（Foster City, Calif.）によって提供されるような市販のキットの技術のうちの1つが、転写物に特異的なアンチセンスプローブを用いて実施される。このプローブは、PCR生成物（例えば、遺伝子由来の核酸断片）に特異的であり、消光剤および蛍光性レポータープローブをオリゴヌクレオチドの5'末端に複合体化させて調製する。異なる蛍光マーカーは、異なるレポーターに結合されており、1つの反応で2つの生成物の測定を可能にする。Taq DNAポリメラーゼが活性化される場合に、それは、その5'-3'エキソヌクレアーゼ活性によりテンプレートに結合したプローブの蛍光レポーターを引き剥がす。消光剤の非存在下で、レポーターは、これより蛍光を発する。レポーターの色変化は、各特異的生成物の量に比例しており、蛍光光度計で測定され、したがって、各色の量が測定され、PCR生成物が定量化される。PCR反応は、多数の個体に由来する試料が同時に処理および測定されるように、96ウェルプレートで実施される。Taqman系は、ゲル電気泳動を必要としないというさらなる利点を有し、標準曲線とともに使用される場合、定量化を可能にする。 40 50

## 【0150】

PCR生成物を定量的に検出するために有用な第2の技法は、市販のQuantitect SYBR Green PCR (Qiagen, Valencia Calif.)等の挿入染料 (intercalating dye) を使用することである。RT-PCRは、PCR段階中にPCR生成物に組み込まれ、PCR生成物の量に比例した蛍光をもたらすSYBR greenを使用して実施される。

## 【0151】

TaqmanおよびQuantitect SYBR系は両方とも、RNAの逆転写後に使用することができる。逆転写は、PCRステップと同じ反応混合物中で実施され得る (一段階プロトコル) か、または逆転写は、PCRを使用して増幅前に最初に実施され得る (二段階プロトコル)。加えて、蛍光分子および消光分子を有するプローブを使用するMolecular Beacons (登録商標) を含む、mRNA発現生成物を定量的に測定するための他の系が知られており、このプローブは、ヘアピン形態である場合には、蛍光分子が消光され、ハイブリダイズされる場合には、蛍光が増加して、遺伝子発現の定量的測定をもたらす。

## 【0152】

## 5.4.1.3 ノーザンプロットアッセイ

当業者に知られている任意のハイブリダイゼーション技術は、バイオマーカープロファイル中のバイオマーカーの特徴値を得るために使用することができる。他の特定の実施形態において、バイオマーカープロファイル中のバイオマーカーの特徴値は、(特定のRNA分子を検出し、定量化するために、ノーザンプロット分析によって得ることができる。標準的なノーザンプロット分析は、当業者に知られている従来のノーザンハイブリダイゼーション技術に従って、RNA転写産物の大きさを確定する、あるいはスプライスされたRNA転写産物、および試料中の本明細書に記載される相対量の1つ以上の遺伝子 (特に、mRNA) を特定するために、使用することができる。ノーザンプロット法では、RNA試料は、まず、変性条件下で、アガロースゲル中で電気泳動法によって大きさごとに分離される。次いで、RNAを膜に移し、架橋し、標識プローブとハイブリダイズさせる。ランダムプライムド (random-primed)、ニック翻訳、またはPCRによって生成されたDNAプローブ、インビトロ転写RNAプローブ、およびオリゴヌクレオチドを含む、非同位体または高比活性放射性標識プローブを使用することができる。加えて、部分的にしか相同でない配列 (例えば、異なる種由来のcDNAまたはエキソンを含み得るまたはゲノムDNA断片) をプローブとして使用してもよい。標識プローブ、例えば、完全長、一本鎖DNA、あるいはそのDNA配列の断片のいずれかを含む放射性標識cDNAが、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも50、または少なくとも100個の連続ヌクレオチドの長さであり得る。このプローブは、当業者に知られている多くの異なる方法のうちのいずれかによって標識化することができる。これらの研究に最も一般的に使用される標識は、放射性元素、酵素、紫外線等に曝露される場合に蛍光を発する化学物質である。多くの蛍光物質が知られており、標識として使用され得る。これらには、フルオレセイン、ローダミン、オーラミン、Texas Red、AMCAブルー、およびLucifer Yellowが含まれるが、これらに限定されない。放射性標識は、現在利用可能な計数方法のうちのいずれかによって検出することができる。同位体の限定されない例には、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、および $^{186}\text{Re}$ が含まれる。酵素標識は同様に有用であり、現在利用されている比色計法、分光光度計法、蛍光分光光度計法、電流測定法、または気体定量法の技術のうちのいずれかによって検出することができる。この酵素は、カルボジイミド、ジイソシアネート、グルタルアルデヒド等の架橋分子との反応によって選択された粒子に共役される。当業者に知られている任意の酵素を使用することができる。そのような酵素の例には、ペルオキシダーゼ、ベータ-D-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ+ペルオキシダーゼ、およびアルカリ性ホスファターゼが含まれるが、これらに限定されない。米国特許第3,654,090号、同

10

20

30

40

50

第 3 , 8 5 0 , 7 5 2 号、および同第 4 , 0 1 6 , 0 4 3 号は、代替的な材料および方法の開示に関する例として参照される。

【 0 1 5 3 】

5 . 4 . 2 タンパク質を検出する方法

本発明の特定の実施形態において、バイオマーカープロファイル中のバイオマーカーの特定値は、タンパク質を検出することにより、例えば、本明細書に記載される 1 つ以上のマーカーの発現生成物（例えば、核酸またはタンパク質）、またはそのようなタンパク質の翻訳後修飾された形態、またはそうでなければ修飾された形態、またはプロセシングされた形態を検出することにより得ることができる。特定の実施形態において、バイオマーカープロファイルは、タンパク質マイクロアレイ分析法、免疫組織化学法、および質量分析法が含まれるが、これらに限定されない、タンパク質を検出するための当業者に知られている任意の方法を使用して、1 つ以上のタンパク質および / またはその特徴的断片を検出および / または分析することによって生成される。

10

【 0 1 5 4 】

細胞培養物中に存在するタンパク質または対象となるタンパク質の量を決定するために、標準的技術が使用され得る。例えば、試料中に存在するタンパク質または対象となるタンパク質の量を決定するために、例えば、ウェスタンブロット、免疫沈降後のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法 ( S D S - P A G E )、免疫細胞化学等の、例えばイムノアッセイを使用する、標準的技術が使用され得る。対象となるタンパク質を検出するための 1 つの例示的な薬剤は、対象となるタンパク質に特異的に結合可能な抗体、好ましくは直接的または間接的のいずれかで検出可能に標識された抗体である。

20

【 0 1 5 5 】

そのような検出方法のために、必要に応じて、分析されるべき細胞培養物からのタンパク質は、当業者によく知られている技術を使用して容易に単離することができる。タンパク質単離法は、例えば、Harlow and Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, N. Y.) に記載されるもの等であり得、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 1 5 6 】

ある特定の実施形態において、タンパク質または対象となるタンパク質の検出方法は、タンパク質に特異的な抗体との相互作用によるそれらの検出を含む。例えば、抗体は、対象となるタンパク質を対象とする。抗体は、当業者によく知られている標準的技術を使用して発生させることができる。特定の実施形態において、抗体は、ポリクローナル、またはより好ましくは、モノクローナルであり得る。例えば、無傷抗体、または抗体断片（例えば、s c F v、F a b、または F ( a b ' )<sub>2</sub>）が使用され得る。

30

【 0 1 5 7 】

例えば、対象となるタンパク質に特異的な抗体または抗体断片が、タンパク質の存在を定量的または定性的に検出するために使用され得る。これは、例えば、免疫蛍光技術によって達成することができる。加えて、抗体（またはその断片）は、対象となるタンパク質のインサイチュー検出法のために免疫蛍光法または免疫電子顕微鏡法等において、組織学的に使用することができる。インサイチュー検出法は、患者から生体試料（例えば、生検標本）を取り出し、対象となるタンパク質を対象とする標的抗体をそれに適用することによって達成され得る。抗体（または断片）は、好ましくは、抗体（または断片）を生体試料で覆うことによって適用される。そのような手法を使用することによって、特定の試料中の対象となるタンパク質の存在だけでなく、その配置もまた決定することが可能である。そのようなインサイチュー検出法を達成するために、広く様々なよく知られている組織学的方法（染色手法等）を使用することができる。

40

【 0 1 5 8 】

対象となるタンパク質のイムノアッセイは、典型的には、対象となるタンパク質を特定

50

することができる検出可能に標識された抗体の試料をインキュベートすることと、当該技術分野でよく知られている多くの技術のうちのいずれかによって結合抗体を検出することを含む。下記により詳細に議論されるように、「標識された」という用語は、例えば、カップリング（すなわち、物理的に結合）することを介する抗体の直接標識化を指すことができ、また、直接標識された別の試薬との反応による抗体の間接標識化を指すことができる。間接標識化の例には、蛍光標識された二次抗体を使用する一次抗体の検出が含まれる。

#### 【0159】

試料を、ニトロセルロース等の固相支持体もしくは担体、または細胞、細胞粒子、もしくは可溶性タンパク質を固定化することができる他の固体支持体と接触させ、固定化することができる。次いで、この支持体を好適な緩衝液で洗浄し、続いて、検出可能に標識された指紋遺伝子に特異的な抗体で処理することができる。次いで、固相支持体を再度洗浄して、非抗体を除去することができる。次いで、固体支持体上に結合した標識の量を、従来の方法によって検出することができる。

#### 【0160】

「固体支持体または担体」とは、抗原または抗体を結合することができる任意の支持体が意図される。よく知られている支持体または担体には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および変性セルロース、ポリアクリルアミド、ならびに磁鉄鉱が含まれる。担体の性質は、本発明の目的のために、ある程度の可溶性または不溶性のいずれかであり得る。支持体材料は、結合される分子が抗原または抗体に結合することができる限り、実質的にあらゆる可能な構造構成を有し得る。したがって、支持体の構成は、ビーズのような球状、または試験管の内表面もしくは竿の害表面のようなシリンダー状であり得る。代替的に、その表面は、シート、試験紙等の平面であり得る。好ましい支持体は、ポリスチレンビーズを含む。当業者は、抗体または抗原を結合する多くの他の好適な担体を知っているだろうし、または日常的な実験作業を使用することによりそれを確認することができるであろう。

#### 【0161】

対象となるタンパク質に特異的な抗体を検出可能に標識化することができる方法のうちの1つは、酵素にそれを結合し、酵素免疫測定法（EIA）において使用するものである（Voller, 1978, "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", Diagnostic Horizons 2:1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Voller et al., 1978, J. Clin. Pathol. 31:507-520, Butler, J. E., 1981, Meth. Enzymol. 73:482-523, Maggio (ed.), 1980, Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., Ishikawa et al., (eds.), 1981, Enzyme Immunoassay, Kaku Shoin, Tokyo、これらのそれぞれは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。抗体と結合する酵素は、例えば、分光光度計法、蛍光光度計法、または可視的手段によって検出され得る化学的部分を生成するような方法で、適切な基質、好ましくは発色性基質と反応する。抗体を検出可能に標識化するために使用することができる酵素には、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファ-グリセロリン酸塩、デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼが含まれるが、これらに限定されない。検出は、酵素に対する発色基質を使用する比色分析法によって達成され得る。検出はまた、同様に調製された標準物と比較して、基質の酵素反応の程度を可視的に比較することにより達

10

20

30

40

50

成され得る。

【0162】

検出はまた、様々な他の免疫測定法のうちのいずれかを使用して達成され得る。例えば、抗体または抗体断片を放射活性に標識化することにより、ラジオイムノアッセイ（RIA）の使用を通じて、対象となるタンパク質を検出することが可能である（例えば、Weintraub, 1986, Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Societyを参照されたく、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。放射性同位体（例えば、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、または $^3\text{H}$ ）は、ガンマカウンターまたはシンチレーションカウンターを使用した方法により、またはオートラジオグラフィーにより検出することができる。

10

【0163】

蛍光化合物により抗体を標識化することも可能である。蛍光標識された抗体が適切な波長の光に曝露されると、蛍光によりその存在が検出され得る。最も一般的に使用される蛍光標識化合物は、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルデヒド、およびフルオレサミンである。

【0164】

抗体はまた、 $^{152}\text{Eu}$ または他のランタニド系列のような蛍光発光金属を使用して検出可能に標識化することもできる。これらの金属を、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）またはエツレンジアミン四酢酸（EDTA）等の金属キレート群の使用により抗体に結合させることができる。

20

【0165】

抗体はまた、それを化学発光化合物とカップリングさせることによって検出可能に標識化することもできる。次いで、化学発光タグ化された抗体の存在は、化学反応の経過で生じる発光の存在を検出することによって決定される。特定の有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、セロマティックアクリジニウムエステル（theromatic acridinium ester）、イミダゾール、アクリジニウム塩、およびシュウ酸エステルである。

30

【0166】

同様に、生物発光化合物は、本発明の抗体を標識化するために使用することができる。生物発光は、触媒タンパク質により化学発光反応の効率が増大される生態系において見出される化学発光の1つの型である。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することによって決定される。標識化の目的で重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリンである。

【0167】

別の実施形態において、アプタマー等の抗体以外の特異的な結合分子は、バイオマーカーと結合するために使用され得る。さらに別の実施形態において、バイオマーカープロファイルは、感染性薬剤（例えば、リポ多糖類またはウイルスタンパク質）またはその成分の測定可能な態様を含み得る。

40

【0168】

いくつかの実施形態において、タンパク質チップアッセイ（例えば、ProteinChip（登録商標）Biomarker System, CIPHERGEN, Fremont, Calif.）はバイオマーカープロファイル中のバイオマーカーの特徴値を測定するために使用される。また、例えば、Lin, 2004, Modern Pathology, 1-9、Li, 2004, Journal of Urology 171, 1782-1787、Wadsworth, 2004, Clinical Cancer Research, 10, 1625-1632、Prieto, 2003, Journal of Liquid Chromatography & Related Te

50

chnologies 26, 2315 - 2328、Coombes, 2003, Clinical Chemistry 49, 1615 - 1623、Mian, 2003, Proteomics 3, 1725 - 1737、Lehre et al., 2003, BJU International 92, 223 - 225、およびDiamond, 2003, Journal of the American Society for Mass Spectrometry 14, 760 - 765も参照されたく、これらのそれぞれは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0169】

いくつかの実施形態において、ビーズアッセイは、バイオマーカープロファイル中のバイオマーカーの特徴値を測定するために使用される。1つのそのようなビーズアッセイは、Becton Dickinsonサイトメトリービーズアレイ(CBA)である。CBAは、複数の可溶性検体を同時に検出するために別々の蛍光強度を有する一連の粒子を使用する。CBAをフローサイトメトリーと合わせて、多重アッセイを作成する。例えば、Becton Dickinson Human Inflammationキットに具現化されるように、Becton Dickinson CBAシステムは、粒子ベースの免疫測定法における可溶性検体を測定するフローサイトメトリーによる増幅された蛍光検出の感受性を使用する。CBA中の各ビーズは、特異的タンパク質に対して捕捉表面を提供し、ELISAプレート中で個々にコーティングされたウェルと類似している。BD CBA捕捉ビーズ混合物は、懸濁液中にあり、少量の試料中の複数の検体の検出を可能にする。

#### 【0170】

いくつかの実施形態において、米国特許第5,981,180号(「180特許」)(参照によりその全体が特に一般的方法論、ビーズ技術、システムハードウェア、および抗体検出のその教示について本明細書に組み込まれる)に記載される多重分析法が、バイオマーカープロファイル中のバイオマーカーの特徴値を測定するために使用される。この分析のためには、微小粒子のマトリックスが合成され、そのマトリックスは、微小粒子の異なるセットからなる。微小粒子の各セットは、微小粒子表面上に固定された異なる抗体捕獲試薬の何千もの分子を有することができ、2つの蛍光染料の異なる量を組み込むことによって色分けすることができる。2つの蛍光染料の比率により、微小粒子の各セットに対して異なる発光スペクトルを提供し、微小粒子セットを特定して、微小粒子の様々なセットのプールを行うことができる。米国特許第6,268,222号および同第6,599,331号はまた、参照によりそれらの全体、および特に多重分析のために微小粒子を標的化する様々な方法のこれらの教示について、本明細書に組み込まれる。

#### 【0171】

##### 5.4.3 その他の検出方法の使用

いくつかの実施形態において、バイオマーカープロファイル中のバイオマーカーの特徴値を決定するために、試料内のバイオマーカーのサブセットのみが分析されるように、分離法が使用され得る。例えば、試料中で分析されるバイオマーカーは、試料内の核酸バイオマーカーのみを得るように分画された細胞抽出物からのmRNA種であり得るか、またはクロマトグラフ技術によって分画される試料内のタンパク質の全成分の一分画からのものであり得る。

#### 【0172】

バイオマーカープロファイル中のバイオマーカーの特徴値はまた、例えば、下記に記載される以下の方法のうちの1つ以上の使用によって得ることができる。例えば、方法には、核磁気共鳴(NMR)分光法、例えば、エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)、ESI-MS/MS、ESI-MS/(MS)<sup>n</sup>(nは、ゼロよりも大きい整数である)、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF-MS)、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析法(SELDI-TOF-MS)、シリコン上での脱離/イオン化(DIOS)、二次イオン質量分析法(SIMS)、四極子飛行時間型(Q-TOF)、気圧化学イオン化質量分析法(APC



I - MS)、APCI - MS / MS、APCI - (MS)<sup>n</sup>、気圧光イオン化質量分析法 (APPI - MS)、APPI - MS / MS、およびAPPI - (MS)<sup>n</sup>等の質量分析法が含まれ得る。他の質量分析法は、とりわけ、四極子、フーリエ変換質量分析法 (FTMS)、およびイオントラップを含み得る。他の好適な方法は、化学抽出分配する、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性 (逆相) 液体クロマトグラフィー、等電点電気泳動、一次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (2D - PAGE)、または薄層、気体もしくは液体クロマトグラフィー、またはこれらの任意の組み合わせ等の他のクロマトグラフィーを含み得る。一実施形態において、生体試料は、分離法の適用の前に分画してもよい。

#### 【0173】

10

一実施形態において、バイオマーカーがイオン化され、入射レーザー放射によって固定支持体から蒸発されるタンパク質またはタンパク質断片であり、その特徴値が質量スペクトルプロファイル中のこれらの断片を閉めるピークの存在または非存在であるバイオマーカープロファイル中の特徴値を決定するために、レーザー脱離 / イオン化飛行時間型質量分析法が使用される。様々なレーザー脱離 / イオン化技術は、当該技術分野で知られている (例えば、Guttman et al., 2001, Anal. Chem. 73: 1252 - 62 および Wei et al., 1999, Nature 399: 243 - 246 を参照されたく、これらのそれぞれは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。

#### 【0174】

20

レーザー脱離 / イオン化飛行時間型質量分析法は、相対的に短時間で大量の情報を生成することができる。生体試料を、試料中のバイオマーカーのすべてまたはそのサブセットを結合する多様な支持体のうちの1つに適用させる。細胞溶解物または試料を、事前の精製または分画の有無にかかわらず、0.5 μL 程度の少量で、これらの表面に直接適用させる。これらの溶解物または試料は、支持体表面上に適用する前に濃縮または希釈することができる。次いで、レーザー脱離 / イオン化は、わずか3時間で試料 (複数を含む) の質量スペクトルを発生させるために使用される。

#### 【0175】

##### 5.4.4 データ分析アルゴリズム

T - MSC のバイオマーカー発現プロファイルは、臨床グレード T - MSC と非臨床グレード T - MSC を区別することができる因子である。臨床グレード T - MSC と非臨床グレード T - MSC を区別する決定規則または複数の決定規則を開発するために、これらのバイオマーカーおよびそれらの対応する特徴の同一性 (例えば、発現レベル) が使用され得る。決定規則または複数の決定規則を構築するための特定のデータ分析アルゴリズムは、臨床グレード T - MSC と非臨床グレード T - MSC を区別することができる。一旦これらの例示的なデータ分析アルゴリズムまたは当該技術分野で知られている他の技術を使用して決定規則が構築されると、2つ以上の表現型の分類 (例えば、臨床グレードまたは非臨床グレード T - MSC) のうちの1つに T - MSC を分類するために、決定規則を使用することができる。これは、決定規則を細胞培養物から得られたバイオマーカープロファイルに適用することによって達成される。したがって、そのような決定規則は、T - MSC の質を画定する場合に、非常に大きな値を有する。

30

40

#### 【0176】

ある特定の実施形態において、対照集団中の細胞培養物から得られたバイオマーカープロファイルと比較して、試験細胞培養物からのバイオマーカープロファイルを評価するための方法が、本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、対照集団ならびに試験細胞培養物から得られた各バイオマーカープロファイルは、複数の異なるバイオマーカーの各々の特徴を含む。いくつかの実施形態において、この比較は、(i) 対照集団からのバイオマーカープロファイルを使用して決定規則を開発し、(ii) 試験細胞培養物からのバイオマーカープロファイルに決定規則を適用することによって達成される。このように、本発明のいくつかの実施形態において適用される決定規則は、試験細胞培養物が臨

50

床グレードまたは非臨床グレードであるかどうかを決定するために使用される。ある特定の  
の実施形態において、対照集団は、臨床グレード T - M S C である。他の実施形態におい  
て、対照集団は、B M - M S C である。

#### 【0177】

本発明のいくつかの実施形態において、決定規則の適用の結果が、試験細胞培養物が臨  
床グレード T - M S C であることを示す場合には、試験細胞培養物は治療のために使用さ  
れる。決定規則の適用の結果が、試験細胞培養物が非臨床グレード T - M S C であること  
を示す場合には、試験細胞培養物は治療のために使用されない。

#### 【0178】

##### 5.5 T - M S C の修飾

改善された免疫抑制機能を有する修飾された M S C の集団を生成するために間葉系幹  
細胞を修飾する方法が、本明細書に提供される。M S C は、( i ) 群 1 マーカーを発現する  
細胞を 95 % 超含有する、( i i ) 群 2 マーカーを発現する細胞を 80 % 超含有する、( i i i ) 群 3 マーカーを発現する細胞を 5 % 未満含有する、( i v ) I L - 10 および T  
G F を発現する、( v ) I L - 6、I L - 12、および T N F を発現する細胞を 2 %  
未満含有する、ならびに ( v i ) すべての群 4 マーカーを共発現する細胞を 0.001 %  
未満含有する、特性を有し、群 1 マーカーは、C D 73、C D 90、C D 105、C D 1  
46、C D 166、および C D 44 であり、群 2 マーカーは、C D 13、C D 29、C D  
54、C D 49E であり、群 3 マーカーは、C D 45、C D 34、C D 31、および S S  
E A 4 であり、群 4 マーカーは、O C T 4、N A N O G、T R A - 1 - 60、および S S  
E A 4 である。

#### 【0179】

A I F の発現を増加させることによって T - M S C の免疫抑制機能を増加させる方法が  
、本明細書に提供される。一実施形態において、本方法は、P I F の発現を減少させるこ  
とを含む。一実施形態において、本方法は、I L 6、I L 12、T N F、R A G E、お  
よび T - M S C 中の他の P I F の発現を減少させることを含む。一実施形態において、本  
方法は、T - M S C 中の T G F および I L - 10 の発現を増加させることを含む。

#### 【0180】

ある特定の実施形態において、本方法は、当該技術分野で知られている T - M S C の遺  
伝的および後成的修飾を含む。ある特定の実施形態において、遺伝的修飾または後成的調  
節としては、ノックアウト、短ヘアピン RNA (「s h R N A」)、マイクロ RNA (「  
m i R N A」)、非コード RNA (「n c R N A」)、モルフォリノオリゴ (m o p h o  
l i n o o l i g o)、デコイ RNA、DNA メチル化制御、ヒストンメチル化制御、  
翻訳阻害、および / または抗体ブロッキングが含まれるが、これらに限定されない。ある  
特定の実施形態において、M S C は、トランスポゾン、ツール様受容体リガンド、または  
小分子を通して修飾される。

#### 【0181】

ある特定の実施形態において、小分子は、I L - 6 シグナル伝達のシグナル伝達経路成  
分のうちのいずれかを標的とするために使用される。ある特定の実施形態において、標的  
としては、g p 130、S T A T 3、カテプシン S、N F カップ B、I R F 5 が含まれる  
が、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、プロスタグランジン E 2 経路  
の活性化によって、フォルスコリン、コレラ毒素、1 および 2 アドレナリン受容体ア  
ゴニストが含まれるが、これらに限定されない c A M P アゴニストにより細胞内環状 A M  
P レベルを増加させることによって、N F - B R e l - B 経路の阻害によって、アポ  
トーシス細胞により T - M S C を処理することによって、ホスファチジルセリンによる処  
理によって、酪酸塩による処理によって、トリプトリドまたはトリプテリジウムウィル  
フォルディからの抽出物または合形成態またはトリプトリド (すなわち、ミンネリド (M i  
n n e l i d e)) による処理によって、T - M S C 中の I L - 12 の発現が減少する。

#### 【0182】

ある特定の実施形態において、M S C は、組み換え DNA の技術分野で知られている方

10

20

30

40

50

法を使用して、ある特定のマーカを発現させるために修飾され得る。ある特定の実施形態において、MSCは、マーカをコードする核酸配列を使用するトランスフェクションによって修飾され得る。マーカを、適切な発現ベクター、すなわち、挿入されたコード配列の転写および翻訳に必要な要素を含有するベクター中に挿入することができる。また、必要な転写および翻訳要素が存在し得る。調節領域およびエンハンサー要素は、天然および合成の両方の様々な源であり得る。様々な宿主ベクター系がマーカを発現するために使用され得る。宿主ベクター系としては、ウイルス（例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルス等）に感染した哺乳動物細胞系、ウイルス（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系、酵母ベクターを含有する酵母等の微生物、またはバクテリオファージ、DNA、プラスミドDNA、もしくはコスミドDNAにより形質転換した細菌、および選択可能なマーカを用いた形質転換により生成された安定した細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。ベクターの発現要素は、それらの強さおよび特異性によって異なる。使用した宿主ベクター系に応じて、多くの好適な転写および翻訳要素のうちのいずれか1つを使用することができる。

#### 【0183】

一旦適切なマーカをコードするベクターが合成されると、MSCは、対象となるベクターで形質転換されるか、またはトランスフェクトされる。

#### 【0184】

対象となる核酸配列をMSCに導入する標準的な方法を使用することができる。形質転換は、例えば、ポリヌクレオチドをウイルスの中にパッケージングすること、宿主細胞をウイルスで形質導入すること、およびポリヌクレオチドの直接摂取によるような、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための任意の既知の方法によるものであり得る。直接摂取による哺乳動物の形質転換（すなわち、トランスフェクション）は、Graham & Van der Eb, 1978, Virology 52: 546のリン酸カルシウム沈殿法またはその様々な既知の修正法を使用して実施され得る。組換えポリヌクレオチドを細胞、特に、哺乳動物細胞に導入するための他の方法には、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、ポリブレン媒介トランスフェクション、原形質融合、電気穿孔法、リポソーム内でのポリヌクレオチド（複数を含む）の封入、およびポリヌクレオチドの核への直接微量注入が含まれる。そのような方法は、当業者にはよく知られている。

#### 【0185】

好ましい実施形態において、対象となる構築物を含有する安定した細胞株は、ハイスルーブットスクリーニングのために生成される。そのような安定した細胞株は、選択可能なマーカを含む構築物を導入することによって生成され得、これにより、細胞を富化培地中で1～2日間増殖させてから、選択培地上で細胞を増殖させることができる。組み換えプラスミドにおける選択可能なマーカは、選択に対する耐性を付与し、細胞がプラスミドをそれらの染色体に安定に組み込んで巣を形成するように増殖させることを可能にし、それによって、クローン化し、細胞株に拡張させることができる。

#### 【0186】

多くの選択系を使用することができ、これには、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (Wigler, et al., 1977, Cell 11: 223)、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy, et al., 1980, Cell 22: 817) 遺伝子が含まれるが、これらに限定されず、それぞれ、tk-、hgprt-、またはaprt-細胞において使用することができる。また、代謝拮抗物質耐性を、メトトレキサートに対する耐性を付与するdhfr (Wigler, et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567、O'Hare, et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527)；ミコフェノール酸に対する耐性を付与するgpt (Mulligan

10

20

30

40

50

& Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); アミノグリコシド G-418 に対する耐性を付与する neo (Colberre-Garapin, et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1); およびハイグロマイシンに対する耐性を付与する hygro (Santerre, et al., 1984, Gene 30:147) の遺伝子の選択の基礎として使用することもできる。

#### 【0187】

#### 5.6 幹細胞収集組成物

幹細胞収集組成物は、幹細胞の収集および/または培養のために適した任意の生理的に許容される溶液、例えば、生理食塩水（例えば、リン酸緩衝生理食塩水、クレブス溶液、修正クレブス溶液、イーグル溶液、0.9% NaCl 等）、培養培地（例えば、DMEM、H.DMEM 等）等を含むことができる。

#### 【0188】

幹細胞収集組成物は、幹細胞を保存する、すなわち、収集時から培養時において、幹細胞が死滅するのを妨げる、または幹細胞の死滅を遅延させる、死滅する細胞の集団における幹細胞の数を減少させる等の傾向がある、1つ以上の成分を含むことができる。そのような成分は、例えば、アポトーシス阻害剤（例えば、カスパーゼ阻害剤または JNK 阻害剤）、血管拡張剤（例えば、硫酸マグネシウム、抗高血圧剤、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、副腎皮質刺激ホルモン、コルチコトロピン放出ホルモン、ニトロプルシドナトリウム、ヒドララジン、アデノシン三リン酸、アデノシン、インドメタシンもしくは硫酸マグネシウム、ホスホジエステラーゼ阻害剤等）、壊死阻害剤（例えば、2-(1H-インドール-3-イル)-3-ペンチルアミノ-マレイミド、ピロリジンジチオカルバミン酸塩、もしくはクロナゼパム）、TNF-阻害剤、および/または酸素運搬ペルフルオロカーボン（例えば、ペルフルオロオクチルブロミド、ペルフルオロデシルブロミド等）であり得る。

#### 【0189】

幹細胞収集組成物は、例えば、金属プロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、中性プロテアーゼ、RNase、または DNase 等の1つ以上の組織分解酵素を含むことができる。そのような酵素としては、コラゲナーゼ（例えば、コラゲナーゼ I、II、III、または IV、ヒストリチウム菌由来のコラゲナーゼ等）；ディスパーゼ、サーモリシン、エラストラーゼ、トリプシン、LIBERASE、ヒアルロニダーゼ等が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0190】

幹細胞収集組成物は、殺菌的または細菌静的に有効な量の抗生物質を含むことができる。ある特定の非限定的な実施形態において、抗生物質は、マクロライド（例えば、トブラマイシン）、セファロスポリン（例えば、セファレキシン、セフラジン、セフロキシム、セフプロジル (cefprozil)、セファクロル、セフィキシム、もしくはセファドロキシム）、クラリスロマイシン、エリスロマイシン、ペニシリン（例えば、ペニシリン V）、またはキノロン（例えば、オフロキサシン、シプロフロキサシン、もしくはノルフロキサシン (norfloxacin)）、テトラサイクリン、ストレプトマイシン等である。特定の実施形態において、抗生物質は、グラム (+) および/またはグラム (-) 細菌、例えば、緑膿菌、黄色ブドウ球菌等に対して活性である。

#### 【0191】

また、幹細胞収集組成物は、以下の化合物のうちの1つ以上を含むこともできる：アデノシン（約 1 mM ~ 約 50 mM）；D-グルコース（約 20 mM ~ 約 100 mM）；マグネシウムイオン（約 1 mM ~ 約 50 mM）；一実施形態において、内皮完全性および細胞生存能を維持するために十分な量で存在する 20,000 ダルトンを超える分子量の巨大分子（例えば、約 25 g/l ~ 約 100 g/l、または約 40 g/l ~ 約 60 g/l で存在する、合成または天然に存在するコロイド、デキストランもしくはポリエチレングリコール等の多糖体）；抗酸化剤（例えば、約 25 μM ~ 約 100 μM で存在する、ブチル化

ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、グルタチオン、ビタミンC、もしくはビタミンE)；還元剤(例えば、約0.1mM～約5mMで存在する、N-アセチルシステイン)；細胞へのカルシウム流入を防止する薬剤(例えば、約2μM～約25μMで存在するベラパミル)；ニトログリセリン(例えば、約0.05g/L～約0.2g/L)；一実施形態において、残留する血液の凝固を防止するのを補助するために十分な量で存在する抗凝固剤(例えば、約1000単位/L～約100,000単位/Lの濃度で存在するヘパリンもしくはヒルジン)；またはアミロライド含有化合物(例えば、約1.0μM～約5μMで存在する、アミロライド、エチルイソプロピルアミロライド、ヘキサメチレンアミロライド、ジメチルアミロライド、もしくはイソブチルアミロライド)。

【0192】

10

#### 5.7 T-MSCを用いた免疫調節

免疫細胞(複数を含む)を複数のT-MSCまたはiT-MSCと接触させることによる1つの免疫細胞または複数の免疫細胞の活性の調整(例えば、細胞増殖の減少、細胞生存の減少、炎症の部位への細胞遊走の障害、炎症を促進するもしくは長引かせる細胞の能力の低下、または健常な組織もしくは器官の恒常性の回復を促進する細胞機能の向上)が、本明細書に提供される。一実施形態において、免疫応答を調整する方法は、T-MSCまたはiT-MSCが免疫応答を検出可能に抑制するのに十分な時間、複数の免疫細胞を複数のT-MSCまたはiT-MSCと接触させることを含み、T-MSCまたはiT-MSCは、混合リンパ球反応(MLR)アッセイにおいてT細胞増殖を抑制する。

【0193】

20

BM-MSCまたは他の成体組織由来のMSCが、多くの自己免疫疾患を治療するために使用されているため、BM-MSCはまた、炎症ならびに秘密の増殖および保護因子を抑えることによって組織を修復し、損傷組織を置換するために使用される。実施例において後で示されるように、T-MSCは、BM-MSCに対して卓越した免疫抑制機能を有し、そのため、T-MSCは、BM-MSCによって現在標的とされるすべての領域および疾患に使用することができる。

【0194】

免疫調節のために使用されるT-MSCまたはiPS-MSCは、それぞれ、胚性幹細胞株または誘導多能性幹細胞株に由来し得るか、またはそれから得られ得る。免疫調節のために使用されるT-MSCまたはiPS-MSCはまた、活性が調節されるべき免疫細胞と同じ種から、または活性が調節されるべき免疫細胞のものと異なる種に由来し得る。

30

【0195】

本方法の文脈において、「免疫細胞」は、免疫系の任意の細胞、特に、T細胞およびNK(ナチュラルキラー)細胞を意味する。したがって、本方法の様々な実施形態において、T-MSCを、複数の免疫細胞と接触させ、複数の免疫細胞が、複数のT細胞(例えば、複数のCD3<sup>+</sup>T細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞、および/もしくはCD8<sup>+</sup>T細胞)ならびに/またはナチュラルキラー細胞であるか、またはこれらを含む。本方法の文脈において、「免疫応答」は、通常免疫細胞によって認知される刺激に対する免疫細胞による任意の反応、例えば、抗原の存在に対する反応であり得る。様々な実施形態において、免疫応答は、輸血もしくは移植片に存在する抗原等の外来抗原に対して、または自己免疫疾患のように自己抗原に対して反応するT細胞(例えば、CD3<sup>+</sup>T細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞、および/またはCD8<sup>+</sup>T細胞)の増殖であり得る。免疫応答はまた、移植片に含まれるT細胞の増殖であり得る。また、免疫応答は、ナチュラルキラー(NK)細胞の任意の活性、樹状細胞の成熟等であり得る。また、免疫応答は、免疫細胞の1つ以上のクラスの活性の局部的、組織、または臓器特異的、または全身的作用であることができ、例えば、免疫応答は、移植片対宿主病、炎症、炎症関連瘢痕組織の形成、自己免疫性状態(例えば、リウマチ様関節炎、I型糖尿病、エリテマトーデス等)等であり得る。

40

【0196】

この文脈において、「接触」は、T-MSCおよび免疫細胞を、単一の容器(例えば、培養皿、フラスコ、バイアル等)内、またはインピボ、例えば、同じ個体(例えば、哺乳

50

動物、例えば、ヒト)において一緒にすることを含む。好ましい実施形態において、この接触は、免疫細胞の免疫機能の変化が検出可能である十分な時間、および十分な数の T - M S C および免疫細胞との接触である。より好ましくは、様々な実施形態において、この接触は、T - M S C の非存在下での免疫機能と比較して、少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または 95 % まで免疫機能 (例えば、抗原に应答する T 細胞増殖) を抑制するのに十分である。インビボの文脈におけるそのような抑制は、インビトロアッセイにおいて決定することができ、すなわち、インビトロアッセイにおける抑制の程度は、レシピエント個体における特定数の T - M S C および多数の免疫細胞に関して、個体における抑制の程度を推定することができる。

【0197】

10

ある特定の実施形態において、本発明は、免疫応答、または複数の 1 つ以上のタイプの免疫細胞をインビトロで調整するために T - M S C を使用する方法を提供する。T - M S C および複数の免疫細胞の接触には、複数の T - M S C の少なくとも一部が複数の免疫細胞の少なくとも一部と相互作用するように、同じ物理的空間で T - M S C と免疫細胞を合わせることと、共通の培地を用い、分離された物理的空間において T - M S C および免疫細胞を維持することとを含むことができるか、または T - M S C もしくは免疫細胞の 1 つもしくは培養液からの培地を他のタイプの細胞と接触させること (例えば、T - M S C の培養液から培養培地を得て、培地中の単離された免疫細胞を再懸濁すること) を含むことができる。特定の例において、接触は、混合リンパ球反応 (M L R) である。

【0198】

20

そのような接触は、例えば、特定の複数の T - M S C が免疫調節、例えば、免疫抑制される範囲を決定するように設計される実験的設定において行われ得る。そのような実験的設定は、例えば、混合リンパ球反応 (M L R) または退行アッセイであり得る。M L R および退行アッセイを行うための手順は、当該技術分野でよく知られている。例えば、S c h w a r z , " T h e M i x e d L y m p h o c y t e R e a c t i o n : A n I n V i t r o T e s t f o r T o l e r a n c e , " J . E x p . M e d . 127 (5) : 879 - 890 (1968)、L a c e r d a e t a l . , " H u m a n E p s t e i n - B a r r V i r u s ( E B V ) - S p e c i f i c C y t o t o x i c T L y m p h o c y t e s H o m e P r e f e r e n t i a l l y t o a n d I n d u c e S e l e c t i v e R e g r e s s i o n s o f A u t o l o g o u s E B V - I n d u c e d B L y m p h o p r o l i f e r a t i o n s i n X e n o g r a f t e d C . B - 17 S c i d / S c i d M i c e , " J . E x p . M e d . 183 : 1215 - 1228 (1996) を参照のこと。好ましい実施形態において、複数の T - M S C を複数の免疫細胞 (例えば、リンパ球、例えば、C D 3 + C D 4 +、および / または C D 8 + T リンパ球) と接触させる M L R が行われる。

30

【0199】

M L R は、複数の T - M S C の免疫抑制の能力を決定するために使用することができる。例えば、複数の T - M S C は、C D 4 + または C D 8 + T 細胞、樹状細胞 (D C)、および T - M S C を約 10 : 1 : 2 の比率で合わせることを含む M L R において試験することができ、T 細胞を、例えば、娘細胞に分配される、例えば C F S E 等の色素で染色し、この T 細胞を約 6 日間増殖させる。T - M S C の存在下、6 日間で T 細胞増殖が、D C の存在および T - M S C の非存在における T 細胞増殖と比較して、検出可能に減少する場合、複数の T - M S C は、免疫抑制性である。そのような M L R において、T - M S C は、解凍されるか、または培養から収集される。約 10,000 個の T - M S C を、100  $\mu$  l の培地 (R P M I 1640、1 m M H E P E S 緩衝液、抗生物質、および 5 % のブールしたヒト血清) 中に再懸濁し、ウェルの底面に 2 時間接着させる。C D 4 + および / または C D 8 + T 細胞を、全末梢血単核細胞 M i l t e n y i 磁気ビーズから単離する。細胞を C F S E 染色し、合計 100,000 個の T 細胞 (C D 4 + T 細胞単独、C D 8 + T 細胞単独、または同量の C D 4 + および C D 8 + T 細胞) をウェルあたりに添加する。

40

50

ウェルの体積を  $200\ \mu\text{l}$  にして、MLRを進行させる。

【0200】

したがって、一実施形態において、本発明は、免疫応答を抑制する方法を提供し、本方法は、T-MSCが混合リンパ球反応（MLR）アッセイにおいてT細胞の増殖を検出可能に抑制するのに十分な時間、複数の免疫細胞を複数のT-MSCと接触させることを含む。

【0201】

異なる胚性幹細胞株から得られたT-MSCの集団は、免疫細胞の活性を調整するそれらの能力が異なり得る、例えば、T細胞活性もしくは増殖またはNK細胞活性を抑制するそれらの能力は異なる得る。したがって、使用前に、免疫抑制に対するT-MSCの特定の集団の能力を決定することが望ましい。そのような能力は、例えば、MLRまたは退行アッセイにおいて幹細胞集団の試料を試験することによって決定することができる。一実施形態において、MLRは、試料を用いて行い、T-MSCに起因するアッセイにおいて免疫抑制の程度を決定する。次いで、この免疫抑制の程度は、試料採取した幹細胞集団に起因し得る。したがって、MLRは、免疫機能を抑制するT-MSCの特定の集団の絶対的および相対的能力を決定する方法として使用することができる。MLRのパラメータは、より多くのデータを提供するように、または免疫抑制するT-MSCの試料の能力を最良に決定するように変更することができる。例えば、T-MSCによる免疫抑制がアッセイに存在するT-MSCの数に比例して増加するようであるため、MLRは、一実施形態において、幹細胞の2倍以上の数、例えば、反応あたり  $1 \times 10^3$ 、 $3 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、および/または  $3 \times 10^4$  個のT-MSCで行うことができる。アッセイにおけるT細胞の数と相対的なT-MSCの数も変更することもできる。例えば、アッセイにおけるT-MSCおよびT細胞は、例えば、約10:1～約1:10、好ましくは約1:5の任意の比で存在することができるが、相対的により多くの数のT-MSCまたはT細胞を使用することができる。

【0202】

本発明はまた、免疫応答、または複数の1つ以上のタイプの免疫細胞をインビボで調整するためにT-MSCを使用する方法を提供する。T-MSCおよび免疫細胞は、例えば、複数のT-MSCのレシピエントである個体において接触させることができる。接触が個体において行われる場合、一実施形態において、この接触は、外因性T-MSC（すなわち、個体に由来しないT-MSC）と、個体に対して内因性の複数の免疫細胞との間である。特定の実施形態において、個体内の免疫細胞は、 $CD3^+$ T細胞、 $CD4^+$ T細胞、 $CD8^+$ T細胞、および/またはNK細胞である。

【0203】

T-MSCを用いたそのような免疫抑制は、不適当な、もしくは望ましくない免疫応答によって生じた、または悪化した、または関連した、任意の状態に関して有利であろう。T-MSCを媒介した免疫調節、例えば免疫抑制は、例えば、それ自体の組織のうちの1つ以上に対する個体の免疫系によって生じる不適当な免疫応答の抑制に有用であろう。したがって、様々な実施形態において、本発明は、免疫応答を抑制する方法を提供し、この免疫応答は、自己免疫疾患、例えば、紅斑性狼瘡、糖尿病、リウマチ性関節炎、または多発性硬化症である。

【0204】

複数のT-MSCの、免疫細胞の1つ以上のタイプの複数のとの接触は、レシピエント個体に対する1つ以上のタイプの組織の移植術または移植の状況において、または補助として、インビボにおいて行うことができる。そのような組織は、例えば、骨髄もしくは血液、器官、特定組織（例えば、皮膚移植）、複合組織同種移植片（すなわち、2つ以上の異なるタイプの組織を含む移植片）等であってもよい。この点に関しては、T-MSCは、レシピエント個体内に、移植された組織もしくは移植片、または両方に含まれる1つ以上の免疫細胞の1つ以上の免疫応答を抑制するために使用することができる。接触は、移植術もしくは移植の前、その間、および/またはその後に行うことができる。例えば、T-

M S C は、移植または移植術の時に投与することができる。また、T - M S C は、または代替的に、移植または移植術の前、例えば、移植または移植術の約 1、2、3、4、5、6、または 7 日前に投与することもできる。また、T - M S C は、または代替的に、移植または移植術の後に、例えば、移植または移植術の約 1、2、3、4、5、6、または 7 日後に移植または移植術のレシピエントに投与することもできる。好ましくは、複数の T 細胞は、レシピエント個体または移植された組織もしくは移植片のいずれかによる免疫応答の任意の検出可能な徴候または症状、例えば、移植片対宿主病の検出可能な徴候もしくは症状または検出可能な炎症が検出可能になる前に、複数の T - M S C と接触される。

#### 【0205】

別の実施形態において、個体内の接触は、主に、外因性 T - M S C と外因性前駆細胞または幹細胞、例えば、免疫細胞に分化する外因性前駆細胞または幹細胞との間である。例えば、癌療法に対する補助として部分的または完全な免疫破壊または骨髄抑制を受けている個体には、幹または前駆細胞のうちの 1 つ以上の他のタイプと組み合わせて T - M S C を受けさせることができる。例えば、T - M S C は、複数の C D 3 4 <sup>+</sup> 細胞、例えば、C D 3 4 <sup>+</sup> 造血幹細胞と組み合わせることができる。そのような C D 3 4 <sup>+</sup> 細胞は、例えば、末梢血、臍帯血、胎盤血、または骨髄等の組織源からの C D 3 4 <sup>+</sup> 細胞であり得る。C D 3 4 <sup>+</sup> 細胞は、そのような組織源から単離することができるか、または組織源全体（例えば、臍帯血もしくは骨髄の単位）もしくは組織源から部分的に精製された調製物（例えば、臍帯血からの白血球）を T - M S C と組み合わせることができる。

#### 【0206】

T - M S C は、好ましくは、個体において免疫細胞、例えば、T 細胞の知られているか、もしくは予想される数に関して、約 1 0 : 1 ~ 約 1 : 1 0、好ましくは約 1 : 5 の比で個体に投与される。しかしながら、非限定的な例において、複数の T - M S C を、約 1 0 , 0 0 0 : 1、約 1 , 0 0 0 : 1、約 1 0 0 : 1、約 1 0 : 1、約 1 : 1、約 1 : 1 0、約 1 : 1 0 0、約 1 : 1 , 0 0 0、または約 1 : 1 0 , 0 0 0 の比で個体に投与することができる。一般に、レシピエントキログラムあたり約  $1 \times 10^5$  ~ 約  $1 \times 10^8$  個の T - M S C、好ましくはレシピエントキログラムあたり約  $1 \times 10^6$  ~ 約  $1 \times 10^7$  個の T - M S C を、免疫抑制をもたらすために投与することができる。様々な実施形態において、個体または対象に投与される複数の T - M S C は、少なくとも、約、 $1 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $3 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^9$  個もしくはそれ以下、またはそれより多い T - M S C を含む。

#### 【0207】

また、T - M S C は、1 つ以上の第 2 のタイプの幹細胞、例えば、骨髄由来の間葉系幹細胞とともに投与することもできる。そのような第 2 の幹細胞は、個体に対して、例えば、約 1 : 1 0 ~ 約 1 0 : 1 の比で T - M S C とともに投与することができる。

#### 【0208】

T - M S C および免疫細胞をインビボで接触させることを促進するために、T - M S C は、T - M S C および免疫細胞を互いに接触させるために十分な任意の経路によって個体に投与することができる。例えば、T - M S C は、個体に対して、例えば、静脈内に、筋肉内に、腹腔内に、または器官、例えば脾臓内に直接投与することができる。インビボの投与のために、T - M S C は、薬学的組成物として製剤化することができる。

#### 【0209】

免疫抑制の方法は、特にインビボの状況において、1 つ以上の免疫抑制剤の添加をさらに含むことができる。一実施形態において、複数の T - M S C を、個体においてインビボで複数の免疫細胞と接触させて、免疫抑制剤を含む組成物を個体に投与する。免疫抑制剤は、当該技術分野でよく知られており、例えば、抗 T 細胞受容体抗体（モノクローナルもしくはポリクローナル、またはその抗体断片もしくは誘導体）、抗 I L - 2 受容体抗体（例えば、B a s i l i x i m a b（S I M U L E C T（登録商標））もしくはダクリズマブ（Z E N A P A X（登録商標））、抗 T 細胞受容体抗体（例えば、ムロモナブ - C D 3）、アザチオプリン、副腎皮質ステロイド、シクロスポリン、タクロリムス、ミコフェノ

10

20

30

40

50



ール酸モフェチル、シロリムス、カルシニューリン阻害剤等を含む。特定の実施形態において、免疫抑制剤は、マクロファージ炎症性タンパク質 (M I P) - 1 または M I P - 1 に対する中和抗体である。

#### 【 0 2 1 0 】

##### 5 . 8 T - M S C および / または T - M S C - D L の保存

T - M S C および / または T - M S C - D L は、保存すること、すなわち、長期貯蔵を可能にする条件、または例えば、アポトーシスもしくは壊死による細胞死を阻害する条件下におくことができる。T - M S C および / または T - M S C - D L は、例えば、アポトーシス阻害剤、壊死阻害剤を含む組成物を使用して調製することができる。一実施形態において、本発明は、幹細胞の集団を保存する方法を提供し、本方法は、幹細胞の集団をアポトーシスの阻害剤を含む幹細胞収集組成物と接触させることを含み、アポトーシスの阻害剤は、アポトーシスの阻害剤と接触しない幹細胞の集団と比較して、幹細胞の集団におけるアポトーシスを低減または防止するのに十分な量および時間で存在する。特定の実施形態において、アポトーシスの阻害剤は、カスパーゼ阻害剤である。別の特定の実施形態において、アポトーシスの阻害剤は、J N K 阻害剤である。さらに特定の実施形態において、J N K 阻害剤は、幹細胞の分化または増殖のいずれも調整しない。別の実施形態において、幹細胞収集組成物は、アポトーシスの阻害剤および酸素運搬ペルフルオロカーボン

を別々の相に含む。別の実施形態において、幹細胞収集組成物は、アポトーシスの阻害剤および酸素運搬ペルフルオロカーボンを乳剤中に含む。別の実施形態において、幹細胞収集組成物は、さらに、乳化剤、例えば、レシチンを含む。別の実施形態において、アポトーシス阻害剤およびペルフルオロカーボンは、幹細胞を接触させる時に、約 0 ~ 約 2 5 の間である。別のさらに特定の実施形態において、アポトーシス阻害剤およびペルフルオロカーボンは、幹細胞を接触させる時に、約 2 ~ 1 0 または約 2 ~ 約 5 の間である。別のさらに特定の実施形態において、接触は、幹細胞の集団の輸送の間に行われる。別のさらに特定の実施形態において、接触は、幹細胞の集団の凍結融解の間に行われる。

#### 【 0 2 1 1 】

別の実施形態において、本発明は、T - M S C および / または T - M S C - D L の集団を保存する方法を提供し、本方法は、幹細胞の集団をアポトーシスの阻害剤および器官保存化合物と接触させることを含み、アポトーシスの阻害剤は、アポトーシスの阻害剤と接触しない幹細胞の集団と比較して、幹細胞の集団におけるアポトーシスを低減、または防止するのに十分な量および時間で存在する。

#### 【 0 2 1 2 】

典型的には、T - M S C および / または T - M S C - D L の収集、濃縮、および単離の間に、低酸素症および機械的ストレスによる細胞ストレスを最小限に抑えるか、または除去することが好ましい。したがって、本方法の別の実施形態において、幹細胞または幹細胞の集団は、収集、濃縮、および単離の間に、保存の間の 6 時間未満の間、正常な血液酸素濃度未満である酸素の濃度である低酸素状態に曝露される。さらに特定の実施形態において、幹細胞の集団は、保存の間に、2 時間未満の間、低酸素状態に曝露される。別のさらに特定の実施形態において、幹細胞の集団は、1 時間もしくは 3 0 分未満より少ない間、低酸素状態に曝露されるか、または収集、濃縮、もしくは単離の間に、低酸素状態に曝露されない。別の特定の実施形態において、幹細胞の集団は、収集、濃縮、または単離の間にせん断応力に曝露されない。

#### 【 0 2 1 3 】

T - M S C および / または T - M S C - D L は、例えば、小さな容器、例えば、アンブル内の凍結保存培地に凍結保存することができる。好適な凍結保存培地には、例えば、成長培地または細胞凍結培地、例えば、市販の細胞凍結培地、例えば、C 2 6 9 5、C 2 6 3 9、もしくは C 6 0 3 9 ( S i g m a ) が含まれるが、これらに限定されない培養培地が含まれる。凍結保存培地は、好ましくは、例えば、約 1 0 % ( v / v ) の濃度で、D M S O ( d i m e t h y l s u l f o x i d e ) を含む。凍結保存培地は、さらなる薬剤、

例えば、メチルセルロースおよび／またはグリセロールを含んでもよい。T - MSC および／または T - MSC - DL は、好ましくは、凍結保存の間に約 1 / 分で冷却される。好ましい凍結保存温度は、約 - 80 ~ 約 - 180 、好ましくは約 - 125 ~ 約 - 140 である。凍結保存された細胞は、使用のために解凍する前に、液体窒素に移すことができる。いくつかの実施形態において、例えば、一旦アンプルが約 - 90 に達したならば、それらを液体窒素貯蔵領域に移す。凍結保存された細胞は、好ましくは、約 25 ~ 約 40 の温度で、好ましくは約 37 の温度に解凍される。

#### 【0214】

#### 5.9 凍結保存された T - MSC および／または T - MSC - DL

本明細書に開示される T - MSC および／または T - MSC - DL が、保存すること、例えば、後で使用するために凍結保存することができる。幹細胞等の細胞の凍結保存のための方法は、当該技術分野でよく知られている。T - MSC および／または T - MSC - DL は、個体に容易に投与可能な形態に調製することができる。例えば、医療用に適した容器内に含まれる T - MSC および／または T - MSC - DL が、本明細書に提供される。そのような容器は、例えば、無菌のプラスチック袋、フラスコ、瓶、または T - MSC および／もしくは T - MSC - DL が容易に分配することができる他の容器であり得る。例えば、容器は、血液バッグ、または、レシピエントに液体を静脈内投与するのに適した医学的に許容される他のプラスチックバッグであり得る。この容器は、好ましくは、合わせた幹細胞集団を凍結保存することができるものである。凍結保存された T - MSC および／または T - MSC - DL は、単一のドナーに、または複数のドナーに由来する T - MSC および／または T - MSC - DL を含むことができる。T - MSC および／または T - MSC - DL は、意図されたレシピエントに完全に HLA 一致、または部分的にもしくは完全に HLA ミスマッチし得る。

#### 【0215】

別の特定の実施形態において、この容器は、バッグ、フラスコ、または瓶である。さらに特定の実施形態において、このバッグは、無菌のプラスチックバッグである。さらに特定の実施形態において、このバッグは、T - MSC および／または T - MSC - DL の静脈内投与を可能にする、または促進するのに適している。このバッグは、例えば、薬物の投与前または投与の間に、T - MSC および／または T - MSC - DL と 1 つ以上の他の溶液の混合を可能にする複数の内腔またはコンパートメントを含むことができる。別の特定の実施形態において、組成物は、合わせた幹細胞集団の凍結保存を促進する 1 つ以上の化合物を含む。別の特定の実施形態において、T - MSC および／または T - MSC - DL は、生理的に許容される水溶液内に含まれる。さらに特定の実施形態において、生理的に許容される水溶液は、0.9% NaCl 溶液である。別の特定の実施形態において、hES - MSC は、幹細胞集団のレシピエントに対して HLA 一致である。別の特定の実施形態において、合わせた幹細胞集団は、幹細胞集団のレシピエントに対して少なくとも部分的に HLA ミスマッチである hES - MSC を含む。

#### 【0216】

#### 5.10 T - MSC の多系統への分化

T - MSC は、神経細胞系細胞もしくはニューロン、または脂肪細胞、または筋芽細胞、または線維芽細胞、または骨芽細胞もしくは軟骨細胞 (chondrocytes) を含む様々な細胞系統に分化され得る。別途具体的な記載のない限り、T - MSC は、ゼラチン、コラーゲン、フィブロネクチン、マトリゲル、ラミニン、ビトロネクチン、またはポリ(リシン)でコーティングした細胞培養プレート上に播種され得る。T - MSC は、ウシ血清 FBS または ABHS を含む無血清培地または血清含有培地中で  $1 \times 10^3$  個の細胞 /  $\text{cm}^2$  ~  $1 \times 10^4$  個の細胞 /  $\text{cm}^2$  の濃度で播種され得る。上述の条件により播種された T - MSC は、以下の方法のうちの 1 つによって分化され得る。

#### 【0217】

一実施形態において、T - MSC は、1 ~ 50 ng / ml の線維芽細胞増殖因子 (FGF) - 2 (任意に 10 ng / ml) + 1 ~ 50 ng / ml の上皮細胞増殖因子 (EGF)

(任意に  $10 \text{ ng/ml}$ ) +  $0.5 \sim 5 \text{ ng/ml}$  の血小板由来の増殖因子 (PDGF) (任意に  $1 \text{ ng/ml}$ ) を含む培地中で分化され得る。この培地を、2 ~ 3 日ごとに交換し、細胞を、2 ~ 4 週間後に収穫し、 $1 \times 10^6$  個の T - MSC あたり  $0.5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  個の神経細胞系細胞の期待収量を得る。

#### 【0218】

別の実施形態において、T - MSC は、ポリ - L - オルニチンおよびラミニンでコーティングしたプレート上に播種することによって、神経細胞系細胞に分化され得る。T - MSC は、3 つの段階で分化されよう。段階 1 : 神経運命に対する hMSC を準備するために、 $1 \sim 50 \text{ ng/ml}$  の FGF - 2 (任意に  $10 \text{ ng/ml}$ ) および  $1 \sim 50 \text{ ng/ml}$  の EGF (任意に  $10 \text{ ng/ml}$ )。段階 2 : 中脳の仕様を開始するために、 $10 \sim 200 \text{ ng/ml}$  のソニックヘッジホッグ (Sonic Hedgehog) (SHH) (任意に  $100 \text{ ng/ml}$ )、 $1 \sim 50 \text{ ng/ml}$  の FGF - 8 (ヒト) (任意に  $10 \text{ ng/ml}$ ) および  $50 \sim 500 \mu\text{M}$  の ACP (任意に  $200 \mu\text{M}$ )。段階 3 : ドーパミン神経表現型に対して分化および成熟を誘発するために、 $5 \sim 500 \text{ ng/ml}$  のグリア由来の神経栄養因子 (GDNF) (任意に  $50 \text{ ng/ml}$ ) および  $50 \sim 500 \mu\text{M}$  の ACP (任意に  $200 \mu\text{M}$ )。各段階を、1 週間適用し、接着した細胞を、各段階の間でトリプシンまたは TrypLE / ディスパーゼで解離させることによって継代する。増殖因子は、毎日補充し、この培地は、2 日ごとに交換する。期待収量は、 $1 \times 10^6$  個の T - MSC あたり  $0.5 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$  個の神経細胞系細胞である。

#### 【0219】

別の実施形態において、T - MSC は、 $0.25 \times \text{B} - 27$  補給剤 +  $10 \sim 200 \text{ ng/ml}$  のソニックヘッジホッグ (SHH) (任意に  $100 \text{ ng/ml}$ ) +  $1 \sim 50 \text{ ng/ml}$  の FGF - 8 (マウス) (任意に  $10 \text{ ng/ml}$ ) +  $1 \sim 200 \text{ ng/ml}$  の FGF - 2 (任意に  $50 \text{ ng/ml}$ ) を含む神経基底培地 (Gibco) 中で神経細胞系細胞に分化され得る。細胞は、6 日後および 12 日後に収穫される。培地は、この期間中入れ替えない。期待収量は、 $1 \times 10^6$  個の T - MSC あたり  $0.5 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$  個の神経細胞系細胞である。

#### 【0220】

別の実施形態において、T - MSC は、2 つの段階で神経細胞系細胞に分化され得る。段階 1 : T - MSC を、 $2 \text{ mM}$  のグルタミン、 $1 \sim 20 \text{ U/ml}$  (任意に  $12.5 \text{ U/ml}$ ) のナイスタチン、N2 補給剤、および  $2 \sim 50 \text{ ng/ml}$  (任意に  $20 \text{ ng/ml}$ ) の線維芽細胞増殖因子 - 2 (FGF - 2)、および  $1 \sim 50 \text{ ng/ml}$  の EGF (任意に  $10 \text{ ng/ml}$ ) を含む無血清培地 (DMEM) 中で  $48 \sim 72$  時間培養する。段階 2 : 細胞を、神経基底培地 + B27 補給剤 +  $0.1 \sim 10 \text{ mM}$  (任意に  $1 \text{ mM}$ ) のジブチリル環状 AMP (dbcAMP)、3 - イソブチル - 1 - メチルキサンチン (IBMX)、および  $10 \sim 500 \mu\text{M}$  (任意に  $200 \mu\text{M}$ ) アスコルビン酸 +  $1 \sim 100 \text{ ng/ml}$  の BDNF (任意に  $50 \text{ ng/ml}$ )、 $1 \sim 50 \text{ ng/ml}$  のグリア由来の神経栄養因子 (GDNF; 任意に  $10 \text{ ng/ml}$ )、 $0.2 \sim 10 \text{ ng/ml}$  の形質転換増殖因子 - 3 (TGF - 3、任意に  $2 \text{ ng/ml}$ )、および  $0.05 \sim 5 \mu\text{M}$  のオールトランスレチノイン酸 (RA、任意に  $0.1 \mu\text{M}$ ) 中で培養する。各段階を、1 週間適用し、接着した細胞を、各段階の間でトリプシンまたは TrypLE / ディスパーゼで解離させることによって継代する。培地を、2 日ごとに交換し、期待収量は、 $1 \times 10^6$  個の T - MSC あたり  $0.5 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$  個の神経細胞系細胞である。

#### 【0221】

別の実施形態において、T - MSC は、骨形成分化を誘導するために培養され得る。T - MSC は、低グルコース DMEM + 10% の FCS、 $1 \sim 150 \mu\text{M}$  (任意に  $80 \mu\text{M}$ ) のアスコルビン酸 2 - リン酸塩、 $0.5 \sim 5 \mu\text{M}$  (任意に  $1 \mu\text{M}$ ) のデキサメタゾン、および  $1 \sim 100 \text{ mM}$  (任意に  $20 \text{ mM}$ ) のベータ - グリセロリン酸塩中で培養される。培地は、2 ~ 3 日ごとに交換し、期待収量は、2 週間後、 $1 \times 10^6$  個の T - MSC あたり  $0.5 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$  個の神経細胞系細胞である。

## 【0222】

別の実施形態において、T-MSCは、脂肪生成分化を誘導するために培養され得る。T-MSCは、低グルコースDMEM+20%のFCS、 $1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ （任意に $5 \mu\text{g/ml}$ ）のインスリン、 $0.5 \sim 10 \mu\text{M}$ （任意に $2 \mu\text{M}$ ）のデキサメタゾン、 $0.1 \sim 1 \text{mM}$ （任意に $0.5 \text{mM}$ ）のイソブチルメチルキサンチン、および $1 \sim 100 \mu\text{M}$ （任意に $60 \mu\text{M}$ ）のインドメタシン中で培養される。培地は、2～3日ごとに交換し、期待収量は、4週間後、 $1 \times 10^6$ 個のT-MSCあたり $0.5 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 個の神経細胞系細胞である。

## 【0223】

別の実施形態において、T-MSCは、軟骨細胞分化を誘導するために培養され得る。T-MSCは、 $0.5 \sim 10 \text{mM}$ （任意に $1 \text{mM}$ ）のピルビン酸ナトリウム、 $0.05 \sim 1 \text{mM}$ （任意に $0.1 \text{mM}$ ）のアスコルビン酸2-リン酸塩、 $0.05 \sim 1 \mu\text{M}$ （任意に $0.1 \mu\text{M}$ ）のデキサメタゾン、 $0.2 \sim 2\%$ （任意に $1\%$ ）のITS、および $1 \sim 50 \text{ng/ml}$ （任意に $10 \text{ng/ml}$ ）のTGF- $\beta$ 3を含む高グルコースDMEM中、ペレット中で増殖される。培地は、2～3日ごとに交換し、期待収量は、20日後、 $1 \times 10^6$ 個のT-MSCあたり $0.5 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 個の神経細胞系細胞である。

## 【0224】

別の実施形態において、T-MSCは、筋原性分化を誘導するために培養され得る。T-MSCは、10%のFBS、 $1 \sim 20 \mu\text{M}$ （任意に $10 \mu\text{M}$ ）の5-アザシチジン、および $1 \sim 50 \text{ng/ml}$ （任意に $10 \text{ng/ml}$ ）の塩基性FGFを含む低グルコースDMEM中で増殖される。24時間後、筋原性誘導培地を、10%のFBS+ $1 \sim 50 \text{ng/ml}$ （任意に $10 \text{ng/ml}$ ）の塩基性FGFを含むDMEMと置き換える。培地は、2～3日ごとに交換し、期待収量は、2週間後、 $1 \times 10^6$ 個のT-MSCあたり $0.5 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 個の神経細胞系細胞である。

## 【0225】

別の実施形態において、T-MSCは、線維芽細胞分化を誘導するために培養され得る。T-MSCは、 $50 \sim 200 \text{ng/ml}$ （任意に $100 \text{ng/ml}$ ）の組換えヒト結合組織増殖因子（CTGF）、および $1 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ （任意に $50 \mu\text{g/ml}$ ）のアスコルビン酸を含むDMEM+10%のFBSで処理されたhMSC中で増殖される。培地は、3～4日ごとに交換し、期待収量は、4週間後、 $1 \times 10^6$ 個のT-MSCあたり $0.5 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 個の神経細胞系細胞である。

## 【0226】

分化法を使用したT-MSC由来のすべての細胞系統および細胞型が、含まれるが、これに限定されず、上記の方法は、期間中ずっと、T-MSC-DLと称される。

## 【0227】

## 5.11 薬学的調製物

一実施形態において、治療有効量のT-MSCおよび薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物が、本明細書に提供される。

## 【0228】

薬学的組成物は、任意の数のT-MSCおよび/またはT-MSC-DLを含むことができる。例えば、様々な実施形態において、T-MSCの単一単位用量は、約、少なくとも、または $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ もしくはそれ以下、またはそれ以上のT-MSCおよび/またはT-MSC-DLを含み得る。

## 【0229】

本明細書に開示される薬学的組成物は、50%またはそれ以上の生存細胞を含む細胞集団を含む（つまり、集団中の細胞の少なくとも50%が機能的または生存している）。好ましくは、集団中の細胞の少なくとも60%が生存している。より好ましくは、薬学的組成物中の集団中の細胞の少なくとも70%、80%、90%、95%、または99%が生

10

20

30

40

50

存している。

【0230】

本明細書に開示される薬学的組成物は、例えば、生着を促進する1つ以上の化合物（例えば、抗T細胞受容体抗体、免疫抑制剤等）、アルブミン、デキストラン40、ゼラチン、ヒドロキシエチルデンプン等の安定剤等を含むことができる。

【0231】

「薬学的に許容される」という語句は、ヒトに投与されたときに、生理的に耐えられ、異常亢進および目まい等のアレルギーまたは類似の有害反応を一般的に生じない、そして、動物、より具体的には、ヒトに使用するために、連邦もしくは州政府の規制当局によって承認される、または米国薬局もしくは他の一般に認識される薬局方に列挙される、分子の実体および組成物を指す。「担体」とは、治療剤と一緒に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。そのような薬学的担体は、例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油等の石油、動物、植物、もしくは合成由来のものを含む、水および油中の食塩溶液等の滅菌液であり得る。薬学的組成物を静脈内投与する場合、食塩溶液が、好ましい担体である。食塩溶液ならびに水性デキストロスおよびグリセロール溶液を、液体担体として、特に注射用溶液に使用することもできる。好適な薬学的賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコレート、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等が含まれる。所望により、組成物はまた、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含有することもできる。

【0232】

これらの組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末剤、徐放製剤、カシェ剤、トローチ、ロゼンジ、分散剤、坐薬、軟膏、パップ（湿布）、ペースト、粉末、包帯剤、クリーム、硬膏、パッチ、エアロゾル、ゲル、患者への非経口投与に適した液体剤形、患者への非経口投与に適した液体剤形を提供するために再構成され得る滅菌固体（例えば、結晶または非晶質固体）の形態をとることができる。そのような組成物は、患者への適切な投与のための形態を提供するような好適な形態の担体とともに、好ましくは精製した形態で、治療有効量の化合物を含む。この製剤は、投与様式に適するものでなければならない。

【0233】

経口投与に適合する薬学的組成物は、カプセル剤、錠剤、粉末、顆粒、液剤、シロップ剤、懸濁液（非水性もしくは水性液体中）、または乳剤であり得る。錠剤または硬ゼラチンカプセル剤は、ラクトース、デンプンまたはそれらの誘導体、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム、ステアリン酸またはそれらの塩を含み得る。軟ゼラチンカプセル剤は、植物油、ワックス、脂肪、半固体、または液体ポリオールを含み得る。液剤およびシロップ剤は、水、ポリオール、および糖を含み得る。経口投与を目的とする活性物質は、胃腸管における活性物質の崩壊および/または吸収を遅延させる物質でコーティングし得るか、またはその物質と混合し得る。したがって、その持続放出を、数時間かけて達成させ得、必要な場合には、活性物質を胃内における分解から保護することができる。経口投与用の薬学的組成物は、特定のpHまたは酵素的条件による胃腸の特定の位置での活性物質の放出を促進するために製剤化され得る。

【0234】

経皮投与に適合する薬学的組成物は、レシipientの表皮との密な接触を長時間維持することを目的として、別々のパッチとして提供され得る。

【0235】

鼻および肺投与に適合する薬学的組成物は、鼻を通して急速な吸入により投与することができる、粉末等の固体担体を含み得る。経鼻投与のための組成物は、スプレーまたは点鼻剤等の液体担体を含み得る。代替的に、肺への直接の吸入は、深い吸入またはマウスピースを通した導入により達成され得る。これらの組成物は、活性成分の水性または油性溶

液を含み得る。吸入用組成物は、所定の用量の活性成分を提供するために構成され得る加圧エアロゾル、噴霧器、または吸入器が含まれるが、これらに限定されない、特別に適合させた装置において供給され得る。

#### 【0236】

非経口投与に適合する薬学的組成物には、水性および非水性の無菌注射用溶液または懸濁液が含まれ、これらは、酸化防止剤、緩衝液、静菌剤、および対象の血液と実質的に等張にする組成物を示す溶質を含み得る。そのような組成物中に存在し得る他の成分には、水、アルコール、ポリオール、グリセリン、および植物油が含まれる。非経口投与に適合する組成物は、単回用量または複数回用量用の容器、例えば、密封したアンプルおよびバイアル中に存在し得、使用直前に、無菌担体の添加のみを必要とするフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保管され得る。即時調製注射溶液および懸濁液は、無菌の粉末、顆粒、および錠剤から調製され得る。本発明の非経口剤形を提供するために使用することができる好適なビヒクルは、当業者にはよく知られている。例には、注射用蒸留水USP、塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、デキストロース注射液、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射液、乳酸化リンガー注射液等の水性ビヒクル；エトリアルコール、ポリエチレングリコール、およびポリプロピレングリコール等の水混和性ビヒクル；ならびにトウモロコシ油、綿実油、ピーナッツ油、ゴマ油、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、および安息香酸ベンジル等の非水性ビヒクルが含まれる。

#### 【0237】

治療有効量の選択は、当業者に知られているいくつかの要因を考慮して、専門家により決定される。そのような要因には、阻害剤の特定の形態、ならびに薬学的組成物の規制認可を得る際に一般的に使用される一般開発手続き（usual development procedures）中に確立されるバイオアベイラビリティ、代謝、および半減期等のその薬物動態パラメーターが含まれる。用量を考慮する際のさらなる要因には、治療される状態もしくは疾患、または正常な個体において達成される利益、患者の体重、投与経路（投与が急性または慢性的であるかどうかに関わらず）、併用する薬剤、ならびに投与される薬剤の効力に影響を与えることがよく知られている他の要因が含まれる。したがって、正確な投薬量は、当業者の判断および各患者の状況に従って、ならびに標準的な臨床技術に従って決定されるべきである。

#### 【0238】

ある特定の実施形態において、患者は、hES-MSC治療における凍結保存成分に関連した任意の可能なDMSOの注入毒性を最小限に抑えるために、解熱剤および/または抗ヒスタミン剤（アセトアミノフェンおよびジフェンヒドラミン塩酸塩）で治療される。

#### 【0239】

##### 5.12 T-MSC馴化培地および誘導体

本明細書に開示されるT-MSCは、免疫抑制のある馴化培地、すなわち、複数の1つ以上のタイプの免疫細胞への検出可能な免疫抑制効果を有する幹細胞によって分泌され、排出される1つ以上の生体分子を含む培地を生成するために使用することができる。様々な実施形態において、馴化培地は、T-MSCが、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日、またはそれ以上の間、増殖している培地を含む。他の実施形態において、馴化培地には、T-MSCが、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%のコンフルエンス、または100%のコンフルエンスまで増殖した培地を含む。そのような馴化培地は、T-MSCの別の集団、または別の種類の幹細胞の培養を補助するために使用することができる。別の実施形態において、馴化培地には、T-MSCが成体細胞型に分化した培地を含む。別の実施形態において、本発明の馴化培地には、T-MSCおよび非T-MSCを培養した培地を含む。

#### 【0240】

したがって、一実施形態において、本発明は、T-MSCの培養液からの培養培地、細胞溶解物、および/または他の誘導体を含む組成物を提供し、T-MSCは、(a)基質に付着し、(b)CD73、CD105、CD90、CD29、CD44、CD146、

10

20

30

40

50

IL - 10、TGF $\beta$ 2、HGFを発現するが、IL - 6、TNF、IL - 12、および/またはRAGEを発現しない。別の特定の実施形態において、この組成物は、抗増殖剤、例えば、抗MIP - 1 または抗MIP - 1 抗体を含む。

#### 【0241】

骨髓造血幹細胞、末梢血造血幹細胞、および臍帯造血幹細胞の拡張のための支持細胞として本明細書に記載されるT - MSCを使用する方法が、本明細書に提供される。ある特定の実施形態において、開示される方法に適したT - MSCは、Stro - 3、Stro - 1、DL1、および/またはネスチンを発現する。また、T - MSCは、本明細書の項5.5に開示される方法を使用して、高レベルのStro - 3、Stro - 1、DL1、ネスチン、またはFrizzledを発現するように修飾され得るか、または遺伝子操作され得る。ある特定の実施形態において、T - MSCは、骨髓造血幹細胞、末梢血造血幹細胞、および/または臍帯造血幹細胞と共培養される。ある実施形態において、T - MSCは、間葉系間質細胞である。本明細書に開示されるT - MSCと骨髓造血幹細胞との共培養が、本明細書に提供される。本明細書に記載されるT - MSCと臍帯造血幹細胞との共培養が、本明細書に提供される。

#### 【0242】

5.13 T - MSCおよび/またはT - MSC由来の系統を含むマトリックス

本発明は、T - MSCおよび/またはT - MSC - DLを含むマトリックス、ヒドロゲル、足場等をさらに含む。T - MSCおよび/またはT - MSC - DLは、天然のマトリックス、例えば、生体材料上に播種することができる。ある特定の実施形態において、足場は、三次元印刷によって得られる。T - MSCおよび/またはT - MSC - DLは、例えば、注射に適したヒドロゲル溶液中に懸濁することができる。そのような組成物に適したヒドロゲルには、RAD16等の自己集合ペプチドを含む。一実施形態において、細胞を含むヒドロゲル溶液を、例えば、型において硬化させて、移植のためにその中に分散させた細胞を有するマトリックスを形成することができる。また、そのようなマトリックスにおけるT - MSCおよび/またはT - MSC - DLは、細胞が移植前に有糸分裂で拡張するように培養することができる。ヒドロゲルは、例えば、共有結合、イオン結合、または水素結合によって架橋して、三次元開放格子構造を作製し、これが水分子を取り込んで、ゲルを形成する有機ポリマー（天然または合成）である。ヒドロゲル形成材料には、アルギン酸およびその塩等の多糖体、ペプチド、ポリホスファジン、およびポリアクリレート（これらはイオンによって架橋される）、またはポリエチレンオキシド - ポリプロピレングリコールブロック共重合体等のブロックポリマー（それぞれ温度またはpHによって架橋される）を含む。いくつかの実施形態において、本発明のヒドロゲルまたはマトリックスは、生体分解性である。本発明のいくつかの実施形態において、製剤には、インサイチューで重合可能なゲルを含む（例えば、米国特許出願公開第2002/0022676号、Anseth et al., J. Control Release, 78(1-3): 199-209(2002)、Wang et al., Biomaterials, 24(22): 3969-80(2003)を参照のこと。

#### 【0243】

いくつかの実施形態において、このポリマーは、水、緩衝塩溶液、または水性アルコール溶液等の水溶液に少なくとも部分的に可溶性があり、荷電側基を有するか、またはその一価のイオン性塩である。陽イオンと反応することができる酸性側基を有するポリマーの例は、ポリ（ホスファゼン）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、アクリル酸とメタクリル酸とのコポリマー、ポリ（酢酸ビニル）、およびスルホン化ポリスチレン等のスルホン化ポリマーである。また、アクリル酸またはメタクリル酸とビニルエーテルモノマーまたはポリマーとの反応によって形成される酸性側基を有するコポリマーを使用することもできる。酸性基の例は、カルボン酸基、スルホン酸基、ハロゲン化された（好ましくはフッ素化された）アルコール基、フェノール性OH基、および酸性OH基である。

#### 【0244】

T - MSC、T - MSC - DL、および/またはその共培養は、三次元フレームワーク

または足場上に播種し、インビボで移植することができる。そのようなフレームワークは、任意の1つ以上の増殖因子、細胞、薬物、または組織形成を刺激するか、またはそうでなければ、本発明の実施を増強するか、もしくは改善するその他の成分と組み合わせて移植することができる。

#### 【0245】

本発明に使用することができる足場の例には、不織マット、多孔性発泡体、または自己集合ペプチドを含む。不織マットは、グリコール酸および乳酸の合成の吸収性コポリマー（例えば、PGA/PLA）（VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N. J.）から成る繊維を使用して形成することができる。例えば、ポリ（s-カプロラクトン）/ポリ（グリコール酸）（PCL/PGA）コポリマーから成り、フリーズドライまたは凍結乾燥（例えば、米国特許第6,355,699号）等のプロセスによって形成される発泡体を、足場としても使用することができる。

10

#### 【0246】

また、T-MSCおよび/またはT-MSC-DLは、モノ-、ジ-、トリ-、アルファ-トリ-、ベータ-トリ-、およびテトラ-リン酸カルシウム、ヒドロキシアパタイト、フルオロアパタイト、硫酸カルシウム、フッ化カルシウム、酸化カルシウム、炭酸カルシウム、マグネシウムカルシウムホスフェート、BIOGLASS（登録商標）等の生物活性ガラス、ならびにこれらの混合物を含むが、これらに限定されない、生物学的に許容されるセラミック材料上に播種または接触させることができる。現在市販の多孔性生体適合性セラミック材料には、SURGIBONE（登録商標）（CanMedica Corp., Canada）、ENDOBON（登録商標）（Merck Biomaterial France, France）、CEROS（登録商標）（Mathys, AG, Bettlach, Switzerland）、ならびにHEALOS（商標）（Depuy, Inc., Raynham, Mass.）およびVITOS（登録商標）、RHAKOSS（商標）、およびCORTOSS（登録商標）（Orthovita, Malvern, Pa.）等のミネラル化コラーゲン骨移植製品を含む。フレームワークは、天然および/または合成材料の混合物、混合または複合体であり得る。

20

#### 【0247】

別の実施形態において、T-MSCおよび/またはT-MSC-DLは、例えば、PGA、PLA、PCLコポリマーもしくは混合物等の生体吸収性材料、またはヒアルロン酸から作製されるマルチフィラメント系から成るフェルト上に播種または接触させることができる。

30

#### 【0248】

T-MSCおよび/またはT-MSC-DLは、別の実施形態において、複合構造体であり得る発泡体足場を上に播種することができる。そのような発泡体足場は、修復、置換、または増大される本体の一部の特異的な構造のもの等の有用な形状に成形することができる。いくつかの実施形態において、フレームワークは、例えば、細胞の接着を増強するために、本発明の細胞の接種より前に、0.1M 酢酸で処理し、続いて、ポリリシン、PBS、および/またはコラーゲン中でインキュベーションする。マトリックスの外面は、マトリックスを血漿コーティングすること、または1つ以上のタンパク質（例えば、コラーゲン、弾性繊維、細網繊維）、糖タンパク質、グリコサミノグリカン（例えば、ヘパリン硫酸、コンドロイチン4硫酸塩、コンドロイチン6硫酸塩、デルマタン硫酸塩、ケラチン硫酸塩等）、細胞マトリックス、および/もしくはゼラチン、アルギン酸塩、寒天、アガロース、および植物ゴム等であるが、これらに限定されない他の材料の添加により、細胞の接着もしくは増殖、および組織の分化を改善するように修飾することができる。

40

#### 【0249】

いくつかの実施形態において、足場は、それに非血栓形成性を与える材料を含むか、またはそれで処理される。また、これらの処理および材料は、内皮増殖、遊走、および細胞外マトリックス沈着を促進および持続し得る。これらの材料および処理の例には、ラミニンおよびIV型コラーゲン等の基底膜タンパク質、EPTFE等の合成材料、ならびにP

50



URSPAN (商標) (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.) 等のセグメント型ポリウレタンウレアシリコンを含むが、これらに限定されない。また、足場は、ヘパリン等の抗血栓剤を含むことができ、足場は、幹細胞で播種する前に、表面荷電を変化させるために処理する(例えば、血漿でコーティングする)ことができる。

#### 【0250】

5.14 不死化した T-MSC および / または T-MSC-DL

哺乳動物 T-MSC および / または T-MSC-DL は、増殖促進タンパク質の生成および / または活性を外部因子によって関連付けられるように、増殖促進遺伝子、すなわち適切な条件下でトランスフェクト細胞の増殖を促進するタンパク質をコードする遺伝子を含む任意の好適なベクターでのトランスフェクションによって条件付きで不死化することができる。好ましい実施形態において、増殖促進遺伝子は、v-myc、N-myc、c-myc、p53、SV40 ラージ T 抗原、ポリオマラージ T 抗原、E1a アデノウイルス、またはヒト乳頭腫ウイルスの E7 タンパク質等であるが、これらに限定されない、腫瘍遺伝子である。

#### 【0251】

増殖促進タンパク質の外部調節は、外部から調節可能なプロモーター、例えば、その活性を、例えば、トランスフェクト細胞の温度または細胞と接触する培地の組成を修飾することによって制御することができるプロモーターの制御下に増殖促進遺伝子を置くことによって達成することができる。一実施形態において、テトラサイクリン(tet)で制御される遺伝子発現系を使用することができる(Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551, 1992、Hoshimaru et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1518-1523, 1996を参照のこと)。Tetの非存在下では、このベクター内のtetで制御されるトランス活性化因子(tTA)は、tetオペレーター配列に融合されたヒトサイトメガロウイルス由来の最小プロモーターである $p_{hCMV}^*$ -1からの転写を強く活性化する。tTAは、大腸菌のトランスポゾン-10由来のtet耐性オペロンのリプレッサー(tetR)と単純ヘルペスウイルスのVP16の酸性ドメインとの融合タンパク質である。tetの低く無毒な濃度(例えば、0.01~1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )では、tTAによるトランス活性化をほぼ完全に消滅させる。

#### 【0252】

一実施形態において、ベクターは、選択可能なマーカー、例えば、薬物耐性を付与するタンパク質をコードする遺伝子をさらに含む。細菌ネオマイシン耐性遺伝子(neo<sup>R</sup>)は、本発明に使用してもよい1つのそのようなマーカーである。neo<sup>R</sup>を有する細胞は、例えば、成長培地に対する100~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のG418の添加等の当業者に知られている手段によって選択してもよい。

#### 【0253】

トランスフェクションは、レトロウイルスの感染を含むが、これに限定されない、当業者に知られている様々な手段のいずれかによって達成することができる。一般に、細胞培養物は、ベクターのための産生細胞株から収集される馴化培地およびN2補充を含むDMEM/F12との混合物とともにインキュベーションすることによってトランスフェクトしてもよい。例えば、上記のように調製された幹細胞培養物を、例えば、1体積の馴化培地と2体積のN2補充を含むDMEM/F12における約20時間のインキュベーションによって、インビトロにて5日後に感染させてもよい。次いで、選択可能なマーカーを有するトランスフェクト細胞を上記のように選択してもよい。

#### 【0254】

トランスフェクション後、培養を、増殖可能な表面上で継代して、例えば、24時間で細胞の少なくとも30%を2倍にさせる。好ましくは、この基質は、ポリオルニチン(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )および / またはラミニン(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )でコーティングした組織培養プラスチックからなるポリオルニチン/ラミニン基質、ポリリシン/ラミニン基質、また

はフィブロネクチンで処理した表面である。次いで、培養物に、成長培地を3～4日ごとに供給し、これには、1つ以上の増殖増強因子を補充しても、補充しなくてもよい。増殖増強因子は、培養が50%未満コンフルエントである場合、成長培地に添加してもよい。

【0255】

条件付きで不死化したT-MSCおよび/またはT-MSC-DL細胞株は、80～95%コンフルエントのときに、トリプシン処理等によって、標準的な技術を使用して継代することができる。およそ第20継代まで、いくつかの実施形態において、(例えば、ネオマイシン耐性遺伝子を含む細胞に対するG418の添加によって)選択を維持することが有益である。細胞はまた、長期貯蔵のために液体窒素中で凍結させてもよい。

【0256】

クローン細胞株は、上記のように調製した条件付きで不死化したヒトT-MSC細胞株から単離することができる。一般に、そのようなクローン細胞株は、例えば、限外希釈またはクローニング環を使用することによる、標準的な技術を使用して単離して、拡張させてもよい。クローン細胞株は、一般に、上記のように供給して、継代してもよい。

【0257】

条件付きで不死化したヒトT-MSC細胞株は、クローンであってもよいが、必要ではなく、一般に、分化を促進する培養条件下で、増殖促進タンパク質の生成および/または活性を抑制することによって、分化するように誘導してもよい。例えば、増殖促進タンパク質をコードする遺伝子が、外部から調節可能なプロモーターの制御下である場合、条件、例えば、培地の温度または組成物を修正して、増殖を促進する遺伝子の転写を抑制して

【0258】

5.15 アッセイ

T-MSCおよび/またはT-MSC-DLは、幹細胞の増殖、拡張、および/または分化における培養条件、環境要因、分子(例えば、生体分子、小無機分子等)等の影響を、そのような条件に曝露されないT-MSCおよび/またはT-MSC-DLと比較して

【0259】

好ましい実施形態において、T-MSCおよび/またはT-MSC-DLは、分子との接触による増殖、拡張、または分化の変化についてアッセイされる。一実施形態において、例えば、本発明は、複数のT-MSCおよび/またはT-MSC-DLの増殖を調整する化合物を特定する方法を提供し、本方法は、複数のT-MSCおよび/またはT-MSC-DLを増殖可能な条件下でこの化合物と接触させることを含み、この化合物がこの化合物と接触されない複数のT-MSCおよび/またはT-MSC-DLと比較して、T-MSCおよび/またはT-MSC-DLの増殖の検出可能な変化を生じさせる場合、この化合物は、T-MSCおよび/またはT-MSC-DLの増殖を調整する化合物として特定される。特定の実施形態において、この化合物は、増殖の阻害剤として特定される。別の特定の実施形態において、この化合物は、増殖のエンハンサーとして特定される。

【0260】

別の実施形態において、本発明は、複数のT-MSCおよび/またはT-MSC-DLの拡張を調整する化合物を特定する方法を提供し、本方法は、複数のT-MSCおよび/またはT-MSC-DLを拡張可能な条件下でこの化合物と接触させることを含み、この化合物がこの化合物と接触されない複数のT-MSCおよび/またはT-MSC-DLと比較して、T-MSCおよび/またはT-MSC-DLの拡張の検出可能な変化を生じさせる場合、この化合物は、T-MSCおよび/またはT-MSC-DLの拡張を調整する化合物として特定される。特定の実施形態において、化合物は、拡張の阻害剤として特定

される。別の特定の実施形態において、化合物は、拡張のエンハンサーとして特定される。

【0261】

別の実施形態において、T - MSCおよび/またはT - MSC - DLの分化を調整する化合物を特定する方法が本明細書に開示され、本方法は、T - MSCおよび/またはT - MSC - DLを分化可能な条件下でこの化合物と接触させることを含み、この化合物がこの化合物と接触されないT - MSCおよび/またはT - MSC - DLと比較して、T - MSCおよび/またはT - MSC - DLの分化の検出可能な変化を生じさせる場合、この化合物は、T - MSCおよび/またはT - MSC - DLの増殖を調整する化合物として特定される。特定の実施形態において、化合物は、分化の阻害剤として特定される。別の特定の実施形態において、化合物は、分化のエンハンサーとして特定される。

10

【0262】

5.16 ヒト胚性幹細胞由来の間葉系幹細胞の治療的使用

骨髓由来の間葉系幹細胞(BM - MSC)は、多発性硬化症(MS)を含むT細胞関連自己免疫疾患のための細胞ベースの療法として使用されているが、制限される源、不安定な質、成体組織由来の細胞を使用することのバイオセーフティーな懸念により、治療補助剤としてのそれらの使用は制限される。

【0263】

本明細書に記載される胚性幹細胞から間葉系幹細胞を発生させるための新規の方法、および本方法から発生される新規のT - MSCは、T細胞関連自己免疫疾患、特に多発性硬化症のための新しい治療法を提供する。

20

【0264】

ある特定の実施形態において、EAEを発症する前のマウスに与えられたT - MSCは、これらの動物の疾患スコアを著しく減じた。スコアの減少は、中枢神経系において、脱髄の減少、T細胞の浸潤、およびミクログリア応答、ならびに免疫細胞増殖の抑制、インビトロでの分化が同時に起こった。

【0265】

ある特定の実施形態において、T - MSCによる治療後、疾患発症後のEAEマウスにおいて、疾患スコアの逐次的減少が、観察された。ある特定の実施形態において、T - MSCは、疾患に対する予防と治療の両方の効果を有する。

30

【0266】

ある特定の実施形態において、T - MSCの免疫抑制活性は、照射を受けたT - MSCとして疾患に対する予防効果の主要因であり、損傷したミエリンを置き換える可能性が低く、疾患スコアを減少させるのに有効であった。一実施形態において、照射は、T - MSCの生存期間を短縮しない。

【0267】

ある特定の実施形態において、T - MSCの治療効果は、免疫抑制ならびに神経修復および再生を含む。

【0268】

ある特定の実施形態において、T - MSCで処置したEAEマウスは、それらの中枢神経系の炎症性T細胞が非常に少なく、脊髄を浸潤するT細胞が少ない。T - MSCは、炎症性T細胞によって生じた損傷および症状を軽減することができ、それらをすべてのT細胞関連の自己免疫疾患の治療および予防に有用にする。また、T - MSCは、脱髄も減少させた。

40

【0269】

T - MSCの特性はすべて、骨髓由来の間葉系幹細胞を用いて得られた結果と好対照である。BM - MSCのみが、インビトロで低用量での抗CD3刺激にตอบสนองしてマウスT細胞増殖を抑制し、Th1およびTh17細胞のCNSへの浸潤も増強した。自己反応性エフェクターCD4<sup>+</sup>T細胞は、多発性硬化症、クローン病、およびリウマチ性関節炎を含むいくつかの自己免疫障害の病因と関連がある。これらのCD4<sup>+</sup>T細胞には、Th1お

50

よびTh17細胞を含む。EAEマウスにおけるヒトBM-MSCのごく穏やかなまたは無視できるほど小さい影響がある(Gordon et al., 2008a, Zhang et al., 2005, Payne et al., 2012)。最近の報告では、ヒト臍帯由来のMSCで処置したEAEマウスにおいてわずかに3.5~3.0の疾患スコアの減少を示した(Liu et al., 2012)。本明細書の結果およびこれらの研究からのものは、開示されるT-MSCの新規性および有用性を強調する。

#### 【0270】

さらに、BM-MSCおよびT-MSCは、非常に類似した世界的な転写プロファイルを有するが、前および抗炎症性因子を特異的に発現する。それらの中で、IL-6は、T-MSCよりもBM-MSCにおいてはるかに高いレベルで発現する。さらに、BM-MS 10  
SCにおけるIL-6発現は、インビトロでのIFN 刺激時に2倍であったが、T-MSCにおいては低いままであった。

#### 【0271】

IL-6は、炎症の発症および解消を含む造血/免疫細胞と間質細胞との間のクロストークに關与する、多面的サイトカインである。IL-6は、Th17細胞の分化および機能を促進することができる(Dong, 2008)。MS患者からの血液中および脳組織中(Patanello et al., 2010)、ならびに高齢のヒトにおける血清中(Seithe et al., 2006)の単核細胞内のIL-6のレベルが上昇する。T細胞プライミング時にIL-6受容体を欠いているマウスは、EAEに耐性を示す(Leech et al., 2012)。CNSにおけるIL-6の部位特異的な生成 20  
は、EAEにおける炎症性応答を再標的化し、増強することができる(Quintana et al., 2009)が、IL-6中和抗体は、EAEマウスにおける症状を軽減させることができる(Gijbels et al., 1995)。したがって、IL-6は、MSの処置に対して有望な治療標的になる。

#### 【0272】

末梢のT細胞活性の免疫調節ならびに神経系細胞の再生および修復は、MSおよびEAEにおけるMSCの治療効果の広く認識された様式である(Al-Jumah and Abumaree, 2012, Auletta et al., 2012, Morando et al., 2012)。しかしながら、MSにおける長期の機能的な神経再生および持続した疾患の緩解は、損傷した血液脳関門および血液脊髄関門の修復を必要とする 30  
(Correale and Villa, 2007, Minagar et al., 2012)。言い換えれば、MSは、炎症性のある神経変性の血管疾患であり、効果的な治療は、3つの要素すべてを標的とする必要がある。

#### 【0273】

T-MSCの特性は、それらをT細胞関連自己免疫疾患、特に多発性硬化症の治療に比類なく好適にする。特に、T-MSCは、EAEマウスの疾患スコアを減少させることができるが、脱髄を減少させ、Th1およびTh17の増殖も減少させて、低発現のIL-6を有する。これらの後者の2つの特性は、それらをその他のT細胞関連自己免疫疾患を治療するのを好適にする。さらに、血液脳関門および血液脊髄関門を横断するT-MSC 40  
の能力は、多発性硬化症、および中枢神経系に関連するその他の自己免疫疾患の治療および予防法としてそれらを優れたものにする。

#### 【0274】

本明細書に提供される一実施形態は、T細胞関連自己免疫疾患を治療または予防する方法であり、本方法は、T-MSCを含む治療有効量の溶液、細胞培養物、または薬学的調製物を、それを必要とする対象に投与するステップを含む。T細胞関連自己免疫疾患には、多発性硬化症、炎症性腸疾患、クローン病、移植片対宿主病、全身性紅斑性狼瘡、およびリウマチ性関節炎を含むが、これらに限定されない。対象は、好ましくは哺乳動物であり、最も好ましくはヒトである。溶液、細胞培養物、または薬学的調製物は、照射されたまたは照射されていないT-MSCを含み得る。溶液、細胞培養物、または薬学的調製物は、好ましくは、注射によって投与される。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 7 5 】

多発性硬化症は、4つのサブタイプ：再発／寛解型、二次進行型、一次進行型、および進行再発型に分類される。再発／寛解型のサブタイプは、予測不可能な再発、それに続いて、長期間の緩解を特徴とする。二次進行型MSは、再発／寛解型MSから始まり、緩解の期間のない進行性の低下を有する個体において起こる場合がある。一次進行型MSは、それらの初期症状後に決して緩解することのない少数の個人を説明する。極めてまれなサブタイプである進行再発型を有する個人は、着実に神経減少を伴い、急性発作に悩まされる。

## 【 0 2 7 6 】

多発性硬化症の治療または予防を必要とする対象に、多発性硬化症を治療または予防するための方法が、本明細書に提供され、本方法は、前述の段落に記載されるT - MSCを含む治療有効量の溶液、細胞培養物、または薬学的調製物を、それを必要とする対象に投与するステップを含む。多発性硬化症は、再発／寛解型多発性硬化症、進行／再発型多発性硬化症、一次多発性硬化症、または二次多発性硬化症であり得る。対象は、好ましくは哺乳動物であり、最も好ましくはヒトである。溶液、細胞培養物、または薬学的調製物は、照射されたまたは照射されていないT - MSCを含み得る。溶液、細胞培養物、または薬学的調製物は、好ましくは、注射によって投与される。

10

## 【 0 2 7 7 】

多発性硬化症は、足の感覚障害、視神経機能障害、錐体路障害、膀胱機能障害、大腸機能障害、性機能障害、運動失調、および複視の発作を含む、様々な症状が現れる。

20

## 【 0 2 7 8 】

本発明のさらなる実施形態は、多発性硬化症を治療する方法であり、T - MSCを含む治療有効量の溶液、細胞培養物、または薬学的調製物を、それを必要とする対象に投与するステップを含み、これらの症状のうちの少なくとも1つ、これらの症状のうちの少なくとも2つ、これらの症状のうちの少なくとも4つ、これらの症状のうちの少なくとも5つ、またはこれらの症状のすべての検出可能な改善がある。

## 【 0 2 7 9 】

拡大能力障害状態尺度(EDSS)は、多発性硬化症に罹患している患者の臨床状態を評価するための最も一般的に使用される評定尺度である。それは、いくつかの別のパラメーター：体力、知覚、脳幹機能(言語および嚥下)、協調、視覚、認識、および腸／膀胱の自制に沿った障害を測定する。それは、MSにおける障害の広く受け入れられている尺度であり、特に困難ではなく、行うのに時間を要しない。EDSSは、8つの機能系(FS)における障害を定量化し、これらの各々における機能系スコア(FSS)を神経学者が指定できるようにする(Kurtzke 1983)。

30

## 【 0 2 8 0 】

Kurtzkeは、機能系を以下の通りに定義する：

- ・ 錐体
- ・ 小脳
- ・ 脳幹
- ・ 感覚
- ・ 腸および膀胱
- ・ 視覚
- ・ 大脳
- ・ その他

40

## 【 0 2 8 1 】

EDSSのステップ1.0～4.5は、十分に移動できる多発性硬化症に罹患している人々を指す。EDSSのステップ5.0～9.5は、歩行への障害によって定義される。各可能性のある結果の臨床的な意義は、以下の通りである：

- ・ 0.0：正常な神経学的検査
- ・ 1.0：障害なし、1つのFSの最小の徴候

50

- ・ 1 . 5 : 障害なし、7つのうちの2つのF Sの最小の徴候
- ・ 2 . 0 : 7つのうちの1つのF Sの最小の障害
- ・ 2 . 5 : 2つのF Sの最小の障害
- ・ 3 . 0 : 十分に移動できるが、1つのF Sの中等度の障害、または3つ～4つのF Sの軽度の障害。

- ・ 3 . 5 : 十分に移動できるが、1つのF Sの中等度の障害および1つもしくは2つのF Sの軽度の障害、または2つのF Sの中等度の障害、または5つのF Sの軽度の障害を伴う

- ・ 4 . 0 : 補助を伴わずに、相対的に重篤な障害にもかかわらず、1日約12時間十分に移動。補助を伴わずに、500メートル歩行可能。

- ・ 4 . 5 : 補助を伴わずに十分に移動、1日の多く、丸一日働くことができる、さもなければ、完全な活動にいくらかの制限を有するか、最小限の介助を必要とする場合がある。相対的に重篤な障害。補助を伴わずに、300メートル歩行可能。

- ・ 5 . 0 : 補助を伴わずに、約200メートル移動。障害は、丸一日の活動を妨げる。

- ・ 5 . 5 : 100メートル移動、障害は、丸一日の活動を不可能にする。

- ・ 6 . 0 : 休憩を伴う、または伴わずに100メートル歩行するのに断続的または片側の特定の補助（杖、松葉杖、または装具）が必要。

- ・ 6 . 5 : 休憩を伴わずに、20メートル歩行するのに断続的な片側の補助（杖、松葉杖、または装具）が必要。

- ・ 7 . 0 : 補助を伴っても5メートルを越えて歩行することができない、本質的に車椅子に制限され、自分で回転して、単独で移動する、1日約12時間車椅子で活動している。

- ・ 7 . 5 : 数歩以上進むことができない、車椅子に制限される、移動の際の補助が必要な場合がある、自分で回転するが、丸一日の活動には動力付車椅子が必要な場合がある。

- ・ 8 . 0 : 本質的にベッド、椅子、もしくは車椅子に制限されるが、1日の大半はベッドの外にいる、セルフケア機能を持つ、一般に腕の使用は有効。

- ・ 8 . 5 : 本質的1日の大半はベッドに制限される、腕の使用はいくらか有効で、いくらかのセルフケア機能を持つ。

- ・ 9 . 0 : 自分では何もできない患者、コミュニケーションをとり、食事をする

- ・ 9 . 5 : コミュニケーションを有効にとること、または食べる／飲み込むことができない。

- ・ 10 . 0 : M Sによる死。

#### 【0282】

多発性硬化症の治療を必要とする対象に、多発性硬化症を治療するための方法が、本明細書に提供され、本方法は、T - M S Cを含む治療有効量の溶液、細胞培養物、または薬学的調製物を、それを必要とする対象に投与するステップを含み、この対象は、少なくとも1ポイント、好ましくは少なくとも2ポイントの拡張障害状態尺度における改善を示す。

#### 【0283】

フィンゴリモド、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン、IFN - 1 a、IFN - 1 b、グリアトリアマーアセテート、シクロホスファミド、メトトレキサート、アザチオプリン、クラドリピン、シクロスポリン、ミトキサントロン、およびスルファサラジンが含まれるが、これらに限定されない、多発性硬化症を治療および予防するために使用される他の治療剤がある。

#### 【0284】

したがって、本発明の方法は、フィンゴリモド、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン、IFN - 1 a、IFN - 1 b、グリアトリア

10

20

30

40

50

マーアセテート、シクロホスファミド、メトトレキサート、アザチオプリン、クラドリピン、シクロスポリン、ミトキサントロン、およびスルファサラジンが含まれるが、これらに限定されない、対象への1つ以上のさらなる治療剤の投与をさらに含むことができる。さらなる実施形態において、これらのさらなる治療剤は、T-MSCの前、その後、もしくはそれと同時に投与することができるか、またはT-MSCと共役させるか、もしくは付着させることができる。

#### 【0285】

T細胞以外のT-MSCはまた、B細胞、樹状細胞、好中球、NK細胞、マクロファージにおける強力な抑制機能、ならびに他の炎症および免疫関連機能を有する。したがって、開示されるT-MSCによりすべて処置され得るT細胞、B細胞、炎症および/または先天性免疫関連自己免疫疾患には、円形脱毛症、強直性脊椎炎(Ankylosing Spondylitis)、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫内耳性疾患、自己免疫性リンパ球増殖性症候群(ALPS)、自己免疫性血小板減少性紫斑病(ATP)、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアック病、疱疹状皮膚炎、慢性疲労症候群免疫不全症候群(CFIDS)、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、瘢痕性類天疱瘡、寒冷凝集素症、クレスト症候群、クローン病、デゴス病(Degos' Disease)、皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋炎、線維筋痛、グレーブス病、ギランバレー症候群、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、IgA腎症、インスリン依存性糖尿病(I型)、II型糖尿病、若年性関節炎、紅斑性狼瘡、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群(Polyglandular Syndromes)、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、リウマチ性関節炎、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティフマン症候群、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、脈管炎、白斑、ヴェーゲナー肉芽腫症、または火傷、手術、損傷、およびアレルギーに関連する任意の急性もしくは慢性炎症が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0286】

T-MSCは、脂肪細胞、筋芽細胞、神経系列細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、軟骨細胞、および間質細胞が含まれるが、これらに限定されない、複数の細胞系列に分化することができる。T-MSC(T-MSC-DL)に由来するこれらの細胞は、複数の組織損傷を治療するために使用することができ、関節の治療、腱の治療、結合組織の治療、神経系列組織および細胞の治療、脂肪組織の治療、骨の治療、皮膚の治療、その他の創傷の治療、筋肉の治療、軟骨の治療、平滑筋の治療、心筋の治療、上皮組織の治療、靱帯の治療、間質修復等のような組織工学、組織修復、組織再生の目的で使用することができる。

#### 【0287】

具体的には、T-MSCは、神経系列細胞に分化することができ、失書症、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、失語症、失行症、くも膜炎、毛細血管拡張性運動失調症、注意欠陥多動性障害、聴覚処理障害、自閉症、アルコール依存症、アスペルガー症候群、双極性障害、ベル麻痺、上腕神経叢損傷、脳外傷、脳損傷、脳腫瘍、カナバン病、カプグラ(Capgras)、灼熱痛、中枢痛症候群、橋中央ミエリン溶解、中心核ミオパシー、頭部障害、脳動脈瘤、脳動脈硬化症、脳萎縮症、脳性巨人症、脳性麻痺、脳血管炎、頸髄狭窄症、シャルコーマリーツース病、キアリ奇形、舞蹈病、慢性疲労症候群、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー(CIDP)、慢性疼痛、コフィンローリー症候群、昏睡、複合性局所疼痛症候群、圧迫性神経障害、先天性神経顔面神経対麻痺、皮質基底核変性、頭部動脈炎、頭蓋骨癒合症、クロイツフェルトヤコブ病、蓄積外傷疾患、クッシング症候群、巨大細胞性封入体症(CIBD)、サイトメガロウイルス感染、デンディーウォーカー症候群、ドウモルシェ症候群、ドウジュリーヌ-クルンプケ麻痺、デジェリンソッタス

病、遅延睡眠期症候群、認知症、皮膚筋炎、発達性統合運動障害、糖尿病ニューロパシー、びまん性硬化症、ダウン症候群、ドラベ症候群、自律神経障害、計算力障害、書字障害、失読症、筋失調症、エンブティセラ症候群、脳炎、脳ヘルニア、脳三叉神経領域血管腫症、便失禁、てんかん、エルブ麻痺、肢端紅痛症、本態性振戦、ファブリー病、ファール症候群、失神、家族性痙性麻痺、熱性発作、フィッシャー症候群、フリートライヒ運動失調、線維筋痛、フォヴィル症候群、胎児性アルコール兆候、ゴーシェ病、ゲルストマン症候群、巨細胞性動脈炎、巨細胞封入疾患、球様細胞白質萎縮症、異所性灰白質、ギランバレー症候群、HTLV-1関連ミエロパシー、ハレルフォルデンスパッツ病、頭部損傷、頭痛、片側顔面痙攣、遺伝性痙性対麻痺、遺伝性多発神経炎性失調、耳帯状疱疹、帯状疱疹、ヒラヤマ症候群、全前脳症、ハンチントン病、水無脳症、水頭症、副腎皮質亢進症、低酸素症、免疫媒介性脳脊髄炎、封入体筋痛炎、色素失調症、乳児フィタン酸蓄積症、乳児レフサム病、乳児痙攣、炎症性ミオパシー、頭蓋内嚢、頭蓋内圧亢進、ジュベール症候群、Karak症候群、キーンズセイアー症候群、ケネディ病、キンスブルン症候群、クリッペルファイル症候群、クラッペ病、クーゲルベルクヴェランデル病、ラフォラ病、ランバートイトン無筋力症候群、ランドウクレフナー症候群、延髄外側（ワレンベルグ）症候群、学習障害、リー病、レノックスガストー症候群、レッシュナイハン症候群、大脳白質萎縮症、レヴィー小体認知症、脳回欠損、閉じ込め症候群、ルーゲーリック病（筋萎縮性側索硬化症を参照）、腰椎椎間板ヘルニア、腰部脊椎管狭窄症、ライム病 - 神経学的後遺症、マチャドジョセフ病（脊髄小脳失調症3型）、大脳症、大視症、巨大脳髄症、メルカーソンローゼンタール症候群、メニエール病、髄膜炎、メンケス病、異染性白質ジストロフィー、小頭症、小視症、片頭痛、ミラーフィッシャー症候群、軽度の脳卒中（一過性脳虚血発作）、ミソフォニア、ミトコンドリアミオパシー、メービウス症候群；単肢筋萎縮症；運動ニューロン疾患（筋萎縮性側索硬化症を参照）、運動能力障害、モヤモヤ病、ムコ多糖症、多発梗塞性認知症、多病巣性運動ニューロパシー、多発性硬化症、多系統萎縮症、筋ジストロフィー、筋痛性脳脊髄炎、重症筋無力症、ミエリン破壊性びまん性硬化症、乳児のミオクロノス脳障害、ミオクロノス、ミオパシー、筋細管ミオパシー、先天性ミオトニー、ナルコレプシー、神経線維腫症、神経弛緩薬性悪性症候群、AIDSの神経学的兆候、狼瘡の神経学的後遺症、神経ミオトニー、神経セロイドリポフスチン症、ニューロン遊走障害、神経症、ニーマンピック病、非24時間睡眠覚醒症候群、非言語性学習障害、神経学的障害（Neurological disorder）、オサリバンマクレオド症候群、後頭神経痛、潜在性脊椎閉鎖不全（Occult Spinal Dysraphism Sequence）、オオタハラ症候群、オリーブ橋小脳萎縮症、オブソクロノスミオクロノス症候群、視神経炎、起立性低血圧症、耳硬化症、乱用症候群（overuse syndrome）、反復視、感覚異常症、パーキンソン病、先天性パラミオトニア、腫瘍随伴症、発作性発作（paroxysmal attack）、パリーロンベルグ症候群、ペリツェウスメルツバッハー病、周期性麻痺、末梢ニューロパシー、広汎性発達障害、光性くしゃみ反射、フィタン酸蓄積症、ピック病、神経不足（pinched nerve）、下垂体部腫瘍、PMG、多発性ニューロパシー、ポリオ、多小回脳、多発性筋炎、孔脳症、ポリオ後症候群、帯状疱疹後神経痛（PHN）、起立性低血圧、プラダーウィリー症候群、原発性側索硬化症、プリオン病、進行性片側顔面萎縮症、進行性多巣性白質脳症、進行性核上性麻痺、偽脳腫瘍、四肢麻痺、狂犬病、ラムゼイハント症候群I型、ラムゼイハント症候群II型、ラムゼイハント症候群III型（ラムゼイハント症候群を参照）、ラスムッセン脳炎、反射性神経血管性ジストロフィー、レフサム病、反復性ストレス損傷、下肢静止不能症候群、レトロウイルス関連ミエロパシー、レット症候群、ライ症候群、律動性運動障害、ロンベルク症候群、舞踏病、サンドホフ病、シルダー病〔要曖昧さ回避〕、裂脳症、感覚統合障害、中隔視神経異形成症、揺さぶられっ子症候群、帯状疱疹、シャイドレーガー症候群、シェーグレン症候群、睡眠時無呼吸、睡眠病、くしゃみ症（Snatiation）、ソトス症候群、痙攣、二分脊椎、脊髄損傷、脊髄腫瘍、脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳失調症、分離脳、スティーリリチャードソンオルスゼフスキー症候群、スティフ・パーソン症候群、脳卒中、スタージウェーバー

10

20

30

40

50



症候群、亜急性硬化性全脳炎、皮質下動脈硬化性脳症、脳表ヘモジデリン沈着症、シデナム舞蹈病、失神、共感覚、脊髄空洞症、足根管症候群、遅発性ジスキネジー、遅発性ディスフェレニア (Tardive dysphrenia)、ターロブ嚢胞、テイサックス病、側頭動脈炎、破傷風、係留脊髄症候群、トムセン病、胸郭出口症候群、疼痛性チック、トッド麻痺、トゥレット症候群、中毒性脳症、一過性脳虚血発作、伝染性海綿状脳障害、横断性脊髄炎、外傷性脳損傷、振戦、三叉神経痛、熱帯性瘧疾不全対麻痺、トリパノソーマ症、結節性硬化症、ウビシオシス (Ubisiosis)、鋳型：単極性鬱病、フォンヒッペルリンドウ病 (VHL)、ビリウスク脳脊髄炎 (VE)、ワレンベルグ症候群、ウェルドニヒホフマン病、ウェスト症候群、むち打ち、ウィリアムズ症候群、ウィルソン病が含まれるが、これらに限定されない、多くの神経疾患を治療するために使用することができる。

10

#### 【0288】

##### 5.17 送達系としての T - MSC の使用

本発明の T - MSC が血液脳関門および血液脊髄関門を横断する独特の能力を有することが示されているため、本発明のさらなる実施形態は、薬剤を T - MSC に接着または接合させて、複合体を形成することと、T - MSC 薬剤複合体を対象に投与することとにより、血液脳関門および/または血液脊髄関門を通じて薬剤を送達するために T - MSC を使用する方法であり、T - MSC が血液脳関門および/または血液脊髄関門を横断し、薬剤を中枢神経系に送達する。T - MSC は、単一細胞、細胞培養物、溶液、または薬学的調製物の形態であり得る。薬剤には、薬物、タンパク質、DNA、RNA、抗体、および小分子が含まれるが、これらに限定されない。

20

#### 【0289】

本発明のさらなる実施形態は、T - MSC および T - MSC に接合または接着させる薬剤を含む、血液脳関門および/または血液脊髄関門を通じて薬剤を送達するための送達系である。

#### 【0290】

血液脳関門および/または血液脊髄関門を通過する能力は、神経学的障害、多発性硬化症、癌、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、髄膜炎、脳炎、狂犬病、てんかん、認知症、ライム病、脳卒中、および筋萎縮性側索硬化症、ならびに脳および脊髄損傷が含まれるが、これらに限定されない、疾患の治療および予防に有用である。したがって、それを必要とする対象は、血液脳関門および/または血液脊髄関門に関与する疾患に罹患している、またはその疾患の危険性があり得る。したがって、本発明のさらなる実施形態は、薬剤を T - MSC に接着または接合させて、複合体を形成することと、T - MSC 薬剤複合体を、それを必要とする対象に投与することとにより、疾患または損傷を治療する方法であり、T - MSC が血液脳関門および/または血液脊髄関門を横断し、薬剤を中枢神経系に送達し、その薬剤が、対象の疾患または損傷の治療または予防薬として使用される。T - MSC は強力な遊走能力および浸潤能力を有するため、抗癌剤およびタンパク質を運搬する腫瘍/癌治療のための担体としても使用することができる。T - MSC は、単一細胞、細胞培養物、溶液、または薬学的調製物の形態であり得る。薬剤には、化学物質、薬物、タンパク質、DNA、RNA、マイクロRNA、非コードRNA、抗体、小分子、および/またはナノ粒子が含まれるが、これらに限定されない。

30

40

#### 【0291】

疾患の治療および予防に有用である薬剤には、抗体、抗ウイルス剤、抗真菌剤、ステロイド、化学療法薬、抗炎症薬、サイトカイン、および/または合成ペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0292】

また、タンパク質およびペプチドは、T - MSC に接合するのに有用であり、これには、エリスロポエチン (EPO)、抗ベータアミロイドペプチド、組織プラスミノゲン活性化因子 (TPA)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、インターフェロン (IFN)、増殖因子/ホルモン、抗 VEGF ペプチド、抗 TNF ペプチド、NGF、HGF、I

50

L - 2、CX3CL1、GCV、CPT - 11、シトシンデアミナーゼ、HSV - TK、カルボキシエステラーゼ、腫瘍溶解性ウイルス、TSP - 1、TRAIL、FASL、IL - 10、およびTGF $\beta$ が含まれる。また、特定の受容体と結合し、これらの受容体を遮断するタンパク質およびペプチドも有用であり、T - MSCに接着させるために本発明によって企図される。

【0293】

また、治療的タンパク質およびペプチドをコードするDNAおよびRNAは、血液脳関門および/または血液脊髄関門を横断して送達するためにT - MSCに接合させるのに有用であり得る。

【0294】

「抗体（複数を含む）」という用語には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化またはキメラ抗体、一本鎖Fv抗体断片、Fab断片、およびF(ab')<sub>2</sub>断片を含む。ポリクローナル抗体は、特定の抗原に対して特異的な抗体分子の異種集団であり、一方、モノクローナル抗体は、抗原内に含まれる特定のエピトープの同種集団である。モノクローナル抗体は、本発明において特に有用である。

【0295】

血液脳関門および/または血液脊髄関門の横断が有用である、任意の疾患に関連する経路において分子または分子の受容体の活性化、発現、および/または作用を遮断する任意の薬剤は、T - MSCに接着または接合され得る。そのような薬剤には、化学物質、植物化学物質、調剤、生物学的製剤、小有機分子、抗体、核酸、ペプチド、およびタンパク質が含まれるが、これらに限定されない。

【0296】

経路の阻害は、結合および活性化する経路内の標的分子の領域を模倣する「デコイ」分子を使用して引き起こされ得る。活性化分子は、標的分子の代わりにデコイ分子と結合し得、活性化を引き起こし得ない。

【0297】

阻害はまた、「支配的に干渉する」分子、または活性化分子の結合部分を保有するが、活性化ドメインを欠くようにその分子を切断するものの使用によって引き起こされ得る。これらの分子は、経路内の受容体と結合するが、効果がなく、受容体が活性化分子と結合するのを妨げる。そのようなデコイ分子および支配的に干渉する分子は、当該技術分野で知られている方法によって製造することができ、血液脳関門または血液脊髄関門を横断して送達するためにT - MSCに接着または接合することができる。

【0298】

血液脳および/または血液脊髄関門を横断する薬物を送達するための方法はまた、化学物質、抗体、ペプチド、タンパク質、DNA、およびRNAが含まれるが、これらに限定されない、診断用薬にも有用である。診断のために有用であるようにそのような薬剤は、視覚化および/または定量化する手段を有さなければならない。そのような手段には、蛍光発光、バイオマーカー、染色、放射性アイソタイプ、および/またはナノ粒子が含まれるが、これらに限定されない。

【0299】

そのような送達するための方法および送達系は、神経学的障害、多発性硬化症、癌、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、髄膜炎、脳炎、狂犬病、てんかん、認知症、ライム病、脳卒中、および筋萎縮性側索硬化症、ならびに脳および脊髄損傷の診断に有用であり得る。したがって、本発明のさらなる実施形態は、薬剤をT - MSCに接着または接合させて、複合体を形成することと、T - MSC薬剤複合体を疾患が疑わしい対象に投与することとにより、疾患または損傷を診断する方法であり、T - MSCが血液脳関門および/または血液脊髄関門を横断し、薬剤を中枢神経系に送達する。T - MSCは、単一細胞、細胞培養物、溶液、または薬学的調製物の形態であり得る。薬剤には、薬物、タンパク質、DNA、RNA、抗体、および小分子が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0300】

どのような種類であろうと、治療、予防、または診断のためであろうとも、薬剤は、合成細胞外マトリックス、アルギン酸 - ポリ - L - リシンの封入法および / または容器を含むが、これらに限定されない、当該技術分野で知られている任意の方法によって、T - MSCに接合または接着され得る。

## 【0301】

ある特定の実施形態において、工業レベルの製造での大規模な生成が、本開示に含まれ、それらの方法は、当該技術分野でよく知られている。ある特定の実施形態において、大規模な生成には、Hyper - STACKの2D培養系および / またはマイクロキャリアの3Dバイオリアクターの使用を含む。

10

## 【実施例】

## 【0302】

実施例1. T - MSCの派生

材料および方法

以下の試薬および材料は、下述の供給源から得られた：

特注のmTeSR1培地：Stem Cell Technology, Inc.

BMP4：Stemgentまたはその他の販売会社

SB431542：Cayman Chemicalまたはその他の販売会社

A83-01：Stemgentまたはその他の販売会社

ALK5阻害剤：Stemgentまたはその他の販売会社

20

DMEM/F12：GIBCO Life Technologies

アルファ - MEM：GIBCO Life Technologies

ウシ胎仔血清：GIBCO Life Technologiesまたはその他の販売会社

## 【0303】

University of Connecticut Stem Cell Coreから得られたCT2 hESC株を、フィーダーとして照射を受けたマウス胎児線維芽細胞(MEF)において2継代の間培養した。次いで、hESCを、マトリゲル(BD Biosciences, San Jose, CA)でコーティングしたプレート上で分裂し、mTeSR1(Ludwig et al., 2006)(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)中で培養した。ESI-017、ESI-051、ESI-053、ESI-049、およびESI-35ヒト胚性幹細胞は、BioTime, Inc. (CA)から購入した。

30

## 【0304】

T - MSCの派生

図1に示されるように、約80%のコンフルエンスで、マトリゲルコーティングしたプレート上でhESCを、1mg/mlのディスパーゼで5~10分間消化した。次いで、この細胞をmTeSR1培地で1回洗浄し、マトリゲルコーティングしたプレート上で小集団または単一細胞に分裂させ、mTeSR1中で12時間培養した。次いで、培養培地を、BMP4(2~100ng/ml)、または任意にA83-01(0.1~1μM)を含むトロホブラスト形成培地に置き換えた。48~72時間培養した後、細胞は、hESC様形態から、変化が少ない拡大した細胞サイズ、小核/細胞質ゾルの比、および拡散した細胞境界を特徴とするトロホブラスト様形態に変更した。細胞を、Tryp-LEで消化させ、MSC成長培地(20% ウシ胎仔血清および非必須アミノ酸を含むアルファ - MEM)で洗浄した。次いで、細胞を、5,000個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度でマトリゲルコーティングしたプレート上で播種した。培地は、24時間後に交換し、3~4日ごとに交換した。さらに6日後、細胞を、典型的なMSCの形態と同様のスピンドル様細胞に分化した。2日目のトロホブラストの形態を図2Aに示し、5日目のプレT - MSCの形態を図2Bに示し、T - MSCの形態を図2Cに示す。

40

## 【0305】

50

## HB - MSC の派生

前述のように、CT2 hESC細胞をEB細胞に分化し、次いで、HBが富化された(Lu et al., 2008)、Lu et al., 2007))。マトリゲルプレート上で50~80%コンフルエントのhEC細胞を、ディスパーゼ(1mg/ml、5~10分間)で消化し、次いで、EB形成基底培地、HPGM(Lonza, Walkersville, Maryland)、またはSTEMLINE I/II造血幹細胞拡張培地(Sigma, St. Louis, Missouri)、またはStemSpan H3000(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)、または10% FBSを含むIMDM、または10% FBSを含むDMEDM/F12で洗浄した。次いで、細胞を、約2~300万個の細胞/mlの極低密度のプレート上で、50ng/mlのVEGF(PeproTech)および50ng/mlのBMP4(Stemgent)で補充したEB形成培地中で48時間培養した。48時間後、この培養培地の半分を、新たなEB形成培地+25~50ng/mlのbFGFと入れ替えた。

10

## 【0306】

4日後、培地中で形成されたEB細胞を収穫し、37℃で2~3分間、TrypLE(Invitrogen)で単一細胞に解離させた。細胞を洗浄し、EB形成基底培地中で1~500万個の細胞/mlで再懸濁した。次いで、単一細胞再懸濁液を、血管芽細胞成長培地(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)を用いて1:10で混合した。

20

## 【0307】

芽細胞成長培地(BGM)は以下の通りに作製した: 100mlの無血清メチルセルロースCFU培地(Stem Cell Technologies, H4436またはH4536)に、VEGF、TPO、および50ng/mlになるまでFLT3-リガンド、20~50ng/mlになるまでbFGF、1mlのEX-CYTE成長増強培地サプリメント、および1mlのPen/Strepを添加し、よく混ぜ合わせる。

## 【0308】

この混合物をボルテックスし、16G針を通過させることによって、超低プレート上で播種し、37℃で5~9日間、5% CO<sub>2</sub>で培養した。

## 【0309】

30

次いで、単一細胞を、1)アルファ-MEM(Invitrogen)中10~20% FBS、または2)10~20% KOSR アルファ-MEM、3)10~20% FBS DMEM高グルコース、または4)10~20% KOSR DMEM高グルコースを含むMSC培地中で再懸濁し、マトリゲル、ゼラチン、ビトロネクチン、ラミニン、フィブロネクチン、またはコラーゲンIのいずれかでコーティングしたプレート上で100~5,000個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度で培養した。培地は、24時間後に交換し、2~4日ごとに新しくした。6~12日後、細胞は、典型的なMSCと同様のスピンドル様細胞に徐々に分化した。

## 【0310】

SB431542によるMSCの派生

40

この方法は、前に公開されていた(Chen et al., 2012)。

## 【0311】

## 結果

この方法は、優れた効率、収率、および純度を有するT-MSCを生成したことが見出された。図1の下パネルに示されるように、10日目に、T-MSCは、既に、10倍の細胞数の増加を有する90%超の純度のMSCを生成したのに対して、他の方法は、いかなるMSCも有さないか、または非常に低い純度のMSCしか有さなかった。20日目に、T-MSCは、既に、99%超の純度のMSCにより3000倍の拡張を有したのに対して、他の方法は、最大でも20倍しか拡張しなかった。30日目には、10万個のhESCは、500億個のT-MSCを生成した、つまり、元のhESCの500,000倍

50

の拡張であったのに対して、他の方法は、最大でも300020倍しか拡張しなかった。

#### 【0312】

#### 実施例2．T-MSC細胞の特徴付け

実施例1において得られたT-MSC細胞を、フローサイトメトリー免疫蛍光染色を用いてさらに分析した。

#### 【0313】

#### 材料および方法

T-MSCを特徴付けるために、フローサイトメトリー染色を使用した。細胞を洗浄し、PBS中2% BSAでブロックし、製造業者の取扱説明書に従って、様々な細胞表面マーカーTrop-2 (Trop-2、eBioscience)、CD31、CD34、CD29、CD73、CD90、CD105、CD44、CD45、CD146、CD166、HLA-ABC、HLA-DR、HLA-G (BD BioscienceまたはeBioscience) に対する抗体で染色した。FACS Divaソフトウェア (BD Bioscience) を使用して、FACS LSR IIフローサイトメーター上でデータを収集した。FlowJoソフトウェア (TreeStar) を用いて、取得後の分析を行った。

#### 【0314】

#### 結果

2日目のトロホブラスト、5日目のプレT-MSC、および9日目のT-MSCから得られた接着細胞をCD73およびTrop-2で染色した。トロホブラスト細胞は、高レベルのTrop-2 (95%超) のみを発現し、CD73は1%未満であり (図3A)、5日目に、プレT-MSCはTrop-2およびCD73の両方を発現する細胞を50%超、CD73のみを発現する細胞を40%有し (図3B)、hESC分化から9日目に、T-MSCは、Trop-2を発現する細胞を1%未満、CD73のみを発現する細胞を99%有した (図3C)。

#### 【0315】

複数の細胞表面マーカーのFACS染色によるT-MSCのさらなる特徴付けは、T-MSCが3%未満のTrop-2、1%未満のCD31、CD34、99%超のCD73、95%超のCD90、90%超のCD105、99%超のCD44、および80%超のCD29を発現することを示す (図4A~H)。

#### 【0316】

実施例3．T-MSCは、BM-MSCよりもインビトロでのT細胞機能においてより強力な阻害を有する

インビトロでT細胞増殖を阻害し、続いて、抗原刺激するそれらの能力について、hES-MSCおよびBM-MSCが比較された。

#### 【0317】

#### 材料および方法

#### BM-MSCの培養

BM-MSCは、BM単核細胞 (BMMNC) に由来するか、AllCells、Inc. (Alameda) およびLonza (Basel, Switzerland) のBMMNCから得られた。派生のために、BMMNCを解凍し、MEM+20% FBS中で、組織培養用プラスチック皿上で播種した。細胞を収穫し、3,000~5,000個の細胞/cm<sup>2</sup> で再播種した場合、接着細胞は、開始から4~5日以内に出現し始め、約10~12日目まで3日おきに供給した。

#### 【0318】

T細胞増殖のためのインビトロアッセイは、マウス末梢リンパ節から単離されたリンパ球を使用して行われた。これらのリンパ球を、5μMのカルボキシフルオレセインサクシニミジルエステル (CFSE) で標識化し、それらの娘細胞中のCFSE希釈を37で10分間モニタリングすることによって、それらの増殖を追跡した。10,000個のT-MSCまたはBM-MSCを、96ウェルプレート中でウェルあたり100,000個

のリンパ球と混合し、増殖のために、プレート結合抗CD3 (0.3、1  $\mu$ g/ml)でおよび可溶性抗CD28抗体 (1  $\mu$ g/ml、eBioscience, CA)で細胞を刺激した。細胞を刺激から3日後に収集し、続いて、抗CD4および抗CD8抗体 (BD Bioscience, CA)でFACS染色を行った。CFSE希釈はそれぞれ、CD4+およびCD8+T細胞にゲートをかけた。

【0319】

結果

マウスリンパ球を用いたインビトロアッセイを使用して、マウスCD4+およびCD8+T細胞を0.3および1  $\mu$ g/mlの抗CD3抗体で刺激した場合、T-MSCがマウスCD4+およびCD8+T細胞の増殖を阻害したのに対して、T細胞を低用量、すなわち、0.3  $\mu$ g/mlの抗CD3抗体で刺激した場合、BM-MSCのみが増殖を阻害したことが見出された (図5)。

10

【0320】

実施例4. T-MSCは、EAEマウスの疾患スコアを減じる

BM-MSCが多発性硬化症、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) のマウスモデルの疾患の進行を減速させることができることを示すため、実施例1で得られたT-MSCを、EAEに罹患しているマウスに注入して、それらが同じ効果を有するかどうかを判定した。

【0321】

材料および方法

20

SB431542によるMSCの派生：この方法から派生したMSCは、hES-MSC (SB) と称され、この方法は、既に公開されていた (Chen et al., 2012)。

【0322】

マウスEAEモデルを、前述のように誘発した (Stromnes and Goverman, 2006)。製造業者のプロトコルに従い、Ge et al. (2012) に記載されるように、C57BL/6マウスに、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質ペプチド35-55 (MOG<sup>35-55</sup>)、フロイントアジュバント、およびEAE誘発キット (Hooke Laboratories, Inc, MA. (カタログ番号# EK-0114)) の中に含まれる百日咳毒素の混合物を皮下注射した。

30

【0323】

10<sup>6</sup>個の細胞/マウスで、BM-MSC、T-MSC、もしくはhES-MSC (SB)、またはPBS (ビヒクル対照) を、免疫付与から6日目 (発症前) または18日目 (発症後) に、腹腔内 (i.p.) 注入した。この疾患スコアは、最大31日間毎日マウスにおいてモニタリングされた。

【0324】

疾患スコアシステムは以下の通りである：

- 0：疾患の兆候なし、
- 1：尾の緊張喪失、
- 2：部分的な後肢麻痺、
- 3：完全な後肢麻痺、
- 4：前肢麻痺、
- 5：瀕死

40

(Stromnes and Goverman, 2006)。

【0325】

結果

図6に示されるように、T-MSCは、6日目または疾患の発症前に注入した場合に、毎日の疾患スコアを著しく減じ、これは、T-MSCの予防効果を示した。BM-MSCを注入されたマウスは、疾患スコアを減じず、hES-MSC (SB) は、疾患スコアを減じる際に部分的な効果があったが、T-MSCほど良好ではなかった。

50

## 【0326】

実施例5．T - MSCの複数の系統分化

材料および方法

T - MSCの骨形成、軟骨形成、および脂質生成

製造業者の取扱説明書に従って、骨形成および軟骨形成のためにSTEMPRO骨形成および軟骨形成分化キット(Invitrogen, Grand Island, NY)、ならびに脂質生成のためにHyclone Advance STEM脂質生成分化キット(Thermo Scientific, Logan, UT)を使用した。

## 【0327】

結果

10

図7に示されるように、T - MSCは、中胚葉組織、骨芽細胞、軟骨細胞、および脂肪細胞の3つの系統のすべてに分化する際に良好な有効性を有した。したがって、T - MSCは、組織再生、組織工学、および組織修復のための源として使用することができる。

## 【0328】

実施例6．T - MSCは、hES - HB - MSCおよびBM - MSCとは異なる

T - MSC、hES - HB - MSC、およびBM - MSCの遺伝子発現プロファイルと比較するために、マイクロアレイ分析が行われた。

## 【0329】

材料および方法

製造業者の取扱説明書に従って、マイクロアレイ分析について、2～4継代でのhES - MSCのRNA、または3継代でのBM - MSCが、トリアゾール(Invitrogen, CA)を用いて収獲された。ヒトHT - 12 v4 Expression BeadChip(Illumina, San Diego, CA)は、細胞の遺伝子発現プロファイル进行分析するために使用した。Genome Studio V2011.1を用いてデータを分析した。異なる源由来の2つのBM - MSC細胞株を使用し、H9およびMA09に由来する2つのhES - MSC細胞株を使用した。

20

## 【0330】

結果

図8に示されるように、いくつかの重要なサイトカイン、転写因子、細胞表面マーカーの総合的な発現プロファイルは、これらの3つの異なるMSCの間で非常に異なる。T - MSCは、免疫抑制および組織再生において異なる役割を果たし得る。

30

## 【0331】

参考文献

Al Jumah, M.A., and Abumaree, M.H. (2012). The Immunomodulatory and Neuroprotective Effects of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE): A Model of Multiple Sclerosis (MS). International journal of molecular sciences 13, 9298-9331.

Anton, K., Banerjee, D., and Glod, J. (2012). Macrophage-associated mesenchymal stem cells assume an activated, migratory, pro-inflammatory phenotype with increased IL-6 and CXCL10 secretion. PLoS One 7, e35036.

40

Auletta, J.J., Bartholomew, A.M., Maziarz, R.T., Deans, R.J., Miller, R.H., Lazarus, H.M., and Cohen, J.A. (2012). The potential of mesenchymal stromal cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis. Immunotherapy 4, 529-547.

Barberi, T., Willis, L.M., Socci, N.D., and Studer, L. (2005). Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. PLoS Med 2, e161.

50

Barry, F., Boynton, R.E., Liu, B., and Murphy, J.M. (2001). Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 268, 189-200.

Becher B, Durell BG, Noelle RJ (2002) Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *The Journal of clinical investigation* 110: 493-497.

Benito-Leon, J. (2011). Are the prevalence and incidence of multiple sclerosis changing? *Neuroepidemiology* 36, 148-149.

10

Brown, S.E., Tong, W., and Krebsbach, P.H. (2009). The derivation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* 189, 256-260.

Chao, Y.X., He, B.P., and Tay, S.S. (2009). Mesenchymal stem cell transplantation attenuates blood brain barrier damage and neuroinflammation and protects dopaminergic neurons against MPTP toxicity in the substantia nigra in a model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroimmunology* 216, 39-50.

Chaudhary P, Marracci GH, Bourdette DN (2006) Lipoic acid inhibits expression of ICAM-1 and VCAM-1 by CNS endothelial cells and T cell migration into the spinal cord in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 175: 87-96.

20

Chen, Y.S., Pelekanos, R.A., Ellis, R.L., Horne, R., Wolvetang, E.J., and Fisk, N.M. (2012). Small Molecule Mesengenic Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells to Generate Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Stem Cells Translational Medicine*.

Chyou, S., Ekland, E.H., Carpenter, A.C., Tzeng, T.C., Tian, S., Michaud, M., Madrid, J.A., and Lu, T.T. (2008). Fibroblast-type reticular stromal cells regulate the lymph node vasculature. *J Immunol* 181, 3887-3896.

30

Connick, P., Kolappan, M., Crawley, C., Webber, D.J., Patani, R., Mitchell, A.W., Du, M.Q., Luan, S.L., Altmann, D.R., Thompson, A.J., et al. (2012). Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of concept study. *Lancet neurology* 11, 150-156.

Correale, J., and Villa, A. (2007). The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity* 40, 148-160.

40

Costa, M., Dottori, M., Ng, E., Hawes, S.M., Sourris, K., Jamshidi, P., Pera, M.F., Elefanti, A.G., and Stanley, E.G. (2005). The hESC line Envy expresses high levels of GFP in all differentiated progeny. *Nat Methods* 2, 259-260.

Crocker, S.J., Milner, R., Pham-Mitchell, N., and Campbell, I.L. (2006). Cell and agonist-specific regulation of genes for matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors by primary glial cells. *Journal of neurochemistry* 98, 812-823.

50



Cuccurullo C, Iezzi A, Fazio ML, De Cesare D, Di Francesco A, et al. (2006) Suppression of RAGE as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in type 2 diabetes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26: 2716-2723.

Cunnea P, McMahon J, O'Connell E, Mashayekhi K, Fitzgerald U, et al. (2010) Gene expression analysis of the microvascular compartment in multiple sclerosis using laser microdissected blood vessels. *Acta neuropathologica* 119: 601-615.

Dai H, Ciric B, Zhang GX, Rostami A (2012) Interleukin-10 plays a crucial role in suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by Bowman-Birk inhibitor. *Journal of neuroimmunology* 245: 1-7.

10

Dienz, O., and Rincon, M. (2009). The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clinical immunology* 130, 27-33.

Djouad, F., Plence, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noel, D., and Jorgensen, C. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102, 3837-3844.

Dong, C. (2008). TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 8, 337-348.

20

Draper, J.S., Pigott, C., Thomson, J.A., and Andrews, P.W. (2002). Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *Journal of anatomy* 200, 249-258.

Drukker, M., Katchman, H., Katz, G., Even-Tov Friedman, S., Shezen, E., Hornstein, E., Mandelboim, O., Reisner, Y., and Benvenisty, N. (2006). Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. *Stem Cells* 24, 221-229.

30

Drukker, M., Katz, G., Urbach, A., Schuldiner, M., Markel, G., Itskovitz-Eldor, J., Reubinoff, B., Mandelboim, O., and Benvenisty, N. (2002). Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9864-9869.

English, K., Barry, F.P., Field-Corbett, C.P., and Mahon, B.P. (2007). IFN-gamma and TNF alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 110, 91-100.

40

Ge, S., Shrestha, B., Paul, D., Keating, C., Cone, R., Guglielmotti, A., and Pachter, J.S. (2012). The CCL2 synthesis inhibitor bindarit targets cells of the neurovascular unit, and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* 9, 171.

Gijbels, K., Brocke, S., Abrams, J.S., and Steinman, L. (1995). Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation. *Mol Med* 1, 795-805.

50

Gordon, D., Pavlovska, G., Glover, C.P., Uney, J.B., Wraith, D., and Scolding, N.J. (2008a). Human mesenchymal stem cells abrogate experimental allergic encephalomyelitis after intraperitoneal injection, and with sparse CNS infiltration. *Neurosci Lett* 448, 71-73.

Gordon, D., Pavlovska, G., Glover, C.P., Uney, J.B., Wraith, D., and Scolding, N.J. (2008b). Human mesenchymal stem cells abrogate experimental allergic encephalomyelitis after intraperitoneal injection, and with sparse CNS infiltration. *Neuroscience letters* 448, 71-73.

10

Gordon, D., Pavlovska, G., Uney, J.B., Wraith, D.C., and Scolding, N.J. (2010). Human mesenchymal stem cells infiltrate the spinal cord, reduce demyelination, and localize to white matter lesions in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 1087-1095.

Grinnemo, K.H., Mansson, A., Dellgren, G., Klingberg, D., Wardell, E., Drvota, V., Tammik, C., Holgersson, J., Ringden, O., Sylven, C., et al. (2004). Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127, 1293-1300.

20

Hansen, W., Westendorp, A.M., and Buer, J. (2008). Regulatory T cells as targets for immunotherapy of autoimmunity and inflammation. *Inflamm Allergy Drug Targets* 7, 217-223.

Hofstetter, C.P., Schwarz, E.J., Hess, D., Widenfalk, J., El Manira, A., Prockop, D.J., and Olson, L. (2002). Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2199-2204.

Huber, T.L., Kouskoff, V., Fehling, H.J., Palis, J., and Keller, G. (2004). Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* 432, 625-630.

30

Hwang, N.S., Varghese, S., Lee, H.J., Zhang, Z., Ye, Z., Bae, J., Cheng, L., and Elisseeff, J. (2008). In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell derived mesenchymal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20641-20646.

Huss DJ, Winger RC, Cox GM, Guerau-de-Arellano M, Yang Y, et al. (2011) TGF-beta signaling via Smad4 drives IL-10 production in effector Th1 cells and reduces T-cell trafficking in EAE. *European journal of immunology* 41: 2987-2996.

40

Javazon, E.H., Beggs, K.J., and Flake, A.W. (2004). Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 32, 414-425.

Johnston, J., and So, T.Y. (2012). First-line disease-modifying therapies in paediatric multiple sclerosis: a comprehensive overview. *Drugs* 72, 1195-1211

Karlsson, C., Emanuelsson, K., Wessberg, F., Kajic, K., Axell, M.Z., Eriksson, P.S., Lindahl, A., Hyllner, J., and Strehl, R. (2009). Human embryonic stem cell-

50

derived mesenchymal progenitors-Potential in regenerative medicine. *Stem Cell Res* 3, 39-50.

Karussis, D., Karageorgiou, C., Vaknin-Dembinsky, A., Gowda-Kurkalli, B., Gomori, J.M., Kassis, I., Bulte, J.W., Petrou, P., Ben-Hur, T., Abramsky, O., et al. (2010). Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 67, 1187-1194.

Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S.J., and Lanza, R. (2006). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444, 481-485. 10

Kurtzke JF (1983). "Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)". *Neurology* 33 (11): 1444-52

Leech, M.D., Barr, T.A., Turner, D.G., Brown, S., O'Connor, R.A., Gray, D., Mellanby, R.J., and Anderton, S.M. (2012). Cutting Edge: IL-6-Dependent Autoimmune Disease: Dendritic Cells as a Sufficient, but Transient, Source. *J Immunol*.

Lin, G., Martins-Taylor, K., and Xu, R.H. (2010). Human embryonic stem cell derivation, maintenance, and differentiation to trophoblast. *Methods in molecular biology* 636, 1-24. 20

Liu, R., Zhang, Z., Lu, Z., Borlongan, C., Pan, J., Chen, J., Qian, L., Liu, Z., Zhu, L., Zhang, J., et al. (2012). Human Umbilical Cord Stem Cells Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Regulating Immunoinflammation and Remyelination. *Stem cells and development*.

Liu, Y., Goldberg, A.J., Dennis, J.E., Gronowicz, G.A., and Kuhn, L.T. (2012). One-step derivation of mesenchymal stem cell (MSC)-like cells from human pluripotent stem cells on a fibrillar collagen coating. *PLoS One* 7, e33225. 30

Lu, S.J., Feng, Q., Caballero, S., Chen, Y., Moore, M.A., Grant, M.B., and Lanza, R. (2007). Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nat Methods* 4, 501-509.

Lu, S.J., Ivanova, Y., Feng, Q., Luo, C., and Lanza, R. (2009). Hemangioblasts from human embryonic stem cells generate multilayered blood vessels with functional smooth muscle cells. *Regenerative medicine* 4, 37-47.

40

Lu, S.J., Luo, C., Holton, K., Feng, Q., Ivanova, Y., and Lanza, R. (2008). Robust generation of hemangioblastic progenitors from human embryonic stem cells. *Regen Med* 3, 693-704.

Ludwig, T.E., Levenstein, M.E., Jones, J.M., Berggren, W.T., Mitchen, E.R., Franke, J.L., Crandall, L.J., Daigh, C.A., Conard, K.R., Piekarczyk, M.S., et al. (2006). Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* 24, 185-187.

Mahad, D.J., and Ransohoff, R.M. (2003). The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in mu 50

Multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol* 15, 23-32.

McFarland, H.F., and Martin, R. (2007). Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 8, 913-919.

Menge, T., Zhao, Y., Zhao, J., Wataha, K., Gerber, M., Zhang, J., Letourneau, P., Redell, J., Shen, L., Wang, J., et al. (2012). Mesenchymal Stem Cells Regulate Blood-Brain Barrier Integrity Through TIMP3 Release After Traumatic Brain Injury. *Science translational medicine* 4, 161ra150.

10

Minagar, A., Maghzi, A.H., McGee, J.C., and Alexander, J.S. (2012). Emerging roles of endothelial cells in multiple sclerosis pathophysiology and therapy. *Neurological research* 34, 738-745.

Mohyeddin Bonab, M., Yazdanbakhsh, S., Lotfi, J., Alimoghaddom, K., Talebian, F., Hooshmand, F., Ghavamzadeh, A., and Nikbin, B. (2007). Does mesenchymal stem cell therapy help multiple sclerosis patients? Report of a pilot study. *Iranian journal of immunology : IJI* 4, 50-57.

20

Moore, C.S., Milner, R., Nishiyama, A., Frausto, R.F., Serwanski, D.R., Pagarigan, R.R., Whitton, J.L., Miller, R.H., and Crocker, S.J. (2011). Astrocytic tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) promotes oligodendrocyte differentiation and enhances CNS myelination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 6247-6254.

Morando, S., Vigo, T., Esposito, M., Casazza, S., Novi, G., Principato, M.C., Furlan, R., and Uccelli, A. (2012). The therapeutic effect of mesenchymal stem cell transplantation in experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by peripheral and central mechanisms. *Stem Cell Res Ther* 3, 3.

30

Ohtaki, H., Ylostalo, J.H., Foraker, J.E., Robinson, A.P., Reger, R.L., Shioda, S., and Prockop, D.J. (2008). Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14638-14643.

Olivier, E.N., Rybicki, A.C., and Bouhassira, E.E. (2006). Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 1914-1922.

40

Patanello, A.K., Zinno, M., Quaranta, D., Nociti, V., Frisullo, G., Gainotti, G., Tonali, P.A., Batocchi, A.P., and Marra, C. (2010). Correlations between peripheral blood mononuclear cell production of BDNF, TNF-alpha, IL-6, IL-10 and cognitive performances in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res* 88, 1106-1112.

Payne, N.L., Sun, G., McDonald, C., Layton, D., Moussa, L., Emerson-Webber, A., Veron, N., Siatskas, C., Herszfeld, D., Price, J., et al. (2012). Distinct immunomodulatory and migratory mechanisms underpin the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in autoimmune demyelination. *Cell Transplant*.

50

Peron, J.P., Jazedje, T., Brandao, W.N., Perin, P.M., Maluf, M., Evangelista, L. P., Halpern, S., Nisenbaum, M.G., Czeresnia, C.E., Zatz, M., et al. (2012). Human endometrial-derived mesenchymal stem cells suppress inflammation in the central nervous system of EAE mice. *Stem Cell Rev* 8, 940-952.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.

Pomper, M.G., Hammond, H., Yu, X., Ye, Z., Foss, C.A., Lin, D.D., Fox, J.J., and Cheng, L. (2009). Serial imaging of human embryonic stem-cell engraftment and teratoma formation in live mouse models. *Cell Res* 19, 370-379.

10

Quintana, A., Muller, M., Frausto, R.F., Ramos, R., Getts, D.R., Sanz, E., Hofer, M.J., Krauthausen, M., King, N.J., Hidalgo, J., et al. (2009). Site-specific production of IL-6 in the central nervous system retargets and enhances the inflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 183, 2079-2088.

Rafei, M., Birman, E., Forner, K., and Galipeau, J. (2009a). Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Ther* 17, 1799-1803.

20

Rafei, M., Campeau, P.M., Aguilar-Mahecha, A., Buchanan, M., Williams, P., Birman, E., Yuan, S., Young, Y.K., Boivin, M.N., Forner, K., et al. (2009b). Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. *J Immunol* 182, 5994-6002.

Rochman, I., Paul, W.E., and Ben-Sasson, S.Z. (2005). IL-6 increases primed cell expansion and survival. *Journal of immunology* 174, 4761-4767.

30

Ryan, J.M., Barry, F., Murphy, J.M., and Mahon, B.P. (2007). Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 149, 353-363.

Sanchez, L., Gutierrez-Aranda, I., Ligerio, G., Rubio, R., Munoz-Lopez, M., Garcia-Perez, J.L., Ramos, V., Real, P.J., Bueno, C., Rodriguez, R., et al. (2011). Enrichment of human ESC-derived multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive and anti-inflammatory properties capable to protect against experimental inflammatory bowel disease. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 29, 251-262.

40

Sethe, S., Scutt, A., and Stolzing, A. (2006). Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* 5, 91-116.

Solchaga, L.A., Penick, K.J., and Welter, J.F. (2011). Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tips and tricks. *Methods in molecular biology* 698, 253-278.

Stromnes, I.M., and Goverman, J.M. (2006). Active induction of experimental allergic

50

rgic encephalomyelitis. Nat Protoc 1, 1810-1819.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282, 1145-1147.

Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C., and Guinan, E.C. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. Transplantation 75, 389-397.

10

Tyndall, A. (2011). Successes and failures of stem cell transplantation in autoimmune diseases. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2011, 280-284.

Uccelli A, Prockop DJ (2010a). Why should mesenchymal stem cells (MSCs) cure autoimmune diseases? Curr Opin Immunol 22: 768-774.

Uccelli, A., and Prockop, D.J. (2010b). Why should mesenchymal stem cells (MSCs) cure autoimmune diseases? Curr Opin Immunol, 7.

Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L., and Betancourt, A.M. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. PLoS One 5, e10088.

20

Weber, M.S., Menge, T., Lehmann-Horn, K., Kronsbein, H.C., Zettl, U., Sellner, J., Hemmer, B., and Stuve, O. (2012). Current treatment strategies for multiple sclerosis - efficacy versus neurological adverse effects. Current pharmaceutical design 18, 209-219.

Wong, R.S. (2011). Mesenchymal stem cells: angels or demons? J Biomed Biotechnol 2011, 459510.

30

Xu, R.H., Chen, X., Li, D.S., Li, R., Addicks, G.C., Glennon, C., Zwaka, T.P., and Thomson, J.A. (2002). BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. Nat Biotechnol 20, 1261-1264.

Xu, R. H., et al.2002. "BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast." Nat Biotechnol 20:1261-1264.

Yamout, B., Hourani, R., Salti, H., Barada, W., El-Hajj, T., Al-Kutoubi, A., Herlopian, A., Baz, E.K., Mahfouz, R., Khalil-Hamdan, R., et al. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: a pilot study. J Neuroimmunol 227, 185-189.

40

Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., et al. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. Blood 106, 1755-1761.

Zhang, J., Li, Y., Chen, J., Cui, Y., Lu, M., Elias, S.B., Mitchell, J.B., Hammi, L., Vanguri, P., and Chopp, M. (2005). Human bone marrow stromal cell treatment

50

ent improves neurological functional recovery in EAE mice. Exp Neurol 195, 16-26

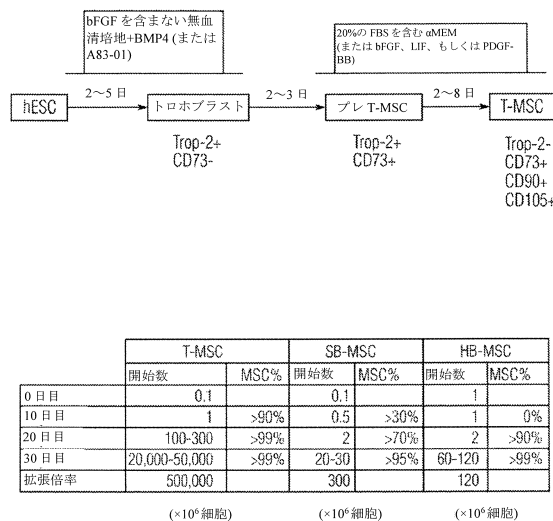
### 【0332】

本開示は、好ましい実施形態を参照して説明されているが、本開示の範囲から逸脱することなく、様々な変更がなされ得、等価物がその要素に対して置換され得ることは、当業者によって理解されるであろう。さらに、本開示の本質的な範囲および精神から逸脱することなく、特定の使用、適用、製造条件、使用条件、組成物、媒体、大きさ、および/または材料に、この教示を適合させるように多くの修正がなされ得る。したがって、本開示は、特定の実施形態に限定されず、本明細書に記載されるように実施するための最良の形態を企図することが意図される。そのような修正はまた、添付の特許請求の範囲内に入ることも意図される。

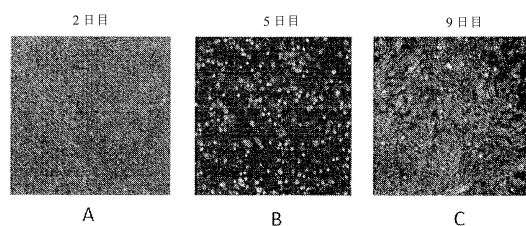
### 【0333】

本明細書に引用されるすべての参考文献は、個々の出版物または特許または特許出願がそれぞれ、すべての目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれると具体的かつ個別に示される場合と同程度に、すべての目的のために参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

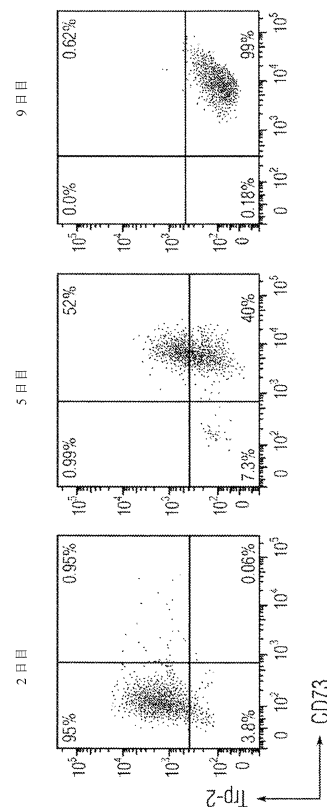
【図1】



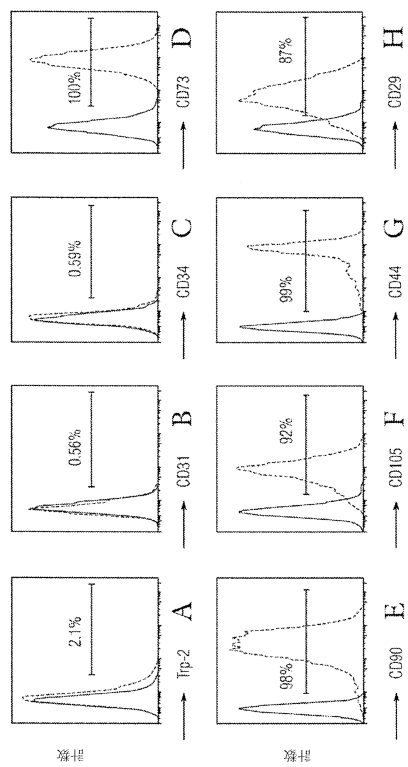
【図2】



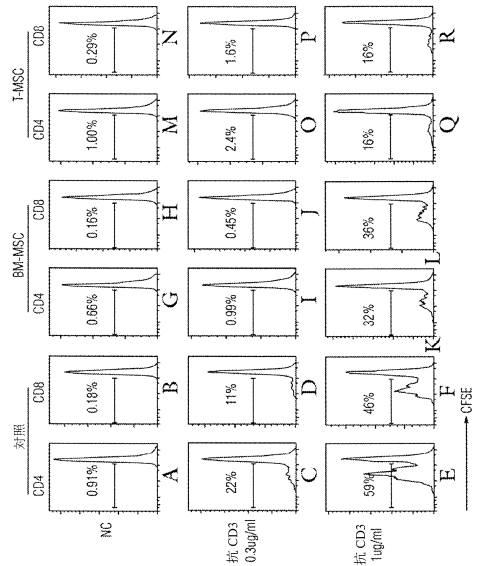
【図3】



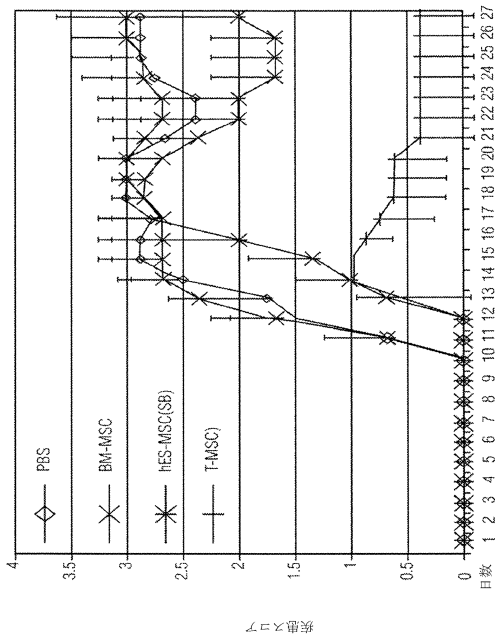
【図 4】



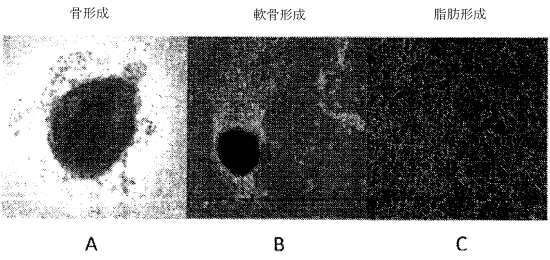
【図 5】



【図 6】

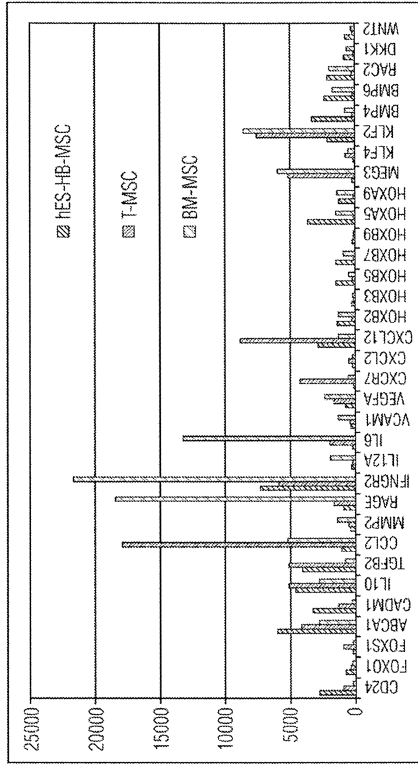


【図 7】





【図 8】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P 19/02 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 5	
A 6 1 P 19/04 (2006.01)		A 6 1 P 19/02		
A 6 1 P 19/08 (2006.01)		A 6 1 P 19/04		
A 6 1 P 17/00 (2006.01)		A 6 1 P 19/08		
A 6 1 P 21/00 (2006.01)		A 6 1 P 17/00		
A 6 1 P 9/00 (2006.01)		A 6 1 P 21/00		
A 6 1 K 35/28 (2015.01)		A 6 1 P 9/00		
A 6 1 L 27/00 (2006.01)		A 6 1 K 35/28		
A 6 1 P 17/02 (2006.01)		A 6 1 L 27/00		
		A 6 1 P 17/02		

- (72)発明者 ワン, シアオフアン  
 アメリカ合衆国, コネチカット州 0 6 0 8 5 , ユニオンヴィッレ, 3 6 リド ロード
- (72)発明者 ス, レン - ヘ  
 アメリカ合衆国, コネチカット州 0 6 0 3 2 , ファーミントン, 5 ピー タルコット フォレスト  
 ト ロード

審査官 千葉 直紀

- (56)参考文献 特開2010-094062(JP, A)  
 特表2005-520514(JP, A)  
 国際公開第2012/068170(WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 C 1 2 N  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / W P I D S / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )