

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4441115号
(P4441115)

(45) 発行日 平成22年3月31日 (2010. 3. 31)

(24) 登録日 平成22年1月15日 (2010. 1. 15)

(51) Int. Cl.	F 1	
A 6 1 K 35/28 (2006. 01)	A 6 1 K 35/28	
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 L 27/00 (2006. 01)	A 6 1 L 27/00	G
A 6 1 P 19/08 (2006. 01)	A 6 1 L 27/00	U
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 19/08	

請求項の数 28 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-535733 (P2000-535733)	(73) 特許権者	500430486
(86) (22) 出願日	平成11年3月12日 (1999. 3. 12)		オシリス セラピューティクス, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2002-506082 (P2002-506082A)		アメリカ合衆国, 21231-2001
(43) 公表日	平成14年2月26日 (2002. 2. 26)		メリーランド, ボルチモア, アリスアンナ
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/005351		ストリート 2001
(87) 国際公開番号	W01999/046366	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開日	平成11年9月16日 (1999. 9. 16)		弁理士 小野 新次郎
審査請求日	平成18年3月7日 (2006. 3. 7)	(74) 代理人	100089705
(31) 優先権主張番号	09/039, 127		弁理士 社本 一夫
(32) 優先日	平成10年3月13日 (1998. 3. 13)	(74) 代理人	100075270
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト非自己間葉幹細胞を使用する方法と利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

間葉組織の再生のための医薬組成物の調製のための同種異系間葉幹細胞の使用法であって、前記同種異系間葉幹細胞が、受容者哺乳類に対する前記医薬組成物の投与の前に供与者哺乳類と前記受容者哺乳類とのMHCマッチング段階なしで前記供与者哺乳類から獲得されることを特徴とする同種異系間葉幹細胞の使用法。

【請求項 2】

受容者哺乳類がヒト被験者であり、同種異系間葉幹細胞が同種異系ヒト間葉幹細胞であることを特徴とする請求項 1 記載の使用法。

【請求項 3】

同種異系ヒト間葉幹細胞が、ヒト骨髄から回収されることを特徴とする請求項 2 記載の使用法。

【請求項 4】

組成物が、事実上無血球であることを特徴とする請求項 3 記載の使用法。

【請求項 5】

組成物が、受容者哺乳類における結合組織増殖を促進するのに使用されることを特徴とする請求項 2 記載の使用法。

【請求項 6】

組成物が、受容者哺乳類における骨形成を生成するためのものであることを特徴とする請求項 2 記載の使用法。

【請求項 7】

組成物が、受容者ヒト被験者における結合組織欠損を処置あるいは修復するためのものであることを特徴とする請求項 2 記載の使用法。

【請求項 8】

欠損が、骨欠損であることを特徴とする請求項 7 記載の使用法。

【請求項 9】

欠損が、軟骨欠損であることを特徴とする請求項 7 記載の使用法。

【請求項 10】

欠損が、骨格組織欠損であることを特徴とする請求項 7 記載の使用法。

【請求項 11】

組成物が、支質の増殖を促進するためのものであることを特徴とする請求項 2 記載の使用法。

【請求項 12】

組成物が、全身投与のためのものであることを特徴とする請求項 2 記載の使用法。

【請求項 13】

組成物が、静脈内投与のためのものであることを特徴とする請求項 2 記載の使用法。

【請求項 14】

組成物を調製するために使用される同種異系ヒト間葉幹細胞が、対象となる組み込み遺伝物質を発現することを特徴とする請求項 2 記載の使用法であって、ここで前記組み込み遺伝物質が副甲状腺ホルモン、インスリン、因子VIII、因子IX、ジストロフィン、アルファ1抗トリプシン、エリスロポイエチン、フェニルアラニンヒドロシキラーゼ、シスタチオニン シンターゼ、G - C S F、GM - C S F、組織プラスミノゲン活性化剤、カルシトニン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、およびアデノシンデアミナーゼから成る群より選ばれる、使用法。

【請求項 15】

組成物が、受容者哺乳類における筋組織増殖を促進することを特徴とする請求項 2 記載の使用法。

【請求項 16】

組成物が、受容者哺乳類への直接注射のためのものであることを特徴とする請求項 1 5 記載の使用法。

【請求項 17】

直接注射が、筋組織への直接注射であることを特徴とする請求項 1 6 記載の使用法。

【請求項 18】

受容者哺乳類に移植するための人工装具装置調製のための同種異系間葉幹細胞の使用法であって、ここで前記同種異系間葉幹細胞が、その増殖が促進される結合組織の型に幹細胞を分化させるのに適した条件下で、受容者哺乳類に移植される前記人工装具装置の結合組織表面に付着され、ここで前記同種異系間葉幹細胞が、前記組成物の投与の前に供与者哺乳類と前記受容者哺乳類とのMHCマッチング段階なしで前記供与者哺乳類から獲得されることを特徴とする使用法。

【請求項 19】

受容者哺乳類が、ヒト被験者であり、また同種異系間葉幹細胞が、同種異系ヒト間葉幹細胞であることを特徴とする請求項 1 8 記載の使用法。

【請求項 20】

同種異系間葉幹細胞が、ヒト骨髓から回収されることを特徴とする請求項 1 9 記載の使用法。

【請求項 21】

同種異系間葉幹細胞が、事実上無血球であることを特徴とする請求項 2 0 記載の使用法。

【請求項 22】

10

20

30

40

50

人工装具装置が、受容者哺乳類における結合組織増殖のためのものであることを特徴とする請求項 19 記載の使用法。

【請求項 23】

人工装具装置が、受容者哺乳類における骨形成を生成するためのものであることを特徴とする請求項 19 記載の使用法。

【請求項 24】

人工装具装置が、受容者ヒト被験者における結合組織欠損を処置又は修復するためのものであることを特徴とする請求項 19 記載の使用法。

【請求項 25】

欠損が、骨欠損であることを特徴とする請求項 24 記載の使用法。

10

【請求項 26】

欠損が、軟骨欠損であることを特徴とする請求項 24 記載の使用法。

【請求項 27】

欠損が、骨格組織欠損であることを特徴とする請求項 24 記載の使用法。

【請求項 28】

人工装具装置が、支質の増殖を促進するためのものであることを特徴とする請求項 19 記載の使用法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【技術分野】

20

この発明は 1998 年 3 月 13 日受理された合衆国特許出願番号 09 / 039 . 127 号を部分継承しその優先権を請求する。

【0002】

この発明は間葉幹細胞 (MSCs) を使用する各種の方法と産物に向けられる。

【0003】

【背景技術】

この発明の一つの見地に従って、ある動物は間葉幹細胞で処置され、ここで前記間葉幹細胞は処置される前記動物以外のある動物から獲得される。すなわち、前記間葉幹細胞は自己のものではない。

【0004】

30

より詳細には、この発明の一つの見地に従って、ある患者は同種異系ヒト間葉幹細胞で処置される。この用語はここで使用されるように、同種異系ヒト間葉幹細胞は間葉幹細胞の意図された受容者以外のヒトから獲得される。

【0005】

間葉幹細胞は表面 MHC 分子を発現するけれども、出願人は間葉幹細胞が免疫学上中性であり、従ってここで記載の通り細胞の受容者に有害な免疫応答を誘導することなく使用できることを発見した。

【0006】

加えて出願人は、間葉幹細胞の提供者が受容者に「適合」する必要がないことを発見した。

40

【0007】

この発明に従って、間葉幹細胞は免疫系に「不可視」であることが発見された。通常、異なった個体 (同種異系細胞) からの共存培養細胞は混合リンパ球反応 (MLR) で明らかにされるように T 細胞増殖に帰着する。しかしヒト間葉幹細胞を試験管内で同種異系 T リンパ球と接触させると、それは T 細胞による免疫応答を生成せず、つまり T 細胞は増殖せず、T 細胞が不適合の間葉幹細胞に応答しないことを示している。この発見は予期されなかったが、その理由は、ヒト間葉幹細胞がそれに免疫性を付与する表面分子のすべてを発現し、つまりそれは同種異系クラス I および II MHC 分子を発現するからである。

【0008】

間葉幹細胞が用量依存様式で混合リンパ液での同種異系 T 細胞応答を有効に減少させる

50

ことも発見された。また更に異なった提供者からの間葉幹細胞がMHC型に関して減少応答の特異性を明示しないことも発見された。かくして間葉幹細胞は、間葉幹細胞に対する同種異系反応T細胞の増殖応答を減少するために、混合リンパ球反応で標的細胞集団に適合するMHCである必要はない。

【0009】

【発明の開示】

同種異系間葉幹細胞を含むこの発明に基づく組成物は結合組織欠損の修復、再構築およびもしくは再生を促進するのに特に有用である。この発明の一つの見地に従って、同種異系間葉幹細胞は骨その他結合組織を処置する各種の方法と産物に利用することができる。

【0010】

も一つの見地において、この発明は造血細胞産生を高めるために同種異系間葉前駆細胞あるいは幹細胞を利用するための各種の方法と装置に関する。

【0011】

更にここに記載され発明の一つの見地において、同種異系間葉幹細胞は遺伝子操作（形質導入あるいは形質移入）される。形質導入細胞はそれを必要とする患者に、例えば遺伝子疾患あるいは疾病を処置するために投与することができる。

【0012】

この発明の方法および産物はそれが意図される受容者に対し同種異系である分離培養拡張間葉幹細胞を利用する。発明はそれにより限定されるものではないが、間葉幹細胞はここに記載された方法を利用する目的で十分な数の細胞を得るために、培養つまり試験管内で分離され、精製され、また拡張することができる。キャプランおよびヘインズワース、合衆国特許番号第5,486,359号、合衆国特許番号第5,197,985号、合衆国特許番号第5,226,914号、WO92/22584号を参照されたい。

【0013】

【発明を実施するための最良の手段】

かくして、望ましい実施例において、ヒト間葉幹細胞は受容者に対して同種異系の個体から採取された骨髓から得られる。望ましい実施例において、間葉幹細胞調製は実質的に純粋であり、つまり間葉幹細胞以外の同種異系細胞を少なくとも95%欠いている。

【0014】

対象となるヒト間葉幹細胞は骨髓もしくは他の間葉幹細胞源から得られる。骨髓細胞は腸骨稜、大腿骨、脛骨、脊髄、あるいは他の骨髓腔から得られる。ヒト間葉幹細胞の他の源は胚卵黄嚢、胎盤、臍帯、胎児および青年の皮膚、ならびに血液を含む。

【0015】

分離精製同種異系ヒト間葉幹細胞は特殊な培地で有糸分裂拡張を通じて未分化状態で成長できる。これらの細胞は機械的刺激、細胞的刺激および生化学的刺激を含む数多くの因子により骨、軟骨およびその他各種の結合組織に分化するために収穫され活性化することができる。ヒト間葉幹細胞は広範な間葉幹組織細胞並びに腱、靭帯、真皮を産生する骨芽細胞および軟骨細胞などの細胞に分化する潜在能力を持ち、この潜在能力は分離後もまた培養でのいくつかの集団拡張のために保持される。このように間葉幹細胞を分離し、精製し、大幅に増幅し活性化できることで、それらを骨、軟骨、腱、靭帯、筋、脂肪、骨髓支質などの骨格および結合組織のような望ましい特殊な型の間葉細胞に分化させることができるために、骨格とその他結合組織疾患を処置する高度に有効な方法が存在する。合衆国特許番号第5,197,985号を参照されたい。

【0016】

望ましい実施例では間葉幹細胞は使用の前に培養拡張されるが、このような間葉幹細胞を培養拡張なしで使用することも可能である。例えば、間葉幹細胞は骨髓から誘導され、そこで血球から分離後に使用することもある。かくして例えば、同種異系骨髓は血球を除去して同種異系ヒト間葉幹細胞で濃縮され、それを必要とする患者に例えば骨格修復のために導入される。

【0017】

10

20

30

40

50

かくしてこの発明の一つの実施例は同種異系間葉幹細胞の移植と分化を高めるための各種の方法と装置を提供する。従って、間葉幹細胞は、例えば結合組織の成長を促進するために、結合組織疾患の処置に使用することができる。結合組織という用語は特殊化された要素を支持する身体の組織を含むものとしてここで使用され、骨、軟骨、靭帯、腱、支質、筋、および脂肪組織を含む。

【0018】

この実施例の望ましい見地に従って、同種異系間葉幹細胞は骨格その他結合組織の疾患を処置する各種の方法と産物に使用することができる。この発明の方法と装置は分離された同種異系間葉前駆細胞を利用し、それはある種の条件の下で骨あるいは軟骨に入り細胞形成するように、分化して各種の型の望ましい結合組織を産生するよう誘導することができる。

10

【0019】

追加の見地において、この発明は処置およびもしくは診断目的のためにヒト同種異系間葉幹細胞あるいは前駆細胞を利用する各種の方法に向けられる。例えば同種異系ヒト間葉幹細胞あるいは前駆細胞は、(1)急性損傷、異常遺伝子発現または後天性疾病を通じて損傷を受けた間葉組織の再生、(2)同種異系間葉幹細胞を、間葉幹細胞を損傷組織部位に送達するのに適した生体適合性担体と組み合わせて処置することにより宿主の損傷間葉組織を処置し、(3)各種の間葉組織を産生し、(4)間葉幹細胞自己再生および委託間葉系列への分化と関連する成長因子を検知し評価し、(5)特異的間葉系列への間葉幹細胞委託と分化を調節する阻害因子を検知し評価し、また(6)間葉細胞系列を発展させ間葉組織発展と関連する因子を検定することに利用される。

20

【0020】

同種異系間葉幹細胞の用量は広い範囲内で変化し、各特定の事例で勿論個体の要求に適合するであろう。使用される細胞数は受容者の重量と疾患および従来技術に習熟した人に既知の他の変数に依存するであろう。細胞は治療される特定の組織あるいは器官に適したルートにより投与することができる。細胞は例えば非経口、静脈内注射により全身に投与できる。大抵の場合、同種異系間葉幹細胞は望ましい処置の部位に送達され、また骨髄などの特定の組織あるいは器官を目標とすることができる。

【0021】

細胞は約 $0.5 \sim 5 \times 10^6$ 細胞 / ml の濃度で適切な希釈剤に懸濁できる。このような溶液の適当な賦形剤は緩衝生理食塩水などのような受容者と生物学的にも生理的にも適合するものである。他の賦形剤は水、等張共通食塩水、アルコール、ポリオール、グリセリン、植物油を含む。投与のための組成物は適当な無菌性と安定性を満たす標準方法に従って処方され、産生され貯蔵されねばならない。

30

【0022】

ヒト間葉幹細胞は細胞の皮下移植を経由して、あるいは幹細胞の注射により、例えば筋細胞に投与できる。

【0023】

も一つの見地はにおいて、この発明は結合組織損傷を修復する方法に関する。この方法は同種異系間葉幹細胞あるいは前駆細胞含有抽出物を修復に必要な結合組織の型に細胞を分化するのに適した条件の下で結合組織損傷区域に適用する段階よりなる。

40

【0024】

この見地の更なる実施例において、この方法は人工装具装置の骨格組織への移植を高める方法に向けられる。この方法は同種異系間葉細胞あるいは前駆細胞人工装具装置の結合表面に付着し、細胞を分化するのに適した条件の下でこれらの間葉細胞を含む人工装具装置を移植を必要とする骨格あるいは結合組織の型に移植する段階よりなる。

【0025】

この発明はそれを必要とする個体に骨形成を増強する方法を提供する。かくしてこの発明のこの見地の方法はトラウマ(外傷)、疾病年齢、出生時欠損、手術介入などに起因して生じる正常な結合組織と比較される何らかの損傷あるいは異常を含む「結合組織欠損」

50

に適用できる。より詳細には、この発明は分節性骨欠損、偽関節、変形治癒あるいは遅滞癒合の修復を行う方法を提供する。ここで使用されるように、「結合組織欠損」は更に骨形成が例えば美容整形にのみ望まれる損傷のない領域にも関連する。ここで開示される方法と材料は従って整形外科、歯科、口腔、顎顔面、歯根膜その他外科手順での使用に適している。

【 0 0 2 6 】

この発明はまた結合組織疾患を補正しあるいは修飾するために同種異系間葉前駆細胞あるいは幹細胞を利用する方法に指向される。かくしても一つの見地において、この発明は同種異系間葉幹細胞あるいは前駆細胞を骨あるいは軟骨形成細胞などの望ましい表現型の特殊な型に分化するよう誘導するために開発された各種の装置および因子に指向される。例えば発明者は各種の多孔トリカルシウムあるいはヒドロキシアパタイトセラミック装置が、同種異系間葉幹細胞あるいは前駆細胞を骨格欠損に移植し、それにより細胞の骨格組織への細胞の分化を可能にしおよびもしくは促進する時に同種異系間葉幹細胞あるいは前駆細胞の担体あるいはキャリアとして利用することができる。

10

【 0 0 2 7 】

かくしてこの発明の一つの実施例は、リン酸トリカルシウムあるいはヒドロキシアパタイトもしくはこの2種の組合せよりなる多孔セラミック組成物を間葉幹細胞あるいは前駆細胞の担体あるいはキャリアとして使用し、これら細胞が骨格欠損に移植された時に細胞の骨格組織への分化を促進する方法に指向される。

20

【 0 0 2 8 】

も一つの実施例において、この発明は、同種異系間葉幹細胞と併用して吸収可能ゼラチン、セルロース、およびもしくはコラーゲンベース基質を使用する方法に指向される。この組成物はスポンジ、帯条、パウダ、ゲル、ウェブ、あるいは他の物理的形状の形態で使用できる。

【 0 0 2 9 】

各種の代替的担体が結合組織の修復のためにヒト間葉幹細胞の送達に使用される。この組成物は新しい骨あるいは軟骨形成にかさと足場を提供するために損傷組織用のパッチとして設計される。ここに記載される各種の組成物、方法および材料は、この発明に従って、新しい骨折、偽関節骨折の修復を刺激し、脊椎固定を促進するために使用できる。合衆国特許第5,197,985号を参照されたい。同様に軟骨および他の筋骨格組織の修復も実行できる。脊椎固定の場合には、このような組成物、方法と材料は板と横突起に沿って量癒合を促進するため器具ありもしくはなしで後で使用でき、更に先には椎体間癒合を促進するため癒合ケージを充たすために使用することができる。同種異系間葉幹細胞を使用するこの発明の方法は、全関節置換および骨粗鬆症を処置するために使用することができる。

30

【 0 0 3 0 】

この発明のも一つの見地に従って、間葉幹細胞は骨髓支質を産生するために使用することができる。骨髓支質は血球合成、すなわち造血に向け支持する足場ならびに可溶因子を提供する。従って発明のこの見地は、例えば、骨髓が強烈な照射および化学療法の間で骨髓が激減しあるいは破壊される場合に、例えば骨髓あるいは末梢血から誘導された造血前駆細胞を使用することによって患者の血球および骨髓組織再生を改良するための方法に向けられる。

40

【 0 0 3 1 】

従って一つの実施例において、この発明は同種異系間葉幹細胞を造血幹細胞あるいは前駆細胞の移植を高めるために間葉幹細胞を使用する方法と産物を提供する。

【 0 0 3 2 】

かくしてこの発明の一つの実施例は同種異系間葉幹細胞を用いることにより骨髓組織の再生を高めるための方法を提供する。造血幹細胞移植あるいは前駆細胞移植値を高める方法は、(i)同種異系間葉幹細胞、および(ii)造血幹細胞あるいは前駆細胞をこれを必要とする個体に投与することによりなり、ここで、前記間葉幹細胞は個体にあるそのよ

50

うな造血幹細胞あるいは前駆細胞の移植を促進するために有効な量で投与される。より詳細には、この発明の一つの実施例は、間葉幹細胞が全身に投与された場合に、それが骨髓腔に移動しあるいは進み、骨髓支質を再生する方法に指向する。同種異系間葉幹細胞は全身に、例えば静脈内に、各種の送達部位にもしくは直接骨の中に投与できる。

【0033】

この見地で更に考慮されるのは、造血幹細胞あるいは前駆細胞と関連して同種異系間葉幹細胞を患者に注射するタイミングに指向される。一つの実施例において、間葉幹細胞は造血幹細胞あるいは前駆細胞と同時に注射される。も一つの実施例では、間葉幹細胞は造血幹細胞あるいは前駆細胞の投与の前あるいは後に投与される。造血幹細胞は自己由来のものであり、あるいは同種異系細胞に適合するものである。

10

【0034】

この発明は癌の処置に骨髓移植の効果を高めるのに有用である。X線照射あるいはアルキル化治療は骨髓微環境ならびに造血幹細胞を破壊する。現在の治療はこれまで収獲され冷凍保存された骨髓を用いて骨髓切除後に患者に移植するものである。しかし骨髓微環境が破壊されるために、骨髓生体移植は支質環境が回復するまで遅延する。この結果、この発明の限界の見地は骨髓組織の支質再構築と再生の過程を促進する分離精製培養拡張同種異系間葉幹細胞を移植するという利点に指向する。

【0035】

間葉幹細胞薬剤の投与モードは必ずしもそれに限定されないが、全身静脈内注射および意図された活性部位への直接の注射を含む。薬剤は注入あるいはボラス注射などいずれかのルートで投与することができ、また他の生物活性剤と共に投与できる。投与は全身であることが望ましい。

20

【0036】

発明のこの見地において、間葉幹細胞は単独で投与できるが、望ましい実施例では間葉幹細胞は薬理組成物の形態で利用される。このような組成物は同種異系間葉幹細胞の治療有効量と、薬理許容担体あるいは賦形剤よりなる。このような担体は必ずしもそれに限定されないが、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、およびこれらの組合せを含む。その構成は投与のモードに適するものでなければならない。

【0037】

望ましい実施例において、間葉幹細胞薬剤あるいは組成物は、人間への静脈内投与に適した薬理組成物として日常的手順に基づいて構成される。典型的には、静脈内注射に適した組成物は無菌等張水緩衝液の溶液である。必要とあれば、この組成物は更に注射の部位で何らかの疼痛を改善する局所麻酔薬を含む。一般に成分は別個にあるいは単位用量形態に混合されたもののいずれかで、例えば活性剤の量を示すアンプルのような密封容器での冷凍保存濃縮物として供給される。組成物が注入で注入投与される場合は、それは無菌薬剤グレードの水あるいは食塩水を含む輸液ボトルで調合される。組成物が注射で投与される場合には、注射用無菌水のアンプルあるいは食塩水が準備され成分は投与の前に混合される。

30

【0038】

この発明の方法は特に(1)間葉幹細胞の注射と組織の移植の間の時間間隔を増減し、(2)注射される間葉幹細胞の量を増減し、(3)間葉幹細胞注射の数を変化させ、あるいは(4)間葉幹細胞の送達方法を変化させることにより変更することができる。

40

【0039】

間葉幹細胞薬剤は受容者の造血細胞あるいは前駆細胞の移植を促進するのに有効な量で使用される。一般にこのような量は体重キログラム当たり少なくとも 1×10^4 間葉幹細胞であり、大抵の場合は $3 \times 10^6 / \text{kg}$ を必要としない。望ましくは、それは移植導入に先立ち少なくとも約 1×10^6 間葉幹細胞/ kg であり、通常 2×10^6 間葉幹細胞/ kg 以上を必要としない。同種異系間葉幹細胞薬剤は移植導入の少なくとも約7日前、しかし一般的には30日前以内に造血幹細胞あるいは前駆細胞と同時に投与される。間葉幹細胞調剤は望ましくは1日1乃至3回静脈内で投与され、最適効率と薬理用量に適合するよう

50

調節される。

【0040】

この発明は更にこの発明の薬理調剤の1個もしくはそれ以上の成分を充填した1個もしくはそれ以上の容器よりなる薬剤パックあるいはキットを提供する。このような容器と関連して、薬剤産物あるいは生物学産物の製造、使用、販売を規制する政府機関の指示した形の通達があり、この通達はヒトへの投与のための製造、使用、販売についての政府機関の承認を反映するものとなる。

【0041】

この発明は、間葉幹細胞の源が受容者のみのものであり、その源が受容者に適合するかどうかを必要としない各種の処置に間葉幹細胞が使用されるということでとりわけ有利である。更にこのような間葉幹細胞は免疫抑制薬の長期投与を必要とせずに使用される。

10

【0042】

また、更なる見地において、この発明はまた、生理的或いは薬理的活性タンパク質を発現するためもしくは遺伝子処置での使用のために特に対象となる遺伝子とその内で運ぶ遺伝子操作細胞としての同種異系ヒト間葉幹細胞の適用に向けられる。

【0043】

この発明のこの見地に従って、同種異系ヒト間葉幹細胞あるいは前駆細胞は外因性遺伝子産物の発現のための宿主細胞として使用することができる。これらの培養拡張細胞は骨髄を目標として向かい骨髄移植環境で造血回復力を高める。更にこれらの細胞は細胞処置のために操作され、例えば拡張され、精製され、選択され臨床用途で保持され、一方その前駆体表現型を維持することができる。この操作の部分はこのような細胞よび将来の使用のための冷凍保存を特徴付けるものである。

20

【0044】

形質転換同種異系幹細胞と組み込み遺伝子材料の発現産物が単独であるいは他の細胞およびもしくは組成物と併用して使用できることも考慮される。

【0045】

外部遺伝子をこれら前駆細胞培養に導入するために使用された技術は、例えば合衆国特許番号5,591,625号に記載されており、すべての細胞の子孫が新しい遺伝物質を運ぶ形質導入間葉幹細胞を提供する。形質転換細胞の細胞送達には骨膜、骨髄、筋および皮下部位への注入および直接注射を含む各種のモードを通じて実行される。

30

【0046】

この発明のこの見地のおかげで遺伝子は同種異系間葉幹細胞に導入され、後者は次いで遺伝子発現がその処置利益を達成する患者に投与される。このような適用の例は、間葉幹細胞の保持、組織の成長、外部遺伝子産物の再モデル化、修復および生体内産生で中心的役割を持つ遺伝子を含む。

【0047】

遺伝子疾患の補正に加えて、この発明のこの見地はある遺伝子産物の発現の増強を可能とするために必須遺伝子の追加コピーを標的方式で導入することができる。これらの遺伝子は例えば、ホルモン、基礎タンパク質、細胞膜タンパク質サイトカイン、細胞培養分子、解毒酵素、組織修復に重要な「再構築」タンパク質などであることができる。正常間葉幹細胞は異常間葉幹細胞を治療するために提供できる。

40

【0048】

追加の適用は同種異系間葉幹細胞の表現型とその分化された子孫を特異的治療用途に変更する導入遺伝子の使用である。これは細胞内遺伝子産物、シグナル形質導入分子、細胞表面タンパク質、細胞外遺伝子発現産物およびホルモンレセプターを含む。このような処置が用途を持つ疾病状態および手順は、筋骨格系の遺伝子疾患、骨や軟骨の疾病、骨髄、炎症状態、筋変形症、悪性疾患、自己由来もしくは同種異系骨あるいは骨髄移植を含む。

【0049】

一つの実施例で、分離ヒト間葉幹細胞は望ましくは遺伝子治療産生細胞になるようにウイルス配列をパッケージできる翻訳産物を発現できる少なくとも1個のDNA配列で形質

50

転換された間葉幹細胞である。この見地の望ましい実施例において、分離ヒト間葉幹細胞はレトロウイルス 5' LTR、およびその転写調節の下で少なくとも1個のレトロウイルス gag, pol あるいは env 遺伝子よりなる DNA 配列で形質転換される。も一つの見地において、分離ヒト間葉幹細胞は、レトロウイルスパッケージングシグナルと配列、および インコンピテントレトロウイルスになるようにそのプロモーターの制御の下で発現される組み込み遺伝物質よりなる DNA 配列で形質転換されている。更に考慮されるべきは造血を開始し、調節しあるいは増強する委託ストローマ芽細胞の形質移入である。

【0050】

事実間葉幹細胞あるいは組織のすべての遺伝子損傷は、この技術で治療あるいは「修正」され得る。主要な成分は、幹細胞が組織空間を拡張し再び住みつくと条件下で適切な組織に遺伝子運搬幹細胞を送達する能力である。同種異系間葉幹細胞へのための患者の準備は、必ずしもされに限定されないが、(a) 骨髄移植と併用する化学療法およびもしくは照射による骨髄切除、と (b) とりわけ形質導入細胞生存の利益、分化の間の利益あるいは機能における利益 (筋ジストロフィーなどの筋疾患をジストロフィンもしくは類似の遺伝子で修正する事例のような場合) を持つ場合に薬剤なしで「形質導入」細胞の直接組織浸潤を含む。追加の用途は生体内にのみ準備され、あるいは留置装置、例えば骨格整形装置などに使用される間葉幹細胞の放射性同位元素による識別にあり、ここで間葉幹細胞を「標識」し、その生存、維持、分化ならびに時間をかけての装置との関連を観察することは興味深いものである。

【0051】

発現されるタンパク質をコードする外因性遺伝物質で形質移入された同種異系ヒト間葉幹細胞により提供される利点は、(a) 投与される個体以外の各種の源から得られたヒト間葉幹細胞を個体に利用する能力、(b) これらの遺伝子運搬間葉幹細胞を逆免疫応答を誘導することなく患者の適切な組織に運び、かくして細胞の投与の前に免疫抑制療法の必要を最小にする能力、(c) 間葉幹細胞が間葉組織空間に局在化する場所で注入のためのヒト間葉幹細胞を培養拡張する能力、(d) 安定した相続遺伝子移転に宿主として使用されるヒト間葉幹細胞を培養拡張し冷凍保存する能力、(e) 生体内での取付けの後で、遺伝子変更細胞を回収する能力、(f) 標的組織に対して遺伝子変更を正確にピンポイントし遺伝子療法を広範な疾患に適合させる能力、および (g) 発現されるヒト間葉幹細胞とその子孫内で新しく誘導された遺伝子を他の細胞よりもより制限された様式で留め、これにより医学的疾患を処置するのに潜在的用途を拡張する能力を含む。

【0052】

レトロウイルスの構造とライフサイクル (生活環) は遺伝子導入ベクターに理想的に適したものに作る。一般にレトロウイルス媒介遺伝子導入についてマクローリン、他、核酸研究の進歩と分子生物学、38巻、91-135ページ、(1990年)を参照されたい。レトロウイルスを用いる幹細胞の形質転換については合衆国特許番号 5,591,625号に記載されている。

【0053】

同種異系幹細胞を遺伝子操作あるいは修飾するためにレトロウイルス以外のベクターを利用することも可能である。新しい遺伝物質を例えばSV40、ヘルペスウイルス、アデノウイルスおよびヒトパピローマウイルスなどの細胞に新しい遺伝物質を発現できるいずれかのウイルスによる対象となる遺伝情報を導入することができる。クローン真核DNAを培養哺乳類細胞に導入するのに多くの方法を使用することができ、それはリン酸カルシウムあるいはDEAEデキストラン、原形質融合および、電気穿孔法を含む。幹細胞に導入される遺伝物質はウイルス核酸、細菌性プラスミドあるいはエピソームの形態にある。

【0054】

この発明は同種異系間葉幹細胞が生物学的に著しい量あるいは少量で通常のヒト間葉幹細胞で産出されるのではなく、過剰産生が処置利益に導くような状況でそれを遺伝子操作することを可能にする。これらの産物は次いで血流あるいは身体の他の領域、例えば中枢神経系に分泌される。このようにして形成されたヒト幹細胞は必要とされる物質の (経口

10

20

30

40

50

摂取、注射、デポット注入などにより) 周期的投与を必要とする現在の処方 に代わる薬剤送達システムとして役立つ。この発明はこのような物質を必要とするヒトにホルモン、酵素および薬剤を提供する応用性を有する。延長された時間期間で徐放用量を必要とするホルモン(例えば小皮小体(副甲状腺)ホルモン、インスリンなど)のようなホルモンなどの物質を提供するのに非常に価値あるものである。

【0055】

例えばこれはインスリンの連続送達に使用することができ、またその結果毎日のインスリン注射は必要となくなる。遺伝子操作ヒト間葉幹細胞は更に因子VIIIなどの凝固因子の産生に使用することができ、あるいは筋ジストロフィーのためにジストロフィンの筋細胞への連続送達のために使用できる。

10

【0056】

対象となる遺伝物質の同種異系ヒト間葉幹細胞への取り込みは先天性および後天性疾病の処置に特に価値がある。先天性疾病の場合には、このアプローチは遺伝子修飾ヒト間葉幹細胞および代謝吸い込みに使用できる他の細胞を提供するために使用される。つまりこのようなヒト間葉幹細胞は潜在的に毒性物質を分解するのに役立つであろう。例えばこれは、フェニルアラニンヒドロキシラーゼの欠損による高フェニルアラニン血症を含むアミノ酸異化作用、シスタチオニンシンターゼの欠損によるホモシスチン血症などの疾患を処置するのに利用できた。この方法で処置できる他の疾患は、シスチン症などのアミノ酸代謝の疾患、ヒスチジン尿症あるいは家族性低コレステロール血症などの膜輸送の疾患、遺伝性オロチン酸尿症などの核酸代謝の疾患などを含む。

20

【0057】

この発明の同種異系ヒト間葉幹細胞はまた、身体で通常産生される産物(例えば酵素あるいはホルモンなど)が産生されずあるいは十分な量でしか作られない遺伝疾病の処置に使用できる。ここで失われたか不適切に産出された物質をコード化する遺伝子で形質導入されたヒト間葉幹細胞はその物質を十分な量で産生するのに使用できる。これはアルファ1抗トリプシンを産生するのに利用できる。これはまた因子VIIIと因子IXの産生に使用でき、血友病の処置に有用になるであろう。

【0058】

処置が遺伝子操作同種異系間葉幹細胞(すなわち対象となる遺伝物質で形質導入されたヒト間葉幹細胞)の使用を通じて提供できる多くの後天性疾病がある。例えば、このような細胞は慢性疾患に普通に存在し(例えば血液透析患者における)慢性腎不全としばしば関連づけられる貧血を処置するのに利用できる。この場合エリスロポイエチンをコード化する遺伝子をそれ自身に取り込んだヒト間葉幹細胞はエリスロポイエチン(すなわち赤血球の産生)を増加するよう骨髄を刺激することにより貧血を補正するであろう。他のコード化サイトカインは例えばG-CSFあるいはGM-CSFである。

30

【0059】

この発明の同種異系ヒト間葉幹細胞はまた血栓形成を予防する活性化剤として低容量の組織プラスミノゲン活性化剤を投与するために使用できる。この場合TPAをコード化するとり込み遺伝子物質を持つヒト間葉幹細胞は血栓予防を望む個体に配置されるであろう。これは例えば、冠状動脈症、脳血管障害、末梢血管閉塞症、例えば塞栓あるいは深静脈血栓症で見られる静脈(例、表面)血栓症などのような一般の疾患に対する予防薬として有用である。カルシトニンをコード化するDNAを含むヒト間葉幹細胞はカルシトニン皮下で現在投与されているパジェット病、つまり進行性骨代謝慢性疾患の処置に使用できる。

40

【0060】

も一つの適用は、同種異系ヒト間葉幹細胞のみ、あるいは間葉幹細胞をその中に留め生体内で分化に向かわせる多孔セラミックキューブ装置に付着させた同種異系ヒト間葉幹細胞の皮下移植である。も一つの例はそれが筋細胞に分化する筋への同種異系間葉幹細胞の注射である。も一つの例はポリペプチドホルモンを連続して分泌し、例えば産児制限に使用される黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)を分泌する遺伝子操作ヒト間葉幹細胞

50

胞を持つ移植片である。

【 0 0 6 1 】

インターロイキン（例えば I L - 1 , I L - 2 , I L - 3、あるいは I L - 4 乃至 I L - 1 1）を産出し分泌するように産生されたヒト間葉幹細胞はいくつかの体系で使用できる。例えば I L 3 をコード化する遺伝子物質を含むヒト間葉幹細胞を通じる I L - 3 の投与は好中球減少症を治療するために好中球数を増加するのに使用できる。同種異系間葉幹細胞はまたトロンボポエチンの遺伝子で形質導入でき、低血小板数で特徴づけられる病気を持つ個体に投与された時にはコード化産物の産生と分泌が血小板産出を刺激するものとなる。

【 0 0 6 2 】

この発明のも一つの用途は酵素欠損症の処置である。この場合ヒト間葉幹細胞に導入された遺伝子でコード化される産物（ポリペプチド）は（ホルモンのように）分泌されない。むしろそれは細胞内に留まる酵素である。個体が特殊な酵素を欠き各種のアミノ酸あるいは他の代謝中間体を代謝できない遺伝病の例が数多くある。これらの酵素に対する正しい遺伝子は同種異系間葉幹細胞に導入され個体に移植することができる。移植片は次いでその代謝機能を実行するであろう。例えば、酵素アデノシンデアミナーゼを欠くことで影響される遺伝病がある。この酵素はプリンの尿酸への分解に係る。この発明を利用して、移植片が適用される域を血液が流れるにつれて血液を解毒し失われた酵素を十分に高い水準にまで産生できる前記の皮下移植片を産生することが可能であると考えられる。

【 0 0 6 3 】

追加の用途は必ずしもそれに限定されないが、骨髄の先天性疾患による骨髄欠損に対する骨髄移植に続き造血再形成を高めるサイトカイン遺伝子、損傷した骨の修復と治癒を改善する骨サイトカイン損傷あるいは変性骨の修復と治癒を改善する骨基質問題、骨形成不全症および筋ジストロフィーなどの間葉遺伝疾患の補正、多くの異なった化合物で細胞療法を提供するタンパク質ホルモン等の局所産生細胞をガンシクロビルに敏感にするチミジンキナーゼなどの細胞毒遺伝子を含む。腫瘍細胞に対するギャップジャンクション癒着は間葉幹細胞が癌療法に役立つことを可能にする。

【 0 0 6 4 】

しかしこの発明の範囲は前記の特異的实施例に限定されないことを理解すべきである。この発明は特に記載されたもの以外にも実施されかつ前記の請求の範囲内にある。

【 0 0 6 5 】

ここに記載された方法は数多くの修飾および変形で従来周知の数多くの方法で実施されることは理解されねばならない。細胞の型の間での行為の態様あるいは相互作用として設定された理論はこの発明を何らかの様式で限定するものと解釈されてはならないし、そのような発明の方法がより完全に理解できるように提示されねばならない。

【 0 0 6 6 】

下記の実施例は更にこの発明の見地を説明する。しかしそれはこの発明の教示あるいは開示を決して限定するものではない。

【 0 0 6 7 】

実施例 1

間葉幹細胞に対する同種異系反応性の欠除

移植片拒絶を引き出す原因となる細胞表面抗原はクラス I およびクラス II M H C 抗原である。T 細胞は外部 M H C 抗原に対し同種異系反応性である。クラス I およびクラス II M H C 分子は混合リンパ球反応を刺激する。

【 0 0 6 8 】

個体 A (T_A) からの 1 × 1 0⁵ 細胞が個体 B (m P B M C_B) からの (T 細胞に対する P B M C_S の増殖を予防する) ミトシン C 処置同種異系 P B M C_S と共に平底マイクロタイタウエルで 7 日培養された。m P B M C_{BS} は 2 0 K と 1 0 0 K で播種された。培養物は T 細胞増殖を測定するため培養期間の最後の 1 8 時間³Hチミジンでパルス標識された。図 1 で示された結果は T_A 細胞が P B M C_B を外部のものであると認識したことを示している

10

20

30

40

50

。(「 $T_A + mPBMC_B$ 」の棒グラフを参照されたい)。 $PBMC_{BS}$ がより多く存在すれば T 細胞はより増殖する。

【0069】

$PBMC_S$ と同じ供与者からの 2×10^4 ヒト間葉幹細胞 ($hMSCs$) が個体 A (T_A) からの 1×10^5 T 細胞と同時保温された。細胞は平底マイクロタイタウエルで全部で 7 日培養された。培養物は T 細胞増殖を測定するために培養期間の最後の 18 時間 3H チミジンでパルス標識された。 T 細胞での同時培養の 2 日前に、ヒト間葉幹細胞は上に与えられた数 (密集) でマイクロタイタウエルに播種され、間葉幹細胞に対する表面 MHC 発現を刺激するために $IFN-$ (50 ユニット/ml) で処置された。ヒト $B7-1$ あるいはヒト $B7-2$ 副刺激分子で形質導入されたヒト間葉幹細胞あるいはヒト間葉幹細胞 [原文通り] (ラファティ, K. J., プラウズ, S. J., および C. J. シメオノビッチ, 免疫学アニュアルレビュー, 1 巻: 143 - 173 (1983 年)) が T 細胞で保温された。

10

【0070】

図 1 で示された結果 (図 1 「 $T_A +$ 形質導入 $hMSCs$ 」を参照) は T リンパ球が形質導入あるいは非形質導入ヒト間葉幹細胞に非応答性であった (増殖しなかった)、すなわちそれらは外部のものであると認識されなかったことを示している。かくして混合リンパ球反応は存在しなかった。

【0071】

この結果はまた、間葉幹細胞に対する応答の欠除が個体間の遺伝物適合性に起因するものでなく、何故なら T 細胞が間葉幹細胞供与者からの末梢血単核細胞 ($PBMC_B$) を外部のもので認識しなかったことを示している。

20

【0072】

実施例 2

混合リンパ球反応の抑制

間葉幹細胞が同種異系応答を活発に抑制したかどうか決定するために、2 個の異なる供与者から得られた癒着性間葉幹細胞ありもしくはなしの条件で混合リンパ球反応 (MLR) が組織培養平板にセッティングされた。1 個の供与者は MLR 内で標的あるいは刺激細胞に適合し、も 1 個の供与者は無関係であった。

【0073】

個体 A ($PBMC_A$) からの 10^5 $PBMC$ が 10^5 標的個体 ($PBMC_B$) と混合された。 $PBMC_{AS}$ の活性化による増殖を予防するために、 $PBMC_{BS}$ は 3000 ラド X 線で (刺激細胞) 照射された。かくして $PBMC_{AS}$ のみ (応答細胞) が増殖した。 $PBMC_{AS}$ と $PBMC_{BS}$ が混合された時、 $PBMC_A$ 細胞が $PBMC_{BS}$ の表面抗原により活性化され混合リンパ球反応が起こった。培養物は 7 日の間隔で保温され最後の 18 時間 3H チミジンでパルス標識された。 $PBMC_{BS}$ の存在下で、 $PBMC_{AS}$ は 40,000 の数まで増殖した。図 2, 1 番目の棒グラフ参照 (「無し」は間葉幹細胞が存在しないことを引用する)。

30

【0074】

しかし $PBMC_{AS}$ と $PBMC_{BS}$ が間葉幹細胞の存在下で混合されると、混合リンパ球反応は抑制された。 10^5 $PBMC_{AS}$ がヒト間葉幹細胞の単層で被覆されたマイクロタイタウエルで 10^5 $PBMC_{BS}$ と混合された。間葉幹細胞はウエル当たり 7,500 乃至 22,500 間葉幹細胞の範囲の量でウエルで平板培養された。2 個の間葉幹細胞集団がテストされた。ヒト間葉幹細胞は個体 B の MHC 型に適合した個体から得られた。またヒト間葉幹細胞は個体 A あるいは B の MHC 型のいずれにも適合しない個体から得られた。培養物は 7 日の間隔にわたり保温され、最後に 18 時間 3H チミジンでパルス標識された。ヒト間葉幹細胞の存在下で、 MLR は抑制された (図 2 参照)。かくして間葉幹細胞の MHC 起原のものであるにも拘らず、間葉幹細胞は混合リンパ球反応を抑制した。

40

【0075】

図 2 で示される結果も、ヒト間葉幹細胞が用量依存様式で混合リンパ球反応を減少させ

50

たことを示している。いずれの供与者からの間葉幹細胞も同じように増殖を抑制し、これはMHC型に関連する抑制の特異性は存在しないことを示していた。これらの結果は間葉幹細胞と一緒に培養された時に活発に混合リンパ球反応を抑制することを示している。

【0076】

実施例 3

同種異系イヌ皮下研究

この研究目的は同種異系MSC負荷HA/TCP標本が皮下でイヌに免疫応答を起こすかどうかおよびこの応答がMSC媒介骨形成に影響を与えたかどうかを決定することであった。

【0077】

2匹のイヌがこの同種異系皮下移植に使用された。それぞれのイヌは6個の自己由来MSC移植片を1個の大腿に、また2個の同種異系供与者それぞれから3個の同種異系MSC移植片を対側性大腿に受けた。3個の自己由来移植片とすべての同種異系標本は無血清無フェノールDMEMLG低グルコースに負荷された。他の3個の自己由来標本は無血清DMEMLG高グルコースに負荷された。冷凍保存MSCsのみがこの研究に使用され、標本は移植24時間前に負荷された。

【0078】

それぞれのタイプの2個の標本は組織処理と一つはRNA抽出を割当てられた。加えて限定された量の血液とリンパ節が免疫応答の決定のために採取された。終点は2週と6週であった。2週のイヌは双方の腱手術を受け、一方6週のイヌは自己由来皮下移植片を受けた肢の片方だけの腱手術を受けた。イヌは一腹子ではなかった。

【0079】

結果

犠牲にされた移植床の概略的な観察結果およびまた一般的な健康状態の観察結果は2週および6週終点の何れにおいても同種異系移植片に対するなんらの大きな免疫反応を示さなかった。膝窩リンパ節は両方の時間点で両肢で拡大された。鼠蹊リンパ節は同定できなかった。供与者-宿主対の一つの組合せからのPBMCsを用いる予備MLRデータは増殖検定で15Kの数で正の反応を示し、この対が不適合であることを示した。

【0080】

自己由来および同種異系標本からの2週組織切片はお互いに区別ができなかった。すべての標本に存在する目の粗い縦連合がありいずれの標本でも(2週で予期されたように)骨形成は見られなかった。6週時間点で各グループの2個からの1個の標本から組織データが得られた。DMEMLGで処理された6週自己由来標本は標本内にかなりの骨の量を有していた(図3)。2個の同種異系供与者のそれぞれからの同種異系標本もまた骨に対して正であり(図4と5)、組織形成のパターンは自己由来標本のものと同様であった。同種異系標本での骨形成量は自己由来標本のものよりも低かった。しかしこの検定に関連する骨形成量に変異性が与えられて限定された標本の大きさに基づいて結論を引き出すことはできなかった。H&E染色の下では同種異系標本のいずれかにも免疫応答は観察できなかった。

【0081】

これら予備研究での骨形成データは明らかにイヌMSCsが同種異系セッティングの下でその骨形成潜在能を保持し主な免疫応答を引き出さないことを示している。

【0082】

実施例 4

この研究の目的は、適度に高用量の供与体イヌ白血球抗原(DLA)同一一腹子イヌ間葉幹細胞(cMSC)を 10×10^6 細胞/kgで同種異系骨髄移植セッティングで注入することのイヌでの実現可能性と安全性を示すためのものである。二次目標は供与者neo-とGFP標識cMSCの分布と機能を移植後50日と100日で試験することであった。

【0083】

材料と方法

実験動物

ビーグル犬がこの研究に使用された。2匹の雄と2匹の雌DLA同一一腹子が研究に使用され0日の時に7歳と9歳であった。使用された類別方法は、主な組織適合性複合体のイヌ等価物であるイヌ白血球抗原(DLA)でのクラスII DRB区域の遺伝体質を追う高度に多形性のマイクロサテライトマーカーの使用を含む。マイクロサテライトは小さなジ・、トリ・あるいはテトラヌクレオチド反復であり、これはそれから多世代交雑を通じて染色体部分の遺伝体質を追うように使用される対立遺伝子で十分な長さの変化を示している。対立遺伝子の分離は各反復を囲むDNAのユニーク配列から誘導されるプライマーで単一段階ポリメラーゼ連鎖反応を用いて典型的にモニターされる。加えて混合白血球反応はPCRマイクロサテライトマーカー検定結果を確認するための研究用に選択されたDLA同一一腹子対で実行される。

10

【0084】

研究設計

同じDLA同一一腹子供与者からcMSCsと骨髄を使用して移植を受けた。骨髄移植片は全身照射(TBI)に先立ち0日に2個のDLA同一一腹子のそれぞれから収穫され、交換された。骨髄切除は0日に単一TBI用量920センチグレイ(cGy)に露出されることで誘導された(7cGy(9.3R)/分の速度で送られた2個の対向する⁶⁰Co源からの正中線空気露出)。移植に先立つ4週あるいはそれ以上の週に供与者骨髄吸引液から分離された培養拡張cMSCはグリーン蛍光タンパク質(GFP)とネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo)の遺伝子を含むPapp@OT-24で形質導入された。cMSCは継代1(P1)あるいは継代2(P2)の後冷凍保存された。TBIに続きcMSCは解凍されたポータブル注入ポンプで15分以上にわたり静脈内に送達された。cMSC注入1乃至2時間後に骨髄移植片が 1×10^8 全有核細胞(TNC)/kgと同じかそれ以上の用量で静脈内注入された。

20

【0085】

シクロスポリンが4匹すべてのイヌに対宿主性移植片病(GVHD)予防のために0日乃至5日に10mg/kg BID(20mg/kg/日)の用量で静脈内に投与された。(サンディミュン注射液, ノバルティス・ファーマシュー・ティカルス・コーポレイション)。グループI.1.aには6乃至50日(研究終了日)、グループI.1.bには6日乃至100日に、シクロスポリンが10mg/kg BID PO(20mg/kg/日)で投与された(ネオラル・ソフトゼラチンカプセル, ノバルティス・ファーマシュー・ティカルス・コーポレイション)。受容者への経口抗生物質での通常の支持ケアは5日までに開始し、全身への抗生物質は0日に始まり移植が完了するまで続けられた。体液支持は必要な場合に与えられた。回復の過程で4匹のイヌはいずれも血小板移入を必要としなかった。もし血小板数が $10,000/mm^3$ 以下にたえず低下するなら、あるいはもし処置スタッフが出血の徴候を観察する場合には、全血移入は任意の供与者からの全照射(2000cGy)血液50mlで投与されるべきであった。移植は連続3回の最初の日、500以上の絶対好中球細胞 mm^3 , $1000/mm^3$ 以上[原文通り]、および血小板 $10,000/mm^3$ 以上、 $50,000/mm^3$ 以上、および $100,000/mm^3$ 以上で確定される。

30

40

【0086】

造血回復を調べるために完全血球算定(CBC_s)が0日乃至50日で得られ、その後2週毎に100日の研究グループで得られた。血清化学分析は0日、2日、その後は毎週行われた。末梢血標本は0日MSC注入前、5分および15分、1時間および2時間、または1, 2, 3, 4日の時点でDNA分離のために採取された。DNAは抗EGFP DNA PCRエリザにより産物にとり込まれたジゴキシゲニンで、また第2段階抗ジゴキシゲニン比色分析でGFP標識細胞の存在を評価された。骨髄吸引液は血小板数がたえず $50,000/mm^3$ に達し、同じPCRを用いてGFP標識細胞の存在を試験した時に得られた。cMSC培養物はコロニー形成単位(CFU)を試験し、更なる抗EGFP

50

PCR分析のためにcMSCを拡張することが確定された。剖検に際し、末梢血、骨髓吸引液および骨髓生検が抗EGFP PCR分析のために得られた。CFU検定は骨髓吸引液で実行され、抗EGFP PCR分析が培養拡張cMSCで行われた。組織分析は各種の組織でEGFPの存在のために行われた。

【0087】

cMSC分離、培養拡張、形質導入と冷凍保存

両側骨髓吸引液がイヌCAN-07-01とCAN-07-02では4週までの週、およびイヌCAN-07-03とCAN-07-04では9週までの週にcMSC分離と培養確定のために得られた。骨髓の15ml(各上腕骨から7ml)が各イヌから得られた。イヌはブトルファノールの注射で、次いでジアゼパムと塩酸ケタミンの混合物の注射で麻酔された(アベコ・カンパニー, インコーポレイテッド, フォートダッジ, アイオワ)。針挿入部位はポビドンヨードでガス浄化され次いでアルコールで洗浄された。吸引液は16ゲージ、2インチ骨髓針を用いて各イヌの各上腕骨顆から得られた。注射器は針に付着され、吸引が各上腕骨から8mlの骨髓を除くために適用された。骨髓吸引液は無菌技術を使用して15mlポリプロピレン円錐チューブに移された。この処理に続きイヌは次いで回復のために暖かいパッドに置かれた。

10

【0088】

骨髓の5乃至10mlアリコートがダルベッコ食塩加リン酸緩衝液(DPBS)でポリプロピレン培養チューブで50mlに希釈された。細胞懸濁液は2200RPMで10分室温(RT)で遠心分離を受けた。全有核細胞数は4%酢酸で計数された。細胞は次いでDPBSで最終濃度 2.0×10^6 細胞/mlに希釈された。10mlすなわち 2.00×10^6 細胞が50ml円錐チューブで20mlのパーコル(比重1.073g/ml)に負荷され、1300RPMで20分遠心分離を受けた。単核細胞を含む細胞界面はDPBSで洗浄され、完全培地に再懸濁され、回収割合を得るために計数された。細胞は次いで完全培地で希釈され、培養物は下記の通りに確定され、37℃恒温器に5%炭酸ガスに置かれた。

20

【0089】

二重シストロンMuLVレトロウイルスベクターの構築

グリーン蛍光タンパク質(EGFP)レトロウイルスが刺胞動物*Aequorea victoria*(クロテック, カリフォルニア)からEGFP-1遺伝子を分離することで構築された。EGFP遺伝子はレトロウイルスベクターpJM573-neoにクローンされた(生成プラスミドはpOT-24と名付けられた)。プラスミドpJM573-neoは下記の修飾でpN2から誘導された(ケラー他, 1985年, ネイチャー318:149)。マウスレトロウイルスgag開始部位はインフレイム終止コドンで置換された。5'LTRと3'LTRは同一カセットに構築された。ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo)と内部リボソームエンターリー部位(IRES)はpN2に挿入された。EGFP-pOT-24プラスミドの図解地図は図6で示される。

30

【0090】

組換えレトロウイルスの調製

pOT-24は製造業者が示唆するようにDOTAP(ベーリンガー・マンハイム)を用いてGP&E86エコトロピック生産者細胞に形質移入された。形質移入細胞は10%熱不活性化FBS, ペニシリン・ストレプトマイシン(ライフテクノロジー)および選択マーカーとしての硫酸プロタミン 0.5 mg/ml で補充されたDMEM高グルコース(HG)培地で成長した。培養物は70%密集まで維持され、この点で培地は新鮮レトロウイルス培地(G418無し)で置換され、細胞は32℃で2日維持された。レトロウイルスを含む培養接지가集められ、 $0.45 \mu\text{m}$ フィルターで濾過され、 -70°C で貯蔵された。両種性ウイルスが遠心分離形質導入手順、続いてG418(0.5 mg/ml)の選択を用いてエコトロピックウイルスで2度PA317細胞を形質導入することで調製された。レトロウイルス上澄みが集められた。3T3細胞にプールされたEGFPレトロウイルスの力価は $1.2 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ であった。EGFP-レトロウイルス上澄みは-

40

50

70 で冷凍保存された。

【0091】

CAN - 07 - 01 と CAN - 07 - 02

パーコル界面で得られた洗浄単核細胞は、30mlの完全培地と 1.0×10^6 細胞/フラスコを含む10個のT-185フラスコに固定された。

【0092】

培養の2日、6日、9日に、フラスコの培地は新鮮完全培地で置換された。一次培養の12日に、写真が撮られ、細胞は継代0(P0)から継代1(P1)に移った。培地は吸引されフラスコは2回8ml DPBSで洗浄された。8mlのトリプシンが加えられ、フラスコは37℃恒温器に3分置かれた。細胞が持ち上がると、反応は完全培地8mlの追加で停止された。細胞は50ml円錐チューブに移されプールされた。フラスコはDPBSで洗浄されプールされた細胞はRT(室温)で2000RPM、5分遠心分離された。上澄みは除かれ細胞ペレットは完全培地に再懸濁された。細胞はプールされ、計数され生存能力を試験された。細胞は18mlの完全培地と 0.4×10^6 細胞/フラスコを含む15個のフラスコに平板培養された。

10

【0093】

培養15日に、18個のフラスコの内15個で最初の形質導入が行われた。培地は除去された。レトロウイルス上澄みのアリコートが解凍され、形質導入カクテル(反応混合液)を作るために $8 \mu\text{g/ml}$ の最終濃度にポリブレンが加えられた。細胞培地は10mlの形質導入カクテルで置換され、フラスコは3000RPMで1時間32℃で遠心分離された。遠心分離の後、熱不活性化胎仔ウシ血清(FBS)を用いて調製された10mlの完全培地が(形質導入カクテルと共に)各フラスコに加えられ、フラスコは恒温器に戻された。3個のフラスコは形質導入されず、完全培地は置換された。培養の16日に、培地は新鮮完全培地で置換された。培養の17日に形質導入は反復された。

20

【0094】

培養の18日に、細胞は前記の通り収穫されP1からP2に移った。 3×10^6 細胞が100mlの完全培地に加えられた三つ組みフラスコ(500 cm^2)に注がれた。15個の三つ組みフラスコが形質導入細胞で準備され、3個は未形質導入細胞で準備された。残存細胞はいずれも冷凍保存された。凍結液は10% DMSOと90% FBSを含んで準備された。 1.0×10^6 細胞が1mlの凍結液に再懸濁された。小びんは標識されナルジェンクリオコンテナで最低4時間-70℃で冷凍保存され-70℃で貯蔵された。

30

【0095】

P2培養の22日細胞分布と形態を記録するために写真が撮られ、P2細胞は収穫され下記の通り冷凍保存された。

【0096】

CAN - 07 - 03 と CAN - 07 - 04

パーコル界面で得られた洗浄単核細胞が20ml完全培地と 1.2×10^6 細胞/フラスコを含む15個のT-75フラスコに固定された。

【0097】

培養の2日に、フラスコ内および皿の培地は新鮮完全培地で置換された。cMSCの一次培養の6日に、第1形質導入が前記の通り実施された。3個のフラスコは形質導入されず、新鮮培地は6日に置換された。培養の7日に、培地は新鮮培地で置換された。

40

【0098】

培養の8日に形質導入手順が反復された。培養9日に、写真が撮られ、細胞は前記の通りP0からP1に継代した。 3×10^6 細胞が100mlの完全培地に加えられ、三つ組みフラスコに注がれた。15個の三つ組みフラスコが形質導入細胞と共に準備され、3個は未形質導入細胞で準備された。

【0099】

15ml 骨髄吸引液は供与者CAN - 07 - 01, CAN 07 - 02, CAN - 07 - 03とCAN - 07 - 04それぞれに対し 9.10×10^6 , 1.212×10^6 , 8.56×1

50

0^6 および 1.948×10^6 有核細胞を産出した。パーコル界面から得られた単核細胞数は 6.12×10^6 、 6.66×10^6 、 5.88×10^6 および 4.62×10^6 となり67.2%、55%、68.7%および23.7%の回収を示した。P1に際して、細胞生存能力は97.1% (93.3乃至100%の範囲)の平均値であった。供与者CAN-07-01とCAN-07-02のP2、および供与者CAN-07-03とCAN-07-04に対するP1細胞に際して、形質導入の細胞生存能力は96.7% (96.3%乃至97.9%の範囲)の平均値であった。未形質導入細胞は95.4% (93.3%乃至96.9%の範囲)で生存可能であった。未形質導入細胞は95.4% (96.3%乃至96.9%の範囲)で生存可能であった。未形質導入細胞は95.4% (93.3%乃至96.9%の範囲)で生存可能であった。cMSCの冷凍保存の収穫に際し、形質導入細胞の生存能力は99.4% (97.4%乃至100%の範囲)の平均値であり、未形質導入細胞は99.4% (97.6%乃至100%の範囲)で生存可能であった(表4) [原文通り]。

10

【0100】

継代2の4日後に収穫されフラスコ当り 3×10^6 に平板培養された供与者CAN-07-01とCAN-07-02のフラスコ当り形質導入cMSC産出量は 5.9×10^6 と 6.7×10^6 であり、またフラスコ当り未形質導入cMSC産出量は 8.4×10^6 と 7.5×10^6 であった。継代1(異なった形質導入と継代設計)の4日後に収穫されたフラスコ当り 3×10^6 で平板培養された供与者CAN-07-03とCAN-07-04のフラスコ当り形質導入cMSC産出量は 2.0×10^6 と 1.4×10^6 であり、またフラスコ当り未形質導入cMSC産出量は 2.5×10^6 と 1.8×10^6 であった。

20

【0101】

P0培養からのcMSCに関するCFU検定

10ml完全培地を含む100ml皿三つ組みに 0.5×10^6 細胞を平板培養してCFUコロニー検定が次培養固定の時点で準備された。皿は37℃で5%炭酸ガスで保温された。培地は2日乃至4日毎に置換された。培養の10日に、CFU検定皿はHBSSで2度洗浄され、1%グルタルアルデヒドで15分固定され、HBSSで更に2度洗浄され、空気乾燥された。皿のcMSCは次いで0.1%クリスタルバイオレットで染色され、脱イオン水で3回洗浄され、空気乾燥された。

【0102】

単核細胞分離と培養確定の日に平板培養され10日に収穫されたCFU検定は、CAN-07-01、CAN-07-02、CAN-07-03とCAN-07-04それぞれに対し56、46.7、114、および72の各コロニーを産出した。

30

【0103】

P1培養の13日に、写真が細胞分布と形態を記録するために撮られ、P1細胞はトリプシン消化により収穫され、下記の通り冷凍保存された。

【0104】

三つ組みフラスコの培地は傾瀉され、フラスコは50ml DPBSで洗浄された。DPBSの傾瀉の後、0.25%トリプシン23mlが各三つ組みフラスコに加えられた。フラスコは37℃恒温器に3分置かれた。細胞剥離後、23mlの完全培地が各フラスコに加えられた。細胞懸濁液は50ml円錐チューブに移され、フラスコは30ml HBSSで洗浄された。チューブは2200RPMで5分室温で遠心分離された。形質導入あるいは未形質導入細胞それぞれを含むペレットはプールされ計数された。 1×10^7 細胞の1個のアリコートが抗EGFP DNA PCR検定により形質導入パーセンテージを決定するためにとっておかれた。

40

【0105】

収穫の後、回収P1あるいはP2形質導入培養拡張cMSCsは1300RPMで5分遠心分離され、85%プラズマライトA(バクスターIVセラピー)、10% DMSO、および5%自己由来イヌ血清を含む冷却冷凍保護液での 1×10^7 cMSC/mlで1mlアリコートに再懸濁された。細胞アリコートはそれぞれ1mlを含む別の冷凍小びんに分

50

配された。チューブはイヌ供与者番号と全生存可能細胞数で標識された。cMSCsは細胞小びんをナルジーン凍結コンテナに配置し、-70フリーザーで4時間置き、-70で貯蔵するため移動された。

【0106】

産物の冷凍保存のための細胞収穫に際して、 1×10^7 細胞アリコートが形質導入効率を測定するために得られた。形質導入効率は産物へのジオキシゲニンとり込みで抗EGFP DNA PCRエリザにより分析され、第2段階では抗ジオキシゲニン比色分析で分析された。

【0107】

cMSC注入産物

注入の1~2時間前に、cMSCの小びんは37ウォーターバスの回転運動で解凍され、70%エタノールでスプレーされ、バイオセーフティキャビネットで開かれた。cMSC産物はDMEM-LGプラス細胞供与者自己由来30%血清を含む50ml注入培地に懸濁された。cMSC産物の生存能力は実際の生存可能用量を決定するためにトリパンブルー排除で測定された。各cMSC産物のアリコートは酵母分離、好気性成長および非好気性成長に付託された。cMSCは組織培養プラスチックに付着し、P2(CAN-07-01とCAN-07-02に対してはP3)で増殖する能力を評価された。 1×10^6 と 0.16×10^6 cMSCのアリコートがT-25プラスチック培養フラスコで三つ組みの完全イヌ培養培地に平板培養された。24時間後、フラスコは 1×10^6 cMSCで平板培養され、3日には 0.16×10^6 cMSCで平板培養されたフラスコはトリプシン消化で収穫され計数された。

【0108】

TBIの後、cMSC懸濁液は50mlを15-20分にわたり送達するために手操作(ハンドヘルド)ハーバード・バード・ミニ・インヒューザーを用いて橈側皮静脈に挿入されたカテーテルを経由して注入された。

【0109】

適度に高用量の 7.49×10^6 , 7.35×10^6 , 10.0×10^6 , 10.0×10^6 (平均値 8.7×10^6)の生存可能cMSC/kgがイヌCAN-07-01, CAN-07-02, CAN-07-03, CAN-07-04それぞれに0日に注入された。これらの用量は患者が受けるであろう典型的な用量の4乃至10倍の量を表わす。注入された全生存可能cMSCは 67.7×10^6 乃至 129×10^6 (平均値 93.9×10^6)のcMSCにわたった。細胞の生存可能性はトリパンブルー排除で測定されたように92.1乃至97.6(平均値94.9)にわたった。cMSC注入はTBI後71から146(平均値110)で与えられた。

【0110】

注入後血液標本

血液標本(2ml)がcMSC注入前(pre)および注入開始5分と15分、1時間と2時間後のcMSC注入期間、更に1日、2日、3日、4日の時点で得られた。細胞溶菌液(ライゼート)は産物にとり込まれたジオキシゲニンでの抗EGFP DNA PCRエリザでの、また血流内のGFP標識cMSCの水準を検知する第2段階抗ジオキシゲニン比色分析での使用のためにピュアジーン(ジェントラ・システムズ、インコーポレイテッド)DNA分離キットを用いて準備された。

【0111】

骨髄収穫と移植片注入

移植用移植片に使用される骨髄はTBIに先立ちDLA同一腹部から収穫された。吸引器は100ml組織培養培地199と4ml(4000単位)ヘパリンを含む真空フラスコから出たポリピニルチュービングに付着された11ゲージ、4-6インチ、ポルトトップステンレススチール骨髄採取針を用いて各上腕骨から得られた。骨髄は300および200 μ m孔サイズを通過され、トランスファーパックコンテナで4で貯蔵され、その日の日後での注入まで供与者と受容者の標識をされた。骨髄の全骨髄有核細胞(BM-

10

20

30

40

50

TNC)は骨髄採取の間に得られた末梢血量に存在するいずれの有核細胞数も排除するように補正される。

【0112】

骨髄の全有核細胞数(TNC)は骨髄採取の間に得られた末梢血量に存在するいずれの有核細胞も排除するように修正された。骨髄の修正された用量はイヌCAN-07-01, CAN-07-02, CAN-07-03およびCAN-07-04それぞれに対して 4.3×10^8 , 3.5×10^8 , 3.1×10^8 , 2.0×10^8 (平均値 3.2×10^8) TNC/kgであった。

【0113】

注入の20分前に骨髄は室温に置かれた。cMSC注入の1時間後、骨髄は1乃至2分バッグに圧を加え撓側皮静脈に挿入されたバタフライ針を通じて静脈内に注入された。

10

【0114】

支持ケア

5日に、経口抗生物質(硫酸ネオマイシンと硫酸ポリミキシン)が1日3回与えられた。これらの経口抗生物質は絶対好中球数が $500/mm^3$ に達するまで投与された。0日に、全身抗生物質ベイトリルが1日2回静脈内で投与され、絶対好中球数が安定して $1,000/mm^3$ に達するまで続けられた。一過性照射毒性の結果として失われた体液と電解質とはリンゲル液500mlの皮下投与により置換され、食料と水とが受け入れられるまで1日2回続けられた。

【0115】

示差血球数

血球標本(2ml)が、0日乃至50日、および研究の終了までその後2週毎にcMSCの分離のために骨髄吸引の朝毎に頸静脈あるいは撓側皮静脈のいずれかから採取された。血液はEDTAを含む真空コンテナに移された。 mm^3 当り全白血球数(WBC)および血小板数がシスメックスE2500を用いて測られ、示差血球数はライト染料での固定と染色後、手動で決定された。

20

【0116】

剖検

血液標本はCBC, ケミストリー23分析、およびPCR評価で得られた。イヌはブルトルファノールで次いでジアゼパムと塩酸ケタミンの混合物で鎮静状態の後、生検と両側性骨髄吸引液が上腕骨、大腿骨および腸骨稜から得られた。次いで安楽死が鎮静薬ペントバルビタールナトリウムの過剰用量で行われた。50日グループのイヌ(CAN-07-01とCAN-07-02)は研究の43日に安楽死された。100日グループのイヌ(CAN-07-03とCAN-07-04)は研究の100日に安楽死された。完全なセットの組織が動物の剖検で採取された。

30

【0117】

組織試験のための組織の採取が直ちに行われた。組織のサブセットが抗EFP DNA PCRエリザ分析に使用された。骨髄吸引液と生検は、抗EGFP DNA PCRより分析に、更なるPCR分析に、またCF4の検定に使用された。

【0118】

組織は約1インチ平方部分に切り取られ、10%中性緩衝ホルマリン液(pH6.8-7.2)で満たされた別標識50ml円錐チューブに置かれた。組織はパラフィンに包埋され、切断され、ヘマトキシリンとエオシンで染色された。骨髄標本は過ヨウ素酸シッフ染色で染色された。

40

【0119】

剖検に先立って得られた骨髄吸引液は各イヌの左側および右側の上腕骨、大腿骨および腸骨稜から15ml標本チューブに採取された。組織標本のサブセットは剖検の間に得られ、約1/4インチ平方片に切断され、PBS浸漬ガーゼに包まれ、標識されたジップロックバック内に個別に置かれた。骨髄吸引液は氷上に保持された。

【0120】

50

C F U 検定のための骨髄吸引液の調製

P C R 分析に得られた各イヌからの左側と右側上腕骨、大腿骨および腸骨稜からの骨髄吸引液のアリコートが個別の 1 5 m l 標識チューブにアリコートされた。骨髄標本は氷上で保持された。

【 0 1 2 1 】

剖検で得られた骨髄からの c M S C についての C F U 検定

剖検で得られた骨髄からの c M S C について行われた C F U コロニー検定は 1 0 m l 完全培地を含む 1 0 0 m m 皿三つ組みに 0.5×10^6 細胞を平板培養して調製された。皿は 3 7 °C で 5 % 炭酸ガスで保温された。培地は新鮮完全培地で 2 - 4 日毎に置換された。培養の 1 0 日に、C F U 検定皿は H B S S で 2 回洗浄され、1 % グルタルアルデヒドで 1 5 分固定され、H B S S で 2 回洗浄され、そして空気乾燥された。皿の c M S C は次いで 0 . 1 % クリスタルバイオレットで染色され、脱イオン水で 3 回洗浄され、そして空気乾燥された。コロニーは平板培養 10^6 細胞当りのコロニー数を計算するため計数された。

10

【 0 1 2 2 】

D N A の分離と精製

D N A は各組織の部分から分離された。標本の残りの部分は冷凍保存され - 7 0 °C フリーザーで貯蔵された。D N A は標本を食塩加リン酸緩衝液 (P B S) に置き、プロテイナーゼ K 溶液を加え、5 5 °C で 3 時間あるいは組織が溶解するまで保温することで分離された。標本は次いで R N a s e (リボヌクレアーゼ) で 3 7 °C 、 6 0 分処理された。標本は室温で冷却されタンパク質は沈殿した。標本は遠心分離され水相はゆっくりと 1 0 0 % イソプロパノールで採取された。標本は混合され遠心分離され、ペレットは 7 0 % エタノールで洗浄された。チューブは遠心分離され、上澄みは汲み出されペレットは約 1 乃至 6 時間乾燥された。D N A は一晩室温で水和され次いで 4 °C で貯蔵された。

20

【 0 1 2 3 】

末梢血と骨髄の標本はまず R B C 溶解液 (塩化アンモニウム緩衝液) で溶解された。D N A は次いで前記の通りライゼートから分離された。D N A は $998 \mu l$ の脱イオン水と標本からの $2 \mu l$ D N A をキュベットに追加して分離され回転運動された。分光測光器が不透明度 (O D) を決定するために使用された。O D は 2 6 0 と 2 8 0 で読み取られ D N A 濃度は $\mu g / m l$ で計算された。D N A 濃度は脱イオン水を使って $1 \mu g / m l$ まで調節された。

30

【 0 1 2 4 】

抗 E G F P D N A P C R エリザ

これらの研究で用いられた抗 E G F P D N A P C R エリザ検定は、G F P に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを利用する注入 c M S C s を検出する。遺伝子発現の分析に対し、我々は P C R - エリザ (D I G 標識 / 検出) キット (ベーリンガー・マンハイム) を利用した。要約すると、P C R はジゴキシゲニン標識ヌクレオチドの存在下で増幅産物を標識するために行われた。次いで $25 \mu l$ の P C R 産物が変性され、ストレプトアビジン被覆マイクロタイタ平板で溶液で 5 % ビオチニル化オリゴヌクレオチドプローブに 3 7 °C で雑種形成することを可能にした。結合プローブ P C R 産物は抗ジゴキシゲニンペルオキシダーゼコンジュゲートで、また比色基質 2 , 2 - アジノビス (3 - エチルベンズチアゾリン - スルホン酸) (A B T S) の使用により検出された。滴定標準曲線は検定で使用された D N A の量当り D N A 濃度を概算するために形質移入対照 c M S C を用いて創り出された。D L A クラス II ゲノム D N A の P C R の内部標準で最初の相関を行い、次いで D N A 濃度を細胞等価物と相関させ、また形質導入細胞当りの 1 個のレトロウイルス組み込み事象を想定することにより、細胞数の推定値を得ることができる。

40

【 0 1 2 5 】

G F P のための D N A の量測定はすべての骨髄へら / 生検で認められた。

【 0 1 2 6 】

移植後の血球回復

$10,000 / m m^3$ までの血小板の閾値 (3 連続値まで) の平均日は 1 2 . 8 (1 1

50

- 17の範囲)、50,000/mm³までは19.8(16-25の範囲)、100,000/mm³までは23.0(20-27の範囲)であった。絶対好中球細胞の500/mm³までの閾値(3連続日)までの平均日は9.3(8-11の範囲)、1,000/mm³までは10.5(9-13の範囲)であった。

【0127】

暫定骨髓吸引液

血小板が50,000/mm³以上の値に安定して回復した時、暫定骨髓吸引液が腸骨稜から採取された。この手順はCAN07-01とCAN07-02の研究では27日に、またCAN-07-03とCAN-07-04には29日に行われた。

【0128】

結果

43日に安楽死されたCAN-07-01とCAN-07-02からのすべての組織の組織病理学評価に際して、転位結合組織と亜急性GVHDに関する発見は負であった。

【0129】

検出可能DNAシグナルは注入1時間以内に、また2日に再び発見できた。1個の標本はGFP DNAに関し注入3日後に量的に測定できた。これはシグナルが2日と3日で発見された自己由来イヌ移植研究での過去の観察と一致する。

【0130】

GFP+細胞に対するCAN-07-03とCAN-07-04での100日の剖検データは、CAN-07-03の大腿骨と上腕骨に、またCAN-07-04の上腕骨にGFPシグナル(10マイクログラムPCRインプットDNA当り1GFP+細胞等価物)を示した。

【0131】

これらの結果は同種異系MSCsが骨髓造血細胞の急速移植を支持できることを示している。輸血支援は必要ではなかった。GVHDの臨床的徴候もなかった。血小板回復は組織対照よりも速かった。同種異系移植後に支質細胞にキメラ現象の徴候が存在した。同種異系MSCsを使用することによる同種異系組織を移植する選択肢は臨床移植シナリオに使用できる移植物質の範囲を拡大する。

【0132】

かくして、ヒト非自己間葉幹細胞はヒト骨髓から回収され、結合組織の骨欠損を処置するために、また造血幹細胞あるいは前駆細胞の移植を高めるために細胞薬剤として単独あるいは担体と併用して使用することを可能にする。

【図面の簡単な説明】

【図1】 間葉幹細胞に対する同種異系反応の欠如。AからのT細胞はBからのPBMCsと異なった量で混合された時には用量依存様式で増殖した。AからのT細胞は間葉幹細胞が全T細胞活性化を提供するために操作された時でさえBからの間葉幹細胞に应答して増殖しなかった(間葉幹細胞は同時刺激分子B7-1あるいはB7-2で形質導入された)。

【図2】 間葉幹細胞は異なった2個の個体からのリンパ球間の混合リンパ球反応を活発に抑制した。hMSC-1は混合リンパ球反応の刺激細胞と应答細胞の両者に対し第三者であった。hMSC-2は混合リンパ球反応では刺激細胞に対して自己由来のものであった。かくして間葉幹細胞はMHC型としての特異性無しで混合リンパ球反応を抑制した。間葉幹細胞は用量依存様式で混合リンパ球反応を抑制した。

【図3】 同種異系イヌの研究。DMEM-LGで処理された6週自己由来標本の組織分析はかなりの量の骨を示した。

【図4】 同種異系イヌの研究。6週同種異系標本の組織分析は骨形成を示した。

【図5】 同種異系イヌの研究。図4で示されたもの以外の異なった供与者からの6週同種異系標本の組織分析は同じように骨形成を示した。

【図6】 実施例4で使用されたEGFP-pOT24プラスミドの概略図。

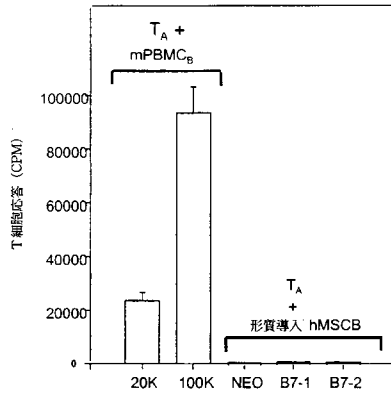
10

20

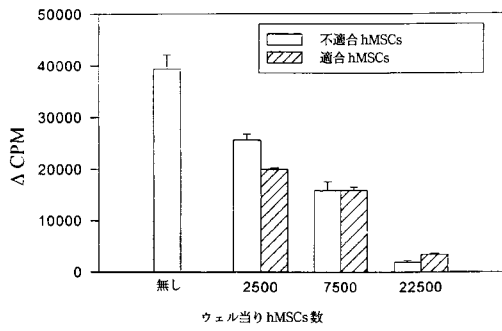
30

40

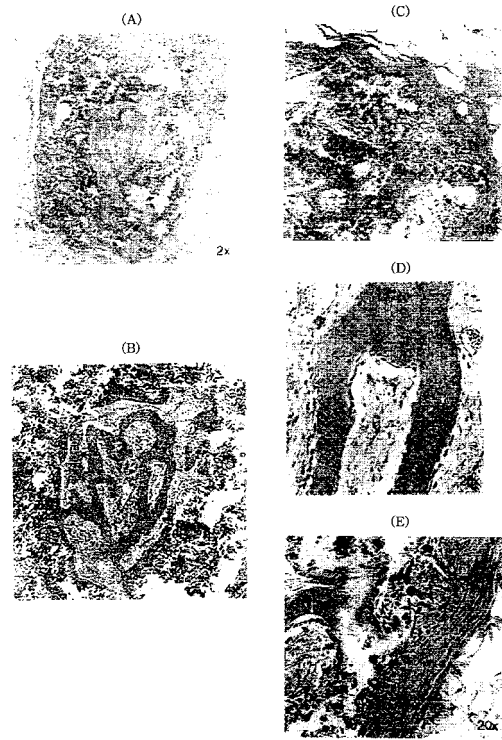
【 図 1 】



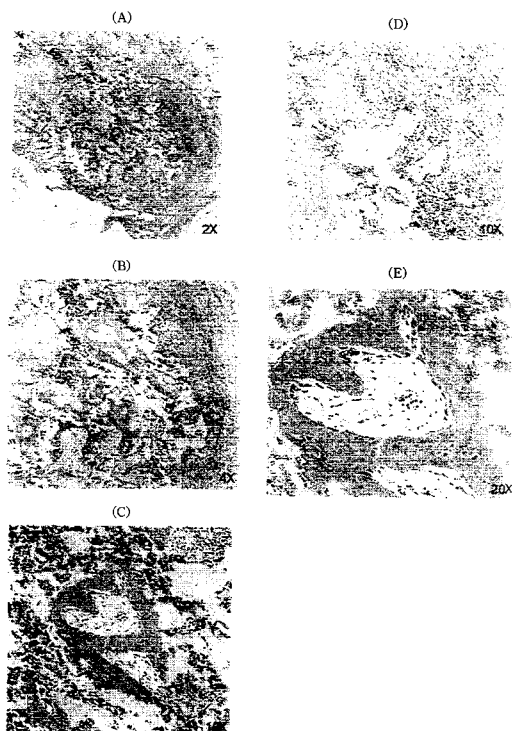
【 図 2 】



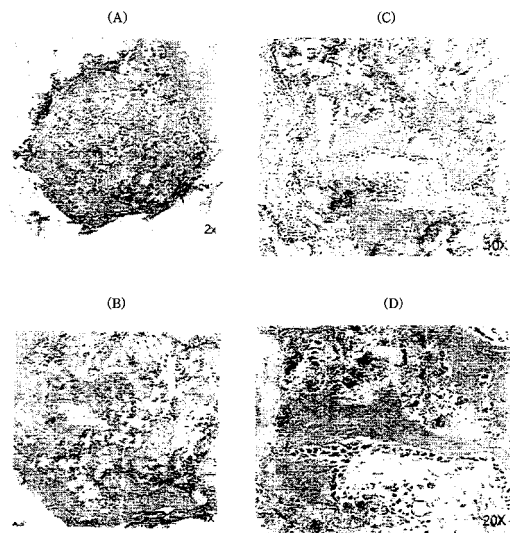
【 図 3 】



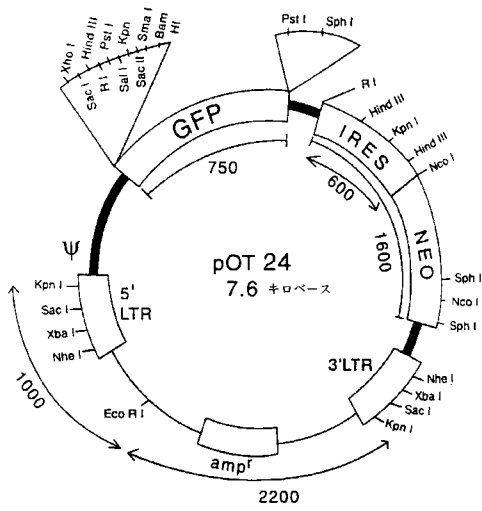
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P 43/00 1 1 1

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(74)代理人 100066061

弁理士 丹羽 宏之

(72)発明者 ブルーダー, スコット, ピー .

アメリカ合衆国, 0 2 4 5 3 マサチューセッツ, ウォルサム, ムーディ ストリート 2 3 7 ,
クロニンズ ランディング, スイート 3 5 2

(72)発明者 マッキントッシュ, ケビン, アール .

アメリカ合衆国, 2 1 0 4 2 メリーランド, エリコット シティ, ブルー パロー ライド 4
2 2 5

(72)発明者 マーシャク, ダニエル, アール .

アメリカ合衆国, 2 1 0 9 3 メリーランド, ルーサービル, セイント ディビッツ レーン 1
1 6 3 9

(72)発明者 モスカ, ジョゼフ, ディー .

アメリカ合衆国, 2 1 0 4 2 メリーランド, エリコット シティ, ブルー パロー ライド 4
2 0 1

審査官 松波 由美子

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 35/28

A61K 48/00

A61L 27/00

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)