

(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2017-529068

(P2017-529068A)

(43) 公表日 平成29年10月5日 (2017. 10. 5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/071 (2010. 01)</b>	C 1 2 N 5/071	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 5/0775 (2010. 01)</b>	C 1 2 N 5/0775	4 C 0 8 7
<b>C 1 2 N 5/0735 (2010. 01)</b>	C 1 2 N 5/0735	
<b>C 1 2 N 5/074 (2010. 01)</b>	C 1 2 N 5/074	
<b>A 6 1 K 35/50 (2015. 01)</b>	A 6 1 K 35/50	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-508490 (P2017-508490)	(71) 出願人	515258491
(86) (22) 出願日	平成27年8月14日 (2015. 8. 14)		アヴィタ・インターナショナル・リミテッ ド
(85) 翻訳文提出日	平成29年4月12日 (2017. 4. 12)		イギリス領バージン諸島, トルトラ, ロー ド・タウン, ウォーターフロント・ドライ ヴ, ジュネーヴ・プレイス, サード・フロ アー
(86) 国際出願番号	PCT/IB2015/056215	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開番号	W02016/024256		弁理士 小野 新次郎
(87) 国際公開日	平成28年2月18日 (2016. 2. 18)	(74) 代理人	100118902
(31) 優先権主張番号	62/037, 600		弁理士 山本 修
(32) 優先日	平成26年8月14日 (2014. 8. 14)	(74) 代理人	100106208
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 宮前 徹
		(74) 代理人	100120112
			弁理士 中西 基晴
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 幹細胞組成物および療法適用のための幹細胞を産生する方法

## (57) 【要約】

本発明の方法は、ドナー試料から得られる幹細胞産生を拡大するかまたは増加させる方法に関する。該方法には好ましくは、最小限に操作された組織から多数回の収集周期を用いて細胞を収集して、得られる幹細胞の数を増加させる工程が含まれる。

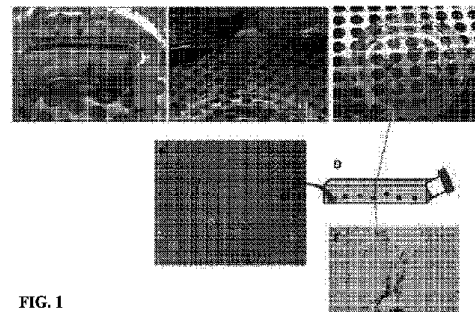


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

外植片組織由来の初代由来幹細胞集団を *in vitro* で拡大する方法であって、外植片組織を培養培地中で少なくとも 2 回の収集周期に渡って培養する工程を含む、ここで収集周期が、半集密 (*semi-confluent*) 幹細胞培養を得るために十分な期間、培養培地中で組織を維持し、そして最終幹細胞集団のために半集密幹細胞を採取する工程を含み、そして外植片組織が各収集周期前に最小限にしか操作されない、前記方法。

## 【請求項 2】

外植片組織から、初代由来幹細胞の拡大された集団を得る *in vitro* 法であって：

- a. 外植片組織を洗浄し、そして最小限に操作し；
- b. 培養培地を含む第一の培養表面において、*in vitro* で外植片組織を培養して、初代由来幹細胞の培養を樹立し；
- c. 培養培地から初代由来幹細胞を採取し；そして
- d. 培養培地を含む第二の培養表面に、外植片組織をトランスファーし；
- e. 工程 b.、c.、および d. を外植片組織で少なくとも 1 回反復し、それによって外植片組織由来の初代由来幹細胞の拡大された集団を得る；

工程を含む、前記方法。

## 【請求項 3】

増殖培地上で初代由来幹細胞を継代し、そして増殖培地から幹細胞を採取する工程をさらに含む、請求項 1 または 2 の方法。

## 【請求項 4】

少なくとも 1 回の収集周期に渡って、培養培地中で組織を培養する工程が、5 % 未満の血清を含有する培養培地中で最初に組織を培養し、そして次いで 15 % 血清を含有する培養培地中で組織を培養する工程を含む、先行する請求項のいずれか一項の方法。

## 【請求項 5】

5 % 未満の血清を含有する培養培地中で組織を培養する期間が 3 日間である、請求項 4 の方法。

## 【請求項 6】

15 % の血清を含有する培養培地中で組織を培養する期間が 7 日間である、請求項 5 の方法。

## 【請求項 7】

培養培地および増殖培地が DMEM である、先行する請求項のいずれか一項の方法。

## 【請求項 8】

培養培地が DMEM - F12 である、請求項 7 の方法。

## 【請求項 9】

増殖培地が DMEM - 低グルコースである、請求項 7 の方法。

## 【請求項 10】

増殖培地に非必須アミノ酸が補充されない、請求項 9 の方法。

## 【請求項 11】

外植細胞および / または継代細胞が安定核型を有する、先行する請求項のいずれか一項の方法。

## 【請求項 12】

請求項 1 または請求項 2 の方法から得られる幹細胞を含む、幹細胞の療法組成物。

## 【請求項 13】

最初の 3 回の収集周期から得た外植細胞を含む、請求項 12 の療法組成物。

## 【請求項 14】

最初の 65 回の収集周期から得た外植細胞を含む、請求項 12 の療法組成物。

## 【請求項 15】

最初の 100 回の収集周期から得た外植細胞を含む、請求項 12 の療法組成物。

10

20

30

40

50

**【請求項 16】**

少なくとも第1継代(P1)から得た継代細胞をさらに含む、請求項12～16のいずれか一項の療法組成物。

**【請求項 17】**

P1～P3から得た継代細胞を含む、請求項12～16のいずれか一項の療法組成物。

**【請求項 18】**

P1～P50から得た継代細胞を含む、請求項12～16のいずれか一項の療法組成物。

**【請求項 19】**

組成物を融解した後、幹細胞マーカーの発現を改変することなく、凍結状態で保存可能である、請求項12～16のいずれか一項の療法組成物。

**【請求項 20】**

幹細胞が神経冠または末梢神経系起源のものである、請求項1～11のいずれか一項の方法または請求項12～19のいずれか一項の療法組成物。

**【請求項 21】**

組織が歯髄である、請求項1～11のいずれか一項の方法または請求項12～19のいずれか一項の療法組成物。

**【請求項 22】**

幹細胞が成体または出生後幹細胞、非胚性幹細胞である、請求項1～11のいずれか一項の方法または請求項12～19のいずれか一項の療法組成物。

**【請求項 23】**

組織が分娩後組織である、請求項1～11のいずれか一項の方法または請求項12～19のいずれか一項の療法組成物。

**【請求項 24】**

分娩後組織が：臍帯および胎盤からなる群より選択される、請求項1～11のいずれか一項の方法または請求項12～19のいずれか一項の療法組成物。

**【請求項 25】**

初代由来および継代幹細胞を混合して、単一外植片組織由来の初代由来および継代幹細胞のバッチを形成する、請求項3の方法。

**【請求項 26】**

工程eを少なくとも30回反復する、請求項2の方法。

**【請求項 27】**

外植片組織が、各収集周期前に、酵素的または化学的に処理されず、あるいは解剖されない、先行する請求項のいずれかの方法。

**【発明の詳細な説明】****【背景技術】****【0001】**

幹細胞は、療法適用、医学研究、薬学的試験等のための細胞の魅力的な供給源である。不運なことに、同種移植片としての細胞の使用には問題がある。幹細胞を多量に拡大することは、細胞療法のための必要条件であるが、成体MSCの増殖能は制限されている。骨髓(BM)単離由来のMSCに用いる主な方法は、プラスチック培養プレート中に全骨髓を置き、そして4時間後、非接着細胞を洗い流した際のプラスチックへの接着能であることが、技術水準で一般的に知られる。このプロトコルにはまた、低粘度および低浸透圧の高密度溶液(例えばFicoll、Percoll)中でBMを密度遠心分離して、MSCを含有するBMの単核分画を得る工程が含まれることも可能である。さらに、フラスコ内に骨小片を入れ、そして骨外植片から細胞を増殖させることによって、骨のような固形組織由来のMSCを単離することも可能である。あるいは、コラゲナーゼ消化プロセスを用いることもまた可能である。しかし、細胞に造血幹細胞のような他のタイプの細胞が混入していると、不均一集団が生じる可能性があり、MSC試料の純度が損なわれる。この問題を克服するため、2つの類似の技術、磁気ビーズソーティングおよび蛍光活性化細胞

10

20

30

40

50

ソーティング (FACS) が開発されてきている。そうでなければ、蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) はMSCを単離する方法である。ex vivo拡大は、MSC単離後の次の必須の工程であり、これは、療法的に有意な細胞数の産生を目指す、MSCの遊離ex vivo自動修復を可能にし、これは、ドナー依存性 (年齢、性別、外傷の存在、および全身性疾患の存在) または方法依存性などのいくつかの要因に応じる。

#### 【0002】

MSCは迅速に増殖するため、比較的短時間で非常に拡大可能であるが、長期間のin vitro培養、すなわち酵素処理を用いたフラスコ間の細胞継代の多数周期を伴わずに療法的に適切な数のMSCの産生を可能にする方法は、技術水準において存在しない。こうした条件下でのMSC拡大は、MSCの最大分化能を次第に減少させることが示されてきている。長期間の継代培養は、細胞の機能を損ない、増殖抑止およびアポトーシスと関連する細胞老化を生じる。他方で、長期間の培養が、腫瘍形成能を獲得する自発的な形質転換を生じうることを示唆するデータがある。さらに、MSCの特定の特性は、培養中に失われる。MSCの心臓保護効果は、この継代数未満のものに比較して、5および10を超えた継代数の細胞で減少する。これは、血管内皮増殖因子放出能の減少によって説明可能である (Crisostomoら、2006; Digiralamoら、1999; Muragliaら、2000; Rubioら、2005; Stenderupら、2003)。したがって、技術水準にあるすべての方法は、拡大した細胞の収量および品質の間で折り合いを付けなければならず、これは細胞療法におけるその使用を制限した。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0003】

【非特許文献1】Crisostomoら、2006

【非特許文献2】Digiralamoら、1999

【非特許文献3】Muragliaら、2000

【非特許文献4】Rubioら、2005

【非特許文献5】Stenderupら、2003

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0004】

本発明に記載する方法および細胞組成物は、前述の限界、例えば多数回の細胞継代、細胞老化、分化減少および増殖因子産生減少、限定された数の凍結保存細胞を克服する。対照的に、本発明者らは、細胞継代減少、in vitro細胞操作減少、そして平行して、分化能および増殖因子産生増加、安定な核型、現実的に制限のない数の凍結保存細胞を提唱した。

#### 【0005】

引用するすべての刊行物、特許、および特許公報は、全目的のため、その全体が本明細書に援用される。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

本発明は、外植片組織から単離された幹細胞集団をin vitroで得てそして/または拡大する方法に関する。該方法は、好ましくは、少なくとも1回の収集周期に渡って、培養培地中で組織を培養する工程を含む。収集周期は、一般的に、半集密 (semi-confluent) 幹細胞培養を得るために十分な期間、培養培地中で組織を維持して細胞を外植し、そして最終幹細胞集団のためにこれらの細胞を採取する工程を含む。組織は、好ましくは、各収集周期前に最小限にしか操作されない。

#### 【0007】

特定の態様において、本発明は、外植片組織から、初代由来幹細胞の拡大された集団を得るin vitro法であって：

a. 外植片組織を洗浄し、そして最小限に操作し；

10

20

30

40

50

b. 培養培地を含む第一の培養表面において、*in vitro*で外植片組織を培養して、初代由来幹細胞の培養を樹立し；  
c. 培養培地から初代由来幹細胞を採取し；そして  
d. 培養培地を含む第二の培養表面に、外植片組織をトランスファーし；  
e. 工程b.、c.、およびd.を外植片組織で少なくとも1回反復し、それによって外植片組織由来の初代由来幹細胞の拡大された集団を得る  
工程を含む、前記方法に関する。

#### 【0008】

これらの方法は、好ましくは、外植片組織を洗浄し、そして最小限に操作する工程を含む。好ましくは、外植片組織は、各収集周期前に、酵素的または化学的に処理されず、あるいは解剖されない。外植片組織から初代由来幹細胞の拡大集団を得る方法は、好ましくは、増殖培地上で初代由来幹細胞を継代し、そして増殖培地から幹細胞を採取する工程もまた含む。継代は、各収集周期後に複数回、または最後に行うことも可能である。

#### 【0009】

方法は、拡大した細胞を継代し、そして増殖培地中で継代細胞を培養する工程をさらに含むことも可能である。いくつかの側面において、少なくとも1回の収集周期に渡って、培養培地中で組織を培養する工程は、5%未満の血清を含有する培養培地中で最初に組織を培養し、そして次いで15%血清を含有する培養培地中で組織を培養する工程を含む。5%未満の血清を含有する培養培地中で組織を培養する期間は3日間である。15%の血清を含有する培養培地中で組織を培養する期間は7日間である。いくつかの実行において、培養培地および増殖培地はDMEMであり、例えば、培養培地はDMEM-F12であり、そして/または増殖培地はDMEM-低グルコースである。いくつかの側面において、増殖培地には非必須アミノ酸が補充されない。いくつかの態様において、外植細胞および/または継代細胞は安定核型を有する。

#### 【0010】

本発明はまた、少なくとも最初の収集周期から得た外植細胞を含む、幹細胞の療法組成物にも関する。いくつかの態様において、組成物は、最初の3回の収集周期、最初の65回の収集周期、または最初の100回の収集周期から得た外植細胞を含む。いくつかの側面において、組成物は、少なくとも第1継代(P1)から、P1~P3から、またはP1~P50から得た継代細胞を含む。いくつかの実行において、組成物を融解した後、幹細胞マーカーの発現を改変することなく、該組成物を凍結状態で保存可能である。

#### 【0011】

本発明の方法および組成物のいくつかの態様において、幹細胞は神経冠または末梢神経系起源のものである。いくつかの側面において、幹細胞は成体または出生後幹細胞、非胚性幹細胞である。いくつかの態様において、組織は歯髄または分娩後組織、例えば臍帯または胎盤である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0012】

【図1】図1は、臍帯(UC)からの幹細胞単離の模式図を示す。パネルAはUCの5cm片の単離を示す。パネルBはUC組織の洗浄を示し；パネルCは小片に切り分けられたUC組織を示す。パネルDは、基本培地中に機械的にトランスファーされ、そしてプラスチック培養プレート中で培養されているUC組織の小片を示す。パネルEは、培養表面に対するCD105陽性幹細胞の接着を示す。パネルFは、間葉系幹細胞の培養を示す。

【図2】図2は、産業規模で幹細胞を培養する方法を示す。

【図3】図3は、バイオテクノロジー、医学、薬学、美容術、栄養等における、幹細胞単離および機械的トランスファーの非酵素的方法の使用を示す。

【図4】図4は、異なるドナーの断片の単離、および同じフラスコにおけるこれらの断片の共培養を示す。異なるHLAマッチ、部分的マッチ、および/またはアンマッチドナーから得た断片は、これらが免疫反応のいかなるシグナルも提示しない限り、MSC産生のため、同じフラスコ中で培養されることも可能である。

10

20

30

40

50

【図5】図5は、「1回」幹細胞単離のための組織供給源凍結保存の慣用法(a)および本出願の組織供給源凍結保存(b)を示す。

【図6】図6は、正常MSCおよびEPまたはiPS細胞の間の原理的な相違を示す。

【図7】図7は、2つのタイプの増殖培地におけるhIDPSCの増殖を示す。

【図8】図8は、MtbおよびM.ボビス(M. bovis)株に感染したC57BL/6マウスの肺細胞によるサイトカイン産生に対する、IDPSC腹腔内接種の影響を示す。

【図9】図9は、蛍光顕微鏡を通して視覚化された角膜移植用のIDPSCにおける角膜縁幹細胞マーカーの免疫染色を示す。スケールバーは、50μmの距離を示す。パネルAは、IDPSCにおけるp63の核局在を示す。パネルBは、パネルAとDAPI核染色の合併図である。パネルCは、インテグリン1の膜局在を示す。パネルDは、中間径フィラメント、ビメンチンの検出を示す。パネルEは、細胞膜タンパク質であるコネキシン43の検出を示す。パネルFは、形質膜タンパク質であるABCG2の検出を示す。パネルGは、K3/12の弱い陽性免疫染色を示す。パネルHは、陰性対照を示す。

【図10】図10は、IDPSCにおける角膜縁幹細胞マーカー(ABCG2、コネキシン43、およびK12)の発現のRT-PCR分析を示す。レーン1は100bpラダーである。レーン2はヒト角膜組織試料である。レーン3はヒト角膜縁組織試料である。レーン4はIDPSC試料である。

【図11】図11は、歯髄中の幹細胞ニッチを示す。パネルAは、歯が歯冠部分および歯根部分で構成されることを示す。パネルBは、歯髄の血管周辺ニッチ(a)および神経叢(b)の位置を示す。パネルCは、血管周辺ニッチ(a)および神経叢(b)におけるネスチンの免疫染色を示す。パネルDは、象牙芽細胞下(subodontoblastic)ニッチ(c)ならびに細胞不含および細胞リッチゾーン(d)の位置を示す。パネルEおよびFは、それぞれ、象牙芽細胞下ニッチ(c)ならびに細胞不含および細胞リッチゾーン(d)におけるネスチンの免疫染色を示す。

【図12】図12は、臍帯における神経幹細胞の推定上のニッチを示す。パネルAは、羊膜下(subamniotic)上皮におけるニューロフィラメント(NF)の発現を示す。パネルBは、静脈における低アフィニティ神経増殖因子(p75またはCD271)の発現を示す。パネルCは、推定上の神経幹細胞ニッチから単離された幹細胞のベータIIITチューブリンの陽性免疫染色を示す。パネルDは、推定上の神経幹細胞ニッチから単離された幹細胞のGFAPの陽性免疫染色を示す。

【図13】図13は、臍帯組織中の異なる幹細胞ニッチにおける、Oct3/4、nanog、およびSox2などの転写因子の発現を示す。白い矢印はこれらの転写因子を発現している細胞を示し、一方、黒い矢印は、これらの転写因子の発現を欠く細胞を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

米国特許出願公報第2004/0136967号は、臍帯マトリックスから幹細胞を得るための方法であって、臍帯の外植片から細胞を単離するか、あるいは細胞を酵素的に、例えばコラゲナーゼまたはトリプシンで遊離させる工程を含む、前記方法を開示する。次いで、組織切片を別のガラススライドで覆い、そして完全培地中で培養する。したがって、先行技術は、外植片培養の反復可能な使用を解説しない。

【0014】

先行技術の幹細胞集団をスケールアップする方法とは異なり、本発明は、多数回の収集周期を用いて、培養幹細胞の集団を増加させる。やはり先行技術の方法とは異なり、起源の組織は解剖されず、反復収集周期のために機械的にスライスされるかまたは粉碎される。組織は最小限に操作されるべきである。収集周期は、新鮮な培養表面に組織をトランスファーして、例えば幹細胞の新規外植片培養を樹立する周期を指す。本発明において、収集周期(幹細胞ソーシングのための組織トランスファー)を複数周期、例えば1~100トランスファーに渡って反復することも可能である。多数回の収集周期は、ユニークな特徴を持つ幹細胞の大規模供給を提供する、多数の初代培養を樹立する。言い換えると、本

10

20

30

40

50

発明は、同じ組織の反復収集周期を通じて、最小限に操作された組織供給源から収集される幹細胞の反復初代培養によって、大規模に幹細胞を口バストに培養する方法を提供する。予期せぬことに、収集周期の反復は、各周期中で得られる接着細胞数の増加を生じる。そして驚くべきことに、外植片培養を反復することによって、抗生物質 / 抗真菌剤および補充物を含有する培養増殖培地に曝露された、最小限に操作された組織片を非酵素的に収集することを通じて、本発明者らは、第 0 継代 ( P 0 ) 状態を複数回開始可能であり、これによって、反復収集周期を通じて十分な数の幹細胞を提供しながら、低継代での核型安定により、安全性の見込みが改善されることを見出した。

#### 【 0 0 1 5 】

組織を最小限に操作する方法は、非療法適用、主に診断目的に関して、先行技術に部分的に知られていた。特に、これらの目的には、毒性、発癌性、療法物質、生物学的剤または感受性試験の影響を評価するための、器官 (例えば角膜) および組織外植片の培養が含まれる。近年、本発明者らは、歯髄幹細胞単離のためのこの技術の利用を開示した。このアプローチの主な目的は、培養組織構築を維持することであり、例えばその構造および機能に関して、実質および間質を保存することである。したがって、*in vitro* で培養中の器官は、*in vivo* での器官機能と類似している。さらに、本発明者らはまた、診断スクリーニング法に関して従来技術において以前用いられた、器官片からの細胞単離のために外植片を培養するアプローチも利用した ; 単離した組織を、単離し、無菌条件下で最小限に処理し、小片に刻み、そして培養培地を含有する細胞培養プレート中に置いた。

10

20

#### 【 0 0 1 6 】

外植片培養は、細胞が周囲の細胞外マトリックス中に置かれ、ニッチから外部環境への *in vivo* 幹細胞 / 前駆細胞の遊走をより正確に模倣する培養であり、そして前駆細胞は組織から遊走し、そして培養プレート表面に接着する。これらは環境および幹細胞ニッチを保持するため、どちらのアプローチも類似性を有する。幹細胞拡大のためにこの方法を利用すると、培養中の組織が低酸素に供されるため、有益である。しかし、培養培地は、最小限に操作された組織の外植片細胞および生存段階で維持されるはずの組織内の細胞を補助するために十分な栄養供給を提供する。この利点は、先行技術の解説に比較して予期せぬものであり、そして幹細胞を未分化状態に維持する際に大きな利点を提供する。したがって、小さい器官である歯髄、および外植片の機械的トランスファーは、単離後、その始原特性を不変のまま維持するために、幹細胞を連続して単離する戦略である。歯髄は、緩い結合組織であり、そしてこの器官は重量が多様でありうる。より軽い DP は、接着および細胞伸長 ( *out growth* ) なしに流動する傾向がある。基質への歯髄組織の接着を加速させるため、無菌カバースリップを用いて、より低酸素条件を提供することも可能である。カバースリップの使用は、多数回収集周期中、組織幹細胞ニッチ内で低酸素症を誘導する別の例である。

30

#### 【 0 0 1 7 】

1 つの態様において、本発明は、最小限操作された組織から初代由来および継代幹細胞の拡大集団までの少なくとも 1 つの収集周期を通じて、*in vitro* 拡大する方法に関する。各収集周期中、外植片細胞の数は、古典的な酵素的に得られる幹細胞拡大で単離された細胞の数を少なくとも倍増する。収集周期の数は、少なくとも 3 周期 ( H 1 ~ H 3 ) 、少なくとも 6 5 周期 ( H 1 ~ H 6 5 ) 、または最大 1 0 0 収集周期 ( H 1 ~ H 1 0 0 ) であることも可能である。各収集周期は、最小限に操作された組織断片 (例えば非酵素的または非化学的処理、解剖されない) を、抗生物質を補充した培養培地中で維持して、半集密幹細胞培養を得るために十分な期間、細胞を外植し、そして最終幹細胞集団のためにこれらの細胞を採取する工程を含む。培養細胞のこの世代は収集周期の初代継代 ( P 0 ) である。

40

#### 【 0 0 1 8 】

該方法は、最小限に操作した組織を洗浄し、そして組織を少なくとも 1 回の収集に渡って、*in vitro* で維持し、したがって、幹細胞、例えば多様なタイプの間葉系多分

50

化能および多能性幹細胞を培養表面またはビーズに付着させる工程を含む。収集周期由来の各外植片培養はP 0であり、そしてその後の継代またはバイオリアクター系のための供給源を提供する。外植片培養を最大50継代まで継代することも可能である。細胞は酵素的にまたは非酵素的に継代可能である。反復収集周期中、組織および細胞を、増殖因子および/または抗菌溶液を含有するDME M補充増殖培地中で維持することも可能である。いくつかの側面において、本発明の方法を用いて組織片を通じて得られる幹細胞の総数は、古典的な酵素的に得られた幹細胞拡大を通じて得られる幹細胞の数の少なくとも三倍である。いくつかの実行において、本発明の方法を通じて得られる幹細胞の総数は、古典的な酵素的に得られた幹細胞拡大を通じて得られる幹細胞の数よりも、少なくとも3倍～少なくとも65倍高い。したがって、本発明は、同じ組織供給源を用いた古典的方法と比較して、単一のまたは混合ドナーの組織/体液供給源から得られる幹細胞数を増加させる方法に関する。

10

#### 【0019】

外植片培養を樹立する前に、組織を凍結保存してもよい。培養し、そして続いて継代した外植片由来の接着細胞もまた、凍結保存可能である。凍結後の細胞生存度は、50～90%より高く、これによって、これらの細胞は、産業および療法適用に適したものになる。該方法のいくつかの側面において、療法組成物は、記載する方法にしたがって多数回の収集周期中に得られる凍結融解間葉系幹細胞を混合するバッチから得られる。研究および臨床適用のための細胞のバッチは、異なる収集周期由来のP 0細胞を含む組成物であることも可能である。

20

#### 【0020】

別の態様において、本発明は、本発明の方法にしたがって単離されたバッチを、ヒトまたは動物の治療が必要な部位に注射しそして/または移植する工程を含む、細胞療法に関する。細胞のバッチは、異なる収集周期および継代の直接凍結ストックから得られた混合細胞であってもよい。また、細胞のバッチを、ヒトまたは動物に投与する前に、凍結ストックから培養することも可能である。いくつかの実行において、細胞のバッチを、放出される適切な因子および/または試験される適切なバイオマーカーなどの、ターゲットとする療法に必要な機能的パラメータに関して試験する。本発明の方法にしたがって単離される最終幹細胞集団は、間葉系マーカーを発現する。最終幹細胞集団はまた、多能性マーカー、神経外胚葉マーカー、および/または周皮細胞マーカーも発現することも可能である。いくつかの態様において、最終幹細胞集団は、好ましくは、間葉系およびいくつかの多能性マーカー、特に神経外胚葉、上皮マーカー、および/または周皮細胞マーカーを発現する。いくつかの態様において、幹細胞は、好ましくはMHCクラスII発現、例えばHLA II (HLA - DR) 発現を欠く。神経適用のため、好ましくはCNS因子、マーカー、例えばベータ・チューブリン、SOX 2; またはSOX 10; あるいは神経増殖因子およびペプチド、例えばGDNF、NGF、およびBDNFを試験する。細胞のバッチは、試験した分化能を有することも可能である。いくつかの側面において、本発明はまた、pHが酸性ではなくそして細胞に対して毒性ではない、細胞療法用の緩衝療法組成物にも向けられる。

30

#### 【0021】

本発明の態様はまた、最小限に操作された細胞から、*in vitro*で拡大された培養中で、初代幹細胞を得る方法であって、組織を、化学薬品または酵素によって完全に分解するまで処理せずまた解剖しない、前記方法にも関する。これらの方法は：抗菌溶液を含有する補充増殖培地中で維持された細胞培養チャンバー中の前記組織から、接着幹細胞を連続して、周期的に、または断続的に収集し；そして最初の収集反復工程由来の培養細胞を継代する工程を含む。好ましい態様において、収集工程を反復し、そして各収集工程に関して、少なくとも1回、2回または3回、継代工程を反復する。多数回の収集周期後、培養中で生じる幹細胞を混合し、そして適切なバイオマーカーの品質管理によって、機能性に関して試験することも可能である。療法使用前に、これらの細胞を凍結することも可能である。

40

50



## 【 0 0 2 2 】

表 1 は、本発明の方法から、そして先行技術の方法から得られる細胞数を比較する。

表 1 . 異なる供給源から得られる成体間葉系幹細胞の比較 :

## 【 0 0 2 3 】

## 【 表 1 】

MSC 供給源	細胞数	参考文献
脂肪組織	100 mL 中、 $3 \times 10^7$ 1 L 中、 $1 \times 10^{10}$	Schirmaier et al. , 2009
脂肪組織	$(1-3) \times 10^8$	Vallee et al., 2009
臍帯のワルトン膠様 質	$1 \times 10^8$ 細胞 (単一の臍帯由来の15 日間培養)	Nekanti et al., 2010
胎盤	第 2 継代で、 $(7.6-11.6) \times 10^8$ (胎盤組織塊のおよそ半量から ; 細胞を第 5 継代まで、0.6-0.8/日の倍 加率で維持した)	Brooke et al., 2008
第三大臼歯 (酵素的)	$(25.29 \pm 1.85) \times 10^6$	Govindasamy et al., 2011
骨髓	$4 \times 10^7$ 細胞 (骨髓 10 ml から)	従来技術 (未開示)
骨髓	フラスコ : 平均収量 $2 \times 10^8$ 細胞 バイオリアクター : 平均収量 $2 \times 10^8$ 細胞	Hanley et al., 2014
乳歯歯髄	$3.5 \times 10^8$ (最初の 35 収集周期から第 3 継代)	Cellavita
乳歯歯髄	$0.9 \times 10^9$ (収集周期 3 の第 1 継代、収 集周期 2 の第 2 継代、および収集周 期 1 の第 3 継代)	Lizier et al., 2012
臍帯組織	$3.6 \times 10^7$ (培養 5~7 日後の単一の臍 帯組織由来の最初の収集周期由来)	Cellavita

## 【 0 0 2 4 】

1 つの態様において、本発明の方法は、組織から過剰な血液を洗浄し、そして抗生物質および緩衝溶液で、採取組織を消毒する工程を含む。また、組織を機械的に組織断片に分離し、ここで組織は顕微鏡を用いずに目で見える片に切断される。例えば、組織断片は 1 mm より大きいはずである。組織断片を補充培養培地に曝露する。好ましい態様において、補充培養培地は、DMEM、より好ましくは DMEM F12 に基づく。数回の培養後、接着細胞が半集密に達したら、組織断片を別の収集周期のため、新規プレートにトランスファーする。

## 【 0 0 2 5 】

いくつかの態様において、各収集周期 (P0) 後の幹細胞を多数継代で培養して、培養中の幹細胞数を拡大する。正常核型を維持しながら、幹細胞を 3 回、15 回、または 50 回継代することも可能である。いくつかの態様において、各反復周期において、幹細胞を、何人かのドナーから、または先行する反復周期と同じドナー由来の何回かの試料採取 (例えば同じドナー由来の乳歯歯髄、外科処置を通じた異なる組織試料採取) から、混合さ

れた組織片より得る。供給源組織は、新鮮であっても、または細胞バンクや凍結保存後に融解されて得られてもよい。

【0026】

外植片収集に続いて、未分化または分化細胞の酵素的分割/継代を、当該技術分野に知られる古典的な細胞培養条件において、またはバイオリアクター条件下で、無菌プラスチックフラスコ、ガラスウェア、無菌バッグ、マイクロキャリア (micro-carriers)、マイクロファイバーリアクターなどにおいて、実行することも可能である。

【0027】

1つの態様において、幹細胞の拡大法を機械的トランスファー、栄養素枯渇、および低酸素条件によって加速することも可能である。いくつかの実行において、方法は以下の工程を含む：

(i) 出生後、若年または成体間葉系細胞および前駆体幹細胞を、最小限に操作された組織 (好ましくは神経外胚葉起源幹細胞ニッチの細胞および周皮細胞を含有する組織、あるいは/ならびに上皮供給源、すなわち歯科組織、出産後組織、例えば胎盤、羊膜、臍帯；毛包、および外胚葉下 (under-ectodermal) 供給源等から単離されたもの) から得る工程：

(ii) ここで、前記組織は、生存性に関して本質的に試験され、抗菌、抗真菌条件で維持され、実質的に血液を含まないよう清浄化され、機械的に小片に分割される (好ましくは、補充培地に曝露するため、約 0.5 ~ 5 mm)。

【0028】

(iii) 最小限に操作された組織からの前記幹細胞コロニー形成を、非酵素的/機械的方法の下で実行する。

(iv) 前記コロニー形成は、本質的に機械的操作および培地曝露およびプラスチックウェア、ビーズまたは接着表面への細胞接着によって誘導され、前記コロニー開始は、低酸素/5%またはそれ未満の低血清培地の飢餓ストレス条件下でほぼ第3日またはそれ以後、あるいは正常培養増殖条件下でそれ以後に、開始される。

【0029】

(v) 反復多数回収集は、低い継代数の多数の細胞の使用を提供し、ここで各収集は、新規初代培養を開始し、最初の収集後、ストレスを受けて、組織サイズは減少し、そして次の収集から細胞を収集する期間は、最初の初代収集培養よりも約2倍迅速になる。

【0030】

(vi) 多数の幹細胞ニッチに由来する、こうした最小限に操作された組織から得た前記細胞は、in vivo 条件を模倣して、in vivo および in vitro で、同じマーカーを発現する。

【0031】

(vii) 前記コロニー形成のための条件を、化学的ストレス、例えば低酸素、機械的ストレス、例えばカバースリップ下の圧；または/および補充物飢餓、好ましくは血清5%およびそれ未満によって誘導可能な、ストレス-低酸素条件下で、実質的に少なくとも2倍、誘導し、そして加速することも可能である (以下の実施例MS2を参照されたい)。

【0032】

(viii) 多数回反復収集由来の幹細胞の初代収集からのコロニー形成単位を酵素的または非酵素的に継代した後、細胞増殖に適した条件に曝露し、ここで好ましい例において、血清補充は約15%であり、または増殖因子およびさらなる補充を行う。当該技術分野において、低酸素/ストレス条件を加速することが周知である、低グルコースDMEMを用いた場合、前記増殖を有意に加速することも可能である (以下の実施例MS3を参照されたい)。

【0033】

細胞療法のための移植を、緩衝薬学的組成物、ヒドロゲル、移植足場内で、さらなる活性添加剤、あるいは相乗的薬学的または生物学的成分等を伴いまたは伴わずに、実行する

10

20

30

40

50

ことも可能である。

【0034】

多様な細胞療法適用のために、得た細胞を、全身または／および局所投与経路を通じて、単回、しかし好ましくは多発性硬化症様治療のイヌ治療において以下の実施例に示すように、反復投与様式で細胞を投与することによって、用いることも可能であり、後者の場合、最適な結果は、症状を改善するため、2～3、好ましくは>2、3または4回の細胞の反復注射を通じて得られる。より好ましいアプローチにおいて、細胞療法によってプロセスの逆転が調節可能である時点である、疾患の比較的初期の段階で、細胞を投与すべきである。

【0035】

上に列挙する利点は、顧客の多数の利益に変換されるであろう：

- ・よく定義され、そして特徴付けられた幹細胞のロバストでそして再現可能な産業規模の産生が可能になると予期される。

【0036】

- ・将来のバイオリアクター拡大のため、初期継代由来の高品質の出発材料が得られる。
- ・Cellavita細胞のユニークなタンパク質発現パターンによって、容易でそして標準化された特徴付けが可能になる。

【0037】

幹細胞単離および断片の機械的トランスファーの非酵素的方法のありうる適用を図3に提示する。細胞または単離断片を、生理活性分子の単離のため、凍結乾燥し、沈殿させ、抽出し、そして精製するかまたはさらにプロセッシングすることも可能である。これらの分子を、美容（若返り）外部および内部使用のための「カクテル」または療法クリームを生成するために、新規の未知の物質の配列決定および合成のためのテンプレートとして用いることも可能である。他方で、MSCを、幹細胞療法として、多様な疾患、傷害および外傷の治療において用いることも可能である。これらの細胞はさらに、癌治療における多様な療法または自殺分子を送達するためのビヒクルとして働きうる。また、これらの細胞を、遺伝子および組織操作、支持体（または足場）を伴うまたは伴わない器官のプリンティング（printing）において、そして多数の疾患において、他のタイプの細胞および／または幹細胞と組み合わせて用いることも可能である。

【0038】

しかし、本発明者らは、単離幹細胞の最終集団が、幹細胞ニッチにしたがって、幹細胞特性に影響を及ぼしうる、表2に示すような類似であるがまた限定的な特性を同時に提示しうることを見出した。

【0039】

表2. UCおよびDP組織中の異なる幹細胞ニッチ

【0040】

10

20

30

【表 2】

臍帯 (UC) 組織における幹細胞ニッチ 胚外中胚葉由来			歯髄(DP) 組織における幹細胞ニッチ 胚性外胚葉由来
UC には存在しない			神経叢中の神経ネットワーク
ワルトン膠様質 ムコ多糖で構成されるゼラチン状物質 (ヒアルロン酸およびコンドロイチン硫酸) ある程度の線維芽細胞およびマクロファージを含有する			DP には存在しない
UC には存在しない			歯髄柔結合組織、毛細血管、リンパおよび神経要素 線維芽細胞および未分化間葉系細胞を含有する コラーゲン線維、I 型および II 型を含有する
UC には存在しない			小毛細血管
静脈および動脈			DP には存在しない
内部縦平滑筋	外部環状平滑筋	血管内皮細胞	DP には存在しない
UC には存在しない			象牙芽細胞下領域 幹細胞—象牙芽細胞を含有する
羊膜上皮 基底層			DP には存在しない
羊膜下上皮			DP には存在しない

## 【0041】

表 2 は、2 つの組織の例を提示するが、本開示はこれらの組織に限定されず、そして以下の任意のタイプの組織を含むことも可能である：

- a. 胚性外胚葉および神経冠由来（舌下および顎下組織、唾液腺および涙腺、歯乳頭、歯堤、ヘルトヴィッヒの上皮鞘、歯小囊、歯根膜、皮膚、痣等）；
- b. 胚外中胚葉由来（卵黄嚢および羊膜、臍帯、胎盤および胎膜）；ならびに
- c. 胚性中胚葉由来（脂肪組織および骨髄）。

## 【0042】

すべてのこれらの細胞は、断片供給源として働き、これを図 1 および 2 にしたがってプロセッシングし、そして図 3 および 4 にしたがって用いることも可能である。

a、b、c に記載する、しかしこれらの例に限定されない、異なる組織供給源から得られる各幹細胞タイプを、多様な目的のため、そして多様な適応症のため、細胞療法および再生医学で用いることも可能である。同時に、これらの幹細胞が異なる胚性起源である場合、療法治療において、増進されたまたは相補的なまたは相補的な効果を提供するため、これらを組み合わせて用いることも可能である。例示される組織供給源には：臍帯、歯/歯周組織、下顎組織、粘膜組織、胃腸組織、胎盤、羊水または羊膜嚢、神経組織（例えば神経およびグリア細胞含有組織）、神経冠由来組織または末梢神経系起源、筋肉、骨、皮膚（真皮、上皮、角化細胞含有、またはメラニン形成細胞含有組織、包皮、形成外科または生検由来皮膚）、脂質/脂肪組織、血液および他の体液、乳腺組織、内皮組織、精巣組

織、卵巣、心臓組織、肝臓、骨組織、肺組織、唾液腺組織、膵臓組織、心臓および脾臓が含まれる。

【0043】

幹細胞単離および機械的トランスファーの非酵素的方法はまた、最小限の変動を伴って他の組織、例えば臍帯（図1）に関して拡大可能である。例えば、臍帯（UC）から5cm片を単離し（図1A）、過剰な血液を除去するために生理食塩水溶液のような無菌溶液で洗浄する（図1B）。UC組織の最初の片を培養するためにさらに小さい組織断片に切断し（パネルC）、そして基本培地内に機械的にトランスファーする（図1D）。基本培地は、幹細胞の各タイプに特異的なものであることも可能であり、そしてその特定の配合は組織起源に応じる。CD105に関して陽性である幹細胞は、培養表面上に接着するために、組織から遊走する（図1E）。図1Fでは、小さいUC組織断片に由来する間葉系幹細胞（MSC）の培養が観察可能である。

10

【0044】

この方法は、図2に示すように、産業規模培養に容易に変換可能である。多数の断片をUCから単離し、そしてMSC産生のため、多様な培養フラスコに入れる。酵素処理を用いた*in vitro*拡大後、これらの細胞を細胞療法において、そして他の目的のために使用可能である。UC断片の数回の機械的トランスファーは、非常に多量のMSCを提供可能であり、これを生理活性分子の産生に用いることも可能である。

【0045】

本発明の別の態様は、この方法にしたがって単離された幹細胞を伴う患者治療措置に関する。措置は、患者の免疫および炎症状態を防御的に調節するため、幹細胞の全身投与で始まる。患者において、サイトカインおよび免疫グロブリンおよび他の免疫調節因子を（例えば血液試験で）測定することによって、抗炎症免疫調節効果が確認されたら、次いで、再生細胞療法のため、幹細胞の局所移植を適用することも可能である。

20

【0046】

機能アッセイには、感染のリスクを有しうる疾患、例えば院内感染、創傷治癒、例えば糖尿病性潰瘍、手術創傷などのための、相乗作用因子、例えば抗炎症、抗菌および再生因子の特徴付けが含まれることも可能である。

【0047】

好ましい態様において、細胞療法治療を用いるCellavita技術は、患者が受けている他の許容されうる医学的および支援的治療とともに補助的に行われるべきであるが、細胞の免疫調節および再生潜在能力を阻害しないように、補助薬剤療法の*in vitro*適用性を試験しなければならない。例えば、抗生物質、ステロイド、抗増殖および免疫抑制剤は毒性であるか、細胞活性を阻害する可能性があり、したがって、関連する療法措置に対して措置を調整すべきである。

30

【0048】

本開示、その側面および実行は、本明細書に開示する特定の材料タイプ、構成要素、方法、または他の例に限定されない。当該技術分野に知られる多くのさらなる材料タイプ、構成要素、方法、および処置が、本開示からの特定の実行での使用のために意図される。したがって、例えば、特定の実行を開示するが、こうした実行および実行構成要素は、意図する操作と一致する、こうした系および実行構成要素に関して当該技術分野に知られるような、いかなる構成要素、モデル、タイプ、材料、細胞、バージョン、量等を含むことも可能である。

40

【0049】

単語「例示的」、「例」またはその変形は、本明細書において、実施例、例、または例示として働くよう意図される。「例示」として、または「例」として、本明細書に記載するいかなる側面または設計も、必ずしも、他の側面または設計よりも好ましいかまたは好都合であるとは見なされないものとする。さらに、実施例は、明確にし、そして理解される目的でのみ提供され、そしていかなる点でも、開示する主題または本開示の関連部分を限定するかまたは制限することを意味しない。多様な範囲のさらなるまたは別の多数の例

50

が提示されうるが、簡潔にする目的のために省略されていることが認識されるものとする。

#### 【0050】

本開示には、多くの異なる型の態様が含まれるが、本開示は、開示する方法および系の原理の例示として見なされるものとし、そして開示する概念の広い側面を、例示する態様に限定することは意図されないことを理解しつつ、図に示され、そして本明細書において、詳細に特定の態様に記載されるであろう。

#### 【実施例】

#### 【0051】

##### 実施例1：歯髄の生存度

Maher Al-Atari Abou-Asiら(2011)は、5～7歳の間の年齢である患者は歯髄ではなく歯胚と呼ばれるものを有し、これは異なる部分：エナメル質、歯髄、歯肉、セメント質、骨、血管および神経を含む将来の歯を形成するであろう未分化細胞の凝集物であるため、Kerkisら、2006の公表にしたがって歯髄(DP)から抽出された多能性細胞の起源が、歯髄ではない可能性があると主張した。しかし、Cordeiroら(2008)は、ヒト剥落乳歯由来の幹細胞が、*in vivo*でDP様組織を生成することを発見した。著者らは、ヒトの歯のスライス内で調製した生体分解性足場中に植え付けたSHEDを、免疫不全マウス内に移植した。著者らは、これらの細胞によって形成された組織が、生理学的DPのものに非常によく似た構築および細胞性を示すことを観察した。透過型電子顕微鏡を用いた超構造分析およびデンチン・シアロタンパク質に関する免疫組織化学によって、SHEDが*in vivo*で象牙芽細胞様細胞に分化したことが示唆された。特に、SHEDはまた、LacZを安定形質導入されたSHEDで操作された組織中の血液含有管の壁の裏打ちをする細胞の - ガラクトシダーゼ染色によって立証されるように、内皮様細胞にも分化した。この研究によって、剥落乳歯が、DP組織操作のための幹細胞の多様な供給源を構成することが示唆される。

#### 【0052】

本発明者らは、抽出時点での歯髄の色に基づいて、細胞培養前に生存歯髄をスクリーニングした。剥落歯は、細胞生存度の指標として、赤い色の歯髄を有するはずである。赤色は、歯髄が除去時点まで血流を受け取っていたことを示す。歯髄が灰色であれば、歯髄への血流は損なわれていた可能性が高い。したがって、幹細胞は壊死している可能性が高く、そしてもはや回収できるように生存していない(Aroraら、2009)。

#### 【0053】

歯髄抽出および培養の例は、倫理委員会(欧州ではヘルシンキ、米国ではIBR)に承認されたインフォームドコンセントを受理した後、健康な被験体由来の新鮮に抽出された乳歯から行い、50%ペニシリン/ストレプトマイシン溶液(100単位/mlペニシリン、100単位/mlストレプトマイシン)および50%リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を含有する無菌溶液中で反復して洗浄し、新鮮に抽出された歯髄を再び洗浄し、そして3～20%ウシ胎児血清(FBS)、100単位/mlペニシリン、100単位/mlストレプトマイシンを補充したDP組織維持培地中で歯髄の生存度試験を行った。最小限に操作された歯髄からコロニー形成が始まり、そして細胞がプラスチック細胞培養表面に付着したら、続く収集周期を反復し、そしてまたは継代を通じて細胞を拡大し、そしてまたは組織もしくは細胞を凍結保存する前に、安全性試験(無菌試験およびマイコプラズマ試験)を行う。

#### 【0054】

歯髄抽出および培養を以下のように行う：

- ・健康な被験体由来の新鮮に抽出された乳歯を、50%ペニシリン/ストレプトマイシン溶液(100単位/mlペニシリン、100単位/mlストレプトマイシン)および50%リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を含有する無菌溶液中で、反復して洗浄する。

#### 【0055】

- ・無菌針の補助で歯からDPを除去する。新鮮に抽出した歯髄を、3%ペニシリン/ス

トレプトマイシン溶液を含有する溶液中で洗浄する。歯髓の生存度試験を、15%ウシ胎児血清 (FBS、Hyclone)、100単位/mLペニシリン、100単位/mLストレプトマイシン、2mM L-グルタミン、および2mM非必須アミノ酸を補充したDP組織維持培地中で行う。

【0056】

・歯髓がプラスチック細胞培養表面に付着したら、コロニー形成は5日から2週間観察されるであろう。

・実行する安全性試験は無菌試験およびマイコプラズマ試験である。

【0057】

#### 実施例2：歯髓外植片由来の幹細胞

10

歯科起源由来幹細胞の最近の概説 (Deepa Ponnaiyan 2014) に詳述される歯科組織の異なる例は、歯科組織由来の幹細胞、例えば歯髓幹細胞、歯根膜幹細胞、ヒト剥落乳歯由来の幹細胞、歯小囊前駆細胞、歯乳頭由来幹細胞、口腔骨膜幹細胞および最近の歯肉結合組織由来幹細胞のバイオマーカーの異なる特性を記載する。顕著なことに、マーカーの大部分は異なる歯科幹細胞間で類似であるが、NotchおよびCD29マーカーの発現は、多様な歯科供給源由来の幹細胞間で異なる。本発明者らが開示する方法によって得られる細胞のin vitroおよびin vivoのマーカー発現は同じである。

【0058】

#### 実施例3：初期継代での反復収集由来のヒトIDPSCの奇形腫形成

20

奇形腫形成は、細胞、例えば胚性幹細胞 (ES細胞) または人工多能性幹細胞 (iPS細胞) の多能性を決定する際の必須ツールである。Groppら (2012) によって最近公表されたプロトコルと類似の、細胞の奇形腫形成能を評価するための一貫したプロトコルを、本発明者らの研究では用いた。本発明者らの方法は、マウスES細胞およびヒトiPS細胞の $10^6$ 細胞 (Groppらは $10^5$ 細胞を用いた) を、免疫不全マウス内に、Matrigelと同時に皮下移植した際に、非常に再現性が高く、そして効率的であることが示された。100%の例で、本発明者らは、多数の動物で奇形腫形成を観察し、そしてさらに、最長移植後6ヶ月の追跡試験でも観察した。本発明者らは、他の成体間葉系幹細胞 (MSC)、例えば乳歯歯髓、臍帯、脂肪組織等由来のものの生体安全性分析のため、この方法を用いた。本明細書に記載する実験系に加えて、やはり部分的に多能性マーカーを発現する、骨髓、肝臓、卵黄囊、尿膜および羊水由来のイヌ胎児MSCを用いて、この方法を検証した。

30

【0059】

#### 奇形腫アッセイのための方法：

腫瘍発展を4ヶ月間 (~16週間) 監視した。多能性細胞に関しては、奇形腫の組織学的基準は、3つの胚葉すべてに由来する組織の発展であった。この分析を病理学者によって行った。生体/間葉系幹細胞に関しては、細胞注射部位での正常組織完全性に対するいかなるタイプまたはいかなる変化も考慮した。

【0060】

#### 結果

40

#### 実験系：

- a. マウス胚性幹細胞
- b. マウス3T3線維芽細胞
- c. 永続性マウス細胞株Balb/c 3T3細胞株、クローンA31
- d. ヒトiPS-IDPSC
- e. ヒトES細胞
- f. ヒトIDPSC

本発明者らは、本発明者らが樹立した異なるマウスES細胞株の多能性を特徴付けるとともに、第25継代以降のES細胞の多能性を確認するため、そしてマウスES細胞株から得られるサブクローンの特徴付けのため、多様な研究において前述の方法を用いた (S

50

ukoyanら、2002; Cartarら、2006; Kerkisら、2007; Lavagnoliら、2007; Hayshira、2010)。さらに、この方法を用いて、本発明者らのグループのより最近の刊行物 (Beltrao - Bragaら、2011) において、未成熟歯髄幹細胞 (IDPSC) 由来のiPS細胞の多能性を特徴付けた。この刊行物において、ヒトIDPSCをiPS-IDPSCの対照として用いた。本発明者らは、iPS-IDPSCが、三胚葉すべてから生じる組織とともに奇形腫を形成する一方、IDPSCはいかなるタイプの奇形腫またはいかなる他のタイプの新生物も産生不能である事を示した。

#### 【0061】

##### 実験系

a. 初期 (n = 10) および後期継代 (n = 10) のIDPSCの3つの異なる初代培養

##### b. ヒト初代線維芽細胞

本発明者らは、胚性幹細胞マーカー、Oct-4、Nanog、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、およびTRA-1-81ならびにいくつかの間葉系幹細胞マーカーを、少なくとも最初の25継代の間に発現する一方、正常核型および幹細胞拡大の特徴的な速度を維持するIDPSC集団の単離を以前報告した。さらに、これらの細胞は、in vitroで、化学的に定義された培養条件下で、平滑筋および骨格筋、ニューロン、軟骨、ならびに骨への均質な分化を経るように誘導可能である。IDPSCは、小さいサイズ、および細胞質中の少数の細胞内小器官を有するが、これらは典型的な間葉系 / 線維芽細胞様形態を提示する、未刺激 (naive) 多能性細胞とは異なる (Lizierら、2012)。IDPSCは、上皮性であるESおよびiPS細胞とは対照的に間葉系である (図5)。MSC細胞およびES細胞 (またはiPS細胞) の間の主な相違は、MSCが遊走性であり、可塑性であり、そして係留性であることである。MSC細胞は細胞外マトリックスを合成し、そして細胞間結合を含まない細胞である。

#### 【0062】

腫瘍形成は、前述のESおよびiPS細胞では関連するが、正常MSCでは関連しない。IDPSCは、多能性マーカーを発現する多様な数の幹細胞 (細胞の1~25%) を含むMSC集団によって構成される (Kerkisら、2006; Lizierら、2012)。このプロトコルは、IDPSC集団のために、特にIDPSCの20%が多能性マーカーを発現することに基づいて計算された、用いる細胞数に関して、適応された。10<sup>6</sup>細胞を試験するのではなく、IDPSCの奇形原性を5 x 10<sup>6</sup>で評価した。IDPSC DNAの存在が研究したすべての器官内に見られたが、腫瘍形成またはいかなる形態変化も観察されなかった (Lizierら)。

#### 【0063】

実施例4：主な幹細胞マーカーの発現パターンは、歯髄 (DP) の凍結保存によって影響を受けない

臍帯、羊膜嚢、胎盤および若年性幹細胞由来の新生細胞は未成熟であるため、これらは、成体対応物 (骨髄および脂肪組織) と比較した際、より高い増殖能およびより高い拡大速度を示す。したがって、臍帯、羊膜嚢、胎盤および歯髄由来の細胞を、同種療法として将来使用するために凍結保存することも可能である (組織断片および / または細胞の凍結保存を、まずフリーザー (約 - 80 ) で、そして続いて液体窒素 (約 - 196 ) で行った)。

#### 【0064】

本発明者らは、外植片の凍結保存および融解の前および後に採取した細胞が、同じパターンの因子発現を維持することを見出した。本発明者らは、凍結保存前および後の歯髄および臍帯由来の反復収集長期培養下で、最小限に操作された外植片から得られた細胞が、間葉系マーカー (すなわちCD73、CD105、CD90) を発現するが、造血系マーカー (すなわちCD34、CD45) を発現せず、そして少なくとも1つの組織適合性マーカー、HLA-DRを発現せず、そして核型安定性を維持し、多能性を維持する (誘導

10

20

30

40

50



因子、例えばレチノイン酸、BMP-TNF、NGF等とともに培養すると、神経系を含む異なる細胞系譜に分化する)ことを示した。

【0065】

例えば、乳歯から除去した歯髄を凍結保存し、そしてその後、IDPSCを単離するために融解した。IDPSCを収集0/継代3(HOP3)まで培養し、そしてFACS分析によって、新鮮なDPから得た同じ継代由来のhIDPSCに比較した。どちらの細胞の発現パターンも類似であることが見出された(表3)。どちらの種類のIDPSCも間葉系マーカー(CD105、CD73、CD90)発現に関して陽性であり、そして造血系マーカーCD45および組織適合性マーカーHLA-DRの発現に関して陰性であった。

10

【0066】

表3. hIDPSCの表現型特性に対する歯髄凍結保存の影響

【0067】

【表3】

マーカー	蛍光%	
	凍結保存なし	凍結保存後
CD105	99.51	99.57
CD73	83.11	96.01
CD90	99.03	98.63
CD45	5.79	7.09
HLA-DR*	0.2	0.3

20

【0068】

実施例5: hIDPSCの増殖速度に対する増殖培地の影響

hIDPSCを培養するための最適な増殖条件を評価するため、同数の細胞を植え付け、そして2タイプの増殖培地中で5日間培養した(表4)。細胞増殖速度は、タイプ2の増殖培地でより高い(2倍)ことが見出され(図7)、したがって、DMEM-低グルコースで構成され、そして15%FBSを補充した増殖培地が、細胞培養により適している。

30

【0069】

表4. 用いた多様な培地の組成

【0070】

【表4】

組織維持培地	培地 1 (増殖および組織維持)	培地 2 (増殖)
DMEM-F12	DMEM-F12	DMEM-低グルコース
FBS <5%	FBS >10% (例えば 15%)	FBS >10% (例えば 15%)
100 単位/ml ペニシリン、100 単位/ml ストレプトマイシン	100 単位/ml ペニシリン、100 単位/ml ストレプトマイシン	100 単位/ml ペニシリン、100 単位/ml ストレプトマイシン
2 mM L-グルタミン	2 mM L-グルタミン 2 mM 非必須アミノ酸	2 mM L-グルタミン --

40

【0071】

50

実施例 5 : 歯髄 ( D P ) からの細胞出芽の開始

D P の 2 つの等しい断片を組織培養中で維持した。断片の 1 つを 1 5 % F B S 存在下で培養し、そしてもう一方を血清欠乏ストレス条件 ( 4 . 8 % F B S ) 下で培養した。D P からの細胞出芽の開始は、4 . 8 % F B S 存在下では 3 日、そして 1 5 % F B S 存在下では 7 日であった。したがって、血清欠乏は、歯髄トランスファーに必要な時間を減少させる。したがって、歯髄からの細胞出芽の開始は、血清欠乏培地の存在下でより迅速であった。

【 0 0 7 2 】

実施例 7 : 後期集団 ( L P ) h I D P S C のパラクリン効果には、抗炎症、免疫調節、および抗菌特性が含まれる。

M S C はパラクリン機構を通じて補助し、そして抗炎症および免疫調節機構を通じて再生環境を調節する。

【 0 0 7 3 】

悪性度が異なる結核菌 ( *Mycobacterium tuberculosis* ( M t b ) ) およびマイコバクテリウム・ボvis ( *Mycobacterium bovis* ) 株に静脈内感染した C 5 7 B 1 / 6 マウスの肺細胞によるサイトカイン産生に対する、I D P S C 腹腔内接種の影響。B I O P L E X 試験データに示されるように、I D P S C 接種は、感染肺細胞によるサイトカインの産生を減少させた ( 図 8 ) 。炎症促進性 ( T N F - a 、 I L - 1 b 、 M I P - 2 、 I L - 1 7 ) および抗炎症性 ( I L - 1 0 ) サイトカインの強い減少が、非常に悪性である M t b 株に感染した肺で観察された。I F N - g および K C 産生の減少はより顕著ではなかった。I L - 4 産生の誘導は、I D P S C を接種されたマウスでのみ観察された。

【 0 0 7 4 】

腫瘍壊死因子 ( T N F 、カケキシン、またはカケクチン、および以前、腫瘍壊死因子アルファまたは T N F として知られた ) は、全身炎症に関与するアディポカインである。T N F の主な役割は、免疫細胞の制御である。T N F は内因性発熱物質であり、発熱、アポトーシス性細胞死、悪液質、炎症を誘導可能であり、そして腫瘍発生およびウイルス複製を阻害可能であり、そして I L 1 および I L 6 産生細胞を通じて敗血症に反応可能である。T N F 産生の制御不全は、アルツハイマー病を含む多様なヒト疾患に関連づけられてきている。

【 0 0 7 5 】

インターフェロンガンマ ( I F N または I F N - g ) は、インターフェロンの I I 型クラスの唯一のメンバーである二量体化可溶性サイトカインであり、ウイルスおよび細胞内細菌感染に対する自然免疫および獲得免疫に、そして腫瘍調節に非常に重要な免疫インターフェロンサイトカインとして知られる。I F N はマクロファージの重要な活性化因子である。異常な I F N 発現は、いくつかの炎症性および自己免疫疾患に関連する。免疫系における I F N の重要性は、部分的に、I F N がウイルス複製を直接阻害する能力から、そして最も重要なことに、I F N の免疫刺激および免疫調節効果から生じる。

【 0 0 7 6 】

インターロイキン 1 7 は、多様な組織においてケモカイン産生を増加させて、I F N 同様、炎症部位に単球および好中球を補充することにより、遅延型反応の強力な仲介因子として作用するサイトカインである。インターロイキン 1 7 は、細胞外病原体による免疫系への侵入に反応する、炎症促進性サイトカインであり、そして病原体の細胞マトリックスの破壊を誘導する。

【 0 0 7 7 】

インターロイキン - 1 ベータ ( I L - 1 ) はまたカタボリンとしても知られ、炎症反応の重要な仲介因子であるサイトカインタンパク質である。該タンパク質は、細胞増殖、分化、およびアポトーシスを含む多様な細胞活性に関与する。I L - 1 7 の最も顕著な役割は、炎症促進性反応を誘導し、そして仲介する際の関与である。I L - 1 7 は、一般的に、アレルギー反応に関連する。

10

20

30

40

50

## 【0078】

インターロイキン - 10 (IL - 10) はまたヒトサイトカイン合成阻害因子 (CSIF) としても知られる抗炎症サイトカインである。IL - 10 は、免疫制御および炎症における多面的影響を持つサイトカインである。

## 【0079】

ケモカインリガンド2 (CXCL2) はまたマクロファージ炎症性タンパク質2 (MIP - 2) とも呼ばれ、好中球性炎症反応を仲介する際に主要な役割を果たし、そして敗血症発展の仲介因子である。KCおよびマクロファージ - 炎症性タンパク質 - 2 (MIP - 2) は、外科手術後、皮膚において特徴的な時間的発現パターンを示す、C - X - Cモチーフを持つケモカインである。KCおよびMIP - 2 は、好中球化学誘引物質である。どちらのケモカインも、広範囲の急性および慢性炎症セッティングで発現されることが知られており、そして後に続く炎症反応の性質および度合いの非常に重要な決定要因であると考えられる。

10

## 【0080】

実施例8：最小限に操作された組織の多数回収集 (LP) によって得られる hIDPSC の口バストな免疫調節能

IDPSC は、単球由来樹状細胞と共培養した際、免疫調節作用を示す。共培養は、Lin<sup>+</sup>T 増殖の能力減少 (50% およびそれより高い) を生じ、そして Lin<sup>+</sup>T CD4<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>/IL10<sup>+</sup> および Lin<sup>+</sup>T CD4<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>/IFN - <sup>+</sup> 細胞の比率の有意な増加に向かう Lin<sup>+</sup>T 分化を誘導した。IDPSC における HLA - DR 発現の影響は観察されなかった。

20

## 【0081】

本発明者らは、反復して収集される (Cellavita 法) 最小限に操作された組織から得られる幹細胞が、大部分の多能性マーカーを発現するが、これらの幹細胞のマウスへの注射は奇形腫を形成しないことを立証した。

## 【0082】

表5. 多様な哺乳動物種間の hIDPSC 処理の比較、新鮮な培養由来細胞、ならびに凍結保存歯髄および細胞に由来する細胞を用いたモデル。

## 【0083】

【表 5】

被験体	傷害または疾患のタイプ	重量	投与	移植片数	移植細胞数	効率範囲: 0-5
凍結保存歯髄および低継代 (継代 3-4) の細胞由来の hiDPSC を用いた新規細胞療法治療例						
イヌ (n = 30)	デンプスター (ヒト多発性 硬化症)	a. 3-5 kg b. 5-20 kg c. > 20 kg	内因性 (EV)	a. 1-2 b. 2-3 c. 4	a. $4 \times 10^6$ b. $6 \times 10^6$ c. $4 \times 10^6$	2-5* * すべての被験体は 機能の逆転を伴わず に生存していた: - 40% 治癒(3-4) - 50% 有意な機能的回 復 (4-5) - 10% 劣った機能的回 復、時間とともに改善 (2-3)
ヒト (n = 5)	骨再生、歯科 移植	平均 70 kg	局所 (足場を 含む)	1	$2 \times 10^6$	5 骨再生、成熟および血 管新生
新鮮な細胞を用いた処置 (以前、2006-2011 に公表)						
マウス (n = 16)	脊髄傷害	25-30 g	病変中心	1	$8 \times 10^5$	4 白質再生および部分 的機能回復
ラット (n = 8)	5 mm x 8 mm 頭蓋骨欠損	320-420 g	局所 (足場を 含む)	1	$1 \times 10^6$	5 骨再構築
ウサギ (n = 15)	角膜欠損 直径 6.0-10.0 mm	-	局所 (足場を 含む)	1	$1 \times 10^6$	3-4 角膜再構築 50% の動物で機能回 復 (範囲は傷害の重篤度 に応じる)
ヒツジ (n = 4)	大腿骨頭の骨 壊死	35 kg	局所	1	$1 \times 10^6$	5 骨再生、機能回復

## 【 0 0 8 4 】

## 実施例 9 : 歯髄における新規神経叢および象牙芽細胞下幹細胞ニッチの発見

初期神経マーカー、ネスチンに関する免疫染色によって、神経叢、血管周辺ニッチ、および象牙芽細胞下ニッチの間の発現相違が示された。神経叢中の細胞は、ネスチン陽性であり(図 1 1 C、b)、一方、血管周囲ニッチ中の細胞はネスチン陰性であった(図 1 1 C、a)。象牙芽細胞下ニッチ中の細胞もまたネスチン陽性であった(図 1 1 D、c および 1 1 E、c) が、細胞不含および細胞リッチゾーンのニッチは、ネスチン陰性であった(図 1 1 D、d および 1 1 F、d)。

## 【 0 0 8 5 】

## 実施例 10 : 臍帯中の推定上の幹細胞ニッチの発見

ニューロフィラメント (NF) および低アフィニティ神経増殖因子受容体 (p 7 5 また

10

20

30

40

50

はCD271)を検出することによって、臍帯中の推定上の幹細胞ニッチを検出した。NFは、ニューロンで見られる10nmフィラメントまたは中間径フィラメントである。CD271は、ニューロトロフィンの2つの受容体タイプの1つであり、ニューロトロフィンは神経細胞を生存させ、そして分化させるよう刺激するタンパク質増殖因子のファミリーである。NFおよびCD271はどちらも、臍帯組織中で見られた。NF発現は、主に、羊膜下上皮ゾーンであり(図12A)、一方、CD271発現は、主に、静脈および動脈中であつた(図12B)。これらのニッチから単離される幹細胞は、神経分化を*in vitro*で経て、ベータ-I II Iチュープリンおよびグリア線維性酸性タンパク質(GFAP)を発現することが可能であつた(図12Cおよび12D)。

【0086】

10

実施例11：臍帯における多能性幹細胞または未成熟前駆体ニッチの発見

転写因子、例えばOct3/4、nanog、およびSox2の発現を検出した。Oct3/4タンパク質発現は、WJ、静脈(VE)、動脈(AR)の細胞において、そして羊膜上皮(AEP)の基底層(BL)に位置する細胞において、核局在とともに適切に検出された(図13)。多能性幹細胞と同様、核においてこれらの3つのマーカーすべてを発現する少量の細胞が検出された。したがって、本発明者らは、臍帯のVEまたはARから、そしてAEPから、少数の「本物」の多能性幹細胞の単離を予測可能である。これらの細胞はまた、他の関連組織、例えば胎盤および胚外中胚葉由来の組織でも見られうる。

【0087】

20

実施例12：安全性アッセイ - 数回の機械的トランスファー後の幹細胞ニッチ*in vitro*培養

人体の特定の解剖学的部位に位置する幹細胞があることはよく知られており、これらは幹細胞ニッチ(SCN)と呼ばれる。各組織はそれ自体のSCNを持ち、これは周囲の微小環境から受け取るシグナルに反応して、幹細胞の運命に関する決定を行う。しかし、天然ニッチ内の幹細胞の*in situ*生物学的特性に関しては、そしてMSCの*in vitro*培養中にこれらの特性がどのように変化しうるかに関しては、ほとんど知られていない。例えば、細胞は、いくつかのタンパク質発現を停止するか、または新規タンパク質発現を開始する可能性もある。この問題は、臨床研究において、広範囲に及ぶ暗示を有する可能性もあり、そして再生医学における幹細胞の成功および/または失敗を説明する可能性もあるため、非常に重要である。*in vitro*で培養した細胞は、組織構築、ならびに組織背景に基づく機能(細胞間相互作用、特定の因子の分泌等)のすべてを欠く。これが、細胞株が組織特異的機能を失い、そしてSCNにおける細胞とはまったく異なる分子表現型を獲得しうる理由である。SCN内の幹細胞マーカーの発現パターンの研究は、幹細胞安全性の評価に、特にヒトにおけるその使用に関して非常に重要である。

30

【0088】

表6において、本発明者らは、単離後の細胞の*in vivo*組織試料に関する免疫組織化学アッセイ、および数回の機械的トランスファーを用いた培養した細胞の*in vitro*試料に関するフローサイトメトリーによって得たデータを要約する。表6は、*in vivo*および*in vitro*で幹細胞、特に歯髄によって発現されるマーカーの大部分が、機械的トランスファー後に得られる単離細胞において、マーカーの欠如を示さなかったことを示す。臍帯組織の機械的トランスファー後に得られた細胞は、c-kitおよびビメンチンを発現する細胞頻度にわずかな相違を示した。これらの結果は歯髄および臍帯組織から単離された幹細胞由来であるが、こうした安全性アッセイは、他の供給源由来の幹細胞で、さらには液体相にある細胞に関しても、使用可能である。

40

【0089】

表6. 歯髄および臍帯組織由来の幹細胞における*in vivo*および*in vitro*の主な幹細胞マーカーの発現パターン。+++は多数の細胞を示し、++は中程度の数の細胞を示し、そして+は少数の細胞を示す。

【0090】

【表 6】

マーカー	歯髄		臍帯	
	In vivo	In vitro	In vivo	In vitro
Oct 3/4	+++	+++	+++	+++
Nanog	+	+	+	+
Sox2	++	++	+	+
ネスチン	+++	+++	+	+
CD271 (p75)	+++	+++	+	+
NF	++	++	+	+
PCK	++	++	+	+
SDC 3	++	++	+	+
CD29	+++	+++	+++	+++
CD140b	+	+	+	+
CD146	++	++	+++	+++
HLA-ABC	+	+	++	++
<u>C-kit (CD117)</u>	++	++	<u>+++</u>	<u>+</u>
フィブロネク チン	+++	++	+++	+
CD105 (SH-2)	+++	+++	+++	+++
CD90 (Thy-1)	+++	+++	+++	+++
SDC 1	+++	+++	+	+
ビメンチン	+++	+++	<u>+++</u>	<u>+</u>
STRO-1	+	+	n/a	n/a
CD44	++	++	+++	+++
CD166	++	++	++	++
CD73	+++	+++	++	++

## 【0091】

別に定義しない限り、本明細書のすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の一般の当業者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載するものと類似であるかまたは同等であるいかなる方法および材料も、本発明の実施または試験において使用可能であるが、好ましい方法および材料を本明細書に記載する。引用するすべての刊行物、特許、および特許公報の全体が、すべての目的のため、本明細書に援用される。

## 【0092】

本明細書で論じる刊行物は、もっぱら、本出願の出願日前の開示に関して提供される。本明細書のいずれも、本発明が、先行発明によるこうした公開に先行する権利を与えないという承認とは見なされないものとする。

## 【0093】

開示する発明は、特定の方法論、プロトコルおよび材料に限定されないものとし、これは、これらが多様でありうるためであることが理解される。また、本明細書で用いる用語法は、特定の態様を記載する目的のためのみのものであり、そして本発明の範囲を限定す

るとは意図されず、本発明は、付随する請求項によってのみ限定されるであろう。

【 0 0 9 4 】

当業者は、本明細書に記載する本発明の特定の態様の多くの同等物を認識するか、またはルーチンの実験以上のものを用いずに、確認可能であろう。こうした同等物は、以下の請求項によって含まれると意図される。

【 0 0 9 5 】

参考文献

【 0 0 9 6 】

【化 1 - 1】

1. Chen VC et al. (2012) “Scalable GMP compliant suspension culture system for human ES cells” *Stem Cell Res.* 2012 May;8(3):388-402.
2. Schirmaier et al: Scale-up of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell production in stirred single-use bioreactors under low-serum conditions. *Eng. Life Sci.* 2014, 14, 292–303,
3. Vallee et al: Adipose-tissue engineering: taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. *Pathol Biol (Paris)*. 2009 Jun;57(4):309-17 10
4. Nekanti et al: Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Stem Cell Research* (2010) 5, 244–254.
5. Brooke G, Rossetti T, Pelekanos R, et al: Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials. *Br J Haematol.* 144:571–579. 2008.
6. Govindasamy et al: Human platelet lysate permits scale-up of dental pulp stromal cells for clinical applications. *Cytherapy*, 2011; Early Online, 1–13 20
7. Hanley et al: Efficient manufacturing of therapeutic mesenchymal stromal cells with the use of the Quantum Cell Expansion System ;*Cytherapy*, 2014-08-01, Volume 16, Issue 8, 1048-1058
8. Lizier NF, Kerkis A, Gomes CM, Hebling J, Oliveira CF, Caplan AI, Kerkis I. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. *PLoS One*. 2012;7(6):e39885; Kerkis I, Caplan AI. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012 Apr;18(2):129-38. 30
9. Maher Al-Atari Abou-Asi Núria Casals Farré Lluís Giner Tarrida Lluís Giner Tarrida Eduardo Ferrés Padró Patent application title: PLURIPOTENT STEM CELLS OBTAINED FROM DENTAL PULP <http://www.faqs.org/patents/app/20110236356>
10. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod.* 2008 34(8):962-9. 40
11. Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED): Saving for the Future *J Clin Pediatr Dent* 33(4): 289–294, 2009

【 0 0 9 7 】



【 化 1 - 2 】

12. Sukoyan MA, Kerkis AY, Mello MR, Kerkis IE, Visintin JA, Pereira LV. Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases. *Braz J Med Biol Res.* 2002 May;35(5):535-42.
13. Carta L, Pereira L, Arteaga-Solis E, Lee-Arteaga SY, Lenart B, Starcher B, Merkel CA, Sukoyan M, Kerkis A, Hazeki N, Keene DR, Sakai LY, Ramirez F. Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. *J Biol Chem.* 2006 Mar 24;281(12):8016-23 10
14. Kerkis A, Fonseca SA, Serafim RC, Lavagnoli TM, Abdelmassih S, Abdelmassih R, Kerkis I. In vitro differentiation of male mouse embryonic stem cells into both presumptive sperm cells and oocytes. *Cloning Stem Cells.* 2007 Winter;9(4):535-48.
15. Lavagnoli TM, Fonseca SA, Serafim RC, Pereira VS, Santos EJ, Abdelmassih S, Kerkis A, Kerkis I. Presumptive germ cells derived from mouse pluripotent somatic cell hybrids. *Differentiation.* 2009 Sep-Oct;78(2-3):124-30 20
16. Hayashi MA, Guerreiro JR, Cassola AC, Lizier NF, Kerkis A, Camargo AC, Kerkis I. Long-term culture of mouse embryonic stem cell-derived adherent neurospheres and functional neurons. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010 Dec;16(6):1493-502.
17. Lima BL, Santos EJ, Fernandes GR, Merkel C, Mello MR, Gomes JP, Soukoyan M, Kerkis A, Massironi SM, Visintin JA, Pereira LV. A new mouse model for marfan syndrome presents phenotypic variability associated with the genetic background and overall levels of Fbn1 expression. *PLoS One.* 2010 Nov 30;5(11):e14136. 30
18. Beltrão-Braga PC, Pignatari GC, Maiorka PC, Oliveira NA, Lizier NF, Wenceslau CV, Miglino MA, Muotri AR, Kerkis I. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from human immature dental pulp stem cells. *Cell Transplant.* 2011;20(11-12):1707-19.
19. Deepa Ponnaiyan -- Do dental stem cells depict distinct characteristics? — Establishing their “phenotypic fingerprint” *Dent Res J (Isfahan).* 2014 Mar-Apr; 11(2): 163–172 40
20. Brito et al., Imbalance of p75NTR/TrkB protein expression in Huntington’s disease: implication for neuroprotective therapies. *Cell Death and Disease* (2013) 4, e595; doi:10.138/cddis.2013.116

【 0 0 9 8 】

## 【化 1 - 3】

21. Crisostomo PR, Wang M, Wairiuko GM, et al. High passage number of stem cells

adversely affects stem cell activation and myocardial protection. Shock. 2006;26:575-80.

22. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, et al. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol. 1999;107:275-81.

23. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. J Cell Sci. 2000;113:1161-6.

24. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. Cancer Res. 2005;65:3035-9.

25. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. Bone. 2003;33:919-26.

10

20

【図 1】

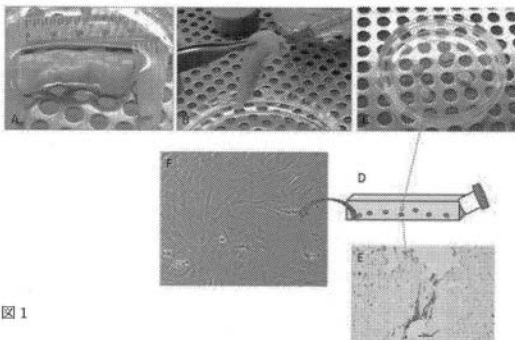


図 1

【図 2】

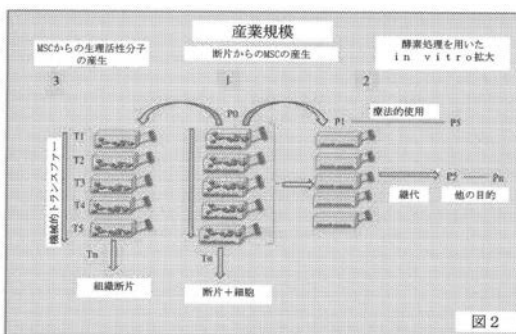


図 2

【図 3】

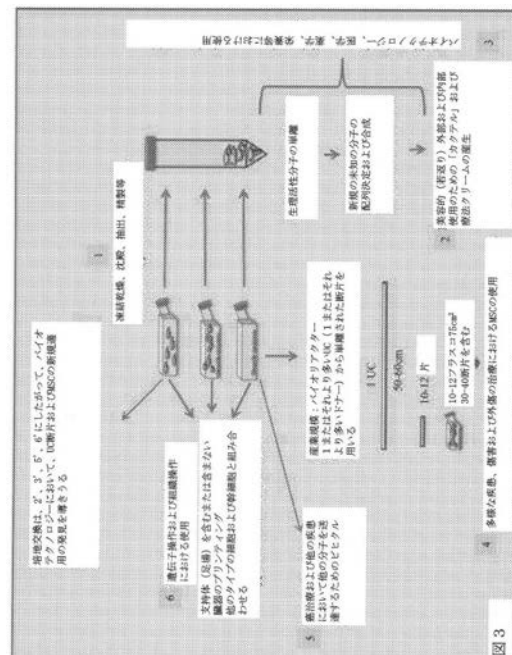


図 3

【図4】

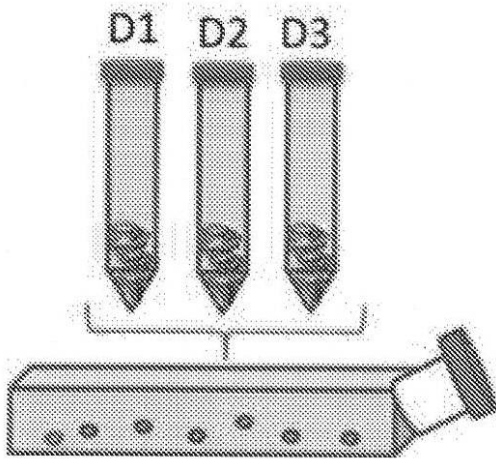


図4

【図5】

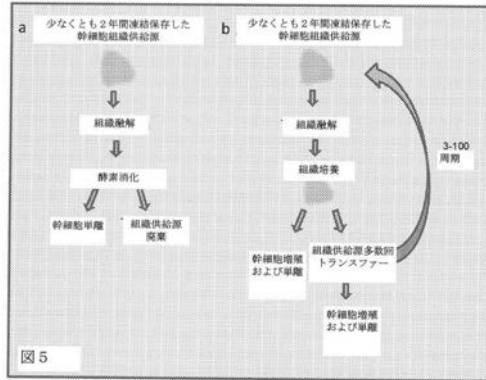


図5

【図6】

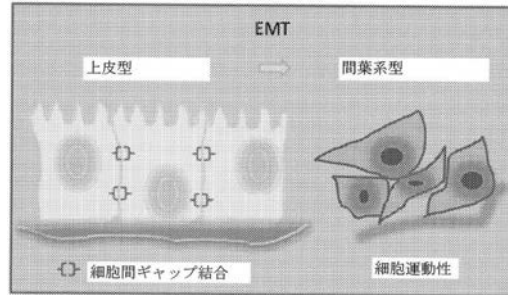


図6

【図7】

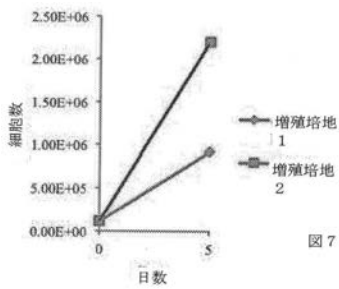


図7

【図8】

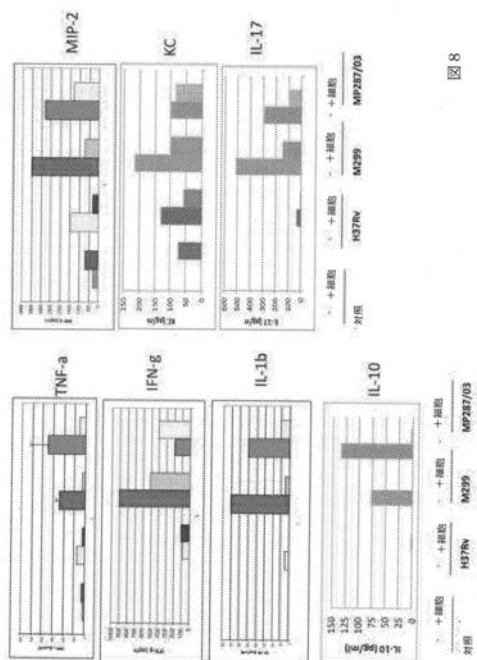


図8

【図 9】

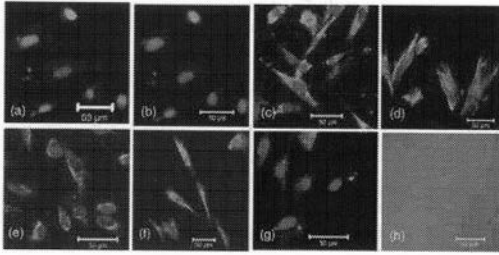


図 9

【図 10】

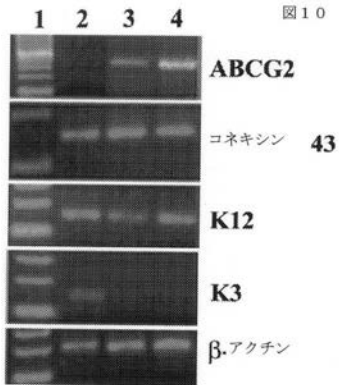


図 10

【図 11】

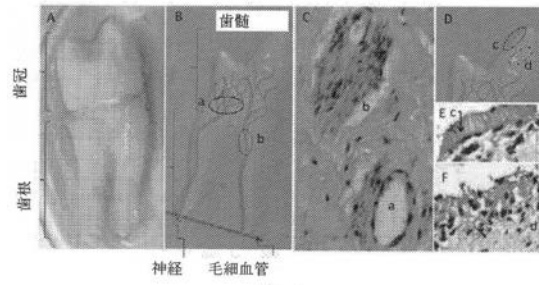


図 11

【図 12】

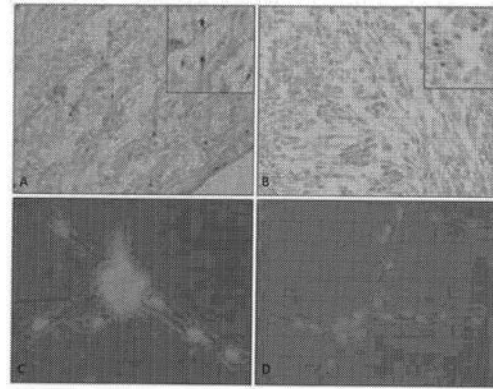


図 12

【図 13】

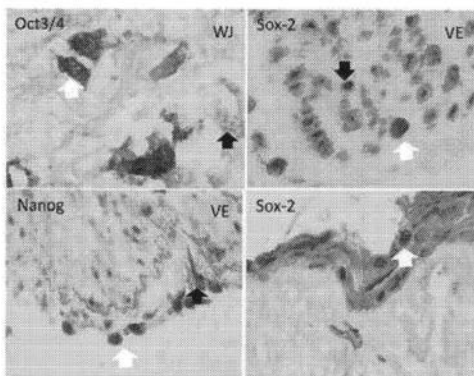


図 13

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2015/056215

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N5/073 C12N5/0775  
ADD.

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)  
C12N

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)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NELSON F. LIZIER ET AL: "Scaling-Up of Dental Pulp Stem Cells Isolated from Multiple Niches", PLOS ONE, vol. 7, no. 6, 29 June 2012 (2012-06-29), page e39885, XP055159827, DOI: 10.1371/journal.pone.0039885 cited in the application the whole document	1-27
A	----- LILY HUSCHTSCHA ET AL: "Enhanced isolation of fibroblasts from human skin explants", BIOTECHNIQUES, vol. 53, no. 4, 1 October 2012 (2012-10-01), XP055211032, ISSN: 0736-6205, DOI: 10.2144/0000113939 the whole document ----- -/--	1-27



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* 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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 November 2015

Date of mailing of the international search report

18/11/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Manu, Dominique

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2015/056215

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2015/024089 A1 (CCB CT DE CRIOGENIA BRASIL LTDA [BR]) 26 February 2015 (2015-02-26) examples 1,2 -----	1-19, 23-27

### Information on patent family members

PCT/IB2015/056215

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード ( 参考 )
<b>A 6 1 K 35/30 (2015.01)</b>		A 6 1 K 35/30	
<b>A 6 1 K 35/32 (2015.01)</b>		A 6 1 K 35/32	
<b>A 6 1 P 37/02 (2006.01)</b>		A 6 1 P 37/02	
<b>A 6 1 P 29/00 (2006.01)</b>		A 6 1 P 29/00	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100128750

弁理士 廣瀬 しのぶ

(72)発明者 ケルキス, イリーナ

ブラジル国 0 5 5 8 6 - 0 6 0 サンパウロ, ルア・コリント 7 3 9, アパートメント 6 2  
ベ

(72)発明者 グロズマン, サビーナ

イスラエル国 ナハリヤ マックス・シュタインメッツ・ストリート 2 3

F ターム(参考) 4B065 AA90X AC20 BB32 BB34 BB40 BD39 CA44 CA60

4C087 AA01 AA02 AA03 BB45 BB46 BB58 BB64 NA03 ZB07 ZB11