

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成29年4月20日 (2017.4.20)

【公表番号】特表2016-517405(P2016-517405A)

【公表日】平成28年6月16日 (2016.6.16)

【年通号数】公開・登録公報2016-036

【出願番号】特願2015-562539(P2015-562539)

【国際特許分類】

A 6 1 K	35/30	(2015.01)
C 1 2 N	5/0775	(2010.01)
C 1 2 N	5/0797	(2010.01)
C 1 2 N	5/0793	(2010.01)
A 6 1 P	25/00	(2006.01)
A 6 1 P	3/02	(2006.01)
A 6 1 P	25/02	(2006.01)
A 6 1 P	27/02	(2006.01)
A 6 1 P	25/28	(2006.01)
A 6 1 P	25/16	(2006.01)
A 6 1 P	25/14	(2006.01)
A 6 1 P	21/02	(2006.01)
A 6 1 P	37/06	(2006.01)
A 6 1 P	13/12	(2006.01)
A 6 1 P	17/14	(2006.01)
A 6 1 K	9/70	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
A 6 1 P	17/02	(2006.01)
A 6 1 P	9/00	(2006.01)
A 6 1 P	15/08	(2006.01)
A 6 1 P	9/10	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 K	35/32	(2015.01)
A 6 1 K	45/00	(2006.01)

【 F I 】

A 6 1 K	35/30	Z N A
C 1 2 N	5/0775	
C 1 2 N	5/0797	
C 1 2 N	5/0793	
A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	3/02	1 0 4
A 6 1 P	25/02	1 0 1
A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	21/02	
A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	17/14	
A 6 1 K	9/70	

A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	15/08	
A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	35/32	
A 6 1 K	45/00	

**【手続補正書】****【提出日】**平成29年3月15日(2017.3.15)**【手続補正 1】****【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**全文**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

未成熟歯髄幹細胞 (IDPSC) の単離集団を産生する方法であって：

(a) 歯から歯髄 (DP) を摘出し；

(b) DP を無菌容器中に入れ、そして抗生物質を含む無菌溶液で DP を洗浄し；

(c) DP を、培地を含有する別の容器内に、機械的にトランスファーするか、または容器内の培地を交換し；および

(d) IDPSC のアウトグロースおよび接着が観察されるまで DP を培養して外植片培養物を確立し；

ここで工程 (c) および (d) は、DP 内の多数ニッチから IDPSC のアウトグロースおよび接着を可能にするように少なくとも 5 回反復する、前記方法。

**【請求項 2】**

工程 (c) および (d) を少なくとも 10 回反復する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

以下：

(e) IDPSC を外植片培養物から単離し；

(f) 単離された IDPSC を培地中で 1 週間、細胞の集密に到達することなく培養し

；

(g) 工程 (f) の培養細胞を酵素的消化を用いて採取し、ここで当該採取した工程 (f) の培養細胞は分化していない；および

(h) 工程 (g) の採取細胞を、レチノイン酸の存在下で拡大する、ここで当該拡大した細胞は神経幹細胞および / または分化した神経細胞である；

をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

以下：

(e) IDPSC を外植片培養物から単離し；

(f) 単離された IDPSC を培地中で、培養物が半集密に到達するまで培養し；

(g) 工程 (f) の培養細胞を酵素的消化を用いて採取し；および

(h) 工程 (g) の採取細胞を拡大する、ここで当該拡大した細胞は神経幹細胞および / または分化した神経細胞である；

をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 5】**

工程 (d) が、工程 (c) を繰り返す前に、DP を約 2 日間、約 3 日間、約 4 日間、または約 5 日間の外植片培養物として培養することを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に

記載の方法。

【請求項 6】

工程 (c) および (d) を少なくとも 25 回反復し、そして前記方法はさらに以下：

(e) IDPSC を外植片培養物から単離し；

(f) 単離された IDPSC を培養し；および

(g) 工程 (f) の単離された培養物から接着細胞を継代して IDPSC の均質な集団を得る、ここで当該接着細胞は自己再生し、内胚葉、中胚葉または外胚葉系譜の細胞に分化し、そして Sox - 1、Sox - 2 および 3 - ベータ - チュープリンを発現する；  
工程を含む、請求項 1、2 または 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法による IDPSC の単離された集団、またはそれに由来する神経幹細胞、を含む組成物。

【請求項 8】

組成物であって、以下：

(i) 未成熟歯髄幹細胞 (IDPSC) の単離集団、ここで少なくとも 50 % の当該 IDPSC の単離集団は、p75 (CD271)、ATP 結合カセットサブファミリー G メンバー 2 (ABCG2)、p63、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)、神経成長因子 - ベータ (ベータ - NGF)、ニューロトロフィン - 3 (NT3)、NT4、および NT5、より選択されるマーカーを発現する；

(ii) IDPSC の単離集団、ここで少なくとも 50 % の当該 IDPSC の単離集団は、CD90、CD117、フィブロネクチン、アルファ - フェトプロテイン (AFP)、テネシン - C、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 1 (MMP - 1)、MMP - 2、MMP - 9、シンデカン 1 (SDC1)、SDC2、SDC3、SDC4、p53、および 1 型コラーゲン、より選択されるマーカーを発現する；

(iii) IDPSC の単離集団、ここで 2 ~ 30 % の当該 IDPSC の単離集団は、Oct3/4、TRA1 - 60、および TRA1 - 81、から選択される少なくとも 1 つのマーカーを発現する；

(iv) (i) ~ (iii) の IDPSC の単離集団に由来する神経幹細胞；およびそれらのいずれかの組合せ；

からなる群より選択される細胞を含み、ここで当該 IDPSC の単離集団または神経幹細胞は HLA - ABC および HLA - DR に関して陰性である、前記組成物。

【請求項 9】

未成熟歯髄幹細胞 (IDPSC) の未分化集団、または IDPSC に由来する神経幹細胞の、神経変性疾患、脱ミエリン化疾患、脊髄傷害の治療のための、網膜神経節細胞 (RGC) 死を阻害するための、および / または、視神経変性を阻害するための医薬の製造における使用であって、IDPSC または IDPSC に由来する神経幹細胞は、以下：

(i) 未成熟歯髄幹細胞 (IDPSC) の単離集団、ここで少なくとも 50 % の当該 IDPSC の単離集団は、p75 (CD271)、ATP 結合カセットサブファミリー G メンバー 2 (ABCG2)、p63、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)、神経成長因子 - ベータ (ベータ - NGF)、ニューロトロフィン - 3 (NT3)、NT4、および NT5、より選択されるマーカーを発現する；

(ii) IDPSC の単離集団、ここで少なくとも 50 % の当該 IDPSC の単離集団は、CD90、CD117、フィブロネクチン、アルファ - フェトプロテイン (AFP)、テネシン - C、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 1 (MMP - 1)、MMP - 2、MMP - 9、シンデカン 1 (SDC1)、SDC2、SDC3、SDC4、p53、および 1 型コラーゲン、より選択されるマーカーを発現する；

(iii) IDPSC の単離集団、ここで 2 ~ 30 % の当該 IDPSC の単離集団は、Oct3/4、TRA1 - 60、および TRA1 - 81、から選択される少なくとも 1 つのマーカーを発現する；

(iv) (i) ~ (iii) の IDPSC の単離集団に由来する神経幹細胞；および

それらのいずれかの組合せ；

からなる群より選択され、ここで当該IDPSCの単離集団または神経幹細胞はHLA - ABCおよびHLA - DRに関して陰性である、前記使用。

【請求項10】

IDPSCに由来する神経幹細胞が、Sox - 1およびSox - 2を共発現する神経冠幹細胞である、請求項7もしくは8に記載の組成物または請求項9に記載の使用。

【請求項11】

組成物が、少なくとも $1 \times 10^6$ のIDPSCおよび/またはIDPSCに由来する神経幹細胞を含む、請求項7～8もしくは10のいずれか1項に記載の組成物または使用。

【請求項12】

さらに薬学的に許容されうるキャリアーを含む、請求項7～8、10または11のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項13】

神経変性疾患、脱ミエリン化疾患、脊髄傷害の治療における使用のための、網膜神経節細胞(RGC)死および/または視神経変性を阻害するための、請求項7～8、10または11のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項14】

脱ミエリン化疾患が、以下：多発性硬化症、特発性炎症性脱ミエリン化疾患、ビタミンB12不全。橋中央ミエリン溶解、脊髄ろう、横断性脊髄炎、デビック病、進行性多巣性白質脳症、視神経炎、白質ジストロフィー、ギランバレー症候群、慢性炎症性脱ミエリン化ポリニューロパシー、抗MAG末梢ニューロパシー、シャルコー - マリー - トゥース病、および銅欠乏からなる群より選択される脱ミエリン化疾患であり；および

神経変性疾患が、以下：アルツハイマー病、パーキンソン病、プリオン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン病、前頭側頭型認知症(ピック病)および筋萎縮性側索硬化症(ALSまたはルー・ゲーリック病)、およびミエリンを攻撃する自己免疫疾患、からなる群より選択される；

請求項12に記載の使用のための組成物または請求項9に記載の使用。

【請求項15】

腎不全、禿頭、白髪、皮膚創傷、皮膚美容的特徴、減少した精子形成、心疾患、または癌の治療において使用するための、請求項8、または10～12のいずれか1項に記載の組成物、または請求項1、2、5および6のいずれか1項に記載の方法によるIDPSCの単離集団を含む組成物。

【請求項16】

未成熟歯髄幹細胞(IDPSC)の未分化集団、またはIDPSCに由来する神経幹細胞の、腎不全、禿頭、白髪、皮膚創傷、皮膚美容的特徴、減少した精子形成、心疾患、または癌の治療のための医薬の製造における使用であって、IDPSCまたはIDPSCに由来する神経幹細胞は、以下：

(i) 未成熟歯髄幹細胞(IDPSC)の単離集団、ここで少なくとも50%の当該IDPSCの単離集団は、p75(CD271)、ATP結合カセットサブファミリーGメンバー2(ABCG2)、p63、脳由来神経栄養因子(BDNF)、グリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)、神経成長因子 - ベータ(ベータ - NGF)、ニューロトロフィン - 3(NT3)、NT4、およびNT5、より選択されるマーカーを発現する；

(ii) IDPSCの単離集団、ここで少なくとも50%の当該IDPSCの単離集団は、CD90、CD117、フィブロネクチン、アルファ - フェトプロテイン(AFP)、テネシン - C、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 1(MMP - 1)、MMP - 2、MMP - 9、シンデカン1(SDC1)、SDC2、SDC3、SDC4、p53、および1型コラーゲン、より選択されるマーカーを発現する；

(iii) IDPSCの単離集団、ここで2～30%の当該IDPSCの単離集団は、Oct3/4、TRA1 - 60、およびTRA1 - 81、から選択される少なくとも1つのマーカーを発現する；

( i v ) ( i ) ~ ( i i i ) の I D P S C の単離集団に由来する神経幹細胞 ; およびそれらのいずれかの組合せ ;

からなる群より選択され、ここで当該 I D P S C の単離集団または神経幹細胞は H L A - A B C および H L A - D R に関して陰性である、前記使用。

【請求項 17】

皮膚創傷が、火傷傷害または糖尿病、虚血もしくはコラーゲン疾患から生じる難治性皮膚潰瘍であり ;

心疾患が、心筋梗塞であり ; および

癌が、神経芽細胞腫または網膜芽細胞腫である ;

請求項 15 に記載の組成物または使用のための方法、または請求項 16 に記載の使用。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0496

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0496】

【化 1 - 3】

Shi et al., "Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis", Bone 29:6 (2001), 532-39.

US Patent No 5,928,947.

US Patent No 5,817,773.

WO 01/176507.

一態様において、本発明は以下であってよい。

[ 態様 1 ]

神経変性疾患、脱ミエリン化疾患、または両方を治療する方法であって、その必要がある被験体に、未成熟歯髄幹細胞 ( I D P S C ) の未分化集団、I D P S C 由来の神経幹細胞、または両方を含む組成物を、神経変性疾患および / または脱ミエリン化疾患を治療するために十分な量で、投与する工程を含む、前記方法。

[ 態様 2 ]

脱ミエリン化疾患が、多発性硬化症 : 特発性炎症性脱ミエリン化疾患 ; ビタミン B 12 不全 ; 橋中央ミエリン溶解 ; 脊髄ろう ; 横断性脊髄炎 ; デビック病 ; 進行性多巣性白質脳症 ; 視神経炎 ; 白質ジストロフィーからなる群より選択される中枢神経系の脱ミエリン化疾患、または : ギランバレー症候群、慢性炎症性脱ミエリン化ポリニューロパシー ; 抗 M A G 末梢ニューロパシー ; シャルコー - マリー - トゥース病 ; および銅欠乏からなる群より選択される末梢神経系の脱ミエリン化疾患である、態様 1 の方法。

[ 態様 3 ]

神経変性疾患が : アルツハイマー病、パーキンソン病、プリオン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン病、前頭側頭型認知症 ( ピック病 ) および筋萎縮性側索硬化症 ( A L S またはルー・ゲーリック病 ) からなる群より選択される、態様 1 の方法。

[ 態様 4 ]

神経変性疾患が、である、態様 1 の方法。

[ 態様 5 ]

網膜神経節細胞 ( R G C ) 死、視神経変性、または両方を阻害する方法であって、その必要がある被験体に、未成熟歯髄幹細胞 ( I D P S C ) の未分化集団、I D P S C 由来の神経幹細胞、または両方を含む組成物を、R G C 死、視神経変性、または両方を阻害するのに十分な量で投与する工程を含む、前記方法。

[ 態様 6 ]

腎不全を治療する方法であって、その必要がある被験体に、未成熟歯髄幹細胞 ( I D P

SC)の未分化集団を含む組成物を、腎機能を増加させるか、または腎臓損傷を減少させるのに十分な量で投与する工程を含む、前記方法。

[ 態様 7 ]

組成物を、kg体重あたり、およそ $0.01 \times 10^6$ 細胞の用量で腎内投与を通じて局所投与する、態様6の方法。

[ 態様 8 ]

IDPSCを投与する工程を1～3週間の間隔で、腎機能が回復するまで、続いて反復する、ここで、IDPSCの投与間隔を1～6ヶ月に増加させる、態様6の方法。

[ 態様 9 ]

禿頭を治療するかまたは白髪を治療する方法であって、その必要がある被験体に、未成熟歯髄幹細胞(IDPSC)の未分化集団を含む組成物を、毛髪増殖を増加させ、そして/または被験体の全体の白髪の割合を減少させるのに十分な量で投与する工程を含む、前記方法。

[ 態様 10 ]

組成物を、皮下、局所で、またはシャワー法によって、投与して、毛包幹細胞ニッチを回復させる、態様9の方法。

[ 態様 11 ]

組成物が細胞シートを生じる、態様9の方法。

[ 態様 12 ]

細胞シートが移植され、そして移植前に予め除去された毛髪皮膚によって覆われている、態様11の方法。

[ 態様 13 ]

他の毛髪回復または白髪減少幹細胞因子または薬剤と組み合わせて組成物を投与する工程をさらに含む、態様9の方法。

[ 態様 14 ]

皮膚創傷および/または皮膚美容的特徴を治療するための皮膚治療法であって、その必要がある被験体に、未成熟歯髄幹細胞(IDPSC)の未分化集団を含む組成物を、皮膚創傷治癒を増加させそして/または皮膚美容的特徴を改善するのに十分な量で投与する工程を含む、前記治療法。

[ 態様 15 ]

皮膚創傷が、糖尿病、虚血およびコラーゲン疾患または火傷傷害から生じる難治性皮膚潰瘍である、態様14の皮膚治療法。

[ 態様 16 ]

組成物を、皮膚の硬さを増加させ、しわを減少させ、皮膚加齢プロセスを遅延させ、新規血管形成を増加させ、免疫学的反応を誘導せずにコラーゲン再生を増加させるのに十分な量で投与する、態様14の皮膚治療法。

[ 態様 17 ]

脊髄傷害を治療する方法であって、その必要がある被験体に、未成熟歯髄幹細胞(IDPSC)の未分化集団、IDPSC由来の神経幹細胞、または両方を含む組成物を、脊髄傷害を治療するのに十分な量で投与する工程を含む、前記方法。

[ 態様 18 ]

心臓疾患を治療する方法であって、その必要がある被験体に、未成熟歯髄幹細胞(IDPSC)の未分化集団、IDPSC由来の幹細胞、または両方を含む組成物を、心臓疾患を治療するのに十分な量で投与する工程を含む、前記方法。

[ 態様 19 ]

精子形成を増加させる方法であって、その必要がある被験体に、未成熟歯髄幹細胞(IDPSC)の未分化集団を含む組成物を被験体における精子形成を誘導するのに十分な量で投与する工程を含む、前記方法。

[ 態様 20 ]

心臓疾患が心筋梗塞である、態様19の方法。

## [ 態様 2 1 ]

治療が、心筋細胞アポトーシスを阻害し、そして / または組成物を動脈注射を通じて投与する、態様 1 9 の方法。

## [ 態様 2 2 ]

I D P S C の少なくとも 5 0 % が、p 7 5 神経上皮マーカー、p 5 3 腫瘍抑制因子マーカー、または両方を発現する、態様 1 ~ 2 1 のいずれか一項の方法。

## [ 態様 2 3 ]

組成物が、I D P S C および / または I D P S C 由来の幹細胞を、少なくとも  $1 \times 10^6$  I D P S C、少なくとも  $1 \times 10^7$  I D P S C、少なくとも  $1 \times 10^8$  I D P S C、少なくとも  $1 \times 10^9$  I D P S C、または少なくとも  $1 \times 10^{10}$  I D P S C で含む、態様 1 ~ 2 1 のいずれか一項の方法。

## [ 態様 2 4 ]

I D P S C の少なくとも 7 5 % が、p 7 5 神経上皮マーカーまたは p 5 3 腫瘍抑制因子マーカーを発現する、態様 1 ~ 2 1 のいずれか一項の方法。

## [ 態様 2 5 ]

I D P S C の 5 0 % 未満が、C D 1 3 マーカー、C D 3 1 マーカー、または両方を発現する、態様 1 ~ 2 1 のいずれか一項の方法。

## [ 態様 2 6 ]

I D P S C の 5 0 % 未満が、C D 3 4、C D 4 3、および C D 4 5 マーカーに関して陰性である、態様 1 ~ 2 1 のいずれか一項の方法。

## [ 態様 2 7 ]

I D P S C の少なくとも 5 0 % が、脳由来神経栄養因子 ( B D N F )、グリア細胞株由来神経栄養因子 ( G N D F )、神経成長因子 - ベータ ( ベータ - N G F )、ニューロトロフィン - 3 ( N T 3 )、ニューロトロフィン - 4 ( N T 4 )、およびニューロトロフィン - 5 ( N T 5 ) より選択される神経栄養因子を生じる、態様 1 ~ 2 1 のいずれか一項の方法。

## [ 態様 2 8 ]

I D P S C の少なくとも 7 5 % が、B D N F、G N D F、ベータ - N G F、N T 3、N T 4、および N T 5 より選択される神経栄養因子を生じる、態様 2 7 の方法。

## [ 態様 2 9 ]

I D P S C の少なくとも 7 5 % がネスチンを発現する、態様 1 ~ 2 1 のいずれか一項の方法。

## [ 態様 3 0 ]

I D P S C の少なくとも 9 5 % がネスチンを発現する、態様 2 9 の方法。

## [ 態様 3 1 ]

I D P S C の 2 0 % 未満が O c t 3 / 4 を発現する、態様 1 ~ 2 1 のいずれか一項の方法。

## [ 態様 3 2 ]

I D P S C が、以下の多機能分子プロファイル：

( a ) I D P S C の少なくとも 8 0 % が、ネスチン、p 7 5、A T P 結合カセットサブファミリー G メンバー 2 ( A B C G 2 )、p 6 3、脳由来神経栄養因子 ( B D N F )、グリア細胞株由来神経栄養因子 ( G N D F )、神経成長因子 - ベータ ( ベータ - N G F )、ニューロトロフィン - 3 ( N T 3 )、N T 4、および N T 5 より選択されるマーカーを発現する、神経上皮幹細胞プロファイル I D P S C ；

( b ) I D P S C の 2 0 % 未満が S T R O - 1 および C D 1 4 6 より選択されるマーカーを発現する、周皮細胞プロファイル I D P S C ；

( c ) 集団の少なくとも 8 0 % が、C D 1 0 5、C D 7 3、C D 9 0、C D 2 9、C D 4 4、C D 1 1 7、ビメンチン、フィブロネクチン、アルカリホスファターゼ ( A L P )、アルファ - フェトプロテイン ( A F P )、テネシン - C、マトリックスメタロプロテナーゼ - 1 ( M M P - 1 )、M M P - 2、M M P - 9、シンデカン 1 ( S D C 1 )、S D

C2、SDC3、SDC4、p53、および1型コラーゲンより選択されるマーカーを発現する、間葉系幹細胞プロファイルIDPSC；

(d) IDPSCの2%~30%が、Oct3/4、SOX2、Nanog、TRA1-60、TRA1-81、およびSSEA4より選択される少なくとも1つのマーカーを発現する、多能性幹細胞プロファイルIDPSC；ならびに

(e) IDPSCがHLA-ABCおよびHLA-DR主要組織適合性(MHC)抗原に関して陰性である、間葉系幹細胞プロファイルIDPSC；

によって特徴付けられる、単離されたヒト出生後IDPSCの表現型的に均質な多系譜集団を含む、態様1~21のいずれか一項の方法。

[態様33]

IDPSCの集団が、単離されたヒト出生後IDPSCの表現型的に均質な多系譜集団を含み、ヒト出生後IDPSCの前記集団が、低酸素条件下で少なくとも10採取サイクルに関して培養されたDPのアウトグロース(outgrowth)として得られる、態様1~21のいずれか一項の方法。

[態様34]

低酸素条件が：

(i) 約0.5%~1%の間の最大値、または約0.5%~15%酸素(O<sub>2</sub>)の間の最大値；

(ii) 約0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%または2%または5%の酸素(O<sub>2</sub>)；

(iii) 約0.1~2%酸素(O<sub>2</sub>)の間；あるいは

5~7%CO<sub>2</sub>を伴う、(i)、(ii)または(iii)のいずれかを含むかまたはこれらと同等である培養条件下で細胞を培養する工程を含む、態様33の方法。

[態様35]

ヒト出生後IDPSCの前記集団の採取工程が、酵素処理を伴わず、DPを保持し、そしてIDPSCの低酸素誘導性多系譜志向を可能にする、機械的トランスファーによって起こる、態様33の方法。

[態様36]

ヒト出生後IDPSC集団が、フィブロネクチン、コラーゲン、ラミニン、ビトロネクチン、ポリリジン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン、またはその組み合わせを含む、細胞外マトリックス(ECM)基質とともに培養される、態様33の方法。

[態様37]

ECM基質がMatrigelである、態様36の方法。

[態様38]

ヒト出生後IDPSC集団が、少なくとも20採取サイクル、少なくとも30採取サイクル、少なくとも40採取サイクル、少なくとも50採取サイクル、または少なくとも60採取サイクルで培養されるDPからのアウトグロースとして単離される、態様33の方法。

[態様39]

IDPSCの単離集団を産生する方法であって：

(a) 歯からDPを摘出し；

(b) DPを無菌容器中に入れ、そして抗生物質を含む無菌溶液でDPを洗浄し；

(c) 場合によって、抗生物質を含む無菌溶液を取り除き、そしてDPを基本培地中で細かく刻み；

(d) DPを、培地を含有する別の容器内に、機械的にトランスファーするか、または容器内の培地を交換し；

(e) IDPSCのアウトグロースおよび接着が観察されるまでDPを培養し；そして

(f) DP内の多数ニッチからIDPSCのアウトグロースおよび接着を可能にするように、少なくとも5回、工程(d)および(e)を反復する



工程を含む、前記方法。

[ 態様 4 0 ]

D P 培養を少なくとも 3 日間進める、態様 3 9 の方法。

[ 態様 4 1 ]

D P 培養を少なくとも 5 日間、少なくとも 1 0 日間または少なくとも 1 5 日間進める、態様 4 0 の方法。

[ 態様 4 2 ]

歯が、乳歯、永久歯、および第三大臼歯より選択される、態様 3 9 の方法。

[ 態様 4 3 ]

工程 ( d ) および ( e ) が、少なくとも 1 0 回、少なくとも 2 0 回、少なくとも 3 0 回、少なくとも 4 0 回、少なくとも 5 0 回、または少なくとも 6 0 回反復される、態様 3 9 の方法。

[ 態様 4 4 ]

D P 内の多数のニッチの完全性が、D P 外植片の機械的トランスファーによって保持される、態様 3 9 の方法。

[ 態様 4 5 ]

D P 外植片を培地を含む別の容器内に機械的にトランスファーする前に、D P を凍結保存し、そして融解する、態様 3 9 の方法。

[ 態様 4 6 ]

( g ) I D P S C を継代培養に継代する

工程をさらに含む、態様 3 9 の方法。

[ 態様 4 7 ]

I D P S C を継代中にプロテアーゼで処理しない、態様 4 6 の方法。

[ 態様 4 8 ]

I D P S C を継代中にプロテアーゼで処理する、態様 4 6 の方法。

[ 態様 4 9 ]

I D P S C の継代培養への継代を最大 5 回反復する、態様 4 6 の方法。

[ 態様 5 0 ]

I D P S C の継代培養への継代を最大 4 回、3 回、2 回、または 1 回反復する、態様 4 9 の方法。

[ 態様 5 1 ]

D P を約 3 日間培養すると、少なくとも  $1 \times 10^5$  I D P S C の単離集団を生じる、態様 3 9 の方法。

[ 態様 5 2 ]

D P を約 3 日間培養すると、少なくとも  $2 \times 10^5$  I D P S C、少なくとも  $3 \times 10^5$  I D P S C、少なくとも  $4 \times 10^5$  I D P S C、少なくとも  $5 \times 10^5$  I D P S C、少なくとも  $6 \times 10^5$  I D P S C、少なくとも  $7 \times 10^5$  I D P S C、または少なくとも  $8 \times 10^5$  I D P S C の単離集団を生じる、態様 5 1 の方法。

[ 態様 5 3 ]

培地が D M E M / F 1 2 培地または M E M - アルファ培地である、態様 3 9 の方法。

[ 態様 5 4 ]

培地に、約 5 % ~ 約 2 0 % のウシ胎児血清、約 1 % の非必須アミノ酸、約 1 % の L - グルタミンまたは L - グルタミン置換物、および約 1 % の抗生物質が補充されている、態様 5 3 の方法。

[ 態様 5 5 ]

神経幹細胞および / または分化した神経細胞を *i n v i t r o* で生じさせる方法であって：

歯髄 ( D P ) の少なくとも 1 0 サイクルの機械的トランスファーによって維持された D P 外植片培養から、未成熟歯髄幹細胞 ( I D P S C ) を単離し；

細胞の集密に到達することなく I D P S C を培養し、ここで、これらの細胞を培地中で

1 週間、追加培養し、

酵素的消化を用いて、これらの細胞を採取し、そして

レチノイン酸の存在下で、さらなる拡大のため、ペトリ皿上に植え付ける

工程を含む、前記方法。

[ 態様 5 6 ]

集密が、 $25 \text{ cm}^2$  の培地中、 $2 \times 10^6$  IDPSC に等しい、態様 5 5 の方法。

[ 態様 5 7 ]

DP 外植片培養が、少なくとも 15 サイクル、少なくとも 20 サイクル、少なくとも 25 サイクル、または少なくとも 30 サイクルの DP の機械的トランスファーによって維持される、態様 5 6 の方法。

[ 態様 5 8 ]

サイクルが、DP の機械的トランスファー前の、約 2 日間、約 3 日間、約 4 日間、または約 5 日間の外植片培養である、態様 5 5 の方法。

[ 態様 5 9 ]

集密前の未分化 LP IDPSC の前記培養が、この段階で、ニューロスフェアまたは一次スフェアまたはスフェア様構造形成を回避する、態様 5 5 の方法。

[ 態様 6 0 ]

集密前が、IDPSC の基本培地中に維持される、 $25 \text{ cm}^2$  中、 $2 \times 10^6$  IDPSC に等しい、態様 5 9 の方法。

[ 態様 6 1 ]

IDPSC 基本培地の前記置換が、いかなる他の成長因子も含まず、2 % の B 2 7 を補充した神経基本培地 (NB + B 2 7) への置換である、態様 6 0 の方法。

[ 態様 6 2 ]

IDPSC の前記インキュベーションが、酵素消化または細胞再植え付けを伴わず、1 週間の間、NB + B 2 7 中でインキュベーションすることである、態様 6 1 の方法。

[ 態様 6 3 ]

NB + B 2 7 培地の前記交換が、各 3 ~ 4 日間である、態様 6 2 の方法。

[ 態様 6 4 ]

態様 5 5 記載の方法によって生じる、単離された神経幹細胞。

[ 態様 6 5 ]

前記の 1 週間後、0.25 % トリプシン / EDTA での 2 ~ 3 分間の処理後に、細胞を採取し、NB + B 2 7 で中和する、態様 6 2 の方法。

[ 態様 6 6 ]

800 g、5 分間の遠心分離後、細胞ペレットを得て、そして上清を廃棄する、態様 6 2 の方法。

[ 態様 6 7 ]

IDPSC ペレットを NB + B 2 7 中で穏やかに脱凝集し、そして拡大のため、各々、平方 9.6  $\text{cm}^2$  を有する 6 枚のペトリ皿上に植え付ける、態様 6 6 の方法。

[ 態様 6 8 ]

前記レチノイン酸を、0.1  $\mu\text{M}$  を超えない最終濃度で 24 時間で添加しなければならず、そして 48 時間後、神経分化細胞を産生するニューロスフェアを得ることが可能である、態様 6 7 の方法。

[ 態様 6 9 ]

IDPSC の前記分化が、同じ培養プレート中、同時に、ニューロンおよびグリア細胞に分化するものである、態様 1 の方法。

[ 態様 7 0 ]

態様 1 にしたがった方法によって生じる、脱ミエリン化疾患を治療し、そして治癒させることが可能な、IDPSC。

[ 態様 7 1 ]

網膜幹細胞および / または分化した網膜細胞を *in vivo* で生成する方法であって

:

歯髄（DP）の少なくとも10サイクルの機械的トランスファーによって、維持されたDP外植片培養から、未成熟歯髄幹細胞（IDPSC）を単離し；

半集密に到達するまで、IDPSCを培養し；

酵素的消化を用いて、これらの細胞を採取し；そして

さらなる拡大のため、ペトリ皿上に植え付ける

工程を含む、前記方法。

[ 態様 7 2 ]

分化した網膜細胞が、桿体細胞、錐体細胞、および/または神経節細胞である、態様 7 1 の方法。

[ 態様 7 3 ]

増加した多系譜潜在力を所持するLP IDPSCを含む組成物であって、前記IDPSCをロバストな神経上皮マーカーの発現を可能にする条件下で培養し、前記発現が、前記LP IDPSCの多機能再生潜在力を生じる、前記組成物。

[ 態様 7 4 ]

DPの長期培養後、遠位ニッチにアクセスさせることを通じて、IDPSCを誘導することによって、そして/または採取したIDPSCを低継代数で培養して、核型突然変異を防止し、そしてそれによって腫瘍原性のリスクを防止する低酸素非酵素的採取条件下で、特に、神経外胚葉系譜へのIDPSCの潜在力を増加させ、そして腫瘍原性潜在力を減少させる方法。

[ 態様 7 5 ]

未成熟歯髄幹細胞（IDPSC）の単離集団を含む組成物であって、IDPSCの少なくとも50%がp75神経上皮マーカーを発現する、前記組成物。

[ 態様 7 6 ]

IDPSCの少なくとも75%がp75神経上皮マーカーを発現する、態様 7 5 の組成物。

[ 態様 7 7 ]

IDPSCの少なくとも50%がp53腫瘍抑制因子マーカーを発現する、IDPSCの単離集団を含む組成物。

[ 態様 7 8 ]

IDPSCの少なくとも75%がp53腫瘍抑制因子マーカーを発現する、態様 3 の組成物。

[ 態様 7 9 ]

IDPSCの50%未満がCD13マーカーを発現する、態様 7 5 ~ 7 8 のいずれか一項の組成物。

[ 態様 8 0 ]

IDPSCの50%未満がCD31マーカーを発現する、態様 7 5 ~ 7 8 のいずれか一項の組成物。

[ 態様 8 1 ]

IDPSCの50%未満が、CD13およびCD31より選択されるマーカーを発現し、そしてIDPSCがCD34、CD43、およびCD45マーカーに関して陰性である、態様 7 5 ~ 7 8 のいずれか一項の組成物。

[ 態様 8 2 ]

IDPSCの少なくとも50%が、脳由来神経栄養因子（BDNF）、グリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）、神経成長因子 - ベータ（ベータ - NGF）、ニューロトロフィン - 3（NT3）、ニューロトロフィン - 4（NT4）、およびニューロトロフィン - 5（NT5）より選択される神経栄養因子を産生する、態様 7 5 ~ 7 8 のいずれか一項の組成物。

[ 態様 8 3 ]

IDPSCの少なくとも75%が、BDNF、GDNF、ベータ - NGF、NT3、N

T 4、および NT 5 より選択される神経栄養因子を産生する、態様 8 2 の組成物。

[ 態様 8 4 ]

I D P S C の少なくとも 7 5 % がネスチンを発現する、態様 7 5 ~ 7 8 のいずれか一項の組成物。

[ 態様 8 5 ]

I D P S C の少なくとも 9 5 % がネスチンを発現する、態様 8 4 の組成物。

[ 態様 8 6 ]

I D P S C の 2 0 % 未満が O c t 3 / 4 を発現する、態様 7 5 ~ 7 8 のいずれか一項の組成物。

[ 態様 8 7 ]

( a ) I D P S C の少なくとも 8 0 % が、ネスチン、p 7 5、A T P 結合カセットサブファミリー G メンバー 2 ( A B C G 2 )、p 6 3、脳由来神経栄養因子 ( B D N F )、グリア細胞株由来神経栄養因子 ( G N D F )、神経成長因子 - ベータ ( ベータ - N G F )、ニューロトロフィン - 3 ( N T - 3 )、NT 4、および NT 5 より選択されるマーカーを発現する、神経上皮幹細胞プロファイル I D P S C ;

( b ) I D P S C の 2 0 % 未満が S T R O - 1 および C D 1 4 6 より選択されるマーカーを発現する、周皮細胞プロファイル I D P S C ;

( c ) 集団の少なくとも 8 0 % が、C D 1 0 5、C D 7 3、C D 9 0、C D 2 9、C D 4 4、C D 1 1 7、ビメンチン、フィブロネクチン、アルカリホスファターゼ ( A L P )、アルファ - フェトプロテイン ( A F P )、テネシン - C、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 1 ( M M P - 1 )、M M P - 2、M M P - 9、シンデカン 1 ( S D C 1 )、S D C 2、S D C 3、S D C 4、p 5 3、および 1 型コラーゲンより選択されるマーカーを発現する、間葉系幹細胞プロファイル I D P S C ;

( d ) I D P S C の 2 % ~ 3 0 % が、O c t 3 / 4、S O X 2、N a n o g、T R A 1 - 6 0、T R A 1 - 8 1、および S S E A 4 より選択される少なくとも 1 つのマーカーを発現する、多能性幹細胞プロファイル I D P S C ; ならびに

( e ) I D P S C が H L A - A B C および H L A - D R 主要組織適合性 ( M H C ) 抗原に関して陰性である、間葉系幹細胞プロファイル I D P S C ;

の多機能分子プロファイルによって特徴付けられる、単離されたヒト出生後 I D P S C の表現型的に均質な多系譜集団を含む、組成物。

[ 態様 8 8 ]

ヒト出生後 I D P S C の集団が、低酸素条件下で少なくとも 1 0 採取サイクルに渡って培養された D P のアウトグロースとして得られる、単離されたヒト出生後 I D P S C の表現型的に均質な多系譜集団を含む組成物。

[ 態様 8 9 ]

低酸素条件が：

( i ) 約 0 . 5 % ~ 1 % の間の最大値、または約 0 . 5 % ~ 1 5 % 酸素 ( O <sub>2</sub> ) の間の最大値；

( i i ) 約 0 . 0 5 %、0 . 1 %、0 . 2 %、0 . 3 %、0 . 4 %、0 . 5 %、0 . 6 %、0 . 7 %、0 . 8 %、0 . 9 %、1 % または 2 % または 5 % の酸素 ( O <sub>2</sub> ) ；

( i i i ) 約 0 . 1 % ~ 2 % 酸素 ( O <sub>2</sub> ) の間；あるいは

5 ~ 7 % C O <sub>2</sub> を伴う、( i )、( i i ) または ( i i i ) のいずれかを含むかまたはこれらと同等である培養条件下で細胞を培養する工程を含む、態様 8 8 の組成物。

態様 8 9

ヒト出生後 I D P S C の集団の採取工程が、D P を保持し、そして I D P S C の低酸素誘導性多系譜志向を可能にする、酵素処理を伴わない機械的トランスファーによって起こる、態様 8 8 の組成物。

[ 態様 9 0 ]

ヒト出生後 I D P S C 集団が、フィブロネクチン、コラーゲン、ラミニン、ビトロネク

チン、ポリリジン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン、またはその組み合わせを含む、細胞外マトリックス (ECM) 基質とともに培養される、態様 88 の組成物。

[ 態様 91 ]

ECM 基質が Matrigel である、態様 90 の組成物。

[ 態様 92 ]

ヒト出生後 IDPSC 集団が、少なくとも 20 採取サイクル、少なくとも 30 採取サイクル、少なくとも 40 採取サイクル、少なくとも 50 採取サイクル、または少なくとも 60 採取サイクルに渡って培養される DP からのアウトグロースとして単離される、態様 88 ~ 91 のいずれか一項の組成物。

[ 態様 93 ]

IDPSC が歯由来の歯髄 (DP) から単離される、態様 75 ~ 92 のいずれか一項の組成物。

[ 態様 94 ]

歯が、乳歯、永久歯、および第三大臼歯より選択される、態様 93 の組成物。

[ 態様 95 ]

SOX-1 および SOX-2 を同時発現し、そして神経冠幹細胞である、ヒト未成熟歯髄幹細胞 (hIDPSC) を含む細胞培養組成物。

[ 態様 96 ]

長期 (LT) 細胞培養から得られ、そして転写因子の濃縮が、LP 培養に向かって増加し、それによって、神経分化への高い潜在能力を保持し、そして正常核型を有する、態様 95 の細胞培養組成物。

[ 態様 97 ]

ヒト未成熟歯髄幹細胞 (hIDPSC) の均質な集団を得るための方法であって：

少なくとも 25 サイクルの長期 (LT) 機械的 / 非酵素的採取サイクルを通じて、均質な集団を得て；

採取された細胞を培養して細胞培養を形成し、そして

細胞培養からプラスチック接着細胞を継代し、ここでプラスチック接着細胞は、(i) 自己再生し、(ii) 内胚葉、中胚葉、または外胚葉系譜の細胞に分化し、(iii) マーカー、Sox-1、Sox-2 および 3-β-チューブリンを発現する工程を含む、前記方法。

[ 態様 98 ]

最終段階にまだ拘束されていない、Sox-1、Sox-2 および β-3-チューブリンなどのマーカーを含む (同時発現する)、有糸分裂的に活性である均質な神経前駆組成物。

[ 態様 99 ]

分化前未成熟歯髄幹細胞 (IDPSC) の実質的に均質な集団を得るための方法であって：

非接着性懸濁条件で IDPSC を培養し、その後、プラスチックプレートに接着させて神経ロゼットを形成することによって、IDPSC 由来ニューロスフェアを得る、ここで、ロゼット内の細胞は、IDPSC よりわずかにより分化した、Sox-1、Sox-2 および BrdU および β-3-チューブリンに関して陽性である神経芽細胞の細胞集団を移行 (transit) 増幅させることによって提示され、神経芽細胞は、外部 in vitro または in vivo 誘導性微小環境に際して、神経前駆体、星状細胞、オリゴデンドロサイト、および神経節細胞を含む、中枢神経系および末梢神経系のニューロン系譜に最終的に分化することが可能である

工程を含む、前記方法。

[ 態様 100 ]

態様 116 の方法によって得られる分化前 IDPSC、および CNS 疾患を治療する細胞療法に適した薬学的に許容されうるキャリアーを含む、薬学的組成物。

[ 態様 101 ]

癌を治療するための、態様 100 の薬学的組成物の使用。

[ 態様 102 ]

癌が神経芽細胞腫および網膜芽細胞腫より選択される、態様 101 の使用。

[ 態様 103 ]

IDPSC の実質的に均質な LP が、Sox - 1 ; Sox - 2 ; およびベータ - 3 - チューブリンを含む群より選択される、少なくとも 2 つのマーカーを同時発現する、態様 99 の方法。