



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I859508 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 10 月 21 日

(21)申請案號：111105929

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 02 月 18 日

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

A61K35/51 (2015.01)

A61P19/08 (2006.01)

(30)優先權：2021/02/19 日本

2021-024794

(71)申請人：日商 P u R E C 股份有限公司 (日本) PUREC CO., LTD. (JP)

日本

(72)發明人：竹谷健 TAKETANI, TAKESHI (JP)；小田泰昭 ODA, YASUAKI (JP)；伊谷有未
IYOKU, YUMI (JP)；陶山史 SUYAMA, TAKASHI (JP)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

JP 2015-43768A

期刊 Taketani et al. Ex Vivo Expanded Allogeneic Mesenchymal Stem
Cells With Bone Marrow Transplantation Improved Osteogenesis in
Infants With Severe Hypophosphatasia Cell Transplantation 24 2015
1931-1943期刊 Mabuchi et al. LNGFR+THY-1+VCAM-1hi+ Cells Reveal Functionally
Distinct Subpopulations in Mesenchymal Stem Cells Stem Cell
Reports 1(2) 2013 152-165

審查人員：周浩宇

申請專利範圍項數：13 項 圖式數：6 共 34 頁

(54)名稱

骨骼疾病治療用醫藥組成物

(57)摘要

一種醫藥組成物，其係含有高純度間質幹細胞之在對象身上使成骨細胞增加之醫藥組成物，並且以與至該對象的造血幹細胞移植併用的方式來使用。



I859508

【發明摘要】

【中文發明名稱】

骨骼疾病治療用醫藥組成物

【中文】

一種醫藥組成物，其係含有高純度間質幹細胞之在對象身上使成骨細胞增加之醫藥組成物，並且以與至該對象的造血幹細胞移植併用的方式來使用。

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

骨骼疾病治療用醫藥組成物

【技術領域】

【0001】本發明關於一種骨骼疾病治療用醫藥組成物。

【先前技術】

【0002】低磷酸酶症(Hypophosphatasia，HPP)是ALPL基因變異造成的常染色體劣性遺傳症，鹼性磷酸酶(ALP)的破損會造成石灰化障礙。而且，隨著ALP活性降低而累積的焦磷酸會阻礙石灰化、或因為局部磷濃度降低，會引發骨骼的低石灰化、佝僂病樣改變。

【0003】從血清學來說，可觀察到ALP的基質phosphoethanolamine、inorganic pyrophosphate(焦磷酸)、pyridoxal 5'-phosphate的上昇。從骨骼相關的臨床影像，確認了骨骼彎曲、易骨折性、牙齒脫落等，從中樞神經症狀，確認了痙攣或重聽、發育遲滯。重症例可能會有致死的臨床病程，而輕症例日常生活受到限制的情形也很多。尤其在以肋骨為首的胸腔發育不全造成呼吸有障礙的情況，生命預後不良。最嚴重的周產期發病的患者，死亡率為50～100%。現況在日本國內患者數有100～200人，並未確立有效的治療法(僅對症療法)。

【0004】目前實行的HPP治療法為ALP酵素補充療法。藉由投予該酵素製劑來改善骨骼的石灰化，不僅改善了重症HPP患者的生命預後，輕症例也可恢復運動功能。但是，由於是補充療法，因此會有整個生涯必須定期投予(每週3次皮下注射)、產生對應於酵素的抗體而效果減弱、不通過腦血液關門因此不會改善中樞神經系統症狀、醫療費高額(投予量最少的患者一年也要2,000萬日圓以上)等的問題點。

【0005】附帶一提，間質幹細胞(Mesenchymal Stem Cell: MSC)是較容易由骨髓、脂肪組織、胎盤、牙髓、羊膜等各種組織分離出來的細胞。著眼於其組織修復作用、免疫抑制能力，以許多疾病為對象，數百項臨床實驗正在進行中。然而，到後期臨床階段的實驗為少數，而且各國主管當局承認的實驗，如在日本以重症GvHD為對象的Temcel(JCR-Pharma公司)、2019年初在歐洲受到承認和推薦的Tigenix公司的Alfisel(對象為克隆氏症造成的肛門裂傷)等，數目有限。

【0006】這種MSC難以實用化的原因，被指出有因為要大量且均質地製造所投予的細胞，品質難以控管，還有投予後難以送達患部、非侵襲性細胞追蹤技術的缺點(難以掌握體內動態)等各種原因。

【0007】過去，本發明人等發現，藉由使用LNGFR(CD271)及Thy1(CD90)兩種抗體，可極有效地篩選人類MSC，並開發出了使用細胞分選器由骨髓、末梢血、胎盤

絨毛膜及牙髓將人類MSC直接分離的技術。藉由該技術所得到的細胞群(Rapidly Expanding Clone: REC)表現出優異的增殖能力、分化能力及遊走能力，被確認為高品質且高純度的人類MSC(專利文獻1、非專利文獻2)。

【0008】另外，本發明人根據「使用人類幹細胞的臨床研究相關的指引」，對重症HPP患者進行骨髓移植併用來自同種骨髓的MSC移植治療(非專利文獻1)。該臨床研究說明了，在藉由骨髓移植替換成來自贈與者的免疫細胞(骨髓細胞)之後移植MSC，所移植的MSC的一部分不會被排斥，會生長於骨髓而形成正常骨骼。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0009】

[專利文獻1]日本特許6363950號

[專利文獻2]國際公開2016/017795號小冊子

[非專利文獻]

【0010】[非專利文獻1]T. Taketani et al., “Ex vivo expanded allogeneic mesenchymal stem cells with bone marrow transplantation improved osteogenesis in infants with severe hypophosphatasia,” Cell Transplant., vol. 24, no. 10, pp. 1931-1943, 2015

[非專利文獻2]Mabuchi Y et al., “LNGFR+ Thy-1+ Vcam-1hi+ cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells” . Stem Cell Reports 1(2): 152-

165, 2013

【發明內容】

[發明所欲解決的課題]

【0011】併用骨髓移植與來自同種骨髓的MSC移植，在臨床上著名的效果，可列舉(i)骨骼石灰化及生命預後的改善、(ii)中樞神經系統症狀的恢復及精神發育。但是，在MSC移植後的患者身上，形成正常的骨骼構造，為了得到更高的效能，需要使用具有較高遊走能力或骨分化能力的高純度的MSC。

[用於解決課題的手段]

【0012】本發明人為了解決上述課題而鑽研檢討，結果藉由投予高純度間質幹細胞並且併用造血幹細胞移植，成功解決了上述課題，而完成本發明。

亦即，本發明如以下所述。

[1] 一種醫藥組成物，其係含有高純度間質幹細胞之在對象身上使成骨細胞增加之醫藥組成物，並且以與至該對象的造血幹細胞移植併用的方式來使用。

[2] 如[1]之醫藥組成物，其中造血幹細胞係來自臍帶血。

[3] 如[1]或[2]之醫藥組成物，其中造血幹細胞係來自對象以外的贈與者的骨髓。

[4] 如[1]～[3]中任一項之醫藥組成物，其中對象為

先天性骨系統疾病患者。

[5] 如[4]之醫藥組成物，其中先天性骨系統疾病為低磷酸酶症。

[6] 如[1]～[5]中任一項之醫藥組成物，其中高純度間質幹細胞係來自人類骨髓之高速增殖性間質幹細胞。

[7] 如[6]之醫藥組成物，其中高速增殖性間質幹細胞係LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)共陽性的幹細胞植株之細胞集團，並且滿足以下的(a)及(b)的至少一個特徵：

(a)流式細胞儀的前向散射光的變異係數為40%以下

(b)平均細胞大小為20 μ m以下

[7-1] 如[6]之組成物，其中前述來自人類骨髓之高純度間質幹細胞係以LNGFR(CD271)陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)共陽性作為指標所分離出的高速增殖性間質幹細胞植株之細胞集團，並且為滿足以下的(a)及(b)的至少一個特徵之細胞集團：

(a)流式細胞儀的前向散射光的變異係數為40%以下

(b)平均細胞大小為20 μ m以下。

[7-2] 如[6]之組成物，其中前述來自人類骨髓之高純度間質幹細胞係來自LNGFR(CD271)陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)共陽性的細胞之高速增殖性間質幹細胞植株之細胞集團，並且為滿足以下的(a)及(b)的至少一個特徵之細胞集團：

(a)流式細胞儀的前向散射光的變異係數為40%以下

(b)平均細胞大小為20 μ m以下。

[8] 如[1]~[7-2]中任一項之醫藥組成物，其中細胞係以對象體重每1kg投予 1×10^7 cells每週1次，重複該投予4次的方式來使用。

[9] 如[8]之醫藥組成物，其中細胞係以至少 1×10^6 cell/ml的濃度使用。

[10] 如[1]~[9]中任一項之組成物，其中高純度間質幹細胞的提供者的HLA與對象的HLA不一致。

[11] 如[1]~[9]中任一項之組成物，其中高純度間質幹細胞的提供者的HLA與對象的HLA的3個基因座的6個抗原中至少4個抗原一致。

[12] 如[1]~[9]中任一項之組成物，其中高純度間質幹細胞的提供者的HLA與對象的HLA的3個基因座的6個抗原中至少3個抗原一致。

[發明之效果]

【0013】藉由本發明，可在對象身上使成骨細胞增加。結果，可對低磷酸酶症等的先天性骨系統疾病使用本發明之醫藥組成物。

【圖式簡單說明】

【0014】

[圖1]為表示高純度間質幹細胞REC-01對低磷酸酶症病態模型小鼠的有效性檢驗用的移植實驗方法之圖。

[圖2]為表示Asfotase α (STRENSIQ(註冊商標))投予對

Alp1^{-/-}小鼠的生存曲線的影響(延命效果的檢驗結果)之圖。

[圖3]為表示細胞移植後各小鼠的體重變遷之圖。圖為細胞移植後的Alp1^{-/-}小鼠(左)、及Alp1^{+/-}小鼠(正常組：右)的體重逐時變化。作為比較對象所使用的Alp1^{+/-}小鼠是Alp1^{-/-}的同胎仔(littermate)。縱軸：以移植日當天的體重為1，將移植後的體重變遷以比值來表示。橫軸：表示移植後的天數。

[圖4]為表示REC-01移植2個月後骨髓內ALP活性的檢討結果之圖。圖中表示了小鼠股骨的冷凍切片的ALP染色影像。僅投予小鼠骨髓細胞的Alp1^{-/-}小鼠(左)、投予小鼠骨髓細胞 + REC01的Alp1^{-/-}小鼠(中左及中右)、ALP活性的正對照組Alp1^{+/-}小鼠(右)，箭號(藍)之處代表ALP染色陽性(藍紫)。

[圖5]為表示REC-01移植對長期生長與骨髓內ALP活性的影響之圖。圖中表示移植3個月後的小鼠股骨及頭蓋骨冷凍切片的ALP染色影像。箭號(藍)為ALP染色陽性部位(藍紫色)

[圖6]為表示REC-01移植的有無對Alp1^{-/-}小鼠生存曲線的影響之圖。

【實施方式】

1.概要

【0015】一般而言，細胞治療所產生的治療效果，其

機制大致可區別成：藉由移植細胞被吸收進接受者的組織及臟器，以移植細胞替換接受者的細胞來進行功能恢復的細胞替換 (Cellular Replacement)；以及期待藉由移植細胞所產生的營養因子、細胞介素及細胞外基質的作用，提高對宿主的細胞的保護效果或組織的修復能力來進行功能修復的營養效果 (Trophic Action)。

【0016】在低磷酸酶症 (HPP) 的治療中，進行細胞替換是必須的，細胞到達患部與長期生存與分化會成為最重要的要素。另外，本疾病是出現全身症狀的骨形成不全疾病，因此經由靜脈的全身投予會是必要的。但是，通常的間質幹細胞 (MSC)，大部分失去了遊走能力，在經由靜脈投予大量細胞的情況，會有引發肺塞栓或血栓形成等的副作用的危險性，一次可移植的細胞數有限。另外，除了 HPP 以外，未確立治療法的遺傳性骨骼形成疾病還存在 450 種以上。先天性骨系統疾病 (Congenital Skeletal Diseases: CSD) 沒有已確立的治療法，會經過致死的病程或日常生活有嚴重障礙。在 CSD 中，形成骨骼的成骨細胞的起源的 MSC，其骨化的路徑會被妨礙，因此利用骨化能力正常的同種 MSC 來進行骨再生醫療，被認為是有前景的治療法。

【0017】本發明是著眼於間質幹細胞之中分化能力及遊走能力優異，而且具有高速增殖能力之間質幹細胞，亦即高純度間質幹細胞而完成，其特徵為：使成骨細胞增加，甚至作為對骨骼疾病的醫藥來使用。

亦即，本發明提供一種含有高純度間質幹細胞之在對象身上使成骨細胞增加之醫藥組成物。而且，本發明之醫藥組成物是以與至對象的造血幹細胞移植併用的方式來使用。

【0018】

2.高純度間質幹細胞

在本發明中使用的間質幹細胞是來自中胚葉性組織(間葉)的體性幹細胞，可期待在骨骼或血管、心肌的再構築等的再生醫療方面的應用。

間質幹細胞可由骨髓、脂肪組織、胎盤組織、牙髓或臍帶組織等的各種組織取得。其純化程序例如以下所述。

【0019】由人類或非人類哺乳動物(例如牛、猴、貓、小鼠、大鼠、天竺鼠、倉鼠、豬、犬、兔子、綿羊、馬、及山羊等)採取少量脂肪片，實施酵素處理而得到細胞型混合集團，藉由離心分離分離出浮遊性的脂肪細胞集團，在接觸裝滿培養液的培養器的頂面的狀態下靜置時沉降至底面並且增殖的類纖維母細胞，藉由繼代培養使其增殖。

另外，在本發明中，可使用來自iPS細胞的間質幹細胞或市售的間質幹細胞。

【0020】本發明人藉由以前的研究，由LNGFR(CD271)陽性的間質幹細胞(CD271+細胞)，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)共陽性的間質幹細胞(CD271+CD90+細胞)之中成功分離出增殖快速的高速增殖性的細胞植株(Rapidly

Expanding Clone：REC)。該REC植株為本發明中的「高純度間質幹細胞」的一種。

【0021】REC是將細胞一個一個接種至96孔盤進行培養時，可在2週達鋪滿的細胞，與藉由過去的方法所得到的間質幹細胞相比，增殖能力、分化能力及遊走能力皆為1000倍以上。而且，尤其由於保持著遊走能力，因此可經由靜脈內投予，可適用於骨骼及軟骨成骨不全症等嚴重的全身性疾病。

高純度間質幹細胞的一種的REC，是以細胞分選器由骨髓的單核球部分分離出LNGFR(CD271)陽性，或LNGFR(CD271)及Thy1(CD90)共陽性的細胞，將細胞一個一個接種至培養盤，只篩選出增殖能力高的高速增殖性MSC，因此是極均勻的細胞集團。

【0022】以這樣的方式分離純化出的REC，保持著分化能力、增殖能力、遊走能力，可由單一細胞增殖超過10¹²個。尤其是保持著遊走能力，因此可經由靜脈內投予，可期待應用於骨骼·軟骨成骨不全症等的嚴重的全身性疾病。

在本發明中，可使用上述REC植株當中，分化能力或增殖能力變動小的細胞植株。

【0023】在本發明中，為了得到LNGFR(CD271)陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)共陽性的間質幹細胞，可依照例如WO2009/31678號所記載的方法。該方法的概要如以下所述。

【0024】首先，由包含人類間質幹細胞的細胞集團，篩選出LNGFR(CD271)陽性(CD271+)，或CD271及CD90共陽性(CD271+CD90+)的細胞部分，並將間質幹細胞高度濃縮。此外，在包含人類間質幹細胞的細胞集團中包含血球系細胞的情況，為了篩選非血球系的細胞，亦可加入篩選CD45及CD235a共陰性(CD45-CD235a-)的細胞的步驟。

【0025】包含間質幹細胞的細胞集團，可藉由流式細胞儀或親和層析來調製。

用來得到此細胞集團的材料並未受到特別限定，可列舉例如骨髓、脂肪組織、臍帶血、末梢血(包含G-CSF投予後的末梢血)等。此外，骨髓只要使用脊椎、胸骨、腸骨等的骨髓即可。另外，細胞還可列舉ES細胞及iPS細胞。

【0026】調製細胞時，在材料變成夾入間質幹細胞的細胞塊的情況，可依照必要對於材料利用吸量管吸放等進行物理處理、或利用胰蛋白酶、膠原蛋白酶等進行酵素處理。另外，在材料中混入紅血球的情況，以預先將紅血球溶血為佳。

使用按照上述方法調製出的細胞集團，篩選CD271+細胞或CD271+CD90+細胞。

【0027】篩選CD271+細胞或CD271+CD90+細胞的方法，可列舉例如使用抗體的方法。抗體為可篩選CD271+細胞或CD271+CD90+細胞的抗CD271抗體及/或抗CD90抗體。在篩選時使用流式細胞儀的情況，藉由適當地組合使用以FITC、PE、APC等不同的螢光色素標識的抗

CD271抗體或抗CD271抗體與抗CD90抗體，可在短時間將活細胞篩選出來。另外，除了流式細胞儀以外，還可藉由使用磁珠的方法或使用親和層析的方法來篩選CD271+CD90+細胞。

【0028】此外，在使用這些方法之前，可預先讓能將死細胞染色的螢光色素(例如PI)與細胞集團反應，將被螢光染色的細胞除去來除去死細胞。

接下來，將篩選出的LNGFR陽性細胞或LNGFR及Thy1共陽性細胞單一細胞(殖株)培養，並選擇增殖快速的細胞批(lot)，而得到增殖能力、分化能力及遊走能力優異的REC。

【0029】此處，「增殖快速」、「高速增殖性」，意指在96孔培養盤的1孔各接種一個細胞來培養時，具有培養開始2週後或在這之前培養盤達鋪滿或半滿程度的增殖速度(倍增時間(Doubling Time)為 26 ± 1 小時)。

【0030】鋪滿是指培養細胞覆蓋培養容器表面(培養面)的90%以上的狀態。另外，半滿是指培養細胞覆蓋培養容器表面(培養面)的70~90%的狀態。所使用的培養器具的尺寸及種類，可因應細胞的增殖速度適當地變更。增殖緩慢的細胞(Moderately/Slowly Expanding Cells)，亦即單一細胞培養2週後仍沒有到半滿或鋪滿的細胞會被廢棄。將從篩選作為REC的各孔所回收的REC按照各孔移入各培養瓶，進一步培養至鋪滿為止(擴大培養)。然後，分別回收擴大培養的細胞。將來自1個孔的REC定為1批。

【0031】在本發明中所使用的REC，是由1個孔接種一個細胞的植株分選所得，因此增殖的細胞彼此的遺傳特質全部相同。所以，在本發明中，會有將細胞集團全體稱為「植株」的情形，也會有將構成細胞集團的各個細胞稱為「植株」的情形。

【0032】另外，在本發明中，使用於篩選的REC，可預先藉由REC標記(抗Ror2)來評估。例如前述擴大培養後，由所有的細胞批回收附著並增殖的細胞，從各批挑出一部分細胞($1 \sim 3 \times 10^5$ 個左右)，以對應於抗Ror2的單株抗體進行單一染色。以對應於抗Ror2的單株抗體進行單一染色是周知的手段(WO2016/17795)。簡言之，藉由使用REC標記的流式細胞儀解析，求得回收細胞中REC標記陽性細胞的比率。該比率可使用定量PCR來定量Ror2的mRNA表現，或可藉由顯微鏡依照手冊求得。將上述陽性比率為一定值(例如65%)以上的批(細胞集團)定為合格，可將其使用於篩選。

【0033】包含本發明之細胞植株的細胞集團，是LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)共陽性且增殖快速的間質幹細胞植株的集團，滿足以下的(a)及(b)的至少一個特徵：

- (a)流式細胞儀的前向散射光的變異係數為40%以下
- (b)平均細胞大小為 $20\mu\text{m}$ 以下

【0034】在本發明的一個態樣之中，前述來自人類骨髓之高純度間質幹細胞係以LNGFR(CD271)陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)共陽性作為指標所分離出的

高速增殖性間質幹細胞植株之細胞集團，並且為滿足以下的(a)及(b)的至少一個特徵之細胞集團：

(a)流式細胞儀的前向散射光的變異係數為40%以下

(b)平均細胞大小為20 μ m以下

【0035】另外，在本發明的一個態樣之中，前述來自人類骨髓之高純度間質幹細胞係來自LNGFR(CD271)陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)共陽性的細胞之高速增殖性間質幹細胞植株之細胞集團，並且為滿足以下的(a)及(b)的至少一個特徵之細胞集團：

(a)流式細胞儀的前向散射光的變異係數為40%以下

(b)平均細胞大小為20 μ m以下

【0036】在本發明中，藉由對各批REC植株調查細胞的增殖能力、脂肪分化能力、REC特異的標記表現量、細胞大小的均勻性，並解析各相關性，可篩選出高純度且均勻、細胞性能較高的REC。

【0037】在本發明中，以前向散射光的變異係數(Coefficient of Variation：CV值)及細胞的平均大小作為篩選的指標。

前向散射光(Forward Scatter)是指對於雷射光的光軸而言為前向的小角度且散射的光線。前向散射光是由細胞表面發生的雷射光散射光、繞射光及折射光所形成，可得到與樣品的大小相關的資訊。

【0038】變異係數(Coefficient of Variation：CV)，是將標準差除以平均值之值，並且是相對評估單位不同的數

據的變動、或相對於平均值的數據與變動的關係時所使用的數值。

在本發明中，篩選出上述 CV 值在 40% 以下的細胞集團。CV 值在 40% 以下的細胞集團，是由大小均勻的細胞所構成的細胞集團。理想的情況，CV 值為 35% 以下、30% 以下、25% 以下或 20% 以下。

另外，由本發明所篩選出的細胞集團中，細胞的平均大小為 20 μ m 以下。宜為在 18 μ m 以下，14 μ m $\sim$ 18 μ m 的範圍的大小。

【0039】

3. 本發明的組成物

(1) 對象

本發明的組成物，適用於人類或人類以外的生物，例如鳥及非人類哺乳動物(例如牛、猴、貓、小鼠、大鼠、天竺鼠、倉鼠、豬、犬、兔子、綿羊、及馬)，用來使成骨細胞增殖，促進骨骼的再生。

【0040】適用對象的疾病為需要增加成骨細胞的骨系統疾病，不論是先天性還是後天性。骨系統疾病，是指因為形成骨或軟骨等骨骼的組織發生障礙而造成骨骼異常的疾病的總稱。而且，先天性骨系統疾病，大致可區分成成骨異常與骨軟骨發育不良這兩個類別。

【0041】先天性骨系統疾病，可列舉例如胸腔不全症候群、低磷酸酶症、軟骨不發育、軟骨生成減退、成骨不全症、大理石骨病、多發性軟骨性外生骨贅、內生軟骨

瘤、第二型膠原蛋白異常症相關疾病、點狀軟骨發育不良、假性軟骨不發育、顎裂-先天性脫位症候群(Larsen syndrome)、進行性骨化性纖維發育不良症、TRPV4異常症、骨硬化性疾病、畢耳氏症候群(Beals syndrome)等。尤其在本發明中，以先天性骨系統疾病的低磷酸酶症為佳。

【0042】

(2)細胞濃度、投予量

細胞是以至少 $1 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ 濃度的細胞集團來使用。例如 $1 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ 、 $5 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ 、 $1 \times 10^7 \text{ cell/ml}$ 等，可因應使用目的適當地設定。

細胞是以每 1kg 對象體重投予 $1 \times 10^7 \text{ cells}$ 的細胞集團，每週投予 1 次，重複該投予 1～4 次(1 個療程的投予期間為 1～4 週)，宜為重複 4 次的方式來使用。

【0043】

(3)組成物

在本發明中，間質幹細胞能夠以醫藥組成物的形態來投予。在其中一個形態中，這種組成物包含醫藥上容許的擔體及/或賦形劑。投予形態為靜脈注射、點滴靜注等的注射。

「擔體」及「賦形劑」，是指為了細胞的儲藏、投予及/或促進生物學活性而在該領域慣用的組成物。

【0044】在本發明的組成物之中所使用的擔體，可列舉例如生理食鹽水、水性右旋糖、乳糖、林格氏液、緩衝

液等。另外，賦形劑，可列舉澱粉、纖維素、葡萄糖、乳糖等。

包含本發明之間質幹細胞的組成物，例如在緩衝溶液或培養液中調製成適當的液體懸浮液。使用於注射的懸浮液，亦可含有鈉羧甲基纖維素、山梨醇、聚葡萄糖等。

【0045】

4.造血幹細胞移植的併用

一般而言，只靠靜脈內投予間質幹細胞(MSC)，在骨髓生長的細胞極少。於是，在本發明中，在投予間質幹細胞時併用了造血幹細胞移植。

【0046】首先，將骨骼形成能力障礙的對象(患者)的MSC替換成骨骼形成能力正常的MSC。因此，藉由抗癌劑或放射線療法等來除去患者的MSC。此時，來自患者的造血幹細胞也會被除去，因此投予本發明之高純度間質幹細胞時，會為了維持血液細胞而併用造血幹細胞移植。「併用」意指在一個療程中使用高純度間質幹細胞的投予與造血幹細胞的移植，造血幹細胞移植的時期，不管高純度間質幹細胞投予的前後，可在其之前或之後，或可同時。「同時」包括將高純度間質幹細胞與造血幹細胞混合至上述擔體，製作出懸浮液，並注射該液。但是，在本發明中，以在進行造血幹細胞移植之後投予高純度間質幹細胞為佳。

【0047】移植的造血幹細胞，會將同時投予的MSC辨識為己方的，並且往血球細胞分化，因此移植後的MSC受

到接受者的免疫細胞排斥的可能性極低。

【0048】在本發明中，高純度間質幹細胞供給源的贈與者及造血幹細胞移植時造血幹細胞供給源的贈與者，任一者皆與對象患者不同(例如健康者)。另外，高純度間質幹細胞的贈與者與造血幹細胞的贈與者可相同或相異。在造血幹細胞移植時，HLA型的A座、B座、C座及DR座這4個座(8個抗原)一致的比例被認為很重要，但是在大多情況下，高純度間質幹細胞的提供者(贈與者)的HLA與對象的HLA不一致。然而，對象的HLA與贈與者的HLA並非完全一致而為不一致也可適用。

【0049】換言之，高純度間質幹細胞，可使用細胞提供者的HLA與對象的HLA的3個基因座(HLA-A、B、DR-B)6個抗原中至少3個抗原一致者，或至少4個抗原一致者。

【0050】以下藉由實施例進一步具體說明本發明。但是，本發明之範圍並不受這些實施例限定。

[製造例]

在本發明中使用的高純度間質幹細胞，是藉由密度梯度離心法將從健康的贈與者採取到的骨髓液單核球分離，使用CD90及CD271抗體僅選擇性地分離出共陽性的細胞，單細胞化，進一步擴大培養至P4，篩選CV值40%以下的細胞植株而取得。

將所得到的細胞植株稱為「REC-01」。

【 0051】**[實驗例]**

STRENSIQ投予對於Alp1-/-小鼠產生的延命效果的檢驗

製作及飼養179隻低磷酸酶症病態模型小鼠(鹼性磷酸酶破損小鼠：ALP(-/-)小鼠)，每隔一天對其皮下投予STRENSIQ(Asfotase α)。

【 0052】 結果，在179隻Alp1-/-小鼠當中，有41隻(22.9%)在出生當天死亡(包括死產)。將對於生存至基因判定後的小鼠每隔一天皮下投予酵素(STRENSIQ)的結果表示於圖2。出生後2週以內88隻(49.2%)、30天以內98隻(54.7%)、60天以內158隻(88.3%)、100天以內168隻(93.9%)死亡。

在不投予STRENSIQ的情況，所有個體在2週以內死亡(Millan JL, et al. J Bone Miner Res. 2008)，因此認為，藉由單獨投予STRENSIQ，觀察到多少有延命效果，然而對於生命預後的效果是有限的。

[實施例1]**【 0053】**

對ALP(-/-)小鼠的高純度間質幹細胞REC移植實驗

在本實施例中，使用低磷酸酶症模型小鼠的Alp1-/-小鼠來評估REC-01移植的有效性。

【 0054】**1. 方法**

(1)對接受者小鼠的 REC-01 投予

使 Alpl 雜合子 (Alpl+/-) 小鼠彼此交配，得到的 day0 ~ day5 小鼠幼兒，由尾部萃取基因 DNA，以 PCR 進行遺傳型的判定。出生後，對於 Alpl-/- 小鼠以每週 2、3 次的頻率持續皮下投予 8mg/kg 的 STRENSIQ (圖 1)。

【0055】在 REC-01 移植的前日，對於贈與者的野生型小鼠 (B6 雌) 與接受者的 Alpl-/- 小鼠以每 10g 體重 0.1mL 投予免疫抑制劑 (0.5mg/1mL Graceptor)。移植當天，對於出生後 33 ~ 159 天齡 (n=9) 的 Alpl-/- 小鼠以每 10g 體重 0.1mL 投予三種混合麻醉藥 (0.75mg/kg Domitor、4mg/kg Midazolam、5mg/kg Vetorphale)，使其完全鎮靜化。然後，照射 8Gy 的放射線，然後使 5×10^6 cells 的來自 B6 小鼠的骨髓細胞與 5×10^6 cells 的 REC 懸浮，由小鼠的尾靜脈投予 (以液量計 200 μ L)。對於比較對照組的 Alpl-/- 小鼠僅投予相同數量的骨髓細胞 (圖 1)。

【0056】

(2)細胞投予後的維持

對於細胞移植後的小鼠以每 10g 體重 0.1mL 的量大致每天投予免疫抑制劑 (0.5mg/1mL Graceptor)。另外，對於 Alpl-/- 小鼠，無關於細胞移植的有無，到 Alpl-/- 小鼠死亡或安樂死以供實驗為止，以每週 2、3 次的頻率持續皮下投予 8mg/kg 的 STRENSIQ。

【0057】

(3)接受者小鼠生存曲線解析

卡本-麥爾生存曲線是使用統計解析軟體EZR來解析。解析方法參考了現存的各種手冊(日本自治醫科大學附屬埼玉醫療中心血液科)。

【0058】

2.結果

(1)細胞移植後各小鼠的體重變遷

REC-01細胞移植後，對於Alpl^{-/-}(n=4)及正常組的Alp^{+/-}(n=5)定期測定體重，觀察逐時的變化。將細胞移植當日各小鼠的體重定為1，將移植後的體重比的變遷以圖來表示(圖3)。

結果，Alpl^{-/-}移植組各接受者觀察到差異，雖然Homo-1(#1233)呈現以雜合子小鼠為基準的體重增加，然而Homo-2(#1313)在移植一個月後體重開始減少，第50天死亡。另一方面，Homo-3(#1375)及Homo-4(#1399)沒有觀察到明顯增減。

【0059】

(2)REC-01移植後的骨髓內ALP活性的檢討

作為ALP活性的正對照組所準備的正常小鼠(#1237，hetero-2)，在通常存在許多成骨細胞的股骨頭海綿骨(生長板附近)及皮質骨表面偵測到ALP活性(淡紫部分)(圖4右)。另外，在移植REC-01後的觀察期間中體重減少的#1313(homo-2，圖4中右)小鼠，在股骨的極少部分之處出現ALP活性。ALP活性是成骨細胞的標記，因此可說是REC-01分化成成骨細胞。另一方面，負對照組僅移植骨

髓細胞(BM)的#1359的股骨，任一部位都沒有偵測到ALP活性(圖4左)。

【0060】值得注意的是，併用造血幹細胞移植與REC-01的Alpl^{-/-}小鼠當中，呈現正常體重增加的#1233(homo-1，圖4中左)，與正常小鼠同樣地在股骨頭海綿骨及皮質骨表面偵測到ALP活性。

【0061】作為接受者使用的ALP^{-/-}小鼠，所有的個體從出生後到死亡或作為檢體被屠宰為止的期間，持續投予STRENSIQ。僅移植骨髓的群組完全沒有偵測到ALP活性，因此說明了，即使所投予的ALP製劑STRENSIQ可提高血中ALP濃度，也不會留在骨髓內，REC-01投予後觀察到體重增加的個體，在骨髓內生長的REC-01分化成成骨細胞並產生ALP，有助於體重增加(成長)等。

【0062】接下來，對於技術上極限期間之移植100天後的小鼠股骨及頭部的冷凍切片進行ALP染色。

移植BM+REC-01的Alpl^{-/-}小鼠(#1375及#1399)，與正常小鼠(#1237+/-，hetero-5)同樣地在骨端部·皮質骨·海綿骨觀察到ALP活性。此外，在頭部的切片，頭蓋骨的一部分或被認為是其他腦組織的部位也有偵測到ALP活性，但是與股骨相比稍弱(圖5)。

【0063】間質幹細胞在骨髓內的生存期間，雖然實驗上沒有被証明，然而在造血幹細胞移植時經過3個月偵測到贈與者的細胞的情況，被規定為長期生長(Osawa et al. Science 273 (5272): 242-5,1996)，只要適用該規定，則可

判定為確認REC-01在骨髓內長期生長。

【0064】

(3)REC-01移植的有無對於生存率提升的影響(圖6)

對於非移植組(n=67，有酵素，右圖：黑線)與移植組(n=9，BM+REC+有酵素，右圖：紅線)的生存曲線，使用卡本-麥爾法以log-rank檢定進行評估。

【0065】結果，藉由REC-01移植，Alp1-/-小鼠的生存率顯著改善(圖6，p=0.00045)。

酵素(STRENSIQ)無法通過血液腦關門，因此無法抑制低磷酸酶症其中一個主症狀癲癇的發作，被指出是問題點。實際上，在沒有移植(有酵素)的觀察組中，以高頻率觀察到癲癇發作而死亡的小鼠。

【0066】相對於此，在REC-01移植組，癲癇發作本身幾乎無法確認，如圖5所示般，在頭蓋骨偵測到ALP陽性細胞，因此說明了REC-01投予對於抑制癲癇發作也會奏效。

【0067】

3.總結

移植REC-01的Alp1-/-接受者小鼠，可確認骨髓內的正常ALP的產生(利用ALP染色來確認ALP活性)及來自移植的REC-01的人類細胞在小鼠股骨長期生長(ALP，STEM121抗體陽性)。另外，REC-01移植組，與非移植組相比，觀察到顯著的生存率上昇。

【0068】由以上的結果可知，僅投予STRENSIQ的臨

床成績(生存率上昇)，再加上藉由移植 REC-01，所移植的 REC-01會在低磷酸酶症患者的股骨內生長，並往成骨細胞分化，透過產生正常的骨型 ALP使患者的骨組織正常化，甚至抑制癲癇發作等的功能改善，可期待給患者生活品質(QOL)帶來更高的效果。

【0069】在人類、小鼠的任一情況，目前為止都還沒有報告經由靜脈投予培養後的間質幹細胞長期生長的成功例子。

相對於此，在本發明中，是使用免疫系統正常的基因變異動物作為接受者並且併用了免疫抑制劑來進行異種間移植，組織適合性極低。所以，經過3個月仍可偵測到移植的 REC-01是驚人的結果。

【0070】這意味著，藉由本發明，成功地在異種間經由靜脈投予來併用人類間質幹細胞移植與造血幹細胞移植，作為醫治骨骼疾病的醫藥極為有用。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種用於製造在對象身上使成骨細胞增加之醫藥之醫藥組成物之用途，該醫藥組成物含有間質幹細胞，且對該對象進行造血幹細胞移植並同時投予間質幹細胞，該間質幹細胞為以 LNGFR(CD271)陽性，或 LNGFR(CD271)及 Thy-1(CD90)共陽性為指標所分離出，且滿足以下的(a)及(b)的特徵之細胞集團：

(a)流式細胞儀的前向散射光的變異係數為40%以下

(b)平均細胞大小為20 μ m以下。

【請求項2】如請求項1之醫藥組成物之用途，其中造血幹細胞為來自臍帶血者。

【請求項3】如請求項1之醫藥組成物之用途，其中造血幹細胞為來自對象以外的贈與者的骨髓者。

【請求項4】如請求項1之醫藥組成物之用途，其中對象為先天性骨系統疾病患者。

【請求項5】如請求項4之醫藥組成物之用途，其中先天性骨系統疾病為低磷酸酶症。

【請求項6】如請求項1之醫藥組成物之用途，其中間質幹細胞為來自人類骨髓之高速增殖性間質幹細胞。

【請求項7】如請求項6之醫藥組成物之用途，其中高速增殖性間質幹細胞為 LNGFR(CD271)及 Thy-1(CD90)共陽性的幹細胞植株之細胞集團，並且滿足以下的(a)及(b)的特徵：

(a)流式細胞儀前向散射光的變異係數為40%以下

(b)平均細胞大小為 $20\mu\text{m}$ 以下。

【請求項8】如請求項6的組成物之用途，其中前述來自人類骨髓之間質幹細胞為來自LNGFR(CD271)陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)共陽性的細胞之高速增殖性間質幹細胞植株之細胞集團，並且滿足以下的(a)及(b)的特徵：

(a)流式細胞儀的前向散射光的變異係數為40%以下

(b)平均細胞大小為 $20\mu\text{m}$ 以下。

【請求項9】如請求項1或2之醫藥組成物之用途，其中細胞係以對象體重每1kg每週投予 $1\times 10^7\text{cells}$ 1次，重複該投予4次的方式來使用。

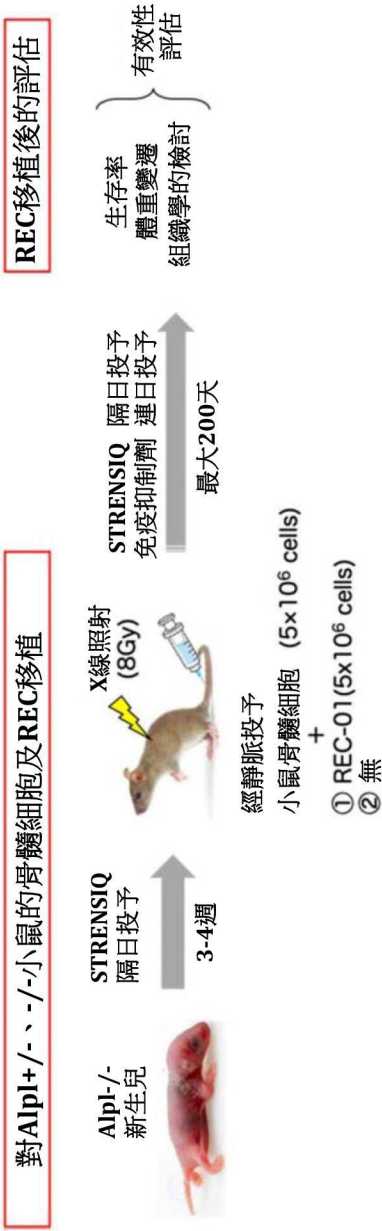
【請求項10】如請求項7之醫藥組成物之用途，其中細胞以至少 $1\times 10^6\text{cell/ml}$ 的濃度使用。

【請求項11】如請求項1或2之組成物之用途，其中間質幹細胞的提供者的HLA與對象的HLA為不一致。

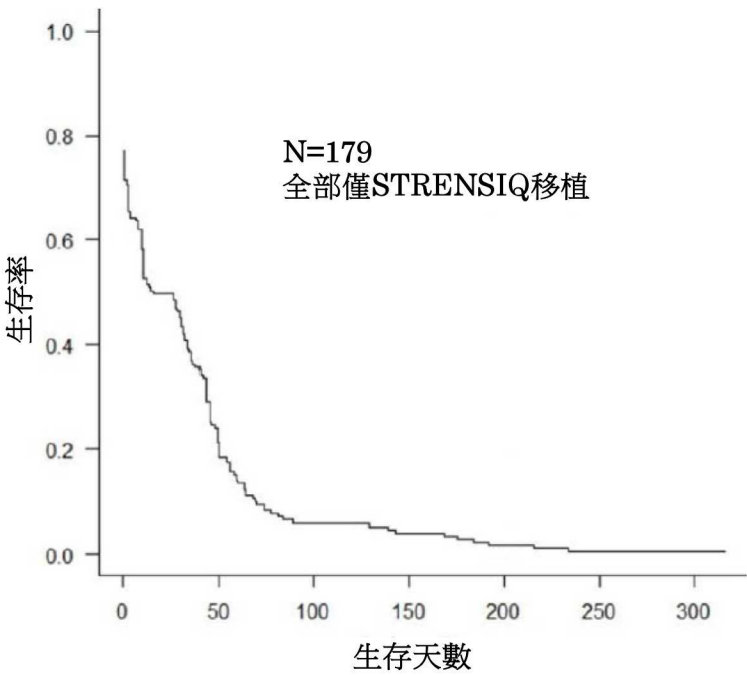
【請求項12】如請求項1或2之組成物之用途，其中間質幹細胞的提供者的HLA與對象的HLA的3個基因座的6個抗原中至少4個抗原一致。

【請求項13】如請求項1或2之組成物之用途，其中間質幹細胞的提供者的HLA與對象的HLA的3個基因座的6個抗原中至少3個抗原一致。

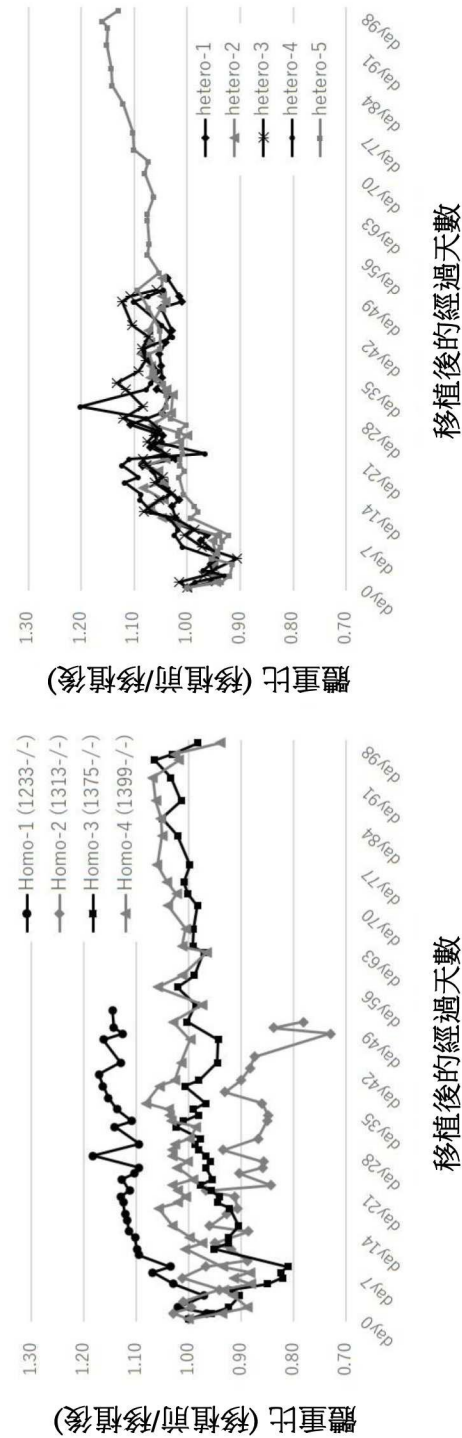
【發明圖式】



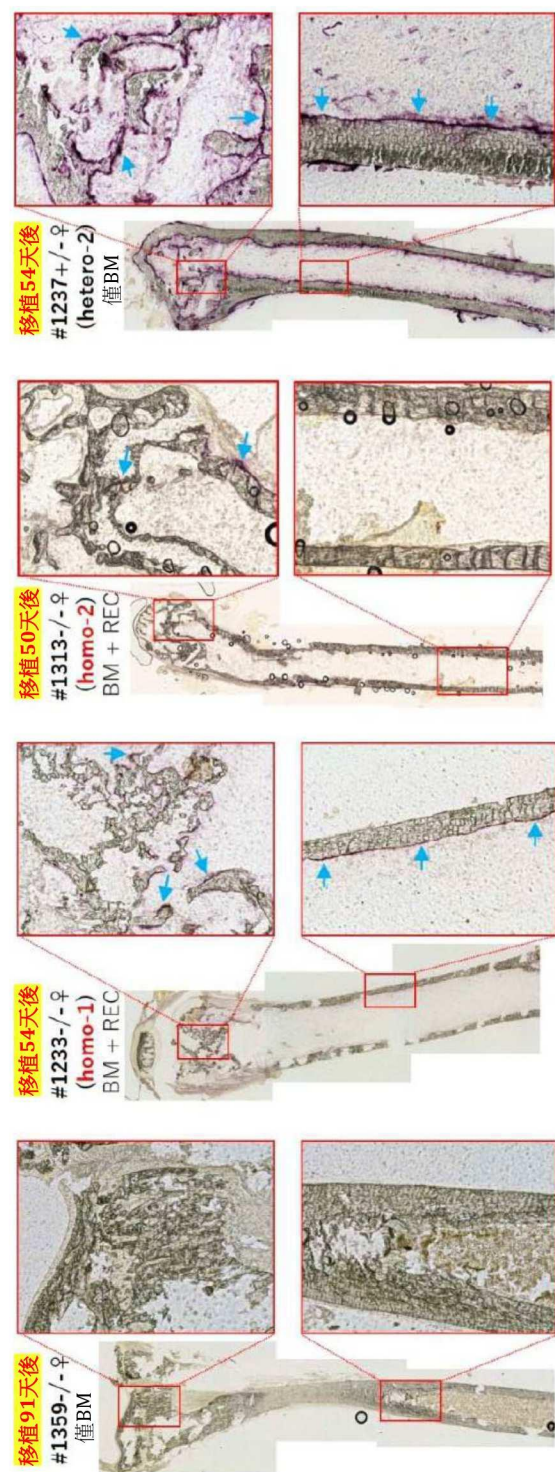
【圖 1】



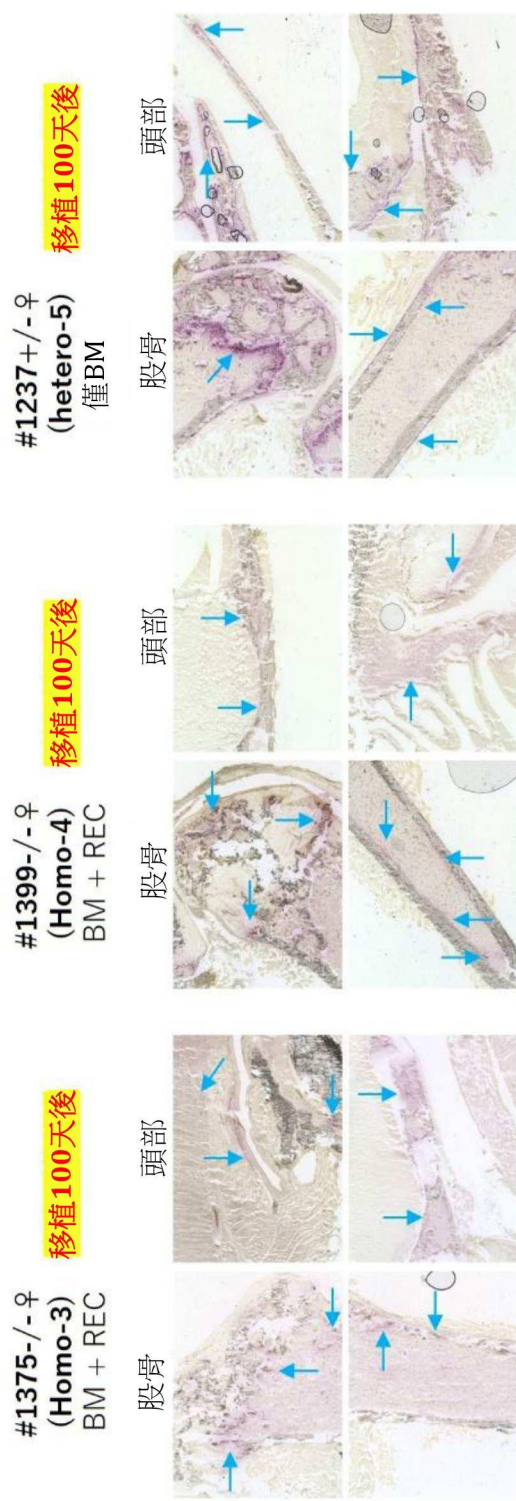
【圖 2】



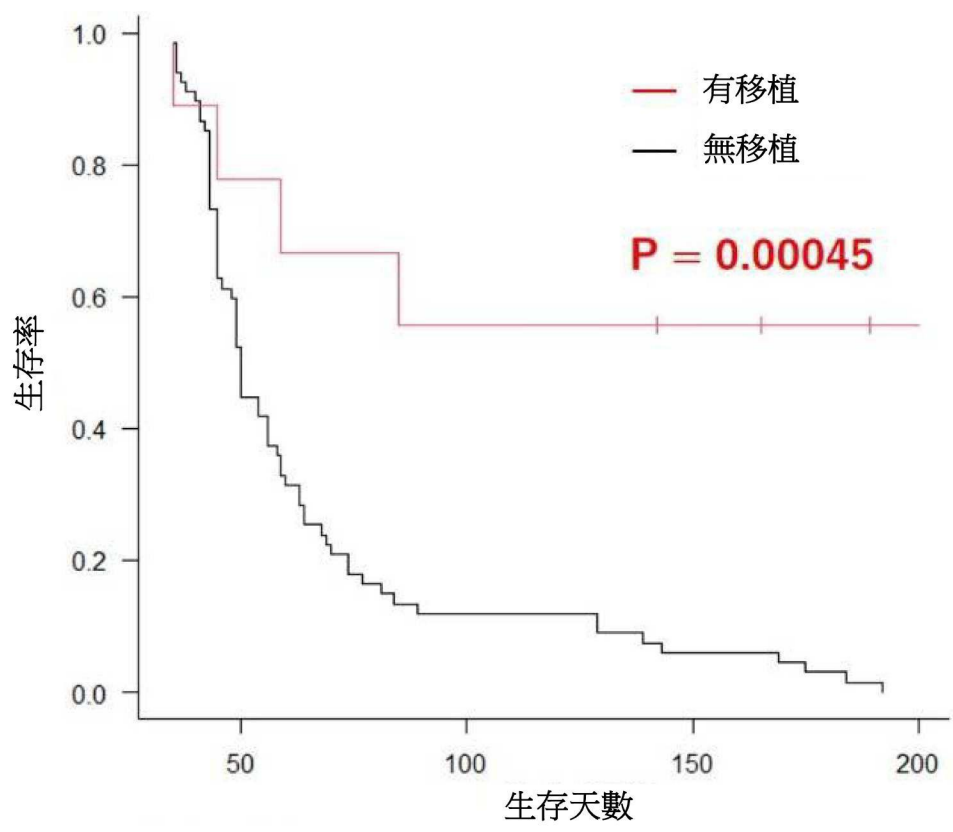
【圖 3】



【圖 4】



【圖 5】



【圖 6】