(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 1 月 19 日(19.01.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/010417 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/0775 (2010.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/070242

(22) 国際出願日: 2016 年 7 月 8 日(08.07.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
62/190,880 2015 年 7 月 10 日(10.07.2015) US
62/353,356 2016 年 6 月 22 日(22.06.2016) US

(71) 出願人: ロート製薬株式会社(ROHTO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西１丁目８番１号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 池山 芳史(IKEYAMA, Yoshifumi); 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西１丁目８番１号 ロート製薬株式会社内 Osaka (JP). 西田 浩之(NISHIDA, Hiroyuki); 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西１丁目８番１号 ロート製薬株式会社内 Osaka (JP). 宇野 栄子(UNO, Eiko); 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西１丁目８番１号 ロート製薬株式会社内 Osaka (JP). 湯本 真代(YUMOTO, Masayo); 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西１丁目８番１号 ロート製薬株式会社内 Osaka (JP). ノ スアン チュン(NGO, Xuan Trung); 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西１丁目８番１号 ロート製薬株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 津国, 外(TSUKUNI & ASSOCIATES et al.); 〒1020083 東京都千代田区麹町５－３－１ 麹町ビジネスセンター Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

(54) **Title**: HIGH-FUNCTIONALITY MESENCHYMAL STEM CELLS, METHOD FOR PREPARING SAME, AND CULTURE MEDIUM FOR PREPARATION

(54) 発明の名称 : 高機能間葉系幹細胞、その調製方法、および調製用培地

(57) **Abstract**: The present invention addresses the problem of providing high-functionality mesenchymal stem cells, a method for preparing the same, and a culture medium for the preparation. Provided is a method for preparing high-functionality mesenchymal stem cells which comprises a step for treatment of mesenchymal stem cells by at least one type of anti-inflammatory agent. When compared to untreated mesenchymal stem cells, the high-functionality mesenchymal stem cells have at least one enhanced function selected from the group consisting of anti-inflammatory function, immunomodulating function, antitumor function, tissue repair function, and barrier strengthening function by tight junction formation in epithelial cells.

(57) 要約: 本発明は、高機能間葉系幹細胞、その調製方法およびその調製用培地を提供することを課題とする。少なくとも一種の抗炎症剤により間葉系幹細胞を処理する工程を含む高機能間葉系幹細胞の調製方法。高機能間葉系幹細胞は、抗炎症機能、免疫調節機能、抗腫瘍機能、組織修復機能、上皮系細胞のタイトジャンクション形成によるバリア増強機能からなる群より選択される少なくとも一種の機能が、無処理の間葉系幹細胞と比較して亢進している。

WO 2017/010417 A1

明　細　書

発明の名称 ：

高機能間葉系幹細胞、その調製方法、および調製用培地

技術分野

[0001] 本発明は、高い治療効果を有する間葉系幹細胞の調製方法、その調製方法により得られた高機能間葉系幹細胞、および調製用培地に関する。

背景技術

[0002] 昨今、生体の細胞あるいは組織を利用した医薬品の開発や再生医療の研究が進み、注目されている。特に、ＥＳ細胞、ｉＰＳ細胞等の多能性幹細胞を用いた臓器再生技術の研究が加速されている。一方、骨髄幹細胞等の体性幹細胞を利用する細胞療法は、病気により障害を受けた組織を修復する本来の体性幹細胞の機能を利用するもので、再生医療の中でもより実現性の高いものとして注目され、研究が進められている。

[0003] 間葉系幹細胞（以下、ＭＳＣともいう）は、通常、骨髄、脂肪組織、臍帯、または末梢血から単離可能な多能性の体性幹細胞であり、多数の異なる種類の細胞に分化する能力を有している。

[0004] 特許文献１には、ＭＳＣは、種々の組織や臓器における血管形成の促進、自己免疫疾患の治療、アレルギー応答の治療、癌の治療、炎症性疾患と障害の治療、創傷治癒の促進、炎症の治療、及び上皮傷害の修復に用い得ること、また、ＭＳＣは、ＩＬ－１０のような抗炎症性サイトカインの分泌を促進し、マクロファージ遊走阻止因子の活性を阻害すると考えられることが記載されている。

[0005] また、ＭＳＣは、炎症性サイトカインであるＴＮＦ－αとともにインキュベートすると、活性化してＴＳＧ－６の発現量が増大すること、ＴＳＧ－６の発現量が増大したＭＳＣの投与は心臓障害の修復に有用であることが、特許文献２に記載されている。しかし、ＭＳＣを抗炎症剤で処理することにより、治療効果の高い細胞に調製可能であることは知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特表２０１０－５０５７６４号公報

特許文献2：特表２０１１－５２５３５５号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、高い治療効果を有する間葉系幹細胞の調製方法、その調製方法により得られた高機能間葉系幹細胞、その高機能間葉系幹細胞を含む医薬組成物、および調製用培地を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 前記課題を解決するために、本発明者が種々検討した結果、少なくとも一種の抗炎症剤により間葉系幹細胞を処理すると高機能間葉系幹細胞が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は、以下に関する。

（１）少なくとも一種の抗炎症剤により間葉系幹細胞を処理する工程を含む、高機能間葉系幹細胞の調製方法。

（２）高機能間葉系幹細胞において、抗炎症機能、免疫調節機能、抗腫瘍機能、組織修復機能、上皮系細胞のタイトジャンクション形成によるバリア増強機能からなる群より選択される少なくとも一種の機能が、無処理の間葉系幹細胞と比較して亢進している、（１）に記載の方法。

（３）抗炎症剤が、非ステロイド性抗炎症剤である、（１）または（２）に記載の方法。

（４）非ステロイド性抗炎症剤が、プロピオン酸系抗炎症剤である、（３）に記載の方法。

（５）非ステロイド性抗炎症剤が、抗アレルギー剤である、（３）に記載の方法。

（６）間葉系幹細胞が、臍帯由来である、（１）～（５）いずれか一に記載

の方法。

（７）（１）～（６）のいずれか一に記載の方法によって調製された、高機能間葉系幹細胞。

（８）（７）に記載の高機能間葉系幹細胞を含有する医薬組成物。

（９）少なくとも一種の抗炎症剤を含む、高機能間葉系幹細胞調製用培地。

発明の効果

[0010] 本発明の調製方法により、高機能間葉系幹細胞を得ることができる。高機能間葉系幹細胞は、抗炎症機能、免疫調節機能、抗腫瘍機能および組織修復機能、上皮系細胞のタイトジャンクション形成によるバリア増強機能等に優れ、ヒトを含む哺乳動物に投与されると、高い治療効果を発揮することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]抗炎症剤処理間葉系幹細胞の、ＴＳＧ－６遺伝子発現量を示すグラフであり、（ａ）は抗炎症剤処理１日、（ｂ）は抗炎症剤処理２日、（ｃ）は抗炎症剤処理３日のＴＳＧ－６遺伝子発現量を示す。

[図2]抗炎症剤処理（４日）の間葉系幹細胞の、ＴＳＧ－６遺伝子発現量を示すグラフである。

[図3]間葉系幹細胞とマウスマクロファージ細胞株Ｒａｗ２６４．７の共培養下、ＬＰＳで刺激した後の培養上清中のＩＬ－６量を示すグラフである。

[図4]抗炎症剤処理間葉系幹細胞とマウスマクロファージ細胞株Ｒａｗ２６４．７の共培養下、ＬＰＳで刺激した後の培養上清中のＩＬ－６量を示すグラフである。

[図5]抗炎症剤処理間葉系幹細胞とマウスマクロファージ細胞株Ｒａｗ２６４．７の共培養下、ＬＰＳで刺激した後の培養上清中のＩＬ－６量を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明について詳細に説明する。

[0013] ＜高機能間葉系幹細胞の調製方法＞

本発明の高機能間葉系幹細胞の調製方法は、少なくとも一種の抗炎症剤により間葉系幹細胞を処理する工程を含む。

[0014] 抗炎症剤により間葉系幹細胞を処理する工程とは、例えば、抗炎症剤含有培地で間葉系幹細胞を培養する工程が挙げられる。また、抗炎症剤を間葉系幹細胞含有溶液に添加する工程が挙げられる。

[0015] 本発明における高機能間葉系幹細胞の調製方法は、以下の工程を含む方法として説明することもできる。

（１）間葉系幹細胞を培養する工程

（２）上記（１）で得られた間葉系幹細胞を抗炎症剤で処理する工程

（３）高機能間葉系幹細胞を回収する工程

[0016] （１）間葉系幹細胞を培養する工程

本工程においては、各組織から得られた間葉系幹細胞を培養する。組織から単離した間葉系幹細胞の培養方法は、それぞれの細胞に適した方法であれば特に限定されず、従来と同様の方法が用いられる。通常、３０℃～３７℃の温度、２％～７％CO_2環境下、５％～２１％O_2環境下で行われる。また、間葉系幹細胞の継代の時期及び方法も間葉系幹細胞に適していれば特に限定されず、間葉系幹細胞の形態を観察しながら、従来と同様に行うことができる。

[0017] 間葉系幹細胞培養用培地は、間葉系幹細胞の培養に適する培地であれば特に制限されず、当業者に従来公知の培地を用いることができる。間葉系幹細胞培養用培地としては、例えば、Ｐｒｏｍｏ　Ｃｅｌｌ社、Ｌｉｆｅ　Ｌｉｎｅ社、Ｌｏｎｚａ社等の間葉系幹細胞培養用培地等が挙げられる。培地は、生物由来原料（例えば、動物血清）を含有してもよい。得られる細胞を動物（ヒトを含む）の疾患の治療に用いることを考慮すると、できるだけ生物由来原料を含まない培地（例えば、無血清培地）であることが好ましい。

[0018] 上記で培養した間葉系幹細胞について、細胞の状態を勘案して適切な回数の継代を行った後、通常その１日後～５日後、好ましくは１日後～４日後、より好ましくは１日後～３日後にトリプシン、コラゲナーゼ等の酵素で処理

して剥離させ、遠心分離して間葉系幹細胞を回収する。または、培養上清を除去する。

[0019] （２）上記（１）で得られた間葉系幹細胞を抗炎症剤で処理する工程

本工程は、間葉系幹細胞含有溶液に抗炎症剤を添加して、一定の時間インキュベートする工程である。間葉系幹細胞含有溶液は培地であってよく、また、培地ではない処理用溶液であってもよい。

[0020] 抗炎症剤添加培地での間葉系幹細胞の培養方法は、それぞれの細胞に適した方法であれば特に限定されず、従来と同様の方法が用いられる。培地中の抗炎症剤の濃度に制限はないが、好ましくは、０．０００１～１．０重量％であり、より好ましくは、０．０００２～０．１重量％、さらに好ましくは、０．０００３～０．０５重量％、特に好ましくは、０．０００５～０．０１重量％である。通常、３０℃～３７℃の温度、２％～１０％CO_2環境下、５％～２１％O_2環境下で行われる。また、抗炎症剤と間葉系幹細胞を接触させる時間に制限はなく、間葉系幹細胞の継代の時期及び方法もそれぞれの間葉系幹細胞に適していれば特に限定されず、間葉系幹細胞の形態を観察しながら、従来と同様に行うことができる。なお、抗炎症剤との接触時間として好ましくは、１２時間～２週間、好ましくは１日～１０日、より好ましくは、２日～１週間である。なお、培養は、細胞の全培養期間に渡って無血清培地を用いて行われてもよい。

[0021] 培地ではない処理用溶液中で抗炎症剤による処理を行う場合は、処理用溶液中の抗炎症剤の濃度に制限はないが、好ましくは、０．０００１～１．０重量％であり、より好ましくは、０．０００２～０．１重量％、さらに好ましくは、０．０００３～０．０５重量％、特に好ましくは、０．０００５～０．０１重量％である。抗炎症剤との接触時間として好ましくは、１２時間～２週間、好ましくは１日～１０日である。

[0022] （３）高機能間葉系幹細胞を回収する工程

（２）において抗炎症剤により処理された間葉系幹細胞について、細胞の状態を勘案して適切な時間に、トリプシン、コラゲナーゼ等の酵素で処理し

て細胞を剥離させ、またはトリプシン、コラゲナーゼ等の酵素処理なしで、遠心分離して高機能間葉系幹細胞を回収する。

回収した高機能間葉系幹細胞はそのまま、またはリン酸緩衝液等で洗浄した後、治療用高機能間葉系幹細胞として治療に使用することができる。保存する場合は、保存用の溶液を用いて保存用容器中に保存する。

[0023] 本発明の調製方法により得られる高機能間葉系幹細胞は、サイトカイン等の分泌タンパク質、細胞内発現タンパク質の種類と量が変化しており、優れた治療効果を有する幹細胞である。本発明の調製方法により得られる高機能間葉系幹細胞は、抗炎症剤で処理をしない間葉系幹細胞に比較して、治療のための機能の少なくとも一つの機能が亢進している細胞である。該治療のための機能としては、例えば、抗炎症機能、免疫調節機能、抗腫瘍機能または組織修復機能、上皮系細胞のタイトジャンクション形成によるバリア増強機能が挙げられる。

[0024] 抗炎症機能が亢進している本発明の間葉系幹細胞は、抗炎症サイトカインの分泌が亢進されている細胞、または、炎症性サイトカインの分泌が抑制されている細胞である。本細胞をヒトを含む哺乳動物に投与することにより、炎症が関与する各種疾患を治療することができる。炎症が関与する疾患はとしては、特に制限はなく、例えば、外傷、敗血症、火傷、手術、感染性疾患、組織障害、潰瘍、並びに、腸、肝臓、目、脳、肺、脊髄、皮膚、骨、関節等の各組織の炎症性疾患が挙げられる。

[0025] 免疫調節機能が亢進している本発明の間葉系幹細胞は、ヒトを含む哺乳動物に投与されることにより、免疫系が関与する各種疾患を治療することができる。免疫系が関与する疾患としては、特に制限はなく、例えば、自己免疫疾患、臓器移植後の拒絶反応、アレルギー疾患、クローン病、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、膠原病等が挙げられる。

[0026] 抗腫瘍機能が亢進している本発明の間葉系幹細胞は、ヒトを含む哺乳動物に投与されることにより、各種腫瘍を治療することができる。腫瘍としては、特に制限はなく、良性腫瘍、悪性腫瘍を含み、例えば、胃癌、脳腫瘍、白

血病が挙げられる。

[0027] 組織修復機能が亢進している本発明の間葉系幹細胞は、ヒトを含む哺乳動物に投与されることにより、損傷している組織を修復することができる。組織が損傷している疾患は特に制限はなく、各種潰瘍（例えば、糖尿病性潰瘍）、骨関節炎、血管の梗塞による組織の損傷、組織の欠損等を挙げることができる。

[0028] 上皮系細胞のタイトジャンクション形成によるバリア増強機能が亢進している本発明の間葉系幹細胞は、ヒトを含む哺乳動物に投与されることにより、上皮又は内皮のバリア機能の低下に起因する疾患の予防又は治療のために用いられることができる。疾患としては、例えば、癌、前癌性症状、炎症性疾患、免疫疾患、神経変性疾患、代謝疾患、心血管疾患、骨疾患、胃腸疾患、肺疾患、肝疾患、腎疾患等が挙げられる。

[0029] また、本発明の調製方法により得られる高機能間葉系幹細胞は、抗炎症剤で処理をしない間葉系幹細胞に比較して、間葉系幹細胞から発現される特定のサイトカインの量の増大により特徴づけられる。抗炎症剤で処理をしない間葉系幹細胞に比較して特定のサイトカインの発現量が２倍以上であることが好ましい。３倍以上であるとより好ましい。特定のサイトカインとしては、例えばＴＳＧ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１ｒａ（ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｎｔａｇｏｎｉｓｔ）、ＴＧＦ－β、ＩＬ－４、ＩＬ－１１、ＩＬ－１３等の抗炎症性サイトカインを挙げることができる。

[0030] さらに、本発明の調製方法により得られる高機能間葉系幹細胞は、抗炎症剤で処理をしない間葉系幹細胞に比較して、間葉系幹細胞から発現する特定のサイトカインの量の減少によっても特徴づけられる。抗炎症剤で処理をしない間葉系幹細胞に比較して特定のサイトカインの発現量が１／２以下であることが好ましく、１／１０以下であるとより好ましい。特定のサイトカインとしては、例えばＩＬ－６、ＩＬ－８等の炎症性サイトカインを挙げることができる。

[0031] 間葉系幹細胞（ＭＳＣ）は多能性幹細胞であり、多数の異なる種類の細胞

に分化することができる細胞である。骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、または筋細胞の少なくとも１つに分化することができ、任意の組織から単離されうる。通常、ＭＳＣは、骨髄、脂肪組織、臍帯、または末梢血から単離される。本発明の好ましい態様では、ＭＳＣは臍帯から得られる。

[0032] 本発明で用いられる抗炎症剤は、抗炎症作用を有する薬剤であれば特に制限はない。例えば、非ステロイド性抗炎症剤、シクロオキシゲナーゼ（ＣＯＸ）阻害剤、抗アレルギー剤、抗ヒスタミン剤、抗ロイコトリエン剤等に分類される抗炎症剤が挙げられる。具体的な薬剤名を例示すると、アセチルサリチル酸、インドメタシン、エトドラク、ジクロフェナクナトリウム、ケトプロフェン、イブプロフェン、オキサプロジン、ロキソプロフェンナトリウム二水和物、プラノプロフェン、ピロキシカム、メロキシカム、グリチルリチン、アルドステロン、グアイアズレン、ブロメライン、クロモグリク酸ナトリウム、トラニラスト、ケトチフェンフマル酸塩、クレマスチンフマル酸塩、クロルフェニラミンマレイン酸塩、ジフェンヒドラミン塩酸塩、エメダスチンジフマル酸塩、プロメタジン塩酸塩、エバスチン、エピナスチン塩酸塩、イブジラスト、モンテルカストナトリウム、スプラタストトシル酸塩、アクタリット、プレドニゾロン、ベタメタゾン、デキサメタゾン、プロピオン酸クロベタゾール、フルオロメトロン、トリアムシノロンアセトニド等であるが、本発明における抗炎症剤を何ら限定するものではない。

[0033] 好ましい抗炎症剤としては、非ステロイド性抗炎症剤であり、より好ましくはシクロオキシゲナーゼ（ＣＯＸ）阻害剤であり、さらに好ましくはプロピオン酸系抗炎症剤である。例えば、イブプロフェン、ナプロキセン、シクロプロフェン、ベノキサプロフェン、ケトプロフェン、フェノプロフェン、フルルビプロフェン、ロキソプロフェン、カルプロフェン、サプロフェン、オキサプロジン、アミノプロフェン、ザルトプロフェン、プラノプロフェン等が挙げられる。

[0034] また、好ましい抗炎症剤として、抗アレルギー剤を挙げることができる。より好ましくは、メディエーター遊離抑制薬であり、例えば、クロモグリク

酸ナトリウム、トラニラスト、アンレキサノクス、レピリナスト、イブジラスト、タザノラスト、ペミロラスト等が挙げられる。

[0035] また、好ましい抗炎症剤として、グリチルリチン（グリチルリチン酸ジカリウム等のグリチルリチン酸塩も含む）を挙げることもできる。

[0036] ＜高機能間葉系幹細胞調製用培地＞

本発明の高機能間葉系幹細胞調製用培地は、少なくとも一種の抗炎症剤を含む培地である。本発明の培地は、間葉系幹細胞培養用培地に少なくとも一種の抗炎症剤が添加された培地である。間葉系幹細胞培養用培地は、間葉系幹細胞の培養に適する培地であれば特に制限されず、当業者に従来公知の培地を用いることができる。間葉系幹細胞培養用培地としては、例えば、Ｐｒｏｍｏ Ｃｅｌｌ社、Ｌｉｆｅ Ｌｉｎｅ社、Ｌｏｎｚａ社等の間葉系幹細胞培養用培地等が挙げられる。培地は、生物由来原料（例えば、動物血清）を含有してもよい。必要に応じて、アルブミン、ＦＣＳ等の生物由来原料を添加することもできる。例えば、ＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地等、またはこれらの基本培地にＦＣＳを、０．１％～１０％の範囲で含む培地等が挙げられる。得られる細胞を動物（ヒトを含む）の疾患の治療に用いることを考慮すると、できるだけ生物由来原料を含まない培地（例えば、無血清培地）であることが好ましい。

[0037] 前記無血清培地は、添加剤として動物血清を含まない培地であればよく、特に限定されない。公知の基本培地に、動物血清を除くその他添加剤を含有した組成を有するものを用いることができる。基本培地の組成は、培養するべき細胞の種類に応じて適宜選択することができる。例えば、イーグル培地のような最小必須培地（ＭＥＭ）、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地α（ＭＥＭ－α）、間葉系細胞基礎培地（ＭＳＣＢＭ）、Ｈａｍ’ｓ Ｆ－１２及びＦ－１０培地、ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地、Ｗｉｌｌｉａｍｓ培地Ｅ、ＲＰＭＩ－１６４０培地、ＭＣＤＢ培地、１９９培地、Ｆｉｓｈｅｒ培地、Ｉｓｃｏｖｅ改変ダルベッコ培地（ＩＭＤＭ）、ＭｃＣｏｙ改変培地等が挙げられる。

[0038] 培地中の抗炎症剤の濃度に制限はない。好ましくは、０．０００１～１．０重量％であり、より好ましくは、０．０００２～０．１重量％、さらに好ましくは、０．０００３～０．０５重量％、特に好ましくは、０．０００５～０．０１重量％である。

[0039] 添加する抗炎症剤は、抗炎症作用を有する薬剤であれば特に制限はない。例えば、非ステロイド性抗炎症剤、シクロオキシゲナーゼ（ＣＯＸ）阻害剤、抗アレルギー剤、抗ヒスタミン剤、抗ロイコトリエン剤等に分類される抗炎症剤が挙げられる。本発明の培地が含む具体的な抗炎症剤としては、本発明の方法において記載した抗炎症剤と同じ抗炎症剤を挙げることができ、好ましい抗炎症剤についても同様である。

[0040] 基本培地に加えるその他の添加剤としては、アミノ酸類、無機塩類、ビタミン類及び炭素源や抗生物質等の他の添加剤を挙げることができる。これらの添加剤の使用濃度は特に限定されず、通常の哺乳動物細胞用培地に用いられる濃度で用いることができる。

[0041] アミノ酸類としては、例えば、グリシン、Ｌ－アラニン、Ｌ－アルギニン、Ｌ－アスパラギン、Ｌ－アスパラギン酸、Ｌ－システイン、Ｌ－シスチン、Ｌ－グルタミン酸、Ｌ－グルタミン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リジン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン等が挙げられる。

[0042] 無機塩類としては、例えば、塩化カルシウム、硫酸銅、硝酸鉄（ＩＩＩ）、硫酸鉄、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カリウム、炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム等が挙げられる。

[0043] ビタミン類としては、例えば、コリン、ビタミンＡ、ビタミンＢ１、ビタミンＢ２、ビタミンＢ３、ビタミンＢ４、ビタミンＢ５、ビタミンＢ６、ビタミンＢ７、ビタミンＢ１２、ビタミンＢ１３、ビタミンＢ１５、ビタミンＢ１７、ビタミンＢｈ、ビタミンＢｔ、ビタミンＢｘ、ビタミンＣ、ビタミ

ンD、ビタミンE、ビタミンF、ビタミンK、ビタミンM、ビタミンP等が挙げられる。

[0044] 他の添加剤として、繊維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、内皮細胞増殖因子（ＥＧＦ）、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）、インスリン様成長因子（ＩＧＦ）、トランスフォーミング成長因子（ＴＧＦ）、神経成長因子（ＮＧＦ）、脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、トロンボポエチン（ＴＰＯ）、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）等の増殖因子；ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン等の抗生物質；グルコース、ガラクトース、フルクトース、スクロース等の炭素源；マグネシウム、鉄、亜鉛、カルシウム、カリウム、ナトリウム、銅、セレン、コバルト、スズ、モリブデン、ニッケル、ケイ素等の微量金属；β－グリセロリン酸、デキサメタゾン、ロシグリタゾン、イソブチルメチルキサンチン、５－アザシチジン等の幹細胞分化誘導剤；２－メルカプトエタノール、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、Ｎ－アセチルシステイン等の抗酸化剤；アデノシン５’－－リン酸、コルチコステロン、エタノールアミン、インスリン、還元型グルタチオン、リポ酸、メラトニン、ヒポキサンチン、フェノールレッド、プロゲステロン、プトレシン、ピルビン酸、チミジン、トリヨードチロニン、トランスフェリン、ラクトフェリン、アルブミン、Ｗｎｔシグナル活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、増殖因子、ステロイド性化合物、ＰＴＥＮ阻害剤、ｐ５３阻害剤、ｐ３８阻害剤等が挙げられる。

[0045] 本発明における間葉系幹細胞を得るための好適な無血清培地としては、市販の無血清培地が挙げられる。この無血清培地は、抗酸化剤、動物血清アルブミン、成長因子、界面活性剤、Ｅｄｇリガンド、セロトニンリガンド、Ｗｎｔシグナル活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、増殖因子、ステロイド性化合物、ＰＴＥＮ阻害剤、ｐ５３阻害剤、ｐ３８阻害剤等から選択される成分をさらに含有してもよい。

[0046] ＜高機能間葉系幹細胞＞

本発明は、上述の本発明の調製方法により得られた高機能間葉系幹細胞も含む。本発明の高機能間葉系幹細胞は、サイトカイン等の分泌タンパク質、細胞内発現タンパク質の種類と量が変化しており、優れた治療効果を有する幹細胞である。本発明の高機能間葉系幹細胞は、抗炎症剤で処理をしない間葉系幹細胞に比較して、治療のための機能の少なくとも一つの機能が亢進している細胞である。該治療のための機能としては、例えば抗炎症機能、免疫調節機能、抗腫瘍機能または組織修復機能、上皮系細胞のタイトジャンクション形成によるバリア増強機能が挙げられる。本発明の高機能間葉系幹細胞の具体的な特徴については、本発明の調製方法における説明を適用できる。

[0047] ＜医薬組成物＞

本発明の医薬組成物は、本発明の調製方法により得られた上記高機能間葉系幹細胞を含む。さらに、高機能間葉系幹細胞以外の成分を、本発明の効果を損なわない範囲で含んでいてもよい。その他の成分としては、一般的な医薬品、医薬部外品等が含むことができる有効成分以外の成分が挙げられる。

[0048] 本発明の医薬組成物は、上述した高機能間葉系幹細胞に、前記その他の成分を混合して製造することができる。

[0049] 本発明の医薬組成物は、疾患の予防および／または治療に用いることができる。疾患としては、例えば、軟骨分解、関節リウマチ、乾癬性関節炎、脊椎関節炎、変形性関節症、痛風、乾癬、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、うっ血性心不全、脳卒中、大動脈弁狭窄症、腎不全、狼瘡、膵炎、アレルギー、線維症、貧血、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、化学療法／放射線関連合併症、Ｉ型糖尿病、II型糖尿病、自己免疫性肝炎、Ｃ型肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、劇症肝炎、セリアック病、非特異性大腸炎、クローン病、アレルギー性結膜炎、糖尿病性網膜症、シェーグレン症候群、ブドウ膜炎アレルギー性鼻炎、喘息、石綿症、珪肺、慢性閉塞性肺疾患、慢性肉芽腫性炎症、嚢胞性線維症、サルコイドーシス、糸球体腎炎、脈管炎、皮膚炎、ＨＩＶ関連悪液質、大

脳マラリア、強直性脊椎炎、らい病、ＣＯＰＤ、肺線維症、線維筋痛、食道癌、胃食道逆流症、バレット食道、胃癌、十二指腸癌、小腸癌、虫垂癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肛門癌、膵臓癌、肝臓癌、胆嚢癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、前立腺癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、乳癌、肺癌、甲状腺癌等があげられる。

[0050] 本発明の医薬組成物は、常法によって適宜の製剤とすることができる。製剤の剤型としては、優れた予防・治療効果を得る観点からは、溶液剤、懸濁剤などの液剤とすることが好ましい。本発明における医薬組成物の製剤においては、製剤上の必要に応じて、適宜の薬学的に許容される担体、例えば、等張化剤、緩衝剤、安定化剤などの任意成分を配合することができる。また、一般的な細胞製剤が含む成分を配合することができる。

[0051] 本発明の医薬組成物の投与方法としては特に制限されないが、血管内投与（好ましくは静脈内投与）、腹腔内投与、腸管内投与、皮下投与等が好ましく、中でも、血管内投与がより好ましい。

[0052] 本発明の医薬組成物の投与量としては、疾患の種類や、その症状の度合い、剤型、投与対象の体重等によって変わり得るが、１日当たり、間葉系幹細胞を１Ｘ１０^{5}個～１Ｘ１０^{9}個の範囲で投与することができる。なお、本発明の医薬組成物の投与は、１日のうち１～複数回に分けて行ってもよい。また、本発明の医薬組成物の投与は、単回投与でもよいし、継続的に行ってもよい。継続的に行う場合は、例えば、３日に１回以上の頻度で、２回以上継続して投与することができ、中でも、２日に１回以上の頻度で、３回以上継続して投与することが好ましく、１日に１回以上の頻度で４回以上継続して投与することがより好ましい。

[0053] 本発明の医薬組成物の投与対象となる哺乳動物としては、特に制限されないが、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ等が好ましく、中でもヒトがより好ましい。また、本発明の医薬組成物に含まれる間葉系幹細胞は、本発明の医薬組成物の投与対象となる哺乳動物の種類と一致していることが、疾患

に対するより安定して優れた予防及び／または治療効果を得る観点から好ましい。

[0054] 以下に本発明を実施例に基づいて更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0055] ［実施例１］

＜抗炎症剤処理高機能間葉系幹細胞の取得＞

臍帯由来間葉系幹細胞（ＵＣ－ＭＳＣ；Ｕｍｂｉｌｉｃａｌ Ｃｏｒｄ ｄｅｒｉｖｅｄ Ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ Ｗｈａｒｔｏｎ’ｓ Ｊｅｌｌｙ（ＨＭＳＣ－ＷＪ）、ＦＣ－００２０、ＬｉｆｅＬｉｎｅ社）を、３７℃、５％CO_2の条件下、推奨培地にて馴化し、２～３日おきに継代しながら培養を行った。

[0056] 継代６－１２回目のＵＣ－ＭＳＣを１×10^4ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ～２×10^4ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌとなるよう２４ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅ（０．５ｍｌ、ＬｉｆｅＬｉｎｅ社推奨培地）に播種した。１日後、プラノプロフェン（ＣＡＳ Ｎｏ．５２５４９－１７－４、培地中０．０２５％）、またはトラニラスト（ＣＡＳ Ｎｏ．５３９０２－１２－８、培地中０．０１２５％）を添加した。添加１日後、２日後または３日後にリン酸緩衝液で２回洗浄し、抗炎症剤処理高機能ＵＣ－ＭＳＣを得た。一部の細胞については、さらに、ＩＬ－１βを添加（１ｎｇ／ｍｌ）して刺激した後、約５時間で細胞を回収し、抗炎症剤処理高機能ＵＣ－ＭＳＣを得た。

[0057] 抗炎症剤処理高機能ＵＣ－ＭＳＣのＴＳＧ－６遺伝子の発現量を、細胞からｍＲＮＡ抽出後ｃＤＮＡを合成し、リアルタイムＰＣＲ法により測定した。抗炎症剤処理ＵＣ－ＭＳＣの相対的ＴＳＧ－６遺伝子発現量を図１の（ａ）、（ｂ）および（ｃ）にそれぞれ示した。（ａ）は抗炎症剤処理期間が１日、（ｂ）は２日、（ｃ）は３日である。ＩＬ－１β添加なしのコントロールのＴＳＧ－６発現量を１とした。ＩＬ－１β無刺激でも抗炎症剤処理期間が２日、３日の細胞においては、トラニラスト処理により、またはプラノプロフェン処理により、ＴＳＧ－６の遺伝子発現が亢進された。ＩＬ－１β刺

激を行うと、１日処理および３日処理細胞においては、その効果は増大した。以上のとおり、トラニラスト処理により、およびプラノプロフェン処理により、ＴＳＧ－６の遺伝子発現が亢進し、ＵＣ－ＭＳＣの抗炎症機能の亢進が認められた。

[0058] ［実施例２］

＜抗炎症剤処理高機能間葉系幹細胞の取得＞

プラノプロフェン処理、またはトラニラスト処理を４日に延長した以外は、実施例１と同様にして、抗炎症剤処理高機能ＵＣ－ＭＳＣを得た。

[0059] 得られた抗炎症剤処理ＵＣ－ＭＳＣの相対的ＴＳＧ－６遺伝子発現量を図２に示した。ＩＬ－１β添加なしのコントロールのＴＳＧ－６発現量を１００とした。ＩＬ－１β無刺激でもトラニラスト処理により、またはプラノプロフェン処理により、ＴＳＧ－６の遺伝子発現を亢進させるが、ＩＬ－１β刺激を行うとその効果は増大した。したがって、トラニラスト処理により、およびプラノプロフェン処理により、ＵＣ－ＭＳＣの抗炎症機能の亢進が認められた。

[0060] ＜抗炎症機能の評価系の確立＞

ＵＣ－ＭＳＣを５×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ～２×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌとなるよう６ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅ（２ｍｌ、ＬｉｆｅＬｉｎｅ社推奨培地）に播種し、翌日細胞を回収した。

マウスマクロファージ細胞株Ｒａｗ２６４．７を２４または４８ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅ（１ｍｌまたは０．５ｍｌ、１０％ＦＣＳ含有ＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地）に播種し、コンフルエント状態になるまで、培養した。細胞数は２×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍｌ～５×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍｌであった。Ｒａｗ２６４．７の細胞数に対し、１／１０、１／１００、１／１０００、１／１００００の細胞数の上記ＵＣ－ＭＳＣを添加し共培養を行った。共培養開始から４時間後にＬＰＳ（１００ｎｇ／ｍｌ）添加し、１８時間後に上清を回収し、ＩＬ－６量をＥＬＩＳＡ法により測定した（図３）。なお、陽性対照としてデキサメタゾン（和光純薬製：ＤＥＸと表記）を使用した。Ｒａｗ２

６４．７の細胞数に対し、１／１０～１／１０００の細胞数のＵＣ－ＭＳＣを添加した場合は、ＵＣ－ＭＳＣ細胞比率に対応して抗炎症効果が認められた

[0061] ［実施例３］

＜抗炎症機能評価１＞

継代６－１２回目のＵＣ－ＭＳＣを５×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ～２×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌとなるよう６ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅ（２ｍｌ、ＬｉｆｅＬｉｎｅ社推奨培地）に播種した。１日後、プラノプロフェン（ＣＡＳ　Ｎｏ．５２５４９－１７－４、培地中０．００５％および０．０２５％）を添加した。添加４日後にリン酸緩衝液で２回洗浄し、抗炎症剤処理高機能ＵＣ－ＭＳＣを得た。この抗炎症剤処理ＵＣ－ＭＳＣについて、上記抗炎症機能の評価系を用いて評価した。Ｒａｗ２６４．７の細胞数に対し、抗炎症剤処理ＵＣ－ＭＳＣの細胞数を１／５００とした。プラノプロフェン０．０２５％で処理されたＵＣ－ＭＳＣは、無処理のＵＣ－ＭＳＣと比較して、ＩＬ－６産生抑制効果がより高まっていたことから、抗炎症機能が高い細胞となっていることがわかった（図４）。なお、抗炎症剤処理したＵＣ－ＭＳＣは共培養前に十分に洗浄しているため、残存する抗炎症剤そのものの効果ではなく、事前処理によってＵＣ－ＭＳＣを改質し、抗炎症機能を増強したことが示唆された。

[0062] ［実施例４］

＜抗炎症機能評価２＞

継代６－１２回目のＵＣ－ＭＳＣを５×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ～２×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌとなるよう６ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅ（２ｍｌ、ＬｉｆｅＬｉｎｅ社推奨培地）に播種した。１日後、プラノプロフェン（ＣＡＳ　Ｎｏ．５２５４９－１７－４、培地中０．００４％）、イブプロフェン（ＣＡＳ　Ｎｏ．１５６８７－２７－１、培地中０．００１％）又はグリチルリチン酸（ＣＡＳ　Ｎｏ．１４０５－８６－３、培地中０．００４％）を添加した。添加５日後にリン酸緩衝液で２回洗浄し、抗炎症剤処理高機能Ｕ

Ｃ－ＭＳＣを得た。この抗炎症剤処理ＵＣ－ＭＳＣについて、上記抗炎症機能の評価系を用いて評価した。Ｒａｗ２６４．７の細胞数に対し、抗炎症剤処理ＵＣ－ＭＳＣの細胞数を１／２５０とした。

[0063] プラノプロフェン０．００４％処理、イブプロフェン０．００１％処理、グリチルリチン酸０．００４％処理によって、ＵＣ－ＭＳＣを共培養した際のＩＬ－６産生抑制効果がより高まっていたことから、上記処理によってＵＣ－ＭＳＣの抗炎症機能が高められたことがわかった（図５）

[0064] ［実施例５］

＜抗炎症機能評価３＞

継代６－１２回目のＵＣ－ＭＳＣを２×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌとなるよう６ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅ（２ｍｌ、ＬｉｆｅＬｉｎｅ社推奨培地）に播種した。１日後、プラノプロフェン（ＣＡＳ Ｎｏ． ５２５４９－１７－４、培地中０．００４％）、イブプロフェン（ＣＡＳ Ｎｏ． １５６８７－２７－１、培地中０．００１％）又はグリチルリチン酸（ＣＡＳ Ｎｏ．１４０５－８６－３、培地中０．００４％）を添加した。添加５日後にリン酸緩衝液で２回洗浄し、抗炎症剤処理高機能ＵＣ－ＭＳＣを得た。得られた抗炎症剤処理高機能ＵＣ－ＭＳＣにおける各種遺伝子発現（ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１ＲＡ、ＩＬ－６、ＩＬ－８）をマイクロアレイ又はｑＰＣＲにより確認した。結果を下記表１に示す。「n.d.」は、実験を行っていないことを示す。「Fold change」は、抗炎症剤処理をしなかったＵＣ－ＭＳＣでの各遺伝子発現強度を１としたときの各細胞における発現強度を示す。

[0065] [表1]

	Fold change		
	0.004%	0.001%	0.004%
	Pranoprofen	Ibuprofen	Glycyrrhizic acid
IL4	2.65	4.23	1.44
IL10	1.05	4.92	n.d.
IL11	1.75	3.49	n.d.
IL1RA	6.36	3.48	4.92
IL6	0.06	0.1	0.9
IL8	0.23	0.35	0.98

[0066] プラノプロフェン０．００４％処理、イブプロフェン０．００１％処理、グリチルリチン酸０．００４％処理によって、抗炎症性サイトカイン（ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１ＲＡ）の遺伝子発現が増強した。一方、炎症性サイトカイン（ＩＬ－６、ＩＬ－８）の遺伝子発現は減少した。このことから、ＵＣ－ＭＳＣを上記抗炎症剤で処理することで、抗炎症機能が高められる方向に遺伝子発現が変化していることがわかった。

産業上の利用可能性

[0067] 本発明の高機能間葉系幹細胞は、高い治療効果を奏し、各種疾患の治療に好適に用いることができる。

請求の範囲

[請求項1] 少なくとも一種の抗炎症剤により間葉系幹細胞を処理する工程を含む、高機能間葉系幹細胞の調製方法。

[請求項2] 高機能間葉系幹細胞において、抗炎症機能、免疫調節機能、抗腫瘍機能、組織修復機能、上皮系細胞のタイトジャンクション形成によるバリア増強機能からなる群より選択される少なくとも一種の機能が、無処理の間葉系幹細胞と比較して亢進している、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 抗炎症剤が、非ステロイド性抗炎症剤である、請求項１または２に記載の方法。

[請求項4] 非ステロイド性抗炎症剤が、プロピオン酸系抗炎症剤である、請求項３に記載の方法。

[請求項5] 非ステロイド性抗炎症剤が、抗アレルギー剤である、請求項３に記載の方法。

[請求項6] 間葉系幹細胞が、臍帯由来である、請求項１～５のいずれか一に記載の方法。

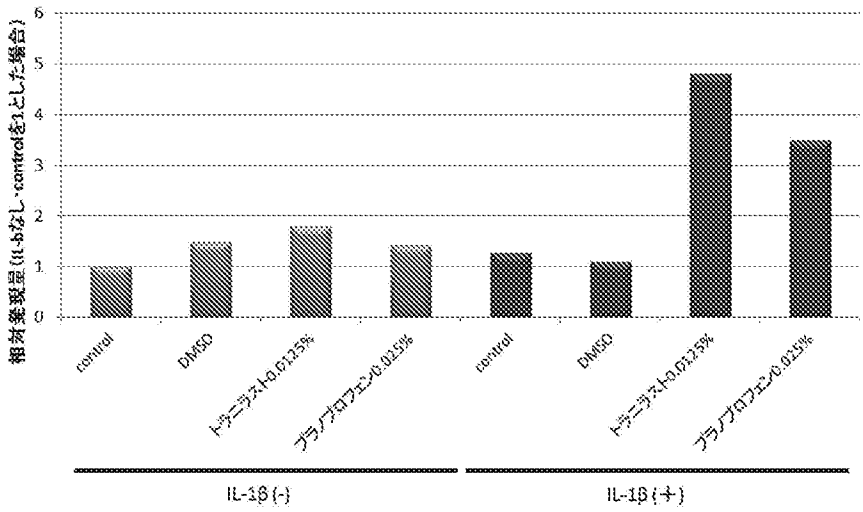
[請求項7] 請求項１～６のいずれか一に記載の方法によって調製された、高機能間葉系幹細胞。

[請求項8] 請求項７に記載の高機能間葉系幹細胞を含有する医薬組成物。

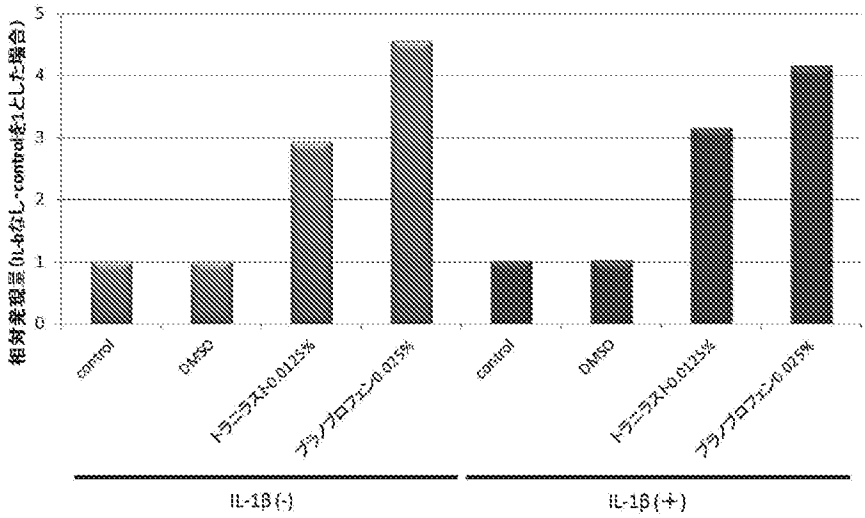
[請求項9] 少なくとも一種の抗炎症剤を含む、高機能間葉系幹細胞調製用培地。

[図1]

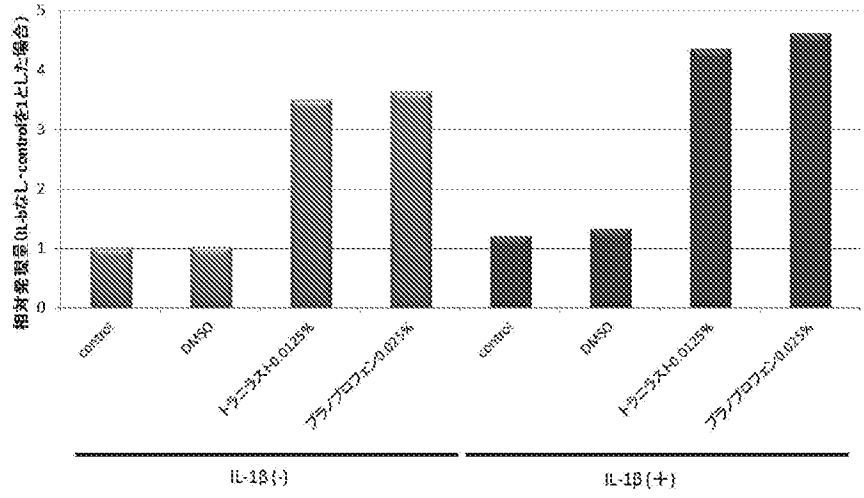
(a)


相対発現量(IL-1bなし・controlを1とした場合)
0
1
2
3
4
5
6
control
DMSO
トラニラスト0.0125%
プラノプロフェン0.025%
control
DMSO
トラニラスト0.0125%
プラノプロフェン0.025%
IL-1β(-)
IL-1β(+)

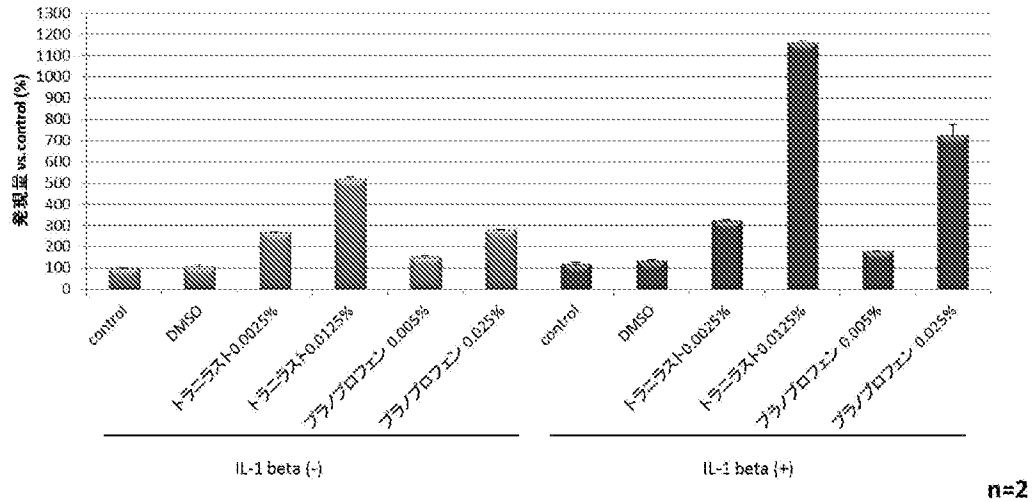
(b)


相対発現量(IL-6なし・controlを1とした場合)
0
1
2
3
4
5
control
DMSO
トラニラスト0.0125%
プラノプロフェン0.025%
control
DMSO
トラニラスト0.0125%
プラノプロフェン0.025%
IL-1β(-)
IL-1β(+)

(c)

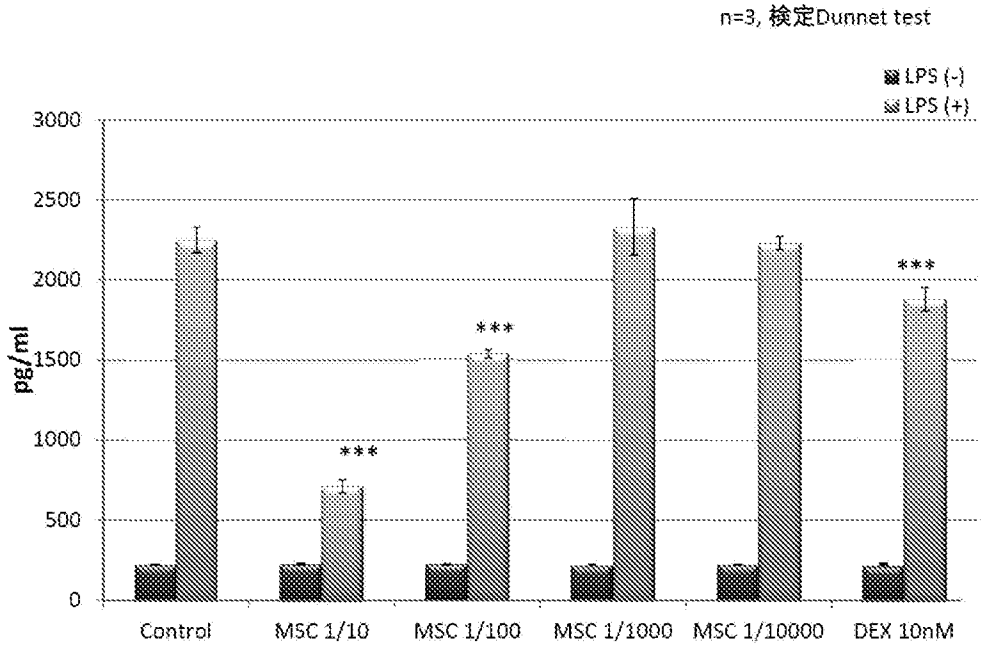

相対発現量(IL-8なし・controlを1とした場合)
0
1
2
3
4
5
control
DMSO
トラニラスト0.0125%
プラノプロフェン0.025%
control
DMSO
トラニラスト0.0125%
プラノプロフェン0.025%
IL-1β(-)
IL-1β(+)

[図2]

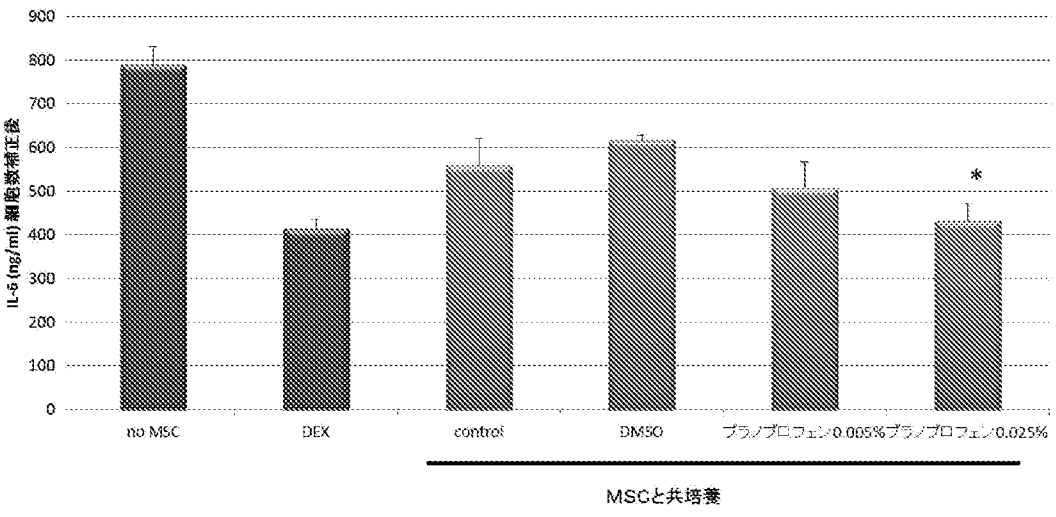

発現量 vs. control (%)
1300
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
control
DMSO
トラニラスト0.0025%
トラニラスト0.0125%
プラノプロフェン 0.005%
プラノプロフェン 0.025%
control
DMSO
トラニラスト0.0025%
トラニラスト0.0125%
プラノプロフェン 0.005%
プラノプロフェン 0.025%
IL-1 beta (-)
IL-1 beta (+)

n=2

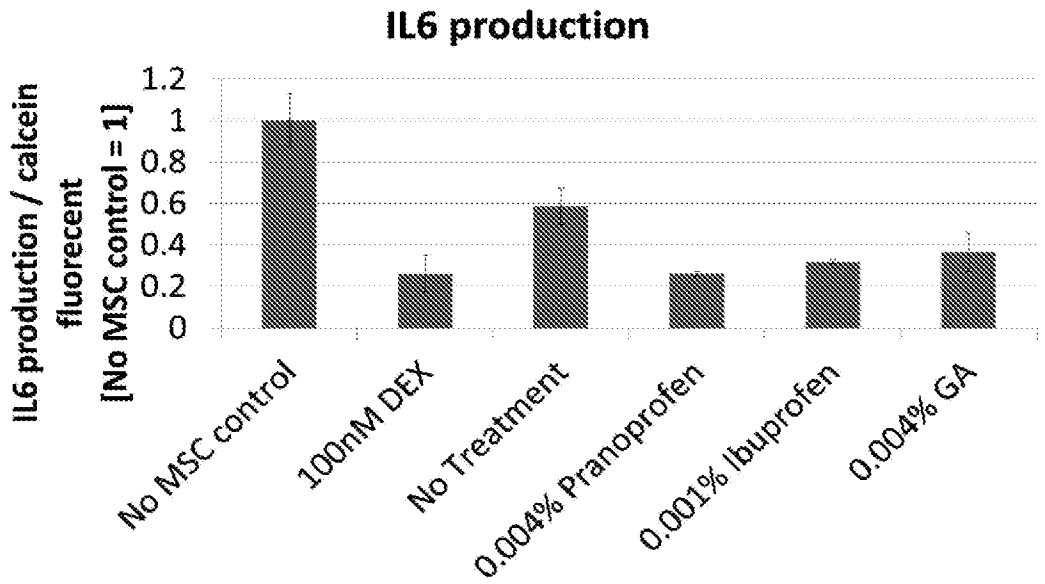
[図3]


n=3, 検定Dunnet test
LPS (-)
LPS (+)
pg/ml
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
***
***
***
Control
MSC 1/10
MSC 1/100
MSC 1/1000
MSC 1/10000
DEX 10nM

[図4]


IL-6 (ng/ml) 細胞数補正後
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
*
no MSC
DEX
control
DMSO
プラノプロフェン0.005%
プラノプロフェン0.025%
MSCと共培養

[図5]


IL6 production
IL6 production / calcein fluorecent [No MSC control = 1]
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
No MSC control
100nM DEX
No Treatment
0.004% Pranoprofen
0.001% Ibuprofen
0.004% GA

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/070242

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/0775(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N5/0775

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Alaseem, Abdulrahman M., et al., Naproxen Induces Type X Collagen Expression in Human Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Through the Upregulation of 5-Lipoxygenase, TISSUE ENGINEERING: Part A, January 1 2015, Vol.21, p.234-245 abstract, page 234, right column, 5th line from the bottom to page 235, left column, line 14	1-5,7-9 6
X Y	Oh, Namgil, et al., Compensatory Cellular Reacions to Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Osteogenic Differentiation in Canine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, J.Vet.Med.Sci.,2014, Vol.76, p.629-636 abstract, page 632, right column, 14th line from the bottom to page 633, left column, line 9, fig. 1	1-5,7-9 6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
09 August 2016 (09.08.16)	23 August 2016 (23.08.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/070242

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Pountos, Ippokratis, et al., NSAIDS inhibit in vitro MSC chondrogenesis but not osteogenesis: implications for mechanism of bone formation inhibition in man, J.Cell.Mol.Med., 2011, Vol.15, p.525-534 abstract, page 528, right column, 18th line from the bottom to 5th line from the bottom, fig. 2C	1-5,7-9 6
Y	Zanwar, K. et al., Comparative evaluation of efficacy of stem cells in combination with PLA/PGA membrane versus sub-epithelial connective tissue for the treatment of multiple gingival recession defects: a clinical study, J Stem Cells., 2014, Vol.9, p.253-267 abstract, page 254, right column, lines 14 to 33	6

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０７０２４２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/0775(2010.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/0775

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１６年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	Alaseem,Abdulrahman M., et al., Naproxen Induces Type X Collagen Expression in Human Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Through the Upregulation of 5-Lipoxygenase, TISSUE ENGINEERING: Part A, January 1 2015, Vol.21, p.234-245 要約、234ページ右欄下から5行～235ページ左欄14行	1-5,7-9 6

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０９．０８．２０１６	２３．０８．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　２９３６
飯室　里美
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	Oh,Namgil, et al., Compensatory Cellular Reacions to Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Osteogenic Differentiation in Canine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, J.Vet.Med.Sci.,2014, Vol.76, p.629-636 要約、632ページ右欄下から14行～633ページ左欄9行、図1	1-5,7-9 6
X Y	Pountos, Ippokratis, et al., NSAIDS inhibit in vitro MSC chondrogenesis but not osteogenesis: implications for mechanism of bone formation inhibition in man, J.Cell.Mol.Med., 2011, Vol.15, p.525-534 要約、528ページ右欄下から18行～下から5行、図2C	1-5,7-9 6
Y	Zanwar, K. et al., Comparative evaluation of efficacy of stem cells in combination with PLA/PGA membrane versus sub-epithelial connective tissue for the treatment of multiple gingival recession defects: a clinical study, J Stem Cells., 2014, Vol.9, p.253-267 要約、254ページ右欄14行～33行	6