

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6265890号  
(P6265890)

(45) 発行日 平成30年1月24日(2018.1.24)

(24) 登録日 平成30年1月5日(2018.1.5)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 K	35/28	(2015.01)	A 6 1 K 35/28
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 K	35/32	(2015.01)	A 6 1 K 35/32

請求項の数 15 (全 53 頁)

(21) 出願番号	特願2014-513005 (P2014-513005)	(73) 特許権者	505362089 メゾブラスト, インコーポレーテッド アメリカ合衆国 10017 ニューヨーク州, ニューヨーク フィフス アベニュー 505, サード フロア
(86) (22) 出願日	平成24年6月4日(2012.6.4)	(73) 特許権者	512118750 セントラル アデレード ローカル ヘルス ネットワーク インコーポレイテッド オーストラリア国 サウスオーストラリア 5000 アデレード フロームロード
(65) 公表番号	特表2014-516715 (P2014-516715A)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(43) 公表日	平成26年7月17日(2014.7.17)	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(86) 国際出願番号	PCT/AU2012/000630		
(87) 国際公開番号	W02012/162758		
(87) 国際公開日	平成24年12月6日(2012.12.6)		
審査請求日	平成27年4月1日(2015.4.1)		
(31) 優先権主張番号	61/493,057		
(32) 優先日	平成23年6月3日(2011.6.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳梗塞の影響を治療する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

脳梗塞を患うヒト対象における脳神経細胞を再生させる医薬の製造における、STRO-1<sup>bright</sup>、CD146<sup>+</sup>間葉系前駆細胞が富化された、培養増殖されたヒト細胞の集団を含む治療薬。

【請求項2】

脳神経細胞が、大脳皮質にある、請求項1記載の治療薬。

【請求項3】

脳神経細胞が、運動皮質および/または感覚皮質にある、請求項2記載の治療薬。

【請求項4】

脳梗塞を患う対象において脳機能を改善するまたは脳機能の喪失を予防する、請求項1記載の治療薬。

【請求項5】

脳梗塞を患う対象において運動障害を治療するまたは予防する、請求項1記載の治療薬。

【請求項6】

脳梗塞が、虚血性脳梗塞である、請求項1～5のいずれか一項に記載の治療薬。

【請求項7】

治療薬は、脳梗塞後、1時間と2週間の間投与されるものとする、請求項1～6のいずれか一項に記載の治療薬。

## 【請求項 8】

治療薬は、脳梗塞後、24時間以内に投与されるものとする、請求項7記載の治療薬。

## 【請求項 9】

培養増殖されたヒト細胞の集団が、骨髄または歯髄に由来する、請求項1～8のいずれか一項に記載の治療薬。

## 【請求項 10】

治療薬は、全身投与される、またはヒト対象の脳に局所投与されるものとする、請求項1～9のいずれか一項に記載の治療薬。

## 【請求項 11】

治療薬は、複数回投与されるものとする、請求項1～10のいずれか一項に記載の治療薬。

10

## 【請求項 12】

治療薬は、4以上の週毎に1回投与されるものとする、請求項11記載の治療薬。

## 【請求項 13】

kgあたり $0.1 \times 10^6$ から $5 \times 10^6$ 個の間の培養増殖されたヒト細胞を含む、またはkgあたり $0.3 \times 10^6$ から $2 \times 10^6$ 個の間の培養増殖されたヒト細胞を含む、またはkgあたり $0.1 \times 10^5$ と $0.5 \times 10^6$ 個の間の培養増殖されたヒト細胞を含む、請求項1～12のいずれか一項に記載の治療薬。

## 【請求項 14】

集団を、投与に先立って培養増殖した、請求項1～13のいずれか一項に記載の治療薬

20

## 【請求項 15】

前記集団が、同種異系である、請求項1～14のいずれか一項に記載の治療薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願

本出願は、2012年6月3日出願された、「脳梗塞の影響を治療する方法」と題された米国特許出願第61/493,057号からの優先権を主張する。その内容全体は、ここに参照により組み込まれる。

30

## 【0002】

## 配列表

配列表は、本出願とともに電子出願される。配列表の内容全体は、ここに参照により組み込まれる。

## 【0003】

本開示は、対象における脳梗塞の影響を治療する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0004】

脳梗塞は、オーストラリアでは、心臓病後後の2番目に大きな死亡原因であり、能力障害の一番大きな原因である。脳梗塞は、米国では3番目に大きな死亡原因であり、毎年、140,000人以上が、脳梗塞が原因で死亡している。脳梗塞はまた、米国において、長期にわたる深刻な機能障害の一番大きな原因である。米国で2005年から2050年の期間に脳梗塞に関して予想されるコストは、2.2兆米国ドルである。

40

## 【0005】

機能障害は、脳梗生存者の75%に影響を与え、それらの人々の雇用可能性を低下させるのに充分である。脳梗塞は、身体的、精神的、情動的に、またはそれら3つが組み合わさって、対象に影響を及ぼす可能性がある。

## 【0006】

脳梗塞の結果として生じうる一部の身体的機能障害には、筋力低下、無感覚、褥瘡、肺炎、失禁、失行(学習動作の実行不能)、日常活動の実行困難、食欲喪失、言語喪失、視覚

50

喪失、および疼痛が挙げられる。もし脳梗塞が十分に重症である、または脳幹の一部といったある特定の場所である場合には、昏睡または死亡という結果になる可能性がある。

【 0 0 0 7 】

脳梗塞の結果生じる情動面の問題は、脳の情動中枢の損傷、または新たな制約に対する適応の障害やフラストレーションから生じる可能性がある。脳梗塞後の情動面の障害には、鬱、不安、パニック発作、平坦な情動、(感情を表現できない)、躁、無関心、および精神病が挙げられる。

【 0 0 0 8 】

脳梗塞の結果生じる認識障害には、知覚障害、言語障害、会話障害、痴呆、および注意力と記憶力の障害が挙げられる。脳梗塞を患う者は、自身の機能障害に気づいていないことがあり、これは疾病失認と呼ばれる状態である。半側空間無視と呼ばれる状態では、患者は、損傷した半球の反対側でのいかなる物にも注意を向けることができない。

10

【 0 0 0 9 】

脳梗塞の患者の最高 10% が、もっとも多くは事象にひき続く 1 週間後で、発作を発症する。脳梗塞の重症度は、発作の尤度を増加させる。

【 0 0 1 0 】

脳梗塞は、脳への血液供給の障害による脳機能の喪失が、急速に発症するものである。これは、閉塞(血栓症、動脈塞栓症)、または出血(血液の漏出)に起因する虚血(血流の欠如)による可能性がある。結果として、脳の患部は機能しなくなり、その結果、対象は、半身の 1 つまたは複数の肢を動かすことができなくなる、会話を理解する、もしくは会話を成立させることができなくなる、または視野の片側を見ることができなくなることになりかねない。脳梗塞はしばしば、神経細胞の死という結果を生じ、死に至る可能性もある。

20

【 0 0 1 1 】

2 つのよく知られた型の脳梗塞があり:(i)虚血性脳梗塞、これは、一時的または持続的な、脳への血流の閉塞によって生じ、脳梗塞の症例の 85% を占め、(ii)脳出血、これは、血管の破裂によって生じ、残りの症例の大部分を占めるものである。虚血性脳梗塞のもっとも多い原因は、中大脳動脈(内頸動脈から下流の頭蓋内動脈)の閉塞であり、これは、大脳(例えば、大脳皮質)、例えば、運動皮質や感覚皮質を損傷させる。そうした損傷の結果、片麻痺、片側感覚脱失、そして、脳半球の損傷に依存して、言語障害または視空間障害のどちらかが生じる。

30

【 0 0 1 2 】

虚血性脳梗塞の現在の治療は、虚血性ペナンプラ、すなわち、構造の完全性は保持しているが電氣的機能を喪失した、脳の中程度の低灌流領域をレスキュー(rescue)することに焦点を当ててきた。現状では、脳梗塞後の結果を改善する、臨床的に証明された治療は:

- ・さらなる脳梗塞を予防するアスピリン、
- ・閉塞を逆転させる組織プラスミノゲン活性化因子を用いた緊急血栓溶解、
- ・ストロークユニット(stroke unit)での管理、および
- ・頭蓋内圧を低下させる半頭蓋切除、の 4 つしかない。

40

【 0 0 1 3 】

しかしながら、そうした治療は、進行中の神経細胞損傷を軽減しようとするだけのものであって、喪失した神経細胞または脳機能を修復するものではない。

【 0 0 1 4 】

一部の神経保護剤が、脳梗塞の治療における有効性について試験され、うまくいかなかったが、それらには、N - メチル - D - アスパルテート受容体拮抗薬、ナルメフェン(nalmefene)、ルベルゾール(lubeluzole)、クロメチアゾール(clomethiazole)、カルシウムチャンネル遮断薬(a - アミノ - 3 - ヒドロキシ - 5 - メチルイソキサゾール - 4 - プロプリオン酸拮抗薬、セロトニン作動薬(例えばレピノタン(repinotan))、およびトランスメンブレンカリウムチャンネル調節剤を含む)、チリラザド(tirilazad)、抗 I C A

50

M - I 抗体、ヒト抗白血球抗体 ( H u 2 3 F 2 G )、抗血小板抗体 ( 例えばアブシキマブ ( abciximab ) )、シチコリン ( citicoline )、( シチジン - 5 ' - ニリン酸コリンの外因性形態 )、および塩基性線維芽細胞増殖因子が挙げられる。

【 0 0 1 5 】

上記のことから、脳梗塞の治療について当技術分野における要求があることは、明らかであるだろう。望ましい治療は、脳梗塞によって生じた神経損傷の少なくとも一部を修復する、および/または脳梗塞の結果としての脳機能喪失を、少なくとも一部を修復するであろう。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

10

【 0 0 1 6 】

【 特許文献 1 】 米国特許出願第 6 1 / 4 9 3 , 0 5 7 号

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 7 】

上記のことから、脳梗塞の治療について当技術分野における要求があることは、明らかであるだろう。望ましい治療は、脳梗塞によって生じた神経損傷の少なくとも一部を修復する、および/または脳梗塞の結果としての脳機能喪失を、少なくとも一部を修復するであろう。

【 課題を解決するための手段 】

20

【 0 0 1 8 】

本開示は、脳梗塞の影響の治療に有用な細胞集団の、本発明人による同定に基づいている。本明細書で例証したように、本発明人は、S T R O - 1 + 細胞および/もしくはその子孫ならびに/またはそれが分泌する因子が、脳梗塞後の喪失した脳機能を修復することを示した。例示的な S T R O - 1 + 細胞は、骨髄および/または歯髄に由来し、治療でのそれらを使用する以前に、培養および/または保存することができることを示した。本発明人は、例えば、大脳に影響を与える虚血性脳梗塞について認められた動物モデルを用いて、脳梗塞の影響を治療する細胞および/または分泌因子の有効性を実証した。

【 0 0 1 9 】

例えば、本発明人は、それらが、脳梗塞後の脳機能を修復する、および/または運動障害を治療することができることを示した。本発明人はまた、S T R O - 1 + 細胞が、因子 ( 例えば S D F - 1 ) を分泌し、これらの因子が、神経細胞からの軸索の成長を引き起こすことを示した。理論または行動様式に拘束されるものではないが、本発明人は、これらの因子が、神経保護、血管新生、免疫調節、および/または神経可塑性に寄与する可能性があることを提案する。

30

【 0 0 2 0 】

発明人はまた、S T R O - 1 + 細胞が、神経細胞様細胞に分化することができることを示した。しかしながら、脳梗塞を患う対象の脳への注入の後に、これらの細胞で数週間を超えて生存したものはほとんどない。これらの結果は、S T R O - 1 + 細胞および/もしくはその子孫ならびに/またはそれが分泌する因子が、脳梗塞後の対象自身の神経細胞の生存および/または再生に寄与していることを示している。

40

【 0 0 2 1 】

本明細書で示された知見は、脳梗塞の1つまたは複数の影響を治療する方法の根拠を提供するものである。例えば、そのような方法は、脳梗塞を患う対象に、S T R O - 1 + 細胞および/もしくはその子孫が富化された細胞の集団ならびに/またはそれに由来する可溶性因子を投与することを含む。

【 0 0 2 2 】

本開示は、脳梗塞を患う対象において、脳機能を改善するまたは脳機能の喪失を予防する方法であって、対象に、S T R O - 1 + 細胞および/もしくはその子孫が富化された細胞の集団ならびに/またはそれに由来する可溶性因子を投与することを含む方法を提供す

50

る。

【0023】

一例では、対象における脳機能改善は、対象における運動障害を改善する。一例では、脳機能は、運動皮質機能および/または感覚皮質機能といった大脳皮質機能である。

【0024】

本開示はさらに、または代わりに、脳梗塞を患う対象における運動障害を治療または予防する方法であって、対象に、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫が富化された細胞の集団ならびに/またはそれに由来する可溶性因子を投与することを含む方法を提供する。

【0025】

本明細書に記載の方法の一例では、運動障害は、麻痺、局部麻痺、言語不明瞭、非協調運動、筋力低下、緊張低下、緊張亢進、または異常不随意運動である。

【0026】

本開示はさらに、脳梗塞を患う対象において脳神経細胞を再生させる方法であって、対象に、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫が富化された細胞の集団ならびに/またはそれに由来する可溶性因子を投与することを含む方法を提供する。

【0027】

本開示さらに、脳梗塞を患う対象において、脳萎縮症を治療する、低下させるまたは予防する方法であって、対象に、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫が富化された細胞の集団ならびに/またはそれに由来する可溶性因子を投与することを含む方法を提供する。一例では、脳萎縮症は脳梁内にある。

【0028】

一例では、本開示の方法を実行することにより再生する脳神経細胞は、大脳皮質、例えば、運動皮質および/または感覚皮質にある。

【0029】

一例では、脳梗塞は、虚血性脳梗塞である。

【0030】

本開示で企図される例示的な脳梗塞は、対象における中大脳動脈の閉塞によって生じる虚血性脳梗塞である。

【0031】

一例では、本開示の方法は、対象に、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫が富化された細胞の集団ならびに/またはそれに由来する可溶性因子を、脳梗塞後の1時間と1か月の間、例えば、1時間と1週間の間といった1時間と2週間の間投与することを含む。例えば、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫が富化された細胞の集団ならびに/またはそれに由来する可溶性因子を、脳梗塞後の約72時間以内に投与する。例えば、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫が富化された細胞の集団ならびに/またはそれに由来する可溶性因子を、脳梗塞後の約48時間以内に投与する。

【0032】

他の例では、方法は、対象にSTRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫が富化された細胞の集団ならびに/またはそれに由来する可溶性因子を、脳梗塞後の24時間以内に投与することを含む。例えば、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫が富化された細胞の集団ならびに/またはそれに由来する可溶性因子を、脳梗塞の約24時間後に投与する。

【0033】

一例では、方法は、STRO-1<sup>bright</sup>細胞および/もしくはその子孫が富化された細胞の集団ならびに/またはそれに由来する可溶性因子を投与することを含む。一例では、子孫は、STRO-1<sup>bright</sup>細胞がさらに富化されている。

【0034】

例示的な細胞および/または子孫はさらに、組織非特異型アルカリフォスファターゼ(TNAP)および/または熱ショックタンパク質90(HSP90P)および/または

10

20

30

40

50

C D 1 4 6 を発現する。

【 0 0 3 5 】

一例では、細胞の集団は、骨髄または歯髄に由来する。

【 0 0 3 6 】

一例では、S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / もしくはその子孫が富化された集団ならびに / またはそれに由来する可溶性因子は、全身投与される。

【 0 0 3 7 】

代替の例では、S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / もしくはその子孫が富化された集団ならびに / またはそれに由来する可溶性因子は、対象の脳に局所投与される。例えば、S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / もしくはその子孫が富化された集団ならびに / またはそれに由来する可溶性因子は、対象の脳に局所投与される。一例では、集団および / または子孫および / または可溶性因子はさらに ( または代わりに )、対象の線状体に投与される。

10

【 0 0 3 8 】

一例では、S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / またはその子孫が富化された集団は、脳梗塞の部位から遠い部位に投与され、脳梗塞の部位、例えば、虚血性梗塞、または虚血性梗塞を取り巻く境界域に移動する。

【 0 0 3 9 】

本明細書記載のいずれかの例に従う例示的な方法は、脳機能を改善する、および / または脳神経細胞を再生するのに十分な用量の、集団および / または子孫および / または可溶性因子を投与することを含む。

20

【 0 0 4 0 】

一例では、方法は、有効量または治療有効量の、集団および / または子孫および / または可溶性因子を投与することを含む。

【 0 0 4 1 】

一例では、方法は、k g あたり  $0.1 \times 10^6$  から  $5 \times 10^6$  個の間の S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / またはその子孫を投与することを含む。例えば、方法は、k g あたり  $0.3 \times 10^6$  から  $2 \times 10^6$  個の間の S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / またはその子孫を投与することを含む。例えば、方法は、k g あたり  $0.5 \times 10^6$  から  $2 \times 10^6$  個の間の S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / またはその子孫を投与することを含む。例えば、方法は、k g あたり  $0.5 \times 10^6$  から  $1.5 \times 10^6$  個の間の S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / またはその子孫を投与することを含む。例えば、方法は、k g あたり約  $5 \times 10^5$  個の S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / もしくはその子孫、または k g あたり約  $1.5 \times 10^6$  個の S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / もしくはその子孫を投与することを含む。例えば、方法は、k g あたり約  $1.8 \times 10^6$  個の S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / またはその子孫を投与することを含む。

30

【 0 0 4 2 】

一例では、本明細書記載のいずれかの例に従う方法は、低用量の、S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / またはその子孫を投与することを含む。例えば、低用量の、S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / またはその子孫は、k g あたり  $0.1 \times 10^5$  と  $0.5 \times 10^6$  個の間の S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / またはその子孫を含む。

【 0 0 4 3 】

一例では、集団および / もしくは子孫ならびに / または可溶性因子は、複数回投与される。例えば、集団および / もしくは子孫ならびに / または可溶性因子は、4 以上の週毎に 1 回投与される。

40

【 0 0 4 4 】

一例では、25%未満の、S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / またはその子孫は、対象の脳 ( 例えば脳 ) の中に、投与後 28 日間残存する。例えば、10%未満の、S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / またはその子孫は、対象の脳 ( 例えば脳 ) に、投与後 28 日間残存する。例えば、5%未満または 3%未満の、S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞および / またはその子孫は、対象の脳 ( 例えば脳 ) に、投与後 28 日間残存する。

【 0 0 4 5 】

50

一例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫細胞が富化された集団は、オートジェネティック (autogeneic) もしくは同種異型であり、ならびに/または可溶性因子は、オートジェネティックもしくは同種異系細胞に由来することがある。一例では、本明細書記載のいずれかの例に従う方法は、集団および/もしくは子孫を単離もしくは富化すること、ならびに/または可溶性因子を単離することを含む。

【0046】

本明細書記載のいずれかの例に従う方法の例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/またはその子孫細胞が富化された集団は、投与に先立って、および/または可溶性因子を得るのに先立って、培養増殖されている。一例では、方法は、本明細書記載の方法はさらに、集団および/または子孫を培養することを含む。一例では、方法はさらに、集団および/または子孫を保存することを含む。

10

【0047】

一例では、集団および/もしくはその子孫細胞ならびに/またはそれに由来する可溶性因子は、前記STRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫細胞および/またはそれに由来する可溶性因子ならびに担体および/または賦形剤を含む組成物の形態で投与される。一例では、本明細書記載のいずれかの例に従う方法はさらに、集団および/または子孫および/または可溶性因子を、担体および/または賦形剤とともに調剤することを含む。

【0048】

一例では、本明細書記載のいずれかの例に従う方法はさらに、治療後の対象の脳機能を試験することを含む。例えば、方法はさらに、対象の、運動および/または体力および/または会話および/または体力を試験することを含む。一例では、もし対象の脳機能が、集団および/または子孫および/または可溶性因子の投与前と比較して有意に増大しなかった場合には、方法は、さらなる用量の、集団および/または子孫および/または可溶性因子を投与することを含む。

20

【0049】

一例では、治療されている対象は、霊長類、例えばヒトといった哺乳類である。

【0050】

本開示はまた、脳梗塞後の対象における脳機能を改善する、または脳梗塞後の対象における運動障害を治療する、または脳梗塞後の対象における脳神経細胞を再生させるさいに使用する、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫が富化された細胞の集団ならびに/またはそれに由来する可溶性因子を提供する。

30

【0051】

本開示はさらに、脳梗塞後の対象における脳機能を改善する、または脳梗塞後の対象における運動障害を治療する、または脳梗塞後の対象における脳神経細胞を再生させる医薬を製造するさいの、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫が富化された細胞の集団ならびに/またはそれに由来する可溶性因子の使用を提供する。

【0052】

本開示はまた、本明細書でいずれかの例に記載の方法において、使用説明書と同梱された、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫が富化された細胞の集団ならびに/またはそれに由来する可溶性因子を含むキットを提供する。

40

【0053】

例えば、本開示は、本明細書でいずれかの実施例に記載の方法において、組成物の使用を指示する製品情報と同梱された、集団および/または子孫および/または可溶性因子を含む組成物、を含むキットを提供する。

【0054】

本開示はまた、本明細書記載のいずれかの例に従う方法において、使用説明書と同梱された、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/またはその子孫を単離するまたは培養するキットを提供する。

【0055】

本開示はまた、本明細書記載のいずれかの例に従う方法において、使用説明書とともに

50

、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫が富化された細胞の集団ならびに/またはそれに由来する可溶性因子を提供することを含む方法を提供する。

【0056】

本開示はまた、本明細書記載のいずれかの例に従う方法において、後に使用するための、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫が富化された細胞の集団ならびに/またはそれに由来する可溶性因子を、単離する、または単離するために用意する、または保存する、または保存するために用意することを含む方法を提供する。

【0057】

本明細書に記載の方法は、さらなる脳梗塞の危険性を低下させる方法に準用すると解されるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】成人BMMNCによるTNAP (STRO-3) および間葉系前駆細胞マーカー、STRO-1<sup>brigt</sup>の共発現を示す。STRO-1 MACSで選別したBMMNCのインキュベーション、およびFITCに結合したヤギ抗マウスIgM抗体での間接標識(x軸)、およびPEに結合したヤギ抗マウスIgGで間接標識されたSTRO-3 mAb (マウスIgG1) (y軸)によって、二色免疫蛍光法およびフローサイトメトリーを行った。ドットプロットヒストグラムはリストモードデータとして収集した5 × 10<sup>4</sup>個の事象を表わしている。垂直線および水平線は、同条件下で処置したアイソタイプ一致の対照抗体、1B5 (IgG) および1A6.12 (IgM) で得られた平均蛍光の1.0%未満の活性レベルに設定した。結果は、少数のSTRO-1<sup>brigt</sup>細胞集団がTNAPを共発現したが(右上の象限)、一方で残りのSTRO-1<sup>+</sup>細胞はSTRO-3 mAbと反応しなかったことを示している。

【図2-1】培養され増殖したSTRO-1<sup>brim</sup>MPCのSTRO-1<sup>br</sup>、またはSTRO-1<sup>d</sup>子孫の遺伝子発現プロファイルである。ex vivoで増殖した骨髄MPCの単個細胞懸濁液は、トリプシン/EDTA処理により調製した。細胞は、ヤギ抗マウスIgMフルオレセインイソチオシアネートと一緒にインキュベーションすることにより引き続き明らかになったSTRO-1抗体で染色した。全細胞RNAは、蛍光標識細胞分取の後に、STRO-1<sup>d</sup>またはSTRO-1<sup>br</sup>発現細胞の集団から精製した(A)。RNAzol B抽出法と標準的な手順を用いて、全RNAを、各亜集団から単離し、cDNA合成の鋳型として使用した。多様な転写産物の発現を、従来の記述(Grontzos et al. J Cell Sci. 77(5):1827-1835, 2003)の標準プロトコルを用いて、PCR増幅により評価した。本研究で使用したプライマーセットを、表2に示す。増幅の後、各反応混合物を、1.5%アガロースゲル電気泳動で分析し、臭化エチジウム染色により可視化した(B)。

【図2-2】各細胞マーカーについての相対遺伝子発現を、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHの発現を基準にして、ImageQuantソフトウェアを用いて評価した(C)。

【図3】培養され増殖したSTRO-1<sup>+</sup>MPCのSTRO-1<sup>br</sup>子孫は、高レベルのSDF-1を発現するが、STRO-1<sup>d</sup>の子孫はそうではない。(A) STRO-1<sup>+</sup>BMMNCの、MACSで単離した調製物を、FACSを用い、STRO-1<sup>brigt</sup>およびSTRO-1<sup>d</sup>/dullの領域に従って、異なるSTRO-1サブセットに分割した。全RNAを、各STRO-1亜集団から調製し、STRO-1<sup>brigt</sup>サブトラクションハイブリダイゼーションライブラリを構築するのに使用した(B-C)。複製ニトロセルロースフィルター、これは、STRO-1<sup>brigt</sup>サブトラクテッドcDNAを用いて形質転換した細菌クローンから増幅した代表的なPCR生成物を用いてプロットした。このフィルターはその後、[<sup>32</sup>P]デオキシシチジン三リン酸(dCTP)で標識されたSTRO-1<sup>brigt</sup>(B)またはSTRO-1<sup>d</sup>/dull(C)サブトラクテッドcDNAのどちらかを用いて精査した。矢印は、ヒトSDF-1に対応するcDNA断片を含む1クローンの差次的発現を示す。(D)培養に先

10

20

30

40

50



立って新にMACS/FACS単離したBMMNC STRO-1集団から調製した全RNA中のSDF-1およびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)転写物の相対発現を示す逆転写酵素(RT)-PCR分析である。bpは、塩基対を示す。

【図4】ヒトDPSCは、神経細胞様細胞に分化する。(A)ヒト包皮線維芽細胞(HFF)が、*in vitro*で神経細胞誘導培地に応答しないことを示す顕微鏡写真のコピーである。(B)hDPSCが、*in vitro*で、神経細胞誘導培地中で神経細胞表現型に分化することを示す顕微鏡写真コピーである。(C)30msステップで-44から36mVまで10mVごとの増加に応答して、分化したDPSCに記録された極微弱なNa<sup>+</sup>電流の代表例を示すグラフ表示である。(D)電圧ステップに応答して、分化した(D)および非分化の(N.D.)DPSCにおいて得られたピークNa<sup>+</sup>電流の平均I-Vプロットを示すグラフ表示である。

10

【図5】脳梗塞のモデルを治療するのに使用する手順を図示する、一連の表示である。パネルAは、2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムクロライドで染色して、中大脳動脈閉塞(MCAo)の1日後の梗塞性(白色)組織を可視化した、代表的な冠状ラット脳断面を示す。パネルBは、抗ヒトミトコンドリア抗原抗体とヘマトキリンで染色した代表的な冠状ラット脳断面を示す。パネルAとBの黒のドットは、ブレグマに対して前後方向-0.40mm、中央側方向-4.00mm、硬膜から背腹方向-5.50mmでの第1の線条体内注入、および硬膜から背腹-1.75mmでの第2の皮質内注入部位を示している。パネルCは、治療スケジュールの図表示を示しており、このスケジュールでは、動物を、MCAo(0日目として表示)前に3日間訓練し、第3の訓練期間を、術前のベースライン(-1日目)として使用した。動物を無作為に割り付けて、ヒトDPSCまたは培地のみを、MCAoの24時間後に与えた。治療割付けに対して盲検化された調査者による行動評価を、MCAo後の1, 7, 14, 21, および28日目に実行した。すべての動物は、実験の継続期間をとおして、10mg/kgのシクロスポリンAの皮下注入を毎日受けた。動物を犠牲にして、それらの脳を、神経行動学的研究の終了にあたり免疫組織化学のために加工した。スケールバー=2mm(A, B)である。略語は: Cx、大脳皮質; DPSC、歯髄幹細胞; MCAo、中大脳動脈閉塞; Str、線状体である。

20

【図6】MCAo後の神経行動学的結果に与える、ヒトDPSC治療の効果を示す一連のグラフ表示である。MCAoの後、すべての動物は、すべての行動テストにおいて機能障害を示した(1日目または7日目対-1日目)。パネルAは、移植の4週間後に、DPSC治療動物が、ビヒクル治療動物と比較して、総計の神経学的スコアにおいて有意の改善を示した( $p < 0.018$  群×日の交互作用、反復測定分散分析[ANOVA];それぞれ21日目と28日目に治療群間で  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$ ; 事後のフィッシャーの保護付き最小有意差法(post hoc Fisher's protected least significant difference))。パネルBに示すように、DPSC移植群はまた、ステップテストにおいて対側前肢を使ってとられた有意に多くの歩数によって示されるように、前肢感覚運動能力の有意な改善を示した( $p = 0.045$  全体の治療効果)。パネルCはまた、ビヒクル治療群と比較して、DPSC移植群がまた、粘着テープ除去テストにおいて対側前肢からラベルを除去しようとする時間の有意に小さい割合を示したことを示している( $p = 0.049$  全体の治療効果)。治療群間の行動遂行の差は、ロータロッド(パネルD)、および先細り/棧状の梁を歩行する(パネルE)テストにおいて、統計的な有意差に達しなかった( $p > 0.05$ 、反復測定ANOVA)。脳梗塞動物は、POST-MCAoの1日後では、旋回行動が原因で、梁歩行の課題を完遂することができなかった。データを、箱髷図としてプロットし、値の分布を可視化した。四角の中の中心のアスタリスクは、メジアンを表し、箱は、値の中央50%(すなわち、それは第一四分位数から第三四分位数までの範囲である)。髷は、データの範囲を示し、極端な観測結果は、はずれた円で示してある。略語は: DPSC、歯髄幹細胞; MCAo、中大脳動脈閉塞である。

30

40

【図7】虚血後の脳における生存DPSCの分布を示す写真表示のコピーである。代表的な冠状ラット脳断面は、移植の4週間後の、移植されたDPSC(個々の細胞を黒点で示す

50

)の生存および移動のパターンを示している。断面を、ヒトミトコンドリア抗原に対して染色し、ラット脳組織からヒト細胞を検出した。目標としていた、脳梗塞病変へのDPSCの移動と、結果として生じる梗塞周辺での蓄積に注意されたい。スケールバー = 2 mm、略語：B、ブレグマ；CC、脳梁；Cx、大脳皮質；DG、背側海馬の歯状回；LV、側脳室；Str、線状体である。

【図8】脳梗塞の28日後の、移植したヒトDPSCの形態を示す写真表示のコピーである。中大脳動脈閉塞の4週間後のげっ歯類脳におけるヒトDPSC（暗灰色に染色したヒトミトコンドリア抗原陽性細胞；図の右側）の高倍率図は、梗塞核のすぐ近傍での蓄積（パネルA）と、CCに沿った明らかな移動（パネルB）を示した。注入部位と脳梗塞の対側の脳半球におけるDPSCの疎な分布に注意されたい。ドットは、個々のヒトDPSCを示す。パネルCは、一部のDPSC由来細胞が、脳血管に生着したように見え、その形態的外観は、内皮細胞（矢印）、周皮細胞、または平滑筋細胞（矢じり形）と整合することを示す。パネルDは、DPSC由来細胞の形態が、星状細胞（矢印）および神経細胞（矢じり形）を示唆していることを示している。スケールバー = 2 m（パネルA、B）および25 μm（パネルC、D、およびパネルA、Bの高倍率の挿入図 = 40）。略語：B、ブレグマ；CC、脳梁である。

【図9】病変部位と同側（ipsilateral）のCC萎縮に与える、DPSC治療の効果を示す一連の表示である。パネルAは、ブレグマのレベルでの代表的なラット脳断面で、ブレグマでは脳の正中線（L1）および側脳室の側稜（L2）において、2つの部位がCC厚の測定に使用され、両方で同側および対側脳半球が表示されている。パネルBは、移植の4週間後に、ビヒクル治療動物と比較して、DPSC治療動物の病変部位と同側半球に、脳梁萎縮の減少傾向があったことを示す。L1（正中線）でのCC測定に対するL2（同側）での測定の規格化は、統計的有意差に達しなかった（ $p > 0.05$ ）。病変と反対側（contralesional）のCC厚の測定に、治療群間で差異はなかった。データは、平均 ± 標準誤差で示してある。スケールバー = 100 μmである。略語は：CC、脳梁；Contra、対側；Cx、大脳皮質；DPSC、歯髄幹細胞；Ipsi、同側；LV、側脳室、である。

【図10】ヤギ抗マウスIgMまたはIgG結合FITC二次抗体を用いて検出されたアイソタイプ（IgM、IgG2aおよびIgG1）陰性対照（破線）と比較して、間葉系幹細胞マーカーであるSTRO-1、STRO-4およびCD146（実線）の陽性細胞表面発現をもつ、培養増殖された骨髄由来カニクイザルMPCの単個細胞懸濁液を用いて生成した代表的なフローサイトメトリーのヒストグラムを示すグラフ表示である。代表的なヒストグラムはまた、カニクイザルMPCが、単球/マクロファージ（CD14）、造血幹/前駆体細胞（CD34）および成熟白血球（CD45）のマーカーに対して細胞表面発現を欠いていることを示している。アイソタイプ対照と比較して1%蛍光よりも大きいレベルは、陽性を示している。

【発明を実施するための形態】

【0059】

配列リストの手がかり

配列番号1 GAPDHをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド  
 配列番号2 GAPDHをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド  
 配列番号3 SDF-1をコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド  
 配列番号4 SDF-1をコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド  
 配列番号5 IL-1をコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド  
 配列番号6 IL-1をコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド  
 配列番号7 FLT-1をコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド  
 配列番号8 FLT-1をコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド  
 配列番号9 TNF-をコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド  
 配列番号10 TNF-をコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド  
 配列番号11 KDRをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド

10

20

30

40

50

配列番号 1 2	K D Rをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 1 3	R A N K Lをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 1 4	R A N K Lをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 1 5	レプチンをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 1 6	レプチンをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 1 7	C B F A - 1をコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 1 8	C B F A - 1をコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 1 9	P P A R 2をコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 2 0	P P A R 2をコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 2 1	O C Nをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	10
配列番号 2 2	O C Nをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 2 3	M y o Dをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 2 4	M y o Dをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 2 5	S M M H Cをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 2 6	S M M H Cをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 2 7	G F A Pをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 2 8	G F A Pをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 2 9	ネスチンをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 3 0	ネスチンをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 3 1	S O X 9をコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	20
配列番号 3 2	S O X 9をコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 3 3	X型コラーゲンをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 3 4	X型コラーゲンをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 3 5	アグリカンをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	
配列番号 3 6	アグリカンをコードする核酸を増幅するオリゴヌクレオチド	

## 【 0 0 6 0 】

一般的技術および選択された定義

本明細書を通じて、それ以外に具体的に述べられている場合または文脈がそれ以外に要求する場合を除いて、単一ステップへの参照、物質の組成物、ステップの群または物質の組成物の群は、1つおよび複数（すなわち一つまたは複数）の、それらのステップ、物質の組成物、ステップの群または物質の組成物の群を包含すると解されるものとする。

## 【 0 0 6 1 】

本開示の各実施例は、それ以外に具体的に述べられている場合を除き、それぞれおよびすべての他の例に準用されるものとする。

## 【 0 0 6 2 】

当業者は、本開示が、具体的に記載されたもの以外の変形および修正を許容することができることを理解するであろう。本開示がそのような変形および修正すべてを含むことを理解すべきである。本開示はまた、本明細書で参照または表示されているステップ、機能、組成物および化合物のすべてを個々にまたは集散的に、ならびに、前記ステップもしくは機能のいずれかのおよびすべての組み合わせまたはいずれか2つ以上の組み合わせを含む。

## 【 0 0 6 3 】

本開示は、本明細書に記載の具体的な実施例によって範囲を制限されるものではなく、それらの実施例は例示を目的とすることだけを意図している。機能的に等価な生成物、組成物、および方法は、明確に、本開示の範囲内にある。

## 【 0 0 6 4 】

本開示は、それ以外に表示されている場合を除き、分子生物学、微生物学、ウイルス学、DNA組み換え技術、溶液中でのペプチド合成、固相ペプチド合成、および免疫学の従来技術を用いて過度の実験なしに実行される。そのような手順は、例えば、Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab

oratories, New York, Second Edition (1989), Vol I, II, およびIIIの全部; DNA Cloning: A Practical Approach, Vols. I and II (D. N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, のテキスト全体; Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (M. J. Gait, ed, 1984) IRL Press, Oxford, のテキスト全体、および特にその中でGaitによる, pp 1 - 22 の論文; Atkinson et al, pp35-81; Sproat et al, pp 83-115; および Wu et al, pp 135-151; 4. Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, のテキスト全体; Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach (1986) IRL Press, Oxford, のテキスト全体; Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), のシリーズ全体; J .F. Ramalho Ortigao, "The Chemistry of Peptide Synthesis" In: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactiva, Germany); Sakakibara, D ., Teichman, J., Lien, E. Land Fenichel, R.L. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 73 336-342; Merrifield, R.B. (1963). J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154; Barany, G. and Merrifield, R.B. (1979) in The Peptides (Gross, E. and Meienhofer, J. eds.), vol. 2, pp. 1-284, Academic Press, New York. 12. Wunsch, E., ed. (1974) Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie (Muler, E., ed.), vol. 15, 4th edn., Parts 1 and 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 25, 449-474; Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); および Animal Cell Culture: Practical Approach, Third Edition (John R. W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, のテキスト全体、に記載されている。

#### 【 0 0 6 5 】

本明細書をとおして、文脈がそれ以外を要求する場合を除き、「comprise (含む)」という語、または「comprises」もしくは「comprising」といった変化形は、述べられたステップまたは要素または完全体またはステップ (複数) もしくは要素 (複数) もしくは完全体 (複数) の群の包含を意味するが、あらゆる他のステップまたは要素または完全体または要素もしくは完全体の群の排除を意味するものではないことが理解されるであろう。

#### 【 0 0 6 6 】

本明細書で使用される場合、「由来する (derived from)」の用語は、特定の完全体が、具体的な源から、その源から必ずしも直接的ではないにしても、得られうることを表示すると解されるものとする。STRO-1<sup>+</sup>細胞および/またはその子孫細胞に由来する可溶性因子という文脈では、この用語は、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/またはそれらの子孫細胞の *in vitro* 培養の間に産生される一つまたは複数の因子、例えば、タンパク質、ペプチド、炭水化物等などを意味すると解されるものとする。

#### 【 0 0 6 7 】

本明細書で使用される場合、「脳梗塞」という用語は、脳または脳幹への血流の障害による、通常、急速に発症する脳機能 (複数可) の喪失を意味すると解されるものとする。障害は、例えば血栓症または塞栓症に起因する虚血 (血液の不足) であり得、または出血によるものでもあり得る。一例では、脳機能の喪失は、神経細胞の死を伴う。一例では、脳梗塞は、大脳またはその領域に生じる血液の障害または喪失に起因する。一例では、脳梗塞は、24時間を超えて持続する、または24時間以内に死によって中断する、脳血管的原因の神経学的障害である (世界保健機関により定義されているとおり)。24時間を超える症状の持続により、脳梗塞は、症状の持続が24時間未満の一過性脳虚血発作 (TIA) から区別される。脳梗塞の症状には、片麻痺 (半身の麻痺); 片側不全麻痺 (半身の脱力); 顔面の筋力低下; 無感覚; 感覚の低下; 嗅覚、味覚、聴覚、または視覚の変化; 嗅覚、味覚、聴覚または視覚の喪失; 瞼の垂下 (眼瞼下垂症); 眼筋の発見可能な脱力

10

20

30

40

50

；咽頭反射の低下；嚥下能力の低下；瞳孔対光反応の低下；顔面の感覚低下；平衡の低下；眼振；呼吸数の変化；心拍数の変化；頭部を一方向へ転換する能力の低下または不可能になることを伴う胸鎖乳突筋の脱力；舌の脱力；失語症（会話するまたは言語を理解することができなくなる）；失行症（随意運動の変化）；視野欠損；記憶障害；半側無視または半側空間無視（病変とは反対の視野側空間への注意障害）；支離滅裂な思考；精神錯乱；性欲過剰な身振りの発現；病態失認（障害の存在を持続的に否定）；歩行困難；運動協調性の変化；空間識失調；不均衡；意識喪失；頭痛；および／または嘔吐が挙げられる。

【 0 0 6 8 】

当業者は、「大脳」が、大脳皮質（すなわち脳半球の皮質）、大脳基底核（すなわち大脳核）および辺縁系を含むことを知っているであろう。

10

【 0 0 6 9 】

「脳機能」という用語は：

- ・論理的思考、企画、会話の一部分、運動、情動、および問題解決（前頭葉が関連する）；
- ・運動、定位、認識、刺激の知覚（頭頂葉が関連する）；
- ・視覚処理（後頭葉が関連する）；および、
- ・聴覚刺激の知覚および認識、記憶、および会話（側頭葉が関連する）、を含む。

【 0 0 7 0 】

本明細書で使用される場合、「運動障害」という用語は、脳梗塞以前と比較した、対象の移動する能力のあらゆる変化を意味すると解されるものとする。例示的な運動障害には、麻痺、局部麻痺、言語不明瞭、非協調運動、筋力低下、緊張低下、緊張亢進または異常不随意運動などが挙げられる。

20

【 0 0 7 1 】

本明細書で使用される場合、神経細胞を「再生させる」とは、対象の内在性神経細胞が、成長する（例えば、軸索を成長させる）および／もしくは分割するように誘導される、ならびに／または内在性神経幹細胞が、成長および／もしくは分割するおよび／もしくは分化して新たな神経細胞を産生するように誘導されることを意味すると解されるものとする。このことは、投与されて神経細胞を産生するように分化する細胞とは異なる。この用語は、神経細胞を再生させる方法がさらに、投与された細胞の、神経細胞または他の細胞型への分化を含んではいけないということの意味するものではない。

30

【 0 0 7 2 】

本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、脳梗塞を患う対象において脳神経細胞の再生を誘導する、および／または対象において神経細胞に分化するのに十分な量の、STRO-1<sup>+</sup>細胞および／もしくはその子孫細胞が富化された集団ならびに／またはそれに由来する可溶性因子を意味すると解されるものとする。有効量は、それだけで治療効果を提供するのに充分である必要はなく、例えば、有効量の、集団および／または細胞および／または可溶性因子の複数の投与が、治療効果を提供してもよい。

【 0 0 7 3 】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、脳梗塞を患う対象において脳機能を改善するおよび／または運動障害を治療するおよび／または脳神経細胞を再生させるのに十分な量の、STRO-1<sup>+</sup>細胞および／もしくはその子孫細胞が富化された集団ならびに／またはそれに由来する可溶性因子を意味すると解されるものとする。

40

【 0 0 7 4 】

本明細書で使用される場合、「低用量」という用語は、STRO-1<sup>+</sup>細胞および／もしくはその子孫の、 $1 \times 10^6$ 個より少ないがそれでも本明細書で定義されている「有効量」ならびに／または本明細書で定義される「治療有効量」であるのに十分な量を意味すると理解されるものとする。例えば、低用量は、 $0.5 \times 10^6$ 個以下の細胞、または $0.4 \times 10^6$ 個以下の細胞、または $0.3 \times 10^6$ 個以下の細胞または $0.1 \times 10^6$ 個以下の細胞を含む。

【 0 0 7 5 】

50

本明細書で使用される場合、「治療する(treat)」、「治療(treatment)」、「治療すること(treating)」という用語は、ある量の可溶性因子および/または細胞を投与すること、ならびに運動障害の重症度を減少させることを意味すると解されるものとする。

【0076】

本明細書で使用される場合、「予防する(prevent)」、「予防すること(preventing)」、「予防(prevention)」という用語は、ある量の可溶性因子および/または細胞を投与すること、ならびに脳梗塞後の運動障害もしくは脳機能喪失の発症もしくは進行を停止するまたは抑制するまたは遅延させることを意味すると解されるものとする。このように、本開示の方法は、脳梗塞を患う対象において運動障害または脳機能喪失を予防する方法に準用すると解されるものとする。

10

【0077】

本明細書で使用される場合、「可溶性因子」という用語は、水溶性であるSTRO-1<sup>+</sup>細胞および/またはその子孫によって産生される、例えば、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、リポタンパク質、リポペプチド、炭水化物などの、あらゆる分子を意味すると解されるものとする。そのような可溶性因子は、細胞内にありうる、および/または細胞によって分泌されうる。そのような可溶性因子は、複雑な混合物(例えば上清)および/もしくはその画分であり得る、並びに/または精製された因子であり得る。本開示の一例では、可溶性因子は、上清である、または上清中に含有される。従って、一つまたは複数の可溶性因子の投与を目的とする、本明細書のいかなる例も、上清の投与に準用されると解されるものとする。

20

【0078】

本明細書で使用される場合、「上清」という用語は、液状培地といった適切な培地においてSTRO-1<sup>+</sup>細胞および/またはその子孫の*in vivo*での培養をおこなった後に生成される非細胞性物質をさす。典型的には、上清は、適切な条件と時間のもと、培地中で細胞を培養し、その後遠心分離といった過程により細胞性物質を除去することによって生成される。上清は、投与前にさらなる精製ステップを経ても経なくてもよい。一例では、上清は、10<sup>5</sup>個より少ない、さらには、10<sup>3</sup>個より少ないといった、例えば10<sup>4</sup>個より少ない細胞を含み、さらには例えば生細胞は含まない。

【0079】

本明細書で使用される場合、「正常または健康な個体」という用語は、脳梗塞を患っている対象を意味すると解されるものとする。

30

【0080】

本明細書では、「脳梗塞の影響」という用語は、脳機能を改善させる、運動障害を治療するもしくは予防するおよび/または脳神経細胞を再生させることの1つまた複数に、文字通りの支持を含み、提供すると理解されるであろう。

【0081】

STRO-r細胞または子孫細胞、およびそれに由来する上清または1つもしくは複数の可溶性因子

STRO-1<sup>+</sup>細胞は、骨髄、血液、歯髄細胞、脂肪組織、皮膚、脾臓、膵臓、脳、腎臓、肝臓、心臓、網膜、脳、毛包、腸、肺、リンパ節、胸腺、骨、靭帯、腱、骨格筋、真皮、および骨膜に見出される細胞であり、中胚葉および/または内胚葉および/または外胚葉等の生殖細胞系に分化することができる。例示的なSTRO-1<sup>+</sup>細胞の源は、骨髄および/または歯髄に由来する。

40

【0082】

一例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞は、多数の細胞型、例えば、限定はされないが、脂肪組織、骨組織、軟骨組織、弾性組織、筋肉組織、および線維性結合組織に分化可能な多能性細胞である。これらの細胞が迎える具体的な細胞系譜の決定および分化経路は、増殖因子、サイトカイン、および/または宿主組織によって構築される局所的な微小環境の条件等の機械的影響および/または内在性生物活性因子からの種々の影響に依存する。従って、STRO-1<sup>+</sup>多能性細胞は、分裂して、どちらも幹細胞である娘細胞を生じる非造血系

50

前駆細胞であるか、または適切な時期に不可逆的に分化して表現型を持つ細胞 (phenotypic cell) を生じる前駆細胞である。

【 0 0 8 3 】

一例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞は、神経細胞または神経細胞様細胞に分化することができる。

【 0 0 8 4 】

一例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞は、神経細胞からの軸索の成長を誘導または促進する、1つまたは複数の因子を分泌する。

【 0 0 8 5 】

一例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞は、対象、例えば、治療を受ける対象または近縁の (related) 対象もしくは非近縁の (unrelated) 対象 (同一種か異種かに関わらない) から得られた試料から富化される。「富化された」、「富化」という用語またはその変化形は、無処置の細胞集団 (例えば、天然環境にある細胞) と比較したときに、ある特定の細胞型の割合またはいくつかの特定の細胞型の割合が増加している細胞集団を記述するために本明細書では使用される。一例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞が富化された集団の割合は、少なくとも約0.1%または0.5%または1%または2%または5%または10%または15%または20%または25%または30%または50%または75%のSTRO-1<sup>+</sup>細胞を含む。この点において、「STRO-1<sup>+</sup>細胞が富化された細胞集団」という用語は、「X%のSTRO-1<sup>+</sup>細胞を含む細胞集団」という用語に明示的な支持を与えると解されるであろう。ここでX%は、本明細で列挙されているようにパーセンテージである。STRO-1<sup>+</sup>細胞は、一部の例では、クローン原生コロニー、例えばCFU-F (線維芽細胞) を形成する可能性があり、またはそのサブセット (例えば50%または60%または70%または70%または90%または95%) がこの活性を有する可能性がある。

【 0 0 8 6 】

一例では、細胞集団は、選択可能な形態でSTRO-r細胞を含む、細胞の調整物から富化される。この点において、「選択可能な形態」という用語は、STRO-1<sup>+</sup>細胞の選択を可能にするマーカー (例えば細胞表面マーカー) を発現することを意味すると理解されるであろう。マーカーは、STRO-1であってもよいが、しかしそうである必要はない。例えば、本明細書に記載されているおよび/または例示されているように、STRO-2および/またはSTRO-3 (TNAP) および/またはSTRO-4および/またはVCAM-1および/またはCD146および/または3G5を発現する細胞 (例えばMPC) はまた、STRO-1 (そしてSTRO-1<sup>+</sup>強陽性 (bright)) である可能性がある) を発現する。従って、細胞がSTRO-1<sup>+</sup>であるという表示は、細胞がSTRO-1発現によって選択されるということの意味するものではない。一例では、細胞は、少なくともSTRO-3発現に基づいて選択され、例えばそれらはSTRO-3<sup>+</sup> (TNAP<sup>+</sup>) である。

【 0 0 8 7 】

細胞またはその集団の選択への言及が、特定の組織源からの選択である必要はない。本明細書に記載されるように、STRO-1<sup>+</sup>細胞は、非常に多様な源から選択または分離または富化されうる。とはいうものの、一部の例では、これらの用語は、STRO-1<sup>+</sup>細胞 (例えばMPC) を含むあらゆる組織、または血管組織、または周皮細胞 (例えばSTRO-1<sup>+</sup>周皮細胞) を含む組織、または本明細書に列挙される組織のいずれかまたはそれ以上のものに支持を与える。

【 0 0 8 8 】

一例では、細胞は、TNAP<sup>+</sup>、VCAM-1<sup>+</sup>、THY-1<sup>+</sup>、STRO-2<sup>+</sup>、STRO-4<sup>+</sup> (HSP-90)、CD45<sup>+</sup>、CD146<sup>+</sup>、3G5<sup>+</sup>またはそれらのあらゆる組合せからなる群から、個々に、または集散的に選択される一つまたは複数のマーカーを発現する。

【 0 0 8 9 】

一例では、細胞は発現する、または細胞の集団は、STRO-1<sup>+</sup> (またはSTRO-

10

20

30

40

50

1<sup>b r i g h t</sup>) および CD146<sup>+</sup> を発現する間葉前駆細胞が富化されている。

【0090】

「個々に(Individually)」とは、本開示が、列挙されたマーカーまたはマーカー群を個別に包含すること、および、個々のマーカーまたはマーカー群が本明細書に個別には列挙されていない可能性があるにもかかわらず、添付の特許請求の範囲が、かかるマーカーまたはマーカー群を互いから個別に、且つ可分的に定義してもよいことを意味している。

【0091】

「集合的に(Collectively)」とは、本開示があらゆる数の、またはあらゆる組合せの列挙されたマーカーまたはペプチド群を含むこと、および、かかるあらゆる数の、またはあらゆる組合せの列挙されたマーカーまたはマーカー群が本明細書では具体的に一覧にされ

10

【0092】

一例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞はSTRO-1<sup>b r i g h t</sup> (STRO-1<sup>b r i</sup>と同義)である。一例では、Stro-1<sup>b r i</sup>細胞は、STRO-1<sup>d i m</sup>またはSTRO-1<sup>i n t e r m e d i a t e</sup>細胞と比較して優先的に富化される。

【0093】

例えば、STRO-1<sup>b r i g h t</sup>細胞は、さらに、TNAP<sup>+</sup>、VCAM-1<sup>+</sup>、THY-1<sup>+</sup>、STRO-2<sup>+</sup>、STRO-4<sup>+</sup> (HSP-90P)、および/またはCD146<sup>+</sup>のうちの一つまたは複数である。例えば、細胞は、1つまたは複数の前述のマーカーに対して選択される、および/または1つまたは複数の前記マーカーを発現することが示される。この点において、マーカーを発現することが示された細胞が、具体的に試験される必要はなく、むしろ、これまで富化されたまたは単離された細胞が試験されてもよく、引き続いて使用、単離または富化された細胞もまた、同一マーカーを発現するものと、妥当に仮定されてもよい。

20

【0094】

一例では、間葉系前駆細胞は、国際公開第WO2004/85630号で定義されたように、血管周囲の間葉系前駆細胞である。例えば、間葉系前駆細胞は、血管周囲細胞のマーカーを発現し、例えば細胞は、STRO-1<sup>+</sup>もしくはSTRO-1<sup>b r i g h t</sup>および/または3G5<sup>+</sup>である。一例では、細胞は、血管周囲の組織または臓器もしくはその一部から単離された細胞である、または以前そうであった、またはその細胞の子孫である。

30

【0095】

所与のマーカーに関して「陽性(positive)」であると見なされる細胞は、用語が蛍光の強度に関連する場合、マーカーが細胞表面上に存在している程度に応じた、低(低(lo)または弱陽性(dim))レベルもしくは高(強陽性(bright、bri))レベルのマーカーどちらかを発現している場合がある。ここで、この用語は、細胞の分取過程で使用される他のマーカーの蛍光強度に関係している。低(または弱陽性もしくは微陽性(dull))および強陽性の差異は、分取されている特定の細胞集団上の使用されるマーカーとの関連で理解されるだろう。所与のマーカーに関して「陰性(negative)」であるとみなされる細胞は、必ずしもその細胞に全く存在していないわけではない。この用語は、マーカーが、前記細胞によって相対的に非常に低いレベルで発現されていること、および、検出可能な程度に標識された場合に、マーカーが非常に小さなシグナルを発すること、またはバックグラウンドレベル、例えば、アイソタイプ対照抗体を用いて(suing)検出されたレベル以上には検出不能であること、を意味する。

40

【0096】

「強陽性(bright)」という用語は、本明細書で使用される場合、検出可能な程度に標識された場合に、相対的に高いシグナルを発する細胞表面上マーカーを指している。理論に制限されることを望むものではないが、「強陽性」細胞は、試料中の他の細胞より多い

50



っそう多くの標的マーカータンパク質（例えばSTRO-1から識別される抗原）を発現すると提唱されている。例えば、STRO-1<sup>br i</sup>細胞は、FITC結合STRO-1抗体で標識された場合、蛍光標識細胞分取（FACS）分析によって測定される、非強陽性細胞（STRO-1<sup>d u l l / d i m</sup>）よりも大きな蛍光シグナルを発する。例えば、「強陽性」細胞は、出発試料中に含まれる最も明るく標識された骨髄単核細胞のうちの少なくとも約0.1%を構成している。他の例では、「強陽性」細胞は、出発試料中に含まれる最も明るく標識された骨髄単核細胞のうちの少なくとも約0.1%、少なくとも約0.5%、少なくとも約1%、少なくとも約1.5%、または少なくとも約2%を構成している。ある例では、STRO-1<sup>b r i g h t</sup>細胞は、「バックグラウンド」、すなわちSTRO-1<sup>-</sup>である細胞と比較して、STRO-1の細胞表面発現が2対数分（2 log magnitude）高い。比較した場合、STRO-1<sup>d i m</sup>および/またはSTRO-1<sup>i n t e r m e d i a t e</sup>細胞は、「バックグラウンド」よりも、STRO-1の細胞表面発現が2対数未満分高く、典型的には、約1対数以下分高い。

10

## 【0097】

本明細書で使用される場合、「TNAP」という用語は、組織非特異的アルカリホスファターゼの全てのアイソフォームを包含することが意図されている。例えば、その用語には、肝アイソフォーム（LAP）、骨アイソフォーム（BAP）および腎アイソフォーム（KAP）が包含される。一例では、TNAPはBAPである。一例では、TNAPは、本明細書で使用される場合、ブダベスト条約の規定に基づきPTA-7282の寄託受託番号で2005年12月19日にATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞株によって産生されるSTRO-3抗体と結合することができる分子を指す。

20

## 【0098】

さらに、本開示のある例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞はクローン原性のCFU-Fを生じさせることができる。

## 【0099】

一例では、かなりの割合のSTRO-1<sup>+</sup>多能性細胞が、少なくとも2種類の異なる生殖細胞系に分化することができる。多能性細胞が分化決定され得る系譜の例としては、限定はされないが、骨前駆細胞；胆管上皮細胞および肝細胞への多分化能を有する肝細胞前駆細胞；乏突起膠細胞および星状膠細胞へと進行するグリア細胞前駆細胞を生じることができる神経限定細胞（neural restricted cell）；ニューロンへと進行する神経前駆細胞；心筋および心筋細胞の前駆細胞、グルコース応答性インスリン分泌膵細胞株が挙げられる。他の系譜としては、限定はされないが、象牙芽細胞、象牙質産生細胞および軟骨細胞、並びに以下の前駆細胞：網膜色素上皮細胞、線維芽細胞、ケラチノサイト等の皮膚細胞、樹状細胞、毛包細胞、尿細管上皮細胞、平滑筋細胞および骨格筋細胞、精巣前駆細胞、血管内皮細胞、腱、靭帯、軟骨、脂肪細胞、線維芽細胞、骨髄基質、心筋、平滑筋、骨格筋、周皮細胞、血管細胞、上皮細胞、グリア細胞、神経細胞、星状膠細胞および乏突起膠細胞が挙げられる。

30

## 【0100】

別の例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞は、培養後、造血細胞を生じさせることができない。

## 【0101】

一例では、本細胞は治療を受ける対象から採取され、標準的な技術を用いて*in vitro*で培養され、自己成分または同種異系成分としてその対象に投与するための上清または可溶性因子または増殖した細胞を得るために用いられる。別の例では、樹立されたヒト細胞株のうちの一つまたは複数の細胞が用いられる。別の有用な例では、非ヒト動物の（または、患者がヒトでない場合は別の種に由来の）細胞が用いられる。

40

## 【0102】

本開示は、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/またはその子孫細胞（後者は増殖後細胞（expanded cell）とも称される）から得られる、または由来する、*in vitro*での培養から生成される上清または可溶性因子の使用も企図している。本開示の増殖後細胞は、培養条件（培地中の刺激因子の数および/または種類を含む）、継代数等に応じて、種々様

50

々な表現型を有し得る。ある例では、子孫細胞は、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、または約 10 回の継代後に、親集団から得られる。もっとも、子孫細胞は、任意の回数 of 継代後に親集団から得ることができる。

【 0 1 0 3 】

子孫細胞は任意の適切な培地中で培養することによって得ることができる。「培地」という用語は、細胞培養に関して使用される場合、細胞周辺の環境の成分を含む。培地は固体、液体、気体または相および物質の混合物であってもよい。培地には、液体の増殖培地、および細胞増殖を維持しない液体培地が含まれる。また、培地には、寒天、アガロース、ゼラチンおよびコラーゲン基質等のゼラチン質の培地も含まれる。気体培地の例としては、ペトリ皿または他の固体もしくは半固体の担体上で増殖している細胞が曝される気相が挙げられる。また、「培地」という用語は、それが未だ細胞と接触していない場合であっても、細胞培養での使用を目的としている物質を指す。すなわち、細菌培養用に調製された栄養分に富んだ液体が培地である。水または他の液体と混合されたときに細胞培養に適したものとなる粉末状混合物は、「粉末状培地」と称することもある。

10

【 0 1 0 4 】

一例では、本開示の方法に有用な子孫細胞は、STRO-3 抗体で標識した磁気ビーズを用いて、TNAP<sup>+</sup>STRO-1<sup>+</sup>細胞を骨髄から単離または富化し、その後、その単離細胞を培養増殖することによって得られる（適切な培養条件の例は、Gronthos et al. Blood 85: 929-940, 1995を参照）。

20

【 0 1 0 5 】

一例では、そのような増殖後細胞（子孫）（例えば、少なくとも 5 回継代後）は、TNAP<sup>-</sup>、CC9<sup>+</sup>、HLAクラスI<sup>+</sup>、HLAクラスII<sup>-</sup>、CD14<sup>-</sup>、CD19<sup>-</sup>、CD3<sup>-</sup>、CD11a<sup>-</sup>c<sup>-</sup>、CD31<sup>-</sup>、CD86<sup>-</sup>、CD34<sup>-</sup>および/またはCD80<sup>-</sup>であり得る。しかし、可能性としては、本明細書に記載の条件とは異なる培養条件下では、種々のマーカーの発現は異なる場合がある。また、これらの表現型の細胞は増殖後の細胞集団において優勢であり得るが、一方で、そのことはこの表現型を有さない細胞の割合が小さいことを意味するものではない（例えば、わずかな比率の増殖後細胞はCC9<sup>-</sup>であり得る）。一例では、増殖後細胞は異なる細胞型への分化能をまだなお有している。

30

【 0 1 0 6 】

一例では、上清もしくは可溶性因子、または細胞それ自体を得るために用いられる消費後（expended）細胞集団が含む細胞は、そのうち少なくとも 50% といった、少なくとも 25% が CC9<sup>+</sup> である。

【 0 1 0 7 】

別の例では、上清もしくは可溶性因子、または細胞それ自体を得るために用いられる増殖後細胞集団が含む細胞は、そのうち少なくとも 45% といった、少なくとも 40% が STRO-1<sup>+</sup> である。

【 0 1 0 8 】

さらなる例では、増殖後細胞は、LFA-3、THY-1、VCAM-1、ICAM-1、PECAM-1、P-セレクトリン、L-セレクトリン、3G5、CD49a/CD49b/CD29、CD49c/CD29、CD49d/CD29、CD90、CD29、CD18、CD61、インテグリン 6-19、トロンボモジュリン、CD10、CD13、SCF、PDGFR、EGFR、IGF1-R、NGFR、FGFR、レプチン-R（STRO-2はレプチン-Rである）、RANKL、STRO-4（HSP-90P）、STRO-1<sup>br i g h t</sup>およびCD146からなる群から集合的に、もしくは個々に選択される一つもしくは複数のマーカー、またはこれらのマーカーのあらゆる組合せを発現し得る。

40

【 0 1 0 9 】

一例では、子孫細胞は、国際公開第WO2006/032092号に定義および/または記載される、多能性増殖後STRO-1<sup>+</sup>多能性細胞子孫（Multipotential Expanded

50

STRO-1<sup>+</sup> Multipotential cells Progeny) (MEMP)である。子孫が由来し得るSTRO-1<sup>+</sup>多能性細胞が富化された集団を調製する方法は、国際公開第WO01/04268号および同第WO2004/085630号に記載されている。in vitroという文脈では、STRO-1<sup>+</sup>多能性細胞は完全に純粋な調製物として存在することはまれであり、通常は組織特異的分化決定済み(committed)細胞(TSCC)である他の細胞と一緒に存在している。国際公開第WO01/04268号は、そのような細胞を骨髄から約0.1%~90%の純度レベルで収集することに言及している。子孫が由来するMPCを含む集団は、組織源から直接収集してもよいし、あるいは、ex vivoで既に増殖させてある集団であってもよい。

#### 【0110】

例えば、子孫は、それらが存在する集団の全細胞の少なくとも約0.1、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80または95%を含む、収集され、増殖していない、実質的に精製されたSTRO-1<sup>+</sup>多能性細胞の集団から得てもよい。このレベルは、例えば、TNAP、STRO-4(HSP-90P)、STRO-1<sup>bright</sup>、3G5<sup>+</sup>、VCAM-1、THY-1、CD146およびSTRO-2からなる群から個々に、または集成的に選択される少なくとも1つのマーカーが陽性である細胞を選別することによって達成することができる。

#### 【0111】

MEMPSは、STRO-1<sup>bright</sup>マーカーに対し陽性であり、アルカリホスファターゼ(ALP)マーカーに対し陰性であるという点で、新たに収集されたSTRO-1<sup>+</sup>多能性細胞と区別することができる。対照的に、新たに単離されたSTRO-1<sup>+</sup>多能性細胞は、STRO-1<sup>bright</sup>およびALPの両方に対し陽性である。本開示の一例では、投与される細胞のうち少なくとも15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または95%が、STRO-1<sup>bright</sup>、ALP<sup>+</sup>の表現型を有する。さらなる一例では、MEMPSはKi67、CD44および/またはCD49c/CD29、VLA-3、 $\alpha$ 3 $\beta$ 1マーカーのうちの一つまたは複数に対し陽性である。さらなる例では、MEMPはTERT活性を示さず、および/または、CD18マーカーに対し陰性である。

#### 【0112】

STRO-1<sup>+</sup>細胞出発集団は、国際公開第WO01/04268号または同第WO2004/085630号に記載される、いずれか一つまたは複数の組織型、すなわち、骨髄、歯髄細胞、脂肪組織および皮膚由来、あるいは、より広範に、脂肪組織、歯、歯髄、皮膚、肝臓、腎臓、心臓、網膜、脳、毛包、腸、肺、脾臓、リンパ節、胸腺、膵臓、骨、靭帯、骨髄、腱および骨格筋由来であってもよい。

#### 【0113】

本開示に記載の方法を実施する際、任意の所与の細胞表面マーカーを保有している細胞の分別は、複数の異なる方法によって達成できるが、例示的な方法は、結合物質(例えば、抗体またはその抗原結合断片)を、関係するマーカーに結合させた後、高レベル結合、または低レベル結合または結合なしのいずれかである結合を示すものを分別することに依存することは理解されるだろう。最も都合のよい結合物質は、抗体または抗体ベースの分子、例えばモノクローナル抗体であるか、またはこれらの後者の作用物質の特異性という理由からモノクローナル抗体(例えばその断片に結合する抗原を含むタンパク質)に基づいている。抗体は両方のステップに用いることができるが、他の作用物質を用いてもよく、従って、マーカーを保有している細胞、またはマーカーがない細胞を富化するために、これらのマーカーに対するリガンドを使用してもよい。

#### 【0114】

抗体またはリガンドを固体の担体に付着させることで、粗分別が可能となる。一例では、分別技術は、収集される画分の生存能の保持率を最大とする。異なる効率の種々の技術が、比較的粗い分別を行うために使用可能である。使用される具体的な技術は、分別効率、随伴する細胞毒性、実施の容易さおよび速さ、並びに高性能機器および/または技巧の

10

20

30

40

50

必要性に応じたものとなるだろう。分別の手順には、限定はされないが、抗体被膜磁気ビーズを用いた磁気分別、アフィニティークロマトグラフィーおよび固体の基盤に付着した抗体での「パニング」が含まれ得る。正確な分別を提供する技術としては、限定はされないが、FACSが挙げられる。FACSを実施するための方法は、当業者には明らかであるだろう。

【0115】

本明細書に記載のマーカの各々に対する抗体は市販されており（例えば、STRO-1に対するモノクローナル抗体はR&Dシステム社、米国から購入できる）、ATCCまたは他の預託機関から入手可能であり、および/または、当該分野で認知されている技術を用いて作製することができる。

10

【0116】

一例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞を単離するための方法は、例えば、STRO-1の高レベル発現を認識する磁気細胞分取(MACS)を利用する固相分取ステップである第一ステップを含む。所望であれば、より高レベルの前駆細胞発現をもたらすために、国際公開第WO01/14268号の特許明細書に記載される第二の分取ステップを続けることができる。この第二の分取ステップには、2つ以上のマーカの使用が含まれ得る。

【0117】

STRO-1<sup>+</sup>細胞を得るための方法には、既知の技術を用いた第一富化ステップの前に、細胞の源を収集することが含まれてもよい。従って、組織が外科的に摘出される。源組織を構成する細胞は、その後分別されて、いわゆる単一細胞懸濁液にされる。この分別は、物理的手段および/または酵素的手段によって達成することができる。

20

【0118】

適切なSTRO-1<sup>+</sup>細胞集団を得た後、細胞を任意の適切な手段で培養または増殖させてMEMPを得ることができる。

【0119】

一例では、前記細胞は治療を受ける対象から採取され、標準的な技術を用いて*in vitro*で培養され、その対象に自己または同種異系間の組成物として投与することを目的とした上清または可溶性因子または増殖後細胞を得るために用いられる。別の例では、樹立されたヒト細胞株のうちの一つまたは複数の細胞が、上清または可溶性因子を得るために使用される。別の有用な例では、非ヒト動物（または、患者がヒトでない場合は別の種に由来）の細胞が、上清または可溶性因子を得るために使用される。

30

【0120】

本開示の方法および使用は、あらゆる非ヒト動物種由来の細胞、例えば、限定はされないが、非ヒト霊長類細胞、有蹄動物、イヌ、ネコ、ウサギ、げっ歯類、トリ、および魚の細胞を用いて実施できる。本開示の方法を実施することができる霊長類細胞としては、限定はされないが、チンパンジー、ヒヒ、カニクイザル、および他のあらゆる新世界ザルまたは旧世界ザルの細胞が挙げられる。本開示の方法を実施することができる有蹄動物細胞としては、限定はされないが、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、水牛およびバイソンの細胞が挙げられる。本開示の方法を実施することができるげっ歯類細胞としては、限定はされないが、マウス、ラット、モルモット、ハムスターおよびスナネズミの細胞が挙げられる。本開示の方法を実施することができるウサギ種の例としては、家畜化されたウサギ、ノウサギ(jack rabbit, hare)、ワタオウサギ、カンジキウサギ、およびナキウサギが挙げられる。ニワトリ(Gallus gallus)は、本開示の方法を実施することができるトリ種の一例である。

40

【0121】

一例では、細胞はヒト細胞である。

【0122】

本開示の方法に有用な細胞は、使用前、または上清もしくは可溶性因子を得る前に、保存することができる。真核細胞、具体的には哺乳類細胞を保存および保管するための方法およびプロトコルは、当該技術分野において周知である（例えば、Pollard, J. W. and W

50

alker, J. M. (1997) Basic Cell Culture Protocols, Second Edition, Humana Press, Totowa, N.J.; Freshney, R. I. (2000) Culture of Animal Cells, Fourth Edition, Wiley-Liss, Hoboken, N.J.を参照)。間葉系幹/前駆細胞、またはその子孫等の単離された幹細胞の生物活性を維持するためのあらゆる方法は、本開示と一緒に利用することができる。一例では、前記細胞は凍結保存を用いて維持および保管される。

#### 【0123】

##### 遺伝子改変細胞

一例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/またはその子孫細胞は、遺伝子改変されて、例えば、関心のタンパク質を発現および/または分泌する。例えば、細胞は、運動障害または脳梗塞の他の影響の治療に有用なタンパク質、例えば、Meade et al., J Exp Stroke Transl Med 2: 22-40, 2009.に記載されている神経成長因子またはペプチドを発現するように設計される。

10

#### 【0124】

細胞を遺伝子改変する方法は、当業者には明らかであるだろう。例えば、細胞で発現されるべき核酸は、細胞での発現を誘導するためのプロモーターと機能的に連結される。例えば、核酸は、例えば、ウイルスプロモーター、例えば、CMVプロモーター（例えば、CMV-IEプロモーター）またはSV-40プロモーター等の、対象の種々の細胞中で機能できるプロモーターに連結される。さらなる適切なプロモーターは当該技術分野において周知であり、本開示の本例に準用すると解されるものとする。

#### 【0125】

一例では、核酸は発現コンストラクトの形態で提供される。本明細書で使用される場合、「発現コンストラクト」という用語は、細胞中で機能的に連結された核酸（例えば、レポーター遺伝子および/または対抗選択可能な(counter-selectable)レポーター遺伝子)を発現させる能力を有する核酸を指す。本開示の文脈においては、発現コンストラクトは、プラスミド、バクテリオファージ、ファージミド、コスミド、ウイルスのサブゲノム断片もしくはゲノム断片、または異種DNAを発現可能な形態で維持および/または複製できる他の核酸を含むか、またはそれら自身であってもよいことは理解されるべきである。

20

#### 【0126】

本開示の方法を実施するための適切な発現コンストラクトを構築するための方法は、当業者には明らかであり、例えば、Ausubel et al (In: Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987)または Sambrook et al (In: Molecular Cloning: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Third Edition 2001)に記載されている。例えば、発現コンストラクトの各成分は、例えばPCRを用いて適切な鋳型核酸から増幅され、その後、例えばプラスミドまたはファージミド等の適切な発現コンストラクト中にクローニングされる。

30

#### 【0127】

そのような発現コンストラクトに適切なベクターは、当該技術分野において周知であり、および/または、本明細書に記載されている。例えば、哺乳類細胞における、本開示の方法における使用に適切な発現ベクターは、例えば、ライフテクノロジーズ社(Life Technologies Corporation)より提供されるpcDNAベクター一式のベクター、pCIベクター一式(プロメガ社(Promega))のベクター、pCMVベクター一式(クロンテック社(Clontech))のベクター、pMベクター(クロンテック社)、pSIベクター(プロメガ社)、VP16ベクター(クロンテック社)またはpcDNAベクター一式(インビトロジェン社(Invitrogen))のベクターである。

40

#### 【0128】

当業者は、さらなるベクター、および例えば、ライフテクノロジーズ社、クロンテック社またはプロメガ社等の、そのようなベクターの供給源は承知しているだろう。

#### 【0129】

単離された核酸分子またはそれを含む遺伝子コンストラクトを発現のために細胞に導入

50

する手段は、当業者に周知である。所与の生物体に用いられる技術は、既知の優れた技術に依存する。組換えDNAを細胞に導入するための手段としては、マイクロインジェクション、DEAE-デキストランによって媒介されるトランスフェクション、例えばリポフェクタミン（ギブコ社（Gibco）、米国メリーランド州）および/またはセルフェクチン（ギブコ社（Gibco）、米国メリーランド州）による、リポソームによって媒介されるトランスフェクション、PEGによって媒介されるDNAの取り込み、エレクトロポレーション、並びに、例えばDNAを被膜したタングステンまたは金粒子（アグラセタス社（Agracetus Inc.、米国ウィスコンシン州）による微小粒子照射（microparticle bombardment）が特に挙げられる。

#### 【0130】

あるいは、本開示の発現コンストラクトはウイルスベクターである。適切なウイルスベクターは当該技術分野において周知であり、市販されている。核酸の運搬および宿主細胞ゲノムへの核酸の組み込みを目的とした従来のウイルスベースの系としては、例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターが挙げられる。あるいは、アデノウイルスベクターが、エピソームのままの核酸を宿主細胞に導入するのに有用である。ウイルスベクターは、標的細胞および標的組織における遺伝子導入の、効率的で且つ用途の広い方法である。加えて、高い導入効率が、多くの異なる細胞型および標的組織で確認されている。

#### 【0131】

例えば、レトロウイルスベクターは、通常、最大6～10kbの外來配列パッケージング容量を有する、シス作動性長末端反復配列（LTR）を含む。最小のシス作動性LTRであってもベクターの複製およびパッケージングには十分であり、その後、発現コンストラクトを標的細胞に組み込むのに使用され、長期発現を提供する。広く使用されているレトロウイルスベクターとしては、マウス白血病ウイルス（MuLV）、テナガザル白血病ウイルス（GaLV）、サル免疫不全ウイルス（SRV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、およびその組合せをベースとするものが含まれる（例えば、Buchscher et al., J Virol. 56:2731-2739 (1992); Johann et al., J. Virol. 65:1635-1640 (1992); Sommerfelt et al., Virol. 76:58-59 (1990); Wilson et al., J. Virol. 63:274-2318 (1989); Miller et al., J. Virol. 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700; Miller and Rosman BioTechniques 7:980-990, 1989; Miller, A. D. Human Gene Therapy 7:5-14, 1990; Scarpa et al Virology 75:849-852, 1991; Burns et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:8033-8037, 1993を参照）。

#### 【0132】

また、様々なアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター系が核酸運搬用に開発されている。AAVベクターは、当該技術分野において周知の技術を用いて容易に構築することができる。例えば、米国特許第5,173,414号および同第5,139,941号；国際公開第WO92/01070号および同第WO93/03769号；Lebkowski et al. Molec. Cell. Biol. 5:3988-3996, 1988; Vincent et al. (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter Current Opinion in Biotechnology 5:533-539, 1992; Muzyczka. Current Topics in Microbiol, and Immunol. 755:97-129, 1992; Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801, 1994; Shelling and Smith Gene Therapy 7:165-169, 1994;並びにZhou et al. J Exp. Med. 779:1867-1875, 1994を参照されたい。

#### 【0133】

本開示の発現コンストラクトを運搬するのに有用なさらなるウイルスベクターとしては、例えば、ワクシニアウイルスおよびトリポックスウイルス等の痘ファミリー（pox family）のウイルス由来のもの、またはアルファウイルス属または複合（conjugate）ウイルスベクター（例えば、Fisher-Hoch et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 56:317-321, 1989に記載のもの）が挙げられる。

#### 【0134】

細胞および可溶性因子の治療/予防における有用性試験

細胞もしくは可溶性因子の、脳機能を改善する、および/または運動障害を治療する、および/または脳神経細胞を再生する能力を決定する方法は、当業者には明らかであろう。

【0135】

例えば、細胞または可溶性因子は、神経細胞とともに培養され、細胞または可溶性因子の、軸索成長を誘導する能力が評価される、例えば顕微鏡技術。同様な試験が、例えば、本明細書で例証したように、細胞および/または可溶性因子の鶏胚の脳への注入、および軸索の成長の評価により、*in vivo*で実行され得る。

【0136】

一例では、神経細胞は、細胞および/または可溶性因子との培養に先立って、または培養時に、酸素および/またはグルコースの除去に曝露される。酸素およびグルコースの除去は、虚血のモデルである。

10

【0137】

他の例では、細胞は、例えば、ブチル化ヒドキシアニソールおよびバルプロ酸または5-アザシチジンまたはインドメタシンおよびイソブチルメチルキサンチンおよびインスリンを含む、神経細胞の分化を誘導する条件のもとで増殖する。神経細胞に分化する細胞は、治療に適切であると考えられる。

【0138】

さらなる例では、細胞または可溶性因子（例えば、因子の混合物または単一因子または因子の画分（例えば、親和性精製またはクロマトグラフィーに由来する））が、脳梗塞のモデルに投与され、脳機能、脳神経細胞の再生および/または行動障害に与える影響が評価される。

20

【0139】

非ヒト動物対象における虚血性脳梗塞を誘導する、多様な既知の技術、例えば、大動脈/大静脈閉塞、外部からの首への止血帯または血圧バンド、出血または低血圧、頭蓋内圧亢進または総頸動脈閉塞、2血管閉塞および低血圧、4血管閉塞、一側総頸動脈閉塞（一部の種でのみ）、エンドセリン1に誘導された動脈および静脈の収縮、中大脳動脈閉塞、自発脳梗塞（自然発症高血圧ラットでの）、マクロスフェア（*macrosphere*）血栓形成、血餅による血栓形成またはマクロスフェア血栓形成が存在する。脳出血は、脳へのコラゲナーゼの注入によりモデル化することができる。

30

【0140】

一例では、脳梗塞のモデルは、虚血性脳梗塞を誘導する中大脳動脈閉塞を含む。

【0141】

集団および/または子孫および/または分泌因子の、脳梗塞の影響を治療する能力を試験するために、集団および/または子孫および/または分泌因子が、脳梗塞の誘導後、例えば、脳梗塞後の1時間から1日以内に投与される。投与後に、脳機能および/または運動障害の評価が、例えば何回か行われる。

【0142】

脳機能および/または運動障害を評価する方法は、当業者には明らかであろうし、例えば、ロータロッド（*rotarod*）、高架式十字迷路法、オープンフィールド（*open-field*）、モリス水迷路、T迷路、放射状迷路、運動評価（例えば、ある期間内に覆われた領域）、テールフリック（*tail flick*）またはDe Ryckの行動試験（*De Ryck et al., Stroke. 20:1383-1390, 1989*）が挙げられる。さらなる試験は、当業者には明らかである、および/または本明細書に記載されているであろう。

40

【0143】

他の例では、集団および/または子孫および/または分泌因子の脳への影響は、画像化により評価される。例えば、アポトーシス、自食作用および神経血管単位は、*in vivo*での光画像化により検出することができ（*Liu et al., Brain Res. 2011 Apr 27*）、PET、MRIまたはCTを用いて、梗塞のサイズ、ペナンプラのサイズおよび/または脳損傷の範囲といった、多様な因子を評価することができる。

50

## 【 0 1 4 4 】

集団および/または子孫および/または分泌因子の、脳神経細胞への影響もまた、評価される。例えば、脳またはその大脳領域は除去され、神経細胞の数または神経細胞のサブタイプが評価、または見積もられる。使用されるモデルに依存して、この数は、対象動物における数と比較されてもよく、またはもし限局的虚血のみが誘導される場合には、同一動物からの脳の対照領域と比較されてもよい。

## 【 0 1 4 5 】

細胞性組成物

本開示の一例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/またはその子孫細胞は、組成物の形態で投与される。一例では、かかる組成物は薬剤的に許容できる担体および/または賦形剤を含む。

10

## 【 0 1 4 6 】

「担体」および「賦形剤」という用語は、貯蔵、投与、および/または活性化合物の生物活性を促進するために当該技術分野において従来用いられる組成物を指す（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mac Publishing Company (1980)を参照）。担体は活性化合物のあらゆる望ましくない副作用を減らすこともできる。適切な担体は、例えば、安定であり、例えば、担体中の他の成分と反応できない。一例では、担体は、治療に使用された投与量および濃度において、重大な局所的または全身的な有害作用をレシピエントにもたらさない。

## 【 0 1 4 7 】

20

本開示のための適切な担体には、従来的に使用されるものが含まれ、例えば、水、食塩水、水性デキストロース、ラクトース、リンゲル液、緩衝液、ヒアルロナンおよびグリコールは、特に（等張である場合）水剤用の、例示的な液体担体である。適切な医薬担体および賦形剤としては、デンプン、セルロース、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、塩化ナトリウム、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール等が挙げられる。

## 【 0 1 4 8 】

別の例では、担体は、例えば、その中で細胞が生育または懸濁される、培地組成物である。一例では、かかる培地組成物は、それを投与された対象においていかなる有害作用も誘導しない。

30

## 【 0 1 4 9 】

例示的な担体および賦形剤は、細胞の生存能、ならびに/または脳梗塞の影響を減少、防止もしくは遅延させる細胞の能力に悪影響を及ぼさない。

## 【 0 1 5 0 】

一例では、担体または賦形剤によって緩衝作用（buffering activity）がもたらされ、それにより細胞および/または可溶性因子が適切なpHに維持されることで生物活性が発現される。例えば、その担体または賦形剤はリン酸緩衝食塩水（PBS）である。PBSは、魅力的な担体または賦形剤であるが、その理由は、血流中または組織もしくは組織の周辺もしくは隣接領域中への、例えば、注射による直接的な適用を目的として、本開示の組成物が液体として製造されるような場合に、PBSが細胞および因子と最小限にしか相互作用せず、細胞および因子の迅速な放出を可能とするためである。

40

## 【 0 1 5 1 】

STRO-1<sup>+</sup>細胞および/またはその子孫細胞は、レシピエント適合性であり、レシピエントに対し有害ではない産物に分解される足場に組み込む、または埋め込むこともできる。これらの足場によって、レシピエントである対象に移植されるべき細胞に、支持および保護がもたらされる。天然および/または合成の生分解性足場は、そのような足場の例である。

## 【 0 1 5 2 】

種々の異なる足場が、本開示の実施において成功裏に使用され得る。例示的な足場とし

50



ては、限定はされないが、生物的で、分解可能な足場が挙げられる。天然の生分解性足場としては、コラーゲン、フィブロネクチン、およびラミニン足場が挙げられる。細胞移植の足場のための適切な合成材料は、広範な細胞成長および細胞機能を支持可能なものであるべきである。そのような足場は再吸収可能なものであってもよい。適切な足場としては、例えば、Vacanti, et al. J. Fed. Surg. 23:3-9 1988; Cima, et al. Biotechnol. Bioeng. 38:145 1991; Vacanti, et al. Plast. Reconstr. Surg. 88:153-9 1991に記載されるように、ポリグリコール酸の足場；またはポリ酸無水物、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸等の合成高分子が挙げられる。

【 0 1 5 3 】

別の例では、本細胞はゲル状足場（アップジョン社（Upjohn Company）のゼルフォーム（Gelfoam）等）に投与され得る。

10

【 0 1 5 4 】

本明細書に記載の方法に有用な本細胞性組成物は、単独で、または他の細胞との混合物として投与されてもよい。本開示の組成物と併せて投与され得る細胞としては、限定はされないが、他の多分化能もしくは多能性を有する細胞もしくは幹細胞、または骨髄細胞が挙げられる。異なる型の細胞は、本開示の組成物と、投与の直前または少し前に混合することができ、あるいは、それらを投与前にある一定期間一緒に共培養してもよい。

【 0 1 5 5 】

一例では、本組成物は、有効量または治療的もしくは予防的に有効量の細胞を含む。例えば、本組成物は、約  $1 \times 10^5$  STRO-1<sup>+</sup>細胞 / kg ~ 約  $1 \times 10^7$  STRO-1<sup>+</sup>細胞 / kg または約  $1 \times 10^6$  STRO-1<sup>+</sup>細胞 / kg ~ 約  $5 \times 10^6$  STRO-1<sup>+</sup>細胞 / kg を含む。投与されるべき細胞の正確な量は、種々の因子、例えば、患者の年齢、体重、および性別、並びに脳梗塞および / または脳梗塞の部位の範囲および重症度に依存する。

20

【 0 1 5 6 】

一例では、低用量の細胞が対象に投与される。例示的な投与量は、kgあたり約  $0.1 \times 10^4$  と  $0.5 \times 10^6$  個の間の細胞、例えば、kgあたり約  $0.5 \times 10^5$  と  $0.5 \times 10^6$  個の間の細胞といった、kgあたり約  $0.5 \times 10^5$  と  $0.5 \times 10^6$  個の間の細胞、例えば、kgあたり約  $0.1 \times 10^6$  と  $0.5 \times 10^6$  個の間の細胞、kgあたり約  $0.2 \times 10^6$  または  $0.3 \times 10^6$  または  $0.4 \times 10^6$  個の細胞を含む。

30

【 0 1 5 7 】

一部の例では、細胞は、細胞が対象の血行路に出て行くことを拒むが、細胞から分泌された因子が血行路に進入することは許すチャンパー内に含まれる。このように、本細胞が対象の血行路に因子を分泌することを可能とさせることにより、可溶性因子は対象に投与され得る。そのようなチャンパーは、対象におけるある部位に均等に埋め込むことで可溶性因子の局所レベルを増加させることができ、例えば、臓腑の中または近くに埋め込まれる。

【 0 1 5 8 】

本開示の一部の例では、細胞性組成物を用いた治療の開始前に患者を免疫抑制することは、必ずしも必要であったり、望まれたりするわけではない。従って、STRO-1<sup>+</sup>細胞またはその子孫の、同種異系間、さらには異種間での移植であっても、場合によっては許容されることがある。

40

【 0 1 5 9 】

しかし、他の場合においては、細胞治療開始前に、患者を薬理的に免疫抑制することおよび / または細胞組成物に対する対象の免疫応答を減少させることが望ましいか、または適切であり得る。これは、全身的または局所的な免疫抑制剤の使用によって達成することができ、あるいは封入デバイスにて本細胞を送達することによって達成することもできる。本細胞は、細胞および治療因子に必要とされる栄養分および酸素を透過させるが、免疫液性因子および細胞は透過させないカプセルに封入してもよい。一例では、カプセルの材料は、アレルギーを起こしにくいもので、標的組織内に容易に且つ安定して位置し、移

50

植された構造体にさらなる保護を与える。移植細胞に対する免疫応答を低減または除去するためのこれらおよび他の手段は、当該技術分野において周知である。代わりに、本細胞を、それらの免疫原性を低減させるために、遺伝的に改変してもよい。

【0160】

可溶性因子の組成物

本開示の一例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞由来の、および/もしくは子孫細胞由来の上清または可溶性因子は、例えば、適切な担体および/または賦形剤を含む組成物の形態で、投与される。一例では、担体または賦形剤は可溶性因子または上清の生物学的効果に悪影響を及ぼさない。

【0161】

一例では、本組成物は、可溶性因子または上清の成分、例えば、プロテアーゼ阻害剤を安定化させるための組成物を含む。一例では、プロテアーゼ阻害剤は、対象に対し有害作用を有するのに十分な量では含まれない。

【0162】

STRO-1<sup>+</sup>細胞由来の、および/または子孫細胞由来の上清または可溶性因子を含む組成物は、例えば、培地中で、または安定な担体もしくは緩衝溶液、例えば、リン酸緩衝食塩水中で、適切な液体懸濁液として調製してもよい。適切な担体は本明細書の上記の通りである。別の例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞由来の、および/または子孫細胞由来の上清または可溶性因子を含む懸濁液は、注射用の油状懸濁液である。適切な親油性溶媒またはビヒクルとしては、ゴマ油等の脂肪油；またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリド等の合成脂肪酸エステル；またはリポソームが挙げられる。注射用に使用されるべき懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストラン等の、懸濁液の粘度を増加させる物質を含有してもよい。所望により懸濁液は、化合物の溶解性を増加させ、高濃度での溶液の調製を可能とさせる、適切な安定剤または作用物質を含んでもよい。

【0163】

無菌の注射剤は、必要とされる量の上清または可溶性因子を、上記成分のうちの一つまたは組合せと一緒に、適切な溶媒に組み入れ、必要に応じて、その後フィルター滅菌を行うことによって、調製できる。

【0164】

通常、分散液は、上清または可溶性因子を、基本(basic)分散媒および上に列挙されたものから必要な他の成分を含有する無菌のビヒクルに組み入れることによって調製される。無菌注射剤調製用の無菌散剤の場合、例示的な調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、それによって、活性成分およびその予め細菌濾過した溶液由来の任意のさらなる所望の成分の粉末が得られる。本開示の別の態様によれば、上清または可溶性因子は、その溶解性を増強する一つまたは複数のさらなる化合物と共に製剤化され得る。

担体または賦形剤の他の例は、例えば、Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N. Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N. Y.; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y.に記載されている。

【0165】

治療組成物は、通常、製造および貯蔵の条件下では無菌且つ安定であるべきである。本組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または他の規則構造として製剤化することができる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等)、および適切なその

10

20

30

40

50

混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。例えば、レシチン等の被膜の使用によって、分散の場合に必要なとされる粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって、適切な流動性を維持することができる。多くの場合、本組成物中に等張剤、例えば、糖類、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトール等、または塩化ナトリウムを含むのが望ましい。注射用組成物の持続的吸収は、本組成物中に、吸収を遅延させる作用物質、例えば、一ステアリン酸塩およびゼラチンを含むことによってもたらされ得る。さらに、可溶性因子を、徐放性製剤、例えば徐放性ポリマーを含む組成物中に、投与してもよい。例えば、移植片およびマイクロカプセル化した送達系を含む徐放性製剤等、活性化化合物は化合物を急速な放出から保護する担体と一緒に調製することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸およびポリ乳酸ポリグリコール酸コポリマー（PLG）等の、生分解性、生体適合性の高分子を使用することができる。そのような製剤を調製するための多くの方法が、特許されているか、または当業者に一般的に知られている。

10

## 【0166】

上清または可溶性因子は、例えば、可溶性因子を除放させるために、適切な基質と併せて投与してもよい。

## 【0167】

組成物のさらなる構成要素

STRO-1<sup>+</sup>細胞由来の上清または可溶性因子、STRO-1<sup>+</sup>細胞またはその子孫は、他の有益な薬物または生化学的分子（増殖因子、栄養因子）とともに投与されてもよい。他の薬剤とともに投与されるとき、それらは、単一の薬剂的組成物で、または独立した薬剂的組成物で、同時にまたは連続して、他の薬剤とともに（他の薬剤の投与の前後に）投与されてもよい。同時投与されてもよい生物活性因子には、反アポトーシス剤（例えばEPO、EPOミメチポディ、TPO、IGF-IおよびIGF-II、HGF、カスパーゼ阻害剤）；抗炎症薬（例えばp38MAPK阻害剤、TGFベータ阻害剤、スタチン、IL-6およびIL-1阻害剤、ペミロラスト、トラニラスト、レミケード、シロリムスおよびNSAID（非ステロイド性の抗炎症薬物；例えば、テボキサリン、トルメン、スプロフェン）；免疫抑制/免疫調節剤（例えば、シクロスポリン、タクロニムスのようなカルシニューリン阻害剤；mTOR阻害剤（例えば、シロリムス、エベロリムス）；抗増殖剤（例えばアザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル）；コルチコステロイド（例えばプレドニゾン、ヒドロコルチゾン）；コルチコステロイド（例えば、プレドニゾン、ヒドロコルチゾン）；モノクローナル抗IL-2Rアルファ受容体抗体（例えば、バシリキシマブ、ダクリズマブ）といった抗体、（例えば、抗胸腺細胞グロブリン（ATG）；抗リンパ球グロブリン（ALG）；モノクローナル抗T細胞抗体OKT3）といったポリクローナル抗T細胞抗体；反血栓形成剤（例えば、ヘパリン、ヘパリン誘導体、ウロキナーゼ、PPack（デキストロフェニルアラニンプロリンアルギニクロロメチルケトン）、抗トロンピン化合物、血小板受容体拮抗薬、抗トロンピン抗体、抗血小板受容体抗体、アスピリン、ジピリダモール、プロタミン、ヒルジン、プロスタグランジン阻害剤および血小板阻害薬）；および抗酸化剤（例えば、プロブコール、ビタミンA、アスコルビン酸、トコフェノール、コエンザイムQ-10、グルタチオン、L-システイン、N-アセチルシステイン）とともに局所麻酔薬、などが挙げられる。

20

30

40

## 【0168】

一例では、本明細書に記載のいずれかの例に従う組成物は、脳機能を改善するおよび/または脳神経細胞を再生するおよび/または運動障害を治療するさらなる因子、例えば神経成長因子等を含む。

## 【0169】

代わりに、またはさらに、本明細書に記載のいずれかの例に従う細胞、分泌因子および/または組成物は、物理療法および/または言語療法といった、脳梗塞の影響の既知の治療と組み合わせられる。

## 【0170】

50

一例では、本明細書に記載のいずれかの例に従う薬剂的組成物は、脳梗塞の影響を治療するのに使用される化合物を含む。代わりに、本明細書に記載の開示のいずれかの例に従う治療/予防の方法は、脳梗塞の影響を治療するのに使用される化合物を投与することを、さらに含む。例示的な化合物が本明細書に記載され、本開示の例に準用されると解されるものとする。

【0171】

他の例では、本明細書に記載のいずれかの例に従う組成物は、前駆体細胞の血管細胞への分化を誘導するまたは促進する因子を、さらに含む。例示的な因子には、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、血小板由来の成長因子 (PDGF; 例えば、PDGF-BB)、およびFGFが挙げられる。

10

【0172】

他の例では、本明細書に記載のいずれかの例に従う組成物は、組織特異的分化決定済み細胞 (TSCC)、をさらに含む。この態様では、国際特許出願第PCT/AU2005/001445号が、TSCCおよびSTRO-1<sup>+</sup>細胞の投与がTSCCの増殖の促進を導くことができることを示している。一例では、TSCCは、血管細胞である。そうした組成物の対象への投与は、血管系産生の増加、例えば、罹患組織へ送達される栄養物の増加の誘導、を導くこともある。

【0173】

医療デバイス

本開示はまた、本明細書に記載のいずれかの例に従う方法において使用するための、または使用される場合の医療デバイスを提供する。例えば、本開示は、本明細書に記載のいずれかの例に従う、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫細胞および/もしくはそれからの可溶性因子ならびに/または組成物を含む、注射器またはカテーテルまたは他の適切な送達デバイスを提供する。注射器またはカテーテルは、本明細書に記載のいずれかの例に従う方法における使用説明書と同梱されていてもよい。

20

【0174】

他の例では、本開示は、本明細書に記載のいずれかの例に従う、STRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫細胞および/もしくはその可溶性因子ならびに/または組成物を含む、移植片を提供する。移植片は、本明細書に記載のいずれかの例に従う方法における使用説明書と同梱されてもよい。適切な移植片は、例えば、本明細書で前述した足場、ならびにSTRO-1<sup>+</sup>細胞および/もしくはその子孫細胞および/またはその可溶性因子とともに形成されてもよい。

30

【0175】

投与様式

STRO-1<sup>+</sup>細胞由来の上清もしくは可溶性因子、STRO-1<sup>+</sup>細胞またはその子孫は、外科的に移植、注射、送達(例えば、カテーテルまたは注射器を手段として)されてもよいし、あるいは、修復または増強を必要としている部位、例えば脂肪体に直接的または間接的に投与されてもよい。

【0176】

一例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞由来の上清または可溶性因子、STRO-1<sup>+</sup>細胞またはその子孫は、対象の血流に送達される。例えば、STRO-1<sup>+</sup>細胞由来の上清または可溶性因子、STRO-1<sup>+</sup>細胞またはその子孫は、非経口的に送達される。非経口投与の経路の例としては、限定はされないが、腹腔内、脳室内(intraventricular, intracerebroventricular)、くも膜下腔内、または静脈内が挙げられる。一例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞由来の上清または可溶性因子、STRO-1<sup>+</sup>細胞またはその子孫は、動脈内、大動脈中、心臓の心房もしくは心室中、または血管中に、例えば、静脈内に送達される。

40

【0177】

心臓の心房または心室への細胞送達の場合、肺への急速な細胞送達によって生じ得る合併症を避けるため、細胞は左心房または左心室に投与されることがある。

【0178】

50

一例では、集団および/または子孫および/またはそれに由来する可溶性因子は、頸動脈に投与される。

【0179】

一例では、集団および/または子孫および/またはそれに由来する可溶性因子は、対象の脳、例えば、頭蓋内に投与される。例えば、集団および/または細胞および/または可溶性因子は、大脳に投与され、および/または線状体に投与されてもよい。

【0180】

一例では、集団および/または細胞および/または可溶性因子は、虚血部位および/または虚血部位の辺縁に投与される。そのような部位は、当技術分野で既知の方法、例えば、磁気共鳴画像化および/またはコンピューター断層撮影および/または超音波などの方法で決定することができる。

10

【0181】

治療剤の投与計画の選択は、いくつかの因子、例えば、血清または組織での実体 (entity) の代謝回転速度、症状レベル、および実体の免疫原性に依存する。

【0182】

一例では、STRO-1<sup>+</sup>細胞由来の上清または可溶性因子、STRO-1<sup>+</sup>細胞またはその子孫は、単回急速投与量として送達される。あるいは、STRO-1<sup>+</sup>細胞由来の上清または可溶性因子、STRO-1<sup>+</sup>細胞もしくはその子孫は、持続注入によって、または、例えば、1日、1週間の間隔の、もしくは週に1~7回の投与によって、投与される。例示的な投与プロトコルは、有意な望ましくない副作用を回避する、最大の投与量または投与頻度を含むものである。適当な総投与量は、使用される因子/細胞のタイプおよび活性に応じて決定される。適切な投与量の決定は、臨床医によって、例えば、当該技術分野において、治療に影響を与えると知られている、もしくは疑われている、または治療に影響を与えると予想されるパラメーターまたは因子を用いて、行われる。通常、投与はやや適量未満の量から開始され、その後、あらゆる負の副作用と比較して所望の、または最適の効果が達成されるまで、小さな増加量で増加される。

20

【0183】

本開示は、以下の非限定的な実施例を含む。

【実施例】

【0184】

実施例1：STRO-3<sup>+</sup>細胞の選択によるMPCの免疫選択

30

骨髓 (BM) を、健康な正常成人の志願者 (20~35歳) から収集する。簡潔には、40mlのBMを、後腸骨稜から、リチウム-ヘパリン抗凝固剤含有チューブに吸引する。

【0185】

BMMNCを、従来 of 記述 (Zanettino, A.C. et al. (1998) Blood 92: 2613-2628) の通りに、Lymphoprep (商標) (ニコメッドファーマ (Nycomed Pharma)、ノルウェイ、オスロ) を用いて、密度勾配分別によって調製する。400×gで30分間、4での遠心分離後、淡黄色の層をホールピペットで除去し、5%ウシ胎仔血清 (FCS、CSLリミテッド社 (CSL Limited)、オーストラリア、ヴィクトリア州) を含有するハンクス平衡塩類溶液 (HBSS; ライフテクノロジーズ社 (Life Technologies)、メリーランド州ゲイサースバーグ) から成る「HHF」中で3回洗浄する。

40

【0186】

続いて、STRO-3<sup>+</sup> (またはTNAP<sup>+</sup>) 細胞を、従来 of 記述 (Gronthos et al. (2003) Journal of Cell Science 116: 1827-1835; Gronthos, S. and Simmons, P.J. (1995) Blood 85: 929-940) の通りに、磁気細胞分取で単離した。簡潔には、およそ1~3×10<sup>8</sup>個のBMMNCを、HHF中10% (体積/体積) 正常ウサギ血清から成るブロッキング緩衝液中で、20分間、氷上でインキュベートする。細胞を、ブロッキング緩衝液中10μg/mlのSTRO-3mAb溶液200μlと一緒に、氷上で1時間インキュベートする。続いて、細胞を400×gでの遠心分離によってHHF中で2回洗浄する

50

。 H H F 緩衝液中 1 / 5 0 希釈のヤギ抗マウス ビオチン ( サザンバイオテクノロジーアソシエイツ社 ( Southern Biotechnology Associates )、英国、パーミンガム) を加え、細胞を氷上で 1 時間インキュベートする。細胞を、上記と同様に、 M A C S 緩衝液 ( 1 % B S A、5 m M の E D T A、および 0 . 0 1 % アジ化ナトリウムを添加した、 C a <sup>2+</sup> および M n <sup>2+</sup> を含まない P B S ) 中で 2 回洗浄し、最終体積 0 . 9 m l の M A C S 緩衝液中に再懸濁する。

【 0 1 8 7 】

1 0 0 μ l のストレプトアビジンマイクロビーズ ( ミルテニーバイオテック社 ( Miltenyi Biotec ) ; ドイツ、ベルギッシュグラートバハ) を細胞懸濁液に添加し、氷上で 1 5 分間インキュベートする。細胞懸濁液を 2 回洗浄し、 0 . 5 m l の M A C S 緩衝液に再懸濁した後、ミニ M A C S カラム ( M S C o l u m n s、ミルテニーバイオテック社 ( Miltenyi Biotec ) ) 上に充填し、 0 . 5 m l の M A C S 緩衝液で 3 回洗浄して、 S T R O - 3 m A b ( 2 0 0 5 年 1 2 月 1 9 日にアメリカ合衆国培養細胞系統保存機関 ( A T C C ) に P T A - 7 2 8 2 の受託番号で寄託 ; 国際公開第 W O 2 0 0 6 / 1 0 8 2 2 9 号を参照 ) と結合しなかった細胞を回収する。さらに 1 m l の M A C S 緩衝液を加えた後、カラムを磁石から取り除き、 T N A P <sup>+</sup> 細胞を陽圧で単離する。各画分からの細胞の一定分量をストレプトアビジン - F I T C で染色し、純度をフローサイトメトリーで評価することができる。

10

【 0 1 8 8 】

実施例 2 : S T R O - 3 m A b によって選択された細胞は S T R O - 1 <sup>b r i g h t</sup> 細胞である

20

S T R O - 3 m A b を、 S T R O - 1 <sup>b r i g h t</sup> 細胞を単離する単一試薬として用いることの可能性を確認する目的の実験を設計した。

【 0 1 8 9 】

S T R O - 3 ( I g G 1 ) は S T R O - 1 ( I g M ) とは異なるアイソタイプであることを考慮し、 S T R O - 3 のクローン原性 C F U - F を同定する能力を、 M A C S を用いて単離した S T R O - 1 <sup>-</sup> 細胞との共発現に基づく 2 色 F A C S 分析によって評価した ( 図 1 )。ドットプロットヒストグラムは、リストモードデータとして収集された 5 × 1 0 <sup>4</sup> 個の事象を表わしている。垂直線および水平線は、同条件下で処理したアイソタイプ対照抗体、 1 B 5 ( I g G ) および 1 A 6 . 1 2 ( I g M ) で得られた平均蛍光の 1 . 0 % 未満の反応性レベルに設定した。結果は、 S T R O - 1 <sup>b r i g h t</sup> 細胞のうち少量の集団が T N A P を共発現したが ( 右上象限 )、残りの S T R O - 1 <sup>+</sup> 細胞は S T R O - 3 m A b と反応しなかったことを示している。その後、 4 つの象限全てから F A C S で単離された細胞を C F U - F の発生率について評価した ( 表 1 )。

30

【 0 1 9 0 】

表 1 : 細胞表面マーカーである S T R O - 1 および T N A P の共発現に基づく 2 重染色 F A C S 分析によるヒト骨髄細胞の富化 ( 図 1 参照 )。 F A C S で分取した細胞を、 2 0 % F C S を添加した M E M 中で、標準的なクローン原性条件下で培養した。データは、播種された 1 0 <sup>5</sup> 個細胞当たりの 1 4 日目のコロニー形成細胞 ( C F U - F ) の平均数 ± 標準誤差 ( S E ) ( n は 3 つの異なる骨髄穿刺液 ) を表わしている。これらのデータは、ヒト M P C が S T R O - 1 抗原を明るく共発現する B M の T N A P 陽性画分だけに限定されていることを示している。

40

【表 1】

骨髄画分	CFU-F/10 <sup>5</sup> 細胞の頻度	富化(増加の倍数)
分画されない BMMNC	11.0 ± 2.2	1.0
TNAP <sup>+</sup> /STRO-1 <sup>bright</sup>	4,511 ± 185	410
TNAP <sup>+</sup> /STRO-1 <sup>dim</sup>	0.0	0.0

## 【0191】

実施例3：STRO-1<sup>du11</sup>およびSTRO-1<sup>br1</sup>細胞の、相対遺伝子および表面タンパク質の発現

第1の組の実験では、半定量的RT-PCR分析を適用して、蛍光標識細胞分取により単離したSTRO-1<sup>du11</sup>またはSTRO-1<sup>br1</sup>集団により発現した、多様な系列関連遺伝子の遺伝子発現プロファイル調べた(図2A)。第2の組の実験では、フローサイトメトリーおよび平均チャネル蛍光分析(mean channel fluorescence analysis)を適用して、蛍光標識細胞分取により単離したSTRO-1<sup>du11</sup>またはSTRO-1<sup>br1</sup>集団により発現した、多様な系統関連タンパク質の表面タンパク質発現プロファイル調べた。

10

## 【0192】

全細胞RNAは、 $2 \times 10^6$ 個のSTRO-1<sup>br</sup>またはSTRO-1<sup>du11</sup>のいずれかの分取された一次細胞、軟骨細胞ペレットおよび他の誘導培養から調製し、製造元(バイオテックスラボラトリーズ社(Biotech Lab. Inc.)、テキサス州、ヒューストン)の奨励にもとづき、RNAzol B抽出方法を用いて溶解させた。各亜集団から単離したRNAはその後、ファーストストランドcDNA(First-strand cDNA)合成キット(ファルマシアバイオテック社(Pharmacia Biotech)、スウェーデン、ウプサラ)を用いて調製した、cDNA合成の鋳型として使用した。多様な転写産物の発現は、従来記述の標準プロトコル(Gronthos et al., J. Bone and Min. Res. 14:48-57, 1999)を用いて、PCR増幅により評価した。本研究で使用されたプライマーのセットを、表2に示す。増幅の後、各反応混合物を、1.5%アガロースゲル電気泳動で分析し、臭化エチジウム染色により可視化した。RNAの完全性は、GAPDHの発現により評価した。

20

## 【0193】

各細胞マーカーの相対遺伝子発現は、ハウスキーピング遺伝子、GAPDHの発現を基準にして、ImageQuantソフトウェアを用いて評価した(図2B、C)。加えて、2色フローサイトメトリー分析を用いて、ex vivoで増殖したMPCのタンパク質発現プロファイルを、STRO-1抗体と組み合わせて、さらに広範囲の細胞系統関連マーカーに対するそれらの発現に基づき調べた。STRO-1<sup>du11</sup>およびSTRO-1<sup>br1</sup>培養細胞の遺伝子およびタンパク質発現に基づく遺伝子の発現型のまとめを表3に示す。これらのデータは、ex vivoで増殖したSTRO-1<sup>br1</sup>MPCが、血管周囲細胞、例えばアンジオポエチン-1、VCAM-1、SDF-1、IL-1p、TNF $\alpha$ 、およびRANKLに関連するマーカーの差次的にさらに高い発現を示すことを表している。STRO-1<sup>du11</sup>およびSTRO-1<sup>br1</sup>培養した細胞のタンパク質および遺伝子発現プロファイルの間の比較を、表3と4にまとめる。

30

## 【0194】

サブトラクティブハイブリダイゼーション研究もまた、STRO-1<sup>br1</sup>細胞により一意的に発現する遺伝子を同定するために実行した。簡潔には、STRO-1<sup>du11</sup>およびSTRO-1<sup>br</sup>を、上に示すように単離した(図3Aを見られたい)。全RNAを、5つの異なる骨髓試料からプールされたSTRO-1<sup>du11</sup>およびSTRO-1<sup>br1</sup>細胞から、RNA STAT-60システム(テルテスト社(TEL-TEST))を用いて調製した。ファーストストランド合成は、SMART cDNA合成キット(クロンテックラボラトリーズ社(Clontech Laboratories))を用いて実行した。得られたmRNA一本鎖cDNAハイブリッドは、最初の室温プロセスにおいて形成された3'および5'末端の特異的プライマー部位を用いる長距離PCR(Advantage 2PCRキット;クロンテック社)により、製造元の仕様にもとづき、増幅した。STRO-1<sup>br1</sup> cDNAのRsaI消化の後、2アリコート(Aliquot)を使用して、異なる特異的アダプターオリゴヌクレオチドを、クロンテックPCR-Select cDNAサブトラクションキット(Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit)を用いて、結合した。2回のサブトラクティブハイブリダイゼーションを、STRO-1<sup>br1</sup>(テスター)およびSTRO-1<sup>du11</sup>(ドライバー)cDNA、およびその逆を用いて、製造元のプロトコルに従って実行した

40

50

。この手順はまた、STRO-1<sup>br i</sup>ドライバーcDNAに対してハイブリダイズしたSTRO-1<sup>du l l</sup>テスターcDNAを用いて、逆に実行した。

【0195】

STRO-1<sup>br i</sup>集団により一意的に発現する遺伝子を同定するために、STRO-1<sup>br i</sup>サブクテッドcDNAを用いて、T/Aクローニングベクターに結合したSTRO-1<sup>br i</sup>サブクテッドcDNA sにより形質転換した、200の無作為に選択された細菌クローンを含む複製低密度マイクロアレイフィルターを構築した。マイクロアレイは引き続いて、[<sup>32</sup>P]dCTP標識したSTRO-1<sup>br i</sup>またはSTRO-1<sup>du l l</sup>いずれかのサブクテッドcDNAを用いて精査した(図3B-C)。差次的スクリーニングにより、合計44のクローンを同定し、これらは、STRO-1<sup>du l l</sup>とSTRO-1<sup>br i g h t</sup>亜集団の間で高度に差次的に発現した。差次的に発現したクローンすべてのDNA塩基配列決定は、ただ1つのクローンが、既知の間質細胞マイトジェンの代表、すなわち、血小板由来増殖因子(PDGF)(Gronthos and Simmons, Blood. 85: 929-940, 1995)であることを明らかにした。興味深いことに、44のクローンの6つが、ケモカインである間質由来因子-1(SDF-1)に対応するDNA挿入断片を含むことがわかった。ヒトSTRO-1<sup>br i g h t</sup>細胞における多量のSDF-1転写物は、新たに分取されたSTRO-1<sup>br i g h t</sup>、STRO-1<sup>du l l</sup>、およびSTRO-1<sup>ne g a t i v e</sup>骨髄亜集団から調製した全RNAの半定量的RT-PCRにより確認した(図3Dおよび表3)。

10

【0196】

表2. RT-PCRプライマーおよびヒトmRNAの特異的増幅の条件

20



【表 2 - 1】

標的遺伝子	センス/アンチセンス(5' -3')プライマー配列	産物のサイズ
GAPDH	CACTGACACGTTGGCAGTGG (配列番号 1) CATGGAGAAGGCTGGGGCTC (配列番号 2)	417
SDF-1	GAGACCCGCGCTCGTCCGCC (配列番号 3) GCTGGACTCCTACTGTAAGGG (配列番号 4)	364
IL-1 $\beta$	AGGAAGATGCTGGTCCCTCTC (配列番号 5) CAGTTCAGTGATCGTACAGGTGC (配列番号 6)	151
FLT-1	TCACTATGGAAGATCTGATTTCTTACAGT (配列番号 7) GGTATAAATACACATGTGCTTCTAG (配列番号 8)	380
TNF- $\alpha$	TCAGATCATCTTCTCGAACC (配列番号 9) CAGATAGATGGGCTCATAACC (配列番号 10)	361
KDR	TATAGATGGTGAACCCGGA (配列番号 11) TTTGTCACTGAGACAGCTTGG (配列番号 12)	450
RANKL	AACAGGCCTTCAAGGAGCTG (配列番号 13) TAAGGAGGGGTGGAGACCTCG (配列番号 14)	538
レプチン	ATGCATTGGGAACCCTGTGC (配列番号 15) GCACCCAGGGCTGAGGTCCA (配列番号 16)	492
CBFA-1	GTGGACGAGGCAAGAGTTCA (配列番号 17) TGGCAGGTAGGTGTGGTAGTG (配列番号 18)	632
PPAR $\gamma$ 22	AACTCGGGGAAACTTGGGAGATTCTCC (配列番号 18) AATAATAAGGTGGAGATGCAGGCTCC (配列番号 19)	341
OCN	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC (配列番号 20) CGTAGAAGCGCCGATAGGC (配列番号 21)	289
MyoD	AAGCGCCATCTCTTGAGGTA (配列番号 22) GCGAGAAACGTGAACCTAGC (配列番号 23)	270
SMMHC	CTGGGCAACGTAGTAAAACC (配列番号 24) TATAGCTCATTGCAGCCTCG (配列番号 25)	150
GFAP	CTGTTGCCAGAGATGGAGTT (配列番号 26) TCATCGCTCAGGAGTCCTT (配列番号 27)	370
ネスチン	GGCAGCGTTGGAACAGAGTTGGA (配列番号 28) CTCTAAACTGGAGTGGTCAGGGCT (配列番号 29)	460

10

20

30

40

【表 2 - 2】

SOX9	CTCTGCCTGTTTGACTTTGT (配列番号 30) CCTTTGCTTGCCCTTTTACCTC (配列番号 31)	598
コラーゲン X 型	AGCCAGGGTTGCCAGGACCA (配列番号 32) TTTTCCCACTCCAGGAGGGC (配列番号 33)	387
アグリカン	CACTGTTACCGCCACTCCC (配列番号 34) ACCAGCGGAAGTCCCCTTCG (配列番号 35)	184

10

## 【0197】

表 3. STRO-1<sup>Bri</sup> および STRO-1<sup>Du11</sup> 集団における相対遺伝子発現のまとめ。逆転写 PCR により決定した、STRO-1<sup>Bri</sup> と STRO-1<sup>M1</sup> 集団の間で測定可能で差次的な発現を示した遺伝子のリストを示す。値は、ハウスキーピング遺伝子、GAPDH を基準にした相対遺伝子発現量を表す。

【表 3】

組織	マーカー	GAPDH と比較した遺伝子発現量	
		STRO-1 <sup>Bri</sup>	STRO-1 <sup>Du11</sup>
グリア細 (神経組織 内)	GFAP (グリア繊維性タンパク質)	0.1	0.7
骨	OCN (オステオカルシン)	1.1	2.5
	OSX (オステリックス)	0.4	1.3
	CBFA-1 (コア因子結合タンパク質-1)	0.3	0.6
免疫調節性	RANKL (NF $\kappa$ B 活性化受容体)	1.6	0.3
神経保護 / 神経科学 誘因物質	SDF-1- $\alpha$ (間質細胞由来因子-1- $\alpha$ )	3.2	0.1
脂肪	レプチン	3.1	4.2
心筋細胞	GATA-4	1.1	2.9
内皮細胞	Ang-1 (アンジオポエチン-1)	1.5	0.8
軟骨細胞	Sox 9	0.3	1.1
	COL X (コラーゲン X)	3.5	2.8
炎症誘発性サイトカ イン	TNF- $\alpha$ (腫瘍壊死 $\alpha$ )	1.7	0.9

20

30

40

## 【0198】

タンパク質表面発現を STRO-1 発現の密度と関連付けるために、ex vivo で増殖した細胞に由来する骨髄 MPC の単個細胞懸濁液を、トリプシン / EDTA 剥離により調製し、引き続いて STRO-1 抗体とともに、広範囲の細胞系統関連マーカーを同定する抗体と組み合わせてインキュベートした。STRO-1 は、ヤギ抗マウス IgM-フルオレセインイソチオシアネートを用いて同定する一方、他のすべてのマーカーは、ヤギ抗

50

マウスまたは抗ウサギ IgG - フィコエリスリンのどちらかを用いて同定した。細胞内抗原を同定するこれらの抗体については、細胞調製物はまず、STRO-1抗体をもちいて標識し、冷70%エタノールを用いて固定して細胞膜を透過性にし、その後、細胞内抗原特異抗体とともにインキュベートした。アイソタイプ一致した対照抗体は、同一条件下で使用した。COULTER EPICSフローサイトメーターを用いて2色フローサイトメトリー分析を実行し、リストモードデータを収集した。ドットプロットは、各系統細胞マーカー（y軸）およびSTRO-1（x軸）について蛍光強度のレベルを表示する5,000個のリストモード事象を表す。垂直および水平の象限は、アイソタイプ一致した負の対照抗体を基準にして確立した。

【0199】

表4. STRO-1<sup>Bri</sup>およびSTRO-1<sup>Dull</sup>集団における相対タンパク質発現のまとめである。フローサイトメトリーにより決定したSTRO-1<sup>Bri</sup>とSTRO-1<sup>Dull</sup>の集団の間で差次的発現を示したタンパク質のリストを示す。値は、染色の相対的な平均蛍光強度を表す。

【表4】

組織	マーカー	平均蛍光強度	
		STRO-1 <sup>Bri</sup>	STRO-1 <sup>Dull</sup>
神経細胞	神経フィラメント	1.7	20.5
骨	ALK PHOS (アルカリフォスファターゼ)	5.7	44.5
免疫調節性	RANKL (NFκB活性化受容体)	658.5	31.0
上皮細胞	サイトケラチン 10+13	1.2	23.3
	Cytokeratin 14	1.8	8.8
平滑筋	α-SMA (α平滑アクチン)	318.0	286.0
軟骨細胞	ビグリカン	84.4	65.9
基底繊維芽細胞	テネイシン C	22.2	6.9
心筋細胞	トロポニン C	2.5	15.0

【0200】

実施例4：ヒト歯髄幹細胞(hDPSC)は神経細胞に分化する

D P S C およびヒト包皮線維芽細胞の単離

D P S C およびヒト脱落乳歯歯髄幹細胞(SHED)を、実質的に、Gronthos et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A 97:13625-13630, 2000の記述のとおり単離した。簡潔には、アデレード大学ならびに医学および獣医科学ヒト対象調査委員会(Institute of Medical and Veterinary Science ヒト Subjects Research Committees)(H-73-2003)によって定められ承認されたガイドラインのもとで、アデレード大学の歯科医院で日常の抜歯を受けている患者からの、告知にもとづく同意を得て、廃棄された正常ヒトの埋伏した第3大臼歯を、成人(19~35歳)または脱落した歯(7~8歳)から収集した。歯は表面を清浄にし、万力を用いて割り開いて髄室を露出させた。歯髄組織は、歯冠と歯根から穏やかに分離して、その後3mg/mlのI型コラゲナーゼと4mg/mlのディスパーゼの溶液中で、1時間、37°Cで消化した。単個細胞懸濁液は、細胞を70-μMろ過器に通すことによって得た。培養物は、単個細胞懸濁液(1~2×10<sup>5</sup>)の歯髄をT-25フラスコで増殖培地、(20%のウシ胎仔血清、100μMのL-アスコルビン酸2リン酸、2mMのL-グルタミン、100U/mlのペニシリン、および100μg/mlのストレプトマイシンを添加した)-MEM((α-modification of Eagle's medium))に播種することによって樹立し、その後、5%のCO<sub>2</sub>中、37°Cでインキュベートした。

【0201】

ヒト包皮線維芽細胞 (HFF) を、告知にもとづく同意を親から得て、男性新生児ドナーから得た包皮生検の外植片から、コラゲナーゼ/ディスペラーゼ消化により単離した。

#### 【0202】

##### 神経誘導試験

組織培養フラスコまたはウェルは、ポリオルニチン (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  最終濃度) で、終夜、室温で被覆した。フラスコおよびウェルは、水で2度洗浄し、その後、湿潤インキュベーターにおいてラミニン (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  最終濃度) で、終夜、37°Cで被覆した。フラスコおよびウェルは、細胞を加える前に、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で、そしてその後、増殖培地で洗浄した。細胞を解凍し、T25-被覆フラスコ中で、80%コンフルエントになるまで増殖させた。細胞を、2 ml/ウェル増殖培地中、 $1.5 \times 10^5$  個/ウェルの密度で、6ウェル被覆プレートで3日間、または8ウェル被覆チャンバースライド中で  $2 \times 10^3$  個の細胞を再播種した。細胞はその後、培地 A または培地 B のどちらかで3週間培養した。培地 A は、ニューロベイスル A 培地 (Neurobasal A Media) (10888-022; インビトロジェン社、米国、カリフォルニア州、カールスバッド)、100 U/ml のペニシリン、1  $\times$  B27 添加剤、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のストレプトマイシン、20 ng/ml の上皮成長因子 (EGF、100-15; ペプロテック社 (PeproTech)、米国、ニュージャージー州、ロッキーヒル)、および 40 ng/ml の基底線維芽細胞増殖因子 (FGF、番号 104 FGF B 01; プロスペクタンニテクノジーン社 (Prospect Tany Techno Gene)、イスラエル、レホヴォト) から成る。培地 B は、3週間の継続期間に関して3つの別個の培地条件を含んでおり：第1のインキュベーションは、培地 A で7日間であり、その後、ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium) (DMEM、12100-046; インビトロジェン社) と F12 培地 (21700-075; インビトロジェン社) の 50:50 の比の培地、ならびにインスリン-トランスフェリン-亜セレン酸ナトリウム添加剤 (ITTS、11074547001; ロッシュダイアグノスティクス社 (Roche Diagnostics)、スイス、バーゼル)、100 U/ml のペニシリン、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のストレプトマイシン、および 40 ng/ml の FGF で7日間というものであった。最終の7日間のインキュベーションは、50:50 の比の DMEM と F12 培地、ITTS、100 U/ml のペニシリンと 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のストレプトマイシン、40 ng/ml の FGF、および 0.5  $\mu\text{M}$  のレチノイン酸 (RA、R2625; シグマアルドリッチ社)、米国、セントルイス) を含む培地からなっていた。対照試料は、神経細胞誘導試験の継続期間のあいだ、増殖培地中に維持された。すべての条件についての培地を、1週間に2回取り替えた。

#### 【0203】

##### 電気生理学

3週間の神経細胞分化試験の完了時には、細胞を、トリプシンにより遊離し、神経細胞分化培地または増殖培地中、 $2 \times 10^4$  個の細胞/500  $\mu\text{L}$  の濃度で、塩酸処理したガラスカバースリップ上に再播種し、24時間インキュベートした。全細胞パッチクランプを、室温で、コンピューターを用いたパッチクランプ増幅器 (EPC-9; HEKA エレクトロニクス (HEKA Electronics)、ドイツ、ランプレヒト/ファルツ) と、PULSE ソフトウェア (HEKA エレクトロニクス) を用いて実行した。浴溶液は (mM で)、: NaCl、140; KCl、4; CaCl<sub>2</sub>、2; MgCl<sub>2</sub>、2; グルコース、10; および HEPES、10; を含んでおり、NaOH により pH 7.4 に調製した。K<sup>+</sup> チャネルを遮断し Na<sup>+</sup> 電流を分離するために、内液中のグルタミン酸 K および KCl を、等モル量のグルタミン酸 Cs および CsCl で置き換えた。パッチピペットをハウケイ酸ガラスから引出し、火炎研磨した; ピペット抵抗は、2~4 M の範囲であった。示された全電圧は、JPCalc (P. H. Barry 博士の提供、ニューサウスウェールズ大学、オーストラリア、シドニー、1994) により見積もられた液界電位 (K<sup>+</sup> ベースおよび Cs<sup>+</sup> ベースの内液について、それぞれ 14 mV と -18 mV) について補正した。保持電位は常に、90 mV であった。

#### 【0204】

## 鳥胚の注入

鶏卵(白色レグホン; H I C H I C K B r e e d i n g C o m p a n y、オーストラリア、ベサル(Bethal))を、卵トレーに縦において加湿インキュベーターで37°C、およそ40時間インキュベートし、注入に先立って10~12期に到らしめた。緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子導入した成人ヒトDPSCまたはHFF(5×10<sup>3</sup>個の細胞^L)を、成長中の鳥胚に注入した。ファーストグリーン色素(Fast green dye)(2μL)を細胞に加え、注入手順の間、それらを可視化した。胚は、卵を70%エタノールで拭いて準備し、注射針を使ってアルブミンを卵から抽出し、窓を卵の頂部に開け、胚の下部にインディアンインク(Indian ink)(ウィンザー&ニュートン(Winsor and Newton)、英国、ミドルセックス)([1LのddH<sub>2</sub>O中に7.2gのNaCl<sub>2</sub>、0.17gのCaCl<sub>2</sub>、0.37gのKCl、0.115gのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH7.4に調節、フィルター殺菌]のリンゲル液に1:10で調整)を注入して、胚を可視化した。リンゲル液を胚の頂部に置き、湿度を維持した。卵黄膜を、胚の頭部周辺からタングステンワイヤーを用いて除去した。細胞を、ガラスキャピラリー針(GC100TF-10; SDRクリニカルテクノロジー(SDR Clinical Technology)、オーストラリア、シドニー)中に置き、25ボルトに設定された、マイクロマニピュレーターおよび圧力注射器(ナリシゲ、東京)に付着させた。マイクロマニピュレーターを使用して、針を、成長中の後脳におけるロンボマ2のすぐ隣接する領域に誘導した。細胞を、圧力注射器に付属した足踏みポンプを使用して胚に注入した。ガラス針を除去し、数滴のリンゲル液を胚の頂部に置いた。卵を粘着テープで密封し、加湿インキュベーターに戻した。インキュベーション期間の後、胚を卵から切り出し、冷PBS中に置いた; GFP注入した細胞を、蛍光解剖顕微鏡を用いて可視化した。胚をその後、解剖した。頭部を、開いた本(open book)の形として、すなわち、鼻から後脳に向かって、頭部の長さを腹側に沿って切り下げた。解剖された胚を、4%PFA中、室温で2時間、または4で終夜のどちらかで固定し、その後、免疫蛍光染色に先立ってPBSで2回洗浄した。

## 【0205】

## 培養された細胞調製物の免疫細胞化学

チャンバースライドを4%PFAで30分間、室温で固定し、その後、PBSと0.1%ツイン20(Tween 20)(シグマアルドリッチ社)(PBS-T)で洗浄した。培養物を(PBS-T中10%馬血清)30分間、室温でブロックし、その後、一次抗体(1:100ネスチン(611658; BDバイオサイエンス社(BD Biosciences)、米国、サンディエゴ); 1:500のポリシアル酸中性細胞接着分子(PSA-NCAM)(T. Seki博士からの贈与)、1:500の-I I Iチューブリンクロン、TUJ1(MMS-435P, 1mg/ml; コーヴァンス(Covance)、米国、ニュージャージー州、プリンストン); 1:200のNF-M(13-0700, 0.5mg/ml; ザイメド(Zymed)、カリフォルニア州、サンフランシスコ); 1:500のNF-H(AB1991; ケミコン(Chemicon)、テメキュラ(Temecula)、米国、カリフォルニア州)とともに、ブロッキング溶液中、4で終夜、インキュベートした。マウス、ヤギ、およびウサギ(Ig)対照を、同一条件下で治療した。洗浄後、二次抗体(1:200ヤギ抗マウスアレクサ488(Alexa 488)[A11029, 1.5mg/ml; ジャクソンイミノサーチラボラトリーズ(Jackson ImmunoResearch Laboratories)、米国、ペンシルベニア州、ウエストグローブ]; 1:200ヤギ抗ウサギアレクサ488(Alexa 488)[A11034, 2mg/ml [モレキュラープローブ社(Molecular Probes Inc.)、米国、オレゴン州、ユージーン、])を、ブロッキング溶液に、2時間、室温で、暗所にて加えた。最後に、スライドを洗浄し、プロロングゴールド褪色防止剤(Prolong gold antifade)と4, 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩(DAPI, P36931; インビトロジェン)とともにカバースリップをつけた。

## 【0206】

## 結果

図4に示すように、hDPSCが、神経細胞誘導培地中で増殖するとき、それらは、ナ

10

20

30

40

50

トリウム電流を誘導する生物物理学的性質をもつ、複数突起 (multiprocess) をもつ神経細胞様細胞に分化する。さらに、hDPSCを鶏胚の脳に移植する場合、それらは、神経細糸を発現する神経細糸に分化する。

【0207】

実施例4： hDPSC治療は、げっ歯類モデルにおいて脳梗塞後の前肢運動機能を改善する

hDPSCの治療有効性を、虚血性脳梗塞を生じる中大脳動脈閉塞(MCAO)のラットモデルにおいて評価した。MCAOは、ヒトにける虚血性脳梗塞の最も多くみられる提示であり、MCAOのこの前臨床的なげっ歯類モデルは、ヒトの状態を簡潔に再現できるものである。このモデルでは、MCAOは、ナイロン繊維を内頸動脈に挿入して、内頸動脈の末梢にある中大脳動脈を閉塞するまで押し込むことにより生じる。

10

【0208】

方法

ヒトDPSCの培養と調製

ヒトDPSCsを、歯髄組織の消化により、成人の埋伏(予想位置に完全に出現することができなかった)第三臼歯から単離し、蛍光マーカー緑色蛍光タンパク質(GFP)とともにレトロウイルスによって遺伝子導入した。3~5継代のDPSCをウシ胎仔血清中、10%ジメチルスルホキシド中で冷凍保存した。細胞を解凍して、脳内移植での使用に先立って少なくとも1回継代した。DPSCsを、20%のウシ胎仔血清、100DMのL-アスコルビン酸二リン酸(和光(Wako)、バージニア州、リッチモンド)、2mMのL-グルタミン、100U/mlのペニシリン、および100μg/mlのストレプトマイシンを添加したMEM(modified Eagle's medium)(シグマアルドリッチ社、セントルイス、<http://www.sigmaaldrich.com>)中、37°C、5%のCO<sub>2</sub>中で培養した。細胞を、トリプシンで分離し、添加剤なしに、マイクロリットルあたり1.5×10<sup>5</sup>個の細胞の密度で、MEM中に再懸濁した。細胞の生存率を、トリパンブルー色素排除法で決定した。

20

【0209】

げっ歯類の中大脳動脈閉塞と脳内移植

54匹の体重300±20gの成体雄スプリグドローリー(Sprague-Dawley)ラットを、餌と水に自由に取れる状態で、12時間の明/暗周期で養った。

30

【0210】

ラットを、イソフランで麻酔して、腔内近位中大脳動脈閉塞(MCAo)を通じて一時的な局所脳虚血にさらした[実質的にはAspey et al., Neuropathol Appl Neurobiol., 26: 232-242, 2000およびSpratt et al., J Neurosci Methods 155: 285-290, 2006に記述のとおり]。直腸温度 温度を、過熱パッドで37±1°Cに維持し、血液酸素飽和度と心拍数をモニターし、パルス酸素濃度計(モデル8500AV; ノンメディカル社(Non in Medical)、ミネソタ州、プリマス)を用いて、生理学的パラメータの範囲内に維持した。簡潔には、右総頸動脈、外頸動脈(ECA)、内頸動脈(ICA)、および口蓋動脈を、鈍的切開を通じて露出させ、その後にECAの焼灼と結紮をおこなった。シリコン被覆した先端(直径0.35mm、長さ5mm)をもつ4-0単繊維のナイロン糸(ダイネック社(Dyneck)、オーストラリア、南オーストラリア州、ヘンドン)を、ECAの断端からICAを通じて、右中大脳動脈(MCA)の起始部まで進めた。糸をその場に固定し、切開を閉じた。閉塞の2時間後、ラットを再び麻酔し、糸を引き抜いて再灌流可能とした。ラットを、手術から回復するにまかせ、短時間の間尻尾で吊して対側前肢屈曲と、床上での旋回行動とについて評価し、2時間でのMCAoを実証した。MCAoの24時間後、動物を無作為に選択し、ヒトDPSC(n=31)またはビヒクル(n=23)治療を付した(治療スケジュールを示した図5を参照されたい)。全容積4μlの細胞懸濁液(6×10<sup>5</sup>個の細胞)を、2つの定位座標(ブレグマに対して前後方向、中央側方向; 硬膜から背腹方向)において同側実質に: 2μlを線状体に(-0.40, +4.00; -5.50mm)そして残りの2μlを大脳皮質に(-0.40, +4.00; -1.

40

50

7.5 mm)、定位フレーム(コップフインストルメンツ社(Kopf Instruments)、カリフォルニア州、タジヤンガ)を用いて注入した(1  $\mu$ E/分)。ビヒクル動物を、MEM(-modified Eagle's medium)をビヒクルとして投与して、同様に治療した。すべての動物に、10 mg/kgのシクロスポリンAの皮下注入を毎日付した(ノバルティス社(Novartis)、スイス、バーゼル)。

#### 【0211】

2, 3, 5 - トリフェニルテトラゾリウムクロライド染色

2, 3, 5 - トリフェニルテトラゾリウムクロライド(TTC)染色を実行し、虚血を確認した。未使用の脳を、2 mmの薄片に切断し、2%のTTC(Sigma-Aldrich)中、37°Cで10分間、暗所でインキュベートした。脳の断面を、LiDE 210フラットベッドスキャナ(キヤノン、東京)を用いてカラー画像化した。

10

#### 【0212】

機能性評価

動物を、MCAoに先立って、3日連続で訓練し、第3の期間(1日目)を、術前ベースラインとして使用した。行動の盲検化評価を、MCAo後の、1日目(DPSC移植に先立つ)、7、14、21、および28日目の明期(light cycle)に実行した(各テストで試行回数3回)(図1C)。MCAo前の神経行動学的訓練に失敗した(その訓練中、動物は、各テストにおいてベースラインスコアに達しなかった)、およびMCAoの少なくとも1週間後に機能障害がわずかもしくは無し、または非常に深刻、のどちらかを示した動物は排除した。実験は、無作為の治療割り当ておよび盲検化した成績評価を用いて行った。これらは、脳梗塞治療学術産業円卓会議(Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR))および同様なガイドランで承認されたものである。

20

#### 【0213】

ニューロスコア(Neuroscore)

各動物についてのMCAo後における全体の神経学的機能障害を、従来研究から修正されたスコア化システムを用いて評価した[Barry et al., Brain Res, 1389: 143-151, 2011; Bederson Stroke 17: 472-476, 1986; およびThal et al., J. Neurol. Sci, 286: 150-159, 2008]。スコアが高いほど、神経学的障害が大きいことを表わしている。

#### 【0214】

粘着テープ剥離テスト

粘着ラベル(15 mm<sup>2</sup>)を、ラットの前足の内側面に貼り付けた[Bouet et al., Nat Protoc 4: 1560-1564, 2009]。粘着性ラベルを対側または同側の前足に置く順序は、無作為化した。テストケージに戻すと、各足から粘着ラベルをはがそうとするのに費やした時間とラベルを除去するのに使った全時間(最高2分を割り当てた)を記録した。ラベルを除去する(または除去しようとする)のに費やした継続時間を、かかった全時間のパーセンテージとして表した。

30

#### 【0215】

足踏みテスト

各ラットを、片手を用いて固くしばりつけ、胴体と後足ともう一方の手をわずかに持ち上げて前足の1つを動かないようにし、拘束されなかった他の前足で体重を支えるようにした[Schallert et al., Exp Neurol, 64: 33-43, 1979]。ラットをその後、横に(30 cm)動かして、体重を支える前足が逆手方向に足踏みして体の動きに合わすようにした。前足のテストの順序は無作為化した。各前肢を使って実行される足踏みの数を記録した。

40

#### 【0216】

ロータロッド(Rotarod)

ラットを、18 x 1 mmのロッドの、電動回転する集合体からなるロータロッド装置上に置いた[28]。動物は、回転速度が2分以内に0から24 rpmに加速するにつれ、装置上の歩行を要求される。動物が試行を完了した、装置から落下した、または連続2回の回転に対して横木上を歩行しようとせずに横木を握って回転した時間を記録した。

50

## 【 0 2 1 7 】

棚状 (Ledged) / 先細り (Tapered) 梁の歩行

動物に、高位置にあって、終端の暗箱に向かう方向に沿って先細りになった梁を横断することを要求し [Schallert T, Woodlee MT. Orienting and placing. In: Wishaw IQ, Kolb B, eds. The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests. Oxford, U.K.: Oxford University Press 2005;129-140], それらの実行をビデオテープに記録した。下部が張り出した (underhanging) 棚 (上梁表面の 2 cm 下) で後肢を滑らす回数を、梁を横断するのに要した歩数の合計に対するパーセンテージとして計算した。梁の歩行は、脳梗塞動物の巡回行動のせいで M C A o の 1 日後では完遂しなかった。

## 【 0 2 1 8 】

免疫組織学と画像化

神経行動学的評価の終わりにあたって、ラットを深麻酔し、1,000 U のヘパリンを心臓に直接注入し、氷冷食塩水、その後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中、4% (重量/体積) パラホルムアルデヒドで経心腔的灌流した。脳を除去し、同一定着剤を用い、4 で終夜、後固定した。生存ヒト DPSC の比色検出のために、脳をパラフィンに埋め込み、連続的な 5 mm 冠状断片に切断した。断片は、PBS 中、3% 正常ウマ血清を用いてブロックし、PBS 中で 2 回洗浄し、その後、マウス抗ヒトミトコンドリア (1:1,500; ミリポア社 (Millipore)、ビレリカ)、続いてビオチン化抗マウス IgG (1:250; ベクターラボラトリーズ社 (Vector Laboratories)、カリフォルニア州、バーリンガム) そしてストレプトアビジンセイヨウワサビペルオキシダーゼ共役抗体 (1:1,000; サーマサイエンティフィック社 (Thermo Scientific)、イリノイ州、ロックフォード) とともにインキュベーションした。抗体を、ブロッキング溶液中で希釈した。抗体染色を、3,3'-ジアミノベンジジン (シグマアルドリッチ社) で可視化した。明視野画像を取り込み、ナノズーマーデジタルパソロジーシステム (NanoZoomer Digital Pathology System) (浜松ホトニクス、静岡、日本) を用いて分析した。移植の 4 週間後のげっ歯類脳 (n = 3) に残存している移植細胞の数を、5 mm 冠状断片の 1 枚おきに計数し、移植細胞の分布を分析した。

## 【 0 2 1 9 】

二重免疫蛍光研究のために、100 mm 浮遊性の断片を、0.3% の Triton X-100 を含む PBS 中、10% 正常ウマ血清でブロックした後、ヒト DPSCs を、ヤギ抗 GFP (1:250; ロックランド社 (Rockland)、ギルバーツヴィル、ペンシルベニア州) を用いて、成熟神経細胞を、マウス抗神経細胞核 (NeuN; 1:500; ミリポア社) を用いて、または星状細胞を、ウサギ抗グリア線維酸性タンパク質 (GFAP; 1:250; DAKO 社、デンマーク、グロストラップ) を用いて同定した。他に使用した一次抗体は、マウス抗  $\alpha$ -I I I チューブリン (1:500; ミリポア社)、マウス抗ネスチン (1:100; アブカム社 (Abcam)、英国、ケンブリッジ)、マウス抗ポリシリアル酸中性細胞接着分子 (PSA-NCAM; 1:200; ミリポア社) およびマウス抗 O4 (1:500; シグマアルドリッチ社) であった。二次抗体は、Cy2 共役抗ヤギ IgG、Cy3 共役抗ウサギ IgG、または Cy3 共役抗マウス IgG (1:300; ジャクソンイミノリサーチラボラトリーズ社 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)、ペンシルベニア州、ウエストグローヴ) のどちらかであった。抗体は、ブロッキング溶液で希釈した。すべての断片を、プロロングゴールド褪色防止剤 (インビトロジェン社、カリフォルニア州、カールスバッド) とともにマウントした。NeuN または GFAP を共発現した GFP 陽性細胞のパーセンテージを評価するため、倍率 D40 での z スタック (z-stack) 画像を、DPSC 移植 (n = 3 の動物) の段階での同側半球における 2 つの皮質領域と 3 つの線条体領域からなる 5 つの野で撮影した。共焦点画像を、TCSP5 共焦点顕微鏡で連続的に取り込み、その LAS AF ソフトウェア (ライカマイクロシステムズ (Leica Microsystems)、ヴェッツラー) を用いて画像処理した。ImageJ (NIH) を用いて、正射影を実行した。

## 【 0 2 2 0 】

10

20

30

40

50



### 脳梁厚の測定

ブレグマのレベル、およびブレグマ $\pm 0.1$  mmのレベルでのパラフィン断片を0.1%のクレシルバイオレット(cresyl violet) (DPSC治療についてn = 6、ビヒクル治療についてn = 2)で染色した。脳梁厚の測定を、正中線(2つの半球の midpoint)と、脳の両半球の脳室の側稜とで行った。測定は、対応する正中線測定のパーセンテージとして表現し、AxioVision画像化ソフトウェア(カールツァイス社(Carl Zeiss)、ドイツ、オーバーコッヘン)を用いて行った。

#### 【0221】

##### 統計分析

分析は、ジェンスタット(GenStat)(13th edition; VSN International, Hemel Hempstead, U.K.)を用いて実行した。行動テストのスコアに与える治療の影響を、反復測定分散分析(ANOVA)を用いて分析し、それには、個々のラット間の連続測定間の相関を説明するグリーンハウスガイザー補正(Greenhouse-Geisser correction)と、ラットの初期能力において考えうる差異を許容する共変量としての脳梗塞前データの調整も行った。もし初期ANOVAが有意であった場合には、事後のフィッシャーの保護付き最小有意差検定(post hoc Fisher's protected least significant difference (LSD) test)を実行した。差異は、 $p < 0.05$ で統計的に有意であると考えられた。データは、R(version 2.10.1; Rディベロプメントコアチーム(R Development Core Team)、オーストリア、ウィーン)を使用して箱型プロットで示すか、またはプリズム(Prism)(version 5.02, グラフパッドソフトウェア社(GraphPad Software, Inc.)、サンディエゴ)を用いて棒グラフで表した。報告した値は平均 $\pm$ 平均の標準誤差(SEM)である。

#### 【0222】

##### 結果

移植ヒトDPSCは、脳梗塞の前肢の感覚運動の回復を促進する

限局性脳虚血後のヒトDPSC治療の、神経行動学的機能を時間とともに改善する能力を調査した。DPSC治療後の有害な影響は、罹患率(Morbidity rate)または死亡率(mortality rate)に関して対照と比較して認められなかった。脳内移植の後に得られた死亡率は、両治療群で同程度(近似的に9%)であった。

#### 【0223】

臨床的に関連する、片側性MCA $\alpha$ げっ歯類モデルは、げっ歯類脳の同側半球中の側背線状体とそれを覆っている前頭/頭頂の皮質にかなりの虚血性損傷を引き起こす。その結果、動物は、脳梗塞後1日目で11.7 $\pm$ 0.4ポイントのニューロスコアの増加で示される、神経行動学的障害を発症する(図6A)。加えて、足踏みテストにおいて、顕著な前肢体性感覚および運動の非対称性を示した(図6B; MCA $\alpha$ 後1日目で対側前肢がとった足踏み数の82.2 $\pm$ 6.6%の低下)および粘着テープ剥離テスト(図6C; MCA $\alpha$ 後1日目で対側前肢から外部刺激を除去しようとするのに要した時間の93.7 $\pm$ 2.8%の低下)。

#### 【0224】

実験的脳梗塞が生じると、運動平衡と運動協調の喪失もまた、ロータロッドテストにおいて認められた(図6D; MCA $\alpha$ 後1日目においてロータロッド上で費やした時間の53.0 $\pm$ 2.0%の低下)。

#### 【0225】

脳梗塞に冒された動物は、MCA $\alpha$ 後1日目で、梁を歩行する間に、病変と反対側の後肢の足滑りに、後肢の非対称性を示した(図6E、21.7 $\pm$ 6.2%の増加)。同側四肢は、脳梗塞後の正常な神経行動学的機能を有していた。

#### 【0226】

すべての動物は、脳梗塞後4週間にわたって、神経行動学的機能の漸進的回復を示した(図6)。DPSC治療動物は、ビヒクル治療群と比較して、有意に促進された全体的な神経行動学的機能(図6A;  $p < 0.018$  群 $\times$ 日の交互作用、反復測定ANOVA)

10

20

30

40

50

と有意に低いニューロスコアを示し、特に、脳梗塞後21日目 ( $p < 0.05$ 、事後のフィッシャーの保護付き最小有意差検定、および28日目 ( $p < 0.01$ ) で、そうであった。肢に特異的な神経行動学的研究においては、D P S C 治療動物は、ビヒクル対照と比較して、有意に促進された対側 (脳梗塞に冒された) 前肢の感覚運動の回復を、足踏みテスト (図6B;  $p < 0.045$  全体の群効果) と、粘着テープ剥離テスト (図2C;  $p < 0.049$  全体の群効果) において示した。総合すると、D P S C 治療動物は、測定されたすべての日で、対側前肢の使用において、脳梗塞後の障害の減少を示した。

#### 【0227】

治療群の間で同側肢機能の有意な差異は存在しなかった。ロータロッド (図6D) と柵状/先細り梁の歩行における動作 (図6E) テストは、治療群間に統計的に有意差がなかった ( $p < 0.05$ )。促進された機能改善に四肢間で差異があることについて考えられる一つの説明は、このげっ歯類MCAoモデルにより、げっ歯類脳における前肢機能に関する感覚運動皮質の表現に、この領域への選択的血管供給のせいでさらに大きな破壊が生じたということである [Salo et al., Soc Neurosci Abstr 13: 1268, 1987]。これを支持して、本研究における動物では、足踏みおよび粘着テープ剥離テストで測定したように、深刻な前肢機能の喪失が存在したが、しかしMCAo直後の先細り/柵状梁の歩行で評価されたように、後肢機能のより劇的でない障害が存在した。ロータロッド走行と梁歩行は、運動協調と後肢機能をそれぞれ評価し [Hicks et al., Cell Stem Cell, 5: 139-140, 2009]、そしてこれらの試験は、脳梗塞後の欠陥を同定するには充分敏感ではない可能性がある。ビヒクル治療動物と比較して、D P S C 治療後の促進された機能改善は、前肢の4週間にわたる分析で明らかになったが、しかし後肢機能ではそうではなかった。

#### 【0228】

代わりの説明が、動物が学習した補償的な運動行動に関係することもあり得る。ロータロッド走行および先細り/柵状梁歩行のテストでは、試験の反復を通じて、げっ歯類が、脳梗塞に冒されていない四肢または尻尾への偏向を用いて、脳梗塞に冒された肢の機能喪失を補償するという新たな方法を学習することがあり得る [Schaar et al., Exp Transl Stroke Med, 2: 13, 2010]。足踏みおよび粘着テープ剥離テストにより測定したように、前肢特異的な作業は、脳梗塞後の感覚運動機能の喪失を克服する補償行動の使用を最小限にすることが可能である。

#### 【0229】

前述のデータは、h D P S C 移植が、脳梗塞後の宿主神経系の正常機能に影響を及ぼし、対照動物と比較して、神経学的機能の改善をもたらしたことを示している。理論または行動様式に拘束されるものではないが、この改善は、脳梗塞後の脳内での神経可塑性変化を通じて生じた可能性がある。例えば、上に示したように、S T R O - 1<sup>+</sup>細胞はS D F - 1 (C X C L - 12) を発現する。h D P S C はまた、このケモカインを発現することを示した。さらに、h D P S C は、これらの動物が後の時点で有意な機能改善を示したにもかかわらず、鶏胚頭部への移植後の宿主の三叉神経節から軸索を化学誘因する。

#### 【0230】

移植後4週間での虚血性脳におけるD P S Cの生存

D P S C 移植後の神経行動学的研究からの知見は、神経学的スコアと前肢の感覚運動機能において、後の時点で頂点となる効能を示した。引き続く研究は、これらの知見を説明する基本的細胞メカニズムが、脳梗塞脳へのD P S C 移植後の神経細胞の置き換えによるものであったのかどうかを調査した。例えば、頂点となる効能が認められた研究終了時点で生存していたドナー細胞の数を決定した。げっ歯類脳の個々のD P S C を、ラット組織と交差反応しないヒトミトコンドリア抗原に対する特異抗体を用いて可視化した。標識した細胞の数を、冠状脳断片の1枚おきに、つまり10 $\mu$  間隔で、手で計数した。移植後4週間で各動物の脳に同定されたヒトミトコンドリア陽性細胞の合計数は、9,458から22,394個の範囲の細胞であった (表5)。これは、残存ヒトD P S C の平均数13,807 $\pm$ 4,293個と、当初に移植した6 $\times$ 10<sup>5</sup>個の細胞の平均生存率2.3 $\pm$ 0.7%を与えた。我々のデータは、虚血脳後におけるD P S C 由来細胞が少数であっ

たにもかかわらず、細胞移植が成功し、結果として長期生存率をもたらしたことを示した。

【0231】

理論と行動様式に拘束されるものではないが、当初移植したhDPSCの平均2.3%しか、脳梗塞の28日後まで生存していないので、神経細胞の置き換えが、hDPSCが神経学的機能を改善する作用の主要メカニズムである可能性は低い。しかしながら、そのような神経細胞の置き換えが、治療効果の一部を提供することもありうる。この改善の原因となりうる代わりのまたはさらなるメカニズムには、神経保護、血管新生、免疫調節として神経可塑性が挙げられる。

【0232】

表5： 移植したヒトDPSCの4週間後での生存  
【表5】

	ラット1	ラット2	ラット3	平均±SEM
生存ヒトDPSCの数	9,458	9,570	22,394	13,807 ± 4,293
DPSCの生存率 (%)	1.6	1.6	3.7	2.3 ± 0.7

中大脳動脈閉塞の4週間後での生存ヒトDPSC全数とパーセンテージ(600,000個の細胞のパーセンテージとして取得)。連続した5μmの脳冠状断面を、ヒトミトコンドリア抗原について染色し、ヒトDPSCを同定した、ヒトミトコンドリア抗原陽性細胞を、手動で、その他すべての断面において計数した。省略：DPSC、歯髄幹細胞

【0233】

目的とされた、脳梗塞病変へのDPSCsの移動

虚血ラット脳への移植後の、ヒトDPSCの空間分布も分析した。移植後24時間では、DPSCsは、注入部位の周囲に集塊をなしているのが認められた。4週間後では、ヒトミトコンドリア標識した細胞が、梗塞核の周囲領域に支配的であるのが認められ(図7、8A、8B)、これは、移植した細胞が移植部位から選択的に虚血性梗塞に向かって移動し、虚血境界域(IBZ)に局在化したことを示している。少数のDPSCが、細胞移植部位の対側の半球(図7、8A、8B)と、脳梁(図8B)に観察された。細胞は、4週間の期間にわたり、対側脳半球内に少なくとも4mm移動した。DPSC由来細胞は、病変部位と同側半球に比較して少数が対側半球に広範囲に分布し、対側半球の特定の標的領域内へのDPSCの明瞭な移動は存在しなかった。さらに、DPSC由来細胞は、内皮細胞(図4C、矢印)、周皮細胞、または平滑筋細胞(図4C、矢じり形)と整合する形態的外観をもつ脳微小血管の壁に取り込まれた、またはその周囲にあった。

【0234】

移植されたヒトDPSCは、神経細胞と星状細胞にIn Vivoで分化した

虚血脳4週間後でのヒトミトコンドリア抗原陽性細胞の形態を、次に調べた。細胞は、星様の外観を示す星状細胞と整合する形態を有しているように見えたが(図8D、矢印)、一方、推定された神経細胞は、長い突起を示した(図8D、矢じり形)。これらの表現型を検証するため、二重免疫蛍光分析と共焦点画像化を使用した。移植したヒトDPSCはこれまで、レトロウイルスによって遺伝子導入されてGFPを発現し、これにより、NeuNまたはGFAPのどちらかで共標識して、成熟した神経細胞または星状細胞をそれぞれ同定することが可能であった。神経膠痕内の細胞におけるGFP発現をともなうGFAPの共局在により、DPSC由来細胞が星状細胞に分化したことを確認した。同側の梗塞周辺皮質領域内で、NeuNおよびGFP二重陽性細胞は、移植したDPSCsの神経細胞への分化を示した。虚血後の同側脳半球での星状細胞と神経細胞の分布は、一様ではなかった。線条体領域のIBZでは、DPSC由来星状細胞が支配的であった(51.0 ± 8.6% GFAP / GFP二重陽性細胞、GFP単一標識細胞のパーセンテージとし

10

20

30

40

50

て表現)が、その一方で、比較して、より少ない割合のDPSC由来神経細胞が存在した(8.7±6.1%NeuN/GFAP細胞)。梗塞周辺皮質領域では、星状細胞と神経細胞の割合は同様であるように見えた(それぞれ、38±0.6%GFAP/GFP細胞および32.1±1.8%NeuN/GFP細胞)。線状体内のIBZに沿って見つかった移植DPSCは大部分、星状細胞に分化し、星状細胞神経膠痕に取り込まれるように見えた。線状体と比較して、皮質の梗塞周辺領域に存在するより多くのDPSC由来神経細胞があった。興味深いことに、梗塞周辺皮質領域のGFAP細胞およそ3分の1もまた、初期/中間神経細胞マーカーである - IIIチューブリンで標識された。しかしながら、IBZに沿った神経膠痕内では、多数のGFAP細胞もまた、神経前駆体マーカーであるネスチンを共発現した。皮質でのネスチン/GFAP細胞の証拠は、ほとんど存在しなかった。少数のGFAP細胞はまた、梗塞周辺皮質において、移動性神経芽細胞マーカーであるPSA-NCAMに対して陽性であった。まれな事象では、DPSC由来の稀突起膠細胞(0.4/GFAP細胞)が、移植の4週間後で、げっ歯類脳に認められた。

10

## 【0235】

DPSC治療が脳梗塞後の脳梁萎縮を減少させた

脳梗塞発作後の、脳梁を介した大脳半球間の結合の喪失に与えるDPSC治療の影響もまた調査した。脳梗塞後の4週間では、ビヒクル治療群と比較して、DPSC治療動物における同側脳梁萎縮に、有意な減少は存在しなかった(DPSC治療、67.6±12.5%、対応する正中線LI測定のパーセンテージとして表現したL2測定;ビヒクル治療、56.6±3.0%; $p > .05$ ) (図9)。DPSC治療脳では、同側半球での脳梁厚は、より良く保存されている傾向を示し、病変と反対側の(脳梗塞に冒されていない)半球の同様な脳梁厚に達していた。対側脳半球における脳梁厚に、治療群の間で差異はなかった(DPSC治療、66.1±14.0%;ビヒクル治療、66.5±1.6%)。

20

## 【0236】

実施例5:カニクイザルSTRO-3<sup>+</sup>MPCの評価

サル骨髄前駆細胞(カニクイザル由来;cyno-MPC)は、雌のカニクイザルから収集したおよそ15mlの骨髄穿刺液から単離した。骨髄穿刺液懸濁液は、フィコール密度勾配遠心を用いて分離し、洗浄して無核細胞(赤血球)を除去した。有核細胞を計数し、その後、CA12抗体(抗STRO-3)およびダイナルビーズ(Dynalbeads)を付着することにより分別した。抗体およびビーズの付着した細胞は、MPC-1磁石の磁場により陽性選択した。陽性選択を受けた細胞を計数し、Tフラスコに増殖培地(Growth Medium)において継代(p.)0で播種した。事前選択、陽性、および陰性の細胞を、コロニー形成試験(CFU-F)に使用した。

30

## 【0237】

cyno-MPC細胞に、増殖培地(Growth Media)により栄養を与えた。すべての培養物(p.0~p.5)に、所望のコンフルエンスに達するまで、2~4日ごとに栄養を与えた。細胞を、その後、継代し、HBSS洗浄、およびさらにコラゲナーゼに続いてトリプシン/バーゼン液を用いて収集した。p.1の細胞を計数し、Tフラスコに播種した。p.1のcyno-MPCが所望のコンフルエンスに達した時、細胞を収集し、速度制御冷凍庫に保存した。

40

## 【0238】

継代1の凍結保存cyno-MPCを解凍してTフラスコに播種した(p.2)。p.2の細胞をセルファクトリー(Cell Factory)にて継代してp.3とした。p.3の細胞を収集し、セルファクトリーにおいてp.4に継代した。余分のp.3の細胞は、凍結保存した。p.4の細胞を6xセルファクトリーにおいて継代しp.5とした。p.5のcyno-MPCが所望のコンフルエンスに達した時、細胞を収集し、速度制御冷凍庫を用いて凍結保存した。細胞は、50%MEM(AlphaMEM)、42.5%プロフリーズ(Profreeze)、および7.5%DMSO中で凍結保存した。試料を、CFU-F試験、FACS、無菌、マイコプラズマ、および内毒素について試験した。

## 【0239】

50

培養した *cyno*-MPC の免疫表現型をフローサイトメトリー分析した代表的な結果を図 10 に示す。示されるように、これらの細胞は、STRO-1<sup>+</sup>、STRO-4<sup>+</sup> および CD146<sup>+</sup> である。

【0240】

実施例 6 非ヒト霊長類 (*inhp*) DPSC の予期的単離：

磁気ビーズ分取の使用することで、希少な DPSC を線維骨髄組織から精製することが可能になる。歯髄組織の採取と酵素消化の後、1 個の成人第 3 臼歯から、およそ  $1 \sim 2 \times 10^6$  個の細胞を収集することができる。この観点から、複数の歯に由来するプールされた細胞を、同一の動物から収集することができる。非ヒト霊長類歯髄の単個細胞懸濁液は、我々がこれまで非ヒト霊長類骨髄細胞と反応することを示してきた、ヒト MPC 関連抗原に対する抗体とともにインキュベートする (図 10) が、それらの抗体には、STRO-1 (マウス IgM 抗ヒト MPC; ディベロブメンタルスタディーズハイブリドーマバンク (Developmental Studies Hybridoma Bank)、アイオワ大学、米国、アイオワ州、アイオワシティー); CD146 (マウス IgG2a 抗ヒト CD146/MUC-18; 9); または STRO-4 (マウス IgG1 抗ヒト熱ショックタンパク質-) などが挙げられる。標識した歯髄細胞を、他のヒツジ抗マウス IgG 結合またはラット抗マウス IgM 結合磁気ダイナビーズ (Dynabeads) (細胞 1 個あたり 4 個のビーズ: ダイナル社 (Dyna) )、ノルウェー、オスロ) とともに、インキュベートする。磁気ビーズ陽性細胞を、製造元の推奨プロトコルに従って、MPC-1 磁気粒子濃縮器 (MPC-1 magnetic particle concentrator) (ダイナル社) を用いて収集する。STRO-1、STRO-4 または CD146 ビーズ陽性細胞を、増殖培地  $cm^2$  あたり約  $3 \times 10^4$  個の細胞で播種し、初代培養物を通常の増殖培地 (20% (体積/体積) の FBS、2 mM の L-グルタミン、100 mM の L-アスコルビン酸 2リン酸、50 U/ml のペニシリン、50 mg/ml のストレプトマイシンを添加した MEM) で生成した。約 90% のコンフルエンスに達した後、初代 DPSC は、 $cm^2$  あたり約  $0.5 \sim 1 \times 10^4$  個の細胞のプレーティング濃度で、継代培養されることになる。

【0241】

実施例 7 *inhp* DPSC コロニー出現頻度の評価: コロニー形成線維芽細胞実験の使用

*inhp* DPSC を精製する単一試薬としての STRO-1、STRO-4 または CD146 抗体の効率を評価する。分画しない、ならびに STRO-1、STRO-4 または CD146 陽性および陰性選択された細胞画分を、通常の増殖培地において、ウェルあたり 0.3、1.0 および  $3.0 \times 10^4$  個の細胞で 3 とおり、6 ウェル培養プレートに播種し、37°C で 5% CO<sub>2</sub> および > 90% の湿度で 12 日間、インキュベートする。> 50 個の細胞の集塊が、線維芽細胞様コロニー (CFU-F) として記録された。CFU-F のコロニー形成の出現率が最高となる抗体選択プロトコルを用いて、機能評価研究のための GLP グレードの *inhp* DPSC を生成する。

【0242】

実施例 8 *inhp* DPSC の特性評価

フローサイトメトリー分析は、*ex vivo* で増殖した DPSC の免疫表現型を特性評価するものである。異なる細胞継代での、間葉および非間葉幹細胞に関連する表面マーカーの発現を、上述のとおり評価する。同種異系 *inhp* DPSC を使用して虚血性脳梗塞治療するさい、これらの細胞が、*in vitro* で混合リンパ球反応において、またはマイトジェン刺激リンパ球とともに共培養されたときに、活性化した免疫細胞を抑制する免疫調節能力を評価する (例えば、Wada et al., J Cell Physiol., 219: 667-676, 2009 に記述のとおり)。

【0243】

それらの由来元と類似の能力を含む、中胚葉および外胚葉組織を発生させる DPSC の能力は、これらの細胞の品質証明となる特徴である。異なる細胞系統に *in vitro* で分化する DPSC の能力を、誘導条件下で培養することにより調査する。*ex vivo* で増殖した *inhp* DPSC を用いて、骨芽細胞 (鉱質沈着物のアリザリンレッド染色)

、脂肪細胞（脂肪滴のオイルレッド染色）および軟骨細胞（硫酸化プロテオグリカンおよびⅡ型コラーゲン発現のトルイジン染色）への、複数系統へ分化する能力を、（例えば、Grontos et al., J Cell Sci., 116: 1827-2835, 2003に記述のとおり）評価する。

【0244】

*ex vivo*で増殖し、GFPで前標識されたnhpDPSCの単個細胞懸濁液をさらに、重度に障害された免疫不全（NOD/SCID）マウス（ $n = 3$ ）の背側表面に、約8週の期間、セラミックヒドロキシアパタイト/リン酸三カルシウム（HA/TCF）粒子を担体ビヒクルとして組み合わせて皮下移植する。移植後8週間で、レシピエント動物を、組織学的分析のために犠牲して移植組織を回収することになる。

【0245】

*in vitro*でのnhpDPSCの神経細胞への分化の評価を、上記のとおり神経誘導培養条件下で、ポリオルニチンで被覆したチャンバースライド内で実行する。

【0246】

リアルタイムPCRおよび免疫組織化学を用いて、初期（NeuroD、ネスチン、NeuN、b-IIIチューブリン）および後期（GFAP、神経細系中鎖および重鎖）の遺伝子およびタンパク質発現を評価する。

【0247】

パッチクランプを実行し、*in vitro*で、分化したnhpDPSCが活動電位を生じさせる能力を決定する。

【0248】

加えて、GFP標識したnhpDPSCの神経原生および神経可塑性の可能性を、これらの細胞を鶏胚に、例えば上述のように、*in ovo*で注入することにより決定する。

【0249】

移植したGFP標識DPSCの電気生理学的性質を、移植後7～14日において、脳組織の300mm断面上に電圧依存のナトリウムおよびカリウムチャンネルの存在を測定することにより評価する。

【0250】

集合的に、これらの研究は、非ヒト霊長類の前治療研究において脳梗塞を治療するのに使用される同種異系のnhpDPSC集団を定義する。

【0251】

実施例9：nhpDPSCを使用した、虚血性脳梗塞の非ヒト霊長類モデルにおける運動機能の改善

複雑な認識能力、大きな社会的複雑性および脳機構の複雑さの観点で、ヒトと非ヒト霊長類の間の類似性は、神経性疾患や障害を研究する良いモデルとなる。

【0252】

虚血性脳梗塞の非ヒト霊長類モデルは、ナイロン繊維による内頸動脈の閉塞を用いたMCAO方法により生成する（例えば、Freret et al., J Cereb Blood Flow Metab., 28: 786-796, 2008の記述のとおり）。非ヒト霊長類モデルは、旧世界ザル（Macaca fascicularis）であるカニクイザルに生成する。以下は、虚血性脳梗塞の研究のための実験計画プログラムである：

(i) ベースラインの神経行動学的テストを、すべての動物について脳梗塞に先立って実行する。

(ii) 虚血性脳梗塞のMCAOモデルを誘導する。

簡潔には、サルを麻酔し、挿管し、機械的に人工呼吸器にかけ、血中酸素濃度、深部体温、血圧、ECG、および頭蓋内血流のレーザードップラー流量測定を集中的にモニタリングする。経験豊富な神経外科医によるきめ細かい手術を実行し、外内頸動脈の分岐での右総頸動脈を露出させる。外頸動脈と他の分岐動脈を焼灼して、内頸動脈に沿って中大脳動脈の起始部までの繊維の滑らかな通過を保証する。径0.54mm長さ3mmの、シリコーンゴムで被覆したナイロン繊維を内頸動脈に挿入し、中大脳動脈の閉塞を示す抵抗が感じられるまで進める。繊維は、結索系でその場に保持する。MCAOの3時間後、シリコ

10

20

30

40

50

ーンゴム被覆ナイロン繊維を引抜くと、その結果、再灌流が生じ、この過程が、ヒトにおける中大脳動脈虚血性脳梗塞を近似する。

( i i i ) M R I を M C A O 後の 7 日以内に実行し、適切なサイズと部位の虚血性脳梗塞が生じたかどうかを決定する。

( i v ) 細胞治療計画は、脳梗塞の 1 週間後における、 $5 \times 10^5$  個または  $1.5 \times 10^6$  個の n h p D P S C、または培地のみ（細胞なし）の線条体内注入を伴う 3 つの群を含む。げっ歯類の場合のように、頭蓋内圧の上昇に由来する罹患率のせいで、脳梗塞後の大脳内に安全に注入することができる液体の体積に関して制限がある。これは、ママカクザルにおいては  $12 \mu\text{L}$  であると見積もられている。このように、すべての線条体内注入は  $12 \mu\text{L}$  であって、細胞密度を変化させることになるであろう。すでに述べたように、サルを麻酔し、定位頭蓋内注入のために頭蓋に穿頭孔を開ける。

( i v ) 神経行動学的テストを、実験継続の 6 週間にわたって毎週、実行する。M C A 虚血性脳梗塞後の感覚運動障害の程度を適切に調査するために、以下のテストを使用する：M o n k e y C A N T A B（登録商標）（Cambridge Neurophysiological Test Automated Battery）、ニューロスコア（Neuroscore）、ヒルアンドバレー階段（Hill-and-Valley Staircase）および触覚前肢刺激（Tactile forelimb stimulation）テスト（例えば、Bihel et al., J Cereb Blood Flow Metab., 30: 273-285, 2010 に記述のとおり）。

( v i ) 脳梗塞の 6 週間後に研究完了。

#### 【 0 2 5 3 】

実施例 10：移植 n h p D P S C と N H P 脳組織との間の相互作用

10.1 虚血性ペナンブラのレスキュー：

虚血性脳梗塞に周辺には、死の危険にあるが蘇生の可能性のある虚血性ペナンブラという領域が存在する。S T R O - 1 細胞治療は、この虚血性ペナンブラと相互作用してもよく、そしてそれ故に、脳梗塞のサイズを制限する。

#### 【 0 2 5 4 】

サルに麻酔をかけ、. 0 T シーメンストリオスキャナー（Siemens Trio scanner）内に入らせた状態で置き、T 2 - W ターボスピンエコー（turbo-spin echo）画像（T 2 W I、T R / T E = 4 8 0 0 / 8 6 m s）を、視野（1 8 0 × 1 8 0 m m）および平面分解能  $0.5 \times 0.5$  の画像収集マトリクスで収集する。スライス厚 2 m m、間隔 0.2 m m で 1 2 とおりの T 2 W I 冠状画像を収集する。T 2 W I による梗塞の容積を、サルに対してシーメンス M R I ソフトウェア（Siemens MRI software）を用いて描出することになる。

#### 【 0 2 5 5 】

10.2 N H P 脳梗塞脳における神経置き換えと結合性

梗塞は、一方の脳半球の神経細胞およびグリアのおよそ 2 / 3 の喪失という結果をもたらす。この一連の調査の目的は：（1）生存 n h p D P S C の数、（2）神経細胞またはグリアに分化する n h p D P S C の数、および（3）n h p D P S C 由来神経細胞が機能的結合を形成するかどうか、を決定することである。このために、n h p D P S C は、G F P を発現するようにレトロウイルスによって遺伝子導入され、移植に先立って、B r d U（約  $20 \mu\text{M}$  で 2 4 時間）中で核標識のために培養される。これらの 2 つの標識法は、宿主脳内に移植した n h p D P S C の正式の同定法を提供する。

#### 【 0 2 5 6 】

神経表現型に分化した n h p D P S C の数は、特定の容積中の n h p D P S C の密度を確立することにより、立体的に見積もられる。げっ歯類の研究から、われわれは、h D P S C が 4 週間で、注入の部位（これは、脳表面上の痕跡から明らかである）から前後のどちらかの方向へ、脳梗塞の部位内におよそ 1 m m 移動することを見出した。このように、注入部位への前後軸における 8 m m 厚のサル脳には、脳梗塞の 6 週間後までに、移植したヒト細胞の大部分が含まれる。この軸に沿った、1 0 0 m m の一連の冠状断面が取られる（治療動物あたり、約  $4 \times 10^3$  m m の組織幅で 1 0 0 m m = 4 0 の冠状断面）。無作為抽出プロトコルを（イメージ J（Image J）を用いて）組立て、標準化された組織容積における B r d U - 陽性細胞の数を計数する。陽性染色したヒト細胞の直接的な 3 次

10

20

30

40

50

元計数を、バイオラッド (Bio-Rad) MRC-1000 UV 共焦点顕微鏡 (アデレードマイクロスコープ (Adelaide Microscopy)) を用いて実行する。共焦点顕微鏡は、GFP 陽性または BrdU 陽性 nhpDPSC が、分化した細胞 (例えば、神経細線維中鎖 (NF-M) または -III チューブリンに対する抗体を用いる神経細胞、グリア原線維酸性タンパク質すなわち GFAP、またはチロシンヒドロキシラーゼを発現する星状細胞) により発現した細胞質抗原と共局在することを同定した。

【0257】

サル脳梗塞に移植した nhpDPSC 由来の神経細胞の電気生理学的性質もまた、評価する。第一に、げっ歯類脳梗塞脳から単離された、単一 nhpDPSC 由来神経細胞の生物物理学性質を評価する。簡潔には、動物の頭部を切断し、脳を取り出して、氷冷した含酸素生理食塩水中に置く。脳切片 300 ~ 500 mm 厚を、振動式組織スライサーを用いて切断し、洗浄して、その後、トリプシンとコラゲナーゼの混合物により酵素消化する。単一神経細胞を、組織の穏やかなピペット操作により得て、洗浄し、コラーゲン処理したガラスのカバースリップ上に置く。24時間の回収の後、細胞を全細胞パッチクランプのために使用する。nhpDPSC 由来の神経細胞は、GFP 陽性細胞として同定される。適切な電圧プロトコルとチャネル阻害剤を使用して、これらの細胞により発現する電圧感受性チャネルの型を同定する。

10

【0258】

nhpDPSC 由来の神経細胞が、活動電位 (AP) を発生させ他の神経細胞との結合を形成する能力を、パッチクランプおよび脳切片内の細胞の画像化により調査する。脳切片の 250 ~ 400 mm の厚を、注入部位の近傍でピプラトームにより切断する。室温および一定の酸化での1時間の回収の後、蛍光付属品、IR および DIC オプティクスを備えた BX51WI オリンパス正立顕微鏡に搭載した記録チャンバーに、個々の切片を移す。nhpDPSC を、最初、GFP 蛍光を用いて同定し、その後、IR フィルター (720 ~ 850 nm) と Rolera-XR IR 高感度カメラを用いて可視化する。脳切片における神経細胞の全細胞パッチクランプを、EPC-10 コンピューター制御増幅装置と関連機器を使用して実行する。AP は、脱分極電流の注入により誘発され、電流クランプモードで記録される。

20

【0259】

nhpDPSC により発生した AP が、密着結合またはシナプス結合を通じて周囲の神経細胞に伝搬することができるかどうかを調査するために、パッチクランプと併せて、Fura-2 蛍光を用いて細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化を可視化する。簡潔には、脳切片を膜透過性 Fura-2 AM とともに載せ、洗浄し、記録チャンバー内に置く。移植した nhpDPSC 由来の神経細胞を、GFP 蛍光により同定し、IR を用いてパッチクランプする。蛍光の設定はその後、Fura-2 測定に適切なものへと変更する。AP は、脱分極電流の受け渡しにより nhpDPSC により誘発され、蛍光は、周囲のげっ歯類の宿主神経細胞において測定する。

30

【0260】

10.3 神経可塑性を調査する、非ヒト霊長類脳梗塞脳の機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) および拡散テンソル画像法 (DTI) :

40

これらの技術は、対照サルと比較した、nhpDPSC 治療後の神経可塑性の非侵襲的調査を可能にする。虚血性脳梗塞モデルでは、fMRI を用いて、前肢の運動制御を評価し、nhpDPSC 治療後に運動皮質のより大きな活性化が存在するかどうかを決定する。fMRI 研究は、治療の 3 ~ 6 週間後に開始する。



【 図 1 】

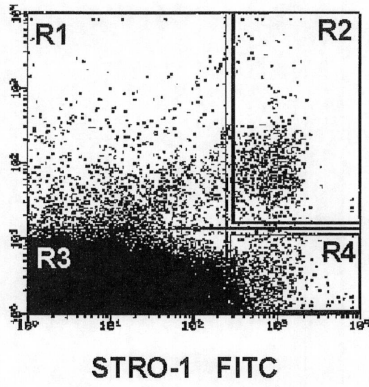


図 1

【 図 2 - 1 】

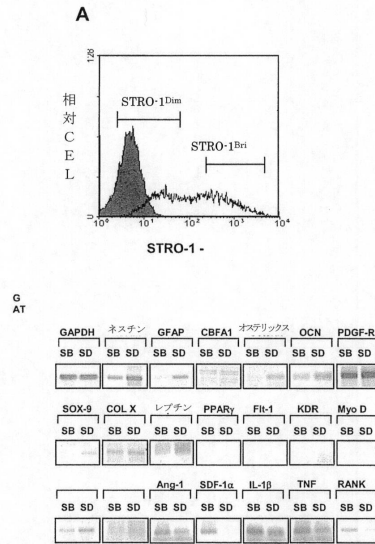


図 2

【 図 2 - 2 】

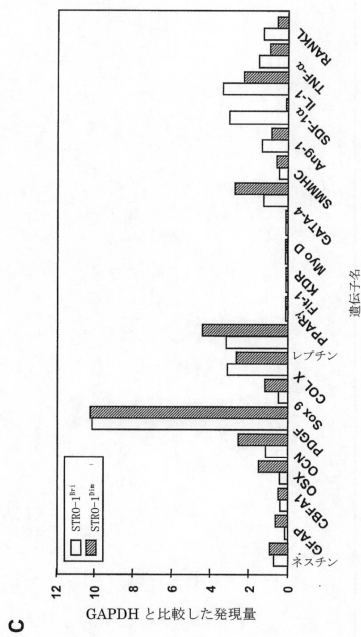


図 2 ( 続き )

【 図 3 】

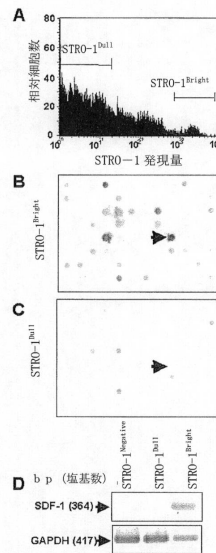


図 3

【 図 4 】

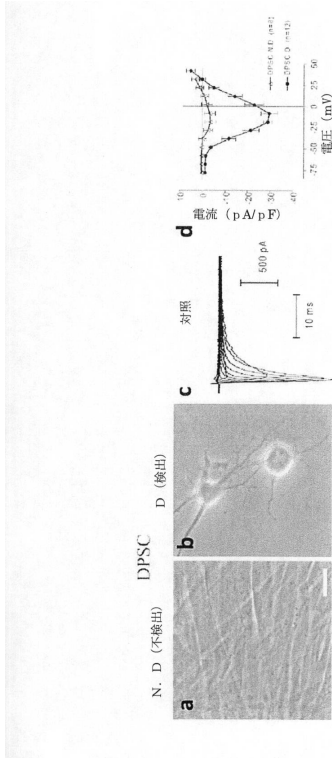


図 4

【 図 5 】

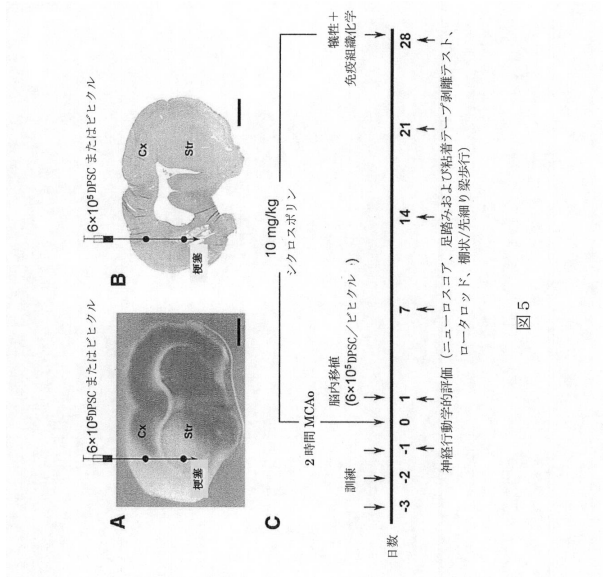


図 5

【 図 6 】

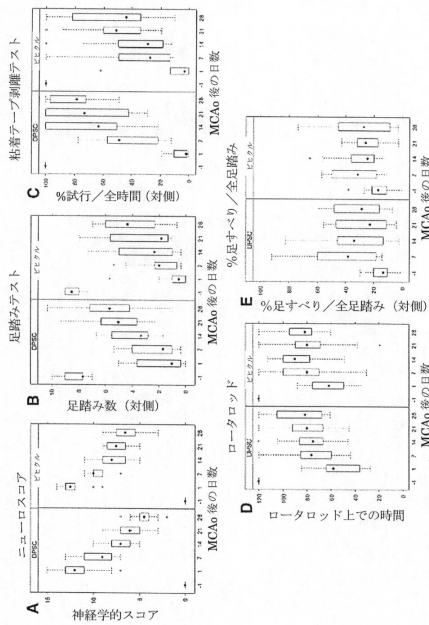


図 6

【 図 7 】

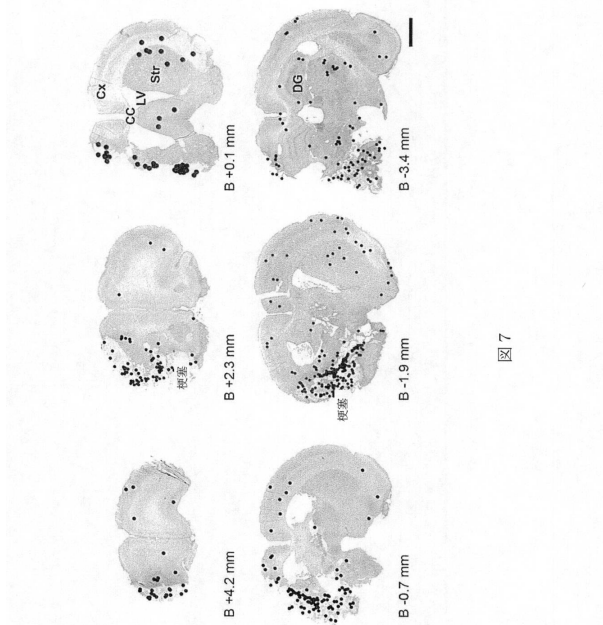
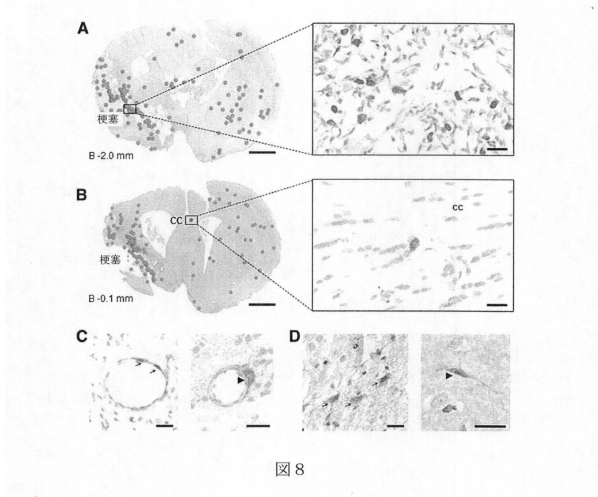
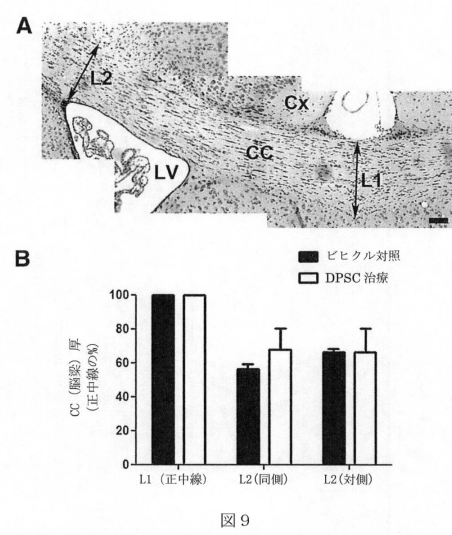


図 7

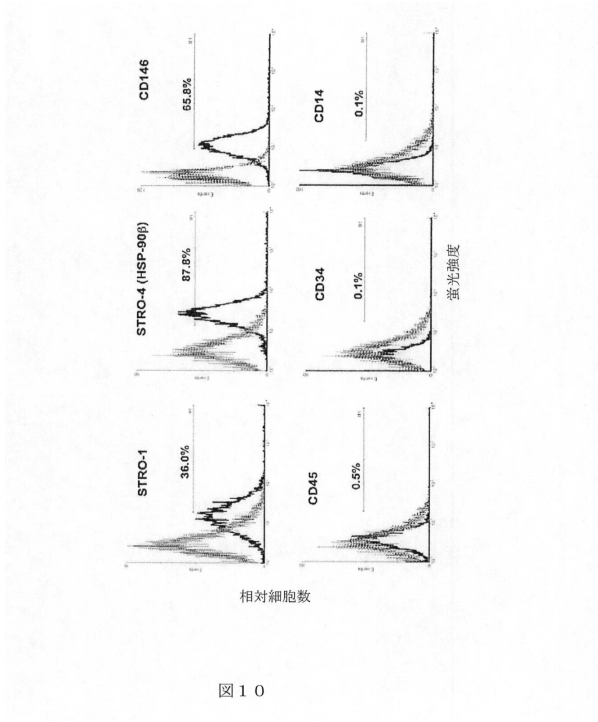
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【配列表】

0006265890000001.app

## フロントページの続き

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 サイモン・アンドレア・コブラー

オーストラリア・サウス・オーストラリア・5041・ミルズウッド・イースト・アヴェニュー・  
33

(72)発明者 スタン・グロントス

オーストラリア・サウス・オーストラリア・5041・コロネル・ライト・ガーデンズ・ライト・  
プレイス・21

(72)発明者 アグニエシュカ・アーサー

オーストラリア・サウス・オーストラリア・5142・ウレイドラ・パリッシュ・ヒル・ロード・  
9

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 国際公開第2010/021412(WO, A1)

再公表特許第2010/021412(JP, A1)

国際公開第2011/118795(WO, A1)

実験医学, 2010年 2月, Vol.28, p.261-267

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)