

(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2020-500008
(P2020-500008A)

(43) 公表日 令和2年1月9日(2020.1.9)

(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 5/0775 Z N A	2 G 0 4 1
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	2 G 0 4 5
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	4 B 0 6 3
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	4 C 0 8 7

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-520694 (P2019-520694)
 (86) (22) 出願日 平成29年9月26日 (2017. 9. 26)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年5月27日 (2019. 5. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2017/010592
 (87) 国際公開番号 WO2018/074758
 (87) 国際公開日 平成30年4月26日 (2018. 4. 26)
 (31) 優先権主張番号 10-2016-0134085
 (32) 優先日 平成28年10月17日 (2016. 10. 17)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)

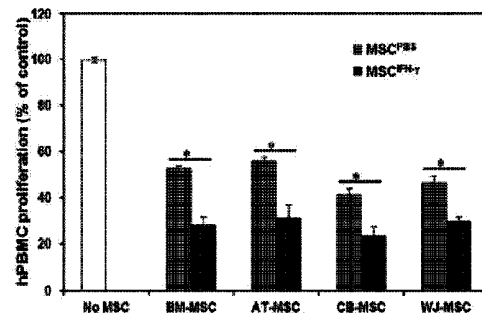
(71) 出願人 512196600
 サムソン ライフ パブリック ウェルフェア ファウンデーション
 大韓民国 1 4 0 - 8 9 3 ソウル、ヨンサン
 グ、イテウォンロ 5 5 ギル 4 8 番
 (74) 代理人 100079049
 弁理士 中島 淳
 (74) 代理人 100084995
 弁理士 加藤 和詳
 (72) 発明者 ユ、コン ヒ
 大韓民国 0 6 1 9 1 ソウル カンナム
 - グ サムソン-ロ 6 4 - ギル 5 1
 0 2 - 1 0 0 2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫疾患の治療のための高効率幹細胞の選別方法

(57) 【要約】

本発明は、間葉系幹細胞で I F N - で前処理刺激した後免疫抑制バイオマーカーのレベルを測定するステップを含む免疫疾患の治療のための高効率間葉系幹細胞の選別方法、その方法によって選別された高効率間葉系幹細胞及びその高効率間葉系幹細胞を用いた免疫疾患の治療方法に関する。本発明は、移植片対宿主病、自己免疫疾患を含む多様な免疫疾患の臨床的治療のための免疫反応の調節能力を有する機能的に優れた間葉系幹細胞が得られる有用な方法を提供することで、免疫疾患の治療法で有用に用いられ得る。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

間葉系幹細胞で I F N - で前処理刺激した後に免疫抑制バイオマーカのレベルを測定するステップを含む、免疫疾患の治療のための高効率間葉系幹細胞の選別方法。

【請求項 2】

前記方法は、下記のステップを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の選別方法：

- (a) 間葉系幹細胞を培養した後 I F N - を処理するステップ；
- (b) 間葉系幹細胞で免疫抑制バイオマーカの発現レベルを測定するステップ；及び
- (c) 前記発現レベルが I F N - の未処理対照群と比較して増加する場合、免疫疾患の治療のための高効率間葉系幹細胞であると判定するステップ。

10

【請求項 3】

前記免疫抑制バイオマーカは、I D O (i n d o l e a m i n e 2 , 3 - d i o x y g e n a s e) であることを特徴とする、請求項 1 に記載の選別方法。

【請求項 4】

前記免疫抑制バイオマーカは、C X C L 9 (C - X - C m o t i f l i g a n d 9)、C X C L 1 0 (C - X - C m o t i f l i g a n d 1 0)、C X C L 1 1 (C - X - C m o t i f l i g a n d 1 1)、I C A M 1 (I n t e r C e l l u l a r A d h e s i o n M o l e c u l e 1)、I C A M 2 (I n t e r C e l l u l a r A d h e s i o n M o l e c u l e 2)、B 7 - H 1 (B 7 - h o m o l o g 1)、P T G D S (P r o s t a g l a n d i n D 2 s y n t h a s e)、V C A M 1 (V a s c u l a r C e l l A d h e s i o n M o l e c u l e 1) 及び T R A I L (T N F - R e l a t e d A p o p t o s i s - I n d u c i n g L i g a n d) からなる群より選択される一つ以上をさらに含むことを特徴とする、請求項 3 に記載の選別方法。

20

【請求項 5】

前記高効率は、免疫抑制能であることを特徴とする、請求項 1 に記載の選別方法。

【請求項 6】

前記間葉系幹細胞は、臍帯、臍帯血、骨髄、脂肪、筋肉、ホウオートンゼリー、神経、皮膚、羊膜、絨毛膜、脱落膜及び胎盤からなる群より選択されるものに由来することを特徴とする、請求項 1 に記載の選別方法。

30

【請求項 7】

前記免疫疾患は、移植片対宿主疾患、臓器移植時の拒絶反応、体液性拒絶反応、自己免疫疾患又はアレルギー性疾患であることを特徴とする、請求項 1 に記載の選別方法。

【請求項 8】

前記自己免疫疾患は、クローン病、紅斑病、アトピー、関節リウマチ、橋本甲状腺炎、悪性貧血、アディソン病、第 1 型糖尿、ルプス、慢性疲労症候群、繊維筋肉痛、甲状腺機能低下症と亢進症、硬皮症、ベーチェット病、炎症性腸疾患、多発性硬化症、重症筋無力症、メニエール症候群 (M e n i e r e ' s s y n d r o m e)、ギラン・バレー症候群 (G u i l i a n - B a r r e s y n d r o m e)、シェーグレン症候群 (S j o g r e n ' s s y n d r o m e)、白斑症、子宮内膜症、乾癬、全身性硬皮症、喘息又は潰瘍性大腸炎であることを特徴とする、請求項 7 に記載の選別方法。

40

【請求項 9】

前記 I D O の発現は、I F N - で刺激された間葉系幹細胞で J A K / S T A T 1 信号経路を通じて増加されることを特徴とする、請求項 3 に記載の選別方法。

【請求項 10】

前記ステップ (a) の I F N - は、培地内に 1 - 1 0 0 I U / m l の濃度で含まれることを特徴とする、請求項 2 に記載の選別方法。

【請求項 11】

前記ステップ (b) のバイオマーカの発現レベルは、ウエスタンブロッティング、抗体免疫沈降法、E L I S A、質量分析法、R T - P C R、競合的 R T - P C R (c o m p e

50

titive RT-PCR)、リアルタイムRT-PCR(Real-time RT-PCR)、RNase保護分析法(RPA:RNase protection assay)、ノーザンブロットング又はDNAチップを用いて測定することを特徴とする、請求項2に記載の選別方法。

【請求項12】

請求項1に記載の方法によって選別された、免疫疾患の治療のための高効率間葉系幹細胞。

【請求項13】

前記免疫疾患は、移植片対宿主疾患、臓器移植時の拒絶反応、体液性拒絶反応、自己免疫疾患又はアレルギー性疾患であることを特徴とする、請求項12に記載の高効率間葉系幹細胞。

10

【請求項14】

前記高効率は、免疫抑制能であることを特徴とする、請求項12に記載の高効率間葉系幹細胞。

【請求項15】

前記間葉系幹細胞は、臍帯、臍帯血、骨髄、脂肪、筋肉、神経、皮膚、羊膜及び胎盤に由来することを特徴とする、請求項12に記載の高効率間葉系幹細胞。

【請求項16】

前記間葉系幹細胞は、自家、他家又は同種異系来由であることを特徴とする、請求項12に記載の高効率間葉系幹細胞。

20

【請求項17】

請求項12に記載の高効率間葉系幹細胞を含有する、免疫疾患治療用薬学組成物。

【請求項18】

請求項12に記載の高効率間葉系幹細胞を含有する、移植片対宿主疾患治療用薬学製剤。

【請求項19】

請求項12に記載の高効率間葉系幹細胞を個体に投与するステップを含む、免疫疾患の治療方法。

【請求項20】

請求項12に記載の高効率間葉系幹細胞の免疫疾患の治療用途。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、間葉系幹細胞でIFN- γ で前処理刺激した後に免疫抑制バイオマーカーのレベルを測定するステップを含む免疫疾患の治療のための高効率間葉系幹細胞の選別方法、その方法によって選別された高効率間葉系幹細胞及びその高効率間葉系幹細胞を用いた免疫疾患の治療方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、悪性及び非悪性の血液疾患、自己免疫疾患及び免疫欠乏の治療のために同種異系造血母幹細胞を移植する方法が広く利用されて来た。しかし、ヒト白血球抗原一致同胞(human leucocyte antigen(HLA)-identical sibling)を移植した後にも免疫疾患中の一つである移植片対宿主病(graft versus-host disease;GVHD)の発病及びこれによる死亡は解決課題として残っている。

40

【0003】

移植片対宿主病は、宿主の抗原提示細胞によって活性化された供与者のT-細胞により誘発され、前記細胞は、ターゲット組織(皮膚、腸及び肝)に移動して標的臓器の機能異常を誘発する。移植片対宿主病の1次的標準治療は、高い濃度のステロイドを処方することである。しかし、前記患者の50%は前記1次治療法に反応せず、一旦ステロイド抵抗性が誘発されると、死亡率が増加することが知られているにもかかわらず、ステロイド抵抗

50

性移植片対宿主病に対する2次的治療法がなく、追加的な治療代案が必要な実情である。

【0004】

一方、成長因子、細胞間相互作用及び基質タンパク質を提供する骨髓間質細胞 (Marrow stromal cell) は、骨髓の微細環境に存在する共通的前駆細胞に由来し、間葉系幹細胞としても知られている。間葉系幹細胞は、分化できる能力を有し、骨芽細胞、脂肪細胞及び軟骨前駆細胞を含む制限された細胞に分化できる潜在力を有する前駆細胞を生産することができる。間葉系幹細胞は、化学療法又は放射線療法により損傷された骨髓の微細環境で宿主細胞を代替することができ、遺伝子の治療のための手段に用いられ得る。

【0005】

多くの研究によると、間葉系幹細胞が傷部位に移動して損傷された組織の復旧に寄与するだけでなく、免疫調節機能を有していることが報告された。間葉系幹細胞は、T-細胞、B-細胞、ナチュラルキラー細胞 (NK cells) 及び抗原提示細胞を含む免疫細胞の活性化、増殖及び機能を抑制する。間葉系幹細胞により媒介される免疫抑制は、インターロイキン-10 (IL-10)、TGF- β 、一酸化窒素、プロスタグランジンE2 (PGE2) のような可溶性因子からなり得る。

【0006】

活性化されたT-細胞、NK細胞、NKT細胞及び大食細胞のような多様な種類の細胞から生成される強力な炎症誘発サイトカイン (pro-inflammatory cytokine) であるインターフェロン-ガンマ (IFN- γ) は、自然免疫及び獲得免疫の反応において重要で且つ複雑な役目を実行し、急性移植片対宿主病において病原性因子として知られている。IFN- γ は、細胞分裂を抑制して細胞死滅を促進することで、同種反応性T-細胞を陰的に調節し、授与者の実質細胞 (parenchymal cells) と直接的な相互作用を通じて組織損傷を抑制する。

【0007】

このように、以前の *in vitro* 研究を通じて活性化された間葉系幹細胞でIFN- γ の役目が知られているが、間葉系幹細胞の移植を通じた *in vivo* 移植片対宿主病の治療機序に対しては知られていない実情である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

さて、本発明者らは、マイクロアレイ分析を通じて間葉系幹細胞の免疫調節機能と関連したバイオマーカーの発現プロファイルに対してIFN- γ が及ぼす影響を分析し、*in vitro* 及び *in vivo* で immune conflicts の調節と関連した間葉系幹細胞の作用機序を確認しただけでなく、IFN- γ により刺激された脂肪組織 (adipose tissue; AT)、臍帯血 (umbilical cord blood; CB)、ハウートンゼリー (Wharton's jelly; WJ) 及び骨髓に由来する間葉系幹細胞が移植片対宿主病のモデルで生存率を増加させることを確認することで、本発明を完成させるに至った。

【0009】

したがって、本発明は、IFN- γ を前処理刺激した後に特定の免疫抑制バイオマーカー (IDO/CXCL9、CXCL10、CXCL11、ICAM1、ICAM2、B7-H1、PTGDS、VCAM1、TRAIL) のレベルを測定するステップを含む免疫疾患の治療のための高効率間葉系幹細胞の選別方法及びそれによって選別された高効率間葉系幹細胞を提供することを目的とする。

【0010】

しかし、本発明が達成しようとする技術的課題は、以上で言及した課題に制限されず、言及しなかったまた他の課題は、下の記載から当業者に明確に理解されるべきである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

10

20

30

40

50

本発明は、間葉系幹細胞でIFN- γ を前処理刺激した後に免疫抑制バイオマーカのレベルを測定するステップを含む免疫疾患の治療のための高効率間葉系幹細胞の選別方法を提供する。

【0012】

本発明の一具現例によると、前記方法は、下記のステップを含むことを特徴とする。

【0013】

(a) 間葉系幹細胞を培養した後にIFN- γ を処理するステップ；
(b) 間葉系幹細胞で免疫抑制バイオマーカの発現レベルを測定するステップ；及び
(c) 前記発現レベルがIFN- γ の未処理対照群と比較して増加する場合、免疫疾患の治療のための高効率幹細胞であると判定するステップ。

10

【0014】

本発明の他の具現例によると、前記免疫抑制バイオマーカは、IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase)であることを特徴とする。

【0015】

本発明のまた他の具現例によると、前記免疫抑制バイオマーカは、CXCL9 (C-X-C motif ligand 9)、CXCL10 (C-X-C motif ligand 10)、CXCL11 (C-X-C motif ligand 11)、ICAM1 (Inter Cellular Adhesion Molecule 1)、ICAM2 (Inter Cellular Adhesion Molecule 2)、B7-H1 (B7-homolog 1)、PTGDS (Prostaglandin D2 synthase)、VCAM1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1)及びTRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)からなる群より選択される一つ以上をさらに含むことを特徴とする。

20

【0016】

本発明のまた他の具現例によると、前記高効率は、免疫抑制能であることを特徴とする。

【0017】

本発明のまた他の具現例によると、前記間葉系幹細胞は、臍帯、臍帯血、骨髄、脂肪、筋肉、ホウオトンゼリー、神経、皮膚、羊膜、絨毛膜、脱落膜及び胎盤からなる群より選択されるものに由来することを特徴とする。

30

【0018】

本発明のまた他の具現例によると、前記免疫疾患は、移植片対宿主疾患、臓器移植時の拒絶反応、体液性拒絶反応、自己免疫疾患又はアレルギー性疾患であることを特徴とする。

【0019】

本発明のまた他の具現例によると、前記自己免疫疾患は、クローン病、紅斑病、アトピー、関節リウマチ、橋本甲状腺炎、悪性貧血、アディソン病、第1型糖尿、ルプス、慢性疲労症候群、繊維筋肉痛、甲状腺機能低下症と亢進症、硬皮症、ベーチェット病、炎症性腸疾患、多発性硬化症、重症筋無力症、メニエール症候群 (Meniere's syndrome)、ギラン・バレー症候群 (Guillain-Barre syndrome)、シェーグレン症候群 (Sjogren's syndrome)、白斑症、子宮内膜症、乾癬、全身性硬皮症、喘息又は潰瘍性大腸炎であることを特徴とする。

40

【0020】

本発明のまた他の具現例によると、前記IDOの発現は、IFN- γ で刺激された間葉系幹細胞でJAK/STAT1の信号経路を通じて増加されることを特徴とする。

【0021】

本発明のまた他の具現例によると、前記ステップ(a)のIFN- γ は、培地内に1-100 IU/mlの濃度で含まれることを特徴とする。

【0022】

本発明のまた他の具現例によると、前記ステップ(b)のバイオマーカの発現レベルは、ウエスタンブロッティング、抗体免疫沈降法、ELISA、質量分析法、RT-PCR

50

、競合的 R T - P C R (c o m p e t i t i v e R T - P C R)、リアルタイム R T - P C R (R e a l - t i m e R T - P C R)、R N a s e 保護分析法 (R P A : R N a s e p r o t e c t i o n a s s a y)、ノーザンブロットング又は D N A チップを用いて測定することを特徴とする。

【 0 0 2 3 】

また、本発明は、前記方法によって選別された免疫疾患の治療のための高効能間葉系幹細胞を提供する。

【 0 0 2 4 】

本発明の一具現例によると、前記免疫疾患は、移植片対宿主疾患、臓器移植時の拒絶反応、体液性拒絶反応、自己免疫疾患又はアレルギー性疾患であることを特徴とする。

10

【 0 0 2 5 】

本発明の他の具現例によると、前記高効能は、免疫抑制能であることを特徴とする。

【 0 0 2 6 】

本発明のまた他の具現例によると、前記間葉系幹細胞は、臍帯、臍帯血、骨髄、脂肪、筋肉、ホウオトンゼリー、神経、皮膚、羊膜又は胎盤に由来することを特徴とする。

【 0 0 2 7 】

本発明のまた他の具現例によると、前記間葉系幹細胞は、自家、他家又は同種異系来由であることを特徴とする。

【 0 0 2 8 】

また、本発明は、前記高効能間葉系幹細胞を含有する免疫疾患治療用薬学組成物を提供する。

20

【 0 0 2 9 】

また、本発明は、前記高効能間葉系幹細胞を含有する移植片対宿主疾患治療用薬学製剤を提供する。

【 0 0 3 0 】

また、本発明は、前記高効能間葉系幹細胞を個体に投与するステップを含む移植片対宿主疾患などの免疫疾患の治療方法を提供する。

【 0 0 3 1 】

また、本発明は、前記高効能間葉系幹細胞を用いた移植片対宿主疾患などの免疫疾患の治療用途を提供する。

30

【 発明の効果 】

【 0 0 3 2 】

本発明によると、I F N - で刺激した後、特定のバイオマーカーの組合せ (I D O / C X C L 9、C X C L 1 0、C X C L 1 1、I C A M 1、I C A M 2、B 7 - H 1、P T G D S、V C A M 1、T R A I L) が移植片対宿主病を含む免疫関連疾患において最も優れた免疫抑制能を有する間葉系幹細胞を選別するためのバイオマーカーとして用いられ得ることを提示する。

【 0 0 3 3 】

したがって、本発明は、移植片対宿主病、自己免疫疾患を含む多様な免疫疾患の臨床的治療のための免疫反応の調節能力を有する機能的に優れた間葉系幹細胞が得られる有用な方法を提供することで、免疫疾患の治療法で有用に用いられ得る。

40

【 0 0 3 4 】

また、本発明の I F N - を通じて活性化された間葉系幹細胞を用いた移植片対宿主病の予防及び治療は、同種異系幹細胞の移植のより高い治療的可能性を示す。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 5 】

【 図 1 a 】 多様な組織 (骨髄 B M、脂肪 A T、臍帯血 C B 及びホウオトンゼリー W J) に由来する間葉系幹細胞の形態を示す結果である。

【 図 1 b 】 表面抗原タンパク質 (図 1 の (b)) を示す結果である。

【 図 1 c 】 分化誘導後の性状 (図 1 の (c)) を示す結果である。

50

【図2】図2は、多様な組織（BM、AT、CB、WJ）に由来する間葉系幹細胞の免疫抑制特性を確認するために、PHAで活性化させた末梢血液単核細胞（hPBM C）の増殖率を評価した結果である。

【図3a】多様な組織（BM、AT、CB、WJ）に由来する間葉系幹細胞の免疫抑制特性が細胞間の接触によるか可溶性因子によるかを確認するために、直接接触培養法及びトランスウェル培養法により比較評価した結果である。

【図3b】多様な組織（BM、AT、CB、WJ）に由来する間葉系幹細胞の免疫抑制特性が細胞間の接触によるか可溶性因子によるかを確認するために、直接接触培養法及びトランスウェル培養法により比較評価した結果である。

【図3c】多様な組織（BM、AT、CB、WJ）に由来する間葉系幹細胞の免疫抑制特性が細胞間の接触によるか可溶性因子によるかを確認するために、直接接触培養法及びトランスウェル培養法により比較評価した結果である。

【図3d】多様な組織（BM、AT、CB、WJ）に由来する間葉系幹細胞の免疫抑制特性が細胞間の接触によるか可溶性因子によるかを確認するために、直接接触培養法及びトランスウェル培養法により比較評価した結果である。

【図4a】*in vivo*で間葉系幹細胞の免疫抑制機能を確認するために、マウスにhPBM C及び多様な組織（BM、AT、CB、WJ）に由来する間葉系幹細胞をともに1回又は2回注入した後のマウス生存率を示す結果である。

【図4b】*in vivo*で間葉系幹細胞の免疫抑制機能を確認するために、マウスにhPBM C及び多様な組織（BM、AT、CB、WJ）に由来する間葉系幹細胞をともに1回又は2回注入した後のマウス生存率を示す結果である。

【図4c】*in vivo*で間葉系幹細胞の免疫抑制機能を確認するために、マウスにhPBM C及び多様な組織（BM、AT、CB、WJ）に由来する間葉系幹細胞をともに1回又は2回注入した後のマウス生存率を示す結果である。

【図4d】*in vivo*で間葉系幹細胞の免疫抑制機能を確認するために、マウスにhPBM C及び多様な組織（BM、AT、CB、WJ）に由来する間葉系幹細胞をともに1回又は2回注入した後のマウス生存率を示す結果である。

【図5】図5は、移植片対宿主病（GVHD）の動物モデルにhPBM Cとともに骨髄由来間葉系幹細胞を注入するとき血液内のIFN- γ （炎症性サイトカイン）のレベルが減少されることを示す結果である。

【図6】図6は、hPBM Cを多様な組織（BM、AT、CB、WJ）由来の間葉系幹細胞とともに培養した後の生存率を評価したもので、このとき、間葉系幹細胞はIFN- γ 非刺激群（MSC^{PBS}）と刺激群（MSC^{IFN- γ} ）間の生存率を比較した結果である。

【図7a】IFN- γ で刺激した間葉系幹細胞が移植片対宿主病を改善させるかを確認するために、No MSC、MSC^{PBS}、MSC^{IFN- γ} 、MSC^{AG490+IFN- γ} 投与群間のマウス生存率を比較評価した結果である。

【図7b】IFN- γ で刺激した間葉系幹細胞が移植片対宿主病を改善させるかを確認するために、No MSC、MSC^{PBS}、MSC^{IFN- γ} 、MSC^{AG490+IFN- γ} 投与群間のマウス生存率を比較評価した結果である。

【図7c】IFN- γ で刺激した間葉系幹細胞が移植片対宿主病を改善させるかを確認するために、No MSC、MSC^{PBS}、MSC^{IFN- γ} 、MSC^{AG490+IFN- γ} 投与群間のマウス生存率を比較評価した結果である。

【図7d】IFN- γ で刺激した間葉系幹細胞が移植片対宿主病を改善させるかを確認するために、No MSC、MSC^{PBS}、MSC^{IFN- γ} 、MSC^{AG490+IFN- γ} 投与群間のマウス生存率を比較評価した結果である。

【図8】図8は、IFN- γ で刺激した間葉系幹細胞が移植片対宿主病のマウスモデルでT細胞の増殖抑制を誘導するかを確認するため、No MSC、MSC^{PBS}、MSC^{IFN- γ} 、MSC^{AG490+IFN- γ} 投与群間のCD45⁺細胞及びCD45⁺CD3⁺細胞の数を比較測定した結果である。

10

20

30

40

50

【図9 a】IFN- γ で刺激した間葉系幹細胞を移植片対宿主病のマウスモデルに移植した後に組織学的分析を通じて組織への免疫細胞浸透が減少することを確認した結果である。

【図9 b】IFN- γ で刺激した間葉系幹細胞を移植片対宿主病のマウスモデルに移植した後に組織学的分析を通じて組織への免疫細胞浸透が減少することを確認した結果である。

【図10 a】IFN- γ で刺激した前後の間葉系幹細胞の形態を比較した結果である。

【図10 b】IFN- γ で刺激した前後の遺伝子発現プロファイルを比較した結果である。

【図11】図11は、IFN- γ で刺激した間葉系幹細胞でCXCL9、CXCL10、CCL8及びIDO遺伝子のmRNAの発現レベルが顕著に増加することを確認した結果である。

【図12】図12は、多様な組織(BM、AT、CB、WJ)由来の間葉系幹細胞をIFN- γ で刺激したとき互いに類似にIDO発現が増加することを確認した結果である。

【図13】IFN- γ を媒介としたIDO発現がJAK/STAT1の信号伝達経路を通じて誘導されることを確認した結果である。

【図14】IFN- γ を媒介としたIDO発現がJAK/STAT1の信号伝達経路を通じて誘導されることを確認した結果である。

【図15】図15は、STAT1標的のsiRNA処理時にIFN- γ の下位の信号伝達経路が抑制されてhPBM Cの増殖抑制効果が遮断されることを示す結果である。

【図16 a】移植片対宿主病のマウスにIFN- γ で刺激した間葉系幹細胞を注入した後、間葉系幹細胞の組織内浸透及びIDO発現誘導を確認した免疫組織染色の結果である。

【図16 b】移植片対宿主病のマウスにIFN- γ で刺激した間葉系幹細胞を注入した後、間葉系幹細胞の組織内浸透及びIDO発現誘導を確認した免疫組織染色の結果である。

【図16 c】移植片対宿主病のマウスにIFN- γ で刺激した間葉系幹細胞を注入した後、間葉系幹細胞の組織内浸透及びIDO発現誘導を確認した免疫組織染色の結果である。

【図16 d】移植片対宿主病のマウスにIFN- γ で刺激した間葉系幹細胞を注入した後、間葉系幹細胞の組織内浸透及びIDO発現誘導を確認した免疫組織染色の結果である。

【図17 a】図17の(a)~図17の(c)は、間葉系幹細胞の免疫抑制特性と関連したIDOの役目を調べるため、shRNA処理でIDO発現阻害を確認した後(図17の(a)、図17の(b))、hPBM Cの増殖率変化(図17の(c))を確認した結果である。

【図17 b】図17の(a)~図17の(c)は、間葉系幹細胞の免疫抑制特性と関連したIDOの役目を調べるため、shRNA処理でIDO発現阻害を確認した後(図17の(a)、図17の(b))、hPBM Cの増殖率変化(図17の(c))を確認した結果である。

【図17 c】図17の(a)~図17の(c)は、間葉系幹細胞の免疫抑制特性と関連したIDOの役目を調べるため、shRNA処理でIDO発現阻害を確認した後(図17の(a)、図17の(b))、hPBM Cの増殖率変化(図17の(c))を確認した結果である。

【図18】図18は、IDOの発現が減少された間葉系幹細胞にIFN- γ を処理するか処理しない状態で移植片対宿主病のマウスに投与した後の生存率を比較評価した結果である。

【図19】図19は、IDOの発現が減少された間葉系幹細胞にIFN- γ を処理するか処理しない状態で移植片対宿主病のマウスに投与した後、小腸及び皮膚組織でIDOダウン調節された間葉系幹細胞の存在を示す免疫組織染色の結果である。

【図20】図20は、IDOを過発現する間葉系幹細胞の免疫抑制能を*in vitro*で確認した結果である。

【図21】図21は、IDOを過発現する間葉系幹細胞の免疫抑制能を*in vivo*で確認した結果である。

10

20

30

40

50

【図 2 2】図 2 2 は、I D O を過発現する間葉系幹細胞を移植片対宿主病のマウスに投与した後、小腸及び皮膚組織で I D O が上向き調節された間葉系幹細胞の存在を示す免疫組織染色の結果である。

【図 2 3】図 2 3 は、I F N - により刺激された間葉系幹細胞と T L R 3 が活性化された (p o l y I : C 刺激) 間葉系幹細胞との免疫抑制の活性を比較した結果である。

【図 2 4 a】図 2 4 の (a) 及び図 2 4 の (b) は、I F N - により刺激された間葉系幹細胞において、J A K / S T A T 1 の経路を通じて I D O 発現が誘導される一方、T L R 3 活性化は誘導されないことを示す結果である。

【図 2 4 b】図 2 4 の (a) 及び図 2 4 の (b) は、I F N - により刺激された間葉系幹細胞において、J A K / S T A T 1 の経路を通じて I D O 発現が誘導される一方、T L R 3 活性化は誘導されないことを示す結果である。

【図 2 5】図 2 5 は、間葉系幹細胞で機能遺伝子 (C X C L 9、C X C L 1 0、I L - 6、I L - 8) の発現に及ぶ影響に対して、I F N - の刺激時と T L R 3 の活性化 (p o l y I : C 刺激) 時とを比較評価した R T - P C R 結果である。

【図 2 6】図 2 6 は、間葉系幹細胞で機能遺伝子 (I D O、C X C L 9、C X C L 1 0、C X C L 1 1、I C A M 1、I C A M 2、B 7 - H 1、P T G D S、V C A M 1 及び T R A I L) の発現に及ぶ影響に対して、I F N - 刺激、T N F - 刺激及び T L R 3 活性化 (p o l y I : C 刺激) 時を比較評価した R T - P C R 結果である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 6】

本発明者らは、以前の研究を通じて、活性化された T - 細胞が制御性 T - 細胞よりさらに高いレベルの I F N - を発現し、前記 I F N - の発現レベルは、T - 細胞を間葉系幹細胞と共同培養したときに顕著に減少することを報告することで、I F N - の自家分泌 - 近距離分泌循環 (a u t o c r i n e - p a r a c r i n e l o o p) を提示したことがある。したがって、本発明では、I F N - を通じた間葉系幹細胞の刺激が細胞の免疫抑制特性を向上させる結果を示すと予想し、I F N - で刺激された間葉系幹細胞で多様な遺伝子の発現レベルが免疫抑制能と関連があるか確認するために、遺伝子発現プロファイルを分析した。

【 0 0 3 7】

その結果、I F N - で刺激された間葉系幹細胞で多様な免疫反応を起こす白血球の募集に重要な役目をする C X C L 9、C X C L 1 0、C C L 8 及び I D O を含む 5 1 2 個の遺伝子の発現が増加したことを確認した。このようなケモカインと区別され、I D O は、より直接的に間葉系幹細胞の免疫抑制能に関与する傾向を示し、このような活性と綿密に関連されている。I D O は、I F N - で刺激された間葉系幹細胞で発現が非常に増加し、I D O の発現を阻害させると、T - 細胞の抗原媒介増殖が抑制された。

【 0 0 3 8】

また、本発明では、I F N - がヒト骨髄以外にも臍帯血、脂肪組織及びホウオートンゼリーなど多様な組織由来の間葉系幹細胞でも I D O の発現を誘導し得ることを確認した。特に、このような I D O の発現は、I F N - で刺激された間葉系幹細胞で J A K / S T A T 1 の信号伝達経路を通じて増加し、I D O を発現する間葉系幹細胞は、免疫抑制能を示すことを明らかにした。I D O の免疫抑制活性は、T - 細胞の増殖に必須なアミノ酸であるトリプトファンの分解を通じて媒介されるので、I D O 及びトリプトファンの欠乏は多くの免疫関連疾患において重要な点と認識される。

【 0 0 3 9】

また、本発明では、共焦点顕微鏡イメージを通じて I F N - で刺激された間葉系幹細胞を注入した移植片対宿主病のマウスモデルで I D O が発現されることを観察した。間葉系幹細胞の増進された免疫抑制活性は、I F N - の前処理と非常に関連があり、これは、また I D O の発現が誘導されたからであると予想される。

【 0 0 4 0】

また、本発明では、移植片対宿主病のマウスモデルで、P B S (対照群) を処理した間葉

10

20

30

40

50

系幹細胞を注入した群に比べてIFN- γ で刺激した間葉系幹細胞を注入した群が一層向上された生存率を示すことを確認した。したがって、移植片対宿主病の細胞治療療法で有用に用いられると期待される。

【0041】

また、本発明では、TLR信号伝達に反応してIDOの発現を増加させるのに関与する信号伝達経路を確認した結果、ヒト間葉系幹細胞でTLR3の刺激がIFN- γ 及び/又はIDOの発現をほとんど誘導しなかった。これは、TLR信号伝達がヒト間葉系幹細胞の免疫抑制機能において主要な経路ではないことを意味する。

【0042】

また、IFN- γ の刺激は、全ての間葉系幹細胞でIDOの発現を顕著に誘導することが観察されたので、直接的なIFN- γ の刺激が免疫関連疾患の治療のための間葉系幹細胞の機能を改善するのに重要な手段であることが分かる。

【0043】

さて、本発明は、間葉系幹細胞でIFN- γ の前処理刺激後の免疫抑制バイオマーカのレベルを測定するステップを含む免疫疾患の治療のための高効率間葉系幹細胞の選別方法を提供する。

【0044】

本発明の選別方法は、(a)間葉系幹細胞を培養した後にIFN- γ を処理するステップ；(b)間葉系幹細胞で免疫抑制バイオマーカの発現レベルを測定するステップ；及び(c)前記発現レベルがIFN- γ の未処理対照群と比較して増加する場合、免疫疾患の治療のための高効率幹細胞であると判定するステップを含むことができる。

【0045】

本発明で、前記免疫抑制バイオマーカに制限はないが、例えば、IDO(indoleamine 2,3-dioxygenase)であることが好ましく、より好ましくは、前記IODマーカに、CXCL9(C-X-C motif ligand 9)、CXCL10(C-X-C motif ligand 10)、CXCL11(C-X-C motif ligand 11)、ICAM1(Inter Cellular Adhesion Molecule 1)、ICAM2(Inter Cellular Adhesion Molecule 2)、B7-H1(B7-homolog 1)、PTGDS(Prostaglandin D2 synthase)、VCAM1(Vascular Cell Adhesion Molecule 1)及びTRAIL(TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)からなる群より選択される一つ以上をさらに含むことが好ましい。

【0046】

本発明で「高効率」とは、間葉系幹細胞の免疫反応抑制能力に優れて免疫関連疾患の治療に効果的な効能を有することを意味する。

【0047】

本発明で「間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell、MSC)」は、骨、軟骨、脂肪、筋肉細胞を含む多様な中胚葉細胞又は神経細胞のような外胚葉細胞にも分化する能力を有する多分化能幹細胞(multipotent stem cell)である。前記間葉系幹細胞は、好ましくは、臍帯、臍帯血、骨髄、脂肪、筋肉、神経、皮膚、羊膜、絨毛膜、脱落膜及び胎盤で構成された群から選択されるものに由来し得る。また、前記間葉系幹細胞は、ヒト、胎児又はヒトを除いた哺乳動物に由来し得る。前記ヒトを除いた哺乳動物は、より好ましくは、イヌ科動物、ネコ科動物、サル科動物、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ラット、マウス又はギニアピッグなどであってもよく、その由来を制限しない。

【0048】

本発明で「免疫疾患」は、免疫調節の異常により発生する疾患であれば、制限がないが、例えば、移植片対宿主疾患、臓器移植時の拒絶反応、体液性拒絶反応、自己免疫疾患又はアレルギー性疾患であってもよい。

10

20

30

40

50

【0049】

このとき、自己免疫疾患は、その種類に制限はないが、クローン病、紅斑病、アトピー、関節リウマチ、橋本甲状腺炎、悪性貧血、アディソン病、第1型糖尿、ルプス、慢性疲労症候群、繊維筋肉痛、甲状腺機能低下症と亢進症、硬皮症、ベーチェット病、炎症性腸疾患、多発性硬化症、重症筋無力症、メニエール症候群 (Meniere's syndrome)、ギラン・バレー症候群 (Guillain-Barre syndrome)、シェーグレン症候群 (Sjogren's syndrome)、白斑症、子宮内膜症、乾癬、全身性硬皮症、喘息又は潰瘍性大腸炎であってもよい。

【0050】

このとき、アレルギー性疾患は、その種類に制限はないが、過敏症 (anaphylaxis)、アレルギー性鼻炎 (allergic rhinitis)、喘息 (asthma)、アレルギー性結膜炎 (allergic conjunctivitis)、アレルギー性皮膚炎 (allergic dermatitis)、アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis)、接触性皮膚炎、蕁麻疹、掻痒症、昆虫アレルギー、食品アレルギー又は薬品アレルギーであってもよい。

10

【0051】

本発明で、IFN- γ で刺激された間葉系幹細胞は、JAK/STAT1信号経路を通じてIDOの発現が増加され、このとき、JAK/STAT1信号経路は、造血系又は免疫系で主要な情報交換分子であるサイトカインの主な情報交換経路である。STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) は、JAK (Janus kinase/Just another r kinase) によってチロシンリン酸化された後、二量体を形成して核に移動することで、遺伝子の発現を調節する転写因子 (TF) として機能するため、IDOはSTAT1のターゲット遺伝子になる。

20

【0052】

本発明の選別方法において、間葉系幹細胞の培養液に処理されるIFN- γ の濃度に制限はないが、例えば、1-100 IU/mlの濃度、好ましくは、1-10 IU/mlの濃度、より好ましくは、1 IU/mlの濃度で含まれ得る。

【0053】

本発明の選別方法において、バイオマーカーの発現レベルを測定する方法に制限はないが、例えば、タンパク質の発現に対しては、ウエスタンブロッティング、抗体免疫沈降法、ELISA、質量分析法を用いて測定し、mRNAの発現に対しては、RT-PCR、競合的RT-PCR (competitive RT-PCR)、リアルタイムRT-PCR (Real-time RT-PCR)、RNase保護分析法 (RPA: RNase protection assay)、ノーザンブロッティング又はDNAチップを用いて測定し得る。

30

【0054】

また、本発明は、上記方法によって選別された免疫疾患の治療のための高効能間葉系幹細胞を提供し、前記間葉系幹細胞の由来に制限はないが、例えば、自家、他家又は同種異系由来であってもよい。

40

【0055】

また、本発明は、前記高効能間葉系細胞を含有する免疫疾患の治療用薬学組成物/薬学製剤を提供する。

【0056】

本発明で「薬学組成物」は、既存の治療活性成分、その他補助剤、薬剤学的に許容可能な担体などの成分をさらに含み得る。前記薬剤学的に許容可能な担体は、食塩水、滅菌水、リンゲル液、緩衝食塩水、デキストロス溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール及びエタノールなどを含む。

【0057】

前記組成物は、それぞれ通常の方法によって散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、

50

エマルジョン、シロップ、エアロゾルなどの経口剤型、外用剤、坐剤及び滅菌注射溶液の形態に剤形化して用いられてもよい。

【0058】

本発明で「投与量」は、患者の体重、年齢、性別、健康状態、食餌、投与回数、投与方法、排泄率及び疾患の程度などによってその範囲が多様に調節され得ることは当業者に明白である。

【0059】

本発明で「個体」とは、疾病の治療を必要とする対象を意味し、より具体的には、ヒト又は非ヒトである霊長類、マウス(mouse)、ラット(rat)、イヌ、ネコ、ウマ及びウシなどの哺乳類を意味する。

10

【0060】

本発明で「薬学的有効量」は、投与される疾患の種類及び程度、患者の年齢及び性別、薬物に対する敏感度、投与時間、投与経路及び排出割合、治療期間、同時に用いられる薬物を含む要素及びその他医学分野によく知られた要素によって決定され、前記要素を全て考慮して副作用なしに最大効果が得られる量であって、当業者により容易に決定され得る。

【0061】

本発明の組成物は、目的組織に到達できる限り、「投与方法」には制限がない。例えば、経口投与、動脈注射、静脈注射、経皮注射、鼻腔内投与、経気管支投与又は筋肉内投与などが含まれる。一日投与量は、約0.0001~100mg/kgであり、好ましくは、0.001~10mg/kgであり、一日一回~数回に分けて投与することが好ましい。

20

【0062】

以下、本発明の理解を助けるために実施例を提示する。しかし、下記の実施例は、本発明をより容易に理解するために提供されるものに過ぎず、実施例によって本発明の内容が限定されるものではない。

【実施例】

【0063】

実施例1：実験方法

1-1. ヒト組織由来の間葉系幹細胞の分離及び培養

本実験は、サムスン医療院の研究審査委員会(Institutional Review Board; IRB)の承認(IRB No. 2011-10-134)を受け、全てのサンプルは、事前同意を得て収集した。骨髓由来の間葉系幹細胞(BM-MSCs)、臍帯血由来の間葉系幹細胞(CB-MSCs)、脂肪組織由来の間葉系幹細胞(AT-MSCs)及びホウォートンゼリー由来の間葉系幹細胞(WJ-MSCs)は、従来知られている方法で分離した。分離された細胞は、10%のFBS(fetal bovine serum、Invitrogen-Gibco)及び100U/mLのペニシリン/ストレプトマイシン(Invitrogen-Gibco)が含まれているDMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium、Invitrogen-Gibco、Rockville, MD)培地を用いて 2×10^3 cells/cm²の密度でシーディングして、37℃及び5%のCO₂条件下で培養した。

30

【0064】

1-2. T-細胞の増殖：BrdU incorporation assay

間葉系幹細胞を10%のFBSが添加されているhigh-glucose DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium、Invitrogen-Gibco、Rockville, MD)培地を用いて96-ウェルプレートに 1.25×10^4 cells/mlの密度でシーディングした。24時間後、前記細胞の増殖を抑制させるために10µg/mlのmitomycin-C(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を添加し、追加的に37℃で2時間の間さらに培養した後、培養培地で5回洗浄した。次に、密度勾配遠心分離を通じて 1×10^5 個のヒト末梢血液単球細胞(human peripheral blood-derived mononuclear cells; hPBMCs)を分離し、各ウェルに添加

40

50

した後、T-細胞の増殖を促進させるために1 μ g/mLのPHA (phytohemagglutinin、Sigma-Aldrich)を処理した。PHA処理によって活性化されたヒト末梢血液単球細胞をBrdU (5-bromo-2-deoxyuridine)を添加する前に3~4日間それぞれ異なる条件の間葉系幹細胞とともに培養した。T-細胞の増殖率は、BrdUを処理し、18時間後にRoche Applied Science (Penzberg、Germany)を用いて評価した。

【0065】

1-3. 移植片対宿主病 (GVHD) の動物モデル

8~9週齢のNOD/SCID免疫欠乏マウス (Jackson Laboratories、Bar Harbor、ME)に300cGyの全身照射法を実施し、24時間後にヒト末梢血液単球細胞を静脈投与した。より具体的に、各マウスに 2×10^7 個のヒト末梢血液単球細胞を 1×10^6 個の間葉系幹細胞とともに投与した。このとき、間葉系幹細胞は、IFN- γ で刺激させるか刺激させないものを用いた。その後、同じ個数の間葉系幹細胞を投与7日目に反復投与した。

10

【0066】

1-4. JAK及びSTAT1の活性抑制

IFN- γ 受容体の細胞内ドメインに該当するJAK (Janus kinase)の活性抑制は、100ng/mLの抗-IFN- γ 抗体 (BD Biosciences)又は1 μ MのAG490 (Calbiochem、San Diego、CA)で処理して実施し、STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1)の発現抑制は、STAT1遺伝子をターゲットにするsiRNA (Santa Cruz Biotechnology)を用い、siRNA-Lipofectamine 2000 (Invitrogen-Gibco)複合体を37 $^{\circ}$ Cで12時間細胞に処理して実施した。

20

【0067】

1-5. 免疫ブロッティング

間葉系幹細胞を冷たいPBSで洗い、300 μ Lの冷たいRIPA buffer (50mM Tris-HCl、pH7.5、containing 1% Triton X-100、150mM NaCl、0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)、1% sodium deoxycholate及びa protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific、Rockford、IL))で溶解させた。その後、細胞の溶解物を4、3、000gで15分間遠心分離して上澄み液を集め、bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fisher Scientific)を用いてタンパク質の定量分析を行った。

30

【0068】

次に、電気泳動のためにタンパク質 (50 μ g)をsample buffer (60mM Tris-HCl、pH6.8、containing 14.4mM β -mercaptoethanol、25% glycerol、2% SDS及び0.1% bromophenol blue)に溶かし、5分間沸かした後、4-12%のSDS reducing gelにローディングしてタンパク質がサイズ別に分離されるようにした。前記分離されたタンパク質に対してtrans-blot system (Invitrogen-Gibco)を用いてトランスファー過程を行うことで、タンパク質がPVDF (polyvinylidene difluoride)メンブレン (GE Healthcare、Buckinghamshire、UK)に移されるようにした。以後、メンブレンプロットに5%のnon-fat dry milk (BD Biosciences)が含まれたTBS (Tris-buffered saline) (10mM Tris-HCl、pH7.5、supplemented with 150mM NaCl)を処理し、1時間の間室温で反応させてブロッティング過程を実行し、TBSで3回洗浄した後、3%のnon-fat dry milkが含まれたTBST

40

50

(TBS supplemented with 0.01% Tween 20)に1次抗体を希釈して処理し、4 で一晩中反応させた。翌日、メンブレンプロットをTBS Tで3回洗浄し、3%のnon-fat dry milkが含まれたTBS Tに希釈した2次抗体を処理した後、室温で1時間の間反応させた。その後、さらにTBS Tでメンブレンプロットを洗浄した後、enhanced chemiluminescence detection system (GE Healthcare)を用いて観察しようとするタンパク質の発現量を分析した。

【0069】

このとき、phospho-JAK2 (#3771)、STAT1 (#9172)、phospho-STAT1 (#9171)、 β -actin (#4967)に特異的な抗体は、Cell Signaling Technology (Danvers, MA)から購入し、IDO (sc-25808)、IRF-1 (sc-13041)に特異的な抗体は、Santa Cruz Biotechnologyから購入した。

10

【0070】

1-6. 遺伝的変異が誘導された間葉系幹細胞の製作

IDO発現を阻害するために、human IDO shRNA (short hairpin RNA) レンチウイルスパーティクル及びIDO発現誘導レンチウイルスパーティクルをそれぞれSanta Cruz Biotechnology (sc-45939-V) (Santa Cruz, CA)及びGenTarget Inc. (LVP302) (San Diego, CA)から購入した。まず、骨髄由来幹細胞にIDO発現阻害用レンチウイルスパーティクルをトランスフェクションするために、前記細胞に10%のFBSが添加されているLG-DMEMを用いて製造した5 μ g/mLのポリブレン (polybrene, Santa Cruz Biotechnology)を前処理した後、MOI (multiplicity of infection) 10でレンチウイルスベクターを処理した。

20

【0071】

以後、細胞を37、5%のCO₂の条件下で24時間の間培養し、PBS (phosphate-buffered saline; Biowest, Nuaille, France)で2回洗浄した後さらに培地を添加した。レンチウイルスベクターが導入された間葉系幹細胞は、導入後、1日目に5 μ g/mLのピューロマイシン (puromycin, Sigma-Aldrich)が含まれている間葉系幹細胞の培地で7日間培養して選別し、ウエスタンブロッティングを通じて確認した。一方、骨髄由来の間葉系幹細胞にIDO発現誘導レンチウイルスパーティクルをトランスフェクションするために、細胞に10%のFBSが添加されたLG-DMEMを用いて前記レンチウイルスパーティクルをMOI 10で処理し、37、5%のCO₂の条件下で72時間の間培養した後、PBSで2回洗浄し、さらに培養培地を添加した。

30

【0072】

次に、上記と同じ方法で、レンチウイルスベクターが導入された間葉系幹細胞に対して導入後1日目に5 μ g/mLのピューロマイシン (puromycin, Sigma-Aldrich)が含まれている間葉系幹細胞の培地で7日間培養して間葉系幹細胞を選別し、RFP (red fluorescent protein)を用いた蛍光観察及びウエスタンブロッティングを通じて確認した。

40

【0073】

1-7. 免疫細胞化学染色法及び免疫組織化学染色法

間葉系幹細胞に固定溶液である4%のホルムアルデヒドを処理し、光を遮断させた状態の室温で30分間反応させた後、PBSで3回洗った。細胞の内部に発現するタンパク質を検出するために、細胞に0.25%のTriton X-100を処理し、光を遮断させた状態の室温で5分間反応させて細胞透過性を高めた。その後、さらに細胞を3回洗い、5%のFBSブロッキング溶液を処理して室温で1時間反応させた後、さらに細胞を洗い、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)

50

から購入したIDO特異的抗体を処理(1:100)した後、やはり室温で1時間反応させた。次に、細胞をさらに3回洗い、Alexa Fluor(登録商標) 488が付着されているgoat anti-mouse IgG(Invitrogen-Gibco) 2次抗体を処理して室温で1時間反応させ、以後、Carl Zeiss LSM 700 confocal microscope system(Jena, Germany)を用いて細胞イメージを得た。

【0074】

間葉系幹細胞をトリプシンで処理し、1 μ MのCM-DiI CellTracker(Invitrogen-Gibco)を用いて37 $^{\circ}$ Cで5分間培養した後、追加で4 $^{\circ}$ Cで15分間培養した。次に、標識された間葉系幹細胞 1×10^6 個をPBSで洗ってhPBM Cとともにマウスに静脈投与し、7日目にさらに同じ数の細胞を投与した。以後、マウスを犠牲にして小腸を分離し、frozen sectioning技術を用いて切断した後、組織を2回洗い、5%のFBSブロッキング溶液を添加して室温で1時間の間細胞と反応させた。もう一度、上記のような方法で組織を洗い、IDO(1:100)に対する1次抗体を処理し、室温で1時間の間細胞と反応させた後、Carl Zeiss LSM 700 confocal microscopy systemを用いて組織から蛍光イメージを得た。これを通じて、核(青色; Vector Laboratories, Burlingame, CA)、IDO(緑色)及びCM-DiI-labeled MSCs(赤色)を検出した。共焦点顕微鏡イメージは、LSM 700 Zenソフトウェアを用いて分析した。

10

20

【0075】

1-8. RT-PCRの分析

間葉系幹細胞を200 IU/mLのIFN- γ 及び/又は100 μ g/mLのpoly I:C(Invitrogen-Gibco)が存在するか存在しない条件で24時間の間培養した後、QIAGEN RNeasy Mini Kit(QIAGEN, Valencia, CA)を用いて総RNAを抽出し、前記RNAに対して、PrimeScriptTM 1st strand cDNA synthesis kit(Takara Shuzo, Shiga, Japan)を用いて総RT-PCR(semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction)を実行してcDNAを合成した。

30

【0076】

前記PCRで用いたプライマー配列は、下記に示した通りである。

IDO forward: 5'-GCGCTGTTGGAAATAGCTTC-3'

IDO reverse: 5'-CAGGACGTCAAAGCACTGAA-3'(234 bp)

IFN- γ forward: 5'-TTGGCTTTTCAGCTCTGCATC-3'

IFN- γ reverse: 5'-GGAGACAATTTGGCTCTGCATT-3'(201 bp)

GAPDH forward: 5'-TCAACGGATTTGGTCGTATTGGG-3'

40

GAPDH reverse: 5'-TGATTTTGGAGGGATCTCGC-3'(234 bp)

【0077】

1-9. 統計分析

全ての実験結果は、平均 \pm 標準偏差で示し、各実験条件間の差は、t-test又は分散分析を用いて分析した。P-valueが0.05未満である場合に統計的有意性があると判断した。

【0078】

2. 実験結果

2-1. ヒト組織由来の間葉系幹細胞の特性分析

50

骨髄、臍帯血及びホウオートンゼリーから分離したヒト間葉系幹細胞を観察した結果、線維芽細胞の形態であることを確認した。一方、脂肪組織由来の間葉系幹細胞は、小さくて紡錘模様であることを観察した(図1の(a))

【0079】

また、細胞分析を通じて表面に発現している抗原タンパク質を確認した結果、前記細胞は、全てCD73、CD90、CD105及びCD166を発現する一方、造血母細胞系統のマーカであるCD14、CD34、CD45及びHLA-DRは発現しないことを確認した(図1の(b))。

【0080】

また、間葉系幹細胞を骨形成、脂肪細胞形成及び軟骨形成の誘導培地で14~21日間培養した結果、それぞれアルカリホスファターゼ活性、中性脂肪液胞の蓄積及び軟骨細胞基質の蓄積を観察し、全ての間葉系幹細胞は、前記各培地で培養して分化を誘導したとき、その起源に関係なく骨、脂肪及び軟骨細胞の類似形態を示すことを確認した(図1の(c))。

【0081】

2-2. *in vitro* 及び *in vivo* モデルで間葉系幹細胞の免疫抑制特性の確認

混合リンパ球反応(*mixed lymphocyte reaction*; MLR)を通じて*naive* 間葉系幹細胞の免疫調節特性を評価した。

【0082】

まず、PHAを処理して活性化させた末梢血液単球細胞を骨髄、脂肪組織、臍帯血又はホウオートゼリー由来の間葉系幹細胞上で培養した結果、T-細胞の活性が顕著に減少した。このような結果から、共同培養時に間葉系幹細胞の数に依存的であることを確認した(図2)。また、他の組織に由来した間葉系幹細胞の免疫調節特性には、著しい差が現われなかった。このような結果は、脂肪組織、臍帯血及びホウオートンゼリー由来の間葉系幹細胞が骨髄誘導の間葉系幹細胞のようにT-細胞の増殖を抑制するのに効果的であることを意味する。

【0083】

次に、間葉系幹細胞によるT-細胞の増殖抑制が前記間葉系幹細胞により直接的に媒介されるのか可溶性因子によるのかを確認するために、トランスウェルシステムを用いて末梢血液単球細胞をトランスウェル挿入体内の間葉系幹細胞と共同培養した。

【0084】

その結果、図3に示したように、各組織に由来する間葉系幹細胞は、細胞の接触がない条件でもPHA刺激に反応する*hCD3+CD8+* T-細胞の増殖を抑制した。これは、直接的な細胞間接触がある条件で現われた増殖抑制レベルよりは少し減少された程度であった。前記結果は、細胞間の直接的な接触だけではなく可溶性因子も間葉系幹細胞の免疫調節効果に寄与することを意味する。

【0085】

また、*in vivo* で間葉系幹細胞の免疫抑制機能を確認するために、各マウスに末梢血液単球細胞及び各組織由来の間葉系幹細胞と一緒に注入した結果、図4に示したように、細胞を注入した後8週目に、ヒト末梢血液単球細胞を単独で注入するか前記細胞と間葉系幹細胞と一緒に1回注入したマウスは死んだ一方、間葉系幹細胞を2回注入したマウスの場合には、20%程度が生存した。

【0086】

また、免疫抑制に対する可溶性因子の役目を確認するために、間葉系幹細胞が存在するか存在しない条件で培養した*mitogen-activated* T-細胞の培養上澄み液を分析した。その結果、末梢血液単球細胞が活性化されたとき、多様なサイトカイン、ケモカイン及び成長因子の分泌が増加した。一方で、間葉系幹細胞が存在する場合には、その起源に関係なくIFN- 及びTNF- のような炎症性サイトカインの量が減少した。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 7 】

また、前記 *in vitro* 結果と類似に、移植片対宿主病の動物モデルに末梢血液単球細胞を骨髄由来の間葉系幹細胞とともに注入した場合にも、血液内の I F N - のレベルが顕著に減少することを確認した（図 5）。

【 0 0 8 8 】

2 - 3 . I F N - 刺激による間葉系幹細胞の免疫抑制特性向上の確認

末梢血液単球細胞は、間葉系幹細胞とともに培養したとき増殖が抑制され、I F N - で刺激した間葉系幹細胞と共同培養した場合には、増殖が一層抑制されたことを確認した（図 6）。

【 0 0 8 9 】

したがって、このような I F N - で刺激した間葉系幹細胞が移植片対宿主病を改善させるかを確認するために、ヒト末梢血液単球細胞を注入したマウスに 7 日間隔で I F N - で刺激した間葉系幹細胞を 2 回注入した。その後、末梢血液単球細胞のみを単独で注入したグループ、末梢血液単球細胞と間葉系幹細胞を一緒に注入したグループ、末梢血液単球細胞と I F N - で刺激した間葉系幹細胞を一緒に注入したグループ又は J A K 抑制剤である A G 4 9 0 を前処理して末梢血液単球細胞と I F N - で刺激した間葉系幹細胞を一緒に注入したグループにおけるマウス生存率を比較した。

【 0 0 9 0 】

その結果、図 7 に示したように、末梢血液単球細胞を単独で注入したマウスに比べて I F N - で刺激した間葉系幹細胞を一緒に注入したマウスの生存率が改善されたことを確認した。また、このような生存率の向上結果は、末梢血液単球細胞と I F N - を処理しない間葉系幹細胞を一緒に注入した場合に比べて一層高く現われた。一方、J A K 抑制剤を前処理した場合には、I F N - で刺激した間葉系幹細胞による移植片対宿主病マウスの生存率向上を減少させることを確認した。

【 0 0 9 1 】

また、I F N - で刺激した間葉系幹細胞が移植片対宿主病のマウスモデルで T 細胞の増殖抑制を誘導するかを確認するために、前記各マウスグループの血液をフローサイトメトリ法を通じて確認した結果、図 8 に示したように、末梢血液単球細胞と間葉系幹細胞を一緒に注入した場合には、C D 4 5 + 及び C D 4 5 + C D 3 + 細胞の数が減少したが、I F N - で刺激した間葉系幹細胞を一緒に注入した場合には、減少程度が一層高く現われた。

【 0 0 9 2 】

また、組織学的分析結果、図 9 に示したように、I F N - で刺激した間葉系幹細胞を一緒に注入したとき、移植片対宿主病マウスの臨床的症状及び皮膚及び小腸で免疫細胞の浸透が効果的に減少したことを確認した。このような結果は、I F N - 刺激が間葉系幹細胞の免疫抑制特性を向上させることを意味する。

【 0 0 9 3 】

次に、間葉系幹細胞の遺伝子発現に I F N - が及ぼす影響を確認するために、I F N - の刺激前後の間葉系幹細胞の遺伝子発現プロファイルと比較した。その結果、骨髄由来の間葉系幹細胞は、I F N - で刺激したとき、形態変化には著しい差がなかったが、（図 1 0 の（a））、遺伝子発現プロファイルには多くの差があることを確認した（図 1 0 の（b））。

【 0 0 9 4 】

実際に、I F N - で刺激した間葉系幹細胞で 5 1 2 個の遺伝子の発現が増加し、下記表 1 に示したように、前記遺伝子のうち 4 個の遺伝子は間葉系幹細胞の免疫抑制機能に関連していることが分かった。

【 0 0 9 5 】

10

20

30

40

【表 1】

Symbol	Full Name	*Fold Change	Adjusted P-value	Biological Function	Gene Ontology Category
CXCL9	C-X-C motif chemokine ligand 9	312.27	< 1.00E-04	A type of T-cell chemoattractant induced by IFN- γ	GO:0006935 _ chemotaxis GO:0006955 _ immune response
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10, also known as IP-10	218.98	< 1.00E-04	Involved in chemoattraction for immune cells	GO:0006935 _ chemotaxis GO:0006955 _ immune response
CCL8	Chemokine (C-C motif) ligand 8, also known as MCP-2	204.78	< 1.00E-04	Associated with survival rate of acute GVHD	GO:0006935 _ chemotaxis GO:0006955 _ immune response
IDO	Indoleamine-pyrrrole 2,3-dioxygenase	203.53	< 1.00E-04	Causes depletion of tryptophan to halt growth of microbes and T-cells	GO:0006569 _ tryptophan catabolic process GO:0033754 _ indoleamine 2,3-dioxygenase activity

10

【0096】

20

また、qRT-PCRを実施した結果、図11に示したように、IFN- γ で刺激した間葉系幹細胞でCXCL9(C-X-C motif)、CXCL10、CCL8(C-C motif)及びIDO遺伝子のmRNA発現レベルが顕著に増加することを確認した。

【0097】

2-4. JAK/STAT1信号伝達経路を通じたIFN- γ 媒介IDO発現誘導の確認
前記結果を通じて骨髄由来の間葉系幹細胞をIFN- γ で刺激したとき、IDO発現が増加することを確認した。このような結果は、他の組織由来の間葉系幹細胞でも同一に現われることを確認した(図12)。

【0098】

30

IFN- γ 信号伝達は、JAK/STAT1経路を通じて起き、STAT1は、リン酸化されて核に移動して転写を媒介する。したがって、免疫プロテオミクス分析結果、図13に示したように、IFN- γ で刺激しない間葉系幹細胞と比較してIFN- γ で刺激した細胞でSTAT1の活性化(STAT1リン酸化)を確認した。

【0099】

また、JAK/STAT1経路とIDO発現間の相関関係を確認するために、JAK抑制剤(AG490)を処理するかSTAT1を標的するsiRNAを処理した後、免疫プロテオミクスを実施した結果、図14に示したように、JAK抑制剤又はSTAT1標的siRNAを処理した場合、IDOが少量発現するか発現しないことを確認した。これは、IFN- γ によるIDOの発現増加がJAK/STAT1経路を通じて起きることを意味する。

40

【0100】

MLR結果は、間葉系幹細胞が末梢血液単球細胞の増殖を抑制することを示したが、このような効果は、抗IFN- γ の抗体処理によって現われないことを確認した。これはT-細胞を含む活性化された免疫細胞により分泌されるIFN- γ がIDO発現を通じて間葉系幹細胞の免疫調節特性において非常に重要な役目をするを示す。また、このような結果は、STAT1標的siRNA処理を通じてIFN- γ の下位信号伝達経路が抑制されることを通じて確認できる(図15)。

【0101】

結論的に、間葉系幹細胞でIFN- γ /JAK/STAT1経路を通じたIDOの発現誘

50

導は、間葉系幹細胞の免疫抑制機能に非常に重要であることが分かる。

【0102】

また、IDO mRNAの発現は、間葉系幹細胞にIFN- γ を少なくとも4時間の間処理したときに増加した。1 IU/mLのIFN- γ を24時間の間処理した場合には、IDO mRNAの発現が少なくとも1日間維持され、IDOタンパク質レベルは、少なくとも7日間維持されることを確認した。また、同一の間葉系幹細胞に1 IU/mLのIFN- γ を再処理したとき、IDO mRNAがさらに発現され、そのタンパク質レベルは一層増加することを確認した。

【0103】

2-5. ヒト間葉系幹細胞の免疫抑制特性でIDOの役目糾明

移植片対宿主病のマウスに注入された間葉系幹細胞が前記マウスの組織に存在するかを評価するために、CM-DiI染色された間葉系幹細胞を注入し、共焦点顕微鏡で観察した。

【0104】

その結果、図16に示したように、前記間葉系幹細胞が組織内に浸透することを観察し、IFN- γ が処理された間葉系幹細胞を注入したとき、間葉系幹細胞でIDOの発現が誘導されることを確認した。一方、前記間葉系幹細胞を注入する前にJAK抑制剤であるAG490を処理したときには、組織で間葉系幹細胞の浸透が減少し、IDOの発現も減少した。

【0105】

前記結果を土台に、間葉系幹細胞の免疫抑制特性においてIDOの役目を確認するために、IDO発現を阻害するshRNAを処理した。

【0106】

その結果、図17に示したように、IDOを標的するshRNAによりIFN- γ で刺激した間葉系幹細胞でIDOの発現レベルが顕著に抑制されたことを確認し(図17の(a)、(b))、また、末梢血液単球細胞をPBS又はIFN- γ を処理した間葉系幹細胞とともに共同培養したとき、PHAにより誘導される末梢血液単球細胞の増殖が顕著に復旧され、このとき、IDO標的shRNAによりIDOの発現が抑制されることを確認した(図17の(c))。

【0107】

これに加えて、IDOの発現が減少された間葉系幹細胞にIFN- γ を処理するか処理しない状態で、移植片対宿主病のマウスに7日間隔で2回静脈投与した結果、図18に示したように、末梢血液単球細胞のみを単独で注入したグループと、末梢血液単球細胞をIDOの発現が減少された間葉系幹細胞とともに注入したグループで有意な生存率の差はなかった。

【0108】

このような生存結果に応じて、免疫蛍光イメージ結果、図19に示したように、移植片対宿主病のマウスから得た小腸及び皮膚組織では、IDOダウン調節された間葉系幹細胞内にIDOがほとんど発見されなかった。

【0109】

次に、IDO及びRFPを発現するレンチウイルスベクターを導入してIDOを安定的に発現する間葉系幹細胞を製作した後、これらIDOを過発現する間葉系幹細胞の免疫抑制能をin vitro及in vivoモデルで確認した。

【0110】

その結果、図20に示したように、末梢血液単球細胞をIDO過発現の間葉系幹細胞と共同培養したとき、PHAにより誘導された末梢血液単球細胞の増殖が顕著に抑制された。このような結果は、IFN- γ で刺激した間葉系幹細胞と共同培養した場合の結果と類似していた。

【0111】

さらに、移植片対宿主病のマウスでIDO過発現の間葉系幹細胞グループの生存率もIF

10

20

30

40

50

N - が処理された間葉系幹細胞と共同培養したグループのマウス生存率程度向上されたことを確認した(図21)。

【0112】

このような生存率結果に応じて、免疫蛍光イメージ結果、図22に示したように、移植片対宿主病マウスの小腸及び皮膚組織でIDO過発現の間葉系幹細胞内にIDOが発現されることを確認した。

【0113】

結論的に、前記結果は、IFN- を処理した間葉系幹細胞が移植片対宿主病が誘導された組織に帰巢し得、IDO発現誘導を通じて免疫抑制機能を示し得ることを示す。

【0114】

2-6. IFN- 刺激によるIDO発現の誘導及びTLR3活性化の非誘導
従来、間葉系幹細胞でこれらの免疫抑制能のためにTLR3(Toll-like receptor 3)がIDOの発現を誘導すると報告されたことがあるので、本実施例では、IFN- により刺激された間葉系幹細胞とTLR3が活性化された間葉系幹細胞との間の免疫抑制の活性を比較した。

【0115】

その結果、図23に示したように、末梢血液単球細胞をpoly I:Cを処理してTLR3を活性化させた間葉系幹細胞と共同培養したとき、前記末梢血液単球細胞の増殖はほとんど抑制されない一方、IFN- で刺激した骨髄、脂肪組織、臍帯血及びホウオートンゼリー由来の間葉系幹細胞と共同培養した場合には、前記末梢血液単球細胞の増殖が顕著に抑制されることを確認した。

【0116】

このとき、ヒト間葉系幹細胞でIFN- 刺激又はTLR3活性化によるIFN- 発現誘導は観察されなかった。これは、ex vivo IFN- 刺激がヒト間葉系幹細胞の免疫抑制特性を増進させるための適切な手段であることを意味する。

【0117】

また、骨髄由来の間葉系幹細胞をIFN- で刺激したとき、IDO発現が誘導された一方、poly I:Cを処理してTLR3を活性化させた間葉系幹細胞の場合には、IDO発現が多少増加した。このような結果は、脂肪組織、臍帯血及びホウオートンゼリーのような多様な組織に由来する間葉系幹細胞でも同一に現われた(図24)。

【0118】

また、図25に示したように、TLR3を活性化させた全ての骨髄由来の間葉系幹細胞で他の機能と関連されたCXCL10、IL-6及びIL-8のような遺伝子は高く発現される一方、STAT1の活性化(STAT1リン酸化)は観察されなかった。

【0119】

前記結果によると、IFN- 刺激がJAK/STAT1経路を通じて間葉系幹細胞で(免疫抑制能のために)IDOの発現を誘導する一方、TLR3の活性化はIDOの発現を誘導しないことが分かる。

【0120】

2-7. IDOバイオマーカー以外の残りの候補マーカー(CXCL9、CXCL10、ICAM2、B7-H1、PTGDS、CXCL11、VCAM1、ICAM1、TRAIL)

脂肪組織由来の間葉系幹細胞(AT-MSC)で機能遺伝子(IDO、CXCL9、CXCL10、CXCL11、ICAM1、ICAM2、B7-H1、PTGDS、VCAM1及びTRAIL)発現に及ぼす影響を、IFN- 刺激、TNF- 刺激及びTLR3活性化(poly I:C刺激)によって比較評価するためにRT-PCRを実施した。

【0121】

その結果、図26に示したように、IFN- 刺激特異的にIDO、CXCL9、CXCL10、CXCL11、ICAM1、ICAM2、B7-H1、PTGDS、VCAM1及びTRAILの発現が誘導されることが分かった。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 2 】

このような結果は、間葉系幹細胞に I F N - で前処理刺激した後に免疫疾患の治療のための高効率間葉系を選別するにおいて、I D O、C X C L 9、C X C L 1 0、C X C L 1 1、I C A M 1、I C A M 2、B 7 - H 1、P T G D S、V C A M 1 及び T R A I L が免疫抑制バイオマーカーとして有効であることを意味する。

【 0 1 2 3 】

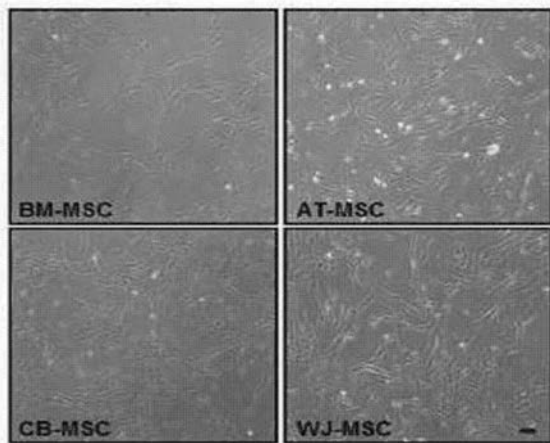
上述した本発明の説明は例示のためのもので、本発明が属する技術分野において通常の知識を有した者は、本発明の技術的思想や必須的な特徴を変更しなくても他の具体的な形態に容易に変形が可能であることが理解できる。したがって、以上で記述した実施例は、全て面で例示的なものであり、限定的ではないことで理解すべきである。

【 産 業 上 の 利 用 可 能 性 】

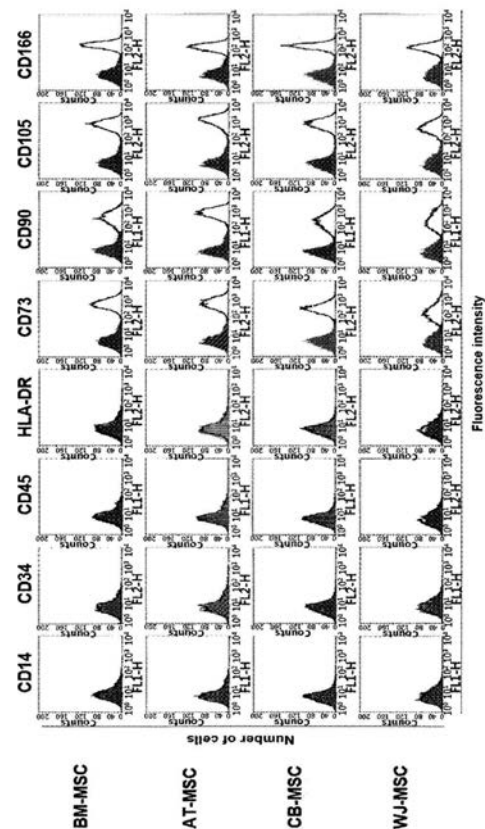
【 0 1 2 4 】

本発明は、移植片対宿主病、自己免疫疾患を含む多様な免疫疾患の臨床的治療のための免疫反応の調節能力を有する機能的に優れた間葉系幹細胞が得られる有用な方法を提供することで、免疫疾患の治療法で有用に用いられ得る。

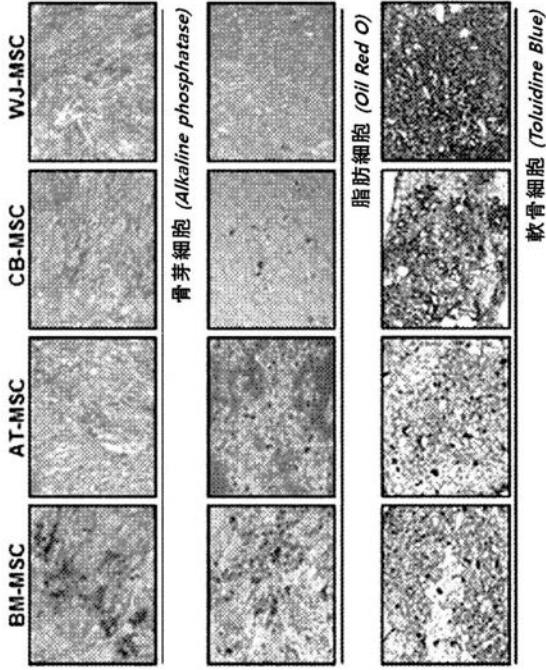
【 図 1 a 】



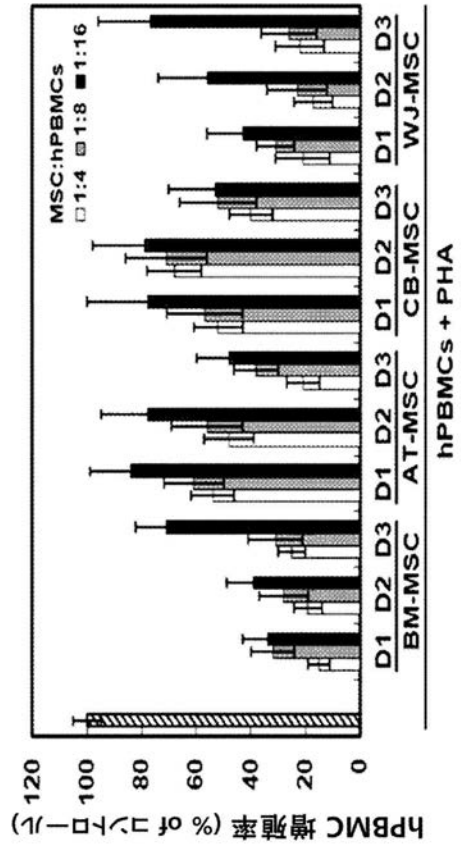
【 図 1 b 】



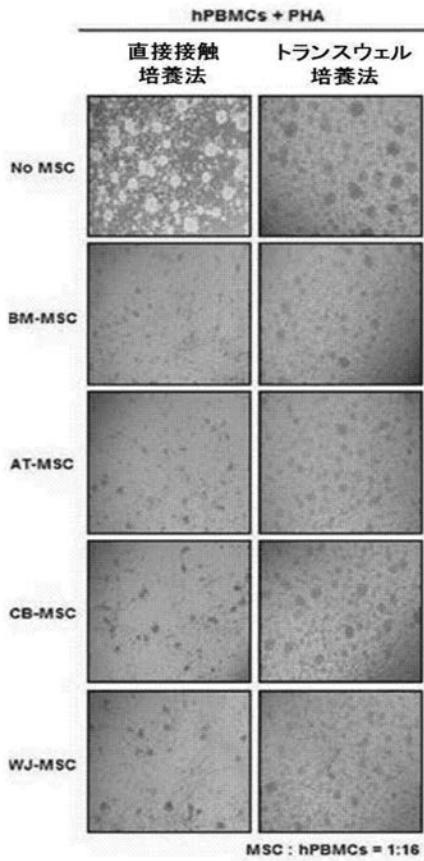
【 図 1 c 】



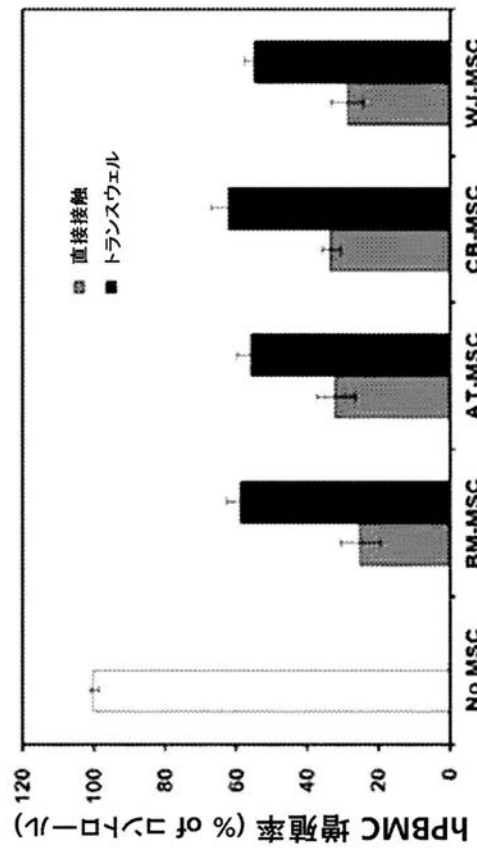
【 図 2 】



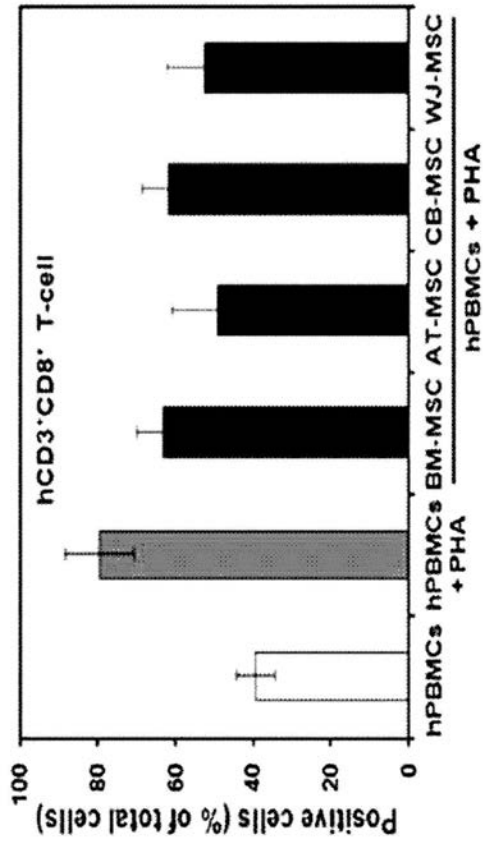
【 図 3 a 】



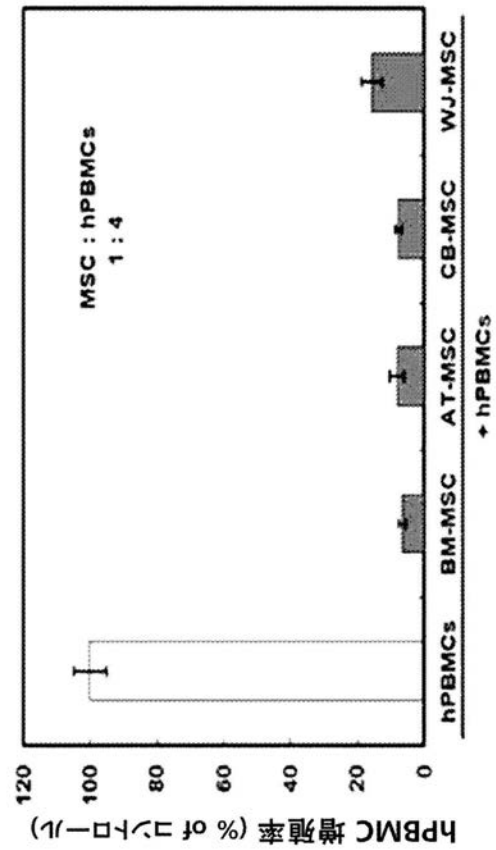
【 図 3 b 】



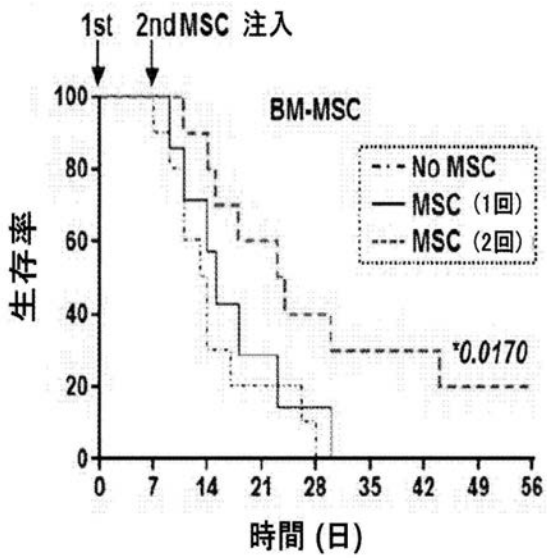
【 図 3 c 】



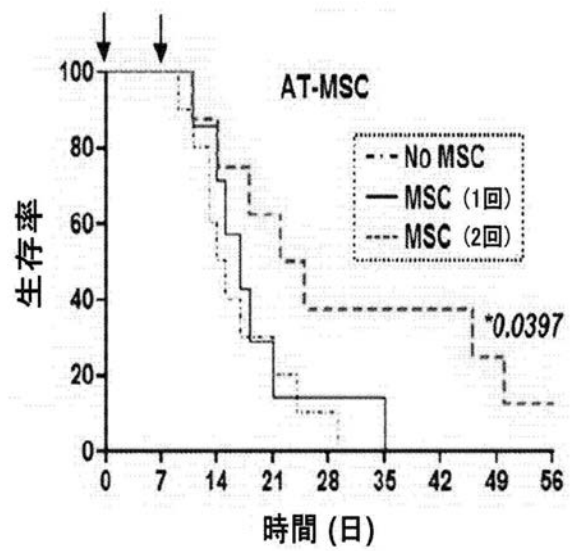
【 図 3 d 】



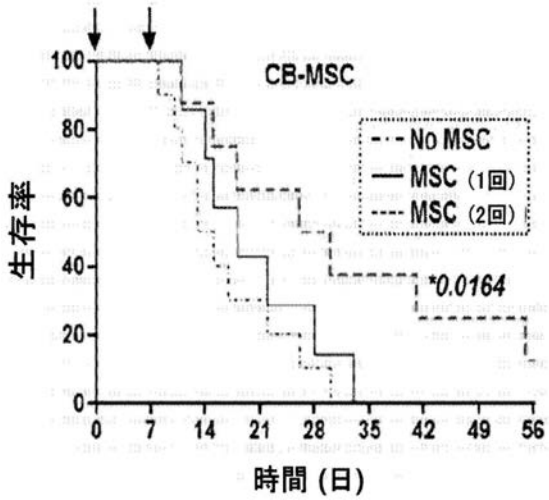
【 図 4 a 】



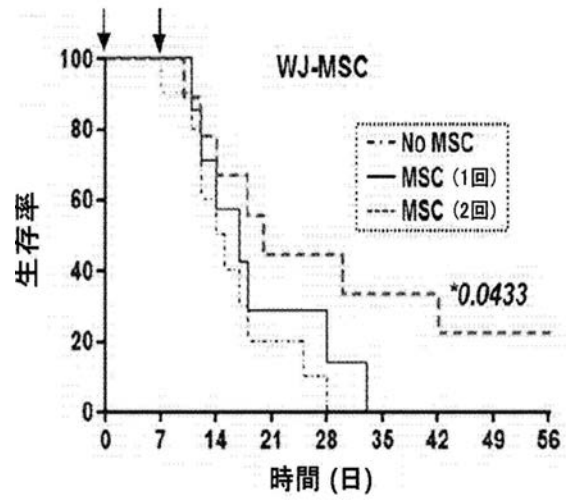
【 図 4 b 】



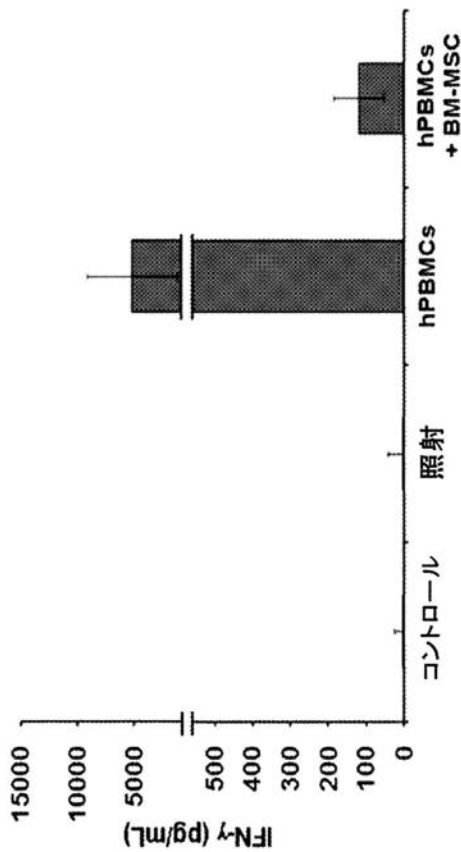
【 図 4 c 】



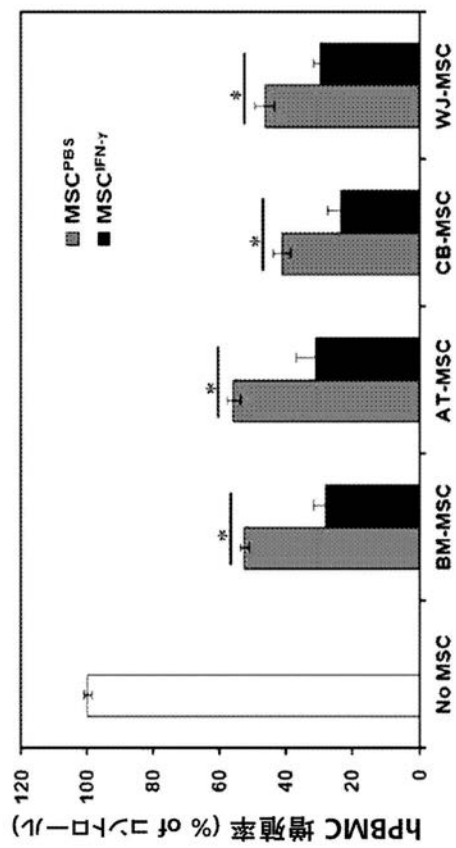
【 図 4 d 】



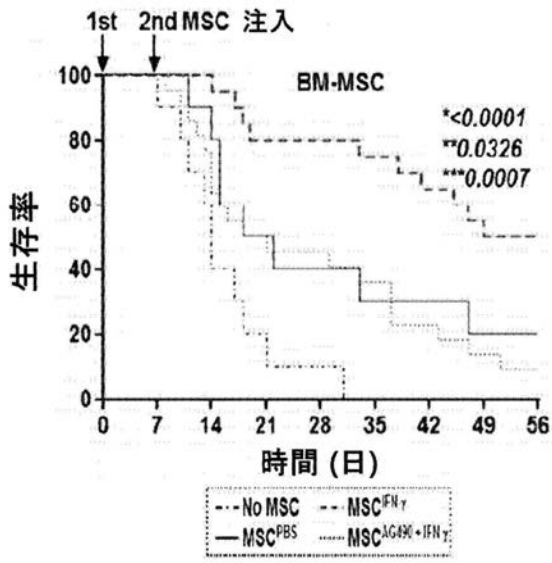
【 図 5 】



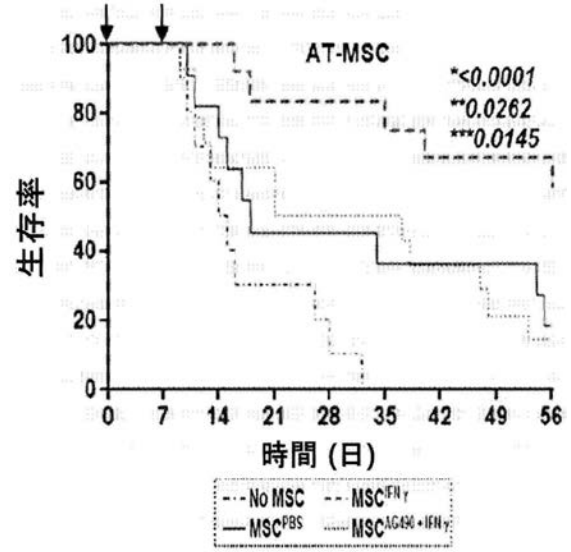
【 図 6 】



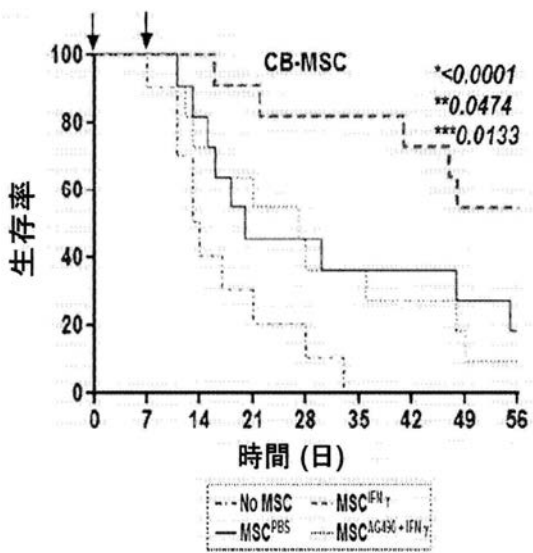
【 図 7 a 】



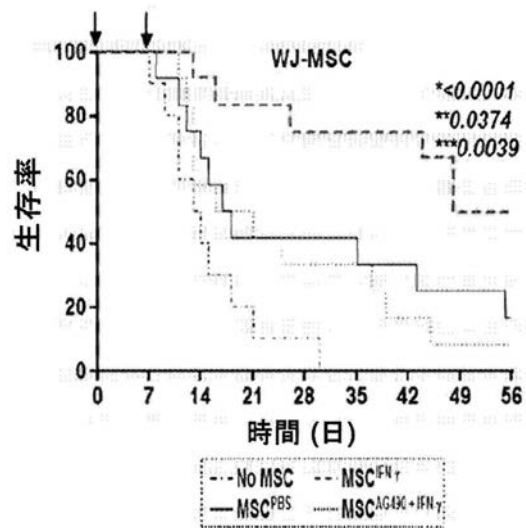
【 図 7 b 】



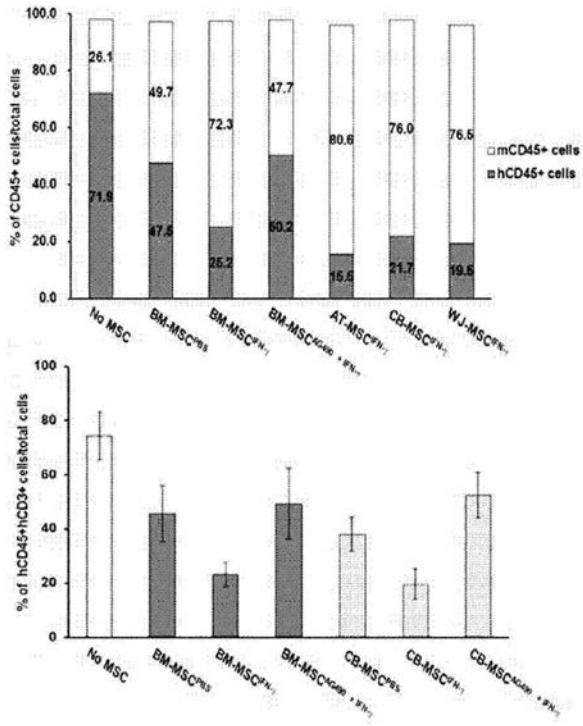
【 図 7 c 】



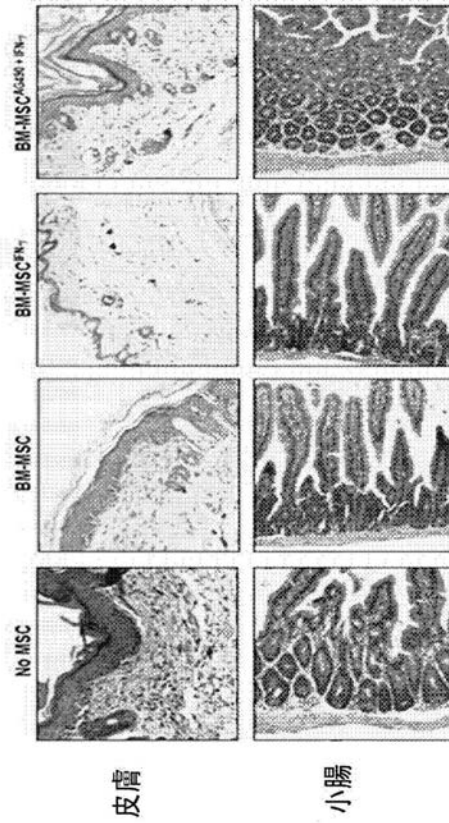
【 図 7 d 】



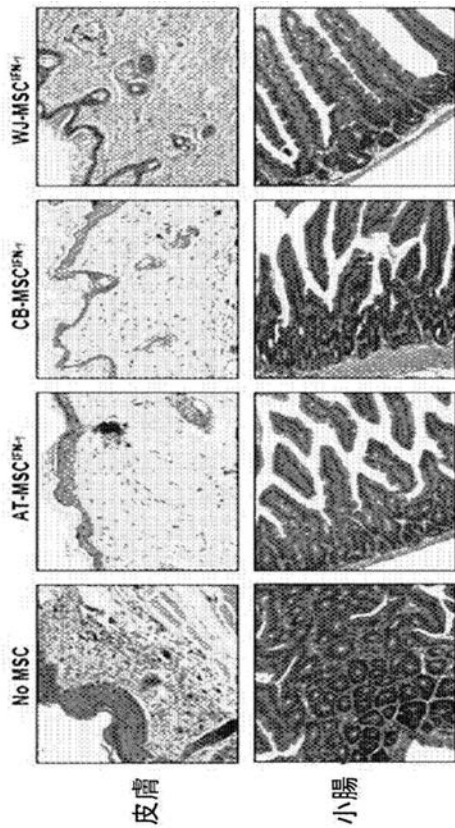
【 図 8 】



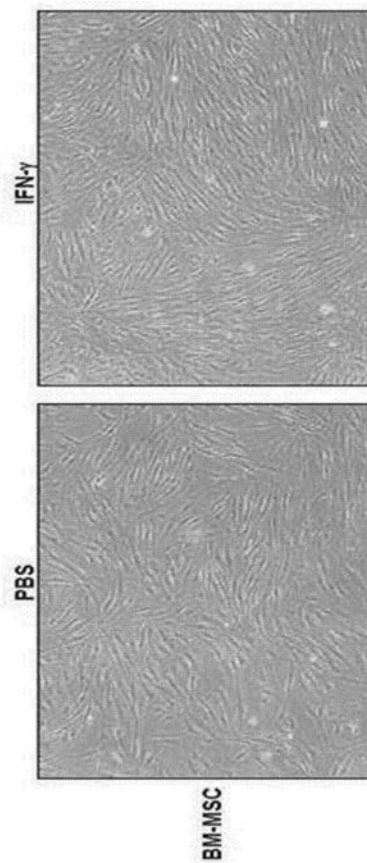
【 図 9 a 】



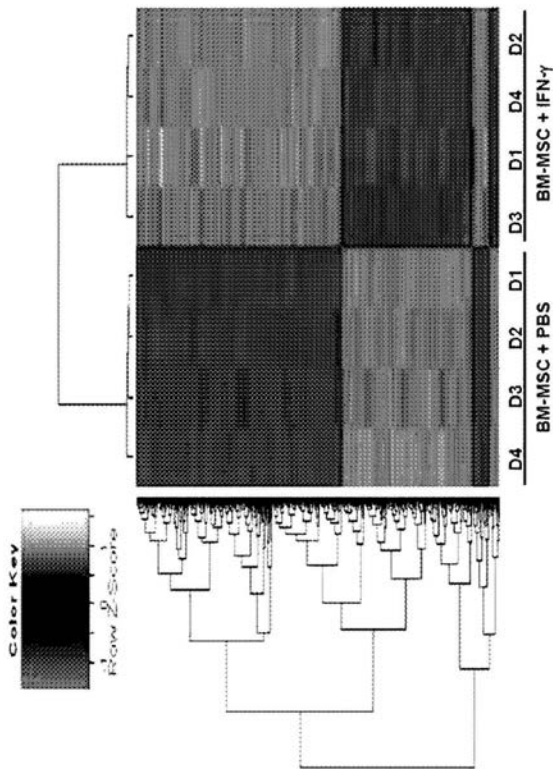
【 図 9 b 】



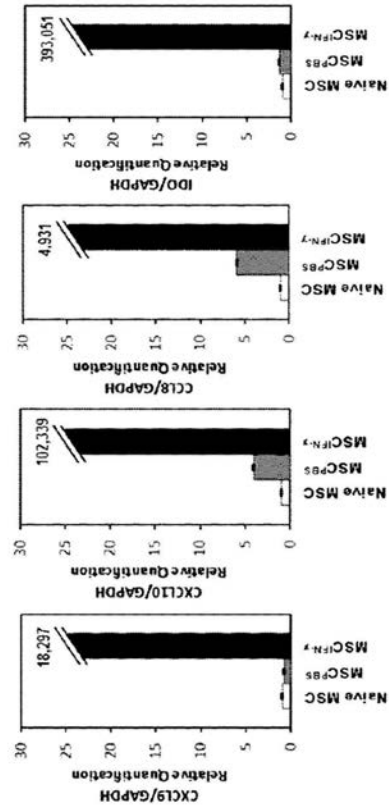
【 図 10 a 】



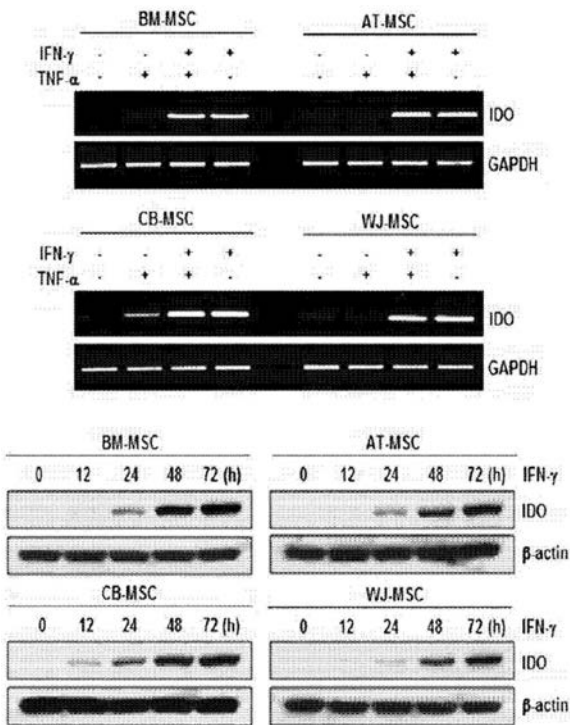
【 図 1 0 b 】



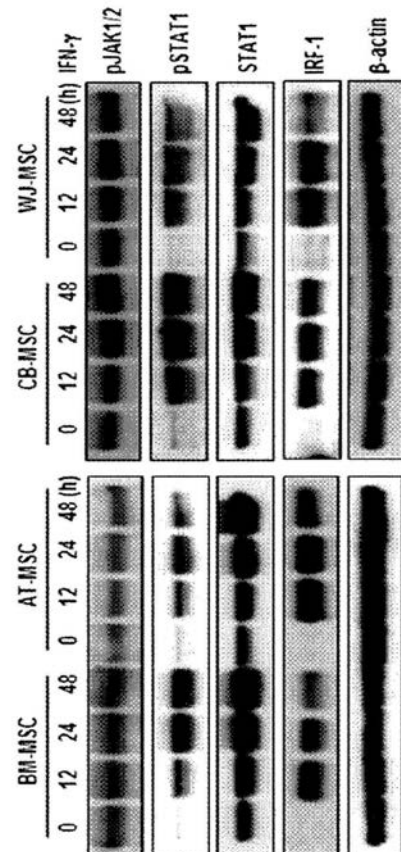
【 図 1 1 】



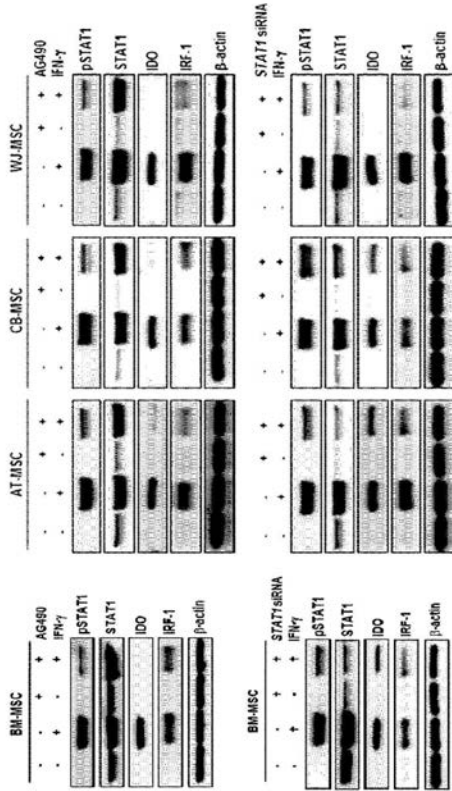
【 図 1 2 】



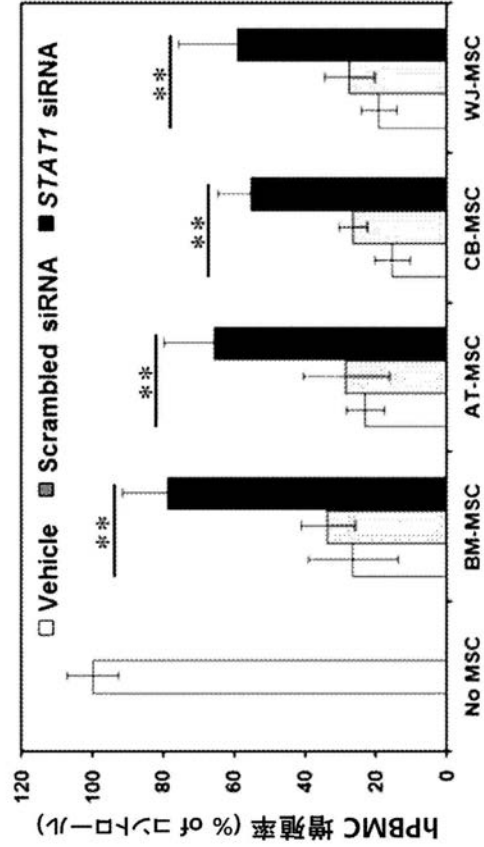
【 図 1 3 】



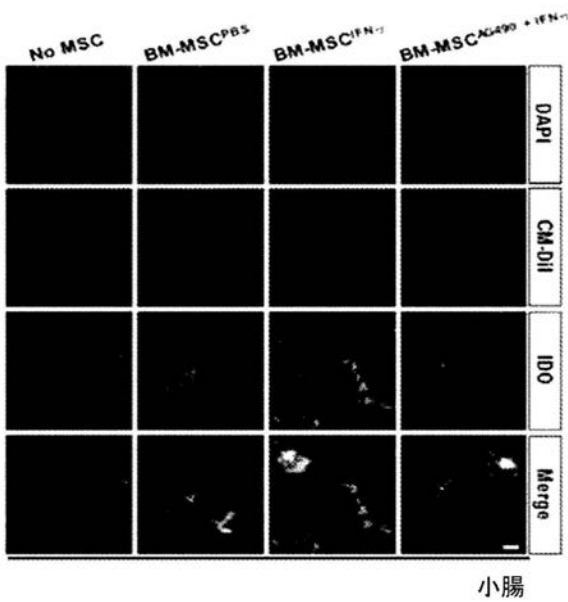
【 図 1 4 】



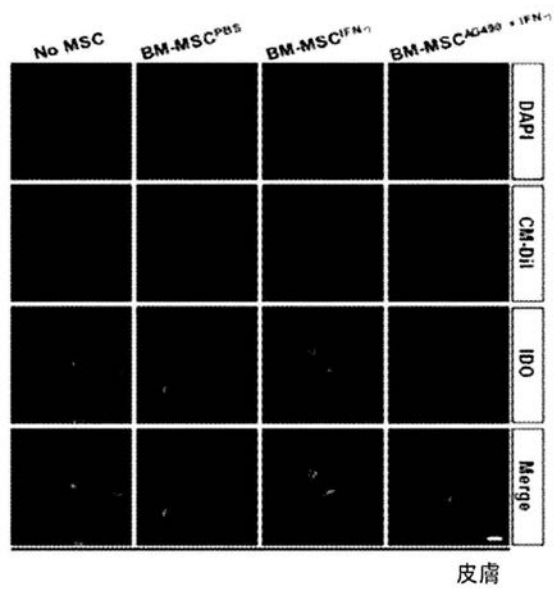
【 図 1 5 】



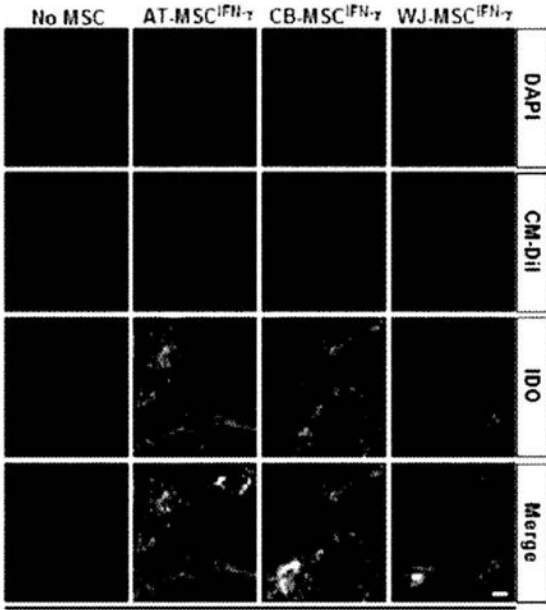
【 図 1 6 a 】



【 図 1 6 b 】

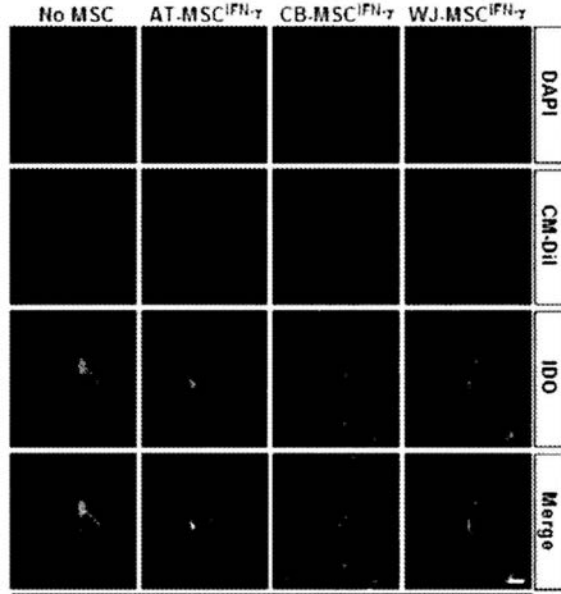


【 図 1 6 c 】



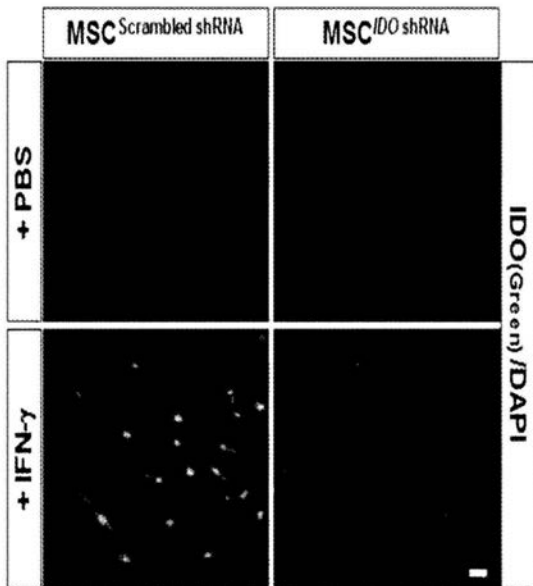
小腸

【 図 1 6 d 】

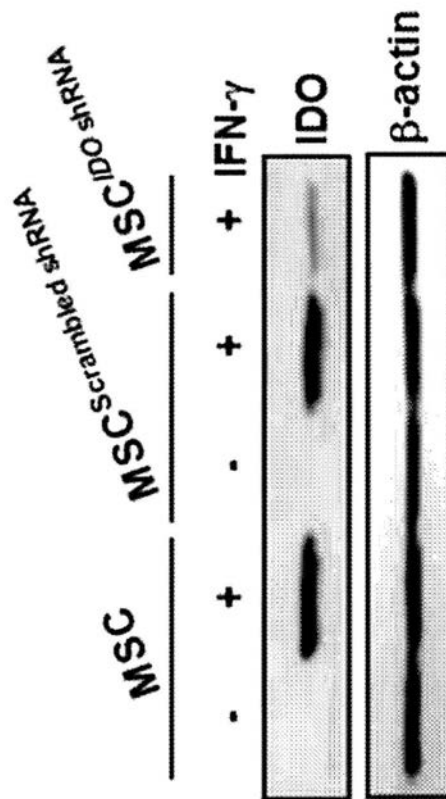


皮膚

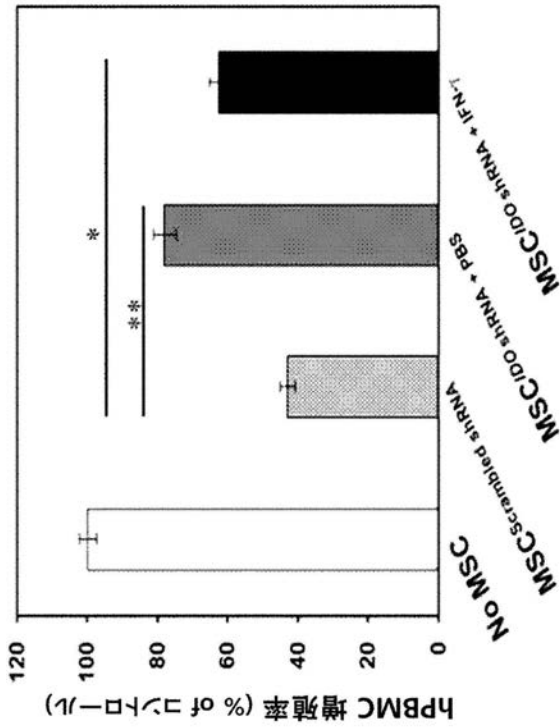
【 図 1 7 a 】



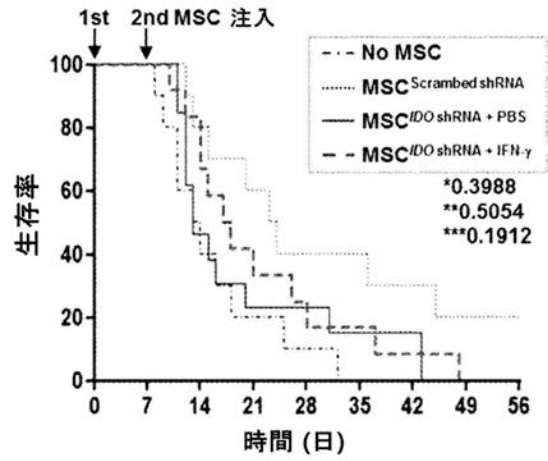
【 図 1 7 b 】



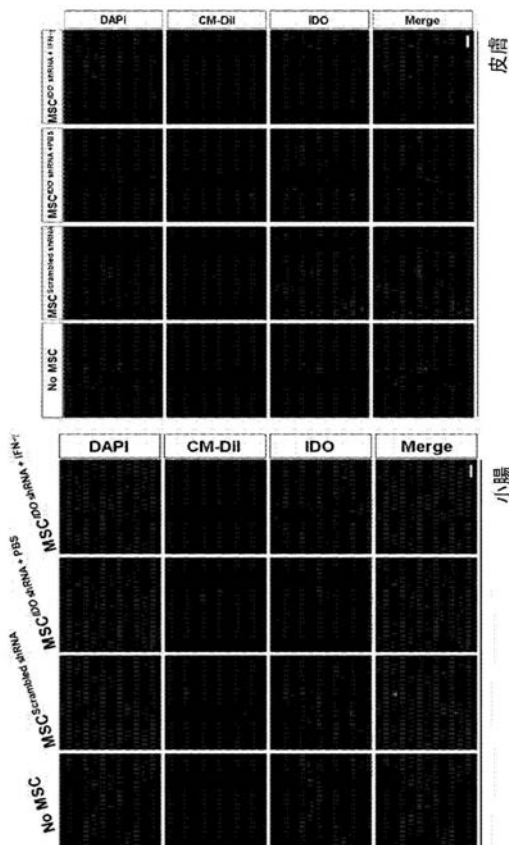
【 図 17 c 】



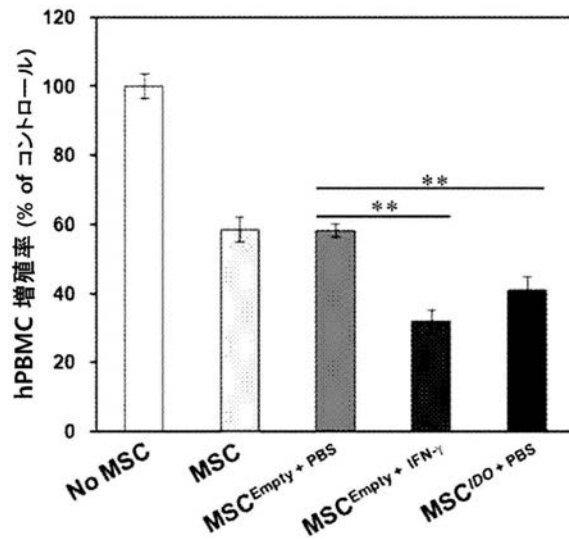
【 図 18 】



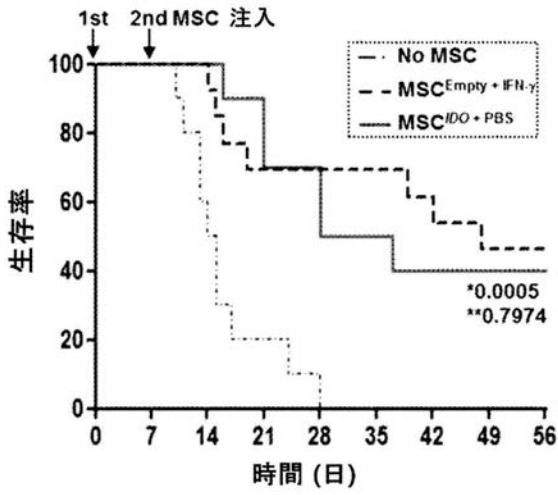
【 図 19 】



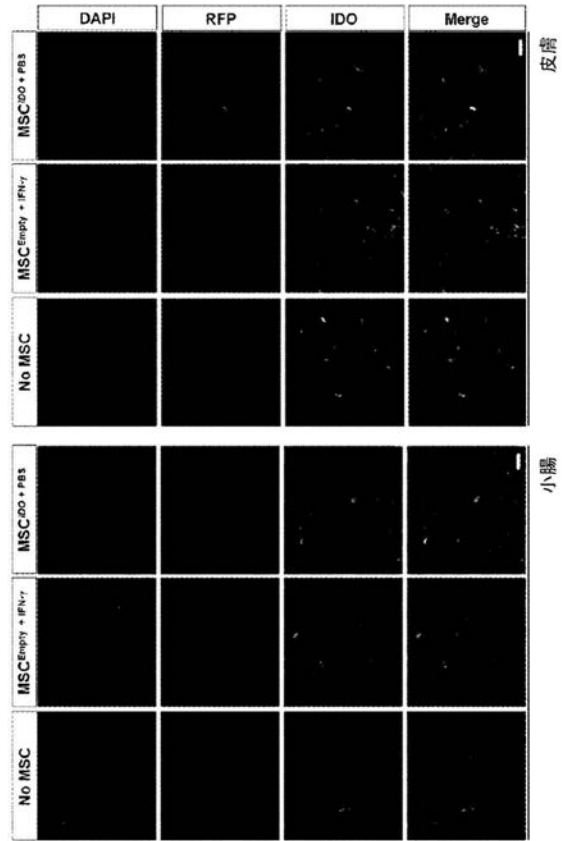
【 図 20 】



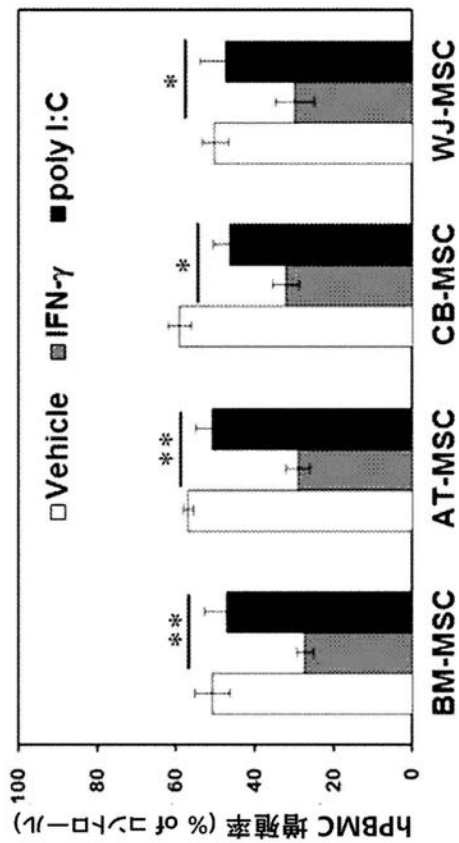
【 図 2 1 】



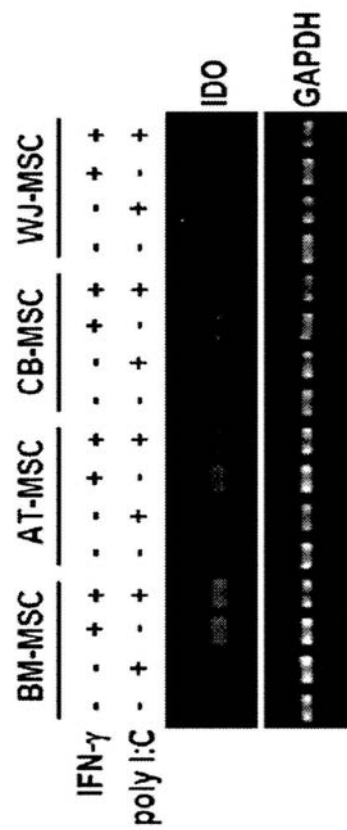
【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



【 図 2 4 a 】



【手続補正書】

【提出日】令和1年6月28日(2019.6.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

間葉系幹細胞をIFN- で前処理刺激した後に免疫抑制バイオマーカのレベルを測定するステップを含む、免疫疾患の治療のための高効率間葉系幹細胞の選別方法。

【請求項2】

前記方法は、下記のステップを含むことを特徴とする、請求項1に記載の選別方法：

- (a) 間葉系幹細胞を培養した後IFN- で処理するステップ；
- (b) 間葉系幹細胞で免疫抑制バイオマーカの発現レベルを測定するステップ；及び
- (c) 前記発現レベルがIFN- の未処理対照群と比較して増加する場合、免疫疾患の治療のための高効率間葉系幹細胞であると判定するステップ。

【請求項3】

前記免疫抑制バイオマーカは、IDO(indoleamine 2,3-dioxygenase)であることを特徴とする、請求項1に記載の選別方法。

【請求項4】

前記免疫抑制バイオマーカは、CXCL9(C-X-C motif ligand 9)、CXCL10(C-X-C motif ligand 10)、CXCL11(C-X-C motif ligand 11)、ICAM1(Inter Cellular Adhesion Molecule 1)、ICAM2(Inter Cellular Adhesion Molecule 2)、B7-H1(B7-homolog 1)、PTGDS(Prostaglandin D2 synthase)、VCAM1(Vascular Cell Adhesion Molecule 1)及びTRAIL(TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)からなる群より選択される一つ以上をさらに含むことを特徴とする、請求項3に記載の選別方法。

【請求項5】

前記高効率は、免疫抑制能であることを特徴とする、請求項1に記載の選別方法。

【請求項6】

前記間葉系幹細胞は、臍帯、臍帯血、骨髄、脂肪、筋肉、ハウートンゼリー、神経、皮膚、羊膜、絨毛膜、脱落膜及び胎盤からなる群より選択されるものに由来することを特徴とする、請求項1に記載の選別方法。

【請求項7】

前記免疫疾患は、移植片対宿主疾患、臓器移植時の拒絶反応、体液性拒絶反応、自己免疫疾患又はアレルギー性疾患であることを特徴とする、請求項1に記載の選別方法。

【請求項8】

前記自己免疫疾患は、クローン病、紅斑病、アトピー、関節リウマチ、橋本甲状腺炎、悪性貧血、アディソン病、第1型糖尿病、ルプス、慢性疲労症候群、繊維筋肉痛、甲状腺機能低下症と亢進症、硬皮症、ベーチェット病、炎症性腸疾患、多発性硬化症、重症筋無力症、メニエール症候群(Meniere's syndrome)、ギラン・バレー症候群(Guillian-Barre syndrome)、シェーグレン症候群(Sjogren's syndrome)、白斑症、子宮内膜症、乾癬、全身性硬皮症、喘息又は潰瘍性大腸炎であることを特徴とする、請求項7に記載の選別方法。

【請求項9】

前記IDOの発現は、IFN- で刺激された間葉系幹細胞でJAK/STAT1信号経

路を通じて増加されることを特徴とする、請求項 3 に記載の選別方法。

【請求項 10】

前記ステップ (a) の I F N - は、培地内に 1 - 1 0 0 I U / m l の濃度で含まれることを特徴とする、請求項 2 に記載の選別方法。

【請求項 11】

前記ステップ (b) のバイオマーカーの発現レベルは、ウエスタンブロッティング、抗体免疫沈降法、E L I S A、質量分析法、R T - P C R、競合的 R T - P C R (c o m p e t i t i v e R T - P C R)、リアルタイム R T - P C R (R e a l - t i m e R T - P C R)、R N a s e 保護分析法 (R P A : R N a s e p r o t e c t i o n a s s a y)、ノーザンブロッティング又は D N A チップを用いて測定することを特徴とする、請求項 2 に記載の選別方法。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の方法によって選別された、免疫疾患の治療のための高効能間葉系幹細胞。

【請求項 13】

前記免疫疾患は、移植片対宿主疾患、臓器移植時の拒絶反応、体液性拒絶反応、自己免疫疾患又はアレルギー性疾患であることを特徴とする、請求項 12 に記載の高効能間葉系幹細胞。

【請求項 14】

前記高効能は、免疫抑制能であることを特徴とする、請求項 12 に記載の高効能間葉系幹細胞。

【請求項 15】

前記間葉系幹細胞は、臍帯、臍帯血、骨髄、脂肪、筋肉、神経、皮膚、羊膜及び胎盤に由来することを特徴とする、請求項 12 に記載の高効能間葉系幹細胞。

【請求項 16】

前記間葉系幹細胞は、自家、他家又は同種異系来由であることを特徴とする、請求項 12 に記載の高効能間葉系幹細胞。

【請求項 17】

請求項 12 に記載の高効能間葉系幹細胞を含有する、免疫疾患治療用医薬組成物。

【請求項 18】

請求項 12 に記載の高効能間葉系幹細胞を含有する、移植片対宿主疾患治療用医薬製剤。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0028】

また、本発明は、前記高効能間葉系幹細胞を含有する免疫疾患治療用医薬組成物を提供する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

また、本発明は、前記高効能間葉系幹細胞を含有する移植片対宿主疾患治療用医薬製剤を提供する。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0055】

また、本発明は、前記高効能間葉系細胞を含有する免疫疾患の治療用薬学組成物 / 薬学製剤を提供する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0056


【補正方法】変更

【補正の内容】

【0056】

本発明で「医薬組成物」は、既存の治療活性成分、その他補助剤、薬剤学的に許容可能な担体などの成分をさらに含み得る。前記薬剤学的に許容可能な担体は、食塩水、滅菌水、リンゲル液、緩衝食塩水、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール及びエタノールを含む。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2017/010592
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>G01N 33/50(2006.01)i, A61K 35/28(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/50; A61K 35/12; A61K 35/28; C12N 5/0775		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: mesenchymal stem cell, IFN- γ , immunosuppressive ability, bio marker		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE, Myoung Woo et al., "Strategies to Improve the Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells", Stem Cell Research & Therapy, 2015, vol. 6, article no. 179 (pages 1-10) See abstract; pages 2 and 5-7; figure 1.	1-18,20
X	POLCHERT, David et al., "IFN- γ Activation of Mesenchymal Stem Cells for Treatment and Prevention of Graft versus Host Disease", European Journal of Immunology, 2008, vol. 38, pages 1745-1755 See abstract; page 1746, left column; page 1748, left column; page 1750, right column, second paragraph.	1-18,20
X	RYAN, J. M. et al., "Interferon- γ Does not Break, but Promotes the Immuno-suppressive Capacity of Adult Human Mesenchymal Stem Cells", Clinical & Experimental Immunology, 2007, vol. 149, pages 353-363 See abstract; page 353, right column, second paragraph-page 354, left column; table 1; figure 6.	1-18,20
A	YOO, Keon Hee et al., "Comparison of Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived from Adult Human Tissues", Cellular Immunology, 2009, vol. 259, pages 150-156 See the entire document.	1-18,20
<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 09 APRIL 2018 (09.04.2018)		Date of mailing of the international search report 09 APRIL 2018 (09.04.2018)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korea Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seomsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/010592

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2015-0191699 A1 (IMSTEM BIOTECHNOLOGY, INC.) 09 July 2015 See paragraphs [0032] and [0146].	1-18,20
PX	KR 10-2017-0054262 A (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) 17 May 2017 See claims 1-14; paragraphs [0037], [0047]-[0062] and [0072]-[0078]; figures 3 and 5.	1-18,20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/010592

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 19
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 19 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/010592

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2015-0191699 A1	09/07/2015	AU 2013-290146 A1	05/02/2015
		CA 2876512 A1	16/01/2014
		CN 104487568 A	01/04/2015
		CN 104487568 B	15/08/2017
		EP 2872619 A2	20/05/2015
		HK 1208055 A1	19/02/2016
		JP 2015-523083 A	13/08/2015
		US 2017-0290664 A1	12/10/2017
		US 9725698 B2	08/08/2017
		WO 2014-011881 A2	16/01/2014
		WO 2014-011881 A3	03/04/2014
		KR 10-2017-0054262 A	17/05/2017

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/010592

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/50(2006.01)i, A61K 35/28(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/50; A61K 35/12; A61K 35/28; C12N 5/0775		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 중간엽 줄기세포, IFN- γ , 면역 억제능, 바이오마커		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	LBE, MYOUNG WOO 등, 'Strategies to improve the immunosuppressive properties of human mesenchymal stem cells', Stem Cell Research & Therapy, 2015, 제6권, 아티클 번호 179(1-10 페이지) 초록; 페이지 2 및 5-7; 도면 1 참조.	1-18, 20
X	POLCHERT, DAVID 등, 'IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease', European Journal of Immunology, 2008, 제38권, 1745-1755 페이지 초록; 페이지 1746, 좌컬럼; 페이지 1748, 좌컬럼; 페이지 1750, 우컬럼, 두 번째 단락 참조.	1-18, 20
X	RYAN, J. M. 등, 'Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells', Clinical & Experimental Immunology, 2007, 제149권, 353-363 페이지 초록; 페이지 353, 우컬럼, 두 번째 단락-페이지 354, 좌컬럼; 표 1; 도면 6 참조.	1-18, 20
A	YOO, KBON HEE 등, 'Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues', Cellular Immunology, 2009, 제259권, 150-156 페이지 전체 문헌 참조.	1-18, 20
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리:		
"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌	"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌	
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌	"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.	
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌	"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.	
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌	"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌	
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2018년 04월 09일 (09.04.2018)	국제조사보고서 발송일 2018년 04월 09일 (09.04.2018)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150	

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/010592

C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2015-0191699 A1 (IMSTEM BIOTECHNOLOGY, INC.) 2015.07.09 단락 [0032] 및 [0146] 참조.	1-18, 20
PX	KR 10-2017-0054262 A (사회복지법인 삼성생명공익재단) 2017.05.17 청구항 1-14; 단락 [0037], [0047]-[0062] 및 [0072]-[0078]; 도면 3 및 5 참조.	1-18, 20

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/010592

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

- 1. 청구항: 19
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 19는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
- 2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
- 3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

- 1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
- 2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
- 3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
- 4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2017/010592

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2015-0191699 A1	2015/07/09	AU 2013-290146 A1 CA 2876512 A1 CN 104487568 A CN 104487568 B EP 2872619 A2 HK 1208055 A1 JP 2015-523083 A US 2017-0290864 A1 US 9725698 B2 WO 2014-011881 A2 WO 2014-011881 A3	2015/02/05 2014/01/16 2015/04/01 2017/08/15 2015/05/20 2016/02/19 2015/08/13 2017/10/12 2017/08/08 2014/01/16 2014/04/03
KR 10-2017-0054262 A	2017/05/17	WO 2017-082562 A1	2017/05/18

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	3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P	15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P	5/00 (2006.01)	A 6 1 P 5/00	
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P	27/16 (2006.01)	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28	
A 6 1 K	35/51 (2015.01)	A 6 1 K 35/51	
A 6 1 K	35/50 (2015.01)	A 6 1 K 35/50	
A 6 1 K	35/30 (2015.01)	A 6 1 K 35/30	
A 6 1 K	35/34 (2015.01)	A 6 1 K 35/34	
A 6 1 K	35/36 (2015.01)	A 6 1 K 35/36	
C 1 2 Q	1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 N	1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00	T
C 1 2 Q	1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851	Z
C 1 2 Q	1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686	Z
C 1 2 Q	1/6837 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6837	Z
G 0 1 N	33/68 (2006.01)	G 0 1 N 33/68	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N	33/573 (2006.01)	G 0 1 N 33/573	A
G 0 1 N	27/62 (2006.01)	G 0 1 N 27/62	V
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 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, RS, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

- 1 . T W E E N
- 2 . T R I T O N

(72)発明者 イ、ミョン ウ
大韓民国 0 5 6 1 4 ソウル ソンパ - グ サムハクサ - ロ 1 4 - ギル 2 7 ナンバー 2 0 3

(72)発明者 キム、デ ソン

大韓民国 10422 キョンギ - ド コヤン - シ イルサンドン - グ ジュンアン - ロ 112
9 103 - 1201

Fターム(参考) 2G041 CA01 FA12

2G045 AA25 DA20 DA36

4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR36 QR55 QR62

QS25 QS34 QX02

4B065 AA93X AB01 AC14 BA01 BD39 BD50 CA24 CA44 CA60

4C087 AA01 AA02 BB44 BB45 BB47 BB48 BB58 BB59 BB63 MA52

MA55 NA14 ZA02 ZA22 ZA34 ZA55 ZA59 ZA66 ZA81 ZA89

ZA94 ZB02 ZB08 ZB11 ZB13 ZC35

专利名称(译)	选择用于治疗免疫疾病的高效干细胞的方法		
公开(公告)号	JP2020500008A	公开(公告)日	2020-01-09
申请号	JP2019520694	申请日	2017-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	三星生命公益基金会		
申请(专利权)人(译)	三星生命公益基金会		
[标]发明人	イミヨンウ		
发明人	ユ、コンヒ イ、ミヨンウ キム、デソン		
IPC分类号	C12N5/0775 A61P37/06 A61P37/08 A61P1/00 A61P37/00 A61P3/10 A61P17/06 A61P11/06 A61P17/00 A61P15/00 A61P29/00 A61P19/02 A61P5/00 A61P7/06 A61P1/04 A61P25/00 A61P21/04 A61P21/00 A61P27/16 A61K35/28 A61K35/51 A61K35/50 A61K35/30 A61K35/34 A61K35/36 C12Q1/04 C12N1/00 C12Q1/6851 C12Q1/686 C12Q1/6837 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/573 G01N27/62 C12N15/09		
CPC分类号	A61P37/06 A61K35/28 C12N5/0663 C12N5/0665 C12N5/0667 C12N5/0668 C12N2501/24 C12N2501/998 C12N2510/00 G01N33/5073 G01N2333/57 G01N2333/90241 G01N2800/245 G01N2800/7095 G01N33/50 G01N2500/10 C12Q1/6881		
FI分类号	C12N5/0775.ZNA A61P37/06 A61P37/08 A61P1/00 A61P37/00 A61P3/10 A61P17/06 A61P11/06 A61P17/00 A61P15/00 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P5/00 A61P7/06 A61P1/04 A61P25/00 A61P21/04 A61P21/00 A61P27/16 A61K35/28 A61K35/51 A61K35/50 A61K35/30 A61K35/34 A61K35/36 C12Q1/04 C12N1/00.T C12Q1/6851.Z C12Q1/686.Z C12Q1/6837.Z G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/573.A G01N27/62.V C12N15/09.Z		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/FA12 2G045/AA25 2G045/DA20 2G045/DA36 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BD39 4B065/BD50 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA60 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB44 4C087/BB45 4C087/BB47 4C087/BB48 4C087/BB58 4C087/BB59 4C087/BB63 4C087/MA52 4C087/MA55 4C087/NA14 4C087/ZA02 4C087/ZA22 4C087/ZA34 4C087/ZA55 4C087/ZA59 4C087/ZA66 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZA94 4C087/ZB02 4C087/ZB08 4C087/ZB11 4C087/ZB13 4C087/ZC35		
代理人(译)	中岛敦		
优先权	1020160134085 2016-10-17 KR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种用于分选用于治疗免疫疾病的高效间充质干细胞的方法，该方法包括在IFN- γ 预处理模拟后测量间充质干细胞中免疫抑制生物标志物水平的步骤。通过该方法分选的高效间充质干细胞；和通过使用高效的间充质干细胞治疗免疫疾病的方法。本发明可以提供一种有用的方法，该方法能够获得具有免疫反应调节能力的功能优良的间充质干细胞，并用于临床治疗包括移植抗宿主病和自身免疫性疾病在内的各种免疫疾病，因此可以有效地用作治疗方法。用于免疫疾病。

