

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6628253号
(P6628253)

(45) 発行日 令和2年1月8日 (2020. 1. 8)

(24) 登録日 令和1年12月13日 (2019. 12. 13)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/68 (2006. 01)	GO 1 N 33/68
A 6 1 K 35/28 (2015. 01)	A 6 1 K 35/28
A 6 1 P 37/02 (2006. 01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P 29/00 (2006. 01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 21/02 (2006. 01)	A 6 1 P 21/02

請求項の数 12 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-548691 (P2016-548691)
(86) (22) 出願日	平成27年2月11日 (2015. 2. 11)
(65) 公表番号	特表2017-511876 (P2017-511876A)
(43) 公表日	平成29年4月27日 (2017. 4. 27)
(86) 国際出願番号	PCT/IL2015/050159
(87) 国際公開番号	W02015/121859
(87) 国際公開日	平成27年8月20日 (2015. 8. 20)
審査請求日	平成29年11月24日 (2017. 11. 24)
(31) 優先権主張番号	61/938, 172
(32) 優先日	平成26年2月11日 (2014. 2. 11)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)

(73) 特許権者	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, 4912502 ペタッ
	ーティクヴァ, キリヤト アリー, ピー. オー. ボックス 2650, バゼル
	ストリート 12
	12 Bazel Street, P.
	O. Box 2650 Kiryat
	Arie, 4912502 Petac
	h-Tikva, Israel

(74) 代理人	100105050
	弁理士 鷲田 公一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞の適性を判定する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞集団が A L S 治療用の治療薬として適しているか否かを判定するための方法であって、

(a) 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 を含む分化培地中で、少なくとも 2 日間、間葉系幹細胞集団をインキュベートして、神経栄養因子分泌細胞の集団を得るステップと、

(b) 前記神経栄養因子分泌細胞の集団における C D 4 9 a の発現を分析するステップであって、C D 4 9 a の発現量が所定のレベルを上回ることをもって、前記神経栄養因子分泌細胞の集団が治療薬として適していることの指標とするステップとを含む、方法。

【請求項 2】

前記 C D 4 9 a の発現を分析するステップが、前記神経栄養因子分泌細胞の集団中の C D 4 9 a を発現している神経栄養因子分泌細胞数を分析するステップを含み、前記細胞数が 8 0 % 超であることをもって、前記神経栄養因子分泌細胞の集団が治療薬として適していることの指標とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

平均蛍光強度によって測定した、前記神経栄養因子分泌細胞の集団における C D 4 9 a 発現レベルが、間葉系幹細胞 (M S C) 集団における C D 4 9 a 発現と比較して 2 倍超に増加することをもって、前記神経栄養因子分泌細胞の集団が治療薬として適していること

10

20

の指標とし、但し、前記神経栄養因子を分泌する前記細胞の集団および前記MSC集団は同一ドナー由来である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記間葉系幹細胞が骨髄に由来する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記インキュベートするステップは6日間を超えない、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記細胞から分泌された神経栄養因子の量を決定するステップをさらに含み、前記神経栄養因子の量が所定のレベルを上回ることをもって、前記細胞集団が治療薬として適していることのさらなる指標とする、請求項1に記載の方法。

10

【請求項7】

前記神経栄養因子が、GDNF、VEGFおよびHGFからなる群から選択される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記分化培地が、ホスホジエステラーゼ阻害剤を含まない、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記分化培地が、トリョードチロニンを含まない、請求項1または8に記載の方法。

【請求項10】

前記分析するステップが、フローサイトメトリーによって実施される、請求項1に記載の方法。

20

【請求項11】

ALS治療用の治療薬として有用であると判定された、神経栄養因子を分泌する細胞の単離された集団であって、前記細胞は、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を含む分化培地中における間葉系幹細胞の、1ステップで実施される少なくとも2日間のインキュベーションによって、ex vivoで分化したものであり、平均蛍光強度によって測定した、前記細胞集団におけるCD49a発現レベルが、未分化間葉系幹細胞におけるCD49a発現と比較して少なくとも2倍に増加し、前記集団の細胞の少なくとも80%がCD49aを発現している、単離された細胞集団。

【請求項12】

前記集団の細胞の少なくとも90%がCD49aを発現している、請求項11に記載の単離された細胞集団。

30

【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、細胞表面マーカーの発現に基づいて神経栄養因子分泌細胞の適性を判定する方法に関する。

【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種である。ALSは脳および脊髄における運動ニューロン細胞死を特徴とする致死的な進行性神経変性疾患であり、筋肉機能の急速な喪失および最終的な完全麻痺を伴う。

40

【0003】

現在実験段階にあるALS薬は、推定される病態生理学的機序に基づいて開発されており、抗グルタミン酸作動性薬剤、タンパク質のミスフォールディングおよび蓄積を標的とする薬物、抗酸化薬療法、免疫調節薬および幹細胞などがあげられる。

【0004】

現在試験段階にある治療法のうち、幹細胞移植は最も可能性の高いものであると考えられる。幹細胞移植療法は、失われたまたは損傷を受けた運動ニューロンを置換することに加えて、独立した細胞保護作用によってALS患者に恩恵をもたらす得る。さらに幹細胞

50

は、星状細胞やミクログリアなどの支持的間質細胞に分化する可能性があり、これら細胞は、神経栄養因子のみならず、神経毒性に対して拮抗する酵素系およびパラクリン系のメディエーターを産生し得るものである。さらなる実験データから、非ニューロン細胞置換は、運動ニューロンの生存率向上および神経筋機能の改善を促進するために極めて重要な療法になりうるということがわかってきた (Corti S et al. Brain (2010) 133 (2): 465-481)。

【0005】

パーキンソン病および多発性硬化症など、その他の神経変性疾患のための細胞置換療法における細胞供給源として幹細胞を使用することも示唆されている。

【0006】

神経栄養因子 (NTF) は、ニューロンの発達および生存を支える天然に存在する小さなポリペプチドであり、そのためここ数年、ALSを含めた種々の神経変性疾患治療の選択肢の候補と考えられてきた。ALS動物モデルによる研究において、種々の神経栄養因子の投与後の疾患の発症および／または進行の遅延が示された。

【0007】

しかし、ALS患者に対する組換え増殖因子の全身投与またはくも膜下腔内投与を行った臨床試験は効果的ではなく、おそらくその理由の一部は、組換え増殖因子の半減期が短いこと、標的部位において低濃度となること、および副作用の高発生率であると考えられる。

【0008】

いくつかの研究によって、種々の因子に *in vitro* で曝露した後の間葉系幹細胞 (MSC) は、その表現型が変化し、ニューロンおよびグリアマーカーを提示することが示された [Kopen, G.C., et al., Proc Natl Acad USA. 96(19):10711-6, 1999; Sanchez-Ramos, et al. Exp Neurol. 164(2):247-56. 2000; Woodbury, D., J Neurosci Res. 61(4):364-70, 2000; Woodbury, D., et al., J Neurosci Res. 69(6):908-17, 2002; Black, I.B., Woodbury, D. Blood Cells Mol Dis. 27(3):632-6, 2001; Kohyama, J., et al. 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]。

【0009】

国際公開第2006/134602号および国際公開第2009/144718号は、間葉系幹細胞から神経栄養因子分泌細胞を作製するための分化プロトコルを教示している。

国際公開第2007/066338号は、間葉系幹細胞から乏突起神経膠細胞様細胞を作製するための分化プロトコルを教示している。

国際公開第2004/046348号は、間葉系幹細胞からニューロン様細胞を作製するための分化プロトコルを教示している。

国際公開第2014/024183号は、神経栄養因子を分泌する細胞を作製するためのさらなる分化プロトコルを教示している。

【0010】

発明の概要

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、細胞集団が治療薬として適しているかを判定するための方法であって、

(a) 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 を含む分化培地中で、少なくとも2日間、未分化間葉系幹細胞 (MSC) 集団をインキュベートして、分化MSC集団を得るステップと、

(b) 分化MSC集団におけるCD49aの発現を分析するステップであって、CD49aの発現量が所定のレベルを上回ることをもって、細胞集団が治療薬として適していることの指標とするステップとを含む、方法が提供される。

【0011】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、神経栄養因子を分泌する細胞へと *ex vivo* で分化した間葉系幹細胞の単離された集団であって、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 を含む分化培地中における少なくとも 2 日間のインキュベーションによって分化 MSC 集団となり、集団の細胞の少なくとも 80% が CD49a を発現している、単離された MSC 集団が提供される。

【0012】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、治療を必要とする対象において免疫関連疾患または炎症関連疾患を治療するための方法であって、対象に、神経栄養因子を分泌する細胞へと *ex vivo* で分化させた間葉系幹細胞を治療有効量投与することによって、疾患を治療するステップを含み、免疫関連疾患または炎症関連疾患が、神経変性疾患または重症筋無力症ではない、方法が提供される。

10

【0013】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、免疫関連疾患または炎症関連疾患の治療用神経栄養因子を分泌する細胞へと *ex vivo* で分化させた間葉系幹細胞の、疾患治療のための使用であって、免疫関連疾患または炎症関連疾患が、神経変性疾患または重症筋無力症ではない使用が提供される。

【0014】

本発明のいくつかの実施形態によれば、CD49a の発現を分析するステップは、分化 MSC 集団中の CD49a を発現している細胞数を分析するステップを含み、細胞数が 80% 超であることをもって、細胞集団が治療薬として適していることの指標とする。

20

【0015】

本発明のいくつかの実施形態によれば、CD49a の発現を分析するステップは、分化 MSC 集団における CD49a の発現レベルを分析するステップを含み、分化 MSC 集団における CD49a 発現レベルが、未分化 MSC 集団における CD49 発現と比較して 2 倍超に増加することをもって、細胞集団が治療薬として適していることの指標とし、但し、分化 MSC 集団および未分化 MSC 集団は同一ドナー由来とする。

【0016】

本発明のいくつかの実施形態によれば、MSC は、骨髄に由来する。

【0017】

30

本発明のいくつかの実施形態によれば、未分化 MSC の前記集団の細胞の 95% 超が、CD73、CD90 および CD105 を発現している。

【0018】

本発明のいくつかの実施形態によれば、未分化 MSC 集団は、フローサイトメトリーによる測定において、CD3、CD14、CD19、CD34、CD45 および HLA-DR を発現していない。

【0019】

本発明のいくつかの実施形態によれば、インキュベートするステップは、6 日間を超えない。

【0020】

40

本発明のいくつかの実施形態によれば、細胞集団中の細胞数は、少なくとも 1×10^6 細胞である。

【0021】

本発明のいくつかの実施形態によれば、細胞数が 85% 超であることをもって、細胞集団が治療薬として適していることの指標とする。

【0022】

本発明のいくつかの実施形態によれば、本発明の方法においては、細胞から分泌された神経栄養因子の量を決定するステップをさらに含み、神経栄養因子の量が所定のレベルを上回ることをもって、細胞集団が治療薬として適していることのさらなる指標とする。

【0023】

50

本発明のいくつかの実施形態によれば、神経栄養因子は、G D N Fである。

【0024】

本発明のいくつかの実施形態によれば、神経栄養因子は、G D N F、V E G FおよびH G Fからなる群から選択される。

【0025】

本発明のいくつかの実施形態によれば、所定のレベルは、同一ドナーから得られた分化していない間葉系幹細胞から分泌されたG D N Fの量の少なくとも5倍である。

【0026】

本発明のいくつかの実施形態によれば、分化培地は、ホスホジエステラーゼ阻害剤を含まない。

10

【0027】

本発明のいくつかの実施形態によれば、分化培地は、トリヨードチロニンを含まない。

【0028】

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

【0029】

本発明のいくつかの実施形態によれば、分化培地は、異種由来成分を含まない。

【0030】

本発明のいくつかの実施形態によれば、分化培地は、抗生物質を含まない。

【0031】

20

本発明のいくつかの実施形態によれば、本発明の方法においては、インキュベートするステップに先立って、未分化M S C集団を培養するステップをさらに含み、培養するステップは、細胞分化を促進しない条件下で実施される。

【0032】

本発明のいくつかの実施形態によれば、培養するステップは、前記未分化M S Cの播種後3日間実施される。

【0033】

本発明のいくつかの実施形態によれば、播種は、約6000~8000細胞/cm²の密度で実施される。

【0034】

30

本発明のいくつかの実施形態によれば、培養するステップは、血小板溶解物を含む培養培地中で実施される。

【0035】

本発明のいくつかの実施形態によれば、培養培地中の血小板溶解物のパーセンテージは約10%である。

【0036】

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

【0037】

本発明のいくつかの実施形態によれば、分析するステップは、フローサイトメトリーによって実施される。

40

【0038】

本発明のいくつかの実施形態によれば、M S C集団の細胞の少なくとも90%がC D 4 9 aを発現している。

【0039】

本発明のいくつかの実施形態によれば、細胞集団の少なくとも80%がC D 4 9 aを発現している。

【0040】

本発明のいくつかの実施形態によれば、細胞は、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を含む分化培地中での

50

インキュベーションによって *ex vivo* で分化されたものである。

【0041】

本発明のいくつかの実施形態によれば、集団の細胞の少なくとも90%は、CD49aを発現している。

【0042】

別途定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および／または科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同一の意味を有する。本発明の実施形態の実施または試験において、本明細書に記載されるものと同様または同等の方法および材料を使用することができるが、例示的方法および／または材料は、以下に記載されている。矛盾する場合には、本明細書およびそこに記載された定義が支配する。さらに、材料、方法および具体例は、単に例示的なものであり、必ずしも本発明の限定を意図するものではない。

【0043】

本発明のいくつかの実施形態は、付随する図面を参照して、単なる例示として本明細書に記載される。ここで特定の図面に対して参照して説明するが、ここで示す詳細は例示あり、且つ本発明の態様を具体的に考察することを目的とするものであることを強調しておく。これに関連して、図面と共に本明細書の説明を読むことによって、本発明の態様が実施され得る方法が明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】同一ドナー由来のMSC細胞（黒線）およびMSC-NTF細胞（太い黒線）の、分化終了時の表面CD49a発現の代表的フローサイトメトリー分析の図である。左側の点線は、アイソタイプ対照である（アイソタイプ対照のMFIは、0.395であり、MSCのMFIは2.83であり、MSC-NTFのMFIは13.5である）。

【図2A】ALS患者由来の骨髄MSCにおける、分化前および分化後のGDF-15量を示すグラフである。

【図2B】ALS患者由来の骨髄MSCにおける、分化前および分化後のIL-8量を示すグラフである。

【図3】貯蔵培地における細胞の安定性を示すグラフである。細胞を2～8℃でシリンジ内でインキュベートした。24、48、72および96時間後、細胞をサンプリングし、各時点における生存細胞の回収率および生存率を評価した（図3のA）。各時点において、細胞を培養培地に播種し、3日間培養した。それぞれの3日間の培養期間の終了時には、生存細胞の回収率および生存率を評価した（0時間で播種した細胞数に対する回収率%として算出した；図3のB）。結果は、2回の実験の平均を示した。

【発明を実施するための形態】

【0045】

本発明は、そのいくつかの実施形態では、細胞表面マーカー発現に基づいて神経栄養因子分泌細胞の適性を判定する方法に関する。

【0046】

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、以下の説明によって示される、または実施例によって例示される詳細に必ずしも制限されるものではないことを理解されたい。本発明は、その他の実施形態も可能であり、また、種々の方法で実施もしくは実行可能である。

【0047】

神経栄養因子（NTF）は、神経細胞の生存、機能維持および表現型の発達を調節する分泌タンパク質である。NTFレベルの変化は、ニューロンにおけるプログラムされた細胞死の誘発に関与しており、したがって、パーキンソン病およびその他の神経変性疾患の病理発生に寄与する。

【0048】

しかし、神経栄養因子は、血液脳関門を通過せず、全身注射後に正しく分布しないので

10

20

30

40

50

、神経栄養因子の直接使用は適用可能ではない。したがって、神経栄養因子の治療的特性を利用するには、その他の手法を開発しなければならない。

【0049】

ヒト間葉系幹細胞（MSC）を神経栄養因子分泌細胞に分化させるためのプロトコールは、当技術分野で公知である。例えば、国際公開第2006/134602号および国際公開第2009/144718号を参照のこと。

【0050】

本発明者らは、MSCからの神経栄養因子の分泌を増強する、新規な1ステップ分化プロトコールをこれまでに開発した。グリア由来増殖因子（GDNF）および脳由来神経栄養因子（BDNF）の分泌のレベルは、分化プロセス後に一貫して上方制御され、同一ドナーから得られた対応する分化していない細胞集団と比較して、GDNFは20倍程度、BDNFは3倍程度、上方制御されることが示された。

10

【0051】

上記プロトコールは、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を含む単一培地中で行う、未分化MSCの直接分化を含む。

【0052】

本発明者らは、このプロトコールに従って分化に成功した間葉系幹細胞集団を選択するための、細胞表面マーカーの発現に基づく独自の簡単な方法を見出した。これらの分化細胞上に発現された無数の潜在的細胞表面マーカーのうち、本発明者らは、CD49aが分化の成功を実証するための単一マーカーとして使用し得ることを見出した。

20

【0053】

図1に詳述されるように、分化成功後に得られた細胞の80%超が、その細胞表面上にCD49aを発現していた。対照的に、分化前には細胞の約65%しか、その細胞表面上にCD49aを発現していなかった。さらに、本発明者らは、分化に成功したMSCにおけるCD49a発現レベルは、未分化MSCにおけるCD49a発現レベルよりも高いことを示した。

【0054】

したがって、本発明の一態様によれば、

（a）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を含む分化培地中で、少なくとも2日間、未分化間葉系幹細胞（MSC）の集団をインキュベートして、分化MSC集団を得るステップと、

30

（b）分化MSC集団におけるCD49aの発現を分析するステップであって、所定のレベルを上回るCD49aの量が、細胞集団が治療薬として適していることを示すステップと

を含む、細胞集団が適した治療薬であるか否かを判定する方法が提供される。

【0055】

本明細書において、「治療に適した」とは、神経変性疾患および免疫疾患（例えば、自己免疫疾患）を治療するための細胞集団の適合性を指す。特定の実施形態によれば、治療に適した細胞は、特定の疾患に対して治療効果を発揮し得るのに十分な神経栄養因子を分泌するものである。

40

【0056】

本明細書において「神経変性疾患」とは、中枢神経系の損傷によって引き起こされる疾患を表すために使用する。本発明の細胞および方法を使用して治療され得る例示的な神経変性疾患としては、例えば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、多系統萎縮（MSA）、ハンチントン舞蹈病、アルツハイマー病、レット症候群、サンフィリポ症候群などのリソソーム蓄積症（例えば、Folkerth, J. Neuropath. Exp. Neuro., September 1999, 58:9に記載の「白質疾患」またはグリア/脱髄疾患）、ゴーシェ病、テイ・サックス病（ β -ヘキソサミニダーゼ欠乏症）、その他の遺伝病、多発性硬化症（MS）、虚血、事故、環境障害などによって引き起こされた脳傷害または外傷、脊髄損傷、運動失

50

調が挙げられる。さらに、本発明は、患者における卒中、そうでなければ、患者の脳内の部位への血流の欠如または虚血によって引き起こされる中枢神経系に対する影響、または脳および／または脊髄への物理的傷害から生じた中枢神経系に対する影響を、低減および／または排除するために使用され得る。神経変性疾患はまた、例えば、自閉症スペクトラム障害および統合失調症などの関連神経疾患を含めた神経発達障害を、多数の他の疾患と共に含む。

【0057】

本明細書に記載された細胞を使用して治療され得る神経系の自己免疫疾患としては、例えば、多発性硬化症および重症筋無力症、ギランバレー症候群、多系統萎縮（MSA；種々の程度のパーキンソン症状、自律神経障害および小脳性運動失調を伴う、孤発性進行性の成人発症型神経変性障害）が挙げられる。その他の自己免疫疾患は、参照によりその内容が本明細書に組み込まれる、Kraker et al., Curr Neuroparmacol. 2011 September; 9(3): 400-408に記載されている。

【0058】

本発明の細胞は、未分化骨髄由来MSCと比較して、増強された免疫調節効果を示す（下記表5を参照）。したがって、本発明の細胞は、任意の免疫関連異常または炎症性障害の治療において有用であり得る。

【0059】

本明細書において、「炎症性障害」とは、慢性炎症性疾患および急性炎症性疾患を含むが、これらに限定されるものではない。このような疾患および状態の例を、以下にまとめた。

【0060】

過敏症を伴う炎症性疾患

過敏症の例として、I型過敏症、II型過敏症、III型過敏症、IV型過敏症、即時型過敏症、抗体媒介性過敏症、免疫複合体媒介性過敏症、Tリンパ球媒介性過敏症およびDTHが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0061】

I型または即時型過敏症の例は、喘息である。

II型過敏症としては、リウマチ性疾患、リウマチ性自己免疫疾患、関節リウマチ(Krenn V. et al., Histol Histopathol 2000 Jul;15 (3):791)、脊椎炎、強直性脊椎炎(Jan Voswinkel et al., Arthritis Res 2001; 3 (3): 189)、全身性疾患、全身性自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス(Erikson J. et al., Immunol Res 1998;17 (1-2):49)、硬化症、全身性硬化症(Renaudineau Y. et al., Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Mar;6 (2):156); Chan OT. et al., Immunol Rev 1999 Jun;169:107)、腺疾患、腺性自己免疫疾患、膵性自己免疫疾患、糖尿病、I型糖尿病(Zimmet P. Diabetes Res Clin Pract 1996 Oct;34 Suppl:S125)、甲状腺疾患、自己免疫性甲状腺疾患、グレーブス病(Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am 2000 Jun;29 (2):339)、甲状腺炎、特発性自己免疫性甲状腺炎(Braley-Mullen H. and Yu S, J Immunol 2000 Dec 15;165 (12):7262)、橋本甲状腺炎(Toyoda N. et al., Nippon Rinsho 1999 Aug;57 (8):1810)、粘液水腫、突発性粘液水腫(Mitsuma T. Nippon Rinsho. 1999 Aug;57 (8):1759); 自己免疫生殖疾患、卵巣疾患、卵巣自己免疫(Garza KM. et al., J Reprod Immunol 1998 Feb;37 (2):87)、自己免疫性抗精子不妊症(Diekman AB. et al., Am J Reprod Immunol. 2000 Mar;43 (3):134)、反復性流産(Tincani A. et al., Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9)、神経変性疾患、神経疾患、神経学的自己免疫疾患、多発性硬化症(Cross AH. et al., J Neuroimmunol 2001 Jan 1;112 (1-2):1)、アルツハイマー病(Oron L. et al., J Neural Transm Suppl. 1997;49:77)、重症筋無力症(Infante AJ. And Kraig E, Int Rev Immunol 1999;18 (1-2):83)、運動神経障害(Kornberg AJ. J Clin Neurosci. 2000 May;7 (3):191)、ギランバレー症候群、神経障害および自己免疫神経障害(Kusunoki S. Am J Med Sci. 2000 Apr;319 (4):234)、筋無力症疾患、ランバート・イートン筋無力症症候群(Takamori M. Am J Med Sci. 2000 Apr;319 (4):204)、腫瘍随伴神経疾患、小脳性萎縮、腫瘍随伴小脳性萎縮、非腫瘍随伴ス

10

20

30

40

50

ティフ・マン症候群、小脳性萎縮症、進行性小脳性萎縮症、脳炎、ラスムッセン脳炎、筋萎縮性側索硬化症、シデナム舞踏病、ジル・ドゥ・ラ・トゥレット症候群、多腺性内分泌障害、自己免疫性多腺性内分泌障害(Antoine JC. and Honnorat J. *Rev Neurol (Paris)* 2000 Jan;156 (1):23); 神経障害、免疫異常神経障害(Nobile-Orazio E. et al., *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 1999;50:419); 神経性筋強直症、後天性神経性筋強直症、先天性多発性関節拘縮症(Vincent A. et al., *Ann N Y Acad Sci.* 1998 May 13;841:482)、心血管疾患、心血管自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化症(Matsuura E. et al., *Lupus.* 1998;7 Suppl 2:S135)、心筋梗塞(Vaarala O. *Lupus.* 1998;7 Suppl 2:S132)、血栓症(Tincani A. et al., *Lupus* 1998;7 Suppl 2:S107-9)、肉芽腫症、ウェジナー肉芽腫症、動脈炎、高安動脈炎および川崎症候群(Praprotnik S. et al., *Wien Klin Wochenschr* 2000 Aug 25;112 (15-16):660); 抗第 V I I I 因子自己免疫疾患(Lacroix-Desmazes S. et al., *Semin Thromb Hemost.* 2000;26 (2):157); 血管炎、壊死性小血管血管炎、顕微鏡的多発血管炎、チャージ・ストラウス症候群、糸球体腎炎、微量免疫型限局性壊死性糸球体腎炎、半月体形成性糸球体腎炎(Noel LH. *Ann Med Interne (Paris).* 2000 May;151 (3):178); 抗リン脂質症候群(Flamholz R. et al., *J Clin Apheresis* 1999;14 (4):171); 心不全、心不全におけるアゴニスト様 β -アドレナリン受容体抗体(Wallukat G. et al., *Am J Cardiol.* 1999 Jun 17;83 (12A):75H)、血小板減少性紫斑病(Moccia F. *Ann Ital Med Int.* 1999 Apr-Jun;14 (2):114); 溶血性貧血、自己免疫性溶血性貧血(Efremov DG. et al., *Leuk Lymphoma* 1998 Jan;28 (3-4):285)、胃腸疾患、胃腸管の自己免疫疾患、腸疾患、慢性炎症性腸疾患(Garcia Herola A. et al., *Gastroenterol Hepatol.* 2000 Jan;23 (1):16)、セリアック病(Landau YE. and Shoenfeld Y. *Harefuah* 2000 Jan 16;138 (2):122)、筋系の自己免疫疾患、筋炎、自己免疫筋炎、シェーグレン症候群(Feist E. et al., *Int Arch Allergy Immunol* 2000 Sep;123 (1):92); 平滑筋自己免疫疾患(Zauli D. et al., *Biomed Pharmacother* 1999 Jun;53 (5-6):234)、肝疾患、肝性自己免疫疾患、自己免疫肝炎(Manns MP. *J Hepatol* 2000 Aug;33 (2):326)および原発性胆汁性肝硬変(Strassburg CP. et al., *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1999 Jun;11 (6):595)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0062】

I V型またはT細胞媒介性過敏症としては、リウマチ性疾患、関節リウマチ(Tisch R, McDevitt HO. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Jan 18;91 (2):437)、全身性疾患、全身性自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス(Datta SK., *Lupus* 1998;7 (9):591)、腺疾患、腺性自己免疫疾患、脾性疾患、脾性自己免疫疾患、1型糖尿病(Castano L. and Eisenbarth GS. *Ann. Rev. Immunol.* 8:647); 甲状腺疾患、自己免疫性甲状腺疾患、グレーブス病(Sakata S. et al., *Mol Cell Endocrinol* 1993 Mar;92 (1):77); 卵巣疾患(Garza KM. et al., *J Reprod Immunol* 1998 Feb;37 (2):87)、前立腺炎、自己免疫性前立腺炎(Alexander RB. et al., *Urology* 1997 Dec;50 (6):893)、多腺性症候群、自己免疫性多腺性症候群、I型自己免疫性多腺性症候群(Hara T. et al., *Blood.* 1991 Mar 1;77 (5):1127)、神経疾患、自己免疫性神経疾患、多発性硬化症、神経炎、視神経炎(Soderstrom M. et al., *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994 May;57 (5):544)、重症筋無力症(Oshima M. et al., *Eur J Immunol* 1990 Dec;20 (12):2563)、スティフ・マン症候群(Hiemstra HS. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Mar 27;98 (7):3988)、心血管疾患、シャーガス病における心臓自己免疫(Cunha-Neto E. et al., *J Clin Invest* 1996 Oct 15;98 (8):1709)、自己免疫血小板減少性紫斑病(Semple JW. et al., *Blood* 1996 May 15;87 (10):245)、抗ヘルパーTリンパ球自己免疫(Caporossi AP. et al., *Viral Immunol* 1998;11 (1):9)、溶血性貧血(Sallah S. et al., *Ann Hematol* 1997 Mar;74 (3):139)、肝疾患、肝性自己免疫疾患、肝炎、慢性活動性肝炎(Franco A. et al., *Clin Immunol Immunopathol* 1990 Mar;54 (3):382)、胆汁性肝硬変、原発性胆汁性肝硬変(Jones DE. *Clin Sci (Colch)* 1996 Nov;91 (5):551)、腎臓病、腎臓自己免疫疾患、腎炎、間質性腎炎(Kelly CJ. *J Am Soc Nephrol* 1990 Aug;1 (2):140)、結合組織疾患、耳疾患、自己免疫結合組織疾患、自己免疫耳疾患(Yoo TJ. et al., *Cell Immunol* 1994 Aug;157 (1):249)、内耳の疾患(Gl

oddek B. et al., Ann N Y Acad Sci 1997 Dec 29;830:266)、皮膚疾患、皮膚疾患(cutaneous diseases)、皮膚疾患(dermal diseases)、水疱性皮膚疾患、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡および落葉状天疱瘡が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0063】

遅延型過敏症の例としては、接触皮膚炎および蕁麻疹が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0064】

過敏症を媒介するTリンパ球種の例としては、ヘルパーTリンパ球および細胞傷害性Tリンパ球が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0065】

ヘルパーTリンパ球媒介性過敏症の例としては、 T_H1 リンパ球媒介性過敏症および T_H2 リンパ球媒介性過敏症が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0066】

自己免疫疾患

自己免疫疾患には、心血管疾患、リウマチ性疾患、腺疾患、胃腸疾患、皮膚疾患、肝疾患、神経疾患、筋疾患、腎臓病、生殖と関連する疾患、結合組織疾患および全身性疾患が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0067】

自己免疫心血管疾患の例としては、アテローム性動脈硬化症(Matsuura E. et al., Lupus. 1998;7 Suppl 2:S135)、心筋梗塞(Vaarala O. Lupus. 1998;7 Suppl 2:S132)、血栓症(Tincani A. et al., Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9)、ウェジナー肉芽腫症、高安動脈炎、川崎症候群(Praprotnik S. et al., Wien Klin Wochenschr 2000 Aug 25;112 (15-16):660)、抗VIII因子自己免疫疾患(Lacroix-Desmazes S. et al., Semin Thromb Hemost. 2000;26 (2):157)、壊死性小血管脈管炎、顕微鏡的多発血管炎、チャージ・スト劳斯症候群、微量免疫型限局性壊死性および半月体形成性糸球体腎炎(Noel LH. Ann Med Interne (Paris). 2000 May;151 (3):178)、抗リン脂質症候群(Flamholz R. et al., J Clin Apheresis 1999;14 (4):171)、抗体誘導性心不全(Wallukat G. et al., Am J Cardiol. 1999 Jun 17;83 (12A):75H)、血小板減少性紫斑病(Moccia F. Ann Ital Med Int. 1999 Apr-Jun;14 (2):114; Semple JW. et al., Blood 1996 May 15;87 (10):4245)、自己免疫性溶血性貧血(Efremov DG. et al., Leuk Lymphoma 1998 Jan;28 (3-4):285; Sallah S. et al., Ann Hematol 1997 Mar;74 (3):139)、シャーガス病における心臓自己免疫(Cunha-Neto E. et al., J Clin Invest 1996 Oct 15;98 (8):1709)および抗ヘルパーTリンパ球自己免疫(Caporossi AP. et al., Viral Immunol 1998;11 (1):9)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0068】

自己免疫リウマチ性疾患の例としては、関節リウマチ(Krenn V. et al., Histol Histo pathol 2000 Jul;15 (3):791; Tisch R, McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci units S A 1994 Jan 18;91 (2):437)および強直性脊椎炎(Jan Voswinkel et al., Arthritis Res 2001; 3 (3): 189)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0069】

自己免疫性腺疾患の例としては、膵性疾患、I型糖尿病、甲状腺疾患、グレーブス病、甲状腺炎、自発性自己免疫性甲状腺炎、橋本甲状腺炎、突発性粘液水腫、卵巣自己免疫、自己免疫性抗精子不妊症、自己免疫性前立腺炎およびI型自己免疫性多腺性症候群が挙げられる。疾患として、それだけには限らないが、膵臓の自己免疫疾患、I型糖尿病(Castano L. and Eisenbarth GS. Ann. Rev. Immunol. 8:647; Zimmet P. diabetes Res Clin Pract 1996 Oct;34 Suppl:S125)、自己免疫性甲状腺疾患、グレーブス病(Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am 2000 Jun;29 (2):339; Sakata S. et al., Mol Cell Endocrinol 1993 Mar;92 (1):77)、自発性自己免疫性甲状腺炎(Braley-Mullen H. and Yu S, J Immunol 2000 Dec 15;165 (12):7262)、橋本甲状腺炎(Toyoda N. et al., Nippon Rinsho 1999 Aug;57 (8):1810)、突発性粘液水腫(Mitsuma T. Nippon Rinsho. 1999 Aug;57 (

10

20

30

40

50

8):1759)、卵巣自己免疫(Garza KM. et al., J Reprod Immunol 1998 Feb;37 (2):87)、自己免疫性抗精子不妊症(Diekman AB. et al., Am J Reprod Immunol. 2000 Mar;43 (3):134)、自己免疫性前立腺炎(Alexander RB. et al., Urology 1997 Dec;50 (6):893)およびI型自己免疫性多腺性症候群(Hara T. et al., Blood. 1991 Mar 1;77 (5):1127)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0070】

自己免疫性胃腸疾患の例としては、慢性炎症性腸疾患(Garcia Herola A. et al., Gastroenterol Hepatol. 2000 Jan;23 (1):16)、セリアック病(Landau YE. and Shoenfeld Y. Harefuah 2000 Jan 16;138 (2):122)、大腸炎、回腸炎およびクローン病が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0071】

自己免疫性皮膚疾患の例としては、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡および落葉状天疱瘡などの自己免疫水疱性皮膚疾患が挙げられる。

【0072】

自己免疫性肝疾患の例としては、肝炎、自己免疫性慢性活動性肝炎(Franco A. et al., Clin Immunol Immunopathol 1990 Mar;54 (3):382)、原発性胆汁性肝硬変(Jones DE. Clin Sci (Colch) 1996 Nov;91 (5):551; Strassburg CP. et al., Eur J Gastroenterol Hepatol. 1999 Jun;11 (6):595)および自己免疫肝炎(Manns MP. J Hepatol 2000 Aug;33 (2):326)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0073】

20

自己免疫性神経疾患の例としては、多発性硬化症(Cross AH. et al., J Neuroimmunol 2001 Jan 1;112 (1-2):1)、アルツハイマー病(Oron L. et al., J Neural Transm Suppl. 1997;49:77)、重症筋無力症(Infante AJ. And Kraig E, Int Rev Immunol 1999;18 (1-2):83; Oshima M. et al., Eur J Immunol 1990 Dec;20 (12):2563)、神経障害、運動神経障害(Kornberg AJ. J Clin Neurosci. 2000 May;7 (3):191);ギランバレー症候群および自己免疫神経障害(Kusunoki S. Am J Med Sci. 2000 Apr;319 (4):234)、筋無力症、ランバート・イートン筋無力症症候群(Takamori M. Am J Med Sci. 2000 Apr;319 (4):204);腫瘍随伴神経疾患、小脳性萎縮、腫瘍随伴小脳性萎縮およびスティフ・マン症候群(Hiemstra HS. et al., Proc Natl Acad Sci units S A 2001 Mar 27;98 (7):3988);非腫瘍随伴スティフ・マン症候群、進行性小脳性萎縮症、脳炎、ラスムッセン脳炎、筋萎縮性側索硬化症、シデナム舞踏病、ジル・ドゥ・ラ・トゥレット症候群および自己免疫性多腺性内分泌障害(Antoine JC. and Honnorat J. Rev Neurol (Paris) 2000 Jan;156 (1):23);免疫異常神経障害(Nobile-Orazio E. et al., Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl 1999;50:419);後天性神経性筋強直症、先天性多発性関節拘縮症(Vincent A. et al., Ann N Y Acad Sci. 1998 May 13;841:482)、神経炎、視神経炎(Soderstrom M. et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994 May;57 (5):544)および神経変性疾患が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

【0074】

自己免疫性筋疾患の例としては、筋炎、自己免疫性筋炎および原発性シェーグレン症候群(Feist E. et al., Int Arch Allergy Immunol 2000 Sep;123 (1):92)および平滑筋自己免疫疾患(Zauli D. et al., Biomed Pharmacother 1999 Jun;53 (5-6):234)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

【0075】

自己免疫性腎臓病の例としては、腎炎および自己免疫性間質性腎炎(Kelly CJ. J Am Soc Nephrol 1990 Aug;1 (2):140)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0076】

生殖と関連している自己免疫疾患の例としては、反復性流産(Tincani A. et al., Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0077】

自己免疫結合組織疾患の例としては、耳疾患、自己免疫耳疾患(Yoo TJ. et al., Cell

50

Immunol 1994 Aug;157 (1):249)および内耳の自己免疫疾患(Gloddek B. et al., Ann N Y Acad Sci 1997 Dec 29;830:266)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0078】

自己免疫系疾患の例としては、全身性エリテマトーデス (Erikson J. et al., Immunol Res 1998;17 (1-2):49)および全身性硬化症(Renaudineau Y. et al., Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Mar;6 (2):156);Chan OT. et al., Immunol Rev 1999 Jun;169:107)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0079】

感染性疾患

感染性疾患の例としては、慢性感染性疾患、亜急性感染性疾患、急性感染性疾患、ウイルス性疾患、細菌性疾患、原虫症、寄生中症、真菌性疾患、マイコプラズマ症およびプリオン疾患が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0080】

移植片拒絶病

移植片の移植に関連している疾患の例としては、移植片拒絶、慢性移植片拒絶、亜急性移植片拒絶、超急性移植片拒絶、急性移植片拒絶および移植片対宿主病が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0081】

アレルギー性疾患

疾患の例としては、喘息、じんま疹(hives)、じんま疹(urticaria)、花粉アレルギー、イェダニアレルギー、ハチ毒アレルギー、化粧品アレルギー、ラテックスアレルギー、化学アレルギー、薬物アレルギー、虫刺アレルギー、動物鱗屑アレルギー、棘植物アレルギー、ツタウルシアレルギーおよび食物アレルギーが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

【0082】

癌性疾患

癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫および白血病が挙げられる。それだけには限らないが、癌性疾患の特定の例：慢性骨髄性白血病などの骨髄性白血病、分化型急性骨髄性白血病、急性前骨髄球性白血病、好塩基球の増大を伴う急性非リンパ性白血病、急性単球性白血病、好酸球増加症を伴う急性骨髄単球性白血病；パーキット非ホジキンなどの悪性リンパ腫；急性リンパ芽球性白血病などのリンパ球性白血病、慢性リンパ性白血病；固形腫瘍良性髄膜腫などの骨髄増殖性疾患、唾液腺の混合腫瘍、結腸腺腫；小細胞肺癌、腎臓、子宮、前立腺、膀胱、卵巣、結腸などの腺癌、肉腫、脂肪肉腫、粘液型、滑膜肉腫、横紋筋肉腫（肺胞）、骨外性粘液型軟骨肉腫、ユーイング腫瘍；その他のものとして、精巣および卵巣未分化胚細胞腫、網膜芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、神経芽細胞腫、悪性黒色腫、中皮腫、乳房、皮膚、前立腺および卵巣が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

【0083】

特定の実施形態によれば、本明細書に記載される方法は、細胞集団がALSの治療に適しているか否かを判定するためのものである。

40

【0084】

「間葉系幹細胞」または「MSC」という用語は、同義的に使用されるものであり、最終分化しておらず、分裂して幹細胞をもたらすか、または不可逆的に分化して、間葉系（軟骨細胞、骨細胞および脂肪細胞）の細胞を生じる、成熟細胞である。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においては、自己（例えば、同系）由来または同種異系由来であり得る。

【0085】

MSCの集団は、通常、その細胞表面上に特定のマーカーを発現する。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る測定において、細胞表面上にCD105、CD73およびCD90を発現し（例えば、95%超が陽性であり）、CD3

50

、CD14、CD19、CD34、CD45およびHLA-DRを発現しない（例えば、2%未満が陽性である）。

【0086】

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としては、CD44 FITCコンジュゲート型（BD Biosciences）、CD73 PEコンジュゲート型（BD Pharmingen）、CD73 PEコンジュゲート型（BD Biosciences）、CD90 PE-Cy5コンジュゲート型（eBioscience）、CD90 PEコンジュゲート型（BD Biosciences）、CD105 PEコンジュゲート型（Beckman Coulter）、CD3 PerCPコンジュゲート型（BD Biosciences）、CD14 FITCコンジュゲート型（eBioscience）、CD14 FITCコンジュゲート型（BD Biosciences）、CD19 PE-Cy5コンジュゲート型（eBioscience）、CD19 FITCコンジュゲート型（BD Biosciences）、CD34 FITCコンジュゲート型（BD Biosciences）（Beckman Coulter）、CD45 PEコンジュゲート型（eBioscience）、CD45 PerCPコンジュゲート型（BD Biosciences）およびHLA-DR PE-Cy5コンジュゲート型（BD Pharmingen）、HLA-DR PerCPコンジュゲート型、BD Biosciencesが挙げられる。

10

【0087】

間葉系幹細胞の存在を確認するための別の方法としては、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可能であることを実証する方法である。これは、例えば、ヒト間葉系幹細胞機能同定キット（R&D Systems）を使用して実施され得る。

20

【0088】

本発明のこの態様の好ましい実施形態によれば、間葉系幹細胞は、本明細書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（すなわち、発現構築物を用いて形質転換）されていない。

【0089】

本発明の細胞は、少なくともいくつかの実施形態では、任意の幹細胞から誘導することが可能であるが、胚性幹（ES）細胞ではないことが好ましいことは理解されたい。

30

【0090】

間葉系幹細胞は種々の組織から単離され得るものであり、このような組織としては、骨髓、末梢血、血液、胎盤および脂肪組織が挙げられるが、これらに限定されるものではない。末梢血から間葉系幹細胞を単離する方法は、Kassis et al [Bone Marrow Transplant, 2006 May; 37(10):967-76]に記載されている。胎盤組織から間葉系幹細胞を単離する方法は、Brooke G et al. [Br J Haematol. 2009 Feb; 144 (4):571-9]に記載されている。

【0091】

脂肪組織、胎盤および臍帯血から間葉系幹細胞を単離および培養する方法は、Kern et al [Stem Cells, 2006; 24:1294-1301]に記載されている。

【0092】

本発明のこの態様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。

40

【0093】

骨髓は、吸引によって個体の腸骨稜または胸骨から単離され得る。低密度骨髓（BM）単核細胞（BMMNC）は、フィコール-Paque密度勾配遠心分離によって分離され得る。間葉系幹細胞を得るために、間葉系幹細胞（例えば、BMMNC）を含む細胞集団を、血小板溶解物の存在下で細胞を維持および／または増殖可能な増殖培地で培養され得る。一実施形態によれば、細胞集団をプラスチックの表面（例えば、フラスコ内部の表面）上にプレーティングし、非接着細胞を除去することによって間葉系幹細胞を単離する。あるいは、間葉系幹細胞は、間葉系幹細胞マーカーを使用してFACSによって単離され得る。

50

【0094】

単離後、単離された細胞は、血小板溶解物の存在下、*ex vivo*で細胞を維持および／または増殖可能な増殖培地中で培養することによって、増殖させることができる。増殖培地は、DMEM、 α -MEMまたはDMEM/F12であり得る。通常、培地中のグルコース濃度は、約0.5～3グラム／リットルである。

【0095】

培養は、間葉系幹細胞の培養に適したプラスチックディッシュおよびバイオリアクターを含む、任意の適切な表面上で実施され得る。

【0096】

血小板溶解物は、当技術分野で公知の任意の方法を使用して調製され得る。多血小板血漿（PRP）は、感染性病原体（すなわち、HIV、HTLV、HCV、HBsAg）を含まないと確認された血液バンクの献血に由来し得る。PRP含有バッグは、 -80°C で保存され、 37°C の水浴中で解凍され得る。解凍後、多血小板血漿は、通常、遠心分離されて、血小板の粒子および膜を除去する。次いで、血小板溶解物である上清を回収し、使用まで -80°C で凍結され得る。血小板溶解物は、内毒素、ヘモグロビン、pH、総タンパク質、アルブミン、浸透圧、無菌性およびマイコプラズマについて試験される。

【0097】

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等の、付加的な成分を含み得る。

【0098】

間葉系幹細胞がヒト由来である場合には、血小板溶解物もヒト細胞から得られたものであることが好ましい点を認識されたい。

【0099】

一実施形態によれば、増殖／成長培地は、異種混入物を含まない、すなわち、血清、動物由来増殖因子およびアルブミンなどの動物由来成分を含まない。したがって、この実施形態においては、異種混入物の不在下で培養を実施する。

【0100】

例示的な間葉系幹細胞単離および増殖プロトコールは、本明細書において、後述する実施例に示されている。

【0101】

上述したように、血小板溶解物含有培地中で間葉系幹細胞を増殖させた後、適切な数の未分化細胞が得られたら、疾患の治療に有用な細胞を得るために、細胞を分化培地中で分化させる。

【0102】

特定の実施形態によれば、細胞は、分化培地の添加に先立って、新鮮な増殖／成長培地に（例えば、 1 cm^2 あたり約6000～8000細胞の密度で）再播種し、1日、2日、3日、4日または5日間経過させる。

【0103】

「未分化MSC」とは、分化を誘導する培地中で培養していないMSCを表す。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、任意の増殖後、分化前ステップを全く介在させることなく、MSCを分化培地と直接接触させる。

【0104】

少なくともいくつかの実施形態では、分化のために、本発明の未分化MSCを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を含む培地中でインキュベートする。この実施形態においては、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の各々は、単一培地に混合され、培養は、単一ステップで実施される。

【0105】

一実施形態によれば、本発明の未分化MSCを、上記ステップの前および増殖ステップ後に、上皮成長因子（EGF）および／またはN2サプリメントの存在下でプレインキュ

10

20

30

40

50

ベートしない。

【0106】

本発明の実施形態における分化培地について考えられるbFGFの例示的濃度は、5～50ng/mlの範囲内、10～40ng/mlの範囲内、10～25ng/mlの範囲内から任意に選択できるものである。

【0107】

本発明の実施形態における分化培地について考えられるPDGF-AAの例示的濃度は、1～30ng/mlの範囲内、1～20ng/mlの範囲内、1～10ng/mlの範囲内、2.5～10ng/mlの範囲内から任意に選択できるものである。

【0108】

本発明の実施形態における分化培地について考えられるヘレグリンβ1の例示的濃度は、5～100ng/mlの範囲内、10～90ng/mlの範囲内、25～75ng/mlの範囲内、40～60ng/mlの範囲内から任意に選択できるものである。

【0109】

本発明の実施形態における分化培地について考えられるdbc-AMPの例示的濃度は、0.5～10mMの範囲内、0.5～5mMの範囲内、0.5と2.5mMの間の範囲内から任意に選択できるものである。

【0110】

1つの実施形態によれば、本発明のこの態様における分化培地は、ホスホジエステラーゼ阻害剤（例えば、IBMX）を含まない、すなわち、培養は、ホスホジエステラーゼ阻害剤の不在下で実施される。

【0111】

別の実施形態によれば、本発明のこの態様における分化培地は、トリヨードチロニンを含まない、すなわち、培養は、トリヨードチロニンの不在下で実施される。

【0112】

所望により、これらの実施形態および副形態のいずれをもを組み合わせてもよい。例えば、分化培地は、所望により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含まなくてもよい。

【0113】

好ましくは、MSCは、上記の分化培地中で、少なくとも1日、少なくとも2日または少なくとも3日間分化させる。分化工程は、5日を超えて実施されないことが好ましい。

【0114】

本発明のこの態様に従って使用される分化培地は、好ましくは、異種不含であり（血清を含まず）、いかなる抗生物質をも含まない、すなわち、培養は、異種混入物の不在下で実施される。

【0115】

細胞の収集は、通常、適当な培地、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などで実施される。低温貯蔵培地もまた企図される（例えば、Hypothermosol）。

【0116】

分化プロセス後、得られた細胞は、CD49aの発現について分析し、所定のレベルを上回るCD49aの量は、細胞集団が治療薬として適していることの指標となる。

【0117】

得られた細胞のすべてを、CD49a発現について分析する必要はなく、細胞集団の残りについて、それらの状態に関する情報を提供するサンプルを分析する点を理解されたい。

【0118】

通常、サンプル中の細胞数は、約 0.5×10^6 細胞である。

【0119】

単一ドナーから得られる細胞数は、一般に、 20×10^6 細胞～ 100×10^7 細胞の

10

20

30

40

50

間である。したがって、細胞数としては、約 20×10^6 細胞、約 100×10^6 細胞、約 200×10^6 細胞を分化させたり、約 300×10^6 細胞や約 400×10^6 細胞を分化させたり、約 500×10^6 細胞を分化させたり、約 600×10^6 細胞を分化させたり、約 700×10^6 細胞、約 800×10^6 細胞、約 900×10^6 細胞または約 100×10^7 細胞を挙げられる。

【0120】

本明細書において、「CD49a」（インテグリン $\alpha 1$ と呼ばれる）とは、細胞外マトリックスと結合する、インテグリン受容体の細胞表面膜タンパク質の $\alpha 1$ サブユニットを表す。このタンパク質は、 $\beta 1$ サブユニットとヘテロ二量体化して、コラーゲンおよびラミニンの細胞表面受容体を形成する。ヘテロ二量体受容体は、細胞間接着に関与している。

10

【0121】

CD49a のヒトタンパク質配列は、UniProt 番号 P56199、NP_852478 に示されており、その mRNA 配列は、NM_181501 に示されている。

【0122】

CD49a は、CD49 $\beta 1$ と一緒に細胞の表面上にヘテロ二量体を形成するので、本発明の方法はまた、分化細胞の表面上の CD49 $\beta 1$ の量を調べることによっても実施可能である点を理解されたい。

【0123】

CD49a または CD49 $\beta 1$ の発現を解析する方法は、通常、抗原を特異的に認識する抗体の使用を含む。CD49a を認識する市販の抗体として、例えば、サンタクルズの R and D Systems（カタログ番号 SC-81733PE）または Biogen（例えば、カタログ番号 328303）によって製造されるものが挙げられる。分析は、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、HPLC、in situ-PCR 免疫細胞化学、質量分析、ラジオイムノアッセイなどを含めた当技術分野で公知の任意の方法を使用して実施され得る。特定の実施形態によれば、分析は、タンパク質を特異的に認識する抗体を使用して実施される。

20

【0124】

フローサイトメトリーを行うためには、CD49a または CD49 $\beta 1$ 抗体を蛍光部分に結合し、蛍光活性化セルソーター（FACS）を使用して分析する。

30

【0125】

本明細書において、「フローサイトメトリー」とは、サンプル中の材料（例えば、特定のマーカーを含む間葉系幹細胞）の割合を、当該材料を標識し（例えば、標識抗体を当該材料と結合することによって）、材料を含有する流体流を光線の中に通過させ、一連のフィルターおよびミラーによってサンプルから発せられた光を構成波長に分離し、光を検出することによって決定するアッセイである。

【0126】

例えば、Becton Dickinson FACSscan および FACScalibur（カリフォルニア州、マウンテンビュー、BD Biosciences 社製）を含めた多数のフローサイトメーターが市販されている。FACS 分析のために使用され得る抗体は、Schlossman S, Boumell L, et al, [Leucocyte Typing V. New York: Oxford University Press; 1995] に教示されており、広く市販されている。

40

【0127】

フローサイトメトリーを含めたいくつかの方法のために、細胞集団は、培養プレートから取り出される必要がある。細胞を分散するために使用され得る薬剤の例としては、コラーゲナーゼ、ディスパーゼ、アクターゼ、トリプシン（例えば、トリプシン-EDTA、TrypLE（商標）などのトリプシンの非動物性代替品）、パパインが挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの代替、あるいはこれらに加えて、トリチュレーションも細胞の分散性を増大するために実施され得る。

【0128】

50

使用され得るトリプシンの例示的濃度は、0.005～0.5%トリプシン－EDTAである。細胞は、分散剤とともに約5～30分間、約37℃の温度でインキュベートされ得る。

【0129】

細胞は、通常、例えば、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、ハンクス平衡塩溶液（HBSS）、ダルベッコの改変イーグル培地（DMEM）、RPMI、PBSなどの適した培地で再懸濁される。

【0130】

細胞が治療薬として有用であると判定するためには、CD49aの量が、同一ドナー、同一臓器に由来する未分化MSCと比較して、統計的に有意なレベルを上回る量に増大していなければならない。

10

【0131】

特定の実施形態によれば、細胞が治療薬として有用であること判定するためには、細胞集団におけるの少なくとも80%がCD49aを発現しなくてはならず、より好ましくは、細胞集団におけるの少なくとも85%がCD49aを発現しなくてはならず、より好ましくは、細胞集団におけるの少なくとも90%がCD49aを発現しなくてはならず、より好ましくは、細胞集団の少なくとも95%がCD49aを発現しなくてはならない。

【0132】

別の実施形態によれば、細胞が治療薬として有用であると判定するためには、CD49a発現のレベル（例えば、平均蛍光強度）は、同一ドナー、同一臓器に由来する未分化MSCと比較して、少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも3倍、より好ましくは少なくとも4倍、さらにより好ましくは少なくとも5倍に増加していなければならない。

20

【0133】

フローサイトメーターを使用して、CD49aについて80%超陽性である細胞集団が得られ得ることは知られている。したがって、例えば、CD49aについて85%陽性、CD49aについて90%陽性、CD49aについて91%陽性、CD49aについて92%陽性、CD49aについて93%陽性、CD49aについて94%陽性、CD49aについて95%陽性、CD49aについて96%陽性、CD49aについて97%陽性、CD49aについて98%陽性、CD49aについて99%陽性、さらにはCD49aについて100%陽性である細胞集団も得られ得る。

30

【0134】

細胞は、CD44などのさらなる細胞表面マーカーの発現について分析されしてもよい。CD44の発現が少なくとも1.5倍、少なくとも2倍またはそれ以上の倍率に低下した細胞は、治療薬として有用であると判定され得る。

【0135】

細胞の適性の判断または特徴づけは、例えば、核型分析、形態学、細胞数と生存率、グラム染色および無菌性を含む、さらなる方法で実施され得る。

【0136】

さらに、細胞は、その神経栄養因子（NTF）分泌のレベルについて分析され得る。

分泌されたNTFの分析のために、上記の分化手順の最後に、MSCまたはNTF分泌性細胞の培養物から上清を回収し、細胞を採取し、計数する。細胞の培養上清中のグリア由来神経栄養因子（GDNF）や脳由来神経栄養因子（BDNF）などのNTFの量は、例えば、GDNFまたはBDNF ELISAアッセイ（GDNF DuoSet DY212；BDNF DuoSet DY248；R&D Systems）を、製造業者のプロトコールに従って使用することによって定量することができるが、これに限定されるものではない。IGF-1の量は、例えば、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が、これに限定されるものではない。

40

【0137】

VEGFの量は、例えば、VEGF ELISAアッセイ（VEGF DuoSet

50

R & D systems、カタログ：DY293B）を使用して定量することができるが、これに限定されるものではない。HGFの量は、例えば、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が、これに限定されるものではない。

【0138】

本発明の細胞によって分泌されるGDNFの量は、同じ間葉系幹細胞の分化していない集団における分泌量よりも、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倍に増加していることが好ましい。

【0139】

GDNFの比生産性は、約200～2000 pg / 10⁶ 細胞である。

【0140】

1つの実施形態によれば、本発明の分化細胞集団の少なくとも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。

【0141】

本発明の細胞によって分泌されるBDNFの量は、同じ間葉系幹細胞の分化していない集団における分泌量よりも、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倍に増加していることが好ましい。

【0142】

BDNFの比生産性は、約500～8000 pg / 10⁶ 細胞である。

【0143】

本発明の細胞は、未分化骨髄由来間葉系幹細胞とは様々な点で異なる。

【0144】

したがって、例えば、本発明の細胞は、GDF-15のELISAアッセイ（例えば、R & D Systems、カタログ番号DY957または同等物）による測定において、未分化MSCよりも少なくとも5倍多いGDF-15を分泌する。

【0145】

さらに、本発明の細胞は、IL-8のELISAアッセイ（例えば、R & D Systems、カタログ番号DY208-05または同等物）による測定において、未分化MSCよりも少なくとも10倍、20倍、さらには30倍多いIL-8を分泌する。

【0146】

さらに、本発明の細胞は、少なくとも2倍、4倍、6倍、8倍、さらには10倍の量の、表2に列挙されるポリペプチド1～82のいずれか1種を含む。別の実施形態によれば、本発明の細胞は、少なくとも2倍、4倍、6倍、8倍、さらには10倍の量の、表2に列挙されるポリペプチド1～82の各々を含む。本発明の細胞は、最大2分の1、4分の1、6分の1、8分の1、さらには10分の1の量の、表2に列挙されるポリペプチド83～122のうち少なくとも1種を含む。本発明の細胞は、最大2分の1、4分の1、6分の1、8分の1またはさらに10分の1の量の、表2に列挙されるポリペプチド83～122の各々を含む。

【0147】

本発明の細胞は、特定の遺伝子の発現によって、未分化MSCと区別され得る。これは、遺伝子によってコードされるmRNAの細胞中の存在量を分析することによって測定され得る。

【0148】

本発明の細胞は、少なくとも6倍、8倍、さらには10倍の量の、表3に列挙される遺伝子1～41のいずれか1種を発現する。別の実施形態によれば、本発明の細胞は、少なくとも6倍、8倍、10倍、20倍、さらには30倍の量の、表3に列挙される遺伝子1～41の各々を発現する。本発明の細胞は、最大で6分の1、8分の1、10分の1、20分の1、さらには30分の1の、表3に列挙される遺伝子42～56の少なくとも1種

10

20

30

40

50

を発現する。本発明の細胞は、最大で6分の1、8分の1、10分の1、さらには20分の1の、表3に列挙される遺伝子42～56の各々を発現する。

【0149】

本発明の細胞は、その他の骨髄間葉系幹細胞由来NTF分泌性細胞（例えば、国際公開第2009/144718号に開示されるもの — それらの細胞は、本明細書において2ステッププロトコルNTFと呼ばれる）とは異なる。

【0150】

したがって、本発明の細胞は、2ステッププロトコルNTFと比較して、少なくとも2倍、4倍、6倍、8倍またはさらに10倍の量の、表4に列挙されるポリペプチド1および/または9のいずれか1種を含む。本発明の細胞は、2ステッププロトコルNTFと比較して、最大2分の1、4分の1、6分の1、8分の1、さらには10分の1の、表4に列挙されるポリペプチド2～8のうち少なくとも1種を含む。本発明の細胞は、2ステッププロトコルNTFと比較して、最大2分の1、4分の1、6分の1、8分の1、さらには10分の1の、表4に列挙されるポリペプチド2～8の各々を含む。

10

【0151】

本発明の細胞は、2ステッププロトコルNTFと比較して、少なくとも2倍、4倍、さらには6倍の量の、表5に列挙される遺伝子1～82のいずれか1種を発現する。別の実施形態によれば、本発明の細胞は、2ステッププロトコルNTFと比較して、少なくとも2倍、4倍、さらには6倍の量の、表5に列挙される遺伝子1～82の各々を発現する。本発明の細胞は、2ステッププロトコルNTFと比較して、最大2分の1、4分の1、さらに6分の1の、表5に列挙される遺伝子83～126のうち少なくとも1種を発現する。本発明の細胞は、2ステッププロトコルNTFと比較して、最大2分の1、4分の1、さらには6分の1の、表5に列挙される遺伝子83～126の各々を発現する。

20

【0152】

本発明の細胞のその他の特徴は、その全文が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2014/024183号によって提供される。

【0153】

ひと度、適性が判定されると、細胞は、それに応じて標識され、当技術分野で公知の方法に従って保存され得る（例えば、凍結されるか、または低温保存される）か、または対象に直接投与され得る。

30

【0154】

記載されるように、本発明のこの態様の細胞は、免疫関連疾患または炎症関連疾患の治療において有用であり得る。

【0155】

したがって、本発明の別の態様によれば、治療を必要とする対象において免疫関連疾患または炎症関連疾患を治療するための方法であって、対象に、神経栄養因子を分泌する細胞へとex vivoで分化させた間葉系幹細胞を治療有効量投与することによって、疾患を治療する方法が提供される。

【0156】

このような疾患の例は、本明細書において上述した通りである。

40

特定の実施形態によれば、免疫関連疾患または炎症関連疾患は、神経変性疾患ではない。

別の実施形態によれば、免疫関連疾患または炎症関連疾患は、神経系の免疫疾患ではない。

さらに別の実施形態によれば、免疫関連疾患または炎症関連疾患は、重症筋無力症ではない。

【0157】

神経栄養因子を分泌するようex vivoで分化させた間葉系幹細胞を得る方法は、国際公開第2014/024183号、国際公開第2006/134602号および国際公開第2009/144718号に開示されており、各々の内容は、参照により本明細書

50

に組み込まれている。

【0158】

細胞は、それ自体で、または好ましくは、医薬上許容される担体をさらに含む医薬組成物の一部として投与され得る。

【0159】

本明細書において「医薬組成物」とは、本明細書に記載の1種または数種の化学コンジュゲートと、薬学的に適当な担体および賦形剤などのその他の化学成分とを含む製剤である。医薬組成物の目的は、対象への化合物の投与を容易にすることである。

【0160】

本明細書において、以下、「薬学的に許容される担体」とは、対象に対して顕著な刺激作用を引き起こさず、投与された化合物の生物活性および特性を抑制しない担体または希釈剤を示す。担体の例として、プロピレングリコール、生理食塩水、エマルジョン、バッファー、DMEMまたはRPMIなどの培養培地、低温下での細胞内環境の平衡を保つためにフリーラジカルを除去し、pHの緩衝化、膨張／浸透圧支持体、エネルギー基質およびイオン濃度を提供する成分を含有する低温貯蔵用培地、および有機溶媒と水との混合物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0161】

通常、医薬担体は、組成物中で少なくとも24時間、少なくとも48時間、さらには少なくとも96時間にわたり、細胞数を維持する（例えば、90%未満に低減させない）。

【0162】

20

本明細書において、「賦形剤」とは、化合物の投与をさらに容易にし、移植／注射の前に、予め決定された温度において、適当な期間、細胞生存率を維持するために、医薬組成物に添加される不活性物質である。賦形剤の例として、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）またはレスベラトロールなどの抗酸化物質が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0163】

本発明の好ましい実施形態によれば、医薬担体は、バッファーまたはDMEMなどの培養培地の水溶液である。

【0164】

薬物の処方および投与のための技術は、参照により本明細書に組み込まれる「Remington's Pharmaceutical Sciences」, Mack Publishing Co., Easton, PA, 最新版に記載されている。

30

【0165】

本発明の方法において使用される任意の製剤について、その治療有効量または用量は、初めに *in vitro* アッセイおよび細胞培養アッセイから推定することができる。好ましくは、動物モデルにおいて所望の濃度または力価を達成するように用量を処方する。このような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。

【0166】

本明細書に記載される有効成分の毒性および治療効果は、*in vitro*、細胞培養物、または実験動物を用いた標準的な薬学的手法によって決定され得る。

40

【0167】

これらの *in vitro* アッセイ、細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおいて使用するための様々な投与量の処方において使用され得る。さらなる情報は、臨床試験から得られ得る。例えば、Salem HK et al., Stem Cells 2010; 28:585-96およびUccelli et al. Lancet Neurol. 2011; 10:649-56を参照のこと。

【0168】

投与量は、使用される投与形および利用される投与経路に応じて変わり得る。正確な処方、投与経路および投与量は、患者の状態を鑑みて個々の医師によって選択され得る（例えば、Fingl, et al., 1975, in 「The Pharmacological Basis of Therapeutics」, Ch. 1 p.1.を参照のこと）。

50

【0169】

注射用には、医薬組成物の有効成分を水溶液、好ましくはハanks溶液、リンガー溶液または生理学食塩水バッファーなどの生理学的に適合するバッファーと、本明細書において上述した付加的な薬剤とを用いて、製剤化され得る。

【0170】

投与量および投与間隔は、免疫調節効果を効果的に引き起こすのに十分な有効成分のレベルに合わせて、個別に調整され得る。所望の効果を達成するのに必要な投与量は、個々の特徴および投与経路に応じて変化する。

【0171】

治療すべき病状の重症度および応答性に応じて、細胞の投与は、単回または複数回で実施し、治療工程は、疾患状態の減少が達成される時期に応じて、数日から数週間または数ヶ月間持続する。

10

【0172】

投与される組成物の量は、もちろん、治療される個体、苦痛の重症度、投与様式、処方医師の判断などに応じて変わる。投与量および投与のタイミングは、個々の変化する病態の注意深い連続モニタリングに対応する。

【0173】

本発明の細胞は、少なくともいくつかの実施形態では、直ちに使用可能なシリンジ中に単位投与量を予めパッケージングされてもよい。シリンジは、細胞の名称およびその材料をラベルに付してもよい。ラベルはまた、細胞の機能と関連する情報（例えば、それから分泌される神経栄養因子の量）を含んでもよい。シリンジは、細胞に関する情報をラベルに付したパッケージ中に梱包されていてもよい。

20

【0174】

本明細書において、「約」という用語は、 $\pm 10\%$ を示す。

「包含する(comprises)」、「包含している(comprising)」、「含む(includes)」、「含んでいる(including)」、「有する(having)」という用語およびその同根語は、「含むが、それに限定されない」を意味する。

「からなる(consisting of)」という用語は、「含み、それに限定される」ことを意味する。

「実質的になる(consisting essentially of)」という用語は、組成物、方法または構造体がさらなる材料、工程及び／または構造を含み得るが、追加される材料、工程及び／または構造が、請求項に記載の組成物、方法または構造体の基本的且つ新規な特徴を実質的に変更しない場合に限られることを意味する。

30

本明細書において、単数形を表す "a"、"an" および "the" は、文脈から明確ではない限り、複数に対する言及をも含む。例えば、用語「1種の化合物」または「少なくとも1種の化合物」は、その混合物を含めた、複数の化合物を含み得る。

【0175】

本明細書を通じて、本発明の種々の実施形態は、様々な範囲を用いて提示され得る。範囲を用いた記載は、単に便宜および簡潔さのためであるということを理解されなければならない。したがって、範囲に関する記載は、具体的に開示されたすべての可能性ある副範囲ならびにその範囲内の個々の数値を開示するものと捉えなければならない。例えば、1から6などの範囲の記載は、1から3、1から4、1から5、2から4、2から6、3から6などといった、その範囲内の副範囲と、その範囲内の個々の数値、例えば、1、2、3、4、5および6を特異的に開示するものと有すると捉えなければならない。これは、範囲の広さに関わらず、全てに当てはまる。

40

【0176】

本明細書において、「方法」とは、与えられた課題を達成するための様式、手段、技術および手順であり、化学的、薬理的、生物学的、生化学的および医学的技術の実施者にとって公知の様式、手段、技術および手順、または公知の様式、手段、技術および手順か

50

ら容易に開発されるものであるが、これらに限定されるものではない。

【0177】

本明細書において、「治療する」とは、病態の進行を抑制、実質的に阻害、減速または逆転させること、病態に係わる臨床症状もしくは審美的症状を実質的に寛解させること、または病態に係わる臨床症状もしくは審美的症状の出現を実質的に防ぐことを含む。

【0178】

明確にするために別個の実施形態に関連して記載した本発明の特定の特徴も、単一の実施形態に組み合わせて提供され得るということを理解されたい。逆に、簡潔さのために、単一の実施形態に関連して記載した本発明の特徴はまた、別個に、または任意の適切な副次的な組合せで、または適当な場合には、本発明の任意の他の実施形態として提供され得る。種々の実施形態に関連して記載される特定の特徴は、実施形態がそれらの要素なしでは実施不可能な場合を除いて、それらの実施形態の必須要件であると考えてはならない。

【0179】

本明細書において上記で説明し、後述する特許請求の範囲に記載の本発明の種々の実施形態および態様について、実験的サポートを以下の実施例に示す。

【0180】

実施例

次に、以下の実施例に参照するが、これらは上記説明と共に本発明のいくつかの実施形態を例示するが、本発明を限定するものではない。

【0181】

全般的に、本明細書において使用される命名法および本発明において利用される実験手順は、分子的技術、生化学的技術、微生物学的技術および組換えDNA技術を含む。このような技術は、文献において完全に説明されている。例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」 Sambrook et al., (1989); 「Current Protocols in Molecular Biology」 Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., 「Current Protocols in Molecular Biology」, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, 「A Practical Guide to Molecular Cloning」, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., 「Recombinant DNA」, Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) 「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 米国特許第 4, 666, 828 号明細書; 同 4, 683, 202 号明細書; 同 4, 801, 531 号明細書; 同 5, 192, 659 号明細書および同 5, 272, 057 号明細書に示されるような方法論; 「Cell Biology: A Laboratory Handbook」, Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); 「Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique」 by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; 「Current Protocols in Immunology」 Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), 「Basic and Clinical Immunology」 (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), 「Selected Methods in Cellular Immunology」, W. H. Freeman and Co., New York (1980)を参照のこと。利用可能なイムノアッセイは、特許および科学文献において広く記載されている。例えば、米国特許第 3, 791, 932 号明細書; 同 3, 839, 153 号明細書; 同 3, 850, 752 号明細書; 同 3, 850, 578 号明細書; 同 3, 853, 987 号明細書; 同 3, 867, 517 号明細書; 同 3, 879, 262 号明細書; 同 3, 901, 654 号明細書; 同 3, 935, 074 号明細書; 同 3, 984, 533 号明細書; 同 3, 996, 345 号明細書; 同 4, 034, 074 号明細書; 同 4, 098, 876 号明細書; 同 4, 879, 219 号明細書; 同 5, 011, 771 号明細書および同 5, 281, 521 号明細書; 「Oligonucleotide Synthesis」 Gait, M. J., ed. (1984); 「Nucleic Acid Hybridization」 Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); 「Transcription and Translation」 Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); 「Animal Cell Culture」 Freshney, R. I., ed. (1986); 「Immobilized Cells and Enzymes」 IRL Press, (1986); 「A Practical Guide to Molecular Cloning」 Perbal, B., (1984)および「

Methods in Enzymology」Vol. 1-317, Academic Press; 「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., 「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」 CSHL Press (1996)を参照のこと。それらのすべては、本明細書に十分に記載されたかのように、参照により組み込まれる。その他の一般的な参考文献は、本明細書を通じて提供される。本明細書における手順は、当技術分野で周知であると考えられており、読者の便宜のために提供される。本明細書に含まれるすべての情報は、参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例 1】

【0182】

10

分化細胞における表面マーカーの分析

材料および方法

骨髄吸引 (BMA) : 麻酔医による局所麻酔および鎮静化のもと、慣例的な医療センターの手順に従って、患者の腸骨稜から新鮮骨髄を吸引した。骨髄 (30 ~ 60 ml) を、吸引針を使用してヘパリン含有チューブ内に吸引した。

【0183】

MNCの分離およびMSCの濃縮 : このステップは、全骨髄からの単核細胞 (MNC) の分離を含む。

【0184】

全骨髄MNCの0.01%を含むと推定されるヒト多能性間葉系間質細胞 (MSC) を、プラスチックに接着するその能力によってMNCから *in vitro* で濃縮した。

20

【0185】

骨髄吸引物を、ハンクス平衡塩溶液 (HBSS) で1:1 (v:v) に希釈し、フィコール密度勾配遠心分離によって全骨髄細胞からMNCを分離した。

【0186】

MNCを計数し、トリパンブルー色素排除試験によって細胞数および生存率を決定した。密度勾配遠心分離後に回収されたMNCの収量は、ドナー間で変化し、採取される骨髄の容量に左右される。ALS患者の骨髄吸引物30 ~ 50 ml から回収されるMNCの収量は、 $70 \sim 400 \times 10^6$ MNCの範囲内であり、全製造プロセスに必要なMSC数を単離するのに十分であった。

30

【0187】

一次骨髄単核細胞の播種および製造プロセス中のMSCの増殖に使用する培地は、血小板成長培地 (PM) とした。PM培地を、MSC製造プロセスを通じて (継代数0代 ~ 4代に) [P0 ~ P4] 使用し、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ていた。

【0188】

MNCを、フラスコ (PM/フラスコ) に100,000 ~ 400,000細胞/cm² の密度で播種し、37℃/5% CO₂ 加湿インキュベーター中で一晩インキュベートした。翌日、細胞培養物を顕微鏡下で調べた。この段階では、非接着性の単核細胞は培養上清中に浮遊しており、プラスチック接着性のMSCは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取り除き、DMEMを用いて接着細胞を穏やかに洗浄した。DMEMを除去し、プラスチック接着性MSC細胞を含有する各フラスコに新鮮なPMを添加した。MNCの播種からMSCの回収までのプロセス段階を、継代数0 (P0) とした。

40

【0189】

P0細胞を、37℃/5% CO₂ 加湿インキュベーター中でインキュベートし、培養がサブコンフルエントとなるまで、週に2回、PMを新鮮なPMと交換した。

【0190】

MSCの増殖 : MSCの一次培養物を、プラスチック基板と付着した単細胞層として *in vitro* で増殖させた。ひと度、利用可能な基板表面が細胞によって覆われると (

50

コンフルエントな培養物)、成長は減速し、次いで、停止した。したがって、細胞を健全な活発に成長する状態に維持するためには、培養物がサブコンフルエントになった時点で、一定間隔でそれらを継代培養する必要があった。各継代培養周期を、継代と言う。MSC培養物は、500~2,000細胞/cm²の密度で継代した。

【0191】

MSCを継代するために、フラスコから培養上清を除去し、各フラスコにトリプシン(TrypLE(商標)Select, Invitrogen)を添加した。フラスコを37℃で数分間インキュベートし、得られた細胞懸濁液をフラスコから遠心管に回収し、トリプシンを希釈し、残りの細胞を回収するために各フラスコにDMEMを添加した。

【0192】

細胞懸濁液を遠心分離し、PMに再懸濁し、計数し、新しい培養容器中に500~2,000細胞/cm²の密度で再播種した。次いで、培養物を37℃/5% CO₂加湿インキュベーター中でインキュベートした。

【0193】

各継代の過程で、培養上清をすべて除去し、同一容量の新鮮なPMと交換することによって、3~4日毎にPMを交換した。

【0194】

分化の誘導: 分化の誘導のために、約6,000~8,000細胞/cm²の濃度でMSCをPMに播種した。3日後、1mMジブチリルcAMP(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β1を添加した低グルコースDMEMを含有する分化培地(S2M)でPMを置換することによって、分化を誘導した。培養物は、分化培地で回収まで3日間維持した。

【0195】

MSC-NTF細胞を、分化終了の24時間前(2日目)および/または分化終了時(3日目)に採取した。MSC細胞は、同じドナーまたは患者由来であり、同じ継代数で、同時に採取した。

【0196】

サンプルの調製、獲得および分析: 細胞を、0.5~1×10⁶細胞/チューブの濃度でPBSに懸濁し、インテグリンα1に対するマウスモノクローナル抗体(IgG1、クローンTS2/7.1.1、Santa Cruz、カタログ番号SC-81733PE)を用いて氷上で30分間染色した。アイソタイプ対照は、マウスIgG1 k-PEコンジュゲート型アイソタイプ対照(クローンMOPC-21、カタログ番号555749、BD Biosciences)とした。細胞はフローサイトメトリー(Cytomics FC 500、Beckman Coulter, Inc.)によって分析し、データはCXPソフトウェア(Beckman Coulter, Inc.)を使用して分析した。

【0197】

結果

インテグリンα1(CD49a)の発現を、MSCおよび向神経性因子を分泌するよう誘導されたMSC細胞(MSC-NTF細胞)の表面について検討した。

【0198】

分化プロセスの最後(3日目)には、MSC-NTF細胞集団の約90±4.43%(平均±標準偏差)がCD49aを発現し、一方、同一ドナー由来の未分化MSC細胞集団は68.75±4.29%(平均±標準偏差)だった(n=8)。2集団間の相違は、高度に有意である(p<0.0001、3日目、表1A)。

【0199】

3日目には、平均蛍光強度(MFI)も、MSCの2.75±0.48%(平均±標準偏差)からMSC-NTF細胞の13.2±4.77%(平均±標準偏差)に、MSC-NTF細胞集団において有意に増加し、誘導は平均4.87±1.56倍であった(n=

10

20

30

40

50

8、表1A)。

【0200】

分化の終了の1日前(2日目)には、MSC-NTF細胞集団の $90.55 \pm 6.62\%$ (平均±標準偏差)がCD49aを発現し、一方、同一ドナー由来の未分化MSC細胞集団は $73 \pm 6\%$ (平均±標準偏差)だった。2集団間の相違は、高度に有意である($p < 0.005$ 、2日目、表1A)。

【0201】

2日目に、平均蛍光強度(MFI)もまた、MSCの $2.84 \pm 0.98\%$ (平均±標準偏差)からMSC-NTF細胞の $11.58 \pm 7.18\%$ (平均±標準偏差)へと、MSC-NTF細胞集団において有意に増加し、誘導は平均 3.77 ± 1.43 倍であった($n = 4$ 、表1A)。

【0202】

【表1A】

	MSC		MSC-NTF		陽性%の 差分に対する p値	MFI誘導倍数	n
	陽性%	MFI	陽性%	MFI			
2日目	73 ± 6	2.84 ± 0.98	90.55 ± 6.62	11.58 ± 7.18	$p < 0.005$	3.77 ± 1.43	4
3日目	68.75 ± 4.29	2.75 ± 0.48	90 ± 4.43	13.2 ± 4.77	$p < 0.0001$	4.87 ± 1.56	8

【0203】

2種のさらなる実験を実施して、これらの結果を実証した。第1の実験においては、分化プロセスの最後(3日目)に、約 80.9% のMSC-NTF細胞集団がCD49aを発現し、一方、同一ドナー由来の未分化MSC細胞集団は 56.05% だった(表1B)。第2の実験においては、分化プロセスの最後(3日目)に、MSC-NTF細胞集団の約 89% がCD49aを発現し、一方、同一ドナー由来の未分化MSC細胞集団は 60% だった(表1B)。

【0204】

【表1B】

実験番号	CD49a陽性%	
	MSC	MSC-NTF
1	56.05	80.9
2	60	89

【実施例2】

【0205】

MSC-NTFの未分化MSCとの比較

材料および方法

分化の誘導：実施例1に詳述される通りである。

【0206】

成長／分化因子-15(GDF-15)およびインターロイキン8(IL-8)の測定
分化終了時の細胞培養上清中のGDF-15およびIL-8の量を定量した。定量には、例えば、GDF-15 ELISAアッセイ(GDF-15 DuoSet DY957; R&D Systems)、IL-8 ELISAアッセイ(IL-8 DuoSet DY208; R&D Systems)を製造業者のプロトコールに従って使用することができるが、これらに限定されるものではない。

【0207】

プロテオミクス

タンパク質分解：9Mの尿素、400mMの重炭酸アンモニウムおよび10mMのDTT

Tと、2サイクルの超音波処理によって、細胞ペレットからタンパク質を抽出した。各サンプルから得た20 µgのタンパク質を、2.8 mMのDTT（60℃で30分）を用いて還元し、400 mMの重炭酸アンモニウム中8.8 mMのヨードアセトアミドを用いて（暗所、室温で30分間）修飾し、2 Mの尿素、25 mMの重炭酸アンモニウム中、酵素対基質比1：50の条件で修飾トリプシン（Promega）を用いて37℃で一晩消化した。さらなる第2のトリプシン処理は4時間行った。

【0208】

質量分析解析：トリプシン処理ペプチドをC18チップ（Harvard）を使用して脱塩し、乾燥させ、0.1%ギ酸に再懸濁した。

【0209】

ペプチドを、Reprosil逆相材料（ドイツ国、Dr Maisch GmbH）を詰めた0.075×180 mmの溶融石英キャピラリー（J&W）上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、流速0.15 µl/分、0.1%ギ酸水溶液に対してアセトニトリル濃度を変化させた以下の条件で溶出した：5～28%を180分の直線濃度勾配、28～95%を5分の直線濃度勾配、および95%アセトニトリルで25分。質量分析は、Q-Exactiv plusマスマススペクトロメーター（Thermo）をポジティブモードで使用し、フルMSスキャンとそれに続くイオンの衝突誘導解離（CID）の繰り返しによって実施し、CIDは最初のMSスキャンで選択した10種の最も優位なイオンに対して実施した。

【0210】

3種の生物学的反復から得た質量分析データは、UniProtデータベースのヒト欄に対してMaxQuantソフトウェア1.4.1.2（Mathias Mann's group）を使用して、1%FDRの条件で分析した。データは、同じソフトウェアを使用してラベルフリー解析によって定量した。

【0211】

強度データは、正規分布を得るためにlog2に変換した。

【0212】

A群とB群間の、並べ替えに基づくFDRを用いたウェルチT検定（250ランダム化、閾値=0.05とした）は、Preseuse 1.4を使用して行った。同じソフトウェアをさらなるアノテーションおよびデータ相関のために使用した。

【0213】

遺伝子アレイ：遺伝子アレイ解析は、Expression Array Gene ST 2.0 GeneChip（登録商標）ヒト遺伝子2.0 STアレイ（Affymetrix）を使用して実施した。

【0214】

細胞ペレットをRNA Protect（Qiagen）に再懸濁した。総RNAは、RNeasy Plus Miniキット（Qiagen、カタログ番号74134）を使用して抽出した。RNAの品質は、TapeStation（Agilent）を使用して測定した。250 ngのRNAを、GeneChip（登録商標）WT PLUS試薬キット（Affymetrix、カタログ番号902280）を製造業者のマニュアル（Affymetrixカタログ番号703174 Rev. 2）に従って使用して標識した。簡単には、ランダムプライマーを使用して、T7プロモーターテイルを付加しながらcDNAをRNAから合成した。次いで、T7-RNAポリメラーゼを使用したin vitroの転写によってcRNAを作製した。一本鎖cDNAを合成し、次いで断片化し、末端標識した。3.5 µgをGeneChip（登録商標）ヒト遺伝子2.0 STアレイ（Affymetrix、カタログ番号902499）とハイブリダイズさせた。GeneChip Hybridization Wash and Stain Kit（Affymetrixカタログ番号900720）を使用してアレイの洗浄と染色を行い、スキャンした。得られたイメージを目視で検査し、続いてExpression Console build 1.3.1.187（Affymetrix）を使用して

、定量 (RMA-遺伝子)、正規化 (Sketch-Quantile) およびQCを実施した。すべてのパラメータがQCマトリックスを通過し、異常値は観察されなかった。差別的発現が認められた遺伝子の一覧を、Transcriptome Analysis Console 2.0 (Affymetrix) を用いる対象ANOVA (独立) 間の一元配置を使用して作製した。

【0215】

実験は、未処理MSC対照と、実施例1に記載した1ステッププロトコールによって分化を誘導したMSC-NTF細胞とを比較した。3種の無関係の対象から得たサンプルを各条件について分析した。個体間の全体的な相違は、条件間よりも小さいとわかった。

【0216】

10

結果

23人のALS患者において、MSCにおけるGDF-15の比生産性は、 $225.79 \pm 99.72 \text{ pg/ml} / 10^6$ 細胞の範囲であり、同一患者の分化の前のMSC-NTF細胞においては $1257.20 \pm 890.60 \text{ pg/ml} / \times 10^6$ 個に増加し、増加は平均9.4倍であるとわかった (図2A)。

【0217】

さらに、ALS患者のMSC-NTF細胞は、同一患者の分化の前のMSCと比べて、有意な量のIL-8 (平均で $81 \pm 43 \text{ ng/ml} / 10^6$ 細胞) を分泌し、その増加は平均170倍とわかった (図2B)。

【0218】

20

ALS患者から得た骨髄由来MSCを、材料および方法に記載したプロトコールを用いた分化の前および後の両方に、プロテオミクスによって分析した。

【0219】

3回繰り返した質量分析において少なくとも2回検出されるペプチドに基づいて同定され、タンパク質の検出強度に対して正規化された、最も有意に上方制御または下方制御されたタンパク質を下記の表2に示した。

【0220】

【表 2 - 1】

	タンパク質ID	タンパク質名	遺伝子名	ウェルチの p値__PA1 対PB1	ウェルチの 差分__PA1 対PB1
1	Q04828;H0Y804; A6NHU4;P17516	アルドーケト還元酵素ファミ リー1メンバーC1	AKR1C1	0.025239	-4.27165
2	P36222;H0Y3U8	キチナーゼ3様タンパク質 1	CHI3L1	0.00333	-8.03492
3	O14684	プロスタグランジンEシン ターゼ	PTGES	0.03174	-6.82836
4	P09601;B1AHA8	ヘムオキシゲナーゼ1	HMOX1	0.004332	-3.58814
5	Q16678	シトクロムP450 1B1	CYP1B1	0.003662	-7.19957
6	Q7LBR1	荷電多胞体タンパク質 1b	CHMP1B	0.003375	-4.41248
7	Q9BS40	ラテキシン	LXN	0.01834	-3.01403
8	P01033;Q5H9A7; H0Y789;Q5H9B5; Q5H9B4	マトロプロテイナーゼ阻害 剤1	TIMP1	0.007288	-3.62584
9	P48307;H7C4A3	組織因子経路阻害剤2	TFPI2	1	ND
10	Q8WUJ3;H0YL56; H0YCE1	タンパク質KIAA1199	KIAA1199	0.014234	-3.67028
11	P42330;S4R3Z2; S4R3D5	アルドーケトレダクターゼ ファミリー1メンバーC3	AKR1C3	0.02981	-3.86375
12	P17301	インテグリンα-2	ITGA2	0.001484	-5.15083
13	O94875;H7BZK1; Q9BX66	ソルビンおよびSH3ドメイ ン含有タンパク質2	SORBS2	0.013196	-4.11166
14	P52895;B4DK69; S4R3P0	アルドーケトレダクターゼ ファミリー1メンバーC2	AKR1C2	0.026833	-4.96764
15	P41221;C9J8I8; Q9H1J7;F5H7Q6; F5H364;F5H034; O00755	タンパク質Wnt-5a	WNT5A	0.010376	-3.1782
16	Q9HCJ1;D6RGI5	進行性関節強直タンパク 質同族体	ANKH	0.018078	-3.77482
17	P07093;C9JN98; C9K031	グリア由来ネキシン	SERPINE2	0.005989	-3.61762
18	Q5VYS4;H0Y831	腸間膜エストロゲン依存 性脂肪生成タンパク質	MEDAG	0.003767	-4.08412
19	Q13228;H0Y532; A6PVX1;F2Z2W8; F8WCR4;C9JVL0; F8WBA9	セレンー結合タンパク質1	SELENBP1	0.024781	-3.34893
20	O00194;K7ES41;K7EJ 38	Ras関連タンパク質Rab- 27B	RAB27B	0.023078	-3.70819
21	P17676	CCAAT/エンハンサー 結合性タンパク質β	CEBPB	0.008846	-3.43367
22	Q99988	成長/分化因子15	GDF15	1	ND
23	Q81WB1;X6RK76	イノシトール1, 4, 5-トリ ホスフェート受容体相互 作用タンパク質	ITPRIP	0.003773	-5.21981
24	P02675;D6REL8;CON __P02676	フィブリノゲンβ鎖;フィブリ ノペプチドB;フィブリノゲン β鎖	FGB	1	-6.5007

【表 2 - 2】

25	P10253;I3L0S5;I3L3L3	リソソーム α -グルコシダーゼ; 76kDaリソソーム α -グルコシダーゼ; 70kDaリソソーム α -グルコシダーゼ	GAA	0.011612	-3.59936
26	C9JEU5;P02679;C9JC84;C9JQP9;C9JU00	フィブリノゲン γ 鎖	FGG	0.012628	-6.08619
27	Q8IV20;A2A3Z5	ラッカーゼドメイン含有タンパク質1	LACC1	0.044734	-4.52527
28	Q96AQ6;Q5T173	プレB細胞白血病転写因子相互作用タンパク質1	PBXIP1	0.004564	-3.39635
29	O15118;K7EQ23	ニーマン・ピックC1タンパク質	NPC1	0.010158	-4.33114
30	Q7Z2X4	PTB含有、キュビリンおよびLRP1相互作用タンパク質	PID1	0.026791	-4.2971
31	P61587;E9PFH1;Q53RZ3	Rho関連GTP結合タンパク質RhoE	RND3	0.029183	-3.05365
32	P32189;Q14409;F8WC39;A6NP46;C9JLT1;F8WDA9;F8WBI8;F8WF44;H7BYD2;H7C2A0	グリセロールキナーゼ; 推定グリセロールキナーゼ3	GK;GK3P	0.018576	-4.98535
33	P04003;A6PVY5;F2Z2V7	C4b-結合タンパク質 α 鎖	C4BPA	1	-5.46453
34	Q8N726	サイクリン依存性キナーゼ阻害剤2A、イン型4	CDKN2A	1	ND
35	A0JP02;B4DJX4;Q9HAU0;E7EME8;H0YG48;H0YGJ6	プレクストリン相同性ドメイン含有ファミリーAメンバー5	PLEKHA5	0.022674	-3.89935
36	P43003;M0R063;P48664;E7EUS7;E7EUV6;M0QY32;M0R106;E7EV13	興奮性アミノ酸輸送体1	SLC1A3	0.036812	-3.63458
37	F5GYK4;O00142;E5KNQ5;H3BP77;J3KS73;J3QL12;J3QRP0;J3KRW8	チミジンキナーゼ2、ミトコンドリア	TK2	0.00388	-4.92515
38	P98066	腫瘍壊死因子誘導性遺伝子6タンパク質	TNFAIP6	1	ND
39	P06280;V9GYN5	α ガラクトシダーゼA	GLA	0.047612	-4.14468
40	P38936;J3KQV0	サイクリン依存性キナーゼ阻害剤1	CDKN1A	1	ND
41	P08476	インヒビン β A鎖	INHBA	1	ND
42	Q9UHE8	メタロレダクターゼSTEAP1	STEAP1	1	ND
43	Q8WWI5	コリン輸送体様タンパク質1	SLC44A1	0.009593	-3.14327

10

20

30

40

【表 2 - 3】

44	P01024;CON_Q2UVX4;M0R0Q9;M0QYC8;M0QXZ3	補体C3;補体C3β鎖;補体C3α鎖;C3aアナフィラトキシン;アシル化刺激タンパク質;補体C3b鎖;補体C3c鎖断片1;補体C3dg断片;補体C3g断片;補体C3d断片;補体C3f断片;補体C3c鎖断片2	C3	0.01925	-4.77651
45	Q9ULG6;H3BN32	細胞周期進行タンパク質1	CCPG1	0.028133	-3.63365
46	P05165;H0Y5U0;Q5JTW6	プロピオニル-CoAカルボキシラーゼα鎖、ミトコンドリア	PCCA	0.023694	-3.97258
47	P14923	ジャンクションプラログロビン	JUP	0.001268	-4.30589
48	Q9Y4F1;C9JME2;M0QXT1;M0QYB0;H0Y783;M0R262	FERM、RhoGEFおよびプレクストリンドメイン含有タンパク質1	FARP1	0.014285	-3.70348
49	Q9NRZ5;Q6AI25;G3XAF1;Q5TEE8	1-アシル-sn-グリセロール-3-ホスフェートアシルトランスフェラーゼδ	AGPAT4	0.00875	-3.07989
50	Q9H098;C9J6N5;C9JQ40;C9JW51;C9J3Q3;X6RET8;C9JP05;F8WCJ2;C9JYP1;C9J6Y8	タンパク質FAM107B	FAM107B	1	ND
51	P18428	リポ多糖類結合タンパク質	LBP	0.021616	-3.41834
52	H0Y4R5;Q5SNT2	膜貫通タンパク質201	TMEM201	1	ND
53	Q8N6G5	コンドロイチン硫酸N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ2	CSGALNACT2	1	ND
54	Q8NFT2;B5MC02;C9JLP2	メタロレダクターゼSTEAP2	STEAP2	0.033114	-3.16521
55	P35475;D6REB5;H0Y9B3;D6R9D5;D6RBD5;H0Y9R9	α-L-イズロニダーゼ	IDUA	1	ND
56	P05546	ヘパリン補因子2	SERPIND1	1	-3.13676
57	H7BXR3;H7C1R7;H7BZX1;C9J3W4;C9JL62;C9JZ89		SORBS2	1	ND
58	Q5QJ74;E9PP54;E9PNS0;E9PJJ0;B3KNB6;G3V147	チュブリン特異的シャペロン補因子E様タンパク質	TBCEL	1	ND
59	P36269;H7C1X2	γ-グルタミルトランスフェラーゼ5;γ-グルタミルトランスフェラーゼ5重鎖;γ-グルタミルトランスフェラーゼ5軽鎖	GGT5	1	ND
60	Q13219	パパリシン(Pappalysin)-1	PAPPA	1	ND

【表 2 - 4】

61	Q9P2B2	プロスタグランジンF2受容体負のレギュレーター	PTGFRN	1	ND
62	E7EW77;E7EP65;Q9NYB9;J3KNB2;E9PEZ7;H7C3Q7;H0Y6B5;F8WBL5;F8WAQ3;F8WEB9;E7EUA1;F8WAU3;F8WCD7;F8WAZ8	Abl相互作用物質2	ABI2	1	ND
63	P58335	炭疽毒素受容体2	ANTXR2	0.017357	-3.75924
64	P51884;CON__Q05443	ルミカン	LUM	1	ND
65	Q86UX7;F5H1C6;F5H3I6	フェルミチン(Fermitin)ファミリー同族体3	FERMT3	1	ND
66	P35869;E5RGQ2;G3V143;E5RFG4;A9YTQ3	アリール炭化水素受容体	AHR	0.029594	-3.42358
67	P56199	インテグリン α -1	ITGA1	1	ND
68	P35354;Q6ZYK7	プロスタグランジンG/Hシンターゼ2	PTGS2	1	ND
69	Q96MK3	タンパク質FAM20A	FAM20A	1	ND
70	Q96CC6;F8WCF7;B8ZZ07;F6XBT0;F8WBS4	不活性ロンボイドタンパク質1	RHBDF1	1	ND
71	P33897;H0Y7L9	ATP結合カセットサブファミリーDメンバー1	ABCD1	1	-3.15122
72	Q05707;J3QT83;Q4G0W3	コラーゲン α -1 (XIV) 鎖	COL14A1	0.047499	-3.24857
73	P43490;Q5SYT8;F5H246;C9JG65;C9JF35	ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ	NAMPT;NAMPTL	0.010112	-2.84468
74	P17302	ギャップ結合 α -1タンパク質	GJA1	0.005458	-2.72582
75	P07711;Q5T8F0;Q5NE16;O60911	カテプシンL1;カテプシンL1重鎖;カテプシンL1軽鎖	CTSL1	0.023268	-2.64752
76	P11498;E9PRE7;E9PS68	ビルビン酸カルボキシラーゼ、ミトコンドリア	PC	0.002932	-2.77116
77	P17677	ニューロモジュリン	GAP43	0.041471	-2.55059
78	Q7LG56;H0YAV1	リボヌクレオシドージホスフェートレダクターゼサブユニットM2B	RRM2B	0.015477	-2.57625
79	Q02252;G3V4Z4	メチルマロン酸セミアルデヒド脱水素酵素[アシル化]、ミトコンドリア	ALDH6A1	0.00472	-2.98955
80	E9PF16;Q96CM8;D6RF87	アシル-CoAシンセターゼファミリーメンバー2、ミトコンドリア	ACSF2	0.036886	-2.88375
81	P23786	カルニチンO-パルミトイルトランスフェラーゼ2、ミトコンドリア	CPT2	0.040208	-2.55565
82	C9JGI3;P19971	チミジンホスホリラーゼ	TYMP	0.032844	-2.93769
83	F5H6B2;Q9UHN6	膜貫通タンパク質2	TMEM2	1	ND

【表 2 - 5】

84	P10915;D6RBS1	ヒアルロンンおよびプロテ オグリカンリンクタンパク質 1	HAPLN1	1	ND	10
85	Q6UVK1	コンドロイチン硫酸プロテ オグリカン4	CSPG4	1	ND	
86	P01130;J3KMZ9;H0Y MD1;H0YMQ3;H0YM 92	低密度リポタンパク質受容 体	LDLR	1	ND	
87	G3V511;G3V3X5;Q14 767	不顕性トランスフォーミング 増殖因子β結合タンパク質 2	LTBP2	1	4.404051	
88	F5H855;P56945;Q145 11	乳癌抗エストロゲン耐性タ ンパク質1	BCAR1	1	4.176916	
89	O95801;Q5TA95	テトラトリコペプチド反復タ ンパク質4	TTC4	1	ND	20
90	O95347;Q5T821	染色体タンパク質2の構造 維持	SMC2	1	ND	
91	P43007	中性アミノ酸輸送体A	SLC1A4	1	ND	
92	P26022	ペントラキシン関連タンパク 質PTX3	PTX3	1	3.989578	
93	Q8TB03	未特性決定タンパク質CX orf38	CXorf38	1	ND	
94	Q8IZ07;S4R3D2;H0YI N8;F8W150;S4R3U2; Q6ZTN6	アンキリン反復ドメイン含有 タンパク質13A	ANKRD13A	1	5.833572	30
95	Q9NX58	細胞成長調節性核小体タ ンパク質	LYAR	1	ND	
96	P02790	ヘモペキシン	HPX	1	ND	
97	Q6ZN40;H0YL80;H0YLS7		TPM1	0.004913	3.131315	
98	P08123	コラーゲンα-2 (I) 鎖	COL1A2	0.008003	3.385308	
99	K7ENT6;K7ERG3		TPM4	0.034608	3.634858	40
100	P02452;CON_Q862S 4;I3L3H7;P02458	コラーゲンα-1 (I) 鎖	COL1A1	0.008651	5.24923	
101	P20337	Ras 関連タンパク質Rab- 3B	RAB3B	0.00338	3.365877	
102	P0C0L5;F5GXS0	補体C4-B; 補体C4β鎖; 補体C4-Bα鎖; C4aアナ フィラトキシン; C4b-B; C 4d-B; 補体C4γ鎖	C4B	0.035673	4.70512	
103	Q14566	DNA複製ライセンス化因 子MCM6	MCM6	0.015309	3.802778	
104	Q9H7C4;C9JTN4;C9J SS1	シンコイリン	SYNC	0.04319	3.910519	40
105	P02787;C9JVG0;H7C 5E8;F8WEK9;F8WCI 6;C9JB55;F8WC57;C ON_Q29443;CON_ Q0IIK2	セロトランスフェリン	TF	0.013404	6.25542	
106	P49736;H7C4N9;C9J0 13;C9JZ21;F8WDM3	DNA複製ライセンス化因 子MCM2	MCM2	0.040152	4.184367	
107	P33993;C9J8M6	DNA複製ライセンス化 因子MCM7	MCM7	0.035577	3.315128	

【表 2 - 6】

108	P33991;E5RG31;E5RFJ8;E5RFR3	DNA複製ライセンス化因子MCM4	MCM4	0.033108	3.523307
109	P25205;B4DWW4;J3KQ69;Q7Z6P5	DNA複製ライセンス化因子MCM3	MCM3	0.040364	3.55418
110	E9PD53;Q9NTJ3;C9JR83;C9JVD8;C9J578;C9J9E4	染色体タンパク質の構造維持;染色体タンパク質4の構造維持	SMC4	0.011999	3.016034
111	P26006;H0YA49;H0YA32;K7EMU3;D6R9X8	インテグリン α -3;インテグリン α -3重鎖;インテグリン α -3軽鎖	ITGA3	0.030181	3.334243
112	P01023;CON_ENSEMBL:ENSBTAP0000024146;P20742;H0YFH1;F8W7L3;F5H1E8	α -2-マクログロブリン	A2M	0.000365	8.539567
113	O95361;B3KP96;H0Y626;K7ENN8;Q309B1;K7EL43;I3L3K9;I3L2F3;J3QL38;J3QKY5	三者間モチーフ含有タンパク質16	TRIM16	1	3.605912
114	P05121	プラスミノゲンアクチベーター阻害剤1	SERPINE1	1	5.247232
115	Q15021;E7EN77	コンデンシン複合体サブユニット1	NCAPD2	0.041189	4.251724
116	H7BY1;F5H7S3;B7Z596;H0YL42;H0YK20		TPM1	0.008933	2.809683
117	P08243;F8WEJ5;C9J057;C9JT45;C9JM09;C9JLN6	アスパラギンシンセターゼ [グルタミン加水分解性]	ASNS	0.011498	2.974403
118	O43294;H3BQC4;H3BSN4;I3L209;H3BS04;H3EN49	トランスフォーミング増殖因子 β 1誘導性転写物1タンパク質	TGFB11	0.014001	2.818781
119	P20908;H7BY82;P12107;C9JMN2;H0YIS1;Q4VXY6;P13942;P25940	コラーゲン α -1 (V)鎖	COL5A1	0.019362	2.800896
120	Q5H909;Q9UNF1;Q5H907	黒色腫関連抗原D2	MAGED2	0.011154	2.607765
121	P35520;C9JMA6;H7C2H4	シスタチオニン β -シンターゼ;システインシンターゼ	CBS	0.029219	2.717574
122	P23921;E9PL69	リボヌクレオシドージホスフェートレダクターゼ大サブユニット	RRM1	0.033696	2.537958

【0226】

A L S 患者から得た骨髄由来M S Cを、材料および方法に記載したプロトコルを用いた分化の前および後の両方に、遺伝子アレイによって分析した。

【0227】

分析された合計48, 226種の遺伝子のうち、1623種の遺伝子が、差異的発現を示し、その内の518種の遺伝子は上方制御されており、567種の遺伝子は下方制御されていると判明した。

【0228】

下記の表3に、分化後に有意に上方制御または下方制御された例示的な遺伝子の一覧を

10

20

30

40

50

示す。

【0229】

【表3-1】

	変化倍数 (線形)	ANOVA p値	遺伝子記号	説明
1	87.97	0.000045	SLC16A6	溶質輸送体ファミリー16、メンバー6(モノカルボン酸輸送体7); NULL
2	66.16	0.000142	IL8	インターロイキン8
3	48.62	0.000019	MMP13	マトリックスメタロペプチダーゼ13(コラゲナーゼ3)
4	47.05	0.000048	BMP2	骨形成タンパク質2
5	37.07	0.002339	CXCL6	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド6
6	30.74	0.000005	RASD1	RAS、デキサメタゾン誘導性1
7	29.67	0.000006	IL11	インターロイキン11
8	28.33	4.29E-07	PCSK1	プロタンパク質コンバーターゼスプチリシン/ケキシン1型
9	27.52	0.001772	TFPI2	組織因子経路阻害剤2
10	27.43	0.001103	AREG	アンフィレギュリン; アンフィレギュリンB
11	26.99	0.000544	PTGES	プロスタグランジンEシンターゼ
12	26.35	0.004312	CHI3L1	キチナーゼ3様1(軟骨糖タンパク質-39)
13	25.85	0.009822	CXCL5	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド5
14	22.3	0.000954	AREGB	アンフィレギュリンB; アンフィレギュリン
15	22.18	0.000314		
16	21.76	0.000641	COL10A1	コラーゲン、X型、 α 1
17	20.32	0.007707		
18	16.09	0.000037	PTH1H	副甲状腺ホルモン様ホルモン
19	15.1	0.000566	TNFAIP6	腫瘍壊死因子、 α 誘導性タンパク質6
20	14.88	0.00001	SMOC1	SPARC関連モジュラーカルシウム結合1
21	13.65	0.000138	ABCA1	ATP-結合カセット、サブファミリーA(ABC1)、メンバー1
22	13.59	0.000006	MEDAG	腸間膜エストロゲン依存性脂肪生成
23	12.67	0.000898	OTTHUMG 0000003742 5	NULL
24	12.49	0.000627	ABCA6	ATP-結合カセット、サブファミリーA(ABC1)、メンバー6; NULL
25	12.25	0.000573	IL1B	インターロイキン1、 β ; NULL
26	11.53	0.007657	MMP3	マトリックスメタロペプチダーゼ3(ストロメライシン(生体内物質)1、プロゼラチナーゼ); NULL
27	11.52	0.000001	SMOX	スペルミンオキシダーゼ; NULL
28	11.46	0.000021	GAS1	成長停止特異的1
29	11.45	0.000237		
30	11.39	0.000207	CXCL16	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド16; NULL
31	10.87	0.00025	PITPNC1	ホスファチジルイノシトール転移タンパク質、細胞質1
32	10.6	0.000128	NR4A2	核受容体サブファミリー4、群A、メンバー2
33	10.56	0.000062	FZD8	frizzledファミリー受容体8; マイクロRNA4683
34	10.11	0.037241	MIR3189	マイクロRNA3189
35	10.03	0.000307	ADAMTS5	トロンボスポンジン1型モチーフ5を有するADAMメタロペプチダーゼ

【0230】

【表 3 - 2】

36	9.86	0.002102	CXCL1	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド1(黒色腫成長刺激活性、 α)
37	9.62	0.000104	LIF	白血病阻害因子
38	9.42	0.000944	RAB27B	RAB27B、メンバーRAS癌遺伝子ファミリー
39	9.39	0.000091	GEM	骨格筋において過剰発現されたGTP結合タンパク質
40	9.06	0.000311		
41	9.03	0.000797	HAS1	ヒアルロナンシンターゼ1
42	-8.96	0.006205	CTGF	結合組織増殖因子
43	-9.3	0.024107	KRTAP2-3	ケラチン関連タンパク質2-3;ケラチン関連タンパク質2-4
44	-9.78	0.000051	TOP2A	トポイソメラーゼ(DNA)II α 170kDa
45	-10.56	0.000014	PBK	PDZ結合キナーゼ
46	-10.63	0.000022	TPX2	TPX2、微小管関連、同族体(アフリカツメガエル)
47	-11.27	0.003641		
48	-11.48	0.000012	DLGAP5	ディスク、大(ショウジョウバエ)同族体関連タンパク質5
49	-12.52	0.000018	CCNA2	サイクリンA2
50	-12.72	0.002789		
51	-14.5	0.000007	ANLN	アニリン、アクチン結合タンパク質;NULL
52	-14.75	0.002755	CYR61	システインリッチ、脈管形成インデューサー、61
53	-15.07	0.000217	B3GALT2	UDP-Gal: β GlcNAc β 1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼ、ポリペプチド2
54	-15.21	0.001511	ALPL	アルカリホスファターゼ、肝臓/骨/腎臓;NULL
55	-18.93	0.000415	TAGLN	トランスジェリン(Transgelin)
56	-27.82	0.005062	PTX3	ペントラキシン3、長鎖

10

20

【実施例 3】

【0231】

2つの異なる分化プロトコルを使用したMSC-NTFの比較

30

材料および方法

分化プロトコル 1 : 実施例 1 に記載されるように実施した。この方法を本明細書において、1ステッププロトコルとする。

分化プロトコル 2 : 国際公開第 2009/144718 号に記載されるように実施した。この方法を、2ステッププロトコルとする。

【0232】

簡単には、ヒト MSC (12,000 細胞/cm²) を、SPN、2 mM の L-グルタミン (Biological industries)、20 ng/ml のヒト上皮成長因子 (hEGF)、20 ng/ml のヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (hbFGF) (R&D Systems) および N2 サプリメント (Invitrogen) を添加した DMEM にまず加えた。72 時間後に培地を、1 mM のジブチル cAMP (dbcAMP)、0.5 mM のイソブチルメチルキサンチン (IBMX) (Sigma-Aldrich)、5 ng/ml のヒト血小板由来増殖因子 (PDGF)、50 ng/ml のヒトニューレグリン 1- β 1/HRG 1- β 1 EGF ドメインおよび 20 ng/ml の hbFGF (すべて R&D Systems 製) を添加した DMEM と交換し、更に 3 日間放置した。

40

【0233】

プロテオミクス : 実施例 2 に記載されるように実施した。

【0234】

遺伝子アレイ分析 : 実施例 2 に記載されるように実施した。

50

【0235】

実験は、1ステッププロトコールによって、または2ステッププロトコールによって分化誘導されたMSC-NTF細胞を比較した。3人の無関係の対象から得たサンプルを、各条件について分析した。個体間の全体的な相違は、条件間よりも小さいとわかった。各分化プロトコールおよび対照間の全体的な相違は、プロトコール間よりも大きいとわかった。

【0236】

結果

3回繰り返した質量分析において少なくとも2回検出されるペプチドに基づいて同定され、タンパク質の検出強度に対して正規化された、最も有意に上方制御または下方制御されたタンパク質を下記の表4に示した。

【0237】

【表4】

	タンパク質ID	主要タンパク質ID	タンパク質名	遺伝子名	ウェルチのp値	ウェルチの差分
1	Q9BVA1	9BVA1	チューブリン β -2 B鎖	TUBB2B	0.000583	3.441701
2	Q15392; H7C4B7	Q15392	δ (24) -ステロ ールレダクターゼ	DHCR24	0.013112	-3.09319
3	S4R371;P05413; S4R3A2	S4R371;P05413; S4R3A2	脂肪酸-結合タン パク質、心臓	FABP3	0.03411	-3.10571
4	E7EVP7;Q1464 3;B7ZMI3	E7EVP7;Q14643	イノシトール1, 4, 5-トリスホス フェート受容体1 型	ITPR1	0.00456	-3.58643
5	O95757;E9PDE 8;D6RJ96	O95757;E9PDE8 ;D6RJ96	熱ショック70kDa タンパク質4L	HSPA4L	0.040802	-3.66797
6	G5E9F5;B5MC5 3;B5MCF8;P392 10;C9J473;H0Y 6M5;E7EX18	G5E9F5;B5MC5 3;B5MCF8;P392 10;C9J473;H0Y6 M5;E7EX18	タンパク質 Mpv1 7	MPV17	0.002826	-6.1913
7	Q8N2G8;K7ESN 3	Q8N2G8;K7ESN 3	GH3ドメイン含有 タンパク質	GHDC	0.000996	-3.30843
8	P08236;F8WBK 6;F2Z3L6	P08236	β -グルクロニダ ーゼ	GUSB	0.014338	-3.70965
9	H3BUL4;H3BM X9;Q9GZU8;H3 BQQ6;H3BTI2; H3BTP8;H3BSY 6;H3BP64;H3B U93;Q6P4H7;H 3BSF0;H3BNK9	H3BUL4;H3BM X9;Q9GZU8;H3 BQQ6;H3BTI2; H3BTP8;H3BSY 6;H3BP64;H3BU 93	タンパク質 FAM1 92A	FAM192 A	0.022477	3.316088

【0238】

分析された合計48, 226種の遺伝子のうち、100種の遺伝子が、1ステッププロトコールと比べて2ステッププロトコールにおいて上方制御されており、69種の遺伝子が、1ステッププロトコールと比べて、2ステッププロトコールにおいて下方制御されると判明した。

【0239】

下記の表5に、分化後に有意に上方制御または下方制御された例示的な遺伝子の一覧を示す。

10

20

30

40

50

【 0 2 4 0 】

【表 5 - 1】

	転写物クラス ター I D	プロトコール2 Bi-weight 平均シグナル (1 o g 2)	プロトコール1 Bi-weight 平均シグナル (1 o g 2)	変化倍数 (線形) (プロトコール2対 プロトコール1)	ANOVA p 値 (プロトコール2対 プロトコール1)	FDR p 値 (プロトコール2対 プロトコール1)	遺伝子 記号
1	16913537	9.31	6.4	7.54	0.002082	0.394067	LBP
2	17080516	11.59	8.91	6.44	0.000435	0.26432	ENPP2
3	16908197	11.76	9.29	5.51	0.00794	0.474763	IGFBP5
4	16919242	10.33	7.91	5.34	0.004	0.439362	MAFB
5	17075789	8	5.74	4.77	0.000235	0.227658	SCARA5
6	16716371	10.36	8.2	4.49	0.004162	0.440384	CH25H
7	16691327	7.75	5.67	4.23	0.004869	0.444802	NGF
8	16816034	11.72	9.65	4.21	0.00035	0.263671	NPIPA1
9	16795943	6.39	4.34	4.13	0.005322	0.450478	TC2N
10	16944010	9.12	7.14	3.93	0.00011	0.198375	BOC
11	16782003	6.6	4.62	3.93	0.01791	0.583076	TRDV3
12	16863593	6.96	5.04	3.8	0.000775	0.319307	C5AR2
13	16816287	11.37	9.47	3.73	0.000126	0.198375	PKD1P1
14	16824400	11.84	9.95	3.7	0.000078	0.198375	NPIPA5
15	16676988	8.61	6.73	3.68	0.018038	0.583776	HSD11B1
16	16853879	6.92	5.09	3.56	0.017063	0.575446	PIEZO2
17	16774384	10.24	8.44	3.49	0.001238	0.353527	TNFSF11
18	16888669	4.22	2.42	3.46	0.009271	0.497877	MIR1245A
19	16980762	8.43	6.68	3.37	0.001297	0.353527	SFRP2
20	16730967	8.12	6.37	3.37	0.001278	0.353527	C11orf87
21	16814986	8.63	6.91	3.29	0.049553	0.722228	MIR4516
22	16824127	9.21	7.53	3.2	0.004523	0.440937	LOC100288162
23	16729290	11.15	9.5	3.15	0.000002	0.02648	TSKU
24	16936947	8.33	6.69	3.12	0.029614	0.660051	ITPR1
25	16840113	10.27	8.65	3.07	0.030963	0.664666	CXCL16
26	16742384	7.95	6.34	3.04	0.00703	0.472433	LRRC32
27	16824366	11.58	9.97	3.03	0.000113	0.198375	PKD1P1
28	16996234	9.47	7.89	3	0.003441	0.414166	PPAP2A
29	16824193	12.35	10.81	2.9	0.000085	0.198375	NPIPA5
30	16774427	11.1	9.59	2.83	0.03554	0.675853	LACC1
31	16774303	5.41	3.92	2.81	0.013365	0.537579	RGCC
32	16994002	8.38	6.92	2.75	0.000489	0.275839	LPCAT1
33	16756447	6.35	4.91	2.71	0.004243	0.440384	BTBD11
34	17043843	8.43	6.99	2.71	0.032515	0.666018	TSPAN13
35	17087109	6.24	4.82	2.68	0.009133	0.497794	MIR27B
36	16970435	8.54	7.14	2.65	0.003122	0.410198	SPRY1
37	16816343	12.62	11.21	2.65	0.000222	0.227658	NPIPA1
38	16910070	7.35	5.95	2.64	0.016769	0.571533	MIR4441
39	16723020	6.53	5.14	2.62	0.003207	0.413056	ANO3
40	16825484	10.52	9.2	2.5	0.003972	0.438334	NPIPB3
41	16746930	9.68	8.36	2.49	0.005319	0.450478	TSPAN9
42	16893349	10.77	9.46	2.48	0.009614	0.504379	SNED1
43	16824166	9.15	7.86	2.44	0.00181	0.383976	LOC399491
44	16871235	7.62	6.34	2.43	7.56E-07	0.02648	CEBPA
45	17088462	11.37	10.11	2.41	0.005785	0.456611	PAPPA
46	16890675	7.61	6.34	2.41	0.012505	0.529023	IGFBP2
47	16920047	9.28	8.03	2.39	0.003573	0.414166	PREX1
48	17005077	8.19	6.95	2.36	0.01056	0.508075	MYLIP

【 0 2 4 1 】

【表 5 - 2】

49	16824349	8.83	7.59	2.36	0.000113	0.198375	LOC100288162
50	16661646	10.07	8.84	2.35	0.005955	0.457174	RNU11
51	16976827	11.73	10.5	2.34	0.036147	0.67781	CXCL5
52	16970465	7.83	6.61	2.34	0.004538	0.440937	FAT4
53	16661730	10.28	9.06	2.33	0.016407	0.567596	PTPRU
54	16990203	6.9	5.69	2.32	0.04901	0.722228	VTRNA1-3
55	16795965	8.98	7.77	2.31	0.003339	0.414166	FBLN5
56	17012140	5.05	3.86	2.29	0.048905	0.722228	RNA5SP215
57	16886174	7.46	6.27	2.28	0.017839	0.582777	KYNU
58	16802497	7.05	5.86	2.28	0.005396	0.450478	PAQR5
59	17023799	9.17	8.01	2.24	0.025425	0.640796	SLC2A12
60	16998059	10.49	9.34	2.22	0.009737	0.506539	ARRDC3
61	16824352	9.6	8.45	2.22	0.000123	0.198375	XYLT1
62	16687875	10.61	9.46	2.21	0.045004	0.714357	JUN
63	16709072	9.48	8.35	2.19	0.002215	0.397731	ADD3
64	16906419	6.73	5.61	2.18	0.028857	0.658607	SLC40A1
65	17092081	7.91	6.79	2.17	0.004207	0.440384	GLIS3
66	17114272	8	6.89	2.17	0.000034	0.198375	GPC4
67	17106688	8.03	6.92	2.16	0.003064	0.406417	GRIA3
68	17074029	7.38	6.27	2.15	0.010791	0.508075	TDRP
69	16754397	6.29	5.18	2.15	0.004317	0.440384	LOC652993
70	16689546	8.07	6.97	2.15	0.002184	0.396235	TGFBR3
71	16997010	6.03	4.94	2.13	0.017556	0.58068	OTTHUM G00000163317
72	17004989	7.05	5.97	2.12	0.001592	0.376991	RNF182
73	16923766	8.31	7.25	2.08	0.003201	0.413056	COL18A1
74	16832350	9.58	8.54	2.07	0.000392	0.263671	KSR1
75	16781511	5.34	4.29	2.07	0.011554	0.517382	RNA5SP382
76	17020258	5.01	3.97	2.06	0.046083	0.717241	BMP5
77	16687737	10.22	9.18	2.05	0.042364	0.702396	PPAP2B
78	16995989	5.96	4.92	2.04	0.002448	0.404044	FGF10
79	17101292	8.17	7.14	2.04	0.010667	0.508075	STS
80	16696295	9.41	8.39	2.03	0.000133	0.198375	KIFAP3
81	16915530	4.49	3.46	2.03	0.034023	0.672731	MIR548AG2
82	16665588	7.06	6.05	2.02	0.042012	0.702396	ROR1
83	16949759	8.52	9.52	-2.01	0.000136	0.198375	HES1
84	16836021	6.04	7.06	-2.03	0.010652	0.508075	ABCC3
85	16904324	10.66	11.68	-2.03	0.006644	0.469744	FAP
86	16743707	4.44	5.47	-2.04	0.010679	0.508075	MMP10
87	17059119	9.28	10.33	-2.06	0.028998	0.659121	SEMA3C
88	16885290	6.34	7.38	-2.06	0.000553	0.285095	GYPC
89	17084025	5.26	6.32	-2.09	0.047689	0.719821	FLJ35282
90	17003640	7.3	8.36	-2.09	0.001358	0.35533	ADAMTS2
91	16972229	5.13	6.23	-2.15	0.023153	0.625718	ANXA10
92	17072601	6.53	7.64	-2.16	0.003707	0.421757	TRIB1
93	17024746	7.11	8.23	-2.17	0.002144	0.396226	ZBTB2

【 0 2 4 2 】

【表 5 - 3】

94	16712292	5.73	6.88	-2.22	0.002665	0.404044	PTPLA
95	16894710	6.38	7.56	-2.27	0.01071	0.508075	FAM49A
96	16856803	6.72	7.95	-2.35	0.011267	0.514555	GADD45B
97	16738630	6.53	7.76	-2.35	0.000374	0.263671	LFXN
98	16927633	7.48	8.73	-2.39	0.018384	0.586973	SDF2L1
99	16818359	7.66	8.91	-2.39	0.002451	0.404044	TGFB111
100	16851486	6.43	7.73	-2.46	0.007203	0.472433	LAMA3
101	16843162	6	7.3	-2.47	0.006176	0.462493	EVI2B
102	17063221	6.44	7.75	-2.48	0.001754	0.383976	FAM180A
103	16886717	9.72	11.04	-2.5	0.01795	0.583334	GALNT5
104	16677451	6.04	7.39	-2.55	0.003262	0.413056	KCNK2
105	17049904	4.79	6.15	-2.58	0.02116	0.609685	LRRC17
106	16691090	5.86	7.27	-2.66	0.014476	0.552858	PTPN22
107	16819325	9.52	10.94	-2.68	0.007272	0.472433	HERPUD1
108	17020846	8.51	9.95	-2.73	0.02339	0.627571	COL12A1
109	16932483	4.38	5.84	-2.75	0.010589	0.508075	OTTHUM G000001506 05
110	16749583	5.53	7	-2.77	0.01259	0.53004	FAR2
111	17072920	8.18	9.65	-2.77	0.007433	0.472433	WISP1
112	16843167	4.15	5.65	-2.84	0.016867	0.573091	EVI2A
113							
114	16858137	7.64	9.14	-2.84	0.047828	0.720122	ICAM1
115	16853716	6.51	8.04	-2.89	0.001064	0.346851	LAMA1
116	16901974	4.82	6.41	-3	0.045208	0.715302	IL1A
117	16901986	5.88	7.47	-3.01	0.013368	0.537579	IL1B
118	16665558	4.21	5.84	-3.09	0.00274	0.404044	DLEU2L
119	16762661	7.5	9.16	-3.16	0.003526	0.414166	PTHLH
120	16773681	9.66	11.32	-3.17	0.038394	0.686809	MEDAG
121	17046135	8.55	10.22	-3.19	0.001125	0.35235	EGFR
122	16766578	5.47	7.17	-3.24	0.016333	0.565871	DDIT3
123	16761212	6.09	7.82	-3.31	0.003101	0.408572	CLEC2B
124	16743148	5.08	7.05	-3.92	0.007367	0.472433	NOX4
125	16903919	5.02	7.05	-4.09	0.025013	0.63692	ERMN
126	16743721	6.09	8.85	-6.77	0.007019	0.472433	MMP1

【実施例 4】

【0243】

MSCおよびMSC-NTFの免疫調節効果

間葉系幹細胞（MSC）は、相当な免疫調節性活性を有することが示されている。それらは、その免疫抑制特性故に、種々の疾患の治療のための臨床試験において現在試験されている。

【0244】

CD4陽性細胞数の決定、およびELISAアッセイによるT細胞のサイトカイン産生によって、T細胞の活性化に対する効果を測定するためのin vitroアッセイを使用して、MSCおよびMSC-NTFの免疫調節性特性を比較した。

【0245】

材料および方法

フィコール密度遠心分離によって、健常なボランティアの新鮮な末梢血から末梢血単核細胞（PBMC）を単離した。

【0246】

MSC-NTF細胞に対して、実施例1に記載の1ステッププロトコルを使用して分化を誘導した。PBMCを、MSCまたはMSC-NTF細胞のいずれかとともに、RPMIと10% FBSを含有する培養培地中、12ウェルプレートで共培養した。PBMCは、PHA 10 μg/mlを用いて活性化した。活性化されたPBMCを、単独で培養するか、あるいはMSCまたはMSC-NTF細胞と共培養した。

【0247】

4日間の共培養後に、穏やかなピペッティングによって非接着性PBM Cを回収し、培養上清をELISAによるサイトカイン分析（IL-10およびIFN- γ ）のために回収した。

【0248】

非接着性のPBM Cは、CD4陽性T細胞のレベルを得るために、フローサイトメトリーによって分析した。

【0249】

結果

結果を下記表6にまとめた。

【0250】

【表6】

細胞型	INF- γ (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	CD4 (陽性%)
非活性化PBM C	0.0	0.0	
活性化PBM C	765.8	2016.9	26.4
活性化PBM C+MSC	80.41	953.6	16.58
活性化PBM C+MSC-NTF	9.1	602.8	13.8
MSC	0.0	0.0	
MSC-NTF	0.0	0.0	

【0251】

これらの結果は、MSC-NTF細胞の免疫調節性効果を追認し、このような効果は、同一ドナーの未分化MSCと比べて増加されていることを示した。活性化PBM Cによるインターフェロン- γ およびIL-10の分泌は、MSC-NTF細胞によって、それぞれ85倍および3.3倍に有意に下方制御されていた。MSCとMSC-NTF細胞のいずれもが、単独ではインターフェロン- γ またはIL-10を分泌しないと判明した。

【0252】

さらに、MSC-NTF細胞は、CD4陽性細胞の減少をもたらし、MSC-NTF細胞不在下での対照培養物におけるその数の半分へと減少させた（26.4から13.8%）。

【実施例5】

【0253】

MSC-NTFの安定性

MSC-NTF細胞の採取後の安定性を評価するために、新鮮な採取されたばかりのMSC-NTF細胞（その細胞の80%超がCD49aを発現することを分析によって確認された集団）を培養培地に再懸濁し、患者への投与のために使用されるシリンジに詰め、2～8℃で最大4日間インキュベートした。24、48、72および96時間の時点で、細胞をサンプリングし、細胞を計数し、生存細胞濃度および生存率を求めた。各時点で、細胞をまた再播種し、培養培地中、37℃でさらに3日間培養して、遅延発症型細胞死について評価した。各時点で、生存細胞の回収し、生存率を確定した。

【0254】

結果

生存率および生存MSC-NTF細胞濃度は、臨床試験において患者への投与に使用されるのと同様のシリンジに詰められた場合に、最大96時間維持された。生存細胞濃度は

、最初の72時間は事実上変化せず、シリンジ中で0時間から96時間の間に約96%までしか低下しなかった(図3A)。さらに、遅延発症細胞死を評価するためのさらなる3日間のインキュベーションによって、細胞が少なくとも72時間にわたって安定性と生存率を維持することが確認された。96時間の時点では、回収された生存細胞数が86%へと低下した(図3B)。シリンジ内の生存細胞の回収とそれに続く3日間の培養によれば、細胞安定性は最大96時間維持されるようである。細胞は、安定性を維持する96時間の期間を通じて、その特徴的表現型および神経栄養因子分泌特性を維持することが示された。

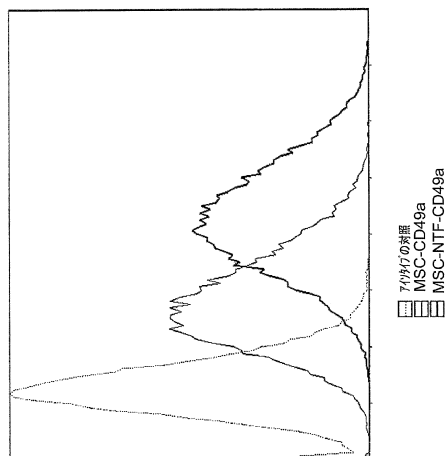
【0255】

本発明がその特定の実施形態とともに記載されているが、多数の代替法、改変および変法が、当業者には明らかである。したがって、添付の特許請求の範囲の趣旨および広い範囲内に入るこのような代替法、改変および変法のすべてが、本発明に包含されることを意図している。

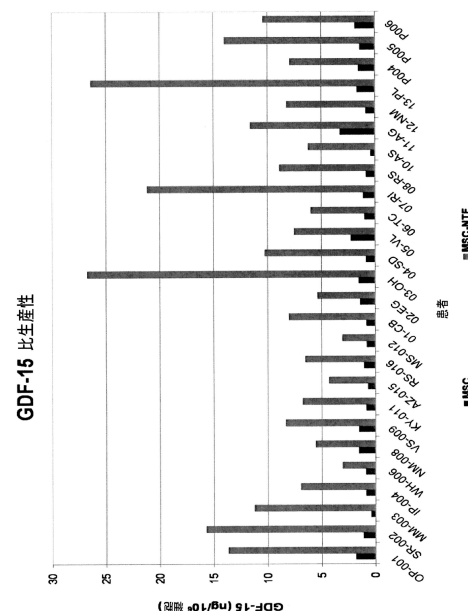
【0256】

本明細書に記載されるすべての刊行物、特許および特許出願は、個々の刊行物、特許または特許出願の各々について、具体的かつ個別に参照して本明細書に組み込まれた場合と同程度に、その明細書の参照することによってその全文が本明細書に組み込まれるものとする。さらに、本願におけるいかなる文献に関する引用または同定は、本発明の先行技術として利用可能であることの承認と解釈されてはならない。章の見出しが使用される範囲について、見出しは必ずしも限定と解釈してはならない。

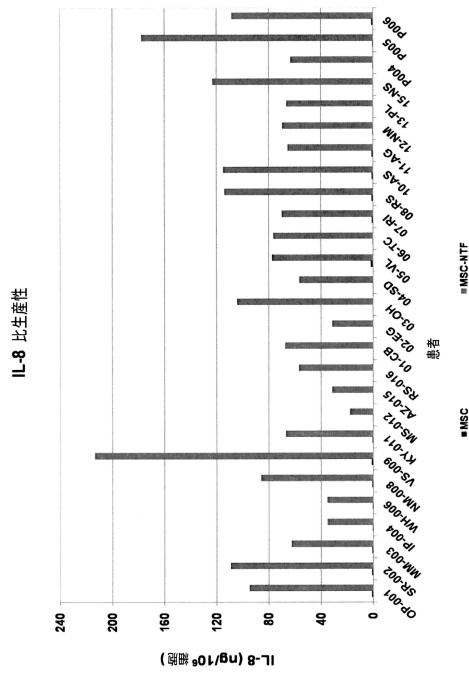
【図1】



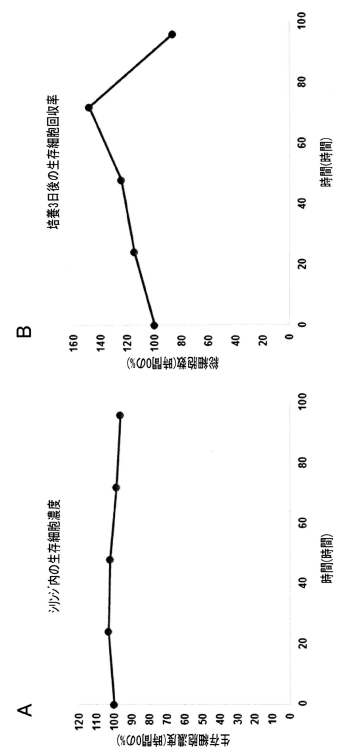
【図2A】



【図 2 B】



【図 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> <i>33/53</i> <i>D</i>
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/543</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> <i>33/543</i> <i>5 9 7</i>
<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/02</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 Q</i> <i>1/02</i>
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/0775</i>	<i>(2010.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> <i>5/0775</i>
<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/68</i>	<i>(2018.01)</i>	<i>C 1 2 Q</i> <i>1/68</i>

(72)発明者 ゴセルフ ヤエル
 イスラエル国 キリヤトーオノ ハルツフェルド ストリート 15
 (72)発明者 レヴィー ヨゼフ
 イスラエル国 モディイン ナハル ゴハール ストリート 7

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 国際公開第2009/144718 (WO, A1)
 特表2008-546385 (JP, A)
 独国特許発明第102011121982 (DE, B3)
 国際公開第2011/063005 (WO, A2)
 国際公開第2013/017699 (WO, A1)
 特表2011-529957 (JP, A)
 KAKA GHOLAM REZA, IN VITRO DIFFERENTIATION OF BONE MARROW STROMAL CELLS INTO OLIGODENDROCYTE-LIKE CELLS USING TRIIODOTHYRONINE AS INDUCER, INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROSCIENCE, 米国, GORDON AND BREACH, 2012年 5月 1日, VOL:122, NR:5,, P1-11(PAGE(S):237 - 247), URL, <http://dx.doi.org/10.3109/00207454.2011.642037>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G 0 1 N 33/48-33/98
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
 CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

專利名称(译)	确定细胞适合性的方法		
公开(公告)号	JP6628253B2	公开(公告)日	2020-01-08
申请号	JP2016548691	申请日	2015-02-11
[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		
当前申请(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		
发明人	ゴセルフ ヤエル レヴィー ヨゼフ		
IPC分类号	G01N33/68 A61K35/28 A61P37/02 A61P29/00 A61P21/02 G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/02 C12N5/0775 C12Q1/68		
CPC分类号	A61P21/02 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/02 C12N5/0662 C12N2501/115 C12N2501/13 C12N2501/135 C12N2501/58 G01N33/5073 G01N33/6896 A61K35/28 C12N5/0663 C12N2501/195		
FI分类号	G01N33/68 A61K35/28 A61P37/02 A61P29/00 A61P21/02 G01N33/53.D G01N33/543.597 C12Q1/02 C12N5/0775 C12Q1/68		
优先权	61/938172 2014-02-11 US		
其他公开文献	JP2017511876A5 JP2017511876A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种鉴定细胞群是否合适的治疗剂的方法。该方法包括：(a) 将未分化的间充质干细胞(MSC)群体在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的分化培养基中孵育至少两天，直至获得分化的MSC群体；(b) 分析CD49a在分化的MSC群体中的表达，其中高于预定水平的CD49a的量指示该细胞群体适合作为治疗剂。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特 許 公 報(B2)	(11) 特許番号 特許第6628253号 (P6628253)
(45) 発行日 令和2年1月8日(2020.1.8)	(24) 登録日 令和1年12月13日(2019.12.13)	
(51) Int. Cl. G 0 1 N 33/68 (2006.01) A 6 1 K 35/28 (2015.01) A 6 1 P 37/02 (2006.01) A 6 1 P 29/00 (2006.01) A 6 1 P 21/02 (2006.01)	F I G 0 1 N 33/68 A 6 1 K 35/28 A 6 1 P 37/02 A 6 1 P 29/00 A 6 1 P 21/02	請求項の数 12 (全 43 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号 特願2016-548691(P2016-548691) (86) (22) 出願日 平成27年2月11日(2015.2.11) (65) 公表番号 特表2017-511876(P2017-511876A) (43) 公表日 平成29年4月27日(2017.4.27) (86) 国際出願番号 PCT/IL2015/050159 (87) 国際公開番号 WO2015/121859 (87) 国際公開日 平成27年8月20日(2015.8.20) (87) 審査請求日 平成29年11月24日(2017.11.24) (31) 優先権主張番号 61/938,172 (32) 優先日 平成26年2月11日(2014.2.11) (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	(73) 特許権者 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, 4912502 ペタッ ーティクヴァ, キリヤト アリー, ピ ー. オー. ボックス 2650, ハゼ ル ストリート 12 12 Bazel Street, P. O. Box 2650 Kiryat Arie, 4912502 Petac h-Tikva, Israel (74) 代理人 100105050 弁理士 鷲田 公一	最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 細胞の適性を判定する方法		