

(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2019-176875

(P2019-176875A)

(43) 公開日 令和1年10月17日(2019. 10. 17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071	4 B 0 2 9
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735	4 C 0 8 1
A 6 1 K 35/50 (2015.01)	A 6 1 K 35/50	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28	

審査請求 有 請求項の数 37 O L (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-117996 (P2019-117996)	(71) 出願人	503291462
(22) 出願日	令和1年6月26日 (2019. 6. 26)		アンスロジェネシス コーポレーション
(62) 分割の表示	特願2016-162660 (P2016-162660)		アメリカ合衆国 07059 ニュージャ
	の分割		ージー州, ウォーレン, テクノロジー ド
原出願日	平成14年2月13日 (2002. 2. 13)		ライブ 33
(31) 優先権主張番号	60/268, 560	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成13年2月14日 (2001. 2. 14)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
(31) 優先権主張番号	10/004, 942	(72) 発明者	ハリリ, ロバート, ジュイ.
(32) 優先日	平成13年12月5日 (2001. 12. 5)		アメリカ合衆国 07932 ニュージャ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		ージー州, フロアハム パーク, ヘリテー
			ジ ロード 5
(特許庁注: 以下のものは登録商標)		Fターム(参考)	4B029 AA02 AA08 AA09 BB11 DA06
1. ジップロック			DG08 FA03

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分娩後の哺乳動物の胎盤、その使用およびそれに由来する胎盤幹細胞

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】本発明は、瀉血したヒト胎盤から、限定するものではないが、多分化能性または多能性幹細胞などの胚様幹細胞を抽出および回収する方法を提供する。

【解決手段】瀉血した胎盤を、好ましくは抗凝固剤溶液を用いて、灌流して残留細胞を洗い流すことにより胎盤を処理して、残留臍帯血を除去する。瀉血した胎盤からの残留細胞および灌流液を収集した後、この残留細胞および灌流液から胚様幹細胞を分離する。本発明はまた、単離および灌流した胎盤を、胚様幹細胞を含むがこれに限らない内在性細胞を増殖させるためのバイオリクターとして利用する方法も提供する。加えて、本発明は、胎盤バイオリクターにおいて内在性細胞を増殖させ、そこから増殖した内在性細胞および生物活性分子を回収する方法も提供する。

【選択図】なし

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
無菌条件下で瀉血および灌流した、単離された哺乳動物胎盤。
- 【請求項 2】
胎盤を灌流するのに用いる溶液が抗凝固剤溶液を含む、請求項 1 に記載の単離された哺乳動物胎盤。
- 【請求項 3】
胎盤を灌流するのに用いる溶液が抗菌剤溶液を含む、請求項 1 に記載の単離された哺乳動物胎盤。
- 【請求項 4】
胎盤を灌流するのに用いる溶液が増殖因子を含む、請求項 1 に記載の単離された哺乳動物胎盤。 10
- 【請求項 5】
胎盤がヒト由来である、請求項 1 に記載の単離された哺乳動物胎盤。
- 【請求項 6】
子宮からの胎盤の娩出後約2～24時間保存した、請求項 1 に記載の単離された哺乳動物胎盤。
- 【請求項 7】
胎盤からの胚様幹細胞および他の多能性幹細胞の生産を可能にする条件下で瀉血、灌流およびインキュベーションした、単離された哺乳動物胎盤。 20
- 【請求項 8】
約2～24時間にわたってインキュベーションした、請求項 7 に記載の単離された哺乳動物胎盤。
- 【請求項 9】
約24～48時間以上にわたって灌流またはインキュベーションした、請求項 7 に記載の単離された哺乳動物胎盤。
- 【請求項 10】
生存可能な胚様幹細胞を含む、単離され灌流された哺乳動物胎盤。
- 【請求項 11】
前記幹細胞がOCT-4-およびABC-p+である、請求項 10 に記載の単離された胎盤。 30
- 【請求項 12】
少なくとも2時間灌流した、請求項 1 に記載の単離された哺乳動物胎盤。
- 【請求項 13】
少なくとも11時間灌流した、請求項 12 に記載の単離された哺乳動物胎盤。
- 【請求項 14】
胎盤が分娩後に回収される、請求項 10 に記載の哺乳動物胎盤。
- 【請求項 15】
少なくとも24時間灌流した、請求項 13 に記載の単離された哺乳動物胎盤。
- 【請求項 16】
増殖因子を含む溶液で胎盤を灌流する、請求項 10 に記載の単離された哺乳動物胎盤。 40
- 【請求項 17】
増殖因子を含む溶液で灌流した、請求項 7 に記載の単離された哺乳動物胎盤。
- 【請求項 18】
ヒト由来である、請求項 7 に記載の単離された哺乳動物胎盤。
- 【請求項 19】
子宮からの娩出後に胎盤を取得し、この胎盤を瀉血した後、無菌条件下で灌流することを含んでなる、哺乳動物胎盤の培養方法。
- 【請求項 20】
抗凝固剤溶液を含む溶液で胎盤を灌流する、請求項 19 に記載の方法。
- 【請求項 21】
50

抗菌剤を含む溶液で胎盤を灌流する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

前記胎盤がヒト由来である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

子宮からの娩出後約 2 ~ 24 時間胎盤を保存する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 24】

前記娩出が分娩時である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 25】

胎盤を室温で保存する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

前記胎盤を冷蔵または冷凍条件下で保存する、請求項 23 に記載の方法。

10

【請求項 27】

胎盤からの胚様幹細胞の生産を可能にする条件下で、この胎盤を培養することを含んでなる、瀉血および灌流した、単離された哺乳動物胎盤の培養方法。

【請求項 28】

胎盤を培養することがこの胎盤を灌流することを含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

約 24 ~ 48 時間にわたって前記胎盤をインキュベートする、請求項 27 または 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記胎盤を少なくとも 2 時間灌流する、請求項 27 に記載の方法。

20

【請求項 31】

前記胎盤を少なくとも 11 時間灌流する、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記胎盤を少なくとも 24 時間灌流する、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記胎盤を 48 時間以上灌流する、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記胎盤を、増殖因子を含む溶液で灌流する、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 35】

前記胎盤がヒト由来である、請求項 27 に記載の方法。

30

【請求項 36】

OCT-4+ および ABC-p+ である、単離されたヒト胎盤幹細胞。

【請求項 37】

前記細胞がヒト細胞である、請求項 36 に記載の幹細胞。

【請求項 38】

少なくとも次の特徴：CD10+、CD29+、CD34-、CD44+、CD45-、CD54+、CD90+、SH2+、SH3+、SH4+、SSEA3-、SSEA4-、OCT-4+ および ABC-p+ を有する、単離された哺乳動物胎盤幹細胞。

【請求項 39】

前記細胞が SSEA3- および SSEA4- である、請求項 35 に記載の単離された胎盤幹細胞。

40

【請求項 40】

分娩後のヒト胎盤を少なくとも 11 時間瀉血および灌流した後、この胎盤から単離したヒト胎盤幹細胞。

【請求項 41】

- (a) 瀉血および灌流しておいた分娩後の哺乳動物胎盤；
- (b) 上記胎盤をインキュベートまたは培養する手段；および
- (c) 幹細胞を検出する手段；

を含んでなる幹細胞生産装置。

【請求項 42】

50

幹細胞を収集するための収集装置をさらに含む、請求項 39 に記載の装置。

【請求項 43】

培養条件をモニタリングおよび調節する手段をさらに含む、請求項 39 に記載の装置。

【請求項 44】

前記モニタリングおよび調節がコンピュータ化される、請求項 41 に記載の装置。

【請求項 45】

細胞分離装置をさらに含む、請求項 39 に記載の装置。

【請求項 46】

請求項 35、37 または 38 に記載のヒト胎盤幹細胞を投与することを含んでなる、ヒト疾患の治療方法。

10

【請求項 47】

請求項 35、37 または 38 に記載のヒト胎盤幹細胞を、それを必要とする患者に投与することを含んでなる、幹細胞の移植方法。

【請求項 48】

請求項 35、37 または 38 に記載のヒト胎盤幹細胞を含んでなる、医薬組成物。

【請求項 49】

臍帯血または胎盤血をさらに含む、請求項 46 に記載の医薬組成物。

【請求項 50】

請求項 35、37 または 38 に記載のヒト胎盤幹細胞から分化した前駆細胞。

【請求項 51】

すべての細胞型に分化することができるヒト胎盤幹細胞の単離された均一集団。

20

【請求項 52】

少なくとも次の細胞表面マーカー-OCT-4+およびABC-p+を示す生存可能なヒト胎盤幹細胞の均一集団。

【請求項 53】

多能性であるヒト胎盤幹細胞の単離された均一集団。

【請求項 54】

胎児由来でも母親由来でもない細胞を含んでなる、単離された胎盤。

【請求項 55】

幹細胞が胎盤に由来する、請求項 49 または 51 に記載の幹細胞。

30

【請求項 56】

CD34+およびCD38-である細胞が富化された造血幹細胞の集団を含んでなる、骨髄移植用の組成物。

【請求項 57】

CD34+およびCD38+である細胞を有する臍帯血をさらに含む、請求項 53 に記載の組成物。

【請求項 58】

CD34-およびCD38-である細胞が富化された造血幹細胞の集団を含む、骨髄移植用の組成物。

【請求項 59】

CD34+およびCD38+である細胞を有する臍帯血をさらに含む、請求項 54 に記載の組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 序文

本発明は、子宮からの娩出後、例えば出産後、の胎盤を瀉血および灌流する方法に関する。本発明は、胎盤および外因性の供給源に由来する胚様幹細胞を増殖するために、分離した胎盤を処理および培養する方法に関する。本発明はさらに、生物学的物質または培養細胞、組織および類器官を生産するバイオリアクターとして、培養した胎盤を使用するこ

50

とに関する。本発明はまた、幹細胞の収集および増殖、特に、胎盤からの胚様幹細胞およびその他の多能性幹細胞の収集にも関する。本発明は、分娩後の胎盤に由来する胚様幹細胞に関する。

【背景技術】

【0002】

2. 発明の背景

ヒト幹細胞の同定、分離および生産には相当の関心が集まっている。ヒト幹細胞は、多様な成熟ヒト細胞系統を発生させる能力がある全能性または多分化能性の前駆細胞である。この能力は、器官および組織発生に必要な細胞分化および専門化のための基礎として働く。

【0003】

近年このような幹細胞の移植に成功したため、疾患による骨髄切除、有毒な化学薬品および/または放射線への暴露後の骨髄を再構成および/または補充する新規の臨床ツールが提供された。さらに、幹細胞を用いて、全てではないにしても、多くの組織を再集団形成 (repopulate) させ、生理学および解剖学的機能性を復元できることを証明する証拠もある。組織工学、遺伝子治療送達および細胞治療法への幹細胞の応用も急速に進展している。

【0004】

多数の異なる型の哺乳動物幹細胞が特性決定されている。例えば、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、成体幹細胞、またはその他の前駆幹細胞 (committed stem cells) もしくは前駆細胞が知られている。幹細胞の中には、分離および特性決定されているだけでなく、制限された範囲までの分化を可能にする条件下で培養されているものもある。しかし、あらゆる細胞型に分化する能力があるヒト幹細胞の十分な量および集団を取得するのはほとんど不可能であるという基本的な問題が残っている。幹細胞の供給は極めて不足している。これらは、悪性疾患、先天性代謝異常、異常ヘモグロビン症、免疫不全などの非常に多様な疾患の治療にとって重要である。従って、より多量の胚性幹細胞の供給源があれば、非常に有利である。

【0005】

十分な数のヒト幹細胞を取得することは、いくつかの理由で困難であった。第一に、成人組織における幹細胞の正常に存在する集団の分離は、一部には、血液または組織には非常に限られた量しか認められないために、技術的に困難で、しかも費用がかかる。第二に、胚または流産児を含む胎児組織からのこれらの細胞の獲得は、宗教的および倫理的問題を引き起こしてきた。ヒト胚および胎児が独立した生命であるという考えが広く支持されたために、医学的研究を含むあらゆる用途での上記供給源の使用に対して、政府による規制が成立するに至った。従って、胚または胎児組織から獲得される細胞の使用を必要としない代替的供給源は、臨床における幹細胞の使用を進展させる上で不可欠である。しかし、幹細胞、特にヒト幹細胞の実現可能な代替供給源は極めて少ないため、供給は限られている。さらに、代替供給源から治療および研究目的に十分な量の幹細胞を回収するのは、ドナー被験者もしくは患者からの細胞または組織の採取、in vitroでの細胞の培養および/または増殖、切開などを含み、一般に煩雑である。

【0006】

例えば、Caplanら (1996年1月23日発行の「ヒト間葉幹細胞」と題する特許文献1) は、間葉幹細胞系統の前駆体として働く骨髄由来のヒト間葉幹細胞 (hMSC) 組成物を開示している。Caplanらは、hMSCが、モノクローナル抗体で同定される特定の細胞表面マーカーにより識別されることを開示している。造血細胞または分化した間葉幹細胞のいずれかに関連するマーカーを含まない付着性の骨髄または骨膜細胞の正の選択により、均一なhMSC組成物が得られる。これらの単離された間葉幹細胞集団は、間葉幹細胞に関連するエピソードの特徴を展示し、分化することなく培養中に再生する能力があり、従って、in vitroで誘導するか、または、損傷組織の部位にin vivoで配置すると、特定の間葉系統に分化する能力を有する。しかし、このような方法には、ドナーから骨髄または骨膜細胞を採取

10

20

30

40

50

した後、MSCを単離しなければならないという欠点がある。

【0007】

Huら（2000年12月7日公開された、「ヒト羊膜上皮細胞の単離、低温保存、および治療的使用」と題する特許文献2）は、将来の使用のために単離、培養および低温保存された、または誘導して分化させた、分娩時の胎盤由来のヒト羊膜上皮細胞を開示している。Huらによれば、分娩後ただちに胎盤を回収し、例えば、切開により、絨毛膜から羊膜を分離する。次に、標準的な単離技法に従って、羊膜から羊膜上皮細胞を単離する。開示された細胞は、各種培地中で培養し、培養下で増殖し、低温保存し、または、分化するように誘導することができる。Huらは、羊膜上皮細胞が多能性（また、恐らく多分化能性）であり、角膜表面上皮または腔上皮のような上皮組織へと分化できることを開示している。しかし、このような方法の欠点として、多大な労力を要することや、幹細胞の収量が非常に低いことがある。例えば、典型的な治療または研究目的に十分な数の幹細胞を取得するためには、まず、切開および細胞分離技法により、羊膜上皮細胞を羊膜から単離した後、*in vitro*で培養および増殖しなければならない。

10

【0008】

臍帯血は、造血前駆幹細胞の代替供給源として知られている。臍帯血由来の幹細胞は、造血再構成に使用するために通常低温保存されており、この造血再構成は、骨髄やその他の関連移植に広範に用いられている治療方法である（例えば、「血液由来の胎児および新生児造血幹および前駆細胞の保存」と題する、Boyseらの特許文献3、1993年3月9日発行の「血液由来の胎児および新生児造血幹および前駆細胞の単離と保存、ならびに、治療的使用方法」と題する、Boyseらの特許文献4を参照）。臍帯血を採取する通常の技法は、針またはカニューレを使用することからなり、これらは、重力を利用して、胎盤から臍帯血を排出（すなわち、瀉血）するのに用いられる（1993年3月9日発行のBoyseらの特許文献4；1991年4月2日発行のBoyseらの特許文献3；1994年12月13日発行の「胎盤血液収集のための方法および装置」と題するAndersonの特許文献5；1995年5月16日発行の「臍帯の締付け、切断、および血液収集装置および方法」と題するHesselらの特許文献6）。針またはカニューレは、通常、臍帯静脈内に配置し、胎盤を穏やかにマッサージすることにより、胎盤から臍帯血を流出させる。しかし、その後、流出させた胎盤は無用とみなされ、一般には、廃棄されてきた。臍帯血からの幹細胞の獲得に際する主な制限事項は、取得した臍帯血の量が往々にして不十分であるため、移植後の骨髄を有効に再構成するには細胞数が不足することであった。

20

30

【0009】

Naughtonら（1999年10月5日発行の「三次元間質組織培養物」と題する特許文献7）は、繊維芽細胞様細胞や軟骨細胞前駆細胞などの胎児細胞を、臍帯もしくは胎盤組織または臍帯血から取得できることを開示している。Naughtonら（特許文献7）は、このような胎児間質細胞を用いて、「一般的（generic）」間質または軟骨性組織を作製できることを開示している。また、Naughtonらは、特定の個体（開示した方法に従って培養し増殖させた細胞および/または組織を、あとで受け取ることになっている個体）に由来する繊維芽細胞を三次元マトリックスに接種することにより、「特定の」間質組織を作製することも開示している。しかし、このような手法の欠点は、多大な労力を要することである。Naughtonらが開示した方法によれば、臍帯または胎盤から胎児間質細胞を回収するには、これらの組織を切開し、組織を細かく切り刻んでから、分離する必要がある。その上、臍帯血、ならびに、臍帯および胎盤から、十分な量の胎児間質細胞を取得するには、さらに*ex vivo*での増殖を必要とする。

40

【0010】

細胞集団の*ex vivo*増殖に現在利用可能な方法もまた多大な労力を要する。例えば、Emersonら（2001年12月4日に発行された「幹細胞の*ex vivo*複製のための、造血前駆細胞培養物の最適化のための、ならびに、ヒト間質細胞の代謝、GM-CSF分泌および/またはIL-6分泌を高めるための、方法および組成物」と題するEmersonらの特許文献8）は、ヒト幹細胞分裂の*ex vivo*培養および/またはヒト造血前駆幹細胞の最適化のための方法および培

50

地条件を開示している。開示された方法によれば、骨髓由来のヒト幹細胞または前駆細胞を液体培地中で培養するが、培地は、約24～約48時間につき培養物1ml当たり1mlの培地という流量で、連続的または定期的に取り替える（好ましくは、灌流する）。培養物を生理的に許容可能な条件下に維持しながら、代謝産物を除去し、枯渇した栄養素を補充する。

【0011】

Krausら（2002年1月15日に発行の「標的細胞集団の選択的増殖」と題する、Krausらの特許文献9）は、予め決定した標的細胞集団の選択的増殖が下記により可能であることを開示している：臍帯血または末梢血由来の細胞の出発サンプルを増殖培地に導入し、標的細胞集団の細胞を分裂させた後、増殖培地中の細胞を、特異的親和性を有する結合分子（CD34についてはモノクローナル抗体）を含む選択エレメントと接触させることにより、増殖培地中の細胞から、予め決定した標的集団の細胞を選択することができる。

10

【0012】

Rodgersら（2002年1月1日に発行の「造血および間葉細胞の増殖および分化を促進する方法」と題する、特許文献10）は、造血および間葉幹細胞のex vivo培養方法、ならびに、アンジオテンシノーゲン、アンジオテンシンI（AI）、AI類似体、AI断片およびその類似体、アンジオテンシンII（AII）、AII類似体、AII断片もしくはその類似体、またはAII AT₂ 2型受容体アゴニストの存在下で、単独もしくは他の増殖因子およびサイトカインと組み合わせて増殖させることからなる系統特異的細胞増殖および分化の誘導を開示している。上記幹細胞は、骨髓、末梢血または臍帯血に由来する。しかし、このような方法の欠点は、幹細胞の増殖および分化のための上記ex vivo方法は、前述したように時間がかかり、幹細胞の収量も低いことである。

20

【0013】

Naughtonら（2000年2月8日発行の「in vitroで作製した、生存間質組織培養臓腑実質細胞の三次元培養物」と題する特許文献11）は、幹細胞または前駆細胞（例えば、臍帯細胞、胎盤細胞、間葉幹細胞または胎児細胞に由来するものなどの間質細胞）を、例えばフラスコや皿のような培養容器中の二次元の単層ではなく、三次元支持体上で増殖させる組織培養系を開示している。

【0014】

幹細胞の採取および使用に制限があり、臍帯血から回収される細胞の数は一般に不十分であることから、幹細胞は極めて供給が不足している。幹細胞は、悪性疾患、先天性代謝異常、異常ヘモグロビン症、免疫不全などの非常に多様な障害の治療に使用できる可能性がある。様々な治療法、およびその他の医学的に関連する目的で、多数のヒト幹細胞を容易に入手可能にする供給源が切実に求められている。本発明は、この需要その他を解消しようとするものである。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】米国特許第5,486,359号

【特許文献2】WO 00/73421

40

【特許文献3】米国特許第5,004,681号

【特許文献4】米国特許第5,192,553号

【特許文献5】米国特許第5,372,581号

【特許文献6】米国特許第5,415,665号

【特許文献7】米国特許第5,962,325号

【特許文献8】米国特許第6,326,198号

【特許文献9】米国特許第6,338,942号

【特許文献10】米国特許第6,335,195号

【特許文献11】米国特許第6,022,743号

【発明の概要】

50

【課題を解決するための手段】

【0016】

3. 発明の概要

本発明は、子宮からの娩出後に、多能性幹細胞（例えば、前駆細胞）、胚様幹細胞およびその他の生物学的物質をもたらすように処理され培養された哺乳動物（好ましくはヒト）の胎盤に関する。特に、本発明は、分娩後の胎盤を灌流および瀉血する方法を提供する。本発明は、子宮からの胎盤の娩出後、少なくとも2時間から48時間以上にわたり、無菌条件下で該胎盤を瀉血および灌流する方法を提供する。好ましい実施形態では、抗凝血因子のように、瀉血を高める因子を含む溶液を用いて、胎盤を灌流する。別の実施形態では、抗菌および抗ウイルス薬のように、無菌条件を高める因子を含む溶液を用いて、胎盤を灌流する。好ましい実施形態では、増殖因子を含む溶液で胎盤を灌流する。増殖因子およびその他の培養成分を含むが、抗凝血剤は含まない溶液を培養溶液と呼ぶ。

10

【0017】

本発明の別の実施形態では、上記胎盤を灌流することにより、血液、残留細胞、タンパク質およびその他の残留物質を除去する。この胎盤をさらに処理することによって残屑を除去してもよい。灌流は、通常、適当な灌流液を用いて、少なくとも2~24時間以上継続する。本発明のいくつか別の実施形態では、少なくとも2、4、6、8、10、12、14、16、18、20および22時間胎盤を灌流してから幹細胞を収集する。上記時点のいずれかで収集した灌流液も胚様幹細胞の供給源を提供すると考えられる。胎盤から最初に収集した血液が、主に、CD34+およびCD38+造血前駆細胞を含む臍帯血と呼ばれることを理解すべきである。分娩後最初の24時間以内の灌流において、CD34+およびCD38-細胞と一緒に、胎盤からCD34+およびCD38-造血前駆細胞を単離することができる。約24時間の灌流後に、前記細胞と一緒に、胎盤からCD34-およびCD38-細胞を単離することができる。

20

【0018】

本発明は、無菌条件下で瀉血および灌流した単離された胎盤に関する。好ましい実施形態では、本発明は、子宮からの娩出後に瀉血および灌流することによりあらゆる残留細胞を除去した後、2~24時間培養しておいた、単離された胎盤を提供する。本発明はまた、胚様幹細胞、前駆細胞およびその他の生物学的物質を産生することができる生存可能な器官を形成するように処理および培養した、単離された胎盤を提供する。

30

【0019】

本発明は、瀉血および灌流しておいた分娩後の哺乳動物の胎盤と、該胎盤をインキュベートまたは培養する手段と、幹細胞を検出する手段を含んでなる、幹細胞生産装置に関する。別の実施形態では、本発明の装置は、さらに収集装置および/または収集された細胞を分離する手段を含む。別の実施形態では、本発明の装置は、細胞の培養条件および収集をモニタリングおよび調節する手段をさらに含む。

【0020】

本発明はまた、単離および瀉血した胎盤を、該胎盤に由来する胚様幹細胞の生産を可能にする適切な条件下で、インキュベートし培養する方法を提供する。本発明によれば、子宮から娩出後の胎盤から胚様幹細胞を取得する。上記胎盤は、少なくとも2~24時間にわたり瀉血および灌流することにより、あらゆる残留細胞を除去する。次に、瀉血した胎盤を、該胎盤に由来する内在性幹細胞の生産を可能にする適切な条件下で培養する。このような幹細胞として、限定するものではないが、胚様幹細胞、多分化能性または多能性幹細胞が挙げられる。好ましい実施形態では、瀉血した胎盤を、PDGFやEGFのような増殖因子の存在下で培養する。

40

【0021】

本発明はさらに、胎盤に由来する内在性幹細胞を増殖させるバイオリクターとして使用するための単離された胎盤の処理および培養方法を提供する。本発明は、内在性細胞および生物学的物質（例えば、抗体、タンパク質、オリゴヌクレオチド、ホルモン、ウイルス、サイトカインおよび酵素）を生産させるバイオリクターとして使用するための単離された胎盤の処理および培養方法を提供する。本発明はまた、胎盤からの胚様幹細胞なら

50

びに他の多分化能性および多能性幹細胞の増殖および収集を提供する。培養した胎盤はバイオリクターとして反復使用が可能であり、数日、数ヶ月、さらには数年にわたって培養可能である。培養した胎盤は、該系に導入した培地または灌流液の一部を定期的または連続的に取り出した後、新鮮な培地または灌流液と取り替えることにより維持するが、この取り出した培地または灌流液から、増殖した細胞または産生された生物学的物質を回収することができる。

【0022】

別の実施形態では、本発明は、限定するものではないが、胚様幹細胞、前駆細胞、多分化能性細胞および多能性細胞などの内在性細胞を増殖するためのバイオリクターとして、単離および灌流した胎盤を使用する方法を提供する。上記胎盤バイオリクターにおいて増殖した内在性細胞を収集し、かつ/または、上記灌流液、培地、あるいは、胎盤細胞自体から、生物活性分子を回収することができる。

10

【0023】

別の実施形態では、本発明は、外因性細胞を増殖するためのバイオリクターとして、単離および灌流した胎盤を使用する方法を提供する。この実施形態によれば、本発明は、胎盤に由来しない細胞を含む、単離された胎盤に関し、ここで、胎盤への細胞の植付け (engraftment) は胎盤を刺激して胚様幹細胞を生産させ、あるいは、植付けた細胞がサイトカインや増殖因子のようなシグナルを生産し、これらシグナルが胎盤を刺激して幹細胞を生産させる。この実施形態によれば、胎盤に、胎盤由来のものではなく、胎盤に関連する乳児から取得した細胞を植え付けてもよい。別の実施形態では、胎盤に、胎盤由来のものではなく、胎盤に関連する乳児の親または同胞から取得した細胞を植え付けてもよい。上記胎盤バイオリクターにおいて増殖させた外因性細胞を収集し、かつ/または上記灌流液、培地、あるいは、胎盤細胞自体から、生物活性分子を回収することができる。

20

【0024】

本発明は、胎盤に由来する胚様幹細胞を提供する。本発明の胚様幹細胞は、フローサイトメトリーおよび免疫細胞化学のような技法を用いて形態および細胞表面マーカーの変化を測定し、かつ、PCRのような技法を用いて遺伝子発現の変化を測定することにより、特性決定することができる。本発明の一実施形態では、このような胚様幹細胞は、下記の細胞表面マーカーの存在により特性決定することができる：CD10+、CD29+、CD34-、CD38-、CD44+、CD45-、CD54+、CD90+、SH2+、SH3+、SH4+、SSEA3-、SSEA4-、OCT-4+、およびABC-p+。好ましい実施形態では、このような胚様幹細胞は、細胞表面マーカー：OCT-4+およびAPC-p+の存在により特性決定することができる。胎盤に由来する胚様幹細胞は、胚性幹細胞の特徴を有するが、胚に由来するものではない。換言すれば、本発明は、娩出後に灌流した胎盤から単離された未分化の幹細胞であるOCT-4+およびABC-p+細胞を包含する。このような細胞はヒト胚性幹細胞と同じくらい万能である（例えば、多分化能性である）。前述のように、様々な時点の灌流した胎盤から、多数の異なる多分化能性または多能性幹細胞を単離することができ、このような細胞として、例えば、CD34+/CD38+、CD34+/CD38-、およびCD34-/CD38-造血細胞が挙げられる。本発明の方法によれば、ヒト胎盤を、分娩後、胚様幹細胞の供給源として用いる。

30

【0025】

別の実施形態では、本発明は、瀉血した胎盤の抽出液または灌流液からその他の胚様および/または多能性もしくは多分化能性幹細胞を単離する方法を提供する。

40

【0026】

本発明は、本発明の胚様幹細胞を含む医薬組成物に関する。本発明はさらに、あらゆる細胞型に分化する能力があるヒト胎盤幹細胞の単離された均一集団に関する。本発明はまた、限定するものではないが、高濃度（または大きな集団）の、CD34+/CD38-細胞およびCD34-/CD38-細胞などの均一造血幹細胞を含む医薬組成物も包含し、ここで、1以上の上記細胞集団を臍帯血造血細胞、すなわち、CD34+/CD38+造血細胞と一緒に、または該細胞との混合物として、移植およびその他の用途に用いることができる。

【0027】

50

本発明の方法により取得した幹細胞は、疾患の治療または予防を目的とする移植において多様な用途を有する。本発明の一実施形態では、上記細胞を用いて、組織および器官を一新または再集団形成し、これにより、罹患した組織、器官またはそれらの一部を置換または修復する。

【0028】

3.1. 定義

本明細書で用いる「バイオリクター」という用語は、細胞を増殖する、生物学的物質を生産または発現する、ならびに、細胞、組織、類臓器、ウイルス、タンパク質、ポリヌクレオチドおよび微生物を生育または培養するためのex vivoシステムを意味する。

【0029】

本明細書で用いる「胚性幹細胞」という用語は、胚盤胞（例えば、生後4～5日のヒト胚）の内部細胞塊に由来し、かつ多分化能性である細胞を意味する。

【0030】

本明細書で用いる「胚様幹細胞」という用語は、胚盤胞の内部細胞塊に由来するものではない細胞を意味する。本明細書で用いる用語「胚様幹細胞」はまた、「胎盤幹細胞」と呼ばれることもある。胚様幹細胞は、好ましくは、多分化能性である。しかし、胎盤から得られる幹細胞には、胚様幹細胞、多能性細胞、および前駆細胞も含まれる。本発明の方法によれば、胎盤に由来する胚様幹細胞は、残留細胞を除去するのに十分な時間胎盤を瀉血および灌流すれば、単離された胎盤から収集することができる。

【0031】

本明細書において、「瀉血した」または「瀉血」という用語は、胎盤に関して用いるとき、胎盤からの全臍帯血の除去および/または排出を意味する。本発明によれば、胎盤の瀉血は、例えば、限定するものではないが、ドレナージ、重力誘導による流出、マッサージ、搾り出し、ポンピングなどにより、達成することができる。好ましい実施形態では、胎盤の瀉血は、胎盤の瀉血に役立つ（抗凝固剤のような薬剤を含む、または含まない）液体で胎盤を灌流し、すすぎ、またはフラッシュ洗浄することにより達成することができる。

【0032】

本明細書で用いる「灌流する」または「灌流」という用語は、器官または組織上にまたはこれらを通して液体を注入または通過させる行為、好ましくは、器官または組織からあらゆる残留細胞、例えば、非付着細胞を除去するのに十分な力または圧力で、上記器官または組織に液体を通過させることを意味する。本明細書で用いる用語「灌流液」は、器官または組織を通過させた後に回収された液体を意味する。好ましい実施形態では、灌流液は、1以上の抗凝固剤を含む。

【0033】

本明細書で用いる「外因性細胞」という用語は、「外来」細胞、すなわち、異種細胞（すなわち、胎盤ドナー以外の供給源に由来する「非自己」細胞）または、該胎盤以外の器官もしくは組織からの自己細胞（すなわち、胎盤ドナーに由来する「自己」細胞）を意味する。

【0034】

本明細書で用いる「類臓器」(organoid)という用語は、哺乳動物の身体（特にヒトの身体）の器官または腺としての実際の構造物または表面的外観に、1以上の細胞型が集めた凝集物を意味する。

【0035】

本明細書で用いる「多能性細胞」という用語は、哺乳動物身体約260の細胞型のいずれかのサブセットに成育する能力を有する細胞を意味する。多分化能性細胞とは違って、多能性細胞は、これら細胞型のすべてを形成する能力はない。

【0036】

本明細書で用いる「多分化能性細胞」という用語は、完全な分化能力、すなわち、哺乳動物身体約260の細胞型のいずれにも成育する能力を有する細胞を意味する。多分化能

10

20

30

40

50

性細胞は、自己再生が可能であり、組織内で休眠または静止したままでいられる。全能性細胞（例えば、受精した二倍体卵細胞）とは違って、胚性幹細胞は、通常、新しい胚盤胞を形成することはできない。

【0037】

本明細書で用いる「前駆細胞」という用語は、特定タイプの細胞に分化するように、または特定タイプの組織を形成するように拘束（committed）された細胞を意味する。

【0038】

本明細書で用いる「幹細胞」という用語は、無限に再生して、組織および器官の専門化した細胞を形成することができるマスター細胞（master cell）を意味する。幹細胞は、発生上は、多分化能性または多能性の細胞である。幹細胞は分裂して2個の娘幹細胞、または1個の娘細胞と1個の前駆（「トランジット」）細胞を産生し、後に、これが増殖して、成熟した完全に形成された組織の細胞となる。

10

【0039】

本明細書で用いる「全能性細胞」という用語は、完全な胚（例えば、胚盤胞）を形成することができる細胞を意味する。

【図面の簡単な説明】

【0040】

4．図面の説明

【図1】胎盤を灌流し、その後、灌流液を収集するため、胎盤の静脈および動脈にカニューレを挿入することを示した横断面図である。

20

【図2a】瀉血および灌流した胎盤の収集を示した概略図である。

【図2b】瀉血および灌流した胎盤のクランピングを示した概略図である。

【図2c】瀉血および灌流した胎盤の灌流を示した概略図である。

【図2d】瀉血および灌流した胎盤からの回収および保存を示した概略図である。

【図2e】瀉血および灌流した胎盤の気密容器への保存を示した概略図である。

【図3】バイオリアクターとして使用する装置における灌流した胎盤の横断概略図である。

【図4】灌流した胎盤から回収された胚様幹細胞などの細胞を選別するための選択スキームである。

30

【発明を実施するための形態】

【0041】

5．発明の詳細な説明

本発明者は、思いがけなく、分娩後の胎盤が、分娩後適切に処理すれば、活性化することができる静止細胞を含むことをみいだした。例えば、子宮からの娩出後、胎盤を出来るだけ迅速に瀉血すると、アポトーシスが阻止されるか、または最小限に抑えられる。次に、瀉血後できるだけ早期に、胎盤を灌流して、器官に存在する血液、残留細胞、タンパク質、因子およびその他の材料を除去する。物質残屑も胎盤から除去することができる。灌流は、通常、少なくとも2～24時間以上にわたり適当な灌流液で継続する。いくつかの別の実施形態では、胎盤は、少なくとも4、6、8、10、12、14、16、18、20および22時間灌流する。換言すれば、本発明は、瀉血および灌流を十分な時間実施することにより、分娩後の胎盤の細胞を活性化できるという発見に少なくとも部分的に基づいている。従って、胚様幹細胞の豊富な供給源として胎盤を容易に用いることができ、これらの胚様幹細胞は、薬物の発見、疾患の治療および予防、特に、移植手術または移植療法、ならびに、前駆細胞、組織および類臓器の形成を含めて、様々な研究に用いることができる。

40

【0042】

さらに、予想外で驚いたことに、瀉血、灌流および/または培養した胎盤により産生されたヒト胎盤幹細胞は、所望の細胞型に容易に分化することができる多分化能性細胞である。

【0043】

本発明は、胎盤または外因性供給源に由来する胚様幹細胞の生産および増殖用のバイオ

50

リアクターとして使用するために、単離された胎盤を処理および培養する方法に関する。本発明はまた、限定するものではないが、抗体、ホルモン、サイトカイン、増殖因子およびウイルスなどの生物学的物質を生産するバイオリアクターとして、培養した胎盤を使用することにも関する。さらに本発明は、培養した胎盤からの幹細胞および生物学的物質を収集および単離する方法にも関する。

【0044】

本発明は、子宮から娩出された直後単離された胎盤を灌流および瀉血することにより、あらゆる残留細胞を除去する方法に関する。本発明はさらに、胚様幹細胞の産生および増殖を可能にする適切な条件下で、単離および瀉血済の胎盤を培養することに関する。

【0045】

本発明は、瀉血したヒト胎盤から、限定するものではないが、多分化能性または多能性幹細胞などの胚様幹細胞を抽出および回収する方法を提供する。胚様幹細胞は、胚性幹細胞の特徴を有するが、胚に由来するものではない。このような細胞は、ヒト胚性幹細胞と同じくらい万能である（例えば、多分化能性である）。本発明の方法によれば、ヒト胎盤を、分娩後、胚様幹細胞の供給源として用いる。

【0046】

本発明の方法によれば、臍帯動脈および臍帯静脈のいずれかもしくは両方を用いる灌流技法により、排液した胎盤から胚様幹細胞を抽出する。胎盤は、残留血液（例えば、残留臍帯血）の瀉血および収集により排液するのが好ましい。次に、排液した胎盤を処理して、*ex vivo*の天然バイオリアクター環境を確立させ、この環境において、実質および血管外空間内の常在する胚様幹細胞を動員する。胚様幹細胞は、排液した空の微小循環中に移動するが、そこで、本発明の方法に従い、好ましくは、灌流で収集容器に洗い流すことにより、これら細胞を収集する。

【0047】

5.1. 胎盤の単離および培養方法

5.1.1. 胎盤の前処理

本発明の方法によれば、出産後、娩出直後のヒト胎盤を回収し、特定の実施形態では、胎盤中の臍帯血を回収する。特定の実施形態では、この胎盤を通常の臍帯血回収方法に付す。このような臍帯血回収は、例えば、LifeBank Inc., Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry and Cryocellから商業的に入手することができる。臍帯血は、胎盤の娩出直後に排液することができる。

【0048】

分娩後、胎盤から臍帯血を排出する。胎盤は、無菌条件下で、室温または5~25（摂氏）のいずれかで保存することができる。胎盤は、48時間以上保存することができるが、好ましくは、4~24時間保存した後に灌流して残留臍帯血をすべて除去する。

【0049】

典型的には、分娩室から別の場所、例えば、実験室に胎盤を輸送して、臍帯血の回収および/またはドレナージ（排液法）および灌流を実施する。胎盤は、図2a~eに示すように、例えば、近位臍帯をクランプして、無菌ジップロック式プラスチックバッグに胎盤を入れ、このバッグを断熱容器に入れるなどして、無菌の断熱輸送装置（胎盤の温度は20~28に維持する）に入れて輸送する。好ましくは、分娩から4~24時間後に胎盤を実験室に送達させる。

【0050】

好ましくは、娩出後に無菌条件下で胎盤を回収した後、5~25（摂氏）の温度で抗凝固剤溶液中に保存する。好適な抗凝固剤溶液は、当業者には公知である。例えば、ヘパリンまたはワルファリンナトリウムの溶液を用いることができる。好ましい実施形態では、抗凝固剤溶液はヘパリン（1:1000溶液中1%w/w）溶液から成る。好ましくは、排液した胎盤の保存開始から36時間以内に、胚様幹細胞を収集する。胎盤を灌流して、残留細胞を除去するのに用いる溶液は、幹細胞の回収のために胎盤を灌流および培養するのに用いたのと同じ溶液でよい。これら灌流液のいずれを収集しても、胚様幹細胞の供給源として

10

20

30

40

50

用いることができる。

【0051】

特定の実施形態では、好ましくは、胎盤への挿入部から4～5cm(センチメートル)の地点で近位臍帯をクランプしてから臍帯血を回収する。別の実施形態では、臍帯血の回収後に、しかし、それ以上の胎盤の処理前に、臍帯をクランプする。

【0052】

臍帯血の回収には通常の方法を用いてよい。典型的には、針またはカニューレを使用し、重力を利用して、胎盤から臍帯血を排出(例えば、瀉血)する(特許文献4;特許文献3;特許文献5;特許文献6)。針またはカニューレは通常、臍帯静脈中に配置し、胎盤を穏やかにマッサージして胎盤からの臍帯血の排出を促す。

10

【0053】

好ましい実施形態では、インフォームドコンセントにより患者から胎盤を回収し、また、妊娠前、妊娠中および妊娠後の患者の完全な医療履歴を取得して、それを胎盤に取り付けておく。これらの医療記録を用いて、胎盤、または胎盤から採取した幹細胞の後の使用を調整する。例えば、その後、当該乳児、親、同胞またはその他の親類の個人医療に、ヒト胎盤幹細胞を容易に用いることができる。実際、ヒト胎盤幹細胞は臍帯血より万能である。しかし、本発明は、瀉血、灌流および/または培養した胎盤により産生されたヒト胎盤幹細胞を、同じまたは異なる胎盤および臍帯由来の臍帯血に添加することも包含することに留意すべきである。こうして得られた臍帯血は、ヒト幹細胞の濃度/集団が増加するため、例えば、骨髄移植などの移植にさらに有用となる。

20

【0054】

5.1.2. 胎盤の瀉血および残留細胞の除去

本発明は、瀉血した、すなわち、分娩および/または通常の方法で回収した後に残った臍帯血を完全に排出した胎盤から、限定するものではないが、胚様幹細胞などの幹または前駆細胞を回収する方法を提供する。本発明の方法によれば、胎盤は、瀉血すると共に、抗凝固剤(例えば、ヘパリン、ワルファリンナトリウム)を溶解させた水性等張液などの好適な水性灌流液で灌流する。このような灌流用の水性等張液は当業者には公知であり、例えば、0.9N塩化ナトリウム溶液が挙げられる。灌流液は、残留臍帯血の血餅形成を防止するのに十分な濃度で、ヘパリンまたはワルファリンナトリウムのような抗凝固剤を含むのが好ましい。特定の実施形態では、1～100単位のヘパリン濃度を使用し、好ましくは、1ml当たり1～10単位のヘパリン濃度を用いる。一実施形態では、瀉血中、および瀉血直後に、アポトーシス阻害剤、例えば、ラジカルスカベンジャー、特に酸素遊離基スカベンジャーを用いてから、これらの薬剤を胎盤から洗い流す。本発明のこの実施形態によれば、単離された胎盤を低温条件下で保存することにより、アポトーシスを防止または阻害する。

30

【0055】

本発明の方法によれば、胎盤への重力流れを利用して、臍帯動脈および臍帯静脈のいずれか一方または両方に灌流液を通過させることにより、胎盤を瀉血する。胎盤は、臍帯動脈および臍帯静脈が、胎盤の最も高い地点に位置するように位置付ける(例えば、吊り下げる)のが好ましい。好ましい実施形態では、図1に示すように、臍帯動脈および臍帯静脈を同時にピペットに接続するが、その際、このピペットは、可とう性のコネクターを介して灌流液タンクに接続されている。灌流液は、臍帯動脈および静脈を通過し、妊娠中母親の子宮に付着していた胎盤の表面から好適な開口容器内に収集される。また、灌流液は、臍帯開口部から導入し、母親の子宮壁とつながる胎盤の壁にある開口部から流れるか、または浸透するようにしてもよい。

40

【0056】

好ましい実施形態では、灌流中、近位臍帯をクランプし、さらに好ましくは、胎盤への臍帯の挿入部から4～5cm(センチメートル)以内の地点で、近位臍帯をクランプする。

【0057】

一実施形態では、十分な灌流液を用いるが、それは、残留臍帯血をすべて除去し、かつ

50

臍帯血の除去後に胎盤に残っている胎盤細胞（限定するものではないが、胚様幹細胞および前駆細胞など）の収集または回収を達成するのに十分なものである。

【0058】

瀉血工程中、最初に灌流液を胎盤から収集すると、その液体は臍帯血の残留赤血球により着色されている。灌流液は、灌流が進行し、残留臍帯血細胞が胎盤から洗い流されるにつれ、透明になっていく。胎盤を瀉血し、胎盤から胚様細胞の初期集団を回収するには、一般に30~100 ml（ミリリットル）の灌流液で十分であるが、観察された結果に応じて、用いる灌流液を増減してもよい。

【0059】

5.1.3. 胎盤の培養

胎盤の瀉血および十分な時間の灌流後、瀉血および灌流した胎盤の微小循環へ胚様幹細胞が移動しているのが観察されるが、この微小循環において、本発明の方法に従い、好ましくは灌流で収集容器中に洗い流すことにより、上記胚様幹細胞を収集する。単離された胎盤の灌流は、残留臍帯血を除去するのに役立つだけでなく、酸素を含む好適な栄養分を胎盤に供給するにも有用である。この胎盤を培養し、残留臍帯血細胞の除去に用いたものと同様の溶液（好ましくは、抗凝固剤を添加せずに）を用いて、灌流することができる。

【0060】

本発明の特定の実施形態では、排液し瀉血した胎盤を、バイオリアクター、すなわち、細胞の増殖または生物学的物質の生産用のex vivoシステムとして培養する。胎盤バイオリアクター中で増殖する細胞の数または生産される生物学的物質のレベルは、胎盤バイオリアクターに導入する培地もしくは灌流液の一部を定期的または連続的に除去することにより、バランスのとれた連続的な増殖状態に維持され、除去した部分から、増殖した細胞または生産された生物学的物質を回収することができる。同じ速度で、または同じ量の、新鮮な培地または灌流液を導入する。

【0061】

増殖した細胞の数および細胞型は、フローサイトメトリー、セルソーティング、免疫細胞化学（例えば、組織特異的または細胞マーカー特異的抗体で染色）、蛍光活性化セルソーティング（FACS）、磁気活性化セルソーティング（MACS）などの標準的細胞検出技法を用いて、形態および細胞表面マーカーの変化を測定することにより；光学または共焦点顕微鏡検査法を用いて細胞の形態を検査することにより；あるいは、PCRおよび遺伝子発現プロファイリングなど、当業者には公知の技法を用いて遺伝子発現の変化を測定することにより、容易にモニタリングすることができる。

【0062】

一実施形態では、蛍光活性化セルソーティング装置（FACS）を用いて、細胞を選別することができる。蛍光活性化セルソーティング（FACS）は、粒子の蛍光特性に基づいて、細胞などの粒子を分離する公知の方法である（Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151:150-165）。個々の粒子における蛍光分子のレーザー励起により、小さな電気的変化を起こすことによって、混合物から正および負の粒子を電磁分離することができる。一実施形態では、細胞表面マーカー特異的抗体またはリガンドを別々の蛍光ラベルで標識付けする。細胞をセルソーティング装置で処理すると、用いた抗体に結合する能力に基づいて細胞を分類することができる。FACSで選別された粒子を96ウェルまたは384ウェルプレートの個々のウェルに直接配置することにより、分離およびクローニングを促進してもよい。

【0063】

別の実施形態では、磁気ビーズを用いて細胞を分離することができる。細胞は、磁気活性化セルソーティング（MACS）技法、すなわち、磁気ビーズ（直径：0.5~100 μm）と結合する能力に基づいて粒子を分離する方法により、選別することができる。多種の有用な修飾を磁気マイクロスフェアに対して実施することができ、このような修飾として、細胞-固相表面分子またはハプテンを特異的に認識する抗体の共有結合付加がある。次に、磁界を加えることにより、選択したビーズを物理的に操作する。続いて、ビーズを細胞と混合

10

20

30

40

50

し、結合させる。その後、細胞を磁界に通過させ、細胞表面マーカーを有する細胞を分離する。次に、これらの細胞を単離し、別の細胞表面マーカーに対する抗体を結合させた磁気ビーズと再混合してもよい。次に、上記細胞を再度磁界に通し、両方の抗体と結合した細胞を単離する。このような細胞を希釈してクローン分離用のマイクロタイター皿のような個別の皿に配置することができる。

【0064】

好ましい実施形態では、バイオリアクターとして用いようとする胎盤を無菌条件下で瀉血および洗浄し、これによって、付着性の凝固細胞および非付着性の細胞汚染物を除去する。次に、容器またはその他の適当なベッセルにおいて無菌条件下で胎盤を培養した後、抗凝固剤（例えば、ヘパリン、ワルファリンナトリウム、クマリン、ビスヒドロキシクマリン）を含むまたは含まない、および/または抗微生物剤（例えば、 β -メルカプトエタノール（0.1 mM）；ストレプトマイシン（例えば、40~100 μ g/ml）、ペニシリン（例えば、40U/ml）、アンホテリシンB（例えば、0.5 μ g/ml）を含むまたは含まない灌流液（例えば、リン酸緩衝溶液（PBS）のような生理食塩水）で灌流する。

10

【0065】

流出灌流液は、胎盤循環を通じて流れた循環灌流液と、血管の壁から滲出し、これらの壁を通過して、胎盤の周辺組織へと流れる溢出灌流液の両方を含む。流出灌流液を好ましくは滅菌容器中に収集するが、循環および溢出灌流液の両方を収集するのが好ましい。胎盤を維持する条件や灌流液の種類を変えて、流出灌流液の量および組成を調節することができる。

20

【0066】

収集した灌流液から細胞型を単離するには、例えば、限定するものではないが、密度勾配遠心分離、磁気細胞分離、フローサイトメトリー、アフィニティー細胞分離またはディファレンシャル付着技法など、当業者には公知の技法を用いることができる。

【0067】

一実施形態において、胎盤を滅菌浅鉢に載せ、500 mlのリン酸緩衝生理食塩水で洗浄する。その後、洗浄液を廃棄する。次に、臍帯静脈にカニューレ、例えば、TEFLON（登録商標）またはプラスチック製カニューレを挿入するが、このカニューレは無菌チューブのような無菌接続装置に接続されている。無菌接続装置は、図3に示すように、灌流マニホールドに接続する。次に、胎盤を入れた容器を覆い、所望の時間、好ましくは2~24時間、または好ましくは48時間以下の間、室温（20~25 $^{\circ}$ C）で胎盤を維持する。導入する灌流液と、除去または回収する流出灌流液を等量にして、胎盤を連続的に灌流することができる。あるいは、所定量の灌流液、例えば100 mlの灌流液（1,000 u/lヘパリンおよび/またはEDTAおよび/またはCPDA（クレアチンリン酸デキストローズ）を補充した、または補充していない無菌の生理食塩水）で定期的に、例えば2時間または4、8、12および24時間毎に、胎盤を灌流してもよい。定期的灌流の場合には、好ましくは、等量の灌流液を、導入すると同時に胎盤の培養環境から除去することにより、安定した量の灌流液が胎盤を常時浸しているようにする。

30

【0068】

胎盤から、例えば、胎盤の向き合う表面で、漏れ出る流出灌流液を収集および処理することにより、胚様幹細胞、前駆細胞またはその他の目的とする細胞を単離する。

40

【0069】

下記のような各種の培地を、胎盤を培養するための灌流液として用いることができる：ウシ胎仔血清（FBS）、全ヒト血清（WHS）、または胎盤の娩出時に回収したヒト臍帯血清を補充したDMEM、F-12、M199、RPMI、Fisher's、Iscore's、McCoy's、ならびに、それらの組合せ。胎盤から残留臍帯血を瀉血するのに用いるのと同じ灌流液を用いて、抗凝固剤を添加せずに、胎盤を培養してもよい。

【0070】

特定の実施形態では、栄養素、ホルモン、ビタミン、増殖因子、またはそれらの組合せを灌流溶液に導入して胎盤バイオリアクターにおいて増殖させるように、胚様幹細胞を誘

50

導する。血清およびその他の増殖因子を増殖灌流溶液または培地に添加してもよい。増殖因子は通常タンパク質であり、限定するものではないが、サイトカイン、リンホカイン、インターフェロン、コロニー刺激因子(CSF)、ケモカイン、およびインターロイキンなどが挙げられる。用いることができるその他の増殖因子としては、リガンド、幹細胞因子、トロンボポエチン(Tpo)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、白血病阻害因子、塩基性繊維芽細胞増殖因子、胎盤由来の増殖因子、および上皮増殖因子などの組換えヒト造血増殖因子が挙げられる。

【0071】

灌流溶液に導入した増殖因子は、未分化胚様幹細胞、前駆細胞、または分化細胞(例えば、分化した造血細胞)の増殖を刺激することができる。増殖因子は、限定するものではないが、免疫グロブリン、ホルモン、酵素、または前述した増殖因子などの生物学的物質および生物活性分子の生産を刺激することができる。

10

【0072】

本発明の一実施形態では、限定するものではないが、多種の多分化能性および/または全能性胚様幹細胞およびリンパ球を含む内在性細胞(すなわち、胎盤に由来する細胞)を増殖するためのバイオリクターとして胎盤を用いる。バイオリクターとして胎盤を用いるためには、本明細書に開示したように、灌流溶液での灌流により、無菌条件下で、様々な時間にわたって胎盤を培養する。特定の実施形態では、胎盤を少なくとも12、24、36もしくは48時間、または3~5日、6~10日、あるいは1~2週間培養する。好ましい実施形態では、胎盤を48時間培養する。培養胎盤は、定期的に「補給」することにより、消費した培地を取り除き、放出される細胞を脱集団形成させ(depopulate)、そして新鮮な培地を添加する必要がある。培養胎盤は、無菌条件下で保存して汚染の可能性を低下させると共に、この胎盤を断続的かつ定期的加圧下で維持して胎盤の細胞への栄養素の十分な供給を維持する条件を作り出さなければならない。胎盤の灌流および培養は、効率および能力向上のために自動化とコンピューター化の両方が可能であることを認識すべきである。

20

【0073】

別の実施形態では、胚様幹細胞のような内在性増殖細胞をすべて取りだし、外来(すなわち、外因性)細胞を灌流胎盤の環境に導入してそこで増殖させるように、胎盤を処理することができる。本発明は、胎盤バイオリクターにおいて培養することができる非常に多様な幹または前駆細胞を意図しており、このような細胞として、限定するものではないが、胚様幹細胞、間葉幹細胞、ストロマ細胞、内皮細胞、肝細胞、角質細胞、および、限定するものではないが、ニューロン、ミエリン、筋肉、血液、骨髄、皮膚、心臓、結合組織、肺、腎臓、肝臓、および膵臓(例えば、膵島細胞)などの特定の細胞型、組織または器官の幹または前駆細胞が挙げられる。

30

【0074】

間葉幹細胞の供給源として、骨髄、胚卵黄嚢、胎盤、臍帯、胎児および青年皮膚および血液が挙げられる。骨髄細胞は、腸骨稜、大腿骨、脛骨、脊髄、肋骨またはその他の髄腔から取得することができる。

【0075】

組織または器官から、増殖している細胞または急速に分裂している細胞を選択的に破壊、剥離または除去する方法は、当業者には公知であり、例えば、癌または腫瘍の治療方法がある。例えば、電磁放射線、UV、X線、またはγ線を灌流した胎盤に照射することにより、残留する生存可能な内在性細胞をすべて根絶することができる。増殖させようとする外来細胞は、例えば灌流により、照射した胎盤バイオリクターに導入する。

40

【0076】

5.2. 胎盤からの細胞の収集

前述したように、胎盤の瀉血および灌流後、胚様幹細胞は排液された空の微小循環に移動し、この微小循環において、好ましくは収集容器中に流出灌流液を収集することにより、胚様幹細胞を本発明に従い収集する。

50

【0077】

好ましい実施形態では、当業者には公知の技法、例えば、密動勾配遠心分離、磁気細胞分離、フローサイトメトリー、または当分野でよく知られたその他の細胞分離もしくは選別方法を用いて、胎盤で培養した細胞を流出灌流液から単離した後、例えば、図4に示すスキームに従って選別する。

【0078】

特定の実施形態では、胎盤から収集した細胞は、室温で15分間の5,000 xgの遠心分離により、流出灌流液から回収する。この遠心分離によって、汚染残屑および血小板から細胞が分離される。2U/mlヘパリンと2mM EDTA (GibcoBRL, NY) を含有するIMDM無血清培地中に細胞ペレットを再懸濁させる。リンフォプレップ (Lymphoprep) (Nycomed Pharma、オスロ、ノルウェー) を用いて製造業者の推奨する方法に従い、全単核細胞画分を単離した後、この単核細胞画分を再懸濁させた。血球計を用いて細胞をカウントした。生存可能性をトリパンブルー排除により評価した。0.2% EDTA (Sigma、セントルイス、MO) を含む0.05%トリプシン溶液を用いた「ディファレンシャルトリプシン処理」により細胞の単離を達成する。ディファレンシャルトリプシン処理が可能であった理由は、繊維芽細胞様 (fibroblastoid) 細胞がプラスチック表面から約5分以内に脱離するのに対し、他の付着集団は20~30分以上のインキュベーションを必要としたためであった。脱離した繊維芽細胞様細胞はトリプシン処理およびトリプシン中和溶液 (TNS, Bio Whittaker) を用いたトリプシン中和の後で回収した。これらの細胞をH.DMEM中で洗浄し、MSCGM中に再懸濁させた。

10

20

【0079】

別の実施形態では、単離された胎盤を所定時間灌流するが、その間灌流液は収集せず、胎盤を2、4、6、8、10、12、20および24時間または数日間灌流した後で灌流液を回収するようにする。

【0080】

別の実施形態では、胎盤バイオリアクター中で培養した細胞を、胎盤から物理的に切り離すことにより胎盤から単離する。

【0081】

別の実施形態では、胎盤の組織またはその一部を解離させ、そして、密度勾配遠心分離、磁気細胞分離、フローサイトメトリーなどの公知の細胞分離または選別方法によって培養細胞を回収することにより、胎盤バイオリアクター中で培養した細胞を胎盤から単離する。

30

【0082】

好ましい実施形態では、回収される有核細胞の数が100個/mlより少なくなるまで、胎盤の灌流および流出灌流液の収集を、胎盤の培養中1回または2回繰り返す。灌流液をプールし、遠心分離に付すことにより血小板、残屑および脱核細胞膜を除去する。次に、フィコール-ハイパック (Ficoll-Hypaque) 密度勾配遠心分離により有核細胞を分離し、洗浄後、H.DMEM中に再懸濁させる。付着細胞を分離する場合は、 $5 \sim 10 \times 10^6$ 個の細胞のアリコート数を数本のT-75フラスコの各々に導入し、Bio Whittakerから取得した市販の間葉幹細胞増殖培地 (MSCGM) で培養した後、組織培養インキュベーター (37 °C、5%CO₂) 中に導入する。10~15日後、PBSで洗浄して非付着細胞をフラスコから除去する。次に、PBSに代えてMSCGMを用いる。好ましくは、各種の付着細胞型の存在について、特に、繊維芽細胞様細胞の確認およびクラスター増殖について、フラスコを毎日検査する。

40

【0083】

他の実施形態では、胎盤から収集した細胞は、後日使用するために低温保存する。幹細胞のような細胞の低温保存方法は当業者には公知であり、例えば、Boyseら (特許文献4) またはHuら (特許文献2) の方法を用いた低温保存がある。

【0084】

5.3. 胎盤から取得した、または胎盤で培養した細胞集団

本発明の方法に従って取得された胚様幹細胞には、多分化能性細胞、すなわち、完全な

50

分化能を有し、自己複製能があり、かつ組織内で休眠または静止状態のままにいられる細胞が含まれる。胎盤から取得できる幹細胞には、胚様幹細胞、多能性細胞、前駆細胞、および繊維芽細胞様細胞が含まれる。

【0085】

胎盤から最初に収集した血液は、臍帯血と呼ばれ、これは、主に、CD34+およびCD38+造血前駆細胞を含む。分娩後最初の24時間以内の灌流で、高濃度のCD34-およびCD38+造血前駆細胞と一緒に、高濃度のCD34+およびCD38-造血前駆細胞を胎盤から単離することができる。約24時間の灌流後、前記の細胞と一緒に、高濃度のCD34-およびCD38-細胞を胎盤から単離することができる。本発明の単離および灌流した胎盤は、CD34+およびCD38-幹細胞ならびにCD34-およびCD38+幹細胞について富化された幹細胞の供給源を大量に提供する。24時間以上灌流した単離胎盤は、CD34-およびCD38-幹細胞について付加された幹細胞の供給源を大量に提供する。

10

【0086】

好ましい実施形態では、本発明の方法により取得される胚様幹細胞は、生存可能で、静止した、多分化能性幹細胞であり、これらの細胞は、満期ヒト胎盤内に存在し、良好な出産および胎盤娩出後に回収することができ、結果的に、10億個もの有核細胞の回収が可能になり、5千万～1億個の多能性および多分化能性幹細胞が得られる。

【0087】

胎盤により提供されるヒト胎盤幹細胞は、驚くことに胚様細胞であり、例えば、これらの細胞に次の細胞表面マーカーの存在が確認されている：SSEA3-、SSEA4-、OCT-4+およびABC-p+。本発明の胚様幹細胞は、OCT-4+およびABC-p+細胞表面マーカーの存在により特性決定するのが好ましい。従って、本発明は、胚供給源から単離もしくは取得されたものではないが、次のマーカー：SSEA3-、SSEA4-、OCT-4+およびABC-p+によって同定可能な幹細胞を包含する。一実施形態では、ヒト胎盤幹細胞は、MHCクラス2抗原を発現しない。

20

【0088】

胎盤から単離された幹細胞は均一で無菌である。さらに、幹細胞はヒトへの投与に適した形態で容易に得られ、すなわち、医薬級のものである。

【0089】

本発明の方法により得られる好ましい胚様幹細胞は、OCT-4+およびABC-p+の細胞表面マーカーの存在によって同定することができる。さらに、本発明は、次のマーカーを有する胚性幹細胞も包含する：CD10+、CD38-、CD29+、CD34-、CD44+、CD45-、CD54+、CD90+、SH2+、SH3+、SH4+、SSEA3-、SSEA4-、OCT-4+およびABC-p+。このような細胞表面マーカーは、当業者には公知の方法、例えば、フローサイトメトリーに続いて、洗浄し、抗細胞表面マーカー抗体で染色することによってルーチンに調べられる。例えば、CD34-またはCD38-の存在を調べるためには、細胞をPBS中で洗浄した後、抗CD34-フィコエリトリンおよび抗CD38-フルオレセインイソチオシアネート (Becton Dickinson、Mountain View, CA) で二重染色する。

30

【0090】

別の実施形態では、胎盤バイオリクターで培養した細胞を、コロニー形成単位アッセイにより同定および特性決定する。このアッセイは、当分野で一般に知られており、Mesen Cult (商標) 培地 (stem cell Technologies, Inc. バンクーバー、ブリティッシュコロンビア) などがある。

40

【0091】

本発明の方法により得られる胚様幹細胞は、脂質生成、軟骨生成、骨形成、造血、筋発生、血管形成、神経発生、および肝発生などの特定の細胞系譜に沿って分化するように誘導することができる。特定の実施形態では、移植やex vivo治療プロトコルで使用できるように分化させるべく、本発明の方法に従って得られた胚様幹細胞を誘導する。特定の実施形態では、特定の細胞型に分化させた後、遺伝子工学的に操作して治療用の遺伝子産物を提供するように、本発明の方法で得られた胚様幹細胞を誘導する。特定の実施形態では、本発明の方法により得られた胚様幹細胞を、それを分化させる化合物と一緒にin vitro

50

でインキュベートした後、分化した細胞を被験者に直接移植する。従って、本発明は、標準的培地を用いて、ヒト胎盤幹細胞を分化させる方法を包含する。さらに、本発明は、造血細胞、ニューロン細胞、繊維芽細胞、ストランド細胞(strand cell)、間葉細胞および肝細胞も包含する。

【0092】

胎盤からの収集後、胚様幹細胞は、その連続した長期培養物を得ることを目的として、胚様幹細胞と同じ胎盤由来の、または別のヒトもしくは非ヒト供給源由来の支持細胞（照射した繊維芽細胞など）上で、あるいは、このような支持細胞の培養物から取得した馴らし培地中で、培養することにより、当業者には公知の方法を用いてさらに培養してもよい。胚様幹細胞はまた、胎盤バイオリクターからの収集前に胎盤内で、あるいは、胎盤からの回収後に *in vitro* で増やしてもよい。特定の実施形態では、増やそうとする胚様幹細胞を、細胞分化を抑制する薬剤に暴露するか、またはその存在下で培養する。このような薬剤は当業者には公知であり、限定するものではないが、ヒトDelta-1やヒトSerrate-1ポリペプチド（2002年1月8日発行の「分化抑制ポリペプチド」と題する、Sakanoらの米国特許第6,337,387号を参照）、白血病阻害因子（LIF）および幹細胞因子が挙げられる。細胞集団の拡張方法も当業者には公知である（例えば、特許文献8；特許文献9を参照）。

10

【0093】

胚様幹細胞は、当業者には公知の標準的技法を用いて、生存可能性、増殖能力、および寿命について評価することができ、このような方法として、例えば、トリバンブルー排除アッセイ、フルオレセインジアセテート取込みアッセイ、ヨウ化プロビジウム取込みアッセイ（生存可能性を評価する）；およびチミジン取込みアッセイ、MTT細胞増殖アッセイ（増殖を評価する）が挙げられる。寿命は、増量した培養物における集団倍加の最大数を決定するなど、当業者には公知の方法により調べることができる。

20

【0094】

特定の実施形態では、瀉血、灌流および/または培養した胎盤において培養した幹細胞または前駆細胞の分化をモジュレートするにあたり、1回または複数回の投与で、胎盤から収集された細胞の分化を阻害し、モジュレートし、かつ/または調節するのに十分な効果を及ぼすのに有効な用量を含む薬剤または医薬組成物を用いる。

【0095】

幹または前駆細胞の分化を誘導することができる薬剤は当業者には公知であり、限定するものではないが、下記のもの挙げられる： Ca^{2+} 、EGF、aFGF、bFGF、PDGF、角質細胞増殖因子（KGF）、TGF- β 、サイトカイン（例えば、IL-1 α 、IL-1 β 、IFN- γ 、TFN）、レチノイン酸、トランスフェリン、ホルモン（例えば、アンドロゲン、エストロゲン、インスリン、プロラクチン、トリヨードチロニン、ヒドロコルチゾン、デキサメタゾン）、酪酸ナトリウム、TPA、DMSO、NMF、DMF、マトリックス要素（例えば、コラーゲン、ラミニン、硫酸ヘパラン、マトリゲル（Matrigel）（商標））またはそれらの組合せ。

30

【0096】

細胞の分化を抑制する薬剤も当業者には公知であり、限定するものではないが、下記のもの挙げられる：ヒトDelta-1およびヒトSerrate-1ポリペプチド（2002年1月8日発行の「分化抑制ポリペプチド」と題する、Sakanoらの米国特許第6,337,387号を参照）、白血病阻害因子（LIF）および幹細胞因子。

40

【0097】

分化をモジュレートするのに用いられる薬剤を胎盤バイオリクターに導入することにより、胎盤において培養する細胞の分化を誘導することができる。あるいは、この薬剤を用いて、胎盤から細胞を収集または除去した後、*in vitro*での分化をモジュレートすることも可能である。

【0098】

幹細胞が特定の細胞型に分化したことを調べるには、当業者には公知の方法、例えばフローサイトメトリーまたは免疫細胞化学（例えば、組織特異的または細胞マーカー特異的抗体で細胞を染色する）などの技法を用いて形態および細胞表面マーカーの変化を測定す

50

るか、光学または共焦点顕微鏡検査法を用いて細胞の形態を調べるか、あるいは、PCRおよび遺伝子発現プロファイリングなどの公知の技法を用いて遺伝子発現の変化を測定する。

【0099】

別の実施形態では、胎盤で培養した細胞を刺激して、免疫グロブリン、ホルモン、酵素のような生物活性分子を産生させる。

【0100】

別の実施形態では、例えば、エリトロポエチン、サイトカイン、リンホカイン、インターフェロン、コロニー刺激因子(CSF)、ケモカイン、インターロイキン；リガンド、幹細胞因子、トロンボポエチン(Tpo)、インターロイキン、および顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)またはその他の増殖因子などの組換えヒト造血増殖因子の投与により、胎盤で培養した細胞を刺激して増殖させる。

10

【0101】

別の実施形態では、胎盤からの収集の前または後のいずれかに、例えば、アデノウイルスまたはレトロウイルスベクターのようなウイルスベクターを用いて、あるいは、リボソームまたは化学物質が媒介するDNAの取込みなどの機械的手段により、胎盤で培養した細胞を遺伝子工学的に操作する。

【0102】

当業者には公知の方法、例えば、トランスフェクション、形質転換、形質導入、エレクトロポレーション、感染、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈降、リボソーム、LPOFECTIN(商標)、リソソーム融合、合成カチオン脂質、遺伝子銃またはDNAベクター運搬体を用いて、目的とする細胞にトランスジーンを含むベクターを導入し、それにより、このトランスジーンを娘細胞(例えば、胚様幹細胞の分裂により産生される娘胚様幹細胞または前駆細胞)に伝達することができる。哺乳動物細胞の形質転換またはトランスフェクションの各種技法については、Keownら、1990, *Methods Enzymol.* 185: 527-37; Sambrookら、2001, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.を参照されたい。

20

【0103】

好ましくは、細胞の核膜または他の存在する細胞または遺伝構造を損傷するものでない限り、どのような技法によりトランスジーンを導入してもよい。特定の実施形態では、マイクロインジェクションにより核の遺伝物質にトランスジーンを導入する。細胞および細胞構造体のマイクロインジェクションは当分野では一般に知られており、実施されている。

30

【0104】

培養した哺乳動物細胞(例えば、胎盤での細胞培養物)の安定したトランスフェクションの場合、小割合の細胞しか外来DNAをそれらのゲノムに組み込むことができない。組み込みの効率は、使用したベクターおよびトランスフェクション技法に左右される。組み込みを同定および選択するためには、一般に、選択マーカー(例えば、抗生物質に対する耐性)をコードする遺伝子を目的の遺伝子配列と一緒に、宿主である胚様幹細胞に導入する。好ましい選択マーカーとして、G418、ヒグロマイシンおよびメトトレキサートのような薬物に耐性を賦与するものが挙げられる。導入された核酸で安定にトランスフェクションされた細胞は、薬物選択により同定することができる(例えば、選択可能なマーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生存するのに対し、他の細胞は死滅する)。このような方法は、被験者もしくは患者に組換え細胞を導入または移植する前に、哺乳動物細胞(例えば、胚様幹細胞)に相同的組換えを実施する方法において、特に有用である。

40

【0105】

多数の選択系を用いて、形質転換された宿主胚様細胞を選択することができる。特に、ベクターは、検出可能または選択可能なマーカーを含んでいてよい。他の選択方法として、限定するものではないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wiglerら、1977, *Cell* 11:223)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybals

50

kaおよびSzybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowyら、1980, Cell 22: 817) 遺伝子などの別のマーカーの選択が挙げられ、これらはそれぞれtk-、hgprt-またはaprt-細胞で用いることができる。また、代謝拮抗物質耐性を下記の遺伝子の選択基準として用いることができる: メトトレキセートに耐性を賦与するdhfr(Wiglerら、1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567; O'Hareら、1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); ミコフェノール酸に耐性を賦与するgpt(MulliganおよびBerg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); アミノグリコシドG-418に耐性を賦与するneo(Colberre-Garapinら、1981, J. Mol. Biol. 150: 1); およびヒグロマイシンに耐性を賦与するhygro(Santerreら、1984, Gene 30: 147)。

10

【0106】

好ましくは、ランダム組込みにより、トランスジーンを目的細胞のゲノムに組み込む。別の実施形態では、トランスジーンは、方向づけられた方法、例えば、定方向相同的組換え(すなわち、目的細胞のゲノムにおける目的遺伝子の「ノックイン」または「ノックアウト」)(Chappel、米国特許第5,272,071号; および1991年5月16日公開のPCT公開番号WO 91/06667; 1995年11月7日発行のCapecchiらの米国特許第5,464,764号; 1997年5月6日発行のCapecchiらの米国特許第5,627,059号; 1996年1月30日発行のCapecchiらの米国特許第5,487,992号)により組み込むことができる。

【0107】

相同的組換えにより標的遺伝子改変を含む細胞を作製する方法は当業者には公知である。このような構築物は、所望の遺伝的改変を有する目的遺伝子の一部を少なくとも含み、また、標的遺伝子座と相同性の領域(すなわち、宿主のゲノムにおける標的遺伝子の内在性コピー)を含む。相同的組換えに用いられるものとは対照的に、ランダム組込み用のDNA構築物は、組換えを媒介するのに、相同性の領域を含んでいなくてもよい。マーカーをターゲティング構築物またはランダム構築物に含有させることにより、トランスジーンの挿入について正および負の選択を実施することができる。

20

【0108】

相同的組換え細胞、例えば、胎盤で培養した相同的組換え胚様幹細胞、内在性胎盤細胞または外因性細胞を作製するためには、相同的組換えベクター(目的の遺伝子が、その5'および3'末端で、標的細胞のゲノムに内在する遺伝子配列により挟まれている)を作製し、これによって、ベクターが担持する目的遺伝子と、標的細胞のゲノム中の内在性遺伝子との間で、相同的組換えが起こるようにする。付加的なフランキンク核酸配列は、標的細胞のゲノム中の内在性遺伝子との相同的組換えを良好に達成するのに十分な長さのものである。典型的には、数キロベースのフランキンクDNA(5'および3'末端の両方で)をベクターに含有させる。相同的組換えベクターおよび組換え幹細胞から相同的組換え動物を作製する方法は、当業者には公知である(例えば、ThomasおよびCapecchi、1987, Cell 51: 503; Bradley, 1991, Curr. Opin. Bio/Technol. 2: 823-29; およびPCT公開番号WO 90/11354、WO 91/01140およびWO 93/04169を参照)。

30

【0109】

一実施形態では、本発明の方法に従って胎盤において培養した外因性細胞のゲノムは、相同的組換えまたはランダム組込みによる遺伝子ターゲティングの標的となる。

40

【0110】

特定の実施形態では、Bonadioらの方法(1999年8月24日発行の「骨細胞への多重遺伝子導入のための方法および組成物」と題する米国特許第5,942,496号; 1995年8月24日公開の「骨細胞を刺激する方法および組成物」と題するPCT WO95/22611)を用いて、胎盤で培養した幹細胞、前駆細胞または外因性細胞、例えば、骨前駆細胞などの目的細胞に核酸を導入する。

【0111】

5.4. 培養した胎盤のバイオリアクターとしての使用

瀉血および/または培養した胎盤細胞を細胞、組織および器官の培養用バイオリアクタ

50

ーとして用いることができる。胎盤中胚葉は、器官発生および組織新生に必要な、小分子および増殖因子、リポ多糖類、および細胞外マトリックスタンパク質を豊富に含む理想的なストロマ環境を提供する。

【0112】

一実施形態では、本発明は、単離された灌流済胎盤を外因性細胞の増殖用のバイオリアクターとして用いる方法を提供する。この実施形態によれば、本発明は、胎盤に由来しない細胞を含む単離された胎盤に関し、ここでは、上記細胞を胎盤に植付けることで胎盤を刺激して胚様幹細胞を産生させるか、あるいは、植付けた細胞がサイトカインや増殖因子のようなシグナルを発生し、これらが胎盤を刺激して幹細胞を産生させる。胎盤には、胎盤と係りのある乳児の親、同胞またはその他の血縁者から取得した、胎盤由来ではない細胞を移植してもよい。別の実施形態では、単離した胎盤には、上記乳児ではなく、しかも乳児とは関係のない個体から取得した、胎盤由来ではない細胞を移植してもよい。同様に、胎盤において増殖および培養した細胞、組織、類臓器および器官を、胎盤と関係する乳児、該乳児の親、同胞またはその他の血縁者、乳児とは関係のない個体に移植することができる。

10

【0113】

本発明の一実施形態では、胎盤に、特定の細胞型を集団形成させてから、該胎盤を細胞、組織または器官のex vivo培養用バイオリアクターとして用いることができる。このような細胞、組織または器官培養物を採取し、移植やex vivo治療プロトコルに用いることもできる。この実施形態では、内在性細胞をすべて除去し、外来（すなわち、外因性）細胞を灌流済胎盤の環境に導入し、そこで増殖させるように胎盤を処理する。内在性細胞の除去方法は当業者には公知である。例えば、灌流済胎盤に、電磁放射線、UV、X線、または放射線を照射することにより、残留する生存可能な内在性細胞をすべて根絶する。一実施形態では、放射線（例えば、500~1,500 CG）への致死下暴露を用いて、胎盤は保存しながら不要な細胞を根絶することができる。致死対非致死電離放射線に関する国際については（米国国防総省による第5章「電離放射線の生物物理学および生物学的作用」を参照）。次に、例えば、血管灌流または直接実質内注入により、照射済胎盤バイオリアクターで増殖しようとする目的の外来細胞を導入する。

20

【0114】

別の実施形態では、バイオリアクターを用いて、新規のキメラ細胞、組織または器官を産生させ、増殖させる。このようなキメラは、バイオリアクターにおいて、出発材料として、胎盤細胞と1以上の別の細胞型を用いて作製することができる。様々な細胞型同士の相互作用、すなわち「クロストーク（cross-talk）」により、出発細胞型のいずれとも異なる発現パターンが誘導される。一実施形態においては、例えば、同じ患者由来の別の細胞型と一緒に、バイオリアクターで患者の自己胎盤細胞を増殖させることにより、自己キメラを作製する。別の実施形態では、例えば、異種胎盤細胞を有するバイオリアクターに、患者の細胞、すなわち血液細胞を添加することにより、異種キメラを作製する。さらに別の実施形態では、胎盤細胞は患者由来のものであるが、第2細胞型は別の患者に由来する。次に、出発細胞のいずれとも異なる表現型および/または遺伝的特徴を有するキメラ細胞を回収する。特定の実施形態では、異種細胞が同じハプロタイプのもので、得られたキメラ細胞を患者に戻す。

30

40

【0115】

他の実施形態では、天然または合成起原のいずれでも、特定の細胞型の増殖を高めるために、あるいは、細胞型特異的産物を生産するために、バイオリアクターを用いる。例えば、一実施形態では、胎盤バイオリアクターを用いて、膵島細胞を刺激してインスリンを産生させる。バイオリアクターは、特に、治療用動物タンパク質の生産に有利であり、その治療効果は適正な翻訳後修飾に依存しうる。従って、バイオリアクターは、治療用タンパク質、増殖因子、サイトカイン、および他の天然または組換え治療分子（例えば、限定するものではないが、エリトロポエチン、インターロイキン、およびインターフェロン）の生産に有用である。

50

【0116】

別の実施形態では、バイオリアクターを用いて遺伝子操作した細胞を増殖させることにより、治療用遺伝子産物を提供したり、このバイオリアクターを組換え産物の大規模生産に用いたりすることができる。一実施形態では、例えば、上記バイオリアクターを用いて抗体生産を高める。胎盤にハイブリドーマなどの抗体産生細胞の集団を形成させると、これらは、特定の抗原に対する抗体の均一集団である特定のモノクローナル抗体を産生する。ハイブリドーマは、次に挙げるどのような方法で取得してもよい：限定するものではないが、KohlerおよびMilsteinのハイブリドーマ技法（1975, Nature 256, 495-497；および米国特許第4,376,110号）、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法（Kosborら、1983, Immunology Today 4, 72；Coleら、1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2026-2030）、およびEBV-ハイブリドーマ技法（Coleら、1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96）。mAb産生ハイブリドーマをバイオリアクターで培養し、高力価のmAbを産生させることができる。

10

【0117】

あるいは、抗原が未知の場合には、バイオリアクターを用いて特定の細胞型に特異的な抗体を生産し、次に、これを用いて未知の抗原を同定することができる。例えば、癌患者由来の全血液サンプルを培養し、これらの細胞をバイオリアクターにおいて増殖させた後、患者の腫瘍細胞に対して特異的に反応する抗体をスクリーニングする。

【0118】

別の実施形態では、バイオリアクターを用いて培養下でウイルスを生産した後、培養下で抗ウイルス薬をスクリーニングする。この方法は、細胞培養条件下では増殖が困難な、パルボウイルスやヒト免疫不全ウイルスなどのウイルスに特に有用である。

20

【0119】

上記バイオリアクターはまた、特定の細胞型の活性（例えば、目的とする遺伝子産物の活性もしくは発現、またはシグナル伝達経路の活性化）をモジュレートする治療用分子のスクリーニングのための支持体として用いることもできる。この実施形態では、目的とする細胞型をバイオリアクターにおいて培養および増殖させる。この細胞は天然に存在する細胞でも、組換え遺伝子産物を発現するように操作された細胞でもよい。次に、バイオリアクターを候補治療分子（例えば、小分子、非ペプチド、抗体など）またはこのような候補治療分子のライブラリーと接触させる。その後、候補治療分子の存在または非存在下で所望の活性の変化について上記細胞を分析する。例えば、このような所望の活性は、増殖速度の増加または低下、遺伝子発現の変化、あるいは、候補治療分子の結合または取込みの変化でありうる。

30

【0120】

数種の方法が、試験薬剤のスクリーニングに特に好都合および/または有用であると考えられる。これらの方法として、限定するものではないが、化合物の結合を測定する方法、抗体またはリガンドと相互作用する細胞の能力の変化を測定する方法、ならびに、目的の制御領域の制御下におかれた「リポーター」タンパク質（すなわち、酵素またはその他の検出可能なもしくは選択可能なタンパク質）の活性または発現を測定する方法が挙げられる。従って、好ましい実施形態では、天然および/または合成化合物（例えば、小分子またはペプチドのライブラリー）を治療活性についてスクリーニングすることができる。スクリーニングアッセイを用いて、細胞型特異的活性をモジュレートするペプチドおよび有機非タンパク質分子などの化合物および組成物を同定することができる。組換え、合成、または外因性の化合物が結合能を有していれば、医薬の候補となりうる。あるいはまた、上記タンパク質および化合物は、同定された遺伝子およびタンパク質とin vivoで相互作用する内在性の細胞成分を含む。このような内在性成分は、医薬および治療的介入の新しい標的を提供する可能性がある。

40

【0121】

本発明の別の実施形態では、胎盤を内在性細胞（すなわち、胎盤に由来する細胞）の増殖用のバイオリアクターとして用いる。このような内在性細胞として、限定するものでは

50

ないが、多種の多分化能性および/または全能性胚様幹細胞およびリンパ球が挙げられる。一実施形態では、胎盤を前記の灌流液で様々な時間にわたりインキュベートする。このような胎盤由来の内在性細胞を形質転換することにより、目的とする遺伝子を組換えにより発現させたり、突然変異を発現させたりすることができ、かつ/または、「ノックアウト」技法を用いて遺伝子座を欠失するように操作することも可能である。例えば、標的相同的組換えを用いて、標的遺伝子またはそのプロモーターを不活性化または「ノックアウト」することにより、内在性標的遺伝子を欠失させることができる（例えば、Smithiesら、1985, Nature 317, 230-234; Thomas & Capecchi, 1987, Cell 51, 503-512; Thompsonら、1989, Cell 5, 313-321; これらはそれぞれ、その全文を参考として本明細書に組み入れる）。例えば、内在性標的遺伝子に相同的なDNA（標的遺伝子のコード領域または調節領域のいずれか）により挟まれた突然変異型の非機能性標的遺伝子（または完全に無関係のDNA配列）を、選択マーカーおよび/または負の選択マーカーの存在下または非存在下で用いて、標的遺伝子を *in vivo* で発現する細胞をトランスフェクションすることができる。標的化した相同的組換えによるDNA構築物の挿入によって、標的遺伝子の不活性化が起こる。このような手法を用いて細胞、組織および/または器官において目的の遺伝子発現を除去、置換または改変することができる。この手法を用いて細胞、組織、または器官の表現型を改変し、これをヒト被験者に導入することも可能である。

10

20

30

40

50

【0122】

別の実施形態では、胎盤細胞を、*ex vivo* または *in vivo* のいずれかで、特定の細胞型に分化するように誘導することができる。例えば、多分化能性胚様幹細胞を損傷器官に注入し、*in vivo* での器官新生および傷害の修復を達成することができる。このような傷害は下記を含む状態および障害によるものが考えられる：限定するものではないが、心筋梗塞、発作障害、多発性硬化症、卒中、低血圧、心停止、虚血症、炎症、加齢による認識機能の低下、放射線による損傷、脳性麻痺、神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、リー病、AIDS痴呆、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症、虚血性腎疾患、脳または脊髄外傷、心肺バイパス、緑内障、網膜虚血、または網膜外傷。

【0123】

特定の実施形態では、胎盤から単離した胚様幹細胞を自己または異種の酵素置換治療において用いて、下記を含む疾患または状態を治療することができる：限定するものではないが、リソソーム蓄積症、例えばテイ-サックス、ニーマン-ピック、ファブリー、ゴーシェ、ハンター、およびフルラー症候群など、ならびに、その他のガングリオシドーシス、ムコ多糖症、および糖原病。

【0124】

他の実施形態では、細胞を遺伝子治療における自己または異種トランスジーン担体として用いることにより、先天性代謝異常、副腎脳白質ジストロフィー、嚢胞性繊維症、糖原貯蔵症、甲状腺低下、鎌状赤血球貧血、ペアソン症候群、ポーンブ病、フェニルケトン尿症（PKU）、ポルフィリン症、カエデシロップ尿病、ホモシスチン尿症、ムコ多糖症、慢性肉芽腫性疾患、チロシン血症およびテイ-サックス病を改善したり、あるいは、癌、腫瘍またはその他の病状を治療したりすることができる。

【0125】

他の実施形態では、下記を含む自己もしくは異種の組織再生/置換療法またはプロトコルに用いることができる：限定するものではないが、角膜上皮欠損の治療、軟骨修復、顔の皮膚擦傷法、粘膜、鼓膜、腸内層、神経構造（例えば、網膜、基部膜における聴覚ニューロン、嗅覚上皮における嗅覚ニューロン）、皮膚の火傷および創傷修復、あるいは、その他の損傷または罹患した器官もしくは組織の再構成。

【0126】

本発明の方法を用いて得られた多数の胚様幹細胞および/または前駆細胞は、特定の実施形態において、多量の骨髄提供の必要性を減らすことができる。骨髄移植のためには、患者の体重1キログラム当たり $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ 個の骨髄単核細胞を注入しなければならない（すなわち、70kgのドナーであれば約70 mlの骨髄）。70 mlを得るためには集中的な

骨髄提供を必要とし、提供過程で相当量の血液が喪失する。特定の実施形態では、少量の骨髄提供（例えば、7～10 ml）からの細胞を胎盤バイオリアクターにおいて増殖させてから受容者に注入する。

【0127】

さらには、少数の幹細胞および前駆細胞は通常、血流中を循環している。別の実施形態では、このような外因性幹細胞または外因性前駆細胞をフェレーシスにより収集する。フェレーシスは血液を採取し、1以上の成分を選択的に除去し、残りの血液をドナーに再注入する方法である。フェレーシスにより回収した外因性細胞は、胎盤バイオリアクターにおける増殖で増やすことができるため骨髄提供の必要性が完全になくなる。

【0128】

別の実施形態では、胎盤バイオリアクターにおける外因性細胞の増殖を、化学療法に加えての補足的治療として用いる。癌細胞をターゲティングし、破壊するのに用いられるほとんどの化学療法薬は、増殖している全ての細胞（すなわち、細胞分裂を経ている細胞）を死滅させることで作用する。骨髄は、身体において最も活発に増殖する組織の1つであるため、造血幹細胞は化学療法薬により損傷を受けたり、破壊されたりすることが多く、その結果、血液細胞生産が低下または停止してしまう。化学療法を所定の期間で中止して、患者の造血系が血液細胞供給を補充してから、再開しなければならない。以前には静止状態の幹細胞が増殖し、白血球数を許容可能なレベルまで増加させ、化学療法を再開できるまでには、1ヶ月以上を要すると考えられる（再開しても、骨髄幹細胞は再び破壊される）。

【0129】

化学療法による治療を停止している間に血液細胞は再生するが、その間にも癌は成長・増殖し、恐らく自然選択により、化学療法薬に対する耐性が強くなる。従って、化学療法による治療期間を長くすると同時に、治療停止期間を短くするほど、癌をうまく死滅させる勝算が高くなる。化学療法による治療の停止期間を短くするために、本発明の方法に従い収集した胚様幹細胞または前駆細胞を患者に導入することができる。このような治療によって、患者が低い血液細胞数を呈示する時間が短くなり、従って、化学療法による治療をこれまでより早く再開することができる。

【0130】

本発明の方法に従い胎盤から取得した胚様幹細胞、前駆細胞、外来細胞、または遺伝子操作細胞は、*in vivo*で組織または器官の製造に用いることができる。本発明の方法は、胎盤から取得した細胞（例えば、胚様幹細胞、前駆細胞、外来の幹または前駆細胞）を用いてマトリックスに接種し、適切な条件下で培養することにより、細胞を分化させ、マトリックスに集団形成させることを包含する。本発明の方法により得られる組織および器官は、研究や治療目的など、多様な用途に用いることができる。

【0131】

5.5. 胚様幹細胞の使用

本発明の胚様幹細胞は、非常に多様な治療プロトコルに用いることができ、これらのプロトコルでは、幹細胞または前駆細胞集団のような所望の細胞集団の植付け（*engraftment*）、移植もしくは注入により、身体の組織または器官が増大、修復または置換される。本発明の胚様幹細胞を用いて、既存の組織を置換または増大したり、新しいまたは改変した組織を導入したり、あるいは、生物学的組織または構造と一緒に結合したりすることができる。また、本発明の胚様幹細胞は、一般に胚性幹細胞を用いる治療プロトコルにおいて、胚性幹細胞の代わりに用いることができる。

【0132】

本発明の好ましい実施形態では、胎盤からの胚様幹細胞およびその他の幹細胞を自己および同種異系（一致したおよび一致しないHLA型造血移植片を含む）として用いることができる。同種異系造血移植片として胚様幹細胞を使用する際には、1998年9月1日発行の米国特許第5,800,539号；および1998年9月15日発行の米国特許第5,806,529号（両者とも、参考として本明細書に組み入れる）に記載されているような、ドナー細胞の免疫拒絶を抑

10

20

30

40

50

制するために宿主を処置しなければならないことがある。

【0133】

例えば、本発明の胚様幹細胞を治療移植プロトコルで用いて、例えば、肝臓、膵臓、腎臓、肺、神経系、筋肉系、骨、骨髄、胸腺、脾臓、粘液様組織、性腺、または毛髪の幹細胞もしくは前駆細胞を増大または置換することができる。

【0134】

胚様幹細胞は、特定クラスの前駆細胞（例えば、軟骨細胞、肝細胞、造血細胞、膵臓実質細胞、神経芽細胞、筋肉前駆細胞など）に代わり、前駆細胞が一般に用いられる治療または研究プロトコルで用いることができる。

【0135】

本発明の胚様幹細胞は、軟骨、腱、または靭帯の増大、修復または置換に用いることができる。例えば、特定の実施形態では、プロテアーゼ（例えば、股関節プロテアーゼ）を、本発明の胚様幹細胞から成長させた置換軟骨組織構築物でコーティングする。別の実施形態では、胚様幹細胞から成長させた軟骨組織で関節（例えば、膝）を再構成する。軟骨組織構築物は、多種の関節の主要な再構築手術に用いることができる（プロトコルについては、例えば、Resnick, D., およびNiwayama, G. 編、1988, Diagnosis of Bone and Joint Disorders, 第2版、W. B. Saunders Co.を参照）。

【0136】

本発明の胚様幹細胞を用いて、疾患による組織および器官の損傷を修復することができる。このような実施形態では、患者に胚様幹細胞を投与することにより、疾患の結果損傷した組織または器官を再生または復元させ、例えば、化学療法または放射線を受けた後の免疫系を増強したり、心筋梗塞後の心臓組織を修復したりすることができる。

【0137】

本発明の胚様幹細胞を用いて、骨髄移植における骨髄細胞を増大または置換することができる。ヒト自己および同種異系骨髄移植は現在、白血病、リンパ腫のような疾患や、その他の生命を脅かす障害の治療法として用いられている。しかし、これらの方法の欠点は、移植に十分な細胞を確保するために、多量のドナー骨髄を採取しなければならないことである。

【0138】

本発明の方法に従って収集した胚様幹細胞は、幹細胞および前駆細胞を提供することができ、これによって、多量の骨髄提供の必要性が減少する。また、本発明の方法によれば、少量の骨髄提供を得てから、胎盤において培養および増殖することにより幹細胞および前駆細胞の数を増加させた後で、受容者に注入または移植する。

【0139】

特定の実施形態では、胎盤から単離した胚様幹細胞は、自己または異種酵素置換療法に用いて、下記を含む特定の疾患または状態を治療することができる：限定するものではないが、リソソーム蓄積症、例えばテイ-サックス、ニーマン-ピック、ファブリー、ゴーシェ、ハンター、およびフルー症候群など、ならびに、その他のガングリオシドーシス、ムコ多糖症、および糖原病。

【0140】

他の実施形態では、細胞を遺伝子治療法で、自己または異種トランスジーン担体として用いることにより、副腎脳白質ジストロフィー、嚢胞性繊維症、糖原貯蔵症、甲状腺低下、鎌状赤血球貧血、ペアソン症候群、ポーンブ病、フェニルケトン尿症（PKU）、およびテイ-サックス病、ポルフィリン症、カエデシロップ尿病、ホモシスチン尿症、ムコ多糖症、慢性肉芽腫性疾患およびチロシン血症などの先天性代謝異常を改善したり、あるいは、癌、腫瘍またはその他の病状を治療したりすることができる。

【0141】

他の実施形態では、下記を含む自己もしくは異種組織再生または置換治療法もしくはプロトコルに用いることができる：限定するものではないが、角膜上皮欠損の治療、軟骨修復、顔の皮膚擦傷法、粘膜、鼓膜、腸内層、神経構造（例えば、網膜、基部膜における聴

10

20

30

40

50

覚ニューロン、嗅覚上皮における嗅覚ニューロン)、皮膚の火傷および創傷修復、頭皮(毛髪)移植、あるいは、その他の損傷または罹患した器官もしくは組織の再構成。

【0142】

本発明の方法を用いて得られた多数の胚様幹細胞および/または前駆細胞は、特定の実施形態において、多量の骨髄提供の必要性を減らすことができる。骨髄移植のためには、患者の体重1キログラム当たり $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ 個の骨髄単核細胞を注入しなければならない(すなわち、70kgのドナーであれば約70 mlの骨髄)。70 mlを得るためには、集中的な提供を必要とし、しかも、提供過程で相当量の血液が失われる。特定の実施形態では、少量の骨髄提供(例えば、7~10 ml)からの細胞を胎盤パイオリクターにおいて増殖した後で、受容者に注入する。

10

【0143】

別の実施形態では、上記胚様幹細胞を、化学療法に加える補足的治療として用いる。癌細胞をターゲティングし、破壊するのに用いられるほとんどの化学療法薬は、すべての増殖中の細胞(すなわち、細胞分裂している細胞)を死滅させることにより作用する。骨髄は身体において最も活発に増殖している組織の1つであるため、造血幹細胞は化学療法薬により損傷を受けたり、破壊されたりすることが多く、その結果、血液細胞生産が減少または停止してしまう。化学療法は、所定期間継続したら停止し、患者の造血系が血液細胞供給を補充してから、再開しなければならない。以前には静止状態であった幹細胞が増殖し、白血球数を許容可能なレベルまで増加させ、化学療法を再開できるまでには、1ヶ月以上を要すると考えられる(再開しても、骨髄幹細胞は再び破壊される)。

20

【0144】

化学療法による治療を停止している間、血液細胞は再生するが、その間にも癌は成長し、恐らく自然選択により、化学療法薬に対する耐性が強くなる。従って、化学療法による治療期間を長くすると同時に、治療を停止する期間を短くするほど、癌を確実に死滅させる勝算が高くなる。化学療法による治療の間隔を短くするために、本発明の方法に従い収集した胚様幹細胞または前駆細胞を患者に導入することができる。このような治療によって、患者が低い血液細胞数を呈示する時間が短くなるため、化学療法治療をこれまでより早く再開することができる。

【0145】

別の実施形態では、ヒト胎盤幹細胞を用いて、慢性肉芽腫性疾患のような遺伝病を治療または予防することができる。

30

【0146】

5.6. 医薬組成物

本発明は、条件付けまたは非条件付けヒト前駆幹細胞の移植前または後に、1回または複数回投与して、胎盤由来のヒト多分化能性および多能性前駆幹細胞が中胚葉および/または造血系列細胞に分化するのを阻害し、モジュレートし、かつ/または調節するのに十分な効果を及ぼす、有効な1回量および/または複数回量を含む医薬組成物を包含する。

【0147】

この実施形態によれば、本発明の胚様幹細胞は注射液として製剤化することができる(例えば、PCT WO96/39101、参考としてその全文を本明細書に組み入れる)。別の実施形態では、本発明の細胞および組織は、米国特許第5,709,854号;第5,516,532号;第5,654,381号(それぞれ、参考としてその全文を本明細書に組み入れる)に記載されているように、重合可能なまたは架橋性のヒドロゲルを用いて、製剤化することができる。

40

【実施例】

【0148】

6. 実施例

6.1. 実施例1: 排液した胎盤の灌流液から回収した細胞型の分析

この実施例では、本発明の方法により培養した胎盤の流出灌流液から回収された細胞型の分析について説明する。

【0149】

50

20 mlのリン酸緩衝溶液 (PBS) を灌流液に添加し、10 ml部分を収集して、3,000 rpm (1分あたりの回転数) で25分間遠心分離した。流出液を4本のチューブに分けて氷浴中に配置した。PBS中の1%ウシ胎仔血清 (FCS) 溶液2.5 mlを添加し、チューブを遠心分離した (140分 × 10 g (重力による加速))。ペレットを5 mlの1%FCS溶液中で再懸濁させた後、2本のチューブを一緒に合わせた。全リンパ球数と全単球数を足し算した和に全細胞懸濁容量を掛けることにより、単核細胞総数を算出した。

【0150】

以下の表に、前述した方法に従って、培養した胎盤の灌流により取得された細胞の型を示す。

【表1】

	WBC 1000/ml	Lym%	MID%	GRA%	合計量	細胞総数
CB (臍帯血)	10.5	43.2	8	48.8	60 ml	6.3 X 10 ⁸
PP (胎盤灌流液、 室温)	12.0	62.9	18.2	18.9	15 ml	1.8 X 10 ⁸
PP ₂ (胎盤灌流液、 37°C)	11.7	56.0	19.2	24.8	30 ml	3.5 X 10 ⁸

PPのサンプルはフィコール (Ficoll) 後のものであった。

【0151】

フィコール後のPPの細胞総数は 5.3×10^8 で、処理前のCBの細胞総数は 6.3×10^8 であった。Lym%はリンパ球の% ; MID%は中央白血球の% ; GRA%は顆粒球の%をそれぞれ示す。

【0152】

6.2. 実施例2 : 胎盤の灌流およびインキュベーションにより取得した細胞の分析

以下の実施例は、本発明の方法に従い、胎盤の灌流およびインキュベーションにより取得された細胞の分析について説明する。

【0153】

6.2.1. 材料および方法

胎盤ドナーは、民間の臍帯血バンクプログラムに登録し、臍帯血の回収後瀉血した胎盤の研究目的での使用を認めるインフォームドコンセントを提供した妊娠中の母親から募った。ドナーデータは内密である。これらのドナーは、低温保存のための臍帯血サンプルの通常処理から得られたデータの使用も認めた。これにより、以下に記載する実験方法を用いて、収集した臍帯血と、回収した流出灌流液の組成を比較することができた。

【0154】

臍帯から臍帯血を瀉血した後、4~24時間以内に胎盤を室温で保存して実験室に移すため、前記の方法に従い、胎盤を室温で滅菌断熱容器に入れ、分娩から4時間以内に実験室に移した。胎盤の検査時に、器官の断片化や臍帯血管の裂傷のような物理的損傷が明らかに認められた場合には、胎盤を廃棄した。胎盤は、滅菌容器に入れて2~20時間室温 (23 ± 2) で維持するか、または冷蔵保存 (4) した。定期的に、25 ± 3 の滅菌食塩水中に胎盤を浸漬して洗浄することにより、肉眼で見える表面の血液や残屑をすべて除去した。

。

10

20

30

40

50

【0155】

臍帯は、胎盤への挿入部から約5cmの地点で切断し、臍帯血管にTEFLON（登録）またはポリプロピレンカテーテルを挿入した。このカテーテルは、胎盤の二方向灌流および流出液の回収を可能にする滅菌液体経路と接続している。前記の方法により、制御された周囲大気条件下で、あらゆる状況の胎盤条件付け、灌流および流出液回収を実施すると同時に、血管内圧力、流量、コアおよび灌流液温度、ならびに、回収された流出液量をリアルタイムでモニタリングすることができた。条件付けプロトコルの範囲を分娩後24時間にわたって評価し、流出液の細胞組成をフローサイトメトリー、光学顕微鏡およびコロニー形成単位アッセイにより分析した。

【0156】

10

6.2.2. 胎盤の条件付け

分娩から12~24時間以内にドナーの胎盤を室温で処理した。処理前に、膜を除去し、母親の部位 (maternal site) を洗い流して残留血液を除いた。臍帯血管に、血液サンプル収集に用いられる20ゲージのバタフライ (Butterfly) 針からなるカテーテルを挿入した。

【0157】

残留する胚様幹細胞の増殖および動員のために生理的に適合しうる環境を模倣および維持する目的で、5~37℃、5%CO₂、pH7.2~7.5に維持するなど、条件を変えながら、ドナー胎盤を維持した。2U/mlヘパリン (Elkins-Sinn, NJ) を含有するIMDM無血清培地 (GibcoBRL, NY) でカニューレをフラッシュ洗浄した。胎盤の灌流は、約150 mlの灌流液を収集するまで、毎分50 mlの流量で継続した。この量の灌流液には「初期画分」と記したラベルを貼った。同じ流量で灌流を継続することにより、約150 mlの第2画分を収集し、これに「後期画分」のラベルを貼った。この手順の実施過程で、胎盤を穏やかにマッサージして灌流工程を促進し、細胞性物質の回収を助けた。動脈カニューレを介した重力ドレナージおよび吸引により、灌流回路から流出液を収集した。

20

【0158】

次に、ヘパリン添加 (2U/ml) ダルベッコ修飾イーグル培地 (H.DMEM) を用いて、15ml/分の流量で10分間胎盤を灌流してから、1時間以内に母親の部位から灌流液を収集し、有核細胞を数えた。回収される有核細胞の数が100個/mlを下回るまで、灌流および収集手順を1または2回繰り返した。灌流液をプールした後、光遠心分離に付すことにより血小板、残屑および脱核細胞膜を除去した。次に、フィコール - ハイバック (Ficoll-Hypaque) 密度勾配遠心分離により有核細胞を単離し、洗浄後H. DMEM中に再懸濁させた。付着細胞を単離するために、5~10 x 10⁶個の細胞のアリコート数を数本のT-75フラスコの各々に配置し、Bio Whittakerから入手した市販の間葉幹細胞増殖培地 (MSCGM) で培養し、組織培養インキュベーター (37℃、5%CO₂) に入れた。10~15日後、非付着細胞をPBSで洗浄して除去し、次にPBSの代わりにMSCGMを用いた。各種の付着細胞型の存在について、特に、繊維芽細胞様 (fibroblastoid) 細胞の確認およびクラスター増殖についてフラスコを毎日検査した。

30

【0159】

6.2.3. 細胞回収および単離

40

室温で5,000 x gの遠心分離を15分実施することにより、灌流液から細胞を回収した。この手順は、混入している残屑および血小板から細胞を分離するのに役立った。細胞ペレットを2U/mlヘパリンおよび2mM EDTA (GibcoBRL, NY) を含有するIMDM無血清培地中で再懸濁させた。リンフォプレップ (Lymphoprep) (Nycomed Pharma、オスロ、ノルウェー) を用いて、製造業者の推奨手順に従い、全単核細胞画分を単離した後、単核細胞画分を再懸濁させた。血球計を用いて細胞を数えた。トリパンブルー排除により生存可能性を評価した。間葉細胞の単離は、0.2%EDTAを含む0.05%トリプシン溶液 (Sigma、セントルイス、MO) を用いた「ディファレンシャルトリプシン処理」により達成された。ディファレンシャルトリプシン処理が可能であった理由は、繊維芽細胞様細胞がプラスチック表面から約5分以内に脱離したのに対して、他の付着集団は20~30分のインキュベーションを必要

50

としたためである。トリプシン処理ならびにトリプシン中和溶液 (TNS, Bio Whittaker) を用いたトリプシン中和後に、脱離した繊維芽細胞様細胞を回収した。細胞をH.DMEM中で洗浄し、MSCGM中に再懸濁させた。

【0160】

Becton-Dickinson FACS Calibur機器を用いてフローサイトメトリーを実施した。骨髄由来のMSC (間葉幹細胞) の既知マーカーに基づいて選択したFITCおよびPE標識モノクローナル抗体 (mAb) は、B.D.およびCaltagラボラトリー (サウスサンフランシスコ、CA) から購入し、SH2、SH3およびSH4抗体を産生するハイブリドーマを取得して、それらの培養上清中のmAbの反応性をFITCまたはPE標識F(ab)'₂ヤギ抗マウス抗体により検出した。市販の誘導および維持培地 (Bio Whittaker) を製造業者の指示に従って用いて、細胞系列分化を実施した。

10

【0161】

6.2.4. 胎盤胚様幹細胞の単離

培養フラスコ中の付着細胞の顕微鏡検査により、形態が異なる細胞型が明らかになった。紡錘型の細胞、大きな核と多数の核周辺小液胞を有する丸い細胞、ならびに、数個の突起 (そのうちの一つを介して星型細胞はフラスコに付着していた) のある星型の細胞がフラスコに付着しているのを観察した。これらの付着細胞のさらなる特性決定は試みなかったが、類似した細胞が骨髄、臍帯および末梢血液の培養物に認められたことから、非幹細胞様であると考えられた。最後にクラスターとして現れた繊維芽細胞様細胞は、MSC (間葉幹細胞) となる候補であり、ディファレンシャルトリプトシン処理により単離し、二次フラスコで継代培養した。トリプトシン処理後に、丸い細胞の位相差顕微鏡検査によって、細胞が高度に顆粒化していることがわかり、これは、研究室で作製したまたはBio Whittakerから購入した骨髄由来のMSCと見分けがつかなかった。継代培養すると、それらの初期相とは対照的に、数時間以内に付着した、胎盤由来の胚様幹細胞は特有の繊維芽細胞様の形状を呈し、基準の骨髄由来MSCと同じ増殖パターンを形成した。継代培養および再補給の間、さらに、緩く結合した単核細胞を洗浄して除去すると、この培養物は均一な状態のままで、繊維芽細胞様細胞以外の混入物が肉眼で一切認められなかった。

20

【0162】

6.2.5. 結果

初期および後期画分から精製された単核細胞上のCD-34、CD-38、ならびに、その他の幹細胞関連表面マーカーの発現をフローサイトメトリーにより評価した。回収、選別した細胞をPBSにおいて洗浄してから、抗CD-34フィコエリトリンおよび抗CD38フルオレセインイソチオシアネート (Becton Dickinson、マウンテンビュー、CA) で二重染色した。

30

【0163】

例えば、Auto Macs (Miltenyi) のような磁気細胞分離を用いて、細胞単離を達成した。好ましくは、CD34+細胞単離を最初に実施する。

【0164】

6.3. 実施例3：灌流培地

以下の実施例は、単離された胎盤を培養するのに好ましい灌流液の処方を示す。

【表 2】

化学物質	供給源	原液濃度	最終濃度	500ml
DMEM-LG	GibcoBRL11885-084			300ml
MCDB201	Sigma M-6770	H ₂ O に溶解	pH7.2 ろ過	200ml
FCS	Hyclone	100%	2%	10ml
ITS	Sigma I-3146 または GibcoBRL41400-045	100x	1x	5ml
Pen&Strep	GibcoBRL15140-122	100x	1x	5ml
LA+BSA	Sigma+ GibcoBRLBSA	100x (1 μg/ml の LA)	10 ng/ml の LA	5ml
デキサメタゾン	Sigma D-2915	H ₂ O 中に 0.25 mM	0.05 μM	100 μl
L-アスコルビン酸	Sigma A-8960	1000x (100mM)	1x (0.1mM)	500 μl
PDGF (50 μg)	R&D 220BD	4mM HCl + 0.1%BSA 中に 10 μg/ml	10ng/ml	500 μl
EGF (200 μg)	Sigma E-9644	10mM HAc + 0.1%BSA 中に 10 μg/ml	10ng/ml	500 μl

10

20

30

【0165】

上記組成物は、胎盤を灌流するために様々な温度で使用できる灌流液である。また、抗生物質、抗凝血剤およびその他の増殖因子などの追加成分を灌流液または培地において使用できることに留意すべきである。

40

【0166】

本発明は、本明細書に記載した具体的な実施形態にその範囲を制限されることはない。実際、以上の説明から、当業者には、本明細書に記載したものに加えて、本発明の様々な改変が明らかであろう。このような改変は、添付の特許請求の範囲に含まれるものとする。

【0167】

本文中に引用した参考文献はすべて、個々の刊行物、特許または特許出願が具体的かつ個別に、あらゆる目的のためにその全文を参考として組み入れるように示されているのと

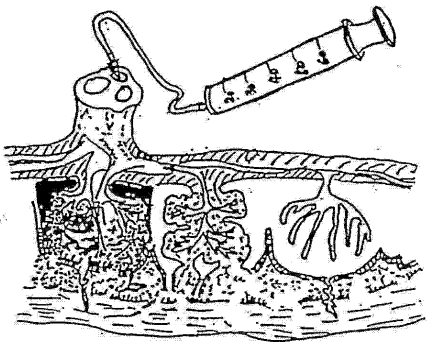
50

同程度に、あらゆる目的のためにその全文を参考として本明細書に組み入れるものとする。

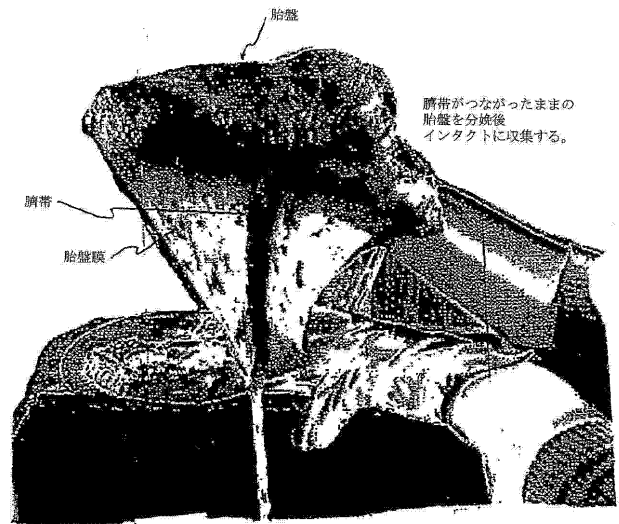
【0168】

あらゆる刊行物の引用はそれが出願日前に開示されたため、先行特許のために、本発明がこのような刊行物に先行する資格がないと認めたと解釈すべきではない。

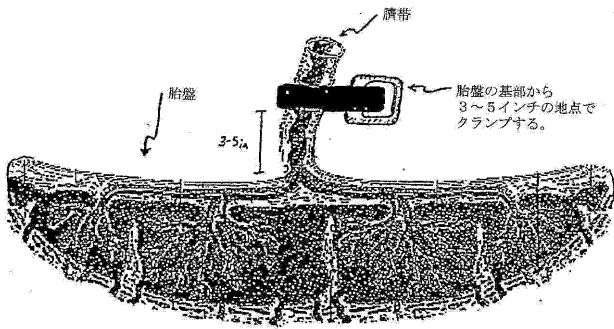
【図1】



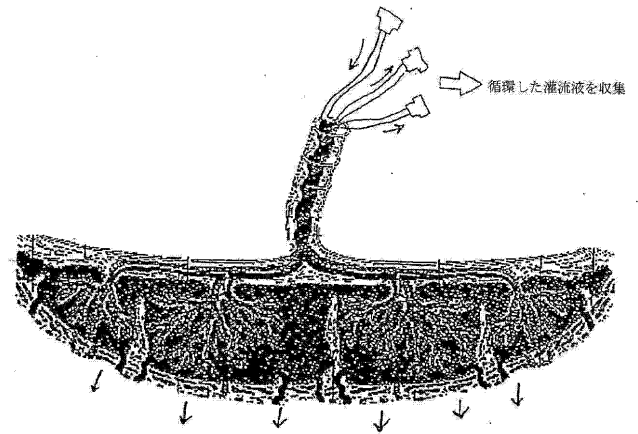
【図2a】



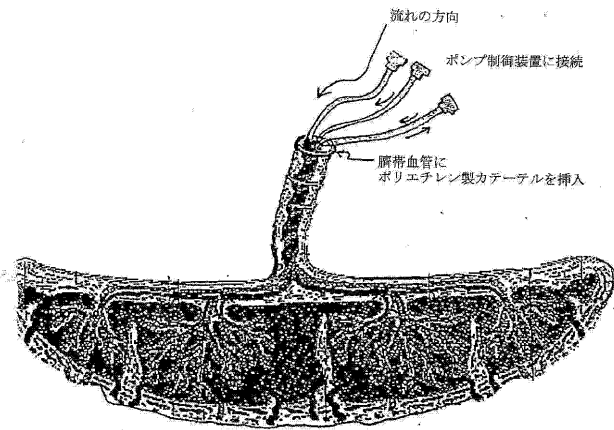
【図 2 b】



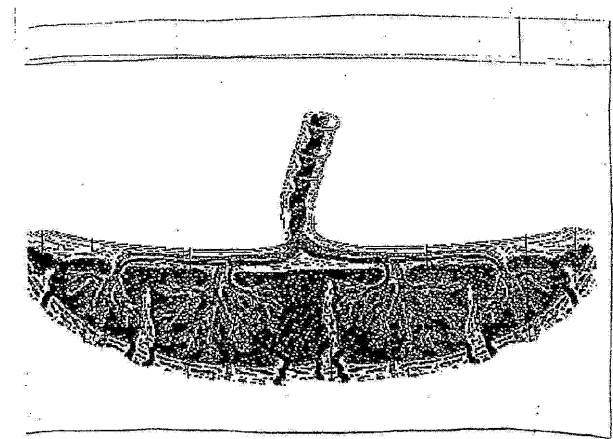
【図 2 d】



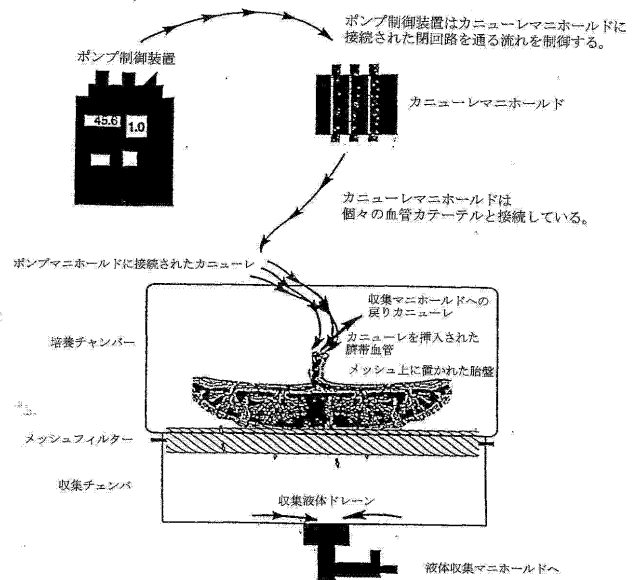
【図 2 c】



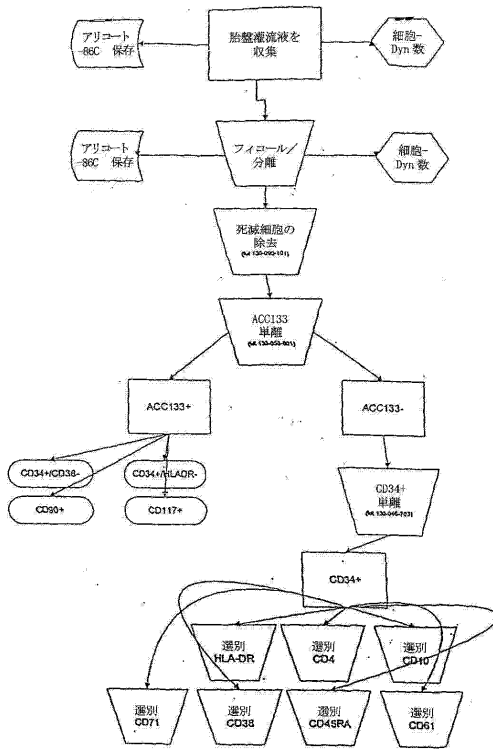
【図 2 e】



【図 3】



【 図 4 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和1年7月26日 (2019.7.26)

【 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 】

OCT-4+およびABC-p+である、単離されたヒト胎盤幹細胞。

【 請求項 2 】

前記細胞がヒト細胞である、請求項 1 に記載の幹細胞。

【 請求項 3 】

少なくとも次の特徴：CD10+、CD29+、CD34-、CD44+、CD45-、CD54+、CD90+、SH2+、SH3+、SH4+、SSEA3-、SSEA4-、OCT-4+およびABC-p+を有する、単離された哺乳動物胎盤幹細胞。

【 請求項 4 】

前記細胞がSSEA3-およびSSEA4-である、請求項 1 に記載の単離された胎盤幹細胞。

【 請求項 5 】

分娩後のヒト胎盤を少なくとも11時間瀉血および灌流した後、この胎盤から単離したヒト胎盤幹細胞。

【 請求項 6 】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のヒト胎盤幹細胞を投与することを含んでなる、ヒト疾患の治療方法。

【 請求項 7 】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のヒト胎盤幹細胞を、それを必要とする患者に投与することを含んでなる、幹細胞の移植方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のヒト胎盤幹細胞を含んでなる、医薬組成物。

【請求項 9】

臍帯血または胎盤血をさらに含む、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のヒト胎盤幹細胞から分化した前駆細胞。

【請求項 11】

すべての細胞型に分化することができるヒト胎盤幹細胞の単離された均一集団。

【請求項 12】

少なくとも次の細胞表面マーカー-OCT-4+およびABC-p+を示す生存可能なヒト胎盤幹細胞の均一集団。

【請求項 13】

多能性であるヒト胎盤幹細胞の単離された均一集団。

【請求項 14】

胎児由来でも母親由来でもない細胞を含んでなる、単離された胎盤。

【請求項 15】

幹細胞が胎盤に由来する、請求項 9 または 11 に記載の幹細胞。

【請求項 16】

CD34+およびCD38-である細胞が富化された造血幹細胞の集団を含んでなる、骨髓移植用の組成物。

【請求項 17】

CD34+およびCD38+である細胞を有する臍帯血をさらに含む、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 18】

CD34-およびCD38-である細胞が富化された造血幹細胞の集団を含む、骨髓移植用の組成物。

【請求項 19】

CD34+およびCD38+である細胞を有する臍帯血をさらに含む、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 20】

OCT-4+およびCD34-である単離されたヒト胎盤幹細胞であって、OCT-4がオクタマー結合タンパク質4であり、次の特徴：CD10+、CD29+、CD44+、CD45-、CD54+、CD90+、SH3+、SH4+、SSEA3-、及びSSEA4-の少なくとも一つを有する、前記胎盤幹細胞。

【請求項 21】

OCT-4+、CD34-、SSEA3-、及びSSEA4-である単離されたヒト胎盤幹細胞。

【請求項 22】

OCT-4+およびCD34-である単離されたヒト胎盤幹細胞であって、SH3+又はSH4+である、胎盤幹細胞。

【請求項 23】

SH3+及びSH4+である、請求項 22 に記載の単離されたヒト胎盤幹細胞。

【請求項 24】

神経表現型の細胞へ分化する可能性を有する、請求項 20、21 又は 22 に記載の単離されたヒト胎盤幹細胞。

【請求項 25】

骨又は軟骨表現型の細胞へ分化する可能性を有する、請求項 20、21 又は 22 に記載の単離されたヒト胎盤幹細胞。

【請求項 26】

請求項 20 に記載のヒト胎盤幹細胞を含む、単離された細胞集団。

- 【請求項 27】
請求項 21 に記載のヒト胎盤幹細胞を含む、単離された細胞集団。
- 【請求項 28】
請求項 22 に記載のヒト胎盤幹細胞を含む、単離された細胞集団。
- 【請求項 29】
請求項 23 に記載のヒト胎盤幹細胞を含む、単離された細胞集団。
- 【請求項 30】
次の特徴：CD10+、CD29+、CD44+、CD45-、CD54+、CD90+、SSEA3-、又はSSEA4-の少なくとも一つを有する、請求項 22 に記載の単離されたヒト胎盤幹細胞。
- 【請求項 31】
次の特徴：CD10+、CD29+、CD44+、CD45-、CD54+、CD90+、SSEA3-、及びSSEA4-の少なくとも一つを有する、請求項 23 に記載の単離されたヒト胎盤幹細胞。
- 【請求項 32】
SSEA3- 及びSSEA4- である、請求項 22 に記載の単離されたヒト胎盤幹細胞。
- 【請求項 33】
請求項 30 に記載のヒト胎盤幹細胞を含む、単離された細胞集団。
- 【請求項 34】
請求項 31 に記載のヒト胎盤幹細胞を含む、単離された細胞集団。
- 【請求項 35】
請求項 32 に記載のヒト胎盤幹細胞を含む、単離された細胞集団。
- 【請求項 36】
組織培養プラスチックに接着する、請求項 20、21 又は 22 に記載の単離されたヒト胎盤幹細胞。
- 【請求項 37】
SSEA3- 及びSSEA4- である、請求項 23 に記載の単離されたヒト胎盤幹細胞。

 フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 L 27/38	(2006.01)	A 6 1 L	27/38	
A 6 1 L 27/36	(2006.01)	A 6 1 L	27/36	2 0 0
A 6 1 K 35/51	(2015.01)	A 6 1 L	27/38	1 1 1
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 K	35/51	
		A 6 1 P	43/00	1 0 7

F ターム(参考) 4B065 AA93X BA22 BD03 CA44
 4C081 AB02 BA12 BA13 CD34 EA02
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB33 BB44 BB57 BB58 BB59 CA04 DA14
 MA66 NA14 ZA01 ZA31 ZA51 ZB21