

(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2010-528107

(P2010-528107A)

(43) 公表日 平成22年8月19日 (2010.8.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	4 C 0 8 7
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 47/46 (2006.01)	A 6 1 K 47/46	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 18 頁) 最終頁に続く

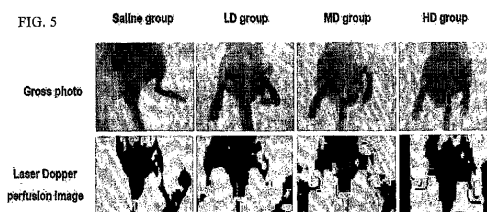
(21) 出願番号	特願2010-510198 (P2010-510198)	(71) 出願人	508033465
(86) (22) 出願日	平成20年5月9日 (2008.5.9)		アールエヌエル バイオ カンパニー リ
(85) 翻訳文提出日	平成22年1月25日 (2010.1.25)		ミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/KR2008/002614		大韓民国, 1 5 1 - 0 5 0, ソウル, クワ
(87) 国際公開番号	W02008/147057		ナーク, ボンチョンードン, 1 5 9 6 - 7
(87) 国際公開日	平成20年12月4日 (2008.12.4)	(71) 出願人	509324746
(31) 優先権主張番号	10-2007-0050624		ラ チョンチャン
(32) 優先日	平成19年5月25日 (2007.5.25)		大韓民国, 4 4 0 - 3 0 0, キョンギード
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		, スウオンーシ, チャンアンーグ, チョン
			チャードン, 9 1 8, チョンソルマウル
			エスケー ハンファ アpartment, 6
			2 6 - 7 0 1
		(74) 代理人	100090251
			弁理士 森田 憲一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂肪組織由来幹細胞を含有する虚血性肢疾患治療用組成物

(57) 【要約】

本発明は四肢末端部虚血性疾患治療用の細胞組成物に係り、さらに詳しくは、脂肪組織由来間葉系幹細胞と賦形剤としてスクロースまたはマンノースを含有することを特徴とする虚血性疾患治療用細胞組成物に関する。本発明に係る組成物は四肢末端部虚血性患部の閉塞された血管の周りに新生血管を誘導することから、虚血性疾患を治療するために有効である。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

脂肪組織由来間葉系幹細胞及び賦形剤を含有する虚血性疾患治療用細胞組成物であって、前記脂肪組織由来間葉系幹細胞の濃度は $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 細胞 / mL であり、前記賦形剤はスクロースまたはマンノースであることを特徴とする虚血性疾患治療用細胞組成物。

【請求項 2】

前記組成物の基剤が、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 及びハートマン - D よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項 1 に記載の治療用細胞組成物。

【請求項 3】

前記賦形剤として、アルブミンまたは血清をさらに含有することを特徴とする請求項 1 に記載の治療用細胞組成物。

【請求項 4】

前記賦形剤として、EDTA または DMSO をさらに含有することを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の治療用細胞組成物。

【請求項 5】

懸濁剤、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤、保存剤、吸着防止剤、界面活性剤、希釈剤、媒体、pH 調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤及び酸化防止剤よりなる群から選ばれる薬学的に許容可能な量の添加剤をさらに含有することを特徴とする請求項 1 に記載の治療用細胞組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は四肢末端部虚血性疾患治療用の細胞組成物に係り、さらに詳しくは、脂肪組織由来間葉系幹細胞及び賦形剤を含有する虚血性疾患治療用細胞組成物に関する。

【背景技術】**【0002】**

四肢末端性虚血性疾患とは、血管内に血栓、塞栓及び血管内炎症または高血圧、高脂血症及び糖尿病の合併症により動脈または静脈が閉塞されて抹消循環障害を引き起こす糖尿病性足病変 (diabetic foot)、火傷または凍傷の外的な原因に起因する血管損失によって四肢に発生する症状、喫煙量の多い中年男性において血管炎症と血栓症として現れるペルリガール病などが相当し、動脈閉塞症、閉塞性動脈硬化症などが代表的である。

【0003】

現在、これらの疾病の治療方法は血栓症や塞栓症の原因疾患、例えば、不整脈、心房粘液腫、赤血球増多症があればこれを優先的に治療し、血栓溶解剤を用いて一時的に症状を緩和したり、デキストラン、抗凝固剤、フェニルブタゾン、ペルサンチン、副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤またはプロスタグランジン E₁ など血管の内腔を広げる血管拡張剤及び循環改善剤などを投与する。

【0004】

手術的処置方法としては、交感神経切除術、硬膜外腔遮断治療及び交感神経破壊術を通じて虚血部位の痛症を除去し、過剰な交感神経緊張を緩和して血管拡張及び血液循環を改善する効果を導き出したりもし、動脈内膜剥離術、Gortex などの人造血管を移植する血管迂回術、病発部位切断術を挙げることができる。

【0005】

しかしながら、上記の如き薬物処理や外科的処置方法は、一時的に虚血性疾患の症状を緩和するか、又は再発する可能性が高いという問題を有しており、根本的な治療が求められているのが現状である。

【0006】

幹細胞とは、自己複製能力を有し、且つ、2 以上の細胞に分化する能力を有する細胞をいい、全能幹細胞 (totipotent stem cells)、多能性幹細胞 (pluripotent stem cells)、

10

20

30

40

50

多分化能性幹細胞(multipotent stem cells)に分類することができる。

【 0 0 0 7 】

最近、脂肪組織が多分化能性幹細胞(multipotent stem cells)の新たな源であることが判明された(Cousin et al., BBRC., 301:1016, 2003; Miranville et al., Circulation, 110:349, 2004; Gronthos et al., J. Cell Physiol., 189:54, 2001; Seo et al., BBRC., 328:258, 2005)。すなわち、脂肪抽出または脂肪吸入術により得られたヒト脂肪組織に未分化細胞群が含まれており、これはイン・ビトロ上において脂肪細胞、骨形成細胞、筋芽細胞及び軟骨芽細胞への分化能を有する細胞であるということが報告されている(Zuk et al., Tissue Eng., 7:211, 2001; Rodriguez et al., BBRC., 315:255, 2004)。このような脂肪組織は、大量に抽出することができ、培養により大量増殖をすることができるというメリットがあり、自家移植であるため免疫学的拒否反応が起こる恐れがないことから反復的な施術も可能であるというメリットを有する。従って、既存の骨髓由来または臍帯血由来幹細胞の、採取の難度、費用負担が高いこと、及び組織適合性を確認して合うものを探さなければならないという欠点を補完する新たな幹細胞の源として注目されているのである。

10

【 0 0 0 8 】

また、最近の研究においては、脂肪組織由来細胞が筋肉再生能及び神経血管分化を促進する能力があることが動物モデル実験を通じて知られることにより、幹細胞の新たな源として注目されている。

【 0 0 0 9 】

これまで知られている脂肪由来幹細胞としては、上皮細胞に分化可能なヒト脂肪由来成体幹細胞(Brzoska et al., BBRC, 330:142, 2005)、骨形成及び脂肪細胞に分化可能なヒト脂肪由来成体幹細胞(Cao et al., BBRC, 332:370, 2005)、神経細胞に分化可能なヒト脂肪由来成体幹細胞(Safford et al., BBRC, 294:371, 2005)、脂肪細胞に分化可能なネズミ脂肪由来幹細胞(Ogawa et al., BBRC, 319:511, 2004)、骨形成及び軟骨形成細胞に分化可能なネズミ脂肪由来幹細胞(Ogawa et al., BBRC, 313:871, 2004)、軟骨細胞に分化可能なヒト脂肪由来幹細胞(Awad et al., Biomaterials, 25:3211, 2004)、神経細胞に分化可能なネズミ脂肪由来幹細胞(Fujimura et al., BBRC, 333:116, 2005)及び骨細胞、軟骨細胞、神経細胞または筋肉細胞に分化可能な脂肪由来幹細胞(米国特許第6,777,231号公報)などがある。

20

30

【 0 0 1 0 】

上記の如き幹細胞を用いて、G-CSFにより分化誘導された造血幹細胞を用いて虚血性疾患を治療するのに適用した例(韓国特許公開第2003-0034177号公報)があり、また、アンジオポイエチン遺伝子が導入された間葉系幹細胞を処理する方法(韓国公開特許第2005-0111593号公報)などがある。しかしながら、従来の方法は幹細胞を補助的に使用したり、幹細胞を含有する治療用細胞組成物の保存が安定的ではないという欠点があった。

【 0 0 1 1 】

そこで、本発明者らはより安定的な幹細胞を用いた虚血性疾患治療方法を開発するために鋭意努力した結果、スクロースなどの賦形剤を添加した脂肪組織由来の脂肪幹細胞をマウスの虚血性疾患モデルの患部に適用する場合、効果的に血管が新生されるということを見出し、本発明を完成するに至った。

40

【発明の詳細な説明】

【 0 0 1 2 】

本発明の目的は、脂肪組織由来間葉系幹細胞を有効成分として含有する、冷蔵や冷凍保存時における安定性が高い虚血性疾患の治療用細胞組成物を提供するところにある。

【 0 0 1 3 】

前記目的を達成するために、本発明は、脂肪組織由来間葉系幹細胞及び賦形剤を含有する虚血性疾患治療用細胞組成物であって、前記脂肪組織由来間葉系幹細胞の濃度は $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 細胞/mLであり、前記賦形剤はスクロースまたはマンノースであるこ

50

とを特徴とする虚血性疾患治療用細胞組成物を提供する。

【0014】

本発明において、前記組成物の基剤は、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)及びハートマン-Dよりなる群から選ばれることを特徴とすることができる。

【0015】

本発明において、前記賦形剤として、アルブミンまたはリン血清をさらに含有することを特徴とし、前記賦形剤として、EDTAまたはDMSOをさらに含有することを特徴とする。

【0016】

本発明において、懸濁剤、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤、保存剤、吸着防止剤、界面活性剤、希釈剤、媒体、pH調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤及び酸化防止剤よりなる群から選ばれる薬学的に許容可能な量の添加剤をさらに含有することを特徴とする。

10

【0017】

本発明の他の特徴及び具現例は、下記の詳細な説明及び特許請求の範囲から一層明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】本発明に係るヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を100倍の倍率にて観察した結果を示すものである。

20

【図2】本発明に係るヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の免疫学的分析結果を示すものである。

【図3】本発明に係るヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の各組成物の安定性をスフィア形成能にて示すものである。

【図4】本発明に係るヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いたイン・ビトロ血管形成能を評価した結果を示すものである。

【図5】本発明に係るヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いてヌードマウスに下肢虚血モデルを誘発して幹細胞を濃度別に注入したグループの四肢脱落の度合い及びレーザーダブルを用いた血管生成の度合いを示すものである。

【図6】本発明の結果として、ヒト脂肪組織由来多分化能性幹細胞(multipotent stem cells)の血管生成率をレーザーダブル血流比率にて比較した結果を示すものである。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明は脂肪組織由来間葉系幹細胞 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 細胞/mL 及び賦形剤としてスクロースまたはマンノースを含有する虚血性疾患治療用細胞組成物に関する。

【0020】

本発明において、脂肪組織由来幹細胞は、ヒト脂肪組織の脂肪吸入術において付随的に得られる脂肪細胞とフラスコ培養容器に付着して生長する脂肪由来間葉系幹細胞から得られる。

【0021】

40

本発明の脂肪由来間葉系幹細胞としては、一態様として、脂肪吸入術の菅組織(tubing)またはカテーテルを連結した使い捨て注射器から得られるチューメセント溶液と脂肪含有原料から、マイコプラズマ試験と無菌試験を通じて原料品質管理基準を通過した試料を遠心分離して脂肪層と水層を分離して水層の試料をコラゲナーゼ溶液により前処理した後、得られた細胞をDMEM培地、10%FBS、アスコルビン酸を含有する培地において培養して得られた細胞を利用することができる。

【0022】

一方、上記において得られたヒト脂肪組織由来幹細胞液から目的の表面抗原を発現している多分化能性幹細胞(multipotent stem cells)を得る方法としては、ソーティング機能をもつフローサイトメトリーを用いたFACS法(Int. Immunol., 10(3):275, 1998)、

50

磁気ビーズを使用する方法、多分化能性幹細胞(multipotent stem cells)を特異的に認識する抗体を用いたパニング法(J. Immunol., 141(8):2797, 1998)などがある。また、大量の培養液などから多分化能性幹細胞(multipotent stem cells)を得る方法としては、細胞の表面に発現されて分子(以下、表面抗原と称する。)を特異的に認識する抗体を単独または組み合わせてこれをカラムとして使用する方法がある。

【0023】

フローサイトメトリーソーティング方式としては、水滴荷電方式、セルキャプチャー方式などを挙げることができる。いかなる方法も細胞の表面抗原を特異的に認識する抗体を蛍光標識し、標識された抗体と抗原の結合体に対する蛍光を測定して蛍光強度を電気信号に変換することにより細胞の抗原発現量を定量することができる。また、使用する蛍光物質の種類を組み合わせることにより、複数の表面抗原を発現している細胞を分離することも可能である。ここに使用可能な蛍光物質としては、F I T C (fluorescein isothiocyanate)、P E (phycoerythrin)、A P C (Allo-phycoerythrin)、T R (TexasRed)、C y 3、CyChrome、R e d 6 1 3、R e d 6 7 0、T R I -Color、QuantumRedなどがある。

【0024】

フローサイトメトリーを用いたF A C S法としては、上記において得られた幹細胞溶液を収集し、遠心分離などの方法により細胞を分離した後、直接的に抗体により染色する方法と、適当な培地中において1回培養、増殖を実施した後に抗体を染色する方法を利用することができる。細胞の染色は、先ず、表面抗原を認識する一次抗体と目的細胞サンプルを混合し、氷上において30分から1時間かけてインキュベーションする。一次抗体が蛍光標識されている場合には、洗浄後にフローサイトメトリーにより分離を実施する。一次抗体が蛍光標識されていない場合には、洗浄後に一次抗体に対して結合活性を有する蛍光標識された2次抗体と一次抗体が反応した細胞を混合し、さらに氷水において30分から1時間かけてインキュベーションする。洗浄後、一次抗体と2次抗体から染色細胞をフローサイトメトリーにより分離する。

【0025】

また、前記分離された本発明に係る間葉系幹細胞はフローサイトメトリーを用いて免疫学的特性を分析することができる。

【0026】

本発明において、虚血疾患とは、組織への血液供給の減少または途絶による機能異常または組織変性または壊死をいい、具体的には、心筋梗塞及び狭心症などの虚血性心疾患及び四肢虚血、血流不全を伴う損傷及び切断などの外傷及び骨折などが含まれる。すなわち、本発明において、虚血疾患には、虚血性疾患だけではなく、損傷・傷害による虚血状態も含まれる。

【0027】

本発明の治療用細胞組成物の投与方法としては、直接投与、または担体を用いた投与を挙げることができる。担体は、生理的に許容可能なものであり、バイオポリマーなどの有機物、ハイドロキシapatiteなどの無機物、具体的には、コラーゲンマトリックス、ポリ乳酸ポリマーまたはコポリマー、ポリエチレングリコールポリマーまたはコポリマー及びその化学的誘導体などを挙げることができる。さらに、担体は、これら生理的に許容される材料の混合組成物であってもよい。

【0028】

投与量は、例えば、虚血部位周辺の生存筋(骨格筋または心筋など)の1個所または複数個所(例えば、2~50個所)に投与することができ、投与量は $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^8$ 細胞/kg(体重)が好ましく、 $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ 細胞/kg(体重)であることが、より好ましい。

【0029】

但し、投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状、投与組成物の形態、投与方法などによって異なってもよく、当業者であれば、適切に調整することが可能である。投与回数は、1回であってもよく、臨床的に容認可能な副作用の範囲において複数回行ってもよ

10

20

30

40

50

く、投与部位についても、１個所または複数個所に投与してもよい。ヒト以外の動物に対しても、１ｋｇあたりにヒトと同じ投与量にするか、または、例えば、目的の動物とヒトとの虚血器官（心臓など）の容積比（例えば、平均値）などに上記の投与量を換算した量を投与することができる。本発明の治療の対象動物としては、ヒト及びそれ以外の目的とする哺乳動物を挙げることができ、具体的には、ヒト、猿、マウス、ラット、ウサギ、羊、牛、犬、馬、豚などが含まれる。

【００３０】

本発明の治療方法は、単独で実施することもでき、他のスタンダードまたは先進的な治療法との組み合わせにより実施することもできる。例えば、本発明の虚血性心疾患の治療方法をＰＴＣＡ（経皮的冠動脈形成術）及び／またはＣＡＢＧ（冠動脈バイパス術）などの外科的な血行再建術と組み合わせることも好ましい。本発明の治療法を併用することにより、心機能の積極的な改善、病床期間の短期化を図ることが可能になる。

10

【００３１】

本発明の治療用細胞組成物は、薬学的に許容可能な担体及び／または添加物などを含む組成物であることができる。例えば、滅菌水、生理食塩水、慣用の緩衝剤（リン酸、クエン酸、その他の有機酸など）、安定剤、塩、酸化防止剤（アスコルビン酸など）、界面活性剤、懸濁剤、等張化剤、または保存剤などを含んでいてもよい。局所投与のために、バイオポリマーなどの有機物、ハイドロキシアパタイトなどの無機物、具体的には、コラーゲンマトリックス、ポリ乳酸ポリマーまたはコポリマー、ポリエチレングリコールポリマーまたはコポリマー及びその化学的誘導体などと組み合わせることも好ましい。

20

【００３２】

本発明において、基剤は、治療用細胞組成物において間葉系幹細胞を懸濁させる基本となる溶液であり、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）またはハートマン・Ｄ（ジュンエ製薬）を使用することが好ましい。

【００３３】

好ましくは、治療用細胞組成物は、注射に適した剤形に調製されなければならない。このためには、本発明の脂肪幹細胞は、薬学的に許容される水溶液中に溶解されているか、または、溶液状態で凍結されたものが好ましい。本発明のキットには、脂肪幹細胞を懸濁または希釈するために使用可能な、薬学的に許容可能な目的担体をさらに含んでいてもよい。このような担体としては、例えば、蒸留水、生理食塩水、ＰＢＳなどを挙げることができる。

30

【００３４】

医薬製剤としての形状を造るために必要とされる製剤担体や賦形剤を、さらには、安定化剤や吸着防止剤を含有することができ、剤形も注射剤（皮下、皮内、筋肉内、静脈内、腹腔内など）などを使用することができ、注射時の痛症を低減可能な無痛化剤を使用することができ、必要に応じて、適当なデバイスを使用することができる。

【００３５】

この治療用細胞組成物は、注射器やデバイスに入れられている最終注入形態、冷凍可能なクライオバイアルの形態、または液状医薬品に入れられるピロゲンフリーガラス瓶とゴム栓、アルミニウムキャップの形態で充填可能である。

40

【００３６】

デバイスの形態としては、注射器、マルチシリンジなどが使用可能であり、四肢虚血性疾患の場合には細胞が投与される間に細胞がせん断されて損傷を与えることなしに苦痛を極力抑えられる注射針を利用し、好ましくは、２０ゲージから３０ゲージの範囲において投与する部位や筋肉の深さを考慮して使用し、シリンジやデバイスが細胞生存力に影響を及ぼさないような素材を使用する。

【００３７】

本発明の治療用細胞組成物は、その投与方法や剤形に応じて、必要に応じて、懸濁剤、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤、保存剤、吸着防止剤、界面活性剤、希釈剤、媒体、ｐＨ調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤、酸化防止剤などを適切に添加することができ

50

る。

【0038】

懸濁剤の例としては、メチルセルロース、ポリソルベート80、ヒドロキシエチルセルロース、アラビアゴム、トラガント末、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートなどを挙げることができ、溶液補助剤としては、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリソルベート80、ニコチン酸アミド、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、マクロゴール、ヒマシ油脂肪酸エチルエステルなどを挙げることができる。

【0039】

安定化剤としては、デキストラン40、メチルセルロース、ゼラチン、亜硫酸ナトリウム、メタ硫酸ナトリウムなどを挙げることができ、等張化剤としては、例えば、D-マンニトール、ソルビトールなどを挙げることができる。

10

【0040】

保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、ソルビン酸、フェノール、クレゾール、クロロクレゾールなどを挙げることができ、吸着防止剤としては、例えば、ヒト血清アルブミン、レシチン、デキストラン、エチレンオキシドプロピレンオキシド共重合体、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエチレングリコールなどを挙げることができる。

【0041】

含流還元剤としては、例えば、N-アセチルシステイン、N-アセチルホモシステイン、チオキト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、炭素原子数1~7のチオアルカン酸などのスルホヒドリル基を有するものなどを挙げることができ、酸化防止剤としては、例えば、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、 α -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸及びその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルまたはエチレンジアミン4酢酸ナトリウム(EDTA)、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウムなどのキレート剤を挙げることができ、凍結保存剤としては、例えば、DMSO、グリセロールなどを挙げることができる。

20

30

【0042】

さらには、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機塩；クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウムなどの有機塩などの通常的に添加される成分を含有していてもよい。

【0043】

特に、本発明のヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を含有する治療用細胞組成物は、冷蔵保存条件を通じて生理食塩水に浮遊して保存する既存の方式の場合、48時間以上保存時、70%以上の生存率を示すことが困難であったが、スクロースやアルブミンを添加する場合、48時間から72時間まで保存しても、生存率が70%以上を示して、安定性が向上することを確認することができた。なお、基剤を生理食塩水の代わりにハートマン-DやPBSにする場合にも有意差はなく、スクロース、アルブミンなどの添加により治療用細胞組成物の安定性が向上することが確認された。

40

【0044】

また、本発明の脂肪由来幹細胞を含有する治療用細胞組成物を凍結製剤として使用する場合には、生理食塩水、スクロース、アルブミン、凍結保存剤DMSOを添加した剤形において解凍時の細胞生存率が最も高いことが確認され、アルブミンと糖成分の追加により、細胞を凍結、解凍するに当たって細胞が保護されて生存率が高まることが確認された。

【実施例】

【0045】

以下、本発明を実施例を挙げて詳述する。これらの実施例は単に本発明をより具体的に

50

説明するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例に制限されないことは当業界において通常の知識を持った者にとって自明である。

【0046】

実施例1：ヒト脂肪組織からの多分化能性幹細胞(multipotent stem cells)の分離

脂肪吸入を通じて腹部から採取された脂肪組織を分離してPBSにより洗浄し、組織を細切した後、コラゲナーゼタイプ1(1mg/mL)を添加したDMEM培地を用いて37°Cにおいて2時間分解した。次に、PBSにより洗浄した後、1000rpmにて5分間遠心分離した。上澄液は除去し、底面に残留しているペレットはPBSにより洗浄した後、1000rpmにて5分間遠心分離した。100μmの網目を用いて浮遊物を除去した後、PBSにより再洗浄した。DMEM(10%FBS、2mM NAC、0.2mM アスコルビン酸)培地において培養し、一晚経過後、培養容器の底面に付着された細胞はPBSにより洗浄し、2mM NAC、0.2mMアスコルビン酸、0.09mMカルシウム、5ng/mL rEGF、50μg/mL BPE、5μg/mLインシュリン及び74ng/mLヒドロコルチゾンを含むケラチノサイト-SFM培地を2日おきに交換しながら培養して多分化能性幹細胞(multipotent stem cells)を分離した(図1)。図1は、前記方法により分離されたヒト脂肪組織由来多分化能性幹細胞(multipotent stem cells)を100倍の倍率にて撮影した写真である。

10

【0047】

実施例2：脂肪由来多分化能性幹細胞(multipotent stem cells)の免疫学的特性

実施例1において得られたヒト脂肪組織由来多分化能性幹細胞(multipotent stem cells)をPBSにより洗浄し、トリプシンにより処理した後、細胞を回収して5分間1000rpmにて遠心分離した。上澄液を捨て、2%FBS及びPBSの混合液を入れて洗浄した後、1000rpmにて5分間遠心分離した。上澄液を捨てた後、細胞をPBSに浮遊させて各サンプルに対して 1×10^5 個の細胞を分注した。各細胞に対しては抗体(R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody)を添加して氷中において40分間放置して結合を誘導した。反応が終わると、1000rpmにて5分間遠心分離して上澄液を除去した後、PBSにより2回洗浄した。洗浄後には最終的に1%パラホルムアルデヒドを添加して固定し、FACS方法を通じて得られた多分化能性幹細胞(multipotent stem cells)の表面抗原を分析した(表1及び図2)。

20

【0048】

30

【表1】

表面抗原	AD-MSCs
CD73	+
CD90	+
CD29	+
CD44	+
CD105	+
CD33	-
CD34	-
CD45	-
CD4	-
CD31	-
CD62p	-
CD14	-
HLA-DR	-

40

【0049】

その結果、表1に示すように、本発明のヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞は、CD73に対しては91%、CD90に対しては97%、CD29に対しては96%、CD44に対しては83%、CD105に対しては80%の陽性反応を示した。また、他の抗原に対する免疫表現型を確認した結果、CD33、CD34、CD45、CD4、CD31、CD62p、CD14及びHLA-DRに対していずれも陰性の免疫学的特性を示した。

【0050】

50

実施例 3 : ヒト脂肪組織多分化能性幹細胞(multipotent stem cells)のスフィア形成

実施例 1 において得られたヒト脂肪組織由来多分化能性幹細胞(multipotent stem cells)を生理食塩水、生理食塩水 + スクロース、生理食塩水 + スクロース + 5 % アルブミン及び PBS + スクロース条件下で保存後のスフィア形成能を確認した。

【 0 0 5 1 】

10 μ M CORM - 2、5 mL 抗生物質溶液 (100X)、1 μ g/mL ヒドロコルチゾン、5 μ g/mL インシュリン、20 ng/mL EGF、40 ng/mL FGF、B27 及び β -メルカプトエタノールを含有する無血清 MEM 培地を含有する 6 ウェル細胞培養器の各ウェルに $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 個/mL の細胞を分注して培養した結果、3 日目 ~ 7 日目からスフィアを形成し始め、図 3 に示すように、7 ~ 10 日目にも幹細胞が増殖してスフィアを形成した。

【 0 0 5 2 】実施例 4 : 脂肪由来幹細胞のイン・ビトロ血管新生効果の確認

血管内条件と同様に 5 dynes/cm² のせん断ストレスを加えた、または、加えなかった細胞を用いて生体外管形成試験を通じて脂肪由来間葉系幹細胞が血管を形成するかどうかを確認した。

【 0 0 5 3 】

20 先ず、マトリゲル (Chemicon, USA) を加温して溶かした後、96 ウェルプレートに添加し、約 1 時間程度室温下で固める。実施例 1 において得られた脂肪組織由来多分化能性幹細胞(multipotent stem cells)を 1×10^4 cell/well の濃度にて分注し、EGM - 2 MV (Clonetics, USA) とともに 5 日間培養して血管内皮細胞に分化するかどうかを確認した。その結果、図 4 に示すように、本発明に係る脂肪間葉系幹細胞は、せん断ストレスを加えた場合に限って、血管内皮細胞に分化して血管網とほとんど同様の構造を形成した。

【 0 0 5 4 】実施例 5 : 脂肪由来幹細胞のインビボ血管新生効果の確認5 - 1 : 虚血性マウスモデルの製作

8 週齢のヌードマウスを用いて全身麻酔後、左脚の正中部を切開して大腿動脈とその側枝を摘出して結紮後、左大腿動脈を完全に除去して虚血性下肢疾患モデルを誘発した。

【 0 0 5 5 】5 - 2 : 虚血性マウスモデルにおける脂肪由来幹細胞の血管新生効果

前記 5 - 1 において製作された虚血性マウスモデルを誘発した後、24 時間後に細胞濃度別に 3 グループ { (LD グループ (1×10^6 細胞/kg)、MD グループ (5×10^6 細胞/kg) 及び HD グループ (1×10^7 細胞/kg) } に分けて虚血性患部に筋肉注射した。

【 0 0 5 6 】

40 下肢脱落が起こるかどうかを持続的に確認し、レーザードップラー血流検査を通じて細胞治療 4 週後の血流改善の度合いを評価した。その結果、生理食塩水だけを注入した陰性対照群においては四肢脱落が発生し、注入された細胞濃度が高いほどレーザードップラー映像において血流が円滑に流れることを観察することができた (図 5)。血流改善の度合いをレーザードップラー血流比率に換算してみても、対照群である生理食塩水投与群に比べて容量依存的な改善があることが確認された (図 6)。

【 0 0 5 7 】実施例 6 : 冷蔵保存用幹細胞治療組成物の剤形例

注射を通じて投与するまで 4 内外の温度において冷蔵保存することを余儀なくされる冷蔵剤形の場合、生理食塩水、ハートマン - D 溶液、PBS と、細胞の安定性を維持するのに役立つ等張液としてのスクロースの比率による細胞の生存率に対する比率を確認した。また、冷蔵保存時に細胞が凝集したり沈殿されない条件の設定のために、EDTA、ヒト血清アルブミンを増加または減少するときの効果を比較した (表 2)。

【 0 0 5 8 】

10

20

30

40

50

その結果、生理食塩水、ハートマン - D 溶液、P B S 単独保存よりは、等張化剤であるスクロース、吸着防止剤であるアルブミン、E D T A を添加した場合に一層高い細胞生存率を示し、細胞が凝集されないことが確認された。

【 0 0 5 9 】

【表 2】

細胞の生存率 (%)	0	3	6	9	12	24	48	72
生理食塩水	97.1	96.3	93.2	90.9	89.2	86.9	70.3	57.2
生理食塩水+1%スクロース	97.8	92.4	93.1	88.8	84.2	71.5	67.2	59.0
生理食塩水+2%スクロース	97.9	92.2	89.4	89.6	79.9	77.4	78.9	64.9
生理食塩水+10%スクロース	98.7	93.9	88.3	89.0	83.0	73.3	75.5	63.8
生理食塩水+2%スクロース +2%アルブミン	97.8	98.0	95.5	90.8	82.4	83.3	71.5	72.1
生理食塩水+2%スクロース +5%アルブミン	98.3	96.9	95.7	86.1	85.5	80.6	78.4	75.0
生理食塩水+2%スクロース +5%アルブミン+1mM E D T A	99.0	95.5	94.3	92.1	93.0	81.7	83.3	79.7
生理食塩水+2%スクロース +2%アルブミン+10mM E D T A	97.7	95.3	96.0	93.9	88.8	83.2	84.5	78.6
P B S	99.1	94.5	91.2	89.3	90.7	85.5	69.2	54.8
P B S+2%スクロース	97.6	90.2	89.5	79.4	82.1	83.7	72.0	65.2
P B S+2%スクロース +5%アルブミン	98.4	89.5	92.2	86.1	83.2	81.7	77.9	70.1
ハートマン-D	99.4	90.0	91.5	82.2	81.9	70.2	55.3	54.9
ハートマン-D+2%スクロース	97.2	92.1	84.0	86.7	83.3	79.2	72.9	71.2
ハートマン-D+2%スクロース +5%アルブミン	97.7	93.8	87.3	79.2	80.9	81.3	75.0	71.4

10

20

【 0 0 6 0 】

実施例 7：冷凍保存用幹細胞治療組成物剤形例

幹細胞治療剤を冷凍保存する場合、生理食塩水をベースとし、凍結保護剤をはじめとする種々の添加剤を用いて冷凍及び解凍による安定性を確保するために様々な剤形に対する細胞生存率を検討した。

【 0 0 6 1 】

冷凍保存する場合、賦形剤としての生理食塩水、ハートマン - D 溶液、生理食塩水、P B S と、細胞の安定性を維持するのに役立つ等張液としてのスクロース及びマンノースと、細胞凍結保存時に使用されるヒト血清アルブミン、D M S O の添加による冷凍後解凍時の細胞生存率を観察した。

30

【 0 0 6 2 】

冷凍条件における細胞生存率は、生理食塩水または P B S、ハートマン - D を基剤として 2 % スクロースと 5 % アルブミンを添加した条件下で、ここに凍結保護剤である D M S O を添加したグループにおいて生存能力が一層向上することを確認した（表 3）。

【 0 0 6 3 】

【表 3】

細胞の生存率 (%)	0	24h	48h	72h
生理食塩水	97.1	82.3	80.0	81.3
生理食塩水+2%スクロース	97.9	78.9	81.3	82.2
生理食塩水+10%DMSO	96.6	87.5	86.5	80.9
生理食塩水+2%スクロース +5%アルブミン	98.3	80.4	84.2	83.1
生理食塩水+2%スクロース +5%アルブミン+10%DMSO	97.7	89.7	87.9	88.0
生理食塩水+2%マンノース	98.1	83.0	80.1	79.8
生理食塩水+2%マンノース +5%アルブミン	97.3	87.7	83.4	82.1
生理食塩水+2%マンノース +5%アルブミン+10%DMSO	98.5	86.4	87.3	87.9
PBS	99.1	82.3	79.0	77.4
PBS+2%スクロース	97.2	87.2	78.0	83.5
PBS+10%DMSO	97.6	84.8	86.5	82.3
PBS+2%スクロース +5%アルブミン	98.4	83.2	81.8	81.0
PBS+2%スクロース +5%アルブミン+10%DMSO	98.0	86.2	79.3	85.4
ハートマン-D	99.4	73.6	69.9	65.4
ハートマン-D+2%スクロース	97.2	70.2	78.9	73.2
ハートマン-D+10%DMSO	98.0	84.2	83.7	81.1
ハートマン-D+2%スクロース +5%アルブミン	97.7	87.1	76.6	79.3
ハートマン-D+2%スクロース +5%アルブミン+10%DMSO	96.9	88.0	83.2	87.3

10

20

【産業上の利用可能性】

【0064】

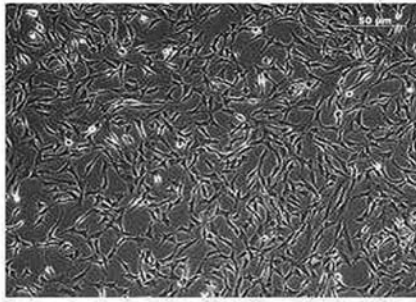
以上詳述したように、本発明は、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を有効成分として含有する虚血性疾患治療用治療用細胞組成物を提供する効果がある。本発明に係る治療用細胞組成物は、虚血性患部の閉塞された血管周囲に新生血管を誘導して血流を円滑にするため、虚血性疾患の治療に有用である。

30

【0065】

以上、本発明の内容の特定の部分を詳述したが、当業界における通常の知識を持った者にとって、このような具体的な記述は単なる好適な実施態様に過ぎず、これにより本発明の範囲が制限されることはないという点は明らかである。よって、本発明の実質的な範囲は特許請求の範囲とこれらの等価物により定義されると言える。

【図 1】

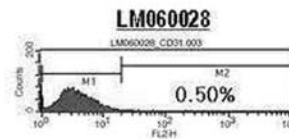
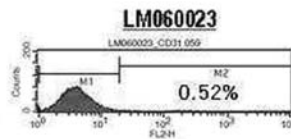
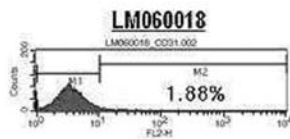


3日目

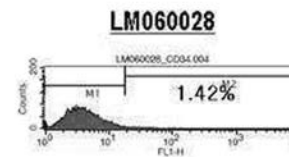
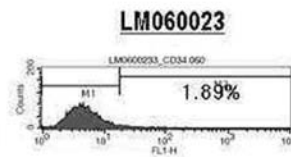
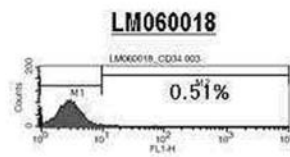
4日目

【図 2】

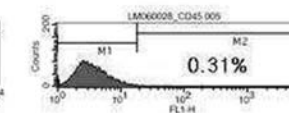
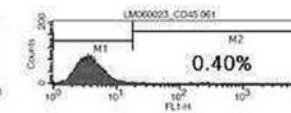
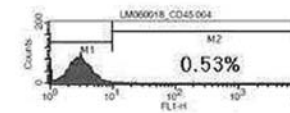
CD31



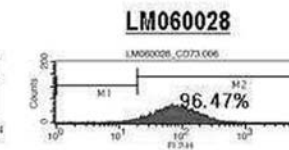
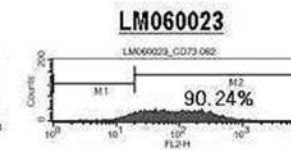
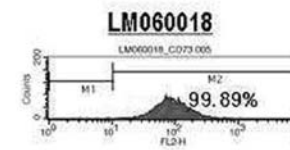
CD34



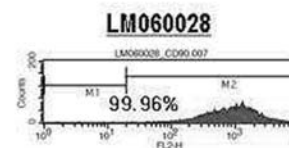
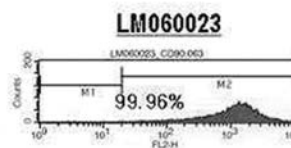
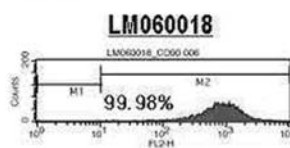
CD45



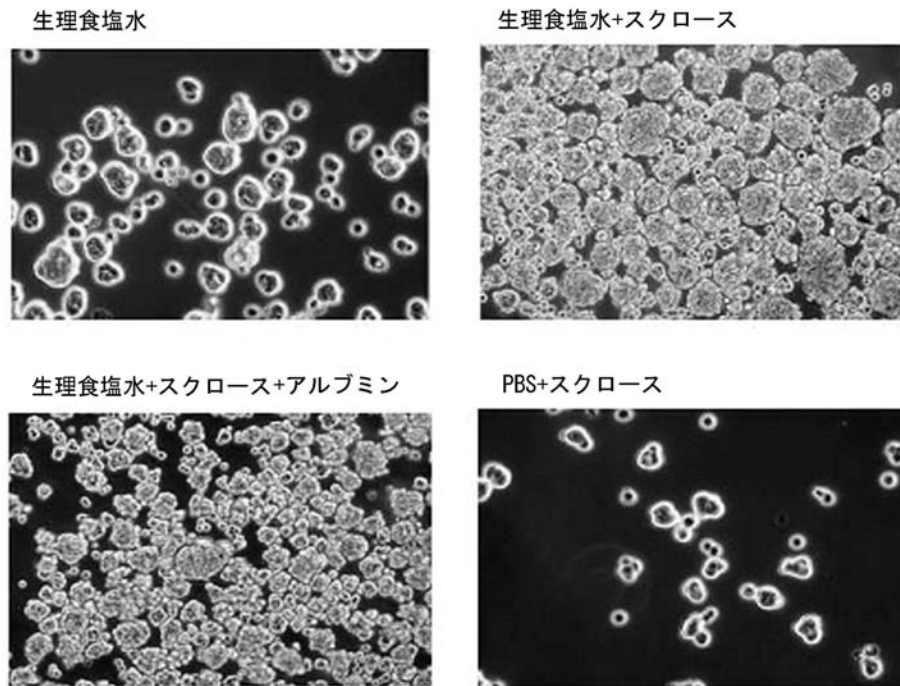
CD73



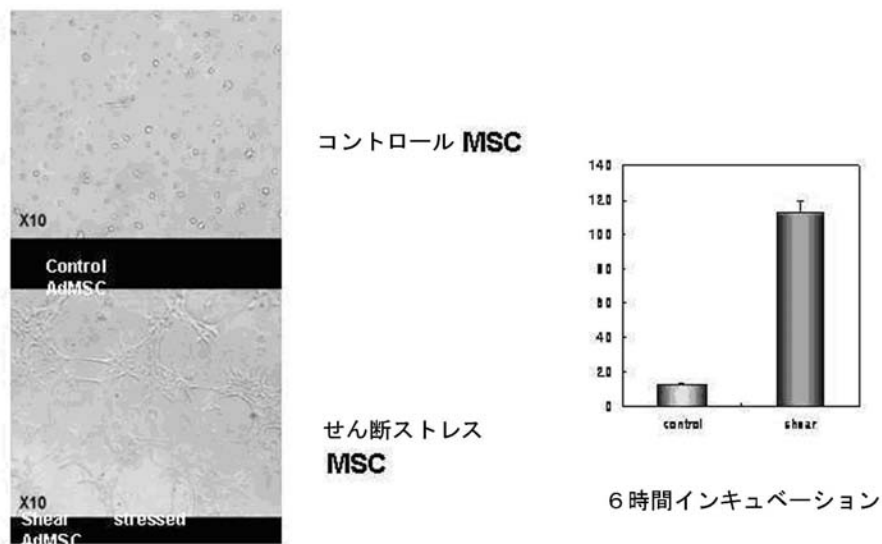
CD90



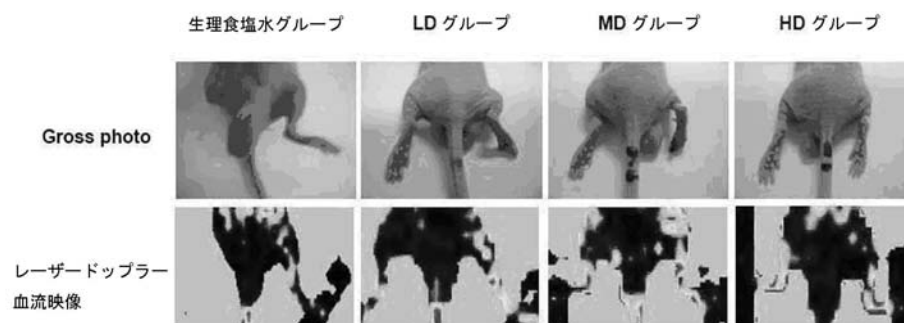
【 図 3 】



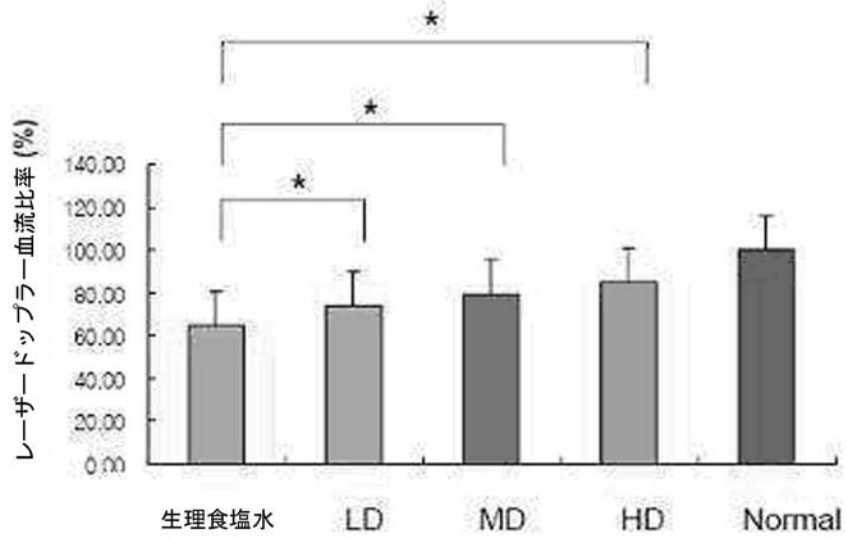
【 図 4 】



【 図 5 】



【図 6】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2008/002614
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61K 35/34(2006.01)i, A01N 63/00(2006.01)i, C12N 5/06(2006.01)i, A61K 45/00(2006.01)i, A61P 25/02(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 8 : as above		
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) EKIPASS (KIPO internal), CAS(ON LINE), PUBMED		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2003/059272 A2 (HENRY FORD HEALTH SYSTEM) 24 July 2003 (24.07.2003) See the abstract; figures 1, 3A and 3B; examples 1 and 2; claims 1-20.	1-5
X	WO 2005/034843 A2 (MACROPOROUS BIOSURGERY INC.) 21 April 2005 (21.04.2005) See the abstract: page 1, lines 16-22; examples 2-4; figures 19, 20A and 20B; claims 1-26.	1-5
X	REHMAN, J. et al. "Angiogenic potential of subcutaneous adipose stromal cells for autologous cell therapy." JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY. vol. 41, no. 6 Supplement A, 19 March 2003 (2003-03-19), page 308A. See the abstract.	1-5
X	PLANAT-BENARD, V. et al. "Plasticity of Human Adipose Lineage Cells Toward Endothelial Cells: Physiological and Therapeutic Perspectives." CIRCULATION. vol. 109, no. 5, 10 February 2004 (2004-02-10), pages 656-663. See the abstract.	1-5
☒ 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 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 06 OCTOBER 2008 (06.10.2008)		Date of mailing of the international search report 06 OCTOBER 2008 (06.10.2008)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer HAN, Jung Hee Telephone No. 82-42-481-5604 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2008/002614

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MIRANVILLE, A. et al., "Human adipose tissue-derived stem cells improve blood flow in the ischemic mouse hind-limb." CIRCULATION, vol. 108, no. 17 Supplement, 28 October 2003 (2003-10-28), pages IV-164. See the abstract.	1-5
A	STASHOWER, M. et al., "Stromal progenitor cells present within liposuction and reduction abdominoplasty fat for autologous transfer to aged skin" DERMATOLOGIC SURGERY, vol. 25, no. 12, 1999, pages 945-949. See the whole document.	1-5
A	RANGAPPA, S. et al., "Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes" ANNALS OF THORACIC SURGERY, vol. 75, no. 3, 1 March 2003 (2003-03-01), pages 775-779. See the whole document.	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2008/002614

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2003-059272 A2	24.07.2003	AU 2003-205141 A1	30.07.2003
		CA 2473108 A1	24.07.2003
		CN 1615143 A	11.05.2005
		EP 1474156 A2	10.11.2004
		JP 2006-502085 A	19.01.2006
		US 2005-0158397 A1	21.07.2005
WO 2005-034843 A2	21.04.2005	AU 2004-280149 A1	21.04.2005
		CA 2539346 A1	21.04.2005
		CN 1878470 A	13.12.2006
		EP 1670315 A2	21.06.2006
		JP 2007-505904 A	15.03.2007
		US 2005-0221150 A1	06.10.2005
		US 2005-095228 A1	05.05.2005

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 K 47/18 (2006.01)		A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/20 (2006.01)		A 6 1 K 47/20	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)		A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 9/14 (2006.01)		A 6 1 P 9/14	
A 6 1 P 7/02 (2006.01)		A 6 1 P 7/02	
A 6 1 K 47/02 (2006.01)		A 6 1 K 47/02	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,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,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,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,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100139594

弁理士 山口 健次郎

(72)発明者 ハン ヘジュン

大韓民国, 4 4 6 - 7 1 8 , キョンギ - ド, ヨンイン - シ, キフン - グ, チュン - ドン, 1 3 - 2 , チョダン メウル ヒュンジン エヴァーヴィル アパートメント, 5 2 0 1 - 2 0 1

(72)発明者 イ ハンヤン

大韓民国, 4 4 0 - 7 1 9 , キョンギ - ド, スウオン - シ, チャンアン - グ, チョンチャ - ドン, ベクソル メウル チンロ アパートメント, 5 2 6 - 1 8 0 3

(72)発明者 キム ヒョウン

大韓民国, 1 5 2 - 7 7 0 , ソウル, クロ - グ, クロ 5 - ドン, ロッテ アパートメント, 1 0 5 - 6 0 1

F ターム(参考) 4C076 AA16 BB11 CC11 DD23 DD26 DD51Q DD55Q DD67D EE41 EE56

FF14 FF17 FF36 FF61

4C087 AA01 AA02 BB64 CA04 MA05 NA14 ZA36 ZA44 ZA54