

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-533373

(P2020-533373A)

(43) 公表日 令和2年11月19日 (2020. 11. 19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/28 (2015. 01)	A 6 1 K 35/28	4 C 0 8 7
A 6 1 P 11/04 (2006. 01)	A 6 1 P 11/04	
A 6 1 P 11/06 (2006. 01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 37/08 (2006. 01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)		

(21) 出願番号 特願2020-515070 (P2020-515070)
 (86) (22) 出願日 平成30年8月31日 (2018. 8. 31)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年3月13日 (2020. 3. 13)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2018/050937
 (87) 国際公開番号 WO2019/051536
 (87) 国際公開日 平成31年3月21日 (2019. 3. 21)
 (31) 優先権主張番号 2017903758
 (32) 優先日 平成29年9月15日 (2017. 9. 15)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 518327992
 サイナータ セラピューティクス リミテ
 ッド
 オーストラリア国、ヴィクトリア州 30
 53 カールトン、ライゴン ストリート
 62、レベル 3
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (74) 代理人 100136629
 弁理士 鎌田 光宣
 (74) 代理人 100125070
 弁理士 土井 京子
 (74) 代理人 100121212
 弁理士 田村 弥栄子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルギー性気道疾患 (A A D) / 喘息の処置方法

(57) 【要約】

本発明は、被験体においてアレルギー性気道疾患 (A A D) / 喘息を処置するための、間葉系血管芽細胞由来 - 間葉系幹細胞 (M C A - M S C) の使用に関連する。

【選択図】 図 1 0

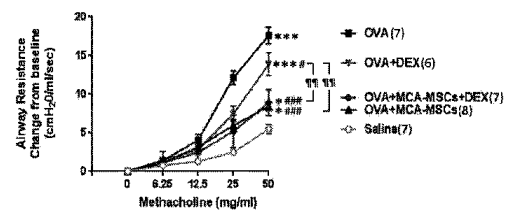


Figure 10

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体においてアレルギー性気道疾患（A A D）／喘息を処置するための方法であって、該方法は間葉系血管芽細胞 - 間葉系幹細胞（M C A - M S C）を該被験体に投与することを含み、ここで M C A - M S C は m i R - 1 4 5 - 5 p、m i R - 1 8 1 b - 5 p 及び m i R - 2 1 4 - 3 p を発現するが、m i R - 1 2 7 - 3 p 及び m i R - 2 9 9 - 5 p を発現しない、方法。

【請求項 2】

被験体におけるアレルギー性気道疾患（A A D）／喘息を処置するための薬剤の製造における間葉系血管芽細胞 - 間葉系幹細胞（M C A - M S C）の使用であって、ここで M C A - M S C は m i R - 1 4 5 - 5 p、m i R - 1 8 1 b - 5 p 及び m i R - 2 1 4 - 3 p を発現するが、m i R - 1 2 7 - 3 p 及び m i R - 2 9 9 - 5 p を発現しない、使用。

10

【請求項 3】

M C A - M S C は、C D 7 3⁺ C D 1 0 5⁺ C D 9 0⁺ C D 1 4 6⁺ C D 4 4⁺ C D 1 0⁺ C D 3 1⁻ C D 4 5⁻ の表現型を有する、請求項 1 の方法又は請求項 2 の使用。

【請求項 4】

M C A - M S C は、

（a）L i C l 及び F G F 2 を含むが、P D G F を除く間葉系コロニー形成培地（M - C F M）の中で、間葉系コロニーを形成するのに十分な時間の間、酸素正常状態の下で原始中胚葉細胞を培養すること；及び

20

（b）（a）の間葉系コロニーを付着させて培養し、M C A - M S C を作製すること、を含む方法により作られた、請求項 1 ～ 3 の何れか 1 項の方法又は使用。

【請求項 5】

M C A - M S C は静脈内に又は鼻腔内に投与される、請求項 1 ～ 4 の何れか 1 項の方法又は使用。

【請求項 6】

M C A - M S C は鼻腔内に投与される、請求項 1 ～ 5 の何れか 1 項の方法又は使用。

【請求項 7】

処置することが、約 1×10^6 個～約 1×10^9 個の M C A - M S C を被験体に投与することを含む、請求項 1 ～ 6 の何れか 1 項の方法又は使用。

30

【請求項 8】

被験体は哺乳動物である、請求項 1 ～ 7 の何れか 1 項の方法又は使用。

【請求項 9】

被験体はヒトである、請求項 1 ～ 8 の何れか 1 項の方法又は使用。

【請求項 10】

喘息を処置するために、被験体は過去にコルチコステロイド又は アゴニストの投与を受けている、請求項 1 ～ 9 の何れか 1 項の方法又は使用。

【請求項 11】

喘息を処置するために、被験体は過去にコルチコステロイド又は アゴニストの投与を受けていない、請求項 1 ～ 9 の何れか 1 項の方法又は使用。

40

【請求項 12】

被験体は重篤な喘息又は重篤な難治性喘息を有する、請求項 1 ～ 11 の何れか 1 項の方法又は使用。

【請求項 13】

A A D / 喘息を処置することは；

（a）A I、A W R、気道線維症、肺線維症、杯細胞化生、上皮肥厚化、気道トランスフォーミング増殖因子（T G F） - 1 レベル、上皮下筋線維芽細胞密度、上皮下コラーゲン濃度、又は総肺コラーゲン濃度を減少させること、又は

（b）肺 M M P 活性を増加させること、又は

（c）（a）の何れか 1 つ以上の特徴の任意の組み合わせ、又は（a）と（b）の何れ

50

か 1 つ以上の特徴の任意の組み合わせ、
を含む、請求項 1 ~ 12 の何れか 1 項の方法又は使用。

【請求項 14】

被験体がコルチコステロイド又は - アゴニストの投与を受けない、請求項 1 ~ 13 の
何れか 1 項の方法又は使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は被験体 (subject) における、アレルギー性気道疾患 (AAD) / 喘息の処置
に関連する。

10

【背景技術】

【0002】

喘息は世界中でおよそ 3 億人の人々が罹患している慢性の呼吸器疾患であり、毎年 25
0000 人の死因となっている。その発症には 3 つの主たる要因：気道炎症 (AI)；気
道リモデリング (airway remodelling) (AWR；気道 / 肺における構造変化を表し、最
終的には気道の線維化及び閉塞に至る)；及び気道過敏性 (AHR；喘息の臨床的特徴で
ある)がある。AWR は持続的な又は慢性の AI から生じ得るが、AI とは独立に AHR
を発症に寄与し得る。

【0003】

コルチコステロイドと - アゴニストを含む現在の喘息療法は、疾患の軽減よりも症状
の管理に焦点が当てられており、そのために完全に有効ではない。 - アゴニストに基
いた療法による処置を受けた被験体は、彼らの喘息の症状については軽減できるが、基
となる彼らの AI は持続している。そのために、 - アゴニストの慢性的な使用を必要とす
る被験体には、喘息が重篤に悪化し、入院と死亡に至る大きな危険性がある。

20

【0004】

代表的な療法であるコルチコステロイドも、重篤な及び重篤難治性の喘息被験体の亜集
団の処置には無効である。重篤な喘息被験体はしばしば高用量のコルチコステロイドによ
る処置を必要とし、それは全身的な副作用を伴うことがあり、肺機能又は生活の質を必ず
しも改善するものでない。加えて、喘息被験体の重篤難治性の亜群では気道の制限が固定
化されており、よってこの集団では彼らの喘息症状の一部として AWR が重要な役割を果
たし、AWR を標的として低減することができる処置戦略が緊急に必要であることが強調
される。

30

【0005】

間葉系幹細胞 (MSC) は、多くの細胞系譜へ分かれる能力を有する多能性間質細胞で
ある。これらの細胞はクラス I 主要組織適合性複合体 (MHC-I) を発現するが、MHC
- II 及び共刺激分子 CD80、CD86、及び CD40 を欠いており、よって免疫特
権を有する (immunoprivileged)。そのために、静脈内 (IV) 注入を介して MSC を全
身投与することができ、広い分布が可能となる。IV 投与により MSC は肺の中に蓄積す
る。ケモカイン受容体 4 型の発現を介して、MSC も損傷された組織に戻り、その発現は
喘息等の炎症誘発性環境において強調され、それらのホーミング能力を促進する。

40

【0006】

ヒトの喘息の幾つの特徴を模倣するアレルギー性気道疾患 (AAD) のネズミモデル
は、直接的な細胞 - 細胞接触とパラクリン因子の分泌の両方を通じて、MSC が免疫調節
性及び抗炎症性の性質を見せることを示すために使用されてきた。外在性の MSC の投与
は、Th2 増殖を減少させ、Th2 バイアスを低下させることが示され、それは AAD に
寄与する。樹状細胞の活性化、移動及び抗原提示の抑制が観察されている。気管支肺胞洗
浄液中で、好酸球関連の炎症誘発性サイトカインの減少が観察された。AI を抑制するコ
ルチコステロイドと比較して、これらのモデルの中で MSC は、炎症を担っている細胞の
存在と活性を能動的に減少させることが示されている。

【0007】

50

更にMSC処置は、それらがコラーゲンを分解するゼラチナーゼレベルを促進する能力を介して、気道における上皮の厚み、平滑筋過形成及び杯細胞化生を減少させ、並びに上皮下及び総コラーゲン沈着（線維症）を多少減少させると示されており、MSCは抗リモデリング作用も有することを示している。

【0008】

しかしながら、MSCは慢性疾患の状況に関連する有害症状の軽減を一貫して示している訳ではなく、MSC処置の結果は、それらの組織の起源/由来、培養増殖の程度、ドナー依存性の生存能力及び有効性、並びにそれらの投与のタイミングによって変わり得る。

【0009】

更に、MSCは第二の治療剤と組み合わせて投与されたときにのみ、MSCは有益な効果を示す。

【0010】

加えて、各ドナー器官から単離できるのは比較的少数のMSCのみであるために、実験及び市販で使用するために十分な数を容易にするために、継続的なドナーの供給が必要とされるであろう。

【0011】

もし何れかの先行文献が本明細書中で言及される場合に、そのような文献は、その文献がオーストラリア又は他の何れかの国における本技術分野の一般常識の一部を形成するという了解を構成するものではないと理解されるべきである。

【発明の概要】

【0012】

第1の観点では、被験体（subject）においてアレルギー性気道疾患（AAD）/喘息を処置するための方法を提供し、その方法は間葉系血管芽細胞-間葉系幹細胞（mesenchymal angioblast mesenchymal stem cell）（MCA-MSC）をその被験体に投与することを含み、ここでMCA-MSCはmiR-145-5p、miR-181b-5p及びmiR-214-3pを発現するが、miR-127-3p及びmiR-299-5pを発現しない。

【0013】

第1の観点の代わりの又は追加の態様は、被験体におけるAAD/喘息を処置するための薬剤の製造における間葉系血管芽細胞-間葉系幹細胞（MCA-MSC）の使用を提供し、ここでMCA-MSCはmiR-145-5p、miR-181b-5p及びmiR-214-3pを発現するが、miR-127-3p及びmiR-299-5pを発現しない。

【0014】

第1の観点の更なる代わりの又は追加の態様は、被験体においてAAD/喘息を処置する方法において使用するための間葉系血管芽細胞-間葉系幹細胞（MCA-MSC）を提供し、ここでMCA-MSCはmiR-145-5p、miR-181b-5p及びmiR-214-3pを発現するが、miR-127-3p及びmiR-299-5pを発現しない。

【0015】

1態様において、間葉系血管芽細胞-間葉系幹細胞（MCA-MSC）は、CD73⁺CD105⁺CD90⁺CD146⁺CD44⁺CD10⁺CD31⁻CD45⁻の表現型を有する。

【0016】

1態様において、MCA-MSCは、

- （a）LIC1とFGF2を含むが、PDGFを除く間葉系コロニー形成培地（M-CFM）の中で、間葉系コロニーが形成するのに十分な時間の間、酸素正常状態（normoxic conditions）の下で原始中胚葉細胞（primitive mesoderm cell）を培養すること；及び
- （b）（a）の間葉系コロニーを付着させて培養し、MCA-MSCを作製すること、を含む方法により作られる。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

1 態様において、M C A - M S C は静脈内に又は鼻腔内に投与される。1 態様において、M C A - M S C は鼻腔内に投与される。

【 0 0 1 8 】

1 態様において、処置することは、約 1×10^6 個 ~ 約 1×10^9 個の M C A - M S C を被験体に投与することを含む。

【 0 0 1 9 】

1 態様において、被験体は哺乳動物である。1 態様において、被験体はヒトである。

【 0 0 2 0 】

1 態様において、喘息を処置するために、被験体は過去にコルチコステロイド又は ア
ゴニストの投与を受けている。他の態様において、喘息を処置するために、被験体は過去
にコルチコステロイド又は アゴニストの投与を受けていない。

【 0 0 2 1 】

1 態様において、被験体はコルチコステロイド又は アゴニストの投与を受けない。

【 0 0 2 2 】

1 態様において、被験体は重篤な喘息又は重篤な難治性喘息を有する。

【 0 0 2 3 】

1 態様において、A A D / 喘息を処置することは；

(a) A I、A W R、気道線維症、肺線維症、杯細胞化生、上皮肥厚化、気道トランス
フォーミング増殖因子 (T G F) - 1 レベル、上皮筋線維芽細胞密度、上皮コラー
ゲン濃度、又は総肺コラーゲン濃度を低下させること；又は

(b) 肺マトリックスメタロプロテイナーゼ (M M P) 活性を増加させること；又は

(c) (a) の何れか 1 つ以上の特徴の任意の組み合わせ、又は (a) と (b) の何れ
か 1 つ以上の特徴の任意の組み合わせ、
を含む。

【 0 0 2 4 】

A A D / 喘息又はその特有の特徴の処置のための M C A - M S C の使用は、下記の非限
定的な利点：

- ・ 異常な気道 T G F - 1 レベル、気道 / 肺線維症、及び A H R の、完全ではなくても実
質的な好転

- ・ コラーゲン分解 M M P レベルの増加

- ・ A A D / 喘息の安全且つ効果的な処置を示す、測定されたパラメーターの基礎発現に影
響しないこと

の 1 つ以上を提供し得る。

【 0 0 2 5 】

過去の研究は、オボアルブミン (O V A) 誘導性の上皮及び総コラーゲン沈着の促進
は、幹細胞に基づいた処置が抗線維症剤と組み合わせて投与されたときのみに、十分に好
転し得たことを示したので、本発明により提供される解決は予期されないものであった。
よって本発明は、A A D / 喘息の処置における顕著な改善を提供する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 6 】

【 図 1 】 図 1 は、実施例 4 による気管支周囲の炎症スコアに関する M C A - M S C の効果
を示す。A) 研究された各群由来のヘマトキシリン及びエオジン (H & E) 染色された肺
切片の代表的な顕微鏡写真は、気道上皮層の中及び周囲に存在する、気管支壁炎症性細胞
の浸潤程度を示す。スケールバー = $50 \mu m$ 。B) 5 つの気道 / マウス ($n = 8$ 匹マウス
/ 群) 由来の炎症スコアの平均 \pm S E M も示し、ここで切片を、0 (明確な炎症無し) ~
4 (重篤な炎症) のスケールで、炎症性凝集体の数と分布についてスコア付けした。生理
食塩水 (S A L) 群に対して * $P < 0.05$ 、* * * $P < 0.001$ ；O V A 群に対して
$P < 0.001$ 。

【 図 2 】 図 2 は、実施例 4 による杯細胞化生に関する M C A - M S C の効果を示す。A)

研究された各群由来のアルシアンブルー過ヨウ素酸シッフ（A B P A S）染色された肺切片の代表的な顕微鏡写真は、気道上皮層中の杯細胞（O V A 損傷マウスにおいてのみ矢印により示される）の程度を示す。スケールバー = 25 μ m。B）5つの気道 / マウス（n = 8 匹マウス / 群）由来の杯細胞カウントの平均 \pm S E M も示す。生理食塩水（S A L）群に対して * * * P < 0.001；O V A 群に対して # # P < 0.01、# # # P < 0.001。

【図3】図3は、実施例4による気道上皮厚み及び上皮コラーゲン沈着（線維症）に関する、M C A - M S C の効果を示す。A）研究された各群由来のマッソントリクローム染色された肺切片の代表的な顕微鏡写真は、気道上皮厚みと上皮コラーゲン厚み（青色染色）の程度を示す。スケールバー = 50 μ m。5つの気道 / マウス（n = 8 匹マウス / 群）由来の基底膜（B M）長さに対する、B）上皮厚み（ μ m²）及びC）上皮コラーゲン厚み（ μ m）の平均 \pm S E M も示す。生理食塩水（S A L）群に対して * P < 0.05、* * P < 0.01、* * * P < 0.001；O V A 群に対して # P < 0.05、# # # P < 0.001；O V A M C A - M S C I V 群に対して P ∇ < 0.05。

【図4】図4は、実施例4による総肺コラーゲン濃度（線維症の別の指標）に関する、M C A - M S C の効果を示す。研究された各群由来の総コラーゲン濃度（肺コラーゲン含有量 / 組織乾燥重量 %）の平均 \pm S E M を示す。マウス当たりの2番目に大きな肺葉から測定された、研究された各群由来の総肺コラーゲン濃度の平均 \pm S E M（肺コラーゲン含有量 / 組織乾燥重量 %）も示し；n = 8 匹マウス / 群から、マウスごとに2番目に大きな肺葉から測定された。生理食塩水（S A L）群に対して * * P < 0.01、* * * P < 0.001；O V A 群に対して # P < 0.05、# # # P < 0.001；O V A M C A - M S C I V 群に対して P ∇ < 0.05。

【図5】図5は、実施例4による気道 T G F - 1（線維症促進性サイトカイン）発現に関する、M C A - M S C の効果を示す。A）研究された各群由来の免疫組織化学（I H C）染色された肺切片の代表的な顕微鏡写真は、気道上皮層の中及び周囲の T G F - 1 染色 / 発現の程度を示す。スケールバー = 50 μ m。B）5つの気道 / マウス（n = 7 ~ 8 匹マウス / 群）由来の T G F - 1 染色（% / 領域として示される）の相対的な平均 \pm S E M も示す。生理食塩水（S A L）群に対して * * * P < 0.001；O V A 群に対して # # # P < 0.001。

【図6】図6は、実施例4による上皮筋線維芽細胞（鍵となる線維症作製細胞）密度に関する、M C A - M S C の効果を示す。A）研究された各群由来の I H C 染色された肺切片の代表的な顕微鏡写真は、気道上皮下層中の - S M A 染色された筋線維芽細胞密度（矢印で示す）の程度を示す。スケールバー = 25 μ m。B）5つの気道 / マウス（n = 7 ~ 8 匹マウス / 群）由来の筋線維芽細胞の平均 \pm S E M 数（100 μ m B M 長さ当たり）も示す。生理食塩水（S A L）群に対して * * * P < 0.001；O V A 群に対して # P < 0.05、# # # P < 0.001；O V A M C A - M S C I V 群に対して P ∇ < 0.05。

【図7】図7は、実施例4による M M P - 9（コラーゲン分解酵素）レベルに関する、M C A - M S C の効果を示す。A）代表的なゼラチン・ザイモグラフ（倒立像）は、研究された各群における肺 M M P - 9（ゼラチナーゼ B；92 kDa）及び M M P - 13（コラゲナーゼ - 3；~ 55 kDa）の相対発現レベルを示す。各場合において、試料当たり 10 μ g の総タンパク質を、解析のためにザイモグラフ上に搭載し；群当たり 5 ~ 6 の追加試料を解析する別途のザイモグラフは類似した結果を作成した。B）n = 7 ~ 8 匹マウス / 群に由来する、M M P - 9（メス B a l b / c マウスの肺の中で最も豊富に発現しているゼラチナーゼである）の光学密度（O D）の相対的な平均 \pm S E M も示す。生理食塩水（S A L）群に対して * P < 0.05、* * P < 0.01、* * * P < 0.001；O V A 群に対して # # # P < 0.001；O V A M C A - M S C I V 群に対して P ∇ < 0.05。

【図8】図8は、実施例4による A H R に関する、M C A - M S C の効果を示す。噴霧化メタコリン（気管収縮剤）の用量増加に応答した侵襲的プレスモラフィーを介して、気

10

20

30

40

50

道抵抗 (AHR の変化を反映する) を評価した (ベースラインからの抵抗変化として表される)。試験したメタコリンの各用量に対する、 $n = 7 \sim 8$ 匹マウス / 群に由来する、気道抵抗の平均 \pm SEM を示す。生理食塩水 (SAL) 群に対する $* P < 0.05$ 、 $*** P < 0.001$; OVA 群に対する $## P < 0.01$ 、 $### P < 0.001$; OVA MCA - MSC IV 群に対する $P^{**} < 0.01$ 。

【図 9】図 9 は、実施例 5 と 6 の慢性アレルギー性気道疾患モデルについての模式的なタイムラインである。処置は (肺病変が確立され進行しているときには) 64 ~ 78 日目に投与された。

【図 10】図 10 は、実施例 5 によるデキサメタゾン (DEX) が添加された MCA - MSC の、AHR に関する効果を示す。実施例 4 による噴霧化メタコリン (気管収縮剤; ベースラインからの抵抗変化として表される) の用量増加に应答した侵襲的プレチスモラフィーを介して、気道抵抗 (AHR の変化を反映する) を評価した。試験したメタコリンの各用量に対する、 $n = 6 \sim 8$ 匹マウス / 群に由来する、気道抵抗の平均 \pm SEM を示す。生理食塩水 (SAL) 群に対する $* P < 0.05$ 、 $*** P < 0.001$; OVA 群に対する $# P < 0.05$ 、 $### P < 0.001$; OVA + DEX 群に対する $P^{**} < 0.01$ 。

【図 11】図 11 は、実施例 6 による鼻腔内 (IN) 対静脈内 (IV) 対気管内 (ET) 投与された MCA - MSC の、AHR に関する効果を示す。実施例 4 による噴霧化メタコリン (気管収縮剤; ベースラインからの抵抗変化として表される) の用量増加に应答した侵襲的プレチスモラフィーを介して、気道抵抗 (AHR の変化を反映する) を評価した。 $n = 6 \sim 8$ 匹マウス / 群に由来する; 試験したメタコリンの各用量に対する、気道抵抗の平均 \pm SEM を示す。生理食塩水処置群に対する $** P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$; OVA 群に対する $## P < 0.01$ 。

【発明を実施するための形態】

【0027】

詳細な説明

気道リモデリング (AWR) として知られる構造変化は、慢性の / 重篤な喘息の特徴であり、肺の機能不全に寄与する。一般的に、喘息はコルチコステロイド及び / 又は アゴニストにより管理される。

【0028】

本発明は、コルチコステロイド及び / 又は アゴニストによる喘息処置を上回る改善であり、且つ MSC を他の薬剤と組み合わせた示唆された処置を上回る改善である、MCA - MSC を使用した被験体における喘息の処置に関連する。

【0029】

実施例 1 と 2 は、ヒト人工多能性幹細胞 (iPSC) の、早期クローン性の中内胚葉前駆体細胞 (mesoendodermal precursor cell) のクラスである、間葉系血管芽細胞 (MCA) として知られる前駆体細胞への、及び引き続いての間葉系幹細胞 (MCA - MSC) への分化を示す。iPSC は無限に増殖することができ、且つそれら自体は極めて大量の MSC に増えることができるので、単一の健康な血液ドナー由来の iPSC の単一のマスターセルバンクから、十分な MCA - MSC を獲得することができ、それにより、一旦 MSC が形成されたならば過度の培養増殖をする必要性が無く、ドナー依存性及び増殖依存性の変動と非標的細胞からの混入を制限する。

【0030】

本開示の MCA - MSC は、本質的に制限が無い供給の利点と、先行技術の MSC と比較して改善された免疫調節効果の更なる利点を提供する。

【0031】

本開示において、特に実施例 4 と 5 において、良好に確立された慢性 AAD のネズミモデルに運ばれたときの、これら MCA - MSC の治療潜在力を検討した。この AAD のネズミモデルはヒト喘息の 3 つの中心となる特徴である AI、AWR、及び AHR を伴って示し、本技術分野において喘息の前臨床モデルとして受け入れられている。特に MCA -

10

20

30

40

50

M S C の抗リモデリング効果を、静脈内 (I V) 投与対鼻腔内 (I N) 投与で比較した。

【 0 0 3 2 】

重要なことに、幾つかの M S C は喘息又はその症状の処置において幾らかの効果を示し得るが、そのような効果は、それらの M S C が他の治療剤と組み合わせて使用されているときのみを得られる。有利なことに、本発明は組み合わせ療法の必要性が防がれる。

【 0 0 3 3 】

喘息

喘息及び / 又は A A D は下記の特徴の何れかの組み合わせの何れか 1 つ以上により特徴付けることができる : A I 、 A W R 、 A H R 、 気道 / 肺線維症、杯細胞化生、上皮肥厚化、気道トランスフォーミング増殖因子 (T G F) - 1 レベルの増加、肺 M M P - 9 が無い又はレベルが低いこと、上皮筋線維芽細胞密度の増加、上皮コラーゲン蓄積、及び総肺コラーゲン蓄積。

【 0 0 3 4 】

従って本開示の M C A - M S C による喘息及び / 又は A A D の処置は、下記の特徴の何れかの組み合わせの何れか 1 つ以上を処置することにより特徴付けることができる : A I の減少、A W R の減少、気道 / 肺線維症の減少、杯細胞化生の減少、上皮肥厚化の減少、気道トランスフォーミング増殖因子 (T G F) - 1 レベルの減少、上皮筋線維芽細胞及び上皮コラーゲンの低下、及び総肺コラーゲン濃度の減少。

【 0 0 3 5 】

本開示の M C A - M S C による A A D / 喘息の処置は、M M P (例えばゼラチナーゼ及び / 又はコラゲナーゼ) の発現 / 活性を増加させてもよい。1 態様において M M P は M M P - 9 である。他の態様において M M P は M M P 1 3 である。他の態様において M M P は M M P 1 、 M M P 2 、 M M P 3 、 M M P 7 、 M M P 8 、 又は M M P 1 2 である。

【 0 0 3 6 】

間葉系血管芽細胞 - 間葉系幹細胞 (M C A - M S C)

従って本発明は、M C A - M S C を投与することによる、A D D / 喘息、又はその特有の特徴の 1 つ以上のための改良された療法を提供する。M C A - M S C はそれらの免疫調節の性質を介してそれらの効果を発揮し、A A D / 喘息の特有の特徴を産生する部位において直接的に作用することができる。

【 0 0 3 7 】

M C A - M S C はサイトカイン、ケモカイン、及び成長因子等の生物活性分子を分泌し、免疫系を調節する能力を有する。M C A - M S C は生着に頼らずに再生を促進し、免疫系に影響を及ぼすと示されている。言い換えれば M C A - M S C は、それら自体が宿主被験体中に導入されている必要性は無く、むしろ、それらは短い時間の間にそれらの影響を及ぼしてその後を除かれる。しかしながら、M C A - M S C は生着してもよい。

【 0 0 3 8 】

本明細書中で使用する「間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell) 」又は「 M S C 」とは、骨髄、脂肪組織 (脂肪) 、胎盤、及び臍帯血を含む、広範囲の組織から単離され得る特定の型の幹細胞を言う。あるいは M S C を、多能性幹細胞 (P S C) から作製してもよい。M S C は「間葉系間質細胞 (mesenchymal stromal cell) 」としても知られている。

【 0 0 3 9 】

本明細書中で使用する「 M C A - M S C 」とは、間葉系血管芽細胞 (mesenchymoangioblast) 表現型を介して i P S C から作製される特定の型の M S C を言う。P S C からの M C A - M S C の作製は 2 0 1 7 年 3 月 1 4 日に出版された国際特許公開番号 P C T / A U 2 0 1 7 / 0 5 0 2 2 8 の中に述べられており、それ全体としてこの相互参照により組み込まれ、実施例 1 と 2 の中に述べられている。例えば実施例 3 に示されているように、M C A - M S C は先行技術の M S C とは異なる。

【 0 0 4 0 】

M S C は、T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージ、及びナチュラルキラー細胞に対して免疫調節活性を奏すると示されている。理論により縛られることを望むものではない

10

20

30

40

50

いが、基となるメカニズムは、一酸化窒素、インドールアミン 2, 3 ジオキシゲナーゼ、プロスタグランジン E₂、腫瘍壊死因子 - 誘導性遺伝子 6 タンパク質、CCL-2、及びプログラム細胞死リガンド 1 等の、免疫調節性メディエーターを含んでもよい。これらのメディエーターは、例えば炎症性サイトカイン (IFN、TNF、及び IL-17 等) により刺激されるまでは、発現レベルが低い。

【0041】

本願明細書で使用される「多能性幹細胞」又は「PSC」とは、それ自体を無制限に再生産し、且つ任意の他の型の細胞に分化する能力を有する細胞を言う。2つの主要な型のPSC：胚性幹細胞 (ESC)；及び人工多能性幹細胞 (iPSC) がある。

【0042】

本願明細書で使用される「胚性幹細胞」又は「ESC」とは、体外受精療法 (in vitro fertilisation therapy) が完了し、余剰の胚を有する被験体から、同意の上で提供された5日目～7日目の胚から単離された細胞を言う。ヒト胚からの細胞の抽出についての倫理的な懸念により、ESCの使用はある程度妨げられている。

【0043】

適切なヒトPSCには、H1及びH9ヒト胚性幹細胞が挙げられる。

【0044】

本明細書で使用される「人工多能性幹細胞」又は「iPSC」とは、成熟細胞に由来するESC様の細胞を言う。iPSCはESCと非常に類似した特性を有するが、iPSCは胚に由来するものではないので、ESCに関する倫理的な懸念が回避される。その代わりにiPSCは、「再プログラム化」されて多能性の状態に戻っている、典型的には十分に分化した成熟細胞に由来する。

【0045】

適切なヒトiPSCには、限定されるものではないが、線維芽細胞に由来するiPSC 19-9-7T、MIRJT6i-mND1-4及びMIRJT7i-mND2-0、並びに骨髓単核細胞に由来するiPSC BM119-9が挙げられる。他の適切なiPSCは、マディソン、ウィスコンシン州、米国のセルラー・ダイナミクス・インターナショナル (CDI) から得られる。

【0046】

1 態様において、本発明において使用されるMCA-MSCは、原始中胚葉細胞から形成される。原始中胚葉細胞は、間葉系血管芽細胞 (MCA) の潜在能力を有してもよい。原始中胚葉細胞は、 $E^{MH}lin^{-}KDR^{+}APLNR^{+}PDGFR\alpha^{+}$ の表現型を有してもよい。1 態様において、本発明で使用するMCA-MSCは、MCAの潜在能力を有する $E^{MH}lin^{-}KDR^{+}APLNR^{+}PDGFR\alpha^{+}$ 原始中胚葉細胞から形成される。

【0047】

本明細書で使用する「MCAの潜在能力を有する $E^{MH}lin^{-}KDR^{+}APLNR^{+}PDGFR\alpha^{+}$ 原始中胚葉細胞」とは、典型的には原始線条 (primitive streak) 及び側板 (lateral plate) / 胚外中胚葉 (extraembryonic mesoderm) 遺伝子を発現している細胞を言う。これらの細胞は、血清無しの培地中で線維芽細胞成長因子 2 (FGF2) に応答して、MCAと血管芽細胞のコロニーを形成する潜在能力を有する。実施例2に従って培養されたときには、これらの細胞はMCA-MSCとなる。

【0048】

用語 $E^{MH}lin^{-}$ は、CD31、VE-カドヘリン内皮マーカー、CD73及びCD105間葉系 / 内皮マーカー、並びにCD43及びCD45造血マーカーの発現を欠いていることを意味する。

【0049】

1 態様において、本発明において使用されるMCA-MSCは、 $CD73^{+}CD105^{+}CD90^{+}CD146^{+}CD44^{+}CD10^{+}CD31^{-}CD45^{-}$ の表現型を示す。

【0050】

10

20

30

40

50

1 態様において、本発明において使用される M C A - M S C は、マイクロ R N A である m i R - 1 4 5 - 5 p、m i R - 1 8 1 b - 5 p 及び m i R - 2 1 4 - 3 p のそれぞれを発現するが、m i R - 1 2 7 - 3 p 及び m i R - 2 9 9 - 5 p を発現しない。

【 0 0 5 1 】

本明細書中で示された A A D / 喘息の処置におけるそれらの効果に加えて、M C A - M S C は、M C A - M S C が T ヘルパー (C D 4 ⁺) リンパ球の増殖を抑制する能力としてインビトロで評価され得る、「免疫調節活性」を有する。免疫調節活性は、例えば免疫能アッセイ (ImmunoPotency Assay) を使用して測定されるように、基準に対してインビトロで定量化されてもよい。

【 0 0 5 2 】

10

適切な免疫能アッセイは、健康なドナーの末梢血から精製された、カルボキシフルオレセイン・スクシンイミジル・エステル標識を有する白血球を種々の濃度で別個にプレートした、本明細書中で開示された方法によって作製された照射試験 M C A - M S C 及び照射基準試料 M S C を使用する。基準試料のサブセットを表す T ヘルパー (C D 4 ⁺) リンパ球を、C D 3 及び C D 2 8 抗体を添加することにより刺激する。T 細胞増殖を評価するために、C D 4 標識された T 細胞を、フローサイトメトリーを使用して数え上げる。I C 5 0 値は基準試料の関数として報告される。より高い I C 5 0 値は、T ヘルパー (C D 4 ⁺) リンパ球の増殖の抑制の程度がより大きいことを示唆し、よって、T 細胞免疫調節の性質が優れていることを示唆する。このアッセイに使用される前に M S C 試料を照射し、それらの増殖潜在能の交絡因子を除く。

20

【 0 0 5 3 】

M C A - M S C による A A D / 喘息の処置

被験体において A A D / 喘息を処置するために、M C A - M S C の治療有効量を被験体に投与する正確な方法は、医師の裁量によるであろうことは、本技術分野の当業者により理解されるであろう。用量、他の薬剤との組み合わせ、投与のタイミングと頻度等を含む投与のやり方は、被験体の状態と病歴により影響され得る。

【 0 0 5 4 】

A A D / 喘息又はその特有の特徴を処置するのに、M C A - M S C を単独でも使用し得ることは本発明の利点であるが、M C A - M S C を他の喘息療法と組み合わせることができるとは理解されるであろう。喘息の被験体が (例えばコルチコステロイド又は - アゴニスト療法を含む) 既存の喘息の処置計画を有するときには、例えば医師は、喘息の被験体を他の喘息療法で処置してもなお、M C A - M S C による処置を引き続き行ってもよい。

30

【 0 0 5 5 】

M C A - M S C を治療組成物として投与してもよい。本明細書で使用する用語「治療組成物」とは、被験体に投与するために調合されている、本明細書中で述べられる M C A - M S C 又は M C A - M S C の集団を含む組成物を言う。好ましくは、治療組成物は無菌である。1 態様において、治療組成物は発熱物質 (pyrogen) を含まない。

【 0 0 5 6 】

1 態様において、M C A - M S C 又は治療組成物は、容器内に、好ましくは滅菌容器内に、好ましくは発熱物質を含まない容器内に提供される。1 態様において容器は、例えばポラス投与のために適したシリンジである。他の態様において、容器は注入のために適している注入バッグである。他の態様において、容器は I N 投与のために適合している。

40

【 0 0 5 7 】

M C A - M S C は良い医療行為 (good medical practice) に適うやり方で製剤化され、投薬され (dosed)、及び投与されるであろう。この文脈において考慮される因子には、処置される障害 (disorder) 及び予測される副作用又は症状の特定の型、処置される特定の被験体、被験体の臨床状態、投与部位、投与方法、投与のスケジュール調整、並びに医師に知られている他の因子が挙げられる。投与される M C A - M S C の治療有効量は、そのような検討事項により支配されるであろう。

50

【0058】

MCA - MSCの用量は、約 10^3 細胞/ m^2 ～約 10^{11} 細胞/ m^2 、例えば約 10^6 細胞/ m^2 ～約 2×10^8 細胞/ m^2 、若しくは約 10^3 細胞/ m^2 、約 5×10^3 細胞/ m^2 、約 10^4 細胞/ m^2 、約 5×10^4 細胞/ m^2 、約 10^5 細胞/ m^2 、約 5×10^5 細胞/ m^2 、約 10^6 細胞/ m^2 、約 5×10^6 細胞/ m^2 、約 10^7 細胞/ m^2 、約 5×10^7 細胞/ m^2 、約 10^8 細胞/ m^2 、約 5×10^8 細胞/ m^2 、約 10^9 細胞/ m^2 、約 5×10^9 細胞/ m^2 、約 10^{10} 細胞/ m^2 、約 5×10^{10} 細胞/ m^2 、又は約 10^{11} 細胞/ m^2 に及び得る。

【0059】

MCA - MSCの用量は、約 10^3 細胞/kg～約 10^{11} 細胞/kg、例えば約 10^6 細胞/kg～約 2×10^8 細胞/kg、若しくは約 10^3 細胞/kg、約 5×10^3 細胞/kg、約 10^4 細胞/kg、約 5×10^4 細胞/kg、約 10^5 細胞/kg、約 5×10^5 細胞/kg、約 10^6 細胞/kg、約 5×10^6 細胞/kg、約 10^7 細胞/kg、約 5×10^7 細胞/kg、約 10^8 細胞/kg、約 5×10^8 細胞/kg、約 10^9 細胞/kg、約 5×10^9 細胞/kg、約 10^{10} 細胞/kg、約 5×10^{10} 細胞/kg、又は約 10^{11} 細胞/kgに及び得る。

10

【0060】

MCA - MSCの用量は、約 10^3 細胞～約 10^{11} 細胞、例えば約 10^6 細胞～約 2×10^8 細胞、若しくは約 10^3 細胞、約 5×10^3 細胞、約 10^4 細胞、約 5×10^4 細胞、約 10^5 細胞、約 5×10^5 細胞、約 10^6 細胞、約 5×10^6 細胞、約 10^7 細胞、約 5×10^7 細胞、約 10^8 細胞、約 5×10^8 細胞、約 10^9 細胞、約 5×10^9 細胞、約 10^{10} 細胞、約 5×10^{10} 細胞、又は約 10^{11} 細胞に及び得る。

20

【0061】

用語「治療有効量」とは、被験体の処置に有効なMCA - MSCの量を言う。

【0062】

MCA - MSCを単回投与で、分割投与で、又は複数回投与で投与してもよい。例えば、被験体の鼻孔（複数）の間で分割投与をしてもよく、例えば鼻孔（単数）当たり用量のおよそ半分を投与してもよい。

【0063】

被験体にMCA - MSCを、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10回投与してもよい。

30

【0064】

1週間、2週間、1か月、又は2か月の間隔をあけて、被験体にMCA - MSCを2回以上投与してもよい。例えば、もしAAD / 喘息又はその特有の特徴が、既にMCA - MSCで処置された被験体で再発するならば、再発の時に又は再発の後に、3か月毎に、半年毎に、1年毎に、2年毎に、又はより大きな間隔をあけて、被験体に2回以上投与してもよい。

【0065】

任意の適切な経路により、例えば、静脈内（IV）、鼻腔内（IN）、気管内、肺内、及び動脈内を含む経路により、MCA - MSCを全身投与又は末梢投与してもよい。1態様において、IV、IN、気管内、又は肺内の経路により、MCA - MSCを投与する。1態様においてMCA - MSCをIN投与する。

40

【0066】

1態様において、MCA - MSCは投与に先立って前処理される。前処理を成長因子により行っても、又は遺伝子編集により行ってもよく、例えば、成長因子がMCA - MSCをプライムしてもよく、遺伝子編集がMCA - MSCに新たな治療特性を付与してもよい。

【0067】

被験体がAAD / 喘息又はその特有の特徴を発症する前に、発症の間に、又は発症の後に、被験体にMCA - MSCを投与してもよい。

50

【 0 0 6 8 】

従って用語「処置する (treat)」、「処置する (treating)」、又は「処置 (treatment)」とは、治療的な処置と、予防的な (prophylactic) 又は防御的な (preventive) 手段の両方を言うものであり、ここで目的は被験体において A A D / 喘息若しくはその特有の特徴を防ぎ、低減し、若しくは改善すること、又は被験体において A A D / 喘息若しくはその特有の特徴の進行を遅らせる (減少させる) ことである。処置の必要がある被験体には、A A D / 喘息又はその特有の特徴を既に有する者のみならず、A A D / 喘息又はその特有の特徴を防ぐべき若しくは改善するべき者も含まれる。

【 0 0 6 9 】

用語「予防する (preventing)」、「予防 (prevention)」、「予防的 (preventative)」、又は「予防的 (prophylactic)」とは、A A D / 喘息若しくはその特有の特徴の発症から守る (keeping) こと、又は A A D / 喘息又はその特有の特徴の発症を妨げる (to hinder) こと、発症から防御する (defend from) こと、若しくは発症から保護する (protect from) ことを言う。A A D / 喘息若しくはその特有の特徴を予防する必要がある被験体は、例えば家族歴のために、A A D / 喘息若しくはその特有の特徴を発症する傾向がある。

【 0 0 7 0 】

用語「改善する (ameliorate)」、又は「改善 (amelioration)」とは、A A D / 喘息又はその特有の特徴が減少すること、低減すること又は除去されることを言う。

【 0 0 7 1 】

M C A - M S C の投与による A A D / 喘息又はその特有の特徴の処置は、A A D / 喘息又はその特有の特徴の約 1 % の減少、約 2 % の減少、約 3 % の減少、約 4 % の減少、約 5 % の減少、約 6 % の減少、約 7 % の減少、約 8 % の減少、約 9 % の減少、約 10 % の減少、約 15 % の減少、約 20 % の減少、約 25 % の減少、約 30 % の減少、約 35 % の減少、約 40 % の減少、約 45 % の減少、約 50 % の減少、約 55 % の減少、約 60 % の減少、約 65 % の減少、約 70 % の減少、約 75 % の減少、約 80 % の減少、約 85 % の減少、約 90 % の減少、約 95 % の減少、約 99 % の減少、又は約 100 % の減少をもたらすことができる。

【 0 0 7 2 】

1 態様において、M C A - M S C の投与による A A D / 喘息又はその特有の特徴の処置は、A A D / 喘息又はその特有の特徴を、A A D / 喘息又はその特有の特徴を有さない被験体と同等の程度まで減少させることができる。

【 0 0 7 3 】

本技術分野の当業者は、A A D / 喘息又はその特有の特徴を評価して定量化する方法を容易に理解し、例えば本実施例中に述べられた方法を使用して、困難又は過度の負担なくに行うことが可能であろう。例えば、以下を定量化することができる：1) A I の指標としての炎症スコア；2) A I に誘導された A W R の指標としての杯細胞化生；i i i) A W R の指標としての上皮厚み；i v) A W R / 線維化の指標としての上皮コラーゲン厚み；v) A W R / 線維化の指標としての総肺コラーゲン濃度；v i) A W R の指標としての上皮 T G F - 1 染色；v i i) A W R の指標としての上皮筋線維芽細胞密度；v i i i) A W R の指標としてのゼラチナーゼ (例えば M M P - 2 及び / 又は M M P - 9) 及び / 又はコラゲナーゼ (例えば M M P - 1 及び / 又は M M P - 13) の発現及び / 又は活性；i x) 肺機能及び A H R の指標としての気道過敏性 / 反応性、並びに A H R。

【 0 0 7 4 】

任意の A A D / 喘息又はその特有の特徴を定量化して、コントロール (例えば A A D / 喘息又はその特有の特徴を有さない健康なコントロール被験体、又はコントロール被験体の健康な集団) と比較してもよい。あるいはコントロールは、A A D / 喘息又はその特有の特徴を有し、且つ M C A - M S C で処置されて反応した、コントロール被験体又はコントロール被験体の集団であってもよい。

【 0 0 7 5 】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される用語「被験体」とは、哺乳動物を言ってもよい。その哺乳動物は霊長類、特にヒトであってもよく、又は家畜、動物園の動物、又は伴侶動物であってもよい。本明細書中で開示される方法はヒトの医学的処置に適することは特に期待されるところであるが、それは、ウマ、ウシ、及びヒツジ等の家畜、イヌ及びネコ等の伴侶動物、又はネコ科動物（felids）、イヌ科動物（canids）、ウシ科動物（bovids）、及び有蹄動物（ungulates）等の動物園の動物の処置を含む、獣医処置にも適用可能である。

【0076】

本明細書中に特に規定されない限り、本明細書中で使用される技術用語と科学用語は、本発明が属する技術分野に当業者により、及び出版された教科書を参照することにより、一般的に理解されるのと同じ意味を有するものである。

10

【0077】

用語「a」又は「an」とは1つ以上を言うことに留意すべきであり、例えば、「a MCA-MS C」は、1つ以上のM C A - M S C（複数可）を表すと理解される。従って用語「a」又は「an」、「一つ以上（one or more）」、及び「少なくとも一つ（at least one）」は、本明細書中で互いに交換可能であるように使用され得る。

【0078】

本明細書に続く特許請求の範囲の中において及び発明の記載の中において、言語表現又は必要な含意のために、そうではないことを文脈が必要とする場合を除いて、用語「含む（comprise）」、又は「含む（comprises）」若しくは「含んでいる（comprising）」等のバリエーションは、包含的な意味で、即ち、述べられた特徴の存在を特定するものとして使用されるが、本発明の種々の態様において更なる特徴が存在すること又は付加することを除外するものではない。

20

【0079】

本明細書中で使用される用語「約」は、所定の数について、その数の大きさの $\pm 25\%$ の値の範囲を予定するものである。他の態様において用語「約」は、所定の数について、その数の大きさの $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、又は $\pm 5\%$ の値の範囲を予定するものである。例えば1態様において「約3グラム」は、2.7グラム～3.3グラム（すなわち3グラム $\pm 10\%$ ）等の値を示す。

【0080】

同様に、イベントのタイミング又は期間は、少なくとも 25% で変動し得る。例えば、特定のイベントが1態様において1日続き得ると開示されているときには、そのイベントはおおよそ1日続き得る。例えば「1日」は、約18時間～約30時間の期間を含み得る。他の態様において、時間の期間は、その時間の期間の $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、又は $\pm 5\%$ で変動し得る。

30

【0081】

下記の実施例は本発明の記述を助けるものであり、そのような実施例により限定されるものではない。

【実施例】

【0082】

実施例1 M C A - M S C 作製のための試薬

40

【表 1 - 1】

表1 試薬

記載	供給業者 / カタログ番号又は参照番号
DMEM/F12 基本培地	インビトロゲン / A1516901
E8 サプリメント	インビトロゲン / A1517101
ビトロネクチン	ライフテクノロジー / A14700
コラーゲン IV	シグマ / C5533
H-1152 ロック阻害剤	EMD ミリボア / 555550
Y27632 ジヒドロクロライドロック阻害剤	Tocris / 1254
FGF2	ワイズマン・バイオマニファクチャリング / WC-FGF2-FP
ヒト内皮-SFM	ライフテクノロジー / 11111-044
ステムライン II 造血幹細胞増殖培地	シグマ / S0192
GLUTAMAX	インビトロゲン / 35050-061
インスリン	シグマ / I9278
塩化リチウム (LiCl)	シグマ / L4408
コラーゲン I 溶液	シグマ / C2249
フィブロネクチン	ライフテクノロジー / 33016-015
DMEM/F12	インビトロゲン / 11330032
組み換えヒト BMP4	ペプロテック / 120-05ET
アクチビン A	ペプロテック / 120-14E
イスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM)	インビトロゲン / 12200036
Ham's F12 栄養ミックス	インビトロゲン / 21700075
重炭酸ナトリウム	シグマ / S5761
L-アスコルビン酸 2-ホスフェイト Mg^{2+}	シグマ / A8960
1-チオグリセロール	シグマ / M6145
亜セレン酸ナトリウム	シグマ / S5261

10

20

30

【 0 0 8 3 】

【表 1 - 2】

記載	供給業者 / カタログ番号又は参照番号
非必須アミノ酸	ハイクローン / SH30853.01
化学的に規定された脂質濃縮物	インビトロゲン / 11905031
胚移植グレード水	シグマ / W1503
ポリビニルアルコール (PVA)	MP バイオ / 151-941-83
ホロトランスフェリン	シグマ / T0665
ES-CULT M3120	ステムセルテクノロジー / 03120
STEMSPAN無血清増殖培地 (SFEM)	ステムセルテクノロジー / 09650
L-アスコルビン酸	シグマ / A4544
血小板由来成長因子サブユニットβホモダイマー (PDGF-BB)	ペプロテック / 110-14B

10

【 0 0 8 4 】

表 1 に列挙された試薬は当業者に知られており、IMDMとHAM's F12等、容認された組成を有する。GLUTAMAXはL-アラニル-L-グルタミンジペプチドを含み、通常は0.85%のNaCl中に200mMで供給される。GLUTAMAXは培養されるべき細胞により、ジペプチド結合の開裂に際してL-グルタミンを放出する。化学的に規定された脂質濃縮物 (Chemically defined lipid concentrate) は、アラキドン酸を2mg/L、コレステロールを220mg/L、DL-アルファ-トコフェロールアセテートを70mg/L、リノール酸を10mg/L、リノレン酸を10mg/L、ミリスチン酸を10mg/L、オレイン酸を10mg/L、パルミチン酸を10mg/L、パルミトレイン酸を10mg/L、プルロニックF-68を90g/L、ステアリン酸を10mg/L、TWEEN80 (登録商標) を2.2g/L、及びエチルアルコールを含む。H-1152とY27632は高度に強力な、細胞浸透性である、選択的なロック (ROCK) (Rho-associated coiled coil forming protein serine/threonine kinase) 阻害剤である。

20

30

【 0 0 8 5 】

【表 2】

表2 IF6S培地 (10倍濃度)

10 倍 IF6S	量	最終濃度
IMDM	1 パッケージ, 1 L 用の粉末	5 倍
Ham's F12 栄養ミックス	1 パッケージ, 1 L 用の粉末	5 倍
重炭酸ナトリウム	4.2 g	21 mg/mL
L-アスコルビン酸 2-リン酸 Mg ²⁺	128 mg	640 µg/mL
1-チオグリセロール	80 µL	4.6 mM
亜セレン酸ナトリウム (0.7 mg/mL 溶液)	24 µL	84 ng/mL
GLUTAMAX	20 mL	10 倍
非必須アミノ酸	20 mL	10 倍
化学的に規定された脂質濃縮物	4 mL	10 倍
胚移植グレード水	200 mL とする	該当なし

10

【0086】

20

【表 3】

表3 IF9S培地 (1倍濃度; IF6Sに基づく)

IF9S	量	最終濃度
IF6S	5 mL	1倍
ポリビニルアルコール (PVA; 20 mg/mL 溶液)	25 mL	10 mg/mL
ホロトランスフェリン (10.6 mg/mL 溶液)	50 µL	10.6 µg/mL
インスリン	100 µL	20 µg/mL
胚移植グレード水	50 mL とする	適用なし

30

【0087】

【表 4】

表4 分化培地 (1倍濃度; IF9Sに基づく)

分化培地	量	最終濃度
IF9S	36 mL	1倍
FGF2	1.8 µg	50 ng/mL
塩化リチウム (LiCl) (2M溶液)	36 µL	2mM
BMP4 (100 µg/mL溶液)	18 µL	50 ng/mL
アクチビンA (10 mg/mL溶液)	5.4 µL	1.5 ng/mL

40

【0088】

【表 5】

表5 間葉系コロニー形成培地 (1倍濃度)

間葉系コロニー形成培地 (M-CFM)	量	最終濃度
ES-CULT M3120	40 mL	40%
STEMSPAN SFEM	30 mL	30%
ヒト内皮-SFM	30 mL	30%
GLUTAMAX	1 mL	1 倍
L-アスコルビン酸 (250 mM 溶液)	100 μ L	250 μ M
塩化リチウム (LiCl) (2M 溶液)	50 μ L	1 mM
1-シオグリセロール (100 mM 溶液)	100 μ L	100 μ M
FGF2	600 ng	20 ng/mL

10

【0089】

【表 6】

表6 間葉系無血清増殖培地 (1倍濃度)

間葉系無血清増殖培地 (M-SFEM)	量	最終濃度
ヒト内皮-SFM	5 L	50%
STEMLINE II HSFM	5 L	50%
GLUTAMAX	100 mL	1倍
1-チオグリセロール	87 μ L	100 μ M
FGF2	100 μ g	10 ng/mL

20

【0090】

実施例2 ヒトiPSCのMCA-MSCへの分化

1. ビトロネクチンで被覆された ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) プラスチック製品上で、E8完全培地 (DMEM/F12基礎培地 + E8サプリメント) + $1 \mu\text{M}$ H1152の中でiPSCを解凍した。プレートしたiPSCを37、5%CO₂、20%O₂ (正常酸素圧) でインキュベートした。

30

【0091】

2. ビトロネクチンで被覆された ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) プラスチック製品上で、E8完全培地 (ロック阻害剤無し) の中でiPSCを3継代増殖し、分化プロセスが開始する前に37、5%CO₂、20%O₂ (正常酸素圧) でインキュベートした。

【0092】

3. 回収し、コラーゲンIVで被覆された ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) プラスチック製品上で、E8完全培地 + $10 \mu\text{M}$ のY27632の中で単一細胞/小さなコロニーとして 5×10^3 細胞/cm₂ でiPSCを播種し、37、5%CO₂、20%O₂ (正常酸素圧) で24時間インキュベートした。

40

【0093】

4. E8完全培地 + $10 \mu\text{M}$ のY27632を分化培地と置き換え、37、5%CO₂、5%O₂ (低酸素圧) で48時間インキュベートし、原始中胚葉細胞 (primitive mesoderm cell) を作製した。

【0094】

5. 単一細胞の懸濁液として、分化培地接着培養液からコロニー形成原始中胚葉細胞を回収し、M-CFM懸濁液培養液に移し、間葉系コロニーが形成するまで、37、5%CO₂、20%O₂ (正常酸素圧) で12日間インキュベートした。

【0095】

6. 回収し、フィブロネクチン/コラーゲンIで被覆された ($0.67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ フィ

50

ブロネクチン、 $1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ コラーゲン I) プラスチック製品上で、M-SFEM の中に間葉系コロニーを播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $20\% \text{O}_2$ (正常酸素圧) で3日間インキュベートしてMSCを作製した(継代0)。

【0096】

7. コロニーを回収し、フィブロネクチン/コラーゲン I で被覆されたプラスチック製品上で、M-SFEM の中に 1.3×10^4 細胞/ cm^2 で単一細胞として播種し(継代1)、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $20\% \text{O}_2$ (正常酸素圧) で3日間インキュベートした。

【0097】

8. 回収し、フィブロネクチン/コラーゲン I で被覆されたプラスチック製品上で、M-SFEM の中に 1.3×10^4 細胞/ cm^2 で単一細胞として播種し(継代2)、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $20\% \text{O}_2$ (正常酸素圧) で3日間インキュベートした。

10

【0098】

9. 回収し、フィブロネクチン/コラーゲン I で被覆されたプラスチック製品上で、M-SFEM の中に 1.3×10^4 細胞/ cm^2 で単一細胞として播種し(継代3)、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $20\% \text{O}_2$ (正常酸素圧) で3日間インキュベートした。

【0099】

10. 回収し、フィブロネクチン/コラーゲン I で被覆されたプラスチック製品上で、M-SFEM の中に 1.3×10^4 細胞/ cm^2 で単一細胞として播種し(継代4)、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $20\% \text{O}_2$ (正常酸素圧) で3日間インキュベートした。

20

【0100】

11. 回収し、フィブロネクチン/コラーゲン I で被覆されたプラスチック製品上で、M-SFEM の中に 1.3×10^4 細胞/ cm^2 で単一細胞として播種し(継代5)、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $20\% \text{O}_2$ (正常酸素圧) で3日間インキュベートした。

【0101】

12. 単一細胞として回収し、最終産物を凍結した。

【0102】

2つの実験(TC-A-96及びDAD-V-90)を実施し、M-CFMにPDGF-BB($10 \text{ ng}/\text{mL}$)及び/又はLiCl(1 mM)を補足することが、iPSC由来のMCA-MSCのT細胞抑制に及ぼす影響を検討した。T細胞抑制を、ワイズマン・バイオマニファクチャリングの免疫能アッセイ(IPA)を使用して評価した。

30

【0103】

表7で概説するように、血小板由来成長因子(PDGF)とLiClの下記の組み合わせ: PDGF+/LiCl+、PDGF-/LiCl-、PDGF+/LiCl-、及びPDGF-/LiCl+、を評価した。2つの異なるDneg1播種密度(5×10^3 細胞/ cm^2 と 1×10^4 細胞/ cm^2)、及び分化培地中のアクチビンA(AA)の2つの異なる濃度(1倍のAA= $15 \text{ ng}/\text{mL}$ 及び0.1倍のAA= $1.5 \text{ ng}/\text{mL}$)を、TC-A-96実験で比較したことに留意されたい。単一のDneg1播種密度(5×10^3 細胞/ cm^2)とアクチビンA濃度($1.5 \text{ ng}/\text{mL}$)を、DAD-V-90実験において使用した。第1のIPA(IPA1)においては単一のleukopak(LPK7)が使用され、第2のIPA(IPA2)においては2つのleukopak(LPK7とLPK8)が使用されたことにも留意されたい。

40

【0104】

このアッセイは、各MSC株がTヘルパー($\text{CD}4^+$)リンパ球の増殖を抑制できる程度を評価するために設計された。健康な個体の末梢血から精製された凍結保存された白血球(leukopak(LPK))に由来する末梢血単核球細胞(PBMC)を使用して、凍結保存されたMSCを試験した。従って、ドナーとドナーの間でLPK細胞集団の変動が予測される。研究グレード材料のための単一のPMB C試料に対する試験に限定するというオプションを伴い、各MCA-MSC試験試料を、臨床グレード材料のための2つの異なる個体に由来するPMB Cに対して試験した。アッセイの完全性(integrity)/再現性を保証し、試験試料を標準化するために、各MCA-MSC試験試料のためのアッ

50

セイは、参照標準MSC株と共に行われた。そのアッセイはBloomら Cytotherapy, 2015, 17(2):140-51に述べられている。

【0105】

要するに、試験MCA-MSCを21Gyのガンマ照射に曝した。48ウェルの組織培養プレート中に、 4×10^5 、 2×10^5 、 4×10^4 、及び 2×10^4 個の照射されたMCA-MSCを、個々のウェル中にプレートした。PBMCを別個に、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステルにより標識した。上記のMCA-MSCを含んでいるウェル当たり 4×10^5 細胞で、標識されたPBMC細胞をプレートした。これは、1:1、1:0.5、1:0.1、及び1:0.05に設定されたPBMC:MCA-MSC比(titrated PBMC:MCA-MSC ratio)をもたらした。追加のウェルに刺激されたPBMC単独、他にMCA-MSC単独、及び他に1:0.05の比で刺激無しをプレートし、それらは全てコントロールとして働いた。その後、T細胞刺激性のモノクローナル抗体、抗ヒトCD3イプシロン(epilsson)及び抗ヒトCD28(R&Dシステムズ社、ミネアポリス、ミネソタ州)を各ウェルに添加した。

10

【0106】

培養の4日目に個々のウェルから細胞を回収した。各ウェル由来の細胞を、アロフィコシアニン標識された抗ヒトCD4と共にインキュベートした。その後、フロ-サイトメーターを使用したカルボキシフルオレセイン強度を介して、CD4⁺細胞の増殖について解析した。MCA-MSC単独のコントロールは、共培養されたウェルからMCA-MSCを取り除く(gate out)ために働いた。PBMC単独のコントロールは、MCA-MSCに仲介された抑制の測定された程度に対する、最大のT細胞増殖のための陽性コントロールとして働いた。刺激されない1:0.05の比のウェルは、測定された増殖に対する陰性コントロールゲート(negative control gate)を作製するために使用された。

20

【0107】

試験試料比から、最良にフィットする曲線を使用してIC50値を作成した。IC50値は基準標準に対して正規化された(IC50基準標準/IC50試験試料)。この正規化されたIC50は、より効力が強い(より抑制的である)試料に対しては大きな値、及び効力がより低い試料に対してはより小さな値をもたらす。

【0108】

結果

30

表7の中に表されたIC50データは、LIC1が補足されているが、PDGFが除かれている(すなわちPDGF-/LIC1+)M-CFMは、iPSCを分化させて、免疫調節性であるiPSC-MSCを作製するために最適であることを示している。さらに、アクチビンAのより低い濃度も、iPSC由来のMCA-MSCの免疫抑制を改善した。

【0109】

【表 7】

表 7 免疫能アッセイ

IC50 (LPK7)	IC50 (LPK8)	試料	PDGF	LiCl	アクチビン A	播種密度 (D2)
適用なし	抑制せず	TC-A-96-B3	+	+	0.1 倍 (1.5ng/mL)	5x10 ³ 細胞 /cm ²
適用なし	0.17	TC-A-96-B1	+	+	1 倍 (15ng/mL)	5x10 ³ 細胞 /cm ²
適用なし	0.17	DAD-V-90-4	+	+	0.1 倍 (1.5ng/mL)	5x10 ³ 細胞 /cm ²
適用なし	0.19	TC-A-96-D3	+	+	0.1 倍 (1.5ng/mL)	1x10 ⁴ 細胞 /cm ²
適用なし	0.36	DAD-V-90-2	+	-	0.1 倍 (1.5ng/mL)	5x10 ³ 細胞 /cm ²
適用なし	0.57	DAD-V-90-1	-	-	0.1 倍 (1.5ng/mL)	5x10 ³ 細胞 /cm ²
0.39	0.54	TC-A-96-B2	-	+	1 倍 (15ng/mL)	5x10 ³ 細胞 /cm ²
0.37	0.58	TC-A-96-D2	-	+	1 倍 (15ng/mL)	1x10 ⁴ 細胞 /cm ²
0.69	0.93	DAD-V-90-3	-	+	0.1 倍 (1.5ng/mL)	5x10 ³ 細胞 /cm ²

【0110】

この実施例により作製された MCA - MSC は、CD73⁺CD105⁺CD90⁺CD146⁺CD44⁺CD10⁺CD31⁻CD45⁻の表現型を示した。

【0111】

実施例 3 MCA - MSC マイクロ RNA 解析

実施例 2 において作製された MCA - MSC は、1194 の miRNA、及び、(71 の MSC 試料と 94 の非 MSC 試料に対して検証された) miR-127-3p、miR-145-5p、miR-181b-5p、miR-214-3p、miR-299-5p からなる独自の miRNA パネルを含む、マイクロ RNA (miRNA) マイクロアレイに対する解析を受けた。

【0112】

実施例 2 において作製された MCA - MSC は、miR-145-5p、miR-181b-5p、及び miR-214-3p をそれぞれ発現したが、miR-214-3p 及び miR-299-5p は発現しなかった。

【0113】

試験された全ての試料について作成された正規化された (少なくとも 1 つの試験された試料の中に存在する) データの中で信頼性を有して検出されたマイクロアレイの 233 の miRNA の主要成分解析は、実施例 2 において作製された MCA - MSC は他の 71 の MSC 試料のそれぞれとは異なることを示した。

【0114】

実施例 4 インビボにおける AAD / 喘息の処置

方法及び材料

動物

10

20

30

40

50

6～8週齢のメスのB a l b / cマウスを、モナッシュ・アニマル・サービス（モナッシュ大学、クレイトン、ビクトリア、オーストラリア）から得、水と飼料（バラストック・ストックフィード、パケナム、ビクトリア、オーストラリア）を自由に摂取できる、12時間明るく／12時間暗い照明サイクルの、制御された環境下で飼育した。如何なる実験の前にも4～5日の順応期間が全てのマウスに与えられ、行われた全ての手順は、モナッシュ大学動物倫理委員会（エシックス番号：M A R P / 2 0 1 6 / 0 7 8）により承認され、科学的な目的のための実験動物のケアと使用のためのオーストラリアのガイダンスに従ったものである。

【0115】

慢性A A Dの誘導

慢性A A DにおけるM S Cの効果を評価するために、オボアルブミン（O V A）誘導性の慢性A A Dのモデルを、マウスにおいて確立した（ $n = 24$ ）。 $10 \mu\text{g}$ のグレードVの鶏卵O V A（シグマ・アルドリッチ、ミズーリ州、米国）及び $400 \mu\text{g}$ 硫酸アルミニウムカリウムアジュバント（ $a l u m$: A J A Xケミカルズ、NSW、オーストラリア）を、0日目と14日目に、腹腔内（I P）注射を2回することによりマウスを感作した。その後それらを、21日目と63日目の間に、週に3回、超音波ネブライザー（オムロン N E - U 0 7 ; オムロン、京都、日本）を使用して、30分間、エアロゾル化したO V A（0.9%の通常の生理食塩水中に2.5% w / v）を、全身吸入で暴露（噴霧）することにより接種した。しかしながらコントロールマウス（ $n = 24$ ）については、O V Aの代わりに、 $500 \mu\text{L}$ の0.9%生理食塩水のI P注射を行い、0.9%の生理食塩水により噴霧した。

【0116】

M C A - M S C 処置

慢性A A Dの確立の24時間後（64日目）、O V A又は生理食塩水で感作された／接種を受けたマウスの亜群（ $n = 8$ 匹マウス／群）は、M C A - M S CのI V又はI N投与を受けた。O V Aに誘導されたA A Dの慢性モデルにおいて、ヒト骨髓由来の（間質の）M S Cとヒト羊膜上皮細胞等の、他の幹細胞のI Nがもたらす効果を評価するのに使用された時間枠を再現するために、全ての場合において14日間の処置期間（64～67日目）が選ばれた。

【0117】

実施例1と2に従ってM C A - M S Cを作製した。M S Cを規定する特徴はC D 7 3、C D 9 0、及びC D 1 0 5の発現であり、M C A - M S C細胞の99%超はそれらのマーカーの3つ全てについて陽性であるが、C D 4 3 / 4 5とC D 3 1については陰性であり、造血及び内皮系列細胞の不在が確かめられた。処置期間に亘って1週間当たり1回（64日目と71日目）、全ての処置が施された。各々のスケジュールされた処置の朝に、凍結されたM C A - M S Cを37℃の水浴中で解凍し、その後に下記のように再懸濁した：M C A - M S CのI V投与のために、 1×10^7 個の細胞を2 mLのリン酸緩衝生理食塩水（P B S）の中で再懸濁した。マウスをパースペックス拘束器により拘束し、 1×10^6 細胞／ $200 \mu\text{L}$ のP B Sを、生理食塩水又はO V Aで感作された／接種を受けたマウスの尾静脈中に注射した。M C A - M S CのI N投与においては、 1×10^7 個の細胞を0.5 mLのP B S中に再懸濁した。マウスをイソフルラン（バクスターヘルスケア、NSW、オーストラリア）により軽く麻酔し、鼻腔内滴下を行っている間は半仰臥位に保った。P B Sの 1×10^6 細胞／ $50 \mu\text{L}$ を（自動ピペットを使用して各鼻腔内に $25 \mu\text{L}$ ）、その後マウスにI N投与した。

【0118】

侵襲的プレチスモグラフィー

78日目（M C A - M S Cの最後の処置に続く7日目）にマウスを、0.9%生理食塩水中のケタミン（ $10 \text{mg} / \text{kg}$ 体重）及びキシラジン（ $2 \text{mg} / \text{kg}$ 体重）により麻酔した。その後、18ゲージの気管切開チューブを用いて全てのマウスについて気管切開を行った。その後、B u x c o F i n e P o i n t e p l e t h y s m o g r a p h（

10

20

30

40

50

ブクスコ、リサーチシステムズ、ウィルミントン、ノースカロライナ州、米国)のチャンパーにマウスを置き、通気した。その後PBS中に溶解され、噴霧されたメタコリン(メタコリン;シグマ-アルドリッチ、ミズ-リ州、米国)の増加する用量に応答した各マウスの気道抵抗を測定し、 $6.25 \sim 50 \text{ mg/mL}$ を気管内に4回送達して気管支収縮を引き起こし、AHRを評価した。気道抵抗の変化(各投与後の最大気道抵抗からPBSのみのベースライン抵抗を引く)を対応するメタコリンの用量に対してプロットした。

【0119】

組織採取

侵襲的プレチスモグラフィーに続いて、各動物から肺組織を単離し、4つの別個の小葉(lobe)に分ける前に冷たいPBS内で洗浄した。最大の小葉を10%の中性緩衝ホルムアルデヒド中で一晚固定し、切断加工し、(種々のエンドポイントの組織学的及び免疫組織化学的な解析のために)パラフィンワックス中に包埋した。残る3つの小葉は、様々な他のアッセイのために液体窒素中で急速凍結した。

【0120】

肺の組織病理学

各マウス由来の最大の小葉が一旦パラフィンに包埋されたら、各組織ブロックを連続切片とし(厚さ $3 \mu\text{m}$)、荷電した(charged)マイクロガラススライド(グレイル・サイエンティフィック、リングウッド、ヴィクトリア、オーストラリア)上に戴置し、様々な組織学的染色又は免疫組織化学に供した。炎症スコアを評価するために、上皮の厚みと上皮細胞外マトリックス(ECM)沈着、各マウス由来の1つの切片(スライド当たり)はマッソンのトリクローム染色を受けた。杯細胞化生の評価のために、スライドの第二のセットは、アルシアンブルー過ヨウ素酸シッフ(ABPAS)染色を受けた。マッソンのトリクローム染色及びABPAS染色された切片を、以下に詳細に述べるように形態計測的に解析した。

【0121】

免疫組織化学(IHC)

TGF- α 1(ポリクローナル抗体;sc-146;サンタクルス・バイオテクノロジー、サンタクルス、カリフォルニア州、米国;1:1000希釈)又は-平滑筋アクチン(-SMA;筋線維芽細胞分化のマーカー;モノクローナル抗体使用;M0851;ダコ、グロストロップ、デンマーク;1:200希釈)を検出するために、IHCを使用した。DAKO EnVision抗ウサギ又は抗マウスキットと3、3'-ジアミノベンジジン(DAB)色素原を使用して一次抗体染色を検出し、一方、如何なる一次抗体も無しでEnVisionキットに曝したネガティブコントロールも含めた。全てのスライドをその後ヘマトキシリンにより対比染色し、形態計測分析的解析のために、ScanScope AT Turbo(アペリオ、カリフォルニア州、米国)を用いてモナッシュ・ヒストロジー・サービスによりスキャンした。

【0122】

形態計測分析的解析

マッソンのトリクローム、ABPAS、及びIHC染色したスライドを、下記のようにして形態計測分析的解析をかけた。切片当たり(直径 $150 \sim 300 \mu\text{m}$ の)5つの気道を無作為に選択し、Aperio ImageScope(アペリオ、カリフォルニア州、米国)を用いて解析した。マッソンのトリクローム染色したスライドに、半定量的細気管支周囲炎症スコア付けを行い、ここで実験を盲検とし、個々の気道に0(気道の周囲に検出可能な炎症無し)から4(広範囲に及び、且つ大きな炎症性細胞凝集物、プールされた大きさ $\sim 0.6 \text{ mm}^2$)のスコアを付けた。マッソンのトリクローム染色したスライドの、上皮及び上皮下のECM層(青色に染色)の厚みを測定することにより(基底膜(EM)の長さの $\mu\text{m}^2 / \mu\text{m}$ として表した)、上皮の厚みと上皮下ECM沈着の解析も行った。

【0123】

ABPAS、-SMA染色されたスライドを、ポジティブに染色された杯細胞又はB

M長さ100 μm 当たりの - SMAポジティブ細胞の数を数えることにより、杯細胞化生及び上皮下の筋線維芽細胞数のそれぞれについて解析した。TGF- β 1染色されたスライドを、気道中の強いポジティブに染色されたピクセルを評価するアルゴリズムを実行することにより、TGF- β 1タンパク質発現について解析した。気道の総面積 (mm^2) 当たりの強いポジティブのピクセルの数として；及びその後（1として表される）生理食塩水で処置されたコントロール群と比較して、結果を表した。

【0124】

ヒドロキシプロリンアッセイ

各マウスに由来する二番目に大きな肺葉を、ヒドロキシプロリン含有量の測定について既に述べられたようにして加工し (Royce, S. G.ら, (2013) Clin. Sci. 124, 41-51)、それを精製されたトランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン (シグマ-アルドリッチ) の標準曲線から測定した。総コラーゲン含有量を推定するために、ヒドロキシプロリンの値を6.94の係数 (多くの哺乳動物組織中のコラーゲンのアミノ酸組成の $\sim 14.4\%$ を表しているヒドロキシプロリンに基づく) により掛け算を行い、次に各対応組織の乾燥重量により割り算を行いコラーゲン濃度パーセンテージを得た。

【0125】

ゼラチンザイモグラフィ

各マウスに由来する三番目に大きな肺葉を、総タンパク質 (試料当たり10 μg) の等量アリコートに1mg/mlのゼラチンを含む7.5%アクリルアミドゲル上で評価する前に、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) を含むタンパク質の抽出のために既に詳細に述べたようにして加工した (Woessner, J. F., (1995) Methods Enzymol. 248, 510-528)。ゼラチン分解活性を明らかなバンドとして可視化した。MMP-9 (メスBa1b/cマウスの肺内の主たるゼラチナーゼ) の濃度測定を、GS710濃度計 (バイオラッド・ラボラトリ-ズ、グレイズヴィル、ニューサウスウェールズ、オーストラリア) 及びQuantity-Oneソフトウェア (バイオラッド) を用いて行った。MMP-9の光学密度 (OD) の相対平均 \pm SEMをその後グラフ化した。

【0126】

統計解析

全ての統計解析は、GraphPad Prism v6.0 (グラフパッド・ソフトウェア社、ラホヤ、カリフォルニア州、米国) を用いて行われ、平均 \pm SEMで表した。AHRの結果を、ボンフェローニ事後解析 (Bonferroni post-hoc test) を伴う二元配置分散分析 (two-way ANOVA) により解析した。残りのデータを、群間の多重比較のために、ニューマン・コイルス事後解析 (Newman-Keuls post-hoc test) を伴う一元配置分散分析 (one-way ANOVA) により解析した。各場合において、データは $p < 0.05$ で有意であると見做された。

【0127】

結果

A Iに対するMCA-MSCの効果

炎症スコア付けシステム (0~4) を使用して、H&E染色した肺切片からA Iを半定量した。OVAで損傷されたマウスの気管支周囲の炎症スコア (2.75 ± 0.09) は、生理食塩水 (SAL) で感作された/接種を受けたコントロールのスコア付け (0.25 ± 0.09 ; SAL群に対して $P < 0.001$) よりも有意に高かった (図1)。OVA群における炎症レベルの上昇により、これらのマウスのOVAによる感作と接種が成功していることが確認された。

【0128】

SAL-コントロールマウスに投与されたときの基礎炎症スコアに影響することなく、MCA-MSCの投与は、OVA誘導性の気管支周囲の炎症細胞の浸潤を有意に減少させた (1.25 ± 0.23 ; OVA群に対して $P < 0.001$) (図1A、図1B)。しかしながらMCA-MSCによる処置は、SALコントロールマウスにおいて測定されたA Iに戻る程には、A Iを十分に減少させることができなかった (OVA損傷マウスにMCA

A - M S C を投与した処置につき、S A L 群に対して $P < 0.05$)。

【0129】

A W R に対する M C A - M S C の効果

杯細胞化生

杯細胞化生を A B P A S 染色された肺切片から形態計測的に評価し、B M 長さ $100 \mu\text{m}$ 当たりの杯細胞の数として表した (図 2)。O V A 処置されたマウスは、それらの S A L コントロールの対応物 (0.001 ± 0.00) と比較して、杯細胞数 (6.08 ± 0.52) が有意に増加した (S A L 群に対して $P < 0.001$; 図 2 A、図 2 B)。M C A - M S C の投与は、O V A 誘導性の杯細胞数の促進を、完全にではないが、有意に減少させることができた (3.97 ± 0.64 から 2.89 ± 0.48 、O V A 群に対して $P < 0.01$; 図 2 A、図 2 B)。しかしながら、M C A - M S C の送達は、O V A 誘導性の杯細胞化生を、S A L コントロールで測定されたところまで好転させることはなかった (両方は S A L 群に対して $P < 0.001$) が、S A L 処置されたマウスにおける杯細胞数には影響しなかった。

10

【0130】

気道上皮厚み

気道上皮厚みを、マッソンのトリクロームで染色された肺切片から形態計測的に評価し、 $\mu\text{m}^2 / \mu\text{m}$ B M 長さとして表した (図 3)。O V A 処置されたマウスの上皮厚み (19.16 ± 0.63) は、S A L コントロールにおいて測定されたもの (14.28 ± 0.45) よりも有意に高かった (S A L 群に対して $P < 0.001$; 図 3 A、図 3 B)。M C A - M S C の送達は上皮の厚みを、O V A 群において測定されたもの (18.59 ± 0.77 から 16.67 ± 0.87) から、完全にではないが有意に減少させた (O V A 群に対して $P < 0.05$; S A L 群に対して $P < 0.05$; 図 3 A、図 3 B)。重要なことに、M C A - M S C 処置は S A L コントロールマウスにおける基礎上皮厚みには影響しなかった。

20

【0131】

上皮下コラーゲン沈着

マッソントリクロームで染色された肺切片から、上皮下コラーゲン沈着を形態計測的に評価し、 $\mu\text{m}^2 / \mu\text{m}$ B M 長さとして表し (図 3); S A L コントロールにおける値 (14.31 ± 1.87) と比較して、O V A 損傷マウス (27.63 ± 0.66) においては有意に上昇した (S A L 群に対して $P < 0.001$; 図 3 A、図 3 C)。M C A - M S C の送達は、O V A 誘導性の上皮下コラーゲン沈着の異常な促進を低下させた (22.39 ± 1.78 から 16.98 ± 0.98 、O V A 群に対して $P < 0.05$; 図 3 A、図 3 C)。

30

【0132】

総肺コラーゲン濃度 (線維症)

総肺コラーゲン濃度 (コラーゲン濃度 % / 肺組織乾燥重量) を、各マウスの二番目に大きな肺葉中に存在するヒドロキシプロリンレベルから推定し、線維症の指標として使用した (図 4); O V A 損傷マウス ($3.94 \pm 0.09\%$) においては、S A L コントロールマウスにおいて測定されたものと比較して有意に増加していた ($2.89 \pm 0.18\%$; S A L 群に対して $P < 0.001$)。O V A 損傷マウスへの M C A - M S C の投与は、肺における線維症を低下させた ($3.26 \pm 0.17\%$ から $3.62 \pm 0.07\%$; O V A 群に対して $P < 0.05$; 図 4)。

40

【0133】

気道 T G F - 1 発現

M C A - M S C が O V A 誘導性の上皮下及び総コラーゲン沈着 (線維症) を好転させることができる機構を決定するために、気道 T G F - 1 (線維症促進性サイトカイン) 発現レベルにおける相対的な変化を、I H C - 染色した肺切片から形態計測的に評価し、解析された気道当たりの染色 % として表した (図 5)。気道 T G F - 1 発現は O V A 損傷マウス (1.85 ± 0.13) において、S A L コントロールで測定されたもの (1.0

50

$0 \pm 0.08\%$)と比較して有意に増加した(SAL群に対して $P < 0.001$; 図5A、図5B)。OVA損傷マウスへのMCA-MSCの送達は、異常な気道TGF- $\beta 1$ 発現レベルを、SALコントロールにおいて測定されたレベルに戻るまで好転させ(1.06 ± 0.05 から 1.22 ± 0.05 、OVA群に対して $P < 0.001$; SAL群と差がない)、SALコントロールマウスに投与したときに基礎気道TGF- $\beta 1$ 発現レベルに影響することはなかった(図5A、図5B)。

【0134】

上皮下筋線維芽細胞密度

- SMA染色された上皮下筋線維芽細胞密度も、IHC染色された肺切片から形態計測的に評価し、BM長さの筋線維芽細胞/ $100\mu m$ の数として表した(図6)。SALコントロールマウスにおいて、微量の上皮下の-SMAポジティブな筋線維芽細胞が検出された(0.14 ± 0.05)一方で、OVA損傷マウスでは筋線維芽細胞密度が ~ 30 倍増加した(4.37 ± 0.37 ; SAL群に対して $P < 0.001$; 図6A、図6B)。MCA-MSCの投与は、OVA誘導性の上皮下筋線維芽細胞密度の増加を減少させ(2.86 ± 0.27 から 3.42 ± 0.09 ; OVA群に対して $P < 0.05$)、SALコントロールマウスに投与されたときの基礎筋線維芽細胞数に何ら影響することはなかった(図6A、図6B)。しかしながら、MCA-MSCの投与が、異常な上皮下筋線維芽細胞負荷を、SALコントロールマウスにおいて測定されたところに戻るまで十分に回復させることはなかった(両方ともSAL群に対して $P < 0.001$; 図6A、図6B)。

【0135】

肺ゼラチナーゼ発現

我々はMCA-MSCに仲介された、OVA誘導性の気道/肺線維症の回復が、コラーゲン分解性のMMPレベルに影響するそれらの能力に関連しているどうかかも決定した。ゼラチンザイモグラフィは、メスBalb/cマウスの肺は主としてMMP-9(ゼラチナーゼB)を発現し、MMP-13(コラゲナーゼ-3)の程度は低いことを明らかにした(図7)。OVA損傷マウスにおける相対的MMP-9発現レベル(1.62 ± 0.22)は、SALコントロール動物において測定されたものと有意差はなかった(1.00 ± 0.09)(図7A; 図7B)。それと比較して、OVA損傷マウスへのMCA-MSCの投与は、MMP-9レベルを顕著に増加させ(3.77 ± 0.18 から 4.56 ± 0.20 ; OVA MCA-MSC群に対して $P < 0.05$)、OVA処置されたマウス単独において測定されたものに対して ~ 1.3 倍と ~ 1.8 倍であった(OVA群に対して $P < 0.001$; SAL群に対して $P < 0.001$; 図7A; 図7B)。興味深いことに、SAL処置マウスへのMCA-MSCの送達も、MMP-9レベルを有意に増加させた(1.95 ± 0.38 から 2.65 ± 0.30 ; SAL群に対して $P < 0.05$)。

【0136】

AHRへのMCA-MSCの効果

AHRを、噴霧されたメタコリン(気管支収縮剤)の濃度増加に応答した侵襲的なプレチスモグラフィにより評価した(図8)。予期された様に、OVA処置されたマウスはSALコントロールにおいて測定されたものと比較して、AHRが有意に上昇した($P < 0.001$ 対SAL群; 図8)。MCA-MSCの送達は、OVA誘導性のAHRの増加を好転させた($P < 0.05$ 対OVA群; 図8)。測定された多くの他のエンドポイントと同様に、SALコントロールマウスに投与されたときには、MCA-MSCの送達は基礎AHR測定には影響しなかった(図8)。

【0137】

考察

この研究は、確立された疾患病理に対する治療として与えられたときに、慢性AAD/喘息の病因の3つの中心要素: AI、AWR、及びAHRに対する、新規なiPSC由来のMCA-MSCの治療潜在能力を評価することを目的としている。

【0138】

10

20

30

40

50

MCA-MSCの投与により、マウスに対する繰り返されたOVA感作と接種により誘導された、確立されたAI、AWR（杯細胞化生、異常な気道TGF- β 1レベル、上皮筋線維芽細胞とコラーゲンの蓄積、総肺コラーゲン濃度）、及びAHRに対して保護がなされた（表8）。これは2週間（週に1回）の処置期間に亘り、異常な気道TGF- β 1レベル、気道/肺線維化及びAHRの好転と、MCA-MSCの送達によるコラーゲン分解性MMP-9レベルの有意な増加をもたらした（表8）。重要なことにMCA-MSCの投与は、測定されたパラメーターの基礎発現に影響しないことが見出され、MCA-MSCの送達は、AAD/喘息の中心要素を処置する安全であり且つ最も有効な手段を提供することを示唆している。

【0139】

【表8】

表8 慢性AADの病因に対するMCA-MSCの効果の概要

ヒトの喘息の鍵となる特徴	OVA	SAL MCA-MSCs IV	OVA MCA-MSCs IV	SAL MCA-MSCs IN	OVA MCA-MSCs IN
AI	↑↑↑	—	↓	—	↓↓↓
杯細胞化生	↑↑↑	—	↓	—	↓↓↓
上皮厚み	↑↑↑	—	—	—	↓↓↓*
上皮下コラーゲン	↑↑↑	—	↓	—	↓↓↓↓*
肺総コラーゲン	↑↑↑	—	↓	—	↓↓↓↓*
気道TGF- β 1レベル	↑↑↑	—	↓↓↓	—	↓↓↓↓
上皮筋線維芽細胞密度	↑↑↑	—	↓	—	↓↓↓*
肺MMP-9レベル	—	↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑*
AHR	↑↑↑	—	↓↓↓	—	↓↓↓↓**

表8においてOVA、SAL MCA-MSC IV、及びSAL MCA-MSC INの欄中の矢印は、生理食塩水（SAL）で処置されたマウスにおいて測定されたものに対する変化を反映する一方で、OVA MCA-MSC IVとOVA MCA-MSC IN群中の矢印は、OVA単独群のものに対する変化を反映する。（—）はそれぞれ、SAL又はOVA処置されたマウスと比較して変化が無いことを意味する。OVA MCA-MSC IV群に対する* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

【0140】

喘息の炎症性要素は気道閉塞に寄与する。Th2が歪めた（skewed）炎症は、インターロイキン（IL）-13を含むサイトカインの特定のサブセットの上昇と、杯細胞化生の誘導をもたらした。

【0141】

これらの発見と整合して、過去の研究は、iPSC由来のMSC（本明細書で開示されるMCA-MSCではない）のIV注射は、急性OVAモデルにおいて、Th2サイトカイン、IL-4、IL-5、及びIL-13のレベルを抑制することにより、気道の炎症スコアを部分的に低下させることができたことと示している。MCA-MSCの全身的な効果は、直接的な細胞-細胞接触を介して制御性T細胞を活性化するそれらの能力とすら関連しているかもしれない。しかしながらMCA-MSCが、AIを～75%、杯細胞化生を

10

20

30

40

50

～ 50 % 顕著に抑制するという本発見は、ヒト骨髄又は脂肪組織に由来するMSCと比較して、MCA-MSCが免疫調節的性質をより大きく仲介することを示唆している。

【0142】

気道/肺へMCA-MSCを直接的に投与すると、それらが分泌する防御因子が、肺環境中に残存することが許容される。さらに直接的に投与されたMCA-MSCは、炎症を起こした肺の中で残存する可能性がより高く、肺胞マクロファージと樹状細胞を含む抗原提示細胞の抑制を介して、仲介されたアレルギー曝露に対する、より大きな保護効果を有する。

【0143】

杯細胞化生と共に上皮増殖は、喘息における上皮リモデリングにおいて大きな貢献をする。上皮のバリア機能の減少と剥離は、上皮増殖としての最高点(culminate)である。この増殖は重篤な喘息において特に広範囲であり、ここで上皮の拡張は気道閉塞をもたらす。このリプログラミングが喘息の発症において早期に起こるならば、喘息療法は上皮を標的にすべきである。MCA-MSCの送達は上皮厚みの減少をもたらすが、AIにおいても類似の減少を提供する。これは骨髄由来のMSCに関連した、骨髄-MSC単独でのIN送達は上皮厚みに影響しないという過去の知見と対照的である。その研究において、AIにおける減少により上皮厚みは影響を受けなかった。よってMCA-MSCと骨髄-MSCの間で観察された差は、それらがAIを弱める能力により作成された受動的な効果というよりも、MCA-MSC自身の能動的な性質によるものでありそうである。

【0144】

更に他の研究において、上皮因子修復ペプチド(トレフォイル因子-2)の投与は、抗線維症とコルチコステロイドによる組み合わせ処置と同程度まで上皮の厚みを減少させたが、その組み合わせ処置によりAIのより大きな減少が提供された。そのために、炎症の減少によって上皮増殖の減少が仲介されることはなかった。

【0145】

この追加の証拠と共に本知見は、MCA-MSCの送達は、i) 上皮厚みを減少させるパラクリン因子を十分に蓄積すること、及び/又は、ii) これらの細胞は損傷された上皮と直接的に接触するようになり、その増殖における好転を仲介すること、を許容することを示唆する。MCA-MSCにより作製される上皮厚みと杯細胞化生の減少は、AWRの好転の最初の証拠である。

【0146】

機械的傷害とアレルギーを含む多数の因子が最高点になる(culmination)ことは、肺構造と気道機能の破壊に貢献し得、AIに加えてAWRをもたらす。アレルギーによる又は遺伝性の感受性に由来する損傷は、構造と気道機能を自己修復しようとするリモデリングの内因性の工程を、肺が受けることの原因となり、これらの修復過程は異常な創傷治癒をもたらし、最終的には線維症に至る。線維症はOVA感作された気道においては明らかであり、上皮と総コラーゲンレベルの異常な上昇を示す。MCA-MSCの送達は、異常な上皮と総コラーゲン沈着の両方を有意に減少させ、場合によっては、損傷を受けていない生理食塩水処置群において見られるレベルに戻るまで、この異常なコラーゲン沈着を完全に好転させた。過去の研究はOVA誘導性の上皮及び総コラーゲン沈着の促進は、幹細胞に基づいた処置が抗線維症剤と共に投与されたときにのみ十分に好転させることができること示したので、これらの結果は予期されないものであった。これらの組み合わせ処置の研究において、抗線維症剤は、幹細胞に基づいた療法を導入し得る、より好ましい環境を作り出すであろうと提案され、よって幹細胞の生き残りを助け且つそれらの増殖及び移動能力を増加させ、それらの予防/治療効果を誘導する。よってMCA-MSCの送達は、抗線維症剤と類似した効果を有し、線維症の非存在下において創傷治癒を促進することができる、胎児線維芽細胞に類似した抗線維症特性を有するかもしれない。

【0147】

これらの結果は、観察された上皮厚みのMCA-MSC誘導性の減少にも相当する。線維形成性成長因子は、上皮障害に応答して、上皮細胞により一般的に放出される。喘息に

10

20

30

40

50

においてこの応答は促進され、上皮下線維症は、防御性の上皮から気道壁のより深部への信号の伝達に起因することを示唆している。従ってMCA - MSCは、IV投与されたときには上皮下コラーゲンと総コラーゲンの減少を前提として、免疫調節性の性質と、抗線維性メディエーターの可能な分泌を介して、それらの抗線維症効果を発揮し得る。

【0148】

この研究の鍵となる発見は、MCA - MSCは線維症を好転させ、AHRを、損傷を受けていないマウスにおいて測定されたレベルまで戻すということである。AHRは杯細胞化生と上皮肥厚に由来する粘液栓により引き起こされ得る、気道閉塞により決定される。加えて気道壁のAIと線維症の間の相互作用も、AHRを上昇させる環境をもたらす。線維症が、喘息を有する被験体における気道コンプライアンス (compliance) を減少させるのみならず、ECMにおけるこの拡張も可溶性炎症性メディエーターの保持と、確立されたAHRの慢性的な持続をもたらす。従ってAHRは、主として上皮下線維症の減少とAIの減退により、及び/又は、MCA - MSCにより提供される杯細胞のカウントの減少により仲介される気道閉塞の低減と上皮肥厚化のレベルの低下により、正常な損傷されていないレベルまで戻り得た。本明細書中で開示されるようにMCA - MSCは、それらの抗炎症性効果に加えて、多くのレベルでAWRを標的とすることによりAHRを修正した。

10

【0149】

結論として本研究は、慢性AAD / 喘息の処置にMCA - MSCを初めて使用し、MCA - MSCがAIを効果的に減少させ、AHRのみならずAWRのマーカーを好転させることを見出した。よってMCA - MSCはAAD / 喘息のための単独の療法を提供する。MCA - MSCを、AAD / 喘息のための補助療法としても使用できる。MCA - MSCは、コルチコステロイド又は - アゴニスト療法等の既存の療法に応答しないAAD / 喘息を有する被験体の亜集団に、特に治療利益を提供し得る。

20

【0150】

MCA - MSCを過去に研究された他の幹細胞から分ける顕著な発見は、他のMSC / 幹細胞は、他の治療剤と組み合わせて投与されたときのみに治療効果を生み出すということである。

【0151】

実施例 5

30

実施例 4 における 6 週間の代わりに、週に 3 回 8 週間 (21 ~ 77 日目、図 9)、オバアルブミンの噴霧エアロゾル溶液で 30 分間マウスに接種した以外は、実施例 4 と同様にして 6 ~ 8 匹のマウスの群にAAD / 喘息を誘発した。5つの群：1 非処置群 (喘息なし)；2 非処置感作動物 (喘息)；3 MCA - MSCのIN注入により処置された感作動物 (喘息)；4 デキサメタゾン (DEX)のIN注入により処置された感作動物 (喘息)；5 MCA - MSC + DEXのIN注入により処置された感作動物 (喘息)、の1つにマウスを無作為に割り当てた。全てのMCA - MSC処置されたマウスは、 10^6 個の細胞の用量でIN投与を2回 (9週と10週に週1回) 受けた。9 ~ 11週にDEX (1 mg / kg / 日) を毎日1回投与した。DEXはAHRを改善したが、MCA - MSCは有意に顕著な効果を有し、DEXはMCA - MSC単独を超える追加効果を有さなかった (図 10)。

40

【0152】

実施例 6

この実施例において使用されたモデルは実施例 5 と同じであり、メスのBalb / cマウスを使用して9週にアレルゲンで誘発された慢性気道疾患モデルは、このモデルにおいて反応性が最も高かった。

【0153】

7 ~ 8 週齢のメスのBalb / cマウスの下記の群 (n ~ 8 匹マウス / 群) を比較し、その中でMCA - MSCを、9 ~ 11週に週に1回、鼻腔内 (IN)、静脈内 (IV)、又は気管内 (ET) を介して投与した：

50

- i) 生理食塩水で感作された / 接種を受けたコントロール ;
- ii) OVAで感作された / 接種を受けた (AAD) ;
- iii) OVAで感作された / 接種を受けた + IN投与による 1×10^6 個のMCA - MSC / マウス ;
- iv) OVAで感作された / 接種を受けた + IV投与による 1×10^6 個のMCA - MSC / マウス ;
- vi) OVAで感作された / 接種を受けた + ET投与による 1×10^6 個のMCA - MSC / マウス。

【0154】

20%のSDを伴うこの設計は、 $n = 8$ 匹マウス / 群で25%の効果を検出する90%の力を提供した。

10

【0155】

気道過敏性 (肺機能の指標) が解析され、図11中に報告されている。

【0156】

OVA誘導性の慢性AADを有するマウスは、気道収縮剤の用量の増加に反応して、これらの生理食塩水処置された対照物と比較して、AHRを有意に悪化させた。このOVA誘導性のAHRは、MCA - MSCのIN又はIV投与 (継続中のOVA誘導性の損傷の存在下で9 ~ 11週に週1回の投与) により、79 ~ 80%で有意に減少した。MCA - MSCでIN又はIV処置されたマウスと生理食塩水で処置されたコントロールの間で、AHRの有意差は無かった。

20

【0157】

MCA - MSCのET投与はAHRを61%減少させ、それはなおOVA群単独から測定されたものよりも有意に低かったが、生理食塩水群から測定されたものよりも有意に高かった。

【0158】

IN対IV対ETで処置された群の間のAHRに有意さはなく、3つのMCA - MSCの送達様式は全て、慢性AAD / 喘息を処置する実現可能なアプローチを提供することを示している。

【0159】

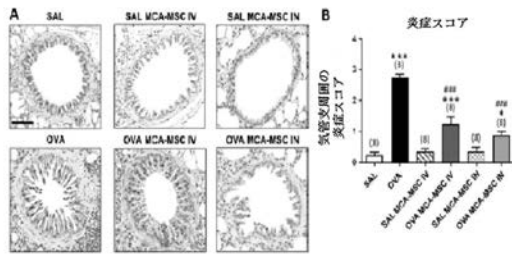
解析されるべき追加のエンドポイントは :

30

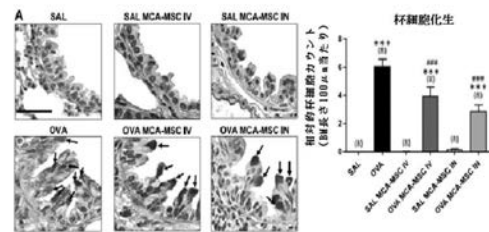
- i) 炎症スコア ;
- ii) 杯細胞化生 ;
- iii) 上皮厚み ;
- iv) 上皮損傷 ;
- v) 上皮コラーゲン厚み ;
- vi) 総肺コラーゲン濃度 ;
- vii) 上皮TGF - ベータ1 (beta1) 染色 ;
- viii) 上皮筋線維芽細胞密度 ; 及び
- ix) ゼラチナーゼ (MMP - 2 及びMMP - 9) 発現 / 活性を含む。

40

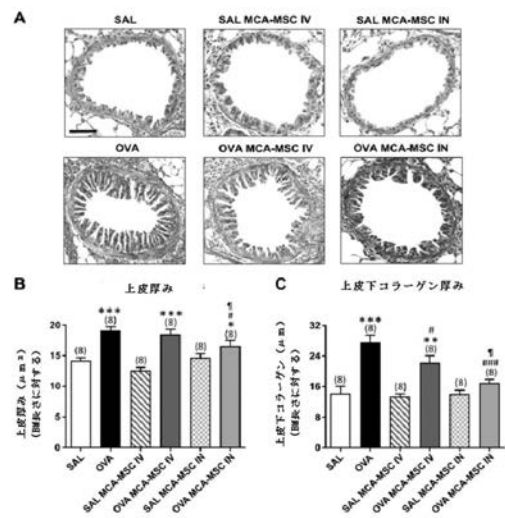
【図 1】



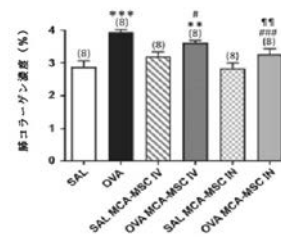
【図 2】



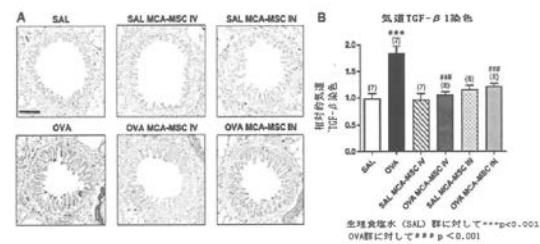
【図 3】



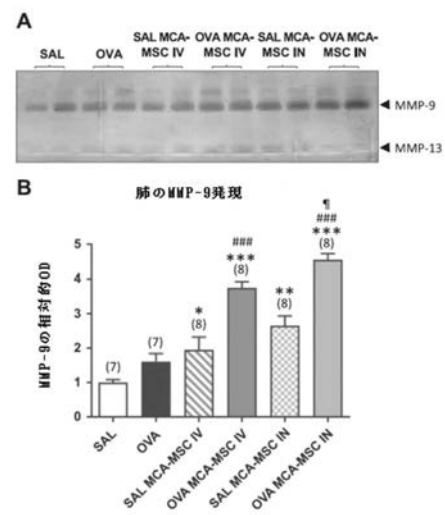
【図 4】



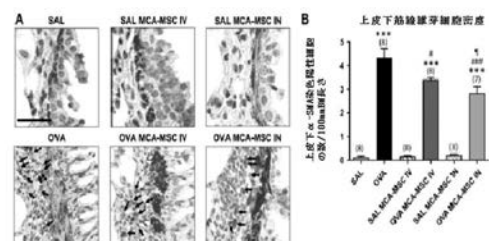
【図 5】



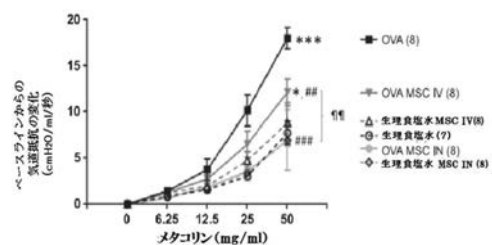
【図 7】



【図 6】



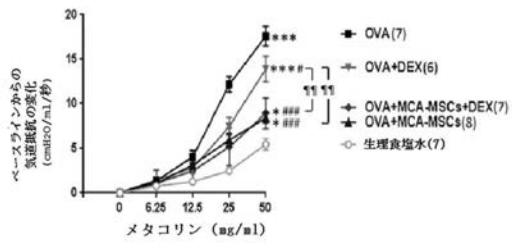
【図 8】



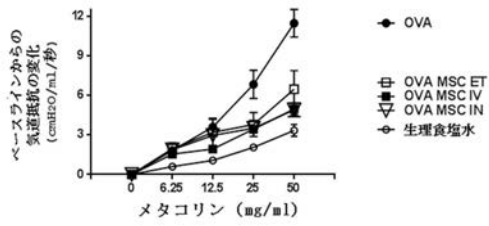
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2018/050937
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 35/28 (2015.01) C12N 5/0775 (2010.01) A61P 11/06 (2006.01)		
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)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PATENW, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE: Mesenchymoangioblast, Mesoendodermal Precursor Cell, Mesenchymal Stromal/Stem Cell, Asthma, Airway remodelling, allergic airway disease, airway inflammation, lung inflammation, miR145, miR181b, miR214 and related terms. PubMed and Espacenet: Cynata Therapeutics, Royce or C Samuel with MSC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* "A"	Special categories of cited documents: 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 12 October 2018		Date of mailing of the international search report 12 October 2018
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au		Authorised officer Vivian Turner AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262108484

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2018/050937
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Vodyanik, M.A. et al., "A mesoderm-derived precursor for mesenchymal stem and endothelial cells", Cell Stem Cell (2010), vol. 7, no. 6, pages 718-729 Abstract, p2 third para, p3 last para, p5 second para	1-14
A	Koch, J.M. et al., "Mesenchymoangioblast-derived mesenchymal stromal cells inhibit cell damage, tissue damage and improved peripheral blood flow following hindlimb ischemic injury in mice", Cytotherapy (2016) vol. 18, no. 2, pages 219-228 Abstract	1-14
P,X	WO 2017/156580 A1 (Cynata Therapeutics Limited) 21 September 2017 abstract, p2 lines 34-36, p3 lines 1-2, p3 lines 3-9, p3 line 12-15, p5 line 34, p6 lines 5-9, p6 line 14, p11 line 7, p13 lines 22-28	1-14

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2018/050937	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2017/156580 A1	21 September 2017	WO 2017156580 A1	21 Sep 2017
		AU 2017234378 A1	27 Sep 2018
		CA 3017772 A1	21 Sep 2017
		SG 11201807114T A	27 Sep 2018
End of Annex			
<p>Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.</p> <p>Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(January 2015)</p>			

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

１．ブルロニック

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 サムエル、クリシャン

オーストラリア国、ヴィクトリア州 3800、クレイトン、ウェリング ロード、モナッシュ
ユニヴァーシティー、ファカルティー オヴ メディシン、ナーシング アンド ヘルス サイエ
ンシズ内

(72)発明者 ロイス、シモン

オーストラリア国、ヴィクトリア州 3800、クレイトン、ウェリング ロード、モナッシュ
ユニヴァーシティー、ファカルティー オヴ メディシン、ナーシング アンド ヘルス サイエ
ンシズ内

F ターム(参考) 4C087 AA01 AA02 BB63 MA02 MA17 MA59 MA66 NA14 ZA59 ZA62

ZB13 ZC75