

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5893562号

(P5893562)

(45) 発行日 平成28年3月23日(2016.3.23)

(24) 登録日 平成28年3月4日(2016.3.4)

(51) Int.Cl.

C 1 2 N 5/074 (2010.01)

F 1

C 1 2 N 5/074

請求項の数 7 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2012-532193 (P2012-532193)	(73) 特許権者	513069064
(86) (22) 出願日	平成22年9月22日 (2010.9.22)		デビュイ・シンセス・プロダクツ・インコ
(65) 公表番号	特表2013-506420 (P2013-506420A)		ーポレイテッド
(43) 公表日	平成25年2月28日 (2013.2.28)		アメリカ合衆国、02767-0350
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/049850		マサチューセッツ州、レインハム、パラマ
(87) 国際公開番号	W02011/041186		ウント・ドライブ 325
(87) 国際公開日	平成23年4月7日 (2011.4.7)		325 Paramount Drive
審査請求日	平成25年8月2日 (2013.8.2)		, Raynham MA 02767-
(31) 優先権主張番号	61/247, 228		0350 United States
(32) 優先日	平成21年9月30日 (2009.9.30)		of America
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100088605
前置審査			弁理士 加藤 公延
		(74) 代理人	100130384
			弁理士 大島 孝文

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳動脈由来細胞並びに組織修復及び再生における使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離されたヒトの内乳動脈由来細胞であって、前記細胞が培養中に自己複製して増殖することができ、前記細胞が細胞－表面マーカーHLA－1について発現陽性であり、細胞－表面マーカーCD10、CD31、CD34、CD45、CD133、CD141及びKDR／Flk－1のそれぞれについて発現陰性であり、

前記ヒトの内乳動脈由来細胞は、血管および心臓血管組織のための足場上で増殖でき、

前記細胞が、CD29、CD44、CD73、CD166について更に発現陽性であり、
CD15、CD23、CD24、CD62p、CD80、CD86、CD104、CD
105、CD117、CD138、CD146、VE－カドヘリン、及びHLA－2につ
いて更に発現陰性である、

細胞。

【請求項 2】

前記細胞が、脂肪細胞、心筋細胞、及び内皮細胞に分化可能である、請求項1に記載の細胞。

【請求項 3】

ヒトの内乳動脈由来細胞を培養する方法であって、

a. 酵素混合物を提供する工程であって、前記酵素混合物が、メタロプロテアーゼ酵素、中性プロテアーゼ酵素、粘液溶解性酵素、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される消化酵素から構成される、工程と、

10

20

b. 前記動脈から内膜層を除去し、かつ外部残屑を除去するために、前記酵素混合物中で、60分間、与えられたヒトの内乳動脈をインキュベートし、部分的に消化された動脈を提供する工程と、

c. 前記部分的に消化された動脈を新しい酵素混合物中に移し、消化された材料を提供するのに十分な時間、消化を継続する工程と、

d. 前記消化された材料から前記細胞を単離する工程であって、前記細胞が、細胞一表面マーカーHLA-1について発現陽性であり、細胞一表面マーカーCD10、CD31、CD34、CD45、CD133、CD141及びKDR/Flk-1のそれぞれについて発現陰性であり、CD15、CD23、CD24、CD62p、CD80、CD86、CD104、CD105、CD117、CD138、CD146、VE-カドヘリン、及びHLA-2について更に発現陰性である工程と、

10

e. コラーゲンをコーティングした組織培養用容器上で前記細胞を培養する工程と、を含み、

前記培養された細胞は、血管および心臓血管組織のための足場上で増殖できる、方法。

【請求項4】

前記酵素混合物が、コラゲナーゼ及びディスパーゼから構成される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記消化された材料を提供するのに十分な時間が、30分間～60分間の範囲内である、請求項3に記載の方法。

20

【請求項6】

前記酵素混合物を消化された材料で飽和させるのに十分な時間が、60分間である、請求項3に記載の方法。

【請求項7】

請求項3～6のいずれか1項に記載の方法によってヒトの内乳動脈から単離された細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

(関連出願の相互参照)

本願は、米国特許仮出願第61/247, 228号の非暫定出願である。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、一般的に哺乳類内乳動脈から単離された哺乳類乳動脈由来細胞に関する。本発明は更に、哺乳類内乳動脈由来細胞の単離方法に関する。単離された内乳動脈由来細胞を足場と組み合わせ、組織工学デバイスにおいて使用する方法が提供される。

【背景技術】

【0003】

内胸動脈としても知られる内乳動脈は、前胸壁及び乳腺を灌流する。内乳動脈は、伏在静脈グラフトと比較して優れた長期間開存性を有し、冠動脈(coronary artery)バイパス術において第1選択の血管であるとされている。冠動脈及び頸動脈と比較して、乳動脈は動脈硬化(arteriosclerosis)に対して高い抵抗性を示す。伏在静脈と比べて、この内乳動脈の移植片動脈硬化に対する長期間抵抗性は、少なくとも部分的にはその優れた内皮細胞機能に起因すると考えられている。加えて、内乳動脈の機械的損傷に対する応答も、冠動脈と異なる。ヒト冠動脈は、細胞遊走及び細胞増殖を促進することによりバルーン血管形成術に応答し、新生内膜の形成と、症例のうち約40%の再狭窄に至る。しかしながら、冠動脈及び伏在静脈グラフトとは異なり、経皮経管的血管形成術後の内乳動脈グラフトには再狭窄はみられなかった。したがって、内乳動脈は、血管前駆細胞の有用な組織源となり得る。

40

50

【0004】

軟骨、骨、及び脂肪から構成される異所性組織が動脈壁内部に形成できることは、十分に立証されている。この現象は異形成と呼ばれ、多分化能前駆細胞が動脈壁内に存在し得ることを示唆する。動脈壁内の骨形成分化及び軟骨形成分化は、臨床的には血管へのカルシウム沈着とみなされ、この種の石灰化は心臓血管障害の増加と関連する。血管のカルシウム沈着は大動脈の硬さを増加させることが知られており、収縮期高血圧、冠不全、左心室肥大、虚血、及びうっ血性心不全の原因となる。実際に、冠動脈血栓の原因となる粥腫の約85%は石灰化されている。動脈壁内の前駆細胞が、粥腫形成、カルシウム沈着、及び動脈硬化においてある役割を果たす場合があると示唆されている。したがって、これらの細胞が血管病変及び修復にどのように寄与するのかを理解することで、心臓血管適応に対する治療の改善をもたらし得る。

10

【0005】

現在は、多くの研究者が、血管生理における幹細胞の役割を理解することに集中している。成人の器官は、器官の維持及び障害後の修復に關与する幹細胞を含むことが示されている。したがって、全てではなくとも多くのタイプの器官組織から成人前駆細胞を単離できると考えられる。その結果、これらの組織特異性前駆細胞を組織特異性の治療目的に利用し得る。

【0006】

最近Zinglinらは、成人ヒト血管壁に「血管原性域」が存在することを示した。この実験では、ヒト内胸動脈から推定前駆細胞を単離した。細胞を回収するために、動脈を刻み、トリプシン／EDTAを用いて37℃で5分間消化した。非消化組織を濾過により除去した。懸濁液を遠心分離し、得られた細胞ペレットを内皮増殖培地に再懸濁して、コラーゲン又はフィブロネクチンをコーティングしたディッシュにまいた。これらの細胞はCD34の発現を示した。KDR／Flk1及びCD45を発現する前駆細胞が、内乳動脈の血管壁内に存在することも示された。これらのデータは、内乳動脈壁の内部に前駆細胞のプールがあることを示唆する。

20

【0007】

製造可能で動脈硬化に抵抗性のある血管壁前駆細胞の同定及び単離は、細胞治療及び組織工学用途に有益であることを証明するであろう。内乳動脈に特有の抗動脈硬化特性及び機械的特性を利用しようとして、我々は、ヒト内乳動脈から特有の前駆細胞を単離して特徴付け、組織工学用途におけるそれらの有用性を評価した。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

我々は、哺乳類内乳動脈から単離された哺乳類内乳動脈由来細胞について開示する。哺乳類内乳動脈由来細胞の単離方法も提供する。哺乳類内乳動脈由来細胞を、細胞形態、増殖能、表面マーカーの表現型、分泌タンパク質、遺伝子発現、多分化能分化、及びインビボ血管新生促進活性について特徴付けた。これらの細胞は、細胞工学及び組織工学用途の両方に有用である。

【図面の簡単な説明】

40

【0009】

【図1】形態。iMAC（内乳動脈由来細胞）を、コラーゲンをコーティングした組織培養用フラスコで培養し、継代数2（A）、継代数7（B）及び継代数23（C）において位相差画像を得た。細胞は、均質な繊維芽細胞の形態を示す。

【図2】成長速度。コラーゲンをコーティングしたフラスコでiMACを81日間培養した。3～5日ごとに細胞を回収してカウントし、集団倍加を決定した。培養は、少なくとも41.9回の集団倍加を達成することができた。

【図3】毛細血管形成。iMAC及びヒト内乳動脈内皮細胞（EC）を、マトリゲルをコーティングしたプレートで別々に培養し、毛細血管形成を観察した。iMAC増殖培地、内皮増殖培地-2（EGM-2）、又は平滑筋細胞用分化培地（SMC培地）の異なる3

50

種の培地内で細胞を培養した。iMAC増殖培地又はEGM-2内で成長したiMAC培養物において、高密度な毛細血管形成が観察された。100×の倍率で画像を得た。

【図4】脂肪生成。iMACを脂肪生成誘導培地で15日間培養した。誘導後5、10、及び15日目にOil Red-Oで培養物を固定し、染色した。細胞内の脂質の小滴は赤く染まる。左下のパネルに示す培養5日目の画像は400×の倍率で得た。他の画像は全て200×の倍率で得た。

【図5】細胞浸潤／毛細血管密度。データのバーは、評価した総面積あたりの細胞／毛細血管から構成される面積の平均割合を表す。N=5又は6。エラーバーは標準誤差（SEM）を表す。

【図6】成長速度。細胞は、消化酵素に30、60、90、120、150分間さらした内乳動脈から単離された。続いて、これらの各時点で得た細胞を、細胞が老化するまで組織培養用プレートで培養した。成長期間中に、細胞が1回の集団倍加を達成できなかったとき、老化と判定した。累積集団倍加（PD）を決定した。

【図7】内皮細胞分化：iMACは、内皮細胞用分化培地で処理後、内皮細胞マーカーを上方制御する。発現（%）は、iMAC細胞培養群における、検査したマーカーを発現する細胞の割合を表す。iMAC細胞用標準培地で増殖後に検査したマーカーを発現する細胞の割合（白色バー）。分化培地で増殖後に検査したマーカーを発現する細胞の割合（黒色バー）。

【図8】平滑筋細胞分化：平滑筋細胞用分化培地で処理前及び処理後、依然として平滑筋細胞マーカーが発現した。発現（%）は、iMAC培養群における、検査したマーカーを発現する細胞の割合を表す。iMAC細胞用標準培地で増殖後に検査したマーカーを発現する細胞の割合（白色バー）。分化培地で増殖後に検査したマーカーを発現する細胞の割合（黒色バー）。

【図9】心筋細胞分化：心筋細胞用分化培地でiMACを培養後、心筋細胞マーカーが上方制御された。発現（%）は、iMAC培養群における、検査したマーカーを発現する細胞の割合を表す。iMAC細胞用標準培地で増殖後に検査したマーカーを発現する細胞の割合（白色バー）。分化培地で増殖後に検査したマーカーを発現する細胞の割合（黒色バー）。

【図10】iMAC-播種された管状足場の組織像。管状足場をiMAC細胞と共に内表面及び外表面の両側に播種し、バイオリアクターチャンバで10日間培養した。この時に、足場をホルマリンで固定し、ヘマトキシリン及びエオジンで染色した。

【図11】iMAC細胞と共に播種された静電紡糸されたPCL足場のLive/Dead染色。静電紡糸された管状PCL足場をiMAC細胞と共に播種し、バイオリアクターチャンバで3日間培養した。細胞を室温で3時間インキュベートすることにより模擬輸送し、その後標準的な細胞培養インキュベーターに戻した。示した時間で足場断片を切り離し、Live/Dead染色液を用いて染色した。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明は、特定の方法、試薬、化合物、組成物、又は生物系に限定されないことが理解され、これらは当然のことながら可変である。また、本明細書に使用される用語は、単に特定の実施形態を説明するためのものであり、限定するものではないことを理解されたい。本明細書及び添付の「特許請求の範囲」において使用されるとき、単数形「a」、「an」及び「the」は、その内容について別段の明確な指示がない限り、複数の指示対象を包含する。

【0011】

別段の規定がない限り、本明細書で使用される全ての技術及び科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者によって一般的に理解されている意味と同一の意味を有する。本明細書に記載されているものと同様又は同等の任意の方法及び材料を、本発明の試験を実施するために使用できるが、好ましい材料及び方法を本明細書に記載する。本発明の記載及び請求には、以下の用語が使用される。

10

20

30

40

50

【0012】

「本発明の細胞」は、哺乳類内乳動脈由来細胞を意味する。「分化」は、非特殊化の（「中立の」）又は比較的特殊化されていない細胞が、例えば血管細胞などの特殊化した細胞の特徴を獲得するプロセスである。「分化した、又は分化を誘発された細胞」は、細胞系内でより特殊化した（「傾倒した」）状況を呈している細胞である。分化プロセスに適用した際の用語「傾倒した」は、通常的环境下で特定の細胞型又は細胞型の小集合に分化し続ける分化経路の地点に進行しており、通常的环境下で異なる細胞型に分化し、又は未分化の細胞型に戻るできない細胞を指す。「系特異的なマーカー」は、対象とする系の細胞の表現型に特異的に関連した特徴を指し、中立細胞の対象とする系への分化を評価する際に使用することができる。

10

【0013】

本明細書で用いるとき「内乳動脈由来細胞」は、哺乳類内乳動脈から単離された細胞である。内乳動脈由来細胞は、同等の潜在能力を有する娘細胞を産生するのに加え、脂肪細胞などの細胞を生じることができ、又は1つ以上のタイプの組織、例えば血管組織を生じることができる。これらの細胞は内乳動脈から「単離」されるが、これは酵素消化による周囲組織からの細胞の分離を意味する。「消化された材料」は、酵素溶液で処理された後に、哺乳類内乳動脈から単離された細胞及び組織を意味する。この消化された材料は廃棄されるか、組織培養用容器に直接時かれるかのいずれかである。「消化された材料」内に含まれる細胞は、組織培養用容器に付着でき、培養中に増殖できる。

【0014】

「条件培地」は、特定の細胞又は細胞集団が培養され、その後除去される培地である。細胞は、この培地で培養される間に、他の細胞に対する栄養的支援を提供できる細胞性因子を分泌する。このような細胞性因子として、ホルモン、サイトカイン、細胞外マトリックス（ECM）、タンパク質、抗体、及び顆粒が挙げられるが、これらに限定されない。細胞性因子を含む培地が条件培地である。

20

【0015】

一般には「栄養素」は、細胞の生存、成長、増殖、成熟、分化、及び／若しくは維持を促進する、又は細胞活動の増加を刺激する物質として定義される。本明細書で用いられる「栄養的支援」は、細胞の生存、成長、増殖、成熟、分化、及び／若しくは維持の促進能、又は細胞活動の増加の刺激能を意味する。本発明の哺乳類内乳動脈由来細胞は、成長因子、サイトカイン、及び分化因子を含むが、これらに限定されない栄養素を産生する。「遺伝子発現」は、遺伝子のRNA産物への転写、及び任意に1つ以上のポリペプチド配列への翻訳を意味する。

30

【0016】

一実施形態では、単離された哺乳類内乳動脈由来細胞が提供される。この細胞は、培養中に自己複製して増殖することができ、このとき細胞は、細胞－表面マーカーCD29、CD44、CD73、CD166及びHLA-1のそれぞれについて発現陽性であり、細胞－表面マーカーCD10、CD15、CD23、CD24、CD31、CD34、CD45、CD62p、CD80、CD86、CD104、CD105、CD117、CD133、CD138、CD141、CD146、VE-カドヘリン、KDR／Flk-1、及びHLA-2のそれぞれについて発現陰性である。

40

【0017】

別の実施形態では、哺乳類内乳動脈由来細胞は、細胞－表面マーカーHLA-1について発現陽性であり、細胞－表面マーカーCD10、CD31、CD34、CD45、CD133、CD141、及びKDR／Flk-1のそれぞれについて発現陰性である。

【0018】

更に別の実施形態では、哺乳類内乳動脈由来細胞は、更にCD29、CD44、CD73、CD166について発現陽性であり、更にCD15、CD23、CD24、CD62p、CD80、CD86、CD104、CD105、CD117、CD138、CD146、VE-カドヘリン、及びHLA-2について発現陰性である。

50

【0019】

別の実施形態では、哺乳類内乳動脈由来細胞は、栄養素 β 2ミクログロブリン、クレアチンキナーゼMB、ENA-78、エンドセリン-1、エオタキシン、脂肪酸結合タンパク質、フェリチン、塩基性FGF、インターロイキン-6、インターロイキン-8、インスリン、MCP-1、PAI-1、幹細胞因子、TIMP-1、VCAM-1、及びVEGFを分泌することができる。この細胞はフォンヴィルブランド因子又はPDGF-bbを分泌しない。

【0020】

更に別の実施形態では、単離された哺乳類内乳動脈由来細胞が提供され、かかる細胞は、培養中に自己複製して増殖することができ、このとき細胞は、CD13、ケモカインリガンド2、エフリンA2、エフリンA3、エンドグリン、内皮細胞PASドメインタンパク質1、繊維芽細胞成長因子-2、繊維芽細胞成長因子受容体-3、低酸素誘導因子-1、マトリックスメタロプロテアーゼ(Matrix metalenoprotinase)-2、ニューロピリン-1、胎盤成長因子、ウロキナーゼ、トロンボスポンジン-2、TIMP阻害物質-1、TIMP阻害物質-3、TNF-12a、トロポニンTタイプ-1、VEGF-B及びVEGF-C、tripartiteモチーフ含有33(TRIM33)、SRV(性決定領域Y)-ボックス11(SOX-11)、Notchホモログ2(ドロソフィラ)(NOTCH-2)、システインリッチ膜貫通型BMP制御因子1(CRIM-1)、ホメオボックスD9(HOXD9)及びPOUクラス3ホメオボックス3(POU3F3)の遺伝子発現が陽性である。

【0021】

一実施形態では、哺乳類内乳動脈由来細胞を単離する方法を提供する。この方法は、内乳動脈組織を得る工程と、動脈を2回の工程で順次消化して消化された材料を得る工程と、消化された材料から細胞を得る工程と、増殖培地中で細胞を培養して内乳動脈由来細胞を提供する工程と、を含む。第1の消化工程は、メタロプロテアーゼ、中性プロテアーゼ、及び/又は粘液溶解性酵素の存在下で、動脈を部分的に消化するのに十分な時間、組織をインキュベートし、これにより動脈外部の残屑及び内膜層を除去する工程を含む。好適な酵素として、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、及びヒアルロニダーゼ、並びにこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、動脈は、コラゲナーゼ及びディスパーゼで消化される。一実施形態では、動脈は、第1の消化工程において酵素混合物と約60分間インキュベートされる。その後、部分的に消化された動脈を酵素混合物から除き、第2の消化工程において、内乳動脈由来細胞を含む消化された材料を得るのに十分な時間、新しい酵素混合物中に置かれる。一実施形態では、動脈は、第2の消化工程において酵素混合物と約30分間～約60分間インキュベートされる。別の実施形態では、動脈は、第2の消化工程において酵素混合物と約60分間インキュベートされる。続いて、消化された材料から単離された細胞を、コラーゲンをコーティングした組織培養用容器に蒔き、標準的な条件で増殖培地中で培養する。短い培養時間の後、形態、表面マーカー発現、遺伝子発現、栄養素分泌、及び多分化能分化について細胞を特徴付ける。

【0022】

別の実施形態では、心臓血管疾患の診断及び予後評価、並びに医薬品開発の方法を提供し、この方法は、統計的に有意な個体集団から哺乳類内乳動脈由来細胞を単離する工程と、統計的に有意な個体集団からの哺乳類内乳動脈由来細胞を培養して増殖し、哺乳類内乳動脈由来細胞である複数の細胞培養物を確立する工程と、哺乳類内乳動脈由来細胞培養物を1つ以上の生物学的又は薬理的薬剤と接触させる工程と、1つ以上の生物学的又は薬理的薬剤に対する1つ以上の細胞応答を特定する工程と、統計的に有意な集団の個体からの哺乳類内乳動脈由来細胞培養物の1つ以上の細胞応答を比較する工程と、を含み、哺乳類内乳動脈由来細胞を用いて生物学的又は薬理的薬剤に対する細胞応答を特徴付ける。本発明の哺乳類内乳動脈由来細胞をインビトロで用いて、薬理的薬剤、成長/制御因子、及び抗炎症剤の有効性及び細胞障害性について様々な化合物をスクリーニングできる。このため、本発明の細胞又は上記組織培養物は、インビトロで維持され、試験される化

合物に曝露される。細胞障害性化合物の活性は、培養中の細胞の障害能又は死滅能により測定できる。これは生体染色技術により容易に評価できる。成長／制御因子の影響は、インビトロでの生細胞の数、例えば、総細胞数及び分化細胞数を解析することにより評価できる。種特異性細胞性抗原を確定する抗体を用いる免疫細胞化学的手技を利用するなど、標準的な細胞学的及び／又は組織学的手技を用いて達成できる。

【0023】

本発明の細胞及び組織は、生理学的又は病理学的状態の研究においてモデル系として使用できる。本発明の細胞及び組織はまた、サイトカイン、成長因子、例えば、炎症性メディエーター、例えば、IL-1、TNF、及びプロスタグランジンの作用機序の研究にも使用できる。加えて、細胞障害性及び／又は薬理学的薬剤は、特定の患者に最も有効なもの、例えば動脈硬化及びその他心臓血管病変を逆行させる、縮小する、又は予防するものとしてスクリーニングされ得る。続いて、インビトロでの有効性が立証される薬剤を、患者の治療の処置に用いることができた。

10

【0024】

別の実施形態では、iMACを、許容できるマトリックス、例えば製薬上許容できるマトリックスと共に投与してよい。マトリックスは生分解性であってよい。マトリックスは、細胞の成長及び分化を促進する更なる遺伝物質、サイトカイン、成長因子、又はその他因子を提供することもできる。投与前に細胞をカプセル化してもよい。カプセル化細胞は、ポリマーカプセル内に含まれてよい。本明細書に記載の担体デバイス、足場、又はマトリックスの調製に用いたポリマーは、生分解性かつ生体適合性である。生分解性ポリマーは、湿った体内組織にさらされると、容易に分解して小さなセグメントになる。セグメントは、次いで、体内に吸収されるか、又は体内を通過する。より具体的には、生分解されたセグメントは、セグメントの痕跡又は残留物が体内に永続的に保持されないように、体内に吸収されるか又は体内を通過するため、永続的な慢性の異物反応を誘発しない。哺乳類内乳動脈由来細胞数が増加したものを含む本発明の増殖した細胞調製物を用いて、組織工学デバイス、例えば人工血管又は他の心臓血管系デバイスを構築できる、細胞を、合成ポリマーの性質で構成される足場と組み合わせる、又は足場上に播種することができる。続いて、これらのデバイスを疾患状態の、又は損傷を受けた動物又はヒト患者に移植できる。血管新生、細胞生存、及び組織修復の促進を目的に、哺乳類内乳動脈由来細胞をデバイス内においても利用することができる。組織工学／器官再建の分野における重要な課題は、治療用デバイスの十分な血管新生化方法である。価値のある任意の構築物について、微小血管コンポーネントを含むように生成させなければならない。これら毛細血管は、構築物が十分に栄養素を供給し、適切にガス交換し、かつ老廃物を除去することを確実にするであろう。iMACは血管新生促進活性を有し、組織工学用途の価値を有することができる。

20

30

【0025】

遺伝子治療の別の用途では、薬剤耐性遺伝子を細胞内に導入することによって、正常な哺乳類内乳動脈由来細胞に薬剤耐性をもたらすことで、通常は危険であるとみなされる高濃度の薬剤の使用を可能にする。特に、抗ガン剤に対する薬剤耐性を有する遺伝子の導入、例えば、哺乳類内乳動脈由来細胞を含む増殖した細胞調製物への多剤耐性遺伝子の導入により、高濃度抗ガン剤を用いる治療の実施が可能である。標的タンパク質をコードする遺伝子を、好適なプロモーター制御下の哺乳類内乳動脈由来細胞に導入することにより、不足タンパク質を誘導し発現することもできる。タンパク質発現を制御し、インビボにおける天然の発現で得られるものと同じ活性を得ることができる。また、リボザイム、アンチセンス核酸など、又は別の好適な遺伝子をコードする遺伝子を哺乳類内乳動脈由来細胞に挿入し、細胞中の特定の遺伝子産物の発現を制御する、又は疾患に対する感受性を阻害することもできる。例えば、アンチセンス核酸又はリボザイムを発現するように哺乳類内乳動脈由来細胞を遺伝子修飾し、これにより標的器官におけるHIV、HTLV-I、及びHTLV-IIを含むが、これらに限定されない病原体の成長を抑制してよい。

40

【0026】

50

本発明は、哺乳類内乳動脈由来細胞を形成する可能性がある細胞の増殖、分化、又は生存に影響する薬剤を同定する方法を特徴とする。このような薬剤の例は、小分子、抗体、及び細胞外タンパク質である。同定された薬剤の特徴を確認し、動物における安全性及び有効性を評価できる。別の態様では、本発明は、哺乳類内乳動脈由来細胞を形成する可能性がある細胞の増殖、分化、又は生存に、これらの細胞を上記方法で同定した薬剤（１種又は複数種）と接触させることにより、影響を及ぼす方法について熟慮する。同定された薬剤を医薬品として処方できる。

【００２７】

分化した細胞が、免疫拒絶を回避するために治療される患者由来であることが好ましい。しかしながら、自己細胞がない場合、細胞が必要な栄養素及び酸素、並びに細胞が分泌する治療用因子に対して透過性であるが、液性免疫因子及び細胞に対して不透過性であるカプセル内に、分化した細胞を封入することが有用であり得る。好ましくは、カプセル材料は低アレルギー性であり、標的組織内に容易にかつ安定的に位置され、移植された構造物に更なる保護性を提供する。

10

【００２８】

免疫拒絶からの保護は、当該分野において既知の任意の方法に従って、分化した細胞の遺伝子修飾により提供されてもよい。米国特許第５，２８６，６３２号、同第５，３２０，９６２号、同第５，３４２，７６１号、並びに国際公開第１９９０／１１３５４号、同第１９９２／０３９１７号、同第１９９３／０４１６９号、及び同第１９９５／１７９１１号に開示されるような方法を用いて自己抗体及びＣＴＬ抵抗性細胞を産生できる。あるいは、耐性分化転換細胞の選択は、これら細胞を、自己抗体、又はＩＤＤ関連ＣＴＬ、又はＩＤＤ特異的自己抗原で活性化されたＣＴＬの存在下で培養することにより達成される。これらの手技の結果として、抗体又はＴリンパ球依存性機序による破壊抵抗性が増した細胞が生成される。本明細書で開示するように、このような細胞を適当な宿主の適当な組織に移植でき、自己免疫過程による破壊に対する抵抗性が増す。

20

【００２９】

同様に、分化した細胞のヒト白血球抗原（ＨＬＡ）特性を、任意に、分化した細胞を、選択された、正常で、同種リンパ球で、かつ生存している細胞に曝す繰り返しプロセスにより改変してよい。あるいは、部位特異的突然変異誘発の手法を用いて、分化した細胞、及び改変した分化した細胞の表面からＨＬＡマーカーを除き、これにより生成されたものを移植に必要なレシピエント哺乳類に移植する。

30

【００３０】

本発明の哺乳類内乳動脈由来細胞を凍結保存し、「細胞バンク」で維持又は保存してよい。本発明の細胞の凍結保存を、既知の方法に従って実施してよい。例えば、ただし制限する目的ではないが、「凍結培地」、例えば、０～９５パーセントのＦＢＳ、及び凍結保護剤である０～１０パーセントのジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を更に含む培地（５～１０パーセントのグリセロールを含む、又は含まない）中に、例えば、約 $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ 個／ミリリットルの細胞密度で、細胞を懸濁してよい。あるいは、グルコース、スクロース、マルトース、及びトレハロースを含むが、これらに限定されない炭水化物など、その他の凍結保護剤を使用できる。細胞をガラス製又はプラスチック製のアンプル又はその他容器に分注し、続いてこれを密封して、凍結速度制御フリーザーの冷凍室に移す。最適な凍結速度は、経験的に決定され得る。速度のプログラムが可能なフリーザーは、例えば、融解熱が使用できることから、 $-1 \sim -10^\circ\text{C}$ ／分の温度変化をもたらすことができる。アンプルが -180°C に達すると、液体窒素保管区域に移される。凍結保存された細胞は長期間保存できるが、少なくとも５年ごとに生存率の維持について確認しなくてはならない。凍結保存された本発明の細胞は細胞バンクを構成し、その一部を解凍することにより「引き出し」、必要に応じて用いることができる。一般には解凍は、例えばアンプルを液体窒素から 37°C の水浴に移すことで、迅速に行わなければならない。解凍されたアンプル内容物は、１０パーセントＦＢＳで調節したＤＭＥＭなど適当な培地を含む培養容器に、無菌状態で直ちに移さなくてはならない。あるいは、全内乳動脈、又は内乳動

40

50

脈の切断した部分若しくは切り刻んだ片を、同様に凍結保存してもよい。続いて、解凍された全動脈、動脈の一部、又は切り刻んだ動脈片から、哺乳類内乳動脈由来細胞を単離してよい。

【0031】

更なる実施形態では、本発明の哺乳類内乳動脈由来細胞をインビトロで培養し、条件培地又は細胞可溶化物を高収率で産生することができる。例えば、特定の対象とする生物由来物質（例えば、成長因子、制御因子、又はペプチドホルモン）を天然に産生するか、又は生物由来物質を産生するよう遺伝子改変されているかのいずれかであるような細胞は、例えば三次元細胞培養系を用いてクローン的に増殖できる。細胞が生物由来物質を栄養培地に排泄する場合、例えばいくつか例を挙げると、タンパク質分画沈殿法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、電気泳動、及びHPLCなどの標準的な分離技術を用いて、使用済みの培地又は条件培地からその物質を容易に単離できる。「バイオリアクター」を用いて、例えばインビトロ三次元培養物に栄養を与えるために流動法を利用することができる。本質的には、新しい培地が三次元培養物を通過するとき、生物由来物質が培養物から除去され、続いて上記のように流出物から単離できる。あるいは、対象とする生物由来物質は細胞内に留まることもでき、この場合、回収は細胞の溶解が必要となり得る。その後、任意の1つ以上の上記手技を用いて、生物由来物質を精製できる。

【実施例】

【0032】

（実施例1）

細胞単離の最適化

組織消化に必要な最適時間を決定するため、最初の実験を実施した。ヒト内乳動脈の一部5センチメートルを、National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA) から入手した。血液及び残屑を除去するために、動脈をトリミングして、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM-低グルコース, Invitrogen, Carlsbad, CA)、又はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, Invitrogen) で洗浄した。続いて、動脈全体を50ミリリットル容のコニカルチューブに移した。

【0033】

次いで、0.25ユニット／ミリリットルのコラゲナーゼ (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Germany) 及び2.5ユニット／ミリリットルのディスパーゼ (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis IN) を含む酵素混合物中において、様々な時間で組織を消化した。続いて、酵素混合物を内皮増殖培地-2 (EGM-2) (Lonza, Walkersville, MD) と混合した。組織、EGM-2、及び消化酵素を含むコニカルチューブを、225rpmで時間を増加させて (30、60、90、120、150分間)、軌道振とう器において37℃でインキュベートした。各時間の終了時点で、得られた消化された材料から細胞を単離した。続いて、部分的に消化された動脈を新しい酵素及びEGM-2の混合物を含む50mL容のコニカルチューブに移し、残りの時間37℃で更に消化した。各時間の終了時点で、得られた消化物を150×gで5分間遠心分離し、上清を吸引した。ペレットを20ミリリットルのEGM-2に再懸濁した。続いて、細胞懸濁液を70マイクロメートルのナイロンであるBD FALCON Cell strainer (BD Biosciences, San Jose, CA) を通して濾過した。次に濾液を、EGM-2 (全容積50ミリリットル) に再懸濁し、150×gで5分間遠心分離した。上清を吸引し、15ミリリットルの別の新しいEGM-2に細胞を再懸濁し、50µg/cm²のラット尾部タイプIコラーゲン (Inamed, Freemont, CA) でコーティングした組織培養用フラスコに蒔いた。次いでこの細胞を37℃、5% CO₂ で培養した。続いて増殖能を評価した。単離された細胞を、タイプIラット尾部コラーゲンをコーティングしたT75フラスコ上、EGM-2中において50

10

20

30

40

50

00個細胞/cm²で蒔き、5%二酸化炭素中37℃で培養した。細胞は3～5日ごとに継代された。各継代において、細胞をTrypleLE (Invitrogen)で回収してカウントし、Guava製の装置 (Guava Technologies、Hayward, CA)を用いて生存率を測定した。次に、集団倍加 $[\ln(\text{最終的に得られた細胞}/\text{蒔いた初期細胞数})/\ln 2]$ を計算した。

【0034】

データは、動脈を順次消化することにより、細胞が内乳動脈から単離されたことを示した。30分又は60分の時間のものから得られた細胞の成長は不十分であった (図6)。90分の時間のものから単離された細胞は、最大の増殖能を有していることを示した。したがって、動脈の外部残屑及び内膜層の除去には、動脈を最初に約60分間消化することが必要であると決定した。増殖能を最大に有する細胞を得るためには、最初の60分間の消化後、続いて動脈を新しい酵素混合物に移し、追加の30～60分間更に消化することを必要とする。この連続消化法により、動脈の内膜層由来の任意の細胞、及び動脈の摘出後に残った任意の外部残屑由来の細胞を排除すると同時に、動脈の外膜/内側層内に位置する細胞の単離を可能にする。

【0035】

(実施例2)

ヒト内乳動脈由来細胞の単離

次に、最適消化時間 (実施例1に記載)を適用して内乳動脈由来細胞を単離した。ヒト内乳動脈の一部5センチメートルを、National Disease Research Interchange (NDRI、Philadelphia, PA)から入手した。血液及び残屑を除去するために、動脈をトリミングして、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM-低グルコース、Invitrogen、Carlsbad, CA)、又はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、Invitrogen)で洗浄した。続いて、動脈全体を50ミリリットル容のコニカルチューブに移した。

【0036】

次いで、0.25ユニット/ミリリットルのコラゲナーゼ (Serva Electrophoresis、Heidelberg, Germany)及び2.5ユニット/ミリリットルのディスペーゼ (Roche Diagnostics Corporation、Indianapolis IN)を含む酵素混合物中において組織を消化した。次に、酵素混合物をiMAC増殖培地 (Advanced DMEM/F12 (Gibco)、L-グルタミン (Gibco)、ペニシリン (50ユニット/ミリリットル)及びストレプトマイシン (50µg/mL、Gibco)、10%ウシ胎児血清 (FBS)を含む)と混合した。組織、iMAC増殖培地及び消化酵素を含有するコニカルチューブを、225rpmで1時間、軌道振とう器にて37℃でインキュベートした。続いて、部分的に消化された動脈を新しい酵素及びiMAC増殖培地の混合物を含む50mL容のコニカルチューブに移し、37℃で1時間更に消化した。次に、消化した動脈を50mL容のコニカルチューブから除去し、廃棄した。次に、得られた消化物を150×gで5分間遠心分離し、上清を吸引した。ペレットを20ミリリットルのiMAC増殖培地に再懸濁した。続いて、細胞懸濁液を70マイクロメートルのナイロンであるBD FALCON Cell strainer (BD Biosciences、San Jose, CA)を通して濾過した。次に濾液を、iMAC増殖培地 (全容積50ミリリットル)に再懸濁し、150×gで5分間遠心分離した。上清を吸引し、15ミリリットルの別の新しいiMAC増殖培地に細胞を再懸濁し、50µg/cm²のラット尾部タイプIコラーゲン (Inamed、Freemont, CA)でコーティングした組織培養用フラスコに蒔いた。次いでこの細胞を37℃、5% CO₂で培養した。細胞を2～10回継代して培養し、次に、標準的な凍結保存法を用いて、凍結保護剤溶液 (DMEM/F12、10% FBS)中1～2e⁶個/mLの細胞数で凍結保存した (cryopreserved)。

【0037】

(実施例3)

ヒト内乳動脈由来細胞の形態

実施例 2 に記載されるように単離された新しい iMAC を、タイプ I ラット尾部コラーゲンをコーティングした T75 フラスコ上、iMAC 増殖培地中において 5000 個細胞 / cm^2 で蒔き、5% 二酸化炭素中 37℃ で培養した。細胞は 3~5 日ごとに継代された。各継代において、細胞を Tryple LE (Gibco) で回収してカウントし、Guava 製の装置 (Guava Technologies, Hayward, CA) を用いて生存率を測定した。形態的評価には、iMAC を光学顕微鏡で評価し、細胞の形態的特徴を Nikon 製の顕微鏡及び LCD デジタルカメラを用いて観察した。

【0038】

iMAC を光学顕微鏡で評価し、細胞の形態的特徴を Nikon 製の顕微鏡及び LCD デジタルカメラを用いて観察した (図 1)。iMAC の培養では、一貫して繊維芽細胞形態を示した。形態は、後期継代数 (継代数 23) において安定していた。

10

【0039】

(実施例 4)

ヒト内乳動脈由来細胞の増殖能

実施例 2 に記載されるように単離された新しい iMAC を、タイプ I ラット尾部コラーゲンをコーティングした T75 フラスコ上、iMAC 増殖培地中において 5000 個細胞 / cm^2 で蒔き、5% 二酸化炭素中 37℃ で培養した。細胞は 3~5 日ごとに継代された。各継代において、細胞を Tryple LE (Gibco) で回収してカウントし、Guava 製の装置 (Guava Technologies, Hayward, CA) を用いて生存率を測定した。次に、集団倍加 $[\ln(\text{最終的に得られた細胞} / \text{蒔いた初期細胞数}) / \ln 2]$ を計算した。培養中の増殖能について iMAC 培養物を分析した (図 2、表 1)。細胞集団を、老化に至るまで数か月間連続的に継代した。試験期間中に、細胞が 1 回超の集団倍加を達成できなかったとき、老化と判定した。培養 86 日間後、データは、コラーゲンをコーティングしたフラスコ上で iMAC 増殖培地において増殖した iMAC は、少なくとも継代数 25 回、かつ 41.9 回の集団倍加に達するまで、増殖できることを示す。平均倍加時間は 48 時間 / 倍加であり、 1.0×10^8 個を超える細胞を 1 つの 5 cm 長の内乳動脈から得ることができた。

20

【表 1】

継代数	0	1	2	3	4	5	6
蒔かれた細胞数	nd	4.13E+05	2.73E+05	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	3.75E+05
回収された細胞数	4.13E+05	2.73E+05	1.06E+06	2.15E+06	3.66E+06	5.89E+06	1.01E+06
生存率	96%	97%	98%	99%	98%	99%	99%
日	0	4	2	2	5	3	3
倍加数	nd	-0.6	2.0	1.1	1.9	2.6	1.4
累積回数	0	4	6	8	13	16	19
累積倍加数	0.0	-0.6	2.0	3.1	5.0	7.6	9.0

継代数	7	8	9	10	11	12	13
蒔かれた細胞数	3.75E+05	3.75E+05	3.75E+05	3.75E+05	3.75E+05	3.75E+05	3.75E+05
回収された細胞数	1.07E+06	8.87E+05	1.10E+06	7.49E+05	1.21E+06	1.22E+06	1.30E+06
生存率	100%	98%	98%	97%	99%	99%	97%
日	3	3	3	4	3	4	3
倍加数	1.5	1.2	1.6	1.0	1.7	1.7	1.8
累積倍加数	22	25	28	32	35	39	42
累積倍加数	10.4	11.7	13.2	14.2	15.9	17.6	19.4

継代数	14	15	16	17	18	19	20
蒔かれた細胞数	3.75E+05	3.75E+05	3.75E+05	3.75E+05	3.75E+05	3.75E+05	3.75E+05
回収された細胞数	1.29E+06	8.78E+05	1.67E+06	1.52E+06	2.72E+06	1.12E+06	2.11E+06
生存率	98%	98%	100%	100%	98%	98%	95%
日	4	3	4	3	5	3	6
倍加数	1.8	1.2	2.2	2.0	2.9	1.6	2.5
累積倍加数	46	49	53	56	61	64	70
累積倍加数	21.2	22.4	24.6	26.6	29.5	31.0	33.5

継代数	21	22	23	24	25
蒔かれた細胞数	1.00E+06	3.75E+05	3.75E+05	3.75E+05	3.75E+05
回収された細胞数	6.76E+06	1.85E+06	9.80E+05	7.78E+05	6.61E+05
生存率	97%	99%	97%	96%	96%
日	4	3	4	3	3
倍加数	2.8	2.3	1.4	1.1	0.8
累積倍加数	74	77	80	83	86
累積倍加数	36.3	38.6	40.0	41.1	41.9

表 1：成長速度。コラーゲンをコーティングしたフラスコで iMAC を 81 日間培養した。3～5 日ごとに細胞を回収してカウントし、集団倍加及び生存率を決定した。

【0040】

(実施例 5)

ヒト内乳動脈由来細胞のインビトロ毛細血管形成

毛細血管形成には、実施例 2 に記載されるように単離された継代数 7 の凍結保存 iMAC を解凍し、マトリゲルをコーティングした 24 ウェルプレート (BD Matrigel Matrix Cellware、BD Biosciences) 上に 5000 個細胞/cm² で播種し、iMAC 増殖培地、内皮増殖培地-2 (Lonza)、又は平滑筋分化培地 (Lonza) 中において、37℃、5%二酸化炭素中で 3 日間培養した。培養 1～5 日後、毛細血管の伸長を光学顕微鏡で評価した。

【0041】

図 4 は、iMAC 増殖培地又は内皮増殖培地-2 内マトリゲル上で培養された iMAC が、毛細血管様構造体の密なネットワークに分化したことを示す。iMAC は、平滑筋細胞分化培地中では分化しなかった。また、ヒト胸動脈由来内皮細胞 (Cell Applications, Inc.、San Diego, CA) もマトリゲルをコーティングしたプレート上で培養した。これらの細胞は、毛細血管様構造体に分化せず、毛細血管分化は iMAC に特有であることを示した。

【0042】

(実施例 6)

ヒト内乳動脈由来細胞の脂肪生成

脂肪生成分化には、実施例 2 に記載されるように単離された継代数 7 の凍結保存 (cryopreserved) iMAC を解凍し、非コーティングの、又はタイプ I ラット尾部コラーゲンをコーティングした 12 ウェルプレート上に 5000 個細胞/cm² で蒔き、iMAC 増殖

10

20

30

40

50

培地中において、37℃、5%二酸化炭素中で培養した。細胞がほぼコンフルエンスに達したとき、iMAC増殖培地を脂肪生成誘導培地(Lonza)に交換し、2~4日ごとに培地を交換しながら更に15~20日間培養した。脂肪生成分化の程度を判定するため、細胞を10%ホルマリンで固定してOil-Red-O(Sigma)で染色し、誘導5日後、10日後、及び15日後に画像を取得した。

【0043】

iMACの培養物は、著しい脂肪細胞分化を示した。図5は、脂肪生成誘導培地で培養されたiMACが、Oil-Red-O染色が陽性の細胞を多く産生することを示す。誘導5日後、Oil-Red-O陽性細胞は少数しか存在しない。しかし10日後、Oil-Red-O陽性細胞数が増加した。15日間後、培養中のほとんどの細胞が、脂肪細胞

10

【0044】

(実施例7)

ヒト内乳動脈由来細胞の表面マーカーの表現型

実施例2に記載されるように新たに単離されたiMACについて、フローサイトメトリー分析を実施した。タイプIコラーゲンをコーティングしたT75フラスコ上、37℃及び5%二酸化炭素において、細胞を継代数7まで増殖培地中で増殖した。接着性細胞をPBSで洗浄し、TrypLE(Gibco)で剥離した。細胞を回収して遠心分離し、 1×10^7 個細胞/mLの濃度で、3%(v/v) FBS/PBSに再懸濁した。各特異抗体を100マイクロリットルの細胞懸濁液に加え、混合液を暗所において、4℃で30~60分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をPBSで洗浄し、遠心分離して過剰の抗体を除去した。細胞を、300マイクロリットルのPBSに再懸濁し、フローサイトメトリーで分析した。フローサイトメトリー分析は、Guava製の装置で実施した。用いた抗体を表2に示す。

20

表2：iMAC細胞表面マーカーの特徴分析に用いた抗体。

【表 2】

抗体	製造業者	カタログ番号
CD34	BD Pharmingen	555821
CD44	BD Pharmingen	555478
CD45R	BD Pharmingen	555489
CD117	BD Pharmingen	340529
CD141	BD Pharmingen	559781
CD31	BD Pharmingen	555446
CD133	Miltenyi Biotech	120-001-243
SSEA4	R&D Systems	FAB1435P
CD105	SantaCruz Biotech	SC-21787
CD104	BD Pharmingen	555720
CD166	BD Pharmingen	559263
CD29	BD Pharmingen	555442
IgG-FITC	BD Pharmingen	555748
IgG-PE	BD Pharmingen	555749
CD34	BD Pharmingen	555821
CD44	BD Pharmingen	555478
CD45R	BD Pharmingen	555489
CD117	BD Pharmingen	340529
CD141	BD Pharmingen	559781
CD31	BD Pharmingen	555446
CD49c	BD Pharmingen	556025
CD73	BD Pharmingen	550257
CD90	BD Pharmingen	555596
HLA-I	BD Pharmingen	555553
HLA-II	BD Pharmingen	555558
CD133	Miltenyi Biotech	120-001-243
SSEA4	R&D Systems	FAB1435P
CD105	SantaCruz Biotech	SC-21787
CD104	BD Pharmingen	555720
CD166	BD Pharmingen	559263
CD29	BD Pharmingen	555442
CD24	BD Pharmingen	555428
CD56	AbCAM	MEM188
CD138	BD Pharmingen	550805
E-カドヘリン	BD Pharmingen	612130
IgG-FITC	BD Pharmingen	555748
IgG-PE	BD Pharmingen	555749

表 3 :

iMAC の特徴をフローサイトメトリーで分析した (表 3)。継代数 7 の iMAC 培養物は、CD 29、CD 44、CD 73、CD 166、及び HLA-1 に染色陽性であり、CD 10、CD 15、CD 23、CD 24、CD 31、CD 34、CD 45、CD 62p、CD 80、CD 86、CD 104、CD 105、CD 117、CD 133、CD 138、CD 141、VE-カドヘリン、KDR/Flk-1、及び HLA-2 に染色陰性であ

10

20

30

40

50

った。表3は、観察されたiMAC表面マーカーの表現型を既知の細胞型の表面マーカーの表現型と比較している。

【表3】

セルの種類	抗体	細胞型発現	iMAC発現
内皮(Endothelial)前駆細胞	CD34	陽性	陰性
	CD133	陽性	陰性
	CD45	陽性	陰性
内皮細胞	VEカドヘリン	陽性	陰性
	KDR/FIk1	陽性	陰性
	CD31	陽性	陰性
	CD104	陽性	陰性
平滑筋細胞	CD141	陽性	陰性
間葉系幹細胞	CD10	陽性	陰性
	CD29	陽性	陽性
	CD44	陽性	陽性
	CD73	陽性	陽性
	CD105	陽性	陰性
	CD166	陽性	陽性
その他	CD15	陽性	陰性
	CD23	陽性	陰性
	CD24	陽性	陰性
	CD62p	陽性	陰性
	CD73	陽性	陽性
	CD80	陽性	陰性
	CD86	陽性	陰性
	CD117	陽性	陰性
	CD138	陽性	陰性
	HLA 1	陽性	陽性
	HLA 2	陽性	陰性

表3：細胞表面マーカーの表現型。表1に記載の抗体を用いて、フローサイトメトリーによりiMACの特徴を確認した。特定の細胞型の既知の表面マーカーに従ってマーカーを構築した（細胞型）。特定の細胞型により発現される表面マーカー（細胞型発現）。検査した表面マーカーを発現するiMAC（陽性）。検査抗体の染色特性を陰性対照の抗体染色と比較して、染色陽性を決定した。75%を超える細胞の染色を陽性とみなした。検査した表面マーカーを発現しないiMAC（陰性）。陰性対照抗体と比較して25%未満の細胞が陽性の場合、染色を陰性とみなした。

【0045】

（実施例8）

ヒト内乳動脈由来細胞の遺伝子発現

実施例2に記載されるように単離された細胞を、タイプIコラーゲンをコーティングしたT75フラスコ上、iMAC増殖培地中において5000個細胞/cm²で蒔き、5%二酸化炭素中37℃で培養した。細胞は3～5日ごとに継代された。RNA抽出キット（Qiagen、Valencia, CA）を製造業者による取扱説明書に沿って用い、継代数10のほぼコンフルエントの培養物をフラスコ内で直接溶解した。次に、総RNAを抽出し、Human Angiogenesis Oligo Arrays（SA Biosciences、Frederick, MD）及びAffymetrix Human Exon ST1.0マイクロアレイを製造業者による取扱説明書に沿って用い、遺伝子発現を評価した。

【0046】

オリゴマーハイブリダイゼーションアレイを用いて、iMACの遺伝子発現特性の特徴

を確認した。データは、iMACが、118種の検査した脈管形成関連遺伝子のうち19種、例えばCD13、ケモカインリガンド2、エフリンA2、エフリンA3、エンドグリン、内皮細胞PASドメインタンパク質1、繊維芽細胞成長因子-2、繊維芽細胞成長因子受容体-3、低酸素誘導因子-1、マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalenoprotinase) -2、ニューロピリン-1、胎盤成長因子、ウロキナーゼ、トロンボスポンジン-2、TIMP阻害物質-1、TIMP阻害物質-3、TNF-12a、トロポニンTタイプ-1、VEGF-B、及びVEGF-Cを発現することを示す。

【0047】

加えて、iMACの培養物を、Affymetrix Human Exon 1.0マイクロアレイを用いるマイクロアレイ分析により評価した。表4は、発現が多い転写物トップ500を示す。発達に関連する遺伝子のいくつか、例えば、tripartiteモチーフ含有33 (TRIM33)、SRY (性決定領域Y) -ボックス11 (SOX-11)、Notchホモログ2 (ドロソフィラ) (NOTCH-2)、システインリッチ膜貫通型BMP制御因子1 (CRIM-1)、ホメオボックスD9 (HOXD9) 及びPOUクラス3ホメオボックス3 (POU3F3) が高く発現している (表5)。

【表4】

UniGene	説明
Hs. 311640	リボソームタンパク質S27a
Hs. 525622	V-aktマウス胸腺腫ウイルス性癌遺伝子ホモログ1
Hs. 1239	アラニン(膜)アミノペプチダーゼ、CD13
Hs. 303649	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド2
Hs. 532655	Ephrin-A2
Hs. 516656	Ephrin-A3
Hs. 76753	エンドグリン (Osler-Rendu-Weber症候群1)
Hs. 468410	内皮細胞PASドメインタンパク質1
Hs. 284244	線維芽細胞増殖因子2 (塩基性)
Hs. 1420	繊維芽細胞成長因子受容体3
Hs. 509554	低酸素誘導因子1
Hs. 512234	インターロイキン6 (インターフェロン、 β 2)
Hs. 479756	キナーゼ挿入ドメイン受容体
Hs. 513617	マトリックスメタロペプチダーゼ2
Hs. 131704	ニューロピリン1
Hs. 252820	胎盤成長因子
Hs. 77274	プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼ
Hs. 371147	トロンボスポンジン2
Hs. 522632	TIMPメタロペプチダーゼ阻害物質1
Hs. 652397	TIMPメタロペプチダーゼ阻害物質3
Hs. 355899	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー12A
Hs. 631558	トロポニンTタイプ1 (骨格筋型、遅筋型)
Hs. 78781	血管内皮増殖因子B
Hs. 435215	血管内皮増殖因子C

表4：脈管形成関連遺伝子の発現。iMACの培養物をオリゴマーハイブリダイゼーションアレイで評価し、続いて製造業者が提供するソフトウェアを用いて評価した。全体的なバックグラウンド値を得てから、同定されたハイブリダイゼーションシグナルから得られた値から差し引いた。ここに示す遺伝子は、バックグラウンド値を超えるレベルでiMACが発現するものである。

【表 5】

プローブ セットID	サンプル1	サンプル2	サンプル3	遺伝子略号	mRNA-受入番号	平均	STD DEV
2429144	14. 42	14. 47	14. 51	TRIM33	NM_015906	14. 5	0. 05
2467968	13. 90	13. 90	14. 10	SOX11	NM_003108	14. 0	0. 11
2431202	13. 57	13. 63	13. 66	NOTCH2	NM_024408	13. 6	0. 05
2477142	13. 19	13. 25	13. 18	CRIM1	NM_016441	13. 2	0. 04
2516866	12. 80	12. 91	12. 91	HOXD9	NM_014213	12. 9	0. 07
2497821	12. 41	12. 59	12. 37	POU3F3	NM_006236	12. 5	0. 12

表 5：マイクロアレイ遺伝子発現分析継代数 10 の iMAC 培養物を、Affymetrix microarray Exon ST1.0 マイクロアレイを用いて評価した。最も発現が多い 500 個の遺伝子を示す。iMAC を 3 回測定し（サンプル 1、サンプル 2、サンプル 3）、相対遺伝子発現を蛍光強度ユニットで表す。全体的な非特異性バックグラウンド蛍光を、各特定のハイブリダイゼーションシグナルから差し引いた。3 回の測定の平均蛍光強度（平均）。標準偏差（Std Dev）。

【0048】

（実施例 9）

ヒト内乳動脈由来細胞の栄養素分析

実施例 2 に記載されるように単離された新しい iMAC を継代数 7 まで培養し、次にタイプ I コラーゲンをコーティングした 6 ウェルプレート上に、iMAC 増殖培地において 5000 個細胞/cm² で播種し、37℃及び 5% 二酸化炭素で培養した。続いて、使用済みの培地を無血清培地（DMEM-低グルコース（Gibco）、ペニシリン（50 ユニット/ミリリットル）及びストレプトマイシン（50 µg/mL））に交換し、更に 20 時間培養した。無血清の条件培地を 14,000×g で 5 分間遠心分離することにより回収し、-20℃で保管した。続いて、HumanMAP v1.6 Immunoplex Immunoassay（Rules-Based Medicine、Austin, TX）を用いてサンプルを分析した。3つの別々の iMAC 培養物について栄養素分析を実施し、無血清の無条件培地で得られた値で標準化した。

【0049】

iMAC 培養物について、90 種の異なる成長因子及びサイトカインの分泌を分析した（表 6、表 7）。結果は、iMAC が、増加したレベルの β2 ミクログロブリン、癌抗原 19-9、クレアチンキナーゼ-MB、ENA-78、エンドセリン-1、エオタキシン、脂肪酸結合タンパク質、フェリチン、塩基性 FGF、インターロイキン-6、インターロイキン-8、インスリン、MCP-1、PAI-1、幹細胞因子、TIMP-1、VCAM-1 及び VEGF を分泌することを示す。iMAC は、フォンウィルブランド因子を分泌しない。

【表 6】

検体	α -1抗トリプシン	アチロネクチン	α -2マクログロブリン	α -フエタンタンパク質	アポリポタンパク質A1	アポリポタンパク質CIII	アポリポタンパク質H	β -2ミクログロブリン	脳由来神経栄養因子	検体3
単位	mg/mL	ug/mL	mg/mL	ng/mL	mg/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ng/mL	mg/mL
最低検出濃度	5.3E-08	0.0010	0.00030	0.086	3.3E-08	1.4E-05	4.4E-05	6.6E-05	0.0059	2.6E-08
iMAC 1	8.4E-07	9.4E-03	5.7E-04	2.2E+00	4.7E-07	4.2E-04	1.2E-03	2.7E-01	2.3E-02	9.3E-05
iMAC 2	2.5E-06	2.4E-02	1.9E-03	5.1E+00	1.4E-06	9.9E-04	3.1E-03	6.4E-01	1.0E-01	2.5E-04
iMAC 3	3.3E-07	5.0E-03	4.8E-04	9.4E-01	2.8E-07	2.6E-04	5.8E-04	1.4E-01	1.4E-02	4.5E-05
細胞なし対照	4.6E-08	0.00051	4.3E-05	0.18	3.7E-08	1.6E-05	0.00016	0.00043	nd	1.1E-07
検体	癌抗原125	癌抗原19-9	カルシトニン	CD40	CD40リガンド	癌胎児性抗原	クレアチンキナーゼ-MB	C反応性タンパク質	EGF	ENA-78
単位	U/mL	U/mL	pg/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ug/mL	pg/mL	ng/mL
最低検出濃度	0.84	0.049	1.2	0.0042	0.0040	0.17	0.084	7.7E-06	1.5	0.015
iMAC 1	1.6E+01	6.3E+00	6.8E+00	nd	Nd	2.1E-01	1.1E+00	nd	1.3E+01	3.0E-01
iMAC 2	6.0E+01	1.7E+01	1.7E+01	nd	Nd	5.3E-01	3.5E+00	5.8E-05	5.2E+01	7.3E-01
iMAC 3	nd	3.7E+00	3.2E+00	nd	5.2E-03	9.7E-02	4.8E-01	nd	1.0E+01	1.2E-01
細胞なし対照	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	0.0079	nd	nd	0.0034
検体	エンドセリン-1	EN-RAGE	エオタキシン	エリスロポエチン	脂肪細胞結合タンパク質	因子VII	フェリチン	FGF塩基性	フィブリノゲン	G-CSF
単位	pg/mL	ng/mL	pg/mL	pg/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	pg/mL	mg/mL	pg/mL
最低検出濃度	1.4	0.0050	8.2	33	0.60	0.20	0.0070	20	4.9E-08	1.0
iMAC 1	5.9E+01	nd	3.9E+03	nd	1.3E+01	nd	5.6E+00	1.1E+03	nd	nd
iMAC 2	1.6E+02	nd	1.2E+04	nd	3.0E+01	nd	1.4E+01	3.3E+03	6.1E-07	nd
iMAC 3	3.6E+01	nd	2.6E+03	nd	5.5E+00	nd	3.0E+00	7.2E+02	nd	nd
細胞なし対照	2.6	nd	3.7	nd	Nd	nd	0.014	11	nd	nd

表 6：栄養素の分泌特性。iMAC 培養物由来の無血清培地を、成長因子及びサイトカイン分泌について評価した。3つの別々の培養物（iMAC 1、iMAC 2、iMAC 3）により示される因子の量を細胞数で基準化し、20時間あたりの細胞100万個あたり分泌された因子の量として表した。アッセイ検出限界（最低検出濃度）。無条件培地（細胞なし対照）。

10

20

30

【表 7】

検体	成長ホルモン	GM-CSF	グルタチオン S-トランスフェラーゼ	ハプトグロビン	ICAM-1	IFN- γ	IgA	IgE	IGF-1	IgM
単位	ng/mL	pg/mL	ng/mL	mg/mL	ng/mL	pg/mL	mg/mL	ng/mL	ng/mL	mg/mL
最低検出濃度	0.027	11	0.081	1.3E-06	0.63	0.92	4.2E-08	2.8	0.80	7.6E-08
iMAC 1	nd	4.9E+01	7.5E-01	2.9E-06	3.7E+00	nd	2.1E-06	1.2E+00	nd	nd
iMAC 2	nd	1.3E+02	1.2E+00	7.0E-06	8.1E+00	nd	4.9E-05	nd	nd	nd
iMAC 3	6.5E-02	1.5E+01	2.2E-01	1.4E-06	1.6E+00	nd	8.3E-06	5.6E-01	nd	3.4E-07
細胞なし対照	nd	2.6	nd	3.5E-07	0.14	nd	3.0E-06	nd	6.1	nd
検体	IL-10	IL-12p40	IL-12p70	IL-13	IL-15	IL-16	IL-18	IL-1 α	IL-1 β	IL-1ra
単位	pg/mL	ng/mL	pg/mL	pg/mL	ng/mL	pg/mL	pg/mL	ng/mL	pg/mL	pg/mL
最低検出濃度	3.1	0.24	19	11	0.26	13	11	0.00050	0.29	3.0
iMAC 1	3.1E+01	6.8E-01	1.6E+02	8.2E+01	1.8E+00	nd	3.0E+01	1.1E-02	8.9E-01	nd
iMAC 2	6.4E+01	8.5E-01	4.5E+02	2.0E+02	4.2E+00	nd	5.5E+01	2.8E-02	3.7E+00	nd
iMAC 3	1.4E+01	2.7E-01	6.5E+01	3.8E+01	8.2E-01	nd	1.0E+01	nd	4.1E-01	nd
細胞なし対照	3.0	0.046	17	8.0	0.15	nd	nd	0.00079	nd	7.6
検体	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	インスリン	レプチン	リポタンパク質 _(a)
単位	pg/mL	ng/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	uIU/mL	ng/mL	ug/mL
最低検出濃度	12	0.035	21	6.5	2.4	11	0.70	0.17	0.021	0.019
iMAC 1	1.8E+01	6.0E-02	1.3E+02	nd	1.8E+04	1.8E+02	4.0E+02	2.4E+04	1.6E-01	8.6E-04
iMAC 2	nd	nd	3.0E+02	nd	6.3E+04	4.7E+02	1.4E+03	5.1E+04	2.1E-01	2.2E-03
iMAC 3	nd	nd	3.8E+01	nd	8.1E+03	9.9E+01	1.7E+02	8.0E+03	6.6E-02	5.0E-04
細胞なし対照	nd	nd	15	nd	Nd	18	0.37	0.32	nd	nd

表 6：栄養素の分泌特性（続き）。iMAC 培養物由来の無血清培地を、成長因子及びサイトカイン分泌について評価した。3つの別々の培養物（iMAC 1、iMAC 2、iMAC 3）により示される因子の量を細胞数で基準化し、20時間あたりの細胞100万個あたり分泌された因子の量として表した。アッセイ検出限界（最低検出濃度）。無条件培地（細胞なし対照）。

10

20

30

【表 8】

分泌タンパク質
β 2ミクログロブリン
癌抗原19-9
クレアチンキナーゼ-MB
ENA-78
エンドセリン-1
エオタキシン
脂肪酸結合タンパク質
フェリチン
FGF塩基性
IL-6
IL-8
インスリン
MCP-1
PAI-1
幹細胞因子
TIMP-1
VCAM-1
VEGF

10

20

表7：分泌された因子。iMAC培養物由来の無血清培地を、成長因子及びサイトカイン分泌について評価した。分泌されたタンパク質を示す。これらは、細胞なし対照である無条件培地及びアッセイ検出限界値を超える量で分泌された因子である。

30

【0050】

(実施例10)

ヒト内乳動脈由来細胞のインビボ脈管形成活性

組織工学／器官再建の分野における重要な課題は、治療用デバイスの十分な血管新生化方法である。価値のある任意の構築物について、微小血管コンポーネントを含むように生成させなければならない。これら毛細血管は、構築物が十分に栄養素を供給し、適切にガス交換し、かつ老廃物を除去することを確実にするであろう。血管新生を亢進する細胞の同定は大きな価値がある。

【0051】

40

我々は最近、ヒト内乳動脈と称する内乳動脈由来細胞から細胞を単離した。これらの細胞は、重要な血管新生促進特性を有し得る。この実験では、マトリゲル脈管形成アッセイを用いて、iMACの血管新生促進活性を評価した。マトリゲル脈管形成アッセイは、脈管形成に関するインビボ試験を含む多くの試験で最適な方法となっている。このアッセイでは、脈管形成誘発化合物、例えばbFGFをマトリゲル冷溶液に導入する。続いて、皮下投与後、マトリゲル溶液は凝固し、脈管化を誘発する宿主細胞による後続侵入を可能にする。マトリゲルプラグ内での血管新生反応の評価は、選択した切片での血管の視認性を強め、かつ血管密度の判定を可能にするために染色された組織学的プレパラートを検査することで達成される。

50

【表 9】

群番号	動物の数	移植数	試験材料
1	3	6	マトリゲルのみ
2	3	6	マトリゲル+iMAC
3	3	6	マトリゲル+bFGF

表 8：実験デザイン

【0052】

移植日に、継代数 7 の iMAC（実施例 2 に記載されるように調製される）を 37℃ で解凍し、サブコンフルエントまで培養して回収し、リン酸緩衝生理食塩水（Ca²⁺、Mg²⁺ を含まない）に再懸濁した。約 400 mL の氷冷した成長因子低減マトリゲルマトリックス（Gibco カタログ番号 12760-021）を、 1×10^6 の iMAC を含む PBS 100 μ L と予備混合する。加えて、50 ng/mL の塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF）を含有するマトリゲルを陽性対照として検査し、細胞負荷マトリゲルである試験物質と同様の方法で調製した。マトリゲルで希釈した細胞又は bFGF を、移植時間まで氷水上に保持した。SCID マウスの取り扱いは全て、フード下で実施しなくてはならない。マウスの体重をそれぞれ測定し、吸入麻酔（5.0% イソフルラン）を用いるチャンバ導入手技により導入し、手術中は、動物を 1.5～2.5% 濃度のイソフルランで維持した。麻酔導入後、電動動物用バリカンを用いて、動物の背側頸部から背側腰部までの背部全体の毛刈りをした。その後、その部位をクロルヘキシジンジアセテートでこすり洗いし、アルコールですすいで乾燥し、有効ヨウ素 1% の水性ヨードフォア溶液を塗布した。眼科用軟膏を目に塗布し、麻酔時間中の組織の乾燥を予防した。麻酔をかけ、手術準備ができた動物を所望の横臥位に置いた。500 μ L のマトリゲル中細胞懸濁液を、23 G 針を用いてマウスの右側及び左側背部表面に皮下注射した。

【0053】

移植 10 日後に、マトリゲル足場内の毛細血管密度を組織学的に評価した。試験期間中に死亡した、又は瀕死状態で安楽死させた任意の動物について、肉眼的検査を実施した。指定の期間において、マウスを CO₂ 吸入により安楽死させた。移植部位の肉眼的観察を記録した。皮下移植部位を上部の皮膚と共に摘出した。皮下移植部位を上部の皮膚と共に二等分出した。組織の半分を、パラフィン包埋用に 10% 緩衝化ホルマリン固定液に保存した。固定した標本を、組織学的処理のために Paragon Bioservices（Baltimore MD）に送った。組織切片を作成し、H&E で染色した。更に、ヒト特定抗ビメンチン抗体（Dako）及び抗フォンビルブランド因子抗体で切片を染色した。毛細血管密度／成長中細胞を、Paragon の技術者によって盲検的に定量化した。簡潔に言えば、各マトリゲル移植体について 5 枚の画像を得た。続いて、マトリゲル中の予め設定したフレームの総面積に対する、新たに形成された細胞／毛細血管で占められた面積の割合を決定した（表 9）。

【0054】

全マトリゲル外植片について、細胞充実性の程度を決定した。図 5 及び表 9 に示すように、第 1 群内のマトリゲルのみの移植体では、確認される細胞又は毛細血管はほとんどなかった（総マトリゲル面積の 4%）。しかし第 1 群と比較して、iMAC 播種マトリゲルは、細胞浸潤及び毛細血管形成を刺激した。細胞及び毛細血管は、iMAC 播種マトリゲル移植体の 11% ± 2% を占めた。細胞及び毛細血管は、bFGF 陽性対照マトリゲル移植体の 7% ± 1.9% を占めた。

【0055】

このデータは、iMAC が細胞浸潤を促進し、マトリゲル足場内の脈管形成及び微小血管系形成を刺激することを示す。したがって、血管新生及び移植可能な生物学的デバイスの全般生存率を亢進する手段を提供することにより、これらの細胞は組織工学／器官再建

用途に価値があり得る。

【表 10】

		視野1	視野2	視野3	視野4	視野5	平均	全体平均	SEM
第1群	動物1左	0.06	0.06	0.03	NA	NA	0.05		
	動物1右	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
	動物2左	0.1	0.02	0.05	0.03	0.08	0.06		
	動物2右	0.01	0.01	0.01	0.02	0.06	0.02		
	動物3左	0.04	0.09	0.05	0.04	0.02	0.05		
	動物3右	0	0	0	0	0	0.00	0.04	0.0106
第2群	動物4左	0.15	0.16	0.16	0.18	0.13	0.16		
	動物4右	0.12	0.11	0.11	NA	NA	0.11		
	動物5左	0.06	0.09	0.07	0.08	0.13	0.09		
	動物5右	0.1	0.06	0.06	0.05	0.09	0.07		
	動物6左	0.18	0.21	0.18	0.24	0.19	0.20		
	動物6右	0.06	0.04	0.04	0.07	0.06	0.05	0.11	0.0226
第3群	動物10左	0.04	0.17	0.02	0.07	0.02	0.06		
	動物10右	0.04	0.08	0.08	0.1	0.1	0.08		
	動物11左	0.07	0.1	0.2	0.18	NA	0.14		
	動物11右	0.03	0.04	0.07	0.07	0.05	0.05		
	動物12左	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
	動物12右	0.02	0.02	0.02	NA	NA	0.02	0.07	0.0194

表9：細胞浸潤／毛細血管密度：得た外植片につき5箇所の顕微鏡視野を取得し、細胞及び毛細血管で占められる面積を評価し、総面積の割合として報告した（細胞／毛細血管から構成される面積／総評価面積）。群割り当ては、評価者に対して盲検化した。処置群の詳細については表1を参照されたい。マトリゲル外植片は検出されなかった（NA）。示されるデータを図5にグラフでまとめる。

【0056】

（実施例11）

ヒト内乳動脈由来細胞の内皮細胞及び平滑筋細胞分化

マトリゲル上で培養されるとき、iMACが毛細血管様細胞に分化することが示されている（実施例5参照）。更なる試験を実施し、iMACの内皮細胞、平滑筋細胞、及び心筋細胞への分化の特徴を確認した。凍結保存した（Cryopreserved）継代数17のiMACを解凍して、組織培養用プラスチック上に播種し、内皮細胞用分化培地（DMEM+10% FBS+50ng/mL VEGF）で7日間培養した。次に、CD144、CD309、CD34、CD31及びフォンヴィルブランド因子を含む数種の異なる内皮細胞特異的マーカーの発現について、フローサイトメトリーで細胞を評価した。結果は、内皮細胞用分化培地で培養されるとき、培養iMACの約20%が、CD144、CD309、CD31及びCD34の発現を上方制御することを示した（図7）。

【0057】

また、継代数17のiMACを解凍し、組織培養用プラスチック上に播種し、平滑筋分化培地（MesenPRO RS、Invitrogen）で7日間培養し、次にSMA、SM22、カルポニンを含む3つの異なる平滑筋細胞特異的マーカーについて、フローサイトメトリーで評価した。結果は、標準的iMAC増殖条件下において、iMACがこれら3つの平滑筋細胞マーカーを全て発現したことを示した。平滑筋細胞分化培地で培養するとき、発現パターンは変わらない（図8）。

【0058】

また、継代数17のiMACを心筋細胞用分化培地（DMEM/F12+10% FBS+10μM 5-アザシチジン）で7日間培養し、次にiSL1及び筋節αアクチン（SA）の発現についてフローサイトメトリーで評価した。データは、80%超のiMACがiSL1を上方制御することを示した。対照的に、心筋細胞用分化培地による処理前及び処理後において100%のiMACがSAを発現する（図9）。

【0059】

これらのデータは、iMACが内皮細胞及び心筋細胞に分化できることを示す。したが

って、これらの細胞は、心臓血管組織工学用途に有用であり得る。

【0060】

(実施例12)

ヒト内乳動脈由来細胞の骨形成分化

骨形成分化には、実施例2に記載されるように、新たに単離された継代数7のiMACを、非コーティングの12ウェルプレート上に5000個細胞/cm²で蒔き、iMAC増殖培地において、37℃、5%二酸化炭素中で培養した。細胞がほぼコンフルエンスに達したとき、iMAC増殖培地を骨形成誘導培地(10⁻⁸Mデキサメタゾン(Sigma)、0.2mMアスコルビン酸(Sigma)、及び10mMβグリセロホスフェート(glycerolphosphate)(Sigma))に交換し、2~4日ごとに培地を交換しながら更に21日間培養した。骨形成分化の程度を判定するため、細胞を70%氷冷エタノールで1時間固定した。水で培養物を洗浄し、1mLの40mMアリザリンレッド(pH4.1(Sigma))で回転させながら10分間染色した。培養物をPBSで洗浄し、非特異的染色を低減した。次に、誘導後5日目、10日目、及び21日目に、染色された培養物の画像を取得した。ヒト間葉系幹細胞(hMSC)(Lonza)を陽性対照として用いた。

10

【0061】

骨形成誘導培地への曝露21日後、iMACは鈣質沈着を示さず、したがって、骨形成分化能はなかった。しかしながら、hMSCは強い鈣質沈着を示した。

20

【0062】

(実施例13)

血管組織工学用ヒト内乳動脈由来細胞

内乳動脈に特有の抗動脈硬化特性及び機械的特性を利用しようとして、我々は新たにiMACを単離し、血管及びその他心臓血管組織工学用途における有用性を評価する。

【0063】

天然ポリマー又は合成ポリマーのいずれかから構成される中空管状足場上にiMACを播種し、回転壁容器(RWV)バイオリアクター(Synthecon, Inc.)又は灌流バイオリアクター(Tissue Growth Technologies, Inc.)を用いて培養する。管状足場の一方を微小動脈瘤クリップ(Roboz Surgical Instrument Co., Inc.)を用いて閉じ、内腔を細胞懸濁液(2500個細胞/cm²)で満たす。もう一方を別のクリップで閉じ、細胞懸濁液を含むグラフトをRWVバイオリアクター内に24時間置いて、足場の内面上への細胞の初回播種を可能にする。反対に、管状足場を入れている培地に細胞を加えることにより、グラフトの外表面上にIMA細胞を播種する。初回の24時間の播種時間後、クリップを外し、グラフトをバイオリアクター内で更に4~7日間培養した。他の実験では、灌流バイオリアクター(Tissue Growth Technologies, Inc.)を用いて、播種された管状足場を生理学的脈動流及び脈動圧下で培養する。培養時間後、細胞を播種した構築物を、上記方法及び組織学的方法を用いて、細胞接着、生存率、増殖(proliferation)及び表現型について評価する。

30

【0064】

加えて、iMACの抗動脈硬化特性を示す。iMAC及びヒト大動脈平滑筋細胞(対照細胞株)を12ウェルプレートで培養する。コンフルエンスの時点で、最大14日間、細胞をカルシウム沈着培地(2mM無機リン酸を含む成長培地)に移す。2日ごとに、培地を新しい培地で交換する。反対に、iMACをカルシウム沈着培地中で平滑筋細胞と共培養する。次に、細胞を0.6N HClで24時間脱石灰化する。HCl上清のカルシウム含量を、オークレゾールフタレインコンプレクソン法(Calcium Kit(Sigma))により比色分析的に決定する。脱石灰後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄し、0.1N NaOH、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)で可溶化する。タンパク質含量をBCAタンパク質アッセイキット(Pierce, Rockford, IL)で測定する。細胞層のカルシウム含量をタンパク質含量で基準化する。iMAC

40

50

を利用して組織設計された血管グラフトは、動脈硬化に対する抵抗性が高くなり得る。iMACはまた、改善されたグラフト弾性をもたらすこともできる。内乳動脈はバイパスグラフトにおいて上手く利用されているが、手術切開時に損傷を受けやすい。これにより、明らかにグラフトの失敗に終わる。iMACから構成される組織設計された血管グラフトは、従来の血管グラフト材料の優れた代替品であることが判明し得る。

【0065】

(実施例14)

50/50ポリ(p-ジオキサノン-コ-グリコリド)PDO/PLGAの静電紡糸された管状足場を予めエタノールで濡らして、製造業者による取扱説明書に沿ってラット尾部タイプIコラーゲンを含む0.02N酢酸(BD Biosciences、Bedford MA)中、室温で1時間コーティングし、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄した。次に、実施例2に記載されるように単離されたiMAC細胞を、チューブの両側に細胞懸濁液25μLをゆっくりピペティングし、30分間室温でインキュベートすることにより、 4×10^6 個細胞/mLの濃度でコラーゲンをコーティングしたチューブの外側に静的に播種した。続いて、播種されたチューブをバイオリアクターのチャンバ棘部(Tissue Growth Technologies、Minnetonka, MN)上に縫合し、チャンバをiMAC増殖培地で満たした。注射器を用いて、iMAC細胞懸濁液を 1×10^6 細胞/mLで追加することにより、内腔に播種した。次に、バイオリアクターチャンバ内の播種されたチューブを、37℃の細胞培養インキュベーター内に置いた細胞培養ボトルローラーで0.5rpmで回転させながら培養する。培養5日及び10日後、チューブをバイオリアクターチャンバから取り出し、10%ホルマリンで固定して、ヘマトキシリン及びエオジン(H&E)を用いて組織学的分析用に染色した。

【0066】

組織学的な結果により、足場の空隙内にいくらか集積された状態で、静電紡糸された管状足場上にiMAC細胞が接着され、よく増殖したことが明らかになった。図10は、細胞を播種したチューブの組織学的断面図を示し、チューブ表面の内側及び外側両方における複数の層内での細胞の接着及び成長を示す。静電紡糸された管状足場の内側層内に移動する細胞も観察できる。

【0067】

(実施例15)

静電紡糸されたPCL足場を以下の方法で調製した。1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール(HFP、TCI America Inc.)溶媒中、PCL(Lakeshore Biomaterials)150mg/mL溶液を調製し、一晚振とう器プレート上で暗所環境に放置し、確実にPCLが全て溶解し、均質溶液を形成させた。次に、ポリマー溶液(3mL)をプラスチック製のBeckton Dickinson注射器(3mL)で吸い取り、5.5mL/時の速度で投与されるようにKD Scientificシリンジポンプ(モデル100)に設置した。高電圧電源(Spellman CZE1000R、Spellman High Voltage Electronics Corporation)を使用して、溶液を含有する注射器に固定された先端が丸い18ゲージ針に、+22kVの電圧を印加した。針先から20.32cm(8インチ)離して配置され、~400rpmの速度で回転する直径2mmの円筒形の接地したマンドレル上で、溶液を静電紡糸して、ランダム配向したファイバーの足場を作製した。18cm/秒の平行移動速度で、マンドレルの平行移動距離は18cmであった。静電紡糸の前に、マンドレルを、アルミホイルの小切片で包み、管を取り出し易くした。静電紡糸が完了次第、マンドレルを100%エタノールに浸漬し、ホイルのライナーをマンドレルからスライドさせて外し、管の内部から注意深く取り出した。

【0068】

消毒したPCL静電紡糸された管状足場を100%エタノールで予め濡らしてから0.02N酢酸で洗浄し、製造業者の取扱説明書に従って、タイプ1ラット尾部コラーゲン(BD Biosciences、Bedford, MA)で1時間コーティングした。次

に、グラフトをiMAC増殖培地で2回洗浄し、バイオリアクターチャンバ (Tissue Growth Technologies, Minnetonka, MN) の棘部に縫合した。外室をiMAC培地で満たし、 1.2×10^6 個細胞/mLの細胞懸濁液を用いてグラフト内面に播種した。注射器を用いて内室を細胞懸濁液で満たし、次にこれに蓋をして、37℃の細胞培養インキュベーター内部に設置した細胞培養ボトルローラーに一晩置く。次の日、内室中の培地を新しい培地と交換し、未接着細胞を全て除いた。次の日、内室中の培地を再び交換した。播種後3日目、チューブをバイオリアクターチャンバ棘部から切り離し、10mLの無血清Advanced DMEM/F12培地で2回洗浄し、輸送のため5mLの凍結用バイアルに移した。1本のサンプルを、製造業者の手順書に従い、Live/Dead染色 (Invitrogen, Carlsbad, CA) で分析した。サンプルを半分に切断し、一方を3時間の室温での模擬輸送後に分析し、もう一方を、5mL凍結用バイアルにおいて、細胞培養インキュベーター中37℃で更に一晩インキュベートを行い、同様の模擬輸送後に分析した。

10

【0069】

残りのサンプルをLewisラットの大動脈に移植した。簡潔に言うと、腎臓下大動脈の一部を外科的に除去し、細胞を播種した管状足場で置換した。続いて、ラットを4週間観察した。次に、グラフトの開存性をCT血管造影法で評価し、グラフトの内径を超音波画像診断法で定期的に測定した。移植4週間後、動物を安楽死させ、グラフトを摘出して組織学的染色により検査した。

【0070】

20

図11はLive/Deadアッセイの結果を示し、PCL静電紡糸された管状グラフト上にiMACが接着され、よく増殖し、3日間の培養、3時間の室温での模擬輸送、及び細胞培養インキュベーター中、37℃で更に一晩インキュベートした後に、生存したままであることを示す。わずかな死亡細胞が明らかとなり、生存細胞には、ストレス下の、又は瀕死の細胞を示す任意の形態変化は現れなかった。

【0071】

Lewisラットの大動脈内に移植されたiMACを播種した足場の直径の超音波測定は、移植後最大4週間、最小限の内径変化を伴ってグラフトが開存したままであったことを示す。CT血管造影の結果においても、グラフトが開存したままであったことが示された。4週間時点におけるグラフト摘出後のヘマトキシリン (hematoxylin) 及びエオジンによる組織学的染色では、血栓形成は認められず、足場への細胞集積の兆候を示した。これらの結果は、iMAC細胞が血管組織の損傷部の修復及び再生に有用であり得ることを示唆する。

30

【0072】

(実施例16)

第2のドナーから再現性よく単離されたヒト内乳動脈由来細胞

実施例2に記載される方法を用いて、新たなヒトドナー由来の新たに得た乳動脈からiMACを単離した。この新ロットのiMACについて、フローサイトメトリー分析を実施した。タイプIラット尾部コラーゲンをコーティングしたT75フラスコ上、37℃及び5%二酸化炭素において、細胞を継代数8までiMAC増殖培地中で増殖した。接着性細胞をPBSで洗浄し、TrypLEで剥離した。細胞を回収して遠心分離し、 5×10^5 個細胞/mLの濃度で、3% (v/v) FBS/PBSに再懸濁した。特異抗体を100マイクロリットルの細胞懸濁液に加え、混合液を暗所において、4℃で30~60分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をPBSで2回洗浄し、遠心分離して過剰の抗体を除去した。細胞を、300マイクロリットルのPBSに再懸濁し、フローサイトメトリーで分析した。フローサイトメトリー分析は、Guava製の装置で実施した。用いた抗体を表10に示す。

40

【表 1 1】

抗体	製造業者	カタログ番号
CD10	BD Pharmingen	555375
CD15	BD Pharmingen	555401
CD23	BD Pharmingen	555711
CD24	BD Pharmingen	555428
CD29	BD Pharmingen	555442
CD31	BD Pharmingen	555446
CD34	BD Pharmingen	555821
CD44	BD Pharmingen	555478
CD45RA	BD Pharmingen	555489
CD49C	BD Pharmingen	556025
CD62P	BD Pharmingen	555523
CD73	BD Pharmingen	550257
CD80	BD Pharmingen	557226
CD86	BD Pharmingen	555657
CD104	BD Pharmingen	555720
CD133	Miltenyi Biotec	130090853
CD138	BD Pharmingen	550805
CD141	BD Pharmingen	559781
CD142	BD Pharmingen	550312
CD146	BD Pharmingen	561013
CD166	BD Pharmingen	559263
HLA-I	BD Pharmingen	555553
HLA-II	BD Pharmingen	555558
IgG-FITC	BD Pharmingen	555748
IgG-PE	BD Pharmingen	555749

10

20

30

表 1 0 : i M A C 細胞表面マーカーの表現型の特徴確認に用いた抗体

【 0 0 7 3 】

継代数 8 の i M A C 培養物は、C D 2 9、C D 4 4、C D 7 3、C D 1 6 6 及び H L A - 1 に染色陽性であった。i M A C は、C D 1 0、C D 1 5、C D 2 3、C D 2 4、C D 3 1、C D 3 4、C D 4 5 R A、C D 6 2 p、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 0 4、C D 1 3 3、C D 1 3 8、C D 1 4 1、C D 1 4 6、及び H L A I I に染色陰性であった。

【 0 0 7 4 】

結果（表 1 1）は、i M A C は異なるドナーから得たヒト内乳動脈から単離でき、一貫した再現可能な表現型を依然として維持できることを示す。実施例 2 に記載される i M A C は 5 1 歳の女性由来であり、一方本実施例に記載される i M A C は 5 6 歳の男性から単離された。i M A C は間葉系幹細胞と同様のいくつかのマーカーを発現するが、i M A C により C D 1 0 が発現されないことが明らかである。加えて、平滑筋細胞マーカー C D 1 4 1 は i M A C により発現されない。i M A C は、内皮細胞、又は造血細胞が典型的に発現するマーカーを発現しない。これらのデータは、実施例 7 に記載される我々が依然得た知見と一致する。

40

【 0 0 7 5 】

このドナーの成長特性及び分化可能性の特徴を確認するには、更なる評価が必要である。しかしながら、これらの結果に基づき、これらの細胞の特徴が過去の知見と変わらないままであると思われる。ここに記載のデータは、i M A C が異なるヒト内乳動脈から再現

50

性よく単離され得ることを示唆する。これは、臨床用途において i M A C を幅広く利用する可能性を高めるものである。

【表 1 2】

セルの種類	抗体	細胞型発現	iMAC発現
内皮前駆細胞	CD34	陽性	陰性
	CD133	陽性	陰性
	CD45 RA	陽性	陰性
内皮細胞	CD31	陽性	陰性
	CD104	陽性	陰性
平滑筋細胞	CD141	陽性	陰性
間葉系幹細胞	CD10	陽性	陰性
	CD29	陽性	陽性
	CD44	陽性	陽性
	CD73	陽性	陽性
	CD166	陽性	陽性
その他	CD15	陽性	陰性
	CD23	陽性	陰性
	CD24	陽性	陰性
	CD62p	陽性	陰性
	CD80	陽性	陰性
	CD86	陽性	陰性
	CD138	陽性	陰性
	CD146	陽性	陰性
	HLA 1	陽性	陽性
	HLA 2	陽性	陰性

表 1 1：細胞表面マーカーの表現型。表 1 0 に記載の抗体を用いて、フローサイトメリーにより i M A C の特徴を確認した。特定の細胞型の既知の表面マーカーに従ってマーカーを構築した（細胞型）。特定の細胞型により発現される表面マーカー（細胞型発現）。検査した表面マーカーを発現する i M A C （陽性）。検査抗体の染色特性を陰性対照の抗体染色と比較して、染色陽性を決定した。

【0 0 7 6】

7 5 % を超える細胞の染色を陽性とみなした。検査した表面マーカーを発現しない i M A C （陰性）。陰性対照抗体と比較して 2 5 % 未満の細胞が陽性的の場合、染色を陰性とみなした。

【0 0 7 7】

〔実施の態様〕

（１） 単離された哺乳類内乳動脈由来細胞であって、前記細胞が培養中に自己複製して増殖することができ、前記細胞が細胞－表面マーカー H L A－1 について発現陽性であり、細胞－表面マーカー C D 1 0、C D 3 1、C D 3 4、C D 4 5、C D 1 3 3、C D 1 4 1 及び K D R / F 1 k－1 のそれぞれについて発現陰性である、細胞。

（２） 前記細胞が、C D 2 9、C D 4 4、C D 7 3、C D 1 6 6 について更に発現陽性であり、C D 1 5、C D 2 3、C D 2 4、C D 6 2 p、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 0 4、C D 1 0 5、C D 1 1 7、C D 1 3 8、C D 1 4 6、V E－カドヘリン、及び H L A－2 について更に発現陰性である、実施態様 1 に記載の細胞。

（３） 前記細胞が、脂肪細胞、心筋細胞、及び内皮細胞に分化可能である、実施態様 1 に記載の細胞。

（４） 哺乳類内乳動脈由来物を単離する方法であって、

a. 哺乳類内乳動脈を提供する工程と、

b. 酵素混合物を提供する工程であって、前記酵素混合物が、メタロプロテアーゼ酵素、中性プロテアーゼ酵素、粘液溶解性酵素、及びこれらの組み合わせからなる群から選択

される消化酵素から構成される、工程と、

c. 前記動脈から内膜層を除去し、かつ外部残屑を除去するのに十分な時間、前記酵素混合物中で前記哺乳類内乳動脈をインキュベートし、部分的に消化された動脈を提供する工程と、

d. 前記部分的に消化された動脈を新しい酵素混合物中に移し、消化された材料を提供するのに十分な時間、消化を継続する工程と、

e. 前記消化された材料から前記細胞を単離する工程と、

f. コラーゲンをコーティングした組織培養用容器上で前記細胞を培養する工程と、を含む、方法。

(5) 前記酵素混合物が、コラゲナーゼ及びディスパーゼから構成される、実施態様 4 に記載の方法。 10

(6) 前記動脈から内膜層を除去し、かつ外部残屑を除去する時間が、約 60 分間である、実施態様 4 に記載の方法。

(7) 前記消化された材料を提供するのに十分な時間が、約 30 分間～約 60 分間の範囲内である、実施態様 6 に記載の方法。

(8) 前記酵素混合物を消化された材料で飽和させるのに十分な時間が、約 60 分間である、実施態様 4 に記載の方法。

(9) a. 哺乳類内乳動脈を提供する工程と、

b. 酵素混合物を提供する工程であって、前記酵素混合物が、メタロプロテアーゼ酵素、中性プロテアーゼ酵素、粘液溶解性酵素、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される消化酵素から構成される、工程と、 20

c. 前記動脈から内膜層を除去し、かつ外部残屑を除去するのに十分な時間、前記酵素混合物中で前記哺乳類内乳動脈をインキュベートし、部分的に消化された動脈を提供する工程と、

d. 前記部分的に消化された動脈を新しい酵素混合物中に移し、消化された材料を提供するのに十分な時間、消化を継続する工程と、

e. 前記消化された材料から細胞を単離する工程と、

f. コラーゲンをコーティングした組織培養用容器上で前記細胞を培養する工程と、を含む方法により、哺乳類内乳動脈から単離された細胞。

(10) 前記酵素混合物が、コラゲナーゼ及びディスパーゼから構成される、実施態様 9 に記載の細胞。 30

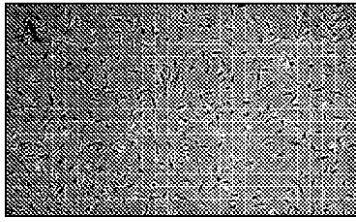
【0078】

(11) 前記動脈から内膜層を除去し、かつ外部残屑を除去する時間が、約 60 分間である、実施態様 9 に記載の細胞。

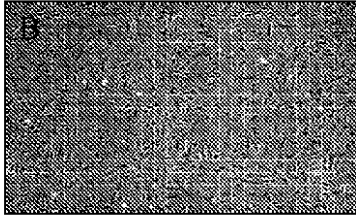
(12) 前記消化された材料を提供するのに十分な時間が、約 30 分間～約 60 分間の範囲内である、実施態様 11 に記載の細胞。

(13) 前記酵素混合物を消化された材料で飽和させるのに十分な時間が、約 60 分間である、実施態様 12 に記載の細胞。

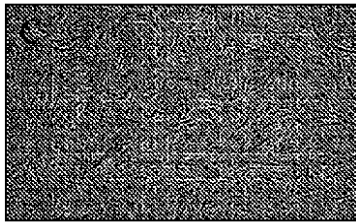
【図 1 A】



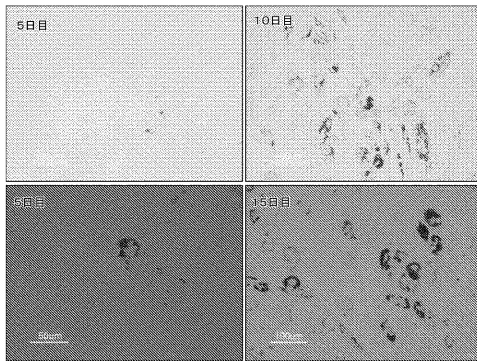
【図 1 B】



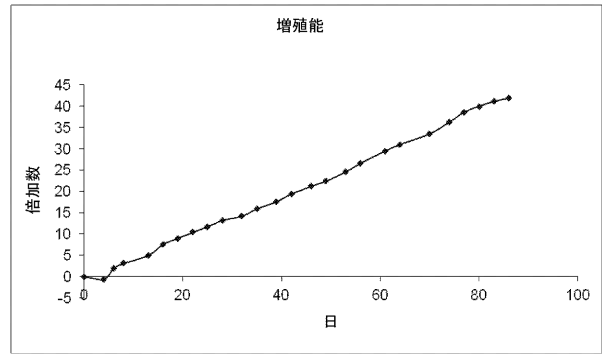
【図 1 C】



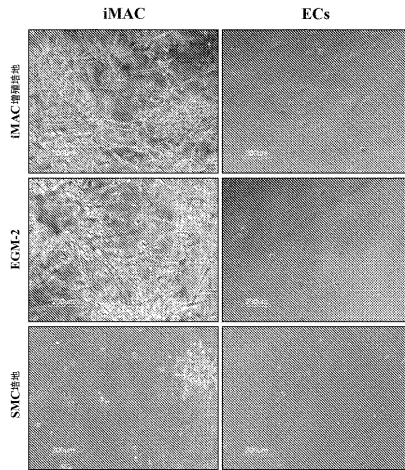
【図 4】



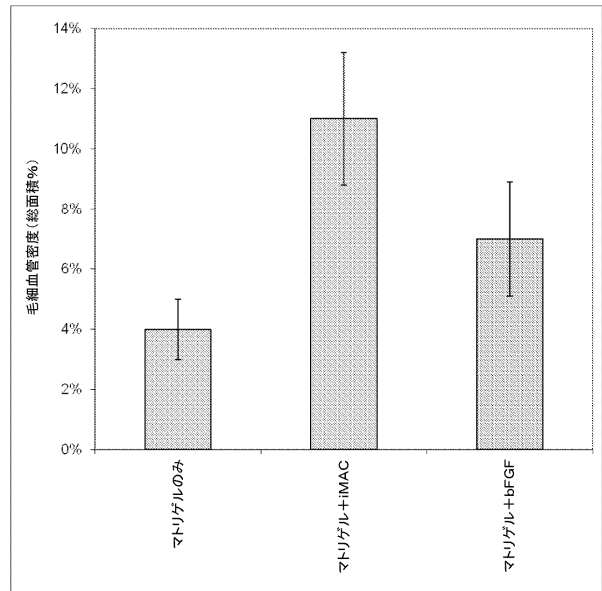
【図 2】



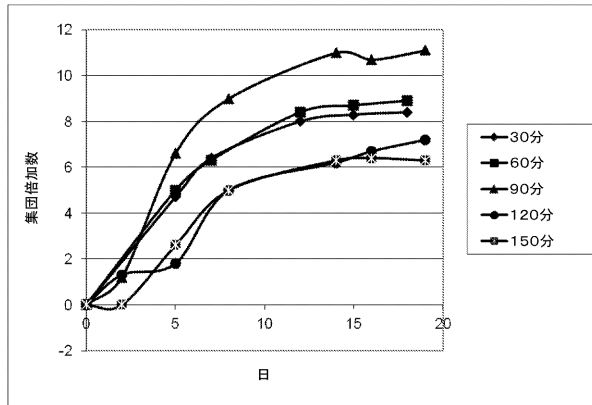
【図 3】



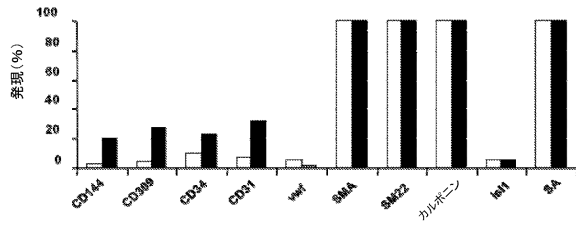
【図 5】



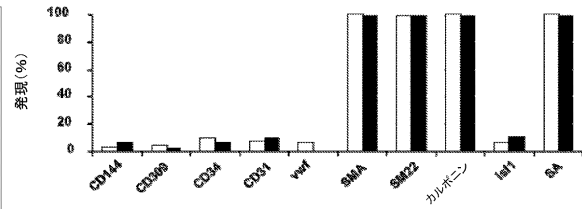
【図 6】



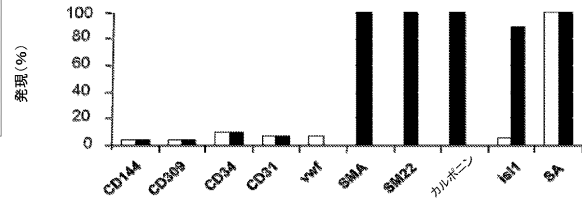
【図 7】



【図 8】

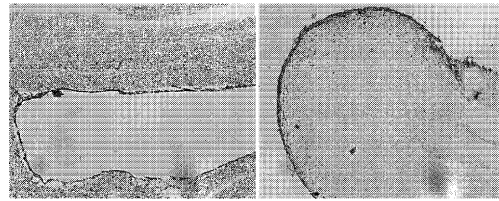


【図 9】



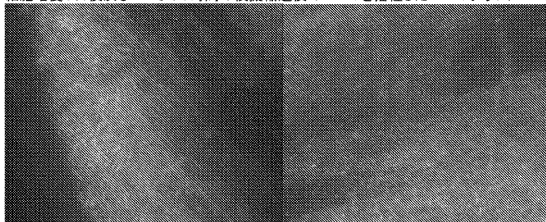
【図 10】

Figure 10

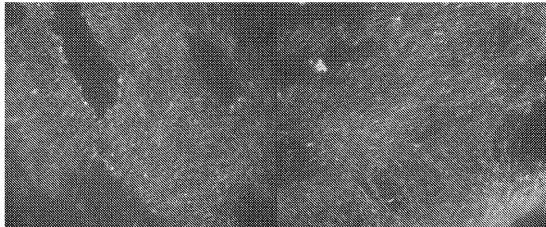


【図 11】

細胞培養3日後及びRTでの3時間の模擬輸送後のIMACを播種したTEBVグラフ



細胞培養3日後、RTでの3時間の模擬輸送後及び細胞培養インキュベーター内で一晩後のIMACを播種したTEBVグラフ



フロントページの続き

- (72)発明者 コルター・デイビッド・シー
アメリカ合衆国、08610 ニュージャージー州、ハミルトン、アービントン・プレイス 208
- (72)発明者 ブエンスセソ・チャリト
アメリカ合衆国、08902 ニュージャージー州、ノース・ブランズウィック、ペチュニア・ドライブ 11、アパートメント 1ジェイ
- (72)発明者 カザネッキー・クリスチャン・シー
アメリカ合衆国、18063 ペンシルベニア州、マーティンス・クリーク、ピーオー・ボックス 451
- (72)発明者 ゴシーウスカ・アンナ
アメリカ合衆国、08558 ニュージャージー州、スキルマン、レッド・フォックス・コート 39

審査官 荒木 英則

- (56)参考文献 特表2008-507957 (JP, A)
ABEDIN, M., et al., Circulation Research, 2004年, Vol.95, pp.671-676
TINTUT, Y., et al., CIRCULATION, 2003年, Vol.108, No.20, pp.2505-2510
PASQUINELLI, G., et al., STEM CELLS, 2007年, Vol.25, No.7, pp.1627-1634
PHINNEY, D.G., et al., STEM CELLS, 2007年, Vol.25, No.11, pp.2896-2902
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 5/00- 5/10
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)