

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6871637号
(P6871637)

(45) 発行日 令和3年5月12日(2021.5.12)

(24) 登録日 令和3年4月20日(2021.4.20)

(51) Int.Cl.

F 1

| | | |
|---------------|-----------|------------------|
| C 12 N 5/0775 | (2010.01) | C 12 N 5/0775 |
| A 61 K 35/28 | (2015.01) | A 61 K 35/28 |
| A 61 P 43/00 | (2006.01) | A 61 P 43/00 107 |
| A 61 P 19/02 | (2006.01) | A 61 P 43/00 105 |
| A 61 P 19/10 | (2006.01) | A 61 P 19/02 |

請求項の数 9 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-523011 (P2018-523011)
 (86) (22) 出願日 平成28年11月4日 (2016.11.4)
 (65) 公表番号 特表2018-537440 (P2018-537440A)
 (43) 公表日 平成30年12月20日 (2018.12.20)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2016/060624
 (87) 國際公開番号 WO2017/079621
 (87) 國際公開日 平成29年5月11日 (2017.5.11)
 審査請求日 令和1年10月30日 (2019.10.30)
 (31) 優先権主張番号 62/250,664
 (32) 優先日 平成27年11月4日 (2015.11.4)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73) 特許権者 508152917
 ザ ボード オブ リージェンツ オブ
 ザ ユニバーシティー オブ テキサス
 システム
 アメリカ合衆国 78701 テキサス,
 オースティン, ウエスト 7番 スト
 リート 210
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】高齢細胞集団由来の高い分化能を有するヒト間葉系幹細胞の濃縮および増幅

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

培養培地と、第1のドナーから得られた骨髓由来間葉系幹細胞(BM-MSC)の第1のセットから単離された小型BM-MSCとを含む、細胞培養系であって、

該単離された小型BM-MSCが単離の時点でSSEA-4を発現しており(SSEA-4+)、該細胞培養系が、単離の時点でサイズが小さくなかったBM-MSCまたは単離の時点でSSEA-4を発現していないなかったBM-MSCを含まず、該第1のドナーが、該BM-MSCの第1のセットが提供された時点で65歳以上であり、かつ該単離された小型BM-MSCが、懸濁液中で測定した場合に30ミクロン未満の直径中央値を有する、前記細胞培養系。

【請求項2】

第2のドナーから得られたBM-MSCの第2のセットに由来する細胞外マトリックス(ECM)をさらに含む、請求項1記載の細胞培養系。

【請求項3】

前記第2のドナーが25歳以下である、請求項2記載の細胞培養系。

【請求項4】

前記第1のドナーが、BM-MSCの量および/もしくは質が低下していた、かつ/または加齢に伴う変性疾患を有していた、かつ/または前記BM-MSCの第1のセットが提供された時点でBM-MSCの量もしくは質を損なう疾患もしくは状態を有していた、請求項1~3のいずれか一項記載の細胞培養系。

【請求項5】

10

20

第1のドナーから得られた骨髄由来間葉系幹細胞（BM-MSC）の第1のセットから単離された小型BM-MSCを含む組成物であって、

該単離された小型BM-MSCが、単離の時点でSSEA-4を発現しており（SSEA-4+）、該組成物が、単離の時点でサイズが小さくなかったBM-MSCまたは単離の時点でSSEA-4を発現していないなかったBM-MSCを含まず、該第1のドナーが、該BM-MSCの第1のセットが提供された時点で65歳以上であり、かつ該単離された小型BM-MSCが、懸濁液中で測定した場合に30ミクロン未満の直径中央値を有する、前記組成物。

【請求項6】

担体をさらに含む、請求項5記載の組成物。

【請求項7】

前記単離された小型BM-MSCが、第2のドナーから得られたBM-MSCの第2のセットに由来するECM上で培養されたものである、請求項5または6記載の組成物。

【請求項8】

前記第2のドナーが25歳以下である、請求項7記載の組成物。

【請求項9】

前記第1のドナーが、BM-MSCの量および/もしくは質が低下していた、かつ/または加齢に伴う変性疾患を有していた、かつ/または前記BM-MSCの第1のセットが提供された時点でBM-MSCの量もしくは質を損なう疾患もしくは状態を有していた、請求項5~8のいずれか一項記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その内容が参照により本出願に組み込まれる、2015年11月4日に出願された米国特許仮出願第62/250,664号の恩典を主張する。

【0002】

連邦支援の研究または開発に関する声明

本発明は、米国退役軍人省によって授与された、メリットレビューアワードプログラム（Merit Review Award Program）、助成金番号1-01 BX002145-01の下で米国政府の支援を得て為された。政府は本発明に一定の権利を有する。

【0003】

1. 発明の分野

本発明は、全体として、細胞生物学および医学の分野に関する。より詳細には、本発明は、間葉系幹細胞の再生能力を回復させ、高齢者などの、骨髄由来の間葉系幹細胞の量および/または質が低下している人々の骨髄間質細胞から欠陥のより少ない間葉系幹細胞の亜集団を単離および拡大培養する方法、これを用いた治療およびそのための装置に関する。

【背景技術】

【0004】

2. 関連技術の説明

現代医学は若齢死亡率の多くの原因を排除したので、ヒトの平均余命は急速に増加している。このため、ほとんどの人々は現在、以前よりもはるかに高い割合で、長生きして加齢に伴う変性疾患から生じる障害を経験する。世界人口の高齢化が続いているので、これは世界的に重要な健康上の懸念事項となっている。間葉系幹細胞（MSC）に基づく治療法は、これらの疾患を治療する大きな可能性を有する。しかし、間葉系幹細胞の量および質は年齢と共に低下し、この高齢化する集団に対する幹細胞療法の有効性と可能性を制限する。

【0005】

骨髄由来の間葉系幹細胞（BM-MSC）は、自己複製し、複数の細胞系統に分化することができる。これらの能力のために、BM-MSCは、ほとんどの組織型の継続的な維持および修復

10

20

30

40

50

において重要な役割を果たす。一般に、MSCの量および質は加齢と共に低下し、これは次に、組織および器官の進行性機能不全に結びつく。BM-MSCに基づく治療法は、多くの加齢に伴う変性疾患の治療のための大きな可能性が示されている。バイオセーフティ上の懸念およびFDA規制のために、患者自身の（自己由来の）幹細胞が細胞療法のために好ましいと考えられている。また、患者の年齢および疾患の重症度、BM-MSCを提供するドナーの年齢および健康状態、ならびにBM-MSCを単離して拡大培養するために使用される方法の違いは、治療の転帰に影響を及ぼす可能性がある。しかし、BM-MSCの量および質は老化と共に低下し、患者自身の幹細胞の治療上の可能性を制限する。高齢者の幹細胞はその効力を喪失するため、現在、多くの幹細胞バンク会社は顧客に早期の提供を要請している。したがって、多くの患者にとってこれらの治療法が成功するためには、老化幹細胞集団の再生能力を回復させるための方法が開発されねばならない。

10

【0006】

集団レベルでは効力が大きく低下しているにもかかわらず、若齢細胞と同じである、高齢個人からの一部の造血幹細胞を単離することが可能であると示唆されている (Cho et al., 2008)。本発明者らは、高齢マウスの幹細胞を組織特異的マトリックスに曝露することによってその再生能を回復させる能力を以前に実証した (Chen, 2010)。しかし、これはヒトMSCでは証明されていない。

【0007】

細胞外マトリックス (ECM) は、組織における細胞ニッチの重要な構成要素であり、細胞機能を開始させるまたは維持するための重要な生化学的および物理的シグナルを供給する (Chen, et al., 2007; Lai, et al., 2010)。組織特異的なECM微小環境は、組織再生および修復のために多能性幹細胞を誘導/制御する化学的および物理的合図を提供するためにインビオおよびインビトロで必須であり得る (Chen, 2010; Costa, et al., 2012)。組織工学の進歩により、様々な足場生体材料が組織再生または修復のためのECMを模倣するために開発されている (Nagaoka, et al., 2010)。その中で、前駆細胞の増殖および分化を支持するのに使用してきた材料には、キトサン、ポリグリコール酸 (PGA)、ポリ-(L)-乳酸 (PLLA)、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸) (PLAG)、およびポリ(エチレングリコール) テレフタレート (PEFT/ポリ(ブチレンテレフタレート) (PBT) が含まれる (Kagami, et al., 2008; Chan et al., 2012; Chen, et al., 2005)。しかし、これらのポリマー足場は、それらの分解産物の酸性度から生じる炎症を誘発し得る (Athanasious et al., 1996; Cancedda, et al., 2003)。

20

【0008】

別の潜在的な足場材料であるMatrikelは、EHSマウス肉腫細胞によって分泌される基底膜タンパク質を含み、培養中の初代上皮細胞を増殖させるのに使用されている (Maria, et al., 2011)。この製品では様々なレベルの成功が達成されているが、骨髓間質細胞を再活性化するという長期的な目標とは一致しない。

30

【0009】

天然の足場材料、特に絹は、その広範囲の弾性（組織特異的な足場形成を可能にする）、細孔径（組織特異的栄養および酸素アクセスを可能にする）、低い細菌付着性、生分解性、ならびに低い毒性および免疫原性のゆえに望ましい (Leal-Egana & Scheibel, 2010)。最近、骨髓 (BM) 細胞によって生成された天然の細胞外マトリックス (ECM) が、ヒトおよびマウス骨髓由来の間葉系幹細胞 (BM-MSC) の付着および増殖を増強することが報告された (Chen, et al., 2007; Lai, et al., 2010)。

40

【0010】

しかし、高齢対象などのMSCの量および質が低下している対象から細胞再生能力を有するMSCを単離および/または作製するために有用な方法、組成物および装置が依然として必要とされている。さらに、これらのMSC入手し、加齢に伴う変性疾患有する可能性がある、幹細胞療法を必要とする対象にそれらを投与する方法の必要性が依然として存在する。

【発明の概要】

50

【0011】

有利には、本発明者らは、高齢者などの骨髓由来間葉系幹細胞の量および/または質が低下した人々の骨髓間質細胞由来の間葉系幹細胞（MSC）の臨床的に価値のある亜集団の単離および拡大培養を可能にする新規アプローチを開発した。さらに、本発明者らは、上記のMSCを含む細胞培養系および組成物を開示した。加えて、本発明者らは、これらのMSCを得る方法、ならびに加齢に伴う変性疾患および状態を有する可能性がある、幹細胞療法を必要とする対象にそれらを投与する方法を開発した。さらに、本発明者らは、骨髓間質細胞の再生能力を回復させるための新規アプローチを開発した。本明細書で述べる方法、組成物および技術は、骨髓以外の供給源、例えば脂肪組織、臍帯血等に由来するMSCにも適用することができる。

10

【0012】

高齢ドナー及び若齢ドナーに由来するMSC細胞の表現型は異なるが、重複部分がある。本発明者らは、小型の骨髓由来間葉系幹細胞（BM-MSC）は早期幹細胞のマーカーを発現している傾向がより強く、大型細胞は小型細胞よりも活性酸素種（ROS）のレベルなどの老化マーカーを発現している傾向が強いことを本明細書で開示する。本明細書において、本発明者らは、若齢ドナー由来のBM-MSCのサイズと同様のサイズの、より高齢のドナーから単離されたBM-MSC中に認められる小さな細胞集団を述べる。本発明者らは、より高齢のドナー由来の小型の細胞が、増殖、分化、タンパク質発現、およびROSプロフィールを含むいくつかの点で若齢細胞により類似し得ることを開示する。本発明者らはまた、より高齢の対象における細胞の環境条件が、より高齢の対象における細胞の増殖能力を抑制し得ることを開示する。

20

【0013】

本発明者らは、より高齢のドナーから単離されたBM-MSCの性能を改善するために、サイズが小さく、同時にSSEA-4を発現する（SSEA+）細胞を単離することが望ましいことを本明細書で開示する。この集団は、増殖速度の増大、細胞当たりのアデノシン三リン酸（ATP）含量の増加、より高いテロメラーゼレベル、およびより大きな幹細胞濃度を含むいくつかの特性において若齢ドナー由来の細胞により酷似する。

【0014】

本発明者らは、ECM、特にBM-MSCに由来するECM上の細胞の培養は、SSEA-4陽性である小型細胞間の相違を際立たせることをさらに開示する。本発明者らはまた、SSEA-4陰性の小型細胞も、ECM、特にBM-MSC由来のECM上で培養した場合に有意に回復するようあることを開示する。したがって、SSEA-4陽性およびSSEA-4陰性の両方の集団が、臨床応用のために潜在的に価値がある。

30

【0015】

本発明の1つの局面では、小型骨髓由来間葉系幹細胞（BM-MSC）を対象に投与する方法が本明細書で開示され、この方法は、

- (a) 第1のドナーからBM-MSCの第1のセットを採取する工程、
- (b) 工程(a)からのBM-MSCを、サイズおよび任意でSSEA-4発現によって選別する工程、
- (c) 小型BM-MSCを単離する工程、
- (d) 小型BM-MSCを培養のためにプレーティングする工程、
- (e) 小型BM-MSCを拡大培養する工程、
- (f) 任意で工程(e)からの小型BM-MSCを保存する工程、ならびに
- (g) 工程(e)および/または(f)からの小型BM-MSCを対象に投与する工程を含む。

40

いくつかの態様では、対象は第1のドナーと同じであり、そのため小型BM-MSCは自己由来である。他の態様では、小型BM-MSCは、懸濁液中で測定した場合に30ミクロン未満の直径中央値を有する。いくつかの態様では、小型BM-MSCは、単離の時点でSSEA-4を発現している（SSEA-4+）。様々な態様において、対象は、50歳以上、65歳以上、または70歳以上である。いくつかの態様では、小型BM-MSCは、TCP上で、または第2のドナーから得られたBM

50

-MSCの第2のセットに由来する細胞外マトリックス（ECM）上で培養される。いくつかの態様では、第2のドナーは25歳以下である。他の態様では、対象は、BM-MSCの量および/もしくは質が低下しており、かつ/または幹細胞療法を必要としている。さらに他の態様では、対象は、加齢に伴う変性疾患を有しており、かつ/またはBM-MSCの量もしくは質を損なう疾患もしくは状態を有しており、かつ/またはBM-MSCの量もしくは質を損なう治療を受けているもしくは今後受けることになっている。

【 0 0 1 6 】

本発明の別の局面では、培養培地と、第1のドナーから得られたBM-MSCの第1のセットから単離された小型BM-MSCとを含む細胞培養系が本明細書で開示され、ここで、単離された小型BM-MSCは単離の時点でSSEA-4を発現しており（SSEA-4+）、第1のドナーは、BM-MSCの第1のセットが提供された時点で65歳以上であった。いくつかの態様では、細胞培養系は、単離の時点でサイズが小さくなかったBM-MSCを含まない。いくつかの態様では、細胞培養系は、単離の時点でSSEA-4を発現していないかったBM-MSCを含まない。いくつかの態様では、単離された小型BM-MSCは、懸濁液中で測定した場合に30ミクロン未満の直径中央値を有する。他の態様では、細胞培養系は、BM-MSCの第2のセットに由来する細胞外マトリックス（ECM）をさらに含む。さらに他の態様では、BM-MSCの第2のセットは、25歳以下の第2のドナーから得たものである。様々な態様において、第1のドナーは、BM-MSCの量および/もしくは質が低下していた、かつ/または加齢に伴う変性疾患を有していた、かつ/またはBM-MSCの第1のセットが提供された時点でBM-MSCの量もしくは質を損なう疾患もしくは状態を有していた。

10

【 0 0 1 7 】

本発明の別の局面では、第1のドナーから得られたBM-MSCの第1のセットから単離された小型BM-MSCを含む組成物が本明細書で開示され、ここで、単離された小型BM-MSCは単離の時点でSSEA-4を発現しており（SSEA-4+）、第1のドナーは、BM-MSCの第1のセットが提供された時点で65歳以上であった。いくつかの態様では、組成物は、単離の時点でサイズが小さくなかったBM-MSCを含まない。いくつかの態様において、組成物は、単離の時点でSSEA-4を発現していないかったBM-MSCを含まない。いくつかの態様では、単離された小型BM-MSCは、懸濁液中で測定した場合に30ミクロン未満の直径中央値を有する。他の態様では、組成物は担体をさらに含む。他の態様では、単離された小型BM-MSCは、BM-MSCの第2のセットに由来するECM上で培養されたものである。さらに他の態様では、BM-MSCの第2のセットは、25歳以下の第2のドナーから得たものである。様々な態様において、第1のドナーは、BM-MSCの量および/もしくは質が低下していた、かつ/または加齢に伴う変性疾患を有していた、かつ/またはBM-MSCの第1のセットが提供された時点でBM-MSCの量もしくは質を損なう疾患もしくは状態を有していた。

20

【 0 0 1 8 】

本発明の別の局面では、対象への投与に適した小型BM-MSCを得る方法が本明細書で開示され、この方法は、

- (a) 第1のドナーからBM-MSCの第1のセットを採取する工程、
- (b) 工程(a)からのBM-MSCを、サイズおよび任意でSSEA-4発現によって選別する工程、
- (c) 小型BM-MSCを単離する工程、
- (d) 小型BM-MSCを培養のためにプレーティングする工程、
- (e) 小型BM-MSCを拡大培養する工程、ならびに
- (f) 任意で工程(e)からの小型BM-MSCを保存する工程を含む。

30

いくつかの態様では、小型BM-MSCは、懸濁液中で測定した場合に30ミクロン未満の直径中央値を有する。いくつかの態様では、工程(b)および(c)はフローサイトメータを用いて実施される。他の態様では、小型BM-MSCは、単離の時点でSSEA-4を発現している（SSEA-4+）。様々な態様において、第1のドナーは50歳以上であり、または第1のドナーは65歳以上であり、または第1のドナーは70歳以上である。いくつかの態様では、小型BM-MSCは

40

50

、TCP上で、または第2のドナーから得られたBM-MSCの第2のセットに由来する細胞外マトリックス(ECM)上で培養される。いくつかの態様では、第2のドナーは25歳以下である。さらに他の態様では、第1のドナーは、BM-MSCの量および/もしくは質が低下しており、かつ/または幹細胞療法を必要としている。様々な態様において、第1のドナーは、加齢に伴う変性疾患有しており、かつ/またはBM-MSCの量もしくは質を損なう疾患もしくは状態を有しており、かつ/またはBM-MSCの量もしくは質を損なう治療を受けているもしくは今後受けることになっている。

【0019】

インビオ組織の生理学的特徴をまだ保持するインビトロで生成された組織は、提案される治療または分子が組織の生理学的機能に及ぼす影響を観測するための特に有用なツールを提供する。したがって、物質の生物学的活性を試験する方法が開示され、この方法は、

10

(a) 本明細書で説明される細胞培養系のいずれかを得る工程、

(b) 細胞培養系に物質を添加する工程;ならびに

(c) 細胞培養系および/または細胞のパラメータを測定して、細胞培養系に物質を添加することの影響を決定する工程

を含む。

【0020】

いくつかの態様では、物質は、疾患および/または状態を治療するための候補治療薬である。いくつかの場合では、疾患および/または状態は、BM-MSCの量もしくは質によって引き起こされるかまたはBM-MSCの量もしくは質を損なう。いくつかの場合では、疾患および/または状態は、加齢関連疾患または老化過程そのものである。いくつかの場合では、状態は、老化した幹細胞集団の再生能力の低下、または投薬もしくは放射線療法の副作用である。さらに他の態様では、物質は細胞増殖因子または細胞分化因子である。物質を細胞培養系に添加することは、物質を培地に添加することを含み得る。培養培地は、細胞の生理学的機能への培地の変化の影響を観測するために、特定の物質または物質の組合せを含む培地と交換することができる。細胞培養系のパラメータを測定することは、例えば細胞の増殖速度または形態学的特徴を観察することを含み得る。細胞を物質に曝露することまたは増殖条件を変化させることの生物学的影響を決定するために、任意の生物学的に関連するパラメータを測定および観測することができる。測定または観測されるパラメータの変化は、対応する対照が同じ変化を示さない場合、物質の存在または増殖条件の変化に帰することができる。

20

【0021】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、代替物のみを指すことが明確に指示されない限りまたは代替物が相互に排他的でない限り、「および/または」を意味するために使用されるが、本開示は、代替物のみおよび「および/または」を指すという定義を支持する。本明細書で使用される場合、「別の」は、少なくとも第2またはそれ以上を意味し得る。

30

【0022】

「約」または「およそ」という用語は、当業者によって理解されるものに近いものと定義される。1つの非限定的な態様では、これらの用語は、10%以内、好ましくは5%以内、より好ましくは1%以内、最も好ましくは0.5%以内と定義される。

40

【0023】

本出願に関して、1つまたは複数の小数点以下の桁数を有する数値は、標準的な丸めのガイドラインを使用して最も近い整数に丸めることができ、すなわち丸められる数値が5、6、7、8または9の場合は切り上げ、丸められる数値が0、1、2、3または4の場合は切り捨てる。例えば、3.7は4に丸めることができる。

【0024】

「含む (comprising)」(ならびに「comprise」および「comprises」などのcomprisingの任意の形態)、「有する (having)」(ならびに「have」および「has」などのhavingの任意の形態)、「含む (including)」(ならびに「includes」および「include」など

50

の including の任意の形態) または「含有する (containing) 」(ならびに「 contains 」および「 contain 」などの containing の任意の形態) という語は、包括的または非限定的であり、付加的な言及されていない要素または方法工程を排除しない。

【 0025 】

「含む (comprising) 」、「有する (having) 」、「含む (including) 」または「含有する (containing) 」(またはこれらの語の任意の変形) と共に使用される場合、「 a 」または「 an 」という語の使用は、「 1 つ」を意味し得るが、「 1 つまたは複数の 」、「少なくとも 1 つの 」、および「 1 つまたは 1 つより多くの 」の意味とも一致する。

【 0026 】

組成物およびそれらの使用方法は、本明細書を通じて開示される成分または工程のいずれかを「含む」、「から本質的になる」または「からなる」ことができる。 10

【 0027 】

本出願を通じて、 MSC および BM-MSC は、その生成された任意の子孫細胞を含む。「子孫細胞」という用語は、親細胞などの別の細胞に由来する細胞を示すのに使用される。子孫細胞は、親細胞と同じ特性を保持し得るか、または分化した子孫細胞のように異なる特性を有し得る。

【 0028 】

本出願を通じて、骨髓由来間葉系幹細胞の「量および/または質の低下」は、幹細胞の数が減少していること、および/または幹細胞の機能が若齢の健常対象集団のものに比べて 1 つまたは複数の側面で低下していることを示すのに使用される。幹細胞性の特性 (すなわち SSEA-4 、自己複製、分化能) および老化の特性 (すなわち老齢化、活性酸素種、アネキシン 5) の非限定的な例を本明細書で示す。非限定的な例では、老化は、骨髓由来間葉系幹細胞の量および/または質の低下を引き起こし得る。 20

【 0029 】

本出願を通じて、「老化」という用語は、幹細胞集団が量および/または質において低下する過程全体を示すのに使用される。

【 0030 】

本出願を通じて、「若齢 (者) 」という用語は、 25 歳以下のヒト (男性または女性) を指し、また当該ヒトから得られる細胞も指す。 30

【 0031 】

本出願を通じて、「高齢 (者) 」、「老齢 (者) 」または「より高齢の 」という用語は、 65 歳以上のヒト (男性または女性) を指し、また当該ヒトから得られる細胞も指す。しかし、文献には、 50 歳という早期に MSC 機能の低下が起こることを実証する例がある (Zhou et al. , 2008) 。

【 0032 】

本出願を通じて、「対象」、「患者」または「ドナー」という用語は、男性または女性のヒトを指す。

【 0033 】

本出願を通じて、骨髓由来間葉系幹細胞の「単離」および「単離された」骨髓由来間葉系幹細胞は、細胞が、異なる特性を有する生物および/または他の骨髓由来間葉系幹細胞から取り出されていることを示す。非限定的な例では、骨髓由来間葉系幹細胞はヒトから単離され得る。別の非限定的な例では、サイズが小さく、かつ/または SSEA-4 を発現する骨髓由来間葉系幹細胞は、サイズが小さくなく、かつ/または SSEA-4 を発現しないもしくは分離された細胞よりも少ない程度に SSEA-4 を発現する骨髓由来間葉系幹細胞から単離され得る。 40

【 0034 】

本出願を通じて、 BM-MSC の細胞の大きさに関して使用される場合の「小さい」および「小型」という用語は、「小型」 BM-MSC の、溶液中に懸濁された場合の直径 (「浮遊直径」) が、所与の時点でドナーから得られた BM-MSC のセットの平均浮遊直径より小さいことを意味する。様々な態様において、小型 BM-MSC は、ドナーから得られた BM-MSC のセットから 50

単離される。様々な態様において、BM-MSCの細胞の大きさに関して使用される場合の「小さい」および「小型」という用語は、懸濁液中で測定した場合に、33ミクロン未満、または30ミクロン未満、または25ミクロン未満、または20ミクロン未満、または19ミクロン未満の細胞直径中央値を有するBM-MSCを意味する。

【 0 0 3 5 】

本出願を通じて、BM-MSCの細胞の大きさに関して使用される場合の「大きい」または「大型」という用語は、「大型」BM-MSCの、溶液中に懸濁された場合の直径（「浮遊直径」）が、所与の時点でドナーから得られたBM-MSCのセットの平均浮遊直径より大きいことを意味する。様々な態様において、BM-MSCの細胞の大きさに関して使用される場合の「大きい」および「大型」という用語は、懸濁液中で測定した場合に、35ミクロンより大きい、または33ミクロンおよびそれ以上の直径中央値を有するBM-MSCを意味する。10

【 0 0 3 6 】

本出願を通じて、SSEA-4を発現している、「SSEA-4陽性」である、SSEA-4+、または「SSEA-4発現が陽性」である細胞、またはこれらの用語の任意の変形は、細胞がSSEA-4を発現しているか、または陰性対照と比較した場合、細胞において測定可能な程度にSSEA-4を発現していることを示す。様々な態様において、SSEA-4を発現しているBM-MSCは、ドナーから得られたBM-MSCのセットから単離される。

【 0 0 3 7 】

本出願を通じて、SSEA-4を発現していない、「SSEA-4陰性」である、SSEA-4-、またはSSEA-4発現に関して陰性である細胞、またはこれらの用語の任意の変形は、細胞がSSEA-4を発現していない、または陰性対照と比較した場合、細胞において測定できない程度にSSEA-4を発現していることを示す。様々な態様において、SSEA-4を発現していないBM-MSCは、ドナーから得られたBM-MSCのセットから単離される。20

【 0 0 3 8 】

また、本発明に関連して以下の態様1~37が開示される。

態様1は、以下の工程を含む、小型骨髄由来間葉系幹細胞（BM-MSC）を対象に投与する方法である：

- (a) 第1のドナーからBM-MSCの第1のセットを採取する工程、
- (b) 工程(a)からのBM-MSCを、サイズおよび任意でSSEA-4発現によって選別する工程、30
- (c) 該小型BM-MSCを単離する工程、
- (d) 該小型BM-MSCを培養のためにプレーティングする工程、
- (e) 該小型BM-MSCを拡大培養する工程、
- (f) 任意で工程(e)からの該小型BM-MSCを保存する工程、ならびに
- (g) 工程(e)および/または(f)からの該小型BM-MSCを該対象に投与する工程。

態様2は、前記対象が前記第1のドナーと同じである、態様1に記載の方法である。

態様3は、前記小型BM-MSCが、懸濁液中で測定した場合に30ミクロン未満の直径中央値を有する、態様1または2に記載の方法である。

態様4は、前記小型BM-MSCが、単離の時点でSSEA-4を発現している（SSEA-4+）、態様1~3のいずれかに記載の方法である。40

態様5は、前記対象が50歳以上である、態様1~4のいずれかに記載の方法である。

態様6は、前記対象が65歳以上である、態様1~4のいずれかに記載の方法である。

態様7は、前記対象が70歳以上である、態様1~4のいずれかに記載の方法である。

態様8は、前記小型BM-MSCを、TCP上で、または第2のドナーから得られたBM-MSCの第2のセットに由来する細胞外マトリックス（ECM）上で培養する、態様1~7のいずれかに記載の方法である。

態様9は、前記第2のドナーが25歳以下である、態様8に記載の方法である。

態様10は、前記対象が、BM-MSCの量および/もしくは質が低下しており、かつ/または幹細胞療法を必要としている、態様1~8のいずれかに記載の方法である。

態様11は、前記対象が、加齢に伴う変性疾患を有しており、かつ/またはBM-MSCの量も50

しくは質を損なう疾患もしくは状態を有しており、かつ/またはBM-MSCの量もしくは質を損なう治療を受けているもしくは今後受けることになっている、態様1~10のいずれかに記載の方法である。

態様12は、培養培地と、第1のドナーから得られたBM-MSCの第1のセットから単離された小型BM-MSCとを含む細胞培養系であって、該単離された小型BM-MSCが単離の時点でSSEA-4を発現しており(SSEA-4+)、該細胞培養系が、単離の時点でサイズが小さくなかったBM-MSCまたは単離の時点でSSEA-4を発現していないかったBM-MSCを含まず、該第1のドナーが、該BM-MSCの第1のセットが提供された時点で65歳以上であった、前記細胞培養系である。

態様13は、前記単離された小型BM-MSCが、懸濁液中で測定した場合に30ミクロン未満の直径中央値を有する、態様12に記載の細胞培養系である。 10

態様14は、BM-MSCの第2のセットに由来する細胞外マトリックス(ECM)をさらに含む、態様12または13に記載の細胞培養系である。

態様15は、前記BM-MSCの第2のセットが、25歳以下の第2のドナーから得られたものである、態様14に記載の細胞培養系である。

態様16は、前記第1のドナーが、BM-MSCの量および/もしくは質が低下していた、かつ/または加齢に伴う変性疾患有していた、かつ/または該BM-MSCの第1のセットが提供された時点でBM-MSCの量もしくは質を損なう疾患もしくは状態を有していた、態様12~15のいずれかに記載の細胞培養系である。

態様17は、第1のドナーから得られたBM-MSCの第1のセットから単離された小型BM-MSCを含む組成物であって、該単離された小型BM-MSCが、単離の時点でSSEA-4を発現しており(SSEA-4+)、該組成物が、単離の時点でサイズが小さくなかったBM-MSCまたは単離の時点でSSEA-4を発現していないかったBM-MSCを含まず、該第1のドナーが、該BM-MSCの第1のセットが提供された時点で65歳以上であった、前記組成物である。 20

態様18は、前記単離された小型BM-MSCが、懸濁液中で測定した場合に30ミクロン未満の直径中央値を有する、態様17に記載の組成物である。

態様19は、担体をさらに含む、態様17または18に記載の組成物である。

態様20は、前記単離された小型BM-MSCが、BM-MSCの第2のセットに由来するECM上で培養されたものである、態様17~19のいずれかに記載の組成物である。

態様21は、前記BM-MSCの第2のセットが、25歳以下の第2のドナーから得られたものである、態様20に記載の組成物である。 30

態様22は、前記第1のドナーが、BM-MSCの量および/もしくは質が低下していた、かつ/または加齢に伴う変性疾患有していた、かつ/または前記BM-MSCの第1のセットが提供された時点でBM-MSCの量もしくは質を損なう疾患もしくは状態を有していた、態様17~21のいずれかに記載の組成物である。

態様23は、以下の工程を含む、対象への投与に適した小型BM-MSCを得る方法である：

- (a) 第1のドナーからBM-MSCの第1のセットを採取する工程、
- (b) 工程(a)からのBM-MSCを、サイズおよび任意でSSEA-4発現によって選別する工程、
- (c) 該小型BM-MSCを単離する工程、
- (d) 該小型BM-MSCを培養のためにプレーティングする工程、
- (e) 該小型BM-MSCを拡大培養する工程、ならびに
- (f) 任意で工程(e)からの該小型BM-MSCを保存する工程。

態様24は、前記小型BM-MSCが、懸濁液中で測定した場合に30ミクロン未満の直径中央値を有する、態様23に記載の方法である。

態様25は、工程(b)および(c)を、フローサイトメータを用いて実施する、態様23または24に記載の方法である。

態様26は、前記小型BM-MSCが、単離の時点でSSEA-4を発現している(SSEA-4+)、態様23~25のいずれかに記載の方法である。

態様27は、前記第1のドナーが50歳以上である、態様23~26のいずれかに記載の方法で

10

20

30

40

50

ある。

態様28は、前記第1のドナーが65歳以上である、態様23～26のいずれかに記載の方法である。

態様29は、前記第1のドナーが70歳以上である、態様23～26のいずれかに記載の方法である。

態様30は、前記小型BM-MSCが、TCP上で、または第2のドナーから得られたBM-MSCの第2のセットに由来する細胞外マトリックス(ECM)上で培養される、態様23～29のいずれかに記載の方法である。

態様31は、前記第2のドナーが25歳以下である、態様30に記載の方法である。

態様32は、前記第1のドナーが、BM-MSCの量および/もしくは質が低下しており、かつ/または幹細胞療法を必要としている、態様23～30のいずれかに記載の方法である。10

態様33は、前記第1のドナーが、加齢に伴う変性疾患有しており、かつ/またはBM-MSCの量もしくは質を損なう疾患有もしくは状態を有しており、かつ/またはBM-MSCの量もしくは質を損なう治療を受けているもしくは今後受けことになっている、態様23～32のいずれかに記載の方法である。

態様34は、以下の工程を含む、物質の生物学的活性を試験する方法である：

(a) 態様12～16のいずれかに記載の細胞培養系を得る工程、20

(b) 該細胞培養系に該物質を添加する工程、ならびに

(c) 該細胞培養系および/または細胞のパラメータを測定して、該細胞培養系に該物質を添加することの影響を決定する工程。20

態様35は、前記物質が、疾患および/または状態を治療するための候補治療薬である、態様34に記載の方法である。

態様36は、前記疾患および/または状態が、BM-MSCの量もしくは質によって引き起こされるかまたはBM-MSCの量もしくは質を損なう、態様35に記載の方法である。

態様37は、前記物質が、細胞増殖因子または細胞分化因子である、態様34～36のいずれかに記載の方法である。

【0039】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかし、詳細な説明および特定の実施例は、本発明の好ましい態様を示すが、本発明の精神および範囲内での様々な変更および修正がこの詳細な説明から当業者に明らかになるので、例示のためにのみ与えられるものである。30

【図面の簡単な説明】

【0040】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の局面をさらに明らかにするために含まれる。本発明は、本明細書で提示される特定の態様の詳細な説明と組み合わせてこれらの図面の1つまたは複数を参照することによってよりよく理解され得る。

【0041】

【図1】高齢および若齢ドナー由来のMSCは固有の表現型を発現する。高齢ドナー(左の柱)と若齢ドナー(右の柱)由来のBM-MSCの間での、発生段階特異的胎児性抗原4(SSEA-4)、ヒト主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII HLAdr、および活性酸素種(ROS)について陽性の細胞の割合の相違を示す。40

【図2】大型MSCは老化マーカーを発現している傾向がより強い。サイズ(大型および小型)ならびにROSの存在(陽性)または欠如(陰性)によって選別されたBM-MSC細胞の散布図。大型MSCは老化マーカーを発現している傾向が有意により強い。UL-Quadは左上象限(Q1)を示し、UR-Quadは右上象限(Q2-2)を示し、LL-Quadは左下象限を示し、LR-Quadは右下象限を示す。

【図3】TCP上で培養中の細胞について細胞伸展面積を測定した。若齢者および高齢者のBM-MSCの伸展面積を、種々の伸展面積におけるBM-MSCの相対頻度としてここで報告する。伸展面積中央値は、若齢MSCと比較して高齢MSCの方が実質的に大きい。

【図4】若齢ECMは、若齢ドナー由来のMSCには有益であるが、高齢ドナーのMSCには利益50

をもたらさない。(A) 培養下で6日後の若齢者および高齢者のBM-MSCを光学顕微鏡によって撮像した。ECM上で培養した若齢BM-MSCは、高度に集密的に見える。高齢BM-MSCは、基質に関係無く培養の6日後にまばらなままである。(B) 細胞密度を測定するために、7日間の培養後に細胞を剥離し、計数した。(C) 計数後、コロニー形成単位アッセイのために細胞をクローン密度で再播種した。(D) 平均CFU頻度に総細胞数を乗じて、総CFU数を算出した。*：同じ基質上の若齢BM-MSCに対してP<0.05。クローバー：TCP上で培養した同じ細胞集団に対してP<0.05。(n=11)

【図5】若齢MSCと高齢MSCは、様々なパラメータにわたって区別され得る。(A) 培養下でコンフルエントに達する前の若齢および高齢BM-MSCを光学顕微鏡によって撮像した。高齢者のMSCは、はるかに大きく、より丸く、より平らな伸展パターンを有する。(B) 若齢および高齢BM-MSCのATP濃度を測定した。若齢MSCは、高齢MSCよりもおよそ2倍多いATPを有する。(C) 培養後、若齢および高齢BM-MSCをフローサイトメトリによって分析した。一部の高齢MSCは、高レベルのアネキシン5および細胞内ROSを発現している。高齢MSCによるSSEA-4発現レベルはより低いが、かなりの割合の高齢MSCがSSEA-4を発現している。各グラフにおいて、発現を定量化するために、試料(黒い線)を陰性対照(網掛け領域)と比較した。(D) 懸濁液中の細胞のサイズを、フローサイトメトリにおいて前方散乱パラメータを用いて測定した。細胞サイズの分布は細胞伸展面積の分布に酷似している。*同じ基質上の若齢MSCに対してP<0.05。

【図6】高齢MSCは、老化に関連する分泌表現型の発現を介して健常細胞の機能を阻害することができる。(A) 高齢MSC集団は、若齢MSC集団と比較して老化細胞の頻度が実質的に高い。(B) 高齢BM-MSCから収集した馴化培地は、対照と比較して若齢MSCの増殖を遅らせる因子を含む。(C) 高齢MSCは、老化関連分泌表現型を示すサイトカインプロフィールを分泌する。図は、若齢BM-MSCと比較して高齢BM-MSCにおいて測定された44のSASP関連サイトカインのサイトカイン発現をまとめたものである。*：若齢BM-MSCに対してP<0.05。
**：若齢BM-MSCに対してP<0.01。

【図7】若い亜集団を単離するための蛍光活性化細胞選別。(A) フローサイトメトリは、若齢BM-MSCは小型のSSEA-4(+)表現型を確実に発現しているが、高齢BM-MSCは、これらの側面からはるかにより不均一であることを明らかにしている。(B) FACS分析を使用することは、高齢ドナーから「若い」表現型亜集団を得ることを可能にする。ダブルレット除去後、細胞をサイズ(小型対大型)およびSSEA-4発現(陽性対陰性)に基づいて分離する。高齢MSCの約5~10%が「若い」(小型(+))表現型を発現している。

【図8】増殖培地(対照としての通常のGM)、若齢ドナーのBM-MSCからの分泌物で馴化された増殖培地(若齢CM)、および高齢ドナーのBM-MSCからの分泌物で馴化された増殖培地(高齢CM)で増殖させた若齢ドナー由来のBM-MSCについて、細胞増殖を測定した。高齢馴化培地は、若齢MSCの増殖を阻害する。若齢ドナー由来のBM-MSCの増殖率は、高齢CMで培養した場合、一定期間後の細胞数によって測定されたように阻害されたが、若齢CMでの培養ではほとんどまたは全く差を示さなかった。

【図9】より高齢のドナー由来の小型細胞の自己複製能力。高齢ドナー由来の未選別、小型および大型BM-MSCについて細胞増殖を測定した。小型細胞は、同じ期間に大型細胞よりも65%多い細胞が増殖した。小型細胞はまた、サイズによって選別しなかった細胞よりも迅速に増殖した。

【図10 A】小型(+)MSCはより若いMSCの特徴を示す。(A) TCP上で培養した若齢および高齢BM-MSCのCFU-F、CFU-ADおよびCFU-OBアッセイの培養プレートの写真。亜集団を単離した直後に、若齢および高齢BM-MSCの亜集団および未選別集団からの細胞を、CFUアッセイのためにクローン密度で培養した。小型BM-MSC(特に小型+BM-MSC)は、他の高齢BM-MSCよりも大きな分化能で、より大きく、より密度が高く、より多くのコロニーを形成することが観察された。

【図10 B】小型(+)MSCはより若いMSCの特徴を示す。(B) CFUアッセイを定量化し、頻度/細胞100個として報告した。線維芽細胞(CFU-F)、骨芽細胞(CFU-OB)、および脂肪細胞(CFU-AD)への分化のマーカーについて染色したCFUアッセイのいずれにおいても、

10

20

30

40

50

小型(+)と若齢BM-MSCの間で統計的に有意な差はない。

【図10C】小型(+)MSCはより若いMSCの特徴を示す。(C)ATPレベルは、大型亞集団と比較して、高齢ドナー由来の小型BM-MSCではより若いレベルに類似していた。

【図10D】小型(+)MSCはより若いMSCの特徴を示す。(D)小型MSCおよび小型(+)MSCは、特に、若齢細胞と同様の⁻Galレベルを発現し、小型亞集団には老化細胞が非常にわずかしか存在しないことを示唆した。

【図10E】小型(+)MSCはより若いMSCの特徴を示す。(E)サイトカインプロフィールを分析するために馴化培地を収集した。ヒートマップは、若齢、高齢および小型(+)MSCにおけるSASPサイトカインの発現を要約する。高齢ドナー由来の小型(+)MSCはSASPを発現しないことが示された。*:同じ基質上の若齢MSCに対してP<0.05。

【図11】幹細胞濃度を、高齢ドナー由来のBM-MSC細胞の未選別、大型-、大型+、小型-、および小型+集団について、コロニー形成単位(CFU-F)の数を測定することによって決定した。SSEA-4を発現する小型細胞は、他の細胞集団よりもはるかに高い幹細胞濃度を有する。

【図12】より高齢のドナー由来の小型、大型および未選別細胞の発現およびROS表現型。若さおよび老化に関連するいくつかのタンパク質を発現している細胞の割合ならびに検出可能なROSレベルを有する細胞の割合を、小さなサイズ(小型)、大きなサイズ(大型)、および未選別のサイズ(未選別)を有する高齢ドナー由来の細胞において決定した。小型の細胞は、大型細胞よりSSEA-4および血小板由来増殖因子PDGFを高発現し、HLA-DRおよび細胞内ROSの発現がより低かった。

【図13】培養前の細胞亞集団内により高いATP濃度を有する細胞。骨髓間質細胞を高齢者および若齢者(若齢)から採取した。高齢者由来の骨髓間質細胞を、分離しなかったか(Unf)、またはサイズ(L=大型、S=小型)およびSSEA-4の存在(+ = 存在する、- = 存在しない)に従って分離した。高齢者由来の骨髓間質細胞からの他の細胞群と比較して、小さなサイズおよびSSEA-4の存在は、増加したATP含量を有する細胞の数の増加と相關することが示された。

【図14】培養前の細胞亞集団のATP濃度。高齢者から骨髓間質細胞を採取した。高齢者由来の骨髓間質細胞を、分離しなかったか(Unf)、またはサイズ(L=大型、S=小型)およびSSEA-4の存在(+ = 存在する、- = 存在しない)に従って分離した。高齢者由来の骨髓間質細胞からの他の細胞群と比較して、小さなサイズおよびSSEA-4の存在はATP含量の増加と相關することが示された。

【図15】若齢者および高齢者のBM-MSC、ならびに高齢ドナー由来のBM-MSCの大型-、大型+、小型-、および小型+集団について測定したテロメラーゼレベルのグラフ。テロメラーゼレベルは、SSEA-4を発現する小型細胞ではわずかに高い。

【図16】大型細胞の馴化培地は若齢MSCの増殖を阻害する。小さなサイズの細胞からの分泌物(小型)、大きなサイズの細胞からの分泌物(大型)、サイズで分類していない細胞からの分泌物(未選別)で馴化された増殖培地、ならびに若齢ドナーのMSCからの分泌物で馴化された増殖培地(若齢CM)で増殖させた若齢ドナー由来のMSCについて細胞増殖を測定した。若齢ドナー由来のMSCの増殖速度は、大型および未選別馴化培地で培養した場合、一定期間後の細胞数によって測定されたように阻害されたが、小型および若齢馴化培地での培養はほとんどまたは全く差を示さなかった。

【図17】若齢ドナー由来のBM-MSCならびに高齢ドナー由来の小型、大型およびサイズ未選別のBM-MSC中の幹細胞のレスキュー。若齢ドナー由来のBM-MSCならびに高齢ドナー由来の小型、大型およびサイズ未選別のBM-MSC中の幹細胞の数を、組織培養プラスチック(TCP)および骨髄細胞外マトリックス(BM-ECM)上で培養の前後にコロニー形成単位の数を数えることによって決定した。より高齢のドナー由来の小型細胞を培養すると、高齢ドナー由来の大型および未選別細胞と比較して、レスキューされる幹細胞の増加を示した。さらに、BM-ECMでの培養は、TCPでの培養と比較して幹細胞の増加を示した。

【図18】若齢ドナーおよび高齢ドナー由来の未選別BM-MSC、高齢ドナー由来の大型細胞、ならびに高齢ドナー由来の小型細胞からのCFUを、ECMおよびTCP上で増殖させ、線維芽

10

20

30

40

50

細胞 (CFU-F)、骨芽細胞 (CFU-OB) および脂肪細胞 (CFU-AD) への分化のマーカーについて染色した。高齢ドナー由来の小型細胞のCFUは、若齢ドナー由来の細胞と同様の分化能を示した。

【図19A】ECMでの拡大培養は小型MSCの複製を増強する。(A) 小型MSCは、ECM上で迅速に増殖し、培養の6日後に高度に集密的になる。

【図19B】ECMでの拡大培養は小型MSCの複製を増強する。(B) TCP上または若齢ドナーからのBM-MSC由来のECM(若齢ECM)上での培養7日後の未分画(若齢、高齢)および分画高齢BM-MSCの細胞密度のグラフ。各集団の総細胞増殖を、培養7日後の細胞密度および等しい播種密度(細胞3,000個/cm²)として示す。TCPまたは若齢ECM上でBM-MSC亜集団を7日間培養した後、培養皿中の細胞の数を数えることによって細胞増殖を定量的に測定した。
試験した集団には、非分離BM-MSC(若齢および高齢)、SSEA-4の存在について陽性の大型細胞(大型+)またはSSEA-4陰性の大型細胞(大型-)およびSSEA-4の存在について陽性の小型細胞(小型+)またはSSEA-4陰性の小型細胞(小型-)が含まれた。小型+細胞は、TCPおよび若齢ECMの両方で細胞増殖の増加を示し、TCP上で増殖させた非分離細胞と比較した場合、細胞数の4倍の増加を示した。この結果は、若齢ECMがすべての亜集団の増殖速度を増加させることを示唆する。さらに、小さな細胞サイズも増殖速度を増加させるようである。*:同じ基質上の若齢BM-MSCに対してP<0.05。クローバー:TCP上で培養した同じ細胞集団に対してP<0.05。

【図19C】ECMでの拡大培養は小型MSCの複製を増強する。(C) TCPまたはECM上で拡大培養後、CFUアッセイのために細胞をクローン密度で播種した。小型(+)MSCは、3つのアッセイすべてにおいて、より大きく、より密度の高い、より多数のコロニーを生成している。

【図19D】ECMでの拡大培養は小型MSCの複製を増強する。(D-F) CFU頻度に総細胞数を乗じてCFUを定量化した。変化倍率をグラフで報告する。

【図19E】図19Dの説明を参照。

【図19F】図19Dの説明を参照。

【図20】間葉系幹細胞を、MSCの質および量がより低い対象から採取することができる。細胞を、サイズおよび発生段階特異的胎児性抗原4(SSEA-4)発現に基づいてフローサイトメトリによって選別する。SSEA-4陽性である小さな細胞(小型+)を、若齢ドナー由来の骨髄間質細胞によって作製したECM(若齢ECM)上にブレーティングする。次いで、若齢ECMを用いて細胞を拡大培養し、分割して、保存する。このアプローチを用いて、自己MSCベースの治療法および自己MSCバンキングのために、高齢ドナーなどのMSCの質および量が低いドナーから多数の「若い」MSCを得ることができる。

【図21A】SSEA-4陽性である小型細胞を得るための例示的ゲーティング方法。

【図21B】SSEA-4陽性である小型細胞を得るための例示的ゲーティング方法。

【図21C】SSEA-4陽性である小型細胞を得るための例示的ゲーティング方法。

【図22】TCP上および若齢ドナーからのBM-MSC由来のECM(若齢ECM)上で7日間培養した71歳の男性ドナーからのBM-MSC亜集団の光学顕微鏡写真。SSEA-4陽性の小型細胞は、両方の条件下で細胞増殖の増加を示した。さらに、若齢ECM上で培養した細胞は、TCP上で培養した細胞と比較して細胞増殖の改善を示した。

【図23】TCPまたは若齢ECM上でBM-MSC亜集団を7日間培養した後、培養皿中の細胞の数を数えることによって細胞増殖を定量的に測定した。試験した集団には、非分離BM-MSC(Unf)、SSEA-4の存在について陽性の大型細胞(L+)またはSSEA-4陰性の大型細胞(L-)およびSSEA-4の存在について陽性の小型細胞(S+)またはSSEA-4陰性の小型細胞(S-)が含まれた。S+細胞は、TCPおよび若齢ECMの両方で細胞増殖の増加を示し、TCP上で増殖させた非分離細胞と比較した場合、細胞数の8倍の増加を示した。この結果は、若齢ECMがすべての亜集団の増殖速度を増加させることを示唆する。さらに、小さな細胞サイズも増殖速度を増加させるようである(S-)。

【図24】TCP(2D)(左の柱)またはECM(右の柱)上で若齢および高齢BM-MSC(それぞれ若齢および高齢)ならびにBM-MSCの高齢亜集団(S+、L+、S-およびL-)を培養した後

10

20

30

40

50

、培養皿中の細胞の数を数えることによって細胞増殖を定量的に測定した。S+細胞は、TCPおよび若齢ECMの両方で細胞増殖の増加を示し、S-細胞も細胞増殖の改善を示した。

【図25】TCP（左の柱）またはECM（右の柱）上での若齢および高齢BM-MSC（それぞれ若齢および未選別）ならびにBM-MSCの高齢亜集団（小型（+）、小型（-）、大型（+）および大型（-））の培養後に、SSEA-4を発現する細胞の割合を測定した。小型（+）細胞はSSEA-4の高発現を示し、ほとんどの群においてECM上での培養はSSEA-4発現を増加させた。

【図26】TCP（左の柱）またはECM（右の柱）上での若齢および高齢BM-MSC（それぞれ若齢および未選別）ならびにBM-MSCの高齢亜集団（小型（+）、小型（-）、大型（+）および大型（-））の培養後に、ROS発現を測定した。小型（+）細胞は、他の群よりも低い細胞内ROSを示し、ECM上での培養は、ほとんどの群について平均細胞内ROSをさらに低下させる。

【図27】TCP（左の柱）またはECM（右の柱）上での若齢および高齢BM-MSC（それぞれYおよびU）ならびにBM-MSCの高齢亜集団、小型（+）、小型（-）、大型（+）および大型（-）（それぞれS+, S-, L+ およびL-）の培養後に、ATP発現を測定した。組織培養プラスチック（TCP）上で培養したS+細胞は、有意により高いATP濃度を有する。ECMは、ほとんどの群においてATP含量を増加させた。

【図28】TCP（左の柱）またはECM（右の柱）上での若齢および高齢BM-MSC（それぞれYおよびU）ならびにBM-MSCの高齢亜集団、小型（+）、小型（-）、大型（+）および大型（-）（それぞれS+, S-, L+ およびL-）の培養後に、テロメラーゼ活性を測定した。組織培養プラスチック（TCP）上で培養したS+細胞は、有意により高いテロメラーゼ活性を有する。

【図29】ECMおよび組織培養プラスチック（2D）上で培養した後、若齢ドナー由来のBM-MSCならびに高齢ドナー由来の小型、大型およびサイズ未選別のBM-MSCの5継代後のSSEA-4陽性細胞の数を測定した。より高齢のドナー由来の小型細胞を培養すると、高齢ドナー由来の大型および未選別細胞と比較して、5継代後のSSEA-4陽性細胞の増加を示した。さらに、ECMでの培養は、2Dでの培養と比較して幹細胞の増加を示した。

【図30A】ECM上で拡大培養した小型（+）MSCは若い表現型を維持する。（A）未分画（若齢、高齢）および分画高齢BM-MSCの-ガラクトシダーゼ発現のグラフ。TCPまたは若齢ドナーからのBM-MSC由来のECM（若齢ECM）上での培養後の若齢、高齢、小型+および小型-集団において-ガラクトシダーゼ発現を測定した。小型亜集団は、培養の間、低レベルの老化を維持する。高齢ドナーから単離した小型細胞は、培養の間、低発現を維持する。
*: 同じ基質上の若齢BM-MSCに対してP<0.05。

【図30B】ECM上で拡大培養した小型（+）MSCは若い表現型を維持する。（B）TCPおよび若齢ドナーからのBM-MSC由来のECM（若齢ECM）上での培養後の未分画（若齢、高齢）および分画高齢BM-MSCのATPレベルのグラフ。TCPまたは若齢ECM上での若齢および高齢BM-MSCならびにBM-MSCの高齢亜集団（S+、S-）の培養後に、ATP発現を測定した。組織培養プラスチック（TCP）上で培養したS+細胞は、有意により高いATP濃度を有する。若齢ECMは、ほとんどの群においてATP含量を増加させた。
*: 同じ基質上の若齢BM-MSCに対してP<0.05。クローバー：TCP上で培養した同じ細胞集団に対してP<0.05。

【図30C】ECM上で拡大培養した小型（+）MSCは若い表現型を維持する。（C）ECM上の細胞のSASPサイトカインプロフィールをヒートマップにて示す。Multiway ANOVAとそれに続くTukeyのHonest Significant Difference法は、若齢または小型（+）BM-MSCと比較して、高齢BM-MSCにおけるSASPサイトカイン発現の統計的に有意な増加を明らかにする。

【図31】未分画（若齢、高齢）および高齢分画BM-MSCにおけるSSEA-4、ROSおよびアネキシン5のフローサイトメトリ分析のヒストグラム。TCPまたは若齢ドナーからのBM-MSC由来のECM（若齢ECM）上での培養後のSSEA-4、ROSおよびアネキシン5の発現。TCPまたは若齢ECM上での若齢および高齢BM-MSCならびにBM-MSCの高齢亜集団（小型+、小型-）の培養後に、フローサイトメトリによって発現を測定した。若齢ECM上で培養した小型+MSCは、TCPに比べてSSEA-4の増加、ROSの減少、およびアネキシン5発現の減少を示す。試料の蛍光強度（黒い線）を陰性対照（網掛け領域）と比較することによって発現を定量化した。

【図32】4継代後の未分画（若齢、高齢）および分画高齢BM-MSCの総変化倍率のグラフ

10

20

30

40

50

。細胞を、細胞1500個/cm²の播種密度を用いてTCPまたは若齢ドナーからのBM-MSC由来のECM（若齢ECM）上での培養下で7日ごとに継代した。TCP上または若齢ECM上での若齢および高齢BM-MSCならびにBM-MSCの高齢亜集団（小型+、小型-）からのBM-MSCの4継代後のSSEA-4陽性細胞数は劇的に増加した。若齢ECM上での連続継代は、小型+細胞を若齢ECM上で拡大培養した場合、約6,000倍の変化をもたらした。

【発明を実施するための形態】

【0042】

例示的態様の説明

本出願の発明者らは、高齢者などの、骨髓由来の間葉系幹細胞（BM-MSC）の量および/または質が低下している人々の骨髓間質細胞から欠陥のより少ない間葉系幹細胞（MSC）の亜集団を単離および拡大培養することを可能にする新規アプローチを開発し、したがつて老化した幹細胞集団の再生能力を回復させるための方法を発見した。さらに、本発明者らは、ヒト幹細胞の量および/または質が低下したドナーからヒト幹細胞をレスキューするのに非常に有効であり得る、上記MSCの細胞培養系、技術および組成物を開示した。加えて、本発明者らは、これらのMSCを得る方法、ならびに加齢に伴う変性疾患および状態を有する可能性がある、幹細胞療法を必要とする対象にそれらを投与する方法を開発した。さらに、本発明者らは、骨髓間質細胞の再生能力を回復させるための新規アプローチを開発した。

【0043】

高齢ドナーと若齢ドナー由来のMSC細胞の表現型は異なるが、重複部分がある。図1および図4参照。本発明者らは、小型BM-MSCは初期幹細胞のマーカーを発現している傾向がより強く、大型細胞は老化マーカーを発現している傾向が小型細胞よりも強いことを本明細書で開示する。サイズおよびROSのレベルに基づいて選別された細胞については、図2参照。本明細書において、本発明者らは、若齢ドナー由来のBM-MSCのサイズと同様のサイズの、より高齢のドナーから単離されたBM-MSC中に認められる小さな細胞集団を述べる。図3参照。本発明者らは、より高齢のドナー由来の小さいサイズのMSCが、増殖、分化、タンパク質発現、およびROSプロフィールを含むいくつかの点で若齢細胞により類似し得ることを開示する。本発明者らはまた、より高齢の対象における細胞の環境条件が、より高齢の対象における細胞の増殖能力を抑制し得ることを開示する。図6B、図8および図16参照。

【0044】

本発明者らは、ドナーから単離されたMSC細胞の性能を改善するために、サイズが小さく、同時にSSEA-4も発現する細胞を単離することが望ましいことを本明細書で開示する。SSEA-4陽性である小型細胞を得るためのゲーティング方法の態様については、図21参照。この集団は、より高いATP含量を有する細胞の数の増加、細胞1個あたりのATP含量の増加、より高いテロメラーゼレベル、より低い-ガラクトシダーゼ発現、およびより高い幹細胞濃度を含むいくつかの特性において、若齢ドナー由来の細胞により酷似する。図10、図11、図13～図15参照。

【0045】

本発明者らは、若齢ドナーからのBM-MSC由来のECM（若齢ECM）上での細胞の培養が、SSEA-4陽性である小型細胞間の相違を際立たせることをさらに開示する。図17～図19および図22～図32参照。

【0046】

本発明者らはまた、SSEA-4陰性である小型細胞も、若齢ECMで培養した場合、有意に回復するようあることを開示する。この集団は臨床応用にも価値がある。

【0047】

一局面では、本明細書の開示は、成人自己幹細胞バンキングにおいて使用することができる。本明細書で開示される技術を用いて、年齢に関わりなく、幹細胞バンキングおよび将来の治療応用のために、誰からでも健常細胞を見出し、拡大培養し得る可能性がある。これらの技術は、老化した幹細胞集団の再生能力を回復させる、または堅固な培養系で使

10

20

30

40

50

用されている溶液の一部を形成するための戦略であり得る。幹細胞バンク、診療所および潜在的に幹細胞で治療できる状態を有する成人患者は、本発明を有用と認め得る群の非限定的な例である。非限定的な例として、本明細書で開示される発見を用いて、幹細胞バンクがより高い質のサービスを提供する、および/または幹細胞バンクがこれまで高齢すぎると見なしていた個人にサービスを提供することを可能にする幹細胞バンキングのために、顧客から最良の細胞だけを選択し得る。

【0048】

有利には、高齢者の細胞などの質および量が低いMSCから、より欠陥の少ないMSCの小さな亜集団を単離および拡大培養することを可能にする新規アプローチが本明細書で開示される。一態様では、より欠陥の少ないMSCは、発生段階特異的胎児性抗原4 (SSEA-4) を発現し、かつ/またはサイズが小さい。さらに、MSCの再生能力を回復させるための新規アプローチが本明細書で開示される。この方法は、加齢関連疾患を治療するための新しい枠組みを提供する。非限定的な例として、若返った自己BM-MSC (本発明者らの新しい培養系への事前曝露による) の連続投与は、古いBM-MSCを置き換えるだけでなく、老化した微小環境も徐々に逆転させ得る。最終的な目標は、加齢に伴う変性疾患、MSCもしくはその子孫細胞の量もしくは質を損なう疾患および/もしくは状態もしくは治療、または老化過程そのものの進行を遅らせるおよび/またはその変性作用を逆転させることである。

10

【0049】

加齢に伴う変性疾患およびMSCの量または質を損なう疾患および/または状態の非限定的な例は、変形性関節症および骨粗しょう症、骨量減少、アテローム性動脈硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、口内乾燥症、黄斑変性、偽関節骨折、化学療法もしくは放射線療法による骨髄切除、および/または肺炎を含むが、これらに限定されない。

20

【0050】

若齢細胞においても、より高い純度で幹細胞を単離することを目指すこれまでの研究の焦点は、細胞表面上のマーカーを用いることに集中してきたが、これらのマーカーはほとんどの場合信頼できないことが判明している。本明細書で開示される手順は、これまで存在することが認識されていなかった成人幹細胞の亜集団を単離することを可能にする。いくつかの態様では、この方法は、高齢対象からの集団などの機能低下した集団から健常細胞を単離することを含む。

30

【0051】

本明細書で述べる試験は、高齢者の老化した骨髄細胞からより欠陥の少ないBM-MSCの小さな亜集団を単離できることを示す。さらに、BM-MSCの増殖能力は、若齢ドナー (若齢ECM) からのBM-MSCによって作製されたECMの提供により、著明に改善される。本明細書で開示される実験データに基づき、分化能ならびに組織修復および再生の効力がより欠陥の少ないMSCの亜集団において増大し、若齢ECM上で細胞を培養することによってさらに増大することが期待される。

【0052】

細胞の大きさは、当業者に公知の手段によって決定することができる。非限定的な例には、フローサイトメトリによる細胞サイズの決定が含まれる。いくつかの場合では、MSCは、細胞が溶液中に懸濁された場合の直径 (「浮遊直径」) が、所与の時点でドナーから得られたMSCのセットの平均浮遊直径より小さい場合に、小さいと見なされ得る。

40

【0053】

本発明のいくつかの局面では、小型骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) を得る方法および/または小型BM-MSCを対象に投与する方法が開示され、この方法は、第1のドナーからBM-MSCの第1のセットを採取する工程、BM-MSCをサイズおよび任意でSSEA-4発現によって選別する工程、小型BM-MSCを単離する工程、小型BM-MSCを培養のためにプレーティングする工程、小型BM-MSCを拡大培養する工程、ならびに小型BM-MSCを対象に投与する工程を含む。いくつかの態様では、フローサイトメータを用いてBM-MSCを選別する。任意で、拡大培養した細胞を分割、および/または将来の使用のために細胞バンクにおいて保存することができる。いくつかの態様では、対象は第1のドナーと同じであり、これらの場合、小型BM-

50

MSCは自己のものである。他の態様では、小型BM-MSCは、懸濁液中で測定した場合、33ミクロン未満、または30ミクロン未満、または25ミクロン未満、または20ミクロン未満、または19ミクロン未満の直径中央値を有する。いくつかの態様では、小型BM-MSCは、単離の時点でSSEA-4を発現している (SSEA-4⁺)。様々な態様において、対象は、50歳以上、65歳以上、または70歳以上である。いくつかの態様では、細胞は、TCP上で、または第2のドナーから得られたBM-MSCの第2のセットに由来する細胞外マトリックス (ECM) 上で培養される。いくつかの態様では、第2のドナーは25歳以下である ('若齢' ECMを提供する)。他の態様では、対象は、BM-MSCの量および/もしくは質が低下しており、かつ/または幹細胞療法を必要としている。さらに他の態様では、対象は、加齢に伴う変性疾患有してあり、かつ/またはBM-MSCの量もしくは質を損なう疾患もしくは状態を有してあり、かつ/またはBM-MSCの量もしくは質を損なう治療を受けているもしくは今後受けのことになっている。

【0054】

本発明の他の局面では、第1のドナーから得られたBM-MSCの第1のセットから単離された小型BM-MSCを含む組成物および/または細胞培養系が開示され、ここで、第1のドナーは、BM-MSCの第1のセットが提供された時点で50、65または70歳以上であった。いくつかの態様では、小型MSCは、単離の時点でSSEA-4を発現していた (SSEA-4⁺)。いくつかの態様では、細胞培養系は、単離の時点でサイズが小さくなかったMSCを含まない。いくつかの態様では、細胞培養系は、単離の時点でSSEA-4を発現していないかったMSCを含まない。いくつかの態様では、単離された小型MSCは、懸濁液中で測定した場合、33ミクロン未満、または30ミクロン未満、または25ミクロン未満、または20ミクロン未満、または19ミクロン未満の直径中央値を有する。他の態様では、単離された小型MSCは、BM-MSCの第2のセットに由来するECM上で培養されたものである。さらに他の態様では、BM-MSCの第2のセットは、25歳以下の第2のドナーから得たものである ('若齢' ECM)。様々な態様において、第1のドナーは、MSCの量および/もしくは質が低下していた、かつ/または加齢に伴う変性疾患有していた、かつ/またはMSCの第1のセットが提供された時点でMSCの量もしくは質を損なう疾患もしくは状態を有していた。細胞培養系に関して、培養系は培養培地を含む。適切な培地は当業者に公知である。組成物に関して、組成物は担体をさらに含み得る。担体は水性ベースであり得る。組成物および細胞培養系は、例えば組成物を保存するまたは細胞の生存能力を維持するためのアジュvantを含むことができる。組成物および細胞培養系は、極低温および/または低温条件で、例えば細胞バンクにおいて保存することができ、これらの条件での保存を助ける成分、例えば凍結保護剤を含むことができる。

【0055】

いくつかの非限定的な局面では、本明細書で述べるBM-MSCに由来する細胞外マトリックス (ECM) は、米国特許第8,084,023号、米国特許第8,388,947号、米国特許第8,961,955号、および国際公開公報第2016/070057号に開示されている方法によって生成することができ、これらのすべてが参照により本明細書に組み込まれる。これらの方法は、BM-MSCを含み得る骨髄間質細胞をTCP上またはマイクロキャリアなどの担体上で培養してECMを生成し、続いてECMからの細胞を脱細胞化 (溶解および/または洗浄/除去) することによって3D ECMを生成することを含む。様々な態様において、ECMは、I型コラーゲン、III型コラーゲン、フィブロネクチン、デコリン、ビグリカン、パールカン、およびラミニンを含む。他の態様では、ECMは、I型コラーゲン、III型コラーゲン、フィブロネクチン、デコリン、ビグリカン、パールカンおよびラミニンを含み、シンデカン1、V型コラーゲンまたはVI型コラーゲンの少なくとも1つをさらに含む。他の態様では、ECMは、コラーゲン-1 (XII)、コラーゲン-3 (VI)、エミリン-1、セルピンHI、トロンボスポンジン-1、テネイシン前駆体 (TN) (ヒト)、トランスフォーミング増殖因子 誘導タンパク質およびビメンチンを含む。さらに他の態様では、ECMは、コラーゲン-1 (XII)、コラーゲン-3 (VI)、エミリン-1、セルピンHI、トロンボスpongジン-1、テネイシン前駆体 (TN) (ヒト)、トランスフォーミング増殖因子 誘導タンパク質、ビメンチン、I型コラーゲン、III型コラーゲン、フィブロネクチン、デコリン、ビグリカン、パールカン、およびラミニンを

10

20

30

40

50

含む。さらに他の態様では、ECMは、コラーゲン-1(XII)、コラーゲン-3(VI)、エミリン-1、セルピンHI、トロンボスポンジン-1、テネイシン前駆体(TN)(ヒト)、トランスクォーミング増殖因子 誘導タンパク質、ビメンチン、I型コラーゲン、III型コラーゲン、フィブロネクチン、デコリン、ビグリカン、パールカン、ラミニンを含み、シンデカント1、V型コラーゲンまたはVI型コラーゲンの少なくとも1つをさらに含む。

【0056】

インビオ組織の生理学的特徴をまだ保持するインビトロで生成された組織は、提案される治療または分子が組織の生理学的機能に及ぼす影響を観測するため特に有用なツールを提供する。したがって、物質の生物学的活性を試験する方法が開示されており、この方法は、上記の細胞培養系のいずれかを得る工程、物質を細胞培養系に添加する工程、および細胞培養系または細胞のパラメータを測定して、細胞培養系に物質を添加することの影響を決定する工程を含む。物質を細胞培養系に添加することは、物質を培地に添加することを含み得る。培養培地は、細胞の生理学的機能への培地の変化の影響を観測するために、特定の物質または物質の組合せを含む培地と交換することができる。細胞培養系のパラメータを測定することは、例えば細胞の増殖速度または形態学的特徴を観察することを含み得る。細胞を物質に曝露することまたは増殖条件を変化させることの生物学的影響を決定するために、任意の生物学的に関連するパラメータを測定および観測することができる。測定または観測されるパラメータの変化は、対応する対照が同じ変化を示さない場合、物質の存在または増殖条件の変化に帰することができる。いくつかの態様では、試験される物質は、例えば加齢関連疾患または老化過程そのものを含む疾患および/または状態を治療するための候補治療薬である。いくつかの態様では、状態は、老化した幹細胞集団の再生能力の低下、または投薬もしくは放射線療法の副作用である。いくつかの態様では、疾患および/または状態は、MSCの量もしくは質によって引き起こされるかまたはMSCの量もしくは質を損なう。いくつかの態様では、物質は細胞増殖因子または細胞分化因子である。

10

【実施例】

【0057】

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を実証するために含まれる。以下の実施例で開示される技術は、本発明の実施において良好に機能するように本発明者らによって発見された技術であり、したがって、その実施のための好ましい方法を構成すると見なし得ることが当業者に認識されるべきである。しかし、当業者は、本開示に照らして、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、開示される特定の態様に多くの変更を行うことができ、それでもやはり同様のまたは類似の結果が得られ得ることを認識すべきである。

30

【0058】

本明細書において、本発明者らは、開示される方法を使用することにより、高齢者の細胞などの質および量が低い骨髄間質細胞からより欠陥の少ないMSCの小さな亜集団を単離および拡大培養することが可能になることを開示する。さらに、本発明者らは、MSCの再生能力を回復するための新規方法を開示する。

【0059】

実施例1

40

S + BM-MSCの単離および培養

高齢対象(65歳以上)から骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)を採取した。サイズおよびSSEA-4発現に基づき、フローサイトメトリを用いて細胞を選別した。採取したBM-MSCの約5%~10%は、SSEA-4陽性の小型細胞(小型+)であった。図4および図7参照。本発明者らは、細胞選別後の小型+に富む画分が、他の亜集団と比較して、コロニー形成単位(CFU-F)アッセイによって測定されたように幹細胞が濃縮されていることを見出した。次いで、若齢ドナー(23歳以下)由来の骨髄間質細胞によって作製されたECM(若齢ECM)またはTCPのいずれかに亜集団をプレーティングした。若齢ドナー由来のBM-MSCを対照として使用した。次いで、若齢ECMまたはTCPを用いて細胞を培養し、自己複製、免疫表現型および分化能に基づいて比較した。培養後、細胞を分割し、保存した。図20は、上記で説明し

50

た一般的なアプローチの態様を例示する。

【0060】

簡単に述べると、BM-MSCを細胞 $3,000\text{個}/\text{cm}^2$ でTCPまたは若齢ECM上に播種し、7日間培養した。図4Aは、6日目の培養下の細胞の明視野顕微鏡検査を示す。若齢間葉系幹細胞(MSC)は、高齢細胞に比べてより多くの細胞数を有し、より紡錘状の形態を示すようである。高齢細胞では、TCP対ECMでの培養に関して細胞の総数または全体的な外観においても実質的な差がない。これは、培養7日後の細胞の密度によって実証される(図4B)。細胞数は、若齢細胞がTCPに比べてECM上で有意により多く増殖することを示し($p=0.015$)、高齢MSCの細胞密度で認められる小さな差は統計的に有意ではなかった($p=0.0781$)。これは、若齢ECMで高齢MSCの増殖が2倍に増加したという、マウスモデルにおける以前に報告された観察と一致しない。10

【0061】

7日間の培養後、細胞を、コロニー形成単位-線維芽細胞(CFU-F)、-脂肪細胞(-AD)および-骨芽細胞(-OB)アッセイのために剥離し、TCP上にクローン密度で再播種するか、またはフローサイトメトリによる免疫表現型分類のために使用した。図4Cに示されているように、高齢BM-MSCによるコロニー形成および分化は、ECM上での予備拡大培養によって実質的に影響されない。さらに、両方の群におけるコロニー形成は若齢BM-MSCよりも少ない。これとは対照的に、ECM上で予備拡大培養した若齢BM-MSCは、各々の条件でより大きく、より密度が高く、より多数のコロニーを形成した。増殖および分化アッセイは4群間の明確な差異を明らかにするが、MSCに関連する標準的な表面マーカーにおける差異は明らかではなかった。CD73、CD90およびCD105の発現は、いずれの培養条件およびどちらの年齢群についても同様であった(示していない)。これは、MSCマーカーの発現が、年齢および/または分化能に関わりなく高いままであるという示唆(Bonab, et al, 2006)と一致する。高齢BM-MSCの複製および骨形成は、若齢ECMでの培養によって確実には回復しなかった。20

【0062】

材料および方法:この実施例および以下の実施例で使用される材料および方法を以下で簡単に説明する。

【0063】

若齢ドナー由来の骨髄 - 若齢ドナー由来の骨髄をLONZA(Walkersville, MD, USA)から購入した。骨髄試料は、23歳未満の健常男性ドナーから得た。新鮮な未処理の試料を氷上にて一晩で輸送し、受領後、赤血球を溶解して、単核細胞を標準的な増殖培地(以下で述べる組成)中でTCP容器に播種した(5×10^5 細胞/ cm^2)。コロニーが形成し始めたとき、培地を取り出し、PBSを用いて非付着細胞を静かに洗い流して、新鮮な培地を添加した。これらの細胞を1回または2回継代のために拡大培養し(P1, P2)、実験に使用した。あるいは、将来の使用のために、細胞を、培地 + 10% (v/v)ジメチルスルホキシド(DMSO)を含有する20%血清中 2×10^6 細胞/mLで液体窒素中に保存した。これらの試験で使用した細胞は、5名の異なるドナーに由來した。30

【0064】

高齢ドナー由来の骨髄 - 膝/股関節全置換術を受けた同意患者から、高齢ドナー(65歳以上)由来の骨髄細胞を得た。手術部位からの海綿骨を取り出し、直ちに4 の単離緩衝液(ハンクス緩衝生理食塩水 + 5% (v/v)ウシ胎仔血清)に入れた。臨床試料を患者から取り出して3~4時間以内に研究室に戻し、4 で鋭利な鋏を用いて小片に切断し、その後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解したコラゲナーゼ2型(400単位/mL)を用いて37度30分間、攪拌しながら消化した。完了時に、消化物を4 で5分間遠心分離し($600 \times g$)、上清を除去した。次いで、ペレットを単離緩衝液中に再懸濁し、骨断片を取り出すために100ミクロンの細胞ストレーナで濾過した。細胞ストレーナ上に収集した骨断片を明るい白色になるまで洗浄した。細胞を含む残りの溶液を4 で5分間遠心分離し($600 \times g$)、細胞ペレットを増殖培地に再懸濁した。増殖培地中でTCP容器に細胞を播種し(5×10^5 細胞/ cm^2)、コロニーが形成し始めるまで標準的な条件下で培養した。ひとたびコロニーが4050

出現すれば、完全培地を取り出し、PBSを用いて非付着細胞を静かに洗い流して、新鮮な培地を添加した。これらの細胞を拡大培養し（P1、P2）、実験において直ちに使用するか、または将来の使用のために液体窒素中に入れた。13名のドナー由来の細胞を試験したが、11名の細胞だけを使用した。表現型組成のために4つの亜集団すべてに十分な数の細胞を選別することができなかつたので、2名のドナーは利用しなかつた。

【0065】

細胞外マトリックス - 骨髓由来細胞外マトリックスは、StemBioSys, Inc. (San Antonio, TX, USA) によって提供された。

【0066】

細胞培養 - 骨髓MSCを37°C、5%CO₂の加湿インキュベータで培養した。特に指示がない限り、細胞は、-Minimal Essential Medium (MEM)、15%の予め選択したFBS (Atlanta Biologics, Flowery Branch, GA, USA)、2mM L-グルタミン (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)、および1% (v/v) ストレプトマイシン/ペニシリン (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を含有する「標準増殖培地」で培養した。培養の間3日ごとに培地の半分の交換を実施した。10

【0067】

コロニー形成単位アッセイ - CFU-線維芽細胞 (CFU-F) アッセイのために、細胞を、標準増殖培地中で細胞10および30個/cm²にて6ウェルプレートに播種した。高密度のコロニーが形成されたとき（典型的には、培養10～14日目）、培地を除去し、ウェルをPBSで1回洗浄して、細胞を室温で固定した（100%メタノールで10分間）。固定後、細胞をPBSで1回洗浄し、室温で10分間乾燥させた。次いで、コロニーをメチルバイオレット (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) で10分間染色した。再使用のために染色溶液を収集し、残留染色剤を、バックグラウンドが透明に見えるまで脱イオン水で洗い流した。20

【0068】

CFU-脂肪細胞 (AD) および骨芽細胞 (OB) アッセイのために、細胞を細胞20および60個/cm²にて6ウェルプレートに播種した。CFU-ADおよびCFU-OB培養を、CFU-Fアッセイのための培養と同時に開始した。CFU-Fプレートを染色する時点で、CFU-ADおよびCFU-OBプレートをそれぞれの誘導培地に切り替えた。CFU-AD培養のために、培地に5mM 3-イソブチル-L-メチルキサンチン (IBMX)、1mMインドメタシン、1μMデキサメタゾン、および10 μg/mL インスリンを補充した。CFU-OB培養のために、培地に100nMデキサメタゾン、10mM L-グリセロリン酸、および50 μM L-アスコルビン酸2-リン酸を補充した。ADおよびOB誘導のためのすべての培地添加物は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。30

【0069】

コロニーが、光学顕微鏡で観察される、脂質またはミネラルをそれぞれ含むことが視覚的に認められた場合にCFU-ADおよびCFU-OBプレートを染色した。これは、典型的には、脂質生成の場合は10～14日後、骨形成の場合は17～21日後であった。10%ホルマリンで細胞を室温で1時間固定し、続いて脱イオン水で静かに洗浄した後、CFU-AD培養物を新鮮調製したオイルレッドOで室温にて1時間染色した。染色後、溶液を除去し、バックグラウンドが透明になるまでウェルを脱イオン水で静かに洗浄した。CFU-OBについては、10%ホルマリンを用いて細胞を室温で1時間固定し、脱イオン水で洗浄した後、紫外線下に室温で一晩、1%硝酸銀 (AgNO₃) で染色した。翌日、AgNO₃溶液を除去し、5%チオ硫酸ナトリウムで2分間処理して過剰の銀を除去した。その後、過剰の染色剤の除去を防ぐためにウェルを脱イオン水で洗浄した。40

【0070】

蛍光活性化細胞選別 - フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 結合抗SSEA-4およびIgG3アイソタイプ対照抗体は、BD Biosciences (San Jose, CA, USA) から購入した。小型および大型BM-MSC集団を選択するためのゲーティング方法を、様々な若齢および高齢ドナー由来の細胞を使用して数週間にわたって開発し、若齢ドナー細胞を小型細胞の対照として使用した。電圧およびサイズのゲーティングは、前方散乱 (FSC) に基づき、すべての細胞選別について一定に保持した。FITCゲーティングをアイソタイプ対照に基づいて50

毎回再評価した。ダブレット識別を用いて細胞ダブルートを除去した。

【0071】

10 µg/mLの抗体および4で1時間のインキュベーションを用いて、単一細胞懸濁液 (10×10^6 細胞/mL) で染色を実施した。細胞を単離緩衝液で2回洗浄し、BD Biosciences (San Jose, CA, USA) のFACSAria Cell Sorterを用いた滅菌選別に供するまで氷上に置いた(3時間未満)。選別は、FACSDivaソフトウェアシステムを使用して実行した。

【0072】

フローサイトメトリ - マウス抗ヒト非結合抗体は、BD Biosciences (San Jose, CA, USA) から購入した。単一細胞懸濁液 (100 µL中 1×10^5 個) を一次抗体 (10 µg/mL) と共に4で少なくとも1時間インキュベートした。染色した細胞を染色緩衝液 (PBS + 5% v/v FB S + 0.01% m/v アジ化ナトリウム) で2回洗浄した後、FITC結合ヤギ抗マウスIgGと共に4で30分間インキュベートした。次いで、細胞を染色緩衝液で2回洗浄し、直ちに分析するか、または新鮮調製した1% パラホルムアルデヒドで固定して72時間以内に分析した。分析は、BD Bioscience LSRIIフローサイトメータを用いて実施した。FACSDivaソフトウェアシステムを用いて試料を測定し、生成されたデータを後ほど解析して、FlowJoソフトウェアパッケージを用いて図面を作成した。各試料について10,000事象を解析し、主要転帰はアイソタイプ対照と比較した陽性細胞のパーセントであった。前述したプロトコルを、アネキシン5について検定する場合は膜の透過性を上げる抗体と共にジメチルスルホキシドを含むように変更した。

【0073】

直径中央値 - 培養後、細胞を剥離し、懸濁液に入れた。懸濁した細胞をスライドガラスの上、カバーガラスの下に広げた。明視野顕微鏡の画像を撮影し、Olympus CellSensソフトウェアを使用して解析し、各条件において少なくとも100個の細胞の拡散形態を解析した。高齢細胞の場合、n = 150; 若齢細胞の場合、n = 276。MATLABテクニカルコンピューティングソフトウェアを用いて記述統計を計算した。

【0074】

細胞内活性酸素種 - CellROX緑色フローサイトメトリアッセイキット (ThermoFisher Scientific, Bedford, MA, USA) を用いて細胞内活性酸素種 (ROS) を分析した。3本のチューブを調製し、各々が約100 µL中に 5×10^5 細胞/mLを含んだ。陰性対照チューブに、1mM N-アセチルシステイン (NAC) を添加して試料の抗酸化能を高めた。陽性対照については、tert-ブチルヒドロペルオキシド (TBHP; 200 µM) を使用して酸化ストレスを誘導した。3本のチューブすべてを37で1時間インキュベートした後、CellROX ROS検出試薬で染色した。染色した試料を、BD Bioscience LSRIIフローサイトメータを用いて直ちに(1時間以内に) 分析した。

【0075】

アデノシン三リン酸 - アデノシン三リン酸 (ATP) 測定キット (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を用いてATPレベルを測定した。試験培養物由来の25,000個の細胞を三重に測定し、キットと共に供給されるATP標準品を用いて作成したATP標準曲線と比較した。ルミネセンスはホタルルシフェラーゼの活性によるものであり、標準曲線を用いて各試料の平均ATP濃度を決定した。

【0076】

-ガラクトシダーゼ - 96ウェルの細胞老化アッセイキット (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) を用いて -ガラクトシダーゼ (-Gal) を測定した。

【0077】

96ウェルプレート中の細胞を細胞溶解緩衝液と共に4で5分間インキュベートした。全細胞溶解物を微量遠心分離管に移し、 $2000 \times g$ で10分間遠心分離した。細胞溶解物の上清を分析のために回収した。試料50 µLを、新鮮調製したアッセイ緩衝液 (キットと共に供給される) 50 µLと共に、光から保護して37で3時間インキュベートした。3時間後、反応液50 µLを96ウェルプレート中の停止液200 µLに添加した。蛍光を360nm励起/465nm発光で直ちに測定した。

10

20

30

40

50

【0078】

テロメラーゼ活性 - TelotAGGGテロメラーゼPCR ELISA^{PLUS}キット (Roche Diagnostics , Indianapolis, IN, USA) を用いてテロメラーゼ活性を定量化した。アッセイキットは2段階工程である。第1段階では、テロメラーゼがテロメア反復配列をビオチン標識プライマーの末端に付加し、次いでプライマーおよび伸長産物がPCRによって増幅される。次の段階では、PCR産物をテロメア反復配列に特異的なジゴキシゲニン (DIG) 標識検出プローブにハイブリダイズさせ、次いでビオチン標識を介してマイクロプレートに固定化する。その後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) に結合した抗体でそれらを検出する。試料の吸光度値およびすべての実験対照を使用して、所与の実験内の種々の試料について相対テロメラーゼ活性を計算することができる。

10

【0079】

細胞形態 - 細胞増殖の様々な段階でOlympus IX73倒立顕微鏡 (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan) を用いて画像を撮影した。細胞形態の測定のために、細胞形態が細胞-細胞接触によって実質的に影響されないようにコンフルエントになる前に画像を撮影した。画像は、OlympusのCellSens Dimensionソフトウェアを用いて分析した。細胞は、フリーハンドポリゴンツールを使用して輪郭を描き、円形度および面積の測定値は自動的に計算された。

【0080】

統計解析 - 細胞数、CFU、-ガラクトシダーゼ、ATP、およびテロメラーゼアッセイを、独立した実験ごとに三重に実施した。フローサイトメトリは、それぞれの独立した実験において各群の各マーカーについて1回実施した。異なる組織ドナー由来の細胞を用いて、すべての種類の実験を少なくとも3回反復した。

20

【0081】

各アッセイの複製データをプールし（すなわち増殖、CFUアッセイ、テロメラーゼ活性、ATPレベル、および遺伝子発現）、その後分析した。平均、標準偏差、および信頼区間を計算し、必要に応じてANOVA分析および事後検定を用いて群を比較した。

【0082】

分化能を、CFU-Fに対するCFU-ADおよびCFU-OBの比率として計算し、修正Wald法を用いて信頼区間を決定した。

【0083】

30

フローサイトメトリデータは、試料サイズが非常に大きいため、集団全体における様々なマーカーを発現する細胞の数を表すと仮定した。群内の種々のドナーからの結果を平均し、増殖試験について述べたようにANOVAを用いて比較した。フィッシャーの正確確率検定を用いて、大型細胞は小型細胞よりも老化のマーカーを発現している傾向が強いかどうかを判定した。

【0084】

実施例2

SSEA-4の形態学的相違および発現の識別

若齢および高齢BM-MSCの特性を比較し、高齢MSC集団のレスキューを妨げる上での制限要因となり得る特性を同定するため、および若齢MSCの特性を他のMSC集団の機能を測定するための基準として使用し得るように、若齢MSCと高齢MSCとの相違を最も確実に明らかにするアッセイを同定するために対比させた。

40

【0085】

高齢MSCの増殖速度は、若齢MSCに比べてはるかに遅い。図4参照。さらに、高齢BM-MSCの形態学的表現型は、若齢MSCに比べてより大きく、より紡錘状でないようである。図4参照。しかし、形態学的相違は、単に、より若齢の細胞の集密度に起因する細胞-細胞接触の結果である可能性がある。若齢BM-MSCがコンフルエントに達する前にこれらの形態学的相違が存在するかどうかを判定するために、細胞-細胞接触の影響が最小限である培養3日後に画像を撮影した。若齢BM-MSCと高齢BM-MSCの形態の大きな相違は、細胞がコンフルエントに達する前の明視野顕微鏡検査によって定性的に認められた。図5A参照。この相違は

50

、細胞伸展面積の比率を、等しい外周（円形度）を有する円の比率と比較することによって定量化することができる。高齢BM-MSCは、若齢MSCに比べて25%超、より円形である（より紡錘状でない）（ $p < 0.00001$ ）。

【0086】

培養の間の細胞形状の相違を測定した後、若齢および高齢BM-MSCの代謝活性の相違を調べた。高齢BM-MSCは、若齢BM-MSCより約50%低いレベルのATPを含むことが示された（ $p = 0.023$ ）（図5B）。これは驚くにはあたらず、代謝活性が年齢と共に低下することは公知である。さらに、多くの細胞過程がATPの形でエネルギーを必要とするので、この低下は、MSCで観察される加齢に関連した機能損失に重要である可能性がある。

【0087】

MSCが不均一な集団であることは公知であり、造血細胞での最近の数多くの試験は、細胞の集団レベルでの老化を、すべての細胞の個別の老化ではなくクローン組成のシフトと記述している。若齢BM-MSCと比較して高齢BM-MSC集団の表現型組成を理解するために、広範な免疫表現型分類を実施した。BM-MSCの従来の免疫表現型マーカーに相違は見られなかつたが、マーカー発現のいくつかの相違は、フローサイトメトリによる幹細胞性および老化と関連した（図5C）。代謝活性の低下にもかかわらず、有意な数の高齢BM-MSCは、非常に高い細胞内活性酸素種（ROS）含量を有する。これは、これらの細胞が、細胞内ROSを除去する能力が実質的に低下していることを示唆する。このシナリオに因果関係が存在するかどうかは不明であるが、同様の割合の細胞が、早期アポトーシスマーカーであるアネキシン5も発現する。これは、培養下の高齢MSCのかなりの部分がアポトーシスを受ける準備をしていることを示唆する。理論に拘束されるものではないが、これは、高齢BM-MSCの比較的大きな部分がSSEA-4を発現することについての1つの可能な説明である。

10

【0088】

SSEA-4は分化能を有するMSCのマーカーとして使用されており、幹細胞性の信頼できるマーカーであり得る（Sun, et al., 2011; Gang, et al., 2007; Kawanabe, et al., 2014; Pipino, et al., 2015）。しかし、これが当てはまる場合、SSEA-4（+）MSCの割合が比較的少ない細胞集団では、SSEA-4表現型が他の細胞よりも迅速に増殖することによって優性表現型になると予想され得る。実際には、そうではない。高齢MSC集団では、SSEA-4発現は連續継代の間に減少する傾向があり、最終的に培養は失敗する。理論に拘束されるものではないが、高齢ドナーにおけるMSCの大きな割合がアポトーシスを受けているとすれば、迅速に分裂する細胞は迅速にアポトーシスも受けており、それらが培養物の優性表現型になるのを妨げるとも考えられる。

20

【0089】

第2の可能な説明は、高齢BM-MSCの形態によって示唆される。高齢BM-MSCは、形状の変化に加えて、はるかにより大きい伸展面積中央値（ $14,326 \mu\text{m}^2$ 対 $2,123 \mu\text{m}^2$ ）および直径中央値（ $33.10 \mu\text{m}$ 対 $18.20 \mu\text{m}$ -表1）を有する。高齢BM-MSCおよび若齢BM-MSCの細胞伸展面積および細胞サイズの分布（フローサイトメトリにおける前方散乱によって測定）をそれぞれ図3および図5Dに示す。サイズ中央値は、若齢MSCと比較して高齢MSCでは実質的により大きいようであるが、集団間で有意な重複部分があり、それらは同様の範囲を占めるようである。高齢ドナー由来の小型のBM-MSCは、若齢ドナーで見られるBM-MSCのサイズと同様のサイズである。高齢ドナー由来のBM-MSCに関してここで観察された細胞サイズおよび形状の変化は、老化表現型を獲得する細胞の特徴である（Zhou, et al., 2008; Wagner, et al., 2008）。過去10年の間に、高齢化における老化の役割の理解に大きな進歩がなされた。この多くは、多面的な機構を同定し、老化に関連する分泌表現型と呼ばれるものを介して老化細胞がパラクリン作用によって隣接細胞に害を及ぼし得ることを示すことに集中してきた（Campisi, et al., 2011; Freund, et al., 2010; Coppe, et al., 2008）。理論に拘束されるものではないが、これらのより大きく、より平らで、より円形の細胞が老化した場合、分泌因子を介して「若い」隣接細胞を阻害している可能性がある。

30

【0090】

40

【表1】

| | 直径中央値 (μm) | 標準偏差 |
|----|------------|------|
| 若齢 | 18.20 | 1.50 |
| 高齢 | 33.10 | 4.90 |

【0091】

実施例3

高齢BM-MSC細胞からの分泌因子の増加の同定および細胞増殖へのその影響

高齢MSC集団が、老化細胞によって分泌される可溶性因子によって阻害される「若い」MSCの亜集団を含むことが妥当であるかどうかを試験するために、高齢集団および若齢集団における老化BM-MSCの集団を測定した。 10

【0092】

若齢および高齢集団における老化細胞の相対数を比較するために、同数の若齢および高齢BM-MSCを収集し、 - ガラクトシダーゼ発現を測定した。 - ガラクトシダーゼ発現は老化のマーカーである。高齢ドナー由来のBM-MSCは、若齢BM-MSCよりも老化細胞の頻度が高い。（図6A）（ $p = 0.017$ ）。

【0093】

次に、若齢BM-MSCを若齢または高齢MSCから収集した馴化培地で処理し、高齢BM-MSCからの分泌因子が「若い」MSCの機能を阻害する能力を有するかどうかを判定した。高齢MSCからの馴化培地（高齢CM）は、対照または若齢BM-MSCからの馴化培地と比較して、若齢BM-MSCの増殖を有意に阻害する（図6B）（それぞれ $p = 0.004$ または $p = 0.007$ ）。図8も参照のこと。理論に拘束されるものではないが、このデータは、高齢MSCが隣接する老化細胞によって阻害される「若い」亜集団を含み得る可能性を許容するのに十分である。 20

【0094】

この作用の原因となり得る特定の因子を同定するために、サイトカインマイクロアレイを用いて高齢および若齢ドナーからの馴化培地を分析し、80のサイトカインの相対濃度を調べた。試験したサイトカインのうちの44が、老化関連分泌表現型の一部として同定されている。予想されたように、高齢MSCからの馴化培地は、老化関連分泌表現型のほとんどの成分の濃度がより高かった。高齢BM-MSC集団では、44のうち36（81.8%）についてサイトカインが上昇していた。これら36例中19例における差は統計的に有意であった。このデータを図6Cに要約する。 30

【0095】

総合すると、これらのデータは、高齢MSCがより高濃度の老化細胞を含むこと、これらの細胞は、以前の試験で他の細胞型について記述され、Freund, et al., 2010に要約されたものと同様の老化関連分泌表現型を発現すること、およびこれらの分泌因子は「若い」MSCの増殖を阻害する能力を有することを示唆する。

【0096】

実施例4

若齢MSCと類似の高齢MSC細胞亜集団の単離

高齢MSCは健常MSCの増殖を抑制すると思われ、一部の高齢MSCは若齢MSCの指標である表現型マーカーを示すので、若齢MSCに表現型的に類似する高齢MSCの亜集団は、年齢と無関係に、保存された機能を有し得ると考えられる。フローサイトメトリを用いてSSEA-4発現対若齢および高齢BM-MSCの細胞サイズをプロットすると、若齢BM-MSCは、これらの側面からは比較的均一であり、大多数の細胞は小型のSSEA-4（+）表現型（小型（+））を発現することが観察された。図7A参照。これに対し、高齢BM-MSCははるかにより不均一であり、サイズおよびSSEA-4発現に基づいて4つの集団に容易に分けることができる（図7A）。高齢BM-MSCを4つの集団に選別し、高齢BM-MSCの小型（+）亜集団が若い機能を有するかどうか、およびこれらのマーカーの両方が細胞機能と相關するかどうかを判定した。図7Bの選別方法参照。ダブルエット除去後、FSCで測定したSSEA-4（陽性対陰性）および細胞サイズ（小型対大型）の発現に基づいて細胞を4つの集団に分けた。より高い純度を有する集団を 40

得るために、中間のFSCまたはFITC強度を有する細胞を廃棄した。選別により、65歳以上の個人由来のMSCの $8.24 \pm 3.63\%$ だけが、これらの側面から測定した場合に若い表現型を有すると決定された。

【 0 0 9 7 】

実施例5

高齢ドナー由来のBM-MSCの亜集団の特徴付け

得られた集団を、インビトロアッセイを用いて若齢BM-MSCならびに高齢ドナー由来の未分画BM-MSCと比較した。検査により、若齢細胞は各条件において最も多くのコロニーを有するようであるが、小型(+)集団は、高齢ドナーから単離されたBM-MSCと比較して実質的に増加している（図10A）。これは、手作業でコロニーを数えることによって実証される（図10Bおよび図11）。実際に、小型(+)BM-MSCと若齢BM-MSCとの間にコロニー形成において統計的に有意な差はなかった。これは、若齢細胞と比較して、小型(+)高齢亜集団のMSCの数および効力における差は、あるとしても極めてわずかである可能性が高いことを示唆する。より高齢のドナー由来の未選別、小型および大型のBM-MSCについても、細胞数によって細胞増殖を測定した。小型細胞は、同じ期間に大型細胞よりも65%多い細胞を増殖させた。小型細胞はまた、サイズによって選別しなかった細胞よりも迅速に増殖した（図9）。

10

【 0 0 9 8 】

若さおよび老化に関連するいくつかのタンパク質を発現する細胞の割合および検出可能なROSレベルを有する細胞の割合を、小型、大型およびサイズ未選別の高齢ドナー由来の細胞において測定した。小型の細胞は、大型細胞よりもSSEA-4および血小板由来増殖因子PDGFを高発現し、HLAdrおよび細胞内ROSの発現がより低かった。図12参照。これは、小型細胞が、より高いSSEA-4、より低いHLAdr、およびより低い細胞内活性酸素種（ROS）などの、若齢細胞により類似した表現型を有することを実証する。

20

【 0 0 9 9 】

高齢ドナー由来のBM-MSC細胞の4つの亜集団について、ATP濃度、高レベルのATPを有する細胞数、細胞のATP含量、テロメラーゼレベル、および β -ガラクトシダーゼ発現を測定した。小型BM-MSCは、SSEA-4発現とは無関係に、若齢BM-MSCと同等のATP濃度を示す。一方、大型BM-MSCは、SSEA-4発現にかかわらず、若齢BM-MSCのおよそ半分のATPレベルを有する（図10C、図14および図30B）。小さなサイズおよびSSEA-4の存在は、より高いATP含量を有する細胞の数の増加、細胞あたりのより高いATP含量、高齢者からの骨髄間質細胞由来の他の細胞群と比較してわずかに高いテロメラーゼレベルと相關する（図13～15）。適切には、大型BM-MSCは小型BM-MSCまたは若齢BM-MSCよりも有意に多くの老化細胞を有し、大型(-)細胞は最も高い β -ガラクトシダーゼ(β -Gal)発現を示し、 β -Galは老化のマーカーであって、発現を、蛍光測定法を用いて相対蛍光として報告する（図10D）。破線は、若齢BM-MSCの平均 β -ガラクトシダーゼ発現を表す。小型BM-MSCは、若齢BM-MSCと統計的に同等であった。理論に拘束されるものではないが、小型(+)細胞が低頻度の老化細胞を有するという証拠は、それらが、通常の条件では老化した隣接細胞によって抑制される高齢MSCの亜集団であり得るという学説に合致する。

30

【 0 1 0 0 】

40

小型(+)細胞が高齢MSCよりも若齢MSCに類似しているかどうかを判定するために、老化に関連する分泌表現型を特徴付けるサイトカインの発現を試験した。図10Eのヒートマップは、SASPの一部であることが公知の試験した44のサイトカインの発現を示す。Multiway ANOVAとそれに続くTukeyのHonest Significant Difference法は、高齢BM-MSCが、若齢または小型(+)BM-MSCよりも高いSASPサイトカインの発現を有することを明らかにする（それぞれ $p < 0.0001$ または $p = 0.039$ ）。若齢BM-MSCと小型(+)BM-MSCの間でSASP因子の発現に有意差はなかった（ $p = 0.068$ ）。

【 0 1 0 1 】

小さな細胞サイズ（小型）または大きな細胞サイズ（大型）を有する高齢ドナーのBM-MSCの亜集団からの分泌物、サイズで選別していない高齢ドナーのBM-MSCからの分泌物（未

50

選別)、および若齢ドナーのBM-MSCからの分泌物(若齢CM)で馴化された増殖培地で増殖させた若齢ドナー由来のBM-MSCについても細胞増殖を測定した。図16参照。若齢ドナー由来のBM-MSCの増殖速度は、大型および未選別馴化培地で培養した場合には、細胞数によって測定されたように阻害されたが、小型および若齢馴化培地での培養は、ほとんどまたは全く差を示さなかった。これは、高齢ドナーにおいてMSC増殖を阻害する環境要因が、大型MSCによって導入される有害な因子に少なくとも部分的に依存する可能性があることを示唆する。

【0102】

実施例6

TCPおよびBM-ECM上での幹細胞の培養

10

機能低下した高齢MSC集団からMSCの画分を単離することが可能であることを実証する結果は有望である。しかし、いくつかの細胞ベースの治療法は、高い質の細胞を大量に必要とする。非常に高い質の細胞の画分を得ることができたとしても、それらはもとの集団の小さなサブセットであり得、臨床的に適切であるための十分な数の細胞を得ることは困難である。これを克服するために、細胞を拡大培養し得る。しかし、このアプローチはそれ自体の落とし穴を伴う。伝統的に、MSCがTCP上で拡大培養されるにつれて自発的分化を受ける可能性があり、最初に単離された細胞とは大きく異なる表現型を有する集団をもたらし得るため、質と量は競合する要求である。この問題に対処するために、細胞が幹細胞性を維持しながら増殖することを可能にすることが示された亜集団を(Sun, et al., 2011)、若齢ECM上で拡大培養した。若齢ドナー由来のBM-MSCならびに高齢ドナー由来の小型、大型およびサイズ未選別のBM-MSC中の幹細胞の数を、組織培養プラスチック(TCP)および骨髄細胞外マトリックス(BM-ECM)上の培養の前後にコロニー形成単位(CFU)の数を数えることによって決定した。より高齢のドナー由来の小型細胞を培養すると、高齢ドナー由来の大型および未選別細胞と比較して、レスキューされる幹細胞の増加を示した。さらに、BM-ECMでの培養は、TCP上の培養と比較して幹細胞の増加を示した(図17)。

20

【0103】

若齢ドナー由来のBM-MSCならびに高齢ドナー由来の小型、大型およびサイズ未選別のBM-MSCのCFUを、線維芽細胞(CFU-F)、骨芽細胞(CFU-OB)、および脂肪細胞(CFU-AD)への分化のマーカーを染色することによって示されるそれらの分化能も測定するために試験した。高齢ドナー由来の小型細胞のCFUは、若齢ドナー由来の細胞と同様の分化能を示した(図18)。

30

【0104】

TCPおよびBM-ECM上で培養した4つの亜集団に分けた高齢ドナー由来のBM-MSCについて、細胞増殖、コロニー形成能および分化能を測定した。7日間培養した細胞では、TCPおよびBM-ECM上で培養した小型(+)BM-MSCは、未選別の高齢MSCと比較して著明な回復を示す(図19Aおよび図22)。それらは若齢ドナー由来の細胞と形態学的に類似すると思われ、培養7日後に高度に集密的である。興味深いことに、小型(-)BM-MSCはまた、高齢BM-MSC集団よりも実質的に健常であると思われ、比較的迅速に増殖することができる。若齢ECM上で培養した細胞は、TCP上で培養した細胞と比較して細胞増殖の改善を示した。小型細胞はまた、大型BM-MSCおよび非分離BM-MSCと比較して、増殖速度の増加も示した。小型+細胞は、TCPおよび若齢ECMの両方で細胞増殖の増加を示した。小型細胞については、細胞をBM-ECM上で拡大培養した場合に有意な改善があった(図19B、図23、および図24)。BM-ECM上で培養した小型(+)細胞は、実際にTCPまたはBM-ECM上で拡大培養した若齢細胞よりも迅速に増殖した(図19Bおよび図24)。この結果は、若齢ECMがすべての亜集団および若齢ドナー由来の細胞の増殖速度を増加させることを示唆する。さらに、小さな細胞サイズも増殖速度を増加させるようである。

40

【0105】

培養7日後、CFU-F、CFU-ADおよびCFU-OBアッセイのために細胞を剥離し、クローン密度で再播種した(図19C)。CFUアッセイの結果は、観察された増殖と一致した。ECM上で拡

50

大培養した小型細胞は、より大きく、より密度が高く、より多数のコロニーを形成した。これは、大型(+)細胞が若齢ECMでの培養後に骨形成の増加を示すという注目すべき例外を除き、いずれの大型細胞集団にも当てはまらない。また、大型(+)集団は、全般的に実質的な骨形成能を有するようであることも言及に値する。理論に拘束されるものではないが、この集団は、既に骨形成運命に拘束されている可能性がある。図19D~Fにおいて、CFUの結果を定量化する。ここで、小型陽性細胞は、ECM上の培養後の3つのアッセイのすべてについて、一貫してCFUの総数に高い変化倍率を有することが示される。

【0106】

また、未分画(若齢;高齢)および分画高齢BM-MSCの総変化倍率を4継代後に測定した。TCP対若齢ドナーからのBM-MSC由来のECM(若齢ECM)上での培養下で7日ごとに細胞を継代した。播種密度は細胞1500個/cm²であった。TCPまたは若齢ECM上の若齢および高齢BM-MSCならびにBM-MSCの高齢亜集団(小型+、小型-)由来のBM-MSCの継代後に、SSEA-4陽性細胞の数は劇的に増加した。若齢ECMでの連続継代は、若齢ECM上で小型+BM-MSCを拡大培養した場合、約6,000倍の変化をもたらした(図32)。

【0107】

したがって、データは、高齢者の老化した骨髄細胞からより欠陥の少ないBM-MSCの小さな亜集団(~10%)を単離することができ、それらの増殖能は、若齢ドナー由来の骨髄間質細胞によって作製されたECMの提供によって著明に改善され得ることを示唆する。

【0108】

実施例7
BM-ECMおよびTCP上で培養したBM-MSCの特徴付け

若齢BM-ECMおよびTCP上で培養した未選別および分画BM-MSCをさらに特徴付けた。

【0109】

SSEA-4は、初期状態のMSCのマーカーである。若齢ドナー由来のBM-MSCならびに高齢ドナー由来の小型、大型およびサイズ未選別のBM-MSCの5継代後のSSEA-4陽性細胞の数を、BM-ECMおよび組織培養プラスチック(2D)上で培養した後に測定した。より高齢のドナー由来の小型細胞を培養すると、高齢ドナー由来の大型および未選別細胞と比較して、5継代後のSSEA-4陽性細胞の増加を示した(図29)。さらに、BM-ECMでの培養は、2Dでの培養と比較して幹細胞の増加を示した。

【0110】

TCPまたは若齢ドナーからのBM-MSCに由来するECM上で培養した、高齢ドナーから単離されたBM-MSCの4つの亜集団(S+、S-、L+、L-)ならびに若齢および高齢ドナーからの未選別BM-MSC細胞について、SSEA-4発現、ROS濃度、細胞あたりのATP含量およびテロメラーゼレベルも測定した。小型(+)細胞はSSEA-4の高発現を有し、ほとんどの群において若齢ECM上の培養はSSEA-4発現を増加させることが認められた。図25および図31参照。さらに、小型BM-MSCは他の群よりも細胞内ROSが低く、若齢ECM上の培養は、平均細胞内ROSをさらに低下させる(図26および図31)。また、TCP上で培養した小型(+)BM-MSCは、有意により高いATP濃度を有し、若齢ECM上の培養は、ほとんどの細胞群についてATP濃度を増加させる(図27)。さらに、小型(+)細胞は、はるかに高いテロメラーゼ活性を有する(図28)。

【0111】

TCPまたは若齢ドナーからのBM-ECM由来のECM(若齢ECM)上で培養した場合の、小型(+)および小型(-)MSC集団を、未選別の若齢および高齢BM-MSCとさらに比較し、対比させた。

-Gal発現の結果は、小型の亜集団が培養の間、低いレベルの老化を維持することを示唆した。具体的には、高齢ドナーから単離された小型BM-MSCは、培養の間、低い-Gal発現を維持する。また、若齢型MSCと小型MSCの-Galレベルに有意差はなかった(図30A)。これは、この集団が一過性ではなく、培養下で維持され得ることを示唆する。BM-MSCをECM上で培養した場合、ATPレベルは平均して増加し、ECMでの培養は、すべての群についてTCP上の培養と比較して平均ATPレベルの増加をもたらした(図30B)。この差は、試験した4群のうち3群において統計的に有意であった。また、TCP上で培養した小型(+)BM-MSCは

10

20

30

40

50

、有意により高いATP濃度を有する（図30B）。

【0112】

若齢、高齢および小型(+)BM-MSCのサイトカインプロフィールを比較した（図30C）。高齢BM-MSCが若齢または小型(+)BM-MSCよりもはるかに高いレベルのSASPサイトカインを発現する（それぞれ $p = 0.0001$ および 0.011 ）という同様の傾向が出現し、一方若齢BM-MSCと小型(+)BM-MSCのSASPプロフィールは有意に異ならなかった（ $p = 0.2756$ ）。

【0113】

BM-ECMが多数の高い質のMSCの拡大培養を可能にするかどうかを判定するために、小型BM-MSCをTCPおよびECM上での拡大培養後に免疫表現型分類し、若齢および高齢MSCと比較した（表2および図31）。ECM上で培養した小型(+)BM-MSCは、細胞内活性酸素種（ROS）のレベルを最小限に抑えながら、SSEA-4発現において他のすべての群を上回った。ECM上で培養したすべての群がアネキシン5の同様の発現を有していたが、小型(+)BM-MSCが、TCPに比べてECMで有意により低いレベルを発現したことは注目すべきである。総合すると、フローサイトメトリは、小型(+)BM-MSC群において加齢に関連する表現型変化の実質的な逆転を示す。ECM上で培養した小型(+)BM-MSCは、TCP培養と比較してより高いSSEA-4発現およびより低いROSおよびアネキシン5を有する。これは、小型BM-MSCが、より高いSSEA-4、より低いアネキシン5、およびより低い細胞内活性酸素種（ROS）などの、若齢細胞により類似した表現型を有することを実証する。これらのデータはまた、MSCの「若い」亜集団を、「若い」表現型を維持しつつ拡大培養し得ることを示す。

【0114】

【表2】

| | SSEA-4 | | ROS | | アネキシン5 | |
|-------|--------|--------|-----|--------|--------|--------|
| | TCP | BM-ECM | TCP | BM-ECM | TCP | BM-ECM |
| 若齢 | 86% | 84% | 9% | 6% | 16% | 11% |
| 高齢 | 77% | 70% | 23% | 17% | 5% | 11% |
| 小型(+) | 87% | 93% | 12% | 3% | 23% | 14% |
| 小型(-) | 86% | 87% | 9% | 14% | 14% | 6% |

【0115】

実施例8

分化能ならびに組織修復および再生のための効力

上記で提示したデータに基づき、本発明者らは、小型+細胞では、MSCの他の亜集団および未選別MSCと比較して、分化能ならびに組織修復および再生のための効力が高いと予測する。さらに、ECM上で培養した細胞、特に小型+細胞は、TCP上で培養した細胞よりも分化能ならびに組織修復および再生のための効力が大きいと予測される。

【0116】

単離されたMSCの細胞分化能は、当業者に周知の方法によって測定することができる。小型+細胞は、MSCの他の亜集団および未選別MSCと比較して高い細胞分化能を示すことが期待される。さらに、若齢ECM上で培養した細胞、特に小型+細胞は、TCP上で培養した小型+細胞よりも極めて高い細胞分化能を有することが期待される。

【0117】

単離されたMSCの組織修復および再生は、当業者に周知の方法によって測定することができる。小型+細胞は、MSCの他の亜集団および未選別のMSCと比較して高い組織修復および再生のための効力を示すことが期待される。さらに、若齢ECM上で培養した細胞、特に小型+細胞は、TCP上で培養した小型+細胞よりも極めて高い組織修復および再生のための効力を有することが期待される。

【0118】

本発明において開示され、特許請求される方法のすべては、本開示に照らして過度の実験を行うことなく作製し、実行することができる。本発明の組成物および方法を好ましい

10

20

30

40

50

態様に関して説明したが、当業者には、本発明の概念、精神および範囲から逸脱することなく、本明細書で述べる方法および本明細書で述べる方法の工程または工程の順序において変更を適用し得ることは明らかであろう。より具体的には、化学的および生理学的に関連する特定の剤が、同じまたは類似の結果を達成しつつ、本明細書で述べる剤を置き換えることは明らかであろう。当業者に明らかなこのような類似の置換および改変はすべて、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の精神、範囲および概念の範囲内であると見なされる。

【 0 1 1 9 】

参考文献

以下の参考文献は、本明細書で示すものを補足する例示的な手順または他の詳細を提供する限り、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

Athanasiou, et al., *Biomaterials*. 17(2):93-102, 1996.

Bonab, et al., *BMC Cell Biol.* 7:14, 2006.

Campisi, et al., *Semin Cancer Biol.* 21(6):354-59, 2011.

Cancedda, et al., *Matrix Biol.* 22(1):81-91, 2003.

Chan, et al., *Biomaterials*. 33(2):464-72, 2012.

Chen, et al., *Tissue Eng.* 11(3-4):526-34, 2005.

Chen, et al., *J. Bone Miner. Res.* 22:1943-1956, 2007.

Chen, *Birth Defects Res C Embryo Today*. 90(1):45-54, 2010.

Cho, et al., *Blood*. 111(12):5553-61, 2008.

Coppé, et al., *PLoS Biol.* 6(12):2853-68, 2008.

Costa, et al., *Int J Biochem Cell Biol.* 44(12):2233-7, 2012.

Freund, et al., *Trends Mol Med.* 16(5):238-46, 2010.

Gang, et al., *Blood*. 109(4):1743-51, 2007.

Kagami, et al., *Oral Dis.* 14(1):15-24, 2008.

Kawanabe, et al., *Clin. Oral Investig.*, 19(2):363-71, 2015.

Lai, et al., *Stem Cells Dev.* 19:1095-1107, 2010.

Leal-Egana & Scheibel, *Biotechnol Appl Biochem.* 55(3):155-67, 2010.

Maria, et al., *Tissue Eng Part A*. 17(9-10):1229-38, 2011.

Nagaoka, et al., *Ann Biomed Eng.* 38(3):683-93, 2010.

Pipino, et al., *Stem Cells Dev.* 24(12):1415-28, 2015.

Sun, et al., *FASEB J.* 25(5):1474-85, 2011.

Wagner, et al., *PLoS ONE*. 3(5):e2213.

Zhou, et al., *Aging Cell*. 7(3):335-43, 2008.

US Patent 8,084,023, Chen et. al.

US Patent 8,388,947, Chen et. al.

US Patent 8,961,955, Chen et. al.

PCT Publication WO 2016/070057, Zamilpa et al.

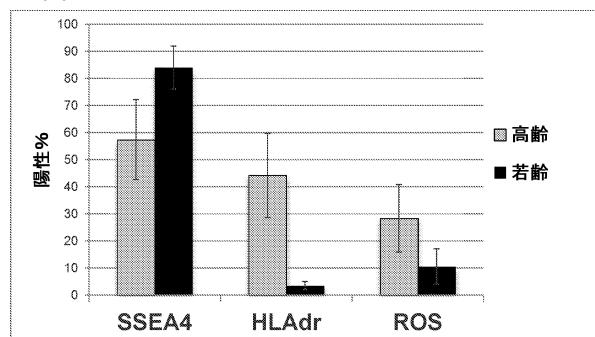
10

20

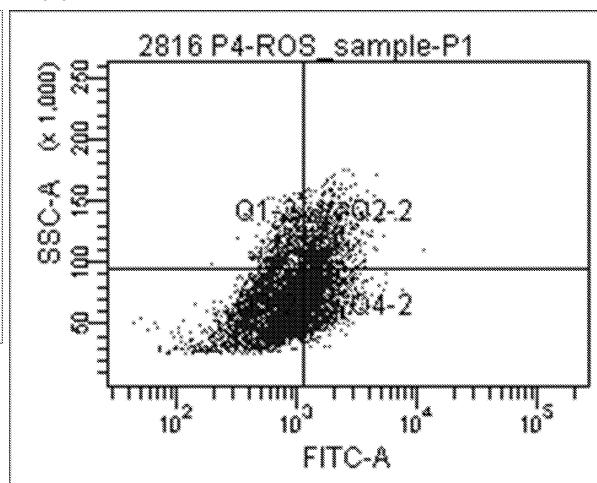
30

40

【図1】

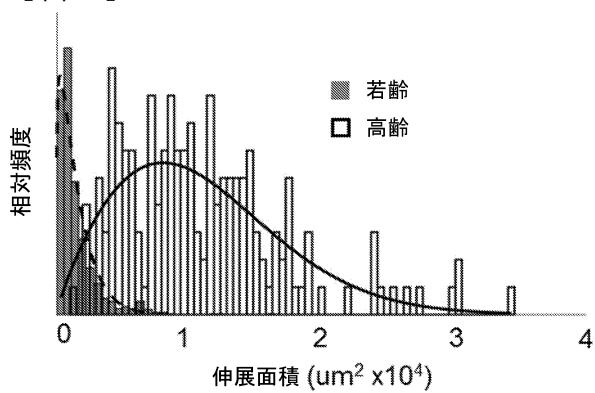


【図2】

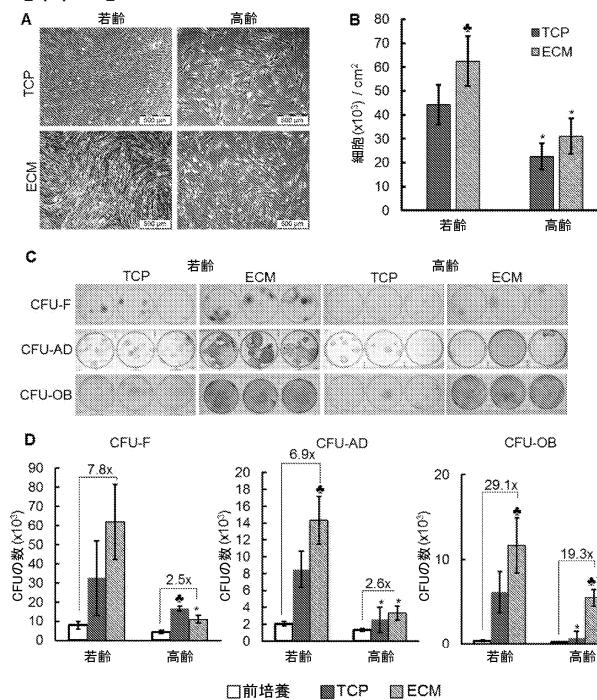


| 分割表 | | | |
|-----|---------|---------|---------|
| | 陰性 | 陽性 | |
| 大型 | UL-Quad | UR-Quad | UL+UR |
| 小型 | LL-Quad | LR-Quad | LL+LR |
| | UL+LL | UR+LR | Total # |

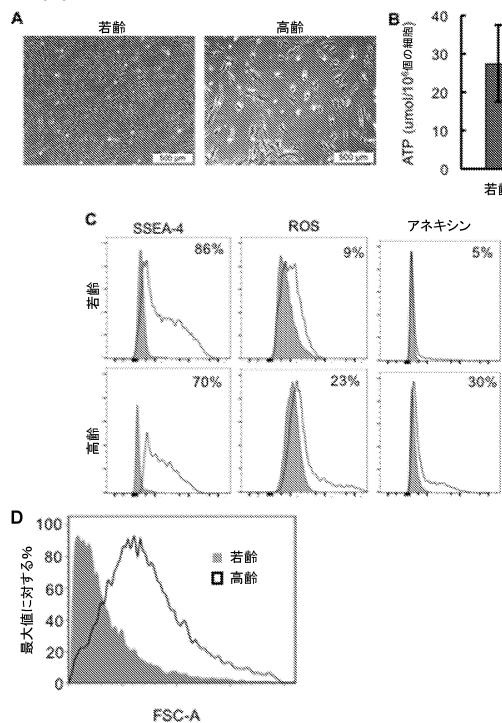
【図3】



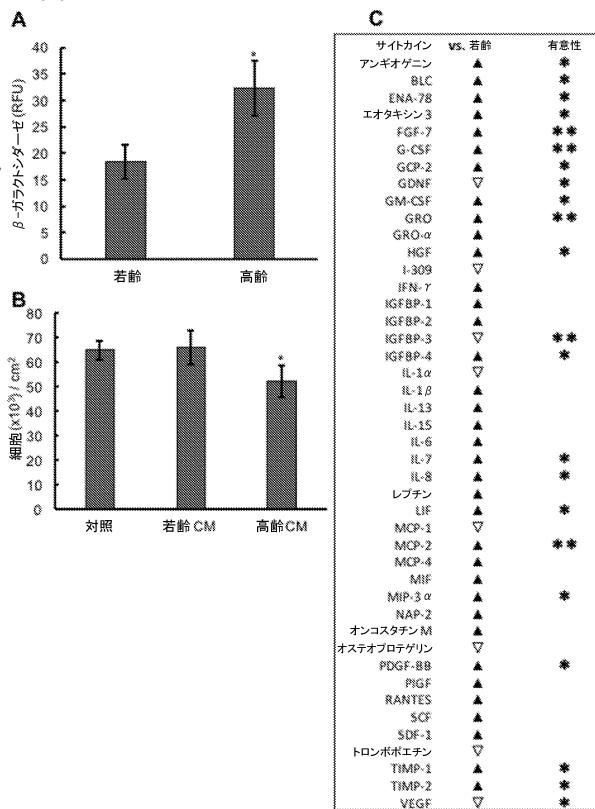
【図4】



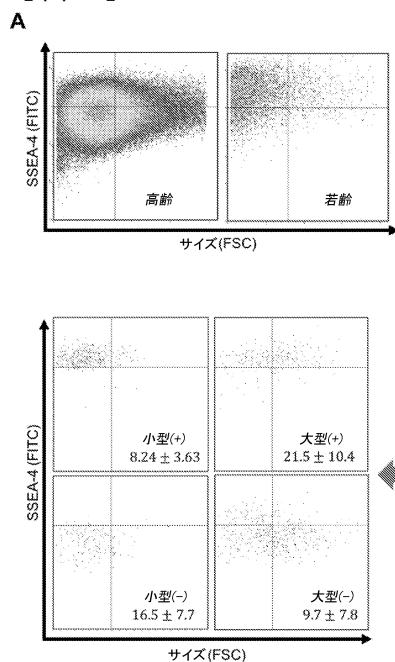
【図5】



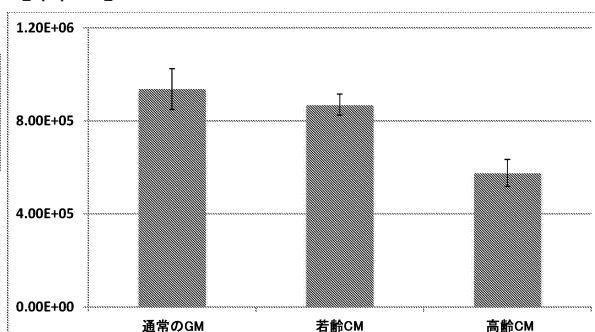
【図6】



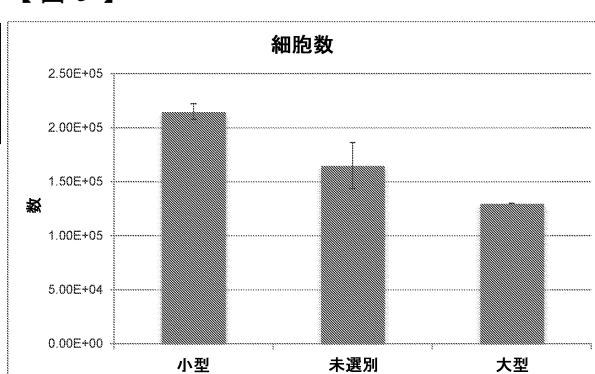
【図7】



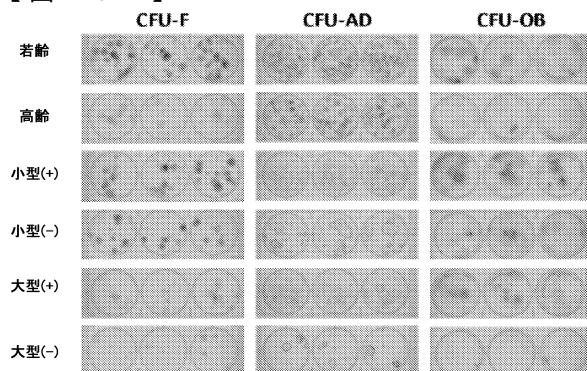
【図8】



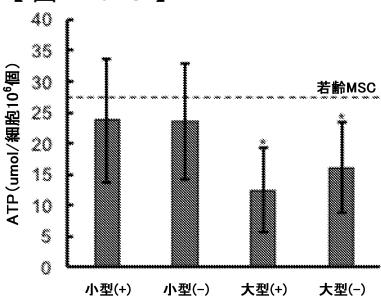
【図9】



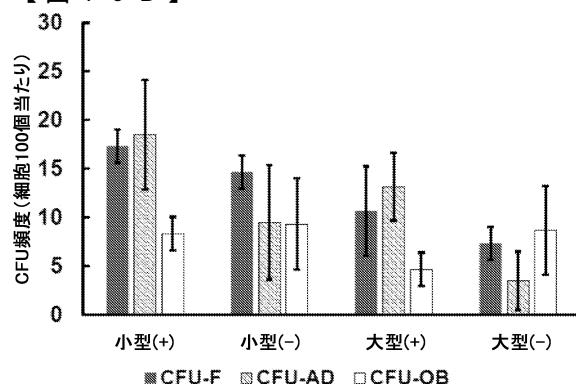
【図 10 A】



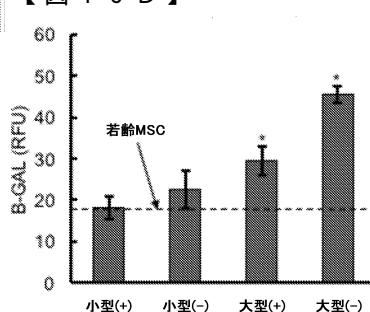
【図 10 C】



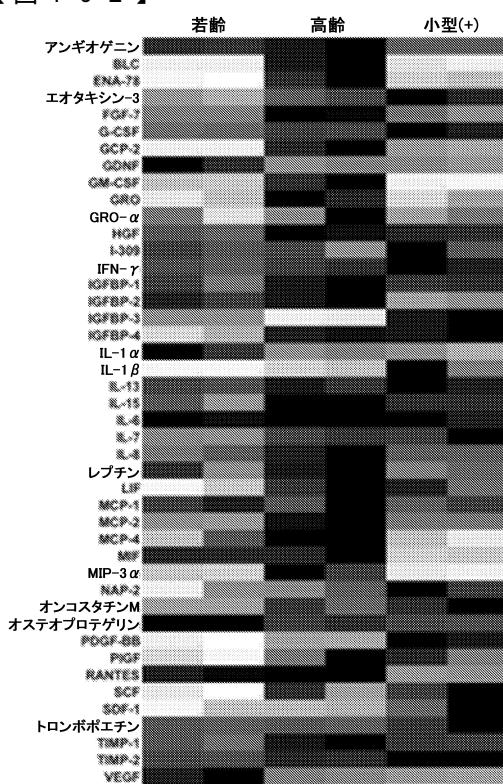
【図 10 B】



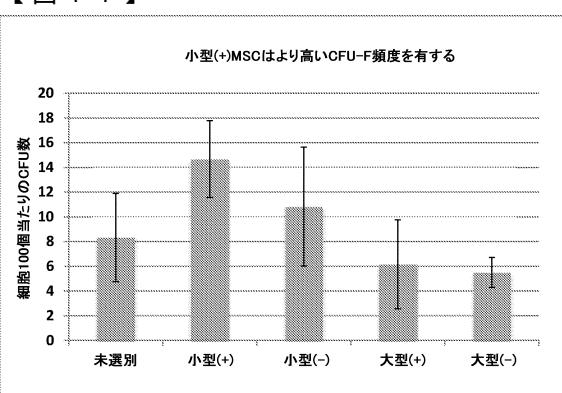
【図 10 D】



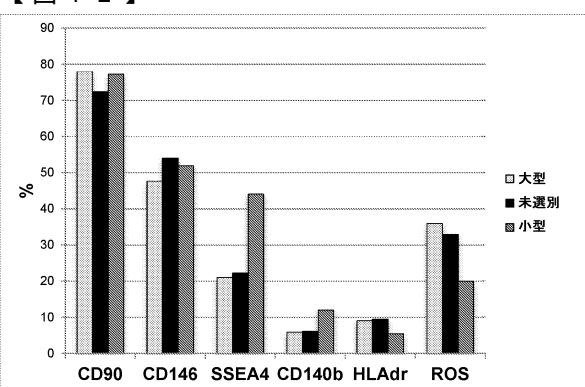
【図 10 E】

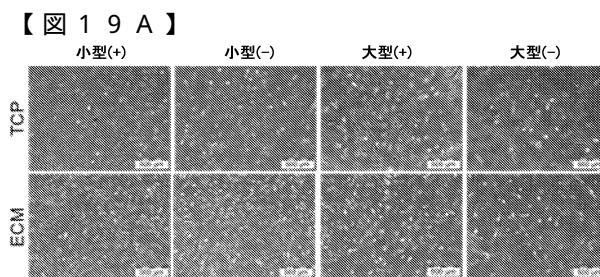
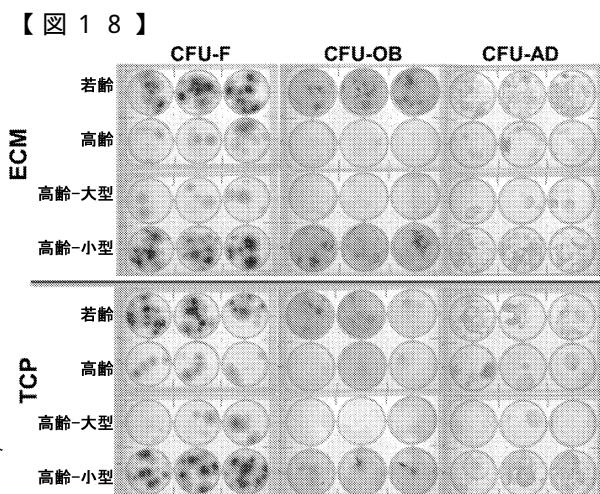
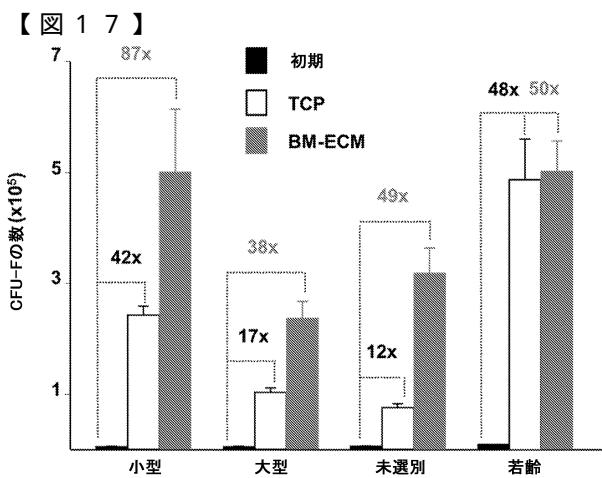
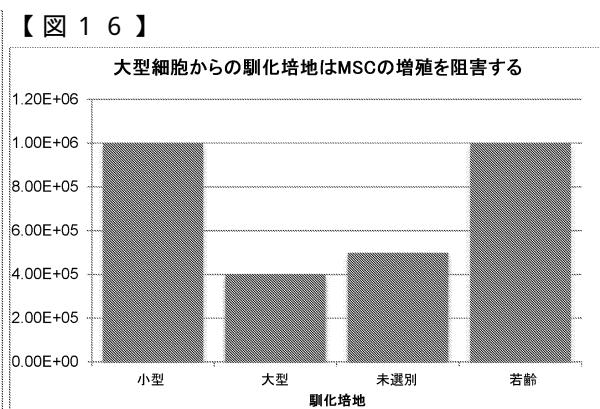
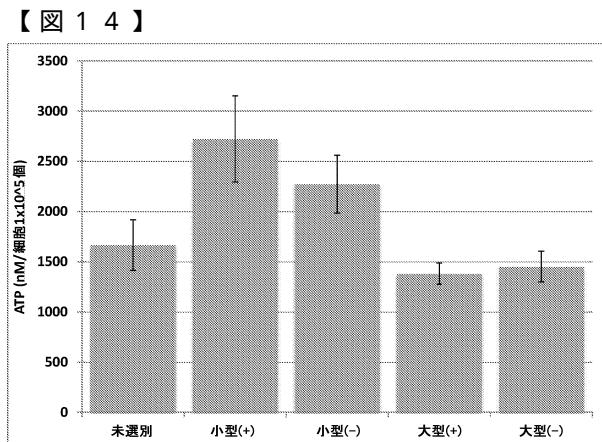
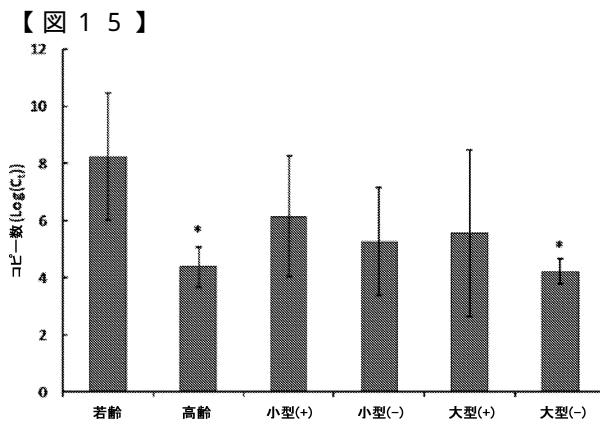
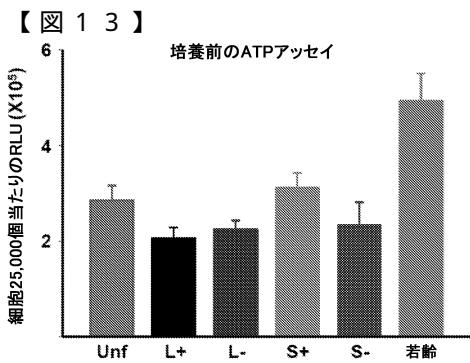


【図 11】

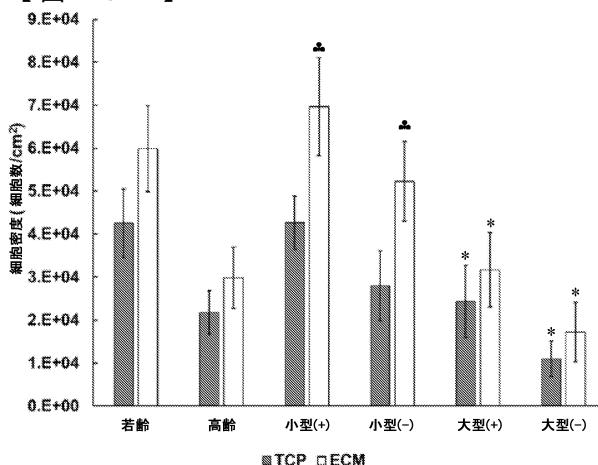


【図 12】

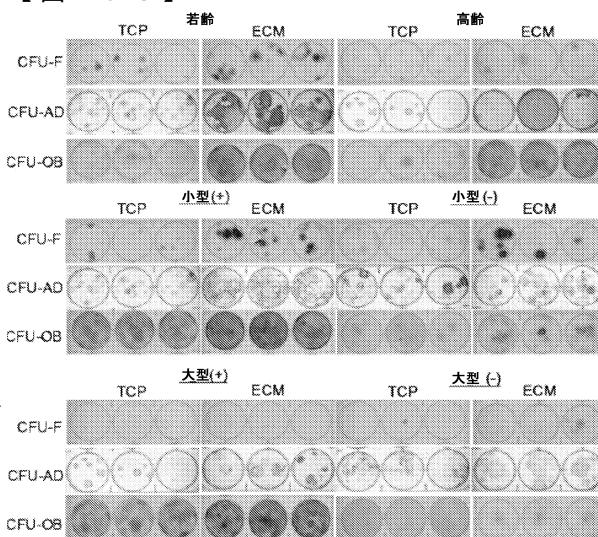




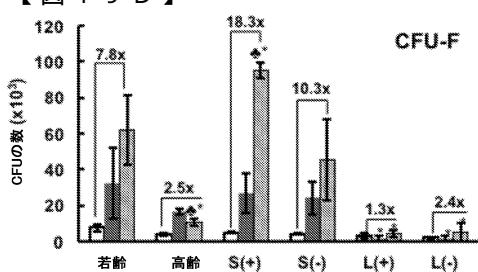
【図19B】



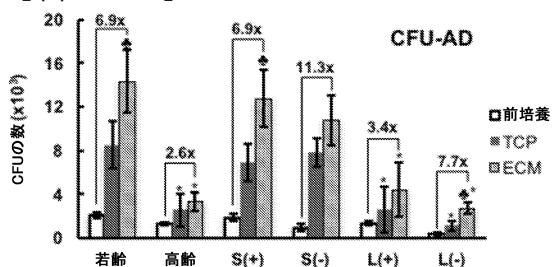
【図19C】



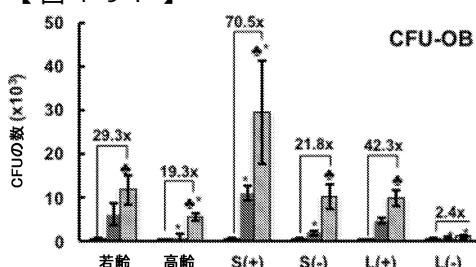
【図19D】



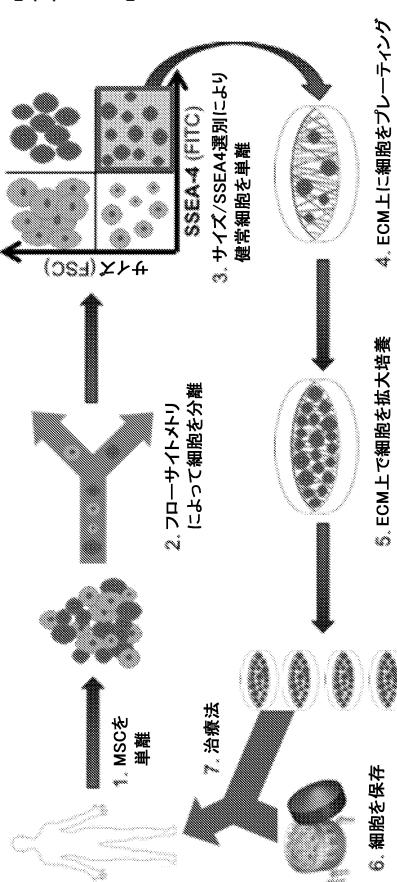
【図19E】



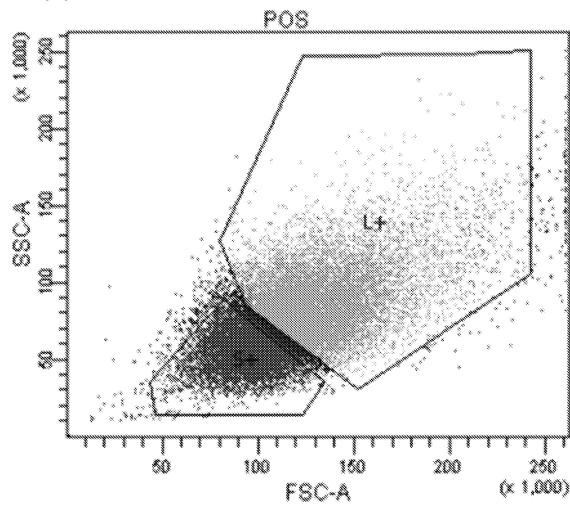
【図19F】



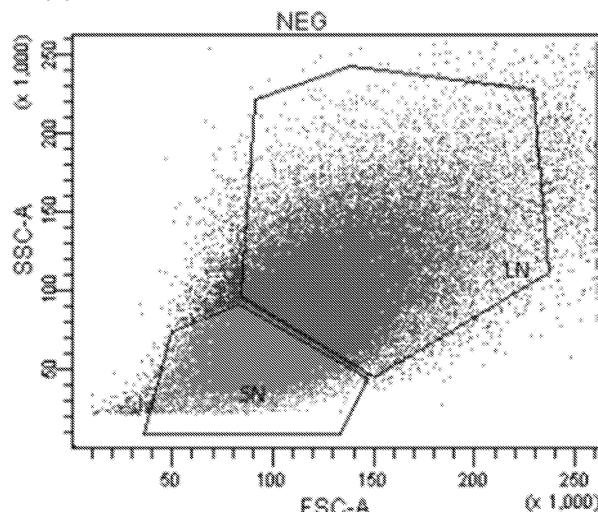
【図20】



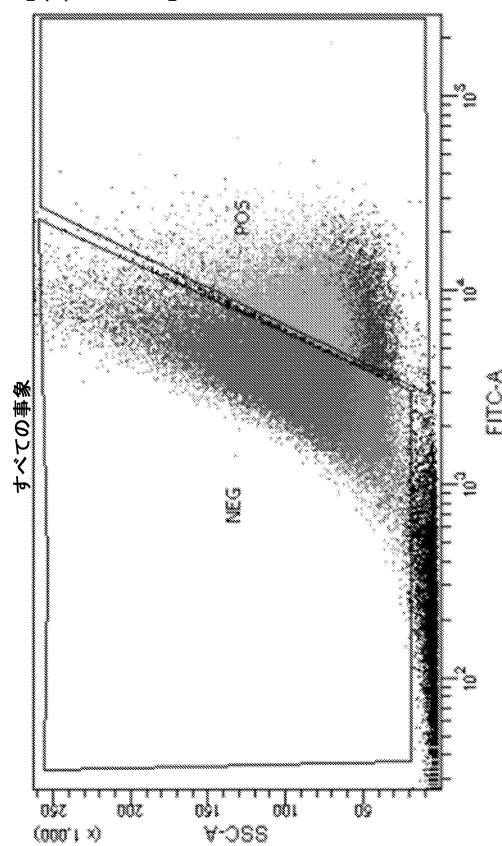
【図 2 1 A】



【図 2 1 B】

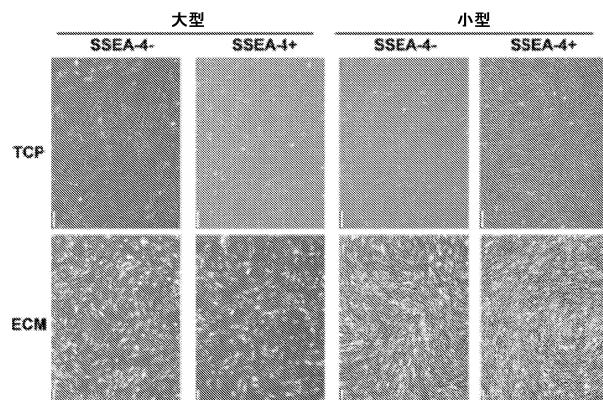


【図 2 1 C】



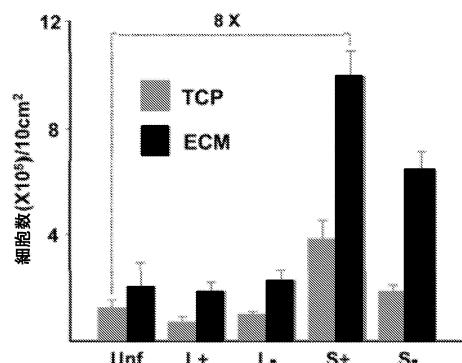
【図 2 2】

TCP対ECM上で7日間増殖させた、
71歳の男性ドナーから選別したBM-MSCの亜集団

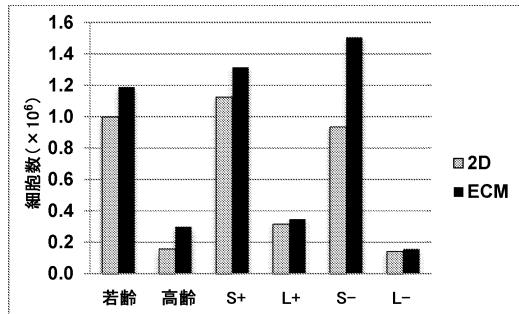


【図 2 3】

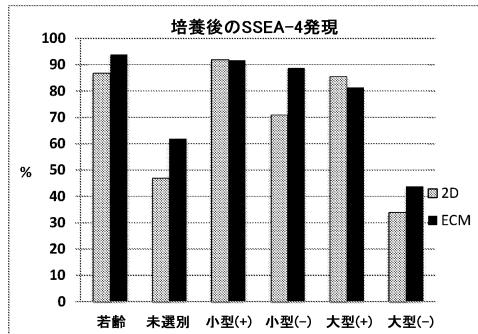
細胞増殖



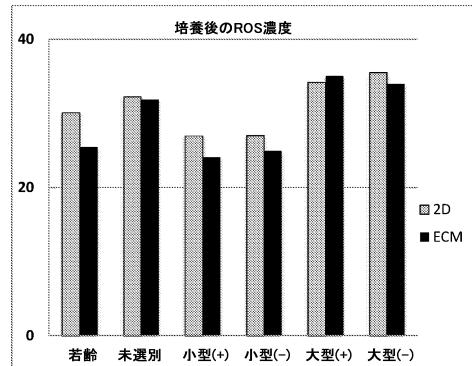
【図24】



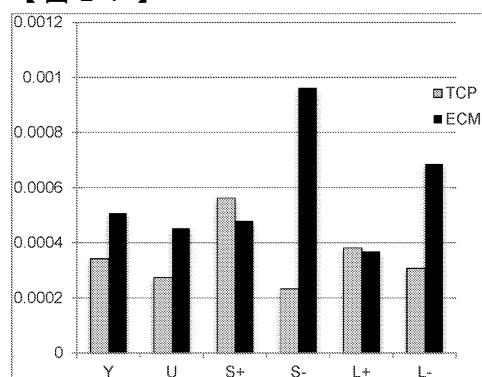
【図25】



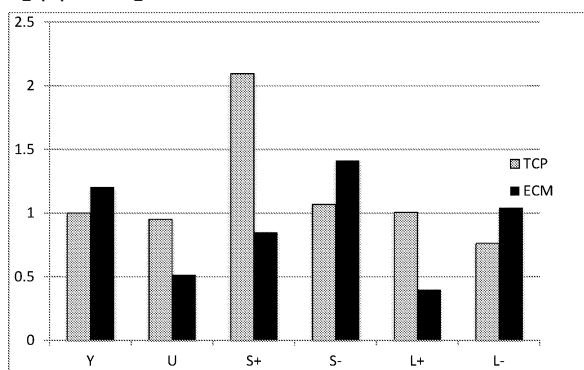
【図26】



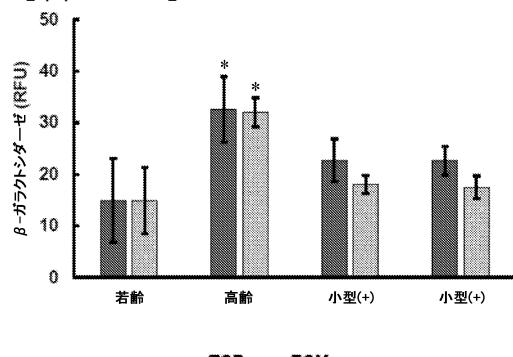
【図27】



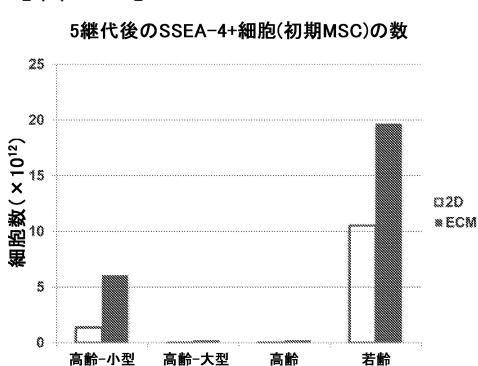
【図28】



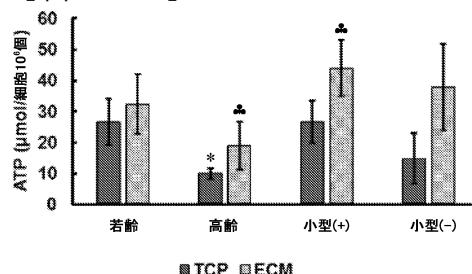
【図30A】



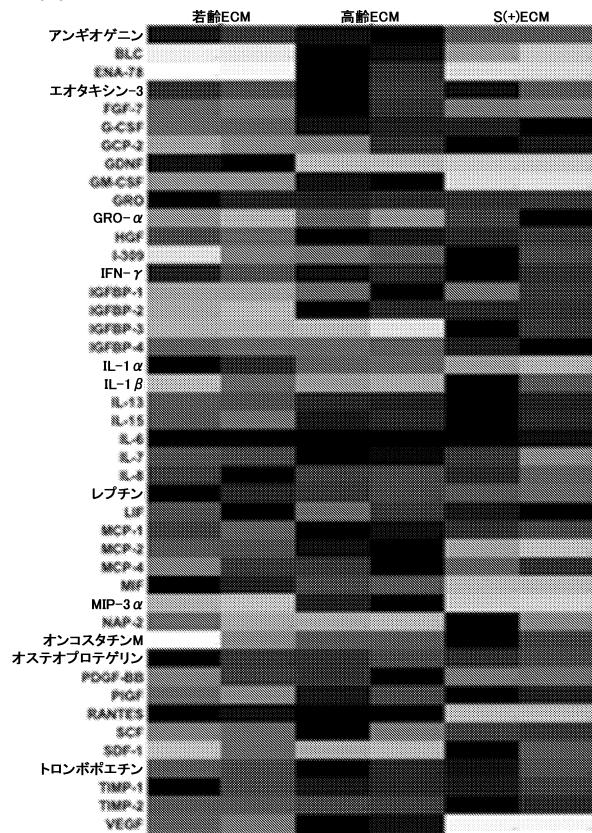
【図29】



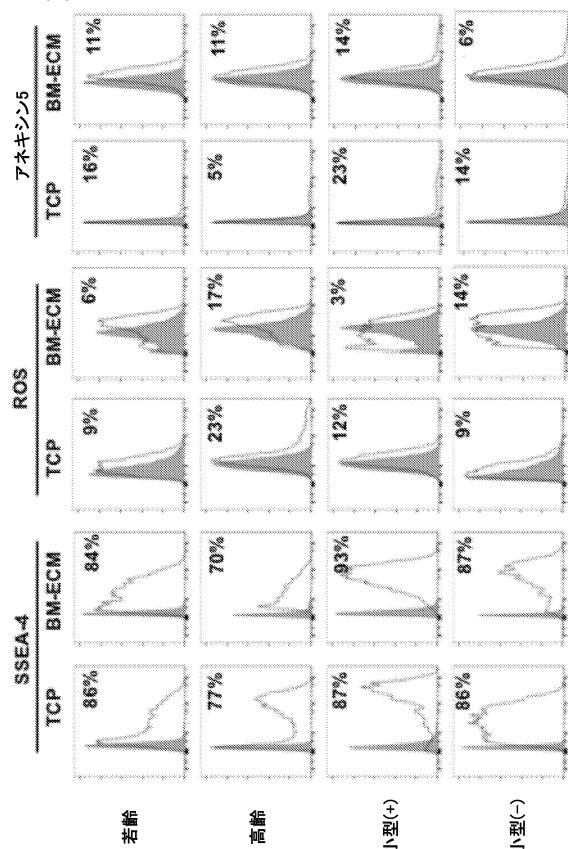
【図30B】



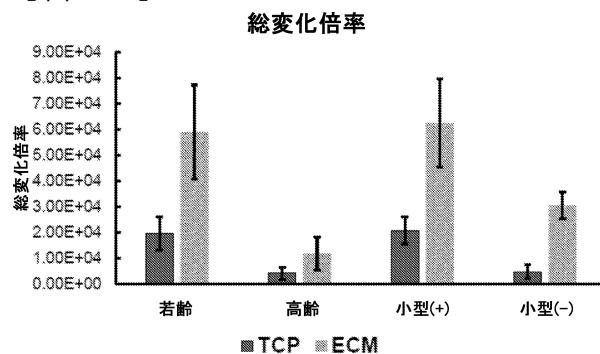
【図30C】



【図31】



【図32】



フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I |
|-------------------------|--------------------------------------|
| A 6 1 P 9/10 (2006.01) | A 6 1 P 19/10 |
| A 6 1 P 25/16 (2006.01) | A 6 1 P 9/10 1 0 1 |
| A 6 1 P 25/28 (2006.01) | A 6 1 P 25/16 |
| A 6 1 P 1/02 (2006.01) | A 6 1 P 25/28 |
| A 6 1 P 27/02 (2006.01) | A 6 1 P 1/02 |
| A 6 1 P 19/08 (2006.01) | A 6 1 P 27/02 |
| A 6 1 P 7/00 (2006.01) | A 6 1 P 19/08 |
| A 6 1 P 11/00 (2006.01) | A 6 1 P 7/00 |
| A 6 1 L 27/38 (2006.01) | A 6 1 P 11/00 A 6 1 L 27/38 3 0 0 |

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ブロック トライビス

アメリカ合衆国 7 8 2 2 9 テキサス州 サンアントニオ フロイド カール ドライブ 7 7
0 3

(72)発明者 マリンコビック ミロス

アメリカ合衆国 7 8 2 2 9 テキサス州 サンアントニオ フロイド カール ドライブ 7 7
0 3

(72)発明者 チエン シャオ ドン

アメリカ合衆国 7 8 2 2 9 テキサス州 サンアントニオ フロイド カール ドライブ 7 7
0 3

審査官 三原 健治

(56)参考文献 米国特許第0 7 8 0 7 4 5 8 (U S , B 1)

国際公開第2 0 1 0 / 0 3 9 2 4 1 (WO , A 1)

J.Bone Miner.Res.,2007,Vol.22,No.12,p.1943-1956

Stem Cells Dev.,2010,Vol.19,No.7,p.1095-1107

Birth Defects Research (Part C),2010,Vol.90,p.45-54

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N

A 6 1 K

A 6 1 P

(39)

JP 6871637 B2 2021.5.12

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)