(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2020-502485
(P2020-502485A)
(43)公表日　令和2年1月23日(2020.1.23)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| ***G01N 33/48*** | ***(2006.01)*** | G01N | 33/48 | M | 2G045 |
| ***A61K 35/28*** | ***(2015.01)*** | A61K | 35/28 | | 4C087 |
| ***A61K 35/51*** | ***(2015.01)*** | A61K | 35/51 | | |
| ***A61K 35/35*** | ***(2015.01)*** | A61K | 35/35 | | |
| ***A61K 35/34*** | ***(2015.01)*** | A61K | 35/34 | | |

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 25 頁）　最終頁に続く

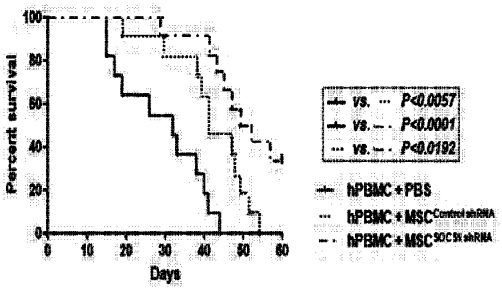
(21)出願番号　特願2019-520702 (P2019-520702)
(86)(22)出願日　平成29年9月26日 (2017.9.26)
(85)翻訳文提出日　令和1年5月27日 (2019.5.27)
(86)国際出願番号　PCT/KR2017/010591
(87)国際公開番号　WO2018/074757
(87)国際公開日　平成30年4月26日 (2018.4.26)
(31)優先権主張番号　10-2016-0134082
(32)優先日　平成28年10月17日 (2016.10.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国 (KR)

(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１４０－８９３ソウル、ヨンサング、イテウォンロ５５ギル４８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　０６１９１　ソウル　カンナム－グ　サムソン－ロ　６４－ギル　５　１０２－１００２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＳＯＣＳの発現又は活性抑制を用いた高効能幹細胞の選別方法

(57)【要約】
本発明は、ＳＯＣＳ（ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ　ｏｆ　ｃｙｔｏｋｉｎｅ　ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）の発現又は活性が抑制された間葉系幹細胞で特定の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治療のための高効能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能間葉系幹細胞及びその高効能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】
ＳＯＣＳ（ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｏｆ ｃｙｔｏｋｉｎｅ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）の発現又は活性が抑制された間葉系幹細胞で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、免疫疾患治療のための高効能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ＳＯＣＳの発現又は活性抑制剤を処理するステップ；
（ｂ）前記ＳＯＣＳの発現又は活性が抑制された間葉系幹細胞で免疫抑制バイオマーカー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ＳＯＣＳの発現又は活性抑制剤の未処理対照群と比較して抑制されている場合、免疫疾患の治療のための高効能間葉系幹細胞であると判定するステップ。
【請求項３】
前記方法は、ステップ（ａ）とステップ（ｂ）と間に間葉系幹細胞を高密度で培養するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項２に記載の選別方法。
【請求項４】
前記免疫抑制バイオマーカーは、ＩＤＯ（ｉｎｄｏｌｅａｍｉｎｅ ２，３－ｄｉｏｘｙｇｅｎａｓｅ）、ＣＸＣＬ９（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｍｏｔｉｆ ｌｉｇａｎｄ ９）、ＣＸＣＬ１０（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｍｏｔｉｆ ｌｉｇａｎｄ １０）、ＣＸＣＬ１１（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｍｏｔｉｆ ｌｉｇａｎｄ １１）、ＣＸＣＬ１２（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｍｏｔｉｆ ｌｉｇａｎｄ １２）、ＰＴＧＥＳ（Ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎ Ｅ ｓｙｎｔｈａｓｅ）、ＣＸＣＲ４（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｔｙｐｅ ４）、ＣＸＣＲ７（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｔｙｐｅ ７）、ＶＣＡＭ１（Ｖａｓｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ １）、ＩＣＡＭ１（Ｉｎｔｅｒ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ １）、ＩＣＡＭ２（Ｉｎｔｅｒ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ ２）、ＴＮＦ－ａｌｐｈａ、Ｂ７－Ｈ１（Ｂ７－ｈｏｍｏｌｏｇ １）、ＴＲＡＩＬ（ＴＮＦ－Ｒｅｌａｔｅｄ Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ－Ｉｎｄｕｃｉｎｇ Ｌｉｇａｎｄ）及びＦａｓ Ｌｉｇａｎｄからなる群より選択される一つ以上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５】
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、ホウォートンゼリー、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、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（Ｇｕｉｌｉａｎ－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ＳＯＣＳ発現抑制剤は、ＳＯＣＳ遺伝子に特異的なｓｉＲＮＡ（ｓｍａｌｌ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ ＲＮＡ）、ｓｈＲＮＡ（ｓｈｏｒｔ ｈａｉｒｐｉｎ ＲＮＡ）、

ｍｉＲＮＡ（ｍｉｃｒｏＲＮＡ）、ＰＮＡ（ｐｅｐｔｉｄｅ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ）及びアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる群より選択さ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１０】
前記ＳＯＣＳ活性抑制剤は、ＳＯＣＳタンパク質に特異的な抗体、アプタマー及び拮抗剤からなる群より選択さ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、ＥＬＩＳＡ、質量分析法、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、免疫疾患治療用薬学組成物。
【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薬学製剤。
【請求項１９】
請求項１２に記載の高効能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に記載の高効能間葉系幹細胞の免疫疾患の治療用途。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ＳＯＣＳ（ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｏｆ ｃｙｔｏｋｉｎｅ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）の発現又は活性が抑制された間葉系幹細胞で特定の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能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能間葉系幹細胞及びその高効能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】
臓器、組織又は細胞移植は、多様な種類の疾病にかかっている患者の生命を守るのに用いられる。ヒトの腎臓、肝、心臓、腎臓、肺及び膵臓などの臓器と皮膚などの組織、骨髄な

ど細胞同種移植（ａｌｌｏｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ）は、末期臓器不全など難治性疾患を治療する方法であって、病院で既に一般的に施行されている。また、ヒト以外の哺乳動物を供与者とする異種移植（ｘｅｎｏｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ）も同種移植供与者の不足を代替する方法として活発に研究されている実情である。特に、最近では、自己自身を永久に再生することができ、適切な条件で身体を構成する多様な種類の細胞に分化可能な幹細胞の移植が多様な難治性疾患の細胞代替治療法の一つとして提起されている。

【０００３】

一般に、正常に機能する受恵者の免疫体系は、移植された臓器、組織や細胞を「非自己（ｎｏｎ－ｓｅｌｆ）」と認識して移植片（ｇｒａｆｔ）に対して免疫拒否反応を誘発する。このような免疫拒否反応は、供与者の組織の同種抗原（ａｌｌｏａｎｔｉｇｅｎｓ）又は異種抗原（ｘｅｎｏａｎｔｉｇｅｎｓ）を認識する受恵者の免疫システムに存在する同種反応性（ａｌｌｏｒｅａｃｔｉｖｅ）又は異種反応性（ｘｅｎｏｒｅａｃｔｉｖｅ）Ｔ細胞により一般的に媒介される。したがって、同種又は異種移植片が長期間生存するためには、外部抗原を認知する受恵者の免疫体系を避けたり、免疫反応を抑制しなければならない。

【０００４】

移植片対宿主病は、宿主の抗原提示細胞により活性化された供与者のＴ－細胞によって誘発され、前記細胞は、ターゲット組織（皮膚、腸及び肝）に移動して標的機関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。

【０００５】

また、移植片に対する受恵者の免疫反応を避けるために、一般的に受恵者に免疫抑制剤を投与する。シクロスポリン（ｃｙｃｌｏｓｐｏｒｉｎ）及びタクロリムス（ｔａｃｒｏｌｉｍｕｓ、ＦＫ－５０６）などのようなカルシニューリン（ｃａｌｃｉｎｅｕｒｉｎ）抑制剤やアザチオプリン（ａｚａｔｈｉｏｐｒｉｎｅ）、ラパマイシン（ｒａｐａｍｙｃｉｎ）、ミコフェノール酸モフェチル（ｍｙｃｏｐｈｅｎｏｌａｔｅ ｍｏｆｅｔｉｌ）及びシクロホスファミド（ｃｙｃｌｏｐｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）などのような抗増殖性薬剤（ａｎｔｉｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｖｅ ｄｒｕｇ）などが代表的な免疫抑制剤として、現在、同種腎臓、肝、膵臓、心臓移植などに頻繁に用いられている。

【０００６】

これらの免疫抑制剤は、一日を基準として投与しなければならず、万一、投与を中断する場合、通常的に免疫拒否反応がもたらされる。したがって、長期間にわたって投与しなければならないが、そのため、腎臓や肝毒性、高血圧などを誘発し得る。それだけでなく、これらの薬物は、移植片の同種抗原にのみ反応する免疫細胞にのみ選択的に作用する特異的免疫抑制剤ではないので、非特異的免疫抑制による日和見感染やリンパ腫のような腫瘍形成などの副作用を誘発し得る。また他の免疫抑制方法として、ＯＫＴ３、ダクリズマブ（Ｄａｃｌｉｚｕｍａｂ)又はバシリキシマブ（Ｂａｓｉｌｉｘｉｍａｂ）などの単クローン抗体を投与する方法があるが、これらもやはり非特異的な免疫抑制剤であって、日和見感染や腫瘍形成の問題点を有している。したがって、薬物毒性や日和見感染などの問題点がない新しい免疫抑制法の開発が要求される。

【０００７】

一方、ヒト間葉系幹細胞（ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ、ＭＳＣｓ）は、多様な組織に由来し、細胞基盤移植又は再生医薬治療において強力な候補者である。損傷した組織への移動、免疫抑制機能、自家再生及び多分化能のようなＭＳＣｓの特徴は、その治療的適用の可能性を提示する。現在、ＭＳＣｓの注入又は移植を含む５００個余りの臨床がｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖに登録されている。また、これらのうち約２０％がＭＳＣの免疫抑制能に関連する。ＭＳＣｓの免疫抑制特性が明らかにされて

おり、多くの臨床１相は、生物学的安定性の問題を示さないにもかかわらず、それ以上の臨床段階では、不備な結果が導き出されている。

【０００８】

さらに、ＭＳＣの標準化のための培養方法又はプロトコルが不在して、同じ授与者の同じ組織から分離したＭＳＣｓの場合にも表現型的及び機能的多様性が観察されている。したがって、特定の条件を付与してＭＳＣの機能を促進又は抑制する方法が必要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

さて、本発明者らは、免疫抑制能に優れた間葉系幹細胞を選別することができる方案を開発するために鋭意努力した結果、ＳＯＣＳ（ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｏｆ ｃｙｔｏｋｉｎｅ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）の発現／活性が抑制された間葉系幹細胞で特定の免疫抑制バイオマーカーと免疫抑制能との相関関係を見つけ、これらバイオマーカーの発現が増加する場合、間葉系幹細胞の免疫抑制能がＳＯＣＳのみ単独抑制された場合より一層向上することを確認し、本発明を完成するに至った。

【００１０】

したがって、本発明は、ＳＯＣＳ（ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｏｆ ｃｙｔｏｋｉｎｅ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）の発現又は活性が抑制された間葉系幹細胞で特定の免疫抑制バイオマーカー（ＩＤＯ、ＣＸＣＬ９、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ１１、ＣＸＣＬ１２、ＰＴＧＥＳ、ＣＸＣＲ４、ＣＸＣＲ７、ＶＣＡＭ１、ＩＣＡＭ１、ＩＣＡＭ２、ＴＮＦ－ａｌｐｈａ、Ｂ７－Ｈ１、ＴＲＡＩＬ、Ｆａｓ Ｌｉｇａｎｄ）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能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能間葉系幹細胞を提供することを目的とする。

【００１１】

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】

【００１２】

本発明は、ＳＯＣＳ（ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｏｆ ｃｙｔｏｋｉｎｅ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）の発現又は活性が抑制された間葉系幹細胞で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能間葉系幹細胞の選別方法を提供する。

【００１３】

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。

【００１４】

（ａ）間葉系幹細胞を培養した後ＳＯＣＳの発現又は活性抑制剤を処理するステップ；

（ｂ）前記ＳＯＣＳの発現又は活性が抑制された間葉系幹細胞で免疫抑制バイオマーカー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ＳＯＣＳの発現又は活性抑制剤の未処理対照群と比較して抑制されている場合、免疫疾患の治療のための高効能間葉系幹細胞であると判定するステップ。

【００１５】

本発明の他の具現例によると、前記方法は、前記ステップ（ａ）とステップ（ｂ）の間に間葉系幹細胞を高密度で培養するステップをさらに含むことを特徴とする。

【００１６】

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ーは、ＩＤＯ（ｉｎｄｏｌｅａｍｉｎｅ ２，３－ｄｉｏｘｙｇｅｎａｓｅ）、ＣＸＣＬ９（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｍｏｔｉｆ ｌｉｇａｎｄ ９）、ＣＸＣＬ１０（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｍｏｔｉｆ ｌｉｇａｎｄ １０）、ＣＸＣＬ１１（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｍｏｔｉｆ ｌｉｇａｎｄ １１）、ＣＸＣＬ１２（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｍｏｔｉｆ ｌｉｇａｎｄ １２）、ＰＴＧＥＳ（Ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎ Ｅ ｓｙｎｔｈａｓｅ）、ＣＸＣＲ４（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ ｒｅｃｅ

ｐｔｏｒ ｔｙｐｅ ４）、ＣＸＣＲ７（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｔｙｐｅ ７）、ＶＣＡＭ１（Ｖａｓｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ １）、ＩＣＡＭ１（Ｉｎｔｅｒ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ １）、ＩＣＡＭ２（Ｉｎｔｅｒ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ ２）、ＴＮＦ－ａｌｐｈａ、Ｂ７－Ｈ１（Ｂ７－ｈｏｍｏｌｏｇ １）、ＴＲＡＩＬ（ＴＮＦ－Ｒｅｌａｔｅｄ Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ－Ｉｎｄｕｃｉｎｇ Ｌｉｇａｎｄ）、Ｆａｓ Ｌｉｇａｎｄからなる群より選択される一つ以上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、前記高効能は、免疫抑制能であることを特徴とする。

【００１８】

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、ホウォートンゼリー、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。

【００１９】

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。

【００２０】

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（Ｇｕｉｌｉａｎ－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。

【００２１】

本発明のまた他の具現例によると、前記ＳＯＣＳ発現抑制剤は、ＳＯＣＳ遺伝子に特異的なｓｉＲＮＡ（ｓｍａｌｌ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ ＲＮＡ）、ｓｈＲＮＡ（ｓｈｏｒｔ ｈａｉｒｐｉｎ ＲＮＡ）、ｍｉＲＮＡ（ｍｉｃｒｏＲＮＡ）、ＰＮＡ（ｐｅｐｔｉｄｅ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ）及びアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる群より選択さ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ＳＯＣＳ活性抑制剤は、ＳＯＣＳタンパク質に特異的な抗体、アプタマー及び拮抗剤からなる群より選択されることを特徴とする。

【００２３】

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、ＥＬＩＳＡ、質量分析法、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することを特徴とする。

【００２４】

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。

【００２５】

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。

【００２６】

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。

【００２７】

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、ホウォートンゼリー、神経、皮膚、羊膜又は胎盤に由来することを特徴とする。

【００２８】

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。

【００２９】

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。

【００３０】

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。

【００３１】

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。

【００３２】

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。

【発明の効果】

【００３３】

本発明によると、ＳＯＣＳ（ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ　ｏｆ　ｃｙｔｏｋｉｎｅ　ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）の発現又は活性が抑制された間葉系幹細胞で特定の免疫抑制バイオマーカー（ＩＤＯ、ＣＸＣＬ９、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ１１、ＣＸＣＬ１２、ＰＴＧＥＳ、ＣＸＣＲ４、ＣＸＣＲ７、ＶＣＡＭ１、ＩＣＡＭ１、ＩＣＡＭ２、ＴＮＦ－ａｌｐｈａ、Ｂ７－Ｈ１、ＴＲＡＩＬ、Ｆａｓ　Ｌｉｇａｎｄ）の組合せが移植片対宿主病を含む免疫関連疾患において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。

【００３４】

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。

【００３５】

また、本発明によって選別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】

【００３６】

【図１ａ】図１の（ａ）は、ＳＯＣＳをターゲットとするｓｈＲＮＡをＭＳＣに処理してＳＯＣＳタンパク質の発現が抑制されたことを確認した赤色蛍光染色の結果である。

【図１ｂ】の（ｂ）は、ＳＯＣＳをターゲットとするｓｈＲＮＡをＭＳＣに処理してＳＯＣＳタンパク質の発現が抑制されたことを確認したウエスタンブロッティングの結果である。

【図２】図２は、ＳＯＣＳが下向き調節されたＭＳＣの免疫抑制能の特性をｉｎ　ｖｉｖｏ移植片対宿主病の動物モデルで確認した結果である。

【発明を実施するための形態】

【００３７】

本発明は、ＳＯＣＳ（ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ　ｏｆ　ｃｙｔｏｋｉｎｅ　ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）の発現又は活性が抑制された間葉系幹細胞で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能間葉系幹細胞の選別方法を提供する。

【００３８】

本発明で、ＳＯＣＳタンパク質は、サイトカイン（ｃｙｔｏｋｉｎｅ）信号伝達の陰性的

フィードバック調節因子（ｎｅｇａｔｉｖｅ ｆｅｅｄｂａｃｋ ｒｅｇｕｌａｔｏｒ）グループに属し、ヤーヌスキナーゼ／信号伝達因子（Ｊａｎｕｓ ｋｉｎａｓｅ／ｓｉｇｎａｌ ｔｒａｎｓｄｕｃｅｒ）及び転写（ＪＡＫ／ＳＴＡＴ）経路の活性因子を含んでいるものとして知られている。

【００３９】

前記ＳＯＣＳは、その種類に制限がなく、例えば、ＣＩＳＨ（Ｃｙｔｏｋｉｎｅｉｎｄｕｃｉｂｌｅ ＳＨ２－ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＳＯＣＳ１、ＳＯＣＳ２、ＳＯＣＳ３、ＳＯＣＳ４、ＳＯＣＳ５、ＳＯＣＳ６、ＳＯＣＳ７であってもよく、最も好ましくは、ＳＯＣＳ１又はＳＯＣＳ３であってもよい。

【００４０】

本発明で、免疫抑制バイオマーカーに制限はないが、例えば、ＩＤＯ（ｉｎｄｏｌｅａｍｉｎｅ ２，３－ｄｉｏｘｙｇｅｎａｓｅ）、ＣＸＣＬ９（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｍｏｔｉｆ ｌｉｇａｎｄ ９）、ＣＸＣＬ１０（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｍｏｔｉｆ ｌｉｇａｎｄ １０）、ＣＸＣＬ１１（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｍｏｔｉｆ ｌｉｇａｎｄ １１）、ＣＸＣＬ１２（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｍｏｔｉｆ ｌｉｇａｎｄ １２）、ＰＴＧＥＳ（Ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎ Ｅ ｓｙｎｔｈａｓｅ）、ＣＸＣＲ４（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｔｙｐｅ ４）、ＣＸＣＲ７（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｔｙｐｅ ７）、ＶＣＡＭ１（Ｖａｓｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ １）、ＩＣＡＭ１（Ｉｎｔｅｒ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ １）、ＩＣＡＭ２（Ｉｎｔｅｒ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ ２）、ＴＮＦ－ａｌｐｈａ、Ｂ７－Ｈ１（Ｂ７－ｈｏｍｏｌｏｇ １）、ＴＲＡＩＬ（ＴＮＦ－Ｒｅｌａｔｅｄ Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ－Ｉｎｄｕｃｉｎｇ Ｌｉｇａｎｄ）、Ｆａｓ Ｌｉｇａｎｄからなる群より選択される一つ以上であってもよい。

【００４１】

このとき、ＰＴＧＥＳ（Ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎ Ｅ ｓｙｎｔｈａｓｅ）は、ＰＧＥ２を合成する機能を、ＶＣＡＭ１（Ｖａｓｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ １）は、細胞結合機能を、ＣＸＣＲ７（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｔｙｐｅ ７）は、ケモカイン（ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ）受容体として幹細胞を炎症部位に募集する機能を、ＩＣＡＭ１（Ｉｎｔｅｒ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ １）は、炎症細胞の付着、移動に関連する機能を行うものとして知られている。

【００４２】

また、本発明の選別方法は、（ａ）間葉系幹細胞を培養した後ＳＯＣＳの発現又は活性抑制剤を処理するステップ；（ｂ）前記ＳＯＣＳの発現又は活性が抑制された間葉系幹細胞で免疫抑制バイオマーカー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ＳＯＣＳの発現又は活性抑制剤の未処理対照群と比較して抑制されている場合、免疫疾患の治療のための高効能間葉系幹細胞であると判定するステップを含むことができる。

【００４３】

本発明で、前記ステップ（ａ）と（ｂ）との間に間葉系幹細胞を高密度で培養するステップをさらに含むことができ、このとき、高密度培養は、５，０００～２０，０００ｃｅｌｌｓ／ｃｍ$^2$の密度で培養するものであってもよい。

【００４４】

本発明で「高効能」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。

【００４５】

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。

【００４６】

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。

【００４７】

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（Ｇｕｉｌｉａｎ－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。

【００４８】

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、じんましん、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。

【００４９】

本発明で、ＳＯＣＳ発現抑制剤は、ＳＯＣＳ遺伝子／ｍＲＮＡに特異的に結合して発現を阻害するものであれば、制限がなく、例えば、ＳＯＣＳ遺伝子／ｍＲＮＡに特異的なｓｉＲＮＡ（ｓｍａｌｌ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ ＲＮＡ）、ｓｈＲＮＡ（ｓｈｏｒｔ ｈａｉｒｐｉｎ ＲＮＡ）、ｍｉＲＮＡ（ｍｉｃｒｏＲＮＡ）、ＰＮＡ（ｐｅｐｔｉｄｅ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ）又はアンチセンスオリゴヌクレオチドであってもよい。

【００５０】

本発明で、ＳＯＣＳ活性抑制剤は、ＳＯＣＳタンパク質に結合／競争してその活性を阻害するものであれば、制限がなく、例えば、ＳＯＣＳタンパク質に特異的な抗体、アプタマー又は拮抗剤であってもよい。

【００５１】

本発明で、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。

【００５２】

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。

【００５３】

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。

【００５４】

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などを含む。

【００５５】

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、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。

【００５６】

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。

【００５７】

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。

【００５８】

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、当業者により容易に決定され得る。

【００５９】

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。

【００６０】

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、実施例よって本発明の内容が限定されるものではない。

【実施例】

【００６１】

実施例１：実験方法

１－１．ヒト組織由来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。間葉系幹細胞の分離は、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$2\times10^{3}$ ｃｅｌｌｓ／ｃｍ$^{2}$の密度でシーディングして、３７℃及び５％の$CO_{2}$条件下で培養した。

【００６２】

１－２．ｓｈＲＮＡ形質感染

ＳＯＣＳ１の発現を阻害するために、脂肪組織由来間葉系幹細胞（ＡＴ－ＭＳＣ）にＳＯＣＳ１ ｓｈＲＮＡ（ｓｈｏｒｔ ｈａｉｒｐｉｎ ＲＮＡ）及び赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）を発現するアデノウイルスを処理した。具体的に、ＳＯＣＳ１をターゲットとするｓｈＲＮＡ配列は、ヒトＵ６プロモーターとＴａｇＲＦＰマーカー遺伝子含有シャトルベクター（ｐＯ６Ａ５－Ｕ６－ｍＰＧＫ－ＴａｇＲＦＰ）にクローニングされてｐＯ６Ａ５－Ｕ６－ｓｈＳＯＣＳ１－ｍＰＧＫ－ＴａｇＲＦＰ発現ベクターで準備し、シャトルベ

クターのＵ６－ｓｈＲＮＡ－ＳＶ４０－ｐＡ領域は、ＢＡＣベクターに組換えしてトランスファーした。回収した組換えアデノウイルス（Ａｄ５－Ｕ６－ｓｈＳＯＣＳ１－ｍＰＧＫ－ＴａｇＲＦＰ）は、ＨＥＫ－２９３細胞で増殖させ、ＰＴＤ（ｐｒｏｔｅｉｎ ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ ｄｏｍａｉｎ）であるＨＰ４は、ペプトロン社から購入した。間葉系幹細胞にアデノ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、ＨＰ４（１００ｎＭ）とともにアデノウイルスパーティクルをＭＯＩ（ｍｕｌｔｉｐｌｉｃｉｔｙ ｏｆ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ）１００で処理し、室温で３０分間無血清培地に培養した。以後、培養された細胞をＰＢＳで洗い、Ａｄ－ＲＦＰ－ｓｈＳＯＣＳ１及びＨＰ４ ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎで培養し、２時間後に細胞をＰＢＳで洗って、血清含有培地で培養した。選別された間葉系幹細胞は、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。

【００６３】

１－３．免疫ブロッティング

細胞を冷たいＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ－Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で洗浄し、３００μＬの冷たいＲＩＰＡバッファー［１％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００、１５０ｍＭのＮａＣｌ、０．１％のＳＤＳ（ｓｏｄｉｕｍ ｄｏｄｅｃｙｌ ｓｕｌｆａｔｅ）及び１％のデオキシコール酸ナトリウムを含む５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５］でプロテアーゼ抑制剤カクテル（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ、ＵＳＡ）で溶出した。細胞の溶出液を４℃で１０分間３０００ｇで遠心分離した後、上澄み液を収集し、タンパク質の濃度をＢＣＡタンパク質アッセイキット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて決定した。電気泳動のために、３０μｇのタンパク質をサンプルバッファー（１４．４ｍＭのβ－メルカプトエタノール、２５％のグリセロール、２％のＳＤＳ及び０．１％のブロモフェノールブルーを含む６０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ６．８）内に溶解させ、５分間沸かした後、１０％のＳＤＳリデューシングジェル上で分離した。分離されたタンパク質をａ ｔｒａｎｓ－ｂｌｏｔ ｓｙｓｔｅｍ（Ｇｉｂｃｏ－Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いてＰＶＤＦ（ｐｏｌｙｖｉｎｙｌｉｄｅｎｅ ｄｉｆｌｕｏｒｉｄｅ）膜（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｌｉｔｔｌｅ Ｃｈａｌｆｏｎｔ、Ｂｕｃｋｉｎｇｈａｍｓｈｉｒｅ、ＵＫ）上に移動させた。前記ＰＶＤＦ膜を１時間の間室温で５％の脱脂粉乳（ＢＤ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、ＣＡ、ＵＳＡ）を含むＴＢＳ（１５０ｍＭのＮａＣｌを含む１０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５）でブロッティングした後、ＴＢＳで３回洗浄し、３％の脱脂粉乳を含むＴＢＳＴ（１５０ｍＭのＮａＣｌ及び０．０２％のＴｗｅｅｎ－２０を含む１０ｍＭのＴｒｉｓ、ｐＨ７．５）内の１次抗体（全ての抗体を１：１０００で希釈）と４℃で一晩中インキュベーションした。翌日、ブロットをＴＢＳＴで３回洗浄し、１時間の間３％の脱脂粉乳を含むＴＢＳＴ内のＨＲＰ－融合した２次抗体（１：２０００又は１：５０００希釈）と室温でインキュベーションした。これをＴＢＳＴで３回洗浄した後、タンパク質をＥＣＬ検出システム（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で視覚化した。

【００６４】

１－４．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の全身照射法を行い、２４時間後にヒト末梢血液単球細胞を静脈投与した。具体的に、各マウスに$2\times10^{7}$個のヒト末梢血液単球細胞を$1\times10^{6}$個の間葉系幹細胞とともに投与した。以後、同じ個数の間葉系幹細胞を投与７日目に反復投与した。

【００６５】

実施例２：実験結果

２－１．ＳＯＣＳの発現抑制

ＳＯＣＳ１をターゲットとするｓｈＲＮＡ発現アデノウイルスを脂肪組織由来間葉系幹細胞（ＡＴ－ＭＳＣ）に形質感染させることで、ＭＳＣでＳＯＣＳの発現抑制を確認した。その結果、図１の（ａ）及び図１の（ｂ）に示したように、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ

）の標識（図１の（ａ））及びウエスタンブロッティング（図１の（ｂ））結果においてＭＳＣ内のＳＯＣＳ１タンパク質の発現が有意的に抑制されることを確認することができた。

【００６６】

２－２．ＳＯＣＳ下向き調節されたＭＳＣのｉｎ　ｖｉｖｏ免疫抑制能の評価

前記実施例２－１で獲得したＳＯＣＳ下向き調節されたＭＳＣが実際に移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）の動物モデルで免疫抑制能を発揮するかを確認した。

【００６７】

その結果、図２に示したように、ｓｈＲＮＡによりＳＯＣＳが下向き調節されたＭＳＣ（赤色ライン）処理群は、対照群に比べて生存率（免疫抑制能）を顕著に増加させることが分かった。

【００６８】

２－３．ＳＯＣＳ下向き調節されたＭＳＣで追加の免疫抑制バイオマーカーの発掘

間葉系幹細胞の遺伝子発現にＳＯＣＳ発現抑制が及ぼす影響を確認するために、ＳＯＣＳ発現抑制剤（ｓｈＲＮＡ）を処理した前後の間葉系幹細胞の遺伝子発現プロファイルを比較した。その結果、処理前後の形態変化には著しい差がなかったが、遺伝子発現プロファイルには多くの差が現われたことを確認した。

【００６９】

実際に、ＳＯＣＳ発現抑制剤（ｓｈＲＮＡ）で処理された間葉系幹細胞で多様な遺伝子発現が増加し、これらのうちＩＤＯ、ＣＸＣＬ９、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ１１、ＣＸＣＬ１２、ＰＴＧＥＳ、ＣＸＣＲ４、ＣＸＣＲ７、ＶＣＡＭ１、ＩＣＡＭ１、ＩＣＡＭ２、ＴＮＦ－ａｌｐｈａ、Ｂ７－Ｈ１、ＴＲＡＩＬ、Ｆａｓ　Ｌｉｇａｎｄ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。

【００７０】

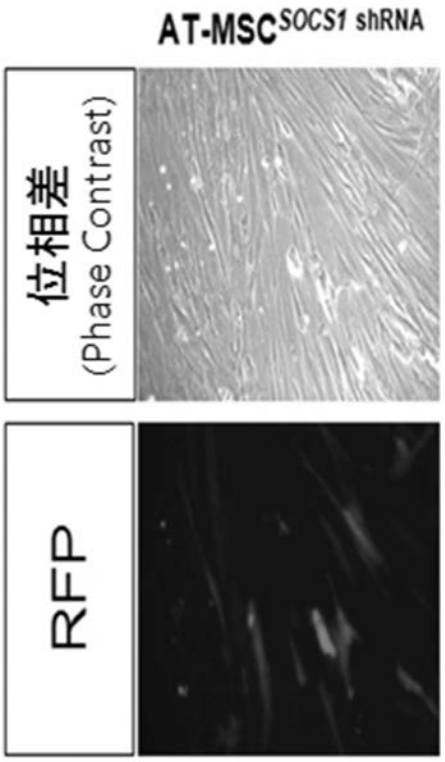
上述した本発明の説明は例示のためのもので、本発明が属する技術分野において通常の知識を有した者は、本発明の技術的思想や必須的な特徴を変更しなくても他の具体的な形態に容易に変形が可能であることが理解できる。したがって、以上で記述した実施例は、全ての面で例示的なものであり、限定的ではないものとして理解すべきである。

【産業上の利用可能性】

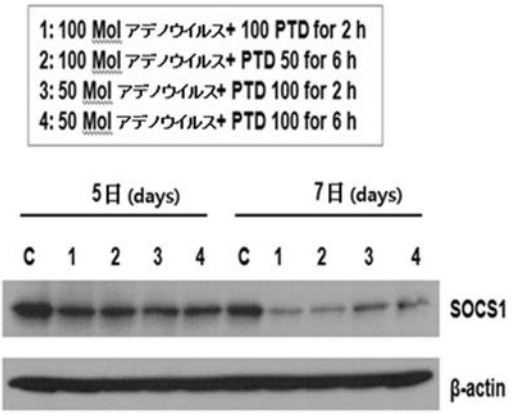
【００７１】

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。

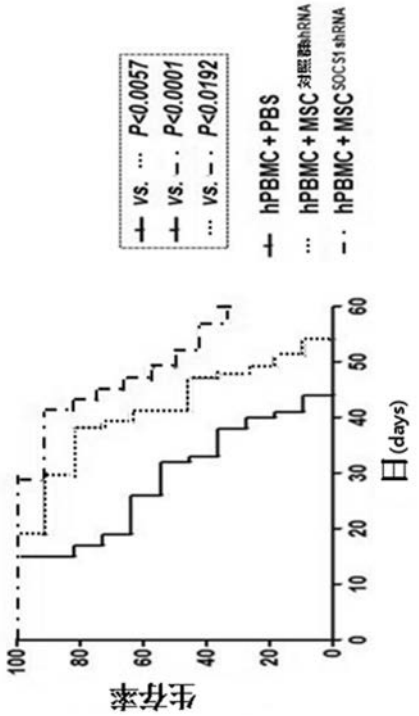
【図１ａ】


AT-MSC SOCS1 shRNA
位相差
(Phase Contrast)
RFP

【図１ｂ】


1: 100 MoI アデノウイルス+ 100 PTD for 2 h
2: 100 MoI アデノウイルス+ PTD 50 for 6 h
3: 50 MoI アデノウイルス+ PTD 100 for 2 h
4: 50 MoI アデノウイルス+ PTD 100 for 6 h
5日 (days)
7日 (days)
C 1 2 3 4 C 1 2 3 4
SOCS1
β-actin

【図２】


hPBMC + PBS
hPBMC + MSC 対照群shRNA
hPBMC + MSC SOCS1 shRNA
vs. P<0.0057
vs. P<0.0001
vs. P<0.0192
生存率
日 (days)
0 10 20 30 40 50 60
100 80 60 40 20 0

【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】
ＳＯＣＳ（ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｏｆ ｃｙｔｏｋｉｎｅ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）の発現又は活性が抑制された間葉系幹細胞で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、免疫疾患治療のための高効能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ＳＯＣＳの発現又は活性抑制剤を処理するステップ；
（ｂ）前記ＳＯＣＳの発現又は活性が抑制された間葉系幹細胞で免疫抑制バイオマーカー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ＳＯＣＳの発現又は活性抑制剤の未処理対照群と比較して抑制されている場合、免疫疾患の治療のための高効能間葉系幹細胞であると判定するステップ。
【請求項３】
前記方法は、ステップ（ａ）とステップ（ｂ）と間に間葉系幹細胞を高密度で培養するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項２に記載の選別方法。
【請求項４】
前記免疫抑制バイオマーカーは、ＩＤＯ（ｉｎｄｏｌｅａｍｉｎｅ ２，３－ｄｉｏｘｙｇｅｎａｓｅ）、ＣＸＣＬ９（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｍｏｔｉｆ ｌｉｇａｎｄ ９）、ＣＸＣＬ１０（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｍｏｔｉｆ ｌｉｇａｎｄ １０）、ＣＸＣＬ１１（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｍｏｔｉｆ ｌｉｇａｎｄ １１）、ＣＸＣＬ１２（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｍｏｔｉｆ ｌｉｇａｎｄ １２）、ＰＴＧＥＳ（Ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎ Ｅ ｓｙｎｔｈａｓｅ）、ＣＸＣＲ４（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｔｙｐｅ ４）、ＣＸＣＲ７（Ｃ－Ｘ－Ｃ ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｔｙｐｅ ７）、ＶＣＡＭ１（Ｖａｓｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ １）、ＩＣＡＭ１（Ｉｎｔｅｒ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ １）、ＩＣＡＭ２（Ｉｎｔｅｒ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ ２）、ＴＮＦ－ａｌｐｈａ、Ｂ７－Ｈ１（Ｂ７－ｈｏｍｏｌｏｇ １）、ＴＲＡＩＬ（ＴＮＦ－Ｒｅｌａｔｅｄ Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ－Ｉｎｄｕｃｉｎｇ Ｌｉｇａｎｄ）及びＦａｓ Ｌｉｇａｎｄからなる群より選択される一つ以上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５】
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、ホウォートンゼリー、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、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（Ｇｕｉｌｉａｎ－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６７に記載の選別方法。
【請求項９】
前記ＳＯＣＳ発現抑制剤は、ＳＯＣＳ遺伝子に特異的なｓｉＲＮＡ（ｓｍａｌｌ　ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ　ＲＮＡ）、ｓｈＲＮＡ（ｓｈｏｒｔ　ｈａｉｒｐｉｎ　ＲＮＡ）、ｍｉＲＮＡ（ｍｉｃｒｏＲＮＡ）、ＰＮＡ（ｐｅｐｔｉｄｅ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄｓ）及びアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる群より選択さ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１０】
前記ＳＯＣＳ活性抑制剤は、ＳＯＣＳタンパク質に特異的な抗体、アプタマー及び拮抗剤からなる群より選択さ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、ＥＬＩＳＡ、質量分析法、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】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】００３０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３０】
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】００５３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５３】
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医薬組成物／医薬製剤を提供する。
【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５４】
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などを含む。

【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
**PCT/KR2017/010591**

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

***G01N 33/50(2006.01)i, A61K 35/28(2006.01)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 39/00; A61K 35/28; A61K 48/00; 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: SOCS, immunosuppression biomarker, immunosuppression ability, stem cell, graft-versus-host disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | US 2015-0191699 A1 (IMSTEM BIOTECHNOLOGY, INC.) 09 July 2015<br>See paragraphs [0032], [0146] and [0151]. | 1-18,20 |
| Y | ZHANG, Lei et al., "SOCS1 Regulates the Immune Modulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells by Inhibiting Nitric Oxide Production", PloS One, 14 May 2014, vol. 9, no. 5, e97256 (pages 1-9)<br>See abstract; page 2, left column; page 5, right column, third paragraph; page 8, left column, fourth paragraph; figure 4. | 1-18,20 |
| Y | 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)<br>See page 3, right column, third paragraph; table 1; page 5, right column, second paragraph; figure 1. | 3,4 |
| A | WO 2015-084897 A2 (MIRIMMUNE, LLC.) 11 June 2015<br>See paragraphs [0053] and [0054]. | 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<br>See the entire document. | 1-18,20 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 11 JANUARY 2018 (11.01.2018) | **12 JANUARY 2018 (12.01.2018)** |
| Name and mailing address of the ISA/KR<br>Korean Intellectual Property Office<br>Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea<br>Facsimile No. +82-42-481-8578 | Authorized officer<br><br>Telephone No. |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
**PCT/KR2017/010591**

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| PX | KR 10-2017-0054262 A (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) 17 May 2017<br>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/KR2017/010591**

**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/KR2017/010591**

| 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 2017-0290864 A1 | 12/10/2017 |
| | | US 9725698 B2 | 08/08/2017 |
| | | WO 2014-011881 A2 | 16/01/2014 |
| | | WO 2014-011881 A3 | 03/04/2014 |
| WO 2015-084897 A2 | 11/06/2015 | CN 106061488 A | 26/10/2016 |
| | | EP 3079707 A2 | 19/10/2016 |
| | | JP 2016-540511 A | 28/12/2016 |
| | | US 2016-0304873 A1 | 20/10/2016 |
| | | WO 2015-084897 A3 | 03/09/2015 |
| KR 10-2017-0054262 A | 17/05/2017 | WO 2017-082562 A1 | 18/05/2017 |

# 국제조사보고서

국제출원번호
**PCT/KR2017/010591**

**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 39/00; A61K 35/28; A61K 48/00; 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:SOCS, 면역억제 바이오마커, 면역억제능, 줄기세포, 이식편대숙주질환

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재 | 관련 청구항 |
|---|---|---|
| Y | US 2015-0191699 A1 (IMSTEM BIOTECHNOLOGY, INC.) 2015.07.09<br>단락 [0032], [0146] 및 [0151] 참조. | 1-18,20 |
| Y | ZHANG, LEI 등, 'SOCS1 regulates the immune modulatory properties of mesenchymal stem cells by inhibiting nitric oxide production', PloS One, 2014.05.14, 제9권, 제5호, e97256 (1-9 페이지)<br>초록; 페이지 2, 좌컬럼; 페이지 5, 우컬럼, 세 번째 단락; 페이지 8, 좌컬럼, 네 번째 단락; 도면 4 참조. | 1-18,20 |
| Y | LEE, 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)<br>페이지 3, 우컬럼, 세 번째 단락; 표 1; 페이지 5, 우컬럼, 두 번째 단락; 도면 1 참조. | 3,4 |
| A | WO 2015-084897 A2 (MIRIMMUNE, LLC) 2015.06.11<br>단락 [0053] 및 [0054] 참조. | 1-18,20 |
| A | YOO, KEON HEE 등, 'Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues', Cellular Immunology, 2009, 제259권, 150-156 페이지<br>전체 문헌 참조. | 1-18,20 |

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

| 국제조사의 실제 완료일 | 국제조사보고서 발송일 |
|---|---|
| 2018년 01월 11일 (11.01.2018) | 2018년 01월 12일 (12.01.2018) |

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
김선희
전화번호 +82-42-481-5405

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/010591

C(계속). 관련 문헌

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재 | 관련 청구항 |
|---|---|---|
| PX | KR 10-2017-0054262 A (사회복지법인 삼성생명공익재단) 2017.05.17<br>청구항 1-14; 단락 【0037], [0047]-[0062] 및 [0072]-[0078]; 도면 3 및 5 참조. | 1-18,20 |

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지의 계속) (2015년 1월)

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/010591

**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/KR2017/010591**

| 국제조사보고서에서 인용된 특허문헌 | 공개일 | 대응특허문헌 | 공개일 |
|---|---|---|---|
| US 2015-0191699 A1 | 2015/07/09 | AU 2013-290146 A1 | 2015/02/05 |
| | | CA 2876512 A1 | 2014/01/16 |
| | | CN 104487568 A | 2015/04/01 |
| | | CN 104487568 B | 2017/08/15 |
| | | EP 2872619 A2 | 2015/05/20 |
| | | HK 1208055 A1 | 2016/02/19 |
| | | JP 2015-523083 A | 2015/08/13 |
| | | US 2017-0290864 A1 | 2017/10/12 |
| | | US 9725698 B2 | 2017/08/08 |
| | | WO 2014-011881 A2 | 2014/01/16 |
| | | WO 2014-011881 A3 | 2014/04/03 |
| WO 2015-084897 A2 | 2015/06/11 | CN 106061488 A | 2016/10/26 |
| | | EP 3079707 A2 | 2016/10/19 |
| | | JP 2016-540511 A | 2016/12/28 |
| | | US 2016-0304873 A1 | 2016/10/20 |
| | | WO 2015-084897 A3 | 2015/09/03 |
| 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. | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *Ａ６１Ｋ　35/30* | *(2015.01)* | Ａ６１Ｋ | 35/30 | | |
| *Ａ６１Ｋ　35/36* | *(2015.01)* | Ａ６１Ｋ | 35/36 | | |
| *Ａ６１Ｋ　35/50* | *(2015.01)* | Ａ６１Ｋ | 35/50 | | |
| *Ａ６１Ｐ　37/02* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 37/02 | | |
| *Ａ６１Ｐ　37/06* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 37/06 | | |
| *Ａ６１Ｐ　37/08* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 37/08 | | |
| *Ｇ０１Ｎ　33/53* | *(2006.01)* | Ｇ０１Ｎ | 33/53 | Ｄ | |
| | | Ｇ０１Ｎ | 33/53 | Ｍ | |

(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．ＴＲＩＴＯＮ
２．ＴＷＥＥＮ

(72)発明者　イ、ミョン　ウ
大韓民国　０５６１４　ソウル　ソンパーグ　サムハクサーロ　１４－ギル　２７　ナンバー２０３
(72)発明者　キム、デ　ソン
大韓民国　１０４２２　キョンギード　コヤンーシ　イルサンドンーグ　ジュンアンーロ　１１２９　１０３－１２０１

Ｆターム(参考)　2G045 AA24 AA40 BA13 BB20 BB60 CB01
4C087 AA01 AA02 BB44 BB47 BB48 BB58 BB63 NA05 ZB07 ZB08
ZB13

| | | | |
|---|---|---|---|
| 专利名称(译) | 通过抑制SOCS表达或活性选择高效能干细胞的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2020502485A | 公开(公告)日 | 2020-01-23 |
| 申请号 | JP2019520702 | 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 | イミョンウ | | |
| 发明人 | ユ、コン ヒ<br>イ、ミョン ウ<br>キム、デ ソン | | |
| IPC分类号 | G01N33/48 A61K35/28 A61K35/51 A61K35/35 A61K35/34 A61K35/30 A61K35/36 A61K35/50 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | A61K35/28 A61P37/06 C12N15/113 C12N2310/14 G01N33/5073 G01N2800/245 G01N2800/7095 G01N33/50 C12N2310/531 G01N2500/10 C12N5/0662 C12N2501/999 | | |
| FI分类号 | G01N33/48.M A61K35/28 A61K35/51 A61K35/35 A61K35/34 A61K35/30 A61K35/36 A61K35/50 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 G01N33/53.D G01N33/53.M | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA24 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/BB60 2G045/CB01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB44 4C087/BB47 4C087/BB48 4C087/BB58 4C087/BB63 4C087/NA05 4C087/ZB07 4C087/ZB08 4C087/ZB13 | | |
| 代理人(译) | 中岛敦 | | |
| 优先权 | 1020160134082 2016-10-17 KR | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |


摘要(译)

本发明用于治疗免疫疾病的高效间充质干细胞，包括测量SOCS（细胞因子信号传导的抑制剂）表达或活性被抑制的特定免疫抑制生物标志物水平的步骤。 ，通过该方法选择的高效能间充质干细胞，以及使用该高效能间充质干细胞治疗免疫疾病的方法。 工业实用性本发明提供了一种有用的方法，其用于获得功能优良的间充质干细胞，其具有调节免疫应答的能力，用于临床治疗包括移植物抗宿主病和自身免疫病在内的各种免疫疾病。 这样，可以有效地用于治疗免疫疾病的方法中。