

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-529621

(P2004-529621A)

(43) 公表日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/06	C 1 2 N 5/00	4 B O 6 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 C O 7 6
A 6 1 K 35/12	A 6 1 K 35/12	4 C O 8 1
A 6 1 K 35/28	A 6 1 K 35/28	4 C O 8 4
A 6 1 K 35/30	A 6 1 K 35/30	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 204 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-565063 (P2002-565063)	(71) 出願人	503294429
(86) (22) 出願日	平成14年2月14日 (2002.2.14)		ファークト, レオ ティー
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月14日 (2003.8.14)		FURCHT, Leo T.
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/004652		アメリカ合衆国 ミネソタ州 55455
(87) 国際公開番号	W02002/064748		ミネアポリス ウェスト トゥエンティ
(87) 国際公開日	平成14年8月22日 (2002.8.22)		ファースト ストリート 2100 エ
(31) 優先権主張番号	60/268, 786		ムシーエル エルエルシー
(32) 優先日	平成13年2月14日 (2001.2.14)	(71) 出願人	503294407
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ヴァーフェイリー, キャセリン エム
(31) 優先権主張番号	60/269, 062		VERFAILLIE, Catherine M.
(32) 優先日	平成13年2月15日 (2001.2.15)		アメリカ合衆国 ミネソタ州 55455
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ミネアポリス デラウェア ストリート
(31) 優先権主張番号	60/310, 625		エスイー 422 ユニヴァーシティ
(32) 優先日	平成13年8月7日 (2001.8.7)		オブ ミネソタ エムエムシー 716
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多能性成体幹細胞、その起源、それを得る方法および維持する方法、それを分化させる方法、その使用法、ならびにそれ由来の細胞

(57) 【要約】

本発明は、哺乳類多能性成体幹細胞 (MASC) に関し、より詳細には、MASCを入手し、維持し、そして分化させる方法に関する。疾患の治療におけるMASCの使用もまた提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

中胚葉性、外胚葉性および内胚葉性起源の少なくとも一つの分化細胞型を形成するように分化誘導される能力を有する、単離された多能性成体幹細胞（MASC）。

【請求項 2】

哺乳類の胚以外の器官または組織に由来することを特徴とする請求項 1 記載の細胞。

【請求項 3】

骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、繊維芽細胞、骨髄間質、骨格筋、平滑筋、心筋、眼、内皮、上皮、肝、脾、造血、グリア、神経細胞および稀突起膠細胞の細胞型より成る群から選択される細胞を形成するように分化誘導される能力を有することを特徴とする請求項 1 10 記載の細胞。

【請求項 4】

前記器官または組織が、骨髄、筋、脳、臍帯血および胎盤より成る群から選択されることを特徴とする請求項 1 記載の細胞。

【請求項 5】

前記哺乳類がマウスであることを特徴とする請求項 2 記載の細胞。

【請求項 6】

前記哺乳類がラットであることを特徴とする請求項 2 記載の細胞。

【請求項 7】

前記哺乳類がヒトであることを特徴とする請求項 2 記載の細胞。 20

【請求項 8】

分化が *in vivo* または *ex vivo* で誘導されることを特徴とする請求項 1 記載の細胞。

【請求項 9】

分化が *in vivo* または *ex vivo* で誘導されることを特徴とする請求項 3 記載の細胞。

【請求項 10】

前記細胞が構成的に *oct4* および高レベルのテロメラーゼを発現することを特徴とする請求項 1 記載の細胞。

【請求項 11】

前記細胞が CD44、MHC クラス I および MHC クラス II 発現について陰性であることを特徴とする請求項 10 記載の細胞。 30

【請求項 12】

- (a) 請求項 1 記載の細胞を胚盤胞に導入する；
- (b) (a) の胚盤胞を代理母に移植する；そして
- (c) 仔を発生および出生させる；

各工程を含むことを特徴とする、正常な非ヒト動物を作成する方法。

【請求項 13】

前記動物がキメラであることを特徴とする請求項 12 記載の動物。

【請求項 14】

MASC の集団と該 MASC を拡大させる培地とを含む組成物。

【請求項 15】

前記培地が、上皮成長因子（EGF）および血小板由来成長因子（PDGF）を含むことを特徴とする請求項 14 記載の組成物。 40

【請求項 16】

前記培地が、白血病抑制因子（LEF）をさらに含むことを特徴とする請求項 15 記載の組成物。

【請求項 17】

完全にまたは部分的に精製された MASC 子孫細胞の集団を含む組成物。

【請求項 18】

前記子孫細胞がさらに分化する能力を有することを特徴とする請求項 17 記載の組成物。

【請求項 19】

前記子孫細胞が最終分化していることを特徴とする請求項 1 7 記載の組成物。

【請求項 2 0】

前記子孫細胞が、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、繊維芽細胞、骨髄間質、骨格筋、平滑筋、心筋、眼、内皮、上皮、肝、脾、造血、グリア、神経細胞または稀突起膠細胞の細胞型であることを特徴とする請求項 1 7 記載の組成物。

【請求項 2 1】

- (a) 哺乳類から組織を得る；
- (b) 接着性細胞の集団を確立する；
- (c) 前記集団からCD45⁺細胞を除去する；
- (d) CD45⁺細胞を回収する；そして
- (e) CD45⁺細胞を拡大条件下で培養し、拡大した細胞集団を得る；

10

各工程を含むことを特徴とする、請求項 1 記載の細胞を単離および増殖するための方法。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 記載の方法によって得られた拡大した細胞集団。

【請求項 2 3】

請求項 2 1 記載の方法の各工程を含み、さらに増殖した細胞を目的の分化因子の存在下で培養する工程を含むことを特徴とする、MSCをex vivoで分化させるための方法。

【請求項 2 4】

前記分化因子が、塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF)；血管内皮成長因子 (VEGF)；ジメチルスルホキシド (DMSO) およびイソプロテレノール；そして、繊維芽細胞成長因子 4 (FGF 4) および肝細胞成長因子 (HGF) より成る群から選択されることを特徴とする請求項 2 3 記載の方法。

20

【請求項 2 5】

請求項 2 3 記載の方法によって得られた分化細胞。

【請求項 2 6】

前記細胞が、外胚葉、中胚葉または内胚葉であることを特徴とする請求項 2 5 記載の分化細胞。

【請求項 2 7】

前記細胞が、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、繊維芽細胞、骨髄間質、骨格筋、平滑筋、心筋、眼、内皮、上皮、肝、脾、造血、グリア、神経細胞または稀突起膠細胞の細胞型であることを特徴とする請求項 2 5 記載の分化細胞。

30

【請求項 2 8】

請求項 2 1 記載の方法の各工程を含み、かつ拡大した細胞集団を哺乳類宿主に投与する工程をさらに含み、前記細胞集団が定着しかつin vivoで組織特異的細胞に分化して、それによって、傷害、遺伝疾患、後天性疾患または医原性処置のために欠陥のある細胞または器官の機能が補強され、再構成され、または初めて提供されることを特徴とする、MSCをin vivoで分化させる方法。

【請求項 2 9】

前記組織特異的細胞が、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、繊維芽細胞、骨髄間質、骨格筋、平滑筋、心筋、眼、内皮、上皮、肝、脾、造血、グリア、神経細胞または稀突起膠細胞の細胞型であることを特徴とする請求項 2 8 記載の方法。

40

【請求項 3 0】

MASCが、in vivoで自己再生することを特徴とする請求項 2 8 記載の方法。

【請求項 3 1】

前記細胞が、医薬として許容される基材と共に投与されることを特徴とする請求項 2 8 記載の方法。

【請求項 3 2】

前記基材が生分解性であることを特徴とする請求項 3 1 記載の方法。

【請求項 3 3】

前記投与が、局所注射、全身注射、非経口投与、経口投与、または胚への子宮内注射によ

50

ってなされることを特徴とする請求項 28 記載の方法。

【請求項 34】

局所注射がカテーテル投与を含むことを特徴とする請求項 33 記載の方法。

【請求項 35】

前記疾患が、癌、心血管疾患、代謝疾患、肝疾患、糖尿病、肝炎、血友病、変性または外傷性神経疾患、自己免疫疾患、遺伝的欠陥、結合組織疾患、貧血、感染症および移植拒絶より成る群から選択されることを特徴とする請求項 28 記載の方法。

【請求項 36】

請求項 28 記載の方法によって得られた分化細胞。

【請求項 37】

請求項 11 記載の細胞の治療上有効な量を、必要のある患者に投与する工程を含む治療方法。

【請求項 38】

前記患者において奇形種が形成されないことを特徴とする請求項 37 記載の方法。

【請求項 39】

MASCまたはその子孫細胞の治療上有効な量を必要のある患者に投与する工程を含む治療方法。

【請求項 40】

前記患者の前処置がほとんどまたは全く必要とされないことを特徴とする請求項 39 記載の方法。

【請求項 41】

前記前処置が、放射線照射または化学療法による骨髓機能廃絶を含むことを特徴とする請求項 40 記載の方法。

【請求項 42】

MASCまたはその子孫細胞の投与の前または同時に耐性を誘導することが不要であることを特徴とする請求項 39 記載の方法。

【請求項 43】

患者の後免疫抑制処置が、従来の薬理用量と比較して減少することを特徴とする請求項 39 記載の方法。

【請求項 44】

前記子孫細胞がさらに分化する能力を有することを特徴とする請求項 39 記載の方法。

【請求項 45】

前記子孫細胞が最終分化していることを特徴とする請求項 39 記載の方法。

【請求項 46】

MASCまたは子孫細胞が、局所注射、全身注射、非経口投与、経口投与、または胚への子宮内注射によって投与されることを特徴とする請求項 39 記載の方法。

【請求項 47】

局所注射がカテーテル投与を含むことを特徴とする請求項 46 記載の方法。

【請求項 48】

細胞が医薬として許容される基材と共に投与されることを特徴とする請求項 39 記載の方法。

【請求項 49】

前記基材が生分解性であることを特徴とする請求項 48 記載の方法。

【請求項 50】

MASCまたはその子孫細胞が、ウイルス、細菌または真菌感染に抵抗するように免疫系を改変することを特徴とする請求項 39 記載の方法。

【請求項 51】

MASCまたはその子孫が、傷害、遺伝疾患、後天性疾患または医原性処置のために欠陥のある細胞または器官の機能を補強し、再構成し、または初めて提供することを特徴とする請求項 39 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 2】

前記器官が、骨髄、血液、脾臓、肝臓、肺、腸管、眼、脳、免疫系、循環系、骨、結合組織、筋、心臓、血管、膵臓、中枢神経系、末梢神経系、腎臓、膀胱、皮膚、上皮付属器、乳房－乳腺、脂肪組織、および口、食道、膣および肛門を含む粘膜より成る群から選択されることを特徴とする請求項 5 1 記載の方法。

【請求項 5 3】

MASCがin vivoで自己再生することを特徴とする請求項 5 1 記載の方法。

【請求項 5 4】

前記疾患が、癌、心血管疾患、代謝疾患、肝疾患、糖尿病、肝炎、血友病、変性または外傷性神経疾患、自己免疫疾患、遺伝的欠陥、結合組織疾患、貧血、感染症および移植拒絶より成る群から選択されることを特徴とする請求項 5 1 記載の方法。 10

【請求項 5 5】

前記子孫細胞が、ex vivoまたはin vivoで分化することを特徴とする請求項 4 4 記載の方法。

【請求項 5 6】

前記子孫細胞が、ex vivoまたはin vivoで分化することを特徴とする請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 5 7】

前記子孫細胞が、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、繊維芽細胞、骨髄間質、骨格筋、平滑筋、心筋、眼、内皮、上皮、肝、膵、造血、グリア、神経細胞および稀突起膠細胞より成る群から選択されることを特徴とする請求項 4 5 記載の方法。 20

【請求項 5 8】

MASCまたはその子孫細胞が、患者の一またはそれ以上の器官にホーミングしそこで定着し、それによって、傷害、遺伝疾患、後天性疾患または医原性処置のために欠陥のある細胞または器官の機能が補強され、再構成され、または初めて提供されることを特徴とする請求項 3 9 記載の方法。

【請求項 5 9】

前記疾患が、癌、心血管疾患、代謝疾患、肝疾患、糖尿病、肝炎、血友病、変性または外傷性神経疾患、自己免疫疾患、遺伝的欠陥、結合組織疾患、貧血、感染症および移植拒絶より成る群から選択されることを特徴とする請求項 5 8 記載の方法。 30

【請求項 6 0】

前記傷害が、虚血または炎症であることを特徴とする請求項 5 8 記載の方法。

【請求項 6 1】

前記器官が、骨髄、血液、脾臓、肝臓、肺、腸管、眼、脳、免疫系、循環系、骨、結合組織、筋、心臓、血管、膵臓、中枢神経系、末梢神経系、腎臓、膀胱、皮膚、上皮付属器、乳房－乳腺、脂肪組織、および口、食道、膣および肛門を含む粘膜、より成る群から選択されることを特徴とする請求項 5 8 記載の方法。

【請求項 6 2】

MASCが、in vivoで自己再生することを特徴とする請求項 5 8 記載の方法。

【請求項 6 3】

MASCまたはその子孫細胞が、血管新生を促進することを特徴とする請求項 3 9 記載の方法。 40

【請求項 6 4】

MASCまたはその子孫細胞が、治療薬を輸送するように遺伝子組み換えされていることを特徴とする請求項 3 9 記載の方法。

【請求項 6 5】

前記治療薬が、抗血管新生薬であることを特徴とする請求項 6 4 記載の方法。

【請求項 6 6】

前記投与が、人工血管を含む三次元マトリクスを介してなされることを特徴とする請求項 3 9 記載の方法。 50

【請求項 67】

前記治療が、腹部大動脈瘤、心臓バイパス手術、末梢血管疾患または冠血管疾患に向けられたものであることを特徴とする請求項 66 記載の方法。

【請求項 68】

骨髓、血液、脾臓、肝臓、肺、腸管、眼、脳、免疫系、骨、結合組織、筋、心臓、血管、膵臓、中枢神経系、腎臓、膀胱、皮膚、上皮付属器、乳房－乳腺、脂肪組織、および口、食道、膣および肛門を含む粘膜より成る群から選択される組織を作成するのに有効な量で MASC が存在することを特徴とする、MASC および医薬として許容される担体を含む治療用組成物。

【請求項 69】

10

(a) MASC を哺乳類提供者から取り出す；
(b) MASC を拡大して未分化細胞の拡大集団を形成する；そして
(c) 拡大した細胞を患者に投与して、器官、組織または細胞の機能を回復させる；各工程を含むことを特徴とする、必要とする患者において器官、組織または細胞の機能を回復させる治療方法。

【請求項 70】

前記機能が酵素的であることを特徴とする請求項 69 記載の方法。

【請求項 71】

前記機能が遺伝子的であることを特徴とする請求項 69 記載の方法。

【請求項 72】

20

前記哺乳類提供者が患者であることを特徴とする請求項 69 記載の方法。

【請求項 73】

前記器官、組織または細胞が、骨髓、血液、脾臓、肝臓、肺、腸管、眼、脳、免疫系、骨、結合組織、筋、心臓、血管、膵臓、中枢神経系、末梢神経系、腎臓、膀胱、皮膚、上皮付属器、乳房－乳腺、脂肪組織、および口、食道、膣および肛門を含む粘膜より成る群から選択されることを特徴とする請求項 69 記載の方法。

【請求項 74】

(a) プロモーターに機能的に結合した被提供者の MHC 抗原をコードする核酸配列を MASC に *ex vivo* で導入して、MHC 抗原を MASC によって発現させる；そして

(b) MHC 抗原が移植された MASC の拒絶を阻害するのに十分なレベルで発現されるように、MASC を患者に移植する；

30

各工程を含むことを特徴とする、患者に移植された異種 MASC の拒絶を阻害する方法。

【請求項 75】

前記患者が、MASC の提供者と同一種または別の哺乳類種であることを特徴とする請求項 74 記載の方法。

【請求項 76】

MASC が、局所注射、全身注射、非経口投与、経口投与、または胚への子宮内注射によって患者に移植されることを特徴とする請求項 74 記載の方法。

【請求項 77】

局所注射がカテーテル投与を含むことを特徴とする請求項 76 記載の方法。

40

【請求項 78】

細胞が、医薬として許容される基材と共に移植されることを特徴とする請求項 74 記載の方法。

【請求項 79】

前記基材が生分解性であることを特徴とする請求項 78 記載の方法。

【請求項 80】

(a) MASC において MHC 抗原の発現を遺伝子導入によってノックアウトし；そして

(b) 前記遺伝子導入 MASC を患者に移植する；各工程を含み、
前記 MHC 抗原が MASC によって発現されず、それによって移植された MASC の拒絶が阻害されることを特徴とする、患者に移植された異種 MASC の拒絶を阻害する方法

50

【請求項 8 1】

患者がMASCの提供者と同一種または別の哺乳類種であることを特徴とする請求項 8 0 記載の方法。

【請求項 8 2】

MASCが、局所注射、全身注射、非経口投与、経口投与、または胚への子宮内注射によって患者に投与されることを特徴とする請求項 8 0 記載の方法。

【請求項 8 3】

局所注射がカテーテル投与を含むことを特徴とする請求項 8 2 記載の方法

【請求項 8 4】

細胞が、医薬として許容される基材と共に移植されることを特徴とする請求項 8 0 記載の方法。 10

【請求項 8 5】

前記基材が生分解性であることを特徴とする請求項 8 4 記載の方法。

【請求項 8 6】

(a) MASCを単離し；そして
(b) MASCを分化させて血液または血液成分を形成させる；
各工程を含むことを特徴とする、血液または個々の血液成分をex vivoで作成する方法。

【請求項 8 7】

前記個々の血液成分が、赤血球、白血球または血小板であることを特徴とする請求項 8 6 記載の方法。 20

【請求項 8 8】

(a) MASCまたはその子孫細胞のゲノムまたはプロテオーム構成を分析する；
(b) バイオインフォマティクスおよび／またはアルゴリズムを用いたコンピュータ分析を介して前記分析を利用する；そして
(c) 新規データを集め、さらに該新規データを既知データベースと比較して、新薬を発見する；
各工程を含むことを特徴とする薬物発見の方法。

【請求項 8 9】

(a) MASCのゲノムまたはプロテオーム構成を分析する；
(b) MASCの分化を誘導する； 30
(c) 分化経路の中間細胞のゲノムまたはプロテオーム構成を分析する；
(d) 分化経路の最終分化細胞のゲノムまたはプロテオーム構成を分析する；
(e) バイオインフォマティクスおよび／またはアルゴリズムを用いて、MASCおよびその子孫細胞のゲノムまたはプロテオーム構成を特徴づける；そして
(f) (e) で得られたデータを比較して、経路の構成要素を同定する；
各工程を含むことを特徴とする、分化経路の構成要素を同定する方法。

【請求項 9 0】

分化がin vitroで生じることを特徴とする請求項 8 9 記載の方法。

【請求項 9 1】

分化がin vivoで生じることを特徴とする請求項 8 9 記載の方法。 40

【請求項 9 2】

請求項 9 0 記載の方法の結果と請求項 9 1 記載の方法の結果とを比較する工程を含むことを特徴とする、in vitroの分化とin vivoの分化とを比較する方法。

【請求項 9 3】

(a) 健康な提供者から単離されたMASCのゲノムまたはプロテオーム構成を分析する；
(b) 疾患または傷害を罹患している提供者から単離されたMASCのゲノムまたはプロテオーム構成を分析する；
(c) バイオインフォマティクスおよび／またはアルゴリズムを用いて (a) からのデータを特徴づける；
(d) バイオインフォマティクスおよび／またはアルゴリズムを用いて (b) からのデータ 50

を特徴づける；

(e) (c) で得られたデータと (d) で得られたデータとを比較して、疾患または傷害の分子構成要素を同定する；

各工程を含むことを特徴とする、疾患または傷害の分子構成要素を同定する方法。

【請求項 9 4】

(a) MASC中の産物を同定する；そして

(b) 前記産物をMASCから単離する；

各工程を含むことを特徴とする、治療上、診断上または研究上の有用性を有する産物を *in vitro* で作成する方法。

【請求項 9 5】

前記産物が、タンパク質、脂質、複合糖質、DNAおよびRNAより成る群から選択されることを特徴とする請求項 9 4 記載の方法。

【請求項 9 6】

哺乳類において該哺乳類に投与された抗原に対する耐性を誘導する方法であって、前記抗原の投与の後またはそれと同時に、MASCまたはその子孫細胞の有効量を哺乳類に投与する工程を含み、それによって、その後の前記抗原での感作に対する哺乳類の体液性免疫反応が抑制されることを特徴とする方法。

【請求項 9 7】

血液を *ex vivo* でMASC由来細胞と接触させる工程を含み、前記細胞が中空の繊維性の器具の内面を覆っていることを特徴とする、患者の血液から毒素を除去する方法。

【請求項 9 8】

前記細胞が腎または肝細胞であることを特徴とする請求項 9 7 記載の方法。

【請求項 9 9】

前記患者の血液を *ex vivo* でMASCまたはその子孫細胞と接触させる工程を含み、前記MASCまたはその子孫細胞が、治療薬を輸送するように遺伝子組み換えされていることを特徴とする、治療用産物を患者へ輸送するための方法。

【請求項 1 0 0】

MASCまたはその子孫細胞を *ex vivo* で薬物と接触させ、さらに前記細胞の生存を観察する工程を含むことを特徴とする、薬物の毒性を試験する方法。

【請求項 1 0 1】

前記子孫細胞が、肝、内皮、上皮および腎細胞より成る群から選択されることを特徴とする請求項 1 0 0 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連特許

本出願は2001年10月25日提出の米国仮特許出願第60/343, 386号、2001年8月7日提出の米国仮特許出願第60/310, 625号、2001年2月15日提出の米国仮特許出願第60/269, 062号、2001年2月14日提出の米国仮特許出願第60/268, 786号の利益を主張するものであり、これらは参照により本開示に含まれる。出願人はまた国際公開第01/11011号、第60/147, 324号および第60/164, 650号に基づく優先権を主張し、これらの出願は参照により本文に含まれる；その中の任意の教示を本発明の実施に用いることができる。本出願は、付録1に添付した本出願の一部である、国際公開第01/11011号の一部継続出願である。参照により本文に含まれる資料は先行技術とは認められない。

【0 0 0 2】

発明の分野

本発明は概して、哺乳類多能性成体幹細胞 (MASC) に関し、より詳細には、MASCを入手し、維持し、そして分化させる方法に関する。疾患の治療におけるMASCの使用もまた提供される。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0003】

発明の背景

幹細胞からの器官および組織の作成、および続くそれらの移植は、いくつかの疾患に有望な治療法を提供し、幹細胞を多くの分野で研究の中心としている。幹細胞技術は、数例を挙げれば糖尿病、パーキンソン病、肝疾患、心疾患、そして自己免疫疾患に有望な新しい治療法を提供する。しかし、器官および組織移植に付随する少なくとも二つの大きな問題がある。

【0004】

第一に、提供器官および組織の不足がある。米国だけで移植に必要な器官のわずか5パーセントしか被提供者は入手できない (Evans, et al. 1992)。米国心臓協会によると、1997年に新しい心臓を必要とした米国人40,000人のうち2,300人しか心臓を受け取っていない。米国肝臓協会は、毎年肝不全で死亡する30,000人近い患者に対して提供者は3,000人に満たないと報告する。 10

【0005】

第二の大きな問題は、被提供者の免疫系と移植組織との不適合の可能性である。提供器官または組織は宿主免疫系によって異物と認識されるため、金額的にも身体的にもかなりのコストで免疫抑制薬を患者に与えなければならない。

【0006】

異種移植、すなわち別の生物種からの組織または器官の移植は、ヒト器官および組織の不足を克服する別の方法を提供できる。異種移植には先行計画という利点がある。器官を健康なうちに採取することができ、また患者は移植手術に先立って任意の有益な前処置を受けることができる。残念ながら、異種移植は、組織不適合の問題を克服しないばかりか、むしろそれを悪化させる。さらに、疾病対策センターによると、有害なウイルスが種間障壁を越えるという証拠がある。ブタは、器官および組織提供者として有力候補になっているが、しかしブタからヒトへの1種以上のウイルスの種間感染が記録されている。たとえば、70名を超えるヒトが感染し死亡した疾患であるヘンドラウイルスの発生を封じ込めるため、100万頭を超えるブタが近年マレーシアで屠畜された (Butler, D. 1999)。 20

【0007】

幹細胞：定義および用途

移植のための器官および組織の最も期待される起源は、したがって、幹細胞技術の開発にある。理論上、幹細胞は自己再生する細胞分裂を行って表現型および遺伝子型の同一な娘細胞を無限回生じることができ、最終的に少なくとも一つの最終細胞型に分化することができる。患者自身の幹細胞から組織または器官を作成することによって、または被提供者の免疫系が異物と認識しないように異種細胞を遺伝子組み換えすることによって、移植組織を作成し、感染または組織拒絶という付随する危険なしに異種移植に伴う利点を提供することができる。 30

【0008】

幹細胞はまた、遺伝子治療の結果を改善する見込みを提供する。患者自身の幹細胞をin vitroで遺伝子組み換えし、それからin vivoで再導入して目的の遺伝子産物を産生することができる。これらの遺伝子組み換え幹細胞は、体の特定の部位に埋め込むための、または全身投与のための、多数の細胞型を形成するように分化誘導される潜在力を有する。あるいは、異種幹細胞を遺伝子組み換えして被提供者の主要組織適合複合体 (MHC) 抗原を発現させるかまたはMHC抗原を全く発現させないようにすることができ、付随する拒絶の危険なしに提供者から被提供者へ細胞を移植することが可能になる。 40

【0009】

幹細胞は、広範囲な増殖可能性を有し、いくつかの細胞系統に分化して、移植時に組織に再集合 (repopulate) する細胞と定義される。典型的な幹細胞は胚性幹 (ES) 細胞であり、それはこれが無限の自己再生および多能性分化可能性を有するからである (Thomson, J. et al. 1995; Thomson, J.A. et al. 1998; Shablott, M. et al. 1998; Williams, 50

R.L. et al. 1988; Orkin, S. 1998; Reubinoff, B.E., et al. 2000)。これらの細胞は胚盤胞の内細胞塊に由来する(Thomson, J. et al. 1995; Thomson, J.A. et al. 1998; Martin, G.R.1981)かまたは、移植後胚由来の始原生殖細胞から得ることができる(胚性生殖細胞すなわちEG細胞)。ESおよびEG細胞はマウスから得られており、より最近では非ヒト霊長類およびヒトからも得られている。マウス胚盤胞に導入されたとき、ES細胞は当該マウス(動物)のすべての組織に寄与することができる(Orkin, S. 1998)。マウスES細胞はしたがって全能性である。出生後の動物に移植されたとき、ESおよびEG細胞は奇形腫を生じ、これはまたそれらの多能性を示す。ES(およびEG)細胞は、発生段階特異的胎児性抗原(SSEA)1および4に対する抗体を用いた陽性染色法で同定することができる。

10

【0010】

分子レベルでは、ESおよびEG細胞は、これらの未分化細胞に高度に特異的ないくつかの転写因子を発現している。これらには、oct-4とRex1、白血病抑制因子受容体(LIF-R)が含まれる。転写因子sox-2およびRox-1は、ESおよび非ES細胞の両方で発現している。oct-4は原腸未形成胚、卵割初期胚、胚盤胞の内細胞塊の細胞、および胚性癌(EC)細胞で発現している。成体動物では、oct-4は生殖細胞だけに見られる。

【0011】

oct-4は、Rox-1と共同して、亜鉛フィンガータンパク質Rex-1の転写活性化を引き起こし、またESを未分化状態に維持するためにも必要である。oct-4遺伝子は、細胞がin vitroで分化誘導されるときダウンレギュレートされる。いくつかの研究が、oct-4がES細胞の未分化の表現型を維持するのに必要であることと、胚発生および分化の初期段階の決定において大きな役割を果たすことを示している。Sox-2は、ES/ECの未分化状態を保ち、マウスES細胞を維持するのに、oct-4と共に必要であるが、ヒトES細胞の維持には必要でない。ヒトまたはマウス始原生殖細胞は、LIFの存在を必要とする。ES細胞のもう一つの顕著な特徴は、高濃度のテロメラーゼの存在であり、それはこれらの細胞に無限の自己再生能力をin vitroで提供する。

20

【0012】

幹細胞は大部分の器官または組織で特定されている。最もよく特徴づけられているのは造血幹細胞(HSC)である。この中胚葉由来細胞は、細胞表面マーカーおよび機能上の特徴に基づいて精製されている。骨髄(BM)、血液、臍帯血、胎児肝臓および卵黄嚢から単離されたHSCは、血液細胞を生じる前駆細胞であって、すなわち続く翻訳が複数の造血系統を再び開始し、被提供者の生命のために造血を再び開始することができる。(Fei, R., et al., 特許文献1; McGlave, et al, 特許文献2; Simmons, P., et al, 特許文献3; Tsukamoto, et al, 特許文献4; Schwartz, et al, 特許文献5; DiGuisto, et al, 特許文献6; Tsukamoto, et al, 特許文献7; Hill, B., et al, 1996を参照) 致死量の放射線を受けた動物またはヒトに移植されたとき、HSCは赤芽球、好中球-マクロファージ、巨核球およびリンパ球造血細胞プールに新たに定着することができる。In vitroで、造血幹細胞を少なくとも数度自己再生する細胞分裂を行うよう誘導することができ、そしてin vivoでみられるように同一の系統に分化するよう誘導することができる。したがって、この細胞は幹細胞の基準を満たす。造血系統の細胞を形成するようにのみ分化する幹細胞は、しかし、他の損傷した組織、たとえば、高用量の化学療法薬物によって損傷した心臓または肺の組織を修復するための細胞の起源を提供することはできない。

30

40

【0013】

幅広く研究されてきたもう一つの幹細胞は神経幹細胞(NSC)である(Gage F.H. 2000; Svendsen C.N. et al, 1999; Okabe S. et al, 1996)。NSCは初め胎児脳の脳室下領域および嗅球で見出された。最近まで、成体脳は幹細胞の能力を有する細胞を含まないと信じられていた。しかし、げっ歯類、より最近ではまた非ヒト霊長類およびヒトにおけるいくつかの研究が、幹細胞が成体脳に存在し続けることを示している。これらの幹細胞はin vivoで増殖でき、そして連続的に少なくとも一部の神経細胞をin vivoで再生する。ex vivoで培養したとき、NSCは増殖するように誘導することができ、またさまざまな型の神経細胞

50

胞およびグリア細胞に分化するように誘導することができる。脳に移植されたとき、NSCは定着し神経細胞およびグリア細胞を生じることができる。したがって、この細胞も、造血幹細胞でも、幹細胞の定義を満たす。

【0014】

Clarke et al.は、マウス胚盤胞またはニワトリ胚に注入されたLac-Z遺伝子導入マウス由来のNSCは、そのキメラマウスまたはニワトリ胚のいくつかの組織に寄与することを報告した (Clarke, D. L. et al. 2000)。LacZ発現細胞は、中枢神経系だけでなく、中胚葉派生物、また肝臓および腸の上皮細胞でさまざまな程度のモザイクで見出されたが、造血機構を含む他の組織ではみられなかった。これらの研究はしたがって、成体NSCは以前知られていたよりも顕著に大きな分化可能性を有しうるが、ESまたはFurcht et al. (国際出願番号PCT/US00/21387) およびここに記載された、成体から得られた多能性成体幹細胞 (MASC) の全能性は持たないことを示唆した。MASC、MAPCおよびMFCの用語は、成体から得られた多能性成体幹細胞を記載するために交換して使用可能である。

10

【0015】

変性および外傷性脳疾患の治療は、細胞置換療法を用いて大きく進歩しうる。NSCは成体哺乳類脳の脳室下領域 (SVZ) および海馬で見出されており (Ciccolini et al, 1998; Morrison et al., 1999; Palmer et al., 1997; Reynolds and Weiss, 1992; Vescovi et al., 1999)、上衣および脳の他の非神経性とされる領域にもまた存在しうる (Doetsch et al, 1999; Johansson et al, 1999; Palmer et al, 1999)。胎児または成体脳由来NSCは、ex vivoで増殖させ星状細胞、稀突起膠細胞および機能する神経細胞に分化するよう誘導することができる (Ciccolini et al, 1998; Johansson et al, 1999; Palmer et al, 1999; Reynolds et al, 1996; Ryder et al, 1990; Studer et al, 1996; Vescovi et al, 1993)。In vivoでは、時間を変えて培養した未分化のNSCはグリア細胞、GABA性およびドーパミン作用性神経細胞に分化する (Flax et al, 1998; Gage et al, 1995; Suhonen et al, 1996)。NSCの最も広く用いられている起源は同種異系胎児脳であり、これは免疫学的および倫理的問題を共に提起する。代案としては、NSCは自家脳から得ることができる。事前の神経病状がNSCの、培養され神経細胞およびグリア細胞にex vivoで分化するよう誘導される能力に影響するかどうかは知られていないため、また既に疾患のある脳における追加の手術が基礎疾患を悪化させる可能性があるため、この手法は魅力がより低い。

20

30

【0016】

置換戦略のための神経細胞およびグリアの理想的な起源は、成体の、容易に利用可能な脳以外の自己組織から採取しうる細胞で、またin vitroで増殖可能でありex vivoまたはin vivoで患者に欠けている細胞型に分化しうるものである。近年の報告は、BM由来細胞はin vitroでNSC条件下で培養したとき、または中枢神経系に入ったとき、神経外胚葉性細胞の表現型の特徴を獲得することを示唆している (Sanchez-Ramos et al., 2000; Woodbury et al, 2000)。この能力を有するBM細胞の表現型は知られていない。神経外胚葉性の性質を獲得する細胞の他の細胞型への分化のための能力もまた未知である。

【0017】

幹細胞の性質を有するもう一つの組織特異的細胞が間葉性幹細胞 (MSC) で、Fridenshtein (1982) によって最初に記載された。MSCは当初は胚性中胚葉から得られそして成体BMから単離され、分化して筋、骨、軟骨、脂肪、骨髄間質、および腱を形成することができる。胚発生の間、中胚葉は肢芽中胚葉、骨、軟骨、脂肪、骨格筋そしておそらく内皮を生じる組織に発展する。中胚葉はまた器官中胚葉に分化し、これは心筋、平滑筋、または内皮および造血前駆細胞から成る血島を生じうる。初期中胚葉つまりMSCはしたがって、いくつかの細胞および組織型の起源を提供しうる。いくつかのMSCが単離されている。(たとえば、Caplan, A., et al, 特許文献8; Young, H., et al, 特許文献9; Caplan, A., et al, 特許文献10; Bruder, S., et al, 特許文献11; Caplan, A., et al., 特許文献12; Masinovsky, B., 特許文献13; Pittenger, M., 特許文献14; Jaiswal, N., et al., 1997; Cassiede P., et al, 1996; Johnstone, B., et al, 1998; Yoo, et al, 1998

40

50

;
Gronthos, S., 1994を参照)。

【0018】

記載されている多くのMSCのうち、すべてが、一般に間葉起源と考えられている細胞を形成する限られた分化を示している。現在まで、報告された最も多能性のMSCはPittenger, et alによって単離された、SH2⁺SH4⁺CD29⁺CD44⁺CD71⁺CD90⁺CD106⁺CD120a⁺CD124⁻CD14⁻CD34⁻CD45⁻表現型を発現する細胞である。この細胞は分化して間葉起源のいくつかの細胞型を形成する能力があるが、明らかに、分化可能性は間葉性系統の細胞に限られていて、この細胞を単離したチームが注目したように拡大培養中に造血細胞は決して見つからなかった(Pittenger, et al, 1999)。

10

【0019】

消化管幹細胞(Potten, C. 1998)、上皮幹細胞(Watt, F. 1997)、そして円形細胞ともいう肝幹細胞(Alison, M. et al. 1998)を含む他の組織特異的幹細胞が同定されている。これらの大部分は比較してよく特徴づけられていない。

【0020】

ES細胞に比べて、組織特異的幹細胞の有する自己再生能力はより小さく、そして複数の系統に分化するが全能性ではない。組織特異的細胞が、ES細胞にみられると上記に記載されたマーカーを発現しているかどうかを扱った研究は無い。さらに、組織特異的または系統決定した幹細胞におけるテロメラーゼ活性の程度は、理由の一部としてこれらの細胞の多数の高度に増幅した集団を得るのは困難であるため、十分に調べられていない。最近まで、組織特異的幹細胞は同一の組織の細胞にだけ分化することができると考えられていた。いくつかの最近の文献は、成体器官特異的幹細胞にはさまざまな組織の細胞に分化する能力がありうると示唆している。しかし、これらの型の細胞の真の性質は完全には解っていない。いくつかの研究は、BM移植時に移植された細胞は骨格筋に分化しうることを示している(Ferrari 1998; Gussoni 1999)。このことは、骨髄に存在する間葉性細胞にありうる分化可能性の範囲内と考えることができる。Jacksonは、筋サテライト細胞は造血細胞に分化しうると発表し、これも胚の内臓中胚葉内での表現型の転換である(Jackson 1999)。他の研究は、ある胚葉(たとえば内臓中胚葉)由来の幹細胞が、胚発生中に別の胚葉から生じると考えられる組織に分化することができることを示している。たとえば、骨髄移植を受けたヒトまたは動物に検出される内皮細胞またはその前駆細胞は、少なくとも一部は骨髄提供者に由来する(Takahashi, 1999; Lin, 2000)。このように、内臓神経中胚葉でなく内臓中胚葉に由来する、MSCのような性質の子孫が、注入される骨髄と共に移植される。さらに驚くべきことには、げっ歯類とヒトの両方で提供者骨髄に由来する肝上皮細胞と胆管上皮細胞が被提供者に見られることを示す報告がある(Petersen, 1999; Theise, 2000; Theise, 2000)。同様に、NSCは造血細胞に分化しうることを3つのグループが示している。最後に、Clarke et al. は、胚盤胞に注入されたとき組織キメラマウスのすべての組織に寄与できる細胞をNSCと呼ぶことを報告している(Clarke et al, 2000)。

20

30

【0021】

これらの研究の大半は単一の細胞が異なる器官の組織に分化できることを決定的に示していないことを指摘する必要がある。また、任意の器官から単離された幹細胞は、必ずしも系統が決定した細胞ではない可能性がある。実際、大部分の研究者は開始細胞の表現型を特定しなかった。例外はWeissmanとGrompeによる研究で、彼らは、肝臓に定着した細胞はHSC中に高度に濃縮されているLin⁻Thy1⁺LowSca1⁺骨髄細胞に存在したことを示した。同様に、MulliganグループはHSCで高度に濃縮されている骨髄Sp細胞は筋および内皮に分化できることを示し、またJackson et al. は筋Sp細胞が造血再構成を担うことを示した(Gussoni et al., 1999)。

40

【0022】

異種ES細胞から作成された組織および器官の移植には、移植拒絶から保護するため、ある種の細胞表面マーカーの発現を阻害するように細胞にさらに遺伝子組み換えを行うか、ま

50

たは化学療法の免疫抑制剤の使用を続けるかが必要である。このように、ES細胞研究は移植のための器官の供給が限られているという問題に有望な新しい解決法を提供するが、異種細胞または組織の移植を維持するための免疫抑制の必要に伴う問題と危険は残る。人口の大多数を対照とする治療法に備えて免疫学的に互換性のある細胞を提供するためには、ES細胞の免疫学的に異なる株を推定20株確立する必要がある。

【0023】

自家または組織型別の一致する同種異系幹細胞の起源として、胚でなく成長した個体からの細胞を用いることは、移植ES細胞の使用に伴う組織不適合の問題を緩和するかまたは克服し、またES細胞研究に伴う倫理的二律背反も解決する。自家幹細胞を組織移植に用いることに伴う最大の短所は、これまでのところその比較的限られた分化可能性にある。

10

【0024】

成熟した生物とくにヒトからいくつかの幹細胞が単離されているが、これらの細胞は、多能性であることが報告されているにもかかわらず、複数の細胞型に分化する可能性は限られていることを示している。

【特許文献1】

米国特許第5,635,387号明細書

【特許文献2】

米国特許第5,460,964号明細書

【特許文献3】

米国特許第5,677,136号明細書

20

【特許文献4】

米国特許第5,750,397号明細書

【特許文献5】

米国特許第5,759,793号明細書

【特許文献6】

米国特許第5,681,599号明細書

【特許文献7】

米国特許第5,716,827号明細書

【特許文献8】

米国特許第5,486,359号明細書

30

【特許文献9】

米国特許第5,827,735号明細書

【特許文献10】

米国特許第5,811,094号明細書

【特許文献11】

米国特許第5,736,396号明細書

【特許文献12】

米国特許第5,837,539号明細書

【特許文献13】

米国特許第5,837,670号明細書

40

【特許文献14】

米国特許第5,827,740号明細書

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0025】

このように、複数の分化可能性を有する幹細胞が以前に他の研究者らおよび本発明者らによって単離されているとはいえ、繊維芽細胞、肝、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、骨格筋、内皮、間質、平滑筋、心筋そして造血細胞を含むさまざまな系統の幅広い細胞型へ分化する可能性を有する前駆細胞は記載されていない。細胞および組織移植と遺伝子治療が、期待される医療の進歩を提供するなら、最大またはもっとも広範囲の分化可能性を有す

50

る幹細胞または前駆細胞が求められる。必要なのは、ES細胞と成体において同等なものである。

【0026】

BM、筋そして脳は、以前思われていたより大きな見かけの可塑性が見出された3つの組織である。BMは、いくつかの中胚葉性 (Ferrari G. et al, 1998; Gussoni E. et al, 1999; Rafii S. et al, 1994; Asahara T. et al., 1997; Lin Y. et al, 2000; Orlic D. et al, 2001; Jackson K. et al, 2001)、内胚葉性 (Petersen B.E. et al, 1999; Theise, N.D. et al, 2000; Lagasse E. et al, 2000; Krause D. et al, 2001)、そして神経外胚葉性 (Mezey D.S. et al, 2000; Brazelton T.R., et al, 2000; Sanchez Ramos J. et al, 2000; Kopen G. et al, 1999)、および皮膚 (Krause, D. et al, 2001) の構造に寄与しうる細胞を含む。筋由来の細胞は造血機構に寄与しうる (Jackson K. et al, 1999; Scale P. et al, 2000)。NSCが造血細胞 (Bjornson C. et al, 1999; Shih C. et al., 2001)、平滑筋芽細胞 (Tsai R.Y. et al, 2000) に分化しうること、またマウス胚盤胞に注入されたときNSCがいくつかの細胞型を生じることの証拠もある (Clarke, D.L. et al, 2000)。

10

【0027】

本研究は、多能性成体前駆細胞の特徴を有する細胞を、複数の異なる器官すなわちBM、筋そして脳から培養して単離することができることを示す。その細胞は同じ形態、表現型、*in vitro*分化能力を有し、非常に似通った発現遺伝子プロファイルを有する。

【課題を解決するための手段】

20

【0028】

本発明は、哺乳類、好ましくはマウス、ラットまたはヒトから単離された多能性成体幹細胞 (MASC) である。当該細胞は胚以外の器官または組織に由来し、分化して中胚葉、外胚葉そして内胚葉起源の少なくとも一つの分化細胞型を形成するよう誘導することのできる能力を有する。好適な一実施形態においては、MASCが単離された器官または組織は骨髄、筋、脳、臍帯血または胎盤である。

【0029】

MASCから得ることのできる分化細胞の例は、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、繊維芽細胞、骨髄間質、骨格筋、平滑筋、心筋、眼、内皮、上皮、肝、膵、造血、グリア、神経細胞または稀突起膠細胞である。分化は*in vivo*または*ex vivo*で誘導することができる。

30

【0030】

本発明のMASCはまた、oct4および高濃度のテロメラーゼを構成的に発現し、CD44、MHCクラスIおよびMHCクラスII発現は陰性である細胞と要約される。治療法としては、治療上有効な量で患者に投与されたこの細胞である。この治療の驚くべき利点は、奇形腫が*in vivo*で形成されないことである。

【0031】

本発明の目的は、MASCを含む正常な非ヒト動物を作成することである。好ましくは、当該動物はキメラである。

【0032】

本発明の別の一実施形態は、MASCの集団とそのMASCの集団を拡大させる培地を含む組成物である。一部の場合には、培地が上皮成長因子 (EGF)、血小板由来成長因子 (PDGF) および白血病抑制因子 (LIF) を含むことが有益である。

40

【0033】

本発明はまた、完全にまたは部分的に精製したMASCの子孫細胞の集団を含む組成物を提供する。子孫細胞はさらに分化する能力を有していてもよく、最終分化していてもよい。

【0034】

好ましい一実施形態においては、子孫細胞は骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、繊維芽細胞、骨髄間質、骨格筋、平滑筋、心筋、眼、内皮、上皮、肝、膵、造血、グリア、神経細胞または稀突起膠細胞細胞型である。

【0035】

50

本発明はまた、哺乳類から組織を入手し、接着細胞の集団を確立し、その集団からCD45⁺細胞を除去し、CD45⁻細胞を回収して拡大条件下で培養して拡大した細胞集団を得ることによって、MASCを単離し増殖させる方法を提供する。本発明の目的はしたがって、この方法によって拡大した細胞集団を作成することである。

【0036】

本発明の一つの態様は、MASCを単離して増殖させ、次いで増殖した細胞を目的の分化因子の存在下で増殖させることによって、MASCをex vivoで分化させる方法である。好ましい分化因子は、塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)、血管内皮成長因子(VEGF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)およびイソプロテレノール；あるいは繊維芽細胞成長因子4(FGF4)および肝細胞成長因子(HGF)である。本発明の別の態様は分化細胞それ自体である。

10

【0037】

本発明は、MASCを単離して拡大し、次いで拡大した細胞集団を哺乳類宿主に投与し、そこで前記細胞集団が定着しin vivoで組織特異的細胞に分化し、それによって傷害、遺伝疾患、後天性疾患または医原性処置のために欠陥のある細胞または器官の機能が補強され、再構成され、あるいは初めて提供されるように、MASCをin vivoで分化させる方法を含む。この方法を用いて、MASCはin vivoで自己再生することができる。

【0038】

本発明のさらにもう一つの態様は、ex vivoまたはin vivo分化で得られた分化細胞である。好適な一実施形態においては、分化細胞は外胚葉、中胚葉または内胚葉である。好適な別の一実施形態においては、分化細胞は骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、繊維芽細胞、骨髓間質、骨格筋、平滑筋、心筋、眼、内皮、上皮、肝、脾、造血、グリア、神経細胞または稀突起膠細胞細胞型である。

20

【0039】

この技術の重要な用途は、MASCまたはその子孫の治療上有効な量を投与することによって患者を治療する方法である。子孫細胞はさらに分化する能力を有していてもよく、最終分化していてもよい。この手法の予期しなかった利点は、放射線照射、化学療法、免疫抑制剤または他の薬物または処置を用いた患者の前処置および／または後処置の必要が減少または消滅することである。処置前または処置中の耐性の誘導もまた必要でない。

【0040】

そのような治療法は、癌、心血管疾患、代謝疾患、肝疾患、糖尿病、肝炎、血友病、変性または外傷性神経疾患、自己免疫疾患、遺伝的欠陥、結合組織疾患、貧血、感染症および移植拒絶を含むさまざまな疾患および症状を治療することができる。

30

【0041】

MASCまたはその子孫は、カテーテル投与、全身注射、非経口投与、経口投与、または胚への子宮内注射を含む局所注射を介して投与される。投与は医薬として許容される基材と共に行うことができ、基材は生分解性であってもよい。

【0042】

患者に投与されたMASCまたはその子孫は、ウイルス、細菌または真菌感染に抵抗するよう免疫系を改変する。

【0043】

驚くべきことに、MASCまたはその子孫が患者に投与されたとき、奇形腫は形成されない。

40

【0044】

患者に投与されたとき、MASCまたはその子孫はまた、傷害、遺伝疾患、後天性疾患または医原性処置のために欠陥のある細胞または器官の機能を補強し、再構成し、あるいは初めて提供することもできる。器官は骨髓、血液、脾臓、肝臓、肺、腸管、脳、免疫系、循環系、骨、結合組織、筋、心臓、血管、脾臓、中枢神経系、末梢神経系、腎臓、膀胱、皮膚、上皮付属器、乳房-乳腺、脂肪組織、および口、食道、膣および肛門を含む粘膜のうち任意のものである。この方法によって治療可能な疾患の例は、癌、心血管疾患、代謝疾患、肝疾患、糖尿病、肝炎、血友病、変性または外傷性神経疾患、自己免疫疾患、遺伝的欠陥、結合組織疾患、貧血、感染症および移植拒絶である。

50

【0045】

MASCまたはその子孫は患者の中で一またはそれ以上の器官にホーミングし、それによって傷害、遺伝疾患、後天性疾患または医原性処置のために欠陥のある細胞または器官の機能が補強され、再構成され、あるいは初めて提供されるように、そこで定着するが、これは驚くべきことでまた予期しなかったことである。好適な一実施形態においては、傷害は虚血または炎症である。

【0046】

好適な別の実施形態においては、MASCまたはその子孫は血管新生を促進する。

【0047】

本発明の別の態様では、MASCまたはその子孫は、治療薬、好ましくは抗血管新生剤を輸送するように遺伝子組み換えされている。 10

【0048】

本発明は、MASCが骨髄、血液、脾臓、肝臓、肺、腸管、脳、免疫系、骨、結合組織、筋、心臓、血管、膵臓、中枢神経系、腎臓、膀胱、皮膚、上皮付属器、乳房-乳腺、脂肪組織、および口、食道、膣および肛門を含む粘膜から成る群から選択された組織を産生するのに有効な量で存在するMASCおよび医薬として許容される担体を含む治療用組成物を提供する。

【0049】

本発明はさらに、哺乳類提供者からMASCを取り出して未分化細胞の拡大集団を形成し、拡大した細胞を患者に投与し、そこで器官、組織または細胞の機能が回復される工程を含む、器官、組織または細胞の機能を患者に回復させるための治療法を提供する。回復される機能は酵素的または遺伝子的でありうる。好適な一実施形態においては、当該哺乳類提供者は患者である。 20

【0050】

本発明はMASCにex vivoで操作のためプロモーターに結合した被提供者のMHC抗原をコードする核酸配列を導入し、そこでMHC抗原がMASCによって発現され、そしてMASCを患者に移植し、そこでMHC抗原が移植されたMASCの拒絶を阻害するのに十分なレベルで発現される工程を含む、患者に移植された異種MASCの拒絶を阻害する方法を提供する。患者はMASCの提供者と同一種であるかまたは別の哺乳類種である。

【0051】

患者に移植された異種MASCの拒絶を阻害する別の方法は、遺伝子導入によってMASCにおいてMHC抗原の発現をノックアウトし、そして遺伝子導入MASCを患者に移植することを含む。MHC抗原はMASCによって発現されておらず、移植細胞の拒絶は阻害される。 30

【0052】

本発明の一つの目的は、MASCを単離しMASCを分化させて血液または血液成分を形成させる過程によって、血液または個別の血液成分をex vivoで作成する方法である。好ましくは、その個別の血液成分は赤血球、白血球または血小板である。

【0053】

本発明の別の態様は、MASCまたはその子孫のゲノムまたはプロテオーム構成を分析し、その分析をバイオインフォマティクスおよび／またはアルゴリズムを用いたコンピュータ分析を介して使用し、新規データを集め既知データベースと比較してこれらを比較対照する工程を含む薬物発見の方法である。 40

【0054】

さらなる態様は、MASCまたはその子孫のゲノムまたはプロテオーム構成を分析し、MASCの分化をin vitroまたはin vivoで誘導し、分化経路の中間細胞のゲノムまたはプロテオーム構成を分析し、分化経路の最終分化細胞のゲノムまたはプロテオーム構成を分析し、バイオインフォマティクスおよび／またはアルゴリズムを用いてMASCおよびその子孫のゲノムまたはプロテオーム構成を特徴づけ、そして得られたデータを比較して経路の構成要素を同定する工程を含む、分化経路の構成要素を同定する方法である。この方法を用いて、in vitroで起こる分化とin vivoで起こる分化とを比較することができ、それによってそ 50

の二つの系の基本的な差異を特徴づけることができる。

【0055】

本発明は、MASC中の産物を同定し、当該産物をMASCから単離することによって、治療上、診断上または研究上の有用性を有する産物をin vitroで作成する方法を提供する。好適な一実施形態においては、当該産物はタンパク質、脂質、複合糖質、DNAまたはRNAである。

【0056】

本発明には、哺乳類において、前記哺乳類に投与された抗原に対する耐性を誘導する方法が含まれ、その方法は、続いての前記抗原を用いた感作に対する前記哺乳類の体液性免疫反応が抑制されるように、前記抗原の投与の後またはそれと同時にMASCまたはその子孫の有効量を前記哺乳類に投与する工程を含む。

10

【0057】

血液をex vivoでMASC由来細胞と接触させることを含み、ここで前記細胞が中空の繊維性の器具の内面を覆っている、患者の血液から毒素を除去する方法もまた含まれる。好適な一実施形態においては、当該細胞は腎または肝細胞である。

【0058】

本発明の一つの目的は、前記患者の血液をex vivoでMASCまたはその子孫と接触させることを含み、ここで前記MASCまたはその子孫は治療薬を輸送するように遺伝子組み換えされている、治療用産物を患者へ輸送するための方法である。さらなる一つの目的は、MASCまたはその子孫をex vivoで前記薬物と接触させ細胞生存を観察することを含む、薬物の毒性を試験するための方法である。好適な一実施形態においては、当該子孫細胞は肝、内皮、上皮および腎細胞より成る群から選択される。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0059】

下記の詳細な説明は、説明の目的で提示され、しかし本発明を記載の特定の実施例に限定することを意図せず、本願に引用して援用する添付の図面と共に理解することができる。

【0060】

図1は、骨髓（BM）、筋および脳由来MASCの拡大可能性を示す図である。

【0061】

図2は、遺伝子発現の（A）筋および脳MASCそして（B）骨髓および筋MASCにおける遺伝子発現を示す散布図である。

30

【0062】

図3は、未分化MASCおよびVEGFとともに培養したMASCのFACS分析を示す図である。プロットはイソ型対照IgG染色プロファイル（細線）に対し特異的抗体染色プロファイル（太線）を示す。図Aは未分化MASCの表現型を示す。MASCは低レベルのp2ミクログロブリン、Flk1、Fit1およびAC133を発現しているが、他のどの抗内皮マーカーでも染色されない；図Bは14日間、10ng/mLのVEGFとともに培養したMASCの表現型を示す。MASCは内皮細胞に伴う低レベルの大部分のマーカーを発現しているが、AC133の発現は失っている；そして図Cは3～9日間10ng/mLのVEGFとともに培養したMASCの表現型を示す。MASCはVEGFとともに培養した3日目までにAC133の発現を失い、TekおよびVE-カドヘリンの発現を3日目までに獲得し、CD34およびHIP12を9日目までに獲得している。

40

【0063】

図4はmMASCの定着とin vivo分化の顕微鏡写真である。スライドは蛍光または共焦点顕微鏡法で検査した。図A、G、J、N、QおよびSは、mMASCを注射されていない対照NOD-SCID動物の同一に染色された組織を示す。図A～Fは、抗 β -gal-FITC抗体および各種造血抗原に対するPE-結合抗体で染色した、対照（A）および試験（B～F）動物からの骨髓（BM）サイトスピンの顕微鏡写真を示す。A～B:CD45、C:CD19、D:MAC1、E:GR1、F:TER119およびDAPI；図G～Iは、抗 β -gal-FITC抗体および抗CD45-PE抗体で染色した、対照（G）および試験動物（H、I）からの脾臓断面の顕微鏡写真を示す。提供者由来抗 β -gal⁺細胞が塊になって見られる。Hは10倍でIは60倍の倍率である；図J～Mは、抗 β -gal-FITCで染色した、対照マウス（J）および試験動物（K～M）からの肝臓断面の顕微鏡写真を示す。J～Lはマウ

50

ス抗CK-18/抗マウス-Cy5に加えてCD45-PEと、そしてMはマウス抗アルブミン/抗マウスCy3抗体と同時染色されている。J~K、LおよびMはそれぞれ20倍、60倍および10倍の倍率である；図N~Pは、抗 β -gal-FITCに加えてマウス抗pan-CK/抗マウス-Cy5抗体（N~P）で染色された、対照マウスおよび試験動物（O~P）からの腸断面の顕微鏡写真を示す。NおよびPはCD45-PE抗体で同時染色した。 β -gal⁺Pan-CK⁺CD45⁻上皮細胞が絨毛の周囲の50%を覆っている（黒矢印、図P）。CD45について同時染色した（P）絨毛の中心のPan-CK⁻/ β -gal⁺細胞（白矢印-図O）；図Q~Rは抗 β -gal-FITCに加えてマウス抗pan-CK/抗マウス-Cy5およびCD45-PE抗体で染色した対照マウス（Q）および試験動物（R）からの肺断面の顕微鏡写真を示す。いくつかの β -gal⁺pan-CK⁺提供者細胞が被提供者動物の肺胞の内面を覆っているのが見られる（R）。造血起源のCD45⁺/pan-CK⁻細胞が上皮細胞から明らかに見られる；そして図S~Tは抗 β -gal-FITC、抗vWF-PEおよびT0-PR03で染色した対照マウス（S）および試験動物で成長した移植後16週間の胸腺リンパ腫（T）の血管断面の顕微鏡写真を示す。

10

【0064】

β -gal⁺提供者細胞は、腫瘍細胞は抗 β -Gal抗体で染色されなかったので被提供者起源である胸腺リンパ腫内でvWF⁺内皮細胞に分化した。

【0065】

図5はMASC由来内皮細胞の共焦点蛍光顕微鏡法を用いた免疫組織化学的評価を示す図である。（a）VEGF中で14日間培養したMASC。接着受容体 α v β 5について、および接着結合タンパク質Z0-1、 β -および γ -カテニンについて、典型的な膜染色が見られる。目盛り棒=50 μ m。（b）VEGF処理後0日目（上図）および21日目（下図）のMASCの明視野での形態。棒=25 μ m。

20

【0066】

図6はMASC由来内皮細胞の顕微鏡写真である。図AはMASC由来内皮からのvWFのヒスタミン媒介放出を示す。ミオシンに対する抗体を用いた染色が、ミオシンストレスファイバーの数の増殖、およびギャップ結合の拡大（矢印）を伴う細胞骨格の変化を示す（実験3回の代表例）。目盛り棒=60 μ m；図BはMASC由来内皮がa-LDLを取り込むのを示す。7日間後、細胞はTie-1を発現したが、今度はa-LDLを取り込まなかった。しかし、9日目のvvWF発現の獲得はaLDL取り込みを伴った（実験10回の代表例）。目盛り棒=100 μ m；そして図CはMASC由来内皮による血管形成を示す。6時間後、典型的な血管をみることができた（実験6回の代表例）。目盛り棒=200 μ m。

30

【0067】

図7はMASC由来内皮細胞のFACS分析を示す図である。プロットはイソ型対照IgG染色プロファイル（細線）に対する特異的抗体染色プロファイル（太線）を示す（実験>3回の代表例）。プロットの上の数字は対照IgG染色および特異的抗体染色についての平均蛍光強度（MFI）である。図Aはフローサイトメトリー分析で、MASC由来内皮細胞で低酸素がFlk1およびTek発現をアップレギュレートするのを示す；図BはMASC由来内皮細胞によるVEGF産生を低酸素がアップレギュレートするのを示す。VEGFレベルはELISAで測定し、結果は実験6回の平均 $\pm$ SEMで示す；そして図CはIL-1aがクラスIIHLA抗原の発現を誘導し接着受容体の発現を増加させることを示す。プロットはイソ型対照IgG染色プロファイル（細線）に対する特異的抗体染色プロファイル（太線）を示す（実験3回の代表例）。プロットの上の数字は対照IgG染色および特異的抗体染色についてのMFIを示す。

40

【0068】

図8はヒトMASC由来内皮細胞の顕微鏡写真である。図C~Fは抗ヒト β 2-ミクログロブリン-FITC（図C）または抗マウス-CD31-FITC（図D）のいずれか、および両者の融合（図E）、抗vWF-Cy3（図F）および3つの染色パターンの融合（図G）の3次元再構成図を示す。図AおよびBは抗ヒト β 2-ミクログロブリン-FITCおよび抗vWF-Cy3、または抗マウスCD31-Cy5および抗vWF-Cy3、のいずれかで染色した一つの切片の共焦点像を示す。目盛り棒=100 μ m。図HはヒトMASC由来内皮細胞（上図）またはヒト包皮繊維芽細胞s（下図）を注射したマウスにおいて抗 β 2-ミクログロブリン-FITCおよび抗vWFで染色した穿孔した耳で創傷治

50

癒が結果として高度に血管新生した部分を生じたのを示す。目盛り棒 = 20 μ m。C = 軟骨。D = 真皮。図Iは腫瘍血管新生が *in vivo* でMASCから生じた内皮細胞に由来し、結果として抗 β 2-ミクログロブリン-FITC、抗vWFおよびTOPRO-3で染色した腫瘍中に高度に血管申請した部分を生じるのを示す。目盛り棒 = 20 μ m。

【0069】

図9はhMSC由来神経細胞様細胞におけるスパイク生成および発現した電位依存性ナトリウム電流を表す図である。図Aはスパイク生成および発現した電位依存性ナトリウム電流を示した培養hMSC由来神経細胞の顕微鏡写真を示す（ピペットの影が細胞を指す）。図BはhMSC由来神経細胞から得た電流固定記録を示す図である。図Cは同じhMSC由来神経細胞から得たリークを差し引いた電流記録を示す図である。

10

【0070】

図10は肝細胞様表現型を確認した定量的RT-PCRおよびウェスタンブロット分析を示す図である。図AおよびBはFGF4およびHGF、またはFGF4単独と、それぞれ21および28日間Matrigel（商標）で培養したmMASC（A）およびhMASC（B）を示す。 α FP、Cyp2b9 およびCyp2b13については、未分化MASCでは転写物が検出されなかったため、プロットの下に数字は肝臓から得たmRNAとの相対比である。Li = マウスまたはヒト肝臓mRNA；NT = テンプレート無し。マウス5例とヒト1例の試験の代表例として、図CはFGF4およびHGF、またはFGF4単独と、21日間Matrigelで培養したhMASC（B）を示す。FH = Matrigel上のFGF4およびHGF誘導性hMASC、Huh = 対照として用いたHuh7細胞株。

【0071】

20

図11は肝細胞様細胞の顕微鏡写真を示す。FGF4によって誘導されたMASCはグリコーゲンを産生する。グリコーゲン貯蔵は染色濃部の集積として見られる（試験3回の代表例）。目盛り棒 = 25 μ m。

【0072】

定義

ここでは、以下の用語は以下の意味を持つものとする：

「拡大」は分化なしでの細胞の増殖を意味することとする。

【0073】

「中間細胞」は、MASCの分化の間に生じる、MASCまたはその最終分化した子孫の一部の特徴を有するがすべての特徴は有しない細胞である。中間細胞は特定の経路に決定された前駆細胞であってもよいが、特定の細胞型に決定されていない。

30

【0074】

「正常」は病気、突然変異、または奇形を有しない動物、すなわち健康な動物を意味することとする。

【0075】

「自己再生」は外的刺激を加えられることなしに増殖する細胞の能力を意味することとする。組織または器官で局所的に産生されるサイトカインまたは他の成長因子の存在は外的刺激とならないこととする。

【0076】

「ホーミング」は、追加の細胞が必要である部位に特異的に移動する、一部のMASCまたはその子孫の能力を意味することとする。

40

【0077】

「発現のノックアウト」は、特定の遺伝子の機能の消失を意味することとする。

【0078】

ここでは、「ゲノムまたはプロテオーム構成」は任意の細胞の遺伝子またはタンパク質構成要素を意味することとする。

【0079】

「高レベルのテロメラーゼ活性」はヒト不死細胞株MCF7で観察されるレベルの2倍と関連づけることができる。Soule et al. (1973) J. Cancer Inst. 51:1409-1416。

50

【0080】

技術用途

MASC技術は哺乳類の体内の損傷細胞、疾患細胞、機能不全細胞または死細胞に置き換えるのに用いることができる。さらにこれらの細胞は、自家または同種異系細胞を用いて、天然または人工の担体、基材、または高分子とともにあるいはこれら無しで、たとえば鎌状赤血球病、血友病または、たとえばゴーシェ病、ニーマン・ピック病、ムコ多糖症などのように処理の欠陥のために産物が体内に蓄積する「貯蔵病」といったタンパク質機能に影響する遺伝子突然変異のように遺伝的な、失われた細胞、異常な機能または細胞または器官を修正するために、宿主に注射することができる。瀕死細胞または死細胞の回復の例は、黄斑変性症および他の神経変性疾患の治療におけるMASCまたはその分化した子孫の用途となりうる。 10

【0081】

これらのMASCを宿主動物の器官/組織に「ホーミング」させて組み込み増殖および分化する能力を考えると、MASCはおそらく虚血心および心筋細胞自体にも新しい内皮細胞を提供するのに用いることができる可能性があり、多数の他の例が存在する。

【0082】

組織または器官の機能への一時的な利益が望ましい効果を有しうる医学的状況があり得る。たとえば、正常な肝機能が回復できるようにするために十分なバイオ人工肝臓を接続し、肝移植の必要を防いだ肝障害患者の例がある。これはたとえば、C型肝炎というひとつの肝疾患だけでも、重大で満たされていない医療上の必要である。現在C型肝炎に感染している米国人は4~5百万人存在し、これらの人々の50%が将来肝硬変になり肝移植を必要とするという推定がある。このことはぜひ救済を要する公衆衛生上の大問題である。自家または同種異系MASCに由来する肝細胞は、C型肝炎または他の肝疾患において移植できる。そのような移植は、提供者自身の肝細胞が回復できるように一時的に肝機能を提供するか、または永久的に損傷肝臓に再定着し提供者細胞によって正常な肝機能が回復するようにすることができる。 20

【0083】

未分化のMASCがヒトまたは他の哺乳類に投与されその後被提供者の中で特定の細胞に分化する多くの細胞療法に加えて、MASCの子孫細胞はex vivoで分化させてその後精製した細胞または細胞の混合物として治療上の利益を提供するために投与することができる。これらの未分化状態のMASCはまた、治療上の利益を有する薬物または分子を輸送する担体または媒体として使用することができる。これは、癌、心血管疾患、炎症性疾患、免疫疾患、感染症、などを含むがこれに限定されないいくつかの疾患のうち任意のものを治療するのに用いることができる。そこで例として、細胞、おそらく新規のまたは高いレベルの血管新生分子を発現している内皮細胞を、患者に投与することができ、それは既存の血管に組み込まれて血管新生をたとえば心臓で促進する；同様に、血管新生を抑制する分子を産生し、血液細胞に組み込まれてそれ以上の形成をたとえば糖尿病性網膜症または新たな血管形成が疾患の病因、蔓延および程度の鍵となる癌において抑制する内皮細胞を得ることができる。 30

【0084】

BMに定着して血液をex vivoで形成する能力は、影で重要な医療上の用途を有する。たとえば、血液のex vivo産生に関して、輸血および血液製剤の注射は世界中でまだ行われていて、その安全性は病原体の感染のために変わりやすい。輸血は、HIV、BおよびC型肝炎、そして現在は狂牛病またはCJD、クロイツフェルト-ヤコブ病の差し迫った危険に繋がってきた。血液、特に赤血球をin vitroで産生する能力は、血液をヒトから集めることの安全かつ信頼できる代替法を提供しうる。提供者からの採血を完全に代替することは決して無いと思われる。hMASCまたはその造血性の子孫を、たとえばヒツジといった動物に胎内で注入し、ヒト造血細胞を形成しヒト血液成分または医療上の用途のあるタンパク質の起源として使うことができる。同じことが肝細胞、脾臓または多くの他の細胞型についていえるが、ヒト細胞をin vitroで産生することの代替案を提供し、動物を細胞の工場として 40 50

用いる。このことは発生が予測される血液不足を補助することができる。hMASCはまた、考えられる限りでは、いくつかの欠陥のうち任意の一つを修正するためにヒト胚に移植することができる。

【0085】

これらのMASCは特異的に分化した細胞のクローン集団を生じることができるため、これらは薬物発見の豊かな基盤である。これにはこの周辺の、遺伝子を発現させること、遺伝子発現を分析すること、活性化の新規の遺伝子活性化パターンの発見、プロテオミクスおよびタンパク質発現および修飾のパターンが含まれる。これはデータベースと、これらのデータを公開または自己所有のデータベースと比較したこれらのデータを分析するためのアルゴリズムとを用いて、バイオインフォマティクスで分析される。既知の薬物または物質がどのように挙動するかを、MASC、その分化した子孫、および利用可能なヒトの集団から得られた情報と比較することができる。経路、標的、および受容体を同定することができる。新薬、抗体または他の化合物が生物学的に望ましい反応を生じるのを発見することができる。同様に、MASCおよびその分化した子孫を、データベース、バイオインフォマティクスおよびアルゴリズムと組み合わせて、望ましくない反応についてのモニターとして用いることができる。

10

【0086】

ヒト、マウス、ラットまたは他の哺乳類に由来するこれらのMASCは現在までに知られた唯一の、正常の、非-悪性の、継代の遅い細胞でさえ非常に高レベルのテロメラーゼを発現する体細胞（非-生殖細胞）であるように見える。テロメアはMASCで伸長していて核型的には正常である。哺乳類に注射されたMASCは、複数の器官へホーミングするので、特定の器官に新たに到着したMASCは自己再生できる可能性がある。このように、MASCは自分自身だけでなく、損傷したか、死亡したか、でなければ遺伝的または後天性疾患のために異常な機能を有した細胞型である、自己再生する分化した細胞型でも、器官に再定着する可能性を有する。

20

【0087】

たとえば、I型糖尿病では膵島のインシュリン産生ベータ細胞が進行性に失われる。各種の腎疾患では機能の進行性消失と、一部の場合では糸球体の消滅がある。もし糖尿病の場合には、MASCまたは分化した子孫が膵臓にホーミングして、それ自身でまたは膵臓の中で内因性細胞との相互作用によって、膵島が形成されるように誘導しうる。これは糖尿病を改善する効果を有しうる。最終的には、MASCの自己再生する能力をin vivoで制御する、すなわち促進または抑制し、そして分化した子孫、たとえば、膵島前駆細胞、肝細胞前駆細胞、血球前駆細胞、神経および／または心前駆細胞への移行を制御する、すなわち促進または抑制する、条件、物質または薬物が見出されうる。MASCを用いて、増殖し分化する内因性前駆細胞を器官の中で誘導しうる、経路、活性化の方法および制御を見出しうる。

30

【0088】

細胞組織または器官の区画に再定着し自己再生しそしてまた分化するこの同じ能力は、多数の用途と、医療上の満たされていない深い必要性を満たす前例の無い効用を有しうる。たとえば、酵素欠損症が存在するある種の遺伝疾患は、BM移植によって治療されている。これはしばしば、疾患の後遺症が脳または骨または他の場所に残りうる疾患の合併症に助けとなりうるが治癒はしない。MASCおよび遺伝子組み換えMASCは、多数の遺伝的および後天性疾患を改善する希望をもたらす。これらはまた、診断上または研究上の目的および薬物発見に有用となる。

40

【0089】

本発明はまた、MASCのゲノムまたはプロテオーム構成を分析し、バイオインフォマティクスによるその分析、アルゴリズムによるコンピュータ分析と組み合わせて、新たなデータベースを収集し既知のデータベースと比較しこれらを対照することを含む；薬物発見、ゲノミクス、プロテオミクス、および経路の同定のための方法を提供する。これによって、治療上の利益を有する可能性のある新規化合物、抗体、タンパク質、小分子有機化合物、または他の生物活性分子に関する標的の定義に繋がらうる、主要構成要素、経路、新規遺

50

伝子および／または遺伝子とタンパク質発現とタンパク質修飾の新たなパターン（プロテオミクス）が同定できる。

【0090】

以下の実施例は本発明を説明するために提供され、しかし本発明を限定しない。

【実施例1】

【0091】

マウス多能性成体幹細胞（mMASC）の選択、培養および特徴づけ

細胞単離と拡大

すべての組織はミネソタ大学学内動物実験委員会からのガイドラインに従って得た。BM単核細胞（BMMNC）はBMのフィコール・ハイパック分離によって得た。BMは5～6週齢のROSA26マウスまたはC57/BL6マウスから得た。あるいは、筋および脳組織を3日齢のマウス129匹から得た。前肢および後肢の近位部からの筋を摘出しよく挽いた。その組織を0.2%コラゲナーゼ（Sigma Chemical Co, St Louis, MO）を用いて1時間、37℃で処理し、次いで0.1%トリプシン（Invitrogen, Grand Island, NY）で45分間処理した。細胞をその後よく磨碎し、70μmフィルターを通した。細胞懸濁液を回収して、10分間、1600rpmで遠心分離した。脳組織は切開してよく挽いた。細胞を0.1%トリプシンおよび0.1% DNase（Sigma）とともに30分間、37℃でインキュベートして解離させた。細胞をその後よく磨碎し、70μmフィルターを通した。細胞懸濁液を回収して、10分間、1600rpmで遠心分離した。

【0092】

BMMNCまたは筋または脳懸濁液を、 $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ で拡大培地[2%PCS添加低グルコースDulbecco最小必須培地（LG-DMEM）に、血小板由来成長因子（PDGF）と上皮成長因子（EGF）および白血病抑制因子（LIF）を各10ng/mL]に平板播種し、 $5 \times 10^3 / \text{cm}^2$ で維持した。3～4週間後、トリプシン/EDTAで回収した細胞からCD45⁺/グリコフォリン（Gly）-A⁺細胞を磁気マイクロビーズを用いて除去した。結果として得られたCD45⁻/Gly-A⁻細胞を10細胞/ウェルでFN被覆96穴プレートに再播種し、 $0.5 \sim 1.5 \times 10^3 / \text{cm}^2$ の間の細胞密度で拡大した。MASCの拡大可能性は由来する組織にかかわらず同様であった（図1）。

【0093】

MASCの特徴づけ

表現型的には、BM、筋および脳由来の、FNで培養したmMASCは、CD13⁺、CD44⁻、CD45⁻、クラスIおよびクラスII組織適合抗原-、低Flk1およびcKifで、国際出願番号PCT/US00/21387に記載されたhMASCの特徴と同一であった。細胞をIV型コラーゲン、ラミニンまたはMatrigelで培養したときのほうが、最初の2～3ヶ月間の細胞拡大はより大きかったが、細胞はMASCの表現型の特徴を有した、すなわち、CD44を発現しCD13を発現しなかった。ヒト細胞と同様に、FNで培養したmMASCはoct-4の転写物とLIF-Rとを発現した。

【0094】

10個のCD45⁻/GlyA⁻細胞を播種したウェルの約1%から、連続的に成長する培養が得られた。これは、培養MASCを開始しうる細胞が稀であっておそらくCD45⁻/GlyA⁻細胞の1/1,000より少ないことを示唆する。FNで培養したmMASCは直径8～10μmで大きい核と少ない細胞質を有する。いくつかの集団が> 100 PDの間培養されている。細胞の形態と表現型は培養期間を通じて変化しないままであった。

【0095】

40および102 PDを経過したmMASCを採取し、テロメア長を評価した。テロメア長はPharmin gen（New Jersey, USA）のテロメア長分析キットを用いて取扱説明書に従って測定した。40 PDの間培養したmMASCの平均テロメア長（ATL）は27Kbであった。102PD後に再試験したとき、ATLは変化しないままであった。mMASCの核型分析には、以前に記載した通り細胞を採取前に1:2希釈で12時間継代培養し、トリプシン-EDTAを用いて回収し、1.5時間コルセミド処理し、続いて低張KClを用いて細胞溶解し、酸/アルコールで固定した（Verfaillie et al., 1992）。細胞遺伝学的分析は月単位で行い、45 PD後に高二倍体となった、試験には使われなくなった一つの集団を除いて正常核型を示した。

【0096】

10

20

30

40

50

46から>80PD後に得られたマウスMASCを、ES細胞の未分化状態を維持するのに重要な二つの転写因子であるoct4およびRex1の発現レベルについて、定量的(Q)-RT-PCRによって試験した。マウスMASC、神経外胚葉性に分化した子孫(bFGFの添加後1~7日目)およびマウスES細胞からRNAを抽出した。RNAを逆転写し、結果として得られたCDNAを下記の反応条件で40回増幅した(ABI PRISM 7700, Perkin Elmer/Applied Biosystems): 2μLのDNA溶液と、1X TaqMan SYBR Green Universal Mix PCR反応緩衝液を用いた最初の変性(95℃で10分間)後、二段階PCR(95℃で15秒間、60℃で60秒間)を40サイクル。プライマーは表1に列記する。

【表1】

表1: 使用プライマー

NEO	5'-TGGATTGCACGCAGGTTCT-3' 5'-TTCGCTTGGTGGTTCGAATG-3'
Oct4	5'-GAAGCGTTTCTCCCTGGATT-3' 5'-GTGTAGGATTGGGTGCGTT-3'
Rex 1	5'-GAAGCGTTTCTCCCTGGAATTC-3' 5'-GTGTAGGATTGGGTGCGTTT-3'
otx 1	5'-GCTGTTTCGCAAAGACTCGCTAC-3' 5'-ATGGCTCTGGCACTGATACGGATG-3'
otx2	5'-CCATGACCTATACTCAGGCTTCAGG-3' 5'-GAAGCTCCATATCCCTGGGTGGAAAG-3'
ネスチン5'	5'-GGAGTGTTCGCTTAGAGGTGC-3' 5'-TCCAGAAAGCCAAGAGAAGC-3'

【0097】

mRNAレベルはGAPDHをハウスキーピング遺伝子として用いて標準化し、マウスES細胞中のレベルと比較した。oct4およびRex1 mRNAは、BM、筋および脳由来MASC中に同様のレベルで存在した。Rex1 mRNAレベルはmMASCおよびmES細胞で同様であった一方、oct4 mRNAレベルはMASCでES細胞より約1,000倍低かった。

【0098】

マウスBM、筋および脳由来MASCの発現遺伝子プロファイルは非常に類似している。異なる組織に由来するMASCが同様であるかどうかさらに評価するために、BM、筋および脳由来MASCの発現遺伝子プロファイルをU74A Affimetrix遺伝子アレイを用いて検討した。要約すると、45回細胞分裂の間培養した2~3x10⁶個のBM、筋または脳由来MASCからmRNAを抽出した。CDNAの調製、6,000個のマウス遺伝子と6,000個のESTクラスターを含むU74Aアレイとのハイブリッド形成、およびデータ取り込みは取扱説明書に従って行った(すべてAffimetrix, Santa Clara, CAより)。データ分析はGeneChip(登録商標)ソフトウェア(Affimetrix)を用いて行った。2.2倍の因数での発現増加または減少(Iyer V.R. et al., 1999; Scherf U. et al., 2000; Alizadeh A.A. et al., 2000)を有意とみなし、r²値を直線回帰分析を用いて決定した(図2)。

【0099】

3種類の組織に由来するMASCの発現遺伝子プロファイルの比較は、BM由来のMASCで筋由来と比べて遺伝子の1%未満が2.2倍より大きく異なるレベルで発現していたことを示した。同様に、BM由来のMASCで脳由来と比べて遺伝子の1%未満だけが2.2倍より大きく異なるレベルで発現していた。異なるMASC集団間の相関係数は>0.975であったため、異なる組織に由来するMASCは非常に相同であり、上記の表現型および実施例5に記載の分化の特徴と合致する。

【0100】

マウス特異的培養条件を用いて、mMASC培養を100細胞分裂以上維持している。mMASC培養

10

20

30

40

50

は、-HMG-LacZについて遺伝子導入したC57BL/6マウス、ROSA26マウスおよびC57BL/6マウス由来の骨髓を用いて開始した。

【実施例 2】

【0101】

ラット多能性成体幹細胞 (VMASC) の選択と培養

Sprague DawleyまたはWistarラット由来のBMおよびMNCをmMASCについてと同様の条件下で得て播種した。21~28日間後、細胞からCD45⁺細胞を除去し、結果として得られたCD45⁻細胞を10細胞/ウェルで継代培養した。

【0102】

mMASCと同様に、rMASCは>100PDの間培養して拡大している。ラットMASC培養の拡大条件には、EGF、PDGF-BBおよびLIFの添加と、I型コラーゲン、ラミニンまたはMatrigelでなくFNでの培養が必要であった。rMASCはCD44、CD45およびMHCクラスIおよびIIについて陰性で、高レベルのテロメラーゼを発現した。100細胞分裂を超えて生育する正常細胞の能力は前例が無く、予想外で、20年以上の従来の定説に反する。

【0103】

42PD、72 PD、80 PD、および100 PDを経過したラット MASCを採取してテロメア長を評価した。42 PD、72 PD、80 PD、and 100 PD後のサザンブロット分析で測定されたように、テロメアは培養中に短縮しなかった。ラットMASCの毎月の細胞遺伝学的分析では正常核型が見られた。

【実施例 3】

【0104】

ヒト多能性成体幹細胞 (hMASC) の選択と培養

BMは健康なボランティア提供者 (2~50歳) から、研究におけるヒト被験者の使用に関するミネソタ大学委員会からのガイドラインを用いたインフォームド・コンセント後に得られた。BMMNCはフィコール・バック密度勾配遠心分離によって得られ、depleted of CD45⁺およびグリコフォリン-A⁺細胞を磁気マイクロビーズ (Miltenyii Biotec, Sunnyvale, CA) を用いて除去した。

【0105】

拡大条件: 5x10³個のCD45⁻/GlyA⁻細胞を200uLの拡大培地[1Xインシュリン-トランスフェリン-セレン (ITS)、1Xリノール酸ウシ血清アルブミン (LA-BSA)、10⁻⁸Mデキサメタゾン、10⁻⁴Mアスコルビン酸-2-リン酸 (すべてSigma)、100Uペニシリンおよび1,000Uストレプトマイシン (Gibco) を添加した58%DMEM-LG、40%MCDB-201 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) に、10 ng/mlのEOF (Sigma) および10ng/mlのPDGF-BB (R&D Systems, Minneapolis, MN) を含む胎児ウシ血清 (PCS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT) を0~10%添加]で希釈し、5ng/mlのFN (Sigma) で被覆した96穴プレートのウェルに播種した。培地は4~6日毎に交換した。ウェルの>40~50%に密集成長したら、接着細胞を0.25%トリプシン-EDTA (Sigma) を用いて剥離して、MASC拡大培地に1:4希釈で5ng/mlのFNで被覆したより大きな培養容器に再播種し、2~8x10³細胞/cm²の間の細胞密度を維持した。

【0106】

未分化のMASCはCD31、CD34、CD36、CD44、CD45、CD62-E、CD62-L、CD62-P、HLA-クラスIおよびII、cKit、Tie、Tek、αvβ3、VE-カドヘリン、血管内皮細胞接着分子 (VCAM)、細胞内接着分子 (ICAM) -1を発現しなかった。MASCは低い/非常に低いレベルのβ2-ミクログロブリン、αvβ5、CDw90、AC133、Flk1およびFlt1、そして高レベルのCD13とCD49bを発現した (図3)。

【実施例 4】

【0107】

免疫表現型分析

免疫蛍光

1.培養細胞を4%パラホルムアルデヒドおよびメタノールメタノールを用いて室温で固定し、一次抗体と、そして二次抗体とあるいは二次抗体無しで、連続して各30分間インキュベ

ートした。各工程の間に、スライドをPBS/BSAで洗浄した。細胞は蛍光顕微鏡法 (Zeiss A xiovert; Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY) および共焦点蛍光顕微鏡法 (共焦点1024 顕微鏡; Olympus AX70, Olympus Optical Co. LTD, Japan) によって検査した。任意の 培養中の異なる細胞型の頻度を評価するために、任意の抗体について染色陽性となった細胞を4つの視野 (視野あたり細胞50~200個) で計数した。2.採取組織:血液およびBMのサイ トスピン標本をアセトン (Fisher Chemicals) で10分間、室温で固定した。固形器官に ついては、組織の5 μ m厚の新鮮凍結切片をスライドグラスに乗せ、ただちにアセトン中 で10分間、室温で固定した。イソ型血清で20分間インキュベート後、サイトスピン調製物 または組織切片を、組織特異的抗原、 β -galおよび核対比染色剤 (DAPIまたはTO-PRO-3) について連続的に染色した。

10

【0108】

カバースリップはSlowfade-antifadeキット (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) を用いて乗せた。スライドは蛍光顕微鏡法および共焦点蛍光顕微鏡法によって検査した。

【0109】

3.抗体:細胞は4%パラホルムアルデヒドを用いて室温で、またはメタノールを用いて-20 °Cで固定し、一次抗体、およびFITCまたはCy3結合抗マウス-または抗ウサギ-IgG抗体を用 いて連続的に各30分間インキュベートした。各工程の間にスライドをPBS+1%BSAを用いて 洗浄した。PEまたはFITC結合抗CD45、抗CD31、抗CD62E、抗Mac1、抗Gr1、抗CD19、抗CD3 、および抗Ter119抗体はBD Pharmingenより入手した。GFAP (クローンG-A-5、1:400)、 ガラクトセレブロシド (GalC) (ポリクローナル、1:50)、MBP (ポリクローナル、1:50)、GABA (クローンGB-69、1:100)、パルプアルブミン (クローンPARV-19、1:2000)、T uJ1 (クローンSDL.3D10、1:400)、NF-68 (クローンNR4、1:400)、NF-160 (cloneNN18、 1:40)、そしてNF-200 (クローンN52、1:400)、NSE (ポリクローナル、1:50)、MAP2-AB (クローンAP20、1:400)、Tau (ポリクローナル、1:400)、TH (クローンTH-2、1:1000)、DDC (クローンDDC-109、1:100)、TrH (クローンWH-3、1:1000)、セロトニン (ポリ クローナル、1:2000)、グルタミン酸 (クローンGLU-4、1:400)、速筋ミオシン (クロー ンMY-32; 1:400希釈) に対する抗体はSigmaから入手した。DAPIおよびTOPRO-3はMolecula r Probesから入手した。vWF (ポリクローナル; 1:50)、Neuro-D (ポリクローナル、1:50)、c-ret (ポリクローナル、1:50) andNurr1 (ポリクローナル、1:50) に対する抗体はS 30 anta Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CAから入手した。PSA-NCAM (ポリクロー ナル、1:500) に対する抗体はPharMingen, San Diego, CAから、そしてセロトニン輸送 体 (クローンMAB1564、1:400)、DTP (ポリクローナル、1:200)、Naゲート電位チャネル (ポリクローナル、1:100)、グルタミン酸-受容体-5、-6および-7 (クローン371、1:5 00) およびNMDA (ポリクローナル1:400) 受容体に対する抗体はChemicon International, Temecula, CAから入手した。抗ネスチン (1:400) 抗体はスウェーデンのLund大学のDr. U. Lendahlより寄贈を受けた。NSE (1:50) pan-サイトケラチン (カタログ番号C-2562; 1 :100)、CK-18 (C-8541; 1:300)、アルブミン (A-6684; 1:100) に対する抗体はすべてS igmaから入手した。Flk1、Flt1、Tek、HNF-1pに対するポリクローナル抗体はSanta Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CAから入手した。抗ネスチン (1:400) 抗体はスウェ 40 ーデンのLund大学のDr. U. Lendahlより寄贈を受けた。対照-マウス、-ウサギまたは-ラ ットIgGとFITC/PE/Cy3-およびCy5-標識二次抗体はSigmaから入手した。ウサギ抗 β -gal-F ITC抗体はRockland Immunochemicals, USAから入手した。TO-PRO-3 Molecular Probes In c.から入手し、DAPはSigmaから入手した。

【0110】

B.X-GAL染色;組織切片は β -ガラクトシダーゼ酵素活性についてInvitrogenの β -gal染色 キットを用いて染色した (pH7.4)。組織切片を10分間のかわりに5分間インキュベートし た固定工程以外は取扱説明書に従った。

【0111】

C.FACS:FACSについては、未分化MASCを剥離して、抗CD44、CD45、CD13、cKit、MHC-クラ

50

スIおよびII、またはb2-ミクログロブリン (BD Pharmingen) および二次FITCまたはPE結合抗体を用いて連続的に染色し、FACS-Calibur (Becton Dickinson) を使用した分析まで2%パラホルムアルデヒドで固定した。

【実施例5】

【0112】

MASCからの分化系統の単一細胞起源

mMASCまたはrMASCの分化能力を、hMASCまたはES細胞の中胚葉、神経外胚葉、および内胚葉への分化について何が記載されているかに基づいて選択した分化因子 (サイトカイン) を加えることによって試験した。分化には、EOF、PDGF-BBおよびLIFを含まないが、系統特異的サイトカインを含む無血清培地に、 $1\sim 2\times 10^4$ 細胞/cm²で細胞を再播種することを要した。分化は組織特異的マーカー[遅筋ミオシンおよびMyoD (筋)、von-Willebrand因子 (vWF) およびTek (内皮)、NF200およびMAP2 (神経外胚葉性)、そしてサイトケラチン-18およびアルブミン (内胚葉性)]についての免疫組織化学、RT-PCR、および機能試験によって判定した。

【0113】

神経外胚葉性細胞へのMASC分化

Palmer et al.は神経前駆細胞をPDGF-BBを用いて培養で拡大できること、およびPDGFの除去と分化因子としてbFGFの添加によってその分化を誘導できることを示した。これらの研究およびhMASCを用いて行われた研究に基づき、mMASCおよびrMASCを、PDGF-BBおよびEGFを含まないが100ng/mLのbFGFを含むFN被覆ウェルに播種した。神経細胞様細胞の成熟の進行が培養期間を通じて見られた。7日間後、細胞の大多数がネスチンを発現した。14日間後、MASCの15~20%が星状細胞の (GFAP⁺)、15~20%が稀突起膠細胞の (ガラクトセレブロシド (GalC)⁺)、そして50~60%が神経細胞の (神経フィラメント-200 (NF-200)⁺) 形態的および表現型の特徴を獲得した。NF200、GFAPまたはGalCは同一の細胞には見つからず、神経細胞様細胞が神経細胞のマーカーを不適切に発現したhMASCまたはグリア細胞である可能性は低いことを示唆した。神経細胞様細胞はまたTau、MAP2およびNSEも発現した。神経細胞の約50%がガンマ-アミノ酪酸 (GABA) およびパルブアルブミンを、30%がチロシンヒドロキシラーゼおよびドーパ-デカルボキシラーゼ (DDC) を、そして20%がセロトニンおよびトリプトファンヒドロキシラーゼを発現した。MASCを40PD、または90PD以上拡大したとき、分化は同様であった。実施例1で記載の通り実施したQ-RT-PCRによって、神経外胚葉性マーカーの発現が確認された: 2日目にMASCはotx1およびotx2 mRNAを発現し、7日間後にはネスチンmRNAが検出された。

【0114】

繊維芽細胞成長因子 (FGF) -8bの分化因子としての効果を次に試験した。これはin vivoで中脳の発生のために重要であり、in vitroでマウスES細胞からhMASCについてドーパミン作用性およびセロトニン作用性神経細胞を誘導するのに用いられる。密集成長したhMASC (n=8) を10ng/mLのFGF-8b+EGFと培養したとき、神経細胞マーカーについて染色陽性であるが稀突起膠細胞および星状細胞について陽性でない細胞への分化が見られた。神経細胞はGABA性 (GABA⁺; 40±4%)、ドーパミン作用性 (DOPA、TH、DCCおよびDTP⁺、26±5%)、そしてセロトニン作用性 (TrH、セロトニンおよびセロトニン-輸送体⁺、34±6%) 神経細胞の特徴を有した。DOPA⁺神経細胞はNurr1に対する抗体で染色され、中脳DA神経細胞への分化を示唆した。FGF-8b誘導性神経細胞は成熟神経細胞の電気生理学的特徴を有しなかった。したがって、FGF-8bで支持された3週齢の細胞を、グリア芽腫細胞株であるU-87と、FGF-8bと共にさらに2~3週間培養した。

【0115】

神経細胞は細胞の大きさおよび数、長さ、および神経突起の複雑さの増大したより成熟した形態を獲得し、そして成熟神経細胞の電気生理学的特徴 (1μMテトロドトキシン (TTX)) によって可逆的に遮断される一時的な内向き電流は、一時的なタイムコースと内向き電流の電位依存活性化とともに、成熟神経細胞にだけ見られる電位活性化ナトリウム電流に典型的である) を獲得した。

【0116】

hMASC (n=13) を10ng/mの脳由来神経分化誘導因子 (BDNF) + EOFと共に培養したとき、分化はDOPA、TH、DCC、DTPおよびNurr1陽性神経細胞に限定された。BDNFはES細胞およびNSCからの神経分化を支援するが (Peault, 1996; Choi et al. 1998)、DA様神経細胞への限定的分化を示した研究は無い。

【0117】

同様の結果が、bFGFで誘導されたmMASCとbFGFおよびBDNFで誘導されたrMASCについて見られた。MASC由来神経細胞についてのさらなる研究が実施例10に示されている。

【0118】

内皮細胞へのMASC分化

中胚葉の例として、内皮への分化を誘導した。未分化のmMASCまたはrMASCは内皮マーカーCD31、CD62E、TekまたはvWFを発現しなかったが、低レベルのFlk1を発現した。mMASCまたはrMASCをFN被覆ウェルで10 ng/mLの内皮分化因子VEGF-Bと共に培養した。14日間のVEGF処理後、MASCの>90%が、経過したPD数にかかわらず、内皮分化に合致してFlt1、CD31、vWFまたはCD62を発現した。初代内皮細胞のように、MASC由来内皮細胞はMatrigelに再播種後6時間以内に血管を形成した。

10

【0119】

同様に、hMASCはFlk1およびFlt1を発現するが、CD34、Muc18 (P1H12)、PECAM、E-およびP-セレクトリン、CD36、またはTie/Tekは発現しない。hMASCを 2×10^4 細胞/cm²、20ng/mLの血管内皮成長因子 (VEGF) を含む無血清培地で培養したとき、細胞はCD34、VE-カドヘリン、VCAMおよびMuc-18を7日目以降に発現した。14日目に、細胞はTie、Tek、Flk1およびFlt1、PECAM、P-セレクトリンおよびE-セレクトリン、CD36、vWF、そしてコネキシン-40も発現した。さらに、細胞は低比重リポタンパク質 (LDL) を取り込むことができた。組織化学染色からの結果はウェスタンブロットによって確認された。血管形成を誘導するために、14日間VEGFと共に培養したMASCを、10ng/mLVEGF-Bを含むMatrigelに再播種して6時間経過した。>2%PCSで培養されたhMASCを用いたときは、内皮分化は見られなかった。さらに、PCSが分化の間に培地中に残されたとき、内皮細胞は生じなかった。

20

【0120】

hMASCを継代培養したとき少なくとも1000-倍の拡大が得られ、hMASCから生じた内皮前駆細胞が顕著な増殖能力を持ち続けていることを示唆した。細胞の拡大は、PCSが7日後に培養に添加されたときさらに大きかった。hMASC由来内皮細胞が皮下にヒト大腸癌を移植されたNOD-SCIマウスに静脈注射で投与されたとき、ヒト内皮細胞が腫瘍で血管新生に寄与するのが見られた。したがって、治療上の利益を得るため、すなわち、たとえば癌において血管新生を阻害するため、または肢あるいはたとえば心臓のようなその他の器官において血管新生を促進するために、遺伝子組み換え内皮細胞を組み込むことが可能である。MASC由来内皮細胞に関するさらなる研究は実施例9に示されている。

30

【0121】

内胚葉へのMASC分化

mMASCまたはrMASCが内胚葉細胞に分化できるかどうかを試験した。分化因子であるケラチノサイト成長因子 (KGF)、肝細胞成長因子 (HGF) およびFGF-4と共に、ラミニン、コラーゲン、FNまたはMatrigel被覆ウェルのいずれかでの培養を含むいくつかの異なる培養条件を試験した。10ng/mLのFGF4+10ng/mLのHGFを含むMatrigelに再播種したとき、MASCの約70%が肝細胞様細胞の形態的および表現型の特徴を獲得した。細胞は類上皮細胞になり、細胞の約10%が二核になり、そして細胞の約70%がアルブミン、サイトケラチン (CK) -18、およびHNF-1Pについて染色陽性となった。

40

【0122】

FGF4およびHGFを含む培養で生じた内胚葉性様細胞もまた、未分化のMASCとFGF4およびHGF誘導性MASCの上清中の尿素レベルをSigma尿素窒素キット640を用いて取扱説明書に従って測定することによって判定された、肝細胞の機能的特徴を有した。未分化のMASC培養においては尿素は検出されなかった。尿素産生はFGF4およびHGFの添加14日後に10 μg/細胞/

50

時間であり、25日目まで同様のレベルで検出可能であった。これは単層で生育した初代ラット肝細胞と同等である。アルブミンの存在は、尿素産生と共にMASCからin vitroの肝細胞分化の概念を支持する。MASC由来肝細胞に関するさらなる研究は実施例11に示されている。

【0123】

内胚葉系統前駆細胞が存在する可能性が高いことを考えると、MASCは肝臓と膵臓の外分泌および内分泌構成部分の両方、および他の内胚葉由来細胞組織系統のさまざまな細胞を形成する細胞を生じる可能性が高い。

【0124】

筋または脳に由来するMASCは、BM由来MASCについて上に記載した方法を用いて、中胚葉（内皮細胞）、神経外胚葉（星状細胞および神経細胞）および内胚葉（肝細胞様細胞）に分化するよう誘導された。 10

【0125】

形質導入

分化した細胞が単一細胞由来でありMASCが実際に「クローン」多能性細胞であることを示すため、MASCにレトロウイルスベクターを導入した培養細胞を作成し、そして未分化の細胞とその子孫はゲノムの同一部位にレトロウイルス挿入配列を有することが見出された。

【0126】

40から>90PDの間拡大した、二つの独立して得られたROSA26MASC、二つのC57BL/6MASCおよび一つのrMASC集団を用いて、またeGFPを導入した「クローン」マウスおよび「クローン」rMASCについて、試験を行った。eGFP導入細胞および非導入細胞の間に差異は見られなかった。注目すべきこととして、eGFP発現は分化したMASCで持続した。 20

【0127】

具体的には、EGF、PDGF-BBおよびLIFを含むFNで3週間培養したマウスおよびラットBMMNCに連続2日間、eGFP腫瘍レトロウイルスベクターを導入した。その後、CD45⁺およびGlyA⁺細胞を除去し、細胞を10細胞/ウェルで継代培養した。eGFP導入ラットBMMNCを85PDの間拡大した。または、80PDの間拡大したマウスMASCを用いた。未分化MASCの継代培養は、75PDの間維持した培養から100個のMASCを播種してそれを $>5 \times 10^6$ 個に再拡大することによって作成した。拡大したMASCはin vitroで内皮、神経外胚葉および内胚葉に分化するよう誘導した。系統分化は、実施例4に記載の通り、これらの細胞型に特異的な抗体で染色することによって示した。 30

【0128】

中胚葉性および神経外胚葉性子孫細胞の単一細胞起源

中胚葉性および神経外胚葉性の分化した子孫細胞が単一細胞起源であることを証明するため、レトロウイルスマーキングを用いた（Jordan et al, 1990; Nolte et al., 1996）。20PD後に得たhMASCの画分にMFG-eGFPレトロウイルスを形質導入した。eGFP⁺hMASCを、同一提供者由来の非導入MASCで希釈し、導入細胞の終濃度を~5%とした。これらの混合物を100細胞/ウェルで播種し、培養を $>2 \times 10^7$ 細胞が得られるまで拡大した。それぞれ 5×10^6 個のMASCを、骨格筋芽細胞、内皮および神経外胚葉性系統に分化するよう誘導した。分化条件下で14日後、細胞を採取してレトロウイルス組み込み部位、およびeGFPと神経外胚葉性、筋および内皮マーカーとの同時発現を同定するために用いた。 40

【0129】

筋芽細胞分化については、hMASCを 2×10^4 細胞/cm²で2%PCS、EGFおよびPDGF含有拡大培地に播種し、3μMの5-アザシチジンを用いて同じ培地中で24時間処理した。その後、細胞は2%PCS、EGFおよびPDGF-BBを含む拡大培地中で維持した。内皮分化については、hMASCを 2×10^4 細胞/cm²で、EGFおよびPDGFを含まないが10ng/mlのVEGF-Bを含む無血清拡大培地で14日間培養した。

【0130】

免疫蛍光評価は、培養中の細胞の5~10%が5-アザシチジンでeGFPおよび骨格筋アクチンについて染色陽性に分化するよう誘導され、細胞の5~10%がeGFPおよびvWFについて同時染 50

色される内皮に分化するよう誘導され、そして細胞の5～10%が、eGFP、およびNF-200かGFAPかMBPのいずれかについて同時染色される神経外胚葉に分化するよう誘導されたことを示した。レトロウイルス挿入部位を定義するため、MASCおよび分化した子孫の宿主ゲノム隣接領域を配列決定した。別々の集団におけるレトロウイルス挿入配列の数は1から7の間であった。表2に示す通り、集団A16で染色体7にマッピングされた、筋、内皮および神経外胚葉性細胞でレトロウイルス挿入配列に隣接する、単一の同一の配列が同定された。

【表2】

表2：内皮、筋および神経外胚葉性細胞の単一細胞起源

	配列：3'-LTR- <i>ccaaatt</i>
クローンA16 (染色体7)	TAG CGGCCGCTTG AATTCGAACG CGAGACTACT GTGACTCACA CT
5- アザシチジン	TAG CGGCCGCTTG AATTCGAACG CGAGACTACT GTGACTCACA CT
VEGF	TAG CGGCCGCTTG AATTCGAACG CGAGACTACT GTGACTCACA CT
bFGF	TAG CGGCCGCTTG AATTCGAACG CGAGACTACT GTGACTCACA CT
クローン A12-A (染色体9)	ATTTATA TTCTAGTTTAT TTGTGTTTGGG GCAGACGAGG
5- アザシチジン	ATTTATA TTCTAGTTTAT TTGTGTTTGGG GCAGACGAGG
VEGF	ATTTATA TTCTAGTTTAT TTGTGTTTGGG GCAGACGAGG
bFGF	ATTTATA TTCTAGTTTAT TTGTGTTTGGG GCAGACGAGG
クローン A12-A (染色体12)	TCCTGTCTCA TTCAAGCCAC ATCAGTTACA TCTGCATTTT
5- アザシチジン	TCCTGTCTCA TTCAAGCCAC ATCAGTTACA TCTGCATTTT
VEGF	TCCTGTCTCA TTCAAGCCAC ATCAGTTACA TCTGCATTTT
bFGF	TCCTGTCTCA TTCAAGCCAC ATCAGTTACA TCTGCATTTT

【0131】

3'LTRに特異的なプライマーを設計し、また隣接するゲノム配列に特異的なプライマーは表3に示す通りで、そしてリアルタイムPCRを用いて、レトロウイルス挿入部位は未分化細胞と分化した細胞とで同一であることが確認された。これらの結果は、隣接配列とeGFP DNA配列とが同様の量で存在することを証明した。クローンA12はそれぞれ染色体1と7に位置する2個のレトロウイルス挿入配列を含み、両方の隣接配列をhMASCだけでなく筋、内皮および神経外胚葉性系統にも検出することができた。これが2個のレトロウイルス要素を有する単一細胞の子孫かまたは2個の細胞の子孫のどちらを示すのか判定するため、リアルタイムPCRを用いて染色体1および7のeGFP隣接配列の相対量を比較した。hMASC、筋、内皮および神経外胚葉性細胞に両方の隣接配列が同様の量存在したことが見出され、2個のレトロウイルス挿入配列を有する単一細胞がeGFP陽性hMASCおよび分化した子孫の元になった可能性が高いことを示唆した。3個以上のレトロウイルス挿入配列を含む他の集団においては、我々は挿入配列が単一細胞の複数の挿入部位に由来するのかそれともeGFP

陽性画分に寄与する複数の細胞に由来するのかが判定することはできなかった。にもかかわらず、2個の集団において筋、内皮および神経外胚葉に分化した子孫細胞は単一のBM由来前駆細胞に由来するという我々の発見は、中胚葉性系統および神経外胚葉の3つの異なる系統の細胞において単一細胞レベルで分化するBMから原始細胞を培養することが可能であることを初めて決定的に証明する。

【表 3】

表1：隣接領域とプライマー

クローン	ゲノム配列
ラット 隣接配列	<u>GATCCTTGGGAGGGTCTCCT</u> CAGATTGATTGACTGCCCACCT CGGGGGTCTTTCAAAGTAACTCCAAAAGAAGAATGGGTTGTAGTTAT TAAACGGTCTTCTAGTAAAGTTTTGGTITTGGGAATCACAGTAACAAC CACATCACAACTCCAATCGTCCGTGAAA
マウス 隣接配列	<u>GATCCTTGGGAGGGTCTCCT</u> CAGATTGATTGACTGCCCATAAGTTA TAAGCTGGCATGACTGTGTGCTAAGGACACTGGTGAAAGC

10

太字：MSCV LTR；**太字下線**：Q-PCRに用いたMSCV LTRプライマー

斜体下線：Q-PCRに用いた隣接配列プライマー

20

【実施例 6】

【0132】

体内の多くの器官への哺乳類MASCのホーミングと定着

定着してin vivoで組織特異的細胞に分化する能力を有するかどうか調べるため、mMASCを試験した。mMASCをLacZ遺伝子導入C57Black6、ROSA26マウスから実施例1に記載の通り育成した。LacZマウス由来の 10^6 個のmMASCを、注射の4～6時間前に250Radの全身照射ありまたは無しで、NOD-SCIDマウス尾静脈に静脈注射した。動物は注射後4～24週間で頸椎脱臼により屠殺した。

30

【0133】

組織採取

血液および骨髄：0.5～1mlの血液を動物の屠殺時に得た。大腿骨および脛骨を洗浄してBMを回収した。表現型分析については、血液およびBM中の赤血球を氷冷塩酸アンモニウムを用いて除去し（Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, Canada）、 10^5 個の細胞をサイトスピン遠心分離に用いた。連続移植については、大腿骨2本および脛骨2本からの 5×10^7 個の細胞を個々の二次被提供者に尾静脈注射によって移植した。二次被提供者は7～10週間後に屠殺した。

【0134】

固形器官：肺はPBSで1:4希釈したOCT化合物（Sakura-Finetek Inc, USA）の1mlで膨張させた。被提供者動物の脾臓、肝臓、肺、腸、骨格筋、心筋、腎臓および脳の標本を採取しOCT中で-80℃にて、および定量的PCR用にRNA Later（Ambion Inc., Austin, TX, USA）中で-20℃にて低温保存した。

40

【0135】

mMASCは定着してin vivoで組織特異的細胞に分化する

β -gal/ネオマイシン（NEO）導入遺伝子含有細胞の定着（Zambrowicz et al., 1997）は、 β -galについて免疫組織化学によって、およびNEOについてQPCRによって試験された。免疫組織化学およびQ-PCRは実施例5および1にそれぞれ記載された通り実施した。プライマーは表1に列記されている。

【0136】

50

1%を超える抗 β -gal細胞の検出として定義される定着が、すべての被提供者 動物の造血組織（血液、BMおよび脾臓）ならびに肺、肝臓および腸の上皮に表4および図4に示す通り見られた。

【表4】

表4：ROSA26MASCを移植されたNOD－SCIDマウスにおける定着レベル

動物	時間(週)	免疫蛍光または(Q-PCR)で測定した定着レベル(%)						
		放射線	骨髄	血液	脾臓	肝臓	肺	腸
1	4	なし	2 (1)	2	5	7	4	2
2	5	なし	3 (4)	4	5	9	5	3
3	10	なし	1	3	3	6	3	2
4	16	なし	4	2	3	4	3	4 (4.9)
5	24	なし	3	2	3	6	4	1
6	8	あり	8 (8)	6	4	5	2 (1.1)	7
7	8	あり	10	8	7 (7.3)	4	6	8
8	8	あり	5	8	3	5	5	6
9	8	あり	7	5	5	6	4	6
10	10	あり	5 (6)	7	9 (12.5)	5	2	8
11	11	あり	8	8	6	5	3	10 (11.9)
12	11	あり	6	5	4	8 (6.2)	10 (12.3)	8
SR-1	7	あり	6	7	5	1 (1.7)	5	8
SR-2	10	あり	5	4	8	3	4	6

10

20

30

【0137】

BM（図4B～F）および脾臓（図4H～I）の β -gal⁺細胞は、抗CD45、抗CD19、抗Mad、抗Gr1および抗TER119抗体と同時染色された。同様の結果が末梢血について見られた。注目すべきこととして、 β -gal⁺CD3⁺T細胞はキメラマウスで見られたにもかかわらず、血液、BMまたは脾臓のいずれにも β -gal⁺CD3⁺T細胞は見られなかった。この理由は現在のところ不明である。

【0138】

脾臓での定着は主に提供者細胞の塊として起こり、MASCが脾臓にホーミングするとき、CFU-Sと同様に、MASCは局部的に増殖し分化して提供者細胞のコロニーを形成するという仮説と合致した。mMASCの造血細胞へのin vivo分化は、mMASCにHSCが混入したことが原因ではないと考えられる。最初に、BMMNCはmMASC培養を開始する前にカラム選択によってCD45細胞を除去されている。次に、brachyury（Robertson et al, 2000）、GATA-2およびGATA-1（Weiss et al., 1995）を含む初期中胚葉性または造血転写因子は、CDNAアレイ分析によって示される通り、未分化のmMASCでは発現していない。第三に、mMASCに用いた培養条件は、HCSについては支持的でない。第四に、hMASCを造血支持細胞とサイトカインと共に培養することによってhMASCからin vitroで造血分化を誘導する試みはどれも成功しなかった（Reyes et al., 2001）。

40

【0139】

50

顕著なレベルのmMASC定着がまた肝臓、腸および肺でも見られた。三色染色免疫組織化学を用いて、上皮(CK⁺)および造血(CD45⁺)細胞を肝臓、腸および肺の同一組織切片において同定した。肝臓では、β-gal⁺提供者由来細胞は肝細胞(CK18⁺CD45⁺またはアルブミン⁺)の束を形成し、任意の5 μmの切片の約5~10%を占めた(図4K~M)。被提供者起源のいくつかのCK18⁺CD45⁺β-gal⁻造血細胞は上皮細胞から明瞭に同定された。Albumin⁺β-gal⁺およびCK18⁺β-gal⁺細胞は、肝幹細胞および円形細胞からの肝再生でみられるパターンで、門脈路周囲の肝細胞束に定着した(Alison et al., 1998; Petersen et al., 1999)。このことと、切片20枚のうち5枚のみが提供者細胞を含んでいたことは、幹細胞は肝臓のすべての部分でなく一部分に定着し、そこで増殖して肝細胞に分化するという概念と合致する。

10

【0140】

腸における定着もまた腸上皮幹細胞について知られていることと合致した。腸では、個々の陰窩は4~5個の長寿命の幹細胞を含む(Potten, 1998)。これらの幹細胞の子孫は陰窩の中部および上部で数回の分裂を経て上皮細胞を生じ、これは上方へ、陰窩外へ出て、隣接する絨毛へ移動する。提供者由来のβ-gal⁺panCK⁺CD45⁻上皮細胞がいくつかの絨毛を完全に覆っていた(図40~P)。一部の絨毛では、β-gal⁺panCK⁺CD45⁻細胞は周囲の50%だけを構成し(黒矢印、図4P)、定着が両方の陰窩でなく一方であったことを示唆した。いくつかのβ-gal⁺panCK⁺細胞が腸絨毛の中心に明瞭に見られた(白矢印、図40)。これらの細胞はCD45について同時染色され(図4P)、これらが提供者由来造血細胞であることを示した。肺では、提供者細胞の大多数がβ-gal⁺panCK⁺CD45⁻肺胞上皮細胞を生じた一方、大部分の造血細胞は被提供者起源であった(panCK⁻CD45⁺β-gal⁻) (図4R)。

20

【0141】

免疫組織化学によって検出された定着のレベルは、NEOについてQ-PCRで測定されたレベルと一致した(表4)。定着レベルは、MASCの静脈注射の4~24週間後に分析した動物で同様であった(表4)。

【0142】

骨格筋または心筋には寄与は見られなかった。上皮組織および造血機構とは対照的に、組織傷害の非存在下で骨格筋または心筋において細胞の交代はわずかであるかまたは全く見られなかった。したがって、これらの組織への幹細胞の顕著な寄与は期待されない。しかし、上皮細胞が迅速な交代を受ける2つの器官である皮膚および腎臓において定着は見られなかった。胚盤胞注射実験(実施例8)において、mMASCはこれらの細胞型に分化できることが示される; 出生後の被提供者におけるこれらの器官で定着が見られないことの可能な説明は、mMASCはこれらの器官へホーミングしないというもので、現在評価中の仮説である。mMASCは神経外胚葉様細胞にex vivoで分化したが、脳においてmMASCの顕著な定着は見られず、脳で見つかった稀な提供者細胞は神経外胚葉性マーカーで同時標識されなかった。2つの最近の論文が、BM移植を受けた動物の脳において神経外胚葉の特徴を有する提供者由来細胞を検出することができることを示した。しかし、血液脳関門の破壊に伴う条件である、移植前の完全除去の準備方法または新生動物への移植が用いられた。細胞は、血液脳関門が完全であるかまたは最小の損傷しか受けていない、照射を受けていない成体動物、または低用量の照射を受けた動物に注入された。このことはCNSにおいてmMASC定着が見られなかったことを説明しうる。

30

40

【0143】

密集MASCはin vivoで分化しない

対照として、注射前にROSA26-MASCを注入し密集となるまで培養した。密集を形成させたMASCは、ex vivoで中胚葉外の細胞の中で分化する能力を失い、古典的MSCのように挙動する(Reyes, M. et al. 2001)。10⁶個の密集mMASCの注射によって顕著なレベルの提供者細胞定着は生じなかった。β-gal⁺細胞はBM中に少数しか見られなかったが、これらの細胞は抗CD45抗体で同時標識されず、MSCは組織に定着しうるが局所的信号に答えて組織特異的細胞に分化することはもうできないことを示している。

【0144】

50

マウス骨髄中のMASC由来細胞は連続的に移植できる

ROSA26MASCを植え付けたマウスに由来するBMを、二次被提供者に定着する細胞を含むかどうか試験した。mMASCの静脈注射から11週間後に一次被提供者から回収した 1.5×10^7 個のBM細胞を、放射線照射を受けた二次NOD-SCID被提供者に移植した（図4:動物SR-1およびSR-2）。7および10週間後、二次被提供者を屠殺し、被提供者動物の血液、BM、脾臓、肝臓、肺および腸を、ROSA26提供者細胞の定着に関して、NEO遺伝子について免疫組織化学およびQ-PCRによって分析した。一次被提供者でのように、定着の同様なパターンが二次被提供者に見られた。BM、脾臓およびPB細胞の4~8%が β -gal⁺CD45⁺であった；腸上皮細胞の6および8%が β -gal⁺pan-CK⁺で、そして肺上皮細胞の4および5%が β -gal⁺pan-CK⁺であった。二次被提供者の肝臓における定着のレベルは一次被提供者より低かった（1および3%に対し5および8%の β -gal⁺CK18⁺）。これは、mMASCが一次被提供者のBM中に持続し、二次被提供者に移植されたとき造血細胞ならびに上皮細胞に分化しうることを示唆する。

10

【0145】

MASC由来細胞はインシュリンをin vivoで産生することができる。ROSA26マウス由来MASCを放射線照射したNOD-SCIDマウスに、ここに記載の通り注射した。結果として得られるMASC由来細胞は、ストレプトゾトシン糖尿病モデルでLacZおよびインシュリンについて同時染色する。

【0146】

要約

「幹細胞可塑性」における決定的な疑問の一つは、定着し分化した提供者mMASCが機能するかどうかである。ここに記載した結果は、老齢NOD-SCIDマウスに普通見られるように、一個体の動物が16週間後に胸腺および脾臓にリンパ腫を生じたことを示す（Prochazka et al., 1992）。表現型分析はこのB細胞リンパ腫が宿主由来であることを示した:CD19⁺細胞は β -gal⁻であった。腫瘍の脈管構造中のCD45⁻vWF⁺細胞の約40%が抗 β -gal抗体で染色され、腫瘍中の血管新生が一部は提供者mMASCに由来することを示した（図4T）。このことはMASCが機能する子孫をin vivoで生じうることを示唆する。同様に、たとえば造血機構および腸上皮のような放射線感受性の器官において、低用量放射線照射後にmMASC定着および分化のレベルがより高いことは（表4、 $p < 0.001$ ）、mMASCが宿主組織に機能的に寄与している可能性を示唆する。

20

【0147】

これらの結果は、哺乳類MASCを精製し、ex vivoで拡大し、そして静脈注射し、体内のさまざまな部位にホーミングさせ、多数の器官に定着させられること、および細胞がこれらの各種器官中で1ヶ月またはより長期間生存することを示した。そのような提供者細胞、未分化の子孫、および分化した子孫は、蛍光マーカーによって、BM、脾臓、肝臓および肺を含むがこれに限定されない器官に見出される。これらの細胞は、一またはそれ以上の区画に再定着させ、細胞または器官の機能を強化または回復するのに用いることができる。

30

【実施例7】

【0148】

in vitro造血および赤血球産生の実証

ヒトBM由来のMASCは、単一細胞レベルで、神経外胚葉性、内胚葉性、および内皮細胞を含む多くの中胚葉性系統に分化する。内皮および血液は個体発生において非常に密接に関連しているため、MASCが造血細胞に分化できると仮説を立てることができる。GlyA、CD45およびCD34陰性であるeGFP導入ヒトMASC（ $n = 20$ ）を、マウス卵黄嚢中胚葉性細胞株YSM5と、細胞凝集塊懸濁液として6日間、10ng/mLのbFGFおよびVEGFを添加した無血清培地中で共に培養した。6日後、eGFP⁺細胞（すなわちMASC子孫）だけが残るYSM5細胞は死亡していた。

40

【0149】

残った細胞を、10%胎児ウシ血清を含む、10ng/mL骨形成タンパク質（BMP）4、VEGF、bFGF、幹細胞因子（SCF）、Flt3L、hyperIL6、トロンプオエチン（TP0）、およびエリスロポエチン（EP0）を添加したメチルセルロース培養に移し2週間培養した。これらの培養中に

50

、接着性eGFP⁺細胞、および接着性細胞に付着した多数のコロニーを形成する小さく丸い非接着性細胞の両方が検出された。非接着性および接着性画分を別々に回収し、10ng/mLのVEGFおよびbFGFを添加した10%FCS含有培地で7日間培養した。接着性細胞はvWFについて染色陽性で、ECMに播種されたとき血管を形成し、a-LDLを取り込むことができ、内皮の性質を示した。非接着性細胞の5～50%がヒト特異的GlyAおよびHLA-クラスIについてフローサイトメトリーによって染色陽性であった。Gly-A⁺/HLAクラスI⁺細胞をFACSによって選択した。ライト-ギムザ染色で、これらの細胞は原始赤芽球の特徴的形態および染色パターンを示した。細胞は免疫ペルオキシダーゼでベンジジン⁺およびヒトH⁺であった。RT-PCRでこれらの細胞はヒト特異的Hb-eを発現したが、しかしHb-aは発現しなかった。

【0150】

20%FCSおよびEP0を含むメチルセルロース分析に再播種したとき、10日後に小さい赤芽球コロニーがみられ、これらのコロニーの100%がヒト特異的GlyAおよびHbについて染色陽性であった。MASCの選択はBMからのCD45⁺およびGlyA⁺細胞の除去に依存し、そして培養MASCはCD45⁻およびGlyA⁻でありFACSおよびCDNAアレイ分析の両方を用いて常に検査されているため、MASCへの造血細胞の混入は非常に可能性が低い。

【実施例8】

【0151】

細胞の胚盤胞注射後の、複数の器官のキメラによって示されたMASCの多能性性質のin vivoの証拠

これらの細胞の治療への応用に重要なのは、MASCの増殖して適当な細胞型にin vivoで分化する能力である。これまで、体内で組織および器官の群全体に寄与する能力のある唯一の細胞はES細胞である。MASCがES細胞の完全な能力を示すことができるかどうか分析するため、MASCを初期胚盤胞に導入してその子孫細胞の運命を観察することによって、各種組織の形成への寄与を判定するため分析した。

【0152】

MASCはβ-ガラクトシダーゼ(β-gal)遺伝子について遺伝子導入したROSA26マウスの骨髓から作成し(Rafii, S., et al. 1994, Blood 84: 10-13)、実施例1に記載の通り拡大した。55～65PD後に得られた1または10～12個のROSA26 MASCを88および40個の3.5日目のC57BL/6胚盤胞にそれぞれ微量注入した。胚盤胞(8個/母体)を16匹の仮母に移植し、マウスを表5に示す通り発生および出生させた。

【表5】

表5：胚盤胞へのMASC注射後のキメラの程度

MASC/ 胚盤胞	出産 母体数	総出生 仔数	O-PCRでNEO陽性				
			0%	1-10%	10-20%	20-40%	>40%
10-12	4/11	22	5/22 (23%)	13/22 (59%)	2/22 (9%)	1/22 (4.5%)	1/22 (4.5%)
1	3/5	15	8/15 (53%)	5/15 (33%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	2/15 (13%)

【0153】

7匹の仮母が出産し、この期間の他の研究でみられる出産率と合致した。一腹当たりの個体数は1～8の間で変動し、合計37匹であった。微量注入した胚盤胞から生まれた個体は正常個体と同様の大きさで、明白な異常は示さなかった。

【0154】

4週間後、尾を切断して、NEOについてQ-PCRによってβ-gal/NEO導入遺伝子含有細胞の尾への寄与を評価することで、キメラ現象について動物を評価した。キメラ現象のパーセン

10

20

30

40

50

トは、試験検体中のNEOコピー数を、ROSA26マウス由来の組織中のコピー数と、取扱説明書に従って比較することによって測定した（7700 ABI PRISM Detector Software 1.6）。10～12個のMASCが注入された胚盤胞由来のマウスの70%、および1個のMASCが微量注入された胚盤胞由来のマウスの50%でキメラ現象を検出することができた（図5）。キメラ現象の程度は0.1%～>45%の幅に分布した。6～20週間後、動物を屠殺した。一部のマウスを液体窒素で凍結して記載の通りに薄切片を切断した。全身マウス切片はX-Galで染色した。その後、各切片を完全に含むデジタル画像1000組を集め、個々の全身マウス切片の合成画像を生成した。単一のMASCが注入された胚盤胞に由来する代表的な非キメラ個体（NEOについてのQ-PCRによって）では、X-Gal染色は見られなかった。対照的に、その個体は尾切断分析によるNEOについてのR-PCRによると45%キメラであり、単一のROSA26由来MASCがすべての体細胞組織に寄与していた。

10

【0155】

他の個体については、複数の器官を採取して、MASC由来細胞の存在に関してX-GAL染色、抗 β -gal-FITC抗体を用いた染色、およびNEOについてのQ-PCRによって分析した。NEO⁺細胞を尾切断部に有した個体は、X-GAL染色および抗 β -gal-FITC抗体を用いた染色によって示された通り、ROSA26由来MASCが脳、網膜、肺、心筋および骨格筋、肝臓、腸、腎臓、脾臓、BM、血液、および皮膚を含むすべての組織に寄与していた。

【0156】

ROSA26 MASCを微量注入された胚盤胞から生じた個体では、キメラ現象はX-GAL染色および抗 β -gal染色によって検出した。 β -gal⁺細胞は、組み込まれた組織に典型的なマーカーを発現した。中枢神経系でNF200およびGFAPについて、また骨格筋でジストロフィンについて、 β -gal⁺細胞は抗 β -gal-FITCおよび抗NF200、またはGFAPおよびTOPRO3と同時染色した（倍率20倍で観察）。肺組織は肺胞および気管支で抗 β -gal-FITCおよびpan-CKについて染色された（またTOPRO3も）（倍率20倍で観察）。骨格筋は抗 β -gal-FITC、ジストロフィン-PEおよびTOPRO3で染色され、倍率20倍で観察された。心臓は抗 β -gal-FITC、心トロポニン-I-Cy3およびTOPRO3で染色され、倍率20倍で観察された。肝臓は抗 β -gal-FITCおよびpan-CK-PEおよびTOPRO3で染色された（倍率40倍および10倍で観察した）。腸は抗 β -gal-FITC、pan-CK-PEおよびTOPRO3で染色され、倍率20倍で観察した。腎臓は抗 β -gal-FITCで染色され（糸球体、尿細管）、倍率20倍で観察された。骨髄染色は抗 β -gal-FITCおよびCD45-PE、GR1-PEおよびMAC1-PEについて観察された。脾臓染色は抗 β -gal-FITCおよびCD45-PE、CD3-PEおよびCD19-PEについて観察された。NEOについてQ-PCRを用いて推定した定着のレベルはX-GALおよび抗 β -gal-FITC染色によって推定されたレベルと一致した。

20

30

【0157】

要約

これらのデータは、BM由来の単一MASCが発生中のマウスに一体化し、さまざまな運命の細胞を生じ、マウスの3つの胚葉すべての組織および器官の生成に寄与することを初めて実証する。すべての生きた個体は、キメラ現象の程度にかかわらず、盛況な機能する期間を有したので、これらの試験はまた、MASCはin vivoで3つの胚葉の機能する細胞に分化することができることも示唆する。胚盤胞に注入されたときまたは生後に注入されたとき、MASCが生殖細胞に寄与するかどうかは、まだ試験されていない。

40

【実施例9】

【0158】

血管内皮前駆細胞の起源

血管芽細胞と呼ばれる原始内皮前駆細胞が内皮細胞に分化し凝集して一次毛管網となるin situ 分化である脈管形成は、胚発生中の脈管系の発達を担っている（Hirashima et al, 1999）。対照的に、既存の血管から発芽する過程による新しい血管の形成と定義される血管新生は、発生中と出生後生活の両方に起こる（Holash et al, 1999; Yang et al., 2001）。最近まで、出生後生活における血管形成は、既存の血管からの内皮細胞の発芽に媒介されると考えられていた。しかし、近年の研究は、内皮「幹細胞」が成体生活まで持

50

続し、そこで新しい血管の形成に寄与する可能性があることを示唆して (Peichev et al., 2000; Lin et al., 2000; Gehling et al., 2000; Asahara et al., 1997; Shi et al., 1998)、成体における血管新生は発生中のように少なくとも部分的に脈管形成の過程に依存することを示唆する。内皮細胞の前駆細胞はBMおよび末梢血から単離されている (Peichev et al., 2000; Watt et al., 1995)。これらの血管内皮前駆細胞の個体発生は未知である。

【0159】

発生中に、内皮細胞は中胚葉に由来する。VEGF受容体2であるFlk1は、大動脈-生殖隆起-中腎領域 (Medvinsky et al., 1996; Fong et al., 1999; Peault, 1996) および胎児肝臓 (Fong et al., 1999) にみられる両能性の幹細胞である血管芽細胞を特徴づけ、そして胚様体の血管芽細胞への決定はFlk1の発現を伴う (Ghoi et al., 1998; Choi, 1998)。血管芽細胞が成体生活に持続するかどうかは不明であり、HSCおよび血管内皮前駆細胞だけが記載されている。血管芽細胞のように、血管内皮前駆細胞はFlk1を発現し (Peichev et al., 2000)、一つの論文はHSCが出生後生活においてFlk1を発現することを示唆した (Ziegler et al., 1999)。発生の間、血管芽細胞の内皮系統への決定は、VE-カドヘリン、CD31、そして少し後にCD34の連続的発現によって特徴づけられる (Nishikawa et al., 1998; Yamashita et al., 2000)。出生後生活において、血管内皮前駆細胞はBMおよび血液から、AC133、Flk1、CD34に対する抗体、およびH1P12抗体を用いて選択されている (Peichev et al., 2000; Lin et al., 2000; Gehling et al., 2000)。AC133はまた、NSCs (Uchida et al., 2000) および消化管上皮細胞 (Corbeil et al., 2000) を含む他の細胞にも見つかっている。成熟内皮への分化に当たって、AC133受容体は速やかに失われる (Peichev et al., 2000; Gehling et al., 2000)。循環内皮細胞上にみられる別の受容体は、ムチンであるMUC18で、H1P12抗体によって認識される (Lin et al., 2000)。MUC18は血管内皮前駆細胞の内皮への分化時に失われる。CD34は血管内皮前駆細胞ならびに造血前駆細胞 (Peichev et al., 2000; Baumhueter et al., 1994) および肝円形細胞 (Crosby et al., 2001) で発現されている。この抗原もまた血管内皮前駆細胞の内皮への分化時に失われる。大部分の成熟内皮細胞は、微小血管内皮細胞を除き、もうCD34を発現しない。

【0160】

in vivoで定着してMASCからの血管新生に寄与する多数の内皮細胞のin vitro生成は、ここで初めて記載される。MASCは培養して>80 PDの間拡大することができ、MASCから生じた内皮細胞は少なくともさらに20 PD拡大することができる。MASCはしたがって臨床治療のための内皮細胞の理想的な起源となりうる。さらに、MASCは個体発生上「血管芽細胞」より成熟していないため、このモデルは内皮の決定および分化を特徴づけるのに有用と思われる。

【0161】

hMASCは内皮の表現型の特徴を有する細胞に分化する

MASCは実施例3に記載の通り採取し培養した。内皮分化を誘導するため、MASCを 2×10^4 細胞/cm²でFN-被覆ウェル中に、EGFおよびPDGF-BBを含まないが10ng/mL VEGFを含む無血清拡大培地に再播種した。一部、PCSを添加した。培養は4~5日間毎に培地交換して維持した。ある場合には、細胞は9日後に1:4希釈で同一の培養条件下で20+ PDの間継代培養した。

【0162】

MASCからの内皮分化をより広範囲に定義するため、3~18日後に細胞のFACSおよび免疫組織化学的分析を実施した。未分化MASC上のFlk1およびFlt1の発現は低く、9日目に最大で、18日目まで持続した。BMまたは血管内皮前駆細胞に存在するVE-カドヘリン (Peichev et al., 2000; Nishikawa et al., 1998) は未分化MASCでは発現されておらず、しかしVEGFを加えた培養の3日後に発現し18日目まで持続した。MASCは内皮ならびに造血前駆細胞に見出されるAC133を低レベルで発現したが (Peichev et al., 2000; Gehling et al., 2000)、しかし3日後にはもう検出不能であった。内皮および造血前駆細胞に存在するCD34 (Peichev et al., 2000; Asahara et al., 1997; Rafii et al., 1994) は、未分化

MASCには存在せず（図4A）しかし9日目から18日目まで発現された。抗体H1P12によって認識されるムチンであるMUC18は、血管内皮前駆細胞を血液から生成するのに用いられている（Lin et al., 2000）。MASCはH1P12では染色されなかったが、VEGFで9日間処理したMASCは染色陽性であり、しかし発現は18日目までに失われた。

【0163】

内皮特異的インテグリンである $\alpha v \beta 3$ （Eliceiri et al, 2000）は、未分化MASCには存在せず、一方 $\alpha v \beta 5$ は非常に低いレベルで発現されていた。インテグリンの発現は分化の間次第に増加し、14日目までに最大となった（図5）。血管新生に重要であるが内皮細胞分化には重要でないチロシンキナーゼ受容体TieおよびTek（Partanen et al, 1999）はMASCでは発現していなかった。Tekの発現は3日後、Tieは7日後にみられた（図6）。MASCはまたvWFも発現していなかったが、vWFは9日目以降発現された（Rosenberg et al, 1998; Wagner et al, 1982）。CD31、CD36、CD62-Pを含む他の成熟内皮マーカー（Tedder et al, 1995）（図7）、および接着結合タンパク質Z0-1、p-カテニン、そして γ -カテニン（図5）が14日後検出された（Li et al, 1990; Van Rijen et al, 1997; Petzelbauer et al, 2000）。VCAMまたはCD62-Eは、下記のように内皮がIL-1 α で活性化されない限り、分化のどの時点でも高いレベルでは発現されなかった。内皮への分化は、 $\beta 2$ -ミクログロブリンおよび、HLA-クラスIIでなく低レベルのHLA-クラスI抗原の獲得を伴った。

10

【0164】

より高い濃度のFCSは、骨芽細胞、軟骨芽細胞および脂肪細胞にだけ分化する古典的MSCの生育を支持するため（Reyes et al, 2001; Pittenger et al, 1999）、内皮分化は、2%P CSまたはそれ以下を用いて拡大されたMASCからだけ得られるが、10%PCSを用いて拡大したときには得られないことは以前に報告されている（Reyes et al, 2001）。FCSが分化の最初の7日間に存在したとき、内皮分化は誘導することができない。非密集MASC（ $< 1 \times 10^4$ 細胞/cm²）が分化するよう誘導されたとき、内皮はみられなかった。MASCがVEGFへの曝露の9日後に、10ng/mL VEGFを含む無血清培地を用いて継代培養されたとき、細胞は少なくともさらに12PDを経ることができた。10%FCSおよび10ng/mLのVEGFが継代培養用の培地に添加されたとき、MASC由来内皮細胞は、MASCの経過したPDの数に関わらず、さらに20+PDを経ることができた。

20

【0165】

未分化のMASCと比較して、内皮細胞はより大きく、核/細胞質比はより低かった。結果はM ASCが20（n=30）または50+（n=25）PDを経た培養から用いられたときと同様であった。

30

【0166】

MASC由来内皮の機能的特徴

hMASCのVEGFに誘導されて分化した子孫細胞が内皮細胞の機能的特徴を有するかどうか試験した。内皮細胞は、VEGFならびにVEGF受容体Flk1および血管新生受容体Tie-1およびTekの発現をアップレギュレートすることによって低酸素に応答する（Kourembanas et al, 1998）。hMASCおよびhMASC由来内皮細胞を、37°Cで、20%または10%O₂中で24時間インキュベートした。細胞をFlk1、Flt1、Tekに対する抗体およびIgG対照を用いて染色し、2%パラホルムアルデヒドで固定し、フローサイトメトリーで分析した。さらに、培養上清中のVE GF濃度をELISAキット（AP biotech, Piscataway, NJ）を用いて測定した。MASC由来内皮細胞および未分化のMASCは低酸素条件に24時間曝露された。

40

【0167】

Flk1およびTekの発現は、低酸素に曝露されたMASC由来内皮細胞で顕著に増加した（図7）一方、これらの受容体のレベルは未分化のMASCでは変化しなかった。さらに、低酸素内皮培養の培養上清中のVEGFレベルは4倍に増加した（図7B）一方、低酸素に曝露されたMASC培養中のVEGFレベルは変化しなかった。

【0168】

次に、MASC由来内皮細胞がHLA-抗原および細胞接着リガンドの発現を、たとえばIL-1 α のような炎症性サイトカインに応じてアップレギュレートするかどうか試験した（Meager,

50

1999; Steeber et al, 2001)。10⁶個のMASCおよびMASC由来内皮細胞を、75ng/mlのIL-1a (R&D Systems) と共に無血清培地中で24時間インキュベートした。細胞を2%パラホルムアルデヒドで固定し、HLA-クラスI、クラスII、 β 2-ミクログロブリン、vWF、CD31、VCAM、CD62EおよびCD62Pに対する抗体、または対照抗体で染色し、FACScalibur (Becton Dickinson) を用いて分析した。

【0169】

顕著に上昇したレベルのHLA-クラスIおよびII、 β 2-ミクログロブリン、VCAM、ECAM、CD62E、CD62PがFACS分析によって内皮細胞で見られた (図7C)。

【0170】

対照的に、未分化のMASCではFlkのアップレギュレーションのみがみられた。

10

【0171】

内皮細胞の別の特徴は、LDLを取り込むことである (Steinberg et al, 1985) これはVEGFを用いて分化するよう誘導されたMASCを2, 3, 5, 7, 9, 12および15および21、LDL-dil-a cilと共にインキュベートして試験した。dil-Ac-LDL染色キットはBiomedical Technologies (Stoughton, MA) から購入した。分析は取扱説明書のように実施した。細胞は抗Tek、-Tie-1または-vWF抗体のいずれかを用いて同時標識した。3日後、Tekの発現が検出されたがa-LDLの取り込みは検出されなかった。7日後、細胞はTie-1を発現したが、a-LDLの顕著な量を取り込むことはなかった。しかし、9日目のvWFの発現の獲得はaLDLの取り込みを伴った (図6B)。

【0172】

20

内皮細胞は、Weibel Pallade体に貯蔵され内皮が活性化されるときin vivoで放出されるvWFを含む (Wagner et al, 1982)。これは細胞をヒスタミンで刺激することによってin vitroで誘導することができ (Rosenberg et al, 1998)、そのことはまた結果として細胞の細胞内骨格の活性化を生じる (Vischer et al, 2000)。MASC由来内皮細胞をFN被覆チャンバースライドに高密度で (10⁴細胞/cm²) 播種した。24時間後、細胞を10 μ Mヒスタミン (Sigma) を用いて無血清培地中で25分間処理し、vWFおよびミオシンに対する抗体で染色した。未処理および処理細胞をメタノールで-20℃にて2分間固定し、vWFおよびミオシンに対する抗体で染色し、蛍光および/または共焦点顕微鏡法を用いて分析した。vWFは未処理内皮細胞の細胞質全体に存在した。ヒスタミン処理した内皮細胞の細胞質は顕著により少ない量のvWFを含み、vWFは核周囲領域でだけ検出可能であって、小胞体に存在する vWFを示している可能性が高かった (図6A)。ヒスタミン処理によって、ギャップ結合の拡大と、細胞骨格のミオシンストレスファイバーの数が増加する変化が生じた (図6A)。

30

【0173】

最後に、Matrigelまたは細胞外マトリクス (ECM) に播種されたとき「血管」を形成することができるかどうか判定するため内皮細胞を試験した (Haralabopoulos et al, 1997)。ウェル当たり0.5mlの細胞外マトリクス (Sigma) を24穴プレートに加え、3時間37℃でインキュベートした。ウェル当たり10⁴個のMASCおよびMASC由来内皮細胞を0.5 mlのVEGF添加無血清培地に加え、37℃でインキュベートした。図6Cに示す通り、MASC由来内皮細胞のECM上での培養の結果、6時間以内に血管形成が起こった。

【0174】

40

hMASC由来内皮細胞が腫瘍-血管新生にin vivoで寄与する

NOD-SCIDマウスの繁殖コロニーをJackson Laboratories (Bar Harbor, ME) から入手したマウスから確立した。マウスは特定病原体フリーの条件に保ち、酸性水とオートクレーブ処理飼料とで維持した。水100ml当たりトリメトプリム60mgおよびスルファメトキサゾール300mg (Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, NJ) を週二回与えた。

【0175】

3個のルイス肺癌球状体を肩の皮下に移植した。腫瘍の移植の3および5日後、マウスに0.25x10⁶個のヒトMASC由来内皮細胞またはヒト包皮繊維芽細胞を尾静脈注射によって注射した。14日後、動物を屠殺し、腫瘍を取り出してOTC化合物 (Santura Finetek USA Inc, Torrance, CA) を用いて-80℃にて低温保存した。さらに、マウスを標識するために切目を

50

入れた耳もまた切除してOTC化合物)を用いて -80°C にて低温保存した。組織の $5\mu\text{m}$ 厚の切片をスライドガラスに乗せ、下記の通り固定して染色した。

【0176】

ヒトおよびマウス内皮細胞の両方を認識する、抗ヒト- $\beta 2$ -ミクログロブリンまたはHLA-クラスI抗体を、抗マウス-抗CD31抗体と抗vWFか抗Tekか抗Tie-1抗体と組み合わせて用い、腫瘍それぞれの切片5枚について計数した分枝の長さとの数のコンピュータを用いた分析は、マウスの中のヒトMASC由来内皮細胞を受けた腫瘍は、対照マウスの腫瘍より 1.45 ± 0.04 倍大きい血管質量を有したことを示した。これらの最初の試験は、腫瘍中の一部の血管は、vWFかTieかTekのいずれかについて同時標識されたがマウス-CD31については標識されない抗ヒト- $\beta 2$ -ミクログロブリンHLA-クラスI陽性細胞を含んだことを示し、ヒトMASC由来内皮細胞が腫瘍血管新生にin vivoで寄与したことを示した。

10

【0177】

寄与の程度をより良く定めるため、連続した $5\mu\text{m}$ スライドを得て、抗ヒト- $\beta 2$ -ミクログロブリン-FITCまたは抗マウス-CD31-Cy5のいずれか、および抗vWF-Cy3を用いた別の方法で染色した。すべてスライドを共焦点顕微鏡法で検査した。異なる図をその後集めて3次元とし、腫瘍血管へのヒトおよびマウス内皮細胞の相対的な寄与を測定した。ヒトMASC由来内皮細胞を注射した動物から得られた腫瘍を分析したとき、腫瘍血管の約35%が抗ヒト- $\beta 2$ -ミクログロブリンおよびvWFについて陽性であり、一方、内皮細胞の約40%が抗マウスCD31抗体について染色陽性であった(図8A-G)。内皮細胞を受けなかったかまたはヒト繊維芽細胞を受けた動物中の腫瘍は、抗 $\beta 2$ -ミクログロブリンまたは抗HLA-クラス-I抗体で陽性に染色される内皮細胞を含まなかった。

20

【0178】

MASC由来内皮細胞がまた創傷治癒血管新生に寄与するかどうか分析した。マウスを標識するために切目を入れた耳の領域をその後調べた。耳の傷における血管新生は、一部はMASC由来内皮細胞に由来した。腫瘍中の血管と同様に、創傷の治癒した皮膚に存在するヒト内皮細胞の割合は30~45%であった(図9H)。

【0179】

未分化のhMASCは内皮細胞にin vivoで分化する

10^6 個の未分化MASCを6週齢のNOD-SCIDマウスの静脈に注射した。動物は12週間飼育してその後屠殺した。1個体において、胸腺腫瘍が検出されたが、これは老齢NOD-SCIDマウスに普通に見られる(Prochazka et al., 1992)。胸腺を切除してOTC化合物中に -80°C にて低温保存した。組織の $10\mu\text{m}$ 厚の切片をスライドガラスに乗せ、下記の通り固定し染色した。

30

【0180】

すべての造血細胞はマウスCD45について染色陽性であったがヒトCD45についてはそうではなく、これらがマウス起源であったことを示す。腫瘍はその後抗ヒト $\beta 2$ -ミクログロブリン-FITC抗体とヒトおよびマウス内皮細胞の両方を認識する抗vWF-Cy3抗体とを用いて染色した。脈管構造の約12%がhMASC由来であった(図9I)。ヒト $\beta 2$ -ミクログロブリンが血管構造の外側で検出されなかったため、この造血要素はヒト起源でないことをこれらの研究はさらに確認した。

【0181】

40

免疫組織化学とデータ分析

in vitro 培養: 未分化のMASCまたは内皮に分化するよう2~18日間誘導されたMASCをFN被覆chamber スライドに播種し、2% パラホルムアルデヒド (Sigma)を用いて4分間、室温で固定した。細胞骨格染色については、チャンバースライドをメタノールを用いて2分間、 -20°C で固定した。細胞内リガンドについては、細胞を0.1 Triton-X (Sigma)を用いて10分間透過処理し、一次抗体(抗体)、およびFITC、PEまたはCy5結合抗マウス-、ヤギ-またはウサギ-IgG抗体と連続的に各30時間インキュベートした。それぞれの工程の間に、スライドをPBS+1%BSAで洗浄した。CD31、CD34、CD36、CD44、HLA-クラスIおよびII、 $\beta 2$ -ミクログロブリンに対する一次抗体は1:50希釈で使用した。VCAM、ICAM、VE-カドヘリン、セレクチン、HIP12、ZO-1、コネキシン-40、コネキシン-43、MUC18、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、B-カ

50

テニンおよび γ -カテニン (Chemicon) およびTek、Tie、vWF (Santa Cruz) に対する一次抗体は、1:50希釈で使用した。ストレスファイバーはミオシンに対する抗体 (軽鎖20kD、クローンno.MY-21; 1:200) を用いて染色した。二次抗体はSigmaから購入し、下記の希釈度で使用した: 抗ヤギIgG-Cy-3 (1:40)、抗ヤギIgG-FITC (1:160)、抗マウスIgG-Cy-3 (1:150) そして抗マウスIgG-FITC (1:320)、抗ウサギ-FITC (1:160) および抗ウサギ-Cy-3 (1:30)。T0PR0-3はSigmaから購入した。細胞は、蛍光顕微鏡法によってZeiss Axiovert顕微鏡 (Carl Zeiss, Inc., Thomwood, NY) を用いて、また共焦点蛍光顕微鏡法によって共焦点1024顕微鏡 (Olympus AX70, 5 Olympus Optical Co. LTD, Japan) を用いて検査した。

【0182】

腫瘍または正常組織: 組織はクリオスタットを用いて5~10 μ m厚の切片に切断した。切片はアセトンを用いて10分間、室温で固定し、0.1 Triton Xで5分間透過処理した。スライドをvWF、TieまたはTekについて一夜インキュベートし、次いでFITC、PEまたはCy5結合抗マウス-、ヤギ-またはウサギ-IgG抗体を用いた二次インキュベーション、そしてマウスCD45-PEまたはヒトCD45-FITC、ヒト β 2-ミクログロブリン-FITC、マウスCD31-FITCまたはT0PR0-3に対する抗体を用いた連続インキュベーションを60分間行った。各工程の間に、スライドをPBS+1%BSAで洗浄した。スライドは、蛍光顕微鏡法によってZeiss Axiovert顕微鏡を用いて、また共焦点蛍光顕微鏡法によって共焦点1024顕微鏡を用いて検査した。3次元再構成は、5 μ m厚のスライドからの連続0.5 μ m共焦点写真の、合計350枚の写真の集合から成った。スライドはvWF-Cy3を用いて染色し、またはヒト β 2-ミクログロブリン-FITCあるいはマウスCD31-FITCを用いて二重染色した。各スライドからの写真はMetamorphソフトウェア (Universal Imaging Corp) で次のスライドと並べ、3次元再構成は3D Doctorソフトウェア (Able software Corp) で行った。

【0183】

ヒト (緑) およびマウス内皮細胞 (青で彩色) の3次元の血管への相対的な寄与量を各色の立方画素として計算した。各色の面積も、寄与の正確な割合を得るため、スライドを通じた4つの血管について平方画素として計算した。4つの異なる主要の別のスライドについても各色の面積を計算した。

【0184】

要約

この研究の中心となる発見は、BMからMSCと共に精製される細胞は、in vitroで成熟内皮細胞と識別できない機能上の特徴を有する内皮細胞に分化する能力を持つことである。そのような内皮細胞は創傷治癒および腫瘍形成の状況下で血管新生にin vivoで寄与すること、また未分化のMASCはin vivoの局所的な信号に応答して腫瘍血管新生に寄与する内皮細胞に分化できることも示されている。

【0185】

内皮に分化する同じ細胞が他の中胚葉性細胞型、また非中胚葉性起源の細胞にも分化するように、ここで定義される細胞は血管芽細胞に先行し、および個体発生における血管芽細胞にさえ先行する。

【0186】

MASCは内皮細胞のマーカーを発現する細胞に分化することも示されているが、VEGFが内皮細胞のようなMASC機能を誘導することが証明された。内皮細胞は動脈壁内の輸送中にリポタンパク質を修飾する (Adams et al, 2000)。内皮細胞は、血流力学的な力、またはたとえばヒスタミンのような血管作用薬に曝露されると幅が広がる細胞間接着を通しての透過障壁を維持する (Rosenberg et al, 1998; Li et al, 1990; Van Rijen et al, 1997; Vischer et al, 2000)。内皮細胞はたとえばvWF、組織因子およびプラスミノーゲン活性化因子阻害因子といった出血を止めるための凝固前期分子を放出し (Vischer et al, 2000)、炎症に反応して接着分子の発現レベルを変化させることによって白血球が出て行くのを調節する (Meager, 1999; Steeber et al, 2001)。内皮はまた、血管密度を増大させることを目的にVEGFを産生しVEGF受容体を発現することによって低酸素に反応する (

10

20

30

40

50

Kourembanas et al, 1998)。したがって、MASCから生じた内皮細胞が、in vitroで試験したとき、これらのすべての仕事を行うことができることが実証されている。

【0187】

最後に、in vitroで生じたMASC由来内皮細胞が、in vivoでの創傷治癒と同様に、腫瘍部位に移動して腫瘍血管新生に寄与することによって血管新生刺激に応答することが証明されている。この発見は、MASCから生じた内皮細胞が成熟内皮のすべての機能上の特徴を有することを確認する。内皮細胞が腫瘍血管新生および血管新生に寄与する程度は35~45%で、内皮細胞の他の起源について記載されているのと同様のレベルである (Conway et al, 2001; Ribatti et al, 2001)。さらに、in vivoで腫瘍の微環境にもたらされた血管新生刺激は、MASCを腫瘍床へ集め、腫瘍の脈管構造に寄与する内皮細胞への分化を誘導するのに十分であることがわかった。これらの試験はしたがって、骨髄に存在する細胞が、脈管形成と類似の過程において、新しい血管形成に寄与できることを示した他のグループによって報告されている研究を拡張し (Peichev et al, 2000; Lin et al, 2000; Gehling et al, 2000; Asahara et al, 1997)、この過程を担う前駆細胞は同定されている。これは、出生後BMに存在する細胞を内皮細胞のごく初期の前駆細胞と同定する、我々の知る限り最初の報告である。

10

【実施例10】

【0188】

神経細胞の誘導

中胚葉性細胞型の他に、機能する神経細胞、ならびに星状細胞および稀突起膠細胞にex vivoで分化することができるかどうか判定するために、単一の成体BM由来hMASCまたはmMASCを試験した。前に実施例1および3にそれぞれ記載した通り、mMASCおよびhMASCを選択し培養して拡大した。ヒト神経前駆細胞 (hNPC) はClonetics (San Diego, CA) から購入した。hNPCを取扱説明書のように培養し分化させた。

20

【0189】

電気生理学:標準の全細胞パッチクランプ記録を用いてMASC由来神経細胞の生理学的性質を検討した。電位固定および電流固定記録を、Dagan3911拡張ユニットで改装したDagan 3900Aパッチクランプアンプ (Dagan Corporation, Minneapolis) を用いて得た。ホウケイ酸ガラス製のパッチピペットをナリシゲ社ピペット製作器 (型番PP-83) で引き延ばし、ナリシゲ社マイクロフォージ (型番MF-83) を用いて研磨した。パッチピペットを、(単位mM) 142.0KF、7.0Na₂SO₄、3.0MgSO₄、1.0CaCl₂、5.0HEPES、11.0EGTA、1.0グルタチオン、2.0グルコース、1.0ATP (マグネシウム塩)、0.5GTP (ナトリウム塩) を含む細胞内液で満たした。大部分の記録について、蛍光顕微鏡法を用いて全細胞パッチ記録の設定が達成されていることを目視で確認するために、蛍光色素5,6-カルボキシフルオレセイン (0.5mm; Eastman Kodak Chemicals) もピペット溶液に添加した。ピペット抵抗は11~24MΩの幅であった。記録用標準細胞外液は以下を含む (単位mM): 155NaCl、5.0KCl、CaCl₂、1.0MgCl₂、10HEPES、グルコース。一部の実験については1μMのTTXを標準対照溶液に添加した。記録用細胞内液および細胞外液のpHは、NaOHを用いてそれぞれ7.4と7.8に調整した。すべての試薬はSigmaから入手した。実験の実施とデータ回収および保存にはPCLamp 8.0 (Axon Instruments, Foster City) を用いた。示したデータは8.4mVの液相界面電位について補正し、これはJPCALCソフトウェアパッケージを用いて計算した。データのオフライン分析と画像表示はClamp fit 8.0 (Axon Instruments, Foster City) およびPrism (Graphpad, San Diego) を用いて構成した。

30

40

【0190】

形質導入:レトロウイルス上清は、オランダ、ロッテルダム大学のDr. G.Wagemakerより提供されたMFG-eGFP含有PG13細胞を (Bierhuizen et al., 1997) MASC拡大培地と48時間インキュベートして作成し、濾過して-80°Cで凍結した。MASCをレトロウイルス上清および8μg/mlプロタミン (Sigma) と6時間インキュベートした。これを24時間後に繰り返した。形質導入効率はFACSによって分析した。

【0191】

50

5遺伝子マイクロアレイ分析:RNAをhMASC、bFGFまたはFGF-8b+EGF誘導細胞からRNeasy miniキット (Qiagene) を用いて単離し、DNase I (Promega) を用いて37℃にて1時間消化し、RNeasyを用いて再精製した。取扱説明書に従って作成した[32P]dATP標識CDNAプローブをヒトNeurobiology Atlas Array (Clontech # 7736- 1, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) と68℃にて18~20時間ハイブリッド形成させ、その後、2xSSC、1%SDSで68℃にて各30分間4回、0.1xSSC、0.5%SDSで68℃にて30分間、そして1回2xSSCで室温にて5分間洗浄した。アレイはホスホイメージャースクリーンスキャナ (Molecular Dynamics, Storm 860) で読み取り、Atlas Image 1.0 (Clontech) を用いて分析した。未分化の細胞と分化した細胞の間の2倍より大きい差を有意とみなした。

【0192】

レトロウイルス挿入配列のPCR分析:PCRを用いて、ヒトゲノムDNA中のMFGベクターの3' LTRから隣接配列3'を増幅した。10⁶個のMASCまたは内皮か筋芽細胞か神経外胚葉に分化した子孫からDNAを、細胞から標準法によって調製した。300ngのゲノムDNAをAscIで消化し、splinkeretteリンカーを5'末端に結合させた (Devon R. S. et al., 1995)。splinkeretteリンカーに用いた2種のオリゴヌクレオチドは下記の通りであった: aattTAGCGGCCGCTTG AATTtttttttgcaaaaa、(ヘアピンループ形成配列は小文字で、大文字は第二のsplinkeretteオリゴヌクレオチドの相補部分である)、および agtgtgagtcacagtagtctcgcgttcgAATTAA GCGGCCGCTA、(下線の配列はPCRおよびRT工程で用いたリンカー特異的プライマー (LSプライマー) の配列でもある)。eGFP遺伝子中の配列を認識する5'-ビオチン-T7結合プライマー [ビオチン-ggc-cag-tga-att-gta-ata-cga-ctc-act-ata-ggc-tgg-CAC-ATG-GTC-CTG-CTG-GAG-TTC-GTG-AC; 下線部は効率的なin vitro転写に必要な最小のプロモーター配列を示し、大文字はeGFP特異的配列である] およびLSプライマーを用いて、隣接領域を10回、Advantage2ポリメラーゼ (Clontech) を使用して増幅した。ビオチン標識増幅産物はストレプトアビジン-磁性ビーズ (ストレプトアビジン磁性粒子; Roche) を用いて捕捉し、結果として生じる産物をさらにT7RNAポリメラーゼを用いて約1,000倍に増幅し、それからDNaseI処理した。結果として生じる産物を agtgtgagtcacagtagtctcgcgttcsplinkeretteプライマーを用いてsuperscriptIIの説明書 (Gibco) に従って逆転写し、続いて30回のnested PCRによって3'LTR用のプライマー [ggc caa gaa cag atg gaa cag ctg aat atg] を用いて増幅した。内皮、筋、および神経外胚葉に分化した細胞と未分化のMASC由来のヒトゲノム中の隣接配列を配列決定した。

【0193】

複数の分化した子孫に同一の挿入部位が存在することを実証するため、宿主隣接ゲノム中に特異的プライマーを作成した。リアルタイムPCR増幅 (ABI PRISM 7700, Perkin Elmer/Applied Biosystems) を、eGFP配列と比較して隣接配列を定量するために用いた。増幅のための反応条件は下記の通りであった: 2μLのDNA溶液、1X TaqMan SYBR Green Universal Mix (Perkin Elmer/Applied Biosystems) PCR反応緩衝液を用いた最初の変性 (95℃で10分間) 後、二段階PCR (95℃で15秒間、60℃で60秒間) を40サイクル。使用したプライマーは下記の通りであった: クローンA16:LTRプライマー=CCA-ATA-AAC-CCT-CTT-GCA-GTT-G; 隣接配列染色体7=TCC-TGC-CAC-CAG-AAA-TAA-CC; クローンA12染色体7配列:LTRプライマー=GGA-GGG-TCT-CCT-CTG-AGT-GAT-T、隣接配列=CAG-TGG-CCA-GAT-CTC-ATC-TCA-C; クローンA12染色体1配列:LTR=GGA-GGG-TCT-CCT-CTG-AGT-GAT-T; 隣接配列=GCA-GAC-GAG-GTA-GGC-ACT-TG。隣接配列の相対量は、eGFP配列と比較して取扱説明書に従って7700 ABI PRISM検出ソフトウェア1.6を用いて計算した。

【0194】

神経移植:新生 (生後1日目~3日目) 雄Sprague Dawleyラット (Charles River Laboratories) をこの試験に用いた。ラットは低温麻酔によって麻酔した。改良定位頭部固定器を用いて頭蓋を固定し、頭皮を反転して頭蓋を露出した。hMASCは0.25%トリプシン/EDTAを用いて採取し、2回洗浄し、PBSに再懸濁した。hMASCの生存能力は85%より大であった。リン酸緩衝液に0.7x10⁴細胞/μlの濃度で懸濁したhMASCの2μlの量を、Hamiltonシリンジに付けた先細ガラスマイクロピペットで、下記の座標を用いて定位固定的に脳室内に注入

10

20

30

40

50

した（ブレグマからのmm）：AP-0.6、ML0.8、DV2.1、toothbarは-1に設定した。注射後、頭皮を縫合し仔ラットを回復させた。

【0195】

移植の4および12週間後、ラットを抱水クロラル（350mg/kg、i.p.）で麻酔し、断頭して脳を摘出し、粉末ドライアイス中で凍結し、-80℃で保存した。新鮮凍結脳をクリオスタットを用いて切断し、染色の直前に4%パラホルムアルデヒドで20分間固定した。切片を、2%正常ロバ血清（Jackson Immuno Labs）および0.3% triton Xを含むブロッッキング/透過処理溶液を用いて1時間室温にてインキュベートした。以降の工程のために、一次および二次抗体を同じブロッッキング/透過処理溶液で希釈した。一次抗体（Chemicon製マウス抗ヒト核（1:25）、抗ヒト角膜（1:25）および抗NeuN（1:200）；DAKO製ウサギ抗GFAP（1:250）、Sigma製ウサギ抗NF200（1:300）を4℃にて一夜インキュベートし、各10分間3回PBSで洗浄し、次いで二次Cy3（1:200）抗体およびFITC（1:100）抗体（すべてJackson Immuno Labs）と2時間室温でインキュベートした。スライドはZeiss Axiovert顕微鏡を用いた蛍光顕微鏡法および共焦点1024顕微鏡を用いた共焦点蛍光顕微鏡法によって検査した。

【0196】

hMASCはbFGFと共に培養したとき神経細胞、星状細胞および稀突起膠細胞表現型を獲得する。

神経外胚葉性分化を実施例5に記載の通りに行った。要約すると、細胞をFN被覆チャンバースライドまたは培養平板で、60%DMEM-LG、40%MCDB-201（Sigma Chemical Co, St Louis, MO）を含み1X ITS、1X LA-BSA、 10^{-8} Mデキサメタゾン、 10^{-4} Mアスコルビン酸-2-リン酸（AA）（すべてSigma）、100Uペニシリンおよび1,000Uストレプトマイシン（Gibco）を添加した無血清培地を用いて培養した。一部の培養には、我々は100ng/mLのbFGFを添加した一方、別の培養には10ng/mLのEOF+10ng/mLのFGF-8bを添加した（すべてR&D Systems）。細胞は継代培養しなかったが、培地は3～5日間毎に交換した。

【0197】

bFGFと共に再播種してから2週間後、表6に示す通り、細胞の26±4%が星状細胞（GFAP⁺）、28±3%が稀突起膠細胞（MBP⁺）そして46±5%が神経細胞（NF200⁺）マーカーを発現した。

【表6】

表6：bFGFおよびFGF-8bで誘導したhMSC上の分化マーカー

	bFGF (7日目)	bFGF (14日目)	bFGF (21日目)	FGF-8b (7日目)	FGF-8b (14日目)	FGF-8b (21日目)
GFAP	36±4%	26±4%	0	0	0	0
MBP	35±3%	28±3%	4±2%	0	0	0
GaIC	30±x%	26±5%	8±3%	0	0	0
ネスチン	35±6%	6±3%	試験せず	90±10%	10±6%	試験せず
Neuro-D	20±2%	0%	試験せず	50±6%	試験せず	試験せず
Tuji	30±3%	23±5%	23±2%	88±5%	92±3%	98±2%
PSA-NCAM	33±2%	16±3%	試験せず	40±7%	試験せず	試験せず
NF68	0	26±7%	22±3%	0	20±3%	試験せず
NF160	0	46±5%	50±3%	0	65±3%	試験せず
NF200	0	15±2%	22±5%	0	75±8%	92±6%
NSE	0	40±4%	82±5%	0	78±3%	80±8%
MAP2-AB	0	40±6%	80±2%	0	95±4%	95±3%
Tau	0	28±2%	78±7%	0	93±2%	92±4%
GABA	0	0	0	0	39±4%	40±2%
パルプ アルブミン	0	0	0	0	28±6%	35±3%
TH	0	0	0	20±5%	23±5%	25±6%
DCC	0	0	0	0	25±6%	28±2%
DTP	0	0	0	0	35±7%	38±3%
TrH	0	0	0	0	26±6%	25±4%
セロトニン	0	0	0	0	30±5%	35±3%
Nurrl	0	0	0	0	20±4%	23±2%
c-ret	0	0	0	0	33±3%	35±5%

10

20

30

40

50

【0198】

hMSCをより高い細胞密度 (2×10^4 細胞/cm²) で再播種して分化を誘導したとき神経外胚葉性の表現型を有する細胞は検出されず、細胞-細胞相互作用がbFGF誘導性の神経外胚葉性分化を阻害することを示した。

【0199】

20または60PDを経たhMSCを用いて分化を誘導したとき、星状細胞様、稀突起膠細胞様および神経細胞様細胞の分布に差は無かった。しかし、20 PDの間拡大したhMSCをbFGFと共に培養したとき、細胞の>50%が死亡した一方、>30 PDの間拡大したhMSC培養の>70%が生きて、神経細胞様、星状細胞様または稀突起膠細胞様の表現型を獲得した。このことは、すべてのhMSCを神経の特徴を獲得するように誘導することはできないが、in vitroで長期間生存するhMSCの部分集団が神経細胞の分化を担っている可能性があることを示唆する。hMSCの核型は培養期間にかかわらず正常であることが示されている (Reyes et al, 2001)。hMSCの神経外胚葉性様細胞への分化はしたがって、長期間の培養後のMSCの変質が原因である可能性は低い。

【0200】

大部分の星状細胞様および稀突起膠細胞様細胞は3週間後に死亡した。神経細胞様細胞の漸進的な成熟が培養期間を通じてみられた。1週間後、bFGF処理hMSCはNeuroD、ネスチン、ポリシアル酸付加型神経細胞接着分子 (PSA-NCAM)、およびチューブリン- β -III (TuJ I) について染色陽性となった (表6)。2週間後、bFGF処理細胞はNF68、-160、および-200、NSE、MAP2-AB、そしてTauについて染色陽性となった。bFGF誘導性神経細胞はGABA作用性、セロトニン作用性またはドーパミン作用性神経細胞のマーカーを発現しなかったが、グルタミン酸およびグルタミン酸受容体-5、-6および-7とN-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体、およびNa⁺ゲート電位チャンネルを発現した。

【0201】

神経外胚葉性分化のさらなる確認は、14日間、100ng/mLのbFGFを用いて分化を誘導された

2つの独立したhMASC集団のCDNAアレイ分析から得られた。ネスチン、otx 1 およびotx2の発現レベルは免疫組織化学的特徴づけと一致し、mRNAの>2倍の上昇がネスチン、GFAP、グルタミン酸-受容体4、5、および6、そしてグルタミン酸、およびいくつかのナトリウムゲート電位チャンネルについて検出されたが、しかしTHまたはTrH mRNAレベルに上昇は見られなかった。mRNAレベルの>2倍の上昇は、脳だけに見られる転写因子である哺乳類achaete-scute相同体1 (MASH I) mRNA (Franco Del Arno et al., 1993)、およびephrin-A5 mRNA (O'Leary and Wilkinson, 1999) についても見られた。星状細胞特異的マーカーのGFAPおよびS100A5、そして稀突起膠細胞特異的マーカーのミエリン-稀突起膠細胞糖タンパク前駆体およびミエリンタンパク質ゼロ (PMZ)、ならびにハンチンチン、そして主要プリオンタンパク質前駆体mRNAが、bFGFへの曝露後、>2倍高く発現された。2倍より大きい上昇は、いくつかのグリシン受容体、GABA受容体、ヒドロキシトリプトファン受容体-Aおよび神経細胞のアセチルコリン受容体、グリシン輸送体タンパク質、シナプトブレビンおよびシナプトソーム補助タンパク質 (SNAP) 25についても見られた。最後に、bFGFはBDNFおよびグリア由来神経分化誘導因子 (GDNF) の発現を誘導した。

【0202】

hMASCのように、mMASCはbFGFと共に培養したとき神経細胞、星状細胞および稀突起膠細胞表現型を獲得する。

【0203】

他の種に由来するMASCを、同様の結果が得られるかどうか判定するために試験した。40-90 PDの間拡大したmMASCを、 10^4 細胞/cm²でhMASCに用いたのと同じ条件で再播種した。14日後、mMASCは星状細胞 (GFAP⁺)、稀突起膠細胞 (MBP⁺) および神経細胞 (NF-200⁺、NSE⁺ およびTau) の形態的および表現型の特徴を獲得した。NF200とGFAPまたはMBPは同一の細胞では決して見つからなかった。未分化のmMASCとは対照的に、bFGF処理mMASCは顕著に大きく、神経突起が>40 μm延長した。

【0204】

神経細胞様細胞が神経細胞の機能的特徴を有するかどうか、そしてbFGF誘導性細胞が電位依存性Na⁺電流を示すかどうか判定するため、パッチクランプを用いた。一部の細胞はカルシウム電流を発現し、4個の細胞ではカルシウム電流に媒介されるスパイク生成の証拠があったにもかかわらず、mMASC由来神経細胞様細胞 (n=59) のどれにも、ナトリウム電流または速いスパイク生成は見られなかった。このように、ナトリウムゲート電位チャンネルmRNAおよびタンパク質の発現にもかかわらず、bFGF誘導性細胞は機能する電位依存性Na⁺電流を有しなかった。

【0205】

hMASCはEGFおよびFGF-8bと共に培養したとき、中脳ドーパミン作用性、セロトニン作用性またはおよびGABA性表現型を獲得する。

中脳後脳境界および吻側前脳に発現されるFGF-8bは、中脳および前脳のドーパミン作用性神経細胞と後脳のセロトニン作用性神経細胞の分化を誘導する (Ye et al., 1998)。In vitroでは、FGF-8bはドーパミン作用性およびセロトニン作用性神経細胞をマウスES細胞から誘導するのに用いられている (Lee et al., 2000)。

【0206】

20~60PDの間拡大したhMASC (n=8) を 2×10^4 細胞/cm²でFNに、ITSとAAと10ng/mLのFGF-8bおよび10ng/mLのEGFを含む無血清培地に再播種した。80%を超える細胞が3週間生存した。FGF-8bおよびEGFは神経細胞のマーカーについて陽性染色する細胞への分化を誘導した (図6) (7日目:PSA-NCAM、ネスチンおよびTuJ1; 14日目:NF-68、NF-160、NF-200; 21日目:MAP2-AB、NSE、Tau、およびNa⁺ゲート電位チャンネル) が、稀突起膠細胞および星状細胞へは誘導しなかった。bFGFに誘導される分化についての我々の観察とは対照的に、 10^4 細胞/cm²でEGFおよびFGF-8bと共に播種した細胞は分化しなかった。2~3週間後、細胞はGABA性 (GABA⁺、パルブアルブミン⁺)、ドーパミン作用性 (TH⁺、DCC⁺、およびDTP⁺) およびセロトニン作用性 (TrH⁺およびセロトニン⁺) 神経細胞の特徴を有した (表6)。細胞はまたGABA-A受容体とグルタミン酸受容体も発現した。ドーパミン作用性 表現型を有する細

胞はまた、中脳ドーパミン作用性神経細胞でのみ発現される核転写因子Nurr1 (Saucedo-Cardenas et al., 1998) ならびに、ドーパミン作用性神経細胞で発現されるグリア細胞系統由来の神経分化誘導因子 (GDNF) 受容体複合体の構成要素である膜結合受容体タンパク質チロシンキナーゼである癌原遺伝子cRet (Trupp et al., 1996) に対する抗体について陽性に染色された。このことは、FGF-8bが中脳ドーパミン作用性神経細胞と一致する表現型を誘導することを示唆する。

【0207】

ここでも、免疫組織化学的試験からの結果は、14日間FGF-8b+EGFと共に分化を誘導されたhMASCについてのCDNAアレイ分析によって確認された。免疫組織化学的特徴づけと一致して、mRNAの>2倍の上昇がTH、TrH、グルタミン酸、いくつかのグルタミン酸受容体、およびナトリウムゲート電位チャンネルについて検出された。パルブアルブミンとGABAはこのアレイ上に存在しないため、それらの発現はmRNA分析では確認できなかった。免疫組織化学によってみられるほぼ限定的な神経分化と一致して、tGFAP、S100A5mRNA、あるいは稀突起膠細胞特異的マーカーであるPMZのmRNAの発現に上昇は見られなかった。FGF-8b+EGFに誘導された細胞は>2倍多いチロシンキナーゼ受容体 (Trk) A、BDNFとGDNF、いくつかのグリシン-、GABA-およびヒドロキシトリプタミン-受容体、そしていくつかのシナプスタンパク質を発現した。

10

【0208】

グリア芽腫細胞株U87との共培養は神経細胞の成熟を促進する

使用した培養条件にかかわらず、hMASC由来神経細胞は培養中で3~4週間を超えて生存しない。どの培養も3週間後にグリア細胞を含まなかったため、グルタミン酸とグルタミン酸受容体の両方を発現する神経細胞がグルタミン酸の毒性のために死亡した可能性がある (Anderson and Swanson, 2000)。あるいは、神経細胞の生存、分化、成熟に必要な、グリア細胞によって供給される因子が培養中に存在しない可能性がある (Blondel et al., 2000; Daadi and Weiss, 1999; Wagner et al., 1999)。この仮説を検証するために、3週齢のFGF-8b+EGF培養からの細胞を、グリア芽腫細胞株U-87と、FGF-8b+EGFを添加した無血清培地でさらに2週間共培養した。

20

【0209】

神経膠腫細胞株U-87 [American Tissue Cell Collection (Rockville, MD)] はDMEM+10% FCS中に維持した (Hyclone Laboratories, Logan, UT)。3週齢のFGF-8b+EGF含有培養からの細胞を、親油性色素PKH26 (Sigma) で取扱説明書の通りに標識した。標識細胞をFN被覆チャンバースライドにFGF-8b+EGF含有無血清培地中に1,000個のU-87細胞と共に再播種し、培地を3~5日間毎に交換しながらさらに2~3週間維持した。MASC由来細胞中に存在するPKH26がU-87細胞株に移動しないのを確実にするため、U-87細胞をBSA含有培地および20 μ lのPKH26色素で7日間培養した。神経膠腫細胞の標識は検出されなかった。

30

【0210】

これらの無血清条件下で、U-87細胞は増殖をやめたが生存した。hMASC由来細胞を蛍光顕微鏡法で確認できるようにするため、hMASC由来神経細胞はU-87細胞との共培養前に膜色素PKH26で標識した。U-87細胞と同じサイトカインと後3週間共培養したFGF-8b+EGF誘導神経細胞は、少なくともさらに2週間生存した。神経細胞は、細胞の大きさが増大し、また神経突起の数、長さ複雑さが増大した、より成熟した形態を獲得した。電流注入後の全細胞電流固定および電位固定によって、U-87細胞との共培養後の、hMASC由来のPKH26標識神経細胞の電気生理学的特徴を評価した (図9B)。電流固定によって、FGF-8b+EGF/U-87培養中に存在する8個中4個のKH26標識hMASC由来細胞が、注入電流に対するスパイク生成を示した。スパイク生成および非スパイク生成細胞の静止膜電位はそれぞれ -64.9 ± 5.5 mVおよび 29.7 ± 12.4 mVであった。試験した個々の細胞について、スパイク生成および非スパイク生成細胞の入力抵抗はそれぞれ194.3 (37.3) および216.3 (52.5) M Ω であった。図9Bにスパイク生成が観察された細胞の一つの例を示す。上図はスパイク生成細胞から対照条件下で得られた一群の電圧記録を示す。DC電流を最初に細胞に注入して-100~-120 mVの範囲に保つ。電流注入手順を、中図に示す通り、次いで膜電位を異なるレベルにする

40

50

のに用いた。この例に示す通り、細胞を活動電位の閾値にするのに十分大きな脱分極電流の段階が、単一のスパイクを引き起こす。下図は、細胞のスパイク生成が $1\mu\text{mTTX}$ でブロックされうること示し、活動電位が Na ゲート電位チャンネルによって媒介されていることを示唆する。同じ細胞の電位固定モードから得られた、リークを差し引いた電流記録（図9C）は、タイムコースの中で一過性でありまた -58mV よりも正である電位で活性化される内向き電流、および外向き電流を示した。一過性の内向き電流は $1\mu\text{mTTX}$ で可逆的にブロックされた。この薬理は、内向き電流の一過性のタイムコースおよび電位依存性の活性化と共に、成熟神経細胞および骨格筋細胞だけにみられる電位依存性 Na^+ 電流に典型的である（Sah et al., 1997; Whittemore et al., 1999）。これらの神経細胞様細胞中に骨格筋マーカーは検出されなかった。これらの試験は、 $\text{FGF-8b} + \text{EGF}$ での処理と神経膠腫との共培養は TTX 感受性電位依存性 Na^+ 電流という興奮可能な神経細胞の基本的な特徴を細胞に与える結果になることを示唆する。

10

【0211】

ラット新生仔の脳室に移植されたhMASCは星状細胞および神経細胞のマーカーを発現する細胞に分化する

1.4×10^4 個のhMASCを定位的に生後1日目～3日目のSprague Dawleyラットの側脳室に注射した。4および12週間後、動物を屠殺し、ヒト細胞の存在およびhMASCが神経外胚葉に分化した証拠について分析した。ヒト核またはヒト核膜に対する抗体を用いた染色によって同定されたヒト細胞は、SVZに、4週間後には分析した個体の側脳室から最大 $400\mu\text{m}$ 離れて観察することができ、12週間後には、ヒト細胞は、たとえば海馬中におよび脳弓に沿って、脳実質のより深くにもみることもできた。一部のヒト細胞は典型的な星状細胞の形態を有し抗GFAP抗体で陽性染色された一方、別の細胞は抗Neu-N抗体、NF-200および抗ヒト核膜抗体で陽性染色された。三重染色は、ヒト核抗原陽性Neu-N陽性細胞はGFAPを同時発現しなかったことを示した。

20

【0212】

要約

この試験の中心的な発見は、単一の出生後BMに由来するMASCを中胚葉性細胞型だけでなく成熟神経細胞の特徴ならびに星状細胞と稀突起膠細胞の特徴を有する細胞に分化するよう誘導することができるということである。MASCの神経外胚葉性の性質を有する細胞への時間依存性ならびに培養方法依存性の成熟が示された。二重染色は、神経細胞またはグリア細胞は真正であり結果は不適切に発現された神経細胞のまたはグリアのマーカーが原因でないことを決定的に実証した。これらの結果はmRNAレベルで確認された。レトロウイルスマーキング試験を用いて、レトロウイルスベクターに隣接する宿主細胞ゲノム領域配列はすべての系統で同一であったため、神経細胞、星状細胞および稀突起膠細胞が、筋および内皮にも分化する単一のMASCに由来することが示された。hMASCは成熟神経細胞の表現型だけでなく電気生理学的特徴すなわち TTX 感受性電位依存性 Na^+ 電流も獲得した。最後に、MASCはin vivoで神経細胞および星状細胞のマーカーを発現する細胞にも分化することが示された。

30

【0213】

レトロウイルス挿入配列の3'-LTRに隣接するゲノム配列のPCRに基づく配列決定と組み合わせhMASCのレトロウイルスマーキングを用いて、神経細胞は星状細胞および稀突起膠細胞、ならびに内皮および筋に分化するのと同じhMASCに由来することが示された（Jordan et al., 1990）このことはMASCが単一細胞レベルで、中胚葉性および神経外胚葉性の系統の細胞に分化できることを決定的に示す。中胚葉性細胞型だけでなく神経外胚葉性細胞型にも分化する能力を有する細胞である多能性成体幹細胞すなわちMASCは新たに命名された。Sanchez-Ramos et al.（Sanchez-Ramos et al., 2000）およびWoodbury et al.（Woodbury et al., 2000）は、ヒトまたはげっ歯類のMSC集団はin vitroで星状細胞および神経細胞のマーカーを発現することができるが稀突起膠細胞のマーカーを発現することはできないことを示した。しかし、どちらの試験も、神経外胚葉性マーカーを獲得した同じ細胞が中胚葉性細胞にも分化できるという証拠は提供しなかった。さらに、どちらの試験

40

50

も、神経細胞のマーカーを発現する細胞が機能する神経細胞の特徴も獲得したことは示さなかった。このように、神経分化について示唆に富むが、これらの報告はMSCからの神経およびグリア分化を決定的に示さなかった。

【0214】

ラット新生仔の脳室に移植されたhMSCは神経脳室下領域中および海馬中へ移動でき、そこで局所的信号に応答して星状細胞および神経細胞のマーカーを発現する細胞に分化することも示された。脳の非神経性領域より胚性領域に行われるほうが、また移植が成体動物と比べて新生仔に行われるほうが、NSCの特定の神経細胞の表現型への移動と分化はずっと大きな程度で起こるため、このモデルが選択された (Bjorklund and Lindvall, 2000; Svendsen and Caldwell, 2000)。hMSCは多能性であり神経外胚葉の外側で細胞に分化するにもかかわらず、hMSCは奇形腫を形成しなかった。脳室下領域の外側に移動した細胞の数は4週間後では少なく、しかし12週間後では増加した。

10

【0215】

MASCを出生後のBMから単離し、拡大して星状細胞、稀突起膠細胞または神経細胞の細胞型に分化するよう誘導するのが容易に可能であることによって、NSC移植における主要な問題の一つ、すなわち適当な提供者組織の入手可能性を回避しうる。

【実施例11】

【0216】

肝細胞様細胞へのMASC分化

胚発生中に、肝臓の形態形成の最初の兆候は腹側内胚葉性上皮の肥厚であり、マウスでは胎生7.5~8.5日目の間に起こる (Zaret K.S., 2001)。最初の内胚葉形成とそれに続く内胚葉決定に関わるシグナルについてはあまり知られていない。原腸胚形成の初期には (e6-e7) 内胚葉は前後方向さえ決定されていない (Melton D., 1997)。しかし、近年の研究は、ex vivoでの内胚葉のFGF4への曝露は、このとき肝マーカーを発現する能力のある初期内胚葉を後側化することを示した (Wells J.M. et al. 1999)。マウスで胎生8.5日目までに、最終的な内胚葉が腸管を形成しHNF3Pを発現する (Zaret K.S., 2000)。前腸内胚葉は、ともに隣接する心中胚葉に産生される酸性 (a) FGFおよびbFGFによって肝細胞系統に誘導され (Zaret K.S., 2001)、これらは既定の脾の運命でなく肝の運命を誘導するために必要である (Zaret K.S., 2001)。transversum間葉に産生される基礎形態形成タンパク質 (BMP) も、これらが内胚葉がFGFに応答する能力を高めるGATA4 転写因子のレベルを上昇させるのでまた必要である (Zaret K.S., 2001) GATA4およびHNF3pが肝決定に必要であり、またこれらは中でもアルブミンといった肝細胞特異的発現のマーカーをアップレギュレートするので、肝細胞分化に繋がる下流の事象の重要なエフェクターである。

20

30

【0217】

大部分の場合、成熟肝細胞は数度の細胞分裂を経ることができ肝細胞置換を担っている。結果として、肝臓幹細胞の存在および機能に関して大きな議論が存在している。化学的傷害による広範囲の肝臓壊死の間、または肝細胞をその増殖をブロックする化学物質で処理したとき、円形細胞と呼ばれる円形のより小さな細胞の集団が出現し増殖する (Petersen, B.E., 2001)。これらの円形細胞は肝臓における「幹細胞」部分を構成する可能性がある。円形細胞は、ヘリング管と呼ばれる胆道の最小単位内に存在し、そこから肝実質へ移動する (Theise N.D., et al., 1999)。円形細胞は両能性であり、in vitroおよびin vivoで肝細胞と胆道上皮の両方を生じる。円形細胞はいくつかの造血マーカーたとえばThy1.1、CD34、Flt3-受容体、およびcKitを発現し、そしてまたαFP、CK19、γ-グルタミル-トランスフェラーゼ、そしてOV-6を発現する。円形細胞の起源は不明である (Petersen, B.E., 2001; Kim T.H. et al, 1997; Petersen, B.E., 2001)。

40

【0218】

最近まで、肝細胞は内胚葉性起源の細胞およびその前駆細胞からだけ得られると信じられていた。しかし、近年の研究は非内胚葉細胞もまた肝細胞をin vivoおよび in vitroで形成することを示唆する (Petersen, B.E., 2001; Pittenger M.F. et al., 1999)。骨髄 (BM) 移植後、円形細胞は提供者BMに由来する (Theise N.D., et al., 1999)。I型チロ

50

シン血症の動物モデルであるFAH^{-/-}マウスへの濃縮した造血幹細胞（HSC）の移植は、多数の提供者LacZ⁺肝細胞の増殖という結果になり、動物は肝臓の生化学機能を回復した（Lagasse E. et al., 2000）。さらに、単一HSCは造血機構に再定着するだけでなく肺、皮膚、肝臓および腸の上皮に寄与する可能性がある（Krause D.S. et al., 2001）。in vitroでオンコスタチンM（OSM）の存在下または非存在下でデキサメタゾン（Dex）処理した外分泌性臍腫瘍細胞は肝細胞表現型を獲得しうる（Shen C.N. et al., 2000）。最後に、マウス胚性幹（ES）細胞は自発的に肝細胞表現型を獲得し、この過程はaFGF、HGF、OSM、およびDexを用いた処理によって促進される（Hamazaki T. et al., 2001）。

【0219】

単一HSCはin vitroで中胚葉性および神経外胚葉性細胞に分化するだけでなく、肝細胞の形態的、表現型および機能的特徴を有する細胞にも分化しうるということが個々に実証された。

【0220】

mMASC、rMASC、およびhMASCはFGF4および／またはHGFと共に培養されたとき肝細胞様表現型を獲得する。

mMASC、rMASCおよびhMASCを記載した通りに選択し培養した。肝細胞様細胞へのMASCの分化のための最適条件を決定するため、さまざまな細胞外マトリクス（ECM）成分、およびin vivoまたはES細胞から肝細胞分化を誘導することが知られているサイトカイン（Zaret K.S., 2001）の、mMASCまたはrMASCの肝細胞への分化に対する効果を試験した。分化には細胞周期停止が必要であるため、細胞密度の効果もまた試験した。肝細胞様細胞への分化を実証するため、14日後に細胞をアルブミン、CK18、およびHNF3pに対する抗体を用いて染色した。

【0221】

mMASCまたはrMASCのアルブミン、CK18、およびHNF3p陽性類上皮細胞への最適分化は、表7Aに示すようにMASCが 21.5×10^3 細胞/cm²で10ng/mlのFGF4および20ng/mlのHGF存在下でMatrigelに播種したときに見られた。14日後、アルブミン、CK18、およびHNF3p陽性類上皮細胞の割合は $61.4 \pm 4.7\%$ であり、細胞の17.3%が二核であった。FNに播種したときも、細胞の $53.1 \pm 6.3\%$ だけが染色され二核細胞がより少なかった（10.9%）が、CK18およびHNF3p陽性類上皮細胞への分化がみられた。

【0222】

FGF4またはHGFのいずれかとの培養によってアルブミン、CK18、およびHNF3p陽性類上皮細胞が得られたが、しかし表7Aに示すようにmMASCまたはrMASCをFGF4とHGFの両方で処理したときのほうがアルブミン、CK18、およびHNF3p陽性細胞の割合はより高かった。aFGF、bFGF、FGF7、BMP、またはOSMの添加では肝細胞マーカーについて陽性である細胞の割合は上昇しなかった一方、1%DMSOおよび0.1mM～10mM酪酸ナトリウムは肝細胞マーカーについて陽性である細胞へのmMASCまたはrMASCの分化を支持しなかった。

【0223】

$2.5 \sim 25 \times 10^3$ 細胞/cm²の細胞密度を試験したとき、肝細胞マーカーを有する細胞の割合の最高値は、 21.5×10^3 細胞/cm²で播種した細胞について見られた。細胞を $< 12.5 \times 10^3$ 細胞/cm²で播種したときは肝細胞分化は見られなかった。

【0224】

hMASCを $3 \sim 30 \times 10^3$ 細胞/cm²で、aFGF、bFGF、FGF7、1%DMSO、HGF、および／またはFGF4を含む、10ng/mlLFNまたは1%Matrigelに播種した。10ng/mlのFGF4単独、20ng/mlのHGF単独、または両者の組で処理した細胞だけがアルブミン、CK18、およびHNF3pを発現する類上皮細胞に分化した。 $15 \sim 30 \times 10^3$ 細胞/cm²で播種したhMASCは類上皮細胞に分化した一方、 3×10^3 細胞/cm²で播種したhMASCは死亡した。mMASCまたはrMASCのように、アルブミン、CK18、およびHNF3p陽性類上皮細胞の割合はhMASCをMatrigel（ $91.3\% \pm 4.4$ ）で培養したときのほうがFN（ $89.5\% \pm 5.4$ ）で培養したときよりも高く、そして表7Bに示す通り、二核細胞の割合はMatrigel（31.3%）でのほうがFN（28.7%）でよりも高かった。

【表7】

10

20

30

40

表7：肝細胞様細胞へのMASC分化の最適化

	A：マウスおよびラット			B：ヒト		
	FGF-4	HGF	FGF4 +HGF	FGF-4	HGF	FGF-4 +HGF
FN						
アルブミン	+++	++	+++	++++	++++	++++
CK18	+++	++	+++	++++	++++	++++
HNF3β	+++	++	+++	++++	NT	++++
Matrigel™						
アルブミン	+++	++	+++	++++	NT	++++
CK18	+++	++	+++	++++	NT	++++
HNF3β	+++	+++	+++	++++	NT	++++
コラーゲン						
アルブミン	-	-	-	NT	NT	NT
CK18	-	-	-	NT	NT	NT
HNF3β	-	-	-	NT	NT	NT

- = 0%、+ = 20%、++ = 30%、+++ = 40%、++++ = 60%、
+++++ = 80%の細胞が特異的マーカーについて染色陽性となった、NT = 試験せず

10

20

30

40

50

【0225】

肝細胞様細胞へのMASC分化の表現型の特徴づけ

肝細胞分化を免疫蛍光および共焦点顕微鏡法によって肝細胞分化の初期（HNF3P、GATA4、CK19、αFP）および後期（CK18、アルブミン、HNF1α）マーカーについて経時的に、さらに評価した。FGF4およびHGFを含むMatrigelに播種したmMASCまたはrMASCは、表8Aに示す通り、直径8μmから15μmに大きくなった。21～28日目に、細胞の約60%は類上皮細胞で、より小さな丸型または紡錘型細胞に囲まれていた。未分化のmMASCまたはrMASCは肝臓特異的転写因子または細胞質マーカーのどれも発現しなかった。4日後、細胞はHNF3J3、GATA4およびαFP、低レベルのCK19を発現し、ごく少数の細胞がHNF1α、アルブミンまたはCK18について染色陽性であった。7日目に、その大きな類上皮細胞はHNF30、GATA4、HNF1αについて染色陽性であり、アルブミンおよびCK18について染色が強まった。少数の細胞だけがαFPを発現した。14、21および28日後、その大きな類上皮細胞はGATA4、HNF30、HNF1α、CK18およびアルブミンについて染色陽性であったが、しかしαFPまたはCK19についてはそうでなかった。類上皮細胞の小塊を取り囲むより小さな細胞はCK19およびαFPについて染色陽性であった。

【0226】

FGF4およびHGF、またはFGF4単独を含むMatrigelに播種したhMASCは、21日目までに直径10～12μmから20～30μmに大きくなった。7日後、細胞はHNF3p、GATA4および低レベルのCK19を発現した一方、アルブミンまたはCK18について染色陽性の細胞は少数しかなかった。14および21日後、類上皮細胞の>90%がGATA4、HNF3p、HNF1α、HNF4、CK18およびアルブミンについて染色陽性であった一方、図10Bに示す通り、少数の細胞だけがαFPまたはCK19について染色陽性であった。

【表8】

表8：肝細胞マーカー発現の免疫組織化学パターン

	A：マウスおよびラット					B：ヒト				
	D4	D7	D10	D14	D21	D4	D7	D10	D14	D21
HNF3β	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	NT	+	NT	+	+
Gata4	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	NT	+	NT	+	+
α-FP	+/+	+/+	NT/NT	-/-	-/-	NT	+	NT	-	-
HNF1α	-/-	+/+	NT/NT	+/+	+/+	NT	-	NT	+	+
アルブミン	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	NT	+	NT	+	+
CK18	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	NT	-	NT	+	+

+ = マーカーが発現されている、- = マーカーが発現されていない、NT = 試験せず

10

20

30

40

50

【0227】

肝細胞様細胞は神経外胚葉および内胚葉に分化したのと同じ単一hMASCに由来する。単一のmMASCまたはrMASCが内皮、神経外胚葉と、CK18およびアルブミン陽性内胚葉細胞に分化することが示されている。単一のhMASCが中胚葉および神経外胚葉に分化することも示されている。同じ単一のhMASCを、肝細胞様細胞に分化することができるかどうか試験した。MASCは記載の通りに得て培養して拡大した。分化のためには、mMASCまたはrMASCを 25×10^3 細胞/cm² で $0.01 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ のフィブロネクチン (FN)、 $0.01 \sim 8 \mu\text{g/ml}$ のコラーゲン (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) または1%Matrigel (Becton-Dickinson) に、無血清培地 [60%低グルコースDMEM (DMEM-LG; Gibco-BRL, Grand Island, NY)、40%MCDB-201 (Sigma) に、1Xインシュリン/トランスフェリン/セレン、 $4.7 \mu\text{g/ml}$ リノール酸、 1mg/ml ウシ血清アルブミン (BSA)、 10^{-8}M デキサメタゾン、 10^{-4}M アスコルビン酸-2-リン酸 (すべてSigma)、100U/mlペニシリン、100U/mlストレプトマイシン (Gibco) を添加] に2% PCS (Hyclone, Logan Utah) および各10 ng/mLの上皮成長因子 (EGF) (Sigma)、白血病抑制因子 (LIF; Chemicon, Temecula, CA) と血小板由来成長因子 (PDGF-BB; R&D Systems, Minneapolis, MN) を加えた中に播種した。hMASCを $15 \sim 30 \times 10^3$ 細胞/cm² で $0.1 \mu\text{g/ml}$ FNまたは1% Matrigelに、LIFを含まない同じ培地中に播種した (Reyes M., 2002)。8～12時間後、培地を除去し、細胞をリン酸緩衝液 (PBS) (Fischer) で2回洗浄し、そして5-50ng/ml HGF、aFGF、bFGF、FGF4、FGF7、またはOSM; または10mg/mlジメチルスルホキシド (DMSO)、または0.1～1mM 酪酸ナトリウムを添加した無血清培地中で培養した。

【0228】

hMASCへのeGFPの形質導入はレトロウイルス含有eGFP-CDNAを用いて行い、 $> 5 \times 10^6$ 細胞に拡大した。20%は筋、内皮、神経外胚葉および内胚葉に分化するよう誘導された。クローンA16については単一のレトロウイルス挿入部位が未分化のMASCならびに中胚葉性と神経外胚葉性の分化した細胞に存在し、またEGFP⁺クローンA16MASCはCK18およびアルブミン陽性細胞に分化した。同じ挿入部位が、同じ細胞集団から作成したFGF4処理MASCに存在し (5'-TAG CGGCCGCTTGAATTGCAACGCGAGACTACTGTGACT CACACT-3'、染色体7)、単一のhMASCが、中胚葉および神経外胚葉以外に、内胚葉に分化することを証明した。

【0229】

定量的RT-PCRはFGF4およびHGFが肝細胞決定および分化を誘導することを示す。定量的RT-PCRによって肝細胞分化は肝細胞分化の初期 (HNFSp, GATA4, CK19, α FP) および (CK18、アルブミン、HNF1 α 、シトクロムP450) マーカーについて確認された。RNAを 3×10^5 個のMASCまたは肝細胞に分化するよう誘導されたMASCから抽出した。mRNAを逆転写し、CDNAを下記の通り増幅した: ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer/Applied Biosystems) を使用して、 $2 \mu\text{L}$ のDNA溶液、1X TaqMan SYBR Green Universal Mix PCR反応緩衝液を用いた最初の変性 (95°C で10分間) 後、二段階PCR (95°C で15秒間、 60°C で60秒間) を40

サイクル。増幅に用いたプライマーは表9に列記する。

【表 9】

表9：使用プライマー

プライマー名	プライマー
マウス	
HNF1 α	S: 5'-TTCTAAGCTGAGCCAGCTGCAGACG-3' A: 5'-GCTGAGGTTCTCCGGCTCTTTCAGA-3'
HNF3 β	S: 5'-CCAACATAGGATCAGATG-3' A: 5'-ACTGGAGCAGCTACTACG-3'
GATA4	S: 5'-AGGCATTACATACAGGCTCACC-3' A: 5'-CTGTGGCCTCTATCACAAGATG-3'
CK18	S: 5'-TGGTACTCTCCTCAATCTGCTG-3' A: 5'-CTCTGGATTGACTGTGGAAGTG-3'
CK19	S: 5'-CATGGTTCTTCTTCAGGTAGGC-3' A: 5'-GCTGCAGATGACTTCAGAACC-3'
アルブミン	S: 5'-TCAACTGTCAGAGCAGAGAAGC-3' A: 5'-AGACTGCCTTGTGTGGAAGACT-3'
α FP	S: 5'-GTGAAACAGACTTCCTGGTCCT-3' A: 5'-GCCCTACAGACCATGAAACAAG-3'
TTR	S: 5'-TCTCTCAATTCTGGGGGTG-3' A: 5'-TTTCACAGCCAACGACTCTG-3'
Cyp2b9	S: 5'-GATGATGTTGGCTGTGATGC-3' A: 5'-CTGGCCACCATGAAAGAGTT-3'
Cyp2b13	S: 5'-CTGCATCAGTGTATGGCATTIT-3' A: 5'-TTTGCTGGAAGTGAAGTACCA-3'
ヒト	
α FP	S: 5'-TGCAGCCAAAGTGAAGAGGGAAGA-3' A: 5'-CATAGCGAGCAGCCCAAAGAAGAA-3'
アルブミン	S: 5'-TGC TTG AATGTGCTGATGACAGGG-3' A: 5'-AAGGCAAGTCAGCAGGCATCTCATC-3'
CK19	S: 5'-ATGGCCGAGCAGAACCGGAA-3' A: 5'-CCATGAGCCGCTGGTACTCC-3'
CK18	S: 5'-TGGTACTCTCCTCAATCTGCTG-3' A: 5'-CTCTGGATTGACTGTGGAAGT-3'
CYP1B1	S: 5'-GAGAACGTACCGGCCACTATCACT-3' A: 5'-GTTAGGCCACTTCAGTGGGTCATGAT-3'
CYP2B6	S: 5'-GATCACACCATATCCCCGGA-3' A: 5'-CACCCCTACCACCCATGACCG-3'
ラット	
HNF1 α	S: 5'-AGCTGCTCCTCCATCATCAGA-3' A: 5'-TGTTCCAAGCATTAAAGTTTCTATTCTAA-3'
HNF3 β	S: 5'-CCTACTCGTACATCTCGTCTCATCA-3' A: 5'-CGCTCAGCGTCAGCATCTT-3'
CK18	S: 5'-GCCCTGGACTCCAGCAACT-3' A: 5'-ACTTTGCCATCCACGACCTT-3'
CK19	S: 5'-ACCATGCAGAACCTGAACGAT-3' A: 5'-CACCTCCAGCTCGCCATTAG-3'
アルブミン	S: 5'-CTGGGAGTGTGCAGATATCAGAGT-3' A: 5'-GAGAAGGTCACCAAGTGCTGTAGT-3'
α FP	S: 5'-GTCCTTTCTTCTCCTGGAGAT-3' A: 5'-CTGTCACTGCTGATTTCTCTGG-3'
TTR	S: 5'-CAGCAGTGGTGCTGTAGGAGTA-3' A: 5'-GGGTAGAACTGGACACCAAATC-3'
Cyp2b1	S: 5'-GAGTTCTTCTCTGGGTTCTTG-3' A: 5'-ACTGTGGGTCATGGAGAGCTG-3'

10

20

30

40

50

【0230】

mRNAレベルは β -アクチン（マウスおよびヒト）または18S（ラット）をハウスキーピング遺伝子として用いて標準化し、そして新規に単離されたラットまたはマウス肝細胞、7日

間培養したラット肝細胞中のmRNAレベル、またはClontech, Palo Alto, Californiaより購入したヒト成体肝臓RNA由来のmRNAと比較した。

【0231】

0日目には、mMASCおよびrMASCは低レベルのアルブミン、 α FP、CK18、CK19、TTR、HNF3P、HNF1 α およびGATA4 mRNAを発現したが、CYP2B9とCYP2B13（マウス）またはCYP2B1（ラット）mRNAは発現しなかった（図10）。mMASCまたはrMASCの、FGF4とHGFを用いた処理後、HNF3J5およびGATA4 mRNAの発現は2日目に増加し、4日目までに最大となり、わずかに減少して14日目までに一定となった。 α FP、およびCK19のmRNAは2日目以降増加し、4日目までに最大となり、以降は減少した。TTR mRNAは4日目以降増加し、7日目までに最大となり一定となった。CK18、アルブミン、HNF1 α およびP450酵素mRNAは7日目以降増加し、14日目に最大となった。14日目と21日目の間に、FGF4およびHGFに誘導されたMASCはアルブミン、TTR、CK18、CYP2B9およびCYP2B13（マウス）とCYP2B1（ラット）mRNAを発現した。

10

【0232】

未分化のhMASCは低レベルのアルブミン、CK18、およびCK19、CYP1B1を発現したが、しかし α FP（図10）とCYP2B6 mRNAは発現しなかった。アルブミン、CK18、CK19、CYP1B1 mRNAのレベルは、0日目（MASC）培養と比較して、FGF4単独とまたはFGF4およびHGFと14日間培養したhMASCでは顕著に増加した。アルブミン、CK18およびCYP1B1 mRNAのレベルは増加を続け、28日目にはより高かった。CYP1B1は特異的肝細胞マーカーではないが、そのアップレギュレーションは肝細胞決定および成熟を示唆する。新鮮肝臓mRNAの0.5%~1.0%である低いレベルのCYP2B6を14日目と21日目に見ることができたが0日目には見られなかった。未成熟肝細胞マーカー（CK19と α FP）のmRNAレベルは分化が進行するにつれ減少し、FGF4単独で誘導した培養でより高かった一方、成熟肝細胞（CK18とアルブミン）のmRNAレベルはFGF4とHGF誘導性hMASCでより高かった。

20

【0233】

ウェスタンブロットはFGF4+HGFが肝細胞決定と分化を誘導することを実証する

発現 of 肝細胞特異的遺伝子の発現は、ウェスタンブロットによっても確認され、Reyes et al. (2000)に記載された通り実施した。 α FP、ヒトアルブミン、CK18に対する抗体をブロッキング緩衝液で1:1000に希釈した。ヤギ抗 β -actin (1:1000)はSanta Cruzより入手した。二次抗体はHRP結合ヤギ抗マウスおよびHRP結合ロバ抗ヤギであった（Amersham, Arlington Heights）。ECLは取扱説明書に従って実施した（Amersham）。未分化のhMASCはCK18、アルブミン、または α FPタンパク質を発現しなかった（図10B）。FGF4単独でまたはFGF4およびHGFで35日間処理後、hMASCはアルブミンとCK18を発現したが、 α FPを発現せず、組織化学的分析と一致した。

30

【0234】

mMASC、rMASCおよびhMASCは肝細胞の機能する活性を獲得する

5種類の異なる分析を用いて、肝細胞の形態的および表現型の特徴を有する細胞が肝細胞の機能的特性も有するかどうかを判定した。

【0235】

肝細胞様細胞による尿素産生と分泌を分化の全期間を通じてさまざまな時点で測定した。尿素濃度は比色分析（Sigma型番640-1）によって取扱説明書の通りに測定した。単層で生育したラット肝細胞と、胎児マウス肝臓原基を陽性対照として、そして培地を陰性対照として用いた。この分析法は最低10mg/mlの尿素濃度を検出できる。この分析法はアンモニアも測定するため、試料はウレアーゼの添加前と後に評価した。

40

【0236】

尿素またはアンモニアは培地単独の中には検出されなかった。未分化のMASCは尿素を産生しなかった。FGF4とHGFを用いた処理後、MASCによる尿素産生は時間依存的に増加した。尿素産生の時間的経過はマウスとラット培養で同様であった。FGF4とHGFを用いて処理したhMASCについては、尿素は4日目には検出されず、マウスおよびラット培養と12日目まで同様で、マウスおよびラット培養中の尿素を21日目に上回った。MASC由来肝細胞に産生された尿素のレベルは、ラット初代肝細胞の単層培養でのレベルと同様であった。三つの種

50

すべてについて、Matrigel上で分化した細胞はFNと比較して顕著に多い尿素を産生した。

【0237】

アルブミン産生を分化の全期間を通じてさまざまな時点で測定した。ラットアルブミン濃度は以前に記載した競合的酵素結合免疫検定法 (ELISA) によって測定した (Tzanakakis E.S., et al., 2001 ; Wells J.M et al.y 2000) 。ヒトおよびマウスアルブミン濃度は、適切な場合にヒトまたはマウスアルブミンおよび抗ヒトまたは抗マウスアルブミン抗体をラット成分と替えて、同様のELISA法を用いて測定した。ペルオキシダーゼ結合抗ヒトアルブミンと対照ヒトアルブミンはCappelから入手した。ペルオキシダーゼ結合アフィニティ精製抗マウスアルブミンと対照マウスアルブミンはBethyl Laboratories (Montgomery, Texas) から入手した。ELISAの特異性を確実にするため、ヒト、マウス、およびラット抗体は、2時間、37℃にて3%BSAの蒸留水 (dH₂O) 溶液中でインキュベートした。ELISAは少なくとも1 ng/mlの感度を有した。

10

【0238】

未分化のMASCはアルブミンを分泌しなかった。FGF4とHGFを用いた処理後、mMASC、rMASCおよびhMASCはアルブミンを時間依存性に産生した。尿素産生について見られたように、Matrigel上で分化した細胞はFN上で培養したときと比較してより多量のアルブミンを産生した。アルブミンはヒト培養で3日目に検出されなかったにもかかわらず、マウス、ラット、およびヒト細胞は同様のレベルのアルブミンを分泌した。マウス、ラットおよびヒトMASC由来肝細胞に産生されたアルブミンのレベルは、ラット初代肝細胞の単層培養でみられるレベルと同様であった。

20

【0239】

次にシトクロムP450活性を、MASC由来肝細胞の凝集塊とラット初代肝臓肝細胞の球状コロニーでPROD分析を用いて評価した。mMASC-肝細胞凝集塊は、14日目のFGF4およびHGF処理mMASCを 5×10^4 細胞/cm²で非-組織培養プレートに播種し、これを振とう器に毎分10回転で5時間かけて作成した。細胞凝集塊はPrimariaシャーレに移し、1mMフェノバルビタールの存在下または非存在下で4日間緊密化させた。hMASC-肝細胞凝集塊はハンギングドロップ法で作成した。要約すると、FGF4およびHGFで24日間処理したhMASCを 10^3 個、1mMフェノバルビタールの存在下または非存在下で100 μ Lの液滴に入れた。4日後、凝集塊を回収し、シトクロムP450活性をPROD分析によって評価した。ペントキシレゾルフィン (PROD) (Molecular Probes, Eugene, Oregon) はシトクロムP450によってO-脱アルキル化され、非蛍光化合物から蛍光化合物レゾルフィンに変化する (Tzanakakis E.S. et al., 2001) 。PROD代謝によって生じた蛍光強度から結果としてシトクロムP450 (CYP) 活性を推定する。insituでのレゾルフィンの測定および検出は、記載の通り共焦点顕微鏡法を用いて実施した (Tzanakakis E.S. et al., 2001) 。

30

【0240】

未分化のmMASCまたはhMASCの凝集塊にPROD活性はみられなかった。しかし、凝集塊を形成するよう誘導されたmMASC (FGF4およびHGFと18日間) およびhMASC (28日間、FGF4単独) は顕著なPROD活性を有した。MASC由来肝細胞凝集塊のPROD活性はラット初代肝細胞凝集塊の活性と同様であった。いくつかの異なる細胞がP450活性を有するが、P450活性のフェノバルビタールによるアップレギュレーションは肝細胞にだけ見られる。したがって、P450もまたフェノバルビタールの存在下または非存在下で試験した。フェノバルビタール無しでは、いくつかのP450酵素が部分的にPROD代謝に加わり、上昇した蛍光値をこれらの検体に与える。対照的に、フェノバルビタールに誘導された凝集塊では、PROD活性は、マウスシトクロムCyp2b9、Cyp2b10、およびCyp2b13、ラットシトクロムCyp2b1/2 (Tzanakakis E.S. et al, 2001) 、そしてヒトではCYP2B6によってほぼ完全に代謝された。したがって増加した蛍光活性は、規定のシトクロムP450酵素のタンパク質発現における実際の増加より小さい。凝集塊を96時間フェノバルビタールと共に培養したとき、PROD 活性に32%~39%の増加がみられ、機能する肝細胞特異的Cyp2b9、Cyp2b10、およびCyp2b13がmMASCに、およびCYP2B6がhMASC由来肝細胞に存在することを示唆した。

40

【0241】

50

MASC由来肝細胞を、FGF4処理hMASCをLDL-dil-acilとインキュベートすることによって、LDLを取り込む能力について評価した。細胞を抗CK18または抗Pan-CKとHNF-3pまたはGATA4抗体を用いて同時標識した。7日間後、a-LDLの低レベルの取り込みが検出され、増加して21日目に最大となった。

【0242】

肝細胞のもう一つの代謝機能はグリコーゲン産生または糖新生である。グリコーゲン貯蔵のレベルは、FGF4およびHGF誘導マウスMASCとFGF誘導hMASCを3日目、7日目、14日目、21日目に、過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色によって分析した。PASのためには、スライドを1%過ヨウ素酸で5分間酸化しdH2Oで3回洗浄した。その後、スライドをシッフ試薬で15分間処理し、dH2O中で5-10分間洗浄し、Mayer's hematoxylinを用いて1分間染色してdH2O中で洗浄した。グリコーゲン貯蔵は最初に4日目までに見られ、最大レベルは21日目以降に見られた（図11）。

【0243】

肝細胞単離と培養

肝細胞は4-6週齢雄Sprague-Dawleyラットから記載の通り採取した（Seglen P.O., 1976）。採取後の肝細胞の生存数は90~95%の幅であった。肝細胞は記載の通り培養した（Tzanakakis E.S. et al., 2001 ; Tzanakakis E.S. et al., 2001）。単層を形成するためには、肝細胞を $8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ コラーゲン（Cohesion Technologies, Palo Alto, CA）で被覆した35 mm Fischer平板培地（Fischer Scientific, Pittsburgh, PA）上で培養した。spheroidsを形成するためには、肝細胞を35-mm Primaria（商標）シャーレで培養した。（Becton Dickinson）。両方の条件下で、播種密度は 5×10^4 細胞/ cm^2 であった。最初の平板培養の12時間後、培地を交換して死細胞および付着していない細胞を除去した。培地はその後48時間毎に交換した。

【0244】

要約

出生後のマウス、ラットおよびヒトBM由来の単一のMASCはin vitroで肝細胞の表現型および機能を有する内胚葉性細胞型へ分化できることが示されている。細胞分化条件下で培養されたMASCは、原始および成熟肝細胞マーカーを時間依存性に発現し、マーカーは二重および三重標識細胞の免疫蛍光顕微鏡法によって示された。非肝細胞マーカーは肝細胞抗原と同時に発現されなかったため、タンパク質発現プロファイルは肝細胞特異的であって擬似的ではなかった。免疫組織化学からの結果はウェスタンブロットによって確認された。さらに、RT-PCRは、内胚葉決定に重要であることが判っている転写因子HNF3 β およびGATA4、および続いての肝細胞分化に必要なたとえばHNF3 β といった転写因子、そしてたとえばCK19、CK18、 α FPおよびアルブミンといった細胞質タンパク質、のアップレギュレーションを確認した。

【0245】

FGF4単独、またはFGF4およびHGFの両方が、MASCを肝細胞の形態的および表現型の特徴を有する細胞に分化させたことが示されたが、肝細胞の機能上の特徴の獲得を示すことができない限り、これだけでは細胞が肝細胞に分化したことは証明されない。したがって、機能する肝細胞を同定するため、いくつかの機能試験が組み合わせて行われた。mMASC、rMASCまたはhMASCは尿素およびアルブミンを産生し、フェノバルビタール誘導性シトクロムP450活性を含み、Dil-acil-LDLを取り込むことができ、グリコーゲン顆粒を含んだ。尿素産生は肝細胞活性に特異的であるが、腎尿細管上皮もまた尿素を産生する（Hedlund E. et al., 2001）。対照的に、アルブミン産生は肝細胞の存在および代謝活性についての特異的試験である（Hedlund E. et al., 2001）。シトクロム P450は、肝細胞にみられるが、多くの他の細胞型にも存在する（Jarukamjorn K. et al., 1999）。

【0246】

しかし、ラットにおけるCyp2b1活性（Tzanakakis E.S. et al., 2001）、マウスにおけるCyp2b9およびCyp2b13（Li-Masters T. et al., 2001; Zelko I. Et al., 2000）、そしてヒトにおけるCYP2B6は比較的に肝細胞特異的と考えられている。P450のこれらの形の存在

はRT-PCRによって示された。P450活性がフェノバルビタールによって誘導可能な場合、示した通り、肝細胞に関する特異性はさらに向上する (Rader D.J. et al., 2000)。

【0247】

LDL取り込みは肝細胞で見られるが (Oh S.H. et al., 2000)、たとえば内皮といった他の細胞も同様の能力を有する (Avital I. et al., 2001)。最後に、肝細胞だけがグリコーゲンを産生し貯蔵することができる。総合すると、これらの機能試験は、*in vitro*でFGF4およびHGFを用いて処理したマウス、ラットまたはヒト由来MASCは肝細胞マーカーを発現するだけでなく肝細胞代謝活性に合致する機能的特徴も有することを示す。

【0248】

いくつかの研究は、BM由来細胞は肝細胞様細胞に *in vivo* および *in vitro* で分化しうることを示している (Petersen B.E. et al., 1999; Theise N.D. et al., 2000; Krause D.S. et al., 2001; Pittenger M.F. et al., 1999; Wang S. et al., 2001; Lagasse E. et al., 2000)。しかし、大部分の研究は、肝細胞表現型を有する細胞に分化するBM細胞の表現型について取り組んでいない。肝細胞マーカーについて染色陽性となる細胞が肝細胞の機能的特徴を有するかどうか、および肝細胞に分化する細胞がたとえば造血細胞のような中胚葉性細胞にも分化できるかどうかは未知である。Lagasse et al.は、マウスBM中に存在する $\text{cKit}^+ \text{Thy1}^{\text{low}} \text{Scal}^+ \text{Lin}^+$ 細胞は肝細胞の表現型だけでなく肝細胞の機能を有する細胞に分化することを示した (Lagasse E. et al., 2000)。わずか50個の細胞が移植されたときにそのような結果を見ることができるとはかかわらず、この研究では造血細胞に分化するのと同じ細胞が肝細胞にも分化することは証明されなかった。Krause et al.は単一の細胞が造血機構に再定着し稀な肝細胞を生じることができることを示した。しかし、肝細胞の機能的評価は行われなかった (Krause D.S. et al., 2001)。Avita et al.は、マウスBM中の Thy-1^+ 細胞である $\beta 2m^+$ がアルブミン、HNF4、C/EBP α 、およびシトクロム P450 3A2 mRNAおよびタンパク質 (Wilmut I., et al., 1997)、通常は肝臓で見られる肝細胞前駆細胞の表現型を発現することを最近報告した。このように、BM中にそのような肝細胞前駆細胞が存在することは、最近の研究で注目された *in vivo* での骨髓の肝細胞への分化を説明しうる (Krause D.S. et al., 2001; Lagasse E. et al., 2000)。

【0249】

機能する肝細胞様細胞を生じる細胞が他の細胞型も生じるかどうかという疑問に対処するため、レトロウイルスマーキングが用いられた (Reyes M. et al., 2001; Jiang Y., 2002)。アルブミン、GK18およびHNF1 α を発現している細胞を、内皮および神経外胚葉性の表現型を有する細胞に分化するのと同じmMASCおよびrMASCから生じうるということが最近示されている (Jiang Y., 2002)。hMASCについても同様の結果がみられることが確認されている。中胚葉性および神経外胚葉性の表現型とsingle hMASCからの機能を有する細胞を得ることを示した最近発表された研究を拡張して (Reyes M., 2002)、同じsingle hMASCがまた肝細胞の形態および表現型を有する細胞に分化することがここに示される。このように、肝細胞マーカーを発現せず機能する肝細胞活性を有しないMASCがBM中に存在し、培養条件に従って、これが肝細胞の表現型および肝細胞の機能的特徴、または中胚葉性および神経外胚葉性細胞の表現型のおよび機能の特徴を獲得することが初めて示される。

【実施例12】

【0250】

血友病マウスを治療するためのLacZ遺伝子導入MASCの移植

MASCは β -gal/NEO導入遺伝子を含むROSA26マウスから得て (10^6 細胞/マウス)、先に放射線照射することなく血友病マウス (N=5) に静脈注射した。動物はMASC移植後1ヶ月 (N=2) および2ヶ月 (N=3) で屠殺した。骨髓サイトスピンおよび肝臓、脾臓、骨格筋、心臓、肺および腸の凍結断面を、FITC-結合抗 β -gal抗体とpan-サイトケラチンまたはCD45を用いて β -gal抗原の存在について染色した。組織はまたQ-PCRによって β -gal遺伝子について実施例6に記載の通り分析した。

【0251】

予備分析では、注射後2ヶ月で分析した3個体 (M3) のうち1個体が提供者細胞に由来す

る肺上皮細胞を0.1%有することが免疫組織化学およびQ-PCRによって示された。免疫組織化学は、個体M5で脾臓、骨髄および腸に、＜1%のCD45⁺提供者細胞が定着していることを示した。個体M4の組織は免疫組織化学的にいくつかの提供者由来細胞を有していた；この個体についてのPCRデータは結果待ちである。

【0252】

個別に参照により含まれるように、すべての公開、特許および特許出願は参照により本開示に含まれる。前期の明細書において本発明はその特定の好ましい実施形態に関連して記載され、説明の目的で多くの詳細が示されている一方、本発明は他の実施形態を許し、またここに記載された詳細のあるものは本発明の基本原理を離れることなく相当に変化させることは、当業者に明らかとなる。

10

【参考文献】

【0253】

Adams, R.H., and Klein, R. (2000). Eph receptors and ephrin ligands. Essential mediators of vascular development. *Trends Cardiovasc Med.* 10:183-188.

Alison, M., and Sarraf, C. (1998). Hepatic stem cells. *J Hepatol* 29: 678-83.

Alizadeh, A.A., M.B. Eisen, R.E. Davis, C. Ma, I.S. Lossos, A. Rosenwald, J.C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J.I. Powell, L. Yang, G.E. Marti, T. Moore, J.J. Hudson, L. LU. D.B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W.C. Chan, T.C. Greiner, D.D. Weisenburger, J.O. Armitage, R. Warnke, and L.M. Staudt. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature.* 403:503-511.

10

Anderson, C. M., and Swanson, R. A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 31:1-14.

Anderson, D. J., Gage, F. H., and Weissman, I. L. (2001). Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med.*, 393-5.

Arsenijevic, Y., and Weiss, S. (1998). Insulin-like growth factor-I is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell-derived neuronal precursors: distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 18:118-28.

20

Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., and Isner, J. M. (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85:221-8.

30

Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967.

Avital, I., Inderbitzin, D., Aoki, T., Tyan, D.B., Cohen, A.H., Ferraresso, C.,

Baumhueter, S., Dybdal, N., Kyle, C., and Lasky, L. (1994). Global vascular expression of murine CD34 a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 84:2554.

40

Ben-Shushan, E., Thompson, J. R., Gudas, L. J., and Bergman, Y. (1998). Rex- 1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox- 1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol* 18:1866-78.

Bierhuizen, M. F., Westerman, Y., Visser, T. P., Dimjati, W., Wognum, A. W., and Wagemaker, G. (1997). Enhanced green fluorescent protein as selectable marker of retroviral-mediated gene transfer in immature hematopoietic bone marrow cells. *Blood* 90:3304-15.

Bjorklund, A., and Lindvall, O. (2000). Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 3: 537-44.

Bjornson, C., R. Rietze, B. Reynolds, M. Magli, and A. Vescovi. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 283:354-357.

10

Blondel, O., Collin, C., McCarran, W. J., Zhu, S., Zamostiano, R., Gozes, I., Brenneman, D. E., and McKay, R. D. (2000). A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *J Neurosci*. 20:8012-20.

Bradley, A. (1987). Production and analysis of chimaeric mice. In Teratocarcinomas and ES Cells: A Practical Approach. E.J. Robertson, ed. *Oxford: IRL Press*, 113-151.

20

Brazelton, T. R., Rossi, F. M. V., Keshet, G. I., and Blau, H. E. (2000). From Marrow to Brain: Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice. *Science* 290:1775-1779.

Bruder, S., *et al.*, U.S. Patent No. 5,736,396

Brustle, O., Jones, K., Learish, R., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O., Duncan, I., and McKay, R. (1999). ES Cell-Derived Glial Precursors: A Source of Myelinating Transplants. *Science* 285:754-6.

30

Brustle, O., Spiro, A. C., Karram, K., Choudhary, K., Okabe, S., and McKay, R. D. (1997). ES cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14809-14814.

Butler, D., (1999) FDA warns on primate xenotransplants. *Nature* 398:549.

Caplan, A., *et al.*, U.S. Patent No. 5,486,359

Caplan, A., *et al.*, U.S. Patent No. 5,811,094

Caplan, A., *et al.*, U.S. Patent No. 5,837,539

40

Cassiede P., Dennis, J. E., Ma, F., Caplan, A. I., (1996). Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res*. 9:1264-73.

Cereghini, S. (1996). Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* 10:267-82.

Choi, K. (1998). Hemangioblast development and regulation. *Biochem Cell Biol.* 76:947-956.

Choi, K., M. Kennedy, A. Kazarov, J.C. Papadimitriou, and G. Keller. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* 125:725-732.

Ciccolini, F., and Svendsen, C. N. (1998). Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: Identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2. *J Neuroscience* 18:7869-7880.

Clarke, D. L., Johansson, C. B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U., and Frisen, J. (2000). Generalized potential of adult NSCs. *Science* 288:1660-3.

Conway, E.M., Collen, D., and Carmeliet, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 49:507-521.

Corbeil, D., Roper, K., Hellwig, A., Tavian, M., Miraglia, S., Watt, S.M., Simmons, P.J., Peault, B., Buck, D.W., and Huttner, W.B. (2000). The human AC 133 HSC antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem.* 275:5512-5530.

Crosby, H.A., Kelly, D.A., and Strain, A.J. 2001. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology.* 120:534-544.

Daadi, M. M., and Weiss, S. (1999). Generation of tyrosine hydroxylase-producing neurons from precursors of the embryonic and adult forebrain. *J Neurosci.* 19:4484-97.

Dahlstrand, J., Lardelli, M., and Lendahl, U. (1995). Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res.* 84:109-29.

Devon R. S., Porteous D. J., and J., B. A. (1995). Splink-erettes improved vectorettes for greater efficiency in PCR walking. *Nucleic Acids Res* 23:1644-1645.

DiGuisto, *et al.*, U.S. Patent No. 5,681,599

10

20

30

40

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are NSCs in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.

Eliceiri, B.P., and Cheresch, D.A. (2000). Role of alpha v integrins during angiogenesis. *Cancer J Sci Am.* 6, Suppl 13:S245-249.

Evans, et al., (1992). *J. Am. Med. Assoc.*, 267:239-246.

Faloon, P., Arentson, E., Kazarov, A., Deng, C. X., Porcher, C., Orkin, S., and Choi, K. (2000). Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development.* 127:1931-1941.

Fei, R., et al., U.S. Patent No. 5,635,387

Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., and Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:528-30.

Flax, J. D., Sanjay, A., Yang, C., Simonin, C., Wills, A. M., Billingham, L. L., Jendoubi, M., Sidman, R. L., Wolfe, J. H., Kim, S. E., and Snyder, E. Y. (1998). Engraftable human NSCs respond to developmental cues replace neurons and express foreign genes. *Nature Biotech* 16:1033-1038.

Fong, G. H., Zhang, L., Bryce, D. M., and Peng, J. (1999). Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development.* 126:3015-3025.

Franco Del Arno, F., Gendron-Maguire, M., Swiatek, P. J., and Gridley, T. (1993). Cloning, sequencing and expression of the mouse mammalian achaete-scute homolog a (MASH 1). *Biochem Biophys Acta* 1171:323-7.

Frankel, M. S. (2000). In Search of Stem Cell Policy. *Science* 298:1397.

Fridenshtein, A. (1982). Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Ark Patol* 44:3-11.

Furcht et al. International Application No. PCT/US00/21387.

Gage, F. H. (2000). Mammalian NSCs. *Science* 287:1433-1438.

Gage, F., Coates, P., Palmer, T., Kuhn, H., Fisher, L., Suhonen, J., Peterson, D., Suhr, S., and Ray, J. (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci US A* 92:11879-83.

10

20

30

40

Gehling, U.M., Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schuch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N., Kluge, K., Schafer, B., Hossfeld, D.K. and Fiedler, W. (2000). *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC I33-positive progenitor cells. *Blood* 95:3106-3112.

Gritti, A., Frolichsthal-Schoeller, P., Galli, R., Parati, E. A., Cova, L., Pagano, S. F., Bjornson, C. R., and Vescovi, A. L. (1999). Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci*. 19:3287-97. 10

Gronthos, S., Graves, S., Ohta, S., and Simmons, P. (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84: 4164-73.

Guenechea, G., Gan, O., Dorrell, C., and Dick, J. E. (2001). Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nat Immunol* 2:75-82. 20

Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C., Buzney, E., Khan, M., Flint, A., Kunkel, L., and Mulligan, R. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401:390-4.

Hamazaki, T., Iiboshi, Y., Oka, M., Papst, P.J., Meacham, A.M., Zon, L.I., and Terada, N. 2001. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett* 497:15-19. 30

Haralabopoulos, G.C., D.S. Grant, H.K. Kleinman, and M.E. Maragoudakis. (1997). Thrombin promotes endothelial cell alignment in Matrigel *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. *Am J Physiol*. 273:C239-245.

Hedlund, E., Gustafsson, J.A., and Warner, M. (2001). Cytochrome P450 in the brain; a review. *Curr Drug Metab* 2:245-263.

Hill, B., Rozler, E., Travis, M., Chen, S., Zannettino, A., Simmons, P., Galy, A., Chen, B., Hoffman, R. (1996). High-level expression of a novel epitope of CD59 identifies a subset of CD34+ bone marrow cells highly enriched for pluripotent stem cells. *Exp Hematol*. 8:936-43. 40

Hirashima, M., H. Kataoka, S. Nishikawa, N. Matsuyoshi, and S. Nishikawa. (1999). Maturation of ES cells into endothelial cells in an *in vitro* model of vasculogenesis. *Blood*. 93:1253-1263.

Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J. (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*. 284:994-998.

Hu, Z., Evarts, R. P., Fujio, K., Marsden, E. R., and Thorgeirsson, S. S. (1993). Expression of hepatocyte growth factor and c-met genes during hepatic differentiation and liver development in the rat. *Am J Pathol*. 142:1823-30.

10

Iyer, V.R., Eisen, M.B., Ross, D.T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J.C.F., Trent, J.M., Staudt, L.M., Hudson, J.J., Boguski, M.S., Lashkari, D., Shalon, D., Botstein, D., and Brown, P.O. (1999). The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science*. 283:83-87.

Jackson, K., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L., Hirschi, K. K., and M.A., G. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107:1395-1402.

20

Jackson, K., Mi, T., and Goodell, M. A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14482-6.

Jaiswal, N., *et al.*, (1997). *J. Cell Biochem*. 64(2):295-312.

Jarukamjorn, K., Sakuma, T., Miyaura, J., and Nemoto, N. (1999). Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital. *Arch Biochem Biophys* 369:89-99.

30

Jiang, Y. 2002. Submitted.

Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., Risling, M., Lendahl, U., and Frisen, J. (1999). Identification of a NSC in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 96:25-34.

Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., Yoo, J. U. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 1:265-72.

40

Jordan, C. T., and Van Zant, G. (1998). Recent progress in identifying genes regulating HSC function and fate. *Curr Opin Cell Biol*. 10:716-20.

Jordan, C., McKearn, J., and Lemischka, I. (1990). Cellular and developmental properties of fetal HSCs. *Cell* 61:953-963.

Kim, T.H., Mars, W.M., Stolz, D.B., Petersen, B.E., and Michalopoulos, G.K. (1997). Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology* 26:896-904.

Kopen, G., D. Prockop, and D. Phinney. 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:10711-10716.

Kourembanas, S., Morita, T., Christou, H., Liu, Y., Koike, H., Brodsky, D., Arthur, V., and Mitsial, S.A. (1998). Hypoxic responses of vascular cells. *Chest.* 11 (Suppl 1):25S-28S.

Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., and Sharkis, S. I. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369-77.

Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L., and Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med.* 6:1229-1234.

Larsson, J., Goumans, M.J., Sjostrand, L.J., van Rooijen, M.A., Ward, D., Leveen, P., Xu, X., ten Dijke, P., Mummery, C.L., and Karlsson, S. (2001). Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *EMBO J.* 20:1663-1673.

Lazar, A., Peshwa, M. V., Wu, F. J., Chi, C. M., Cerra, F. B., and Hu, W. S. (1995). Formation of porcine hepatocyte spheroids for use in a bioartificial liver. *Cell Transplant* 4:259-68.

Lee, S. H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J. M., and McKay, R. D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse ES cells. *Nat Biotechnol* 18:675-9.

Lewis, I. D., Almeida-Porada, G., Du, J., Lemischka, I. R., Moore, K. A., Zanjani, E. D., and Verfaillie, C. M. (2001). Long-term repopulating cord blood stem cells are preserved after ex-vivo culture in a non-contact system. *Blood* 97:441-9.

Li, C.X., and Poznansky, M.J. (1990). Characterization of the ZO-1 protein in endothelial and other cell lines. *J Cell Sci.* 2:231-7. 97:231-237.

10

20

30

40

Li-Masters, T., and Morgan, E.T. 2001. Effects of bacterial lipopolysaccharide on Phenobarbital-induced CYP2B expression in mice. *Drug Metab Dispos* 29:252-257.

Lin, Y., Weisdorf, D. J., Solovey, A., and Hebbel, R. P. (2000). Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105:71-7.

Liu, S., Qu, Y., Stewart, T. J., Howard, M. J., Chakraborty, S., Holekamp, T. F., and McDonald, J. W. (2000). ES cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6126-31.

Mahley, R.W., and Ji, Z.S. (1999). Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 40:1-16.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 12:7634-8.

Masinovsky, B., U.S. Patent No. 5,837,670

Mathon, N. F., Malcolm, D. S., Harrisingh, M. C., Cheng, L., and Lloyd, A. C. (2001). Lack of Replicative Senescence in Normal Rodent Glia. *Science* 291:872-875.

McGlave, *et al.*, U.S. Patent No. 5,460,964

Meager, A. (1999). Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10:27-39.

Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell.* 86:897.

Melton, D. (1997). Signals for tissue induction and organ formation in vertebrate embryos. *Harvey Lect* 93:49-64.

Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R.A., and McKercher, S. R. (2000). Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated *in vivo* from Bone Marrow. *Science* 290:1779-1782.

Miyajima, A., Kinoshita, T., Tanaka, M., Kamiya, A., Mukoyama, Y., and Hara, T. (2000). Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:177-183.

10

20

30

40

- Morrison, S. J., White, P. M., Zock, C., and Anderson, D. J. (1999). Prospective identification isolation by flow cytometry and *in vivo* self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 96:737-749.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct 4. *Cell* 95:379-91. 10
- Nishikawa, S., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N., and Kodama, H. (1998). Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLKI+VEcadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125:1747-1757.
- Nishikawa, S.I., Nishikawa, S., Kawamoto, H., Yoshida, H., Kizumoto, M., Kataoka, H. and Katsura, Y. (1998). *In vitro* generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity* 8:761-769. 20
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24:372-6.
- Nolta, J., Dao, M., Wells, S., Smogorzewska, E., and Kohn, D. (1996). Transduction of pluripotent human HSCs demonstrated by clonal analysis after engraftment in immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2414-9.
- Odorico, J. S., Kaufman, D. S., and Thomson, J. A. (2001). Multilineage differentiation from human ES cell lines. *Stem Cells* 19:193-204. 30
- Oh, S.H., Miyazaki, M., Kouchi, H., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Tsuji, T., Shima, N., Higashio, K., and Namba, M. (2000). Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 279:500-504.
- Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A. C., Segal, M., and McKay, R. D. (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from ES cells *in vitro*. *Mech Dev* 59:89-102. 40
- O'Leary, D. D., and Wilkinson, D. G. (1999). Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 9:65-73.
- Orkin, S. (1998). Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis. *Int. J. Dev. Biol.* 42:927-34.

Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., and Anversa, P. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-5.

O'Shea, K. (1999). ES cell models of development. *Anat Rec* 15:32-41.

Palmer, T. D., Markakis, E. A., Willhoite, A. R., Safar, F., and Gage, F. H. (1999). Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in NSCs from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 19:8487-97.

Palmer, T. D., Takahashi, J., and Gage, F. H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial NSCs. *Mol Cell Neurosci* 8:389-404.

Partanen, J., and D.J. Dumont. (1999). Functions of Tie 1 and Tie2 receptor tyrosine kinases in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol.* 237:159-172.

Peault, B. 1996. Hematopoietic stem cell emergence in embryonic life: developmental hematology revisited. *J. Hematother.* 5:369.

Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., Moore, M.A., and Rafii, S. (2000). Expression of VEGFR 2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 95:952-958.

Peshwa MV, WU FJ, Follstad BD, Cerra, F.B., and Hu, W.S. 1994. Kinetics of hepatocyte spheroid formation. *Biotechnology Progress* 10:460-466.

Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S., and Goff, J. P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-1170.

Petersen, B.E. 2001. Hepatic "stem" cells: coming full circle. *Blood Cells Mol Dis* 27:590-600.

Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S., and Goff, J.P. 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-1170.

Petzelbauer, P., Halama, T., and Groger, M. (2000). Endothelial adherens junctions. *Investig Dermatol Symp Proc.* 5:10-13.

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

10

20

30

40

Pittenger, M., U.S. Patent No. 5,827,740

Ploemacher, R. E., and Brons, N. H. (1988). Isolation of hemopoietic stem cell subsets from murine bone marrow: I. Radioprotective ability of purified cell suspensions differing in the proportion of day-7 and day-12 CFU-S. *Exp Hematol* 16:21-6.

Potten, C. (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353:821-30.

10

Prochazka, M., H.R. Gaskins, L.D. Shultz, and E.H. Leiter. (1992). The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:3290-3294.

Rader, D.J., and Dugi, K.A. (2000). The endothelium and lipoproteins: insights from recent cell biology and animal studies. *Semin Thromb Hemost* 26:521-528.

Rafii, S., F. Shapiro, J. Rimarachin, R. Nachman, B. Ferris, B. Weksler, M. Moore, and A. Asch. (1994). Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion. *Blood* 84:10-20.

20

Rafii, S., Shapiro, F., Pettengell, R., Ferris, B., Nachman, R., Moore, M., and Asch, A. (1995). Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. *Blood* 86:3353-61.

30

Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T., and Jenkins, M. K. (2001). Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 401:101-105.

Reubinooff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). ES cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotech* 18:399-404.

Reyes, M., and Verfaillie, C.M. (2001). Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 938:231-233; discussion 233-235.

40

Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L., and Verfaillie, C.M. (2001). Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98:2615-2625.

Reynolds, B., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-10.

Reynolds, B., and Weiss, S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 175:1-13

Ribatti, D., A. Vacca, B. Nico, L. Roncali, and F. Dammacco. (2001). Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev.* 100:157-163. 10

Richards, L. J., Kilpatrick, T. J., and Bartlett, P. F. (1992). De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:8591-5.

Rideout, W. M., 3rd, Wakayama, T., Wutz, A., Eggan, K., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Yanagimachi, R., and Jaenisch, R. (2000). Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nat Genet* 24:109-10. 20

Robertson, S. M., Kennedy, M., Shannon, J. M., Keller, G. (2000). A transitional stage in the commitment of mesoderm to hematopoiesis requiring the transcription factor SCL/tal-1. *Development.* 11:2447-59.

Rosenberg, J.B., P.A. Foster, R.J. Kaufman, E.A. Vokac, M. Moussalli, P.A. Kroner, and R.R. Montgomery. (1998). Intracellular trafficking of factor VIII to von Willebrand factor storage granules. *J Clin Invest.* 101:613-624.

Rozga, J., Arnaout, W.S., and Demetriou, A.A. (2001). Isolation, characterization, -derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288:156-164. 30

Ryder, E. F., Snyder, E. Y., and Cepko, C. L. (1990). Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-mediated oncogene transfer. *J Neurobiol* 21:356-375.

Sah, D. W., Ray, J., and Gage, F. H. (1997). Regulation of voltage- and ligand-gated currents in rat hippocampal progenitor cells *in vitro*. *J Neurobiol* 32:95-110. 40

Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T. B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D. R., and Sanberg, P. R. (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol.* 164:247-56.

Saucedo-Cardenas, O., Quintana-Hau, J. D., Le, W. D., Smidt, M. P., Cox, J. J., De Mayo, F., Burbach, J. P., and Conneely, O. M. (1998). Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4013-8.

Scherf, U., D.T. Ross, M. Waltham, L.H. Smith, J.K. Lee, L. Tanabe, K.W. Kohn, W.C. Reinhold, T.G. Myers, D.T. Andrews, D.A. Scudiero, M.B. Eisen, E.A. Sausville, Y. Pommier, D. Botstein, P.O. Brown, and J.N. Weinstein. (2000). A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Biotech.* 24:236-244.

10

Scholer, H. R., Hatzopoulos, A. K., Balling, R., Suzuki, N., and Gruss, P. (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J* 8:2543-50.

Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A., and Benvenisty, N. (2000). From the cover: effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human ES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11307-12.

20

Schwartz, *et al.*, U.S. Patent No. ,759,793

Seglen, P.O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13:29-83.

Shamblott, M., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E., Littlefield, J., Donovan, P., Blumenthal, P., Huggins, G., Gearhart, J.: (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:13726-31.

30

Shen, C.N., Slack, J.M., and Tosh, D. (2000). Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol.* 2:879-887.

Shi, Q., S. Rafii, M. Hong-De Wu, E.S. Wijelath, C. Yu, A. Ishida, Y. Fujita, S. Kothari, R. Mohle, L.R. Sauvage, M.A.S. Moore, R.F. Storb, and W.P. Hammond. (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 92:362-367.

40

Shih, C.C., Y. Weng, A. Mamelak, T. LeBon, M.C. Hu, and S. Forman. (2001). Identification of a candidate human neurohematopoietic stem-cell population. *Blood.* 98:2412-2422.

Simeone, A. (1998). *Otx1 and Otx2 in the development and evolution of the mammalian brain. EMBO* 117:6790-8.

Simmons, P., *et al.*, U.S. Patent No. 5,677,136

Soule HD, *et al.* (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*; 51(5):1409-16.

Southern, P. J., Blount, P., and Oldstone, M. B. (1984). Analysis of persistent virus infections by in situ hybridization to whole-mouse sections. *Nature* 312:555-8.

10

Steeber, D.A., and T. Tedder, F. (2001). Adhesion molecule cascades direct lymphocyte recirculation and leukocyte migration during inflammation. *Immunol Res.* 22:299-317.

Steinberg, D., Pittman, R.C. and Carew, T.E. (1985). Mechanisms involved in the uptake and degradation of low density lipoprotein by the artery wall *in vivo*. *Ann N Y Acad Sci.* 454:195-206.

20

Studer, L., Spenger, C., Seiler, R., Othberg, A., Lindvall, O., and Odin, P. (1996). Effects of brain-derived neurotrophic factor on neuronal structure of dopaminergic neurons in dissociated cultures of human fetal mesencephalon. *Exp Brain Res* 108:328-36.

Suhonen, J., Peterson, D., Ray, J., and Gage, F. (1996). Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons *in vivo*. *Nature* 383:624-7.

30

Svendsen, C. N., and Caldwell, M. A. (2000). NSCs in the developing central nervous system: implications for cell therapy through transplantation. *Prog Brain Res.* 127:13-34.

Svendsen, C. N., Caldwell, M. A., Ostenfeld, T. (1999). Human neural stem cells: Isolation, expansion and transplantation. *Brain Path* 9:499-513.

Tang, D. G., Tokumoto, Y. M., Apperly, J. A., Lloyd, A. C., and Raff, M. C. (2001). Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cells. *Science* 291:868-71.

40

Tedder, T., Steeber, D., Chen, A., and Engel, P. (1995). The selections: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 9:866.

Theise, N. D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J. M., and Krause, D. S. (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31:235-40.

Theise, N.D., Saxena, R., Portmann, B.C., Thung, S.N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A., and Crawford, J.M. (1999). The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 30:1425-1433.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). ES cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:114-7.

10

Thomson, J., Kalisman J., Golos, J., Durning, M., Harris, C., Becker, R., Hearn, J. (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:7844-8,

Trupp, M., Arenas, E., Fainzilber, M., Nilsson, A. S., Sieber, B. A., Grigoriou, M., Kilkenny, C., Salazar-Grueso, E., Pachnis, V., and Arumae, U. (1996). Functional receptor for GDNF encoded by the c-rét proto-oncogene. *Nature* 381:785-9.

20

Tsai, R.Y. and McKay, R.D. (2000). Cell contact regulates fate choice by cortical stem cells. *J. Neurosci.* 20:3725-35.

Tsukamoto, *et al.*, U.S. Patent No. 5,750,397

Tsukamoto, *et al.*, U.S. Patent No. 5,716,827

Tzanakakis, E.S., Hansen, L.K., and Hu, W.S. (2001). The role of actin filaments and microtubules in hepatocyte spheroid self-assembly. *Cell Motil Cytoskeleton* 48:175-189.

30

Tzanakakis, E.S., Hsiao, C.C., Matsushita, T., Rimmel, R.P., and Hu, W.S. (2001). Probing enhanced cytochrome P450 2B1/2 activity in rat hepatocyte spheroids through confocal laser scanning microscopy. *Cell Transplant.* 10:329342.

Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., and Weissman, I.L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:14720-14725.

40

Van Rijen, H., van Kempen, M.J., Analbers, L.J., Rook, M.B., van Ginneken, A.C., Gros, D., and Jongsma, H.J. (1997). Gap junctions in human umbilical cord endothelial cells contain multiple connexins. *Am J Physiol.* 272:C117-130.

Verfaillie, C., Miller, W., Boylan, K., McGlave, P. (1992). Selection of benign primitive hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia on the basis of HLA-DR antigen expression. *Blood*. 79:1003-1010.

Vescovi, A. L., Paraati, E. A., Gritti, A., Poulin, P., Ferrario, M., Wanke, E., Frolichsthal-Schoeller, P., Cova, L., Arcellana-Panlilio, M., Colombo, A., and Galli, R. (1999). Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human NSC lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol* 156:71-83. 10

Vescovi, A., Reynolds, B., Fraser, D., and Weiss, S. (1993). bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11: 951-66.

Vischer, U.M., H. Barth, and C.B. Wollheim. (2000). Regulated von Willebrand factor secretion is associated with agonist-specific patterns of cytoskeletal remodeling in cultured endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20:883-891. 20

Wagner, D.D., Olmsted, J.B., and Marder, V.J. (1982). Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J. Cell Biol*. 95:355-360.

Wagner, J., Akerud, P., Castro, D. S., Holm, P. C., Canals, J. M., Snyder, E. Y., Perlmann, T., and Arenas, E. (1999). Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurrl-overexpressing NSCs by type 1 astrocytes. *Nat Biotech* 17:653-9. 30

Wakitani, S., Saito, T., and Caplan, A. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow MSCs exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18:1417-26.

Wang, X., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., and Grompe, M. (2001). Liver repopulation and correction of metabolic liver disease by transplanted adult mouse pancreatic cells. *Am J Pathol* 158:571-579.

Watt, F. (1997). Epidermal stem cells: markers patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 831-6. 40

Watt, S., Gschmeissner, S., and Bates, P. (1995). PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymph*. 17:229.

Weiss, M. J., Orkin, S. H. (1995) GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol.* 2:99-107.

Weissman, I. L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287:1442-6.

Wells, J. M., and Melton, D. A. (2000). Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development.* 127:1563-72.

Wells, J.M., and Melton, D.A. (1999). Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:393-410. 10

Whittemore, S. R., Morassutti, D. J., Walters, W. M., Liu, R. H., and Magnuson, D. S. (1999). Mitogen and substrate differentially affect the lineage restriction of adult rat subventricular zone neural precursor cell populations. *Exp Cell Res* 252:75-95.

Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. If, Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Gough, N. M. (1988). Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of ES cells. *Nature* 336:684-7. 20

Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-3.

Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., and Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 15:364-70. 30

Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., Naito, M., Nakao, K., and Nishikawa, S. (2000). Flkl-positive cells derived from ES cells serve as vascular progenitors. *Nature.* 408:92-96.

Yang, J., Nagavarapu, U., Relloma, K., Sjaastad, M.D., Moss, W.C., Passaniti, A., and Herron, G.S. (2001). Telomerized human microvasculature is functional *in vivo*. *Nat Biotechnol.* 19:219-224. 40

Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J., Hynes, M., and Rosenthal, A. (1998). FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93:755-66.

Yoneya, T., Tahara, T., Nagao, K., Yamada, Y., Yamamoto, T., Osawa, M., Miyatani, S., and Nishikawa, M. (2001). Molecular cloning of delta-4, a new mouse and human Notch ligand. *J Biochem.* 129:27-34.

Yoo, J. U., Barthel, T. S., Nishimura, K., Solchaga, L., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., Johnstone, B. (1998). Then chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* 12:1745-57.

10

Young, H., *et al.*, U.S. Patent No. 5,827,735

Zambrowicz, B. P., Imamoto, A., Hering, S., Herzenberg, L. A., Kerr, W. G., and Soriano, P. (1997). Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:3789-94.

Zaret, K.S. (2000). Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev* 92:83- 88.

20

Zaret, K.S. (2001). Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. *Curr Opin Genet Dev.* 11:568-574.

Zelko, I., and Negishi, M. (2000). Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 277:1-6.

Zhao, R. C. H., Jiang, Y., and Verfaillie, C. M. (2000). A model of human p210BCW^{BL} mediated CML by transducing primary normal human CD34⁺ cells with a BCR/ABL containing retroviral vector. *Blood.* 97:2406-12.

30

Ziegler, B., M. Valtieri, G. Porada, R. De Maria, R. Muller, B. Masella, M. Gabbianelli, I. Casella, E. Pelosi, T. Bock, E. Zanjani, and C. Peschle. (1999). KDR Receptor: A Key Marker Defining HSCs. *Science.* 285:1553 1558.

【図面の簡単な説明】

【 0 2 5 4 】

【図 1】 図 1 は、骨髄 (BM)、筋および脳由来 MASC の拡大可能性を示す図である。

40

【図 2】 図 2 は、遺伝子発現の (A) 筋および脳 MASC そして (B) 骨髄および筋 MASC における遺伝子発現を示す散布図である。

【図 3】 図 3 は、未分化 MASC および VEGF とともに培養した MASC の FACS 分析を示す図である。

【図 4】 図 4 は、mMASC の定着と *in vivo* 分化の顕微鏡写真である。

【図 5】 図 5 は、MASC 由来内皮細胞の共焦点蛍光顕微鏡法を用いた免疫組織化学的評価を示す図である。

【図 6】 図 6 は、MASC 由来内皮細胞の顕微鏡写真である。

【図 7】 図 7 は、MASC 由来内皮細胞の FACS 分析を示す図である。

【図 8】 図 8 は、ヒト MASC 由来内皮細胞の顕微鏡写真である。

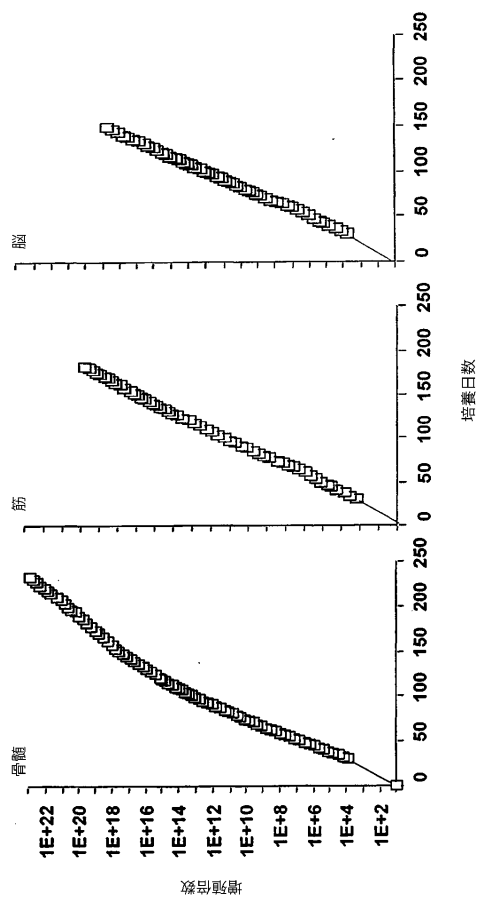
50

【図 9】図 9 は、hMSC 由来神経細胞様細胞におけるスパイク生成および発現した電位依存性ナトリウム電流を表す図である。

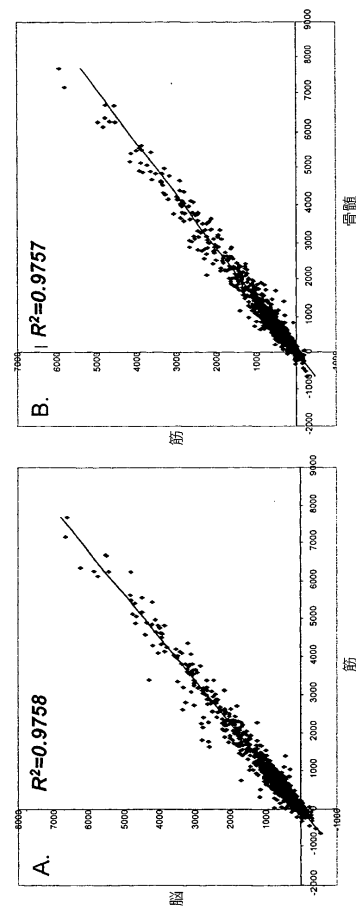
【図 10】図 10 は、肝細胞様表現型を確認した定量的 RT-PCR およびウェスタンブロット分析を示す図である。

【図 11】図 11 は、肝細胞様細胞の顕微鏡写真を示す。

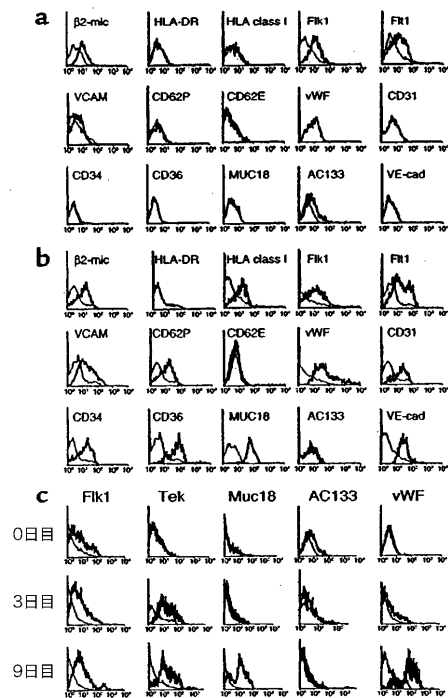
【図 1】



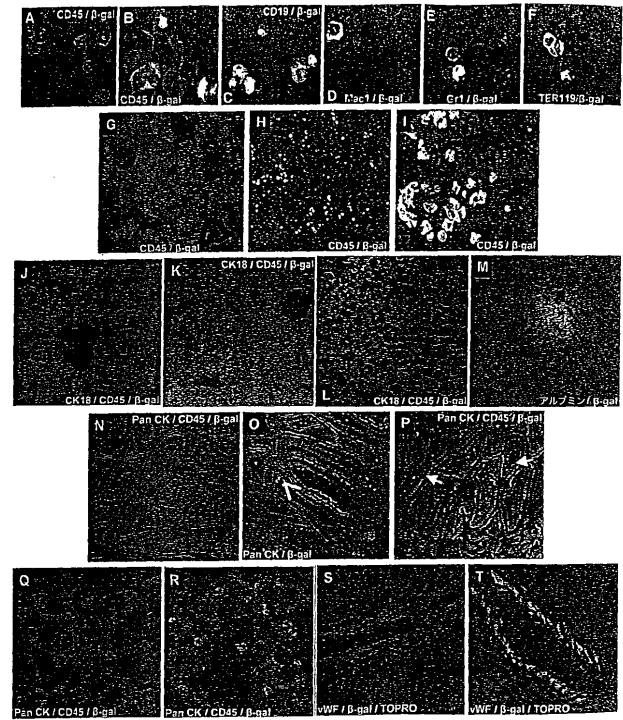
【図 2】



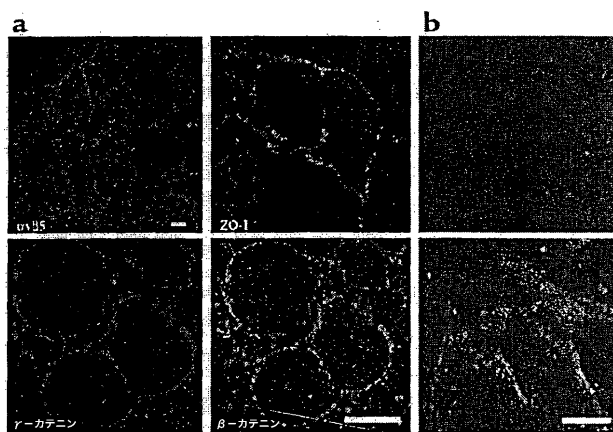
【図 3】



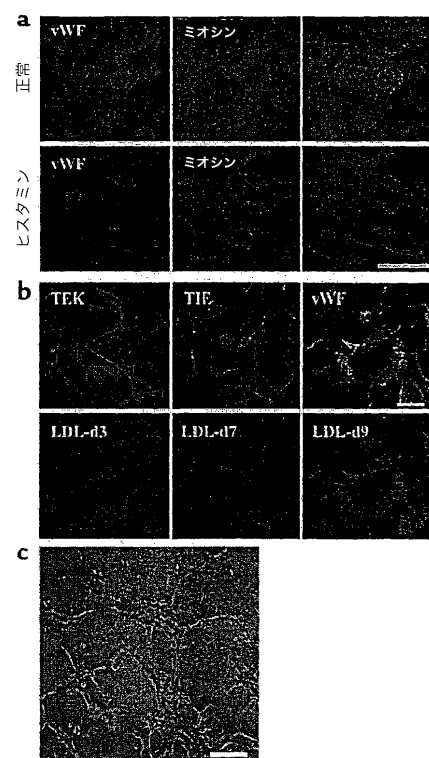
【図 4】



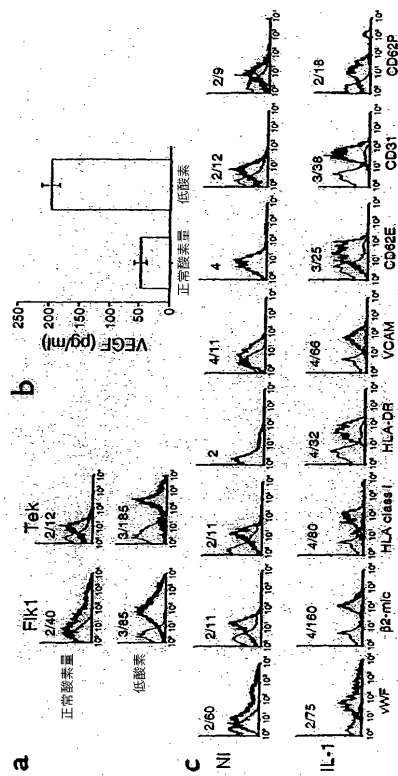
【図 5】



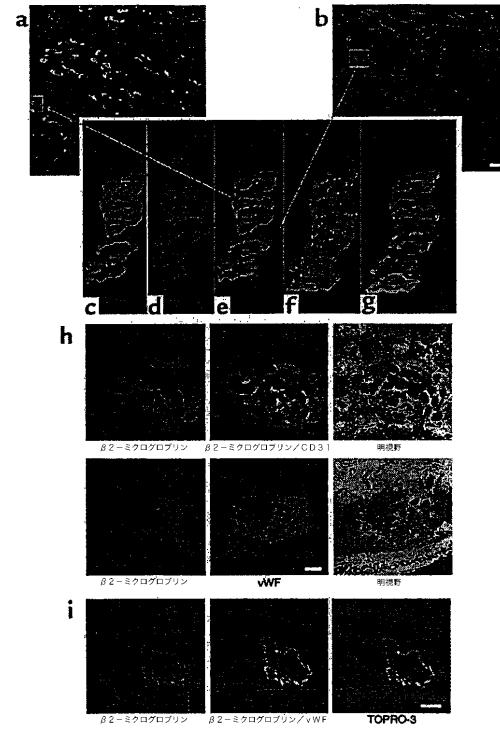
【図 6】



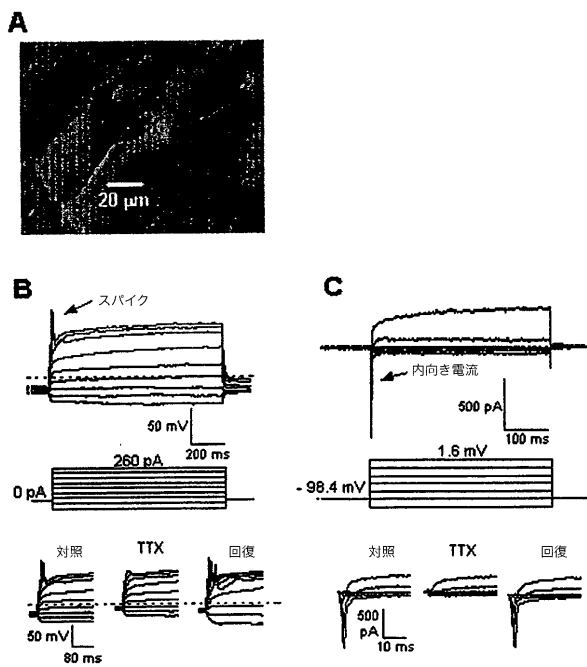
【図 7】



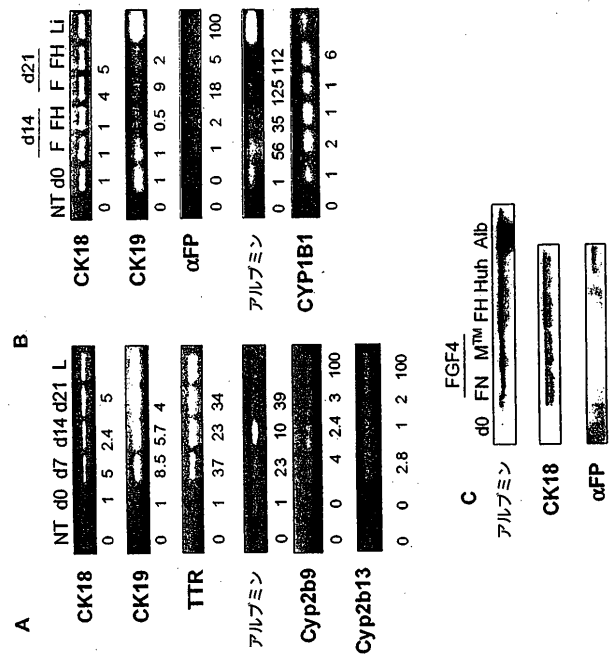
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
22 August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/064748 A2

- (51) International Patent Classification: C12N (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US02/04652
- (22) International Filing Date: 14 February 2002 (14.02.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/268,786 14 February 2001 (14.02.2001) US
60/269,062 15 February 2001 (15.02.2001) US
60/310,625 7 August 2001 (07.08.2001) US
60/343,586 25 October 2001 (25.10.2001) US
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Applicants and
(72) Inventors: FURCHT, Leo, T. (US/US); MCT, I.L.C. 2100 West 21st Street, Minneapolis, MN 55455. VERFAILLIE, Catherine, M. (US/US); University of Minnesota, MMC 716, 422 Delaware Street SE, Minneapolis, MN 55455.
- (74) Agent: LAWRENCE, William, F.; Frommer Lawrence & Haug LLP, 745 Fifth Avenue, New York, NY 10151 (US).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/064748 A2

(54) Title: MULTIPOTENT ADULT STEM CELLS, SOURCES THEREOF, METHODS OF OBTAINING AND MAINTAINING SAME, METHODS OF DIFFERENTIATION THEREOF, METHODS OF USE THEREOF AND CELLS DERIVED THEREOF

(57) Abstract: Methods and compositions are provided for circularizing target sequences in a sample. In particular, ligation oligonucleotides are employed to selectively hybridize with the target such that the target can be ligated into a closed circular target. Rolling circle amplification can then be performed directly on the target sequence for subsequent detection and analysis.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

**MULTIPOTENT ADULT STEM CELLS, SOURCES THEREOF, METHODS
OF OBTAINING AND MAINTAINING SAME, METHODS OF
DIFFERENTIATION THEREOF, METHODS OF USE THEREOF AND
CELLS DERIVED THEREOF**

5

RELATED CASES

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/343,386, filed October 25, 2001, U.S. Provisional Application No. 60/310,625, filed August 7, 2001, U.S. Provisional Application No. 60/269,062, filed February 15, 2001, U.S. Provisional Application No. 60/268,786, filed February 14, 2001, which are hereby incorporated by reference for all purposes. Applicants also claim priority of WO 01/11011, 60/147,324 and 60/164,650 and these applications are hereby incorporated by reference into this text; any teachings therein may be used in the practice of this invention. The present application is a continuation-in-part of WO 01/11011, which is attached herein at Appendix 1 and is part of the present application. Documents incorporated by reference into this text are not admitted to be prior art.

10

15

FIELD OF THE INVENTION

20

The present invention relates generally to mammalian multipotent adult stem cells (MASC), and more specifically to methods for obtaining, maintaining and differentiating MASC. Uses of MASC in the therapeutic treatment of disease are also provided.

25

BACKGROUND OF THE INVENTION

Organ and tissue generation from stem cells, and their subsequent transplantation provide promising treatments for a number of pathologies, making stem cells a central focus of research in many fields. Stem cell technology provides a promising alternative therapy for diabetes, Parkinson's disease, liver disease, heart disease, and autoimmune disorders, to name a few. However, there are at least two major problems associated with organ and tissue transplantation.

30

First, there is a shortage of donor organs and tissues. As few as 5 percent of the organs needed for transplant in the United States alone ever become available to a recipient (Evans, *et al.* 1992). According to the American Heart Association, only 2,300 of the 40,000 Americans who needed a new heart in 1997 received one. The

35

WO 02/064748

PCT/US02/04652

2

American Liver Foundation reports that there are fewer than 3,000 donors for the nearly 30,000 patients who die each year from liver failure.

The second major problem is the potential incompatibility of the transplanted tissue with the immune system of the recipient. Because the donated organ or tissue is recognized by the host immune system as foreign, immunosuppressive medications must be provided to the patient at a significant cost-both financially and physically.

Xenotransplantation, or transplantation of tissue or organs from another species, could provide an alternative means to overcome the shortage of human organs and tissues. Xenotransplantation would offer the advantage of advanced planning. The organ could be harvested while still healthy and the patient could undergo any beneficial pretreatment prior to transplant surgery. Unfortunately, xenotransplantation does not overcome the problem of tissue incompatibility, but instead exacerbates it. Furthermore, according to the Centers for Disease Control, there is evidence that damaging viruses cross species barriers. Pigs have become likely candidates as organ and tissue donors, yet cross-species transmission of more than one virus from pigs to humans has been documented. For example, over a million pigs were recently slaughtered in Malaysia in an effort to contain an outbreak of Hendra virus, a disease that was transmitted to more than 70 humans with deadly results (Butler, D. 1999).

Stem cells: Definition and use

The most promising source of organs and tissues for transplantation, therefore, lies in the development of stem cell technology. Theoretically, stem cells can undergo self-renewing cell division to give rise to phenotypically and genotypically identical daughters for an indefinite time and ultimately can differentiate into at least one final cell type. By generating tissues or organs from a patient's own stem cells, or by genetically altering heterologous cells so that the recipient immune system does not recognize them as foreign, transplant tissues can be generated to provide the advantages associated with xenotransplantation without the associated risk of infection or tissue rejection.

Stem cells also provide promise for improving the results of gene therapy. A patient's own stem cells could be genetically altered *in vitro*, then reintroduced *in vivo* to produce a desired gene product. These genetically altered stem cells would

3

have the potential to be induced to differentiate to form a multitude of cell types for implantation at specific sites in the body, or for systemic application. Alternately, heterologous stem cells could be genetically altered to express the recipient's major histocompatibility complex (MHC) antigen, or no MHC antigen, allowing

5 transplantation of cells from donor to recipient without the associated risk of rejection.

Stem cells are defined as cells that have extensive proliferation potential, differentiate into several cell lineages, and repopulate tissues upon transplantation. The quintessential stem cell is the embryonic stem (ES) cell, as it has unlimited self-renewal and multipotent differentiation potential (Thomson, J. *et al.* 1995; Thomson, J.A. *et al.* 1998; Shambloott, M. *et al.* 1998; Williams, R.L. *et al.* 1988; Orkin, S. 1998; Reubinooff, B.E., *et al.* 2000). These cells are derived from the inner cell mass

10 of the blastocyst (Thomson, J. *et al.* 1995; Thomson, J.A. *et al.* 1998; Martin, G.R. 1981), or can be derived from the primordial germ cells from a post-implantation embryo (embryonal germ cells or EG cells). ES and EG cells have been derived

15 from mouse, and more recently also from non-human primates and humans. When introduced into mouse blastocysts, ES cells can contribute to all tissues of the mouse (animal) (Orkin, S. 1998). Murine ES cells are therefore pluripotent. When transplanted in post-natal animals, ES and EG cells generate teratomas, which again demonstrates their multipotency. ES (and EG) cells can be identified by positive

20 staining with the antibodies to stage-specific embryonic antigens (SSEA) 1 and 4.

At the molecular level, ES and EG cells express a number of transcription factors highly specific for these undifferentiated cells. These include oct-4 and Rex-1, leukemia inhibitory factor receptor (LIF-R). The transcription factors sox-2 and Rox-1 are expressed in both ES and non-ES cells. Oct-4 is expressed in the

25 pregastrulation embryo, early cleavage stage embryo, cells of the inner cell mass of the blastocyst, and embryonic carcinoma (EC) cells. In the adult animal, oct-4 is only found in germ cells.

Oct-4, in combination with Rox-1, causes transcriptional activation of the Zn-finger protein Rex-1, and is also required for maintaining ES in an

30 undifferentiated state. The oct-4 gene is down-regulated when cells are induced to differentiate *in vitro*. Several studies have shown that oct-4 is required for maintaining the undifferentiated phenotype of ES cells, and that it plays a major role in determining early steps in embryogenesis and differentiation. Sox-2, is required

WO 02/064748

PCT/US02/04652

4

with oct-4 to retain the undifferentiated state of ES/EC and to maintain murine, but not human, ES cells. Human or murine primordial germ cells require presence of LIF. Another hallmark of ES cells is presence of high levels of telomerase, which provides these cells with an unlimited self-renewal potential *in vitro*.

5 Stem cells have been identified in most organs or tissues. The best characterized is the hematopoietic stem cell (HSC). This mesoderm-derived cell has been purified based on cell surface markers and functional characteristics. The HSC, isolated from bone marrow (BM), blood, cord blood, fetal liver and yolk sac, is the progenitor cell that generates blood cells or following translation reinitiates multiple hematopoietic lineages and can reinitiate hematopoiesis for the life of a recipient. (See Fei, R., *et al.*, U.S. Patent No. 5,635,387; McGlave, *et al.*, U.S. Patent No. 5,460,964; Simmons, P., *et al.*, U.S. Patent No. 5,677,136; Tsukamoto, *et al.*, U.S. Patent No. 5,750,397; Schwartz, *et al.*, U.S. Patent No. 5,759,793; DiGuisto, *et al.*, U.S. Patent No. 5,681,599; Tsukamoto, *et al.*, U.S. Patent No. 5,716,827; Hill, B., *et al.* 1996.) When transplanted into lethally irradiated animals or humans, HSCs can repopulate the erythroid, neutrophil-macrophage, megakaryocyte and lymphoid hemopoietic cell pool. *In vitro*, hemopoietic stem cells can be induced to undergo at least some self-renewing cell divisions and can be induced to differentiate to the same lineages as is seen *in vivo*. Therefore, this cell fulfills the criteria of a stem cell. Stem cells which differentiate only to form cells of hematopoietic lineage, however, are unable to provide a source of cells for repair of other damaged tissues, for example, heart or lung tissue damaged by high-dose chemotherapeutic agents.

A second stem cell that has been studied extensively is the neural stem cell (NSC) (Gage F.H. 2000; Svendsen C.N. *et al.* 1999; Okabe S. *et al.* 1996). NSCs were initially identified in the subventricular zone and the olfactory bulb of fetal brain. Until recently, it was believed that the adult brain no longer contained cells with stem cell potential. However, several studies in rodents, and more recently also non-human primates and humans, have shown that stem cells continue to be present in adult brain. These stem cells can proliferate *in vivo* and continuously regenerate at least some neuronal cells *in vivo*. When cultured *ex vivo*, NSCs can be induced to proliferate, as well as to differentiate into different types of neurons and glial cells. When transplanted into the brain, NSCs can engraft and generate neural cells and

WO 02/064748

PCT/US02/04652

5

glial cells. Therefore, this cell too fulfills the definition of a stem cell, albeit a hematopoietic stem cell.

Clarke *et al.* reported that NSCs from Lac-Z transgenic mice injected into murine blastocysts or in chick embryos contribute to a number of tissues of the chimeric mouse or chicken embryo (Clarke, D. L. *et al.* 2000). LacZ-expressing cells were found with varying degree of mosaicism, not only in the central nervous system, but also in mesodermal derivatives as well as in epithelial cells of the liver and intestine but not in other tissues, including the hematopoietic system. These studies therefore suggested that adult NSCs may have significantly greater differentiation potential than previously realized but still do not have the pluripotent capability of ES or of the adult derived multipotent adult stem cells (MASC) described in Furcht *et al.* (International Application No. PCT/US00/21387) and herein. The terms MASC, MAPC and MPC can also be used interchangeably to describe adult derived multipotent adult stem cells.

Therapies for degenerative and traumatic brain disorders would be significantly furthered with cellular replacement therapies. NSC have been identified in the sub-ventricular zone (SVZ) and the hippocampus of the adult mammalian brain (Ciccolini *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 1999; Palmer *et al.*, 1997; Reynolds and Weiss, 1992; Vescovi *et al.*, 1999) and may also be present in the ependyma and other presumed non-neurogenic areas of the brain (Doetsch *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 1999; Palmer *et al.*, 1999). Fetal or adult brain-derived NSC can be expanded *ex vivo* and induced to differentiate into astrocytes, oligodendrocytes and functional neurons (Ciccolini *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 1999; Palmer *et al.*, 1999; Reynolds *et al.*, 1996; Ryder *et al.*, 1990; Studer *et al.*, 1996; Vescovi *et al.*, 1993). *In vivo*, undifferentiated NSC cultured for variable amounts of time differentiate into glial cells, GABAergic and dopaminergic neurons (Flax *et al.*, 1998; Gage *et al.*, 1995; Suhonen *et al.*, 1996). The most commonly used source of NSC is allogeneic fetal brain, which poses both immunological and ethical problems. Alternatively, NSC could be harvested from the autologous brain. As it is not known whether pre-existing neural pathology will affect the ability of NSC to be cultured and induced to differentiate into neuronal and glial cells *ex vivo*, and because additional surgery in an already diseased brain may aggravate the underlying disease, this approach is less attractive.

- The ideal source of neurons and glia for replacement strategies would be cells harvestable from adult, autologous tissue different than the brain that was readily accessible and that can be expanded *in vitro* and differentiated *ex vivo* or *in vivo* to the cell type that is deficient in the patient. Recent reports have suggested that BM derived cells acquire phenotypic characteristics of neuroectodermal cells when cultured *in vitro* under NSC conditions, or when they enter the central nervous system (Sanchez-Ramos *et al.*, 2000; Woodbury *et al.*, 2000). The phenotype of the BM cells with this capability is not known. The capacity for differentiation of cells that acquire neuroectodermal features to other cell types is also unknown.
- A third tissue specific cell with stem cell properties is the mesenchymal stem cell (MSC), initially described by Friedenstein (1982). MSC, originally derived from the embryonal mesoderm and isolated from adult BM, can differentiate to form muscle, bone, cartilage, fat, marrow stroma, and tendon. During embryogenesis, the mesoderm develops into limb-bud mesoderm, tissue that generates bone, cartilage, fat, skeletal muscle and possibly endothelium. Mesoderm also differentiates to visceral mesoderm, which can give rise to cardiac muscle, smooth muscle, or blood islands consisting of endothelium and hematopoietic progenitor cells. Primitive mesodermal or MSCs, therefore, could provide a source for a number of cell and tissue types. A number of MSCs have been isolated. (See, for example, Caplan, A., *et al.*, U.S. Patent No. 5,486,359; Young, H., *et al.*, U.S. Patent No. 5,827,735; Caplan, A., *et al.*, U.S. Patent No. 5,811,094; Bruder, S., *et al.*, U.S. Patent No. 5,736,396; Caplan, A., *et al.*, U.S. Patent No. 5,837,539; Masinovsky, B., U.S. Patent No. 5,837,670; Pittenger, M., U.S. Patent No. 5,827,740; Jaiswal, N., *et al.*, 1997; Cassiede P., *et al.*, 1996; Johnstone, B., *et al.*, 1998; Yoo, *et al.*, 1998; Gronthos, S., 1994).
- Of the many MSC that have been described, all have demonstrated limited differentiation to form cells generally considered to be of mesenchymal origin. To date, the most multipotent MSC reported is the cell isolated by Pittenger, *et al.*, which expresses the SH2⁺ SH4⁺ CD29⁺ CD44⁺ CD71⁺ CD90⁺ CD106⁺ CD120a⁺ CD124⁺ CD 14⁺ CD34⁺ CD45⁺ phenotype. This cell is capable of differentiating to form a number of cell types of mesenchymal origin, but is apparently limited in differentiation potential to cells of the mesenchymal lineage, as the team who

WO 02/064748

PCT/US02/04652

7

isolated it noted that hematopoietic cells were never identified in the expanded cultures (Pittenger, *et al.*, 1999).

Other tissue-specific stem cells have been identified, including gastrointestinal stem cells (Potten, C. 1998), epidermal stem cells (Watt, F. 1997),
5 and hepatic stem cells, also termed oval cells (Alison, M. *et al.* 1998). Most of these are less well characterized.

Compared with ES cells, tissue specific stem cells have less self-renewal ability and, although they differentiate into multiple lineages, they are not pluripotent. No studies have addressed whether tissue specific cells express the
10 markers described above as seen in ES cells. In addition, the degree of telomerase activity in tissue specific or lineage committed stem cells has not been fully explored, in part because large numbers of highly enriched populations of these cells are difficult to obtain.

Until recently, it was thought that tissue specific stem cells could only
15 differentiate into cells of the same tissue. A number of recent publications have suggested that adult organ specific stem cells may be capable of differentiation into cells of different tissues. However, the true nature of these types of cells has not been fully discerned. A number of studies have shown that cells transplanted at the time of a BM transplant can differentiate into skeletal muscle (Ferrari 1998; Gussoni
20 1999). This could be considered within the realm of possible differentiation potential of mesenchymal cells that are present in marrow. Jackson published that muscle satellite cells can differentiate into hemopoietic cells, again a switch in phenotype within the splanchnic mesoderm of the embryo (Jackson 1999). Other studies have shown that stem cells from one embryonic layer (for instance
25 splanchnic mesoderm) can differentiate into tissues thought to be derived during embryogenesis from a different embryonic layer. For instance, endothelial cells or their precursors detected in humans or animals that underwent marrow transplantation are at least in part derived from the marrow donor (Takahashi, 1999; Lin, 2000). Thus, visceral mesoderm and not splanchnic mesoderm, capabilities
30 such as MSC, derived progeny are transferred with the infused marrow. Even more surprising are the reports demonstrating both in rodents and humans that hepatic epithelial cells and biliary duct epithelial cells can be seen in recipients that are derived from the donor marrow (Petersen, 1999; Theise, 2000; Theise, 2000).

WO 02/064748

PCT/US02/04652

8

Likewise, three groups have shown that NSCs can differentiate into hemopoietic cells. Finally, Clarke *et al.* reported that cells be termed NSCs when injected into blastocysts can contribute to all tissues of the chimeric mouse (Clarke *et al.*, 2000).

It is necessary to point out that most of these studies have not conclusively demonstrated that a single cell can differentiate into tissues of different organs. Also, stem cells isolated from a given organ may not necessarily be a lineage committed cell. Indeed most investigators did not identify the phenotype of the initiating cell. An exception is the study by Weissman and Grompe, who showed that cells that repopulated the liver were present in Lin⁻Thy1⁺LowSca1⁺ marrow cells, which are highly enriched in HSCs. Likewise, the Mulligan group showed that marrow Sp cells, highly enriched for HSC, can differentiate into muscle and endothelium, and Jackson *et al.* showed that muscle Sp cells are responsible for hemopoietic reconstitution (Gussoni *et al.*, 1999).

Transplantation of tissues and organs generated from heterologous ES cells requires either that the cells be further genetically modified to inhibit expression of certain cell surface markers, or that the use of chemotherapeutic immune suppressors continue in order to protect against transplant rejection. Thus, although ES cell research provides a promising alternative solution to the problem of a limited supply of organs for transplantation, the problems and risks associated with the need for immunosuppression to sustain transplantation of heterologous cells or tissue would remain. An estimated 20 immunologically different lines of ES cells would need to be established in order to provide immunocompatible cells for therapies directed to the majority of the population.

Using cells from the developed individual, rather than an embryo, as a source of autologous or from tissue typing matched allogeneic stem cells would mitigate or overcome the problem of tissue incompatibility associated with the use of transplanted ES cells, as well as solve the ethical dilemma associated with ES cell research. The greatest disadvantage associated with the use of autologous stem cells for tissue transplant thus far lies in their relatively limited differentiation potential. A number of stem cells have been isolated from fully-developed organisms, particularly humans, but these cells, although reported to be multipotent, have demonstrated limited potential to differentiate to multiple cell types.

Thus, even though stem cells with multiple differentiation potential have been isolated previously by others and by the present inventors, a progenitor cell with the potential to differentiate into a wide variety of cell types of different lineages, including fibroblasts, hepatic, osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, skeletal muscle, endothelium, stroma, smooth muscle, cardiac muscle and hemopoietic cells, has not been described. If cell and tissue transplant and gene therapy are to provide the therapeutic advances expected, a stem cell or progenitor cell with the greatest or most extensive differentiation potential is needed. What is needed is the adult equivalent of an ES cell.

BM, muscle and brain are the three tissues in which cells with apparent greater plasticity than previously thought have been identified. BM contains cells that can contribute to a number of mesodermal (Ferrari G. *et al.*, 1998; Gussoni E. *et al.*, 1999; Rafii S. *et al.*, 1994; Asahara T. *et al.*, 1997; Lin Y. *et al.*, 2000; Orlic D. *et al.*, 2001; Jackson K. *et al.*, 2001) endodermal (Petersen B.E. *et al.*, 1999; Theise, N.D. *et al.*, 2000; Lagasse E. *et al.*, 2000; Krause D. *et al.*, 2001) and neuroectodermal (Mezey D.S. *et al.*, 2000; Brazelton T.R., *et al.*, 2000, Sanchez-Ramos J. *et al.*, 2000; Kopen G. *et al.*, 1999) and skin (Krause, D. *et al.*, 2001) structures. Cells from muscle may contribute to the hematopoietic system (Jackson K. *et al.*, 1999; Seale P. *et al.*, 2000). There is also evidence that NSC may differentiate into hematopoietic cells (Bjornson C. *et al.*, 1999; Shih C. *et al.*, 2001), smooth muscle myoblasts (Tsai R.Y. *et al.*, 2000) and that NSC give rise to several cell types when injected in a mouse blastocyst (Clarke, D.L. *et al.*, 2000).

The present study demonstrates that cells with multipotent adult progenitor characteristics can be culture-isolated from multiple different organs, namely BM, muscle and the brain. The cells have the same morphology, phenotype, *in vitro* differentiation ability and have a highly similar expressed gene profile.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is a multipotent adult stem cell (MASC) isolated from a mammal, preferably mouse, rat or human. The cell is derived from a non-embryonic organ or tissue and has the capacity to be induced to differentiate to form at least one differentiated cell type of mesodermal, ectodermal and endodermal

WO 02/064748

PCT/US02/04652

10

origin. In a preferred embodiment, the organ or tissue from which the MASC are isolated is bone marrow, muscle, brain, umbilical cord blood or placenta.

Examples of differentiated cells that can be derived from MASC are osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, fibroblasts, marrow stroma, skeletal muscle, smooth muscle, cardiac muscle, ocular, endothelial, epithelial, hepatic, pancreatic, hematopoietic, glial, neuronal or oligodendrocytes. Differentiation can be induced *in vivo* or *ex vivo*.

The MASC of the present invention is also summarized as a cell that constitutively expresses oct4 and high levels of telomerase and is negative for CD44, MHC class I and MHC class II expression. As a method of treatment, this cell administered to a patient in a therapeutically effective amount. A surprising benefit of this treatment is that no teratomas are formed *in vivo*.

An object of the invention is to produce a normal, non-human animal comprising MASC. Preferably, the animal is chimeric.

Another embodiment of the invention is a composition comprising a population of MASC and a culture medium that expands the MASC population. It is advantageous in some cases for the medium to contain epidermal growth factor (EGF), platelet derived growth factor (PDGF) and leukemia inhibitory factor (LIF).

The present invention also provides a composition comprising a population of fully or partially purified MASC progeny. The progeny can have the capacity to be further differentiated, or can be terminally differentiated.

In a preferable embodiment, the progeny are of the osteoblast, chondrocyte, adipocyte, fibroblast, marrow stroma, skeletal muscle, smooth muscle, cardiac muscle, ocular, endothelial, epithelial, hepatic, pancreatic, hematopoietic, glial, neuronal or oligodendrocyte cell type.

The present invention also provides a method for isolating and propagating MASC by obtaining tissue from a mammal, establishing a population of adherent cells, depleting the population of CD45⁺ cells, recovering CD45⁻ cells and culturing them under expansion conditions to produce an expanded cell population. An object of the present invention, therefore, is to produce an expanded cell population obtained by this method.

An aspect of the invention is a method for differentiating MASC *ex vivo* by isolating and propagating them, and then culturing the propagated cells in the

WO 02/064748

PCT/US02/04652

11

presence of desired differentiation factors. The preferred differentiation factors are basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), dimethylsulfoxide (DMSO) and isoproterenol; or fibroblast growth factor4 (FGF4) and hepatocyte growth factor (HGF). Another aspect of the invention is the

5 differentiated cell itself.

The invention includes a method for differentiating MASC *in vivo*, by isolating and expanding them, and then administering the expanded cell population to a mammalian host, wherein said cell population is engrafted and differentiated *in vivo* in tissue specific cells, such that the function of a cell or organ, defective due to

10 injury, genetic disease, acquired disease or iatrogenic treatments, is augmented, reconstituted or provided for the first time. Using this method, the MASC can undergo self-renewal *in vivo*.

A further aspect of the invention is a differentiated cell obtained by *ex vivo* or *in vivo* differentiation. In a preferred embodiment, the differentiated cell is

15 ectoderm, mesoderm or endoderm. In another preferred embodiment, the differentiated cell is of the osteoblast, chondrocyte, adipocyte, fibroblast, marrow stroma, skeletal muscle, smooth muscle, cardiac muscle, ocular, endothelial, epithelial, hepatic, pancreatic, hematopoietic, glial, neuronal or oligodendrocyte cell type.

20 An important application of this technology is the method of treating a patient by administering a therapeutically effective amount of MASC or their progeny. The progeny can either have the capacity to be further differentiated, or can be terminally differentiated. An unexpected benefit of this approach is that the need for pretreatment and/or post treatment of the patient with irradiation,

25 chemotherapy, immunosuppressive agents or other drugs or treatments is reduced or eliminated. The induction of tolerance before or during treatment is also not required.

Such treatment can treat a variety of diseases and conditions, including cancer, cardiovascular disease, metabolic disease, liver disease, diabetes, hepatitis,

30 hemophilia, degenerative or traumatic neurological conditions, autoimmune disease, genetic deficiency, connective tissue disorders, anemia, infectious disease and transplant rejection.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

12

MASC or their progeny are administered via localized injection, including catheter administration, systemic injection, parenteral administration, oral administration, or intrauterine injection into an embryo. Administration can be in conjunction with a pharmaceutically acceptable matrix, which may be

5 biodegradable.

MASC or their progeny, administered to a patient, alter the immune system to resist viral, bacterial or fungal infection.

Surprisingly, teratomas are not formed when MASC or their progeny are administered to a patient.

10 When administered to a patient, MASC or their progeny also are able to augment, reconstitute or provide for the first time the function of a cell or organ defective due to injury, genetic disease, acquired disease or iatrogenic treatments. The organ is any of bone marrow, blood, spleen, liver, lung, intestinal tract, brain, immune system, circulatory system, bone, connective tissue, muscle, heart, blood
15 vessels, pancreas, central nervous system, peripheral nervous system, kidney, bladder, skin, epithelial appendages, breast-mammary glands, fat tissue, and mucosal surfaces including oral esophageal, vaginal and anal. Examples of diseases treatable by this method are cancer, cardiovascular disease, metabolic disease, liver disease, diabetes, hepatitis, hemophilia, degenerative or traumatic neurological
20 conditions, autoimmune disease, genetic deficiency, connective tissue disorders, anemia, infectious disease and transplant rejection.

The MASC or their progeny home to one or more organs in the patient and are engrafted therein such that the function of a cell or organ, defective due to injury, genetic disease, acquired disease or iatrogenic treatments, is augmented,
25 reconstituted or provided for the first time, which is surprising and unexpected. In a preferred embodiment, the injury is ischemia or inflammation.

In another preferred embodiment, the MASC or their progeny enhance angiogenesis.

In an additional aspect of the invention, MASC or their progeny are
30 genetically transformed to deliver a therapeutic agent, preferably an antiangiogenic agent.

The invention provides a therapeutic composition comprising MASC and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein the MASC are present in an amount

WO 02/064748

PCT/US02/04652

13

effective to produce tissue selected from the group consisting of bone marrow, blood, spleen, liver, lung, intestinal tract, brain, immune system, bone, connective tissue, muscle, heart, blood vessels, pancreas, central nervous system, kidney, bladder, skin, epithelial appendages, breast-mammary glands, fat tissue, and mucosal surfaces including oral esophageal, vaginal and anal.

5 The invention further provides a therapeutic method for restoring organ, tissue or cellular function to a patient comprising the steps of removing MASC from a mammalian donor, expanding MASC to form an expanded population of undifferentiated cells, and administering the expanded cells to the patient, wherein
10 organ, tissue or cellular function is restored. The restored function may be enzymatic or genetic. In a preferred embodiment, the mammalian donor is the patient.

The invention provides a method of inhibiting the rejection of a heterologous MASC transplanted into a patient comprising the steps of introducing into the
15 MASC, *ex vivo*, a nucleic acid sequence encoding the recipient's MHC antigen operably linked to a promotor, wherein the MHC antigen is expressed by the MASC and transplanting the MASC into the patient, wherein MHC antigen is expressed at a level sufficient to inhibit the rejection of the transplanted MASC. The patient is of the same species or another mammalian species as the donor of the MASC.

20 An alternative method of inhibiting the rejection of a heterologous MASC transplanted into a patient comprises transgenically knocking out expression of MHC antigen in the MASC and transplanting the transgenic MASC into the patient MHC antigen is not expressed by the MASC and rejection of the transplanted cells is inhibited.

25 An object of the invention is a method of generating blood or individual blood components *ex vivo* by the process of isolating MASC and differentiating the MASC to form blood or blood components. Preferably, the individual blood components are red blood cells, white blood cells or platelets.

Another aspect of the invention is a method of drug discovery comprising the
30 steps of analyzing the genomic or proteomic makeup of MASC or their progeny, employing analysis thereof via bioinformatics and/or computer analysis using algorithms, and assembling and comparing new data with known databases to compare and contrast these.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

14

A further aspect is a method of identifying the components of a differentiation pathway comprising the steps of analyzing the genomic or proteomic makeup of MASC, inducing differentiation of MASC *in vitro* or *in vivo*, analyzing the genomic or proteomic makeup of intermediary cells in the differentiation pathway, analyzing the genomic or proteomic makeup of terminally differentiated cells in the differentiation pathway, using bioinformatics and/or algorithms to characterize the genomic or proteomic makeup of MASC and their progeny, and comparing the data obtained in (e) to identify the components of the pathway. Using this method, differentiation that occurs *in vitro* can be compared with differentiation that occurs *in vivo* such that fundamental differences between the two systems can be characterized.

The invention provides a method of generating products *in vitro* that have therapeutic, diagnostic or research utility by identifying the products in MASC and isolating the products from MASC. In a preferred embodiment, the products are proteins, lipids, complex carbohydrates, DNA or RNA.

Included in the invention is a method of inducing, in a mammal, tolerance to an antigen administered to said mammal, the method comprising the step of administering to said mammal, after or simultaneously with the administration of said antigen, an effective amount of MASC or their progeny so that said mammal's humoral immune response to a subsequent challenge with said antigen is suppressed.

Also included is a method for removing toxins from the blood of a patient comprising contacting blood *ex vivo* with MASC derived cells, wherein said cells line a hollow, fiber based device. In a preferred embodiment, the cells are kidney or liver cells.

An object of the invention is a method for delivering therapeutic products to a patient comprising contacting the blood of said patient *ex vivo* with MASC or their progeny, wherein said MASC or their progeny are genetically transformed to deliver a therapeutic agent.

A further object is a method for testing the toxicity of a drug comprising contacting MASC or their progeny *ex vivo* with said drug and monitoring cell survival. In a preferred embodiment, the progeny are selected from the group consisting of hepatic, endothelial, epithelial and kidney.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

15

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

The following Detailed Description, given by way of example, but not intended to limit the invention to specific embodiments described, may be understood in conjunction with the accompanying drawings, incorporated herein by reference, in which:

Fig. 1 shows a graphical illustration of the expansion potential of bone marrow (BM), muscle and brain derived MASC.

Fig. 2 shows a scatter plot representing gene expression in (A) muscle and brain MASC and (B) bone marrow and muscle MASC.

Fig. 3 shows a graphical illustration of FACS analysis of undifferentiated MASC and MASC cultured with VEGF. The plots show isotype control IgG staining profile (thin line) vs. specific antibody staining profile (thick line). Panel A shows the phenotype of undifferentiated MASC. MASC express low levels of $\beta 2$ -microglobulin, Flkl, Flt 1 and AC 133, but do not stain with any of the other anti-endothelial markers; panel B shows the phenotype of MASC cultured for 14 days with 10 ng/mL VEGF. MASC express low levels most markers associated with endothelial cells, but lost expression of AC 133; and panel C shows phenotype of MASC cultured or 3-9 days with 10 ng/mL VEGF. MASC lose expression of AC 133 by day 3 of culture with VEGF, acquire expression of Tek and VE-cadherin by day 3, Tie, vWF, CD34 and HIP12 by day 9.

Fig. 4 shows a photomicrograph of engraftment and in vivo differentiation of mMASC. Slides were examined by fluorescence or confocal microscopy. Panels A, G, J, N, Q and S represent identically stained tissues of control NOD-SCID animals that were not injected with mMASC. Panels A-F show a photomicrograph of bone marrow (BM) cytospin from a control (A) and study (B-F) animal stained with anti- β -gal-FITC antibody and PE-conjugated antibodies to various hematopoietic antigens. A-B: CD45, C: CD19, D: MAC1, E: GR1, F: TER119 and DAPI; panels G-I shows a photomicrograph of a spleen section from a control (G) and study animal (H, I) stained with anti- β -gal-FITC antibody and anti-CD45-PE antibody. Donor derived anti- β -gal⁺ cells are seen in clusters. H is 10X and I are 60X magnifications; panels J-M shows a photomicrograph of a liver section from a control mouse (J) and study animal (K-M) stained with anti- β -gal-FITC. J-L are co-stained with mouse-anti-CK-18 / anti-mouse-Cy5 plus CD45-PE and M with mouse anti-albumin / anti-

WO 02/064748

PCT/US02/04652

16

mouse Cy3 antibodies. J-K, L and M are 20X, 60X and 10X magnifications respectively; panels N-P show a photomicrograph of an intestine section from a control mouse and study animal (O-P), stained with anti- β -gal-FITC plus mouse-anti-pan-CK / anti-mouse-Cy5 antibodies (N-P). N and P are costained with CD45-PE antibodies. β -gal⁺ Pan-CK⁺CD45⁻ epithelial cells covered 50% (solid arrow, panel P) of the circumference of villi. Pan-CK⁻ / β -gal⁺ cells in the core of the villi (open arrow-panel O) co-stained for CD45 (P); panels Q-R show a photomicrograph of a lung section from a control mouse (Q) and study animal (R) stained with anti- β -gal-FITC plus mouse-anti-pan-CK / anti-mouse-Cy5 plus CD45-PE antibodies.

Several β -gal⁺ pan-CK⁺ donor cells are seen lining the alveoli of the recipient animal (R). CD45⁺ / pan-CK⁻ cells of hematopoietic origin are seen distinctly from the epithelial cells; and panels S-T show a photomicrograph of a blood vessel section from a control mouse (S) and thymic lymphoma that developed in a study animal 16 weeks after transplantation (T) stained with anti- β -gal-FITC, anti-vWF-PE and TO-PRO3. β -gal⁺ donor cells differentiated into vWF⁺ endothelial cells in the thymic lymphoma which is of recipient origin, as the tumor cells did not stain with anti- β -Gal antibodies.

Fig. 5 shows immunohistochemical evaluation of MASC-derived endothelial cells using confocal fluorescence microscopy. (a) MASC grown for 14 days in VEGF. Typical membrane staining is seen for the adhesion receptor, α v β 5, and for the adherens junction proteins, ZO-1, β - and γ -catenin. Scale bar = 50 μ m. (b) Morphology in bright field of MASC at day 0 (upper panel) and day 21 (lower panel) after VEGF treatment. Bar = 25 μ m.

Fig. 6 shows a photomicrograph of MASC derived endothelial cells. Panel A shows histamine-mediated release of vWF from MASC-derived endothelium. Staining with antibodies against myosin shows cytoskeletal changes with increased numbers of myosin stress fibers, and widening of gap junctions (Arrows) (Representative example of 3 experiments). Scale bar = 60 μ m; panel B shows MASC-derived endothelium takes up a-LDL. After 7 days, cells expressed Tie-1, but again did not take up a-LDL. However, acquisition of expression of vVWF on day 9 was associated with uptake of aLDL (representative example of 10 experiments). Scale bar = 100 μ m; and panel C shows vascular tube formation by

WO 02/064748

PCT/US02/04652

17

MASC-derived endothelium. After 6h, typical vascular tubes could be seen.

(Representative example of 6 experiments). Scale bar = 200 μ m

Fig. 7 shows a graphical illustration of FACS analysis of MASC derived endothelial cells. The Plots show isotype control IgG staining profile (thin line) vs. specific antibody staining profile (thick line) (Representative example of >3 experiments). Number above plots is the Mean Fluorescence Intensity (MFI) for the control IgG staining and the specific antibody staining. Panel A shows hypoxia upregulates Flk1 and Tek expression on MASC-derived endothelial cells analyzed by flow cytometry; panel B shows that hypoxia upregulates VEGF production by MASC-derived endothelial cells. VEGF levels were measured by ELISA and the results are shown as Mean $\pm$ SEM of 6 experiments; and panel C shows that IL-1 α induces expression of class II HLA antigens and increases expression of adhesion receptors. Plots show isotype control IgG staining profile (thin line) vs. specific antibody staining profile (thick line) (Representative example of 3 experiments). Number above plots shows MFI for the control IgG staining and the specific antibody staining.

Fig. 8 shows a photomicrograph of human MASC derived endothelial cells. Panels C-F show the 3-D reconstructed figures for either anti-human β 2-microglobulin-FITC (panel C) or anti-mouse-CD31-FITC (panel D) and merging of the two (Panel E), anti-vWF-Cy3 (panel F), and merging of the three staining patterns (Panel G). Panels A and B show the confocal image of a single slice stained with either anti-human β 2-microglobulin-FITC and anti-vWF-Cy3, or anti-mouse-CD31-Cy5 and anti-vWF-Cy3. Scale bar = 100 μ m. Panel H shows wound healing resulting in a highly vascularized area in the punched ear stained with anti- β 2-microglobulin-FITC and anti-vWF in mice injected with human MASC-derived endothelial cells (Top panel) or human foreskin fibroblasts (Bottom panel). Scale bar = 20 μ m. C= Cartilage. D= dermis. Panel I shows that tumor angiogenesis is derived from endothelial cells generated *in vivo* from MASC resulting in a highly vascularized area in the tumor stained with anti-X32-microglobulin-FITC, anti-vWF and TOPRO-3. Scale bar = 20 μ m.

Fig. 9 shows spiking behavior and expressed voltage-gated sodium currents in hMSC derived neuron-like cells. Panel A shows a photomicrograph of cultured hMSC-derived neurons that showed spiking behavior and expressed voltage-gated

WO 02/064748

PCT/US02/04652

18

sodium currents (the shadow of the pipette points to the cell). Panel B shows graphical illustrations of current-clamp recordings from a hMSC derived neuron. Panel C shows graphical illustrations of leak-subtracted current traces from the same hMSC derived neuron.

5 **Fig. 10** shows quantitative RT-PCR and Western blot analysis confirming the hepatocyte-like phenotype. Panels A and B show mMASC (A) and hMASC (B) cultured on Matrigel™ with FGF4 and HGF or FGF4 alone for 21 and 28 days respectively. For α FP, Cyp2b9 and Cyp2b13, numbers under the blots are relative to mRNA from liver, as no transcripts were detected in undifferentiated MASC. Li =
10 mouse or human liver mRNA; NT = no-template. Representative example of 5 mouse and 1 human studies, Panel C shows hMASC (B) cultured on Matrigel™ with FGF4 and HGF or FGF4 alone for 21 days. FH= FGF4 and HGF-induced hMASC on Matrigel™, Huh= Huh7 cell line used as control.

Fig. 11 shows a photomicrograph of hepatocyte-like cells. MASC induced
15 by FGF4 produce glycogen. Glycogen storage is seen as accumulation of dark staining (Representative example of 3 studies). Scale bar = 25 μ m.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions

20 As used herein, the following terms shall have the following meanings:
“Expansion” shall mean the propagation of a cell without differentiation.
“Intermediary cells” are cells produced during differentiation of a MASC that have some, but not all, of the characteristics of MASC or their terminally differentiated progeny. Intermediary cells may be progenitor cells which are
25 committed to a specific pathway, but not to a specific cell type.
“Normal” shall mean an animal that is not diseased, mutated or malformed, i.e., healthy animals.
“Self-renewal” shall mean the ability of cells to propagate without the addition of external stimulation. The presence of cytokines or other growth factors
30 produced locally in the tissue or organ shall not constitute external stimulation.
“Home” shall mean the ability of certain MASC or their progeny to migrate specifically to sites where additional cells may be needed.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

19

"Knocking out expression" shall mean the elimination of the function of a particular gene.

As used herein, "genomic or proteomic makeup" shall mean the gene or protein components of a given cell.

- 5 "High levels of telomerase activity" can be correlated to the two-fold level observed in the immortal human cell line MCF7. Soule et al. (1973) J. Cancer Inst. 51:1409-1416.

Application of this Technology

- MASC technology could be used to replace damaged, diseased,
 10 dysfunctional or dead cells in the body of a mammal. Furthermore these cells could be injected into the host using autologous or allogeneic cells with or without nature or artificial supports, matrices or polymers to correct for loss of cells, abnormal function or cells or organs e.g. genetic such as mutations of genes affecting a protein function such as sickle cell disease, hemophilia or "storage diseases" where products
 15 accumulate in the body because of faulty processing, e.g. Gaucher's, Nieman Pick's, mucopolysaccharidosis etc. Examples of restitution of dying or dead cells would be the use of MASC or their differentiated progeny in the treatment of macular degeneration and other neurodegenerative diseases.

- Given the ability to have these MASC to "home" to and incorporate into
 20 organs/tissues of a host animal proliferate and differentiation they could potentially be used to provide new endothelial cells to an ischemic heart and also myocardial cells themselves, numerous other examples exist.

- There may be medical circumstances where transient benefits to a tissue or organs function could have desirable effects. For example, there are now cases with
 25 liver failure patients hooked up to a bioartificial liver, which was sufficient to allow for the recovery of normal liver function, obviating the need for a liver transplant. This is a serious unmet medical need, for example in one liver disease alone - hepatitis C. There are 4-5 million Americans currently infected with hepatitis C and there are estimates that 50% of these people will get cirrhosis and need a liver
 30 transplant. This is a huge public health problem that is begging for a remedy. Hepatocytes, derived from autologous or allogeneic MASC, can be transplanted in this or other liver diseases. Such transplants may either transiently provide liver function to allow recovery of the recipient's own liver cells or permanently

WO 02/064748

PCT/US02/04652

20

repopulate a damaged liver to allow recovery of normal liver function via the donor cells.

In addition to many cell therapies where the undifferentiated MASC are administered to a human or other mammal to then differentiate into specific cells in the donor, the progeny of the MASC could be differentiated *ex vivo* and then be administered as purified or even mixtures of cells to provide a therapeutic benefit. These MASC in the undifferentiated state could also be used as carriers or vehicles to deliver drugs or molecules of therapeutic benefit. This could be to treat any one of a number of diseases including but not limited to cancer, cardiovascular, inflammatory, immunologic, infections, etc. So by example, a cell perhaps an endothelial cell expressing a novel or high levels of an angiogenic molecule could be administered to a patient which would be incorporated into existing blood vessels to promote angiogenesis, for example in the heart; correspondingly one could have endothelial cells producing molecules that might suppress angiogenesis that would be incorporated into blood cells and inhibit their further formation for example in diabetic retinopathy or in cancer where new blood vessel formation is key to the pathogenesis, spread and extent of the disease.

The ability to populate the BM and to form blood *ex vivo* has an untold use for important medical applications. For example regarding *ex vivo* production of blood, the transfusion of blood and blood products around the world is still performed with variable safety because of transmission of infectious agents. Blood transfusions have lead to HIV, hepatitis C and B, and now the impending threat of Mad Cow or CJD, Creutzfeldt-Jakob disease. The ability to produce blood *in vitro*, especially red blood cells, could provide a safe and reliable alternative to collection of blood from people. It might never fully replace blood collection from donors. hMASC or their hematopoietic progeny could be placed in animals in utero such as sheep which could form human hematopoietic cells and serve as a source for human blood components or proteins of therapeutic utility. The same could be true for hepatocytes, islets or many other cell types but would provide an alternative to producing human cells *in vitro* and use the animals as factories for the cells. It could also assist in blood shortages that are predicted to occur. hMASC could also conceivably be transplanted into a human embryo to correct any one of a number of defects.

21

Because these MASC can give rise to clonal populations of specifically differentiated cells they are a rich platform for drug discovery. This would involve doing gene expression, analyzing gene expression, discovery of new genes activated patterns of activation, proteomics and patterns of protein expression and modification surrounding this. This would be analyzed with bioinformatics, using data bases and algorithms for analyzing these data compared to publicly available or proprietary data bases. The information of how known drugs or agents might act could be compared to information derived from MASC, their differentiated progeny and from a population of people which could be available. Pathways, targets, and receptors could be identified. New drugs, antibodies or other compounds could be found to produce a biologically desirable responses. Correspondingly, the MASC and their differentiated progeny could be used as monitors for undesirable responses, coupled with databases, bioinformatics and algorithms.

These MASC derived from human, mouse, rat or other mammals appear to be the only normal, non-malignant, somatic cell (non germ cell) known to date to express very high levels of telomerase even in late passage cells. The telomeres are extended in MASC and they are karyotypically normal. Because MASC injected into a mammal, home to multiple organs, there is the likelihood that newly arrived MASC in a particular organ could be self renewing. As such, they have the potential to repopulate an organ not only with themselves but also with self renewing differentiated cell types that could have been damaged, died, or otherwise might have an abnormal function because of genetic or acquired disease.

For example in type I diabetes there is a progressive loss of insulin producing beta cells in the pancreatic islets. In various renal diseases there is progressive loss of function and in some cases obliteration of glomerulus. If in the case of diabetes, MASC or differentiated progeny might home to the pancreas and themselves or via interaction with endogenous cells within the pancreas, induce islets to be formed. This would have an ameliorating impact on diabetes. Ultimately conditions, agents or drugs might be found to *in vivo* control, i.e. promote or inhibit their self renewing capability of the MASC and control, or enhance or inhibit the movement to differentiated progeny, e.g., islet precursors, hepatocyte precursors, blood precursors, neural and/or cardiac precursors using

MASC one will likely find pathways, methods of activation and control that might induce endogenous precursor cells within an organ to proliferate and differentiation.

This same ability to repopulate a cellular tissue or organ compartment and self renew and also differentiate could have numerous uses and be of unprecedented usefulness to meet profound unmet medical needs. So for example certain genetic diseases where there are enzyme deficiencies have been treated by BM transplantation. Often times this may help but not cure the complications of the disease where residual effects of the disease might persist in the brain or bones or elsewhere, MASC and genetically engineered MASC offer the hope to ameliorate numerous genetic and acquired diseases. They will also be useful for diagnostic and research purposes and drug discovery.

The present invention also provides methods for drug discovery, genomics, proteomics, and pathway identification; comprising analyzing the genomic or proteomic makeup of a MASC, coupled with analysis thereof via bioinformatics, computer analysis via algorithms, to assemble and compare new with known databases and compare and contract these. This will identify key components, pathways, new genes and/or new patterns of gene and protein expression and protein modification (proteomics) that could lead to the definition of targets for new compounds, antibodies, proteins, small molecule organic compounds, or other biologically active molecules that would have therapeutic benefit.

EXAMPLES

The following examples are provided to illustrate but not limit the invention.

Example 1. Selection, Culture and Characterization of Mouse Multipotent Adult Stem Cells (mMASC)

Cell Isolation and Expansion

All tissues were obtained according to guidelines from the University of Minnesota IACUC. BM mononuclear cells (BMMNC) were obtained by ficoll-hypaque separation of BM was obtained from 5-6 week old ROSA26 mice or C57/BL6 mice. Alternatively, muscle and brain tissue was obtained from 3-day old 129 mice. Muscles from the proximal parts of fore and hind limbs were excised from and thoroughly minced. The tissue was treated with 0.2% collagenase (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) for 1 hour at 37°C, followed by 0.1% trypsin (Invitrogen, Grand Island, NY) for 45 minutes. Cells were then triturated vigorously

WO 02/064748

PCT/US02/04652

23

and passed through a 70-um filter. Cell suspensions were collected and centrifuged for 10 minutes at 1600 rpm. Brain tissues was dissected and minced thoroughly. Cells were dissociated by incubation with 0.1% trypsin and 0.1% DNase (Sigma) for 30 minutes at 37 °C. Cells were then triturated vigorously and passed through a
 5 70-um filter. Cell suspension was collected and centrifuged for 10 minutes at 1600 rpm.

BMMNC or muscle or brain suspensions were plated at $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ in expansion medium [2% FCS in low glucose Dulbecco's minimal essential medium (LG-DMEM), 10 ng/mL each platelet derived growth factor (PDGF), epidermal
 10 growth factor (EGF) and leukemia inhibitory factor (LIF)] and maintained at $5 \times 10^3/\text{cm}^2$. After 3-4 weeks, cells recovered by trypsin/EDTA were depleted of CD45⁺/glycophorin (Gly)-A⁺ cells with micromagnetic beads. Resulting CD45⁻/Gly-A⁻ cells were replated at 10 cells/well in 96-well plates coated with FN and were expanded at cell densities between 0.5 and $1.5 \times 10^3/\text{cm}^2$. The expansion
 15 potential of MASC was similar regardless of the tissue from which they were derived (Fig. 1).

Characterization of MASC

Phenotypically, mMASC derived from BM, muscle and brain and cultured on FN were CD13⁺, CD44⁺, CD45⁻, class-I and class-II histocompatibility antigen⁺,
 20 Fli^{low} and cKit⁻, identical to the characteristics of hMASC, as described in International Application No. PCT/US00/21387. Although cell expansion during the initial 2-3 months was greater when cells were cultured on collagen type IV, laminin or Matrigel™, cells had phenotypic characteristics of MSC, i.e., expressed CD44 and did not express CD13. As with human cells, mMASC cultured on FN expressed
 25 transcripts for oct-4, and the LIF-R.

Approximately 1 % of wells seeded with 10 CD45⁻/GlyA⁻ cells yielded continuous growing cultures. This suggests that the cells capable of initiating MASC cultures are rare and likely less than 1/1,000 of CD45⁻/GlyA⁻ cells. mMASC cultured on FN were 8-10 µm in diameter with a large nucleus and scant cytoplasm.
 30 Several populations have been cultured for > 100 PDs. The morphology and phenotype of cells remained unchanged throughout culture.

mMASC that had undergone 40 and 102 PDs were harvested and telomere lengths evaluated. Telomere length was measured using the Telomere Length Assay

WO 02/064748

PCT/US02/04652

24

Kit from Pharmingen (New Jersey, USA) according to the manufacturer's recommendations. Average telomere length (ATL) of mMASC cultured for 40 PDs was 27 Kb. When re-tested after 102 PDs, ATL remained unchanged. For karyotyping of mMASC, cells were subcultured at a 1:2 dilution 12h before

- 5 harvesting, collected with trypsin-EDTA, and subjected to a 1.5h colcemid incubation followed by lysis with hypotonic KCl and fixation in acid/alcohol as previously described (Verfaillie *et al.*, 1992). Cytogenic analysis was conducted on a monthly basis and showed a normal karyotype, except for a single population that became hyperdiploid after 45 PDs, which was no longer used for studies.
- 10 Murine MASC obtained after 46 to >80 PDs were tested by Quantitative (Q)-RT-PCR for expression levels of Oct4 and Rex1, two transcription factors important in maintaining an undifferentiated status of ES cells. RNA was extracted from mouse MASC, neuroectodermal differentiated progeny (day 1-7 after addition of bFGF) and mouse ES cells. RNA was reverse transcribed and the resulting cDNA
- 15 underwent 40 rounds of amplification (ABI PRISM 7700, Perkin Elmer/Applied Biosystems) with the following reaction conditions: 40 cycles of a two step PCR (95°C for 15 seconds, 60°C for 60 seconds) after initial denaturation (95°C for 10 minutes) with 2 µl of DNA solution, 1X TaqMan SYBR Green Universal Mix PCR reaction buffer. Primers are listed in Table 1.

20 Table 1: Primers used

NEO	5'-TGGATTGCACGCAGGTTCT-3' 5'-TTCGCTTGGTGGTCGAATG-3'
Oct4	5'-GAAGCGTTTCTCCCTGGATT-3' 5'-GTGTAGGATTGGGTGCGTT-3'
Rex 1	5'-GAAGCGTTTCTCCCTGGAAATTC-3' 5'-GTGTAGGATTGGGTGCGTTT-3'
otx 1	5'-GCTGTTCGCAAAGACTCGCTAC-3' 5'-ATGGCTCTGGCACTGATACGGATG-3'
otx2	5'-CCATGACCTATACTCAGGCTTCAGG-3' 5'-GAAGCTCCATATCCCTGGGTGGAAAG-3'
Nestin 5'	5'-GGAGTGTGCTTAGAGGTGC-3' 5'-TCCAGAAAGCCAAGAGAAGC-3'

mRNA levels were normalized using GAPDH as housekeeping gene, and compared with levels in mouse ES cells. Oct4 and Rex 1 mRNA were present at similar levels in BM, muscle and brain derived MASC. Rex1 mRNA levels were

WO 02/064748

PCT/US02/04652

25

similar in mMASC and mES cells, while Oct4 mRNA levels were about 1,000 fold lower in MASC than in ES cells.

Expressed gene profile of mouse BM, muscle and brain derived MASC is highly similar

- 5 To further evaluate whether MASC derived from different tissues were similar, the expressed gene profile of BM, muscle and brain derived MASC was examined using U74A Affimetrix gene array. Briefly, mRNA was extracted from 2-3x10⁶ BM, muscle or brain derived-MASC, cultured for 45 population doublings. Preparation of cDNA, hybridization to the U74A array containing 6,000 murine
- 10 genes and 6,000 EST clusters, and data acquisition were done per manufacturer's recommendations (all from Affimetrix, Santa Clara, CA). Data analysis was done using GeneChip® software (Affimetrix). Increased or decreased expression by a factor of 2.2 fold (Iyer V.R. *et al.*, 1999; Scherf U. *et al.*, 2000; Alizadeh A.A. *et al.*, 2000) was considered significant. r^2 value was determined using linear regression
- 15 analysis (Fig.2).

- Comparison between the expressed gene profile in MASC from the three tissues showed that <1% of genes were expressed at >2.2-fold different levels in MASC from BM than muscle. Likewise, only <1% of genes were expressed > 2.2-fold different level in BM than brain derived MASC. As the correlation coefficient
- 20 between the different MASC populations was > 0.975, it was concluded that MASC derived from the different tissues are highly homologous, in line with the phenotypic described above and the differentiation characteristics described in Example 5.

- Using the mouse-specific culture conditions, mMASC cultures have been maintained for more than 100 cell doublings. mMASC cultures have been initiated
- 25 with marrow from C57Bl/6 mice, ROSA26 mice and C57Bl/6 mice transgenic for the -HMG-LacZ.

Example 2. Selection and Culture of Rat Multipotent Adult Stem Cells (rMASC)

- BM and MNC from Sprague Dawley or Wistar rats were obtained and plated
- 30 under conditions similar for mMASC. After 21-28 days, cells were depleted of CD45⁺ cells, and the resulting CD45⁻ cells were subcultured at 10 cells/well.

Similar to mMASC, rMASC have been culture expanded for >100 PDs. Expansion conditions of rat MASC culture required the addition of EGF, PDGF-BB

WO 02/064748

PCT/US02/04652

26

and LIF and culture on FN, but not collagen type I, laminin or Matrigel™. rMASC were CD44, CD45 and MHC class I and II negative, and expressed high levels of telomerase. The ability of a normal cell to grow over 100 cell doublings is unprecedented, unexpected and goes against conventional dogma of more than two decades.

Rat MASC that had undergone 42 PDs, 72 PDs, 80 PDs, and 100 PDs, were harvested and telomere lengths evaluated. Telomeres did not shorten in culture, as was determined by Southern blot analysis after 42 PDs, 72 PDs, 80 PDs, and 100 PDs. Monthly cytogenetic analysis of rat MASC revealed normal karyotype.

Example 3. Selection and Culture of Human Multipotent Adult Stem Cells (hMASC)

BM was obtained from healthy volunteer donors (age 2-50 years) after informed consent using guidelines from the University of Minnesota Committee on the use of Human Subject in Research. BMMNC were obtained by Ficoll-Paque density gradient centrifugation and depleted of CD45⁺ and glycophorin-A⁺ cells using micromagnetic beads (Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA).

Expansion conditions: 5×10^3 CD45⁺/GlyA⁺ cells were diluted in 200 μ L expansion medium [58% DMEM-LG, 40% MCDB-201 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO), supplemented with 1X insulin-transferrin-selenium (ITS), 1X linoleic-acid bovine serum albumin (LA-BSA), 10^{-8} M Dexamethasone, 10^{-4} M ascorbic acid 2-phosphate (all from Sigma), 100 U penicillin and 1,000 U streptomycin (Gibco)] and 0-10% fetal calf serum (FCS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT) with 10 ng/ml of EGF (Sigma) and 10 ng/ml PDGF-BB (R&D Systems, Minneapolis, MN)] and plated in wells of 96 well plates that had been coated with 5 ng/ml of FN (Sigma). Medium was exchanged every 4-6 days. Once wells were >40-50% confluent, adherent cells were detached with 0.25% trypsin-EDTA (Sigma) and replated at 1:4 dilution in MASC expansion medium and bigger culture vessels coated with 5 ng/ml FN to maintain cell densities between 2 and 8×10^3 cells/cm².

Undifferentiated MASC did not express CD31, CD34, CD36, CD44, CD45, CD62-E, CD62-L, CD62-P, HLA-class I and II, cKit, Tie, Tek, $\alpha_3\beta_3$, VE-cadherin, vascular cell adhesion molecule (VCAM), intracellular adhesion molecule (ICAM)-1. MASC expressed low/very low levels of β_2 -microglobulin, $\alpha_4\beta_5$, CDw90, AC133, Flk1 and Flt1, and high levels of CD13 and CD49b (Fig. 3).

Example 4. Immunophenotypic AnalysisImmunofluorescence

1. Cultured cells were fixed with 4% paraformaldehyde and methanol at room temperature, and incubated sequentially for 30 min each with primary antibody, and with or without secondary antibody. Between steps, slides were washed with PBS/BSA. Cells were examined by fluorescence microscopy (Zeiss Axiovert; Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY) and confocal fluorescence microscopy (Confocal 1024 microscope; Olympus AX70, Olympus Optical Co. LTD, Japan).
- 10 To assess the frequency of different cell types in a given culture, the number of cells were counted that stained positive with a given antibody in four visual fields (50-200 cells per field).
2. Harvested tissues: Cytospin specimens of blood and BM were fixed with acetone (Fisher Chemicals) for 10 min at room temperature. For solid organs, 5 μ m thick fresh frozen sections of tissues were mounted on glass slides and immediately fixed in acetone for 10 min at room temperature. Following incubation with isotype sera for 20 min, cytospin preparations or tissue sections were serially stained for tissue specific antigens, β -gal and a nuclear counter stain (DAPI or TO-PRO-3). Cover slips were mounted using Slowfade-antifade kit (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Slides were examined by fluorescence microscopy and confocal fluorescence microscopy.
3. Antibodies: Cells were fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature or methanol at -20°C, and incubated sequentially for 30 min each with primary Ab, and FITC or Cy3 coupled anti-mouse- or anti-rabbit-IgG Ab. Between each step slides were washed with PBS+1 %BSA. PE or FITC-coupled anti-CD45, anti-CD31, anti-CD62E, anti-Mac1, anti-Gr1, anti-CD19, anti-CD3, and anti-Ter119 antibodies were obtained from BD Pharmingen. Abs against GFAP (clone G-A-5, 1:400), galactocerebroside (GalC) (polyclonal, 1:50), MBP (polyclonal, 1:50), GABA (clone GB-69, 1:100), parvalbumin (clone PARV-19, 1:2000), TuJ1 (clone SDL3D10, 1:400), NF-68 (clone NR4, 1:400), NF-160 (clone NN 18, 1:40), and NF-200 (clone N52, 1:400), NSE (polyclonal, 1:50), MAP2-AB (clone AP20, 1:400), Tau (polyclonal, 1:400), TH (clone TH-2, 1:1000), DDC (clone DDC-109, 1:100), TrH (clone WH-3, 1:1000), serotonin (polyclonal, 1:2000), glutamate (clone

WO 02/064748

PCT/US02/04652

28

- GLU-4, 1:400), fast twitch myosin (clone MY-32; 1:400 dilution) were from Sigma. DAPI and TOPRO-3 were from Molecular Probes. Abs against vWF (polyclonal; 1:50) Neuro-D (polyclonal, 1:50), c-ret (polyclonal, 1:50) and Nurrl (polyclonal, 1:50) were from Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA. Abs against PSA-NCAM (polyclonal, 1:500) from Phammingen, San Diego, CA and against serotonin transporter (clone MAB 1564, 1:400), DTP (polyclonal, 1:200), Na-gated voltage channel (polyclonal, 1:100), glutamate-receptors -5, -6 and -7 (clone 3711:500) and NMDA (polyclonal 1:400) receptor from Chemicon International, Temecula, CA. Anti-nestin (1:400) Abs were a kind gift from Dr. U. Lendahl, University of Lund, Sweden. Antibodies against NSE (1:50) pan-cytokeratin (catalog number C-2562; 1:100), CK-18 (C-8541; 1:300), albumin (A-6684; 1:100) were all obtained from Sigma. Polyclonal antibodies against Flk1, Flt1, Tek, HNF-1 β were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA. Anti-nestin (1:400) antibodies were a kind gift from Dr. U. Lendahl, University of Lund, Sweden. Control-mouse, -rabbit or -rat IgGs and FITC/PE/Cy3- and Cy5-labeled secondary antibodies were obtained from Sigma. Rabbit anti- β -gal-FITC antibody was obtained from Rockland Immunochemicals, USA. TO-PRO-3 was obtained from Molecular Probes Inc. and DAPI was obtained from Sigma.
- B. X-GAL staining: Tissue sections were stained by for β -galactosidase enzyme activity using β -gal staining kit from Invitrogen, pH 7.4. Manufacturer's instructions were followed except for the fixation step, during which the tissue sections were incubated for 5 min instead of 10 min.
- C. FACS: For FACS, undifferentiated MASC were detached and stained sequentially with anti-CD44, CD45, CD13, cKit, MHC-class I and II, or b2-microglobulin (BD Pharmingen) and secondary FITC or PE coupled antibodies, fixed with 2% paraformaldehyde until analysis using a FACS-Calibur (Becton-Dickinson).

Example 5. Single Cell Origin of Differentiated Lineages from MASC

- The differentiation ability of mMASC or rMASC was tested by adding differentiation factors (cytokines) chosen based on what has been described for differentiation of hMASC or ES cells to mesoderm, neuroectoderm, and endoderm. Differentiation required that cells were replated at $1-2 \times 10^4$ cells/cm² in serum free medium, without EGF, PDGF-BB and LIF, but with lineage specific cytokines.

29

Differentiation was determined by immunohistology for tissue specific markers [slow twitch myosin and MyoD (muscle), von-Willebrand factor (vWF) and Tek (endothelium), NF200 and MAP2 (neuroectodermal), and cytokeratin-18 and albumin (endodermal)], RT-PCR, and functional studies.

5 MASC Differentiation into Neuroectodermal Cells

Palmer *et al.* showed that neuroprogenitors can be culture expanded with PDGF-BB and induced to differentiate by removal of PDGF and addition of bFGF as a differentiation factor. Based on those studies and studies conducted using hMASC, mMASC and rMASC were plated in FN coated wells without PDGF-BB and EGF but with 100 ng/mL bFGF. Progressive maturation of neuron-like cells was seen throughout culture. After 7 days, the majority of cells expressed nestin. After 14 days, 15-20% of MASC acquired morphologic and phenotypic characteristics of astrocytes (GFAP⁺), 15-20% of oligodendrocytes (galactocerebroside (GalC)⁺) and 50-60% of neurons (neurofilament-200 (NF-200)⁺). NF200, GFAP or GalC were never found in the same cell, suggesting that it is unlikely that neuron-like cells were hMASC or glial cells that inappropriately expressed neuronal markers. Neuron-like cells also expressed Tau, MAP2 and NSE. Approximately 50% of neurons expressed gamma-amino-butyric-acid (GABA) and parvalbumin, 30% tyrosine hydroxylase and dopa-decarboxylase (DDC), and 20% serotonin and tryptophan hydroxylase. Differentiation was similar when MASC had been expanded for 40 or >90 PDs. Q-RT-PCR, performed as described in Example 1, confirmed expression of neuroectodermal markers: on day 2 MASC expressed *otx1* and *otx2* mRNA, and after 7 days nestin mRNA was detected.

The effect of fibroblast growth factor (FGF)-8b as a differentiation factor was tested next. This is important *in vivo* for midbrain development and used *in vitro* to induce dopaminergic and serotonergic neurons from murine ES cells on hMASC. When confluent hMASC (n=8) were cultured with 10 ng/mL FGF-8b + EGF, differentiation into cells staining positive for neuronal markers but not oligodendrocytes and astrocytes was seen. Neurons had characteristics of GABAergic (GABA⁺; 40±4%), dopaminergic (DOPA, TH, DCC and DTP⁺, 26±5%) and serotonergic (TrH, serotonin and serotonin-transporter⁺, 34±6%) neurons. DOPA⁺ neurons stained with Abs against Nurrl suggesting differentiation to midbrain DA neurons. FGF-8b induced neurons did not have electrophysiological

WO 02/064748

PCT/US02/04652

30

characteristics of mature neurons. Therefore, cocultured cells from 3-week old FGF-8b supported cultures with the glioblastoma cell line, U-87, and FGF-8b for an additional 2-3 weeks.

Neurons acquired a more mature morphology with increased cell size and number, length and complexity of the neurites, and acquired electrophysiological characteristics of mature neurons (a transient inward current, blocked reversibly by 1 μ M tetrodotoxin (TTX) together with the transient time course and the voltage-dependent activation of the inward current is typical for voltage-activated sodium currents, found only in mature neurons).

When hMASC (n=13) were cultured with 10 ng/ml brain-derived neurotrophic factor (BDNF) + EGF, differentiation was to exclusively DOPA, TH, DCC, DTP and Nurrl positive neurons. Although BDNF supports neural differentiation from ES cells and NSC (Peault, 1996; Choi *et al.* 1998), no studies have shown exclusive differentiation to DA-like neurons.

Similar results were seen for mMASC induced with bFGF and rMASC with bFGF and BDNF. Further studies on MASC-derived neuronal cells are presented in Example 10.

MASC Differentiation into Endothelial Cells

As an example of mesoderm, differentiation was induced to endothelium. Undifferentiated mMASC or rMASC did not express the endothelial markers CD31, CD62E, Tek or vWF, but expressed low levels of Flk1. mMASC or rMASC were cultured in FN-coated wells with 10 ng/mL of the endothelial differentiation factor VEGF-B. Following treatment with VEGF for 14 days, >90% of MASC, irrespective of the number of PDs they had undergone, expressed Flt1, CD31, vWF or CD62, consistent with endothelial differentiation. Like primary endothelial cells, MASC-derived endothelial cells formed vascular tubes within 6 hours after replating in Matrigel™.

Similarly, hMASC express Flk1 and Flt1 but not CD34, Muc18 (P1H12), PECAM, E- and P-selectin, CD36, or Tie/Tek. When hMASC 2×10^4 cells/cm² were cultured in serum free medium with 20 ng/mL vascular endothelial growth factor (VEGF), cells expressed CD34, VE-cadherin, VCAM and Muc-18 from day 7 on. On day 14, they also expressed Tie, Tek, Flk1 and Flt1, PECAM, P-selectin and E-selectin, CD36, vWF, and connexin-40. Furthermore, cells could uptake low-

31

density lipoproteins (LDL). Results from the histochemical staining were confirmed by Western blot. To induce vascular tube formation, MASC cultured for 14 days with VEGF were replated on Matrigel™ with 10 ng/mL VEGF-B for 6h. Endothelial differentiation was not seen when hMASC cultured in >2% FCS were used. In addition, when FCS was left in the media during differentiation, no endothelial cells were generated.

At least 1000-fold expansion was obtained when hMASC were sub-cultured, suggesting that endothelial precursors generated from hMASC continue to have significant proliferative potential. Cell expansion was even greater when FCS was added to the cultures after day 7.

When hMASC derived endothelial cells were administered intravenously (I.V.) in NOD-SCI mice who have a human colon-carcinoma implanted under the skin, contribution of the human endothelial cells could be seen to the neovascularization in the tumors. It may therefore be possible to incorporate genetically modified endothelial cells to derive a therapeutic benefit, i.e., to inhibit angiogenesis in for example cancer or to promote it to enhance vascularization in limbs or other organs such as the heart. Further studies on MASC-derived endothelial cells are presented in Example 9.

MASC Differentiation into Endoderm

Whether mMASC or rMASC could differentiate to endodermal cells was tested. A number of different culture conditions were tested including culture with the differentiation factors keratinocyte growth factor (KGF), hepatocyte growth factor (HGF) and FGF-4, either on laminin, collagen, FN or Matrigel™ coated wells. When re-plated on Matrigel™ with 10 ng/mL FGF4 + 10 ng/mL HGF, approximately 70% of MASC acquired morphologic and phenotypic characteristics of hepatocyte-like cells. Cells became epithelioid, approximately 10% of cells became binucleated, and about 70% of cells stained positive for albumin, cytokeratin (CK)-18, and HNF-1P.

Endodermal-like cells generated in FGF4 and HGF containing cultures also had functional characteristics of hepatocytes, determined by measuring urea levels in supernatants of undifferentiated MASC and FGF4 and HGF-induced MASC using the Sigma Urea Nitrogen Kit 640 according to the manufacturer's recommendations.. No urea was detected in undifferentiated MASC cultures. Urea production was 10

WO 02/064748

PCT/US02/04652

32

µg/cell/hr 14 days after adding FGF4 and HGF and remained detectable at similar levels until day 25. This is comparable to primary rat hepatocytes grown in monolayer. Presence of albumin together with urea production supports the notion of hepatic differentiation from MASC *in vitro*. Further studies on MASC-derived hepatocytes are presented in Example 11.

Given the likely existence of an endodermal lineage precursor cell, MASC likely give rise to a cell that forms various cells in the liver in the pancreas both exocrine and endocrine components and other endodermal derived cell tissue lineages.

MASC derived from muscle or brain were induced to differentiate to mesoderm (endothelial cells), neuroectoderm (astrocytes and neurons) and endoderm (hepatocyte-like cells) using the methods described above for BM-derived MASC.

Transduction

To demonstrate that differentiated cells were single cell derived and MASC are indeed "clonal" multipotent cells, cultures were made in which MASC had been transduced with a retroviral vector and undifferentiated cells and their progeny were found to have the retrovirus inserted in the same site in the genome.

Studies were done using two independently derived ROSA26 MASC, two C57BL/6 MASC and one rMASC population expanded for 40 to >90PDs, as well as with the eGFP transduced "clonal" mouse and "clonal" rMASC. No differences were seen between eGFP transduced and untransduced cells. Of note, eGFP expression persisted in differentiated MASC.

Specifically, murine and rat BMMNC cultured on FN with EGF, PDGF-BB and LIF for three weeks were transduced on two sequential days with an eGFP oncoretroviral vector. Afterwards, CD45⁺ and G1yA⁺ cells were depleted and cells sub-cultured at 10 cells/well. eGFP-transduced rat BMMNC were expanded for 85 PDs. Alternatively, mouse MASC expanded for 80 PDS were used. Subcultures of undifferentiated MASC were generated by plating 100 MASC from cultures maintained for 75 PDs and re-expanding them to > 5x10⁶ cells. Expanded MASC were induced to differentiate *in vitro* to endothelium, neuroectoderm and endoderm. Lineage differentiation was shown by staining with antibodies specific for these cell types, as described in Example 4.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

33

Single cell origin of mesodermal and neuroectodermal progeny

To prove single cell origin of mesodermal and neuroectodermal differentiated progeny retroviral marking was used (Jordan *et al.*, 1990; Nolta *et al.*, 1996). A fraction of hMASC obtained after 20 PDs was transduced with an MFG-eGFP retrovirus. eGFP⁺ hMASC were diluted in non-transduced MASC from the same donors to obtain a final concentration of ~5% transduced cells. These mixtures were plated at 100 cells/well and culture expanded until $>2 \times 10^7$ cells were obtained. 5×10^6 MASC each were induced to differentiate to skeletal myoblasts, endothelium and neuroectodermal lineages. After 14 days under differentiation conditions, cells were harvested and used to identify the retroviral integration site and co-expression of eGFP and neuroectodermal, muscle and endothelial markers.

For myoblast differentiation, hMASC were plated at 2×10^4 cells/cm² in 2% FCS, EGF and PDGF containing expansion medium and treated with 3 μ M 5-azacytidine in the same medium for 24h. Afterwards, cells were maintained in expansion medium with 2% FCS, EGF and PDGF-BB. For endothelial differentiation, hMASC were replated at 2×10^4 cells/cm² in serum-free expansion medium without EGF and PDGF but with 10 ng/ml VEGF-B for 14 days.

Immunofluorescence evaluation showed that 5-10% of cells in cultures induced to differentiate with 5-azacytidine stained positive for eGFP and skeletal actin, 5-10% of cells induced to differentiate to endothelium costained for eGFP and vWF, and 5-10% of cells induced to differentiate to neuroectoderm costained for eGFP and either NF-200, GFAP or MBP. To define the retroviral insertion site, the host genomic flanking region in MASC and differentiated progeny was sequenced. The number of retroviral inserts in the different populations was between one and seven. As shown in Table 2, a single, identical sequence flanking the retroviral insert in muscle, endothelium and neuroectodermal cells in population A16 that mapped to chromosome 7 was identified.

Table 2: Single cell origin of endothelium, muscle and neuroectodermal cells

	Sequence: 3'-LTR-<i>cgaatt</i>
Clone A16 (Chrom. 7)	TAG CGGCCGCTTG AATTCGAACG CGAGACTACT GTGACTCACA CT
5- Azacytidine	TAG CGGCCGCTTG AATTCGAACG CGAGACTACT GTGACTCACA CT
VEGF	TAG CGGCCGCTTG AATTCGAACG CGAGACTACT GTGACTCACA CT
bFGF	TAG CGGCCGCTTG AATTCGAACG CGAGACTACT GTGACTCACA CT
Clone A12- A (Chrom. 9)	ATTATA TTCTAGTTTAT TTGTGTTTGGG GCAGACGAGG
5- Azacytidine	ATTATA TTCTAGTTTAT TTGTGTTTGGG GCAGACGAGG
VEGF	ATTATA TTCTAGTTTAT TTGTGTTTGGG GCAGACGAGG
bFGF	ATTATA TTCTAGTTTAT TTGTGTTTGGG GCAGACGAGG
Clone A12- A (Chrom. 12)	TCCTGTCTCA TTCAAGCCAC ATCAGTTACA TCTGCATTTT
5- Azacytidine	TCCTGTCTCA TTCAAGCCAC ATCAGTTACA TCTGCATTTT
VEGF	TCCTGTCTCA TTCAAGCCAC ATCAGTTACA TCTGCATTTT
bFGF	TCCTGTCTCA TTCAAGCCAC ATCAGTTACA TCTGCATTTT

- Primers specific for the 3' LTR were designed and for the flanking genomic sequence are shown in Table 3 and using Real-time PCR, it was confirmed that the retroviral insert site was identical in undifferentiated and differentiated cells. These results proved that the flanking sequence and the eGFP DNA sequence was present in similar quantities. Clone A12 contained two retroviral inserts, located on chromosome 1 and 7 respectively, and both flanking sequences could be detected not only in hMASC but also muscle, endothelium and neuroectodermal lineages. To determine whether this represented progeny of a single cell with two retroviral integrants or progeny of two cells, Real-Time PCR was used to compare the relative amount of the chromosome 1 and 7 flanking sequence to eGFP. It was found that similar amounts of both flanking regions were present in hMASC, muscle, endothelium and neuroectodermal cells, suggesting that a single cell with two retroviral inserts was likely responsible for the eGFP positive hMASC and differentiated progeny. In the other populations containing 3 or more retroviral

WO 02/064748

PCT/US02/04652

35

inserts we were not able to determine whether the inserts were due to multiple insertion sites in a single cells or multiple cells contributing to the eGFP positive fraction. Nevertheless, our finding that in 2 populations, progeny differentiated into muscle, endothelium and neuroectoderm are derived from a single BM derived progenitor cell definitively proves for the first time that primitive cells can be cultured from BM that differentiate at the single cell level in cells of mesodermal lineage as well as the three different lineages of the neuroectoderm.

Table 3: Flanking regions and primers

Clone	Genomic sequence
Rat flanking sequence	<u>GATCCTTGGGAGGGTCTCCTCAGATTGATTGACTGCCACCT</u> CGGGGGTCTTTCAAAGTAACCTCAAAGAAGAATGGGTGTGTAGTTAT TAAACGGTCTTAAAGTTTGGTTTGGGAATCACAGTAACAACCT <u>CACATCACAACTCCAATCGTCCGTGAAA</u>
Mouse flanking sequence	<u>GATCCTTGGGAGGGTCTCCTCAGATTGATTGACTGCCATAAGTTA</u> TAAGCTGGCATGACTGTGTGCTAAGGACACTGGTGAAAGC

10 **Bold:** MSCV LTR; **Bold and underlined:** MSCV LTR primer used for Q-PCR
Italics and underlined: Flanking sequence primers used for Q-PCR.

Example 6. Homing and Engraftment of Mammalian MASC into Numerous Organs in the Body

15 mMASC were tested to determine whether they had the ability to engraft and differentiate *in vivo* into tissue specific cells. mMASC were grown as described in Example 1 from a LacZ transgenic C57 Black 6, R0SA 26 mouse. 10^6 mMASC from the LacZ mouse were I.V. injected into NOD-SCID mice tail veins with or without 250 Rads of total body radiation 4-6 hrs prior to the injection. The animals
20 were sacrificed by cervical dislocation at 4-24 weeks after the injections.

Tissue Harvest

Blood and bone marrow: 0.5-1 ml of blood was obtained at the time animals were sacrificed. BM was collected by flushing femurs and tibias. For phenotyping, red cells in blood and BM were depleted using ice cold ammonium chloride (Stem
25 Cell Technologies Inc., Vancouver, Canada) and 10^5 cells used for cytospin centrifugation. For serial transplantation, 5×10^7 cells from 2 femurs and 2 tibias were transplanted into individual secondary recipients via tail vein injection. Secondary recipients were sacrificed after 7-10 weeks.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

36

Solid organs: Lungs were inflated with 1 ml 1:4 dilution of OCT compound (Sakura-Finetek Inc, USA) in PBS. Specimens of spleen, liver, lung, intestine, skeletal muscle, myocardium, kidney and brain of the recipient animals were harvested and cryopreserved in OCT at -80°C and in RNA Later (Ambion Inc.,

5 Austin, TX, USA) at -20°C for quantitative PCR.

mMASC engraft and differentiate in tissue specific cells *in vivo*

Engraftment of the β -gal/neomycin (NEO) transgene-containing cells (Zambrowicz *et al.*, 1997) was tested by immunohistochemistry for β -gal and by Q-PCR for NEO. Immunohistochemistry and Q-PCR were performed as described in

10 Examples 5 and 1 respectively. Primers are listed in Table 1.

Engraftment, defined as detection of >1% anti- β -gal cells, was seen in hematopoietic tissues (blood, BM and spleen) as well as epithelium of lung, liver, and intestine of all recipient animals as shown in Table 4 and Fig. 4.

15 **Table 4:** Engraftment levels in NOD-SCID mice transplanted with ROSA26 MASC.

Animal	Time (Weeks)	Engraftment levels (%) determined by immunofluorescence or (Q-PCR)						
		Radiation	Marrow	Blood	Spleen	Liver	Lung	Intestine
1	4	No	2 (1)	2	5	7	4	2
2	5	No	3 (4)	4	5	9	5	3
3	10	No	1	3	3	6	3	2
4	16	No	4	2	3	4	3	4 (4.9)
5	24	No	3	2	3	6	4	1
6	8	Yes	8 (8)	6	4	5	2 (1.1)	7
7	8	yes	10	8	7 (7.3)	4	6	8
8	8	Yes	5	8	3	5	5	6
9	8	Yes	7	5	5	6	4	6
10	10	Yes	5 (6)	7	9 (12.5)	5	2	8
11	11	Yes	8	8	6	5	3	10 (11.9)
12	11	Yes	6	5	4	8 (6.2)	10 (12.3)	8
SR-1	7	Yes	6	7	5	1 (1.7)	5	8
SR-2	10	Yes	5	4	8	3	4	6

WO 02/064748

PCT/US02/04652

37

β -gal⁺ cells in BM (Fig. 4B-F) and spleen (Fig. 4H-I) co-labeled with anti-CD45, anti-CD19, anti-Mac1, anti-Gr1 and anti-TER119 Abs. Similar results were seen for peripheral blood. Of note, no β -gal⁺CD3⁺ T cells were seen in either blood, BM or spleen even though β -gal⁺CD3⁺ T-cells were seen in chimeric mice. The reason for this is currently not known.

Engraftment in the spleen occurred mostly as clusters of donor cells, consistent with the hypothesis that when MASC home to the spleen, they proliferate locally and differentiate to form a colony of donor cells, similar to CFU-S. It is not believed that differentiation of mMASC into hematopoietic cells *in vivo* can be attributed to contamination of the mMASC with HSC. First, BMMNC are depleted of CD45 cells by column selection before mMASC cultures are initiated. Second, early mesodermal or hematopoietic transcription factors, including brachyury (Robertson *et al.*, 2000), GATA-2 and GATA-1 (Weiss *et al.*, 1995), are not expressed in undifferentiated mMASC, as shown by cDNA array analysis. Third, the culture conditions used for mMASC are not supportive for HCS. Fourth all attempts at inducing hematopoietic differentiation from hMASC *in vitro*, by co-culturing hMASC with hematopoietic supportive feeders and cytokines, have been unsuccessful (Reyes *et al.*, 2001).

Significant levels of mMASC engraftment were also seen in liver, intestine and lung. Triple-color immunohistochemistry was used to identify epithelial (CK⁺) and hematopoietic (CD45⁺) cells in the same tissue sections of the liver, intestine and lung. In the liver, β -gal⁺ donor-derived cells formed cords of hepatocytes (CK18⁺CD45⁺ or albumin⁺), occupying about 5-10% of a given 5 μ m section (Fig. 4K-M). Several CK18⁺CD45⁺ β -gal⁺ hematopoietic cells of recipient origin were distinctly identified from the epithelial cells. Albumin⁺ β -gal⁺ and CK18⁺ β -gal⁺ cells engrafted in cords of hepatocytes surrounding portal tracts, a pattern seen in hepatic regeneration from hepatic stem cells and oval cells (Alison *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 1999). This and the fact that only 5/20 sections contained donor cells, is consistent with the notion that stem cells engraft in some but not all areas of the liver, where they proliferate and differentiate into hepatocytes.

Engraftment in the intestine was also consistent with what is known about intestinal epithelial stem cells. In the gut, each crypt contains a population of 4-5 long-lived stem cells (Potten, 1998). Progeny of these stem cells undergo several

WO 02/064748

PCT/US02/04652

38

rounds of division in the middle and upper portions of crypts and give rise to epithelial cells that migrate upwards, out of the crypt, onto adjacent villi. Donor derived, β -gal⁺panCK⁺CD45⁺ epithelial cells entirely covered several villi (Fig. 4O-P). In some villi, β -gal⁺panCK⁺CD45⁺ cells constituted only 50% of the circumference (solid arrows, Fig. 4P) suggesting engraftment in one but not both crypts. Several β -gal⁺panCK⁺ cells were distinctly seen in the core of intestinal villi (open arrow, Fig. 4O). These cells co-stained for CD45 (Fig. 4P), indicating that they were donor-derived hematopoietic cells. In the lung, the majority of donor cells gave rise to β -gal⁺panCK⁺CD45⁺ alveolar epithelial cells whereas, most hematopoietic cells were of recipient-origin (panCK⁺CD45⁺ β -gal⁻) (Fig. 4R).

Levels of engraftment detected by immunohistochemistry were concordant with levels determined by Q-PCR for NEO (Table 4). Engraftment levels were similar in animals analyzed after 4 to 24 weeks following I.V. injection of MASC (Table 4).

No contribution was seen to skeletal or cardiac muscle. In contrast to epithelial tissues and the hematopoietic system, little to no cell turnover is seen in skeletal or cardiac muscle in the absence of tissue injury. Therefore, one may not expect significant contribution of stem cells to these tissues. However, engraftment was not found in skin and kidney, two organs in which epithelial cells undergo rapid turnover. It is shown in the blastocyst injection experiments (Example 8) that mMASC can differentiate into these cell types; one possible explanation for the lack of engraftment in these organs in post-natal recipients is that mMASC do not home to these organs, a hypothesis that is currently being evaluated. Although mMASC differentiated into neuroectoderm-like cells *ex vivo*, no significant engraftment of mMASC was seen in the brain, and rare donor cells found in the brain did not co-label with neuroectodermal markers. Two recent publications demonstrated that donor derived cells with neuroectodermal characteristics can be detected in the brain of animals that underwent BM transplantation. However, a fully ablative preparative regimen prior to transplantation or transplantation in newborn animals was used, conditions associated with break-down of the blood-brain barrier. Cells were infused in non-irradiated adult animals, or animals treated with low dose radiation, where the blood-brain barrier is intact or only minimally damaged. This may explain the lack of mMASC engraftment in the CNS.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

39

Confluent MASC do not differentiate *in vivo*

As control, ROSA26-MASC were infused and grown to confluence prior injection. MASC allowed to become confluent lose their ability to differentiate *ex vivo* in cells outside of the mesoderm, and behave like classical MSC (Reyes, M. *et al.* 2001). Infusion of 10^6 confluent mMASC did not yield significant levels of donor cell engraftment. Although few β -gal⁺ cells were seen in BM, these cells did not co-label with anti-CD45 Abs, indicating that MSC may engraft in tissues, but are no longer able to differentiate into tissue specific cells in response to local cues.

MASC derived cells in bone marrow of mice can be serially transferred

BM from mouse engrafted with ROSA26 MASC was tested to determine whether they contained cells that would engraft in secondary recipients. 1.5×10^7 BM cells, recovered from primary recipients 11 weeks after I.V. infusion of mMASC, were transferred to secondary irradiated NOD-SCID recipients (Table 4: animal SR-1 and SR-2). After 7 and 10 weeks, secondary recipients were sacrificed, and blood, BM, spleen, liver, lung and intestines of the recipient animal were analyzed for engraftment of ROSA26 donor cells by immunohistochemistry and Q-PCR for the NEO gene. A similar pattern of engraftment was seen in secondary recipients as in the primary recipients. Four-8% of BM, spleen and PB cells were β -gal⁺CD45⁺; six and 8% of intestinal epithelial cells were β -gal⁺pan-CK⁺, and 4 and 5% of lung epithelial cells were β -gal⁺pan-CK⁺. Levels of engraftment in the liver of secondary recipients were lower than in the primary recipients (1 and 3% vs. 5 and 8% β -gal⁺CK18⁺). This suggests that mMASC may persist in the BM of the primary recipient and differentiate into hematopoietic cells as well as epithelial cells when transferred to a second recipient.

MASC derived cells can produce insulin *in vivo*. MASC from ROSA26 mice were injected into irradiated NOD-SCID mice as described herein. The resulting MASC derived cells co-stain for LacZ and insulin in a model of streptozotocin-induced diabetes.

Summary

One of the critical questions in "stem cell plasticity" is whether the engrafted and differentiated donor mMASC are functional. The results described herein show that one animal developed a lymphoma in thymus and spleen after 16 weeks, as is commonly seen in aging NOD-SCID mice (Prochazka *et al.*, 1992). Phenotypic

40

analysis showed that this B-cell lymphoma was host-derived: CD19⁺ cells were β -gal⁺. Approximately 40% of CD45⁺vWF⁺ cells in the vasculature of the tumor stained with anti- β -gal Abs, indicating that neoangiogenesis in the tumor was in part derived from donor mMASC (Fig. 4T). This suggests that MASC give rise to

5 functioning progeny *in vivo*. Likewise, higher levels of mMASC engraftment and differentiation in radiosensitive organs, such as the hematopoietic system and intestinal epithelium (Table 4, $p < 0.001$), following low dose irradiation suggests that mMASC may contribute functionally to host tissues.

These results showed that mammalian MASC can be purified, expanded *ex vivo*, and infused I.V., homed to various sites in the body, engraft into numerous

10 organs, and that the cells are alive in these various organs one month or longer. Such donor cells, undifferentiated, and differentiated progeny are found, by virtue of the fluorescent marker, in organs including, but not limited to, the BM, spleen, liver and lung. These cells can be used to repopulate one or more compartment(s) to

15 augment or restore cell or organ function.

Example 7. Demonstration of *in vitro* Hematopoiesis and Erythropoiesis

MASC from, human BM differentiate at the single cell level into neuroectodermal, endodermal and many mesodermal lineages, including endothelial cells. Because endothelium and blood are very closely related in ontogeny, it can be

20 hypothesized that MASC can differentiate into hematopoietic cells. eGFP transduced human MASC, that are GlyA, CD45 and CD34 negative (n=20), were cocultured with the mouse yolk sac mesodermal cell line, YSM5, as suspension cell aggregates for 6 days in serum free medium supplemented with 10 ng/mL bFGF and VEGF. After six days, only eGFP⁺ cells (i.e., MASC progeny) remained and YSM5

25 cells had died.

Remaining cells were transferred to methylcellulose cultures containing 10% fetal calf serum supplemented with 10 ng/mL bone morphogenic protein (BMP)4, VEGF, bFGF, stem cell factor (SCF), Flt3L, hyper IL6, thrombopoietin (TPO), and erythropoietin (EPO) for 2 weeks. In these cultures, both adherent eGFP⁺ cells and

30 small, round non-adherent cells, which formed many colonies attached to the adherent cells were detected. The non-adherent and adherent fractions were collected separately and cultured in 10%FCS containing medium with 10 ng/mL VEGF and bFGF for 7 days. Adherent cells stained positive for vWF, formed

41

vascular tubes when plated on ECM, and were able to uptake a-LDL, indicating their endothelial nature. 5-50% of the non-adherent cells stained positive for human specific GlyA and HLA-class I by flow cytometry. Gly-A⁺/HLA-class-I⁺ cells were selected by FACS. On Wright -Giemsa, these cells exhibited the characteristic morphology and staining pattern of primitive erythroblasts. Cells were benzidine⁺ and human Hb⁺ by immunoperoxidase. By RT-PCR these cells expressed human specific Hb-e, but not Hb-a.

When replated in methylcellulose assay with 20%FCS and EPO, small erythroid colonies were seen after 10 days, and 100% of these colonies stained positive for human specific GlyA and Hb. As selection of MASC depends on the depletion of CD45⁺ and Gly A⁺ cells from BM, and cultured MASC are CD45⁻ and GlyA⁺ at all times examined using both FACS and cDNA array analysis, contamination of MASC with hematopoietic cells is very unlikely.

Example 8. *In vivo* proof of the Multipotent Nature of MASC as Shown by Multiple Organ Chimerism following Blastocyst Injections of the Cells

Important for therapeutic applications of these cells is the ability of MASC to proliferate and differentiate into the appropriate cell types *in vivo*. Up until this point the only cells that should be capable of contributing to the full constellation of tissues and organs in the body are ES cells. In order to analyze whether MASC could show the full capability of ES cells, they were assayed to determine their contribution to the formation of various tissues by introducing them into the early blastocyst and observing the fate of their progeny.

MASC were generated from marrow of ROSA26 mice that are transgenic for the β -galactosidase (β -gal) gene (Rafii, S., *et al.* 1994, Blood. 84:10-13) and expanded as described in Example 1. One or 10-12 ROSA26 MASC obtained after 55-65 PDs were microinjected into 88 and 40 3.5-day C57BL/6 blastocysts, respectively. Blastocysts (8/mother) were transferred to 16 foster mothers and mice allowed to develop and be born as shown in Table 5.

Table 5: Degree of chimerism following MASC injection in blastocyst

MASC/ blastocyst	Litters born	Total # pups born	NEO positive by Q-PCR				
			0%	1-10%	10-20%	20-40%	>40%
10-12	4/11	22	5/22 (23%)	13/22 (59%)	2/22 (9%)	1/22 (4.5%)	1/22 (4.5%)
1	3/5	15	8/15 (53%)	5/15 (33%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	2/15 (13%)

Seven litters were born, in line with the birth rate seen in other studies during this period. The number of mice per litter varied between 1 and 8, for a total of 37 mice. Animals born from microinjected blastocysts were of similar size as normal animals and did not display any overt abnormalities.

After four weeks, animals were evaluated for chimerism by clipping their tails and assessing the contribution of β -gal/NEO transgene containing cells to the tails by Q-PCR for NEO. Percent chimerism was determined by comparing the number of NEO copies in test samples with that in tissue from ROSA26 mice according to manufacturer's recommendations (7700 ABI PRISM Detector Software 1.6). Chimerism could be detected in 70% of mice derived from blastocysts in which 10 to 12 MASC had been injected and 50% of mice derived from blastocysts microinjected with 1 MASC (Table 5). The degree of chimerism ranged between 0.1 % to >45%. After 6 to 20 weeks, animals were sacrificed. Some mice were frozen in liquid nitrogen and thin sections were cut as described. Whole-mouse sections were stained with X-Gal. One thousand sets of digital images covering completely each section were then assembled to create a composite image of each whole-mouse section. In a representative non-chimeric animal (by Q-PCR for NEO) derived from a blastocyst in which a single MASC was injected, no X-Gal staining was seen. In contrast, the animal was 45% chimeric by R-PCR for NEO by tail clip analysis and had contribution of a single ROSA26-derived MASC to all somatic tissues.

For other animals, multiple organs were harvested and analyzed for the presence of MASC derived cells by X-GAL staining, staining with an anti- β -gal-FITC antibody, and Q-PCR for NEO. Animals that had NEO⁺ cells in tail-clippings had contribution of the ROSA26-derived MASC in all tissues, including the brain,

WO 02/064748

PCT/US02/04652

43

retina, lung, cardiac and skeletal muscle, liver, intestine, kidney, spleen, BM, blood, and skin as shown by X-GAL staining and staining with an anti- β -gal-FITC antibody.

Chimerism was detected by X-Gal staining and anti- β -gal staining in the animals generated from blastocysts microinjected with ROSA26 MASC. β -gal⁺ cells expressed markers typical for the tissue in which they had incorporated. β -gal⁺ cells co-stained with anti- β -gal⁺ FITC and anti-NF200 or GFAP and TOPRO3 (observed at 20X magnification) for NF200 and GFAP in the central nervous system and for dystrophin in the skeletal muscle. Lung tissue was stained for anti- β -gal-FITC and pan-CK in alveoli and bronchi (also TOPRO3) (observed at 20X magnification). Skeletal muscle was stained with anti- β -gal-FITC, dystrophin-PE, and TOPRO3 was observed at 20X magnification. Heart was stained with anti- β -gal-FITC and cardiac troponin-I-Cy3, TOPRO3 was observed at 20X magnification. Liver was stained with anti- β -gal-FITC and pan-CK-PE and TOPRO3 (was observed with 40X magnification and 10X magnification). Intestine was stained with anti- β -gal-FITC, pan-CK-PE, and TOPRO3 was observed at 20X magnification. Kidney was stained with anti- β -gal-FITC (glomerulus, tubulus) was observed at 20X magnification. Marrow staining was observed with anti- β -gal-FITC and CD45-PE, GR1-PE and MAC1-PE. Spleen staining was observed with anti- β -gal-FITC and CD45-PE, CD3-PE and CD 19-PE. Levels of engraftment estimated by Q-PCR for NEO were concordant with those estimated by X-GAL and anti- β -gal-FITC staining.

Summary

These data demonstrate for the first time that BM derived single MASC integrate into the developing mouse, giving rise to cells of various fates, and contributing to the generation of all tissues and organs of the three germ layers of the mouse. As all live animals, irrespective of the degree of chimerism, had normal functioning organs, these studies also suggest that MASC can differentiate *in vivo* in functional cells of the three germ layers. Whether MASC contribute to germ cells, when injected in a blastocyst or when injected postnatally, has not yet been tested.

Example 9. Origin of Endothelial Progenitors

Vasculogenesis, the *in situ* differentiation of primitive endothelial progenitors, termed angioblasts, into endothelial cells that aggregate into a primary

capillary plexus is responsible for the development of the vascular system during embryogenesis (Hirashima *et al.*, 1999). In contrast, angiogenesis, defined as the formation of new blood vessels by a process of sprouting from preexisting vessels, occurs both during development and in postnatal life (Holash *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001). Until recently, it was thought that blood vessel formation in post-natal life was mediated by sprouting of endothelial cells from existing vessels. However, recent studies have suggested that endothelial "stem cells" may persist into adult life, where they contribute to the formation of new blood vessels (Peichev *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Gehling *et al.*, 2000; Asahara *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1998), suggesting that like during development neoangiogenesis in the adult may at least in part depend on a process of vasculogenesis. Precursors for endothelial cells have been isolated from BM and peripheral blood (Peichev *et al.*, 2000; Watt *et al.*, 1995). The ontogeny of these endothelial progenitors is unknown.

During development, endothelial cells are derived from mesoderm. The VEGF receptor 2, Flk1, characterizes the hemangioblasts, a bipotent stem cell found in the aorto-gonad-mesonephros region (Medvinsky *et al.*, 1996; Fong *et al.*, 1999; Peault, 1996) and in fetal liver (Fong *et al.*, 1999), and commitment of embryoid bodies to hemangioblasts is accompanied with expression of Flk1 (Choi *et al.*, 1998; Choi, 1998). Whether hemangioblasts persist in adult life is not known, and only HSC and endothelial progenitors have been documented. Like hemangioblasts, endothelial progenitors express Flk1 (Peichev *et al.*, 2000) and one report suggested that HSC in post-natal life express Flk1 (Ziegler *et al.*, 1999). During embryology, commitment of the hemangioblast to the endothelial lineage is characterized by the sequential expression of VE-cadherin, CD31, and shortly afterwards CD34 (Nishikawa *et al.*, 1998; Yamashita *et al.*, 2000). In post-natal life, endothelial progenitors have been selected from BM and blood using Abs against AC133, Flk1, CD34, and the HIP12 Ab (Peichev *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Gehling *et al.*, 2000). AC133 has also been found on other cells, including NSCs (Uchida *et al.*, 2000) and gastrointestinal epithelial cells (Corbeil *et al.*, 2000). Upon differentiation to mature endothelium, the AC133 receptor is quickly lost (Peichev *et al.*, 2000; Gehling *et al.*, 2000). Another receptor found on circulating endothelial cells is a mucin, MUC18, recognized by the HIP12 Ab (Lin *et al.*, 2000). MUC18 is lost upon differentiation of endothelial progenitors to endothelium. CD34 is

45

expressed on endothelial progenitors, as well as on hematopoietic progenitors (Peichev *et al.*, 2000; Baumhueter *et al.*, 1994) and hepatic oval cells (Crosby *et al.*, 2001). This antigen is also lost upon differentiation of endothelial progenitors to endothelium. Most mature endothelial cells, but microvascular endothelial cells, no longer express CD34.

It is described here for the first time, the *in vitro* generation of vast numbers of endothelial cells that engraft *in vivo* and contribute to neoangiogenesis from a MASC. MASC can be culture expanded for >80 PDs and endothelial cells generated from MASC can be expanded for at least and additional 20 PDs. MASC may therefore be an ideal source of endothelial cells for clinical therapies. In addition, as MASC are ontogenically less mature than the "angioblast", this model should be useful to characterize endothelial commitment and differentiation.

hMASC differentiate into cells with phenotypic characteristics of endothelium

MASC were obtained and cultured as described in Example 3. To induce endothelial differentiation, MASC were replated at 2×10^4 cells/cm² in FN-coated wells in serum-free expansion medium without EGF and PDGF-BB but with 10 ng/mL VEGF. In some instances, FCS was added. Cultures were maintained by media exchange every 4-5 days. In some instances, cells were subcultured after day 9 at a 1:4 dilution under the same culture conditions for 20+ PDs.

In order to define endothelial differentiation from MASC more extensively, FACS and immunohistochemical analysis of cells after 3-18 days was performed. Expression of Flk1 and Flt1 on undifferentiated MASC was low, was maximal at day 9, and persisted until day 18. VE-cadherin, present on BM or blood endothelial progenitors (Peichev *et al.*, 2000; Nishikawa *et al.*, 1998), was not expressed on undifferentiated MASC, but was expressed after 3 days of culture with VEGF and persisted until day 18. MASC expressed low levels of AC133, found on endothelial as well as hematopoietic progenitors (Peichev *et al.*, 2000; Gehling *et al.*, 2000) but was no longer detectable after day 3. CD34, present on endothelial and hematopoietic progenitors (Peichev *et al.*, 2000; Asahara *et al.*, 1997; Rafii *et al.*, 1994), was not present on undifferentiated MASC (Fig. 4A) but was expressed from day 9 until day 18. The mucin, MUC18, recognized by the Ab HIP12 has been used to purify endothelial progenitors from blood (Lin *et al.*, 2000). Although MASC did

not stain with H1P12 MASC treated with VEGF for 9 days stained positive, but expression was lost by day 18.

The endothelium specific integrin, $\alpha v\beta 3$, (Eliceiri *et al.*, 2000) was not present on undifferentiated MASC, whereas $\alpha v\beta 5$ was expressed at very low levels.

5 Expression of integrins increased progressively during differentiation and was maximal by day 14 (Fig. 5). The tyrosine kinase receptors, Tie and Tek, important for angiogenesis but not endothelial cell differentiation (Partanen *et al.*, 1999), were not expressed on MASC. Expression of Tek could be seen after day 3 and Tie after day 7 (Fig. 6). MASC also do not express vWF, but vWF was expressed from day 9 on (Rosenberg *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1982). More mature endothelial markers, 10 including CD31, CD36, CD62-P (Tedder *et al.*, 1995) (Fig. 7), and the adhesion junction proteins ZO-1, β -catenin, and γ -catenin (Fig. 5) were detected after day 14 (Li *et al.*, 1990; Van Rijen *et al.*, 1997; Petzelbauer *et al.*, 2000). VCAM or CD62-E were not expressed at high level at any time point during differentiation, unless 15 endothelium was activated with IL-1 α , as described below. Differentiation to endothelium was associated with acquisition of $\beta 2$ -microglobulin and low levels of HLA-class I antigens, but not HLA-class II.

It has been reported previously, that endothelial differentiation can only be obtained from MASC expanded with 2% FCS or less, but not when expanded with 20 10% FCS (Reyes *et al.*, 2001) as higher concentrations of FCS supports growth of classical MSC that differentiate only into osteoblasts, chondroblasts and adipocytes (Reyes *et al.*, 2001; Pittenger *et al.*, 1999). When FCS was present during the initial 7 days of differentiation, endothelial differentiation could not be induced. When non-confluent MASC ($\leq 1 \times 10^4$ cells/cm²) were induced to differentiate, endothelial 25 was not seen. When MASC were subcultured 9-days after exposure to VEGF using serum free medium with 10 ng/mL VEGF, cells could undergo at least an additional 12 PDs. When 10% FCS and 10 ng/mL VEGF was added to the medium for subculturing, MASC-derived endothelial cells could undergo an additional 20+ PDs, irrespective of the number of PDs that MASC had undergone.

30 Compared with undifferentiated MASC, endothelial cells were larger, and had a lower nuclear/cytoplasm ratio. Results were similar when MASC were used from cultures that had undergone 20 (n=30) or 50+ (n=25) PDs.

Functional characteristics of MASC-derived endothelium

It was tested whether VEGF-induced differentiated progeny of hMASC had functional characteristics of endothelial cells. Endothelial cells respond to hypoxia by upregulating expression of VEGF as well as the VEGF receptors Flk1 and the angiogenesis receptors, Tie-1 and Tek (Kourembanas *et al.*, 1998). hMASC and hMASC-derived endothelial cells were incubated at 37°C in 20% or 10% O₂ for 24h. Cells were stained with Abs against Flk1, Flt1, Tek and IgG control, fixed in 2% paraformaldehyde and analyzed by flow cytometry. In addition, VEGF concentrations in the culture supernatants was measured using an ELISA kit (AP biotech, Piscataway, NJ). MASC-derived endothelial cells and undifferentiated MASC were exposed to hypoxic conditions for 24h.

Expression of Flk1 and Tek was significantly increased on MASC-derived endothelial cells exposed to hypoxia (Fig. 7), while the levels of these receptors remained unchanged on undifferentiated MASC. In addition, levels of VEGF in culture supernatants of hypoxic endothelial cultures was increased by 4 fold (Fig. 7B) whereas VEGF levels in MASC cultures exposed to hypoxia remained unchanged.

It was next tested whether MASC-derived endothelial cells would upregulate expression of HLA-antigens and cell adhesion ligands in response to inflammatory cytokines, such as IL-1 α (Meager, 1999; Steeber *et al.*, 2001). 10⁶ MASC and MASC-derived endothelial cells were incubated with 75 ng/ml IL-1 α (R&D Systems) in serum-free medium for 24h. Cells were fixed in 2% paraformaldehyde and stained with Abs against HLA-class I, class II, β 2-microglobulin, vWF, CD31, VCAM, CD62E and CD62P, or control Abs, and analyzed using a FACScalibur (Becton Dickinson).

Significantly increased levels of HLA-Class I and II, β 2-microglobulin, VCAM, ECAM, CD62E, CD62P were seen by FACS analysis (Fig. 7C) on endothelial cells. In contrast, on undifferentiated MASC only upregulation of Flk1 was seen.

Another characteristic of endothelial cells is that they take up LDL (Steinberg *et al.*, 1985). This was tested by incubating MASC induced to differentiate with VEGF for 2, 3, 5, 7, 9, 12 and 15 and 21 with LDL-dil-acil. The dil-Ac-LDL staining kit was purchased from Biomedical Technologies (Stoughton,

WO 02/064748

PCT/US02/04652

48

MA). The assay was performed as per manufacture's recommendations. Cells were co-labeled either with anti-Tek, -Tie-1 or -vWF Abs. After 3 days, expression of Tek was detected but no uptake of a-LDL. After 7 days, cells expressed Tie-1, but did not take up significant amounts of a-LDL. However, acquisition of expression of vWF on day 9 was associated with uptake of aLDL (Fig. 6B).

Endothelial cells contain vWF stored in Weibel Pallade bodies that is released *in vivo* when endothelium is activated (Wagner *et al.*, 1982). This can be induced *in vitro* by stimulating cells with histamine (Rosenberg *et al.*, 1998), which also results in activation of the cell cytoskeleton (Vischer *et al.*, 2000). MASC-derived endothelial cells were plated at high confluency (10^4 cells/cm²) in FN-coated chamber slides. After 24h, cells were treated with 10 μ M histamine (Sigma) in serum free medium for 25min. and stained with Abs against vWF and myosin. Untreated and treated cells were fixed with methanol at -20°C for 2 min, stained with Abs against vWF and myosin, and analyzed using fluorescence and/or confocal microscopy. vWF was present throughout the cytoplasm of untreated endothelial cells. Cytoplasm of endothelial cells treated with histamine contained significantly less vWF and vWF was only detectable in the perinuclear region, likely representing vWF present in the endoplasmic reticulum (Fig. 6A). Histamine treatment caused widening of gap junctions and cytoskeletal changes with increased numbers of myosin stress fibers (Fig. 6A).

Finally, endothelial cells were tested to determine if they could form "vascular tubes" when plated on Matrigel™ or extracellular matrix (ECM) (Haralabopoulos *et al.*, 1997). 0.5 ml extracellular matrix (Sigma) was added per well of a 24 well plate, incubated for 3h at 37°C. 10^4 MASC and MASC-derived endothelial cells were added per well in 0.5 ml of serum free plus VEGF medium and incubated at 37°C. As shown in Fig. 6C, culture of MASC derived endothelial cells on ECM resulted in vascular tube formation within 6 hours.

hMASC-derived endothelial cells contribute to tumor-angiogenesis *in vivo*

A breeding colony of NOD-SCID mice was established from mice obtained from the Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Mice were kept in specific pathogen free conditions and maintained on acidified water and autoclaved food. Trimethoprim 60 mg and sulphamethoxazole 300 mg (Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, NJ) per 100 ml water was given twice weekly.

49

Three Lewis lung carcinoma spheroids were implanted subcutaneously in the shoulder. 3 and 5 days after implantation of the tumor, mice were injected with 0.25×10^6 human MASC-derived endothelial cells or human foreskin fibroblasts via tail vein injection. After 14 days, animals were sacrificed, tumors removed and cryopreserved using OTC compound (Santura Finetek USA Inc, Torrance, CA) at -80°C . In addition, the ears that were clipped to tag the mouse were also removed and cryopreserved using OTC compound at -80°C . Five μm thick sections of the tissues were mounted on glass slides and were fixed and stained as described below.

Computer-aided analysis of length and number of branches counted on five sections of each tumor showed that tumors in mice that received human MASC-derived endothelial cells had a 1.45 ± 0.04 fold greater vascular mass than tumors in control mice that did with anti-human- $\beta 2$ -microglobulin or HLA-Class I Abs, combined with anti-mouse-anti-CD31 Abs and anti-vWF, anti-Tek or anti-Tie-1 Abs, which recognize both human and mouse endothelial cells. These initial studies showed that some blood vessels in the tumor contained anti-human- $\beta 2$ -microglobulin or HLA-Class I positive cells that co-labeled for either vWF, Tie or Tek, but not with mouse-CD31, indicating that human MASC-derived endothelial cells contributed to tumor neoangiogenesis *in vivo*.

To better address the degree of contribution, 35 sequential 5 μm slides were obtained and were stained in an alternate fashion with either anti-human $\beta 2$ -microglobulin-FITC or anti-mouse-CD31-Cy5 and anti-vWF-Cy3. All slides were examined by confocal microscopy. The different figures were then assembled in 3-D to determine the relative contribution of human and murine endothelial cells to the tumor vessels. When tumors obtained from animals injected with human-MASC derived endothelial cells were analyzed approximately 35% of the tumor vessels were positive for anti-human $\beta 2$ -microglobulin as well as vWF whereas approximately 40% of endothelial cells stained positive with anti-mouse CD31 Abs (Fig. 8A-G). Tumors in animals that did not receive endothelial cells or received human fibroblasts did not contain endothelial cells that stained positive with the anti- $\beta 2$ -microglobulin or anti-HLA-class-I Abs.

MASC-derived endothelial cells were also analyzed whether they contribute to wound healing angiogenesis. The area of the ear that had been clipped to tag the mouse was then examined. Neoangiogenesis in the ear wounds was in part derived

WO 02/064748

PCT/US02/04652

50

from the MASC derived endothelial cells. Similar to blood vessels in the tumor the percent human endothelial cells present in the healed skin wound was 30-45% (Fig. 9H).

Undifferentiated hMASC differentiate in endothelial cells *in vivo*

5 10^6 undifferentiated MASC were injected I.V. in 6-week old NOD-SCID mice. Animals were maintained for 12 weeks and then sacrificed. In one animal, a thymic tumor was detected, which is commonly seen in aging NOD-SCID mice (Prochazka *et al.*, 1992). The thymus was removed and cryopreserved in OTC compound at -80°C. Ten μ m thick sections of the tissues were mounted on glass
10 slides and were fixed and stained as described below.

 All hematopoietic cells stained positive for mouse CD45 but not human CD45, indicating that they were murine in origin. The tumor was then stained with an anti-human β 2-microglobulin-FITC Ab and an anti-vWF-Cy3 Ab that recognizes both human and mouse endothelial cells. Approximately 12% of the vasculature
15 was derived from hMASC (Fig. 9I). These studies further confirmed that the hematopoietic elements were not of human origin, as no human β 2-microglobulin was detected outside of the vascular structures.

Immunohistochemistry and Data Analysis

In vitro cultures: Undifferentiated MASC or MASC induced to differentiate
20 to endothelium for 2-18 days, plated in FN coated chamber slides were fixed with 2% paraformaldehyde (Sigma) for 4 min at room temperature. For cytoskeleton staining chamber slides were fixed with methanol for 2 min at -20°C. For intracellular ligands, cells were permeabilized with 0.1 Triton-X (Sigma) for 10min and incubated sequentially for 30h in each with primary antibody (Ab), and FITC,
25 PE or Cy5 coupled anti-mouse-, goat- or rabbit-IgG Ab. Between each step, slides were washed with PBS+1%BSA. Primary Abs against CD31, CD34, CD36, CD44, HLA-class I and -II, β 2-microglobulin were used at a 1:50 dilution. Primary Abs against VCAM, ICAM, VE-cadherin, selectins, HIP12, ZO-1, connexin-40, connexin-43, MUC18, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_5\beta_3$, B-catenin and γ -catenin (Chemicon) and Tek, Tie,
30 vWF (Santa Cruz) were used at a 1:50 dilution. Stress fibers were stained with Abs against myosin (light chain 20kD, clone no. MY-21; 1:200). Secondary Abs were purchased from Sigma and used at the following dilutions: anti-goat IgG-Cy-3 (1:40), anti-goat IgG-FITC (1:160), anti-mouse IgG-Cy-3 (1:150) and anti-mouse

WO 02/064748

PCT/US02/04652

51

IgG-FITC (1:320), anti-rabbit-FITC (1:160) and anti-rabbit-Cy-3 (1:30). TOPRO-3 was purchased from Sigma. Cells were examined by fluorescence microscopy using a Zeiss Axiovert scope (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY) as well as by confocal fluorescence microscopy using a Confocal 1024 microscope (Olympus AX70, Olympus Optical Co. LTD, Japan).

Tumors or normal tissue: The tissue was sliced using a cryostat in 5-10 μ m thick slices. Slices were fixed with acetone for 10 min at room temperature and permeabilized with 0.1 Triton X for 5 min. Slides were incubated overnight for vWF, Tie or Tek, followed by secondary incubation with FITC, PE or Cy5 coupled anti-mouse-, goat- or rabbit-IgG Abs and sequential incubation with Abs against mouse CD45-PE or human CD45-FITC, human β 2-microglobulin-FITC, mouse CD31-FITC or TOPRO-3 for 60min. Between each step, slides were washed with PBS + 1% BSA. Slides were examined by fluorescence microscopy using a Zeiss Axiovert scope as well as by confocal fluorescence microscopy using a Confocal 1024 microscope. 3D-reconstruction consisted of the collection of sequential 0.5 μ m confocal photos from 35 slides of 5 μ m thick to a total of 350 photos. Slides were stained with vWF-Cy3 and alternately double stained with human β 2-microglobulin-FITC or mouse CD31-FITC. The photos from each slide were aligned with the next slide in Metamorph software (Universal Imaging Corp) and the 3D reconstruction was made in 3D Doctor Software (Able software Corp).

Volume of relative contribution of human (green) and murine endothelial cells (false colored as blue) to the 3D vessel was calculated as cubic pixels of each color. The area of each color was also calculated as square pixels in 4 vessels through the 35 slides to obtain an accurate percentage of contribution. The area of each color was also calculated in alternate slides of four different tumors.

Summary

The central finding of this study is that cells that co-purify with MSC from BM have the ability to differentiate to endothelial cells that have *in vitro* functional characteristics indistinguishable from mature endothelial cells. It is also shown that such endothelial cells contribute to neoangiogenesis *in vivo* in the setting of wound healing and tumorigenesis, and that undifferentiated MASC can respond to local cues *in vivo* to differentiate into endothelial cells contributing to tumor angiogenesis. As the same cell that differentiates to endothelium also differentiates to other

mesodermal cell types, as well as cells of non-mesodermal origin, the cell defined here precedes the angioblast, and even the hemangioblast in ontogeny.

It has also been shown that MASC differentiate into cells that express markers of endothelial cells, but proved that VEGF induced MASC function like
5 endothelial cells. Endothelial cells modify lipoproteins during transport in the artery wall (Adams *et al.*, 2000). Endothelial cells maintain a permeability barrier through intercellular junctions that widen when exposed to hemodynamic forces or vasoactive agents, such as histamine (Rosenberg *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1990; Van Rijen *et al.*, 1997; Vischer *et al.*, 2000). Endothelial cells release prothrombotic
10 molecules such as vWF, tissue factor, and plasminogen activator inhibitor to prevent bleeding (Vischer *et al.*, 2000), and regulate egress of leukocytes by changing expression levels of adhesion molecules in response to inflammation (Meager, 1999; Steeber *et al.*, 2001). Endothelium also reacts to hypoxia by producing VEGF and expressing VEGF receptor aimed at increasing vascular density (Kourembanas *et al.*, 1998). Therefore it has been demonstrated that endothelial cells generated from
15 MASC can perform all of these tasks when tested *in vitro*.

Finally it has been proved that *in vitro* generated MASC-derived endothelial cells respond to angiogenic stimuli by migrating to the tumor site and contributing to tumor vascularization as well as wound healing *in vivo*. This finding confirms that
20 endothelial cells generated from MASC have all the functional characteristics of mature endothelium. The degree of contribution of endothelial cells to tumor angiogenesis and neo-angiogenesis was 35-45%, levels similar to what has been described for other sources of endothelial cells (Conway *et al.*, 2001; Ribatti *et al.*, 2001). In addition, it has been found that angiogenic stimuli *in vivo* provided in a
25 tumor microenvironment are sufficient to recruit MASC to the tumor bed and induce their differentiation into endothelial cells that contribute to the tumor vasculature. These studies therefore extend studies reported by other groups demonstrating that cells present in marrow can contribute to new blood vessel formation (Peichev *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Gehling *et al.*, 2000; Asahara *et al.*, 1997), in a process
30 similar to vasculogenesis, precursor responsible for this process has been identified the. This is to our knowledge the first report that identifies a cell present in post-natal BM as a very early progenitor for endothelial cells.

Example 10. Derivation of Neurons

Single adult BM-derived hMASC or mMASC were tested to determine whether they can differentiate *ex vivo* to functional neurons, as well astrocytes and oligodendrocytes aside from mesodermal cell types. mMASC and hMASC were selected and culture expanded as previously described in Examples 1 and 3, respectively. Human neural progenitor cells (hNPC) were purchased from Clonetics (San Diego, CA). hNPC were cultured and differentiated per manufactures' recommendations.

Electrophysiology: Standard whole-cell patch-clamp recording was used to examine the physiological properties of MASC-derived neurons. Voltage-clamp and current-clamp recordings were obtained using a Dagan 3900A patch-clamp amplifier (Dagan Corporation, Minneapolis) which was retrofitted with a Dagan 3911 expander unit. Patch pipettes, made from borosilicate glass, were pulled on a Narishige pipette puller (model PP-83), and polished using a Narishige microforge (model MF-83). Patch pipettes were filled with an intracellular saline consisting of (in mM) 142.0 KF, 7.0 Na₂SO₄, 3.0 MgSO₄, 1.0 CaCl₂, 5.0 HEPES, 11.0 EGTA, 1.0 glutathione, 2.0 glucose, 1.0 ATP (magnesium salt), 0.5 GTP (sodium salt). For most recordings, the fluorescent dye 5,6-carboxyfluorescein (0.5 mM; Eastman Kodak Chemicals) was also added to the pipette solution to confirm visually, using fluorescence microscopy, that the whole-cell patch recording configuration had been achieved. Pipette resistances ranged from 11 to 24 Mohm. The standard extracellular recording saline was comprised of the following (in mM): 155 NaCl, 5.0 KCl, CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 10 HEPES, 5 glucose. For some experiments 1 μ M TTX was added to the standard control solution. The pH of the intracellular and extracellular recording solutions was adjusted to 7.4 and 7.8, respectively, using NaOH. All chemicals were from Sigma. PClamp 8.0 (Axon Instruments, Foster City) was used to run experiments, and to collect and store data. The data presented were corrected for a 8.4 mV liquid junctional potential, which was calculated using the JPCALC software package. Off-line analyses and graphical representations of the data were constructed using Clampfit 8.0 (Axon Instruments, Foster City) and Prism (Graphpad, San Diego).

Transduction: Retroviral supernatant was produced by incubating MFG-eGFP-containing PG13 cells, provided by Dr. G. Wagemaker, U. of Rotterdam,

WO 02/064748

PCT/US02/04652

54

Netherlands (Bierhuizen *et al.*, 1997), with MASC expansion medium for 48h, filtered and frozen at -80°C. MASC were incubated with retroviral supernatants and 8 µg/ml protamine (Sigma) for 6h. This was repeated 24h later. Transduction efficiency was analyzed by FACS.

- 5 Gene microarray analysis: RNA was isolated from hMASC, bFGF or FGF-8b+EGF induced cells using the RNeasy mini kit (Qiagen), digested with DNase I (Promega) at 37°C for 1h and re-purified using the RNeasy. The [³²P] dATP labeled cDNA probe, generated according to the manufacturers recommendations, was hybridized to the Human Neurobiology Atlas Array (Clontech # 7736-1, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) at 68°C for 18-20h, followed by 4 washes in 2x
10 SSC, 1% SDS at 68°C for 30min each time, 0.1x SSC, 0.5% SDS at 68°C for 30 min, and once in 2x SSC at room temperature for 5 min. The arrays were read by a phosphorimager screen scanner (Molecular Dynamics, Storm 860) and analyzed using Atlas Image 1.0 (Clontech). Differences between undifferentiated and
15 differentiated cells greater than 2-fold were considered significant.

- PCR analysis for retroviral insert: PCR was used to amplify the flanking sequence 3' from the 3' LTR of the MFG vector in the human genomic DNA. DNA from 10⁶ MASC or endothelial, myoblast or neuroectodermal differentiated progeny was prepared from cells by standard methods. 300 ng of genomic DNA was
20 digested with *AscI* and a splinkerette linker was ligated to the 5' end (Devon R. S. *et al.*, 1995). The two oligonucleotides used for the splinkerette linker were as follows: aattTAGCGGCCGCTTGAATTtttttgcacaaa, (the hairpin loop forming sequence is in lower case and the upper case is the reverse complement of the second splinkerette oligo), and agtgtgagtcacagtagctcgcgttc
25 gAATTAAGCGGCCGCTA, (the underlined sequence is also the sequence of the linker-specific primer (LS Primer) used for the PCR and RT steps). A 5'-biotin-T7 coupled primer was used that recognizes a sequence in the eGFP gene [Biotin-ggc-cag-tga-att-gta-ata-cga-ctc-act-ata-ggc-tgg-CAC-ATG-GTC-CTG-CTG-GAG-TTC-GTG-AC; underlined portion shows the minimum promoter sequence needed for efficient *in vitro* transcription and the upper case is the eGFP specific sequence] and
30 LS primer to amplify the flanking regions for 10 rounds using Advantage 2 polymerase (Clontech). The biotin labeled amplified product was captured using streptavidin-magnetic beads (Streptavidin Magnetic Particles; Roche) and the

WO 02/064748

PCT/US02/04652

55

resultant product was further amplified using the T7 RNA polymerase an approximately 1,000 fold and then DNAase I treated. The resultant product was reverse transcribed using the agtgtgagtcacagtagtctcgcgttc splinkerette primer according to the superscript II protocol (Gibco), and subsequently amplified by 30 rounds of nested PCR using the primer for the 3'LTR [ggc caa gaa cag atg gaa cag ctg aat atg]. The flanking sequence in the human genome from endothelium, muscle, and neuroectodermal differentiated cells and undifferentiated MASC was sequenced.

To demonstrate that the same insertion site was present in multiple differentiated progeny, specific primers were generated in the host-flanking genome. Real time PCR amplification (ABI PRISM 7700, Perkin Elmer/Applied Biosystems) was used to quantitate the flanking sequence compared to the eGFP sequence. Reaction conditions for amplification were as follows: 40 cycles of a two step PCR (95°C for 15 sec, 60°C for 60 sec) after initial denaturation (95°C for 10 min.) with 2 µl of DNA solution, 1X TaqMan SYBR GreenUniversal Mix (Perkin Elmer/Applied Biosystems) PCR reaction buffer. Primers used were as follows: Clone A16: LTR primer = CCA-ATA-AAC-CCT-CTT-GCA-GTT-G; Flanking sequence chromosome 7 = TCC-TGC-CAC-CAG-AAA-TAA-CC; Clone A 12 chromosome 7 sequence: LTR primer = GGA-GGG-TCT-CCT-CTG-AGT-GAT-T, Flanking sequence = CAG-TGG-CCA-GAT-CTC-ATC-TCA-C; Clone A12 chromosome 1 sequence: LTR = GGA-GGG-TCT-CCT-CTG-AGT-GAT-T; Flanking sequence = GCA-GAC-GAG-GTA-GGC-ACT-TG. The relative amount of the flanking sequence was calculated in comparison with eGFP sequence according to manufacturer's recommendations using the 7700 ABI PRISM Detector Software 1.6.

Neural transplantation: Newborn (P1-P3) male Sprague Dawley rats (Charles River Laboratories) were used in this study. The rats were anaesthetized by cryoanesthesia. The cranium was immobilized using a modified stereotaxic head holder and the scalp reflected to expose the skull. hMASC were harvested with 0.25% trypsin/EDTA, washed twice, and resuspended in PBS. The viability of the hMASC was more than 85%. A 2 µl volume of hMASC suspended in phosphate buffered saline at a concentration of 0.7×10^4 cells/µl was stereotactically injected intracerebroventricularly with a tapered glass micropipette attached to a Hamilton syringe using the following coordinates (mm from bregma): AP -0.6, ML 0.8, DV

WO 02/064748

PCT/US02/04652

56

2.1, toothbar was set at -1. Following the injections, the scalp was sutured and the pups allowed to recover.

Four and 12 weeks after transplantation, the rats were anaesthetized with chloral hydrate (350mg/kg, i.p.), decapitated the brains removed, frozen in powered dry ice, and stored at -80°C. Fresh frozen brains were sectioned using a cryostat and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min immediately before staining. Sections were incubated for one hour at room temperature with blocking/permeabilization solution consisting of 2% normal donkey serum (Jackson Immuno Labs) and 0.3% triton X. Primary and secondary antibodies were diluted in the same blocking/permeabilization solution for subsequent steps. Primary antibodies (mouse anti human nuclei (1:25), anti human nuclear membrane (1:25) and anti NeuN (1:200) from Chemicon; rabbit anti GFAP (1:250) from DAKO, rabbit anti NF200 (1:300) from Sigma were incubated overnight at 4°C, rinsed 3x10 minutes each in PBS and followed by secondary Cy3 (1:200) anti and FITC (1:100) antibodies (all from Jackson Immuno Labs) for two hours at room temperature. Slides were examined by fluorescence microscopy using a Zeiss Axiovert scope as well as by confocal fluorescence microscopy using a Confocal 1024 microscope.

hMASC acquire a neuron, astrocyte and oligodendrocyte phenotype when cultured with bFGF.

Neuroectodermal differentiation was done as described in Example 5. Briefly, cells were cultured in FN-coated chamberslides or culture plates with serum-free medium consisting of 60% DMEM-LG, 40% MCDB-201 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO), supplemented with 1X ITS, 1X LA-BSA, 10^{-8} M dexamethasone, 10^{-4} M ascorbic acid 2-phosphate (AA) (all from Sigma), 100 U penicillin and 1,000 U streptomycin (Gibco). In some cultures, we added 100ng/mL bFGF whereas in other cultures 10 ng/mL EGF + 10 ng/mL FGF-8b were added (all from R&D Systems). Cells were not subcultured, but media was exchanged every 3-5 days.

Two weeks after re-plating with bFGF, 26±4% of cells expressed astrocyte (GFAP+), 28±3% oligodendrocyte (MBP+) and 46±5% neuron (NF200+) markers as shown in Table 6.

Table 6: Differentiation markers on bFGF and FGF-8b induced hMSC

	bFGF (day 7)	bFGF (day 14)	bFGF (day 21)	FGF-8b (day 7)	FGF-8b (day 14)	FGF-8b (day 21)
GFAP	36±4%	26±4%	0	0	0	0
MBP	35±3%	28±3%	4±2%	0	0	0
GalC	30±x%	26±5%	8±3%	0	0	0
Nestin	35±6%	6±3%	Not tested	90±10%	10±6%	Not tested
Neuro-D	20±2%	0%	Not tested	50±6%	Not tested	Not tested
Tuj1	30±3%	23±5%	23±2%	88±5%	92±3%	98±2%
PSA-NCAM	33±2%	16±3%	Not tested	40±7%	Not tested	Not tested
NF68	0	26±7%	22±3%	0	20±3%	Not tested
NF160	0	46±5%	50±3%	0	65±3%	Not tested
NF200	0	15±2%	22±5%	0	75±8%	92±6%
NSE	0	40±4%	82±5%	0	78±3%	80±8%
MAP2-AB	0	40±6%	80±2%	0	95±4%	95±3%
Tau	0	28±2%	78±7%	0	93±2%	92±4%
GABA	0	0	0	0	39±4%	40±2%
Parvalbumin	0	0	0	0	28±6%	35±3%
TH	0	0	0	20±5%	23±5%	25±6%
DCC	0	0	0	0	25±6%	28±2%
DTP	0	0	0	0	35±7%	38±3%
TrH	0	0	0	0	26±6%	25±4%
Serotonin	0	0	0	0	30±5%	35±3%
Nurr1	0	0	0	0	20±4%	23±2%
c-ret	0	0	0	0	33±3%	35±5%

- When hMSC were replated at higher cell densities (2×10^4 cells/cm²) to induce differentiation, no cells with neuroectodermal phenotype could be detected,
- 5 suggesting that cell-cell interactions prevent bFGF-induced neuroectodermal differentiation.
- The distribution of astrocyte-, oligodendrocyte- and neuron-like cells did not differ when differentiation was induced with hMSC that had undergone 20 or 60 PDs. However, when hMSC expanded for 20 PDs were cultured with bFGF,
- 10 >50% of cells died while >70% of hMSC culture expanded for >30 PDs survived and acquired a neuron-, astrocyte- or oligodendrocyte-like phenotype. This suggests that not all hMSC can be induced to acquire neural characteristics but that a subpopulation of hMSC that survives long-term *in vitro* may be responsible for neuronal differentiation. It has been shown that the karyotype of hMSC is normal
- 15 irrespective of culture duration (Reyes *et al.*, 2001). Differentiation of hMSC into neuroectodermal-like cells is therefore not likely due to transformation of MSC following long-term culture.
- Most astrocyte- and oligodendrocyte-like cells died after 3 weeks.
- Progressive maturation of neuron-like cells was seen throughout culture. After 1
- 20 week, bFGF treated hMSC stained positive for NeuroD, Nestin, polysialated

58

neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM), and tubulin- β -III (TuJ1) (Table 6).

After 2 weeks, bFGF treated cells stained positive for NF68, -160, and -200, NSE, MAP2-AB, and Tau. bFGF-induced neurons did not express markers of GABA-

5 ergic, serotonergic or dopaminergic neurons, but expressed glutamate as well as the glutamate-receptors-5, -6 and -7 and N-methyl-D-aspartate (NMDA)-receptor, and Na⁺-gated voltage channels.

Further confirmation of neuroectodermal differentiation was obtained from cDNA array analysis of two independent hMASC populations induced to differentiate for 14 days with 100 ng/mL bFGF. Expression levels of nestin, otx 1

10 increase in mRNA for nestin was detected, GFAP, glutamate-receptors 4, 5, and 6, and glutamate, and several sodium-gated voltage channels, but did not detect increases in TH or TrH mRNA levels. A >2 fold increase in mRNA levels was also found for mammalian achaete-scute homolog 1 (MASH 1) mRNA, a transcription factor found only in brain (Franco Del Arno *et al.*, 1993) and ephrin-A5 mRNA (O'Leary and Wilkinson, 1999). The astrocyte specific markers GFAP and S100A5, and oligodendrocyte specific markers, myelin-oligodendrocyte glycoprotein precursor and myelin protein zero (PMZ), as well as Huntingtin, and major prion protein precursor mRNA were expressed >2-fold higher after exposure to bFGF. A greater than 2 fold increase was also seen for several glycine receptors, GABA-

20 receptors, the hydroxytryptophan receptor-A and neuronal acetylcholine receptor, glycine transporter proteins, synaptobrevin and synaptosomal-associated protein (SNAP)25. Finally, bFGF induced expression of BDNF and glia-derived neurotrophic factor (GDNF).

25 Like hMASC, mMASC acquire a neuron, astrocyte and oligodendrocyte phenotype when cultured with bFGF.

MASC derived from other species was tested to determine whether similar results could be obtained. mMASC expanded for 40-90 PDs were replated at 10⁴ cells/cm² in conditions identical to those used for hMASC. After 14 days, mMASC acquired morphologic and phenotypic characteristics of astrocytes (GFAP⁺), oligodendrocytes (MBP⁺) and neurons (NF-200⁺, NSE⁺ and Tau). NF200 and GFAP or MBP were never found in the same cell. In contrast to undifferentiated

30

WO 02/064748

PCT/US02/04652

59

mMASC, mMASC treated with bFGF were significantly larger and extended processes for $>40\ \mu\text{m}$.

To determine whether neuron-like cells had functional characteristics of neurons, and if bFGF-induced cells showed evidence of voltage-gated Na^+ currents a patch clamp was used. No sodium currents or fast spiking behavior was seen in any of the mMASC derived neuron-like cells ($n=59$), even though some cells expressed calcium currents, and in 4 cells there was evidence of spiking behavior mediated by calcium currents. Thus, bFGF induced cells did not have functional voltage-gated Na^+ currents, despite expression of sodium-gated voltage channel mRNA and protein.

hMASC acquire a midbrain dopaminergic, serotonergic and GABAergic phenotype when cultured with EGF and FGF-8b.

FGF-8b, expressed at the mid-hindbrain boundary and by the rostral forebrain, induces differentiation of dopaminergic neurons in midbrain and forebrain and serotonergic neurons in the hindbrain (Ye *et al.*, 1998). *In vitro*, FGF-8b has been used to induce dopaminergic and serotonergic neurons from murine ES cells (Lee *et al.*, 2000).

hMASC ($n=8$), expanded = for 20 to 60 PDs, were replated at 2×10^4 cells/ cm^2 on FN in serum free medium with ITS and AA and with 10 ng/mL FGF-8b and 10 ng/mL EGF. More than 80% of cells survived for 3 weeks. FGF-8b and EGF induced differentiation into cells staining positive for neuronal markers (Table 6) (day 7: PSA-NCAM, Nestin and TuJ1; day 14: NF-68, NF-160, NF-200; and day 21: MAP2-AB, NSE, Tau, and Na^+ -gated voltage channels) but not oligodendrocytes and astrocytes. In contrast to our observation for bFGF induced differentiation, cells plated at 10^4 cells/ cm^2 with EGF and FGF-8b did not lead to differentiation. After 2-3 weeks, cells had characteristics of GABAergic (GABA^+ , parvalbumin $^+$), dopaminergic (TH^+ , DCC^+ , and DTP^+) and serotonergic (TrH^+ and serotonin $^+$) neurons (Table 6). Cells also expressed the GABA-A-receptor and glutamate receptors. Cells with a dopaminergic phenotype also stained positive with Abs against the nuclear transcription factor, Nurr1, expressed only in midbrain dopaminergic neurons (Saucedo-Cardenas *et al.*, 1998) as well as the proto-oncogene cRet, a membrane-associated receptor protein tyrosine kinase, which is a component of the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) receptor

WO 02/064748

PCT/US02/04652

60

complex expressed on dopaminergic neurons (Trupp *et al.*, 1996). This suggests that FGF-8b induces a phenotype consistent with midbrain dopaminergic neurons.

Again, results from immunohistochemical studies were confirmed by cDNA array analysis on hMASC induced to differentiate for 14 days with FGF-8b+EGF.

- 5 Consistent with the immunohistochemical characterization, a >2 fold increase in mRNA for TH, TrH, glutamate, several glutamate-receptors, and sodium-gated voltage channels was detected. As parvalbumin and GABA are not present on the array, their expression could not be confirmed by mRNA analysis. Consistent with the almost exclusive neural differentiation seen by immunohistochemistry, there was
- 10 no increase in expression of GFAP, S100A5 mRNA nor mRNA for the oligodendrocyte specific marker, PMZ. FGF-8b+EGF induced cells expressed >2 fold more tyrosine kinase receptor (Trk)A, BDNF and GDNF, several glycine-, GABA-and hydroxytryptamine-receptors, and several synaptic proteins.
- Coculture with the glioblastoma cell line U87 enhances neuron maturation.

- 15 Irrespective of the culture conditions used, hMASC-derived neurons did not survive more than 3-4 weeks in culture. As neither culture contained glial cells after 3 weeks, it is possible that neuronal cells that express both glutamate and glutamate-receptors died due to glutamate toxicity (Anderson and Swanson, 2000).
- Alternatively, factors required for neural cell survival, differentiation and maturation
- 20 provided by glial cells might not be present in the cultures (Blondel *et al.*, 2000; Daadi and Weiss, 1999; Wagner *et al.*, 1999). To test this hypothesis, cells from 3-week old FGF-8b+EGF cultures were cocultured with the glioblastoma cell line, U-87, in serum-free medium supplemented with FGF-8b+EGF for an additional 2 weeks.

- 25 The glioma cell line, U-87, [American Tissue Cell Collection (Rockville, MD)] was maintained in DMEM+10% FCS (Hyclone Laboratories, Logan, UT). Cells from 3-week old FGF-8b+EGF containing cultures were labeled with the lipophilic dye, PKH26 (Sigma), as per manufacturer's recommendations. Labeled cells were replated in FN coated chamber slides in FGF-8b+EGF containing serum
- 30 free medium together with 1,000 U-87 cells and maintained an additional 2-3 weeks with media changes every 3-5 days. To assure that PKH26 present in MASC-derived cells did not transfer to the U-87 cell line, U-87 cells were cultured in BSA-

WO 02/064748

PCT/US02/04652

61

containing medium and 20 μ l PKH26 dye for 7 days. No labeling of glioma cells was detected.

Under these serum-free conditions, U-87 cells ceased to proliferate but survived. hMASC derived neurons were labeled with the membrane dye, PKH26, prior to coculture with U-87 cells to allow us to identify the hMASC-derived cells by fluorescence microscopy. FGF-8b+EGF induced neurons cocultured after 3 weeks with U-87 cells and the same cytokines survived for at least 2 additional weeks. Neurons acquired a more mature morphology with increased cell size as well increased number, length and complexity of the neurites.

The electrophysiological characteristics of PKH26 labeled neural cells derived from hMASC after coculture with U-87 cells by whole-cell current clamp and voltage-clamp after current-injection was evaluated (Fig. 9B). Current-clamp demonstrated spiking behavior in response to injected current in 4/8 of PKH26 labeled hMASC-derived cells present in FGF-8b+EGF/U-87 cultures. The resting membrane potential of spiking and non-spiking cells was -64.9 ± 5.5 mV and -29.7 ± 12.4 mV, respectively. For each cell studied, input resistance of spiking and non-spiking cells was 194.3 (37.3) and 216.3 (52.5) Mohm, respectively. An example of one of the cells in which we observed spiking behavior is shown in Fig. 9B. The top panel shows a family of voltage traces which was elicited from a spiking cell under control conditions. A DC current was first injected in the cell to hold them in the range of -100 to -120 mV. A current injection protocol, as shown in the middle panel, was then used to drive the membrane potential to different levels. As shown in this example, depolarizing current steps that were sufficiently large to bring the cell to threshold for action potential, evoked a single spike. The lower panel shows that the spiking behavior of the cells could be blocked by 1 μ M TTX, suggesting that the action potentials are mediated by Na-gated voltage channels. Leak-subtracted current records, obtained in voltage-clamp mode from the same cells (Fig. 9C), demonstrated an inward current that was transient in time course and activated at voltages more positive than -58 mV, as well as outward currents. The transient inward current was blocked reversibly by 1 μ M TTX. This pharmacology, together with the transient time course and the voltage-dependent activation of the inward current is typical for voltage-gated Na^+ currents, found only in mature neurons and skeletal muscle cells (Sah *et al.*, 1997; Whittemore *et al.*,

WO 02/064748

PCT/US02/04652

62

1999). Skeletal muscle markers in these neuron-like cells was not detected. These studies suggest that treatment with FGF-8b+EGF and co-culture with glioblastoma cells results in maturation to cells with the fundamental characteristics of excitable neurons, TTX-sensitive voltage-gated Na^+ currents.

5 hMASC transplanted in ventricles of newborn rats differentiate in cells expressing astrocyte and neuronal markers

1.4x10⁴ hMASC were stereotactically injected in the lateral ventricles of P1-P3 Sprague Dawley rats. After 4 and 12 weeks, animals were sacrificed and analyzed for presence of human cells and evidence of differentiation of hMASC to neuroectoderm. Human cells, identified by staining with antibodies against human nuclei or human nuclear membrane could be seen in the SVZ up to 400 μm away from the ventricle in animals analyzed after 4 weeks, and after 12 weeks, human cells could also be seen deeper in the brain parenchyma such as in the hippocampus and along the fornix. Some human cells had typical astrocyte morphology and stained positive with anti-GFAP antibodies, whereas other cells stained positive with anti-Neu-N antibodies, NF-200 and anti-human nuclear membrane antibodies. Triple staining showed that human nuclear antigen positive Neu-N positive cells did not coexpress and GFAP.

Summary

20 The central finding of this work is that single post-natal BM-derived MASC can be induced to differentiate not only into mesodermal cell types but also cells with mature neuronal characteristics, as well as astrocyte and oligodendrocyte characteristics. Time-dependent as well as culture-method-dependent maturation of MASC to cells with neuroectodermal features was shown. Double staining
25 definitively demonstrated that neuronal or glial cells were authentic and results were not due to inappropriately expressed neuronal or glial markers. These results were confirmed at the mRNA level. Retroviral marking studies were used to demonstrate that the neurons, astrocytes and oligodendrocytes were derived from a single MASC that also differentiates into muscle and endothelium, as the sequence of the host cell
30 genomic region flanking the retroviral vector was identical in all lineages. hMASC did not only acquire phenotypic but also electrophysiological characteristics of mature neurons, namely TTX-sensitive voltage-gated Na^+ currents. Finally, it was

WO 02/064748

PCT/US02/04652

63

also shown that MASC can differentiate *in vivo* into cells expressing neuronal and astrocyte markers.

Using retroviral marking of hMASC combined with PCR-based sequencing of the genomic sequence flanking the 3'-LTR of the retroviral insert, it was shown
5 that neurons are derived from the same hMASC that differentiate into astrocytes and oligodendrocytes, as well as into endothelium and muscle (Jordan *et al.*, 1990). This conclusively demonstrates that MASC can, at the single cell level, differentiate to cells of mesodermal and neuroectodermal lineages. The cells with the ability to differentiate not only into mesodermal cell types but also neuroectodermal cell types
10 multipotent adult stem cells, or MASC were re-named. Sanchez-Ramos *et al.* (Sanchez-Ramos *et al.*, 2000) and Woodbury *et al.* (Woodbury *et al.*, 2000) showed that populations of human or rodent MSC can express markers of astrocytes and neurons, but not oligodendrocytes *in vitro*. However, neither study provided evidence that the same cell that acquired neuroectodermal markers could also
15 differentiate into mesodermal cells. Furthermore, neither study showed that cells expressing neuronal markers also acquired functional neuronal characteristics. Thus, although suggestive for neural differentiation, these reports did not conclusively demonstrate neural and glial differentiation from MSC.

It was also shown that hMASC transplanted in the ventricle of newborn rats
20 can migrate in the neurogenic subventricular zone and into the hippocampus where they respond to local cues to differentiate into cells expressing astrocyte and neuronal markers. This model was chosen because migration and differentiation of NSC to specific neuronal phenotypes occurs to a much greater extent when transplantation is done in germinal areas of the brain than in non-neurogenic areas,
25 and when transplants are done in newborn animals compared with adult animals (Bjorklund and Lindvall, 2000; Svendsen and Caldwell, 2000). Although hMASC are multipotent and differentiate into cells outside of the neuroectoderm, hMASC did not form teratomas. The number of cells that had migrated outside the subventricular area was low after 4 weeks, but increased after 12 weeks.

30 The ease with which MASC can be isolated from post-natal BM, expanded and induced to differentiate *in vitro* to astrocytes, oligodendrocytes or neuronal cell types may circumvent one of the key problems in NSC transplantation, namely the availability of suitable donor tissue.

64

Example 11. MASC Differentiation into Hepatocyte-like Cells

During embryogenesis, the first sign of liver morphogenesis is a thickening of the ventral endodermal epithelium, which occurs between e7.5 and e8.5 in the mouse (Zaret K.S., 2001). Little is known about the signals involved in initial
 5 endoderm formation and subsequent endoderm specification. Early in gastrulation (e6-e7) endoderm is not specified, not even in an anterior/posterior direction (Melton D., 1997). However, recent studies showed that *ex vivo* exposure of endoderm to FGF4 posteriorizes the early endoderm, which is now competent to express hepatic markers (Wells J.M. *et al.*, 1999). By e8.5 in the mouse, definitive
 10 endoderm has formed the gut tube and expresses HNF3 β (Zaret K.S., 2000). The foregut endoderm is induced to the hepatocyte lineage by acidic (a)FGF and bFGF, both produced by the adjacent cardiac mesoderm (Zaret K.S., 2001), which are required to induce a hepatic fate and not the default pancreatic fate (Zaret K.S., 2001). Basic morphogenetic proteins (BMP's) produced by the transversum
 15 mesenchyme are also required as they increase levels of the GATA4 transcription factor which promote the ability of endoderm to respond to FGF's (Zaret K.S., 2001). GATA4 and HNF3 β are required for hepatic specification and are important effectors of downstream events leading to hepatocyte differentiation, as they upregulate markers of hepatocyte specific expression such as albumin, among
 20 others.

In most instances, mature hepatocytes can undergo several cell divisions and are responsible for hepatic cell replacement. As a result, there has been great controversy about the existence and function of a liver stem cell. During extensive liver necrosis due to chemical injury or when hepatocytes are treated with chemicals
 25 that block their proliferation, a population of smaller cells with oval shape, termed oval cells, emerges and proliferates (Petersen, B.E., 2001). These oval cells may constitute the "stem cell" compartment in the liver. Oval cells reside in the smallest units of the biliary tree, called the canals of Herring, from where they migrate into the liver parenchyma (Theise N.D., *et al.*, 1999). Oval cells are bi-potential, giving
 30 rise *in vitro* and *in vivo* to both hepatocytes and bile ductular epithelium. Oval cells express several hematopoietic markers such as Thy1.1, CD34, Flt3-receptor, and c-Kit, and also express α FP, CK19, γ -glutamyl-transferase, and OV-6. The origin of

65

oval cells is not known (Petersen, B.E., 2001; Kim T.H. *et al.*, 1997; Petersen, B.E., 2001).

Until recently, it was believed that hepatocytes could only be derived from cells of endodermal origin and their progenitors. However, recent studies suggest that non-endodermal cells may also form hepatocytes *in vivo* and *in vitro* (Petersen, B.E., 2001; Pittenger M.F. *et al.*, 1999). Following bone marrow (BM) transplantation, oval cells are derived from the donor BM (Theise N.D., *et al.*, 1999). Transplantation of enriched hematopoietic stem cells (HSC) in *FAH*^{-/-} mice, an animal model of tyrosinemia type I, resulted in the proliferation of large numbers of donor LacZ⁺ hepatocytes and animals had restored biochemical function of the liver (Lagasse E. *et al.*, 2000). Furthermore, single HSC may not only repopulate the hematopoietic system but also contribute to epithelium of lung, skin, liver and gut (Krause D.S. *et al.*, 2001). Exocrine pancreatic tumor cells treated *in vitro* with dexamethasone (Dex) with or without oncostatin M (OSM) may acquire a hepatocyte phenotype (Shen C.N. *et al.*, 2000). Finally, mouse embryonic stem (ES) cells spontaneously acquire a hepatocyte phenotype, a process that is enhanced by treatment with aFGF, HGF, OSM, and Dex (Hamazaki T. *et al.*, 2001).

It was demonstrated here that single MASC not only differentiate into mesodermal and neuroectodermal cells, but also into cells with morphological, phenotypic and functional characteristics of hepatocytes *in vitro*.
mMASC, rMASC, and hMASC acquire a hepatocyte-like phenotype when cultured with FGF4 and/or HGF.

mMASC, rMASC and hMASC were selected and cultured as described. To determine optimal conditions for MASC differentiation into hepatocyte-like cells, the effect of different extracellular matrix (ECM) components was tested and cytokines known to induce hepatocyte differentiation *in vivo* or from ES cells (Zaret K.S., 2001) on mMASC or rMASC differentiation to hepatocytes. As differentiation requires cell cycle arrest, the effect of cell density was also tested. To demonstrate differentiation to hepatocyte like cells, cells were stained after 14 days with Abs against albumin, CK18, and HNF3 β .

Optimal differentiation of mMASC or rMASC to albumin, CK18 and HNF3 β positive epithelioid cells was seen when MASC were plated at 21.5×10^3 cells/cm² in the presence of 10 ng/ml FGF4 and 20 ng/ml HGF on Matrigel™ as

WO 02/064748

PCT/US02/04652

66

shown in Table 7A. After 14 days, the percent albumin, CK18 and HNF3 β positive epithelioid cells was 61.4 $\pm$ 4.7%, and 17.3% of cells were binucleated. When plated on FN, differentiation to CK18 and HNF3 β positive epithelioid cells was also seen, even though only 53.1 $\pm$ 6.3% of cells stained and fewer (10.9%) binucleated cells

5 were seen.

Culture with either FGF4 or HGF yielded albumin, CK18 and HNF3 β positive epithelioid cells, but the percent albumin, CK18 and HNF3 β positive cells was higher when mMASC or rMASC were treated with both FGF4 and HGF as shown in Table 7A. Addition of aFGF, bFGF, FGF7, BMP's, or OSM did not increase the percent cells positive for hepatocyte markers, while 1% DMSO and 0.1 mM-10 mM Sodium Butyrate did not support differentiation of mMASC or rMASC to cells positive for hepatocyte markers.

When cell densities between 2.5 and 25 $\times 10^3$ cells/cm ^{2} were tested, the highest percent cells with hepatocyte markers was seen in cultures seeded at 21.5 $\times 10^3$ cells/cm ^{2} . No hepatocyte differentiation was seen when cells were plated at <12.5 $\times 10^3$ cells/cm ^{2} .

hMASC were plated at 3-30 $\times 10^3$ cells/cm ^{2} on 10ng/mL FN or 1% Matrigel $^{\text{TM}}$ with aFGF, bFGF, FGF7, 1% DMSO, HGF, and / or FGF4. Only cells treated with 10ng/ml FGF4 alone, 20ng/ml HGF alone, or a combination of both differentiated into epithelioid cells that expressed albumin, CK18 and HNF3 β . hMASC plated at 15-30 $\times 10^3$ cell/cm ^{2} differentiated into epithelioid cells whereas hMASC plated at 3 $\times 10^3$ cell/cm ^{2} died. Like mMASC or rMASC, the percent albumin, CK18 and HNF3 β positive epithelioid cells was higher when hMASC were cultured on Matrigel $^{\text{TM}}$ (91.3% $\pm$ 4.4) than on FN (89.5% $\pm$ 5.4), and the percent binucleated cells was higher on Matrigel $^{\text{TM}}$ (31.3%) than on FN (28.7%) as shown in Table 7B.

Table 7: Optimization of MASC differentiation into hepatocyte like cells.

	A: Mouse and Rat			B: Human		
	FGF-4	HGF	FGF4 +HGF	FGF-4	HGF	FGF-4 +HGF
FN						
Albumin	+/++	+/+	++/++	++++	++++	++++
CK18	++/++	+/+	++/++	++++	++++	++++
HNF3 β	++/++	++/++	+++/++	++++	NT	++++

WO 02/064748

PCT/US02/04652

67

Matrigel™						
Albumin	++/++	+/+	+++/>++	++++	NT	++++
CK18	+/+/+	+/+	+++/>++	++++	NT	++++
HNF3β	+++/>++	+++/>++	+++/>++	++++	NT	++++
Collagen						
Albumin	-	-	-	NT	NT	NT
CK18	-	-	-	NT	NT	NT
HNF3β	-	-	-	NT	NT	NT

- = 0% + = 20%, ++ = 30%, +++ = 40%, ++++ = 60%, +++++ = 80% cells staining positive for specific markers and NT = not tested.

Phenotypic characterization of MASC differentiation to hepatocyte-like cells

- 5 Hepatocyte differentiation was further evaluated over time by immunofluorescence and confocal microscopy for early (HNF3β, GATA4, CK19, αFP) and late (CK18, albumin, HNF1α) markers of hepatocyte differentiation. mMASC or rMASC plated on Matrigel™ with FGF4 and HGF enlarged from 8μm to 15μm diameter as shown in Table 8A. On d21-d28, approximately 60% of cells
- 10 were epithelioid and surrounded by smaller round or spindle shaped cells. Undifferentiated mMASC or rMASC did not express any of the liver specific transcription factors or cytoplasmic markers. After 4 days, cells expressed HNF3β, GATA4 and αFP, low levels of CK19, and very rare cells stained positive for HNF1α, albumin or CK18. At seven days, the large epithelioid cells stained positive
- 15 for HNF3β, GATA4, HNF1α with increasing staining for albumin and CK18. Only rare cells expressed αFP. After 14, 21 and 28 days, the large epithelioid cells stained positive for GATA4, HNF3β, HNF1α, CK18 and albumin, but not αFP or CK19. The smaller cells surrounding the nodules of epithelioid cells stained positive for CK19 and αFP.
- 20 hMASC was plated on Matrigel™ with FGF4 and HGF or FGF4 alone enlarged from 10–12μm to 20–30μm diameter by d21. After 7 days, cells expressed HNF3β, GATA4 and low levels of CK19, while few cells stained positive for albumin or CK18. After 14 and 21 days, >90% of epithelioid cells stained positive

WO 02/064748

PCT/US02/04652

68

for GATA4, HNF3 β , HNF1 α , HNF4, CK18 and albumin, while only rare cells stained positive for α FP or CK19 as shown in Figure 10B.

Table 8: Immunohistochemistry Pattern of Hepatocyte Marker Expression

	A: Mouse and Rat					B: Human				
	D4	D7	D10	D14	D21	D4	D7	D10	D14	D21
HNF3β	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	NT	+	NT	+	+
Gata4	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	NT	+	NT	+	+
α -FP	+/+	+/+	NT/NT	-/-	-/-	NT	+	NT	-	-
HNF1 α	-/-	+/+	NT/NT	+/+	+/+	NT	-	NT	+	+
Albumin	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	NT	+	NT	+	+
CK18	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	NT	-	NT	+	+

5 + = Marker is expressed, - = Marker is not expressed and NT = not tested

Hepatocyte-like cells are derived from the same single hMASC that differentiated into neuroectoderm and endoderm

It has been shown that single mMASC or rMASC differentiate into endothelium, neuroectoderm and CK18 and albumin positive endodermal cells. It has also been shown that single hMASC differentiate into mesoderm and neuroectoderm. The same single hMASC was tested to determine whether they can differentiate into hepatocyte-like cells. MASC were obtained, cultured and expanded as described. For differentiation, mMASC or rMASC were plated at 5-25x10³ cells/cm² on 0.01-10 μ g/ml fibronectin (FN), 0.01-8 μ g/ml collagen (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), or 1% Matrigel™ (Becton-Dickinson) in serum-free medium [60% low glucose DMEM (DMEM-LG; Gibco-BRL, Grand Island, NY), 40% MCDB-201 (Sigma), supplemented with 1X insulin/transferrin/selenium, 4.7 μ g/ml linoleic acid, 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 10⁻⁸ M dexamethasone, 10⁻⁴ M ascorbic acid 2-phosphate (all from Sigma), 100U/ml penicillin, 100/ml U streptomycin (Gibco)], with 2% FCS (Hyclone, Logan Utah) and 10 ng/mL each epidermal growth factor (EGF) (Sigma), leukemia inhibitory factor (LIF; Chemicon, Temecula, CA), and platelet derived growth factor (PDGF-BB; R&D Systems, Minneapolis, MN). hMASC were plated at 15-30x10³ cells/cm² on 0.1 μ g/ml FN, or 1% Matrigel™ in the same medium without LIF (Reyes M., 2002). After 8-12h, media were removed, cells washed twice with phosphate buffered saline (PBS)

WO 02/064748

PCT/US02/04652

69

(Fischer) and cultured in serum-free medium supplemented with 5-50ng/ml HGF, aFGF, bFGF, FGF4, FGF7, or OSM; or 10 mg/ml dimethyl-sulphoxide (DMSO), or 0.1-1mM sodium butyrate.

- Transduction of hMASC with eGFP was performed using an eGFP-cDNA containing retrovirus and expanded to $>5 \times 10^6$ cells. Twenty percent was induced to differentiate into muscle, endothelium, neuroectoderm and endoderm. For clone A16 a single retroviral insertion site was present in undifferentiated MASC as well as mesodermal and neuroectodermal differentiated cells and eGFP⁺ clone A16 MASC differentiated into CK18 and albumin positive cells. The same insertion site was present in FGF4-treated MASC generated from the same cell population (5'-TAG CGGCCGCTTGAATTCGAACGCGAGCTACTGTGACT CACACT-3', Chromosome 7), proving that single hMASC differentiate into endoderm aside from mesoderm and neuroectoderm.

- Quantitative RT-PCR demonstrates that FGF4 and HGF induces hepatocyte specification and differentiation.

- Hepatocyte differentiation by quantitative RT-PCR was confirmed for early (HNF3 β , GATA4, CK19, α FP) and late (CK18, albumin, HNF1 α , cytochrome P450) markers of hepatocyte differentiation. RNA was extracted from 3×10^5 MASC or MASC induced to differentiate to hepatocytes. mRNA was reverse transcribed and cDNA was amplified as follows: 40 cycles of a two step PCR (95°C for 15", 60°C for 60") after initial denaturation (95°C for 10') with 2 μ l of DNA solution, 1X TaqMan SYBR Green Universal Mix PCR reaction buffer using a ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer/Applied Biosystems). Primers used for amplification are listed in Table 9.

- Table 9: Primers used**

Primer Name	Primers
MOUSE	
HNF1 α	S: 5'-TTCTAAGCTGAGCCAGCTGCAGACG-3' A: 5'-GCTGAGGTTCTCCGGCTCTTTCAGA-3'
HNF3 β	S: 5'-CCAACATAGGATCAGATG-3' A: 5'-ACTGGAGCAGCTACTACG-3'
GATA4	S: 5'-AGGCATTACATACAGGCTCACC-3' A: 5'-CTGTGGCCTCTATCACAAGATG-3'
CK18	S: 5'-TGGTACTCTCCTCAATCTGCTG-3' A: 5'-CTCTGGATTGACTGTGGAAGTG-3'
CK19	S: 5'-CATGGTTCTTCTCAGGTAGGC-3' A: 5'-GCTGCAGATGACTTCAGAACC-3'
Albumin	S: 5'-TCAACTGTCAGAGCAGAGAAGC-3'

WO 02/064748

PCT/US02/04652

70

	A: 5'-AGACTGCCTTGTGTGGAAGACT-3'
α FP	S: 5'-GTGAAACAGACTTCTGGTCT-3' A: 5'-GCCCTACAGACCATGAAACAAG-3'
TTR	S: 5'-ICTCTCAATTCTGGGGTTG-3' A: 5'-TTTCACAGCCAACGACTCTG-3'
Cyp2b9	S: 5'-GATGATGTTGGCTGTGATGC-3' A: 5'-CTGGCCACCATGAAAGAGTT-3'
Cyp2b13	S: 5'-CTGCATCAGTGTATGGCATTTT-3' A: 5'-TTTGCTGGAACAGACTACCA-3'
HUMAN	
α FP	S: 5'-TGCAGCCAAAGTGAAGAGGGAAGA-3' A: 5'-CATAGCGAGCAGCCAAAGAAGA-3'
Albumin	S: 5'-TGC TTG AATGTCTGATGACAGGG-3' A: 5'-AAGGCAAGTCAGCAGGCATCTATC-3'
CK19	S: 5'-ATGGCCGAGCAGAACCGGAA-3' A: 5'-CCATGAGCCGCTGGTACTCC-3'
CK18	S: 5'-TGGTACTCTCTCAATCTGTG-3' A: 5'-CTCTGGATTGACTGTGGAAGT-3'
CYP1B1	S: 5'-GAGAACGTACCGGCCACTATCACT-3' A: 5'-GTTAGGCCACTTCAGTGGGTCATGAT-3'
CYP2B6	S: 5'-GATCACACCATATCCCGGA-3' A: 5'-CACCTACCACCATGACCG-3'
RAT	
HNF1 α	S: 5'-AGCTGCTCTCCATCATCAGA-3' A: 5'-TGTTCGAAGCATTAGTTTCTATTCTAA-3'
HNF3 β	S: 5'-CCTACTCTGATCATCTCGCTCATCA-3' A: 5'-CGCTCAGCGTCAGCATCTT-3'
CK18	S: 5'-GCCCTGGACTCCAGCAACT-3' A: 5'-ACTTTGCCATCCAGACCTT-3'
CK19	S: 5'-ACCATGCAGAACCTGAACGAT-3' A: 5'-CACCTCCAGCTCGCCATTAG-3'
Albumin	S: 5'-CTGGGAGTGTGCAGATATCAGAGT-3' A: 5'-GAGAAGGTACCAAGTGCTGTAGT-3'
α FP	S: 5'-GTCCTTCTCTCTCTGGAGAT-3' A: 5'-CTGTCAGTCTGATTCTCTGG-3'
TTR	S: 5'-CAGCAGTGGTGTGTAGGAGTA-3' A: 5'-GGGTAGAACTGGACCAAAATC-3'
Cyp2b1	S: 5'-GAGTTCTTCTCTGGGTTCTCTG-3' A: 5'-ACTGTGGGTCATGGAGAGCTG-3'

mRNA levels were normalized using β -actin (mouse and human) or 18S (rat) as housekeeping genes and compared with mRNA levels in freshly isolated rat or mouse hepatocytes, rat hepatocytes cultured for 7 days, or mRNA from human adult liver RNA purchased from Clontech, Palo Alto, California.

On d0, mMASC and rMASC expressed low levels of albumin α FP, CK18, CK19, TTR, HNF3 β , HNF1 α and GATA4 mRNA, but no CYP2B9 and CYP2B13 (mouse) or CYP2B1 (rat) mRNA (Fig. 10). Following treatment of mMASC or rMASC with FGF4 and HGF, expression of HNF3 β and GATA4 mRNA increased on d2, became maximal by d4, decreasing slightly and leveling off by d14. mRNA for α FP, and CK19 increased after d2, and became maximal by d4 and decreased

71

thereafter. TTR mRNA increased after d4, was maximal by d7 and leveled off. CK18, Albumin, HNF1 α and P450 enzyme mRNA increased after d7 and was maximal on d14. Between d14 and d21, FGF4 and HGF induced MASC expressed albumin, TTR, CK18, CYP2B9 and CYP2B13 (mouse) and CYP2B1 (rat) mRNA.

5 Undifferentiated hMASC expressed low levels of albumin, CK18, and CK19, CYP1B1, but not α FP (Fig. 10) and CYP2B6 mRNA. Levels of albumin, CK18, CK19, CYP1B1 mRNA increased significantly in hMASC cultured with FGF4 alone or with FGF4 and HGF for 14 days compared to day 0 (MASC) cultures. Levels of albumin, CK18 and CYP1B1 mRNA continued to increase and
10 were higher on d28. Although, CYP1B1 is not a specific hepatocyte marker, its upregulation suggests hepatocyte commitment and maturation. Low levels of CYP2B6, 0.5% to 1.0% of fresh liver mRNA's could be seen on d14 and d21 but not d0. mRNA levels of immature hepatocyte markers (CK19 and α FP) decreased as differentiation progressed and were higher in cultures induced with FGF4 alone,
15 whereas mRNA levels for mature hepatocytes (CK18 and albumin) were higher in FGF4 and HGF-induced hMASC.

Western Blot demonstrates that FGF4+HGF induces hepatocyte specification and differentiation

Expression of hepatocyte-specific genes was also confirmed by Western Blot
20 and performed as described by Reyes *et al.* (2000). Abs to α FP, human albumin, CK18 were diluted 1:1000 in blocking buffer. Goat anti- β -actin (1:1000) was from Santa Cruz. Secondary Abs were HRP-linked goat anti-mouse and HRP-linked donkey anti-goat (Amersham, Arlington Heights). ECL was performed according to manufacturers instructions (Amersham). Undifferentiated hMASC did not express
25 CK18, albumin, or α FP protein (Fig. 10B). After treatment for 35 days with FGF4 alone or FGF4 and HGF, hMASC expressed albumin and CK18, but not α FP, consistent with the histochemical analysis.

mMASC, rMASC and hMASC acquire hepatocyte functional activity

Five different assays were used to determine whether cells with morphologic
30 and phenotypic characteristics of hepatocytes also had functional hepatocyte attributes.

Urea production and secretion by hepatocyte-like cells was measured at various time points throughout differentiation. Urea concentrations were determined

WO 02/064748

PCT/US02/04652

72

by colorimetric assay (Sigma Cat. 640-1) per manufacturer's instructions. Rat hepatocytes grown in monolayer and fetal mouse liver buds were used as positive controls, and culture medium as negative control. The assay can detect urea concentrations as low as 10 mg/ml. As the assay also measures ammonia, samples
5 were assessed before and after urease addition.

No urea or ammonia was detected in culture medium alone. Undifferentiated MASC did not produce urea. Following treatment with FGF4 and HGF, urea production by MASC increased in a time dependent manner. The time course for urea production in mouse and rat cultures was similar. For hMASC treated with
10 FGF4 and HGF, urea was not detected on d4, was similar to mouse and rat cultures by d12, and exceeded that in mouse or rat cultures on d21. Levels of urea produced by MASC-derived hepatocytes were similar to that in monolayer cultures of primary rat hepatocytes. For all three species, significantly more urea was produced by cells differentiated on Matrigel™ compared to FN.

Albumin production was measured at various time points throughout the differentiation. Rat albumin concentrations were determined by a competitive enzyme linked immunoassay (ELISA) described previously (Tzanakakis E.S., *et al.*, 2001; Wells J.M. *et al.*, 2000). Human and mouse albumin concentrations were determined using a similar ELISA method with substitution of human or mouse
20 albumin and anti-human or anti-mouse albumin Abs for the rat components where appropriate. Peroxidase conjugated anti-human-albumin and reference human albumin were from Cappel. Peroxidase conjugated and affinity purified anti-mouse albumin and reference mouse albumin were from Bethyl Laboratories (Montgomery, Texas). To ensure specificity of the ELISA, human, mouse, and rat Abs were
25 incubated for 2 hrs at 37°C with 3% BSA in distilled water (dH₂O). ELISA's had a sensitivity of at least 1 ng/ml.

Undifferentiated MASC did not secrete albumin. Following treatment with FGF4 and HGF, mMASC, rMASC and hMASC produced albumin in a time dependent manner. As was seen for urea production, MASC differentiated on
30 Matrigel™ produced higher amounts of albumin than when cultured on FN. Mouse, rat, and human cells secreted similar levels of albumin, even though albumin was not detected in human cultures on d3. Levels of albumin produced by mouse, rat

and human MASC-derived hepatocytes were similar to those seen in monolayer cultures of primary rat hepatocytes.

Cytochrome P450 activity was next assessed in aggregates of MASC-derived hepatocytes and primary rat liver hepatocyte spheroids using the PROD assay.

- 5 mMASC-hepatocyte aggregates were formed by plating d14 FGF4 and HGF treated mMASC at 5×10^4 cells/cm² on non-tissue culture plates, which were placed on a shaker at 10 revolutions per minute for 5h. Cell aggregates were transferred to Primaria™ dishes and allowed to compact for 4 days in the presence or absence of 1mM phenobarbital. hMASC-hepatocyte aggregates were formed by hanging drop method. Briefly, 10³ hMASC treated for 24 days with FGF4 and HGF were placed 10 into 100μL drops with or without 1mM phenobarbital. After 4 days, aggregates were collected and cytochrome P450 activity assessed by PROD assay. Pentoxoresorufin (PROD) (Molecular Probes, Eugene, Oregon) is O-dealkylated by Cytochrome P450, changing a non-fluorescent compound into a fluorescent 15 compound, resorufin (Tzanakakis E.S. *et al.*, 2001). Fluorescence intensity caused by PROD metabolism consequently estimates cytochrome P450 (CYP) activity. Assessment and detection of resorufin in situ was performed using confocal microscopy as described (Tzanakakis E.S. *et al.*, 2001).

- No PROD activity was seen in aggregates of undifferentiated mMASC or 20 hMASC. However, mMASC (18 days with FGF4 and HGF) and hMASC (28 days, FGF4 alone) induced to form aggregates had significant PROD activity. PROD activity in MASC-derived hepatocyte aggregates was similar to that of primary rat hepatocyte aggregates. A number of different cells have P450 activity, but P450 activity up-regulation by phenobarbital is only seen in hepatocytes. Therefore, P450 25 was also tested in the presence or absence of phenobarbital. Without phenobarbital, several P450 enzymes partially participate in PROD metabolism giving an inflated fluorescence value for those samples. In contrast, in the phenobarbital induced aggregates, PROD activity is almost wholly metabolized by mouse cytochromes Cyp2b9, Cyp2b10, and Cyp2b13, rat cytochrome Cyp2b1/2 (Tzanakakis E.S. *et al.*, 30 2001), and in human, by CYP2B6. Therefore increased fluorescent activity is smaller than the actual increase in the protein expression of the stated cytochrome P450 enzymes. When aggregates were cultured for 96 hours with phenobarbital, a 32% to 39% increase in PROD activity was seen, suggesting presence of functional

WO 02/064748

PCT/US02/04652

74

hepatocyte specific Cyp2b9, Cyp2b10, and Cyp2b13 in mMASC and CYP2B6 in hMASC-derived hepatocytes.

MASC-derived hepatocytes were also assessed for their ability to take up LDL by incubating FGF4 treated hMASC with LDL-dil-acil. Cells were co-labeled either with anti-CK18 or anti-Pan-CK and HNF-3 β or GATA4 Abs. After 7 days, low level uptake of a-LDL was detected, which increased to become maximal on d21.

Another metabolic function of hepatocytes is glycogen production or gluconeogenesis. The levels of glycogen storage were analyzed by periodic acid Schiff (PAS) staining of FGF4 and HGF induced mouse MASC and FGF induced hMASC at d3, d7, d14, and d21. For PAS, slides were oxidized in 1% periodic acid for 5' and rinsed 3 times in dH₂O. Afterwards slides were treated with Schiff's reagent for 15', rinsed in dH₂O for 5-10', stained with Mayer's hematoxylin for 1' and rinsed in dH₂O. Glycogen storage was first seen by d14 and maximum levels were seen after d21 (Fig. 11).

Hepatocyte Isolation and Culture

Hepatocytes were harvested from 4-6 week old male Sprague-Dawley rats as described (Seglen P.O., 1976). Hepatocyte viability after the harvest ranged from 90-95%. Hepatocytes were cultured as described (Tzanakakis E.S. *et al.*, 2001; Tzanakakis E.S. *et al.*, 2001). To form a monolayer, hepatocytes were cultured on 35 mM Fischer culture plates (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA) coated with 8 μ g/cm² collagen (Cohesion Technologies, Palo Alto, CA). To form spheroids, hepatocytes were cultured on 35-mm Primaria™ dishes (Becton Dickinson). Under both conditions, seeding density was 5 $\times$ 10⁴ cells/cm². 12h after initial plating, medium was changed to remove dead and unattached cells. Medium was replaced every 48 hours thereafter.

Summary

It has been shown that a single post-natal mouse, rat and human BM-derived MASC can differentiate *in vitro* into an endodermal cell type with hepatocyte phenotype and function. MASC, cultured under hepatocyte differentiation conditions, expressed in a time-dependent fashion primitive and mature hepatocyte markers, shown by immunofluorescence microscopy of double and triple labeled cells. The protein expression profile was hepatocyte specific and not spurious, as

75

non-hepatocyte markers were not co-expressed with hepatocyte antigens. Results from immunohistochemistry were confirmed by Western blot. In addition, RT-PCR corroborated upregulation of the transcription factors HNF3 β and GATA4 known to be important in endoderm specification and transcription factors required for subsequent hepatocyte differentiation, such as HNF3 β , and cytoplasmic proteins such as CK19, CK18, α FP and albumin.

Although it was shown that FGF4 alone or both FGF4 and HGF induced MASC into cells with morphological and phenotypic characteristics of hepatocytes, this alone does not prove that cells have differentiated into hepatocytes unless one can demonstrate acquisition of functional characteristics of hepatocytes. Therefore, several functional tests were done in combination to identify functional hepatocytes. mMASC, rMASC or hMASC produced urea and albumin, contained phenobarbital inducible cytochrome P450 activity, could take up Dil-acil-LDL, and contained glycogen granules. Although urea production is characteristic of hepatocyte activity, kidney tubular epithelium also produces urea (Hedlund E. *et al.*, 2001). In contrast, albumin production is a specific test for the presence and metabolic activity of hepatocytes (Hedlund E. *et al.*, 2001). Cytochrome P450, although found in hepatocytes, is also present in many other cell types (Jarukamjorn K. *et al.*, 1999). However, Cyp2b1 activity in rat (Tzanakakis E.S. *et al.*, 2001), Cyp2b9 and Cyp2b13 in mouse (Li-Masters T. *et al.*, 2001; Zelko I. *et al.*, 2000), and CYP2B6 in human is considered relatively hepatocyte specific. Presence of these forms of P450 was shown by RT-PCR. The specificity for hepatocytes is enhanced further when P450 activity is inducible by phenobarbital (Rader D.J. *et al.*, 2000), as shown. Although LDL uptake is seen in hepatocytes (Oh S.H. *et al.*, 2000), other cells such as endothelium have a similar capability (Avital I. *et al.*, 2001). Finally, only hepatocytes can generate and store glycogen. When taken together, these functional tests demonstrate that MASC from mouse, rat or humans treated in vitro with FGF4 and HGF not only express hepatocyte markers but also have functional characteristics consistent with hepatocyte metabolic activities.

Several studies have shown that BM derived cells may differentiate into hepatocyte-like cells *in vivo* and *in vitro* (Petersen B.E. *et al.*, 1999; Theise N.D. *et al.*, 2000; Krause D.S. *et al.*, 2001; Pittenger M.F. *et al.*, 1999; Wang S. *et al.*, 2001; Lagasse E. *et al.*, 2000). However, most studies have not addressed the phenotype of the BM cell

WO 02/064748

PCT/US02/04652

76

that differentiates into cells with hepatocyte phenotype. It is unknown whether the cells staining positive for hepatocyte markers had functional characteristics of hepatocytes, and whether cells that differentiate into hepatocytes can also differentiate into mesodermal cells, such as hematopoietic cells. Lagasse *et al.* demonstrated that cKit⁺Thy1^{low} Sca1⁺ Lin⁻ cells present in murine BM differentiate into cells with not only hepatocyte phenotype but also hepatocyte function (Lagasse *et al.*, 2000). Even though such results could be seen when as few as 50 cells were transplanted, this study did not prove that the same cell that differentiates into hematopoietic cells also differentiates into hepatocytes. Krause *et al.* showed that a single cell can repopulate the hematopoietic system and give rise to rare hepatocytes. However, no functional assessment of the hepatocytes was done (Krause D.S. *et al.*, 2001). Avital *et al.* recently published that β_2m^+ , Thy-1⁺ cells in mouse BM express albumin, HNF4, C/EBP α , and Cytochrome P450 3A2 mRNA and protein (Wilmot I., *et al.*, 1997), a phenotype of hepatocyte progenitors usually found in the liver. Thus, presence of such hepatocyte progenitor cells in BM could explain the *in vivo* differentiation of bone marrow into hepatocytes noted in recent studies (Krause D.S. *et al.*, 2001; Lagasse E. *et al.*, 2000).

To address the question whether cells giving rise to functional hepatocyte-like cells also give rise to other cell types, retroviral marking was used (Reyes M. *et al.*, 2001; Jiang Y., 2002). It has been recently shown that cells expressing albumin, CK18 and HNF1 α can be generated from the same mMASC and rMASC that differentiate into cells with endothelial and neuroectodermal phenotype (Jiang Y., 2002). It is confirmed that similar results are seen for hMASC. Extending recently published studies demonstrating derivation of cells with mesodermal and neuroectodermal phenotype and function from single hMASC (Reyes M., 2002), it is shown here that the same single hMASC also differentiates into cells with hepatocyte morphology and phenotype. Thus, it is demonstrated for the first time that MASC that do not express hepatocyte markers and have no functional hepatocyte activity exist in BM, which depending on the culture conditions, acquire a hepatocyte phenotype and functional characteristics of hepatocytes, or phenotypic and functional characteristics of mesodermal and neuroectodermal cells.

Example 12. Transplantation of LacZ Transgenic MASC to Treat Hemophiliac**Mice**

MASC were derived from ROSA26 mice containing the β -gal/NEO transgene (10^6 cells/mouse) and were I.V. injected into hemophiliac mice (N=5) without prior irradiation. The animals were sacrificed at 1 (N=2) and 2 months (N=3) post-MASC transplantation. Bone marrow cytopins and frozen sections of liver, spleen, skeletal muscle, heart, lung and intestine were stained for presence of β -gal antigen using a FITC-conjugated anti- β -gal antibody and pan-cytokeratin or CD45. Tissues were also analyzed by Q-PCR for the β -gal gene as described in Example 6.

Preliminary analysis indicates that one of the three animals (M3) analyzed at 2 months post-injection had 0.1% of pulmonary epithelial cells derived from the donor cells by immunohistochemistry and Q-PCR. Immunohistochemistry also showed that animal M5 had <1% engraftment of CD45⁺ donor cells in the spleen, marrow and intestine. Tissues of the animal M4 had some donor derived cells on immunohistochemistry; PCR data on this animal is pending.

All publications, patents and patent applications are incorporated herein by reference as though individually incorporated by reference. While in the foregoing specification this invention has been described in relation to certain preferred embodiments thereof, and many details have been set forth for purposes of illustration, it will be apparent to those skilled in the art that the invention is susceptible to additional embodiments and that certain of the details described herein may be varied considerably without departing from the basic principles of the invention.

REFERENCES

- Adams, R.H., and Klein, R. (2000). Eph receptors and ephrin ligands. Essential mediators of vascular development. *Trends Cardiovasc Med* 10:183-188.
- Alison, M., and Sarraf, C. (1998). Hepatic stem cells. *J Hepatol* 29: 678-83.
- 5 Alizadeh, A.A., M.B. Eisen, R.E. Davis, C. Ma, I.S. Lossos, A. Rosenwald, J.C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J.I. Powell, L. Yang, G.E. Marti, T. Moore, J.J. Hudson, L. L.U. D.B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W.C. Chan, T.C. Greiner, D.D. Weisenburger, J.O. Armitage, R. Warnke, and L.M. Staudt. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression
- 10 profiling. *Nature*. 403:503-511.
- Anderson, C. M., and Swanson, R. A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 31:1-14.
- Anderson, D. J., Gage, F. H., and Weissman, I. L. (2001). Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med*, 393-5.
- 15 Arsenijevic, Y., and Weiss, S. (1998). Insulin-like growth factor-I is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell-derived neuronal precursors: distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 18:118-28.
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., and Isner, J. M. (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85:221-8.
- 20 Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzensbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967.
- 25 Avital, I., Inderbitzin, D., Aoki, T., Tyan, D.B., Cohen, A.H., Ferrareso, C., Baumhueter, S., Dybdal, N., Kyle, C., and Lasky, L. (1994). Global vascular expression of murine CD34 a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 84:2554.
- 30 Ben-Shushan, E., Thompson, J. R., Gudas, L. J., and Bergman, Y. (1998). Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol* 18:1866-78.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

79

- Bierhuizen, M. F., Westerman, Y., Visser, T. P., Dimjati, W., Wognum, A. W., and Wagemaker, G. (1997). Enhanced green fluorescent protein as selectable marker of retroviral-mediated gene transfer in immature hematopoietic bone marrow cells. *Blood* 90:3304-15.
- 5 Bjorklund, A., and Lindvall, O. (2000). Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 3: 537-44.
- Bjornson, C., R. Rietze, B. Reynolds, M. Magli, and A. Vescovi. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 283:354-357.
- 10 Blondel, O., Collin, C., McCarran, W. J., Zhu, S., Zamostiano, R., Gozes, I., Brenneman, D. E., and McKay, R. D. (2000). A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *J Neurosci*. 20:8012-20.
- Bradley, A. (1987). Production and analysis of chimaeric mice. In Teratocarcinomas and ES Cells: A Practical Approach. E.J. Robertson, ed. *Oxford: IRL Press*, 113-151.
- 15 Brazelton, T. R., Rossi, F. M. V., Keshet, G. I., and Blau, H. E. (2000). From Marrow to Brain: Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice. *Science* 290:1775-1779.
- Bruder, S., *et al.*, U.S. Patent No. 5,736,396
- 20 Brustle, O., Jones, K., Learish, R., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O., Duncan, I., and McKay, R. (1999). ES Cell-Derived Glial Precursors: A Source of Myelinating Transplants. *Science* 285:754-6.
- Brustle, O., Spiro, A. C., Karram, K., Choudhary, K., Okabe, S., and McKay, R. D. (1997). ES cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14809-14814.
- 25 Butler, D., (1999) FDA warns on primate xenotransplants. *Nature* 398:549.
- Caplan, A., *et al.*, U.S. Patent No. 5,486,359
- Caplan, A., *et al.*, U.S. Patent No. 5,811,094
- Caplan, A., *et al.*, U.S. Patent No. 5,837,539
- 30 Cassiede P., Dennis, J. E., Ma, F., Caplan, A. I., (1996). Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res*. 9:1264-73.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

80

- Cereghini, S. (1996). Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* 10:267-82.
- Choi, K. (1998). Hemangioblast development and regulation. *Biochem Cell Biol.* 76:947-956.
- 5 Choi, K., M. Kennedy, A. Kazarov, J.C. Papadimitriou, and G. Keller. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* 125:725-732.
- Ciccolini, F., and Svendsen, C. N. (1998). Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striata) precursor cells: Identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2. *J Neuroscience* 18:7869-7880.
- 10 Clarke, D. L., Johansson, C. B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U., and Frisen, J. (2000). Generalized potential of adult NSCs. *Science* 288:1660-3.
- 15 Conway, E.M., Collen, D., and Carmeliet, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 49:507-521.
- Corbeil, D., Roper, K., Hellwig, A., Tavian, M., Miraglia, S., Watt, S.M., Simmons, P.J., Peault, B., Buck, D.W., and Huttner, W.B. (2000). The human AC 133 HSC antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma
- 20 membrane protrusions. *J Biol Chem.* 275:5512-5530.
- Crosby, H.A., Kelly, D.A., and Strain, A.J. 2001. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology.* 120:534-544.
- Daadi, M. M., and Weiss, S. (1999). Generation of tyrosine hydroxylase-producing neurons from precursors of the embryonic and adult forebrain. *J Neurosci.* 19:4484-97.
- 25 Dahlstrand, J., Lardelli, M., and Lendahl, U. (1995). Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res.* 84:109-29.
- 30 Devon R. S., Porteous D. J., and J., B. A. (1995). Splink-erettes improved vectorettes for greater efficiency in PCR walking. *Nucleic Acids Res* 23:1644-1645.
- DiGuisto, *et al.*, U.S. Patent No. 5,681,599

WO 02/064748

PCT/US02/04652

81

- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are NSCs in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Eliceiri, B.P., and Cheresh, D.A. (2000). Role of alpha v integrins during
5 angiogenesis. *Cancer J Sci Am.* 6, Suppl 13:S245-249.
- Evans, et al., (1992). *J. Am. Med. Assoc.*, 267:239-246.
- Faloon, P., Arentson, E., Kazarov, A., Deng, C. X., Porcher, C., Orkin, S., and Choi, K. (2000). Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development.* 127:1931-1941.
- 10 Fei, R., *et al.*, U.S. Patent No. 5,635,387
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., and Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:528-30.
- Flax, J. D., Sanjay, A., Yang, C., Simonin, C., Wills, A. M., Billingham, L.
15 L., Jendoubi, M., Sidman, R. L., Wolfe, J. H., Kim, S. E., and Snyder, E. Y. (1998). Engraftable human NSCs respond to developmental cues replace neurons and express foreign genes. *Nature Biotech* 16:1033-1038.
- Fong, G. H., Zhang, L., Bryce, D. M., and Peng, J. (1999). Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in
20 flt-1 knock-out mice. *Development.* 126:3015-3025.
- Franco Del Arno, F., Gendron-Maguire, M., Swiatek, P. J., and Gridley, T. (1993). Cloning, sequencing and expression of the mouse mammalian achaete-scute homolog 1 (MASH1). *Biochem Biophys Acta* 1171:323-7.
- Frankel, M. S. (2000). In Search of Stem Cell Policy. *Science* 298:1397.
- 25 Fridenshtein, A. (1982). Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Arkh Patol* 44:3-11.
- Furcht *et al.* International Application No. PCT/US00/21387.
- Gage, F. H. (2000). Mammalian NSCs. *Science* 287:1433-1438.
- Gage, F., Coates, P., Palmer, T., Kuhn, H., Fisher, L., Suhonen, J., Peterson,
30 D., Suhr, S., and Ray, J. (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11879-83.

- Gehling, U.M., Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schuch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N., Kluge, K., Schafer, B., Hossfeld, D.K. and Fiedler, W. (2000). *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC 133-positive progenitor cells. *Blood* 95:3106-3112.
- 5 Gritti, A., Frolichsthal-Schoeller, P., Galli, R., Parati, E. A., Cova, L., Pagano, S. F., Bjornson, C. R., and Vescovi, A. L. (1999). Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci*. 19:3287-97.
- 10 Gronthos, S., Graves, S., Ohta, S., and Simmons, P. (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84: 4164-73.
- Guenechea, G., Gan, O., Dorrell, C., and Dick, J. E. (2001). Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nat Immunol* 2:75-82.
- 15 Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C., Buzney, E., Khan, M., Flint, A., Kunkel, L., and Mulligan, R. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401:390-4.
- Hamazaki, T., Iiboshi, Y., Oka, M., Papst, P.J., Meacham, A.M., Zon, L.I., 20 and Terada, N. 2001. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett* 497:15-19.
- Haralabopoulos, G.C., D.S. Grant, H.K. Kleinman, and M.E. Maragoudakis. (1997). Thrombin promotes endothelial cell alignment in Matrigel *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. *Am J Physiol*. 273:C239-245.
- 25 Hedlund, E., Gustafsson, J.A., and Warner, M. (2001). Cytochrome P450 in the brain; a review. *Curr Drug Metab* 2:245-263.
- Hill, B., Rozler, E., Travis, M., Chen, S., Zannettino, A., Simmons, P., Galy, A., Chen, B., Hoffman, R. (1996). High-level expression of a novel epitope of CD59 identifies a subset of CD34+ bone marrow cells highly enriched for pluripotent stem 30 cells. *Exp Hematol*. 8:936-43.
- Hirashima, M., H. Kataoka, S. Nishikawa, N. Matsuyoshi, and S.Nishikawa. (1999). Maturation of ES cells into endothelial cells in an invitro model of vasculogenesis. *Blood*. 93:1253-1263.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

83

- Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J. (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*. 284:994-998.
- 5 Hu, Z., Evarts, R. P., Fujio, K., Marsden, E. R., and Thorgeirsson, S. S. (1993). Expression of hepatocyte growth factor and c-met genes during hepatic differentiation and liver development in the rat. *Am J Pathol*. 142:1823-30.
- Iyer, V.R., Eisen, M.B., Ross, D.T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J.C.F., Trent, J.M., Staudt, L.M., Hudson, J.J., Boguski, M.S., Lashkari, D., Shalon, D.,
- 10 Botstein, D., and Brown, P.O. (1999). The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science*. 283:83-87.
- Jackson, K., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L., Hirschi, K. K., and M.A., G. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107:1395-1402.
- 15 Jackson, K., Mi, T., and Goodell, M. A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14482-6.
- Jaiswal, N., et al., (1997). *J. Cell Biochem*. 64(2):295-312.
- 20 Jarukamjorn, K., Sakuma, T., Miyaura, J., and Nemoto, N. (1999). Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital. *Arch Biochem Biophys* 369:89-99.
- Jiang, Y. 2002. Submitted.
- Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., Risling, M., Lendahl, U., and
- 25 Frisen, J. (1999). Identification of a NSC in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 96:25-34.
- Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. L., Goldberg, V. M., Yoo, J. U. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 1:265-72.
- 30 Jordan, C. T., and Van Zant, G. (1998). Recent progress in identifying genes regulating HSC function and fate. *Curr Opin Cell Biol*. 10:716-20.
- Jordan, C., McKearn, J., and Lemischka, I. (1990). Cellular and developmental properties of fetal HSCs. *Cell* 61:953-963.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

84

- Kim, T.H., Mars, W.M., Stolz, D.B., Petersen, B.E., and Michalopoulos, G.K. (1997). Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology* 26:896-904.
- Kopen, G., D. Prockop, and D. Phinney. 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:10711-10716.
- Kourembanas, S., Morita, T., Christou, H., Liu, Y., Koike, H., Brodsky, D., Arthur, V., and Mitsial, S.A. (1998). Hypoxic responses of vascular cells. *Chest. 111* (Suppl 1):25S-28S.
- Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., and Sharkis, S. I. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369-77.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L., and Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med.* 6:1229-1234.
- Larsson, J., Goumans, M.J., Sjostrand, L.J., van Rooijen, M.A., Ward, D., Leveen, P., Xu, X., ten Dijke, P., Mummery, C.L., and Karlsson, S. (2001). Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *EMBO J.* 20:1663-1673.
- Lazar, A., Peshwa, M. V., Wu, F. J., Chi, C. M., Cerra, F. B., and Hu, W. S. (1995). Formation of porcine hepatocyte spheroids for use in a bioartificial liver. *Cell Transplant* 4:259-68.
- Lee, S. H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J. M., and McKay, R. D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse ES cells. *Nat Biotechnol* 18:675-9.
- Lewis, I. D., Almeida-Porada, G., Du, J., Lemischka, I. R., Moore, K. A., Zanjani, E. D., and Verfaillie, C. M. (2001). Long-term repopulating cord blood stem cells are preserved after ex-vivo culture in a non-contact system. *Blood* 97:441-9.
- Li, C.X., and Poznansky, M.J. (1990). Characterization of the ZO-1 protein in endothelial and other cell lines. *J Cell Sci.* 2:231-7. 97:231-237.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

85

Li-Masters, T., and Morgan, E.T. 2001. Effects of bacterial lipopolysaccharide on Phenobarbital-induced CYP2B expression in mice. *Drug Metab Dispos* 29:252-257.

5 Lin, Y., Weisdorf, D. J., Solovey, A., and Hebbel, R. P. (2000). Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105:71-7.

Liu, S., Qu, Y., Stewart, T. J., Howard, M. J., Chakraborty, S., Holekamp, T. F., and McDonald, J. W. (2000). ES cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 10 97:6126-31.

Mahley, R. W., and Ji, Z. S. (1999). Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 40:1-16.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 12:7634-8.

Masinovsky, B., U.S. Patent No. 5,837,670

Mathon, N. F., Malcolm, D. S., Harrisingh, M. C., Cheng, L., and Lloyd, A. C. (2001). Lack of Replicative Senescence in Normal Rodent Glia. *Science* 291:872- 20 875.

McGlave, *et al.*, U.S. Patent No. 5,460,964

Meager, A. (1999). Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10:27-39.

Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is 25 autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86:897.

Melton, D. (1997). Signals for tissue induction and organ formation in vertebrate embryos. *Harvey Lect* 93:49-64.

Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R.A., and McKercher, S. R. (2000). Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated *in vivo* from Bone Marrow. *Science* 290:1779-1782.

Miyajima, A., Kinoshita, T., Tanaka, M., Kamiya, A., Mukoyama, Y., and Hara, T. (2000). Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:177-183.

- Morrison, S. J., White, P. M., Zock, C., and Anderson, D. J. (1999). Prospective identification isolation by flow cytometry and *in vivo* self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 96:737-749.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct 4. *Cell* 95:379-91.
- Nishikawa, S., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N., and Kodama, H. (1998). Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLKI+VEcadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125:1747-1757.
- Nishikawa, S.I., Nishikawa, S., Kawamoto, H., Yoshida, H., Kizumoto, M., Kataoka, H. and Katsura, Y. (1998). *In vitro* generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity* 8:761-769.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24:372-6.
- Nolta, J., Dao, M., Wells, S., Smogorzewska, E., and Kohn, D. (1996). Transduction of pluripotent human HSCs demonstrated by clonal analysis after engraftment in immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2414-9.
- Odorico, J. S., Kaufman, D. S., and Thomson, J. A. (2001). Multilineage differentiation from human ES cell lines. *Stem Cells* 19:193-204.
- Oh, S.H., Miyazaki, M., Kouchi, H., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Tsuji, T., Shima, N., Higashio, K., and Namba, M. (2000). Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 279:500-504.
- Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A. C., Segal, M., and McKay, R. D. (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from ES cells *in vitro*. *Mech Dev* 59:89-102.
- O'Leary, D. D., and Wilkinson, D. G. (1999). Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 9:65-73.
- Orkin, S. (1998). Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis. *Int. J. Dev. Biol.* 42:927-34.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

87

- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., and Anversa, P. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-5.
- O'Shea, K. (1999). ES cell models of development. *Anat Rec* 15:32-41.
- 5 Palmer, T. D., Markakis, E. A., Willhoite, A. R., Safar, F., and Gage, F. H. (1999). Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in NSCs from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 19:8487-97.
- Palmer, T. D., Takahashi, J., and Gage, F. H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial NSCs. *Mol Cell Neurosci* 8:389-404.
- 10 Partanen, J., and D.J. Dumont. (1999). Functions of Tie 1 and Tie2 receptor tyrosine kinases in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol.* 237:159-172.
- Peault, B. 1996. Hematopoietic stem cell emergence in embryonic life: developmental hematology revisited. *J. Hematother.* 5:369.
- 15 Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., Moore, M.A., and Rafii, S. (2000). Expression of VEGFR 2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 95:952-958.
- Peshwa MV, WU FJ, Follstad BD, Cerra, F.B., and Hu, W.S. 1994. Kinetics of hepatocyte spheroid formation. *Biotechnology Progress* 10:460-466.
- 20 Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S., and Goff, J. P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-1170.
- Petersen, B.E. 2001. Hepatic "stem" cells: coming full circle. *Blood Cells Mol Dis* 27:590-600.
- 25 Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S., and Goff, J.P. 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-1170.
- Petzelbauer, P., Halama, T., and Groger, M. (2000). Endothelial adherens junctions. *Investig Dermatol Symp Proc.* 5:10-13.
- 30 Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human MSCs. *Science* 284:143-147.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

88

Pittenger, M., U.S. Patent No. 5,827,740

Ploemacher, R. E., and Brons, N. H. (1988). Isolation of hemopoietic stem cell subsets from murine bone marrow: I. Radioprotective ability of purified cell suspensions differing in the proportion of day-7 and day-12 CFU-S. *Exp Hematol*

5 16:21-6.

Potten, C. (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353:821-30.

Prochazka, M., H.R. Gaskins, L.D. Shultz, and E.H. Leiter. (1992). The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:3290-3294.

10 Rader, D.J., and Dugi, K.A. (2000). The endothelium and lipoproteins: insights from recent cell biology and animal studies. *Semin Thromb Hemost* 26:521-528.

Rafii, S., F. Shapiro, J. Rimarachin, R. Nachman, B. Ferris, B. Weksler, M. Moore, and A. Asch. (1994). Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion. *Blood* 84:10-20.

15 Rafii, S., Shapiro, F., Pettengell, R., Ferris, B., Nachman, R., Moore, M., and Asch, A. (1995). Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. *Blood* 86:3353-61.

Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T., and Jenkins, M. K. (2001). Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 401:101-105.

25 Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). ES cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotech* 18:399-404.

Reyes, M., and Verfaillie, C.M. (2001). Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 938:231-233; discussion 233-235.

30 Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L., and Verfaillie, C.M. (2001). Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98:2615-2625.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

89

- Reynolds, B., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-10.
- Reynolds, B., and Weiss, S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 175:1-13
- Ribatti, D., A. Vacca, B. Nico, L. Roncali, and F. Dammacco. (2001). Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev.* 100:157-163.
- Richards, L. J., Kilpatrick, T. J., and Bartlett, P. F. (1992). De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:8591-5.
- Rideout, W. M., 3rd, Wakayama, T., Wutz, A., Eggan, K., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Yanagimachi, R., and Jaenisch, R. (2000). Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nat Genet* 24:109-10.
- Robertson, S. M., Kennedy, M., Shannon, J. M., Keller, G. (2000). A transitional stage in the commitment of mesoderm to hematopoiesis requiring the transcription factor SCL/tal-1. *Development.* 11:2447-59.
- Rosenberg, J.B., P.A. Foster, R.J. Kaufman, E.A. Vokac, M. Moussalli, P.A. Kroner, and R.R. Montgomery. (1998). Intracellular trafficking of factor VIII to von Willebrand factor storage granules. *J Clin Invest.* 101:613-624.
- Rozga, J., Amaout, W.S., and Demetriou, A.A. (2001). Isolation, characterization, -derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288:156-164.
- Ryder, E. F., Snyder, E. Y., and Cepko, C. L. (1990). Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-mediated oncogene transfer. *J Neurobiol* 21:356-375.
- Sah, D. W., Ray, J., and Gage, F. H. (1997). Regulation of voltage- and ligand-gated currents in rat hippocampal progenitor cells *in vitro*. *J Neurobiol* 32:95-110.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T. B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D. R., and Sanberg, P. R. (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol.* 164:247-56.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

90

- Saucedo-Cardenas, O., Quintana-Hau, J. D., Le, W. D., Smidt, M. P., Cox, J. J., De Mayo, F., Burbach, J. P., and Conneely, O. M. (1998). Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4013-8.
- Scherf, U., D.T. Ross, M. Waltham, L.H. Smith, J.K. Lee, L. Tanabe, K.W. Kohn, W.C. Reinhold, T.G. Myers, D.T. Andrews, D.A. Scudiero, M.B. Eisen, E.A. Sausville, Y. Pommier, D. Botstein, P.O. Brown, and J.N. Weinstein. (2000). A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Biotech* 24:236-244.
- Scholer, H. R., Hatzopoulos, A. K., Balling, R., Suzuki, N., and Gruss, P. (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J* 8:2543-50.
- Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A., and Benvenisty, N. (2000). From the cover: effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human ES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11307-12.
- Schwartz, *et al.*, U.S. Patent No. ,759,793
- Seglen, P.O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13:29-83.
- Shamblott, M., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E., Littlefield, J., Donovan, P., Blumenthal, P., Huggins, G., Gearhart, J.: (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:13726-31.
- Shen, C.N., Slack, J.M., and Tosh, D. (2000). Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol.* 2:879-887.
- Shi, Q., S. Rafii, M. Hong-De Wu, E.S. Wijelath, C. Yu, A. Ishida, Y. Fujita, S. Kothari, R. Mohle, L.R. Sauvage, M.A.S. Moore, R.F. Storb, and W.P. Hammond. (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 92:362-367.
- Shih, C.C., Y. Weng, A. Mamelak, T. LeBon, M.C. Hu, and S. Forman. (2001). Identification of a candidate human neurohematopoietic stem-cell population. *Blood*. 98:2412-2422.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

91

- Simeone, A. (1998). Otx1 and Otx2 in the development and evolution of the mammalian brain. *EMBO* 117:6790-8.
- Simmons, P., *et al.*, U.S. Patent No. 5,677,136
- Soule HD, et al. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived
 5 from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*; 51(5):1409-16.
- Southern, P. J., Blount, P., and Oldstone, M. B. (1984). Analysis of persistent virus infections by in situ hybridization to whole-mouse sections. *Nature* 312:555-8.
- Steeber, D.A., and T. Tedder, F. (2001). Adhesion molecule cascades direct
 10 lymphocyte recirculation and leukocyte migration during inflammation. *Immunol Res.* 22:299-317.
- Steinberg, D., Pittman, R.C. and Carew, T.E. (1985). Mechanisms involved in the uptake and degradation of low density lipoprotein by the artery wall *in vivo*. *Ann N Y Acad Sci.* 454:195-206.
- 15 Studer, L., Spenger, C., Seiler, R., Othberg, A., Lindvall, O., and Odin, P. (1996). Effects of brain-derived neurotrophic factor on neuronal structure of dopaminergic neurons in dissociated cultures of human fetal mesencephalon. *Exp Brain Res* 108:328-36.
- Suhonen, J., Peterson, D., Ray, J., and Gage, F. (1996). Differentiation of
 20 adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons *in vivo*. *Nature* 383:624-7.
- Svendsen, C. N., and Caldwell, M. A. (2000). NSCs in the developing central nervous system: implications for cell therapy through transplantation. *Prog Brain Res.* 127:13-34.
- 25 Svendsen, C. N., Caldwell, M. A., Ostenfeld, T. (1999). Human neural stem cells: Isolation, expansion and transplantation. *Brain Path* 9:499-513.
- Tang, D. G., Tokumoto, Y. M., Apperly, J. A., Lloyd, A. C., and Raff, M. C. (2001). Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cells. *Science* 291:868-71.
- 30 Tedder, T., Steeber, D., Chen, A., and Engel, P. (1995). The selections: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 9:866.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

92

- Theise, N. D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J. M., and Krause, D. S. (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31:235-40.
- Theise, N.D., Saxena, R., Portmann, B.C., Thung, S.N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A., and Crawford, J.M. (1999). The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 30:1425-1433.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). ES cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:114-7.
- Thomson, J., Kalisman J., Golos, J., Durning, M., Harris, C., Becker, R., Hearn, J. (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:7844-8.
- Trupp, M., Arenas, E., Fainzilber, M., Nilsson, A. S., Sieber, B. A., Grigoriou, M., Kilkenny, C., Salazar-Grueso, E., Pachnis, V., and Arumae, U. (1996). Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* 381:785-9.
- Tsai, R.Y. and McKay, R.D. (2000). Cell contact regulates fate choice by cortical stem cells. *J. Neurosci.* 20:3725-35.
- Tsukamoto, *et al.*, U.S. Patent No. 5,750,397
- Tsukamoto, *et al.*, U.S. Patent No. 5,716,827
- Tzanakakis, E.S., Hansen, L.K., and Hu, W.S. (2001). The role of actin filaments and microtubules in hepatocyte spheroid self-assembly. *Cell Motil Cytoskeleton* 48:175-189.
- Tzanakakis, E.S., Hsiao, C.C., Matsushita, T., Rimmel, R.P., and Hu, W.S. (2001). Probing enhanced cytochrome P450 2B1/2 activity in rat hepatocyte spheroids through confocal laser scanning microscopy. *Cell Transplant.* 10:329342.
- Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., and Weissman, I.L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:14720-14725.
- Van Rijen, H., van Kempen, M.J., Analbers, L.J., Rook, M.B., van Ginneken, A.C., Gros, D., and Jongsma, H.J. (1997). Gap junctions in human umbilical cord endothelial cells contain multiple connexins. *Am J Physiol.* 272:C117-130.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

93

- Verfaillie, C., Miller, W., Boylan, K., McGlave, P. (1992). Selection of benign primitive hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia on the basis of HLA-DR antigen expression. *Blood*. 79:1003-1010.
- Vescovi, A. L., Paraati, E. A., Gritti, A., Poulin, P., Ferrario, M., Wanke, E.,
 5 Frolichthal-Schoeller, P., Cova, L., Arcellana-Panlilio, M., Colombo, A., and Galli, R. (1999). Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human NSC lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol* 156:71-83.
- Vescovi, A., Reynolds, B., Fraser, D., and Weiss, S. (1993). bFGF regulates
 10 the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11: 951-66.
- Vischer, U.M., H. Barth, and C.B. Wollheim. (2000). Regulated von Willebrand factor secretion is associated with agonist-specific patterns of cytoskeletal remodeling in cultured endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.
 15 20:883-891.
- Wagner, D.D., Olmsted, J.B., and Marder, V.J. (1982). Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 95:355-360.
- Wagner, J., Akerud, P., Castro, D. S., Holm, P. C., Canals, J. M., Snyder, E.
 20 Y., Perlmann, T., and Arenas, E. (1999). Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurrl-overexpressing NSCs by type 1 astrocytes. *Nat Biotech* 17:653-9.
- Wakitani, S., Saito, T., and Caplan, A. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow MSCs exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18:1417-26.
- 25 Wang, X., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., and Grompe, M. (2001). Liver repopulation and correction of metabolic liver disease by transplanted adult mouse pancreatic cells. *Am J Pathol* 158:571-579.
- Watt, F. (1997). Epidermal stem cells: markers patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 831-6.
- 30 Watt, S., Gschmeissner, S., and Bates, P. (1995). PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymph.* 17:229.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

94

- Weiss, M. J., Orkin, S. H. (1995) GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol.* 2:99-107.
- Weissman, I. L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287:1442-6.
- 5 Wells, J. M., and Melton, D. A. (2000). Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development.* 127:1563-72.
- Wells, J.M., and Melton, D.A. (1999). Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:393-410.
- Whittemore, S. R., Morassutti, D. J., Walters, W. M., Liu, R. H., and Magnuson, D. S. (1999). Mitogen and substrate differentially affect the lineage restriction of adult rat subventricular zone neural precursor cell populations. *Exp Cell Res* 252:75-95.
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. If, Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Gough, N. M. (1988).
- 15 Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of ES cells. *Nature* 336:684-7.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-3.
- 20 Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., and Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 15:364-70.
- Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., Naito, M., Nakao, K., and Nishikawa, S. (2000). Fkl-positive cells derived from
- 25 ES cells serve as vascular progenitors. *Nature.* 408:92-96.
- Yang, J., Nagavarapu, U., Relloma, K., Sjaastad, M.D., Moss, W.C., Passaniti, A., and Herron, G.S. (2001). Telomerized human microvasculature is functional *in vivo*. *Nat Biotechnol.* 19:219-224.
- Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J., Hynes, M., and Rosenthal, A.
- 30 (1998). FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93:755-66.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

95

- Yoneya, T., Tahara, T., Nagao, K., Yamada, Y., Yamamoto, T., Osawa, M., Miyatani, S., and Nishikawa, M. (2001). Molecular cloning of delta-4, a new mouse and human Notch ligand. *J Biochem.* 129:27-34.
- Yoo, J. U., Barthel, T. S., Nishimura, K., Solchaga, L., Caplan, A. I.,
 5 Goldberg, V. M., Johnstone, B. (1998). Then chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* 12:1745-57.
- Young, H., *et al.*, U.S. Patent No. 5,827,735
- Zambrowicz, B. P., Imamoto, A., Hering, S., Herzenberg, L. A., Kerr, W. G.,
 10 and Soriano, P. (1997). Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:3789-94.
- Zaret, K.S. (2000). Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev* 92:83- 88.
- 15 Zaret, K.S. (2001). Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. *Curr Opin Genet Dev.* 11:568-574.
- Zelko, I., and Negishi, M. (2000). Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 277:1-6.
- 20 Zhao, R. C. H., Jiang, Y., and Verfaillie, C. M. (2000). A model of human p210BCW"BL mediated CML by transducing primary normal human CD34+ cells with a BCR/ABL containing retroviral vector. *Blood.* 97:2406-12.
- Ziegler, B., M. Valtieri, G. Porada, R. De Maria, R. Muller, B. Masella, M. Gabbianelli, I. Casella, E. Pelosi, T. Bock, E. Zanjani, and C. Peschle. (1999). KDR
 25 Receptor: A Key Marker Defining HSCs. *Science.* 285:1553 1558.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

96

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated multipotent adult stem cell (MASC), wherein the cell has the capacity to be induced to differentiate to form at least one differentiated cell type of mesodermal, ectodermal and endodermal origin.
- 5 2. The cell of claim 1, wherein said cell is derived from a non-embryonic organ or tissue of a mammal.
3. The cell of claim 1, wherein the cell has the capacity to be induced to differentiate to form cells selected from the group consisting of osteoblast, chondrocyte, adipocyte, fibroblast, marrow stroma, skeletal muscle, smooth muscle,
- 10 cardiac muscle, ocular, endothelial, epithelial, hepatic, pancreatic, hematopoietic, glial, neuronal and oligodendrocyte cell type.
4. The cell of claim 1, wherein the organ or tissue is selected from the group consisting of bone marrow, muscle, brain, umbilical cord blood and placenta.
5. The cell of claim 2, wherein the mammal is a mouse.
- 15 6. The cell of claim 2, wherein the mammal is a rat.
7. The cell of claim 2, wherein the mammal is a human.
8. The cell of claim 1, wherein differentiation is induced *in vivo* or *ex vivo*.
9. The cell of claim 3, wherein differentiation is induced *in vivo* or *ex*
- 20 *vivo*.
10. The cell of claim 1, wherein the cell constitutively expresses oct4 and high levels of telomerase.
11. The cell of claim 10, wherein the cell is negative for CD44, MHC class I and MHC class II expression.
- 25 12. A method of creating a normal non-human animal comprising the steps of:
 - (a) introducing the cell of claim 1 into a blastocyst;
 - (b) implanting the blastocyst of (a) into a surrogate mother; and
 - (c) allowing the pups to develop and be born.
- 30 13. The animal of claim 12, wherein said animal is chimeric.
14. A composition comprising a population of MASC and a culture medium, wherein the culture medium expands the MASC.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

97

15. The composition of claim 14, wherein the medium comprises epidermal growth factor (EGF) and platelet derived growth factor (PDGF).
16. The composition of claim 15, wherein the medium further comprises leukemia inhibitory factor (LIF).
- 5 17. A composition comprising a population of fully or partially purified MASC progeny.
18. The composition of claim 17, wherein the progeny have the capacity to be further differentiated.
19. The composition of claim 17, wherein the progeny are terminally differentiated.
- 10 20. The composition of claim 17, wherein the progeny are of the osteoblast, chondrocyte, adipocyte, fibroblast, marrow stroma, skeletal muscle, smooth muscle, cardiac muscle, ocular, endothelial, epithelial, hepatic, pancreatic, hematopoietic, glial, neuronal or oligodendrocyte cell type.
- 15 21. A method for isolating and propagating the cell of claim 1 comprising the steps of:
 - (a) obtaining tissue from a mammal;
 - (b) establishing a population of adherent cells;
 - (c) depleting said population of CD45⁺ cells;
 - 20 (d) recovering CD45⁻ cells; and
 - (e) culturing CD45⁻ cells under expansion conditions to produce an expanded cell population.
22. An expanded cell population obtained by the method of claim 21.
23. A method for differentiating MASC *ex vivo* comprising the steps of
- 25 claim 21 and further comprising culturing the propagated cells in the presence of desired differentiation factors.
24. The method of claim 23, wherein the differentiation factors are selected from the group consisting of basic fibroblast growth factor (bFGF); vascular endothelial growth factor (VEGF); dimethylsulfoxide (DMSO) and isoproterenol;
- 30 and, fibroblast growth factor4 (FGF4) and hepatocyte growth factor (HGF).
25. A differentiated cell obtained by the method of claim 23.
26. The differentiated cell of claim 25, wherein the cell is ectoderm, mesoderm or endoderm.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

98

27. The differentiated cell of claim 25, wherein the cell is of the osteoblast, chondrocyte, adipocyte, fibroblast, marrow stroma, skeletal muscle, smooth muscle, cardiac muscle, ocular, endothelial, epithelial, hepatic, pancreatic, hematopoietic, glial, neuronal or oligodendrocyte cell type.
- 5 28. A method for differentiating MASC *in vivo* comprising the steps of claim 21 and further comprising administering the expanded cell population to a mammalian host, wherein said cell population is engrafted and differentiated *in vivo* in tissue specific cells, such that the function of a cell or organ, defective due to injury, genetic disease, acquired disease or iatrogenic treatments, is augmented, reconstituted or provided for the first time.
- 10 29. The method of claim 28, wherein the tissue specific cells are of the osteoblast, chondrocyte, adipocyte, fibroblast, marrow stroma, skeletal muscle, smooth muscle, cardiac muscle, ocular, endothelial, epithelial, hepatic, pancreatic, hematopoietic, glial, neuronal or oligodendrocyte cell type.
- 15 30. The method of claim 28, wherein the MASC undergo self-renewal *in vivo*.
31. The method of claim 28, wherein cells are administered in conjunction with a pharmaceutically acceptable matrix.
32. The method of claim 31, wherein the matrix is biodegradable.
- 20 33. The method of claim 28, wherein administration is via localized injection, systemic injection, parenteral administration, oral administration, or intrauterine injection into an embryo.
34. The method of claim 33, wherein localized injection comprises catheter administration.
- 25 35. The method of claim 28, wherein the disease is selected from the group consisting of cancer, cardiovascular disease, metabolic disease, liver disease, diabetes, hepatitis, hemophilia, degenerative or traumatic neurological conditions, autoimmune disease, genetic deficiency, connective tissue disorders, anemia, infectious disease and transplant rejection.
- 30 36. A differentiated cell obtained by the method of claim 28.
37. A method of treatment comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the cell of claim 11.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

99

38. The method of claim 37, wherein no teratomas are formed in the patient.
39. A method of treatment comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of MASC or their progeny.
- 5 40. The method of claim 39, wherein reduced or no pretreatment of the patient is required.
41. The method of claim 40, wherein pretreatment comprises myeloablation via irradiation or chemotherapy.
42. The method of claim 39, wherein it is unnecessary to induce
- 10 tolerance prior to or simultaneous with administration of MASC or their progeny.
43. The method of claim 39, wherein post immunosuppressive treatment of the patient is reduced compared with traditional pharmacological doses.
44. The method of claim 39, wherein the progeny have the capacity to be further differentiated.
- 15 45. The method of claim 39, wherein the progeny are terminally differentiated.
46. The method of claim 39, wherein the MASC or their progeny are administered via localized injection, systemic injection, parenteral administration, oral administration, or intrauterine injection into an embryo.
- 20 47. The method of claim 46, wherein localized injection comprises catheter administration.
48. The method of claim 39, wherein cells are administered in conjunction with a pharmaceutically acceptable matrix.
49. The method of claim 48, wherein the matrix is biodegradable.
- 25 50. The method of claim 39, wherein the MASC or their progeny alter the immune system to resist viral, bacterial or fungal infection.
51. The method of claim 39, wherein the MASC or their progeny augment, reconstitute or provide for the first time the function of a cell or organ defective due to injury, genetic disease, acquired disease or iatrogenic treatments.
- 30 52. The method of claim 51, wherein the organ is selected from the group consisting of bone marrow, blood, spleen, liver, lung, intestinal tract, eye, brain, immune system, circulatory system, bone, connective tissue, muscle, heart, blood vessels, pancreas, central nervous system, peripheral nervous system, kidney,

WO 02/064748

PCT/US02/04652

100

bladder, skin, epithelial appendages, breast-mammary glands, fat tissue, and mucosal surfaces including oral esophageal, vaginal and anal.

53. The method of claim 51, wherein the MASC undergo self-renewal *in vivo*.

5 54. The method of claim 51, wherein the disease is selected from the group consisting of cancer, cardiovascular disease, metabolic disease, liver disease, diabetes, hepatitis, hemophilia, degenerative or traumatic neurological conditions, autoimmune disease, genetic deficiency, connective tissue disorders, anemia, infectious disease and transplant rejection.

10 55. The method of claim 44, wherein the progeny are differentiated *ex vivo* or *in vivo*.

56. The method of claim 45, wherein the progeny are differentiated *ex vivo* or *in vivo*.

15 57. The method of claim 45, wherein the progeny are selected from the group consisting of osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, fibroblasts, marrow stroma, skeletal muscle, smooth muscle, cardiac muscle, ocular endothelial, epithelial, hepatic, pancreatic, hematopoietic, glial, neuronal and oligodendrocytes.

20 58. The method of claim 39, wherein the MASC or their progeny home to one or more organs in the patient and are engrafted therein such that the function of a cell or organ, defective due to injury, genetic disease, acquired disease or iatrogenic treatments, is augmented, reconstituted or provided for the first time.

25 59. The method of claim 58, wherein the disease is selected from the group consisting of cancer, cardiovascular disease, metabolic disease, liver disease, diabetes, hepatitis, hemophilia, degenerative or traumatic neurological conditions, autoimmune disease, genetic deficiency, connective tissue disorders, anemia, infectious disease and transplant rejection.

60. The method of claim 58, wherein the injury is ischemia or inflammation.

30 61. The method of claim 58, wherein the organ is selected from the group consisting of bone marrow, blood, spleen, liver, lung, intestinal tract, eye, brain, immune system, circulatory system, bone, connective tissue, muscle, heart, blood vessels, pancreas, central nervous system, peripheral nervous system, kidney,

WO 02/064748

PCT/US02/04652

101

bladder, skin, epithelial appendages, breast-mammary glands, fat tissue, and mucosal surfaces including oral esophageal, vaginal and anal.

62. The method of claim 58, wherein the MASC undergo self-renewal *in vivo*.
- 5 63. The method of claim 39, wherein the MASC or their progeny enhance angiogenesis.
64. The method of claim 39, wherein the MASC or their progeny are genetically transformed to deliver a therapeutic agent.
65. The method of claim 64, wherein the therapeutic agent is an
10 antiangiogenic agent.
66. The method of claim 39, wherein administration is via a three dimensional matrix comprising an artificial vein.
67. The method of claim 66, wherein the treatment is directed to
15 abdominal aortic aneurysm, cardiac bypass surgery, peripheral vascular disease or coronary vascular disease.
68. A therapeutic composition comprising MASC and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein the MASC are present in an amount effective to produce tissue selected from the group consisting of bone marrow, blood, spleen, liver, lung, intestinal tract, eye, brain, immune system, bone, connective tissue, muscle, heart,
20 blood vessels, pancreas, central nervous system, kidney, bladder, skin, epithelial appendages, breast-mammary glands, fat tissue, and mucosal surfaces including oral esophageal, vaginal and anal.
69. A therapeutic method for restoring organ, tissue or cellular function to a patient in need thereof comprising the steps of:
25 (a) removing MASC from a mammalian donor;
(b) expanding MASC to form an expanded population of undifferentiated cells; and
(c) administering the expanded cells to the patient, wherein organ, tissue or cellular function is restored.
- 30 70. The method of claim 69, wherein the function is enzymatic.
71. The method of claim 69, wherein the function is genetic.
72. The method of claim 69, wherein the mammalian donor is the patient.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

102

73. The method of claim 69, wherein the organ, tissue or cell is selected from the group consisting of bone marrow, blood, spleen, liver, lung, intestinal tract, eye, brain, immune system, bone, connective tissue, muscle, heart, blood vessels, pancreas, central nervous system, peripheral nervous system, kidney, bladder, skin, epithelial appendages, breast-mammary glands, fat tissue, and mucosal surfaces including oral esophageal, vaginal and anal.

74. A method of inhibiting the rejection of a heterologous MASC transplanted into a patient comprising the steps of:

(a) introducing into the MASC, *ex vivo*, a nucleic acid sequence encoding the recipient's MHC antigens operably linked to a promotor, wherein the MHC antigens are expressed by the MASC; and
(b) transplanting the MASC into the patient, wherein MHC antigens are expressed at a level sufficient to inhibit the rejection of the transplanted MASC.

75. The method of claim 74, wherein the patient is of the same species or another mammalian species as the donor of the MASC.

76. The method of claim 74, wherein the MASC are transplanted into the patient via localized injection, systemic injection, parenteral administration, oral administration, or intrauterine injection into an embryo.

77. The method of claim 76, wherein localized injection comprises catheter administration.

78. The method of claim 74, wherein cells are transplanted in conjunction with a pharmaceutically acceptable matrix.

79. The method of claim 78, wherein the matrix is biodegradable.

80. A method of inhibiting the rejection of a heterologous MASC transplanted into a patient comprising the steps of:

(a) transgenically knocking out expression of MHC antigens in the MASC; and
(b) transplanting the transgenic MASC into the patient, wherein said MHC antigens are not expressed by the MASC such that rejection of the transplanted MASC is inhibited.

81. The method of claim 80, wherein the patient is of the same species or another mammalian species as the donor of the MASC.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

103

82. The method of claim 80, wherein the MASC are transplanted into the patient via localized injection, systemic injection, parenteral administration, oral administration, or intrauterine injection into an embryo.
83. The method of claim 82, wherein localized injection comprises
 5 catheter administration.
84. The method of claim 80, wherein cells are transplanted in conjunction with a pharmaceutically acceptable matrix.
85. The method of claim 84, wherein the matrix is biodegradable.
86. A method of generating blood or individual blood components *ex vivo* comprising the steps of:
 10 (a) isolating MASC; and
 (b) differentiating the MASC to form blood or blood components.
87. The method of claim 86, wherein the individual blood components are red blood cells, white blood cells or platelets.
88. A method of drug discovery comprising the steps of:
 15 (a) analyzing the genomic or proteomic makeup of MASC or their progeny;
 (b) employing analysis thereof via bioinformatics and/or computer analysis using algorithms; and
- (c) assembling and comparing new data with known databases to
 20 discover new drugs.
89. A method of identifying the components of a differentiation pathway comprising the steps of:
 (a) analyzing the genomic or proteomic makeup of MASC;
 25 (b) inducing differentiation of MASC;
 (c) analyzing the genomic or proteomic makeup of intermediary cells in the differentiation pathway;
 (d) analyzing the genomic or proteomic makeup of terminally differentiated cells in the differentiation pathway;
 30 (e) using bioinformatics and/or algorithms to characterize the genomic or proteomic makeup of MASC and their progeny; and

WO 02/064748

PCT/US02/04652

104

(f) comparing the data obtained in (e) to identify the components of the pathway.

90. The method of claim 89, wherein the differentiation occurs *in vitro*.

91. The method of claim 89, wherein the differentiation occurs *in vivo*.

5 92. A method for comparing differentiation *in vitro* with differentiation *in vivo* comprising comparing the results of the method of claim 90 with the results of the method of claim 91.

93. A method of identifying the molecular components of disease or injury comprising the steps of:

10 (a) analyzing the genomic or proteomic makeup of MASC isolated from a healthy donor;

(b) analyzing the genomic or proteomic makeup of MASC isolated from a donor afflicted with the disease or injury;

15 (c) using bioinformatics and/or algorithms to characterize the data from (a);

(d) using bioinformatics and/or algorithms to characterize the data from (b);

(e) comparing the data obtained in (c) with that obtained in (d) to identify the molecular components of the disease or injury.

20 94. A method of generating products *in vitro* that have therapeutic, diagnostic or research utility comprising the steps of:

(a) identifying the products in MASC; and

(b) isolating the products from MASC.

25 95. The method of claim 94 wherein the products are selected from the group consisting of proteins, lipids, complex carbohydrates, DNA and RNA.

96. A method of inducing, in a mammal, tolerance to an antigen administered to said mammal, the method comprising the step of administering to said mammal, after or simultaneously with the administration of said antigen, an effective amount of MASC or their progeny so that said mammal's humoral immune
30 response to a subsequent challenge with said antigen is suppressed.

WO 02/064748

PCT/US02/04652

105

97. A method for removing toxins from the blood of a patient comprising contacting blood *ex vivo* with MASC derived cells, wherein said cells line a hollow, fiber based device.
98. The method of claim 97 wherein the cells are kidney or liver cells.
- 5 99. A method for delivering therapeutic products to a patient comprising contacting the blood of said patient *ex vivo* with MASC or their progeny, wherein said MASC or their progeny are genetically transformed to deliver a therapeutic agent.
100. A method for testing the toxicity of a drug comprising contacting
- 10 MASC or their progeny *ex vivo* with said drug and monitoring cell survival.
101. The method of claim 100, wherein the progeny are selected from the group consisting of hepatic, endothelial, epithelial and kidney.

WO 02/064748

1/11

PCT/US02/04652

Fig. 1

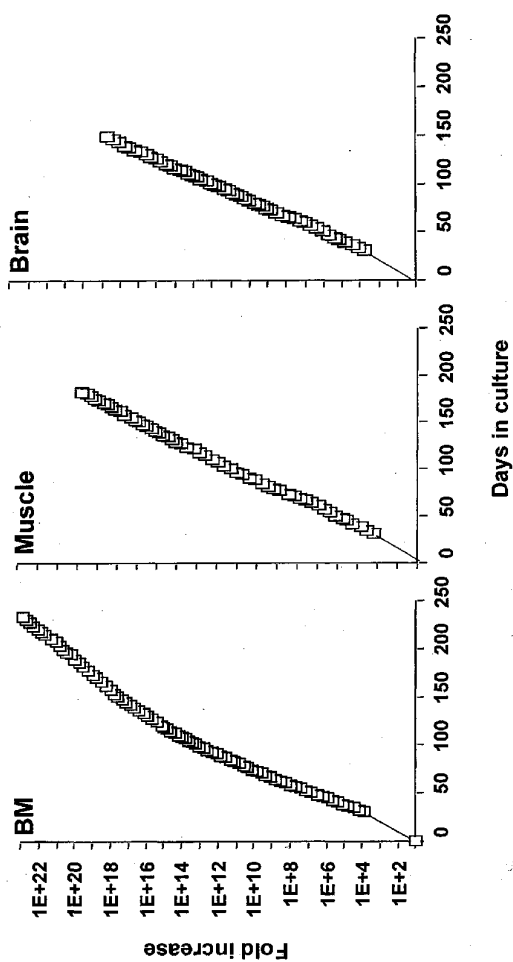
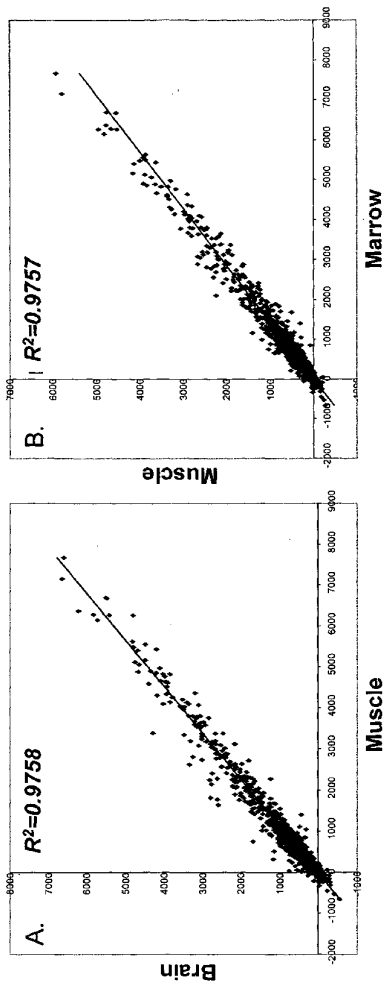


Fig. 2



WO 02/064748

3/11

PCT/US02/04652

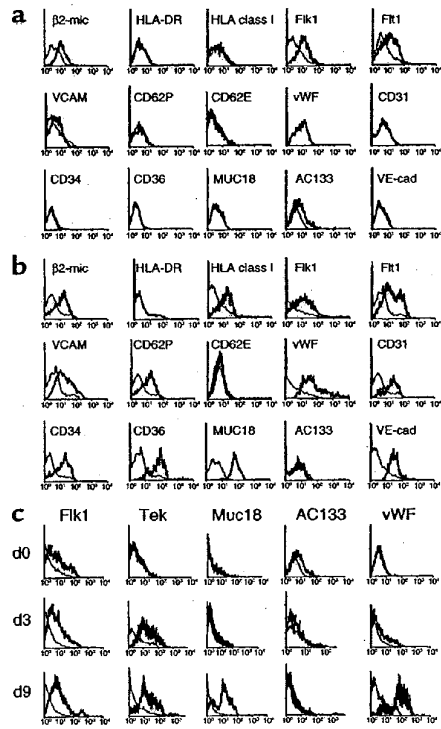
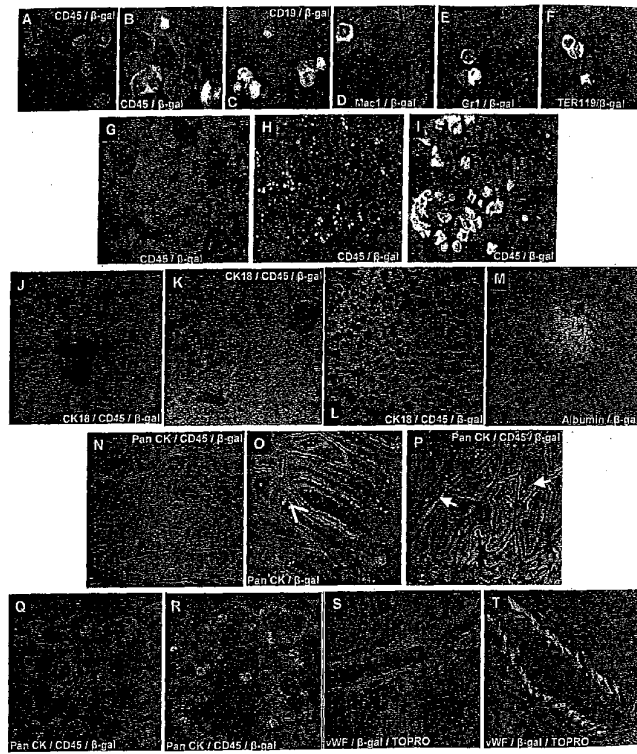
Fig. 3

Fig. 4

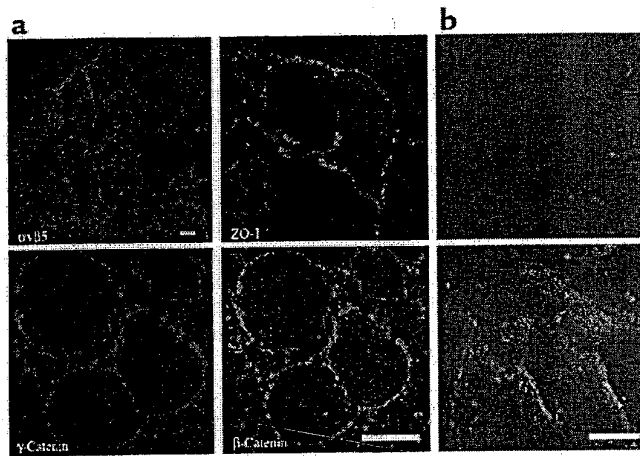


WO 02/064748

5/11

PCT/US02/04652

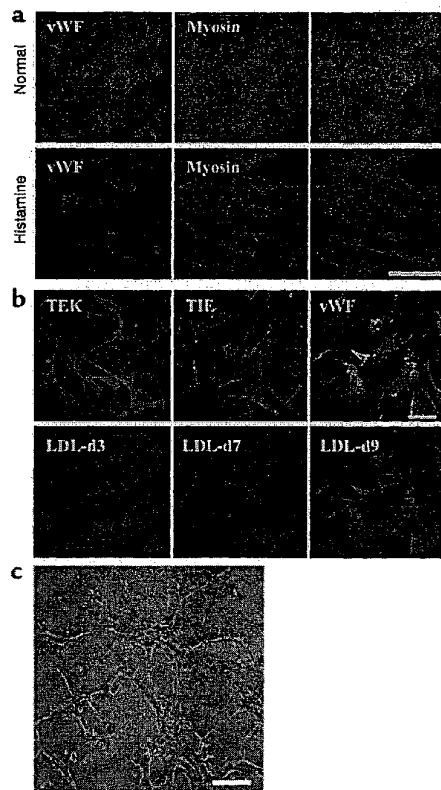
Fig. 5



WO 02/064748

6/11

PCT/US02/04652

Fig. 6

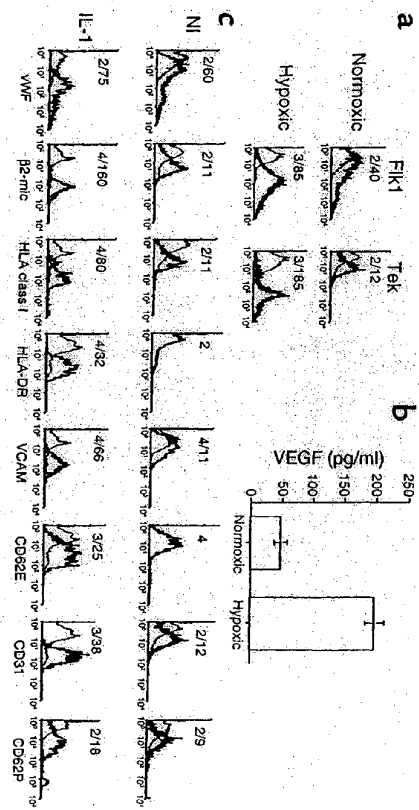
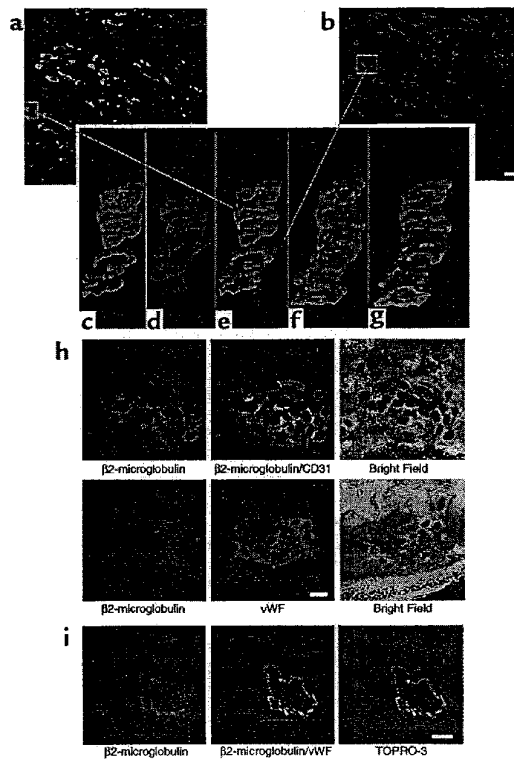


Fig. 7

WO 02/064748

8/11

PCT/US02/04652

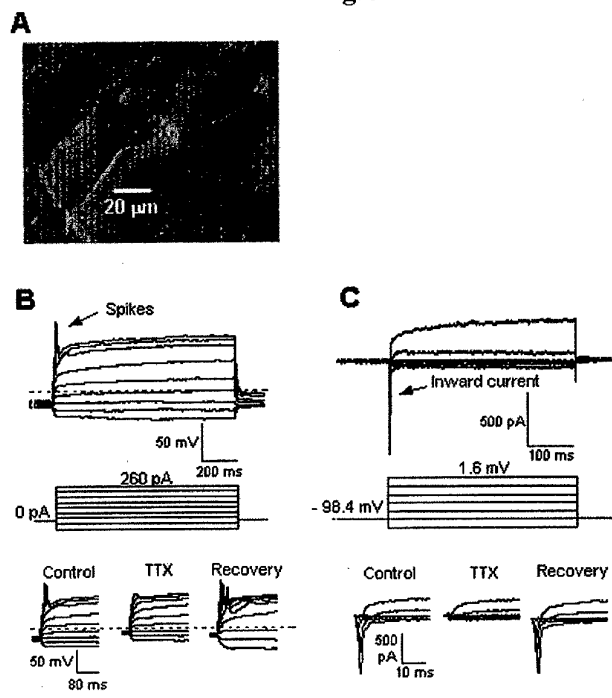
Fig. 8

WO 02/064748

9/11

PCT/US02/04652

Fig. 9



WO 02/064748

10/11

PCT/US02/04652

Fig. 10

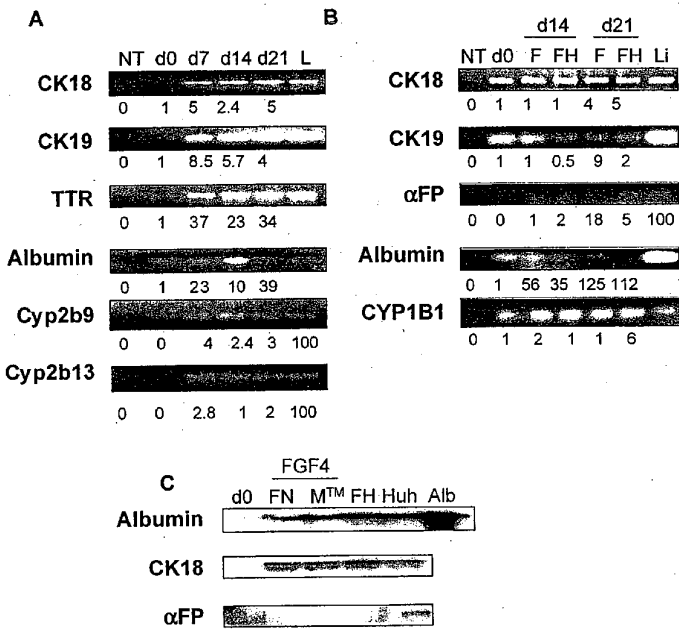
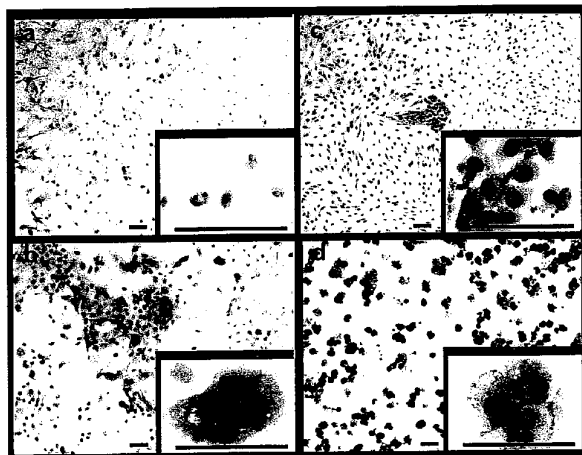


Fig. 11



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
22 August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/064748 A2

(51) International Patent Classification: C12N

(21) International Application Number: PCT/US02/04652

(22) International Filing Date: 14 February 2002 (14.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/268,786 14 February 2001 (14.02.2001) US
60/269,062 15 February 2001 (15.02.2001) US
60/310,625 7 August 2001 (07.08.2001) US
60/343,386 25 October 2001 (25.10.2001) USCZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KR, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent:
(BI, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report(48) Date of publication of this corrected version:
24 April 2003(15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 17/2003 of 24 April 2003, Section IIFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning
of each regular issue of the PCT Gazette.(71) Applicants and
(72) Inventors: FURCHT, Leo, T. [US/US]; MCL LLC, 2100
West 21st Street, Minneapolis, MN 55455 (US); VER-
FAILLIE, Catherine, M. [US/US]; University of Min-
nesota, MMC 715, 422 Delaware Street SE, Minneapolis,
MN 55455; REYES, Morayma [US/US]; 1011 29th Av-
enue S.E., Apartment C, Minneapolis, MN 55414 (US).(74) Agent: LAWRENCE, William, F.; Frommer Lawrence &
Hong LLP, 745 Fifth Avenue, New York, NY 10151 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,(54) Title: MULTIPOTENT ADULT STEM CELLS, SOURCES THEREOF, METHODS OF OBTAINING AND MAINTAINING
SAME, METHODS OF DIFFERENTIATION THEREOF, METHODS OF USE THEREOF AND CELLS DERIVED THEREOF(57) Abstract: The present invention relates generally to mammalian multipotent adult stem cells (MASC), and more specifically
to methods for obtaining, maintaining and differentiating MASC to cells of multiple tissue types. Uses of MASC in the therapeutic
treatment of disease are also provided.

WO 02/064748 A2

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
22 August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/064748 A3(51) International Patent Classification: A01N 63/00.
A61K 48/00, C12Q 1/02, C12N 5/00, 5/02, 15/00,
C07K 1/00, 14/00, G01N 33/48, 33/50

(21) International Application Number: PCT/US02/04652

(22) International Filing Date: 14 February 2002 (14.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/268,786 14 February 2001 (14.02.2001) US
60/269,062 15 February 2001 (15.02.2001) US
60/310,625 7 August 2001 (07.08.2001) US
60/343,386 25 October 2001 (25.10.2001) US(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NI, SN, TD, TG).Published:
with international search report(71) Applicants and
(72) Inventors: FURCHT, Leo, T. [US/US]; MCL LLC, 2100
West 21st Street, Minneapolis, MN 55455 (US); VER-
FAILLIE, Catherine, M. [US/US]; University of Min-
nesota, MMC 716, 422 Delaware Street SE, Minneapolis,
MN 55455; REYES, Morayma [US/US]; 1011 29th Av-
enue S.E., Apartment C, Minneapolis, MN 55414 (US).(88) Date of publication of the international search report:
21 August 2003(15) Information about Correction:
Previous Correction:
see PCT Gazette No. 17/2003 of 24 April 2003, Section II(74) Agent: LAWRENCE, William, F.; Frommer Lawrence &
Haug LLP, 745 Fifth Avenue, New York, NY 10151 (US).For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/064748 A3

(54) Title: MULTIPOTENT ADULT STEM CELLS, SOURCES THEREOF, METHODS OF OBTAINING AND MAINTAINING
SAME, METHODS OF DIFFERENTIATION THEREOF, METHODS OF USE THEREOF AND CELLS DERIVED THEREOF(57) Abstract: The present invention relates generally to mammalian multipotent adult stem cells (MASC), and more specifically
to methods for obtaining, maintaining and differentiating MASC to cells of multiple tissue types. Uses of MASC in the therapeutic
treatment of disease are also provided.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/04652
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A01N 63/00; A61K 48/00; C12Q 1/02; C12N 5/00, 5/08, 5/02, 15/00; C07K 1/00, 14/00; G01N 33/48, 33/50 US CL : 424/93.2, 93.21; 435/29, 325, 366, 377, 384, 387; 530/412; 702/19, 20; 800/24 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/93.2, 93.21; 435/29, 325, 366, 377, 384, 387; 530/412; 800/24 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HULLIN, Q. et al. Identification of Genes Responsible for Bone Differentiation from Human Bone Marrow Derived Multipotent Adult Stem Cells (MASC). Blood. 16 November 2000, Vol. 96, No. 11, Part. 1, ppages 70a-71a, Abs. 298, see entire abstract.	1-11, 14-73, 86, 87 and 94-101
Y	REYES, M. et al. Characterization of Multipotent Adult Progenitor Cells, a Subpopulation of Mesenchymal Stem Cells. Annals of the New York Academy of Sciences. 2001, Vol. 938, pages 231-235, see pages 232-234.	1-11, 14-73, 86, 87, 94-101
Y	KUZNETSOV, S. A. et al. Factors Required for Bone Marrow Stromal Fibroblast Colony Formation In Vitro. British Journal of Haematology. June 1997, Vol. 97, issue 3, pages 561-570, see especially pages 566-569.	1-11, 14-73, 86, 87, 94-101
Y	KEENE, C. D. et al. Phenotypic Expression of Transplanted Human Bone Marrow-Derived Multipotent Adult Stem Cells into the Rat CNS. Experimental Neurology. August 2000, Vol. 164, No. 2, page 465, column 2, see entire document.	1-11, 14-73, 86, 87, 94-101
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 August 2002 (02.08.2002)		Date of mailing of the international search report 13 SEP 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Deborah Crouch, Ph.D. Telephone No. 703-308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/04652

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARMUR, R. et al. Isolation and Developmental Characterization of Cerebral Cortical Multipotent Progenitors. <i>Developmental Biology</i> . 1998, Vol. 204, No. 2, pages 577-591, see especially pages 583-588.	1-11, 14-73, 86, 87, 94-101
Y	GEIGER, H. et al. Globin Gene Expression is Reprogrammed in Chimeras Generated by Injecting Adult Hematopoietic Stem Cells into Mouse Blastocysts. <i>Cell</i> . 12 June 1998, Vol. 93, issue 6, pages 1055-1065, see especially pages 1059-1063.	12 and 13
Y	GRIGORIADOU, K. et al. MHC Class Ia Molecules Alone Control NK-Mediated Bone Marrow Graft Rejection. <i>European Journal of Immunology</i> . November 1999, Vol. 29, No. 11, pages 3683-3690, see especially pages 3685-3688.	74-85
Y	GEISLER, E. K. et al. Effective Use of Donor MHC Class I Gene Therapy in Organ Transplantation: Prevention of Antibody-Mediated Hyperacute Heart Allograft Rejection in Highly Sensitized Rat Recipients. <i>Human Gene Therapy</i> . 2000, Vol. 11, issue 3, pages 459-469, see especially pages 462-468.	74-85
A	CARGILL, M. et al. Characterization of Single-Nucleotide Polymorphisms in Coding Regions of Genes. <i>Nature Genetics</i> . July 1999, Vol. 22, 231-238.	88-95
A	GULCHER, J. et al. Population Genetics: Laying the Groundwork for Genetic Disease Modeling and Targeting. <i>Clinical Chemical Laboratory Medicine</i> . 1998, Vol. 36, No. 8, pages 523-527.	88-95

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/04652
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	☐	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	☐	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	☒	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	☐	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		
	☐	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	☐	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/04652

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-13 and 21-22, drawn to an isolated MASC, a method of creating a normal nonhuman animal comprising inserting the MASC into a blastocyst and a method for isolating and propagating an MASC.

Group II, claim(s) 14-20, drawn to a composition of MASC and a culture medium and a composition of MASC progeny.

Group III, claim(s) 23-27, drawn to a method of differentiating MASC cells ex vivo by culturing MASC cells in the presence of differentiation factors.

Group IV, claim(s) 28-36, drawn to a method of differentiating MASC cells in vivo by administering expanded cells to a mammalian host.

Group V, claim(s) 37-73,86 and 87, drawn to a method of treatment comprising administering to patient an amount of MASC or their progeny.

Group VI, claim(s) 74-79, drawn to a method of inhibiting the rejection of heterologous MASC transplanted into a patient comprising introducing into the MASC a DNA sequence encoding MHC antigens.

Group VII, claim(s) 80-85, drawn to a method of inhibiting the rejection of heterologous MASC transplanted into a patient comprising knocking out expression of MHC antigens.

Group VIII, claim(s) 88, drawn to a method of drug discovery comprising analyzing the genomic or proteomic make up of MASC or their progeny.

Group IX, claim(s) 89-90, drawn to a method of identifying the components of a differentiation pathway in vitro.

Group X, claim(s) 89 and 91, drawn to a method of identifying the components of a differentiation pathway in vivo.

Group XI, claim(s) 92, drawn to a method for comparing differentiation in vitro with differentiation in vivo.

Group XII, claim(s) 93, drawn to a method of identifying the molecular components of disease or injury.

Group XIII, claim(s) 94 and 95, drawn to a method of generating products in vitro that have therapeutic, diagnostic or research utility identifying the components of a differentiation pathway in vitro.

Group XIV, claim(s) 96, drawn to a method of inducing tolerance to an antigen.

Group XV, claim(s) 97 and 98, drawn to a method for removing toxins from the blood of a patient.

Group XVI, claim(s) 99, drawn to a method for delivering therapeutic products comprising administering genetically transformed MASC.

Group XVII, claim(s) 100 and 101, drawn to a method for testing toxicity of a drug. The inventions listed as Groups I-XVII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions listed as Groups I-XVII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/04652

Unity of invention between different categories of inventions will only be found to exist if specific combinations of inventions are present. Those combinations include:

- 1) A product and a special process of manufacture of said product.
- 2) A product and a process of use of said product.
- 3) A product, a special process of manufacture of said product, and a process of use of said product.
- 4) A process and an apparatus specially designed to carry out said process.
- 5) A product, a special process of manufacture of said product, and an apparatus specially designed to carry out said process.

The allowed combinations do not include multiple products, multiple methods of using said products, and methods of making multiple products as claimed in the instant application, see MPEP § 1850. Also, 37 CFR 1.475 does not provide for multiple independent products, methods of manufacture and methods of use (37 CFR 1.475(d)).

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/32	A 6 1 K 35/32	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/39	A 6 1 K 35/39	
A 6 1 K 35/407	A 6 1 K 35/407	
A 6 1 K 35/44	A 6 1 K 35/44	
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	A
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 47/46	A 6 1 K 47/46	
A 6 1 L 27/00	A 6 1 L 27/00	Q
A 6 1 L 31/00	A 6 1 L 31/00	Z
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 1/18	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 3/00	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/04	A 6 1 P 7/04	
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 7/08	A 6 1 P 7/08	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 13/10	A 6 1 P 13/10	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 19/04	A 6 1 P 19/04	
A 6 1 P 19/08	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/02	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 39/02	A 6 1 P 39/02	
A 6 1 P 41/00	A 6 1 P 41/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 1
	A 6 1 P 43/00	1 0 5

(31)優先権主張番号 60/343,386

(32)優先日 平成13年10月25日(2001.10.25)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,

BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(71)出願人 503294430

レイエス, モレイマ

REYES, Morayma

アメリカ合衆国 ミネソタ州 55414 ミネアポリス トゥエンティーナインス アヴェニュー
エスイー 1011 アpartment シー

(74)代理人 100073184

弁理士 柳田 征史

(74)代理人 100090468

弁理士 佐久間 剛

(72)発明者 ファークト, レオ ティー

アメリカ合衆国 ミネソタ州 55455 ミネアポリス ウェスト トゥエンティーファースト
ストリート 2100 エムシーエル エルエルシー

(72)発明者 ヴァーフエイリー, キャセリン エム

アメリカ合衆国 ミネソタ州 55455 ミネアポリス デラウェア ストリート エスイー
422 ユニヴァーシティ オブ ミネソタ エムエムシー 716

(72)発明者 レイエス, モレイマ

アメリカ合衆国 ミネソタ州 55414 ミネアポリス トゥエンティーナインス アヴェニュー
エスイー 1011 アpartment シー

Fターム(参考) 4B065 AA91X AA93X AC20 BA22 CA44

4C076 AA95 BB01 BB11 BB21 BB30 CC01 CC07 CC09 CC10 CC11
CC14 CC15 CC16 CC17 CC18 CC21 CC26 CC27 CC29 CC30
CC31 CC32 CC35 EE57 FF68

4C081 AB13 BB06 CD27 CD28 CD29 CD34 CE02 DA03 DC03

4C084 AA17 MA52 MA55 MA56 MA66 NA10 NA13 NA14 ZA01 ZA02
ZA20 ZA31 ZA33 ZA36 ZA51 ZA53 ZA55 ZA59 ZA66 ZA75
ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZB05 ZB07 ZB08 ZB11 ZB21 ZB26
ZB31 ZB32 ZB33 ZB35 ZC02 ZC21 ZC35 ZC37

4C085 AA02 BA01 EE03 GG01 GG08

4C087 AA01 AA02 BB33 BB34 BB44 BB45 BB46 BB47 BB48 BB49
BB51 BB52 BB56 BB57 BB63 BB64 BB65 DA02 DA03 DA25
DA27 DA32 MA52 MA55 MA56 MA66 NA10 NA13 NA14 ZA01
ZA02 ZA20 ZA31 ZA33 ZA36 ZA51 ZA53 ZA55 ZA59 ZA66
ZA75 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZB05 ZB07 ZB08 ZB11 ZB21
ZB26 ZB31 ZB32 ZB33 ZB35 ZC02 ZC21 ZC35 ZC37