

(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2015-531594
(P2015-531594A)

(43) 公表日 平成27年11月5日(2015.11.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0775 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 H	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12 Z N A	4 B O 6 3
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00 V	4 B O 6 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5	4 C O 8 1
A 6 1 K 35/15 (2015.01)	A 6 1 K 35/15 Z	4 C O 8 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 113 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-526006 (P2015-526006)
 (86) (22) 出願日 平成25年8月4日 (2013.8.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年2月4日 (2015.2.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2013/050660
 (87) 国際公開番号 WO2014/024183
 (87) 国際公開日 平成26年2月13日 (2014.2.13)
 (31) 優先権主張番号 61/679,822
 (32) 優先日 平成24年8月6日 (2012.8.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515032396
 ブレインストーム セル セラベウティクス リミテッド
 イスラエル, 4900101 ペタッチーティクヴァ, キリャト アリー, ピー. オー. ボックス 10019, バゼル ストリート 12
 (74) 代理人 100103816
 弁理士 風早 信昭
 (74) 代理人 100120927
 弁理士 浅野 典子
 (72) 発明者 ゴセルフ, ヤエル
 イスラエル, 5556015 キリャト-オノ, ハーツフェルド ストリート 15

最終頁に続く

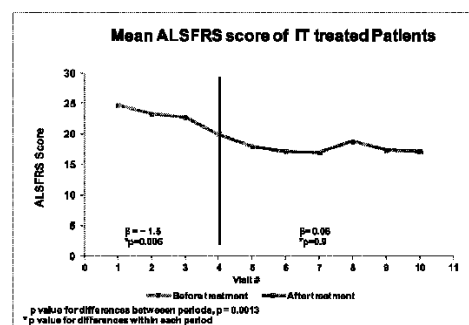
(54) 【発明の名称】 神経栄養因子を分泌する間葉系幹細胞の作製方法

(57) 【要約】

神経栄養因子 (NTF) を分泌する間葉系幹細胞 (MSC) を作製する方法であって、未分化間葉系幹細胞 (MSC) の集団を、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、ヘレグリンおよびcAMPを含む分化用培地においてインキュベーションすることを含む方法。

【選択図】 図 2 5

FIG. 25



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

神経栄養因子 (N T F) を分泌する細胞を作製する方法であって、未分化間葉系幹細胞 (M S C) の集団を、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b F G F)、血小板由来増殖因子 (P D G F)、ヘレグリンおよび c A M P を含む分化用培地においてインキュベーションすることを含む方法。

【請求項 2】

前記分化用培地はホスホジエステラーゼ阻害剤を欠いている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記分化用培地はトリヨードチロニンを欠いている、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記ホスホジエステラーゼ阻害剤は I B M X を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記分化用培地は異種由来成分を欠いている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記方法はさらに、未分化 M S C の前記集団を前記インキュベーションの前に培養することを含み、ただし、前記培養することが、細胞分化を促進させない条件のもとで行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記培養することが、前記未分化 M S C を播種した後の 3 日間にわたって行われる、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記播種することが約 6000 細胞 / cm^2 ~ 8000 細胞 / cm^2 の密度で行われる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記培養することが、血小板溶解物を含む培養培地において行われる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

前記培養培地における前記血小板溶解物の割合が約 10% である、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記培養培地はさらに、L - グルタミン、ピルビン酸ナトリウムおよびヘパリンを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記細胞の表面における C D 4 4 および / または C D 7 3 の発現を分析することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記細胞の表面における C D 1 0 5 の発現を分析することをさらに含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

前記発現を未分化 M S C の表面における C D 4 4 および / または C D 7 3 の発現と比較することをさらに含む、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

40

【請求項 15】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の方法に従って作製される、神経栄養因子を分泌する細胞の単離された集団。

【請求項 16】

フローサイトメトリーによって検出される場合、C D 4 4、C D 7 3、C D 9 0 および C D 1 0 5 の間葉系幹細胞マーカーのそれぞれを発現する、請求項 1 5 に記載の細胞の単離された集団。

【請求項 17】

50

フローサイトメトリーによって検出される場合、CD3、CD14、CD19、CD34、CD45およびHLA-DRの表面マーカーのいずれをも発現しない、請求項15に記載の細胞の単離された集団。

【請求項18】

遺伝子改変されない、請求項15に記載の細胞の単離された集団。

【請求項19】

神経栄養因子の投与が有益である疾患の処置をその必要性のある対象において行う方法であって、請求項15に記載の単離された細胞集団の治療有効量を前記対象に投与し、それにより、前記疾患を処置することを含む方法。

【請求項20】

前記細胞は、前記対象に対して自己であるMSCからエキスピボ分化させられる、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記細胞は、前記対象に対して同種異系であるMSCからエキスピボ分化させられる、請求項19に記載の方法。

【請求項22】

前記細胞は、前記対象の骨髄に由来するMSCからエキスピボ分化させられる、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

前記疾患は神経変性疾患または免疫疾患である、請求項19に記載の方法。

【請求項24】

前記神経変性疾患は、パーキンソン病、多系統萎縮症(MSA)、多発性硬化症、てんかん、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、卒中、自己免疫性脳脊髄炎、糖尿病性神経障害、緑内障性神経障害、アルツハイマー病およびハンチントン病からなる群から選択される、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記神経変性疾患はALSである、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記免疫疾患は自己免疫疾患である、請求項23に記載の方法。

【請求項27】

前記自己免疫疾患は重症筋無力症である、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記投与することが筋肉内および/またはクモ膜下腔内に行われる、請求項19に記載の方法。

【請求項29】

前記投与することが筋肉内に行われるとき、70kgの対象に投与される細胞の総量が 20×10^6 細胞 $\sim 100 \times 10^6$ 細胞の間である、請求項19に記載の方法。

【請求項30】

前記投与することがクモ膜下腔内に行われるとき、70kgの対象に投与されるMSC-NTFの総量が 50×10^6 細胞 $\sim 200 \times 10^6$ 細胞の間である、請求項19に記載の方法。

【請求項31】

前記投与することが筋肉内およびクモ膜下腔内に行われるとき、70kgの対象に投与されるMSC-NTFの総量が 20×10^6 細胞 $\sim 500 \times 10^6$ 細胞の間である、請求項19に記載の方法。

【請求項32】

神経栄養因子(NTF)を分泌する細胞をMSCの混合集団から選択する方法であって、

(a) 前記混合細胞集団の細胞を、下記のパラメータ：

(i) CD44を所定の閾値よりも少なく発現する細胞、

10

20

30

40

50

(i i) C D 7 3 を所定の閾値よりも多く発現する細胞の少なくとも1つについて分析すること、および

(b) 前記パラメータの少なくとも1つについて陽性である細胞を選択し、それにより、神経栄養因子を分泌する前記細胞を選択することを含む方法。

【請求項33】

前記細胞におけるC D 1 0 5 のレベルを分析すること、および、C D 1 0 5 を所定のレベルよりも少なく発現する細胞を選択することをさらに含む、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

前記N T F はグリア由来神経栄養因子(G D N F) および脳由来神経栄養因子(B D N F) を含む、請求項32に記載の方法。

10

【請求項35】

未分化M S C の集団を、前記分析することに先立って、N T F を分泌するM S C を生じさせるように分化用培地においてインキュベーションすることをさらに含む、請求項32に記載の方法。

【請求項36】

活性成分としての請求項15に記載の単離された細胞集団と、医薬的に許容され得るキャリアとを含む医薬組成物。

【請求項37】

前記医薬的に許容され得るキャリアは前記組成物における細胞の数を少なくとも48時間にわたって維持する、請求項36に記載の医薬組成物。

20

【請求項38】

M S C からエクスピボ分化されており、かつ、神経栄養因子を分泌する、疾患の処置のために有用な細胞の適格性を調べる方法であって、m i R - 5 0 3 - 5 p、m i R - 3 6 5 9、m i R - 3 5 2 9 - 3 p、m i R - 3 2 0 b、m i R - 4 2 4 - 5 p、m i R - 3 2 0 a、m i R - 2 2 2 - 3 p、m i R - 3 6 6 3 - 3 p、m i R - 7 6 2、m i R - 4 3 2 7、m i R - 3 6 6 5、m i R 3 4 a - 5 p、m i R - 4 3 2 7、m i R N A - 3 6 6 5 およびm i R 1 3 2 - 3 p からなる群から選択される少なくとも1つのm i R N A の発現について前記細胞を分析することを含み、ただし、非分化M S C と比較して、前記m i R - 3 6 6 3 - 3 p、m i R - 7 6 2、m i R - 4 3 2 7、m i R - 3 6 6 5、m i R 3 4 a - 5 p、m i R - 4 3 2 7、m i R N A 3 6 6 5 またはm i R 1 3 2 - 3 p の増大した発現、あるいは、非分化M S C と比較して、前記m i R - 5 0 3 - 5 p、m i R - 3 6 5 9、m i R - 3 5 2 9 - 3 p、m i R - 3 2 0 b、m i R - 4 2 4 - 5 p、m i R - 3 2 0 a またはm i R - 2 2 2 - 3 p の低下した発現により、疾患を処置するために有用である細胞が示される方法。

30

【請求項39】

前記m i R N A は、m i R - 5 0 3 - 5 p、m i R - 3 2 0 b、m i R 4 2 4 - 5 p、m i R - 1 3 2 - 3 p およびm i R - 3 4 a - 5 p からなる群から選択される、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

M S C からエクスピボ分化されており、かつ、神経栄養因子を分泌する、疾患の処置のために有用な細胞の適格性を調べる方法であって、イソブチリル - C o A デヒドロゲナーゼ、C - X - C モチーフケモカイン6、ニューロモジュリン、増殖/分化因子15、ヒアルロンタンシターゼ1、インターロイキン - 1 ベータ、インターロイキン - 8、インヒビンベータA鎖、インスリン受容体基質1、インテグリンアルファ - 1、ラッカーゼドメイン含有タンパク質1、ラミニンサブユニットアルファ - 4、ルミカン、コラゲナーゼ3、食道正常粘膜特異的遺伝子1タンパク質、プレB細胞白血病転写因子相互作用タンパク質1、プレクトストリン相同様ドメインファミリーAメンバー1、ホスファチジルイノシトール - 3, 4, 5 - 三リン酸依存性R a c 交換体1タンパク質、プロスタグランジンEシターゼ、プロスタグランジンG / Hシターゼ2、R a s 関連タンパク質R a b - 2 7

40

50

B、R h o 関連 G T P 結合タンパク質 R h o B、シアル酸 O - アセチルエステラーゼ、モノカルボン酸輸送体 7、組織因子経路阻害剤 2、膜貫通タンパク質 6 5、V a m 6 / V p s 3 9 様タンパク質、3 - オキソ - 5 - ベータ - ステロイド 4 - デヒドロゲナーゼ、プロピオニル - C o A カルボキシラーゼベータ鎖 (ミトコンドリア)、インターフェロン調節因子 2 結合タンパク質様、組織アルファ - L - フコシダーゼ、アルド - ケトレダクターゼファミリー 1 メンバー C 2、イノシトール - 1, 4, 5 - 三リン酸受容体相互作用タンパク質、タンパク質 K I A A 1 1 9 9、セレン結合タンパク質 1、ホスホリパーゼ D 3、G T P : A M P ホスホトランスフェラーゼ (ミトコンドリア)、タンパク質 W n t - 5 a ; タンパク質 W n t、アルド - ケトレダクターゼファミリー 1 メンバー C 3、ソーティングネキシン - 9、ギャップジャンクションアルファ - 1 タンパク質、ビルビン酸カルボキシラーゼ (ミトコンドリア)、S H 3 / P X ドメイン含有タンパク質 2 B、インテグリンアルファ - 2、シトクローム P 4 5 0 1 B 1、キチナーゼ - 3 様タンパク質 1、ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ、セブラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、アルド - ケトレダクターゼファミリー 1 メンバー C 1、F E R M、R h o G E F およびプレクトストリンドメイン含有タンパク質 1、プロリル 4 - ヒドロキシラーゼサブユニットアルファ - 3、リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼサブユニット M 2 B、コアヒストンマクロ - H 2 A . 2 ; ヒストン H 2 A、コリン輸送体様タンパク質 1 およびニーマン・ピック C 1 タンパク質、リソソームアルファ - グルコシダーゼからなる群から選択される少なくとも 1 つのタンパク質の発現について前記細胞を分析することを含み、ただし、非分化 M S C と比較して、前記少なくとも 1 つのタンパク質の発現における増大により、前記細胞が疾患の処置のために有用であることが示される方法。

【請求項 4 1】

M S C からエクスピボ分化されており、かつ、神経栄養因子を分泌する、疾患の処置のために有用な細胞の適格性を調べる方法であって、タイトジャンクションタンパク質 Z O - 2、アルファ - 1, 3 - マンノシル糖タンパク質 2 - ベータ - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、スムーセリン (s m o o t h e l i n)、異所性 P 顆粒タンパク質 5 ホモログ、B R C A 1 会合 A T M 活性化因子 1、W D リピート含有タンパク質 3 6、S H 3 ドメイン結合タンパク質 4、E H ドメイン結合タンパク質 1 様タンパク質 1、R a s G T P アーゼ活性化様タンパク質 I Q G A P 3、リシルオキシダーゼホモログ 2、トロポミオシン 1 (アルファ)、イソ型 C R A _ f、G e m 会合タンパク質 5、三者モチーフ含有タンパク質 1 6、結合組織増殖因子、リンホカイン活性化キラー T 細胞起源のプロテインキナーゼ、テトラトリコペプチドリピートタンパク質 4、乳ガンの抗エストロゲン剤抵抗性タンパク質 1、リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼサブユニット M 2、ユビキチン結合酵素 E 2 C、好中球デフェンシン 1、C d c 4 2 エフェクタータンパク質 3、コンデンシン複合体サブユニット 2、I g カップ鎖 C 領域、コンデンシン複合体サブユニット 3、シンコイリン (s y n c o i l i n)、染色体構造維持タンパク質 2、コンデンシン複合体サブユニット 1、インターアルファ - トリプシン阻害剤重鎖 H 4、チミジル酸シンターゼ、セロトランスフェリン、妊娠領域タンパク質、D N A 複製ライセンス化因子 M C M 7、ヘモペキシン、D N A ミスマッチ修復タンパク質 M s h 6、アンキリンリピートドメイン含有タンパク質 1 3 A、ホスデューシン様タンパク質 3、1 - ホスファチジルイノシトール - 4, 5 - ニリン酸ホスホジエステラーゼベータ - 3、補体 C 3、D N A 複製ライセンス化因子 M C M 3、C D 9 7 抗原、C D 9 7 抗原サブユニットアルファ、D N A 複製ライセンス化因子 M C M 6、D N A 複製ライセンス化因子 M C M 4、D i s a b l e d ホモログ 2、タンパク質 K I A A 0 6 6 4、D N A 複製ライセンス化因子 M C M 2、タンパク質 - リシン 6 - オキシダーゼ、リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼサブユニット、メラノーマ関連抗原 D 2、I g ガンマ - 1 鎖 C 領域、ヘパラナーゼ、インポーチンサブユニットアルファ - 2、アスパラギンシンセターゼ [グルタミン加水分解性]、アルファ - 2 - マクログロブリン、コラーゲンアルファ - 1 (I) 鎖、コラーゲンアルファ - 1 (V) 鎖、D n a J ホモログサブファミリー B メンバー 4、トロンボスポンジン - 1、血清アルブミンおよびコラーゲンアルファ - 2 (I) 鎖からなる群から選択され

る少なくとも1つのタンパク質の発現について前記細胞を分析することを含み、ただし、非分化細胞と比較して、前記少なくとも1つのタンパク質の発現における低下により、前記細胞が疾患の処置のために有用であることが示される方法。

【請求項42】

神経栄養因子を分泌する単離された細胞集団であって、前記細胞が、フローサイトメトリーによって検出される場合、CD44、CD73、CD90およびCD105の間葉系幹細胞マーカーのそれぞれを発現し、かつ、CD3、CD14、CD19、CD34、CD45およびHLA-DRの表面マーカーのいずれをも発現しない単離された細胞集団。

【請求項43】

前記神経栄養因子は、BDNF、GDNF、VEGFおよびHGFからなる群から選択される、請求項42に記載の単離された細胞集団。

10

【請求項44】

前記神経栄養因子は、BDNF、GDNF、VEGFおよびHGFを含む、請求項42に記載の単離された細胞集団。

【請求項45】

前記細胞は遺伝子改変されない、請求項42～44のいずれかに記載の単離された細胞集団。

【請求項46】

前記細胞は、非分化MSCと比較して、miR34a-5p、miR-222-3p、miR762、miRNA3663-3pまたはmiR132-3pからなる群から選択されるmiRNAの増大した発現を示す、請求項42～45のいずれかに記載の単離された細胞集団。

20

【請求項47】

前記細胞は、非分化MSCと比較して、miR-503-5p、miR-320b、miR-424-5p、miR-320aまたはmiR-222-3pからなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAの減少した発現を示す、請求項42～46のいずれかに記載の単離された細胞集団。

【請求項48】

前記細胞は、非分化MSCと比較して、イソブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、C-X-Cモチーフケモカイン6、ニューロモジュリン、増殖/分化因子15、ヒアルロナンシンターゼ1、インターロイキン-1ベータ、インターロイキン-8、インヒピンベータA鎖、インスリン受容体基質1、インテグリンアルファ-1、ラッカーゼドメイン含有タンパク質1、ラミニンサブユニットアルファ-4、ルミカン、コラゲナーゼ3、食道正常粘膜特異的遺伝子1タンパク質、プレB細胞白血球転写因子相互作用タンパク質1、プレクトストリン相同様ドメインファミリーAメンバー1、ホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸依存性Rac交換体1タンパク質、プロスタグランジンEシンターゼ、プロスタグランジンG/Hシンターゼ2、Ras関連タンパク質Rab-27B、Rho関連GTP結合タンパク質RhoB、シアル酸O-アセチルエステラーゼ、モノカルボン酸輸送体7、組織因子経路阻害剤2、膜貫通タンパク質65、Vam6/Vps39様タンパク質、3-オキソ-5-ベータ-ステロイド4-デヒドロゲナーゼ、プロピオニル-CoAカルボキシラーゼベータ鎖(ミトコンドリア)、インターフェロン調節因子2結合タンパク質様、組織アルファ-L-フコシダーゼ、アルド-ケトレダクターゼファミリー1メンバーC2、イノシトール-1,4,5-三リン酸受容体相互作用タンパク質、タンパク質KIAA1199、セレン結合タンパク質1、ホスホリパーゼD3、GTP:AAMPホスホトランスフェラーゼ(ミトコンドリア)、タンパク質Wnt-5a;タンパク質Wnt、アルド-ケトレダクターゼファミリー1メンバーC3、ソーティングネキシン-9、ギャップジャンクションアルファ-1タンパク質、ピルビン酸カルボキシラーゼ(ミトコンドリア)、SH3/PXドメイン含有タンパク質2B、インテグリンアルファ-2、シトクロームP450 1B1、キチナーゼ-3様タンパク質1、ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ、セプラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、アルド

30

40

50

- ケトレダクターゼファミリー 1 メンバー C 1、FERM、RhoGEF およびプレクトストリンドメイン含有タンパク質 1、プロリル 4 - ヒドロキシラーゼサブユニットアルファ - 3、リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼサブユニット M 2 B、コアヒストンマクロ - H 2 A . 2 ; ヒストン H 2 A、コリン輸送体様タンパク質 1 およびニーマン・ピック C 1 タンパク質、リソソームアルファ - グルコシダーゼの 1 種以上の増大した発現を示す、請求項 4 2 ~ 4 7 のいずれかに記載の単離された細胞集団。

【請求項 4 9】

前記細胞は、非分化 MSC と比較して、タイトジャンクションタンパク質 ZO - 2、アルファ - 1 , 3 - マンノシル糖タンパク質 2 - ベータ - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、スムーセリン (smoothelin)、異所性 P 顆粒タンパク質 5 ホモログ、BRCA 1 会合 ATM 活性化因子 1、WD リピート含有タンパク質 3 6、SH 3 ドメイン結合タンパク質 4、EH ドメイン結合タンパク質 1 様タンパク質 1、Ras GTP アーゼ活性化様タンパク質 IQGAP 3、リシルオキシダーゼホモログ 2、トロポミオシン 1 (アルファ)、イソ型 CRA __ f、Gem 会合タンパク質 5、三者モチーフ含有タンパク質 1 6、結合組織増殖因子、リンホカイン活性化キラー T 細胞起源のプロテインキナーゼ、テトラトリコペプチドリピートタンパク質 4、乳ガンの抗エストロゲン剤抵抗性タンパク質 1、リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼサブユニット M 2、ユビキチン結合酵素 E 2 C、好中球デフェンシン 1、Cdc 4 2 エフェクタータンパク質 3、コンデンシン複合体サブユニット 2、I g カップ鎖 C 領域、コンデンシン複合体サブユニット 3、シンコイリン (syncollin)、染色体構造維持タンパク質 2、コンデンシン複合体サブユニット 1、インターアルファ - トリプシン阻害剤重鎖 H 4、チミジル酸シターゼ、セロトランスフェリン、妊娠領域タンパク質、DNA 複製ライセンス化因子 MCM 7、ヘモペキシン、DNA ミスマッチ修復タンパク質 Msh 6、アンキリンリピートドメイン含有タンパク質 1 3 A、ホスデューシン様タンパク質 3、1 - ホスファチジルイノシトール - 4 , 5 - ニリン酸ホスホジエステラーゼベータ - 3、補体 C 3、DNA 複製ライセンス化因子 MCM 3、CD 9 7 抗原、CD 9 7 抗原サブユニットアルファ、DNA 複製ライセンス化因子 MCM 6、DNA 複製ライセンス化因子 MCM 4、Disabled ホモログ 2、タンパク質 KIAA 0 6 6 4、DNA 複製ライセンス化因子 MCM 2、タンパク質 - リシン 6 - オキシダーゼ、リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼサブユニット、メラノーマ関連抗原 D 2、I g ガンマ - 1 鎖 C 領域、ヘパラーゼ、インポーチンサブユニットアルファ - 2、アスパラギンシンターゼ [グルタミン加水分解性]、アルファ - 2 - マクログロブリン、コラーゲンアルファ - 1 (I) 鎖、コラーゲンアルファ - 1 (V) 鎖、Dna J ホモログサブファミリー B メンバー 4、トロンボスポンジン - 1、血清アルブミンおよびコラーゲンアルファ - 2 (I) 鎖の 1 種以上の減少した発現を示す、請求項 4 2 ~ 4 8 のいずれかに記載の単離された細胞集団。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はそのいくつかの実施形態において、神経栄養因子を分泌する間葉系幹細胞から細胞を作製する方法および該細胞を選択する方法に関連する。

【背景技術】

【0002】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は成人における最も一般的な神経変性疾患の 1 つである。筋萎縮性側索硬化症は、筋機能の急速な喪失および結果として起こる完全な麻痺が随伴する脳および脊髄における運動ニューロンの細胞死によって特徴づけられる致死的な進行性神経変性疾患である。

【0003】

現在の実験的 ALS 薬物は、推定される病態生理学的機構に基づいて開発される (例えば、抗グルタミン酸作動性薬剤、タンパク質の誤った折り畳みおよび蓄積を標的とする薬物、抗酸化治療、免疫調節剤および幹細胞など) 。

10

20

30

40

50

【0004】

現在の治験中の治療法の中で、幹細胞移植が最も大きな可能性を有しているかもしれない。失われた運動ニューロンまたは損なわれた運動ニューロンの置換は別にして、幹細胞埋め込み治療が細胞保護の独立した効果によってALS患者のためになるかもしれない。さらに、幹細胞には、神経栄養因子、同様にまた、神経毒性を打ち消す酵素媒介因子およびパラクリン媒介因子を潜在的には産生することができる星状膠細胞およびミクログリアを含めて様々な支持的間質細胞に分化する潜在的能力がある。さらなる実験データは、非ニューロン細胞置換が、運動ニューロンの生存および改善された神経筋機能を促進させることにおける戦略上重要な治療法となり得ることを示している(Cortis他、2010)。

10

【0005】

パーキンソン病および多発性硬化症を含むさらなる神経変性疾患のための細胞置換治療における細胞源としての幹細胞の使用もまた提案されている。

【0006】

神経栄養因子(NTF)は、ニューロンの発達および生存を支持する天然に存在する小さいポリペプチドであり、したがって、この数年で、ALSを含めて種々の神経変性疾患のための治療選択肢のための候補として見なされてきている。ALS動物モデルにおける研究では、疾患の発症および/または進行における遅れが、様々な神経栄養因子を投与した後で示されている。

20

【0007】

しかしながら、ALS患者への組換え増殖因子の全身投与またはクモ膜下投与の臨床研究は、部分的にはそれらの短い半減期、標的部位における低い濃度および副作用の高い発生率のためであるとおそらくは考えられるが、これまで効果的ではなかった。

【0008】

いくつかの研究では、種々の因子にインビトロでさらされた後の間葉系幹細胞(MSC)がそれらの表現型を変化させ、また、ニューロンおよびグリアのマーカーを明らかにすることが示されている[Kopen, G. C., ら, Proc Natl Acad U S A. 96(19):10711-6, 1999; Sanchez-Ramos, ら, Exp Neurol. 164(2):247-56, 2000; Woodbury, D., J Neurosci Res. 61(4):364-70, 2000; Woodbury, D., ら, J Neurosci Res. 69(6):908-17, 2002; Black, I. B., Woodbury, D. Blood Cells Mol Dis. 27(3):632-6, 2001; Kohyama, J., ら, Differentiation. 68(4-5):235-44, 2001; Levy, Y. S. J Mol Neurosci. 21(2):121-32, 2003, Blondheim N. R., Stem Cells & Dev. 15:141-164, 2006]

30

【0009】

国際公開WO2006/134602および同WO2009/144718は、神経栄養因子分泌細胞を間葉系幹細胞から作製するための分化プロトコルを教示する。

40

【0010】

国際公開WO2007/066338は、乏突起膠細胞様細胞を間葉系幹細胞から作製するための分化プロトコルを教示する。

【0011】

国際公開WO2004/046348は、ニューロン様細胞を間葉系幹細胞から作製するための分化プロトコルを教示する。

【0012】

Abbaszadeh他[Iranian Biomedical Journal, 17(2):62~70(2013年4月)]は、培地の1つが、PDGF、ヘレグリン、bFGFおよびトリヨードチロニンを含む、乏突起膠細胞をMSCから作製するための

50

2 工程分化プロトコルを教示する。

【発明の概要】

【0013】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、神経栄養因子（NTF）を分泌する細胞を作製する方法であって、未分化間葉系幹細胞（MSC）の集団を、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、ヘレグリンおよびcAMPを含む分化用培地においてインキュベーションすることを含む方法が提供される。

【0014】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、本明細書中に記載される方法に従って作製される、神経栄養因子を分泌する細胞の単離された集団が提供される。

10

【0015】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、神経栄養因子の投与が有益である疾患の処置をその必要性のある対象において行う方法であって、本明細書中に記載される上記単離された細胞集団の治療有効量を前記対象に投与し、それにより、前記疾患を処置することを含む方法が提供される。

【0016】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、神経栄養因子（NTF）を分泌する細胞をMSCの混合集団から選択する方法であって、

a) 前記混合細胞集団の細胞を、下記のパラメータ：

(i) CD44を所定の閾値よりも少なく発現する細胞、

(ii) CD73を所定の閾値よりも多く発現する細胞

の少なくとも1つについて分析すること、および

(b) 前記パラメータの少なくとも1つについて陽性である細胞を選択し、それにより、神経栄養因子を分泌する前記細胞を選択すること

を含む方法が提供される。

20

【0017】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、活性成分としての本明細書中に記載される上記単離された細胞集団と、医薬的に許容され得るキャリアとを含む医薬組成物が提供される。

【0018】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、MSCからエクスピボ分化されており、かつ、神経栄養因子を分泌する、疾患の処置のために有用な細胞の適格性を調べる方法であって、イソブチリル-C_oAデヒドロゲナーゼ、C-X-Cモチーフケモカイン6、ニューロモジュリン、増殖/分化因子15、ヒアルロナンシンターゼ1、インターロイキン-1ベータ、インターロイキン-8、インヒピンベータA鎖、インスリン受容体基質1、インテグリンアルファ-1、ラッカーゼドメイン含有タンパク質1、ラミニンサブユニットアルファ-4、ルミカン、コラゲナーゼ3、食道正常粘膜特異的遺伝子1タンパク質、プレB細胞白血球転写因子相互作用タンパク質1、プレクトストリン相同様ドメインファミリーAメンバー1、ホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸依存性Rac交換体1タンパク質、プロスタグランジンEシンターゼ、プロスタグランジンG/Hシンターゼ2、Ras関連タンパク質Rab-27B、Rho関連GTP結合タンパク質RhoB、シアル酸O-アセチルエステラーゼ、モノカルボン酸輸送体7、組織因子経路阻害剤2、膜貫通タンパク質65、Vam6/Vps39様タンパク質、3-オキソ-5-ベータ-ステロイド4-デヒドロゲナーゼ、プロピオニル-C_oAカルボキシラーゼベータ鎖（ミトコンドリア）、インターフェロン調節因子2結合タンパク質様、組織アルファ-L-フコシダーゼ、アルド-ケトレダクターゼファミリー1メンバーC2、イノシトール-1,4,5-三リン酸受容体相互作用タンパク質、タンパク質KIAA1199、セレン結合タンパク質1、ホスホリパーゼD3、GTP:AMPホスホトランスフェラーゼ（ミトコンドリア）、タンパク質Wnt-5a；タンパク質Wnt、アルド-ケトレダクターゼファミリー1メンバーC3、ソーティングネキシン-9、ギャップジャンクシ

30

40

50

ヨンアルファ - 1 タンパク質、ピルビン酸カルボキシラーゼ (ミトコンドリア)、SH3 / PXドメイン含有タンパク質2B、インテグリンアルファ - 2、シトクロームP450 1B1、キチナーゼ - 3 様タンパク質1、ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ、セプラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、アルド - ケトレダクターゼファミリー1メンバーC1、FERM、Rhogefおよびプレクトストリンドメイン含有タンパク質1、プロリル4 - ヒドロキシラーゼサブユニットアルファ - 3、リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼサブユニットM2B、コアヒストンマクロ - H2A . 2 ; ヒストンH2A、コリン輸送体様タンパク質1およびニーマン・ピックC1タンパク質、リソソームアルファ - グルコシダーゼからなる群から選択される少なくとも1つのタンパク質の発現について前記細胞を分析することを含み、ただし、非分化MSCと比較して、前記少なくとも1つのタンパク質の発現における増大により、前記細胞が疾患の処置のために有用であることが示される方法が提供される。

10

【0019】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、MSCからエクスピボ分化されており、かつ、神経栄養因子を分泌する、疾患の処置のために有用な細胞の適格性を調べる方法であって、タイトジャンクションタンパク質ZO - 2、アルファ - 1, 3 - マンノシル糖タンパク質2 - ベータ - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、スムーセリン (smoothelin)、異所性P顆粒タンパク質5ホモログ、BRCA1会合ATM活性化因子1、WDリピート含有タンパク質36、SH3ドメイン結合タンパク質4、EHドメイン結合タンパク質1様タンパク質1、RasGTPアーゼ活性化様タンパク質IQGAP3、リシルオキシダーゼホモログ2、トロポミオシン1 (アルファ)、イソ型CRA__f、Gem会合タンパク質5、三者モチーフ含有タンパク質16、結合組織増殖因子、リンホカイン活性化キラーT細胞起源のプロテインキナーゼ、テトラトリコペプチドリピータンパク質4、乳ガンの抗エストロゲン剤抵抗性タンパク質1、リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼサブユニットM2、ユビキチン結合酵素E2C、好中球デフェンシン1、Cdc42エフェクタータンパク質3、コンデンシン複合体サブユニット2、Igカッパ鎖C領域、コンデンシン複合体サブユニット3、シンコイリン (syncollin)、染色体構造維持タンパク質2、コンデンシン複合体サブユニット1、インターアルファ - トリプシン阻害剤重鎖H4、チミジル酸シンターゼ、セロトランスフェリン、妊娠領域タンパク質、DNA複製ライセンス化因子MCM7、ヘモペキシン、DNA mismatches修復タンパク質Msh6、アンキリンリピートドメイン含有タンパク質13A、ホスデューシン様タンパク質3、1 - ホスファチジルイノシトール - 4, 5 - ニリン酸ホスホジエステラーゼベータ - 3、補体C3、DNA複製ライセンス化因子MCM3、CD97抗原、CD97抗原サブユニットアルファ、DNA複製ライセンス化因子MCM6、DNA複製ライセンス化因子MCM4、Disab1edホモログ2、タンパク質KIAA0664、DNA複製ライセンス化因子MCM2、タンパク質 - リシン6 - オキシダーゼ、リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼラージサブユニット、メラノーマ関連抗原D2、Igガンマ - 1鎖C領域、ヘパラーゼ、インボーチンサブユニットアルファ - 2、アスパラギンシンセターゼ [グルタミン加水分解性]、アルファ - 2 - マクログロブリン、コラーゲンアルファ - 1 (I) 鎖、コラーゲンアルファ - 1 (V) 鎖、DnaJホモログサブファミリーBメンバー4、トロンボスポンジン - 1、血清アルブミンおよびコラーゲンアルファ - 2 (I) 鎖からなる群から選択される少なくとも1つのタンパク質の発現について前記細胞を分析することを含み、ただし、非分化細胞と比較して、前記少なくとも1つのタンパク質の発現における低下により、前記細胞が疾患の処置のために有用であることが示される方法が提供される。

20

30

40

【0020】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、神経栄養因子を分泌する単離された細胞集団であって、前記細胞が、フローサイトメトリーによって検出される場合、CD44、CD73、CD90およびCD105の間葉系幹細胞マーカーのそれぞれを発現し、かつ、CD3、CD14、CD19、CD34、CD45およびHLA - DRの表面マ

50

ーカーのいずれをも発現しない単離された細胞集団が提供される。

【0021】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、MSCからエクスピボ分化されており、かつ、神経栄養因子を分泌する、疾患の処置のために有用な細胞の適格性を調べる方法であって、miR-503-5p、miR-3659、miR-3529-3p、miR-320b、miR-424-5p、miR-320a、miR-222-3p、miR-3663-3p、miR-762、miR-4327、miR-3665、miR34a-5p、miR-4327、miRNA-3665およびmiR132-3pからなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAの発現について前記細胞を分析することを含み、ただし、非分化MSCと比較して、前記miR-3663-3p、miR-762、miR-4327、miR-3665、miR34a-5p、miR-4327、miRNA3665またはmiR132-3pの増大した発現、あるいは、非分化MSCと比較して、前記miR-503-5p、miR-3659、miR-3529-3p、miR-320b、miR-424-5p、miR-320aまたはmiR-222-3pの低下した発現により、疾患を処置するために有用である細胞が示される方法が提供される。

10

【0022】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記分化用培地はホスホジエステラーゼ阻害剤を欠いている。

【0023】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記分化用培地はトリヨードチロニンを欠いている。

20

【0024】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記ホスホジエステラーゼ阻害剤はIBMXを含む。

【0025】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記分化用培地は異種由来成分を欠いている。

【0026】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、未分化MSCの上記集団を上記インキュベーションの前に培養することを含み、ただし、前記培養することが、細胞分化を促進させない条件のもとで行われる。

30

【0027】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記培養することが、上記未分化MSCを播種した後の3日間にわたって行われる。

【0028】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記播種することが約6000細胞/cm²~8000細胞/cm²の密度で行われる。

【0029】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記培養することが、血小板溶解物を含む培養培地において行われる。

40

【0030】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記培養培地における上記血小板溶解物の割合が約10%である。

【0031】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記培養培地はさらに、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウムおよびヘパリンを含む。

【0032】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、上記細胞の表面におけるCD44および/またはCD73の発現を分析することを含む。

【0033】

50

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、上記細胞の表面における CD 105 の発現を分析することを含む。

【0034】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、上記発現を未分化 MSC の表面における CD 44 および / または CD 73 の発現と比較することを含む。

【0035】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記細胞は、フローサイトメトリーによって検出される場合、CD 44、CD 73、CD 90 および CD 105 の間葉系幹細胞マーカーのそれぞれを発現する。

【0036】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記細胞は、フローサイトメトリーによって検出される場合、CD 3、CD 14、CD 19、CD 34、CD 45 および HLA - DR の表面マーカーのいずれをも発現しない。

【0037】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記細胞は遺伝子改変されない。

【0038】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記細胞は、上記対象に対して自己である MSC からエキスピボ分化させられる。

【0039】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記細胞は、上記対象に対して同種異系である MSC からエキスピボ分化させられる。

【0040】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記細胞は、上記対象の骨髄に由来する MSC からエキスピボ分化させられる。

【0041】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記疾患は神経変性疾患または免疫疾患である。

【0042】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記神経変性疾患は、パーキンソン病、多系統萎縮症 (MSA)、多発性硬化症、てんかん、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、卒中、自己免疫性脳脊髄炎、糖尿病性神経障害、緑内障性神経障害、アルツハイマー病およびハンチントン病からなる群から選択される。

【0043】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記神経変性疾患は ALS である。

【0044】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記免疫疾患は自己免疫疾患である。

【0045】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記自己免疫疾患は重症筋無力症である。

【0046】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記投与することが筋肉内および / またはクモ膜下腔内に行われる。

【0047】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記投与することが筋肉内に行われるとき、70 kg の対象に投与される細胞の総量が 20×10^6 細胞 ~ 100×10^6 細胞の間である。

【0048】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記投与することがクモ膜下腔内に行われるとき、70 kg の対象に投与される MSC - NTF の総量が 50×10^6 細胞 ~ 200×10^6 細胞の間である。

【0049】

10

20

30

40

50

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記投与することが筋肉内およびクモ膜下腔内に行われるとき、70kgの対象に投与されるMSC-NTFの総量が 20×10^6 細胞 $\sim 500 \times 10^6$ 細胞の間である。

【0050】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、上記細胞におけるCD105のレベルを分析すること、および、CD105を所定のレベルよりも少なく発現する細胞を選択することを含む。

【0051】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記NTFはグリア由来神経栄養因子(GDNF)および脳由来神経栄養因子(BDNF)を含む。

10

【0052】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、未分化MSCの集団を、上記分析することに先立って、NTFを分泌するMSCを生じさせるように分化用培地においてインキュベーションすることを含む。

【0053】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記医薬的に許容され得るキャリアは上記組成物における細胞の数を少なくとも48時間にわたって維持する。

【0054】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記miRNAは、miR-503-5p、miR-320b、miR424-5p、miR-132-3pおよびmiR-34a-5pからなる群から選択される。

20

【0055】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記神経栄養因子は、BDNF、GDNF、VEGFおよびHGFからなる群から選択される。

【0056】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記神経栄養因子は、BDNF、GDNF、VEGFおよびHGFを含む。

【0057】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記細胞は遺伝子改変されない。

【0058】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記細胞は、非分化MSCと比較して、miR34a-5p、miR-222-3p、miR762、miRNA3663-3pまたはmiR132-3pからなる群から選択されるmiRNAの増大した発現を示す。

30

【0059】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記細胞は、非分化MSCと比較して、miR-503-5p、miR-320b、miR-424-5p、miR-320aまたはmiR-222-3pからなる群から選択されるmiRNAの減少した発現を示す。

【0060】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記細胞は、非分化MSCと比較して、イソプチリル-COAデヒドロゲナーゼ、C-X-Cモチーフケモカイン6、ニューロモジュリン、増殖/分化因子15、ヒアルロナンシンターゼ1、インターロイキン-1ベータ、インターロイキン-8、インヒピンベータA鎖、インスリン受容体基質1、インテグリンアルファ-1、ラッカーゼドメイン含有タンパク質1、ラミニンサブユニットアルファ-4、ルミカン、コラゲナーゼ3、食道正常粘膜特異的遺伝子1タンパク質、プレB細胞白血病転写因子相互作用タンパク質1、プレクトストリン相同様ドメインファミリーAメンバー1、ホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸依存性Rac交換体1タンパク質、プロスタグランジンEシンターゼ、プロスタグランジンG/Hシンターゼ2、Ras関連タンパク質Rab-27B、Rho関連GTP結合タンパク質RhoB、シアル酸O-アセチルエステラーゼ、モノカルボン酸輸送体7、組織因子経路阻害剤2、膜貫通タンパク質65、Vam6/Vps39様タンパク質、3-オキソ-5-ベータ-ステロイ

40

50

ド4 - デヒドロゲナーゼ、プロピオニル - C o Aカルボキシラーゼベータ鎖 (ミトコンドリア)、インターフェロン調節因子2結合タンパク質様、組織アルファ - L - フコシダーゼ、アルド - ケトレダクターゼファミリー1メンバーC2、イノシトール - 1, 4, 5 - 三リン酸受容体相互作用タンパク質、タンパク質K I A A 1 1 9 9、セレン結合タンパク質1、ホスホリパーゼD3、G T P : A M Pホスホトランスフェラーゼ (ミトコンドリア)、タンパク質W n t - 5 a ; タンパク質W n t、アルド - ケトレダクターゼファミリー1メンバーC3、ソーティングネキシン - 9、ギャップジャンクションアルファ - 1タンパク質、ピルビン酸カルボキシラーゼ (ミトコンドリア)、S H 3 / P Xドメイン含有タンパク質2 B、インテグリンアルファ - 2、シトクロームP 4 5 0 1 B 1、キチナーゼ - 3様タンパク質1、ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ、セブラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、アルド - ケトレダクターゼファミリー1メンバーC1、F E R M、R h o G E Fおよびプレクトストリンドメイン含有タンパク質1、プロリル4 - ヒドロキシラーゼサブユニットアルファ - 3、リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼサブユニットM 2 B、コアヒストンマクロ - H 2 A . 2 ; ヒストンH 2 A、コリン輸送体様タンパク質1およびニーマン・ピックC 1タンパク質、リソソームアルファ - グルコシダーゼの1種以上の増大した発現を示す。

10

【0061】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記細胞は、非分化M S Cと比較して、タイトジャンクションタンパク質Z O - 2、アルファ - 1, 3 - マンノシル糖タンパク質2 - ベータ - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、スムーセリン (s m o o t h e l i n)、異所性P顆粒タンパク質5ホモログ、B R C A 1会合A T M活性化因子1、W Dリピート含有タンパク質36、S H 3ドメイン結合タンパク質4、E Hドメイン結合タンパク質1様タンパク質1、R a s G T Pアーゼ活性化様タンパク質I Q G A P 3、リシルオキシダーゼホモログ2、トロポミオシン1 (アルファ)、イソ型C R A __ f、G e m会合タンパク質5、三者モチーフ含有タンパク質16、結合組織増殖因子、リンホカイン活性化キラーT細胞起源のプロテインキナーゼ、テトラトリコペプチドリピータンパク質4、乳ガンの抗エストロゲン剤抵抗性タンパク質1、リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼサブユニットM 2、ユビキチン結合酵素E 2 C、好中球デフェンシン1、C d c 4 2エフェクタータンパク質3、コンデンシン複合体サブユニット2、I gカップ鎖C領域、コンデンシン複合体サブユニット3、シンコイリン (s y n c o i l i n)、染色体構造維持タンパク質2、コンデンシン複合体サブユニット1、インターアルファ - トリプシン阻害剤重鎖H 4、チミジル酸シターゼ、セロトランスフェリン、妊娠領域タンパク質、D N A複製ライセンス化因子M C M 7、ヘモペキシン、D N Aミスマッチ修復タンパク質M s h 6、アンキリンリピートドメイン含有タンパク質13 A、ホスデューシン様タンパク質3、1 - ホスファチジルイノシトール - 4, 5 - ニリン酸ホスホジエステラーゼベータ - 3、補体C 3、D N A複製ライセンス化因子M C M 3、C D 9 7抗原、C D 9 7抗原サブユニットアルファ、D N A複製ライセンス化因子M C M 6、D N A複製ライセンス化因子M C M 4、D i s a b l e dホモログ2、タンパク質K I A A 0 6 6 4、D N A複製ライセンス化因子M C M 2、タンパク質 - リシン6 - オキシダーゼ、リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼラージサブユニット、メラノーマ関連抗原D 2、I gガンマ - 1鎖C領域、ヘパラーゼ、インポーチンサブユニットアルファ - 2、アスパラギンシンターゼ [グルタミン加水分解性]、アルファ - 2 - マクログロブリン、コラーゲンアルファ - 1 (I) 鎖、コラーゲンアルファ - 1 (V) 鎖、D n a JホモログサブファミリーBメンバー4、トロポスポンジン - 1、血清アルブミンおよびコラーゲンアルファ - 2 (I) 鎖の1種以上の減少した発現を示す。

20

30

40

【0062】

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術的用語および/または科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載される方法および材料と類似または同等である方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、例示的な方法および/または材

50

料が下記に記載される。矛盾する場合には、定義を含めて、本特許明細書が優先する。加えて、材料、方法および実施例は例示にすぎず、限定であることは意図されない。

【図面の簡単な説明】

【0063】

本明細書では本発明のいくつかの実施形態を単に例示し添付の図面を参照して説明する。特に詳細に図面を参照して、示されている詳細が例示として本発明の実施形態を例示考察することだけを目的としていることを強調するものである。この点について、図面について行う説明によって、本発明の実施形態を実施する方法は当業者には明らかになるであろう。

【0064】

【図1A - 1B】図1A - 1Bは、トリパンプルー排除色素を使用して生細胞計数によって測定されるような、この場合における2つの投与経路のために好適な濃度における最終生成物の安定性を例示するグラフである。ALS患者のMSC - NTF最終生成物の安定性を2つの細胞濃度で、すなわち、筋肉内(IM)移植経路のための 10×10^6 細胞/ml (A)およびクモ膜下腔内(IT)移植のための 35×10^6 細胞/ml (B)において採取後7時間まで2 ~ 8 で評価した。細胞を50mlのチューブにおいて5時間インキュベーションし、その後、さらに2時間にわたって1mlおよび5mlのシリンジにそれぞれ移した。

10

【0065】

【図2】図2は、長期間の増殖の後におけるALS患者由来のMSCの細胞数を例示するグラフである。7名のALS患者の骨髄由来MSCの増殖が、60日までの間、5回~7回の継代にわたって示される。細胞数を継代毎に求め、累積集団倍加(PD)を計算した。 $PD = \log_{10}(\text{継代終了時採取の細胞数}) - \log_{10}(\text{継代開始時の播種細胞数}) / \log_2$ 。PDの合計数がすべての継代についてのPDの増加分に対応した。最初のPDを1回目の継代(P1)の後の細胞数に関して求めた。

20

【0066】

【図3A - 3I】図3A - 3Iは、脂肪細胞(図3A~図3C)、骨細胞(図3D~図3F)および軟骨細胞(図3G~図3I)に分化するように誘導された、2回目の継代における3名のドナー(#60、#61および#62)のMSCの写真である。

【0067】

【図4A - 4B】図4A - 4Bは、Gバンド形成技術によって行われるような染色体分析の結果の写真である。ALS患者の培養されたMSCを初期の継代(P2)(A)および後期の継代(P5)(B)において採取した。細胞は正常な核型を両方の継代において示した。

30

【0068】

【図5A - 5F】図5A - 5Fは、脂肪細胞、骨細胞および軟骨細胞に分化するように誘導された、3回目の継代における同じALS患者のMSCの凍結保存前の写真(図5A~図5C)および凍結保存後の写真(図5D~図5F)である。

【0069】

【図6A - 6B】図6A - 6Bは、MSC - NTF細胞のGDNFおよびBDNFの産生性を例示するグラフである。12名のALS患者のMSC - NTF細胞の産生性(赤色)を、同じELISAアッセイで分析される同じ患者のMSCの産生性(青色)と比較した。GDNFの分泌が、同じ患者のMSCと比較してMSC - NTFにおいて2倍~20倍またはそれ以上誘導され、BDNFの分泌が、同じ患者のMSCと比較してMSC - NTFにおいて1.5倍~5倍誘導される。

40

【0070】

【図7】図7は、23名の異なるALS患者のMSC細胞およびMSC - NTF細胞のBDNF産生性を例示するグラフである。

【0071】

【図8】図8は、23名の異なるALS患者のMSC細胞およびMSC - NTF細胞のG

50

D N F 産生性を例示するグラフである。

【0072】

【図9】図9は、MSC - NTF細胞のVEGF産生性を例示するグラフである。22名のALS患者のMSC - NTF細胞の産生性（赤色）を、同じELISAアッセイで分析される同じ患者のMSCの産生性（青色）と比較した。VEGFの分泌が、同じ患者のMSCと比較してMSC - NTFにおいて 4.1 ± 1.4 倍またはそれ以上誘導される。

【0073】

【図10】図10は、MSC - NTF細胞のHGF産生性を例示するグラフである。19名のALS患者のMSC - NTF細胞の産生性（赤色）を、同じELISAアッセイで分析される同じ患者のMSCの産生性（青色）と比較した。HGFの分泌が、同じ患者のMSCと比較してMSC - NTFにおいて 6.7 ± 3.9 倍またはそれ以上誘導される。

10

【0074】

【図11A - 11B】図11A - 11Bは、採取時（時間‘0’）、および、‘生体内’環境を模倣する成長培地‘移植’における培養の3日後におけるMSC - NTF細胞によるGDNFおよびBDNFの産生を例示するグラフである。結果は、ALS患者のMSC - NTF細胞を用いる4つの独立した実験の平均 \pm SDを示す。

【0075】

【図12A - 12B】図12A - 12Bは、分化終了時におけるALS患者MSC - NTFの表面マーカー発現の表現型特徴づけの、同じ患者のMSCと比較したときの結果である。フローサイトメトリーによって分析されるMSC特徴的な表面マーカーのパネルには、CD44、CD73、CD90およびCD105の陽性マーカー（A）と、CD3、CD14、CD19、CD34、CD45およびHLA - DRの陰性マーカー（B）とが含まれた。MSC細胞およびMSC - NTF細胞が赤色であり、イソ型対照が黒色である（ALS患者の頭文字、ZH）。

20

【0076】

【図13A - 13B】図13A - 13Bは、分化終了時における同じ患者のMSC細胞（黒色）およびMSC - NTF細胞（赤色）の表面におけるCD44発現およびCD73発現のフローサイトメトリー分析を例示するヒストグラムである。左側の点線がイソ型対照である。

【0077】

【図14A - 14B】図14A - 14Bは、分化期間中のMSC細胞およびMSC - NTF細胞のCD105発現のフローサイトメトリー分析を例示するグラフである。分化の2日目および3日目における同じ患者のMSC細胞（黒色）およびMSC - NTF細胞（赤色）の表面におけるCD105発現のフローサイトメトリー分析（それぞれ $n = 16$ および 22 ）。左側の点線がイソ型対照である。

30

【0078】

【図15A - 15B】図15A - 15Bは、MSC細胞およびMSC - NTF分泌細胞の細胞周期分析を例示するヒストグラムである。細胞周期の G_0 / G_1 期、S期および G_2 / M 期における細胞の分布が示される。 G_0 / G_1 への変化がMSC - NTF細胞集団において明らかである。

40

【0079】

【図16A - 16B】図16A - 16Bは、2つの細胞タイプを、示される細胞タイプおよびドナーIDとともに、160個すべての検出されたmiRNAに基づいて比較する。A、ドナーIDを含めて、8個の異なる細胞サンプルのmiRNAプロファイルを3次元PCA投影図で表すものである；B、ドナーIDを含めて、8個の異なる細胞サンプルのmiRNAプロファイルを階層的クラスタ化後のヒートマップ・クラスタグラムプロットとして表すものである。

【0080】

【図17】図17は、MSCに対してMSC - NTFにおいてアップレギュレーションされる19個の主要なmiRNAの、 \log_2 の目盛りでの発現プロファイルである。強い誘

50

導 / 非常に大きいアップレギュレーションをMSC - NTFにおいて受けるmiRNAが赤色の楕円により強調される。miRNAの発現がアレイについての検出レベルに達しなかったときには、名目上の強度値がこれらのデータ点に対して与えられる。この値が、その後のデータ分析のときの計算不能な数学的操作から生じるエラーを回避するために挿入される。正規化プロセスから、これはその後、これらのmiRNAについては1.1375の正規化された強度値をもたらす。

【0081】

【図18】図18は、MSCに対してMSC - NTFにおいてダウンレギュレーションされる22個の主要なmiRNAの、log2の目盛りでの発現プロファイルである。非常に大きいダウンレギュレーションをMSC - NTFにおいて受けるmiRNAが赤色の楕円により強調される。miRNAの発現がアレイについての検出レベルに達しなかったときには、名目上の強度値がこれらのデータ点に対して与えられる。この値が、その後のデータ分析のときの計算不能な数学的操作から生じるエラーを回避するために挿入される。正規化プロセスから、これはその後、これらのmiRNAについては1.1375の正規化された強度値をもたらす。

10

【0082】

【図19】図19は、miR - 503の発現がMSCに対してMSC - NTFにおいてダウンレギュレーションされることを例示する棒グラフである。

【0083】

【図20】図20は、miR132 - 3pの発現がMSCに対してMSC - NTFにおいてアップレギュレーションされることを例示する棒グラフである。

20

【0084】

【図21】図21は、これらの細胞の予測された強化されている血管形成促進能をもたらすMSC - NTFにおける示差的に発現されたmiRNAのプロファイルをまとめるスキームである。

【0085】

【図22A - 22B】図22A - 22Bは、miR - 762 (A) およびmiR - 34a - 5p (B) の発現がMSCに対してMSC - NTFにおいてアップレギュレーションされることを例示する。miRNAの発現がアレイについての検出レベルに達しなかったときには、名目上の強度値がこれらのデータ点に対して与えられる。この値が、その後のデータ分析のときの計算不能な数学的操作から生じるエラーを回避するために挿入される。正規化プロセスから、これはその後、線形目盛りでこれらのmiRNAについては2.2の正規化された強度値をもたらす。

30

【0086】

【図23A - 23C】図23A - 23Cは、MSCに対してMSC - NTFにおいてDEであった、確認されたmRNA標的を何ら有しない非常に識別的なmiRNAの発現プロファイルを例示する。miRNAの発現がアレイについての検出レベルに達しなかったときには、名目上の強度値がこれらのデータ点に対して与えられる。この値が、その後のデータ分析のときの計算不能な数学的操作から生じるエラーを回避するために挿入される。正規化プロセスから、これはその後、線形目盛りでこれらのmiRNAについては2.2の正規化された強度値をもたらす。

40

【図23D - 23E】図23D - 23Eは、MSCに対してMSC - NTFにおいてDEであった、確認されたmRNA標的を何ら有しない非常に識別的なmiRNAの発現プロファイルを例示する。miRNAの発現がアレイについての検出レベルに達しなかったときには、名目上の強度値がこれらのデータ点に対して与えられる。この値が、その後のデータ分析のときの計算不能な数学的操作から生じるエラーを回避するために挿入される。正規化プロセスから、これはその後、線形目盛りでこれらのmiRNAについては2.2の正規化された強度値をもたらす。

【0087】

【図24A - 24B】図24A - 24Bは、特定のmiRNAの発現をMSCサンプルお

50

よびMSC-NTFサンプルにおいて比較する棒グラフである。図24Aは、hsa-miR-503が、MSCと比較して、MSC-NTFにおいてダウンレギュレーションされることを例示する。図24Bは、hsa-miR-320bが、MSCと比較して、MSC-NTFにおいてダウンレギュレーションされることを例示する。

【図24C-24D】図24C-24Dは、特定のmiRNAの発現をMSCサンプルおよびMSC-NTFサンプルにおいて比較する棒グラフである。図24Cは、hsa-miR-424-5pが、MSCと比較して、MSC-NTFにおいてダウンレギュレーションされることを例示する。図24Dは、hsa-miR-34a-5pが、MSCと比較して、MSC-NTFにおいてアップレギュレーションされることを例示する。

【図24E-24F】図24E-24Fは、特定のmiRNAの発現をMSCサンプルおよびMSC-NTFサンプルにおいて比較する棒グラフである。図24Eは、hsa-miR-132-3pが、MSCと比較して、MSC-NTFにおいてアップレギュレーションされることを例示する。図24Fは、hsa-miR-320aが、MSCと比較して、MSC-NTFにおいて有意にダウンレギュレーションされないことを例示する。

【図24G】図24Gは、特定のmiRNAの発現をMSCサンプルおよびMSC-NTFサンプルにおいて比較する棒グラフである。図24Gは、miR-222-3pが、MSCと比較して、MSC-NTFにおいて有意にダウンレギュレーションされないことを例示する。

【0088】

【図25】図25は、ALS機能評価スコア(ALSFRS-R)に対するMSC-NTFのIT投与の影響を例示するグラフである。

【0089】

【図26】図26は、努力肺活量(FVC)に対するMSC-NTFのIT投与の影響を例示するグラフである。

【0090】

【図27】図27は、平均筋肉周囲に対するMSC-NTFのIT投与の影響を例示するグラフである。

【0091】

【図28A-28C】図28A-28Cは、3つのALS患者サンプルに対して2工程または1工程の分化プロトコルを使用して得られる収量を比較する棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0092】

本発明はそのいくつかの実施形態において、神経栄養因子を分泌する間葉系幹細胞から細胞を作製する方法および該細胞を選択する方法に関連する。

【0093】

本発明の少なくとも1つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、その適用において、下記の説明に示される細部、または、実施例によって例示される細部に限定されないことを理解しなければならない。本発明は他の実施形態が可能であり、あるいは、様々な方法で実施、または、実行される。

【0094】

神経栄養因子(NTF)は、ニューロン細胞の生存、機能的維持および表現型発達を調節する分泌タンパク質である。NTFレベルにおける変化が、プログラム化された細胞死をニューロンにおいて誘発することに関与しており、したがって、パーキンソン病および他の神経変性疾患の病理発生の一因である。

【0095】

しかしながら、神経栄養因子をそのまま使用することは、神経栄養因子が全身注入後において血液脳関門を通り抜けず、また、適正に分布しないので適用することができない。したがって、他の方策が、それらの治療特性をうまく利用するために開発されなければならない。

【0096】

10

20

30

40

50

ヒト間葉系幹細胞を神経栄養因子分泌細胞に分化させるための様々なプロトコルがこの技術分野では知られている。例えば、国際公開WO 2006/134602および同WO 2009/144718を参照のこと。

【0097】

本発明者らは、間葉系幹細胞(MSC)からの神経栄養因子の分泌を高める新しい方法を開発している。この方法は、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、ヘレグリンおよびcAMPを含むただ1つの培地において未分化MSCを直接に分化させることを初めて含む。グリア由来増殖因子(GDNF)および脳由来神経栄養因子(BDNF)の分泌レベルが分化プロセスの後で一貫してアップレギュレーションされることが示され、この場合、図5A~図5Bに例示されるように、対応する非分化細胞集団と比較して、GDNFが20倍もの多くアップレギュレーションされ、BDNFが3倍もの多くアップレギュレーションされた。

10

【0098】

本発明者らは、これらの特異な細胞を、図7A~図7Bに例示されるように表面マーカーの発現によって特徴づけている。

【0099】

従って、本発明の1つの局面によれば、NTFを分泌する細胞を作製する方法であって、未分化MSCの集団を、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、ヘレグリンおよびcAMPを含む分化用培地においてインキュベーションすることを含む方法が提供される。

20

【0100】

用語「間葉系幹細胞」または用語「MSC」は、幹細胞である細胞を生じさせるために分裂することができるか、または、間葉系(軟骨細胞、骨細胞および脂肪細胞)の細胞系譜の細胞を生じさせるために不可逆的に分化する最終分化していない成体細胞について交換可能に使用される。本発明の間葉系幹細胞は少なくともいくつかの実施形態では、同系起源または同種起源のものである場合がある。

【0101】

MSCの集団は典型的には、特定のマーカーをそれらの細胞表面に発現する。特定の実施形態によれば、未分化MSCは、フローサイトメトリーによって求められるように、CD105、CD73およびCD90を細胞表面に発現し(例えば、95%を超えて陽性であり)、かつ、CD3、CD14、CD19、CD34、CD45およびHLA-DRの発現を欠いている(例えば、2%未満の陽性である)。

30

【0102】

間葉系幹細胞の存在を確認するために使用され得る例示的な抗体には、CD44 FITCコンジュゲート化体(BD Biosciences)、CD73 PEコンジュゲート化体(BD Pharmingen)、CD73 PEコンジュゲート化体(BD Biosciences)、CD90 PE-Cy5コンジュゲート化体(eBioscience)、CD90 PEコンジュゲート化体(BD Biosciences)、CD105 PEコンジュゲート化体(Beckman Coulter)、CD3 PerCPコンジュゲート化体(BD Biosciences)、CD14 FITCコンジュゲート化体(eBioscience)、CD14 FITCコンジュゲート化体(BD Biosciences)、CD19 PE-Cy5コンジュゲート化体(eBioscience)、CD19 FITCコンジュゲート化体(BD Biosciences)、CD34 FITCコンジュゲート化体(BD Biosciences、Beckman Coulter)、CD45 PEコンジュゲート化体(eBioscience)、CD45 PerCPコンジュゲート化体(BD Biosciences)、および、HLA-DR PE-Cy5コンジュゲート化体(BD Pharmingen)が含まれる。HLA-DR PerCPコンジュゲート化体(BD Biosciences)。

40

【0103】

50

間葉系幹細胞の存在を確認するための別の方法が、当該細胞が多系統（例えば、脂肪細胞、骨細胞および軟骨細胞など）に分化することができることを示すことによってである。これは、例えば、Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R&D Systems) を使用して行われる場合がある。

【0104】

本発明のこの局面の好ましい実施形態によれば、間葉系幹細胞は、本明細書中に記載される細胞および細胞集団を作製するために遺伝子操作されない（すなわち、発現構築物により形質転換されない）。

【0105】

本発明の細胞は少なくともいくつかの実施形態では、どのような幹細胞に由来してもよく、だが、好ましくは胚性幹（ES）細胞に由来しないことが理解されるであろう。

【0106】

間葉系幹細胞が、骨髄、末梢血、血液、胎盤および脂肪組織（これらに限定されない）を含めて様々な組織から単離される場合がある。間葉系幹細胞を末梢血から単離する方法が、Kassiss 他 [Bone Marrow Transplant、2006年5月、37(10):967~76] によって記載されている。間葉系幹細胞を胎盤組織から単離する方法が、Brooke G 他 [Br J Haematol、2009年2月、144(4):571~9] によって記載されている。

【0107】

脂肪組織、胎盤および臍帯血の間葉系幹細胞を単離し、培養する様々な方法が、Kern 他 [Stem Cells、2006; 24:1294~1301] によって記載されている。

【0108】

本発明のこの局面の好ましい実施形態によれば、間葉系幹細胞はヒト由来である。

【0109】

骨髄を吸引によって個体の腸骨稜または胸骨から単離することができる。低密度のBM単核細胞（BMMNC）がFICOLL-PAQUE密度勾配遠心分離によって分離される場合がある。間葉系幹細胞を得るために、当該間葉系幹細胞（例えば、BMMNC）を含む細胞集団が、当該細胞を血小板溶解物の存在下で維持および/または拡大培養することができる増殖用培地において培養される場合がある。1つの実施形態によれば、集団が（例えば、フラスコにおいて）プラスチック表面に置床され、間葉系幹細胞が、非接着性細胞を除くことによって単離される。代替では、間葉系幹細胞が、間葉系幹細胞のマーカーを使用してFACSによって単離される場合がある。

【0110】

単離後、細胞は典型的には、単離された細胞を血小板溶解物の存在下においてエクスピボで維持および/または拡大培養することができる増殖培地における培養によって拡大培養される。増殖培地は、DMEM、アルファ-MEMまたはDMEM/F12である場合がある。典型的には、培地におけるグルコース濃度が約0.5グラム/リットル~3グラム/リットルである。

【0111】

培養することが、間葉系幹細胞を培養するために好適であるプラスチック皿およびバイオリアクターを含めて、どのような表面であれ、好適な表面において行われる場合がある。

【0112】

血小板溶解物が、どのような方法であれ、この技術分野で知られている方法を使用して調製される場合がある。多血小板血漿（PRP）が、感染性病原体（すなわち、HIV、HTLV、HCV、HBsAg）が存在しないことが決定された血液バンク献血物から得られる場合がある。PRP含有バッグが-80で貯蔵され、37の水浴で解凍される場合がある。解凍後、多血小板血漿は典型的には、血小板の粒子および膜を除くために遠

10

20

30

40

50

心分離される。その後、血小板溶解物上清が集められ、使用まで - 80 で凍結される場合がある。血小板溶解物は、エンドトキシン、ヘモグロビン、pH、総タンパク質、アルブミン、重量オスモル濃度、無菌性およびマイコプラズマについて試験される。

【0113】

増殖培地は、例えば、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウムおよびヘパリンを含めて、さらなる成分を含む場合がある。

【0114】

好ましくは、間葉系幹細胞がヒト由来であるとき、血小板溶解物もまたヒトの細胞から得られることが理解されるであろう。

【0115】

1つの実施形態によれば、増殖/成長培地は異種混入物を欠いており、すなわち、動物由来成分、例えば、血清、動物由来の増殖因子およびアルブミンなどを含まない。したがって、この実施形態によれば、培養することが異種混入物の非存在下で行われる。

【0116】

間葉系幹細胞の単離および増殖のための例示的なプロトコルが本明細書中下記の実施例の節において示される。

【0117】

述べられるように、間葉系幹細胞を血小板溶解物含有培地で増殖させ、かつ、十分な数の未分化細胞が得られた後で、細胞は、疾患を処置するために有用である細胞を作製するために分化用培地において分化させられる場合がある。

【0118】

特定の実施形態によれば、細胞が、分化培地の添加に先立って1日間、2日間、3日間、4日間または5日間、(例えば、約6000細胞/cm² ~ 8000細胞/cm²の密度で)新鮮な増殖/成長培地に再播種される。

【0119】

表現「未分化MSC」は、分化を誘導する培地で培養されたことがないMSCを示す。したがって、本発明の少なくともいくつかの実施形態によれば、増殖後、MSCは、介在する分化前の工程を何ら伴うことなく、分化培地と直接に接触させられる。

【0120】

分化のために、本発明の未分化MSCは少なくともいくつかの実施形態では、線維芽細胞増殖因子(FGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、ヘレグリンおよびc-AMPを含む培地においてインキュベーションされる。この実施形態によれば、線維芽細胞増殖因子(FGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、ヘレグリンおよびc-AMPのそれぞれがただ1つの培地において混合され、培養することがただ1つの工程で行われる。

【0121】

1つの実施形態によれば、本発明の未分化MSCは、この工程の前および拡大培養工程の後において上皮増殖因子(EGF)および/またはN2補充物の存在下で事前にインキュベーションされない。

【0122】

本発明の様々な実施形態の分化培地のために意図されるbFGFの例示的な濃度が、必要に応じて5ng/ml ~ 50ng/mlの間であり、必要に応じて10ng/ml ~ 40ng/mlの間であり、必要に応じて10ng/ml ~ 25ng/mlの間である。

【0123】

本発明の様々な実施形態の分化培地のために意図されるPDGF-AAの例示的な濃度が、必要に応じて1ng/ml ~ 30ng/mlの間であり、必要に応じて1ng/ml ~ 20ng/mlの間であり、必要に応じて1ng/ml ~ 10ng/mlの間であり、必要に応じて2.5ng/ml ~ 10ng/mlの間である。

【0124】

本発明の様々な実施形態の分化培地のために意図されるヘレグリン 1の例示的な濃度が、必要に応じて5ng/ml ~ 100ng/mlの間であり、10ng/ml ~ 90n

10

20

30

40

50

g / m l、必要に応じて 25 ng / m l ~ 75 ng / m l の間であり、必要に応じて 40 ng / m l ~ 60 ng / m l の間である。

【0125】

本発明の様々な実施形態の分化培地のために意図される d b c - A M P の例示的な濃度が、必要に応じて 0.5 m M ~ 10 m M の間であり、必要に応じて 0.5 m M ~ 5 m M の間であり、必要に応じて 0.5 m M ~ 2.5 m M の間である。

【0126】

1つの実施形態によれば、本発明のこの局面の分化用培地はホスホジエステラーゼ阻害剤（例えば、I B M X）を欠いており、すなわち、培養することがホスホジエステラーゼ阻害剤の非存在下で行われる。

【0127】

別の実施形態によれば、本発明のこの局面の分化用培地はトリヨードチロニンを欠いており、すなわち、培養することがトリヨードチロニンの非存在下で行われる。

【0128】

必要に応じて、これらの実施形態および下位実施形態のいずれかが組み合わせられる場合があり、その結果、例えば、分化用培地が必要に応じて、ホスホジエステラーゼ阻害剤およびトリヨードチロニンの両方を欠いている場合がある。

【0129】

好ましくは、M S C は、少なくとも1日間、少なくとも2日間または少なくとも3日間、上記の分化用培地において分化させられる。好ましくは、分化工程は5日間を超えて行われぬ。

【0130】

本発明のこの局面に従って使用される分化用培地は好ましくは異種非含有であり（血清を欠いており）、かつ、どのような抗生物質をも欠いており、すなわち、培養することが異種混入物の非存在下で行われる。

【0131】

1つの実施形態によれば、細胞が、本明細書中下記に記載される処置方式において使用されるために十分である産業的量で製造される。

【0132】

したがって、例えば、1名のドナーからではあるが、少なくとも 20×10^6 個の細胞が製造され、より好ましくは少なくとも 50×10^6 個の細胞が製造され、より好ましくは少なくとも 110×10^6 個の細胞が製造され、より好ましくは少なくとも 200×10^6 個の細胞が製造され、より好ましくは少なくとも 330×10^6 個の細胞が製造され、より好ましくは少なくとも 500×10^6 個の細胞が製造され、より好ましくは少なくとも 20×10^6 個の細胞が製造され、より好ましくは少なくとも 600×10^6 個の細胞が製造され、より好ましくは少なくとも 700×10^6 個の細胞が製造され、より好ましくは少なくとも 800×10^6 個の細胞が製造され、より好ましくは少なくとも 900×10^6 個の細胞が製造され、より好ましくは少なくとも 100×10^7 個の細胞が製造されることが想定される。

【0133】

本発明ではさらに、分化した幹細胞をバンクにおいて貯蔵することが想定される。

【0134】

分化した幹細胞の各アリコートが特定のドナーに対応する場合がある。代替では、2名以上のドナーから得られる分化した幹細胞がプールされ、ただ1つのアリコートで貯蔵される場合がある。バンクはまた、M S C 集団を拡大培養するために、および/または、M S C 集団を分化させるために使用されるヒトフィーダー細胞および/または血小板溶解物の1つまたは複数のサンプルを含有する場合がある。

【0135】

M S C 集団は、幹細胞を生存したままで、かつ、機能を有したままで保つために（典型的には凍結によって）適切な条件のもとで貯蔵される。1つの実施形態によれば、M S C

10

20

30

40

50

集団は、凍結保存された集団として貯蔵される。他の保存方法が、米国特許第5656498号、同第5004681号、同第5192553号、同第5955257号および同第6461645号に記載されている。幹細胞のバンクを作製するための方法が、例えば、米国特許出願公開第2003/0215942号に記載されている。

【0136】

1つの実施形態によれば、バンクに貯蔵される細胞集団は、少なくとも1つの所定の特徴に従って特徴づけられ、例えば、分泌される神経栄養因子の量に従って特徴づけられる。さらなる所定の特徴には、例えば、形態学的特徴、分化プロファイル、血液型、主要組織適合遺伝子複合体、ドナーの疾患状態、あるいは、疾患に伴うか、または疾患に伴わない遺伝子型情報（例えば、遺伝子あるいはゲノムDNAまたはミトコンドリアDNAに関連する特異的な核酸配列の単一ヌクレオチド多型、すなわち、「SNP」）が含まれる。

10

【0137】

カタログ作成は、それぞれの細胞集団について得られる特徴の集中記録、例えば、集められた文書記録、または、情報が入力されているコンピューターデータベース（これらに限定されない）などを新たに作ることの一部となる場合がある。幹細胞バンクは、研究者または臨床医の要求のために好適である特定の間葉系幹細胞サンプルを複数のサンプルから選択することを容易にする。

【0138】

1つの実施形態によれば、本明細書中に記載される間葉系幹細胞バンクは幹細胞データベースコンピューターユニットによって維持される。それぞれのコンピューターユニットが、情報を処理するためにそれぞれ、少なくとも1つの処理モジュールを含む。コンピューターユニットは、通信するようにディスプレイに接続される場合がある。間葉系幹細胞集団に関する情報がデータベースコンピューターに記憶される場合があり、この場合、情報はネットワーク接続を介して使用者に伝えられる。そのようなシステムは、間葉系幹細胞集団を評価して、どれが進行中の研究および使用のために好適であるかを決定することができることを顧客に提供し、また、幹細胞を購入するという取引および適正な輸送を容易にするために役立つ場合もある。

20

【0139】

当業者によって理解されるであろうように、本発明の様々な実施形態が、処理モジュール、および/または、少なくとも1つのプログラムコードモジュールを含むコンピュータープログラム製造物を含むデバイスまたはシステムとして具体化される場合がある。したがって、本発明は、完全にハードウェアの実施形態の形態、または、ソフトウェア側面およびハードウェア側面を組み合わせる実施形態の形態を取る場合がある。さらに、本発明は、コンピューター使用可能なプログラムコード手段が当該媒体において具体化されているコンピューター使用可能な記憶媒体におけるコンピュータープログラム製造物を含む場合がある。好適なコンピューター読み取り可能な媒体はどれも利用される場合があり、これには、ハードディスク、CD-ROM、DVD、光学的記憶デバイスまたは磁気記憶デバイスが含まれる。

30

【0140】

述べられるように、この方法の様々な実施形態に従って作製される細胞はいくつかの神経栄養因子を分泌する。

40

【0141】

本明細書中で使用される場合、表現「神経栄養因子」は、ニューロンに対する成長、分化、機能的維持および/または生存の影響を含む中枢神経系に作用する細胞因子を示す。神経栄養因子の例には、下記のものが含まれるが、それらに限定されない：グリア由来神経栄養因子（GDNF）、GenBank受入番号L19063、同L15306；脳由来神経栄養因子（BDNF）、GenBank受入番号CAA62632；ニューロトロフィン-3（NT-3）；ニューロトロフィン-4/5；ニューロトロフィン（NTN）、GenBank受入番号NP_004549；ニューロトロフィン-4、GenBank受入番号M86528；パーセフィン、GenBank受入番号AAC39640；脳由来

50

神経栄養因子 (BDNF)、GenBank 受入番号 CAA42761; アルテミン (ART)、GenBank 受入番号 AAD13110; 毛様体神経栄養因子 (CNTF)、GenBank 受入番号 NP__000605; およびニューラスチン (Neublastin)、GenBank 受入番号 AAD21075。

【0142】

別の実施形態によれば、本発明の様々な実施形態に従って作製される細胞は肝細胞増殖因子 (HGF; GenBank 受入番号 D90334.2) を分泌する。1つの実施形態によれば、当該細胞は、非分化 MSC の少なくとも 2 倍量の、少なくとも 3 倍量の、少なくとも 4 倍量の、少なくとも 5 倍量の、または、それどころか、少なくとも 6 倍量の HGF を分泌する。対照の非分化 MSC は好ましくは、神経栄養因子を分泌する細胞を作製するために使用される供給源と同じ供給源 (例えば、同じドナー、同じ器官) から得られる。

10

【0143】

別の実施形態によれば、本発明の様々な実施形態に従って作製される細胞は血管内皮増殖因子 (VEGF) を分泌する。1つの実施形態によれば、当該細胞は、非分化 MSC の少なくとも 2 倍量の、少なくとも 3 倍量の、少なくとも 4 倍量の、少なくとも 5 倍量の、または、それどころか、少なくとも 6 倍量の VEGF を分泌する。対照の非分化 MSC は好ましくは、神経栄養因子を分泌する細胞を作製するために使用される供給源と同じ供給源 (例えば、同じドナー、同じ器官) から得られる。

【0144】

別の実施形態によれば、本発明の様々な実施形態に従って作製される細胞は腫瘍壊死因子誘導遺伝子 6 タンパク質 (TSG-6; GenBank 受入番号 AJ421518.1、Gene ID: 7130) を分泌しない。

20

【0145】

別の実施形態によれば、本発明の様々な実施形態に従って作製される細胞は神経成長因子 (NGF; GenBank 受入番号 M57399.1) を分泌しない。

【0146】

別の実施形態によれば、本発明の様々な実施形態に従って作製される細胞はインスリン様増殖因子 - I (IGF-I; GenBank 受入番号 NP__000609) を分泌しない。

30

【0147】

1つの実施形態によれば、本発明の分化細胞の集団の少なくとも、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% またはそれ以上が GDNF を分泌する。

【0148】

好ましくは、本発明の細胞によって分泌される GDNF の量が、分化を伴わない間葉系幹細胞の同じ集団の分泌の少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍増大する。

【0149】

GDNF の典型的な濃度が約 $200 \text{ pg} / 10^6 \text{ 細胞}$ ~ $2000 \text{ pg} / 10^6 \text{ 細胞}$ である。

40

【0150】

1つの実施形態によれば、本発明の分化細胞の集団の少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% またはそれ以上が BDNF を分泌する。

【0151】

好ましくは、本発明の細胞によって分泌される BDNF の量が、分化を伴わない間葉系幹細胞の同じ集団の分泌の少なくとも 1.5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 2.5 倍、少なくとも 3 倍増大する。

【0152】

BDNF の典型的な濃度が約 $500 \text{ pg} / 10^6 \text{ 細胞}$ ~ $5000 \text{ pg} / 10^6 \text{ 細胞}$ であ

50

る。

【0153】

分化され、必要に応じて単離されると、細胞は、NTFを分泌するそれらの能力について（培養状態で）試験される場合がある。分泌されたNTFの分析のために、上清が、上記で記載される分化手順が終わったときにMSCの培養物またはNTF分泌細胞の培養物から回収され、また、細胞が採取され、計数される。細胞はまた、分化手順の期間中に、例えば、1日の分化の後または2日の分化の後で分析される場合がある。細胞の培養上清におけるグリア由来神経栄養因子（GDNF）または脳由来神経栄養因子（BDNF）などのNTFの量が、例えば、また、限定されないが、GDNFまたはBDNFのELISAアッセイ（GDNF DuoSet DY212；BDNF DuoSet DY248；R&D Systems）を製造者のプロトコルに従って使用することによって定量される場合がある。IGF-1の量を、例えば、また、限定されないが、IGF ELISAアッセイ（IGF-1 DuoSet、カタログ番号DY291；R&D System）を使用して定量することができる。

10

【0154】

VEGFの量を、例えば、また、限定されないが、VEGF ELISAアッセイ（VEGF DuoSet、R&D Systems、カタログ：DY293B）を使用して定量することができる。HGFの量を、例えば、また、限定されないが、HGF ELISAアッセイ（HGF DuoSet、R&D Systems、カタログ：DY294）を使用して定量することができる。

20

【0155】

神経栄養因子分泌細胞は、非分化MSCと比較して、高まったレベル（例えば、少なくとも2倍、または、それどころか、少なくとも3倍）のインテグリンアルファ1を発現する場合がある。

【0156】

加えて、神経栄養因子分泌細胞は、非分化MSCと比較して、高まったレベル（例えば、少なくとも2倍、または、それどころか、少なくとも3倍）のTGFベータ、幹細胞因子（SCF）、マクローファージコロニー刺激因子（M-CSF）、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IFN- α および/またはプロスタグランジンE₂（PGE₂）を発現する場合がある。

30

【0157】

なおさらに別の実施形態によれば、神経栄養因子分泌細胞は、非分化MSCと比較して、高まったレベルの乏突起膠細胞マーカー（例えば、PDGF受容体、O4スルファチドマーカー、ガラクトセレブロシド（O1、GalC）、Nkx2.2、Sox10、乏突起膠細胞特異的タンパク質（OSP）、ミエリン関連糖タンパク質（MAG）、2',3'-環状ヌクレオチド-3'-ホスホジエステラーゼ（CNP）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、大腸腺腫性ポリポーシス（APC）、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）、CNPアーゼ、MOSPおよび/または乏突起膠細胞NS-1など）を発現しない。

【0158】

なおさらに別の実施形態によれば、神経栄養因子分泌細胞は、非分化MSCと比較して、高まったレベルの神経伝達物質を分泌しない。前記細胞において発現されない神経伝達物質の例には、ドパミン、ノルアドレナリンおよびセロトニンが含まれる。

40

【0159】

本発明の細胞は少なくともいくつかの実施形態では、間葉系幹細胞からエクスピボ分化させられることが理解されるであろう。そのようなものとして、本発明の細胞は依然として、フローサイトメトリーによって検出される場合、間葉系幹細胞のマーカー（例えば、CD29、CD47、MSCA-1、CD44、CD90、CD73およびCD105など）を発現する。

【0160】

50

MSCと同様に、本発明の細胞は少なくともいくつかの実施形態では、フローサイトメトリーによって検出される場合、CD3、CD14、CD19、CD34、CD45およびHLA-DRの表面マーカーを発現しない。

【0161】

本明細書中に記載される細胞はMSCのある特定のいくつかの特徴を保持するにもかかわらず、例えば、神経栄養因子の分泌ならびに特定のmiRNAおよびタンパク質の発現を含めて、いくつかの点でMSCと異なることがさらに理解されるであろう。

【0162】

したがって、例えば、本発明者らは、特定の細胞表面マーカーが、非分化のMSCとは対照的に、分化したNTF分泌細胞において示差的に発現されることを示している。

10

【0163】

分化した間葉系幹細胞によって示差的に発現される表面マーカーには、例えば、平均蛍光強度によって求められる場合、分化細胞においてダウンレギュレーションされるCD44、および、分化細胞においてアップレギュレーションされるCD73が含まれる。例えば、少なくともいくつかの実施形態によれば、CD44陽性集団の平均蛍光強度が分化細胞では非分化の細胞と比較して低くなっており、例えば、場合により、少なくとも5%低くなっており、場合により、また、好ましくは少なくとも10%低くなっており、場合により、また、より好ましくは少なくとも15%、場合により、また、最も好ましくは、少なくとも20%、25%、30%または40%低くなっており、あるいは、それどころか、50%低くなっている。同様に、例えば、少なくともいくつかの実施形態によれば、CD73陽性集団の平均蛍光強度が分化細胞では非分化の細胞と比較して高くなっており、例えば、場合により、少なくとも5%高くなっており、場合により、また、好ましくは少なくとも10%高くなっており、場合により、また、より好ましくは少なくとも15%、場合により、また、最も好ましくは、少なくとも20%、25%、30%または40%高くなっており、あるいは、それどころか、50%高くなっている。

20

【0164】

非分化のMSCと比較して、分化したMSCにおいてアップレギュレーションされるmiRNAには、例えば、下記のものが含まれる：

miR-3663-3p (配列番号1)

miR-132-3p (配列番号2)

miR-762 (配列番号3)

miR-4327 (配列番号4)

miR-3665 (配列番号5)

miR-34a-5p (配列番号6)

miR-1915-3p (配列番号7)

10

miR-34a-3p (配列番号8)

miR-34b-5p (配列番号9)

miR-874-3p (配列番号10)

miR-874-5p (配列番号11)

miR-4281 (配列番号12)

miR-1207-5p (配列番号13)

miR-30b-5p (配列番号14)

20

miR-29b-3p (配列番号15)

miR-199b-5p (配列番号16)

miR-30e-5p (配列番号17)

miR-26a-5p (配列番号18)

miR-4324 (配列番号19)

【 0 1 6 5 】

非分化のMSCと比較して、分化したMSCにおいてダウンレギュレーションされるmiRNAには、例えば、下記のものが含まれる：

30

miR-503-5p (配列番号20)

miR-3659 (配列番号21)

miR-3529-3p (配列番号22)

miR-320b (配列番号 23)

miR-1275 (配列番号 24)

miR-3132 (配列番号 25)

miR-495-5p (配列番号 26)

miR-181b-5p (配列番号 27)

miR-424-5p (配列番号 28)

miR-4284 (配列番号 29)

10

miR-574-5p (配列番号 30)

miR-143-3p (配列番号 31)

miR-106a-5p (配列番号 32)

miR-455-3p (配列番号 33)

miR-20a-5p (配列番号 34)

miR-145-5p (配列番号 35)

miR-324-3p (配列番号 36)

20

miR-130b-3p (配列番号 37)

miR-1305 (配列番号 38)

miR-140-3p (配列番号 39)

【 0 1 6 6 】

ダウンレギュレーションされる追加の miRNA には、例えば、下記のものが含まれる :

miR-320a (配列番号 40)

miR-222-3p (配列番号 41)

30

【 0 1 6 7 】

別の実施形態によれば、細胞集団は、非分化の MSC と比較して、増大したレベルの miR-3663-3p、miR-762、miR-4327、miR-3665、miR-34a-5p、miR-4327、miRNA3665 および / または miR132-3p を発現する。

【 0 1 6 8 】

さらに別の実施形態によれば、細胞集団は、増大したレベルの miR34a-5p および / または miR132-3p を発現する。

【 0 1 6 9 】

別の実施形態によれば、細胞集団は、非分化の MSC と比較して、減少したレベルの miR-503-5p、miR-3659、miR-3529-3p、miR-320b、miR-424-5p、miR-320a および / または miR-222-3p を発現する。

40

【 0 1 7 0 】

さらに別の実施形態によれば、細胞集団は、減少したレベルの miR-503-5p、miR-320b、miR-424-5p、miR-320a および / または miR-222-3p を発現する。

【 0 1 7 1 】

さらに別の実施形態によれば、細胞集団は、減少したレベルの miR-150-3p を発現する。

50

【0172】

さらに別の実施形態によれば、細胞集団は、減少したレベルのmiR-503-5p、miR-320bおよび/またはmiR-424-5pを発現する。

【0173】

発現の増大したレベルまたは低下したレベルの上記記載のすべてが非分化のMSCとの比較においてである。

【0174】

非分化細胞と比較される分化細胞におけるアップレギュレーションされた発現レベルを有するタンパク質が実施例の節の表7において詳述される。

【0175】

非分化細胞と比較される分化細胞におけるダウンレギュレーションされた発現レベルを有するタンパク質が実施例の節の表8において詳述される。

【0176】

述べられるように、本発明の少なくともいくつかの実施形態によれば、本発明の細胞および細胞集団は、特定の疾患または障害を処置するために使用される場合がある。細胞集団が、本明細書中下記に記載されるように、分化後にそのまま使用される場合があり、または、特定の表現型について濃縮される場合がある。

【0177】

本発明の様々な実施形態に従って作製される細胞は細胞表面マーカーの特定の発現パターンを呈示する。したがって、例えば、分化後、細胞は典型的には、分化前の同じ細胞集団と比較して、特有の増大したレベルのCD73をそれらの細胞表面に示す。加えて、分化後、細胞は典型的には、分化前の同じ細胞集団と比較して、特有の低下したレベルのCD44をそれらの細胞表面に示す。

【0178】

細胞表面マーカーを分析することが、例えば、フローサイトメトリー、HPLC、免疫組織化学、インシトゥーPCRを含めて、どのような方法であれ、この技術分野で知られている方法を使用することによって行われる場合がある。

【0179】

本発明者らは、MSCの集団が、これらのマーカーを発現する細胞について選択することによってNTF分泌細胞について濃縮され得ることを提案する。

【0180】

従って、本発明の別の局面によれば、神経栄養因子(NTF)を分泌する間葉系幹細胞(MSC)をMSCの混合集団から選択する方法であって、

a) 前記混合細胞集団の細胞を、下記のパラメータ:

(i) CD44を所定の閾値よりも少なく発現する細胞、

(ii) CD73を所定の閾値よりも多く発現する細胞

の少なくとも1つについて分析すること、および

(b) 前記パラメータの少なくとも1つについて陽性である細胞を選択し、それにより、神経栄養因子を分泌する前記MSCを選択すること

を含む方法が提供される。

【0181】

分取することが典型的には、指示された分化プロトコルの開始から2日または3日で行われる。

【0182】

NTF分泌MSCが選択される混合細胞集団は、使用される分化方法、および、細胞が分化するために割り当てられる時間に依存して、様々なNTFを異なるレベルで分泌する、異なる分化段階にある様々なMSCを含むであろうことが理解されるであろう。

【0183】

述べられるように、NTF分泌MSCが下記の判断基準の1つに従って選択される:

(i) CD44を所定の閾値よりも少なく発現する細胞、

10

20

30

40

50

(i i) C D 7 3 を所定の閾値よりも多く発現する細胞。

【 0 1 8 4 】

C D 7 3 を発現する細胞を選択することが典型的には、C D 7 3 に対して特異的に結合する作用因を使用して行われる。典型的には、そのような細胞は、当該細胞が本明細書中下記でさらに記載されるような方法（例えば、F A C S、M A C S および免疫パンニングなど）を使用して検出され得るように、十分なC D 7 3 をそれらの膜に発現する。

【 0 1 8 5 】

所定の閾値の選択が典型的には、本明細書中下記でさらに記載されるように、閾値の選択は分化前の間葉系幹細胞の同一集団におけるその細胞表面マーカーの発現の量に基づくので、それぞれの個々の間葉系幹細胞集団について行われる。

10

【 0 1 8 6 】

典型的には、選択することが、この細胞表面タンパク質を特異的に認識することができる抗体を使用して行われ、だが、本発明では、さらなる作用因、例えば、ポリヌクレオチドまたは小分子などが意図される。

【 0 1 8 7 】

C D 7 3 またはC D 4 4 を認識する抗体が、この技術分野で知られている方法に従って得られる場合があり、または、市販の供給元から得られる場合がある。

【 0 1 8 8 】

C D 7 3 抗体が（直接的、または、同族の結合性分子を介して間接的のどちらかで）磁性成分に結合されるならば、不均一な細胞集団が、磁気活性化細胞分離によって、C D 7 3 を高発現する細胞について濃縮される場合がある。

20

【 0 1 8 9 】

C D 7 3 抗体が親和性部分に結合されるならば、不均一な細胞集団が、同族の結合性分子を用いたアフィニティー精製によってC D 7 3 + 細胞について濃縮される場合がある。したがって、例えば、C D 7 3 抗体がビオチンに結合されるならば、不均一な細胞集団から、C D 7 3 + 細胞が、ストレプトアビジンのビーズまたはカラムを用いた精製によって枯渇化される場合がある。C D 7 3 + 細胞を続いて回収することができる。例えば、C D 7 3 抗体が、ある抗体またはある抗体のF c に結合されるならば、不均一な細胞集団から、C D 7 3 + 細胞が、プロテインAのビーズまたはカラムを用いた精製によって枯渇化される場合がある。C D 7 3 + 細胞を続いて回収することができる。C D 7 3 抗体が蛍光性部分に結合されるならば、不均一な細胞集団は、蛍光活性化細胞分取器（F A C S）を使用することによってC D 7 3 + 細胞について濃縮される場合がある。

30

【 0 1 9 0 】

本明細書中で使用される場合、用語「フローサイトメトリー」は、サンプル中のある材料（例えば、特定のマーカーを含む腎臓細胞）の割合が、当該材料を（例えば、標識された抗体を当該材料に結合することによって）標識し、当該材料を含有する流体の流れを光のビームの中を通し、サンプルから放射される光を一連のフィルターおよびミラーによって構成波長に分離し、そして、この光を検出することによって決定されるアッセイを示す。

【 0 1 9 1 】

数多くのフローサイトメーターが市販されており、これらには、例えば、B e c t o n D i c k i n s o n F A C S c a n およびF A C S c a l i b u r (B D B i o s c i e n c e s、マウンテンビュー、カリフォルニア) が含まれる。F A C S 分析のために使用され得る抗体が、S c h l o s s m a n S、B o u m e l l L 他 [L e u c o c y t e T y p i n g V、New York: Oxford University Press; 1995] に教示されており、また、広く市販されている。

40

【 0 1 9 2 】

F A C S 分取器を使用した場合、特定のレベルの表面マーカーを有する細胞について選択することもまた可能であることが理解されるであろう。

【 0 1 9 3 】

50

本発明は少なくともいくつかの実施形態では、未分化MSC集団におけるCD73のレベルを分析し、その後、少なくとも1.5倍または少なくとも2倍あるいはそれ以上の発現における増大を有する対応する分化MSC集団の細胞集団を選択することを意図する。

【0194】

加えて、または、代替において、本発明は少なくともいくつかの実施形態では、未分化MSC集団におけるCD44のレベルを分析し、その後、少なくとも1.5倍または少なくとも2倍あるいはそれ以上の差による発現における低下を有する対応する分化MSC集団の細胞集団を選択することを意図する。

【0195】

本発明は少なくともいくつかの実施形態ではまた、さらなる細胞表面マーカー（例えば、CD105など）の発現を分化プロトコルの経過にわたって分析することを意図する。CD105の発現は当初、分化後（第2日の後）は増大し、しかし、NTFの分泌が最大となったとき（第3日の後）、CD105の発現が低下する。したがって、本発明は少なくともいくつかの実施形態では、NTF分泌MSCを、例えば、少なくとも0.5倍、少なくとも1倍または少なくとも2倍の差によるCD105の発現における低下を有するそのような細胞を選択することによって選択することを意図する。

【0196】

作製および必要に応じた細胞表面マーカー分析の後、NTF分泌MSCはさらに分析される場合がある（例えば、核型分析、形態学、細胞数および生存性、グラム染色、無菌性）。

【0197】

作製された細胞集団は典型的には、細胞分散化剤を使用して培養プレートから取り出される。好ましくは、単一細胞の集団が得られる。細胞を分散させるために使用され得る薬剤の例には、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、アクターゼ（accutase）、トリプシン（例えば、トリプシン-EDTA、トリプシンの非動物代替物（例えば、TrypLE（商標）など）、パインが含まれるが、これらに限定されない。代替では、または、加えて、研和もまた、細胞の分散を増大させるために行われる場合がある。

【0198】

使用され得るトリプシンの例示的な濃度が0.005%~0.5%のトリプシン-EDTAである。細胞が、約5分間~30分間、約37の温度で分散化剤とインキュベーションされる場合がある。

【0199】

細胞を採取することが典型的には、適切な培地、例えば、ハンクス平衡塩溶液（HBSS）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI、PBSなどにおいて行われる。

【0200】

必要に応じて、細胞はこの段階で保存（例えば、凍結または凍結保存）され、また、保存（例えば、凍結または凍結保存）される場合がある。これは、患者への反復投与のために適する場合がある。

【0201】

場合により、細胞は、凍結保存の前に、または、代替では対象への投与の前に、適格性が調べられる場合があり、または、特徴づけが行われる場合がある。適格性が調べられると、細胞にはラベルがそれに従って付けられる場合があり、または、細胞が対象にそのまま投与される場合がある。

【0202】

従って、本発明の別の局面によれば、神経栄養因子を分泌する細胞の適格性を調べる方法であって、miR-503、miR-3659、miR-3529-3p、miR-320b、miR-424-5p、miR-320a、miR-222-3p、miR-3663-3p、miR-762、miR-4327、miR-3665、miR34a-5p、miR-4327、miRNA-3665およびmiR132-3pからなる群か

10

20

30

40

50

ら選択される少なくとも1つのmiRNAの発現について前記細胞を分析することを含み、ただし、非分化MSCと比較して、前記miR-3663-3p、miR-762、miR-4327、miR-3665、miR34a-5p、miR-4327、miRNA3665またはmiR132-3pの増大した発現、あるいは、非分化MSCと比較して、前記miR-503、miR-3659、miR-3529-3p、miR-320b、miR-424-5p、miR-320aまたはmiR-222-3pの低下した発現により、神経栄養因子を分泌する細胞が示される方法が提供される。

【0203】

特定の実施形態によれば、miRNAは、miR-503、miR-320b、miR424-5p、miR-132-3pおよびmiR-34a-5pからなる群から選択される。

10

【0204】

好ましくは、miRNAにおける発現での変化は統計学的に有意な量である。

【0205】

好ましくは、分化細胞が比較される対照細胞は、神経栄養因子を分泌する細胞を作製するために使用されるのと同じ細胞（すなわち、同じドナーの非分化MSCおよび同じ器官に由来する非分化MSC）である。

【0206】

miRNAの発現について分析することが、miRNAアレイ分析、PCR分析などを含めて、どのような方法であれ、この技術分野で知られている方法を使用して行われる場合がある。

20

【0207】

細胞の適格性を調べる別の方法がタンパク質発現の分析によってである。

【0208】

従って、本発明の別の局面によれば、MSCからエクスピボ分化されており、かつ、神経栄養因子を分泌する細胞の適格性を調べる方法であって、イソブチリル-COAデヒドロゲナーゼ、C-X-Cモチーフケモカイン6、ニューロモジュリン、増殖/分化因子15、ヒアルロナンシンターゼ1、インターロイキン-1ベータ、インターロイキン-8、インヒピンベータA鎖、インスリン受容体基質1、インテグリンアルファ-1、ラッカーゼドメイン含有タンパク質1、ラミニンサブユニットアルファ-4、ルミカン、コラゲナーゼ3、食道正常粘膜特異的遺伝子1タンパク質、プレB細胞白血病転写因子相互作用タンパク質1、プレクトストリン相同様ドメインファミリーAメンバー1、ホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸依存性Rac交換体1タンパク質、プロスタグランジンEシンターゼ、プロスタグランジンG/Hシンターゼ2、Ras関連タンパク質Rab-27B、Rho関連GTP結合タンパク質RhoB、シアル酸O-アセチルエステラーゼ、モノカルボン酸輸送体7、組織因子経路阻害剤2、膜貫通タンパク質65、Vam6/Vps39様タンパク質、3-オキソ-5-ベータ-ステロイド4-デヒドロゲナーゼ、プロピオニル-COAカルボキシラーゼベータ鎖（ミトコンドリア）、インターフェロン調節因子2結合タンパク質様、組織アルファ-L-フコシダーゼ、アルド-ケトレダクターゼファミリー1メンバーC2、イノシトール-1,4,5-三リン酸受容体相互作用タンパク質、タンパク質KIAA1199、セレン結合タンパク質1、ホスホリパーゼD3、GTP:AMPホスホトランスフェラーゼ（ミトコンドリア）、タンパク質Wnt-5a；タンパク質Wnt、アルド-ケトレダクターゼファミリー1メンバーC3、ソーティングネキシン-9、ギャップジャンクションアルファ-1タンパク質、ピルビン酸カルボキシラーゼ（ミトコンドリア）、SH3/PXドメイン含有タンパク質2B、インテグリンアルファ-2、シトクロームP450 1B1、キチナーゼ-3様タンパク質1、ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ、セブラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、アルド-ケトレダクターゼファミリー1メンバーC1、FERM、RhoGEFおよびプレクトストリンドメイン含有タンパク質1、プロリル4-ヒドロキシラーゼサブユニットアルファ-3、リボヌクレオシド三リン酸レダクターゼサブユニットM2B、

30

40

50

コアヒストンマクロ - H 2 A . 2 ; ヒストン H 2 A 、 コリン輸送体様タンパク質 1 および
ニーマン・ピック C 1 タンパク質、 リソソームアルファ - グルコシダーゼからなる群から
選択される少なくとも 1 つのタンパク質の発現について前記細胞を分析することを含み、
ただし、非分化 M S C と比較して、前記少なくとも 1 つのタンパク質の発現における増大
により、前記細胞が神経栄養因子を分泌することが示される方法が提供される。

【 0 2 0 9 】

本発明の別の局面によれば、M S C からエクスピボ分化されており、かつ、神経栄養因
子を分泌する細胞の適格性を調べる方法であって、タイトジャンクションタンパク質 Z O
- 2 、 アルファ - 1 , 3 - マンノシル糖タンパク質 2 - ベータ - N - アセチルグルコサミ
ニルトランスフェラーゼ、スムーセリン (s m o o t h e l i n) 、 異所性 P 顆粒タンバ
ク質 5 ホモログ、 B R C A 1 会合 A T M 活性化因子 1 、 W D リピート含有タンパク質 3 6
、 S H 3 ドメイン結合タンパク質 4 、 E H ドメイン結合タンパク質 1 様タンパク質 1 、 R
a s G T P アーゼ活性化様タンパク質 I Q G A P 3 、 リシルオキシダーゼホモログ 2 、
トロポミオシン 1 (アルファ) 、 イソ型 C R A _ f 、 G e m 会合タンパク質 5 、 三者モチ
ーフ含有タンパク質 1 6 、 結合組織増殖因子、リンホカイン活性化キラー T 細胞起源のプ
ロテインキナーゼ、テトラトリコペプチドリピータンパク質 4 、 乳ガンの抗エストロゲ
ン剤抵抗性タンパク質 1 、 リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼサブユニット M 2 、 ユ
ビキチン結合酵素 E 2 C 、 好中球デフェンシン 1 、 C d c 4 2 エフェクタータンパク質 3
、 コンデンシン複合体サブユニット 2 、 I g カップ鎖 C 領域、 コンデンシン複合体サブユ
ニット 3 、 シンコイリン (s y n c o i l i n) 、 染色体構造維持タンパク質 2 、 コンデ
ンシン複合体サブユニット 1 、 インターアルファ - トリプシン阻害剤重鎖 H 4 、 チミジル
酸シターゼ、セロトランスフェリン、妊娠領域タンパク質、 D N A 複製ライセンス化因
子 M C M 7 、 ヘモペキシン、 D N A ミスマッチ修復タンパク質 M s h 6 、 アンキリンリピ
ートドメイン含有タンパク質 1 3 A 、 ホスデューシン様タンパク質 3 、 1 - ホスファチジ
ルイノシトール - 4 , 5 - ニリン酸ホスホジエステラーゼベータ - 3 、 補体 C 3 、 D N A
複製ライセンス化因子 M C M 3 、 C D 9 7 抗原、 C D 9 7 抗原サブユニットアルファ、 D
N A 複製ライセンス化因子 M C M 6 、 D N A 複製ライセンス化因子 M C M 4 、 D i s a b
l e d ホモログ 2 、 タンパク質 K I A A 0 6 6 4 、 D N A 複製ライセンス化因子 M C M 2
、 タンパク質 - リシン 6 - オキシダーゼ、 リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼラージ
サブユニット、メラノーマ関連抗原 D 2 、 I g ガンマ - 1 鎖 C 領域、ヘパラナーゼ、イン
ポーチンサブユニットアルファ - 2 、 アスパラギンシンセターゼ [グルタミン加水分解性
] 、 アルファ - 2 - マクログロブリン、 コラーゲンアルファ - 1 (I) 鎖、 コラーゲンアル
ファ - 1 (V) 鎖、 D n a J ホモログサブファミリー B メンバー 4 、 トロンボスポンジ
ン - 1 、 血清アルブミンおよびコラーゲンアルファ - 2 (I) 鎖からなる群から選択され
る少なくとも 1 つのタンパク質の発現について前記細胞を分析することを含み、ただし、
非分化細胞と比較して、前記少なくとも 1 つのタンパク質の発現における低下により、前
記細胞が神経栄養因子を分泌することが示される方法が提供される。

【 0 2 1 0 】

好ましくは、分析されるタンパク質における発現での変化は統計学的に有意な量 (すな
わち、統計学的に有意な増大または統計学的に有意な低下) である。

【 0 2 1 1 】

好ましくは、分化細胞が比較される対照細胞は、神経栄養因子を分泌する細胞を作製す
るために使用されるのと同じ細胞 (すなわち、同じドナーの非分化 M S C および同じ器官
に由来する非分化 M S C) である。

【 0 2 1 2 】

タンパク質の発現について分析することが、ウエスタンブロット、免疫細胞化学、質量
分析法、放射免疫アッセイなどを含めて、どのような方法であれ、この技術分野で知られ
ている方法を使用して行われる場合がある。特定の実施形態によれば、分析することが、
タンパク質を特異的に認識する抗体を使用して行われる。

【 0 2 1 3 】

10

20

30

40

50

述べられるように、本発明の様々な実施形態の細胞は、医薬品（これは交換可能に、医薬組成物として示される）を調製するために使用することができ、それによって、そのような医薬品は、神経栄養因子を分泌する細胞を用いて有益に処置することができる疾患を処置するために配合される。

【0214】

そのような疾患の例には、神経変性疾患および神経系の免疫疾患（例えば、自己免疫疾患）が含まれる。

【0215】

用語「神経変性疾患」は、中枢神経系に対する損傷によって引き起こされる疾患を記載するために本明細書中では使用される。本発明による細胞および方法を使用して処置され得る例示的な神経変性疾患には、例えば、下記のものが含まれる：筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、多系統萎縮症（MSA）、ハンチントン病、アルツハイマー病、レット症候群、リソソーム蓄積病（「白質疾患」またはグリア/脱髄疾患、例えば、Folkerth (J. Neuropath. Exp. Neuro., 1999年9月、58:9) によって記載されたもの）、例えばサンフィリッポ症候群、ゴーシェ病、テイ・サックス病（ベータヘキソサミニダーゼ欠損症）、他の遺伝的疾患、多発性硬化症（MS）、虚血、事故、環境的浸襲などによって引き起こされる脳の傷害または外傷、脊髄損傷、運動失調。加えて、本発明は、患者における卒中の中枢神経系に対する影響を軽減および/または排除するために使用される場合があり、そのような卒中は、他の場合には患者の脳内の部位に対する血流の欠如または虚血によって引き起こされるか、あるいは、脳および/または脊髄に対する物理的傷害から生じている。神経変性疾患にはまた、例えば、とりわけ、自閉症および関連する神経学的疾患（例えば、統合失調症など）を含めて、様々な神経発達障害が含まれる。

10

20

【0216】

本明細書中に記載される細胞を使用して処置され得る神経系の自己免疫疾患には、例えば、多発性硬化症および重症筋無力症、ギラン・バール症候群、多系統萎縮症（MSA；様々な程度のパーキンソン症候群、自律神経機能障害および小脳性運動失調を伴う散発性の進行性成人発症型神経変性障害）が含まれる。他の自己免疫疾患が、Kraker他、Curr Neuroparmacol、2011年9月、9(3):400~408に記載されている（その内容は参照によって本明細書中に組み込まれる）。

30

【0217】

本発明の細胞は、様々な移植法（その性質は埋め込み部位に依存する）を使用して個体を治療するために投与することができる。

【0218】

「移植」、「細胞置換」または「グラフト化する」注入の用語または表現は、本明細書中では交換可能に使用され、本発明の細胞を標的組織（例えば、脳、灰白質）に導入することを示す。細胞は被移植者に由来し得る（同種）か、あるいは、非同種ドナーまたは異種ドナーに由来し得る。

【0219】

細胞は、直接には筋肉（筋肉内、例えば、上腕または大腿の筋肉などにおいて）、呼吸筋、嚥下筋の中に、脊髄（クモ膜下腔内）の中に、静脈内に、直接には脳の中に、または、これらの組合せで（例えば、筋肉内およびクモ膜下腔内に）移植することができる。他の投与様式もまた意図される（例えば、全身投与など）。

40

【0220】

筋肉内投与され得る細胞の例示的な用量が 1×10^6 細胞/部位~ 20×10^6 細胞/部位である。筋肉あたりの投与の数が、処置の経過の期間中に、5から50まで、10から30まで、20から100まで、または、15から25まで変化する場合がある。1つの実施形態によれば、投与される細胞の総数が 20×10^6 個~ 2000×10^6 個の間であり、より好ましくは 20×10^6 個~ 1000×10^6 個の間であり、より好ましくは 20×10^6 個~ 500×10^6 個の間であり、より好ましくは 20×10^6 個~ 20

50

0×10^6 個の間であり、より好ましくは 20×10^6 個 ~ 100×10^6 個の間である。特定の実施形態によれば、それぞれの投与が、 $20 \sim 30$ の間の投与（例えば、 24 の投与）に関して 1×10^6 個の細胞を含み、または、処置の経過の期間中における $20 \sim 30$ の間の投与（例えば、 24 の投与）に関して 1.5×10^6 個の細胞を含み、または、 $20 \sim 30$ の間の投与（例えば、 24 の投与）に関して 2×10^6 個の細胞を含む。

【0221】

クモ膜下腔に投与され得る細胞の例示的な用量が 0.5×10^6 細胞 / Kg 体重 ~ 20×10^6 細胞 / Kg 体重であり、より好ましくは 0.5×10^6 細胞 / Kg 体重 ~ 10×10^6 細胞 / Kg 体重であり、より好ましくは 1×10^6 細胞 / Kg 体重 ~ 10×10^6 細胞 / Kg 体重であり、より好ましくは 1×10^6 細胞 / Kg 体重 ~ 5×10^6 細胞 / Kg 体重であり、より好ましくは 1×10^6 細胞 / Kg 体重 ~ 2.5×10^6 細胞 / Kg 体重であり、より好ましくは 1×10^6 細胞 / Kg 体重 ~ 2×10^6 細胞 / Kg 体重である。

10

【0222】

筋肉内送達およびクモ膜下腔内送達の両方の組合せについては、本発明は少なくともいくつかの実施形態では、約 1×10^6 細胞 / 部位 ~ 10×10^6 細胞 / 部位の筋肉内送達、より好ましくは 1×10^6 細胞 / 部位 ~ 5×10^6 細胞 / 部位の間での筋肉内送達、より好ましくは 1×10^6 細胞 / 部位 ~ 2.5×10^6 細胞 / 部位の間での筋肉内送達を意図する。部位の数が、 5 から 50 まで、 10 から 30 まで、 20 から 100 まで、または、 15 から 25 まで変化する可能性がある（例えば、 24 ）；クモ膜下腔内送達については 1×10^6 細胞 / Kg 体重 ~ 10×10^6 細胞 / Kg 体重であり、より好ましくは 1×10^6 細胞 / Kg 体重 ~ 5×10^6 細胞 / Kg 体重である。1つの実施形態によれば、 70 kg の患者につき約 20×10^6 個 ~ 1400×10^6 個の細胞の投与あたりの最大数が意図され、より好ましくは、 70 kg の患者につき 50×10^6 個 ~ 1000×10^6 個の間の細胞が意図され、より好ましくは、 70 kg の患者につき 50×10^6 個 ~ 500×10^6 個の間の細胞が意図され、より好ましくは、 70 kg の患者につき 50×10^6 個 ~ 200×10^6 個の間の細胞が意図される。別の実施形態によれば、 70 kg の患者につき約 20×10^6 個 ~ 500×10^6 個の細胞の最大数が意図される。別の実施形態によれば、 70 kg の患者につき約 100×10^6 個 ~ 2000×10^6 個の細胞の最大数が意図され、より具体的には、 70 kg の患者につき 200×10^6 個の細胞が意図される。

20

30

【0223】

本明細書中に記載される方法のどれにおいても、細胞は、それ自体で、または、好ましくは、医薬的に許容され得るキャリアをさらに含む医薬組成物の一部としてそのどちらでも投与することができる。

【0224】

本明細書中で使用される「医薬組成物」は、本明細書中に記載される化学的コンジュゲートの1つまたは複数と、他の化学的成分（例えば、医薬的に好適な担体（キャリア）および賦形剤など）との調製物を示す。医薬組成物の目的は、対象に対する化合物の投与を容易にすることである。

40

【0225】

本明細書中以降、用語「医薬的に許容され得るキャリア（担体）」は、交換可能に使用され得るが、対象に対する著しい刺激を生じさせず、かつ、投与された化合物の生物学的な活性および性質を妨げないキャリアまたは希釈剤を示す。限定されないが、キャリアの例には、プロピレングリコール；生理的食塩水；エマルション；緩衝液；培養培地、例えば、DMEMまたはRPMIなど；フリーラジカルを除去し、pH緩衝作用、膨張/浸透圧支持、エネルギー基質およびイオン濃度を提供する成分で、細胞内状態を低い温度で平衡化する成分を含有する低体温用貯蔵培地；ならびに、有機溶媒と水との混合物がある。

【0226】

典型的には、医薬用キャリアは、組成物における細胞の数を少なくとも24時間にわた

50

って、少なくとも48時間にわたって、または、それどころか、少なくとも96時間にわたって保つ(例えば、90%を超えて低下させない)。

【0227】

本明細書中において、用語「賦形剤」は、化合物の投与をさらに容易にするために、および移植/注入前の好適な時間期間の間、予め決められた温度で細胞の生存性を維持するために医薬組成物に添加される不活性な物質を示す。賦形剤の非限定的な例としては、アルブミン、血漿、血清、および脳脊髄液(CSF)、N-アセチルシステイン(NAC)またはレスベラトールなどの抗酸化剤が挙げられる。

【0228】

本発明の好ましい実施形態によれば、医薬用キャリアは、緩衝剤の水溶液または培養培地(例えば、DMEMなど)である。

【0229】

薬物の配合および投与のための技術が「Remington's Pharmaceutical Sciences」(Mack Publishing Co., Easton, PA、最新版)に見出されることができ、これは参考として本明細書中に組み込まれる。

【0230】

本発明の方法において使用されるいかなる調製物についても、投与量または治療有効量は、生体外アッセイおよび細胞培養アッセイから最初に推定されることができ、好ましくは、投与量は、所望の濃度または力価を達成するために動物モデルにおいて決定されることができ、そのような情報は、ヒトにおける有用な投与量をより正確に決定するために使用されることができ。

【0231】

本明細書中に記載される有効成分の毒性および治療効力は、生体外、細胞培養物、または実験動物における標準的な薬学的手法によって決定されることができ。例えば、6-OHDA障害のマウスまたはラットがパーキンソン病の動物モデルとして使用される場合がある。加えて、ヒマワリ試験が、動物にヒマワリの種子を特定の期間の間に開けるように促すことによって繊細な運動機能における改善を試験するために使用される場合がある。MSA患者における運動機能の改善を試験するための様々な動物モデルが、例えば、Stefanova他、Trends Neurosci., 2005年9月、28(9): 501~6に開示されている。

【0232】

遺伝子組換えマウスがハンチントン病のためのモデルとして使用される場合があり、この場合、遺伝子組換えマウスは増大した数のCAG反復を含み、かつ、ハンチンチンおよびユビキチンの核内封入体を、この疾患におけるニューロン細胞喪失の部位に厳密に一致して、脳幹、視床または脊髄においてではなく、線条体および大脳皮質のニューロンにおいて有する。

【0233】

SOD-1の変異を含む遺伝子組換えマウスがALS疾患のためのモデルとして使用される場合がある。例えば、Uccelli A他、Mol Med、2012年4月2日を参照のこと。

【0234】

中隔海馬経路は、海馬采を切断することによって片側性に横切開される場合、アルツハイマー病における中隔海馬経路喪失のコリン作動性欠損を模倣する。したがって、この病変を含む動物モデルが、アルツハイマー病を処置するための本発明の細胞を試験するために使用される場合がある。

【0235】

動物の生存および巡回性挙動(例えば、ロータロッド上での巡回性挙動)が本発明の細胞の投与の後で分析される場合がある。

【0236】

10

20

30

40

50

これらのインビトロアッセイおよび細胞培養アッセイならびに動物研究から得られるデータは、ヒトにおける使用のための投薬量の範囲を定める際に使用することができる。さらなる情報が臨床研究から得られる場合がある。例えば、Salem HK他、Stem Cells、2010、28:585~96、および、Uccelli他、Lancet Neurol、2011、10:649~56を参照のこと。

【0237】

投薬量は、用いられる投薬形態および利用される投与経路に依存して変化する可能性がある。正確な配合、投与経路および投薬量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選ぶことができる(例えば、Fingl他、1975、“The Pharmacological Basis of Therapeutics”、第1章、1頁を参照のこと)。例えば、ALS患者を、処置に対する陽性の応答を示している改善された運動機能について症候的にモニターすることができる。

10

【0238】

注射の場合、医薬組成物の有効成分は、水溶液において、好ましくは生理学的に適合する緩衝液(例えば、ハンス溶液、リンゲル溶液、または生理学的な食塩緩衝液など)および本明細書中で上述したような追加の薬剤において配合されることができる。

【0239】

投薬量および投薬間隔が、埋め込まれた細胞による神経伝達物質の合成を効果的に調節するために十分である有効成分のレベルに個々に調節され場合がある。所望される効果を達成するために必要である投薬量は、個体の特徴および投与経路に依存するであろう。

20

【0240】

処置される状態の重篤度および応答性に依存して、細胞を与えることが、疾患状態の縮小がいつ達成されるかに依存して数日から数週間または数ヶ月にまで続く処置の経過とともに、単回または複数回の投与であることが可能である。

【0241】

投与される組成物の量は当然のことながら、処置されている個体、病気の重篤度、投与様式、処方医の判断などに依存しているであろう。投薬量および投与時期が、個体の変化しつつある状態の注意深い連続したモニターリングに応じて変わるであろう。例えば、処置されたALS患者には、モニターしている徴候に基づいて、疾患の症状を軽減するために十分である量の細胞が投与されるであろう。

30

【0242】

本発明の細胞は少なくともいくつかの実施形態では、使える状態にあるシリンジにおける単位投薬形態で事前に包装される場合がある。シリンジには、細胞の名称および起源がラベル表示される場合がある。ラベル表示はまた、細胞の機能に関連する情報(例えば、細胞から分泌される神経栄養因子の量)を含む場合がある。シリンジは、細胞に関する情報もまたラベル表示されている包装材で包装される場合がある。

【0243】

本発明の細胞は少なくともいくつかの実施形態では、神経変性障害を処置することにおいて有用である治療剤、例えば、ガングリオシド;抗生物質、神経伝達物質、神経ホルモン、トキシン、神経突起促進分子;ならびに、神経伝達物質分子(例えば、L-DOPAなど)の代謝拮抗剤小分子剤および前駆体などと一緒に共投与される場合がある。例えば、ALSについては、本発明の細胞がRilutek(登録商標)(リルゾール、Sanofi Aventis)と一緒に共投与される場合がある。加えて、または、代替において、本発明の細胞は少なくともいくつかの実施形態では、神経伝達物質を合成することができる他の細胞と一緒に共投与される場合がある。そのような細胞が米国特許出願公開第20050265983号に記載されている(これは参照によって本明細書中に組み込まれる)。

40

【0244】

本明細書中で使用される用語「約」は、±10%を示す。

【0245】

50

本発明の追加の目的、利点、及び新規な特徴は限定されることを意図されない以下の実施例の精査により当業者に明らかになるだろう。

【0246】

用語「含む／備える (comprises、comprising、includes、including)」、「有する (having)」、およびそれらの同根語は、「含むが、それらに限定されない (including but not limited to)」ことを意味する。

【0247】

用語「からなる (consisting of)」は、「含み、それらに限定される (including and limited to)」ことを意味する。

10

【0248】

表現「から本質的になる (consisting essentially of)」は、さらなる成分、工程および／または部分が、主張される組成物、方法または構造の基本的かつ新規な特徴を実質的に変化させない場合にだけ、組成物、方法または構造がさらなる成分、工程および／または部分を含み得ることを意味する。

【0249】

本開示を通して、本発明の様々な態様が範囲形式で提示され得る。範囲形式での記載は単に便宜上および簡潔化のためであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定として解釈すべきでないことを理解しなければならない。従って、範囲の記載は、具体的に開示された可能なすべての部分範囲、ならびに、その範囲に含まれる個々の数値を有すると見なさなければならない。例えば、1～6などの範囲の記載は、具体的に開示された部分範囲（例えば、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6など）、ならびに、その範囲に含まれる個々の数値（例えば、1、2、3、4、5および6）を有すると見なさなければならない。このことは、範囲の広さにかかわらず、適用される。

20

【0250】

本明細書中で使用される用語「方法 (method)」は、所与の課題を達成するための様式、手段、技術および手順を示し、これには、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の技術分野の実施者に知られているそのような様式、手段、技術および手順、または、知られている様式、手段、技術および手順から、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の技術分野の実施者によって容易に開発されるそのような様式、手段、技術および手順が含まれるが、それらに限定されない。

30

【0251】

本明細書で使用される場合、用語「治療する／処置する」には、状態の進行を取り消すこと、実質的に阻害すること、遅くすること、または、逆向きにすること、状態の臨床的症状または審美的症状を実質的に改善すること、あるいは、状態の臨床的症状または審美的症状の出現を実質的に防止することが含まれる。

【0252】

明確にするため別個の実施形態の文脈で説明されている本発明の特定の特徴が、単一の実施形態に組み合わせて提供されることもできることは分かるであろう。逆に、簡潔にするため単一の実施形態で説明されている本発明の各種の特徴は別個にまたは適切なサブコンビネーションで、あるいは本発明の他の記載される実施形態において好適なように提供することもできる。種々の実施形態の文脈において記載される特定の特徴は、その実施形態がそれらの要素なしに動作不能である場合を除いては、それらの実施形態の不可欠な特徴であるとは見なされるべきではない。

40

【0253】

本明細書中上記に描かれるような、および、下記の請求項の節において特許請求されるような本発明の様々な実施形態および態様のそれぞれは、実験的裏付けが下記の実施例において見出される。

【実施例】

【0254】

50

次に下記の実施例が参照されるが、下記の実施例は、上記の説明と一緒に、本発明を非限定様式で例示する。

【0255】

本願で使用される用語と、本発明のいくつかの実施形態の非限定的な例において利用される実験方法には、分子生化学、微生物学および組み換えDNAの技法が広く含まれている。これらの技術は文献に詳細に説明されている。例えば以下の諸文献を参照されたい：「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」 Sambrookら、(1989)；「Current Protocols in Molecular Biology」I~III巻、Ausubel, R. M. 編(1994)；Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley and Sons、米国メリーランド州バルチモア(1989)；Perbal「A Practical Guide to Molecular Cloning」、John Wiley & Sons、米国ニューヨーク(1988)；Watsonら、「Recombinant DNA」Scientific American Books、米国ニューヨーク；Birrenら編「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」1~4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、米国ニューヨーク(1998)；米国特許の第4666828号、同第4683202号、同第4801531号、同第5192659号および同第5272057号に記載される方法；「Cell Biology: A Laboratory Handbook」I~III巻、Cellis, J. E. 編(1994)；「Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique」、Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), 第三版；「Current Protocols in Immunology」I~III巻、Coligan, J. E. 編(1994)；Stitesら編「Basic and Clinical Immunology」(第8版)、Appleton & Lange、米国コネティカット州ノーウォーク(1994)；MishellとShiggi編「Selected Methods in Cellular Immunology」、W. H. Freeman and Co.、米国ニューヨーク(1980)；利用可能な免疫アッセイ法は、特許と科学文献に広範囲にわたって記載されており、例えば：米国特許の第3791932号、同第3839153号、同第3850752号、同第3850578号、同第3853987号、同第3867517号、同第3879262号、同第3901654号、同第3935074号、同第3984533号、同第3996345号、同第4034074号、同第4098876号、同第4879219号、同第5011771号および同第5281521号；「Oligonucleotide Synthesis」Gait, M. J. 編(1984)；「Nucleic Acid Hybridization」Hames, B. D. およびHiggins S. J. 編(1985)；「Transcription and Translation」Hames, B. D. およびHiggins S. J. 編(1984)；「Animal Cell Culture」Freshney, R. I. 編(1986)；「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press(1986)；「A Practical Guide to Molecular Cloning」Perbal, B. (1984) および「Methods in Enzymology」1~317巻、Academic Press；「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」、Academic Press、米国カリフォルニア州サンディエゴ(1990)；Marshakら、「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」CSHL Press(1996)；これらの文献の全ては、あたかも本願に完全に記載されているように援用するものである。その他の一般的な文献は、本

10

20

30

40

50

明細書を通じて提供される。それらの文献に記載の方法は当業技術界で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。それらの文献に含まれるすべての情報は本願に援用するものである。

【0256】

実施例1

神経栄養因子を分泌する間葉系幹細胞(MSC-NTF)の作製

非限定的な本実施例において、神経栄養因子を分泌する臨床規格の間葉系骨髄間質細胞(MSC-NTF)のための製造プロセスは下記の主要な工程を伴う：

1. 骨髄吸引(BMA)
2. 単核細胞(MNC)の分離
3. 多分化能の間葉系間質細胞(MSC)の濃縮および増殖
4. MSC-NTF細胞への分化の誘導
5. 最終生成物の採取
6. 生成物の包装およびラベル表示
7. 移植のための生成物の使用許可

10

【0257】

MSC-NTF分泌細胞への分化が継代2～継代6の間で誘導される場合がある。

【0258】

骨髄吸引(BMA)：新鮮な骨髄を、麻酔医による局所麻酔および鎮静のもと、患者の腸骨稜から当医療センターの常法手順に従って吸引した。骨髄(30～60ml)を、吸引針を使用してヘパリン含有チューブの中に吸引した。骨髄吸引手順に先立って、HBV、HCVおよびHIVについての陰性試験結果を報告する記録が作成される。

20

【0259】

MNCの分離およびMSCの濃縮：製造プロセスの最初の工程は、単核細胞(MNC)を骨髄全体から分離することを伴う。ヒト多分化能間葉系間質細胞(MSC)(これらは骨髄MNC全体の0.01%を構成すると見積もられる)が、これらの細胞はプラスチックに接着することができることに基づいてMNCからインビトロ濃縮される。

【0260】

骨髄吸引物をハンクス平衡塩溶液(HBSS)において1:1(v:v)で希釈し、MNCをFicoll密度勾配遠心分離によって骨髄細胞全体から分離した。

30

【0261】

MNCを計数し、細胞数および生存性をトリパンブルー色素排除試験によって求めた。密度勾配遠心分離後に回収されるMNCの収量がドナー間で変化した。また、MNCの収量が、収集された骨髄の体積に依存している。ALS患者の30ml～50mlの骨髄吸引物から回収されるMNCの収量は 70×10^6 個～ 400×10^6 個のMNCの間で変化した。かつ、製造プロセス全体のために必要である数のMSCを単離するためには十分であった。

【0262】

初代骨髄単核細胞を播種し、製造プロセスの期間中を通してMSCを増殖させるために使用される培地を、血小板成長培地(PM)と称した。PM培地がMSC製造プロセスの期間中を通して使用され(継代0～継代6)[P0～P6]、PM培地は、低グルコースDMEM、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、ヘパリンおよび血小板溶解物を含有した。

40

【0263】

MNCをPM/フラスコにおけるフラスコ中 100000 細胞/cm²～ 400000 細胞/cm²の密度で播種し、37/5%CO₂の加湿インキュベータにおいて一晩インキュベーションした。翌日、細胞培養物を顕微鏡で調べた。この段階で、非接着性の単核細胞が培養上清に浮遊しており、プラスチック接着性のMSCがフラスコ表面に付着していた。非接着性の単核細胞を含有する培養上清を除き、接着性細胞をDMEMにより穏やかに洗浄した。DMEMを捨て、新鮮なPMを、プラスチック接着性のMSC細胞を含

50

有するそれぞれのフラスコに加えた。MNC播種からMSC採取までのプロセス相を継代0 (P0) と称した。

【0264】

P0細胞を37 / 5% CO₂の加湿インキュベータにおいてインキュベーションし、PMを、培養物がサブコンフルエンスになるまで週に二回、新鮮なPMと取り換えた。

【0265】

継代1を採取したとき、MSC細胞集団を、CD73、CD90およびCD105の細胞表面での発現(95%超の陽性)によってフローサイトメトリーによって特徴づけた。細胞集団の純度を確認するために、かつ、造血細胞の混入の存在を排除するために、これらの細胞は、フローサイトメトリーによって求められる場合、CD3、CD14、CD19、CD34、CD45およびHLA-DRの発現を欠いているべきである(2%未満の陽性)。

10

【0266】

MSCの増殖：MSCの初代培養物を、プラスチック基体に付着する単一細胞層としてインビトロ成長させた。利用可能な基体表面が細胞によって覆われると(コンフルエントな培養物)、成長が遅くなり、その後、停止した。したがって、細胞が健康かつ活発に成長することを保つために、培養物がサブコンフルエンスになったときには、細胞を定期的な間隔で継代培養することが必要であった。それぞれの継代培養サイクルが継代と称される。培養物は、最大で継代6まで継代培養される場合がある。MSC培養物を、製造プロセスの期間中を通して注意深い顕微鏡検査によって継続してモニターし、かつ、MSCのプラスチック接着性および特徴的な形態学的外観についてモニターした。

20

【0267】

MSC培養物を500細胞/cm² ~ 2000細胞/cm²の密度で継代した。

【0268】

MSCを継代するために、培養上清をフラスコから除き、トリプシン(Invitrogen)をそれぞれのフラスコに加えた。フラスコを37で数分間インキュベーションし、得られた細胞懸濁物をフラスコから遠心分離チューブに集め、そして、トリプシンを希釈し、残留する細胞を集めるために、DMEMをそれぞれのフラスコに加えた。

【0269】

細胞懸濁物を遠心分離し、PMに再懸濁し、計数し、新しい培養容器において500細胞/cm² ~ 2000細胞/cm²の密度で再播種した。その後、培養物を37 / 5% CO₂の加湿インキュベータにおいてインキュベーションした。

30

【0270】

それぞれの継代の過程において、PMを、培養上清のすべてを取り除き、それを同じ体積の新鮮なPMと取り換えることによって3日後 ~ 4日毎に取り換えた。

【0271】

分化の誘導：継代2(しかし、遅くとも継代6)で開始して、培養物が十分な数の細胞を含有することが見積もられると、MSCを採取し、NTF分泌細胞(MSC-NTF)への分化を誘導するために再播種した。

【0272】

MSCを、6000細胞/cm² ~ 8000細胞/cm²にわたる濃度でPMにおける分化の誘導のために播種した。3日後、分化を、PMを、1mMのジブチリル環状AMP(cAMP)、20ng/mlのヒト塩基性線維芽細胞増殖因子(hbFGF)、5ng/mlのヒト血小板由来増殖因子(PDGF-AA)および50ng/mlのヒトヘレグリン1が補充された低グルコースDMEMを含有する分化培地(S2M)と取り換えることによって誘導した。培養物を、採取するまでの3日間、分化培地において維持した。

40

【0273】

分化終了の1日前に、培養上清を、GDNFおよびBDNFの分泌をELISAまたはHPLCによって分析するためにサンプル採取し、細胞を細胞表面マーカーの分析のために採取した。

50

【0274】

移植のための最終生成物の採取：分化プロセスが終了したとき、NTF分泌細胞（MSC-NTF）を移植のために採取した。MSC-NTF細胞をDMEMにおいて洗浄し、細胞数および生存性を求めた。80%超の細胞生存性をもたらす培養物のみを移植のために使用許可とした。細胞をIM移植のための 10×10^6 細胞/mlのDMEM中濃度で再懸濁し、また、 22.5×10^6 個～ 30×10^6 個の濃度で再懸濁した（注入のための体積は一定であるので、最終的な細胞濃度は患者重量に基づく）。

【0275】

分化プロセスが終了したとき、培養上清を集め、NTF（GDNFおよびBDNF）の分泌のためにサンプル採取した。

10

【0276】

最終生成物の安定性：培地または塩溶液におけるMSC-NTF最終生成物の安定性を2つの細胞濃度、すなわち、 10×10^6 細胞/ml（IM移植のために使用される細胞濃度）および 35×10^6 細胞/ml（IT移植のために予想される最大細胞濃度）において採取後7時間までにわたって2～8で評価した。細胞を、50mlのチューブにおいて5時間、2～8でインキュベーションし、その後、同じ温度でさらに2時間、1mlおよび5mlのシリンジにそれぞれ移した。結果は、両方の濃度における細胞の数が合計で7時間にわたって安定していたこと、そして、80%～100%の範囲にあることを示している（図1A～図1B）。

20

【0277】

生成物の包装およびラベル表示

それぞれの処置用包装物が、神経栄養因子を分泌する新しく採取された自己の培養された間葉系骨髄間質細胞（MSC-NTF）を臨床研究プロトコルにおける適切な投与経路のために規定された用量にしたがって含有する注入準備のできたシリンジ（1つまたは複数）からなる。

【0278】

最も重要なラベルが、個別シリンジケースで包装されるであろうそれぞれのシリンジに添付されるであろう。副次的なラベルがシリンジケースまたは仕切りトレイに添付され、移植のために医師に伝えられるであろう。

30

【0279】

移植の1日前に採取されたMSC-NTF細胞を、同じ患者のMSCの発現と比較して、細胞表面におけるCD44およびCD73の発現についてフローサイトメトリーによって分析した。加えて、MSC-NTFを、分泌された神経栄養因子（GDNFおよびBDNF）についてELISAによって分析した。このアッセイを、移植当日に採取された培養上清に対して繰り返した。

【0280】

無菌性試験が、移植の3日前に、プールされた培養上清に対して行われる。マイコプラズマ培養およびnPCR試験が、分化終了の1日前または2日前に無作為に採取されたフラスコから行われる。エンドトキシン試験およびグラム染色試験を移植当日に最終生成物に対して行った。

40

【0281】

MSC-NTFの選択を本明細書中下記の表1における判断基準に従って行った。

表1

明細	方法の参照	試験
細胞懸濁物は、目に見える異物粒子を本質的に含まない。	目視検査 USP29<788>(注入物における粒状物)	1. 外観
CD44、CD73、95%超の陽性;CD44のMFI(MSC-NTF) 0.67±0.1、同じ患者のMSCと比較した場合;CD73のMFI 1.76±0.7、同じ患者のMSCと比較した場合	表面マーカーのためのFACS分析	2. 同一性 (移植前日に行われる)
IM投与のために、NMT 300EU、<1EU/ml IT投与のために、NMT 12EU、<0.03EU/ml	LAL試験 USP29<85>	3. 純度
GDNF 2倍~20倍、MSC-NTF対MSC	GDNFのためのELISA	4. 効力
BDNF 2倍~5倍、MSC-NTF対MSC	BDNFのためのELISA	5. 効力
投与経路に従って: IM:48×10 ⁶ 細胞[2×10 ⁶ 細胞/部位×24部位] IT:90×10 ⁶ 細胞[1.5~2×10 ⁶ 細胞/Kg体重]	トリパンブルー排除色素	6. 総細胞数
>80%	トリパンブルー排除色素	7. 生細胞数
IM移植のためには0.3ml IT移植のためには4ml	USP 29 <1>	8. シリンジ体積
陰性の試験結果	USP 34<71>	9. 無菌性試験:
陰性の試験結果	グラム染色	10. 迅速微生物混入
陰性の試験結果	21CFR Subpart D, Sec. 610.30およびnPCR	11. マイコプラズマ

10

20

【0282】

結果

A L S 患者の M S C の単離および増殖：A L S 患者の骨髄から分離される単核細胞の収量が患者間で変化し、 70×10^6 細胞 ~ 400×10^6 細胞の範囲であった。A L S 患者の単核細胞から濃縮される M S C の数もまた、 5×10^6 個 ~ 150×10^6 個の範囲で一定しなかった。

30

【0283】

A L S 患者の M S C を成長させ、合計で60日間までの期間、最大で7回に及ぶ継代(32回の集団倍加)にわたって継代した(図2)。平均集団倍加時間が0.5日であった。M S C 細胞数における患者間の変動性にもかかわらず、細胞増殖プロセスは一貫しており、再現性があった(図2)。

40

【0284】

M S C の表現型特徴づけ：A L S 患者の M S C 細胞を表面抗原発現のフローサイトメトリー分析によって特徴づけた。A L S 患者の M S C は、本明細書中下記の表2に例示されるように、フローサイトメトリーによって求められる場合、C D 1 0 5、C D 7 3 および C D 9 0 を細胞表面に発現すること(95%を超える陽性)、ならびに、C D 3、C D 1 4、C D 1 9、C D 3 4、C D 4 5 および H L A - D R の発現を欠くこと(2%未満の陽性)(このことから、造血細胞混入の存在が除外される)が見出された。

表2

CDマーカー (% 陽性)→	CD73	CD90	CD105	CD3	CD14	CD19	CD34	CD45	HLA-DR
患者の頭文字↓									
OP	99.88	99.98	99.69	0	0(陰性)	0(陰性)	2.22	0	0(陰性)
SR	99.63	99.5	99.23	0	0(陰性)	0	0	0	0(陰性)
MM	99.84	95.31	99.64	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)
IP	99.76	96.41	99.44	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)
WH	99.84	98.34	99.48	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)
NM	99.26	97.76	99.33	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)
VS	99.18	94.07	96.39	0(陰性)	0.77	0(陰性)	0.29	0(陰性)	0(陰性)
KY	99.81	82.77	96.39	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)
MS	99.82	99.6	99.68	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)
ZH	99.45	98.75	99.03	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)
AZ	99.45	98.75	99.03	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)
RS	99.39	93.91	97.85	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)	0(陰性)

10

【0285】

さらなる特徴づけ：三血球系分化、形態学的分析および細胞遺伝学的分析：MSC細胞の同一性を確認するために、製造プロセスの開発の期間中に、MSCは、脂肪細胞系譜、骨細胞系譜および軟骨細胞系譜への分化を受けることが示された（図3）。骨芽細胞の形成が、MSCを、デキサメタゾン（Dex）、アスコルビン酸、グリセロリン酸と一緒に培養することによって誘導され、オステオカルシン抗体を使用して評価された。脂肪細胞が、MSCを、ヒドロコルチゾン、イソブチルメチルキサンチンおよびインドメタシンが95%エタノールにおいて補充された基礎培地で培養することによって誘導され、細胞質におけるオイルレッドO染色された中性脂質の存在によって特定された。MSCの軟骨細胞形成が、デキサメタゾン、アスコルビン酸-リン酸、プロリン、ビルビン酸およびTGF- β 3において誘導され、アルシアンブルー染色された硫酸化プロテオグリカンの分泌およびDapi対比染色によって決定された（図3A～図3I）。細胞遺伝学的分析を、5回の継代の後における染色体安定性および正常な核型を確認するためにALS患者のMSCに対して行った。少なくとも14個の分裂中期細胞をそれぞれの展開サンプルにおいて分析した。トリソミー、4倍体または染色体再配置が、図4A～図4Bに示されるように、全く認められなかった。

20

30

【0286】

図5A～図5Fに例示されるように、凍結保存は、脂肪細胞系譜、骨細胞系譜および軟骨細胞系譜に分化するALS患者のMSCの能力に影響を及ぼさなかった。

【0287】

MSC-NTF分泌細胞へのMSCの分化：NTF分泌：MSC-NTF分泌細胞への分化を、分化培地を使用して、第I/I相臨床研究の期間中に12名のALS患者におけるMSC継代3の細胞において誘導した。分化後、NTF分泌を、GDNFおよびBDNFのためのELISAアッセイを使用して測定した。第I/I相臨床研究における12名の異なるALS患者のMSC-NTF細胞のGDNFおよびBDNFの分泌が図6A～図6Bに示される。GDNFの分泌が、MSCと比較して、MSC-NTFにおいて平均で2倍～20倍誘導されることが見出され、BDNFの分泌が、MSCと比較して、MSC-NTFにおいて1.5倍～5倍誘導されることが見出された（ $n=10$ 、図6A～図6B）。比産生性におけるこれらの違いは患者間の変動性の結果である。

40

【0288】

分化終了および移植の前日、MSC-NTF細胞のGDNF分泌が分化最終日におけるその分泌の $54 \pm 12\%$ であることが見出され、MSC-NTF細胞のBDNF分泌が分化最終日におけるその分泌の $64 \pm 21\%$ であることが見出された。

【0289】

50

アッセイを患者のより大きいサンプルに対して繰り返した。第 I / I I 相臨床研究および第 I I a 相臨床研究における 23 名の異なる ALS 患者の MSC - NTF 細胞の BDNF 分泌が図 7 に示される。BDNF の分泌が、MSC と比較して、MSC - NTF において平均で 2.2 ± 0.7 倍誘導されることが見出された (図 7)。

【0290】

第 I / I I 相臨床研究および第 I I a 相臨床研究における 23 名の異なる ALS 患者の MSC - NTF 細胞の GDNF 分泌が図 8 に示される。GDNF の分泌が、MSC と比較して、MSC - NTF において 6.6 ± 2.4 倍を超えて誘導されることが見出された (図 8)。(注: GDNF の発現が ELISA アッセイの検出レベルに達しなかったとき、定量化の最小限界 (23 pg/ml) に等しい名目的な値が、誘導倍数の計算に備えるために与えられる。したがって、結果が、 $>$ として表される)。

10

【0291】

分化終了および移植の前日、MSC - NTF 細胞の BDNF 分泌が分化最終日におけるその分泌の $76 \pm 23\%$ であることが見出され、MSC - NTF 細胞の GDNF 分泌が分化最終日におけるその分泌の $66 \pm 18\%$ であることが見出された。

【0292】

TNF - アルファ誘導タンパク質 6 (TSG - 6) の分泌を、MyBioSource (米国) から得られる ELISA キットを使用して、MSC 培養上清および MSC - NTF 培養上清の 13 個のサンプルにおいて試験した。

20

【0293】

試験されたすべての MSC 培養上清および MSC - NTF 培養上清が TSG - 6 について陰性であることが見出された。

【0294】

さらなる MSC - NTF 上清サンプルがインスリン増殖因子 - 1 (IGF - 1) および神経成長因子 (NGF) について陰性であることが、IGF - 1 のための ELISA キット (ヒト IGF - 1 DuoSet、カタログ番号 DY291; R&D System) を使用して ELISA によって測定される場合に、見出された。

【0295】

VEGF および HGF の分泌を、MSC を本明細書中上記に記載されるように ALS 患者から分化させることによって作製される MSC - NTF において測定した。それぞれのサイトカインのための ELISA アッセイが下記の通りであった (VEGF DuoSet、R&D systems、カタログ: DY293B、および、HGF DuoSet、R&D systems、カタログ: DY294)。MSC - NTF 細胞は、 $20 \text{ ng} / 10^6 \text{ 細胞} \sim 100 \text{ ng} / 10^6 \text{ 細胞}$ の範囲における比産生性を伴って、高レベルの VEGF および HGF を分泌することが見出された (図 9 および図 10)。

30

【0296】

第 I / I I 相臨床研究および第 I I a 相臨床研究における 22 名の異なる ALS 患者の MSC - NTF 細胞の VEGF 分泌が図 9 に示される。VEGF の分泌が、MSC と比較して、MSC - NTF において平均で 4.1 ± 1.4 倍誘導されることが見出された (図 9)。

40

【0297】

第 I / I I 相臨床研究および第 I I a 相臨床研究における 19 名の異なる ALS 患者の MSC - NTF 細胞の HGF 分泌が図 10 に示される。HGF の分泌が、MSC と比較して、MSC - NTF において 6.7 ± 3.9 倍誘導されることが見出された (図 10)。分化終了および移植の前日、MSC - NTF 細胞の VEGF 分泌が分化最終日におけるその分泌の $69 \pm 25\%$ であることが見出され、MSC - NTF 細胞の HGF 分泌が分化最終日におけるその分泌の $79 \pm 31\%$ であることが見出された ($n = 8$)。

【0298】

移植後の安定性: '移植後' の、生体内における ALS 患者の MSC - NTF 細胞による NTF の分泌の安定性を評価するために、分化終了時に採取される MSC - NTF 細胞

50

を、‘移植後’の生体内状況を模擬するために成長培地に再播種した。

【0299】

3日の期間が終了したとき、細胞を採取し、NTFの分泌を、細胞が最初に採取された日(分化培地での3日後、時間‘0’)における分泌と比較した。

【0300】

MSC-NTF細胞は、成長培地における3日間の培養の後でもまた、NTF分泌のレベルを維持することが見出された。ALS患者の細胞を使用する4つの独立した実験において、‘移植後’3日でのMSC-NTF細胞のGDNFおよびBDNFの比産生性が、採取時における比産生性と類似していることが見出された(図11A~図11B)。

【0301】

MSC-NTF分泌細胞の表現型特徴づけ：MSC-NTF分泌細胞の表現型特徴づけでは、分化終了時(3日目)において、MSC-NTF分泌細胞はMSCに特徴的なすべての表面マーカーを発現し、かつ、MSC陰性マーカーのどれも発現しないことが示された(図12A~図12B)。

【0302】

それにもかかわらず、MSCに特徴的な表面マーカーのいくつかはMSC-NTF細胞への分化の期間中にダウンレギュレーションされた。MSC表面マーカーのダウンレギュレーションが、骨形成系譜、軟骨形成系譜および脂肪生成系譜に沿った分化について以前に示されている(Jeong JA他、2007; Lee HJ他、2009; Nieh age C他、2011; Liu F他、2008)。CD44およびCD73、すなわち、特徴的なMSC表面マーカーの発現が、分化期間中にMSC-NTF細胞の表面において調節されることが見出された。CD44の発現が、平均蛍光強度(MFI)によって求められる場合、同じ日に、かつ、フローサイトメーターの同一装置状況のもとでフローサイトメーターによって分析されるMSCにおけるその発現と比較して、分化プロセス終了時(3日目)のMSC-NTF細胞において59%にダウンレギュレーションされることが見出された(図13A~図13Bおよび表5)。同じ実験手法を使用した場合、CD44の発現が、MSCと比較して、MSC-NTFにおいてダウンレギュレーションされ、分化終了前日においてもまた同様な程度にダウンレギュレーションされることが見出された(MSC-NTF/MSCのMFI比が2日目において0.67である;表3)。MFIによって求められるように、CD73の発現が、MSCにおけるその発現と比較して、分化プロセス終了時(3日目)のMSC-NTF細胞において80%アップレギュレーションされることが見出された(図13A~図13Bおよび表3)。CD73の発現が、分化終了前日においてもまた同様な程度にMSC-NTFにおいてアップレギュレーションされることが見出された(76%、2日目、表3)。したがって、MSC-NTF細胞の表面におけるCD44およびCD73の調節された発現は、同じ日に、かつ、同じ実験条件のもとで分析される同じ患者のMSC細胞におけるそれらの発現と比較した場合、MSC-NTF細胞の明確な特徴である。

【0303】

この発現パターンが、ほぼ同じ程度にはあるが(表3)、(移植当日での)分化終了時(3日目)、同様にまた、分化終了前日(2日目、表3)の両方において、MSC-NTF細胞に特徴的であり、このことは、これらの表面マーカーが、MSC-NTF細胞を移植のために特定することのために使用されることを可能にする。

【0304】

本明細書中下記の表3では、MSCと比較して、MSC-NTF細胞表面における表面マーカー発現の調節がまとめられる。

10

20

30

40

表3

MFI* (比 ±SD MSC-NTF/MSC)

CD 73		CD 44		
p 値		p 値		
p<0.05	1.76±0.7	p<0.001	0.67±0.1	2日目
p<0.001	1.80±0.5	p<0.001	0.59±0.2	3日目

【0305】

CD105の発現が、MSC-NTF細胞へのMSCの分化の期間中、異なるパターンに従った。2日目において、MSC-NTF細胞の95.8±4.2%（平均±標準偏差）がCD105を発現し、MSC-NTF細胞のMFIが、MSCと比較して、平均して1.36±0.26（平均±標準偏差）にアップレギュレーションされた。分化の3日目には、同じ日に、かつ、同一状況のフローサイトメーターのもとでフローサイトメトリーによって分析されるMSCにおけるその発現と比較して、MSC-NTFの73.6±13.8%（平均±標準偏差）のみがCD105を発現し、一方、陽性細胞のMFIが平均して0.50±0.22（平均±標準偏差）に低下した（図14A～図14B）。

10

【0306】

本明細書中下記の表4では、MSCと比較して、MSC-NTF細胞表面におけるさらなる表面マーカーの発現がまとめられる。

20

マーカー	特徴づけ	結果	
		MSC-NTF	MSC
CD 24	細胞接着分子	陰性	陰性
CD 133	幹細胞/始原体細胞マーカー (プロミン-1)	陰性	陰性
A2B5	幹細胞マーカー接着	陰性	陰性
CD 56	神経細胞接着分子 (NCAM)	約7%が陽性	約20%が陽性
CD 15	発生段階特異的胎児抗原-1 (Lex-1)	陰性	陰性
CD 184	Gタンパク質共役受容体	陰性	陰性
CD 271	低親和性神経成長因子受容体	陰性	陰性
CD29	インテグリンβ1(3つのクローン)	95%超が陽性	95%超が陽性
CD106	血管内皮接着分子(VCAM-1)	陰性	陰性
GLAST	グルタミン酸-アスパラギン酸輸送体	陰性	陰性
CD47	インテグリン会合タンパク質	95%超が陽性	95%超が陽性
CD309	血管内皮増殖因子受容体-2 (KDR/VEGFR-2)	陰性	陰性
MSCA-1	急速に増殖する未成熟な 始原体細胞	約65%が陽性	約65%が陽性

10

20

30

40

【0307】

細胞周期分析：ALS患者のMSC-NTF分泌細胞の細胞周期分布をフローサイトメトリーによって分析し、同じ患者のMSCの細胞周期分布と比較した。MSC-NTF分泌細胞は、細胞周期循環の集団に特徴的な分布を呈示するMSCと比較して、分化最終日(3日目)(図15A~図15B)において、同様にまた、分化終了前日(2日目、表5)において細胞周期のG₀/G₁期で停止されることが見出された。これらの結果は、MSC-NTF細胞が細胞周期循環の細胞集団でないことを示している。

表5

% G₀-G₁

平均 ± SD

		MSC-NTF	MSC	
p<0.001	n=13	87.4±5	75.5±2	2日目
p<0.001	n=13	86.9±5	78.7±4	3日目

【0308】

50

実施例 2

神経栄養因子を分泌する間葉系幹細胞 (MSC-NTF) の miRNA 分析

本研究の目的は、マイクロRNAに基づく (miRNA) フィンガープリンティングを行って、4つの独立する一致ドナーサンプルの骨髄由来MSCおよびMSC-NTF細胞の特徴づけを、miRNA発現プロファイルの間における相違点および類似点を特定すること、ならびに、これら2つの細胞タイプの間における相違点を明確にし、かつ、それらがどのように表されるか (すなわち、神経/星状膠細胞の分化経路、同様にまた、BDNF、GDNFおよびVEGFの発現およびシグナル伝達) を決定する主要なmiRNAを特定することによって行うことである。

【0309】

本研究では、サンプルのすべてにわたって信頼性よく検出された合計で160個のmiRNAが特定され、miRNAプロファイリングを介して明白であるドナー間の変動性が比較的小さかった。また、主成分分析 (PCA) により、サンプル集合が細胞タイプに基づいて明確なクラスターを形成することが明らかにされた。

【0310】

これら2つの異なる細胞タイプについてのmiRNAプロファイルの統計学的比較により、41個の示差的に発現された (DE) 主要なmiRが特定された。

19個がMSCに対してMSC-NTFにおいてアップレギュレーションされた。

22個がMSCに対してMSC-NTFにおいてダウンレギュレーションされた。

【0311】

文脈分析により、これらの示差的に発現されたmiRNAは、VEGFシグナル伝達、神経形成を調節することにおける機能を有するタンパク質、および/または、神経前駆体細胞表現型に関連するタンパク質をコードするmRNAを標的とすることが明らかにされた。

【0312】

材料および方法

サンプル処理および品質管理：総RNAを4つの無関係なドナーサンプルの一致するMSCおよびMSC-NTFの対から単離した。RNA濃度を、サンプルの収量および純度の指標としてもまた求められる260/280nmおよび260/230nmにおける吸光度比 (Abs) によって求めた。すべてのサンプルについて、RNAのさらなるQCを、RNA Integrity Number (RIN) を求めるために、Agilent 2200 TapeStationおよびScreenTape R6Kキットを使用して行った。

【0313】

マイクロアレイによるプロファイリング：サンプルを、(Agilent社のSurePrint G3ヒトv16マイクロRNA 8x60Kマイクロアレイスライド (miRBaseバージョン16.0) を使用して) Agilent miRNAプラットフォームで分析した。100ナノグラムの総RNA (これはヌクレアーゼ非含有水における50ng/μlの作業用溶液に由来する) をそれぞれのマイクロアレイ実験のための投入物として使用した。それぞれのスライドが8個の個別的アレイを含有し、それぞれのアレイが1349個のマイクロRNA (1205個のヒト由来 (miRbase18において実際のmiRNAとして確認される1199個) および144個のウイルス由来) を表す。

【0314】

マイクロアレイプロセスの4つの主要な工程が下記の通りであった：

1. RNAを単色のCy3系試薬により標識すること。
2. 標識されたRNAサンプルのマイクロアレイへのハイブリダイゼーション。
3. 洗浄工程。
4. スライド走査、データ取り込みおよび特徴抽出 (アレイのスポットをmiRNAのIDに対して一致させること)、ならびに、得られた画像およびデータのファイルに対する品質管理検査。

10

20

30

40

50

【0315】

データの前処理およびQC：マイクロアレイのデータを、前処理およびデータ品質管理（QC）の方法を使用して正規化した。アレイの品質管理を、下記の計量学に基づく外れ値の検定を使用して行った：

- ・アレイあたりの平均シグナル
- ・アレイあたりの平均バックグラウンド
- ・%存在（発現がそれぞれのアレイで検出されるmiRNAの%）
- ・十分に正規化されたサンプル集合のPCA（Jackson JE、1991）から得られる主成分1～3。

【0316】

加えて、サンプル間の相関分析を、ピアソンの相関計量学を使用して、正規化後のデータセットに対して行った。外れ値を、 $p < 0.05$ で判定される有意性によるグラブスの外れ値検定（Grubbs、1969）を使用して特定した。

【0317】

データ分析

検出コールの概要：個々のmiRNAについての検出コール（存在または非存在）をサンプル全体にわたって比較した。検出コールを、Agilent Feature Extraction（AFE）ソフトウェア（バージョン10.7.3.1）を使用して計算した。これらのコールがどのようにもたらされるかの詳細な記述が、Agilentのウェブサイトで、Feature Extraction Reference Guideにおいて入手可能である。

【0318】

miRNAの発現がアレイについての検出レベルに達しなかったときには、名目上の強度値をこれらのデータ点に対して与えた。この値（ \log_2 の目盛りでの1.1375、および、線形目盛りでの2.2000）をそれぞれの検出されなかったmiRNAに割り当て、正規化プロセスの期間中に計算し、そして、その後のデータ分析のときの計算不能な数学的操作から生じるエラーを回避するために使用した。加えて、この正規化方法論では、その結果として、非常に類似する発現強度を有するmiRNAの様々な群に対して、同じ平均正規化強度が割り当てられた。

【0319】

miRNA発現データの要約的な概略可視化：発現データの要約的な描写が、PCAを使用してもたらされた。PCAにより、主要な影響が、高次元のデータ、例えば、様々なマイクロアレイ・データセット（これらはそれぞれのサンプルについて、数百個のmiRNAからの発現測定値を有する）などから抽出される。これらの主要な影響（主成分）を、データの主要な特性を保持する簡略化されたグラフィック描写で呈示することができる。重要な点が、類似するmiRNAプロファイルを有するサンプルがPCAプロットでは同じ空間にクラスターを形成するという点である。加えて、ヒートマップが、発現レベルおよびサンプル関連性を可視化するために作製された。ヒートマップに関連するクラスターを、ユークリッド距離をワード連鎖とともに使用して凝縮型階層的クラスタリングから導いた。

【0320】

仮説の検証：種々のサンプル群の間における同等に発現された（EE）miRNAおよび示差的に発現された（DE）miRNAの特定、ならびに、DE miRNA集合の機能的分析。同等な発現レベルを有するmiRNA（安定的に発現された不変マーカー）を、両側検定として、2つの片側検定（TOST）の手法を使用して特定した（例えば、Barker LE他（2002）を参照のこと）。この手法はFDAによって生物学的同等性研究のために推奨される（FDA指針書、2001）。下限および上限からそれぞれ0.05未満である最大値（pFDR）を有するmiRNAを、同等に発現されると見なした。同等性のために許される発現レベル範囲（ ）は \log_2 空間において1.5未満の倍率変化に対応する。

10

20

30

40

50

【0321】

それぞれの細胞群の間でのmiRNA発現における差を、両側分散分析(ANOVA)を種々の細胞群の間で行うことによって評価した。ANOVAから得られるp値を、ベンジャミニ・ホックベルグ法(Benjamini YおよびHochberg Y、1995)を使用して多重検定拡大のために調節した。この値がpFDRと呼ばれる。pFDR < 0.05での仮説検証からの有意差を有し、同様にまた、1.5以上の絶対倍率変化(FC)を有するmiRNAを、特定のサンプルと、残るサンプルとの間で示差的に発現されると見なした。0.05のp値カットオフが、マイクロアレイのデータを分析するときの一般的な慣行であり、また、1.5の倍率変化閾値の使用は、Agilentシステムからの記録されたアレイ間の変動性に基いている。

10

【0322】

機能的分析(文脈分析)を、示差的に発現された(DE)miRNAのリストをGeneGo MetaCoreTM(v6.14)に読み込み、それらをそれらの確認されたmRNA標的に対してマッピングすることによって行った。加えて、文献調査を、選択されたDE miRNAについて行った。

【0323】

結果

8個すべてのサンプルの全体にわたって検出されるmiRNAの完全なリストが本明細書中下記の表6に示される。

表6

20

miRNA.ID
hsa-let-7a-5p
hsa-let-7b-5p
hsa-let-7c
hsa-let-7d-5p
hsa-let-7e-5p
hsa-let-7f-5p
hsa-let-7g-5p
hsa-let-7i-5p
hsa-miR-100-5p
hsa-miR-103b
hsa-miR-106a-5p
hsa-miR-106b-5p
hsa-miR-107
hsa-miR-10a-5p
hsa-miR-10b-5p
hsa-miR-1181
hsa-miR-1202

30

40

hsa-miR-1207-5p	
hsa-miR-1225-5p	
hsa-miR-1228-3p	
hsa-miR-1234	
hsa-miR-1246	
hsa-miR-125a-5p	
hsa-miR-125b-5p	
hsa-miR-1260a	
hsa-miR-1260b	10
hsa-miR-1268b	
hsa-miR-127-3p	
hsa-miR-1275	
hsa-miR-1280	
hsa-miR-1305	
hsa-miR-130a-3p	
hsa-miR-130b-3p	
hsa-miR-132-3p	
hsa-miR-136-5p	20
hsa-miR-137	
hsa-miR-140-3p	
hsa-miR-140-5p	
hsa-miR-143-3p	
hsa-miR-145-5p	
hsa-miR-146a-5p	
hsa-miR-148a-3p	
hsa-miR-150-3p	
hsa-miR-151a-5p	
hsa-miR-152	30
hsa-miR-154-3p	
hsa-miR-155-5p	
hsa-miR-15a-5p	
hsa-miR-15b-5p	
hsa-miR-16-5p	
hsa-miR-181a-5p	
hsa-miR-181b-5p	
hsa-miR-1915	
hsa-miR-193a-3p	40
hsa-miR-193a-5p	
hsa-miR-193b-3p	
hsa-miR-195-5p	
hsa-miR-196a-5p	
hsa-miR-196b-5p	

hsa-miR-1973	
hsa-miR-199a-3p	
hsa-miR-199a-5p	
hsa-miR-199b-5p	
hsa-miR-19a-3p	
hsa-miR-19b-3p	
hsa-miR-20a-5p	
hsa-miR-20b-5p	
hsa-miR-21-3p	10
hsa-miR-21-5p	
hsa-miR-210	
hsa-miR-214-3p	
hsa-miR-22-3p	
hsa-miR-22-5p	
hsa-miR-221-3p	
hsa-miR-221-5p	
hsa-miR-222-3p	
hsa-miR-224-5p	20
hsa-miR-23a-3p	
hsa-miR-23b-3p	
hsa-miR-23b-5p	
hsa-miR-24-3p	
hsa-miR-25-3p	
hsa-miR-26a-5p	
hsa-miR-26b-5p	
hsa-miR-27a-3p	
hsa-miR-27b-3p	
hsa-miR-2861	30
hsa-miR-299-5p	
hsa-miR-29a-3p	
hsa-miR-29b-3p	
hsa-miR-29c-3p	
hsa-miR-30a-5p	
hsa-miR-30b-5p	
hsa-miR-30c-5p	
hsa-miR-30d-5p	
hsa-miR-30e-5p	
hsa-miR-31-3p	40
hsa-miR-31-5p	
hsa-miR-3132	
hsa-miR-3162-5p	
hsa-miR-3195	

hsa-miR-3196	
hsa-miR-3198	
hsa-miR-320a	
hsa-miR-320b	
hsa-miR-320c	
hsa-miR-320d	
hsa-miR-320e	
hsa-miR-324-3p	
hsa-miR-331-3p	10
hsa-miR-337-5p	
hsa-miR-342-3p	
hsa-miR-34a-3p	
hsa-miR-34a-5p	
hsa-miR-34b-5p	
hsa-miR-3529-3p	
hsa-miR-361-5p	
hsa-miR-3651	
hsa-miR-3656	
hsa-miR-3659	20
hsa-miR-365b-3p	
hsa-miR-3663-3p	
hsa-miR-3665	
hsa-miR-3679-5p	
hsa-miR-374a-5p	
hsa-miR-374c-3p	
hsa-miR-376a-3p	
hsa-miR-376c	
hsa-miR-377-3p	30
hsa-miR-381	
hsa-miR-409-3p	
hsa-miR-424-5p	
hsa-miR-4281	
hsa-miR-4284	
hsa-miR-4286	
hsa-miR-4291	
hsa-miR-4299	
hsa-miR-4324	
hsa-miR-4327	40
hsa-miR-450a-5p	
hsa-miR-455-3p	
hsa-miR-487b	
hsa-miR-493-5p	

hsa-miR-494
hsa-miR-495
hsa-miR-503
hsa-miR-574-3p
hsa-miR-574-5p
hsa-miR-630
hsa-miR-638
hsa-miR-642b-3p
hsa-miR-654-3p
hsa-miR-762
hsa-miR-874
hsa-miR-92a-3p
hsa-miR-93-5p
hsa-miR-939
hsa-miR-940
hsa-miR-99a-5p
hsa-miR-99b-5p

10

20

【0324】

完全なサンプル集合のPCAおよびヒートマップ可視化：それぞれの細胞群の中におけるドナー間の変動性およびこれらの異なる細胞群の間における関連性の概略を得るために、完全なデータセットの可視化が、160個すべての検出されたmiRNAを使用してPCAによってもたらされた。PCAプロットでは、プロットにおけるそれぞれの完全なミクロRNA-1データセットの情報量(変動)が主成分(PC)投影における単一の点として表される。重要な点が、類似するデータセットがまとまってクラスターを形成するという点である。

【0325】

これを最初、初めの3つのPCの投影として行った(図16A)。それぞれのサンプルにおけるmiRNAについての発現パターンおよびサンプル関連性の代替的な可視化を、凝縮型階層的クラスタリングに基づくヒートマップを使用して作製した(図16B)。

30

【0326】

PCAおよびヒートマップ・クラスターグラムは、サンプル集合が、2つの異なるクラスターを細胞タイプに基づいて形成して明瞭に別れることを示す。

【0327】

示差的に発現された(DE)miRNAの特定
群間における差の仮説検証を、両側ANOVAを使用して行い、有意性を $pFDR < 0.05$ および $FC = 1.5$ において判定した。群間におけるDE miRNAの特定を本明細書中上記に記載されるように行った。

40

【0328】

2つの細胞タイプについてのmiRNAプロファイルの統計学的比較により、41個のDE(示差的に発現された)主要なmiRNAが特定された。

MSCに対するMSC-NTFの比較を行ったとき、19個がアップレギュレーションされた。

MSCに対するMSC-NTFの比較を行ったとき、22個がダウンレギュレーションされた。

DE主要miRNAの発現プロファイルの要約が図17および図18に示される。MSCに対してMSC-NTFにおいてアップレギュレーションされる19個の主要なmiRNAが図17に示され、MSCに対してMSC-NTFにおいてダウンレギュレーションされ

50

る 22 個の主要な miRNA が図 18 に示される。

【0329】

選択された DE miRNA の文脈分析

miRNA DE プロファイルによって影響される経路の概要を MSC - NTF について導き出すために、選択された DE kmirs (商標) を、GeneGO MetaCore TM および文献調査を使用して、高い信頼度で実験的に確認された mRNA 標的に対してマッピングした。

【0330】

血管形成：いくつかの DE miRNA が、VEGF シグナル伝達および / または血管形成を調節することに関与するとして特定された。miRNA - 503 が、MSC - NTF における最も顕著にダウンレギュレーションされた miRNA であり (8.4 倍)、発現が、MSC - NTF 3、MSC - NTF 5 および MSC - NTF 7 では検出限界未満に低下した。MSC - NTF 2 のみが、非常に低い発現を有した。このことが図 19 に示され、図 19 では、倍率変化を可視化するための助けとして、発現値が線形目盛りで変換されている。

10

【0331】

加えて、一群のあまり大きくダウンレギュレーションされなかった miRNA (1.5 倍 ~ 2.0 倍) もまた、VEGF A を直接に標的とするとして (miR - 145 a、20 a - 5 p、miR - 320 a および 424 - 5 p)、VEGFR - 2 を直接に標的とするとして (424 - 5 p)、FGF 2 を直接に標的とするものとして特定され (424 - 5 p)、または、抗血管形成性であるとして報告されるものとして特定された (miR - 222 - 3 p) (Poliseno 他、2006; Chamorro - Jorganes 他、2011; Anand、2013; Kim 他、2013)。

20

【0332】

そのうえ、miR - 132 - 3 p が高度にアップレギュレーションされ、MSC - NTF において強く誘導された (7.9 倍)。このことが図 20 に示され、図 20 では、再度ではあるが、倍率変化を可視化するための助けとして、発現値が線形目盛りで変換されている。

【0333】

miR - 132 - 3 p は血管形成促進性であり、p120 RasGAP を阻害することを介して、VEGF シグナル伝達の負の調節因子である。加えて、miR - 132 - 3 p を阻止することにより、血管形成が低下する (Anand、2013)。対照的に、miR - 34 a - 5 p、すなわち、抗血管形成性の miRNA (Zhao 他、2010; Nalls 他、2011) が両方の細胞タイプにおいて高発現し、しかし、これもまた、MSC - NTF においてアップレギュレーションされる (4 倍)。図 17 および図 22 B を参照のこと。しかしながら、miR - 34 a - 5 p はまた、ニューロン細胞の分化においてある一定の役割を有しており、この影響が、上記で議論される血管形成に対する潜在的な負の影響を上回って優位であるかもしれない。

30

【0334】

明らかに、MSC - NTF における VEGF シグナル伝達を伴う複雑な相互作用経路が存在する。しかしながら、結局は、このデータを一緒に用いると、とりわけ、miR - 503 および miR - 132 - 3 p の大きな調節は、VEGF シグナル伝達が、MSC に対する比較では、MSC - NTF においてアップレギュレーションされ、これにより、これらの細胞における血管形成促進能の強化を引き起こすであろうことを示唆していると考えられる。図 21 を参照のこと。

40

【0335】

神経前駆体細胞 (NPC) / 神経形成：いくつかの DE miRNA が、NPC および / またはニューロンにおいて富化 / アップレギュレーションされ、かつ、神経形成に関するものとして特定された。

【0336】

50

miR-132-3pが高度にアップレギュレーションされ、MSC-NTFにおいて強く誘導された(7.9倍)。図17を参照のこと。miR-132-3pが、ニューロンの発達および成熟化において重要な役割を果たしており、また、その発現が樹状突起の伸長のために要求され、かつ、(インビトロおよびインビボでの)樹状突起形成を、p250GAP(RacおよびCdc42の負の調節因子)を阻害することによって促進させる(Magill他、2010)。

【0337】

miR-762もまた、MSC-NTFにおいて強くアップレギュレーションされた(5.9倍)。図22Aを参照のこと。miR-762は、ニューロンに多く存在するmiRNAであり、胚性幹細胞からのNPC分化の期間中にアップレギュレーションされ、重要な役割をこのプロセスにおいて果たしている(Zhang他、2012)。

10

【0338】

miR-34a-5pが両方の細胞タイプにおいて高発現し、MSC-NTFにおいてアップレギュレーションされる(4倍)。図22Bを参照のこと。このmiRNAが、その上昇が神経突起の伸長を促進させることが示されている骨髄MSC由来のNPCにおいてアップレギュレーションされ、このmiRNAはニューロン分化の重要な調節因子である(Agostini他、2011; Chang他、2011)。

【0339】

全体として、MSC-NTFにおけるこれらのmiRNAのアップレギュレーションは、これらの細胞が、ニューロンに向かう分化軌道を有するニューロン前駆体表現型を有することと一致している。

20

【0340】

知られている生物学的機能を何ら有しない高度に識別的なDE miRNAは、候補となる代用の効力マーカーとして使用されるかもしれない:現時点で確認されているmRNA標的を何ら有しない一組の高度に識別的なmiRNAが、MSC-NTFにおいてDEであるとして特定された(図23A~図23E)。これらの主要なmiRNAは、MSC-NTFのための、候補となる同一性/効力マーカーを表す。miR-3659については、発現レベルが4名のドナーのうち3名において検出限界未満にダウンレギュレーションされ、ドナー2のみが、低い、検出可能な発現を有した。

【0341】

30

実施例3

定量的PCRの妥当性確認研究

サンプル処理および品質管理:すべての総RNAサンプルをRNAの濃度、収量および品質について調べた。RNAのQCを、RINを求めるために、Agilent 2200 Tape StationおよびR6K Screen Tapes and ReagentsをSystemic's SOP(SSOP27)に従って使用して行った。

【0342】

フェーズIで使用される8個のサンプルをRNAの量および品質について事前に調べた。

【0343】

40

qPCRプロファイリングおよびデータ分析:qPCRを、miRCURY LNA(商標)Universal RT microRNA PCRの方法論および試薬(Exiqon A/S)を取り扱いマニュアル(v5.1;プロトコルA-個々のアッセイ)に従って使用して行った。簡単に記載すると、cDNAを、5ng/ulの開始RNAテンプレートを使用して合成した。LNA(商標)RNA Spike-in対照RNAをそれぞれのサンプルに加えた。候補miRNA(kmiR(商標))の発現レベルを、miRNA特異的プライマー組を使用して、目的とするすべてのサンプルについて技術的な三連で測定した。

【0344】

陽性対照(これはLNA(商標)RNA-Spike-in対照を測定する)ならびに

50

‘RNAテンプレートなし’および‘逆転写酵素なし(RTなし)’の陰性対照が、試験されたサンプルのそれぞれのために含まれた。陰性の‘cDNAテンプレートなし’対照が、試験されたmiRNAのそれぞれのために含まれた。

【0345】

qPCRを、LC480 LightCycler (Roche Ltd)を使用して行い、計量サイクル(Cq)値を、二次微分極大法を使用して絶対的定量化分析を行うことによって計算した。

【0346】

標準曲線および効率推定：miRNA増幅プロセスの効率および直線性を、標準曲線手法を使用して必要な場合には評価した(特注および実験的に確認されていないプライマーのみ)。8個のMSC-NTFサンプルからプールされるcDNAの連続希釈物を技術的な三連でhsa-miR-762およびhsa-miR-3663-3について処理した。得られたCq値をBiogazelle gbase+(バージョン2.5)(Hellemans J他、2007)に取り込んで、標準曲線を作成し、効率値を計算した。

10

【0347】

最適なmiRNA正規化パネルの選択：候補となる不変miRNAの発現レベルを8個すべてのサンプルについて技術的な三連で測定した(フェーズI)。得られたCq値をBiogazelle gbase+(バージョン2.5)に取り込んだ。不変マーカーの最も安定なサブセットの選択(正規化群の最適な数およびそれらの同一性)を、qbase+において実行されるように、Genormアルゴリズム[Vandesompele J他、2002]を使用して行った。不変遺伝子の1つのサブセットが、それらのGenorm発現安定性値の幾何平均(M値)が0.5未満であり、増大する数の遺伝子を含む2つの逐次正規化因子の間における対となる変化(V値)が0.15未満であり、かつ、変動係数(Cv)が0.25未満であるならば、最適かつ安定的であり、したがって、正規化のために好適であると見なされた。その後、それぞれのサンプルについての正規化因子をこのサンプルにおける選ばれた正規化群の発現の幾何平均として計算した。

20

【0348】

データの前処理：miRNAの発現レベルをすべてのサンプルについて技術的な三連で測定した。得られたCq値をBiogazelle's qbase+(v2.5)に取り込んだ。Cq値が、適用可能な場合には、Pfafl法[Pfafl MW、2001]を使用して増幅効率における差について補正し、サンプル特異的な正規化因子を使用して正規化した[Hellemans J他、2007]。技術的な複製物を平均化し、正規化された相対的量(NRQ)を、選択された不変miRNAの幾何平均に対する平均Cq値の比(正規化因子)を計算することによってそれぞれのmiRNAおよびサンプルについて求めた[Hellemans J他、2007]。

30

【0349】

統計学的分析：サンプル群間でのmiRNAの発現レベルにおける差を、両側t検定を使用して形式的に検定した。差は、t検定のp値が0.05未満であったならば、有意であると見なした。

40

【0350】

分析されたmiRNAのリスト：

hsa-miR-22-3p; miR-19b-3p; hsa-miR-503、hsa-miR-320b、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-34a-5pおよびhsa-miR-132-3p、hsa-miR-320aおよびmiR-222-3p。

【0351】

結果

hsa-miR-22-3pおよびhsa-miR-19b-3pの発現レベルがMSCおよびMSC-NTFにおいて同一であることが見出された。図24Aは、hsa-miR-503-5pが、MSCと比較して、MSC-NTFにおいてダウンレギュレーション

50

オンされることを例示する。図24Bは、hsa-miR-320bが、MSCと比較して、MSC-NTFにおいてダウンレギュレーションされることを例示する。図24Cは、hsa-miR-424-5pが、MSCと比較して、MSC-NTFにおいてダウンレギュレーションされることを例示する。図24Dは、hsa-miR-34a-5pが、MSCと比較して、MSC-NTFにおいてアップレギュレーションされることを例示する。図24Eは、hsa-miR-132-3pが、MSCと比較して、MSC-NTFにおいてアップレギュレーションされることを例示する。図24Fは、hsa-miR-320aが、MSCと比較して、MSC-NTFにおいて有意にダウンレギュレーションされないことを例示する。図24Gは、miR-222-3pが、MSCと比較して、MSC-NTFにおいて有意にダウンレギュレーションされないことを例示する。

10

【0352】

実施例4

神経栄養因子を分泌する間葉系幹細胞(MSC-NTF)のタンパク質分析

材料および方法

タンパク質分解：タンパク質を、9Mの尿素、400mMの重炭酸アンモニウムおよび10mMのDTT、ならびに、2サイクルの超音波処理において細胞ペレットから抽出した。それぞれのサンプルから得られる20μgのタンパク質を2.8mMのDTTにより還元し(60で30分間)、400mMの重炭酸アンモニウムにおいて8.8mMのヨードアセトアミドにより修飾し(暗所において室温で30分間)、1:50の酵素対基質比での修飾トリプシン(Promega)により、37で一晩、2Mの尿素、25mMの重炭酸アンモニウムにおいて消化した。さらに2回目のトリプシン処理を4時間行った。

20

【0353】

質量分析法による分析：トリプシン消化ペプチドを、C18チップ(Harvard)を使用して脱塩し、乾燥し、0.1%のギ酸に再懸濁した。

【0354】

ペプチドを、Reprosil逆相材(Dr Maisch GmbH、ドイツ)が充填される0.075x180mmの石英ガラスキャピラリー(J&W)での逆相クロマトグラフィーによって分離した。ペプチドを、0.15μl/分の流速で、水に0.1%のギ酸を含む5%アセトニトリルから28%アセトニトリルへの180分間の直線勾配、28%アセトニトリルから95%アセトニトリルへの5分間の勾配、および、95%アセトニトリルにおける25分間により溶出した。質量分析を、全体的なMS走査、その後、最初のMS走査から選択される10個の最も優勢なイオンの衝突誘起解離(CID)を繰り返し使用して正モードでのQ Exactive質量分析計(Thermo)によって行った。

30

【0355】

3つの生物学的反復物から得られる質量分析データを、1%のFDRによりUniprotデータベースのヒト部分に対してMaxQuantソフトウェア1.3.0.5(Mathias Mann's group)を使用して分析した。データを、同じソフトウェアを使用して無標識分析によって定量化した。強度データを、名目的な分布を得るためにlog2変換した。欠けているデータを10で置き換えた。

40

【0356】

A群とB群との間における並び替えに基づくFDRによるt検定(250のランダム化、閾値=0.05)を、Preseuse 1.3.0.4を使用して行った。同じソフトウェアをさらなる注釈およびデータ相関のために使用した。

【0357】

結果

3622個のタンパク質が、少なくとも2つのペプチドによる研究で特定された。高い類似性がサンプル間に存在するにもかかわらず、強度プロファイル間における相関により、同じ群のサンプルの間におけるより高い相関が示される。

50

【 0 3 5 8 】

本明細書中下記の表 7 および表 8 には、最も示差的に発現されたタンパク質が列挙される。(3 を超えるか、または - 3 未満である差に関して 0 . 0 5 未満の p 値、および、少なくとも 2 回の反復における少なくとも 2 つの特定されたペプチド)。負の値を 1 0 で置き換えた。A = M S C ; B = 分化 M S C 。

表 7—分化サンプルにおけるアップレギュレーションされたタンパク質

名称	記号	Aサンプルにおける平均	Bサンプルにおける平均	例示的な受入番号	配列番号
イソブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、ミトコンドリア	ACAD8	10	25	Q9UKU7	42
C-X-Cモチーフケモカイン 6	CXCL6	10	28	P80162	43
ニューロモジュリン	GAP43	10	28	P17677	44
増殖/分化因子 15	GDF15	10	29	Q99988	45
ヒアルロナンシンターゼ 1	HAS1	10	28	Q92839	46
インターロイキン-1ベータ	IL1B	10	32	P01584	47
インターロイキン-8	IL8	10	30	P10145	48
インヒビンベータA鎖	INHBA	10	27	P08476	49
インスリン受容体基質 1	IRS1	10	27	P35568	50
インテグリンアルファ-1	ITGA1	10	28	P56199	51

10

20

30

ラッカーゼドメイン含有タンパク質1	LACC1	10	29	Q8IV20	52
ラミニンサブユニットアルファ-4	LAMA4	10	28	Q16363	53
ルミカン	LUM	10	27	P51884	54
コラゲナーゼ3	MMP13	10	26	P45452	55
食道正常粘膜特異的遺伝子1タンパク質	NMES1;C15orf48	10	27	Q9C002	56
プレB細胞白血病転写因子相互作用タンパク質1	PBXIP1	10	29	Q96AQ6	57
プレクトストリン相同様ドメインファミリーAメンバー1	PHLDA1	10	28	Q8WV24	58
ホスファチジルイノシトール-3, 4, 5-三リン酸依存性Rac交換体1タンパク質	PREX1	10	26	Q8TCU6	59
プロスタグランジンEシンターゼ	PTGES	10	32	O14684	60
プロスタグランジンG/Hシンターゼ2	PTGS2	10	31	P35354	61
Ras関連タンパク質Rab-27B	RAB27B	10	28	O00194	62
Rho関連GTP結合タンパク質RhoB	RHOB	10	27	P62745	63

10

20

30

40

シアル酸O-アセチルエステラーゼ	SIAE	10	26	Q9HAT2	64
モノカルボン酸輸送体7	SLC16A6	10	27	O15403	65
組織因子経路阻害剤2	TFPI2	10	30	P48307	66
膜貫通タンパク質65	TMEM65	10	26	Q6PI78	67
Vam6/Vps39様タンパク質	VPS39	10	26	Q96JC1	68
3-オキソ-5-ペーターステロイド4-デヒドロゲナーゼ	AKR1D1	14	28	P51857	69
プロピオニル-CoAカルボキシラーゼベータ鎖、ミトコンドリア	PCCB	15	28	P05166	70
インターフェロン調節因子2結合タンパク質様	IRF2BPL	15	28	Q9H1B7	71
組織アルファー-L-フコシダーゼ	FUCA1	14	27	P04066	72
アルド-ケトレダクターゼファミリー-1メンバーC2	AKR1C2	24	29	P52895	73
イノシトール-1, 4, 5-三リン酸受容体相互作用タンパク質	ITPRIP	26	30	Q8IWB1	74
タンパク質KIAA1199	KIAA1199	28	31	Q8WUJ3	75

10

20

30

40

セレン結合タンパク質1	SELENBP1	27	31	Q13228	76
ホスホリパーゼD3	PLD3	27	31	Q8IV08	77
GTP:AMPホスホトランスフェラーゼ、ミトコンドリア	AK3	28	31	Q9UIJ7	78
タンパク質Wnt-5a;タンパク質Wnt	WNT5A	28	31	P41221	79
アルドールレダクターゼファミリーメンバーC3	AKR1C3	25	31	P42330	80
ソーティングネキシン-9	SNX9	28	31	Q9Y5X1	81
ギャップジャンクションアルファ-1タンパク質	GJA1	28	32	P17302	82
ピルビン酸カルボキシラーゼ、ミトコンドリア	PC	27	32	P11498	83
SH3/PXDメイン含有タンパク質2B	SH3PXD2B	28	32	A1X283	84
インテグリンアルファ-2	ITGA2	28	32	P17301	85
シトクロームP450 1B1	CYP1B1	27	33	Q16678	86
キチナーゼ-3様タンパク質1	CHI3L1	15	33	P36222	87
ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ	NAMPT;RP11-92J19.4	30	34	P43490	88
セブラーゼ	FAP	30	33	Q12884	89

10

20

30

40

スーパーオキシドジスムターゼ	SOD2	27	34	P04179	90
アルドーケトレダクターゼファミリー1メンバーC1	AKR1C1	29	34	Q04828	91
FERM、RhoGEFおよびプレクトストリンドメイン含有タンパク質1	FARP1	25	28	Q9Y4F1	92
プロリル4-ヒドロキシラーゼサブユニットアルファ-3	P4HA3	24	28	Q7Z4N8	93
リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼサブユニットM2B	RRM2B	25	29	Q7LG56	94
コアヒストンマクロ-H2A. 2; ヒストンH2A	H2AFY2	26	29	Q9P0M6	95
コリン輸送体様タンパク質1	SLC44A1	26	29	Q8WWI5	96
ニーマン・ピックC1タンパク質	NPC1	25	30	O15118	97
リソゾームアルファ-グルコシダーゼ	GAA	27	31	P10253	98

表8-1 分化サンプルにおけるダウンレギュレーションされたタンパク質

タンパク質名	遺伝子名	Aサンプルにおける平均	Bサンプルにおける平均	例示的な受入番号	配列番号
タイトジャンクションタンパク質ZO-2	TJP2	24	10	Q9UDY2	99

10

20

30

40

アルファー-1, 3-マンノシル糖タンパク質2-ペーターN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ	MGAT1	26	10	P26572	100
スムーセリン (smoothelin)	SMTN	26	10	P53814	101
異所性P顆粒タンパク質5ホモログ	EPG5	25	10	Q9HCE0	102
BRCA1会合ATM活性化因子1	BRAT1	25	14	Q6PJG6	103
WDリピート含有タンパク質36	WDR36	26	10	Q8NI36	104
SH3ドメイン結合タンパク質4	SH3BP4	26	10	Q9P0V3	105
EHDドメイン結合タンパク質1様タンパク質1	EHBP1L1	26	10	Q8N3D4	106
Ras GTPアーゼ活性化様タンパク質IQGAP3	IQGAP3	26	10	Q86VI3	107
リシルオキシダーゼホモログ2	LOXL2	26	10	Q9Y4K0	108
トロポミオシン1(アルファ)、イソ型 CRA__f	TPM1	27	10	Q6ZN40	109
Gem会合タンパク質5	GEMIN5	27	10	Q8TEQ6	110
三者モチーフ含有タンパク質16	TRIM16;CDRT1	27	10	O95361	111
結合組織増殖因子	CTGF	28	10	P29279	112
リンホカイン活性化キラーT細胞起源のプロテインキナーゼ	PBK	26	10	Q96KB5	113

10

20

30

40

テトラトリコペプチドリピータンパク質4	TTC4	27	10	Q5TA95	114
乳ガンの抗エストロゲン剤抵抗性タンパク質1	BCAR1	28	10	P56945	115
リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼサブユニットM2	RRM2	27	10	P31350	116
ユビキチン結合酵素E2C	UBE2C	27	10	O00762	117
好中球デフェンシン1;HP1-56;好中球デフェンシン2;好中球デフェンシン3;HP3-56;好中球デフェンシン2	DEFA1;DEFA3	28	10	P59665	118
Cdc42エフェクタータンパク質3	CDC42EP3	27	10	Q9UKI2	119
コンデンシン複合体サブユニット2	NCAPH	27	10	Q15003	120
Igカッパ鎖C領域	IGKC	28	10	P01834	121
コンデンシン複合体サブユニット3	NCAPG	28	10	Q9BPX3	122
シンコイリン (syncoilin)	SYNC	27	14	Q9H7C4	123
染色体構造維持タンパク質2	SMC2	29	15	O95347	124
コンデンシン複合体サブユニット1	NCAPD2	29	10	Q15021	125

10

20

30

40

インターアルファートリプシン阻害剤重鎖H4; 70kDaのインターアルファートリプシン阻害剤重鎖H4; 35kDaのインターアルファートリプシン阻害剤重鎖H4	ITI4				
		29	15	Q14624	126
チミジル酸シンターゼ	TYMS;TS				
		29	10	P04818	127
セロトランスフェリン	TF				
		30	10	P02787	128
妊娠領域タンパク質	PZP				
		29	15	P20742	129
DNA複製ライセンス化因子MCM7	MCM7				
		30	15	P33993	130
ヘモペキシン	HPX				
		31	15	P02790	131
DNAミスマッチ修復タンパク質 Msh6	MSH6				
		27	23	P52701	132
アンキリンリピートドメイン含有タンパク質13A	ANKRD13A				
		27	23	Q8IZ07	133
ホスデューシン様タンパク質3	PDCL3				
		27	24	Q9H2J4	134
1-ホスファチジルイノシトール-4, 5-ニリン酸ホスホジエステラーゼベーター3	PLCB3				
		27	24	Q01970	135
補体C3; 補体C3ベータ鎖; 補体C3アルファ鎖; C3aアナフィラトキシン; 補体C3bアルファ鎖; 補体C3cアルファ鎖フラグメント1; 補体C3dgフラグメント; 補体C3gフラグメント; 補体C3dフラグメント; 補体C3fフラグメント; 補体C3cアルファ鎖フラグメント2	C3				
		28	25	P01024	136

10

20

30

40

DNA複製ライセンス化因子MCM3	MCM3	30	25	P25205	137
CD97抗原;CD97抗原サブユニットアルファ;CD97抗原サブユニットベータ	CD97	27	24	P48960	138
DNA複製ライセンス化因子MCM6	MCM6	31	25	Q14566	139
DNA複製ライセンス化因子MCM4	MCM4	30	25	P33991	140
Disabledホモログ2	DAB2	29	26	P98082	141
タンパク質KIAA0664	KIAA0664	28	25	O75153	142
DNA複製ライセンス化因子MCM2	MCM2	30	27	P49736	143
タンパク質-リシン6-オキシダーゼ	LOX	29	25	P28300	144
リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼラージサブユニット;リボヌクレオシドニリン酸レダクターゼ	RRM1	29	26	P23921	145
メラノーマ関連抗原D2	MAGED2	30	26	Q9UNF1	146
Igガンマー1鎖C領域	IGHG1	29	26	P01857	147
ヘパラーゼ;ヘパラーゼの8kDaサブユニット;ヘパラーゼの50kDaサブユニット	HPSE	29	26	Q9Y251	148
インボーチンサブユニットアルファ-2	KPNA2	30	27	P52292	149

10

20

30

40

アスパラギンシンセターゼ[グルタミン加水分解性]	ASNS	31	28	P08243	150
アルファ-2-マクログロブリン	A2M	35	27	P01023	151
コラーゲンアルファ-1(I)鎖	COL1A1	35	28	P02452	152
コラーゲンアルファ-1(V)鎖	COL5A1	32	29	P20908	153
DnaJホモログサブファミリーBメンバー4	DNAJB4	31	28	Q9UDY4	154
トロンボスポンジン-1	THBS1	33	29	P07996	155
血清アルブミン	ALB	33	29	P02768	156
コラーゲンアルファ-2(I)鎖	COL1A2	34	29	P08123	157

10

20

【0359】

実施例5

神経栄養因子を分泌する自己の培養された間葉系骨髄間質細胞(MSC-NTF)の移植の安全性、耐容性および治療効果を評価するための、筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者における第I/I相非盲検臨床研究

研究目的：神経栄養因子を分泌する自己の培養された間葉系骨髄間質細胞(MSC-NTF)の注入の安全性、耐容性および治療効果(予備的効力)を、初期疾患段階および進行性疾患段階の筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者のための処置として評価すること。

【0360】

主要評価項目：1. 初期疾患状態のALS患者に対する合計で約 2.4×10^6 個の細胞による二頭筋および三頭筋における24箇所別の部位での多数の筋肉内注入(IM)による、神経栄養因子を分泌する自己の培養された間葉系骨髄間質細胞(MSC-NTF)の1回だけの処置施与の安全性評価および耐容性。

2. 進行性疾患状態のALS患者に対する合計で約 6.0×10^6 個の、神経栄養因子を分泌する自己の培養された間葉系骨髄間質細胞(MSC-NTF)の脳脊髄液(CSF)内への1回だけのクモ膜下注入(IT)の安全性評価および耐容性。

【0361】

副次的評価項目：

- ・ ALS機能評価尺度(ALS-FRS-S)における変化。
- ・ 筋チャートによる、また、必要な場合には握ることによる筋力判定(MVIC)における変化。
- ・ 努力肺活量における変化(FVC%) (進行性疾患状態群のみにおいて)。
- ・ 上肢および下肢のMRIによって推定される筋肉量における変化。
- ・ 上肢および下肢の周囲(cm)における変化。
- ・ EMGパラメータにおける変化。
- ・ 気管切開または永続的な補助換気に至る必要性および至るまでの時間。
- ・ 全生存期間、これにより死亡までの時間を計算する。

30

40

【0362】

対象者の数：合計で12名の対象者 - ALSの初期段階における6名、および、ALS

50

の進行性疾患段階における6名。

【0363】

研究設計：これは、神経栄養因子を分泌する自己の培養された間葉系骨髄間質細胞（MSC-NTF）の安全性、耐容性および予備的効力を、初期疾患段階および進行性疾患段階の筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者のための効力のある処置として評価するための第I/I I相の前向き非盲検の2患者群臨床研究である。本研究は単一拠点での試験である。

【0364】

登録されるすべての患者が研究登録前にALS疾患の記録された病歴を有するであろう。6ヶ月未満の継続期間により初期段階のALS疾患として診断される患者、および、6ヶ月～12ヶ月の継続期間により進行性段階のALS疾患と診断される患者。「素因を有する」として特定されるALS患者が打診され、インフォームドコンセント用紙（ICF）に署名するように要請されるであろう。全体として、12名の患者が募集され、患者のALS疾患重篤度に基づいて下記の2つの処置群に割り当てられるであろう：

A群 - 初期ALS疾患段階の6名の患者

B群 - 進行性ALS疾患の6名の患者

【0365】

この研究への登録に先立つ患者スクリーニング期間の予想された継続期間は2回目の通院時における研究登録日の2週間前から2日前までの間である（臨床検査室での結果を含む参加基準/除外基準に一致することの確認）。適格患者が研究に登録されるであろうし、かつ、疾患の進行速度を決定するための3ヶ月の「導入期間」（これは±5日の時間窓をすべての通院のために可能にする）の間において2週間毎に観察されるであろう。登録後約6週間の後での「導入期間」の間に、両方の研究群の患者が骨髄吸引（MBA）手順を受けるであろうし、MSC-NTF細胞が、現時点で開示された方法に基づいて骨髄吸引物から製造されるであろう。「導入期間」での最後の通院のとき、両方の研究群の患者は処置を受けるであろうし、MSC-NTFが初期ALS患者および進行性ALS患者へのIM注入またはIT注入によってそれぞれ移植されるであろう。

【0366】

MSC-NTF移植後、患者は、（±5日の時間窓をすべての通院のために可能にする）6ヶ月の処置後追跡調査期間にわたって毎月、観察されるであろう。処置の安全性、有害事象および調査パラメータが、疾患のALS進行速度評価を確定させるために、「導入期間」の継続期間および処置後追跡調査期間の全体を通して記録されるであろう。

【0367】

研究期間：全体として、研究プロトコルのもとでは、それぞれの患者が約9ヶ月の研究期間の間に合計で13回通院するであろう。

【0368】

処置用量：本明細書中下記の表9に詳述される通り。

10

20

30

表9

	A群—ALS初期段階	B群—ALS進行性段階
対象者数	6	6
投与経路	IM	IT
移植のためのNTF細胞濃度	約 5×10^3 細胞/ μ l	約 30×10^3 細胞/ μ l
注入NTF細胞数/箇所	約 1×10^6 細胞	約 60×10^6 細胞
注入箇所数	24	1
細胞総数/患者	約 24×10^6 細胞	約 60×10^6 細胞
細胞体積/注入	200 μ l	2 ml
シリンジ総数	24	1
シリンジのサイズおよびタイプ(BD)	1 ml ルアーロック 309628	3 ml ルアーロック 309578

10

【0369】

結果

IM投与またはIT投与のどちらかによるMSC-NTF処置は、6回の毎月の追跡調査通院の期間中において安全であり、十分に許容された。処置に関連した著しい有害事象が、どちらの投与経路によってでも12名の処置された患者において何ら認められなかった。6名中2名の患者が紫斑および発熱をIM投与後に経験し、6名中3名の患者が、頭痛、頸部硬直および発熱をIT投与後に経験した。

20

【0370】

図25に例示されるように、IT処置の患者についてのALS機能評価スコア(ALSFRS-R)が、処置前よりも処置後において、より穏やかな月間低下速度を示した：傾きが、3ヶ月間にわたる-1.5から、6ヶ月間にわたる0.08に改善した。

【0371】

図26に例示されるように、IT処置の患者についての努力肺活量(FVC)が、処置前よりも処置後において、より穏やかな月間低下速度を示した：傾きが、3ヶ月間にわたる-0.107から、6ヶ月間にわたる-0.06に改善した。

30

【0372】

図27に例示されるように、筋肉周囲もまた、同じように正の傾向を示した。これらの違いは、おそらくは患者数が少ないために、統計学的有意性に達しなかった。

【0373】

実施例6

神経栄養因子を分泌する自己の培養された間葉系骨髄間質細胞(MSC-NTF)の移植の安全性、耐容性および治療効果を評価するための、筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者における第IIa相非盲検用量漸増臨床研究

研究目的：研究目的は、神経栄養因子を分泌する自己の培養された間葉系骨髄間質細胞(MSC-NTF)の漸増する用量のクモ膜下腔内および筋肉内に同時に施される注入の安全性、耐容性および治療効果(予備的効力)を、初期疾患段階の筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者のための処置として評価することである。

40

【0374】

主要評価項目：初期疾患状態のALS患者に対する脳脊髄液(CSF)内への1回だけのクモ膜下注入(IT)に加えて、二頭筋および三頭筋における24箇所の別個の部位での多数の筋肉内注入(IM)によって、漸増する低用量、中間用量および高用量(それぞれ、 94×10^6 個、 141×10^6 個および 188×10^6 個)で投与される、神経栄養因子を分泌する自己の培養された間葉系骨髄間質細胞(MSC-NTF)の1回だけの処置施与の安全性評価および耐容性。

50

【0375】

副次的評価項目：

- ・ALS機能評価尺度(ALS-FRS-S)における変化。
- ・握ることによる筋力判定(MVIC)における変化。
- ・%努力肺活量(FVC)における変化。
- ・上肢のMRIによって推定される筋肉量における変化。
- ・上肢および下肢の周囲(cm)における変化。
- ・EMGパラメータにおける変化。

【0376】

対象者の数：ALS初期疾患状態にある合計で12名の対象者。

10

【0377】

研究設計：これは、神経栄養因子を分泌する自己の培養された間葉系骨髄間質細胞(MSC-NTF)の安全性、耐容性および予備的効力を、初期疾患段階の筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者のための効力のある処置として評価するための第IIa相の前向き非盲検用量漸増の3患者群臨床研究である。本研究は単一拠点での試験である。

【0378】

登録されるすべての患者が研究登録前にALS疾患の記録された病歴を有するであろう。2年未満の継続期間により初期段階のALS疾患として診断される患者。「素因を有する」として特定されるALS患者が打診され、インフォームド Consent 用紙(ICF)に署名するように要請されるであろう。全体として、12名の患者が募集されるであろう。

20

【0379】

処置が最低用量(94×10^6 細胞)により開始されるであろう。用量は、安全性分析の後でのみ、その次の患者群のためにその次の中間用量および高用量(それぞれ、 141×10^6 個および 188×10^6 個)に増大されるであろう。

【0380】

この研究への登録に先立つ患者スクリーニング期間の予想された継続期間は2回目の通院時における研究登録日の2週間前から2日前までの間である(臨床検査室での結果を含む参加基準/除外基準に一致することの確認)。適格患者が研究に登録されるであろうし、かつ、疾患の進行速度を決定するための3ヶ月の「導入期間」(これは±5日の時間窓をすべての通院のために可能にする)の期間中において1ヶ月毎に観察されるであろう。登録後約6週間の後での「導入期間」の間に、両方の研究群の患者が骨髄吸引(MBA)手順を受けるであろうし、MSC-NTF細胞が、Brainstorm Cell Therapeutics Ltdが権利を有する方法に基づいて骨髄吸引物から製造されるであろう。「導入期間」での最後の通院のとき、患者は処置を受けるであろうし、MSC-NTFが初期ALS患者へのIM+ITによって移植されるであろう。

30

【0381】

MSC-NTF移植後、患者は、(±5日の時間窓をすべての通院のために可能にする)6ヶ月の処置後追跡調査期間にわたって毎月、観察されるであろう。処置の安全性、有害事象および調査パラメータが、疾患のALS進行速度評価を確定させるために、「導入期間」の継続期間および処置後追跡調査期間の全体を通して記録されるであろう。

40

【0382】

研究期間：全体として、研究プロトコルのもとでは、それぞれの患者が約9ヶ月の研究期間の間に合計で10回通院するであろう。

【0383】

処置用量：本明細書中下記の表10に詳述される通り。

表10

		A群— 低用量	B群— 中間用量	C群— 高用量
対象者数		4	4	4
投与経路		IM+IT	IM+IT	IM+IT
用量 IM		1x10 ⁶ 細胞	1.5x10 ⁶ 細胞	2x10 ⁶ 細胞
注入部位数		24	24	24
用量 IT(平均70Kg)		1x10 ⁶ 細胞/Kg 体重	1.5x10 ⁶ 細胞/Kg 体重	2x10 ⁶ 細胞/Kg 体重
注入部位数		1	1	1
細胞濃度/用量	IM	5x10 ⁶ 細胞/ml	7.5x10 ⁶ 細胞/ml	10x10 ⁶ 細胞/ml
	体積	200 μl/部位	200 μl/部位	200μl/部位
総IM用量		24 x 10 ⁶ 細胞	36 x 10 ⁶ 細胞	48 x 10 ⁶ 細胞
細胞濃度/用量	IT	17.5x10 ⁶ 細胞/ml	26.25x10 ⁶ 細胞/ml	35x10 ⁶ 細胞/ml
	体積	4 ml	4 ml	4 ml
総IM用量		70 x 10 ⁶ 細胞	105 x 10 ⁶ 細胞	140 x 10 ⁶ 細胞
総細胞用量		94 x 10 ⁶ 細胞	141 x 10 ⁶ 細胞	188 x 10 ⁶ 細胞

10

20

30

40

【0384】

効力評価：MSC - NTF処置の予備的効力評価は、研究の処置後追跡調査期間に沿った下記の変数の観察に基づくであろう：ALS機能評価尺度（ALS - FRS - R）、握ることによる筋力判定（MVIC）、%努力肺活量（FVC）、上肢のMRIによって推定される筋肉量、上肢および下肢の周囲（cm）、EMGパラメータ。

【0385】

安全性評価：

対象者の安全性が、下記の変数の測定値を使用して、MSC - NTFによる処置の後で評価されるであろう：

・ 理学的検査、

50

- ・生命徴候（HR、BP、RP、体温）、
- ・臨床検査室パラメータ：
 - ・CBC - 各種指数を伴うRBC、鑑別を伴うWBC、血小板数、ヘモグロビン（Hb）およびヘマトクリット（Ht）
 - ・凝固機能 - プロトロンビン時間（PT）、INR、部分トロンボプラスチン時間（PTT）、フィブリノーゲン
 - ・電解質（ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、塩化物）、グルコース、総タンパク質、トリグリセリド（TG）、総コレステロール、HDL、LDLについての血液化学
 - ・腎機能（尿素、クレアチニン）
 - ・肝機能（総ビリルビン、AST（GOT）、ALT（GPT）、ALP）
 - ・尿検査（ディップ・スティック試験） - 比重、pH、グルコース、タンパク質、ケトン体、血液
- ・有害事象の記録、および
- ・併用薬

10

【0386】

統計学的分析：

この研究で得られ、かつ、CRFにおいて記録されるすべてのデータが適宜、リストに記載され、また、記述的な群統計学（平均、標準偏差、最小値、最大値、有効事例数）とともに表にされるであろう。統計学的な処理および計算が3つの患者群について並行して行われるであろう。離散変数（例えば、性別、状態、有害事象の数（発生、重篤度、IPとの関連性）などについては、頻度、パーセントおよび分布がコンピューター計算されるであろう。3つの群の間における結果が比較され、統計学的分析によって分析されるであろう。

20

【0387】

両側t検定が、ベースラインからの効力パラメータにおける変化を比較するために使用されるであろう。

【0388】

さらなるデータ分析が適宜行われるであろう。それぞれの統計学的検定が、0.05の有意性水準により分析されるであろう：p = 0.05は有意な結果を意味し、p > 0.05は、有意でない結果を意味する。

30

【0389】

実施例7

1工程プロトコルまたは2工程プロトコルを使用して得られるMSC-NTFの収量の比較

材料および方法

1工程プロトコル：実施例1に記載される通り。

【0390】

2工程プロトコル：ヒトMSC（12000細胞/cm²）を、低グルコースDMEM、L-グルタミン、ビルビン酸ナトリウム、ヘパリンおよび血小板溶解物を含むPMに播種した。2日後、培地を、2mMのL-グルタミン（Biological Industries）、20ng/mlのヒト上皮増殖因子（hEGF）、20ng/mlのヒト塩基性線維芽細胞増殖因子（hbFGF）（R&D Systems）およびN2補充物（Invitrogen）が補充された低グルコースDMEMと置き換えた。72時間後、培地を、1mMのジブチリル環状AMP（dbcAMP）、0.5mMのイソブチルメチルキサンチン（IBMX）（Sigma-Aldrich）、5ng/mlのヒト血小板由来増殖因子（PDGF）、50ng/mlのヒトニューレグリン1-1/HRG1-1EGFドメインおよび20ng/mlのhbFGF（すべてが、R&D Systemsから得られる）が補充されたDMEMと、さらに3日間、取り換えた。

40

【0391】

50

結果

図 28A ~ 図 28C に例示されるように、1 工程プロトコルは、3 つの異なる患者サンプルにおいて示されるように、2 工程プロトコルを使用して得られる収量と比較して、MSC-NTF の有意により高い収量であって、実施例 1 および実施例 6 において概略された用量で患者における臨床試験を支援することができる実行可能な生産的製造プロセスを確立することを可能にする収量をもたらした。

【0392】

本発明はその特定の実施態様によって説明してきたが、多くの別法、変更および変形があることは当業者には明らかであることは明白である。従って、本発明は、本願の請求項の精神と広い範囲の中に入るこのような別法、変更および変形すべてを包含するものである。

10

【0393】

本明細書で挙げた刊行物、特許および特許出願はすべて、個々の刊行物、特許および特許出願が各々あたかも具体的にかつ個々に引用提示されているのと同程度に、全体を本明細書に援用するものである。さらに、本願で引用または確認したことは本発明の先行技術として利用できるという自白とみなすべきではない。節の見出しが使用されている程度まで、それらは必ずしも限定であると解釈されるべきではない。

【0394】

引用文献

Agostini M, Tucci P, Steinert JR, Shalom-Feuerstein R, Rouleau M, Aberdam D, Forsythe ID, Young KW, Ventura A, Concepcion CP, Han YC, Candi E, Knight RA, Mak TW, Melino G (2011). microRNA-34a regulates neurite outgrowth, spinal morphology, and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(52):21099-104.

20

Anand S (2013). A brief primer on microRNAs and their roles in angiogenesis. *Vasc Cell*. 5(1):2.

30

Barker LE, Luman ET, McCauley MM, Chu SY (2002). Assessing equivalence: an alternative to the use of difference tests for measuring disparities in vaccination coverage. *Am J Epidemiol.* 156(11):1056-61.

Benjamini Y and Hochberg Y (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Stat Soc B*, 57:289–300.

Caporali A, Emanuelli C (2011). MicroRNA-503 and the extended microRNA-16 family in angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med.* 21(6):162-6.

10

Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Penalva LO, Sandhu D, Fernández-Hernando C, Suárez Y (2011). MicroRNA-16 and microRNA-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(11):2595-606.

20

Chang SJ, Weng SL, Hsieh JY, Wang TY, Chang MD, Wang HW (2011). MicroRNA-34a modulates genes involved in cellular motility and oxidative phosphorylation in neural precursors derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *BMC Med Genomics.* 4:65.

FDA guidance document “Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence” (2001).

www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070244.pdf

30

Grubbs, F (1969). Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples, *Technometrics*, 11:1-21.

Jackson JE. (1991). *A User’s Guide to Principal Components*, New York: John Wiley & Sons

40

Kim J, Kang Y, Kojima Y, Lighthouse JK, Hu X, Aldred MA, McLean DL, Park H,

Comhair SA, Greif DM, Erzurum SC, Chun HJ (2013). An endothelial apelin-FGF link mediated by miR-424 and miR-503 is disrupted in pulmonary arterial hypertension. *Nat Med.* 19(1):74-82.

Leeper NJ, Cooke JP (2011). MicroRNA and mechanisms of impaired angiogenesis in diabetes mellitus. *Circulation.* 123(3):236-8.

Magill ST, Cambronne XA, Luikart BW, Liroy DT, Leighton BH, Westbrook GL, Mandel G, Goodman RH (2010). microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(47):20382-7.

Nalls D, Tang SN, Rodova M, Srivastava RK, Shankar S (2011). Targeting epigenetic regulation of miR-34a for treatment of pancreatic cancer by inhibition of pancreatic cancer stem cells. *PLoS One.* 6(8):e24099.

Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, Mercatanti A, Hammond S, Rainaldi G (2006). MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood.* 108(9):3068-71.

Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16(2):159-78.

Zhang D, Zhao T, Ang HS, Chong P, Saiki R, Igarashi K, Yang H, Vardy LA (2012). AMD1 is essential for ESC self-renewal and is translationally down-regulated on differentiation to neural precursor cells. *Genes Dev.* 26(5):461-73.

Zhao T, Li J, Chen AF (2010). MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299(1):E110-6. Zheng K, Li H, Huang H, Qiu M (2012). MicroRNAs and glial cell development.

10

20

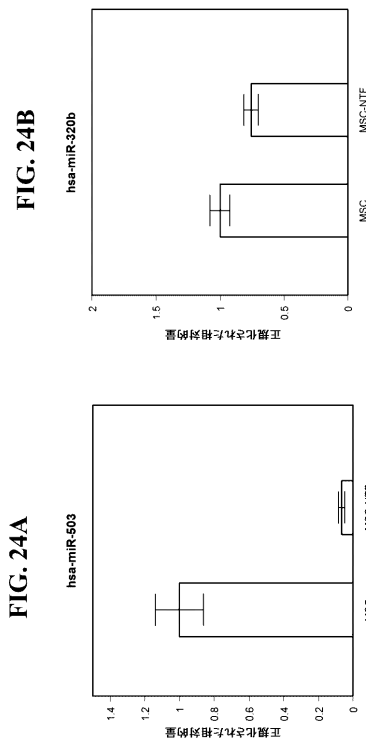
30

40

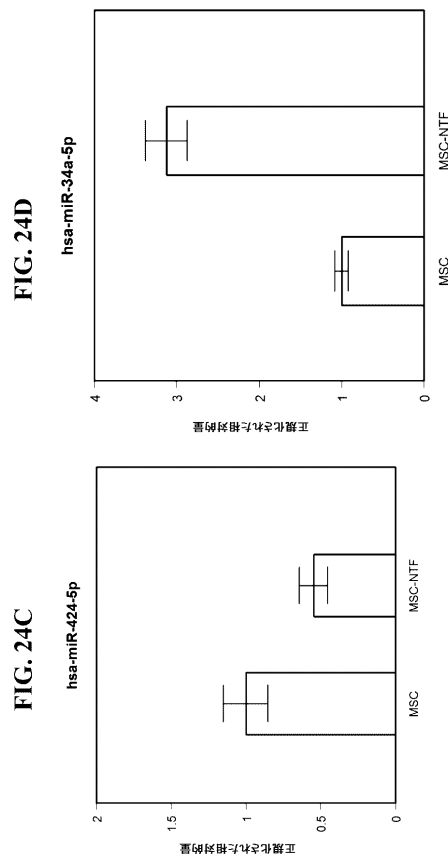
Neuroscientist. 18(2):114-8.

Zhou B, Ma R, Si W, Li S, Xu Y, Tu X, Wang Q (2013). MicroRNA-503 targets FGF2 and VEGFA and inhibits tumor angiogenesis and growth. *Cancer Lett.* 333(2):159-69.

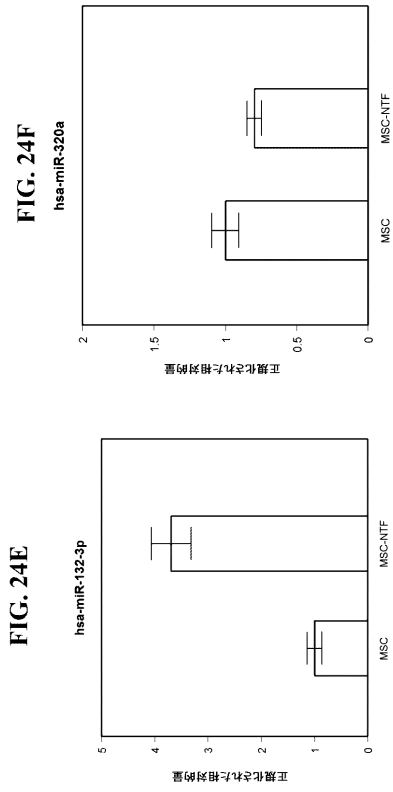
【 图 2 4 A - 2 4 B 】



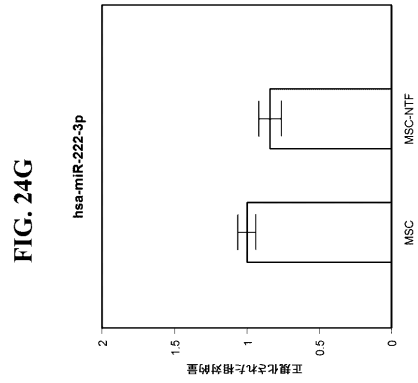
【 图 2 4 C - 2 4 D 】



【 24E - 24F 】



【 24G 】



【図 1 A - 1 B】

FIG. 1B

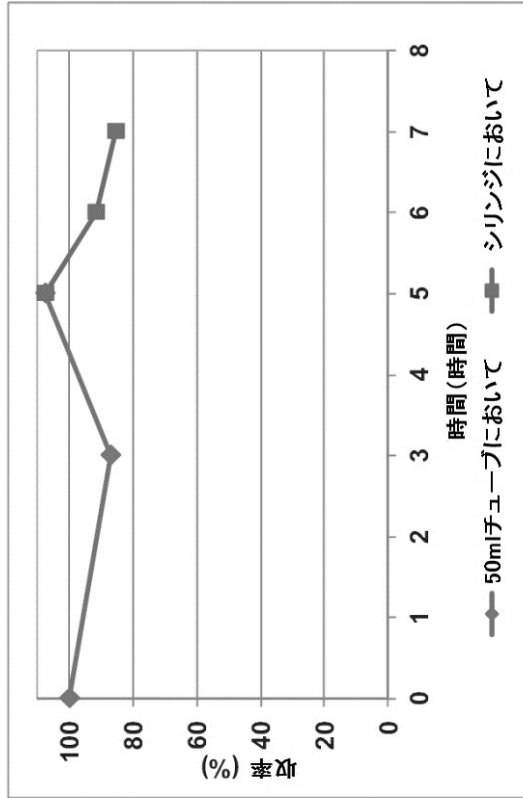
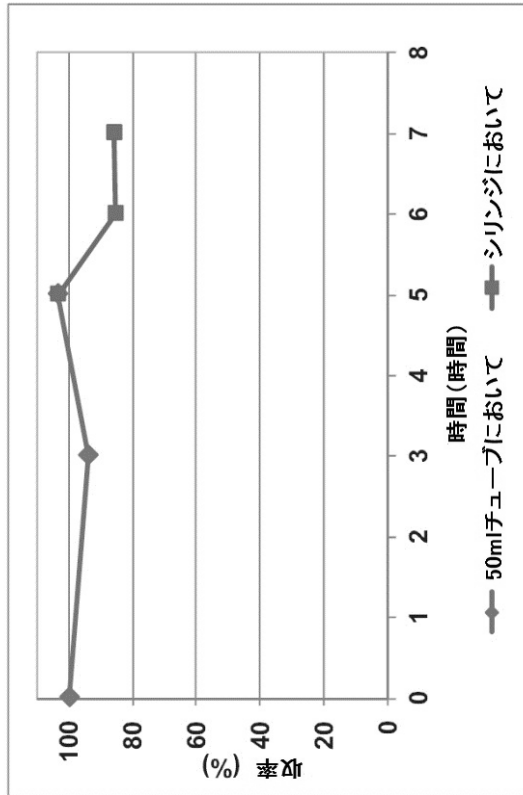
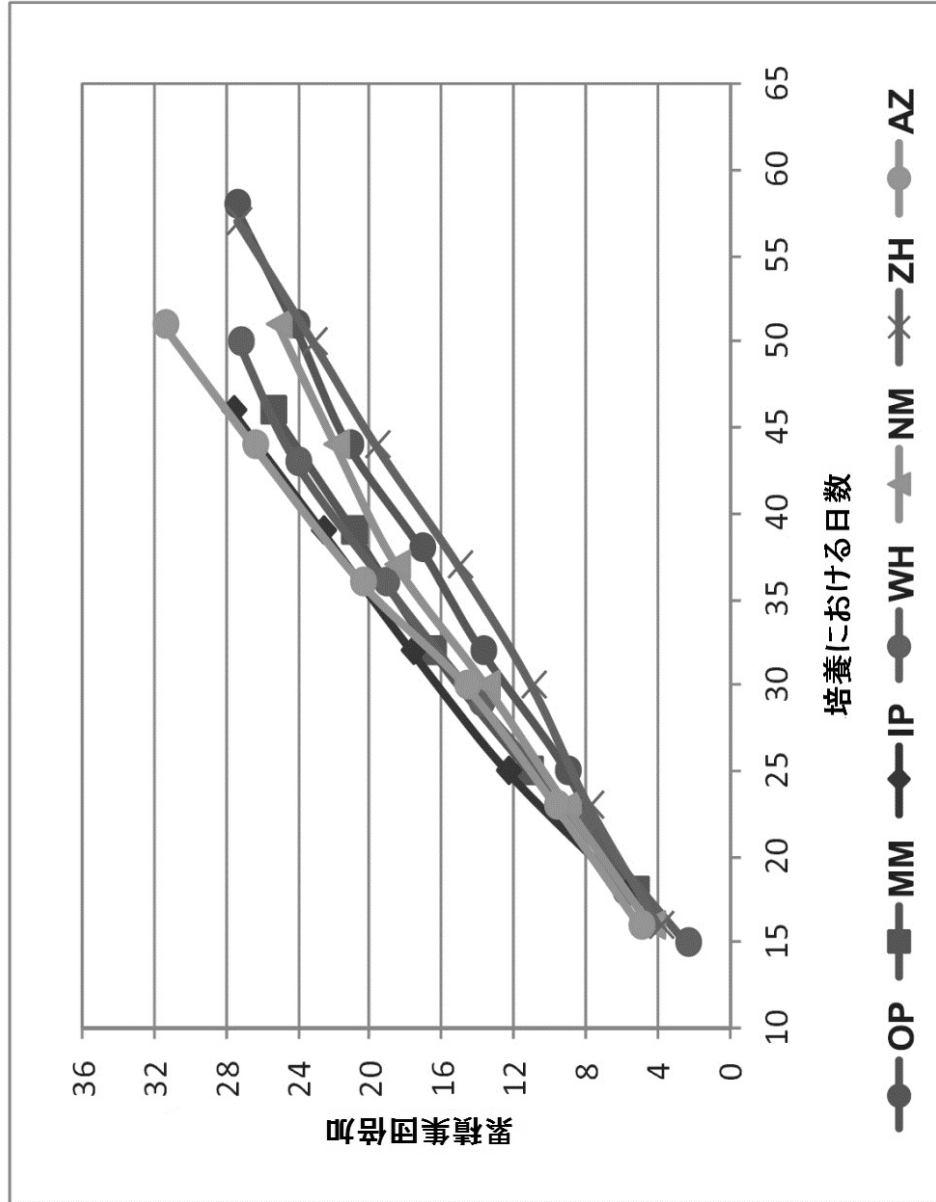


FIG. 1A



【 図 2 】

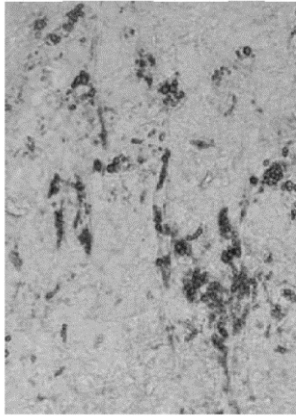
FIG. 2



【 図 3 A - 3 I 】

FIG. 3A

脂肪細胞
(オイルレッドO)



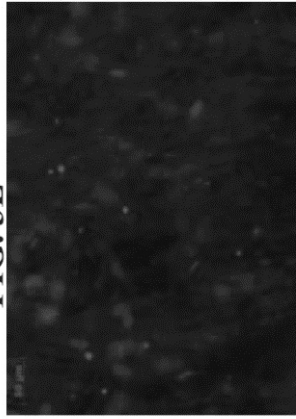
60p2

FIG. 3D

骨細胞
(DAPI+オステオカルシン)

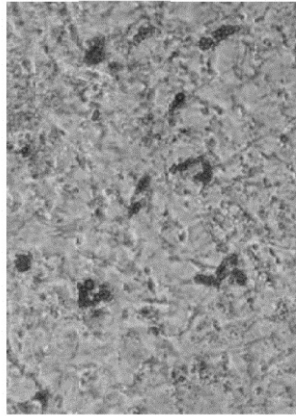


FIG. 3E



61p2

FIG. 3B



62p2

FIG. 3G

軟骨細胞
(アルシアンブルー)

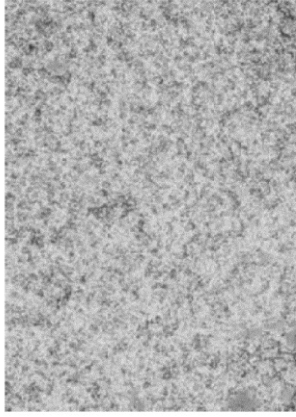


FIG. 3H

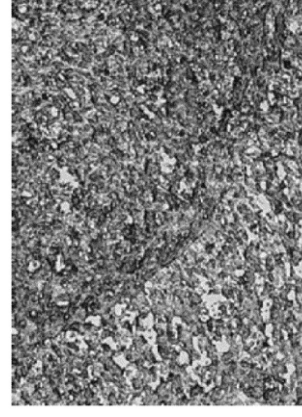
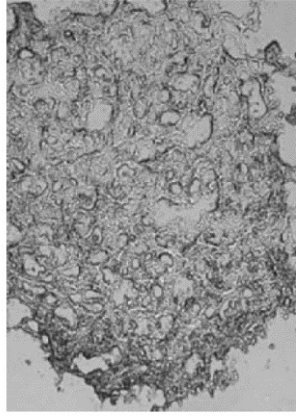


FIG. 3C

FIG. 3F

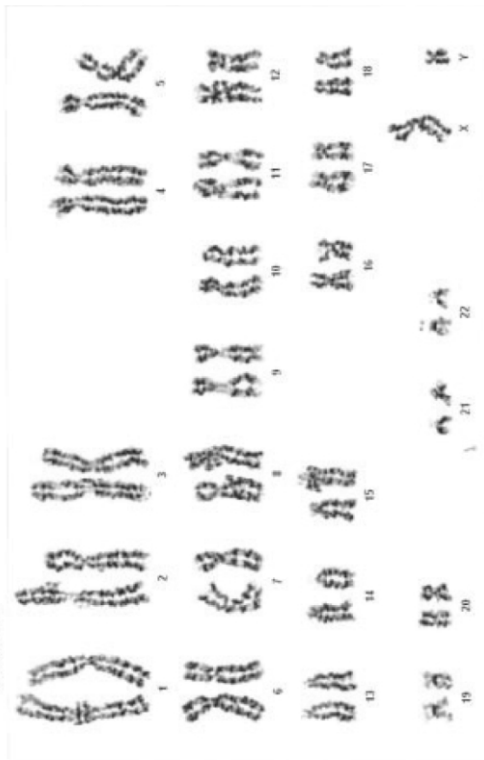
FIG. 3I

【 図 4 A - 4 B 】

FIG. 4B



FIG. 4A



【 図 5 A - 5 F 】

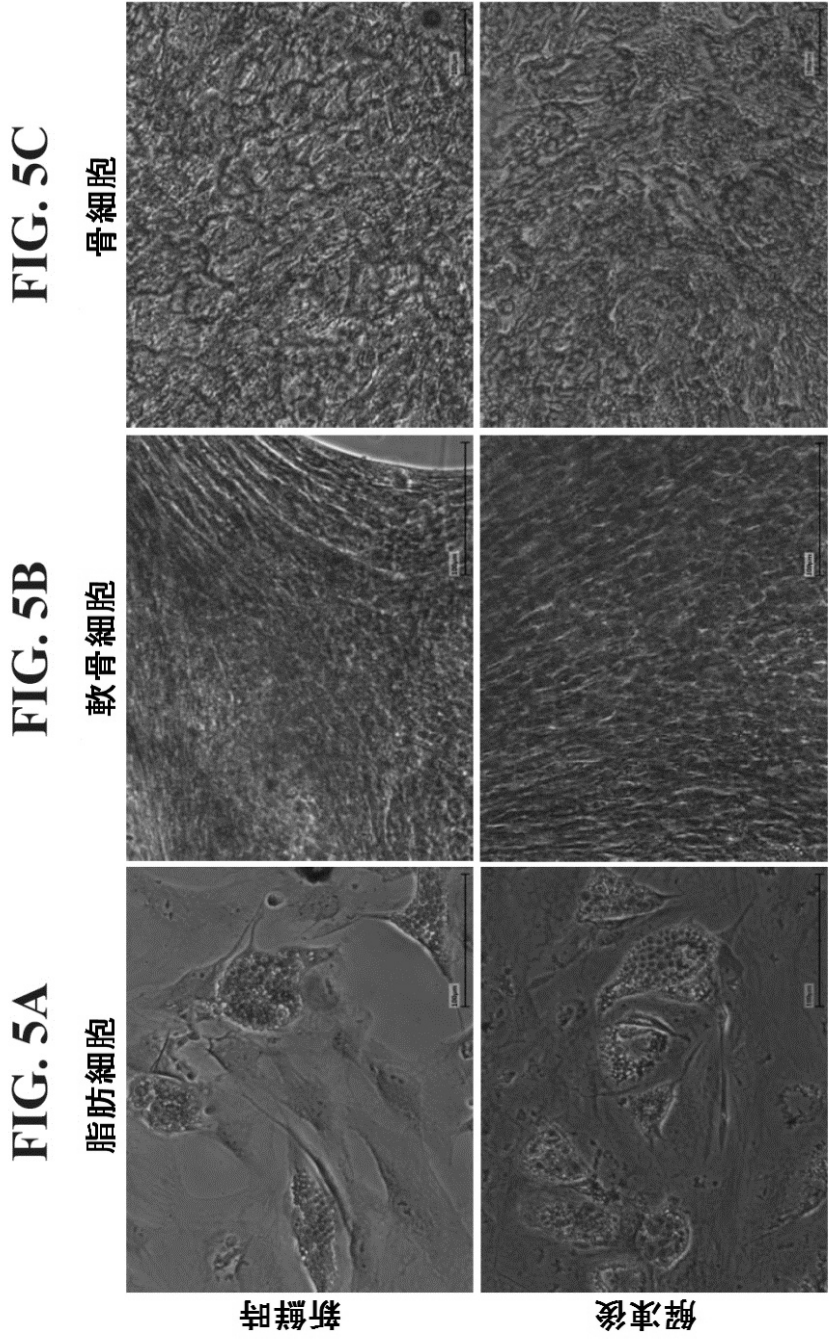


FIG. 5A

脂肪細胞

FIG. 5B

軟骨細胞

FIG. 5C

骨細胞

FIG. 5D

FIG. 5E

FIG. 5F

【 図 6 A - 6 B 】

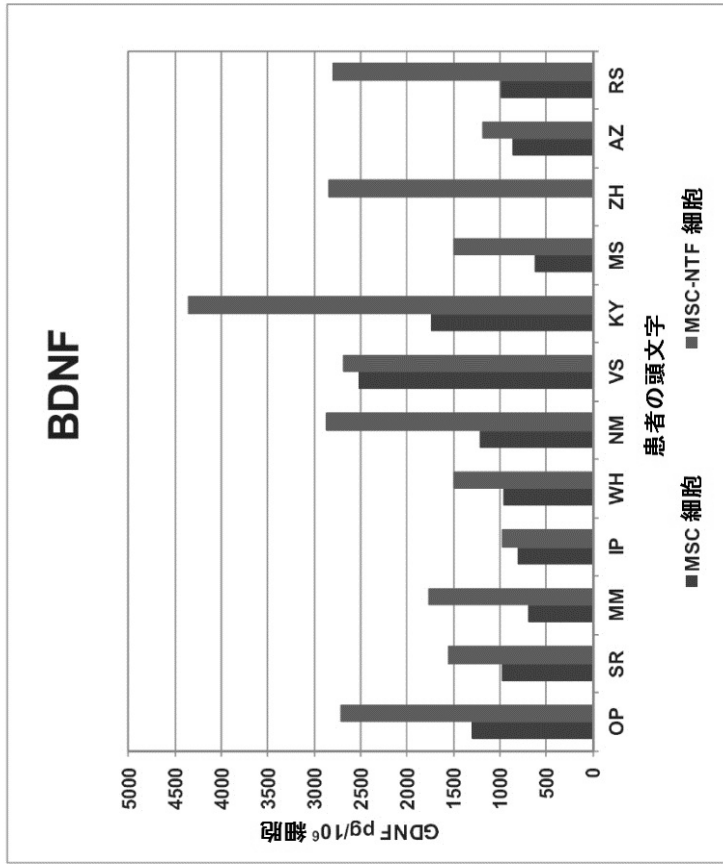


FIG. 6B

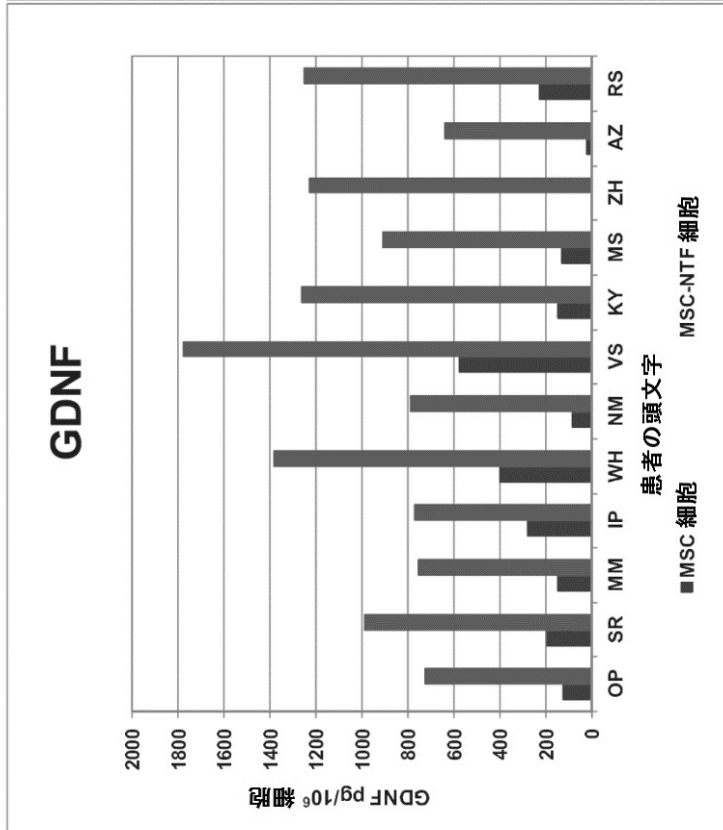
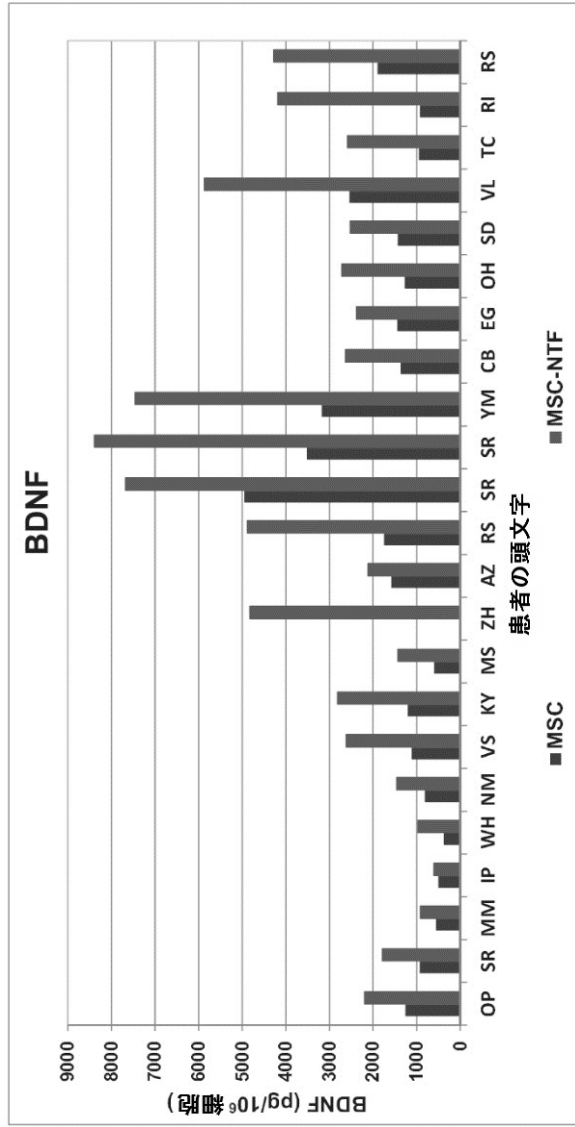


FIG. 6A

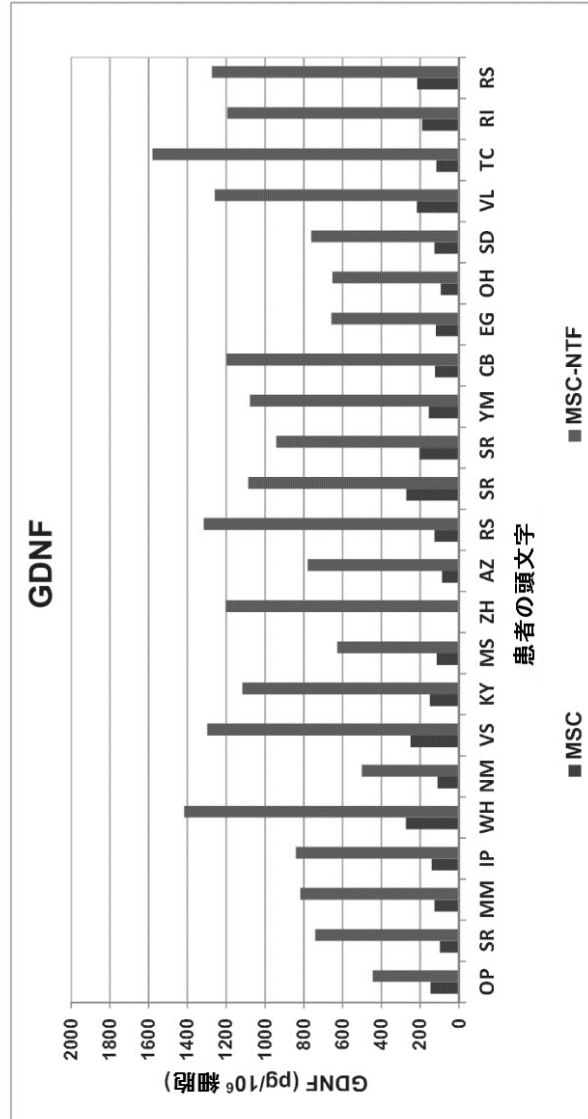
【 図 7 】

FIG. 7



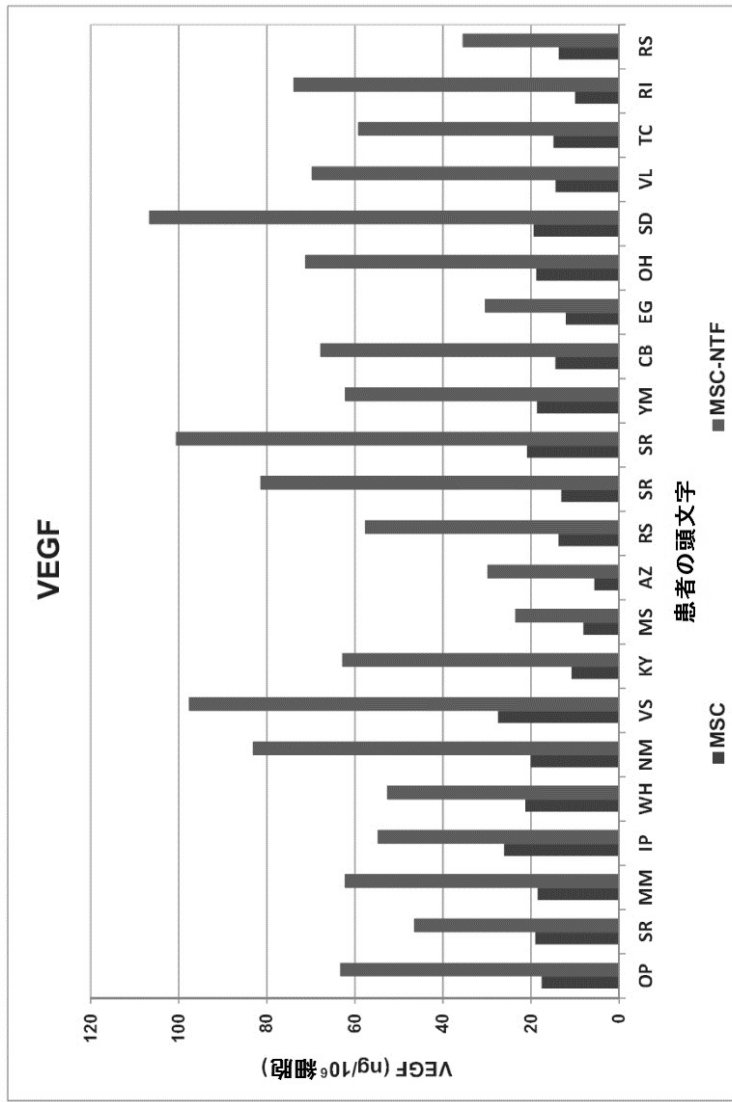
【 図 8 】

FIG. 8



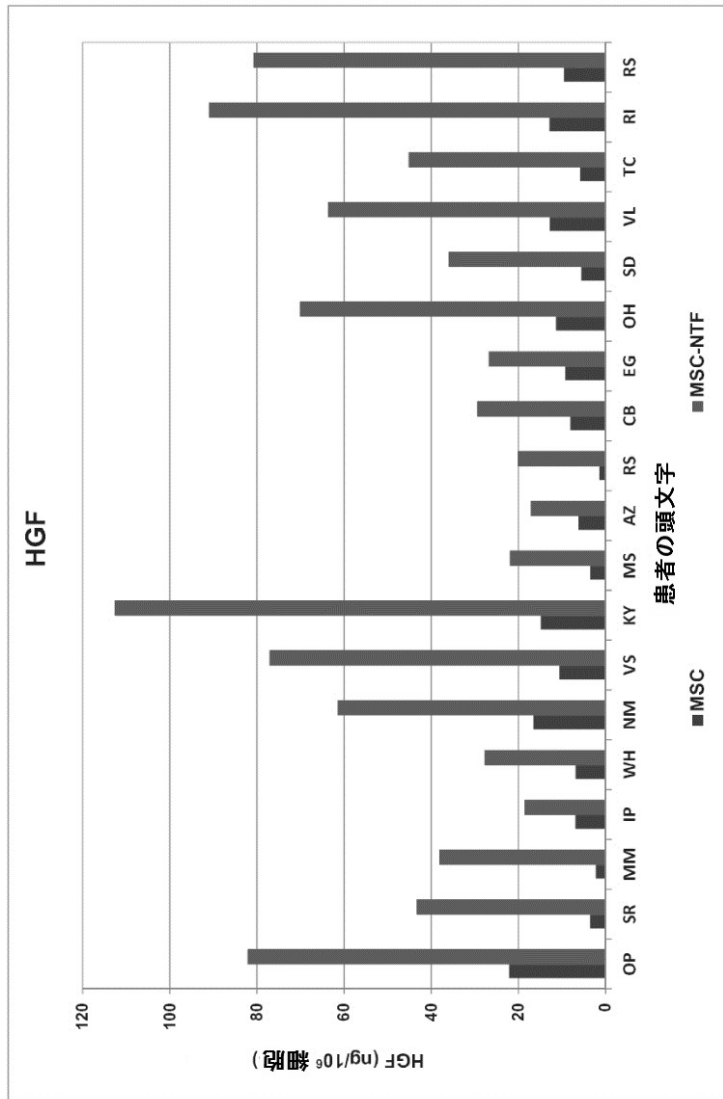
【 図 9 】

FIG. 9



【 図 1 0 】

FIG. 10



【 図 1 1 A - 1 1 B 】

FIG. 11A

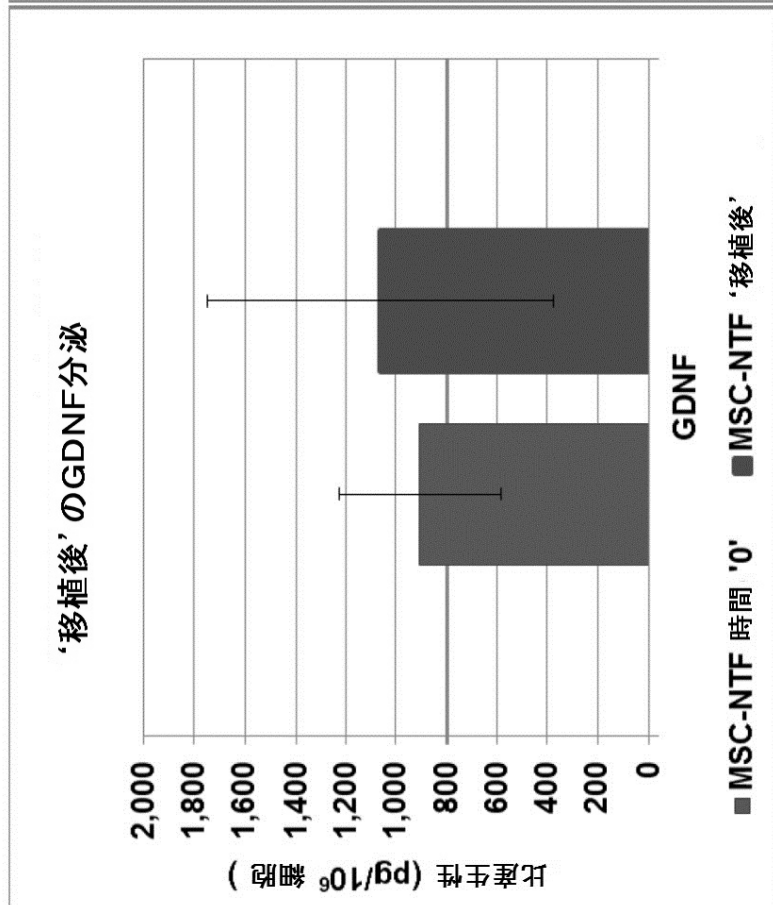
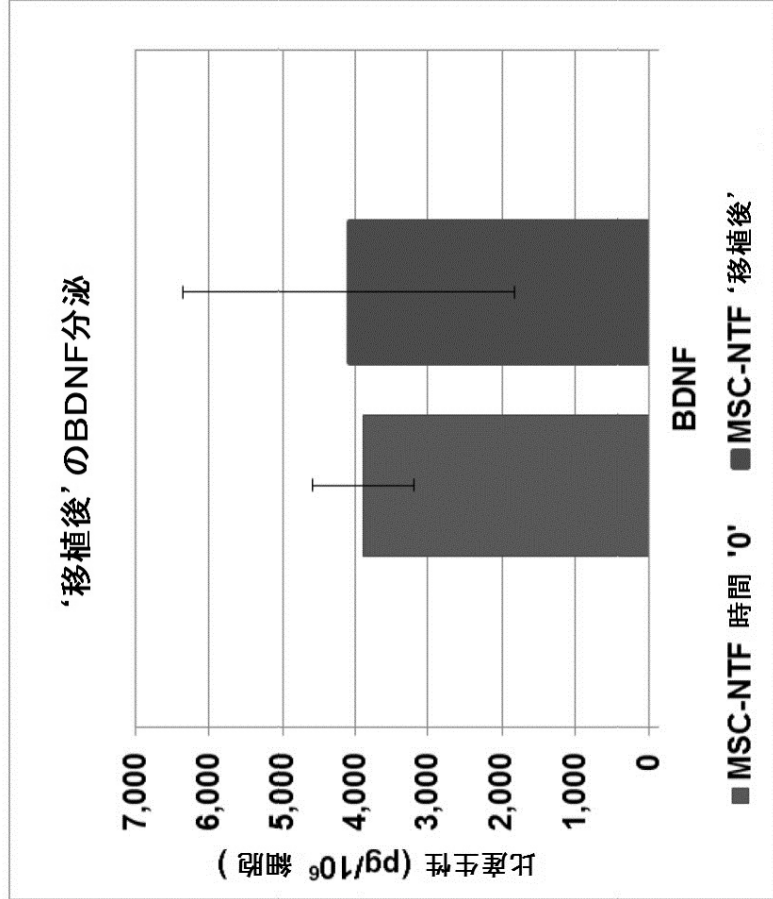


FIG. 11B



【 1 2 A - 1 2 B 】

FIG. 12A

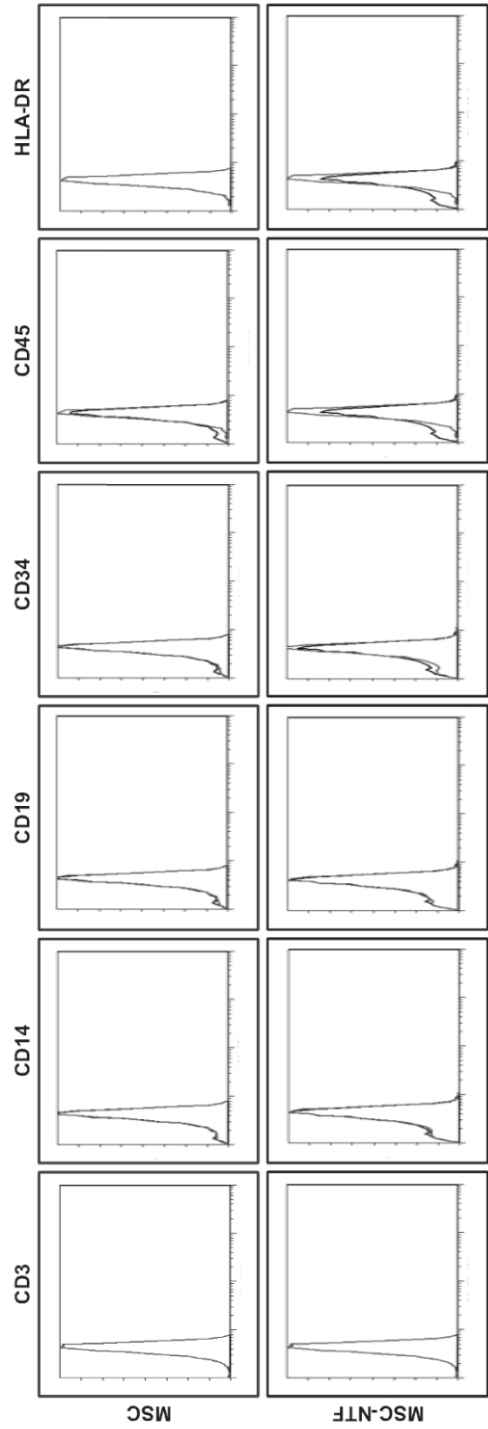
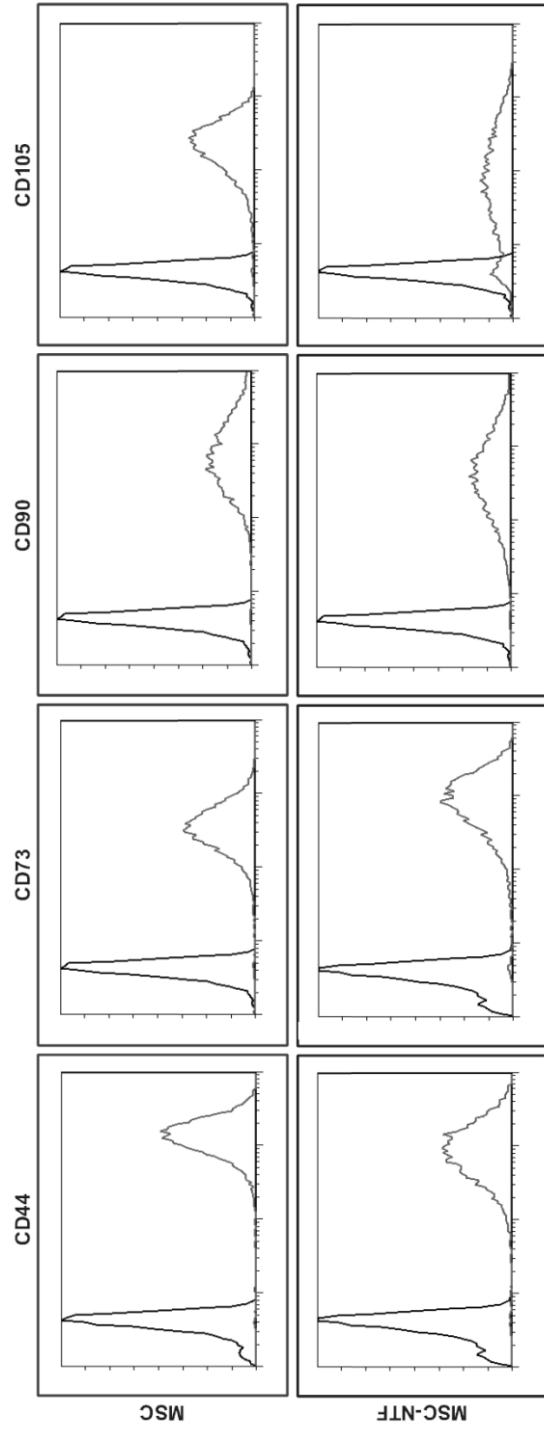


FIG. 12B

【 図 1 3 A - 1 3 B 】

FIG. 13B CD73

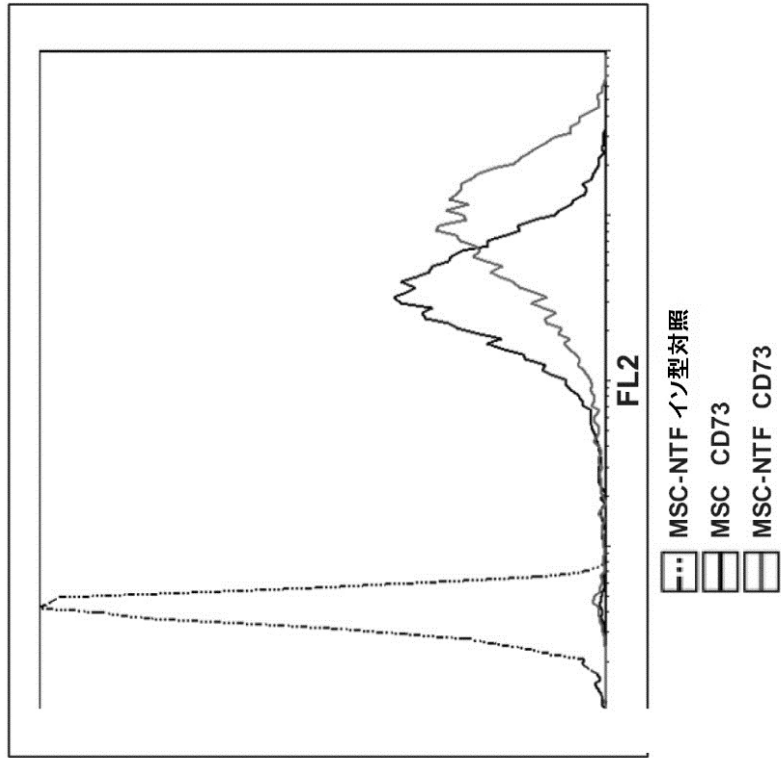
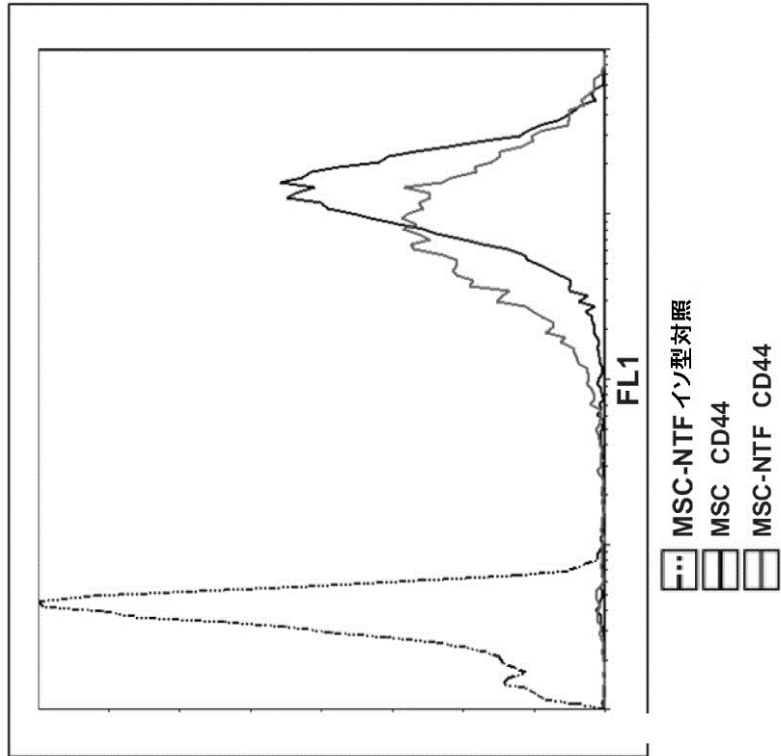


FIG. 13A CD44



【 図 1 4 A - 1 4 B 】

CD105

FIG. 14A 2日目

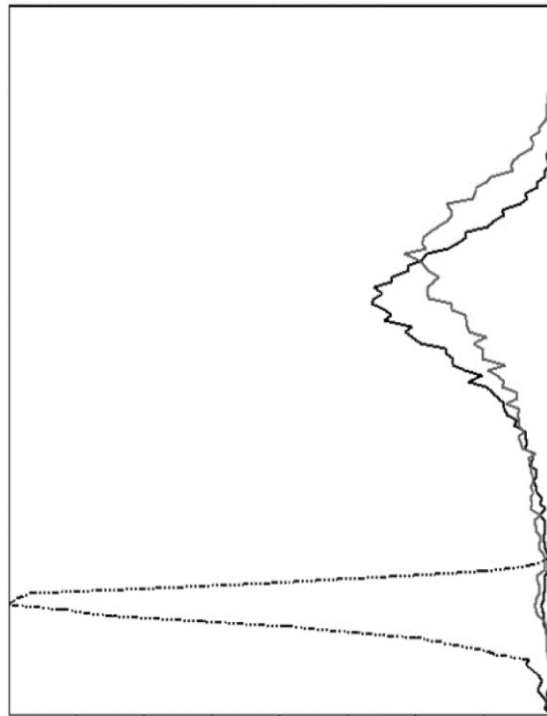
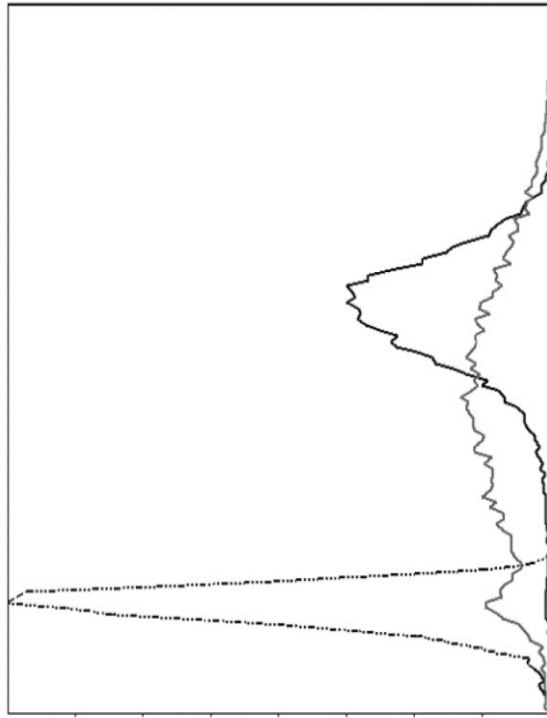


FIG. 14B 3日目



-  MSC-NTF イソ型対照
-  MSC CD105
-  MSC-NTF CD105

【 15 A - 15 B 】

FIG. 15A MSC

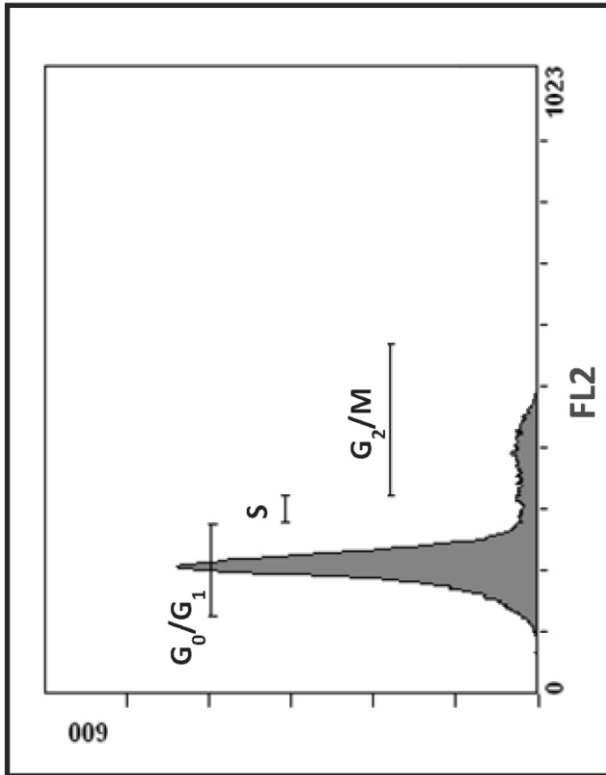
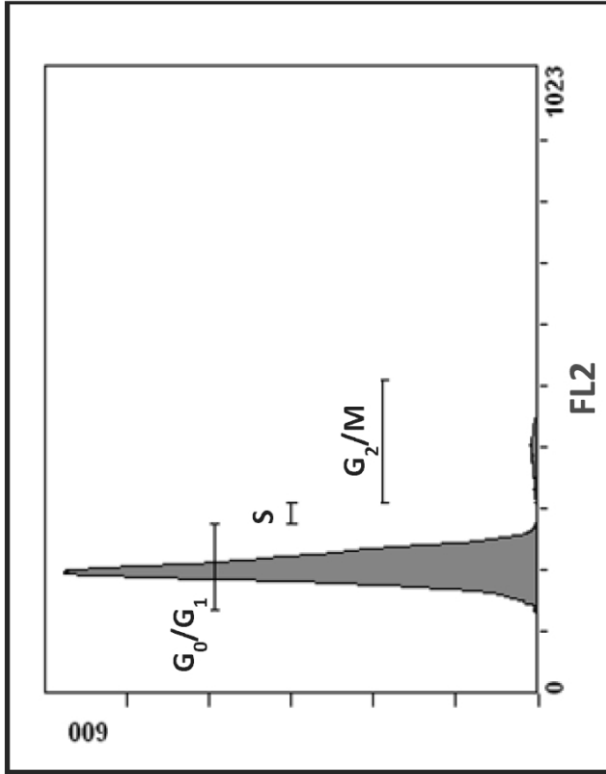


FIG. 15B MSC-NTF



【 図 1 6 A - 1 6 B 】

FIG. 16A

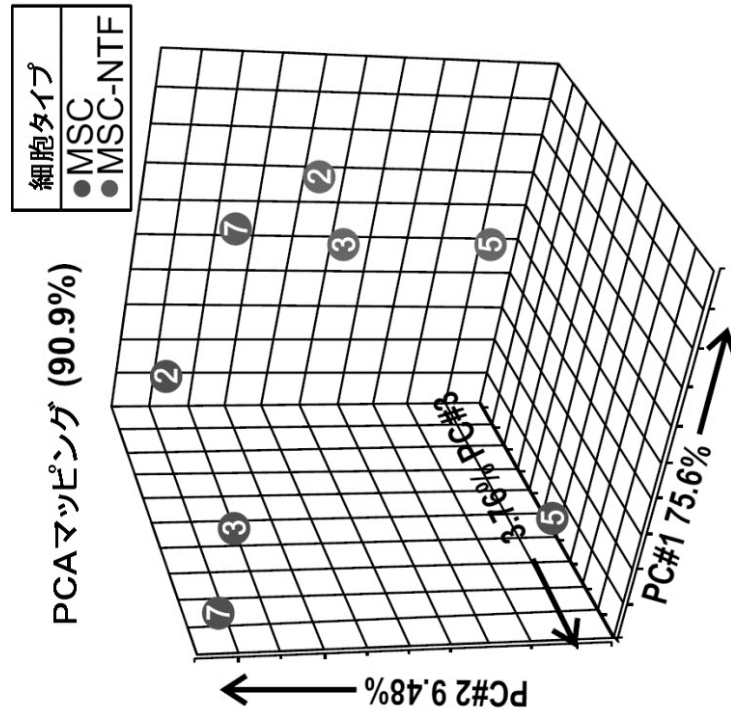
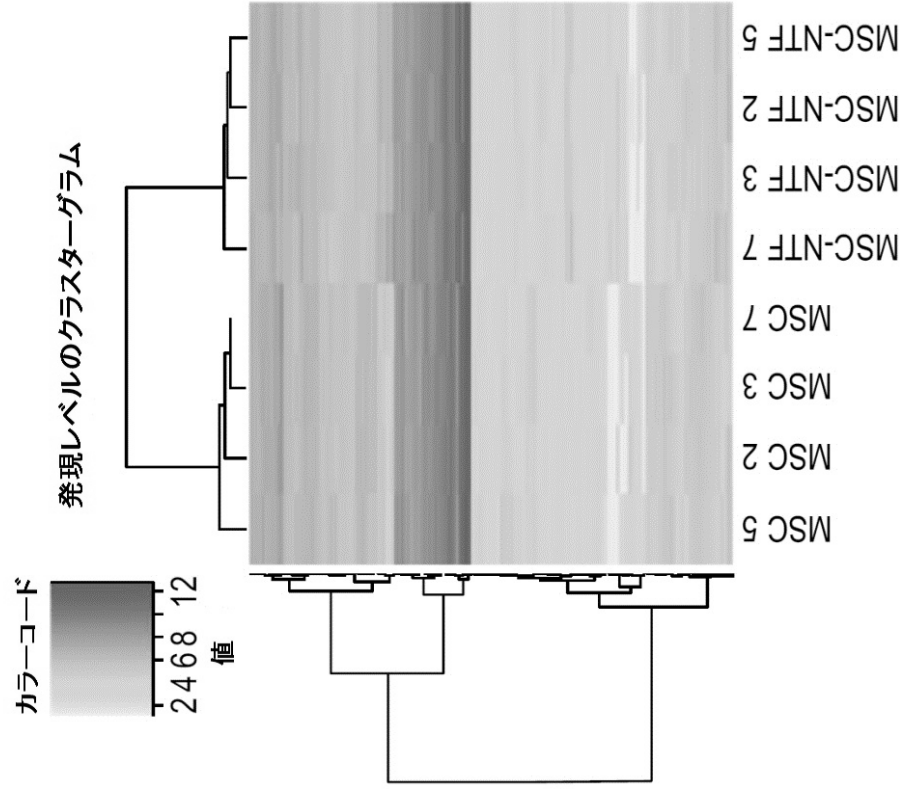


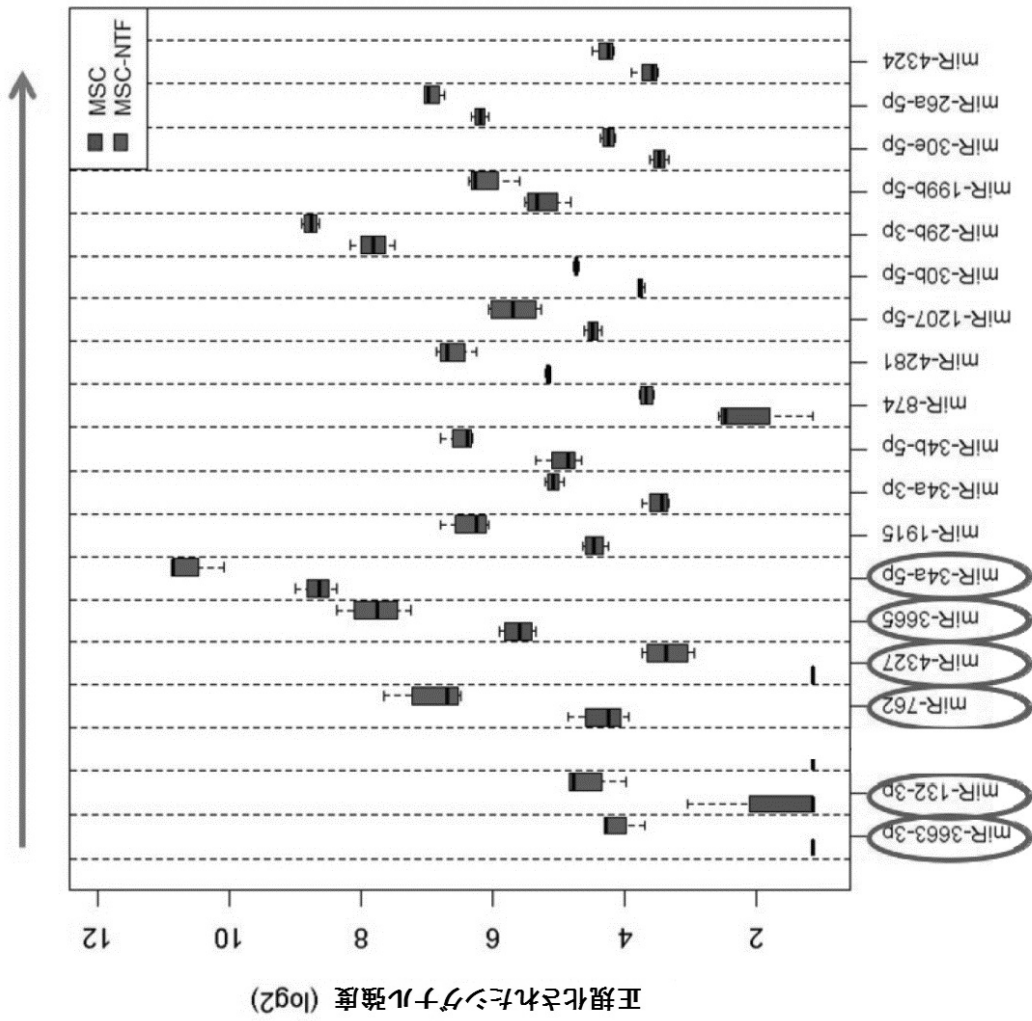
FIG. 16B



【 図 17 】

FIG. 17

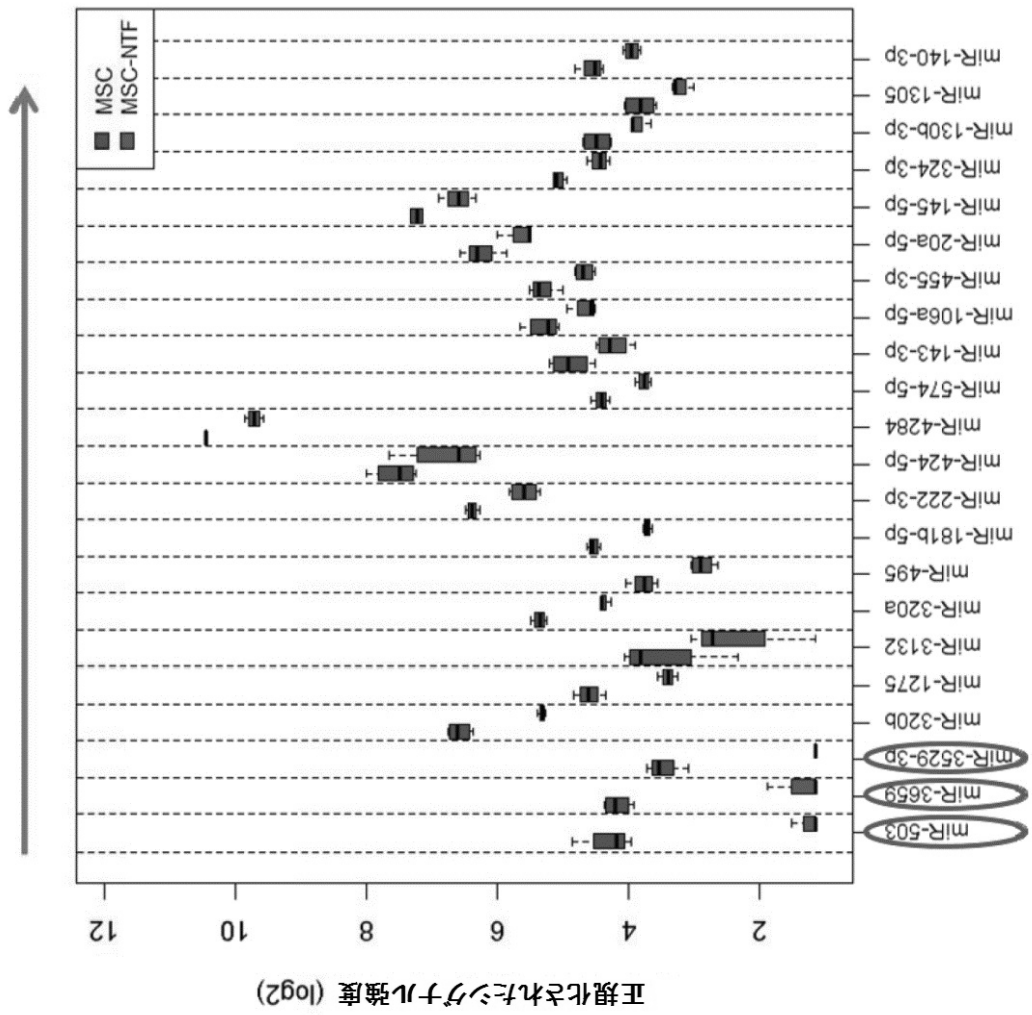
減少する倍率変化



【 図 1 8 】

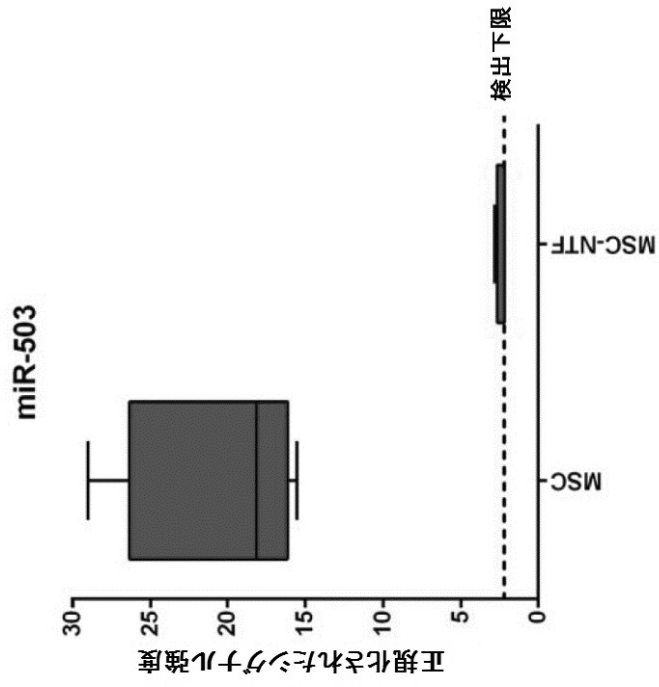
FIG. 18

減少する倍率変化



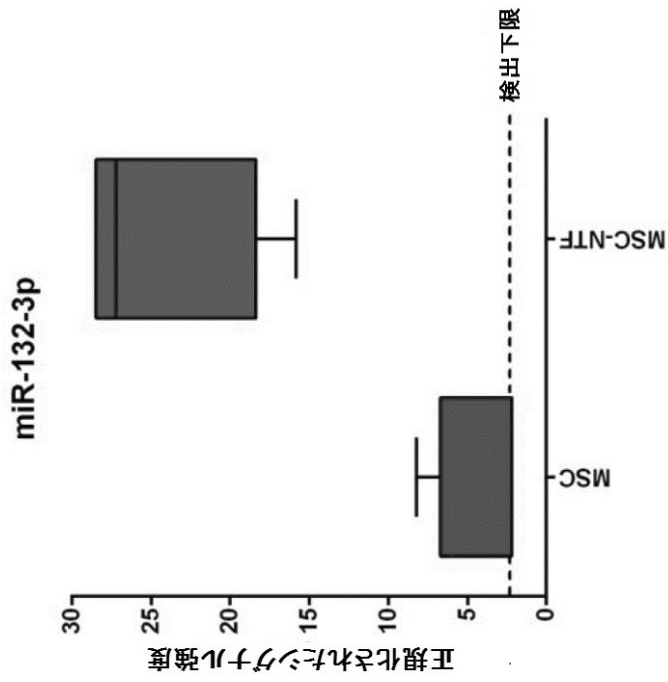
【 図 19 】

FIG. 19



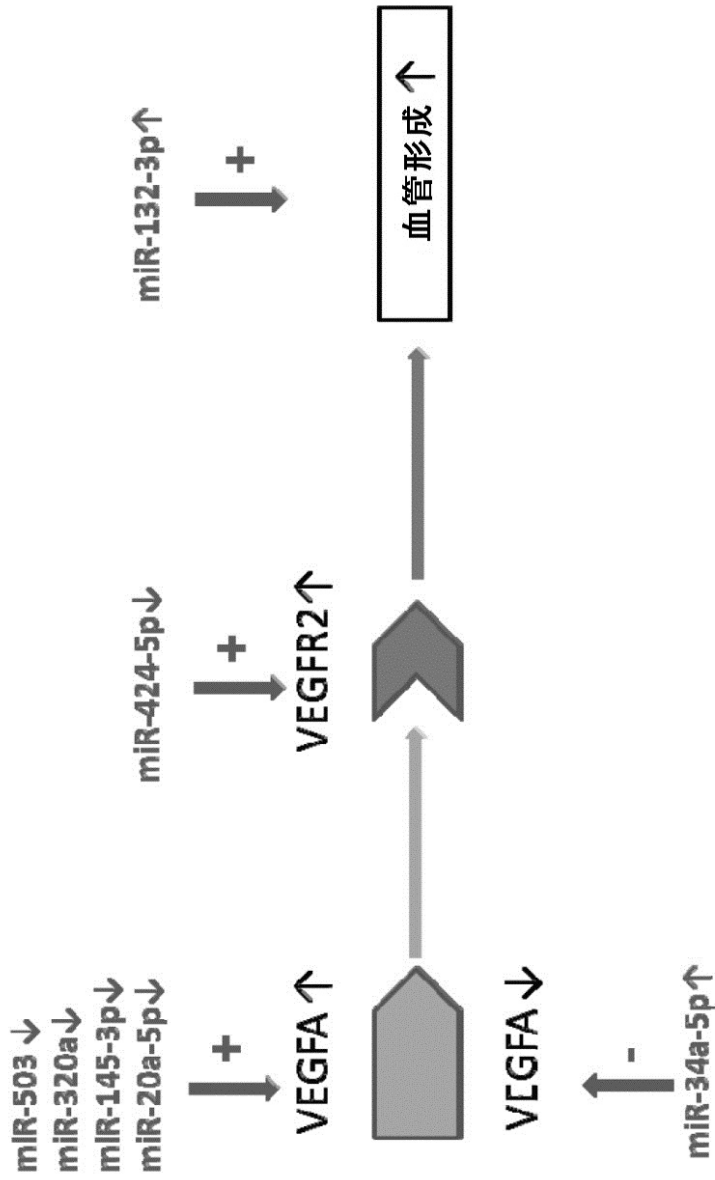
【 図 2 0 】

FIG. 20



【 図 2 1 】

FIG. 21



【 図 2 2 A - 2 2 B 】

FIG. 22B

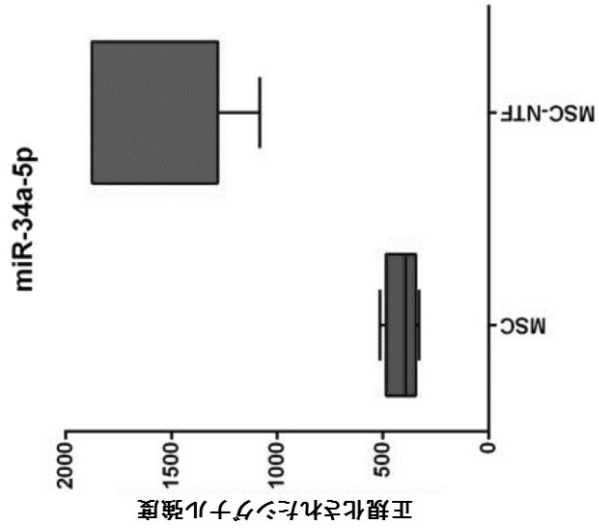
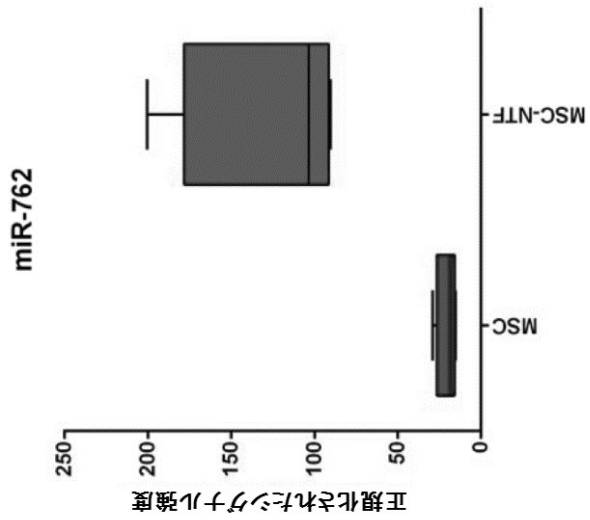


FIG. 22A



【 図 2 3 A - 2 3 C 】

FIG. 23C

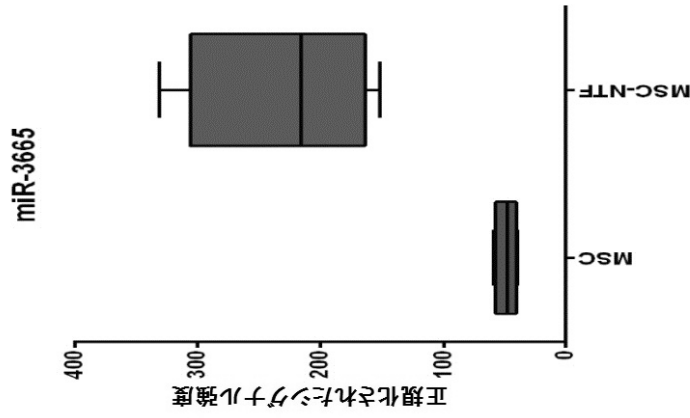


FIG. 23B

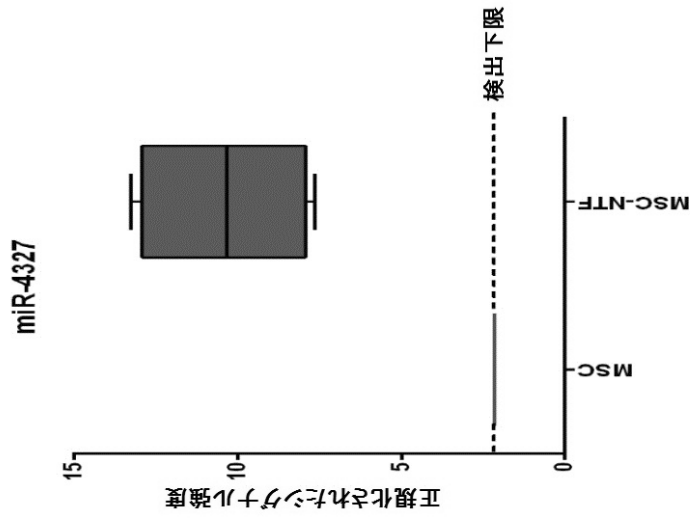
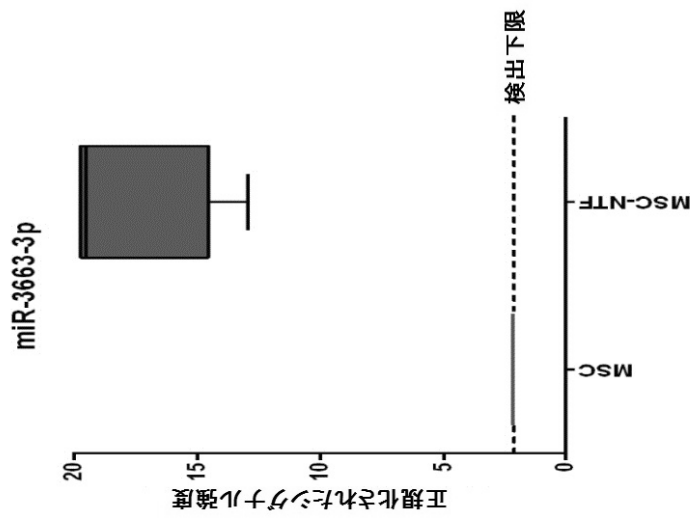


FIG. 23A



【 図 2 3 D - 2 3 E 】

FIG. 23E

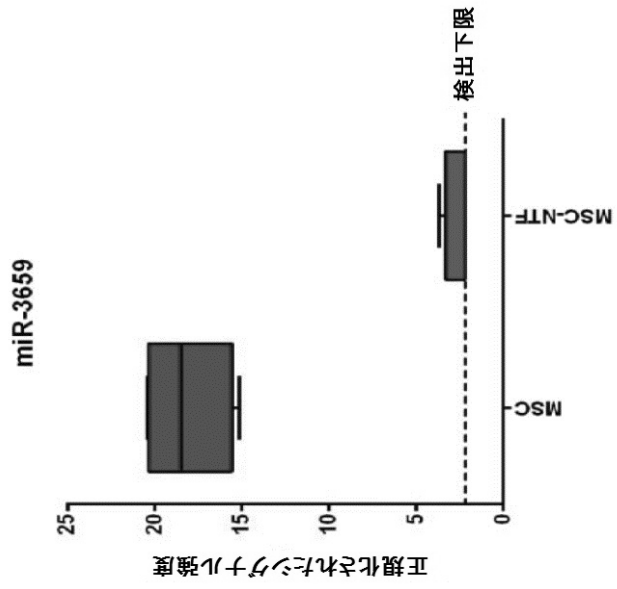
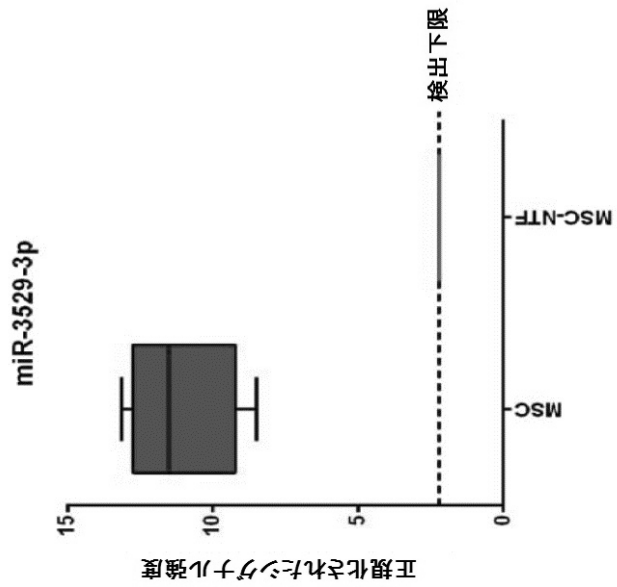
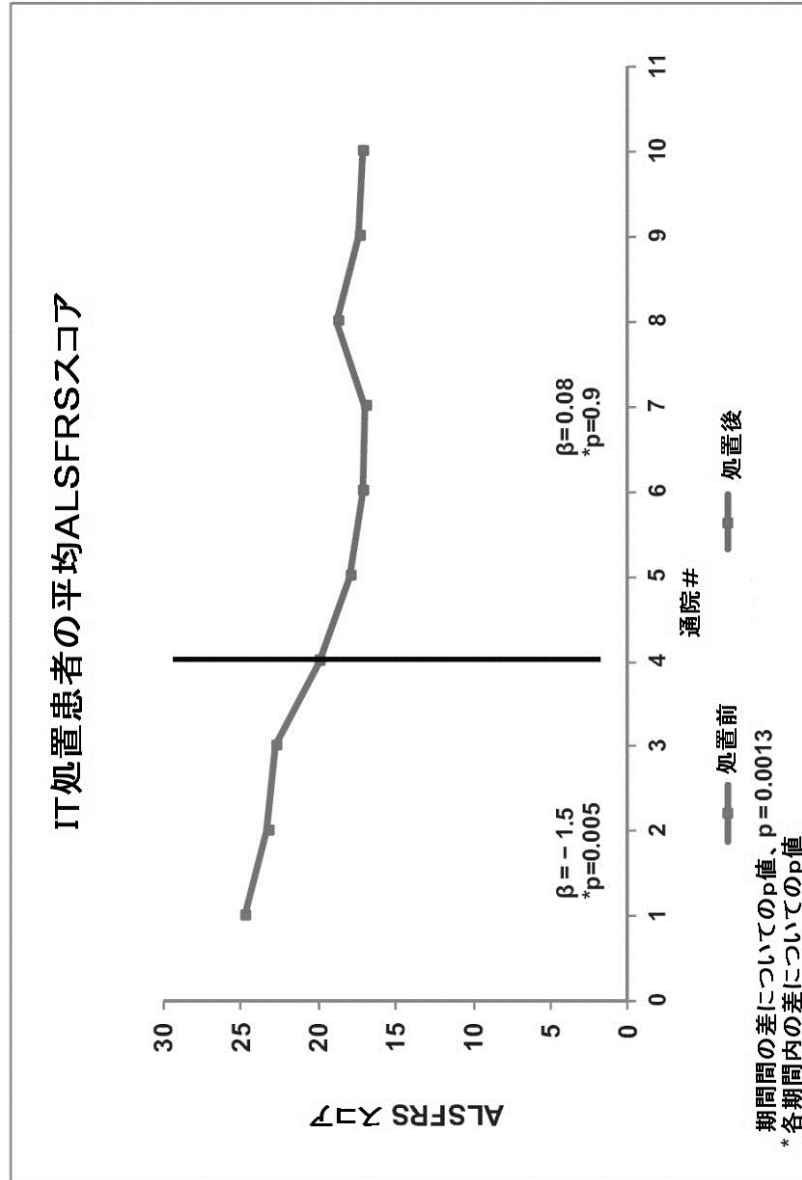


FIG. 23D



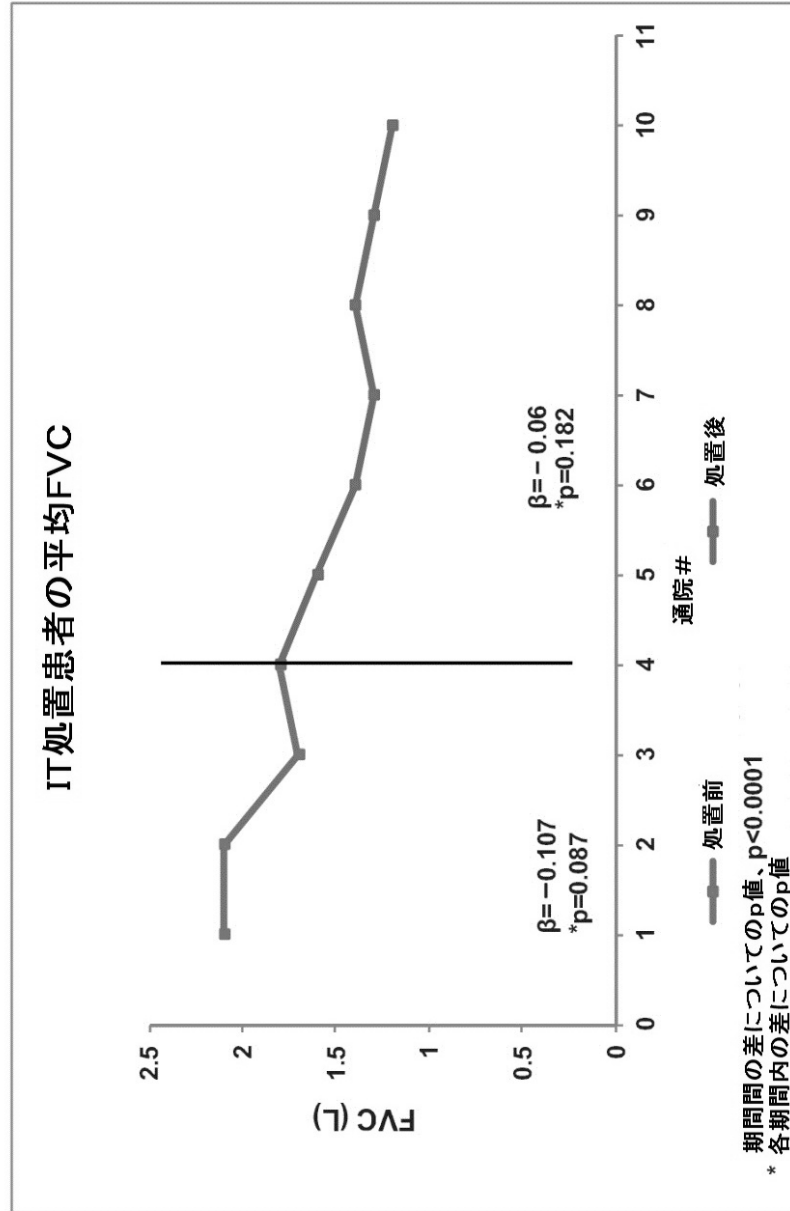
【 図 2 5 】

FIG. 25



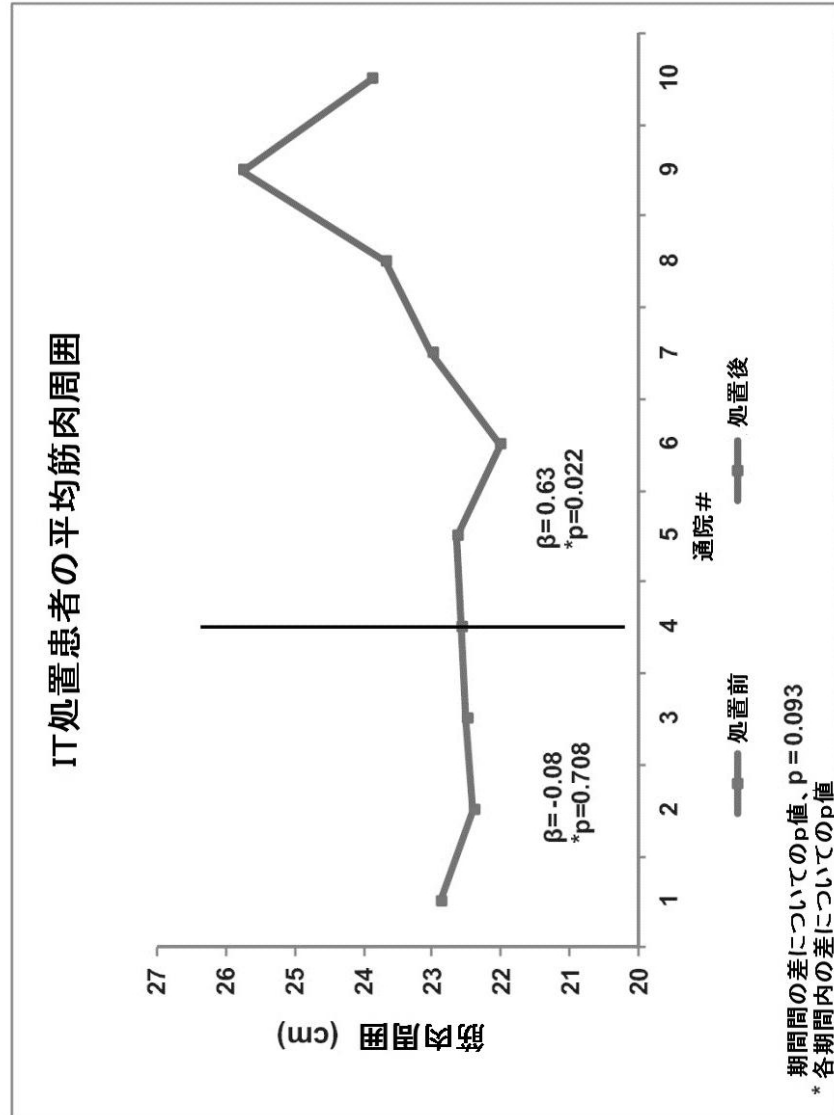
【 図 2 6 】

FIG. 26



【 図 27 】

FIG. 27



【 図 2 8 A - 2 8 C 】

FIG. 28C

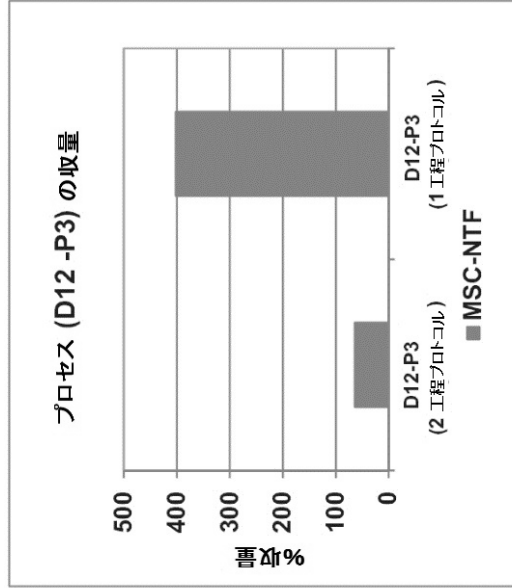


FIG. 28B

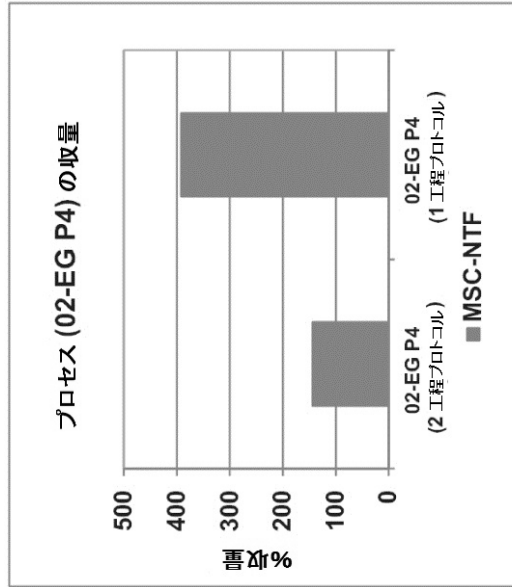
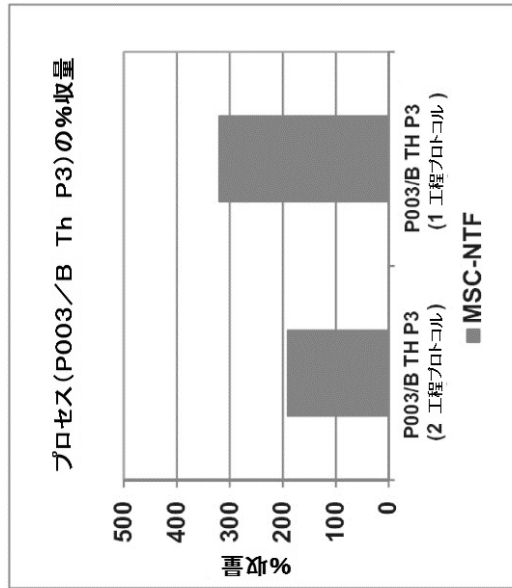


FIG. 28A



【 配 列 表 】

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IL2013/050660

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/079 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/144718 A1 (UNIV RAMOT [IL]; BRAINSTORM CELL THERAPEUTICS I [IL]; KADOURI AVINOAM) 3 December 2009 (2009-12-03) cited in the application examples 1-3 ----- -/--	1-49
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" 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 but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 7 November 2013		Date of mailing of the international search report 22/11/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Trommsdorff, Marion

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IL2013/050660

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GARCIA R ET AL: "Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 316, no. 3, 9 April 2004 (2004-04-09) , pages 753-754, XP004495951, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2004.02.111 figure 1 -----	15-18, 36,42-49
X	KUROZUMI KAZUHIKO ET AL: "BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model", MOLECULAR THERAPY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 9, no. 2, 1 February 2004 (2004-02-01), pages 189-197, XP009117446, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/J.YMTHE.2003.10.012 the whole document -----	15-17, 19, 21-37, 42-44, 46-49
X	KAKA GHOLAM REZA ET AL: "In vitro differentiation of bone marrow stromal cells into oligodendrocyte-like cells using triiodothyronine as inducer", INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROSCIENCE, GORDON AND BREACH, US, vol. 122, no. 5, 1 May 2012 (2012-05-01), pages 237-247, XP008165743, ISSN: 0020-7454, DOI: 10.3109/00207454.2011.642037 table 1 -----	1-49
T	CHOUDDHRY MAHMOOD SABA ET AL: "Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue", CYTOTHERAPY, vol. 15, no. 3, March 2013 (2013-03), pages 330-343, XP002716010, figure 2 -----	
A	EP 1 479 767 A1 (SANBIO INC [US]) 24 November 2004 (2004-11-24) the whole document ----- ----- -/--	1-49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IL2013/050660

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DEZAWA M ET AL: "Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION, US, vol. 113, no. 12, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 1701-1710, XP002311058, ISSN: 0021-9738 the whole document</p> <p>-----</p>	1-49
A	<p>UMA LAKSHMIPATHY ET AL: "Concise Review: MicroRNA Expression in Multipotent Mesenchymal Stromal Cells", STEM CELLS, vol. 26, no. 2, 1 February 2008 (2008-02-01), pages 356-363, XP055077003, ISSN: 1066-5099, DOI: 10.1634/stemcells.2007-0625 the whole document</p> <p>-----</p>	1-49
A	<p>BOSSOLASCO P ET AL: "Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro", EXPERIMENTAL NEUROLOGY, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 193, no. 2, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 312-325, XP004875161, ISSN: 0014-4886, DOI: 10.1016/J.EXPNEUROL.2004.12.013 the whole document</p> <p>-----</p>	1-49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IL2013/050660

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009144718 A1	03-12-2009	EP 2285951 A1	23-02-2011
		EP 2620493 A1	31-07-2013
		US 2012009673 A1	12-01-2012
		WO 2009144718 A1	03-12-2009

EP 1479767 A1	24-11-2004	AU 2003207064 A1	02-09-2003
		CA 2475288 A1	14-08-2003
		CN 1639335 A	13-07-2005
		CN 101584869 A	25-11-2009
		EP 1479767 A1	24-11-2004
		EP 2270146 A1	05-01-2011
		HK 1078610 A1	05-02-2010
		US 2006166362 A1	27-07-2006
		US 2010144034 A1	10-06-2010
		US 2010310523 A1	09-12-2010
		US 2012009160 A1	12-01-2012
		US 2013209428 A1	15-08-2013
		WO 03066856 A1	14-08-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL2013/050660

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/08	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	1 0 1
A 6 1 P 21/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 25/14	(2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 21/04	(2006.01)	A 6 1 P 25/14	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 P 21/04	
G 0 1 N 33/543	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 9 7
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
		C 1 2 Q 1/68	A

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

(72)発明者 レヴィー, ヨゼフ

イスラエル, 7 1 7 0 4 5 5 モディイン, ナハル ゴハー ストリート 7

(72)発明者 パースタイン, アレックス

イスラエル, 7 6 6 2 8 1 1 レホヴォト, ハー ハゼイティム ストリート 11 ビー

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA11 CA20 HA12

4B063 QA13 QA18 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR55 QR62

QR77 QS25 QX01

4B065 AA90X BB08 BB12 BB23 BB40 CA44

4C081 AB11 BA12 CD34

4C087 AA01 AA02 AA03 BB44 BB64 CA04 MA66 NA14 ZA01 ZA02

ZA06 ZA16 ZA33 ZA36 ZA94 ZB07 ZB21

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015531594A5	公开(公告)日	2016-07-14
申请号	JP2015526006	申请日	2013-08-04
[标]申请(专利权)人(译)	头脑风暴Serse la Paix酒店鸬鹚遗传学有限公司		
申请(专利权)人(译)	头脑风暴细胞Serapeutikusu有限公司		
[标]发明人	ゴセルフヤエル レヴィーヨゼフ バースタインアレックス		
发明人	ゴセルフ, ヤエル レヴィー, ヨゼフ バースタイン, アレックス		
IPC分类号	C12N5/0775 A61K35/12 A61L27/00 A61P43/00 A61K35/15 A61P25/00 A61P37/02 A61P25/16 A61P25/08 A61P21/00 A61P9/10 A61P27/02 A61P25/28 A61P25/14 A61P21/04 G01N33/53 G01N33/543 C12N15/09 C12Q1/68		
CPC分类号	A61P3/10 A61P9/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P37/02 A61P43/00 C12N5/0618 C12N2501/01 C12N2501/115 C12N2501/135 C12N2501/195 C12N2506/1353 A61K35/28 A61K2035/124 C12N5/0662 C12N2500/42 C12N2501/11 G01N33/5023 G01N2333/70585 G01N2333/71 G01N2333/916		
FI分类号	C12N5/00.202.H A61K35/12.ZNA A61L27/00.V A61P43/00.105 A61K35/15.Z A61P25/00 A61P37/02 A61P25/16 A61P25/00.101 A61P25/08 A61P21/00 A61P9/10 A61P27/02 A61P25/28 A61P25/14 A61P21/04 G01N33/53.D G01N33/543.597 C12N15/00.A C12Q1/68.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA12 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QX01 4B065/AA90X 4B065/BB08 4B065/BB12 4B065/BB23 4B065/BB40 4B065/CA44 4C081/AB11 4C081/BA12 4C081/CD34 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB44 4C087/BB64 4C087/CA04 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZA01 4C087/ZA02 4C087/ZA06 4C087/ZA16 4C087/ZA33 4C087/ZA36 4C087/ZA94 4C087/ZB07 4C087/ZB21		
代理人(译)	Kazehaya信明 浅野纪子		
优先权	61/679822 2012-08-06 US		
其他公开文献	JP6362596B2 JP2015531594A		

摘要(译)

一种产生分泌神经营养因子 (NTF) 的MSC的方法, 包括在分化培养基中培养一群未分化的间充质干细胞 (MSC), 所述分化培养基包含碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF), 血小板衍生生长因子 (PDGF), 调蛋白和cAMP。

