



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201919666 A

(43)公開日：中華民國 108 (2019) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：107131786

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 09 月 10 日

(51)Int. Cl. : A61K35/28 (2015.01)

A61P11/06 (2006.01)

(30)優先權：2017/09/15 澳大利亞

2017903758

(71)申請人：澳大利亞商辛那塔治療有限公司 (澳大利亞) CYNATA THERAPEUTICS LIMITED (AU)

澳大利亞

(72)發明人：羅伊斯 賽門 ROYCE, SIMON (AU)；山繆爾 克里斯安 SAMUEL, CHRISHAN (AU)

(74)代理人：鄭志玲

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：13 項 圖式數：11 共 56 頁

(54)名稱

治療過敏性氣道疾病 (AAD)/哮喘的方法

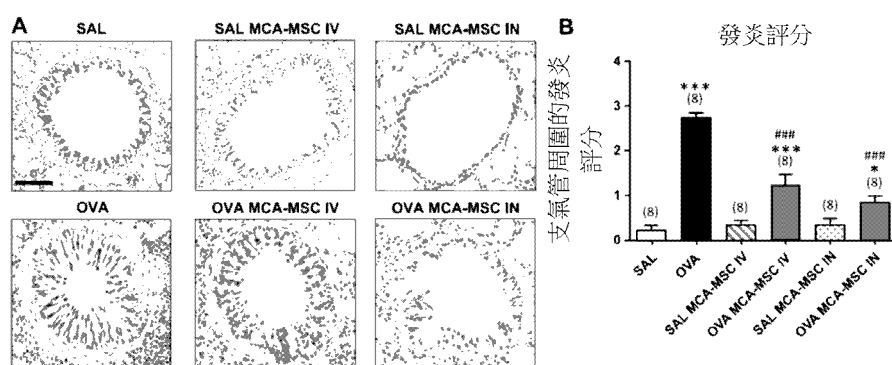
METHOD FOR TREATING ALLERGIC AIRWAYS DISEASE (AAD)/ ASTHMA

(57)摘要

本發明涉及一種間質血管母細胞衍生的間質幹細胞(mesenchymoangioblast-derived mesenchymal stem cell, MSC-MSCs)在體體內治療過敏性氣道疾病(allergic airway disease, AAD)/哮喘之用途。

The invention relates to use of a mesenchymoangioblast-derived mesenchymal stem cell (MSC-MSC) for treating allergic airway disease (AAD)/ asthma in a subject.

指定代表圖：



【圖1】

【發明說明書】

【中文發明名稱】 治療過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘的方法

【英文發明名稱】 METHOD FOR TREATING ALLERGIC AIRWAYS DISEASE
(AAD)/ ASTHMA

【技術領域】

【0001】 本發明涉及在一個體體內治療過敏性氣道疾病(allergic airway disease, AAD)/哮喘。

【先前技術】

【0002】 哮喘是一種慢性呼吸道疾病，影響全球約3億人口，每年造成25萬人死亡。其發病機制有三個主要組成部分：氣道發炎(airway inflammation, AI)；氣道重塑(airway remodeling, AWR；代表氣道/肺部的結構變化，最終導致氣道纖維化及阻塞)；以及氣道過度敏感(airway hyperresponsiveness, AHR；哮喘的臨床特徵)。氣道重塑(AWR)可以來自持久性或慢性氣道發炎(AI)，但也可以獨立於氣道發炎(AI)發展並促成氣道過度敏感(AHR)。

【0003】 目前的哮喘治療，包括皮質類固醇和 β -激動劑，主要集中在症狀管理，而非疾病消退，因此並不完全有效。以基於 β -激動劑療法進行治療的個體的哮喘症狀緩解，但其潛在的氣道發炎(AI)持續存在。因此，需要長期使用 β -激動劑的個體的哮喘嚴重惡化的風險更高，其可導致住院及死亡。

【0004】 皮質類固醇的黃金標準治療對於治療哮喘患者的嚴重及嚴重難治的次族群也是無效的。嚴重的哮喘患者通常需要使用高劑量皮質類固醇來治

療，這些皮質類固醇可能與全身副作用有關，且不一定能改善肺功能或生活品質。此外，哮喘患者的嚴重難治的次族群顯現出固定性氣道的限制，因此該族群顯示出氣道重塑(AWR)在其哮喘症狀中具有部分的關鍵作用，突顯出對於可以將氣道重塑(AWR)作為標的且降低氣道重塑(AWR)的治療策略之迫切需求。

【0005】 間質幹細胞(Mesenchymal stem cells，MSCs)為多能的基質細胞，具有分裂為許多細胞系的能力。這些細胞表現第I類主要組織相容性錯合物(Class I major histocompatibility complex，MHC-I)，但缺乏第II類主要組織相容性錯合物(MHC-II)以及共刺激分子CD80、CD86與CD40，因此是免疫紊亂的。因此，間質幹細胞(MSCs)可以透過靜脈內(intravenous，IV)輸注全身施用，而可廣泛分佈。在靜脈內給藥後，間質幹細胞(MSCs)會積聚於肺部。間質幹細胞(MSCs)通過表現第4型趨化因子受體也聚積於受損的組織中，第4型趨化因子受體的表現在促發炎的環境中增強，如在哮喘中，增強其聚積的能力。

【0006】 模擬人類哮喘的幾種特徵的過敏性氣道疾病(AAD)的小鼠模型已被用於顯示間質幹細胞(MSCs)通過直接細胞-細胞接觸以及旁分泌因子的分泌而表現出免疫調節與抗發炎的特性。施用外源性間質幹細胞(MSCs)顯示出Th2增殖的減少以及Th2偏向的降低，這種現象有助於過敏性氣道疾病(AAD)。已經觀察到抑制樹突細胞活化、遷移與抗原呈現。在支氣管肺泡灌洗液中觀察到嗜酸性白血球相關的促發炎細胞因子的減少。與抑制氣道發炎(AI)的皮質類固醇相比，已在這些模型中顯示出間質幹細胞(MSCs)主動降低負責發炎的細胞的存在及活性。

【0007】此外，間質幹細胞(MSCs)治療已被證明可減少氣道上皮厚度、平滑肌增生以及杯狀細胞轉變，並通過其促進膠原蛋白降解明膠酶含量的能力適度減少上皮及總膠原沉積(纖維化)，暗示間質幹細胞(MSCs)也有反重塑作用。

【0008】然而，間質幹細胞(MSCs)並未一致地被證實緩解與慢性疾病相關的不良症狀，而且間質幹細胞(MSCs)治療的結果可能因其組織起源/來源、培養擴張的程度、供體依賴性生存力與療效，以及其施用的時間而異。

【0009】此外，當與第二種治療劑聯合給藥時，間質幹細胞(MSCs)僅顯示出有益的效果。

【0010】另外，由於只能從每個供體器官中分離出相對少量的間質幹細胞(MSCs)，因此需要連續供應供體以協助足夠數量的實驗及商業用途。

【0011】應當理解的是，如果本文提及任何現有技術出版物，則此類參考並不構成承認該出版物形成在澳洲或任何其他國家的本領域公知常識的一部分。

【發明內容】

【0012】第一方面提供一種治療在體體內的過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘的方法，該方法包含向該個體施用間質血管母細胞間質幹細胞(mesenchymoangioblast mesenchymal stem cell, MCA-MSCs)，其中該間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)表現miR-145-5p、miR-181b-5p，以及miR-214-3p，但不表現miR-127-3p與miR-299-5p。

【0013】該第一方面的替代或額外的具體實施例係提供一種間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)在製備用於在體體內治療過敏性氣道疾病(AAD)/

哮喘的藥物中的用途，其中該間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)表現miR-145-5p、miR-181b-5p，以及miR-214-3p，但不表現miR-127-3p與miR-299-5p。

【0014】 該第一方面的另一替代或額外的具體實施例係提供一種間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)，以供用於在個體體內治療過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘的方法，其中該間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)表現miR-145-5p、miR-181b-5p，以及miR-214-3p，但不表現miR-127-3p與miR-299-5p。

【0015】 於一具體實施例中，該間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)具有CD73⁺CD105⁺CD90⁺CD146⁺CD44⁺CD10⁺CD31⁻CD45⁻的表型。

【0016】 於一具體實施例中，該間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)由包含以下之方法所製備：

(a) 於間質集落形成培養基 (mesenchymal-colony forming medium，M-CFM) 中培養原始的中胚層細胞，該培養基 (M-CFM) 包含LiCl與FGF2，但不包括PDGF，在含氧量正常的條件下培養足夠的時間以形成間質集落；以及

(b) 黏附地培養 (a)的該間質集落以產生該間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)。

【0017】 於一具體實施例中，該間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)透過靜脈內或鼻內給藥。於一具體實施例中，該間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)透過鼻內給藥。

【0018】 於一具體實施例中，治療包含向該個體施用約 1×10^6 至約 1×10^9 個間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)。

【0019】 於一具體實施例中，該個體為哺乳動物。於一具體實施例中，該個體為人類。

【0020】於一具體實施例中，該個體已先施用一皮質類固醇或一 β -激動劑以治療哮喘。於另一具體實施例中，該個體未先施用一皮質類固醇或一 β -激動劑以治療哮喘。

【0021】於一具體實施例中，該個體不施用皮質類固醇或 β -激動劑。

【0022】於一具體實施例中，該個體患有嚴重的哮喘或嚴重難治性哮喘。

【0023】於一具體實施例中，治療過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵包含：

(a) 減少氣道發炎(AI)、氣道重塑(AWR)、氣道纖維化、肺纖維化、杯狀細胞轉變、上皮增厚、氣道轉化生長因子(transforming growth factor, TGF)- β 1含量、皮下肌纖維母細胞密度、皮下膠原濃度，或總肺膠原濃度；或

(b) 增加肺基質金屬蛋白酶(lung matrix metalloproteinase, MMP)活性；或

(c) (a)的任何一項或多項特徵的任何組合或(a)及(b)的任何一項或多項特徵的任何組合。

【0024】間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)用於治療過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵的用途可提供以下一個或多個非限制性優點：

- 若不完全則大體上逆轉異常氣道TGF- β 1含量、氣道/肺纖維化以及氣道過度敏感(AHR)
- 增加膠原蛋白降解基質金屬蛋白酶(MMP)含量
- 對測量參數的基礎表現沒有影響，表示這是一種安全有效的過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘治療。

【0025】本發明提供的解決方法是令人意外的，因為先前的研究顯示，當基於幹細胞的治療與抗纖維化藥物結合給藥時，卵白蛋白(ovalbumin, OVA)誘

導的皮下與總膠原沉積的促進只能完全逆轉。因此，本發明提供了在治療過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘的顯著改進。

【圖式簡單說明】

【0026】圖1所示為根據實施例4的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對支氣管周圍的發炎評分之影響。A) 來自所研究的每組的蘇木精和伊紅(hematoxylin and eosin, H&E)染色的肺切片的代表性顯微鏡照片，顯示在氣道上皮層之中及周圍的支氣管壁發炎性細胞浸潤的程度。比例尺=50 μm 。B) 還顯示了來自五個氣道/小鼠， $n = 8$ 隻小鼠/組的平均值 $\pm$ SEM的發炎評分，其中切片評定發炎聚集體的數量和分佈，範圍為0(無明顯發炎)至4(嚴重發炎)。與生理鹽水(SAL)組相比，* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$ ；與卵清蛋白(OVA)組相比，### $P < 0.001$ 。

圖2所示為根據實施例4的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對杯狀細胞轉變的影響。A) 來自所研究的每組的阿爾新藍高碘酸希夫 (Alcian blue periodic acid Schiff, ABPAS)染色的肺切片的代表性顯微鏡照片，顯示在氣道上皮層內杯狀細胞的程度(僅在卵清蛋白(OVA)損傷的小鼠中以箭頭指示)。比例尺=25 μm 。B) 還顯示來自五個氣道/小鼠的平均 $\pm$ SEM杯狀細胞計數， $n = 8$ 隻小鼠/組。與生理鹽水(SAL)組相比，*** $P < 0.001$ ；與卵清蛋白(OVA)組相比，### $P < 0.01$ ，#### $P < 0.001$ 。

圖3所示為根據實施例4的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對氣道上皮厚度與上皮膠原沉積(纖維化)的影響。A) 來自所研究的每組的Masson三色染色的肺切片的代表性顯微鏡照片，顯示氣道上皮厚度與上皮膠原蛋白厚度(藍

色染色)的程度。比例尺=50 μm 。還顯示了相對於來自五個氣道/小鼠， $n = 8$ 隻小鼠/組的基底膜(basement membrane, BM)長度的平均值 $\pm\text{SEM}$ B)上皮厚度(μm^2)以及 C) 上皮膠原厚度(μm)。與生理鹽水(SAL)組相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ；與卵清蛋白(OVA)組相比，# $P < 0.05$ ，### $P < 0.001$ ；與OVA 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs) IV組相比， $\text{¶}P < 0.05$ 。

圖4顯示了根據實施例4的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對總肺膠原濃度(纖維化的另一測量)的影響。顯示了來自所研究的每組的平均值 $\pm\text{SEM}$ 總肺膠原濃度(%肺膠原含量/乾重組織)；從每隻小鼠的第二大肺葉測量，來自 $n = 8$ 隻小鼠/組。與生理鹽水(SAL)組相比，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ；與卵清蛋白(OVA)組相比，# $P < 0.05$ ，### $P < 0.001$ ；與OVA 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs) IV組相比， $\text{¶}P < 0.05$ 。

圖5所示為根據實施例4的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對氣道TGF- $\beta 1$ (促纖維化細胞因子)表現的影響。A) 來自每組的免疫組織化學(immunohistochemistry, IHC)染色的肺切片的代表性顯微鏡照片，顯示在氣道上皮層內及周圍TGF- $\beta 1$ 染色/表現的程度。比例尺=50 μm 。B) 還顯示了來自五個氣道/小鼠， $n = 7-8$ 小鼠/組的相對平均值 $\pm\text{SEM}$ TGF- $\beta 1$ 染色(表示為%/場)。與生理鹽水(SAL)組相比，*** $P < 0.001$ ；與卵清蛋白(OVA)組相比，### $P < 0.001$ 。

圖6所示為根據實施例4的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對上皮肌纖維母細胞(關鍵纖維化產生細胞)密度的影響。A) 來自所研究的每組的免疫組織化學(IHC)染色的肺切片的代表性顯微鏡照片，顯示了在氣道上皮層內 α -SMA染色的肌纖維母細胞密度的程度(如箭頭所示)。比例尺=25 μm 。B) 還顯示來自五個氣道/小鼠的肌纖維母細胞的平均值 $\pm\text{SEM}$ 數(每100 μm 基底膜(BM)長度)， n

= 7-8隻小鼠/組。與生理鹽水(SAL)組相比，*** $P < 0.001$ ；與卵清蛋白(OVA)組相比，[#] $P < 0.05$ ，^{###} $P < 0.001$ ；與OVA 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs) IV組相比，[¶] $P < 0.05$ 。

圖7所示為根據實施例4的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9)(膠原降解酶)含量的影響。A) 代表性的明膠酶譜(倒置影像)顯示在所研究的每組中肺基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9)(明膠酶B；92 kDa)以及基質金屬蛋白酶-13 (MMP-13) (膠原酶3；約55 kDa)的相對表現含量。在每種情況下，將每個樣本10 μ g的總蛋白質加載到酶譜上進行分析；而且分開的酶譜分析每組5-6個額外的樣本產生類似的結果。B) 還顯示了來自 $n = 7-8$ 小鼠/組的相對平均值 $\pm$ SEM光密度(optical density, OD)基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9)(其為雌性Balb/c小鼠的肺中最豐富表現的明膠酶)。與生理鹽水(SAL)組相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ；與卵清蛋白(OVA)組相比，^{###} $P < 0.001$ ；與OVA 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs) IV組相比，[¶] $P < 0.05$ 。

圖8所示為根據實施例4的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對氣道過度敏感(AHR)的作用。氣道阻力(反映氣道過度敏感(AHR)的變化)通過侵入性體積描記法評估，以反應增加劑量的霧化乙醯甲膽鹼(支氣管收縮劑；並表示為相對於基線的阻力變化)。所顯示為對於每個劑量的乙醯甲膽鹼的平均值 $\pm$ SEM氣道阻力，來自 $n = 7-8$ 隻小鼠/組。與生理鹽水(SAL)組相比，* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$ ；與卵清蛋白(OVA)組相比，^{##} $P < 0.01$ ，^{###} $P < 0.001$ ；與OVA 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs) IV組相比，^{¶¶} $P < 0.01$ 。

圖9所示為實施例5及6的慢性過敏性氣道疾病模型的示意性時間線。從第64-78天(當肺病理學建立並且正在進行時)進行治療。

圖10所示為根據實施例5補充有地塞米松(dexamethasone, DEX)的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對氣道過度敏感(AHR)的影響。根據實施例4, 氣道阻力(反映氣道過度敏感(AHR)的變化)通過侵入性體積描記法評估以反應增加劑量的霧化乙醯甲膽鹼(支氣管收縮劑; 並且表示為相對於基線的阻力變化)。所顯示為對每種測試的乙醯甲膽鹼劑量的平均值 $\pm$ SEM氣道阻力; 來自n = 6-8隻小鼠/組。與生理鹽水(SAL)組相比, *P < 0.05, ***P < 0.001; 與卵清蛋白(OVA)組相比, #P < 0.05, ###P < 0.001; 與OVA + DEX組相比, ^{##}P < 0.01。

圖11所示為根據實施例6對鼻內(intranasally, IN)與靜脈內(intravenously, IV)與氣管內(endotracheally, ET)給藥的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對氣道過度敏感(AHR)的影響。根據實施例4, 氣道阻力(反映氣道過度敏感(AHR)的變化)通過侵入性體積描記法評估以反應增加劑量的霧化乙醯甲膽鹼(支氣管收縮劑; 並且表示為相對於基線的阻力變化)。所顯示為對每種測試的乙醯甲膽鹼劑量的平均值 $\pm$ SEM氣道阻力; 來自n = 6-8隻小鼠/組。與生理鹽水組相比, ** p < 0.01, *** p < 0.001; 與卵清蛋白(OVA)組相比, ^{##}p < 0.01。

【實施方式】

【0027】 稱為氣道重塑(AWR)的結構變化是慢性/重度哮喘的特徵, 並導致肺功能障礙。通常, 以皮質類固醇及/或 β 激動劑治療哮喘。

【0028】 本發明涉及使用間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)治療個體的哮喘, 這是對以皮質類固醇及/或 β 激動劑治療哮喘的改進, 並且是對間質幹細胞(MSCs)與其它藥物組合的建議治療的改進。

【0029】 實施例1及2證明了人類的誘導的多能幹細胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)分化成稱為間質血管母細胞(mesenchymoangioblasts, MCAs)的前體細胞，一類早期選殖的中胚層前體細胞，隨後分化為間質幹細胞(MCA-MSCs)。由於誘導的多能幹細胞(iPSCs)可以無限增殖，而且間質血管母細胞(MCAs)本身可以擴展到極大量的間質幹細胞(MSCs)，因此可以從來自單一健康捐血者的單個誘導的多能幹細胞(iPSCs)主細胞庫獲得足夠的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)，從而限制了供體依賴性和擴增依賴性變異性以及非靶細胞的污染，一旦形成間質幹細胞(MSCs)就不需要過度的培養擴增。

【0030】 與現有技術的間質幹細胞(MSCs)相比，本發明的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)提供了基本上無限供應的優點和改善的免疫調節作用的進一步優點。

【0031】 在本發明中，具體而言是在實施例4和5中，研究了這些間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)在遞送至公認的慢性過敏性氣道疾病(AAD)小鼠模型時的治療潛力。該過敏性氣道疾病(AAD)小鼠模型具有人類哮喘的三個中心特徵：氣道發炎(AI)、氣道重塑(AWR)和氣道過度敏感(AHR)，並且在本領域中被接受為哮喘的臨床前模型。具體而言，比較了靜脈內(IV)施用的與鼻內(IN)施用的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的抗重塑作用。

【0032】 重要的是，儘管一些間質幹細胞(MSCs)可能已經在治療哮喘或其症狀方面顯示出一些功效，但是只有當這些間質幹細胞(MSCs)與其他治療劑組合使用時才能獲得這種效果。有利地，本發明避免了對組合療法的需要。

【0033】 哮喘

【0034】哮喘及/或過敏性氣道疾病(AAD)的特徵可以是任何組合中的任何一種或多種以下特徵：氣道發炎(AI)、氣道重塑(AWR)、氣道過度敏感(AHR)、氣道/肺纖維化、杯狀細胞轉變、上皮增厚、氣道轉化生長因子(TGF)- β 1含量升高、缺乏或低肺基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9)含量、增加上皮肌纖維母細胞密度、上皮膠原蛋白積聚，以及總肺膠原蛋白積聚。

【0035】因此，以本發明的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)治療哮喘及/或過敏性氣道疾病(AAD)可以通過以任何組合治療任何一種或多種以下特徵來表徵：氣道發炎(AI)降低、氣道重塑(AWR)降低、氣道/肺纖維化減少、杯狀細胞轉變減少、上皮增厚減少、氣道轉化生長因子(TGF)- β 1含量下降、上皮肌纖維母細胞和膠原減少，以及肺總膠原濃度降低。

【0036】以本發明的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)處理過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘可以增加基質金屬蛋白酶(MMP)的表現/活性，例如明膠酶及/或膠原酶。於一具體實施例中，該基質金屬蛋白酶(MMP)為基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9)。於另一具體實施例中，該基質金屬蛋白酶(MMP)為基質金屬蛋白酶-13 (MMP-13)。於另一具體實施例中，該基質金屬蛋白酶(MMP)為基質金屬蛋白酶-1 (MMP-1)、基質金屬蛋白酶-2 (MMP-2)、基質金屬蛋白酶-3 (MMP-3)、基質金屬蛋白酶-7 (MMP-7)、基質金屬蛋白酶-8 (MMP-8)，或基質金屬蛋白酶-12 (MMP-12)。

【0037】 間質血管母細胞-間質幹細胞(MCA-MSCs)

【0038】據此，本發明通過施用間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)提供了過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其一種或多種特徵的改進療法。間質血管

母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)通過其免疫調節特性發揮作用，並且能夠直接作用於產生過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘特徵的部位。

【0039】 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)分泌生物活性分子，如細胞因子、趨化因子，以及生長因子，並具有調節免疫系統的能力。已顯示間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)在不依賴植入的情況下促進再生和對免疫系統的作用。換言之，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)本身不一定被納入宿主個體 - 相反地，它們發揮作用，然後在短時間內消除。然而，也可以移植間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)。

【0040】 如本文所用，「間質幹細胞」或「MSC」指特定類型的幹細胞，其可以從多種組織中分離，包括骨髓、脂肪組織(脂肪)、胎盤以及臍帶血。或者，間質幹細胞(MSCs)可以由多能幹細胞(pluripotent stem cells, PSCs)產生。間質幹細胞(MSCs)也稱為「間質基質細胞」。

【0041】 如本文所用，「間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)」是指經由一間質血管母細胞表型從誘導的多能幹細胞(iPSCs)產生的特定類型的間質幹細胞(MSCs)。從多能幹細胞(PSCs)產生間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的方法描述於2017年3月14日申請的PCT國際專利申請號PCT/AU2017/050228，其透過本交叉引用全部併入，並於實施例1和2中描述。間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)與現有技術的間質幹細胞(MSCs)不同，例如如實施例3中所示。

【0042】 已經顯示間質幹細胞(MSCs)對T細胞、B細胞、樹突細胞、巨噬細胞和天然殺手細胞發揮免疫調節活性。雖然不希望受理論束縛，但潛在的機制可能包含免疫調節介質，例如一氧化氮、吲哚胺2,3-二氧酶、前列腺素E2、

腫瘤壞死因子誘導基因6蛋白、CCL-2，以及程序性死亡配體1。這些調節劑以低含量表現，直至被刺激，例如通過發炎性細胞因子，例如IFN γ 、TNF α 和IL-17。

【0043】如本文所用，「多能幹細胞」或「PSC」是指具有無限繁殖自身並分化成任何其他細胞類型的能力的細胞。有兩種主要類型的PSC：胚胎幹細胞(embryonic stem cells，ESCs)；以及誘導的多能幹細胞(iPSCs)。

【0044】如本文所用，「胚胎幹細胞」或「ESC」是指從已經完成體外受精治療的個體同意捐獻的五至七日齡胚胎中分離的細胞，並且具有多餘的胚胎。從人類胚胎中萃取細胞的倫理問題在某種程度上阻礙了胚胎幹細胞的使用。

【0045】合適的人類多能幹細胞(PSCs)包括H1和H9人類胚胎幹細胞。

【0046】如本文所用，「誘導的多能幹細胞」或「iPSC」是指衍生自成體細胞的類胚胎幹細胞(ESC-like)細胞。誘導的多能幹細胞(iPSCs)具有與胚胎幹細胞(ESCs)非常相似的特徵，但避免了與胚胎幹細胞(ESCs)相關的倫理問題，因為誘導的多能幹細胞(iPSCs)並非來自於胚胎。相反地，誘導的多能幹細胞(iPSCs)通常衍生自完全分化的成體細胞，其已被「重編程」回到多能狀態。

【0047】合適的人類誘導的多能幹細胞(iPSCs)包括，但不限於，衍生自纖維母細胞的iPSC19-9-7T、MIRJT6i-mND1-4以及MIRJT7i-mND2-0，以及衍生自骨髓單核細胞的iPSC BM119-9。其他合適的誘導的多能幹細胞(iPSCs)可以從美國威斯康辛州麥迪遜市的Cellular Dynamics International (CDI)公司獲得。

【0048】於一具體實施例中，根據本發明使用的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)由原始中胚層細胞形成。原始中胚層細胞可能具有間質血管母細胞(MCA)潛能。原始中胚層細胞可具有^{EMH}lin⁻KDR⁺APLNR⁺PDGFRalpha⁺表型。於一具體實施例中，根據本發明使用的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)

由具有間質血管母細胞(MCA)的 $^{EMH}lin^{-}KDR^{+}APLNR^{+}PDGFRalpha^{+}$ 原始中胚層細胞形成。

【0049】如本文所用，「具有間質血管母細胞(MCA)潛能的 $^{EMH}lin^{-}KDR^{+}APLNR^{+}PDGFRalpha^{+}$ 原始中胚層細胞」是指表現典型原條和側板/胚外中胚層基因的細胞。這些細胞有可能在無血清培養基中對纖維母細胞生長因子2 (fibroblast growth factor 2, FGF2)產生反應而形成間質血管母細胞(MCA)和血管母細胞集落。當根據實施例2培養時，這些細胞變成間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)。

【0050】 $^{EMH}lin^{-}$ 乙詞表示缺乏CD31、VE-鈣粘蛋白內皮標記物、CD73和CD105間質/內皮標記物，以及CD43和CD45造血標記物的表現。

【0051】於一具體實施例中，根據本發明所用之間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)具有 $CD73^{+}CD105^{+}CD90^{+}CD146^{+}CD44^{+}CD10^{+}CD31^{-}CD45^{-}$ 的表型。

【0052】於一具體實施例中，根據本發明所用之間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)表現microRNAs miR-145-5p、miR-181b-5p，以及miR-214-3p的每一種，但不表現miR-127-3p與miR-299-5p。

【0053】除了它們在本文中證實的治療過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘的作用之外，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)具有「免疫調節活性」，其可以在體外評估為間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)抑制T輔助細胞($CD4^{+}$)淋巴細胞增殖的能力。免疫調節活性可以相對於參考體外定量，例如使用免疫效力分析法來測定。

【0054】合適的免疫效力分析法使用根據本文公開的方法產生的經輻照的測試間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)和經輻照的參考樣本間質幹細胞(MSC)，其以各種濃度分別接種從健康供體周圍血純化的以羧基螢光素琥珀醯亞胺酯標記的白血球。通過添加CD3和CD28抗體刺激代表參照樣本子集的T輔助(CD4⁺)淋巴細胞。使用流式細胞儀計數CD4標記的T細胞以評估T細胞的增殖。報告IC50值作為參考樣本的函數。IC50值越高表示T輔助(CD4⁺)淋巴細胞增殖的抑制程度越大，因此表示T細胞免疫調節性能優越。在用於該測定之前照射間質幹細胞(MSC)樣本以消除其增殖潛力的混雜因素。

【0055】以間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)治療過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘

【0056】本領域技術人員將理解，向一個體施用一治療有效量的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)以在該個體體內治療過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘的確切方式將由醫師決定。給藥方式，包括劑量，與其他藥劑的組合、給藥的時間和頻率等，可能受到個體的病症和病史的影響。

【0057】儘管本發明的一個優點為間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)可單獨用於治療過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵，但應當理解的是，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)可與另一種哮喘療法組合。例如，當哮喘患者具有現有的哮喘治療方案時，醫生可以用另一種哮喘治療來治療哮喘患者，例如，包含皮質類固醇或 β -激動劑治療，並且隨後以間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)治療。

【0058】間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)可以作為治療組合物施用。如本文所用，「治療組合物」乙詞是指包含間質血管母細胞間質幹細胞

(MCA-MSCs)或如本文所述的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)群體的組合物，其已經配製用於施用於一個體。較佳地，該治療組合物為無菌的。於一具體實施例中，該治療組合物為無熱原的。

【0059】 於一具體實施例中，該間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)或治療組合物提供於一容器中，較佳為一無菌容器，較佳為一無熱原容器。於一具體實施例中，該容器為一注射器，例如適合於推注給藥。於另一具體實施例中，該容器為適於輸注的輸液袋。於另一具體實施例中，容器適於鼻內(IN)施用。

【0060】 該間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)將以符合良好醫療實踐的方式配製，調製劑量和施用。在這種情況下需要考慮的因素包括所治療的特定類型的疾病和預期的副作用或症狀、所治療的具體個體、該個體的臨床狀況、給藥部位、給藥方法、給藥方案，以及醫生所知的其他因素。待施用的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的治療有效量將受這些考慮因素所支配。

【0061】 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的劑量範圍可為從約 10^3 個細胞/ m^2 至約 10^{11} 個細胞/ m^2 ，例如約 10^6 個細胞/ m^2 至約 2×10^8 個細胞/ m^2 ，或約 10^3 個細胞/ m^2 、約 5×10^3 個細胞/ m^2 、約 10^4 個細胞/ m^2 、約 5×10^4 個細胞/ m^2 、約 10^5 個細胞/ m^2 、約 5×10^5 個細胞/ m^2 、約 10^6 個細胞/ m^2 、約 5×10^6 個細胞/ m^2 、約 10^7 個細胞/ m^2 、約 5×10^7 個細胞/ m^2 、約 10^8 個細胞/ m^2 、約 5×10^8 個細胞/ m^2 、約 10^9 個細胞/ m^2 、約 5×10^9 個細胞/ m^2 、約 10^{10} 個細胞/ m^2 、約 5×10^{10} 個細胞/ m^2 ，或約 10^{11} 個細胞/ m^2 。

【0062】 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的劑量範圍可為從約 10^3 個細胞/kg至約 10^{11} 個細胞/kg，例如約 10^6 個細胞/kg至約 2×10^8 個細胞/kg，或約 10^3 個細胞/kg、約 5×10^3 個細胞/kg、約 10^4 個細胞/kg、約 5×10^4 個細胞/kg、約 10^5

個細胞/kg、約 5×10^5 個細胞/kg、約 10^6 個細胞/kg、約 5×10^6 個細胞/kg、約 10^7 個細胞/kg、約 5×10^7 個細胞/kg、約 10^8 個細胞/kg、約 5×10^8 個細胞/kg、約 10^9 個細胞/kg、約 5×10^9 個細胞/kg、約 10^{10} 個細胞/kg、約 5×10^{10} 個細胞/kg，或約 10^{11} 個細胞/kg。

【0063】 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的劑量範圍可為從約 10^3 個細胞至約 10^{11} 個細胞，例如約 10^6 個細胞至約 2×10^8 個細胞，或約 10^3 個細胞、約 5×10^3 個細胞、約 10^4 個細胞、約 5×10^4 個細胞、約 10^5 個細胞、約 5×10^5 個細胞、約 10^6 個細胞、約 5×10^6 個細胞、約 10^7 個細胞、約 5×10^7 個細胞、約 10^8 個細胞、約 5×10^8 個細胞、約 10^9 個細胞、約 5×10^9 個細胞、約 10^{10} 個細胞、約 5×10^{10} 個細胞，或約 10^{11} 個細胞。

【0064】 「治療有效量」乙詞是指在一個體中有效治療的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的量。

【0065】 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)可以以單劑量、分劑量或多劑量施用。例如，可以在個體的鼻孔之間施用分劑量，例如每個鼻孔約一半劑量。

【0066】 可以給一個體施用1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個劑量的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)。

【0067】 一個體可以間隔1週、2週、1個月或2個月施用兩劑或更多劑量的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)。一個體可以每季、每兩年、每年、每兩年或以更大的間隔施用兩次或更多次劑量，例如，若過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵在已經用間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)治療的個體中復發，在復發的時間當下或之後。

【0068】 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)可以通過任何合適的途徑全身或外周施用，例如透過包括靜脈內(IV)、鼻內(IN)、氣管內、肺內和動脈內的途徑。於一具體實施例中，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)透過靜脈內(IV)、鼻內(IN)、氣管內或肺內途徑施用。於一具體實施例中，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)透過鼻內(IN)施用。

【0069】 於一具體實施例中，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)在施用前進行預處理。預處理可以使用生長因子或通過基因編輯，例如，其中生長因子可以引發間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)，而基因編輯可以賦予間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)新的治療特性。

【0070】 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)可以在個體發生過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘之前、期間或之後或其特徵性特徵下施用於該個體。

【0071】 因此，「治療(動詞)」、「治療(動名詞)」或「治療(名詞)」等詞是指治療性治療以及預防疾病的或預防性的措施，其中目的在於預防、減少或改善個體中的過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵或減緩(減輕)個體中過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘的進展或其特徵。需要治療的個體包括已經患有過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵的個體以及其中要預防或改善過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵的個體。

【0072】 「預防(動名詞)」、「預防(名詞)」、「預防性的」或「預防疾病的」等詞是指保持過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵不發生，或阻止、防禦或保護過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵的發生。需要預防過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵的個體可能易於發展過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵，例如因為家族史的緣故。

【0073】「改善(動詞)」或「改善(名詞)」等詞是指過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵的降低、減少或消除。

【0074】透過施用間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)治療過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵可導致減少約1%、減少約2%、減少約3%、減少約4%、減少約5%、減少約6%、減少約7%、減少約8%、減少約9%、減少約10%、減少約15%、減少約20%、減少約25%、減少約30%、減少約35%、減少約40%、減少約45%、減少約50%、減少約55%、減少約60%、減少約65%、減少約70%、減少約75%、減少約80%、減少約85%、減少約90%、減少約95%、減少約99%，或減少約100%的過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵。

【0075】於一具體實施例中，透過施用間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)治療過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵可以將過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵降低至相當於沒有過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵的個體的程度。

【0076】本領域技術人員將容易理解如何評估和量化過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵，並且能夠毫無困難或過度負擔地進行，例如使用本實施例中所述之方法。例如，可以量化以下內容：i) 發炎評分作為氣道發炎(AI)的計量；ii) 杯狀細胞轉變作為氣道發炎(AI)誘導的氣道重塑(AWR)的計量；iii) 上皮厚度作為氣道重塑(AWR)的計量；iv) 亞上皮膠原厚度作為氣道重塑(AWR)/纖維化的計量；v) 總肺膠原濃度作為氣道重塑(AWR)/纖維化的計量；vi) 上皮TGF- β 1染色作為氣道重塑(AWR)的計量；vii) 上皮肌纖維母細胞密度作為氣道重塑(AWR)的計量；viii) 明膠酶(例如，基質金屬蛋白酶-2 (MMP-2)及/或基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9))及/或膠原酶(例如，基質金屬蛋白酶-1 (MMP-1)及/或基質金

屬蛋白酶-13 (MMP-13))表現/活性作為氣道重塑(AWR)的計量；及/或ix) 氣道過度反應性/反應性作為肺功能和氣道過度敏感(AHR)的計量。

【0077】 可以將過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘的任何定量或其特徵性特徵與對照組比較，例如健康對照個體或不具有過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵的對照個體的健康群體。或者，對照可以是對照個體或對照個體群體，其具有過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘或其特徵性特徵並且已經以間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)治療並對其產生反應。

【0078】 如本文所用，「個體」乙詞可以指哺乳動物。哺乳動物可以為靈長類動物，特別是人類，或者可以是家畜、動物園動物，或伴侶動物。儘管特別考慮到本文公開的方法適用於人類的醫學治療，但它也適用於獸醫治療，包括治療家畜，如馬、牛和羊，伴侶動物如狗和貓，或動物園動物如貓科動物、犬科動物、牛科動物和有蹄類動物。

【0079】 除非在本說明書中另外定義，否則本文使用的技術和科學術語具有與本發明所屬領域的技術人員通常理解的含義相同的含義，並且參考公開的文本。

【0080】 應注意，「一」或「一個」等詞是指一個或多個，例如，「一間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)」，應理解為代表一個或多個間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)。因此，「一」或「一個」、「一個或多個」和「至少一個」等詞在本文中可互換使用。

【0081】 在以下與在本發明的描述中的申請專利範圍中，除非上下文由於明確的語言或必要的含義而另外要求，否則詞語「包含」或例如「包含(單數形

式)」或「包含(動名詞)」的變體用於包含意義，即指定所述特徵的存在，但不排除在本發明的各種具體實施例中存在或添加其他特徵。

【0082】 如本文所用，「約」乙詞考慮了該數量的±25%的給定數量的一系列值。在其他具體實施例中，「約」乙詞考慮給定數量的數字大小的±20%、±15%、±10%、±5%的值的範圍。例如，於一具體實施例中，「約3克」表示2.7克至3.3克 (即3克±10%)的值等。

【0083】 類似地，事件的時間或持續時間可以變化至少25%。例如，雖然於一具體實施例中可以將特定事件公開為持續一天，但事件可持續多於或少於一天。例如，「一天」可包括約18小時至約30小時的時段。在其他具體實施例中，時間的時段可以在該時間的時段的±20%、±15%、±10%、±5%之間變化。

【0084】 以下實施例有助於描述本發明，但本發明不限於這些實施例。

【0085】 實施例

【0086】 實施例1. 用於產生間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的試劑

【0087】 表1. 試劑

描述	供應商/型號或參考號
DMEM/F12 基礎培養基	Invitrogen 公司/A1516901
E8 補充物	Invitrogen 公司/A1517101
玻璃黏連蛋白	Life Technologies 公司/A14700
第 IV 型膠原蛋白	Sigma 公司/C5533
H-1152 ROCK 抑制劑	EMD Millipore 公司/555550
Y27632 二鹽酸鹽 ROCK 抑制劑	Tocris 公司/1254
FGF2	Waisman Biomanufacturing 公司 /WC-FGF2-FP
人類內皮細胞-無血清培養基	Life Technologies 公司/11111-044
幹細胞 II 造血幹細胞擴增培養基	Sigma 公司/S0192
GLUTAMAX	Invitrogen 公司/35050-061

描述	供應商/型號或參考號
胰島素	Sigma 公司/I9278
氯化鋰(LiCl)	Sigma 公司/L4408
第 I 型膠原蛋白溶液	Sigma 公司/C2249
纖維接合素	Life Technologies 公司/33016-015
DMEM/F12	Invitrogen 公司/11330032
重組人類 BMP4	Peptotech 公司/120-05ET
活化素 A	Peptotech 公司/120-14E
Iscoe 所改良之 Dulbecco 氏培養基(Iscoe's modified Dulbecco's medium , IMDM)	Invitrogen 公司/12200036
漢氏 F12 營養混合物	Invitrogen 公司/21700075
碳酸氫鈉	Sigma 公司/S5761
L-抗壞血酸 2-磷酸鎂 Mg ²⁺	Sigma 公司/A8960
1-硫代甘油	Sigma 公司/M6145
亞硒酸鈉	Sigma/S5261
非必需胺基酸	HyClone 公司/SH30853.01
化學定義的脂質濃縮物	Invitrogen 公司/11905031
胚胎轉移等級水	Sigma 公司/W1503
聚乙烯醇(polyvinyl alcohol , PVA)	MP Bio 公司/151-941-83
全鐵轉鐵蛋白	Sigma 公司/T0665
ES-CULT M3120	Stem Cell Technologies 公司/03120
STEMSPAN無血清擴增培養基(serum-free expansion medium , SFEM)	Stem Cell Technologies 公司/09650
L-抗壞血酸	Sigma 公司/A4544
血小板衍生的生長因子亞基B同源二聚體 (Platelet-derived growth factor subunit B homodimer , PDGF-BB)	Peptotech 公司/110-14B

【0088】 表1中列出的試劑為本領域技術人員已知的並且具有可接受的組合物，例如IMDM與Ham's F12。GLUTAMAX包含L-丙胺醯-L-谷胺醯胺二胜肽，通常在0.85% NaCl中以200 mM的濃度提供。GLUTAMAX在被培養的細胞切割二胜肽鍵時釋放L谷胺醯胺。化學定義的脂質濃縮物包含花生四烯酸2 mg/L、膽固醇220 mg/L、DL-α-生育酚乙酸酯70 mg/L、亞油酸10 mg/L、亞麻酸10 mg/L、肉豆蔻酸10 mg/L、油酸10 mg/L、棕櫚酸10 mg/L、棕櫚油酸10 mg/L、pluronic F-68 90 g/L、硬脂酸10 mg/L、TWEEN 80[®] 2.2g/L，以及乙醇。H-1152與Y27632為高

效的，細胞可滲透的，選擇性ROCK (Rho相關的捲曲螺旋形成蛋白絲胺酸/蘇胺酸激酶)抑制劑。

【0089】 表2. IF6S培養基(10倍濃度)

10 倍 IF6S	數量	最終濃度
IMDM	1 包，配製為 1 L 的粉末	5X
Ham's F12 營養混合物	1 包，配製為 1 L 的粉末	5X
碳酸氫鈉	4.2 g	21 mg/mL
L-抗壞血酸 2-磷酸鎂 Mg ²⁺	128 mg	640 µg/mL
1-硫代甘油	80 µL	4.6 mM
亞硒酸鈉(0.7 mg/mL 溶液)	24 µL	84 ng/mL
GLUTAMAX	20 mL	10X
非必需胺基酸	20 mL	10X
化學定義的脂質濃縮物	4 mL	10X
胚胎轉移等級水	至 200 mL	NA

【0090】 表3. IF9S培養基(1倍濃度；基於IF6S)

IF9S	數量	最終濃度
IF6S	5 mL	1X
聚乙烯醇(PVA；20 mg/mL溶液)	25 mL	10 mg/mL
全鐵轉鐵蛋白(10.6 mg/mL溶液)	50 µL	10.6 µg/mL
胰島素	100 µL	20 µg/mL
胚胎轉移等級水	至50 mL	NA

【0091】 表4. 分化培養基(1倍濃度；基於IF9S)

分化培養基	數量	最終濃度
IF9S	36 mL	1X
FGF2	1.8 µg	50 ng/mL
氯化鋰(2M溶液)	36 µL	2mM
BMP4 (100 µg/mL溶液)	18 µL	50 ng/mL
活化素A (10 mg/mL溶液)	5.4 µL	1.5 ng/mL

【0092】 表5. 間質集落形成培養基(1倍濃度)

間質集落形成培養基(Mesenchymal colony forming medium , M-CFM)	數量	最終濃度
ES-CULT M3120	40 mL	40%
STEMSPAN SFEM	30 mL	30%
人類內皮細胞-無血清培養基	30 mL	30%
GLUTAMAX	1 mL	1X
L-抗壞血酸(250 mM 溶液)	100 µL	250 µM
氯化鋰 (2M 溶液)	50 µL	1 mM
1-硫代甘油(100 mM 溶液)	100 µL	100 µM
FGF2	600 ng	20 ng/mL

【0093】 表6. 間質無血清擴增培養基(1倍濃度)

間質無血清擴增培養基(Mesenchymal serum-free expansion medium , M-SFEM)	數量	最終濃度
人類內皮細胞-無血清培養基	5 L	50%
STEMLINE II HSFM	5 L	50%
GLUTAMAX	100 mL	1X
1-硫代甘油	87 µL	100 µM
FGF2	100 µg	10 ng/mL

【0094】 實施例2. 將人類誘導的多能幹細胞(iPSCs)分化為間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)

1. 在塗覆有玻璃黏連蛋白 (0.5µg/cm²)的塑膠器皿上於E8完全培養基 (DMEM/F12基礎培養基 + E8補充物) +1 µM H1152中解凍誘導的多能幹細胞 (iPSCs)。於37°C，5% CO₂，20% O₂ (含氧量正常)下培養接種的誘導的多能幹細胞 (iPSCs)。

2. 在塗覆有玻璃黏連蛋白 ($0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$)的塑膠器皿上於E8完全培養基(無ROCK抑制劑)中擴增誘導的多能幹細胞 (iPSCs)三次繼代，並在開始分化過程之前於 37°C ，5% CO_2 ，20% O_2 (含氧量正常)下培養。
3. 收穫並以單細胞/小集落於 5×10^3 細胞/ cm^2 的濃度下將誘導的多能幹細胞 (iPSCs)接種於塗覆有第IV型膠原蛋白($0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$)的塑膠器皿上並在E8完全培養基 + 10 μM Y27632中，於 37°C ，5% CO_2 ，20% O_2 (含氧量正常)下培養24小時。
4. 以分化培養基替換E8完全培養基 + 10 μM Y27632，並於 37°C ，5% CO_2 ，5% O_2 (缺氧)下培養48小時以產生原始中胚層細胞。
5. 收穫的菌落形成來自分化培養基貼壁培養物的原始中胚層細胞作為單細胞懸浮液，轉移至M-CFM懸浮培養物並於 37°C ，5% CO_2 ，20% O_2 (含氧量正常)下培養12天，直至間質集落形成。
6. 收穫並接種間質集落於塗覆有纖維接合素/第I型膠原蛋白($0.67\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 纖維接合素，1.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 膠原蛋白I)的塑膠器皿上並在M-SFEM培養基中，於 37°C ，5% CO_2 ，20% O_2 (含氧量正常)下培養3天至產生間質幹細胞(MSCs) (第0代)。
7. 收穫的菌落並作為單細胞(第1代)以 1.3×10^4 個細胞/ cm^2 的密度接種於塗覆有纖維接合素/第I型膠原蛋白的塑膠器皿上並在M-SFEM培養基中，於 37°C ，5% CO_2 ，20% O_2 (含氧量正常)下培養3天。
8. 收穫並作為單細胞(第2代) 以 1.3×10^4 個細胞/ cm^2 的密度接種於塗覆有纖維接合素/第I型膠原蛋白的塑膠器皿上並在M-SFEM培養基中，於 37°C ，5% CO_2 ，20% O_2 (含氧量正常)下培養3天。

9. 收穫並作為單細胞(第3代) 以 1.3×10^4 個細胞/ cm^2 的密度接種於塗覆有纖維接合素/第I型膠原蛋白的塑膠器皿上並在M-SFEM培養基中，於 37°C ，5% CO_2 ，20% O_2 (含氧量正常)下培養3天。
10. 收穫並作為單細胞(第4代) 以 1.3×10^4 個細胞/ cm^2 的密度接種於塗覆有纖維接合素/第I型膠原蛋白的塑膠器皿上並在M-SFEM培養基中，於 37°C ，5% CO_2 ，20% O_2 (含氧量正常)下培養3天。
11. 收穫並作為單細胞(第5代) 以 1.3×10^4 個細胞/ cm^2 的密度接種於塗覆有纖維接合素/第I型膠原蛋白的塑膠器皿上並在M-SFEM培養基中，於 37°C ，5% CO_2 ，20% O_2 (含氧量正常)下培養3天。
12. 作為單細胞收穫並冷凍最終產物。

【0095】 進行兩個實驗 (TC-A-96與DAD-V-90)以研究補充M-CFM與PDGF-BB (10 ng/mL)及/或氯化鋰(1 mM)對誘導的多能幹細胞 (iPSCs)-衍生的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs))的T細胞抑制作用的影響。使用Waisman Biomanufacturing的免疫效力測定(ImmunoPotency Assay，IPA)評估T細胞抑制作用。

【0096】 如表7所示，評估血小板衍生生長因子 (platelet-derived growth factor，PDGF)與氯化鋰的以下組合：PDGF+/LiCl+、PDGF-/LiCl-、PDGF+/LiCl-，以及PDGF-/LiCl+。請注意，兩種不同的Dneg1的種植密度 (5×10^3 個細胞/ cm^2 與 1×10^4 個細胞/ cm^2)以及在分化培養基中兩種不同濃度的活化素A (activin A，AA) (1倍 AA = 15 ng/mL，而0.1倍 AA = 1.5 ng/mL)在TC-A-96實驗中進行了比較。在DAD-V-90實驗中則使用單一Dneg1種植密度 (5×10^3 個細胞/ cm^2)以及活化素A濃度(1.5 ng/mL)。還要注意在第一個IPA (IPA 1)中使用單一leukopak (LPK7)，在第二個IPA (IPA 2)中使用兩個leukopak (LPK7與LPK8)。

【0097】設計該測定以評估每個間質幹細胞(MSCs)株可以抑制T輔助(CD4+)淋巴細胞增殖的程度。使用從健康個體的周圍血(來自Leucopaks (LPK)的周圍血單核細胞(peripheral blood mononucleocyte cells, PBMC))純化的冷凍保存的白血球測試冷凍保存的間質幹細胞(MSCs)。因此,預期從供體到供體的LPK細胞群變異。針對臨床級材料,以來自兩個不同個體的周圍血單核細胞(PMBC)測試每個間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)測試樣本,並且可以選擇將測試限制為用於研究等級材料的單個周圍血單核細胞(PMBC)樣本。每個間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSC)測試樣本的測定與參考標準間質幹細胞(MSCs)株一起進行,以確保測定完整性/再現性並使測試樣本標準化。Bloom等人於Cytotherapy期刊,2015年,17 (2):140-51描述了該測定法。

【0098】簡言之,將測試間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)暴露於21Gy的 γ 輻射。在48孔組織培養盤中,將 4×10^5 個、 2×10^5 個、 4×10^4 個和 2×10^4 個輻射的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)接種到各個孔中。周圍血單核細胞(PMBC)分別以羧基螢光素琥珀醯亞胺酯標記。標記的周圍血單核細胞(PMBC)以每孔 4×10^5 個細胞的濃度種植,每孔含有上述間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)。這導致滴定的周圍血單核細胞(PMBC):間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)比例為1:1、1:0.5、1:0.1,以及1:0.05。另一額外的孔僅用受刺激的周圍血單核細胞(PMBC)種植,且另一孔以單獨的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)種植,而另一孔以無刺激的細胞以1:0.05比例種植,所有這些都作為對照組。隨後,將T細胞刺激性單株抗體,抗人類CD3-epilson與抗人類CD28 (R & D Systems公司,明尼亞波利斯城,明尼蘇達州)加入每個孔中。

【0099】 在培養的第四天，從各個孔收穫細胞。將來自每個孔的細胞與別藻藍蛋白標記的抗人類CD4一起作用。然後使用流式細胞儀經由羧基螢光素強度分析CD4⁺細胞的增殖。單獨的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對照組用於從共培養孔中篩選出間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)。單獨的周圍血單核細胞(PMBC)對照組作為最大T細胞增殖的陽性對照組，對其測量間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)抑制程度。使用未刺激的1：0.05比例的孔產生一陰性對照門檻，針對增殖進行測量。

【0100】 根據測試樣本比率，使用最佳擬合曲線來產生IC50值。將IC50值標準化為參考標準品 (IC50 Ref Std/IC50測試樣本)。這種標準化的IC50對於較有效(較具抑制性)的樣本產生較大的值，對於效力較小的樣本產生較小的值。

【0101】 結果

【0102】 表7中所示的IC50數據顯示補充有氯化鋰但不包含血小板衍生生長因子 (PDGF) (即PDGF-/LiCl+)的M-CFM培養基對於分化誘導的多能幹細胞 (iPSCs)以產生免疫調節的誘導的多能幹細胞 (iPSCs)-間質幹細胞(MSCs)是最佳的。此外，較低濃度的活化素A也改善了誘導的多能幹細胞 (iPSCs)-衍生的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的免疫抑制。

【0103】 表7. 免疫效力測定

IC50 (LPK7)	IC50 (LPK8)	樣本	血小板衍生生長因子	氯化鋰	活化素 A	種植密度 (D2)
不適用	不具抑制性	TC-A-96-B3	+	+	0.1 倍 (1.5 ng/mL)	5x10 ³ 個細胞/cm ²
不適用	0.17	TC-A-96-B1	+	+	1 倍 (15 ng/mL)	5x10 ³ 個細胞/cm ²
不適用	0.17	DAD-V-90-4	+	+	0.1 倍 (1.5 ng/mL)	5x10 ³ 個細胞/cm ²
不適用	0.19	TC-A-96-D3	+	+	0.1 倍 (1.5 ng/mL)	1x10 ⁴ 個細胞/cm ²
不適用	0.36	DAD-V-90-2	+	-	0.1 倍 (1.5 ng/mL)	5x10 ³ 個細胞/cm ²
不適用	0.57	DAD-V-90-1	-	-	0.1 倍 (1.5 ng/mL)	5x10 ³ 個細胞/cm ²

0.39	0.54	TC-A-96-B2	-	+	1 倍 (15 ng/mL)	5x10 ³ 個細胞/cm ²
0.37	0.58	TC-A-96-D2	-	+	1 倍 (15 ng/mL)	1x10 ⁴ 個細胞/cm ²
0.69	0.93	DAD-V-90-3	-	+	0.1 倍 (1.5 ng/mL)	5x10 ³ 個細胞/cm ²

【0104】 根據該實施例產生的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)表現出CD73⁺CD105⁺CD90⁺CD146⁺CD44⁺CD10⁺CD31⁻CD45⁻的表型。

【0105】 實施例3. 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs) microRNA分析

【0106】 根據實施例2產生的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)進行針對包含 1194 個 miRNA 的 microRNA (miRNA) 微陣列的分析以及由 miR-127-3p、miR-145-5p、miR-181b-5p、miR-214-3p、miR-299-5p組成的專有 miRNA組，針對71個間質幹細胞(MSCs)樣本以及94個非間質幹細胞(MSCs)樣本進行了驗證。

【0107】 根據實施例2產生的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)表現miR-145-5p、miR-181b-5p，以及miR-214-3p中的每一種，但不表現miR-127-3p與miR-299-5p。

【0108】 在針對所有測試樣本產生的標準化數據(存在於至少一個測試樣本中)中可靠地檢測到的微陣列的233個miRNA的主成分分析證明，根據實施例2產生的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)不同於其他71個間質幹細胞(MSCs)樣本的每一個。

【0109】 實施例4. 體內治療過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘

【0110】 方法和材料

【0111】 動物

【0112】 從Monash Animal Services (Monash大學，克萊頓，維多利亞州，澳洲)獲得六至八週齡的雌性Balb/c小鼠，並在受控制的環境下，在12小時光照/12小時黑暗照明週期中飼養。免費獲取水和實驗室食物(Barastock Stockfeeds公司，Pakenham，維多利亞州，澳洲)。在進行任何實驗之前，所有小鼠都有4-5天的適應期，而且所有程序都經 Monash 大學動物倫理委員會(道德編號：MARF/2016/078)批准，該委員會符合澳洲用於科學目的的實驗動物的護理及使用指南。

【0113】 慢性過敏性氣道疾病(AAD)的誘導

【0114】 為了評估間質幹細胞(MSCs)在慢性過敏性氣道疾病(AAD)中的作用，在小鼠中建立了卵清蛋白(OVA)誘導的慢性過敏性氣道疾病(AAD)模型($n = 24$)。在第0天和第14天，以兩次腹膜內(IP)注射10 μg V級雞蛋卵清蛋白(OVA) (Sigma-Aldrich公司，密蘇里州，美國)以及400 μg 硫酸鋁鉀佐劑(明礬；AJAX 化學公司，新南威爾斯州，澳洲)使小鼠產生過敏。然後使用超音波霧化器(Omron NE-U07；Omron公司，京都，日本)以全身吸入暴露(霧化)於霧化的卵清蛋白(OVA) (2.5% w/v溶於0.9%生理鹽水) 30分鐘，每週三次，介於第21天和第63天之間。然而，對照組小鼠($n = 24$)則給予腹膜內(IP)注射500 μL 0.9%生理鹽水並以0.9%生理鹽水霧化來取代卵清蛋白(OVA)。

【0115】 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)治療

【0116】 在建立慢性過敏性氣道疾病(AAD)後24小時(第64天)，卵清蛋白(OVA)-或生理鹽水致敏/攻毒的小鼠的亞組($n = 8$ 隻小鼠/組)進行靜脈內(IV)或鼻內(IN)施用間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)。在所有情況下，選擇14天的治療期(從第64-77天開始)以在卵清蛋白(OVA)誘導的過敏性氣道疾病(AAD)

慢性模型中，複製用於評估其他幹細胞，例如人類骨髓衍生的(基質)間質幹細胞(MSCs)和人類卵巢上皮細胞，鼻內遞送的效果。

【0117】 根據實施例1和2製備間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)。間質幹細胞(MSCs)的定義特徵為CD73、CD90以及CD105的表現，而且> 99%的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對所有這三種標記物均呈現陽性，但對CD43/45和CD31呈現陰性的，確認沒有造血細胞和內皮細胞譜系細胞。在治療期間(第64和71天)所有的治療每週施用一次。在每個排定治療的早晨，將冷凍的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)在37°C水浴中解凍，然後如以下方式重新懸浮：對於間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的靜脈內(IV)施用，將 1×10^7 細胞重新懸浮於2 mL磷酸鹽緩衝鹽水(phosphate-buffered saline, PBS)中。將小鼠限制在Perspex限制器中，並將 1×10^6 個細胞/200 μ L的磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)注射到生理鹽水或卵清蛋白(OVA)致敏/攻毒的小鼠的尾靜脈中。對於鼻內(IN)施用間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)，將 1×10^7 個細胞重新懸浮於0.5 mL的磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中。以異氟烷(Baxter Health Care公司，新南威爾斯州，澳洲)輕度麻醉小鼠並保持半仰臥姿勢，同時進行鼻內滴注。然後將 1×10^6 個細胞/50 μ L的磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)鼻內(IN)給予小鼠；每個鼻孔25 μ L，使用自動移液器。

【0118】 侵入性體積描記法 (Invasive plethysmography)

【0119】 在第78天(最後一次間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)治療的後7天)，以氯胺酮(10 mg/kg體重)和甲苯噻嗪(2 mg/kg體重)在0.9%生理鹽水中麻醉小鼠。然後對所有具有18號氣管造口管的小鼠進行氣管切開術。然後將小鼠置於Buxco FinePointe體積描記器(Buxco, Research Systems, Wilmington,

北卡羅萊州，美國)的艙室中並通風。然後測量每隻小鼠反應於溶解在PBS中的增加劑量的霧化乙醯甲膽鹼(methacholine；Sigma-Aldrich公司，密蘇里州，美國)的氣道阻力，並在4個劑量下從6.25-50 mg/mL氣管內遞送以引發支氣管收縮並評估氣道過度敏感(AHR)。將氣道阻力的變化(每次劑量後的最大氣道阻力減去對單獨的磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)的基線阻力)相對於相應的乙醯甲膽鹼劑量作圖。

【0120】組織收集

【0121】在侵入性體積描記法後，分離來自每隻動物的肺組織並在冷磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中漂洗，然後分成四個分開的葉片。將最大的葉片固定在10%中性緩衝甲醛中整夜，並加工成切割並包埋在石蠟中(用於各種終點的組織學和免疫組織化學分析)。將剩餘的三個葉片在液態氮中快速冷凍以用於各種其他測定。

【0122】肺組織病理學

【0123】一旦來自每隻小鼠的最大葉片被石蠟包埋，將每個組織塊連續切片(3 μ m厚)並置於帶電的Mikro玻璃載玻片(Grafe Scientific公司，Ringwood，維多利亞州，澳洲)上並進行各種組織學染色或免疫組織化學。為了評估發炎評分，上皮厚度及亞上皮細胞外基質(extracellular matrix，ECM)沉積，來自每隻小鼠的一個切片(每個載玻片)進行Masson三色染色。為了評估杯狀細胞轉變，對第二組載玻片進行阿爾新藍高碘酸希夫(ABPAS)染色。如下詳述，對Masson三色和ABPAS染色的切片進行形態測定分析。

【0124】免疫組織化學(IHC)

【0125】免疫組織化學(IHC)用於檢測TGF- β 1 (使用多株抗體；sc-146；Santa Cruz Biotechnology公司，Santa Cruz，加州，美國；1：1000稀釋)或 α -平滑

肌動蛋白(α -SMA; 肌纖維母細胞分化的標記物; 使用單株抗體; M0851; DAKO 公司, Glostrup, 丹麥; 1:200稀釋)。使用DAKO EnVision抗兔或抗小鼠套組和3,3'-二胺基聯苯胺(Diaminobenzidine, DAB)色原偵測初級抗體染色, 也包括在沒有任何初級抗體的情況下暴露於EnVision套組的陰性對照組。然後將所有載玻片以蘇木精複染, 並使用ScanScope AT Turbo (Aperio公司, 加州, 美國)通過Monash Histology Services掃描以用於形態測定分析。

【0126】形態測定分析

【0127】 Masson的三色、ABPAS和免疫組織化學(IHC)染色的載玻片如下進行形態測定分析。隨機選擇每個切片的五個氣道(直徑150-300 μm)並使用Aperio ImageScope軟體(Aperio公司, 加州, 美國)進行分析。Masson三色染色的載玻片進行半定量的細支氣管周圍的發炎評分, 而實驗者盲測, 並以單個氣道進行評分從0分(氣道周圍無可檢測的發炎)到4分(廣泛和大量發炎細胞聚集體, 合併大小約0.6 mm^2)。通過測量上皮和亞上皮細胞外基質(ECM)層(染成藍色)的厚度, Masson三色染色的載玻片也進行了上皮厚度和亞上皮細胞外基質(ECM)沉積的分析; 其表示為 $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ 的基底膜(BM)長度。

【0128】 通過計數每100 μm 基底膜(BM)長度的陽性染色杯狀細胞或 α -SMA陽性細胞的數量, 分別分析ABPAS-、 α -SMA-染色的載玻片的杯狀細胞轉變和上皮肌纖維母細胞數。通過運行演算法評估TGF- β 1染色的載玻片的TGF- β 1蛋白表現, 以評估氣道內強烈的陽性染色像素。結果表示為氣道總面積(mm^2)的強陽性像素數; 然後相對於生理鹽水處理對照組的表現為1。

【0129】 羥脯胺酸測定

【0130】 如前所述處理來自每隻小鼠的第二大肺葉用於測量羧脯胺酸含量(Royce, S.G.等人, (2013年) Clin. Sci. 124, 41-51), 其由純化的反式-4-羧基-L-脯胺酸(Sigma-Aldrich公司)的標準曲線確定。將羧脯胺酸值乘以6.94 (基於羧脯胺酸佔大多數哺乳動物組織中膠原胺基酸組成的約14.4%)以推斷總膠原含量, 其又除以每個相應組織的乾重以產生膠原濃度百分比。

【0131】 明膠酶譜法

【0132】 在含有1 mg/ml明膠的7.5%丙烯醯胺凝膠上評估等份總蛋白質(每個樣本10 µg)之前, 來自每隻小鼠的第三大肺葉如先前詳述的那樣用於萃取含有基質金屬蛋白酶(MMP)的蛋白質(Woessner, J.F., (1995年) Methods Enzymol. 248, 510-528)。明膠水解活性可視化為清晰的條帶。使用GS710密度計(Bio-Rad Laboratories公司, Gladesville, 新南威爾斯州, 澳洲)和Quantity-One軟體(Bio-Rad公司)進行基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9)(雌性Balb/c小鼠肺中的主要明膠酶)的密度測定。然後繪製基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9)的相對平均值 $\pm$ SEM光密度(OD)。

【0133】 統計分析

【0134】 使用GraphPad Prism v6.0 (GraphPad軟體公司, La Jolla, 加州, 美國)進行所有統計學分析, 並表示為平均值 $\pm$ SEM。通過具有Bonferroni事後檢驗的雙向ANOVA分析氣道過度敏感(AHR)結果。通過單向ANOVA分析剩餘數據, 使用Neuman-Keuls事後檢驗進行組間多重比較。在每種情況下, 在 $P < 0.05$ 下數據被認為是顯著的。

【0135】 結果

【0136】 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對氣道發炎(AI)的影響

【0137】 使用發炎評分系統(來自0-4)從H&E染色的肺切片中半定量氣道發炎(AI)。卵清蛋白(OVA)損傷小鼠的支氣管周圍的發炎評分(2.75 ± 0.09)顯著高於生理鹽水(SAL)-致敏/攻毒對照組的評分(0.25 ± 0.09)；與生理鹽水(SAL)組相比 $P < 0.001$ (圖1)。卵清蛋白(OVA)組中發炎含量升高證實這些小鼠已成功致敏並以卵清蛋白(OVA)攻毒。

【0138】 當施用於生理鹽水(SAL)對照組小鼠時，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的施用顯著降低卵清蛋白(OVA)誘導的支氣管周圍的炎性細胞浸潤(1.25 ± 0.23)；與卵清蛋白(OVA)組相比 $P < 0.001$)而不影響基礎發炎評分(圖1A，圖1B)。然而，以間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)治療不能將氣道發炎(AI)完全降低回到生理鹽水(SAL)對照組小鼠中測量的值(對於給予卵清蛋白(OVA)損傷的小鼠施用間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的治療，與生理鹽水(SAL)組相比， $P < 0.05$)。

【0139】 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對氣道重塑(AWR)的影響

【0140】 杯狀細胞轉變

【0141】 從ABPAS染色的肺切片中以形態學評估杯狀細胞轉變，並表示為杯狀細胞數/100 μm 基底膜(BM)長度(圖2)。與其生理鹽水(SAL)對照組對應物(0.001 ± 0.00)相比，卵清蛋白(OVA)處理的小鼠具有顯著增加的杯狀細胞數(6.08 ± 0.52) (與生理鹽水(SAL)組相比， $P < 0.001$)；圖2A，圖2B)。間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的施用能夠顯著地，儘管不是完全的，減少卵清蛋白(OVA)誘導的杯狀細胞數量的促進(3.97 ± 0.64 至 2.89 ± 0.48 ，與卵清蛋白(OVA)組相比， $P < 0.01$)；圖2A，圖2B)。然而，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)

的遞送未將卵清蛋白(OVA)誘導的杯狀細胞轉變恢復至生理鹽水(SAL)對照組中所測量到的(與生理鹽水(SAL)組相比，皆為 $P < 0.001$)，但不影響生理鹽水(SAL)處理的小鼠中的杯狀細胞數。

【0142】 氣道上皮厚度

【0143】 從Masson三色染色的肺切片進行形態測定評估氣道上皮厚度，並表示為 $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ 基底膜(BM)長度(圖3)。卵清蛋白(OVA)處理的小鼠的上皮厚度(19.16 ± 0.63)顯著高於生理鹽水(SAL)對照組中所測量到的(14.28 ± 0.45 ；與生理鹽水(SAL)組相比 $P < 0.001$ ；圖3A，圖3B)。與卵清蛋白(OVA)組相比，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的遞送雖然不是完全的，但顯著降低了上皮的厚度(18.59 ± 0.77 至 16.67 ± 0.87)($P < 0.05$ ，與卵清蛋白(OVA)組相比； $P < 0.05$ ，與生理鹽水(SAL)組相比；圖3A，圖3B)。重要的是，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)治療不影響生理鹽水(SAL)對照組小鼠的基底上皮厚度。

【0144】 上皮膠原沉積

【0145】 從Masson三色染色的肺切片中形態測定評估上皮膠原沉積，並表示為 $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ 基底膜(BM)長度(圖3)；與生理鹽水(SAL)對照組(14.31 ± 1.87)相比，卵清蛋白(OVA)損傷小鼠(27.63 ± 0.66)顯著升高(與生理鹽水(SAL)組相比 $P < 0.001$ ；圖3A，圖3C)。間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的遞送減少了異常的卵清蛋白(OVA)誘導的上皮膠原沉積的促進(22.39 ± 1.78 至 16.98 ± 0.98 ；與卵清蛋白(OVA)組相比 $P < 0.05$ ；圖3A，圖3C)。

【0146】 總肺膠原濃度(纖維化)

【0147】 從每隻小鼠的第二大肺葉內存在的羥脯胺酸含量外推總肺膠原濃度(膠原濃度%/乾重肺組織)，並作為纖維化的計量(圖4)；與在生理鹽水(SAL)

對照組中測量到的($2.89 \pm 0.18\%$)相比，卵清蛋白(OVA)損傷的小鼠($3.94 \pm 0.09\%$)顯著增加(與生理鹽水(SAL)組相比 $P < 0.001$)。向卵清蛋白(OVA)損傷的小鼠施用間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)減少肺中的纖維化($3.26 \pm 0.17\%$ 至 $3.62 \pm 0.07\%$ ；與卵清蛋白(OVA)組相比 $P < 0.05$ ；圖4)。

【0148】 氣道TGF- β 1表現

【0149】 為了確定間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)能夠逆轉卵清蛋白(OVA)誘導的上皮和總膠原沉積(纖維化)的機制，從IHC染色的肺切片通過形態計量學評估氣道TGF- β 1 (促纖維化細胞因子)表現含量的相對變化，並表示為每個氣道分析的%染色(圖5)。與在生理鹽水(SAL)對照組中測量到的(1.00 ± 0.08)相比，卵清蛋白(OVA)損傷的小鼠(1.85 ± 0.13)中的氣道TGF- β 1表現顯著增加(與生理鹽水(SAL)組相比 $P < 0.001$ ；圖5A，圖5B)。將間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)遞送至卵清蛋白(OVA)損傷的小鼠將異常氣道TGF- β 1表現含量逆轉至生理鹽水(SAL)對照組中測量到的值(1.06 ± 0.05 至 1.22 ± 0.05 ；與卵清蛋白(OVA)組相比 $P < 0.001$ ；與生理鹽水(SAL)組無差異)，當施用於生理鹽水(SAL)對照組小鼠時，不影響基礎氣道TGF- β 1表現含量(圖5A，圖5B)。

【0150】 上皮肌纖維母細胞密度

【0151】 也以形態計量地評估了IHC染色的肺切片中 α -SMA染色的上皮肌纖維母細胞密度的變化，並表示為肌纖維母細胞的數量/100 μ m的基底膜(BM)長度(圖6)。在生理鹽水(SAL)對照組小鼠中檢測到極微量的上皮 α -SMA陽性肌纖維母細胞(0.14 ± 0.05)，而卵清蛋白(OVA)損傷的小鼠肌纖維母細胞密度增加約30倍(4.37 ± 0.37 ；與生理鹽水(SAL)組相比， $P < 0.001$ ；圖6A，圖6B)。施用間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)則減少了卵清蛋白(OVA)誘導的上皮肌纖維母

細胞密度的增加(2.86 ± 0.27 至 3.42 ± 0.09 ；與卵清蛋白(OVA)組相比， $P < 0.05$)，當施用到生理鹽水(SAL)對照組小鼠時，對基礎肌纖維母細胞數沒有任何影響(圖6A，圖6B)。然而，施用間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)並未完全逆轉異常的上皮肌纖維母細胞回到與生理鹽水(SAL)對照組小鼠中測量到的一樣(與生理鹽水(SAL)組相比， $P < 0.001$ ；圖6A，圖6B)。

【0152】 肺明膠酶表現

【0153】 我們還確定了間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)調節的卵清蛋白(OVA)誘導的氣道/肺纖維化逆轉是否與它們影響膠原降解基質金屬蛋白酶(MMP)含量的能力相關。明膠酶譜顯示雌性Balb/c小鼠的肺主要表現基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9)(明膠酶B)，並且在較小程度上表現基質金屬蛋白酶-13 (MMP-13)(膠原酶-3)(圖7)。卵清蛋白(OVA)損傷小鼠中的相對基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9)表現含量(1.62 ± 0.22)與生理鹽水(SAL)對照組動物中測量到的(1.00 ± 0.09)相比沒有顯著差異(圖7A；圖7B)。相較之下，施用間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)至卵清蛋白(OVA)損傷小鼠會顯著增加基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9)含量(3.77 ± 0.18 至 4.56 ± 0.20 ；與卵清蛋白(OVA)間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)組相比， $P < 0.05$)，與單獨以卵清蛋白(OVA)處理的小鼠測量到的相比，顯著增加約1.3及約1.8倍(與卵清蛋白(OVA)組相比， $P < 0.001$ ；與生理鹽水(SAL)組相比， $P < 0.001$ ；圖7A；圖7B)。有趣的是，將間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)遞送至生理鹽水(SAL)處理的小鼠也顯著增加基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9)含量(1.95 ± 0.38 至 2.65 ± 0.30 與生理鹽水(SAL)組相比， $P < 0.05$)。

【0154】 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對氣道過度敏感(AHR)的影響

【0155】 以侵入性體積描記法評估氣道過度敏感(AHR)對增加濃度的霧化乙醯甲膽鹼-支氣管收縮劑的反應(圖8)。預期地，與在生理鹽水(SAL)對照組中測量到的相比，卵清蛋白(OVA)處理的小鼠具有顯著升高的氣道過度敏感(AHR)(與生理鹽水(SAL)組相比， $P < 0.001$ ；圖8)。間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的遞送逆轉了卵清蛋白(OVA)誘導造成的氣道過度敏感(AHR)增加(與卵清蛋白(OVA)組相比， $P < 0.05$ ；圖8)。與大多數其他終點測量到的一樣，當施用於生理鹽水(SAL)對照組小鼠時，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的遞送不影響基礎氣道過度敏感(AHR)測量(圖8)。

【0156】 討論

【0157】 本研究旨在評估新穎誘導的多能幹細胞(iPSC)衍生的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對抗慢性過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘發病機理的三個中心組分的治療潛力：氣道發炎(AI)、氣道重塑(AWR)，以及氣道過度敏感(AHR)，當在治療上給予已建立的疾病病理學時。

【0158】 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的施用可以防止已經建立的氣道發炎(AI)、氣道重塑(AWR)(杯狀細胞轉變、異常氣道TGF- β 1含量、上皮肌纖維母細胞與膠原積聚、總肺膠原濃度)以及氣道過度敏感(AHR)，其係由對小鼠重複進行卵清蛋白(OVA)致敏及攻毒所誘導的(表8)。這導致在兩週(每週一次)治療期間異常氣道TGF- β 1含量，氣道/肺纖維化和氣道過度敏感(AHR)的逆轉，並透過遞送間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)顯著增加膠原降解基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9)含量(表8)。同樣重要的是，未發現施用間質血管母細胞

間質幹細胞(MCA-MSCs)影響測量參數的基礎表現，這表示間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的遞送提供了治療過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘中心組分的安全且最有效的方法。

【0159】 表8. 概述間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)對慢性過敏性氣道疾病(AAD)病理學的影響

人類哮喘關鍵特徵	卵清蛋白(OVA)	生理鹽水(SAL) 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs) 靜脈內(IV)	卵清蛋白(OVA)間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs) 靜脈內(IV)	生理鹽水(SAL)間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs) 鼻內(IN)	卵清蛋白(OVA)間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs) 鼻內(IN)
氣道發炎(AI)	↑↑↑	-	↓	-	↓↓
杯狀細胞轉變	↑↑↑	-	↓	-	↓↓
上皮厚度	↑↑↑	-	-	-	↓↓*
亞上皮膠原	↑↑↑	-	↓	-	↓↓↓*
總肺膠原	↑↑↑	-	↓	-	↓↓↓*
氣道 TGF-β1 含量	↑↑↑	-	↓↓↓	-	↓↓↓
上皮肌纖維母細胞密度	↑↑↑	-	↓	-	↓↓*
肺基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9) 含量	-	↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑*
氣道過度敏感(AHR)	↑↑↑	-	↓↓	-	↓↓↓**

【0160】 在表8中，卵清蛋白(OVA)、生理鹽水(SAL)間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)靜脈內(IV)施用，以及生理鹽水(SAL)間質血管母細胞間質

幹細胞(MCA-MSCs)鼻內(IN)施用組中的箭頭反映了在生理鹽水(SAL)處理的小鼠中測量到的變化，而卵清蛋白(OVA)間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)靜脈內(IV)施用以及卵清蛋白(OVA)間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)鼻內(IN)施用組中的箭頭反映了單獨卵清蛋白(OVA)組中的變化。(-)分別與生理鹽水(SAL)或卵清蛋白(OVA)處理的小鼠相比沒有變化。與卵清蛋白(OVA)間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)靜脈內(IV)施用組相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

【0161】 哮喘的炎性成分有助於氣道阻塞。Th2-扭曲的發炎導致特定細胞因子子集的升高，包括介白素(interleukin，IL)-13，以及杯狀細胞轉變的誘導。

【0162】 與這些發現一致，先前的研究已經顯示，透過抑制Th2細胞因子、IL-4、IL-5，以及IL-13的含量，靜脈內(IV)注射誘導的多能幹細胞(iPSC)衍生的間質幹細胞(MSCs)(並非如本文公開的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs))可以部分地降低急性卵清蛋白(OVA)模型中的氣道發炎評分。間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的全身作用甚至可能與它們透過直接細胞-細胞接觸活化調節性T細胞的能力有關。然而，目前發現間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)顯著抑制約75%的氣道發炎(AI)和約50%的杯狀細胞轉變，顯示與源自人類骨髓或脂肪組織的間質幹細胞(MSCs)相比，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)調節更大的免疫調節性質。

【0163】 將間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)直接施用到氣道/肺中可使它們分泌的保護因子保留在肺環境中。此外，直接施用的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)更可能保留在發炎的肺中，並且通過抑制抗原呈現細

胞，包括肺泡巨噬細胞和樹突細胞，而對調節的過敏原暴露具有更大的保護作用。

【0164】 與杯狀細胞轉變一起，上皮增殖是哮喘中上皮重塑的主要原因。上皮屏障功能和脫屑的減少最終導致上皮細胞增殖。這種增殖在嚴重哮喘中特別廣泛，其中上皮細胞的擴張導致氣道阻塞。鑑於這種重編程發生在哮喘發病機制的早期，哮喘治療應針對上皮細胞。儘管提供類似的氣道發炎(AI)減少，但間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的遞送導致上皮厚度減小。這與先前與骨髓來源的間質幹細胞(MSC)相關的發現形成對比，其中單獨的骨髓-間質幹細胞(MSC)的鼻內(IN)遞送對上皮厚度沒有影響。在該研究中，上皮厚度不受氣道發炎(AI)減少的影響。因此，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)和骨髓-間質幹細胞(MSC)之間觀察到的差異似乎是由於間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)本身的活性特性，而不是由它們減弱氣道發炎(AI)的能力產生的被動效應。

【0165】 此外，在另一項研究中，上皮因子修復胜肽(三葉因子-2)的施用使上皮厚度減少至與抗纖維化和皮質類固醇的組合治療相同的程度，儘管由該組合治療提供的氣道發炎(AI)減少更多。因此，上皮增殖的減少不是由發炎減少調節的。

【0166】 有了這些額外的證據，本發現表明間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的遞送允許：i) 旁分泌因子的充分積累，其減少上皮厚度，及/或 ii) 這些細胞與受損上皮直接接觸並調節其擴散的逆轉。由間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)產生的上皮厚度和杯狀細胞轉變的這種減少是反轉氣道重塑(AWR)的第一個證據。

【0167】除了氣道發炎(AI)之外，包括機械損傷和過敏原在內的許多因素的累積可能導致肺結構和氣道功能的破壞，其導致氣道重塑(AWR)。由於過敏原或遺傳易感性引起的損傷導致肺經歷內源性重塑過程以努力自我修復氣道的結構和功能，而且這些修復過程導致傷口癒合異常，最終導致纖維化。在卵清蛋白(OVA)致敏的氣道中纖維化明顯，其顯示異常的上皮和總膠原含量升高。間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的遞送顯著降低了異常的上皮和總膠原沉積，並且在一些情況下完全逆轉了這種異常的膠原沉積，而回到未受傷的生理鹽水處理組中所見的含量。這些結果是出乎意料的，因為先前的研究表明，只有當基於幹細胞的治療與抗纖維化藥物共同施用時，卵清蛋白(OVA)誘導的上皮和總膠原沉積的促進才能被完全逆轉。在這些聯合治療研究中，提出抗纖維化藥物將創造更有利的環境，其中可以引入基於幹細胞的療法，從而有助於幹細胞存活並增加其增殖和遷移能力以誘導其保護/治療效果。因此，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的遞送具有與抗纖維化藥物相似的效果，並且可具有與胎兒纖維母細胞類似的抗纖維化性質，其可在不存在纖維化的情況下促進傷口癒合。

【0168】這些結果也與間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)誘導的上皮厚度減少一致。纖維生長因子通常由上皮細胞對上皮細胞紊亂的反應而釋放。在哮喘中，這種反應增強，表明上皮纖維化是由有缺陷的上皮細胞到更深的氣道壁的信號導管所引起的。因此，當靜脈內施用時，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)可透過免疫調節性質和可能的抗纖維化介質的分泌，發揮其抗纖維化作用，因為上皮和總膠原的減少。

【0169】 本研究的主要發現為間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)逆轉纖維化並將氣道過度敏感(AHR)恢復至未受傷小鼠中測量到的含量。氣道過度敏感(AHR)由氣道阻塞驅動，這可能是由杯狀細胞轉變和上皮增厚引起的黏液堵塞所引起的。此外，氣道發炎(AI)與氣道壁纖維化之間的相互作用導致氣道過度敏感(AHR)升高的環境。纖維化不僅降低哮喘患者的氣道順應性，而且細胞外基質(ECM)的這種擴展導致可溶性發炎介質的保留和已建立的氣道過度敏感(AHR)的慢性持續性。因此，氣道過度敏感(AHR)可以恢復到正常未受傷的含量，主要是透過減少上皮纖維化和減少氣道發炎(AI)及/或由間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)提供的杯狀細胞減少和降低的上皮增厚所調節的氣道阻塞減少。如本文所公開的，除了它們的抗發炎作用之外，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)透過以多種含量將氣道重塑(AWR)作為標的來校正氣道過度敏感(AHR)。

【0170】 總之，本研究首次使用間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)治療慢性過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘，發現間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)有效地降低了氣道發炎(AI)以及氣道重塑(AWR)與氣道過度敏感(AHR)的反轉標記物。因此，間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)為過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘提供獨立治療。間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)也可用作過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘的輔助療法。間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)可以對具有過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘的個體的亞族群提供特定的治療益處，該亞族群的個體對當前療法，亦即皮質類固醇或 β -激動劑療法，沒有反應。

【0171】 將間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)與先前研究的其他幹細胞區分開來的顯著發現是，其他間質幹細胞(MSCs)/幹細胞只有在與其他治療劑組合施用時才能產生治療效果。

【0172】 實施例5

【0173】 以與實施例4類似的方式在6至8隻小鼠的組別中誘導過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘，除了小鼠以噴霧的卵白蛋白氣溶膠溶液攻毒30分鐘，每週三次，持續8週(從第21天至第77天，如圖9所示)，而非如實施例4中的6週。將小鼠隨機分配到五組中的一組：1為未治療的對照組(無哮喘)；2為未經治療的致敏動物(哮喘)；3為致敏動物(哮喘)，以鼻內(IN)輸注間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)治療；4為致敏動物(哮喘)，以鼻內(IN)輸注地塞米松(DEX)治療；5為致敏動物(哮喘)，以鼻內(IN)輸注間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs) + 地塞米松(DEX)治療。所有間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)處理的小鼠兩次接受 10^6 細胞的鼻內(IN)劑量(在第9週和第10週每週一次)。從第9-11週開始每天一次施用地塞米松(DEX) (1 mg/kg/天)。地塞米松(DEX)改善了氣道過度敏感(AHR)，但間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)具有明顯更顯著的效果，與地塞米松(DEX)共用，除了具有跟單獨的間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)施用之效果外，沒有額外的作用(圖10)。

【0174】 實施例6

【0175】 本實施例中使用的模型與實施例5相同，實施例5是使用在該模型中反應最強的雌性Balb/c小鼠的9週過敏原誘導的慢性氣道疾病模型。

【0176】 比較以下組7-8週齡雌性Balb/c小鼠(n~8隻小鼠/組),其中透過鼻內(IN)、靜脈內(IV),或氣管內(ET)給藥,從第9-11週每週一次施用間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs):

- i) 鹽水致敏/攻毒對照組;
- ii) 卵清蛋白(OVA)敏感/攻毒(過敏性氣道疾病(AAD));
- iii) 透過鼻內(IN)施用卵清蛋白(OVA)致敏/攻毒 + 1×10^6 個間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)/小鼠;
- iv) 透過靜脈內(IV)施用卵清蛋白(OVA)致敏/攻毒 + 1×10^6 個間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)/小鼠;以及
- vi) 透過氣管內(ET)施用卵清蛋白(OVA)致敏/攻毒 + 1×10^6 個間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)/小鼠。

【0177】 該設計具有20%標準差(SD),提供90%的功率以檢測n = 8隻小鼠/組的25%效果。

【0178】 分析了氣道高反應性(肺功能的測量)並在圖11中報導。

【0179】 與其鹽水處理的對應物相比,具有卵清蛋白(OVA)誘導的慢性過敏性氣道疾病(AAD)的小鼠反應於增加劑量的支氣管收縮劑而造成氣道過度敏感(AHR)的顯著惡化。通過鼻內(IN)-或靜脈內(IV)施用間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs),這種由卵清蛋白(OVA)誘導的氣道過度敏感(AHR)被顯著降低了79-80% (在持續的卵清蛋白(OVA)誘導的損傷存在下從第9-11週每週一次給藥)。以間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)和生理鹽水(SAL)處理的對照組進行鼻內(IN)-或靜脈內(IV)-處理的小鼠之間的氣道過度敏感(AHR)則沒有顯著差異。

【0180】 間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)的氣管內(ET)施用使氣道過度敏感(AHR)降低61% - 其仍顯著低於單獨的卵清蛋白(OVA)組所測量到的，但也顯著高於從生理鹽水(SAL)組測量的氣道過度敏感(AHR)。

【0181】 鼻內(IN)-與靜脈內(IV)-與氣管內(ET)-治療組之間的氣道過度敏感(AHR)沒有顯著差異，表示間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)遞送的所有三種模式提供了治療慢性過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘的可行方法。

【0182】 要分析的其他端點包括：

- i) 發炎評分；
- ii) 杯狀細胞轉變；
- iii) 上皮厚度；
- iv) 上皮損傷；
- v) 上皮膠原厚度；
- vi) 總肺膠原濃度；
- vii) 上皮TGF- β 1染色；
- viii) 上皮肌纖維母細胞密度；以及
- ix) 明膠酶(基質金屬蛋白酶-2 (MMP-2)以及基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9))的表現/活性。



201919666

【發明摘要】

【中文發明名稱】 治療過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘的方法

【英文發明名稱】 METHOD FOR TREATING ALLERGIC AIRWAYS DISEASE

(AAD)/ ASTHMA

【中文】

本發明涉及一種間質血管母細胞衍生的間質幹細胞 (mesenchymoangioblast-derived mesenchymal stem cell, MSC-MSCs)在體體內治療過敏性氣道疾病(allergic airway disease, AAD)/哮喘之用途。

【英文】

The invention relates to use of a mesenchymoangioblast-derived mesenchymal stem cell (MSC-MSC) for treating allergic airway disease (AAD)/ asthma in a subject.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種間質血管母細胞間質幹細胞 (mesenchymoangioblast mesenchymal stem cell, MCA-MSC)在製備用於在體體內治療過敏性氣道疾病 (allergic airways disease, AAD)/哮喘的藥物中的用途，其中該間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSC)表現miR-145-5p、miR-181b-5p，以及miR-214-3p，但不表現miR-127-3p與miR-299-5p。

【第2項】如請求項1之用途，其中間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSC)具有CD73⁺CD105⁺CD90⁺CD146⁺CD44⁺CD10⁺CD31⁻CD45⁻的表型。

【第3項】如請求項1或2之用途，其中該間質血管母細胞間質幹細胞 (MCA-MSC)由包含以下之方法所製備：

(a) 於間質集落形成培養基 (mesenchymal-colony forming medium, M-CFM)中培養原始的中胚層細胞，該培養基 (M-CFM)包含LiCl與FGF2，但不包括PDGF，在含氧量正常的條件下培養足夠的時間以形成間質集落；以及

(b) 黏附地培養 (a)的該間質集落以產生該間質血管母細胞間質幹細胞 (MCA-MSCs)。

【第4項】如請求項1或2之用途，其中該間質血管母細胞間質幹細胞 (MCA-MSC)透過靜脈內或鼻內給藥。

【第5項】如請求項1或2之用途，其中該間質血管母細胞間質幹細胞 (MCA-MSCs)透過鼻內給藥。

【第6項】如請求項1或2之用途，其中治療包含向該個體施用約 1×10^6 至約 1×10^9 個間質血管母細胞間質幹細胞(MCA-MSCs)。

【第7項】 如請求項1或2之用途，其中該個體為哺乳動物。

【第8項】 如請求項1或2之用途，其中該個體為人類。

【第9項】 如請求項1或2之用途，其中該個體已先施用皮質類固醇或 β -激動劑以治療哮喘。

【第10項】 如請求項1或2之用途，其中該個體未先施用皮質類固醇或 β -激動劑以治療哮喘。

【第11項】 如請求項1或2之用途，其中該個體患有嚴重的哮喘或嚴重難治性哮喘。

【第12項】 如請求項1或2之用途，其中治療過敏性氣道疾病(AAD)/哮喘包含：

(a) 減少氣道發炎(AI)、氣道重塑(AWR)、氣道纖維化、肺纖維化、杯狀細胞轉變、上皮增厚、氣道轉化生長因子(transforming growth factor, TGF)- β 1含量、皮下肌纖維母細胞密度、皮下膠原濃度，或總肺膠原濃度；或

(b) 增加肺基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9)活性；或

(c) (a)的任何一項或多項特徵的任何組合或(a)及(b)的任何一項或多項特徵的任何組合。

【第13項】 如請求項1或2之用途，其中該個體未施用皮質類固醇或 β -激動劑。

