(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-145259
(P2017-145259A)
(43)公開日　平成29年8月24日(2017.8.24)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 35/28	(2015.01)	A61K	35/28		4C076
A61K 9/10	(2006.01)	A61K	9/10		4C081
A61K 38/48	(2006.01)	A61K	38/48	100	4C084
A61K 38/46	(2006.01)	A61K	38/46		4C087
A61K 38/43	(2006.01)	A61K	38/43		

審査請求 有　請求項の数 34　ＯＬ　（全 33 頁）　最終頁に続く

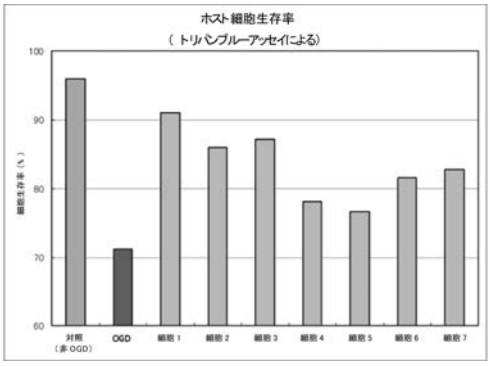
(21)出願番号　特願2017-109249 (P2017-109249)
(22)出願日　平成29年6月1日 (2017.6.1)
(62)分割の表示　特願2015-555985 (P2015-555985)の分割
原出願日　平成25年2月6日 (2013.2.6)

(71)出願人　506100495
ＮＣメディカルリサーチ株式会社
東京都港区虎ノ門４－３－１　城山ＪＴトラストタワー１７Ｆ
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉　良幸
(74)代理人　100109346
弁理士　大貫　敏史
(74)代理人　100117189
弁理士　江口　昭彦
(74)代理人　100134120
弁理士　内藤　和彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】神経変性の治療のための細胞療法

(57)【要約】
【課題】神経変性を緩和及び／又は阻止する安全かつ有効な療法に対する緊急の要望を満たす。
【解決手段】ＮＣＳ－０１と呼ばれる、神経変性に有効である不均質な骨髄細胞の集団を、分離及び選択する方法を記載する。例えば、ＮＣＳ－０１細胞は虚血により生じた神経変性を治療することが示された。インビボ試験で、選択されたＮＣＳ－０１細胞集団が、一過性又は永続性の総動脈閉塞条件下にある標準的なラット中大脳動脈閉塞（ＭＣＡＯ）動物モデルにおいて神経変性を治療することが立証された。これらの試験は、神経変性が脳梗塞により生じた場合に、選択されたＮＣＳ－０１細胞集団の投与と血栓溶解剤及び／又は機械的な血塊除去方法を組み合わせると、神経変性の急性発症により生じた梗塞の体積が低減することをも示す。開示した細胞療法は、発作後の患者生存率に著しい臨床効果を及ぼすことを保証する。
【選択図】図１Ａ



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ）未処理骨髄から骨髄細胞の集団を採取し；
ｂ）前記骨髄細胞の集団を低密度でプラスチック表面に播種し；
ｃ）前記播種した細胞集団を洗浄して、付着していない細胞を除去し；
ｄ）前記付着した細胞集団を血清含有培地中でほぼ集密状態まで培養し；前記培養細胞の集団を約７連続継代以下で連続継代し、各継代において前記培養細胞を低密度で播種し；
ｅ）不均質な骨髄細胞の亜集団を採取すること、
を含む方法により調製された、不均質な骨髄細胞の亜集団であって、
有効量が神経変性の治療に有効である、不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項２】
前記神経変性が虚血による、請求項１に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項３】
さらに神経変性の実験モデルにおいて試験し、神経変性を治療する能力を示す細胞集団が選択された、請求項２に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項４】
前記神経変性の実験モデルが、酸素／グルコース枯渇（ＯＧＤ）細胞培養モデルである、請求項３に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項５】
前記神経変性の実験モデルが、脳卒中の動物モデルである、請求項３に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項６】
前記骨髄細胞の集団が約10^2～10^6細胞／cm^2の密度で播種される、請求項１に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項７】
前記採取された骨髄細胞の亜集団が血清含有培地中で培養される、請求項１に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項８】
各継代において前記培養細胞が約７５０細胞／cm^2未満の密度で播種される、請求項１に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項９】
血流に注入した後、前記亜集団内の細胞が神経変性の部位へ移行する、請求項１に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項１０】
前記未処理骨髄が、化学療法剤で前処理されていない対象から採取される、請求項１に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項１１】
前記化学療法剤が５－フルオロウラシルである、請求項１０に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項１２】
前記骨髄細胞の集団が密度分画又はＡＣＫ溶解により分離できない、請求項１に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項１３】
前記密度分画がＦｉｃｏｌｌ（商標）又はＰｅｒｃｏｌｌ（商標）勾配を必要とする、請求項１２に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項１４】
神経変性の治療方法であって、
請求項１に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団を、神経変性を伴う哺乳動物の血流に注入することを含み、

前記骨髄細胞の亜集団の注入によって、前記神経変性により生じた神経欠損が低減する、方法。

【請求項１５】

神経変性が脳梗塞による、請求項１４に記載の神経変性の治療方法。

【請求項１６】

さらに、閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置を含み、

前記追加処置と組み合わせた骨髄細胞の亜集団の注入によって、神経欠損が追加処置単独又は追加処置なしの骨髄細胞の亜集団の注入のいずれかの後より著しく低減する、

請求項１５に記載の神経変性の治療方法。

【請求項１７】

前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置を、前記骨髄細胞の亜集団の注入と同時に行なう、請求項１６に記載の神経変性の治療方法。

【請求項１８】

前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置を、前記骨髄細胞の亜集団の注入の前に行なう、請求項１６に記載の神経変性の治療方法。

【請求項１９】

前記血管が血塊によって閉塞している、請求項１６に記載の神経変性の治療方法。

【請求項２０】

前記血塊がアテローム硬化斑の破裂による、請求項２０に記載の神経変性の治療方法。

【請求項２１】

前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置が、血栓溶解剤の投与を含む、請求項１６に記載の神経変性の治療方法。

【請求項２２】

前記血栓溶解剤が、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、及び組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターからなる群から選択される少なくとも一つである、請求項２１に記載の神経変性の治療方法。

【請求項２３】

前記組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターが、アルテプラーゼ、レテプラーゼ、デスモテプラーゼ又はテネクテプラーゼである、請求項２２に記載の神経変性の治療方法。

【請求項２４】

前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置が、前記閉塞した血管から血塊を機械的に除去することを含む、請求項１６に記載の神経変性の治療方法。

【請求項２５】

前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置が、さらに血塊をフィルターで捕獲することを含む、請求項１６に記載の神経変性の治療方法。

【請求項２６】

前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置が、血管形成術及び／又は血管ステント挿入の実施を含む、請求項１６に記載の神経変性の治療方法。

【請求項２７】

前記骨髄細胞の亜集団が静脈内又は動脈内に注入される、請求項１４に記載の神経変性の治療方法。

【請求項２８】

前記骨髄細胞の亜集団が頚動脈に注入される、請求項１４に記載の神経変性の治療方法。

【請求項２９】

前記骨髄細胞の亜集団を脳内に注入される、請求項１４に記載の神経変性の治療方法。

【請求項３０】

脳梗塞により生じた神経変性の治療方法であって、

請求項１に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団を、虚血により生じた神経変性を伴う哺乳

動物の血流に注入することを含み、
前記骨髄細胞の亜集団の注入によって、前記神経変性により生じた梗塞の体積が低減する、方法。
【請求項３１】
さらに、閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置を含み、
前記追加処置と組み合わせた骨髄細胞の亜集団の注入によって、梗塞の体積が追加処置単独又は追加処置なしの骨髄細胞の亜集団の注入のいずれかの後より著しく低減する、請求項３０に記載の神経変性の治療方法。
【請求項３２】
前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置が、血栓溶解剤の投与を含む、請求項３１に記載の神経変性の治療方法。
【請求項３３】
前記血栓溶解剤が、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、及び組換え型プラスミノーゲンアクチベーターからなる群から選択される少なくとも一つである、請求項３２に記載の神経変性の治療方法。
【請求項３４】
前記組換え型プラスミノーゲンアクチベーターが、アルテプラーゼ、レテプラーゼ、デスモテプラーゼ又はテネクテプラーゼである、請求項３３に記載の神経変性の治療方法。
【請求項３５】
前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置が、血管形成術及び／又はステント挿入の実施を含む、請求項３１に記載の神経変性の治療方法。
【請求項３６】
前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置が、梗塞部位付近の血塊を機械的に除去することを含む、請求項３１に記載の神経変性の治療方法。
【請求項３７】
前記骨髄細胞の亜集団が静脈内又は動脈内に注入される、請求項３０に記載の神経変性の治療方法。
【請求項３８】
前記骨髄細胞の亜集団が頚動脈に注入される、請求項３０に記載の神経変性の治療方法。
【請求項３９】
前記骨髄細胞の亜集団が脳内に注入される、請求項３０に記載の神経変性の治療方法。
【請求項４０】
血栓溶解剤、及び請求項１に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団を含む、キット。
【請求項４１】
前記血栓溶解剤が、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、及び組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターからなる群から選択される少なくとも一つである、請求項４０に記載のキット。
【請求項４２】
前記組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターが、アルテプラーゼ、レテプラーゼ、又はテネクテプラーゼである、請求項４１に記載のキット。
【請求項４３】
請求項１に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団、及び血塊を機械的に除去する手段を含む、キット。
【請求項４４】
脳梗塞により生じた神経変性を治療するための組成物であって、血栓溶解剤、請求項１に記載の骨髄細胞の亜集団、及び当該組成物を注入するためのキャリヤーを含む組成物。
【請求項４５】
前記血栓溶解剤が、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、及び組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターからなる群から選択される少なくとも一つである、請求項４４に記

載の組成物。
【請求項４６】
前記組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターが、アルテプラーゼ、レテプラーゼ、又はテネクテプラーゼである、請求項４５に記載の組成物。
【請求項４７】
神経変性の治療のための不均質な骨髄細胞の亜集団を調製する方法であって、
ａ）未処理骨髄から骨髄細胞の集団を採取し；
ｂ）前記骨髄細胞の集団を低密度でプラスチック表面に播種し；
ｃ）前記播種した細胞集団を洗浄して、付着していない細胞を除去し；
ｄ）前記洗浄した細胞集団からの付着した細胞を血清含有培地中でほぼ集密状態まで培養し；
ｅ）前記培養細胞を約７連続継代以下で連続継代し、各継代において前記培養細胞を低密度で播種し；
ｆ）不均質な骨髄細胞の亜集団を採取すること
を含み、
不均質な骨髄細胞の亜集団により神経変性が治療される、方法。
【請求項４８】
前記未処理骨髄が、化学療法剤で前処理されていない対象から採取される、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
前記化学療法剤が５－フルオロウラシルである、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記骨髄細胞の集団が密度分画又はＡＣＫ溶解により分離できない、請求項４８に記載の方法。
【請求項５１】
前記密度分画がＦｉｃｏｌｌ（商標）又はＰｅｒｃｏｌｌ（商標）勾配を必要とする、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記神経変性が虚血による、請求項４７に記載の方法。
【請求項５３】
さらに、前記不均質な骨髄細胞の亜集団を神経変性の実験モデルにおいて試験することを含み、神経変性を治療する能力を示す集団のみが選択される、請求項４７に記載の方法。
【請求項５４】
前記実験モデルが虚血の実験モデルである、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
前記虚血の実験モデルが、酸素／グルコース枯渇（ＯＧＤ）細胞培養モデルである、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記実験モデルが脳卒中の動物モデルである、請求項５４に記載の方法。
【請求項５７】
神経変性を治療する細胞集団を分離するための実験プロトコルを最適化する方法であって、実験プロトコルに従って細胞集団を分離することを含み、
前記細胞集団で神経変性を治療し、
前記プロトコルの各段階の最適パラメーターが、前記分離した細胞集団が神経変性の実験動物モデルにおいて神経変性を治療する効力に対して各パラメーターが及ぼす作用を試験することにより決定される、
方法。
【請求項５８】
前記神経変性が脳梗塞により生じたものである、請求項５７に記載の方法。

【請求項５９】
前記パラメーターが、播種時の細胞密度、細胞継代数、培養培地組成、又は細胞分画を含む、請求項５７に記載の方法。
【請求項６０】
前記神経変性の実験モデルが虚血の実験モデルである、請求項５７に記載の方法。
【請求項６１】
前記虚血の実験動物モデルが、酸素／グルコース枯渇（ＯＧＤ）細胞培養モデルである、請求項６０に記載の方法。
【請求項６２】
前記虚血の実験動物モデルが脳卒中の動物モデルである、請求項６０に記載の方法。
【請求項６３】
前記虚血の実験モデルが、中大脳動脈閉塞（ＭＣＡＯ）動物モデルである、請求項６０に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
[1] 本開示は、神経変性の治療のための細胞組成物及び方法を記載する。
【背景技術】
【０００２】
[2] 神経変性は、神経系細胞の死をもたらす病的状態である。神経変性の原因は多様である可能性があり、必ずしも常に確定できるわけではないが、多数の神経障害が共通の病的状態として神経変性を共有する。例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、及び筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）はすべて、慢性神経変性を生じ、それは数年間にわたる緩除な進行性の神経系細胞死を特徴とする；これに対し、急性神経変性は、脳卒中などの虚血もしくは外傷性脳傷害などの外傷の結果としての、又は例えば脊髄損傷もしくは多発性硬化症により生じた脱髄もしくは外傷による軸索離断の結果としての、神経系細胞死の突然発症を特徴とする。
【０００３】
[3] 神経変性は、例えばアルコール耽溺、薬物嗜癖、神経毒及び放射線の被曝から生じる、さまざまな神経系細胞傷害により誘発される可能性もある。神経変性の証拠は、認知症、てんかん、種々の精神障害において、また正常な加齢プロセスの一部として見られる可能性すらある。
【０００４】
[4] 根底にある原因にかかわらず、いったん神経変性が誘発されるとこれらすべての障害の結果は常に同じ－最終的には神経系細胞の死、であることを、増加しつつある多量の証拠が指摘している。
【０００５】
[5] 脳卒中は、脳に至る血管又は脳内血管の閉塞（脳梗塞）又は破裂（出血）による急性神経変性（中枢神経系の神経系細胞の急速な損失に付随する機能喪失）を伴う。それは永続的な神経損傷、全身性合併症、さらには死亡すら生じる可能性があるので、通常は救急医療となる。脳卒中は米国及び欧州において成人の能力障害の主因であり、世界的に第２位の死因である。脳卒中は米国において死亡１５人につき１人を上回る数に達し、すべての死因のうち心疾患及び癌に次いで第３位にある(American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics - 2009 Update. Dallas, Texas: American Heart Association; 2009; Rosamond et al. Heart disease and stroke statistics - 2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation. 2007; 115: e69-e171)。３回目の脳卒中はいずれも致命的結果となる(Haheim et al. Risk factors of stroke incidence and mortality. A 12-year follow-up of the Oslo Study. Stroke. 1993; 24(10): 1484-9)。６５歳以前のすべての死亡のうち約６％、及びそれ以後の死亡全体のうち約１０％は、脳卒中

によるものである(Donnan et al. Stroke. Lancet. 2008; 371(9624): 1612-23)。したがって統計学的データは、重篤な能力障害が不幸な著しく高い頻度で多くの脳卒中になった者に生じることを立証している。実際に、脳卒中は長期成人ケアのための入院患者メディケア医療費償還制(Medicare reimbursement)の第１位の原因である。脳卒中の治療及びリハビリテーションに関連する総経費は、現在は年間４５０億米ドルを超え、疑いもなく米国及び他の主要先進国における保健費の全般的増大に関与し続けるであろう。

【０００６】

[6] 脳梗塞は最も一般的な形態の脳卒中であり、すべての脳卒中のうち８０パーセントを上回る。それらは、通常は血栓形成によるか、又はより少ないが塞栓症による、動脈遮断から生じる。発症は一般に突然であり、それに続いて一般的に局所的神経欠損が起きる。特にその梗塞が著しい場合、約２０％の患者が数日以内に死亡する。さらに１０％の患者が最初の脳卒中から数週間以内に死亡する。残念ながら、生存者は通常は重篤な能力障害を伴う。損傷を受けた脳の領域に応じて、症状には、片側の顔面又は手足の脱力感及び感覚障害、ならびに認知障害及び言語障害が含まれる。損傷を受けた脳の領域が大きいほど、より多くの機能が損なわれる可能性がある。ある程度の機能改善が数日以内に起き始める場合があり、数カ月かけてさらに回復するのが一般的である。それにもかかわらず、回復の程度は予測できず、一般に不完全である。米国脳卒中学会(American Stroke Association)によれば、発作の生存者のうち１５～３０％は永久な能力障害を伴い、２０％は発症後３ヶ月間は施設におけるケアを必要とする(Harmsen et al. Long-term risk factors for stroke: twenty-eight years of follow-up of 7457 middle-aged men in Goeteborg, Sweden. Stroke. 2006; 37(7): 1663-7)。

【０００７】

[7] 脳梗塞は、中心病変部（そこでは神経細胞が酸素枯渇の数分以内に死ぬ）及び周囲のペナンブラ(penumbra)（血流、したがって酸素を若干は受け取るが、正常には満たない）に至る。細胞死は虚血ペナンブラではより緩慢に、一般に数時間にわたって進行し、変動性の酸素欠乏、ならびに虚血カスケードによって発生する毒物、及び中心病変部におけるグルタミン酸放出によって生じる。したがって現在の領域介入は主に脳卒中ペナンブラの傷害状態を軽減することを目標とする。

【０００８】

[8] しかし、急性脳梗塞の治療法は依然として限られている。

【０００９】

[9] 脳損傷は脳への血流の減少の結果として起きるので、現在の療法は血塊の溶解（血栓溶解）又は血塊の機械的除去（血栓摘除術）のいずれかにより動脈遮断を取り除くことを試みる。血流の復旧が速やかなほど、脳細胞死はより少なく、永続性後遺症を回避できるチャンスはより大きい。

【００１０】

[10] 現在、米国では脳卒中に関して２つの治療法のみがＦＤＡ承認されている：

【００１１】

・組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーター(recombinant tissue plasminogen activator)（ｒｔ－ＰＡ；Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、すなわち動脈血塊を溶解する薬物；及び

・Ｍｅｒｃｉ Ｒｅｔｒｉｅｖａｌ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｃｏｎｃｅｎｔｒｉｃ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｉｎｃ．）及びＰｅｎｕｍｂｒａ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｅｎｕｍｂｒａ Ｉｎｃ．）、すなわち血塊を機械的に除去する器具。

【００１２】

[11] 上記のすべての療法に重大な制限がある。

【００１３】

[12] 有効であるためには、血栓溶解剤による療法は症状発症から３～４．５時間以内に実施されなければならず、これは急性脳梗塞を伴う患者のうち約３％が有効なｒｔ－ＰＡ療法を受けられるにすぎないことを意味する。さらに、血栓溶解療法は実質的に脳出血のリスク増大を伴い、これはある個体における使用をさらに制限する。

【先行技術文献】
【非特許文献】
【００１４】
【非特許文献１】American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics - 2009 Update. Dallas, Texas: American Heart Association; 2009
【非特許文献２】Rosamond et al. Heart disease and stroke statistics - 2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation. 2007; 115: e69-e171
【非特許文献３】Haheim et al. Risk factors of stroke incidence and mortality. A 12-year follow-up of the Oslo Study. Stroke. 1993; 24(10): 1484-9
【非特許文献４】Donnan et al. Stroke. Lancet. 2008; 371(9624): 1612-23
【非特許文献５】Harmsen et al. Long-term risk factors for stroke: twenty-eight years of follow-up of 7457 middle-aged men in Goeteborg, Sweden. Stroke. 2006; 37(7): 1663-7
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１５】
[13] 以上の理由で、当技術分野では、神経変性、特に虚血により生じる神経変性を緩和及び／又は阻止する安全かつ有効な療法に対する緊急の要望が満たされていない。
【課題を解決するための手段】
【００１６】
[14] したがって、一態様において本発明は、
ａ）未処理骨髄から骨髄細胞の集団を採取し；
ｂ）その骨髄細胞の集団を低密度でプラスチック表面に播種し；
ｃ）播種した細胞集団を洗浄して、付着していない細胞を除去し；
ｄ）付着した細胞集団を血清含有培地中でほぼ集密状態まで培養し；
ｅ）培養細胞の集団を約７連続継代以下で連続継代し、各継代において培養細胞を低密度で播種し；
ｆ）不均質な骨髄細胞の亜集団を採取すること
を含む方法により調製された、不均質な骨髄（ＢＭ）細胞の亜集団(heterogeneous sub population of BM cells)であって、
有効量が神経変性の治療に有効である、不均質な骨髄細胞の亜集団を提供する。
【００１７】
[15] ある側面において、有効量の不均質な骨髄細胞の亜集団は、虚血により生じた神経変性の治療に有効である。
【００１８】
[16] ある側面において、不均質な骨髄細胞の亜集団を血清含有培地中で培養する。
【００１９】
[17] ある側面において、骨髄細胞の集団を約10^2～10^6細胞／cm^2の密度で播種する。
【００２０】
[18] ある側面において、継代に際して培養細胞を約７５０細胞／cm^2以下の密度で播種する。
【００２１】
[19] 未処理骨髄は、細胞分裂を調節するいずれかの薬剤、例えば、化学療法に用いられる代謝拮抗剤を含めた、５－フルオロウラシルのような抗腫瘍薬で前処理されていない対象から採取できる。
【００２２】
[20] ある側面において、不均質な骨髄細胞の亜集団は、密度分画、例えばＦｉｃｏｌｌ（商標）もしくはＰｅｒｃｏｌｌ（商標）勾配、又はＡＣＫ(塩化アンモニウムカリウ

ム、Ammonium-Chloride-Potassium)溶解により分離できない。

【００２３】

[21] 本発明の他の側面において、不均質な骨髄細胞の亜集団をさらに、虚血により生じた神経変性の実験モデルにおいて試験し、虚血により生じた神経変性を治療する能力を示す細胞集団のみを選択する。虚血により生じた神経変性の実験モデルは、酸素／グルコース枯渇(oxygen / glucose deprivation)（ＯＧＤ）細胞培養モデル又は脳卒中の動物モデルであってもよい。ある側面において、実験モデルは、酸素／グルコース枯渇（ＯＧＤ）細胞培養モデル、続いて脳卒中の動物モデルであってもよい。

【００２４】

[22] 他の側面において、血流に注入した後、不均質な亜集団内の細胞は神経変性の部位へ移行する。

【００２５】

[23] ある側面において、虚血により生じた神経変性は脳梗塞である。

【００２６】

[24] 他の態様において、本発明はまた、虚血により生じた神経変性の治療方法であって、前記の不均質な骨髄細胞の亜集団を、神経変性を伴う哺乳動物の血流に注入することを含み、不均質な骨髄細胞の亜集団の注入によって、神経変性により生じた神経欠損が低減する方法を提供する。

【００２７】

[25] 神経変性が脳梗塞により生じたものである場合、その方法はさらに、閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置を含むことができ、追加処置と組み合わせた不均質な骨髄細胞の亜集団の注入によって、神経欠損が追加処置単独又は追加処置なしの不均質な骨髄細胞の亜集団の注入のいずれかの後より著しく低減する。

【００２８】

[26] ある側面において、閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置を、不均質な骨髄細胞の亜集団の注入と同時に行なう。

【００２９】

[27] 他の側面において、閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置を、不均質な骨髄細胞の亜集団の注入の前に行なう。

【００３０】

[28] 神経変性が脳梗塞により生じた場合、血管は血塊によって閉塞している可能性がある。血塊はアテローム硬化斑の破裂から生じる可能性がある。

【００３１】

[29] 神経変性が脳梗塞により生じた場合、閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置は、血栓溶解剤の投与を含むことができる。血栓溶解剤は、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、及び組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターのうち少なくとも１つであってもよい。さらに、組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターは、アルテプラーゼ(alteplase)、レテプラーゼ(reteplase)、デスモテプラーゼ(desmoteplase)又はテネクテプラーゼ(tenecteplase)であってもよい。

【００３２】

[30] 他の側面において、神経変性が脳梗塞により生じた場合、閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置は、閉塞した血管からの機械的な血塊除去を含むことができる。

【００３３】

[31] さらに他の側面において、血塊をフィルターで捕獲することができる。

【００３４】

[32] 他の側面において、神経変性が脳梗塞により生じた場合、閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置は、血管形成術及び／又は血管ステント挿入の実施を含むことができる。

【００３５】

[33] 不均質な骨髄細胞の亜集団を静脈内、動脈内、例えば頚動脈内、又は脳内に注入することができる。

【００３６】

[34] 他の態様において、本発明はまた、虚血により生じた神経変性の治療方法であって、不均質な骨髄細胞の亜集団を、虚血により生じた神経変性を伴う哺乳動物の血流に注入することを含み、骨髄細胞の亜集団の注入によって、虚血により生じた梗塞の体積が低減する方法を提供する。

【００３７】

[35] 神経変性が脳梗塞により生じたものである場合、その方法はさらに、閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置を含むことができ、追加処置と組み合わせた不均質な骨髄細胞の亜集団の注入によって、梗塞の体積が追加処置単独又は追加処置なしの不均質な骨髄細胞の亜集団の注入のいずれかの後より著しく低減する。

【００３８】

[36] ある側面において、神経変性が脳梗塞により生じた場合、閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置は、血栓溶解剤の投与を含む。血栓溶解剤は、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、及び組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターのうち少なくとも１つであってもよい。さらに、組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターは、アルテプラーゼ、レテプラーゼ、デスモテプラーゼ又はテネクテプラーゼであってもよい。

【００３９】

[37] 他の側面において、神経変性が脳梗塞により生じた場合、閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置は、血管形成術及び／又はステント挿入の実施を含むことができる。

【００４０】

[38] 他の側面において、神経変性が脳梗塞により生じた場合、閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置は、梗塞部位付近の血塊の機械的除去を含むことができる。

【００４１】

[39] 第２方法によれば、不均質な骨髄細胞の亜集団を静脈内、動脈内、例えば頚動脈内、又は脳内に注入することができる。

【００４２】

[40] 神経変性が脳梗塞により生じた場合、本発明は、血栓溶解剤及び前記の不均質な骨髄細胞の亜集団を含むキットも提供できる。血栓溶解剤は、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、及び組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターのうち少なくとも１つであってもよい。さらに、組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターは、アルテプラーゼ、レテプラーゼ、又はテネクテプラーゼであってもよい。

【００４３】

[41] 神経変性が脳梗塞により生じた場合、本発明はさらに、前記の不均質な骨髄細胞の亜集団及び血塊を機械的に除去する手段を含むキットを提供できる。

【００４４】

[42] さらに、神経変性が脳梗塞により生じた場合、本発明は、血栓溶解剤、前記の不均質な骨髄細胞の亜集団、及び組成物を注入するためのキャリヤーを含む、虚血により生じた神経変性を治療するための組成物を提供できる。血栓溶解剤は、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、及び組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターのうち少なくとも１つであってもよい。さらに、組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターは、アルテプラーゼ、レテプラーゼ、又はテネクテプラーゼであってもよい。

【００４５】

[43] 本発明はまた、神経変性の治療のための不均質な骨髄細胞の亜集団を調製する方法であって、

ａ）未処理骨髄から不均質な骨髄細胞の集団を採取し；

ｂ）その不均質な骨髄細胞の集団を低密度でプラスチック表面に播種し；
ｃ）播種した細胞集団を洗浄して、付着していない細胞を除去し；
ｄ）洗浄した細胞集団からの付着した細胞を血清含有培地中でほぼ集密状態まで培養し；
ｅ）培養細胞の各集団を約７連続継代以下で連続継代し、各継代において培養細胞を低密度で播種し、これによって不均質な骨髄細胞の亜集団が得られること、
を含む方法を提供する。

【００４６】
[44] ある側面において、前記の未処理骨髄は、細胞分裂を調節するいずれかの薬剤、例えば、化学療法に用いられる代謝拮抗剤を含めた、５－フルオロウラシルのような抗腫瘍薬で前処理されていない対象から採取できる。

【００４７】
[45] ある側面において、不均質な骨髄細胞の亜集団は、密度分画、例えばＦｉｃｏｌｌ（商標）もしくはＰｅｒｃｏｌｌ（商標）勾配、又はＡＣＫ(塩化アンモニウムカリウム)溶解により分離できない。

【００４８】
[46] 本発明の他の側面において、不均質な骨髄細胞の亜集団をさらに、虚血により生じた神経変性の実験モデルにおいて試験し、虚血により生じた神経変性を治療する能力を示す細胞集団のみを選択する。虚血により生じた神経変性の実験モデルは、酸素／グルコース枯渇（ＯＧＤ）細胞培養モデル又は脳卒中の動物モデルであってもよい。ある側面において、実験モデルは、酸素／グルコース枯渇（ＯＧＤ）細胞培養モデル、続いて脳卒中の動物モデルであってもよい。ある側面において、両方のモデルを用いて不均質な骨髄細胞の亜集団を試験することができる。

【００４９】
[47] 他の側面において、本発明はまた、虚血により生じた神経変性を治療する不均質な細胞集団を分離するための実験プロトコルを最適化する方法であって、
ある実験プロトコルに従って細胞集団を分離するステップを含み、
その細胞集団で虚血により生じた神経変性を治療し、
そのプロトコルの各段階の最適パラメーターが、分離した細胞集団が虚血の実験動物モデルにおいて虚血により生じた神経変性を治療する効力に対して各パラメーターが及ぼす作用を試験することにより決定される、
方法を提供できる。

【００５０】
[48] ある側面において、パラメーターは播種時の細胞密度、細胞継代数、培養培地組成、又は細胞分画を含むことができる。

【００５１】
[49] 他の側面において、虚血の実験モデルは、酸素／グルコース枯渇（ＯＧＤ）細胞培養モデル、又は脳卒中の動物モデル、例えば中大脳動脈閉塞（ＭＣＡＯ）動物モデルであってもよい。両方のモデルを用いることもできる。ある側面において、実験モデルは、酸素／グルコース枯渇（ＯＧＤ）細胞培養モデル、続いて脳卒中の動物モデルであってもよい。

【００５２】
[50] 前記の側面は、不均質な骨髄細胞の亜集団が脳梗塞により生じた神経変性を治療する能力を含めた多数の利点をもつ。この細胞集団は、梗塞の領域を著しく低減し、神経機能を改善する。

【００５３】
[51] 血栓溶解剤及び機械的な血塊除去方法との組合わせで、この細胞療法は脳卒中後の患者の生存率、機能性、及び生活の質に著しい臨床効果を及ぼすことを保証する。

【図面の簡単な説明】

【００５４】

[52] 以下に記載する図面が説明のためのものにすぎないことは当業者に理解されるであろう。図面は決して本発明の教示を限定するためのものではない。

【図１Ａ】[53] 図１は、インビトロＯＧＤモデル（図１Ａ、１Ｂ及び１Ｅ）及びインビボＭＣＡＯラットモデル（図１Ｃ、１Ｄ及び１Ｆ）を用いた骨髄由来細胞の亜集団の候補のスクリーニングからの結果を示す。[54] 図１Ａ及び１Ｂは、骨髄由来細胞の亜集団の７つの異なる候補の存在又は不存在に応答した、インビトロＯＧＤモデルにおけるそれぞれホスト細胞生存率及びサイトカイン放出量（ｂＦＧＦ及びＩＬ－６）を示す。

【図１Ｂ】図１Ａ及び１Ｂは、骨髄由来細胞の亜集団の７つの異なる候補の存在又は不存在に応答した、インビトロＯＧＤモデルにおけるそれぞれホスト細胞生存率及びサイトカイン放出量（ｂＦＧＦ及びＩＬ－６）を示す。

【図１Ｃ】[55] 図１Ｃ及び１Ｄは、静脈内（ＩＶ）又は動脈内（ＩＣＡ）注入したＮＣＳ－０１骨髄細胞亜集団又は生理食塩水に応答した、インビボＭＣＡＯラットモデルにおけるホスト細胞生存率、梗塞体積及び神経機能を比較したものである。

【図１Ｄ】[55] 図１Ｃ及び１Ｄは、静脈内（ＩＶ）又は動脈内（ＩＣＡ）注入したＮＣＳ－０１骨髄細胞亜集団又は生理食塩水に応答した、インビボＭＣＡＯラットモデルにおけるホスト細胞生存率、梗塞体積及び神経機能を比較したものである。

【図１Ｅ】[56] 図１Ｅは、ＮＣＳ－０１骨髄由来細胞亜集団の存在又は不存在に応答した、インビトロＯＧＤモデルにおけるホスト細胞生存率及びサイトカイン放出量（ｂＦＧＦ及びＩＬ－６）を示す。

【図１Ｆ】[57] 図１Ｆは、3×10^{5}、10^{6}及び10^{7}のＮＣＳ－０１骨髄由来細胞の注入に応答した、インビボＭＣＡＯラットモデルにおける梗塞体積及び神経機能の変化を示す。

【図２】[58] 図２は、１ｍｌの7.5×10^{6} ＮＣＳ－０１細胞又は生理食塩水のＩＣＡ注入に応答した、一過性（６０分間）又は永続性ＭＣＡＯラットモデルにおける梗塞体積の変化（パネルＡ）及び神経機能の変化（パネルＢ；改変ベーダーソン目盛(Modified Bederson Scale)（０＝正常～３＝最も重篤）により測定）を示す。

【図３】[59] 図３は、インビトロ酸素グルコース枯渇（ＯＧＤ）アッセイに用いたプロトコルを記載した模式図を示す。

【図４】[60] 図４は、生理食塩水、Ｌｉ細胞又はＮＣＳ－０１細胞を添加した後にＯＧＤアッセイの細胞培養培地中に分泌されたｂＦＧＦ及びＩＬ－６サイトカインの相対レベルを示す。

【図５Ａ】[61] 図５Ａ及び５Ｂは、生理食塩水、Ｌｉ細胞及びＮＣＳ－０１細胞の注入に応答したインビボＭＣＡＯラットモデルにおける、ホスト細胞の生存率、梗塞体積及び神経機能を示す。

【図５Ｂ】[61] 図５Ａ及び５Ｂは、生理食塩水、Ｌｉ細胞及びＮＣＳ－０１細胞の注入に応答したインビボＭＣＡＯラットモデルにおける、ホスト細胞の生存率、梗塞体積及び神経機能を示す。

【発明を実施するための形態】

【００５５】

[62] 本発明の実施には、別に指示しない限り、当業者がなしうる一般的な分子生物学的手法を用いる。そのような手法は当業者に周知であり、文献に十分に説明されている。例えば、Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2008), すべての補稿を含む; Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)を参照。

【００５６】

[63] 別に定義しない限り、本明細書中で用いるすべての技術用語及び科学用語は当業者が一般的に理解しているものと同じ意味をもつ。本明細書には、本出願の開示内容及び特許請求の範囲の解釈を補助するために、用語の定義も示す。定義が他のいずれかの定義と一致しない場合、この出願中に述べる定義が支配するであろう。

【００５７】
[64] 骨髄（ＢＭ）由来の細胞は、多数の異なるタイプの細胞の不均質混合物を含む。骨髄は、２つの別個の系列－造血組織及び付随する支持間質、に属する２つの主要な細胞系から構成される。したがって、少なくとも２種類の別個の幹細胞、すなわち造血幹細胞（ＨＳＣ）及び間葉幹細胞（ＭＳＣ）が骨髄に共存することが知られている(Bianco, M. Riminucci, S. Gronthos, and P. G. Robey, "Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications," Stem Cells, vol. 19, no. 3, pp. 180-192, 2001)。
【００５８】
[65] ＭＳＣは、細胞表面マーカー及びそれらが組織／細胞培養プラスチックに付着する能力の両方によって、おおまかに定義できる。したがって、ＭＳＣ集団は必然的に不均質であり、すなわちクローン化された細胞集団ではない。たとえＭＳＣ亜集団が１以上の共通な細胞表面マーカーを共有していたとしても、それにもかかわらず、それらを分離するために用いる調製方法に応じてそれらの生物活性は有意に異なる可能性がある。本明細書には、虚血により生じる急性発症型神経変性を含めた神経変性の治療に有効である不均質な骨髄細胞の集団を同定するための、２段階スクリーニングプロトコルを記載する。
【００５９】
[66] 第１段階で、骨髄細胞の亜集団の候補及び神経系細胞を含む共培養物において、骨髄細胞の亜集団をそれらが酸素グルコース枯渇（ＯＧＤ）の影響を減弱する能力についてスクリーニングする。骨髄細胞の亜集団の候補が神経変性を減弱する活性は、ＯＧＤアッセイにおいて培養培地中の栄養因子（ｂＦＧＦ及びＩＬ６）の分泌量を測定すること、及び細胞生存率を測定することにより評価される。
【００６０】
[67] 第２段階で、ＯＧＤアッセイにおいて最も強い活性をもつ骨髄由来細胞集団を、次いで虚血により生じた神経変性のインビボＭＣＡＯラットモデルにおいて試験することによってさらにスクリーニングする。このスクリーニング操作は、本明細書に定義するように、虚血により生じた神経変性を大幅に減弱するＮＣＳ－０１と呼ばれる不均質な骨髄細胞の亜集団の同定を容易にする。
【００６１】
[68] 未処理の骨髄細胞は、当業者が容易に入手できる。
【００６２】
[69] 本明細書中で用いるように、用語"未処理の骨髄"は、いずれかの追加処理、例えば密度分画又は細胞選別を施していない、ヒトの骨髄細胞吸引物を表わす。
【００６３】
[70] 他の態様において、"未処理の骨髄"は、例えば細胞分裂抑制剤又は代謝拮抗剤などの化学療法剤を含めた正常な細胞増殖及び分裂を妨げるいずれかの薬剤で前処理していない対象から得られる。
【００６４】
[71] そのような薬剤の例は、Cancer Principles and Practice of Oncology, V.T. Devita and S. Hellman (著者), 6th edition (2001年2月15日), Lippincott Williams & Wilkins Publishers中にある。
【００６５】
[72] 用語"代謝拮抗剤"は、本明細書中で用いるように、ＤＮＡの合成を阻害又は撹乱して細胞死をもたらす化合物に関する。代謝拮抗剤の例には下記のものが含まれるが、それらに限定されない：６－メルカプトプリン；シタラビン(cytarabine)；フルダラビン(fludarabine)；フロクスウリジン(flexuridine)；５－フルオロウラシル；カペシタビン(capecitabine)；ラルチトレキセド(raltitrexed)；メトトレキセート(methotrexate)；クラドリビン(cladribine)；ゲムシタビン(gemcitabine)；塩酸ゲムシタビン；チオグアニン(thioguanine)；ヒドロキシ尿素；ＤＮＡ脱メチル剤、例えば５－アザシチジン及びデシタビン(decitabine)；エダトレキセート(edatrexate)；ならびに葉酸アンタゴニスト、

例えばペメトレキセド(pemetrexed)（これに限定されない）。

【００６６】

[73] 本明細書中で用いるように、用語"密度分画"は、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（商標）又はＰｅｒｃｏｌｌ（商標）勾配を用いて骨髄細胞を細胞密度に基づいて分画するための周知の実験室操作を表わす。例えば、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（商標）をコニカルチューブの底に置き、次いで未処理の骨髄を徐々にＦｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（商標）の上に積層する。Ｆｉｃｏｌｌ勾配を通して細胞を遠心した後、細胞は密度に従って層中へ上から下に下記のように分離する：血漿及び他の成分、バフィーコート（白血球層）と呼ばれる単核細胞の層であって末梢血単核細胞(peripheral blood mononuclear cell)（ＰＢＭＣ）及び単核細胞（ＭＮＣ）を含む層、ならびにペレット中の赤血球及び顆粒球。この分画操作により赤血球がＰＢＭＣから分離される。凝固を防ぐために、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（商標）と併せてエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）及びヘパリンが一般に用いられる。

【００６７】

[74] 本明細書中で用いるように、用語"ＡＣＫ溶解"は、ＥＤＴＡで抗凝固処理した全血中の赤血球を溶解するための塩化アンモニウムカリウム溶解緩衝液（ＡＣＫ溶解緩衝液）に関係する。

【００６８】

[75] 本明細書中で用いるように、用語"骨髄細胞の集団を低密度で播種する"は、細胞培養の開始時に添加する骨髄細胞の濃度に関係する。ある側面において、骨髄細胞は約10^2又は約10^3又は約10^4又は約10^5又は約10^6細胞／cm^2の密度で播種される。好ましい側面において、骨髄細胞は約10^5～約10^6細胞／cm^2の密度で播種される。

【００６９】

[76] 本明細書中で用いるように、"神経変性"は、神経系細胞の死を含めた、進行性の神経系細胞の構造又は機能の喪失をもたらすいずれかの病的状態を表わす。したがって、神経変性は神経障害により生じる病的状態である。

【００７０】

[77] 一態様において、"神経系細胞(neural cell)"という句には、神経細胞(nerve cell)（すなわち、ニューロン、例えば単極、双極又は多極ニューロン）及びそれらの前駆体、ならびにグリア細胞（例えば、マクログリア細胞、例えばオリゴデンドロサイト、シュヴァン細胞及びアストロサイト、又はミクログリア細胞）及びそれらの前駆体が含まれる。

【００７１】

[78] 一態様において、"有効量"は、神経変性の遅延、停止もしくは回復、神経欠損の低減、又は神経応答の改善を含めた、神経変性に関連する症状及び／又は病的状態の臨床的に有意の改善を誘発するのに必要な細胞の最適数を表わす。ある態様において、ＮＣＳ－０１細胞集団の有効量は脳卒中後の急性神経変性の突然発症により生じる梗塞の体積を低減するのに必要な細胞の最適数を表わす。特定の生物に適切なＮＣＳ－０１細胞集団の有効量は、当業者がルーティン実験を用いて決定できる。

【００７２】

[79] 本明細書中で用いるように、"神経変性の治療"は、ＮＣＳ－０１細胞集団により神経変性を治療することを表わし、その結果、神経変性の遅延、停止もしくは回復、神経欠損の低減、又は神経応答の改善を含めて、神経変性に関連する症状及び／又は病的状態が臨床的に有意に改善される。

【００７３】

[80] 本明細書中で用いるように、"血栓溶解剤"は、血栓溶解と呼ばれる措置に際して血塊を溶解するために医療に用いられる薬物を表わす。限定ではない血栓溶解剤の例には、組織プラスミノーゲン組織アクチベーターｔＰＡ、アルテプラーゼ（Ａｃｔｉｖａｓｅ）、レテプラーゼ（Ｒｅｔａｖａｓｅ）、テネクテプラーゼ（ＴＮＫａｓｅ）、アニストレプラーゼ(anistreplase)（Ｅｍｉｎａｓｅ）、ストレプトキナーゼ（Ｋａｂｉｋｉｎａ

ｓｅ、Ｓｔｒｅｐｔａｓｅ）及びウロキナーゼ（Ａｂｂｏｋｉｎａｓｅ）が含まれる。

【００７４】

[81] 以下に、虚血による神経変性の治療を含めた神経変性の治療に最適である不均質な骨髄細胞の亜集団を未処理の全骨髄から分離して特性分析する操作を記載する。

【００７５】

虚血により生じた神経変性を治療するのに有効な骨髄細胞集団の候補の分離

【００７６】

[82] 未処理の全骨髄は、細胞分裂抑制剤、又は代謝拮抗剤、例えば５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）で前処理されていない哺乳動物から採取される。

【００７７】

[83] この未処理骨髄細胞を、次いで組織／細胞培養プラスチックに直接乗せ、血清含有培地中で連続継代することにより増殖させる。各継代に際して、細胞をきわめて低い密度、すなわち約７５０細胞／ｃｍ^{2}以下で播種し、ほぼ集密状態まで培養した後、さらに継代する。付着していない細胞を洗浄により除去する。この骨髄は密度分画により処理されていないので、出発時の全骨髄細胞の集団は造血細胞及び非造血細胞、ならびに有核骨髄細胞及び非有核骨髄細胞の両方を含有する。

【００７８】

[84] 次いで、それぞれ継代３回目及び５回目でマスター細胞バンク(Master Cell Bank)（ＭＣＢ）及び作業用細胞バンク(Working Cell Bank)（ＷＣＢ）を樹立し、凍結保存する。必要ならば、ＷＣＢ細胞をきわめて低い密度、例えば約７５０細胞／ｃｍ^{2}以下で播種し、血清含有培地中で増殖させた後、標準法を用いて収穫し、凍結保存する。

【００７９】

骨髄細胞の集団が神経変性を減弱する能力を評価するための２段階選択プロトコル

【００８０】

[85] 骨髄細胞の集団の'候補'を、次いで神経変性の治療に最適な骨髄細胞の集団を選択する２段階法でスクリーニングすることができる。

【００８１】

[86] 第１段階で、骨髄細胞の集団の候補をインビトロ酸素グルコース枯渇アッセイ法で試験する。ここで、神経変性を模倣した実験条件下で、骨髄細胞の集団の候補が、神経系細胞と共培養される。インビトロで神経変性を減弱することが示された細胞集団は、次いで、インビボでそれらが神経変性を治療する能力についてスクリーニングされる。

【００８２】

[87] 第２段階で、選択した骨髄細胞の集団の候補を、虚血により生じた神経変性のラットＭＣＡＯモデルにおいて評価する。次いで、インビボで神経変性を減弱する最大活性を示す不均質な骨髄細胞の集団の候補を選択する。

【００８３】

[88] この２段階スクリーニング法により選択した不均質な骨髄細胞の集団を、ＮＣＳ－０１細胞集団又はＮＣＳ－０１と呼ぶ。

【００８４】

神経変性を減弱する活性をもつ骨髄細胞の集団を分離するのに最適な細胞培養条件の同定

【００８５】

[89] この２段階スクリーニングプロトコルは、神経変性を治療できる骨髄細胞の集団の培養に最適な実験条件、例えば播種時の細胞密度、細胞継代数、細胞培地組成、又は細胞分画法を同定する際にも有用である。

【００８６】

[90] こうして２スクリーニング法を用いると、最適な再播種細胞濃度は各継代に際して約７５０細胞／ｃｍ^{2}以下である。最適培養培地は血清含有培地である。ＮＣＳ－０１細胞集団を、未処理の全骨髄の最初の平板培養から約７、又は約６、又は約５、又は約４、又は約３、又は約２継代以下で継代することができる。長期継代、すなわち未処理の全

骨髄の最初の平板培養から７継代を超える継代は、ＮＣＳ－０１がＯＧＤインビトロアッセイ及びＭＣＡＯラットモデルにおいて神経変性を治療する能力を漸減させ、又は無効にする。

【００８７】

[91] 神経変性のＯＧＤアッセイ及びＭＣＡＯラットモデルを以下に詳細に記載する。

【００８８】

神経変性を治療することができる骨髄細胞の集団のインビトロスクリーニング

【００８９】

[92] 骨髄細胞の集団の候補を、まずそれらが神経変性を阻止する能力について、ニューロン－アストロサイトの共培養で、虚血により生じる神経変性を模倣した酸素グルコース枯渇（ＯＧＤ）の培養条件に従ってスクリーニングする。

【００９０】

[93] ラット又はヒトのニューロン及びアストロサイトの一次混合培養物を、まず酸素グルコース枯渇（ＯＧＤ）の培養条件（例えば、８％酸素、無グルコース培地）に約０．５～３時間曝露して、神経変性を誘導する。次いで、細胞培養の酸素グルコース枯渇を停止し、このＯＧＤ誘導した神経系細胞を生理的条件下で２時間培養し、次いで骨髄細胞の集団の候補の存在下でさらに３時間、共培養する。次いで、骨髄細胞の集団の候補の存在下又は不存在下で、ＯＧＤ後０及び５時間目にホスト細胞の生存率を測定することにより、神経変性を評価する。ホスト細胞（ニューロン及びアストロサイト）の生存率は、例えばトリパンブルー染色及び／又はＭＴＴ（３－（４，５－ジメチルチアゾール－２－イル）－２，５－ジフェニルテトラゾリウムブロミド）アッセイを用いて評価することができる。

【００９１】

[94] 対照（骨髄細胞の集団の候補を添加しないもの）の細胞生存率と比較して、骨髄細胞の集団の候補の存在下で約５％、又は約１０％、又は約１５％、又は約２０％、又は約２５％、又はそれ以上の細胞生存率の増大は、その骨髄細胞の集団の候補が、酸素及びグルコースの枯渇により生じる神経変性からニューロン／アストロサイト共培養物を保護及び救済できることの指標となる。

【００９２】

[95] さらに、骨髄細胞の集団の候補の存在下又は不存在下でＯＧＤ条件を施したニューロン／アストロサイト細胞培養の培養培地を、栄養因子、例えばｂＦＧＦ及び／又はＩＬ－６の誘導分泌について市販のＥＬＩＳＡキットでアッセイすることもできる。

【００９３】

[96] 特定の態様において、骨髄細胞の集団の候補を、それらが酸素グルコース枯渇に応答してニューロン／アストロサイト共培養の培地中に分泌されるｂＦＧＦ及び／又はＩＬ－６の量の増加を誘導する能力（ただし、酸素グルコース枯渇が無い状態では誘導しない）に従って選択する。

【００９４】

[97] 他の態様において、骨髄細胞の集団の候補を、それらが酸素グルコース枯渇に応答してニューロン／アストロサイト共培養の培地中に分泌されるｂＦＧＦ及び／又はＩＬ－６の量の少なくとも２倍又はそれ以上の増加を誘導する能力（ただし、酸素グルコース枯渇が無い状態では誘導しない）に従って選択する。

【００９５】

[98] ＯＧＤ誘導による細胞死の発生率を低減させかつ栄養因子（例えば、ｂＦＧＦ及び／又はＩＬ－６）の分泌量の増加を誘導する骨髄細胞の集団の候補を、次いでインビボＭＣＡＯラットモデルにおけるスクリーニングのために選択する（下記を参照）。

【００９６】

[99] 例えば、骨髄細胞の集団の候補がＯＧＤ誘導による細胞死の発生率を約２５％より多く低減させかつ栄養因子の分泌量を少なくとも１０％以上増加させれば、それらを以後のスクリーニングのために選択できる。

【００９７】
神経変性を治療できる骨髄細胞の集団の候補のインビボスクリーニング
【００９８】
[100] 前記のＯＧＤアッセイスクリーニング段階で選択した骨髄細胞の集団の候補を、それらがインビボで神経変性を治療する能力について試験する。例えば、骨髄細胞の集団の候補を、それらが神経変性性疾患のトランスジェニックモデルを含めた神経変性の実験動物モデルにおいて神経変性を治療する能力について試験することができる(例えば、Harvey et al. Transgenic animal models of neurodegeneration based on human genetic studies J Neural Transm. (2011) 118(1): 27-45; Trancikova et al. Genetic mouse models of neurodegenerative diseases. Prog Mol Biol Transl Sci. (2011); 100: 419-82; Chan et al. Generation of transgenic monkeys with human inherited genetic disease Methods (2009) 49(1): 78-84; Rockenstein et al. Transgenic animal models of neurodegenerative diseases and their application to treatment development Adv Drug Deliv Rev. (2007) 59(11): 1093-102を参照)。
【００９９】
[101] 一態様において、神経変性の実験動物モデルは、脳卒中／脳虚血の動物モデル(Graham et al. Comp Med. 2004 54(5): 486-96により概説)、例えばＭＣＡＯラットモデルであってもよく、この場合は大脳動脈の周囲に外科的に付与した結紮による狭窄が、脳への血流を制限して虚血及びそれに続く神経変性を生じることにより脳梗塞の作用を模倣している。
【０１００】
[102] 一過性ＭＣＡＯモデルにおいて、ＯＧＤアッセイで選択した骨髄細胞の集団の候補を一過性ＭＣＡＯラットの血流への定速点滴注入により投与する。当業者は適切な投与量を決定でき、それは例えば７．５×１０^{4}細胞から３．７５×１０^{7}細胞までの範囲であってもよい。それらの細胞を、例えば頚静脈（ＩＶ）又は頚動脈（ＩＣＡ）のいずれかに注入することができる。対照は、等体積の凍結保存媒体又は生理食塩水の投与からなる。次いで、骨髄細胞の集団の候補に含まれる細胞は一過性ＭＣＡＯにより生じた梗塞部位へ移行する。
【０１０１】
[103] ＯＧＤ選択した骨髄細胞の集団の存在下又は不存在下での神経機能を、次いで梗塞後の種々の時点で改変ベーダーソン神経学的試験（Bederson Neurologic Test)により評価する。次いでラットを屍殺し、梗塞の体積及びホスト細胞の生存率を、治療された、及び治療されなかったＭＣＡＯラットからの脳組織切片のヘマトキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）又はニッスル(Nissl)染色により測定する。次いで骨髄細胞の集団を、それらが対照動物と比較してＭＣＡＯ後２８日目までに神経機能を改善し、ホスト細胞の生存率を高め、梗塞の体積を低減する能力に従って選択する。
【０１０２】
脳梗塞により生じた神経変性を治療するための併用療法
【０１０３】
[104] 中大脳動脈を通る血流を長期間止めることにより、血塊を伴う永続性動脈閉塞を模倣する。大脳動脈を通る血流を限られた期間止めた後に復旧させて再潅流する一過性閉塞を、脳梗塞により生じた動脈閉塞の直後に血栓溶解又は機械的な血塊除去などにより脳卒中ペナンブラへの血流を復旧させる療法を模倣するものとする。
【０１０４】
[105] 多くの点で、一過性ＭＣＡＯラットへのＮＣＳ－０１細胞集団の投与は、血栓溶解、又は血管形成術もしくは外科的なステント移植を含めた機械的な血塊除去の結果としての、閉塞動脈の再潅流を模倣する。
【０１０５】
[106] 神経変性が脳梗塞により生じた場合、ＮＣＳ－０１細胞集団を虚血により生じた神経変性の治療のための血栓溶解療法と併用できる。血栓溶解剤及びそれらの投与につ

いての記載は、例えばU.S. Patent No. 5,945,432及び6,821,985中にある。

【０１０６】

[107] 虚血事象後に注入する血栓溶解剤は、ＮＣＳ－０１細胞集団の注入の前、一緒又は後に投与することができる。

【０１０７】

[108] 開示したＮＣＳ－０１細胞組成物の注入と併用できる脳卒中ペナンブラへの血流改善のための機械的措置の例には、限定ではなく、当技術分野で周知の血管形成術又は外科的なステント移植が含まれる。

【０１０８】

[109] 以下の実施例を参照して、本発明をさらに詳細に記載する。

【実施例】

【０１０９】

[110] 実施例は、本発明に従って神経変性を治療するための骨髄細胞の亜集団を分離、選択及び使用する方法を示す。これらの例に記載する方法の各段階は限定のためのものではないと理解される。前記に述べたもの以外の本発明の他の目的及び利点は実施例から明らかになるであろう；実施例は本発明の範囲を限定するためのものではない。

【０１１０】

実施例１：ＮＣＳ－０１細胞集団の分離

１）骨髄細胞の集団の候補の分離

[111] 不均質な骨髄細胞の集団を下記の調製方法により分離した：

・ヒトの未処理骨髄は、予備スクリーニングした健康な５０歳以下のドナーから資格をもつ業者により採取された。骨髄は、５－フルオロウラシルなどの細胞分裂抑制剤で前処理されていないドナーから採取された；

・処理済み又は未処理の骨髄を、次いで低密度（10^2～10^6細胞／cm^2）で組織／細胞培養プラスチック表面に播種し、血清含有培地の存在下で培養した；

・数日おいて細胞をプラスチックに付着させた後、付着していない細胞を洗浄により除去した；そして

・付着した細胞集団を血清含有培地中でほぼ集密状態まで培養した；培養細胞の集団を約７連続継代以下で連続継代し、各継代に際して培養細胞を低密度で播種した。

【０１１１】

[112] 神経変性を治療することができる骨髄細胞の集団を分離するのに最適な培養条件を選択するために、細胞集団をまず、播種時の細胞密度、細胞継代数、培養培地組成、又は細胞分画など種々の培養条件下で増殖させた（表Ｉを参照）。

【０１１２】

[113] 未処理骨髄由来の、又は密度分画もしくはＡＣＫ溶解後の骨髄細胞を、２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）及び１０％のウシ胎仔血清（ＦＢＳ、ＨｙＣｌｏｎｅ又はＧＩＢＣＯ）を補充したα－ＭＥＭ、又は２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）及び１０％のウシ胎仔血清（ＦＢＳ、ＨｙＣｌｏｎｅ又はＧＩＢＣＯ）を補充したα－ＭＥＭ（Ｍｅｄｉａｔｅｃｈ）、又は無血清培地（ＳｔｅｍＰｒｏ）の存在下で、組織／細胞培養プラスチックに播種した。付着していない細胞を洗浄除去した後、付着した細胞をほぼ集密状態まで増殖させた。細胞を次いで合計３、４、５又は６継代で継代した。

【０１１３】

[114] 骨髄細胞の集団の候補を、次いでそれらが神経変性を治療する能力についてインビトロＯＧＤアッセイ及びインビボＭＣＡＯ試験で試験した。

【表１】

細胞	細胞画分	培養培地	継代
細胞 1	未処理 BM*	αMEM + 10% FBS	3
細胞 2	Ficoll 使用	αMEM + 10% FBS	3
細胞 3	ACK 溶解使用	αMEM + 10% FBS	3
細胞 4	Ficoll 使用	無血清培地（StemPro）	6
細胞 5	ACK 溶解使用	無血清培地（StemPro）	5
細胞 6	Ficoll 使用	無血清培地（StemPro）	4
細胞 7	ACK 溶解使用	無血清培地（StemPro）	4

*骨髄

【０１１４】

２）インビトロ酸素／グルコース枯渇（ＯＧＤ）プロトコルを用いる一次スクリーニング

[115] 前記に概説した調製プロセスにおける種々のパラメーター、例えば密度分画の存在下又は不存在下での骨髄調製、播種密度、継代数、培養培地、及び／又はそれらの組合わせを、インビトロ酸素／グルコース枯渇（ＯＧＤ）実験プロトコルにより評価して、神経変性を治療することができる骨髄細胞の集団の候補を分離するのに最適な方法を決定した。

【０１１５】

[116] インビトロＯＧＤモデルを一次スクリーニングとして選択したのは、それが脳梗塞により生じる神経変性を模倣しているからである。詳細には、特定の骨髄細胞の亜集団の候補が培養中の神経系細胞の死を阻止し、ｂＦＧＦ及びＩＬ－６などの神経保護栄養因子の分泌を誘導することができるか否かを、ＯＧＤにより試験した。

【０１１６】

[117] インビトロ酸素グルコース枯渇（ＯＧＤ）モデルにおいて、ラットのニューロン及びアストロサイトの一次混合培養物（１：１の比率で）にＯＧＤ傷害（８％酸素；グルコースを含まないアール(Earle)の平衡塩類溶液）を９０分間付与し、生理的条件に戻して２時間おいた後、このＯＧＤ処理したニューロン－アストロサイト共培養物に骨髄細胞の集団の候補を添加してさらに３時間おいた。ＯＧＤ直後及びＯＧＤ後５時間目に、標準トリパンブルー染色及びＭＴＴ（３－（４，５－ジメチルチアゾール－２－イル）－２，５－ジフェニルテトラゾリウムブロミド）法を用いて神経系細胞の生存率を評価した。

【０１１７】

細胞培養

[118] ラットのニューロン及びアストロサイトの一次混合培養物を、業者のプロトコル（ＣＡＭＢＲＥＸ，メリーランド州）に従った培養により維持した。融解した直後に、細胞（４×１０^{4}細胞／ウェル）をポリリジンでコートした９６ウェルプレートに播種し、Ｎｅｕｒｏ ｂａｓａｌ ｍｅｄｉａ(神経基礎培地)（ＧＩＢＣＯ，カリフォルニア州）［２ｍＭのＬ－グルタミン，２％のＢ２７（ＧＩＢＣＯ，カリフォルニア州），ならびに５０Ｕ／ｍｌのペニシリン及びストレプトマイシンを含有］中、３７℃で、５％ ＣＯ$_2$を含む加湿雰囲気において７～１０日間増殖させた。次いでニューロン及びアストロサイト細胞集団の純度をそれぞれＭＡＰ２及びＧＦＡＰ免疫染色により評価して、９９％を超えることが認められた。

【０１１８】

酸素グルコース枯渇（ＯＧＤ）及び骨髄細胞の集団の候補との共培養

[119] 以前の記載(Malagelada et al., Stroke (2004) 35(10): 2396-2401)をわずかに改変したものに従って、培養細胞にＯＧＤ傷害モデル条件を付与した。簡単に述べると、培養培地を、下記の組成をもつグルコースを含まないアールの平衡塩類溶液（ＢＳＳ）

で置き換えた：１１６ｍＭのＮａＣｌ，５．４ｍＭのＫＣｌ，０．８ｍＭの$MgSO_4$，１ｍＭのNaH_2PO_4，２６．２ｍＭの$NaHCO_3$，０．０１ｍＭのグリシン，１．８ｍＭの$CaCl_2$，ｐＨを７．４に調整。培養細胞を加湿チャンバーに入れて、９２％ N_2及び８％ O_2ガスの連続流で１５分間平衡化した。平衡に達した後、チャンバーを密閉し、３７℃のインキュベーターに９０分間入れた。この期間後に、培養培地にグルコースを添加しかつ培養物を標準的な９５％ O_2及び５％ CO_2のインキュベーターに戻すことにより、ＯＧＤを終結した。次いで標準培地及び正常酸素条件で２時間の'再潅流'を行ない、その後、このＯＧＤ処理した混合ニューロン－グリア培養物に骨髄（ＢＭ）細胞集団の候補を添加して約３時間おいた。次いで上清及び骨髄細胞の集団を混合培養物から洗浄により分離した。その後、下記に従って細胞について細胞生存率及び免疫細胞化学の試験を実施し、分泌された栄養因子の量を市販のＥＬＩＳＡアッセイ法により測定した。

【０１１９】

細胞生存率アッセイ

[120] 細胞生存率を２つの時点で評価した：ＯＧＤの直後及びＯＧＤの５時間後（すなわち、２時間の再潅流＋選択した骨髄細胞の集団による３時間の処理）。ＯＧＤ後の生存率アッセイのために、骨髄由来細胞を含有する上清を、付着した混合神経系細胞培養物から分離した。トリパンブルー染色法を実施し、各ウェル（処理条件当たりｎ＝５）のランダムに選択した３領域（０．２mm^2）において平均生存細胞数を計算して、それぞれの処理条件についての細胞生存率を調べた。さらに、上清からペレットとして収穫した骨髄由来細胞のサブセットについてトリパンブルー染色を実施した。

【０１２０】

ＥＬＩＳＡアッセイ

[121] 骨髄由来細胞が分泌する栄養因子、例えばｂＦＧＦ及びＩＬ－６ならびに可能性のある神経栄養因子が、ＯＧＤ培養条件により模倣した神経変性の治療に関与すると推定される。したがって、培養培地中へ分泌されたこれらの分子の量を測定することにより、インビボで神経変性を治療することができる骨髄細胞の集団の候補を評価するための基準が得られる。神経系細胞と骨髄細胞の集団の候補を標準培養条件下で共培養したもの又はＯＧＤ曝露したものから上清を採集し、市販のＥＬＩＳＡキットを用いて製造業者の指示に従って栄養因子分泌の存在を分析した。

【０１２１】

[122] 前記の表Ｉに示したパラメーターに従って処理した骨髄由来細胞集団のＯＧＤ分析の結果を図１Ａ及び１Ｂに示す。

【０１２２】

[123] 図１Ａ及び１Ｂに示した結果に基づき、αＭＥＭ ＋ １０％ ＦＢＳを最適な細胞培養培地として選択し、未処理骨髄が密度分画（例えば、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ又はＰｅｒｃｏｌｌ）又はＡＣＫ溶解によって処理した骨髄より優れていることが認められた。αＭＥＭ ＋ １０％ ＦＢＳ培地における未処理骨髄細胞に最適な継代数は７継代以下であることが認められた。

【０１２３】

３）インビボ中大脳動脈閉塞ラットモデルを用いる骨髄細胞の集団の候補の二次スクリーニング及び選択

[124] インビトロＯＧＤモデルにおける一次スクリーニングで得られた結果に基づいて、骨髄細胞の集団の候補で処置したＭＣＡＯラットの神経欠損及び梗塞体積を、生理食塩水のみの投与で処置したＭＣＡＯラットと比較することにより、骨髄細胞の集団の候補それぞれが神経変性を治療する生物活性を評価した。

【０１２４】

中大脳動脈閉塞（ＭＣＡＯ）外科処置

[125] 動物をイソフルラン（１．５％～２．５％，酸素含有）により麻酔した。頭皮を剃毛し、アルコール及びクロルヘキシジン外科用スクラブで拭いた。次いで動物を定位固定装置に置いた。眼のわずかに後方から始めて約２．５ｃｍ長さの正中線矢状面切開を

行ない、スパーテルの丸めた端を用いて頭蓋領域を露出させた。ブレグマを基準点として、ベースライン（すなわち、脳卒中の外科処置前）レーザードップラー記録を下記の座標から求めた（ＡＰ：＋２．０，ＭＬ：±２．０）。頸部腹側の皮膚を顎から胸骨柄(manubrium)まで剃毛し、アルコール及びクロルヘキシジン外科用スクラブで拭いた。次いで動物を外科用顕微鏡下へ移動させた。右頸動脈上部の皮膚切開を行なった。外頸動脈を分離し、可能な限り遠位で結紮した。後頭動脈を焼灼した。場合により外頸動脈から伸びる分枝がもう一つ又は二つあり、それも焼灼する必要があった。第２結紮を外頸動脈の近位に配置し、結紮間で切断した。翼口蓋動脈(pterygopalatine artery)を結紮した。これに続いて、張力を付与して血流を制限するために、総頸動脈の周囲に仮の縫合を施した。結紮を使って外頸動脈の近位断端を引き戻して、頸動脈分岐部を効率的に伸ばした。外頸動脈の断端にミクロ鋏を用いて切開を行ない、端が予め加工された４－０ナイロン糸を挿入し、抵抗が感じられるまで内頸動脈中へ通した（約１５～１７ｍｍ）。これによって中大脳動脈（ＭＣＡ）が効率的に遮断される。外頸動脈の近位断端の周囲の結紮で糸を適所に固定した。反対側の総頸動脈を分離し、仮の結紮で固定した。皮膚切開部をステープルで閉じた。次いで、レーザードップラー記録のために動物を定位固定装置に固定し、ＭＣＡ閉塞の成功を確認した。５分後に、反対側の総頸動脈の結紮を取り除いた。イソフルランを停止し、動物を回復ケージに入れて保温ブランケット上に置いた。６０分後、動物を再びイソフルランで麻酔し、この一過性モデルにおける試験のために切開部を開いた。閉塞の原因となっている糸を取り除き、外頸動脈の断端を頸動脈分岐部近くで連結した(ligated)。皮膚切開部をステープルで閉じた。レーザードップラー記録のために動物を再び定位固定装置に固定し、再潅流の成功を確認した。最後に動物を回復ケージに入れて保温ブランケット上に置いた。

【０１２５】

神経機能試験

[126] 十分に認識されている改変ベーダーソン神経学的試験を各ラットについて実施した；これは下記のそれぞれからのスコアを求めることを伴う：

・対側後足の引き戻し；これは後足を外側へ２～３ｃｍずらされた後に動物がそれを元に戻す能力を測定し、０（即時引き戻し）から３（戻さない）まで格付けされる；

・ビーム歩行能力；０（幅２．４－ｃｍ、長さ８０－ｃｍのビームを直ちに横切るラット）から３（ビーム上に１０秒間留まることができないラット）まで格付けされる；及び

・両前足握力；これは直径２－ｍｍのスチール棒にしがみつく能力を測定し、０（正常な前足握り挙動を伴うラット）から３（前足で握ることができないラット）まで格付けされる。

【０１２６】

[127] ３試験すべてからのスコアを、それぞれの評価日に約１５分間にわたって評価した。３試験から平均スコアを計算して、０（正常な神経機能）から最大３（重篤な神経欠損）までの範囲の神経欠損総合スコアを求めた。したがって、スコアが高いほど神経欠損は大きい。

【０１２７】

[128] パイロット試験に基づけば、約２．５を超えるスコアは動物が脳卒中の特徴である神経欠損を伴うことの指標となる。

【０１２８】

組織所見

脳切片標本

[129] 脳傷害の領域を同定するために脳切片標本をデザインする。ＭＣＡ閉塞後、７日目又は２８日目にラットを安楽死させ、生理食塩水に続いて４％パラホルムアルデヒドの経心臓潅流により潅流した。次いで脳を４％パラホルムアルデヒド中に固定し、その後２５％ショ糖に浸漬した。それぞれの前脳を、各動物につきブレグマ５．２ｍｍからブレグマ－８．８ｍｍまでに対応する前－後座標で３０μｍ厚さの冠状組織切片に切断した。

【０１２９】

梗塞体積の測定

[130] 脳当たり少なくとも４つの冠状組織切片をヘマトキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）染色又はニッスル染色用に処理した。脳梗塞を確認するために、対側半球の面積から同側半球の無傷面積を差し引いた間接病変面積を用いた。

【０１３０】

[131] 病変体積を、対側半球と比較した病変部の体積パーセントとして提示した。ヘマトキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）染色又はニッスル染色を用いて病変部体積の組織学的測定を実施し、代表的画像をディジタル取得し、ＮＩＨ Ｉｍａｇｅ Ｊソフトウェア及び定量画像分析により処理した。病変部体積を次式に従って決定した：

【０１３１】

[132] 切片の厚さ×全脳切片における梗塞面積の和

【０１３２】

[133] 梗塞面積の虚血後浮腫により生じた人為的な結果を最小限に抑えるために、対側半球の全無傷面積から同側半球の非梗塞面積を差し引くことにより、同側半球の梗塞面積を間接測定した。

【０１３３】

虚血による梗塞周囲領域における細胞生存率の測定

[134] 皮質の梗塞周囲領域に対応するランダムに選択した高倍率視野を用いて、この虚血領域中で生存している細胞を計数した(Yasuhara et al., Stem Cells and Dev, 2009)。虚血皮質領域内のホスト神経系細胞の生存率を推定するために、クリスタルバイオレット液（Ｓｉｇｍａ，ミズーリ州セントルイス）を用いてニッスル染色を実施し、３切片におけるランダムに選択した皮質領域及び対応する対側無傷皮質の視野を写真撮影し（Ｃａｒｌ Ｚｅｉｓｓ，Ａｘｉｏｐｈｏｔ２）、ランダムに選択した高倍率視野（２８，８００μｍ^2）の細胞を計数することにより細胞数を測定した。無傷側に対する損傷を受けた皮質中の保存されたニューロンのパーセントを計算し、統計分析に用いた。脳切片を盲目コードし、計数された染色細胞の総数をＡｂｅｒｃｒｏｍｂｉｅ式により補正した。

【０１３４】

ＭＣＡＯ脳卒中動物モデルを用いた骨髄細胞の集団の候補のスクリーニング

[135] ３匹（ＩＶ投与）又は６匹（ＩＣＡ投与）の雄ラット／グループに１時間の一過性ＭＣＡＯを施し、次いで生理食塩水又は前記のプロトコルに従って分離した骨髄由来細胞（ＮＣＳ－０１細胞集団と呼ぶ）７．５×１０^{6}個を含有する注入用媒体１ｍｌを注入した。細胞投与後７日目まで動物を追跡した。

【０１３５】

[136] 図１Ｃ及び１Ｄは、一過性ＭＣＡＯを伴うラットに投与した際に、ＩＶ又はＩＣＡ投与したＮＣＳ－０１骨髄細胞集団が神経学的及び病理学的な実質的有益性をもたらしたことを示す。さらに、ＮＣＳ－０１は虚血により誘導された神経変性を治療することによりホスト細胞の死を阻止し、結果的に梗塞体積を低減し、かつ神経欠損を改善した。

【０１３６】

[137] 一次インビトロスクリーニング及び二次インビボスクリーニングは、神経変性を治療できる最適な骨髄由来細胞の亜集団（ＮＣＳ－０１細胞集団と呼ぶ）がその方法によって信頼性及び再現性をもって生成されるまで繰り返された。

【０１３７】

[138] この最適化されたＮＣＳ－０１細胞集団を、インビトロＯＧＤモデルで再試験してヒトのニューロン及びアストロサイトの共培養における抗神経変性活性を確認し（図１Ｅを参照）、かつインビボラットＭＣＡＯモデルで再試験した（図１Ｆ）。図１Ｆに示した実験は、ＮＣＳ－０１細胞集団が神経変性を治療する能力が用量依存性であることをも示す。

【０１３８】

実施例２：神経変性を治療できるＮＣＳ－０１細胞集団を調製するための標準化した調製方法

[139] 未処理の全骨髄は、いずれかの細胞分裂抑制剤、又は代謝拮抗剤、例えば５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）で前処理されていない哺乳動物から採取される。この骨髄は密度分画又はＡＣＫ溶解により処理されていないので、出発時の全骨髄細胞集団は造血細胞及び非造血細胞、ならびに有核骨髄細胞及び非有核骨髄細胞の両方を含有する可能性がある。

【０１３９】

[140] 上記の未処理骨髄を希釈し、低密度（10^5～10^6細胞／cm^2）で組織／細胞培養プラスチック表面に播種し、血清含有培地（２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）及び１０％のウシ胎仔血清（ＦＢＳ，ＨｙＣｌｏｎｅ又はＧＩＢＣＯ）を補充したα－ＭＥＭ（フェノールレッドを含まない）、又は２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）及び１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ，ＨｙＣｌｏｎｅ又はＧＩＢＣＯ）を補充したα－ＭＥＭ（Ｍｅｄｉａｔｅｃｈ））の存在下で培養する。次いで細胞培養物を３７℃、５％CO_2、８０％ＲＨ（相対湿度）で７２時間インキュベートする。

【０１４０】

[141] 細胞をＤ－ＰＢＳですすいで、付着していない細胞及びＲＢＣを細胞培養プラスチックから除去し、続いて補充α－ＭＥＭで培地を完全交換し、これをその後のすべての供給に用いる。次いで細胞培養物（継代０又はｐ０）を３７℃、５％CO_2、８０％ＲＨでインキュベートした。

【０１４１】

[142] 継代１について、細胞をＤ－ＰＢＳですすぎ、プラスチックに付着した細胞を細胞解離試薬により離脱させる。解離した細胞を３００ｇ（約１０００ｒｐｍ）で８～１０分間の遠心により収穫する。ペレット状細胞を補充α－ＭＥＭで再懸濁し、約７５０細胞／cm^2の密度で組織／細胞培養プラスチック表面に播種する。

【０１４２】

[143] 細胞をほぼ集密状態まで培養した後、さらに継代する。

【０１４３】

[144] 継代２について、前記に従って細胞を収穫し、この場合も約７５０細胞／cm^2の密度で組織／細胞培養プラスチック表面に再び播種する。

【０１４４】

[145] 継代３について、細胞を細胞解離試薬を用いて収穫し、前記に従って遠心する。ペレット状細胞を次いで再懸濁し、プールする。細胞を凍結保存培地に再懸濁し、１ｍＬの細胞懸濁液をＣｒｙｏｖｉａｌ（Ｎｕｎｃ）中に小分けする。バイアルを制御速度フリーザーにより凍結し、凍結プログラムが完了した時点で、気相液体窒素フリーザー内での永久保存のためにドライアイス上へ移す。

【０１４５】

[146] 継代３（ｐ３）の細胞を入れたバイアルがＭＣＢとなる。

【０１４６】

[147] ＭＣＢのバイアルのひとつを融解し、回収した細胞（継代４又はＰ４）を、１０％ ＦＢＳ及びＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）を補充したα－ＭＥＭ中、約７５０細胞／cm^2の密度で組織／細胞培養プラスチックに播種する。細胞を次いで３７℃、５％CO_2、８０％ＲＨでインキュベートする。

【０１４７】

[148] 継代４について、細胞をほぼ集密状態まで培養した後、さらに継代する。前記に従って細胞を収穫し、新たな組織／細胞培養プラスチック表面に播種する。

【０１４８】

[149] 継代５について、ＭＣＢに関して前記に述べた方法に従って細胞を収穫し、凍結する。バイアルに小分けして凍結保存した継代５（ｐ５）の細胞がＷＣＢとなる。

【０１４９】

[150] 必要な場合には、ＭＣＢのバイアルのひとつを融解し、回収した細胞を、１０％ ＦＢＳ及びＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）を補充したα－ＭＥＭ中、約７５０細胞／ｃｍ

^{2}の密度で組織／細胞培養プラスチックに播種する。細胞を次いで３７℃、５％CO_2、８０％ＲＨでインキュベートする。

【０１５０】

[151] 継代６について、細胞をほぼ集密状態まで培養した後、さらに継代する。前記に従って細胞を収穫し、新たな組織／細胞培養プラスチック表面に播種する。

【０１５１】

[152] 培地を継代の間で交換する（ＷＣＢから継代６、及び継代６と継代７）。

【０１５２】

[153] 継代７について、ＭＣＢに関して前記に述べた方法に従って細胞を収穫し、凍結する。

【０１５３】

実施例３：一過性のものと対比した永続性の中大脳動脈閉塞（ＭＣＡＯ）により生じた神経変性の、ＮＣＳ－０１細胞による治療

【０１５４】

[154] ＮＣＳ－０１治療した永続性ＭＣＡＯを伴うラットの梗塞体積及び神経機能を、ＮＣＳ－０１治療した一過性（６０分間）ＭＣＡＯを伴うラットのものと比較した。

【０１５５】

[155] 一過性ＭＣＡＯは、脳卒中により生じた動脈閉塞を脳卒中ペナンブラへの血流を復旧させる現在の標準臨床措置により治療したものを模倣する。これらの措置には、血栓溶解剤の投与、ならびに血塊の機械的除去を伴う血管形成術及び／又は血管ステント挿入などの措置が含まれる。

【０１５６】

[156] ３又は６匹のラットのグループに永続性ＭＣＡＯ又は一過性ＭＣＡＯ（再潅流を伴う）のいずれかを施した。次いで１ｍｌの生理食塩水又は７．５×10^{6}のＮＣＳ－０１細胞のいずれかを、虚血後２４時間目にＩＣＡ投与し、ラットを２８日目までモニターした。次いで神経機能を改変ベーダーソン神経学的試験により評価した。一過性閉塞モデルは、脳卒中患者をｔＰＡで治療するかあるいは血塊除去処置した状況を模倣する。

【０１５７】

[157] 図２の結果は、両方のＭＣＡＯパラダイムにおけるＮＣＳ－０１細胞集団による治療について有意の組織学的有益性（梗塞体積；パネルＡ）及び臨床的有益性（改変ベーダーソン目盛；パネルＢ）を示す。有益性は一過性閉塞モデルの方が永続性閉塞モデルの場合より２～３倍大きかった。神経応答の時間経過（パネルＢ）は、梗塞後２８日目まで定常的な改善を示し、この期間で平均して非再潅流（永続性閉塞）及び未治療対照についての１１％から、再潅流（一過性閉塞）及びＮＣＳ－０１治療動物についての６７％であった。

【０１５８】

[158] 予想外に、ＮＣＳ－０１は一過性閉塞モデルの症状の治療の場合の方がより有効であった；これは、ＮＣＳ－０１を血塊除去と組み合わせて、血栓溶解剤の投与又は機械的器具による血塊除去のいずれかの後に付与した場合に最大効力が得られる可能性があることを示唆する。

【０１５９】

実施例４：ＮＣＳ－０１細胞と他の骨髄由来細胞との比較

１）Li et al.に従った骨髄細胞の集団の分離

[159] 刊行物Li et al. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism (2000) 20: 131 1-1319の記載に厳密に従って骨髄細胞の集団を調製した（以下、Ｌｉ骨髄細胞の集団と呼ぶ）。

【０１６０】

[160] 採取の２日前に代謝拮抗剤５－フルオロウラシル（５－ＦＵ　１５０ｍｇ／ｋｇ）を腹腔内投与した成体マウスから、初代培養骨髄細胞を採取した(Randall and Weissman, 1997)。リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ，０．５ｍＬ）を含む１ｍＬの注射器に接

続した２１ゲージ針を用いて、脛骨及び大腿骨から新鮮な全骨髄を無菌的に採取した。乳状の均質な単細胞懸濁液になるまで、骨髄を機械的に解離させた。０．８４％NH_4Clを用いて赤血球を骨髄から除去し、血球計算器を用いて有核骨髄細胞数を測定した。２×10^6の有核骨髄細胞を組織培養フラスコ内の、ウシ胎仔血清（１０％）を補充したイスコブの改変ダルベッコ培地(Iscove's Modified Dulbecco's medium)に播種した。３日間のインキュベーション後、細胞はプラスチックに緊密に付着し、それらを新たなフラスコ内で新鮮なイスコブの改変ダルベッコ培地に再懸濁し、さらに３継代増殖させた。

【０１６１】

２）インビトロＯＧＤアッセイにおけるＬｉ細胞集団とＮＣＳ－０１細胞集団の比較

[161] 同じＭＣＢ及び骨髄の異なるＷＣＢから調製した２ロットのＮＣＳ－０１を、Ｌｉ細胞集団と一緒に、図３に概説したようにインビトロＯＧＤモデルにおいて試験した。

【０１６２】

[162] 図４に示すように、両方のロットのＮＣＳ－０１細胞がＩＬ－６及びｂＦＧＦ両方の分泌において同じ増加を生じた。したがって、前記の最適化した調製方法により得られたＮＣＳ－０１細胞集団は、インビトロＯＧＤアッセイにおいて神経変性を確実に治療した。

【０１６３】

[163] これに対し、Li (2000)刊行物の記載に厳密に従って分離したＬｉ細胞集団は、ＯＧＤアッセイにおいてＮＣＳ－０１細胞集団より４～５倍少ないｂＦＧＦ及びＩＬ－６を産生した。

【０１６４】

２）インビボＭＣＡＯアッセイにおけるＬｉ細胞集団とＮＣＳ－０１細胞集団の比較

【０１６５】

[164] ＮＣＳ－０１及びＬｉ細胞集団がインビボで神経変性を治療する能力を、ＭＣＡＯラットモデルにおいてインビボ試験した。これらの細胞がホスト細胞の生存率、梗塞体積、及び神経欠損に及ぼす影響を図５Ａ及び５Ｂに示す。前記の試験と一致して、ＮＣＳ－０１細胞集団は、虚血により誘導された神経変性を治療することによりホスト細胞の死を阻止し（図５Ａを参照）、結果的に梗塞体積を低減し、かつ神経欠損を改善した（図５Ｂを参照）。

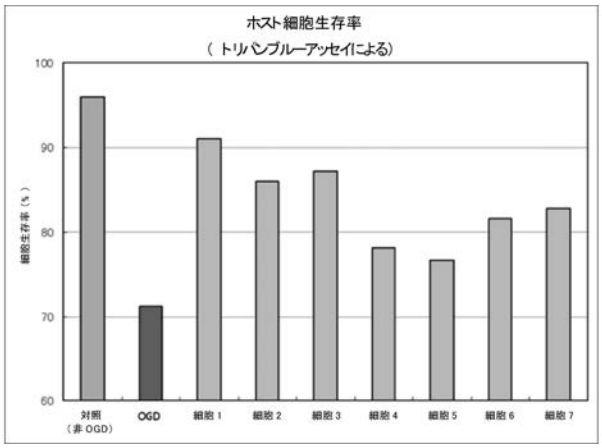
【０１６６】

[165] これに対し、Ｌｉ細胞集団は、梗塞体積又は神経機能に対して統計的に有意の活性を何ら示さなかった。したがってこれらのデータは、ＮＣＳ－０１集団が神経変性を治療する能力は調製方法により決まること、及びＮＣＳ－０１細胞集団はLi 2000刊行物に記載された細胞集団とは別個のものであることを立証する。

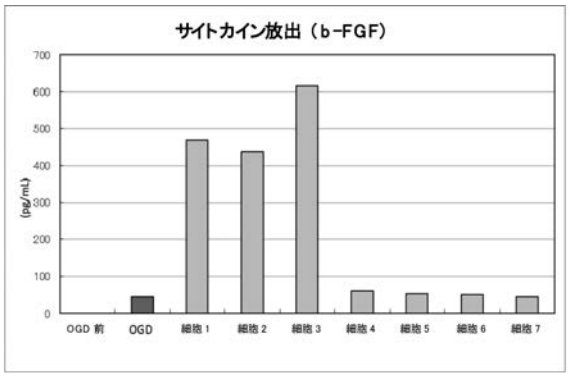
【０１６７】

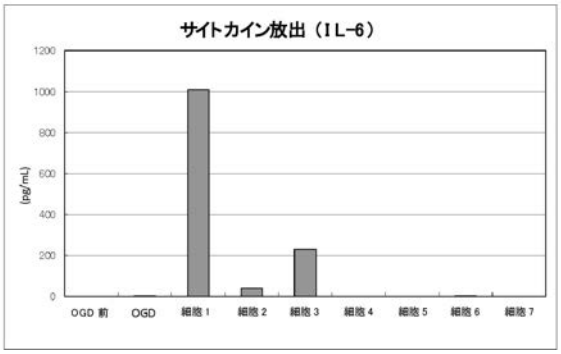
[166] 本明細書に記載した特許、特許出願、刊行物、又は他の開示物はいずれも、それの全体が本明細書に援用される。本明細書に援用すると述べたもの又はその一部であるけれども本明細書に述べる既存の定義、記述、又は他の開示物と矛盾するものはいずれも、援用したものと本明細書に開示するものとの間に矛盾が生じない範囲でのみ援用される。

【図１Ａ】

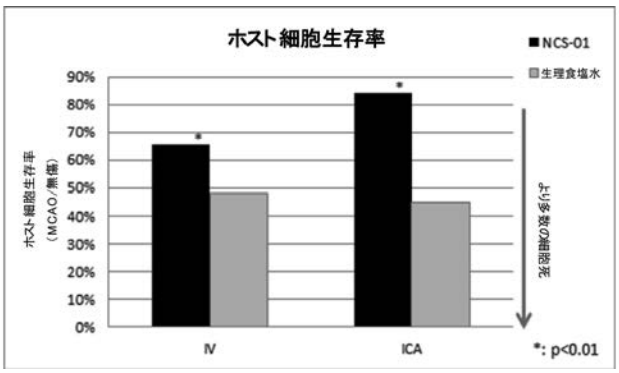


【図１Ｂ】

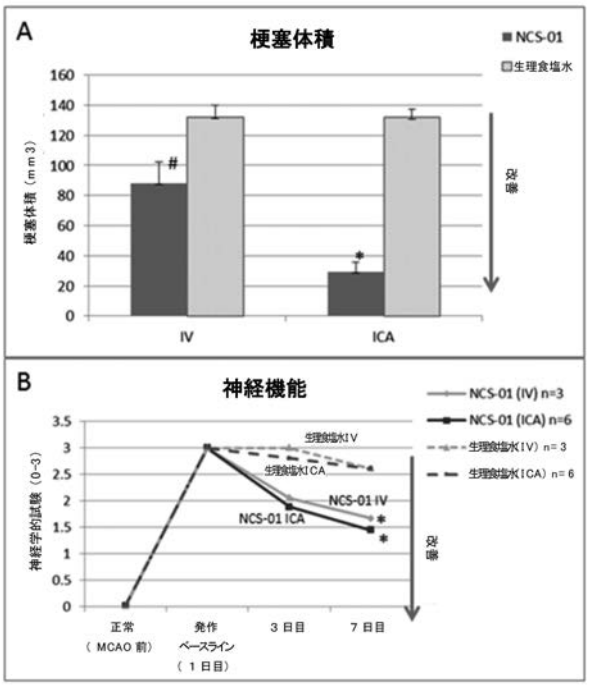




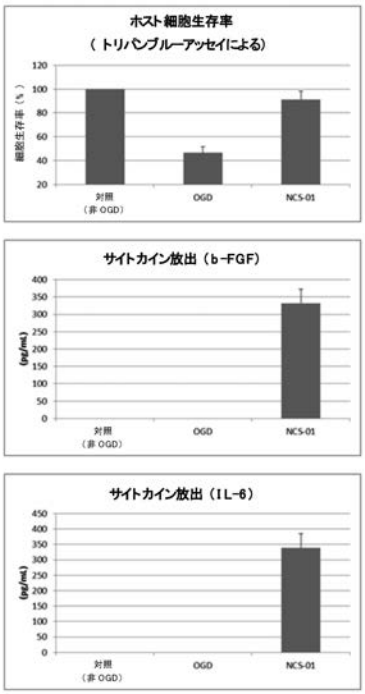
【図１Ｃ】



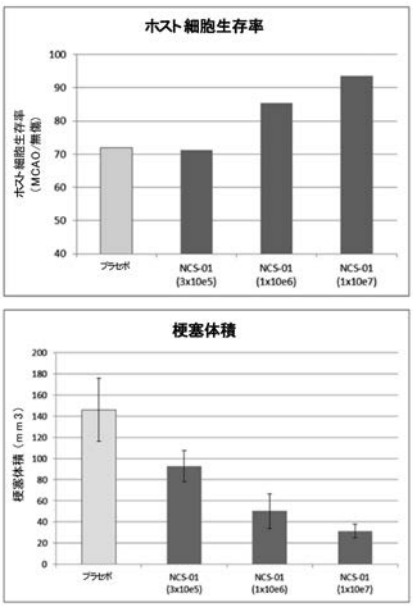
【図１Ｄ】



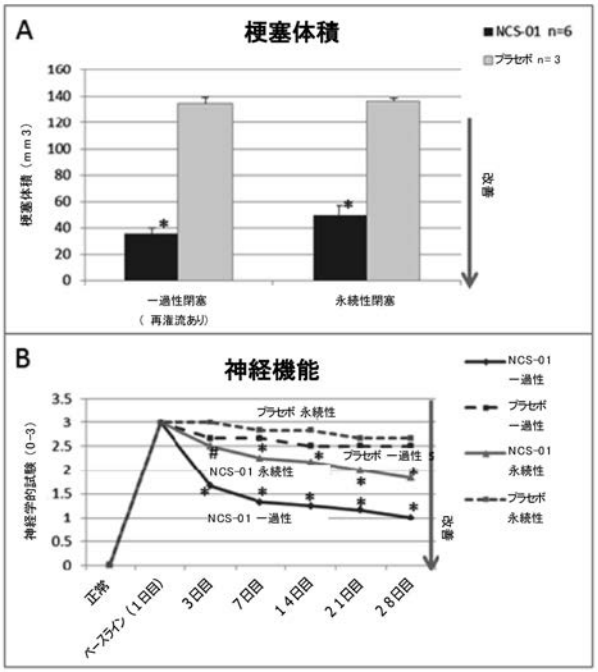
【図１Ｅ】


ホスト細胞生存率
（トリパンブルーアッセイによる）
細胞生存率（%）
対照
（非OGD）
OGD
NCS-01
サイトカイン放出（b-FGF）
(pg/mL)
サイトカイン放出（IL-6）

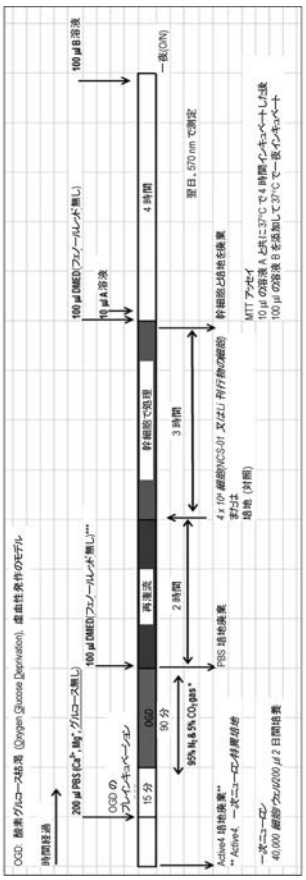
【図１Ｆ】


ホスト細胞生存率
（MCAO/無傷）
プラセボ
NCS-01
(3x10e5)
(1x10e6)
(1x10e7)
梗塞体積
梗塞体積（mm3）

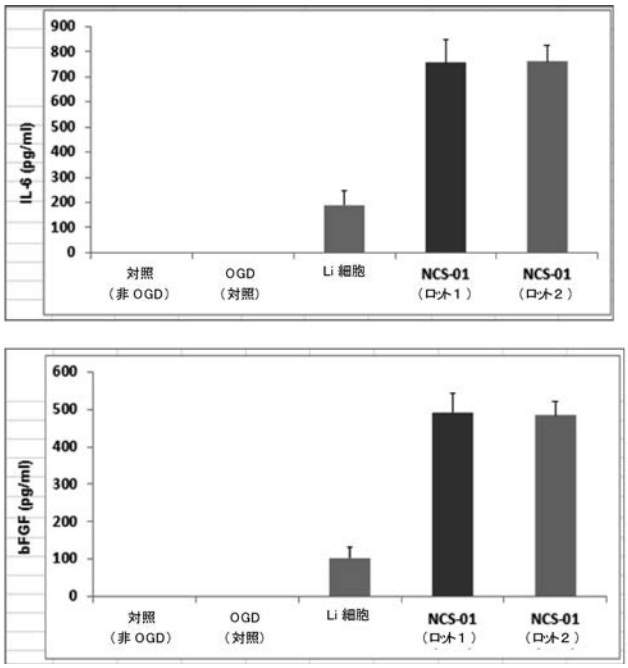
【図２】


A
梗塞体積
■NCS-01 n=6
□プラセボ n=3
梗塞体積（mm3）
一過性閉塞
（再潅流あり）
永続性閉塞
B
神経機能
神経学的試験（0-3）
NCS-01 一過性
プラセボ 永続性
プラセボ 一過性
NCS-01 永続性
プラセボ 永続性
正常
ベースライン（1日目）
3日目
7日目
14日目
21日目
28日目

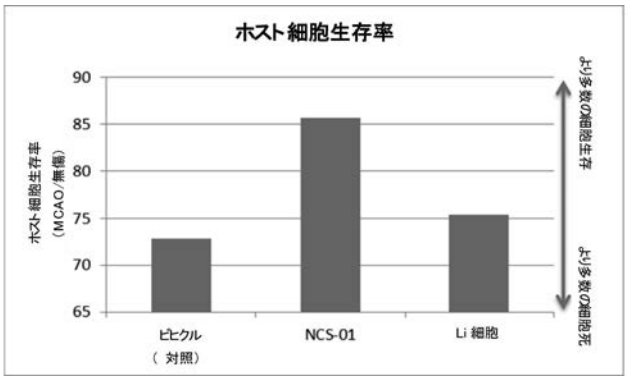
【図３】


OGD: 酸素グルコース絶奪 (Oxygen Glucose Deprivation), 虚血性条件のモデル
時間経過
200 μl PBS (Ca2+, Mg2+ グルコース無し)
100 μl DMEM (フェノールレッド無し)
OGD の
プレインキュベーション
15 分
OGD
90 分
95% N2 & 5% CO2 gas
再潅流
2 時間
100 μl DMEM (フェノールレッド無し)
10 μl A 溶液
100 μl B 溶液
幹細胞で処理
3 時間
4 時間
一夜(ON)
翌日、570 nm で測定
幹細胞と培地を添加
4 x 10⁴ 細胞/NCS-01 又は(と) 対行為の細胞
PBS 培地添加
対照
培地（対照）
MTT アッセイ
10 μl の溶液 A と共に 37°C で 4 時間インキュベートし反応
100 μl の溶液 B を添加して 37°C で一夜インキュベート

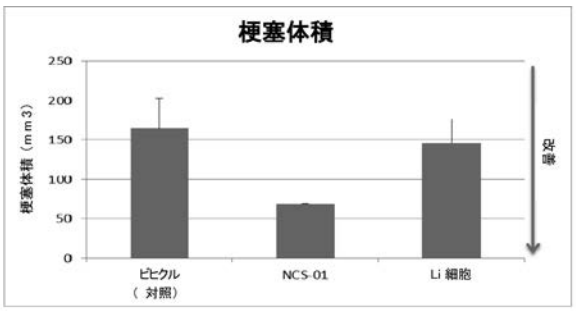
【図４】

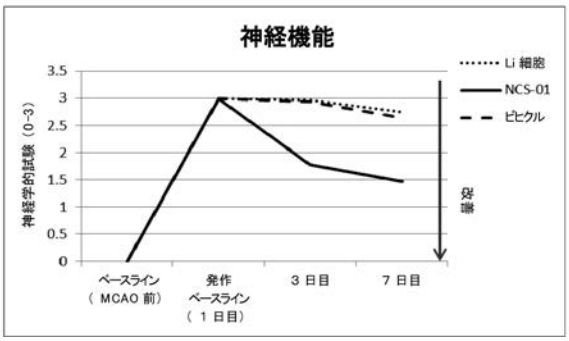

IL-6 (pg/ml)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
対照
（非 OGD）
OGD
（対照）
Li 細胞
NCS-01
（ロット１）
NCS-01
（ロット２）
bFGF (pg/ml)
600
500
400
300
200
100
0
対照
（非 OGD）
OGD
（対照）
Li 細胞
NCS-01
（ロット１）
NCS-01
（ロット２）

【図５Ａ】


ホスト細胞生存率
ホスト細胞生存率
（MCAO/無傷）
90
85
80
75
70
65
ピヒクル
（ 対照）
NCS-01
Li 細胞
より多数の細胞生存
より多数の細胞死

【図５Ｂ】


梗塞体積
梗塞体積（mm3）
250
200
150
100
50
0
ピヒクル
（ 対照）
NCS-01
Li 細胞
増悪


神経機能
神経学的試験（0-3）
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
ベースライン
（ MCAO 前）
発作
ベースライン
（ 1 日目）
3 日目
7 日目
Li 細胞
NCS-01
ピヒクル
増悪

【手続補正書】
【提出日】平成29年6月1日(2017.6.1)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
虚血による神経変性の治療に用いられる不均質な骨髄細胞の亜集団であって、
前記虚血による神経変性を伴う哺乳動物の血流に注入され、前記虚血による神経変性により生じた神経欠損を低減させる不均質な骨髄細胞の亜集団であり、
当該不均質な骨髄細胞の亜集団が、
ａ）ヒトの未処理骨髄から骨髄細胞の集団を採取し；
ｂ）前記骨髄細胞の集団を１０^{5}細胞／ｃｍ^{2}から１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}の低密度でプラスチック表面に播種し；
ｃ）前記播種した細胞集団を洗浄して、付着していない細胞を除去し；
ｄ）前記洗浄した細胞集団からの付着した細胞を血清含有培地中で集密状態まで培養し；
ｅ）前記培養細胞を７連続継代以下で血清含有培地中で連続継代し、各継代において前記培養細胞を約７５０細胞／ｃｍ^{2}の低密度で播種し；
ｆ）当該不均質な骨髄細胞の亜集団を採取すること
を含む方法によって調製される、
不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項２】
前記神経変性が脳梗塞による、請求項１に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項３】
閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置と併用され、
前記追加処置と組み合わせた当該不均質な骨髄細胞の亜集団の注入によって、神経欠損が追加処置単独又は追加処置なしの骨髄細胞の亜集団の注入のいずれかの後より著しく低減する、
請求項２に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項４】
前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置が、当該不均質な骨髄細胞の亜集団の注入と同時に行なわれる、請求項３に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項５】
前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置が、当該不均質な骨髄細胞の亜集団の注入の前に行なわれる、請求項３に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項６】
前記閉塞した血管が血塊によって閉塞している場合における、請求項３に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項７】
前記閉塞した血管の血塊がアテローム硬化斑の破裂による場合における、請求項６に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項８】
前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置が、血栓溶解剤の投与を含む、請求項３に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項９】
前記血栓溶解剤が、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、及び組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターからなる群から選択される少なくとも一つである、請求項８に記載

の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項１０】
前記組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターが、アルテプラーゼ、レテプラーゼ、デスモテプラーゼ又はテネクテプラーゼである、請求項９に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項１１】
前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置が、前記閉塞した血管から血塊を機械的に除去することを含む、請求項３に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項１２】
前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置が、さらに血塊をフィルターで捕獲することを含む、請求項３に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項１３】
前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置が、血管形成術及び／又は血管ステント挿入の実施を含む、請求項３に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項１４】
当該不均質な骨髄細胞の亜集団が静脈内又は動脈内に注入される、請求項１に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項１５】
当該不均質な骨髄細胞の亜集団が頚動脈に注入される、請求項１に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項１６】
当該不均質な骨髄細胞の亜集団が脳内に注入される、請求項１に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項１７】
虚血による神経変性の治療に用いられる不均質な骨髄細胞の亜集団であって、
前記虚血により生じた神経変性を伴う哺乳動物の血流に注入され、前記虚血による神経変性により生じた梗塞の体積を低減させる不均質な骨髄細胞の亜集団であり、
当該不均質な骨髄細胞の亜集団が、
ａ）ヒトの未処理骨髄から骨髄細胞の集団を採取し；
ｂ）前記骨髄細胞の集団を１０^{5}細胞／ｃｍ^{2}から１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}の低密度でプラスチック表面に播種し；
ｃ）前記播種した細胞集団を洗浄して、付着していない細胞を除去し；
ｄ）前記洗浄した細胞集団からの付着した細胞を血清含有培地中で集密状態まで培養し；
ｅ）前記培養細胞を７連続継代以下で血清含有培地中で連続継代し、各継代において前記培養細胞を約７５０細胞／ｃｍ^{2}の低密度で播種し；
ｆ）当該不均質な骨髄細胞の亜集団を採取すること
を含む方法によって調製される、
不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項１８】
前記神経変性が脳梗塞による、請求項１７に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項１９】
閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置と併用され、
前記追加処置と組み合わせた当該不均質な骨髄細胞の亜集団の注入によって、梗塞の体積が追加処置単独又は追加処置なしの骨髄細胞の亜集団の注入のいずれかの後より著しく低減する、
請求項１７に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項２０】
前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置が、血栓溶解剤の投与を含む、請求項１９に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。

【請求項２１】
前記血栓溶解剤が、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、及び組換え型プラスミノーゲンアクチベーターからなる群から選択される少なくとも一つである、請求項２０に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項２２】
前記組換え型プラスミノーゲンアクチベーターが、アルテプラーゼ、レテプラーゼ、デスモテプラーゼ又はテネクテプラーゼである、請求項２１に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項２３】
前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置が、血管形成術及び／又はステント挿入の実施を含む、請求項１９に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項２４】
前記閉塞した血管を通る血流を増大させるための追加処置が、梗塞部位付近の血塊を機械的に除去することを含む、請求項１９に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項２５】
当該不均質な骨髄細胞の亜集団が静脈内又は動脈内に注入される、請求項１７に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項２６】
当該不均質な骨髄細胞の亜集団が頚動脈に注入される、請求項１７に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項２７】
当該不均質な骨髄細胞の亜集団が脳内に注入される、請求項１７に記載の不均質な骨髄細胞の亜集団。
【請求項２８】
血栓溶解剤、及び不均質な骨髄細胞の亜集団を含む、キットであって、
前記不均質な骨髄細胞の亜集団が、
ａ）ヒトの未処理骨髄から骨髄細胞の集団を採取し；
ｂ）前記骨髄細胞の集団を10^5細胞／cm^2から10^6細胞／cm^2の低密度でプラスチック表面に播種し；
ｃ）前記播種した細胞集団を洗浄して、付着していない細胞を除去し；
ｄ）前記洗浄した細胞集団からの付着した細胞を血清含有培地中で集密状態まで培養し；
ｅ）前記培養細胞を７連続継代以下で血清含有培地中で連続継代し、各継代において前記培養細胞を約７５０細胞／cm^2の低密度で播種し；
ｆ）当該不均質な骨髄細胞の亜集団を採取すること
を含む方法によって調製される、
キット。
【請求項２９】
前記血栓溶解剤が、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、及び組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターからなる群から選択される少なくとも一つである、請求項２８に記載のキット。
【請求項３０】
前記組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターが、アルテプラーゼ、レテプラーゼ、又はテネクテプラーゼである、請求項２９に記載のキット。
【請求項３１】
不均質な骨髄細胞の亜集団、及び血塊を機械的に除去する手段を含む、キットであって、
前記不均質な骨髄細胞の亜集団が、
ａ）ヒトの未処理骨髄から骨髄細胞の集団を採取し；
ｂ）前記骨髄細胞の集団を10^5細胞／cm^2から10^6細胞／cm^2の低密度でプラスチ

ック表面に播種し；
ｃ）前記播種した細胞集団を洗浄して、付着していない細胞を除去し；
ｄ）前記洗浄した細胞集団からの付着した細胞を血清含有培地中で集密状態まで培養し；
ｅ）前記培養細胞を７連続継代以下で血清含有培地中で連続継代し、各継代において前記培養細胞を約７５０細胞／ｃｍ^{2}の低密度で播種し；
ｆ）当該不均質な骨髄細胞の亜集団を採取すること
を含む方法によって調製される、
キット。
【請求項３２】
脳梗塞により生じた神経変性を治療するための組成物であって、血栓溶解剤、不均質な骨髄細胞の亜集団、及び当該組成物を注入するためのキャリヤーを含む組成物であり、
前記不均質な骨髄細胞の亜集団が、
ａ）ヒトの未処理骨髄から骨髄細胞の集団を採取し；
ｂ）前記骨髄細胞の集団を１０^{5}細胞／ｃｍ^{2}から１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}の低密度でプラスチック表面に播種し；
ｃ）前記播種した細胞集団を洗浄して、付着していない細胞を除去し；
ｄ）前記洗浄した細胞集団からの付着した細胞を血清含有培地中で集密状態まで培養し；
ｅ）前記培養細胞を７連続継代以下で血清含有培地中で連続継代し、各継代において前記培養細胞を約７５０細胞／ｃｍ^{2}の低密度で播種し；
ｆ）当該不均質な骨髄細胞の亜集団を採取すること
を含む方法によって調製される、
組成物。
【請求項３３】
前記血栓溶解剤が、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、及び組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターからなる群から選択される少なくとも一つである、請求項３２に記載の組成物。
【請求項３４】
前記組換え型組織プラスミノーゲンアクチベーターが、アルテプラーゼ、レテプラーゼ、又はテネクテプラーゼである、請求項３３に記載の組成物。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｌ 27/36	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	27/36	１００
Ａ６１Ｐ 9/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00	
Ａ６１Ｐ 9/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10	
Ａ６１Ｐ 25/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｐ 43/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１

(72)発明者　トーマス　エヌ　チェイス
アメリカ合衆国　ワシントン　コロンビア特別区　２０００７　３１番ストリート　エヌダブリュ　１６２３
(72)発明者　佐々木　経世
東京都目黒区東が丘１－１８－１８
(72)発明者　古賀　三奈子
アメリカ合衆国　メリーランド州　ロックヴィル　２０８５２　アパートメント１３２０　グロヴナープレイス　１０４０１

Ｆターム(参考)　4C076 AA16 BB12 BB14 BB40 FF68
4C081 AB18 AC09 BA12 CD18 CD22 CD34
4C084 AA02 AA03 DC01 DC03 DC25 MA02 MA65 MA70 NA05 ZA01 ZA36 ZC75
4C087 AA01 AA02 BB44 MA02 MA65 MA70 NA05 NA14 ZA01 ZA36 ZC75