

(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2009-525044

(P2009-525044A)

(43) 公表日 平成21年7月9日(2009.7.9)

(51) Int.Cl.

C 12 N 5/06 (2006.01)  
A 61 L 27/00 (2006.01)

F 1

C 12 N 5/00  
A 61 L 27/00

テーマコード(参考)

4 B 0 6 5  
4 C 0 8 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁)

(21) 出願番号 特願2008-553314 (P2008-553314)  
 (86) (22) 出願日 平成19年1月30日 (2007.1.30)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年9月25日 (2008.9.25)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2007/002572  
 (87) 國際公開番号 WO2007/089798  
 (87) 國際公開日 平成19年8月9日 (2007.8.9)  
 (31) 優先権主張番号 60/763,333  
 (32) 優先日 平成18年1月30日 (2006.1.30)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

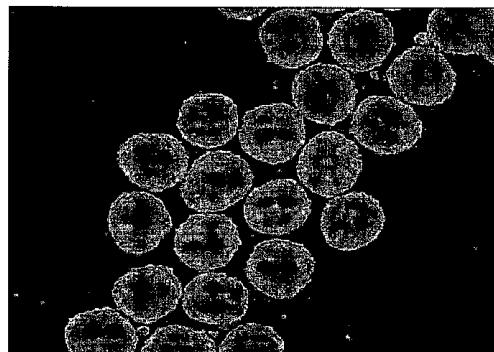
(71) 出願人 501149684  
 ユニバーシティ オブ バージニア パテント ファウンデーション  
 アメリカ合衆国 22902 バージニア州 シヤーロツビル、スウィート300、ウエスト・メイン・ストリート250番  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100108518  
 弁理士 松谷 道子  
 (74) 代理人 100127638  
 弁理士 志賀 美苗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】間葉系幹細胞集合体を調製および特性評価する方法ならびにそれらの使用

## (57) 【要約】

本発明は、多能性間葉系幹細胞集合体を調製および特性評価するための組成物および方法を提供する。本発明はさらに、本発明の幹細胞集合体を使用するための方法を提供する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

脂肪組織由来幹細胞（「A S C」）が組織化して三次元多細胞性構造を作るよう に該脂肪組織由来幹細胞を培養する方法であつて、以下を含む方法：

A S Cを得る；  
該A S Cを増殖培地中に懸濁する；  
該A S C含有増殖培地の1アリコートを、該A S Cを集合させ三次元多細胞性構造を作らせるのに適した固相支持体に移す；および  
該A S Cを組織培養環境において維持し、それによつて三次元多細胞性構造を形成する。

10

**【請求項 2】**

前記三次元多細胞性構造が自己組織化間葉系芽体を含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記固相支持体を前記A S C含有増殖培地のアリコートの添加後に反転し、前記固相支持体が反転している間に前記A S Cを液滴状に集合させる、請求項2に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記アリコートが約100マイクロリットル未満である、請求項3に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記アリコートが約30マイクロリットル未満である、請求項4に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記三次元多細胞性構造が増殖可能である、請求項1に記載の方法。

20

**【請求項 7】**

前記A S Cが、増殖培地中に懸濁される前に少なくとも1つの精製工程に供される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記培地が約1%未満の血清を含む、請求項7に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記培地が約0.5%未満の血清を含む、請求項8に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記培地が無血清である、請求項2に記載の方法。

30

**【請求項 11】**

前記A S Cが初期継代A S Cである、請求項2に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記A S CがヒトA S Cである、請求項11に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記固相支持体が組織培養プレートカバーまたは細菌プレートである、請求項2に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記A S Cが約48～72時間以内に集合する、請求項2に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記A S Cが約24時間以内に集合する、請求項14に記載の方法。

40

**【請求項 16】**

前記自己組織化間葉系芽体が、分化可能な少なくとも1種の細胞を含む、請求項2に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記少なくとも1種の細胞が、脂肪細胞、軟骨細胞、および骨芽細胞からなる群から選択される少なくとも1種の細胞型へと分化可能である、請求項16に記載の方法。

**【請求項 18】**

前記自己組織化間葉系芽体が、増殖可能な少なくとも1種の細胞を含む、請求項2に記載の方法。

50

**【請求項 19】**

前記自己組織化間葉系芽体が移動する能力を有する、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記自己組織化間葉系芽体が、少なくとも 1 種の他の自己組織化間葉系芽体と融合する能力を有する、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 21】**

前記固相支持体が、細胞付着に対する低付着性、超低付着性、または非付着性表面を有する、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 22】**

前記増殖培地が基本培地 A R 8 または A R 9 を含む、請求項 2 に記載の方法。

10

**【請求項 23】**

自己組織化間葉系芽体を増殖させる方法であって、ここで該自己組織化間葉系芽体は大きくなるか、または組織培養プレートに存在するものであり、少なくとも 1 種の自己組織化間葉系芽体を得ること、該少なくとも 1 種の自己組織化間葉系芽体を増殖培地を含む組織培養プレートに移し、それによって該自己組織化間葉系芽体を増殖させることを含む、方法。

**【請求項 24】**

前記自己組織化間葉系芽体が、少なくとも 1 種の他の自己組織化間葉系芽体と融合することによって大きくなる、請求項 2 3 に記載の方法。

20

**【請求項 25】**

前記自己組織化間葉系芽体が前記自己組織化間葉系芽体内での細胞増殖によって大きくなる、請求項 2 3 に記載の方法。

**【請求項 26】**

前記自己組織化間葉系芽体が、少なくとも 1 種の他の自己組織化間葉系芽体との融合および前記自己組織化間葉系芽体内での細胞増殖によって大きくなる、請求項 2 3 に記載の方法。

**【請求項 27】**

前記自己組織化間葉系芽体が細胞外マトリックスの生成によって大きくなる、請求項 2 3 に記載の方法。

30

**【請求項 28】**

A S C を増殖させる、請求項 2 3 に記載の方法。

**【請求項 29】**

前記自己組織化間葉系芽体を少なくとも 1 ヶ月間増殖させ得る、請求項 2 3 に記載の方法。

**【請求項 30】**

前記自己組織化間葉系芽体を少なくとも 3 ヶ月間増殖させ得る、請求項 2 3 に記載の方法。

40

**【請求項 31】**

前記自己組織化間葉系芽体を少なくとも 6 ヶ月間増殖させ得る、請求項 2 3 に記載の方法。

**【請求項 32】**

前記増殖自己組織化間葉系芽体が、脂肪細胞、軟骨細胞、および骨芽細胞からなる群から選択される少なくとも 1 種の細胞型へと分化する能力を有する細胞を含む、請求項 2 3 に記載の方法。

**【請求項 33】**

前記芽体がヒト細胞を含む、請求項 2 3 に記載の方法。

**【請求項 34】**

さらに前記自己組織化間葉系芽体がフィーダー細胞層とともに培養される、請求項 2 3 に記載の方法。

**【請求項 35】**

50

前記自己組織化間葉系芽体が懸濁培養において維持される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

少なくとも 1 種の自己組織化間葉系芽体を、それを必要とする被験体に投与する方法であって、該被験体に医薬上許容される担体および少なくとも 1 種の自己組織化間葉系芽体を含む医薬組成物を投与することを含み、該少なくとも 1 種の自己組織化間葉系芽体が有効な数の細胞を含む、方法。

【請求項 3 7】

前記医薬組成物が少なくとも 1 つの薬物または化合物をさらに含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記医薬組成物が直接に、局所的に、または非経口的に投与される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記少なくとも 1 種の自己組織化間葉系芽体を形成するために使用される細胞が、前記少なくとも 1 種の自己組織化間葉系芽体が形成される前に細胞マーカーまたは細胞機能に基づく少なくとも 1 つの精製工程に供される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記マーカーが細胞表面マーカーである、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記マーカーが CD34、NG2、ABC G2、CXCR4、CD271、CD140b、CD105、ALDH および HLA-1 からなる群から選択される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記少なくとも 1 種の自己組織化間葉系芽体が、前記少なくとも 1 種の自己組織化間葉系芽体の置換分ではない他の細胞の活性または機能を変調可能な少なくとも 1 つの因子を分泌する少なくとも 1 種の細胞を含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本願は、合衆国法典第 35 編第 119 条 (e) 項に基づいて 2006 年 1 月 30 日出願の米国仮出願第 60/763,333 号の優先権を主張し、この米国仮出願の開示内容は引用することによりそのまま本明細書の一部とされる。

【0 0 0 2】

連邦支援調査または開発に関する記述

本発明は、国立衛生研究所 (the National Institutes of Health) によって決定された認可番号 HL72141 の下で合衆国政府支援を受けてなされたものである。合衆国政府は、本発明において一定の権利を有し得る。

【背景技術】

【0 0 0 3】

間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪組織、真皮 / 皮膚などのような種々の組織から単離することができる幹細胞である。これらの細胞は、厳しい科学研究および調査の対象であり、将来の再生治療の潜在的に革命的なパラダイムの基礎であると考えられている。

【0 0 0 4】

間葉系幹細胞、一般には、脂肪幹細胞は、特に、体の自然治癒力を高める将来の臨床治療にかなり有望である。これらの潜在的な治療の使用に共通した 1 つの障害は、ヒトへの使用を目的とする細胞の培養培地においてウシ胎児血清または他の動物血清を使用する現在の慣習である。動物の血清の不明確性および可変性、ならびに生体異物の病原体を取り込み、一部の被験体において重篤なアレルギー応答を引き起こす関連するリスクは、現在当分野において未解決の技術的問題である。

10

20

30

40

50

## 【0005】

最近では、主として骨髓から得られる間葉系幹細胞の同定が組織の再生および分化の進展をもたらした。かかる細胞は骨髓および骨膜に見られる多能性細胞であり、様々な間葉系組織または結合組織へと分化可能である。例えば、かかる骨髓由来幹細胞は、5-アザシチジンなどの薬剤への曝露によって誘導されて、筋細胞へと発展し得る(Wakitani et al., Muscle Nerve, 18 (12), 1417-26 (1995))。かかる細胞は軟骨、脂肪、および骨などの組織の修復に有用であるということ(例えば、米国特許第5,908,784号、同第5,906,934号、同第5,827,740号、同第5,827,735号参照)、そしてそれらの細胞はまた、遺伝子改変を使って応用もできるということ(例えば、米国特許第5,591,625号参照)が示唆されている。かかる細胞の同定は組織の再生および分化の進展をもたらしたが、かかる細胞の使用はいくつかの技術的な障害によって妨げられている。かかる細胞の使用の1つの欠点は、それらの細胞が希少であり(わずか1/2,000,000細胞に相当する)、それらの細胞を獲得し、単離するための任意のプロセスを困難かつ高コストにすることである。いうまでもなく、骨髓採取はドナーには一般に痛みを伴う。さらに、かかる細胞は、分化誘導しないで培養することは難しく、特にスクリーニングした血清ロットを使用しない場合、かかる幹細胞の使用にはさらにコストと労働が上乗せされる。

10

## 【0006】

成体多能性「幹」細胞の存在は、数多くの組織(例えば骨髓、血液、肝臓、筋肉、神経系)および脂肪組織において立証されている。理論上、無限自己再生が可能である成体「幹」細胞は、優れた細胞可塑性、すなわちそれらの細胞が運命付けられていると考えられる組織以外の組織へと分化する能力を有する。胚幹細胞(ES)の特性と類似している前記細胞の特性は、特にそれら細胞の使用にはES細胞を用いて直面する適合性や倫理学の問題がないことから重要な治療的展望を開く。

20

## 【0007】

脂肪組織は、ヒトおよび他の哺乳類種の正常な発達および生理学において重要な見過された役割を果たす。多くの異なる種類の脂肪が存在する。最も一般的なタイプは、皮膚の下(皮下脂肪)、腹腔内(内臓脂肪)、および生殖器周囲(性腺脂肪)に位置する白色脂肪組織である。成体ヒトではあまり見られないのが褐色脂肪組織であるが、この褐色脂肪組織は新生児期の間の発熱において重要な役割を果たす;このタイプの脂肪は肩甲骨の間(肩甲骨間)、主要血管および心臓の周囲(大動脈周囲および心臓の周囲)、および腎臓の上(副腎)に位置する。

30

## 【0008】

女性は成熟するにつれて、乳房脂肪組織の量が高まる。乳房脂肪体は、授乳期間中のエネルギー源となる。実際に、生殖能力および成熟は個体の脂肪組織蓄積と密接な関係がある。女性および男性の思春期は、脂肪組織由来ホルモンであるレプチンの産生および放出と、そして体脂肪組成と密接な相関関係がある。他の脂肪組織部位は体内で構造的役割を果たす。例えば、足の裏の機械的脂肪体は歩行の影響に対するクッションを提供する。この脂肪貯蔵の喪失は進行性筋骨格系損傷および移動性障害の原因となる。骨髓脂肪細胞は骨髓に存在して、エネルギーを提供し、骨髓内で血液細胞に発展させる。

40

## 【0009】

骨髓脂肪細胞は脂肪組織に存在する脂肪細胞とは異なり、形態学、生理学、生化学ならびにインスリンなどの様々な刺激因子に対するそれらの応答において異なっている。骨髓間質に存在する脂肪細胞は:1)血行動態的に活性な骨髓の量を調節するように作用し得;2)骨髓細胞の増殖に必要な脂質の貯蔵器として働き、そして3)骨芽細胞などの他の細胞系統と発生的に関連し得る。白色脂肪組織(すなわち体脂肪)は、対照的に、脂質代謝およびエネルギー恒常性に関与している(Gimble, "The Function of Adipocytes in the Bone Marrow Stroma", The New Biologist 2(4), 1990, pp. 304-312)。

## 【0010】

様々な幹細胞集団に関する調査の大半は、自然に混合されているか、またはクローンに

50

由来する付着細胞培養物および / または単一細胞懸濁液としてのそれらの挙動および治療可能性に集中していた。しかしながら、幹細胞は *in vivo* では支持的ニッチ、または微小環境の中で存在する可能性が最も高いという証拠を約束することによって裏付けられたコンセンサスは徐々に発展しつつある。

#### 【0011】

最近のいくつかの論文で概説されているように、新たに明らかになったデータは、「それが幹細胞の固有の特徴と、それらの特性を定め、それらの可能性を定義するそれらの微小環境との組合せである」ことを示唆している (Fuchs et al., *Cell*, 116:769-778, 2004)。本質的に、特殊細胞環境、またはニッチは、可溶性因子およびマトリックス因子の環境を作り出す / 提供する (幹細胞構成要素に追加される、または幹細胞構成要素を含む) 細胞の多様な異種コレクションからなる。これらの因子は、幹細胞貯蔵器のホメオスタシス (細胞増殖、分化、および再生を含む) を命令し、制御する手助けをする (Kindler, *J. Leukocyte Biol.*, 78:836-844, 2005; Fuchs et al., *Cell*, 116:769-778, 2004)。そして、組織 / ニッチが平衡状態にある場合には、幹細胞の大部分は細胞周期の G<sub>0</sub> 期において休眠状態 / 静止状態であると現在は考えられているが、組織 / ニッチの喪失、または損傷は幹細胞貯蔵器に強力な刺激を与えて、再生 (増加) および / または分化によって平衡を再確立する (すなわち修復する ; 再生する) とも考えられている。この能力は恐らく非対称細胞分裂、さらに場合によってはある程度の脱分化を必要とし、これらの全てはニッチ微小環境によって支配されていると考えられる。

10

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0012】

上記背景を考えると、*ex vivo* 幹細胞ニッチモデルの「作出」は、幹細胞生物学の研究だけでなく、可能性ある治療用途にも非常に有用かつ有益であろうことが明らかになる。研究者らは胚幹細胞 (胚様体) および神経幹細胞 (ニューロスフェア) の *in vitro* 「ニッチ」を記載し、特性評価した - それらの細胞は両方とも多細胞性集合体における前記細胞の懸濁 (すなわち非付着性) 培養を必要とする。しかしながら、間葉系幹 / 間質細胞、特に脂肪由来細胞ではそのような「システム」は記載されていない。かかる細胞は付着性単層として伝統的に培養されるが、これは、これらの細胞が細胞培養 / 付着に対して不利であると見られる表面に対してさえも極めて高い付着性を示すために、これらの細胞を懸濁状態で培養することが難しいことによると思われる。

20

#### 【0013】

当技術分野では長年にわたって、間葉系幹細胞、特に脂肪組織由来細胞の多細胞性集合体を調製、特性評価、および操作する方法、そして代替の、および / または強化された再生技術を提供する方法を必要としており、本発明はこの必要性を満たしている。

30

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0014】

#### 発明の概要

本発明は、脂肪幹 / 間質細胞集団を増殖させ、分化させるための方法および組成物を提供する。本発明はさらに、かかる細胞のクラスターを操作し、巧みに処理するための方法および組成物を提供する。

40

#### 【0015】

本願は、懸濁培養においてヒト脂肪由来幹 / 間質細胞 (ASC) を培養する複数の方法を開示し、これらの方法は、該ヒト脂肪由来幹 / 間質細胞 (ASC) が：1) 生じ、組織化して、血清、または他の異種のタンパク質を加えたまたは加えない (懸濁または付着性) 培養下で長期間生存する三次元多細胞性集合体 (スフェア、クラスター、芽体、ネットワークなどとも呼ばれる) を作り；2) 集密状態まで増殖する付着細胞を繰り返し「発生させる」ことができ (すなわち高度自己再生能力)；3) 多系統表現型へと分化することができ、そして4) 異なる環境条件、例えば様々な培地または外傷に応じて変形する (増殖する、伸長する、分極する) ことができるような培養方法である。さらに、これらの三

50

次元集合体は、2種以上の異なる細胞型、例えばASCとケラチノサイト、またはASCと造血幹細胞(HSC)を用いることによって細胞キメラとして形成することができる。これらの三次元細胞集合体は、本明細書では芽体と呼ぶ。芽体は、損傷もしくは剥離構造/組織の再生を開始、促進、および/または命令する能力がある細胞のクラスターとして定義される。この文書を通じて、これらの芽体はさらに記載され、同義的に自己組織化間葉系芽体(SOM-B)、脂肪幹/間質細胞芽体(ASCB)、キメラ芽体(CB)、および/またはASC-間葉系芽体(ASC-MB)と呼ばれる。

## 【0016】

本発明は、懸濁(非付着性)状態のヒト脂肪由来幹/間質細胞が組織化して新規三次元多細胞性動的自立構造を作るよう、それらを作製、培養、維持、および/または操作することを包含する。本願に開示する結果は、これらのex vivo構造はASCのための静止幹細胞ニッチ(微小環境)に匹敵し、それらの細胞を(それらがin vivoで存在するように)未分化および/または脱分化状態で維持することができることを示唆している。増殖因子への曝露および/または組織傷害などの適当なシグナルおよび/または状態により、それらのニッチにおける細胞は複製し、分化し、かつ/または移動、分極および/もしくは他の形態形成/発生拳動を受ける能力を有する。現在開示されているデータは、このニッチ環境で調製されたまたはこのニッチ環境から誘導されたASCは(標準的な技術を用いて付着性単層培養物として増殖させた細胞と比べて)発生可塑性の高まりを示し、結果として再生治療可能性の高まりを示すことをさらに示唆している。SOM-Bは、移植細胞の移植および生存を促進するだけでなく、その宿主部位内でのそれらの組込み、移動および分化を促進する可能性を有する再生医療用途向けの新規送達系/戦略である。ASCは再生治療を病院へとつなげるための特に実用的で魅力的な細胞源であるため、この発見は調査、診断学、および治療学におけるASCの使用に重要な影響をもたらす。

10

20

30

## 【0017】

本明細書に記載の本発明は、ASCが支持的ニッチ/微小環境において幹細胞集団のように作用する三次元多細胞性集合体を形成する方法での該ASCの培養に関する。

## 【0018】

一実施形態では、本発明は、ASCが組織化して三次元多細胞性構造を作るよう該ASCを培養する方法を提供する。一態様では、前記ASCは培養下でSOM-Bと呼ばれる集合体を形成する。一態様では、前記集合体は非付着性、すなわち懸濁状態である。一態様では、前記培養培地は無血清である。一態様では、前記培地は約0.5%血清を含む。一態様では、使用する前記培地はAR8またはAR9である。一態様では、前記SOM-Bは培養下で増殖させることができる。一態様では、前記SOM-Bは増殖可能な細胞を含む。一態様では、前記SOM-Bは運動/移動可能である。一態様では、SOM-Bは少なくとも1種の細胞型へと分化可能な細胞を含む。一態様では、SOM-Bは、存在する環境条件または刺激に応じて、限定されるものではないが、脂肪細胞、骨芽細胞および軟骨細胞を含む様々な細胞型へと分化可能な細胞を含む。一態様では、少なくとも1種のSOM-Bは少なくとも1種の他のSOM-Bと融合することができる。一態様では、前記ASCはヒトASCである。

40

## 【0019】

一実施形態では、SOM-B中の細胞は、該SOM-Bに隣接するかまたは該SOM-Bに近い細胞の活性および機能を変調可能な因子を分泌する。一態様では、前記因子は増殖因子である。もう1つの態様では、前記因子は分化因子である。さらにもう1つの態様では、前記因子は血管新生因子である。

## 【0020】

一実施形態では、SOM-B中の細胞は細胞外マトリックスタンパク質を分泌する。

## 【0021】

一実施形態では、SOM-Bは、キメラが形成されるようにASC以外の細胞をさらに含んで形成され得る。

## 【0022】

50

一実施形態では、SOM-Bは培養下で増殖させる。一態様では、前記培養は懸濁培養である。

【0023】

一実施形態では、SOM-Bはそれを必要とする被験体に投与される。一態様では、前記SOM-Bは薬物または他の薬剤もしくは化合物と同時投与され得る。かかる化合物には、限定されるものではないが、ペプチド、リボザイム、核酸、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー、フィロマー(phylomer)、ポリマー、生分解性スキャフォールド、およびsiRNAが含まれる。

【0024】

一実施形態では、ASCは培養される前に少なくとも部分的に精製される。一態様では、細胞マーカーは前記細胞を精製するために使用される。一態様では、前記細胞マーカーはCD34、NG2、ABC G2、CXCR4、CD271、CD140b、CD105、ALDHおよびHLA-1からなる群から選択される。

10

【0025】

本発明の様々な態様および実施形態については以下でさらに詳細に記載する。

【0026】

発明の詳細な説明

略語および頭字語

ASC - 脂肪組織由来幹細胞

20

ASC-B - 脂肪幹/間質細胞芽体

ASC-MB - ASC - 間葉系芽体

CB - キメラ芽体

DMEM - ダルベッコ改変イーグル培地

ES - 胚幹細胞

FACS - 蛍光活性化細胞選別

FBS - ウシ胎児血清

HSC - 造血幹細胞

MB - メセンコイドボディ

SOM-B - 自己組織化間葉系芽体(本明細書においては「自己組織化メセンコイドボディ」とも呼ばれる)

30

UL A - 超低付着性組織培養プレート

【0027】

定義

本発明を記載し、主張する場合において、次の用語は以下に示す定義に従って使用される。

【0028】

冠詞「1つの(a)」および「1つの(an)」は、この冠詞の文法上の目的語の1つまたは2つ以上(すなわち少なくとも1つ)を指すために本明細書において使用される。一例として、「1つの要素(an element)」は1つの要素または2つ以上の要素を意味する。

40

【0029】

「約」とは、本明細書において、近似的に、~の辺り、大体、または前後を意味する。この「約」が数値域とともに使用される場合には、それによって示された数値の上下限が広がることによってその範囲が変更される。例えば、一態様では、この「約」は、数値を表示値の上下に20%の変動分変更するために本明細書において使用される。

【0030】

「脂肪由来幹細胞」は、本明細書において「脂肪由来間質細胞」とも呼び、脂肪組織が起源である細胞を指す。「脂肪」とは任意の脂肪組織を意味する。この脂肪組織は、皮下、大網/内臓、乳房、性腺、または他の脂肪組織部位由来の褐色または白色脂肪組織であつてよい。好ましくは、前記脂肪は皮下白色脂肪組織である。かかる細胞には初代細胞培養または不死化細胞株が含まれ得る。前記脂肪組織は脂肪組織を有する任意の生物由来で

50

あってよい。好ましくは、前記脂肪組織は哺乳類のものであり、より好ましくは、前記脂肪組織はヒトのものである。便宜な脂肪組織源は脂肪吸引術により得られるが、脂肪組織源または脂肪組織の分離方法は本発明にとって極めて重要なものではない。

【0031】

「成体」とは、本明細書において、任意の非胎児または非未成体被験体を指すことを意味する。例えば「成体脂肪組織幹細胞」とは、胎児または未成体被験体から得られるもの以外の脂肪幹細胞を指す。

【0032】

疾患または障害は、該疾患、状態、もしくは障害の症状の重篤度、または被験体にかかる症状が見られる頻度、または両方が軽減されるならば「緩和される」。

10

【0033】

本明細書において、化学化合物の「類似体」は、一例として、構造が別の中に似ている化合物であるが、必ずしも異性体とは限らない（例えば、5-フルオロウラシルはチミンの類似体である）。

【0034】

本明細書において、アミノ酸は、次の表に示すとおり、その完全名称、それに対応する3文字表記、またはそれに対応する1文字表記によって表される：

【0035】

【表1】

完全名称	3文字表記	1文字表記	20
アスパラギン酸	A s p	D	
グルタミン酸	G l u	E	
リジン	L y s	K	
アルギニン	A r g	R	
ヒスチジン	H i s	H	
チロシン	T y r	Y	
システイン	C y s	C	
アスパラギン	A s n	N	
グルタミン	G l n	Q	
セリン	S e r	S	
トレオニン	T h r	T	
グリシン	G l y	G	
アラニン	A l a	A	
バリン	V a l	V	
ロイシン	L e u	L	
イソロイシン	I l e	I	
メチオニン	M e t	M	
プロリン	P r o	P	
フェニルアラニン	P h e	F	
トリプトファン	T r p	W	
			30

【0036】

表現「アミノ酸」とは、本明細書において、天然アミノ酸および合成アミノ酸の両方、ならびにD型アミノ酸およびL型アミノ酸の両方を含むことを意味する。「標準アミノ酸」は、天然に存在するペプチドにおいてよく見られる20種の標準L-アミノ酸の任意のものを意味する。「非標準アミノ酸残基」とは、それが合成により調製されるか、または天然源から得られるかには関係なく、標準アミノ酸以外の任意のアミノ酸を意味する。本明細書において、「合成アミノ酸」は、化学修飾アミノ酸も包含し、そのような化学修飾アミノ酸には、限定されるものではないが、塩、アミノ酸誘導体（例えばアミド）、および置換体が含まれる。本発明のペプチド内に含まれる、特にカルボキシ-またはアミノ-末端のアミノ酸は、メチル化、アミド化、アセチル化またはそれらのアミノ酸の活性に悪

50

影響を及ぼさずにペプチドの循環半減期を変更することができる他の化学基との置換によって修飾することができる。加えて、ジスルフィド結合は本発明のペプチド中に存在していてよく、または不在であってもよい。

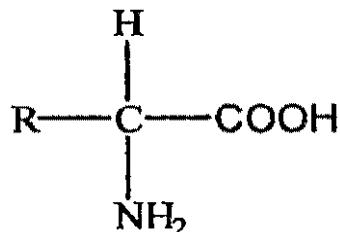
【0037】

「アミノ酸」とは、「アミノ酸残基」と同義的に使用され、遊離アミノ酸も、さらにペプチドのアミノ酸残基も指し得る。この用語が遊離アミノ酸を指しているのか、またはペプチドの残基を指しているのかは、この用語が使用されている文脈から明らかであろう。

【0038】

アミノ酸は次の一般構造を有する：

【化1】



10

【0039】

アミノ酸は、側鎖Rに基づいて7つのグループに分類され得る：(1)脂肪族側鎖、(2)ヒドロキシル(OH)基含有側鎖、(3)硫黄原子含有側鎖、(4)酸性またはアミド基含有側鎖、(5)塩基性基含有側鎖、(6)芳香環含有側鎖、および(7)プロリン、すなわちアミノ基と縮合されているイミノ酸。

20

【0040】

本発明のペプチド化合物を記載するために使用される命名法は、各アミノ酸残基の左にアミノ基を、右にカルボキシ基を示す従来の慣例に従う。本発明の選択した特定の実施形態を表す式において、前記アミノ-およびカルボキシ-末端基は、具体的には示していないが、特に断りのない限り、それらが生理学的pH値においてとるであろう形態であると考えられる。

【0041】

「塩基性」または「正電荷」アミノ酸とは、本明細書において、R基がpH7.0において正味の正電荷を有するアミノ酸を指し、そのようなアミノ酸には、限定されるものではないが、標準アミノ酸であるリジン、アルギニン、およびヒスチジンが含まれる。

30

【0042】

「抗体」とは、本明細書において、抗原の特定のエピトープと特異的に結合することができる免疫グロブリン分子を指す。抗体は、天然源または組換え体源から得られる無傷免疫グロブリンであり得、無傷免疫グロブリンの免疫反応性部分であり得る。抗体は、一般には、免疫グロブリン分子の四量体である。本発明における抗体は種々の形態で存在してよく、そのような形態には、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fv、FabおよびF(ab)<sub>2</sub>、ならびに单鎖抗体およびヒト化抗体が含まれる。

40

【0043】

本明細書において、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」またはアンチセンス核酸とは、少なくとも一部が正常細胞または罹患細胞に存在する核酸と相補的である核酸高分子を意味する。「アンチセンス」は、特に、タンパク質をコードする二本鎖DNA分子の非コード鎖の核酸配列、またはその非コード鎖と実質的に相同である配列を指す。本明細書において定義されるとおり、アンチセンス配列はタンパク質をコードする二本鎖DNA分子の配列と相補的である。このアンチセンス配列はDNA分子のコード鎖のコード部分のみに相補的である必要はなく、アンチセンス配列は、タンパク質をコードするDNA分子のコード鎖上に定められた、そのコード配列の発現を制御する調節配列と相補的であってよい。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドには、限定されるものではないが、ホスホチオエートオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドの他の修飾体が含まれる。

50

## 【0044】

「自己（の）」とは、本明細書において、ある特定の種類の組織中でまたは体の特定構造中で自然にかつ通常生じるものと指す。移植の場合、この用語は、同じ個体中にドナー領域とレシピエント領域がある移植片を指し、またはドナーが事前に提供し、その後、通常手術中に受ける血液を指す。

## 【0045】

「基本培地」とは、本明細書において、他の成分を追加し得る、「ダルベッコ改変イーグル培地」、HamのF12、イーグル培地、RPMI、AR8、などのような最小限必要なタイプの培地を指す。この用語は、調製されているまたは特殊用途に向けられたものであるが、修飾により他の細胞型などに使用することができる培地を排除しない。

10

## 【0046】

「芽体」とは、本明細書において、とりわけ、器官、組織または部分が形成される原始細胞塊ならびに損傷もしくは剥離構造の再生を開始および／または促進する能力がある細胞のクラスターを包含する。

## 【0047】

「生体適合性（の）」とは、本明細書において、宿主において実質的な有害応答を引き起こさない材料を指す。

## 【0048】

「細胞」および「細胞系統」とは、本明細書において、同義的に使用され得る。これらの用語は全て、ありとあらゆる次の世代であるそれらの後代も含む。全ての後代は、意図的または非意図的な突然変異によって同一でない可能性があることは理解される。

20

## 【0049】

「細胞培養」および「培養」とは、本明細書において、人工的なin vitro環境における細胞の維持を指す。しかしながら、この「細胞培養」とは、一般用語であり、個々の細胞だけでなく、組織、器官、器官系または生物全体の培養（このような培養に関して「組織培養」、「器官培養」、「器官系培養」または「器官培養」が「細胞培養」と同義的に使用される場合がある）を包含するように使用してよいことは理解すべきである

## 【0050】

フレーズ「細胞培養培地」、「培養培地」（いずれの場合にも複合「培地」）および「培地処方物」は、細胞を培養するための栄養液を指し、同義的に使用され得る。

30

## 【0051】

「化合物」とは、本明細書において、薬物、または薬物として使用するための候補、組合せ、および前記のものの混合物、ならびに本発明のポリペプチドおよび抗体と一般に考えられる任意の種類の物質または薬剤を指す。

## 【0052】

「馴化培地」とは、培地中で細胞または組織の第1集団を培養し、その後、その培地を回収することによって調製されたものである。この馴化培地（細胞によって培地に分泌された任意のものとともに）は、その後、細胞の第2集団の増殖または分化を支援するために使用され得る。

## 【0053】

「対照」細胞、組織、サンプル、または被験体とは、試験細胞、組織、サンプル、または被験体と同じ種類の細胞、組織、サンプル、または被験体である。この対照は、例えば、試験細胞、組織、サンプル、または被験体を調べるのと正確にまたはほぼ同時に調べてよい。対照はまた、例えば、試験細胞、組織、サンプル、または被験体を調べる時期から離れた時期に調べてもよく、対照の調査の結果は、記録された結果を試験細胞、組織、サンプル、または被験体の調査によって得られた結果と比較し得るように、記録され得る。この対照は、試験を実施する対象の疾患または障害の疑いがある被験体から試験サンプルが得られる試験群または被験体以外の別の源または同様の源からも得られ得る。

40

## 【0054】

「試験」細胞、組織、サンプル、または被験体は、調べられるまたは処置されるもの（

50

人)である。

【0055】

「疾病指標」細胞、組織、またはサンプルは、存在する場合に、その細胞、組織、またはサンプルが存在している(またはその組織が得られる)動物が疾患または障害に罹患していることを示すものである。一例として、動物の肺組織に1つ以上の乳房細胞が存在することは、その動物が転移性乳癌に罹患していることを示している。

【0056】

1つ以上の細胞が疾患または障害に罹患していない動物の組織に存在するならば、組織はその細胞を「通常含む」。

【0057】

「送達ビヒクル」とは、in vivoで細胞を送達するのに使用することができ、または動物に投与される細胞を含む組成物に加えることができる任意の種類の装置または材料を指す。これには、限定されるものではないが、埋め込み可能な装置、細胞の集合体、マトリックス材料、ゲルなどが含まれる。

【0058】

本明細書において、化合物の「誘導体」とは、類似構造の別の化合物から、アルキル、アシル、またはアミノ基によるHの置換によるような1以上の工程によってもたらされ得る化学化合物を指す。

【0059】

単語「検出する」およびその文法的变形の使用は、定量を伴わない種の測定を指すことを意味し、一方、単語「決定する」または「測定する」(それらの文法的变形を含む)の使用は、定量を伴う種の測定を指すことを意味する。「検出する」および「同定する」は本明細書において同義的に使用される。

【0060】

「疾患」は、動物がホメオスタシスを維持することができず、その疾患が改善されない場合にはその動物の健康は悪化し続ける動物の健康状態である。

【0061】

これに対して、動物における「障害」は、動物がホメオスタシスを維持することができるが、その動物の健康状態はその障害の不在下での状態よりもよくない健康状態である。処置しないまま放置しても、障害は必ずしも動物の健康状態をさらに低下させない。

【0062】

本明細書において、「有効な量」とは、選択された効果をもたらすのに十分な量を意味する。

【0063】

「フィーダー細胞」とは、本明細書において、第2の種類の細胞と同時培養されて、その第2の種類の細胞が維持され、恐らく増殖することができる環境を提供する、一種類の細胞を指す。このフィーダー細胞は、フィーダー細胞が支持している細胞とは異なる種由来のものであり得る。フィーダー細胞は、フィーダー細胞が増殖せず、フィーダー細胞が栄養供給している細胞と混ざらないことを確実にするために、同時培養される前に非致死的に照射または処理して、フィーダー細胞の増殖を防ぐことができる。「フィーダー細胞」、「フィーダー」、および「フィーダー層」は本明細書において同義的に使用される。

【0064】

本明細書において、「機能性」分子とは、その分子が特徴付けられる特性または活性をその分子が示す形態にある分子である。

【0065】

「断片」または「セグメント」は少なくとも1つのアミノ酸を含むアミノ酸配列の一部、または少なくとも1つのヌクレオチドを含む核酸配列の一部である。これらの「断片」および「セグメント」は本明細書において同義的に使用される。

【0066】

「移植片」とは、移植に用いる任意の自由な(離れた)細胞、組織、または器官を指す

10

20

30

40

50

。

## 【0067】

「同種移植片」または「同種（の）」とは、同じ種の異なる動物から得られる移植細胞、組織、または器官を指す。

## 【0068】

「異種移植片」または「異種（の）」とは、異なる種の動物から得られる移植細胞、組織、または器官を指す

## 【0069】

「相同（の）」とは、本明細書において、2高分子間、例えば、2核酸分子（例えば、2DNA分子もしくは2RNA分子）間、または2ポリペプチド分子間のサブユニット配列類似性を指す。2分子の両方におけるサブユニット位置が同じ単量体サブユニットによって占められている場合、例えば、2DNA分子のそれぞれにおけるある位置がアデニンによって占められているならば、それらはその位置において相同である。2配列間の相同性はマッチングまたは相同位置の数一次関数であり、例えば、2化合物配列における半分の位置（例えば、高分子10サブユニット長において5つの位置）が相同であるならば、それらの2配列は50%相同であり、90%の位置、例えば、10のうち9つの位置がマッチしているまたは相同であるならば、それらの2配列は90%相同性を共有する。一例として、DNA配列 3' T T G C C 5' および 3' T A T G G C は 50% 相同性を共有する。

10

## 【0070】

本明細書において、「相同性」は「同一性」と同義的に使用される。

20

## 【0071】

2ヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の同一性パーセントの決定は、数学アルゴリズムを用いて行うことができる。例えば、2配列の比較に有用な数学アルゴリズムは、Karlin and Altschul (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877) に記載のように改良されたKarlin and Altschul (1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268) のアルゴリズムである。このアルゴリズムはAltschul, et al. のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれており(1990, J. Mol. Biol. 215:403-410)、例えば国立バイオテクノロジー情報センター(the National Center for Biotechnology Information) (NCBI) ワールドワイドウェブサイトでアクセスすることができる。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTプログラム (NCBIウェブサイトでは「blastn」と示される) を使用して、本明細書に記載の核酸と相同なヌクレオチド配列を得るために次のパラメーター：ギャップペナルティー = 5；ギャップ伸長ペナルティー = 2；ミスマッチペナルティー = 3；マッチスコア = 1；期待値 10.0；およびワードサイズ = 11を用いて実行することができる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラム (NCBIウェブサイトでは「blastn」と示される) またはNCBI「blastp」プログラムを使用して、本明細書に記載のタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得るために次のパラメーター：期待値 10.0、BLOSUM62スコア行列を用いて実行することができる。比較のためにギャップ付きアライメントを得るために、Altschul et al. (1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) に記載のとおりGapped BLASTを利用することができる。あるいは、PSI-BlastまたはPHI-Blastを使用して、分子間の距離関係(同文献)および共通したパターンを有する分子間の関係を検出する反復検索を実行することができる。BLAST、Gapped BLAST、PSI-Blast、およびPHI-Blastプログラムを利用する場合には、各プログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメーターを使用することができる。

30

## 【0072】

2配列間の同一性パーセントは、ギャップを伴うまたは伴わない、上記のものと同じような技術を用いて決定することができる。同一性パーセントを算出する場合には、一般に、完全なマッチが計数される。

40

50

## 【0073】

「成分」とは、細胞の増殖、生存、もしくは分化を維持または促進するために細胞培養培地に使用することができる、化学的起源のものであるかまたは生物学的起源のものであるかどうかにはかかわらない、任意の化合物を指す。「成分(component)」、「栄養物」、「補給物」および「成分(ingredient)」は同義的に使用され得、全てはかかる化合物を指すことを意味する。細胞培養培地に使用される非限定的な典型成分には、アミノ酸、塩、金属、糖、脂質、核酸、ホルモン、ビタミン、脂肪酸、タンパク質などが含まれる。ex vivoでの細胞の培養を促進または維持する他の成分は、特定のニーズに合わせて当業者によって選択され得る。

## 【0074】

10

「阻害する」とは、本明細書において、活性もしくは機能が対照値と比べて低いように活性もしくは機能を抑制または遮断することを意味する。この阻害は直接または間接的機構によるものであってよい。一態様では、前記活性は、対照値と比べて少なくとも10%、より好ましくは、少なくとも25%、さらに好ましくは、少なくとも50%抑制または遮断される。

## 【0075】

「阻害剤」とは、本明細書において、適用することによって、限定されるものではないが、分化および活性を含む目的のプロセスまたは機能の阻害をもたらす任意の化合物または薬剤を指す。目的の活性または機能の低下が起こるならば、阻害が推測され得る。

## 【0076】

20

「傷害」とは、暴力、事故、外傷、または骨折などによって起こる身体への任意の物理的損害を指す。

## 【0077】

30

本明細書において、「教示材料」には、本明細書に列挙する様々な疾患または障害の緩和をもたらすためのキット中の本発明のペプチドの有用性を伝達するために使用することができる刊行物、記録、図表、または任意の他の表現媒体が含まれる。所望により、または代替的に、教示材料には哺乳類の細胞または組織における疾患または障害を緩和する1以上の方法が記載されていることもある。本発明のキットの教示材料は、例えば、本発明の同定化合物が入っている容器へ添付され得るか、または同定化合物が入っている容器とともに出荷され得る。あるいは、この教示材料は、レシピエントによって教示材料と化合物が協力的に使用されるという意図で、容器とは別に出荷してもよい。

## 【0078】

1)「単離する」と「選択する」；そして2)「検出する」と「同定する」は本明細書において同義的に使用される。

## 【0079】

40

細胞に関して用いられる際の「単離(された)」とは、目的の単一細胞、または目的の細胞集団が起源の組織(例えば、脂肪組織)においてともに自然に生じる他の細胞型または他の細胞材料から少なくとも部分的に単離された目的の単一細胞、または目的の細胞集団を指す。幹細胞のサンプルは、目的の細胞以外の細胞が少なくとも60%、または少なくとも75%、または少なくとも90%、ある特定の場合では、少なくとも99%存在しない場合に「実質的に純粋」である。純度は任意の適当な方法によって、例えば、蛍光活性化細胞選別(FACS)、または細胞型を識別する他のアッセイによって測定することができる。

## 【0080】

50

「単離核酸」とは、天然に存在する状態においてランキングする配列から分離されている核酸セグメントまたは断片、例えば、通常はその断片に隣接している配列(例えば、それが自然に生じるゲノムにおいてその断片に隣接している配列)から取り出されたDNA断片を指す。この用語はまた、自然にその核酸に伴って起こる他の成分(例えば、細胞中で自然にそれに伴って起こるRNAまたはDNAまたはタンパク質)から実質的に精製された核酸にも当てはまる。そのため、この用語には、例えば、ベクターに、自己複製プ

ラスミドもしくはウイルスに、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれるか、あるいは他の配列とは無関係に独立した分子として（例えば、PCRまたは制限酵素消化によって生成されるcDNAまたはゲノムもしくはcDNA断片として）存在する組換えDNAが含まれる。またこれには、さらなるポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAも含まれる。  
も含む。

【0081】

特に断りのない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」には、互いに縮重変形であり、同じアミノ酸配列をコードする全てのヌクレオチド配列が含まれる。タンパク質およびRNAをコードするヌクレオチド配列はイントロンを含み得る。

10

【0082】

本明細書において、「検出マーカー」または「リポーター分子」は、マーカーを含まない類似化合物の存在下でマーカーを含む化合物の特異的検出を可能にする原子または分子である。検出マーカーまたはリポーター分子には、例えば、放射性同位元素、抗原決定基、酵素、ハイブリダイゼーションに利用できる核酸、発色団、フルオロフォア、化学発光分子、電気化学的に検出可能な分子、および蛍光偏光の変化または光散乱の変化をもたらす分子が含まれる。

【0083】

本明細書において、「リガンド」とは、標的化合物と特異的に結合する化合物である。異種化合物のサンプル中のある化合物の存在を決定する結合反応においてリガンド（例えば、抗体）が作用する場合に、そのリガンドはその化合物と「特異的に結合する」または「特異的に免疫反応する」。よって、設計されたアッセイ（例えば、イムノアッセイ）条件下では、リガンドは特定の化合物と選択的に結合し、サンプル中に存在する他の化合物とはわずかな程度にしか結合しない。例えば、抗体は、イムノアッセイ条件下では、抗体が作製されるエピトープを有する抗原と特異的に結合する。種々のイムノアッセイ形式を用いて、特定の抗原と特異的に免疫反応する抗体を選択することができる。例えば、固相ELISAイムノアッセイは、抗原と特異的に免疫反応するモノクローナル抗体を選択するために日常的に使用される。特異的免疫反応性を決定するために使用することができるイムノアッセイ形式および条件の記載については、Harlow and Lane, 1988, Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York参照。

20

【0084】

本明細書において、「結合」とは、2群間の連結のを指す。この連結は共有結合性または非共有結合性のいずれかであり得、これには、限定されるものではないが、イオン結合、水素結合、および疎水性／親水性相互作用が含まれる。

【0085】

本明細書において、「リンカー」とは、共有結合または非共有結合のいずれかによって、例えば、イオンもしくは水素結合またはファン・デル・ワールス相互作用によって他の2つの分子を連結させる分子を指す。

【0086】

「細胞付着に対する低付着性、超低付着性、または非付着性表面」とは、細胞の付着を支援する表面の能力を指す。「細胞付着に対する非付着性表面」とは、細胞付着があるとしても表面がほとんど支援しないということを意味する。

40

【0087】

「変調する」とは、本明細書において、活性、機能、またはプロセスのレベルを変化させることを指す。この「変調する」は、活性、機能、またはプロセスを阻害することと刺激することの両方を包含する。

【0088】

「多細胞性集合体」、「多細胞性スフェア」、「芽体」、および「多細胞性構造」は本明細書において同義的に使用される。

【0089】

50

本明細書において、「医薬上許容される担体」には、標準的な医薬担体の任意のもの、例えばリン酸緩衝生理食塩水、水、エマルジョン（油／水または水／油エマルジョンなど）、および様々な種類の湿潤剤が含まれる。この用語はまた、ヒトをはじめとする動物に使用するためにU.S.連邦政府の監督官庁によって認可されているまたはU.S.薬局方に記載されている薬剤の任意のものも包含する。

## 【0090】

「複数」とは、少なくとも2つを意味する。

## 【0091】

幹細胞の「後代」とは、本明細書において、幹細胞から誘導された、親幹細胞の分化能力の全て、すなわち、多能性をまだ有し得る細胞、またはもはや多能性ではないかもしれないが、その時点でただ1種の細胞型へと分化可能な方向に傾倒しているもの、すなわち委任細胞型を指す。また、この用語は分化細胞も指すこともある。

10

## 【0092】

「増殖させる」とは、繁殖させることまたは発生させることを意味する。

## 【0093】

本明細書において、末端アミノ基に関して「保護基」とは、末端アミノ基が、ペプチド合成において伝統的に使用される様々なアミノ末端保護基の任意のものと結合されている、ペプチドの末端アミノ基を指す。かかる保護基には、例えば、アシル保護基（ホルミル、アセチル、ベンゾイル、トリフルオロアセチル、スクシニル、およびメトキシスクシニルなど）；芳香族ウレタン保護基（ベンジルオキシカルボニルなど）；および脂肪族ウレタン保護基、例えば、*tert*-ブトキシカルボニルまたはアダマンチルオキシカルボニルが含まれる。好適な保護基については、Gross and Mienhofer, eds., *The Peptides*, vol. 3, pp. 3-88 (Academic Press, New York, 1981)参照。

20

## 【0094】

本明細書において、末端カルボキシ基に関して「保護基」とは、末端カルボキシル基が様々なカルボキシル末端保護基の任意のものと結合されている、ペプチドの末端カルボキシル基を指す。かかる保護基には、例えば、*tert*-ブチル、ベンジルまたはエステルまたはエーテル結合によって末端カルボキシル基と結合される他の許容される基が含まれる。

30

## 【0095】

本明細書において、「精製（された）」および同様の用語は、自然環境において分子または化合物と通常関係している他の成分に対してその分子または化合物を濃縮することに関連している。「精製（された）」は、処理中に特定分子の完全な純度が得られたことを必ずしも示さない。「高度に精製された」化合物とは、本明細書において、純度が90%を超える化合物を指す。

## 【0096】

「サンプル」とは、本明細書において、好ましくは、被験体からの生体サンプルを指し、これには、限定されるものではないが、正常組織サンプル、病変組織サンプル、生検材料、血液、唾液、糞便、精液、涙、および尿が含まれる。また、サンプルは、目的の細胞、組織、または体液を含む被験体から得られた任意の他の材料源でもあり得る。サンプルは、細胞または組織培養からも得ることができる。

40

## 【0097】

本明細書において、「二次抗体」とは、別の抗体（一次抗体）の定常領域と結合する抗体を指す。

## 【0098】

本明細書において、化合物と結合を形成する基体に関して用いられる際の「固相支持体」とは、様々な化合物と結合（好ましくは、共有結合）を形成することが可能である溶媒不溶性基体に関連している。この支持体は、生物学的な性質のもの（限定されるものではないが、細胞もしくはバクテリオファージ粒子など）、または合成品（限定されるものではないが、アクリルアミド誘導体、アガロース、セルロース、ナイロン、シリカ、または

50

磁化粒子など)のいずれかであり得る。

【0099】

「組織培養環境において細胞を維持するのに適した固相支持体」とは、細胞を含む培地を加え、その支持体を、細胞を維持または増殖させるために組織培養インキュベーターなどの好適な環境に入れることができる、組織培養ディッシュまたはプレート、あるいはカバーなどの任意の表面を意味する。当然、これは滅菌済みかまたは滅菌可能である固相支持体でなければならない。この支持体は細胞付着に適したものである必要はない。

【0100】

「固相支持体」とは、細胞培養用の低付着性、超低付着性、または非付着性支持体であり、表面に付着する哺乳類細胞の能力を高めるために処理または調製されていない細菌プレートまたは組織培養ディッシュもしくはプレートなどの手段を指す。これには、例えば、細胞が付着するのを防ぐために寒天層が加えられたディッシュも含まれることがある。細菌プレートは一般に寒天を用いて使用されることから、細菌プレートは哺乳類細胞の付着を高めるために処理されず、その細菌プレートでは、細菌が寒天中に懸濁され、その寒天中で増殖することは当業者に公知である。

10

【0101】

「発生させる」とは、本明細書において、とりわけ、集密状態まで増殖する能力を有する付着細胞(すなわち、後代)を生じる、本明細書に開示される細胞の多細胞性スフェア(SOMB)の能力を指す。

20

【0102】

「標準」とは、本明細書において、比較のために用いられるものを指す。例えば、標準は、対照サンプルに投与または添加され、試験サンプル中の化合物を測定する際に結果を比較するために用いられる既知標準薬剤または化合物であり得る。標準はまた、「内部標準」例えばサンプルに既知量で添加され、目的のマーカーが測定される前にサンプルを処理するまたは精製もしくは抽出法に供する際に精製または回収率のようなことを決定するのに有用である薬剤または化合物も指すことがある。

20

【0103】

「刺激する」とは、本明細書において、対照値と比べて高いように活性または機能レベルを誘導または増大させることを意味する。この刺激は直接または間接的機構によるものであってよい。一態様では、前記活性または分化は、対照値と比べて少なくとも10%、より好ましくは、少なくとも25%、さらに好ましくは、少なくとも50%刺激される。「刺激因子」とは、本明細書において、適用することによって、限定されるものではないが、ASC細胞の產生、分化、および活性、ならびにASC後代のものを含む目的のプロセスまたは機能の刺激をもたらす任意の化合物または薬剤を指す。

30

【0104】

解析、診断、または処置についての「被験体」は動物である。かかる動物には、哺乳類、好ましくは、ヒトが含まれる。

【0105】

「実質的に純粋な」は、自然に伴って起こる成分から分離されている化合物、例えば、タンパク質またはポリペプチドを説明する。一般に、化合物は、サンプル中の材料全体の(容量で、湿潤または乾燥重量で、またはモル百分率もしくはモル分率で)少なくとも10%、より好ましくは、少なくとも20%、より好ましくは、少なくとも50%、より好ましくは、少なくとも60%、より好ましくは、少なくとも75%、より好ましくは、少なくとも90%、最も好ましくは、少なくとも99%が目的の化合物である場合に実質的に純粋である。純度は、任意の適当な方法によって、例えば、ポリペプチドの場合にはカラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、またはHPLC解析によって測定することができる。化合物、例えば、タンパク質は、そのタンパク質が自然に関係している成分を本質的に含まない場合またはそのタンパク質がその自然状態においてそのタンパク質に伴って起こる自然混入物質から分離されている場合にも実質的に精製されている。

40

【0106】

50

フレーズ「少なくとも 1 種の自己組織化芽体の置換分ではない他の細胞」において使用される「置換分」とは、芽体の置換可能な細胞を指す。よって、自己組織化芽体の置換分ではない細胞は、芽体に隣接する細胞であり得、自己組織化芽体から誘導される細胞である必要はない。

【0107】

「治療的」処置は、病変の兆候を示す被験体に、それらの兆候を減少または除去する目的で施与される処置である。

【0108】

化合物の「治療上有効な量」とは、化合物が投与される被験体に有益な効果をもたらすのに十分な化合物の量である。

10

【0109】

フレーズ「組織培養ディッシュまたはプレート」の使用は、増殖または分化のために細胞をプレーティングするのに使用することができる任意の種類の器を指す。

【0110】

本明細書において、「処置すること」には、特定の障害もしくは状態の予防、または特定の障害もしくは状態に伴う症状の緩和および／または前記症状の予防もしくは除去が含まれる。「予防的」処置は、疾患の兆候を示していないかまたはその疾患の初期兆候しか示していない被験体に、その疾患に関連する病変を発症する危険性を減少させる目的で施与される処置である。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0111】

実施形態

本発明は、脂肪幹／間質細胞を増殖させ、本明細書に記載の細胞クラスターを形成するための方法および組成物を提供する。一実施形態では、無血清培養培地を提供する。一態様では、前記培地は A R 8 である。もう 1 つの実施形態では、本発明は、脂肪組織細胞の増殖を促進または刺激するための培養培地および技術を提供する。一態様では、かかる細胞の濃縮方法は、前駆体細胞の分化を誘導する方法を含む。

【0112】

本発明は、脂肪幹／間質細胞およびそれらの誘導体の集団を同定および特性評価するための方法を提供する。一態様では、本発明は、本発明の細胞に向けられた抗体を提供する。

30

【0113】

成体ヒト皮下脂肪組織は、患者に対する危険性または不快感を最小限に抑えて日常的に採取することができる間質／幹細胞源である。証拠から脂肪由来間質細胞は複数の系統経路に沿って分化可能であることが示されている。脂肪組織は、多くの個体で容易に入手可能で、豊富にある。肥満症は米国において拡大している状態であり、成人の 50 % を超える人が身長および体重に基づいた推奨 B M I を上回っている。

【0114】

U S 2 0 0 2 / 0 0 7 6 4 0 0 および W O 0 0 / 5 3 7 9 5 では、ヒト脂肪組織からの多能性細胞集団の產生について記載されている。前記細胞集団は、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、および筋細胞へと分化させることができる。これらの公開では、in vitro で培養下、それらの多能性を損なわずに少なくとも 15 回の細胞の移し替えの間維持することができる一部の細胞を示している。

40

【0115】

米国特許第 6,800,480 号では、無フィーダー細胞培養系中で靈長類由来始原幹細胞を増殖させるための方法および材料について記載されている。

【0116】

脂肪細胞が補充可能な細胞集団であることは十分に裏付けられている。脂肪吸引術または他の手法による外科切除後でも、個体において経時的に脂肪細胞の再現が通常見られる。このことは、脂肪組織が自己再生可能である間質幹細胞を含むことを示唆している。

50

## 【0117】

脂肪組織には組織工学用途において多くの実用上の利点がある。第1に、脂肪組織は豊富にある。第2に、患者に対する危険性最小限に抑えた採取方法が利用可能である。第3に、脂肪組織は補充可能である。間質細胞は骨髄の有核細胞集団の0.01%未満であるが、脂肪組織1g当たり最大 $8.6 \times 10^4$ の間質細胞が存在する(Sen et al., 2001, *Journal of Cellular Biochemistry* 81:312-319)。2~4週間にわたるex vivoでの増殖により0.5kgの脂肪組織から最大5億の間質細胞が得られる。これらの細胞はすぐに使用することができ、または今後の自己または同種適用のために低温保存することもできる。

## 【0118】

脂肪由来間質細胞はまた、数多くの付着および表面タンパク質も発現する。これらには、限定されるものではないが、細胞表面マーカー例えはCD9; CD29(インテグリン1); CD44(ヒアルロン酸受容体); CD49d, e(インテグリン4, 5); CD54(ICAM1); CD55(崩壊促進因子); CD105(エンドグリン); CD106(VCAM-1); CD166(ALCAM)およびHLA-ABC(クラスI組織適合性抗原); ならびにサイトカイン例えはインターロイキン6, 7, 8, 11; マクロファージ-コロニー刺激因子; GM-コロニー刺激因子; 顆粒球-コロニー刺激因子; 白血病抑制因子; 幹細胞因子および骨形成タンパク質が含まれる。これらのタンパク質の多くは造血支持機能を果たす可能性を有し、それらの大部分は一般に骨髄間質細胞に共有される。

## 【0119】

本発明の方法において有用な脂肪組織由来幹/間質細胞は、the University of Pittsburgh et alのWO 00/53795に記載されているような当業者に公知の種々の方法によって単離される。好ましい方法では、脂肪組織は哺乳類被験体、好ましくは、ヒト被験体から単離される。一態様では、脂肪組織源は大網脂肪である。もう1つの態様では、脂肪組織源は皮下脂肪である。ヒトでは、前記脂肪は一般に脂肪吸引術により単離される。本発明の細胞がヒト被験体に移植される場合には、前記脂肪組織は、自己移植植物を提供するために同じ被験体から単離されることが好ましい。あるいは、前記移植細胞は同種である。

## 【0120】

単離、培養、分化誘導を助けるために、そして本発明の細胞を特徴付けるために使用することができる多くの技術が当業者に公知である(Gorio et al., 2004, *Neuroscience*, 125: 179-189; Yamashita et al., 2005, *J. Cell Sci.*, 118:665-672; Conley et al., 2004, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36:555-567; Kindler, 2005, *Journal of Leukocyte Biology*, 78:836-844; Fuchs et al., 2004, *Cell*, 116:769-778; Campos, 2004, *Journal of Neuroscience Research*, 78:761-769; Dontu et al., 2005, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 10:75-86)。

## 【0121】

一態様では、本発明は、様々な大きさのSOM-Bを形成するために必要な細胞の最適な数を決定するための方法を提供する。一態様では、前記SOM-Bは「有効な」SOM-Bと考えられ、この場合、有効などとは、増殖、分極、分化能力などの所望の特徴を表示する能力があることを意味する。本発明はまた、SOM-Bにおいて細胞増殖が起こっている位置、産生されているマトリックスの種類、該マトリックスが産生されている位置、産生されているマトリックスの量を決定するための方法も提供する。前記特性を決定するための方法、ならびにかかる特徴を細胞増殖率などとして測定するための方法は当技術分野で公知である。

## 【0122】

SOM-Bが付着細胞を発生させ得る頻度およびその発生した細胞の特徴、例えば増殖率、集密状態に達する能力、発生可塑性などを決定するために使用することができる方法もまた当技術分野で公知である。また、SOM-B融合の頻度を決定するために、そして

10

20

30

40

50

結果として得られた大きさ、形状、極性など測定するために使用することができる方法も入手可能である。また、SOM-Bが多能性または可塑性であるかどうか、すなわち、SOM-Bが2種以上の細胞型へと分化する能力を有するかどうかを検証する方法も当技術分野で公知である。かかる研究は、懸濁細胞、付着細胞、または発生細胞を使用して行うことができる。研究することができる細胞表現型としては、限定されるものではないが、脂肪細胞、骨、軟骨、骨格筋、心筋、神経系細胞例えはニューロン、膵島細胞、および内皮細胞が挙げられる。

## 【0123】

SOM-Bを特性評価するための方法および試薬、例えは免疫特性評価を行うための方法および試薬も入手可能であり、それらには、限定されるものではないが、マーカーおよびタンパク質：Oct 4、SSEA 3、SSEA 4、CD34、CD133、CD184、NG2、ABC-G2、ネスチン、MyoD、NKX2.5、ラミニン、1インテグリン、Cbfa1、コラーゲン型II、MAPK、HLA-1対照、インスリン、Gata、Pax、Wht、および他の転写因子およびタンパク質が含まれる。フローサイトメトリーマーカーとしては、CD34、NG2、ABC-G2、CXCR4、CD271、CD140b、CD105、ALDHおよびHLA-1が挙げられる。

10

## 【0124】

本発明はまた、in vivoでSOM-Bを使用するための方法も提供し、in vivoでSOM-Bを使用するための様々な技術は当業者に公知である。例えは、SOM-Bは、様々な経路によって（局所的に、皮下に、筋肉内、および直接投与を含む）被験体に投与することができる。本発明のSOM-Bには種々の用途があり、そのような用途には、限定されるものではないが、血管リモデリング、骨増殖および再生、組織/細胞の代替使用（例えは膵臓/膵島、中枢神経系、皮膚修復および創傷治癒部分、末梢神経系、創傷、腱、靭帯、筋肉、器官例えは肝臓および腎臓、ならびにリンパ節）、ならびに移植手法が含まれる。

20

## 【0125】

SOM-Bは、限定されるものではないが：

1) 細胞-細胞相互作用、細胞-マトリックス相互作用、形態形成/形状形成、アポトーシス/アノイキス、間葉-上皮、間葉-間質、および間葉-内胚葉相互作用/クロストーク、悪性形質転換、脱分化、分化形質転換、非対称細胞分裂の研究のための、基礎科学調査；

30

2) 幹細胞アッセイ、薬物の純度および有効性、毒物学、医薬の効力の予測に用いる、診断学/アッセイ；

3) 損傷、傷害、破壊または老化組織/器官に対する、細胞に基づく治療学および再生戦略、例えは単一細胞型（ASCなど）からなるSOM-Bの投与/使用、複数の細胞型/組合せからなるSOM-B、すなわち「ハイブリッドSOM-B」、例えは、ASCと膵島細胞、もしくはASCと骨芽細胞、ASCとHSC、もしくはケラチノサイトなどの外胚葉細胞を含むASCの投与/使用、SOM-Bと他の細胞型、例えは単一細胞型、の解離細胞懸濁液の組合せ、または付着細胞から得られるおよび/もしくは懸濁状態のSOM-Bから得られる1種以上の細胞型もしくは解離細胞の組合せ、ならびに次の成分（限定されるものではないが、マトリックス因子、細胞外マトリックス分子、増殖因子、ホルモン、および生物活性因子を含む）の1種以上と組み合わせて使用される任意および/または全数の前記細胞順列の投与/使用；ならびに

40

4) SOM-B/細胞懸濁液とは対照的に、極性、位置、表現型、遺伝子変化などに基づいて巧みに処理することができ、または生物活性因子を含むもしくは含まないマトリックス/高分子などのスキャフォールドを用いて/上に播種することができる、投与/移植前に「事前に作製された」前記のSOM-Bと細胞の組合せから巧みに処理された2Dまたは3D構築物（すなわち、細胞懸濁液、SOM-Bおよび/またはスキャフォールドの構築物）を調製、研究および使用するための組織工学戦略を含む様々な臨床および調査分野に新規影響および有用性をもたらす。「ハイブリッドSOM-B」および「キメラ-SOM-B」は本明細書において同義的に使用される。

50

## 【0126】

また、SOM-Bと本明細書に記載の組成物および方法は、細胞を含むもしくは含まない、処理および/または精製したSOM-B由来細胞外マトリックスを利用する再生治療にも利用される。

## 【0127】

SOM-B培養物から得られる馴化培地は診断目的に有用である。この馴化培地は再生治療にも有用である。

## 【0128】

本明細書に記載のデータは、ASC芽体はそれらの自然微小ニッチにおいて単層培養よりも現実的にASCを形に表すことを示唆し、ASC芽体が単一細胞懸濁液よりよく組織修復を変調し得ることもさらに示唆している。より伝統的な単一細胞懸濁液と比較すると、3-Dニッチ(芽体)として事前に作製されたASCを投与することによっていくつかの実質的または潜在的利点がもたらされ得、それらの利点には以下が含まれる：

・本細胞は安定した細胞-細胞接触および細胞-マトリックス接触を受けるため、アノイキスの傾向が低い。アノイキスは細胞-マトリックス相互作用の喪失によって、または不適当な細胞-マトリックス相互作用によって誘導されるプログラム細胞死として定義される。(Valentijn et al., 2004; Michel, 2003)。アノイキスは様々な細胞送達方法に関する送達および移植の低効率に重要な役割を果たし得る。細胞間相互作用は幹細胞の様々な系統(心筋細胞など)への分化に重要であることが証明されている、例えば(Li et al., 2006)；

・本細胞はそれら自身の細胞外マトリックス環境と(推定上)関連した増殖因子を生み出した(Wang et al., 2004)；

・「数の上の強み」：本細胞は生存し、単層培養では単一細胞を死に至らしめる厳しいin vitro条件(無血清培養など)に耐えることができる；

・本細胞は(培養下で)拡散によって3-D構造として生存することができ、推定上、創傷/外傷環境への移植後にも同じことができると思われる；さらに

・本細胞は様々な外部刺激に応答して増殖、移動および/または変形する能力を保持し、それらの細胞が傷害組織環境内で動的に相互作用する可能性があることを示唆している。

## 【0129】

抗体は、当技術分野で周知である方法を使用して作製し得る。例えば、米国特許出願第07/481,491号(これは引用することによりそのまま本明細書の一部とされる)では、特定タンパク質に対する抗体の作製方法を開示している。抗体の產生のために、様々な宿主動物(限定されるものではないが、ウサギ、マウス、およびラットを含む)を、特定ポリペプチドまたはそのペプチド断片を注射することによって免疫することができる。免疫応答を高めるために、宿主種に応じて様々なアジュバントを使用してよく、そのようなアジュバントには、限定されるものではないが、フロイントのもの(完全および不完全)、水酸化アルミニウムなどの無機ゲル、リゾレシチン、pluronicポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノールなどの界面活性物質、およびBCG(カルメット・グラン菌(bacille Calmette-Guerin)および(corynebacterium parvum)などの潜在的に有用なヒトアジュバントが含まれる。

## 【0130】

モノクローナル抗体の調製のために、培養下での連続細胞系統による抗体分子の產生をもたらす任意の技術を用いてよい。例えば、Kohler and Milsteinによって最初に開発されたハイブリドーマ技術(1975, *Nature* 256:495-497)、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72)、およびEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)を使用して、ヒトモノクローナル抗体を產生させ得る。もう1つの実施形態では、モノクローナル抗体は、国際出願番号PCT/US90/025

10

20

30

40

50

45(これは引用することによりそのまま本明細書の一部とされる)に記載されている技術を利用して無菌動物において產生される。

【0131】

本発明によれば、ヒト抗体を使用し、ヒトハイブリドーマを利用することによって(Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030)またはin vitroでヒトB細胞をEBVウイルスで形質転換することによって(Cole et al., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)得てよい。さらに、SLL Pポリペプチドのエピトープに特異的なマウス抗体分子由来の遺伝子を、適当な生物活性のヒト抗体分子由来の遺伝子とともにスプライシングすることによる「キメラ抗体」の產生について開発された技術(Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454)も使用することができる;かかる抗体は本発明の範囲内である。一度、特異的モノクローナル抗体が開発されたら、従来の技術による突然変異体およびそれらの異型の調製も利用できる。

【0132】

一実施形態では、単鎖抗体の產生について記載されている技術(米国特許第4,946,778号、引用することによりそのまま本明細書の一部とされる)は、タンパク質特異的単鎖抗体を產生するように構成される。もう1つの実施形態では、Fab発現ライブラリーの構築について記載されている技術(Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281)は、特異的抗原、タンパク質、誘導体、または類似体に対して所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの迅速かつ簡易な同定を可能にするために利用される。

【0133】

イディオタイプの抗体分子を含む抗体フラグメントは、公知技術によって作製することができる。例えば、かかるフラグメントには、限定されるものではないが、抗体分子のペプシン消化によってもたらされ得るF(ab')<sub>2</sub>フラグメント; F(ab')<sub>2</sub>フラグメントのジスルフィド結合を還元することによって生成され得るFab'フラグメント;抗体分子をパパインと還元剤で処理することによって生成され得るFabフラグメント;およびFvフラグメント;が含まれる。

【0134】

ポリクローナル抗体の作製は、所望の動物に抗原を接種し、そこからその抗原と特異的に結合する抗体を単離することにより行われる。

【0135】

タンパク質またはペプチドの全長ペプチドまたはペプチド断片に対して向けられたモノクローナル抗体は、任意の周知モノクローナル抗体調製手法(例えば、Harlow et al. (1988, In: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY)およびTuszynski et al. (1988, Blood, 72:109-115)に記載のものなど)を用いて調製し得る。多量の所望のペプチドは化学合成技術を用いても合成し得る。あるいは、所望のペプチドをコードするDNAをクローニングし、多量のペプチドの作製に適した細胞において適当なプロモーター配列から発現させてもよい。ペプチドに対して向けられたモノクローナル抗体は、本明細書において参照される標準的な手法を用いてペプチドで免疫したマウスから生成される。

【0136】

本明細書に記載の手法を用いて得られるモノクローナル抗体をコードする核酸は、当技術分野で入手可能である、例えば、Wright et al. (1992, Critical Rev. in Immunol. 12(3,4): 125-168)およびそこで引用されている参考文献に記載されている技術を用いてクローニングし、配列決定し得る。さらに、本発明の抗体は、Wright et al., (前掲)およびそこで引用されている参考文献、ならびにGu et al. (1997, Thrombosis and Hemostasis 77(4):755-759)に記載されている技術を用いて「ヒト化」し得る。

【0137】

ファージ抗体ライブラリーを作成するために、まず、ファージ表面で発現させる所望の

10

20

30

40

50

タンパク質、例えば、所望の抗体を発現する細胞、例えば、ハイブリドーマから単離されるmRNAからcDNAライブラリーを得る。前記mRNAのcDNAコピーは逆転写酵素を用いて作出される。免疫グロブリンフラグメントを特定するcDNAはPCRによって得られ、結果として得られたDNAを、免疫グロブリン遺伝子を特定するDNAを含むバクテリオファージDNAライブラリーを作成するのに適したバクテリオファージベクターにクローニングする。異種DNAを含むバクテリオファージライブラリーを作製するための手法は当技術分野で周知であり、例えば、Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY)に記載されている。

#### 【0138】

所望の抗体をコードするバクテリオファージは、そのタンパク質がその対応する結合タンパク質、例えば、その抗体が向けられる抗原との結合に利用できる方法でそのタンパク質がその表面に提示されるように巧みに処理し得る。このようにして、特異的抗体を発現するバクテリオファージを、その対応抗原を発現する細胞の存在下でインキュベートする場合には、そのバクテリオファージは前記細胞と結合する。前記抗体を発現しないバクテリオファージは前記細胞と結合しない。かかるパニング技術は当技術分野で周知であり、Wright et al., (前掲)に記載されている。

#### 【0139】

前記のような方法は、M13バクテリオファージディスプレイを用いたヒト抗体の產生に関して開発されている(Burton et al., 1994, Adv. Immunol. 57:191 -280)。本質的に、cDNAライブラリーは、抗体産生細胞の集団から得られるmRNAから作成される。このmRNAは再配列された免疫グロブリン遺伝子をコードするため、そのcDNAもそれをコードする。増幅されたcDNAを、表面でヒトFabフラグメントを発現するファージのライブラリーを生み出すM13発現ベクターにクローニングする。目的の抗体を提示するファージを抗原結合によって選択し、細菌で増殖させて、可溶性ヒトFab免疫グロブリンを作出する。このように、この手法は、従来のモノクローナル抗体合成とは異なり、ヒト免疫グロブリンを発現する細胞よりもむしろヒト免疫グロブリンをコードするDNAを不死化する。

#### 【0140】

ここで示した手法では、抗体分子のFab部分をコードするファージの作製を記載している。しかしながら、本発明を、Fab抗体をコードするファージの作製のみに限定するものと解釈してはならない。それどころか、単鎖抗体をコードするファージ(scfv/ファージ抗体ライブラリー)も本発明に含まれる。Fab分子は、完全Ig軽鎖を含む、すなわち、それらは軽鎖の可変領域および定常領域の両方を含む、が、重鎖については可変領域単独と第1定常領域ドメイン(CH1)を含む。単鎖抗体分子は、Ig Fvフラグメントを含むタンパク質の単鎖を含む。Ig Fvフラグメントは、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域しか含まず、そこには定常領域は存在しない。scfv DNAを含むファージライブラリーは、Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581-597に記載されている手法に従って作製し得る。所望の抗体の単離のためにそのように作製されたファージのパニングは、Fab DNAを含むファージライブラリーについて記載されている方法と同様に実施される。

#### 【0141】

本発明はまた、重鎖および軽鎖可変領域が考えられる特異性のほぼ全てを含むようにその重鎖および軽鎖可変領域を合成し得る合成ファージディスプレイライブラリーも含むものと解釈すべきである(Barbas, 1995, Nature Medicine 1 :837-839; de Kruif et al. 1995, J. Mol. Biol. 248:97-105)。

#### 【0142】

抗体の產生では、所望の抗体についてのスクリーニングは、当技術分野で公知の技術、例えば、ELISA(酵素結合免疫吸着測定法)によって行うことができる。本発明に従って作製される抗体には、限定されるものではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ(すなわち、「ヒト化」)抗体、および単鎖(組換え)抗体、Fabフ

10

20

30

40

50

ラグメント、ならびに Fab 発現ライブラリーによって作製されるフラグメントが含まれ得る。

【 0 1 4 3 】

本発明のペプチドは、標準的な、十分に確立された技術、例えば Stewart et al. によって Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Edition, 1984, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois に記載されており；さらに Bodanszky and Bodanszky によって The Practice of Peptide Synthesis, 1984, Springer-Verlag, New York に記載されている固相ペプチド合成 (S P P S) によって容易に調製し得る。最初に、適切に保護されたアミノ酸残基をそのカルボキシル基を通じて、誘導体化された不溶性高分子支持体、例えば架橋ポリスチレンまたはポリアミド樹脂に結合する。「適切に保護された」とは、アミノ酸の -アミノ基と、任意の側鎖官能基の両方に保護基が存在することを指す。側鎖保護基は、一般に、合成を通じて使用される溶媒、試薬および反応条件に対して安定しており、最終ペプチド産物に影響を及ぼさない条件下で除去可能である。オリゴペプチドの段階的合成は、最初のアミノ酸から N-保護基を除去し、それと所望のペプチドの配列における次のアミノ酸のカルボキシル末端をカップリングさせることによって行われる。このアミノ酸も適切に保護される。受入アミノ酸のカルボキシルは、反応性基を形成すること例えばカルボジイミド、対称酸無水物またはヒドロキシベンゾトリアゾールまたはペンタフルオロフェニルエステルなどの「活性エステル」基を形成することによって活性化して、支持体に結合したアミノ酸の N 末端と反応させることができる。

【 0 1 4 4 】

固相ペプチド合成方法の例としては、-アミノ保護基として tert - ブチルオキシカルボニルを利用した BOC 法、およびアミノ酸残基の -アミノを保護するために 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニルを利用する FMOC 法が挙げられ、これらの両方法は当業者に周知である。

【 0 1 4 5 】

N - および / または C - 封鎖基の組込みも固相ペプチド合成方法に慣用のプロトコールを用いて行うことができる。C 末端封鎖基の組込みのために、例えば、所望のペプチドの合成は、一般に、固相として、支持樹脂から切断することによって所望の C 末端封鎖基を有するペプチドが得られるように化学修飾された支持樹脂を使用して行われる。C 末端に第 1 級アミノ封鎖基を有するペプチドを提供するためには、例えば、ペプチド合成が完了した際にフッ化水素酸で処理することによって所望の C 末端アミド化ペプチドを放出するように、p - メチルベンズヒドリルアミン (M B H A) 樹脂を使用して合成は行われる。同様に、C 末端での N - メチルアミン封鎖基の組込みは、HF 処理によって N - メチルアミド化 C 末端を有するペプチドを放出する N - メチルアミノエチル誘導体化 DVB 樹脂を使用して行われる。エステル化による C 末端の封鎖も従来の手法を用いて行うことができる。これには、樹脂から側鎖ペプチドを放出させる樹脂 / 封鎖基組合せの使用を必要とし、後に所望のアルコールと反応させて、エステル官能基を形成する。この目的には、FMOC 保護基をメトキシアルコキシベンジルアルコールまたは等価リンカーで誘導体化した DVB 樹脂と組み合わせて使用することができ、支持体からの切断はジクロロメタン中 TFA によって行われる。次に、適切に活性化されたカルボキシル官能基の、例えば DCC によるエステル化は、所望のアルコールを添加し、続いてエステル化されたペプチド産物の脱保護および単離を行うことによって進めることができる。

【 0 1 4 6 】

N 末端封鎖基の組込みは、合成されたペプチドが樹脂とまだ結合しているうちに、例えば、好適な無水物およびニトリルで処理することによって行うことができる。N 末端にアセチル封鎖基を組み込むためには、例えば、樹脂結合ペプチドをアセトニトリル中 20 % 無水酢酸で処理することができる。次に、その樹脂から N 封鎖ペプチド産物を切断し、脱保護し、続いて単離することができる。

【 0 1 4 7 】

化学的合成技術または生物学的合成技術のいずれかから得られるペプチドが所望のペプ

10

20

30

40

50

チドであることを確実にするように、ペプチド組成の分析を行うべきである。かかるアミノ酸組成分析は、ペプチドの分子量を決定する高分解能質量分析を用いて行ってよい。別法として、または加えて、酸性水溶液中でペプチドを加水分解し、HPLC、またはアミノ酸分析計を使用して混合物の成分を分離し、同定し、定量することによって、ペプチドのアミノ酸含量を確認することができる。ペプチドを順次分解し、順にアミノ酸を同定するタンパク質シーケンスエネーターを使用して、ペプチドの配列を正確に決定してもよい。

【0148】

ペプチドは、その使用前に精製して、混入物質を除去する。これに関して、ペプチドは、適切な監督官庁によって設定された基準に合うように精製されることは分かるであろう。例えば、アルキル化シリカカラム例えばC4-、C8-またはC18-シリカを用いる逆相高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)を含む、数多くの従来の精製手法のうちの任意の1つの手法を用いて、必要な水準の純度を得てよい。一般には、漸増有機含有量の勾配移動相、例えば、少量のトリフルオロ酢酸を通常含む水性バッファー中アセトニトリルを使用して、精製を行う。また、イオン交換クロマトグラフィーを用いて、ペプチドを電荷に基づいて分離することもできる。

10

【0149】

当然、ペプチドまたは抗体、誘導体、もしくはそれらの断片は、活性に影響を及ぼすことなく修飾されるアミノ酸残基を組み込み得ることは分かるであろう。例えば、封鎖基、すなわち、「望ましくない分解」からN-およびC-末端を保護しつゝまたは安定させるのに適した化学置換基を含むように末端を誘導体化し得、「望ましくない分解」は化合物の機能に影響を及ぼす可能性があるその末端での化合物の任意のタイプの酵素的、化学的または生化学的分解、すなわち、その末端での化合物の逐次分解を包含することを意味する。

20

【0150】

封鎖基には、ペプチドの*in vivo*活性に悪影響を及ぼさない、ペプチド化学の分野で通常使用される保護基が含まれる。例えば、好適なN末端封鎖基はN末端のアルキル化またはアシル化によって導入することができる。好適なN末端封鎖基の例としては、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>分枝または非分枝アルキル基、ホルミル基およびアセチル基などのアシル基、ならびにアセトアミドメチル(Acm)基などのそれらの置換形が挙げられる。アミノ酸のデスマニノ類似体も有用なN末端封鎖基であり、ペプチドのN末端とカップリングするか、またはN末端残基の代わりに使用することができる。C末端のカルボキシル基が組み込まれるまたは組み込まれない好適なC末端封鎖基としては、エステル、ケトンまたはアミドが挙げられる。C末端封鎖基の例は、エステルまたはケトン形成アルキル基、特に低級アルキル基例えばメチル、エチルおよびプロピル、ならびにアミド形成アミノ基例え第一級アミン(-NH<sub>2</sub>)、およびモノ-およびジ-アルキルアミノ基例えメチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、メチルエチルアミノなどである。アグマチンなどのデスカルボキシル化アミノ酸類似体も有用なC末端封鎖基であり、ペプチドのC末端残基とカップリングするか、またはその代わりに使用することができる。さらに、ペプチドから末端の遊離アミノおよびカルボキシル基を完全に除去して、ペプチド活性に影響を及ぼさずにそれらのデスマニノおよびデスカルボキシル化形態を得ることができることは分かるであろう。

30

【0151】

他の修飾も活性に悪影響を及ぼさずに組み込むことができ、これらの修飾には、限定されるものではないが、1つ以上の天然L-異性体アミノ酸のD-異性体アミノ酸との置換が含まれる。よって、ペプチドは1つ以上のD-アミノ酸残基を含み得、または全てD型であるアミノ酸を含み得る。本発明に従うRetro-inverso型ペプチド、例えば、全てのアミノ酸がD-アミノ酸型と置換されている逆転ペプチドも考えられる。

40

【0152】

本発明の酸付加塩も機能的等価物として考えられる。よって、ペプチドの水溶性塩を提供するために、無機酸例え塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸など、または有機酸

50

例えば酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸などで処理した本発明のペプチドは本発明での使用に適している。

## 【0153】

本発明はまた、タンパク質の類似体も提供する。類似体は、天然に存在するタンパク質またはペプチドと、保存的アミノ酸配列の違いによってまたは配列に影響を及ぼさない修飾によって、あるいはその両方によって異なり得る。

## 【0154】

10 例えば、タンパク質またはペプチドの一次配列を変更するが、通常はその機能を変更しない保存的アミノ酸変化を加えてよい。これを受け、10以上の保存的アミノ酸変化は、一般に、ペプチドの機能には影響を及ぼさない。保存的アミノ酸置換には、一般に、以下の群内での置換が含まれる：

グリシン、アラニン；  
バリン、イソロイシン、ロイシン；  
アスパラギン酸、グルタミン酸；  
アスパラギン、グルタミン；  
セリン、トレオニン；  
リジン、アルギニン；  
フェニルアラニン、チロシン。

10

20

## 【0155】

修飾（通常は一次配列を変更しない）には、ポリペプチドのin vivo、またはin vitroでの化学誘導体化、例えば、アセチル化、またはカルボキシル化が含まれる。また、グリコシル化の修飾、例えば、その合成およびプロセッシング中にまたはさらなるプロセッシング工程においてポリペプチドのグリコシル化パターンを修飾することによって；例えば、ポリペプチドをグリコシル化に作用する酵素、例えば、哺乳類グリコシル化酵素または脱グリコシル化酵素に曝露することによって、もたらされるものも含まれる。また、リン酸化アミノ酸残基を有する配列、例えば、ホスホチロシン、ホスホセリン、またはホスホトレオニンも含まれる。

30

## 【0156】

また、タンパク質分解に対するそれらの耐性を向上させるようにまたは溶解特性を最適化するようにまたは治療薬としてより適したものにするように、通常の分子生物学的技術を用いて修飾されたポリペプチドまたは抗体フラグメントも含まれる。かかるポリペプチドの類似体には、天然に存在するL-アミノ酸以外の残基を含むもの、例えば、D-アミノ酸または天然には存在しない合成アミノ酸が含まれる。本発明のペプチドは、本明細書に記載のいかなる特定の模範的な方法の産物にも限定されない。

30

## 【0157】

本明細書に記載のとおりに得られる実質的に純粋なタンパク質はタンパク質精製についての公知手法に従うことによって精製し得、その際にはその手法の各段階において精製を監視するために、免疫アッセイ、酵素アッセイまたは他のアッセイを用いる。タンパク質精製方法は当技術分野で周知であり、例えばDeutscher et al. (ed., 1990, Guide to Protein Purification, Harcourt Brace Jovanovich, San Diego)に記載されている。

40

## 【0158】

本発明の方法に有用である医薬組成物は、投与に適した処方物で調製され、パッケージングされ、または販売され得る。

## 【0159】

本発明の医薬組成物は、大量に、一回分の単一単位用量として、または複数回分の単一単位用量として調製され、パッケージングされ、または販売され得る。本明細書において、「単位用量」は、所定量の有効成分を含む医薬組成物（すなわち、細胞、SOM-B、異なる大きさのSOM-Bなど）の独立した量である。本発明の医薬組成物中の有効成分

50

、医薬上許容される担体、および任意の追加成分の相対量は、処置する被験体の特性、大きさ、および状態によって異なり、さらに組成物が投与される経路によっても異なる。本発明の医薬組成物は、有効成分の他に、1種以上の追加の医薬上活性な薬剤をさらに含み得る。

#### 【0160】

本明細書において、医薬組成物の「非経口投与」は、被験体の組織の物理的突破を特徴とする任意の投与経路および組織の突破を通じた医薬組成物の投与を含む。よって、非経口投与には、限定されるものではないが、組成物の注射、外科的切開を通じた組成物の適用、組織に貫通する非外科的創傷を通じた組成物の適用などによる医薬組成物の投与が含まれる。特に、非経口投与は、限定されるものではないが、皮下、腹腔内、および筋肉内注入技術を含むと考えられる。

10

#### 【0161】

非経口投与に適した医薬組成物の処方物は、滅菌水または滅菌等張生理食塩水などの医薬上許容される担体と組み合わせた有効成分を含む。かかる処方物は、ボーラス投与または連続投与に適した形態で調製され、パッケージングされ、または販売され得る。注射処方物は、アンプルまたは防腐剤を含む複数投与用容器などの単位投与形で調製され、パッケージングされ、または販売され得る。非経口投与用処方物としては、限定されるものではないが、懸濁液、溶液、油性または水性ビヒクル中のエマルジョン、ペースト、および埋め込み可能な持続放出性または生分解性処方物が挙げられる。かかる処方物は、限定されるものではないが、懸濁化剤、安定剤、または分散剤を含む1種以上の追加成分をさらに含み得る。非経口投与用処方物の一実施形態では、前記有効成分は、好適なビヒクル（例えば滅菌バイロジエンフリー水）で再構成される乾燥（すなわち粉末または顆粒）形態で提供され、再構成後に再構成された組成物が非経口投与される。

20

#### 【0162】

本発明はまた、本発明の組成物とその組成物の投与または使用を記載する教示材料を含むキットも含む。もう1つの実施形態では、このキットは、本発明の組成物を投与する前にその組成物を溶解または懸濁するのに適した（好ましくは、滅菌）溶媒を含む。

30

#### 【0163】

本明細書において、「教示材料」には、脂肪幹細胞の濃縮および増殖をもたらすためのキット中の本発明の有用性を伝達するために使用することができる刊行物、記録、図表、または任意の他の表現媒体が含まれる。所望により、または代替的に、教示材料には哺乳類の細胞または組織における疾患または障害を緩和する1以上の方法が記載されていることもある。本発明のキットの教示材料は、例えば、本発明の組成物が入っている容器へ添付され得るか、または抗体が入っている容器とともに出荷され得る。あるいは、この教示材料は、レシピエントによって教示材料と化合物が協力的に使用されるという意図で、容器とは別に出荷してもよい。

#### 【実施例】

#### 【0164】

##### 一般的方法

本発明の方法において有用な脂肪組織由来幹／間質細胞は、当業者に公知の種々の方法によって単離することができる。好ましい脂肪組織源は皮下脂肪である。ヒトでは、前記脂肪は一般に脂肪吸引術により単離される。

40

#### 【0165】

ヒト脂肪組織由来成体幹／間質細胞は、患者に対する危険性または不快感を最小限に抑えて日常的に採取することができる細胞源である。ヒト脂肪組織由来成体幹／間質細胞は、ex vivoで増殖させ、独自の系統経路に沿って分化させ、遺伝子操作し、自己移植または同種移植のいずれかとして個体に再導入することができる。

#### 【0166】

ヒト脂肪組織由来細胞の単離、増殖、および分化のための方法は報告されている。例えば、Burris et al 1999, Mol Endocrinol 13:410-7; Erickson et al 2002, Biochem Bio

50

phys Res Commun. Jan. 18, 2002; 290(2):763-9; Gronthos et al 2001, Journal of Cellular Physiology, 189:54-63; Halvorsen et al 2001, Metabolism 50:407-413; Halvorsen et al 2001, Tissue Eng. 7(6):729-41; Harp et al 2001, Biochem Biophys Res Commun 281 :907-912; Saladin et al 1999, Cell Growth & Diff 10:43-48; Sen et al 2001, Journal of Cellular Biochemistry 81:312-319; Zhou et al 1999, Biotechnol. Techniques 13: 513-517参照。脂肪組織由来間質細胞は、ヒト脂肪組織切片からコラゲナーゼ消化および分画遠心によって得られる(Halvorsen et al 2001, Metabolism 50:407-413; Hauner et al 1989, J Clin Invest 84:1663-1670; Rodbell et al 1966, J. Biol. Chem. 241: 130-139)。ヒト脂肪組織由来間質細胞を脂肪細胞、軟骨細胞、および骨芽細胞系統経路に沿って分化させることができることを証明した人もいた(Erickson et al 2002, Biochem. Biophys. Res. Commun. Jan. 18, 2002; 290(2):763-9; Gronthos et al 2001, Journal of Cellular Physiology, 189:54-63; Halvorsen et al 2001, Metabolism 50:407-413; Halvorsen et al, 2001, Tissue Eng. Dec. 7, 2001; (6):729-41; Harp et al 2001, Biochem Biophys Res Commun 281:907-912; Saladin et al 1999, Cell Growth & Diff 10:43-48; Sen et al 2001, Journal of Cellular Biochemistry 81:312-319; Zhou et al 1999, Biotechnol. Techniques 13: 513-517; Zuk et al 2001, Tissue Eng. 7: 211-228)。他の有用な技術も利用可能である。

10

20

30

## 【0167】

上記に示した方法を用いて、脂肪組織および脂肪幹細胞を単離することができる。

## 【0168】

ASCは単層培養条件で独立した細胞「クラスター」または細胞の「結節」を形成することがあるという本発明者らによる観察に基づいて以下に記載する試験を開始した。

## 【0169】

培地の開発

2005年9月8日、および2005年9月12日出願のそれぞれ、米国仮出願第60/715,025号および同第60/716,337号の優先権の利益を主張し、これらの米国仮出願の開示内容は引用することによりそのまま本明細書の一部とされるPCT出願PCT/US06/34915(Katz and Parker; 2006年9月8日出願)に記載のとおり、原型基本培地に用いるためにDMEM/F12を選択した。ASCの増殖率を高めることができた各成分の段階的な添加によって連続濃縮培地を作り出した。表1にこのプロセスと各反復でスクリーニングされた成分の一覧を要約する。

## 【0170】

## 【表2】

表1. 培地処方物

処方物	スクリーニングされた修飾	結果の主成分
AR	N/A	DMEM/F12、L-グルタミン、デキサメタゾン、アスコルビン酸2-リン酸、ITS+3、脂肪酸補給物、非必須アミノ酸、抗生物質-抗真菌薬
AR2	AR+(EGF、PDGF、bFGFまたはグルテンペプトン)	AR+PDGF+EGF
AR3	AR2+(bFGF、FLT-3リガンド、HGF、IGF-1、SCGF- $\beta$ 、SDF-1、VEGF、SCF、ヒドロコルチゾン、エストラジオール、プロゲステロン、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ またはヒト血清)	AR2+0.5%ヒト血清
AR4	AR3+(bFGF、FLT-3リガンド、HGF、IGF-1、SCGF- $\beta$ 、SDF-1、VEGF、SCF、ヒドロコルチゾン、エストラジオール、プロゲステロン、TNF $\alpha$ またはIL-1 $\beta$ )	AR3+SCGF- $\beta$ +TNF $\alpha$
AR5	AR4+(bFGF、FLT-3リガンド、HGF、IGF-1、SDF-1、VEGF、SCF、ヒドロコルチゾン、エストラジオール、プロゲステロン、IL-1 $\beta$ またはTGF- $\beta$ 1)	AR4+エストラジオール+プロゲステロン
AR6	AR5+(bFGF、FLT-3リガンド、HGF、IGF-1、SDF-1、VEGF、SCF、ヒドロコルチゾン、IL-1 $\beta$ またはTGF- $\beta$ 1)	AR5+IL-1 $\beta$ +ヒドロコルチゾン
AR7	AR6+(ペプトンPPA、PPB、WPA、SPA、SPB、YE、UFYE、MER2、MER3、CPN1またはGPN3)；ITS+3の代わりにITSを使用、修飾濃度のAR6	修飾濃度のAR6
AR8	修飾濃度のAR7	表2参照

## 【0171】

後の研究によって検証された最終的なレシピは、5種の増殖因子、4種のホルモン、数種の栄養補給物を補給し、0.5%ヒト血清を自由選択で補給した基本培地 DMEM/F12を含む(表2)。表2では、最初の基本レシピから開始し、その後、修飾を細胞増殖を高めるそれらの能力について個別にスクリーニングした研究を要約する。開始処方と比べて統計的に有意な増殖の増加を示す前記修飾を新たな基本レシピに加えた。これを段階的に繰り返して、リッチな基本培地の開発を導いた。

## 【0172】

本発明の基本培地成分を表2に示し、その表2にはDMEM/F12と表2に記載した成分を含めている。

10

20

30

40

## 【表3】

表2. 本発明の一般培地处方物

AR 8 基本レシピ	AR 9 AR 8 の ITS + 3 の代わりに以下を使用 :
	<u>DMEM / F 1 2 (グルタミンを含む)</u>
0. 1 mM	L-グルタミン
$1 \times 10^{-8} M$	デキサメタゾン
$100 \mu M$	アスコルビン酸 2-リシン酸 (ASAP)
0. 50 %	ITS + 3
0. 05 %	脂肪酸補給物
1 %	NEAA (非必須アミノ酸)
$1 \times 10^{-8} M$	エストラジオール
$1 \times 10^{-8} M$	プログステロン
$500 \text{ng} / \text{ml}$	ヒドロコルチゾン
$10 \text{ng} / \text{ml}$	EGF
$1 \text{ng} / \text{ml}$	PDGF
$1 \text{ng} / \text{ml}$	SCGF- $\beta$
$1 \text{ng} / \text{ml}$	TNF- $\alpha$
$1 \text{ng} / \text{ml}$	IL-1 $\beta$
1 %	抗生物質 抗真菌薬
0. 5 %	ヒト血清 (自由選択)

## 【0173】

簡潔には、基本成分には、DMEM / F 1 2 、抗生物質、栄養物 (アミノ酸、脂肪酸、無機物) 、増殖因子、および / もしくはホルモン、ならびにまたは接着因子 : が含まれる。数種類のアルブミンを試験した。

## 【0174】

表2の培地の調製は、 $500 \text{ml}$  の DMEM / F 1 2 (Gibcoカタログ番号 11320-033 ; Invitrogen Corp) 、 $250 \mu \text{l}$  L-グルタミン (Gibcoカタログ番号 25030-081 , Invitrogen Corp) 、 $5 \text{ml}$  抗生物質 抗真菌薬 (Gibcoカタログ番号 15240-062 , Invitrogen Corp) 、 $2.5 \text{ml}$  ITS + 3 (Sigma I-2771) 、 $250 \mu \text{l}$  脂肪酸補給物 (Sigma F-7050) 、 $5 \text{ml}$  MEM 非必須アミノ酸 (Gibcoカタログ番号 11140-050 , Invitrogen Corp) 、 $50 \mu \text{M}$  ASAP (Sigma A-8960) 、 $1 \text{ng} / \text{ml}$  PDGF-BB (Research Diagnostics Inc. 、 RDI-114b) 、 $10 \text{ng} / \text{ml}$  EGF (R&D Systems 236EG) 、 $1 \text{ng} / \text{ml}$  SCGF- (Research Diagnostics Inc. RDI-1022B) 、 $1 \text{ng} / \text{ml}$  TNF (Research Diagnostics Inc. , RDI-301) 、 $1 \text{ng} / \text{ml}$  IL-1 (Research Diagnostics Inc. , RDI-201B) 、 $1 \times 10^{-8} M$  エストラジオール (Sigma E2758-1G) 、 $1 \times 10^{-8} M$  プロゲステロン (Sigma P8783-5G) 、 $1 \times 10^{-8} M$  デキサメタゾン (Sigma D-8893) 、および  $500 \text{ng} / \text{ml}$  ヒドロコルチゾン (Sigma H0888-1G) : の使用を含む。AR 9 培地調製では AR 8 の ITS + 3 を表2の右欄の成分と置き換える。

## 【0175】

間葉系幹細胞集合体の調製および特性評価

## 方法

自己組織化間葉系芽体 (SOM-B) の形成 :

単層培養による低継代 ASC を、製造業者の使用説明書に従って D i I または D i O (Molecular Probes) で前標識した (存在する場合には血清を除去するために細胞をすすぎ、代表的な染料溶液を含む無血清培地 (1 : 200) 中、37 度 15 分間インキュベー

10

20

30

40

50

トし、続いて過剰の染料を除去するために再度すすいだ)。

【0176】

細胞をトリプシンで処理して、プラスチックから離した。遠心分離を経てペレットを得た。それらの細胞を、所望の希釈に適当な量の培地 (D M E M / F 1 2 + 1 0 % F B S または化学的に定義された低血清または無血清) で希釈した。所望の数の細胞 (5 0 0 ~ 5 0 , 0 0 0) を含む培地の様々な量 (1 5 ~ 3 0  $\mu$  l) をピペットで培養プレートカバー上に移した。一部の試験では、培養プレートカバーを逆さにひっくり返して、「懸滴」を生じさせた。

【0177】

培地が乾燥しないようにプレートを高湿チャンバーに入れた。液滴を標準的な組織培養インキュベーター内で 48 時間維持した。 10

【0178】

結果として生じたスフェア / S O M - B をピペットで超低付着性 (U L A) ウェル / プレート (Corning) に移した。一部の S O M - B を 1 ウェル当たり 1 つの S O M - B で 9 6 ウェルプレートにプレーティングして、個々の S O M - B の変化を経時的に記録した。一部の S O M - B を 1 ウェル当たり複数の S O M - B の群として 1 2 ウェル U L A プレートと 2 4 ウェル U L A プレートにプレーティングした。

【0179】

前記方法の変形は、U L A プレートの底で A S C 含有液滴を形成することである。液滴中で S O M - B が形成した後、プレートを、表面を上にひっくり返し、目的培地を充填して、S O M - B を懸濁状態に置く。この手法では S O M - B を手で取り扱わないようにする。 20

【0180】

前記方法のもう 1 つの変形は、U L A プレート内で培地中高密度で所定数の A S C を懸濁し、続いて、結果として生じた S O M - B をそれらの大きさに基づいて選別することによって S O M - B を形成することである (図 9 参照)。 20

【0181】

形成後、異なる培地を入れたウェルに S O M - B をプレーティングした: 血清を含まない D M E M / F 1 2 ; D M E M / F 1 2 + 1 0 % F B S 、血清を含まない A R 培地バージョン 6 (A R 6) ; 1 % ヒト血清を含む A R 6 ; 血清を含まない A R 培地バージョン 8 (A R 8) ; A R 8 + 0 . 5 % ヒト血清 ; および A R 8 + 1 % ヒト血清。全ての培地に 1 % 抗生物質を含めた。培地は定期的に交換した。一定の間隔をおいて S O M - B を写真撮影して、大きさと分極の変化を追跡した。これらの結果は S O M - B はそれぞれの培地中で最大 3 ヶ月間またはそれ以上の間維持されることを示している。 30

【0182】

一部の試験では、以下のとおりに、S O M - B を H o e c h s t 3 3 3 4 2 染料で標識して、細胞の分布を明らかにした: S O M - B を P B S ですすぎ、4  $\mu$  M 染料溶液中で暗所において 3 7 で 1 5 分間インキュベートした。続いて、S O M - B を P B S ですすぎ、適当な培地に入れた (図 1 4 C 参照)。一部の試験では細胞増殖の指標としてプロモデオキシリジン (B r d U) を使用して、細胞を標識した。 40

【0183】

凍結切片にするため、S O M - B を 1 0 % ホルマリン中で 3 ~ 1 2 時間固定し、続いて、P B S 中 3 0 % スクロース中で 3 ~ 1 2 インキュベーションを行い、その後、冷却イソペンタン中で急速冷凍した。S O M - B を 1 0  $\mu$  m の切片にし、H & E 染色 (図 1 3) 、 O i l R e d O 染色、アリザリンレッド染色、および / または免疫組織化学のために処理した。S O M - B の自然形成について試験するために、A S C を U L A 培養プレート内で 1 0 % F B S を含む D M E M / F 1 2 中または無血清 A R 8 中、浮遊細胞の「超集密」層化を可能にする超高細胞密度で懸濁状態にしておいた。顕微鏡を使用してプレートを定期的に調べて、S O M - B の自然形成を監視し、記録した (図 9)。

【0184】

50

50

50

50

50

## 結果

I. A S C はいくつかの異なるアプローチを用いて制御された様式により確実にかつ再現性のある方法で三次元多細胞性集合体に形成され得る。

### 【0185】

以下に開示する研究は、懸滴法を用いて複数のドナーから単離され、培養された初期継代 A S C の様々な数 (500 ~ 50,000) を使用して成功した A S C スフェロイド (芽体) の形成を示している。芽体は、様々な培地量 (15 ~ 30 マイクロリットル) でならびに種々の培地タイプ (10% F B S を含む D M E M / F 1 2、他の添加物を含まない D M E M / F 1 2、無血清 A S C 培地 (A R 8)、または低血清 A S C 培地 (ヒトまたは胎児ウシいずれかの 0.5 ~ 1% 血清を含む A R 8) を含む) で生じた。スフェロイド形成に 500 または 1000 の A S C を使用した際には、懸滴法により複数の小クラスター / スフェロイドが生じた。これに対し、多数の細胞 (2,000, 5,000 およびそれ以上) を使用した際には、95% 以上の効率で一貫した大きさの大きな单一芽体が生じた。図 1 は、懸滴技術を用いて形成した直後の典型的な S O M - B の初期クラスター化および外観を示している。懸滴方法を用いて、A S C は、一般に、24 - 72 時間以内に組織化して独立したスフェロイドを作り (図 2)、その後、確実に、形態を損傷または喪失することなく懸濁または付着性培養状態に移行させることができた。図 2 は、それらを懸濁培養へ移行させた直後の蛍光標識 (D i I) A S C からなる、均一な大きさの明確な S O M - B 複数の顕微鏡写真を示している。対照的に、図 9 および図 15 では、使用した細胞数と懸滴状態にした時間に応じて作製され得る芽体の大きさの可変範囲を示している。パネル D は Hamilton 社製 20  $\mu$  l マイクロシリングのバレル内での「ミニ - S O M - B」の外観を示しており、それによって、in vivo 送達目標に向けて S O M - B の大きさを制御 / 操作する能力を示していることに注目すべきである。懸滴技術において 5,000 より少ない細胞を使用する際には、1 つの大きな明確なスフェアではなくむしろ様々な大きさの「ミニ - S O M - B」複数が生じる; 予測可能かつ再現可能な大きさの S O M - B を形成するには約 5,000 以上の細胞が必要であると思われる。

### 【0186】

A S C 芽体は、超低付着性プレートを使用して A S C を懸濁状態で超高密度で培養することによっても形成され得る。この方法を用いて、A S C の浮遊層は、前記と同様の種々の培養培地中で 24 ~ 72 時間かけて自己集合する。懸滴技術とは異なり、この方法を用いて生じた芽体は大きさが均一ではなく、1 集合体当たりの A S C の数は限定されない。図 9 では、記載した「高密度浮遊細胞」技術を用いた A S C 芽体の形成を示す 2 つのパネルを示している。

### 【0187】

芽体形成に対する細胞培養 / 細胞継代の影響および濃縮 A S C 亜集団の効果を評価するために、さらなる研究を行った。S O M - B は、新たに単離された、プラスチックに触れたことのない A S C で生じることができることが分かった。これらの S O M - B は、付着性単層培養において 1 または 2 継代間増殖させた細胞から生じたスフェアと類似した形成特性、付着特性、および「発生」特性を示した。

### 【0188】

5  $\times$  10<sup>2</sup>、1  $\times$  10<sup>3</sup>、2  $\times$  10<sup>3</sup> および 5  $\times$  10<sup>3</sup> の F A C S 選別 A S C からの S O M - B 形成について試験するために、さらなる研究を行った。以下のとおりに、細胞外抗原 C D 3 4 および細胞内 A L D H の有無により細胞を亜集団に選別した: A L D H<sup>+</sup> 単独、A L D H<sup>-</sup> 単独、C D 3 4<sup>+</sup> / A L D H<sup>+</sup>、C D 3 4<sup>+</sup> / A L D H<sup>-</sup>、C D 3 4<sup>-</sup> / A L D H<sup>+</sup>、C D 3 4<sup>-</sup> / A L D H<sup>-</sup>。これら全ての群間では S O M - B 形成頻度に差は認められず、C D 3 4 および A L D H の有無では集合および S O M - B 形成能力の高いまたは低い細胞が事前選択されないことを示唆している (表 3)。

### 【0189】

10

20

30

40

## 【表4】

表3. 選別したASCからのSOM-Bの形成。

選別マー カ 細胞数	ALDH <sup>+</sup>	ALDH <sup>-</sup>	CD34 <sup>+</sup> ALDH <sup>+</sup>	CD34 <sup>+</sup> ALDH <sup>-</sup>	CD34 <sup>-</sup> ALDH <sup>+</sup>	CD34 <sup>-</sup> ALDH <sup>-</sup>
5 x 10 <sup>2</sup>	-	+	+	+	+	+
1 x 10 <sup>3</sup>	-	+	+	+	+	+
2 x 10 <sup>3</sup>	-	+	+	+	-	+
5 x 10 <sup>3</sup>	+	-	-	-	+	-

## 【0190】

10

III. ASC芽体は、細胞と可変量の自然発生した細胞外マトリックスからなる。

SOM-Bの細胞性と細胞形状を決定するために、Hoechst染色を用いて、核を標識した。これにより、SOM-B全体にわたる広範囲に及ぶ外見上損傷のない細胞性が明らかになった(図14C参照)。SOM-Bの細胞性と構造をさらに評価するために、一部のSOM-Bを固定し、切片にし、染色した。この研究では、かなり均一な細胞性と豊富な細胞外マトリックスを有する構造が明らかになった。図13、図14および図19に見られように、D MEM/F12-0%血清、D MEM/F12-10%FBS、またはAR+0%血清のいずれかで維持した代表的なSOM-BのH&E染色により、SOM-Bが大きくなるのは、強い細胞増殖および/または細胞外マトリックス産生によるものであることが示唆されている。さらに、SOMBの細胞の最外層は上皮の、すなわち円柱状の外観を有するように見え、これらの細胞の上皮転換の問題を提起する。SOM-B内での細胞増殖の差異は図14Bで可視化された蛍光の差異(すなわち、偏光蛍光)に反映される。

20

## 【0191】

形成されたSOM-Bを最もよく解離する方法を決定するために、いくつかの研究を行った。SOM-Bを、それらの細胞成分を単離する目的で種々の化合物および手法に供した。これらには、トリプシン、コラゲナーゼ、およびSOM-Bの機械的解離/攪拌が含まれた。SOM-Bは、各段に強く持続的な耐性がある機械的解離戦略であることが分かった。酵素化合物(コラゲナーゼ、トリプシンなど)は最良の解離をもたらし、SOM-B内の確立された細胞外マトリックス環境の存在をさらに示した。

30

## 【0192】

III. ASC芽体は付着性培養において長期間維持することができ、付着性培養条件において高度自己再生能力を示す。

通常の組織培養プレート上にプレーティングすると、SOM-Bは、そのSOM-Bから伸びる細胞突起によってプラスチックに「固定された」状態になった(図8参照)。SOM-Bは、明らかに、固定している細胞突起の付着および解離の差異によって、プレートの表面上を複雑なパターンで移動し得る。付着直後、SOM-Bは周辺部に後代細胞を「発生させる」(図10B、図11A、および図11B参照)。細胞はSOM-Bから増殖し、宿主プレート中に集密状態まで存在し続けた(図10C参照)。さらに、付着SOM-Bは、培養物から取り、新しい培養器に移し、または継代することができ、その培養器でそれらが容易に付着し、さらなる後代を発生させることができた。本発明者らは本書の執筆時点においてかかる付着SOM-Bを30回近く継代しており、20代継代以降では後代細胞の発生は減少したが、それらは、集密状態まで増殖し、多系統発生可塑性を維持する単層ASCを生成し続ける(現在まで~15代継代細胞で試験した)。

40

## 【0193】

IV. ASC芽体は懸濁培養において長期間維持することができ、様々な無血清懸濁培養条件で増殖させた際に強い生存能力を示す。

ASC芽体はまた、ULTRA培養製品を使用して懸濁(すなわち、浮遊)培養においてうまく培養することができる。SOM-Bは、顕微鏡像、H&E組織学、および付着性培養に変えた際に新しい細胞を発生させるそれらの能力に基づいて、懸濁培養において少な

50

くとも 3 ヶ月（試験した最長期間）生存することができる。D M E M - 0 % 血清中で 1 ヶ月もの期間増殖させた S O M - B でさえも、顕微鏡での評価、ならびに D i I 蛍光に基づいて、それらのコンパクトな構造を維持した。さらに、かかる S O M - B を通常の組織培養プレート上にプレーティングすると、それらはプラスチックに容易に付着し、細胞を発生させた。つまり、S O M - B が血清または他の添加物を含まない非添加 D M E M / F 1 2 培地中で維持される際でも、細胞は生存することができるということを示す。また、これは、最もミニマリズムな培養条件の場合でも維持および再生可能なニッチ環境を示唆している。興味深いことに、S O M - B は低血清または無血清培地中で自然形成することも観察され（図 2 2 参照）、A S C は、自己を組織化してネットワークを作ることによって、それら自身の生存に必要な因子 / 条件を生み出すことを示唆した。

10

#### 【 0 1 9 4 】

V . 懸濁培養において増殖させた A S C 芽体は様々な環境条件に応じて異なる動的増殖、形態形成、および / または自己組織化についての能力を示す。

細胞増殖、細胞移動および S O M - B の全体形状を可視化するために、一部の試験では、D i I 標識 A S C を用いて S O M - B を形成させた。結果は、化学的に定義された増殖因子補給無血清のまたは低血清培地（A R 8）中で懸濁状態で増殖させた際に S O M - B は劇的に大きくなっていることを示している。さらに、これらの無血清条件（A R 8）下では、S O M - B は主として一方向に増殖し、結果として、細長い卵形状になるように見える。これらの結果は、略球形状の増殖パターンを示す、1 0 % F B S を含む D M E M 中で S O M - B を増殖させる際に見られるものとは異なる（図 3、図 4、図 5 および図 6 参照）。

20

#### 【 0 1 9 5 】

A S C 芽体は、A R 8 培地中で増殖させた際のそれらの大きさの著しい増加に加えて、興味深い分極形状も示し、この分極形状は蛍光 D i I 標識に容易に反映される。図 3、図 4、図 5、図 6 および図 7 に見られるように、蛍光標識した S O M - B が A R 8 培地中で増殖するにつれて、新しく生じた「極」は、「コア」、すなわち、強い蛍光の「極」と比べると蛍光が比較的弱くなる。この増殖差異は極めて顕著であり、さらに場合によっては S O M - B 内での細胞の特定亜集団の非対称細胞分裂および / または能動的複製を反映する。いずれにしても、これらのデータは自己調節幹 / 間質細胞ニッチとしての S O M - B の概念を強く裏付けている。1 0 % F B S 中で増殖させた S O M - B は、より少ない増殖を示すだけではなく、それらは蛍光勾配に反映される著しい増殖差異も示さない（図 4 および図 5）。

30

#### 【 0 1 9 6 】

B r d U パルシングを用いたさらなる試験では、A R 8 培地中で増殖させた芽体内での A S C の方向性増殖がさらに示された。図 1 9 A の光学顕微鏡写真では、無血清 A R 8 培地中で懸濁培養において増殖させた S O M - B ( A S C - M B ) が分極および方向性増殖の兆候を示していることが分かる。同じ A S C - M B の H & E 組織学では、A S C 由来細胞外マトリックスの背景全体に明確な核を示している（1 9 C）。同じ切片（1 9 B）の蛍光顕微鏡写真では、（M B の右側に向かって）増殖中の「頂端」部と比べてより強い細胞およびマトリックス高密度「コア」を示している。図 1 9 D は免疫組織化的に B r d U 染色した同じ A S C - M B の切片（褐色の核）の光学顕微鏡写真である。この A S C - M B は無血清培地中で 8 日間増殖させ、固定および染色の前に B r d U を加えて 2 4 時間パルス処理した。観察された染色パターンは非蛍光極で観察される増殖活性と完全に一致している。大きさおよび組織化を自己調節する A S C 芽体の能力は、融合研究によってされに例示される。いくつかの分極芽体を極めて接近して一緒に培養した際には、それらはすぐに互いに付着した。融合後、最初のうちは極めて大きいが、その新しい S O M - B は、最終的にはそれら自身を A R 8 培地中で増殖させた単一 S O M - B に見られる大きさ（直径最大 5 0 0 ~ 6 0 0  $\mu$ m）にリモデリングし、その大きさは有効拡散距離によって定義されるアスペクト限界比の設定においてアポトーシスを反映していると思われる。さらに、融合した S O M - B は動的再組織化を受け、この動的再組織化は蛍光の強い D i I +

40

50

「コア」の整列および統合から明らかである(図12)。これらのデータは、A S C芽体が様々な環境条件に応じて異なる動的増殖、複製、形態形成、および/または自己組織化についての能力を有するという結論を裏付けている。

【0197】

V I . 付着性培養によるA S C芽体は多系統分化能力を示す。

付着A S C芽体を、付着後すぐにそれらを系統誘導条件に曝すことによって、多系統発生可塑性について試験した。図16~18および図23~26に見られるように、A S C芽体は、繰り返し継代した後でさえも(図17および図18)、そして、種々の異なる培地中でのそれらの初期懸濁培養にもかかわらず(図23~26)、脂肪生成および/または骨形成をすぐに受ける。

10

【0198】

V II . 懸濁培養によるA S C芽体は多系統分化能力を示す。

A S C芽体を、それらを系統誘導条件に様々な時間で曝すことによって、懸濁培養における多系統発生可塑性について試験した。図27~29に見られるように、懸濁状態のA S C芽体は多系統分化能力を示唆する組織学的特徴を示している。

【0199】

本明細書において引用したいかなる特許、特許出願、および刊行物の開示内容も、引用することによりそのまま本明細書の一部とされる。見出しあは、参考用に、そしてある特定の節を見つける助けをするように本明細書に含まれる。これらの見出しあは、その中で下に記載されている概念の範囲を限定するものではなく、これらの概念は本明細書全体を通じて他の節にも適用可能であり得る。

20

【0200】

使用しているが本明細書には記載していない他の方法は周知のものであり、臨床技術、化学技術、細胞技術、組織化学的技術、生化学的技術、分子生物学技術、微生物学技術および組換えD N A技術の分野の業者の能力の範囲内である。

【0201】

開示した実施形態の説明は、いかなる当業者でも本発明を作製または使用することができるよう示している。これらの実施形態に対する様々な修飾については当業者ならば容易に理解し、本発明の精神または範囲を逸脱することなく、本明細書において定義した一般的な原理を他の実施形態に適用し得る。よって、本発明は、本明細書に示した実施形態に限定されるものではなく、本明細書に開示した原理および新規特徴と一致する最大範囲を許容するものである。

30

【図面の簡単な説明】

【0202】

図面の簡単な説明

写真原本の一部はカラー写真である。そのため、黒色、灰色、または白色以外の色について言及する場合には、それが本明細書に添えて提出された白黒写真の灰色として現れることに注意すべきである。

【0203】

【図1】左(1A)および右(1B)パネルからなる、逆さにされた液滴中のA S Cからの自己組織化メセンコイドボディ(Self-Organizing Mesenchoid Bodies)(S O M - B)の形成を示す顕微鏡写真画像である。

40

【0204】

【図2】均一な大きさの細胞スフェア/S O M Bの安定した形成を可能にする技術を示す顕微鏡写真画像である。

【0205】

【図3】図3A~Dからなる、S O M - Bが化学的に定義された培地(A Rシリーズ)において多くは分極した形で劇的に増殖することを示す顕微鏡写真画像である。S O M B形成前にD i IでA S Cを標識することによって(図3Aおよび3C)増殖および分極の可視化を可能にしている(3Cの星印は最初の細胞集団を示している)。

50

## 【0206】

【図4】SOMBが、最初の細胞の「コア」を維持しながら、合成無血清培地AR8中で3～4週間後に増殖してそれらの最初の大きさの10倍になることを示す顕微鏡写真画像であり、この「コア」はSOMB形成前にDiIでASCを前標識することによって明らかになる（赤色、AR8-0%中で増殖させた大型スフェア内のDiI<sup>+</sup>「コア」）。小型スフェア（DiIにより赤色）はDMEM/F12-10%FBS中で維持されたSOMBである。

## 【0207】

【図5】図5A～Dからなり、顕微鏡写真画像を示し（5A～C）、1ヶ月後のSOMBインプリント領域をグラフにより示し、SOMBが、細胞の最初の数（2K=2,000細胞）に関係なく増殖して最適な大きさになると思われることを示している。

## 【0208】

【図6】5つのパネルからなる、SOMB形成前にDiIで細胞を前標識することによって極性増殖の蛍光に基づく測定を可能にすることを示す顕微鏡写真画像である（右下のパネル）。

## 【0209】

【図7】ARタイプの培地中でのSOMBの極性増殖の進行を示す合成図の顕微鏡写真画像である

## 【0210】

【図8】4つのパネル（8A～8D）からなる、ゼロ血清または超低（0.5%）血清条件で数経代の間増殖させた際にASCがSOMBを自然形成することが観察された顕微鏡写真画像である。

## 【0211】

【図9】左および右パネルからなる、「液滴法」の代替法を示す顕微鏡写真画像であり：超低付着性プレートに超高密度にプレーティングした際にASCが誘導されてSOMBを形成した。

## 【0212】

【図10】図10A～10Dからなる、SOMB（10Aおよび10B）が、SOMBから伸びる細胞突起で「固定すること」によって組織培養用プラスチック製品に付着することを示す顕微鏡写真画像である。付着後、SOMBは、最終的に培養場所に再集合する細胞を「発生させる」（C）。SOMBはプレートから離すことができ（Dの星印）、新たな細胞の生成のために繰り返し再プレーティングすることができる。

## 【0213】

【図11】左および右パネルからなる、DMEM/F12+10%またはARタイプの培地+0%血清で増殖させたSOMBによる細胞の付着、固定、および発生を示す顕微鏡写真画像である。

## 【0214】

【図12】4つのパネル（12A～12B）からなる、SOMBが接触するとそれらが細胞突起を互いに伸ばし合うことによって融合することができるることを示す顕微鏡写真画像である。図12A（左上パネル）は接触したところの2つのより小さなSOMBを示す。図12Bは融合の始まりを示す。融合後、SOMBは、DiI<sup>+</sup>「コア」の形態変化および融合からも明らかのように、動的に再組織化し続ける（12Cおよび12D）。図12Cおよび12D（下のパネル）は複数のSOMBが融合する際に起こる自発的な自己組織化を示している。

## 【0215】

【図13】図13Aおよび13Bからなり、図13Bはさらに左および右パネルからなる、顕微鏡写真画像である。形成後14日のSOMBのH&E染色は、スフェア全体にわたって、自然発生した細胞外マトリックスに組み込まれている明らかに生存能力のある細胞の均一分布を示し、スフェアの境界において細胞の分化が起こっている可能性を伴う。

## 【0216】

10

20

30

40

50

【図14】図14A～Cからなる、顕微鏡写真画像である。H & E染色(A)では細胞が増殖された最初のDi I陽性「コア」(B)とSOM-Bの残りの部分の間には細胞密度の差がないようであることが分かる。「生」SOM-B(C)のHoechst染色でもスフェア全体にわたって細胞のかなり均一な分布を示している。

【0217】

【図15】4つのパネル(A～D)からなる、SOM-Bの大きさは特定の用途、例えば傷へのin vivo送達のためなどに調整することができるることを示す顕微鏡写真画像である。得られるSOMBは、10μl Hamilton社製マイクロシリジ筒に適合するのに十分な小ささでありながら、細胞治療に最適な形状を与えることができる(15D)。

10

【0218】

【図16】脂肪生成培地中で14日間培養したSOM-B由来マウスASCのOil Red O染色を示す顕微鏡写真画像である(星印は培養プレートへのSOM-Bの付着位置を示している)。

【0219】

【図17】2回連続のSOM-B「移植」および再付着後に脂肪生成培地中で培養したSOM-B由来ヒトASCのOil Red O染色を示す顕微鏡写真画像である(星印は培養プレートへのSOM-Bの付着位置を示している)。

【0220】

【図18】3回連続のSOM-B「移植」および再付着後に脂肪生成培地中で培養したSOM-B由来ヒトASCのOil Red O染色を示す顕微鏡写真画像である(星印は培養プレートへのSOM-Bの付着位置を示している)。

20

【0221】

【図19】図19A～19D(4つのパネル)からなる、懸濁培養におけるSOM-B(ASC-MB)の方向性増殖を示す顕微鏡写真画像である。(19A)分極および方向性増殖の早期兆候を示す、無血清培地中での懸濁培養において増殖させたASC-MBの光学顕微鏡写真。(19B)同じASC-MBのH & E組織学では、ASC由来細胞外マトリックスの背景全体に明確な核を示している。(19C)(19B)の同じ切片の蛍光顕微鏡写真では、(MBの右側に向かって)増殖中の「頂端」部と比べてより強い細胞およびマトリックス高密度「コア」を示している。(19D)では免疫組織化学的にBrdU染色した同じASC-MBの切片(褐色の核)の光学顕微鏡写真を示している。このASC-MBは無血清培地中で8日間増殖させ、固定および染色の前にBrdUを加えて24時間パルス処理した。観察された染色パターンは非蛍光極で観察される増殖活性と完全に一致している。

30

【0222】

【図20】図20A～20Cからなる、付着ASCの小クラスターを示す位相差画像であり、これらからやがて細胞の大きな後代がもたらされる(20A～20C)。

【0223】

【図21】付着ASC SOM-Bの顕微鏡写真画像であり、低血清(1%ヒト血清)培地、次に10%FBS培地中で最初に増殖させる場合、脂肪生成培地の不在下ではSOM-B内の細胞の脂肪細胞への強い分化が起こることを示している。

40

【0224】

【図22】無血清培地に入れる場合、付着ASCは誘導されてSOM-Bを形成することができることを示す顕微鏡写真画像である。融合してSOM-Bにはならない細胞は最終的には分離し、死滅する。

【0225】

【図23】4つのパネル(図23A-左上、10×倍率；右上、4×倍率；図23B-左下、10×；右下、4×)からなる、無血清AR8培地中で懸濁培養において4週間増殖させたASC芽体の顕微鏡写真画像である。次いで、それらを付着性培養に移した。付着性培養にて4日後、それらの芽体を脂肪生成培地または骨形成培地のいずれかにさらに14日間さらした。その後、これらの培養物を固定し、染色した。上のパネル画像は骨形成

50

培地中で増殖させた芽体における広範囲に及ぶアリザリンレッド染色を示している。下のパネル画像は脂肪生成培地中で増殖させた芽体における遊離脂質液滴と陽性 Oil Red O 染色を示している。

【0226】

【図24】4つのパネル（図24A - 左上、10×；右上、4×；図24B - 左下、10×；右下、4×）からなる、DMEM/F12+10%FBS培地中で懸濁培養において4週間増殖させたASC芽体の顕微鏡写真画像である。次いで、それらを付着性培養に移した。付着性培養にて4日後、それらの芽体を脂肪生成培地または骨形成培地のいずれかにさらに14日間さらした。その後、これらの培養物を固定し、染色した。上のパネル画像は骨形成培地中で増殖させた芽体における広範囲に及ぶアリザリンレッド染色を示している。下のパネル画像は脂肪生成培地中で増殖させた芽体における遊離脂質液滴と陽性 Oil Red O 染色を示している。

10

【0227】

【図25】4つのパネル（図25A - 左上、10×；右上、4×；左下、10×；図25B - 右下、4×）からなる、無血清を含まない非添加DMEM/F12培地中で懸濁培養において4週間増殖させたASC芽体の顕微鏡写真画像である。次いで、それらを付着性培養に移した。付着性培養にて4日後、それらの芽体をさらに、脂肪生成培地中または骨形成培地中のいずれかで14日間培養した。その後、これらの培養物を固定し、染色した。上のパネル画像は骨形成培地中で増殖させた芽体における広範囲に及ぶアリザリンレッド染色を示している。下のパネル画像は脂肪生成培地中で増殖させた芽体における遊離脂質液滴と陽性 Oil Red O 染色を示している。

20

【0228】

【図26】4つのパネル（図26A - 左上、10×；右上、4×；図26B - 左下、10×；右下、4×）からなる、DMEM/F12+10%FBS培地中で懸濁培養において4週間増殖させたASC芽体の顕微鏡写真画像である。次いで、それらを付着性培養に移した。付着性培養にて4日後、それらの芽体を、対照群となるDMEM/F12+10%FBS培地中でさらに14日間培養した。その後、これらの培養物を固定し、染色した。上のパネル画像は対照培地で増殖させた芽体におけるアリザリンレッド染色を示している。下のパネル画像は対照培地で増殖させた芽体におけるOil Red O 染色を示している。

30

【0229】

【図27】図27Aおよび27Bからなる、懸濁培養におけるASC芽体の分化を示す顕微鏡写真画像である。ASC芽体を無血清AR8培地を用いて懸濁培養において2週間培養した。次いで、それらを対照培地（AR8または「対照」）、骨形成培地（OM）、または軟骨形成培地（CM）に3週間、および脂肪生成培地（AM）に2週間さらした。その後、これらの芽体を凍結し、凍結切片とし、H&Eで染色した。4つの画像からなる上のパネル（図27A）は、光学顕微鏡を使用して懸濁培養（対照、AM、OM、CM）により芽体を示している。4つの画像からなる下のパネル（27B）は、H&E染色後の図27Aと同じ芽体を示している。

30

【0230】

【図28】左（対照）および右（10×倍率でのAM）パネルからなる、懸濁培養におけるヒトASC芽体の脂肪生成分化を示す顕微鏡写真画像である。ヒトASC芽体を懸濁培養においてAR8無血清培地中で2週間、その後、脂肪生成培地（AM）中で6週間増殖させた。対照芽体をAR8無血清培地中で8週間培養した。その後、両方の芽体を凍結切片とし、Oil Red Oを用いて脂質について染色した。左パネルは対照培地における芽体を示し、右パネルは広範囲に及ぶOil Red O染色を示したAMで誘導された芽体を示している。10×倍率。

40

【0231】

【図29】懸濁培養におけるヒトASC芽体の骨形成分化を示す顕微鏡写真画像である。ヒトASC芽体を懸濁培養においてAR8無血清培地中で2週間、その後、骨形成培地（

50

AM) 中で 6 週間増殖させた。対照芽体(矢印)を AR 8 無血清培地で 8 週間培養した。その後、両方の芽体を凍結切片とし、アリザリンレッド染料を用いて石灰化マトリックスについて染色した。OM で増殖させた芽体は強い染色により容易に確認されるが、一方、対照芽体(矢印)では顕著な染色は認められない。

【図 1】

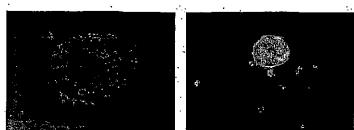


FIG. 1A

FIG. 1B

【図 2】

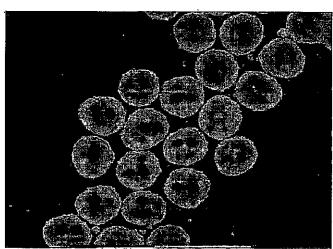


FIG. 2

【図 3】

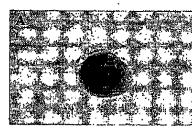


FIG. 3A



FIG. 3B

【図 4】



FIG. 3C



FIG. 3D

【図 4】

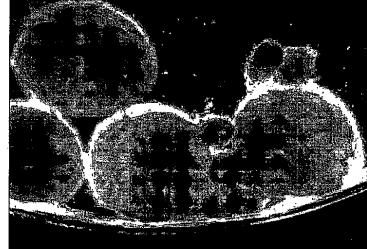


FIG. 4

【図 5】



FIG. 5A

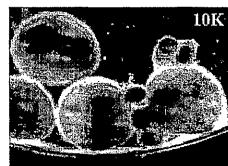


FIG. 5B

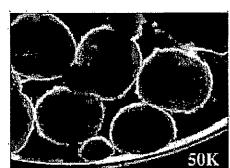


FIG. 5C

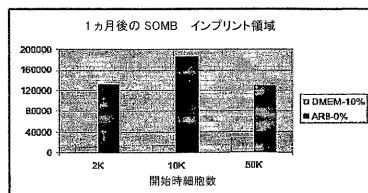


FIG. 5D

【図 6】

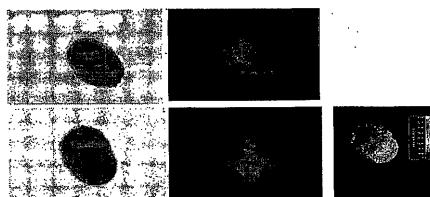


FIG. 6

【図 7】

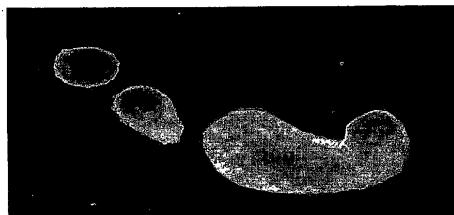


FIG. 7

【図 8】

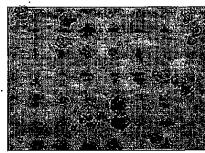


FIG. 8A



FIG. 8B



FIG. 8C



FIG. 8D

【図 9】

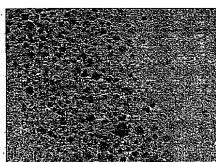


FIG. 9

【図 10】



FIG. 10A

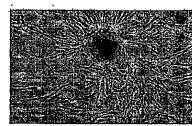


FIG. 10B



FIG. 10C

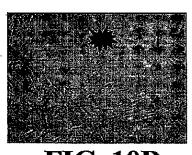


FIG. 10D

【図 11】

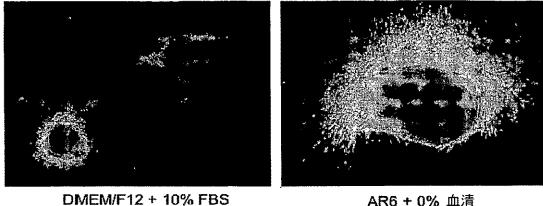


FIG. 11

【図 12】

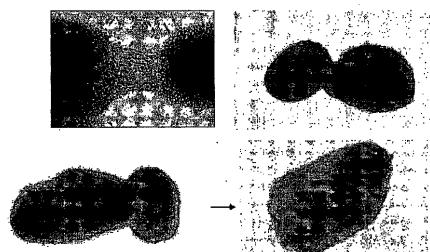


FIG. 12

【図 13】



FIG. 13A



FIG. 13B

【図 15】

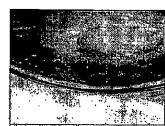


FIG. 15A



FIG. 15B



FIG. 15C



FIG. 15D

【図 16】

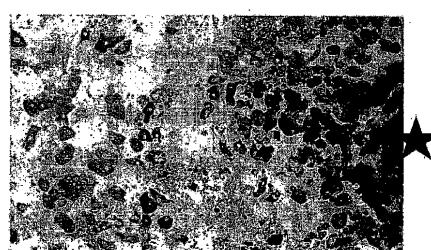


FIG. 16

【図 14】



FIG. 14A



FIG. 14B



FIG. 14C

【図 17】



FIG. 17

【図 18】

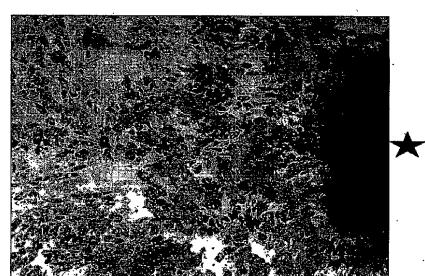


FIG. 18

【図 19】



FIG. 19A

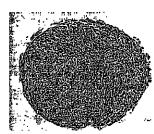


FIG. 19B

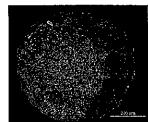


FIG. 19C



FIG. 19D

【図 20】



FIG. 20A

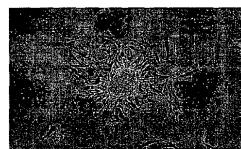


FIG. 20B

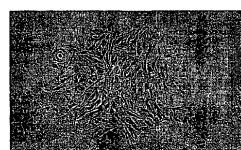


FIG. 20C

【図 21】

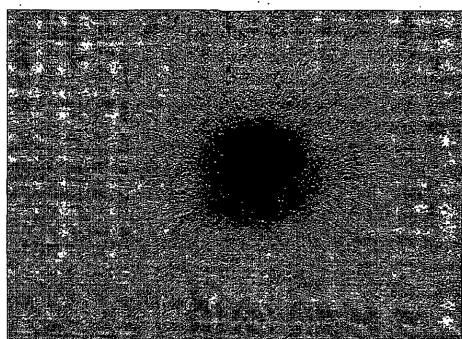


FIG. 21

【図 23】

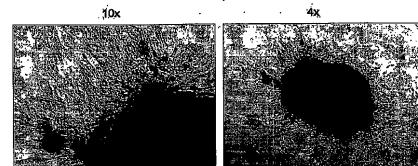


FIG. 23A



FIG. 23B

【図 24】

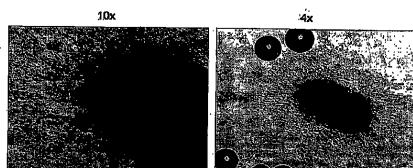


FIG. 24A

【図 25】



FIG. 25A

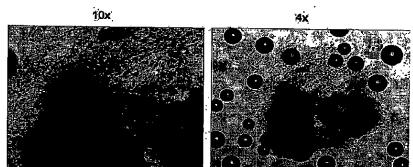


FIG. 24B

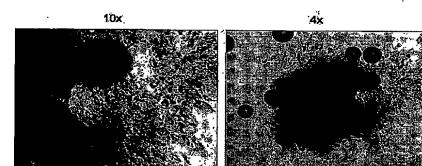


FIG. 25B

【図 26】

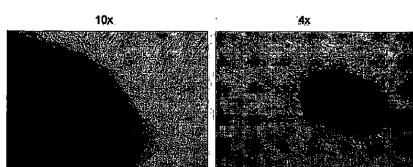


FIG. 26A

【図 27】

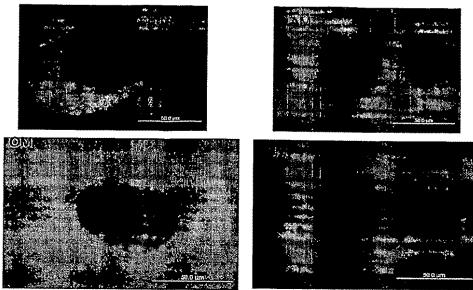


FIG. 27A

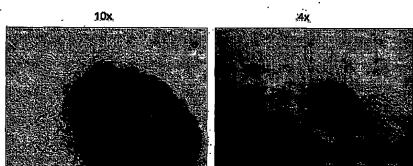


FIG. 26B

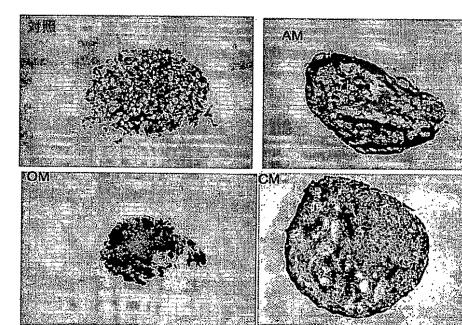


FIG. 27B

【図28】

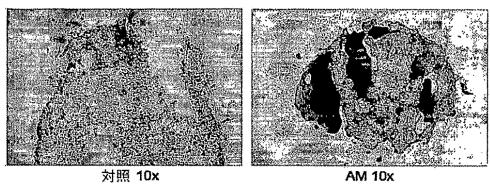


FIG. 28

【図29】

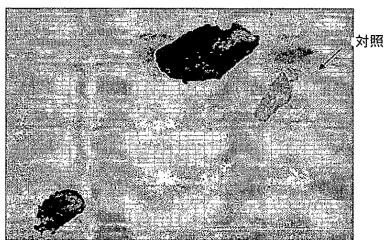


FIG. 29

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/02572																		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC: C12N 5/02																				
USPC: 435/377 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/377																				
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) EAST, NCBI, STN Easy (search terms: mesenchymal stem cells, adipose tissue derived stem cells, blastema, ASC)																				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">US 6,429,013 (HALVORSEN et al.) 06 August 2002 (06.08.2002) see abstract, column 3, lines 55-60.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-3, 6-12, 16-21</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">---</td> <td></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">-----</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">US 5,486,359 (CAGLIO et al.) 23 January 1996 (23.01.1996) see column 18, lines 10-13, column 7, lines 43-45.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-22</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">WO 03/022988 A2, 20 March 2003 (20.03.2003) see description of figure 8.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">4-5, 13</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">14-15</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 6,429,013 (HALVORSEN et al.) 06 August 2002 (06.08.2002) see abstract, column 3, lines 55-60.	1-3, 6-12, 16-21	---		-----	Y	US 5,486,359 (CAGLIO et al.) 23 January 1996 (23.01.1996) see column 18, lines 10-13, column 7, lines 43-45.	1-22	Y	WO 03/022988 A2, 20 March 2003 (20.03.2003) see description of figure 8.	4-5, 13			14-15
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	US 6,429,013 (HALVORSEN et al.) 06 August 2002 (06.08.2002) see abstract, column 3, lines 55-60.	1-3, 6-12, 16-21																		
---		-----																		
Y	US 5,486,359 (CAGLIO et al.) 23 January 1996 (23.01.1996) see column 18, lines 10-13, column 7, lines 43-45.	1-22																		
Y	WO 03/022988 A2, 20 March 2003 (20.03.2003) see description of figure 8.	4-5, 13																		
		14-15																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 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																				
Date of the actual completion of the international search 29 August 2007 (29.08.2007)		Date of mailing of the international search report <b>28 DEC 2007</b>																		
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 Maury Audet Telephone No. 571-272-1600																		

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US07/02572						
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b> <p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</li> <li>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</li> <li>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</li> </ol>								
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b> <p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</li> <li>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.</li> <li>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</li> <li>4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-22.</li> </ol> <p><b>Remark on Protest</b></p> <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>			<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.							
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.							
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.							

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US07/02572
---

**BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions, which are not so linked as to form a single general inventive concept under the PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional fees must be paid.

**Group I**, claims 1-22 are drawn to a method of culturing adipose tissue-derived stem cells (ASCs) such that they organize into a three-dimensional multicellular structure.

**Group II**, claims 23-35 are drawn to a method of propagating self-organizing mesenchymal blastemas.

**Group III**, claims 36-42 are drawn to a method of administering at least one self-organizing mesenchymal blastema to a subject in need thereof.

The International Searching Authority considers that the international application does not comply with the requirement of unity of invention (PCT Rule 13.1, 13.2 and 13.3) for the reason indicated below:

The inventions are linked by the common technical feature of a "self organizing mesenchymal blastema" which is synonym for "adipose tissue derived stem/stromal cells" as per page 4 of the description, lines 10-20. However, this feature is not special because it does not constitute an advance over the prior art. Halvorsen et al (US 6,429,013 B1) teach cultivation and differentiation of adipose tissue derived stem/stromal cells (see abstract).

Each group involves method steps not required by the other.

Group I, a first method, requires method steps obtaining of ASCs, suspending said ASCs into growth medium and transferring said growth medium containing ASCs to a solid support to aggregate into a multicellular structure, not required by methods of Group II and Group III. Group II, a second method, requires method steps obtaining self-organizing mesenchymal blastemas, transferring said self-organizing mesenchymal blastemas to a tissue culture plate comprising growth medium, fusing and propagating self-organizing mesenchymal blastemas, nor required by methods of Group I and Group III.

Group III, a third method, involves administration of self-organizing mesenchymal blastema to a subject in need thereof not required by methods of Group I & Group II.

---

フロントページの続き

(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,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,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,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,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,L,A,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,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 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(74)代理人 100146259

弁理士 橋本 諭志

(72)発明者 モシェ・ケーゲル

アメリカ合衆国 22901 バージニア州シャーロッツビル、クローバー・リッジ・コート 4750  
番

(72)発明者 アダム・ジェイ・キャット

アメリカ合衆国 22911 バージニア州シャーロッツビル、ブロードリーフ・ウェイ 503 番

F ターム(参考) 4B065 AA93X AC20 BB25 CA44

4C081 AB02 AB11 BA13 EA01