

(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2015-521054

(P2015-521054A)

(43) 公表日 平成27年7月27日(2015.7.27)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)		
C 12 N 5/071 (2010.01)	C 12 N 5/00	202 A	4 B 065	
C 12 N 5/074 (2010.01)	C 12 N 5/00	202 D	4 C 081	
C 12 N 5/075 (2010.01)	C 12 N 5/00	202 H	4 C 087	
A 61 L 27/00 (2006.01)	A 61 L 27/00	E		
A 61 K 35/34 (2015.01)	A 61 K 35/34			

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-516082 (P2015-516082)	(71) 出願人	514309457 カプリコール, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 90211 カリフォルニア州 ビバリー・ヒルズ ウィルシェア ブルバード セカンド フロア 884 O
(86) (22) 出願日	平成25年5月31日 (2013.5.31)	(74) 代理人	100156845 弁理士 山田 威一郎
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月3日 (2015.2.3)	(74) 代理人	100124431 弁理士 田中 順也
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/043772	(74) 代理人	100174160 弁理士 水谷 韶也
(87) 國際公開番号	W02013/184527	(74) 代理人	100124039 弁理士 立花 顯治
(87) 國際公開日	平成25年12月12日 (2013.12.12)		
(31) 優先権主張番号	61/655,928		
(32) 優先日	平成24年6月5日 (2012.6.5)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】心臓組織から心臓幹細胞を作製するための最適化方法および心臓治療におけるそれらの使用

(57) 【要約】

本開示は、全般に、心臓幹細胞の作製のための組織の処理增加のための方法に關し、幹細胞が心臓幹細胞療法における使用に適切である。特に、いくつかの実施形態は、心臓幹細胞の複数患者用量の作製のための、同種異系ドナー心臓組織の処理に関する。

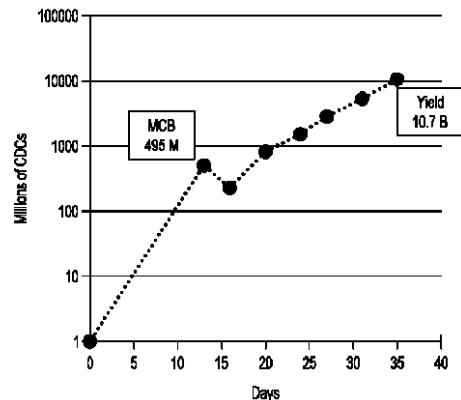


FIG. 8

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

同種異系心臓幹細胞療法に適切な、ろ過された心筋球由来細胞（CDC）の調製方法であって、

ドナー心臓組織を対象から受け取るステップ、

前記ドナー心臓組織の小片を、約200 μm^3 から約600 μm^3 の範囲の複数の組織外植片に処理し、前記外植片が約0.3から約0.6グラムの範囲であるステップ；

前記外植片を、約30秒から約5分の範囲の時間、酵素的に消化するステップ；

前記外植片を、約1外植片/400から700 cm^2 培養表面積の密度で、細胞が前記外植片から遊走するまで培養するステップ；

10

外植片から遊走する細胞を収集するステップ；

収集した細胞を、CDCを作製するために培養するステップ；

CDCを採取するステップ；および

前記採取されたCDCを、直径50 μm より大きい粒子を除去して、直径50 μm 未満のCDCを単離して、同種異系心臓幹細胞療法を容易にするためにろ過するステップ；を含む方法。

【請求項 2】

直径50 μm 未満にサイズ分けされた単離CDCが、冠動脈内送達および内径約50 μm を有する心臓細動脈への通過に適切である、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 3】

前記ろ過ステップが、前記採取されたCDCを、第1のフィルターを介してろ過し、約140 μm より大きい粒子を除去するステップおよび第2のフィルターを介してろ過し、約50 μm より大きい粒子を除去するステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記第1および前記第2のフィルターが、単一の2段階フィルター装置を構成する、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記ドナー心臓組織が、前記処理の前に、約1から約90日の範囲の期間、場合により凍結保存される、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 6】

前記処理ステップが、培養容器中の外植片を手動で配置するのではなく、外植片を培養培地であふれさせることによって、前記外植片を解剖容器から培養容器に移動させるステップをさらに含み、前記あふれさせることによる移動が、汚染の危険性を低下させ、前記外植片の攪乱を低下させる、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記複数の外植片が、ドナー心臓組織の1つの領域から得られた複数の外植片を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記複数の外植片が、ドナー心臓組織の複数の領域から得られた複数の外植片を含む、請求項1に記載の方法。

40

【請求項 9】

前記培養ステップが、前記外植片から遊走する細胞の凝集を減少させるために、ヘパリンおよびL-グルタミンの1つ以上を培養培地に加えるステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

同種異系心臓幹細胞療法に適切なCDCを凍結するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 11】

ドナー心臓組織が、約1グラムから約300グラムのサイズに及ぶ、請求項1に記載の方法。

50

【請求項 1 2】

前記処理ステップが、立方体形状である複数の組織外植片をもたらす、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

ドナー心臓組織が、前記対象から摘出されてから 3 日以内に処理される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

同種異系心臓幹細胞療法に適切な前記 C D C が、 $140 \mu\text{m}$ より大きい粒子を 1 % 未満含む、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

同種異系心臓幹細胞療法に適切な前記 C D C が、 $150 \mu\text{m}$ より大きい粒子を実質的に 0 % 含む、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

同種異系心臓幹細胞療法に適切な前記 C D C が、 $50 \mu\text{m}$ より大きい粒子を 1 % 未満含む、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記単離 C D C を、冠動脈内送達により対象に送達するステップをさらに含む、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法に従って作製された単離 C D C 。

【請求項 1 9】

同種異系心臓幹細胞療法に適切な心筋球由来細胞 (C D C) を調製する方法であって、ドナー心臓組織を第 1 の対象から受け取るステップ；

前記ドナー心臓組織の小片を、約 0 . 3 から約 0 . 6 グラムの範囲の複数の立方体状組織外植片に処理するステップ；

前記外植片を、約 1 外植片 / 400 から 700 cm^2 培養表面積の密度で、細胞が前記外植片から遊走するまで培養するステップ；

外植片から遊走する細胞を収集するステップ；

収集した細胞を、 C D C を作製するために培養するステップ；

C D C を採取するステップ；

前記採取された C D C をろ過し、約 $50 \mu\text{m}$ より大きい粒子を除去して、それによって、同種異系心臓幹細胞療法に適切な C D C を作製するステップ；

を含む方法。

【請求項 2 0】

同種異系心臓幹細胞療法に適切な心筋球由来細胞 (C D C) を含む組成物であって：

第 1 の対象由来のドナー心臓組織から作製された複数の C D C ；

1 % 未満の $140 \mu\text{m}$ より大きいサイズの粒子；

1 % 未満の $50 \mu\text{m}$ より大きいサイズの粒子、

を含み、

前記組成物が、冠動脈内送達経路による対象への投与に適切である組成物。

【請求項 2 1】

前記組成物が、 C D C の実質的に純粋な集団を含む、請求項 2 0 に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記組成物が、実質的に均一なサイズの C D C 集団を含み、全 C D C の 98 % より多くが $40 \mu\text{m}$ 未満である、請求項 2 0 または 2 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0 0 0 1】

本出願は、2012年6月5日出願の米国特許仮出願第 61 / 655,928 号の利益を請求するものであり、この全開示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

(連邦政府資金による研究開発の記載)

【0002】

本研究は、少なくとも一部は、国立衛生研究所 (National Institutes of Health) NHLBI R C 3 認可番号 HL 103356 および NHLBI S B I R 認可番号 HL 095203 からの助成金により Capricor, Inc. に資金援助された。政府は、本明細書において開示された本発明に特定の権利を有する。

【技術分野】

【0003】

本出願は、概して、損傷した細胞または組織の修復または再生のための幹細胞を作製する方法および組成物に関する。例えば、いくつかの実施形態において、本明細書に開示の方法および組成物は、心臓組織の修復および / または再生に使用可能である。特に、本明細書に開示の方法は、組織試料、例えば心臓組織の処理をスケールアップし、処理された組織を培養し、心臓組織修復を必要とする 1 以上の対象の治療における使用に十分な組織から大量の心臓幹細胞を作製する方法に関する。

10

【背景技術】

【0004】

細胞の喪失または損傷に関するヒト疾患の範囲は広く、限定するものではないが、神経変性疾患、内分泌疾患、癌および心血管疾患を含む。例えば、冠動脈心疾患は、現在米国において死亡の主因であり、年間 650,000 を超える命を奪っている。米国心臓協会 (American Heart Association) によれば、米国において毎年 120 万の人々が心臓発作 (または心筋梗塞、MI) を患っている。初回の MI を生き残った人々のうち、数多く (男性生存者の 25 % および女性生存者の 38 %) が、MI の 1 年以内にさらに死亡する。現在、1600 万の米国人が MI の生存者または狭心症 (冠動脈心疾患のための胸部痛) を患っている。冠動脈心疾患は、数多くの患者が心不全に悪化し得る。500 万人の米国人が現在心不全を患っており、毎年 550,000 人が新たに診断される。それらの病態の病因とは関係なく、冠動脈心疾患または心不全を患う人々の多くは、永続的な心臓組織の損傷を患っており、これは多くの場合生活の質の低下につながる。

20

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

罹患または損傷した心臓組織の修復または再生のために、心臓幹細胞の即時使用の必要性を考慮して、ドナー心臓組織を対象から受け取るステップ、ドナー心臓組織の小片を複数の組織外植片に処理するステップ、外植片を酵素的に消化するステップ、外植片範囲を、細胞が外植片から遊走するまで培養するステップ、外植片から遊走する細胞を収集するステップ、収集した細胞を、CDC 作製のために培養するステップ、CDC を採取するステップ、採取した CDC をろ過して、約 50 μm より大きい粒子を除去するステップ、それによって、同種異系心臓幹細胞療法に適切な CDC を作製するステップを含む、同種異系心臓幹細胞療法に適切な心筋球由来細胞 (CDC) を調製する方法を、本明細書において提供する。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

いくつかの実施形態において、対象由来のドナー心臓組織を複数の組織外植片に処理するステップ、前記外植片を部分的に酵素的に消化するステップ、前記外植片を、前記外植片から細胞が遊走するまで培養するステップ、外植片から遊走する細胞を収集するステップ、収集した細胞を、CDC 作製のために培養するステップ、CDC を採取するステップ、および前記採取された CDC をろ過し、直径約 50 μm より大きい粒子を除去し、直径約 50 μm 未満の CDC を単離して、同種異系心臓幹細胞療法を容易にするステップ、を含む、同種異系細胞療法のためのろ過された CDC を調製する方法論をさらに提供する

50

。特に、いくつかの実施形態において、直径 50 μm より大きい粒子が除去された、ろ過された C D C は、内径約 50 μm を有する心臓細動脈への冠内の送達および通過に適しており、これは、C D C 投与に伴う有害な副作用、例えば、不整脈、血管閉塞、療法誘導性虚血などの危険性を有利に低下させる。

【0007】

いくつかの実施形態において、ドナー心臓組織の処理は、培養容器中の外植片を手動で配置（自動配置を含む）するのではなく、外植片を培養培地であふれさせることによって、外植片を消化（および／または解剖）容器から培養容器に移動させるステップを伴う。有利には、いくつかの実施形態において、外植片を培地であふれさせることによる移動は、汚染の危険性を低下させるだけでなく、外植片の攪乱もまた低下させ、それによって、外植片からの細胞の収量、外植片由来の C D C の効力および外植片から C D C を作製する時間の短縮の 1 つ以上を改善する。

10

【0008】

いくつかの実施形態において、複数の外植片は、ドナー心臓組織の単一の領域から得られる複数の外植片を含む（例えば、複数の外植片のそれぞれは、例えば心房に由来する）。対称的に、いくつかの実施形態において、複数の外植片は、ドナー心臓組織の複数の領域から得られた外植片を含む。一部の実施形態において、さまざまな領域から得られた外植片の混合物は、外植片は、*in vivo* 環境に非常に良く似ている培養液中のサイトカインおよび／またはシグナル伝達環境条件に曝露されるので、C D C の収量、効力および／または成長が改善される。例えば、中隔由来の外植片と同時培養された心房由来の外植片は、心臓のより分離された領域由来の外植片より非常に、化学的に相互作用（例えば、サイトカイン、ケモカインまたはパラクリン因子のクロストークまたはシグナリング）可能である。しかし、いくつかの実施形態において、心臓の別個の領域由来の外植片は、互いに容易に同時培養される。

20

【0009】

いくつかの実施形態において、外植片から発生した細胞は、外植片から離れて遊走するので凝集し得る。一部の実施形態において、凝集は、C D C の最終収量または質を低下させ、したがって、一部の実施形態において、抗凝集剤が利用される。例えば、一部の実施形態において、細胞の凝集を減少させるために、ヘパリンを使用して、外植片培養培地を補う。一部の実施形態において、外植片培養培地は、前記外植片から遊走する細胞の凝集を減少させるために、L-グルタミンが補足されている。ヘパリンおよびL-グルタミン（および／または他の薬剤）の組み合わせが、一部の実施形態において使用される。細胞凝集体の手動の解離もまた、いくつかの実施形態において用いられる。しかし、いくつかの実施形態において、細胞の凝集を減少させるために、追加のステップまたは薬剤は利用されない。

30

【0010】

いくつかの実施形態において、組織外植片は、約 100 μm^3 から約 800 μm^3 の範囲のサイズに処理され、この範囲は、約 100 μm^3 から約 700 μm^3 、約 200 μm^3 から約 600 μm^3 、約 100 μm^3 から約 600 μm^3 、約 200 μm^3 から約 500 μm^3 、約 200 μm^3 から約 400 μm^3 、約 300 μm^3 から約 500 μm^3 、約 300 μm^3 から約 400 μm^3 およびこれらの重複範囲を含む。いくつかの実施形態において、処理は完全に自動である。一部の実施形態において、手動の処理または手動および自動の処理が組み合わせて使用される。一部の実施形態において、ドナー組織は、場合により処理前に凍結される。一部の実施形態において、他の処理（例えば、生理食塩水による灌流または酸素化 K r e b s 溶液）が処理の前、処理中または処理後に用いられる。いくつかの実施形態において、外植片のサイズは、ドナーの年齢、健康、疾患状態および／またはドナー組織の採取からの時間の 1 つ以上により決定される。いくつかの実施形態において、外植片は、約 0.1 から約 0.9 グラムの範囲であり、この範囲は、約 0.1 から約 0.8 グラム、約 0.1 から約 0.7 グラム、約 0.1 から約 0.6 グラム、約 0.2 から約 0.6 グラム、約 0.3 から約 0.6 グラム、約 0.3 から約 0.5 グラム、約 0.3 から

40

50

約0.4グラムおよびこれらの重複範囲を含む。実施形態に依存して、より重いまたは軽い質量も使用されてよい。組織の質量もまた、一部の実施形態において、組織が収集された心臓の領域により、ある程度決定される。いくつかの実施形態において、外植片は、立方体の形状に処理されるが、一部の実施形態において、他の形状または近似の形状が使用される。したがって、いくつかの実施形態において、サイズおよび組織質量の組み合わせが使用され、特定のドナー組織（またはドナー組織の領域）に関する外植片の全体の大きさが決定される。いくつかの実施形態において、全体の大きさは、所与の作製作業で、および/または所与の培養容器内で培養される外植片の数（例えば、外植片密度）に基づく。いくつかの実施形態において、全体の大きさは、外植片が由来する心臓の領域（複数可）に基づく。

10

【0011】

一部の実施形態において、組織外植片は、約30秒から約5分の範囲の時間で消化され、この時間は、約30秒から約4分、約30秒から約3分、約30秒から約2分、約30秒から約1分、約30秒から約90秒、約30秒から約120秒、約30秒から約200秒、約30秒から約250秒およびこれらの重複範囲を含む。ドナー組織の全体のサイズおよび質量の決定と同様に、酵素的消化は、最適な組織消化および得られた細胞の生存能力を提供するパラメーターに基づき、（酵素の選択、酵素の濃度および/または消化時間により）適合させることができる。例えば、一部の実施形態において、より大きな外植片を使用する場合、より長い消化時間を使用して、酵素が外植片の中心部に確実に到達するようになる。一部の実施形態において、酵素的消化は、場合により削除される。いくつかの実施形態において、消化は完全であり（例えば、断片が完全に細胞内に分散される）、一方、一部の実施形態において、消化は部分的である（例えば、外植片の一部が無傷のままである）。

20

【0012】

いくつかの実施形態において、外植片は、約1外植片/400から700cm²培養表面の密度で培養され、この密度は、約1外植片/400cm²、約1外植片/450cm²、約1外植片/500cm²、約1外植片/550cm²、約1外植片/600cm²、約1外植片/650cm²およびこれらの間の重複密度を含む。一部の実施形態において、複数の外植片が、単一の培養容器内で培養される。一部の実施形態において、複数の外植片が、1つの外植片由来の細胞が別の外植片由来の細胞と直接相互作用しないように、単一の容器内で個別に（例えば分割されて）培養される。一部の実施形態において、細胞は相互作用できないが、培養容器のさまざまな領域が、互いに流体連通しており、それによって、例えば、さまざまな外植片とそれらのそれぞれの細胞の間で、パラクリン相互作用が可能である。

30

【0013】

いくつかの実施形態において、本方法は、同種異系心臓幹細胞療法に適切なCDCを凍結するステップをさらに含む。一部の実施形態において、培養工程は、CDCの作製前（例えば、心筋球段階において）に終了するように適合される。したがって、心筋球は、一部の実施形態において、保存され、その後、CDCの作製に使用することもできる。

40

【0014】

いくつかの実施形態において、ドナー心臓組織は、約1グラムから約300グラムのサイズの範囲であり、この範囲は、約1から約20グラム、約20から約50グラム、約50から約75グラム、約75から約150グラム、約150から約200グラム、約200から約250グラム、約250から約300グラムおよびこれらの重複範囲を含む。一部の実施形態において、全心臓が使用される。一部のこの実施形態において、心臓の一部分を最初に処理して、残りを後の時点で処理してもよい。例えば、一部の実施形態において、組織の一部分を処理し、CDCの作製に使用して、一方、組織の残りは、場合により処理段階の間凍結される。しかし、一部の実施形態において、組織の残りは冷心筋保護液（またはその機能的等価物）において保存される。いくつかの実施形態において、ドナー心臓組織は、対象から摘出されてから約3日以内に処理されるが、一部の実施形態

50

(例えば、凍結または低体温保存状態)において、より長い時間が、細胞の作製にさらに適切である。いくつかの実施形態において、組織試料は、処理前に約1から約90日の間凍結されてよく、この日数は、約1から約4日、約4から約7日、約7から約10日、約10から約14日、約14から約28日、約28から約36日、約36から約48日、約48から約60日、約60から約75日、約75から約90日およびこれらの間の凍結保存の重複時間を含む。

【0015】

いくつかの実施形態において、ろ過は、約140 μm より大きな粒子を除去するための第1のフィルターによる採取されたCDCのろ過、および約50 μm より大きい粒子を除去するための第2のフィルターによるろ過を含む。一方、一部の実施形態において、フィルターは、別々の装置であってよく、一部の実施形態において、第1および第2のフィルターが単一の2段階のフィルター装置を構成する。いくつかの実施形態において、100%未満のろ過効率を考慮して、1つ以上のフィルターによる複数回通過が実施される。

10

【0016】

いくつかの実施形態において、同種異系心臓幹細胞療法に適切なCDCは、150 μm より大きい粒子を1%未満含む。いくつかの実施形態において、同種異系心臓幹細胞療法に適切なCDCは、150 μm より大きい粒子を実質的に0%含む。いくつかの実施形態において、同種異系心臓幹細胞療法に適切なCDCはまた、50 μm を超える粒子を1%未満含む。特許請求する方法から得られる細胞性組成物中の粒子(および細胞)のサイズの結果として、同種異系心臓幹細胞療法に適切なCDCは、冠動脈内送達に適切である。得られた細胞性組成物の成分は、150 μm より大きいものは事実上ないので、この組成物は、冠動脈(直径平均150~170 μm)内を自由に流れることができる。さらに、50 μm より大きい得られた細胞性組成物の成分の割合が非常に少ないので、心臓細動脈を流れる血液または酸素の減少による有害事象(例えば、不整脈)の危険性が低下する。

20

【0017】

いくつかの実施形態において、本方法は、例えば細胞を対象に投与する時間まで、細胞を極低温で保存するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、対照的に、本方法は、前記単離CDCを対象に直接送達するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、この送達は冠動脈内送達によるが、本明細書にて述べるように、他の経路も場合により使用される(例えば、静脈内、直接注入など)。

30

【0018】

本明細書において、第1の対象からドナー心臓組織を受け取るステップ、ドナー心臓組織の小片を、約0.3から約0.6グラムの範囲の複数の立方体状組織外植片に処理するステップ、外植片を、約1外植片/400から700 cm^2 培養表面積の密度で、細胞が外植片から遊走するまで培養するステップ、外植片から遊走する細胞を収集するステップ、収集した細胞を、心臓幹細胞の作製のために培養するステップ、心臓幹細胞を採取するステップ、および採取した心臓幹細胞をろ過して、約50 μm を超える粒子を除去するステップ、それによって、同種異系心臓幹細胞療法に適切な心臓幹細胞を作製するステップを含む、同種異系心臓幹細胞療法に適切な心臓幹細胞を調製する方法を提供する。

40

【0019】

本明細書において、本明細書に開示の方法のいずれかにより作製されるCDCを含む組成物もまた提供される。本明細書において、第1の対象由来のドナー心臓組織から作製された複数のCDC、1%未満の140 μm より大きいサイズの粒子、1%未満の50 μm より大きいサイズの粒子を含み、冠動脈内送達経路により対象に投与するため適切である、同種異系心臓幹細胞療法に適切な単離CDCもまた提供される。

【0020】

いくつかの実施形態において、組成物は、CDCの実質的に純粋な集団を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、実質的に均一のサイズのCDCの集団を含み、全CDC

50

Cの約90%より多くの、約95%より多くの、約98%より多くの、約99%より多くの、または約100%のCDCが40μm未満である。

【0021】

本明細書において、同種異系心臓幹細胞療法に適切なCDCの集団を含み、第1の対象由来のドナー心臓組織から作製された複数のCDCを含み、前記CDCの少なくとも約70%が、CD9、CD13、CD26、CD29、CD44、CD46、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD51/61、CD54、CD55、CD58、CD59、CD61、CD63、CD73、CD81、CD95、CD98、CD99、CD105、CD147、CD151、CD165、CD166、CD200、CD273、CD274、ベータ2ミクログロブリン、上皮成長因子受容体およびヒト白血球抗原A、B、Cの1つ以上を発現する組成物をさらに提供する。いくつかの実施形態において、少なくとも約80%のCDCがリスト化されたマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態において、少なくとも約90%のCDCがリスト化されたマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態において、少なくとも約95%のCDCがリスト化されたマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態において、少なくとも約97%のCDCがリスト化されたマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態において、少なくとも約99%のCDCがリスト化されたマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態において、全集団が、少なくとも1つのマーカーを発現する。いくつかの実施形態において、CDCの集団は、他の細胞（例えば、他の幹細胞および/または本明細書に開示の方法の間に作製される他の中間細胞）から、発現されるさまざまなマーカー（および/または発現のレベル）のおかげで識別可能である。したがって、いくつかの実施形態において、CDCのマーカープロファイルを使用して、CDCである（またはCDCでない）細胞を特異的に同定、CDC調製物の純度の決定、および/またはCDC作製作業の間の変動性の同定（およびその変動性の潜在的供給源、ドナーごとの変動、作製毎の変動など）ができる。

10

20

30

30

40

【0022】

いくつかの実施形態において、第1の対象由来のドナー心臓組織から作製された複数のCDC、約1%未満の約140μmより大きいサイズの粒子、約1%未満の約50μmより大きいサイズの粒子を含み、前記CDCの少なくとも約70%が、CD9、CD13、CD26、CD29、CD44、CD46、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD51/61、CD54、CD55、CD58、CD59、CD61、CD63、CD73、CD81、CD95、CD98、CD99、CD105、CD147、CD151、CD165、CD166、CD200、CD273、CD274、ベータ2ミクログロブリン、上皮成長因子受容体およびヒト白血球抗原A、B、Cの1つ以上を発現する、同種異系心臓幹細胞療法に適切なCDCを含む組成物をさらに提供する。いくつかの実施形態において、少なくとも約80%のCDCが、リスト化されたマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態において、少なくとも約90%のCDCが、リスト化されたマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態において、少なくとも約95%のCDCが、リスト化されたマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態において、少なくとも約97%のCDCが、リスト化されたマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態において、少なくとも約99%のCDCが、リスト化されたマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態において、全集団が、少なくとも1つのマーカーを発現する。

40

【0023】

一部の実施形態において、約20パーセントから約80パーセントのCDCが、CD10、CD15、CD31、CD34、CD49a、CD56、CD71、CD72、CD87、CD90、CD91、CD97、CD99R、CD107a、CD108、CD109、CD119、CD130、CD140a、CD141、CD142、CD164、CD220、CD221、CD227、CD321、CD340、ヒト白血球抗原A2、ヒト白血球抗原DQ、MIC A/B、CD49fおよびCD201の1つ以上を発現す

50

る。

【0024】

いくつかの実施形態において、CDC組成物は、ドナー心臓組織を複数の組織外植片に処理するステップ、および外植片を、細胞が前記外植片から遊走するまで培養し、それによって外植片由来細胞(EDC)を作製し、これをさらに処理してCDCを作製し得るステップ、によって作製される。いくつかの実施形態において、前記EDCの少なくとも約70%が、CD9、CD13、CD26、CD29、CD44、CD46、CD47、CD49b、CD49c、CD49e、CD51/61、CD54、CD55、CD58、CD59、CD61、CD63、CD73、CD81、CD90、CD95、CD98、CD99、CD105、CD108、CD130、CD142、CD147、CD151、CD165、CD166、CD200、CD274、CD340、ベータ2ミクログロブリン、上皮成長因子受容体およびヒト白血球抗原A、B、Cの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態において、少なくとも約80%のEDCが、リスト化されたマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態において、少なくとも約90%のEDCが、リスト化されたマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態において、少なくとも約95%のEDCが、リスト化されたマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態において、少なくとも約97%のEDCが、リスト化されたマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態において、少なくとも約99%のEDCが、リスト化されたマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの実施形態において、全EDC集団が、少なくとも1つのマーカーを発現する。

10

20

30

40

50

【0025】

いくつかの実施形態において、EDCのマーカープロファイルは、得られたCDCのマーカープロファイルと一致する。しかし、いくつかの実施形態において、EDCに存在する1つ以上のマーカーは、CDCにおいて発現の増加または減少を示し得るという点から、マーカープロファイルは変動することがある。いくつかの実施形態において、マーカー発現の差は、CDC集団を、その前駆体であるEDC集団と識別可能にする。いくつかの実施形態において、CDCの純度が検証できることから、この識別能力は有利である。したがって、いくつかの実施形態において、CDC集団は、約30%未満、約20%未満、約15%未満、約5%未満、または約1%未満のEDCを含むものとして同定され得る。さらに、いくつかの実施形態において、CDCは、前記EDCと比較した、前記CDCによるSSEA-4、CD141およびCD227の1つ以上の発現の減少を検出することによって、EDCと識別することができる。

【0026】

いくつかの実施形態において、EDCのマーカープロファイルは、得られたCDC集団の生存能力のおよび/または治療効力の予測因子として使用可能である。いくつかの実施形態において、例えば、EDCにおける特定のマーカープロファイルの存在は、適切な臨床有効性を有するCDCと相関し得る。したがって、いくつかの実施形態において、EDCのプロファイリングは、特定の組織供給源からCDCの作製を継続すべきかどうか(例えば、CDCが治療的に有効であると予測される場合、作製を継続する価値があるとみなすことができる)を決定するスクリーニングステップとして使用可能である。実施形態および評価される変動性に依存して、スクリーニングを使用して、EDCおよびCDCの間の発現の潜在的相違(例えば、増減が公知であるそれらのマーカー)またはEDCおよびCDCの間の類似性(例えば、EDCにおける特定のマーカーの存在は、CDCにおいて同様の量でそのマーカーの存在をもたらし、したがって、CDCが所望の特徴を有するか、または有さないかを示すものである)が特定される。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1は、ドナー心臓からマスターセルバンクを作製するための模式的なプロセスフローを表し、このマスターセルバンクから心筋球および/または心筋球由来細胞(CDC)が作製される。

【図2A-2B】図2A-2Bは、心臓のさまざまな領域から作製されたCDCの成長に関するデータを表す。A)心房、心尖、右心室、左心室または中隔から、時間と共に作製されたCDCの量。B)5つの領域のそれぞれに対するCDC/グラム組織/日の成長速度。ANOVA = 0.003。テューキー検定を使用した、すべてのペアに関する比較:
* p < 0.05 対 LV、† p < 0.05 対心尖。

【図3A-3C】図3A-3Cは、同種異系CDC製造のために使用されるヒトドナー心臓の外観を表す図である。A)ドナー心臓1番、解剖前。B)ドナー心臓2番、解剖前。C)細胞増殖7日目の外植片(左のパネル)、ポリ-D-リジン上に播種された3日後の心筋球(中央のパネル)、フィブロネクチン上に播種された90%集密のCDCの単層(右のパネル)を含む、CDC培養工程。

【図4A-4C】図4A-4Cは、組織および同種異系CDCの保存条件の効果を表す図である。A)解剖の当日(新鮮)、冷蔵保存の3日後(3日後)、または凍結および解凍後(凍結)のいずれかに播種された外植片から継続的に作製したCDC細胞の量。B)新鮮、冷蔵保存、凍結処理された、発現されたCDC/グラム組織/日の成長速度。ANOVA = 0.0612。C)さまざまな時点における、凍結および解凍されたCDCの生存能力、回復性および増殖に対する効果。

【図5】図5は、同種異系CDCの例示的表現型を表す図である。ヒストグラムは、CD105およびCD90のCDC発現を示す。実線は、標識細胞を表す。点線はアイソタイプの対照である。ドットプロットは、c-KittおよびMDR-1、CD90およびDDR2、ならびにCD90およびSMAの同時発現を示す。

【図6A-6C】図6A-6Cは、同種異系CDCの収量のドナーの差を表す図である。A)継続的に各ドナーから成長したCDCの量。B)各ドナーに関するCDC/グラム組織/日の成長速度。t検定を使用した群の比較:
* p < 0.05 対 DCD。C)マスターセルバンクの作製および各ドナーに関する全CDC収量。全収量はMCBの一部を拡大して収集されたデータから推定される。

【図7】図7は、ヒトおよびブタ両方の細胞を使用して、小規模および大規模な方法により作製された心筋球を表す図である。

【図8】図8は、マスターセルバンクの作製および同種異系ブタドナー組織に関する全CDC収量を表す図である。

【図9】図9は、ブタCDCの免疫表現型を表す図である。

【図10A-10B】図10A-10Bは、ブタ同種異系CDCに対するろ過の効果を表す図である。A)解凍され、ろ過されなかった同種異系ブタCDC、大型の希薄なCDC凝集体が表される。B)解凍およびろ過された同種異系ブタCDC。小型の希薄なCDC凝集体がいまだ残っていることが表される。

【図11】図11は、さまざまなCDC調整物中に存在する細胞凝集体および微粒子の分析を表す図である。表6の試料1、3、4、6および17を表す。

【図12A-12J】図12A-12Jは、4つの別個の作製作業による、EDCにおける242の細胞表面マーカーの平均発現レベルを表す図である。

【図13A-13J】図13A-13Jは、6つの別個の作製作業による、CDCにおける242の細胞表面マーカーの平均発現レベルを表す図である。

【図14】図14は、心筋梗塞のマーカーに対するリガンドである、CDCにおいて発現された特定マーカーの同定を表す図である。

【図15A-15C】図15A-15Cは、CD146(A)、CD107b(B)およびCD140bの発現と駆出率の変化との負の相関を表す図である(CDC治療効力の一態様の代表)。

【図16A-16B】図16A-16Bは、CDCにおけるさまざまな免疫学的マーカーの間の発現の相関を表す図である。

【図17A-17J】図17A-17Jは、4つの別個の作製作業による、EDCにおける242の細胞表面マーカーの発現レベルを、対応するCDCにおけるマーカー発現と比較した差の平均を表す図である。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【0028】

疾患を治療するために新しい細胞を組織に導入する細胞療法は、罹患組織を修復または健康な組織に置き換えるための有望な新しい方法となる。いくつかの実施形態において、組織から常在幹細胞を採取する、または拡大するための、さまざまな組織の調製方法を開示する。いくつかの実施形態において、本明細書に開示の方法は、比較的小質量の出発物質から非常に大量の細胞を作製させ、それによって「マスターセルバンク」の作製を可能にする。いくつかの実施形態において、このマスターセルバンクは、心臓幹細胞療法を必要とする複数の患者の治療に使用できる幹細胞の宝庫として機能する。

心臓幹細胞療法

10

【0029】

本明細書において、損傷または罹患した心臓組織の解剖学的形態および/または機能を、修復、再生および/または改善するために、損傷または罹患した心臓組織を有する対象に投与するために使用される幹細胞を作製するための最適化方法を提供する。複数のタイプの幹細胞が、本明細書に開示の方法に従って処理できるが、いくつかの実施形態において、心臓幹細胞は心臓組織を処理するステップにより作製される。

【0030】

複数のタイプの心臓幹細胞が、本明細書に開示の方法に従って得ることができ、これらのタイプは、限定するものではないが、心筋球および心筋球由来細胞（CDC）を含む。心筋球およびCDCに関する追加の情報は、例えば、2012年9月18日発行の米国特許第8,268,619号、および2007年4月21日出願の米国特許出願第11/666,685号および2012年3月5日出願の米国特許出願第13/412,051号に見出すことができ、これらそれぞれの全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0031】

いくつかの実施形態において、本明細書におけるいくつかの心臓の実施形態は、急性心不全（例えば、発作またはMI）または慢性心不全（例えば、鬱血性心不全）の1つ以上からもたらされる、損傷した、または罹患した心臓組織を治療または修復するために使用される。いくつかの実施形態において、約 1×10^5 から約 1×10^7 の心臓幹細胞が投与される。いくつかの実施形態において、用量は、細胞を与えられる対象のサイズおよび/または年齢に依存して変動される。一部の実施形態において、より少数またはより多数の細胞が、場合により投与される。さまざまな投与経路もまた、実施形態に依存して使用される。例えば、心臓幹細胞は、静脈内、動脈内、冠動脈内または心筋内（または他の経路）の投与経路により投与される。

30

【0032】

心臓幹細胞療法（および本明細書に開示の方法）は、実施形態に依存して、自己、同種異系、同系間または異種間であってよい。いくつかの実施形態において、組織供給源（例えば、臓器ドナーなど）の即時利用の可能性が、保存可能で、後に「オフ・ザ・シェルフ」様式で使用可能な大量の細胞のスケールアップ作製を可能にするので、同種異系療法が用いられる。

40

【0033】

興味深いことに、同種異系組織供給源を使用する場合、即時使用のスケールアップの可能性はさまざまな技術的課題を提示し、これらはより詳細に述べられ、本明細書に開示の方法により対処される。

心臓組織調製のスケールアップの間に応する問題

【0034】

研究室プロトコルまたは料理レシピのスケールアップと同様に、治療的使用のための心臓幹細胞作製のための組織処理および培養のスケールアップは、「倍加」またはバッチサイズの増加によって単純に達成されるものではない。1つの課題は、同種異系心臓幹細胞療法に関連して得られる、より大きい可能性もあるドナー組織試料サイズを、時宜に即して処理する能力である。自己細胞療法は、通常は、1つ以上の心内膜心筋生検試料（全組

50

織質量約0.27g)が用いられるが、同種異系組織供給源は、約8から約40グラムの間の範囲に容易になり得る(これより大きくない場合、例えば全ドナー心臓)。この量の組織の処理は、組織が使用に不適切になる前に可能な限り多くの組織を利用するため、規模および時間の効率の改善を必要とする。

【0035】

大規模な心臓幹細胞の処理に対処するための別の問題は、細胞の凝集である。心臓幹細胞療法のいくつかの実施形態は、血管系の投与経路(例えば、冠動脈内、静脈内など)を用いるので、細胞の凝集により、投与における有害副作用の危険性が増加する。これらは、限定するものではないが、不整脈、塞栓症またはより細い心臓血管系の閉塞を含む。

【0036】

一部の実施形態において、複数の異なる心臓組織サブタイプ(例えば、心房、中隔、心室)が、単一のドナー試料から受け取られ、処理され得るので、得られた心臓幹細胞のプールの整合性もまた問題である。組織のこれらのサブタイプはそれぞれ、培養液中で異なる特徴(例えば、成長速度)を有し、いくつかの実施形態において、違う領域から単離し得る細胞をプールしてマスターセルバンクを作ることになるので、バッチごとの特徴は変動し得る。下記に述べるように、本明細書に開示の方法は、上記の問題に、特に、心臓幹細胞作製の最適化されたスケールアップを提供するために対処する。

組織の採取および処理

【0037】

上で述べたように、同種異系ドナー心臓組織を用いるいくつかの実施形態において、大量となる可能性もある得られた組織は、特定の処理方法を必要とし得る。手動処理は多くの場合、心内膜心筋生検に使用されるが(自動操作も使用可能であるが)、いくつかの実施形態において、受け取った大量の組織を処理するための時間的視点から、手動処理は不十分であると思われる。したがって、いくつかの実施形態において、自動方法および/または機械を使用して、受け取った組織は、より効率的で、時宜にかなった、コスト効率的手段で処理される。結果として、いくつかの実施形態において、これらの方法に基づきより優れた収量が得られる。

【0038】

例えば、いくつかの実施形態において、ドナー心臓組織の受け取りおよび扱いやすい組織断片を作製するための大まかな解剖標本を作製後、一部の実施形態において、自動皮膚採取器を使用して、例えばz軸に初期切断を行う。いくつかの実施形態において、この初期切断によって、(単一の培養皿に使用される)約0.2から約1.5gの範囲の心臓組織の断片を切断する。一部の実施形態において、初期断片は、約0.2から約0.3g、約0.3から約0.4g、約0.4から約0.5、約0.5から約0.6g、約0.6から約0.8g、約0.8から約1.0g、約1.0から約1.2g、約1.2から約1.5gおよびこれらの重複範囲に及ぶ。初期断片を作製後、x軸およびy軸の切断を行い、組織の立方体(例えば、外植片)を作製する。いくつかの実施形態において、外植片サイズは、組織のサブタイプに依存して変動するが、他の実施形態において、組織のサブタイプに関係なく、一定サイズの外植片が全ドナー組織に関して使用される。一部の実施形態において、外植片は、約100から約200 μm^3 、約200から約300 μm^3 、約300から約400 μm^3 、約400から約500 μm^3 、約500から約600 μm^3 、約600から約700 μm^3 、約700から約800 μm^3 、約800から約900 μm^3 、約900から約1000 μm^3 およびこれらの重複範囲に及ぶ。一部の実施形態において、外植片サイズは、組織の質(例えば、新鮮なドナー組織対古いドナー組織)に依存して決定される。一部の実施形態において、外植片サイズは、下流のステップの効率を改善するように選択され、この下流のステップは、限定するものではないが、(例えば、酵素が外植片の中心部分にさらにより浸透するための)外植片の酵素的処理を含む。

【0039】

いくつかの実施形態において、得られた外植片は解剖皿から培養皿に、外植片を培養培地であふれさせることによって移動され、(外植片の手による配置とは反対に)外植片を

10

20

30

40

50

培養容器に静止させる。その後、外植片は数日間平静に培養することができ、その間追加のドナー心臓を時宜にかなった様式で処理することができる。一部の実施形態において、本明細書に開示の方法は、1つ以上のロボットシステムを本工程の1つ以上のステップにおいて使用可能であり、このロボットシステムは、限定するものではないが、自動フラスコ処理ステーションを含む。したがって、一部の実施形態において、ヒューマン・エラーは減少し、一部の実施形態において、培養液の汚染の危険性などの過誤が減少する。マスターセルバンクの処理および作製のための全スキームを、図1に大まかに示す。

組織外植片の培養

【0040】

上で述べたドナー組織の処理に続き、心臓組織外植片は、数日間適切な培養培地で平静に培養される。いくつかの実施形態において、攪乱の欠如は、(いくつかの実施形態において、基底膜様材料、例えば、ラミニン、フィブロネクチン、ポリ-L-オルニチンまたはこれらの組み合わせによりコーティングされた)培養皿表面への外植片の付着をより効果的に可能にし、順に、採取ために細胞のより迅速および強固な作製を可能にする。いくつかの実施形態において、培養フラスコは、コーティングが必要ないように処理される(例えば、外植片は、一部の実施形態において、フィブロネクチンなどの不在下で培養され得る)。

10

【0041】

組織外植片は、間質様細胞の層が付着外植片から発生するまで培養される。培養のこの相は、間質細胞を越えて遊走する小型で、丸く、相が明るい細胞によりさらに同定可能である。特定の実施形態において、外植片は、間質様細胞が集密に成長するまで培養される。この段階またはその段階の前で、相が明るい細胞は採取される。特定の実施形態において、相が明るい細胞は手動方法により採取されるが、他においては、酵素消化、例えばトリプシン(または非動物由来等価酵素)が使用される。これらの採取された細胞(外植片由来細胞またはEDCと呼ばれる)は、次いで、心筋球、CDCの作製に使用、後に心筋球もしくはCDCを作製するために凍結、またはさまざまな品質管理分析に供することができる。心筋球およびCDCの作製に関する追加の情報は、例えば、2006年7月13日出願の米国特許出願第10/567,008号、2007年4月21日出願の第11/666,685号および2012年3月5日出願の第13/412,051号に見出すことができ、これらそれぞれの全体が参考により本明細書に組み込まれる。

20

【0042】

いくつかの実施形態において、サイズ分けされた外植片を受け取るために選択される培養容器のサイズは変動する。一部の実施形態において培養容器の表面積は、1つ以上の外植片が、単一の容器内に付着可能なように選択される。一部の実施形態において、外植片に割り当てられる表面積は、約200から約300cm²、約300から約400cm²、約400から約500cm²、約500から約600cm²、約600から約700cm²、約700から約800cm²、約800から約900cm²、約900から約1000cm²、約1000から約1100cm²、約1100から約1200cm²およびこれらの重複範囲に及ぶ。いくつかの実施形態において、約400cm²と450cm²との間、約450cm²と500cm²との間、約500cm²と550cm²との間、約550cm²と600cm²との間、約600cm²と550cm²との間、約650cm²と700cm²との間の範囲、およびこれらの重複する範囲(外植片)が使用される。一部の実施形態において、市販の培養容器が使用され、一方、他の実施形態において、注文容器が作製される。

30

【0043】

いくつかの実施形態において、特定の表面積が単一の外植片に専有されることにより、移植片からの細胞成長が改善される。一部の実施形態において、これは、接触阻止または他の外植片から発生する細胞による他のタイプの成長阻害の減少によるものである。一部の実施形態において、得られた細胞の密度は、十分な細胞同士の相互作用(接触、パラクリンまたは他)を、細胞が過剰成長することなく可能にする。収量全体の改善に加えて、

40

50

これはまた、細胞採取が最適化され得るように（例えば、低成長または過剰成長の回避）、細胞成長の予測可能性を改善する。本明細書に開示の方法を利用することにより、多数の細胞を、ドナー組織から作製できる。いくつかの実施形態において、（出発組織のグラム量当たりで比較して）、本明細書に開示の方法の結果として作製された細胞の数は、実施形態に依存して、約 1×10^5 、約 2×10^5 、約 4×10^5 、約 6×10^5 、約 8×10^5 、約 1×10^6 、約 2×10^6 、約 4×10^6 、約 10×10^6 、約 20×10^6 、約 30×10^6 、約 35×10^6 、約 40×10^6 、約 1×10^7 、約 1×10^8 であるか、またはそれを超える。したがって、本明細書の方法に基づく臨床的品質の細胞の予期しない有利な拡大に基づき、出発組織質量対臨床用量の比は、約 1 : 4、約 1 : 5、約 1 : 6、約 1 : 7、約 1 : 8、約 1 : 9、約 1 : 10 であり、いくつかの事例において、約 1 : 20 またはそれより多い。したがって、出発材料質量が、約 24 グラムの心臓ドナー組織である場合、約 30 の凍結保存バイアルの外植片由来細胞が得られ、これは、用量に依存して、およそ 150 人の患者の治療用量に適切である。

10

【0044】

外植片に割り当てられた、専有表面積に加えて、いくつかの実施形態において、ドナー試料に由来する心臓組織のサブタイプが最適化される。本明細書に記載の処理に供した場合、心臓組織の特定領域は、違う成長特徴を示す。例えば、いくつかの実施形態において、心房外植片は、他の領域由来の外植片より前に培養容器が集密になる（採取の準備ができている）ような、急速な細胞成長を示す。興味深いことに、他の領域は異なる成長パターンを示す。例えば、図 2A - 2B を参照されたい。一部の実施形態において、異なる領域のさまざまな特徴を、単一の培養フォーマットにおいて活用することができ、例えば、複数領域由来の外植片を組み合わせ（例えば、一緒に培養する）、外植片と細胞との間の相乗的相互作用を可能にし、それによって、いくつかの実施形態において、（任意の領域単独に由来する細胞の成長と比較して）予想外にさらなる成長強化が得られる。例えば、いくつかの実施形態において、心房外植片が他の心臓領域、例えば右心室、中隔、左心室または心尖由来の 1 つ以上の外植片と組み合され、一緒に培養される。一部の実施形態において、第 1 の領域の質量の比は、第 2 の領域の質量に対して適合される。例えば、一部の実施形態において、この比は、約 1 : 1、約 1 : 2、約 1 : 3、約 1 : 4、約 1 : 5、約 1 : 6、約 1 : 10、約 1 : 20、約 20 : 1、約 10 : 1、約 6 : 1、約 5 : 1、約 4 : 1、約 3 : 1、約 2 : 1 および上記の比の範囲内の他の比である。一部の実施形態において、第 1 の組織の量（例えば、心房対中隔、心房対心室、心室対中隔、心房対心尖、心尖対中隔など）は、第 2 のサブタイプの量の約 5 %、第 2 のサブタイプの量の約 10 %、第 2 のサブタイプの量の約 15 %、第 2 のサブタイプの量の約 20 %、第 2 のサブタイプの量の約 25 %、第 2 のサブタイプの量の約 30 %、第 2 のサブタイプの量の約 35 %、第 2 のサブタイプの量の約 40 %、第 2 のサブタイプの量の約 45 %、第 2 のサブタイプの量の約 50 %、またはこれらの重複範囲である。一部の実施形態において、他の比または組み合わせが使用される。一部の実施形態において、この比率の選択は、ドナー組織の状況（例えば、質および / または量）に基づく。いくつかの実施形態において、さまざまな成長細胞の間に、全体の収量および / または細胞世代の速度の予期しない増加を可能にする相乗的な情報伝達（例えば、接触またはパラクリン）が存在する。いくつかの実施形態において、異なる細胞により沈着されたさまざまな細胞外マトリックスタンパク質が、異なる組織サブタイプ由来の細胞の成長および / または生存能力を促進する。さらに追加の実施形態において、他のタンパク質同士の相互作用が、細胞タイプの間で起こり、細胞の組み合わせの成長に利益を与える。さらに、マスターセルバンクは、いくつかの実施形態において、複数の移植片それぞれから採取された細胞の組み合わせであるので、2つ（またはそれ以上）の心臓組織サブタイプの組み合わせは、より整合性のある最終幹細胞バッチをもたらす。

20

30

40

培養後の処理

【0045】

外植片からの成長した細胞の採取および心筋球または C D C の作製の後で、対象の損傷

50

した心臓組織の治療に使用される幹細胞の最終品質に対処するために、（単独または組み合わせで）いくつかの処理ステップが用いられる。上で述べたように、スケールアップした組織の処理および成長の1つの副作用は、細胞の凝集であり得る。この副作用は、大規模培養の間に外植片／細胞が経験した条件の変化によるものと思われる（例えば、より高い播種密度などから近隣細胞とより多く接触する）。本明細書に開示の方法により作製された幹細胞を使用する心臓修復のいくつかの実施形態は血管系によるので、不整脈誘導、血管閉塞などの可能性ため、細胞の凝集は限られた範囲しか容認されない。冠動脈内経路（直径約150～170μm）を介して心臓細動脈（直径約40～50μm）に通過する投与は、したがって、細胞凝集を制限することに特に注意が必要である。

【0046】

10

いくつかの実施形態において、培養培地に1つ以上の試薬を加えることにより、特定の細胞が凝集または接合する傾向が減少する。いくつかの実施形態において、L-グルタミンを培地に加えることにより、細胞凝集の減少が助けられる。一部の実施形態において、ヘパリンの補足により、細胞凝集が減少する。心臓血管系通路が事実上管状であるとすれば、線形（例えば、デイジーチェーン）に接合した細胞は、一次元においてそれらのサイズが心臓血管系を通り抜けるために十分であれば、別の次元においてそれらのサイズが大きすぎたとしても、使用に適切である。

【0047】

20

いくつかの実施形態において、不整脈（または他の有害事象）の危険性を減少させるために、ろ過もまた使用される。いくつかの実施形態において、ろ過はまた、肉芽腫形成の危険性を減少させるためにも機能し、肉芽腫は、免疫系が、外来であるが除去不可能であると知覚した物質を、免疫系が遮断しようとする場合に起こり得る。しかし、いくつかの実施形態において、微粒子非含有培養生成物の維持および使用は、肉芽腫の減少を目的とするフィルターの必要性を大きく（または完全に）削減する。

【0048】

30

いくつかの実施形態において、大まかなろ過および／または沈降は、大型の異物、細胞凝集体および／または外植片断片を除去するための初回通過として使用される。一部の実施形態において、150μmの細孔サイズを有する微粒子フィルターを介したろ過は、約150μmより大きい粒子（例えば、顕微鏡的異物）の存在を減少させる。一部の実施形態において、100%未満であり得るろ過効率を考慮して、150μmのフィルターを介した複数回通過が使用される。一部の実施形態において、このろ過は、結果として生じる、約5%未満、約1%未満、約0.1%未満、または約0.01%未満の150μmより大きい粒子を有する細胞組成物をもたらす。いくつかの実施形態において、得られた細胞組成物は、細胞組成物中の全粒子の約80%より多くの、約85%より多くの、約90%より多くの、約95%より多くの、約98%より多くの（greater than）、約99%より多くの、またはそれより多くの150μm未満である粒子を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、150μmより大きい粒子を実質的に含まない。いくつかの実施形態において、組成物は、150μmより大きい粒子が存在しないという点で純粋である。他のフィルターサイズが、例えば、約100から約110μm、約110から約120μm、約120から約125μm、約125から約130μm、約130から約135μm、約135から約140μm、約140から約145μm、約145μmから約150μmおよびこれらの重複範囲に及ぶ細孔サイズを有するフィルターが他の実施形態において使用できることを理解すべきである。加えて、「フィルター」という用語は、その普通の意味を与えられ、さらに、サイズ、形状、表面特徴、質量、密度などの1つ以上に基づき、第1の物質を第2の物質から分離する任意の手段を指すものである。したがって、さらなるろ過手段を使用してもよく、限定するものではないが、フィルター、篩、膜、機械的フィルター、ケミカルフィルター、光学フィルター、生物学的濾過器などを含む。

【0049】

40

不整脈または他の有害事象の危険性をさらに減少させるために、いくつかの実施形態において、さらなるろ過ステップ（複数可）が実施される。一部の実施形態において、40

50

μmの細孔直径を有するフィルターを使用して、既に150μmにおいてろ過された細胞組成物をろ過する。他の実施形態において、他の細孔サイズ、例えば、約20から約25μm、約25から約30μm、約30から約35μm、約35から約40μmおよびこれらの重複する範囲に及ぶ細孔のフィルターを使用してよい。一部の実施形態において、100%未満であり得るろ過効率を考慮して、このような二次フィルターを介した複数回通過を使用する。一部の実施形態において、したがって、得られた細胞混合物は、約5%未満、約1%未満、約0.1%未満、または約0.01%未満の40μmより大きい粒子を含む。いくつかの実施形態において、得られた細胞組成物は、全CDCの約80%より多く、約85%より多く、約90%より多く、約95%より多く、約98%より多く、約99%より多く、またはそれより多くが、約40μm未満であるCDCを含む。いくつかの実施形態において、組成物は、約40μmより大きい粒子を実質的に含まない。いくつかの実施形態において、組成物は、約40μmより大きい粒子が存在しないという点で純粋である。

10

20

30

40

50

【0050】

さらに追加の実施形態および試料操作の減少（および付隨する汚染の危険性の減少）という追加の有利性において、単回ろ過を、細孔直径約40μmを有するフィルター（複数可）を使用して実施し、細胞組成物のろ過に使用する。上で述べたように、他の細孔サイズ、例えば、約20から約25μm、約25から約30μm、約30から約35μm、約35から約40μmおよびこれらの重複範囲に及ぶ細孔の他のフィルターが、一部の実施形態において使用できる。一部の実施形態において、100%未満であり得るろ過効率を考慮して、このようなフィルターを介した複数回通過を使用する。したがって、一部の実施形態において、得られた細胞混合物は、約10%未満、約5%未満、約1%未満、約0.1%未満、または約0.01%未満の40μmより大きい粒子を含み、約5%未満、約1%未満、約0.1%未満、約0.01%未満の150μmより大きい粒子を含むか、または150μmより大きい粒子を実質的に含まない。いくつかの実施形態において、得られた細胞組成物は、全CDCの約80%より多く、約85%より多く、約90%より多く、約95%より多く、約98%より多く、約99%より多く、またはそれより多くの40μm未満であるCDCを含む。いくつかの実施形態において、組成物は、40μmより大きい粒子を実質的に含まない。いくつかの実施形態において、組成物は、40μmより大きい粒子が存在しないという点で純粋である。

【0051】

実施形態およびろ過される細胞培養液の量に依存して、さまざまなるろ過機構が使用できることもまた、理解すべきである。一部の実施形態において滅菌済の使い捨てフィルターが使用される。他の実施形態において、繰り返して滅菌可能な再使用可能なフィルター装置が用いられる。一部の実施形態において、遠心濾過システムが使用される。一部の実施形態において、インラインフィルターまたはシリングチップフィルターが使用される。いくつかの実施形態において、スクリーンフィルターが使用される。同心円状フィルターが、追加の実施形態において使用される。2ステップ（またはマルチステップ）フィルター（例えば、連続ろ過領域において複数のフィルター細孔サイズを有するフィルター）が、一部の実施形態において使用される。有利には、いくつかの実施形態において、このようなフィルターは、汚染の危険性を減少させ、一部の実施形態において、多段階フィルターが自己内臓型である。フィルターの組み合わせもまた、一部の実施形態において使用される。

【0052】

したがって、一部の実施形態において、得られた細胞混合物は、5%未満、1%未満、0.1%未満、または0.01%未満の150μmより大きい粒子を含み、5%未満、1%未満、0.1%未満または0.01%未満の50μmより大きい粒子を含む。このような実施形態は、対象への投与における、不整脈の発生（または他の有害事象、例えば肉芽腫）の危険性を有利に減少させる。上記のサイズは、いくつかの事例において、細胞の群に対するサイズ制限であることを理解すべきである。言い換えれば、サイズ20μmの2

つのC D Cが接合またはそうでなければ互いに付着している場合、全体のサイズが心臓細動脈を通過するために十分に小さいので、細胞のペアは、それでもろ過を通過すると思われる。

【実施例】

【0053】

下記に提供する実施例は、本明細書に開示の発明の実施形態を限定する意図の物ではない。

実施例1 - スケールアップした同種異系製造の開発

【0054】

心筋球は、自己供給源組織として、経皮心内膜心筋生検からあらかじめ採取されている（例えば、ヒトまたはブタから得られた心筋球）。いくつかの事例において、同種異系幹細胞療法の取り組みが好ましいと思われる。本研究は、心臓幹細胞（例えば、臓器ドナーから収集された試験同種異系全心臓由来の心筋球またはC D C）のスケールアップした作製を成功させる能力を試験した。2つのヒト心臓（1つは心臓死後のドナー[C D C D]由来）を、調査目的で入手した。心臓を、自己C D Cの確立された製造工程に供し、得られた生成物を、成長および表現型同定に関して特徴付けした。組織保存の効果および心臓のさまざまな領域からの組織サンプリングを検査した。本明細書に開示の比較方法は、工程のスケールアップを可能にするように開発された。さらに、2つのブタ心臓から前臨床試験のために製造されたブタC D Cを得、1つは工程変更の分析用および1つは前臨床研究のために製造した。ヒトC D Cはまた、工程変更の効果を評価するために利用した。

10

20

30

40

材料および方法

【0055】

受け取り次第すぐに、心臓を、対象となる5つの別個の領域：心房（右および左の両方）、心尖、左心室心外膜（L V）、右心室心外膜（R V）および右中隔心外膜（通常、心内膜心筋生検が得られる領域）に大まかに解剖した。各領域由来の組織を、外植片と称される、それぞれ約25mgの生検サイズ小片に切断した（500μm × 500μm × 500μm；しかし、一部の実施形態において、他のサイズが使用される）。ヒト心臓を、はさみおよび外科用メスを使用して、記載のように切断し（例えば、2006年7月13日出願の米国特許出願第10/567,008を参照されたく、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、一方ブタ心臓は、自動組織スライサー（Zimmer（登録商標）Dermatome）および自動組織チョッパー（McIlwain（商標）Tissue Chopper, Ted Pella, Inc.）を使用して切断した。次いで、外植片を前記のように処理するか（例えば、Smithら、2007年、および2007年4月21日出願の米国特許出願第11/666,685号および2012年3月5日出願の第13/412,051号を参照されたく、これらは参照によりそれぞれその全体が本明細書に組み込まれる）、または保存に供した。冷蔵保存組織を、4において3日または6日間、100U/mLのヘパリン（APP Pharma）を含む心筋保護溶液（VIASPIN、DuPont Merck）中で維持した。凍結保存組織を、Cryostor（登録商標）CS5またはCS10（Biolife Solutions）に凍結保存バイアル中で再懸濁（75mg/mL）し、Cryomed（Thermo Fisher）速度調節フリーザーに直接配置し、次いで、液体窒素に移した。

30

同種異系C D Cの保存および製剤化

【0056】

同種異系C D Cを作製するために、1mg/mLのコラゲナーゼにより15分間37において消化後、外植片を、100mmのフィブロネクチン（25ng/mL；BD Biosciences）によりコーティングされた皿またはCELLBIND（登録商標）CellStack（登録商標）容器（Corning Life Sciences）に配置した。1～2週間後、外植片からの細胞増殖出現が集密になった。これらの外植片由来細胞（EDC）を、1×TrypLE（商標）（Invitrogen）を使用して採取した。EDCは、マスターセルバンク（M C B）として凍結保存して、次いで心筋

40

50

球 (C S p) として培養されるか、または C S p 培養条件に迅速に配置されるかのいずれかであった。 C S p を、ポリ - D - リジン (2 0 m g / m L ; B D B i o s c i e n c e s) によりコーティングされたプレートまたは U l t r a L o w (登録商標) C e l l S T A C K (登録商標) 容器 (C o r n i n g L i f e S c i e n c e s) において成長させた。同種異系 C D C を、 C S p をフィブロネクチンによりコーティングされた皿または C E L L B I N D (登録商標) H Y P E R F l a s k (登録商標) 容器 (C o r n i n g L i f e S c i e n c e s) または N u n c * T r i p l e F l a s k (T h e r m o S c i e n t i f i c) に播種することによって成長させ、集密したら継代させた。いくつかの (非臨床実験に使用のための) 例において、 C D C を、低体温利用 (凍結せずに) した。これらの事例において、 C D C を、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) に再懸濁した。または、凍結保存のための調製において、同種異系 C D C を、 1 0 0 U / m L のヘパリンを含む、または含まない C r y o S t o r C S 5 または C S 1 0 に再懸濁した (2 5 0 万 / m L [ヒト] または 1 2 5 万 / m L [ブタ]) (注記)。注記したいいくつかの例において、 C D C を、凍結保存前に細孔サイズ 4 0 μ m を有するメッシュ (S t e r i f l i p (登録商標) F i l t e r U n i t s , M i l l i p o r e) を介してろ過したが、他の細孔サイズも、他の実施形態において使用可能である。 C D C 懸濁液を凍結バッグ (P L 0 7 P e r m a L i f e B a g s , O r i G e n B i o m e d i c a l I n c) に充填し、 C r y o M e d 速度調節フリーザーに直接配置し、次いで、液体窒素に移した。解凍において、 (注記した) いくつかの例において、同種異系 C D C を、使用前に 1 5 0 μ m の細孔径を有する小児用血液フィルター (C h a r t e r M e d i c a l) によりろ過した。細胞凝集体を、各調製品において M u l t i s i z e r (商標) 4 C O U L T E R C O U N T E R (登録商標) (B e c k m a n C o u l t e r) を使用して評価した。

統計解析

【 0 0 5 7 】

すべての結果は、平均 \pm S D として表した。 2 つの群の統計的有意性を、対応のない両側 t 検定を使用して決定し、群内を A N O V A により、その後全ペアを比較するためにテューキー検定を使用して決定した。差は、 $p < 0 . 0 5$ に関して有意であるとみなした。

結果

ヒトドナープロファイル

【 0 0 5 8 】

2 つの心臓を N D R I から入手した (表 1)。第 1 のドナー心臓 (O D 3 5 2 1 1 、図 3 a) は、 1 1 歳の D C D (心臓死後の提供) 男性から得、より典型的には 5 分である温阻血時間 (w a r m i s c h e m i c t i m e) に 3 9 分供され、クロスクランプ (c r o s s - c l a m p) の 2 8 . 5 時間以内に届けられ、外植片は、クロスクランプの 4 9 時間以内に播種された。この心臓は弁の採取の候補であり、したがって、中隔の両側の右心室および左心室において切断を行った。切り口はわずかに茶色であり、縁からの組織は廃棄した。第 2 のドナー心臓 (O D 3 5 2 2 0 、図 3 b) は、 D C D ではない 3 歳の男性から入手し、クロスクランプの 2 7 時間以内に届けられ、外植片は、クロスクランプの 3 4 . 5 時間以内に播種された。図 3 c は、培養工程のさまざまなステップを表す。先行する研究において使用された自己供給源組織と比較して、同種異系供給源組織由来の C D C の培養に大きな差は観察されなかった。

10

20

30

40

【表1】

表1. ヒトドナープロファイル

パラメーター	D C D ドナー	非D C D ドナー
I D	O D 3 5 2 1 1	O D 3 5 2 2 0
年齢	1 1 歳	3 歳
性別	男性	男性
人種	白人	白人
温阻血時間	3 9 分	該当なし
クロスクリンプから届くまでの時間	2 8 . 5 時間	2 7 時間
クロスクリンプから外植片までの時間	4 9 時間	3 4 . 5 時間
心臓重量	1 9 0 g	7 5 g

組織保存の効果

【0059】

組織保存の潜在的効果を、両方のドナー心臓を使用して検査した。D C D 心臓から採取し、6日間保存した12の被検査物のうちの4つ（全部で被検査物の17%）は、C D C が得られず、6日保存は、一部の実施形態において最適なC D C 収量より低いことを例示している。C D C を産出したそれらの被検査物を考慮に入れるとして、データは、同様のC D C 収量を達成するために要求される時間に関する3日の冷蔵保存のわずかな効果（図4 a）、および平均収量の減少および処理時間の増加の両方を示す、被検査物の凍結および解凍後に見られる大きな効果（図4 a）を実証している。全体として、計算された成長速度は、凍結保存によりいくらか影響を受けたが（新鮮 = 13 ± 13 、3日目 = 14 ± 15 、凍結 = 2 ± 1 M C D C / g / 日；図4 b）；冷蔵保存または凍結保存の3日目後はいずれも工程の失敗は起こらなかった。凍結組織により作り出された大幅な融通性を前提として、一部の実施形態において、処理前の組織貯蔵が場合により使用される。さらに、冷蔵保存は、数日間のさらなる融通性を処理において可能にする。

C D C 保存の効果

【0060】

細胞の生存能力、回復および増殖に対する凍結保存の潜在的効果を、新鮮なC D C と、凍結および1~90日間の後解凍されたC D C とを比較することによって評価した（図4 c）。C D C の解凍後の生存能力は、凍結保存1日後平均してベースラインの 80 ± 9 %、回復が 79 ± 22 %および6日にわたる増殖が 82 ± 6 %であった。凍結保存の期間を90日まで延長した場合、1日目の対照と比較して任意のパラメーターに有意な変化は起こらなかった。これらのデータは、いくつかの実施形態において、一時的に保存された全心臓およびバンキングセルからC D C を作製することは、いくつかの製造実施形態において実行可能な方法論であることを実証している。

C D C の領域的差

【0061】

2つのドナーからプールされたデータは、心房および右心室からの収量が、他の領域からの収量より大きいが、C D C は、すべての領域由来の組織を使用して、確実に作製可能であることをさらに実証している（図2 a）。計算による成長速度を比較した場合、心房および右心室由来の組織試料は、他の領域と比較して4から6倍多いC D C をもたらした（心房 = 26 ± 10 、R V = 25 ± 22 、心尖 = 6 ± 4 、L V = 5 ± 5 、中隔 = 7 ± 4 M C D C / g / 日；図2 b）。

【0062】

次にマーカーのパネルを使用して、各領域から作製されたC D C を定義した（表2）。ヒトC D C はC D 1 0 5 (T G F - 受容体複合体の調節成分) を発現し、C D 4 5 陰性であり、心臓前駆細胞 (c - K i t + C D 9 0 -) 、心臓間葉様細胞 (C D 9 0 + c - K i t -) および内皮前駆細胞 (C D 3 1 + c - K i t - またはC D 3 4 + c - K i t -)

10

20

30

40

50

の多細胞亜集団を含有することが確立されている。ここに示されたデータは、先行する発現プロファイルと一致する。両方とも多剤耐性ポンプである MDR-1 および Abcg2 もまた、成人心臓前駆細胞に存在する抗原として記載されており、CDC のほんのわずかを構成しており、MDR-1 は、c-Kitt+ 細胞の 31% において同時発現される（図 5）。CD133 はまた、内皮前駆体の同定に使用される別の抗原であるが、CDC では大きく欠けている。CD29、CD44、CD73 および CD166 は、成人骨髄間葉幹細胞および CDC に存在する。心臓間葉様細胞を、心臓線維芽細胞および SMA と識別し、心臓筋線維芽細胞を同定するために、DDR2 をマーカーパネルに加えた。結果は、CD90+ CDC が相対的に均一な集団であり、心臓線維芽細胞または心筋線維芽細胞は均一な集団でないが、心臓間葉細胞は均一な集団であることを示している（図 4）。線維芽細胞および筋線維芽細胞は、実際には、CDC 集団の < 5% を構成している。心臓前駆体（すなわち、c-Kitt+、MDR1+ または Scat-1+ CDC）のごく一部または派生した支持細胞（すなわち、CD90+、DDR2+ または SMA+ CDC）は、領域の間で大きく変動はせず、平均して、前駆体より 1.9 倍多くの支持体が存在していた。

10

【表 2】

表 2. 同種異系 CDC の表現型における領域類似性

マーカー	領域					
	心房	心尖	RV	LV	中隔	平均
c-Kitt	1.6	2.4	2.6	2.4	2.4	2.3 ± 0.4
MDR-1	1.5	2.1	0.6	2.2	2.4	1.8 ± 0.7
Scat-1	1.1	1.1	1.1	0.5	0.8	0.9 ± 0.3
Abcg2	0.7	1.9	0.4	0.6	0.7	0.9 ± 0.6
CD133	0.9	0.8	0.3	0.6	0.6	0.6 ± 0.2
CD31	1.0	0.8	0.4	0.7	0.8	0.7 ± 0.2
CD34	0.9	2.1	0.7	1.3	1.0	1.2 ± 0.5
CD45	0.9	0.8	0.9	0.6	0.7	0.8 ± 0.1
CD105	99.5	98.6	97.8	99.8	99.6	99.1 ± 0.8
CD29	100.0	99.7	100.0	99.9	99.8	99.9 ± 0.1
CD44	99.9	99.7	99.4	99.5	99.7	99.6 ± 0.2
CD73	100.0	99.6	99.9	99.8	99.9	99.8 ± 0.2
CD166	99.2	99.2	99.4	98.6	98.5	99.0 ± 0.4
CD90	4.0	13.4	8.7	6.4	2.9	7.1 ± 4.2
DDR2	1.8	2.2	1.4	2.3	1.7	1.9 ± 0.4
αSMA	0.3	0.8	0.6	0.5	0.5	0.5 ± 0.2

20

ヒトドナーの差

【0063】

2つのドナーに由来する CDC 培養の間に有意差は観察されなかつたが、非 CDC ドナー由来の CDC は、CDC ドナーよりいくらくかよく成長し（図 6a）、計算による成長速度は、非 CDC ドナーが有意に速かった（ 21 ± 16 対 7 ± 8 M CDC/g/日；図 6b）。収量に差があるにもかかわらず、CDC は、CDC および非 CDC 両方の心臓に由来する組織を使用して、確実に作製された。

30

【0064】

次に、心内膜心筋生検と同等の量（250mg）の組織を、2つの心臓それぞれの中隔から収集した。CDC のマスター・セルバンク（MCB）および理論的使用のために調製された P5 の CDC のバッチの両方を作製した。CDC 心臓により、4140 万の CDC の MCB および計算上合計 44 億の P5 の CDC が作製された。非 CDC 心臓により、3720 万の CDC の MCB および計算上合計 606 億の P5 の CDC が調製された（図 6c）。非 CDC 心臓由来の CDC は、P10 において起こった in vitro の老化までにさらに拡大した。老化は、MCB の 15 の集団倍加により起こり、このことは in vivo の腫瘍形成性（tumorigenicity）の懸念を低下させ得るので有利であ

40

50

る（CDCにより治療された数百の動物において理論的懸念は認識されていないが、臨床研究においてさらモニターされている）。いくつかの実施形態において、継代5は、P5のCDCがそれらの成長曲線の直線部にあれば、CDCを治療的に使用するには最適な時を表す。これらのデータは、同種異系組織供給源から妥当なスケールにおいて製造することの実現可能性を実証している。

製造のスケールアップ最適化

【0065】

より大量の組織による出発を可能にし、得られた細胞数を培養する負担を軽減する、製造工程の複数の変形を試験するために、組織をブタ心臓から収集した。組織スライサーおよび組織チョッパーを、外植片作製段階に組み込み、生存能力のある、均一な組織片の迅速な作製を可能にした。それぞれ、2つのタイプの表面処理により利用可能な2つのタイプの培養容器を、EDCの増殖、CSpの形成およびCDCの拡大段階に組み込み、容器のフットプリントを低下させ、培養容器の総数を減少させ、2つの試薬を削除した（ポリ-D-リジンおよびヒトフィブロネクチン、しかし、これらの試薬、またはそれらの機能的等価物／代替品が、いくつかの実施形態において、場合により使用可能である）。小規模および大規模な方法の比較（表3）により、EDCを採取する前に必要な培養時間において差はなく、EDCの収量（MCBを構成する細胞集団）に有意な差はなく、CSp収集前に必要な培養時間が減少し、CSp出現（図7）、または収量（続くP1のCDCの収量として表す）に有意差がなく、同じブタ供給源組織および／またはヒトMCBを使用する直接の比較においてCDC倍加時間に有意差がないことが明らかにされた。特定の製造の変化の影響の概要を、表4に示す。

10

20

30

【0066】

いくつかの実施形態において、開示の方法は、大量のドナー心臓組織の処理に適切である。例えば、開示の方法を使用する平均的な研究室は、40グラムのドナー組織を同時に、日常的に処理することができる。この規模において、上記のヒトのデータから推定すると、（MCBに要求されるウイルス剤試験により大きく駆動される）必要な品質管理による損失を考慮しても、同種異系心臓幹細胞のおよそ850の冠動脈内用量を得ることができる。本明細書に開示の最適化手順の視点から、（例えば、追加の組織を処理することによる）さらなるスケールアップにより、いくつかの実施形態において、より大きな能力およびフロースルーを得ることができることを理解すべきである。自己および同種異系工程から外植片由来細胞の成長効率の比較を表5に示す。これらのデータにより証明されるように、本明細書に開示のスケールアップ工程は、より多くの時間を消費し、自動化が少ない、以前に使用された方法と比較して、細胞採取の全体効率（/グラム組織ベースに対して）を維持しており、さらに予期していない全体収量の増加を可能にする。さらに、利用可能な出発材料の増加、（例えば、少なくとも一部の自動化の増加による）労働力の減少との組み合わせにより、開示の方法は、治療用細胞の大きな収量ならびに実質的コストおよび時間節約を可能にする。

【表3】

表3. 製造スケールアップの結果

工程ステップ	小規模方法	大規模方法
外植片の作製	EDC採取まで11日：	EDCの採取まで11日：
EDCの増殖	5.9 M ブタEDC	5.8 M ブタEDC
CSpの形成	CSpの採取まで6日： 0.75 M ブタP1 CDC 2.0 M ヒトP1 CDC	CSpの採取まで3日： 0.54 M ブタP1 CDC 1.4 M ヒトP1 CDC
CDCの拡大	ヒトCDCに関して2.2日の倍加時間	ヒトCDCに関して2.4日の倍加時間

40

【表4】

表4. 製造スケールアップの概要

工程ステップ	小規模方法	大規模方法	結果	
外植片の作製	ハサミおよび外科メス	組織スライサー	組織を迅速に、 500 μ mの厚さに 均一にスライスする。	
E D C の増殖	ヒトフィブロネクチンによ りコーティングされた 100 mmのペトリ皿	組織チョッパー	薄片を迅速に、 500 μ m ³ の均一な 外植片に刻む。	
		C e l l B I N D 表面	ヒト試薬を削除	10
C S p の形成	ポリ-D-リジンによ りコーティングされた 6 ウェルプレート	C e l l S T A C K フラスコ	830 の皿を80 の フラスコに減少	
		U l t r a - L o w 表面	試薬の変動性を削除	
C D C の拡大	ヒトフィブロネクチンによ りコーティングされた T 175 フラスコ	C e l l B I N D 表面	ヒト試薬を削除	
		H Y P E R F l a s k または T r i p l e F l a s k	150 のフラスコを 15~48 のフラスコに 減少	
				20

【表5】

表5. 細胞培養の性能

	組織の E D C / グラム	平均 E D C 収量
C A P - 1 0 0 1	35. 6 \times 10 ⁶ E D C / g ¹	9. 8 \times 10 ⁶ 細胞 ²
C A P - 1 0 0 2	34. 9 \times 10 ⁶ E D C / g ³	281. 7 \times 10 ⁶ 細胞 ⁴

¹ 平均生検である 0. 276 g で推測 (Makkara, 2012)² 19 の自己作製の平均 E D C 収量 (IND# 13930)³ 播種した組織のグラムおよび 6 つの同種異系の前臨床および臨床のバッチからの E D C 収量に基づき計算した。⁴ 6 つの同種異系の前臨床および臨床バッチから計算した。

ブタ C D C の製造

【0067】

第2のブタ心臓 (0111) を、スケールアップした手順を使用して処理した。ドナーの豚は、ドナーと研究中のレシピエントとの間の最も大きい不一致を確実にするために、S L A (豚白血球抗原) タイプであった。組織 (全部で 8.5 g) を、ドナーブタ心臓の中隔、心房、L V および R V から収集し、マスター・セルバンクの作製に使用した。M C B は 49500 万細胞から構成され、このM B C は、完全に拡大した場合、107 億の同種異系 C D C を作製する (図8)。

【0068】

図9は、ブタ由来のC D C が、C D 105⁺であり、C D 45 に対して大きく陰性であるという点で、ヒト由来のC D C と同じ基本的マーカーを含有することを実証している。

カテーテルによる適合性試験

【0069】

ヒトおよびブタ C D C の両方を、さまざまな市販のカテーテルにより試験した。C D C は、生存能力を低下させることなく (試験前 80 ± 7 % 対試験後 80 ± 8 %)、非常に優れた回復で (98 ± 3 %、付着による損失 2 ± 3 % により裏付けられる)、このようなカテーテルのいずれをも容易に通過した (生データ非掲載)。

10

20

30

40

50

安全性のための製造最適化

【0070】

投与前の細胞凝集を回避するために、生成物解凍後および投与前のろ過ステップを試験した。ろ過の効果を、まず *in vitro* で試験した。細孔サイズ 150 μm の小児用血液フィルターを使用するろ過は、CDCの生存能力に対して影響を与えないこと（トリパンブルーにより、ろ過前 74 % 対ろ過後 85 % の生存能力）、生成物の損失がわずかであること（12.5 M のうち 130,000 の同種異系 CDC が、逆洗により得られた、約 1 % の生成物損失）および細胞凝集のサイズおよび頻度の両方が減少したことが見出された（図 10A - 10B）。上で述べたように、さまざまな他の細孔サイズのフィルターおよびろ過エピソードも、さまざまな実施形態において使用可能である。併せて、いくつかの実施形態において、特定の培養容器において検出可能な微粒子状物質の相対頻度が評価可能であり、これは必要に応じてろ過プロトコルの変更をもたらし得る（例えば、より多くの微粒子状物質を含むフラスコは、より大きなろ過ストリンジエンサーにより使用可能である）。

【0071】

後続の試験により、凍結保存前にヘパリンを含有することが、凍結 / 解凍工程の間の細胞凝集体の形成の防止を援助し、CDC 生存能力には影響を与えない（トリパンブルーにより 83 % の生存能力）ことが明らかになった。CADUCEUS 臨床試験に利用された臨床試料を、ゴールドスタンダードおよび細胞凝集体の許容され得るレベルの基準として分析し、微粒子をそれらの試料に基づき定義した（図 11）。それらの試料は、150 μm より大きい粒子を含有せず、< 1 % の粒子が 50 μm より大きかったことが見出された（表 6：試料 1 および 2）。上で述べたように、複数のろ過エピソードが、ろ過の全体効率を上げるために、いくつかの実施形態において使用される。データは、ブタ由来の CDC が、ヒト由来の CDC より細胞凝集体になりやすく（表 6：試料 5 と 8 を比較、試料 9 と 10 を比較）、フィブロネクチンコーティングを使用せずに成長した CDC は、フィブロネクチンコーティングにおいて成長した CDC より細胞凝集体になりやすく（表 6：試料 5 と 11 を比較（試料 11 は合格）、試料 12 と 13 を比較）、および凍結 / 解凍工程それ自体は細胞凝集体を形成しなかった（表 6：試料 14 と 15 を比較、両方の試料とも合格；試料 16 と 17 を比較、両方の試料とも合格）ことを明らかにした。実行された第 4 および第 5 の工程変更は、製造の CDC 拡大相の間のフィブロネクチンコーティング使用の再設定からなり（これは、CADUCEUS において製造された生成物に対して行われた）、凍結保存前に 40 μm のメッシュを介したろ過により、> 50 μm の粒子の大部分を確実に除去した。臨床使用に指定された生成物の安全性を試験するために、臨床使用のための CDC は、ヒト MCB (YKT260、臨床使用に指定) に由来し、ブタ MCB ではなかった。これらの CDC は、要求される QC 基準を満たした（図 11 および表 6：試料 17）。

10

20

30

【表6】

表6. 異なるCDC調製物において存在する細胞凝集体および微粒子の概要

試験	試料	条件	>50μmの%	>150μmの数	P/F
1.	CADUCEUSによる CAP-1001	ヒト フィブロネクチン 新鮮(凍結しない)	0.39%	0%	合格
2.	CADUCEUSによる CAP-1001	ヒト フィブロネクチン 新鮮(凍結しない)	0.25%	0%	合格
3.	1002-010CAPによる 無ろ過CAP-1002	ブタ HYPERF1ask	7.75%	0.0014%	不合格
4.	1002-010CAPによる ろ過CAP-1002	ブタ HYPERF1ask 解凍後150μm	21.2%	0.0030%	不合格
5.	1002-011CAPによる 無濾過CAP-1002	ブタ Trip1eF1ask	5.16%	0.10%	不合格
6.	1002-011CAPによる ろ過CAP-1002	ブタ Trip1eF1ask 解凍後150μm	8.06%	0.027%	不合格
7.	試験CAP-1002	ブタ Trip1eF1ask 解凍後40μm	1.85%	0%	不合格
8.	試験CAP-1002	ヒト Trip1eF1ask	1.24%	0.00095%	不合格
9.	試験CAP-1002	ブタ	7.49%	0.0050%	不合格
10.	試験CAP-1002	ヒト	0.72%	0.0036%	不合格
11.	試験CAP-1002	ブタ フィブロネクチン	0.99%	0%	合格
12.	試験CAP-1002	ヒト	0.84%	0.00056%	不合格
13.	試験CAP-1002	ヒト フィブロネクチン	0.12%	0.00046%	不合格
14.	試験CAP-1002	ヒト 凍結前	0.68%	0%	合格
15.	試験CAP-1002	ヒト 解凍後40μm	0.17%	0%	合格
16.	1002-012CAPによる 凍結前CAP-1002	ヒト フィブロネクチン 凍結前40μm	0.19%	0%	合格
17.	1002-012CAPによる 凍結後CAP-1002	ヒト フィブロネクチン 凍結前40μm	0.11%	0%	合格

【0072】

表7は、本明細書に開示のさまざまな実施形態を実行した製造工程中の変形を要約している。

【表7】

表7. 製造工程の概要

供給源	容器	コーティング	製剤化	フィルター
ブタ 0111	CELL BIND HYPERFLask	なし	凍結バッグ中に ヘパリンは含まれない	作製された第1ロット には使用しない
ブタ 0111	Nunc Triple Flask	なし	凍結バッグ中に 100U/mLの ヘパリンが含まれる	作製された第2ロット には、細孔サイズ150 μ mのフィルターを 投与前に使用
ヒト YKT260	Nunc Triple Flask	フィブロネクチン	凍結バッグ中に 100U/mLの ヘパリンが含まれる	細孔サイズ40 μ mの フィルターを製剤化前 に使用

【0073】

CDCがMHC不一致株の2つの同系繁殖体に由来し、同種異系および同系のCDCを比較できるように交差移植された、MIのラットモデルにおいて収集されたデータは、同種異系CDCが、心臓において、単に一時的な、軽度の局所免疫反応を、拒絶の組織学的証拠または免疫原性の全身性証拠なく誘導したことを示した(Malliarasら、2012年)。さらに、心臓機能の改善は、同系および同種異系のCDCに対して同等であり、衰退していくCDCの生着レベルにもかかわらず6ヶ月の間持続した。同種異系CDCおよび自己は、分泌因子(VEGF、IGF-1、HGF)およびこれまでのところ同定されていない他の作用機序によって内因性再生機序(心筋細胞の細胞周期再進入、c-Kit+細胞の動員、血管新生)を刺激すると考えられる。本研究およびCADUCEUS(Makkaraら、2012年)による臨床データは、MI後の患者に同種異系CDCを注入し、安全性ならびに梗塞サイズを評価する臨床研究を開始するための正当な基盤を提供する。

【0074】

そのために、本研究は、同種異系CDC作製のための強固な製造戦略を実証した。実施形態に依存して、さまざまな組織供給源を使用し、この組織供給源は、限定するものではないが、外科手術の廃棄物、死体ドナー、組織ドナー、臓器ドナーを含む。しかし、いくつかの実施形態において臓器提供が用いられ、したがって供給源は、十分に試験され、関連する伝染性疾患に関してスクリーニングされるという理由で、FDAのドナー必要条件に準拠して容易に作製され、無菌であり、臓器が冷心筋保護液中で保存されているという点でCDC培養における使用のために最適に調製される。製造工程に必要とされる組織はわずか数グラムであり、本研究は、組織は、事実上心臓のいかなる領域に由来してもよいことを示しているので(例えば、弁の採取の場合は心尖)、組織ドナーは容易に有用とすることができる。加えて、本研究は、心臓死のドナーからの提供が、組織供給源として実行可能であることを実証している。UNOS(全米臓器配分ネットワーク(United Network for Organ Sharing))は、2008年に、他の臓器(通常、腎臓、肝臓および膵臓)が利用された832のDCDドナーのうち、移植の可能性により収集された心臓はわずか1つであり、残りの831は使用されなかったことを報告した。このサブ供給源単独は、現在の製造規模において理論的に年に4Mの用量をもたらすことができ、毎年新規または再発のMIを患う1.3Mの米国人に十分な用量を供給し、数多くを他の徴候に対してより利用可能に残すことが可能である。

【0075】

本研究はまた、より大量のドナー組織を同時に処理し、処理に必要な労働力を減少させる技術を最適化する。40グラム以下から全心臓までの、ドナー心臓由来の任意の量の組織を、特に短期および長期の組織保存の生存能力に関して、本明細書において提示した陽性の日数の観点から、実施形態に依存して使用可能であることを理解すべきである。さら

10

20

30

40

50

に、本研究によるデータは、心臓のすべての領域（および一部の実施形態において、領域の組み合わせ）を、CDCの作製のために使用できることを示している。最終的に、CDC凍結保存の実現可能性が、同様に実証された。

実施例2 - 外植片由来細胞および心筋球由来細胞の特徴付け

【0076】

下記の実験を、本明細書に開示の最適化された作製方法により作製されたCDCおよび培養された組織外植片から収集された第1の細胞集団である選択された中間細胞、すなわち外植片由来細胞（EDC）の特徴を、より完全に特徴付けるために実施した。この特徴付は、心筋球および/またはCDCの作製に使用される方法の、作製された心筋球および/またはCDCの得られた遺伝子型および/または表現型に対する効果のより詳細な理解を提供する。さらに、外植片由来細胞（EDC）の特徴付けは、作製工程における中間細胞の遺伝子型および/または表現型について提供されたデータにより、作製方法の効果のより完全な理解を可能にする。さらに、作製工程のさまざまな段階における細胞の特徴付けは、いくつかの実施形態に従って、本方法のステップの1つ以上の変形により、得られた細胞を目的に合わせることができる。

10

【0077】

特徴付けを、6つの最初の心臓組織供給源に由来する6つの細胞系について実施した。CDCを、本明細書に開示の方法により作製した。242の異なる細胞表面マーカーの発現を評価するために、CDCを、確立された方法により、ハイスループットフローサイトメトリーに供した。6つの組織供給源のうち4つに由来するEDCもまた、ハイスループットフローサイトメトリーに供し、中間体（EDC）と最終（CDC）の細胞集団との間の発現の差を同定するために、マーカーの発現を、対応するCDCの発現と比較した。EDC系1番は、CDC系1番に対応し、EDC系2番はCDC系2番に対応し、EDC系5番はCDC系5番に対応し、EDC系6番はCDC系6番に対応する。評価した細胞表面マーカーを、表9にリスト化する。

20

外植片由来細胞の特徴付け

【0078】

上で述べたように、外植片由来細胞（EDC）は、上で開示したCDC作製方法に従って、培養組織外植片から収集された第1の細胞集団である。最初の中間体として、その特徴付けは、製造ステップが作製されたCDCにどのように影響を与えるかについてさらなる情報をもたらすことができ、4つのEDC集団の表面マーカーの発現を調査した。

30

【0079】

4つのEDC系それぞれにわたる個別のマーカー発現データおよび4つすべての系の平均を表10に提供し、図12A-12Jにグラフにより示す。EDCに関して、表10は、EDCの（平均して）80%より多くにおいて存在するマーカーを特定しており、「マーカー」と表題を付けた列において適切な細胞に黒く影を付けてある。EDCの20~80%において存在するマーカーは、灰色の影をつけて特定している。EDCの20%未満において存在するマーカーには影をつけていない。EDCマーカープロファイルのより詳細な考察を、下記に提供する。

40

心筋球由来細胞の特徴付け

【0080】

EDCに関して上で述べたように、CDCもまた、同じ様式で特徴付けした。フローサイトメトリーを使用して、6つのヒトCDC系（このうち4つは上で特徴付された4つのEDC集団に対応する）由来の242の表面マーカーを特徴付けた。6つのCDC系それぞれにわたる個別のマーカー発現データおよび6つの系の平均を表11に提供し、図13A-13Jにグラフにより示す。表11は、CDCの（平均して）80%より多くにおいて存在するマーカーを特定しており、「マーカー」と表題を付けた列において適切な細胞に黒く影を付けてある。CDCの20~80%において存在するマーカーは、灰色の影をつけて特定している。CDCの20%未満において存在するマーカーには影をつけていない。

50

【0081】

下記により詳細に述べるように、本実験的分析は、いくつかの実施形態において、CDCである細胞を特異的に同定するために使用されたマーカーの「パネル」を同定した。さらに、いくつかの実施形態において、これらのマーカーパネルは、本明細書に開示のプロトコルのさまざまな態様が、得られた細胞集団（中間体であっても、または最終の細胞集団であっても）にどのように影響を与えるかに対するより深い理解を容易にし、これらの集団の特徴の改変、細胞の単離の特異性の変化、および／またはCDC作製作業の中の潜在的変動性の他の供給源の理解を支援する。さらに、いくつかの実施形態において、マーカーは、CDCの純度の特徴付け、および／またはCDCと、より早期の細胞中間体との識別のために使用される。

10

【0082】

およそ30のマーカーが、約80%より多くのCDCにより発現されることを同定した（表11中の黒）。いくつかの実施形態において、これらのマーカーの1つ以上が集団中のCDCの約80%より多く、約85%より多く、約90%より多く、約92%より多く、約94%より多く、約96%より多く、約97%より多く、約98%より多く、約99%より多く、約99.5%より多く、約99.8%より多く、または約99.9%より多くに存在する。これらのマーカーのいくらかが、CDCの推定の作用機序に関連していると思われる（例えば、これらのマーカーが、いくつかの実施形態において、CDCの治療有効性において役割を果たすことができる特定の経路に関与している）。これらのマーカーを使用して、いくつかの実施形態において、どの細胞集団をCDC集団であるとみなすことができるかを定義することができる（例えば、本明細書に開示の方法により処理され、これらのマーカーの1つ以上を発現する細胞を、CDCとして同定可能である）。

20

【0083】

およそ30のマーカーが、より変動するパーセンテージのCDC（例えば、約20%から約80%；表11の灰色）により発現されることを同定した。ほぼ60のマーカーは、変動するレベルで発現され、平均発現の標準偏差が10%より大きいことを同定した（表11中のイタリック）。これらのマーカーの変動する発現は、CDC作製のバッチごとの変動の可能性についての追加の情報を提供する。一部の実施形態において、この変動は、組織供給源特異的変動によるものである（例えば、ドナーからドナーへの遺伝的変動）。この変動性はまた、実施形態に依存して、細胞の効力、免疫応答の誘導および他の臨床的に関連のある考慮すべき事柄における変動との相関をもたらし得る。175を超えるマーカーを、20%未満のCDCにより発現されるとして同定した（表11中の影をつけていないもの）。CDCのかなりの部分におけるこれらのマーカーの不在が、いくつかの実施形態において、本明細書に開示の方法に従って作製された所与のCDC集団の純度を評価するために有用である。

30

CDCを定義するマーカー

【0084】

上で述べたように、評価したおよそ30の細胞表面マーカーが、およそ80%より多くのCDCにおいて発現される。マーカーのさらなる分析により、5つのマーカーがCDCの作用機序に潜在的に関係し、3つのマーカーが、心筋梗塞後上方制御されることが公知である受容体に対するリガンドであることが示されている。7つのマーカーは、インテグリンファミリーの一部であり、一方4つのマーカーは、免疫原性シグナル伝達経路に関係する。マーカーのうちの3つは、CDCの効力と関連し、7つのマーカーは、成長因子および／またはホルモン受容体に関連し、これらはCDCのパラクリン系作用機序の可能性にも関連する。

40

CDCの作用機序候補に関連するマーカー

【0085】

CDCのスクリーニングにおいて同定されたいくらかのマーカーは、CDCの作用機序の候補に関係がある。被験CDC系において、99%より多くのCDCがCD105を発現した（99.5±0.5%；エンドグリンとしても公知である）。CD105は、TG

50

F 受容体複合体の調節成分である。CD105は、この能力において、TGF 受容体サブタイプIおよびIIと会合することによって機能し、これらは一緒に複合体化した場合、TGF-b1およびTGF-b3と高い親和性で結合する。いくつかのTGF ファミリーメンバーは、梗塞した心筋において有意に誘導され、梗塞の治癒、心臓の修復および/または左心室のリモデリングの1つ以上において役割を果たすことができる。したがって、この効果に加えて、血管新生、造血および心臓の発達において、CD105は、CDCの治療有効性の主要なプレイヤーであり得る。CD105はまた、活性内皮細胞および間葉幹細胞においても高いレベルで発現される。さらに、CD105の可溶性形態の増加は、心臓線維症を弱めることができる。したがって、高レベルのCD105を発現する細胞集団、例えばCDCの投与は、CD105関連シグナル伝達経路による心臓組織の修復および/または再生を容易にすることができます。

10

【0086】

被験CDC系において、CD81は、97%より多くのCDCにおいて発現された(98.2±2.7%)。CD81は、Target of the AntiProliferative Antibody 1(TAPA-1)およびTetraspanin-28(Tspan-28)とも称される。CD81は、トランスメンブラン4スーパーファミリーのメンバーであるタンパク質をコードする。CD81のコードされたタンパク質は、インテグリンと複合体を形成する糖タンパク質であり、したがって、細胞発生、細胞活性化、細胞成長および細胞運動性の調節に関係する。CD81はまた、特定のタイプの間葉幹細胞、例えば、心臓組織に由来する間葉幹細胞および心筋原性脂肪組織に由来する間葉幹細胞などにおいて発現されることが見出された。

20

【0087】

被験細胞系において、CD151は、99%より多くのCDCにおいて発現された(99.6±0.3%)。CD151はまた、トランスメンブラン4スーパーファミリーのタンパク質(テトラスパニンとも称される)をコードする。これらのタンパク質は、細胞発生、細胞接着、細胞運動性、細胞成長および細胞活性化に関与する特定のシグナル伝達事象を仲介する。CD151はまた血管新生にも関与し、CD151の過剰発現は、心臓の新血管形成の誘導に関与している。CD151は内皮細胞において発現され、白血球を動員するために、炎症の間にCD9、ICAM-1(CD54とも称される)およびVCAM-1(CD106とも称され、これは、いくつかの実施形態において、CDCにおいて発現されない)と複合体を形成することが公知である。

30

【0088】

被験細胞系において、CD9は、98%より多くのCDCにおいて発現された(98.9±1.4%)。CD9はまた、トランスメンブラン4スーパーファミリーのタンパク質をコードする。CD9は、MRP-1(motility-related protein in-1)および/またはp24抗原としても公知である。CD9は、細胞接着の調節に関係し、細胞の遊走/運動性にも関与している。CD9は、細胞の分化および/または細胞増殖において役割を果たすことができ、状況に依存して、腫瘍抑制因子としても機能できる。CD9は、Wnt遺伝子発現の下方制御にも関係している。CDCにおける発現に加えて、CD9は、エクソソーム、内皮細胞および肥満細胞において発現される。いくつかの実施形態において、CD9発現のエクソソームとの共有に加えて、CDCはまた、CD81の発現をエクソソームと共有している。同様に、内皮細胞もまた、CD151、CD54およびCD106を発現する。いくつかの実施形態において、CDCはまた、CD151、CD54およびCD106の1つ以上を発現する。しかし一部の実施形態において、CDCは、CD106を発現しない。肥満細胞はまたCD117を発現することが公知であり、いくつかの実施形態において、CD117は、CDCにより発現されない。

40

【0089】

被験細胞系において、CD147は98%より多くのCDCにより発現された(98.6±2.1%)。CD147は、細胞外マトリックスマタロプロテアーゼ誘導物質(EMPRLIN)および/またはベイシジンとも称される。CD147は、さまざまなマトリ

50

ックスメタロプロテアーゼの産生および活性化を刺激する。いくつかの事例において、この活性化は、心臓のリモデリングをもたらす（しかし、その効果は他の組織において変動し得る、例えば、間質コラゲナーゼの改変による腫瘍細胞の浸潤の促進）。CD147は、初期発生の間に心臓前駆細胞に存在し、心臓前駆細胞に由来するエクソソームにも存在する。心臓療法の分野における特定の対象のうち、心筋細胞におけるCD147の発現は、心筋梗塞または心不全の後で有意に増加される。実験的証拠により、CD147の過剰発現が有害な心臓のリモデリングにつながることが示されている。

【0090】

いくつかの実施形態において、CDCにおいてこれらのトランスマンプラン4スーパーファミリーのマーカーの1つ以上が存在することは、それらの治療効果の1つ以上の態様を有するCDCを発生させる（例えば、投与後のCDCの心臓組織への接着、損傷または罹患した心臓組織へのCDCのホーミング；血管新生など）。

10

【0091】

したがってこれらのデータは、いくつかの実施形態において、CDCが、トランスマンプラン4スーパーファミリーおよび/またはTGF- β 介在性シグナル伝達において役割を果たす特定の分子のうち1つ以上のメンバーを発現することを実証している。一部の実施形態において、これらのマーカーは、個別または組み合わせ（例えば2つ以上、3つ以上など）のいずれかで、約80%より多くの、約85%より多くの、約90%より多くの、約95%より多くの、約97%より多くの、約98%より多くの、および/または約99%より多くのCDCにおいて発現される。したがって、いくつかの実施形態において、これらのマーカーの1つ以上の検出に基づいて、本明細書に開示の方法により作製された細胞集団が、CDC集団として陽性に同定され得る。

20

心筋梗塞のマーカーに対するリガンド

【0092】

図14は、心筋梗塞に対する応答において発現が変化される遺伝子を同定するデータを表す。それらの遺伝子のいくつかは、作製されたCDC系において研究される細胞マーカーのいくつかに対するリガンド（または受容体）であることが公知である。例えば、心筋梗塞に対する応答においてほぼ2倍に増加するエピレグリンは、上皮成長因子受容体（EGF-r）のリガンドであり、エピレグリンは評価されたCDCのおよそ85%において発現される（85.1 ± 24.6%；48.4 ~ 99.6%の範囲）。EGF-rはチロシンキナーゼであり、受容体を介したシグナル伝達は、さまざま異なるシグナル伝達経路、例えばマイトイエン活性化プロテインキナーゼ、ホスホイノシチド3-キナーゼ、プロテインキナーゼC、STAT（シグナル伝達性転写因子（signal transducer and activator of transcription））およびホスホリパーゼCなどの活性化をもたらす。概して、EGF-rおよびその活性化経路は、血管新生の調節、細胞増殖および/またはアポトーシスの減少に関与する。したがって、MI後の心臓におけるエピレグリンの存在は、CDC中のEGF-rを活性化でき、血管新生の増加および/またはアポトーシスの減少をもたらす、EGF-rを介したシグナル伝達カスケードを開始し得る。単独または他のシグナル伝達経路と併せて、これらの効果のいずれか（または両方）は、心臓組織に対する機能的能力の増加（例えば、血流の改善によって）および/または組織生存能力の増加（直接細胞死の減少および他の細胞を殺す局所アポトーシスシグナルによる有害効果の減少）をもたらし得る。

30

【0093】

シンデカン3はアクセサリータンパクとして機能し、成長因子とそれらの受容体との結合を支援し、心筋梗塞に対する応答においてさらに2倍以上に上方制御される。シンデカン3はまた、特定の細胞接着反応においてもアクセサリーとして機能し、限定するものではないが、1インテグリン（CD29としても公知）および5インテグリン（CD49eとしても公知）を含む、特定のインテグリンの作用を容易にする。インテグリンは、特定の生物学的工程に依存してさまざまな役割を有するが、インテグリンは、一般的には発生の間の細胞の遊走、創傷治癒、細胞分化およびアポトーシスに関係する。1インテ

40

50

グリンは、研究した C D C のおよそ 9 0 % において発現され (9 1 . 0 ± 7 . 3 % ; 8 4 . 1 ~ 9 9 . 7 % の範囲) 、 5 インテグリンは、評価した C D C の 9 9 % より多くに存在する (9 9 . 3 ± 1 . 1 % ; 9 7 . 4 ~ 9 9 . 8 % の範囲) 。したがって、 M I 後の心臓における増加レベルのシンデカン 3 の存在は、 1 インテグリンおよび / または 5 インテグリンとのその相互作用を増加させることができ、 C D C の心筋への遊走および / または生着促進、および / または投与後の C D C のアポトーシスの減少をもたらし得る。

【 0 0 9 4 】

いくつかの追加のインテグリン分子は、 C D C により比較的高レベルで発現される。例えば、接着マーカーの C D 4 9 d が、 8 0 % より多くの C D C において発現される (8 4 . 6 ± 1 1 . 4 % ; 7 1 . 0 ~ 9 9 . 8 % の範囲) 。 C D 4 9 d はインテグリンアルファ (タイプ 4) のサブユニットをコードし、これは、白血球ホーミングに関与する受容体の一部である。

【 0 0 9 5 】

C D 5 1 / 6 1 は、 9 5 % より多くの C D C において発現される (平均 9 8 . 4 ± 3 . 1 % 、 9 2 . 8 ~ 9 9 . 9 % の範囲) 。 C D 5 1 / 6 1 は、 ν インテグリンサブユニットをコードする。 C D 6 1 はまた、 9 5 % より多くの C D C に存在する (平均 9 8 . 8 ± % 1 . 9 ; 9 5 . 0 ~ 9 9 . 9 % の範囲) 。 C D 6 1 は、 3 インテグリンサブユニットをコードする。

【 0 0 9 6 】

C D 4 9 c は、評価した C D C の 9 5 % より多くにおいて発現される (平均 9 9 . 6 ± 0 . 5 % ; 9 8 . 7 ~ 9 9 . 9 % の範囲) 。 C D 4 9 c は 3 インテグリンをコードし、さまざまな他の接着細胞、例えば内皮細胞、上皮細胞および線維芽細胞において発現される。

【 0 0 9 7 】

C D 4 9 b は、評価した C D C の 9 5 % より多くにおいて発現される (平均 9 9 . 4 ± 0 . 7 % ; 9 8 . 0 ~ 9 9 . 8 % の範囲) 。 C D 4 9 b は 2 インテグリンサブユニットをコードし、他のインテグリンと一緒に、細胞接着および細胞表面介在性シグナル伝達において役割を果たす。全被験 C D C 中にいくつかの接着分子が非常に高いパーセンテージで存在することから、 C D C は、いくつかの実施形態において、心臓細胞および / または C D C に接着する (例えば生着する) 、またはこれらを刺激する (例えば、細胞表面および / またはパラクリンシグナル伝達) それらの能力のおかげで、心臓組織の機能的および解剖学的な修復および / または再生を容易にする。

免疫マーカーとの会合

【 0 0 9 8 】

およそ 9 0 % の C D C が C D 2 7 4 を発現し、 C D 2 7 4 はプログラム死リガンド - 1 (p r o g r a m m e d d e a t h l i g a n d - 1) としても公知である (P D - L 1 ; 8 9 . 9 ± 1 0 . 5 % ; 7 4 . 2 ~ 9 8 . 6 % の範囲) 。 C D 2 7 4 は、免疫拒絶の危険性の増加が存在する特定の事象、例えば、妊娠、組織同種移植片および自己免疫疾患の間の免疫系の抑制において役割を果たす。免疫系は通常、抗原特異的 C D 8 + T 細胞の増殖を誘発することによって外来抗原に反応するが、 C D 2 7 4 / P D - L 1 リガンドとその受容体である P D - 1 受容体との相互作用が、これらの C D 8 + T 細胞の増殖を減少させる阻害シグナルを伝える。したがって、 C D C により発現される相対的に高いレベルの C D 2 7 4 は、投与における免疫応答を減少 / 回避する能力の強化をもたらし得る。 C D 2 7 4 / P D - L 1 は、心臓前駆細胞の免疫抑制および / または調節効果に必要であることが示されている。いくつかの実施形態において、例えば、 C D C が同種異系投与において使用される場合、この特徴は特に有利である。

【 0 0 9 9 】

C D 1 1 9 は、ヘテロ二量体ガンマインターフェロン受容体 (I N F - R) の 1 つのリガンド結合鎖 (アルファ鎖) をコードし、これはマクロファージにおいて見出され、平均しておよそ 4 0 % の C D C において発現される (平均 3 8 . 4 ± 2 6 . 4 % ; 8 . 1 ~

10

20

30

40

50

62.1%の範囲)。INF-Rはまた、インターフェロンガンマと相互作用し、インターフェロンガンマは、先天性免疫応答および適応免疫応答に複雑に関与する。CDCにおけるCD119の発現は、CDCが投与された場合に予期される免疫応答を改変する能力をCDCが持つ可能性が示唆される。いくつかの実施形態において、この改変は、CDCの生着、保持、治療効果の強化および/またはCDC投与に対して開始される任意の免疫応答の改変をもたらす。

【0100】

C D 1 4 2 (T i s s u e F a c t o r としても公知である)は、平均して 50% より多くのCDCにおいて発現される(平均 $56.3 \pm 24.7\%$; 16.7 ~ 91% の範囲)。CD142は、血液凝固におけるその役割に関して最も一般的に知られている(CD142は、Factor VIIaとの複合体形成により、不活性なFactor Xの活性Factor Xaへの転換を触媒する)。しかし、CD142はまた、血管新生およびアポトーシスの両方に関係している。CD142は、正常な状況下で、血流に曝露されない細胞(例えば、平滑筋細胞または線維芽細胞)により発現される。肉体的な傷害、例えば、アテローム性動脈硬化巣の破裂または細胞を損傷する虚血事象によりCD142発現細胞が血流に曝露された場合、CD142とFactor VIIとの間で複合体形成が起こり、順に、Factor VIIの活性化(その結果Factor VIIaとして公知)につながり得る。CD142 / Factor VIIa複合体は、その後血管新生および/またはアポトーシスに強い影響を与える。

10

【0101】

B7-1としても公知であるCD80は、評価したCDCの約20%未満において発現される(平均 $17.5 \pm 13.9\%$; 1.4 ~ 38.0% の範囲)。CD80は、活性化されたB細胞および単球において通常見出され、発現した場合、T細胞の活性化および生存に必要とされる刺激性シグナルを提供する。CD80は、T細胞の表面の2つの受容体、CD28(自己調節および細胞間会合を促進する)またはCTLA-4(T細胞調節および細胞解離の減少)のいずれかのうちの1つに対するリガンドとして作用する。CD80の比較的低いレベルの発現は、いくつかの実施形態において、CDCがT細胞により限定された活性を誘導し、同種異系投与が実施された場合、再度CDCに有利性をもたらし得ることを示唆している。

20

治療効力と相關しているマーカー

30

【0102】

マーカーの別の群は、CDCの治療効力と相關していた。治療効力は、駆出率の変化、すなわち、CDCによる治療後の対象の駆出率と比較した、心筋梗塞後の対象の駆出率(図15A-15CのX軸)により表される。CD146、CD107BおよびCD140bの発現レベル(それぞれ、図15A、BおよびC)は、CDCの治療有効性が増加した場合、それぞれ減少している。CD146は、メラノーマ細胞接着分子(MCAM)としても公知である。最も低い治療効力レベルにおいて、CD146は、ほぼ80%のCDCにおいて発現されたが、一方で、最も高い治療効力において、CD146は、およそ14%のCDCにおいて発現された(平均 $48.0 \pm 22.9\%$; 14.1 ~ 77.9% の範囲)。CD146は、内皮細胞に対するマーカーとして使用され、いくつかの状況において、内皮細胞とアクチン細胞骨格の接合点の形成に関係していると思われる。CD146はまた、いくつかの臓器において、周皮細胞に対するマーカーとして使用される。

40

【0103】

同様に、CD107bは、およそ5%のCDCにおいて最も高いレベルの治療効力で発現され、20%より多くのCDCにおいて、最も低いレベルの治療効力で発現された(12.0 ± 5.9%、5.5 ~ 20.9% の範囲)。CD107bまたはリソソーム関連膜タンパク質2(LAMP-2)は、糖タンパク質のメンバーをコードし、セレクチンに対するリガンドである炭水化物の提供に関与していると思われる。

【0104】

最後に、CD140b(血小板由来成長因子ベータ; PDGF-R としても公知である

50

)は、ほぼ50%のCDCにおいて最も低いレベルの治療効力で発現され、CDCが最も高いレベルの治療効力をもたらした場合、発現はほぼ存在しなかった(平均9.8±17.6%、0.9~45.6%の範囲)。CD140bは、血小板由来成長因子ファミリーのさまざまなメンバーと相互作用する、細胞表面チロシンキナーゼ受容体をコードする。このような成長因子は通常、間葉細胞のマイトジエンとして機能する。

追加のマーカー

【0105】

いくつかの他の成長因子受容体は、CDCにおいて中程度のレベルから低レベルで発現されることが見出された。例えば、血小板由来成長因子受容体アルファとしても公知であるCD140aは、およそ40%のCDCにおいて発現される(平均45.7±22.1%；28.0~75%の範囲)。CD221(インスリン様成長因子タイプ-1受容体としても公知である)はCDCにおけるその発現レベルが同様であり、CD140aよりもわずかに低いレベルで発現される(平均42.7±28.2%、4.2~75.7%の範囲)。インスリン受容体であるCD220は、約15%のCDCにおいて発現される(平均24.3±24.4%、3.1~69.2%の範囲)。腫瘍壞死因子受容体タイプ1であるCD120aは、約15%未満のCDCにおいて発現される(平均15.3±4.7%、9.6~15.2%の範囲)。これらのデータは、CDCが、特定の成長因子、例えばインスリン様成長因子タイプ-1またはPDGFに対して中程度に応答性であり得るが、おそらく腫瘍壞死因子またはインスリンなどの他の成長因子に対する応答性はこれより低いことを示唆している。発現の変動は、実施形態に依存して、特定の成長因子に対する機能または応答性と必ずしも直接相関しておらず、むしろより大きなシグナル伝達カスケードと相関している可能性がある。

10

20

30

CDCと比較した、EDCにおけるマーカー発現の比較

【0106】

上で述べた方法の最終生成物、すなわちCDCと、中間生成物のEDCとの比較において、2つの細胞集団の間のいくつかの違いは明らかである。CDC対EDCにおいて発現された242の細胞表面マーカーの差を、表12に提供し、図17A-17Jに可視的に表す。比較1番は、EDC/CDC系1番に対応し、比較2番は、EDC/CDC系2番に対応し、比較5番は、EDC/CDC系5番に対応し、比較6番は、EDC/CDC系6番に対応する。違うマーカープロファイルの認識を使用して、いくつかの実施形態において、本明細書に開示の方法に従って作製された細胞集団が、真のCDC集団を表すか、またはEDCで「汚染された」CDC集団を表すかどうかを決定する。これらの集団の識別は、いくつかの実施形態において、細胞処理の品質管理の基準として機能できる(例えば、マーカープロファイルは、作製プロトコルに特定の細胞集団が存在する場合、同定を支援することができる)。CDCをEDCから識別する大まかに15のマーカーのうち、3つのマーカー、すなわちSSSEA-4、CD227およびCD141が、CDCをEDCから明確に識別すると思われる。

【0107】

ステージ特異的胎児抗原-4(SSSEA-4)は、約1%から約18%の間のCDCにおいて発現されるが、約30%から約52%のEDCにおいて発現される(EDCからCDCの発現で平均して28%の減少)。SSSEA-4はグリコスフィンゴリピドであり、多能性および/または幹細胞様の特徴を有するさまざまな細胞の同定に関係する。CDCにおけるSSSEA-4の発現の、EDCと比較した減少は、一部の実施形態において、EDCがより多能性および/またはより幹細胞様の集団であることに関連すると思われる。

40

【0108】

CD227(MUC1としても公知)は、トランスメンブラン上皮ムチン糖タンパク質であり、腺癌および造血細胞悪性腫瘍(例えば、TおよびB細胞のリンパ腫および骨髄腫(myleomas))において過剰発現する傾向がある。CD227は、およそ9%~68%のCDCにおいて発現されるが、約72%から約82%のEDCにおいて発現される。したがって、本明細書に開示のCDCの作製手順は、EDC段階からCDC段階まで

50

で C D 2 2 7 発現の減少をもたらす。

【 0 1 0 9 】

C D 1 4 1 (トロンボモジュリンとしても公知である) は、内皮細胞の表面において発現され、トロンビンの補因子として機能する。通常、血液凝固の減少に関係するが、上で述べたように C D 1 4 1 の発現の減少 (E D C において 7 2 % から約 8 6 % 、 C D C において約 3 0 % ~ 5 9 %) は、血管新生を促進する C D C の能力において役割を果たすと思われる。

【 0 1 1 0 】

本明細書に開示の C D C の作製方法のため、いくつかの実施形態において (E D C と比較して) より低いレベルで C D C において発現される、上で述べた S S E A - 4 に加えて、 C D 1 4 6 もまた、一般的に E D C と比較して C D C においてより低いレベルで発現されると思われる (E D C の約 6 5 % ~ 9 0 % および C D C の約 1 4 % ~ 7 8 % の発現) 。上で述べたように、 C D 1 4 6 もまた、メラノーマ細胞接着分子 (M C A M) として公知であり、治療効力と負に相関し、内皮細胞に対するマーカーであり、内皮細胞とアクチン細胞骨格との接合点の形成に関係すると思われる。 C D 1 4 6 もまた、周皮細胞に対するマーカーとして使用され、 E D C と比較して C D C において発現が減少することは、一部の実施形態において、心臓の周皮細胞からの C D C 誘導に関連すると思われる。

【表8】

表9. 評価した細胞表面マーカー

CD1a	CD35	CD66 (a.c.d.e)	CD112	CD165	CD321(F11 Rcptr)	CD201
CD1b	CD36	CD66b	CD114	CD166	CDw327	CD210
CD1d	CD37	CD66f	CD116	CD171	CDw328	CD212
CD2	CD38	CD69	CD117	CD172b	CDw329	CD267
CD3	CD39	CD70	CD118 (LIF rcptr)	CD177	CD335(NKP46)	CD294
CD4	CD40	CD71	CD119	CD178	CD336	CD326
CD4v4	CD41a	CD72	CD120a	CD180	CD337	皮膚リンパ球抗原
CD5	CD41b	CD73	CD121a	CD181	CD338(ABCG2)	INT B7
CD6	CD42a	CD74	CD121b	CD183	CD340(Her2)	SSEA-3
CD7	CD42b	CD75	CD122	CD184	abTCR	
CD8a	CD43	CD77	CD123	CD193	B2-uGlob	
CD8b	CD44	CD79b	CD124	CD195	BLTR-1	
CD9	CD45	CD80	CD126	CD196	CLIP	
CD10	CD45RA	CD81	CD127	CD197	CMRF-44	
CD11a	CD45RB	CD83	CD128b	CD200	CMRF-56	
CD11b	CD45RO	CD84	CD130	CD205	EGF-r	
CD11c	CD46	CD85	CD134	CD206	Fmlp-r	
CD13	CD47	CD86	CD135	CD209	gd TCR	
CD14	CD48	CD87	CD137	CD220	Hem. 前駆細胞	
CD15	CD49a	CD88	CD137L	CD221	HLA-A,B,C	
CD15s	CD49b	CD89	CD138	CD226	HLA-A2	
CD16	CD49c	CD90	CD140a	CD227	HLA-DQ	
CD18	CD49d	CD91	CD140b	CD229	HLA-DR	
CD19	CD49e	CDw93	CD141	CD231	HLA-DR,DP,DQ	
CD20	CD50	CD94	CD142	CD235a	インパリアントNKT	
CD21	CD51/61	CD95	CD144	CD243 (p-糖タンパク質)	ジシアロガンギリオシド GD2	
CD22	CD53	CD97	CD146	CD244	MIC A/B	
CD23	CD54	CD98	CD147	CD255 (Tweak)	NKB1	
CD24	CD55	CD99	CD150	CD268	SSEA-1	
CD25	CD56	CD99R	CD151	CD271	SSEA-4	
CD26	CD57	CD100	CD152	CD273	TRA-1-60	
CD27	CD58	CD102	CD153	CD274	TRA-1-81	
CD28	CD59	CD103	CD154	CD275 (B7-H2)	Vb 23	
CD29	CD61	CD105	CD158a	CD278	Vb 8	
CD30	CD62E	CD106	CD158b	CD279	CD49f	
CD31	CD62L	CD107a	CD161	CD282	CD104	
CD32	CD62P	CD107b	CD162	CD305(LAIR-1)	CD120b	
CD33	CD63	CD108	CD163	CD309	CD132	
CD34	CD64	CD109	CD164	CD314(NKG2D)		

10

20

30

【表9】

表10—EDC系によるEDC細胞表面マーカーの発現および平均

マーカー	EDC系 #1	EDC系 #2	EDC系 #5	EDC系 #6	平均	標準偏差
CD1a	2.56	1.07	0.39	1.50	1.38	0.91
CD1b	2.83	1.97	0.45	3.12	2.09	1.20
CD1d	7.56	0.90	0.31	1.41	2.54	3.37
CD2	1.56	1.58	0.48	1.23	1.21	0.51
CD3	5.58	1.23	0.45	1.37	2.16	2.32
CD4	3.25	1.45	0.38	1.28	1.59	1.20
CD4v4	4.26	2.61	0.98	2.62	2.62	1.34
CD5	11.10	1.30	0.31	1.77	3.62	5.02
CD6	2.42	1.11	0.47	1.21	1.30	0.81
CD7	2.53	0.94	0.30	1.32	1.27	0.94
CD8a	1.85	0.76	0.36	1.02	1.00	0.63
CD8b	1.87	1.12	0.48	1.61	1.27	0.61
CD9	99.80	99.80	99.50	99.60	99.68	0.15
CD10	80.70	47.60	29.30	63.90	55.38	22.02
CD11a	4.01	1.00	0.55	1.54	1.78	1.54
CD11b	1.34	1.46	0.50	1.25	1.14	0.43
CD11c	1.52	0.98	0.25	1.15	0.97	0.54
CD13	98.90	96.60	98.80	99.30	98.40	1.22
CD14	5.52	1.63	1.34	2.20	2.67	1.93
CD15	3.03	3.67	2.78	2.20	2.92	0.61
CD15s	1.62	0.68	0.29	1.28	0.97	0.60
CD16	2.06	0.99	0.25	1.50	1.20	0.77
CD18	2.00	0.94	0.50	1.47	1.23	0.65
CD19	1.63	1.06	0.30	1.49	1.12	0.60
CD20	2.71	1.82	0.29	1.70	1.63	1.00
CD21	1.88	1.25	0.33	1.59	1.26	0.67
CD22	3.58	1.18	0.47	1.57	1.70	1.34
CD23	1.71	1.36	0.49	1.39	1.24	0.52
CD24	13.70	5.74	4.21	10.50	8.54	4.36
CD25	1.81	1.28	0.56	1.73	1.34	0.57
CD26	99.60	99.30	99.70	99.90	99.63	0.25
CD27	2.62	1.54		3.30	2.49	0.89
CD28	2.47	1.21		1.74	1.81	0.63
CD29	99.60	95.80		98.10	97.83	1.91
CD30	17.20	4.78		4.90	8.96	7.14
CD31	25.60	23.90		19.90	23.13	2.93
CD32	2.64	1.54		1.34	1.84	0.70
CD33	2.00	1.44		1.51	1.65	0.31
CD34	28.60	27.50		25.40	27.17	1.63
CD35	1.79	1.27		1.65	1.57	0.27
CD36	3.76	2.02		2.88	2.89	0.87
CD37	2.10	1.11		2.02	1.74	0.55
CD38	4.78	1.57		5.29	3.88	2.02
CD39	3.30	1.50		4.89	3.23	1.70
CD40	23.60	10.60		16.00	16.73	6.53
CD41a	2.29	1.09		6.71	3.36	2.96
CD41b	1.70	1.05		3.35	2.03	1.19

10

20

30

40

マークー	EDC系 #1	EDC系 #2	EDC系 #5	EDC系 #6	平均	標準偏差
CD42a	5.53	4.60	1.40	6.10	4.41	2.10
CD42b	4.34	2.56	0.12	3.00	2.50	1.76
CD43	2.06	1.72	0.38	1.90	1.52	0.77
CD44	99.70	98.80	99.90	99.90	99.58	0.53
CD45	2.45	1.19	0.73	2.13	1.63	0.80
CD45RA	3.65	2.74	1.14	2.69	2.56	1.04
CD45RB	5.00	1.36	6.37	1.78	3.63	2.45
CD45RO	2.89	2.04	1.40	6.05	3.10	2.06
CD46	99.80	99.10	99.80	99.80	99.63	0.35
CD47	99.80	99.80	99.80	99.60	99.75	0.10
CD48	2.86	1.57		11.90	5.44	5.63
CD49a	71.90	15.10		83.70	56.90	36.68
CD49b	99.80	99.50		99.70	99.67	0.15
CD49c	99.80	99.90		99.90	99.87	0.06
CD49d	86.10	70.80		73.50	76.80	8.17
CD49e	99.90	98.40		99.90	99.40	0.87
CD50	5.78	2.46		3.09	3.78	1.76
CD51/61	99.90	99.10		99.30	99.43	0.42
CD53	2.74	2.05		6.16	3.65	2.20
CD54	99.00	93.20		98.90	97.03	3.32
CD55	99.50	98.70		99.10	99.10	0.40
CD56	44.40	16.40		21.30	27.37	14.95
CD57	2.49	1.39		27.00	10.29	14.48
CD58	99.50	99.60		99.90	99.67	0.21
CD59	99.70	99.40		99.70	99.60	0.17
CD61	99.80	99.90		99.90	99.87	0.06
CD62E	6.29	4.99		3.38	4.89	1.46
CD62L	3.27	1.98		4.50	3.25	1.26
CD62P	10.20	3.51		3.57	5.76	3.85
CD63	99.50	95.90		97.50	97.63	1.80
CD64	0.67	2.09		5.37	2.71	2.41
CD66(a.c.d.e)	4.73	4.48		29.40	12.87	14.32
CD66b	2.54	1.85		6.73	3.71	2.64
CD66f	1.71	1.06		5.43	2.73	2.36
CD69	4.82	2.97		43.30	17.03	22.77
CD70	5.07	1.59		59.80	22.15	32.65
CD71	84.40	54.40		62.60	67.13	15.51
CD72	5.70	3.90		12.20	7.27	4.37
CD73	99.80	99.90		99.60	99.77	0.15
CD74	3.19	2.63		1.65	2.49	0.78
CD75	4.49	4.71		9.15	6.12	2.63
CD77	20.60	13.10		19.40	17.70	4.03
CD79b	7.36	4.23		8.44	6.68	2.19
CD80	12.20	2.88		3.59	6.22	5.19
CD81	98.90	99.30		99.90	99.37	0.50
CD83	3.88	1.74		15.30	6.97	7.29
CD84	3.91	1.27		4.13	3.10	1.59
CD85	5.03	1.02		3.08	3.04	2.01

10

20

30

40

マークー	EDC系 #1	EDC系 #2	EDC系 #5	EDC系 #6	平均	標準偏差
CD86	2.92	2.14		2.12	2.39	0.46
CD87	42.40	73.10		32.10	49.20	21.33
CD88	4.06	2.07		1.55	2.56	1.32
CD89	2.29	2.00		2.16	2.15	0.15
CD90	94.20	93.60		83.00	90.27	6.30
CD91	70.70	77.70		79.00	75.80	4.46
CDw93	2.82	9.62		14.00	8.81	5.63
CD94	2.09	2.36		1.40	1.95	0.50
CD95	99.80	99.90		98.90	99.53	0.55
CD97	61.00	58.70		66.70	62.13	4.12
CD98	99.80	99.60		99.90	99.77	0.15
CD99	99.30	99.60		99.80	99.57	0.25
CD99R	53.90	64.40		60.30	59.53	5.29
CD100	2.33	2.18		1.49	2.00	0.45
CD102	19.10	39.90		13.80	24.27	13.80
CD103	1.37	1.84		1.30	1.50	0.29
CD105	99.50	99.80		99.50	99.60	0.17
CD106	12.70	11.70		13.80	12.73	1.05
CD107a	75.40	65.10		25.50	55.33	26.34
CD107b	21.70	15.00		13.70	16.80	4.29
CD108	83.10	97.40		92.80	91.10	7.30
CD109	28.50	73.20		44.00	48.57	22.70
CD112	15.70	33.00		12.60	20.43	10.99
CD114	2.70	1.77		1.76	2.08	0.54
CD116	2.87	2.93		3.05	2.95	0.09
CD117	2.65	2.89		1.87	2.47	0.53
CD118 (LIF rcptr)	8.84	3.72		3.02	5.19	3.18
CD119	57.80	80.00		56.50	64.77	13.21
CD120a	27.00	39.40		23.10	29.83	8.51
CD121a	12.70	0.00		16.60	9.77	8.68
CD121b	3.21	4.55		2.21	3.32	1.17
CD122	3.06	3.71		3.39	3.39	0.33
CD123	2.07	4.27		1.32	2.55	1.53
CD124	9.18	8.13		6.25	7.85	1.48
CD126	2.23	2.16		0.75	1.71	0.84
CD127	2.11	1.90		1.80	1.94	0.16
CD128b	2.42	2.44		1.64	2.17	0.46
CD130	83.20	93.90		78.10	85.07	8.06
CD134	13.40	3.70		2.45	6.52	5.99
CD135	1.54	2.41		1.57	1.84	0.49
CD137	6.72	11.30		9.47	9.16	2.31
CD137L	3.75	4.68		4.63	4.35	0.52
CD138	2.89	7.26		2.48	4.21	2.65
CD140a	48.80	83.10		74.20	68.70	17.80
CD140b	2.38	8.63		15.60	8.87	6.61

10

20

30

マークー	EDC系 #1	EDC系 #2	EDC系 #5	EDC系 #6	平均	標準偏差
CD141	77.50	85.70		71.50	78.23	7.13
CD142	89.60	91.20		91.90	90.90	1.18
CD144	10.30	19.20		5.46	11.65	6.97
CD146	64.50	90.20		68.00	74.23	13.94
CD147	99.60	99.50		99.70	99.60	0.10
CD150	22.00	5.06		2.26	9.77	10.68
CD151	99.60	99.30		99.70	99.53	0.21
CD152	30.10	32.40		8.36	23.62	13.27
CD153	4.15	5.56		9.79	6.50	2.94
CD154	2.14	7.28		2.91	4.11	2.77
CD158a	1.22	2.15		1.61	1.66	0.47
CD158b	2.53	26.60		2.17	10.43	14.00
CD161	1.90	2.39		1.25	1.85	0.57
CD162	2.99	4.74		1.45	3.06	1.65
CD163	1.50	2.21		1.89	1.87	0.36
CD164	81.00	81.10		53.50	71.87	15.91
CD165	95.40	99.40		98.70	97.83	2.14
CD166	99.70	99.80		99.70	99.73	0.06
CD171	5.07	24.40		2.89	10.79	11.84
CD172b	6.89	20.10		3.27	10.09	8.86
CD177	2.02	7.76		1.26	3.68	3.55
CD178	1.75	11.10		2.43	5.09	5.21
CD180	3.08	4.04		3.31	3.48	0.50
CD181	3.41	9.49		4.09	5.66	3.33
CD183	5.26	6.64		4.48	5.46	1.09
CD184	4.02	6.24		2.32	4.19	1.97
CD193	2.06	2.49		2.72	2.42	0.34
CD195	3.20	3.62		1.76	2.86	0.98
CD196	3.32	2.54		3.83	3.23	0.65
CD197	3.07	2.15		3.45	2.89	0.67
CD200	98.70	92.20		95.70	95.53	3.25
CD205	4.66	4.54		4.64	4.61	0.06
CD206	1.67	6.46		1.16	3.10	2.92
CD209	5.21	14.30		14.40	11.30	5.28
CD220	53.30	47.00		67.80	56.03	10.67
CD221	87.60	61.60		67.40	72.20	13.65
CD226	3.54	7.80		4.43	5.26	2.25
CD227	71.50	80.90		80.60	77.67	5.34
CD229	1.55	1.91		1.63	1.70	0.19
CD231	12.00	2.89		1.75	5.55	5.62
CD235a	5.03	3.18		2.87	3.69	1.17
CD243 (p- 糖タンパク質)	2.71	3.27		5.98	3.99	1.75
CD244	1.31	3.79		2.09	2.40	1.27

10

20

30

マーク	EDC系 #1	EDC系 #2	EDC系 #5	EDC系 #6	平均	標準偏差
CD255 (Tweak)	1.86	8.41		4.78	5.02	3.28
CD268	2.41	29.60		1.11	11.04	16.09
CD271	13.00	36.70		5.64	18.45	16.23
CD273	89.10	30.40		89.30	69.60	33.95
CD274	97.40	95.90		92.40	95.23	2.57
CD275 (B7-H2)	5.70	5.14		7.07	5.97	0.99
CD278	3.19	2.38		0.66	2.08	1.29
CD279	4.67	1.45		1.45	2.52	1.86
CD282	3.23	1.02		1.06	1.77	1.26
CD305(LAIR-1)	3.72	1.25		1.26	2.08	1.42
CD309	15.20	4.75		1.59	7.18	7.12
CD314(NKG2D)	3.69	1.60		1.40	2.23	1.27
CD321(F11 Rcptr)	91.60	59.20		54.70	68.50	20.13
CDw327	4.28	1.43		1.25	2.32	1.70
CDw328	4.17	2.32		1.83	2.77	1.23
CDw329	3.80	1.97		2.39	2.72	0.96
CD335(NKP46)	3.62	1.45		2.12	2.40	1.11
CD336	3.63	1.28		1.39	2.10	1.33
CD337	4.32	2.36		4.35	3.68	1.14
CD338(ABCG2)	15.70	2.88		2.91	7.16	7.39
CD340(Her2)	98.80	98.60		95.10	97.50	2.08
abTCR	4.19	2.69		3.37	3.42	0.75
B2-uGlob	99.30	99.10		99.40	99.27	0.15
BLTR-1	5.03	2.28		2.71	3.34	1.48
CLIP	5.31	2.09		2.06	3.15	1.87
CMRF-44	9.66	4.75		2.85	5.75	3.51
CMRF-56	5.03	2.77		2.26	3.35	1.47
EGF-r	98.80	99.20		99.60	99.20	0.40
Fmlp-r	4.77	1.81		2.47	3.02	1.55
gd TCR	4.61	1.90		2.41	2.97	1.44
Hem. 前駆細胞	44.10	15.30		38.50	32.63	15.27
HLA-A,B,C	99.60	99.30		99.80	99.57	0.25
HLA-A2	99.40	99.40		1.61	66.80	56.46
HLA-DQ	54.60	30.30		24.80	36.57	15.86
HLA-DR	4.52	1.65		1.80	2.66	1.62
HLA-DR,DP,DQ	5.53	2.51		2.78	3.61	1.67
インパリアント NKT	4.42	1.47		1.63	2.51	1.66
ジシアロガングリオシド GD2	10.50	2.28		2.18	4.99	4.77
MIC A/B	73.00	95.10		18.40	62.17	39.48
NKB1	3.74	1.85		1.88	2.49	1.08
SSEA-1	22.70	19.60		6.59	16.30	8.55
SSEA-4	52.40	32.10		30.10	38.20	12.34
TRA-1-60	2.76	1.09		1.24	1.70	0.92
TRA-1-81	2.60	1.29	0.26	1.28	1.36	0.96
Vb 23	4.04	2.60	0.84	2.54	2.51	1.31
Vb 8	4.26	2.19	0.79	2.10	2.33	1.44
CD49f	69.40	53.80	0.00	43.70	41.73	29.76
CD104	2.56	1.52	0.55	1.21	1.46	0.84

10

20

30

40

マークー	EDC系 #1	EDC系 #2	EDC系 #5	EDC系 #6	平均	標準偏差
CD120b	3.57	1.78	0.58	1.16	1.77	1.29
CD132	3.49	1.77	0.80	1.06	1.78	1.21
CD201	58.90	65.90	55.40	70.50	62.68	6.80
CD210	4.36	1.62	0.57	1.80	2.09	1.61
CD212	3.62	1.29	0.61	1.16	1.67	1.33
CD267	4.10	1.29	0.57	1.11	1.77	1.58
CD294	4.37	1.34	1.03	1.04	1.95	1.62
CD326	44.60	16.70	23.20	10.40	23.73	14.87
皮膚リンパ球抗原	68.40	25.80	21.00	23.60	34.70	22.55
INT B7	3.73	1.37	0.45	1.14	1.67	1.43
SSEA-3	15.50	24.30	27.50	16.80	21.03	5.80

10

20

30

40

【表10】

表11—CDC系によるCDC細胞表面マーカーの発現および平均

マーカー	CDC系 #1	CDC系 #2	CDC系 #3	CDC系 #4	CDC系 #5	CDC系 #6	平均	標準偏差
CD1a	2.07	39.60	1.15		1.27	22.10	13.24	17.23
CD1b	3.26	4.27		0.71	2.86	2.72	2.76	1.30
CD1d	16.30	2.52	0.47	0.53	1.13	55.30	12.71	21.74
CD2	10.90	3.31	1.13		1.93	35.30	10.51	14.39
CD3	3.15	12.00	1.91		1.78	3.87	4.54	4.26
CD4	2.32	3.45	1.75	0.90	0.83	1.67	1.82	0.98
CD4v4	6.38	8.56	2.18		4.66	4.26	5.21	2.40
CD5	2.34	2.72	1.25		1.48	1.83	1.92	0.61
CD6	20.50	3.91	0.66		1.22	2.13	5.68	8.37
CD7	2.69	4.81			1.75	2.09	2.84	1.37
CD8a	3.43	3.17	1.21	0.75	1.41	2.80	2.13	1.14
CD8b	1.87	2.14			2.20	1.86	2.02	0.18
CD9	99.80	99.80	97.70	96.60	99.80	99.90	98.93	1.43
CD10	98.00	68.60	27.90	21.50	52.90	83.20	58.68	30.36
CD11a	4.89	1.77	2.00		1.38	55.70	13.15	23.83
CD11b	4.57	2.47	2.61		1.14	1.67	2.49	1.31
CD11c	2.16	11.40	1.39		1.04	3.21	3.84	4.31
CD13	99.80	99.60	89.40		99.60	99.30	97.54	4.55
CD14	5.46	10.40			2.50	6.69	6.26	3.27
CD15	30.60	56.60			62.90	7.97	39.52	25.25
CD15s	1.85	3.27	1.97		1.21	2.12	2.08	0.75
CD16	3.56	3.53		0.56	1.11	1.91	2.13	1.37
CD18	4.23	7.17	1.67		1.36	1.96	3.28	2.45
CD19	1.69	2.19	0.99		1.99	1.75	1.72	0.46
CD20	2.23	3.42	2.49		2.33	27.70	7.63	11.23
CD21	4.49	3.72	1.05		3.39	2.74	3.08	1.30
CD22	5.00	1.90	1.56		1.32	71.90	16.34	31.10
CD23	4.92	11.10	2.17		1.30	1.58	4.21	4.11
CD24	8.11	21.80			6.98	37.60	18.62	14.33
CD25	2.90	3.38	1.87		2.30	2.12	2.51	0.62
CD26	99.90	99.80	98.40		99.40	99.80	99.46	0.62
CD27	3.38	10.40	1.91	1.30	2.18	2.54	3.62	3.39
CD28	3.13	5.27	1.69		2.05	2.45	2.92	1.42
CD29	97.80	85.10	84.10		88.40	99.70	91.02	7.26
CD30	18.00	6.51	1.06		2.63	5.88	6.82	6.65
CD31	67.40	50.30	12.70		59.70	49.40	47.90	21.02
CD32	2.51	2.98	1.35	0.86	1.49	9.44	3.11	3.20
CD33	2.97	2.34			0.96	2.58	2.21	0.88
CD34	11.10	38.00			15.50	77.10	35.43	30.18
CD35	5.13	3.65	1.68		2.34	1.92	2.94	1.44
CD36	3.50	7.18		2.03	2.91	5.15	4.15	2.04
CD37	2.58	2.75	1.68		1.09	2.26	2.07	0.68
CD38	9.08	16.00			1.99	6.31	8.35	5.88
CD39	6.55	5.16	1.51		1.87	48.80	12.78	20.25

10

20

30

40

マークー	CDC系 #1	CDC系 #2	CDC系 #3	CDC系 #4	CDC系 #5	CDC系 #6	平均	標準偏差
CD40	17.10	8.29		1.21	4.78	17.40	9.76	7.29
CD41a	20.80	9.50	1.85		1.28	1.97	7.08	8.38
CD41b	3.95	9.10	1.21	0.80	1.23	2.24	3.09	3.16
CD42a	6.25	15.20		3.54	4.41	2.61	6.40	5.10
CD42b	3.81	4.53	1.39	1.07	2.09	8.38	3.55	2.73
CD43	3.51	3.88	3.00		2.18	3.36	3.19	0.64
CD44	99.50	99.70	95.50	90.30	99.70	99.40	97.35	3.82
CD45		5.58	1.88		2.13	2.44	3.01	1.73
CD45RA	5.72	7.79	1.53		2.14	3.96	4.23	2.58
CD45RB	3.08	5.08	1.24		1.66	2.00	2.61	1.54
CD45RO	4.60	6.01	1.92		2.60	3.08	3.64	1.65
CD46	99.50	99.80	96.50		99.40	99.70	98.98	1.40
CD47	99.60	99.30	91.80	98.80	99.80	99.90	98.20	3.16
CD48	67.70	3.84	2.94	6.31	2.93	1.99	14.29	26.21
CD49a	64.20	61.30	32.50		32.50	91.80	56.46	24.90
CD49b	99.70	99.80	99.50	98.00	99.80	99.60	99.40	0.70
CD49c	99.90	99.90	98.70		99.80	99.90	99.64	0.53
CD49d	97.00	78.40		80.60	71.00	96.00	84.60	11.44
CD49e	99.80	99.80	97.40		99.80	99.70	99.30	1.06
CD50	15.70	11.40	5.70		14.20	3.95	10.19	5.17
CD51/61	99.90	99.80	92.80		99.80	99.70	98.40	3.13
CD53	5.38	5.63			2.51	1.99	3.88	1.89
CD54	96.30	95.60		95.80	96.20	98.70	96.52	1.25
CD55	99.70	99.70	93.80	92.70	99.80	99.50	97.53	3.34
CD56	71.80	12.80		1.26	6.51	20.00	22.47	28.45
CD57	29.50	3.57			1.35	1.66	9.02	13.69
CD58	99.90	99.80	91.00	97.10	99.90	99.70	97.90	3.55
CD59	99.80	99.90	98.50	99.30	99.80	99.50	99.47	0.52
CD61	99.80	99.80	95.00	98.70	99.90	99.70	98.82	1.92
CD62E	17.10	3.89	1.39		1.79	9.05	6.64	6.59
CD62L	5.78	4.06			2.48	2.57	3.72	1.55
CD62P	18.60	13.90	1.98		4.33	6.48	9.06	6.96
CD63	98.70	94.60			99.10	99.50	97.98	2.27
CD64	3.30	4.22	2.29		15.70	1.57	5.42	5.84
CD66(a.c.d.e)	9.44	29.00			6.69	13.70	14.71	9.96
CD66b	55.60	7.36			2.96	2.61	17.13	25.74
CD66f	2.71	3.52			1.32	1.89	2.36	0.96
CD69	3.37	5.12	1.25		2.79	4.65	3.44	1.54
CD70	8.11	12.60	0.88		1.77	3.89	5.45	4.88
CD71	86.80	57.70	51.70		52.40	98.60	69.44	21.76
CD72	5.51	2.34		95.00	8.38	9.42	24.13	39.71
CD73	99.90	99.80			99.60	99.90	99.80	0.14
CD74	15.40	2.30	1.67		1.24	1.79	4.48	6.12
CD75	8.11	6.78	7.23		2.17	4.09	5.68	2.47
CD77	20.00	18.20			17.80	6.55	15.64	6.13
CD79b	10.20	11.20			2.77	2.58	6.69	4.65
CD80	23.50	38.00	1.41		10.60	13.80	17.46	13.93

10

20

30

40

マーカー	CDC系 #1	CDC系 #2	CDC系 #3	CDC系 #4	CDC系 #5	CDC系 #6	平均	標準偏差
CD81	93.50	99.80	98.70		99.70	99.40	98.22	2.67
CD83	3.93	7.05	2.06		1.24	2.75	3.41	2.26
CD84	9.71	24.60	1.62		1.97	2.19	8.02	9.87
CD85	29.30	12.20		0.39	1.19	48.30	18.28	20.44
CD86	3.07	0.54	1.48	1.09	3.79	7.42	2.90	2.53
CD87	52.00	2.96	0.97		58.90	40.20	31.01	27.35
CD88	3.08	0.54	0.61	0.98	2.54	1.32	1.51	1.06
CD89	2.62	0.61		1.60	2.79	2.08	1.94	0.88
CD90	86.70	83.40		58.50	30.70	97.70	71.40	26.89
CD91	53.80	49.40	49.60		47.40	70.00	54.04	9.22
CDw93	4.83	4.71	1.20	0.72	15.50	3.42	5.06	5.40
CD94	2.02	0.69	0.69	0.85	3.71	1.65	1.60	1.17
CD95	99.80	97.60	99.60	65.60	99.80	99.70	93.68	13.78
CD97	27.90	18.30	17.60	22.50	44.50	86.80	36.27	26.65
CD98	99.80	99.80	99.30	99.10	99.90	99.80	99.62	0.33
CD99	99.50	97.10	99.30	99.00	99.40	99.00	98.88	0.90
CD99R	57.30	6.09	88.90	73.40	73.30	44.60	57.27	29.32
CD100	3.61	0.60	1.27		2.71	1.27	1.89	1.23
CD102	7.56	7.71	25.10		27.30	14.60	16.45	9.37
CD103	1.97	0.34			1.61	1.06	1.24	0.71
CD105	99.70	99.80		98.60	99.80	99.70	99.52	0.52
CD106	4.20	4.09	2.85	2.92	2.62	14.90	5.26	4.77
CD107a	29.10	27.80			31.40	25.40	28.43	2.51
CD107b	5.45	11.20	20.90	8.99	17.00	8.18	11.95	5.85
CD108	95.20	94.90	79.70	4.26	98.10	92.00	77.36	36.39
CD109	39.70	47.60	14.90	1.08	20.80	58.10	30.36	21.64
CD112	10.20	6.41	16.80	3.52	27.50	19.10	13.92	8.92
CD114	2.20	0.53	1.46	0.80	2.72	1.24	1.49	0.83
CD116	2.30	0.56	1.48	0.98	3.41	2.54	1.88	1.06
CD117	2.80	0.76	2.49		3.53	1.44	2.20	1.10
CD118 (LIF rcptr)	3.62	6.22	4.95	1.96	3.74	2.10	3.77	1.64
CD119	50.80	8.11		11.60	59.40	62.10	38.40	26.42
CD120a	15.20	9.61			15.20	21.20	15.30	4.73
CD121a	12.20	7.78	3.57	2.31	3.98	7.84	6.28	3.69
CD121b	3.40	1.37	1.04	2.11	3.98	1.51	2.24	1.19
CD122	2.82	1.97	2.02	1.48	3.40	2.94	2.44	0.73
CD123	2.32	0.63	0.91	0.96	2.49	0.71	1.34	0.84
CD124	5.41	2.62	1.93	1.22	1.64	0.00	2.14	1.82
CD126	1.52	0.60	0.77	1.10	2.61	1.05	1.28	0.73
CD127	2.15	0.66	1.27	1.15	2.19	1.48	1.48	0.60
CD128b	2.37	0.49	0.58	1.03	3.04	1.03	1.42	1.04
CD130	86.90	19.90	54.10		92.70	76.50	66.02	29.69
CD134	2.64	1.43	1.15	1.17	3.47	1.46	1.89	0.95
CD135	2.10	0.46		2.13	1.89	1.16	1.55	0.72
CD137	3.43	1.97		1.02	3.18	9.72	3.86	3.41
CD137L	4.18	2.21	2.87	1.36	3.73	3.08	2.91	1.02
CD138	3.63	2.19	1.80	1.48	4.11	2.48	2.62	1.04
CD140a	45.30	20.80	28.30		59.10	75.00	45.70	22.14
CD140b	2.76	3.56	45.60	0.89	3.20	2.54	9.76	17.58

10

20

30

40

マーク一	CDC系 #1	CDC系 #2	CDC系 #3	CDC系 #4	CDC系 #5	CDC系 #6	平均	標準偏差
CD141	52.60	58.80	29.50		42.80	59.00	48.54	12.52
CD142	60.90	69.00	52.50	16.70	47.80	91.00	56.32	24.66
CD144	14.40	16.40	13.00	7.55	29.30	22.80	17.24	7.71
CD146		46.60	77.90	14.10	46.90	54.60	48.02	22.86
CD147	99.70	99.90	98.80	95.00	99.70	99.20	98.72	1.86
CD150	3.06	0.66	1.53	1.04	3.74	1.25	1.88	1.23
CD151	99.90	99.80		99.10	99.70	99.40	99.58	0.33
CD152	8.69	5.14		4.63	8.39	14.40	8.25	3.90
CD153	5.66	7.41	6.61	7.04	3.66	2.98	5.56	1.84
CD154	3.77	2.06	1.43	1.86	4.81	1.47	2.57	1.40
CD158a	1.09	0.41	0.56		2.01	0.70	0.95	0.64
CD158b	2.32	0.81	0.67	1.34	2.39	1.37	1.48	0.73
CD161	1.40	0.48	0.84	0.97	1.33	1.05	1.01	0.34
CD162	3.80	1.49	1.00	1.24	3.64	2.00	2.19	1.23
CD163	2.44	0.54	1.06	0.63	2.61	0.80	1.35	0.93
CD164	59.40	35.40	73.70	42.20	72.90	83.20	61.13	19.01
CD165	99.40	62.10	98.50	90.80	99.50	98.80	91.52	14.79
CD166	99.70	99.70	99.50	98.30	99.80	99.20	99.37	0.56
CD171	2.94	9.75	4.82	1.89	10.70	5.97	6.01	3.57
CD172b	17.50	1.51	2.83	0.86	6.80	2.98	5.41	6.27
CD177	2.55	0.47	0.82	1.52	1.31	1.04	1.29	0.72
CD178	2.80	0.70	0.50	1.14	3.45	1.03	1.60	1.22
CD180	3.94	2.57	1.42	1.71	4.54	1.87	2.68	1.28
CD181	3.12	2.66	6.17	2.45	2.42	2.52	3.22	1.47
CD183	3.28	3.92	4.24	2.73	5.80	2.57	3.76	1.19
CD184	5.29	2.28	2.30	1.67	4.43	2.49	3.08	1.43
CD193	2.76	2.20	4.65		2.62	2.45	2.94	0.98
CD195	1.99	0.52	0.44	0.69	3.97	1.16	1.46	1.36
CD196	2.52	3.45	3.64	1.50	3.22	5.27	3.27	1.25
CD197	1.72	0.60	1.10	1.34	1.45	1.30	1.25	0.38
CD200	99.80	79.20		95.30	89.50	96.60	92.08	8.11
CD205	1.35	0.63	1.08	1.41	3.41	5.05	2.16	1.71
CD206	2.02	0.52	0.77	1.32	1.39	1.13	1.19	0.53
CD209	10.10	12.10	10.60	6.30	5.67	3.41	8.03	3.39
CD220	32.10	17.50	3.05	4.89	19.20	69.20	24.32	24.40
CD221	75.70	27.10	26.60	4.16	50.40	72.10	42.68	28.29
CD226	3.15	2.85	4.12	2.53	3.50	2.24	3.07	0.68
CD227	35.10	40.40	39.90	9.37	45.90	67.50	39.70	18.72
CD229	1.21	1.35	0.73	0.51	13.70	1.06	3.09	5.21
CD231	2.60	0.39	1.03	0.98	4.33	1.13	1.74	1.46
CD235a	2.02	2.81	11.40	0.26	5.19	2.55	4.04	3.94
CD243 (p-糖タンパク質)	2.84	1.69	5.34	0.68	2.37	3.30	2.70	1.58
CD244	2.14	0.34	1.42	1.07	1.41	27.40	5.63	10.68
CD255 (Tweak)	11.10	2.54	3.09	1.08	3.83	22.70	7.39	8.28

10

20

30

マーカー	CDC系 #1	CDC系 #2	CDC系 #3	CDC系 #4	CDC系 #5	CDC系 #6	平均	標準偏差
CD268	4.52	1.64	2.20		19.90	2.36	6.12	7.78
CD271	5.44	5.10	4.15	1.21	4.97	3.92	4.13	1.54
CD273	98.10	90.40	87.70	31.60	98.90	98.70	84.23	26.22
CD274	84.30	74.20	95.10		97.50	98.60	89.94	10.47
CD275 (B7-H2)	3.89	4.82	5.14	2.47	4.77	3.62	4.12	1.00
CD278	3.27	0.67	0.70	1.99	1.23	0.94	1.47	1.01
CD279	0.88	2.70	0.73	0.92	0.20	2.35	1.30	0.99
CD282	3.11	3.07	1.05	1.35	0.18	1.26	1.67	1.18
CD305(LAIR-1)	0.99	3.11	1.07	1.42	0.19	2.27	1.51	1.04
CD309	4.30	5.27	0.60	1.23	0.46	7.08	3.16	2.78
CD314(NKG2D)	1.27	2.26	0.93	0.84	0.22	3.53	1.51	1.20
CD321(F11 Rcptr)	87.50	77.30	49.80	84.80	14.40	78.40	65.37	28.35
CDw327	1.36	2.63	0.87	1.60	0.16	1.93	1.43	0.85
CDw328	1.47	3.27			0.24	1.76	1.69	1.24
CDw329	1.48	3.99			0.99	0.26	2.84	1.91
CD335(NKP46)	3.76	2.97	1.36	1.06	0.20	11.20	3.43	4.02
CD336	1.12	3.20	1.00	0.91	0.23	4.30	1.79	1.59
CD337	1.42	2.87	1.45	0.64	0.30	2.26	1.49	0.96
CD338(ABCG2)	2.01	3.82	1.14	1.10	0.22	2.24	1.76	1.24
CD340(Her2)	83.40	89.00			52.90	14.60	99.10	67.80
abTCR	1.18	2.83	1.17	1.34	0.20	3.73	1.74	1.29
B2-uGlob	99.90	99.60	97.40	98.60	47.20	99.80	90.42	21.19
BLTR-1	2.05	3.96	1.57	0.66	0.19	3.06	1.91	1.43
CLIP	4.02	4.04	1.85		0.22	2.17	2.46	1.61
CMRF-44	1.86	4.19	1.08	0.72	0.26	6.90	2.50	2.56
CMRF-56	1.25	2.89			1.00	0.23	2.20	1.51
EGF-r	99.20	93.20				48.40	99.60	85.10
Fmlp-r	1.30	3.60	1.09	0.91	0.18	3.37	1.74	1.41
gd TCR	1.73	3.14	1.03	1.10	0.26	5.30	2.09	1.84
Hem. 前駆細胞	7.08	5.18	0.85	0.74	0.32	36.50	8.44	14.02
HLA-A,B,C	99.60	99.80	99.50	99.40	47.10	99.50	90.82	21.42
HLA-A2	99.70	99.50	1.07	0.84	0.16	1.83	33.85	50.93
HLA-DQ	16.60	21.60	34.00	14.70	5.30	41.40	22.27	13.28
HLA-DR	1.28	3.34	1.54	1.04	0.15	2.12	1.58	1.08
HLA-DR,DP,DQ	1.83	2.85	0.89	0.81	0.20	3.01	1.60	1.16
インバリアント NKT	2.50	2.70	1.65	0.95	0.22	1.50	1.59	0.93
ジシアロガングリオシド GD2	2.08	3.63	1.52	0.96	0.17	2.50	1.81	1.21
MIC A/B	54.80	70.70	13.40		27.60	56.30	44.56	23.37
NKB1	1.58	2.96	1.01	1.07	5.75	2.31	2.45	1.78
SSEA-1	4.16	10.10	2.53	1.37	3.89	7.67	4.95	3.30
SSEA-4	5.56	5.67	2.78	1.13	1.95	18.10	5.87	6.28
TRA-1-60	1.05	2.63	0.78	1.15	0.29	1.17	1.18	0.78
TRA-1-81	1.69	2.78	0.72	0.81	0.16	1.04	1.20	0.92

10

20

30

マーカー	CDC系 #1	CDC系 #2	CDC系 #3	CDC系 #4	CDC系 #5	CDC系 #6	平均	標準偏差
Vb 23	1.94	2.51		0.90	0.29	2.11	1.55	0.92
Vb 8	1.85	3.04	1.41	0.92	0.24	4.62	2.01	1.59
CD49f	61.60	42.10	57.20	13.00	7.88	73.00	42.46	26.76
CD104	18.40	1.56	3.19		0.53	1.40	5.02	7.54
CD120b	1.21	2.14			0.46	1.64	1.36	0.71
CD132	0.91	3.00	1.55		0.39	6.18	2.41	2.33
CD201	67.20	49.00	80.20		29.40	77.60	60.68	21.36
CD210	1.39	2.59	1.14		0.38	2.21	1.54	0.88
CD212	1.64	3.27	0.96		0.43	1.77	1.61	1.07
CD267	1.05	2.24	1.28		0.49	58.60	12.73	25.65
CD294	1.00	2.69	1.17	1.66	0.60	3.91	1.84	1.24
CD326	9.74	7.61	3.55	1.21	0.51	33.80	9.40	12.48
皮膚リンパ球抗原	0.82	2.16	0.97	1.71	0.52	60.20	11.06	24.08
INT B7	0.82	2.53	1.00	0.90	0.42	2.31	1.33	0.87
SSEA-3	1.11	3.02	5.65	1.48	0.48	14.90	4.44	5.45

【表11】

表12-CDCのマーカー発現対EDCのマーカー発現の比較

マーカー	比較 #1	比較 #2	比較 #5	比較 #6	平均	標準 偏差	CDC 最低	CDC 最高	EDC 最低	EDC 最高
CD1a	-0.49	38.53	0.88	20.60	14.88	18.48	1.15	39.60	0.39	2.56
CD1b	0.43	2.30	2.41	-0.40	1.18	1.39	0.71	4.27	0.45	3.12
CD1d	8.74	1.62	0.82	53.89	16.27	25.33	0.47	55.30	0.31	7.56
CD2	9.34	1.73	1.45	34.07	11.65	15.39	1.13	35.30	0.48	1.58
CD3	-2.43	10.77	1.33	2.50	3.04	5.56	1.78	12.00	0.45	5.58
CD4	-0.93	2.00	0.45	0.39	0.48	1.20	0.83	3.45	0.38	3.25
CD4v4	2.12	5.95	3.68	1.64	3.35	1.94	2.18	8.56	0.98	4.26
CD5	-8.76	1.42	1.17	0.06	-1.53	-4.86	1.25	2.72	0.31	11.1
CD6	18.08	2.80	0.75	0.92	5.64	8.35	0.66	20.50	0.47	2.42
CD7	0.16	3.87	1.45	0.77	1.56	1.63	1.75	4.81	0.30	2.53
CD8a	1.58	2.41	1.05	1.78	1.70	0.56	0.75	3.43	0.36	1.85
CD8b	0.00	1.02	1.73	0.25	0.75	0.78	1.86	2.20	0.48	1.87
CD9	0.00	0.00	0.30	0.30	0.15	0.17	0	99.90	99.5	99.8
CD10	17.30	21.00	23.60	19.30	20.30	2.67	21.50	98.00	29.30	80.70
CD11a	0.88	0.77	0.83	54.16	14.16	26.67	1.38	55.70	0.55	4.01
CD11b	3.23	1.01	0.64	0.42	1.32	1.29	1.14	4.57	0.50	1.46
CD11c	0.64	10.42	0.80	2.06	3.48	4.67	1.04	11.40	0.25	1.52
CD13	0.90	3.00	0.80	0.00	1.18	1.28	0	99.80	96.6	99.3
CD14	-0.06	8.77	1.16	4.49	3.59	3.95	2.50	10.40	1.34	5.52
CD15	27.57	52.93	60.12	5.77	36.60	24.85	7.97	62.90	2.20	3.67
CD15s	0.23	2.59	0.93	0.84	1.15	1.01	1.21	3.27	0.29	1.62
CD16	1.50	2.54	0.86	0.41	1.33	0.92	0.56	3.56	0.25	2.06
CD18	2.23	6.23	0.86	0.49	2.45	2.63	1.36	7.17	0.50	2.00
CD19	0.06	1.13	1.69	0.26	0.79	0.76	0.99	2.19	0.30	1.63
CD20	-0.48	1.60	2.04	26.00	7.29	12.52	2.23	27.70	0.29	2.71
CD21	2.61	2.47	3.06	1.15	2.32	0.82	1.05	4.49	0.33	1.88
CD22	1.42	0.72	0.86	70.33	18.33	34.67	1.32	71.90	0.47	3.58
CD23	3.21	9.74	0.81	0.19	3.49	4.37	1.30	11.10	0.49	1.71
CD24	-5.59	16.06	2.77	27.10	10.09	14.43	6.98	37.60	4.21	13.7
CD25	1.09	2.10	1.74	0.39	1.33	0.75	1.87	3.38	0.56	1.81
CD26	0.30	0.50	-0.30	-0.10	0.10	0.37	0	99.90	99.3	99.9
CD27	0.76	8.86		-0.76	2.95	5.17	1.30	10.40	1.54	3.30
CD28	0.66	4.06		0.71	1.81	1.95	1.69	5.27	1.21	2.47
CD29	-1.80	-10.70		1.60	-3.63	-6.35	84.1	0	95.8	99.6
CD30	0.80	1.73		0.98	1.17	0.49	1.06	18.00	4.78	17.2
CD31	41.80	26.40		29.50	32.57	8.15	12.7	0	19.9	25.6
CD32	-0.13	1.44		8.10	3.14	4.37	0.86	9.44	1.34	2.64
CD33	0.97	0.90		1.07	0.98	0.09	0.96	2.97	1.44	2.00
CD34	-17.50	10.50		51.70	14.90	34.81	11.1	0	25.4	28.6
CD35	3.34	2.38		0.27	2.00	1.57	1.68	5.13	1.27	1.79
CD36	-0.26	5.16		2.27	2.39	2.71	2.03	7.18	2.02	3.76
CD37	0.48	1.64		0.24	0.79	0.75	1.09	2.75	1.11	2.10
CD38	4.30	14.43		1.02	6.58	6.99	1.99	16.00	1.57	5.29
CD39	3.25	3.66		43.91	16.94	23.36	1.51	48.80	1.50	4.89
CD40	-6.50	-2.31		1.40	-2.47	-3.95	1.21	17.40	10.6	23.6

10

20

30

40

マーカー	比較 #1	比較 #2	比較 #5	比較 #6	平均	標準 偏差	CDC 最低	CDC 最高	EDC 最低	EDC 最高
									0	0
CD41a	18.51	8.41		-4.74	7.39	11.66	1.28	20.80	1.09	6.71
CD41b	2.25	8.05		-1.11	3.06	4.63	0.80	9.10	1.05	3.35
CD42a	0.72	10.60	3.01	-3.49	2.71	5.91	2.61	15.20	1.40	6.10
CD42b	-0.53	1.97	1.97	5.38	2.20	2.43	1.07	8.38	0.12	4.34
CD43	1.45	2.16	1.80	1.46	1.72	0.34	2.18	3.88	0.38	2.06
							90.3		98.8	99.9
CD44	-0.20	0.90	-0.20	-0.50	0.00	0.00	0	99.70	0	0
CD45	-2.45	4.39	1.40	0.31	0.91	2.83	1.88	5.58	0.73	2.45
CD45RA	2.07	5.05	1.00	1.27	2.35	1.86	1.53	7.79	1.14	3.65
CD45RB	-1.92	3.72	-4.71	0.22	-0.67	-3.56	1.24	5.08	1.36	6.37
CD45RO	1.71	3.97	1.20	-2.97	0.98	2.89	1.92	6.01	1.40	6.05
							96.5		99.1	99.8
CD46	-0.30	0.70	-0.40	-0.10	-0.02	-0.50	0	99.80	0	0
							91.8		99.6	99.8
CD47	-0.20	-0.50	0.00	0.30	-0.10	-0.34	0	99.90	0	0
									11.9	
CD48	64.84	2.27		-9.91	19.07	40.11	1.99	67.70	1.57	0
							32.5		15.1	83.7
CD49a	-7.70	46.20		8.10	15.53	27.71	0	91.80	0	0
							98.0		99.5	99.8
CD49b	-0.10	0.30		-0.10	0.03	0.23	0	99.80	0	0
							98.7		99.8	99.9
CD49c	0.10	0.00		0.00	0.03	0.06	0	99.90	0	0
							71.0		70.8	86.1
CD49d	10.90	7.60		22.50	13.67	7.83	0	97.00	0	0
							97.4		98.4	99.9
CD49e	-0.10	1.40		-0.20	0.37	0.90	0	99.80	0	0
CD50	9.92	8.94		0.86	6.57	4.97	3.95	15.70	2.46	5.78
							92.8		99.1	99.9
CD51/61	0.00	0.70		0.40	0.37	0.35	0	99.90	0	0
CD53	2.64	3.58		-4.17	0.68	4.23	1.99	5.63	2.05	6.16
							95.6		93.2	99.0
CD54	-2.70	2.40		-0.20	-0.17	-2.55	0	98.70	0	0
							92.7		98.7	99.5
CD55	0.20	1.00		0.40	0.53	0.42	0	99.80	0	0
									16.4	44.4
CD56	27.40	-3.60		-1.30	7.50	17.27	1.26	71.80	0	0
									27.0	0
CD57	27.01	2.18		-25.34	1.28	26.19	1.35	29.50	1.39	0

10

20

30

マーカー	比較 #1	比較 #2	比較 #5	比較 #6	平均	標準 偏差	CDC 最低	CDC 最高	EDC 最低	EDC 最高
CD58	0.40	0.20		-0.20	0.13	0.31	91.0 0	99.90	99.5 0	99.9 0
CD59	0.10	0.50		-0.20	0.13	0.35	98.5 0	99.90	99.4 0	99.7 0
CD61	0.00	-0.10		-0.20	-0.10	-0.10	95.0 0	99.90	99.8 0	99.9 0
CD62E	10.81	-1.10		5.67	5.13	5.97	1.39	17.10	3.38	6.29
CD62L	2.51	2.08		-1.93	0.89	2.45	2.48	5.78	1.98	4.50
CD62P	8.40	10.39		2.91	7.23	3.87	1.98	18.60	3.51	10.2 0
CD63	-0.80	-1.30		2.00	-0.03	-1.78	94.6 0	99.50	95.9 0	99.5 0
CD64	2.63	2.13		-3.80	0.32	3.58	1.57	15.70	0.67	5.37
CD66(a.c.d.e)	4.71	24.52		-15.70	4.51	20.11	6.69	29.00	4.48	29.4 0
CD66b	53.06	5.51		-4.12	18.15	30.61	2.61	55.60	1.85	6.73
CD66f	1.00	2.46		-3.54	-0.03	-3.13	1.32	3.52	1.06	5.43
CD69	-1.45	2.15		-38.65	-12.65	22.59	1.25	5.12	2.97	43.3 0
CD70	3.04	11.01		-55.91	-13.95	36.55	0.88	12.60	1.59	59.8 0
CD71	2.40	3.30		36.00	13.90	19.14	0	98.60	54.4 0	84.4 0
CD72	-0.19	-1.56		-2.78	-1.51	-1.30	2.34	95.00	3.90	12.2 0
CD73	0.10	-0.10		0.30	0.10	0.20	99.6 0	99.90	99.6 0	99.9 0
CD74	12.21	-0.33		0.14	4.01	7.11	1.24	15.40	1.65	3.19
CD75	3.62	2.07		-5.06	0.21	4.63	2.17	8.11	4.49	9.15
CD77	-0.60	5.10		-12.85	-2.78	-9.17	6.55	20.00	0	13.1 0
CD79b	2.84	6.97		-5.86	1.32	6.55	2.58	11.20	4.23	8.44
CD80	11.30	35.12		10.21	18.88	14.08	1.41	38.00	2.88	12.2 0
CD81	-5.40	0.50		-0.50	-1.80	-3.16	93.5 0	99.80	98.9 0	99.9 0
CD83	0.05	5.31		-12.55	-2.40	-9.18	1.24	7.05	1.74	15.3 0
CD84	5.80	23.33		-1.94	9.06	12.95	1.62	24.60	1.27	4.13
CD85	24.27	11.18		45.22	26.89	17.17	0.39	48.30	1.02	5.03

10

20

30

マーカー	比較 #1	比較 #2	比較 #5	比較 #6	平均	標準 偏差	CDC 最低	CDC 最高	EDC 最低	EDC 最高
CD86	0.15	-1.60		5.30	1.28	3.59	0.54	7.42	2.12	2.92
CD87	9.60	-70.14		8.10	-17.48	45.61	0.97	58.90	32.1 0	73.1 0
CD88	-0.98	-1.53		-0.23	-0.91	-0.65	0.54	3.08	1.55	4.06
CD89	0.33	-1.39		-0.08	-0.38	-0.90	0.61	2.79	2.00	2.29
CD90	-7.50	-10.20		14.70	-1.00	13.66	-	30.7 0	83.0 97.70	94.2 0
CD91	-16.90	-28.30		-9.00	-18.07	-9.70	-	47.4 0	70.7 70.00	79.0 0
CDw93	2.01	-4.91		-10.58	-4.49	-6.31	0.72	15.50	2.82	14.0 0
CD94	-0.07	-1.67		0.25	-0.50	-1.03	0.69	3.71	1.40	2.36
CD95	0.00	-2.30		0.80	-0.50	-1.61	65.6 0	99.80	98.9 0	99.9 0
CD97	-33.10	-40.40		20.10	-17.80	33.02	-	17.6 0	86.80	58.7 0
CD98	0.00	0.20		-0.10	0.03	0.15	99.1 0	99.90	99.6 0	99.9 0
CD99	0.20	-2.50		-0.80	-1.03	-1.37	97.1 0	99.50	99.3 0	99.8 0
CD99R	3.40	-58.31		-15.70	-23.54	31.59	6.09	88.90	53.9 0	64.4 0
CD100	1.28	-1.58		-0.22	-0.17	-1.43	0.60	3.61	1.49	2.33
CD102	-11.54	-32.19		0.80	-14.31	16.67	7.56	27.30	13.8 0	39.9 0
CD103	0.60	-1.50		-0.24	-0.38	-1.06	0.34	1.97	1.30	1.84
CD105	0.20	0.00		0.20	0.13	0.12	98.6 0	99.80	99.5 0	99.8 0
CD106	-8.50	-7.61		1.10	-5.00	-5.30	2.62	14.90	11.7 0	13.8 0
CD107a	-46.30	-37.30		-0.10	-27.90	24.49	-	31.40	25.5 0	75.4 0
CD107b	-16.25	-3.80		-5.52	-8.52	-6.75	5.45	20.90	13.7 0	21.7 0
CD108	12.10	-2.50		-0.80	2.93	7.98	4.26	98.10	83.1 0	97.4 0
CD109	11.20	-25.60		14.10	-0.10	22.13	1.08	58.10	28.5 0	73.2 0
CD112	-5.50	-26.59		6.50	-8.53	-	16.75	3.52	27.50	12.6 0
										33.0 0

10

20

30

マーカー	比較 #1	比較 #2	比較 #5	比較 #6	平均	標準 偏差	CDC 最低	CDC 最高	EDC 最低	EDC 最高	
CD114	-0.50	-1.24		-0.52	-0.75	-0.42	0.53	2.72	1.76	2.70	
CD116	-0.57	-2.37		-0.51	-1.15	-1.06	0.56	3.41	2.87	3.05	
CD117	0.15	-2.13		-0.43	-0.80	-1.19	0.76	3.53	1.87	2.89	
CD118 (LIF rcptr)	-5.22	2.50		-0.92	-1.21	-3.87	1.96	6.22	3.02	8.84	
CD119	-7.00	-71.89		5.60	-24.43	41.58	8.11	62.10	56.5 0	80.0 0	
CD120a	-11.80	-29.79		-1.90	-14.50	14.14	9.61	21.20	23.1 0	39.4 0	
CD121a	-0.50	7.78		-8.76	-0.49	-8.27	2.31	12.20	0.00	16.6 0	
CD121b	0.19	-3.18		-0.70	-1.23	-1.75	1.04	3.98	2.21	4.55	
CD122	-0.24	-1.74		-0.45	-0.81	-0.81	1.48	3.40	3.06	3.71	
CD123	0.25	-3.64		-0.61	-1.33	-2.04	0.63	2.49	1.32	4.27	
CD124	-3.77	-5.51		-6.25	-5.18	-1.27	0.00	5.41	6.25	9.18	
CD126	-0.71	-1.56		0.30	-0.66	-0.93	0.60	2.61	0.75	2.23	
CD127	0.04	-1.24		-0.32	-0.51	-0.66	0.66	2.19	1.80	2.11	
CD128b	-0.05	-1.96		-0.61	-0.87	-0.98	0.49	3.04	1.64	2.44	
CD130	3.70	-74.00		-1.60	-23.97	43.41	0	92.70	78.1 0	93.9 0	
CD134	-10.76	-2.27		-0.99	-4.67	-5.31	1.15	3.47	2.45	13.4 0	
CD135	0.56	-1.95		-0.41	-0.60	-1.27	0.46	2.13	1.54	2.41	
CD137	-3.29	-9.33		0.25	-4.12	-4.84	1.02	9.72	6.72	11.3 0	
CD137L	0.43	-2.47		-1.55	-1.20	-1.48	1.36	4.18	3.75	4.68	
CD138	0.74	-5.07		0.00	-1.44	-3.16	1.48	4.11	2.48	7.26	
CD140a	-3.50	-62.30		0.80	-21.67	35.26	-	20.8 0	75.00	48.8 0	83.1 0
CD140b	0.38	-5.07		-13.06	-5.92	-6.76	0.89	45.60	2.38	15.6 0	
CD141	-24.90	-26.90		-12.50	-21.43	-7.80	0	59.00	71.5 0	85.7 0	
CD142	-28.70	-22.20		-0.90	-17.27	-	14.54	91.00	89.6 0	91.9 0	
CD144	4.10	-2.80		17.34	6.21	10.23	7.55	29.30	5.46	19.2 0	
CD146	-64.50	-43.60		-13.40	-40.50	25.69	-	14.1 0	77.90	64.5 0	90.2 0
CD147	0.10	0.40		-0.50	0.00	0.46	95.0	99.90	99.5	99.7	

10

20

30

マーカー	比較 #1	比較 #2	比較 #5	比較 #6	平均	標準 偏差	CDC 最低	CDC 最高	EDC 最低	EDC 最高
						0		0	0	0
CD150	-18.94	-4.40		-1.01	-8.12	-9.53	0.66	3.74	2.26	22.0
CD151	0.30	0.50		-0.30	0.17	0.42	99.1	0	99.3	99.7
CD152	-21.41	-27.26		6.04	-14.21	17.78	4.63	14.40	8.36	32.4
CD153	1.51	1.85		-6.81	-1.15	-4.90	2.98	7.41	4.15	9.79
CD154	1.63	-5.22		-1.44	-1.68	-3.43	1.43	4.81	2.14	7.28
CD158a	-0.13	-1.74		-0.91	-0.93	-0.81	0.41	2.01	1.22	2.15
CD158b	-0.21	-25.79		-0.80	-8.93	14.60	0.67	2.39	2.17	26.6
CD161	-0.50	-1.91		-0.20	-0.87	-0.91	0.48	1.40	1.25	2.39
CD162	0.81	-3.25		0.55	-0.63	-2.27	1.00	3.80	1.45	4.74
CD163	0.94	-1.67		-1.09	-0.61	-1.37	0.54	2.61	1.50	2.21
CD164	-21.60	-45.70		29.70	-12.53	38.51	0	83.20	0	53.5
CD165	4.00	-37.30		0.10	-11.07	22.80	0	99.50	0	81.1
CD166	0.00	-0.10		-0.50	-0.20	-0.26	98.3	0	99.7	99.8
CD171	-2.13	-14.65		3.08	-4.57	-9.11	1.89	10.70	2.89	0
CD172b	10.61	-18.59		-0.29	-2.76	14.76	0.86	17.50	3.27	20.1
CD177	0.53	-7.29		-0.22	-2.33	-4.32	0.47	2.55	1.26	7.76
CD178	1.05	-10.40		-1.40	-3.58	-6.03	0.50	3.45	1.75	11.1
CD180	0.86	-1.47		-1.44	-0.68	-1.34	1.42	4.54	3.08	4.04
CD181	-0.29	-6.83		-1.57	-2.90	-3.47	2.42	6.17	3.41	9.49
CD183	-1.98	-2.72		-1.91	-2.20	-0.45	2.57	5.80	4.48	6.64
CD184	1.27	-3.96		0.17	-0.84	-2.76	1.67	5.29	2.32	6.24
CD193	0.70	-0.29		-0.27	0.05	0.57	2.20	4.65	2.06	2.72
CD195	-1.21	-3.10		-0.60	-1.64	-1.31	0.44	3.97	1.76	3.62
CD196	-0.80	0.91		1.44	0.52	1.17	1.50	5.27	2.54	3.83
CD197	-1.35	-1.55		-2.15	-1.68	-0.42	0.60	1.72	2.15	3.45
CD200	1.10	-13.00		0.90	-3.67	-8.08	0	99.80	0	92.2
CD205	-3.31	-3.91		0.41	-2.27	-2.34	0.63	5.05	4.54	98.7

10

20

30

マーカー	比較 #1	比較 #2	比較 #5	比較 #6	平均	標準 偏差	CDC 最低	CDC 最高	EDC 最低	EDC 最高
CD206	0.35	-5.94		-0.03	-1.87	-3.53	0.52	2.02	1.16	6.46
CD209	4.89	-2.20		-10.99	-2.77	-7.96	3.41	12.10	5.21	14.40
CD220	-21.20	-29.50		1.40	-16.43	15.99	3.05	69.20	0	67.80
CD221	-11.90	-34.50		4.70	-13.90	19.68	4.16	75.70	0	87.60
CD226	-0.39	-4.95		-2.19	-2.51	-2.30	2.24	4.12	3.54	7.80
CD227	-36.40	-40.50		-13.10	-30.00	14.78	9.37	67.50	0	80.90
CD229	-0.34	-0.56		-0.57	-0.49	-0.13	0.51	13.70	1.55	1.91
CD231	-9.40	-2.50		-0.62	-4.17	-4.62	0.39	4.33	1.75	12.00
CD235a	-3.01	-0.37		-0.32	-1.23	-1.54	0.26	11.40	2.87	5.03
CD243 (p-糖タンパク質)	0.13	-1.58		-2.68	-1.38	-1.42	0.68	5.34	2.71	5.98
CD244	0.83	-3.45		25.31	7.56	15.52	0.34	27.40	1.31	3.79
CD255 (Tweak)	9.24	-5.87		17.92	7.10	12.04	1.08	22.70	1.86	8.41
CD268	2.11	-27.96		1.25	-8.20	17.12	1.64	19.90	1.11	29.60
CD271	-7.56	-31.60		-1.72	-13.63	15.84	1.21	5.44	5.64	36.70
CD273	9.00	60.00		9.40	26.13	29.33	0	98.90	0	89.30
CD274	-13.10	-21.70		6.20	-9.53	14.29	0	98.60	0	97.40
CD275 (B7-H2)	-1.81	-0.32		-3.45	-1.86	-1.57	2.47	5.14	5.14	7.07
CD278	0.08	-1.71		0.28	-0.45	-1.09	0.67	3.27	0.66	3.19
CD279	-3.79	1.25		0.90	-0.55	-2.82	0.20	2.70	1.45	4.67
CD282	-0.12	2.05		0.20	0.71	1.17	0.18	3.11	1.02	3.23
CD305(LAIR-1)	-2.73	1.86		1.01	0.05	2.44	0.19	3.11	1.25	3.72
CD309	-10.90	0.52		5.49	-1.63	-8.40	0.46	7.08	1.59	15.20
CD314(NKG2D)	-2.42	0.66		2.13	0.12	2.32	0.22	3.53	1.40	3.69
CD321(F11 Rcptr)	-4.10	18.10		23.70	12.57	14.70	14.40	87.50	54.70	91.60

10

20

30

マーカー	比較 #1	比較 #2	比較 #5	比較 #6	平均	標準 偏差	CDC 最低	CDC 最高	EDC 最低	EDC 最高
CDw327	-2.92	1.20		0.68	-0.35	-2.24	0.16	2.63	1.25	4.28
CDw328	-2.70	0.95		-0.07	-0.61	-1.88	0.24	3.27	1.83	4.17
CDw329	-2.32	2.02		0.45	0.05	2.20	0.26	3.99	1.97	3.80
CD335(NKP4 6)	0.14	1.52		9.08	3.58	4.81	0.20	11.20	1.45	3.62
CD336	-2.51	1.92		2.91	0.77	2.89	0.23	4.30	1.28	3.63
CD337	-2.90	0.51		-2.09	-1.49	-1.78	0.30	2.87	2.36	4.35
CD338(ABCG 2)	-13.69	0.94		-0.67	-4.47	-8.02	0.22	3.82	2.88	15.7 0
CD340(Her2)	-15.40	-9.60		4.00	-7.00	-9.96	14.6 0	99.10	95.1 0	98.8 0
abTCR	-3.01	0.14		0.36	-0.84	-1.89	0.20	3.73	2.69	4.19
B2-uGlob	0.60	0.50		0.40	0.50	0.10	47.2 0	99.90	99.1 0	99.4 0
BLTR-1	-2.98	1.68		0.35	-0.32	-2.40	0.19	3.96	2.28	5.03
CLIP	-1.29	1.95		0.11	0.26	1.62	0.22	4.04	2.06	5.31
CMRF-44	-7.80	-0.56		4.05	-1.44	-5.97	0.26	6.90	2.85	9.66
CMRF-56	-3.78	0.12		-0.06	-1.24	-2.20	0.23	2.89	2.26	5.03
EGF-r	0.40	-6.00		0.00	-1.87	-3.59	48.4 0	99.60	98.8 0	99.6 0
Fmlp-r	-3.47	1.79		0.90	-0.26	-2.82	0.18	3.60	1.81	4.77
gd TCR	-2.88	1.24		2.89	0.42	2.97	0.26	5.30	1.90	4.61
Hem. 前駆細胞	-37.02	-10.12		-2.00	-16.38	18.33	0.32	36.50	15.3 0	44.1 0
HLA-A,B,C	0.00	0.50		-0.30	0.07	0.40	47.1 0	99.80	99.3 0	99.8 0
HLA-A2	0.30	0.10		0.22	0.21	0.10	0.16	99.70	1.61	99.4 0
HLA-DQ	-38.00	-8.70		16.60	-10.03	27.32	5.30	41.40	24.8 0	54.6 0
HLA-DR	-3.24	1.69		0.32	-0.41	-2.54	0.15	3.34	1.65	4.52
HLA- DR,DP,DQ	-3.70	0.34		0.23	-1.04	-2.30	0.20	3.01	2.51	5.53
インバリアントNKT	-1.92	1.23		-0.13	-0.27	-1.58	0.22	2.70	1.47	4.42
ジシアロガン グリオシド GD2	-8.42	1.35		0.32	-2.25	-5.37	0.17	3.63	2.18	10.5 0
MIC A/B	-18.20	-24.40		37.90	-1.57	34.32	- 0	70.70	18.4 0	95.1 0
NKB1	-2.16	1.11		0.43	-0.21	-1.73	1.01	5.75	1.85	3.74
SSEA-1	-18.54	-9.50		1.08	-8.99	-9.82	1.37	10.10	6.59	22.7

10

20

30

マーカー	比較 #1	比較 #2	比較 #5	比較 #6	平均	標準 偏差	CDC 最低	CDC 最高	EDC 最低	EDC 最高	
										0	
SSEA-4	-46.84	-26.43		-12.00	-28.42	17.51	1.13	18.10	30.1 0	52.4 0	
TRA-1-60	-1.71	1.54		-0.07	-0.08	-1.63	0.29	2.63	1.09	2.76	
TRA-1-81	-0.91	1.49	-0.10	-0.24	0.06	1.02	0.16	2.78	0.26	2.60	
Vb 23	-2.10	-0.09	-0.55	-0.43	-0.79	-0.89	0.29	2.51	0.84	4.04	
Vb 8	-2.41	0.85	-0.55	2.52	0.10	2.09	0.24	4.62	0.79	4.26	
CD49f	-7.80	-11.70	7.88	29.30	4.42	18.62	7.88	73.00	0.00	69.4	
CD104	15.84	0.04	-0.02	0.19	4.01	7.89	0.53	18.40	0.55	2.56	
CD120b	-2.36	0.36	-0.12	0.48	-0.41	-1.33	0.46	2.14	0.58	3.57	
CD132	-2.58	1.23	-0.41	5.12	0.84	3.25	0.39	6.18	0.80	3.49	
CD201	8.30	-16.90	-26.00	7.10	-6.88	17.24	-	29.4 0	55.4 0	70.5 0	
CD210	-2.97	0.97	-0.20	0.41	-0.45	-1.75	0.38	2.59	0.57	4.36	
CD212	-1.98	1.98	-0.18	0.61	0.11	1.65	0.43	3.27	0.61	3.62	
CD267	-3.05	0.95	-0.09	57.49	13.83	29.16	0.49	58.60	0.57	4.10	
CD294	-3.37	1.35	-0.43	2.87	0.10	2.68	0.60	3.91	1.03	4.37	
CD326	-34.86	-9.09	-22.69	23.40	-10.81	25.12	0.51	33.80	-	10.4 0	44.6 0
皮膚リンパ球 抗原									21.0	68.4	
	-67.58	-23.64	-20.48	36.60	-18.78	42.72	0.52	60.20	0	0	
INT B7	-2.91	1.16	-0.03	1.17	-0.15	-1.92	0.42	2.53	0.45	3.73	
SSEA-3	-14.39	-21.28	-27.02	-1.90	-16.15	10.81	0.48	14.90	15.5 0	27.5 0	

【0111】

本発明の実施形態は、特定の好ましい実施形態および実施例と関連して開示されているが、本発明が具体的に開示された実施形態を越えて、他の代替の実施形態および／または本発明の使用ならびにこれらの明らかな改良および等価物へと拡大することは、当業者には理解されると思われる。加えて、本発明の多数の変形が示され、詳細に記載されているが、本発明の範囲内である他の改良は、この開示に基づき当業者には容易に明らかであると思われる。本実施形態の具体的特徴および態様のさまざまな組み合わせまたは部分的組み合わせが実施可能であり、それもまた本発明の1つ以上の範囲内に入ることもまた、企図されている。さらに実施形態に関連した任意の特定の特長、態様、方法、特性、特徴、質、属性、要素などの本明細書における開示は、本明細書において説明したすべての他の実施形態において使用可能である。したがって、開示された実施形態のさまざまな特長および態様が、開示された発明の変動様式を形成するために、互いに組み合わせ、または置き換えることができるることを理解すべきである。本明細書に記載のすべての実施形態に関して、方法のステップは、必ずしも連続して実施される必要はない。したがって、本明細書において開示された本発明の範囲は、上記の特定の開示された実施形態により限定されるものでは決してないことが意図される。

【0112】

本明細書に開示された範囲は、ありとあらゆる重複、部分範囲およびこれらの組み合わせもまた包含する。「まで」「少なくとも」「より大きい」「未満」「の間」などの言葉は、列挙された数字を含む。「約」または「およそ」などの用語に先行される数は、列挙された数字を含む。例えば、「約10ナノメーター」は、「10ナノメーター」を含む。

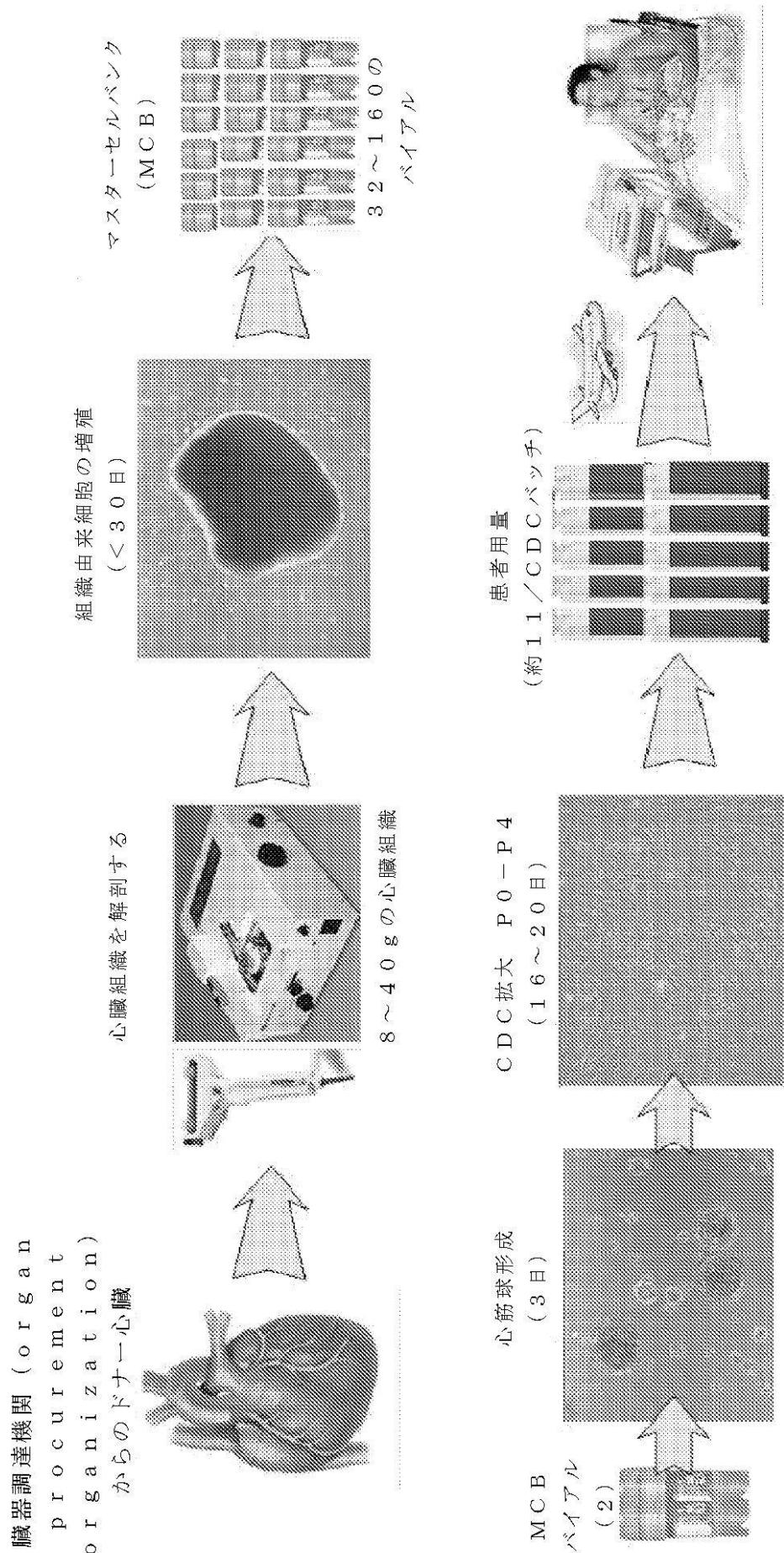
10

20

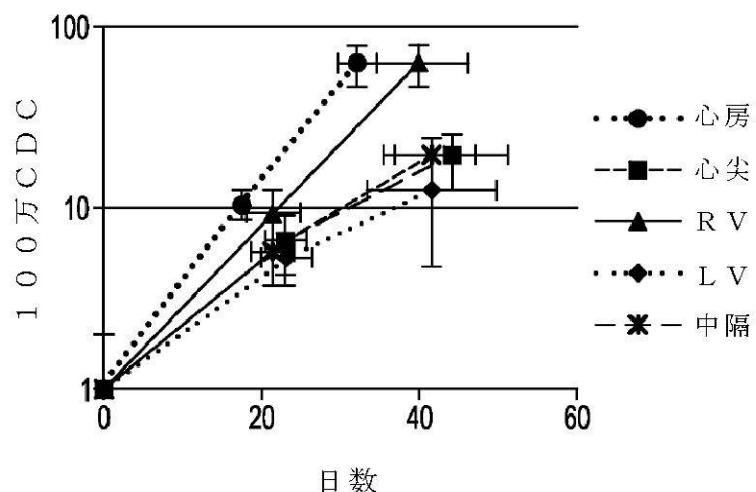
30

40

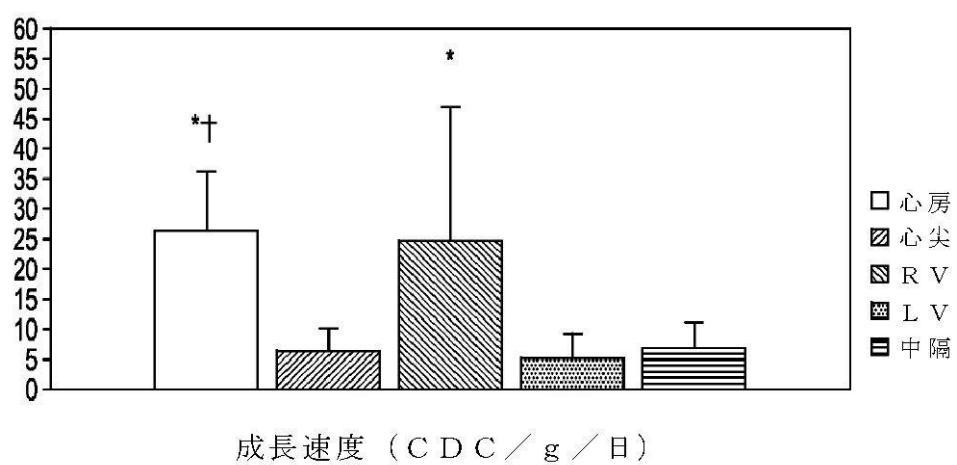
【図1】



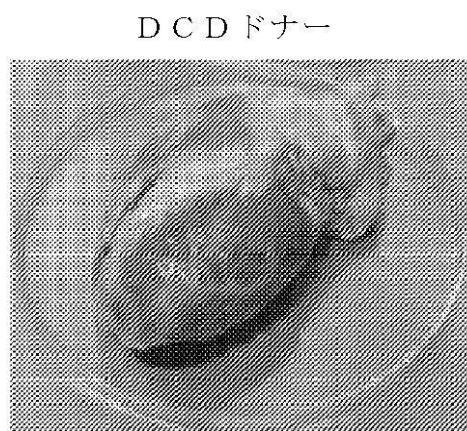
【図 2 A】



【図 2 B】

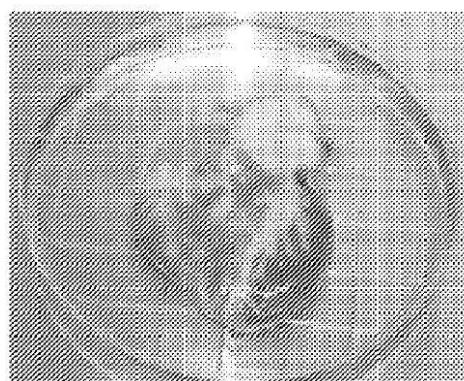


【図 3 A】



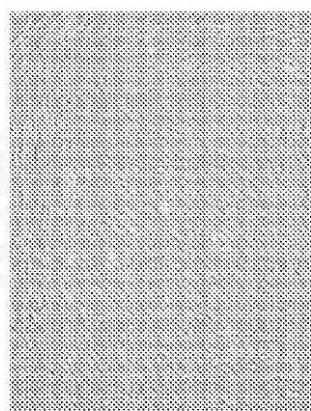
【図 3 B】

非 D C D ドナー

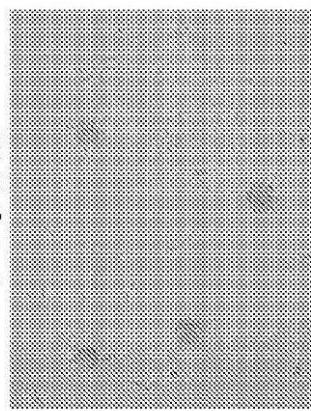


【図 3 C】

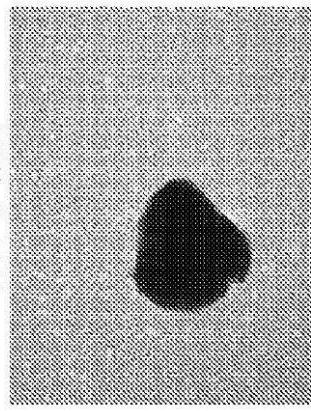
C D C 拡大



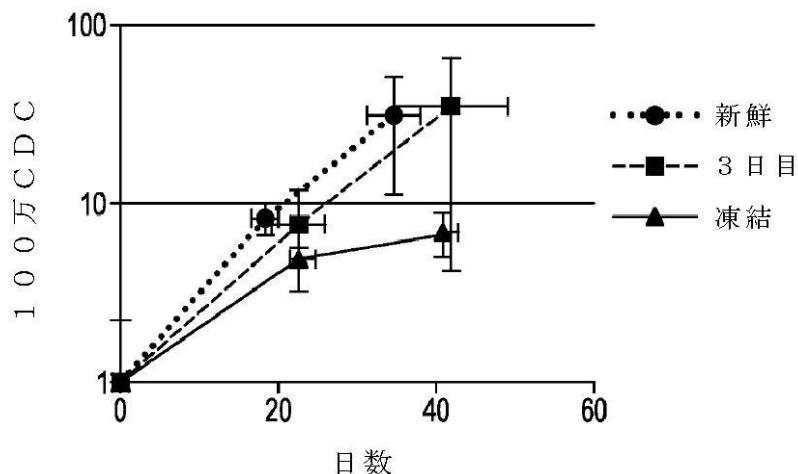
C S p 形成



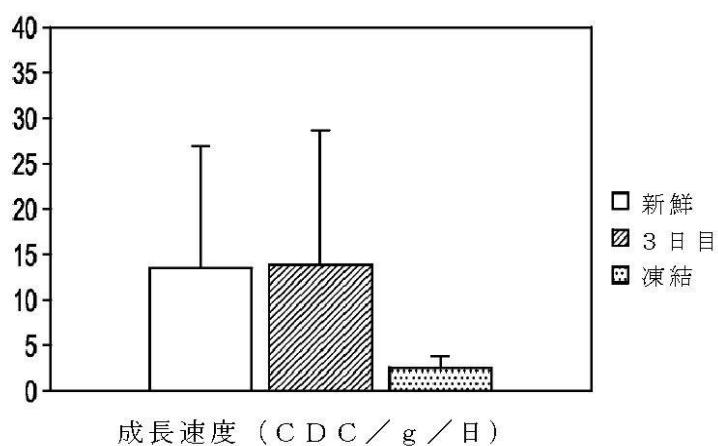
E D C 増殖



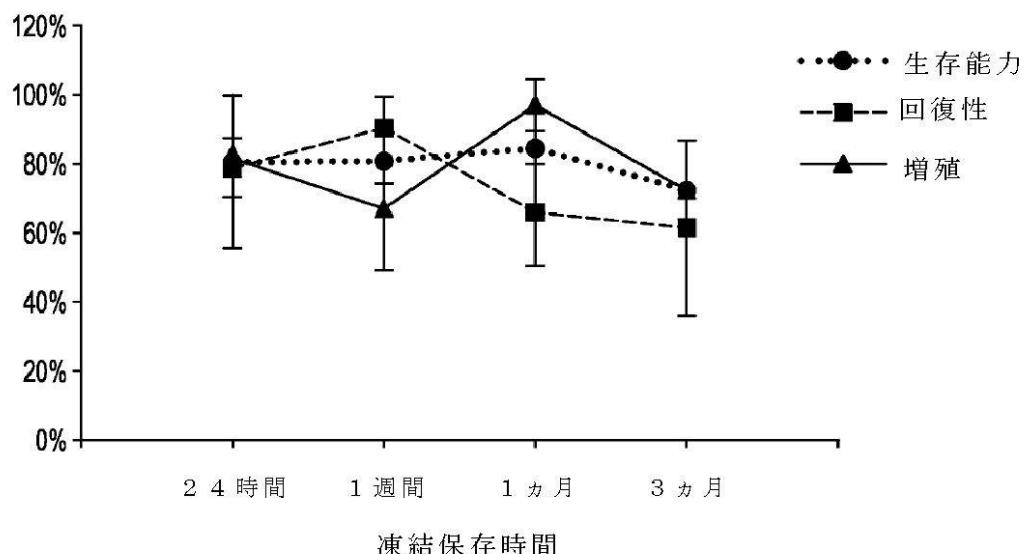
【図4A】



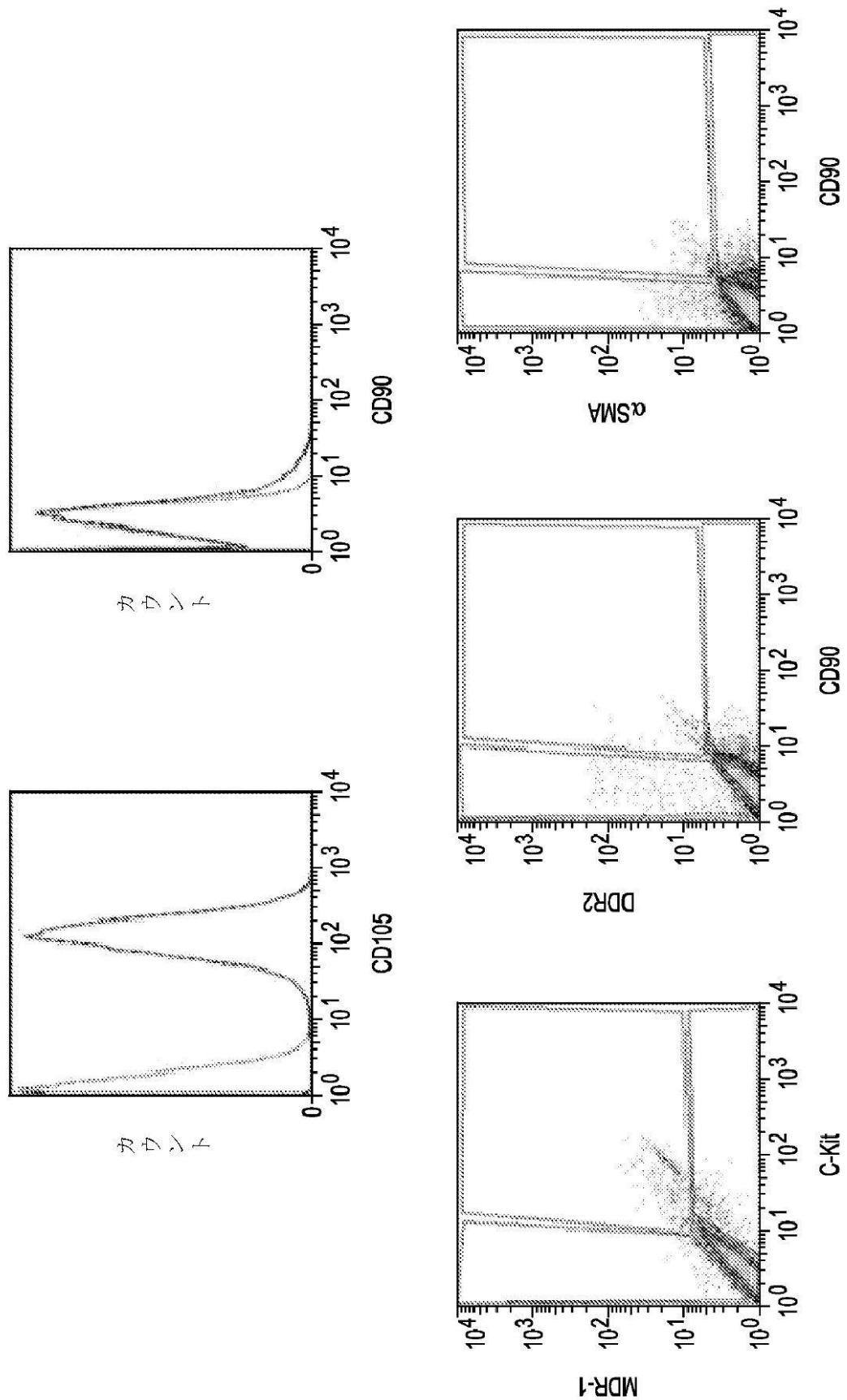
【図4B】



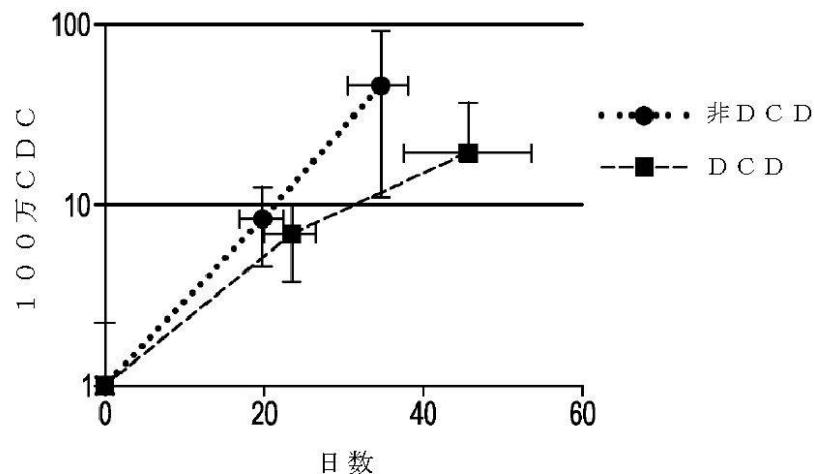
【図4C】



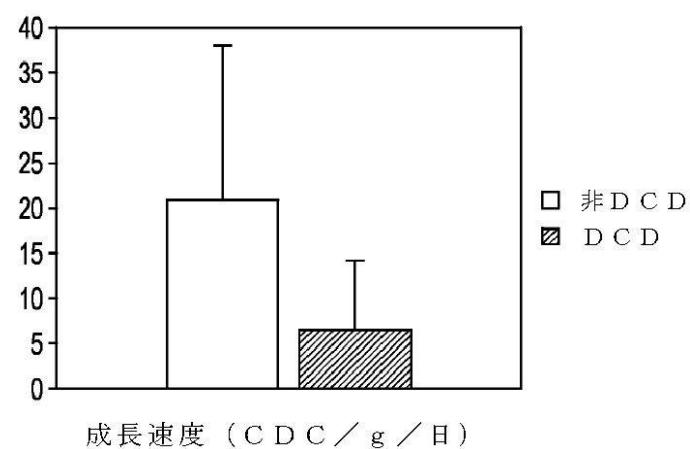
【図5】



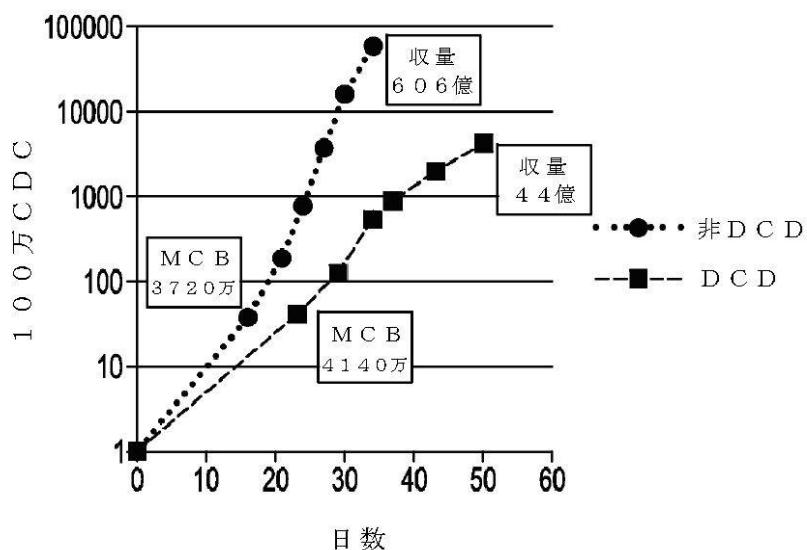
【図 6 A】



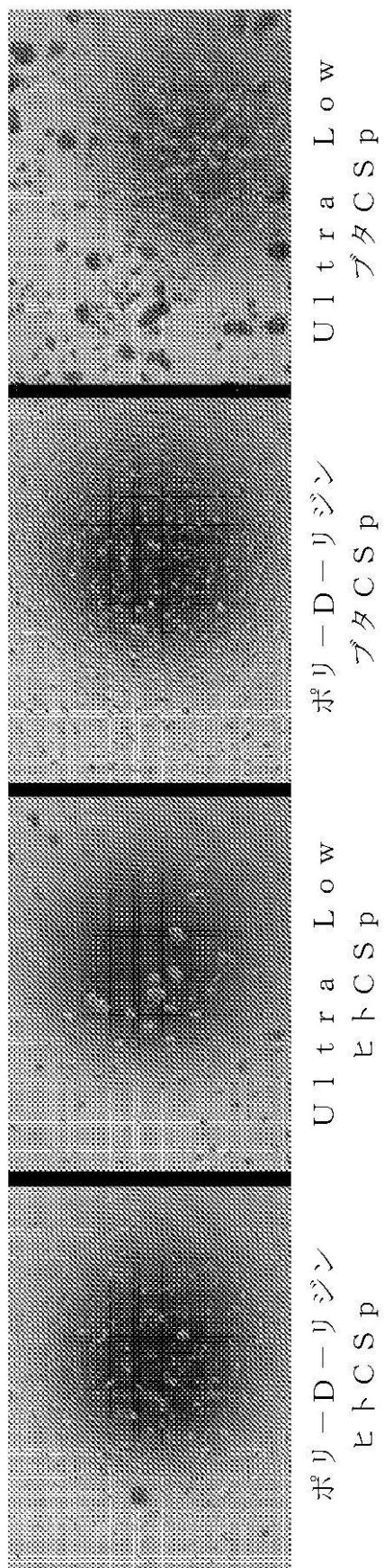
【図 6 B】



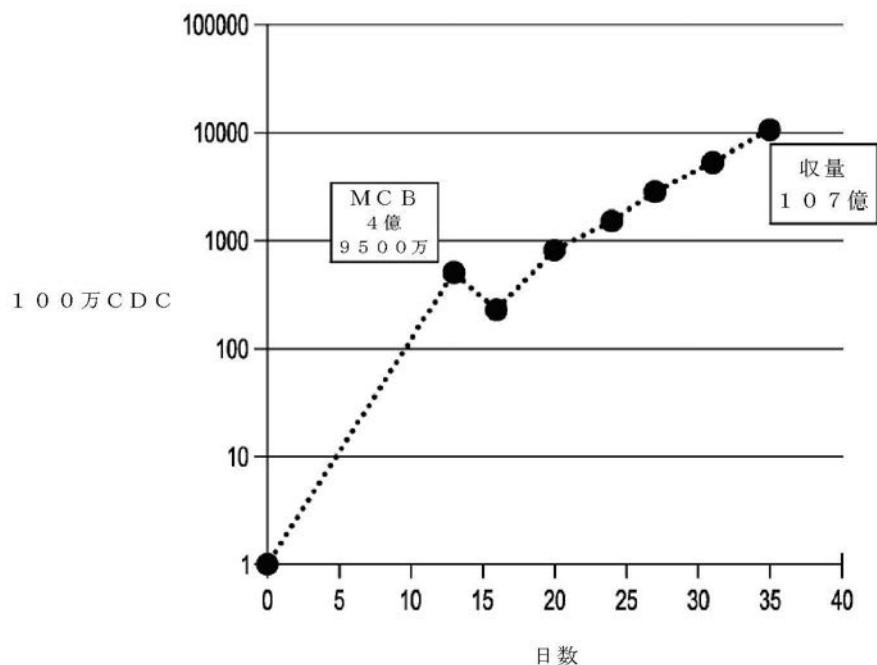
【図 6 C】



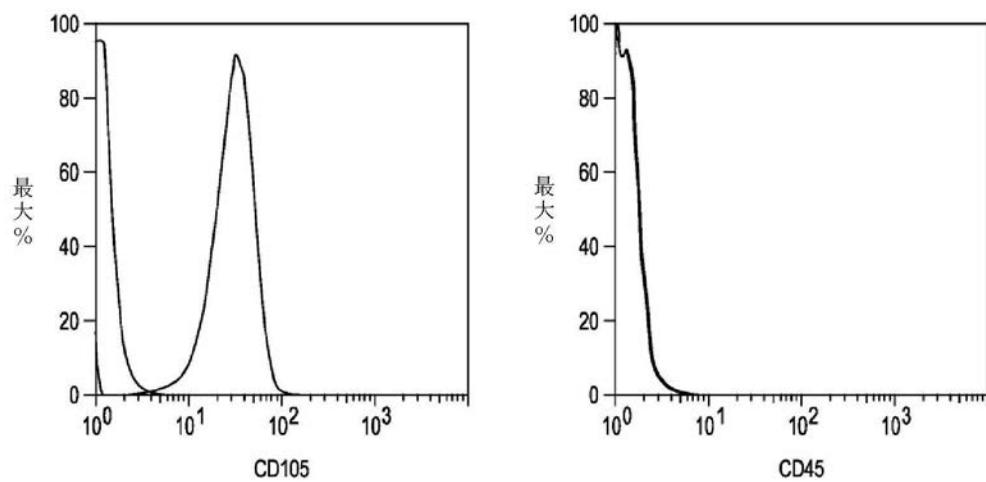
【図7】



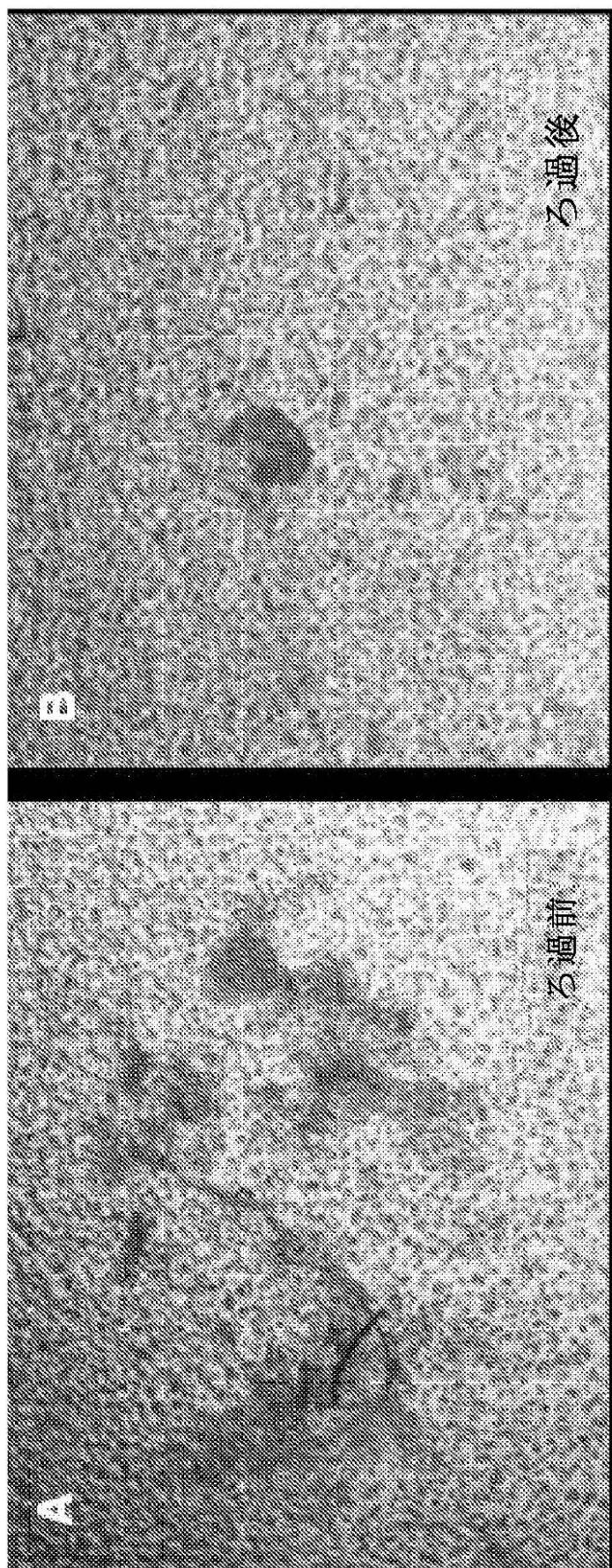
【図8】



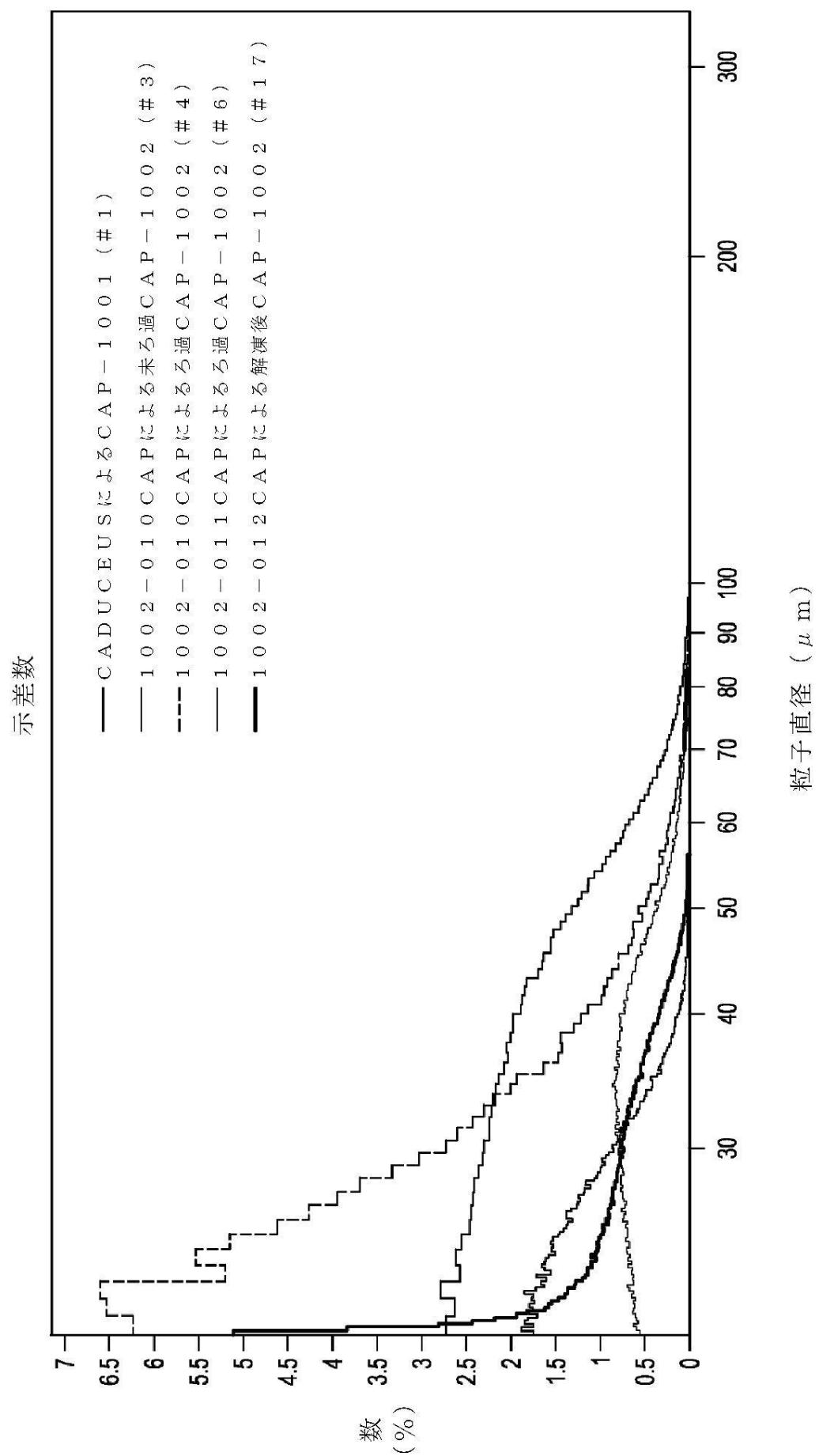
【図9】



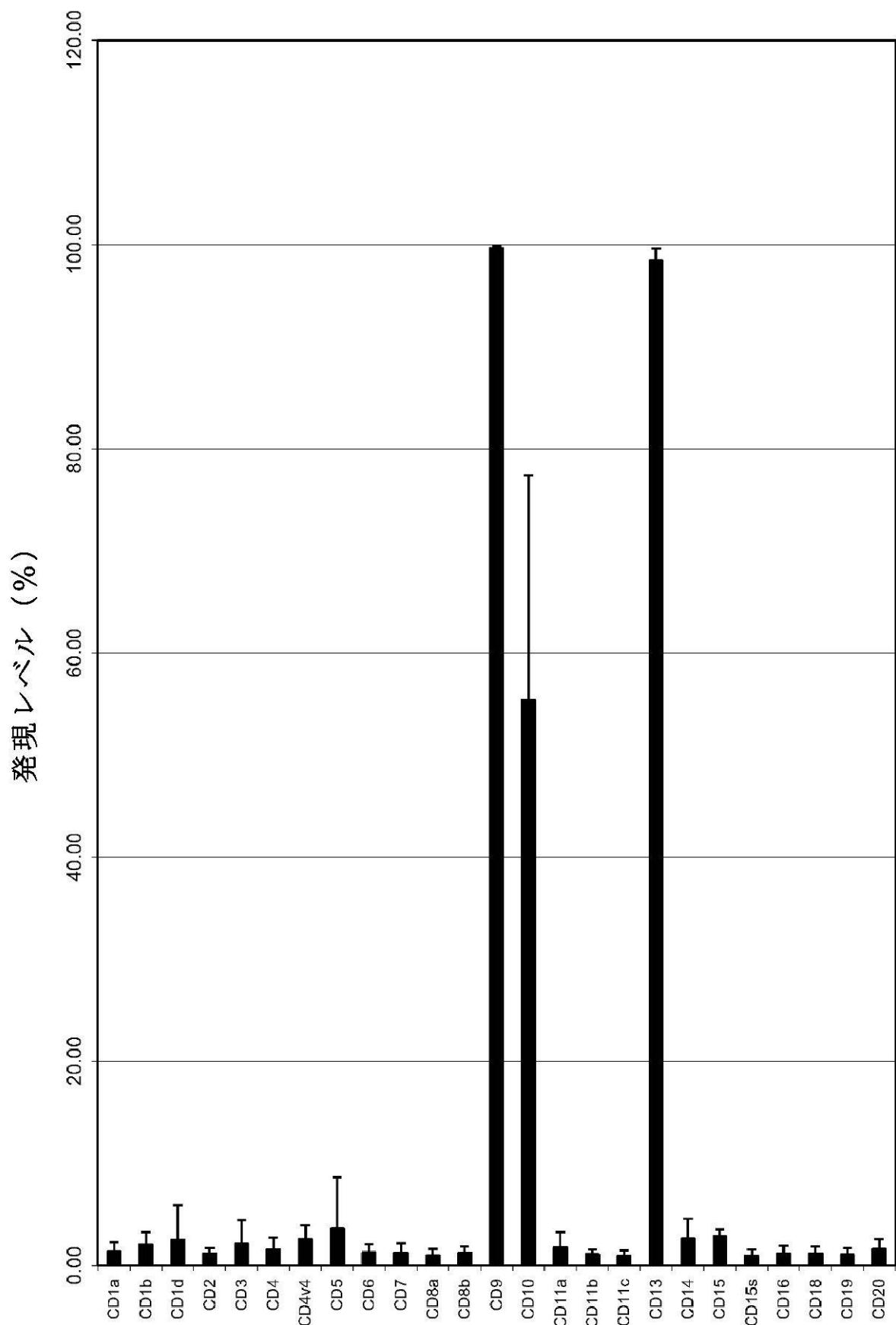
【図 10】



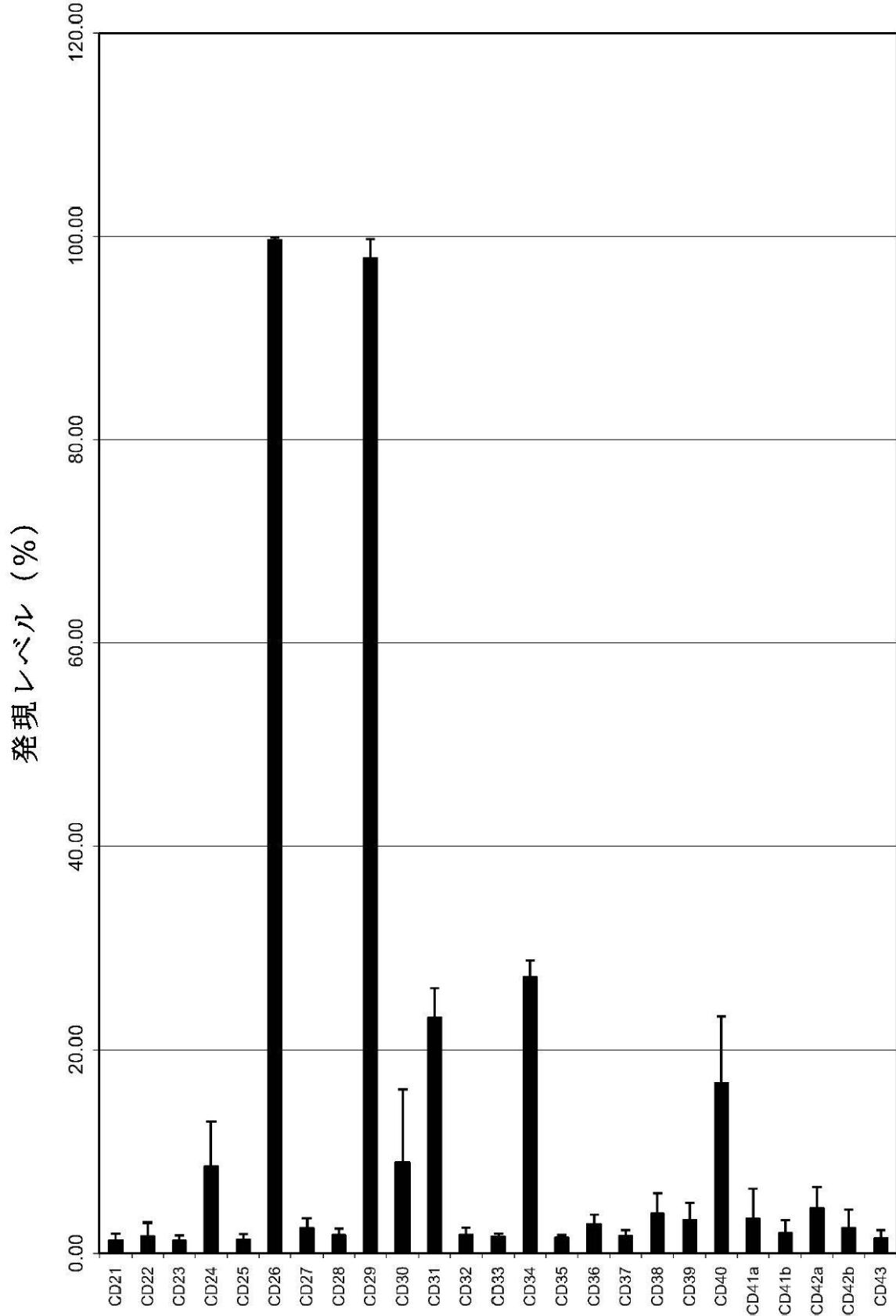
【図 1-1】



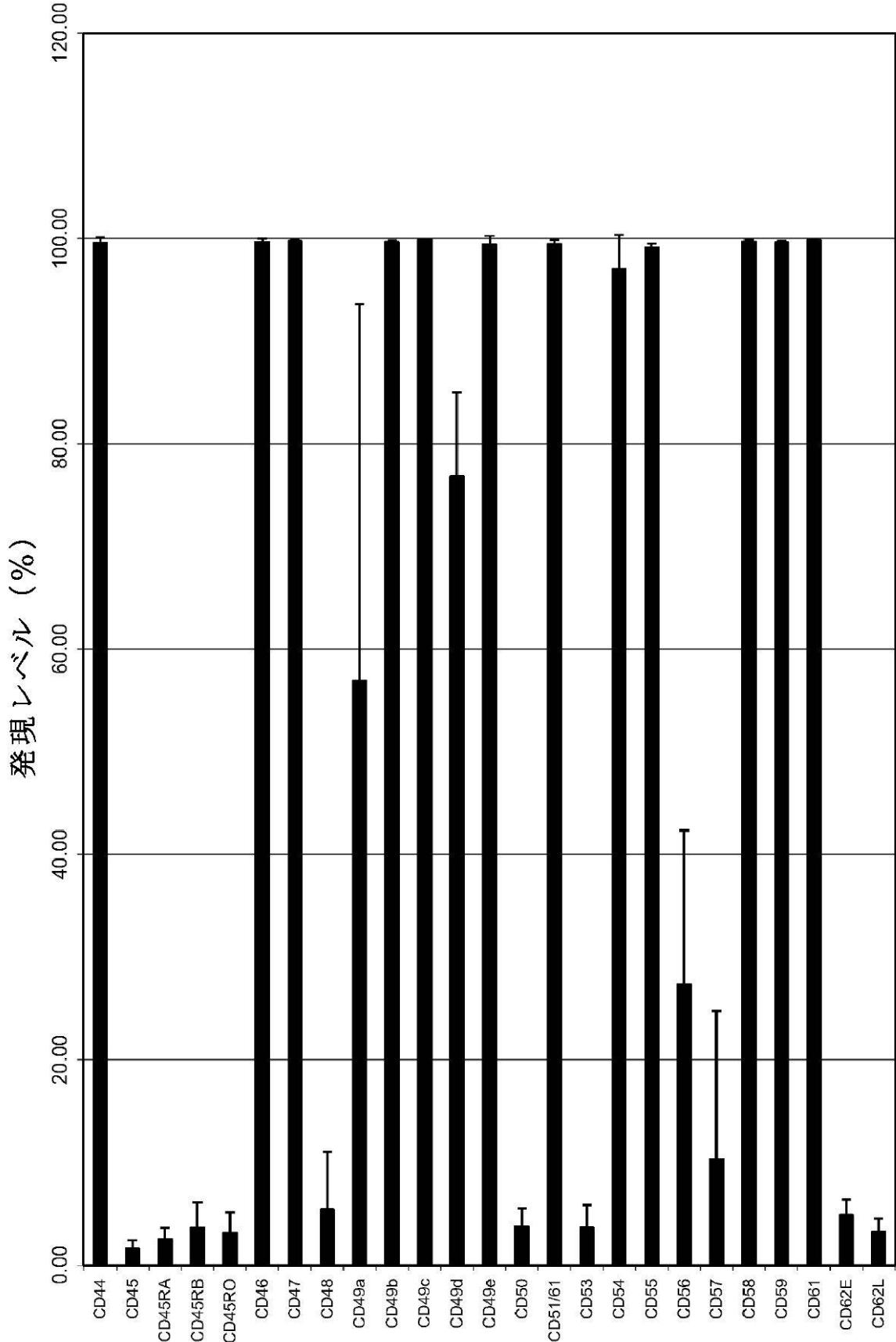
【図 1 2 A】



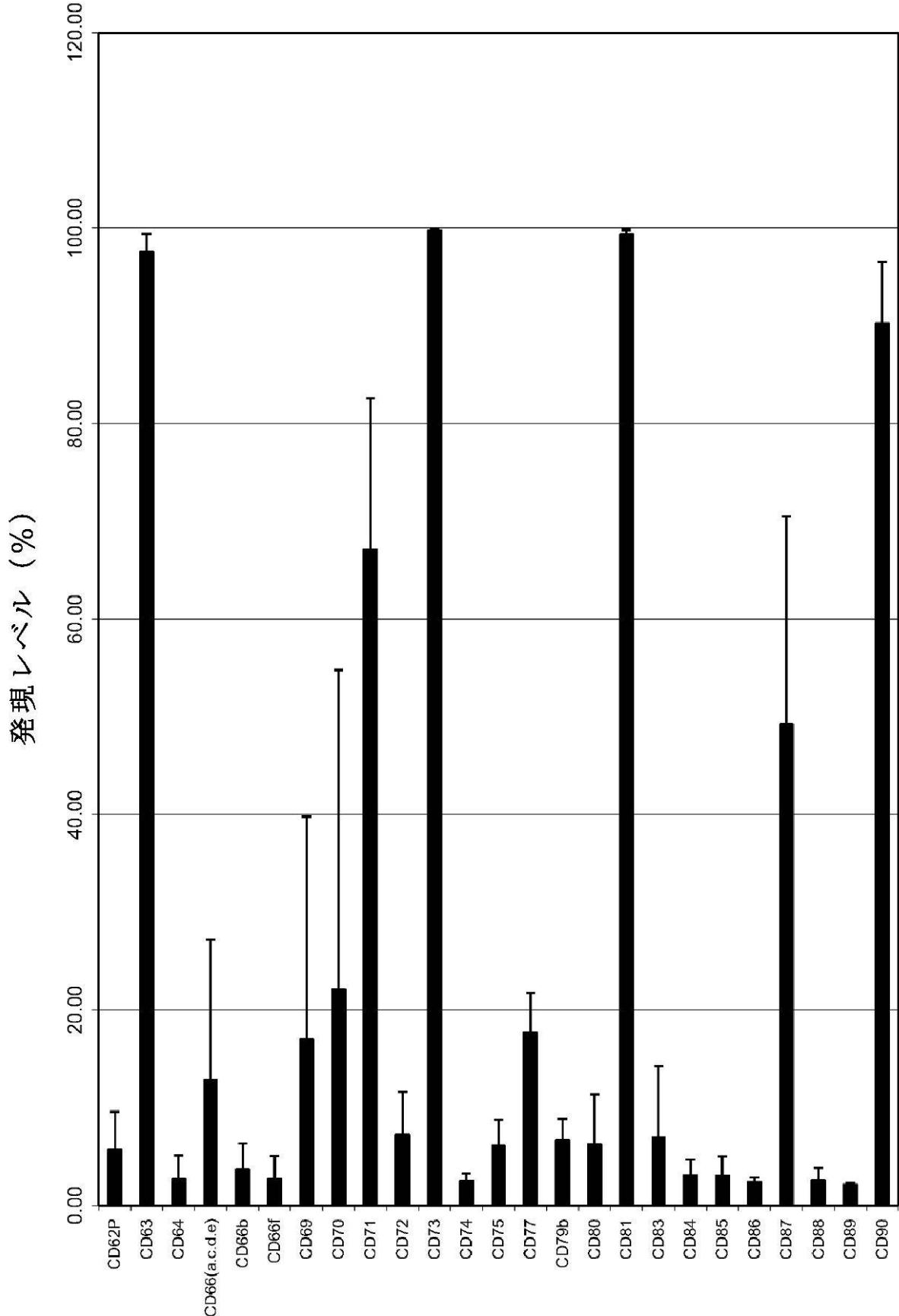
【図 1 2 B】



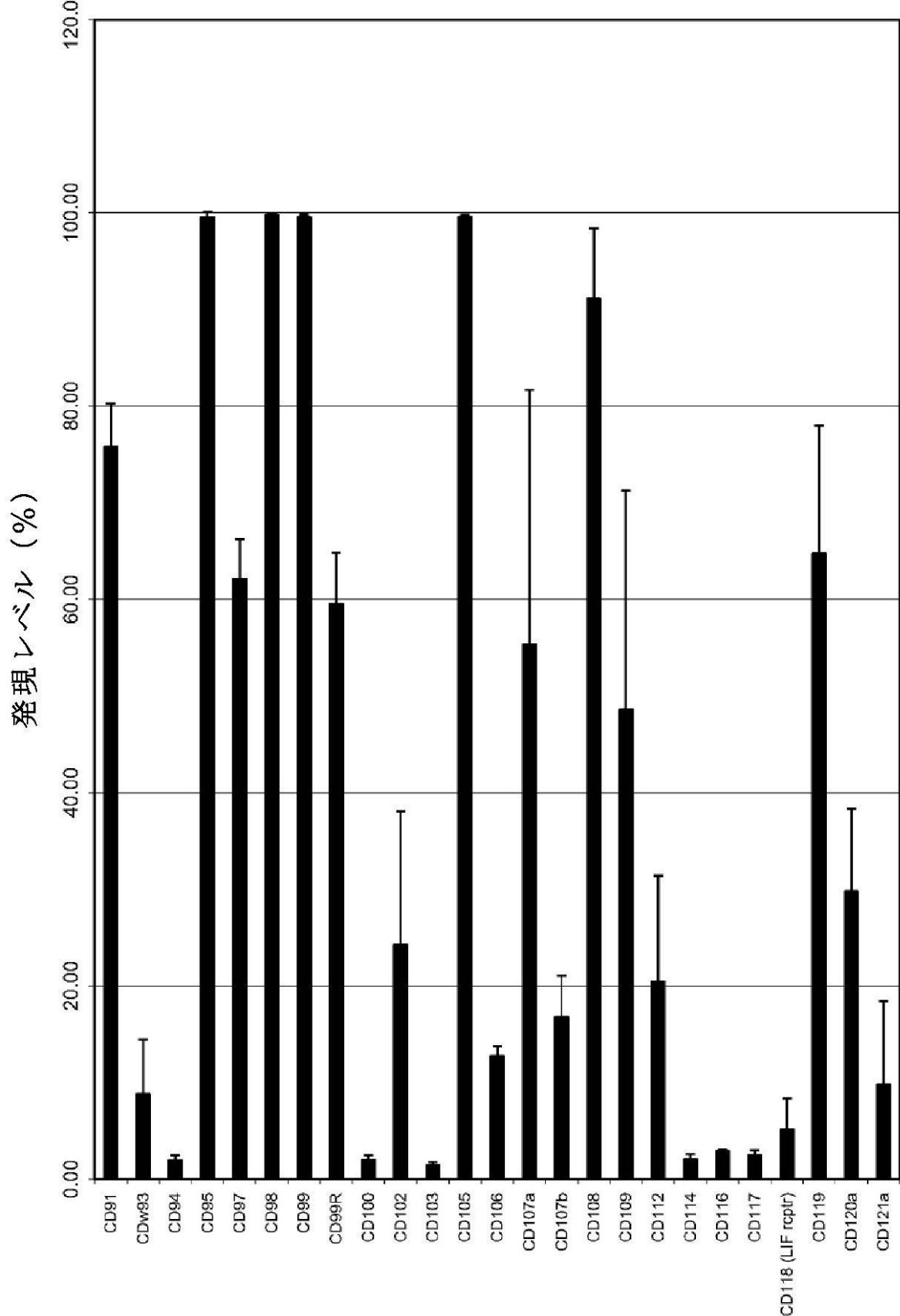
【図 1 2 C】



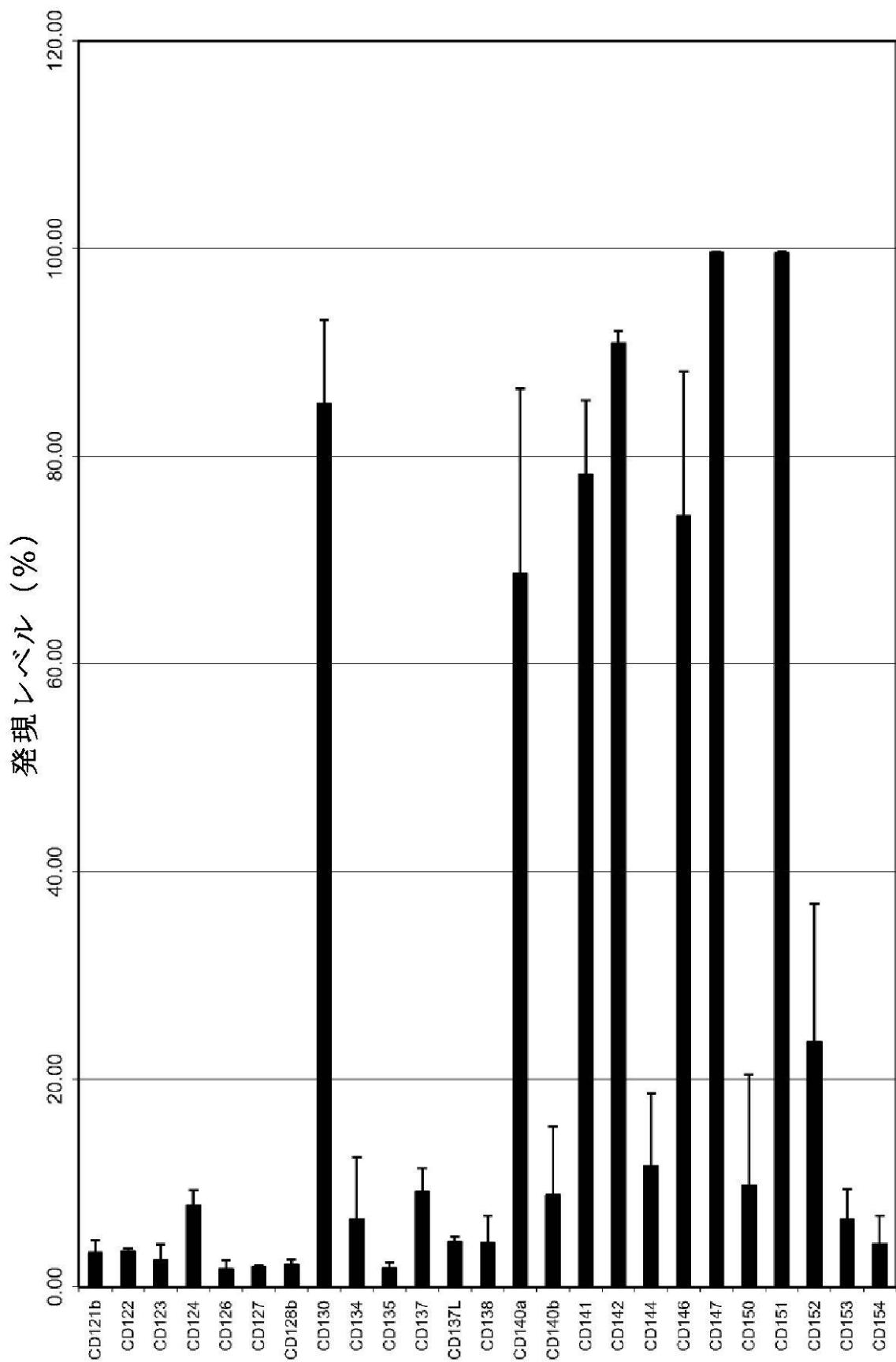
【図 1 2 D】



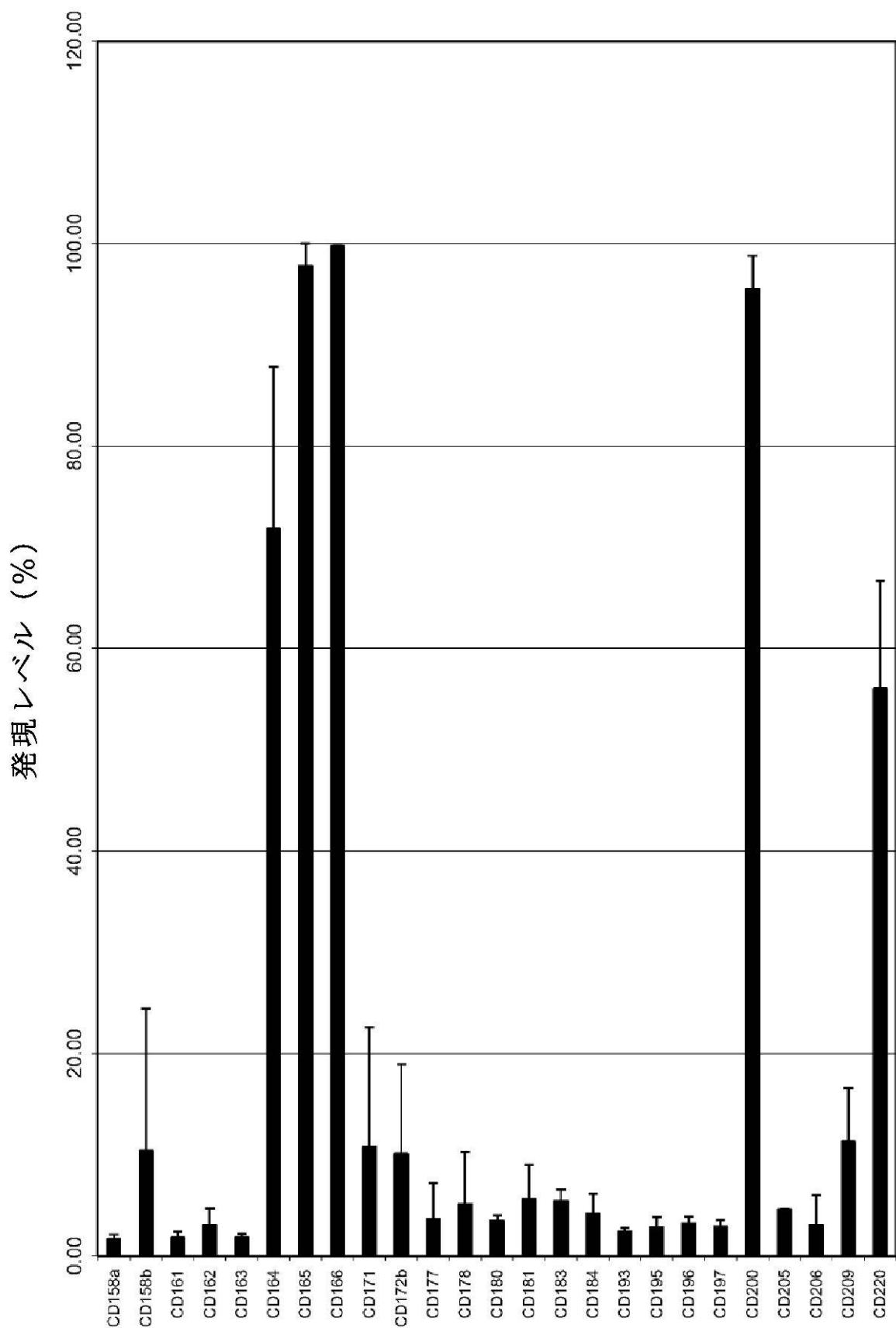
【図 1 2 E】



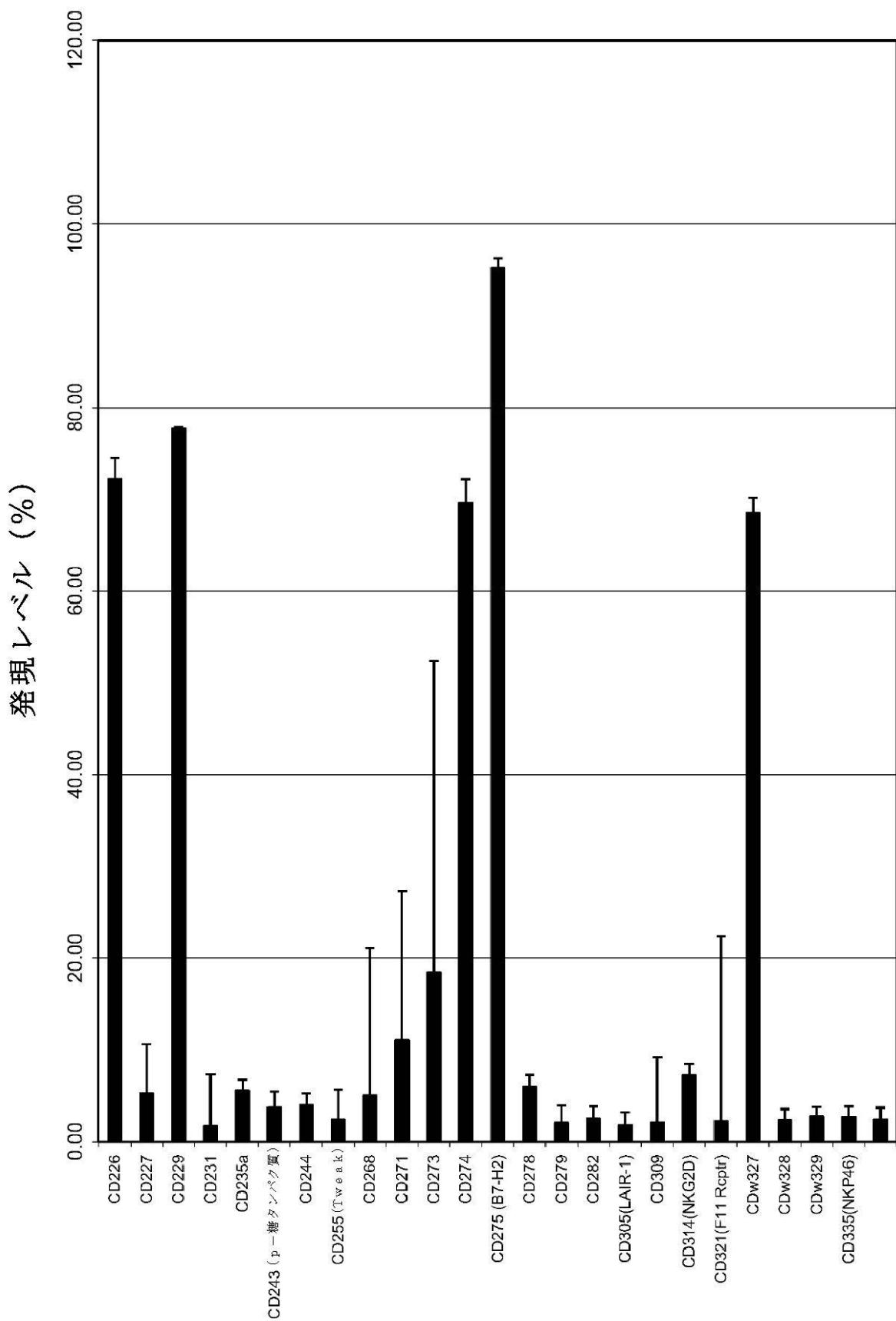
【図 1 2 F】



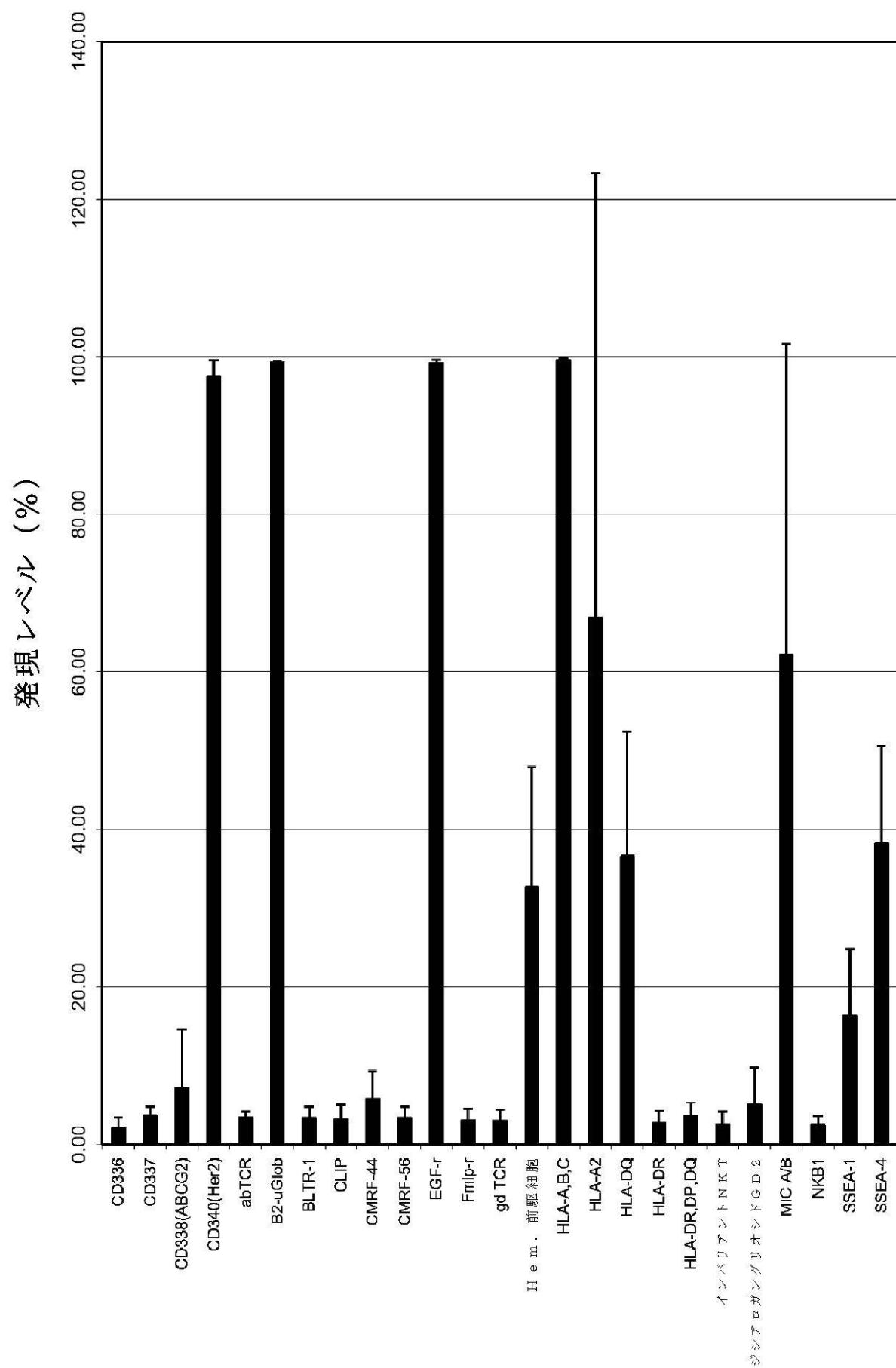
【図 1 2 G】



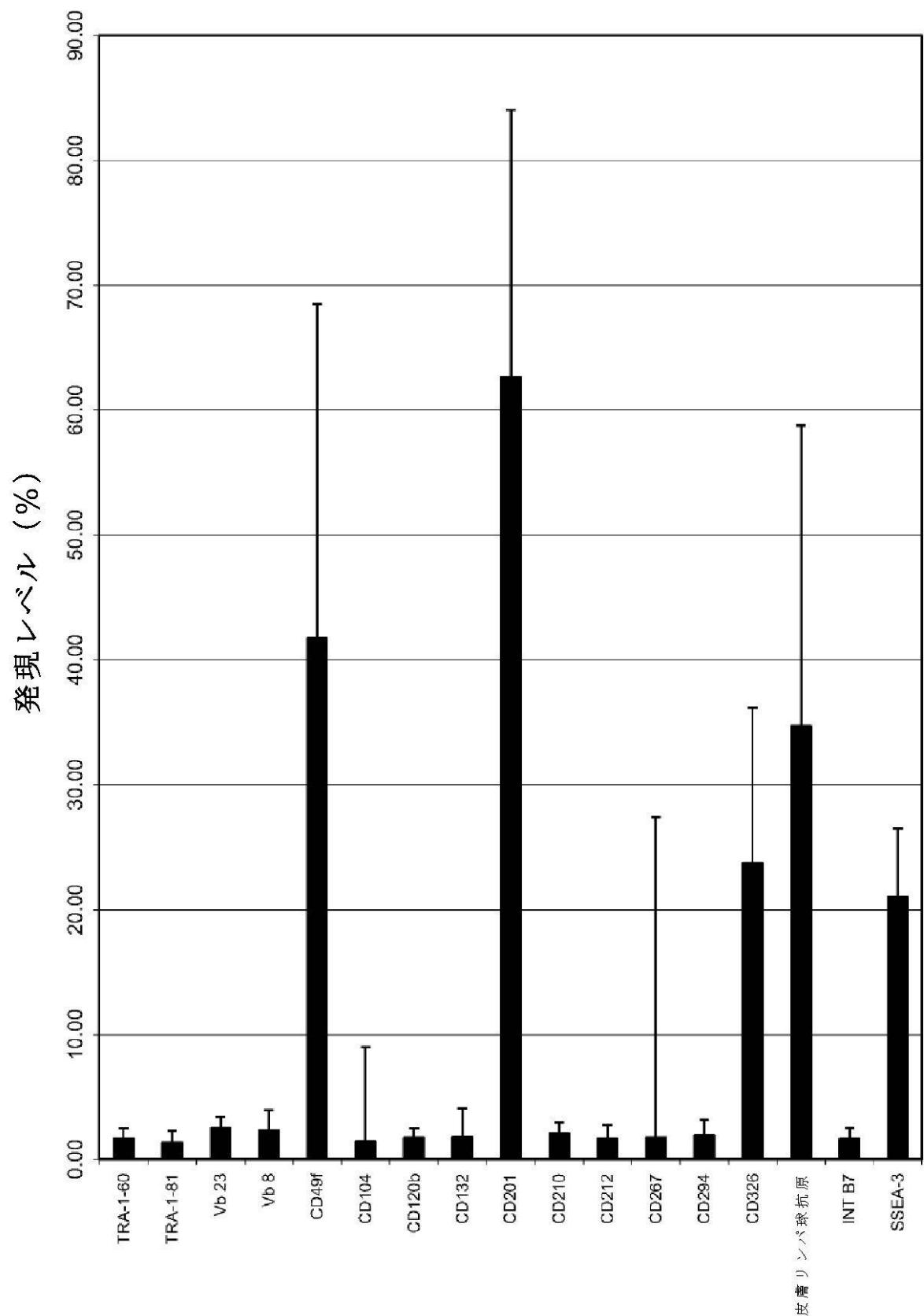
【図 1 2 H】



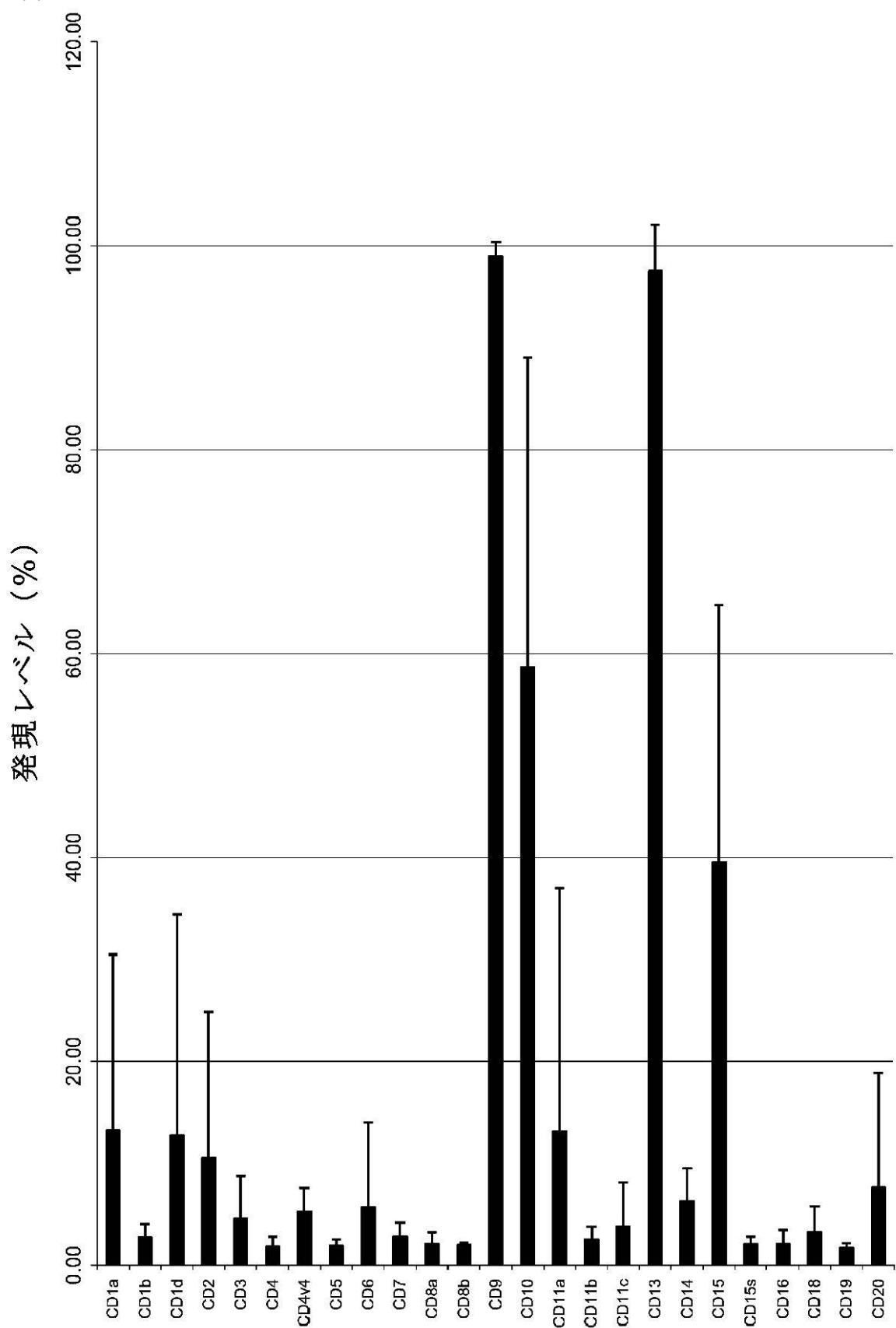
【図12】



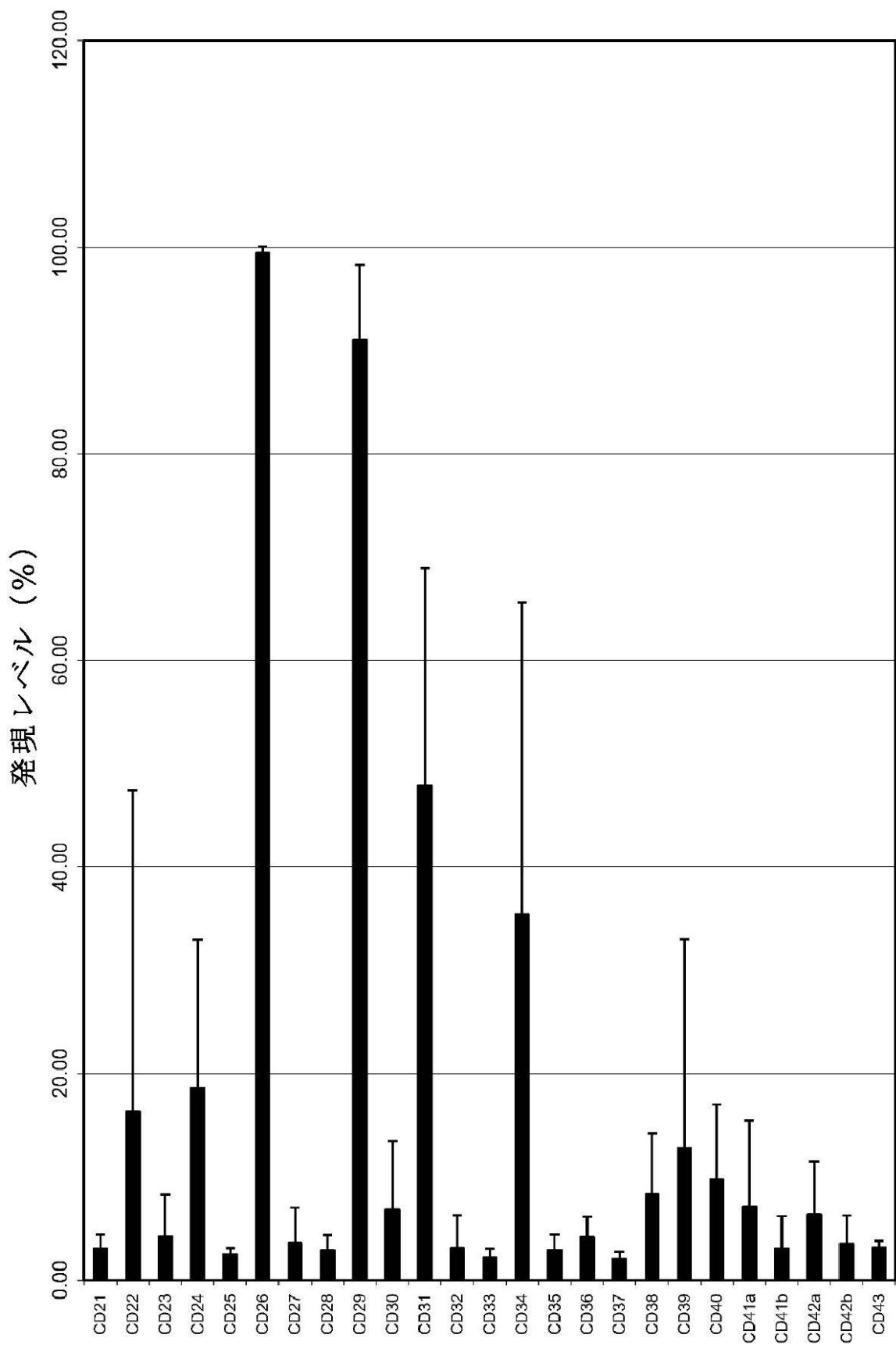
【図 1 2 J】



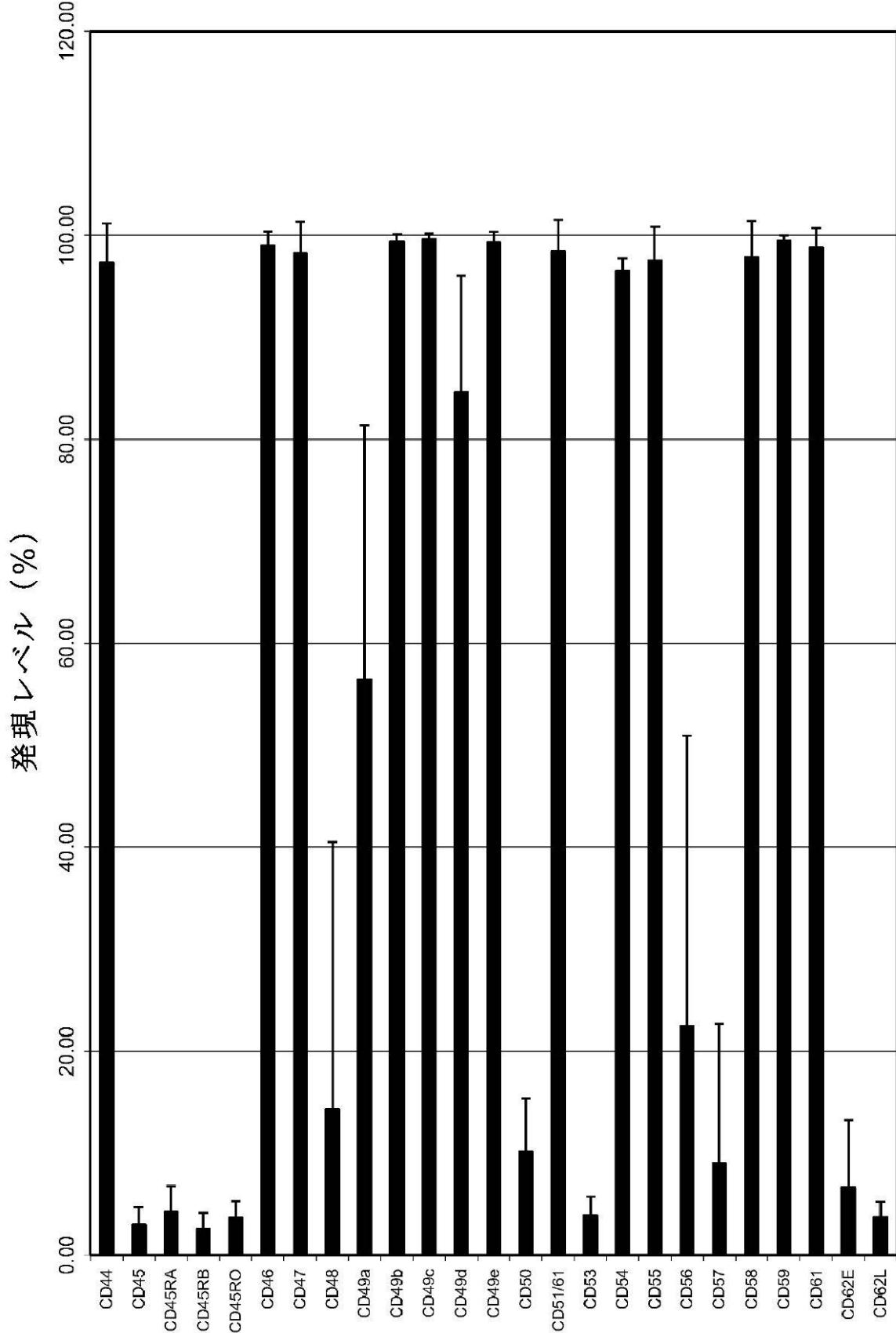
【図 1 3 A】



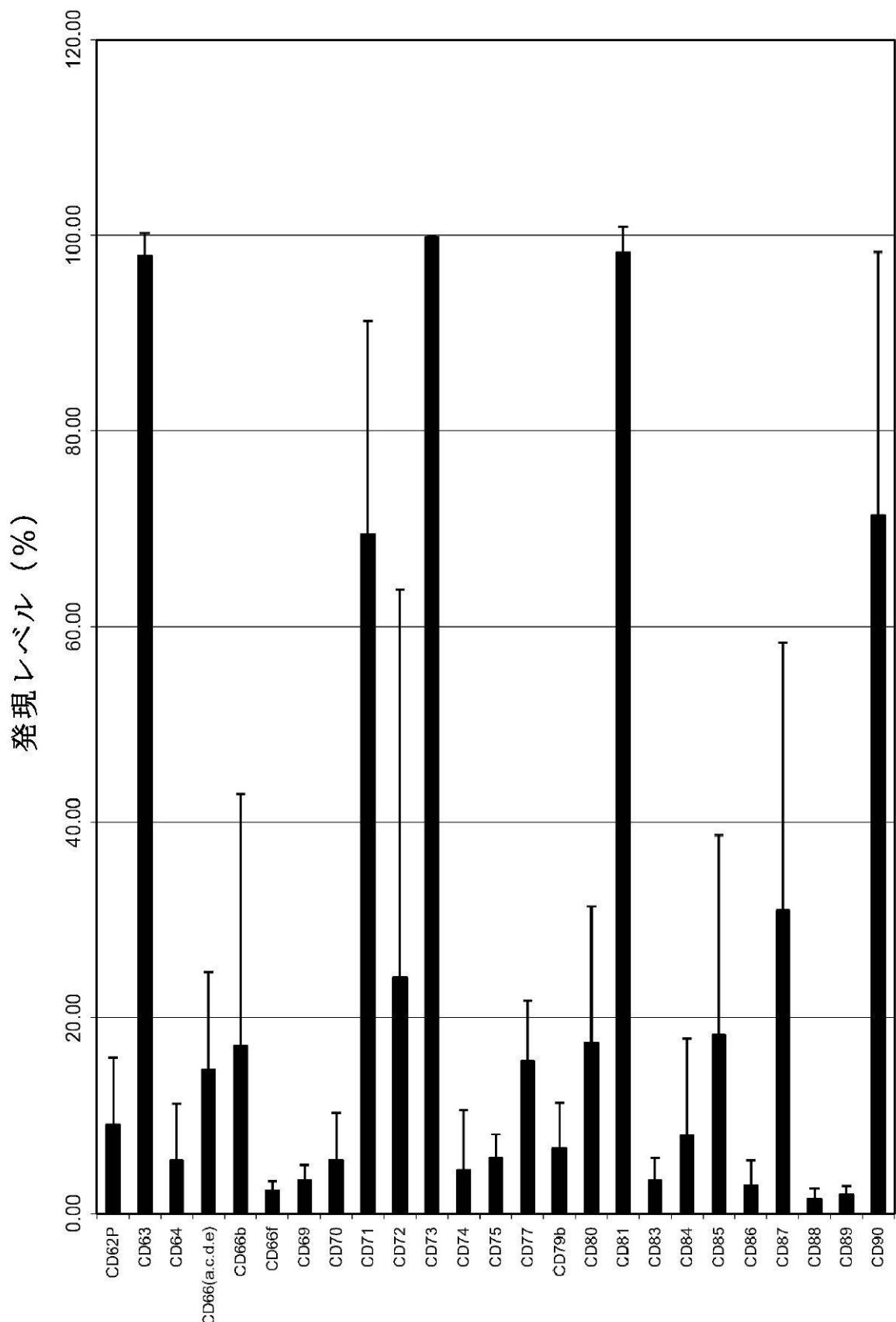
【図13B】



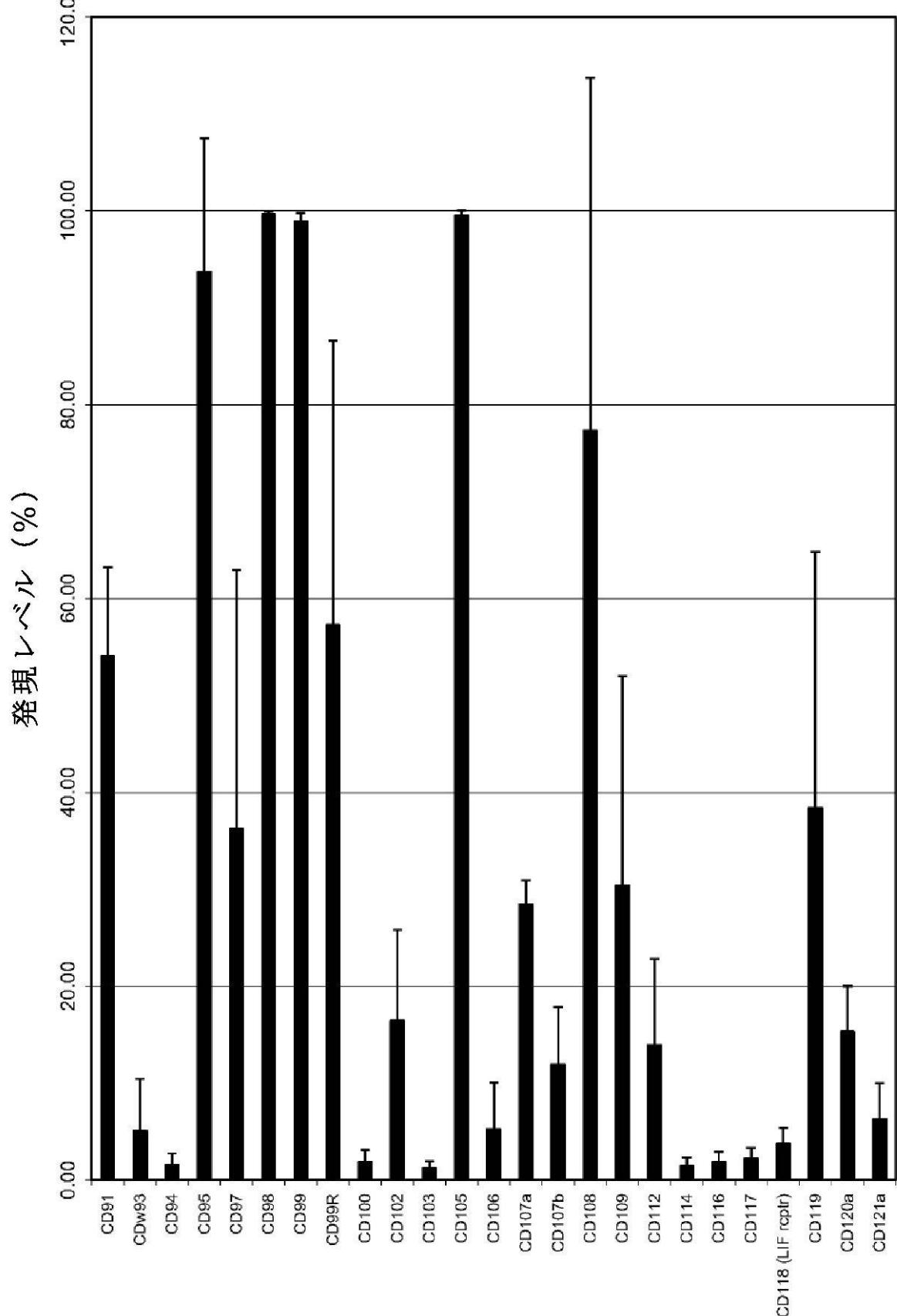
【図 1 3 C】



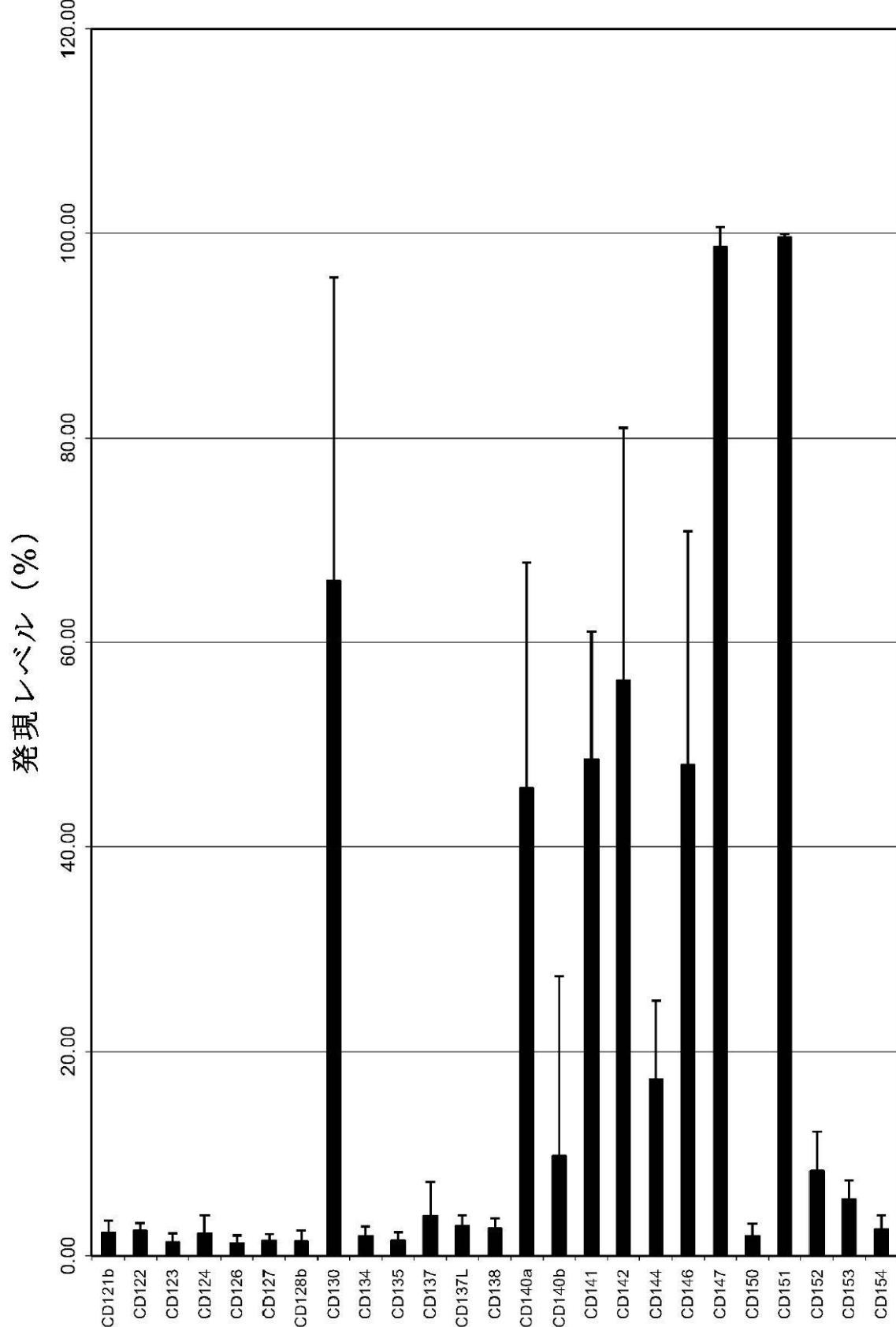
【図 1 3 D】



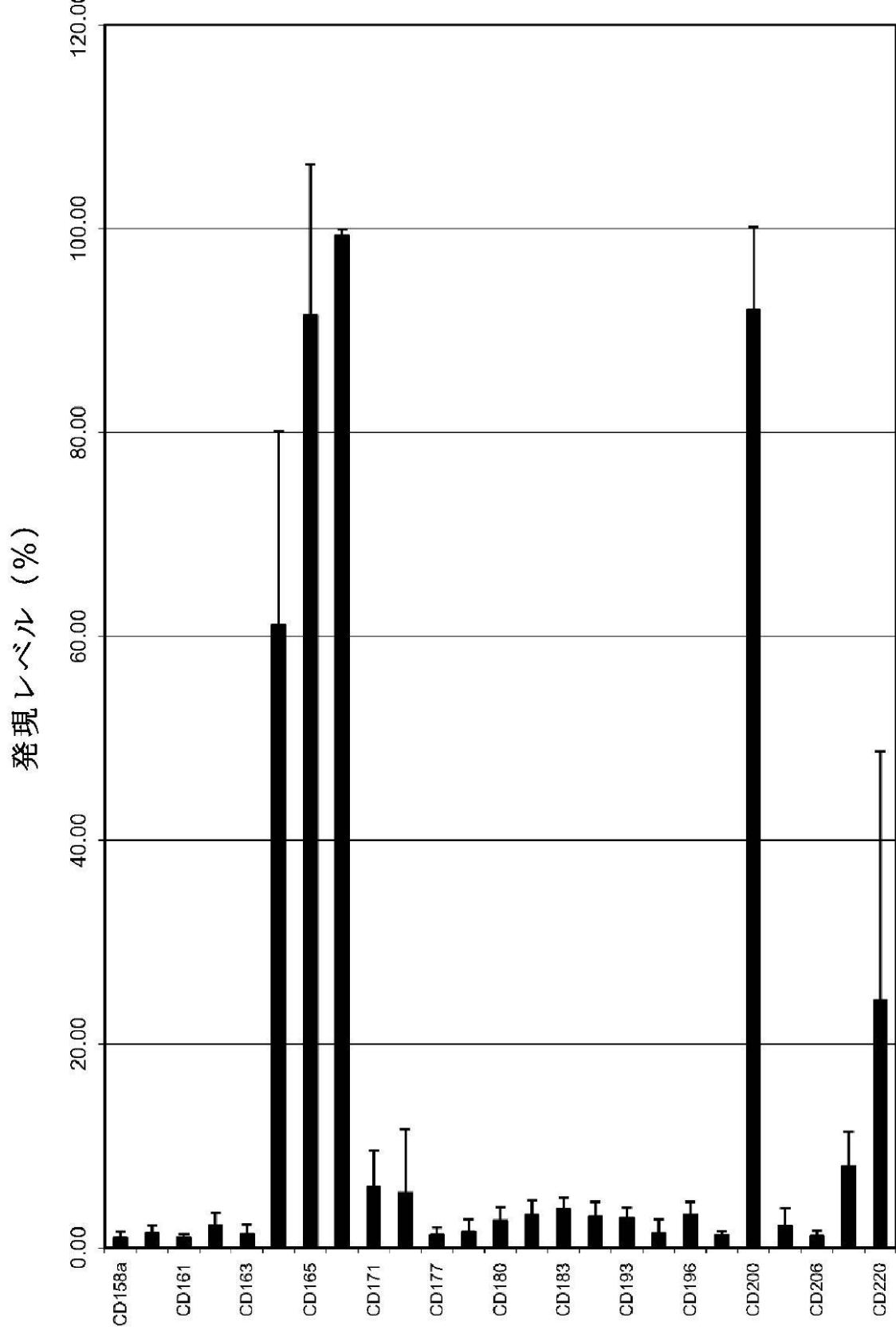
【図 1 3 E】



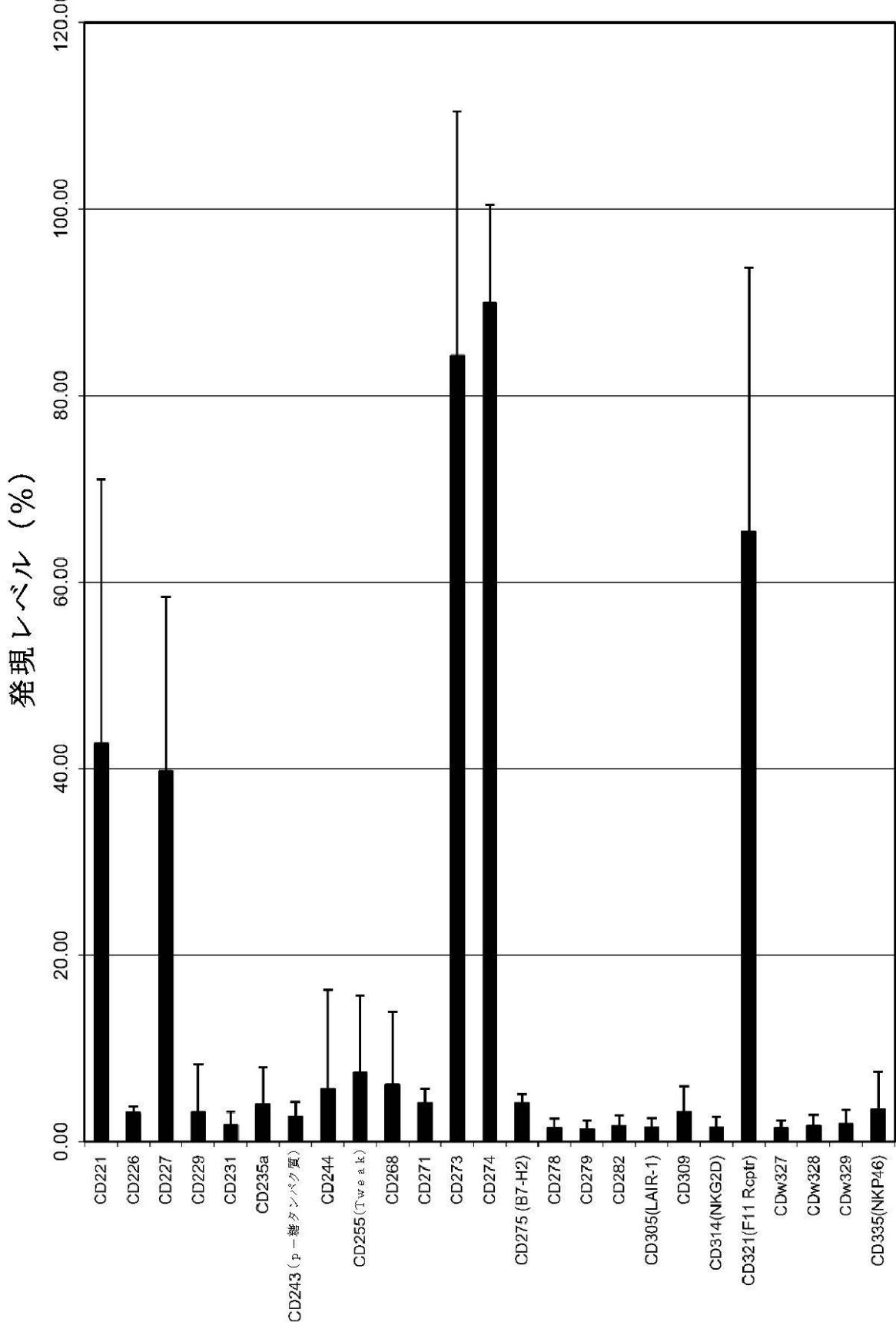
【図 1 3 F】



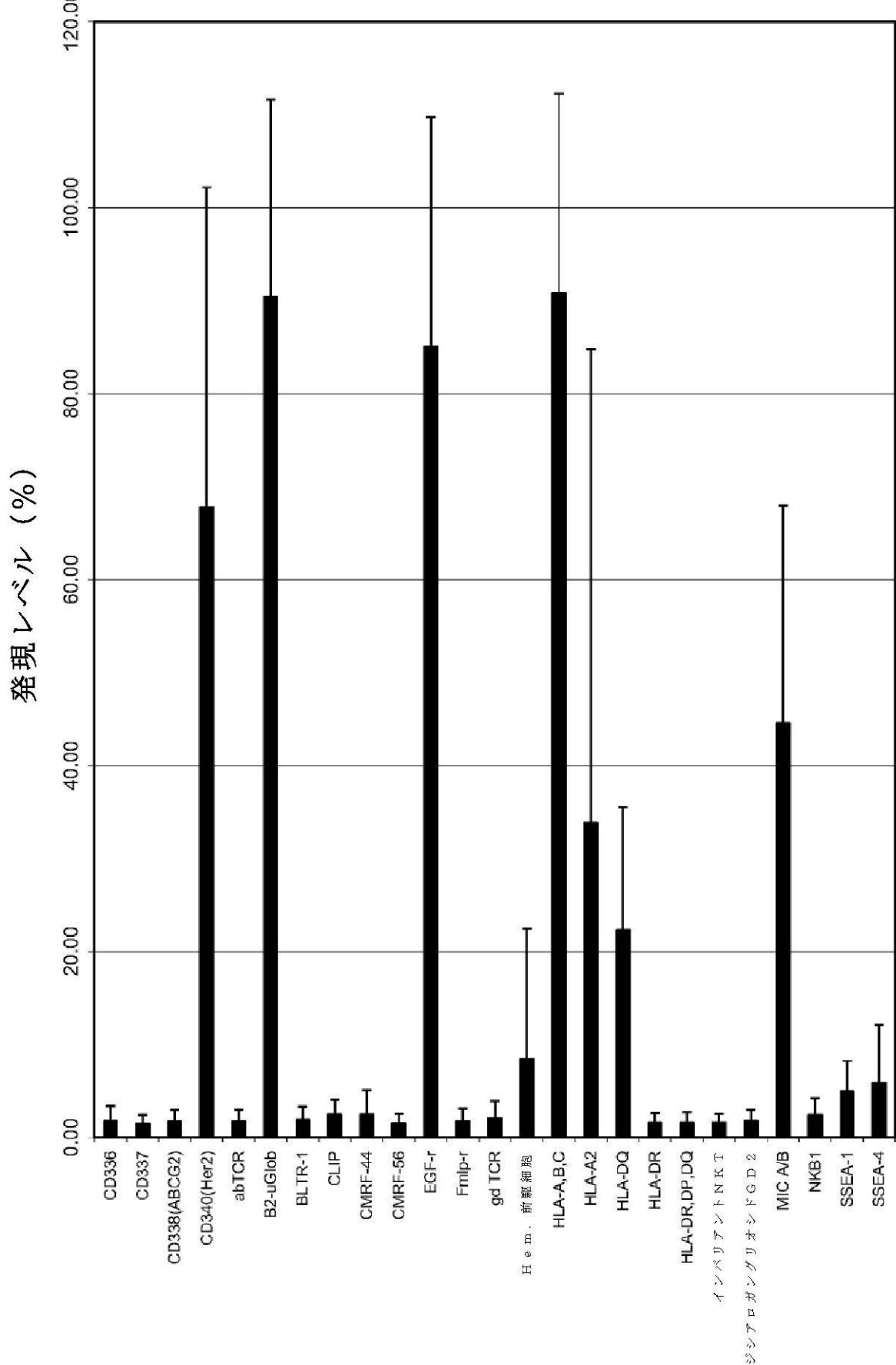
【図 13 G】



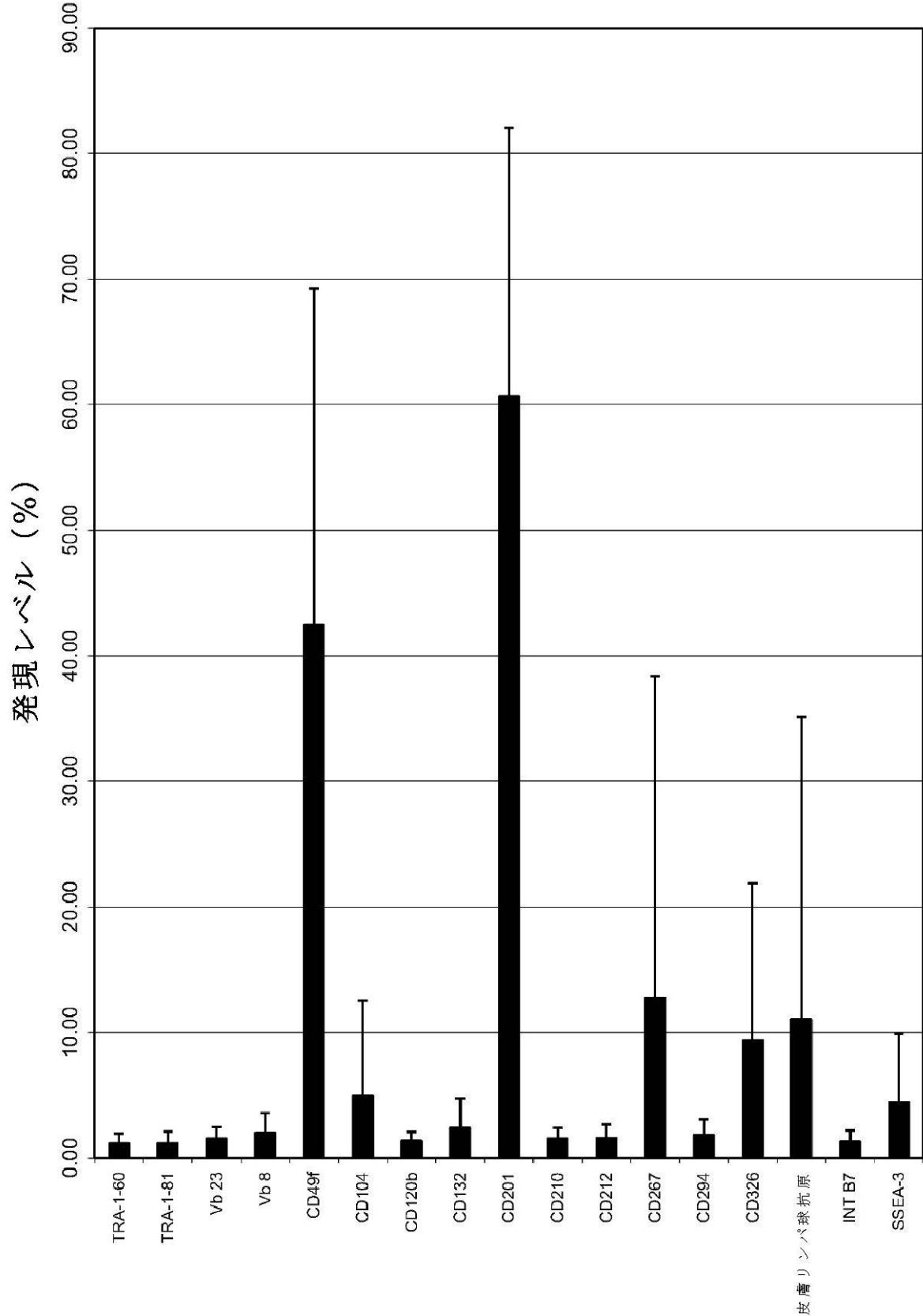
【図 13H】



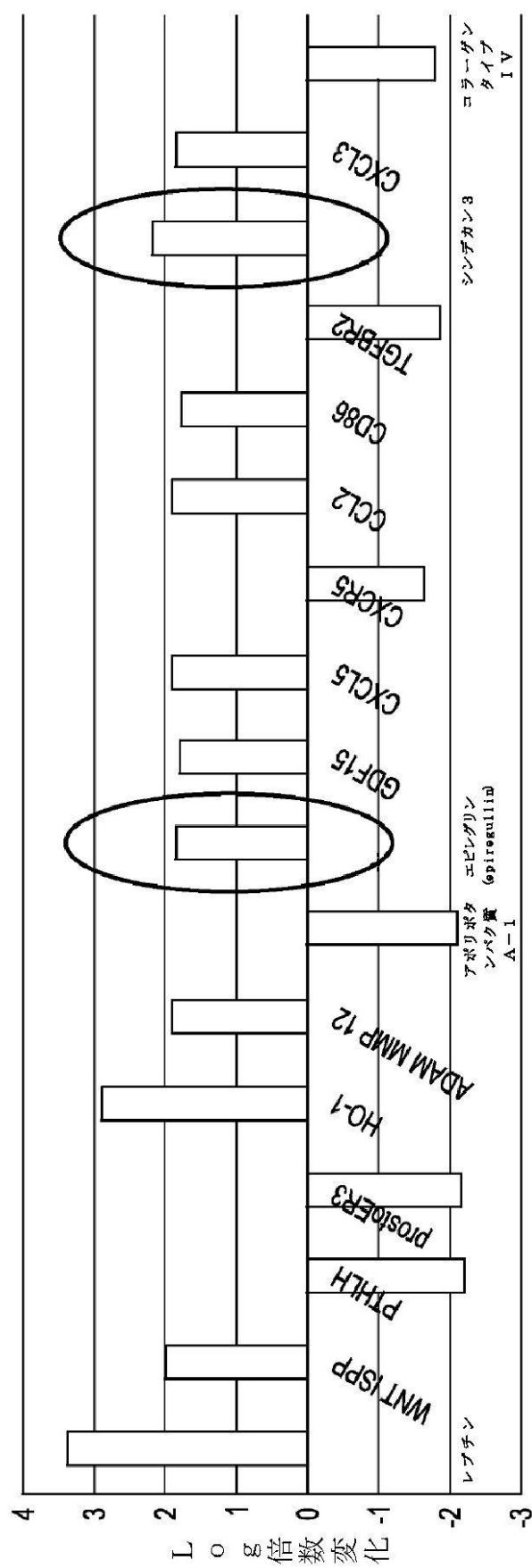
【図 1 3 I】



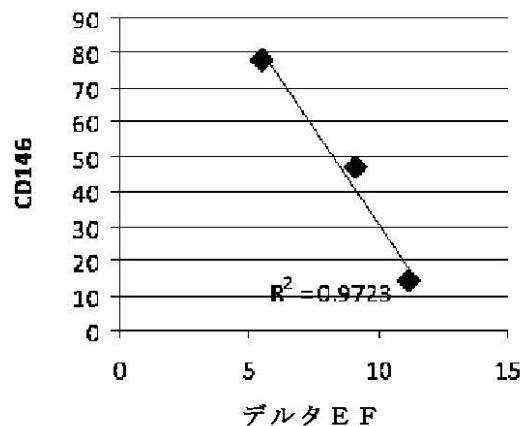
【図 13 J】



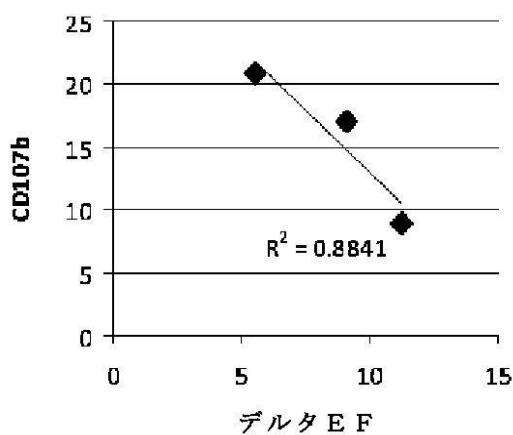
【図 1 4】



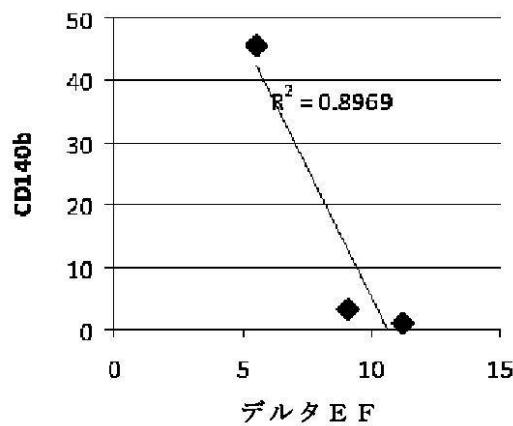
【図 15 A】



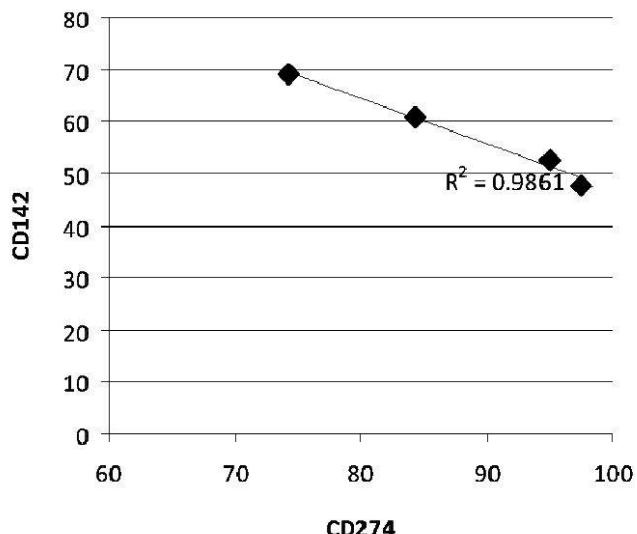
【図 15 B】



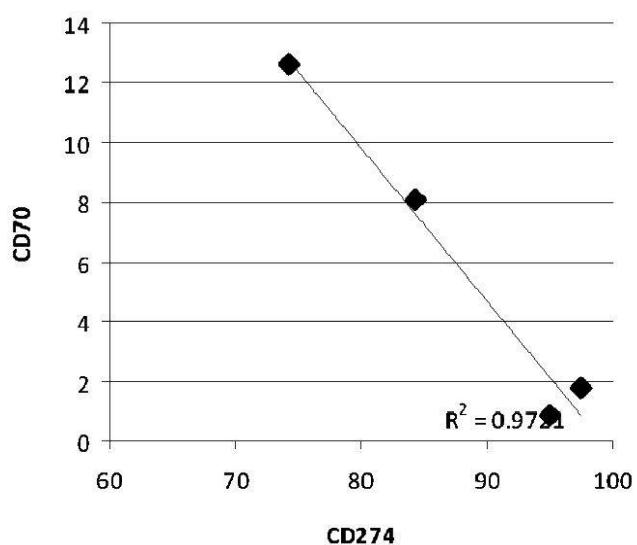
【図 15 C】



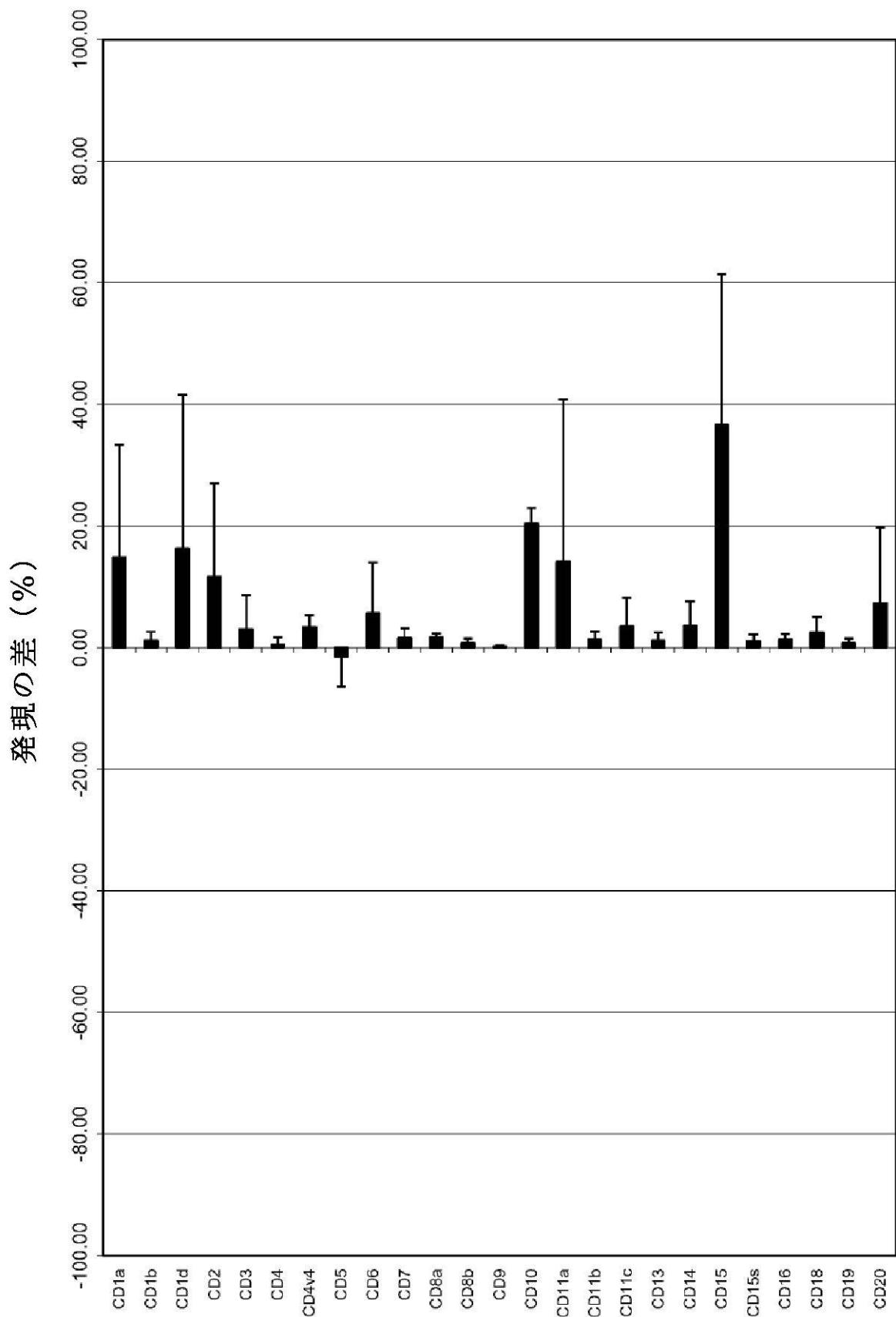
【図 16 A】



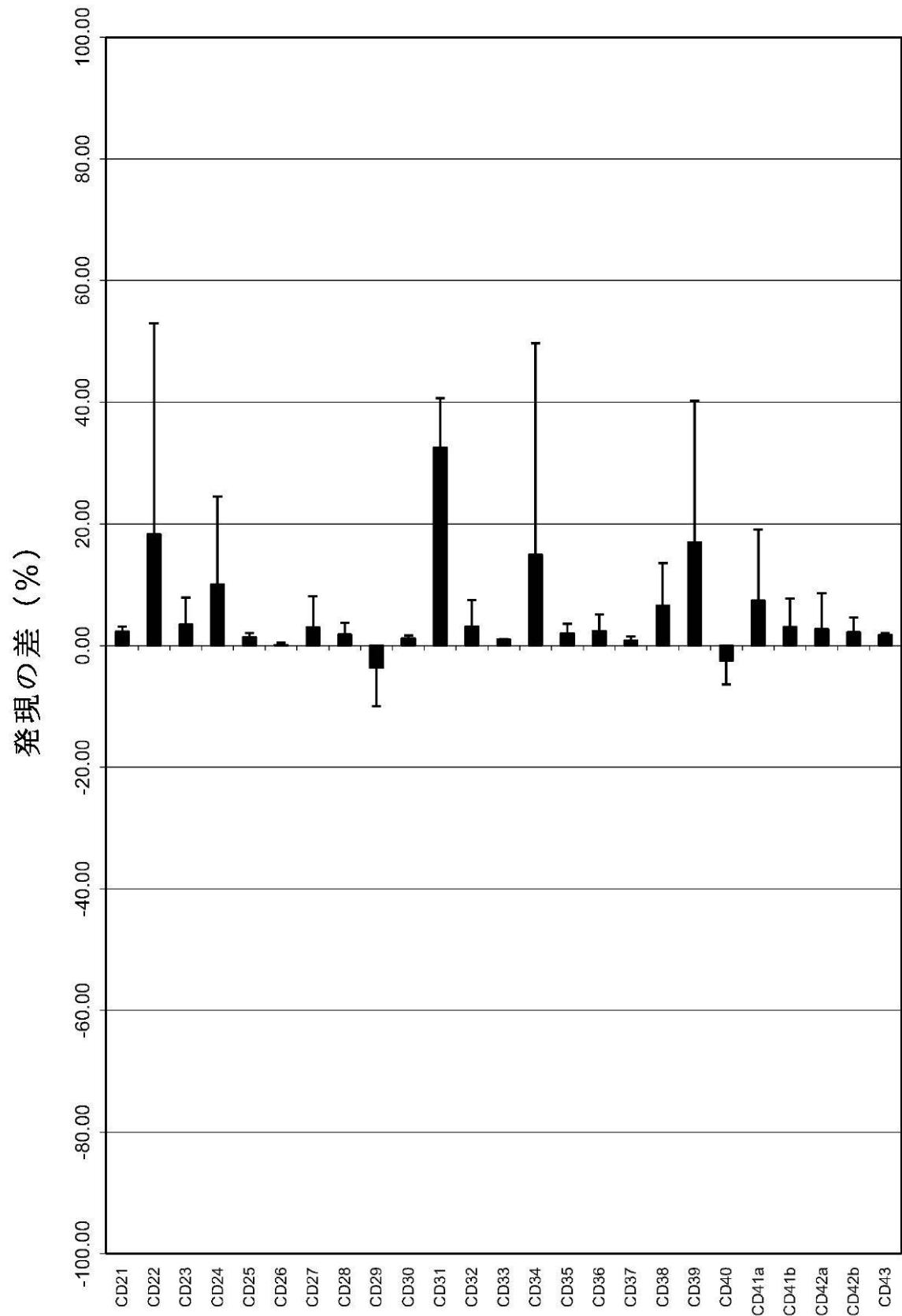
【図 16 B】



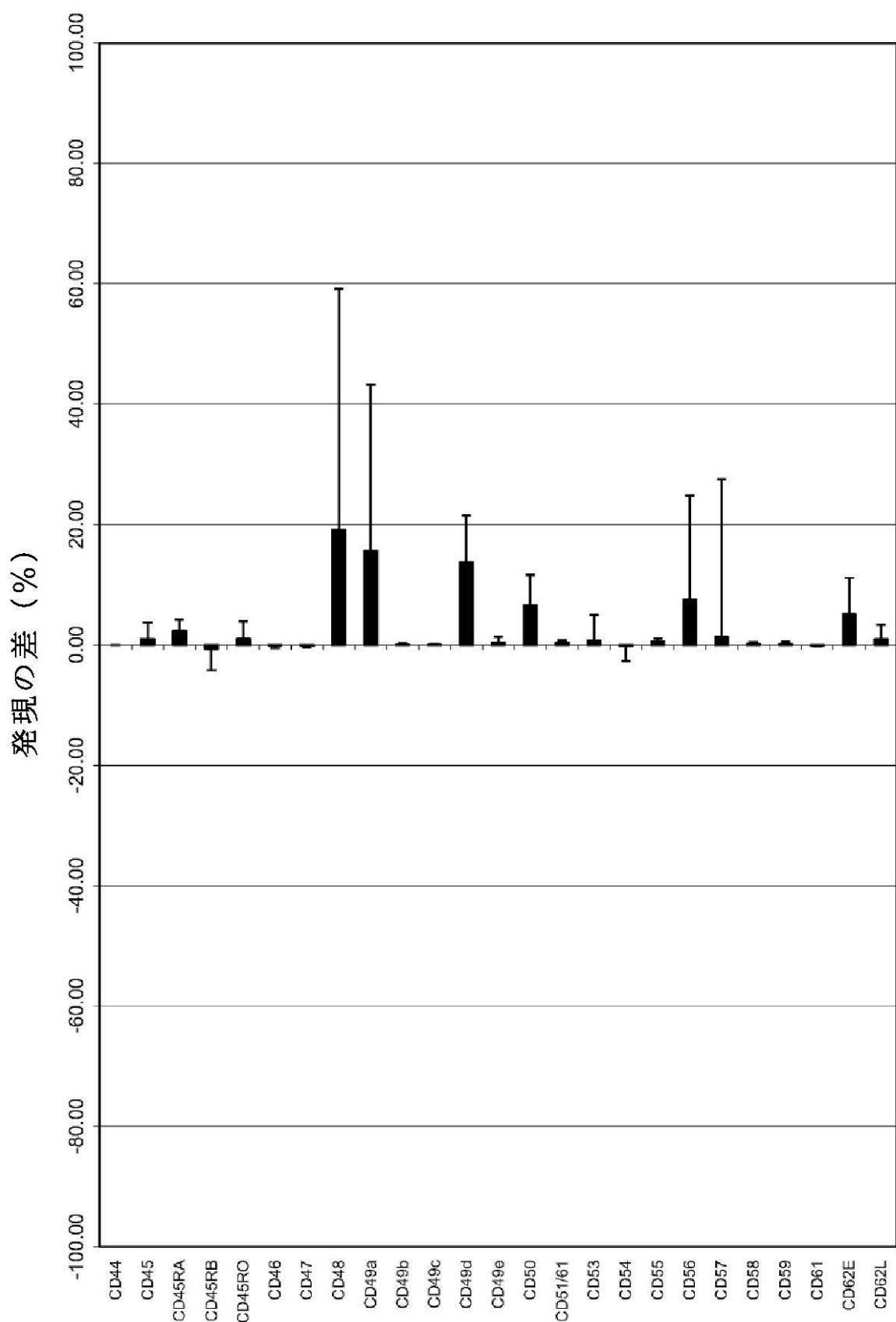
【図 17 A】



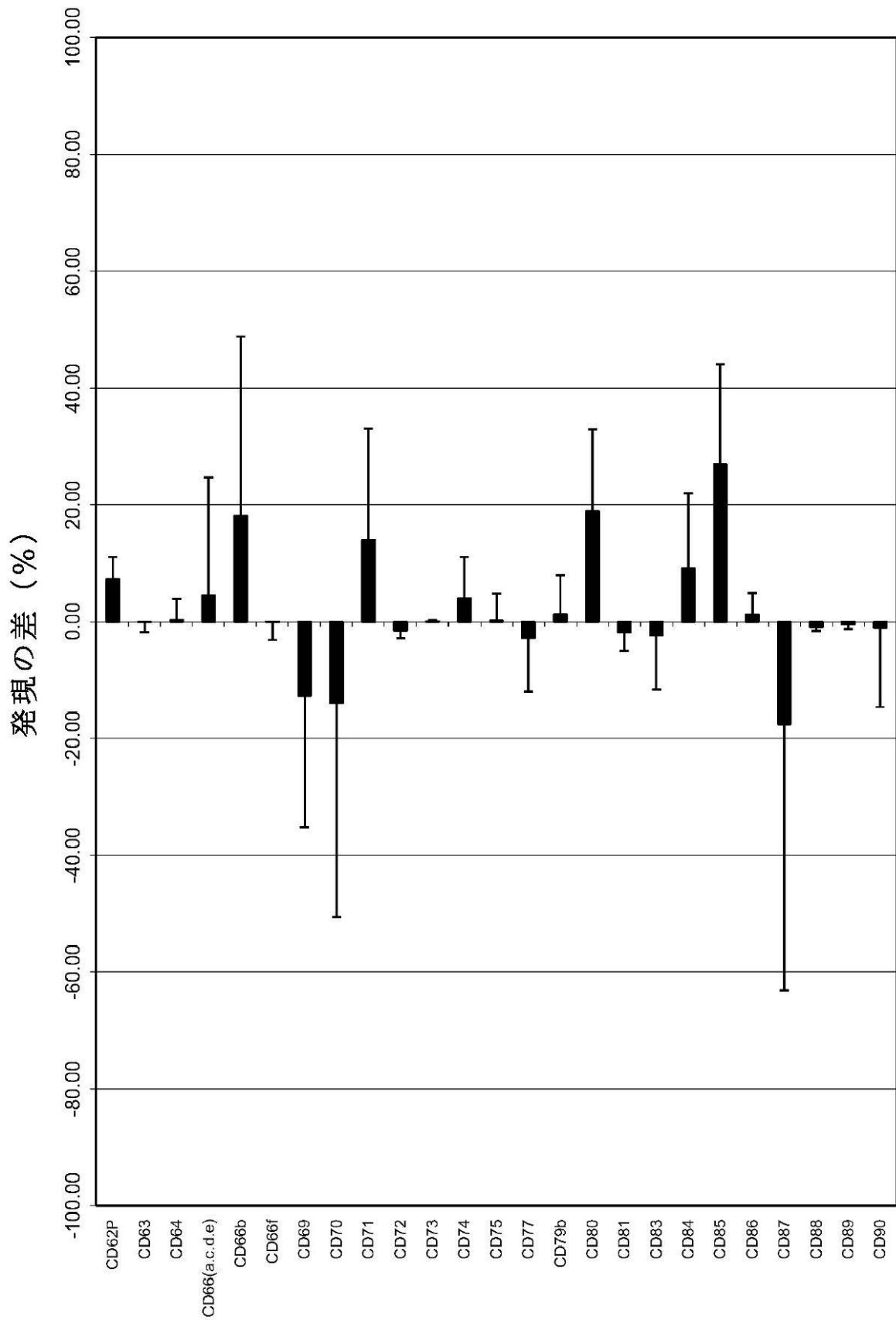
【図 17 B】



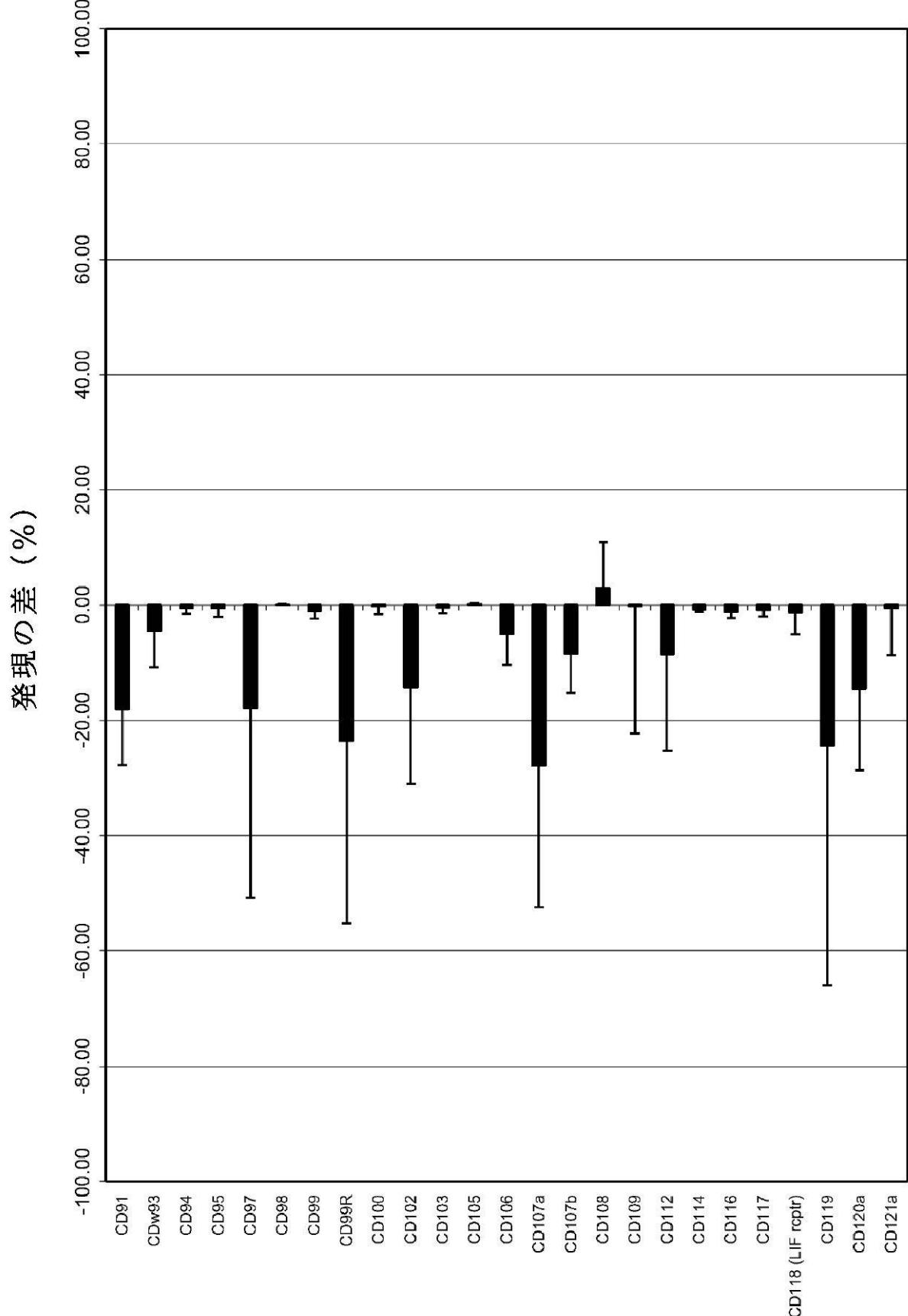
【図 17 C】



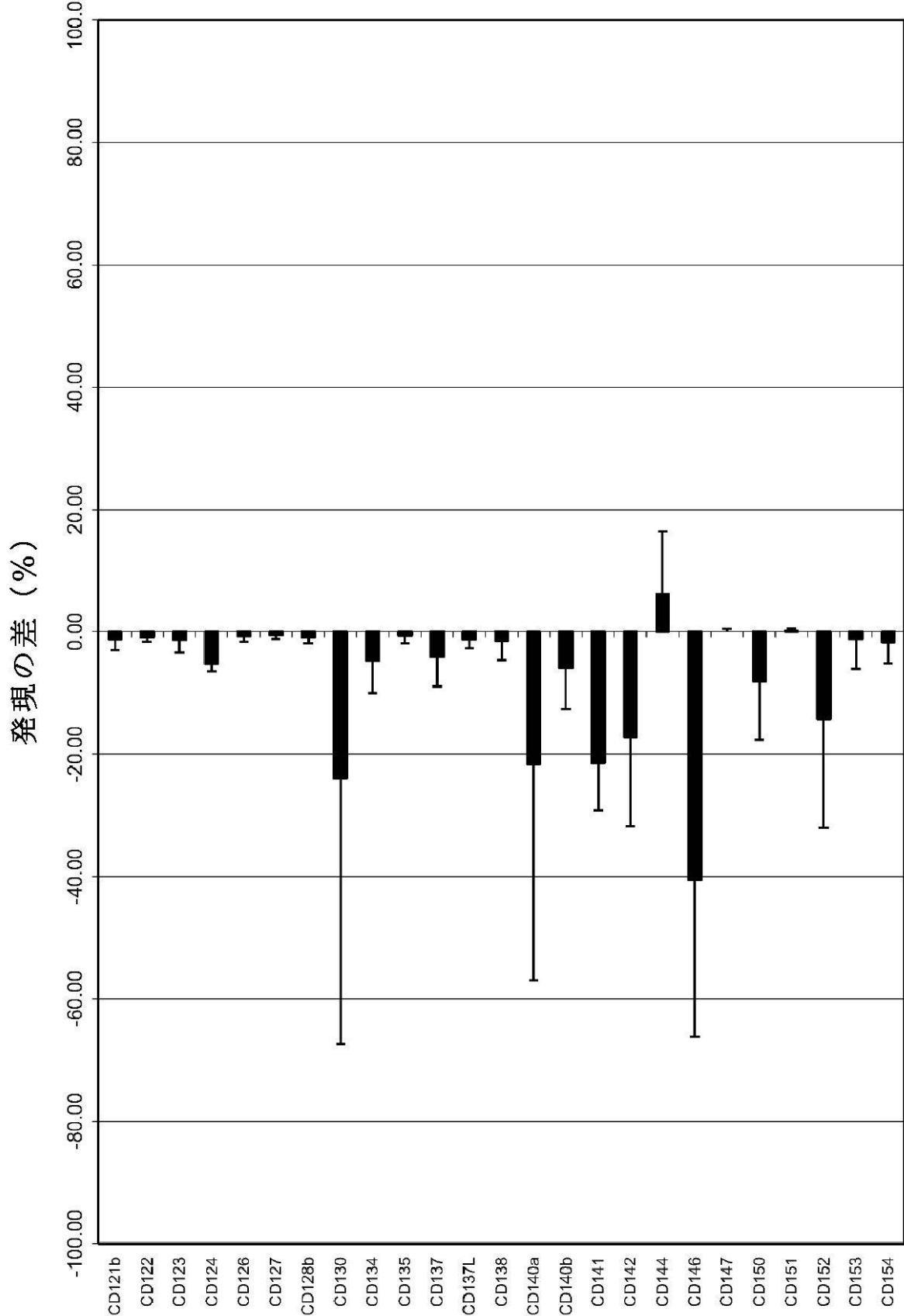
【図 17 D】



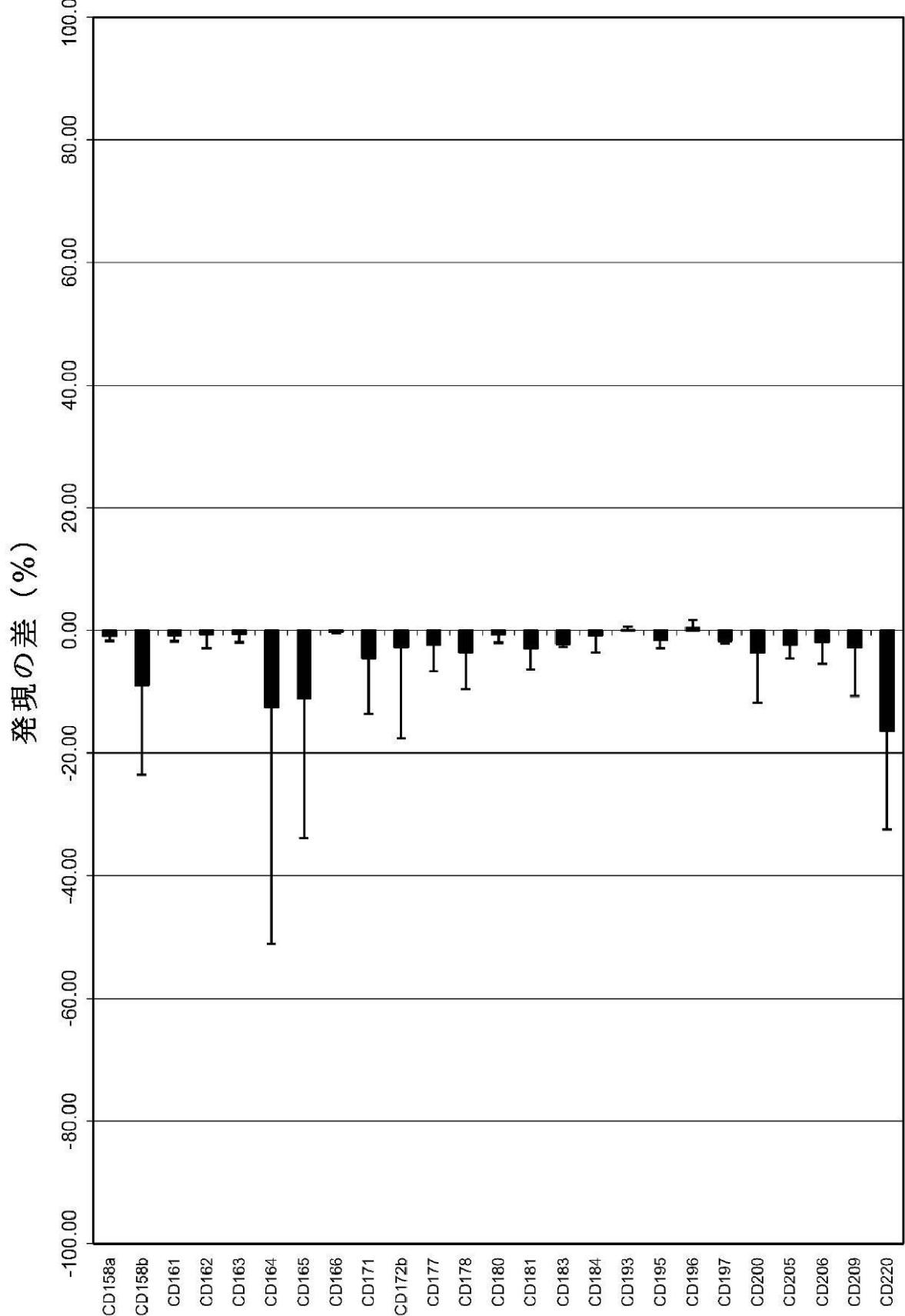
【図 17 E】



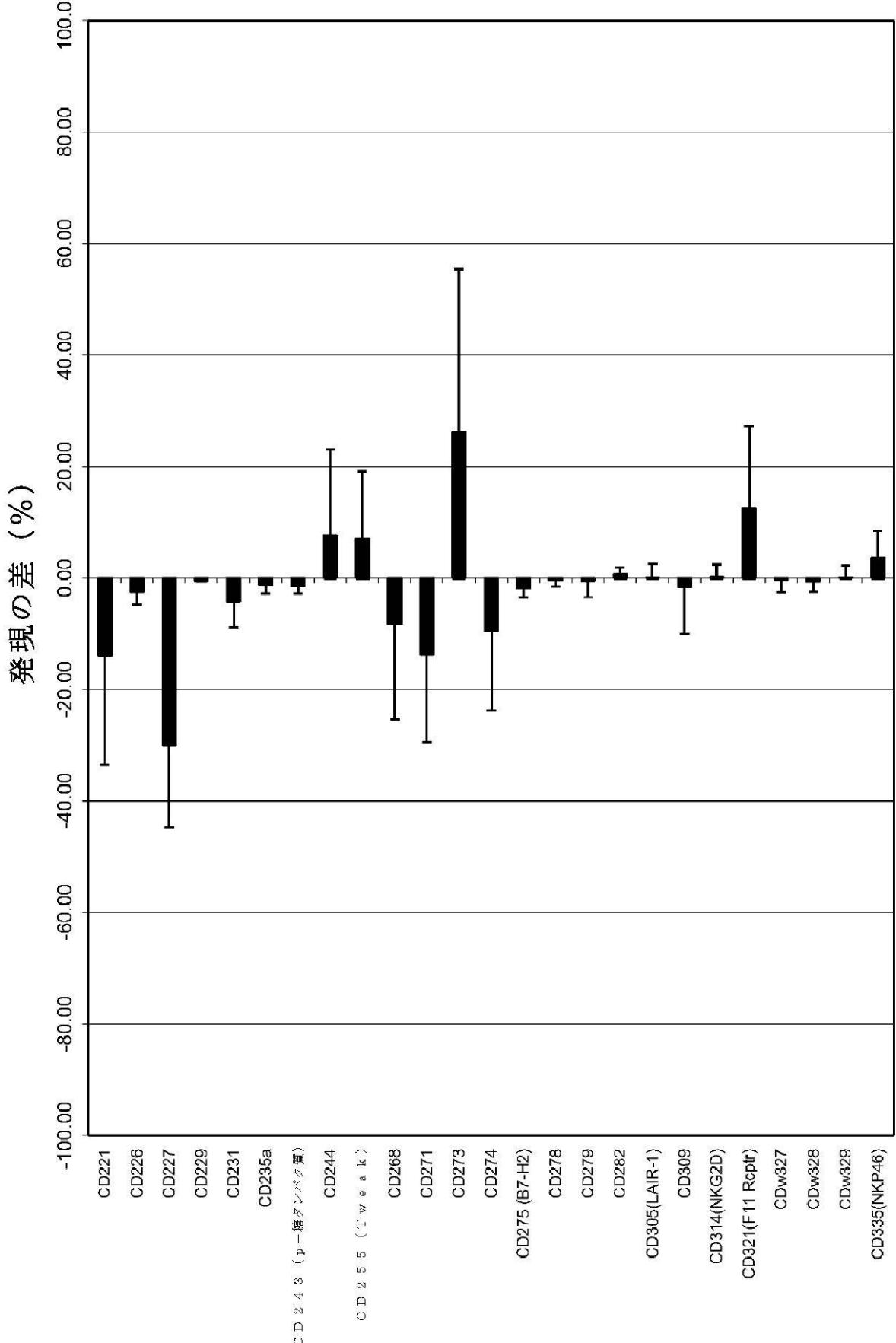
【図 17 F】



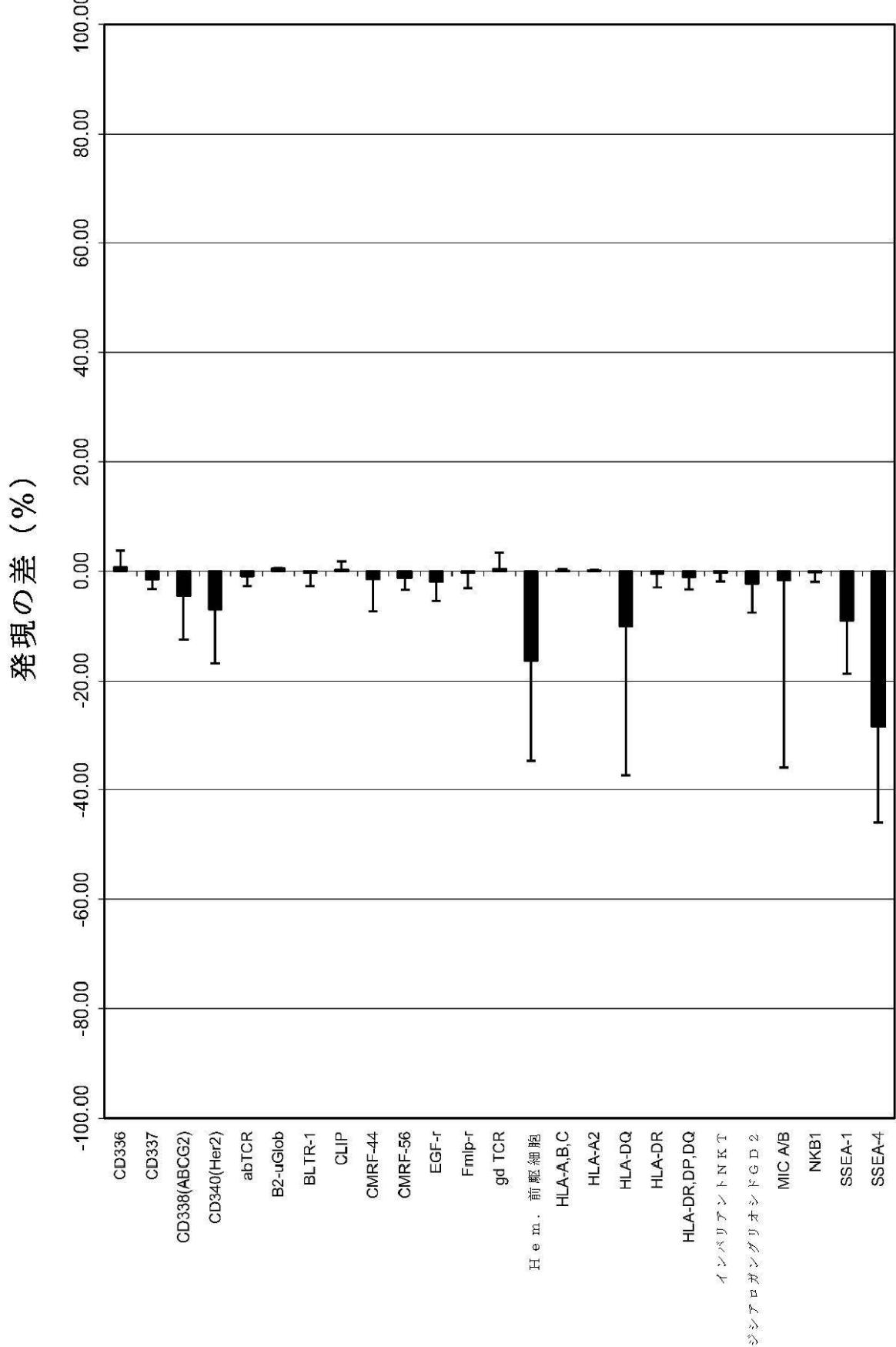
【図 17 G】



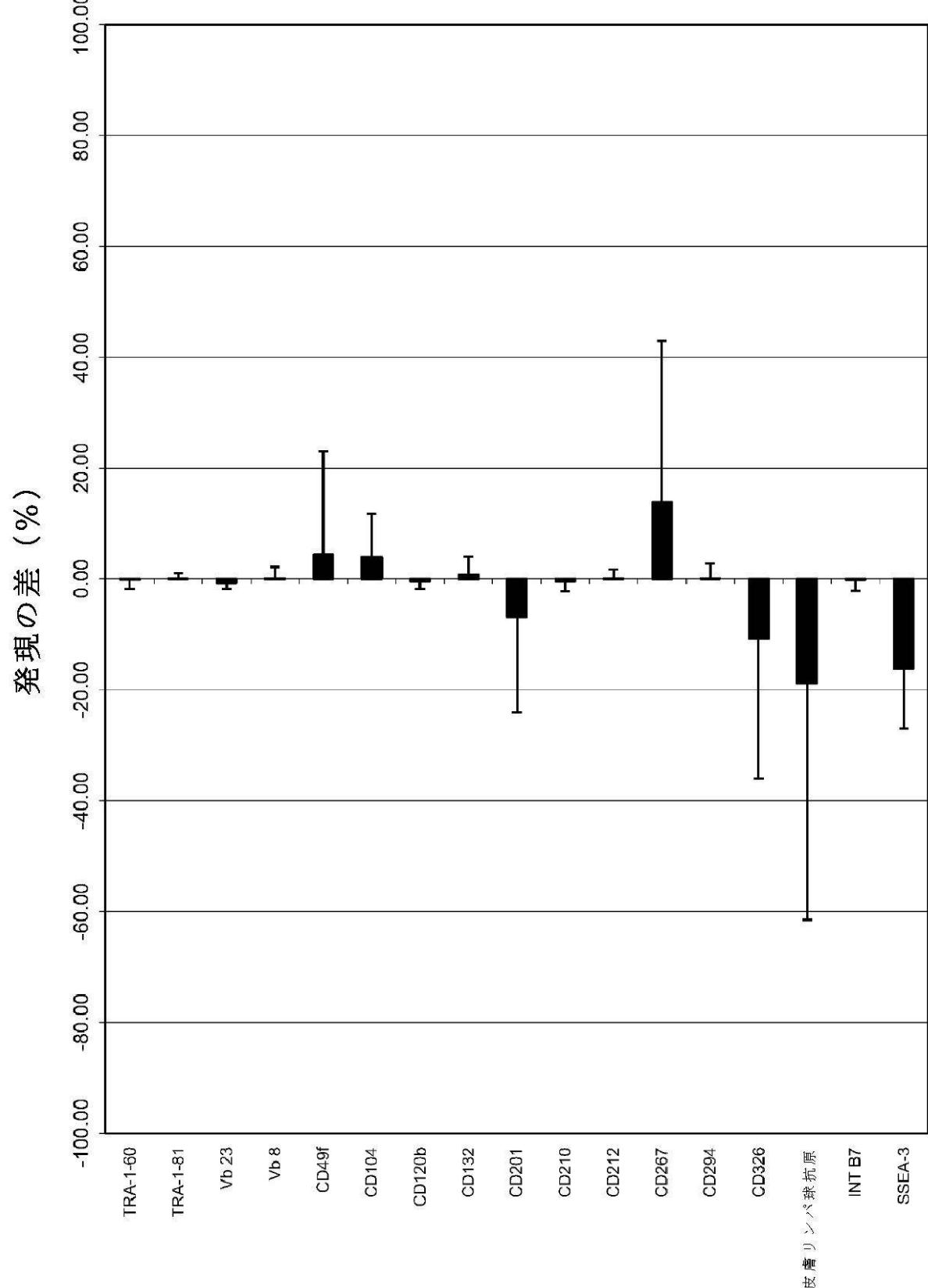
【図 17 H】



【図 17 I】



【図 17】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/43772

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 35/34, A61K 35/12, A61K 45/00, A61P 9/00, C12N 5/02 (2013.01)

USPC - 424/93.7, 435/366

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)

IPC(8) - A61K 35/34, A61K 35/12, A61K 45/00, A61P 9/00, C12N 5/02 (2013.01)

USPC - 424/93.7, 435/366

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 424/93.1, 435/325, 435/374, 435/378
(keyword limited; terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatBase, Google Scholar, ProQuest Dialog; Search terms: cardiosphere-derived cells, cardiosphere, stem cell, progenitor cell, filter, filtration, culture, explant, heparin, L-glutamine, migrate, cryopreserve, freeze, frozen, cut, mince, slice, cardio, cardiac, heart, intracoronary, allogeneic, allotransplant, allograft, homograft, purify, enrich,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 20110110897 A1 (SCHWARZ et al.) 12 May 2011 (12.05.2011) para [0039], [0073]-[0074], [0081], [00194], [00198]	1-2, 6-9, 11-13, 14-18/(1-2,6-9,11-13), 19-22
Y		3-5, 10, 14-18/(3-5,10)
Y	US 2011/0111412 A1 (TAI et al.) 12 May 2011 (12.05.2011) para [0016], [0051], [0056]-[0057], [0082]	3-4, 14-18/(3-4)
Y	US 2007/0020758 A1 (GIACOMELLO et al.) 25 January 2007 (25.01.2007) para [0019], [0038]	5, 10, 14-18/(5,10)
A	US 20080267921 A1 (MARBAN et al.) 30 October 2008 (30.10.2008) para [0006], [0049], [0056]-[0057]	1-22

Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

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

Date of the actual completion of the international search 15 October 2013 (15.10.2013)	Date of mailing of the international search report 08 NOV 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/10 (2006.01) A 6 1 P 9/10

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(74) 代理人 100112896

弁理士 松井 宏記

(72) 発明者 クレケ ミシェル

アメリカ合衆国 90230 カリフォルニア州 カルバー シティ ベロイト アベニュー 4
911

(72) 発明者 スミス レイ切尔

アメリカ合衆国 91423 カリフォルニア州 シャーマン オークス モース アベニュー
4915

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA93X AC20 BC41 BD09 BD18 CA44

4C081 AB11 BA12 CD34 EA02

4C087 AA01 AA02 AA03 AA04 BB47 CA04 MA65 NA20 ZA36