

(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2014-507390

(P2014-507390A)

(43) 公表日 平成26年3月27日(2014.3.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/50 (2006.01)	A 6 1 K 35/50	4 B 0 6 5
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	4 C 0 8 7
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C 2 0 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 96 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-544781 (P2013-544781)	(71) 出願人	512194260
(86) (22) 出願日	平成23年12月15日 (2011.12.15)		アントフロゲネシス コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成25年8月13日 (2013.8.13)		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/065170		7 0 5 9 ワルレン ポウデル ホルン
(87) 国際公開番号	W02012/083024		ドライブ 7
(87) 国際公開日	平成24年6月21日 (2012.6.21)	(74) 代理人	100097456
(31) 優先権主張番号	61/424, 559		弁理士 石川 徹
(32) 優先日	平成22年12月17日 (2010.12.17)	(72) 発明者	ステワルト アブボト
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
			7 0 5 9 ワルレン カサレ ドライブ
			1 5
		(72) 発明者	ジャメス ダブリュー. エドインゲル
			アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
			7 7 1 8 ベルフオルド レオナルドビル
			レ ロード 2 7 3
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胎盤幹細胞を用いる脊髄損傷及び外傷性脳損傷の治療

(57) 【要約】

本明細書に説明された胎盤幹細胞及び胎盤多能性幹細胞、並びにそのような胎盤細胞の集団を使用し、脊髄損傷又は外傷性脳損傷などの中枢神経系の損傷を有する個体を治療する方法が、本明細書に提供される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

治療有効量の胎盤幹細胞、又は胎盤幹細胞により馴化された培養培地を個体へ投与することを含む、脊髄損傷又は外傷性脳損傷に関連した疾患、障害又は病態を有するか又はそのリスクがある個体を治療する方法であって、ここで該治療有効量が、該疾患、障害又は病態の1以上の症状の検出可能な改善を引き起こすのに十分な量である、前記方法。

【請求項2】

前記胎盤幹細胞が、CD10⁺、CD34⁻、CD105⁺、CD200⁺胎盤幹細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記胎盤幹細胞が、CD200を発現し且つHLA-Gを発現しないか、又はCD73、CD105、及びCD200を発現するか、又はCD200及びOCT-4を発現するか、又はCD73及びCD105を発現し且つHLA-Gを発現しないか、又はCD73及びCD105を発現し且つ該幹細胞を含む胎盤細胞の集団が胚様体の形成を可能にする条件下で培養される場合、該集団中の1以上の胚様体の形成を促進するか、又はOCT-4を発現し且つ該幹細胞を含む胎盤細胞の集団が胚様体の形成を可能にする条件下で培養される場合、該集団中の1以上の胚様体の形成を促進する、請求項1記載の方法。

【請求項4】

前記個体が、脊髄損傷に関連した疾患、障害又は病態を有するか又は発症のリスクがある、請求項2記載の方法。

【請求項5】

前記脊髄損傷が、直接外傷により引き起こされる、請求項4記載の方法。

【請求項6】

前記脊髄損傷が、骨片、血腫、又は椎間板物質による圧迫により引き起こされる、請求項4記載の方法。

【請求項7】

前記脊髄損傷が、脊髄動脈への損傷又は衝突からの虚血により引き起こされる、請求項4記載の方法。

【請求項8】

前記疾患、障害又は病態が、脊髄損傷から生じる脊髄ショックである、請求項2記載の方法。

【請求項9】

前記疾患、障害又は病態が、脊髄損傷から生じる神経原性ショックである、請求項2記載の方法。

【請求項10】

前記疾患、障害又は病態が、脊髄損傷から生じる自律神経反射異常である、請求項2記載の方法。

【請求項11】

前記疾患、障害又は病態が、脊髄損傷から生じる浮腫である、請求項2記載の方法。

【請求項12】

前記疾患、障害又は病態が、脊髄中心症候群、ブラウン・セカール症候群、脊髄前部症候群、脊髄円錐症候群、及び馬尾症候群からなる群から選択される、請求項2記載の方法。

【請求項13】

前記脊髄損傷が、頸椎、胸椎、腰椎、又は仙椎の1以上にある、請求項4記載の方法。

【請求項14】

前記脊髄損傷が、頸髄、胸髄、腰仙椎、円錐、後頭部の1以上、又は馬尾神経の1以上にある、請求項4記載の方法。

【請求項15】

前記1つ又は複数の症状が、脊髄の頸髄分節、胸髄分節、腰髄分節又は仙髄分節の運動

10

20

30

40

50

機能、感覚機能、又は運動感覚機能の喪失又は障害を含む、請求項4記載の方法。

【請求項16】

前記1つ又は複数の症状が、腕、胴体、脚又は骨盤内器官の運動機能、感覚機能、又は運動感覚機能の喪失又は障害を含む、請求項4記載の方法。

【請求項17】

前記1つ又は複数の症状が、皮膚分節C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11、T12、L1、L2、L3、L4又はL5の1以上の無感覚を含む、請求項4記載の方法。

【請求項18】

前記胎盤幹細胞又は胎盤幹細胞により馴化された培養培地の治療有効量が、脊髓損傷の14日以内に個体に投与される、請求項4記載の方法。 10

【請求項19】

前記個体へ第二の治療薬を投与することを含む、請求項4記載の方法。

【請求項20】

前記第二の治療薬が、コルチコステロイド、神経保護薬、免疫調節薬若しくは免疫抑制薬、又は抗凝固薬である、請求項9記載の方法。

【請求項21】

前記個体が、外傷性脳損傷に関連した疾患、障害又は病態を有するか又はそのリスクがある、請求項2記載の方法。

【請求項22】

前記外傷性脳損傷が、前頭葉、頭頂葉、後頭葉、側頭葉、脳幹、又は小脳の損傷である、請求項21記載の方法。 20

【請求項23】

前記外傷性脳損傷が、軽度の外傷性脳損傷である、請求項21記載の方法。

【請求項24】

前記外傷性脳損傷が、中程度から重度の外傷性脳損傷である、請求項21記載の方法。

【請求項25】

前記症状が、頭痛、思考の困難、記憶障害、注意欠陥、気分動揺及び欲求不満、疲労、視力障害、記憶喪失、注意不足／集中力不足、睡眠障害、眩暈／平衡感覚障害、短気、情緒障害、意気消沈、発作、悪心、嗅覚喪失、光及び音への過敏、気分変動、迷い又は混乱、又は思考緩徐の1以上である、請求項21記載の方法。 30

【請求項26】

前記症状が、注意困難、集中困難、散漫性、記憶困難、処理速度の緩慢化、混乱、固執、衝動、言語処理の困難、発語及び言語の困難、話し言葉の理解不能(受容失語症)、会話及び理解の困難(表現性失語症)、不明瞭言語、非常に速い又は非常に遅い発語、難読症、難書症、触覚・温度・運動・四肢の位置・微細な識別の解釈の困難、心理学的に意味のあるデータへの知覚印象の統合又はパターン化の困難、部分的又は完全な視力喪失、眼筋虚弱及び二重視力(複視)、かすみ目、距離判断の問題、眼球固視微動(眼振)、光への不耐(羞明)、聴力低下又は喪失、耳鳴り(耳鳴)、音への敏感さの増大、嗅覚喪失又は減退(嗅覚消失)、味覚喪失又は減退、発作、てんかんに関連した痙攣、身体麻痺／痙直、慢性疼痛、腸及び／又は膀胱の制御喪失、睡眠障害、体力低下、食欲の変化、体温調節不能、月経困難、社会的感情の困難、依存行動、情動能喪失、意欲喪失、短気、攻撃性、抑鬱、脱抑制、又は認識欠如の1以上である、請求項21記載の方法。 40

【請求項27】

前記個体への第二の治療薬の投与を含む、請求項21記載の方法。

【請求項28】

前記第二の治療薬が、抗痙攣薬、抗鬱薬、アマンタジン、メチルフェニデート、プロモクリプチン、カルバマゼピン又はアミトリプチリンである、請求項9記載の方法。

【請求項29】

前記胎盤幹細胞又は胎盤幹細胞により馴化された培養培地の治療有効量が、静脈内、動 50

脈内、腹腔内、心室内、尿管内、胸骨内、頭蓋内、筋肉内、滑液嚢内、眼球内、硝子体内、大脳内、脳室内、髄腔内、骨内注入、膀胱内、経真皮、槽内、硬膜外、又は皮下投与からなる群から選択される経路により、個体へ投与される、請求項1記載の方法。

【請求項30】

前記胎盤幹細胞又は胎盤幹細胞により馴化された培養培地の治療有効量が、損傷部位へ直接個体に投与される、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その開示が全体として引用により本明細書中に組み込まれている、2010年12月17日に本願された米国特許仮出願第61/424,559号の優先権を主張するものである。

【0002】

(1. 分野)

ヒト胎盤幹細胞を用い、外傷性脊髄損傷(SCI)又は外傷性脳損傷(TBI)を有する個体を治療する方法を、本明細書において提供する。

【背景技術】

【0003】

(2. 背景)

中枢神経系(CNS)の損傷は、医学的に重大な問題を示す。米国において生存者のおよそ300,000名が、脊髄損傷(SCI)に罹患しており、且つ毎年およそ10,000~14,000例が新たにSCI症例と診断されている。SCIは通常、脊柱への外傷の結果、例えば位置がずれた骨又は椎間板(disc)が脊髄を圧迫することの結果である。SCIは、例えば脊髄への血流喪失から、明らかな椎骨骨折を伴わずに起こり得、且つ脊椎骨折は、SCIを伴わずに起こり得る。

【0004】

外傷性脳損傷(TBI)は、世界中で若年成人における身体障害及び死亡の主要な原因の一つである。軍隊において、例えば、脳障害は、例えば直接の衝撃、銃弾及び爆弾の破片などの物体の貫通、並びに爆発により引き起こされた爆風から生じる。

【発明の概要】

【0005】

(3. 概要)

CNS損傷に関連した疾患及び／又は病態を治療、管理及び／又は改善する方法が、本明細書において提供される。一実施態様において、治療有効量の胎盤幹細胞又は胎盤幹細胞により馴化された培地を個体に投与することを含む、外傷性CNS損傷、又はCNS損傷に関連した疾患、障害若しくは病態を有する個体を治療する方法が、本明細書において提供され、ここで該治療有効量は、該外傷性CNS損傷、又は該CNS損傷に関連した疾患、障害若しくは病態の、1以上の症状の検出可能な改善、又は1以上の症状の進行の縮小を引き起こすのに十分な量である。また、CNS損傷、例えばSCI又はTBIの1以上の症状の治療、管理及び／又は改善のための医薬品の製造における胎盤幹細胞の使用も、本明細書において提供される。

【0006】

いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞、又は胎盤幹細胞により馴化された培養培地の治療有効量は、損傷の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、13、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50日以内若しくはそれ以降に、又はCNS損傷後1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年間以内若しくはそれ以降に、個体に投与される。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞、又は胎盤幹細胞により馴化された培養培地の治療有効量は、CNS損傷の21日、14日、若しくは7日以内に、又はCNS損傷の48時間、24時間、12時間若しくは3時間以内に、個体に投与される。

【0007】

具体的実施態様において、該CNS損傷は、SCIである。いくつかの実施態様において、該SCIは、直接の外傷により引き起こされる。いくつかの実施態様において、該SCIは、骨片

10

20

30

40

50

、血腫、又は椎間板物質による圧迫により引き起こされる。いくつかの実施態様において、該SCIは、頸椎、胸椎、腰椎、又は仙椎の1以上においてである。いくつかの実施態様において、該SCIは、頸髄、胸髄、腰仙椎、円錐(conus)、後頭部の1以上、又は馬尾神経の1以上に対してである。

【0008】

いくつかの実施態様において、CNS損傷に関連した疾患、障害又は病態は、SCIから生じる脊髄ショックである。いくつかの実施態様において、CNS損傷に関連した疾患、障害又は病態は、SCIから生じる神経原性ショックである。いくつかの実施態様において、CNS損傷に関連した疾患、障害又は病態は、SCIから生じる自律神経反射異常である。いくつかの実施態様において、CNS損傷に関連した疾患、障害又は病態は、SCIから生じる浮腫である。いくつかの実施態様において、CNS損傷に関連した疾患、障害又は病態は、脊髄中心症候群、ブラウン・セカール症候群、脊髄前部症候群、脊髄円錐症候群、及び馬尾症候群からなる群から選択される。

10

【0009】

いくつかの実施態様において、投与される胎盤幹細胞、又は胎盤幹細胞により馴化された培地の治療有効量は、以下のSCIの症状の1以上の検出可能な改善又は進行の縮小を引き起こすのに十分な量である：脊髄の頸髄分節、胸髄分節、腰髄分節又は仙髄分節における運動機能、感覚機能、又は運動感覚機能の喪失又は障害。いくつかの実施態様において、SCIの1つ又は複数の症状は、腕、胴体、脚又は骨盤内器官の運動機能、感覚機能、又は運動感覚機能の喪失又は障害を含む。いくつかの実施態様において、SCIの1つ又は複数の症状は、皮膚分節C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11、T12、L1、L2、L3、L4又はL5の1以上の無感覚を含む。

20

【0010】

本明細書に提供されるSCIの治療のいくつかの実施態様において、本方法は更に、該個体へ第二の治療薬を投与することを含む。いくつかの実施態様において、該第二の治療薬は、コルチコステロイド、神経保護薬、免疫調節薬又は免疫抑制薬、又は抗凝固薬である。

【0011】

本明細書に提供される治療方法の別の具体的実施態様において、CNS損傷に関連した疾患、障害又は病態は、TBIである。いくつかの実施態様において、該TBIは、前頭葉、頭頂葉、後頭葉、側頭葉、脳幹、又は小脳の損傷である。いくつかの実施態様において、該TBIは、軽度のTBIである。いくつかの実施態様において、該TBIは、中程度から重度のTBIである。

30

【0012】

いくつかの実施態様において、投与される胎盤幹細胞、又は胎盤幹細胞により馴化された培地の治療有効量は、以下の軽度TBIの症状の1以上の検出可能な改善又は進行の縮小を引き起こすのに十分な量である：頭痛、記憶障害、注意欠陥、気分動揺及び欲求不満、疲労、視力障害、記憶喪失、注意不足／集中力不足、睡眠障害、眩暈／平衡感覚障害、短気、情緒障害、意気消沈、発作、悪心、嗅覚喪失、光及び音への過敏、気分変動、迷い又は混乱(getting lost or confused)、又は思考緩徐。

40

【0013】

いくつかの実施態様において、投与される胎盤幹細胞、又は胎盤幹細胞により馴化された培地の治療有効量は、以下の中等度から重度のTBIの症状の1以上の検出可能な改善又は進行の縮小を引き起こすのに十分な量である：注意困難、集中困難、散漫性、記憶困難、処理速度の緩慢化、混乱、固執、衝動、言語処理の困難、発語及び言語の困難、話し言葉の理解不能(受容失語症)、会話及び理解の困難(表現性失語症)、不明瞭言語、非常に速い又は非常に遅い発語、難読症、難書症、触覚・温度・運動・四肢の位置・微細な識別の解釈の困難、心理学的に意味のあるデータへの知覚印象の統合又はパターン化の困難、部分的又は完全な視力喪失、眼筋虚弱及び二重視力(複視)、かすみ目、距離判断の問題、眼球固視微動(眼振)、光への不耐(羞明)、聴力低下又は喪失、耳鳴り(耳鳴)、音への敏感さの

50

増大、嗅覚喪失又は減退(嗅覚消失)、味覚喪失又は減退、発作、てんかんに関連した痙攣、身体麻痺／痙直、慢性疼痛、腸及び／又は膀胱の制御喪失、睡眠障害、体力低下、食欲の変化、体温調節不能、月経困難、社会的感情の困難、依存行動、情動能(emotional ability)喪失、意欲喪失、短気、攻撃性、抑鬱、脱抑制、又は認識欠如。

【0014】

本明細書に提供されるTBI治療のいくつかの実施態様において、本方法は、第二の治療薬を該個体へ投与することを更に含む。いくつかの実施態様において、該第二の治療薬は、抗痙攣薬、抗鬱薬、アマンタジン、メチルフェニデート、プロモクリプチン、カルバマゼピン(carbamazepine)又はアミトリプチリンである。

【0015】

本明細書に提供されるCNS損傷、例えばSCI又はTBIの治療のいくつかの実施態様において、胎盤幹細胞、又は胎盤幹細胞により馴化された培養培地の治療有効量は、静脈内、動脈内、腹腔内、心室内、胸骨内、頭蓋内、筋肉内、滑液嚢内、眼球内、硝子体内、大脳内、脳室内、髄腔内、骨内注入、膀胱内、経真皮、槽内、硬膜外、腰椎穿刺、大槽又は皮下投与からなる群から選択される経路により、個体へ投与される。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞、又は胎盤幹細胞により馴化された培養培地の治療有効量は、損傷部位へ直接個体に投与される。

【0016】

具体的実施態様において、該胎盤幹細胞は、CD10⁺、CD34⁺、CD105⁺、CD200⁺胎盤幹細胞である。別の具体的実施態様において、該胎盤幹細胞は、CD200を発現するが、HLA-Gを発現しないか；又は、CD73、CD105、及びCD200を発現するか；又は、CD200及びOCT-4を発現するか；又は、CD73及びCD105を発現するが、HLA-Gを発現しないか；又は、CD73及びCD105を発現し、且つ該幹細胞を含む胎盤細胞集団が胚様体(embryoid-like body)の形成が可能である条件下で培養される場合に、該集団において1以上の胚様体の形成を促進するか；又は、OCT-4を発現し、且つ該幹細胞を含む胎盤細胞集団が胚様体の形成が可能である条件下で培養される場合に、該集団において1以上の胚様体の形成を促進する。特定の実施態様において、胎盤幹細胞は、免疫細胞の活性を抑制し、例えばT細胞の増殖を抑制する。

【0017】

特定の実施態様において、CNS損傷に関連した又はその一部であるT細胞(例えば、CD4⁺ Tリンパ球又は白血球)を、胎盤幹細胞、例えば本明細書に記載の胎盤幹細胞と接触させることを含む、個体におけるCNS損傷、例えばSCI又はTBIなどに対する前炎症反応を阻害する方法が、本明細書に提供される。具体的実施態様において、該炎症反応は、Th1反応又はTh17反応である。具体的実施態様において、該接触は、Th1細胞成熟を検出可能に低下する。本方法の具体的実施態様において、該接触は、該T細胞により、インターロイキン-1β(IL-1β)、IL-12、IL-17、IL-21、IL-23、腫瘍壊死因子α(TNFα)及び／又はインターフェロンγ(IFNγ)の1種以上の生成を検出可能に低下する。本方法の別の具体的実施態様において、該接触は、制御性T細胞(Treg)表現型を強化又はアップレギュレートする。別の具体的実施態様において、該接触は、Th1及び／又はTh17免疫反応を促進するマーカー(例えば、CD80、CD83、CD86、ICAM-1、HLA-II)の樹状細胞(DC)及び／又はマクロファージ発現をダウンレギュレートする。具体的実施態様において、該T細胞はまた、IL-10、例えば外因性IL-10、又は該T細胞により生成されないIL-10、例えば組換えIL-10と接触される。別の実施態様において、マクロファージを、有効量の胎盤幹細胞と接触させることを含む、マクロファージ由来の炎症誘発サイトカインの生成を減少する方法が、本明細書において提供される。別の実施態様において、免疫系細胞を、有効量の胎盤幹細胞と接触させることを含む、例えばマクロファージ由来の、寛容細胞及び／又はサイトカインをアップレギュレートする方法が、本明細書において提供される。具体的実施態様において、該接触は、活性化されたマクロファージに、該胎盤幹細胞と接触されない活性化されたマクロファージよりも、検出可能により多くのIL-10を産生させる。別の実施態様において、免疫系細胞を有効量の胎盤幹細胞と接触させることを含む、抗炎症T細胞をアップレギ

10

20

30

40

50

ュレート、又は数を増加する方法が、本明細書において提供される。

【0018】

一実施態様において、有効量の胎盤幹細胞を個体に投与することを含む、個体におけるCNS損傷-関連したTh1反応を阻害する方法が、本明細書において提供され、ここで該有効量は、個体において該CNS損傷-関連したTh1反応の検出可能な減少を生じる量である。別の実施態様において、個体へ有効量の胎盤幹細胞を投与することを含む、個体においてCNS損傷-関連したTh17反応を阻害する方法が、本明細書に提供され、ここで該有効量は、個体においてTh17反応の検出可能な減少を生じる量である。これらの方法の具体的実施態様において、該投与は、該個体におけるT細胞又は抗原提示細胞(例えば、DC、マクロファージ又は単球)による、リンホトキシン-1 α (LT-1 α)、IL-1 β 、IL-12、IL-17、IL-21、IL-23、TNF α 及び／又はIFN γ の1以上の産生を、検出可能に低下させる。本方法の別の具体的実施態様において、該接触は、制御性T細胞(Treg)を強化又はアップレギュレートする。別の実施態様において、該接触は、Th1又はTh17反応を促進するマーカー(例えば、CD80、CD83、CD86、ICAM-1、HLA-II)の、該個体における樹状細胞(DC)及び／又はマクロファージによる産生を調節する(例えば、減少させる)。別の具体的実施態様において、本方法は加えて、IL-10の該個体への投与を含む。

【0019】

別の態様において、抗炎症サイトカインの1種以上を発現するように遺伝子操作されている、本明細書に記載の胎盤幹細胞が、本明細書において提供される。具体的実施態様において、該抗炎症サイトカインは、IL-10を含む。

【0020】

(3.1 定義)

本明細書で使用されるように、記述された数値に言及するときの「約」という用語は、該記述された数値の $\pm 10\%$ 以内の値を示す。

【0021】

本明細書で使用される用語「量」とは、本明細書に記載の胎盤幹細胞に言及するとき、特定の数の胎盤細胞、例えば、CNS損傷の1以上の症状の検出可能な改善を引き起こすか、重症度を軽減するか、又は進行を縮小するなど十分に1以上の投与量で投与される胎盤幹細胞の数を説明する。

【0022】

本明細書で使用されるように、「由来した」という用語は、単離されているか、又は別の形で純化されていることを意味する。例えば、胎盤由来接着細胞は、胎盤から単離されている。「由来した」という用語は、組織、例えば、胎盤から直接単離された細胞から培養される細胞、及び初代単離株から培養又は拡大された細胞を包含する。

【0023】

本明細書で使用されるように、「免疫局在決定」は、例えば、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別、磁気細胞選別、インサイチュハイブリダイゼーション、免疫組織化学などにおいて、免疫タンパク質、例えば、抗体又はその断片を用いる、化合物、例えば、細胞マーカーの検出を意味する。

【0024】

本明細書で使用されるように、「SH2」という用語は、マーカーCD105上のエピトープに結合する抗体を指す。従って、SH2 $^{+}$ と表される細胞は、CD105 $^{+}$ である。

【0025】

本明細書で使用されるように、「SH3」及び「SH4」という用語は、マーカーCD73上に存在するエピトープに結合する抗体を指す。従って、SH3 $^{+}$ 及び／又はSH4 $^{+}$ と表される細胞は、CD73 $^{+}$ である。

【0026】

本明細書で使用されるように、幹細胞は、該幹細胞が天然に関連している他の細胞の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は少なくとも99%が、例えば、該幹細胞の回収及び／又は培養時に、該幹細胞から取り除かれる場合、「単離され」ている。「

単離された」細胞の集団は、該細胞の集団が由来する組織、例えば、胎盤の他の細胞から実質的に分離されている細胞の集団を意味する。いくつかの実施態様において、例えば幹細胞の集団は、該幹細胞の集団が天然に関連している細胞の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は少なくとも99%が、例えば、該幹細胞の集団の回収及び／又は培養時に、該幹細胞の集団から取り除かれる場合、「単離され」ている。

【0027】

本明細書で使用されるように、「胎盤幹細胞」という用語は、形態、細胞表面マーカー又は初代培養後の継代数を問わず、組織培養基材(例えば、組織培養プラスチック又はフィブロネクチンコーティング組織培養プレート)に接着する、哺乳動物の胎盤から由来する、例えばそれから単離される、幹細胞又は前駆細胞を指す。しかし本明細書で使用される「胎盤幹細胞」という用語は、それらの細胞が当業者に理解されるように、栄養芽層も、細胞栄養芽層も、胚性生殖細胞も、胚性幹細胞も指さない。細胞は、該細胞が、幹細胞の性質、例えば、1種類以上の幹細胞型と関連するマーカー又は遺伝子発現プロファイル；培養下で少なくとも10~40回複製する能力；多能性、例えば、3胚葉のうちの1以上の細胞へインビトロ、インビボのいずれか又は両方で分化する能力；成体(すなわち分化した)細胞の特徴の欠如；などの少なくとも1つを保持する場合、「幹細胞」とみなされる。用語「胎盤幹細胞」及び「胎盤由来幹細胞」は、互換的に使用することができる。本明細書で別に注記しない限り、「胎盤」という用語は、臍帯を含む。本明細書で明らかにされている胎盤幹細胞は、特定の実施態様において、インビトロ多能性(すなわち、細胞は分化条件下にインビトロで分化する)、インビボ多能性(すなわち、細胞はインビボで分化する)、又は両方である。

【0028】

本明細書で使用されるように、幹細胞は、特定のマーカーが検出可能である場合、そのマーカーについて「陽性」である。例えば、CD73は、バックグラウンドよりも(例えばいずれか所定のアッセイについてアイソタイプ対照又は実験上の陰性対照と比べて)検出可能に多い量で胎盤幹細胞上で検出可能であるので、胎盤幹細胞は、例えばCD73について陽性である。細胞はまた、マーカーを、該細胞を少なくとも1種の他の細胞型から識別するために使用することができる場合、或いは存在するか又は該細胞により発現された場合細胞を選択又は単離するために使用することができる場合、そのマーカーについて陽性である。

【0029】

本明細書で使用される「免疫調節」及び「免疫調節性」は、免疫反応における検出可能な変化を引き起こすか又は引き起こす能力を有すること、並びに免疫反応における検出可能な変化を引き起こす能力を意味する。

【0030】

本明細書で使用される「免疫抑制」及び「免疫抑制性」は、免疫反応における検出可能な低下を引き起こすか又は引き起こす能力を有すること、並びに免疫反応における検出可能な低下を引き起こす能力を意味する。

【図面の簡単な説明】

【0031】

(4. 図面の簡単な説明)

【図1】図1は、胎盤由来接着細胞による、選択された血管新生タンパク質の分泌を示す。

【0032】

【図2】図2は、ヒト内皮細胞(HUVEC)管形成に対する胎盤由来接着細胞馴化培地の血管新生作用を示す。

【0033】

【図3】図3は、ヒト内皮細胞遊走に対する胎盤由来接着細胞馴化培地の血管新生作用を示す。

【0034】

【図4】図4は、ヒト内皮細胞増殖に対する胎盤由来接着細胞馴化培地の血管新生作用を示す。

【0035】

【図5】図5は、HUVEC及び胎盤由来接着細胞の管形成を示す。

【0036】

【図6】図6は、低酸素条件下及び正常酸素条件下の胎盤由来接着細胞によるVEGF及びIL-8の分泌を示す。

【0037】

【図7】図7は、ニワトリ漿尿膜血管新生モデルでの血管新生に対するPDACの正の作用を示す。bFGF：塩基性線維芽細胞増殖因子(陽性対照)。MDAMB231：血管新生性乳癌細胞株(陽性対照)。Y軸：血管新生の程度。

10

【0038】

【図8】図8は、ニワトリ漿尿膜血管新生モデルでの血管新生に対するPDAC馴化培地(上清)の正の作用を示す。bFGF：塩基性線維芽細胞増殖因子(陽性対照)。MDAMB231：血管新生性乳癌細胞株(陽性対照)。Y軸：血管新生の程度。

【0039】

【図9】図9は、星状細胞の培養物、又は星状細胞とPDACの共培養物中に存在する、過酸化水素により生成された活性酸素種である。RFU ROS活性：活性酸素種についての相対蛍光単位。

【発明を実施するための形態】

20

【0040】

(5. 詳細な説明)

(5.1 CNS損傷の治療方法)

胎盤幹細胞の1以上の投与量を、CNS損傷を有する個体へ投与することを含む、CNSへの損傷、例えばSCI若しくはTBI、又はCNS損傷に関連した疾患、障害又は病態を有する個体を治療する方法が、本明細書で提供される。そのような個体を治療する方法、及びそのような幹細胞を単独で又は他の療法と組合せて投与する方法が、以下に詳細に考察される。

【0041】

(5.1.1 脊髄損傷(SCI)の治療)

治療有効量の胎盤幹細胞又は胎盤幹細胞により馴化された培地を個体へ投与することを含む、SCIの症状又はこれに関連した疾患、障害若しくは病態を有するか又は経験している個体を治療する方法が、本明細書に提供され、ここで該治療有効量は、該SCIの1以上の症状の検出可能な改善、又は1以上の症状の進行の縮小を引き起こすのに十分な量である。本明細書において使用される「1以上の症状」は、治療プロセスと相関している損傷部位内の炎症の程度、免疫反応、遺伝子発現、損傷部位での瘢痕化の量及び程度、患者の運動感覚機能の改善などの、客観的に測定可能なパラメータ、並びに、患者の幸福(well-being)、運動感覚機能の改善の患者の認知、SCIに関連した疼痛若しくは不快の軽減の認知などの、主観的に測定可能なパラメータを含む。

30

【0042】

SCIは、その正常な運動機能、感覚機能、又は自律神経機能において、一時的又は恒久的のいずれかの変化を生じる脊髄への損傷である。SCIは、四肢麻痺(これまで四肢不全麻痺として知られている)及び対麻痺として公知の病態を含む。従って本明細書に提供されるSCIの治療の方法のいくつかの実施態様において、SCIに関連した症状、又は疾患、障害若しくは病態を有するか又は経験している個体は、四肢麻痺又は対麻痺である。

40

【0043】

四肢麻痺は、脊柱管内の神経要素の損傷に起因した、脊髄の頸髄分節中の運動及び／若しくは感覚機能の障害又は喪失により特徴付けられる、頸部領域中の脊髄への損傷を指す。四肢麻痺は、腕に加え、胴体、脚及び骨盤内器官の機能の障害を生じる。これは、上腕神経叢の病変又は神経腔の外側の末梢神経の損傷は含まない。

【0044】

50

対麻痺は、脊柱管内の神経要素の損傷に続発する、脊髄の胸髄、腰髄又は仙髄(頸髄ではない)分節における運動及び／又は感覚機能の障害又は喪失を指す。対麻痺により、腕機能は温存される(spare)が、損傷のレベルに応じて、胴体、脚及び骨盤内器官が関与し得る。この用語は、馬尾及び脊髄円錐の損傷を指すが、腰仙骨神経叢病変又は神経腔の外側の末梢神経の損傷は指さない。

【0045】

SCIの一般的な原因は、自動車事故、落下、暴力、スポーツ損傷、血管障害、腫瘍、感染症病態、脊椎症、医源性(latrogenic)損傷(特に脊髄注射及び硬膜外カテーテル留置後)、骨粗鬆症に続発する脊椎骨折、及び発育障害を含むが、これらに限定されるものではない。

10

【0046】

特定の実施態様において、SCIは、例えば、鈍器外傷、圧迫、位置ずれなどから生じ得る。特定の実施態様において、該脊髄は、完全に重症である。特定の他の実施態様において、該脊髄は、損傷され、例えば部分的に重症であるが、完全には重症ではない。他の実施態様において、該脊髄は、例えば、脊柱の骨構造への損傷、1以上の椎骨の他の椎骨に対する位置ずれ、炎症又は隣接組織の膨潤などにより、圧迫される。

【0047】

一実施態様において、SCIは1以上の頸椎で起こる。別の実施態様において、SCIは1以上の胸椎で起こる。別の実施態様において、SCIは1以上の腰椎で起こる。別の実施態様において、SCIは1以上の仙椎で起こる。特定の実施態様において、SCIは、椎骨C1、C2、C3、C4、C5、C6若しくはC7；又は、椎骨T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11若しくはT12；又は、椎骨L1、L2、L3、L4若しくはL5で起こる。特定の他の実施態様において、SCIは、脊柱のC1からC2の間；C2からC3の間；C3からC4の間；C4からC5の間；C5からC6の間；C6からC7の間；C7からT1の間；T1からT2の間；T2からT3の間；T3からT4の間；T4からT5の間；T5からT6の間；T6からT7の間；T7からT8の間；T8からT9の間；T9からT10の間；T10からT11の間；T11からT12の間；T12からL1の間；L1からL2の間；L2からL3の間；L3からL4の間；又は、L4からL5の間に存在する脊髄根に起こる。特定の実施態様において、損傷は頸髄に起こる。他の実施態様において、損傷は胸髄に起こる。他の実施態様において、SCIは腰仙髄に起こる。特定の他の実施態様において、SCIは円錐に起こる。特定の他の実施態様において、CNS損傷は馬尾神経の1以上に起こる。別の実施態様において、SCIは後頭部に起こる。

20

30

【0048】

特定の実施態様において、SCIの症状は、1以上の皮膚分節(すなわち、所定の脊髄レベルにより支配された皮膚の1区画)の無感覚である。具体的実施態様において、SCIの症状は、皮膚分節C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11、T12、L1、L2、L3、L4、又はL5の1以上の無感覚である。

【0049】

脊髄ショックは、全ての感覚運動機能の喪失に関連した、損傷レベルの下側の脊髄機能の一時的生理的(解剖学的よりもむしろ)反射低下の病態である。カテコールアミンの放出に起因した最初の血圧の上昇、それに続く低血圧症が注目される。腸管及び／又は膀胱を含む弛緩麻痺が認められ、時には持続性プリアピズムが発症する。これらの症状は、損傷のレベルの下側の反射弓が再び機能し始めるまで(例えば、球海綿体反射、筋伸展反射[MSR])、数時間から数日間続く傾向がある。従って、本方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞の治療有効量は、限定するものではないが、感覚運動機能の一部又は全ての喪失、高血圧症、低血圧症、弛緩麻痺(例えば腸管及び／又は膀胱の)、並びに持続性プリアピズムを含む、SCIから生じる脊髄ショックの1以上の症状の検出可能な改善を引き起こすのに十分な量である。

40

【0050】

神経原性ショックは、低血圧症、徐脈、及び低体温症の三つ組みにより症状発現される。ショックは、T1-L2から及び無競争(unopposed)迷走神経緊張までの交感神経性アウトフ

50

ローの破壊に続発して、T6の上側の損傷により一般的に起こる傾向があり、これは随伴する血管拡張による血管抵抗の減少に繋がる。神経原性ショックは、頻拍を随伴する傾向がある脊髄ショック及び乏血性ショックとは区別される。従ってSCI治療方法のいくつかの実施態様において、胎盤幹細胞の治療有効量は、限定するものではないが、低血圧症、徐脈、低体温症、血管抵抗の減少、及び血管拡張を含む、SCIから生じる神経原性ショックの1以上の症状の検出可能な改善を引き起こすのに十分な量である。

【0051】

自律神経反射異常(AD)は、内臓交感神経性アウトフロー(T5-T6)の上側の、SCI患者において生じる大規模な不均衡な反射交感神経放電の症候群である。ADは、反射が回復する脊髄ショック相の後で起こる。主要な内臓アウトフローの上側が損傷した個体は、ADを発症し得る。この損傷の下側で、無傷の末梢感覚神経は、脊髄視床及び後柱中を登るインパルスを伝達し、脊髄の中間外側灰白質に位置する交感神経ニューロンを刺激する。大脳の血管運動中枢からのSCIの上側の阻害性アウトフロー(inhibitory outflow)は増加するが、これはSCIのブロックの下側を通過することはできない。この巨大な交感神経性アウトフローは、様々な神経伝達物質(ノルエピネフリン、ドパミン-b-水酸化酵素、ドパミン)の放出を引き起こし、立毛、皮膚蒼白、及び動脈血管系における重度の血管収縮を引き起こす。その結果、血圧の突然の上昇及び損傷レベルの上側の血管拡張が起こる。患者は通常、疼痛感受性頭蓋内血管の血管拡張により引き起こされた頭痛を有する。従ってSCI治療方法のいくつかの実施態様において、胎盤幹細胞の治療有効量は、限定するものではないが、立毛、皮膚蒼白、動脈血管系における重度の血管収縮、血圧上昇、及び損傷レベルの上側の血管拡張を含む、SCIから生じる自律神経反射異常の1以上の症状の検出可能な改善を引き起こすのに十分な量である。

【0052】

SCI治療方法のいくつかの実施態様において、胎盤幹細胞の治療有効量は、SCIから生じる浮腫の1以上の症状の検出可能な改善を引き起こすのに十分な量である。本方法のいくつかの実施態様において、胎盤幹細胞の治療有効量は、直接外傷により引き起こされたSCIの1以上の症状の検出可能な改善を引き起こすのに十分な量である。本方法のいくつかの実施態様において、胎盤幹細胞の治療有効量は、椎骨骨片による圧迫により引き起こされたSCIの1以上の症状の検出可能な改善を引き起こすのに十分な量である。本方法のいくつかの実施態様において、胎盤幹細胞の治療有効量は、椎間板物質の圧迫により引き起こされたSCIの1以上の症状の検出可能な改善を引き起こすのに十分な量である。

【0053】

本明細書に提供されるSCI治療方法はまた、限定するものではないが、脊髄中心症候群、ブラウン・セカール症候群、脊髄前部症候群、脊髄円錐症候群、及び馬尾症候群を含む、SCIの他の分類の症状を、又は該分類に関連した疾患、障害若しくは病態を有する又は経験している個体の治療を提供する。

【0054】

脊髄中心症候群は、頸部領域の損傷に関連することが多く、且つ下肢よりも上肢のより大きい衰弱に繋がり、仙骨感覚温存を伴う。従ってSCI治療方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞の治療有効量は、限定するものではないが、仙骨感覚温存を伴い、下肢よりも上肢におけるより大きい衰弱を含む、脊髄中心症候群の1以上の症状の検出可能な改善を引き起こすのに十分な量である。

【0055】

ブラウン・セカール症候群は、脊髄の半側切断病変に関連することが多く、痛覚及び温度覚の対側喪失を伴う、比較的大きい同側の固有覚喪失及び運動喪失を引き起こす。従ってSCI治療方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞の治療有効量は、限定するものではないが、痛覚及び温度覚の対側喪失を伴う、同側の固有覚喪失及び運動喪失を含む、ブラウン・セカール症候群の1以上の症状の検出可能な改善を引き起こすのに十分な量である。

【0056】

脊髄前部症候群は、運動機能並びに痛覚及び温度覚の可変性の喪失を引き起こす病変に関連することが多く；固有覚は保存される。従ってSCI治療方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞の治療有効量は、限定するものではないが、運動機能並びに痛覚及び温度覚の可変性の喪失を含む、脊髄前部症候群の1以上の症状の検出可能な改善を引き起こすのに十分な量である。

【0057】

脊髄円錐症候群は、仙髄及び腰髄神経根の損傷に関連し、反射消失した膀胱、腸管、及び下肢に繋がる一方で、仙髄分節は時には保存された反射を示すことがある(例えば、球海綿体反射及び排尿反射)。従ってSCI治療方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞の治療有効量は、限定するものではないが、反射消失した膀胱、腸管、及び下肢を含む、脊髄円錐症候群の1以上の症状の検出可能な改善を引き起こすのに十分な量である。

10

【0058】

馬尾症候群は、脊柱管内の腰仙骨神経根の損傷に起因し、反射消失した膀胱、腸管、及び下肢に繋がる。従ってSCI治療方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞の治療有効量は、限定するものではないが、反射消失した膀胱、腸管、及び下肢を含む、馬尾症候群の1以上の症状の検出可能な改善を引き起こすのに十分な量である。

【0059】

特定の実施態様において、SCIの1以上の症状、病態又は症候群の改善、重症度の軽減、又は進行の縮小を検出する特定の技術は、本明細書に提供されるSCI治療方法においては重要ではない。特定の実施態様において、該SCIの1以上の症状、病態、又は症候群の改善又は進行の縮小の評価は、当該技術分野の実践者の判断に従い決定される。特定の実施態様において、該SCIの1以上の症状、病態、又は症候群の進行の改善又は縮小の評価は、対象の主観的経験と組合せて、当該技術分野の実践者の判断に従い決定される。

20

【0060】

いくつかの実施態様において、該SCIの1以上の症状の改善、又は1以上の症状の進行の縮小は、「脊髄損傷の神経学的及び機能的分類に関する国際標準(International Standards for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury)」に従い決定される。「脊髄損傷の神経学的及び機能的分類に関する国際標準」は、米国脊髄損傷協会(ASIA)により公表され、これは神経学的機能の全身の運動及び感覚試験を基にしたSCIのレベル及び程度を説明する広く受け入れられているシステムである。International Standards For Neurological Classification Of Spinal Cord Injury、J Spinal Cord Med. 26 Suppl 1:S50-6 (2003)を参照し、その開示はその全体として参照により本明細書に組み入れられる。

30

【0061】

特定の実施態様において、該SCIの1以上の症状の改善、又は1以上の症状の進行の縮小は、下記のカテゴリーを用いる、ASIA障害スケール(フランケル分類からの改変)に従い検出される：

Aー完全：感覚又は運動機能が、仙髄分節S4-S5.4において残存しない。「完全麻痺」とは、最下位の仙髄分節に感覚及び運動機能が存在しないことをいう。

Bー不全：神経学的レベルより下位に感覚機能は残存するが、運動機能は残存せず、仙髄分節S4-S5を通じて広がる。「不全麻痺」とは、最下位の仙髄分節を含む、損傷のレベルより下位の感覚又は運動機能の残存をいう。

40

Cー不全：神経学的レベルより下位に運動機能は残存しているが、神経学的レベルより下位の主要筋群のほとんどが筋力3未満である。

Dー不全：神経学的レベルより下位に運動機能は残存しているが、神経学的レベルより下位の主要筋群のほとんどが筋力3以上である。

Eー正常：感覚及び運動機能は正常。

【0062】

従って本明細書に提供されるSCI治療方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、ASIA障害スケール(AIS)に従い障害の軽減を引き起こすのに十分

50

な量である。いくつかの実施態様において、この低下は、障害の1、2、3、4又は5グレードの低下であり、ここで1グレードは、単一のカテゴリーの改善、例えばカテゴリーDからカテゴリーEへの障害の軽減に相当している。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、AISに従いASIA AからASIA B、ASIA C、ASIA D又はASIA Eへと個体分類を変換するのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、AISに従いASIA BからASIA C、ASIA D又はASIA Eへと個体分類を変換するのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、AISに従いASIA CからASIA D又はASIA Eへと個体分類を変換するのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、AISに従いASIA DからASIA Eへと個体分類を変換するのに十分な量である。

10

【0063】

いくつかの実施態様において、該SCIの1以上の症状の改善、又は1以上の症状の進行の縮小は、患者の筋力を測定することにより検出される。いくつかの実施態様において、筋力は、下記の医学研究協議会(MRC)スケール0-5を用い等級化することができる：

5－正常筋力

4⁺－抵抗に対し最大を下回る動き

4－抵抗に対し適度な動き

4⁻－抵抗に対しわずかな動き

3－重力に対し動くが抵抗に対し動かない

2－重力を取り除いて動く

1－ぴくぴく動く

0－動かず

20

【0064】

下記の主要筋群を、SCI患者において試験し、相当する損傷レベルを示した：

C5－肘屈筋群(上腕二頭筋)

C6－手首伸筋群(長橈側手根伸筋又は短指伸筋)

C7－肘伸筋群(三頭筋)

C8－中指までの指屈筋(深指屈筋)

T1－小指の外転筋(小指外転筋)

L2－股屈筋(腸腰筋)

L3－膝伸筋(大腿四頭筋)

L4－足背屈筋(前脛骨筋)

L5－長趾伸筋(長母指伸筋)

S1－足底屈筋(腓腹筋又はひらめ筋)。

30

【0065】

従って本明細書に提供されるSCI治療方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、MRCスケールに従い筋力の1、2、3、4又は5ポイントの増加を引き起こすのに十分な量である。例えばいくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、SCIの結果として動かない筋肉を、ぴくぴく動く、重力を取り除いて動く、重力に対し動くが抵抗に対し動かない、抵抗に対しわずかな動き、抵抗に対し適度な動き、抵抗に対し最大を下回る動き、又は正常筋力を有するようにするのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、SCIの結果としてぴくぴく動くのみを有する筋肉を、重力を取り除いて動く、重力に対し動くが抵抗に対し動かない、抵抗に対しわずかな動き、抵抗に対し適度な動き、抵抗に対し最大を下回る動き、又は正常筋力を有するようにするのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、SCIの結果として重力に対し動くが抵抗に対し動かない、抵抗に対しわずかな動き、抵抗に対し適度な動き、抵抗に対し最大を下回る動き、又は正常筋力を有するようにするのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、SCIの結果として重力に対し動くが抵抗に対し動かないのみを有する筋肉を

40

50

、抵抗に対しわずかな動き、抵抗に対し適度な動き、抵抗に対し最大を下回る動き、又は正常筋力を有するようにするのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、SCIの結果として抵抗に対しわずかな動きのみの筋肉を、抵抗に対し適度な動き、抵抗に対し最大を下回る動き、又は正常筋力を有するようにするのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、SCIの結果として抵抗に対し適度な動きのみを有する筋肉を、抵抗に対し最大を下回る動き、又は正常筋力を有するようにするのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、SCIの結果として抵抗に対し最大を下回る動きのみを有する筋肉を、正常筋力を有するようにするのに十分な量である。

【0066】

いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の二頭筋の筋力の1、2、3、4又は5ポイントの増加を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の上腕筋の筋力の1、2、3、4又は5ポイントの増加を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の長橈側手根伸筋又は短指伸筋の筋力の1、2、3、4又は5ポイントの増加を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の三頭筋の筋力の1、2、3、4又は5ポイントの増加を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の深指屈筋の筋力の1、2、3、4又は5ポイントの増加を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の小指外転筋の筋力の1、2、3、4又は5ポイントの増加を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の腸腰筋の筋力の1、2、3、4又は5ポイントの増加を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の大腿四頭筋の筋力の1、2、3、4又は5ポイントの増加を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の前脛骨筋の筋力の1、2、3、4又は5ポイントの増加を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の長母指伸筋の筋力の1、2、3、4又は5ポイントの増加を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の腓腹筋又はひらめ筋の筋力の1、2、3、4又は5ポイントの増加を引き起こすのに十分な量である。

【0067】

いくつかの実施態様において、該SCIの1以上の症状の改善、又はその1以上の症状の進行の縮小が、知覚試験により検出される。知覚試験は、下記のレベルで実行することができる：

- C2－後頭隆起
- C3－鎖骨上窩
- C4－肩鎖関節の表面
- C5－肘前窩の側面
- C6－母指
- C7－中指
- C8－小指
- T1－肘前窩の内側
- T2－腋窩の尖端
- T3－第3肋間腔(IS)
- T4－乳頭線の第4 IS
- T5－第5 IS(T4とT6の中間)
- T6－剣状突起レベルの第6 IS
- T7－第7 IS (T6とT8の中間)
- T8－第8 IS (T6とT10の中間)

10

20

30

40

50

T9－第9 IS (T8とT10の間)
 T10－第10 IS又は臍点
 T11－第11th IS (T10とT12の間)
 T12－鼠径靱帯の中央
 L1－T12とL2の間の距離の半分
 L2－中前部大腿
 L3－中央大腿顆
 L4－中央踝
 L5－第3中足指節関節での足背
 S1－側方踵
 S2－正中線膝窩
 S3－坐骨結節
 S4-5－肛門周囲領域(レベル1とみなす)。

10

【0068】

知覚スコア化は、軽い接触及び針刺しに関するもので、下記である：

0－なし
 1－正常ではないか又は知覚過敏
 2－正常。

【0069】

スコア0は、患者が、鋭い針と鈍い刃(dull edge)とを区別できない場合に、与えられる。従って本明細書に提供される治療方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11、T12、L1、L2、L3、L4、L5、S1、S2、S3、S4及びS5の1以上に対応する知覚スコア化において1又は2ポイントの増加を引き起こすのに十分な量である。

20

【0070】

いくつかの実施態様において、該SCIの1以上の症状の改善、又は1以上の症状の進行の縮小は、患者の日常生活の機能をモニタリングすることにより検出される。本明細書に提供されるSCI治療方法のいくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、患者の日常生活活動における機能改善に作用するのに十分な量である。いくつかの実施態様において、機能自立度評価尺度(Functional Independence Measure)(FIM)を使用し、患者の機能改善を評価する。FIMは、機能性の6つの領域に焦点を当てている：セルフケア、括約筋制御、移乗、移動、意思の疎通、及び社会的認知。合計18項目について、各領域内の、2以上の具体的活動/項目を評価する。例えば、6つの活動項目(食事、整容、入浴、上半身更衣、下半身更衣、及びトイレ動作)は、セルフケア領域を構成する。これら18項目の各々は、7ポイントスケールを使用し、機能の独立に関して評価する：

30

自立(介助は不要)：

7＝完全自立：活動は典型的には、修正(modification)、補装具又は補助を伴わず、且つ妥当な時間内で、安全に行われる。

6＝修正自立：活動は、補装具及び／又は妥当な時間より長い時間が必要で有り、及び／又は安全には行われない。

40

依存(監視又は身体介助が必要)：

5＝要監視又は準備：身体介助は不要であるが、合図、誘導又は準備が必要。

4＝最小接触介助：対象は、接触以上を必要とせず、活動に必要とされる労作の75%以上を自立。

3＝中等度介助：対象は、接触以上を必要とし、活動に必要とされる労作の50±75%を自立。

2＝最大介助：対象は、活動に必要とされる労作の25±50%を自立。

1＝全介助：対象は、活動に必要とされる努力の0±25%を自立。

【0071】

従ってFIM総スコア(全ての項目にわたり合計)は、安全性の問題並びに他人及び技術装

50

置への依存に関して、身体障害の代価を概算する。領域スコア及び項目スコアのプロファイルは、SCIにより最も影響を受ける日常生活の具体的局面を特定する。本明細書に提供されるSCI治療方法のいくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、FIMスケールに従い患者の機能性の1、2、3、4、5又は6ポイントの増加を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、SCIの結果として全介助を必要とする対象を、中等度介助のみ、最小の接触介助のみ、監視又は準備のみ、若しくは修正自立又は完全自立とするのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、SCIの結果として中等度介助を必要とする対象を、最小の接触介助のみ、監視又は準備のみ、若しくは修正自立又は完全自立とするのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、SCIの結果として最小の接触介助を必要とする対象を、監視又は準備のみ、若しくは修正自立又は完全自立とするのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、SCIの結果として監視又は準備を必要とする対象を、修正自立又は完全自立とするのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、SCIの結果として修正自立を有する対象を、完全自立とするのに十分な量である。

【0072】

SCIの症状を有するか又は経験している個体は、損傷の進行時任意の時点で、複数の胎盤幹細胞、及び任意に1種以上の治療薬により治療することができる。例えば、該個体は、損傷の直後に、損傷の1、2、3、4、5、6日以内に、又は損傷の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、13、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50日以内若しくはそれ以降で、又は損傷後1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年以内若しくはそれ以降で治療することができる。該個体は、損傷の臨床経過時に1回又は複数回治療することができる。本治療方法の具体的実施態様において、該胎盤幹細胞は、SCIの1以上の症状の出現の21日以内に該個体に投与される。本治療方法の別の具体的実施態様において、該胎盤幹細胞は、SCIの1以上の症状の出現の14日以内に該個体に投与される。本治療方法の別の具体的実施態様において、該胎盤幹細胞は、SCIの1以上の症状の出現の7日以内に該個体に投与される。本治療方法の別の具体的実施態様において、該胎盤幹細胞は、SCIの1以上の症状の出現の48時間以内に該個体に投与される。別の具体的実施態様において、該胎盤幹細胞は、SCIの1以上の症状の出現の24時間以内に該個体に投与される。別の具体的実施態様において、該胎盤幹細胞は、SCIの1以上の症状の出現の12時間以内に該個体に投与される。別の具体的実施態様において、該胎盤幹細胞は、SCIの1以上の症状の出現の3時間以内に該個体に投与される。

【0073】

本発明の特定の実施態様において、該個体は、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくは非ヒト霊長類である。特定の実施態様において、該個体はヒト患者である。該個体は、雄又は雌対象であることができる。特定の実施態様において、該対象は、例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット又はマウスなどの非ヒト動物である。

【0074】

SCI治療に有用な胎盤幹細胞は、本明細書に明らかにされた胎盤幹細胞のいずれかであることができる(5.5節参照)。具体的実施態様において、胎盤幹細胞は、CD200を発現するが、HLA-Gを発現しないか；CD73、CD105、及びCD200を発現するか；CD200及びOCT-4を発現するか；CD73及びCD105を発現するが、HLA-Gを発現しないか；CD73及びCD105を発現し、且つ該胎盤幹細胞集団が胚様体の形成が可能である条件下で培養される場合に、該集団において1以上の胚様体の形成を促進するか；又は、OCT-4を発現し、且つ(c)該胎盤幹細胞集団が胚様体の形成が可能である条件下で培養される場合に、該集団において1以上の胚様体の形成を促進するか；又は、前述の任意の組合せである。具体的実施態様において、胎盤幹細胞は、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻胎盤幹細胞である。別の具体的実施態様において、胎盤幹細胞は、CD117⁻である。

【0075】

一実施態様において、個体には、投与量約3億個の胎盤幹細胞が投与される。しかし投与量は、個体の身体特徴、例えば体重により変動することができ、且つ1回の投薬につき100万個～100億個の胎盤幹細胞、好ましくは1回の投薬につき1000万個～10億個、又は1回の投薬につき1億個～5億個の胎盤幹細胞の範囲であることができる。いくつかの実施態様において、投与は、生存細胞の投与に関する医学的に許容し得る任意の経路、例えば静脈内、動脈内、腹腔内、心室内、胸骨内、頭蓋内、筋肉内、滑液嚢内、眼球内、硝子体内(例えば眼球の関与が存在する場合)、大脳内、脳室内(例えば神経又は脳の関与が存在する場合)、髄腔内、骨内注入、膀胱内、経真皮、槽内、硬膜外、又は皮下投与によることができる。具体的実施態様において、投与は、SCI部位への直接のボーラス注射又は注入により、例えば腰椎穿刺による。

10

【0076】

一実施態様において、胎盤幹細胞は、細胞バンク、例えば胎盤幹細胞バンク由来である。一実施態様において、胎盤幹細胞の投与量は、ボーラス注射又はカテーテルによる投与に適した、血液バッグ又は類似のバッグ内に含まれる。

【0077】

胎盤幹細胞又は胎盤幹細胞により馴化された培地は、単回投与量又は反復投与量で投与することができる。胎盤幹細胞が反復投与量で投与される場合、これらの投与量は、SCIの1以上の急性症状を緩和するようにデザインされた治療レジメンの一部であることができるか、又はSCIの重症度を軽減するようにデザインされた長期治療レジメンの一部であることができる。

20

【0078】

本明細書に提供されるSCIを治療する方法は、SCI治療の過程において使用される1以上の療法又は治療と一緒に、治療有効量の胎盤幹細胞の投与によりSCIを治療することを更に包含している。これらの1以上の追加療法は、胎盤幹細胞の投与前、投与時、又は投与後に使用することができる。いくつかの実施態様において、1以上の追加療法は、治療的脊椎牽引の適用を含む。治療的脊椎牽引は、手作業によるか又は機械的に発生させた力を使用し、脊柱の縦軸に沿って力を加え(通常重り)、脊椎を伸展し且つ動かす。首又は頸髄分節が骨折している場合、牽引は、脊柱をまっすぐし、且つその圧迫を解く。

【0079】

他の実施態様において、1以上の追加療法は、例えば脊柱を適切に並べ、又は椎骨を強化するための隣接椎骨を融合し、骨の再生を促進し、及び将来の更なるSCIの可能性を低下するための、ロッド及びスクリューの挿入による、脊椎の手術による安定化を含む。他の実施態様において、1以上の追加療法は、リハビリテーション(例えば、繰り返しの自発的運動トレーニング、筋力トレーニングなど)であり、これは新たな局所的CNS接合の形成を促進し得る。他の実施態様において、1以上の追加療法は、特定の神経又は筋肉の機能的電気刺激(FES)を含み、例えば、横隔神経のFESは、呼吸を補助し；仙骨神経根のFESは、膀胱及び腸管の機能を促進し；四肢筋肉のFESは、腕又は手の機能を改善することに加え、起立又は歩行を改善する。

30

【0080】

該SCIの1以上の症状、病態、若しくは症候群の検出可能な改善、又は1以上の症状、病態、若しくは症候群の進行の縮小を引き起こすのに十分な複数の胎盤幹細胞及び1以上の治療薬を個体に投与することを含む、SCIの症状を有するか又は経験している個体の治療方法も、本明細書に提供される。一実施態様において、該治療薬はコルチコステロイドである。他の実施態様において、該治療薬は、ヘパリンなどの抗凝血薬である。他の実施態様において、該治療薬は、神経保護薬である。いくつかの実施態様において、該神経保護薬は、メチルプレドニゾロンコハク酸ナトリウム(MPSS)、GM-1(Sygen)、Gacylidine(GK-11)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、モノサイクリン(ミノサイクリン)、リチウム又はエリスロポエチン(EPO)である。

40

【0081】

50

他の実施態様において、該治療薬は、イノシン、ロリプラム、ATI-355(NOGO)、コンドロイチナーゼ、ファミプリジン(fampridine)(4-アミノピリデイン)、ガバペンチン、又はRhoアンタゴニスト(例えば、Cethrin(登録商標))である。別の実施態様において、該治療薬は、免疫調節薬又は免疫抑制薬、例えばシクロスポリンA、FTY506(タクロリムス)又はFTY720である。他の実施態様において、該治療薬は、胎盤幹細胞と同時投与される第二の細胞集団である。いくつかの実施態様において、第二の細胞集団は、自己マクロファージ、骨髄間質細胞、鼻の嗅神経鞘細胞、胚性嗅神経皮層細胞、又はシュワン細胞の集団である。

【0082】

(5.1.2 外傷性脳損傷(TBI)の治療)

また治療有効量の胎盤幹細胞又は胎盤幹細胞により馴化された培地を個体へ投与することを含む、TBIの症状を有するか又は経験している個体を治療する方法が、本明細書に提供され、ここで該治療有効量は、該TBIの1以上の症状の検出可能な改善、又は1以上の症状の進行の縮小を引き起こすのに十分な量である。本明細書において使用される「1以上の症状」とは、治癒プロセスと関連している損傷部位内の炎症の程度、免疫反応、遺伝子発現、損傷部位での瘢痕化の量及び程度、患者の運動機能、感覚機能及び認知機能の改善などの、客観的に測定可能なパラメータ、並びに、患者の幸福、運動機能、感覚機能および認知機能の改善の患者の認知、TBIに関連した疼痛若しくは不快の軽減の認知などの、主観的に測定可能なパラメータを含む。

【0083】

TBIは、頭蓋及び頭蓋内部へ加えられた外部の機械的力からの脳への非変性性で非先天性の傷害であり、意識の関連した低下した又は変更された状態を伴う、恐らく認知、身体的及び心理社会的な機能の永久又は一過性の障害に繋がるであろう。TBIは、脳震盪から昏睡及び死亡まで臨床症状発現し得る。

【0084】

TBI治療方法のいくつかの実施態様において、胎盤幹細胞の治療有効量は、原発性TBI、すなわち外傷の瞬間に起こるTBIの1以上の症状の検出可能な改善を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、原発性TBIは、例えば頭蓋骨の骨折、裂傷、打撲傷、又は貫通性創傷などの、限局性損傷である。いくつかの実施態様において、原発性TBIは、びまん性、例えばびまん性軸索損傷である。

【0085】

TBI治療方法のいくつかの実施態様において、胎盤幹細胞の治療有効量は、外傷の直後発生し且つある期間継続する作用を生じる、原発性TBIの結果生じる続発性損傷の1以上の症状の検出可能な改善を引き起こすのに十分な量である。TBIの続発型は、原発性損傷の作用由来の更なる細胞損傷が原因である。続発性損傷は、脳への最初の外傷後数時間又は数日数にわたり出現することがある。

【0086】

本明細書に提供されるTBI治療方法はまた、脳に対し特定領域に負わせられたTBI損傷の治療も包含している。いくつかの実施態様において、本明細書に提供されるTBI治療方法は、前頭葉(前額部に位置する)、頭頂葉(頭部の背面及び頂上近傍に位置する)、後頭葉(頭部の背面、最も後方に位置する)、側頭葉(耳の上の頭部側面に位置する)、脳幹(脳内の深部に位置する)、又は小脳(頭蓋底に位置する)への損傷を治療するために有用である。

【0087】

本明細書に提供されるTBI治療方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、限定するものではないが、様々な身体部分の単純な動作の喪失(麻痺)、コーヒーを入れるなど多段階の作業を完遂するために必要な複雑な動作の順序の計画の不能(順序付け)、他者との交流の自発性の喪失、思考の自由度の喪失、一つの考えの持続(固執)、作業への集中の不能(陪席(attending))、気分変動(情緒不安定)、社会的行動の変化、人格の変化、問題解決の困難、又は言語表現の不能(ブロカ失語症)を含む、前頭葉への損傷の1以上の症状の改善を引き起こすのに十分な量である。

【0088】

本明細書に提供されるTBI治療方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、限定するものではないが、一度に2つ以上の対象への関心を払うことの不能、物体の名前を呼ぶことの不能(健忘性失語症)、筆記のために単語を探すことの不能(失書症)、読みの問題(失読症)、物体を描写することの困難、左右を識別することの困難、数学的行動の困難(計算力障害)、セルフケアの困難に繋がるある身体部分及び／又は周囲の空間の認識の欠如(失行症)、視覚的注意を集中することの不能、又は眼と手の協調の困難を含む、頭頂葉への損傷の1以上の症状の改善を引き起こすのに十分な量である。

【0089】

本明細書に提供されるTBI治療方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、限定するものではないが、視力欠損(視野狭窄)、環境中に物体を配置することの困難、色を確定することの困難(色覚失認症)、幻覚の発生、錯視(物体の不正確な目視)、失読(単語を認識することの不能)、描画された物体を認識することの困難、物体の動きを認識することの不能(運動失認症)、又は読み書きの困難を含む、後頭葉への損傷の1以上の症状の改善を引き起こすのに十分な量である。

【0090】

本明細書に提供されるTBI治療方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、限定するものではないが、顔の認識の困難(相貌失認)、話し言葉の理解困難(ウェルニッケ失語症)、対象が見たり聞いたりするものに対する選択的注意の混乱、物体の識別及び言語化の困難、短期記憶障害、長期記憶との干渉、性交渉への関心の増減、物体を類別することの不能(カテゴリー化)、執拗な会話(右葉損傷の指標)、又は攻撃的行動の増加を含む、側頭葉への損傷の1以上の症状の改善を引き起こすのに十分な量である。

【0091】

本明細書に提供されるTBI治療方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、限定するものではないが、呼吸の肺活量の減少(会話に重要)、食品及び水の嚥下の困難(嚥下障害)、環境の組織化／認知の困難、平衡運動の問題、眩暈及び悪心(めまい)、又は睡眠困難(不眠症、睡眠時無呼吸)を含む、脳幹への損傷の1以上の症状の改善を引き起こすのに十分な量である。

【0092】

本明細書に提供されるTBI治療方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、限定するものではないが、細かい動作の協調能の喪失、歩行能の喪失、物体に手を伸ばし掴むことの不能、振戦、眩暈(めまい)、不明瞭言語(断節言語)、又は素早い動作の不能を含む、頭蓋底への損傷の1以上の症状の改善を引き起こすのに十分な量である。

【0093】

本明細書に提供されるTBI治療方法はまた、軽度から重度までの範囲に及ぶTBI損傷の治療も包含している。TBIは、意識喪失及び／又は混乱及び見当識障害が30分間よりも短い場合に軽度と分類することができる。従っていくつかの実施態様において、本発明は、TBIに罹患した個体への胎盤幹細胞(例えばPDAC)の有効量の投与を提供し、ここで該有効量は、例えば、限定するものではないが、頭痛、記憶障害、注意欠陥、気分動揺及び欲求不満、疲労、視力障害、記憶喪失、注意不足／集中力不足、睡眠障害、眩暈／平衡感覚障害、短気、情緒障害、意気消沈、発作、悪心、嗅覚喪失、光及び音への過敏、気分変動、迷い又は混乱、又は思考緩徐などの認識問題を含む、軽度TBIの1以上の症状の検出可能な改善、重症度の軽減、又は進行の縮小を引き起こすのに十分な胎盤細胞の量である。

【0094】

具体的実施態様において、該有効量は、限定するものではないが、混乱又は放心状態(feeling dazed)、不器用、不明瞭言語、悪心又は吐気、頭痛、平衡感覚障害又は眩暈、かすみ目、光への過敏、雑音への過敏、不活発、耳鳴り、行動又は人格の変化、集中困難、又は記憶喪失を含む、脳震盪の1以上の症状の検出可能な改善、重症度の軽減、又は進行

10

20

30

40

50

の縮小を引き起こすのに十分な胎盤細胞の量である。いくつかの実施態様において、脳震盪は、意識喪失のない、1分間未満続く脳震盪症状を特徴とする、グレード1(軽度)脳震盪である。いくつかの実施態様において、脳震盪は、意識喪失のない、及び15分間よりも長く続く脳震盪症状を特徴とする、グレード2(中等度)脳震盪である。いくつかの実施態様において、脳震盪は、少なくとも数秒間の意識喪失を特徴とする、グレード3(重度)脳震盪である。

【0095】

いくつかの実施態様において、本発明は、TBIに罹患した個体への胎盤幹細胞(例えばPDAC)の有効量の投与を提供し、ここで該有効量は、例えば、限定するものではないが、注意困難、集中困難、散漫性、記憶困難、処理速度の緩慢化、混乱、固執、衝動、言語処理の困難、発語及び言語の困難、話し言葉の理解不能(受容失語症)、会話及び理解の困難(表現性失語症)、不明瞭言語、非常に速い又は非常に遅い発語、難読症、難書症などの認知障害；触覚・温度・運動・四肢の位置・微細な識別の解釈の困難などの感覚障害；心理学的に意味のあるデータへの知覚印象の統合又はパターン化の困難などの、知覚障害；部分的又は完全な視力喪失、眼筋虚弱及び二重視力(複視)、かすみ目、距離判断の問題、眼球固視微動(眼振)、光への不耐(羞明)を含む、視覚障害；聴力低下又は喪失、耳鳴り(耳鳴)、音への敏感さの増大を含む、聴力障害；嗅覚喪失又は減退(嗅覚消失)を含む、嗅覚器官障害；味覚喪失又は減退；いくつかの型があり且つ意識、知覚認知、又は運動動作の破壊に参与するてんかんに関連した痙攣を含む、発作；身体麻痺／痙直を含む身体変化；慢性疼痛、腸及び／又は膀胱の制御喪失、睡眠障害、体力低下、食欲の変化、体温調節不能、及び月経困難；依存行動、情動能喪失、意欲喪失、短気、攻撃性、抑鬱、脱抑制、又は認識の拒否／欠如を含む、社会的感情の困難を含む、中等度から重度のTBIの1以上の症状の検出可能な改善、重症度の軽減、又は進行の縮小を引き起こすのに十分な胎盤細胞の量である。

【0096】

一実施態様において、本発明は、TBIに罹患した個体への胎盤幹細胞(例えばPDAC)の有効量の投与を提供し、ここで該有効量は、先に列記したTBIの1以上の症状の検出可能な改善、重症度の軽減、又は進行の縮小を引き起こすのに十分な胎盤細胞の量である。特定の実施態様において、TBIの1以上の症状、病態又は症候群の改善、重症度の軽減、又は進行の縮小を検出する特定の技術は、本明細書に提供されるTBI治療方法においては重要ではない。特定の実施態様において、該SCIの1以上の症状の改善又は進行の縮小の評価は、当該技術分野の実践者の判断に従い決定される。特定の実施態様において、該TBIの1以上の症状の改善又は進行の縮小の評価は、対象の主観的経験と組合せて、当該技術分野の実践者の判断に従い決定される。

【0097】

いくつかの実施態様において、該TBIの1以上の症状の改善、又は1以上の症状の進行の縮小は、グラスゴー・コーマ・スケール(GCS)に従い検出される。GCSは、下記のように、損傷の48時間以内のTBIの重症度を規定している：

開眼：

自発的に開眼＝4

呼びかけると開眼＝3

痛み刺激で開眼＝2

反応なし＝1

運動反応：

命令に従い動作＝6

痛みに対し局所的に動作＝5

痛みに対し引っ込める動作＝4

痛みに対し屈曲姿勢(除皮質姿勢)＝3

痛みに対し伸展姿勢(除脳姿勢)＝2

反応なし＝1

言語反応：

人物、場所、及び日時に対する見当識あり＝5

会話するが、見当識混乱＝4

不適切な単語の発語＝3

意味のない発声＝2

反応なし＝1。

【0098】

GCSスコアに従うTBI重症度(48時間以内)は、下記である：

植物状態のTBI＝3未満(睡眠覚醒サイクル；覚醒するが、周囲と干渉せず；痛みに対し局所的反応なし：により特徴付けられる)

重度TBI＝3～8(昏睡：意識不明状態；意味のない反応、自発的活動なし：により特徴付けられる)

中等度TBI＝9～12(30分以上の意識喪失；消散する身体障害又は認識障害；リハビリテーションから恩恵を受ける患者：により特徴付けられる)

軽度TBI＝13～15(精神状態の短い変化(混乱、見当識混乱又は記憶喪失)、又は30分未満の意識喪失：により特徴付けられる)。

【0099】

従って本明細書に提供されるTBI治療方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、患者のGCSスコアの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ポイント又はそれ以上の増大を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、GCSに従い、開眼に関して1、2、又は3ポイントの増大を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、GCSに従い、運動反応に関して1、2、3、4又は5ポイントの増大を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、GCSに従い、言語反応に関して1、2、3、又は4ポイントの増大を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、植物状態TBIに相当するレベルから、重度、中等度又は軽度TBIに相当するレベルへ、外傷性損傷の重症度を軽減するのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、重度TBIに相当するレベルから、中等度又は軽度TBIに相当するレベルへ、外傷性損傷の重症度を軽減するのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、中等度TBIに相当するレベルから、軽度TBIに相当するレベルへ、外傷性損傷の重症度を軽減するのに十分な量である。

【0100】

いくつかの実施態様において、該TBIの1以上の症状の改善、又は1以上の症状の進行の縮小は、Rancho Los Amigosスケールに従い検出される。Rancho Los Amigosスケールは、下記のスケールで、認識、認知、行動及び周囲との相互作用のレベルを測定する：

レベルI：反応なし

レベルII：全身の反応

レベルIII：局所的反応

レベルIV：混乱し、興奮

レベルV：混乱し、不適切な反応

レベルVI：混乱しているが、適切な反応

レベルVII：無意識の適切な反応

レベルVIII：合目的の適切な反応。

【0101】

従って本明細書に提供されるTBI治療方法の具体的実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、Rancho Los Amigosスケールに従う患者のスコアの1、2、3、4、5、6又は7レベルの増加を引き起こすのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の認識、認知、行動及び周囲との相互作用

用を、反応なしのレベルから、全身の反応、局所的反応、混乱し興奮、混乱した不適切な反応、混乱しているが適切な反応、無意識の適切な反応、又は合目的の適切な反応のレベルまで上げるのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の認識、認知、行動及び周囲との相互作用を、全身の反応のレベルから、局所的反応、混乱し興奮、混乱した不適切な反応、混乱しているが適切な反応、無意識の適切な反応、又は合目的の適切な反応のレベルまで上げるのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の認識、認知、行動及び周囲との相互作用を、局所的反応のレベルから、混乱し興奮、混乱した不適切な反応、混乱しているが適切な反応、無意識の適切な反応、又は合目的の適切な反応のレベルまで上げるのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の認識、認知、行動及び周囲との相互作用を、混乱し興奮のレベルから、混乱した不適切な反応、混乱しているが適切な反応、無意識の適切な反応、又は合目的の適切な反応のレベルまで上げるのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の認識、認知、行動及び周囲との相互作用を、混乱した不適切な反応のレベルから、混乱しているが適切な反応、無意識の適切な反応、又は合目的の適切な反応のレベルまで上げるのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の認識、認知、行動及び周囲との相互作用を、混乱しているが適切な反応のレベルから、無意識の適切な反応、又は合目的の適切な反応のレベルまで上げるのに十分な量である。いくつかの実施態様において、胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量は、対象の認識、認知、行動及び周囲との相互作用を、無意識の適切な反応のレベルから、合目的の適切な反応のレベルまで上げるのに十分な量である。

10

20

【0102】

TBIの症状を有するか又は経験している個体は、該損傷の進行の任意の時点で、複数の胎盤幹細胞、及び任意に1種以上の治療薬により治療することができる。例えば、該個体は、損傷の直後に、又は損傷の1、2、3、4、5、6日以内に、又は損傷の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50日以内若しくはそれ以降に治療することができる。該個体は、損傷の臨床経過時に1回又は複数回治療することができる。本治療方法の具体的実施態様において、該胎盤幹細胞は、TBIの1以上の症状の出現の21日以内に該個体に投与される。本治療方法の別の具体的実施態様において、該胎盤幹細胞は、TBIの1以上の症状の出現の14日以内に該個体に投与される。本治療方法の別の具体的実施態様において、該胎盤幹細胞は、TBIの1以上の症状の出現の7日以内に該個体に投与される。本治療方法の別の具体的実施態様において、該胎盤幹細胞は、TBIの1以上の症状の出現の48時間以内に該個体に投与される。別の具体的実施態様において、該胎盤幹細胞は、TBIの1以上の症状の出現の24時間以内に該個体に投与される。別の具体的実施態様において、該胎盤幹細胞は、TBIの1以上の症状の出現の12時間以内に該個体に投与される。別の具体的実施態様において、該胎盤幹細胞は、TBIの1以上の症状の出現の3時間以内に該個体に投与される。

30

【0103】

本発明の特定の実施態様において、該個体は、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくは非ヒト霊長類である。特定の実施態様において、該個体はヒト患者である。該個体は、雄又は雌対象であることができる。特定の実施態様において、該対象は、例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット又はマウスなどの非ヒト動物である。

40

【0104】

TBI治療に有用な胎盤幹細胞は、本明細書に明らかにされた胎盤幹細胞のいずれかであることができる(5.5節参照)。具体的実施態様において、胎盤幹細胞は、CD200を発現するが、HLA-Gを発現しないか；CD73、CD105、及びCD200を発現するか；CD200及びOCT-4を発現するか；CD73及びCD105を発現するが、HLA-Gを発現しないか；CD73及びCD105を発現し、且つ該胎盤幹細胞集団が胚様体の形成が可能である条件下で培養される場合に、該集団

50

において1以上の胚様体の形成を促進するか；又は、OCT-4を発現し、且つ(c)該胎盤幹細胞集団が胚様体の形成が可能である条件下で培養される場合に、該集団において1以上の胚様体の形成を促進するか；又は、前述の任意の組合せである。具体的実施態様において、胎盤幹細胞は、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁺胎盤幹細胞である。別の具体的実施態様において、胎盤幹細胞は、CD117⁺である。

【0105】

一実施態様において、個体には、投与量約2億個から8億個の胎盤幹細胞が投与される。しかし投与量は、個体の身体特徴、例えば体重により変動することができ、且つ1回の投薬につき100万個～100億個の胎盤幹細胞、好ましくは1回の投薬につき1000万個～10億個、又は1回の投薬につき1億個～5億個の胎盤幹細胞の範囲であることができる。投与は、好ましくは静脈内であるが、生存細胞の投与に関する医学的に許容し得る任意の経路、例えば静脈内、動脈内、腹腔内、心室内、胸骨内、頭蓋内、筋肉内、滑液嚢内、眼球内、硝子体内(例えば眼球の関与が存在する場合)、大脳内、脳室内(例えば神経又は脳の関与が存在する場合)、髄腔内、骨内注入、膀胱内、経真皮、槽内、硬膜外、又は皮下投与によることができる。具体的実施態様において、投与は、TBI部位への直接のボーラス注射又は注入により、例えば大槽を介してである。

【0106】

胎盤幹細胞又は胎盤幹細胞により馴化された培地は、単回投与量又は反復投与量で投与することができる。胎盤幹細胞が反復投与量で投与される場合、これらの投与量は、TBIの1以上の急性症状を緩和するようにデザインされた治療レジメンの一部であることができるか、又はTBIの重症度を軽減するようにデザインされた長期治療レジメンの一部であることができる。

【0107】

本明細書に提供されるTBIを治療する方法は、TBI治療の過程において使用される1以上の療法又は治療と一緒に、治療有効量の胎盤幹細胞の投与によりTBIを治療することを更に包含している。これらの1以上の追加療法は、胎盤幹細胞の投与前、投与時、又は投与後に使用することができる。いくつかの実施態様において、1以上の追加療法は、外科的治療を含む。いくつかの実施態様において、ボルト又はICP(頭蓋内圧)モニタリング装置を、頭蓋内に配置し、脳室(brain cavity)内の圧力をモニタリングすることができる。いくつかの実施態様において、頭蓋腔(skull cavity)内に出血が存在する場合、これは外科的に除去するか又は排出することができ、且つ胎盤幹細胞の投与前、投与時又は投与後に、出血している血管又は組織を外科的に修復してよい。重篤な症例において、過度な膨潤及び損傷した脳組織が存在する場合、胎盤幹細胞の投与前、投与時又は投与後に、一部は外科的に除去し、生存脳組織のための空間(room)を形成することができる。いくつかの実施態様において、1以上の追加療法は、呼吸を支援し且つ頭部の圧力低下を維持することを補助する人工呼吸器の使用を含む。

【0108】

該TBIの1以上の症状の検出可能な改善、又は1以上の症状の進行の縮小を引き起こすのに十分な複数の胎盤幹細胞及び1以上の治療薬を個体に投与することを含む、TBIの症状を有するか又は経験している個体の治療方法も、本明細書に提供される。例えば、胎盤幹細胞は、興奮及び続発性損傷を最小化するために、対象を鎮静し薬剤誘発性昏睡とする医薬品と組合せて投与することができる。いくつかの実施態様において、発作予防薬を、治療過程の早期に且つ個体が発作を起こした場合はその後に投与することができる。いくつかの実施態様において、痙性を管理するための医薬品は、患者が機能を回復するので使用することができる。加えて、医薬品を使用し、注意及び集中を改善するか(例えば、アマンタジン及びメチルフェニデート、プロモクリプチン及び抗鬱薬)、又は攻撃的行動を制御することができる(例えば、カルバマゼピン及びアミトリプチリン)。

【0109】

(5.2 CNS損傷により引き起こされた又は関連した炎症反応を抑制するための胎盤幹細胞の使用)

別の態様において、CNS損傷により引き起こされた又は関連した炎症反応を抑制することを含む、CNS損傷を有する個体を治療する方法が、本明細書に提供される。免疫細胞を複数の胎盤幹細胞と接触させることにより、1個の免疫細胞又は複数の免疫細胞の活性、例えば増殖を調節する、例えば抑制する方法が、本明細書に提供される。

【0110】

胎盤幹細胞-媒介性免疫調節、例えば免疫抑制は、例えば、炎症がCNS損傷の初期及び慢性期いずれか又は両方において役割を果たすCNS損傷に有利であろう。従って様々な実施態様において、免疫反応がCNS損傷、例えばSCI又はTBIにより引き起こされた又は関連した免疫反応を抑制する方法が、本明細書に提供される。

【0111】

一実施態様において、複数の免疫細胞を複数の胎盤幹細胞と、該胎盤幹細胞が該免疫反応を検出可能に抑制するのに十分な期間接触させることを含む、CNS損傷、例えばSCI又はTBIにより引き起こされた又は関連した免疫反応を抑制する方法方法が、本明細書に提供され、ここで該胎盤幹細胞は、MLRアッセイ又は退行(regression)アッセイにおいてT細胞増殖を検出可能に抑制する。

【0112】

胎盤幹細胞は、例えば本明細書において別所に記載された胎盤幹細胞である(5.5節参照)。免疫抑制に使用される胎盤幹細胞は、単独の胎盤又は複数の胎盤に由来するか又はそれらから入手することができる。免疫抑制に使用される胎盤幹細胞はまた、単独の種、例えば意図されたレシピエントの種又はその機能が低下又は抑制される免疫細胞の種に由来することができるか、或いは複数の種に由来することができる。

【0113】

本方法の文脈での「免疫細胞」は、免疫系の任意の細胞、特にT細胞及びナチュラルキラー(NK)細胞を意味する。従って本方法の様々な実施態様において、胎盤幹細胞は、複数の免疫細胞と接触され、ここで該複数の免疫細胞は、複数のT細胞(例えば、複数のCD3⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞及び／若しくはCD8⁺ T細胞)並びに／又はナチュラルキラー細胞であるか又はこれらを含む。本方法の文脈での「免疫反応」は、免疫細胞により正常に認識される刺激に対する免疫細胞による任意の反応、例えば抗原の存在に対する反応を意味する。様々な実施態様において、免疫反応は、CNS損傷、例えばSCI又はTBIに対する反応におけるT細胞(例えば、CD3⁺T細胞、CD4⁺T細胞及び／又はCD8⁺T細胞)の増殖であることができる。免疫反応はまた、ナチュラルキラー(NK)細胞の任意の活性、樹状細胞の成熟などであることができる。免疫反応はまた、免疫細胞の1以上のクラスの活性の局所的、組織-若しくは臓器-特異的、又は全身作用であることができ、例えば免疫反応は、炎症、炎症-関連した瘢痕組織の形成などであることができる。

【0114】

本文脈において「接触させる」は、胎盤幹細胞と免疫細胞を、1つの容器(例えば、培養皿、フラスコ、バイアルなど)又はインビボにおいて、例えば同じ個体(例えば哺乳動物、例えばヒト)において一緒にさせることを包含している。好ましい実施態様において、接触させるのは、免疫細胞の免疫機能の変化が検出可能であるのに十分な時間、及び胎盤幹細胞と免疫細胞の十分な数である。より好ましくは様々な実施態様において、該接触させるのは、免疫機能(例えば、抗原に反応したT細胞増殖)を、胎盤幹細胞非存在下での免疫機能と比べ、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%又は95%抑制するのに十分である。インビボ状況におけるそのような抑制は、インビトロアッセイ(下記参照)により決定することができる；すなわち、インビトロアッセイにおける抑制の程度は、レシピエント個体内の特定数の胎盤幹細胞及び多くの免疫細胞について該個体における抑制の程度に外挿することができる。

【0115】

特定の実施態様において、インビトロにおける複数の免疫細胞の1以上の型の免疫反応、又は活性を調節するための胎盤幹細胞の使用方法が、本明細書に提供される。胎盤幹細胞と複数の免疫細胞を接触させることは、複数の胎盤幹細胞の少なくとも一部が、複数の

10

20

30

40

50

免疫細胞の少なくとも一部と相互作用するように、胎盤幹細胞と免疫細胞を同じ物理的空間内で一緒にすること；共通培地の入った個別の物理的空間に胎盤幹細胞と免疫細胞を維持することを含むか；又は、胎盤幹細胞又は免疫細胞の1つ又は複数の培養物由来の培地を、他の細胞型と接触させることを含むことができる(例えば、胎盤幹細胞の培養物から培養培地を入手し、且つ該培地中に単離された免疫細胞を再懸濁する)。具体例において、接触は、MLRアッセイにおいて行われる。別の具体例において、接触は、退行アッセイにおいて行われる。別の具体例において、接触は、ビーズT-リンパ球反応(BTR)アッセイにおいて行われる。

【0116】

そのような接触は、例えば、特定の複数の胎盤幹細胞が免疫調節性、例えば免疫抑制性である程度を決定するためにデザインされた実験的設定で行うことができる。そのような実験的設定は、例えばMLR又は退行アッセイであることができる。MLR及び退行アッセイを行う手順は、当該技術分野において周知である。例えばSchwarzの文献、「混合リンパ球反応：寛容に関するインビトロ試験(The Mixed Lymphocyte Reaction : An In Vitro Test for Tolerance)」、J. Exp. Med. 127(5):879-890 (1968)；Lacerdaらの文献、「異種移植したC.B-17 Scid/Scidマウスにおける自家EBV-誘導したBリンパ液増殖へ優先的に回復し、かつそれへの選択的回帰を誘導したヒトエプスタイン・バーウイルス(EBV)-特異的細胞傷害性Tリンパ球(Human Epstein Barr Virus (EBV)-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Home Preferentially to and Induce Selective Regressions of Autologous EBV-Induced B Lymphoproliferations in Xenografted C.B-17 Scid/Scid Mice)」、J. Exp. Med. 183:1215-1228 (1996)を参照されたい。好ましい実施態様において、多数の胎盤幹細胞が複数の免疫細胞(例えばリンパ球、例えばCD3⁺、CD4⁺及び／又はCD8⁺ Tリンパ球)と接触されるMLRが実行される。

【0117】

MLRを使用し、複数の胎盤幹細胞の免疫抑制能力を決定することができる。例えば複数の胎盤幹細胞は、CD4⁺又はCD8⁺T細胞、樹状細胞(DC)及び胎盤幹細胞を比約10:1:2で一緒にすることを含む、MLRにおいて試験することができ、ここでT細胞は、例えば娘細胞へ分配されるCFSEなどの色素で染色され、且つここでT細胞は約6日間増殖させることができる。胎盤幹細胞の存在下での6日目のT細胞増殖が、DC存在下且つ胎盤幹細胞非存在下でのT細胞増殖と比べ、検出可能に低下する場合に、複数の胎盤幹細胞は、免疫抑制性である。そのようなMLRにおいて、胎盤幹細胞は、解凍されるか又は培養物から収集されるかのいずれかである。胎盤幹細胞約20,000個を、培地(RPMI1640、1mM HEPES緩衝液、抗生物質、及び5% プールしたヒト血清)100 µL中に再懸濁し、且つ2時間ウェルの底へ接着させる。CD4⁺及び／又はCD8⁺T細胞は、全末梢血単核細胞Miltenyi磁気ビーズから単離される。これらの細胞を、CFSE染色し、且つ全部で100,000個のT細胞(CD4⁺T細胞のみ、CD8⁺T細胞のみ、又は等量のCD4⁺及びCD8⁺T細胞)を、各ウェルに添加する。ウェルの容積は200 µLとし、且つMLRを進行させる。

【0118】

従って一実施態様において、複数の免疫細胞を複数の胎盤幹細胞と、該胎盤幹細胞がMLRアッセイ又は退行アッセイにおいてT細胞増殖を検出可能に抑制するのに十分な時間、接触させることを含む、免疫反応を抑制する方法が、本明細書に提供される。一実施態様において、MLRにおいて使用した該胎盤幹細胞は、胎盤幹細胞の多い集団からの胎盤幹細胞の試料又はアリコートを表す。

【0119】

異なる胎盤、又は同じ胎盤内の異なる組織から得られた胎盤幹細胞の集団は、免疫細胞の活性を調節するそれらの能力が異なり、例えばT細胞活性若しくは増殖又はNK細胞活性を抑制する能力が異なり得る。従って使用前に、免疫抑制に関する胎盤幹細胞の特定の集団の能力を決定することが望ましい。そのような能力は、例えば、MLR又は退行アッセイにおいて胎盤幹細胞集団の試料を試験することにより、決定することができる。一実施態様において、試料でMLRが実行され、且つ胎盤幹細胞が原因となる該アッセイにおける免

疫抑制の程度が決定される。この疫抑制の程度は次に、試料採取される胎盤幹細胞集団に帰することができる。従ってMLRを、特定集団の胎盤幹細胞の疫機能を抑制する絶対能力及び相対能力を決定する方法として使用することができる。MLRのパラメータは、より多くのデータを提供し、又は胎盤幹細胞試料の疫抑制能力を最良に決定するために変動することができる。例えば、胎盤幹細胞による疫抑制は、該アッセイ中に存在する胎盤幹細胞の数におおまかに比例して増加するように見えるので、MLRは、一実施態様において2つ以上の胎盤幹細胞の数、例えば1反応につき 1×10^3 、 3×10^3 、 1×10^4 及び／又は 3×10^4 個の胎盤幹細胞で行うことができる。また該アッセイ中のT細胞数に対する胎盤幹細胞数は、変動することができる。例えば、比較的多数の胎盤幹細胞又はT細胞の使用にも拘わらず、該アッセイ中の胎盤幹細胞及びT細胞は、例えば約10：1～約1：10、好ましくは約1：5の比で存在することができる。

10

【0120】

退行アッセイ又はBTRアッセイは、類似の様式で使用するすることができる。

【0121】

CNS損傷、例えばSCI又はTBIにより引き起こされた又は関連した、インビボにおける複数の疫細胞の1以上の型の疫反応、又は活性を調節するための胎盤幹細胞の使用方法が、本明細書で提供される。胎盤幹細胞と疫細胞は、例えば複数の胎盤幹細胞のレシピエントである個体において、接触させられる。接触が個体において行われる場合、一実施態様において、この接触は、外来性胎盤幹細胞(すなわち、該個体由来ではない胎盤幹細胞)及び該個体に対して内因性の複数の疫細胞の間である。具体的実施態様において、個体内の疫細胞は、 $CD3^+$ T細胞、 $CD4^+$ T細胞、 $CD8^+$ T細胞、及び／又はNK細胞である。

20

【0122】

本胎盤幹細胞は、個体において公知の又は予想される疫細胞、T細胞の数に関して、例えば約10：1～約1：10、好ましくは約1：5の比で、個体へ投与することができる。しかし複数の胎盤幹細胞を、非限定的例で約10,000：1、約1,000：1、約100：1、約10：1、約1：1、約1：10、約1：100、約1：1,000又は約1：10,000の比で、個体へ投与することができる。一般に、レシピエント1kg当たり約 1×10^5 ～約 1×10^8 個の胎盤幹細胞、好ましくはレシピエント1kg当たり約 1×10^6 ～約 1×10^7 個の胎盤幹細胞を、疫抑制作用するために投与することができる。様々な実施態様において、個体又は対象へ投与される複数の胎盤幹細胞は、少なくとも、約、又はわずかに 1×10^5 、 3×10^5 、 1×10^6 、 3×10^6 、 1×10^7 、 3×10^7 、 1×10^8 、 3×10^8 、 1×10^9 、 3×10^9 個の胎盤幹細胞、又はそれ以上を含む。

30

【0123】

本胎盤幹細胞はまた、1以上の第二の幹細胞型、例えば骨髓由来の間葉系幹細胞と共に投与することができる。そのような第二の幹細胞は、胎盤幹細胞と、例えば約1：10～約10：1の比で、個体へ投与することができる。

【0124】

インビボにおける胎盤幹細胞と疫細胞の接触又は隣接を促進するために、胎盤幹細胞を、胎盤幹細胞と疫細胞を互いに接触させるのに十分な任意の経路により、個体へ投与することができる。例えば、胎盤幹細胞は、例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内、眼球内、非経口、髄腔内、又は直接臓器へ、例えば脾臓へにより、個体へ投与することができる。インビボ投与に関して、本胎盤幹細胞は、下記5.9.1.2節に説明したように、医薬組成物として製剤することができる。

40

【0125】

この疫抑制の方法は加えて、インビボ状況において、1以上の疫抑制薬の添加を含むことができる。一実施態様において、複数の胎盤幹細胞を、個体中インビボにおいて複数の疫細胞と接触させ、且つ疫抑制薬を含有する組成物を該個体へ投与する。疫抑制薬は、当該技術分野において周知であり、且つ例えば抗-T細胞受容体抗体(モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、又はそれらの抗体断片若しくは誘導体)、抗-IL-2受容体抗体(例えば、バシリキシマブ(SIMULECT(登録商標))又はダクリツマブ(ZENAPAX)(登録商標))、抗T細胞受容体抗体(例えば、Muromonab-CD3)、アザチオプリン、コルチコステロ

50

イド、シクロスポリン、タクロリムス、ミコフェノール酸モフェチル、シロリムス、カルシニューリン阻害剤などを含む。具体的実施態様において、免疫抑制薬は、マクロファージ炎症タンパク質(MIP)-1 α 又はMIP-1 β に対する中和抗体である。好ましくは抗-MIP-1 α 又はMIP-1 β 抗体は、該個体におけるMIP-1 α 及び／又はMIP-1 β の量の検出可能な減少を引き起こすのに十分な量で投与される。

【0126】

胎盤幹細胞は、T細胞増殖の抑制に加え、CNS損傷、例えばSCI又はTBIの治療において有益であり得る、免疫系細胞に対する他の抗炎症作用を有する。例えば、胎盤幹細胞は、例えばインビトロ又はインビボ、個体へ投与される場合のように、Th1及び／又はTh17 T細胞サブセットにより媒介された免疫反応を低下する。別の態様において、T細胞(例えば、CD4⁺ Tリンパ球又は白血球)を胎盤幹細胞、例えば本明細書記載の胎盤幹細胞と接触させることを含む、インビボ又はインビトロのいずれかにおいて、例えばTh1反応又はTh17反応などの、炎症誘発反応を阻害する方法が、本明細書に提供される。具体的実施態様において、該接触は、Th1細胞成熟を検出可能に低下する。本方法の具体的実施態様において、該接触は、該T細胞によるか又は抗原-産生細胞による、リンホトキシン-1 α (LT-1 α)、インターロイキン-1 β (IL-1 β)、IL-12、IL-17、IL-21、IL-23、腫瘍壊死因子アルファ(TNF α)及び／又はインターフェロンガンマ(IFN γ)の1以上の生成を検出可能に減少する。本方法の別の具体的実施態様において、該接触は、制御性T細胞(Treg)表現型を強化又はアップレギュレートし、並びに／又はTh1及び／又はTh17反応を促進する生体分子(例えば、CD80、CD83、CD86、ICAM-1、HLA-II)の樹状細胞(DC)及び／若しくはマクロファージにおける発現を低下する。具体的実施態様において、該T細胞はまた、IL-10、例えば外因性IL-10、又は該T細胞により生成されないIL-10、例えば組換えIL-10と接触される。別の実施態様において、マクロファージを、有効量の胎盤幹細胞と接触させることを含む、マクロファージからの炎症誘発サイトカインの生成を減少する方法が、本明細書に提供される。別の実施態様において、免疫系細胞を、有効量の胎盤幹細胞と接触させることを含む、寛容原性細胞の数を増加し、免疫細胞の寛容原性機能を促進し、及び／又は例えばマクロファージ由来の寛容原性サイトカインをアップレギュレートする方法が、本明細書に提供される。具体的実施態様において、該接触は、活性化されたマクロファージが、該胎盤幹細胞と接触せずに活性化されたマクロファージよりも、より多くのIL-10を検出可能に生成することを引き起こす。別の実施態様において、免疫系細胞を、有効量の胎盤幹細胞と接触させることを含む、抗炎症性T細胞の数をアップレギュレートするか、又は増加する方法が、本明細書に提供される。

【0127】

一実施態様において、胎盤幹細胞の有効量を個体へ投与することを含む、CNS損傷、例えばSCI又はTBIの症状を有するか又は経験している個体において、Th1反応を阻害する方法が、本明細書に提供され、ここで該有効量は、該個体においてTh1反応の検出可能な減少を生じる量である。別の実施態様において、胎盤幹細胞の有効量を個体へ投与することを含む、CNS損傷、例えばSCI又はTBIの症状を有するか又は経験している個体において、Th17反応を阻害する方法が、本明細書に提供され、ここで該有効量は、該個体においてTh17反応の検出可能な減少を生じる量である。これらの方法の具体的実施態様において、該投与は、該個体内のT細胞又は抗原提示細胞により、IL-1 β 、IL-12、IL-17、IL-21、IL-23、TNF α 及び／又はIFN γ の1以上の生成を検出可能に減少する。本方法の別の具体的実施態様において、該接触は、制御性T細胞(Treg)表現型を強化又はアップレギュレートするか、又はTh1若しくはTh17反応を促進するマーカーの該個体の樹状細胞(DC)及び／若しくはマクロファージにおける生成を調節する。別の具体的実施態様において、本方法は、加えてIL-10を該個体へ投与することを含む。

【0128】

別の態様において、1以上の抗炎症サイトカインを発現するように遺伝子操作された本明細書に記載の胎盤幹細胞が、本明細書に提供される。具体的実施態様において、該抗炎症サイトカインは、IL-10を含む。

10

20

30

40

50

【0129】

(5.3 血管新生及びCNS損傷の治療)

別の態様において、単離された胎盤幹細胞(例えばPDAC)の治療有効量を個体へ投与することを含む、CNS損傷、例えばSCI又はTBIから生じる個体の脳又はCNSの内側若しくは周囲の血流の途絶の原因となる症状又は神経学的欠損を有する個体の脳の内側若しくは周囲の血流の途絶を有する個体を治療する方法が、本明細書に提供される。特定の実施態様において、血流の途絶は、個体の脳又はCNSに無酸素障害又は低酸素障害を生じる。特定の実施態様において、PDACは、血管新生性である。特定の実施態様において、PDACは、インビトロ及びインビボの両方において、内皮細胞及び内皮細胞集団、並びに上皮細胞及び上皮細胞集団の成長を支援することができる。

10

【0130】

本明細書記載の胎盤由来の接着細胞に関して本明細書に使用される用語「血管新生性」とは、該細胞が、血管又は血管-様突起を形成することができること、或いは該細胞が、例えば内皮細胞などの、別の細胞集団において血管新生を促進し得ること(例えば血管又は血管-様構造物の形成)を意味する。

【0131】

本明細書に使用される用語「血管新生」とは、限定するものではないが、内皮細胞活性化、遊走、増殖、マトリクス再構築及び細胞安定化を含む、血管新生のプロセスを指す。

【0132】

PDAC及びそのような細胞の集団は、特定の実施態様において、外傷による組織喪失を示す個体における血管新生を促進するため、又はCNS損傷、例えばSCI若しくはTBIから生じる瘢痕形成防止するために使用することができる。

20

【0133】

特定の実施態様において、該個体は、例えば、乏突起膠細胞及びニューロンを含む他の細胞の成長を支援する細胞の能力から、組織の内方成長(ingrowth)又は組織の血管化から、及び有益な細胞因子、ケモカイン、サイトカインなどの存在からなど、該療法からの恩恵を経験するが、該細胞は該個体において組込又は増幅はしない。別の実施態様において、該患者は、該細胞による治療的処置から恩恵を受けるが、これらの細胞は、該患者において長期間生存しない。一実施態様において、該細胞は、数、生存度又は生化学活性が次第に衰退していき、他の実施態様において、この細胞の衰退には、活性、例えば成長、分裂、又は生化学活性の期間が先行している。他の実施態様において、老化細胞、失活した細胞又は死滅細胞であっても、有益な治療的作用を有することができる。

30

【0134】

PDAC又はそのような細胞を含有する治療的組成物の、それを必要とする個体への投与は、移植、埋め込み(例えば、細胞それ自身又はマトリクス-細胞の一部としての細胞との組合せ)、注射(例えば、CNS損傷部位への直接)、注入、カテーテルを介した送達、又は細胞療法を提供するための当該技術分野において公知のいずれか他の手段により実現することができる。

【0135】

この目的のために、血管新生、ヘム血管新生(hemangiogenic)、又は脈管形成の経路に沿った幹細胞又は前駆細胞の分化を刺激する1以上の因子と接触させた、例えば、該因子の存在下でインキュベート又は培養した、PDACの集団が本明細書で更に提供される。そのような因子としては、増殖因子、ケモカイン、サイトカイン、細胞産物、脱メチル化剤などの因子、及び例えば、血管新生、ヘム血管新生、又は脈管形成の経路又は系統に沿った幹細胞の分化を刺激することが現在知られているか又は後に明らかにされる他の因子が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0136】

特定の実施態様において、PDACは、脱メチル化剤、BMP(骨形成タンパク質)、FGF(線維芽細胞増殖因子)、Wnt因子タンパク質、ヘッジホッグタンパク質、及び/又は抗Wnt因子のうちの少なくとも1つを含む因子の存在下での該細胞の培養により、インビトロにおい

50

て、血管新生、ヘム血管新生、又は脈管形成の経路又は系列に沿って、分化されてよい。

【0137】

PDACは、該細胞と、別の治療薬、例えば、インスリン様増殖因子(IGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、上皮増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、インターロイキン18(IL-8)、抗血栓剤(例えば、ヘパリン、ヘパリン誘導体、ウロキナーゼ、又はPPack(デキストロフェニルアラニンプロリンアルギニクロロメチルケトン)、抗トロンビン化合物、血小板受容体アンタゴニスト、抗トロンビン抗体、抗血小板受容体抗体、アスピリン、ジピリダモール、プロタミン、ヒルジン、プロスタグランジン阻害剤、及び／又は血小板阻害剤)、抗アポトーシス剤(例えば、エリスロポエチン(Epo)、Epo誘導体若しくは類似体、又はそれらの塩、トロンボポエチン(Tpo)、IGF-I、IGF-II、肝細胞増殖因子(HGF)、又はカスパーゼ阻害剤)、抗炎症剤(例えば、(例えば、p38MAPキナーゼ阻害剤、スタチン、IL-6阻害剤、IL-1阻害剤、ペミロラスト、トラニラスト、レミケード、シロリムス、及び／又は非ステロイド抗炎症化合物(例えば、アセチルサリチル酸、イブプロフェン、テポキサリン、トルメチン、若しくはスプロフェン))、免疫抑制薬又は免疫調節剤(例えば、カルシニューリン阻害剤、例えば、シクロスポリン、タクロリムス、mTOR阻害剤、例えば、シロリムス又はエベロリムス；抗増殖薬、例えば、アザチオプリン及び／又はミコフェノール酸モフェチル；コルチコステロイド、例えば、プレドニゾン又はヒドロコルチゾン；抗体、例えば、モノクローナル抗IL-2R α 受容体抗体、バシリキシマブ、ダクリズマ、ポリクローナル抗T細胞抗体、例えば、抗胸腺細胞グロブリン(ATG)、抗リンパ球グロブリン(ALG)、及び／又はモノクローナル抗T細胞抗体OKT3、又はその各々の開示がその全体として引用により本明細書中に組み込まれている、米国特許第7,468,276号及び米国特許出願公開第2007/0275362号に記載されている接着性胎盤幹細胞、並びに／或いは酸化防止剤(例えば、プロブコール；ビタミンA、C、及び／若しくはE、補酵素Q-10、グルタチオン、Lシステイン、N-アセチルシステイン、酸化防止剤、又は前述のもののいずれかの誘導体、類似体、若しくは塩)を含む治療的組成物の形態で個体に投与することができる。特定の実施態様において、PDACを含む治療的組成物は、1以上の追加の細胞型、例えば、成体細胞(例えば、線維芽細胞若しくは内胚葉細胞)、幹細胞、及び／又は前駆細胞を更に含む。そのような治療薬及び／又は1以上の追加の細胞型は、それを必要とする個体に、個別に若しくは組合せて、又は2以上のそのような化合物若しくは薬剤を投与することができる。

【0138】

(5.4 第二の治療組成物及び第二の療法)

前記治療方法のいずれかにおいて、該方法は、第二治療組成物又は第二療法の投与を含むことができる。前記具体的疾患の治療方法における具体的第二の治療化合物又は第二の療法の列挙は、排除されることを意図するものではない。例えば、本明細書に考察した疾患、障害又は病態のいずれかは、本明細書に記載の抗炎症化合物又は免疫抑制化合物のいずれかにより治療することができる。胎盤幹細胞が第二の治療薬又は第二の幹細胞型と共に投与される実施態様において、該胎盤幹細胞及び第二の治療薬及び／又は第二の幹細胞型は、同時に、又は異なる時点で投与することができ、例えば投与は、互いに1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、若しくは50分以内に行うか、又は互いに1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、若しくは22時間以内に、又は互いに1、2、3、4、5、6、7、8、9若しくは10日以内に行うことができる。

【0139】

具体的実施態様において、不適切な、悪い(deleterious)又は有害な免疫反応に関連したか又は反応により引き起こされた疾患、障害又は病態の治療は、第二の幹細胞型、又は第二の幹細胞型の集団の投与を含む。具体的実施態様において、該第二の幹細胞型は、間葉系幹細胞、例えば骨髄-由来間葉系幹細胞である。他の実施態様において、該第二の幹細胞型は、多能性幹細胞、分化多能性(pluripotent)の幹細胞、前駆細胞、造血幹細胞、例えばCD34⁺造血幹細胞、成体幹細胞、胚性幹細胞又は胚性生殖細胞である。該第二の幹細胞型、例えば間葉系幹細胞は、約100:1、75:1、50:1、25:1、20:1、15:1、10:1

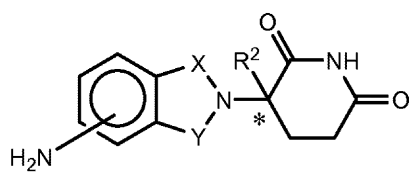
、5:1、1:1、1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:50、1:75又は1:100のいずれかの比で、胎盤幹細胞と共に投与することができる。間葉系幹細胞は、商業的に、又は例えば骨髄、骨髄穿刺液、脂肪組織などの発生源(original source)から入手することができる。

【0140】

別の具体的実施態様において、該第二の療法は、免疫調節化合物を含み、ここで該免疫調節化合物は、3-(4-アミノ-1-オキソ-1,3-ジヒドロイソインドール-2-イル)-ピペリジン-2,6-ジオン；3-(4'アミノイソインドリン-1'-オンウ)-1-ピペリジン-2,6-ジオン；4-(アミノ)-2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-イソインドリン-1,3-ジオン；又は、 α -(3-アミノフタルイミド)グルタルイミドである。更なる具体的実施態様において、該免疫調節化合物は、下記構造を有する化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩、水和物、溶媒和物、クラスレート、エナンチオマー、ジアステレオマー、ラセミ体、又は立体異性体の混合物である：

10

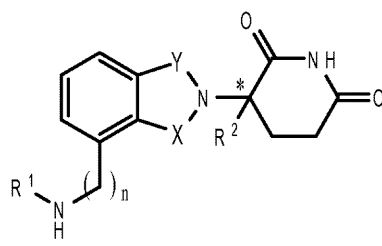
【化1】



20

(式中、X及びYの一方は、C=Oであり、X及びYの他方は、C=O又はCH₂であり、且つR²は、水素又は低級アルキルである)。別の更なる具体的実施態様において、該免疫調節化合物は、下記構造を有する化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩、水和物、溶媒和物、クラスレート、エナンチオマー、ジアステレオマー、ラセミ体、又は立体異性体の混合物である：

【化2】



30

(式中、X及びYの一方は、C=Oであり、X及びYの他方は、CH₂又はC=Oであり；

R¹は、H、(C₁-C₈)アルキル、(C₃-C₇)シクロアルキル、(C₂-C₈)アルケニル、(C₂-C₈)アルキニル、ベンジル、アリール、(C₀-C₄)アルキル-(C₁-C₆)ヘテロシクロアルキル、(C₀-C₄)アルキル-(C₂-C₅)ヘテロアリール、C(O)R³、C(S)R³、C(O)OR⁴、(C₁-C₈)アルキル-N(R⁶)₂、(C₁-C₈)アルキル-OR⁵、(C₁-C₈)アルキル-C(O)OR⁵、C(O)NHR³、C(S)NHR³、C(O)NR³R^{3'}、C(S)NR³R^{3'}又は(C₁-C₈)アルキル-O(CO)R⁵であり；

R²は、H、F、ベンジル、(C₁-C₈)アルキル、(C₂-C₈)アルケニル、又は(C₂-C₈)アルキニルであり；

40

R³及びR^{3'}は独立して、(C₁-C₈)アルキル、(C₃-C₇)シクロアルキル、(C₂-C₈)アルケニル、(C₂-C₈)アルキニル、ベンジル、アリール、(C₀-C₄)アルキル-(C₁-C₆)ヘテロシクロアルキル、(C₀-C₄)アルキル-(C₂-C₅)ヘテロアリール、(C₀-C₈)アルキル-N(R⁶)₂、(C₁-C₈)アルキル-OR⁵、(C₁-C₈)アルキル-C(O)OR⁵、(C₁-C₈)アルキル-O(CO)R⁵、又はC(O)OR⁵であり；

R⁴は、(C₁-C₈)アルキル、(C₂-C₈)アルケニル、(C₂-C₈)アルキニル、(C₁-C₄)アルキル-O R⁵、ベンジル、アリール、(C₀-C₄)アルキル-(C₁-C₆)ヘテロシクロアルキル、又は(C₀-C₄)アルキル-(C₂-C₅)ヘテロアリールであり；

R⁵は、(C₁-C₈)アルキル、(C₂-C₈)アルケニル、(C₂-C₈)アルキニル、ベンジル、アリール、又は(C₂-C₅)ヘテロアリールであり；

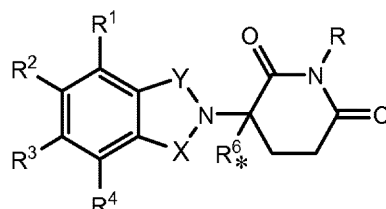
50

R^6 の各々の出現は独立して、H、 (C_1-C_8) アルキル、 (C_2-C_8) アルケニル、 (C_2-C_8) アルキニル、ベンジル、アリール、 (C_2-C_5) ヘテロアリール、又は (C_0-C_8) アルキル- $C(=O)O-R^5$ であるか、又は R^6 基は、結合し、ヘテロシクロアルキル基を形成することができ；

n は、0又は1であり；並びに

*は、キラル炭素中心を表している)。別の更なる具体的実施態様において、該免疫調節化合物は、下記構造を有する化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩、水和物、溶媒和物、クラスレート、エナンチオマー、ジアステレオマー、ラセミ体、又は立体異性体の混合物である：

【化3】



(式中、X及びYの一方は、 $C=O$ であり、他方は、 CH_2 又は $C=O$ であり；

Rは、H又は CH_2OCOR^1 であり；

(i) R^1 、 R^2 、 R^3 、又は R^4 の各々は互いに独立して、ハロ、炭素原子1～4個のアルキル、若しくは炭素原子1～4個のアルコキシであるか、又は(ii) R^1 、 R^2 、 R^3 、又は R^4 の1つは、ニトロ若しくは $-NHR^5$ であり、且つ R^1 、 R^2 、 R^3 、又は R^4 の残りは、水素であり；

R^5 は、水素又は炭素原子1～8個のアルキルであり、

R^6 は、水素、炭素原子1～8個のアルキル、ベンゾ、クロロ、又はフルオロであり；

R^1 は、 $R^7-CHR^{10}-N(R^8R^9)$ であり；

R^7 は、 m -フェニレン又は p -フェニレン又は $-(C_nH_{2n})-$ であり、ここで n は、0～4の値を有し；

R^8 及び R^9 の各々は、互いに独立して、水素又は炭素原子1～8個のアルキルであるか、又は R^8 と R^9 は一緒に、テトラメチレン、ペンタメチレン、ヘキサメチレン、若しくは $-CH_2CH_2X_1CH_2CH_2-$ を形成し、ここで X_1 は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、若しくは $-NH-$ であり；

R^{10} は、水素、炭素原子～8個のアルキル、又はフェニルであり；並びに

*は、キラル炭素中心を表している)。

【0141】

前記治療薬の任意の組合せを、投与することができる。そのような治療薬は、胎盤幹細胞との任意の組合せで、同時に又は個別の治療コースとして、投与することができる。

【0142】

胎盤幹細胞は、医薬組成物の形状で、例えば静脈内、筋肉内又は腹腔内注射に適した医薬組成物の形状で、CNS損傷、例えばSCI又はTBIに罹患している個体に投与することができる。胎盤幹細胞は、単回投与量、又は反復投与量で投与することができる。胎盤幹細胞が反復投与量で投与される場合、投与量は、CNS損傷、例えばSCI又はTBIの1以上の急性症状を緩和するようにデザインされた治療レジメンの一部であるか、或いは該損傷の慢性経過の予防、又は重症度を軽減するようにデザインされた長期治療レジメンの一部であることができる。胎盤幹細胞が第二の治療薬又は第二の幹細胞型と共に投与される実施態様において、胎盤幹細胞と第二の治療薬及び／又は第二の幹細胞型は、同時に、又は異なる時点で投与することができ、例えば投与は、互いに1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、若しくは50分以内に行うか、又は互いに1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、若しくは22時間以内に、又は互いに1、2、3、4、5、6、7、8、9若しくは10日以内に行うことができる。

【0143】

(5.5 胎盤幹細胞及び胎盤幹細胞集団)

本明細書に提供される方法は、(1)組織培養基材に接着し；(2)非胎盤細胞型に分化する

能力を有し；且つ、(3)十分な数で、免疫機能、例えばMLRアッセイ又は退行アッセイにおいてCD4⁺及び／又はCD8⁺T細胞の増殖を、検出可能に抑制する能力を有する、胎盤幹細胞、すなわち、胎盤又はその部分から入手可能な幹細胞を使用する。胎盤幹細胞は、血液、例えば胎盤血又は臍帯血には由来しない。本明細書に提供される方法及び組成物において使用される胎盤幹細胞は、個体の免疫系を抑制する能力を有し、それらの能力について選択される。

【0144】

胎盤幹細胞は、胎児起源のもの又は母親起源のもののいずれかであることができる(すなわち、胎児又は母親のいずれかの遺伝子型を有することができる)。胎盤幹細胞の集団、又は胎盤幹細胞を含む細胞の集団は、もっぱら胎児起源のもの若しくは母親起源のものである胎盤幹細胞を含むことができるか、又は胎児起源と母親起源の両方の胎盤幹細胞の混合集団を含むことができる。胎盤幹細胞、及び胎盤幹細胞を含む細胞の集団は、以下で論じられている形態的特性、マーカー特性、及び培養特性によって同定及び選択することができる。

10

【0145】

(5.5.1 物理的及び形態的特性)

本明細書に記載の胎盤幹細胞は、初代培養又は細胞培養で培養したとき、組織培養基材、例えば、組織培養容器表面(例えば、組織培養プラスチック)に接着する。培養下の胎盤幹細胞は、通常、線維芽細胞のような星状の外観をしており、いくつかの細胞質突起が中央の細胞体から伸びている。しかしながら、胎盤幹細胞は、線維芽細胞よりも多くのそのような突起を示すので、胎盤幹細胞は、同じ条件下で培養された線維芽細胞と形態的に区別することができる。形態学的には、胎盤幹細胞は、造血幹細胞からも区別することができ、造血幹細胞は、通常、培養下では、より丸みを帯びた、又は敷石状の形態をとる。

20

【0146】

(5.5.2 細胞表面マーカー、分子マーカー、及び遺伝子マーカー)

本明細書に開示されている方法、例えばCNS損傷の治療方法において有用な、単離された胎盤幹細胞、例えば単離された多能性胎盤幹細胞又は単離された胎盤幹細胞、及びそのような単離された胎盤幹細胞集団は、多能性細胞又は幹細胞の特徴を有し、且つ幹細胞を含む細胞又は細胞集団を同定及び／又は単離するために用いることができる複数のマーカーを発現する組織培養プラスチック接着性ヒト胎盤幹細胞である。特定の実施態様において、PDACは、例えば、インビトロ又はインビボで血管新生性である。本明細書に記載の単離された胎盤幹細胞、及び胎盤細胞集団(すなわち、2以上の単離された胎盤幹細胞)には、胎盤、又はその任意の部分(例えば、絨毛膜、胎盤葉など)から直接得られる胎盤幹細胞及び胎盤細胞含有細胞集団が含まれる。単離された胎盤細胞集団には、(すなわち、2以上の)培養下の単離された胎盤幹細胞の集団、及び容器、例えばバッグの中の集団も含まれる。本明細書に記載の単離された胎盤幹細胞は、骨髓由来間葉系細胞でも、脂肪由来間葉系幹細胞でも、臍帯血、胎盤血、又は末梢血から得られる間葉系細胞でもない。本明細書に記載の方法及び組成物において有用な、胎盤細胞、例えば、胎盤多能性細胞及び胎盤幹細胞は本明細書に記載されており、且つ例えば、その開示が、その全体として引用により本明細書中に組み込まれている、米国特許第7,311,904号；第7,311,905号；及び第7,468,276号；並びに米国特許出願公開第2007/0275362号に記載されている。

30

40

【0147】

特定の実施態様において、単離された胎盤細胞は、単離された胎盤幹細胞である。いくつかの他の実施態様において、単離された胎盤細胞は、単離された胎盤多能性細胞である。一実施態様において、単離された胎盤細胞、例えば、PDACは、フローサイトメトリーで検出した場合、CD34⁻、CD10⁺、及びCD105⁺である。別の具体的実施態様において、単離されたCD34⁻、CD10⁺、CD105⁺胎盤細胞は、神経表現型の細胞、骨形成表現型の細胞、及び／又は軟骨形成表現型の細胞に分化する潜在能力を有する。別の具体的実施態様において、単離されたCD34⁻、CD10⁺、CD105⁺胎盤細胞は更に、CD200⁺である。別の具体的実施態様において、単離されたCD34⁻、CD10⁺、CD105⁺胎盤細胞は更に、CD45⁻又はCD90⁺である。別の

50

具体的実施態様において、単離されたCD34⁻、CD10⁺、CD105⁺胎盤細胞は更に、フローサイトメトリーで検出した場合、CD45⁻及びCD90⁺である。別の具体的実施態様において、単離されたCD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺胎盤細胞は更に、フローサイトメトリーで検出した場合、CD90⁺又はCD45⁻である。別の具体的実施態様において、単離されたCD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺胎盤細胞は更に、フローサイトメトリーで検出した場合、CD90⁺及びCD45⁻であり、すなわち、該細胞は、CD34⁻、CD10⁺、CD45⁻、CD90⁺、CD105⁺及びCD200⁺である。別の具体的実施態様において、該CD34⁻、CD10⁺、CD45⁻、CD90⁺、CD105⁺、CD200⁺細胞は更に、CD80⁻及びCD86⁻である。

【0148】

特定の実施態様において、該胎盤細胞は、フローサイトメトリーで検出した場合、CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、及びCD200⁺、並びにCD38⁻、CD45⁻、CD80⁻、CD86⁻、CD133⁻、HLA-DR,D P,DQ⁻、SSEA3⁻、SSEA4⁻、CD29⁺、CD44⁺、CD73⁺、CD90⁺、CD105⁺、HLA-A,B,C⁺、PDL1⁺、ABC-p⁺、及び／又はOCT-4⁺のうちの1つ又は複数である。他の実施態様において、上記のCD34⁻、CD10⁺、CD105⁺細胞はいずれも更に、CD29⁺、CD38⁻、CD44⁺、CD54⁺、SH3⁺、又はSH4⁺のうちの1つ又は複数である。別の具体的実施態様において、該細胞は更に、CD44⁺である。上記の単離されたCD34⁻、CD10⁺、CD105⁺胎盤細胞のいずれかの別の具体的実施態様において、該細胞は更に、CD117⁻、CD133⁻、KDR⁻(VEGFR2⁻)、HLA-A,B,C⁺、HLA-DP,DQ,DR⁻、若しくはプログラム死-1リガンド(PDL1)⁺のうちの1つ若しくは複数、又はそれらの任意の組合せである。

【0149】

別の実施態様において、CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺細胞は更に、CD13⁺、CD29⁺、CD33⁺、CD38⁻、CD44⁺、CD45⁻、CD54⁺、CD62E⁻、CD62L⁻、CD62P⁻、SH3⁺(CD73⁺)、SH4⁺(CD73⁺)、CD80⁻、CD86⁻、CD90⁺、SH2⁺(CD105⁺)、CD106/VCAM⁺、CD117⁻、CD144/VE-カドヘリン^{low}、CD184/CXCR4⁻、CD200⁺、CD133⁻、OCT-4⁺、SSEA3⁻、SSEA4⁻、ABC-p⁺、KDR⁻(VEGFR2⁻)、HLA-A,B,C⁺、HLA-DP,DQ,DR⁻、HLA-G⁻、若しくはプログラム死-1リガンド(PDL1)⁺のうちの1つ若しくは複数、又はそれらの任意の組合せである。別の実施態様において、CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺細胞は更に、CD13⁺、CD29⁺、CD33⁺、CD38⁻、CD44⁺、CD45⁻、CD54/ICAM⁺、CD62E⁻、CD62L⁻、CD62P⁻、SH3⁺(CD73⁺)、SH4⁺(CD73⁺)、CD80⁻、CD86⁻、CD90⁺、SH2⁺(CD105⁺)、CD106/VCAM⁺、CD117⁻、CD144/VE-カドヘリン^{low}、CD184/CXCR4⁻、CD200⁺、CD133⁻、OCT-4⁺、SSEA3⁻、SSEA4⁻、ABC-p⁺、KDR⁻(VEGFR2⁻)、HLA-A,B,C⁺、HLA-DP,DQ,DR⁻、HLA-G⁻、及びプログラム死-1リガンド(PDL1)⁺である。

【0150】

別の具体的実施態様において、本明細書に記載の胎盤細胞はいずれも更に、フローサイトメトリーで検出した場合、ABC-p⁺であるか、又は逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)で決定した場合、OCT-4⁺(POU5F1⁺)であり、ここで、ABC-pは、胎盤特異的ABC輸送体タンパク質(乳癌耐性タンパク質(BCRP)及びミトキサントロン耐性タンパク質(MXR)としても知られる)であり、且つOCT-4は、オクタマー-4タンパク質(POU5F1)である。別の具体的実施態様において、本明細書に記載の胎盤細胞はいずれも更に、フローサイトメトリーで決定した場合、SSEA3⁻又はSSEA4⁻であり、ここで、SSEA3はステージ特異的胚抗原3であり、且つSSEA4はステージ特異的胚抗原4である。別の具体的実施態様において、本明細書に記載の胎盤細胞はいずれも更に、SSEA3⁻及びSSEA4⁻である。

【0151】

別の具体的実施態様において、本明細書に記載の胎盤細胞はいずれも更に、MHC-I⁺(例えば、HLA-A,B,C⁺)、MHC-II⁻(例えば、HLA-DP,DQ,DR⁻)、又はHLA-G⁻のうちの1つ又は複数である。別の具体的実施態様において、本明細書に記載の胎盤細胞はいずれも更に、MHC-I⁺(例えば、HLA-A,B,C⁺)、MHC-II⁻(例えば、HLA-DP,DQ,DR⁻)、及びHLA-G⁻のうちの1つ又は複数である。

【0152】

本明細書に開示されている方法及び組成物において有用である、単離された胎盤細胞、又は例えば単離された胎盤細胞を含む、例えば該細胞が濃縮されている胎盤細胞の集団な

10

20

30

40

50

どの細胞集団も本明細書で提供される。好ましい細胞集団は、単離された胎盤細胞を含み、ここで、該細胞集団は、例えば、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は98%の単離されたCD10⁺、CD105⁺、及びCD34⁻胎盤細胞を含み；すなわち、該集団内の細胞の少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は98%は、単離されたCD10⁺、CD105⁺、及びCD34⁻胎盤細胞である。具体的実施態様において、単離されたCD34⁻、CD10⁺、CD105⁺胎盤細胞は更に、CD200⁺である。別の具体的実施態様において、単離されたCD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺胎盤細胞は更に、フローサイトメトリーで検出した場合、CD90⁺又はCD45⁻である。別の具体的実施態様において、単離されたCD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺胎盤細胞は更に、フローサイトメトリーで検出した場合、CD90⁺及びCD45⁻である。別の具体的実施態様において、上記の単離されたCD34⁻、CD10⁺、CD105⁺胎盤細胞はいずれも更に、CD29⁺、CD38⁻、CD44⁺、CD54⁺、SH3⁺、又はSH4⁺のうちの1つ又は複数である。別の具体的実施態様において、単離されたCD34⁻、CD10⁺、CD105⁺胎盤細胞、又は単離されたCD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺胎盤細胞は更に、CD44⁺である。上記の単離されたCD34⁻、CD10⁺、CD105⁺胎盤細胞を含む細胞集団のいずれかの具体的実施態様において、単離された胎盤細胞は更に、CD13⁺、CD29⁺、CD33⁺、CD38⁻、CD44⁺、CD45⁻、CD54⁺、CD62E⁻、CD62L⁻、CD62P⁻、SH3⁺(CD73⁺)、SH4⁺(CD73⁺)、CD80⁻、CD86⁻、CD90⁺、SH2⁺(CD105⁺)、CD106/VCAM⁺、CD117⁻、CD144/VE-cadherin^{low}、CD184/CXCR4⁻、CD200⁺、CD133⁻、OCT-4⁺、SSEA3⁻、SSEA4⁻、ABC-p⁺、KDR⁻(VEGFR2⁻)、HLA-A,B,C⁺、HLA-DP,DQ,DR⁻、HLA-G⁻、又はプログラム死-1リガンド(PDL1)⁺のうちの1つ若しくは複数、又はそれらの任意の組合せである。別の具体的実施態様において、CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺細胞は更に、CD13⁺、CD29⁺、CD33⁺、CD38⁻、CD44⁺、CD45⁻、CD54⁺/ICAM⁺、CD62E⁻、CD62L⁻、CD62P⁻、SH3⁺(CD73⁺)、SH4⁺(CD73⁺)、CD80⁻、CD86⁻、CD90⁺、SH2⁺(CD105⁺)、CD106/VCAM⁺、CD117⁻、CD144/VE-cadherin^{low}、CD184/CXCR4⁻、CD200⁺、CD133⁻、OCT-4⁺、SSEA3⁻、SSEA4⁻、ABC-p⁺、KDR⁻(VEGFR2⁻)、HLA-A,B,C⁺、HLA-DP,DQ,DR⁻、HLA-G⁻、及びプログラム死-1リガンド(PDL1)⁺である。

【0153】

特定の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、CD10⁺、CD29⁺、CD34⁻、CD38⁻、CD44⁺、CD45⁻、CD54⁺、CD90⁺、SH2⁺、SH3⁺、SH4⁺、SSEA3⁻、SSEA4⁻、OCT-4⁺、及びABC-p⁺のうちの1つ又は複数、又は全てであり、ここで、該単離された胎盤細胞は、胎盤組織の物理的及び／又は酵素的破壊によって得られる。具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、OCT-4⁺及びABC-p⁺である。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、OCT-4⁺及びCD34⁻であり、ここで、該単離された胎盤細胞は、以下の特徴のうちの少なくとも1つを有する：CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD45⁻、CD54⁺、CD90⁺、SH3⁺、SH4⁺、SSEA3⁻、及びSSEA4⁻。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、OCT-4⁺、CD34⁻、CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD45⁻、CD54⁺、CD90⁺、SH3⁺、SH4⁺、SSEA3⁻、及びSSEA4⁻である。別の実施態様において、該単離された胎盤細胞は、OCT-4⁺、CD34⁻、SSEA3⁻、及びSSEA4⁻である。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、OCT-4⁺及びCD34⁻であり、且つSH2⁺又はSH3⁺のいずれかである。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、OCT-4⁺、CD34⁻、SH2⁺、及びSH3⁺である。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、OCT-4⁺、CD34⁻、SSEA3⁻、及びSSEA4⁻であり、且つSH2⁺又はSH3⁺のいずれかである。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、OCT-4⁺及びCD34⁻であり、且つSH2⁺又はSH3⁺のいずれかであり、且つCD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD45⁻、CD54⁺、CD90⁺、SSEA3⁻、又はSSEA4⁻のうちの少なくとも1つである。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、OCT-4⁺、CD34⁻、CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD45⁻、CD54⁺、CD90⁺、SSEA3⁻、及びSSEA4⁻であり、且つSH2⁺又はSH3⁺のいずれかである。

【0154】

別の実施態様において、本明細書に開示されている方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、SH2⁺、SH3⁺、SH4⁺、及びOCT-4⁺である。別の具体的実施態様において

、該単離された胎盤細胞は、CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD54⁺、CD90⁺、CD34⁻、CD45⁻、SSEA3⁻、又はSSEA4⁻である。別の実施態様において、該単離された胎盤細胞は、SH2⁺、SH3⁺、SH4⁺、SSEA3⁻、及びSSEA4⁻である。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、SH2⁺、SH3⁺、SH4⁺、SSEA3⁻及びSSEA4⁻、CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD54⁺、CD90⁺、OCT-4⁺、CD34⁻、又はCD45⁻である。

【0155】

別の実施態様において、本明細書に開示されている方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、CD10⁺、CD29⁺、CD34⁻、CD44⁺、CD45⁻、CD54⁺、CD90⁺、SH2⁺、SH3⁺、及びSH4⁺であり；ここで、該単離された胎盤細胞は更に、OCT-4⁺、SSEA3⁻、又はSSEA4⁻のうちの1つ又は複数である。

【0156】

特定の実施態様において、本明細書に開示されている方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、CD200⁺又はHLA-G⁻である。具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、CD200⁺及びHLA-G⁻である。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は更に、CD73⁺及びCD105⁺である。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は更に、CD34⁻、CD38⁻、又はCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は更に、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該胎盤細胞は、CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、及びCD105⁺である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD200⁺又はHLA-G⁻胎盤細胞は、胚様体の形成を可能にする条件下で、該単離された胎盤細胞を含む胎盤細胞の集団内での胚様体の形成を促進する。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、幹細胞でも多能性細胞でもない胎盤細胞から単離されている。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、これらのマーカーの組合せを示さない胎盤細胞から単離されている。

【0157】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な細胞集団は、CD200⁺、HLA-G⁻幹細胞を含む、例えばCD200⁺、HLA-G⁻幹細胞が濃縮されている、細胞の集団である。具体的実施態様において、該集団は、胎盤細胞の集団である。様々な実施態様において、該細胞集団内の細胞の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、又は少なくとも約60%は、単離されたCD200⁺、HLA-G⁻胎盤細胞である。好ましくは、該細胞集団内の細胞の少なくとも約70%は、単離されたCD200⁺、HLA-G⁻胎盤細胞である。より好ましくは、該細胞の少なくとも約90%、95%、又は99%は、単離されたCD200⁺、HLA-G⁻胎盤細胞である。該細胞集団の具体的実施態様において、該単離されたCD200⁺、HLA-G⁻胎盤細胞は、CD73⁺及びCD105⁺でもある。別の具体的実施態様において、該単離されたCD200⁺、HLA-G⁻胎盤細胞は、CD34⁻、CD38⁻、又はCD45⁻でもある。別の具体的実施態様において、該単離されたCD200⁺、HLA-G⁻胎盤細胞は、CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、及びCD105⁺でもある。別の実施態様において、該細胞集団は、胚様体の形成を可能にする条件下で培養したとき、1以上の胚様体を生じさせる。別の具体的実施態様において、該細胞集団は、幹細胞ではない胎盤細胞から単離されている。別の具体的実施態様において、該単離されたCD200⁺、HLA-G⁻胎盤細胞は、これらのマーカーを示さない胎盤細胞から単離されている。

【0158】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、CD73⁺、CD105⁺、及びCD200⁺である。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、HLA-G⁻である。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、CD34⁻、CD38⁻、又はCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、及びHLA-G⁻である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺、及びCD200⁺胎盤細胞は、該単離された胎盤細胞を含む胎盤細胞の集団を、胚様体の形成を可能にする条件下で培養したとき、該集団内での1以上の胚様体の形成を促進する。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、単離さ

れた胎盤細胞ではない胎盤細胞から単離されている。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、これらのマーカーを示さない胎盤細胞から単離されている。

【0159】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な細胞集団は、単離された $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 胎盤細胞を含む、例えば、単離された $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 胎盤細胞が濃縮されている、細胞の集団である。様々な実施態様において、該細胞集団内の細胞の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、又は少なくとも約60%は、単離された $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 胎盤細胞である。別の実施態様において、該細胞の集団内の該細胞の少なくとも約70%は、単離された $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 胎盤細胞である。別の実施態様において、該細胞の集団内の細胞の少なくとも約90%、95%、又は99%は、単離された $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 胎盤細胞である。該集団の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、 $HLA-G^-$ である。別の実施態様において、該単離された胎盤細胞は更に、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、又は $CD45^-$ である。別の実施態様において、該単離された胎盤細胞は更に、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、及び $CD45^-$ である。別の実施態様において、該単離された胎盤細胞は更に、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 、及び $HLA-G^-$ である。別の実施態様において、該細胞の集団は、胚様体の形成を可能にする条件下で培養したとき、1以上の胚様体を生じさせる。別の具体的実施態様において、該胎盤細胞の集団は、幹細胞でない胎盤細胞から単離されている。別の実施態様において、該胎盤細胞の集団は、これらの特徴を示さない胎盤細胞から単離されている。

【0160】

特定の他の実施態様において、単離された胎盤細胞は、 $CD10^+$ 、 $CD29^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD44^+$ 、 $CD45^-$ 、 $CD54^+$ 、 $CD90^+$ 、 $SH2^+$ 、 $SH3^+$ 、 $SH4^+$ 、 $SSEA3^-$ 、 $SSEA4^-$ 、 $OCT-4^+$ 、 $HLA-G^-$ 、又は $ABC-p^+$ のうちの1つ又は複数である。具体的実施態様において、単離された胎盤細胞は、 $CD10^+$ 、 $CD29^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD44^+$ 、 $CD45^-$ 、 $CD54^+$ 、 $CD90^+$ 、 $SH2^+$ 、 $SH3^+$ 、 $SH4^+$ 、 $SSEA3^-$ 、 $SSEA4^-$ 、及び $OCT-4^+$ である。別の実施態様において、単離された胎盤細胞は、 $CD10^+$ 、 $CD29^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 、 $CD54^+$ 、 $SH2^+$ 、 $SH3^+$ 、及び $SH4^+$ である。別の実施態様において、単離された胎盤細胞は、 $CD10^+$ 、 $CD29^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 、 $CD54^+$ 、 $SH2^+$ 、 $SH3^+$ 、 $SH4^+$ 、及び $OCT-4^+$ である。別の実施態様において、単離された胎盤細胞は、 $CD10^+$ 、 $CD29^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD44^+$ 、 $CD45^-$ 、 $CD54^+$ 、 $CD90^+$ 、 $HLA-G^-$ 、 $SH2^+$ 、 $SH3^+$ 、 $SH4^+$ である。別の実施態様において、単離された胎盤細胞は、 $OCT-4^+$ 及び $ABC-p^+$ である。別の実施態様において、単離された胎盤細胞は、 $SH2^+$ 、 $SH3^+$ 、 $SH4^+$ 、及び $OCT-4^+$ である。別の実施態様において、単離された胎盤細胞は、 $OCT-4^+$ 、 $CD34^-$ 、 $SSEA3^-$ 、及び $SSEA4^-$ である。具体的実施態様において、該単離された $OCT-4^+$ 、 $CD34^-$ 、 $SSEA3^-$ 、及び $SSEA4^-$ 胎盤細胞は更に、 $CD10^+$ 、 $CD29^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD44^+$ 、 $CD45^-$ 、 $CD54^+$ 、 $CD90^+$ 、 $SH2^+$ 、 $SH3^+$ 、及び $SH4^+$ である。別の実施態様において、単離された胎盤細胞は、 $OCT-4^+$ 及び $CD34^-$ であり、且つ $SH3^+$ 又は $SH4^+$ のいずれかである。別の実施態様において、単離された胎盤細胞は、 $CD34^-$ 、並びに $CD10^+$ 、 $CD29^+$ 、 $CD44^+$ 、 $CD54^+$ 、 $CD90^+$ 、又は $OCT-4^+$ のいずれかである。

【0161】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、 $CD200^+$ 及び $OCT-4^+$ である。具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、 $CD73^+$ 及び $CD105^+$ である。別の実施態様において、該単離された胎盤細胞は、 $HLA-G^-$ である。別の実施態様において、該単離された $CD200^+$ 、 $OCT-4^+$ 胎盤細胞は、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、又は $CD45^-$ である。別の実施態様において、該単離された $CD200^+$ 、 $OCT-4^+$ 胎盤細胞は、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、及び $CD45^-$ である。別の実施態様において、該単離された $CD200^+$ 、 $OCT-4^+$ 胎盤細胞は、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 、 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 、及び $HLA-G^-$ である。別の実施態様において、該単離された $CD200^+$ 、 $OCT-4^+$ 胎盤細胞は、該単離された細胞を含む胎盤細胞の集団を、胚様体の形成を可能にする条件下で培養したとき、該集団による1以上の胚様体の産生を促進する。別の実施態様において、該単離され

たCD200⁺、OCT-4⁺胎盤細胞は、幹細胞ではない胎盤細胞から単離されている。別の具体的実施態様において、該単離されたCD200⁺、OCT-4⁺胎盤細胞は、これらの特徴を示さない胎盤細胞から単離されている。

【0162】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な細胞集団は、CD200⁺、OCT-4⁺胎盤細胞を含む、例えば、CD200⁺、OCT-4⁺胎盤細胞が濃縮されている、細胞の集団である。様々な実施態様において、該細胞集団内の細胞の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、又は少なくとも約60%は、単離されたCD200⁺、OCT-4⁺胎盤細胞である。別の実施態様において、該細胞の少なくとも約70%は、該単離されたCD200⁺、OCT-4⁺胎盤細胞である。別の実施態様において、該細胞集団内の細胞の少なくとも約80%、90%、95%、又は99%は、該単離されたCD200⁺、OCT-4⁺胎盤細胞である。該単離された集団の具体的実施態様において、該単離されたCD200⁺、OCT-4⁺胎盤細胞は更に、CD73⁺及びCD105⁺である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD200⁺、OCT-4⁺胎盤細胞は更に、HLA-G⁻である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD200⁺、OCT-4⁺胎盤細胞は更に、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD200⁺、OCT-4⁺胎盤細胞は更に、CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、CD105⁺、及びHLA-G⁻である。別の具体的実施態様において、該細胞集団は、胚様体の形成を可能にする条件下で培養したとき、1以上の胚様体を産生する。別の具体的実施態様において、該細胞集団は、単離されたCD200⁺、OCT-4⁺胎盤細胞ではない胎盤細胞から単離されている。別の具体的実施態様において、該細胞集団は、これらのマーカーを示さない胎盤細胞から単離されている。

【0163】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、CD73⁺、CD105⁺、及びHLA-G⁻である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺、及びHLA-G⁻胎盤細胞は更に、CD34⁻、CD38⁻、又はCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺、HLA-G⁻胎盤細胞は更に、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺、HLA-G⁻胎盤細胞は更に、OCT-4⁺である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺、HLA-G⁻胎盤細胞は更に、CD200⁺である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺、HLA-G⁻胎盤細胞は更に、CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺、及びCD200⁺である。別の具体的実施態様において、単離されたCD73⁺、CD105⁺、HLA-G⁻胎盤細胞は、該細胞を含む胎盤細胞の集団を、胚様体の形成を可能にする条件下で培養したとき、該集団内での胚様体の形成を促進する。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺、HLA-G⁻胎盤細胞は、該単離されたCD73⁺、CD105⁺、HLA-G⁻胎盤細胞ではない胎盤細胞から単離されている。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺、HLA-G⁻胎盤細胞は、これらのマーカーを示さない胎盤細胞から単離されている。

【0164】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な細胞集団は、単離されたCD73⁺、CD105⁺、及びHLA-G⁻胎盤細胞を含む、例えば、単離されたCD73⁺、CD105⁺、及びHLA-G⁻胎盤細胞が濃縮されている、細胞の集団である。様々な実施態様において、該細胞の集団内の細胞の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、又は少なくとも約60%は、単離されたCD73⁺、CD105⁺、HLA-G⁻胎盤細胞である。別の実施態様において、該細胞の集団内の細胞の少なくとも約70%は、単離されたCD73⁺、CD105⁺、HLA-G⁻胎盤細胞である。別の実施態様において、該細胞の集団内の細胞の少なくとも約90%、95%、又は99%は、単離されたCD73⁺、CD105⁺、HLA-G⁻胎盤細胞である。上記の集団の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺、HLA-G⁻胎盤細胞は更に、CD34⁻、CD38⁻、又はCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺、HLA-G⁻胎盤細胞は更に、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺、HLA-G⁻胎盤細胞は更に、OCT-4⁺である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺、HLA

-G⁺胎盤細胞は更に、CD200⁺である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺、HLA-G⁺胎盤細胞は更に、CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺、及びCD200⁺である。別の具体的実施態様において、該細胞集団は、CD73⁺、CD105⁺、HLA-G⁺胎盤細胞ではない胎盤細胞から単離されている。別の具体的実施態様において、該細胞集団は、これらのマーカーを示さない胎盤細胞から単離されている。

【0165】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、CD73⁺及びCD105⁺であり、且つ該CD73⁺、CD105⁺細胞を含む単離された胎盤細胞の集団を、胚様体の形成を可能にする条件下で培養したとき、該集団内での1以上の胚様体の形成を促進する。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺胎盤細胞は更に、CD34⁻、CD38⁻、又はCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺胎盤細胞は更に、OCT-4⁺である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺胎盤細胞は更に、OCT-4⁺、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺胎盤細胞は、該細胞ではない胎盤細胞から単離されている。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺胎盤細胞は、これらの特徴を示さない胎盤細胞から単離されている。

【0166】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な細胞集団は、CD73⁺、CD105⁺であり、且つ該細胞を含む単離された胎盤細胞の集団を、胚様体の形成を可能にする条件下で培養したとき、該集団内での1以上の胚様体の形成を促進する単離された胎盤細胞を含む、例えば、該単離された胎盤細胞が濃縮されている、細胞の集団である。様々な実施態様において、該細胞の集団内の細胞の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、又は少なくとも約60%は、該単離されたCD73⁺、CD105⁺胎盤細胞である。別の実施態様において、該細胞の集団内の細胞の少なくとも約70%は、該単離されたCD73⁺、CD105⁺胎盤細胞である。別の実施態様において、該細胞の集団内の細胞の少なくとも約90%、95%、又は99%は、該単離されたCD73⁺、CD105⁺胎盤細胞である。上記の集団の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺胎盤細胞は更に、CD34⁻、CD38⁻、又はCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺胎盤細胞は更に、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺胎盤細胞は更に、OCT-4⁺である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺胎盤細胞は更に、CD200⁺である。別の具体的実施態様において、該単離されたCD73⁺、CD105⁺胎盤細胞は更に、CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺、及びCD200⁺である。別の具体的実施態様において、該細胞集団は、該単離されたCD73⁺、CD105⁺胎盤細胞ではない胎盤細胞から単離されている。別の具体的実施態様において、該細胞集団は、これらのマーカーを示さない胎盤細胞から単離されている。

【0167】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、OCT-4⁺であり、且つ胚様体の形成を可能にする条件下で培養したとき、該細胞を含む単離された胎盤細胞の集団内での1以上の胚様体の形成を促進する。具体的実施態様において、該単離されたOCT-4⁺胎盤細胞は更に、CD73⁺及びCD105⁺である。別の具体的実施態様において、該単離されたOCT-4⁺胎盤細胞は更に、CD34⁻、CD38⁻、又はCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該単離されたOCT-4⁺胎盤細胞は更に、CD200⁺である。別の具体的実施態様において、該単離されたOCT-4⁺胎盤細胞は更に、CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該単離されたOCT-4⁺胎盤細胞は、OCT-4⁺胎盤細胞ではない胎盤細胞から単離されている。別の具体的実施態様において、該単離されたOCT-4⁺胎盤細胞は、これらの特徴を示さない胎盤細胞から単離されている。

【0168】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な細胞集団は、OCT-4⁺であり、且つ該細胞を含む単離された胎盤細胞の集団を、胚様体の形成を可能にする条件下で培養したとき、該集団内での1以上の胚様体の形成を促進する単離された胎盤細胞を含む、例えば、該単離された胎盤細胞が濃縮されている、細胞の集団である。様々な実施態様において、該細胞の集団内の細胞の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、又は少なくとも約60%は、該単離されたOCT-4⁺胎盤細胞である。別の実施態様において、該細胞の集団内の細胞の少なくとも約70%は、該単離されたOCT-4⁺胎盤細胞である。別の実施態様において、該細胞の集団内の細胞の少なくとも約80%、90%、95%、又は99%は、該単離されたOCT-4⁺胎盤細胞である。上記の集団の具体的実施態様において、該単離されたOCT-4⁺胎盤細胞は更に、CD 10 34⁻、CD38⁻、又はCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該単離されたOCT-4⁺胎盤細胞は更に、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該単離されたOCT-4⁺胎盤細胞は更に、CD73⁺及びCD105⁺である。別の具体的実施態様において、該単離されたOCT-4⁺胎盤細胞は更に、CD200⁺である。別の具体的実施態様において、該単離されたOCT-4⁺胎盤細胞は更に、CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である。別の具体的実施態様において、該細胞集団は、該細胞ではない胎盤細胞から単離されている。別の具体的実施態様において、該細胞集団は、これらのマーカーを示さない胎盤細胞から単離されている。

【0169】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、単離されたHLA-A,B,C⁺、CD45⁻、CD133⁻、及びCD34⁻胎盤細胞である。別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な細胞集団は、単離された胎盤細胞を含む細胞の集団であり、ここで、該細胞集団内の細胞の少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は少なくとも約99%は、単離されたHLA-A,B,C⁺、CD45⁻、CD133⁻、及びCD34⁻胎盤細胞である。具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞又は単離された胎盤細胞の集団は、HLA-A,B,C⁺、CD45⁻、CD133⁻、及びCD34⁻胎盤細胞ではない胎盤細胞から単離されている。別の実施態様において、該単離された胎盤細胞は、非母親起源のものである。別の実施態様において、該単離された胎盤細胞集団は、母親成分を実質的に含まず；例えば、該単離された胎盤細胞集団内の該細胞の少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、90%、85%、90%、95%、98%、又は99%は、非母親起源のものである。 20 30

【0170】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、単離されたCD10⁺、CD13⁺、CD33⁺、CD45⁻、CD117⁻、及びCD133⁻胎盤細胞である。別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な細胞集団は、単離された胎盤細胞を含む細胞の集団であり、ここで、該細胞の集団内の細胞の少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は少なくとも約99%は、単離されたCD10⁺、CD13⁺、CD33⁺、CD45⁻、CD117⁻、及びCD133⁻胎盤細胞である。具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞又は単離された胎盤細胞の集団は、該単離された胎盤細胞ではない胎盤細胞から単離されている。別の実施態様において、該単離されたCD10⁺、CD13⁺、CD33⁺、CD45⁻、CD117⁻、及びCD133⁻胎盤細胞は、非母親起源のものであり、すなわち、胎児の遺伝子型を有する。別の実施態様において、該単離された胎盤細胞集団内の該細胞の少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、90%、85%、90%、95%、98%、又は99%は、非母親起源のものである。別の実施態様において、該単離された胎盤細胞又は単離された胎盤細胞の集団は、これらの特徴を示さない胎盤細胞から単離されている。 40

【0171】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、単離されたCD10⁺、CD33⁺、CD44⁺、CD45⁻、及びCD117⁻胎盤細胞である。別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な細胞集団は、単離され 50

た胎盤細胞を含む、例えば、該単離された胎盤細胞が濃縮されている、細胞の集団であり、ここで、該細胞の集団内の細胞の少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は少なくとも約99%は、単離されたCD10⁺ CD33⁻、CD44⁺、CD45⁻、及びCD117⁻胎盤細胞である。具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞又は単離された胎盤細胞の集団は、該細胞ではない胎盤細胞から単離されている。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、非母親起源のものである。別の具体的実施態様において、該細胞集団内の該細胞の少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、90%、85%、90%、95%、98%、又は99%は、非母親起源のものである。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞又は単離された胎盤細胞の集団は、これらのマーカーを示さない胎盤細胞から単離されている。

10

【0172】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、単離されたCD10⁺ CD13⁻、CD33⁻、CD45⁻、及びCD117⁻胎盤細胞である。別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な細胞集団は、単離されたCD10⁺、CD13⁻、CD33⁻、CD45⁻、及びCD117⁻胎盤細胞を含む、例えば、該胎盤細胞が濃縮されている、細胞の集団であり、ここで、該集団内の細胞の少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は少なくとも約99%は、CD10⁺、CD13⁻、CD33⁻、CD45⁻、及びCD117⁻胎盤細胞である。具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞又は単離された胎盤細胞の集団は、該細胞ではない胎盤細胞から単離されている。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、非母親起源のものである。別の具体的実施態様において、該細胞集団内の該細胞の少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、90%、85%、90%、95%、98%、又は99%は、非母親起源のものである。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞又は単離された胎盤細胞の集団は、これらの特徴を示さない胎盤細胞から単離されている。

20

【0173】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、HLA A,B,C⁺、CD45⁻、CD34⁻、及びCD133⁻であり、且つ更に、CD10⁺、CD13⁺、CD38⁺、CD44⁺、CD90⁺、CD105⁺、CD200⁺、及び／若しくはHLA-G⁻、並びに／又はCD117陰性である。別の実施態様において、本明細書に記載の方法において有用な細胞集団は、単離された胎盤細胞を含む細胞の集団であり、ここで、該集団内の細胞の少なくとも約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は約99%は、HLA A,B,C⁻、CD45⁻、CD34⁻、CD133⁻であり、且つ更にCD10⁺、CD13⁺、CD38⁺、CD44⁺、CD90⁺、CD105⁺、CD200⁺が陽性であり、並びに／又はCD117及び／若しくはHLA-Gが陰性である単離された胎盤細胞である。具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞又は単離された胎盤細胞の集団は、該細胞ではない胎盤細胞から単離されている。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、非母親起源のものである。別の具体的実施態様において、該細胞集団内の該細胞の少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、90%、85%、90%、95%、98%、又は99%は、非母親起源のものである。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞又は単離された胎盤細胞の集団は、これらのマーカーを示さない胎盤細胞から単離されている。

30

40

【0174】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、抗体結合によって決定した場合、CD200⁺及びCD10⁺であり、且つ抗体結合とRT-PCRの両方で決定した場合、CD117⁻である単離された胎盤細胞である。別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、CD10⁺、CD29⁻、CD54⁺、CD200⁺、HLA-G⁻、MHCクラスI⁺、及びβ-2-ミクログロブリン⁺である、単離された胎盤細胞、例えば、胎盤幹細胞又は胎盤多能性細胞である。別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、少なくとも1つの細胞マーカーの発現が、間葉系幹細胞(例えば、骨髄由来間葉系幹細胞)の場合よりも少なくとも2倍高い胎盤細胞である。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞

50

胞は、非母親起源のものである。別の具体的実施態様において、該細胞集団内の該細胞の少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、90%、85%、90%、95%、98%、又は99%は、非母親起源のものである。

【0175】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD45⁻、CD54/ICAM⁺、CD62E⁻、CD62L⁻、CD62P⁻、CD80⁻、CD86⁻、CD103⁻、CD104⁻、CD105⁺、CD106/VCAM⁺、CD144/VE-カドヘリン^{low}、CD184/CXCR4⁻、β2-ミクログロブリン^{low}、MHC-I^{low}、MHC-II⁻、HLA-G^{low}、及び／又はPDL1^{low}のうちの1つ又は複数である、単離された胎盤細胞、例えば、胎盤幹細胞又は胎盤多能性細胞である。具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、少なくともCD29⁺及びCD54⁺である。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、少なくともCD44⁺及びCD106⁺である。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、少なくともCD29⁺である。

10

【0176】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な細胞集団は、単離された胎盤細胞を含み、且つ該細胞集団内の細胞の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、又は99%は、CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD45⁻、CD54/ICAM⁺、CD62-E⁻、CD62-L⁻、CD62-P⁻、CD80⁻、CD86⁻、CD103⁻、CD104⁻、CD105⁺、CD106/VCAM⁺、CD144/VE-カドヘリン^{dim}、CD184/CXCR4⁻、β2-ミクログロブリン^{dim}、HLA-I^{dim}、HLA-II⁻、HLA-G^{dim}、及び／又はPDL1^{dim}のうちの1つ又は複数である単離された胎盤細胞である。別の具体的実施態様において、該細胞集団内の細胞の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、又は99%は、CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD45⁻、CD54/ICAM⁺、CD62-E⁻、CD62-L⁻、CD62-P⁻、CD80⁻、CD86⁻、CD103⁻、CD104⁻、CD105⁺、CD106/VCAM⁺、CD144/VE-カドヘリン^{dim}、CD184/CXCR4⁻、β2-ミクログロブリン^{dim}、MHC-I^{dim}、MHC-II⁻、HLA-G^{dim}、及びPDL1^{dim}である。特定の実施態様において、胎盤細胞は、インターフェロンガンマ(IFN-γ)により誘導された場合に、HLA-IIマーカーを発現する。

20

【0177】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、CD10⁺、CD29⁺、CD34⁻、CD38⁻、CD44⁺、CD45⁻、CD54⁺、CD90⁺、SH2⁺、SH3⁺、SH4⁺、SSEA3⁻、SSEA4⁻、OCT-4⁺、及びABC-p⁺のうちの1つ又は複数、又は全てである単離された胎盤細胞であり、ここで、ABC-pは、胎盤特異的ABC輸送体タンパク質(乳癌耐性タンパク質(BCRP)及びミトキサントロン耐性タンパク質(MXR)としても知られる)であり、ここで、該単離された胎盤細胞は、臍帯血が抜かれ、且つ残留血液を取り除くように灌流された、哺乳動物、例えば、ヒトの胎盤の灌流によって得られる。

30

【0178】

上記の特徴のいずれかの別の具体的実施態様において、細胞マーカー(例えば、分化マーカー又は免疫原性マーカーのクラスター)の発現は、フローサイトメトリーで決定され；別の具体的実施態様において、該マーカーの発現は、RT-PCRで決定される。

【0179】

遺伝子プロファイリングによって、単離された胎盤細胞、及び単離された胎盤細胞の集団は、他の細胞、例えば、間葉系幹細胞、例えば、骨髓由来間葉系幹細胞と区別可能であることが確認されている。本明細書に記載の単離された胎盤細胞は、例えば、その発現が、骨髓由来間葉系幹細胞と比較して、単離された胎盤細胞で有意により高い、1種以上の遺伝子の発現に基づいて、間葉系幹細胞と区別することができる。特に、本明細書で提供される治療方法において有用な単離された胎盤細胞は、その発現が、同等数の骨髓由来間葉系幹細胞でよりも、単離された胎盤細胞で有意により高い(すなわち、少なくとも2倍高い)1種以上の遺伝子の発現に基づいて、間葉系幹細胞と区別することができ、ここで、該1種以上の遺伝子は、これらの細胞を同等の条件下で成長させたとき、

40

【化 4】

ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1,
 B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2,
 ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A,
 IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7,
 PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21,
 TGFB2, VTN, ZC3H12A,

10

又は前述のもののいずれかの組合せである。例えば、その開示がその全体として引用により本明細書中に組み込まれている、米国特許出願公開第2007/0275362号を参照されたい。いくつかの具体的実施態様において、該1種以上の遺伝子の該発現は、例えば、RT-PCR、又は例えば、U133-Aマイクロアレイ(Affymetrix社)を用いるマイクロアレイ解析によって決定される。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、DMEM-LG(例えば、Gibco社)；2%胎仔ウシ血清(例えば、Hyclone Labs.社)；1×インスリン-トランスフェリン-セレン(ITS)；1×リノール酸-ウシ血清アルブミン(LA-BSA)； 10^{-9} Mデキサメタゾン(例えば、Sigma社)； 10^{-4} Mアスコルビン酸2-ホスフェート(例えば、Sigma社)；上皮増殖因子10ng/mL(例えば、R&D Systems社)；及び血小板由来増殖因子(PDGF-BB)10ng/mL(例えば、R&D Systems社)を含む培地中で、何回かの集団倍加、例えば、約3～約35回の範囲の集団倍加の間、培養したときに、該1種以上の遺伝子を発現する。別の具体的実施態様において、単離された胎盤細胞に特異的な遺伝子は、CD200である。

20

【0180】

これらの遺伝子に対する具体的な配列は、2008年3月現在、GenBankにおいて、アクセッション番号

【化 5】

NM_001615 (ACTG2), BC065545 (ADARB1), (NM_181847 (AMIGO2), AY358590
 (ARTS-1), BC074884 (B4GALT6), BC008396 (BCHE), BC020196 (C11orf9), BC031103
 (CD200), NM_001845 (COL4A1), NM_001846 (COL4A2), BC052289 (CPA4), BC094758
 (DMD), AF293359 (DSC3), NM_001943 (DSG2), AF338241 (ELOVL2), AY336105
 (F2RL1), NM_018215 (FLJ10781), AY416799 (GATA6), BC075798 (GPR126),
 NM_016235 (GPRC5B), AF340038 (ICAM1), BC000844 (IER3), BC066339 (IGFBP7),
 BC013142 (IL1A), BT019749 (IL6), BC007461 (IL18), (BC072017) KRT18, BC075839
 (KRT8), BC060825 (LIPG), BC065240 (LRAP), BC010444 (MATN2), BC011908 (MEST),
 BC068455 (NFE2L3), NM_014840 (NUAK1), AB006755 (PCDH7), NM_014476
 (PDLIM3), BC126199 (PKP-2), BC090862 (RTN1), BC002538 (SERPINB9), BC023312
 (ST3GAL6), BC001201 (ST6GALNAC5), BC126160又はBC065328 (SLC12A8), BC025697
 (TCF21), BC096235 (TGFB2), BC005046 (VTN), 及びBC005001 (ZC3H12A)

30

40

で見出すことができる。

【0181】

いくつかの具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、これらの細胞を同等の条件下で成長させたとき、同等数の骨髓由来間葉系幹細胞よりも検出可能に高いレベルで、

50

【化 6】

ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, 及び ZC3H12A

10

の各々を発現する。

【0182】

具体的実施態様において、胎盤細胞は、同等数の骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MS C)よりも検出可能に高いレベルで、CD200及びARTS1(1型腫瘍壊死因子のアミノペプチダーゼ調節因子)；ARTS-1及びLRAP(白血球由来アルギニンアミノペプチダーゼ)；IL6(インターロイキン-6)及びTGFB2(トランスフォーミング増殖因子、 β 2)；IL6及びKRT18(ケラチン18)；IER3(即初期応答3)、MEST(中胚葉特異的転写産物ホモログ)、及びTGFB2；CD200及びIER3；CD200及びIL6；CD200及びKRT18；CD200及びLRAP；CD200及びMEST；CD200及びNFE2L3(核因子(赤血球由来2)-様3)；又はCD200及びTGFB2を発現し、ここで、該骨髄由来間葉系幹細胞は、該単離された胎盤細胞が経た継代数と同等の培養継代数を経たものである。他の具体的実施態様において、胎盤細胞は、同等数の骨髄由来間葉系幹細胞BM-MS Cよりも検出可能に高いレベルで、

20

【化 7】

ARTS-1, CD200, IL6 及び LRAP;

ARTS-1, IL6, TGFB2, IER3, KRT18 及び MEST; CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3, 及び TGFB2; ARTS-1, CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3, 及び TGFB2; 又は IER3, MEST 及び TGFB2

30

を発現し、ここで、該骨髄由来間葉系幹細胞は、該単離された胎盤細胞が経た継代数と同等の培養継代数を経たものである。

【0183】

上に言及した遺伝子の発現を標準的な技術で評価することができる。例えば、遺伝子の配列に基づくプローブを個々に選択し、従来技術で構築することができる。該遺伝子の発現は、例えば、該遺伝子の1つ又は複数に対するプローブを含むマイクロアレイ、例えば、Affymetrix GENECHIP(登録商標)ヒトゲノムU133A 2.0アレイ、又はAffymetrix GENECHIP(登録商標)ヒトゲノムU133 Plus 2.0(サンタクララ、CA)で評価することができる。これらの遺伝子の発現は、特定のGenBankアクセッション番号の配列が変更された場合でも評価することができるが、それは、変更された配列に特異的なプローブを、周知の標準的な技術を用いてすぐに作製することができるからである。

40

【0184】

これらの遺伝子の発現のレベルを用いて、単離された胎盤細胞の集団の同一性を確認するか、細胞の集団が少なくとも複数の単離された胎盤細胞を有することを確認するか、又は同様のことをすることができる。その同一性が確認される単離された胎盤細胞の集団は、クローン性のもの、例えば、単一の単離された胎盤細胞から拡大された単離された胎盤細胞の集団、又は混合された幹細胞集団、例えば、多数の単離された胎盤細胞から拡大された単離された胎盤細胞をのみ含む細胞の集団、若しくは本明細書に記載の単離された胎盤細胞と少なくとも1種類の他の細胞とを含む細胞の集団であることができる。

【0185】

50

これらの遺伝子の発現のレベルを用いて、単離された胎盤細胞の集団を選択することができる。例えば、上記の遺伝子のうちの1つ又は複数の発現が、間葉系幹細胞の同等の集団よりも細胞の集団由来の試料で有意に高い場合、細胞、例えば、クローン性に拡大された細胞の集団を選択することができる。そのような選択は、複数の単離された胎盤細胞集団由来の集団、その正体が不明の複数の細胞集団由来の集団などについてのものであることができる。

【0186】

単離された胎盤細胞は、例えば、間葉系幹細胞対照における該1種以上の遺伝子の発現のレベル、例えば、同等数の骨髄由来間葉系幹細胞における該1種以上の遺伝子の発現のレベルと比較したときの、1種以上のそのような遺伝子の発現のレベルに基づいて選択することができる。一実施態様において、同数の間葉系幹細胞を含む試料における該1種以上の遺伝子の発現のレベルは対照として用いられる。別の実施態様において、特定の条件下で試験される単離された胎盤細胞についての対照は、該条件下の間葉系幹細胞における該1種以上の遺伝子の発現のレベルを表す数値である。

【0187】

本明細書に記載の単離された胎盤細胞は、初代培養下、又は例えば、DMEM-LG(例えば、Gibco社)、2%胎仔ウシ血清(FCS)(Hyclone Labs.社)、1×インスリン-トランスフェリン-セレン(ITS)、1×リノール酸-ウシ血清アルブミン(LA-BSA)、 10^{-9} Mデキサメタゾン(Sigma社)、 10^{-4} Mアスコルビン酸2-ホスフェート(Sigma社)、上皮増殖因子10ng/mL(R&D Systems社)、血小板由来増殖因子(PDGF-BB)10ng/mL(R&D Systems社)、及び100Uペニシリン/1000Uストレプトマイシンを含有する培地での増殖時に、前述の特徴(例えば、細胞表面マーカー及び/又は遺伝子発現プロファイルの組合せ)を示す。

【0188】

本明細書に開示されている胎盤細胞のいずれかの特定の実施態様において、細胞はヒトのものである。本明細書に開示されている胎盤細胞のいずれかの特定の実施態様において、細胞マーカー特性又は遺伝子発現特性は、ヒトマーカー又はヒト遺伝子である。

【0189】

該単離された胎盤細胞又は該単離された胎盤細胞を含む細胞集団の別の具体的実施態様において、該細胞又は集団は拡大したものであり、例えば、少なくとも、約、若しくはわずか1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは20回継代したものであるか、或いは少なくとも、約、又はわずか1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38若しくは40回の集団倍加の間、増殖させたものである。該単離された胎盤細胞又は該単離された胎盤細胞を含む細胞集団の別の具体的実施態様において、該細胞又は集団は、初代単離株である。本明細書に開示されている、単離された胎盤細胞、又は単離された胎盤細胞を含む細胞集団の別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、胎児起源のものである(すなわち、胎児の遺伝子型を有する)。

【0190】

特定の実施態様において、該単離された胎盤細胞は、成長培地、すなわち、増殖を促進するように調合された培地中で培養する間、例えば、成長培地中での増殖の間、分化しない。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、増殖するためにフィーダー層を必要としない。別の具体的実施態様において、該単離された胎盤細胞は、フィーダー細胞層の欠如という理由だけで、フィーダー層の非存在下の培養では分化しない。

【0191】

別の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物において有用な細胞は、単離された胎盤細胞であり、ここで、複数の該単離された胎盤細胞は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性アッセイで評価したとき、アルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)陽性である。そのようなアッセイは当該技術分野で公知である(例えば、Bostian及びBettsの文献(Biochem. J., 173, 787, (1978))を参照されたい)。具体的実施態様において、該ALDHアッセイは、ALDEFLUOR(登録商標)(Aldagen社、アシュランド、OR)をアルデヒドデヒドロゲナーゼ活

性のマーカーとして用いる。具体的実施態様において、該複数は、該細胞の集団内の細胞の約3%～約25%である。別の実施態様において、該単離された胎盤細胞の集団は、ほぼ同等数の細胞を有し、且つ同じ条件下で培養された骨髄由来間葉系幹細胞の集団よりも少なくとも3倍、又は少なくとも5倍高いALDH活性を示す。

【0192】

本明細書に記載の単離された胎盤細胞を含む細胞集団のいずれかの特定の実施態様において、該細胞の集団内の胎盤細胞は、母親の遺伝子型を有する細胞を実質的に含まず；例えば、該集団内の胎盤細胞の少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%は、胎児の遺伝子型を有する。本明細書に記載の単離された胎盤細胞を含む細胞の集団のいずれかの特定の他の実施態様において、該胎盤細胞を含む細胞の集団は、母親の遺伝子型を有する細胞を実質的に含まず；例えば、該集団内の細胞の少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%は、胎児の遺伝子型を有する。

10

【0193】

上記の単離された胎盤細胞又は単離された胎盤細胞の細胞集団のいずれかの具体的実施態様において、該細胞、例えば該細胞の全て、又は該集団内の細胞の少なくとも約95%若しくは約99%の核型は、正常である。上記の胎盤細胞又は細胞集団のいずれかの別の具体的実施態様において、該細胞、又は該細胞の集団内の細胞は、非母親起源のものである。

【0194】

本明細書記載の胎盤細胞の実施態様のいずれかの具体的実施態様において、該胎盤細胞は、遺伝子的に安定しており、正常な二倍体染色体数及び正常な核型を示す。

20

【0195】

上記のマーカーの組合せのいずれかを有する単離された胎盤細胞、又は単離された胎盤細胞の集団を任意の比で組合せることができる。上記の単離された胎盤細胞集団のうちのいずれか2以上の集団を組合せて、単離された胎盤細胞集団を形成させることができる。例えば、単離された胎盤細胞の集団は、上記のマーカー組合せのうちの1つによって定義される第一の単離された胎盤細胞の集団と、上記のマーカー組合せのうちの別のものによって定義される第二の単離された胎盤細胞の集団とを含むことができ、ここで、該第一の集団と第二の集団は、約1:99、2:98、3:97、4:96、5:95、10:90、20:80、30:70、40:60、50:50、60:40、70:30、80:20、90:10、95:5、96:4、97:3、98:2、又は約99:1の比で組み合わせられる。同じやり方で、上記の単離された胎盤細胞、又は単離された胎盤細胞集団のいずれか3つ、4つ、5つ、又はそれより多くを組合せることができる。

30

【0196】

本明細書に記載の方法及び組成物において有用な単離された胎盤細胞は、例えば、酵素的消化(第5.3.3節参照)若しくは灌流(第5.3.4節参照)を用いるか、又はこれらを用いない、胎盤組織の破壊によって得ることができる。例えば、単離された胎盤細胞の集団は、臍帯血が抜かれ、且つ残留血液を取り除くように灌流された哺乳動物の胎盤を灌流すること；該胎盤を灌流溶液で灌流すること；及び該灌流溶液を回収すること(ここで、灌流後の該灌流溶液は、単離された胎盤細胞を含む胎盤細胞の集団を含む)；並びに該細胞の集団から複数の該単離された胎盤細胞を単離することを含む方法によって生じさせることができる。具体的実施態様において、該灌流溶液を臍帯静脈と臍帯動脈の両方に通し、それが胎盤から浸出した後に回収する。別の具体的実施態様において、該灌流溶液を臍帯静脈に通して、臍帯動脈から回収するか、又は臍帯動脈に通して、臍帯静脈から回収する。

40

【0197】

様々な実施態様において、胎盤の灌流によって得られる細胞の集団内に含まれる単離された胎盤細胞は、該胎盤細胞の集団の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、又は少なくとも99.5%である。別の具体的実施態様において、灌流によって回収される単離された胎盤細胞は、胎児細胞と母親細胞を含む。別の具体的実施態様において、灌流によって回収される単離された胎盤細胞は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90

50

%、95%、99%、又は少なくとも99.5%胎児細胞である。

【0198】

別の具体的実施態様において、灌流によって回収される、本明細書に記載の単離された胎盤細胞の集団を含む組成物が本明細書で提供され、ここで、該組成物は、該単離された胎盤細胞を回収するために用いられた灌流溶液の少なくとも一部を含む。

【0199】

本明細書に記載の単離された胎盤細胞の単離された集団は、該細胞を含む胎盤細胞の集団を得るために組織破壊酵素で胎盤組織を消化し、且つ複数の胎盤細胞を該胎盤細胞の残りの部分から単離するか、又は実質的に単離することによって生じさせることができる。胎盤の全体、又は任意の部分の消化して、本明細書に記載の単離された胎盤細胞を得ることができる。具体的実施態様において、例えば、該胎盤組織は、全胎盤(例えば臍帯を含む)、羊膜、絨毛膜、羊膜と絨毛膜の組合せ、又は前述のもののいずれかの組合せであることができる。他の具体的実施態様において、組織破壊酵素は、トリプシン又はコラゲナーゼである。様々な実施態様において、胎盤の消化によって得られる細胞の集団内に含まれる単離された胎盤細胞は、該胎盤細胞の集団の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、又は少なくとも99.5%である。

【0200】

上記の単離された胎盤細胞集団、及び単離された胎盤細胞の集団は、一般に、約、少なくとも、又はわずかに 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 個、又はそれより多くの単離された胎盤細胞を含むことができる。本明細書に記載の治療方法において有用な単離された胎盤細胞の集団は、例えば、トリパンプルー排出などによって決定した場合、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%の生存している単離された胎盤細胞を含む。

【0201】

上記の胎盤細胞、又は胎盤細胞集団のいずれかについて、胎盤幹細胞の細胞又は集団は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、若しくは20回又はそれよりも多く継代したか、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38若しくは40回集団倍加、又はそれよりも多く拡大した細胞であるか、又は細胞を含むことができる。

【0202】

上記の胎盤細胞又は細胞集団のいずれかの具体的実施態様において、該細胞、又は該集団内の細胞の少なくとも約95%若しくは約99%の核型は、正常である。上記の胎盤細胞又は細胞集団のいずれかの別の具体的実施態様において、該細胞、又は該細胞の集団内の細胞は、非母親起源のものである。

【0203】

上記のマーカーの組合せのいずれかを有する単離された胎盤細胞、又は単離された胎盤細胞の集団を任意の比で組合せることができる。上記の胎盤細胞集団のうちのいずれか2以上を単離するか又は濃縮して、胎盤細胞集団を形成させることができる。例えば、上記のマーカー組合せのうちの1つによって定義される第一の胎盤細胞の集団を含む単離された胎盤細胞の集団と、上記のマーカー組合せのうちの別のものによって定義される第二の胎盤細胞の集団とを組合せることができ、ここで、該第一の集団と第二の集団は、約1:99、2:98、3:97、4:96、5:95、10:90、20:80、30:70、40:60、50:50、60:40、70:30、80:20、90:10、95:5、96:4、97:3、98:2、又は約99:1の比で組合せられる。同じやり方で、上記の胎盤細胞、又は胎盤細胞集団のいずれか3つ、4つ、5つ、又はそれよりも多くを組合せることができる。

【0204】

上記の胎盤細胞の具体的実施態様において、胎盤細胞は、IL-6、IL-8及び単球走化性タンパク質(MCP-1)を構成的に分泌する。

【0205】

10

20

30

40

50

上記の免疫抑制性の複数の胎盤細胞は、約、少なくとも、又はわずかに 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 個又はそれよりも多い胎盤細胞を含むことができる。

【0206】

特定の実施態様において、本明細書に提供される方法において有用な胎盤細胞(例えばPDAC)は、VEGF $1 \sim 100 \text{ ng/mL}$ に4~21日間曝露した後、免疫局在性により検出されるCD34を発現しない。具体的実施態様において、該胎盤接着細胞は、組織培養プラスチックに接着する。別の具体的実施態様において、該細胞集団は、例えばMATRIGEL(商標)などの基材上で、血管内皮増殖因子(VEGF)、上皮増殖因子(EGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)又は塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)などの血管新生因子の存在下で培養した場合、内皮細胞が、新芽又は管様構造を形成することを誘導する。

10

【0207】

別の態様において、本明細書に提供されるPDAC、細胞集団、例えば、PDACの集団、又は該集団中の細胞の少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%若しくは98%はPDACである細胞の集団は、VEGF、HGF、IL-8、MCP-3、FGF2、フォリスタチン、G-CSF、EGF、ENA-78、GRO、IL-6、MCP-1、PDGF-BB、TIMP-2、uPAR、又はガレクチン-1の1つ以上、又は全てを、例えば、1個又は複数の細胞が成長する培養培地へ分泌する。別の実施態様において、PDACは、低酸素条件(例えば約5%未満 O_2)下で、正常酸素条件(例えば約20%又は約21% O_2)と比べ、CD202b、IL-8及び／又はVEGFを増加したレベルで発現する。

【0208】

別の実施態様において、本明細書記載のPDAC又はPDACを含む細胞集団のいずれかは、該胎盤由来接着細胞と接触した、内皮細胞集団内で新芽又は管様構造の形成を引き起こすことができる。具体的実施態様において、PDACは、ヒト内皮細胞と共培養され、これは例えば胎盤コラーゲン又はMATRIGEL(商標)などの基材内又は基材上で、少なくとも4日間、例えば、I型及びIV型コラーゲンなどの細胞外マトリクスタンパク質、並びに／又は血管内皮増殖因子(VEGF)、上皮増殖因子(EGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)若しくは塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)などの血管新生因子の存在下で培養した場合、新芽又は管様構造を形成するか、又は内皮細胞新芽の形成を支援する。別の実施態様において、本明細書記載の胎盤由来接着細胞を含む細胞の集団のいずれかは、血管内皮増殖因子(VEGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、又はインターロイキン-8(IL-8)などの血管新生因子を分泌し、これによりヒト内皮細胞が例えば胎盤コラーゲン又はMATRIGEL(商標)などの基材内又は基材上で、I型及びIV型コラーゲンなどの細胞外マトリクスタンパク質の存在下で培養した場合、新芽又は管様構造を形成するのを誘導することができる。

20

30

【0209】

別の実施態様において、上記の胎盤由来接着細胞(PDAC)を含む細胞集団のいずれかは、血管新生因子を分泌する。具体的実施態様において、該細胞集団は、血管内皮増殖因子(VEGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、及び／又はインターロイキン-8(IL-8)を分泌する。他の具体的実施態様において、PDACを含む細胞集団は、1以上の血管新生因子を分泌し、これによりヒト内皮細胞が、インビトロ創傷治癒アッセイにおいて遊走することを誘導する。他の具体的実施態様において、胎盤由来接着細胞を含む細胞集団は、ヒト内皮細胞、内皮前駆細胞、筋細胞又は筋芽細胞の成熟、分化又は増殖を誘導する。

40

【0210】

(5.5.3 胎盤細胞集団の選別及び生成)

特定の実施態様において、胎盤細胞の集団が免疫抑制性である、該集団が選択され得る。一実施態様において、例えば、胎盤細胞の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%が、 $\text{CD}10^+$ 、 $\text{CD}34^+$ 、 $\text{CD}105^+$ 、 $\text{CD}200^+$ 胎盤細胞であり、且つ該胎盤細胞が、MLRアッセイにおいてT細胞増殖を検出可能に抑制する胎盤

50

細胞集団を選別することを含む、複数の胎盤細胞由来の複数の免疫抑制性胎盤細胞を選別する方法が、本明細書に提供される。具体的実施態様において、該選別はまた、CD45⁻及びCD90⁺である幹細胞を選別することを含む。

【0211】

別の実施態様において、胎盤細胞の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%が、CD200⁺、HLA-G⁻胎盤細胞であり、且つ該胎盤細胞が、MLRアッセイにおいてT細胞増殖を検出可能に抑制する胎盤細胞集団を選別することを含む、複数の胎盤細胞から複数の免疫抑制性胎盤細胞を選別する方法が、本明細書に提供される。具体的実施態様において、該選別はまた、CD73⁺及びCD105⁺である幹細胞を選別することを含む。別の具体的実施態様において、該選別はまた、CD34⁻、CD38⁻、又はCD45⁻である幹細胞を選別することを含む。別の具体的実施態様において、該選別はまた、CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、及びCD105⁺である胎盤細胞を選別することを含む。別の具体的実施態様において、該選別はまた、胚様体の形成を可能にする条件下で培養した場合に、1以上の胚様体を形成する複数の胎盤細胞を選別することを含む。

10

【0212】

別の実施態様において、胎盤細胞の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%が、CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺胎盤細胞であり、且つ該胎盤細胞が、MLRアッセイにおいてT細胞増殖を検出可能に抑制する複数の胎盤細胞を選別することを含む、複数の胎盤細胞から複数の免疫抑制性胎盤細胞を選別する方法が、本明細書に提供される。具体的実施態様において、該選別はまた、HLA-G⁻である幹細胞を選別することを含む。別の具体的実施態様において、該選別はまた、CD34⁻、CD38⁻、又はCD45⁻である胎盤細胞を選別することを含む。別の具体的実施態様において、該選別はまた、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である胎盤細胞を選別することを含む。別の具体的実施態様において、該選別はまた、CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、及びHLA-G⁻である胎盤細胞を選別することを含む。別の具体的実施態様において、該選別はまた、胎盤細胞集団を胚様体の形成を可能にする条件下で培養した場合に、1以上の胚様体を形成する該集団を選別することを含む。

20

【0213】

別の実施態様において、胎盤細胞の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%が、CD200⁺、OCT-4⁺胎盤細胞であり、且つ該胎盤細胞が、MLRアッセイにおいてT細胞増殖を検出可能に抑制する複数の胎盤細胞を選別することを含む、複数の胎盤細胞から複数の免疫抑制性胎盤細胞を選別する方法が、本明細書に提供される。具体的実施態様において、該選別はまた、CD73⁺及びCD105⁺である胎盤細胞を選別することを含む。別の具体的実施態様において、該選別はまた、HLA-G⁻である胎盤細胞を選別することを含む。別の具体的実施態様において、該選別はまた、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である胎盤細胞を選別することを含む。別の具体的実施態様において、該選別はまた、CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、CD105⁺、及びHLA-G⁻である胎盤細胞を選別することを含む。

30

40

【0214】

別の実施態様において、胎盤細胞の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%が、CD73⁺、CD105⁺、及びHLA-G⁻胎盤細胞であり、且つ該胎盤細胞が、MLRアッセイにおいてT細胞増殖を検出可能に抑制する複数の胎盤細胞を選別することを含む、複数の胎盤細胞から複数の免疫抑制性胎盤細胞を選別する方法が、本明細書に提供される。具体的実施態様において、該選別はまた、CD34⁻、CD38⁻、又はCD45⁻である胎盤細胞を選別することを含む。別の具体的実施態様において、該選別はまた、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である胎盤細胞を選別することを含む。別の具体的実施

50

態様において、該選別はまた、CD200⁺である胎盤細胞を選別することを含む。別の具体的実施態様において、該選別はまた、CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺、及びCD200⁺である胎盤細胞を選別することを含む。

【0215】

別の実施態様において、胎盤細胞の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%が、CD73⁺、CD105⁺胎盤細胞であり、且つ該複数のものが、胚様体の形成を可能にする条件下で、1以上の胚様体を形成する複数の胎盤細胞を選別することを含む、複数の胎盤細胞から複数の免疫抑制性胎盤細胞を選別する方法が、本明細書に提供される。具体的実施態様において、該選別はまた、CD34⁻、CD38⁻、又はCD45⁻である胎盤細胞を選別することを含む。別の具体的実施態様において、該選別はまた、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である胎盤細胞を選別することを含む。別の具体的実施態様において、該選別はまた、OCT-4⁺である胎盤細胞を選別することを含む。より具体的実施態様において、該選別はまた、OCT-4⁺、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である胎盤細胞を選別することを含む。

10

【0216】

別の実施態様において、単離された胎盤細胞の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%が、OCT4⁺幹細胞であり、且つ該複数のものが、胚様体の形成を可能にする条件下で、1以上の胚様体を形成する複数の胎盤細胞を選別することを含む、複数の胎盤細胞から複数の免疫抑制性胎盤細胞を選別する方法が、本明細書に提供される。具体的実施態様において、該選別はまた、CD73⁺及びCD105⁺である胎盤細胞を選別することを含む。別の具体的実施態様において、該選別はまた、CD34⁻、CD38⁻、又はCD45⁻である胎盤細胞を選別することを含む。別の具体的実施態様において、該選別はまた、CD200⁺である胎盤細胞を選別することを含む。より具体的実施態様において、該選別はまた、CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である胎盤細胞を選別することを含む。

20

【0217】

胎盤細胞の免疫抑制性の集団、又は複数の胎盤細胞は、本明細書に提供される方法に従い生成され得る。例えば、上記の複数の胎盤細胞のいずれかを選別し、且つ該複数の胎盤細胞を他の細胞、例えば他の胎盤細胞から単離することを含む、細胞集団を作製する方法が、本明細書に提供される。具体的実施態様において、胎盤細胞を選別する工程であって、ここで該胎盤細胞は、(a)基材に接着し、(b)CD200を発現し、且つHLA-Gを発現しないか、又はCD73、CD105、及びCD200を発現するか、又はCD200及びOCT-4を発現するか、又はCD73、CD105を発現し、且つHLA-Gを発現しないか、又はCD73及びCD105を発現し、且つ幹細胞を含む胎盤細胞集団が胚様体の形成を可能にする条件下で培養される場合、該集団において1以上の胚様体の形成を促進するか、又はOCT-4を発現し、且つ幹細胞を含む胎盤細胞集団が胚様体の形成を可能にする条件下で培養される場合、該集団において1以上の胚様体の形成を促進し；且つ、(c)MLR又は退行アッセイにおいてCD4⁺又はCD8⁺T細胞増殖を検出可能に抑制する；並びに、該胎盤細胞を他の細胞から単離し、細胞集団を形成する工程を含む、細胞集団を作製する方法が、本明細書に提供される。

30

40

【0218】

更なる具体的実施態様において、免疫抑制性胎盤細胞集団は、(a)基材に接着し、(b)CD200を発現し、且つHLA-Gを発現せず；且つ、(c)MLRアッセイにおいてCD4⁺又はCD8⁺T細胞増殖を検出可能に抑制する胎盤細胞を選別する工程；並びに、該胎盤細胞を他の細胞から単離し、細胞集団を形成する工程を含む方法により、作製することができる。別の具体的実施態様において、本方法は、(a)基材に接着し、(b)CD73、CD105、及びCD200を発現し；且つ、(c)MLRにおいてCD4⁺又はCD8⁺T細胞増殖を検出可能に抑制する胎盤細胞を選別する工程；並びに、該胎盤細胞を他の細胞から単離し、細胞集団を形成する工程を含む。別の具体的実施態様において、(a)基材に接着し、(b)CD200及びOCT-4を発現し；且つ、(c)MLR

50

においてCD4⁺又はCD8⁺ T細胞増殖を検出可能に抑制する胎盤細胞を選別する工程；並びに、該胎盤細胞を他の細胞から単離し、細胞集団を形成する工程を含む細胞集団を作製する方法が、本明細書に提供される。別の具体的実施態様において、(a)基材に接着し、(b)CD73及びCD105を発現し；(c)胚様体の形成を可能にする条件下で培養した場合、胚様体を形成し；且つ、(d)MLRにおいてCD4⁺又はCD8⁺ T細胞増殖を検出可能に抑制する胎盤細胞を選別する工程；並びに、該胎盤細胞を他の細胞から単離し、細胞集団を形成する工程を含む、細胞集団を作製する方法が、本明細書に提供される。別の具体的実施態様において、本方法は、(a)基材に接着し、(b)CD73及びCD105を発現し、且つHLA-Gは発現せず；且つ、(c)MLRにおいてCD4⁺又はCD8⁺ T細胞増殖を検出可能に抑制する胎盤細胞を選別する工程；並びに、該胎盤細胞を他の細胞から単離し、細胞集団を形成する工程を含む。細胞集団を作製する方法は、(a)基材に接着し、(b)OCT-4を発現し；(c)胚様体の形成を可能にする条件下で培養した場合、胚様体を形成し；且つ、(d)MLRにおいてCD4⁺又はCD8⁺ T細胞増殖を検出可能に抑制する胎盤細胞を選別する工程；並びに、該胎盤細胞を他の細胞から単離し、細胞集団を形成する工程を含む。

【0219】

免疫抑制性胎盤細胞集団を作製する方法の具体的実施態様において、該T細胞及び該胎盤細胞は、該MLRにおいて、約5：1の比で存在する。本方法において使用する胎盤細胞は、全胎盤から由来、又は主に羊膜、若しくは羊膜及び絨毛膜から由来することができる。別の具体的実施態様において、該胎盤細胞は、該胎盤細胞が存在しない該MLRにおけるT細胞増殖の量と比べ、CD4⁺又はCD8⁺ T細胞増殖を、該MLRにおいて少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%、又は少なくとも95%抑制する。本方法は加えて、免疫調節が可能な、例えば他の免疫細胞の活性、例えばナチュラルキラー(NK)細胞の活性の抑制が可能な胎盤細胞集団の選別及び／又は作製を含むことができる。

【0220】

(5.5.4 培養下の成長)

任意の哺乳動物細胞に関して、本明細書記載の胎盤細胞、例えば胎盤幹細胞(PDAC)の成長は、成長用に選択される特定の培地の一部左右される。最適な条件下では、胎盤細胞は、典型的には3～5日で数が2倍になる。培養中、本明細書に提供される胎盤細胞は、培養液中の基材、例えば組織培養容器(例えば、組織培養皿プラスチック、フィブロネクチンコーティングしたプラスチックなど)の表面に接着し、単層を形成する。

【0221】

本明細書に提供される胎盤細胞を含む単離された胎盤細胞の集団は、適切な条件下で培養したとき、胚様体を形成することができる、すなわち、3次元の細胞塊が、接着性幹細胞層の上で成長する。胚様体内の細胞は、ごく初期の幹細胞と関連するマーカー、例えば、OCT-4、Nanog、SSEA3、及びSSEA4を発現する。胚様体内の細胞は、典型的には、本明細書に記載の胎盤細胞が接着するように培養基材に接着するのではなく、培養中、接着細胞に付着した状態であり続ける。胚様体は、接着性の幹細胞の非存在下では形成されないもので、胚様体細胞は、生存を接着性の胎盤細胞に依存している。接着性の胎盤細胞は、従って、該接着性の胎盤細胞を含む胎盤細胞の集団内での1以上の胚様体の成長を促進する。理論に束縛されることを望むものではないが、胚様体の細胞は、胚性幹細胞が細胞のフィーダー層上で成長するのと同じ程度に、接着性の胎盤細胞上で成長すると考えられる。間葉系幹細胞、例えば骨髄由来間葉系幹細胞は、培養において胚様体を発達しない。

【0222】

(5.5.5 分化)

特定の実施態様において、本明細書に提供されるCNS損傷、例えばSCI又はTBIを治療する方法において有用である胎盤細胞は、異なるコミットされた細胞株へ分化可能である。例えば特定の実施態様において、胎盤細胞は、脂肪生成、軟骨形成、神経形成、又は骨形成系統の細胞へ分化することができる。そのような分化は、例えば、例として骨髄由来間葉系幹細胞の類似の細胞株への分化に関して当該技術分野において公知の任意の方法により、又は本明細書の別所記載の方法により、達成することができる。胎盤細胞を特定の細

胞株へ分化する具体的方法は、例えば、その開示がそれら全体として引用により本明細書中に組み込まれている、米国特許第7,311,905号、及び米国特許出願公開第2007/0275362号において明らかにされている。

【0223】

本明細書に提供される胎盤細胞は、インビトロ、インビボ、又はインビトロとインビボにおいて、特定の細胞株へ分化する能力を示すことができる。具体的実施態様において、本明細書に提供される胎盤細胞は、特定の細胞株への分化を引き起こすか又は促進する条件下に配置された場合に、インビトロにおいて分化することができるが、例えばNOD-SCIDマウスモデルにおいて、インビボにおいて検出可能には分化しない。

【0224】

(5.6 胎盤細胞を得る方法)

(5.6.1 幹細胞回収組成物)

胎盤細胞は、本明細書に提供される方法に従い、回収及び単離することができる。一般に、幹細胞は、生理的に許容し得る溶液、例えば、幹細胞回収組成物を用いて、哺乳動物の胎盤から得られる。幹細胞回収組成物は、2005年12月29日に出願された、「胎盤幹細胞の回収及び保存のための改善された組成物及び組成物の使用方法(Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Cells and Methods of Using the Composition)」という表題の関連米国特許仮出願第60/754,969号に詳細に記載されている。

【0225】

該幹細胞回収組成物は、幹細胞の回収及び／又は培養に好適な任意の生理的に許容し得る溶液、例えば、生理食塩水溶液(例えば、リン酸緩衝生理食塩水、クレブス溶液、改変クレブス溶液、イーグル溶液、0.9%NaClなど)、培養培地(例えば、DMEM、HDMEMなど)などを含むことができる。

【0226】

幹細胞回収組成物は、回収の時点から培養の時点まで、胎盤細胞を保存する、すなわち、胎盤細胞の死を防止するか、又は該胎盤細胞の死を遅延させるか、死滅する細胞集団内の胎盤細胞の数を減少させるなどの傾向がある1種以上の成分を含むことができる。そのような成分は、例えば、アポトーシス阻害剤(例えば、カスパーゼ阻害剤若しくはJNK阻害剤)；血管拡張剤(例えば、硫酸マグネシウム、抗高血圧薬、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、副腎皮質刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、ニトロプルシドナトリウム、ヒドララジン、アデノシン三リン酸、アデノシン、インドメタシン若しくは硫酸マグネシウム、ホスホジエステラーゼ阻害剤など)；壊死阻害剤(例えば、2-(1H-インドール-3-イル)-3-ベンチルアミノ-マレイミド、ピロリジンジチオカルバメート、若しくはクロナゼパム)；TNF- α 阻害剤；及び／又は、酸素運搬ペルフルオロカーボン(例えば、ペルフルオロオクチルプロミド、ペルフルオロデシルプロミドなど)であることができる。

【0227】

幹細胞回収組成物は、1種以上の組織分解酵素、例えば、メタロプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、中性プロテアーゼ、RNアーゼ、又はDNアーゼなどを含むことができる。そのような酵素としては、コラゲナーゼ(例えば、コラゲナーゼI、II、III、又はIV、クロストリジウム・ヒストリチカム(*Clostridium histolyticum*)由来のコラゲナーゼなど)；ディスパーゼ、サーモリシン、エラスターゼ、トリプシン、LIBERASE、ヒアルロニダーゼなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0228】

幹細胞回収組成物は、殺菌有効量又は静菌有効量の抗生物質を含むことができる。特定の非限定的な実施態様において、抗生物質は、マクロライド(例えば、トブラマイシン)、セファロsporin(例えば、セファレキシン、セフラジン、セフロキシム、セフプロジル、セファクロール、セフィキシム、若しくはセファドロキシム)、クラリスロマイシン、エリスロマイシン、ペニシリン(例えば、ペニシリンV)、又はキノロン(例えば、オフロキサシン、シプロフロキサシン、若しくはノルフロキサシン)、テトラサイクリン、ストレ

10

20

30

40

50

プトマイシンなどである。特定の実施態様において、抗生物質は、グラム陽性細菌及び／又はグラム陰性細菌、例えば、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)などに対して活性がある。

【0229】

幹細胞回収組成物は、以下の化合物のうちの1以上を含むこともできる：アデノシン(約1mM～約50mM)；D-グルコース(約20mM～約100mM)；マグネシウムイオン(約1mM～約50mM)；一実施態様において、内皮の完全性及び細胞の生存能力を維持するのに十分な量で存在する、分子量20,000ダルトン超の高分子(例えば、合成若しくは天然のコロイド、約25g/l～約100g/l、若しくは約40g/l～約60g/lで存在するデキストラン若しくはポリエチレングリコールなどの多糖)；酸化防止剤(例えば、約25μM～約100μMで存在するブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、グルタチオン、ビタミンC、若しくはビタミンE)；還元剤(例えば、約0.1mM～約5mMで存在するN-アセチルシステイン)；細胞内へのカルシウムの侵入を防止する薬剤(例えば、約2μM～約25μMで存在するベラパミル)；ニトログリセリン(例えば、約0.05g/L～約0.2g/L)；一実施態様において、残留血液の凝固の防止を助けるのに十分な量で存在する抗凝血剤(例えば、約1000ユニット/l～約100,000ユニット/lの濃度で存在するヘパリン若しくはヒルジン)；又はアミロライド含有化合物(例えば、約1.0μM～約5μMで存在するアミロライド、エチルイソプロピルアミロライド、ヘキサメチレンアミロライド、ジメチルアミロライド、若しくはイソブチルアミロライド)。

【0230】

(5.6.2 胎盤の回収及び取り扱い)

一般に、ヒトの胎盤を、出産後その娩出後すぐに回収する。好ましい実施態様において、インフォームド Consent 後、及び患者の全病歴を取得して、該胎盤と関連付けた後、胎盤を患者から回収する。好ましくは、この病歴は分娩後も続く。そのような病歴を用いて、胎盤又はそれから採取される胎盤又は幹細胞の後続的使用を調整することができる。例えば、ヒト胎盤細胞は、その病歴を考慮して、該胎盤と関連する幼児のための、又はその幼児の親、兄弟姉妹、若しくは他の血縁者のための個人医療に用いることができる。

【0231】

胎盤細胞の回収前に、臍帯血及び胎盤血を除去する。特定の実施態様において、分娩後、胎盤内の臍帯血を回収する。胎盤は、従来の臍帯血の回収プロセスに供することができる。典型的には、針又はカニューレを用い、重力の助けを借りて、胎盤を放血させる(例えば、Andersonの米国特許第5,372,581号；Hesselらの米国特許第5,415,665号を参照されたい)。針又はカニューレを、通常、臍帯静脈内に留置し、胎盤を穏やかにマッサージして、胎盤からの臍帯血の排出を助けることができる。そのような臍帯血の回収は、商業的に、例えば、LifeBank社(シダーノールズ, NJ)、ViaCord、Cord Blood Registry and Cryocellにより行なわれてもよい。好ましくは、臍帯血を回収する間の組織破壊を最小限に抑えるために、胎盤を、それ以上操作することなく、重力排出させる。

【0232】

典型的には、臍帯血の回収、及び例えば、灌流又は組織解離による幹細胞の回収のために、胎盤を、分娩室又は出産室から別の場所、例えば、実験室まで輸送する。例えば、胎盤を、近位臍帯をクランプしたまま、滅菌されたジップロック式プラスチックバッグの中に入れ、その後、このプラスチックバッグを断熱容器内に入れることによって、胎盤を(胎盤の温度を20～28℃に維持する)滅菌された断熱輸送装置に入れて輸送することが好ましい。別の実施態様において、2005年9月19日に出願された係属中の米国特許出願第11/230,760号に実質的に記載されているように、胎盤を臍帯血回収キットに入れて輸送する。好ましくは、胎盤を、分娩から4～24時間後に、実験室に移送する。特定の実施態様において、臍帯血の回収前に、盤状胎盤(placental disc)への挿入部から好ましくは4～5cm(センチメートル)以内のところで、近位臍帯をクランプする。他の実施態様において、臍帯血の回収後、しかし、それ以上の胎盤の処理前に、近位臍帯をクランプする。

【0233】

胎盤は、幹細胞回収前に、滅菌条件下、且つ室温又は5～25℃(摂氏)の温度のいずれかで保存することができる。胎盤を灌流して残留臍帯血を除去する前に、胎盤は、48時間よりも長い時間、好ましくは4～24時間、保存してもよい。胎盤は、5～25℃(摂氏)の温度で、抗凝血剤溶液に入れて保存することが好ましい。好適な抗凝血剤溶液は当該技術分野で周知である。例えば、ヘパリン又はワルファリンナトリウム溶液を用いることができる。好ましい実施態様において、抗凝血剤溶液は、ヘパリン溶液(例えば、1:1000溶液中で1% w/w)を含む。放血された胎盤は、胎盤細胞を回収する前に、36時間を超えない時間、保存することが好ましい。

【0234】

哺乳動物の胎盤又はその一部は、一般に上記のように回収及び調製されれば、幹細胞を得るために、任意の当該技術分野で公知の方法で処理することができ、例えば、灌流するか、又は破壊する、例えば、1種以上の組織破壊酵素で消化することができる。

【0235】

(5.6.3 胎盤組織の物理的破壊及び酵素的消化)

一実施態様において、例えば、上記第5.3.1節に説明された幹細胞回収組成物を使用し、幹細胞を、哺乳動物の胎盤の物理的破壊によって、例えば酵素的消化によって、この臓器から回収する。例えば、胎盤又はその一部を、例えば、圧搾するか、剪断するか、細かく切り刻むか、さいの目状に切るか、みじん切りにするか、液体に浸して柔らかくするか、又は同様に処理する一方で、例えば、緩衝液、培地又は幹細胞回収組成物と、該組織を接触させ、引き続き1種以上の酵素で消化することができる。胎盤又はその一部はまた、物理的に破壊し、且つ1種以上の酵素で消化してもよく、その後得られた材料を、緩衝液、培地又は幹細胞回収組成物中に含浸するか又はこれに混合する。破壊の方法が、例えばトリパンプルー排出により決定された、該生存臓器中の細胞の複数、より好ましくは過半数、及びより好ましくは少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%、又は99%を残留するならば、任意の物理的破壊の方法を使用することができる。

【0236】

物理的破壊及び／又は酵素的消化並びに幹細胞回収の前に、胎盤を構成要素に解剖することができる。例えば、胎盤細胞は、羊膜、絨毛膜、胎盤葉、若しくはそれらの任意の組合せ、又は臍帯、若しくはそれらの任意の組合せから得ることができる。好ましくは、胎盤細胞は、羊膜及び絨毛膜を含む胎盤組織、又は羊膜-絨毛膜及び臍帯から得られる。一実施態様において、幹細胞は、羊膜-絨毛膜及び臍帯から、重量比約1:1で得られる。典型的には、胎盤細胞は、胎盤組織の小さなブロック、例えば、体積約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、又は約1000立方ミリメートルの胎盤組織のブロックの破壊によって得ることができる。

【0237】

好ましい幹細胞回収組成物は、1種以上の組織破壊酵素を含む。酵素的消化は好ましくは、酵素の組合せを使用し、例えばマトリクスメタロプロテアーゼと中性プロテアーゼの組合せ、例えばコラゲナーゼとディスパーゼの組合せを使用する。一実施態様において、胎盤組織の酵素的消化は、マトリクスメタロプロテアーゼ、中性プロテアーゼ、及びヒアルロン酸消化のための粘液溶解酵素の組合せ、例えば、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、及びヒアルロニダーゼの組合せ、又はLIBERASE(Boehringer Mannheim社、インディアナポリス、IN)及びヒアルロニダーゼの組合せなどを使用する。胎盤組織を破壊するために用いることができる他の酵素としては、パパイン、デオキシリボヌクレアーゼ、セリンプロテアーゼ、例えば、トリプシン、キモトリプシン、又はエラスターゼが挙げられる。セリンプロテアーゼは、血清中の $\alpha 2$ ミクログロブリンによって阻害されることがあり、そのため、消化に用いられる培地は、通常、無血清のものである。EDTA及びDNアーゼは、細胞回収効率を増加させるために、酵素的消化手順において一般的に用いられる。粘性のある消化液内に幹細胞が捕捉されることを避けるために、消化物を希釈することが好ましい。

【0238】

組織消化酵素の任意の組合せを用いることができる。組織消化酵素の代表的な濃度は、例えば、コラゲナーゼI及びコラゲナーゼIVの50～200 U/mL、ディスパーゼの1～10 U/mL、及びエラスターゼの10～100 U/mLである。胎盤細胞を遊離させるために、プロテアーゼを組合せて、すなわち、2種以上のプロテアーゼを同じ消化反応で用いることができるか、又はプロテアーゼを順次用いることができる。例えば、一実施態様において、胎盤又はその一部を、まず、約2mg/mlの適量のコラゲナーゼIで、30分間消化し、その後、約0.25%のトリプシンで、例えば、37℃で10分間消化する。セリンプロテアーゼを、他の酵素の使用後に連続して用いることが好ましい。

【0239】

別の実施態様において、キレート剤、例えば、エチレングリコールビス(2-アミノエチルエーテル)-N,N,N'-四酢酸(EGTA)又はエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を、幹細胞を含む幹細胞回収組成物に、又は幹細胞回収組成物で幹細胞を単離する前にその中で組織を破壊及び／若しくは消化する溶液に添加することにより、組織を更に破壊することができる。

【0240】

胎盤全体、又は胎盤の一部が、胎児細胞と母親細胞の両方を含む場合(例えば、胎盤の一部が、絨毛膜又は胎盤葉を含む場合)、回収された胎盤細胞は、胎児起源と母親起源の両方に由来する胎盤細胞の混合物を含むことが理解されるであろう。胎盤の一部が、母親細胞(例えば、羊膜)を全く、又はごくわずかな数しか含まない場合、回収される胎盤細胞は、ほとんど胎児性の胎盤細胞しか含まないことになる。

【0241】

(5.6.4 胎盤の灌流)

胎盤細胞、例えば胎盤幹細胞(PDAC)はまた、哺乳動物の胎盤の灌流によって得ることもできる。哺乳動物の胎盤を灌流して幹細胞を得る方法は、例えば、Haririの米国特許出願第2002/0123141号、及び2005年12月29日に出願された、関連の米国特許仮出願第60/754,969号、表題「胎盤細胞回収及び保存のための改善された組成物、及び組成物の使用方法(Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Cells and Methods of Using the Composition)」に開示されている。

【0242】

胎盤細胞を、例えば、幹細胞回収組成物を灌流溶液として用いる、例えば、胎盤血管系を通した灌流によって、回収することができる。一実施態様において、哺乳動物の胎盤を、灌流溶液を臍帯動脈と臍帯静脈のどちらか又は両方に通すことによって灌流する。胎盤を通る灌流溶液の流れを、例えば、胎盤の中への重力流を用いて達成することができる。好ましくは、灌流溶液を、ポンプ、例えば、蠕動ポンプを用いて、胎盤に強制的に通す。臍帯静脈に、例えば、滅菌チューブなどの滅菌された接続装置に接続されている、カニューレ、例えば、TEFLON(登録商標)又はプラスチックカニューレを挿入することができる。この滅菌された接続装置は、灌流マニフォールドに接続されている。

【0243】

灌流に備えて、臍帯動脈及び臍帯静脈が胎盤の最も高い位置に配置されるような形で、胎盤を配向させる(例えば、ぶら下げる)ことが好ましい。灌流液、例えば本明細書に提供される幹細胞回収組成物を胎盤血管系を通すか、又は胎盤血管系と周囲組織に通すことによって、胎盤を灌流することができる。一実施態様において、臍帯動脈及び臍帯静脈を、柔軟なコネクタを介して灌流液のリザーバに接続されたピペットに同時に接続する。灌流液を、臍帯静脈及び臍帯動脈に通す。灌流液は、血管壁から滲出し、且つ／又は血管壁を通して、胎盤の周囲組織中に入り、妊娠中、母親の子宮に付着していた胎盤表面から好適な開放容器中に回収される。灌流溶液を臍帯の開放部を通して導入し、母親の子宮壁と接続している胎盤壁の開口部から流出又は浸出させることもできる。別の実施態様において、灌流液を臍帯静脈に通し、臍帯動脈から回収するか、又は灌流液を臍帯動脈に通し、臍帯静脈から回収することができる。

【0244】

一実施態様において、灌流中、近位臍帯をクランプし、より好ましくは、盤状胎盤への臍帯挿入部から4~5cm(センチメートル)以内のところで、近位臍帯をクランプする。

【0245】

放血プロセスの間の哺乳動物の胎盤からの灌流液の最初の回収物は、通常、臍帯血及び／又は胎盤血の残留赤血球のために色が付いている。該灌流液は、灌流が進み、残留臍帯血細胞が胎盤から洗い流されるにつれて、より無色になっていく。一般に、最初に胎盤を放血するためには、30~100ml(ミリリットル)の灌流液で十分であるが、観察された結果次第で、より多くの又はより少ない灌流液を用いることができる。

【0246】

胎盤細胞を回収するために用いられる灌流液の容量は、回収しようとする幹細胞の数、胎盤の大きさ、単一の胎盤から行なわれる回収の回数などによって異なり得る。様々な実施態様において、灌流液の容量は、50mL~5000mL、50mL~4000mL、50mL~3000mL、100mL~2000mL、250mL~2000mL、500mL~2000mL、又は750mL~2000mLであることができる。典型的には、放血後、胎盤を700~800mLの灌流液で灌流する。

【0247】

胎盤を、数時間から数日間かけて、複数回灌流することができる。胎盤を複数回灌流しようとする場合、それを、容器(container)又は他の好適な容器(vessel)中、無菌条件下で維持又は培養し、幹細胞回収組成物、又は抗凝血剤(例えば、ヘパリン、ワルファリンナトリウム、クマリン、ビスヒドロキシクマリン)を含むか若しくは含まない、及び／又は抗微生物剤(例えば、 β -メルカプトエタノール(0.1mM)；ストレプトマイシン(例えば、40~100 μ g/ml)、ペニシリン(例えば、40U/ml)、アンホテリシンB(例えば、0.5 μ g/ml)などの抗生物質を含むか若しくは含まない、標準的な灌流溶液(例えば、リン酸緩衝生理食塩水(「PBS」)などの通常の生理食塩水溶液)で灌流することができる。一実施態様において、胎盤を、灌流及び灌流液の回収前に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、若しくは24時間、又は2若しくは3日間若しくはそれより長い間、維持又は培養するように、単離された胎盤を、灌流液を回収しないで、しばらくの間、維持又は培養する。灌流された胎盤を、更にもう1回以上、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24時間、又はそれより長い時間、維持し、例えば、700~800mLの灌流液で再び灌流することができる。胎盤を、1、2、3、4、5回、又はそれより多く、例えば、1、2、3、4、5、又は6時間に1回、灌流することができる。好ましい実施態様において、回収された有核細胞の数が100細胞/mlを下回るまで、胎盤の灌流、及び灌流溶液、例えば、細胞回収組成物の回収を繰り返す。異なる時点の灌流液を更に個別に処理して、時間依存的な細胞、例えば、幹細胞の集団を回収することができる。異なる時点からの灌流液をプールすることもできる。

【0248】

理論に束縛されることを望むものではないが、胎盤の放血及び十分な時間の灌流の後、胎盤細胞は、好ましくは灌流による回収容器への洗浄により、それらが回収される胎盤の放血され且つ灌流された微小循環(microcirculation)に移動されと考えられる。単離された胎盤の灌流は、残留臍帯血を除去するのみではなく、胎盤に酸素を含む適切な栄養素を提供するために役立つ。胎盤は、培養し、且つ残留臍帯血細胞を除去するために使用したものの類似溶液で、好ましくは抗凝血薬を添加しない溶液で灌流する。

【0249】

本明細書に記載の灌流は、該溶液で灌流していないし、幹細胞を得るために他の方法で(例えば、組織破壊、例えば、酵素的消化によって)処理してもいない、哺乳動物の胎盤から得ることができる数よりも有意に多い胎盤細胞の回収をもたらす。この文脈において、「有意により多い」とは、少なくとも10%より多いことを意味する。灌流によって、例えば、胎盤又はその一部が培養された培養培地から入手することができる胎盤細胞の数よりも有意に多い胎盤細胞が得られる。

【0250】

幹細胞は、1種以上のプロテアーゼ又は他の組織破壊酵素を含む溶液での灌流によって、胎盤から単離することができる。具体的実施態様において、胎盤又はその部分(例えば、羊膜、羊膜と絨毛膜、胎盤小葉若しくは胎盤葉、又は前述のもののいずれかの組合せ)を25~37℃に置き、1種以上の組織破壊酵素とともに、200mLの培養培地中、30分間インキュベートする。灌流液由来の細胞を回収し、4℃に置き、5mM EDTA、2mMジチオスレイトール、及び2mM β -メルカプトエタノールを含む冷たい阻害剤混合物で洗浄する。数分後、幹細胞を、本明細書別所記載の冷たい(例えば、4℃)幹細胞回収組成物で洗浄する。

【0251】

灌流液が胎盤の母親側から滲出した後に灌流液が回収される、受け皿法を用いる灌流は、胎児細胞と母親細胞の混合物をもたらすことが理解されるだろう。結果として、この方法で回収された細胞は、胎児起源と母親起源の両方の、胎盤細胞の混合集団を含む。対照的に、灌流液が1つ又は2つの胎盤血管に通され、単に残りの血管を通して回収される、単に胎盤血管系を通した灌流は、ほぼ胎児起源のものしかない胎盤細胞の集団の回収をもたらす。

【0252】

(5.6.5 胎盤細胞の単離、選別及び特徴付け)

灌流で得られたものであれ、酵素的消化によって得られたものであれ、哺乳動物の胎盤由来の幹細胞を、最初に、フィコール勾配遠心分離によって、他の細胞から純化(すなわち、単離)することができる。そのような遠心分離は、遠心分離速度などについての任意の標準的なプロトコールに従うことができる。一実施態様において、例えば、胎盤から回収された細胞を、室温で15分間、5000×gでの遠心分離によって灌流液から回収し、これにより、細胞は、例えば、夾雑している破片及び血小板から分離される。別の実施態様において、胎盤灌流液を、約200mlに濃縮し、フィコール上で穏やかに層を形成させ、22℃で20分間、約1100×gで遠心分離し、該細胞の低密度界面層を更なる処理のために回収する。

【0253】

細胞ペレットを、新鮮な幹細胞回収組成物、又は幹細胞維持に好適な培地、例えば、2U/mlヘパリン及び2mM EDTA(GibcoBRL社、NY)を含むIMDM無血清培地に再懸濁することができる。全単核細胞画分を、例えば、Lymphoprep(NycomedPharmas社、オスロ、ノルウェー)を、製造者の推奨手順に従って用いて単離することができる。

【0254】

本明細書に使用する胎盤細胞、例えば胎盤幹細胞(PDAC)を「単離する」とは、通常幹細胞が無傷の哺乳動物の胎盤において関連されている細胞の少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%又は99%を除去することを意味する。臓器由来の幹細胞は、通常幹細胞が無傷の臓器において関連されている細胞の50%未満を含む細胞集団中に存在する場合に、「単離される」。

【0255】

灌流又は消化によって得られた胎盤細胞を、例えば、0.2%EDTA(Sigma社、セントルイス、MO)を含む0.05%トリプシン溶液を用いる示差的トリプシン処理によって、例えば、更に、又は最初に単離することができる。胎盤細胞(PDAC)は典型的には、約5分以内にプラスチック表面から剥がれるが、他の接着性の集団は典型的には、20~30分間を超えるインキュベーションを必要とするので、示差的トリプシン処理が可能である。トリプシン処理、及び例えばトリプシン中和溶液(TNS、Cambrex社)を用いるトリプシン中和後、剥がれた胎盤細胞を回収することができる。接着細胞の単離の一実施態様において、アリコート、例えば、約 $5 \sim 10 \times 10^6$ 個の細胞を、いくつかのT-75フラスコ、好ましくは、フィブロネクチンコーティングしたT75フラスコの各々に入れる。そのような実施態様において、該細胞を、市販の間葉系幹細胞成長培地(MSCGM)(Cambrex社)を用いて培養し、組織培養インキュベーター(37℃、5%CO₂)内に置くことができる。10~15日後、PBSで洗浄することにより、接着していない細胞をフラスコから除去する。その後、PBSをMSCGMに交換する。フラスコを、様々な接着細胞型の存在について、特に、線維芽細胞様細胞の塊の同定及び

拡大について、毎日調べることが好ましい。

【0256】

哺乳動物の胎盤から回収された細胞の数と種類を、例えば、フローサイトメトリー、細胞選別、免疫細胞化学(例えば、組織特異的抗体若しくは細胞マーカー特異的抗体による染色)、蛍光活性化細胞選別(FACS)、磁気活性化細胞選別(MACS)などの標準的な細胞検出技術を用いて形態及び細胞表面マーカーの変化を測定することにより、光学顕微鏡若しくは共焦点顕微鏡法を用いて細胞の形態を調べることにより、並びに／又はPCR及び遺伝子発現プロファイリングなどの当該技術分野で周知の技術を用いて遺伝子発現の変化を測定することにより、モニタリングすることができる。これらの技術を、同様に、1種以上の特定のマーカーが陽性である細胞を同定するためにも用いることができる。例えば、CD34 10 に対する抗体を用いて、上記の技術を用いて、細胞が検出可能な量のCD34を含むかどうかを決定することができ；もしそうであるならば、細胞はCD34⁺である。同様に、細胞がRT-PCRで検出されるのに十分なOCT-4RNA、又は成体細胞よりも有意に多くのOCT-4RNAを産生するならば、該細胞は、OCT-4⁺である。細胞表面マーカー(例えば、CD34などのCDマーカー)に対する抗体及びOCT-4などの幹細胞特異的遺伝子の配列は、当該技術分野で周知である。

【0257】

胎盤細胞、特にフィコール分離、示差的接着、又は両方の組合せによって単離された細胞を、蛍光活性化細胞選別機(FACS)を用いて選別することができる。蛍光活性化細胞選別(FACS)は、粒子の蛍光特性に基づいて、細胞を含む粒子を分離する周知の方法である(Kam 20 archの文献(1987, Methods Enzymol, 151:150-165))。個々の粒子中の蛍光部分のレーザーによる励起によって、わずかな電荷が生じ、混合物からの陽性粒子及び陰性粒子の電磁分離が可能になる。一実施態様において、細胞表面マーカー特異的抗体又はリガンドを個別の蛍光標識で標識する。細胞をセルソーターに通して処理し、使用された抗体に結合するその能力に基づく細胞の分離を可能にする。FACSで選別された粒子を96ウェル又は384ウェルプレートの個々のウェルに直接に堆積させて、分離及びクローニングをしやすくすることができる。

【0258】

1つの選別スキームでは、胎盤由来の幹細胞を、マーカーCD34、CD38、CD44、CD45、CD7 3、CD105、OCT-4、及び／又はHLA-Gの発現に基づいて選別する。これは、幹細胞を培養下 30 のその接着特性に基づいて選択する手順との関連で達成することができる。例えば、幹細胞(stem)接着の選択を、マーカー発現に基づく選別の前又は後に達成することができる。一実施態様において、例えば、細胞を、まず、そのCD34発現に基づいて選別し；CD34⁻細胞を保持し、且つCD200⁺HLA-G⁺である細胞を、他の全てのCD34⁻細胞から分離する。別の実施態様において、胎盤由来の細胞をそのマーカーCD200及び／又はHLA-Gの発現に基づいて選別し；例えば、これらのマーカーのいずれかを提示する細胞を、更なる使用のために単離する。例えばCD200及び／又はHLA-Gを発現する細胞を、具体的実施態様において、そのCD73及び／若しくはCD105、又は抗体SH2、SH3、若しくはSH4によって認識されるエピト 40 ープの発現、或いはCD34、CD38、又はCD45の発現の欠如に基づいて更に選別することができる。例えば、一実施態様において、胎盤細胞を、CD200、HLA-G、CD73、CD105、CD34、CD38、及びCD45の発現、又はその欠如によって選別し、且つCD200⁺、HLA-G⁻、CD73⁺、CD10 5⁺、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻である胎盤細胞を、更なる使用のために他の胎盤細胞から単離する。

【0259】

別の実施態様において、磁気ビーズを用いて細胞を分離することができる。磁気ビーズ(直径0.5~100 µm)に結合するその能力に基づいて粒子を分離する方法である、磁気活性化細胞選別(MACS)技術を用いて、該細胞を選別してもよい。特定の細胞表面分子又はハプテンを特異的に認識する抗体の共有結合的付加を含む、種々の有用な修飾を磁気ミクロスフェアに対して行なうことができる。その後、該ビーズを細胞と混合し、結合させておく。その後、細胞を磁場に通して、特異的細胞表面マーカーを有する細胞を分離する。一実 50

施態様において、その後、これらの細胞を単離し、更なる細胞表面マーカーに対する抗体と結合した磁気ビーズと再び混合することができる。該細胞を再び磁場に通して、両方の抗体に結合した細胞を単離する。その後、そのような細胞を希釈して、別々の皿、例えば、クローン単離用のマイクロタイターディッシュに入れることができる。

【0260】

胎盤細胞は、細胞形態及び成長の特性に基づいて特徴付け、並びに／又は選別することもできる。例えば、胎盤細胞を、例えば、培養下で線維芽細胞様の外観を有するものとして特徴付け、且つ／又は培養下での線維芽細胞様の外観に基づいて選択することができる。胎盤細胞を、胚様体を形成するその能力を有するものとして特徴付け、並びに／又は胚様体を形成するその能力に基づいて選択することもできる。一実施態様において、例えば、線維芽細胞様の形状であり、CD73及びCD105を発現し、且つ培養下で1以上の胚様体を生じさせる胎盤細胞を他の胎盤細胞から単離する。別の実施態様において、培養下で1以上の胚様体を生じさせるOCT-4⁺胎盤細胞を他の胎盤細胞から単離する。

10

【0261】

別の実施態様において、胎盤細胞は、コロニー形成単位アッセイによって同定し、特徴付けることができる。Mesen Cult(商標)培地(Stem Cell Technologies社、バンクーバー、ブリティッシュコロンビア州)などの、コロニー形成単位アッセイは、当該技術分野で一般に公知である。

【0262】

胎盤細胞を、(生存を評価するための)トリパンブルー排出アッセイ、フルオレセインジアセテート取込みアッセイ、ヨウ化プロビジウム取込みアッセイ；及び、(増殖を評価するための)チミジン取込みアッセイ、MTT細胞増殖アッセイなどの、当該技術分野で公知の標準的技術を用いて、生存能力、増殖能力、及び寿命について評価することができる。寿命は、延長された培養下での集団倍加の最大数を決定することなどの、当該技術分野で周知の方法によって測定してもよい。

20

【0263】

胎盤細胞を、当該技術分野で公知の他の技術、例えば、所望の細胞の選択的成長(陽性選択)、望ましくない細胞の選択的破壊(陰性選択)；例えば、大豆凝集素を用いる、混合集団における示差的細胞凝集力に基づく分離；凍結-解凍処置；濾過；従来のゾーン遠心分離；遠心洗浄(向流遠心分離)；単位重力分離；向流分配；電気泳動法；などを用いて他の胎盤細胞から分離することもできる。

30

【0264】

(5.7 胎盤細胞の培養)

(5.7.1 培養培地)

単離された胎盤細胞、又は胎盤細胞集団、又は胎盤細胞が生じる細胞若しくは胎盤組織を用いて、細胞培養物をイニシエートするか、又はそれを播種することができる。一般に、細胞を、コーティングされていないか、或いはラミニン、コラーゲン(例えば、天然物若しくは変性物)、ゼラチン、フィブ्रोネクチン、オルニチン、ビトロネクチン、及び／又は細胞外膜タンパク質(例えば、MATRIGEL(BD Discovery Labware社、ベッドフォード、MA))などの細胞外マトリクス若しくはリガンドでコーティングされているかのいずれかの滅菌組織培養容器に移す。

40

【0265】

胎盤細胞を、幹細胞の培養に許容し得るものとして当該技術分野で認識されている任意の培地中及び任意の条件下で培養することができる。好ましくは、培養培地は、血清を含む。胎盤細胞を、例えば、ITS(インスリン-トランスフェリン-セレン)、LA+BSA(リノール酸-ウシ血清アルブミン)、デキストロース、L-アスコルビン酸、PDGF、EGF、IGF-1、及びペニシリン／ストレプトマイシンを含むDMEM-LG(ダルベッコの改変必須培地、低グルコース)／MCDB 201(ニワトリ線維芽細胞基本培地)；10%胎仔ウシ血清(FBS)を含むDMEM-HG(高グルコース)；15%FBSを含むDMEM-HG；10%FBS、10%ウマ血清、及びヒドロコルチゾンを含むIMDM(イスコフの改変ダルベッコ培地)；10%FBS、EGF、及びヘパリンを含むM199；

50

10%FBS、GlutaMax(商標)、及びゲンタマイシンを含む α -MEM(最小必須培地)；10%FBS、GlutaMax(商標)、及びゲンタマイシンを含むDMEMなどの中で培養することができる。好ましい培地は、2%FBS、ITS、LA+BSA、デキストロース、L-アスコルビン酸、PDGF、EGF、及びペニシリン／ストレプトマイシンを含む、DMEM-LG/MCDB-201である。

【0266】

胎盤細胞を培養するために用いることができる他の培地としては、DMEM(高グルコース又は低グルコース)、イーグルの基本培地、ハムのF10培地(F10)、ハムのF-12培地(F12)、イスコフの改変ダルベッコ培地、間葉系幹細胞成長培地(MSCGM)、ライボヴィッツのL-15培地、MCDB、DMEM／F12、RPMI1640、改良DMEM(Gibco社)、DMEM／MCDB201(Sigma社)、及びCELL-GROFREEが挙げられる。

10

【0267】

培養培地には、例えば、血清(例えば、ウシ胎仔血清(FBS)、好ましくは、約2～15%(v/v)；ウマ科(ウマ)血清(ES)；ヒト血清(HS))； β -メルカプトエタノール(BME)、好ましくは、約0.001%(v/v)；1種以上の増殖因子、例えば、血小板由来増殖因子(PDGF)、上皮増殖因子(EGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、インスリン様増殖因子-1(IGF-1)、白血病抑制因子(LIF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、及びエリスロポエチン(EPO)；L-バリンを含むアミノ酸；並びに例えば、単独の又は組合せた、ペニシリンG、硫酸ストレプトマイシン、アンホテリシンB、ゲンタマイシン、及びナイスタチンなどの、微生物汚染を防除するための1種以上の抗生物質及び／又は抗真菌剤を含む1種以上の成分を補充することができる。

20

【0268】

(5.7.2 胎盤細胞の拡大及び増殖)

一旦単離された胎盤細胞、又は単離された幹細胞の集団(例えば、該幹細胞又は幹細胞の集団が通常インビボで関連している胎盤細胞の少なくとも50%から分離されている、幹細胞又は幹細胞集団)、幹細胞又は幹細胞の集団は、インビトロで増殖させ、拡大することができる。例えば、胎盤細胞の集団を、組織培養容器、例えば、皿、フラスコ、マルチウェルプレートなどの中で、70～90%コンフルエンスになるまで、すなわち、該幹細胞及びその子孫が、組織培養容器の培養表面積の70～90%を占めるまで、該幹細胞が増殖するのに十分な時間、培養することができる。

【0269】

胎盤細胞を、細胞成長を可能にする密度で培養容器中に播種することができる。例えば、該細胞を、低密度(約1000～約5000個細胞/cm²)から高密度(例えば約50,000個細胞/cm²以上)で播種してもよい。好ましい実施態様において、該細胞を、大気中、約0～約5容積%のCO₂の存在下で培養する。いくつかの好ましい実施態様において、該細胞を、大気中約2～約25%のO₂、好ましくは、大気中約5～約20%のO₂で培養する。該細胞を、約25℃～約40℃、好ましくは37℃で培養することが好ましい。該細胞をインキュベーター内で培養することが好ましい。培養培地は、静止状態とするか、又は例えば、バイオリアクターを用いて攪拌することができる。胎盤細胞を(例えば、グルタチオン、アスコルビン酸、カタラーゼ、トコフェロール、N-アセチルシステインなどの添加により)低酸化ストレス下で成長させることが好ましい。

30

40

【0270】

一旦70～90%のコンフルエンスが得られれば、細胞を継代してもよい。例えば、該細胞を、当該技術分野で周知の技術を用いて酵素的に処理し、例えば、トリプシン処理し、それらを組織培養表面から分離することができる。該細胞をピペッティングで取り除き、該細胞を計数した後、約20,000～100,000個の幹細胞、好ましくは約50,000個の幹細胞を、新鮮な培養培地を含む新しい培養容器に継代する。典型的には、新しい培地は、該幹細胞が取り除かれた培地と同じ種類である。少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、若しくは20回、又はそれより多くの回数継代した該胎盤細胞の集団、及びその組合せが、本明細書において提供される。

【0271】

50

(5.7.3 胎盤細胞集団)

本明細書に提供される治療方法は、特定の実施態様において、胎盤細胞の集団を使用する。胎盤細胞集団は、1以上の胎盤から直接単離することができ；すなわち、該胎盤細胞集団は、灌流液から得られるか、又はその中に含まれるか、或いは消化物(すなわち、胎盤若しくはその部分の酵素的消化によって得られる細胞の集合体)から得られるか、又はその中に含まれる胎盤細胞を含む胎盤細胞集団であることができる。本明細書に記載の単離された胎盤細胞を培養及び拡大して、胎盤細胞集団を生じさせることもできる。胎盤細胞(例えばPDAC)を含む胎盤細胞の集団も培養及び拡大して、胎盤幹細胞集団、例えば、PDAC又はPDACの集団を含む胎盤細胞集団を生じさせることもできる。

【0272】

本明細書に記載の胎盤細胞集団は、胎盤細胞、例えば本明細書に記載の胎盤細胞(例えば、PDAC)を含む。様々な実施態様において、単離された胎盤細胞集団内の細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は99%は、胎盤幹細胞である。すなわち、胎盤の幹細胞集団は、例えば、幹細胞ではない1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%と同程度の量の細胞を含むことができる。

【0273】

例えば、酵素的消化によって得られたものであれ、灌流によって得られたものであれ、特定のマーカー及び／又は特定の培養特性若しくは形態特性を発現する胎盤幹細胞を選択することによる、単離された胎盤細胞集団を生成する方法が、本明細書に提供される。一実施態様において、細胞集団は、例えば、(a)基材に接着し、且つ(b)CD200を発現し、HLA-Gの発現を欠く胎盤細胞を選択し；且つ該細胞を他の細胞から単離して細胞集団を形成させることを含む方法により、作製される。別の実施態様において、細胞集団を作製する方法は、(a)基材に接着し、且つ(b)CD73、CD105、及びCD200を発現する胎盤細胞を選択し；且つ該細胞を他の細胞から単離して細胞集団を形成させることを含む。別の実施態様において、細胞集団を作製する方法は、(a)基材に接着し、且つ(b)CD200及びOCT-4を発現する胎盤細胞を選択し；且つ該細胞を他の細胞から単離して、細胞集団を形成させることを含む。別の実施態様において、細胞集団を生成する方法は、(a)基材に接着し、(b)CD73及びCD105を発現し、且つ(c)該幹細胞を含む胎盤細胞の集団を、胚様体の形成を可能にする条件下で培養したとき、該集団内での1以上の胚様体の形成を促進する胎盤細胞を選択し；且つ該細胞を他の細胞から単離して細胞集団を形成させることを含む。別の実施態様において、細胞集団を作製する方法は、(a)基材に接着し、且つ(b)CD73及びCD105を発現し、HLA-Gの発現を欠く胎盤細胞を選択し；且つ該細胞を他の細胞から単離して細胞集団を形成させることを含む。別の実施態様において、細胞集団を作製する方法は、(a)基材に接着し、(b)OCT-4を発現し、且つ(c)該幹細胞を含む胎盤細胞の集団を、胚様体の形成を可能にする条件下で培養したとき、該集団内での1以上の胚様体の形成を促進する胎盤細胞を選択すること；及び該細胞を他の細胞から単離して細胞集団を形成させることを含む。上記実施態様のいずれかにおいて、本方法は更に、ABC-p(胎盤特異的ABC輸送体タンパク質；例えば、Allikmetsらの文献(Cancer Res. 58(23):5337-9(1998))を参照されたい)を発現する胎盤細胞を選択することを含むことができる。該方法はまた、例えば、間葉系幹細胞に特異的な少なくとも1つの特徴、例えば、CD29の発現、CD44の発現、CD90の発現、又は前述のものの組合せの発現を示す細胞を選択することを含むこともできる。

【0274】

上記の実施態様において、基材は、細胞、例えば胎盤幹細胞の培養及び／又は選択を達成することができる任意の表面であることができる。典型的には、該基材は、プラスチック、例えば、組織培養皿又はマルチウェルプレートプラスチックである。組織培養プラスチックは、生体分子、例えば、ラミニン又はフィブロネクチンでコーティングすることができる。

【0275】

細胞、例えば胎盤幹細胞を、細胞選択の技術分野で公知の任意の手段によって、胎盤細

10

20

30

40

50

胞集団について選択することができる。例えば、細胞を、例えばフローサイトメトリー又はFACSにおいて1つ以上の細胞表面マーカーに対する1つ又は複数の抗体を用いて選択することができる。抗体の磁気ビーズとの複合体を用いて、選択を達成することができる。特定の幹細胞関連マーカーに特異的である抗体は当該技術分野で公知である。例えば、OCT-4に対する抗体(Abcam社、ケンブリッジ、MA)、CD200に対する抗体(Abcam社)、HLA-Gに対する抗体(Abcam社)、CD73に対する抗体(BD Biosciences Pharmingen社、サンディエゴ、CA)、CD105に対する抗体(Abcam社; BioDesign International社、サコ、ME)など。他のマーカーに対する抗体も市販されており、例えば、CD34、CD38、及びCD45に対する抗体が、例えば、StemCell Technologies社又はBioDesign International社から入手可能である。

【0276】

10

単離された胎盤細胞集団は、幹細胞ではない胎盤細胞、又は胎盤細胞ではない細胞を含むことができる。

【0277】

単離された胎盤細胞集団は、1以上の非幹細胞又は非胎盤細胞の集団と組合せることができる。例えば、胎盤細胞の単離された集団は、血液(例えば、胎盤血又は臍帯血)、血液由来の幹細胞(例えば、胎盤血又は臍帯血由来の幹細胞)、血液由来有核細胞の集団、骨髓由来間葉系幹細胞、骨由来幹細胞集団、粗骨髓、成体(体性)幹細胞、組織内に含まれる幹細胞の集団、培養された幹細胞、完全に分化した細胞(例えば、軟骨細胞、線維芽細胞、羊膜細胞、骨芽細胞、筋肉細胞、心臓細胞など)などと組合せることができる。単離された胎盤細胞集団内の細胞を、各々の集団内の全有核細胞の数と比べて、約100,000,000:1、50,000,000:1、20,000,000:1、10,000,000:1、5,000,000:1、2,000,000:1、1,000,000:1、500,000:1、200,000:1、100,000:1、50,000:1、20,000:1、10,000:1、5,000:1、2,000:1、1,000:1、500:1、200:1、100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1,000; 1:2,000; 1:5,000; 1:10,000; 1:20,000; 1:50,000; 1:100,000; 1:500,000; 1:1,000,000; 1:2,000,000; 1:5,000,000; 1:10,000,000; 1:20,000,000; 1:50,000,000; 又は約1:100,000,000の比で、別のタイプの複数の細胞と組合せることができる。単離された胎盤細胞集団内の細胞を、更に複数の細胞型の複数の細胞と組合せることもできる。

20

【0278】

一つに、胎盤細胞の単離された集団は、複数の造血幹細胞と組合せられる。そのような造血幹細胞は、例えば、未処理の胎盤血、臍帯血、又は末梢血; 胎盤血、臍帯血、又は末梢血由来の全有核細胞; 胎盤血、臍帯血、又は末梢血由来の単離されたCD34⁺細胞集団; 未処理の骨髓; 骨髓由来の全有核細胞; 骨髓由来の単離されたCD34⁺細胞集団などに含まれることができる。

30

【0279】

(5.8 胎盤細胞の保存)

胎盤細胞を、保存する、すなわち、長期保存を可能にする条件下、又は例えば、アポトーシス若しくは壊死による細胞死を阻害する条件下に置くことができる。

【0280】

胎盤細胞を、例えば、その開示が、2005年12月25日に出願された関連米国特許仮出願第60/754,969号、表題「胎盤細胞回収及び保存のための改善された組成物及び組成物を使用する方法(Improved Composition for Collection and Preserving Placental Cells and Methods of Using the Composition)」に記載されているアポトーシス阻害剤、壊死阻害剤、及び/又は酸素運搬ペルフルオロカーボンを含む組成物を用いて保存することができる。一実施態様において、幹細胞の集団を、アポトーシス阻害剤及び酸素運搬ペルフルオロカーボンを含む幹細胞回収組成物と接触させることを含む幹細胞の集団を保存する方法が、本明細書に提供され、ここで、該アポトーシス阻害剤は、該アポトーシス阻害剤と接触していない幹細胞の集団と比較したとき、該細胞集団のアポトーシスを低下させるか又は防止するのに十分な量及び時間で存在する。具体的実施態様において、該アポトーシス阻害剤は、カスパーゼ阻害剤である。別の具体的実施態様において、該アポトーシス阻害

40

50

剤はJNK阻害剤である。より具体的実施態様において、該JNK阻害剤は、該幹細胞の分化又は増殖を調節しない。別の実施態様において、該幹細胞回収組成物は、分離相中に該アポトーシス阻害剤及び該酸素運搬ペルフルオロカーボンを含む。別の実施態様において、該幹細胞回収組成物は、エマルジョン中に該アポトーシス阻害剤及び該酸素運搬ペルフルオロカーボンを含む。別の実施態様において、幹細胞回収組成物は更に、乳化剤、例えば、レシチンを含む。別の実施態様において、該アポトーシス阻害剤及び該ペルフルオロカーボンは、幹細胞と接触させるときに、約0℃～約25℃である。別のより具体的実施態様において、該アポトーシス阻害剤及び該ペルフルオロカーボンは、幹細胞と接触させるときに、約2℃～10℃、又は約2℃～約5℃である。別のより具体的実施態様において、該接触させることは、該幹細胞の集団の輸送の間に行なわれる。別のより具体的実施態様において、該接触させることは、該幹細胞の集団の凍結及び解凍の間に行なわれる。

10

【0281】

別の実施態様において、胎盤細胞の集団を、該幹細胞の集団をアポトーシス阻害剤及び臓器保存化合物と接触させることを含む方法によって保存することができ、ここで、該アポトーシス阻害剤は、該アポトーシス阻害剤と接触していない幹細胞の集団と比較したとき、該幹細胞の集団のアポトーシスを低下させるか又は防止するのに十分な量及び時間で存在する。具体的実施態様において、臓器保存化合物は、UW溶液(米国特許第4,798,824号に記載されており；ViaSpanとしても知られているもの；Southardらの文献(Transplantation 49(2)：251-257(1990))も参照されたい)、又はSternらの米国特許第5,552,267号に記載されている溶液である。別の実施態様において、該臓器保存化合物は、ヒドロキシエチルデンプン、ラクトビオン酸、ラフィノース、又はそれらの組合せである。別の実施態様において、幹細胞回収組成物は更に、2相状態にあるか又はエマルジョンとしてかのいずれかの酸素運搬ペルフルオロカーボンを含む。

20

【0282】

本方法の別の実施態様において、胎盤細胞を、灌流の間に、アポトーシス阻害剤及び酸素運搬ペルフルオロカーボン、臓器保存化合物、又はそれらの組合せを含む幹細胞回収組成物と接触させる。別の実施態様において、該幹細胞を、組織破壊、例えば、酵素的消化のプロセスの間に、接触させる。別の実施態様において、胎盤細胞を、灌流による回収の後に、又は組織破壊、例えば、酵素的消化による回収の後に、該幹細胞回収化合物と接触させる。

30

【0283】

典型的には、胎盤細胞の回収、濃縮、及び単離時に、低酸素ストレス及び機械的ストレスによる細胞ストレスを最小限に抑えるか、又はそれらを排除することが好ましい。本方法の別の実施態様において、それゆえ、幹細胞、又は幹細胞の集団は、回収、濃縮、又は単離時に、該保存時に6時間未満の間、低酸素状態に曝され、ここで、低酸素状態は、正常な血中酸素濃度を下回る酸素濃度である。より具体的実施態様において、該幹細胞の集団は、該保存時に2時間未満の間、該低酸素状態に曝される。別のより具体的実施態様において、該幹細胞の集団は、回収、濃縮、又は単離時に、1時間未満、若しくは30分未満の間、該低酸素状態に曝されるか、又は低酸素状態に曝されない。別の具体的実施態様において、該幹細胞の集団は、回収、濃縮、又は単離時に、剪断ストレスに曝されない。

40

【0284】

本明細書に記載の胎盤細胞を、例えば、小型の容器、例えばアンプル中の凍結保存培地に入れて凍結保存することができる。好適な凍結保存培地としては、例えば、成長培地、又は細胞凍結培地、例えば、市販の細胞凍結培地、例えば、C2695、C2639、若しくはC6039(Sigma社)をはじめとする培養培地が挙げられるが、これらに限定されない。凍結保存培地は、例えば、約10%(v/v)の濃度のDMSO(ジメチルスルホキシド)を含むことが好ましい。凍結保存培地は、例えば、グリセロールを含むか又は含まずに、Plasmalyte、メチルセルロースなどの追加の物質を含んでいてもよい。胎盤細胞を、凍結保存時に、約1℃/分で冷却することが好ましい。好ましい凍結保存温度は、約-80℃～約-180℃、好ましくは約-125℃～約-140℃である。凍結保存された細胞を液体窒素に移した後、使用のために解

50

凍することができる。いくつかの実施態様において、例えば、一旦アンプルが約-90℃に達したら、それを液体窒素保存領域に移す。凍結保存された細胞は、約25℃～約40℃、好ましくは約37℃の温度で解凍することが好ましい。

【0285】

(5.9 胎盤細胞の使用)

(5.9.1 胎盤細胞を含有する組成物)

本明細書に提供される免疫抑制方法は、胎盤細胞、又はそれら由来の生体分子を含有する組成物を使用する。同じ様式で、本明細書に提供される胎盤細胞の複数及び集団は、例えば、研究又は治療において使用するために、任意の生理的に許容し得る又は医学的に許容し得る化合物、組成物、又は装置と組合せることができる。

10

【0286】

(5.9.1.1 凍結保存された胎盤細胞)

本明細書に記載の免疫抑制性の胎盤細胞、及び該細胞の集団を、後で使用するために保存する、例えば、凍結保存することができる。幹細胞などの細胞の凍結保存方法は当該技術分野で周知である。胎盤細胞集団を、個体に容易に投与することができる形態で調製することができる。例えば、本明細書記載の胎盤細胞、又は胎盤細胞の集団は、医療用途に好適な容器中に含まれることができる。そのような容器は、例えば、滅菌プラスチックバッグ、フラスコ、瓶、又は胎盤細胞集団を容易に分注することができる他の容器であることができる。例えば、該容器は、血液バッグ又はレシピエントへの液体の静脈内投与に好適な他のプラスチック製の医療用に許容し得るバッグであることができる。該容器は、好ましくは、組合せられた幹細胞集団の凍結保存を可能にする容器である。

20

【0287】

凍結保存された免疫抑制性の胎盤細胞集団は、単一のドナー、又は複数のドナーに由来する胎盤細胞を含むことができる。胎盤細胞集団は、意図されるレシピエントと完全にHLA Aが一致するものであることができるか、又は一部若しくは完全にHLAが一致しないものであることができる。

【0288】

従って、一実施態様において、容器中に免疫抑制性の胎盤細胞集団を含む組成物が、本明細書に提供される。具体的実施態様において、幹細胞集団は凍結保存されている。別の具体的実施態様において、容器は、バッグ、フラスコ、又は瓶である。より具体的実施態様において、該バッグは、滅菌プラスチックバッグである。より具体的実施態様において、該バッグは、該胎盤細胞集団の静脈内投与に好適であるか、該静脈内投与を可能にするか、又は該静脈内投与を容易にする。該バッグは、投与の前又は投与の間に、胎盤細胞と1種以上の他の溶液、例えば、薬物との混合を可能にするために相互接続されている複数の管腔又は区画を含むことができる。別の具体的実施態様において、該組成物は、組み合わされた幹細胞集団の凍結保存を容易にする1種以上の化合物を含む。別の具体的実施態様において、該胎盤細胞集団は、生理的に許容し得る水溶液に含まれている。より具体的実施態様において、該生理的に許容し得る水溶液は、0.9%NaCl溶液である。別の具体的実施態様において、該胎盤細胞集団は、該幹細胞集団のレシピエントとHLAが一致する胎盤細胞を含む。別の具体的実施態様において、該組み合わされた幹細胞集団は、該幹細胞集団のレシピエントと少なくとも一部HLAが一致しない胎盤細胞を含む。別の具体的実施態様において、該胎盤細胞は、複数のドナーに由来する。

30

40

【0289】

(5.9.1.2 医薬組成物)

免疫抑制性の胎盤細胞集団、又は胎盤細胞を含む細胞の集団を、インビボで用いるための医薬組成物へと製剤化することができる。そのような医薬組成物は、医薬として許容し得る担体、例えば、生理食塩水溶液又はインビボ投与のための他の認可された生理的に許容し得る溶液中に、胎盤細胞の集団、又は胎盤細胞を含む細胞の集団を含む。本明細書に提供される医薬組成物は、本明細書の別所に記載されている、胎盤細胞集団、又は胎盤細胞型を含むことができる。医薬組成物は、胎児の、母親の、又は胎児と母親の両方の胎盤

50

細胞を含むことができる。本明細書で提供される医薬組成物は更に、単一の個体若しくは胎盤から、又は複数の個体若しくは胎盤から得られた胎盤細胞を含むことができる。

【0290】

本明細書で提供される医薬組成物は、任意の免疫抑制性の数の胎盤細胞を含むことができる。例えば、胎盤細胞の単一の単位投与量は、様々な実施態様において、約、少なくとも、又はわずかに 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 個、又はそれより多くの胎盤細胞を含むことができる。

【0291】

本明細書で提供される医薬組成物は、50%以上の生存細胞を含む細胞の集団を含むことができる(すなわち、該集団内の細胞の少なくとも50%は機能的であるか、又は生存している)。好ましくは、該集団内の細胞の少なくとも60%が生存している。より好ましくは、該医薬組成物中の該集団内の細胞の少なくとも70%、80%、90%、95%、又は99%が生存している。

【0292】

本明細書で提供される医薬組成物は、例えば、生着を促進する1種以上の化合物(例えば、抗T細胞受容体抗体、免疫抑制薬など)；アルブミン、デキストラン40、ゼラチン、ヒドロキシエチルデンプンなどの安定化剤などを含むことができる。

【0293】

(5.9.1.3 胎盤細胞馴化培地)

本明細書に提供される胎盤細胞は、免疫抑制性である馴化培地、すなわち複数の免疫細胞の1以上の型に検出可能な免疫抑制性の作用を有する幹細胞により分泌又は排出された1以上の生体分子を含有する培地を作製するために使用することができる。様々な実施態様において、馴化培地は、その中で胎盤細胞が少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日間又はそれ以上成長している培地を含む。他の実施態様において、馴化培地は、その中で胎盤細胞が少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%コンフルエンス、又は最大100%コンフルエンスまで成長している培地を含む。そのような馴化培地を使用し、胎盤細胞の個別の集団、又は別の種類の幹細胞の培養を支援することができる。別の実施態様において、馴化培地は、その中で胎盤細胞が成体細胞型に分化されている培地を含む。別の実施態様において、馴化培地は、その中で胎盤細胞及び非胎盤細胞が培養されている培地を含む。

【0294】

従って、一実施態様において、胎盤細胞の培養物由来の培養培地を含有する組成物が、本明細書に提供され、ここで該胎盤細胞は、(a)基材に接着し；(b)CD200を発現し且つHLA-Gを発現しないか、又はCD73、CD105、及びCD200を発現するか、又はCD200及びOCT-4を発現するか、又はCD73及びCD105を発現し、且つHLA-Gを発現しないか、又はCD73及びCD105を発現し、且つ胎盤細胞を含む胎盤細胞の集団を、胚様体の形成を可能にする条件下で培養したとき、該集団内での1以上の胚様体の形成を促進するか、又はOCT-4を発現し、且つ胎盤細胞を含む胎盤細胞の集団を、胚様体の形成を可能にする条件下で培養したとき、該集団内での1以上の胚様体の形成を促進し；並びに、(c)MLRアッセイにおいて、 $CD4^+$ 又は $CD8^+$ T細胞増殖を検出可能に抑制し、ここで該胎盤細胞の培養物が、該培地において24時間以上培養される。具体的実施態様において、該組成物は更に、複数の該胎盤細胞を含む。別の具体的実施態様において、該組成物は、複数の非胎盤細胞を含む。より具体的実施態様において、該非胎盤細胞は、 $CD34^+$ 細胞、例えば末梢血造血前駆細胞、臍帯血造血前駆細胞、又は胎盤血造血前駆細胞などの、造血前駆細胞を含む。非胎盤細胞はまた、他の幹細胞、例えば間葉系幹細胞、例えば骨髄由来間葉系幹細胞を含む。非胎盤細胞はまた、1種以上の型の成体細胞又は細胞株を含む。別の具体的実施態様において、該組成物は、抗増殖剤、例えば抗-MIP-1 α 抗体又は抗-MIP-1 β 抗体を含む。

【0295】

(5.9.1.4 胎盤細胞を含むマトリクス)

免疫抑制性の胎盤細胞、例えば胎盤幹細胞(例えばPDAC)の免疫抑制性の集団を含むマトリクス、ヒドロゲル、スキャフォールドなどが本明細書で更に提供される。

【0296】

本明細書に提供される胎盤細胞を、天然マトリクス、例えば、羊膜材料などの胎盤生体材料に播種することができる。そのような羊膜材料は、例えば、哺乳動物の胎盤から直接解剖された羊膜；固定又は熱処理された羊膜、実質的に乾燥している(すなわち、 $<20\%H_2O$)羊膜、絨毛膜、実質的に乾燥している絨毛膜、実質的に乾燥している羊膜と絨毛膜などであることができる。胎盤細胞を播種することができる好ましい胎盤生体材料は、Harririの米国特許出願公開第2004/0048796号に記載されている。

【0297】

本明細書に提供される胎盤細胞を、例えば、注射に好適なヒドロゲル溶液に懸濁することができる。そのような組成物のための好適なヒドロゲルは、RAD16などの自己集合ペプチドを含む。一実施態様において、該細胞を含むヒドロゲル溶液を、例えば、鑄型中で硬化させて、その中に分散した細胞を有する埋め込み用のマトリクスを形成させることができる。そのようなマトリクス中の胎盤細胞を、該細胞が埋め込み前に有糸分裂で拡大されるように培養することもできる。ヒドロゲルは、例えば、共有結合、イオン結合、又は水素結合によって架橋されて、3次元開放格子構造を作製する有機ポリマー(天然物又は合成物)であり、この3次元開放格子構造は、水分子を捕捉してゲルを形成する。ヒドロゲル形成材料としては、イオンによって架橋される、アルギネート及びその塩などの多糖類、ペプチド、ポリホスファジン、並びにポリアクリレート、又はそれぞれ、温度若しくはpHによって架橋される、ポリエチレンオキシド-ポリプロピレングリコールブロックコポリマーなどのブロックポリマーが挙げられる。いくつかの実施態様において、ヒドロゲル又はマトリクスは生体分解性である。

【0298】

いくつかの実施態様において、本製剤は、インサイチュで重合可能なゲルを含む(例えば、米国特許出願公開第2002/0022676号；Ansethらの文献(J. Control Release, 78(1-3): 199-209(2002))；Wangらの文献(Biomaterials, 24(22): 3969-80(2003))を参照されたい)。

【0299】

いくつかの実施態様において、該ポリマーは、荷電側基、又はその一価イオン塩を有する水、緩衝塩溶液、又は水性アルコール溶液などの水溶液に少なくとも一部溶ける。カチオンと反応させることができる酸性側基を有するポリマーの例は、ポリ(ホスファゼン)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(メタクリル酸)、アクリル酸とメタクリル酸のコポリマー、ポリ(酢酸ビニル)、及びスルホン化ポリスチレンなどのスルホン化ポリマーである。アクリル酸又はメタクリル酸とビニルエーテルモノマー又はビニルエーテルポリマーの反応によって形成される酸性側基を有するコポリマーを用いることもできる。酸性基の例は、カルボン酸基、スルホン酸基、ハロゲン化(好ましくは、フッ素化)アルコール基、フェノール性OH基、及び酸性OH基である。

【0300】

胎盤細胞又はそれらの共培養物を3次元フレームワーク又はスキャフォールドに播種し、インビボにおいて埋め込むことができる。そのようなフレームワークを、任意の1種以上の増殖因子、細胞、薬物、又は例えば、組織形成を刺激するかそうでなければ本明細書の別所記載の治療方法の実践を改善する他の成分と組合せて埋め込むことができる。

【0301】

本明細書に記載の治療方法に使用することができるスキャフォールドの例としては、不織マット、多孔性発泡体、又は自己集合ペプチドが挙げられる。不織マットは、グリコール酸と乳酸の吸収性合成コポリマー(例えば、PGA/PLA)(VICRYL, Ethicon社、ソマービル、NJ)から構成される繊維を用いて形成させることができる。フリーズドライ、又は凍結乾燥などのプロセスによって形成される、例えば、ポリ(ϵ -カプロラクトン)/ポリ(グリコール酸)(PCL/PGA)コポリマーから構成される発泡体(例えば、米国特許第6,355,699号

参照)をスキヤフォールドとして用いることもできる。

【0302】

別の実施態様において、該スキヤフォールドは、ナノ繊維のスキヤフォールド、例えば電気紡糸(electrospun)したナノ繊維スキヤフォールドであるか、又はこれを含む。より具体的実施態様において、該ナノ繊維スキヤフォールドは、ポリ(L-乳酸)(PLLA)、I型コラーゲン、フッ化ビニリデンとトリフルオロエチルニーのコポリマー(PVDF-TrFE)、ポリ(-カプロラクトン)、ポリ(L-ラクチド-コ-ε-カプロラクトン)[P(LLA-CL)](例えば75:25)、及び／又はポリ(3-ヒドロキシブチラート-コ-3-ヒドロキシバレレート)(PHBV)とI型コラーゲンのコポリマーを含む。別のより具体的実施態様において、該スキヤフォールドは、胎盤細胞の軟骨細胞への分化を促進する。ナノ繊維スキヤフォールド、例えば電気紡糸したナノ繊維スキヤフォールドの作製方法は、当該技術分野において公知である。例えば、Xuらの文献、Tissue Engineering 10(7):1160-1168 (2004)；Xuらの文献、Biomaterials 25:877-886 (2004)；Mengらの文献、J. Biomaterials Sci., Polymer Edition 18(1):81-94 (2007)を参照されたい。

10

【0303】

本明細書記載の胎盤細胞、例えば免疫抑制性の胎盤細胞はまた、生理的に許容し得るセラミック材料に播種するか、又はそれと接触させることもでき、該セラミック材料としては、限定するものではないが、モノリン酸カルシウム、ジリン酸カルシウム、トリリン酸カルシウム、α-トリリン酸カルシウム、β-トリリン酸カルシウム、及びテトラリン酸カルシウム、ヒドロキシアパタイト、フルオロアパタイト、硫酸カルシウム、フッ化カルシウム、酸化カルシウム、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムマグネシウム、BIOGLASS(登録商標)などの生体活性ガラス、並びにそれらの混合物が挙げられる。現在市販されている多孔性の生体適合性セラミック材料としては、SURGIBONE(登録商標)(CanMedica社、カナダ)、ENDOBN(登録商標)(Merck Biomaterial France社、フランス)、CEROS(登録商標)(Mathys, AG社、ベトラッハ、スイス)、並びにHEALOS(商標)(DePuy社、レイハム、MA)、及びVITOSS(登録商標)、RHAKOSS(商標)、及びCORTOSS(登録商標)(Orthovita社、マルバーン、PA)などの石灰化コラーゲンの骨移植用製品が挙げられる。フレームワークは、天然材料及び／又は合成材料の混合物、ブレンド、又は複合物であることができる。

20

【0304】

別の実施態様において、胎盤細胞は、例えば、PGA、PLA、PCLコポリマー若しくはブレンド、又はヒアルロン酸などの生体吸収性材料で製造されたマルチフィラメント糸で複合される得るフェルトに播種するか、又はそれと接触させることもできる。

30

【0305】

本明細書記載の胎盤細胞を、別の実施態様において、複合構造物であり得る発泡体スキヤフォールドに播種することができる。そのような発泡体スキヤフォールドを、有用な形状、例えば、修復、置換、又は強化すべき体内の特定の構造物の一部の形状に成形することができる。いくつかの実施態様において、フレームワークを、例えば、0.1M酢酸で処理し、その後、細胞接着を強化するために、免疫抑制性の胎盤細胞の接種前に、ポリリジン、PBS、及び／又はコラーゲン中でインキュベートする。例えば、マトリクスのプラズマコーティング、又は1種以上のタンパク質(例えば、コラーゲン、弾性繊維、細網繊維)、糖タンパク質、グリコサミノグリカン(例えば、ヘパリン硫酸、コンドロイチン-4-硫酸、コンドロイチン-6-硫酸、デルマタン硫酸、ケラチン硫酸など)、細胞マトリクス、並びに／若しくは限定するものではないが、ゼラチン、アルギネート、寒天、アガロース、及び植物ゴムなどのような他の材料の添加によって、マトリクスの外部表面を修飾し、細胞の接着又は成長、及び組織の分化を改善することができる。

40

【0306】

いくつかの実施態様において、スキヤフォールドは、それを非血栓形成性にする材料を含むか、又は該材料で処理される。これらの処理及び材料は、内皮成長、移動、及び細胞外マトリクス沈着を促進し、且つ持続させることもできる。これらの材料及び処理の例としては、天然材料、例えば、ラミニン及びIV型コラーゲンなどの基底膜タンパク質、合成

50

材料、例えば、EPTFE、並びにセグメント化ポリウレタン尿素シリコーン、例えば、PURSPAN(商標)(The Polymer Technology Group社、パークレー、CA)が挙げられるが、これらに限定されない。スキャフォールドは、ヘパリンなどの抗血栓剤を含むこともでき；胎盤細胞の播種の前に、スキャフォールドを、表面電荷を変化させるように処理する(例えば、プラズマでコーティングする)こともできる。

【0307】

(5.9.2 遺伝子改変された胎盤細胞)

別の態様において、例えば関心対象の核酸又はポリペプチドを生成するように、遺伝子改変された胎盤細胞が、本明細書に提供される。遺伝子改変は、例えば、限定するものではないが、例えば、パピローマウイルスベクター、SV40ベクター、アデノウイルスベクターなどの非組込み複製ベクター；例えば、レトロウイルスベクター又はアデノ随伴ウイルスベクターなどの組込みウイルスベクター；又は、複製欠損ウイルスベクターを含む、ウイルス-ベースのベクターを用い、達成することができる。DNAを細胞へ導入する他の方法は、リポソームの使用、エレクトロポレーション、粒子銃、直接DNA注入などを含む。

【0308】

幹細胞は、例えば、プロモーター配列若しくはエンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位、配列内リポソーム進入部位などの、1以上の好適な発現制御エレメントにより制御された又はそれとの機能的に関連して制御されたDNAにより形質転換又はトランスフェクトされ得る。そのようなDNAは、選択マーカーを組込んでいることが好ましい。外来DNAの導入後、操作された幹細胞を、例えば、強化培地において成長させ、その後選択培地に交換することができる。一実施態様において、胎盤細胞を操作するために使用したDNAは、例えば、サイトカイン、増殖因子、分化物質、又は治療的ポリペプチドなどの、関心対象のポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む。

【0309】

該幹細胞を操作するために使用するDNAは、例えばヒト細胞などの哺乳動物細胞におけるヌクレオチド配列の発現を駆動するために、当該技術分野において公知の任意のプロモーターを含むことができる。例えばプロモーターとしては、CMVプロモーター/エンハンサー、SV40プロモーター、パピローマウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルスプロモーター、エラスチン遺伝子プロモーターなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。具体的実施態様において、該プロモーターは、該ヌクレオチド配列が、望ましい時のみに発現されるように、調節可能である。プロモーターは、誘導性(例えば、メタロチオネイン及びヒートショックタンパク質に関連したもの)又は構成性のいずれかであることができる。

【0310】

別の具体的実施態様において、プロモーターは、組織-特異的であるか、又は組織特異性を示す。そのようなプロモーターの例としては、ミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域(Readheadらの文献、1987, Cell 48:703)(乏突起膠細胞)；エラスターゼI遺伝子制御領域(Switらの文献、1984, Cell 38:639；Ornitzらの文献、1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399；MacDonaldの文献、1987, Hepatology 7:425)(膵臓の腺房細胞)；インスリン遺伝子制御領域(Hanahanの文献、1985, Nature 315:115)(膵臓のβ細胞)；ミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域(Shaniの文献、1985, Nature 314:283)(骨格筋)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0311】

胎盤細胞は、1種以上の遺伝子を「ノックアウト」又は「ノックダウン」発現するように操作してよい。細胞に本来備わる遺伝子の発現は、例えば、相同組換えなどによる完全な遺伝子の失活による、発現の阻害により、低下することができる。一実施態様において、例えば、タンパク質の重要な領域をコードしているエキソン、又はその領域に対するエキソン5'は、例えば、正常なmRNAの標的遺伝子からの生成を妨害し且つ該遺伝子の失活を生じるneoなどの、陽性選択マーカーにより妨害される。遺伝子はまた、遺伝子の部分の欠失を作製することによるか、又は全遺伝子を欠失することにより、失活することもでき

る。該ゲノム内で遠く離れた標的遺伝子と相同な2つの領域を伴う構築体を用いることにより、これら2つの領域に介在する配列を欠失することができる(Mombaertsらの文献、1991, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 88:3084)。標的遺伝子の発現を阻害するアンチセンス、DNAzyme、低分子干渉RNA、及びリボザイム分子もまた、該幹細胞における標的遺伝子活性のレベルを低下するために使用することができる。例えば、主要組織適合性遺伝子複合体(HLA)の発現を阻害するアンチセンスRNA分子は、免疫反応に関して最も汎用性がある(versatile)ことが示されている。3本鎖分子を、標的遺伝子活性のレベルの低下に利用することができる。例えば、引用により本明細書中に組み込まれている、L. G. Davisら編集の文献、「分子生物学における基本的方法(BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY)」、第2版、1994年、Appleton & Lange社、ノーウォーク、CNを参照されたい。

10

【0312】

具体的実施態様において、胎盤細胞は、関心対象のポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む核酸分子により遺伝子改変することができ、ここで関心対象のポリペプチドの発現は、外因性因子、例えば、ポリペプチド、小型有機分子などにより制御可能である。そのようなポリペプチドは、治療用ポリペプチドであることができる。より具体的実施態様において、関心対象のポリペプチドは、IL-12又はインターロイキン-1受容体アンタゴニスト(IL-1Ra)である。別のより具体的実施態様において、関心対象のポリペプチドは、インターロイキン-1受容体アンタゴニストとジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)の融合物であり、且つ該外因性因子は、葉酸代謝拮抗物質、例えばメトトレキセートである。そのような構築体は、メトトレキセートとの接触時に、IL-1Ra、IL-1RaとDHFRの融合物を発現する胎盤細胞の操作において有用である。そのような構築体は、例えば、関節リウマチの治療において使用することができる。この実施態様において、IL-1RaとDHFRの融合物は、メトトレキセートなどの葉酸代謝拮抗物質への曝露時に、翻訳によりアップレギュレートされる。従って別の具体的実施態様において、胎盤細胞を遺伝子操作するために使用される核酸は、第一のポリペプチド及び第二のポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含むことができ、ここで該第一及び第二のポリペプチドは、外因性因子の存在下で翻訳によりアップレギュレートされる融合タンパク質として発現される。該ポリペプチドは、一時的に又は長期に(例えば、数週間又は数ヶ月にわたり)発現されることができる。

20

【0313】

そのような核酸分子は更に、操作された幹細胞の陽性選択を可能にするか、又は操作された幹細胞の可視化を可能にするポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む。別のより具体的実施態様において、該ヌクレオチド配列は、例えば適切な可視化条件下で蛍光を発するポリペプチド、例えば、ルシフェラーゼ(Luc)をコードしている。より具体的実施態様において、そのような核酸分子は、IL-1Ra-DHFR-IRES-Lucを含むことができ、ここでIRESは配列内リボソーム進入部位である。

30

【0314】

(5.9.3. 不死化胎盤細胞株)

成長促進タンパク質の産生及び／又は活性が外部因子によって調節可能であるように、哺乳動物の胎盤細胞を、成長促進遺伝子、すなわち、適切な条件下で、トランスフェクトされた細胞の成長を促進するタンパク質をコードする遺伝子を含む任意の好適なベクターによるトランスフェクションによって、条件付きで不死化することができる。好ましい実施態様において、成長促進遺伝子は、限定するものではないが、v-myc、N-myc、c-myc、p53、SV40ラージT抗原、ポリオーマラージT抗原、Elaアデノウイルス、又はヒトパピローマウイルスのE7タンパク質などのオンコジーンである。

40

【0315】

成長促進タンパク質の外部調節は、外部調節可能なプロモーター、例えば、その活性を、例えば、トランスフェクトされた細胞の温度又は該細胞と接触する培地の組成を変更することによって制御することができるプロモーターの制御下に成長促進遺伝子を配置することによって達成することができる。一実施態様において、テトラサイクリン(tet)制御

50

遺伝子発現系を利用することができる(Gossenらの文献(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 5547-5551, 1992) ; Hoshimaruらの文献(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 1518-1523, 1996)を参照されたい)。tetの非存在下で、このベクター中のtet制御性トランス活性化因子(tTA)は、tetオペレーター配列に融合したヒトサイトメガロウイルス由来の最小プロモーターである $ph_{CMV^{*}-1}$ からの転写を強く活性化する。tTAは、大腸菌のトランスポゾン-10由来のtet耐性オペロンのリプレッサー(tetR)と単純ヘルペスウイルスのVP16の酸性ドメインの融合タンパク質である。tetの低い、非毒性濃度(例えば、0.01~1.0 $\mu\text{g/mL}$)は、tTAによるトランス活性化をほぼ完全に消失させる。

【0316】

一実施態様において、ベクターは、選択マーカー、例えば、薬物耐性を付与するタンパク質をコードする遺伝子を更に含む。細菌のネオマイシン耐性遺伝子(neo^R)は、本明細書記載の方法において利用し得るそのようなマーカーの1つである。neo^Rを有する細胞は、成長培地への、例えば、100~200 $\mu\text{g/mL}$ のG418の添加などの、当業者に公知の手段によって選択することができる。

【0317】

トランスフェクションは、限定するものではないが、レトロウイルス感染を含む、当業者に公知の種々の手段のいずれかによって達成することができる。一般に、細胞培養物を、ベクターのプロデューサー細胞株から回収される馴化培地とN2補給剤含有DMEM/F12の混合物とのインキュベーションによってトランスフェクトすることができる。例えば、上記のように調製された胎盤細胞培養物を、例えば、5日後にインビトロで、1容量の馴化培地と2容量のN2補充剤含有DMEM/F12中での約20時間のインキュベーションによって感染させることができる。その後、選択マーカーを有するトランスフェクトされた細胞を、上記のように選択することができる。

【0318】

トランスフェクション後、培養物を、増殖を可能にする、例えば、24時間の間に細胞の少なくとも約30%を倍加させる表面上で継代する。好ましくは、該基材は、ポリオルニチン(10 $\mu\text{g/mL}$)及び／若しくはラミニン(10 $\mu\text{g/mL}$)でコーティングされた組織培養プラスチックからなるポリオルニチン／ラミニン基材、ポリリジン／ラミニン基材、又はフィブロネクチンで処理された表面である。その後、培養物に、3~4日ごとに成長培地を供給し、この成長培地には、1種以上の増殖増強因子が補充されていてもよいし、補充されていなくてもよい。増殖増強因子は、培養物が50%未満のコンフルエントである場合に、成長培地に添加してもよい。

【0319】

80~95%コンフルエントになったとき、条件的に不死化された胎盤細胞株を、標準的な技術を用いて、例えば、トリプシン処理によって継代することができる。約20回目の継代までは、いくつかの実施態様において、選択(例えば、ネオマイシン耐性遺伝子を含む細胞の場合、G418の添加による)を維持することが有益である。細胞は、長期保存のために液体窒素で凍結することもできる。

【0320】

クローン細胞株を、上記のように調製された条件的に不死化されたヒト胎盤細胞株から単離することができる。一般に、そのようなクローン細胞株を、標準的な技術を用いて、例えば、限定希釈によるか、又はクローニングリングを用いて単離し、拡大することができる。一般に、クローン細胞株に、上記のように栄養を与え、それを継代することができる。

【0321】

クローンであってもよいが、その必要はない、条件的に不死化されたヒト胎盤細胞株は、一般に、分化を促進する培養条件下で成長促進タンパク質の産生及び／又は活性を抑制することによって、分化するように誘導することができる。例えば、成長促進タンパク質をコードする遺伝子が外部調節可能なプロモーターの制御下にある場合、条件、例えば、培地の温度又は組成を変更して、成長促進遺伝子の転写を抑制することができる。上で論

10

20

30

40

50

じられているテトラサイクリンで制御される遺伝子発現系については、成長促進遺伝子の転写を抑制するためのテトラサイクリンの添加によって、分化を達成することができる。一般に、分化を開始するのに、4～5日間の1 μ g/mLのテトラサイクリンで十分である。更なる分化を促進するために、追加の薬剤を成長培地を含めてもよい。

【0322】

(5.9.4 アッセイ)

胎盤細胞を、幹細胞増殖、拡大及び／又は分化に対する、培養条件、環境因子、分子(例えば生体分子、小型無機分子など)などの影響を、そのような条件に曝されていない胎盤細胞と比べ、決定するアッセイにおいて使用することができる。

【0323】

一実施態様において、胎盤細胞は、分子と接触された際の増殖、拡大又は分化の変化についてアッセイすることができる。一実施態様において、例えば、該複数の幹細胞を、増殖を可能にする条件下で、該化合物と接触させることを含む、複数の胎盤細胞の増殖を調節する化合物を同定する方法が、本明細書に提供され、ここで該化合物は、該化合物と接触していない複数の幹細胞と比べ、該複数の幹細胞の増殖の検出可能な変化を引き起こす場合、該化合物は、胎盤細胞の増殖を調節する化合物として同定される。具体的実施態様において、該化合物は、増殖の阻害剤として同定される。別の具体的実施態様において、該化合物は、増殖のエンハンサーとして同定される。

【0324】

別の実施態様において、該複数の幹細胞を、拡大を可能にする条件下で、該化合物と接触させることを含む、複数の胎盤細胞の拡大を調節する化合物を同定することができ、ここで該化合物が、該化合物と接触していない複数の幹細胞と比べ、該複数の幹細胞の拡大の検出可能な変化を引き起こす場合、該化合物は、胎盤細胞の拡大を調節する化合物として同定される。具体的実施態様において、該化合物は、拡大の阻害剤として同定される。別の具体的実施態様において、該化合物は、拡大のエンハンサーとして同定される。

【0325】

別の実施態様において、胎盤細胞の分化を調節する化合物は、該幹細胞を、分化を可能にする条件下で、該化合物と接触させることを含む方法により同定することができ、ここで該化合物が、該化合物と接触していない幹細胞と比べ、該幹細胞の分化の検出可能な変化を引き起こす場合、該化合物は、胎盤細胞の増殖を調節する化合物として同定される。具体的実施態様において、該化合物は、分化の阻害剤として同定される。別の具体的実施態様において、該化合物は、分化のエンハンサーとして同定される。

【0326】

(5.9.5 胎盤細胞バンク)

分娩後の胎盤由来の幹細胞を、多くの異なる方法で培養して、胎盤細胞のロットの組、例えば、胎盤細胞の個別投与可能な投与量の組を生ることができる。そのようなロットは、例えば、胎盤灌流液由来の幹細胞又は酵素的消化した胎盤組織由来の幹細胞から得ることができる。複数の胎盤から得られた胎盤細胞のロットの組を、例えば、長期保存用の胎盤細胞のバンクに準備しておくことができる。一般に、接着性幹細胞を胎盤材料の初期培養物から得て、シード培養物を形成させ、これを制御された条件下で拡大して、ほぼ同等数の倍加から細胞の集団を形成させる。ロットは、単一の胎盤の組織に由来することが好ましいが、複数の胎盤の組織に由来することもできる。

【0327】

一実施態様において、幹細胞ロットは、次のように得られる。胎盤組織をまず、例えば、細かく刻むことによって破壊し、好適な酵素、例えばコラゲナーゼで消化する(上の第5.3.3節を参照されたい)。胎盤組織は、例えば、単一の胎盤由来の羊膜全体、絨毛膜全体、又は両方を含むことが好ましいが、羊膜又は絨毛膜のいずれかの一部のみを含むことができる。消化した組織を、例えば、約1～3週間、好ましくは、約2週間培養する。接着していない細胞を除去した後、形成される高密度コロニーを、例えば、トリプシン処理によって回収する。これらの細胞を回収し、好都合な容量の培養培地に再懸濁し、その後、そ

れを用いて、拡大培養物を播種する。拡大培養物は、個別の細胞培養装置、例えば、NUNC (商標)製のCell Factoryに配置されたものであることができる。拡大培養物を、例えば、 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、 1×10^4 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、又は 10×10^4 個幹細胞/cm²で播種するために、細胞を任意の程度に細分することができる。好ましくは、約 1×10^3 ～約 1×10^4 個細胞/cm²を用いて、各々の拡大培養物を播種する。拡大培養物の数は、該幹細胞が得られる特定の胎盤によって、数がより多いことも、より少ないこともあり得る。

【0328】

培養下の細胞の密度が、一定の値、例えば、約 1×10^5 個細胞/cm²に達するまで、拡大培養物を成長させる。細胞をこの時点で回収して凍結保存するか、又は上記のような新しい拡大培養物へと継代することができる。使用前に、細胞を、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20回継代することができる。拡大培養中、集団倍加の累積数の記録を保持することが好ましい。培養物由来の細胞は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、若しくは40回の倍加、又は最大60回の倍加の間、拡大することができる。しかしながら、細胞集団を個々の投与量に分割する前の集団倍加の数は、約15～約30回であることが好ましい。細胞は、拡大過程を通して連続的に培養することができるか、又は拡大の間の1以上の時点で凍結させることができる。

【0329】

個々の投与量のために使用すべき細胞は、凍結させる、例えば、後の使用のために凍結保存することができる。個々の投与量は、例えば、1ml当たり約1,000,000～約50,000,000個の細胞を含むことができ、且つ全体で約 10^6 ～約 10^{10} 個の細胞を含むことができる。

【0330】

一実施態様において、それゆえ、胎盤幹細胞バンクは、第一の複数の集団倍加の間、ヒトの分娩後の胎盤から初代培養胎盤幹細胞を拡大し；該胎盤幹細胞を凍結保存して、マスター細胞バンクを形成させ；第二の複数の集団倍加の間、該マスター細胞バンクから複数の胎盤幹細胞を拡大し；該胎盤幹細胞を凍結保存して、ワーキング細胞バンクを形成させ；第三の複数の集団倍加の間、該ワーキング細胞バンクから複数の胎盤幹細胞を拡大し；且つ該胎盤幹細胞を個々の投与量で凍結保存すること；を含む方法によって作製することができ、ここで、該個々の投与量は、胎盤幹細胞バンクを集合的に構成する。任意に、該第三の複数の集団倍加からの複数の胎盤細胞を、第四の複数の集団倍加の間、拡大して、個々の投与量で凍結保存することができ、ここで、該個々の投与量は、胎盤幹細胞バンクを集合的に構成する。

【0331】

一実施態様において、該細胞は、Plasmalyte中の10%ヒト血清アルブミン(HSA)、10%DMSOにおいて、約2,000,000/mlに希釈される。

【0332】

好ましい実施態様において、胎盤が得られるドナー(例えば、母親)を少なくとも1つの病原体について検査する。母親が、検査した病原体について陽性反応を示す場合、該胎盤由来の全ロットを廃棄する。そのような検査は、0代細胞の確立の前又は後を含む、胎盤細胞ロットの産生中いつでも実施することができる。その存在を検査する病原体としては、限定するものではないが、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎、ヒト免疫不全ウイルス(I型及びII型)、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルスなどを挙げることができる。

【実施例】

【0333】

(6. 実施例)

(6.1 実施例1：胎盤細胞を使用する免疫調節)

胎盤細胞、例えば胎盤幹細胞(PDAC)は、T細胞及びナチュラルキラー細胞の増殖の抑制

を含む、免疫調節作用を有する。下記の実験は、胎盤細胞(CD10⁺、CD34⁻、CD105⁺、CD200⁺胎盤幹細胞)は、刺激に対するT細胞の反応を調節する能力を有することを明らかにしている。

【0334】

(6.1.1 IFN- γ 誘導性可溶性機構により媒介されたT細胞増殖のPDAC抑制)

PDACがT細胞増殖を抑制するかどうか、及びそのような抑制が、細胞と細胞の接触又は可溶性因子が媒介した機構により媒介されるかどうかに対処するために、BTR(抗-CD3、抗-CD28-コートされたDynabeadにより刺激されたT細胞)、及びPDAC又はIFN- γ の500若しくは100ユニット/mLで24時間前処理されたPDACのいずれかの共培養物を、細胞と細胞の接触を可能にする共培養、又はトランスウェルシステムにT細胞：PDACの比10：1で設定した。

10

【0335】

ビーズT-リンパ球反応(BTR)を、96-ウェルプレートのウェル内で、20,000個のPDACの存在又は非存在下で、100,000個のT-リンパ球を、抗-CD3及び抗-CD28コートされたDynaBeads(Invitrogen社)と、ビーズ：T-リンパ球の比1:3で混合することにより、実行した。この混合した細胞培養物を、37℃、5%CO₂、及び相対湿度90%で、6日間インキュベートした。6日目に、全ての細胞を回収し、抗-CD4-PE及び抗-CD8 APC(R&D Systems社、ミネアポリス、MN)により染色した。

【0336】

PDACによるBTRの抑制は、細胞-細胞接触条件及びトランスウェル条件の両方で認められ、これは抑制は、可溶性因子により少なくとも一部媒介されることを指摘している。PDACのIFN- γ による前処理は、BTRのPDAC-媒介性抑制を強力に増強した。IFN- γ 誘導性機構を介したPDACによるT細胞増殖の抑制を更に確認するために、抗-IFN- γ 中和抗体を、PDACとAbTRの共培養物(可溶性抗-CD3及び抗-CD28により刺激されたPBMC)へ、2、8、16又は32 μ g/mlで導入した。抗-IFN- γ 抗体は、投与量依存的様式で、T細胞増殖をPDAC-媒介性抑制からレスキューし、ED50は、 $\sim$ 2 μ g/mlであった。従って、活性化されたT細胞増殖のPDAC免疫抑制は、IFN- γ により媒介される。

20

【0337】

(6.1.2 PDACが誘導したT_{REG}細胞)

本実施例は、胎盤細胞(PDAC)は、T細胞の、他のT細胞の活性をダウンレギュレートすることができるT_{reg}細胞(サプレッサーT細胞としても公知)への分化を誘導する能力を有することを明らかにしている。

30

【0338】

ナイーブCD4⁺T細胞は、局所的サイトカイン環境(milieu)に従い、Th1、Th2、Th17及び調節性(T_{reg})表現型へ分化するよう誘導することができる。T_{reg}細胞は、自己抗原に対する免疫寛容を制御する。Th17又はTh1表現型に向かう反応、及びTreg表現型から離れる反応のスキューは、特定の自己免疫疾患及び／又は移植片対宿主疾患(GVHD)の発生及び／又は進行が原因である。

【0339】

誘導されたT_{reg}細胞は、表現型FoxP3⁺(Forkhead box P3⁺)を有する。従ってT_{reg}細胞におけるFoxP3の発現に対するPDACの作用を調べた。末梢血細胞(PBMC)単独、PBMC+PDACの比1:1000、又はPBMCを、インターロイキン-2(IL-2; 300IU/mL)及びIL-15(125IU/mL)の存在下で、4日間培養した。その後PBMCの試料を、CD25及びFoxP3について免疫染色した。各条件におけるPBMC由来のCD4⁺T細胞を、抗-CD4抗体でコートしたマイクロビーズを用いて、単離した。単離されたT細胞を、マイトマイシンCの10 μ g/mLにより、37℃で2時間処理し、新たに単離されたT細胞の増殖に対するそれらの作用を、比1:1、1:10及び1:100で試験した。PDACと共培養したPBMCは、FoxP3⁺表現型を示すCD4⁺細胞をより高い割合で示し、このことはより多数のT_{reg}細胞を指摘している。

40

【0340】

結論：PBMCと共培養したPDACは、T細胞を、Treg表現型を有する細胞へ分化するように誘導し、そのような細胞は、T細胞増殖を抑制する能力を有する。

50

【0341】

(6.1.3 インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)を介したT細胞増殖のPDAC媒介性抑制)

本実験は、PDAC T細胞免疫抑制が、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)活性により媒介されることを明らかにしている。

【0342】

先に確立されたように、PDACは、T細胞と共培養された場合に、T細胞増殖を抑制する。T細胞増殖のPDAC-媒介性抑制の作用機構を調べるために、インビトロT細胞増殖アッセイ(BTR)において、薬理的阻害物質又は中和抗体を使用し、プロスタグランジンE2(PGE2)、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β)、インターロイキン-10(IL-10)及びIDOの活性をブロックした。PGE2、iNOS、TGF- β 及びIL-10活性のブロックにより、T細胞増殖の回復は認められなかった。しかしT細胞増殖アッセイへのID

10

O阻害剤1MT(1-メチルトリプトファン)の16、64、128及び256 μ Mの添加により、投与量依存的様式で、T細胞増殖の回復が認められた。

【0343】

トリプトファンは、T細胞増殖に必須である。インビトロにおけるT細胞増殖のPDAC-媒介性抑制がIDOにより媒介されることを確認するために、1MTの16、64、128及び256 μ M、及び過剰なL-トリプトファン(trptophan)(L-Trp)を、T細胞増殖アッセイに導入した。1MTの256 μ M及びL-Trpの256 μ Mは、投与量依存的様式で、T細胞増殖をPDAC-媒介性抑制から実質的にレスキューした。

20

【0344】

別の実験において、IDOの低分子干渉RNA(siRNA)又は対照siRNAを、PDACにトランスフェクションし、IDOの発現を低下した。IDO siRNAではトランスフェクションされたが、対照siRNAではされなかったPDACは、BTRアッセイにおいてT細胞増殖の抑制を実質的に無効にした。これらの結果は、T細胞増殖のPDAC抑制がIDOにより媒介されることを確認した。

【0345】

(6.1.4 PDAC媒介性免疫抑制に必要なL-システム)

L-システム輸送体は、中性の分岐したアミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン)及び芳香族アミノ酸(トリプトファン、チロシン)を優先的に輸送するヘテロ二量体膜輸送タンパク質である。L-システム輸送体はIDO基質トリプトファンを細胞膜を超えて輸送するので、L-システムは、PDAC-媒介性免疫抑制に必要であると仮定された。L-システム軽鎖(LAT1)に特異的なsiRNAをPDACヘトランスフェクトし、且つ該PDACを、増殖アッセイにおいてT細胞と共培養した。LAT1に特異的なsiRNAは、PDAC存在下で、T細胞増殖を回復したが、対照siRNAは回復しなかった。この結果は、L-システムはPDAC媒介性免疫抑制に必要であることを示唆している。

30

【0346】

(6.1.5 T細胞分化及びサイトカイン分泌に対するPDACの作用)

この実施例は、胎盤幹細胞(PDAC)は、T細胞分化を、Th1及びTh17サブセットから離れ、且つT_{reg}サブセットに向かってスキューすることを明らかにしている。

【0347】

T細胞コンパートメントにおけるスキューに影響を及ぼすPDACの能力を、PDACを含むPMLRにおけるサイトカイン分泌を測定することにより試験した。Th1サブセットのマーカーであるIFN- γ の生成は、MLRにおいてPDACと共培養されたT細胞において、MLRにおいてT細胞単独と、又はT細胞単独で培養されたものと比べ、減少した(50%)。この結果は、PMLRにおけるT細胞増殖の抑制と一致した。別の実験において、PMLR中のPDACの存在はまた、Th17細胞(IL-17-発現細胞)の割合を、T細胞の10.44%から4.68%まで低下し、且つT_{reg}細胞の割合を8.34%から12.65%まで増加した。

40

【0348】

Th1スキューのPDAC-媒介性抑制の作用の分子機構を調べるために、IDO siRNAを、標準技術によりPDACヘ一過性にトランスフェクトした。Th1スキューは、BTR反応(上記参照)の

50

ように実行したが、IL-2(200IU/mL)、IL-12(2ng/mL)及び抗-IL-4(0.4 µg/ml)を含む追加のTh1スキューするサイトカインカクテルを補充した。IDO siRNAトランスフェクションは、Th1スキューのPDAC-媒介性抑制を完全にレスキューした。確認のため、IDO阻害物質1MT、及び過剰なトリプトファンも、PDACにより抑制されたTh1スキューを完全にレスキューした。

【0349】

PDACによるTh17スキューの抑制は、可溶性因子により媒介されるかどうかを決定するために、PDAC及びIL-1βで処理したPDAC由来の馴化培地を、PDAC培養の1、2及び3日目に回収し、T細胞が通常Th17サブセットへ分化する条件下で、T細胞培養物に添加した。Th17分極(polarization)(スキュー)に関して、 5×10^5 個の総T-リンパ球を、 5×10^5 個の選別したCD14⁺単球、50ng/mL抗-CD3抗体(BD BioSciences社)、及び100ng/mL LPS(Sigma Aldrich社)により、50,000個のPDACの存在又は非存在下のいずれかで、6日間刺激した。Th17細胞集団を、CD4陽性集団に対するIL-17のICCS染色により分析した。

【0350】

PDAC馴化培地は、Th17スキューを抑制し、且つIL-1β処置の追加は、この抑制作用を増強した。従って、Th17スキューのPDAC-媒介性抑制は、可溶性因子により媒介され、且つIL-1β処置はこの作用を増強する。

【0351】

IL-10生成T細胞表現型のPDAC-媒介性誘導は、ナイーブT細胞Th1/Th2系統のコミットメントのスキューに関連していない。PDAC共培養物に対する反応におけるT細胞サイトカイン分泌に対する観察された作用に関する調節の様式を規定するために、IL-10及びTNF mRNAの量的PCR(qPCR)分析を、PDAC/BTR共培養物から選別されたCD4及びCD8 T細胞に関するFACSにより行った。PDACと共培養されたT細胞におけるIL-10 mRNAの強力な再現可能な転写誘導が認められた。

【0352】

認められたIL-10の転写調節は、T細胞とのPDAC共培養物に反応した変更されたエフェクターT細胞分化パターンを指摘し、且つナイーブT細胞のTh1系列分化の特異的抑制、及び/又はTh2系列分化の誘導により説明することができる。この可能性に対処するために、非分極条件、更にはTh1-若しくはTh2-分極条件で培養され、選択されたナイーブCD4 T細胞におけるTh1/Th2分化パターンに対するPDACの作用を、モニタリングした。各々Th1及びTh2系列コミットメントの特異的転写マーカーである、T-bet(転写因子)及びGATA-3 mRNAの相対発現レベルを用い、PDACを含むか又は含まないBTR培養物から単離されたT細胞の分化を定量した。Th1又はTh2転写因子に対するPDAC共培養物の作用は、ニュートラル又は系列特異的培養条件のいずれかの下では、認められなかった。従って、PDACによるIL-10産生表現型の転写誘導は、Th1/Th2コミットメントのスキューにより媒介されず、これは調節性T細胞発生の個別の分子経路に対するPDACの作用と一致している。

【0353】

(6.1.6 マクロファージ/単球サイトカインプロファイルに対するPDAC作用)

およそ50%CD14⁺細胞を含むPBMCから得られた細胞の接着集団を、単離した。第二のCD14⁺細胞集団は、抗-CD14コートされたMACSビーズによる陽性選択により得た。マクロファージ及び単球サイトカイン分泌プロファイルに対するPDACの作用を調べるために、マクロファージ/単球を、LPSで12時間処理し、その後PDACと更に48時間共培養した。上清を収集し、且つサイトカイン及び増殖因子について25-plex Luminexアッセイにより分析した。PDACは、PBMC接着集団と共培養した場合、IL-1β、IL-8、ランテス(RANTES)及びTNF-αの産生を抑制し、且つトリポ多糖体(LPS)-処理したPBMC接着細胞により、インターロイキン-1受容体アゴニスト(IL-1Ra)の産生を増強した。マクロファージとPDACの共培養物は、TNF-αの抑制、更にはIL-10の誘導においてPDAC細胞を投与量依存的反応で産生することが認められた。IL-10反応の大きさは、マクロファージドナーによりより変動した。

【0354】

(6.1.7 樹状細胞成熟及び機能に対する胎盤幹細胞の作用)

樹状細胞(DC)の成熟及び機能のPDAC-媒介性調節を調べるために、単球由来の未熟DCを、LPS単独又はLPSとIFN- γ の組合せで処理し、PDACの存在又は非存在下でDC成熟プロセスを駆動した。DC成熟は、DC成熟マーカーCD83、CD86及びHLA-DRのFACS染色により分析した。DC機能評価は、IL-12の細胞内染色により、及びCytometric Beadアッセイ(BD Pharmingen社)による可溶性サイトカイン産生の測定により、決定した。DC上のCD86、HLA DR及びCD83発現のダウンモジュレーションにより示されるように、PDACは、LPS-及びLPS+IFN- γ -誘導したDC成熟を強力に抑制することがわかった。

【0355】

加えて、PDACは、LPS+IFN- γ -刺激したIL-12-産生DC集団の形成をおよそ50%、有意に抑制した。同様にPDACは、TNF- α 産生を抑制した。PDACがT細胞由来のIL-10産生を増加した先の結果とは異なり、PDACは、樹状細胞由来のIL-10産生を上昇しなかった。

10

【0356】

(6.1.8. 単球によりLPS誘導したIL-23産生を抑制し且つ可溶性因子により媒介されるPDAC)

PDACは、IL-23産生を調節するかどうかを調べるために、1,000,000個のヒトPBMCを、PDACの200~100,000個細胞/ウェルの存在又は非存在下で、LPS 10ng/mlで24時間刺激した。IL-23は、ELISAにより決定した。PDACは、投与量依存的様式で、PBMCによるIL-23産生を強力に抑制した。実質的に完全な抑制(>90%)が、20,000個以上のPDAC細胞数で認められた。およそ50%のIL-23産生の抑制が、200個細胞/ウェルという最も低いPDAC細胞投与量で達成された。

20

【0357】

対照的に、PDACは、LPS-活性化された単球由来の樹状細胞によるIL-23産生は抑制しなかった。IL-23産生がどのPBMC細胞型で調節されるかを決定するために、CD14単球画分及びCD11c DC画分を、ヒトPBMCから単離した。各画分を、培養物中PDACの存在又は非存在下のいずれかで、LPSの10ng/mlにより24時間処理した。PDACは、単球により、LPS-活性化されたIL-23産生を特異的にダウンモジュレーションすることが認められたが、DCによっては認められなかった。

【0358】

PBMC IL-23産生のPDAC-媒介性ダウンモジュレーションの作用機構を理解するために、馴化培地をPDAC、PDAC+IFN- γ (100U/ml)、及びPDAC+IL-1 β (10ng/ml)の培養物から回収した。これらの馴化培地を、LPS-処理したPBMCの培養物に一晩、様々な濃度で添加した。PDAC-馴化培地は、LPS-活性化されたPBMCにより投与量依存的様式で、IL-23産生を強力に抑制することが認められた。更に、IL-1 β -処理したPDAC由来の馴化培地は、PDAC単独で馴化された培地と比べ、投与量依存的様式でより強力な抑制を示した。対照的に、IFN- γ 処理したPDACは、LPS-活性化されたPBMCによるIL-23産生を抑制しなかった。この結果は、LPS活性化されたPBMCによるIL-23産生のPDAC-媒介性抑制は、未同定の可溶性因子により媒介されることを示唆している。

30

【0359】

(6.1.9 Th17スキュー培地におけるIL-21産生を抑制するPDAC)

IL-21は、Th17集団の維持に必要な重要なサイトカインである。PDACはIL-21産生を調節することができるかどうかを調べるために、PDACを、Th17スキュー培地に導入した。Th-17スキュー培養から得られた上清中の可溶性IL-21を、eBioscience社製ELISAキット(#88-7216)を製造業者のプロトコールに従って用い、測定した。PDACは、PDAC-Th17共培養物において、PDACを含まないTh17スキュー培養物と比べ、IL-21産生を強力に抑制することが認められた。この結果は、PDACはIL-21産生を抑制することができることを示している。

40

【0360】

(6.2 実施例2：胎盤由来接着細胞を使用する血管新生)

(6.2.1 PDACによる血管新生因子の分泌)

この実施例は、胎盤細胞(PDACとも呼ばれる、CD10⁺、CD34⁺、CD105⁺、CD200⁺胎盤幹細胞)による血管新生因子の分泌を示す。

50

【0361】

(6.2.1.1 胎盤由来接着細胞の血管新生能の評価のためのセクレトームプロファイリング)

マルチプレックスビーズアッセイ：継代数6の胎盤由来接着細胞を成長培地中に同じ細胞数でプレーティングし、馴化培地を48時間後に回収した。磁気ビーズに基づくマルチプレックスアッセイ(Bio-Plex Pro™、Bio-Rad社、CA)を用いて、細胞馴化培地中の複数の血管新生サイトカイン／増殖因子の同時定量解析を行なった。このアッセイは、血清、血漿、及び細胞／組織培養上清を含む多様なマトリクス中での血管新生性バイオマーカーの測定を可能にするものである。これらの96ウェルプレートフォーマットのビーズに基づくアッセイの原理は、捕捉サンドイッチイムノアッセイと類似している。所望の血管新生標的に対する抗体を、内部染色したビーズに共有結合させる。結合したビーズを、該血管新生標的を含む試料と反応させる。未結合タンパク質を除去するための一連の洗浄の後、異なるエピトープに特異的なビオチン化検出抗体を反応に加える。結果は、該血管新生標的周辺での抗体のサンドイッチの形成である。次に、ストレプトアビジン-PEを加えて、ビーズ表面のビオチン化検出抗体に結合させる。簡潔に述べると、マルチプレックスアッセイを製造業者の指示に従って行ない、馴化培地中のそれぞれの血管新生増殖因子の量を評価した。

10

【0362】

ELISA：細胞馴化培地中の単一の血管新生サイトカイン／増殖因子の定量解析を、R&D Systems社(ミネアポリス、MN)製の市販キットを用いて行なった。簡潔に述べると、ELISAアッセイを製造業者の指示に従って行ない、馴化培地中のそれぞれの血管新生増殖因子の量を評価した。

20

【0363】

PDACによる様々な血管新生タンパク質の分泌のレベルを図1に示す。

【表 1】

表1 血管新生マーカーのマルチプレックス及びELISAの結果

PDACマーカー	陽性	陰性	セクレトーム 分析ELISA、 マルチプレックス
ANG	X		X
EGF	X		X
ENA-78	X		X
FGF2	X		X
フォリスタチン	X		X
G-CSF	X		X
GRO	X		X
HGF	X		X
IL-6	X		X
IL-8	X		X
レプチン	X		X
MCP-1	X		X
MCP-3	X		X
PDGFB	X		X
PLGF	X		X
ランテス	X		X
TGFB1	X		X
トロンボポエチン	X		X
TIMP1	X		X
TIMP2	X		X
uPAR	X		X
VEGF	X		X
VEGFD	X		X

【0364】

別の実験において、PDACは、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、PECAM-1(CD31；血小板内皮細胞接着分子)、ラミニン、フィブロネクチン、MMP1、MMP7、MMP9、及びMMP10も分泌することが確認された。

【0365】

(6.2.2 PDACの機能特徴付け)

この実施例は、血管新生能及び分化能と関連する胎盤細胞(PDACとも呼ばれる、CD10⁺、CD34⁻、CD105⁺、CD200⁺胎盤幹細胞)の様々な特徴を明らかにしている。

【0366】

(6.2.2.1 PDACの血管新生能の評価のためのHUVEC管形成)

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を、継代数3以下で、EGM-2培地(Cambrex社、イーストラザフォード、NJ)中で3日間、継代培養し、約70%~80%のコンフルエンスで回収した。

HUVECを基本培地／抗生物質(DMEM／F12(Gibco社))で1回洗浄し、所望の濃度で同じ培地に再懸濁した。HUVECは、調製から1時間以内に用いた。ヒト胎盤コラーゲン(HPC)を10mM HCl(pH 2.25)中濃度1.5mg/mLとし、緩衝剤でpH7.2に中和し、使用するまで氷上に置いた。このHPCを4000個細胞/ μ Lの最終細胞濃度でHUVEC懸濁液と組合せた。得られたHUVEC／HPC懸濁液をすぐに、1ウェル当たり3 μ Lで96ウェルプレートにピペティングした(蒸発を避けるために、プレート周囲を、滅菌PBSで予め満たさなければならない。1条件当たりn=5)。コラーゲン重合を可能にするために、培地を添加せずに、HUVEC滴を37℃及び5%CO₂で75～90分間インキュベートした。「乾燥」インキュベーションの完了後、各ウェルを200 μ Lの馴化PDAC培地(n=2細胞株)又は対照培地(例えば、陰性対照としてのDMEM／F12、及び陽性対照としてのEGM-2)でゆっくりと満たし、且つ37℃及び5%CO₂で20時間インキュベートした。馴化培地は、継代数6のPDACを成長培地中で4～6時間インキュベートすることにより調製し；接着及び広がりした後、培地を24時間 DMEM／F12に交換した。インキュベーション後、HUVEC滴を乱さないで培地をウェルから除去し、ウェルをPBSで1回洗浄した。次に、HUVEC滴を10秒間固定し、Diff-Quik細胞染色キットを用いて1分間染色し、その後、滅菌水で3回すすいだ。染色された滴を風乾し、Zeiss SteReo Discovery V8顕微鏡を用いて各ウェルの画像を取得した。次に、これらの画像を、コンピュータソフトウェアパッケージImageJ及び／又はMatLabを用いて解析した。画像を、カラーから8ビットグレースケール画像に変換し、閾値を設定して白黒画像に変換した。次に、粒子解析機能を用いて画像を解析し、それにより、カウント(個々の粒子の数)、総面積、(個々の粒子の)平均サイズ、及びアッセイにおける内皮管形成の量に等しい面積率を含む、ピクセル密度データがもたらされた。

10

20

【0367】

管形成の誘導によって示されるように、馴化培地は、内皮細胞に対する血管新生効果を発揮した(図2を参照されたい)。

【0368】

(6.2.2.2 HUVEC遊走アッセイ)

この実験で、胎盤由来接着細胞の血管新生能が明らかにされた。HUVECをフィブロネクチン(FN)コーティングした12ウェルプレートで単層コンフルエンスになるまで成長させ、この単層を1mLプラスチックピペットチップで「傷付け」て、ウェルを横切る無細胞線を作った。この「傷付けられた」細胞を、3日間の成長の後にPDACから得られた無血清馴化培地(EBM2；Cambrex社)とともにインキュベートすることにより、HUVECの遊走を試験した。細胞を含まないEBM2培地を対照として用いた。15時間後に、無細胞領域内への細胞遊走を倒立顕微鏡を用いて記録した(n=3)。次に、これらの写真を、コンピュータソフトウェアパッケージImageJ及び／又はMatLabを用いて解析した。画像を、カラーから8ビットグレースケール画像に変換し、閾値を設定して白黒画像に変換した。次に、粒子解析機能を用いて画像を解析し、それにより、カウント(個々の粒子の数)、総面積、(個々の粒子の)平均サイズ、及びアッセイにおける内皮遊走の量に等しい面積率を含む、ピクセル密度データがもたらされた。細胞遊走の程度を、最初に記録した創傷線の大きさに対してスコア化し、結果を1x10⁶個細胞に対して規準化した。

30

【0369】

細胞遊走の誘導によって示されるように、胎盤由来接着細胞によって分泌された栄養因子は、内皮細胞に対する血管新生効果を発揮した(図3)。

40

【0370】

別の実験において、HUVECを24ウェルプレートの底で培養して、EGM2中で一晚定着させ、その後、EBM中で半日飢餓状態にした。同時に、培地で培養したPDACを解凍し、トランスウェル(8 μ M)中で一晚培養した。EC飢餓の後、馴化した無血清DMEMを、トランスウェルとともに、ECの上方に移して、一晚増殖させた。4つの複製物を各実験に含め、24時間後の増殖をPromega社のCell Titer Glo Assayで評価した。EBM-2培地を陰性対照として用い、EGM-2を陽性対照として用いた。エラーバーは、分析の反復(n=3)の標準偏差を表す。

【0371】

50

PDACによって分泌された栄養因子は、HUVECの増殖を示すHUVEC細胞数の増加をもたらした。図4を参照されたい。

【0372】

(6.2.2.3 胎盤由来接着細胞の血管新生能の評価のための管形成)

PDACを、VEGFを含まない成長培地か、又はVEGFを含むEGM2-MVかのどちらかの中で成長させて、この細胞の全般的な血管新生能、及びこの細胞の分化能に対するVEGFの作用を評価した。HUVECを、管形成の対照細胞として、EGM2-MV中で成長させた。これらの細胞を、それらが70~80%コンフルエンスに達するまで、それぞれの培地中で4~7日間培養した。冷たい(4℃)MATRIGEL(商標)溶液(50 µL; BD Biosciences社)を12ウェルプレートのウェルに分注し、このプレートを37℃で60分間インキュベートして、この溶液をゲル化させた。PDAC及びHUVEC細胞をトリプシン処理し、適当な培地(VEGFを含む及び含まない)に再懸濁し、100 µLの希釈した細胞($1\sim3\times10^4$ 個細胞)を、MATRIGEL(商標)を含むウェルの各々に加えた。重合したMATRIGEL(商標)上の細胞を、0.5~100ngのVEGFの存在下又は非存在下で、4~24時間、37℃の5%CO₂インキュベーター内に置いた。インキュベーション後、これらの細胞を、標準的な光学顕微鏡法を用いて、管形成の徴候について評価した。

10

【0373】

PDACは、VEGFの非存在下でわずかな管形成を示したが、VEGFによる刺激によって誘導され／分化させられて、管状構造を形成した。図5を参照されたい。

【0374】

(6.2.2.4 胎盤由来接着細胞の血管新生能の評価のための低酸素反応性)

内皮細胞及び／又は内皮前駆体の血管新生機能を評価するために、細胞を、低酸素条件及び正常酸素条件下で血管新生増殖因子を分泌するその能力に関して評価することができる。低酸素条件下の培養は、通常、内皮細胞又は内皮前駆細胞のいずれかによる血管新生増殖因子の分泌の増加を誘導し、これは、馴化培地中で測定することができる。胎盤由来接着細胞を、その標準的な成長培地中に同じ細胞数でプレーティングし、約70~80%コンフルエンスになるまで成長させた。その後、細胞を無血清培地(EBM-2)に移し、正常酸素(21%O₂)又は低酸素(1%O₂)条件下で24時間インキュベートした。馴化培地を回収し、R&D Systems社製の市販のELISAキットを用いて、血管新生増殖因子の分泌を解析した。ELISAアッセイを製造業者の指示に従って行ない、馴化培地中のそれぞれの血管新生増殖因子(VEGF及びIL-8)の量を 1×10^6 細胞に対して規準化した。

20

30

【0375】

胎盤由来接着細胞は、低酸素条件下での様々な血管新生増殖因子の分泌の上昇を示した。図6を参照されたい。

【0376】

(6.2.2.5 PDAC馴化培地に対するHUVEC反応)

PDACを、60%DMEM-LG(Gibco社); 40%MCBD-201(Sigma社); 2%FBS(Hyclone Labs社)、1×インスリン-トランスフェリン-セレン(ITS社); 10ng/mLのリノール酸-ウシ血清アルブミン(LA-BSA社); 1n-デキサメタゾン(Sigma社); 100 µMアスコルビン酸2-ホスフェート(Sigma社); 10ng/mL上皮増殖因子(R & D Systems社); 及び10ng/mL血小板由来増殖因子(PDGF-BB)(R & D Systems社)を含む成長培地中で48時間培養し、その後、無血清培地中で更に48時間培養した。PDAC培養物由来の馴化培地を回収し、これを用いて、血清飢餓HUVECを5、15、及び30分間刺激した。その後、HUVECを溶解させ、血管新生経路シグナル伝達において役割を果たすことが知られているホスホタンパク質について、BD(商標)CBA(サイトメトリービーズアッセイ)Cell Signaling Flex Kit(BD Biosciences社)で染色した。PDACは、AKT-1(これは、アポトーシス過程を阻害する)、AKT-2(これは、インスリンシグナル伝達経路の重要なシグナル伝達タンパク質である)、及びERK 1/2というHUVECの細胞増殖経路の強力なアクチベーターであることが分かった。これらの結果は、PDACの血管新生能を更に示している。

40

【0377】

(6.2.3 PDACによる血管新生の誘導)

50

この実施例は、上の実施例2に記載のPDACが、ニワトリ絨毛尿膜(CAM)を用いるインビボアッセイで血管新生を促進することを示す。

【0378】

2つの別々のCAMアッセイを実施した。第一のCAMアッセイでは、様々なPDAC調製物由来の無傷の細胞ペレットを評価した。第二のCAMアッセイでは、様々なPDAC調製物の上清を評価した。線維芽細胞増殖因子(bFGF)を陽性対照として用い、MDA-MB-231ヒト乳癌細胞を参照として用い、ビヒクル対照及び培地対照を陰性対照として用いた。この試験のエンドポイントは、全ての処置群及び対照群の血管密度を決定することであった。

【0379】

(6.2.3.1 PDACを用いるCAMアッセイ)

10

上記のように調製され、凍結保存されたPDACを用いた。PDACを投与のために解凍し、CAM上に投与される細胞の数を決定した。

【0380】

試験デザイン：この試験は5つの群を含み、各群に10個の胚が含まれた。この試験のデザインを表2に記載する。

【表2】

表2: ニワトリ絨毛尿膜血管新生アッセイの試験群

群番号	胚の数	処置	エンドポイント
1	10	ビヒクル対照(PBS/MATRIGEL(商標)の容積で1:1混合物40 μ L)	血液密度スコア
2	10	陽性対照、bFGFで処理(DMEM/MATRIGEL(商標)の1:1混合物40 μ L中の100ng/CAM)	第1群と同じ
3	10	培地対照(DMEMの40 μ L)	第1群と同じ
4	10	PDAC	第1群と同じ
5	10	MDA-MB-231細胞P34、ロット番号092608	第1群と同じ

20

【0381】

CAMアッセイ手順：新鮮な受精卵を標準的な卵インキュベーターにて37°Cで3日間インキュベートした。3日目に、滅菌条件下で卵を割り、胚を20枚の100mmプラスチックプレートに入れ、一番下の棚に貯水槽を備えた胚インキュベーターにて37°Cで培養した。インキュベーター内の湿度が一定に保たれるように、小型のポンプを用いて空気を貯水槽に連続的にバブリングさせた。6日目に、滅菌シリコン製「0」リングを各CAM上に置き、その後、 7.69×10^5 個細胞/40 μ Lの培地/MATRIGEL(商標)混合物(1:1)の密度のPDACを、滅菌フード内の各「0」リングの中に供給した。表2A及び2Bは、使用した細胞の数及び投与用各細胞調製物に添加した培地の量を表す。ビヒクル対照胚には、40 μ Lのビヒクル(PBS/MATRIGEL(商標)、1:1)を投与し、陽性対照には、40 μ LのDMEM培地/MATRIGEL(商標)混合物(1:1)中の100ng/mlのbFGFを投与し、培地対照には、40 μ LのDMEM培地のみを投与した。各投与が終了した後、胚をインキュベーターに戻した。8日目に、胚をインキュベーターから取り出し、室温に保持しながら、画像取得システムを100倍の倍率で用いて、各「0」リング下で血管密度を決定した。

30

40

【0382】

血管密度は、CAM上の処理部位に存在する血管の数を示す、0~5の算術的数、又は1~32の指数関数的数を用いた血管新生スコアリングシステムにより測定した。より高いスコアがより高い血管密度を表す一方、0は血管新生なしを表した。各投与部位での障害のパーセントは、各々の個々の実験の対照試料から得られた平均スコアで割ったその部位について記録されたスコアを用いて計算した。所与の化合物の各投与量についての障害率は、そ

50

の投与量について8～10個の胚から得られた全ての結果をプールすることによって計算した。

【表 3】

表 3: 投与のために最終細胞懸濁液の規準化のために各細胞調製物に添加した培地の量

細胞株	ペレットサイズ	DMEM及びMATRIGEL(商標)による規準化	細胞懸濁液の最終容積
PDAC	260 μ L	0 μ L + 260 μ L MATRIGEL™	520 μ L
MDA-MB-231	40 μ L	220 μ L + 260 μ L MATRIGEL™	520 μ L

10

PDACは、6回継代したものを使用した。

【0 3 8 3】

(結果)

血管密度スコアの結果を図7に示す。これらの結果から、PDAC細胞懸濁液、又は100ng/mLのbFGF、又はMDAMB231乳癌細胞懸濁液で処理したニワトリ絨毛尿膜の血管密度スコアが、ビヒクル対照CAMの血管密度スコアと比較して統計的に有意に高かった($P < 0.001$ 、スチューデントの「t」検定)ことが明白に示されている。PDACを培養するために用いた培地(陰性対照)は、血管密度に何ら影響を及ぼさなかった。更に、PDAC調製物の血管密度の誘導は若干の変動を示したが、この変動は統計的に有意でなかった。

20

【0 3 8 4】

(6.2.3.2 PDAC上清を用いるCAMアッセイ)

MDA-MB-231細胞及びPDAC由来の上清試料を上記の第二のCAMアッセイで用いた。bFGF及びMDA-MB-231上清を陽性対照として用い、培地及びビヒクルを陰性対照として用いた。

【0 3 8 5】

試験デザイン：この試験は5つの群を含み、各群に10個の胚が含まれた。この試験のデザインを表4に記載する。

【表 4】

表 4: 試験デザインー細胞上清を使用するCAMアッセイ

群番号	胚の数	処置	エンドポイント
1	10	ビヒクル対照(PBS/MATRIGEL(商標)の容積で1:1混合物40 μ L)	血液密度スコア
2	10	陽性対照、bFGFで処理(DMEM/MATRIGEL(商標)の1:1混合物40 μ L中の100ng/CAM)	第1群と同じ
3	10	培地対照(DMEMの40 μ L)	第1群と同じ
4	10	PDACの上清	第1群と同じ
5	10	MDA-MB-231細胞(P34)の上清	第1群と同じ

30

40

PDAC上清は、継代数6の細胞から得た。

【0 3 8 6】

CAMアッセイ手順：アッセイの手順は、上の第6.3.1節に記載したものと同一であった。唯一の違いは、各幹細胞調製物又はMDA-MB-231細胞由来の上清を試験材料として用いたこ

50

とであった。投与のために、各上清をMATRIGEL(商標)と混合し(体積で1:1)、40 μ Lの混合物を各胚に投与した。

【0387】

結果：血管密度スコア(図8参照)は、各幹細胞調製物の上清による血管新生の誘導が異なっていたことを示している。PDAC由来の上清試料は、それぞれ $P<0.01$ 、 $P<0.001$ 、及び $P<0.02$ (スチューデントの「t」検定)で血管誘導に対する有意な作用を示した。予想されたように、陽性対照bFGFも、CAMアッセイNo.1において上で認められたような血管新生の強力な誘導を示した($P<0.001$ 、スチューデントの「t」検定)。しかしながら、MDA-MB-231ヒト乳癌細胞由来の上清は、ビヒクル対照と比較して血管新生に対する有意な誘導を示さなかった。先に示したように、培養培地のみは、何ら影響を及ぼさなかった。

10

【0388】

(6.3 実施例3：神経保護作用を示すPDAC)

この実施例は、PDACが酸素グルコース欠乏(OGD)傷害アッセイ及び活性酸素種アッセイを用い、低酸素及び低グルコース条件で神経保護作用を有することを示す。加えてPDACは、神経栄養因子、BDNF、GDNF、NT-3、NT-4/5、及び抗酸化酵素ヘムオキシゲナーゼ-1、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ-1及びアルデヒドオキシダーゼ-1を含む、神経保護部分を発現し、且つこれらの部分の一部の発現及び分泌は、低酸素傷害後に上昇する。従ってこれらの結果は、PDACは、典型的には、壊死、アポトーシス、脱髄によるニューロンの機能喪失又は変性、及び他の機能喪失の形態により特徴づけられる、例えばSCI又はTBIなどの、CNS損傷の治療において有用であることを示す。

20

【0389】

ヒトニューロン(ScienCell社、カタログ#1520)を製造業者の推奨に従って培養した。簡潔に述べると、培養容器を、滅菌蒸留水中、37°Cで1時間、ポリL-リジン(2 μ g/mL)でコーティングした。この容器を再蒸留 H_2O で3回洗浄した。ニューロン培地(ScienCell社)を容器に加え、インキュベーター内で37°Cに平衡化した。ニューロンを解凍し、遠心分離せずに容器に直接加えた。その後の培養では、培地を、培養の開始の翌日に、その後は1日おきに交換した。ニューロンは、典型的には、4日目までに傷害を受ける準備が整っていた。

【0390】

OGD培地(ダルベッコの改変イーグル培地-グルコース不含)は、1つには液体培地中の酸素の溶解度を低下させるために、最初に培地を水浴中で加温することによって調製した。溶存酸素を除去するために、0.5 μ m拡散石(diffusing stone)を用いて100%窒素を培地中に30分間バブリングさせた。HEPES緩衝液を1mMの最終濃度になるように加えた。スパーージャの終了時に培地をニューロンに直接加えた。ディップ式の酸素センサーを用いた酸素レベルの確認のために、少量の培地試料を分注した。酸素レベルは、典型的には、0.9%～約5.0%酸素に低下した。

30

【0391】

ガス処理前にチャンバーを少なくとも4時間(好ましくは一晩)37°Cのインキュベーター内に置くことにより、低酸素チャンバーを準備した。培養容器中の培地を除去し、脱気した培地と交換し、この培養容器を低酸素チャンバーの中に入れた。次に、この低酸素チャンバーに、システムを通して20～25Lpmの速度で少なくとも5分間、95% N_2 /5% CO_2 ガスを流した。このシステムをインキュベーターにて37°Cで4時間インキュベートし、1時間後にチャンバーをもう一度脱気した。

40

【0392】

傷害処置の終了時に、OGD培地を吸引し、温かい培地をニューロンに加えた。24～28時間後に、PDAC及びニューロンを、ニューロンに加えられるニューロン培地に懸濁した6ウェルプレートの1ウェル当たり各100,000個の細胞で同じ数でプレーティングし、6日間共培養した。

【0393】

各条件について6ウェルプレートのランダムな視野の顕微鏡写真を撮影した。典型的な

50

ニューロンの形態を有する細胞を同定し、神経突起長を記録した。神経突起の平均長は、ニューロンの健康と正に相関し、ニューロンとPDACの共培養でより長く、PDACが傷害から細胞を保護することが示された。

【0394】

(活性酸素種アッセイ)

活性酸素種を除去し、そのような種から細胞を保護するPDACの能力を、過酸化水素を活性酸素種発生源として用いるアッセイで決定した。

【0395】

アッセイの説明：標的細胞(星状細胞、ScienCell Research Laboratories社)を、ポリL-リジンを予めコーティングした96ウェル黒色ウェルプレートに6000個/cm²で播種した。星状細胞を、成長培地中、37℃、5%二酸化炭素で一晩付着させる。翌日、培養培地を除去し、細胞を蛍光発生プローブである細胞透過性色素DCFH-DA(ジクロロフルオレセイン二酢酸塩)とともにインキュベートした。ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水又はハンクスの緩衝塩類溶液で洗浄することにより、余分な色素を除去した。次に、1000 μMの過酸化水素を30~60分間加えることにより、細胞を活性酸素種で傷害した。次に、過酸化水素含有培地を除去し、無血清のグルコース不含成長培地と交換した。PDACを6000個/cm²に加え、細胞を更に24時間培養した。次に、細胞を標準的な蛍光プレートリーダーで480Ex及び530Emで読み取った。培地の活性酸素種含量は、細胞サイトゾル中のDCFH-DAのレベルと正比例していた。活性酸素種含量は、予め決定したDCF標準曲線との比較により測定した。全ての実験をN=24で行なった。

【0396】

アッセイのために、20×DCFH-DAストック溶液を、胎仔ウシ血清を含まない細胞培養培地に1×になるまで希釈し、均一になるまで攪拌することにより、1×DCFH-DAを使用直前に調製した。過酸化水素(H₂O₂)希釈物は、必要に応じてDMEM又はDPBS中で調製した。標準曲線は、1mM DCF標準を細胞培養培地に希釈し、100 μLのDCF標準を蛍光測定に好適な96ウェルプレートに移し、100 μLの細胞溶解緩衝液を加えることにより、0 μM~10 μMの濃度範囲の1:10希釈系列として作成した。蛍光は、480Ex及び530Emで読み取った。

【0397】

結果：PDACは、星状細胞共培養物中の活性酸素種の濃度を有意に低下させた。図9を参照されたい。

【0398】

(神経保護部分の発現及び分泌)

正常(正常酸素)条件及び損傷/疾患-関連(低酸素)条件下での、神経保護部分の遺伝子発現を評価するために、PDACを、6-ウェル組織培養皿に6000個細胞/cm²で播種し、培地において24時間成長させた。引き続き成長培地を除去し、細胞をPBSで洗浄した。その後無血清DMEM培地を細胞に添加し、培養物を37℃、5%CO₂、21%O₂、湿度90%で3時間インキュベートした。低酸素条件下でのPDAC遺伝子発現を評価するために、1% O₂と平衡にした無血清培地を細胞に添加し、培養物を低酸素チャンバーに37℃、5%CO₂、1%O₂、湿度90%で3時間配置した。該条件でインキュベーションした後、細胞から、RNeasy Miniキット(Qiagen社、バレンシア、CA)を製造業者の指示に従い使い、総RNAを抽出した。遺伝子転写物の定量を、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)技術を用いて行った。BDNF、GDNF、NT-3、NT-4/5の上清への分泌は、固相サンドイッチELISAイムノアッセイシステム(R&D Systems社、ミネアポリス、WN)を製造業者の指示に従い使用し、決定した。タンパク質濃度を、既知の個々の標準との、450nmでの吸光度とレポーター色素原(テトラメチルベンジジン)の相関により、比色分析により決定した。

【0399】

神経保護部分の分泌を評価するために、PDACを、6-ウェル組織培養皿に6000個細胞/cm²で播種し、PDAC培地において24時間成長させた。引き続き成長培地を除去し、細胞をPBSで洗浄した。その後無血清DMEM培地を細胞に添加し、培養物を標準組織培養インキュベーター内で37℃、5%CO₂、21%O₂、湿度90%で更に3時間インキュベートし、正常酸素条件

下での栄養因子のPDAC分泌を評価した。低酸素条件下でのPDAC分泌を評価するために、1% O_2 と平衡にした無血清培地を細胞に添加し、培養物を低酸素チャンバーに37℃、5% CO_2 、1% O_2 、湿度90%で3時間配置した。

【0400】

インキュベーション期間の完了後、細胞-馴化培地を組織培養容器から回収し、-80℃で凍結し、引き続き下記のように分析した。

【0401】

結果：正常酸素条件下でPDACにより発現された抗酸化酵素転写物の発現レベルを、ヒト星状膠細胞のそれと比較した。測定したCt値は、PDACによる抗酸化酵素カタラーゼ(CAT)、ヘムオキシゲナーゼ-1(HMOX-1)、アルデヒドオキシダーゼ-1(AOX-1)及びスーパーオキシド・ジスムターゼ-1(SOD-1)のより高い発現を示し、このことは培養した星状膠細胞と比べ、ROSの選りすぐれた中和を示唆している。加えて、正常酸素条件下でPDACにより発現された神経栄養因子の発現レベルを、ヒト星状膠細胞対照と比較した。測定したCt値は、PDACによる公知の神経栄養因子である脳由来神経栄養因子(BDNF)、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、ニュートロフィン-3(NT-3)、ニュートロフィン-4/5(NT-4/5)の発現を示し、このことは、PDACは、多数の因子を介して神経保護機能を示すことを示唆している。損傷/疾患-関連状態下のこれらの関心対象の遺伝子の誘導性を評価するために、PDACを、低酸素条件下で3時間培養し、その後遺伝子発現を評価した。PDACによるBDNF、GDNF、NT-3及びNT-4/5の発現は、低酸素培養後、各々、2.5倍、5倍、30倍、及び15倍上昇した。これらの結果は、PDACは、神経保護因子の調節を介して疾患-関連環境に適宜反応し得ることを示唆し、更にはPDACは神経保護機能を有するという仮説を裏付けている。

【0402】

上昇した転写産物が、増加したタンパク質発現を生じるかどうかを決定するために、馴化された上清を、神経栄養因子の存在について評価した。馴化培地内で3時間培養後に、BDNF、GDNF、NT-3及びNT-4神経栄養因子の存在を実質的レベルで確認し、且つBDNF及びNT-3分泌のそれぞれ78%及び100%の増加を、低酸素傷害の3時間後に確認し、遺伝子発現レベルに対する観察された調節を裏付けた。これらの結果は、PDACは、抗酸化酵素及び神経栄養因子の発現を介して、例えば低酸素-駆動したROSの過剰な蓄積及びニューロン細胞損傷などの、急性CNS損傷に関連した様々な病理過程を治療的に調節するであろう概念を裏付けている。

【0403】

(6.4 実施例4：ラットSCIモデルにおけるPDACを使用するSCIの治療)

この実施例は、PDACとも称される、 $CD10^+$ 、 $CD34^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 胎盤幹細胞の、SCIに対する作用を評価する、特にラットの未損傷脊髄及び損傷脊髄に移植されたPDACの免疫拒絶、遊走、及び分化を評価する、例証的モデル及び方法を提供する。このモデルは、PDAC投与の単独での作用、又は第二の治療選択肢との組合せ、例えばメチルプレドニゾロン、リチウム、及び／若しくはシクロスポリンAとの同時投与での作用の評価を提供する。移動運動活動の回復(BBBスコア)、皮質脊髄路及びセロトニン作動性軸索の再生、並びに脊髄の白質領域を含む機能に対するPDACの作用を、細胞移植をしない対照ラットと比べ、シクロスポリンを伴う又は伴わずに、損傷後12週間評価する。該細胞は、損傷後直ぐ、2週目、及び6週目に脊髄へ移植し、SCIの急性相、亜急性相及び慢性相への細胞の移植をシミュレートする。損傷後0、1、2、3、4、及び6週目に、投与したPDACの生存、遊走、及び分化を評価する。加えて、PDACの投与後の神経原性増殖因子、例えばニュートロフィンの発現を、遺伝子チップ、RT-PCR及びELISA法を用いて評価することができる。

【0404】

(実験デザイン)

【0405】

(PDACのインビボ持続性) PDACを、0、1、2、3、4、及び6週目に、25mm重り落下によるSCI苦痛を伴う又は伴わないラット脊髄の椎骨分節のT9の上端及びT10の下端で、中心灰白質領域に注射する(n=4/群)。6週間後、ラットを、ペントバルビタール60mg/kgで麻酔し、

ホルムアルデヒドで灌流し、且つ脊髄を水平に切断し、落射蛍光解剖顕微鏡により試験する。注射部位からの様々な距離でのPDACの分布を蛍光により測定し、且つ切片を、 β -3-チューブリン(ニューロン)、GFAP(星状膠細胞)、ネスチン(前駆細胞)マーカーについて免疫組織学的染色する。

【0406】

(治療) PDAC投与したラットを、メチルプレドニゾロン(MP、移植時30mg/kgボラス)、リチウム(Li、100mg/kg/日で6週間)、及びシクロスポリン(CsA、10mg/kg/日)で治療し、且つ損傷及び移植後6週目の移植したPDACの数、分布、及び特徴を評価する。PDAC単独、MP単独、Li単独、CsA単独、又はMP+Liの作用を評価する。細胞を定量するために、脊髄中のヒトDNA及び緑色蛍光タンパク質(GFP)の量を測定する。PDAC中の短-中期GFP発現を、構成的GFP発現カセットをコードしているプラスミドベクターのAmara-ベースのエレクトロポレーションにより達成する。長期発現は、構成的GFP発現をコードしているレンチウイルスベクターを使用し達成する。

10

【0407】

(遺伝子/タンパク質発現) RT/PCR及びELISAを使用し、治療していない動物、又はPDAC単独、PDAC+MP、PDAC+MP及びLi、並びにPDAC+MP、Li及びCsAで治療した動物において、LIF、BDNF、GDNF、NT3、NGFA、及びGFPのmRNA及びタンパク質のレベルを測定する。

【0408】

(回復/再生) PDACは、CsAを伴う又は伴わずに、損傷後2週間及び6週間に移植し、且つ動物は、12週間維持する。移動運動回復(BBB)を評価し、組織学的試験を行う。

20

【0409】

(プロトコール)

【0410】

(麻酔) 77 $\pm$ 1日齢のSprague-Dawleyラットに、椎弓切除術を施す。ラットを、腹腔内ペントバルビタール(雌45mg/kg、雄65mg/kg)により麻酔する。5分以内に深麻酔状態とならなかったラットは、本実験から除外する。損傷後1週目及び4週目の脊髄への細胞の遅延移植のために、ラットは、頭部錐体(head-cone)を介したイソフルランでの自発呼吸により麻酔する(5%で5分間誘導し、その後1%で維持)。

【0411】

(脊髄損傷) ラットを剃毛し、且つ手術部位をベタジン処理した後、背側正中切開を行い、T8-11脊柱を露出し、且つT9-10椎弓切除術を行い、下側にあるT13脊髄を露出する。ラットを、TS及びT11背側突起上に配置したクランプにより懸架する。麻酔導入の1時間後に、10gの棒を、T13脊髄上25mmに落下する。ポリ乳酸及びポリカプリラクトンの薄いシート(100 μ)を癒着を防止するために硬膜上に配置し、且つ自家皮下脂肪小片を椎弓切除部位に配置し、瘢痕形成を遅らせる。椎弓切除の上側及び下側で、筋肉を正中線で絹糸により縫合する。皮膚をステンレス製クリップで閉じた。クリップは1週間後に取り外す。

30

【0412】

(細胞移植) 硬膜を、26-ゲージツベルクリン注射器で切開し、200,000個細胞の1 μ L懸濁液を、脊髄へ注射する。遅延移植のためには、椎弓切除部位を、イソフルランによる麻酔後に再度開放し、小さい硬膜切開を行い、衝撃部位に対し吻側及び尾側の脊髄へ、マイクロピペットを用い、細胞200,000個の1 μ L懸濁液を2回注入する。

40

【0413】

(術後ケア) ラットが覚醒するまでは、ラットをヒーティングパッド上に維持する。チアノーゼ(ラットの足の色から)を示すラットには、分泌物を清掃し且つ呼吸を刺激するために、経口気道吸引を施す。呼吸器閉塞の発生が比較的多い場合は、術中の分泌物の増加を低下するために、アトロピン0.04mg/kg IM又はグリコピロレート0.5mg/kg IMを任意に投与する。脱水の徴候(例えば、背中の皮膚をつまんで、数秒以内に返ることができない)を示すラットは、皮下食塩水注射5~10ml(雌5ml、雄10ml)を投与する。尿道及び創傷の感染症を減らすために、全てのラットにはセファゾリン50mg/kgを毎日皮下に7日間投与する。

50

【0414】

(術後鎮痛) 脊髄損傷したラットは一般に、疼痛の証拠を示さず、その理由はこの損傷は損傷部位で又はその下側で感覚消失(anesthesia)を引き起こすからである。しかしながら、椎弓切除術のみを施された動物、すなわち脊髄損傷を伴わず術後疼痛を示す動物については、局所麻酔薬ブピバカイン(Marcaine)を、手術部位に最大投与量2mg/kg体重で投与する。各動物を、疼痛の証拠についてモニタリングし、且つ必要ならば緩和を施す。

【0415】

(長期ケア) ラットを、毎日検査し、移動運動スコア(BBB)について毎週評価する。最初に、動物を毎日2回検査し、触診がラットの膀胱内の尿>1mlを示す場合、手作業で絞り出す(expressed)。開始後7日間に、膀胱感染症の指標である、濁った血尿を伴うラットには、Baytril(フルオロキノロン抗生物質)2.5mg/kg/日を7~10日間投与する。この投与量で感染症が治らない場合、ラットを安楽死させる。第二に、ラットを無菌白色紙製寝床(Alpha Dry)上に維持し、これはラットを乾燥状態で維持し血尿の存在を示す。血尿を示すラットは取りのけ、感染症の伝播を防ぐために、他のラットから離してケアする。第三に、ラットが疼痛の証拠(発声、接触に対する過敏)又は自咬症(脱毛又は皮膚穿通により明らかになる損傷部位の下側の皮膚分節を噛む)を示す場合、ラットには、経口アセトアミノフェン(64 mg/kg/日、「Baby Tylenol」、経口)を、それらの皮膚病巣が完全に治癒するまで投与する。疼痛の治療可能な原因が認められない場合、ラットは安楽死させる。動物は第1週は毎日、それ以後は週1回体重を量る。

【0416】

(安楽死) 全ての動物は、ペントバルビタール(雌-雄投与量100mg/kg)で深麻酔をかけ、分子試験のために断頭するか、又は固定及び組織試験のために4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流する。

【0417】

(6.5 実施例5: ラットTBIモデルにおけるPDACを使用するTBIの治療)

この実施例は、PDACとも称される、CD10⁺、CD34⁺、CD105⁺、CD200⁺胎盤幹細胞の、TBIに対する作用を評価する、例証的モデル及び方法を提供する。いずれか特定の理論又は作用機構と結びつけることを意図するものではないが、TBIは、循環免疫細胞の増加と相関する、脾臓重量の減少を生じ、これは血液脳関門透過性の増大に繋がると考えられる。従って本方法は、PDACの、免疫反応を調節する能力；脾細胞と同時局在化し、脾細胞の増殖並びにIL-4及びIL-10などの抗炎症サイトカインの分泌を促進する能力；脾臓重量を保持する能力；並びに、誘導されたTBI後の、血液脳関門の完全性を維持する能力を評価することを提供する。

【0418】

(インビボ方法)

【0419】

(制御皮質衝撃損傷) 制御皮質衝撃(CCI)装置、例えばeCCIモデル6.3(VCU社、リッチモンド、VA)を使用し、その開示が全体として引用により本明細書中に組み込まれているLighthall J.の文献(Neurotrauma 5, 1-15 (1988))に説明されたように、片側性の脳損傷を与える。体重225~250gの雄のラットを、4%イソフルラン及びO₂により麻酔をかけ、各ラットの頭部を、定位固定式フレームに載せる。頭を、水平面に維持する。正中線切開を用い露出し、且つ7~8mmの頭蓋骨切除術を右側頭蓋冠に行う。頭蓋骨切除術の中心が、プレグマとラムダの間の中央に、正中線から側方に~3mmに、側頭頭頂皮質に重なるように、配置する。動物には、直径6mmの衝撃装置先端(impactor tip)を用い、へこみ深さ3.1mmの、衝撃速度5.8m/秒、及び滞留時間150ms(中等度~重度の損傷)を、垂直面からの角度10°で、1回の衝撃を施し、皮質表面に対し直交する衝撃を生じさせる。この衝撃は、頭頂連合皮質に行う。シャム損傷を、動物に麻酔をかけ、正中線切開を行い、且つ頭蓋から皮膚、結合組織及び腱膜を分離することにより行う。その後切開は閉じる。

【0420】

(PDACの調製及び静脈内注射) 注射前に、PDACを解凍し、リン酸緩衝食塩水(PBS)ピヒ

クルで洗浄し且つ懸濁し、濃度 2×10^6 個細胞/mLとする。トリパンプブルー排出により、細胞をカウントし、生存度をチェックする。静脈内注射直前に、PDACを、穏やかに8~10回滴定し(titrate)、細胞の均質な混合を確実にする。PDACを、CCI損傷後2時間及び24時間の両方で、2つの異なる投与量(CCI+ 2×10^6 個PDAC/kg、及びCCI+ 10×10^6 個PDAC/kg)で注射する。従って、各処置動物は、それらに割り当てられたPDAC濃度の2つの個別の投与量を受け取る。CCI損傷対照動物は、細胞処理動物と同じ指定された時点で、PBSビヒクル注射のみを受け取る。

【0421】

(ラット脾臓摘出) 脾臓摘出後のラットで行った全ての実験に関して、雄のSprague Dawleyラットを、前述のように麻酔をかけ、背臥位で配置する。腹部四分円の左上部に小さい3cm切開を作製し、その後脾臓を引き出し(retraction)、脾門を結紮する。脾臓摘出後、切開部を連続縫合により閉じる。脾臓摘出術後、動物は回復させ、72時間順応させる。その後全ての実験は、当初の脾臓摘出術後72時間で完了する。

【0422】

(エバンスブルー血液脳関門(BBB)透過性分析) CCI損傷の72時間後、ラットを、前述のように麻酔をかけ、PBS中の3%エバンスブルー色素1mL($4\text{cm}^3/\text{kg}$)を、右側内頸静脈へ直接カニューレを介して注入する。動物を60分間回復させ、色素を灌流させた。この時点で、動物を右心房穿刺により屠殺し、4%パラホルムアルデヒドを灌流する。次に動物を断頭し、その後脳を摘出する。小脳を、残りの皮質組織から解離する。この脳を、正中線を通して分割し、各半球の塊(損傷と同側及び損傷と対側)を規準化のために測定する。引き続き、各半球を、色素抽出のために、ホルムアミド5mL中 50°C で一晩インキュベートする。遠心分離後、各試料からの上清 $100\mu\text{L}$ を、96ウェルプレートに移し(3つ組)、吸光度を620nmで測定する。全ての値を、半球重量に対し規準化する。

【0423】

(皮質免疫組織化学) BBB完全性を、タイトジャンクションタンパク質オクルジン(occludin)についての免疫染色により、及び蛍光顕微鏡による可視化(核についてDAPIブルー、及びオクルジンについてFITCグリーン)により更に試験する。CCI損傷の72時間後、無傷の脾臓を持つラット及び脾臓摘出後のラットの両方の4群(未損傷、CCI損傷のみ、CCI損傷+ 2×10^6 個PDAC/kg、及びCCI損傷+ 10×10^6 個PDAC/kg)を、屠殺し迅速に断頭する。脳を摘出し、両半球(損傷の同側及び対側)を分離する。その後組織試料を、直ちに予め冷却した2-メチルブタン中に配置し、瞬間凍結する。試料を、ドライアイスへ移し、組織を切片化するまで -80°C で貯蔵する。その後組織試料を、Optimal Cutting Temperature化合物、例えばSakura Finetek社(トランス、CA)中に配置し、且つ直接損傷領域を貫通する $20\mu\text{m}$ の凍結切片を作製する。血管構造に対する直接損傷は、タイトジャンクションタンパク質オクルジンの抗体(例えば、1:150希釈、Invitrogen社、カールスバッド、CA)及び好適なフルオレセインイソチオシアネート(FITC)複合した二次抗体(例えば、1:200希釈、Invitrogen社、カールスバッド、CA)で染色することにより評価する。全ての抗体染色後、組織切片を、核染色について4'6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)(例えば、Invitrogen社、カールスバッド、CA)により対抗染色し、且つ蛍光顕微鏡により可視化する。

【0424】

(脾臓の免疫組織化学) インビボにおいてPDACを追跡するため、例えば投与されたPDACは肺微小血管を迂回し脾臓に達するかどうかを決定するために、ラットの4群(未損傷、CCI損傷のみ、CCI損傷+ 2×10^6 個PDAC/kg、及びCCI損傷+ 10×10^6 個PDAC/kg)に、シャム損傷又はCCI損傷のいずれかを施す。次に2つの治療群には、量子ドット(例えば、QDOT、Qtracker細胞標識キット525及び800、Invitrogen社、カールスバッド、CA)標識した(製造業者の指示するプロトコールに従い)PDACの注射を、CCI損傷後2及び24時間で投与する。二回目のQDOT標識したPDAC注入の6時間後、動物を屠殺し、脾臓を摘出する。その後脾臓を、蛍光スキャナー(例えば、Odyssey Imaging System、Licor社、リンカーン、NE)上に配置し、QDOT標識したPDACを局在化する。走査が完了した後、組織試料を、直ちに予め冷却した2-メチルブタン中に配置し、瞬間凍結する。試料を、ドライアイスへ移し、使用する

まで -80°C で貯蔵する。次に組織試料を、最適切断温度(Optimal Cutting Temperature)化合物(例えばSakura Finetek社、トランス、CA)中に配置し、且つ脾臓を貫通する $10\mu\text{m}$ の凍結切片を作製する。組織切片を、核染色について4'6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)(例えば、Invitrogen社、カールスバッド、CA)により染色し、且つQDOT標識したPDAC及び脾細胞の両方を、蛍光顕微鏡により可視化する。更に脾臓の構造を評価するために、ヘマトキシリン・エオシン染色を、製造業者の指示するプロトコールに従い行う。

【0425】

(脾細胞単離／脾臓質量の測定) 損傷の72時間後、動物に脾臓摘出を施し、脾臓質量を測定する。動物をこの時点で安楽死させる。次に脾臓を、レーザーブレードを用い小片とし、基本培地(RPMI中の10%FBS及び1%ペニシリン／ストレプトマイシン)で洗浄し、破碎し、且つ $100\mu\text{m}$ フィルターを通して濾過する。このフィルターから流出した試料を、穏やかに8~10回滴定し、引き続き $40\mu\text{m}$ フィルターを通して濾過し、あらゆる残存する結合組織を除去する。この試料を、 1000g で3分間遠心分離する。次に上清溶液を除去し、且つ試料を赤血球溶解緩衝液(Qiagen Sciences社、バレンシア、CA)3mL中に懸濁し、氷上で5分間インキュベーションさせる。引き続き試料を、基本培地で2回洗浄し、前述の設定を用いて遠心分離する。トリパンブルー排出により、細胞をカウントし、生存度をチェックする。

【0426】

(インビボ脾細胞増殖アッセイ) 屠殺した時点で活発に増殖している脾細胞(S相)の割合を、例えば、Click-iT(商標)EdUフローサイトメトリーアッセイキット(Invitrogen社、カールスバッド、CA)を製造業者の指示したプロトコールに従い用いて測定する。簡単に述べると、脾細胞を、72時間の時点で収集し、この細胞に20mM EdUを添加し、2時間インキュベーションさせる。次に、これらの細胞を洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定する。細胞を、Triton-X100を用いて透過性とし、次に該製造業者から提供された抗-EdU抗体「カクテル」を添加する。最後に、これらの細胞を洗浄し、引き続きリボヌクレアーゼ及びCellCycle488-Red染色を添加し、DNA含量を分析する。

【0427】

(インビボ脾細胞アポトーシスアッセイ) 屠殺時のアポトーシス脾細胞の割合を、例えばアネキシンV染色(BD Biosciences社、サンノゼ、CA)を製造業者の指示したプロトコールに従い用いて測定する。簡単に述べると、単離後、脾細胞を、冷PBSにより2回洗浄する。次に、 1×10^6 個細胞を、アネキシンV及び7-アミノ-アクチノマイシン(7-AAD)の $5\mu\text{L}$ と一緒に15分間インキュベーションする。その後フローサイトメトリーを用い、アポトーシス細胞の割合を測定する。定量的PCR RNAを、例えば、RNEasyカラム(Qiagen社、バレンシア、CA)を製造業者の仕様に従い用いて、脾細胞から単離する。ラットの参照RNA(Stratagene社、ラホヤ、CA)を、陽性対照として用いる。cDNAの合成は、M-MLV逆転写酵素及びランダムヘキサマー(Promega社、マジソン、WI)により実行する。対照反応を、ゲノムDNA夾雑を制御するために、逆転写酵素を使わずに実行する。qPCRを、例えば、ABI 7500を9600エミュレーションで用い、行う。

【0428】

(インビトロ法)

【0429】

(脾細胞培養) 密度 7.5×10^5 個細胞/mLの培養脾細胞を、コンカナバリンA $2\mu\text{g}$ で刺激した成長培地(RPMI中の10%FBS、1%ビタミンを含むRPMI、1%ビルビン酸ナトリウム、0.09%2-メルカプトエタノール、及び1%ペニシリン／ストレプトマイシン)において72時間拡大させる。

【0430】

(脾細胞特徴づけ) 単離した脾細胞を、単球、好中球、及びT細胞集団を決定するために、フローサイトメトリーにより分析する。単球及び好中球は、各々、CD200及びCD11b/CD18に対する抗体を用いて測定する。脾細胞T細胞集団を、CD3、CD4、及びCD8抗体を用いて標識する。全ての染色は、製造業者の指示したプロトコールに従い完了する。

【0431】

(インビトロにおける増殖アッセイ) 刺激した成長培地において培養した後の活発に増殖しているCD4⁺脾細胞(S相)の割合を、例えば、Click-iT(商標)EdUフローサイトメトリーアッセイキット(Invitrogen社、カールスバッド、CA)を製造業者の指示したプロトコールに従い用いて測定する。簡単に述べると、脾細胞を、密度 7.5×10^5 個細胞/mLで、前述のように、コンカナバリンA 2 μ gで刺激した成長培地において、72時間培養する。20mM EdUを添加し、1時間インキュベーションさせる。次に、これらの細胞を、DMEM中の4%ウシ血清(4%FBS)で洗浄し、且つCD4-PEを添加し、関心対象のT細胞集団をゲート開閉(gate)する。30分間のインキュベーション後、細胞を洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定する。細胞を、Triton-X100を用いて透過性とし、次に該製造業者から提供された抗-EdU抗体「カクテル」を添加する。最後に、これらの細胞を洗浄し、引き続きリボヌクレアーゼ及びCellCycle488-Red染色を添加し、DNA含量を分析する。

10

【0432】

(インビトロにおける脾細胞サイトカイン産生) 刺激した成長培地での培養後、抗炎症サイトカインIL-4及びIL-10の産生を、例えば、BD Cytometric Bead Array flexセット(BD Biosciences社、サンノゼ、CA)を製造業者の指示したプロトコールに従い用いる、フローサイトメトリーにより定量した。

【0433】

(6.6 実施例6: 組織修復のためのPDACの使用)

本実施例は、線維形成を調節し、その結果組織を修復するためのPDACの使用方法を明らかにしている。

20

【0434】

ELISAアッセイ及びマルチプレックスアッセイを用い、2つの細胞型の分泌プロファイルを評価するために、PDAC-馴化培地を、正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)の馴化培地と比較した。PDACはフォリスタチンを、NHDFにより分泌されるフォリスタチン量よりも、60%~65%多く分泌すると決定した。PDACはまた肝細胞増殖因子(HGF)を、NHDFにより分泌されるHGF量よりも、75%~95%多く分泌すると決定した。加えて、PDACは、マトリクスメタロプロテイナーゼ(MMP)1、MMP2、MMP7、及びMMP10を分泌すると決定した。

【0435】

PDACは、NHDFに比べ、フォリスタチン及びHGFの両方を高レベルで分泌すること、並びにPDACはMMP1、MMP2、MMP7、及びMMP10も分泌するという決定は、PDACは、インビボにおいて組織を修復する能力、例えば線維形成を調節する能力を有することができ、その結果本明細書に説明された方法において有用であることを指摘している。

30

【0436】

(6.7 実施例7: PDACを用いる治療方法)

(6.7.1 PDACを用いるSCIの治療)

脊髄損傷(SCI)を呈し、且つ感覚機能及び／又は運動機能の喪失を経験している個人。個人に、0.9% NaCl溶液中 $2.5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ 個のCD10⁺、CD34⁻、CD105⁺、CD200⁺胎盤幹細胞(PDAC)を静脈内投与する。個人を、次の2週間~1ヶ月にわたってモニタリングし、1種以上の該症状の軽減を評価する。加えて個人を、続く1年間にわたりモニタリングし、例えば症状が戻るか又は重症度が増した場合には、必要に応じ、同投与量のPDACを投与する。

40

【0437】

(6.7.2 PDACを用いるSCIの治療)

脊髄損傷(SCI)を呈し、且つ感覚機能及び／又は運動機能の喪失を経験している個人。個人に、0.9% NaCl溶液中 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個のCD10⁺、CD34⁻、CD105⁺、CD200⁺胎盤幹細胞(PDAC)を脊髄損傷部位に投与する。個人を、次の2週間~1ヶ月にわたってモニタリングし、1種以上の該症状の軽減を評価する。加えて個人を、続く1年にわたりモニタリングし、例えば症状が戻るか又は重症度が増した場合には、必要に応じ、同投与量のPDACを投与する。

50

【0438】

(6.7.3 PDACを用いるTBIの治療)

外傷性脳損傷(TBI)を呈し、且つ記憶喪失、注意不足／集中力不足、及び／又は眩暈／平衡感覚障害を経験している個人。個人に、0.9% NaCl溶液中 $2.5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ 個のCD10⁺、CD34⁻、CD105⁺、CD200⁺胎盤幹細胞(PDAC)を静脈内に投与する。個人を、次の2週間～1ヶ月にわたってモニタリングし、1種以上の該症状の軽減を評価する。加えて個人を、続く1年にわたりモニタリングし、例えば症状が戻るか又は重症度が増した場合には、必要に応じ、同投与量のPDACを投与する。

【0439】

(6.7.4 PDACを用いるTBIの治療)

外傷性脳損傷(TBI)を呈し、且つ記憶喪失、注意不足／集中力不足、及び／又は眩暈／平衡感覚障害を経験している個人。個人に、0.9% NaCl溶液中 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個のCD10⁺、CD34⁻、CD105⁺、CD200⁺胎盤幹細胞(PDAC)を頭蓋内に投与する。個人を、次の2週間～1ヶ月にわたってモニタリングし、1種以上の該症状の軽減を評価する。加えて個人を、続く1年にわたりモニタリングし、例えば症状が戻るか又は重症度が増した場合には、必要に応じ、同投与量のPDACを投与する。

【0440】

等価物：

本明細書に開示した組成物及び方法は、本明細書に記載の具体的実施態様によって範囲が限定されるべきではない。実際、記載されたものに加えて、組成物及び方法の様々な変更が、前述の説明及び添付の図面から当業者には明らかになるであろう。そのような変更は、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれることが意図される。

【0441】

様々な刊行物、特許、及び特許出願が本明細書で引用されており、それらの開示は、その全体が引用により本明細書中に組み込まれている。

10

20

【図 1】

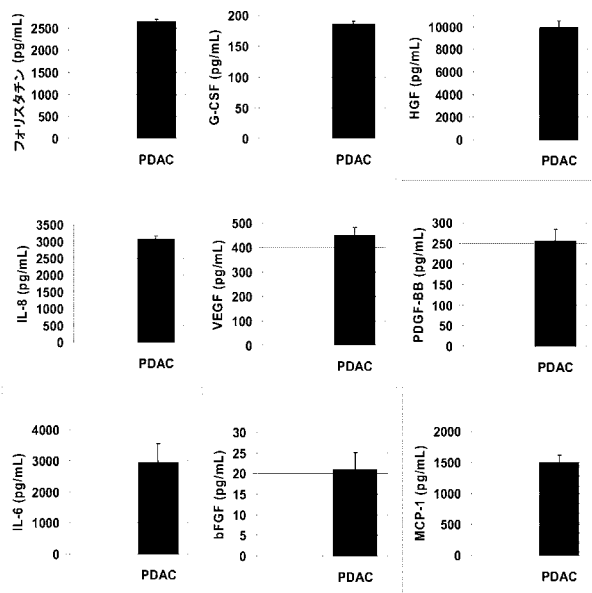


図 1

【図 2】

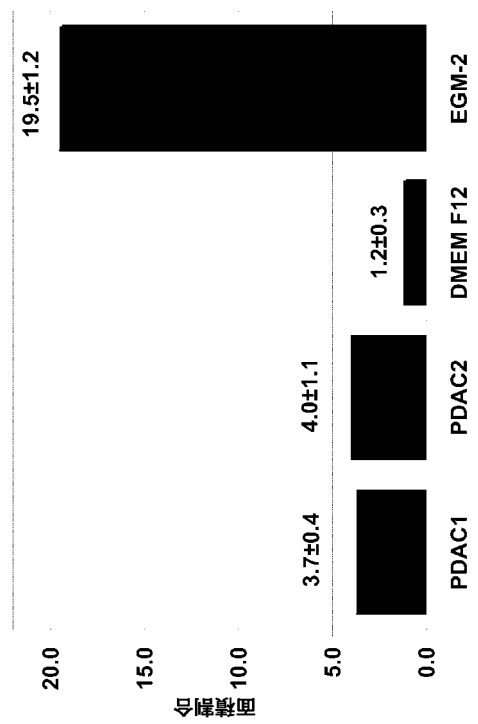


図 2

【図 3】

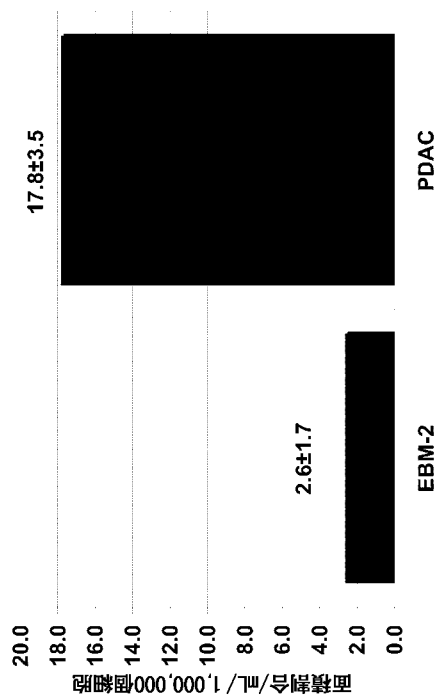


図 3

【図 4】

PDACと24時間間接共培養された後の
HUVCE増殖の誘導

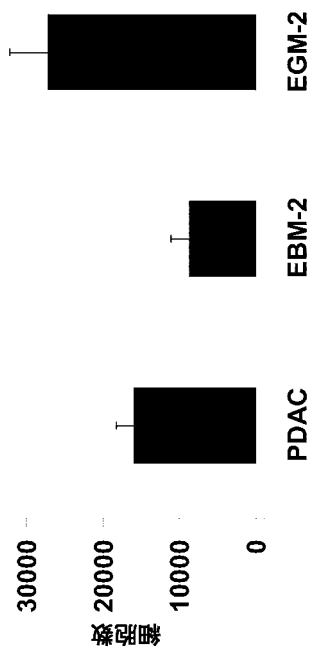


図 4

【 図 5 】

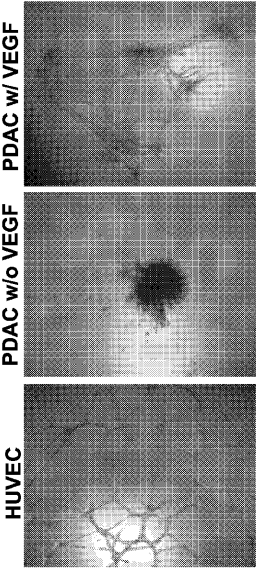


FIG. 5

【 図 6 】

PDAC低酸素分泌プロファイル

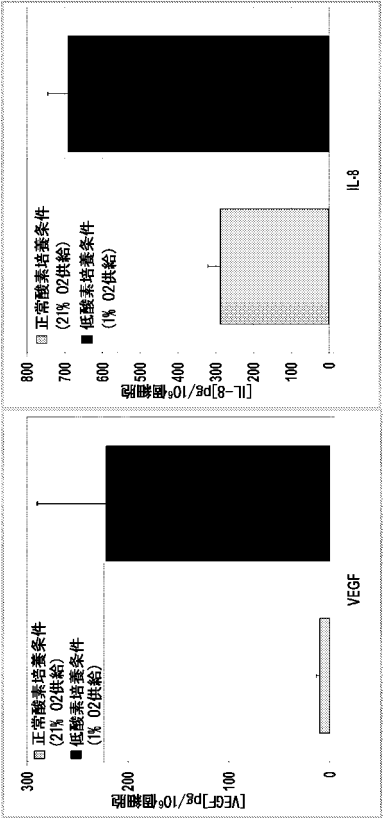


図 6

【 図 7 】

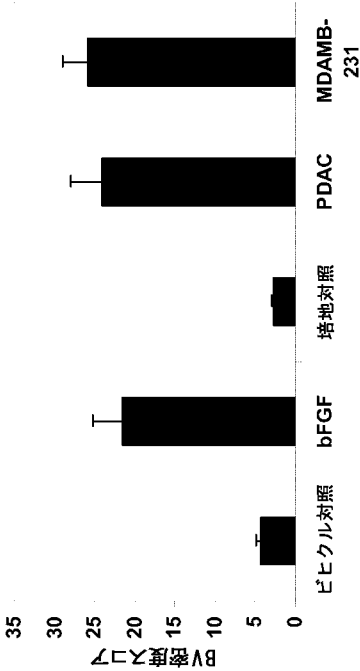


図 7

【 図 8 】

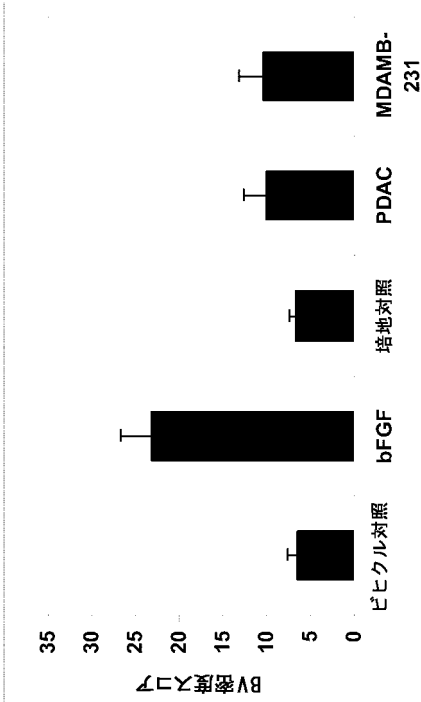


図 8

【図 9】

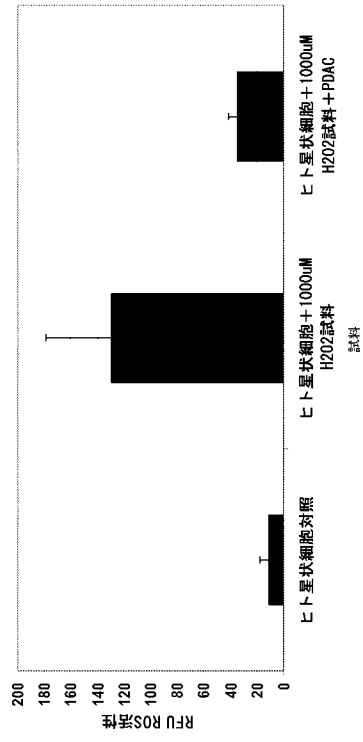


図 9

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/65170

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 48/00; C12N 5/00 (2012.01) USPC - 424/93.21; 435/325 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) USPC: 424/93.21; 435/325 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) PubWEST (PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google; PubMed: placenta, stem cell, CNS, spinal cord, traumatic brain, injury, CD10, CD34, CD105, CD200, HLA-G, CD73, compression, vertebra, central cord syndrome, motor, sensory		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2010/0047351 A1 (ZEITLIN, et al.) 25 February 2010 (25.02.2010) para [0007]-[0010], [0023]-[0024], [0026], [0031], [0075], [0297]	1-4, 7-11, 18-20 5-6, 12-17, 21-30
Y	US 2009/0214484 A1 (MIRONOV) 27 August 2009 (27.08.2009) abstract; para [0020]-[0022], [0046], [0069], [0242], [0251]-[0254]	5-6, 12-17, 21-30
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 April 2012 (08.04.2012)		Date of mailing of the international search report 23 APR 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/20 (2006.01)		A 6 1 P 25/20	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)		A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 11/02 (2006.01)		A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)		A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 13/10 (2006.01)		A 6 1 P 13/10	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)		A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 3/02 (2006.01)		A 6 1 P 3/02	
A 6 1 K 31/13 (2006.01)		A 6 1 K 31/13	
A 6 1 K 31/4458 (2006.01)		A 6 1 K 31/4458	
A 6 1 K 31/48 (2006.01)		A 6 1 K 31/48	
A 6 1 K 31/55 (2006.01)		A 6 1 K 31/55	
A 6 1 K 31/135 (2006.01)		A 6 1 K 31/135	
C 1 2 N 5/071 (2010.01)		C 1 2 N 5/00 2 0 2 A	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,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,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,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,IS,JP,KE,KG,KM,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,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

- (72)発明者 アレクサンダル フランクキ
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 8 0 1 アンナンダレ ラ コスタ ドライブ 8 0
- (72)発明者 ブラドイミル ジャンコビク
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 4 4 ニューヨーク アプト. 4 ド リバー ロード 3 0
- (72)発明者 アレクサンドル カプルノブスキ
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 7 8 2 8 ブドド ラケ クレアセネ アベニュー 3 0
- (72)発明者 クリステン ラバズゾ
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 7 0 8 1 スプリングフィールド ネウプロオク レー ン 5 0
- (72)発明者 エリク ラウ
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 8 1 6 エアスト ブルンスウィック ジェルネエ ドライブ 4 5
- (72)発明者 ビタオ リアング
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 7 6 2 4 クロステル ベトハニ シルクレ 6 5
- (72)発明者 ロベルト ジェイ. ハリリ
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 7 9 2 4 ベルナルドスビルレ メンドハム ロード 3 4 1

Fターム(参考) 4B065 AA93X BA30 BB32 BC50
4C084 AA19 MA02 NA05 ZA012 ZA122 ZA292 ZB072 ZB082 ZC752
4C086 AA01 AA02 BC21 BC32 CB22 MA02 MA04 NA05 ZA01 ZA12
ZA15 ZA18 ZA29 ZC75
4C087 AA01 AA02 BB58 BB63 MA02 MA65 MA66 MA67 NA14 ZA02
ZA03 ZA08 ZA12 ZA15 ZA18 ZA22 ZA24 ZA29 ZA33 ZA34

	ZA68	ZA81	ZC41							
4C206	AA01	AA02	FA07	FA29	MA02	MA04	NA05	ZA01	ZA12	ZA15
	ZA18	ZA29	ZC75							