

(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2016-519938

(P2016-519938A)

(43) 公表日 **平成28年7月11日(2016.7.11)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0775 (2010.01)	C 1 2 N 5/0775	2 G 0 4 3
C 1 2 N 5/0789 (2010.01)	C 1 2 N 5/0789	2 G 0 4 5
C 1 2 N 5/074 (2010.01)	C 1 2 N 5/074	2 G 0 5 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-514476 (P2016-514476)
 (86) (22) 出願日 平成26年5月20日 (2014.5.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年12月17日 (2015.12.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2014/051538
 (87) 国際公開番号 W02014/188170
 (87) 国際公開日 平成26年11月27日 (2014.11.27)
 (31) 優先権主張番号 1309057.6
 (32) 優先日 平成25年5月20日 (2013.5.20)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 514002662
 セル セラピー リミテッド
 CELL THERAPY LIMITE
 D
 英国 エスエー2 8ピーピー シングル
 トン パーク スウォンジ スウォンジ
 ユニバーシティー スクール オブ メデ
 イシン ルーム 137 ファースト フ
 ロアー インスティテュート オブ ライ
 フ サイエンス (番地なし)
 Institute of Life S
 ciences First Floor
 , Room 137 School o
 f Medicine Swansea
 University Singleto
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特定の間葉系幹細胞において、細胞の集団を同定するための、マルチカラーフローサイトメトリ
 ー方法

(57) 【要約】

本発明は、示差的な、特異的な蛍光活性化セルソーティング (FACS) を用いた、間
 葉系幹細胞 (MSC) および他の細胞型の同定、およびさらに分離の分野の発明である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

細胞の集団における間葉系幹細胞（MSC）を同定する方法であって、
蛍光活性化セルソーティング（FACS）を用いて、その表面上に検出可能なレベルのCD73、CD90およびCD105を提示し検出可能なレベルのCD14、CD19、CD34およびCD45を提示しない、前記集団における細胞を同時に同定するステップ、および、
それにより、細胞の集団における間葉系幹細胞（MSC）を同定するステップ、
を含む、
方法。

10

【請求項 2】

細胞の集団における特定の細胞型を同定する方法であって、
FACSを用いて、前記集団における細胞の表面上の、前記の特定の細胞型を示す7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を、同時に同定するステップを含む、
方法。

【請求項 3】

請求項2に記載の方法であって、
前記方法は、前記集団における細胞の表面上の、前記の特定の細胞型を示す10またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を、同定するステップを含む、
方法。

20

【請求項 4】

請求項2または3に記載の方法であって、
前記の特定の細胞型は間葉系幹細胞（MSC）であり、
前記方法は、CD73、CD90、CD105、CD14、CD19、CD34およびCD45の存在または不存在を同時に同定するステップを含み、
ここで、細胞表面上の、検出可能なレベルのCD73、CD90およびCD105の存在、および、検出可能なレベルのCD14、CD19、CD34およびCD45の不存在は、それがMSCであることを示す、
方法。

30

【請求項 5】

請求項4に記載の方法であって、
前記方法は、検出可能なレベルのCD181およびCD184の存在または不存在を同定するステップをさらに含み、
ここで、細胞表面上の、検出可能なレベルのCD181およびCD184の存在は、それが特定のサブタイプのMSCであることを示す、
方法。

【請求項 6】

請求項2または3に記載の方法であって、
前記の特定の細胞型は、中胚葉系列の前駆細胞であり、
前記方法は、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD271、CD14、CD34およびCD45の存在または不存在を同定するステップを含み、
ここで、細胞表面上の、検出可能なレベルのCD29、CD44、CD73、CD90、CD105およびCD271の存在、および、検出可能なレベルのCD14、CD34およびCD45の不存在は、それが中胚葉系列の前駆細胞であることを示す、
方法。

40

【請求項 7】

請求項6に記載の方法であって、
前記方法は、C-X-Cケモカイン受容体タイプ1（CXCR1）、CXCR2またはCXCR4の存在または不存在を同定するステップをさらに含み、

50

ここで、細胞表面上の、検出可能なレベルのCXCR1、CXCR2またはCXCR4の存在は、患者において、特定の損傷した組織へ移行することが可能であることを示す、方法。

【請求項8】

請求項7に記載の方法であって、

細胞表面上の、検出可能なレベルのCXCR4の存在は、患者において、損傷した心臓組織、網膜組織または骨組織へ移行することが可能であることを示す、方法。

【請求項9】

請求項2または3に記載の方法であって、

前記の特定の細胞型は線維芽細胞であり、

前記方法は、とりわけ、CD10、CD29およびCD106の存在または不存在を同定するステップを含み、

ここで、細胞表面上の、検出可能なレベルのCD10、CD29およびCD106の存在は、それが線維芽細胞であることを示す、方法。

【請求項10】

請求項2または3に記載の方法であって、

前記の特定の細胞型は、非常に微小な胚/外肺葉様の幹細胞(very small embryonic/epiblast-like stem cell)(VSEL)であり、

前記方法は、検出可能なレベルのSca-1、CD45R、Gr-1、TCRalpha beta、TCRgamma delta、CD11b、Ter119およびOct-4の存在または不存在を同定するステップを含み、

ここで細胞表面上の、検出可能なレベルのSca-1、CD45R、Gr-1、TCRalpha beta、TCRgamma delta、CD11b、Ter119およびOct-4の存在は、それがVSELであることを示す、方法。

【請求項11】

請求項2または3に記載の方法であって、

前記の特定の細胞型は造血幹細胞(HSC)であり、

前記方法は、とりわけ、検出可能なレベルのCD133の存在または不存在を同定するステップを含み、

ここで、細胞表面上の、検出可能なレベルのCD133の存在は、それがHSCであることを示す、方法。

【請求項12】

請求項2または3に記載の方法であって、

前記の特定の細胞型は内皮前駆細胞(EPC)であり、

前記方法は、とりわけ、検出可能なレベルのKDR、VE-カドヘリンおよびCD31の存在または不存在を同定するステップを含み、

ここで、細胞表面上の、検出可能なレベルのKDR、VE-カドヘリンおよびCD31の存在は、それがEPCであることを示す、方法。

【請求項13】

請求項2または3に記載の方法であって、

前記の特定の細胞型は組織系幹細胞(tissue-committed stem cell)であり、

前記方法は、とりわけ、検出可能なレベルのCD117+、CD184、c-metおよびAC133の存在または不存在を同定するステップを含み、

10

20

30

40

50

ここで、細胞表面上の、検出可能なレベルのCD117+、CD184、c-metおよびAC133の存在は、それが組織系幹細胞であることを示す、方法。

【請求項14】

細胞集団における間葉系幹細胞(MSC)を同定するためのキットであって、
7またはそれより多い蛍光標識抗体を含み、
前記キット中の少なくとも1つの抗体は、CD73、CD90、CD105、CD14、
CD19、CD34およびCD45のそれぞれに特異的に結合する、
キット。

【請求項15】

細胞の集団における特定の細胞型を同定するためのキットであって、
7またはそれより多い蛍光標識抗体を含み、
前記キット中の少なくとも1つの抗体は、前記の特定の細胞型を示す7またはそれより
多い細胞表面マーカーの1つに特異的に結合する、
キット。

【請求項16】

請求項15に記載のキットであって、
前記キットは、10またはそれより多い蛍光標識抗体を含み、
前記キット中の少なくとも1つの抗体は、前記の特定の細胞型を示す10またはそれよ
り多い細胞表面マーカーの1つに特異的に結合する、
キット。

【請求項17】

請求項15または16に記載のキットであって、
前記キット中の少なくとも1つの抗体は、CD73、CD90、CD105、CD14
、CD19、CD34およびCD45のそれぞれに特異的に結合する、
キット。

【請求項18】

請求項17に記載のキットであって、
前記キット中の少なくとも1つの抗体は、CD181およびCD184のそれぞれに特
異的に結合する、
キット。

【請求項19】

請求項15または16に記載のキットであって、
前記キット中の少なくとも1つの抗体は、CD29、CD44、CD73、CD90、
CD105、CD271、CD14、CD34およびCD45のそれぞれに特異的に結合
する、
キット。

【請求項20】

請求項19に記載のキットであって、
前記キット中の前記の少なくとも1つの抗体は、C-X-Cケモカイン受容体タイプ1
(CXCR1)、CXCR2およびCXCR4のそれぞれに特異的に結合する、
キット。

【請求項21】

請求項15または16に記載のキットであって、
前記キット中の少なくとも1つの抗体は、CD10、CD29およびCD106のそれ
ぞれに特異的に結合する、
キット。

【請求項22】

請求項15または16に記載のキットであって、
前記キット中の少なくとも1つの抗体は、Sca-1、CD45R、Gr-1、TCR

10

20

30

40

50

alpha、TCR gamma delta、CD11b、Ter119およびO
ct-4のそれぞれに特異的に結合する、
キット。

【請求項23】

請求項15または16に記載のキットであって、
前記キット中の少なくとも1つの抗体は、CD133に特異的に結合する、
キット。

【請求項24】

請求項15または16に記載のキットであって、
前記キット中の少なくとも1つの抗体は、KDR、VE-カドヘリンおよびCD31の
それぞれに特異的に結合する、
キット。

10

【請求項25】

請求項15または16に記載のキットであって、
前記キット中の少なくとも1つの抗体は、CD117+、CD184、c-metおよ
びAC133のそれぞれに特異的に結合する、
キット。

【請求項26】

FAC試薬の活性成分の相対的な特定の濃度に基づいて、細胞集団における間葉系幹細
胞(MSC)を同定するための、試薬または物質組成であって、

20

蛍光活性化セルソーティング(FACS)を用いて、その表面上に検出可能なレベルの
CD73、CD90およびCD105を提示し検出可能なレベルのCD14、CD19、
CD34およびCD45を提示しない、前記集団における細胞を、同時に同定するステッ
プ、および、

それにより、細胞集団における間葉系幹細胞(MSC)を同定するステップ、
を含む、
試薬または物質組成。

【請求項27】

FAC試薬の活性成分の相対的な特定の濃度に基づいて、細胞の集団における特定の細
胞型を同定するための、試薬または物質組成であって、

30

FACSを用いて、前記集団における細胞の表面上の、前記の特定の細胞型を示す7ま
たはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を、同時に同定するステップを含
む、

試薬または物質組成。

【請求項28】

FACS分析を用いて、7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を
同時に同定するための、蛍光標識抗体のパネルを製造する方法であって、
前記方法は、

- (a) 前記の7またはそれより多い細胞表面マーカーを選択するステップ；
- (b) 異なるレーザー上に陽性マーカーを広げるステップ；
- (c) 7またはそれより多い蛍光標識抗体を選択するステップ；
- (d) 前記の7またはそれより多いマーカー(陽性および陰性の両方)の公知の発現を
有する細胞において最適な濃度および最小のスペクトルオーバーラップが達成されること
を確実にするために、抗体を滴定するステップ；
- (e) 陽性の細胞表面マーカーに対して前記抗体を試験するステップ；
- (f) 前記抗体のコアパネルを試験するステップ；
- (g) プレースホルダーのマーカーを発現するために、細胞を誘導または刺激するステ
ップ；
- (h) 前記プレースホルダーの抗体を試験および滴定するステップ；
- (i) 前記プレースホルダーの条件を最適化するステップ；および、

40

50

(j) 他の細胞型の不存在下で、および混合された集団において、細胞に全パネルを試験するステップ、

を含む、

方法。

【請求項 29】

蛍光標識抗体のパネルであって、

FACS分析を用いて、7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を同時に同定するための蛍光標識抗体のパネルであり、

請求項 28の方法を用いて製造される、

蛍光標識抗体のパネル。

10

【請求項 30】

細胞の集団における新規の細胞型を同定する方法であって、

FACSを用いて、前記集団における前記細胞の表面上の、7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を同時に同定するステップを含み、

前記の7またはそれより多いマーカーの少なくとも一部は、特定の細胞型を示し、

前記の7またはそれより多いマーカーの少なくとも1つは、前記の特定の細胞型によって検出可能に発現されない、

方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、示差的な、特異的な蛍光活性化セルソーティング(FACS)を用いた、間葉系幹細胞(MSC)および他の細胞型の同定、およびさらに分離の分野の発明である。すなわち、本発明は、様々な相対的な特定の濃度での試薬または物質組成であり、それは、驚くべきことに、試薬中の様々な特定の濃度の標識細胞マーカーに起因して、標識細胞に対する治療的(または生理学的)効果を提供する。本発明は、特定の相対的な試薬濃度の効果に基づき、細胞の選択的分離のための試薬および方法である。本発明者らは、蛍光活性化セルソーティング(FACS)を用いて、7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在下で、物質組成が細胞上でそれらの同時の同定を可能にする薬剤として区別して作用することができる、驚くべき方法を提供する。

30

【背景技術】

【0002】

序論

間葉系幹細胞(MSC)は、再生医療の分野におけるそれらの可能性に多くの注目を受けていて、多くの障害に関する臨床試験において使用されている。MSCは、急性心筋梗塞[1, 2]、脳卒中[3]、多系統萎縮症(MSA)[4]、移植片対宿主病[5]、および脊髄損傷[6]の患者において、治療利益の可能性が示されている。

【0003】

国際細胞治療学会(ISCT)は、MSCを同定するのに用いられる最小基準のセットを開発した[7]。これらは：i) プラスチックへの付着、ii) 脂肪細胞、軟骨細胞、および骨細胞への分化、および、iii) 細胞表面分子の特定の発現パターンである。最初の2つの基準は、異なる条件下での細胞培養で評価され、一方で最後のものはマルチカラーフローサイトメトリー(MFC)を用いて評価することができる。MSCとして同定されるためには、細胞集団の95%よりも多くが、CD73(エクト5'-ヌクレオチダーゼ)、CD90(Thy-1)およびCD105(エンドグリン)を発現しなければならず、そして、CD11bまたはCD14、CD34、CD45、CD19またはCD79、およびHLA-DRに関して陰性(2%の陽性細胞)でなければならない[7]。

40

【0004】

MSCの表面マーカーのパターンは、パラレルチューブのアプローチ：チューブごとに

50

異なるフルオロフォアにそれぞれコンジュゲートされた2～4つの抗体の組み合わせを有する多数のサンプルチューブを用いて、伝統的に分析がされている。これは、実際的な制限を含む。例えば、パラレルチューブによる結果は、細胞集団が均質であるかのように分析され、表面マーカーの発現(%)が報告される。

【0005】

MSCに関するマルチカラーパネルの公表された例は、現在までのところ、推奨される表面マーカーのISCT基準を無視し(Martins et al., 2009, Jones et al., 2006)、シングルチューブのアプローチではなくパラレルチューブを使用し(Tucker and Bunnett, 2011)、または、慣習のコンジュゲートおよび最も一般的な蛍光色素を利用する(Bradford and Clark, 2011)、のいずれかであり、個々の研究の要求に適應できない、柔軟性のないツールを生じる。ある場合には、研究者らは、フローサイトメトリーによりMSCとして同定される細胞が、他の2つの最小基準：プラスチックへの付着および3系統分化の能力も観察されることを確認していない(Martinsら、2009)。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明者らは、驚くべきことに、脂肪細胞、軟骨細胞および骨細胞へ分化することが証明された、プラスチック付着細胞上の、ISCTにより推奨される間葉系幹細胞MSCマーカーを含む、マルチカラーフローサイトメトリー(MFC)パネルを開発した。本発明者らは、コアパネル(3つの最も一般に利用可能な蛍光色素コンジュゲート、蛍光色素FITC(フルオレセインイソチオシアネート)、PE(フィコエリトリン)およびAPC(アロフィコシアニン)にコンジュゲートされた試薬を用いなかった)を設計し、これらの3つの位置を交換可能なプレースホルダーとして用いることを可能にし、および、目的とする他の抗原と組み合わせてパネルの使用を可能にした。本発明者らは、2つの一般に用いられる組織源(臍帯マトリックスおよびBM吸引液)由来のMSCを用いて、パネルを評価した。また、本発明者らは、異種集団内のMSCを同定するためにパネルを用いることが可能であることも確認した。

20

【0007】

マルチカラーフローサイトメトリー(MFC)は、シングルカラーフローサイトメトリーとは異なり、分析の開発に、より高度の技術的困難性を導入する。様々な表面マーカーを同時に分析するためには、各表面マーカーは、検出のための特異的な抗体を必要とする。フローサイトメトリーでは、検出のための一次抗体およびシグナル増幅のための二次抗体の代わりに、蛍光色素に直接コンジュゲートされた抗体を用いることが最も良い。したがって、多数の抗体を同時に使用する場合、それらのコンジュゲートされた蛍光色素は、それらの放出波長内でそれらが重ならないように賢明に選択しなければならない。簡単に言えば、色スペクトルができるだけ遠く離れた蛍光色素を選択すべきである。成功は、主に3つの因子：最適に滴定された抗体、正確な補正(compensation)および抗原-蛍光色素バランスに依存する。どのようにこれが達成されるのか、以下により詳細に述べる。

30

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の方法は、パラレルチューブのアプローチに勝る様々な利点を有する。第一に、単一の細胞レベルでの細胞の表現型を同定するための高い精度は、臨床状況において、患者サンプルまたは治療細胞の産物中の特定の細胞型の正確な定量化に極めて重要である。またそれは、高い検出感度も提供し、最新の分析ストラテジーを用いて、混合された細胞サンプルにおいてMSCを同定することも可能にする。これは、異種であり得る臨床サンプルを研究する場合に、特に利点となる。第二に、シングルチューブのフローサイトメトリーは、小サンプル(生検または小児検体など)から最大限の情報が得られることを可能にし、それはまた、研究対象あたり1つのチューブのみ必要とするので、より大きな研究

50

プロジェクトも促進する。最後に、マルチカラーアプローチは、異なる型のMSCの検出を容易にし、表現型および機能、例えば、サイトカイン産生、アポトーシス、および細胞周期分析の、同時の分析を可能にする (De Rosaら、2003)。

【0009】

本発明は、新規の細胞型を同定および分離/捕捉するハイスループットの細胞薬剤の発見技術、および、ハイスループットの細胞ソーティング/自動化細胞スクリーニングと組み合わせたアルゴリズムを提供する。本発明は、候補細胞を同定するための(例えば、7つの典型的なMSCマーカーを有するが、例えばCD62に関して+veでもある、新規の細胞を同定するための)アルゴリズムを用いることにより、1000のマーカー、色、および、マーカーと色の組み合わせの自動化およびコンピューターによる分析が、新規の細胞型を同定することを可能にする。以下のアルゴリズムを用いることにより、FACS実験を規定し、存在するならば候補細胞を同定/捕捉するためのマーカー、抗体および色の組み合わせを試験することが可能である。このプロセスは、細胞医薬に初めて適用される「合理的な」薬剤設計アプローチを可能にし、研究者らが新規の細胞型の設計および実証的試験をすることを可能にする。したがって、実践する研究者らが、(i)理論的に最適な細胞、例えば、7つの典型的なMSCマーカーおよびCXCR4およびCD62を発現するものを構築すること、(ii)(存在するならば)この細胞を分離することを試験するために、潜在的なFACSパネルを計算すること、それから、(iii)自動化ソーティングと組み合わせ、1000の組織サンプルからこの細胞を分離/捕捉すること、および、(iv)その特有のFACSマーカープロファイルを通して候補細胞の新規性を決定的に試験および証明することを、可能にする。本発明なしでは、このプロセス(i~iv)は、100の実験室内実験を含む何ヶ月もの「試行錯誤」の研究を要する。本発明の組成物およびアルゴリズムの組み合わせの使用は、研究者らが、細胞薬剤の発見を自動化および合理化すること、および、より速い、より正確な、および、より効率的かつ効果的な、新規の細胞の同定および捕捉を計算する、コンピューターによるアプローチ(スーパーを含む)を利用することを可能にする。

10

20

30

40

50

【0010】

本発明に対する様々な態様が存在する。間葉系幹細胞(MSC)免疫蛍光ラベリング試薬は、CD73(エクト5'-ヌクレオチダーゼ)、CD90(Thy-1)およびCD105(エンドグリン)を発現するMSCに対するモノクローナル抗体のコンジュゲートを含み、CD11bまたはCD14、CD34、CD45、CD19またはCD79、およびHLA-DRに関して陰性(2%の陽性細胞)であり[7]、それは、特定の細胞型の改善された同定およびサンプル回収さえも可能にする特定の表現型を示す医療効果を生じる、相対的な特定の濃度に関して、実験的に選択されている。本発明の一態様は、検出アッセイにおける対象細胞の表現型の発現を変えるための試薬の医薬(薬剤)として、すなわち、様々な分析における免疫蛍光抗体ラベルの各々の濃度を選択的に変化させることによって前記細胞をより良く特徴付けるための、間葉系幹細胞(MSC)の免疫蛍光ラベリングの両方のための試薬として、であり、そして、抗体を含む実験試薬は、制限されないが、以下の細胞型を目的とするものを含む：線維芽細胞(CD10、CD29、CD106)；VSELS(Sca-1、CD45R、Gr-1、TCR alpha-beta、TCR gamma-delta、CD11b、Ter119、Oct-4；HSC：CD133)；EPC(KDR、VE-カドヘリン、CD31)；MSCサブタイプ(CD181、CD184)；および組織系幹細胞(CD117+、CD184、c-met、AC133)。加えて、これらの手順を行なうためのキットは別の態様である。

【0011】

本発明では、新規のFACS試薬は、特定のマーカーを発現する細胞を同定するために用いられるだけでなく、予想外に、細胞表現型に影響を及ぼす物質組成を提供し、活性成分(制限されないが、MSCに対するモノクローナル抗体のコンジュゲート)の各々の濃度を変化させることにより、細胞集団における間葉系幹細胞(MSC)の即時の同定および分離さえも可能にする。これによって、試薬の活性成分は、蛍光活性化セルソーティン

グ (F A C S) を用いて、様々な M S C の、濃度の範囲にわたる同時の同定を可能にする。これによって、試薬 (単数または複数) は、表面上に検出可能なレベルの C D 7 3、C D 9 0 および C D 1 0 5 を提示し検出可能なレベルの C D 1 4、C D 1 9、C D 3 4 および C D 4 5 を提示しない、集団における M S C の示差的検出を可能にし、その表面マーカーパターンを有する細胞を分離する。また、本発明は、試薬も提供し (その反応成分の測定された相対的濃度に基づいて、細胞の集団における特定の細胞型を同定および分離する)、F A C S を用いて、集団における細胞の表面上の、特定の細胞型を示す 7 またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を、同時に同定すること、および、指標の細胞表面マーカーを有する細胞を分離することを含む。ここで、前記試薬は、インビボ、インビトロおよびエクスピボで使用して、ヒトまたは動物において作用する、および、幹細胞および非 - 幹細胞に作用することができ、制限されないが、培地、賦形剤、不活性の添加剤、血液、組織、および、他の体液と組み合わせて用いられることを含み ; 制限されないが、フローサイトメトリーと組み合わせた使用を含み、一方で、その使用は、制限されないが、分離、検出、および、組織、血液、溶液および固体 (凍結サンプルを含む) 由来の細胞および病理検体の回収の補助を含むことができる。

10

【 0 0 1 2 】

本明細書において本発明者らは、ユーザーが、蛍光活性化セルソーティング (F A C S) を用いて、7 またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を同時に同定することを可能にさせる薬剤として、物質組成が細胞に作用することができる、驚くべき方法を提供する。

20

【 0 0 1 3 】

表現型に対するパネルおよびアルゴリズム (すなわち、制限されないが、末梢血、骨髓、脂肪、生検サンプルにおける他の細胞から、または、任意の他の組織から分離され、または改変され、または分化転換を用いて I P S から生じた細胞から、間葉系幹細胞 (M S C) を、同定、分離、および、区別するための手段) が、本明細書により提案される。我々は、M S C 表現型をより良く予測するためのフルオロフォア I S C T コアパネルおよびアルゴリズムの手段により、M S C の表現型の改善された予測を提供する。M S C は、再生医療の治療の分野での使用の可能性を有し、多様な障害に関する臨床試験において用いられている。それにより、国際細胞治療学会 (I S C T) は、マルチカラーフローサイトメトリー (M F C) により測定される細胞表面分子の発現の特定のパターンを含む、M S C を同定するために用いられる最小基準のセットを開発している。M S C の表面マーカー発現に関する M F C の方法論は、伝統的に、マルチプルのパラレルの (p a r a l l e l) サンプルを用いている。M S C のシングル - サンプルのマルチカラー分析を行なうことが可能であることは、多くの利点がある。この研究において、我々は、M S C の同定のための 7 - フルオロフォア I S C T コアパネル、および、M S C の異なるサブタイプを同定するための試薬に用いることのできる 3 つのプレースホルダー位置からなる、10 - フルオロフォアパネルの開発を報告する。このパネルは、骨髓および臍帯マトリックスの M S C を表現型する (p h e n o t y p e) ために用いることができ、線維芽細胞および末梢血単核細胞の混合された集団における、M S C のレアイベントを区別する。このツールは、血液および骨髓中の M S C を同定および定量化するための有益な方法を提供し、また、消化された組織からの単一の細胞懸濁液にも用いることができた。

30

40

【 0 0 1 4 】

本発明者らは、驚くべきことに、蛍光活性化セルソーティング (F A C S) を用いて、7 またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を、同時に同定することが可能であることを示した。

【 0 0 1 5 】

本発明は、細胞集団における M S C を同定する、および場合により分離する方法を提供し、それは、F A C S を用いて、その表面上に検出可能なレベルの C D 7 3、C D 9 0 および C D 1 0 5 を提示し検出可能なレベルの C D 1 4、C D 1 9、C D 3 4 および C D 4 5 を提示しない、集団における細胞を、同時に同定するステップ、および、それにより、

50

細胞集団における間葉系幹細胞（MSC）を同定する、および場合により分離するステップを含む。7つのマーカーの存在または不存在は、FACSを用いて、同時に同定される。7つのマーカーの存在または不存在は、同じ時に同定される。本発明の方法は、集団の1サンプルを用いる。それは、パラレルチューブのアプローチを伴わない。

【0016】

また、本発明は、細胞の集団における特定の細胞型を同定する、および場合により分離する方法も提供し、それは、FACSを用いて、集団における細胞の表面上の、特定の細胞型を示す7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を同時に同定するステップを含む。

【0017】

本発明は、細胞集団における間葉系幹細胞（MSC）を同定する、および場合により分離するためのキットを提供し、それは、7またはそれより多い蛍光標識抗体を含み、キット中の少なくとも1つの抗体は、CD73、CD90、CD105、CD14、CD19、CD34およびCD45のそれぞれに特異的に結合する。

【0018】

また、本発明は、細胞の集団における特定の細胞型を同定する、および場合により分離するためのキットも提供し、それは、7またはそれより多い蛍光標識抗体を含み、キット中の少なくとも1つの抗体は、特定の細胞型を示す7またはそれより多い細胞表面マーカーの1つ（one of）に特異的に結合する。

【0019】

本発明は、細胞集団におけるMSCを同定する、および場合により分離するための試薬およびキットを提供し、それは、FACSを用いて、その表面上に検出可能なレベルのCD73、CD90およびCD105を提示し検出可能なレベルのCD14、CD19、CD34およびCD45を提示しない、集団における細胞を、同時に同定するステップ、および、それにより、細胞集団における間葉系幹細胞（MSC）を同定するステップを含む。7つのマーカーの存在または不存在は、FACSを用いて、同時に同定される。

【0020】

また、本発明は、細胞の集団における特定の細胞型を同定する、および場合により分離するための試薬も提供し、それは、FACSを用いて、集団における細胞の表面上の、特定の細胞型を示す7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を、同時に同定するステップを含む。

【0021】

また、本発明は、FACS分析を用いて、7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を同時に同定するための蛍光標識抗体のパネルを製造する方法も提供し、当該方法は、（a）7またはそれより多い細胞表面マーカーを選択するステップ；（b）異なるレーザー上に陽性マーカーを広げるステップ；（c）7またはそれより多い蛍光標識抗体を選択するステップ；（d）7またはそれより多いマーカー（陽性および陰性の両方）の公知の発現を有する細胞において最適な濃度および最小のスペクトルオーバーラップが達成されることを確実にするために、抗体を滴定するステップ；（e）陽性の細胞表面マーカーに対して抗体を試験するステップ；（f）抗体のコアパネルを試験するステップ；（g）プレースホルダーのマーカーを発現するために細胞を誘導または刺激するステップ；（h）プレースホルダーの抗体を試験および滴定するステップ；（i）プレースホルダーの条件を最適化するステップ；および（j）他の細胞型の不存在下で、および混合された集団において、細胞に全パネルを試験するステップ、を含む。

【0022】

また、本発明は、FACS分析を用いて7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を同時に同定するための、本発明の方法を用いて生産される、蛍光標識抗体のパネルも提供する。

【0023】

また、本発明は、細胞の集団における新規の細胞型を同定する、および場合により分離

10

20

30

40

50

する方法も提供し、それは、FACSを用いて、集団における細胞の表面上の、7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を同時に同定するステップを含み、ここで、7またはそれより多いマーカーの少なくとも一部は特定の細胞型を示し、7またはそれより多いマーカーの少なくとも1つは特定の細胞型によって検出可能に発現されない。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】10色パネルで染色されたUCM MSCを示す。A) <1%のCD14+イベントが存在するようにゲートを設定するために用いたCD14-FMO。B) <1%のCD19+イベントが存在するようにCD19+閾値を設定するために用いたCD19-FMOを用いて修正したAでのゲート。C) 表現型分析のために全パネルで染色したサンプルに適用したゲート。

10

【図2】6ステップのゲーティングストラテジーを示し、上に概略バージョンを示し、および、UCM MSCのサンプルとともに例示する。1) FSC vs. SSCプロット上の、全10抗体で染色したチューブからの、全ての非ゲートの記録されたイベント。ゲートを引いてデブリおよびダブレットを除外した。2) CD14-/CD19-イベント上でゲーティングするCD14 vs. CD19プロット。3) CD34-/CD45-イベント上でゲーティングするCD34 vs. CD45プロット。4) CD73+/CD90+イベント上でゲーティングするCD73 vs. CD90プロット。5) CD105-強度を示すCD105 vs. SSCプロット。6) 非染色および染色細胞のオーバーレイは、CD105-強度のクリアなシフトを示し、最後の陽性ISCT-マーカーを確認する。黒=非染色、赤=染色。

20

【図3】明るい、または暗い、プレースホルダーの存在下での、コア表面マーカー発現を示す。UCM (n=6) およびBM MSC (n=6) を、以前に説明したゲーティングストラテジーを用いてゲートした。UCM MSCは、BM MSCよりも均質な前および横の散乱プロファイルを示す。外傷患者から得られたBM吸引液から分離されたBM MSCは、市販のBM吸引液(#4) およびBM MSC(#1) およびUCM MSCと比較して、小さなCD34dim集団(サンプル#2、#3、#5、#6)を示す。非染色のコントロール(オーバーレイヒストグラム)と比較すると、全てのサンプルはCD105を発現する。

30

【図4】BMおよびUCM MSCの間の、プレースホルダーパネル発現の違いを示す。サンプルを、明るい(UCM MSC、n=3; BM MSC、n=3) または暗い10色パネル(UCM MSC、n=6; BM MSC、n=4)のいずれかで染色した。明るいパネルで用いたプレースホルダーの抗体は、CD29-FITC、CD164-PE およびCD44-APCであり、暗いパネルでのものは、CD49d-FITC、CD29-PE およびCD182-APCであった。暗いプレースホルダーパネルを構成するマーカー(CD29-PE、CD49d-FITC、CD182-APC)の間では、UCM MSCにおいてより高く発現されるCD49dの観点から、BMおよびUCM MSCの間の発現に違いがあるだけである(p=0.006)。

【図5】線維芽細胞が主の混合物におけるMSCの同定を示す。UCM-MSC(2%)をHSFと混合した。A1) 10色パネルで染色されたUCM MSCのチューブからの、全ての非ゲートの記録されたイベント。細胞ゲートを引いてデブリおよびダブレットを除外した。B1) HSFのチューブからの、全ての非ゲートの記録されたイベント。細胞ゲートはHSFを含んだ。C1) 2%のMSCを加えたHSF。60,000の記録された細胞のイベントでは、MSCは、前および横の散乱に基づいて、HSFから区別することができない。C2~C6) 図2に示すMSCゲーティングストラテジーであり、2.0%の同定されたMSCをもたらす(59,550の細胞のイベントのうち、1,164のMSC)。

40

【図6】PBM Cが主の混合物におけるMSCの同定を示す。UCM-MSC(1%)をPBM Cと混合した。A1) 10色パネルで染色されたUCM MSCのチューブからの

50

、全ての非ゲートの記録されたイベント。細胞ゲートを引いてデブリおよびダブレットを除外した。B 1) P B M Cのチューブからの、全ての非ゲートの記録されたイベント。細胞ゲートはP B M Cを含んだ。C 1) 1%のM S Cを加えたP B M C。100,000の記録された細胞イベントでは、M S Cは、前および横の散乱に基づいて、P B M Cから区別することができない。C 2 ~ C 6) 図2に示すM S Cゲーティングストラテジーであり、0.63%の同定されたM S Cをもたらす。

【発明を実施するための形態】

【0025】

細胞型の検出

本発明の方法を用いて、様々な特定の細胞型を、それらの細胞表面マーカーパターンを用いて、同定および場合により分離することができる。これらは、限定されないが、間葉系幹細胞(M S C)、中胚葉系列の前駆細胞、線維芽細胞、非常に微小な胚/外肺葉様の幹細胞(very small embryonic/epiblast-like stem cell)(V S E L)、造血幹細胞(H S C)、内皮前駆細胞(E P C)および組織系幹細胞を含む。これらの細胞に関する細胞表面マーカーパターンは、特許請求の範囲に示される。

【0026】

当該方法は、F A C Sを用いて、7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を同時に同定することに関する。任意の数のマーカーを同時に同定することができる。例えば、本発明は、F A C Sを用いて、8またはそれより多い、9またはそれより多い、10またはそれより多い、12またはそれより多い、15またはそれより多い、20またはそれより多い、25またはそれより多い、30またはそれより多い、35またはそれより多い、40またはそれより多い、45またはそれより多い、50またはそれより多い、55またはそれより多い、60またはそれより多い、65またはそれより多い、70またはそれより多い、75またはそれより多い、80またはそれより多い、85またはそれより多い、90またはそれより多い、95またはそれより多い、100または細胞、150またはそれより多い、200またはそれより多い、250またはそれより多い、300またはそれより多い、350またはそれより多い、400またはそれより多い、500またはそれより多い、600またはそれより多い、700またはそれより多い、800またはそれより多い、900またはそれより多い、1000またはそれより多い、1500またはそれより多い、2000またはそれより多い、2500またはそれより多い、または、5000またはそれより多い、表面マーカーの存在または不存在を同定することに関してよい。これは、以下により詳細に述べるように行なうことができる。

【0027】

7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在は、同時に、すなわち同じ時に、判定される。本発明を用いて、F A C S分析は、細胞の集団に対して一度行なってよく、そこから、7またはそれより多いマーカーが存在または不存在であるか否かを判定することができる。一度よりも多く、または多数のサンプルを用いて、F A C S分析を行なう必要はない。本発明は、パラレルチューブのアプローチの使用を避ける。

【0028】

様々な細胞表面マーカーに特異的に結合することが可能な抗体は、当技術分野で知られている。抗体は、それが、選択的または高い親和力でそのマーカーに結合するが、他の細胞表面マーカーまたは他のタンパク質には実質的に結合せず、結合せず、または低い親和力でのみ結合する場合に、細胞表面マーカー配列に「特異的に結合する」。例えば、抗体は、それが、選択的または高い親和力でC D 7 3に結合するが、他の細胞表面マーカーまたはタンパク質、例えば、C D 9 0、C D 1 0 5、C D 1 4、C D 1 9、C D 3 4およびC D 4 5には実質的に結合せず、結合せず、または低い親和力でのみ結合する場合に、C D 7 3に「特異的に結合する」。

【0029】

抗体は、それが、 1×10^{-7} Mまたはそれ未満、より好ましくは 5×10^{-8} Mまた

10

20

30

40

50

はそれ未満、より好ましくは 1×10^{-8} M またはそれ未満、または、より好ましくは 5×10^{-9} M またはそれ未満の K_d で結合する場合に、選択的または高い親和力で結合する。一部分は、それが、 1×10^{-6} M またはそれより高い、より好ましくは 1×10^{-5} M またはそれより高い、より好ましくは 1×10^{-4} M またはそれより高い、より好ましくは 1×10^{-3} M またはそれより高い、さらにより好ましくは 1×10^{-2} M またはそれより高い K_d で結合する場合に、低い親和力で結合する。化合物（例えば抗体または抗体構築物およびオリゴヌクレオチド）の特異的な結合能力を判定するための競合結合または免疫放射定量測定法に関する様々なプロトコルは、当技術分野でよく知られている（例えば、Maddox et al., J. Exp. Med. 158, 1211-1226, 1993 を参照）。

10

【0030】

抗体は、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、CDR-移植抗体、またはヒト化抗体であってよい。抗体は、無傷の免疫グロブリン分子またはそのフラグメント、例えば、Fab、F(ab')₂ または Fv フラグメントであってよい。

【0031】

本発明の方法での使用に適切な蛍光ラベルを、本発明のキットに関して以下に述べる。

【0032】

MSC は、その表面上に、検出可能なレベルの CD73、CD90 および CD105 を提示し、検出可能なレベルの CD14、CD19、CD34 および CD45 を提示しない。この発現パターンは、本発明の方法を用いて検出することができる。それ故に、MSC を同定することができ、場合により分離することができる。

20

【0033】

中胚葉系列の前駆細胞は、検出可能なレベルの CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 および CD271 を発現し、および、(b) 検出可能なレベルの CD14、CD34 および CD45 を発現しない。これらの細胞は、好ましくは、CXCR1、CXCR2 または CXCR4 も発現する。それらは、より好ましくは、CXCR1、CXCR2 および CXCR4 の全てを発現する。それらは、国際出願番号 PCT/GB2012/051600 (WO2013/005053 として公表) に開示される。この発現パターンは、本発明の方法を用いて検出することができる。それ故に、PML を同定することができ、場合により分離することができる。

30

【0034】

特定の細胞型は、好ましくは間質細胞である。本発明の方法を用いて同定することのできる他の特定の間質細胞の型、および、それらおよびそれらの表面マーカーの発現を以下に示す。+ は、細胞が、検出可能なレベルのマーカーを提示することを意味する。- は、細胞が、検出可能なレベルのマーカーを提示しないことを意味する。マウスおよびヒトにより共有されるマーカーは、マウス (m) またはヒト (h) に特有のものと同様に、マーカーの後に (m/h) を示す。これは、Johanna A. Joyce & Jeffrey W. Pollard, Nature Reviews Cancer 9, 239-252 (2009年4月) から得られる。

40

【0035】

腫瘍関連マクロファージ (TAM) : CD11b+ CD14+ CD31- CD34- CD45+ CD68+ CD117- CD133- CD146- CD204+ CD206+ CCR2+ CSF1R+ MHC II+ VEGFR1+ VEGFR2- (m/h) F4/80+ (m) CD23+ CD163+ CXCR4+。

【0036】

骨髄系由来サブレッサー細胞 (MDSC) : CD11b+ CD14+ / - MHC II+ MHC I low (m/h) GR1+ CD11b+、および、LY6G+ LY6Clow CD11b+ CD11c+ / - CD33+ CD34+ CD86- にさらに細分化することができる。

50

【0037】

アンジオポエチン受容体TIE2を発現する単球(TEM): CD11b+ CD14
+ CD31 low CD34- CD45+ CD117- CD133- TIE
2+ VEGFR2- (m/h) F4/80+ GR1 low SCA1- (m
) CD11c+ CD13+ CD16+ CD33+ CD62L- CD146-
CCR2- CCR5+ CSF1R+ (h)

【0038】

好中球: CD11b+ CD14 low CD31+ CD66B+ CXCR2+
(m/h) GR1+ VEGFR1+ CXCR1- (m) CD15+ CXCR
R1+ (h)

10

【0039】

マスト細胞: CD43+ CD117+ CD123+ CD153+ (m/h)
CD11b+ CD16+ CD34+ SCA1+ (m) CCR1+ CCR3+
CCR4+ CCR5+ CXCR1+ CXCR2+ CXCR4+ (h)

【0040】

内皮細胞: CD31+ CD34+ CD105+ CD106+ CD144+ (m
/h)

【0041】

周皮細胞: デスミン+/- NG2+/- SMA+/- PDGFR+/-

【0042】

線維芽細胞: ビメンチン+ デスミン+ SMA+/- FSP1+ FAP+ (m/
h)

20

【0043】

血小板: CD41+ CD42a-d CD51+ CD110+ (m/h)

【0044】

CD4+T細胞 CD3+ CD4+ CD45+ (m/h)

【0045】

CD8+T細胞 CD3+ CD8+ CD45+ (m/h)

【0046】

B細胞: CD3- CD19+ CD20+ CD45+ (m/h) CD45RA
+ B220+ (m)

30

【0047】

NK細胞: CD11b+ CD27+ CD3- CD16+/- CD56+ CD
3- CD335+ NKp46+ (m/h)

【0048】

また、本発明は、新規の細胞型を同定する、および場合により分離する方法も提供する。当該方法は、FACSを用いて、集団における細胞の表面上の、7またはそれより多い細胞表面マーカーの、存在または不存在を同時に同定するステップを含み、ここで、7またはそれより多いマーカーの少なくとも一部は特定の細胞型を示し、7またはそれより多いマーカーの少なくとも1つは特定の細胞型によって検出可能に発現されない。特定の細胞型は、上述のものいずれかであってよい。特定の細胞型は、好ましくはMSCである。当該方法は、FACSを用いて、集団における細胞の表面上の、8またはそれより多い細胞表面マーカーの、存在または不存在を同時に同定するステップに関してよく、ここで、8またはそれより多いマーカーは、CD73、CD90、CD105、CD14、CD19、CD34およびCD45を含み、8またはそれより多いマーカーの少なくとも1つはMSCによって発現されない。MSC上の細胞表面マーカーは、よく特徴付けられていて、MSCによって発現されない少なくとも1つの細胞表面マーカーを同定することは日常的である。当業者は、以下のアルゴリズムを用いてマーカーのパネルおよび対応する抗体を設計して、ハイスループットの様式で新規の細胞型を同定することができる。

40

【0049】

50

FACS分析はよく知られた技術である。この技術を行なう1つの方法を実施例に開示する。FACSは単一の細胞を分離することができる。本発明の方法は、特定の型の単一の細胞（例えば、単一のMSCまたは単一の中胚葉系列の前駆細胞）または上述の新規の細胞型を同定するため、および場合により分離するためであってよい。あるいは、本発明の方法は、特定の型の2またはそれより多い細胞（例えば、2またはそれより多いMSC、または、2またはそれより多い中胚葉系列の前駆細胞）を同定する、および場合により分離するためであってよい。

【0050】

また、FACSは、特定のマーカーを発現する細胞も分離し得る。それ故に、本発明は、細胞集団における間葉系幹細胞（MSC）を同定および分離する方法も提供し、それは、蛍光活性化セルソーティング（FACS）を用いて、その表面上に検出可能なレベルのCD73、CD90およびCD105を発現し検出可能なレベルのCD14、CD19、CD34およびCD45を発現しない、集団における細胞を、同時に同定するステップ、および、その表面マーカーパターンを有する細胞を分離するステップを含む。また、本発明は、細胞の集団における特定の細胞型を同定および分離する方法も提供し、それは、FACSを用いて、集団における細胞の表面上の、特定の細胞型を示す7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を、同時に同定するステップ、および、指標の細胞表面マーカーを有する細胞を分離するステップを含む。

10

【0051】

FACSの方法で用いられる抗体は、典型的に、以下に述べる方法での使用のために滴定される。

20

【0052】

細胞集団は典型的に、サンプル中に存在する。サンプルは、好ましくは液体サンプルである。サンプルは典型的に、患者の体液を含む。サンプルは、尿、リンパ液、唾液、粘液、乳または羊水であってよいが、好ましくは、血液、血漿または血清である。サンプルは、骨髄由来であってよい。典型的に、サンプルは起源がヒトであるが、その代わりに、別の哺乳類動物由来、例えば、ウマ、ウシ、ヒツジまたはブタのような商業的に飼育された動物由来であってよく、またはその代わりに、ネコまたはイヌのようなペットであってよい。

30

【0053】

サンプルは典型的に、例えば、不要な分子または細胞（赤血球など）をフィルター除去する膜の通過により、または、遠心分離により、分析する前に処理される。サンプルは、得てすぐに測定してよい。また、サンプルは典型的に、分析前に、好ましくは-70 未満で保管してもよい。

【0054】

キットおよび試薬

また、本発明は、間葉系幹細胞（MSC）または特定の細胞型を同定する、および場合により分離するためのキットも提供する。本発明のキットは、特定の型の単一の細胞（例えば、単一のMSCまたは単一の中胚葉系列の前駆細胞）または新規の細胞型を同定する、および場合により分離するためであってよい。あるいは、本発明のキットは、特定の型の2またはそれより多い細胞、例えば、2またはそれより多いMSC、または、2またはそれより多い中胚葉系列の前駆細胞、または、1つのMSCおよび1つの中胚葉系列の前駆細胞を、同定する、および場合により分離するためであってよい。

40

【0055】

キットは、7またはそれより多い蛍光標識抗体を含む。キット中の少なくとも1つの抗体は、MSCまたは特定の細胞型を同定する、および場合により分離するために用いられている細胞表面マーカーのそれぞれに、特異的に結合する。例えば、一実施態様では、キットは、7またはそれより多い蛍光標識抗体を含み、キット中の少なくとも1つの抗体は、CD73、CD90、CD105、CD14、CD19、CD34およびCD45のそれぞれに特異的に結合する。他の特異的なキットは、特許請求の範囲に記載する。

50

【0056】

特異的な結合は上述される。

【0057】

FACSを用いて、細胞の集団におけるMSCまたは特定の細胞型を同定する、および場合により分離するために、本発明のキットを本発明の方法において用いてよい。当該キットは、上述の任意の細胞型を同定するためであってよく、および場合により分離するためであってよい。

【0058】

様々なマーカーに対する抗体は、市販される。表1は、CD11b、CD14、CD19およびCD79 に対する抗体の市販元を要約する。

10

【0059】

キット中の各抗体は典型的に、異なる蛍光ラベルで標識される。7またはそれより多い蛍光ラベルは、典型的に、FACSを用いてそれらが同定され得るように選択される。7またはそれより多い蛍光ラベルは、好ましくは、BV605、K-Orange、eF450、PE-Cy7、PerCP-Cy5.5、PE、FITC/AF488、APC-eF780、AF700およびAPCから選択される。7またはそれより多い蛍光ラベルは、好ましくは、BV605、K-Orange、eF450、PE-Cy7、PerCP-Cy5.5、APC-eF780およびAF700から選択される。これらのラベルの任意の組み合わせを用いてよい。これらのラベルとともに使用するための適切なFACS構成を以下に示す。

20

【0060】

7またはそれより多い蛍光標識抗体は、好ましくは、抗-CD14-APC-eFluor780(クローン61D3, eBioscience, Hatfield, Ireland, UK)、抗-CD19-PE-Cy7(クローンJ3-119, Beckman Coulter, London, UK)、抗-CD34-PerCP-Cy5.5(クローン581, BioLegend, San Diego, CA, US)、抗-CD45-Krome Orange(クローンJ.33, Beckman Coulter)、抗-CD73-eFluor450(クローンAD2, eBioscience)、抗-CD90-AlexaFluor700(クローン5E10, BioLegend)、抗-CD105-Brilliant Violet 605(クローン266, BD Bioscience, Oxford, UK)を含む。全ての抗体は、マウスアイソタイプIgG1, であった。

30

【0061】

7またはそれより多い蛍光標識抗体のそれぞれは、典型的に、本発明のFACSの方法における使用に適切な濃度に滴定される。各抗体は典型的に、1:10~1:100000、例えば、1:50、1:100、1:500、1:1000、1:10、000、1:50、000、1:100、000で滴定される。滴定は、以下に詳細に述べるように、本発明の方法において重要である。

【0062】

本発明のキットは、上述の任意の実施態様の実施を可能にする、1つまたは複数の他の試薬または器具をさらに含んでよい。そのような試薬または器具は、以下の1つまたは複数を含む:適切なバッファ(単数または複数)(水溶液)、対象からサンプルを得る手段(例えばベッセル、またはニードルを含む器具)、および/または、FACS分析に必要な他の試薬。試薬は、液体サンプルが試薬を再懸濁するように、乾燥状態でキット中に存在してよい。キットはまた、場合により、キットを本発明の方法において使用することを可能にする説明書、または、どの患者に当該方法を用いてよいのかに関する詳細も含んでよい。

40

【0063】

アルゴリズム

本発明は、7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在が同時に同定さ

50

れることを可能にする。これを行なうためには、以下のアルゴリズムを用いて様々な因子を考慮しなければならない。

【0064】

本発明の目的は、(i)プラスチック付着細胞上に、ISCTにより推奨される陽性および陰性の表面マーカーを含む、マルチカラーフローサイトメトリーパネルを開発すること；(ii)3つの最も一般的な蛍光色素FITC（フルオレセインイソチオシアネート）、PE（フィコエリトリン）またはAPC（アロフィコシアニン）にコンジュゲートされた試薬を使用しないパネルを設計し、研究者らが目的とする他の抗原と組み合わせてパネルを使用することを可能にする交換可能なプレースホルダーとして、これらの3つの位置が用いられることを可能にすること；および、(iii)細胞（例えば、臍帯マトリックスおよび骨髓穿刺液由来のMSC）を用いてパネルを評価することである。

10

【0065】

方法の成功は、(i)同定することが選択されたマーカーの数；(ii)FACS機器における蛍光チャンネル/デテクターの数；(iii)FACS機器の各チャンネル/デテクター上のレーザーの数；(iv)各マーカーに関して利用可能な抗体の数；(v)抗体の感度（スペクトルの領域内でシグナルがどれくらい明るい）；(vi)抗体コンジュゲートの性能（蛍光色素がどれくらい明るい、および、マーカーの発現レベル）；および(vii)同一細胞上の他の抗体の存在に依存する。蛍光標識抗体の適切なパネルを設計する場合は、これら全てを考慮する必要がある。

20

【0066】

本発明は、FACS分析を用いて7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を同時に同定するための、蛍光標識抗体のパネルを製造する方法を提供し、当該方法は、(a)7またはそれより多い細胞表面マーカーを選択するステップ；(b)異なるレーザー上に陽性マーカーを広げるステップ；(c)7またはそれより多い蛍光標識抗体を選択するステップ；(d)7またはそれより多いマーカー（陽性および陰性の両方）の公知の発現を有する細胞において最適な濃度および最小のスペクトルオーバーラップが達成されることを確実にするために、抗体を滴定するステップ；(e)陽性の細胞表面マーカーに対して抗体を試験するステップ；(f)抗体のコアパネルを試験するステップ；(g)プレースホルダーのマーカーを発現するために、細胞を誘導または刺激するステップ；(h)プレースホルダーの抗体を試験および滴定するステップ；(i)プレースホルダーの条件を最適化するステップ；および(j)他の細胞型の不存在下で、および混合された集団において、細胞に全パネルを試験するステップ、を含む。

30

【0067】

ステップ(b)は、最小のスペクトルオーバーラップおよび他のマーカーとの干渉を確実にする。異なるレーザーがFACS機器内にある。(c)における7またはそれより多い蛍光標識抗体は、7またはそれより多いマーカーに特異的に結合する。典型的に、7またはそれより多いマーカーのそれぞれに特異的に結合する1つの抗体が存在する。しかしながら、パネルは、7またはそれより多いマーカーの1つまたは複数に特異的に結合する1よりも多い抗体を含んでよい。適切な抗体および蛍光ラベルは上述される。

40

【0068】

滴定ステップ(d)は、常法を用いて行なうことができる。本発明での使用に適切な抗体濃度は上述される。7またはそれより多い抗体の濃度を、FACS分析を用いて試験し、最小のスペクトルオーバーラップおよび他のマーカーに特異的に結合する他の抗体との干渉を確実にする。

【0069】

ステップ(e)、(f)、(h)、(i)および(j)は、典型的に、FACS分析を用いて行われる。これは、抗体が試験および滴定されることを可能にし、および、状態が最適化されることを可能にする。

【0070】

(f)における抗体のコアパネルは、目的とする特定の細胞型に関する細胞表面マーカー

50

ーのコアパネル、例えば上述の任意のコアパネルに、特異的に結合する。MSCに関しては、CD73、CD90、CD105、CD14、CD19、CD34およびCD45に特異的に結合する7つの抗体のコアパネルは、市販されるMSCおよびその混合集団（すなわち非MSCおよびMSC）の細胞株上で試験してよい。上記および実施例に記載の10色パネルもまた、これらの両方の条件下で試験してよい。これは、実施例で行なわれたことである。蛍光標識抗体のコアパネルは、典型的に、FITC（フルオレセインイソチオシアネート）、PE（フィコエリトリン）およびAPC（アロフィコシアニン）を含まない。

【0071】

(g)におけるプレースホルダーの抗体は、FITC（フルオレセインイソチオシアネート）、PE（フィコエリトリン）およびAPC（アロフィコシアニン）を含んでよい。交換可能なプレースホルダーの抗体は、コアパネルが、目的とする他の細胞表面マーカーと組み合わせて試験されることを可能にする。例えばMSCに関しては、CD73、CD90、CD105、CD14、CD19、CD34およびCD45に特異的に結合する7つの抗体のコアパネルを、CD62のような他の細胞表面マーカーと組み合わせて試験してよい。これは、新規の細胞型が上記のように同定されるのを可能にする。

10

【0072】

ステップ(d)および/または(h)のように、フローサイトメトリーに関する抗体を滴定する理由は、不必要に抗体を消費せずに、陽性および陰性のシグナルの間の最適な分離を可能にするためであり、したがって、バックグラウンドノイズおよび方法の全体的費用を低減させる。染色ボリュームにおける高すぎる抗体濃度もまた、非特異的の抗体結合をもたらし得る。したがって、分析の特異性を増大させるためでなく、試薬の消費およびコストを低減させるためにも、滴定は良好なプラクティスである（ICSH/ICCS, 2013）。滴定の終点は、最も高い染色指標をもたらす抗体濃度を同定することである。これは当分野において日常的である。

20

【0073】

本発明による蛍光標識抗体のパネルを製造する方法は、自動化することができる。自動化された方法は、手作業/人の処理の制約を取り除き、自動化されたスクリーニングおよび計算能力を可能にし、合理的な(rational)ハイスループットの細胞薬剤の発見を可能にする。これは、FACS分析を用いて1000またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を同時に同定するための蛍光標識抗体のパネルが、製造されるのを可能にする。

30

【0074】

また、本発明は、本発明の方法を用いて生産される、FACS分析を用いて7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を同時に同定するための、蛍光標識抗体のパネルも提供する。

【0075】

また、本発明は、細胞集団における間葉系幹細胞(MSC)を同定する方法も提供し、それは、蛍光活性化セルソーティング(FACS)を用いて、CD73、CD90およびCD105の存在およびCD14、CD19、CD34およびCD45の不存在を、上記の(b)~(j)を用いて同時に同定するための、および、蛍光活性化セルソーティング(FACS)を用いて、その表面上に検出可能なレベルのCD73、CD90およびCD105を提示し検出可能なレベルのCD14、CD19、CD34およびCD45を提示しない、集団における細胞を、蛍光標識抗体のパネルを用いて同定し、それにより、細胞集団における間葉系幹細胞(MSC)を同定するための、蛍光標識抗体のパネルを製造するステップを含む。

40

【0076】

また、本発明は、細胞の集団における特定の細胞型を同定する方法も提供し、それは、蛍光活性化セルソーティング(FACS)を用いて、特定の細胞型における7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在を、上記の(a)~(j)を用いて同時に同定するため

50

の、および、FACSを用いて、集団における細胞の表面上の、特定の細胞型を示す7またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を、蛍光標識抗体のパネルを用いて同時に同定するための、蛍光標識抗体のパネルを製造するステップを含む。

【0077】

当該方法は、MSCまたは特定の細胞型を示す10またはそれより多い細胞表面マーカーの存在または不存在を同定するための、蛍光標識抗体のパネルを製造するステップも含んでよい。上述の任意の実施態様は、本実施態様に同等に適用される。

【0078】

本発明の特定の一実施態様は、アルゴリズム、および、(i)脂肪細胞、軟骨細胞および骨細胞へ分化することが証明されたプラスチック附着細胞上に、ISCCTにより推奨されるMSCマーカーを含む、MFCパネルを開発する方法；(ii)コアパネル(3つの最も一般に利用可能な蛍光色素コンジュゲート-FITC(フルオレセインイソチオシアネート)、PE(フィコエリトリン)またはAPC(アロフィコシアニン)にコンジュゲートされた試薬を用いなかった)を設計する方法(研究者らが目的とする他の抗原と組み合わせるパネルを使用することを可能にする交換可能なプレースホルダーとして、これらの3つの位置が用いられることを可能にする)；(iii)2つの一般に用いられる組織源：臍帯マトリックスおよび骨髓穿刺液由来のMSCを用いてパネルを評価する方法；(iv)異種集団中のMSCを同定するためにパネルを用いることができることを確実にする方法、を目的とする。

10

【0079】

別の特定の実施態様は、サンプルデータのアイテムを含むMFCパネルからのデータを、統合分類(aggregated classification)、および、統計集団またはコミティメソッド(committee method)(例えば、ブートストラップ、バギング、またはアーキングアルゴリズム)を用いて形成された回帰ツリーモデルを用いて処理するための、より良い手段の開発を目的とする。さらなる実施態様では、統合分類および回帰ツリーモデルは、事前処理によりトレーニングされる(trained)。

20

【0080】

i)MSC含有量(%)について以前に記録したサンプルの実際のサンプルデータを含む病歴データ、および、

30

ii)好適なMSC分析後の結果をどのように予測するかを知るための、これらのサンプルに関する対応する好適なMSC分析後の結果。特定の一実施態様では、事前処理は、病歴サンプルデータおよび対応するサンプルの好適なMSC分析後の結果の量を低減する(reducing)ステップ；分類および回帰ツリーを用いて、病歴サンプルデータおよび対応するサンプルの好適なMSC分析後の結果に含まれる変数の数を低減するステップ；病歴サンプルデータおよび対応するサンプルの好適なMSC分析後の結果の値を変換するステップ；ブースティングアルゴリズム(boosting algorithm)を抽出された特性に適用するステップ；および、ブーストされ抽出された特性から、好適な結果(高収率のMSC)を予測するための、分類および回帰ツリーモデルを作成するステップを含む。さらなる一実施態様では、モデルは、無作為に選択された90%のトレーニングサンプルにおけるモデルの繰り返しトレーニングにより交差検定され、残りの10%のホールドアウトテストセット(hold-out test set)での予測が続けられ、好適なMSC分析後の結果においてスクリーニング関連の改善の推定を生み出す。

40

【0081】

さらに別の実施態様では、好適な結果(良好な利益(yield))の予測は、統合分類、および、回帰ツリーモデル(多くの明確なツリーの組み合わせを含むブートストラップアルゴリズムを用いて形成され、各モデルは、元のサンプルから引かれた一連のブートストラップサンプルにおいて推定される)を用いて、データのアイテムを処理するステップを含み、ここで、サンプルに関して予測するためにMSC細胞の表現型を計算するため

50

に用いられるスクリーニングの判定は、その結果、平均的な予測される好適な交差したストラップツリーの組み合わせ、および、ブートストラップツリーの大部分が、所定の閾値レベルよりも上を好適と予測するかどうかを含む多数決基準に基づく。

【0082】

特定の一実施態様では、統合分類、および、統計集団またはコミティーマソッド（例えば、ブートストラップ、バギング、またはアーキングアルゴリズム）を用いて形成された回帰ツリーモデルを用いて、サンプル情報のアイテムを処理するための、より良い手段の開発。さらなる実施態様では、統合分類および回帰ツリーモデルは、事前処理によりトレーニングされる。

【0083】

i) MSC含有量(%)について以前に記録されたサンプルの実際のサンプル情報を含む、病歴データ、および

ii) 好適なMSC分析後の結果をどのように予測するかを知るための、これらのサンプルに関する対応する好適なMSC分析後の結果。特定の一実施態様では、事前処理は、病歴サンプルデータおよび対応するサンプルの好適なMSC分析後の結果の量を低減するステップ；分類および回帰ツリーを用いて、病歴サンプルデータおよび対応するサンプルの好適なMSC分析後の結果に含まれる変数の数を低減するステップ；病歴サンプルデータおよび対応するサンプルの好適なMSC分析後の結果の値を変換するステップ；ブースティングアルゴリズムを、抽出された特性に適用するステップ；および、ブーストされ抽出された特性から、好適な結果（高収率のMSC）を予測するための、分類および回帰ツリーモデルを作成するステップを含む。さらなる一実施態様では、モデルは、無作為に選択された90%のトレーニングサンプル中のモデルの繰り返しトレーニングにより交差検定され、残りの10%のホールドアウトテストセットでの予測が続けられ、好適なMSC分析後の結果においてスクリーニング関連の改善の推定を生み出す。

【0084】

別の実施態様では、好適な結果の予測は、統合分類、および、回帰ツリーモデル（多くの明確なツリーの組み合わせを含むブートストラップアルゴリズムを用いて形成され、各モデルは、元のサンプルから引かれた一連のブートストラップサンプルにおいて推定される）を用いて、データのアイテムを処理するステップを含み、ここで、サンプルに関して予測するためにMSC細胞の数を計算するために用いられるスクリーニングの判定は、その結果、平均的な予測される好適な交差したストラップツリーの組み合わせ、および、ブートストラップツリーの大部分が、所定の閾値レベルよりも上を好適と予測するかどうかを含む多数決基準に基づく。

【実施例】

【0085】

材料および方法

ヒト臍帯マトリックスサンプルの収集

ヒト臍帯および胎盤を、選択的帝王切開の出産後に正期産から収集し、処理するまで、出産から90分未満の輸送の間、室温で無菌的に保管した。臍帯を胎盤から分離し、胎盤に近位の10cm切片を取り出して、滅菌容器内に置いた。臍帯を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS; Life Technologies Ltd, Paisley, UK)でリンスして、血液を洗い流し、抗生物質-抗真菌(両方ともLife Technologies)で補充されたHanks緩衝食塩水(HBSS)中で、4にて2時間インキュベートした。この研究は現地の研究倫理委員会により承認され、全ての母親は同意書を提供した。臍帯マトリックスMSCは、公表された方法[13, 14]を一部改変して調製した。それから、細胞を採取し、計数し、そして、10%ジメチルスルホキシド(Sigma Aldrich, Poole, UK)で補充された培養培地中で、-80まで3代継代で凍結保存し、後の使用のために液体窒素中で保管した。

【0086】

ヒト骨髄穿刺液サンプルの収集

整形外科の外傷に関する外科的処置中に骨髓穿刺液を収集した。1～8mlのサンプルを、腸骨稜からヘパリン化シリンジ内に収集し、処理されるまで1時間未満の輸送の間、室温で保管した。HBSS (Life Technologies) を用いて骨髓を1:2希釈し、遠心分離による骨髓単核細胞 (BMMC) の分離のために、Ficoll-Plus 1.077 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) の上に重ねた。この研究は現地の研究倫理委員会により承認され、患者は同意書を提供した。T25フラスコ (CellSTAR, Greiner Bio-One, Stonehouse, UK) 中の、5mlの細胞培養培地、MEM (Life Technologies)、期限切れのアフェレーシス血小板から調製された10%の血小板溶解物、2mMのGlutaMAX (Life Technologies)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン (Life Technologies)、5U/mlのヘパリン (CalBiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 中に、BMMCを 1×10^5 細胞/cm²で蒔き、そして、37℃、空气中5%のCO₂でインキュベートした。8日目に、培養表面をAccutase (Sigma Aldrich) で覆ってフラスコを5分間37℃でインキュベートすることにより使用済み培地の除去後、細胞を採取し、細胞を分離した。遠心分離により細胞を収集し、完全培地に再懸濁し、そして上記のように計数した；それから、95%コンフルエントまで、500細胞/cm²で細胞を培養した。細胞を採取し、計数し、そして、上述のように、培養培地/10%DMSO中に、2代継代で凍結保存した。若い健常者 (22才男性) からの1つの追加の骨髓サンプル、および、2代継代で凍結保存された、分離されたMSC (22才女性) を、処理および細胞分離プロトコルの内部コントロールとして、Lonza (Lonza, Slough, UK) から購入した。

【0087】

ヒト線維芽細胞の細胞株

混合された細胞集団におけるMSCを同定するためにパネルを用いることが可能であるか否かを試験するために、陰性コントロールとして、ヒト皮膚線維芽細胞 (HSF) の細胞株1184を用いた。細胞を、高グルコースDMEM (Sigma Aldrich)、10%のFCS (Sigma Aldrich)、2mMのGlutaMAX (Life Technologies)、1%のペニシリン/ストレプトマイシン (Life Technologies) 中で、80～90%コンフルエントまで培養した。上記のようにAccutaseを用いてそれらを採取した。

【0088】

末梢血単核細胞 (PBMC)

現地の研究倫理委員会による承認付きの同意書が通知された後に、健常者由来の末梢血を、ヘパリン化パキュテナーチューブ (Greiner Bio-One) 中に回収した。HBSS (Invitrogen) を用いて血液サンプルを1:2希釈し、Ficoll-Plus 1.073 (GE Healthcare) 上に重ねて、遠心分離によりPBMCを分離した。上記のように細胞を計数し、MSCと混合して、パネルが異種サンプル中のMSCを同定することができるかどうか評価した。

【0089】

MSCの調製

UCMおよびBM MSCを解凍して、上記のそれらのそれぞれの培養培地中に、空气中5%のCO₂で、37℃にて、5,000細胞/cm²で増殖させ、そして、Accutaseを用いて採取した。UCM MSCおよびBM MSCは、5代継代で用いた。採取における細胞の生存能力は82%未満となることは決してなかった。

【0090】

表面マーカーの選択

陽性マーカー

ISCT基準によれば、MSCは、CD73、CD90およびCD105を発現しなければならないので、これらをマルチカラーパネルに含めた。

10

20

30

40

50

【0091】

陰性マーカー

I S C Tの陰性マーカーのうち、以下を含めた：CD14、CD19、CD34、およびCD45。MSCによるHLA-DR発現が誘導され得るので、それは決定的な陰性マーカーとはみなされず、したがってパネルから除外した[7]。I S C Tにより推奨される2つの単球マーカー(CD11bおよびCD14)のうち、CD14を選択した(この抗原を標的とする、より様々な利用可能な産物(特に、抗-CD14抗体がコンジュゲートされる様々なフルオロフォア)のため)。同様の理由で、CD79よりもBリンパ球マーカーCD19を選択した。13の供給元が2012年7月にレビューされた-CD11b:79の産物、CD14:100の産物、CD19:108の産物、CD79:26の産物、表1参照。

10

【0092】

モノクローナル抗体の選択7色コアパネル

上記の選択表面マーカーを標的とするモノクローナル抗体を同定するための基準は、FITC、PEおよびAPCにコンジュゲートされるべきではない(これらの一般に使用される蛍光色素が、目的とする追加のマーカーを試験するために利用できるように)ということであった。同様に、紫レーザーに適切なフルオロフォアは、より一般に利用可能でないので、紫レーザーは、その最大の可能性(BD FACSAria Iに関する3x光電子増倍管が我々に利用可能)まで用いられることが要求された。さらに、スペクトルオーバーラップおよび他のマーカーとの干渉を最小限化するために、異なるレーザー上に陽性マーカーを広げることが決定された。これらの基準を考慮して、13の供給元を、CD14、CD19、CD34、CD45、CD73、CD90およびCD105に対するこれらのフルオロフォア-コンジュゲートモノクローナル抗体に関してスクリーニングした。パネルの開発での使用に選択されたモノクローナル抗体は：抗-CD14-APC-eFluor780(クローン61D3, eBioscience, Hatfield, Ireland, UK)、抗-CD19-PE-Cy7(クローンJ3-119, Beckman Coulter, London, UK)、抗-CD34-PerCP-Cy5.5(クローン581, BioLegend, San Diego, CA, US)、抗-CD45-Krome Orange(クローンJ.33, Beckman Coulter)、抗-CD73-eFluor450(クローンAD2, eBioscience)、抗-CD90-AlexaFluor700(クローン5E10, BioLegend)、抗-CD105-Brilliant Violet 605(クローン266, BD Bioscience, Oxford, UK)であった。全ての抗体は、マウスアイソタイプIgG1, であった。

20

30

【0093】

プレースホルダー

プレースホルダーのコンセプトを試験するために、以下の報告された陽性MSC-マーカーを、コアパネルと組み合わせて用いた：抗-CD29-FITC(クローンTS2/16, eBioscience)、抗-CD29-PE(クローンHUTS-21, BD Bioscience)[15]、抗-CD44-APC(クローンIM7, eBioscience)[16]、抗-CD49d-FITC(クローン44H6, Serotec, Kidlington, UK)[17]、抗-CD164-PE(クローンN6B6, BD Bioscience)[18]、および、抗-CD182-APC(クローン5E8/CXCR2, BioLegend)[19]。全ての抗体は、CD44-APC(IgG2b,)、CD29-PEおよびCD164-PE(IgG2,)の両方は別として、マウスアイソタイプIgG1, であった。プレースホルダーを、予備データによるシグナル強度に基づいて2つのパネルに分けた。1つは明るいパネル、CD29-FITC、CD164-PEおよびCD44-APC、および、1つは暗いパネル、CD49d-FITC、CD29-PE、およびCD182-APCであり、プレースホ

40

50

ルダ-の抗体の明度がコアパネルの性能に影響を及ぼさないことを確実にした。

【0094】

抗体滴定

陰性MSCマ-カ-抗体(CD14、CD19、およびCD45)を、末梢血に対して滴定した。ISHAGE手順を用いて臍帯血液に対してCD34を滴定し、CD34+細胞を検出した[20]。陽性MSCマ-カ-抗体(CD29、CD44、CD49d、CD73、CD90、CD105、CD164およびCD182)を、UCM MSCに対して滴定した。

【0095】

モノクローナル抗体染色ストラテジー

パネルを段階的に組み立てて、試薬を組み合わせて用いることができることを確実にした。はじめに、UCM MSCを、陽性マ-カ-CD73、CD90およびCD105に対する抗体で単一染色し、3つの可能な全ての組み合わせで二重染色し、それから三重染色した。結果を分析して、全ての組み合わせに関するシグナルを比較した。それからサンプルを、明るい10色パネル(UCM MSC, n=3; BM MSC, n=3)または暗い10色パネル(UCM MSC, n=6; BM MSC, n=4)で染色した。抗体捕捉(ABC)ビーズ(Life Technologies)を用いて、全ての試薬に関する補正コントロールを作成した。全ての10の組み合わせ中の1つを除き全ての抗体で染色することにより、Fluorescence-minus-one(FMO)コントロール[21]を並行して作成し、ゲートをどこに設定すべきか特定した。UCM MSCサンプル(n=4)を、HSF 1184またはPBMCと混合して、MSCが、混合された細胞集団においてレアイベントとして同定することができることを確認した。

【0096】

モノクローナル抗体の染色条件

100µlのFACSバッファ- (Dulbecco's PBS, Life Technologies; 0.2%のBSAおよび0.05%のアジ化ナトリウム、両方ともSigma Aldrich)中で、細胞(3×10⁵)を30分間、暗所の氷上で、以前の滴定実験により決定された適切な量の各抗体とともにインキュベートした。それから細胞を、4で7分間、515×gの遠心分離によりペレット化し、上清を捨てて、細胞を3mlの同一バッファ-中に再懸濁し、そして、遠心分離により再度ペレット化した。上清を迅速に捨てた後、チューブを穏やかにタッピングすることにより、チューブ内に残った少量のバッファ-中に、細胞ペレットを再懸濁した。線維芽細胞およびPBMCを用いて、混合された集団サンプルを、染色前に最終的な細胞数が3×10⁵となるように調製した。

【0097】

フローサイトメトリーデータの取得

染色された細胞を、2時間以内に、FACS Diva 6.1.3ソフトウェアでのBD FACSAria I フローサイトメーター(BD Bioscience)を用いて分析した。用いたフィルター構成を表2に示す。レーザーのウォームアップを可能にするために、各運転前に少なくとも1時間、機器のスイッチを入れ、Cytometer Setup & Tracking Beads(BD Bioscience)を用いて機器の性能をチェックした。全てのサンプルは補正せずに記録した。最小限の10,000の細胞のイベントを、それぞれのモノクローナル抗体の組み合わせに関して記録した。混合された細胞集団のデータ取得の間、線維芽細胞に関して60,000細胞のイベント、および、PBMCに関して100,000のイベントを記録した。電圧は非染色サンプルに設定した[22]。

【0098】

フローサイトメトリーのデータ分析

FCSファイルは自動的に補正され、ABCビーズからのデータを用いてKaluzia 1.2(Beckman Coulter)において解析し、補正ルールを作成した。

10

20

30

40

50

試験全体を通じて、蛍光強度の中央値 (MFI) を、ロジカル (logicle) (二重の指数関数的 (bi-exponential)) 軸上に示し、軸より下の陰性イベントの視覚化を可能にした [23]。イベントの密度に関する情報を伝達するために、視覚化された異常値を有する等高線密度プロット (contour density plot) を、標準的なプロットとして選択した [24]。細胞集団全体から、蛍光強度の中央値 (MFI) を得た。記述統計は、中央値、最低および最高値を含んだ。統計的有意性を学生t検定により評価した。

【0099】

結果

MSCを同定するためのゲーティングストラテジー

全てのゲートは、fluorescence minus one (FMO) コントロールを用いて設定し、正確なゲーティングを確実にした (図1) [21]。実証するために、象限ゲートで、CD14 vs. CD19プロット上にCD14-FMOを表示した。右象限に分類されたイベントの<1%まで、CD14ゲートを調節した (A)。それから、CD19-FMOサンプルをサンプルプロット上に表示し、適宜、CD19に関してゲートを調節した (B)。最後に、全ての抗体で染色されたサンプルを、設定したゲートを用いて視覚化した (C)。同一の手順を全てのFMOに関して行なった。

【0100】

FMOで設定したゲートを用いて、MSCを同定するためにマルチステップのゲーティングストラテジーを開発した (図2に図式的に概説されてUCM MSCで例示される)。第一に、全ての記録されたイベントは、前散乱 vs. 横散乱のプロット上に視覚化され、細胞の周りにゲートを引いてデブリおよびダブルットを除外した (ステップ1)。対数軸上に横散乱を表示し、線形軸上に前散乱を表示した。ゲートした細胞をCD14 vs. CD19プロット上に表示し、ダブル陰性 (CD14-/CD19-) イベントを同定した (ステップ2)。CD14-/CD19-イベントをCD34 vs. CD45プロット上に表示し、CD34-/CD45-イベントをゲートした (ステップ3)。これらをCD73 vs. CD90プロット上に表示し、ダブル陽性 (CD73+/CD90+) イベントをゲートした (ステップ4)。ダブル陽性イベントをCD105 vs. 横散乱プロット上に表示し、CD105強度を観察した (ステップ5)。陽性マーカーのうち、CD105強度が、サンプル間で最も変化することが分かった。CD73およびCD90は一貫して明るかったので、ゲーティングストラテジーにおいて、これらをCD105の前に用いた。非染色細胞に関するヒストグラムの上にCD73+/CD90+/CD105+細胞に関するヒストグラムを重ねることにより、集団全体がCD105+であることが確認された (ステップ6)。CD105 FMOとCD105 MFIにおける非染色細胞との間に違いはなく、そのため、非染色コントロールを用いることができた。

【0101】

表現型分析

ゲーティングストラテジーを通して示されるコア表面マーカーパターンは、BMおよびUCM MSCに関して一貫し、プレースホルダーのシグナル強度により影響を受けなかった (図3)。UCM MSCは、より均質な前および横の散乱プロファイルを示した。サンプル#2および#3においてBM MSC細胞ゲートの外側に見られる不均一性は、細胞のデブリである可能性が最も高く、それらのより低い生存能力 (それぞれ82%および86%) を反映する。外傷患者由来のBM吸引液から分離されたBM MSCは、市販のBM吸引液 (サンプル#4)、市販のBM MSC (#1)、およびUCM MSCと比較して、小さなCD34dim集団 (サンプル#2、#3、#5および#6) を示す。

【0102】

骨髄 vs. 臍帯マトリックスのMSC上の、表面抗原の強度分析

陽性および陰性のISCTマーカーに関するMFIの観点から、BMおよびUCM MSCの間に統計的に有意な違いはなかった (データ示さず)。明るいパネルでは、CD14およびCD34は、非染色コントロールよりも高いMFIを有した (このことは、偽陽

10

20

30

40

50

性を除外するためのゲートを設定するために、FMOを使用する重要性を示す)。CD49d MFIはBM MSCよりもUCM MSCが高かった ($p = 0.006$) (図4)。CD44は、UCM MSCと比較して、BM MSCにおいて、より広い範囲のシグナル強度を示した。暗いパネルおよび明るいパネルは、抗原(この場合、CD29)の発現が、用いたクローンおよび/または蛍光色素に大いに依存することを明らかにし:同一サンプルを染色するために用いた場合、CD29-FITCは、CD29-PEよりも高いMFIを生じた。

【0103】

混合された細胞集団におけるMSCの同定

MSCは、2% (2.0%、59,550の細胞イベントのうち1,164のMSC)、5% (4.6%、59,587の細胞イベントのうち2730のMSC)および10% (10.4%、59,474の細胞イベントのうち6193のMSC)で線維芽細胞の集団と混合した場合に同定することができ(図5)、2度繰り返した。1% (0.63%、98,071の細胞イベントのうち620のMSC)、2% (1.9%、97,705の細胞イベントのうち1860のMSC)、5% (3.7%、97,360の細胞イベントのうち3627のMSC)および10% (6.8%、95,772の細胞イベントのうち6535のMSC)でPBMCに加えられたMSCを同定することも可能であり(図6)、1度行った。しかしながら、PBMC調製は、陰性のISCT MSCマーカー-CD14、CD19、CD34、およびCD45を発現する細胞が多数を占める。したがって、ゲーティングストラテジーは、それらの発現に関して陽性のMNCについて再計算されたこれらのマーカーに関して、FMOを用いて修正しなければならなかった。計算されたMSCは、紫チャンネルにおいて、主なPBMCよりも高い自己蛍光も有し、一部のMSCを、CD45に関して偽陽性に見えるようにさせ、それにより、それらはゲーティングステップ3において除外される。これは、同定率のわずかな低減をもたらした。

【0104】

結論

MSCは、インビボでレアな細胞集団であり、MFCはそれらの同定および研究を可能にする。これを実証するために、MSCを、低濃度(1~10%)で、HSFと、およびPBMCと、混合し、このパネルを用いてそれらを検出することが可能であった。線維芽細胞の表面マーカー発現は、MSCと同様であり[25]、それらは多くの同様の組織中に存在する。線維芽細胞は、様々な組織における一般的な細胞型である。それらはISCT-マーカーを共有すること[25]、および、脂肪細胞、軟骨細胞および骨細胞へ分化すること[26]が示されている。したがって、臨床用途のためなど、一次組織由来のMSCの純粋な出発原料を分離することが重要である場合には、これらの2つの細胞型を区別することが可能であることが望ましい。本研究では、用いたヒト皮膚線維芽細胞の細胞株はCD90-陰性であり、このマーカーに基づく細胞分離を可能にした。しかしながら、一次線維芽細胞はCD90+であることが示されているので、これらの細胞の記載の陽性マーカー(例えば、CD10、CD29、およびCD106[25])を用いて線維芽細胞をより良く区別するプレースホルダーを用いることができた。

【0105】

PBMCは主にリンパ球および単球からなり、これらとMSCの混合は、骨髄、血液、および他の複雑な組織サンプルにおいてMSCを同定するステップに近いステップを取る。パネルを用いてこの異種サンプル中のMSCを検出することができるので、様々な病態(3~4色分析で行なわれた、および/または、ISCT-マーカーを含めなかった)において、循環するMSCの研究を再評価するために用いることができた[27~31]。定量化ビーズを用いた直接の単一のプラットフォームの方法により、または、パネルデータを、CD34+細胞の定量化に用いられる自動化された血液白血球カウント[20]と組み合わせて、二重のプラットフォームの方法を間接的に用いて、パネルを用いてMSC/ μ lサンプルを定量化することができた。したがって、このパネルを用いて、標準的な様式で、非骨髄MSCのソースを評価することができた。

【 0 1 0 6 】

本研究における2つのCD29-コンジュゲートで見ることができたように(図4)、異なるクローンおよびコンジュゲートは、大いに異なる強度シグナルを生じることができる。目的とする研究のために最適な性能の抗体を同定することが重要である(性能は変化し得るので)[32]。明るいパネルおよび暗いパネルは、7色コアパネルの性能に影響を及ぼさなかった。他の目的のためにパネルを改変する場合は、細胞は、別々に、7色コアパネル(追加のプレースホルダーの抗体のそれぞれ)で染色しなければならず、(または機能性染色(functionality stain))、それから、組み合わせて、追加がコアパネルの結果に影響を及ぼさないことを確実にする。

【 0 1 0 7 】

細胞からのシグナルを測定する能力における不正確さは、光子を計測する統計から生じるエラーに関連し、このエラーは、従来の方法により統計的に補正されるデータさえ、陽性に見え得る誤りのデータイベントを生じ得る、集団の拡張(a spread of the population)をもたらし得る[33]。この「拡張エラー(spreading error)」は、このパネルにおいてCD14を検出するために用いられるAPC-eFluor780のような遠赤色素で最も著しい。したがって、このパネルを使用する場合は、拡張に合わせるために、および、CD14-FMOを用いて閾値を設定するために、ロジカル軸を用いてデータを示すことが重要である。

【 0 1 0 8 】

拡張エラーはまた、統合分類、および、回帰ツリーモデル(多くの明確なツリーの組み合わせを含むブートストラップアルゴリズムを用いて形成され、各モデルは、元のサンプルから引かれた一連のブートストラップサンプルにおいて推定される)を用いることにより補正することもでき、ここで、スクリーニングの判定は、平均的な予測される好適な交差したストラップツリーの組み合わせ、および、ブートストラップツリーの大部分が、所定の閾値レベルよりも上を好適と予測するかどうかを含む多数決基準に基づいて、MSC細胞の表現型を計算するために用いられる。

【 0 1 0 9 】

結論付けると、本出願において提案される革新的な10色パネルおよびアルゴリズムは、統計的モデリングプログラムおよび7つのISCTコア-パネルマーカーからなり、必要に応じて、追加すべき(to be populate)3つまでのプレースホルダーの位置さえ含むことができ、それらは、骨髄および臍帯のMSCを表現型するために用いることができる。それは、MSC研究の任意の態様で、研究者らが、アポトーシス、細胞周期分析および増殖(細胞ごと(on a cell-by-cell basis))のようなイベントの視覚化のために、機能性細胞色素と組み合わせて、MSCおよびそれらのサブタイプを研究するための、柔軟なフローサイトメトリーツールを提供する。

[参考文献]

1. Chen, S.-l., et al., Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 2004. 94: p. 92-95.

10

20

30

40

2. Hare, J.M., et al., A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2009. 54(24): p. 2277-86.
3. Bang, O.Y., et al., Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol*, 2005. 57(6): p. 874-82.
4. Lee, P.H., et al., Autologous mesenchymal stem cell therapy delays the progression of neurological deficits in patients with multiple system atrophy. *Clin Pharmacol Ther*, 2008. 83(5): p. 723-30. 10
5. Le Blanc, K., et al., Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, 2008. 371(9624): p. 1579-86.
6. Kang, K.S., et al., A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study. *Cytotherapy*, 2005. 7(4): p. 368-73.
7. Dominici, M., et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. 8(4): p. 315-317.
8. De Rosa, S.C., J.M. Brenchley, and M. Roederer, Beyond six colors: a new era in flow cytometry. *Nat Med*, 2003. 9(1): p. 112-7. 20
9. Martins, A.A., et al., Quantification and immunophenotypic characterization of bone marrow and umbilical cord blood mesenchymal stem cells by multicolor flow cytometry. *Transplantation Proceedings*, 2009. 41: p. 943-946.
10. Jones, E.A., et al., Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytometry part B (clinical cytometry)*, 2006. 70B: p. 391-399.
11. Tucker, H.A. and B.A. Bunnell, Characterization of human adipose-derived stem cells using flow cytometry. *Methods Mol Biol*, 2011. 702: p. 121-31. 30
12. Bradford, J.A. and S.T. Clarke, Panel development for multicolor flow-cytometry testing of proliferation and immunophenotype in hMSCs. *Methods Mol Biol*, 2011. 698: p. 367-85.
13. La Rocca, G., et al., Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol*, 2009. 131(2): p. 267-82.

14. Najar, M., et al., Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol*, 2010. 264(2): p. 171-9.
15. Ohgushi, H., et al., Tissue engineered ceramic artificial joint—ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*, 2005. 26(22): p. 4654-4661.
16. Wexler, S.A., et al., Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*, 2003. 121(2): p. 368-74. 10
17. Gronthos, S., et al., Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of cellular physiology*, 2001. 189(1): p. 54-63.
18. Bühring, H.J., et al., Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009. 1176(1): p. 124-134.
19. Ringe, J., et al., Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem*, 2007. 101(1): p. 135-46.
20. Barnett, D., et al., Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells PREPARED BY THE CD34+ HAEMATOPOIETIC STEM CELL WORKING PARTY*. *Clinical & Laboratory Haematology*, 1999. 21(5): p. 301-308. 20
21. Roederer, M., Compensation in flow cytometry. *Curr Protoc Cytom*, 2002. Chapter 1: p. Unit 1 14.
22. Maecker, H.T. and J. Trotter, Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. *Cytometry A*, 2006. 69(9): p. 1037-42.
23. Herzenberg, L.A., et al., Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat Immunol*, 2006. 7(7): p. 681-5.
24. Alvarez, D.F., et al., Publishing flow cytometry data. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010. 298(2): p. L127-30. 30
25. Cappellesso-Fleury, S., et al., Human fibroblasts share immunosuppressive properties with bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of clinical immunology*, 2010. 30(4): p. 607-619.
26. Lysy, P.A., et al., Human skin fibroblasts: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation. *Hepatology*, 2007. 46(5): p. 1574-85.

27. Wang, Y., et al., Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart*, 2006. 92(6): p. 768-74.
28. Mansilla, E., et al., Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplantation Proceedings*, 2006. 36: p. 967-969.
29. Villaron, E.M., et al., Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *haematologica*, 2004. 89(12): p. 1421-7. 10
30. Fernandez, M., et al., Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant*, 1997. 20(4): p. 265-71.
31. Bian, Z.Y., et al., Increased number of mesenchymal stem cell-like cells in peripheral blood of patients with bone sarcomas. *Arch Med Res*, 2009. 40(3): p. 163-8.
32. Mahnke, Y.D. and M. Roederer, Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin Lab Med*, 2007. 27(3): p. 469-85, v.
33. Roederer, M., Multiparameter FACS analysis. *Curr Protoc Immunol*, 2002. Chapter 5: p. Unit 5 8. 20

【 0 1 1 0 】

表

【表 1】

表 1.

供給元	コンジュゲート先			
	CD11 b	CD1 4	CD1 9	CD79 α
AbCam	10	12	12	3
Beckman Coulter	5	8	10	2
BD Bioscience	12	13	16	2
BioLegend	16	15	15	3
eBioscience	9	11	13	4
Life Technologies	4	8	15	2
Merck Millipore	3	3	2	1
Miltenyi Biotec	7	9	7	0
RnD Systems	4	5	5	3
Santa Cruz Biotechnology	0	4	2	0
AbD Serotec	7	9	8	4
Sigma Aldrich	2	3	3	2
利用可能なコンジュ ゲートの合計	79	100	108	26

単球マーカー（CD11bおよびCD14）およびB細胞マーカー（CD19およびCD79 α ）あたりの、抗体コンジュゲートの数の評価。試験は2012年7月に行なった。13番目の供給元、ImmuneQuestは、利用可能な適切な産物がなかった。

10

20

30

【表 2】

表 2. FACS Aria I フィルターの構成

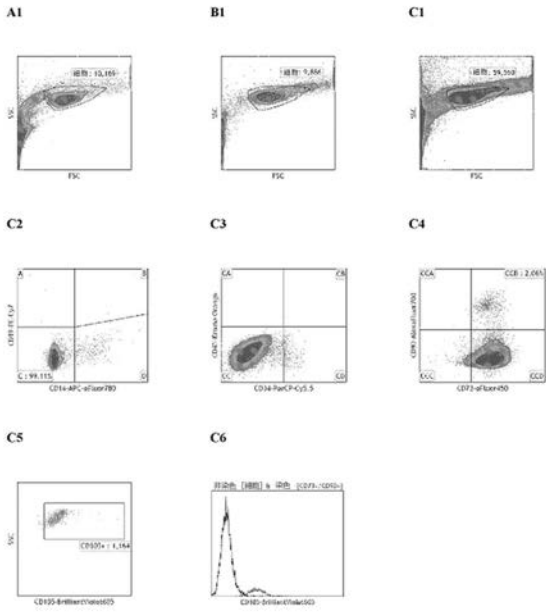
レーザー	デテクター	ロングパスフィルター	バンドパスフィルター	発光範囲	蛍光色素	マーカー
紫 (405 nm)	A	600	610/20	600-620 nm	BV605	CD105
	B	502	530/30	515-545 nm	K-Orange	CD45
	C	None	450/40	425-475 nm	eF450	CD73
青 (488 nm)	A	735	780/60	750-810 nm	PE-Cy7	CD19
	B	655	695/40	675-715 nm	PerCP-Cy5.5	CD34
	C	595	610/20	600-620 nm	-	-
	D	556	585/42	564-606 nm	PE	プレースホルダー
	E	502	530/30	515-545 nm	FITC/AF488	プレースホルダー
	F	-	488/10	483-493 nm	-	-
	G	-	-	-	-	-
	H	-	-	-	-	-
赤 (633 nm)	A	735	780/60	750-810 nm	APC-eF780	CD14
	B	691	710/40	690-730 nm	AF700	CD90
	C	-	660/20	650-670 nm	APC	プレースホルダー

10

20

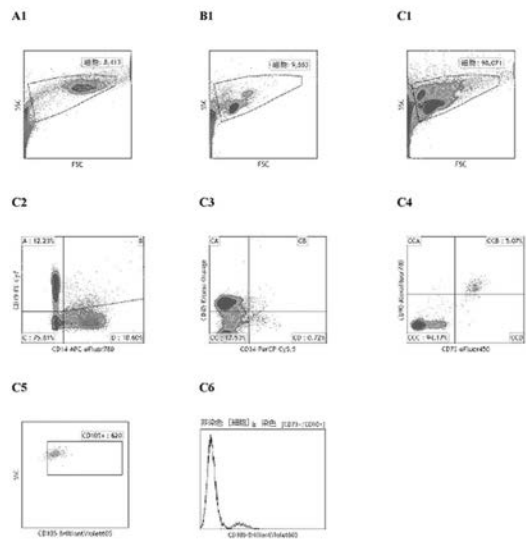
【 図 5 】

Fig 5



【 図 6 】

Fig 6



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2014/051538

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/0775 G01N33/50 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRADFORD JOLENE A ET AL: "Panel development for multicolor flow-cytometry testing of proliferation and immunophenotype in hMSCs", METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, HUMANA PRESS, INC, US, vol. 698, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 367-385, XP009178976, ISSN: 1940-6029, DOI: 10.1007/978-1-60761-999-4_27 cited in the application	1,2,4, 14,15, 17,26,27
Y	page 368, first full paragraph page 369, second full paragraph 2.3 Immunostaining 3.4 Immunostaining table 1 ----- -/--	3,5,16, 18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
15 July 2014	08/10/2014	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Mauhin, Viviane	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2014/051538

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>MARTINS A A ET AL: "Quantification and Immunophenotypic Characterization of Bone Marrow and Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells by Multicolor Flow Cytometry", TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, ELSEVIER INC, ORLANDO, FL; US, vol. 41, no. 3, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 943-946, XP026149970, ISSN: 0041-1345, DOI: 10.1016/J.TRANSPROCEED.2009.01.059 [retrieved on 2009-04-17] cited in the application figure 1 RESULTS: first sentence DISCUSSION: second sentence and last paragraph</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	3,5,16, 18
Y	<p>JOCHEN RINGE ET AL: "Towards in situ tissue repair: Human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2", JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. 101, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 135-146, XP055050679, ISSN: 0730-2312, DOI: 10.1002/jcb.21172 page 140, left column, first and second sentences</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	3,5,16, 18
Y	<p>STEPHEN P. PERFETTO ET AL: "Innovation: Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system", NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY, vol. 4, no. 8, 1 August 2004 (2004-08-01), pages 648-655, XP055107816, ISSN: 1474-1733, DOI: 10.1038/nri1416 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	3,5,16, 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2014/051538**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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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:

see additional sheet

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 an 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.:
1, 4, 5, 14, 17, 18, 26(completely); 2, 3, 15, 16, 27(partially)

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 Application No. PCT/GB2014/051538

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 4, 5, 14, 17, 18, 26(completely); 2, 3, 15, 16, 27(partially)

Method of identifying a mesenchymal stem cell in a cell population comprising simultaneously identifying using FACS a cell which displays CD73, CD90, CD105 but not CD14, CD19, CD34 and CD45; Kit for identifying such a cell comprising at least seven fluorescently-labelled antibodies; Reagent or composition of matter

2. claims: 6-8, 19, 20(completely); 2, 3, 15, 16, 27(partially)

Method of identifying a progenitor cell of mesodermal lineage in a cell population comprising simultaneously identifying using FACS a cell using CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, CD14, CD34 and CD45; Kit for identifying such a cell comprising at least seven fluorescently-labelled antibodies; Reagent or composition of matter

3. claims: 9, 21(completely); 2, 3, 15, 16, 27(partially)

Method of identifying a fibroblast in a cell population comprising simultaneously identifying using FACS a cell using CD10, CD29, CD106; Kit for identifying such a cell comprising at least seven fluorescently-labelled antibodies; Reagent or composition of matter

4. claims: 10, 22(completely); 2, 3, 15, 16, 27(partially)

Method of identifying a very small embryonic/epiblast-like stem cell (VSEL) in a cell population comprising simultaneously identifying using FACS a cell using Sca-1, CD45R, Gr-1, TCRlaphabeta, TCRgammadelta, CD11b, Ter119 and Oct-4; Kit for identifying such a cell comprising at least seven fluorescently-labelled antibodies; Reagent or composition of matter

5. claims: 11, 23(completely); 2, 3, 15, 16, 27(partially)

Method of identifying hematopoietic stem cell in a cell population comprising simultaneously identifying using FACS a cell using CD133; Kit for identifying such a cell comprising at least seven fluorescently-labelled antibodies; Reagent or composition of matter

6. claims: 12, 24(completely); 2, 3, 15, 16, 27(partially)

International Application No. PCT/GB2014/051538

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Method of identifying an endothelial progenitor cell in a cell population comprising simultaneously identifying using FACS a cell using KDR, VE-cadherin, CD31; Kit for identifying such a cell comprising at least seven fluorescently-labelled antibodies; Reagent or composition of matter

7. claims: 13, 25(completely); 2, 3, 15, 16, 27(partially)

Method of identifying a tissue-commited stem cell in a cell population comprising simultaneously identifying using FACS a cell using CD117, CD184, c-met, AC133; Kit for identifying such a cell comprising at least seven fluorescently-labelled antibodies; Reagent or composition of matter

8. claims: 28-30(completely); 2, 3, 15, 16, 27(partially)

General methods and products without indication of any specific cell surface marker and/or any specific cell type

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y
G 0 1 N 21/78 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	P
	G 0 1 N	21/64	F
	G 0 1 N	21/78	C

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71)出願人 514002662

セル セラピー リミテッド

CELL THERAPY LIMITED

英国 エスエー2 8ピーピー シングルトン パーク スウォンジ スウォンジ ユニバーシティー スクール オブ メディシン ルーム 137 ファースト フロアー インスティテュート オブ ライフ サイエンシズ(番地なし)

Institute of Life Sciences First Floor, Room
137 School of Medicine Swansea University Singleton Park Swansea SA2 8PP United Kingdom

(74)代理人 100113376

弁理士 南条 雅裕

(74)代理人 100179394

弁理士 瀬田 あや子

(74)代理人 100185384

弁理士 伊波 興一朗

(74)代理人 100137811

弁理士 原 秀貢人

(72)発明者 エヴァンス マーティン ジョン

英国 エスエー2 8ピーピー シングルトン パーク スウォンジ スウォンジ ユニバーシティー スクール オブ メディシン, ルーム 137, ファースト フロアー, インスティテュート オブ ライフ サイエンシズ セル セラピー リミテッド

(72)発明者 レジナルド アジャン

英国 エスエー2 8ピーピー シングルトン パーク スウォンジ スウォンジ ユニバーシティー スクール オブ メディシン, ルーム 137, ファースト フロアー, インスティテュート オブ ライフ サイエンシズ セル セラピー リミテッド

(72)発明者 スルタン サベナ

英国 エスエー2 8ピーピー シングルトン パーク スウォンジ スウォンジ ユニバーシティー スクール オブ メディシン, ルーム 137, ファースト フロアー, インスティテュート オブ ライフ サイエンシズ セル セラピー リミテッド

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA04 DA05 DA06 EA01 JA03 KA02 KA09 LA02

NA02

2G045 AA25 CB01 DA36

2G054 AA08 AB04 AB05 CA30 CE02 EA03 FA08 FA33 GA03 GA05

GB02

4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ08 QR48 QR66 QS33 QX02

4B065 AA90X BA25 BA30 CA44 CA46 CA60

专利名称(译)	用于鉴定特定间充质干细胞中细胞群的多色流式细胞术方法		
公开(公告)号	JP2016519938A	公开(公告)日	2016-07-11
申请号	JP2016514476	申请日	2014-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	细胞治疗有限公司 CELLTHERAPY		
申请(专利权)人(译)	细胞治疗有限公司		
[标]发明人	エヴァンスマーティンジョン レジナルドアジャン スルタンサベナ		
发明人	エヴァンス マーティン ジョン レジナルド アジャン スルタン サベナ		
IPC分类号	C12N5/0775 C12N5/0789 C12N5/074 C12Q1/02 G01N33/68 G01N33/53 G01N21/64 G01N21/78		
CPC分类号	C12N5/0663 C12N5/0665 G01N33/533 G01N2333/70596 G01N33/56966 G01N2333/705		
FI分类号	C12N5/0775 C12N5/0789 C12N5/074 C12Q1/02 G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/53.P G01N21/64.F G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/CA04 2G043/DA05 2G043/DA06 2G043/EA01 2G043/JA03 2G043/KA02 2G043/KA09 2G043/LA02 2G043/NA02 2G045/AA25 2G045/CB01 2G045/DA36 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/AB05 2G054/CA30 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/FA08 2G054/FA33 2G054/GA03 2G054/GA05 2G054/GB02 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QS33 4B063/QX02 4B065/AA90X 4B065/BA25 4B065/BA30 4B065/CA44 4B065/CA46 4B065/CA60		
优先权	2013009057 2013-05-20 GB		
其他公开文献	JP2016519938A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	(21) 出願番号 特願2016-514476 (P2016-514476)	(71) 出願人 514002662
<p>本発明は使用差異と特异性蛍光激活細胞分選 (FACS) 以及进一步分离来鉴定间充质干细胞 (MSC) 和其他细胞类型的领域的发明。</p>	(86) (22) 出願日 平成26年5月20日 (2014. 5. 20)	セル セラピー リミテッド
	(85) 翻訳文提出日 平成27年12月17日 (2015. 12. 17)	CELL THERAPY LIMITE
	(86) 国際出願番号 PCT/GB2014/051538	D
	(87) 国際公開番号 W02014/188170	英国 エスエー2 8ビービー シングル
	(87) 国際公開日 平成26年11月27日 (2014. 11. 27)	トン パーク スウォンジ スウォンジ
	(31) 優先権主張番号 1309057.6	ユニバーシティー スクール オブ メデ
	(32) 優先日 平成25年5月20日 (2013. 5. 20)	イシン ルーム 137 ファースト フ
	(33) 優先権主張国 英国 (GB)	ロアー インスティテュート オブ ライ
		フ サイエンス (番地なし)
	Institute of Life S	
	ciences First Floor	
	, Room 137 School o	
	f Medicine Swansea	
	University Singleto	
	最終頁に続く	