

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

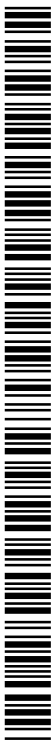
(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年11月27日(27.11.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/189071 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/063448
- (22) 国際出願日: 2014年5月21日(21.05.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-108408 2013年5月22日(22.05.2013) JP
- (71) 出願人: 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター(NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY) [JP/JP]; 〒1878551 東京都小平市小川東町4丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 岡田 尚巳(OKADA Takashi); 〒1878551 東京都小平市小川東町4丁目1番1号 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター内 Tokyo (JP). 笠原 優子(KASAHARA Yuko); 〒1878551 東京都小平市小川東町4丁目1番1号 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター内 Tokyo (JP). 武田 伸一(TAKEDA Shinichi); 〒1878551 東京都小平市小川東町4丁目1番1号 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則 4.17 に規定する申立て:
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2014/189071 A1

(54) Title: STEM CELLS FOR TRANSPLANTATION AND MANUFACTURING METHOD THEREFOR

(54) 発明の名称: 移植用幹細胞及びその製造方法

(57) Abstract: Provided are stem cells for transplantation composed of MSCs capable of overexpression of IL-10 as means for providing: MSCs for transplantation having improved take ratio and cell survivability after transplantation, and having high safety with few side effects; and a method for manufacturing, in a simple manner, MSCs for transplantation having a high take ratio and cell survivability.

(57) 要約: 移植後の細胞生存率や生着率を改善した、副作用の少なく安全性の高い移植用 MSCs、及び細胞生存率及び生着率の高い移植用 MSCs を簡便に製造する方法を提供する手段として、IL-10 を過剰に発現することのできる MSCs からなる移植用幹細胞提供する。

明 細 書

発明の名称：移植用幹細胞及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞移植において生存率及び生着率の高い移植用の間葉系幹細胞、当該移植用の間葉系幹細胞を製造する方法、及び間葉系幹細胞の移植後の生着を増強する薬剤に関する。

背景技術

[0002] 間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cells；以下、本明細書ではしばしば「MSCs」と略称する）は、間葉系に属する細胞への分化能を有する体性幹細胞である。MSCsは、増殖力が旺盛であり、細胞数確保が容易であること、移植時の拒絶反応が少ないこと、及び倫理的な障壁が低いこと等の理由から、現時点で最も現実的な細胞移植治療のプラットフォームと考えられており、骨、血管、心筋等の間葉系結合組織や中枢神経系の再構築等の再生医療への応用が期待されている。

[0003] また、MSCsには、炎症性疾患における炎症制御療法への応用や、患者本人のMSCsに対して治療遺伝子を導入する自家移植治療の有効性が高いという利点がある（非特許文献1）。さらに、MSCsは炎症や組織障害のある部位に集積する性質や免疫抑制能を有することから、造血幹細胞の生着促進を目的として骨髓移植と同時に骨髓由来MSCsの移植が行われている（非特許文献2）。MSCsの免疫抑制作用はMSCsが集積した局所に限定され、全身性の強い免疫抑制は起こらないと想定されることから、免疫抑制剤と比較して安全性が高いと考えられており、その臨床的効果が期待されている。

[0004] それ故、これまでも標的組織にMSCsを移植する細胞移植治療や、MSCsの免疫制御機能を利用した移植片対宿主病等の炎症性疾患に対する炎症制御療法の臨床試験が実施されている（非特許文献3～6）。また、カナダやニュージーランドでは、有効性や安全性が確立され、既に医薬承認されている。

[0005] ところが、MSCsは移植後の生存率や生着率が不安定なため生着不全を生じ

やすく、本来の性質を長期にわたって維持することが困難という大きな問題がある。それ故、MSCsを用いた自家移植治療において、これまでは治療遺伝子を安定的に発現することができなかった。

先行技術文献

非特許文献

- [0006] 非特許文献1 : Connick et al., 2012, Lancet Neurol. 11(2):150-156.
非特許文献2 : Carrancio S., et al., 2012, Cell Transplant. 11:15-156
非特許文献3 : M von Bonin et al., 2009, Bone Marrow Transplant., 43:245-251
非特許文献4 : Tolar et al., 2011, Hum. Gene Ther., 22:257-262
非特許文献5 : Si Y.L., et al., 2011, Ageing Res. Rev., 10:93-103
非特許文献6 : Wang et al. 2012, J. Hematol. Oncol., 5:19

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、上記問題点を鑑み、移植後の細胞生存率や生着率を改善した、副作用が少なく安全性の高いMSCsを開発し、提供すること、及び細胞生存率及び生着率の高い移植用幹細胞を簡便に製造する方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0008] 上記課題を解決するために、本発明者はMSCsに対して様々な処理を行ったところ、抗炎症性サイトカインであるインターロイキン-10（以下、本明細書ではしばしば「IL-10」と略称する）をMSCs内で過剰に発現させたときに、そのMSCsの移植後の生存率及び生着率が劇的に向上することを見出した。
- [0009] さらに、細胞移植や組織移植を受ける受容個体に対して、移植前に免疫原と共にMSCsで少なくとも1回処理することで後天的な免疫寛容を誘導できることを見出した。
- [0010] 本発明は、前記知見に基づくものであって、以下を提供する。

- [0011] (1) IL-10を過剰に発現することのできるMSCsからなる移植用幹細胞。
- [0012] (2) 前記IL-10の過剰発現が外因性のIL-10発現システムによる、(1)に記載の移植用幹細胞。
- [0013] (3) 前記IL-10発現システムがプラスミドベクター又はウイルスベクターである、(2)に記載の移植用幹細胞。
- [0014] (4) 間葉系結合組織、中枢神経系又は肝臓の再構築用である、(1)～(3)のいずれかに記載の移植用幹細胞。
- [0015] (5) IL-10を過剰発現可能なIL-10発現システムをMSCsに導入する工程を含む、移植用幹細胞の製造方法。
- [0016] (6) 前記IL-10発現システムがプラスミドベクター又はウイルスベクターである、(5)に記載の移植用幹細胞の製造方法。
- [0017] (7) IL-10を過剰発現可能なIL-10発現システムを有効成分とする、間葉系幹細胞生着増強剤。
- [0018] (8) 前記IL-10発現システムがプラスミドベクター又はウイルスベクターである、(7)に記載の間葉系幹細胞生着増強剤。
- [0019] (9) 後天的免疫寛容誘導方法であって、受容個体に免疫原を導入する日の2日前～14日前の期間内にMSCs及び前記免疫原と同一免疫原性を有する免疫原又はその一部を少なくとも1回投与する第1工程、及び受容個体に免疫原を導入する日の前日又は当日にMSCsを投与する第2工程を含む前記方法。
- [0020] (10) 前記MSCsが(1)～(4)のいずれかに記載の移植用幹細胞である、(9)に記載の方法。
- [0021] (11) 前記免疫原がウイルス、細胞、組織、又は臓器である、(9)又は(10)に記載の方法。
- [0022] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2013-108408号の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

- [0023] 本発明の移植用幹細胞によれば、移植後の細胞生存率及び生着率が高く、また安全性の高いMSCsを提供することができる。

[0024] 本発明の移植用幹細胞の製造方法によれば、簡便に移植後の生着率が高い移植用幹細胞を製造することができる。

[0025] 本発明のMSCs生着増強剤によれば、移植後のMSCsの細胞生存率及び生着率を増強することができる。

[0026] 本発明のMSCs免疫寛容誘導方法によれば、移植後の細胞に対する拒絶反応を抑制できる。また、それによって移植後の細胞生存率及び生着率をさらに増強することができる。

図面の簡単な説明

[0027] [図1]組換えIL-10をMSCsと共にNOD/Scidマウスの下腿に局注投与したときのMSCsの生存率を示す。Aは、投与2、4日後のマウスのin vivoイメージング像を示す。マウス左下腿にはMSCsと組換えIL-10を((+)で示す)、マウス右下腿にはMSCsのみを((-)で示す)、それぞれ投与している。またB、Cは、Aのイメージング像に基づいて算出された定量値で、それぞれ投与2日後及び4日後を示す。

[図2]IL-10発現AAVベクター及びコントロールのLacZ発現AAVベクターをMSCsと共にNOD/Scidマウスの下腿に局注投与した時のMSCsの生存率を示す。Aは、投与9日後のin vivoイメージング像を示す。IL-10発現AAVベクター(IL-10)はマウス左下腿に、LacZ発現AAVベクター(LacZ)はマウス右下腿に、それぞれ投与している。またBは、Aのin vivoイメージング像に基づいて算出された定量値を示す。

[図3]IL-10発現プラスミドDNA又はコントロールのGFP発現プラスミドDNAを導入したMSCsを、NOD/Scidマウスの下腿に局注投与した時のMSCsの生存率を示す。この図では、IL-10発現プラスミドDNA(IL-10(+))をマウス左下腿に、GFP発現プラスミドDNA(IL-10(-))をマウス右下腿に、それぞれ投与している。Aは、投与日(0 day)から3日、7日、及び10日後のマウスのin vivoイメージング像を示す。また、Bは、IL-10発現プラスミドDNA又はGFP発現プラスミドDNAの導入から12日間培養後のMSCsにおけるIL-10発現量を示す。そして、Cは、Aのイメージング像に基づいて算出された投与3日、7日、10及び12日後の

定量値を示す。

[図4]MSCs移植マウスにおける血清中のIL-10濃度を示す。ContはMSCsのみ移植したコントロールマウスを、pIL-10(+)MSCsは図3Aに記載のマウスIL-10発現プラスミドDNAを導入したMSCsであるIL-10(+)MSCsを移植した2匹のマウス(No.1、No.2)を、そしてAAV1-IL-10はMSCs移植部位にマウスIL-10発現AAVベクターAAV1-IL-10をMSCsと共投与したマウスを示す。

[図5]AAVベクターによるMSCsへの遺伝子導入とIL-10の発現を示す。AはGFP発現AAVベクター(AAV1-GFP)を遺伝子導入した7日後のMSCsの結果である。矢印はGFP発現AAVベクターが導入され、GFPを発現しているMSCsを示す。BはAAV1-GFP又はマウスIL-10発現AAVベクター(AAV1-IL-10)を導入した7日後のMSCsにおけるIL-10の発現結果を示す。

[図6]本発明の移植用幹細胞をNOD/Scidマウスへ局注投与した後のMSCsの生存率を示す。Aは、MSCs投与から各日後におけるマウスのin vivoイメージング像を示す。この図では、AAV1-IL-10を導入したMSCsであるvIL-10(+)MSCsをマウス左下腿に(IL-10(+))、コントロールのAAV1-GFPを導入したMSCsであるvIL-10(-)MSCsをマウス右下腿に(IL-10(-))、それぞれ投与している。またBはAの結果に基づいて算出した定量値(n=5)である。

[図7]マウス筋組織における移植したMSCsの生着を示す図である。AはvIL-10(-)MSCsの、BはvIL-10(+)MSCsの筋組織における生着像を、そしてCは組織染色像より算出したvIL-10(-)MSCs及びvIL-10(+)MSCsの生着率を示す。

[図8]イヌへのvIL-10(+)MSCs移植フローの概念図を示す。

[図9]移植30日後のイヌ筋組織におけるvIL-10(+)MSCsの生着を示す図である。破線円内や矢印で示す濃い斑点は、筋線維内膜及び外膜に生着したvIL-10(+)MSCsを示す。

[図10]Aは、MSCsを移植した左右前脛骨筋組織における4部位の位置を示す。T A-2がMSCsの移植部位である。Bは、移植30日後の左右前脛骨筋組織における各部位のMSCsの生存率及び組織内IL-10濃度を示す。(a)及び(b)は、それぞれ左前脛骨筋(vIL-10(-)MSCsを移植)及び右前脛骨筋(vIL-10(+)MSCs

を移植)におけるMSCsの生存率である。また(c)及び(d)は、それぞれ左前脛骨筋及び右前脛骨筋における各部位の筋組織中のIL-10濃度である。

[図11]非分化誘導MSCsの生着及び筋線維形成を示す。Aは、筋組織中におけるMSCsの病理像である。破線円内の矢印で示す部位は移植したvIL-10(+)MSCsの炎症部位での生着を、また矢頭で示す部位は生着したMSCsから新たに形成された筋線維を示す。また、Bにおいて破線内の明るい細胞は、in vitroにおいてMSCsと筋芽細胞が融合していることを示す。

[図12]本発明の後天的免疫寛容誘導方法による免疫寛容誘導効果を示す図である。A：免疫原のAAV9-Lucのみを正常犬の前脛骨筋組織に局所投与し、本発明の免疫寛容誘導処理を行っていない対照用犬(Cont-AAV)を示す。B：本発明の後天的免疫寛容誘導方法に基づいて免疫原のAAV9-Lucと共にMSCsを正常犬の上記同部位に局所投与した免疫寛容誘導犬(MSCs+AAV)を示す。C：MSCsのみを正常犬の上記同部位に局所投与し、免疫原のAAV9-Lucを投与していない対照用犬(Cont-MSCs)を示す。A~Cの左図は、それぞれの犬における実験用タイムテーブルを示す。i.v.は静脈内投与を、i.m.は筋肉内投与(局所投与)を示す。また右図は、前脛骨筋組織を生検し、免疫原のAAV9におけるマーカー遺伝子であるルシフェラーゼの発現を、抗ルシフェラーゼ抗体を用いて検出した図である。ルシフェラーゼ発現細胞は、図中、明るい細胞として示される。図中のスケールバーは、100 μ mである。

[図13]静脈内投与を用いた本発明の後天的免疫寛容誘導方法による免疫寛容誘導効果を示す図である。A：免疫原のAAV9-Lucのみを正常犬に静注し、本発明の免疫寛容誘導処理を行っていない対照用犬(Cont-AAV)を示す。B：本発明の後天的免疫寛容誘導方法に基づいて免疫原のAAV9-Lucと共にMSCsを正常犬に静注した免疫寛容誘導犬(MSCs+AAV)を示す。C：本発明の後天的免疫寛容誘導方法に基づいて免疫原のAAV9- μ Dysと共にMSCsを筋ジストロフィー誘導患犬(DMD)に静注した免疫寛容誘導犬(DMD/MSCs+AAV)を示す。A~Cの左図は、それぞれの犬における実験用タイムテーブルを示す。i.v.は静脈内投与を示す。また右図は、側頭筋を生検し、ルシフェラーゼの発現を、抗ルシ

フェラーゼ抗体を用いて (A及びB)、又はマイクロジストロフィンの発現を、抗ジストロフィン抗体を用いて (C)、検出した図である。各図中に見られる白い斑点は、核であり、ルシフェラーゼ又はマイクロジストロフィン発現細胞は、図中、明るい細胞として示される。図中のスケールバーは、A及びBが100 μ m、Cが50 μ mである。

[図14]各種イヌの15m走における走行タイムの結果を示す図である。図中、横軸下段の「pre」は、筋ジストロフィー患犬 (DMD) に対して、本発明の後天的免疫寛容誘導方法によって前処理を行った時点を示す。他の数値は、AAV9- μ Dysを導入した基準日からの経過時間 (週) を示す。また、横軸上段のカッコ内の数値は、筋ジストロフィー患犬 (DMD) の週齢を示す。

[図15]筋ジストロフィー患犬の病態評価を示す図である。縦軸は、Grading Scoreのスコア値を、横軸は患犬の月齢を示す。

発明を実施するための形態

[0028] 1. 移植用幹細胞

1-1. 概要及び定義

本発明の第1の態様は、移植用幹細胞である。

[0029] 「移植用幹細胞」とは、細胞移植のための幹細胞であって、受容個体 (レシピエント) の特定組織へ移植し、移植部位及び/又はその周辺部位に生着させて、周辺環境に応じて適切に分化させることを目的とする。本態様の移植用幹細胞は、特に、骨、血管、心筋等の間葉系結合組織、中枢神経系、又は肝組織の補充や再構築等の組織再生に好適に利用し得る。本明細書で「受容個体」とは、脊椎動物、好ましくは鳥類又は哺乳動物 (ヒト、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、サル、及びげっ歯類を含む)、より好ましくはヒトである。

[0030] 「生着」とは、一般的には移植された細胞、組織又は臓器が移植部位において本来の機能を発揮し得る状態となることをいう。本明細書では移植対象物が幹細胞であることから、特に、移植した幹細胞が移植部位又はその周辺部位等において、所定の遺伝子を適時発現し、また周辺環境に応じて適切な

細胞分化を行う機能を有することをいう。本明細書に記載の「生着率」とは、移植した幹細胞に対する生着した幹細胞の割合をいう。一方、本明細書に記載の「生存率」とは、移植した幹細胞に対する移植後に生存している幹細胞の割合をいう。生着率や生存率は、細胞数のような絶対値から算出してもよいし、細胞由来の標識強度のような相対値から算出してもよい。

[0031] 1-2. 構成

本発明の移植用幹細胞は、インターロイキン-10を細胞内で過剰に発現することのできる間葉系幹細胞からなる。

[0032] 「間葉系幹細胞 (MSCs) は、前述のように、骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞等の間葉系に属する細胞への分化能を有する細胞である。またMSCsは、胚葉差を超えて、神経細胞 (外胚葉系由来) や肝細胞 (内胚葉系由来) への可塑的分化能も知られている。本態様の移植用幹細胞は、MSCsをベースとする。

[0033] 「インターロイキン-10 (Interleukin-10 ; IL-10) 」は、抗炎症性サイトカインである。2型ヘルパーT細胞 (Th2細胞) をはじめ、単球、マクロファージ、肥満細胞、活性化B細胞、角化細胞等の多くの細胞で生産され、単球系細胞に作用して炎症性サイトカインの産生等を抑制制御し、炎症症状を抑制する他、マクロファージの機能抑制制御を行うことが知られている。

[0034] 本明細書においてIL-10は、野生型IL-10の他、野生型IL-10と同等以上の生理活性を保持する、変異型IL-10及びIL-10断片を包含する。

[0035] 本明細書で「野生型IL-10」とは、IL-10本来の機能を有し、自然界に存在する対立遺伝子群において、最も多く存在する対立遺伝子にコードされた各生物種のIL-10タンパク質をいう。例えば、配列番号1に示すヒトIL-10、配列番号3に示すマウスIL-10、配列番号5に示すラットIL-10、配列番号7に示すイヌIL-10、配列番号9に示すチンパンジーIL-10、配列番号11に示すウシIL-10等が該当する。

[0036] 本明細書で「変異型IL-10」とは、前記野生型IL-10に変異が生じたIL-10タンパク質をいう。具体的には、野生型IL-10のアミノ酸配列において1若しく

は複数個のアミノ酸の欠失、置換、又は付加を含む変異体、あるいは該アミノ酸配列と85%以上、90%以上、好ましくは95%以上、97%以上、98%以上又は99%以上のアミノ酸同一性を示す変異体を意味する。ここで「複数個」とは、2~10個、2~7個、2~5個、2~4個又は2~3個をいう。また、「同一性」の%は、BLASTやFASTAによるタンパク質の検索システムを用いて、必要に応じてギャップを導入して、野生型IL-10のアミノ酸配列との一致度が最大となるようにアラインメントしたときの野生型IL-10の全アミノ酸数に対する同一アミノ酸数の割合をいう。

[0037] 本明細書において「IL-10断片」とは、野生型IL-10又は変異型IL-10のポリペプチド断片をいう。IL-10断片のアミノ酸の長さ及び領域は、野生型IL-10の生理活性を保持する長さ及び領域であれば、特に限定はしない。通常はIL-10の機能ドメインを破壊しない状態で包含するポリペプチド断片が好適に用いられる。ここでいう機能ドメインとは、IL-10に特有の抑制性活性機能を担い、又はその機能を発揮する上で不可欠な領域をいう。

[0038] MSCsはIL-10をコードする内因性のIL-10遺伝子を有しており、その遺伝子に起因するIL-10を発現し得る。それ故、本態様の移植用幹細胞は、通常のMSCsよりもIL-10を過剰に発現することを特徴とする。本明細書において「IL-10を過剰（に）発現」とは、通常のMSCsにおけるIL-10の発現量の2倍以上、好ましくは5倍以上、より好ましくは10倍以上、さらに好ましくは20倍以上の発現量をいう。

[0039] 本態様の移植用幹細胞がIL-10を過剰発現する機序は特に限定しない。例えば、内因性のIL-10の発現増強によるものであってもよいし、外因性のIL-10発現システムによるものであってもよい。

[0040] 「内因性のIL-10の発現増強」とは、MSCsのゲノム上におけるIL-10遺伝子の発現量が結果的に増強されれば、その機序は特に限定はしない。例えば、IL-10遺伝子の発現を制御するエンハンサー又はプロモーターに変異が生じ、IL-10を過剰に発現するようになった変異型MSCs、ゲノム上におけるIL-10遺伝子が重複により多コピー化された変異型MSCs等が挙げられる。

- [0041] 「外因性のIL-10発現システム」とは、MSCs内に導入された外来のIL-10発現システムをいう。
- [0042] 「IL-10発現システム」とは、MSCs内でIL-10遺伝子を発現可能な状態で包含する一つの発現系単位をいう。IL-10遺伝子を持続的に発現できる発現単位が好ましい。
- [0043] 「IL-10遺伝子」は、前記IL-10をコードする遺伝子又はその断片をいう。例えば、前述の配列番号1に示すヒトIL-10をコードする配列番号2に示すヒトIL-10遺伝子、配列番号3に示すマウスIL-10をコードする配列番号4に示すマウスIL-10遺伝子、配列番号5に示すラットIL-10をコードする配列番号6に示すラットIL-10遺伝子、配列番号7に示すイヌIL-10をコードする配列番号8に示すイヌIL-10遺伝子、配列番号9に示すチンパンジーIL-10をコードする配列番号10に示すチンパンジーIL-10遺伝子、配列番号11に示すウシIL-10をコードする配列番号12に示すウシIL-10遺伝子等が該当する。
- [0044] IL-10発現システムは、IL-10遺伝子の他に、MSCs内で当該IL-10遺伝子を発現する上で必要な構成要素を有する。そのような構成要素には、例えば、プロモーター及びターミネーターが含まれる。IL-10発現システムにおいて、IL-10遺伝子は、核酸発現システム内のプロモーターとターミネーターの制御下で発現可能な状態で配置されている。その他、エンハンサー、ポリA付加シグナル、5'-UTR（非翻訳領域）配列、標識若しくは選抜マーカー遺伝子、マルチクロニング部位、複製開始点等を含んでいてもよい。
- [0045] プロモーターは、MSCs内で作動可能なプロモーターであれば、特に制限はしない。例えば、IL-10発現システムを含むMSCsが哺乳動物由来の場合は、哺乳動物で作動可能なプロモーターであるヒトサイトメガロウイルス、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40（SV40）等のウイルスプロモーター、又はエロンゲーションファクター1 α （EF1 α ）等の哺乳類細胞由来のプロモーターを使用することができる。プロモーターには、その発現制御の性質により過剰発現型プロモーター、構成的プロモーター、部位特異的プロモーター、段階特異的プロモーター、又は誘導性プ

ロモーター等が知られているが、IL-10発現システムに使用するプロモーターは、過剰発現型プロモーター又は構成的プロモーターが好ましい。IL-10発現システムは、移植幹細胞における内因性IL-10遺伝子の発現が移植部位において位置的制御又は量的制御を受けている場合であっても、その制御から独立してIL-10遺伝子を常時発現することができることが望ましい。IL-10発現システムにおいて、プロモーターは、IL-10遺伝子の開始コドンよりも上流に配置される。

[0046] ターミネーターは、MSCs内で、プロモーターにより転写されたIL-10遺伝子の転写を終結できる配列であれば特に限定はしない。IL-10発現システムにおいて、ターミネーターは、IL-10遺伝子の終止コドンよりも下流側に配置される。

[0047] IL-10発現システムには、IL-10遺伝子を発現させる上で必要な一つの発現系単位をゲノム上からそっくり取り出して組み込んだものの他、組換えIL-10遺伝子と各構成要素を組合せて人工的に構築したものが存在するが、本発明ではいずれの核酸発現システムも利用できる。また、IL-10発現システムは、1システム内にIL-10遺伝子を1つ含むモノシストロニックであってもよいし、2以上のIL-10遺伝子を含むポリシストロニックであってもよい。

[0048] IL-10発現システムとして、例えば、IL-10発現型のプラスミドベクター、IL-10発現型のウイルスベクター、又はIL-10発現型の人工染色体ベクターが挙げられる。好ましくはウイルスベクターである。

[0049] 「プラスミドベクター」とは、プラスミドを改変した遺伝子ベクターである。IL-10発現型のプラスミドベクターに用いるプラスミド部分は、MSCs内でIL-10遺伝子を発現可能であれば、特に限定はしない。プラスミドベクターはMSCs内では自己複製能を有さないことから、プラスミドベクターを用いる場合、それがMSCsのゲノム内に挿入されていない限りIL-10遺伝子の発現は、通常、一過的である。IL-10発現システムの骨格となるプラスミド部分は、市販の発現プラスミド、例えば、哺乳動物細胞用発現プラスミドを用いることもできる。

[0050] 「ウイルスベクター」とは、ウイルスの感染能や複製能を利用した遺伝子ベクターである。ウイルスゲノムから病原性に関する遺伝子を除去し、外来遺伝子（ここではIL-10遺伝子）を組み込んだウイルス核酸（DNA又はRNAを含む）を包含するウイルス粒子から構成される。IL-10発現システムには、当該分野で公知のあらゆるウイルスに由来するベクターを使用することができる。例えば、レトロウイルス（レンチウイルス、マウスモロニー白血病ウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（Adeno-Associated Viruses；以下、「AAV」と表記する）、センダイウイルスが挙げられる。パルボウイルスに属する非病原性のウイルスであるAAVは、自己複製能の欠損により自律的増殖ができず、増殖にはアデノウイルスやヘルペスウイルスの共感染を必要とするため感染性が低い。また宿主における免疫原性も低い。それ故、遺伝子ベクターとして、安全性が高いという利点を有する。さらに、AAVは、宿主域が広く、筋細胞、神経細胞、肝細胞等の種々の細胞に感染可能である。したがって、AAVは、本態様におけるIL-10発現システムのウイルスベクターとしても好ましい。また、ウイルスベクターは、カプシド又は被膜粒子からなる外殻タンパク質に包含された細胞感染能を有するウイルス粒子とすることができる。

[0051] 「人工染色体」は、ヒト人工染色体（HAC； Human Artificial Chromosome）を含む。

[0052] 本態様の移植用幹細胞は、MSCs一つあたりに同一の又は異なる複数のIL-10発現システムを含むことができる。これにより、個々のシステムからのIL-10の発現量が少ない場合でも、一細胞あたりのIL-10発現システム数を増やすことで、一MSCsあたりのIL-10発現量を増加させて、過剰発現状態にすることができる。

[0053] 1 - 3. 効果

本態様の移植用幹細胞によれば、移植後の細胞生存率及び生着率が高く、副作用の低い幹細胞を提供することができる。したがって、本態様の移植用幹細胞を移植細胞として、骨、血管、心筋等の間葉系結合組織、中枢神経系

、又は肝臓に移植することによって、移植細胞は、移植組織に生着し、周辺環境に応答して適当な分化誘導を受けることから、組織再構築等の再生医療に適用することができる。

[0054] 2. 移植用幹細胞の製造方法

2-1. 概要

本発明の第2の態様は、移植用幹細胞の製造方法である。本態様の製造方法は、IL-10発現システムをMSCsに導入して、IL-10を過剰に発現することのできるMSCsを製造することを特徴とする。

[0055] 2-2. 方法

本態様の製造方法は、IL-10発現システム導入工程を含む。IL-10発現システム導入工程は、IL-10を過剰発現可能なIL-10発現システムを少なくとも一つMSCsに導入する工程をいう。

[0056] IL-10発現システム導入工程で使用するIL-10発現システムの構成は、前記第1態様に記載のIL-10発現システムと同じでよい。

[0057] IL-10発現システムの調製は、当該分野で公知の方法、例えば、Green & Sambrook, *Molecular Cloning*, 2012, Fourth Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Pressに記載の方法に従って行えばよい。

[0058] 以下でIL-10発現システムとしてのプラスミドベクター又はウイルスベクターの調製について具体例を挙げて説明をするが、IL-10発現システムの調製は、以下に制限されるものではない。

[0059] (1) プラスミドベクターの調製

IL-10遺伝子のクローニングを行う。使用するIL-10遺伝子の由来種は、IL-10発現システムを導入するMSCs内でIL-10としての活性を有する限り、特に制限はしない。好ましくは導入するMSCsと同じ生物種由来のIL-10遺伝子である。例えば、ヒト由来のMSCsにIL-10発現システムを導入する場合、IL-10遺伝子は、配列番号2で示されるヒトIL-10遺伝子が好ましい。IL-10遺伝子のクローニングは、当該分野で公知の方法、例えば、上記Green & Sambrook (2012)に記載の方法に従って行えばよい。例えば、ヒトIL-10遺伝子をクローニ

ングする場合、配列番号2で示される塩基配列から適当な領域を選択し、その塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを化学合成する。化学合成は、ライフサイエンスメーカーの受託合成サービスを利用すればよい。次に、そのオリゴヌクレオチドをプローブとしてヒトのcDNAライブラリーからヒトIL-10遺伝子を当該分野で公知の方法、例えばプラークハイブリダイゼーション法等に基づいて単離する。詳細な遺伝子の単離方法については、上記Green & Sambrook (2012) 等を参照すればよい。ヒトcDNAライブラリーは、ライフサイエンスメーカー各社から市販されているので、それを利用することもできる。あるいは、配列番号2で示される塩基配列に基づいてプライマーペアとなるオリゴヌクレオチドを化学合成し、そのプライマーペアを用いて、ヒトのゲノムDNA又はcDNAライブラリーを鋳型として、PCR法等の核酸増幅法により目的とするヒトIL-10遺伝子を増幅してもよい。核酸増幅を行なう場合には、pfuポリメラーゼのような3' -5' エキソヌクレアーゼ活性を有するフィデリティー（正確性）の高いDNAポリメラーゼを使用することが好ましい。核酸増幅の詳細な条件等については、例えば、Innis M. et al (Ed.) , 1990, Academic Press, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applicationsに記載の方法を参照すればよい。単離したヒトIL-10遺伝子を必要に応じて適当なプラスミドに挿入し、大腸菌等の微生物内でクローニングした後、全長塩基配列を公知技術に基づいて確認する。この他、ヒトIL-10のcDNAクローンが市販されていることから、それを購入して用いることもできる。

[0060] 続いて、クローニングしたヒトIL-10遺伝子を発現用プラスミドベクターの所定の部位に組み込む。これら一連の遺伝子操作技術は、当該分野で周知の技術である。詳細な方法については、上記Green & Sambrook (2012) 等を参照すればよい。

[0061] (2) ウイルスベクターの調製

基本操作は、前記プラスミドベクターの方法に準ずればよい。まず、ウイルスゲノムを当該分野で公知の方法により調製した後、それを適当なクローニングベクター（例えば、大腸菌由来のpBI系、pPZP系、pSMA系、pUC系、pBR

系、pBluescript系)に挿入して組換え体を得る。次に、組換え体に含まれるウイルスゲノム内の所定の部位に上記(1)で説明したIL-10遺伝子を挿入し、クローニングする。続いて、制限酵素によって前記組換え体からIL-10発現システムであるウイルスゲノム領域を切り出せばよい。これによって、目的のウイルスベクターを得ることができる。

[0062] IL-10発現システムをMSCs内に導入する方法、すなわちMSCsの形質転換方法は、当該分野で公知の任意の適当な方法を用いればよい。

[0063] 例えば、IL-10発現システムがプラスミドベクターの場合、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション、リポフェクション、細胞膜透過性ペプチドとの結合等の周知の方法を用いることができる。これらの具体的な方法については、当該分野で周知の方法、例えば、前記Green & Sambrook (2012)等に記載の方法を参照すればよい。また、Lipofectamin 2000 (Life technologies)等の市販の核酸導入剤を使用してプラスミドベクターをMSCsに導入してもよい。

[0064] IL-10発現システムがウイルスベクターの場合、そのウイルスベクターをMSCsにウイルス感染させてMSCs内に導入すればよい。感染方法は、ベクターに用いたウイルスの種類に基づいて、当該分野で周知の方法、例えば、前記Green & Sambrook (2012)等に記載の方法を参照すればよい。

[0065] IL-10をMSCs内で安定的かつ持続的に発現させるために、相同性組換えを介してIL-10発現システムをMSCsのゲノム内に挿入してもよい。

[0066] 2-3. 効果

本態様の製造方法によれば、MSCsをベースとして、簡便かつ比較的安価に、移植用幹細胞を製造することができる。この方法によって、移植後の生着率が高いMSCsを容易に入手することが可能となる。

[0067] 3. 間葉系幹細胞生着増強剤

3-1. 概要

本発明の第3の態様は、間葉系幹細胞生着増強剤(MSCs生着増強剤)である。本態様のMSCs生着増強剤は、MSCsを細胞生存率及び生着率の高い移植用

幹細胞に変換するための薬剤で、移植後のMSCsの生存率及び生着率を劇的に増強させることを特徴とする。

[0068] 3-2. 構成

本態様のMSCs生着増強剤は、IL-10を過剰発現可能なIL-10発現システムを有効成分とする。このIL-10発現システムは、前記第1態様に記載のIL-10発現システムと同一の構成を有することから、ここではその説明を省略する。本態様のMSCs生着増強剤は、乾燥した固体状態、又はそれを適当なバッファに溶解した液体状態のいずれであってもよい。有効成分であるIL-10発現システムは、核酸で構成されることから、ヌクレアーゼフリーの条件下で、MSCs生着増強剤において分解されずに安定的に保持されるような条件下、例えば、氷点下で保存されることが好ましい。

[0069] 3-3. 使用方法

本態様のMSCs生着増強剤は、有効成分であるIL-10発現システムを移植対象細胞であるMSCs内に導入することで、その目的を達成し得る。IL-10発現システムをMSCs内に導入する方法は、IL-10発現システムの種類によって異なるが、基本的には上記実施例2に記載のIL-10発現システムをMSCs内に導入する方法（MSCsの形質転換方法）に準じて行えばよい。移植対象細胞となるMSCsは、生体から単離し、培養した野生型MSCsのみならず、ルシフェラーゼ発現ベクター等のマーカー遺伝子を予め導入した変異型MSCsであってもよい。

[0070] 3-4. 効果

本態様のMSCs生着増強剤によれば、通常のMSCsから容易に細胞生存率及び生着率の高い移植用MSCsを調製することができる。

[0071] 4. 後天的免疫寛容誘導方法

4-1. 概要

本発明の第4の態様は、後天的免疫寛容誘導方法である。本態様の方法は、受容個体の免疫寛容を後天的に誘導し、生体内に導入する細胞や組織等の免疫原に対する免疫応答を抑制することを特徴とする。

[0072] 4-2. 方法

本態様の方法は、第1工程及び第2工程を必須の工程として含む。

[0073] (1) 第1工程

「第1工程」は、受容個体に免疫原を導入する日前の所定の期間内にMSCs及び該免疫原又はその一部を投与する工程である。

[0074] 本態様でいう「免疫原」とは、生体内への導入を目的とする免疫原性を有する物質であり、主としてタンパク質をいう。例えば、ウイルス、細胞、組織、又は臓器等が挙げられる。なお、本工程及び次述する第2工程で使用する免疫原は、受容個体と異なる免疫原性を有していればよく、必ずしも同じ種類の免疫原である必要はない。「異なる免疫原性を有する」とは、免疫原性又は抗原性が異なることをいう。例えば、ヒト白血球抗原 (HLA) 型やウイルスの血清型が異なることをいう。受容個体であるヒト (受容者) に、異なるヒト由来の組織を移植する場合、移植組織と受容者の免疫原性であるHLA型は互いに異なる。

[0075] 本態様でいう「その一部」とは、移植する免疫原が注射等を介して局所投与又は血管内投与できないほど大きなサイズの場合、免疫原の一部で、受容個体に局所投与又は血管内投与可能な程度のサイズのことを意味する。例えば、免疫原が特定の組織であれば、その組織を構成する1細胞～複数個の細胞塊をいう。

[0076] 本態様で用いるMSCsは、通常のMSCsであってもよいし、第1態様に記載したIL-10を過剰に発現することのできる移植用幹細胞としてのMSCsであってもよい。MSCsとして移植用幹細胞を用いる場合、本工程ではMSCsのみを投与することができる。

[0077] 本工程では、免疫原の受容個体への移植日を基準日 (0日目) として、その2日前から14日前の期間 (13日間)、好ましくは2日前から10日前の期間 (9日間)、さらに好ましくは2日前から8日前の期間 (7日間) 内にMSCsと免疫原又はその一部を受容個体内に投与する。MSCsと免疫原又はその一部は、それらを混合して、免疫原がウイルスの場合にはMSCsに感染させた後に、又は個別に、受容個体に同時に投与してもよいし、それぞれを順番に投与してもよい

。この場合、投与順序は、制限しない。MSCs投与後に免疫原又はその一部を受容個体に投与してもよいし、その逆であってもよい。ただし、両者の投与間隔は、30分以内、好ましくは10分以内である。

[0078] 上記期間内の投与回数は、少なくとも1回あればよい。通常は1～数回で足りる。ただし、原則として1日あたり1回とする。期間内の投与時期は、問わないが、例えば、期間内の投与回数が1回であれば、基準日の6～8日前の期間内が好ましい。

[0079] 受容個体への投与方法は、限定はされないが、免疫原の移植予定箇所又はその周辺に直接投与する局所投与方法か循環系を介した全身投与方法が好ましく使用され得る。局所投与方法には、皮下投与、筋肉内投与、関節内投与、骨髓内投与、組織内投与（臓器内投与、器官内投与を含む）、及び腹腔内投与等が挙げられる。循環系を介した全身投与方法には、静脈内投与、動脈内投与、及びリンパ管内投与等が挙げられる。上記投与方法は、いずれも注射による液剤投与が好ましい。静脈内注射による投与方法は、本態様において好適な投与方法である。

[0080] 本工程で1回の投与あたりにおけるMSCsの細胞数及び免疫原の量は、限定はしないが、MSCsであれば、例えば、 5×10^5 cells/kg B.W. (Body Weight)～ 2×10^6 cells/kg B.W.の範囲であればよい。また、免疫原の量は、その種類によって異なるが、ウイルスであれば 1×10^5 v.g./cell～ 1×10^6 v.g./cellの範囲、細胞であれば 1×10^2 ～ 1×10^{10} 個/kg B.W.の範囲であればよい。

[0081] (2) 第2工程

「第2工程」とは、受容個体に免疫原を導入する日の前日又は当日にMSCsを投与する工程をいう。

[0082] 本工程で投与するMSCsは、第1工程で投与したMSCsと異なるMSCsであってもよい。例えば、第1工程で通常のMSCsを投与し、本工程では第1態様に記載したIL-10を過剰に発現することのできる移植用幹細胞を投与することができる。

[0083] 免疫原導入日、すなわち基準日の前述又は当日のいずれにMSCsを投与して

もよいが、好ましくは前日投与である。基準日当日にMSCsを投与する場合、導入する免疫原とは別個に投与してもよいし、免疫原の導入と同時に投与してもよい。免疫原の導入と別個に投与する場合、MSCs投与後に免疫原を導入することが好ましい。また、免疫原の導入と同時に投与する場合、導入する免疫原がウイルスのように局所投与又は循環系を介した全身投与が可能であれば、MSCsと混合して導入することもできる。

[0084] 4-3. 効果

本態様の後天的免疫寛容誘導方法で処理した受容個体は、前処理で使用した免疫原に対して免疫寛容性が誘導される。したがって、その後、当該分野で公知の方法で免疫原を受容個体に導入することで、受容個体における導入した免疫原への免疫応答を抑制することができる。それ故、免疫原が細胞、組織、又は臓器の場合、それらの移植による受容個体内での免疫応答による拒絶反応を抑制又は回避できることから、移植後の細胞等の生存率を高め、また受容個体への生着率を増強することができる。

[0085] [比較例1]

<組換えIL-10によるMSCsの生存率の改善効果の検証>

(目的)

組換えマウスIL-10をMSCsと共に筋肉組織内に導入したときの移植細胞の生存率の改善効果を検証する。

[0086] (方法)

1. 培養細胞及び培養条件

ラット骨髄由来MSCs (SD-rat MSCs) にルシフェラーゼ発現ベクターpLucを導入して、ルシフェラーゼを安定に発現する細胞株SD-rat MSCs-Lucを樹立した。SD-rat MSCs-Lucを10% FBS (ニチレイ) 含有DMED/F-12(1:1) (GIBCO) 培地を入れたディッシュに播種して、5% CO₂存在下37°Cで培養した。以下、本明細書における比較例1~2及び実施例1~2に記載の「MSCs」は、実験に使用した「SD-rat MSCs-Luc」を意味する。

[0087] 2. マウスへの局所移植

培養後のMSCsをトリプシン処理により回収後、細胞数 5×10^6 個/ $100 \mu\text{L}$ となるようにPBSで調整し、MSCs溶液を調製した。組換えマウスIL-10 (PEPROTEC) を $0.3 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ 生理食塩水 (以下、「 $0.3 \mu\text{g}$ のIL-10」と略称する) 及び $1.0 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ 生理食塩水 (以下、「 $1.0 \mu\text{g}$ のIL-10」と略称する) に調整し、それぞれ前記MSCs溶液と混和して、NOD/Scidマウス (3ヶ月齢、♂) の左下腿に局注投与することによりMSCsを移植した。コントロールには組換えIL-10を含まないMSCs溶液 (IL-10(-)MSCs) を右下腿に局注投与した。投与から1及び4日後に同量の組換えマウスIL-10を左下腿に追加投与した。

[0088] 3. 移植したMSCsにおける生存率の検証

投与から2、4、9日後に、移植したMSCsのルシフェラーゼ発光活性をマウスの生体外から測定する *in vivo* 生体イメージング解析を行った。2%イソフルラン麻酔下にて $15\text{mg}/\text{mL}$ のルシフェリン溶液を $150\text{mg}/\text{kg}$ となるように、 $200 \sim 300 \mu\text{L}$ をマウス腹腔内に投与した。20分後のルシフェラーゼ発光量をIVIS (登録商標) Imaging System (PerkinElmer) を用いて測定し、ソフトウェア; Living Image (登録商標) 3.2を用いてROI (Region of Interest) として数値化した後、投与後の移植したMSCsの生存率を定量的に解析した。コントロールであるIL-10(-)MSCsにおけるROIを1としたときの、IL-10(+)MSCsにおける発光値の比率を算出した。

[0089] (結果)

図1に結果を示す。Aは、投与2、4日後のマウスのイメージング像 ($n=2$) を、またBは、Aのイメージング像に基づいて算出された定量値を示す。 $0.3 \mu\text{g}$ のIL-10をMSCsと共に投与した場合、2日後、4日後共にIL-10(-)MSCsと比較して生存率に大きな差は認められなかった。しかし、 $1.0 \mu\text{g}$ のIL-10をMSCsと共に投与した場合には、投与から2日後には3.2倍、4日後には1.7倍となった。この結果から、IL-10による量依存的な移植MSCsの生存率の改善が確認された。

[0090] しかし、 $0.3 \mu\text{g}$ 及び $1.0 \mu\text{g}$ のIL-10共に、投与から9日後には、MSCsの生存は確認できなかった。したがって、IL-10をMSCsと共に組織内に投与した場合

、移植されたMSCsの生存率は、IL-10の量依存的に改善し得るものの、その効果は一過的であり、生着は困難であることが明らかとなった。

[0091] [比較例 2]

<IL-10発現AAVベクターの同時投与によるMSCs生存率の改善効果の検証>

(目的)

IL-10発現AAVベクターをMSCsと共に筋肉組織内に同時投与したときのMSCsの生存率の改善効果を検証する。

[0092] (方法)

1. 組換えAAVの調製

本比較例では、組換えAAV1(rAAV1)を使用した。rAAV1は、Okadaらの方法(Okada, T., et al., 2009, Hum. Gene Ther., 20:1013-1021; Okada, T., et al., 2005, Hum. Gene Ther., 16:1212-1218)に従って調製した。

[0093] IL-10発現AAVベクター (AAV1-CAG-mIL-10-WPRE(EW) ; 以下、「AAV1-IL-10」と表記する)の調製は、まず、マウス末梢血リンパ球よりRNAを採取後、RT-PCRによりcDNAに逆転写し、そのcDNAを鋳型として、5'側にBamHIタグを有する配列番号13 (Fw:5' -CGCGGATCCATGCCTGGCTCAGCACTGCTATGCT-3')及び14 (Rv:5' -GAGGATCCTCTTAGCTTTTCATTTTGATCAT-3')からなるプライマーセットを用いて、PCRによりマウスIL-10のコード領域を組換えマウスIL-10遺伝子として増幅した。続いて、増幅産物をBamHIで切断後、pW-CAG-WPREベクター(Okada, T., et al., 2005, Hum. Gene Ther., 16:1212-1218)のBamHI部位に組み込んでAAV1-IL-10を調製した。AAV1-IL-10は、投与した組織内において持続的にIL-10を発現することができる。

[0094] 一方、IL-10に代えてLacZを含むLacZ発現AAVベクター (pAAV-LacZ ; 以下、AAV1-LacZと表記する) (Agilent Technologies)をコントロールとした。

[0095] 2. マウスへの局所移植とMSCs生存率の検証

基本的な方法は、比較例1に記載の方法に準じた。投与4日前にNOD/Scidマウス(5ヶ月齢、♂)の左右下腿に10 μ Mカルジオトキシン(Sigma-Aldrich)100 μ Lを局注投与し、筋傷害を誘発した。AAV1-IL-10及びAAV1-LacZを、5

$\times 10^8$ g. c. 及び 1×10^9 g. c. に調整し、 5×10^6 個/ $100 \mu\text{L}$ MSCs 溶液と混和して、AAV1-IL-10をマウスの左下腿に及び AAV1-LacZを右下腿に、それぞれ局注投与した。投与から9日後、in vivo生体イメージング解析によりMSCsの生存率を定量的に解析した。

[0096] (結果)

図2に結果を示す。Aは投与9日後のマウスのイメージング像を、BはAの結果に基づいて算出した定量値 ($n=4$) 示す。AAV1-IL-10を局注投与した場合であっても、投与した量に関わらず移植MSCsの生存率の改善効果は認められなかった。したがって、投与組織内でIL-10を持続的に発現させた場合でも、MSCsの生着はできないことが明らかとなった。

[0097] [実施例1]

<IL-10を細胞内で過剰発現するMSCsによるMSCs生存率の向上効果の検証>

(目的)

IL-10発現プラスミドによりMSCsにおけるIL-10の細胞内発現量を増加させたときのMSCsの生存率の向上効果、及び血清中のIL-10濃度を検証する。

[0098] (方法)

1. MSCsへのIL-10発現プラスミドDNAの遺伝子導入

マウスIL-10発現プラスミドDNA (pW-CAG-mIL-10-WPRE) 及びコントロールGFP発現プラスミドDNA (pW-CAG-EGFP-WPRE) を $2 \mu\text{g}$ 、それぞれ $100 \mu\text{L}$ の Nucleofection 溶液 (Human MSC Nucleofector kit、LONZA) / MSCs 5×10^5 個と混ぜ合わせ、Amaya Nucleofector システム (C-17モード) を用いて遺伝子導入を行った。なお、pW-CAG-mIL-10-WPREは、pW-CAG-WPREのBamHI部位に、比較例2で調製した組換えマウスIL-10遺伝子を導入して調製した。また、pW-CAG-EGFP-WPREは、pW-CAG-WPREのBamHI部位に、EGFP遺伝子を導入して調製した (Okada, T., et al., 2005, Hum. Gene Ther., 16:1212-1218)。詳細は本品添付プロトコルに従った。以下、マウスIL-10発現プラスミドDNAを導入したMSCsをpIL-10(+)MSCs、コントロールのGFP発現プラスミドDNAを導入したMSCsをpIL-10(-)MSCsとする。

[0099] 2. マウスへの局注投与及び生存率の検証

基本的には比較例1に記載の方法に準じた。上記「1. MSCsへのIL-10発現プラスミドDNAの遺伝子導入」によりMSCsに各遺伝子を導入した直後に、NOD/Scidマウス(6ヶ月齢、♀)の左下腿及び右下腿に、それぞれ 7.5×10^6 個/100 μ LのpIL-10(+)MSCs溶液及びpIL-10(-)MSCs溶液を等量ずつ局注投与した。投与から3、7、10、及び13日後にin vivo生体イメージング解析を行い、MSCsの生存率を定量的に解析した。

[0100] 3. IL-10発現解析

MSCs由来のIL-10発現の確認は、上記「1. MSCsへのIL-10発現プラスミドDNAの遺伝子導入」において遺伝子導入したMSCsの一部を前述の10% FBS含有DMED/F-12(1:1)培地に播種して、5% CO₂存在下37°Cで12日間培養後の培養上清を用いて、ELISA法(Mouse IL-10 ELISA Kit, Thermo SCIENTIFIC)により添付のプロトコルに従って行った。

[0101] 4. 血清中のIL-10濃度の測定

MSCs投与から13日後にマウス心臓より採血し、血清中のIL-10濃度を、Mouse IL-10 ELISA Kit (Thermo SCIENTIFIC)を用いて定量した。対照として、比較例2においてMSCs移植部位にAAV1-IL-10を局注投与したマウスからも同様に採血し、血清中のIL-10濃度を、同キットを用いて定量した。

[0102] (結果)

図3に結果を示す。Aは、MSCs投与から各日後におけるマウスのイメージング像を、BはAの結果に基づいて算出した定量値(n=2)を、そしてCはMSCs由来のIL-10発現量を示す。pIL-10(+)MSCsは、pIL-10(-)MSCsと比較して、投与から7日及び10日後に、それぞれ69倍及び3.4倍もの高い値を示した。一方、投与から12日後には、ルシフェラーゼのシグナル強度が確認できなかった。この結果から、MSCs内でIL-10を過剰発現させることによって、移植後のMSCsの生存率が向上し、従来方法では困難であった投与後10日間でもMSCsの生着が可能であることが示唆された。

[0103] 図4は、MSCs移植マウスにおける血清中のIL-10濃度を示す。比較例2にお

いてMSCs移植部位にAAV1-IL-10を局注投与したマウスでは、血清中のIL-10濃度が軽度（～150pg/mL）に上昇した。一方、IL-10を細胞内で発現するpIL-10(+)MSCsを移植した本実施例の2匹のマウス（No.1、No.2）では、血清中のIL-10濃度の上昇は僅かであった。一般に、血清中のIL-10濃度が上昇すると造血傷害や免疫力の低下等の弊害を生じる。したがって、細胞内でIL-10を過剰発現するMSCsを移植すれば、血清中のIL-10濃度による副作用が低く、安全性が高いことが立証された。

[0104] [実施例2]

<IL-10を過剰発現するMSCsによる生存率及び生着率の向上効果の検証>

(目的)

IL-10発現AAVベクターを用いてMSCsにおけるIL-10の細胞内発現量を増加させたときのMSCsの生存率及び生着率の向上効果を検証する。

[0105] (方法)

1. AAVベクターによるMSCsへの遺伝子導入と発現確認

組換えAAVの調製は、比較例2に記載の方法に準じた。10% FBS含有DMEM/F-12(1:1)培地を入れた24 well-plate (IWAKI) にSD-rat MSCs-Lucを 1×10^5 個/wellとなるように播種し、細胞接着後にマウスIL-10発現AAVベクターであるAAV1-IL-10又はGFP発現AAVベクターであるAAV1-CAG-EGFP-WPRE(EW)(以下、「AAV1-GFP」とする)をそれぞれ 5.0×10^{10} g.c. 含む未精製培養上清を加えて、SD-rat MSCsへの遺伝子導入を行った。5% CO₂存在下37°Cで一晩培養後、2日おきに培地交換を行い、遺伝子導入から5～7日目の2日分の培養液を回収した。遺伝子導入から7日後に、GFP発現細胞を蛍光顕微鏡(Olympus, IX71)により観察し、遺伝子導入効率を求めた。回収した培養上清中のIL-10発現量をELISA法(Mouse IL-10 ELISA Kit, Thermo SCIENTIFIC)を用いて定量した。なお、AAV1-GFPは、AAV1-CAG-WPRE(EW)のBamHI部位に、実施例1で調製したEGFP遺伝子を挿入して調製した。

[0106] 2. マウスへの局注投与及び生存率及び生着率の検証

基本的な方法は比較例1に記載の方法に準じた。上記「1. AAVベクターに

よるMSCsへの遺伝子導入と発現確認」と同様に、AAV1-IL-10又はコントロールとしてのAAV1-GFPを含む未精製培養上清を用いて、MSCsへの遺伝子導入を行った。6.0×10¹² g. c. で各AAVベクターを添加した10% FBS含有DMED/F-12(1:1)培地を1.6×10⁷細胞のMSCsが接着したT225フラスコ (Thermo SCIENTIFIC) に入れて5% CO₂存在下37°Cで5日間培養後、再度各AAVベクターを1.1×10¹³ g. c. /フラスコで加えて2日間培養を続けて遺伝子導入を行った。以下、本発明の移植用幹細胞に相当するAAV1-IL-10を導入したMSCsを「vIL-10(+)MSCs」とし、またコントロールのAAV1-GFPを導入したMSCsを「vIL-10(-)MSCs」とする。遺伝子導入後のMSCs (1.0×10⁷個) をNOD/Scid マウス (3ヶ月齢、♀5匹、♂1匹) の左下腿 (vIL-10(+)MSCs) 及び右下腿 (vIL-10(-)MSCs) にそれぞれ局注投与し、投与から3、7、18、27、31、34、42、49、54、及び67日後にin vivo生体イメージング解析を行い、MSCsの生存率を定量的に解析した。

[0107] また、移植したMSCsの生着を確認するために、投与74日後に解剖を行い、MSCsを移植した筋組織の凍結ブロックを作製して免疫組織染色を行った。MSCsに導入したルシフェラーゼに対する抗体 (rabbit anti-firefly Luciferase 抗体、1/100希釈、Abcam Plc.) を用いてDAB染色 (VECTASTAIN Elite ABC, VECTOR) を行い、続いてH&E染色を行って筋組織内に生着したMSCsを検出した。単位面積当たりのMSCs細胞数をカウントして生着率を算出した。

[0108] (結果)

1. AAVベクターによるMSCsへの遺伝子導入と発現確認

図5に結果を示す。AはvIL-10(-)MSCsへの遺伝子導入結果を、またBはvIL-10(+)MSCsでのIL-10の発現結果を示す。

[0109] 遺伝子導入は、GFP陽性細胞数に基づいて確認した。図5Aに示すように、遺伝子導入後のMSCsの多くがGFP陽性細胞であったことから、AAVベクターを用いたMSCsへの遺伝子導入は効率的に行われることが証明された。また、図5Bに示すように、vIL-10(+)MSCsの培養上清中からIL-10を検出できたことから、vIL-10(+)MSCsにおいてIL-10の高発現が可能であることが示された。

[0110] 2. マウスへの局注投与及び生存率及び生着率の検証

図6にマウスのイメージング像と移植したMSCsの生存率を示す。Aは、MSCs投与から各日後におけるマウスのイメージング像を、BはAの結果に基づいて算出した定量値 (n=5) である。投与31日後のvIL-10(+)MSCsにおけるルシフェラーゼのシグナル強度は、vIL-10(-)MSCsと比較して9.7倍も高い値を示した。さらに驚くべきことに、投与後67日目でもvIL-10(+)MSCsは、ルシフェラーゼの高いシグナルが維持されており、MSCsの生存率が著しく向上することが確認できた。以上の結果から、AAVベクターを用いてIL-10をMSCs内で持続的に発現させることにより、MSCsが移植した組織内で長期にわたって生存可能となることが立証された。

[0111] 図7は、MSCsの移植部位である筋組織への生着を示す図である。Aは、vIL-10(-)MSCsの、BはvIL-10(+)MSCsの筋組織における生着像を、そしてCは組織染色像より単位面積当たりのMSC細胞数を測定し、算出したvIL-10(-)MSCs及びvIL-10(+)MSCsの生着率を示す。

[0112] DAB染色により、vIL-10(+)MSCsは、Bの破線円内における濃い斑点で示されるように、筋線維内膜及び外膜に生着していることが立証された。またCの結果から本発明の移植用幹細胞であるvIL-10(+)MSCsは、コントロールのvIL-10(-)MSCsと比べて、生着効率が2倍以上向上し、有意な差 ($p < 0.005$) があることが立証された。

[0113] [実施例3]

<IL-10発現AAVベクターを導入したMSCsのイヌへの移植実験における生存率及び生着率改善の検証>

(目的)

マウスにおいて立証されたAAV1-IL-10導入MSCsの生存生着率の向上効果をイヌにおいて検証する。

[0114] (方法)

1. イヌ骨髄由来MSCsの調製

DLA (dog leukocyte antigen) の一致するビーグル犬の雌雄ペアからドナー犬、レシピエント犬を選出した。図8に図示するように、ドナー正常犬の

前肢左右上腕より骨髓液2mLを採取した。20U/mL ヘパリン含有2mL RPMI-1640 (life technologies) にて培養した。Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) による密度勾配にて単球を単離した後 (1.3×10^8 個)、増殖能の高いCD271陽性分画 (CD271 (LNGFR)-PE & Anti-PE Micro Beads 含有MSC Research Tool Box-CD271 (LNGFR) (Miltenyi Biotec) をイムノ磁気ビーズ (MACS (登録商標) Columns and MACS Separators, Miltenyi Biotec) を用いて濃縮した (CD271陽性細胞 = $1.4 - 5 \times 10^6$ 個)。詳細な方法は、添付のプロトコルに従った。回収した細胞は6 well plate (IWAKI) に播種し、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) を添加したnonhaematopoietic (NH) Expansion Medium (MiltenyiBiotec) を用いて培養した。3日毎に培地を交換し、4回の継代を経てT225フラスコに10枚分、増殖させた。詳細は、Kasahara, Y., et al., 2012, Mol Ther., 20(1):168-77に従って調製した。CD271⁺ MSCsにpolybrane (8 μ g/mL) 存在下でルシフェラーゼ発現レンチウイルスベクター (200 μ L) を感染させて、NH Expansion Medium中にて(T225フラスコ)、32°Cで2日間培養し、遺伝子を導入した。続いて、AAV1-GFP又はAAV1-IL-10 (それぞれ 8.0×10^{12} g.c.) をNH Expansion Medium中にて (T225フラスコ) 37°Cで3日間の培養を二度行った。MSCsにおけるルシフェラーゼ発現はルシフェラーゼ活性測定 (Bright-Glo Luciferase Assay System, Promega) により、またIL-10発現はELISA解析 (canine IL-10 ELISA Kit, Thermo SCIENTIFIC) により、確認した。両者とも、測定にはAppliskan (Thermo Scientific) (luminescence, 450nm, shake)を用いた。

[0115] 2. イヌへの同種移植及び移植細胞の生存率及び生着率の検証

移植細胞のレシピエントとしての患犬を作製した、正常ビーグル犬 (4歳3ヶ月齢、♂) に筋障害を誘導するため、MSCs移植の5日前に50 μ Mカルジオトキシン1.0 mLを左右前脛骨筋に局注投与して、患犬とした。続いて、上記「1. イヌ骨髓由来MSCsの調製」において遺伝子導入したMSCsをトリプシン処理にて回収後、 $2.4 \times 10^7 \sim 2.7 \times 10^7$ cells/2mL PBSに調整して、2%イソフルラン (日本薬局方) 麻酔下で患犬の左前脛骨筋にvIL-10(-)MSCsを、及び右前

脛骨筋にvIL-10(+)MSCsを局所移植した。この間、免疫抑制剤は使用していない。1ヶ月後、図10のAに示すように移植した左右前脛骨筋組織を生検して4部位に分断後、POLYTRONホモジナイザー(150~180min⁻¹)を用いて筋抽出液を得た。MSCsの生着を筋抽出液のルシフェラーゼ活性(Bright-Glo Luciferase Assay System)より解析した。測定値は、組織タンパク質量(Pierce(登録商標)BCA Protein Assay Kit, Thermo scientific)で補正した。組織中のIL-10量は、筋抽出液を用いてELISA解析(canine IL-10 ELISA Kit)により算出した。

[0116] 移植を行った筋組織は、生検後に一部を凍結ブロックとして切片作成し、病理解析を行った。MSCsに導入したマーカーであるルシフェラーゼに対する抗体(rabbit anti-firefly Luciferase 抗体、1/100希釈、Abcam Plc.)を用いて実施例2と同様の方法でDAB染色(VECTASTAIN Elite ABC, VECTOR)を行い、続いてH&E染色を行って筋組織内に生着したMSCsを検出した。さらに、移植細胞の局在を顕微鏡(Leica, DMR)にて観察した。また、rabbit anti-firefly Luciferase 抗体(1/50希釈、Abcam Plc.)、及びmouse anti-dystrophin抗体(1/100希釈、NCL-DYS3, Leica)、二次抗体としてAlexa 594-conjugated anti-rabbit IgG antibodies、(1/250希釈、Life technologies)を用いて免疫組織染色を行い、核染色も兼ねたマウント剤、Vectashield Mounting Medium with DAPI(Vector Laboratories)を用いて封入した。移植細胞の局在を蛍光顕微鏡(Olympus, IX71)にて観察した。

[0117] (結果)

図9~11に結果を示す。

[0118] 図9は、移植30日後のvIL-10(+)MSCsの移植部位である右前脛骨筋組織への生着像である。DAB染色された破線円内及び矢印で示す濃い斑点は、筋線維内膜及び外膜に生着したvIL-10(+)MSCsを示す。

[0119] 図10Aは、MSCsを移植した左右前脛骨筋組織における4部位の位置を示す図である。図10Bは、移植30日後の左右前脛骨筋組織における各部位のMSCsの生存率及び組織内IL-10濃度を示す。図中、(a)及び(b)は、それぞれ

ルシフェラーゼ活性に基づくvIL-10(-)MSCs（左前脛骨筋組織）及びvIL-10(+)
MSCs（右前脛骨筋組織）におけるMSCsの生存率を示す。また、（c）及び（
d）は、それぞれvIL-10(-)MSCs（左前脛骨筋組織）及びvIL-10(+)
MSCs（右前脛骨筋組織）における各部位の筋組織中のIL-10濃度を示す。MSCsの移植部
位であるTA-2では、vIL-10(+)
MSCsがvIL-10(-)MSCsと比較して2倍以上の生存
率を有することが示された。また、vIL-10(-)MSCsを移植した場合でも筋組織
内のIL-10濃度は増加したが、vIL-10(+)
MSCsを移植した場合には、高濃度のI
L-10が移植部位のみならずその周辺部位でも確認できた。なお、血清中のIL-
10濃度の上昇は、認められなかった（図示せず）。これらの結果は、実施例
2で立証したマウスにおける結果と矛盾がなく、本発明の移植用幹細胞であ
るvIL-10(+)
MSCsは、イヌにおいても移植後の高い生存率と生着率を有するこ
とが立証された。すなわち、生物種を問わず、有効であることが示唆された
。

[0120] 図11は、非分化誘導MSCsの生着及び筋線維形成を示す。Aは筋組織中にお
けるMSCsの病理像を、またBはMSCsの筋管細胞とのin vitro融合能を示す。vI
L-10(+)
MSCsをレシピエント犬の右前脛骨筋に二回投与し、長期観察を行った
結果、Aで示すように、移植したvIL-10(+)
MSCsが炎症部位に生着しているこ
とが示された（破線円内矢印）。また、Aにおいて、矢頭は新たに形成された
筋線維を示す。さらに、Bで示すように、in vitroにおいてMSCsと筋芽細胞と
の融合（破線内の明るい細胞）を確認することができた。これらの結果は、本
発明の移植用幹細胞を用いて、IL-10を持続的に発現させて長期間の筋組織に
生着することで、周辺の筋芽細胞と融合した新たな筋線維の再形成が可能で
あることを示している。なお、造血障害や腫瘍形成等の有害事象は認められ
なかった。

[0121] [実施例4]

<MSCsを利用した後天的免疫寛容誘導の検証（1）>

（目的）

MSCsを用いた前処理により受容個体に導入する免疫原に対して免疫寛容が

誘導されることをイヌで検証する。

[0122] (方法)

基本的な方法は、実施例3に記載の方法に準じて行った。

[0123] 1. 免疫寛容誘導手順

本発明の免疫寛容誘導方法に基づいて、以下の手順で免疫寛容誘導を行った。まず、レシピエントに免疫原としてAAV9を導入することとし、この投与日を基準日として0日目とした。次に、基準日の8日前に免疫寛容誘導方法の第1工程として、MSCsと免疫原であるAAV9を静脈内投与した。対照用として、AAV9のみ又はMSCsのみを静脈内投与した。続いて、基準日の前日に免疫寛容誘導方法の第2工程として、MSCsを静脈内投与した。対照用は、投与なしとした。基準日に、免疫原であるAAV9を局所投与により導入した。導入したAAV9は、ルシフェラーゼ遺伝子を発現する。対照用として、AAV9を含まないPB Sバッファのみを導入した。導入4週間後に生検を行った。

[0124] 2. イヌ骨髄由来MSCsの調製

基本的な方法は、実施例3に準じた。

[0125] 3. AAV9-Lucの調製

本実施例で導入及び投与する免疫原のルシフェラーゼ発現AAVベクター (AAV9-CAG-Luc: 本明細書では、しばしば「AAV9-Luc」と表記する) は、比較例2の「1. 組換えAAVの調製」に記載の方法に基づいて調製した。

[0126] AAV9-Lucの調製は、Ohshima S., et al., 2009, Mol Ther, 17(1): 73-80、又はShin J.H., et al., 2011, Gene Ther, 18: 910-919に記載の方法に従った。AAV9-Lucは、投与した組織内において持続的にルシフェラーゼを発現することができる。

[0127] 4. 局所投与による免疫寛容誘導の検証

レシピエントには、正常ビーグル犬(同腹の2ヶ月齢、♂又は♀)を用いた。上記「1. 免疫寛容誘導手順」に従い、免疫寛容誘導のため、基準日の8日前に 4×10^6 cells (1×10^6 cells/kg B.W.)のMSCsとAAV9-Luc溶液2mLを前脛骨筋に注射器を用いて局所投与した(MSCs+AAV)。また、対照として、AAV9-Lu

cのみ (Cont-AAV) 及びMSCsのみ (Cont-MSCs) を投与した。基準日前日に、MSCs+AAV及びCont-MSCsの個体に 1.8×10^6 cells/kg B.W. でMSCsを投与した。基準日には、MSCs+AAV及びCont-AAVの個体に、AAV9-Lucを1カ所あたり 1×10^{12} v.g. (液量2mL)で局所投与にて2か所、またCont-MSCsの個体にはPBSバッファのみを2mLで局所投与にて2か所、注射器を用いて前脛骨筋に導入した。基準日から4週間後に、導入箇所である前脛骨筋を生検した。ルシフェラーゼに対する抗体 (rabbit anti-firefly Luciferase 抗体、1:2000希釈、Abcam Plc.)、及び二次抗体としてのAlexa 594-conjugated anti-rabbit IgG antibodies (1:1000 希釈、life technologies)を用いて免疫組織染色を行い、ルシフェラーゼの発現を蛍光顕微鏡 (Olympus, IX71) にて観察した。

[0128] (結果)

図12に結果を示す。AはCont-AAVを、BはMSCs+AAVを、そしてCはCont-MSCsを示す。本発明の免疫寛容誘導方法で処理を行ったMSCs+AAVでは、免疫原のAAV9におけるマーカー遺伝子であるルシフェラーゼの発現が認められた (B)。一方、AAV9のみで前処理し、MSCsによる免疫寛容誘導処理を行っていないCont-AAVでは、ルシフェラーゼの発現は見られなかった (A)。AAV9-Lucを投与又は導入していないCont-MSCsでもルシフェラーゼの発現は見られなかった (C)。

[0129] これらの結果は、本発明の方法で免疫誘導処理を行った個体では、免疫原であるAAV9-Lucに対する免疫寛容性が誘導され、AAV9-Lucの導入4週間後も免疫応答によって導入したAAV9-Lucが排除されていないことを示している。

[0130] [実施例5]

<MSCsを利用した後天的免疫寛容誘導の検証 (2)>

(目的)

本発明の後天的免疫寛容誘導方法における免疫原の導入は、静脈内導入であっても局所導入と同様に効果が得られることを検証する。

[0131] (方法)

1. 免疫寛容誘導手順

基本的な手順は、実施例4の手順に準じた。なお、本実施例では、免疫原としてAAV9-Luc又はAAV- μ Dysを導入した。

[0132] 2. ヒト由来MSCs

ヒト由来骨髄由来細胞 (JCR Pharmaceuticals) を購入後、拡大培養して用いた。

[0133] 3. AAV9- μ Dysの調製

導入及び投与するAAV9- μ Dysは、比較例2の「1. 組換えAAVの調製」に記載の方法に基づいて調製した。

[0134] マイクロジストロフィン発現AAVベクター (AAV9-CMV- μ Dys ; 本明細書では、しばしば「AAV9- μ Dys」と表記する) の調製は、実施例4の3に記述のAAV9-Lucの調製に記載の方法に準じた。マイクロジストロフィンは、AAVベクターに組み込み可能なように開発されたジストロフィン遺伝子の短縮型で、ジストロフィンと同機能を有する。AAV9- μ Dysは、投与した組織内において持続的にマイクロジストロフィンを発現することができる。

[0135] 4. 静脈内導入による免疫寛容誘導の検証

レシピエントには、11週齢の同腹の、正常ビーグル犬 (♂) 2頭、又はデュシェンヌ型筋ジストロフィー患犬 (♂) (CXMD_J) 1頭を用いた。CXMD_Jは、ゴールデンレトリバーの自然発症デュシェンヌ型筋ジストロフィー患犬 (GRMD) の精子を海外から輸入し、独立行政法人国立精神・神経医療研究センター (日本) でビーグル犬に掛け合わせて繁殖及び維持している雑種である (Shimatsu Y. et al., 2005, Acta Myol vol24(2): 145-54; Yugeta N. et al., 2006, BMC Cardiovasc Disord, 6: 47; Kobayashi M et al., 2009, Muscle Nerve, 40(5): 815-26)。

[0136] 上記「1. 免疫寛容誘導手順」に従い、免疫寛容誘導のため、基準日の8日前に 1×10^6 cells/kg B.W. のMSCsとAAV9-Lucを正常ビーグル犬に (MSCs+AAV-Luc)、また 1×10^6 cells/kg B.W. のMSCsとAAV9- μ Dysを患犬に (DMD/MSCs+AAV- μ Dys)、それぞれ3mLを静注した。対照として、AAV9-Lucのみ (Cont-AAV) を投与した。AAVはそれぞれ 5×10^5 v.g./cellとした。基準日前日に、MSCs+AA

V-Luc及びDMD/MSCs+AAV- μ Dysの個体に 2×10^6 cells/kg B.W.のMSCsを投与した。基準日には、MSCs+AAV-Luc及びCont-AAVの個体にAAV9-Lucを 2×10^{12} v.g./kg B.W.で、またDMD/MSCs+AAV- μ DysにはAAV9- μ Dysを 2×10^{12} v.g./kg B.W.で、それぞれ3mLを静脈内に導入した。基準日から4週間後に、側頭筋を摘出して生検した。ルシフェラーゼに対する抗体 (rabbit anti-firefly Luciferase 抗体、1:2000希釈、Abcam Plc.)及びジストロフィンに対する抗体 (mouse anti-dystrophin抗体、1:50希釈、NCL-DYS3, Leica)、及び二次抗体としてのAlexa 594-conjugated anti-rabbit IgG antibodies, (1:1000 希釈、life technologies)を用いて免疫組織染色を行い、核染色も兼ねたマウント剤、Vectashield Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories)を用いて封入した。ルシフェラーゼ又はマイクロジストロフィンの発現を蛍光顕微鏡 (Olympus, IX71) にて観察した。

[0137] (結果)

図13に結果を示す。AはCont-AAVを、BはMSCs+AAV-Lucを、そしてCはDMD/MSCs+AAV- μ Dysを示す。本発明の免疫寛容誘導方法で処理を行ったMSCs+AAV-Lucでは、実施例4と同様にルシフェラーゼの発現が見られた (B)。一方、AAV9のみで前処理し、MSCsによる免疫寛容誘導処理を行っていないCont-AAVでは、ルシフェラーゼの発現は見られなかった (A)。これらの結果から、免疫寛容誘導処理による免疫原の導入は、局所導入に限らず、静脈内導入のような循環系を介した全身投与であっても同様の効果が得られることが立証された。

[0138] また、DMD/MSCs+AAV- μ Dysにおいても、ルシフェラーゼを投与したMSCs+AAV-Lucと同様に、マイクロジストロフィンの発現が確認された (C)。この結果は、免疫原であるAAV9- μ Dysに対する免疫寛容性が誘導され、AAV9- μ Dysの導入4週間後であっても免疫応答によって導入したAAV9- μ Dysが排除されていないことを示している。

[0139] [実施例6]

<後天的免疫寛容誘導方法による遺伝子治療の検証>

(目的)

本発明の後天的免疫寛容誘導方法を用いて、AAV9- μ Dysを導入した個体における遺伝子治療効果について検証する。

[0140] (方法)

1、各種イヌの準備

11週齢の同腹の、正常ビーグル犬 (Normal)、筋ジストロフィー患犬 (DMD)、及びその患犬に本発明の後天的免疫寛容誘導方法を用いてAAV9- μ Dysを導入した治療患犬 (DMD/MSCs+AAV- μ Dys) を準備した。DMDは、前述のCXMD_J患犬、またDMD/MSCs+AAV- μ Dysは、実施例5で作製したAAV9- μ Dysを導入患犬である。

[0141] 2. 遺伝子治療効果の検証 (1)

各イヌを用いて15m走を行わせ、走行タイムを測定した。DMDについては、各週齢の個体5頭について1回のみ測定した。Normal及びDMD/MSCs+AAV- μ Dysについては、1個体あたり4回測定し、その平均タイムを算出した。

[0142] 3. 遺伝子治療効果の検証 (2)

筋ジストロフィーの病態評価は、独立行政法人国立精神・神経医療研究センター (日本) で使用されているGrading Score (ver.10)に従った。このGrading Scoreでは、筋ジストロフィーに関する、食事・嚥下、飲水、流涎、嚥下障害、異常発声、横臥位起き直りテスト、playfulness、歩様、後肢歩行テスト、座位姿勢、側頭筋委縮、舌下の腫大、巨舌、及び大腿筋の14項目の病態に関して、各項目中で規定した状態のいずれに該当するかを選択し、その状態に予め割り振られたスコアを合計して、スコアリングした。スコアが大きいほど、症状が重いことを示す。病態評価は、一か月に一度行った。

[0143] (結果)

15m走の結果を図14に、また筋ジストロフィーの病態評価として行ったGrading Scoreの推移を図15に示す。

[0144] 図14から、遺伝子治療未処理の筋ジストロフィー患犬 (DMD) では、いずれの週齢でも正常個体 (Normal) よりも走行タイムが遅く、運動機能に障害を

生じていることが示された。一方、本発明の後天的免疫寛容誘導方法を用いて免疫寛容誘導処理を行い、AAV9- μ Dysを導入した筋ジストロフィー治療患犬（DMD/MSCs+AAV- μ Dys）では、DMDの走行タイムと比較して、正常個体の走行タイムに近似した。また、この効果は、AAV9- μ Dysの導入後17週目にも維持された。

[0145] 筋ジストロフィーの病態評価の結果を図15に示す。図15から、遺伝子治療未処理の筋ジストロフィー患犬（DMD1及びDMD2）では、いずれも月齢を重ねるごとに症状が進行し、重症化していった。一方、本発明の後天的免疫寛容誘導方法を用いてAAV9- μ Dysを導入した筋ジストロフィー治療患犬（DMD/MSCs+AAV- μ Dys）では、月齢を重ねてもDMDと比較して症状の進行が非常に緩やかであった。

[0146] 以上の結果は、本発明の後天的免疫寛容誘導方法でレシピエントを処理することにより、導入したAAV9- μ Dysが免疫応答により排除されることなく長期にわたり遺伝子治療効果が維持されることを示している。

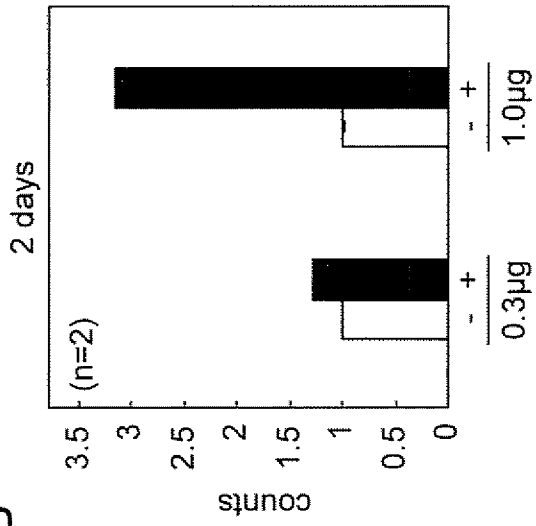
[0147] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

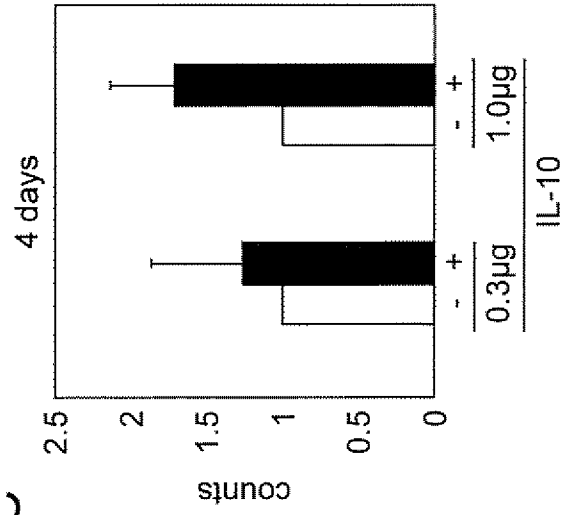
- [請求項1] インターロイキン-10 (IL-10) を過剰に発現することのできる間葉系幹細胞からなる移植用幹細胞。
- [請求項2] 前記IL-10の過剰発現が外因性のIL-10発現システムによる、請求項1に記載の移植用幹細胞。
- [請求項3] 前記IL-10発現システムがプラスミドベクター又はウイルスベクターである、請求項2に記載の移植用幹細胞。
- [請求項4] 間葉系結合組織、中枢神経系又は肝臓の再構築用である、請求項1～3のいずれか一項に記載の移植用幹細胞。
- [請求項5] IL-10を過剰発現可能なIL-10発現システムを間葉系幹細胞に導入する工程を含む、移植用幹細胞の製造方法。
- [請求項6] 前記IL-10発現システムがプラスミドベクター又はウイルスベクターである、請求項5に記載の移植用幹細胞の製造方法。
- [請求項7] IL-10を過剰発現可能なIL-10発現システムを有効成分とする、間葉系幹細胞生着増強剤。
- [請求項8] 前記IL-10発現システムがプラスミドベクター又はウイルスベクターである、請求項7に記載の間葉系幹細胞生着増強剤。
- [請求項9] 後天的免疫寛容誘導方法であって、
受容個体に免疫原を導入する日の2日前～14日間の期間内に間葉系幹細胞及び前記免疫原と同一免疫原性を有する免疫原又はその一部を少なくとも1回投与する第1工程、及び
受容個体に免疫原を導入する日の前日又は当日に間葉系幹細胞を投与する第2工程を含む前記方法。
- [請求項10] 前記間葉系幹細胞が請求項1～4のいずれか一項に記載の移植用幹細胞である、請求項9に記載の方法。
- [請求項11] 前記免疫原がウイルス、細胞、組織又は臓器である、請求項9又は10に記載の方法。

[1]

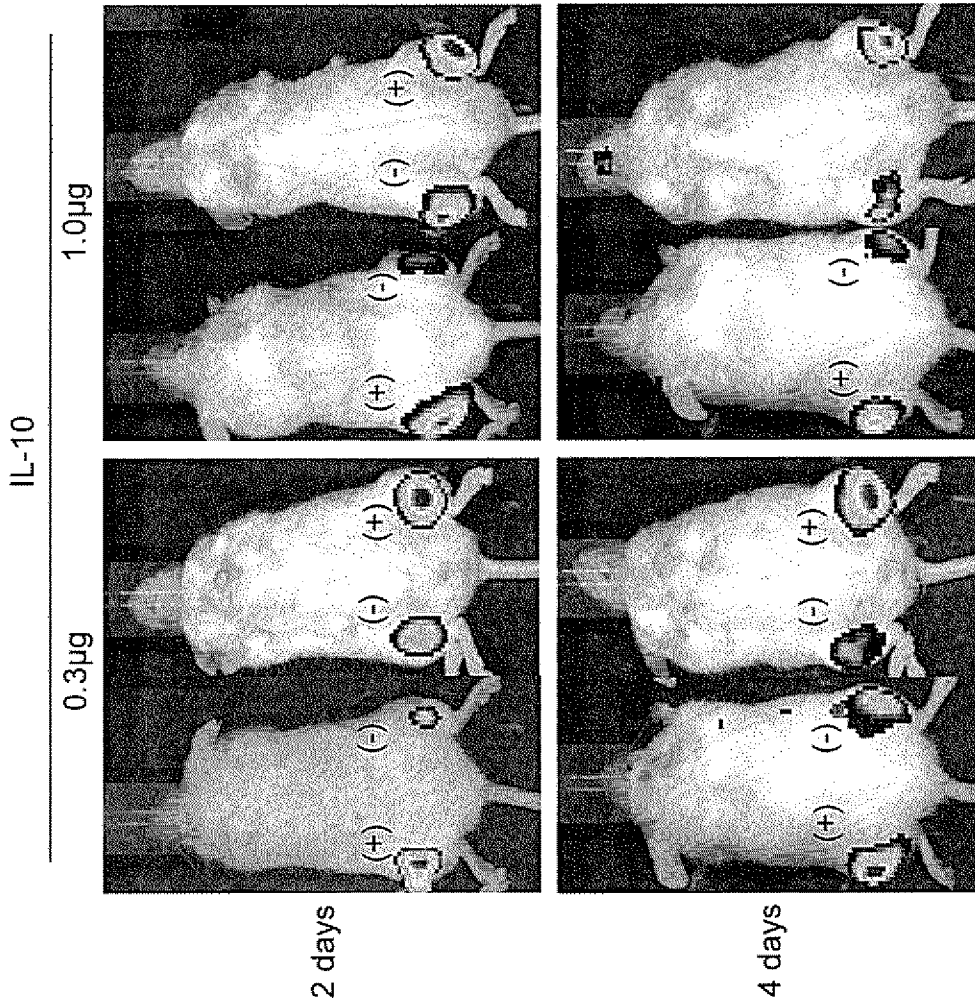
B



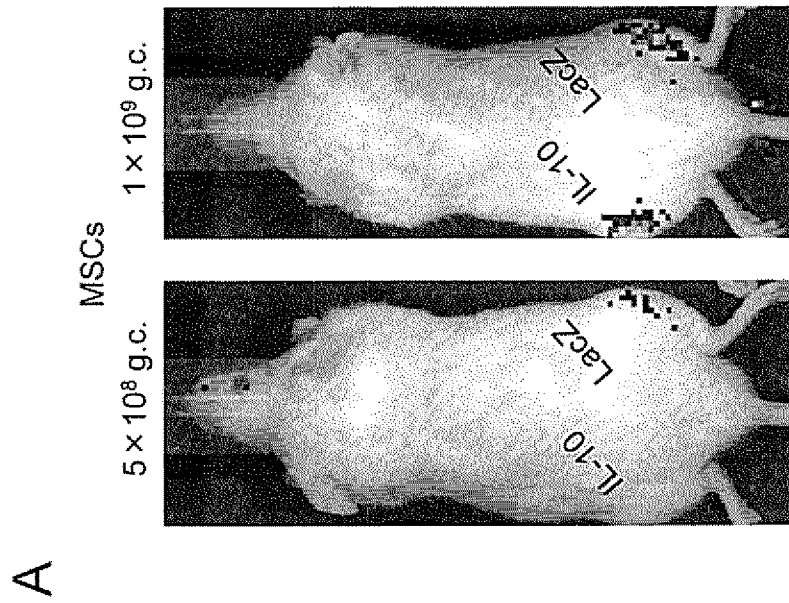
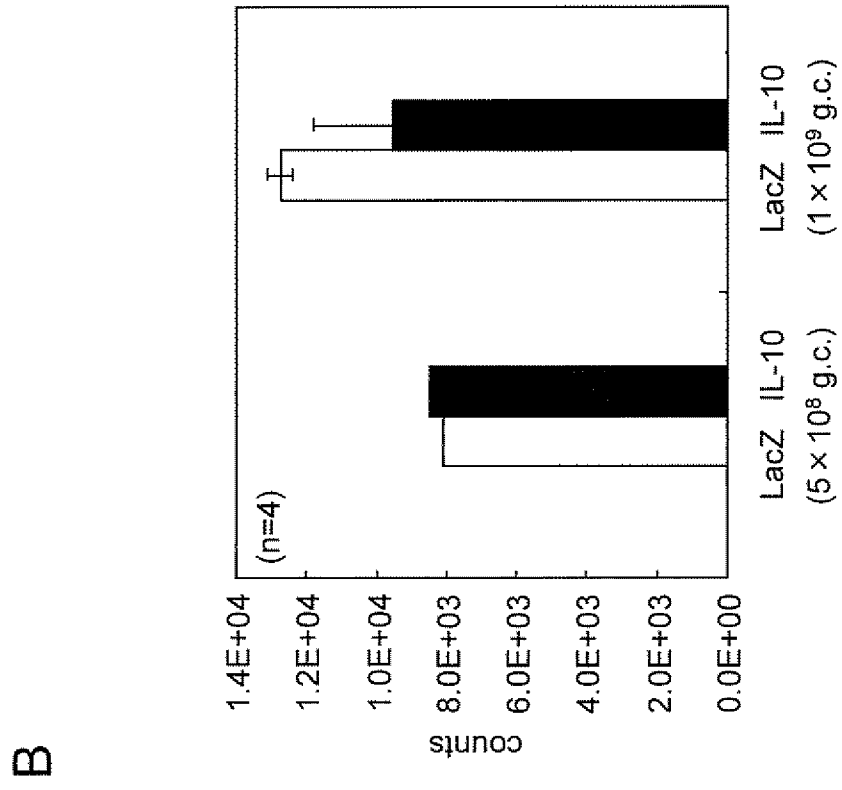
C



A

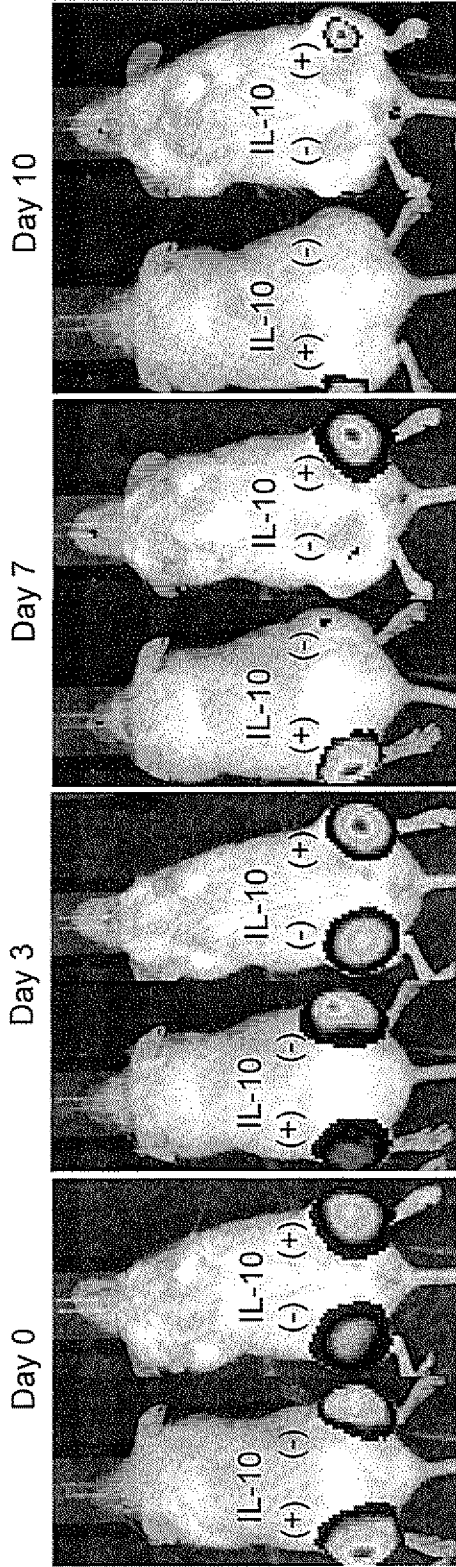


[2]

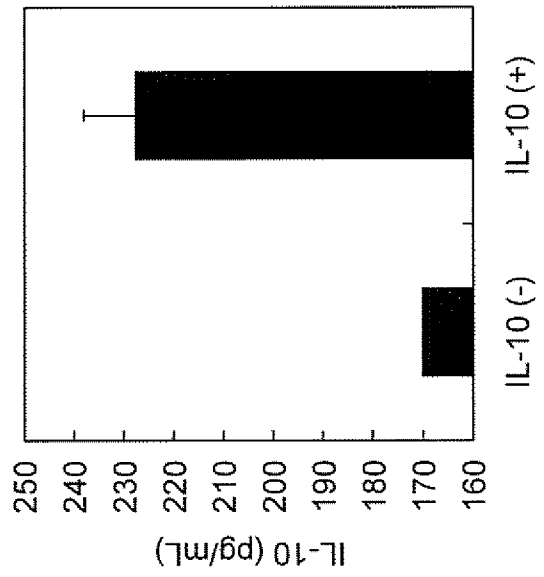


[図3]

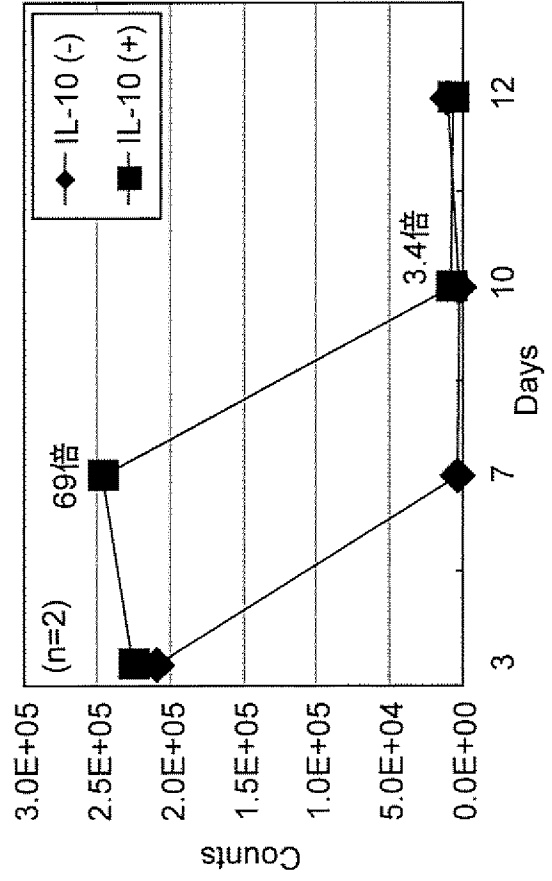
A

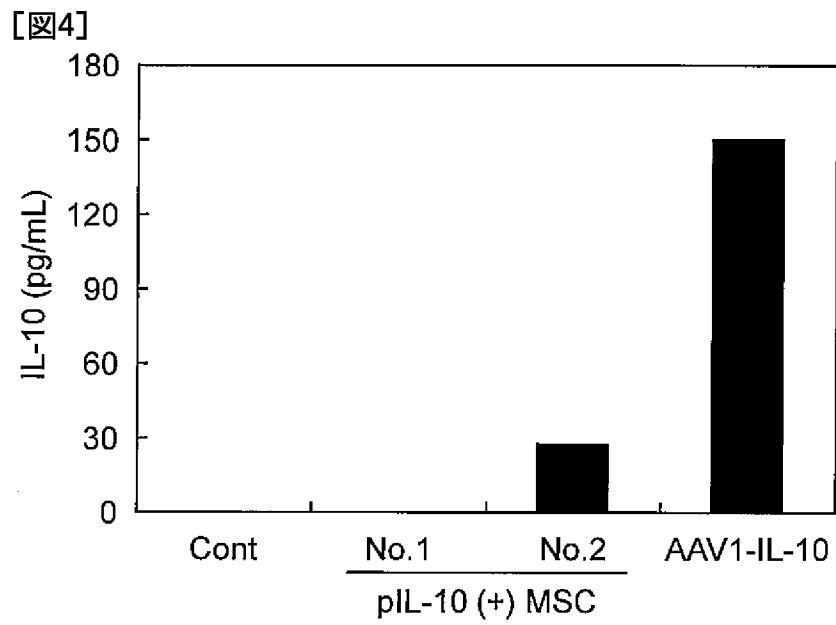


B

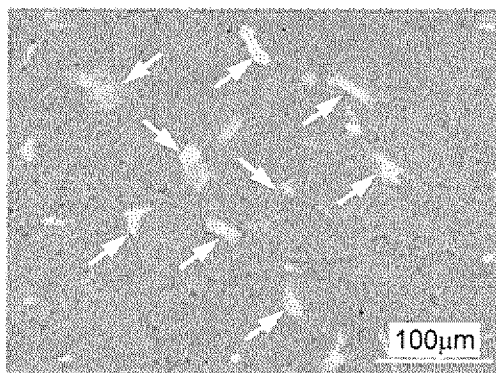


C

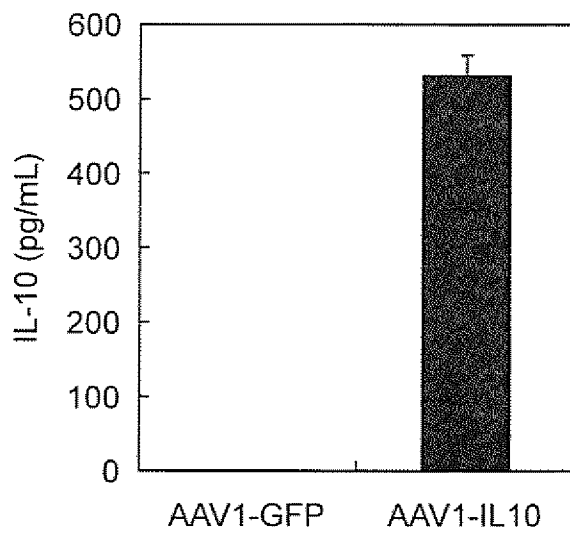


[5]

A

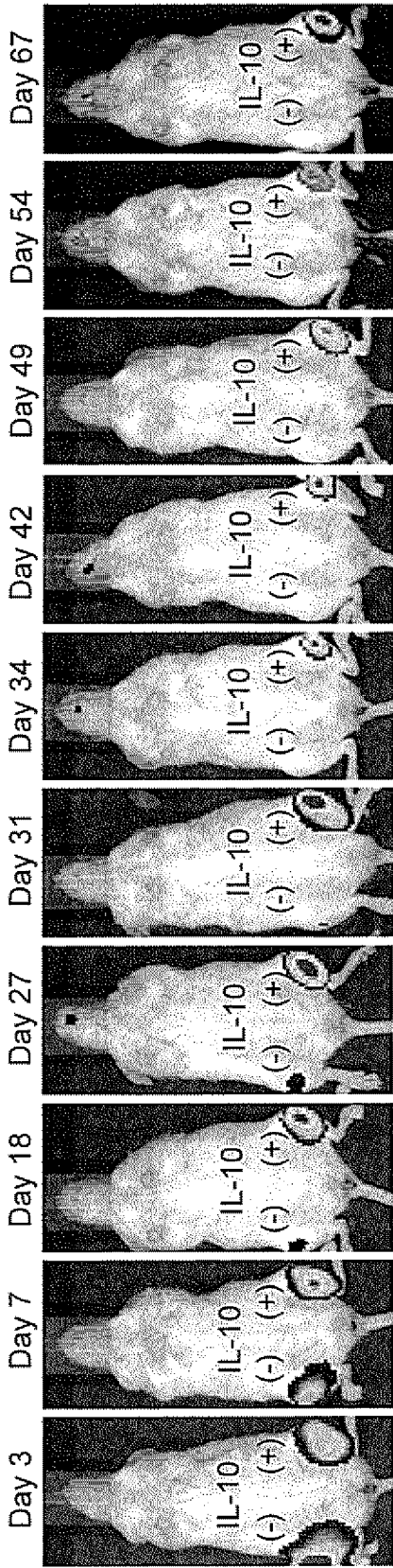


B

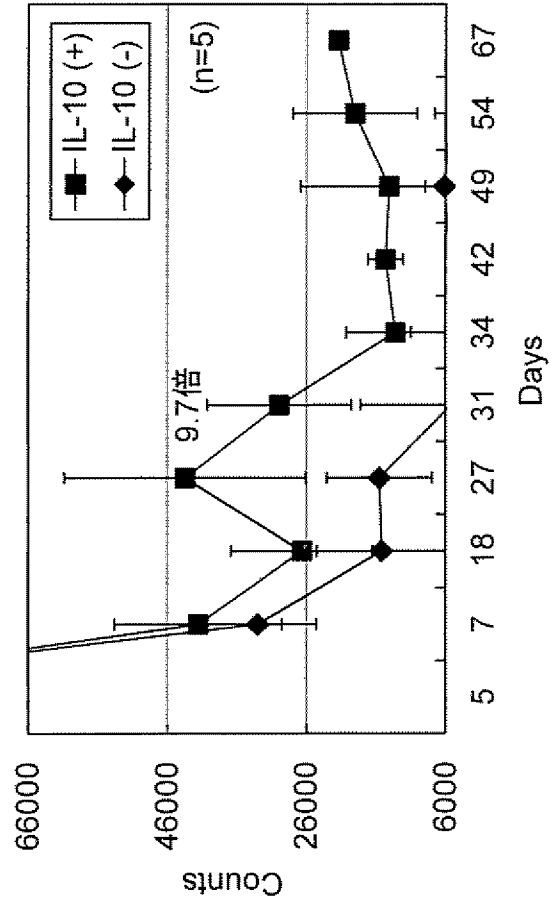


[図6]

A



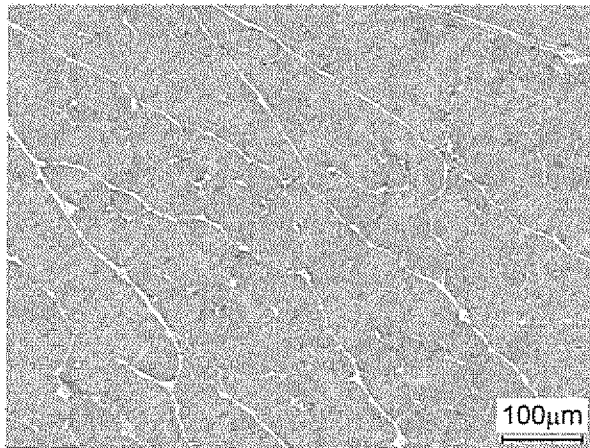
B



[図7]

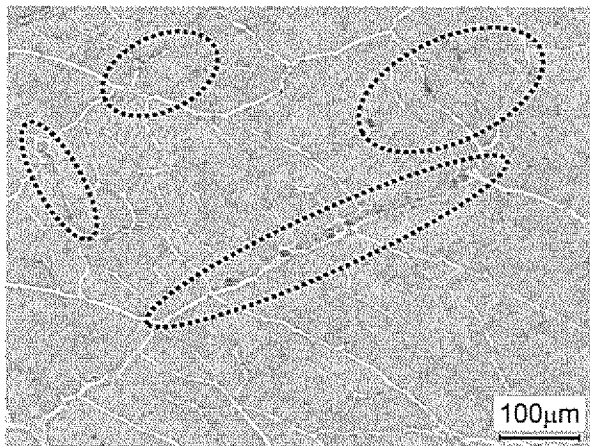
A

vIL-10(-)MSCs

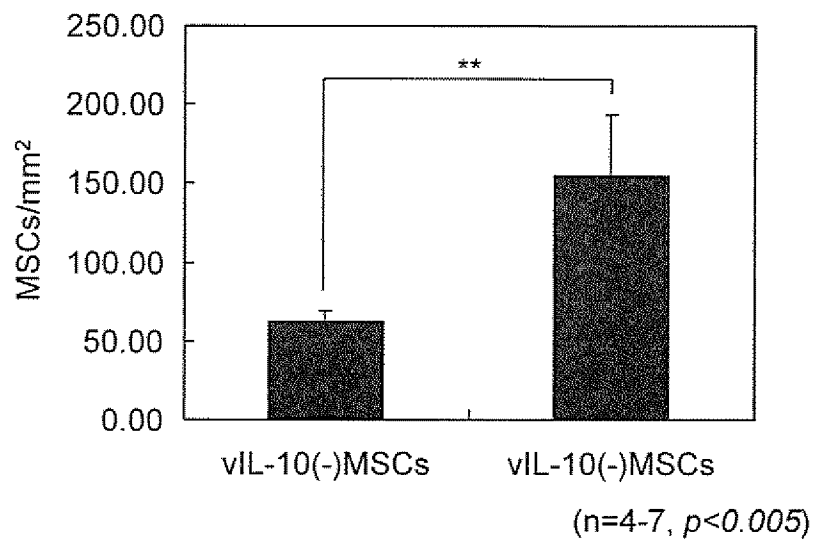


B

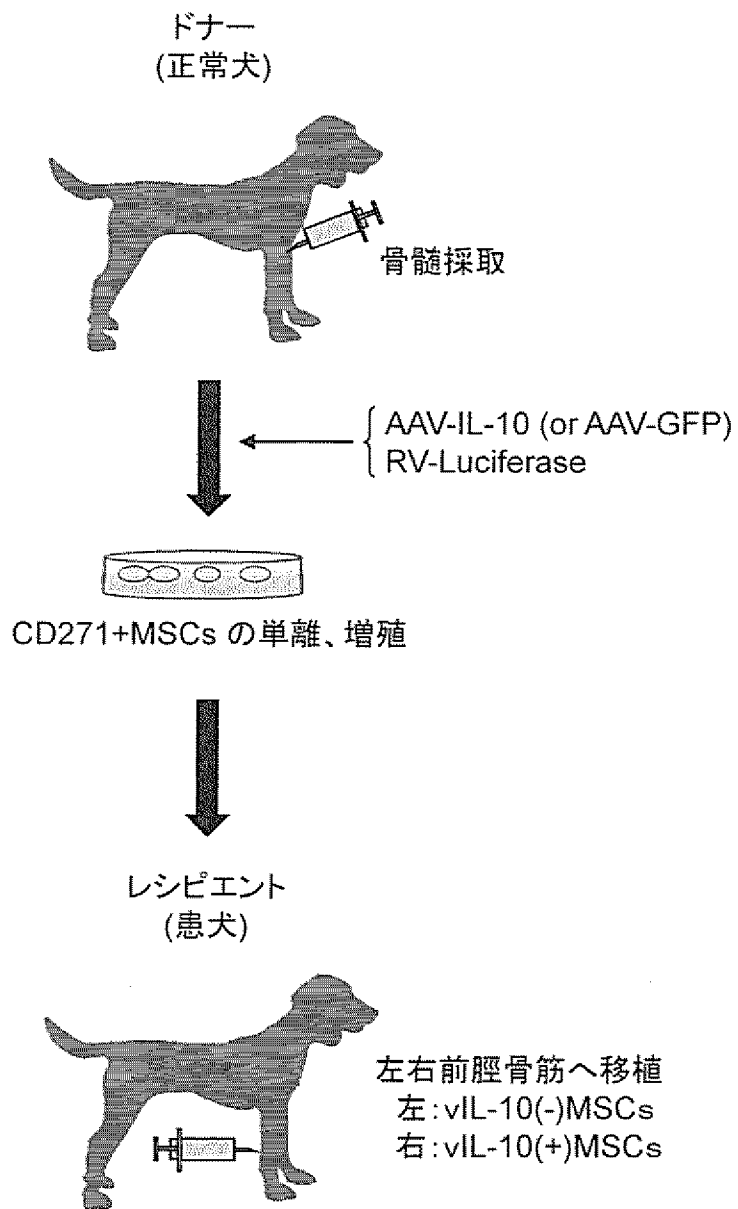
vIL-10(+)MSCs



C

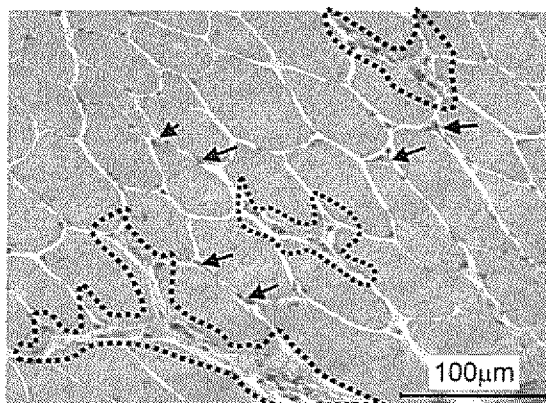


[図8]

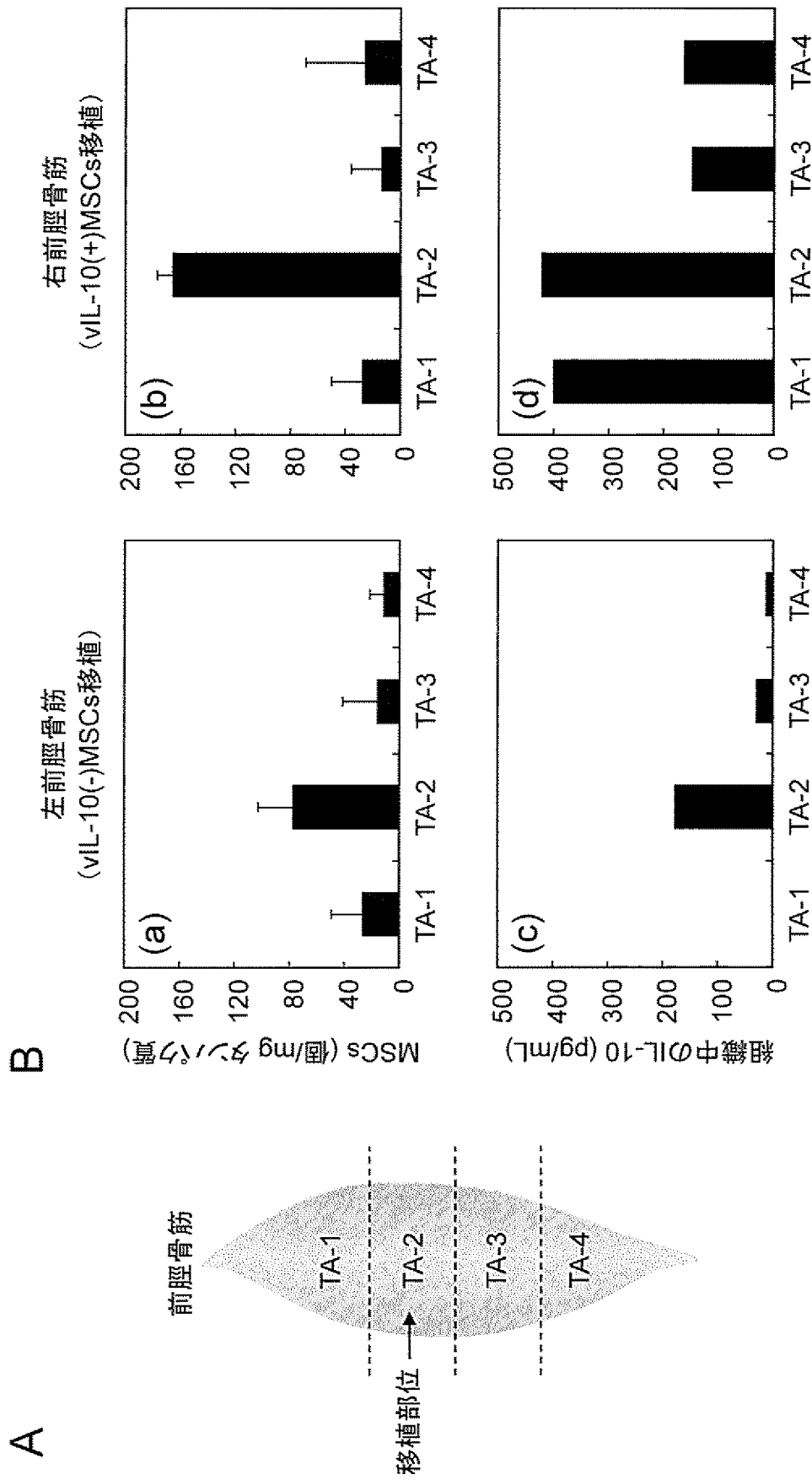


[図9]

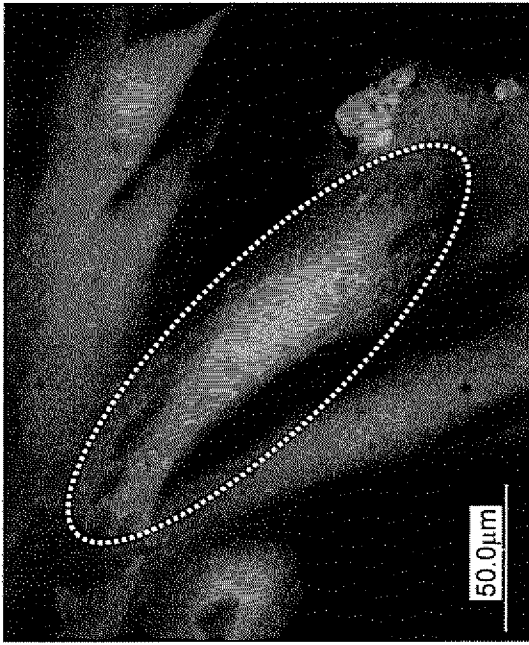
IL-10(+) MSCs



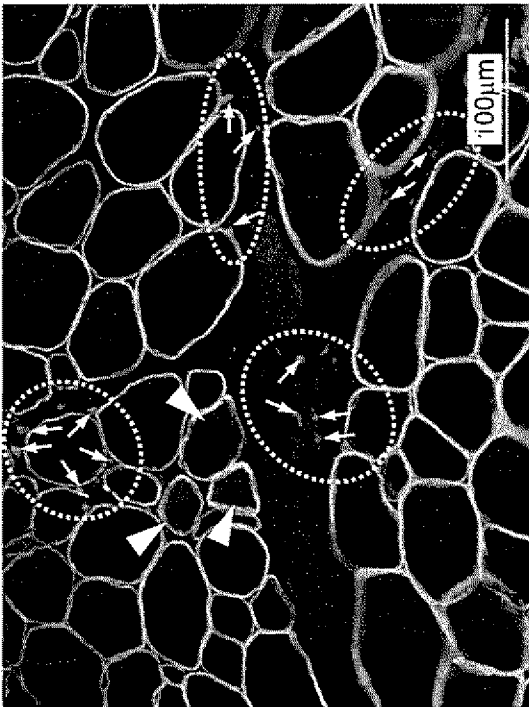
[図10]



[図11]



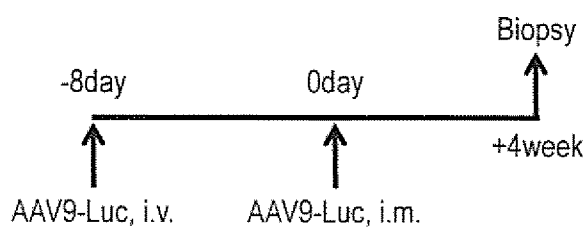
B



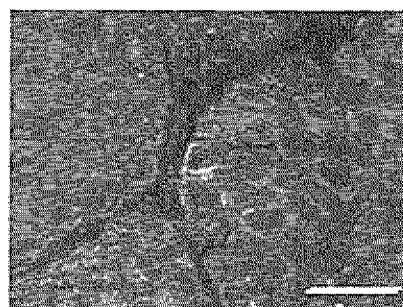
A

[圖12]

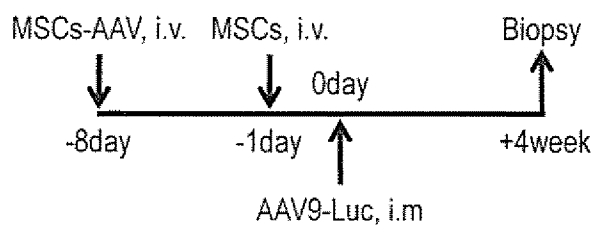
A



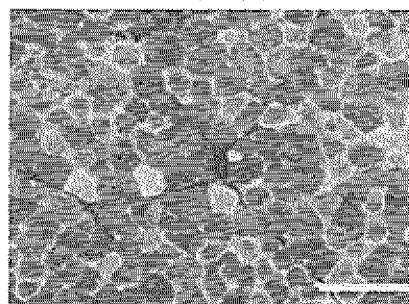
anti Luc



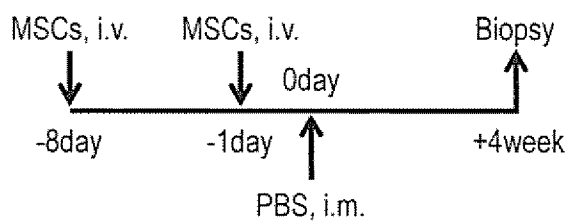
B



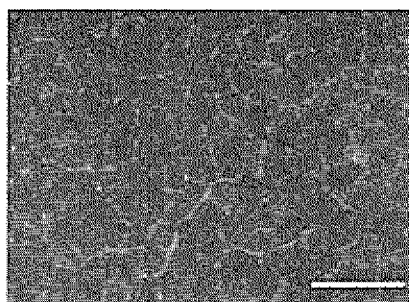
anti Luc



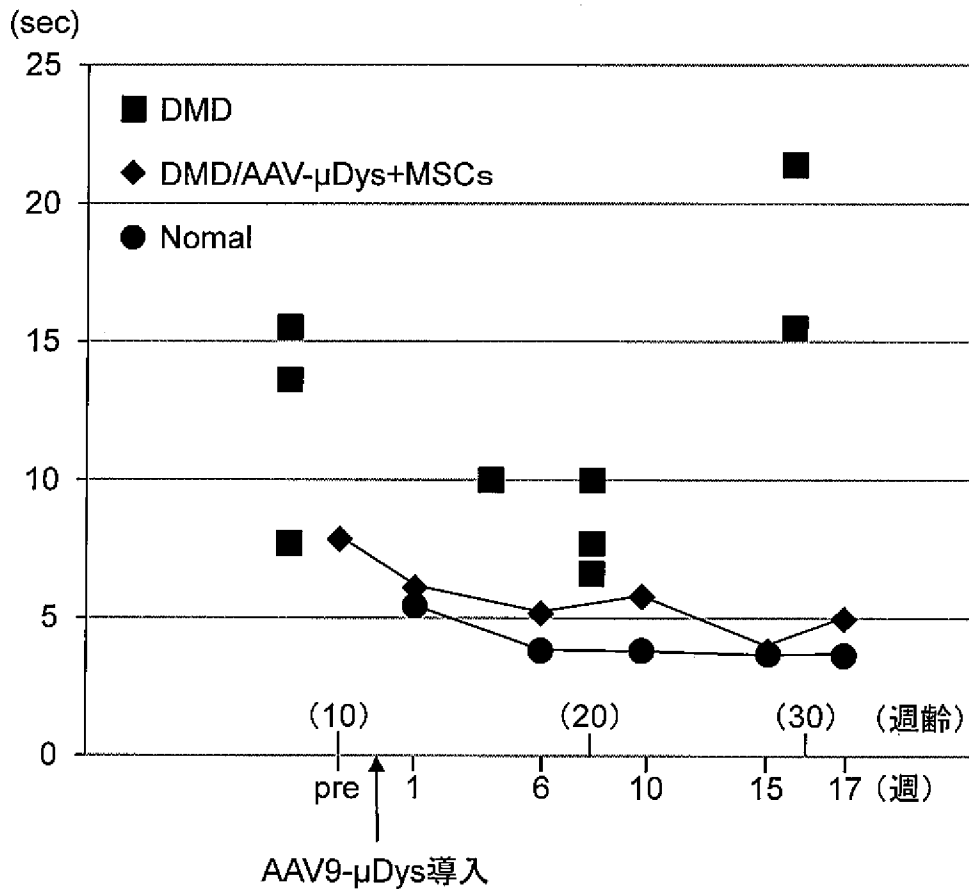
C



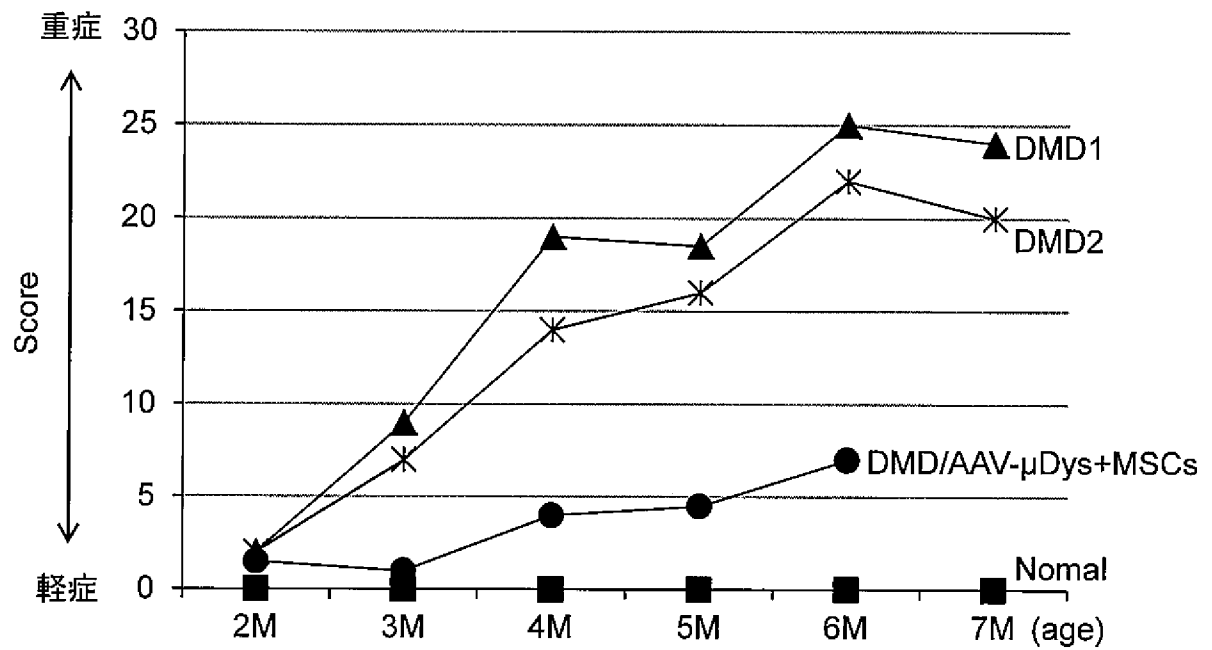
anti Luc



[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/063448

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N5/10(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P21/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12N5/10, A61K35/12, A61L27/00, A61P9/00, A61P21/00, A61P25/00, C12N15/09</i> Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <table border="0"> <tr> <td>Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1922-1996</td> <td>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</td> <td>1996-2014</td> </tr> <tr> <td>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1971-2014</td> <td>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1994-2014</td> </tr> </table> Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>CAplus/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII), Thomson Innovation</i>			Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014	Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014		
Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014									
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014									
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X/Y	N-KASAHARA Y.et al., Engraftment of mesenchymal stromal cells that can differentiate to form myogenic cells is enhanced by expressing IL-10 in dog with Duchenne muscular dystrophy, <i>Molecular Therapy</i> , 2013 May 14, 21(1), p.569, 176	1-8/1-8										
X/Y	MIN CK.et al., IL-10-transduced bone marrow mesenchymal stem cells can attenuate the severity of acute graft-versus-host disease after experimental allogeneic stem cell transplantation, <i>Bone Marrow Transplant.</i> , 2007 May, 39(10), p.637-45, Epub 2007 Mar 19	1-8/1-8										
X/Y	MANNING E.et al., Interleukin-10 delivery via mesenchymal stem cells: a novel gene therapy approach to prevent lung ischemia-reperfusion injury, <i>Hum.Gene.Ther.</i> , 2010 Jun, 21(6), p.713-27	1-8/1-8										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>“&” document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&” document member of the same patent family	“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&” document member of the same patent family											
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 15 August, 2014 (15.08.14)		Date of mailing of the international search report 26 August, 2014 (26.08.14)										
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer										
Facsimile No.		Telephone No.										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/063448

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YANG J.et al., Adult neural stem cells expressing IL-10 confer potent immunomodulation and remyelination in experimental autoimmune encephalitis, J.Clin.Invest., 2009 Dec, 119(12), p.3678-91, Epub 2009 Nov 2	1-8
Y	BRIKCI-NIGASSA L.et al., Prope tolerance to heart allografts in mice associated with persistence of donor interleukin-10-transduced stem cells, Transplantation, 2012 Apr 27, 93(8), p.761-8	1-8
Y	Taro HASE et al., "Mouse Shin Ishoku Model ni Okeru IL-10 no Zoki Seichaku Kikan Encho Koka", Acta Urol.Jpn., 30 June 2005 (30.06.2005), 51(6), page 424	1-8
Y	NITAHARA-KASAHARA, Y.et al., Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne muscular dystrophy, Mol. Ther., 2012 Jan, 20(1), p.168-77, Epub 2011 Sep 20	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/063448

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 9-11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 9-11 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and [PCT Rule 39.1(iv)].
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P21/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N5/10, A61K35/12, A61L27/00, A61P9/00, A61P21/00, A61P25/00, C12N15/09</p>										
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2014年									
日本国実用新案登録公報	1996-2014年									
日本国登録実用新案公報	1994-2014年									
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Thomson Innovation</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X/Y</td> <td>N-KASAHARA Y. et al., Engraftment of mesenchymal stromal cells that can differentiate to form myogenic cells is enhanced by expressing IL-10 in dog with Duchenne muscular dystrophy, Molecular Therapy, 2013 May 14, 21(1), p. S69, 176</td> <td>1-8/1-8</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X/Y	N-KASAHARA Y. et al., Engraftment of mesenchymal stromal cells that can differentiate to form myogenic cells is enhanced by expressing IL-10 in dog with Duchenne muscular dystrophy, Molecular Therapy, 2013 May 14, 21(1), p. S69, 176	1-8/1-8		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X/Y	N-KASAHARA Y. et al., Engraftment of mesenchymal stromal cells that can differentiate to form myogenic cells is enhanced by expressing IL-10 in dog with Duchenne muscular dystrophy, Molecular Therapy, 2013 May 14, 21(1), p. S69, 176	1-8/1-8								
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>										
<p>国際調査を完了した日</p> <p>15.08.2014</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>26.08.2014</p>									
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>渡邊 潤也</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>	<table border="1"> <tr> <td>4B</td> <td>3131</td> </tr> </table>	4B	3131						
4B	3131									

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	MIN CK. et al., IL-10-transduced bone marrow mesenchymal stem cells can attenuate the severity of acute graft-versus-host disease after experimental allogeneic stem cell transplantation, Bone Marrow Transplant., 2007 May, 39(10), p. 637-45, Epub 2007 Mar 19	1-8/1-8
X/Y	MANNING E. et al., Interleukin-10 delivery via mesenchymal stem cells: a novel gene therapy approach to prevent lung ischemia-reperfusion injury, Hum. Gene. Ther., 2010 Jun, 21(6), p. 713-27	1-8/-1-8
Y	YANG J. et al., Adult neural stem cells expressing IL-10 confer potent immunomodulation and remyelination in experimental autoimmune encephalitis, J. Clin. Invest., 2009 Dec, 119(12), p. 3678-91, Epub 2009 Nov 2	1-8
Y	BRIKCI-NIGASSA L. et al., Prope tolerance to heart allografts in mice associated with persistence of donor interleukin-10-transduced stem cells, Transplantation, 2012 Apr 27, 93(8), p. 761-8	1-8
Y	長谷 太郎, 他 7 名, マウス心移植モデルにおける IL-10 の臓器生着期間延長効果, Acta Urol. Jpn., 2005 Jun 30, 51(6), p. 424	1-8
Y	NITAHARA-KASAHARA, Y. et al., Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne muscular dystrophy, Mol. Ther., 2012 Jan, 20(1), p. 168-77, Epub 2011 Sep 20	1-8

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 9-11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項9-11は手術又は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及び[PCT規則39.1(iv)]の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。