

(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2005-512592

(P2005-512592A)

(43) 公表日 平成17年5月12日(2005.5.12)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/06	C 1 2 N 5/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/14	A 6 1 K 35/14	4 B 0 6 3
A 6 1 K 35/28	A 6 1 K 35/28	4 B 0 6 5
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 57 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2003-556509 (P2003-556509)
 (86) (22) 出願日 平成14年12月20日 (2002.12.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年8月17日 (2004.8.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2002/001979
 (87) 国際公開番号 W02003/055989
 (87) 国際公開日 平成15年7月10日 (2003.7.10)
 (31) 優先権主張番号 60/342,586
 (32) 優先日 平成13年12月21日 (2001.12.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

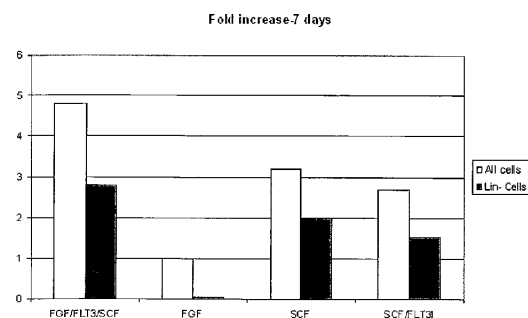
(71) 出願人 501405845
 マウント・シナイ・ホスピタル
 カナダ・オンタリオ エム5ジー 1エツ
 クス5・トロント・ユニバーシテイアベニ
 ユー600・オフィスオブテクノロジー
 ランスファーアンドインダストリアルリエ
 イソン・サミュエルルネフエルドリサー
 チインステイテユート
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞性組成物ならびに細胞性組成物の作製法および細胞性組成物の使用法

(57) 【要約】

本発明は、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する造血細胞を含む細胞性組成物に関し、このような細胞性組成物を産生する方法；本発明の細胞性組成物の細胞を、非造血細胞の形態学的特徴、生理学的特徴、機能的特徴および／または免疫学的特徴を表す細胞への分化に関する方法；ならびに細胞性組成物の使用に関する。本発明はまた、造血幹細胞および造血前駆細胞の増殖方法に関する。この方法は以下：(a) 造血細胞を獲得する工程；(b) ポジティブセクションまたはネガティブセクションによって、造血幹細胞および造血前駆細胞について造血細胞を富化し、富化された造血細胞調製物を獲得する工程；および(c) 増殖条件下で富化された造血幹細胞および造血前駆細胞を培養し、その結果、調製中の細胞が、潜在力または増強された潜在力を発揮し異なる型の非造血細胞を形成する工程、を包含する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された細胞組成物を産生する方法であって該組成物は、異なる型の非造血細胞を形成する潜在力または増強された潜在力を有する細胞を含むまたは本質的に含む組成物であって、該方法は以下：

(a) 造血細胞を獲得する工程；

(b) ポジティブセレクションまたはネガティブセレクションによって、造血幹細胞および造血前駆細胞について造血細胞を富化し、富化された造血細胞調製物を獲得する工程；および

(c) 増殖条件下で富化された造血幹細胞および造血前駆細胞を培養し、その結果、調製中の細胞が、潜在力または増強された潜在力を発揮し異なる型の非造血細胞を形成する工程、
を包含する方法。 10

【請求項 2】

工程 (a) における前記造血細胞が、臍帯血から得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

工程 (c) における前記増殖条件が、前記富化された造血細胞調製物中の細胞が細胞周期を十分に完了するのに十分な時間の間、一つ以上のポジティブな増殖因子の存在下で該細胞を培養し、非造血細胞および非造血組織を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を獲得する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 4】

前記ポジティブな増殖因子が、線維芽細胞増殖因子 (F G F) ファミリーのメンバーであり、該ファミリーは、F G F-4 および F G F-2、上皮増殖因子 (E G F)、幹細胞因子 (S C F)、トロンボポエチン (T P O)、F L T-3 リガンド、インターロイキン-3 (I L-3)、インターロイキン-6 (I L-6)、神経増殖因子 (N G F)、V E G F、顆粒球マクロファージ増殖因子 (G M-C S F)、H G F または N o t c h を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ポジティブな増殖因子が、一つ以上の F G F-4、F G F-2、I L-3、S C F、F L T 3 リガンド、T P O、G M-C S F および N G F である、請求項 4 に記載の方法 30

【請求項 6】

工程 (c) における前記増殖条件が、前記富化される造血細胞調製物中の細胞が細胞周期を十分に完了するのに十分な時間の間、以下、

(i) F G F-2 もしくは F G F-4、F L T 3 リガンドおよび S C F；

(i i) T P O、F L T-3 リガンドおよび S C F；または、

(i i i) N G F、S C F および F L T-3 リガンド、

の存在下で該細胞を培養し、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を獲得する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記富化された造血細胞調製物が、C D 4 5⁺ H L A-A B C⁺ 細胞を本質的に含み、該調製物が、好ましくは、C D 4 5⁺ H L A-A B C⁺ L i n⁻ 細胞を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。 40

【請求項 8】

前記非造血細胞が、内皮細胞、破骨細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、星状細胞、腎細胞、脾細胞、肝細胞、網膜細胞、角膜細胞、結合組織細胞または神経細胞である、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

インビトロまたはインビボにおいて、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を誘導し、非造血細胞系統の細胞および非造血組織系統の組織へ 50

分化する工程をさらに包含する、請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

請求項 1～9 のいずれかの方法によって産生された細胞性組成物。

【請求項 11】

細胞性組成物における前記細胞が、非造血細胞の形態学的特徴、生理学的特徴および／または免疫学的特徴を表す細胞へ分化する潜在力を有する、請求項 10 に記載の細胞性組成物。

【請求項 12】

細胞性組成物における前記細胞が、胚性組織マーカーまたは初期非造血組織マーカーを発現する、請求項 10 または 11 に記載の細胞性組成物。

10

【請求項 13】

単離された細胞性組成物および精製された細胞性組成物が、以下：

- (a) $CD45^+HLA-ABC^+$ ；
 - (b) 造血細胞または造血前駆細胞へ分化し得ること；
 - (c) 一つ以上、二つ以上、三つ以上、四つ以上、五つ以上または六つ以上の異なる非造血細胞型へ分化し得ること；
 - (d) 丸型および非接着性の増殖必要条件；ならびに
 - (e) 幹細胞因子レセプター (KIT)⁺、
- によって特徴付けられる細胞を含む、細胞性組成物。

【請求項 14】

20

単離された細胞性組成物および精製された細胞性組成物が、以下：

- (a) $CD45^+HLA-ABC^+$ ；
- (b) 造血細胞または造血前駆細胞へ分化し得ること；
- (c) 一つ以上、二つ以上、三つ以上、四つ以上、五つ以上または六つ以上の異なる非造血細胞型へ分化し得ること；
- (d) 丸型および非接着性の増殖必要条件；
- (e) 幹細胞因子レセプター (KIT)⁺
- (f) $FLT3$ リガンドレセプター⁺；
- (g) FGF レセプター⁺；
- (h) 胚性幹細胞タンパク質の発現；
- (i) $HoxB4^+$ ；
- (j) $Flk-1^+$ ；
- (k) $CD34^{\pm}$ ；
- (l) 非腫瘍形成性；
- (m) $CD38^{\pm}$ ；ならびに
- (n) 臍帯血に由来すること、

30

によって特徴付けられる細胞を含む、細胞性組成物。

【請求項 15】

細胞性組成物における前記細胞が、遺伝的に改変されている、請求項 1～14 のいずれかの細胞性組成物。

40

【請求項 16】

外傷、年齢、代謝もしくは毒性損傷、疾患または特発性喪失に起因して損失したまたは損傷された体組織、器官、構成要素または構造を置換するために、請求項 1～15 のいずれかに記載の細胞性組成物を使用する方法。

【請求項 17】

非造血細胞を含む障害および疾患の緩和に指向される細胞治療および遺伝子治療において、請求項 1～16 のいずれかに記載の細胞性組成物を使用する方法。

【請求項 18】

造血細胞または免疫系細胞を含む障害および疾患の緩和に指向される細胞治療および遺伝子治療において、請求項 1～17 のいずれかに記載の細胞性組成物を使用する方法。

50

【請求項 19】

非造血細胞に関係する条件を有する患者を処置する方法であって、該方法は、請求項 1～18 のいずれかの細胞性組成物を移す工程であって、該調製物は、患者へ非造血細胞を形成するための潜在力を有する細胞を含み、ここで、該細胞が非造血細胞へ分化する工程を包含する、方法。

【請求項 20】

請求項 1～19 のいずれかに記載の細胞性組成物を使用し、非造血細胞を形成するための潜在力を有する細胞または該細胞から分化した細胞の成長または細胞の活性を調節する可能性のある治療法をスクリーンする方法。

【請求項 21】

請求項 1～20 のいずれかの細胞性組成物を使用し、疾患のモデル系を調製するために、または増殖因子もしくはホルモンを産生する方法。

【請求項 22】

臍帯血から造血幹細胞および造血前駆細胞を増殖する方法であって、該方法は、以下（a）臍帯血から造血幹細胞および造血前駆細胞を獲得する工程；（b）増殖条件下で造血幹細胞および造血前駆細胞を培養する工程；ならびに（c）増大数の造血幹細胞および造血前駆細胞を単離する工程、を包含する、方法。

【請求項 23】

造血幹細胞および造血前駆細胞の数が、少なくとも約 2 倍増加される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

造血幹細胞および造血前駆細胞が、 $CD45^+HLA-ABC^+$ であり、該細胞が好ましくは $CD45^+HLA-ABC^+Lin^-$ である、請求項 22 または請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

（b）において生じる培養細胞は、以下：

（a） $CD45^+HLA-ABC^+$ ；

（b）造血細胞または造血前駆細胞へ分化し得ること；

（c）一つ以上、二つ以上、三つ以上、四つ以上、五つ以上または六つ以上の異なる非造血細胞型へ分化し得ること；

（d）丸型および非接着性の増殖必要条件；ならびに

（e）幹細胞因子レセプター（KIT）⁺

、で特徴づけられる、請求項 22、請求項 23 または請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

造血細胞もしくは免疫系細胞を含む障害または疾患を緩和するために、増殖された造血幹細胞および造血前駆細胞を患者に投与する工程をさらに包含する、請求項 22、請求項 23、請求項 24 または請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

混合された細胞集団において、請求項 13 に記載の細胞性組成物の細胞の存在を同定する方法であって、該方法は、以下：請求項 13 に記載のマーカー（a）またはマーカー（e）に対して、免疫遺伝学的に特異的な抗体またはそのフラグメントに該細胞集団を曝露する工程であって、該マーカーの存在が、該細胞集団における該細胞の存在を表示する工程、を包含する、方法。

【請求項 28】

請求項 1～27 のいずれかの細胞性組成物を含む薬学的組成物であり、薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤を含む薬学的組成物。

【請求項 29】

患者自身の造血細胞から自家移植のための非造血細胞を獲得する方法であって、該方法は、以下（a）該患者から造血細胞を含むサンプルを獲得する工程；（b）富化された細胞調製物より分離する工程であって該細胞調製物は、造血幹細胞および造血前駆細胞、好

10

20

30

40

50

ましくはCD45⁺HLA-ABC⁺細胞、さらに好ましくはCD45⁺HLA-ABC⁺Lin⁻細胞を含む、工程；(c) 潜在力または増強された潜在力を有する細胞を含む細胞性組成物を産生するための増殖条件下で、該細胞を培養し、非造血細胞を形成する工程、を包含する、方法。

【請求項30】

試験物質の活性をアッセイする方法であって、該方法は以下：

(a) 増殖条件下で造血幹細胞および造血前駆細胞を含む富化された造血細胞調製物において細胞を培養し、細胞性組成物を獲得する工程であって、該組成物は、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を含む、工程；

(b) 必要に応じて、インビトロの分化条件下において、該非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を培養する工程； 10

(c) 工程(a)または工程(b)において培養された該細胞を試験物質に曝露する工程；ならびに

(d) 該細胞の生存あるいは該細胞の形態学的特性、機能的特性または生理学的特性および／もしくは分子生物学的特性に対する該試験物質の効果の存在または非存在を検出し、ここで該細胞の細胞生存特性、形態学的特性、機能的特性または生理学的特性および／もしくは分子生物学的特性を変える効果が、前記試験物質の活性を表す、工程、を包含する、方法。

【請求項31】

非造血細胞に関係する障害を処置する可能性をもつ新しい薬物をスクリーンするための方法であって、該方法は、以下： 20

(a) 非造血細胞に関係する障害を有する患者由来のサンプルから造血細胞を獲得する工程；

(b) 造血幹細胞および造血前駆細胞を含む富化された造血細胞調製物から造血細胞を調製する工程；

(c) 増殖条件下で富化された造血細胞調製物を培養し、細胞性組成物を獲得する工程であって、該組成物は、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を含む、工程；

(d) 必要に応じて、インビトロの分化条件下で、非造血細胞を形成する潜在力または増強された潜在力を有する細胞を培養する工程； 30

(e) (c)または(d)において培養された該細胞を、可能性をもつ新しい薬剤に曝露する工程；ならびに

(f) 該細胞の生存あるいは該細胞の形態学的特性、機能的特性または生理学的特性および／もしくは分子生物学的特性に対する該可能性をもつ新しい薬剤の効果の存在または非存在を検出し、ここで該細胞の細胞生存特性、形態学的特性、機能的特性または生理学的特性および／もしくは分子生物学的特性を変える効果は、該可能性をもつ新しい薬剤の活性を表す工程、を包含する、方法。

【請求項32】

前記細胞性組成物が、請求項13または請求項14に規定される、請求項29、請求項30または請求項31に記載される方法。 40

【請求項33】

請求項10～15、および28のいずれかに記載される細胞性組成物を産生するキット、または請求項1～9、16～27、および29～32のいずれかの方法を実施するキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する造血細胞を含む細胞性組成物；このような細胞性組成物を産生するための方法；非造血細胞の形 50

態学的特徴、生理学的特徴、機能的特徴、および／または免疫学的特徴を表す細胞へ、本発明の細胞性組成物の細胞を分化させる方法；ならびに細胞性組成物の使用に関する。本発明はまた、造血幹細胞および造血前駆細胞の増殖に対する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

器官移植は、損傷された組織を置換または修復するために、成功して使用されている。しかしながら、移植は、ドナーの適用性、ならびに高い費用および手術への基礎体力により制限された。移植に対して代替的な手法が所望されることは、明らかである。

【0003】

疾病組織へ健康な細胞を移植することは、器官移植に対する代替として提案されている。しかしながら、このような移植片の成功は、注入された細胞の進化段階に依存する。一般的に、成人細胞は、組織へ取り込まれないが、早期の胎性細胞は、安定して統合する。胎性細胞移植片は、倫理的に複雑な問題、ならびに技術的制限および適用制限に起因するため、好ましくない。従って、組織へ統合し得る細胞の代替供給源の必要性がある。特に、一つの必要性は、移植に対する各種の組織の細胞を含む細胞調製物（（１）調製物は患者によって受容され、従って、免疫抑制に関連する障害を回避する、（２）調製物は安全でかつ効果的であり、従って、処置に関する費用および努力を正当化する、そして（３）調製物は、移植中および移植後に有効である）に対して存在する。 10

【0004】

骨髄移植は、造血細胞の機能障害を含み、または、造血細胞を不可逆的に損傷する（例えば、癌に対する化学療法および放射線療法）処置を包含する、多くの疾病に対する治療の共通の様式である。骨髄移植の使用は癌に対してより集中的で、そして有効な化学療法および放射線療法を与えた。しかし、このアプローチは、成功を確実にするためには、十分な幹細胞数を必要とする。従って、対宿主性移植片反応のリスクを減らし、そして移植のために十分な幹細胞数を提供する造血幹細胞の供給源に対する必要性がある。 20

【0005】

本明細書の任意の参考文献の引用は、このような参考文献として本発明に対する先行技術が利用可能であるという承認はない。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

30

【0006】

（発明の要旨）

本発明者らは、インビボおよびインビトロにおいて、多様な組織型の細胞へ分化し得る特有の細胞を同定している。この細胞は、選択された増殖条件下で、臍帯血に由来する造血細胞を増殖することによって産生された。この細胞は、胚性幹細胞と類似の特性を有する。

【0007】

本発明者らはまた、臍帯血由来の造血幹細胞および造血前駆細胞の増殖に対する方法（単一の臍帯から移植のために利用可能な造血幹細胞および造血前駆細胞の数において、重要な増殖を提供する）を開発している。単一の臍帯は、一回の骨髄移植に対して十分な幹細胞を産生し、代表的には、対小児患者である。幹細胞のインビトロでの増殖は、単一の臍帯血回収に対して、可能な使用目的を増大する。幹細胞の増殖は、この処置の形態を非常に手に入れやすくし、そして遺伝子治療に対する臍帯血幹細胞の開発を可能にする。さらに、寛容され得るHLA不適合度は、骨髄よりも臍帯血の方が高い（１）。ドナープールを増大するので、これは、臍帯血バンクの設立において重要である。 40

【0008】

従って、本発明の一つの局面は、異なる型の非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を産生する方法に関する。本発明に従って、この方法は、造血細胞（例えば、臍帯血由来）を獲得し、そしてポジティブセレクションまたはネガティブセレクションにより、造血幹細胞および造血前駆細胞に対する細胞を富化することで 50

開始する。造血幹細胞および造血前駆細胞に対して富化されて生じる細胞調製物は、異なる型の非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を産生するための増殖条件下で、培養される。この新規のプロセスは、インビトロおよびインビボで異なる型の非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する造血細胞の調製物を導く。

【0009】

一つの実施形態において、造血細胞を、異なる型の非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞へ置換するための方法が提供される。造血細胞を非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する新しく作製された細胞へ置換する方法は、造血細胞（例えば、臍帯血由来）を獲得する工程、そして、ポジティブセレクションまたはネガティブセレクションにより、造血幹細胞および造血前駆細胞に対する細胞を富化する工程；ならびに、生じる細胞調製物を増殖条件下にて培養する工程であって、その結果、調製中の細胞は、異なる型の非造血細胞および非造血組織を形成するための潜在力または増強された潜在力を発現させる工程を包含する。

10

【0010】

本発明の別の局面は、富化される造血細胞調製物（インビトロおよびインビボの両方において、多様な組織型の細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を形成し得る造血幹細胞および造血前駆細胞に対して富化される）である。一つの実施形態において、富化される造血細胞調製物は、本質的に、 $CD45^+HLA-ABC^+$ 細胞（HLAクラス1+）を含み、好ましくは $CD45^+HLA-ABC^+Lin^-$ 細胞を含む。

20

【0011】

別の局面において、本発明は、単離された細胞性組成物に関連し、インビトロおよびインビボにおいて造血細胞および非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する内因性細胞を含むか、または本質的に含む。組成物におけるこの細胞は、細胞が非造血細胞を形成することを可能にする変更された分化プログラムを有し得る。この細胞は、非造血細胞の形態学的特徴、生理学的特徴、機能的特徴および／または免疫学的特徴を表す細胞へ分化するための潜在力を有する。この細胞は、胎性マーカーまたは早期非造血組織マーカー（例えば、早期の筋マーカーであるDesmin）によって、さらに特徴付けられ得る。

30

【0012】

一つの実施形態において、本発明の方法によって産生される、異なる型の非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を本質的に含む細胞性組成物が提供される。

【0013】

本発明の特定の局面において、増殖条件下にて、造血幹細胞および造血前駆細胞を含む造血細胞を培養することによって産生される細胞調製物を提供し、好ましくは、 $CD45^+HLA-ABC^+$ 細胞を含む富化される造血細胞調製物であり、さらに好ましくは、 $CD45^+HLA-ABC^+Lin^-$ 細胞を含む富化される造血細胞調製物であり、そして、インビトロおよびインビボの両方において、異なる型の非造血細胞および造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する培養中の細胞を単離することによって産生される細胞調製物を提供する。

40

【0014】

細胞性組成物において非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞は、インビトロまたはインビボにおいて、異なる型の非造血系統（lineage）の細胞および組織へ分化するために、誘導され得る。従って、本発明は、本発明の方法によって産生された非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する造血細胞から、本質的に非造血性の細胞集団を単離する方法に関する。

【0015】

従って、本発明はまた、精製された細胞性組成物、または、異なる型の非造血細胞（非

50

造血細胞系統の細胞へ分化を誘導されている)を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する内因性細胞を含むかまたは本質的に含む、精製された細胞性組成物に関し、好ましくは、非造血細胞の形態学的特徴、生理学的特徴、機能的特徴および／または免疫学的特徴を表す細胞である。分化した細胞調製物は、非造血細胞系統(例えば、筋マーカー、神経マーカー、脂肪細胞マーカー、破骨細胞マーカー、骨芽細胞マーカー、内皮マーカー、星状細胞マーカー、腎マーカー、網膜マーカー、角膜マーカーおよび肝細胞系統マーカー)の遺伝子マーカーの発現によって特徴付けられる。

【0016】

一つの実施形態において、有効量の少なくとも一つの分化因子と組み合わせて、本発明の方法によって産生される非造血細胞を形成するための潜在力または増強される潜在力を有する細胞を含む、細胞性組成物が提供される。

10

【0017】

別の実施形態において、本発明の方法によって産生される非造血細胞を形成するための潜在力または増強される潜在力を有する細胞の子孫である有糸分裂細胞または分化細胞を含む、細胞性組成物が提供される。

【0018】

一つの局面において、本発明は、細胞、細胞調製物および本発明の細胞性組成物を含む培養系を提供する。

【0019】

本発明はまた、基質またはマトリックス(好ましくは、患者への移植に対して適応した基質またはマトリックス)との組み合わせにおいて、細胞、細胞調製物および本発明の細胞性組成物を考察した。この基質は、操作された生体材料または多孔性の組織培養挿入物であり得る。

20

【0020】

本発明はまた、臍帯血由来の造血幹細胞および造血前駆細胞を増殖する方法(好ましくは、選択的に増殖する方法)を提供する。この方法は、(a)増殖条件下において造血幹細胞および造血前駆細胞を含む、臍帯血由来の富化された造血細胞調製物を培養する工程；および(b)増大された数の造血幹細胞および造血前駆細胞を単離する工程、を包含する。「増大された数の造血幹細胞および造血前駆細胞」は、造血幹細胞数および造血前駆細胞数に対して(同じ増殖条件に供されない細胞の、平行コントロール培養において存在する)、少なくとも約2倍の細胞数の増加をいう。本発明はまた、この方法によって獲得される、増殖された造血幹細胞調製物および造血前駆細胞調製物に関する。用語「増殖する」または「増殖」は、造血細胞の増殖を考察する。

30

【0021】

一つの実施形態において、本発明は、造血幹細胞および造血前駆細胞を増殖する方法を提供し、その方法は、(a)臍帯血を獲得する工程、およびポジティブセレクションまたはネガティブセレクションによって、造血幹細胞および造血前駆細胞を富化する工程で、好ましくは、 $CD45^+HLA-ABC^+$ 細胞を富化する工程で、さらに好ましくは、 $CD45^+HLA-ABC^+Lin^-$ 細胞を富化する工程；(b)生じる富化された造血細胞調製物を増殖条件下にて培養する工程；および(c)増大された数の造血幹細胞および造血前駆細胞を単離する工程、を包含する。

40

【0022】

一つの局面において、本発明は、細胞調製物の細胞の存在を同定する方法、および混合細胞集団中の本発明の細胞性組成物の存在を同定する方法を提供し、その方法は：このような細胞へのマーカー(マーカーの存在は、細胞集団における細胞の存在を表している)に、免疫遺伝学的に特異的な抗体またはそのフラグメントに細胞集団を曝露する工程、を包含する。この抗体は、検出可能な標識を含み得る。この方法は、蛍光細胞分析分離または磁気ビーズ分離(magnetic bead separation)を含む選択工程を包含し得る。一つの実施形態において、混合細胞集団は、一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、六つ、七つ、八つ、九つ、十、または十一またはこれ以上、好ましくは全部の以下

50

のマーカー C D 4 5、H L A－A B C、幹細胞因子レセプター、F t l 3 リガンドレセプター、F g f レセプター、胚性幹細胞タンパク質（例えば、O c t 4、段階特異的な胎児性抗原－3（S S E A 3）および／または段階特異的な胎児性抗原－4（S S E A 4））、H o x B 4、F l k－1、C D 3 4 および C D 3 8 と接触される。細胞を同定するこの方法は、本発明の細胞を含む疾患または障害において、診断上の適用を有し得る。この方法は、早期の小児癌、幹細胞基底癌および患者における内因性の幹細胞評価の診断で使用され得る。この方法はまた、本発明の細胞に関連する疾患または障害に対する治療、または本発明の細胞を含む疾患または障害に対する治療を、モニターするために使用され得る。

【0023】

10

本発明の細胞、細胞調製物、および細胞性組成物は、多様な方法（例えば、移植（t r a n s p l a n t a t i o n）または移植（g r a f t i n g））で使用され得、そしてこれらは医薬の分野で多数の用途を有する。非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞、またはこれから分化した細胞は、体の組織、器官、成分または構造体（これらは、外傷、年齢、代謝障害または毒性障害、疾患、特発性の欠失または任意の他の理由に起因して脱落したり損傷される）の置換のために使用され得る。

【0024】

本発明の一つの局面において、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞、またはこれから分化した非造血細胞を含む新規作製細胞性調製物は、非造血細胞を含む障害および疾患を緩和する目的で、細胞療法および遺伝子治療の両方において使用され得る。本発明は、各種医療の適用および研究応用で使用されるためのヒト組織に対する要求を回避する。

20

【0025】

本発明はまた、非造血細胞が関与する状態（特に、非造血細胞における欠乏）を有する患者を処置する方法を提供し、この方法は、患者に非造血細胞を形成するための潜在力を有する細胞（ここで、この細胞は非造血細胞へ分化する）を含む、有効な量の細胞性組成物を移動する工程、または投薬する工程を包含する。

【0026】

本発明はまた、本発明の方法によって産生される非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を含む細胞株（患者において、特定部位に移動する能力および局在する能力を有し、この部位でこれらは、この部位に代表的な非造血細胞へ分化し、そして、これらは、特徴的な組織のパターンの組織へ統合する）を考察する。

30

【0027】

本発明の増殖された造血幹細胞および造血前駆細胞は、造血細胞を含む障害および疾患を緩和する目的で、細胞療法および遺伝子治療の両方に使用され得る。本発明は、造血幹細胞および造血前駆細胞を含む本発明の有効な量の細胞性組成物を患者に移動する工程を包含する、造血細胞が関与する状態を有する患者を処置する方法を考察する。

【0028】

非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞は、このような細胞またはこれから分化した細胞の発達、または活性を調節する可能性をもつ治療剤をスクリーンするために使用され得る。

40

【0029】

本発明の細胞、細胞調製物、および細胞性組成物は、異形のレシピエントへ投薬される免疫原として使用され得る。

【0030】

本発明の細胞、細胞調製物、および細胞性組成物は、疾病のモデル系を調製するために使用され得る。本発明の細胞、細胞調製物、および細胞性組成物はまた、増殖因子、ホルモンなどを産生するために使用され得る。

【0031】

本発明はまた、本発明の細胞、細胞調製物、または細胞性組成物、および薬学的に受容

50

可能なキャリア、賦形剤または希釈剤を含む薬学的組成物を考察する。薬学的組成物は、特定の組織または器官に対して細胞を標的化するための標的因子を含み得る。

【0032】

本発明は、患者自身の造血細胞由来の自家移植のため、非造血細胞を獲得する方法を提供し、その方法は、(a)患者から、(好ましくは、新鮮臍帯血または低温保存の臍帯血から)造血細胞を含むサンプルを獲得する工程；(b)造血幹細胞および造血前駆細胞(好ましくは、 $CD45^+HLA-ABC^+$ 細胞、さらに好ましくは $CD45^+HLA-ABC^+Lin^-$ 細胞)を含む富化した細胞調製物を分離する工程；(b)非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を含む細胞性組成物を産生するために、増殖条件下で細胞を培養する工程、を包含する。

10

【0033】

本発明はまた、再生医療ビジネスを導く方法に関する。なお、本発明はさらに、本発明の造血細胞および非造血細胞を形成するための潜在力を有する細胞の増殖、細胞の分化、細胞の機能または細胞の生存に影響を及ぼす因子を同定する工程を含む幹細胞ビジネスを導く方法に関する。同定された因子は、薬学的な調製物として処方され得、そして販売のために製造、市販および配給され得る。

【0034】

別の局面において、本発明は、本発明の方法によって同定された一つの因子または複数の因子と、本発明の細胞性組成物の細胞とを接触することにより、造血細胞および非造血細胞を形成するための潜在力を有する細胞の増殖、細胞の分化または細胞の生存に影響を

20

【0035】

本発明はまた、患者を処置する方法を考察し、その方法は、造血細胞または非造血細胞の増殖、造血細胞または非造血細胞の分化、造血細胞または非造血細胞の機能または造血細胞または非造血細胞の生存に影響を及ぼす障害を有する患者に対して、本発明の方法に従って同定された、有効な量の因子を投与する工程を包含する。

【0036】

本発明はまた、薬物発見ビジネスを導く方法を考察し、その方法は、本発明の造血細胞および非造血細胞を形成するための潜在力を有する細胞の増殖、細胞の分化、細胞の機能または細胞の生存に影響を与える要因または因子を同定する工程、および、さらに開発するために権利をライセンスする工程を包含する。

30

【0037】

本発明はさらに、薬物の開発を提供する方法を考察し、ここで、本発明の細胞性組成物、またはこれからの有糸分裂もしくはこれから分化した子孫は、非造血細胞または造血細胞の生物学的構成要素(一つ以上のこれらの生物学的構成要素は、開発している薬物の標的である)の供給源として使用される。

【0038】

本発明はまた、バイオアッセイを提供する方法に関連する。

【0039】

一つの局面において、本発明は、本発明の方法を用いて生じた細胞、またはこれらの細胞の子孫である有糸分裂細胞または分化細胞を含むキットを特徴とする。

40

【0040】

本発明はまた、非造血細胞の移植のためのキットに関し、このキットは、培地を有するフラスコおよび本発明の細胞、細胞調製物、または細胞性組成物を含む。

【0041】

本発明はまた、合理的な薬物設計において、細胞性組成物を使用する方法に関する。

【0042】

一つの局面において、本発明は、合理的な薬物設計に対するキットに関し、このキットは、本発明のプロセスにより獲得される非造血細胞を含む。一つの実施形態において、このキットは、肝細胞および毒性アッセイにおけるこれらの細胞の使用に関する指示書を含

50

む。別の実施形態において、このキットは、腸管細胞および吸収アッセイにおけるこれらの細胞の使用に関する指示書を含む。

【0043】

なお、本発明の別の局面は、細胞性組成物を産生するためのキット、または増殖された造血幹細胞調製物または造血前駆細胞調製物を産生するキットであり、このキットは、インビトロおよびインビボの両方において、多様な組織型の細胞へ分化し得る細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を含む。

【0044】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

本発明に従って、当業者の間で、従来の分子生物学、微生物学および組換えDNA技術を使用され得る。このような技術は、文献で十分に説明される。例えば、Sambrook, Fritsch, & Maniatis (2); DNA Cloning: A Practical Approach, I巻およびII巻 (D. N. Glover編、1985) (3); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait編、1984) (4); Nucleic Acid Hybridization B. D. HamesおよびS. J. Higgins編 (1985) (5); Transcription and Translation B. D. HamesおよびS. J. Higgins編 (1984) (6); Animal Cell Culture R. I. Freshney編 (1986) (7); Immobilized Cells and enzymes IRL Press, (1986) (8); ならびにB. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) (9)を参照のこと。本発明はまた、当該分野で公知である、免疫学において標準的な方法 (例えば、Stitesら (10); ならびにMishellおよびShigi (11)に記載) を使用し得る。

【0045】

便宜上、本明細書および特許請求の範囲で使用された特定の用語を以下にまとめる。

【0046】

「患者」とは、動物、好ましくはヒトをいい、本発明の細胞、調製物および組成物を用いる処置 (予防的処置を含む) が提供される。特定の動物 (例えば、ヒト患者) に対して特異的であるこれらの状態または疾病状態の処置について、この用語は、特定の動物をいう。「ドナー」とは、造血細胞 (特に、患者に使用される臍帯血) を提供する個体 (動物 (ヒトを含む)) をいう。

【0047】

「有効量」とは、意図した結果 (造血幹細胞および造血前駆細胞の増殖を含む) を生じさせるか、または本発明の細胞、調製物および組成物を用いて疾患または状態を処置するか、または、処置される患者への細胞の移植を実施するのに有効な成分 (増殖因子、細胞、調製物または組成物) の濃度をいう。

【0048】

用語「投与する」または「投与」とは、本発明の細胞、調製物または組成物が、処置目的のために、患者内に送達されるプロセスをいう。細胞、調製物または組成物は、非経口 (例えば、静脈内および動脈内、ならびに他の適切な非経口経路)、経口、皮下、吸入または経皮を含む多くの投与方法で投与され得る。本発明の細胞、調製物および組成物は、患者の臨床状態、投与部位および投与方法、用量、患者の年齢、性別、体重および医師に公知である他の因子を考慮して、適切な医療に従って投与される。

【0049】

用語「移植 (transplanting、transplantation、grafting、およびgraft)」は、本発明の細胞、調製物および組成物が患者の体内部位に送達されるプロセスを記載するために使用され、患者の体内では、細胞は、好ましい効果 (例えば、患者組織の損傷修復、疾患、損傷または外傷、あるいは遺伝的損傷または例えば、事故や他の活動によって引き起こされる器官や組織に対する環境的損傷の処置

）を示すことを意図される。細胞、調製物、および組成物はまた、移植をもたらすために、体内の適切な領域への細胞移動に依存して、任意の投与様式によって体内の離れた領域に送達され得る。

【0050】

用語「本質的に」は、少なくとも20+%、30+%、40+%、50+%、60+%、70+%、80+%、85+%、90+%、または95+%有効、より好ましくは、少なくとも98+%有効、最も好ましくは、99+%有効である細胞の集団または方法をいう。従って、所定の細胞集団を富化する方法は、標的細胞集団の少なくとも約20+%、30+%、40+%、50+%、60+%、70+%、80%、85%、90%、または95%を富化し、最も好ましくは、細胞集団の少なくとも約98+%、最も好ましくは細胞集団の約99+%を富化する。特定の実施形態において、本発明の富化された造血細胞集団中の細胞は、本質的にCD45⁺HLA-ABC⁺細胞を含むか、または好ましくはCD45⁺HLA-ABC+Lin⁻細胞を含む。他の実施形態において、本発明の細胞組成物は、本質的に、非造血細胞を形成する能力または増強した能力を有する細胞を含む。

10

【0051】

用語「単離された」または「精製された」は、天然の状態から「ヒトの手で」変えられた（すなわち、天然に存在する全てのものは、その本来の環境から取り出される場合、単離されたと定義される）ことまたは両方をいう。ある局面において、細胞の集団または組成物は、それが天然において関連され得る細胞および材料を実質的に含まない。「実質的に含まない」または「実質的に精製された」によって、集団の少なくとも50%が標的細胞であること、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、そしてさらによりこの好ましくは少なくとも90%が、他の細胞を含まないことを意味する。細胞の集団または組成物の純度は、当該分野で周知の適切な方法で評価され得る。

20

【0052】

用語「線維芽細胞増殖因子レセプター」すなわち「FGFレセプター」すなわち「FGF-R」は、関連した増殖因子リガンドのファミリー、つまり線維芽細胞増殖因子（FGF）ファミリーと結合するタンパク質をいう。この用語は、4つのFGF膜貫通型タンパク質チロシンキナーゼ（12、50）、および細胞結合型または分泌型であり得るその改変体を含む。FGFR1およびFGFR2は、同じ親和性で、酸性FGF/FGF1および塩基性FGF/FGF2と結合する（13）。FGFRは、中程度の親和性から高度の親和性でFGF1およびFGF4（hst/kfgt）と結合する一方で、FGFR3は、FGF1およびFGF4とのみ結合する（14、15）。この用語はまた、FGFR6、FGFR16、FGFR17、FGFR18およびFGFR19を包含する。線維芽細胞増殖因子およびそれらのレセプターについて記載した、Moroni Eら（51）およびGoldfarb M（52）を参照のこと。

30

【0053】

用語「flt3レセプター」または「flt3」は、構造的に関連したチロシンキナーゼレセプターのファミリーに属するタンパク質をいい、このファミリーは、5つの細胞外免疫グロブリン（Ig）様ドメインおよび1つの細胞内チロシンキナーゼドメインを含む（Smallら、Proc. Natl. Acad. Sci. 91:459~463（1994））。FLT3の総説についてはGilliland DGおよびGriffin JD.（53）を参照のこと。

40

【0054】

幹細胞因子（SCF）レセプター〔同意語：CD117タンパク質、SCFレセプターまたはc-kitレセプター（17）〕は、血液幹細胞の形質膜に局在し、そして癌遺伝子c-kitによってコードされる（18）。幹細胞因子の総説については、Smith NAら（54）を参照のこと。

【0055】

「遺伝子治療」は、疾患または障害の治療的処置のための細胞内への新規の遺伝情報の

50

移入および安定な挿入をいう。外来遺伝子は、細胞集団中に移入遺伝子を導入するために、増殖する細胞内に移される。従って、本発明の細胞および組成物は、遺伝子移入の標的であり得る。なぜなら、それらは、外来遺伝子を潜在的に発現する種々の系統を生成するからである。

【0056】

本明細書中で使用される場合、「造血細胞」は、血液細胞（リンパ球系統、骨髄系統および赤血球系統の細胞を含む）の産生に関連する細胞をいう。例示的な造血細胞としては、造血幹細胞、始原幹細胞、初期先祖細胞、CD34⁺細胞、間葉系統、骨髄様系統、リンパ球系統および赤血球初期系統の細胞、骨髄細胞、血液細胞、臍帯血細胞、間質細胞、および当業者に公知の他の造血前駆細胞が挙げられる。造血細胞は、新鮮血液、再構築された低温保存血液、あるいはその新鮮画分または再構築画分から得られ得る。

10

【0057】

造血細胞（および本発明の調製物および組成物における細胞）は、好ましくは哺乳動物細胞であり、より好ましくは、この細胞は、霊長類、ブタ、ウサギ、イヌまたはげっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）起源である。最も好ましくは、細胞は、ヒト起源である。造血細胞は、胎仔、子供、青年、または成体から入手され得る。

【0058】

造血細胞の最も望ましい供給源は、臍帯血（UCB）である。「臍帯血」は、一般的に、新生児、または胎児から入手される血液をいう。好ましい実施形態において、臍帯血は、臍帯または新生児の胎盤から入手された血液をいう。UCBから得た造血細胞は、いくつかの利点（より侵襲性の低い収集およびより重篤度の低い対宿主移植片（GVH）反応）を提供する（19）。臍帯血の使用はまた、胚性幹細胞の供給源としてのヒト胚の使用を排除する。臍帯血は、臍帯から直接ドレナージによって、そして／または根および拡張静脈にて、送達された胎盤から針吸引によって、入手され得る。

20

【0059】

「非造血細胞」としては、非血液細胞および非リンパ球細胞（筋肉細胞、神経細胞、脂肪細胞、破骨細胞、骨芽細胞、内皮細胞、星状細胞、膵臓細胞（例えば外分泌または内分泌膵臓細胞）、網膜細胞、腎臓細胞、結合組織細胞、角膜細胞、および肝臓細胞が挙げられるが、それらに限定されない）が挙げられる。

【0060】

「非造血細胞を形成する能力または増強された能力を有する細胞」は、初期段階の非造血細胞（例えば、幹細胞、前駆細胞、または先祖非造血細胞）の少なくとも1つの表現型的特徴、および、好ましくは胚性幹細胞の少なくとも1つの表現型的特徴を示す、細胞、好ましくは、造血細胞をいう。このような表現型的特徴としては、初期段階の非造血細胞に特異的な1つ以上のタンパク質の発現、または初期段階の非造血細胞または胚性幹細胞に特異的な生理学的、形態学的、免疫学的、または機能的特徴（例えば、Oct4、段階特異的胚性抗原3（SSEA3）、および／または段階特異的胚性抗原4（SSEA4））が挙げられる。

30

【0061】

非造血細胞を形成する能力または増強された能力を有する細胞は、第1に造血細胞入手し、そして造血幹細胞および先祖細胞（「富化された造血細胞調製物」として本明細書中でいわれることもある）について細胞を富化することで生成される。用語「幹細胞」は、インビトロ、インビボまたはエクスピボのいずれかで本質的に無制限の増殖ができ、そして他の細胞型への分化し得る未分化細胞をいう。用語「先祖細胞」は、分化によって幹細胞から誘導されて、そしてより成熟した細胞型にさらに分化できる細胞である。当業者に公知であるネガティブおよびポジティブの選択方法は、造血細胞の富化のために使用され得る。例えば、細胞は、蛍光活性化細胞分別、または特定の細胞表面抗原（例えば、CD45）を有する細胞と結合する磁気ビーズを用いて、細胞表面抗原に基づいて分別され得る。ネガティブセクションカラムは、系統特異的表面抗原を発現する細胞を除去するために使用され得る。

40

50

【0062】

本発明の1局面において、富化された造血細胞調製物は、調製物中の細胞が以下のように特徴付けられる場合に提供される：

- (a) $CD45^+HLA-ABC^+$ ；
- (b) Lin^- ；
- (c) 幹細胞因子レセプター⁺；
- (d) $FLT3$ リガンドレセプター⁺；
- (e) FGF レセプター⁺；
- (f) $CD34^+$ ；
- (g) $CD38^+$ ；および
- (h) $CD33^+$ 。

10

【0063】

ある実施形態において、(a)および(b)；または(a)、(c)、(d)および(e)、および必要に応じて(b)、(f)、(a)、および／または(h)によって特徴付けられた細胞を含む、富化された造血細胞調製物が提供される。

【0064】

富化された造血幹細胞調製物は、少なくとも70%、80%、90%、95%、98%または99%の $CD45^+HLA-ABC^+Lin^-$ 細胞、70%、80%、90%、95%、98%、または99%の幹細胞因子レセプター⁺、70%、80%、90%、95%、98%、または99%の $Flt3$ リガンドレセプター⁺、70%、80%、90%、95%、98%、または99%の FGF レセプター⁺である細胞を含み得、そして富化された造血幹細胞調製物は、少なくとも50%～80%の $CD34^+$ 細胞、少なくとも50%～80%の $CD38^+$ 細胞、および／または少なくとも50%の $CD33^+$ 細胞を、必要に応じて含み得る。

20

【0065】

ある実施形態において、以下の細胞を含む本発明の富化された細胞集団が提供される：

(a) 少なくとも50%の $CD34^+$ 細胞、好ましくは、60%～95%（の細胞）、より好ましくは、65%～90%（の細胞）または最も好ましくは、約65%の $CD34^+$ 細胞；

(b) (a)における細胞の約5%～50%、好ましくは、5%～25%；より好ましくは、5%～15%、最も好ましくは、約10%が $CD33^-$ および $CD38^-$ である；

30

(c) 少なくとも50%の $CD34^-$ 、好ましくは、15%～40%、より好ましくは15%～40%、または最も好ましくは、約35%の $CD34^+$ 細胞；

(d) (c)中の細胞の約5%～50%、好ましくは5%～25%、より好ましくは5%～15%、最も好ましくは、約10%（の細胞）が、 $CD33^+$ または $CD38^+$ であり、そして残りの細胞は、全ての造血細胞表面抗原に対してネガティブである；

(e) 約5%～50%、好ましくは5%～25%、より好ましくは、5%～20%、最も好ましくは、約5%が $CD33^+$ であり；そして

(f) 約20%～60%、好ましくは25%～55%、より好ましくは35%～45%、最も好ましくは40%が $CD38^+$ である。

40

【0066】

富化された造血細胞調製物は、増殖条件下で培養され得、非造血細胞および非造血組織の異なる型を形成する能力または増強された能力を有する細胞を産生する。造血幹細胞および先祖細胞の富化された調製物は、インビトロまたはインビボ、好ましくはインビトロで培養され得る。増殖条件は、非造血細胞および非造血組織を形成する能力または増強された能力を有する細胞を生じるような条件である。

【0067】

増殖条件は、細胞が組織能または増強された組織能力を発達させるために十分な細胞周期を完了できる十分な時間にわたって、1つ以上の陽性増殖因子の存在下で細胞培養する工程を包含する。陽性増殖因子は、細胞増殖を促進し、そして維持する増殖因子である。

50

分化を促進する増殖因子（例えば、 $TGF\beta$ および $TNF\alpha$ ）は、本発明の方法の増殖条件における使用には適さない。

【0068】

陽性増殖因子の起源はヒトであり得るか、または、ヒト細胞で活性である場合、他の哺乳動物種から誘導され得る。以下は、本発明で使用され得る陽性増殖因子の例を表している：FGF-4 および FGF-2 を含む線維芽細胞増殖因子（FGF）ファミリーの全てのメンバー、上皮増殖因子（EGF）、幹細胞因子（SCF）、トロンボポエチン（TPO）、FLT-3 リガンド、インターロイキン-3（IL-3）、インターロイキン-6（IL-6）、神経増殖因子（NGF）、VEGF、顆粒球マクロファージ増殖因子（GM-CSF）、HGF、Hox ファミリー、および Notch。本発明の好ましい実施形態において、細胞は、EGF 非存在下で培養される。

【0069】

好ましくは、本発明において使用される陽性増殖因子または増殖因子の組み合わせは、線維芽細胞増殖因子（FGF）（例えば、FGF-4 および FGF-2）、IL-3、幹細胞因子（SCF）、FLT3 リガンド、トロンボポエチン（TPO）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、および神経増殖因子（NGF）である。本発明の実施形態において、FGF（例えば、FGF-4 または FGF-2）は、SCF および FLT3 リガンドと共に使用される；FGF は、TPO と使用される；または TPO は、SCF および FLT3 リガンドと共に使用される。

【0070】

本発明の一つの局面において、増殖条件は、非造血細胞、例えば、破骨細胞、骨芽細胞、筋細胞、内皮細胞、肝細胞、星状細胞、神経細胞、および／または脂肪細胞を生成するための細胞性組成物を調製するために、FGF-4 または FGF-2、SCF および FLT3 リガンドを使用することを包含する。別の局面において、増殖条件は、非造血細胞、例えば内皮細胞を生成するための細胞性組成物を調製するために、TPO、SCF および FLT-3 リガンドを使用することを包含する。別の局面において、増殖条件は、非造血細胞、例えば内皮細胞または他の細胞を生成するための細胞性組成物を調製するために、NGF、SCF および FLT-3 を使用することを包含する。

【0071】

増殖因子は、等モル以上のグリコサミノグリカン（例えばヘパリン硫酸）との組み合わせで使用され得る。

【0072】

増殖因子は、市販され得るか、または組換え DNA 技術によって生成され、そして各種の程度で精製され得る。例えば、増殖因子は、いくつかの業者、例えば、Genzyme（Framingham, Mass.）、Genentech（South San Francisco, Calif.）、Amgen（Thousand Oaks, Calif.）、R&D Systems（Minneapolis, Minn.）および Immunex（Seattle, Wash.）から、市販されている。いくつかの増殖因子は、標準的な生化学の技術によって、細胞株の培養培地から精製され得る。従って、野生型増殖因子または精製された増殖因子（例えば、組換えにより生成されるか、または変異体の）のように、類似の生物学的活性を有する分子は、本発明の趣旨および範囲内で使用されることを意図している。

【0073】

陽性増殖因子の効果的な量は、培養培地で使用される。概して、培養培地における陽性増殖因子の濃度は、 $10 \sim 150 \text{ ng/ml}$ であり、好ましくは $25 \sim 100 \text{ ng/ml}$ である。増殖因子は、代表的には、高い増殖レベルおよび幹細胞表現型の維持を保持するために、十分な間隔で適用される。ある実施形態において、増殖因子は、約 2～4 回／週、好ましくは 2～3 回／週で適用される。

【0074】

培養培地は、馴化培地、非馴化培地、または胚性幹細胞培地を含有し得る。適した馴化

培地の例は、胚性線維芽細胞（例えば、ヒト胚性線維芽細胞またはマウス胚性線維芽細胞）を用いて馴化された、IMDM、DMEMまたはαMEMを含むか、もしくは等価な培地である。適した非馴化培地の例は、イスコブ改変ダルベッコ培地（IMDM）、DMEMもしくはαMEM、または等価な培地を含む。培養培地は、血清（例えば、ウシ血清、胎児ウシ血清、子ウシ血清、ウマ血清、ヒト血清または人工代用血清〔例えば、1%ウシ血清アルブミン、10 μg/ml ウシ膵インスリン、200 μg/ml ヒトトランスフェリン、10⁻⁴ M β-メルカプトエタノール、2 mM L-グルタミンおよび40 μg/ml LDL（低密度リポタンパク質）〕を含有し得るか、またはそれは無血清であり得る。

【0075】

10

ある実施形態において、培養培地は、細胞表面に結合し得る、血清タンパク質または生物分子がない、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を提供するために、無血清である。このような条件で培養された細胞は、新規の抗原性部位を潜在的に露出している非造血細胞を提供し得る。このような細胞は、免疫原として有用であり得る。従って、本発明は、細胞性組成物、または無血清培地において単離および維持される有糸分裂細胞もしくは分化細胞を提供する。

【0076】

増殖条件は、十分な時間にわたり、富化された細胞調製物を培養することを必要とし、その結果、この調製物における細胞は、非造血細胞および組織を形成するための潜在力または増強された潜在力を発達させる。一般的に、細胞は維持され、その結果、この細胞は約1~100細胞周期を終え、好ましくは5~75細胞周期であり、さらに好ましくは2~50細胞周期、2~40細胞周期または2~20細胞周期、最も好ましくは少なくとも約2~10細胞周期または4~5細胞周期である。これは、代表的に、培養において約4~40日に相当し、好ましくは培養において約2~20日であり、さらに好ましくは培養において少なくともまたは約2~15日もしくは4~10日であり、最も好ましくは培養において少なくとも約4~8日である。

20

【0077】

富化された造血細胞調製物に栄養供給する頻度は、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞の生存および細胞の増殖を促進するために選択される。ある実施形態において、細胞は、1~2回/週で栄養供給される。細胞は、全体の培養培地を新しい培地で置換することにより、栄養供給され得る。

30

【0078】

培養中の細胞は、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞の生存および細胞の増殖を促進するための頻度において、造血幹細胞および造血前駆細胞（例えば、CD45⁺HLA-ABC⁺細胞）を選択され得る。本発明の方法の好ましい実施形態において、造血幹細胞および造血前駆細胞（例えば、CD45⁺HLA-ABC⁺細胞）を増加させた細胞は、一定間隔で再選択され、好ましくは1週間に1回であり、当該分野で公知の、そして本明細書に記載されるポジティブセレクション技術またはネガティブセレクション技術による。

【0079】

40

本発明の方法は、大スケールで行われ得、例えば、本発明の細胞性組成物は、バイオリアクターで単離および/または増殖され得る。

【0080】

本発明の方法は、インビトロおよびインビボにおいて造血細胞および非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞集団を含む、新しく作製された細胞性組成物を導く。細胞は、非造血細胞を形成することを可能にする、変化した分化プログラムを有し得る。細胞は、非造血細胞の形態学的特徴、生理学的特徴、機能的特徴および/または免疫学的特徴を表す細胞へ、分化する潜在能力を有し得る。細胞は、さらに、胚性組織マーカーまたは早期非造血組織マーカー（例えば、早期の筋マーカーDesmin）によって、特徴付けられ得る。

50

【0081】

本発明の一つの局面において、単離された細胞組成物および精製された細胞組成物が提供され、以下の工程または以下の一つ以上の工程によって特徴付けられる細胞を含むかまたは本質的に含む：

(a) $CD45^+HLA-ABC^+$

(b) 造血細胞または造血前駆細胞へ分化し得る；

(c) 一つ以上、二つ以上、三つ以上、四つ以上、五つ以上、または六つ以上の異なる非造血細胞型（間葉幹細胞または間葉前駆細胞、神経幹細胞または神経前駆細胞、または内皮幹細胞または内皮前駆細胞を含む；特に、例えば、内皮細胞、破骨細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、星状細胞および神経細胞）へ分化し得る；

10

(d) 丸型および非接着の増殖必要条件；

(e) 幹細胞因子レセプター (KIT)⁺；

(f) FLT3リガンドレセプター⁺；

(g) FGFレセプター⁺；

(h) 胚性幹細胞タンパク質、例えば、Oct4、Stage Specific Embryonic Antigen-3 (SSEA3)、および／または Stage Specific Embryonic Antigen-4 (SSEA4) の発現；

(i) $HoxB4^+$ ；

(j) $Flk-1^+$ ；

(k) $CD34^{\pm}$ ；

20

(l) 非腫瘍形成性、すなわち、細胞が新生物または腫瘍を生じないか、あるいは新形成および癌がない；

(m) $CD38^{\pm}$ ；および

(n) 臍帯血から誘導される。

【0082】

細胞性組成物は、特徴 (a) および (c)；特徴 (a)、(b) および (c)；特徴 (a)、(b)、(c) および (d)；特徴 (a)、(b)、(c)、(d) および (e)；特徴 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) および (g)；特徴 (a) から (e)；特徴 (a) から (f)；特徴 (a) から (g)；特徴 (a) から (h)；特徴 (a) から (i)；特徴 (a) から (j)；特徴 (a) から (j) および (k)；特徴 (a) から (j) および (l) および (k)；特徴 (a) から (j) および (l) および (m)；特徴 (a) から (j) および (l)、(m) および (n)；または特徴 (a) から (i) および (k)；特徴 (a) から (i) および (k) および (l)；特徴 (a) から (i) および (k)、(l) および (m)；特徴 (a) から (i) および (k)、(l)、(m) および (n) を有する細胞を含有し得る。好ましい実施形態において、富化細胞調製物が提供され、特徴 (a)、(b)、(c)、(d) および (e) を有する細胞を含む。

30

【0083】

本発明の細胞性組成物はまた、本明細書に記載されるように、組成物の細胞の一つ以上の特徴に基づいてポジティブセレクション技術またはネガティブセレクション技術を用いて調製され得る。

40

【0084】

非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞は、インビトロまたはインビボにおいて、非造血系統の細胞および組織へ分化するために誘導され得る。これらの細胞はまた、造血細胞（例えば、幹細胞および／または前駆細胞）を提供し得、好ましくは、増殖された造血細胞の調製物を提供し得る。

【0085】

非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞は、非造血系統の細胞へ分化するために誘導され得、好ましくは非造血細胞の形態学的特徴、生理学的特徴、機能的特徴および／または免疫学的特徴を表す細胞に誘導され得る。分化した細胞

50

調製物からの細胞は、非造血系統の遺伝子マーカー（例えば、筋肉、神経細胞、脂肪細胞、破骨細胞、骨芽細胞、内皮細胞、星状細胞、臍細胞、網膜細胞、腎細胞、結合組織細胞および肝細胞のマーカー）の発現、または非造血系統の細胞の生理学的特徴、免疫学的特徴および／または機能的特徴によって特徴付けられ得る。例えば、非造血細胞は、組織特異的なマーカー、例えば、Myo-D（筋肉）、FLK-1（内皮）、グリア線維酸性タンパク（星状細胞）、グルカゴン（ α 細胞）、インスリン（臍島 β 細胞）、ソマトスタチン（臍島 δ ）、臍ポリペプチド（臍島PP細胞）、サイトケラチン（CK）、ムチンMUC1、カルボニックアンヒドラーゼII、および炭水化物抗原19.1（管細胞）、およびNESTIN（神経）の発現に対してスクリーンされ得る。

【0086】

10

本発明の一つの局面において、本発明は、本発明の細胞性組成物または方法を用いて、単離された細胞調製物および精製された細胞調製物（筋細胞、神経細胞（ニューロン、星状細胞、I型およびII型、および希乏突起神経膠細胞）、脂肪細胞、破骨細胞、骨芽細胞、内皮細胞、臍細胞（腺房の、管の、臍島 α 、臍島 β 、臍島 δ および臍島PP）、腎細胞、網膜細胞、角膜細胞、結合組織細胞または肝細胞を含む）を生成するための方法を提供する。

【0087】

分化細胞は、他の系統からの細胞において優先的に発現されるcDNAによって相対的に汚染していないcDNAライブラリーを調製するために使用され得、そして、それらは、非造血細胞特定マーカーに対して特異的である抗体を調製するために使用され得る。

20

【0088】

ある実施形態において、本発明の細胞性組成物における細胞は、機能的な破骨細胞へ細胞を分化するために、破骨細胞の分化培地（例えば、血清含有のGM-CSFを有する培地）で培養され得る。破骨細胞は、カルシウムクエン酸塩基質を再吸収する細胞の能力によって同定され得る。破骨細胞は、骨芽細胞特異的な分化培地で培養することにより、骨芽細胞へ変換され得る。骨芽細胞はまた、骨芽細胞の分化培地（例えば、デキサメタゾン、リン酸グリセロール、アスコルビン酸および血清を有する α MEM）での本発明の細胞または細胞性組成物を培養することによって生成され得る。骨芽細胞は、組織特異的なマーカー、例えば、CBF α の発現によって同定され得る。

【0089】

30

機能的な神経細胞は、神経細胞の形成を誘導する分化因子（例えば、神経増殖因子）を用いて、本発明の細胞性組成物の細胞を培養することにより、獲得され得る。神経細胞は、その細胞の神経細胞への分化を誘導する培地（例えば、血清およびレチノイン酸を有するDMEM培地）で、本発明の細胞性組成物の細胞を増殖することにより、獲得され得る。神経細胞は、神経特異的なマーカー、例えば、神経フィラメント、NESTIN、およびParkinの発現に基づいて同定され得る。

【0090】

筋細胞は、筋細胞の形成を誘導する分化因子を用いて、本発明の細胞性組成物の細胞を培養することにより、生成され得る。本発明の細胞性組成物の細胞は、特殊な筋肉特異的な細胞培養培地（筋細胞を形成するために、細胞の分化を誘導する分化因子を含有し得る）で、培養され得る。筋細胞は、成熟筋細胞マーカー、例えば、Myo-Dおよび筋特異的なアクチンの発現により、同定され得る。

40

【0091】

内皮細胞は、内皮細胞の形成を誘導する分化因子を用いて、本発明の細胞性組成物の細胞を培養することにより、生成され得る。本発明の細胞性組成物の細胞は、特殊な内皮細胞培養（内皮細胞を形成するために、細胞の分化を誘導する分化因子を含有し得る）で、培養され得る。内皮細胞は、FLK-1および／またはCD31の発現に基づいて同定され得る。

【0092】

肝細胞は、肝細胞の形成を誘導する分化因子（例えば、n-ブチレート）を用いて、本

50

発明の細胞性組成物の細胞を培養することにより、生成され得る。本発明の細胞性組成物の細胞は、特殊な細胞培養（肝細胞を形成するために、細胞の分化を誘導する分化因子を含有し得る）で、培養され得る。肝細胞は、C Y P 1 A 2、 α -フェトプロテイン、アルブミン、C K 1 9、および／または I C A M - I の発現に基づいて同定され得る。

【0093】

星状細胞は、星状細胞の形成を誘導する分化因子（例えば、G-5 星状細胞増殖補充物）を用いて、本発明の細胞性組成物の細胞を培養することにより、生成され得る。本発明の細胞性組成物の細胞は、特殊な細胞培養（星状細胞を形成するために、細胞の分化を誘導する分化因子を含有し得る）で、培養され得る。星状細胞は、グリア線維酸性タンパク質（G F A P）の発現に基づいて同定され得る。

10

【0094】

脂肪細胞は、脂肪細胞の形成を誘導する分化因子を用いて、本発明の細胞性組成物の細胞を培養することにより、生成され得る。本発明の細胞性組成物の細胞は、特殊な細胞培養（脂肪細胞を形成するために、細胞の分化を誘導する分化因子を含有し得る）で、培養され得る。脂肪細胞は、S u d a n I V 染色陽性またはオイルーオーレッドでの染色陽性に基づいて同定され得る。

【0095】

同様に、腎細胞、網膜細胞、角膜細胞、および結合組織細胞は、これらの細胞の形成を誘導する分化因子を用いて、本発明の細胞性組成物の細胞を培養することにより、生成され得るか、または、これらは、これらの細胞を形成するために、分化を誘導する特殊な細胞培養で、培養され得る。これらの細胞は、細胞特異的マーカーの発現に基づいて同定され得る。

20

【0096】

本明細書に記載されているように、選択された非造血細胞への細胞分化後、この細胞は、主に非造血細胞からなる細胞集団を獲得するために、分離され得る。これは、組織特異的細胞表面マーカーを同定するために抗体を用いた非造血細胞のポジティブセレクション、または造血細胞特異的マーカーを用いたネガティブセレクションによって実行され得る。

【0097】

本発明に従って、造血幹細胞および造血前駆細胞の増大は、本明細書に記載されるような、増殖条件下で実施され得る。概して、非増殖細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を生成するために、細胞を培養するのに使用される同一の培養条件が、使用され得る。造血幹細胞および造血前駆細胞を増大するための典型的なプロトコルは、実施例に提供される。

30

【0098】

（細胞の改変）

本発明の細胞調製物または細胞性組成物は、天然で、またはインビボもしくはインビトロでの遺伝子工学技術のいずれかにより、遺伝子的に改変している（形質導入されるかまたはトランスフェクトされる）細胞から誘導され得るか、またはこの細胞を含有し得る。

【0099】

本発明の細胞調製物および組成物中の細胞は、細胞（獲得される細胞）における遺伝子へ変異を導入することにより、または、細胞へトランスジーンを導入することにより改変され得る。挿入変異または欠失変異は、標準的な技術を用いて、細胞において導入され得る。トランスジーンは、従来技術、例えば、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウム共沈殿、D E A E デキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション、またはマイクロインジェクションを通じて、細胞へ導入され得る。細胞を形質転換およびトランスフェクトするための適切な方法は、S a m b r o o k ら、（2）および他の実験書で見出され得る。例によって、トランスジーンは、適切な発現ベクター（コスミド、プラスミド、または改変されたウイルス（例えば、複製不完全性レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルス）を含むが、これらに限定されない

40

50

）を用いて、細胞へ導入され得る。トランスフェクションは、ウイルス生成細胞（20、21）の単層上に細胞を培養することを包含する標準的な方法を用いて、容易にかつ効率的に獲得される。

【0100】

選択マーカーをコードする遺伝子は、本発明の細胞調製物または組成物の細胞へ、組み込まれ得る。例えば、タンパク質、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、または、蛍光タンパク質マーカーをコードする遺伝子は、細胞へ組み込まれ得る。蛍光タンパク質マーカーの例は、クラゲ *A. victoria* 由来の緑色蛍光タンパク質（GFP）であるか、または、脊椎動物細胞において発現した場合に、蛍光特性を保持する改変体である。（例えば、参考文献22～24に記載されるGFP改変体；Clontech Palo Alto, CAから市販されるEGFP）。

10

【0101】

本発明の別な局面は、本発明の細胞調製物および組成物中の細胞またはこれらに由来する細胞が、インビトロまたはインビボにおいて、細胞中に通常生物学的な有意な量で生成されないか、または少量で生成されるが、発現の調節が治療効果を導くという状況で生成する、ポリペプチド、ホルモンおよびタンパク質を生成するような様式において、本発明の細胞調製物および組成物中の細胞を遺伝子操作することに関する。例えば、細胞は、骨吸収を特異的に阻害する分子を発現するが、そうでなければ破骨細胞の骨への結合を妨げない遺伝子を用いて操作され得るか、または、細胞は、通常注入される用量と適合するレベルで、インスリンを発現する遺伝子を用いて操作され得る。あるいは、細胞は、改変され得、その結果、正常に発現されるタンパク質が、さらに低いレベルで発現される。次いで、これらの産物は、周囲の培地へ分泌されるか、または、細胞から精製される。この方法で形成された細胞は、発現された基質の連続短期間生成システムまたは連続長期間生成システムとして働き得る。

20

【0102】

従って、本発明のこの局面に従って、非造血細胞を形成するための潜在力または増強される潜在力を有する細胞は、目的の遺伝物質で改変され得る。改変された細胞は、適切な条件下において、インビトロで培養され得、その結果、これらの細胞は特定の非造血細胞へ分化する。非造血細胞は、遺伝子発現の産物を発現し得るか、または発現産物を分泌し得る。発現された産物が有益な効果を有する場合、これらの改変された細胞は、標的組織へ投与され得る。

30

【0103】

さらなる実施形態において、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する形質導入細胞は、遺伝子産物を発現する非造血細胞へ分化するために、インビボで誘導され得る。例えば、形質導入細胞は、形質導入遺伝子を有する非造血細胞の産物を誘導するために、投与され得る。細胞は、互いに混合されて、または別々に投与され得、そして標的領域へ送達され得る。細胞は、静脈内へ導入され得、そして標的領域へ向かい得る。あるいは、細胞は、単独で使用され得、そしてインビボで分化させ得る。

【0104】

従って、遺伝子の発現が治療効果を有する場合、遺伝子は、細胞へ導入され得、次いで、それはレシピエントへ注射され得る。例えば、破骨細胞は、インビボで減少させた活性を有するように、遺伝的に操作され得る。適切な遺伝子は、例えば、血清カルシウムの反応性、エストロゲン分泌および骨再吸収の分野において、骨粗鬆症の調節において役割を果たす。インスリン遺伝子は、骨髄および末梢血での一定のインスリン治療の用量を提供するために、血液幹細胞へ導入され得る。

40

【0105】

この技術は、必須遺伝子のさらなるコピーを生成して、インビボにおいて、ある遺伝子産物の非造血細胞による発現の増強を与えるために使用され得る。これらの遺伝子は、例えば、ホルモン、マトリックスタンパク質、細胞膜タンパク質、サイトカイン、接着分子

50

、または組織の修復において重要な「再構築 (r e b u i l d i n g) 」タンパク質であり得る。

【0106】

(適用)

本発明の細胞調製物および組成物は、多様な方法 (例えば、移植) において使用され得、そして、これらは、医学の領域で多数の用途を有する。これらは、外傷、年齢、代謝または毒性傷害、疾患、特発喪失、または任意の他の原因に起因する身体組織、器官、欠失または損傷した成分または構造の置換のために使用され得る。

【0107】

移植 (t r a n s p l a n t a t i o n) または移植 (g r a f t i n g) は、本明細書で使用されるように、本発明に従って細胞調製物を単離する工程、および、調製物中の細胞を哺乳動物または患者へ移入する工程を包含し得る。移植は、哺乳動物または患者への細胞懸濁の注射により、哺乳動物または患者の組織または器官への細胞塊の外科的な移植によって、または細胞懸濁を用いた組織または器官の灌流によって、細胞を哺乳動物または患者に移入する工程を包含し得る。細胞を移入する経路は、特定の組織または器官中に細胞が存在するための必要条件により、および所望される標的組織または標的器官を見出し、そして所望される標的組織または標的器官により保持される細胞の能力により決定され得る。移植細胞が特定の位置に存在する場合、これらは、組織または器官へ外科的に配置され得るか、または、細胞が所望される標的器官へ移動する能力を有する場合、簡単に、血流へ注入され得る。

【0108】

本発明は、自家移植 (個体からの細胞が、同一個体で使用される)、同種移植片細胞 (一つの個体からの細胞が、別の個体で使用される) および異種移植 (一つの種から別な種への移植) に対して使用され得る。従って、細胞は、本発明の細胞調製物および細胞性組成物は、非造血細胞または造血細胞の欠損を改良するため、または組織を修復するために、自己由来の移植手順または同種異系移植手順で使用され得る。

【0109】

本発明の一つの局面において、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞、またはそれから分化した非造血細胞を含む、新しく作製された細胞組成物は、非造血細胞を含む障害および疾患を改善する目的で、細胞治療および遺伝子治療の両方で使用され得る。本発明は、各種の医学の適応および各種の研究の適応において使用されるために、ヒト組織に対する必要性を回避する。

【0110】

細胞療法のアプローチは、傷害および疾患に対する処置として、新しく作製された細胞性組成物の移植の用途を包含し、この細胞組成物は、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞、またはそれから分化した非造血細胞を含む。この適応における工程は、以下: (a) 本明細書に記載されるように、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞、またはそれから分化した非造血細胞を含む細胞性組成物を生成する工程; および (b) 細胞移植を含む工程前または後のいずれかにおいて、細胞を機能的に結合させる工程、を包含する。遺伝子治療のアプローチはまた、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を含む細胞性組成物を含むが、増殖条件における培養工程の後、新しく作製された細胞は、所望されるタンパク質に対する c D N A を含む適切なベクターでトランスフェクトされ、改変された細胞が移植される工程が続く。

【0111】

従って、細胞治療アプローチまたは遺伝子治療アプローチのいずれでも、本発明の細胞組成物において非造血細胞および造血細胞を形成する可能性があるか、またはその可能性が増大した細胞、またはその細胞から分化した細胞もしくは組織が、必要とされる患者中に移植され得る (t r a n s p l a n t e d i n) か、またはその患者に移植され得る (g r a f t e d t o) 。従って、非造血細胞を形成する可能性のある細胞、またはその

細胞から分化した細胞が、組織損傷および疾患の処置において有用な細胞治療アプローチにおいて、患者において非造血細胞を置換するために使用され得る。これらの細胞はまた、患者への特異的遺伝子産物の送達のためのビヒクルとして使用され得る。これらの新規に作出された細胞またはそこから分化した細胞が遺伝子療法においてどうやって使用され得るかの一例は、パーキンソン病の影響を処置する際の例である。例えば、チロシンヒドローラーゼ（ドーパミン合成において主要な酵素）は、ニューロン細胞に分化し得る細胞を含む本発明の細胞調製物の移植を介して、またはこの細胞から分化したニューロン細胞の移植を介して、患者に送達され得、これらは、チロシンヒドローラーゼの発現に適切なベクターでトランスフェクトされている。

【0112】

本発明はまた、非造血細胞を包含する状態を有する患者を処置する方法を提供し、この方法は、非造血細胞を形成する可能性のある細胞またはその可能性の増大した細胞を含む細胞組成物を患者に移入する工程であって、ここでこの細胞が非造血細胞に分化する、工程を包含する。

【0113】

本発明は、患者自身の造血細胞から自家移植用の非造血細胞を得るための方法を提供し、この方法は、（a）患者から、好ましくは、採取されたばかりのまたは凍結保存された臍帯血から、造血細胞を含むサンプルを得る工程；（b）造血幹細胞および造血前駆細胞（好ましくは、 $CD45^+HLA-ABC^+$ 細胞）を含む富化細胞調製物を分離する工程；および（b）非造血細胞を形成する可能性があるかまたは可能性の増大した細胞を含む細胞組成物を生成する増殖条件下で細胞を培養する工程を包含する。（b）から得た細胞組成物は、分化因子と共に培養され得るか、または組成物の細胞は患者に移入され得る。

【0114】

本発明はまた、本発明の細胞、細胞調製物、または細胞組成物と薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または希釈剤とを含む薬学的組成物を企図する。本明細書中での薬学的組成物は、被験体に投与され得る薬学的に受容可能な組成物の調製のためのそれ自体公知の方法によって、有効量の活性物質が、薬学的に受容可能なビヒクルと混合して組み合わせられるように、調製され得る。適切なビヒクルは、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1985)において記載されている。これに基づいて、組成物は、排他的にではないが、1つ以上の薬学的に受容可能なビヒクルまたは希釈剤と共に、そして適切なpHを有し、そして生理的流体と等浸透圧である緩衝化溶液中に含まれる、細胞、細胞調製物、または細胞組成物の溶液を含む。

【0115】

本発明のなお別の局面は、本発明の細胞性組成物を産生するキットであり、このキットはインビトロおよびインビボの両方において、複数の組織型の細胞へ分化し得る細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を含む。このキットは、細胞性組成物を産生するための、本発明の方法に関する試薬を含む。このキットは、好ましくは、少なくとも一つのポジティブな増殖因子、および使用に関する指示書を含む。

【0116】

一つの局面において、本明細書で開示される細胞、細胞調製物および細胞性組成物は、薬物開発試験に対する毒性試験に使用され得る。毒性試験は、適切な培地において、細胞、細胞調製物および細胞性組成物、またはこれらから分化した細胞を培養することによってか、または培養物に基質（例えば、薬学的基質または化学的基質）を導入することによって行われ得る。この細胞または分化した細胞は、この基質が培養に悪影響を有するか否かを決定するために試験される。薬物開発試験は、新薬の有効性を試験するために使用され得る、誘導細胞株を開発することによって実施され得る。新薬に対する親和性アッセイはまた、細胞、分化した細胞または細胞株から開発され得る。

【0117】

本発明の方法を使用することで、非造血細胞または造血細胞に対して毒性の可能性がある薬物を同定することが可能である。

【0118】

本発明の細胞性組成物は、可能性ある治療法（非造血細胞またはこれらから分化した細胞を形成するための潜在力を有する細胞の発達または活性を調節する）に対してスクリーニングするために使用され得る。特に、本発明の細胞性組成物の細胞は、試験物質に供され得、そしてこの試験物質の効果は、コントロール（例えば、基質の非存在下において）と比較されこの試験物質が、非造血細胞またはこれらから分化した細胞を形成するための潜在力を有する細胞の発達または活性を調節するか否かを決定し得る。

10

【0119】

本発明の一つの局面において、試験物質の活性をアッセイするために、非造血細胞またはこれから分化した細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を使用する方法が提供され、この方法は以下の工程を包含する：

a) 造血細胞および前駆細胞を含む富化させた造血細胞調製物において、増殖条件下で細胞を培養し、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を含む細胞性組成物を得る工程；

b) 必要に応じて、インビトロの分化条件下で、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を培養する工程；

c) 工程(a)または(b)における培養細胞を試験物質に曝露する工程；および

20

d) 細胞の生存または細胞の形態学的特徴、機能的特徴、または生理学的特徴、および／または分子生物学的特性に関して、試験物質の効果が存在するかまたは存在しないかを検出する工程であって、これにより、細胞の生存または細胞の形態学的特徴、機能的特徴、または生理学的特徴、および／または分子生物学的特性を変化する効果が、試験物質の活性を示す工程。

【0120】

別の局面において、非造血細胞またはこれから分化された細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を用いる方法が提供され、非造血細胞を含む障害を処置する可能性のある新薬をスクリーニングし、この方法は以下の工程を含む：

(a) 非造血細胞を含む障害を有する患者由来のサンプルから、造血細胞を得る工程；

30

(b) 造血細胞から造血幹細胞および造血前駆細胞を含む富化された造血細胞調製物を調製する工程；

(c) 増殖条件下で、富化された造血細胞調製物を培養し、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を得る工程；

(d) 必要に応じて、インビトロの分化条件下で、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を培養する工程；

(e) (c)または(d)において培養される細胞を潜在力のある新薬に曝露する工程；および

(f) 細胞の生存または前記細胞の形態学的特徴、機能的特徴、または生理学的特徴、および／または分子生物学的特性に関して、潜在能力のある新薬の効果が存在するかまたは存在しないかを検出する工程であって、これにより、細胞の生存または細胞の形態学的特徴、機能的特徴、または生理学的特徴、および／または分子生物学的特性を変化させる効果が潜在力のある新薬の活性を表す工程。

40

【0121】

本発明はまた、薬物発見における細胞、細胞調製物、および細胞性組成物の使用に関する。本発明は、本発明の細胞、細胞調製物および細胞性組成物を用いる、薬物開発の方法を提供する。本発明の細胞、細胞調製物および細胞性組成物は、新規または公知の生物学的分子もしくは生物学的成分を分泌する細胞を含有し得る。特に、血清の非存在下での培養は、血清分子からの最小の干渉を有する細胞を提供し得、従って、より生理学的に正確に、そして位相的により正確であり得る。従って、本明細書に記載される細胞によって分

50

泌されたタンパク質は、薬物開発に対する標的として使用され得る。一つの実施形態において、薬物は、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞における特異的なタンパク質を標的とするように作製され得る。薬物の結合は、特異的な非造血細胞への細胞の分化を促進し得る。別の実施形態において、非造血細胞の調節タンパク質に対して特異的な薬物は、特定の細胞型の増殖を停止するために使用され得る。任意のタンパク質は、抗体、タンパク質、アンチセンス、アプタマー、リボザイムまたは小分子薬物を開発するための標的として使用され得る。

【0122】

本発明の方法に従って同定されるまたは本発明の方法で使用される因子、試験物質、薬物として、タンパク質、ペプチド（例えば、Ig 尾部融合ペプチドを含む可溶性ペプチド）、D 体アミノ酸および／または L 体アミノ酸から作製されるランダムペプチドライブラリーおよびコンビナトリアル化学誘導分子ライブラリーのメンバー、リン酸ペプチド（ランダムまたは部分的な変性のメンバー、指向されるリン酸ペプチドライブラリーを含む）、抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗イディオタイプ抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、フラグメント（例えば、Fab、F(ab)₂ ならびに Fab 発現ライブラリーフラグメント、およびこれらのエピトープ結合フラグメント）、核酸、リボザイム、炭水化物および小有機分子または小無機分子が挙げられるが、これらに限定されない。因子、物質または薬物は、内因性の生理的な化合物であり得るか、または天然化合物もしくは合成化合物であり得る。

【0123】

本明細書中で開示される細胞、細胞調製物および細胞性組成物は、様々なバイオアッセイで使用され得る。一つの実施形態において、この細胞は、生物学的要因が増殖または分化に必要であることを決定するために使用される。異なる生物学的化合物（例えば、ホルモン、特異的増殖因子など）を組み合わせ、段階的な様式にて、非造血細胞および造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞を使用することによって、一つ以上の特異的な生物学的化合物は、非造血細胞に対して分化を誘発することが見出され得る。この細胞に関するバイオアッセイでの他の用途は、ディファレンシャルディスプレイ（すなわち、mRNA ディファレンシャルディスプレイ）およびこの細胞由来の分泌タンパク質を使用するタンパク質-タンパク質の相互作用である。タンパク質-タンパク質の相互作用は、技術（例えば、酵母ツーハイブリッドシステム）を用いて決定され得る。本発明の細胞、細胞調製物および細胞性組成物からのタンパク質は、細胞と相互作用する他の未知のタンパク質または他の細胞型を同定するために使用され得る。これらの未知のタンパク質は、以下の一つ以上であり得る：増殖因子、ホルモン、酵素、転写因子、翻訳因子および腫瘍抑制剤。本発明の細胞、細胞調製物および細胞性組成物を含むバイオアッセイ、ならびにこれらの細胞が形成するタンパク質-タンパク質の相互作用およびタンパク質-タンパク質接触または細胞-細胞接触の効果は、周辺組織が非造血細胞および造血細胞の増殖または分化に対して、どのように寄与するかを決定するために使用され得る。

【0124】

本発明の一つの局面において、臍帯血幹細胞由来の調製物を培養した後に得られた、非造血細胞を形成するための潜在力または増強された潜在力を有する細胞は、細胞損傷または組織損傷を修復するために使用され得る。これらはまた、非機能性細胞を生じる遺伝子欠損の処置において使用され得る。増殖培地において増殖された臍帯血幹細胞は、欠陥細胞の部位へ指向的に移植され欠陥をレスキューするか、または、この細胞を静脈に注入することにより、血流を介して送達され得る。さらに、遺伝子治療ベクターは、この臍帯血幹細胞へ組み込まれた後、標的組織へこれらの遺伝子操作された細胞を移植し得る。遺伝子治療ベクターの導入は、細胞増殖を必要とする。標的組織への細胞の首尾よい長期移植は、これらが幹細胞特性を維持することを必要とする。臍帯幹細胞の高い増殖率は、分化なしで達成されており、これは、首尾よい遺伝子治療へとつながる。

【0125】

一つの実施形態において、本発明の細胞性組成物の分化細胞から得られる肝細胞（好ましくは、臍帯血、またはその前駆細胞由来）は、このような治療を必要とする患者に対して、肝機能の程度（おそらく、急性肝機能障害、慢性肝機能障害または先天性肝機能障害に起因する）を回復するために使用され得る。従って、これらは、肝疾患を処置するため、または肝損傷を修復するために使用され得る。特に、本発明に従って得られる肝細胞は、多くの変性肝疾患を処置するために使用され得る。非機能性肝細胞（外見の物理的損傷はない）は、部分肝切除を介して処置され得、その後、本発明を用いて得られる肝細胞を使用する治療へと続く。この肝細胞は、カプセル化され得るか、またはバイオ人工肝デバイス（bioartificial liver device）の一部であり得る。

【0126】

10

別の実施形態において、本発明の細胞性組成物の分化細胞から得られる内皮細胞（好ましくは、臍帯血またはその前駆細胞由来）は、血管修復のために使用され得、そしてこれらは、心肺バイパス手術で使用され得る。内皮細胞は、血管形成因子を産生する遺伝子を用いてトランスフェクトされ得、そして血管機能不全または心不全を有する患者において、血管形成を刺激する遺伝子治療において使用され得る。

【0127】

なお、別の実施形態において、本発明の細胞性組成物の分化細胞から得られた筋細胞（好ましくは、臍帯血またはその前駆細胞由来）は、筋肉（特に、横紋筋または心筋）を修復するために使用され得る。従って、本発明は、変性筋疾患を処置するために使用され得る。この細胞は、例えば、筋ジストロフィー、心筋症、うっ血性心不全および心筋梗塞を処置するのに使用され得る。遺伝性筋障害および遺伝性心筋障害は、本発明の方法を使用して得られた前駆筋細胞を用いて処置され得る。筋肉の減少が、ニューロン接続の欠如（神経－筋肉疾患）に起因する場合、神経組織および筋肉組織の両方は、本発明を使用して得られた細胞を用いて置換され得る。

20

【0128】

さらなる実施形態において、本発明の細胞性組成物の分化細胞から得られた神経細胞（好ましくは、臍帯血またはその前駆細胞由来）は、神経変性障害（脳損傷もしくは脊髄損傷、または神経学的欠損）を処置するために使用され得る。処置され得る神経変性障害としては、パーキンソン病、ハンチングトン病、多発性硬化症、アルツハイマー病、テイサックス病、リソソーム蓄積（lysosomal storage）病、虚血に起因する脳損傷ならびに／または脊髄損傷、発作、頭部損傷、脳性麻痺、脊髄障害／損傷ならびに脳障害／損傷、うつ病、てんかん、精神分裂病、および運動失調症ならびにアルコール依存症が挙げられる。

30

【0129】

本発明の方法に従って生じた神経細胞は、増殖因子、増殖因子レセプターおよびペプチド神経伝達物質を発現し得るか、または神経伝達物質の合成に含まれる酵素を発現し得るベクターを用いてトランスフェクトされ得る。これらのトランスフェクトされる細胞は、神経変性の領域へ移植され得る。

【0130】

なおさらなる実施形態において、本発明の細胞性組成物の分化細胞から得られる骨細胞または軟骨細胞（好ましくは、臍帯血またはその前駆細胞由来）は、骨を修復するために使用され得、そして再建手術または変性疾患において使用され得る。人工基質またはマトリックスは、これらの細胞の組み合わせに使用され、組織を再構成し得、患者の関節へ移植され、損傷した軟骨または欠如した軟骨を置換または修復し得る。この軟骨細胞は、関節の疾患（例えば、変形性関節症、炎症性関節症、敗血症性関節炎および結晶性関節症）の処置に有用であり得、そして、骨折部位へ挿入された場合、これらは骨折の治癒を増強するために使用され得る。この細胞はまた、軟骨異形成症の試験および処置において、そして血管形成因子を試験するために使用され得る。

40

【0131】

本発明の方法に従って生じた網膜細胞または網膜前駆細胞は、網膜細胞が損傷される場

50

合、失われた視力を回復するために使用され得、そしてこれらは、増殖因子による刺激に対して、インビボの標的として使用され健全な組織を産生し得る。特に、この細胞は、条件（例えば、緑内障、黄斑変性症、糖尿病性網膜症、先天性網膜変性（例えば、色素性網膜炎、網膜剥離または網膜損傷、および網膜障害（先天性か否かに関わらず、手術、外傷、毒性化合物または毒性因子により誘導されるか、あるいは光学的に（*photoically*）誘導される；特に、糖尿病性網膜症））を処置するために使用され得る。

【0132】

本発明の方法に従って生じた結合組織細胞または結合組織前駆細胞は、マトリックスまたは基質上へ、シードされ得、そして損傷した組織（例えば、腱）を修復するか、または再生するために使用され得る。従って、本発明は、これを必要とする患者のデノボ結合組織形成に対する部位へ、本発明の方法によって産生される結合組織細胞を導入することにより、インビボの結合組織のデノボ形成に関する方法を企図する。

10

【0133】

本発明の方法に従って生じた腎細胞または腎前駆細胞は、腎障害または腎損傷、あるいは腎癌を処置するために使用され得る。この細胞または組織、あるいはこれらから再生される機能性腎臓は、急性腎機能低下または慢性腎機能低下を処置するために、患者に投与され得る。機能性腎細胞または再生腎臓は、腎細胞が誘導される造血細胞のドナーへ移植され得るか、または別の患者へ移植され得る。腎細胞または腎前駆細胞は、人工腎臓システム（例えば、ホローファイバ濾過システムに基づくシステム）を構築するために使用され得る。

20

【0134】

本発明の方法に従って生じた角膜細胞または角膜前駆細胞は、種々の角膜上皮細胞および／または結膜上皮の損傷、変性および／または異常を処置するために使用され得、眼球表層疾患（例えば、スティーブンス・ジョンソン症候群）、化学熱傷ならびに熱傷、眼球表層腫瘍、免疫学的条件、放射線損傷、先天性症候群（例えば、無虹彩）、類天疱瘡性眼球、黄斑の変性などを有する患者が挙げられる。角膜細胞または角膜前駆細胞は、角膜輪部の正常な幹細胞集団が消耗され、非機能性であり、そうでなければ角膜損傷の治癒を促進するためには不適切である患者を処置するのに、特に有益であり得る。

【0135】

本発明の細胞、細胞調製物および細胞性組成物は、異種レシピエントへ投与される免疫原として使用され得る。本発明に従って得られる非造血細胞および造血細胞の投与は、種々の方法によって達成され得る。異種レシピエントに対する免疫原として細胞を投与する方法としては、無制限な免疫、直接接触による膜への投与（例えば、塗布または搔爬装置による）、粘膜への投与（例えば、エアロゾルによる）および経口投与が挙げられるが、これらに限定されない。免疫は、受動または能動であり得、そして異なる経路（腹腔内注入、皮内注入および局所注入が挙げられる）を介して生じ得る。免疫の経路およびスケジュールは、一般的に、抗体刺激と抗体産生に対して確立された従来の方法に従う。哺乳動物患者（特にマウス）およびこれらからの抗体産生細胞は、哺乳動物ハイブリドーマ細胞株の産生の基礎として役立つよう操作され得る。

30

【0136】

本発明の細胞性組成物は、疾患のモデル系を調製するために使用され得る。本発明の細胞性組成物はまた、増殖因子、ホルモンなどを産生するために使用され得る。

40

【0137】

一つの局面において、本発明は、同定および単離され得る造血細胞または非造血細胞の増殖または分化に含まれる遺伝子、タンパク質および他の代謝物からの培養系を提供する。本発明の培養系における細胞は、非造血細胞および造血細胞の産生を刺激するメカニズムおよび化合物を決定するために、他の細胞（例えば、分化細胞）と比較され得る。

【0138】

本発明の細胞性組成物は、非造血細胞において発現する遺伝子、または非造血細胞の分化に不可欠な遺伝子に対してスクリーニングするために使用され得る。使用され得るスク

50

リーニング方法としては、表現差異分析 (Representational Difference Analysis) (RDA) または例えば S A - l a c Z を用いる遺伝子トラッピングを包含する (25)。遺伝子トラッピングは、非造血細胞の分化または活性に影響を及ぼし、そしてこれらの細胞において発現する遺伝子、またはこれらの細胞の分化に不可欠な遺伝子の同定を可能にする優性変異 (例えば、遺伝子産物の特定のドメインの欠失による) を誘導するために使用され得る。

【0139】

増加した造血幹細胞数および造血前駆細胞数を含む、本発明の増殖された細胞調製物は、患者の免疫系を増強するために使用され得る。この細胞調製物は、患者の免疫系ならびに／または血液形成系の増強作用または再構築を促進する。

10

【0140】

本発明の一つの局面において、本発明の細胞性組成物は、白血病 (例えば、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病)、リンパ腫 (例えば、非ホジキンリンパ腫)、神経芽細胞腫、精巣癌、多発性骨髄腫、ミエローマ、乳癌、幹細胞病因を有する固形癌、または治療が造血細胞の除去を生じる他の癌の処置に使用される。

【0141】

本発明の別の局面において、本発明の細胞性組成物 (H I V に対する耐性を提供するような遺伝子改変を有するか否か) は、H I V - 1 に感染した患者 (免疫不全の状態を生じる造血細胞生成の重篤な欠乏を起こす) を処置するために使用される。

【0142】

増殖された細胞調製物における造血幹細胞および造血前駆細胞はまた、遺伝子疾患の処置に使用され得る所望される遺伝子を用いて、トランスフェクトされ得る。造血細胞関連性遺伝子疾患は、疾患を引き起こす遺伝子の欠損または異常性に対して作製し得る遺伝子を用いてトランスフェクトされた細胞を有する、増殖された細胞調製物を移植することによって、処置され得る。例えば疾患を引き起こす正常野生型遺伝子 (例えば、 β サラセミア病 (地中海人種の貧血 (Mediterranean anemia))、鎌形赤血球貧血、A D A 欠損、リコンビナーゼ欠損、リコンビナーゼ調節遺伝子欠損など) は、相同組換えまたはランダムな組換えによって、造血幹細胞または造血前駆細胞へ運搬され得、そしてこれらの細胞は、患者へ移植され得る。さらに、遺伝子の異常性のない正常な造血幹細胞および正常な造血前駆細胞 (適切なドナー由来) を含む調製物は、処置に使用され得る。

20

30

遺伝子治療の別の適用は、この細胞へ薬物耐性遺伝子を運搬することによって、正常な造血幹細胞に薬物耐性を提供することにより、通常、危険と考えられる高濃度での薬物の使用を可能にする。特に、抗癌剤に対して薬剤耐性を有する遺伝子 (例えば多剤耐性遺伝子) を造血幹細胞および造血前駆細胞を含む増殖された細胞調製物へ運搬することによって、高濃度での抗癌剤を用いる処置を実施し得る。

【0143】

造血系に関する疾患以外の疾患は、分泌タンパク質 (例えば、ホルモン、酵素、サイトカイン、増殖因子など) の欠乏に関連する疾患である限り、造血幹細胞および造血前駆細胞を含む増殖された細胞調製物を使用することによって処置され得る。欠乏タンパク質は、適切なプロモーターの制御下で、標的タンパク質をコードする遺伝子を、造血幹細胞または造血前駆細胞へ運搬することにより、誘導され得る。タンパク質の発現は、インビボの天然の発現によって得られるものと同じ活性を得るために制御され得る。

40

【0144】

この細胞で特異的な遺伝子産物の発現を制御するためにか、または、疾患に対する感受性を抑制するために、リボザイム、アンチセンス核酸などをコードする遺伝子、または別の適切な遺伝子を、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞へ挿入することもまた可能である。例えば、造血幹細胞および造血前駆細胞は、アンチセンス核酸またはリボザイムを発現するように、遺伝子改変を供され得、これは造血幹細胞または造血幹細胞から分化した細胞

50

において、血液病原体（例えば、H I V、H T L V－I、H T L V－I I など）の増殖を妨げ得る。

【0145】

造血幹細胞および造血前駆細胞を含む細胞調製物は、例えば、従来の静脈内投与によって、脊椎動物（これは、細胞移植のレシピエントである）において誘導され得る。

【0146】

本発明はまた、再生医療ビジネスを実施するための方法に関し、この方法は、以下：

（a）造血細胞および非造血細胞を形成する能力を有する細胞を形成し得る造血細胞を含むクライアント由来のサイプルを受容し、そしてログインするためのサービス；

（b）このサンプルから分離した細胞を培養するためのシステムであって、このシステムは、造血細胞および非造血細胞を形成する能力を有する細胞を産生するための条件を提供する、システム； 10

（c）クライアントまたは第三者の代わりに後に回収するための、（b）のシステムにより生成された細胞を保存するための細胞保存システム；

を含む。この方法はさらに、クライアントまたはその医療保険提供者に請求書を発行するための請求書発行システムを含み得る。

【0147】

本発明は、幹細胞ビジネスを実施するための方法の特徴としており、この方法は、細胞の増殖、分化または生存に影響する因子を同定する工程を包含し、この因子は、造血細胞および非造血細胞を形成する能力を有する。このような因子の例としては、低分子、抗体および細胞外タンパク質である。同定された因子は、プロファイルされ得、そして動物における安全性および効率のために評価され得る。別の局面において、本発明は、細胞を以前の方法により同定した因子と接触させることによって、造血細胞および非造血細胞を形成する能力を有する細胞の、増殖、分化または生存に影響を与える方法を企図する。同定された因子は、薬学的調製物として処方され得、販売のために製造、市販および配送され得る。 20

【0148】

1つの実施形態において、本発明は、幹細胞ビジネスを行うための方法を提供し、この方法は、以下：

（a）本発明の造血細胞および非造血細胞を形成する能力を有する細胞の、増殖、分化、機能または生存に影響を及ぼす1つ以上の因子を同定する工程； 30

（b）（a）で同定した因子；またはそのアナログの、動物における効能および毒性に関する治療的プロファイリングを行う工程；ならびに

（c）受容可能な治療的プロファイルを有すると（b）で同定された1つ以上の因子を含む薬学的組成物を処方する工程

を包含する。この方法はさらに、販売用の薬学的調製物を配送するための配送システムを確立する工程を包含し得る。この方法はまた、薬学的調製物を市販するための販売グループを確立する工程を包含する。本発明はまた、薬物送達ビジネスを実施する方法を企図する。この方法は、本発明の造血細胞および非造血細胞を形成する能力を有する細胞の増殖、分化、機能または生存に影響を及ぼす因子を同定する工程、およびさらなる開発に権利 40
を与える工程をさらに包含する。

【0149】

ここで、本発明を記載してきたので、同じものが、以下の実施例を参照してより容易に理解される。これらの実施例は、例示の目的で提供され、本発明を限定することは意図されない。

【実施例】

【0150】

（実施例1）

（材料および方法）

（母体血スクリーニング）

母体血を、妊娠34週の前の登録時点で、HIV I/I I、HTLV-1/I I、B型肝炎(HBs Ag)、C型肝炎(抗HVC)、CMVおよびVDRLに対してスクリーンした。臍帯血の採集およびプロセッシングに関する承諾書は、登録時に入手した。資格のある病院職員で、Toronto General Hospitalおよびトロント大学のヒトの倫理委員会によって承認されたプロトコルに従って、分娩時点の臍帯血を回収した。

【0151】

(サンプルプロセッシング)

血液量を減少し、赤血球をFicollまたはPentaspán (デンプン) 処置のいずれかを用いて除去した。サンプルは、抗凝血物質(10mlの血液(10% v/v)につき1mlのAcid Citrate Dextrose (ACD))を含む60mlシリンジを用いて回収するか、または250mlの血液バッグ(Baxter-Fenwal, Deerfield, IL, USA)へ直接回収し、そしてPenicillin Gをこのバッグへ直接添加した。Ficoll (Histopaque-1077, Sigma, St. Louis, USA) 濃度勾配遠心分離を、富化した単核細胞の集団を獲得するために使用した。簡潔には、血液をRPMI培地で1:1へ希釈し、30mlを15mlのFicoll (1.077) クッションの上にかぶせた。この濃度勾配を、室温で30分間、300gで遠心分離し、そして単核細胞(MNC)層を回収した。Ficoll層の下もまた回収した。MNC層およびFicoll層を、2×容量の洗浄溶液(ドナー臍帯血由来の12.5mlのフィルター処理した血漿、120ml Iscoves 20 改変ダルベッコ培地、3ml ACD)に、両層を再懸濁した。このサンプルを、室温で10分間、300gで遠心分離した。細胞ペレットを回収し、合わせた。臍帯血サンプルの原体積は、10% v/vのACDを含んだ。従って、100mlの容量は、約90mlの血液および10mlのACDを含んだ。

【0152】

デンプンのプロセッシングに対して、1mlのデンプン(Pentaspán, Dupont, ILL. U. S. A.) を5mlの血液に添加し、混合し、次いで、10分間50×gで遠心分離した。白血球リッチの上層を回収し、この細胞を10分間、400×gでスピンのによって回収する。このペレットを5mlのIMDMおよび6容量の赤血球溶解緩衝液(Ammonium Chloride Buffer)に再懸濁する。室温で10 30 分後、この細胞をペレット化し、1×PBSで洗浄し、そしてカラム緩衝液で冷凍保存するかまたは再懸濁のいずれかした。

【0153】

(低温保存)

全工程を氷上で実施した。この細胞ペレットをIMDM/10%自己血清またはFBS/10% DMSO中に再懸濁した。6アリコートまで、-80℃の冷凍庫で一晩中、Nalgene凍結バイアル(Nalgenenunc, Rochester, NY)内にサンプルを置くことにより、サンプルごとに凍結した。長期間保存するために、サンプルを液体窒素(-196℃)へ移した。

【0154】

(富化した幹細胞集団または前駆細胞集団の単離)

二つの異なるカラムを使用する異なる方法を、幹細胞または前駆細胞の単離に対して使用した。

【0155】

(A.) MACSカラム(Mitenyl Biotech., Germany)。CD34に対するモノクローナル抗体(Mab)を用いたポジティブセクション磁気カラム。一旦細胞に結合したMAbは、金属ビーズと結合され、その結果、磁石に付着するカラム上に維持される。他の全ての細胞をカラムから洗い落とした。このカラムを磁石から除去し、そしてCD34⁺細胞を溶出する。

【0156】

10

20

30

40

50

(B.) Stem Sepカラム (Stem Cell Technologies) は、ネガティブセレクションのカラムであり、そして、原始幹細胞の単離においてより適切である。全幹細胞は、 $CD34^+$ (26) であり得ないので、ネガティブセレクションカラムは、富化した幹細胞集団を残して、公知の不必要な細胞を全て除去する。この抗体カクテルは、全ての成熟リンパ系細胞を除去し、骨髄性細胞は、全ての後期前駆体段階の細胞と同様に除去される。これは、成熟な造血細胞上で発見された系統特異的表面マーカーのセットを包含する； $CD2$ 、 $CD3$ 、 $CD14$ 、 $CD16$ 、 $CD19$ 、 $CD24$ 、 $CD56$ 、 $CD66$ およびGLYCOPHORIN A。

【0157】

(C. 細胞培養系)

10

多様な細胞培養系を検査した。多くの培地を検査し、そして、主な構成要素は以下の通りである；

(A.) 馴化培地：ヒト胎性線維芽細胞 (HEF-CM) は、72時間、20% FBS (胎児ウシ血清) を含む α MEM 中で増殖される。この培地を除去し、この細胞および破片を遠心分離およびフィルター ($0.22 \mu m$ フィルター) を用いて除去する。この培地を $-20^\circ C$ で保管する。

【0158】

(B.) 非馴化培地／無血清：IMDM、1% ウシ血清アルブミン、 $10 \mu g/ml$ ウシ膵インスリン、 $200 \mu g/ml$ ヒトトランスフェリン、 $10^{-4} M$ β メルカプトエタノール、2 mM L-グルタミンおよび $40 \mu g/ml$ LDL (低密度リポ蛋白質)

20

【0159】

(C.) マイトマイシン存在下において、LIF を含まない ES 細胞培地は、ヒト胎性線維芽細胞を処置した。

【0160】

細胞を、任意の組み合わせで、以下の増殖因子を有するか、もしくは有さない三つの培地のうちの任意の一つで増殖した； $25 \sim 100 ng/ml$ FGF-4、 $25 \sim 100 ng/ml$ FGF-2、 $25 \sim 100 ng/ml$ IL-3、 $25 \sim 100 ng/ml$ SCF、 $25 \sim 100 ng/ml$ FLT3 リガンド、 $25 \sim 100 ng/ml$ TPO、 $25 \sim 100 ng/ml$ GM-CSF、 $25 \sim 100 ng/ml$ IL-6、 $25 \sim 100 ng/ml$ NGF。

30

【0161】

細胞を、毎週、一週間に二回、または一週間に三回のいずれかの培地交換および増殖因子の交換を伴って、培地中で、4～76+日間増殖した。全ての細胞を、NUNC ブランドの組織培養物処理した6ウェルプレート、12ウェルプレートまたは24ウェルプレート (Becton Dickinson, NJ, USA) で増殖した。

【0162】

(フローサイトメトリー分析：細胞数および細胞の生存)

サンプルを種々の細胞表面マーカー (Beckman-Coulter) について染色し、フローサイトメトリー分析に供した；Coulter-Epics (Coulter . Burlington, Canada)。アイソタイプコントロールを全てのケースで使用した。全てのサンプルを、製造業者の指示書ごとに、 $4^\circ C$ で10～20分間標識し、洗浄し、そして10%ホルマリンで固定した。

40

【0163】

(コロニー形成単位プレーティングアッセイ)

あらかじめ作製したメチルセルローススペースのコロニーアッセイ培地 (Stem Cell Technologies) を使用した。この培地を、原始前駆細胞を増殖するために、形式を定めた (カタログ番号 H4435)。細胞を $3 ml$ の培地あたり、 $CD34^+$ 細胞を500個プレートするか、または、 $3 ml$ の非選択細胞の培地あたり1500～3000細胞をプレートした。全ての集団を二連でプレートし、そして、12日、14日

50

、16日および18日目に記録した。

【0164】

(LTC-ICアッセイ)

細胞はまた、初期造血前駆細胞を増殖させる長期培養-惹起細胞アッセイにおいて増殖した。このアッセイは、CFUアッセイとNOD/SCIDアッセイとを連続する。細胞を、造血細胞を長期増殖させる栄養支持細胞上で増殖する。

【0165】

(カラム再選択)

いくつかの実験に対して、この細胞をStem Sepカラム(Stem cell Technologies)を用いて、再選択した。組織培養細胞を適切な抗体カクテルを用いて標識化し、上記に記載されるように、カラムを通した。生産細胞は、カクテル中で標識化された表面マーカーに対してネガティブであると考えられ、そして、これらの細胞を、フローサイトメトリーによりポジティブな表面マーカーに対してチェックしたか、CFUアッセイにおいて配置したか、継続的な組織培養に対して再プレートしたか、またはNOD/SCIDマウスを移植するために使用したかのいずれかであった。

【0166】

(NOD/SCIDマウス移植)

Non Obese Diabetic/Severe Combined Immune Deficient(NOD/SCID)マウスを、ヒト臍帯血幹細胞の移植の潜在力を試験するために使用した。全ての実験は、確立したプロトコルに従い、そして、動物倫理の承認を受けた。NOD/SCIDマウスを、クリーンルームの隔離棚で維持し、餌および水を与えた。マウスを、移植前に、Cs¹³⁷源を用いて、360ラドで2時間照射した。次いで、このマウスに、200μlの細胞を尾部静脈から注入した。マウスに、i.m.注射により抗生物質を与え、毎日モニターした。生存率は、1実験につき80+%であった。2週、4週または6週で、動物を頸部脱臼によってと屠殺した。大腿骨を除去し、そして、骨髓を洗い流した。細胞をPBSで洗浄し、この細胞ペレットを3分間、Red Cell Lysis Bufferに供し、そして再度洗浄した。細胞を、再移植のために冷凍保存したか、フローサイトメトリーで分析したか、または、PCR分析もしくはDNAマイクロアレイ分析に対してRNA単離に供したかのいずれかをした。

【0167】

肝臓組織、脾臓組織、筋肉組織および脳組織もまた単離した。組織を断片に分割し、そして、4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィンワックス中に包埋した。いくつかの組織をマイルドなトリプシン処理(27)を用いて単細胞懸濁物へ分離し、上記に記載されるように、蛍光抗体を用いて標識した。

【0168】

(免疫組織化学および免疫細胞学)

全ての組織を4%パラホルムアルデヒドで固定後、PBSで洗浄した。この組織を脱水後、パラフィンワックス中に包埋した。6μmの切片を切断し、スライドガラス上に置いた。スライドを脱ろう化し、蛍光タグ化抗体を用いて染色した抗体に供した。スライドをデコンボリューション(deconvolution)顕微鏡の上で分析した。

【0169】

(破骨細胞)

破骨細胞形成は、IMDM+10%血清+GM-CSFに細胞を培養することにより、達成した。ポジティブな細胞活性は、細胞をカルシウムキレート基板上にプレートすることにより決定し、そして、活性化骨芽細胞が骨様基質を吸収する場合、基質の欠失を測定することにより決定した。

【0170】

(TRAP染色)

TRAP染色を、Minkin Cedric(28)に記載されるように、実施した

。細胞を、いくつかの「因子」の影響下で、様々な期間、96ウェルプレートまたは24ウェルプレートのいずれかで増殖した。酒石酸(tartrate)耐性酸フォスファターゼ染色を以下のように細胞に対して実施した。:

6. 4 ml のナフトール-as-B-リン酸 (ジメチルホルムアミド中 12.5 mg/ml)

6. 4 ml 酢酸溶液 (2.5 mol/L) pH = 5.2

3. 2 ml 酒石酸溶液 (0.67 mol/L) pH = 5.2

Fast Red TR (0.1 g)

64 ml の蒸留水

上記の溶液を混合し、ろ過した。次いで、細胞を 37°C で 45 分間インキュベートした。 10

【0171】

(吸収試験)

細胞を、TRAP ポジティブに対して好都合な条件下で、3週間増殖した。10,000細胞を骨学的スライド上にシードし、2~3日ごとに培地交換をして、2週間増殖した。培地は、血清を含むIMDMおよびGM-CSFからなる。10日および14日目に、この実験を終了し、Von Kossa 染色を実施した。

【0172】

(超構造的試験)

臍帯血細胞を、24ウェルプレートにおいて、21日間、上記の条件下で増殖した。次いで、細胞をスクラップし、マイクロチューブ内で5分間600gで遠心分離した。1時間、2%グルタルアルデヒド(glutaraldehyde)での再懸濁後、カコシル酸緩衝液へ移し、その後、電子顕微鏡下で見るために処理をした。 20

【0173】

(内皮)

細胞を培養ディッシュで増殖するか、またはスライドチャンバーおよび3-D培養(キャピラリーネットワークの形成をさせる)中で増殖する。スライドチャンバー上での培養に対して、血清(10%)を含む内皮増殖因子サプリメント(Sigma)を補充されたM119培地に細胞をプレートした。細胞を、細胞の欠失がない培地の除去により、週に二回供給する。キャピラリー形成を、10μlのトロンビン(μg/ml)を含むM199培地に0.5mlの3mg/mlフィブリノーゲンを混合することによって作製した0.5mlマトリックスの上に2,000~10,000細胞(5μl容量中)を置くことによって達成し、次いで、24ウェルプレートに第2の0.5mlのマトリックスで細胞を覆い、そして、1mlのM199+5%血清で覆った。内皮細胞ネットワークが発達するまで、培地を3~4週間の間、1週につき一回交換した。 30

【0174】

(脂肪細胞)

上記に記載される条件下で増殖させた細胞に、脂肪が存在するか否かを決定するために、Sudan IV染色を実施した。簡潔には、細胞を5分間70%エタノールで固定後、さらなる5分間、Sudan IV(アセトン:エタノールを50:50中の2g/ml)溶液とともにインキュベーションした。 40

【0175】

(骨芽細胞)

10^{-8} M デキサメタゾン、10 mM β-グリセロールリン酸、0.2 mM アスコルビン酸; 10%血清を含むα-MEM。細胞を3~4週間増殖した。Alzirin Red 染色に対して、細胞を30分間、70%氷冷却エタノール中に固定し、次いで、40 mM Alzirin red (pH 4.0)を用いて10分間染色した。

【0176】

(神経系)

細胞をDME+10%血清中へ置き、そして、1週につき二回の培地交換を伴い、3週 50

間増殖した。いくつかの培養物に、10～50 nMのレチノイン酸を補充した。

【0177】

(筋肉)

細胞を2～21日間、Stem Span培地 (Stem Cell Technologies) 中のFGF、SCF、FLT3リガンド中で増殖した。任意の時点で、間葉系細胞を産生するように、3週間、この細胞をDME中の20%血清の(高グルコース)へ移すか、または、以下の5つの列挙された条件のうち1つの条件において、37℃、33℃または6%酸素(37℃)でこの細胞を種々の培地へ直接移した：

A：αMEM+10%血清+50 μM 2メルカプトエタノール

B：αMEM+10%血清+50 μM 2メルカプトエタノール+5-アザシチジン

C：αMEM+10%血清+50 μM 2メルカプトエタノール+10 μg/mlインスリン+0.1～1 μMデキサメタゾン+0.5 μMイソメチルブチルキシサンチン

D：αMEM+10%血清+ニワトリ胎児抽出物(5%)

E：αMEM+1%血清+ニワトリ胎児抽出物(5%)。

10

【0178】

細胞を2～4週間培養し、筋肉特異的マーカーに対して、PCRおよび免疫細胞学によって試験した。

【0179】

(肝細胞)

尾部静脈注射によって細胞を受け取ったマウスから、肝臓を単離した。屠殺の際、肝臓をすばやく除去し、そして、10%ホルマリンで固定し、免疫組織学のためにパラフィンワックスを用いて処理するか、または単細胞懸濁液を産生し、細胞を抗HLA-ABC抗体および抗CD45抗体を用いて染色した。

20

【0180】

(結果)

以下に列挙された全ての実験において、細胞をヒト臍帯血から単離した。3つの初期細胞集団は、1) 未分画の白血球、2) 系統マイナス細胞(CD2、CD3、CD14、CD16、CD19、CD24、CD56、CD66およびGLYCOPHORIN Aマイナス)を試験した。系統マイナス細胞は、公知の成熟血液細胞を始めに除去することにより獲得し、これにより未熟な細胞および任意の公知の血液マーカー(同定されていない細胞)を欠失する細胞を残す。系統マイナスのこの細胞集団は、HLA-ABCポジティブ、CD45⁺(100%)、富化されたCD34(50～80%)、富化されたCD38(50～80%)および富化されたCD33(50%)、骨髓系マーカー、および3) 系統ポジティブな細胞である。要約すれば、以下に詳述されるが、試験の大部分において、系統ポジティブの細胞は、任意の幹細胞特性を示さないもので、主要な集団は、系統マイナス集団であり、未分画細胞集団で発見された幹細胞潜在力を有する細胞の出現率は、その中に含まれる系統マイナス集団由来であることを示唆する。

30

【0181】

(非血液細胞の出現)

非血液細胞を、CD45⁺UCB細胞から産生した。まず、供給が減少している状態での長期培養の組み合わせは、細胞周期からこれらを離脱させることにより、これらの細胞の分化を引き起こしたことが観察された。この細胞は接着し始め、伸長した接着細胞のコロニーを混合し、そして、円形細胞にゆるく付着する。FGFが存在する限り、この細胞は、これらのコロニー(約3週の培養で出現する)を維持し得る。さらに3週後、この円形細胞は、死滅し始め、接着細胞は分裂を止めるが、生存し続ける。この細胞は、間葉系マーカー(ビメンチン)に対してポジティブに染色した。培養6～10週(全ての時間)後、この接着細胞は存続し、内皮細胞、脂肪細胞(脂肪)および破骨細胞に類似する形態を示す。これらの特殊な細胞は、まれに生じる。培養条件を変更することにより(上記に言及され、そして以下に詳述されるように)、この細胞の運命は、より良好に制御され得る。最適なサイトカインの型、および幹細胞の増殖を促進するのに必要な濃度を決定する

40

50

ために、初期研究を実施した。成熟造血細胞ならびに組織および非造血細胞ならびに組織を生じる細胞の能力によって規定されるように、目標は、多能性細胞の特性を維持するために、血清、馴化培地または栄養支持細胞を必要としない増殖する細胞集団を産生することであった。これは、臨床的設定に適していないので、血清および馴化培地の必要性の両方を排除することが重要である。さらに、血清および馴化培地の依存を減少することは、細胞表現型および細胞増殖の維持に対するさらなる制御を提供する。

【0182】

間葉様細胞は、DMEまたはIMDM+10~20%血清へ全臍帯血を直接プレートすることによって、直接獲得され得る（以下の間葉細胞の中間体を参照のこと）。

【0183】

（サイトカイン補充）

臍帯血由来の白血球は、富化させた幹細胞集団および前駆細胞集団を残して全ての成熟細胞を枯渇させる。細胞増殖の大部分は、最初の28日で起こり、次いで次第に減少するが、これらの細胞は、約3ヶ月間、増殖因子補充を有する無血清の条件で維持され得る。7~10日ごとの培養期間の初めに、あるいは連続ベースで実施されるように、培養は48時間ごとに供給することによって高い増殖状態で維持され得、そして、系統ポジティブの集団から系統マイナス細胞を分離し得る。非分化細胞の増殖を維持するために、マウス胎児の能力に起因するFGF-2およびFGF-4に焦点をあてた。さらに、FGF-2およびFGF-4は、細胞が分化を受ける前にダウンレギュレートされ、その結果、それは、幹細胞増殖に対して理想の候補になる。FGF-2およびFGF-4を、+/-血清と+/-サイトカインとの組み合わせで、異なる基質に対して試験した。この研究は、FGF-2とFGF-4との間での相違を示さなかった。しかし、ヒト胎性細胞株を維持するその用途に起因して、FGF-4単独を使用した。FGF-4を含む培地へのSCFおよびFLT-3リガンドの添加は、増殖率を増加した。FGF、SCFまたはFLT-3リガンドを、無血清の条件で単独で使用し、細胞増殖は減少し、その一方で、これらのサイトカインの組み合わせは、幹細胞の産生を改良した。FGF培地、FLT-3リガンド培地に添加した場合、SCFは、細胞増殖率に小さな効果を有したが、幹細胞プールの分化のブロッキングには重要であった（図1）。

【0184】

FGF補充の頻度は（濃度でない）、培養の結果に大きな影響を及ぼした。100ng/mlおよび25ng/mlのFGF-4またはFGF-2を、25ng/mlのFLT-3リガンドおよび25ng/mlのSCFを用いて試験した。補充スケジュールを一定に保つ場合、細胞の増殖率（CD34⁺/CD38⁻細胞またはCFU細胞の頻度）に相違はない。これは、FGFの速い分解速度に起因する。4週の間の1週につき一回の供給は、HSCの特徴を有するいくつかの細胞を維持する結果となったが、細胞の大部分は分化し、そして死滅した。興味深いことに、FGF-4、FLT-3L、SCF、無血清（1週につき一回の培地交換を行い）、3週間、大量の細胞増殖を生じ、その後、大部分の細胞が死滅し、残りは、同じ割合の円形細胞、非接着細胞および伸長化接着細胞の混合コロニーを形成した。1週につき約三回の供給は、高い増殖レベルを維持するため必要であり、そして、幹細胞表現型の維持に必要である。さらに、同じネガティブセレクションカラムによって、週間隔での細胞再選択は、系統マイナス集団を維持し、そして増殖することに役立った。1週につき三回、増殖因子を有する培地に補充することにより、この細胞を円形非接着細胞として維持した。この細胞は、実験を終結する前に、この状態で約80日間維持した。

【0185】

（他のサイトカイン）

試験したいくつかのサイトカイン補充プロトコールは、非常な増殖を生じたが、分化の速度はまた、総細胞集団の幹細胞数の減少を生じた。IL-3とFLT-3およびSCFは、非常な細胞増殖を生じたが、系統マイナス集団は、それらが迅速に分化するにつれてなくなった。TPOとFLT-3およびSCFは、細胞増殖および幹細胞維持のより良好

10

20

30

40

50

なバランスを生じた。NGF、SCFおよびFLT-3リガンドはまた、FGFに対して類似の効果を与えた。TPO、SCFおよびFLT3リガンドで培養した細胞をまた、FGF、SCF、FLT3リガンド細胞と比較した。TPO処理細胞は、FGF細胞より遙かに良好に増殖するが（12～20倍増加 対 4～10倍増加）、TPO細胞は、非造血性系統を生じる範囲はより制限された。

【0186】

（非造血性細胞の形成は、間葉細胞中間体（mesenchymal cell intermediate）に依存しない）

頻繁ではない供給で現れるか、または血清条件において増殖している非分画臍帯血細胞の結果として現れる接着細胞集団は、骨髓吸引物中に見いだされる間葉細胞集団を想起させる。まず、もとの集団において観察された増殖の接着段階が、骨髓において見られたものと類似の間葉細胞集団であるか否かおよび2）非血液分化に向かう強制的工程を調査した。Jiangら（29）は、クローン性細胞集団由来の広範な細胞型を生成し得る、骨髓から単離されたCD45⁻（非血液）間葉細胞集団を報告した。本発明者らは、1）系統陰性細胞（幹細胞および前駆細胞）、2）系統陽性細胞（成熟血球）および3）非分画UCB細胞を試験した。

【0187】

（系統陰性細胞：） UBC Lin⁻細胞を、FGF-4ありまたはなしでSCFおよびFLT-3リガンド中で増殖させた。増殖の三週間後に、間質様細胞および丸い造血性細胞からなる混合したコロニーが、現れた。FGF-4、SCF、Flt3リガンド中で増殖させた細胞は、より多くのこれらのコロニーを生成する。さらに、2～3回供給／週 対 1回／週で細胞に供給した場合、培養物は、より多い非接着性の単一細胞を含む。これらの丸い非接着性細胞はなお、一旦増殖因子が減少するか、または細胞が血清含有培地に配置されると、間葉細胞をなお形成し得る。FGF、SCFおよびFlt3リガンド中で細胞を増殖させると、間葉細胞集団特性を有する細胞数が増大する。間葉様細胞は、増殖の3週間後に出現するので、始めの2～3週間での培養物に優勢な、その丸い非接着性細胞を、試験した。増殖された非接着性細胞は、（材料および方法、ならびに以下で記載されるように）特定の非造血性細胞型を生じる能力を含む。従って、頻繁に細胞に供給すると、非接着性であり続け、かつそれらの非造血性細胞を生成する可能性を保持する傾向がある。さらに、その丸い非接着性細胞は、CD45⁺およびHLA-クラスI⁺（図2）を維持する。

【0188】

UBC lin⁻細胞を、接着性間葉様細胞の増殖を促進する条件（DME+20%血清）に直接入れた場合、その細胞は、1週間後に死亡した。血清培地中で培養する前に、そのlin⁻細胞を、FGF-4、SCF、Flt3リガンド中で8日間増殖させた場合、ビメンチン陽性細胞が発生した。これらの細胞を、約6週間血清条件において維持することができた。さらに、これらの細胞は、CFUアッセイおよびLTIC-ICインビトロアッセイにおいて試験した場合に、陽性血液形成細胞を生成する能力を失った。これらの細胞はまた、内皮細胞発生（VEGF含有培養物）または破骨細胞を促進する培養に配置した場合に死亡した。興味深いことに、DME+10%血清中に配置してFGF-4、SCF、Flt3リガンド増殖させた細胞は、神経マーカーである神経フィラメントについて50%陽性であった。従って、ビメンチン陽性細胞をもたらし条件はまた、神経細胞を生じる。筋肉および骨については、FGF-4、SCF、Flt3リガンド培養物由来の細胞を、組織特異的分化を引き起こす増殖条件に直接入れると、試験した特異的組織についての陽性細胞が生じる。骨または筋肉分化培地に直接入れられるUCB Lin⁻細胞は、死亡する。筋肉および骨芽細胞前駆細胞の増加は、その細胞を、初めにFGF-4、SCF、Flt3リガンド培地中で増殖させ、次いでDME+血清もしくはIMDM+血清（10～20%）中で14日間増殖させる場合に生じた。間質／間葉様細胞はまた、UCBからインビボで同定された。系統がないUCB細胞（UBC Lin⁻）を、NOD／SCIDマウスに注射した。10週間後に、マウスの骨髓を分析すると、間質お

よび造血性細胞集団が、同定された。CD45は、汎ヒト白血球マーカーであり、HLA-ABCは、汎ヒト細胞マーカーである。HLA-ABC陽性かつCD45陰性の細胞は、ヒト非血液細胞であり、間質細胞である可能性が最も高い（図3）。

【0189】

（系統陽性（ lin^+ ）：） これらの細胞を、 lin^- 細胞と同一条件において増殖させ、接着細胞および非血液マーカーの存在について試験した。 lin^+ 細胞の大部分は、培養の7～10日以内に死亡した（95%）。生き残っている細胞は、接着細胞のごくわずか（1/1,000,000細胞）において生じ、これらの細胞は、分裂できず、死亡した。組織特異的培地中で増殖させた系統陽性細胞は、全ての細胞の死を生じた。このことは、その除去される細胞が（CD2、CD3、CD14、CD16、CD19、CD24、CD56、CD66およびグリコホリンA陽性の細胞）が、非造血性細胞を生成することができないことを示した。

10

【0190】

（非分画：） 細胞を、20% 血清/DMEまたはIMDM中に直接入れた。接着性細胞の頻度は、10/100,000であった。これらの細胞は、6週間にわたってゆっくりと増殖し、その後死亡した。興味深いことに、接着性細胞の最も良好な収率は、DMEまたはIMDM/10～20%血清中で4日間培養した非接着性の非分画細胞を、新鮮な培地を含む新たな培養チャンバに移した場合に生じた。移して24時間以内に、その細胞の10%が接着する。もとのウェルに残された非接着性細胞は、ほとんど死亡しなかった。培養の4～6週間後に、生存している接着性細胞の数は、同じ時間の長さにわたって増殖させた lin^- 細胞画分に由来する接着性細胞の数に類似していた。このことは、活性な重要な細胞が、系統陰性集団において見いだされることを強く示唆する。接着性の非分画細胞は、ビメンチン陽性であり、 lin^- 接着性細胞のもとの同じ特性を有する。

20

【0191】

系統+および非分画細胞もまた、上記の試験の前に、7日間にわたってFSF培養において増殖させた。FGF-4、SCF、Flt3リガンド培地中で予め培養しなかったものと比較すると、結果に差異は、観察されなかった。非分画細胞内に含まれる系統陰性細胞に対する任意の効果は、多数の非反応性系統陽性細胞によってマスクされた。従って、FGF-4、SCF、Flt3リガンド増殖期間は、系統マイナス細胞に対して特有の効果をも有する。

30

【0192】

NGF-レセプターが、骨髓中の間葉細胞およびいくつかの血球上で発現されることが、以前報告された。骨髓からNGF- R^+ 細胞の単離により、骨芽細胞および線維芽細胞へと発生し得る間葉細胞が富化される（30）。ヒトUCB由来のNGF- R^+ 集団のFACS分類は、間葉特性を有する細胞を生じなかった。細胞を単離し、間葉細胞増殖をもたらす条件において増殖した。その陽性細胞は、これらの培養において十分には生き残らず、予測されるように決して接着しなかった。試験しなかったが、その細胞は、おそらく、血球NGFR陽性集団である。

【0193】

（UBC細胞は、どの程度早く非造血性マーカーを提示し始めるか？）

40

血清条件において増殖されたUBC細胞が、ビメンチン陽性細胞および形態的に非血液型に似た細胞を生じ得るという観察は、非血液マーカーの発現について異なる増殖段階でUBC細胞の試験を想起させた。0日目には、 lin^- 細胞は、試験した全ての非血液マーカーに対して陰性であった。接着性細胞は、FSF培地中での培養の21日目までに出現しないので、2日目、4日目、8日目、14日目および21日目での非接着性の早期段階細胞の能力を、試験した。少なくとも4日（1～2回の細胞分裂）後のこれらの培養物において、非造血性胚性マーカーおよび早期組織特異的マーカーが生じる。

【0194】

系統陰性細胞および系統陽性細胞、ならびに非選択細胞を、試験した。細胞を、血球および非血球についてのそれらの発生の可能性の決定を可能にする組織特異的インビボアッ

50

セイおよび組織特異的インビトロアッセイに直接入れたか、またはその細胞を、初めに、使用される増殖因子に依存して、 $CD45^+$ 集団が非血球へ増殖する増大した能力を可能にし得る条件下で培養した。

【0195】

PCR分析、抗体染色、酵素アッセイおよびインビトロ機能アッセイの組み合わせを使用して、UCB細胞の非造血性の可能性を試験した。0日目に、 Lin^- 細胞は、非血液マーカーに対して陰性であるが、HLA-ABCおよび血液マーカー $CD45$ に対しては、100%陽性である。細胞の非血液細胞への分化は、2段階プロセスであった、第1段階は、上記で概説されるように、最低4日間にわたってFGF-4、SCF、Flt3リガンド中での、またはDMEMもしくはIMDM中の10-20%血清中でのUCB Lin^- 細胞の増殖を必要とした。 10

【0196】

PCR分析および非血液マーカーに対する抗体でのタンパク質検出により、0日目の Lin^- 細胞は、PCRによって、ネスチン（神経）、デスミン、心筋ミオシン（Cardiomyosin）（筋肉）、GFAP（星状細胞）、FLK-1（中胚葉および内皮細胞）、CBF α -1（骨）およびOct-4（胚性幹細胞）に対して陰性であることが示された。同じ細胞が、抗体によって、FLK-1、CD31（内皮細胞）、Oct-4、神経フィラメント、ネスチン、Parkin（神経）、GFAP（星状細胞）、Cyp1A2（肝細胞）、CBF α -1（骨芽細胞）、デスミン、MyoDおよび筋肉アクチン（筋肉）に対して陰性である。細胞はまた、TRAPおよびクエン酸カルシウム基質再吸収（破骨細胞）に対して陰性であり、Alzirinレッド染色（破骨細胞）およびSudan IV染色（脂肪細胞）によって、カルシウム沈着に対して陰性であった。0日目に、 Lin^- 細胞を、 $CD34$ （造血性幹細胞に対する代理マーカー）に対して富化した。これらの観察により、 $CD34$ と多能性幹細胞の出現との間の関係はないことが示される。サイトカイン補充した、無血清培地中での培養期間の間に、 $CD34$ 細胞は、多能性幹細胞（UCB幹細胞）の出現とともに頻繁に増加するが、UCB幹細胞はまた、 $CD34^-$ 集団中に見いだされる。 $CD38$ マーカーは、始めの4日間に失われ、この間に $CD33$ が出現する。8日目までに、その細胞の80%より多くは、 $CD33^+$ であるが、これは、UCB幹細胞の数を超える。 20

【0197】

細胞を、2、4、8、14および21日間、FGF-4、SCF、Flt3リガンド中で増殖させ、週に3回補充した。2日目に、同じPCRマーカーに対して細胞は陰性のままであるが、4日間以上増殖させた細胞は、ネスチン、デスミン、GFAP、Flk-1およびOct-4を発現した。Oct-4は、幹細胞のマーカーであると考えられるので、Oct-4の存在は、非常に意義深い。このことを調査するために、さらなるUBC Lin^- 細胞を、IL-3とSCFおよびFlt-3リガンド中、神経成長因子とSCFおよびFlt-3リガンド中、またはTPOとSCFおよびFlt-3リガンド中で増殖させた。IL-3補充培養物は、迅速に増殖したが、Oct-4、デスミン、ネスチンに対して陰性であった。NGF補充培養物は、OCT4に対してのみ陽性であった。8日目にTPO培養した細胞は、PCRによって、ネスチンおよびFLK-1に対して陰性であり、OCT4に対して陽性であり、デスミンに対して弱～陰性である。従って、FGF細胞と比較した場合、減少した多分化能が実証された。 40

【0198】

これは、重要な観察である。なぜなら、OCT4 $^+$ またはFLK1 $^+$ 細胞は、おそらく、重要な中間細胞型であり（例えば；増殖した全ての成熟内皮細胞は、FLK1 $^+$ 集団に直接由来する）、OCT4またはFLK1陽性細胞は、開始集団中には見いだされないからである。従って、多分化能であり得るUCB中に見いだされるその細胞集団は、 $CD45^+ / HLA-ABC^+ / FLK1^- / OCT4^-$ 細胞である。UCB幹細胞は、十分に応答し、培養物中のそれらの出現は、FGF、SCFおよびFlt-3リガンドに依存するので、その重要な細胞はまた、FLT3レセプター（レセプターチロシンキナーゼクラ 50

ス I I I レセプターのメンバー)、S C F レセプター (c - K i t)、および F G F R I I 陽性である。

【0199】

増殖の2～4日後、細胞は、広範な組織に由来する非血液胚性マーカーに対して陽性である。これらの細胞をさらに分化させるために、これらの細胞を、組織特異的細胞培養物に入れなければならなかった。その細胞は、複数の血液細胞および非血液細胞型を生じ得る。

【0200】

まとめると、培養物中の系統マイナス細胞は、系統陽性（成熟血液）細胞を生じるが、その系統マイナス細胞はまた、非血液系統を生じるそのもとの集団中に見いだされるものではない、新規な細胞型を生じる。これらの細胞は、未処理の0日目には、全ての非血液インジケーターに対して陰性であるので、培養条件の産物であるようである。

10

【0201】

これらの細胞は、特定の細胞型（例えば、破骨細胞）の生成／増殖を促進する特定の培養条件に置いた場合に、さらに分化し得る。従って、その細胞は、接着相を経る必要はなく、ビメンチン陽性細胞の生成は、必要な中間段階ではないが、非造血性系統の発生を可能にするために、細胞が無血清培養において増殖されることが必須である。

【0202】

（血液）

F g f、S c f、F l t 3 1細胞が、非血液マーカーを発現し得るという事実にも拘わらず、それらは、血液マーカーを発現するその能力をなお維持する。臍帯由来の細胞は、血液系統を再構成し得る細胞を単離するために使用される様式で収集される。非血液細胞を形成し得る幹細胞集団の成長および増殖はまた、血液細胞を形成するその能力を維持すべきである。造血性幹細胞の維持および増殖を、インビトロアッセイおよびインビボアッセイを使用して試験した。コロニー形成単位（C F U）アッセイ、L T C - I Cおよび細胞表面マーカー分析を使用して、造血性幹細胞を示した。その後の実験において、N O D / S C I Dアッセイを使用して、幹細胞表現型、およびこれらの細胞が骨髄を移植される能力を確認した。

20

【0203】

上記の無血清培地／上記で概説される馴化培地なしの培地を使用すると、非血液マーカーを発現する細胞の増加を生じ、C F U ' sおよびL T C - I Cの増加もまた、培養の始めの8日間に観察された。F g f、S C F、F l t 3 リガンド中で4～8日間増殖させた細胞の表面分析により、顕著なC D 3 4⁺からC D 3 3⁺集団への、集団のシフトが得られた。C D 3 4、C D 3 8⁻、およびC D 3 3⁻細胞の増加もまた存在した。全ての細胞は、C D 4 5⁺を維持した。細胞を、80日間まで維持したが、ほとんどの場合、分析するための細胞はほとんど残らなかった。細胞は決してそれらのC D 4 5マーカーを失わず、最初の集団中にC D 4 5¹⁰またはC D 4 5⁻細胞が存在したいくらかの場合において、これらの細胞は、死亡するか、または集団の100%が陽性である（図4）ように、8日目までにC D 4 5に向く。

30

【0204】

インビトロ研究により、8日間+の培養期間の間に、造血性幹細胞数の増加が明らかに示される。インビトロ増殖幹細胞の移植化可能性に取り組むために、新たに単離した臍帯血単核細胞、新たに単離したL i n⁻細胞、またはインビトロ増殖細胞を使用して、照射N O D / S C I Dマウスに移植した（図5）。投入細胞の増加は、移植レベルの増大を生じた。さらに、最低8日間の間の培養に入れられたL i n⁻の等数が、それらの0日目の対応物と同じ移植化能力を有した。このことは、より多くのN O D - S C I D再占有細胞が、8日間にわたって生成されたことを示唆する。

40

【0205】

（臍帯血細胞に由来する内皮細胞、骨（破骨細胞および骨芽細胞）、脂肪細胞、筋肉、星状細胞および神経細胞）

50

細胞を、配置し、（培養物の一定の分割によって）単一の細胞の観察を可能にする非常に低い密度で維持した。間質様細胞（接着性平坦細胞）は、増殖の3～4週間まで、培養物において観察されなかった。丸い細胞（個々の細胞は、反復観察のためにディッシュ中に特定される）を、増殖の3週間後に、より接着性になっていると観察した。その細胞をならし、それらの子孫は、丸い細胞および平坦な細胞の両方を生成し、これらの細胞は、混合したコロニーを形成する。さらに、12週まで懸濁液中で維持される細胞は、生存し続け、非接着性のままであった。1週間間隔で取り出したアリコートをし、沈め、接着性にした。逆に、接着性細胞を、トリプシン処理し、懸濁培養に戻し、非接着性細胞として増殖させ続けた。

【0206】

10

低増殖因子無血清培地中で12週まで増殖させた接着培養物は、脂肪細胞、内皮細胞、および骨芽細胞を想起させる細胞形態を生じた。これらの細胞は、低頻度で出現し、全ての3つの型は、単一培養物において出現する。これらの細胞の同一性を決定するために、培養条件を最適化して、十分な数が分析のために得られ得る時点まで、これらの細胞の収量を増大させた。上記のように、4日間ほど増殖させた細胞を、非血液組織を発現するように誘導することができた。

【0207】

（A）破骨細胞：)

0日目に、臍帯血液幹細胞を、破骨細胞のマーカー（TRAP）に対して試験した。試験した全てのサンプルは、この破骨細胞マーカーに対して陰性であった。FGF-4、SCFおよびFLT-3L中で7、14、21および28日間増殖させた臍帯血液幹細胞（系統マイナス）は、TRAPに対して高度に陽性であり（50%+）、多核性であり、この両方は、破骨細胞に特徴的である（図6A）。最大数のTRAP陽性細胞が、21日目に出現し（80%）、28日目までには、横ばいになった。破骨細胞様細胞の機能性を測定するために、細胞を、クエン酸カルシウム基質に入れ、その基質の吸収について測定した。FGF、SCF、FLT3リガンド中で増殖させた細胞は、TRAP陽性であるにも拘わらず、機能的破骨細胞ではなかった。その細胞は、クエン酸カルシウム基質の再吸収により観察されるような（図6B）機能的破骨細胞に分化させるために、破骨細胞分化培地（GM-CSFを含む血清含有培地）に入れなければならなかった。従って、培養条件が、破骨細胞前駆体生成を強く誘導した。

20

30

【0208】

（B）骨芽細胞：)

分化培養物を使用して、骨芽細胞を生成した。骨芽細胞は、少なくとも14日間増殖因子と共に培養した「増殖培地」UCB-Lin⁻細胞から生成し、次いで、骨特異的分化培地中に入れた。増殖培地中の細胞は、成熟骨マーカーおよび形態に対して陰性であるが、分化プログラムを完了して、骨芽細胞を示す特徴を有する成熟骨細胞を生じる能力を有する。増殖因子の量を増大または減少させて、長期化した培養期間は、アルカリ性の細胞も鉍化細胞も生じない。骨芽細胞をより成熟した骨細胞へと分化させるために、その細胞を、骨特異的培地へ移さなければならない。新たに単離したLin⁻UCB細胞を、骨培地に入れると、成熟した骨細胞を生成することなく死亡した。これらの同じ細胞を、Fgf、Scf、Flt3リガンド培地中で7日間培養し、次いで、骨特異的培地に移すと、アルカリホスファターゼ陽性の細胞が生じた。さらに、鉍化作用が、試験した細胞が、Alizirinレッド染色に対して陽性であるとして観察された。

40

【0209】

（c）筋肉：)

UCB-Lin⁻細胞を、無血清培地中で、FGF+SCF、FLT-3Lいずれかにおいて、7日間増殖させた。細胞は迅速に分裂し、造血性細胞のその丸い形態を維持した。8日の培養期間の最後には、胚性／初期筋肉マーカーデスミンに対して、RT-PCRにより細胞を試験した。陽性シグナルが、得られた（図7）。細胞をまた、成熟筋肉マーカーMyo-Dに対して試験したが、陰性のままであった。FGF中で増殖させた細胞を、

50

筋肉特異的細胞培養培地に入れ、試験すると、免疫細胞学により myo-D および筋肉特異的アクチンに対して陽性であった（図 8）。

【0210】

（D）内皮細胞：)

F l k-1 は、中胚葉細胞ならびに血管芽細胞および内皮細胞のマーカーである。内皮細胞前駆体は、F L K-1 陽性であり、このマーカーは、これらの細胞が機能的内皮細胞への成熟するにつれて失われる。0 日目の臍帯血幹細胞は、f l k-1 に対して陰性である。血管の生成を可能にする 3 D 培養系に入れた場合に、0 日目の細胞は全て、死亡した。このことは、他の特異化培地に入れられた L i n⁻ U B C 細胞の運命と似ている。このことは、未処理日の L i n⁻ U B C 細胞が、内皮細胞能力を有さないことを示す。L i n⁻ U B C 細胞を、F G F-4、S C F、F L T-3 L または T P O、S C F、F L T-3 L 中で最低 4 日間培養し、次いで、特異化内皮細胞培養に入れた場合、その細胞は、内皮細胞へと発生した。

10

【0211】

U B C L i n⁻ 細胞を、0、7、14、21 および 28 日間増殖させ、各細胞集団を、内皮細胞の形成および支持に特異的な組織培養条件に入れた。2 つの異なる培養物を使用した。第 1 は、3-D 脈管の増殖を支持する。細胞を、胚性内皮細胞マーカー F l k-1 および成熟内皮細胞マーカー C D 31 に対して試験した。0 日目には、陽性細胞は存在しなかった。内皮細胞の数は、細胞を、7~28 日間培養した場合に増大した。図 9 A は、F l k-1 マーカーが、丸い未成熟細胞の上に存在し、内皮細胞に特徴的な接着性の細長い内皮細胞形態になるにつれて失われることを示す。F G F、S C F、F L T-3 L 中で少なくとも 7 日間増殖させた U B C L i n⁻ 細胞は、インビトロで小さな脈管を形成することができた（図 9 B~F）。低酸素症は、V E G F の生成を誘導し得、この V E G F は、F L K-1 陽性内皮細胞の生成を誘導する。低酸素症 + F G F-4 は、F L K-1 陽性細胞の最高のパーセンテージを与えた。細胞を回収し、C D 31 発現に対して染色した（図 10）。最低 14 日間の内皮細胞培養における細胞の 80% は、C D 31⁺ であった。興味深いことに、細胞は、高密度で播種されなければならない。培養の 7 日後、細胞は、周辺に沿って、細長くなり、外側に向かって動く。培養の 4~6 週間後には、脈管のネットワークが観察される。細胞塊の中心の細胞は死滅し、脈管の外側周縁部は残る。

20

【0212】

実験の全てを、F L K⁺ 細胞、C D 34⁺ および C D 45⁺ に対して分類した細胞で繰り返した。F l k 1⁺ 細胞のみ（+/-他のマーカー）が、内皮細胞を生じた。

30

【0213】

（E）肝細胞：)

ヒト U B C / L i n⁻ 細胞が、機能的肝臓細胞を生成する能力を試験した。この細胞を、良好なインビトロ肝細胞モデルがないので、インビボモデルで試験した。未処理であったか、または F G F 中で 7 日間培養したかのいずれかの U B C / L i n⁻ 細胞を、N O D / S C I D マウスに尾静脈を介して注射した。6~10 週間後、肝臓を単離し、単一の細胞懸濁液を、得た。ヒト血液細胞移植化に対して陽性であったマウスは、H L A-A B C⁺ / C D 45⁻ である肝細胞を有した。このことは、その細胞が、ヒト非血液細胞であることを示唆する（5/25）。これらの細胞を、肝臓の単一の細胞懸濁液の F A C S 分類により単離し、C Y P 1 A 2 発現について試験した。このサブグループ（2/5）のうち、C Y P 1 A 2 陽性発現によって評価されるような、機能的肝細胞に対して陽性の細胞は非常に少なかった。その細胞を、ヒト血液細胞に対して特異的な抗 C D 45 抗体および全てのヒト細胞に対して特異的な抗 H L A-A B C で染色した。C D 45 陰性 H L A-A B C 陽性細胞を、マウス肝臓において同定した（図 11 A：矢印）。予備データにより、F G F-4 処理細胞が、非処理細胞の 3 倍もの多くの細胞に貢献することが示唆される。この間接的アプローチは、ヒト細胞であるが、血液細胞でない、肝臓中の細胞のみの同定を可能にする。

40

【0214】

50

マウスにおける機能的なヒト肝細胞を同定するために、CYP1A2陽性である細胞を、同定した。CYP1A2は、ヒト肝臓組織において見いだされる酵素である。この酵素は、ダイオキシンで処理したマウス肝臓中でのみ誘導され、従って、アッセイにおいて使用される抗体との交差反応の可能性を排除する。さらに、使用される抗体は、ヒトCYP1A2特異的であり、マウスCYP1A2タンパク質とは反応しない。NOD/SCIDマウスは、新たに移植された細胞の機能性を維持するために、いずれの肝臓損傷化学物質（例えば、四塩化炭素）でも処理しなかった。さらに、新たな細胞を、肝臓に侵入させて、そこに存在させ続ける（肝臓は、劇的に損傷されない）ことが好ましい。このことは、UCB細胞が、遺伝的欠陥のある肝臓（物理的な損傷は存在しないかもしれない）のための肝臓治療において使用される能力の評価を可能にする。これはまた、代謝の先天性欠陥を処置する非外科手術的方法を提供する。従って、非常に低レベルの肝臓移植化のみが、予期される。マウス肝臓において検出されるCD45⁺/HLA-ABC⁺細胞の約10～20%がまた、CYP1A2陽性である。このことは、移植レベルが、高い可能性があるが、より少ない機能的肝細胞が存在することを示唆する（図11B、C）。同じ肝臓を切片にし、CYP1A2抗体での免疫組織化学により、陽性細胞を検出した（図12）。

【0215】

新たに単離したUCB細胞（MNCまたはLin⁺）は、CYP1A2に対して陰性であった。NOD/SCIDマウスに尾静脈注射する前にFSFで7日間処理したUCB/Lin⁺細胞はまた、CYP1A2発現細胞に対して陰性であった。

【0216】

（E）星状細胞：

細胞の間質的性質に起因して、その細胞を、星状細胞マーカーグリアル繊維酸性タンパク質（GFAP）に対して試験した。上記の実験に関して、UBC/Lin⁺細胞を、増殖因子を含有する無血清培地中で0～7日間増殖させた。次いで、その細胞を、PCRによって、GFAP mRNAに対して試験した。0日目の細胞は、陰性であったが、7日間増殖させた細胞は、陽性であった（図13）。細胞をまた、免疫細胞学によりGFAPタンパク質発現に対して試験した。G-5星状細胞増殖補充物（星状細胞増殖を促進するために使用した）を補充した培地に入れた細胞はまた、GFAPに対して陽性であった。

【0217】

（F）神経系）

ヒトUCB/Lin⁺細胞を、0～7日間、増殖培地（Fgf, Scf, Flt3リガンド）で増殖し、初期神経マーカーネスチンについて試験した。0日目に試験したUCB/Lin⁺細胞は、ネスチンに対して陰性だった。一旦、細胞を7日間増殖すると、これらはPCRで陽性となった（図14）。これらの細胞は神経幹細胞潜在力を示していたので、この細胞を各種の培地で増殖し、成熟神経マーカーおよび神経形態学の発現を誘導する。あるポイントにおいて、この細胞は、ニューロスフィア形態を呈し得ることが予想された。神経幹細胞の増殖に関して公開されるように（31）、ニューロスフィアを誘導するために、この細胞をFGF/EGF/ヘパリン/DMEM/F12HAMs培地（血清有り、および血清無し）で増殖した。0日目の細胞および8日目の細胞は、無血清培地において3日後に死滅した（細胞は、血清ポジティブの培地中で生存したが、これらはニューロスフィアを形成しなかった）。上記に列挙された実験に関する限り、任意の神経培養物中の0日目の細胞は、任意の神経マーカーを発現しなかった。任意の神経マーカーまたは形態を発現するために、UBC/Lin⁺細胞を、明細書に記載される増殖培地中で、まず増殖しなければならなかった。

【0218】

7日目のUBC/Lin⁺細胞を、DMEM10%血清培地へ置いた場合、約50%の細胞が死滅したが、残りは、培養2～3週後に伸長し、そして接着した。これらの細胞は、繊維芽細胞の形態に類似した。長期培養は、神経形態を呈する接着細胞のいくつかの細胞（約50%）をもたらした。これらの細胞を、神経フィラメントタンパク質、Parkin、ネスチンおよび神経特異的エノラーゼの発現について試験した。神経形態を有する

細胞は、これらの各神経マーカーの少なくとも一つに対して、陽性であった。ニューロスフィア、Parkinおよび神経陽性細胞を、図15に示した。

【0219】

興味深いことに、 $10\mu\text{m}$ レチノイン酸 (RA) を7日間の増殖培地中で増殖する細胞に添加した場合、神経細胞の選択的成長／生存が生じ、次いで、接着細胞が出現するまで、DMEM／10%血清に置いた。RAを含む培養がより多くの細胞死の存在を有した場合、他の非神経細胞は全て死滅し、7日後の細胞半数は、非RA培養物であった。さらに、90+%のRA細胞は、ニューロフィラメントに対して陽性であったが、50%の非RA細胞のみが陽性だった (図15)。どの培地中の細胞も、細胞分裂が止まる前に12週間生存し、そして、この細胞は死滅する。これは、最終分化段階に到達する細胞におそ

10

【0220】

別の実験において、Fgf、Scf、Flt3リガンド中での増殖の7日後、細胞を、神経成長因子 (NGF) を有する培養物へ置いた。NGFおよびSCFおよびFLT-3リガンドの存在下で、この細胞は生存し、そして、いくつかの (<2%) ニューロフィラメント陽性細胞およびParkin陽性細胞を獲得した。従って、NGFは、臍帯血幹細胞を神経幹細胞へ変換する能力を有する。対照的に、NGF、SCF、Flt-3L細胞

20

【0221】

(G) 脂肪細胞

マウス骨髓誘導間質細胞は、同じ培養物中に破骨細胞および脂肪細胞を形成し得る。UCB-Lin⁻細胞を、増殖培養物へ移し、そして脂肪細胞について様々な日に試験した。7~28日間増殖された細胞は、Sudan IVで染色される場合、脂肪細胞に対して低いレベル (<1%) で陽性であった。1%未満の細胞が陽性に染色したが、増殖因子GM-CSFを欠失した同じ培養物の中に検出された細胞はないので、これは有意である (図16)。

【0222】

(H) 単一幹細胞または複数幹細胞

少なくとも一つの組織特異的マーカーに対するポジティブな細胞の合わせた百分率は、最小限で、単一細胞が、少なくとも二つの無関係のマーカーを発現していることを示す。これは、一つの細胞が二つ以上の組織を生じ得ることを示唆する。7日間のみ増殖培地におけるUCB/Lin⁻細胞の増殖は、全ての細胞がCD45⁺/HLA-ABC⁺/CD33⁺であるという結果となり、これは、全ての観察された細胞型の原因となる単一集団、多能性集団、クローナルな集団の存在を示唆する。これを確認するために、単一細胞を、96ウェルプレートへ置き、そして増殖培地中で増殖した。平均して5/96ウェルのみが、14日の増殖後、健全な分裂細胞を含有した。1つのウェルのみが、21日後、増殖を継続し、そして、静止および死滅する前に、全部で10週間継続した。この実験を、1ウェルにつき10細胞を用いて、繰り返し行った。7日後、10/96ウェルが、増殖集団を含んだ。

30

40

【0223】

特異的な組織は試験し得ないが、10%の10細胞/ウェル培養が、本出願人らの大量培養に類似する増殖特性を有するという事実は、初期集団が、異なる増殖率および生存率を有する細胞を含むが、単一細胞は観察された結果の原因となることを示唆した。多能性は、細胞と細胞との相互作用に依存し得、単一細胞のプレーティングは、UCB多能性細胞の生存に重要であるシグナル経路で分裂し得る。

【0224】

(考察)

50

臍帯血に由来する多能性幹細胞の産生を可能にする簡単な培養系を報告する。U C Bの有用性および大量のサンプルのバンキングの容易さは、H L A適合サンプルの有用性を確実にする。さらに、簡易化された培養系は、造血用途を超える組織治療に対して、臍帯血細胞の増殖された使用を可能にする。

【0225】

臍帯血の細胞が非造血細胞に分化し得るメカニズムは、以下に起因し得る：1) この細胞は天然には多能性であるが、これらの細胞の運命は、周辺細胞または局所の環境により決定される；または2) この細胞の運命は、決定しているが、これらが代替環境（分化転換）に置かれる場合、この細胞はプログラムを変える。

【0226】

再増殖する造血細胞は、前駆細胞（C D 3 4⁺、C D 3 8⁺ / ⁻ および L i n⁻）（これらは、制限された再生能力を有する）、および幹細胞（C D 3 4⁺ / ⁻、C D 3 8⁻、L i n⁻）（これらは、前駆集団内に含まれ、さらにより高い自己再生能を有する）として分類され得る。コロニーアッセイ、またはF A C S分析によって測定されるので、前駆細胞のインビトロの増殖はこれらの増殖を導き得るが、限定されており、例えあったとしても、長期再増殖は、マウス骨髄再構成研究の間に生じる（32）。さらに、幹細胞、前駆細胞およびアクセサリ細胞（全ては、U C B内で発見される）との間のオートクライン反応は、生じる任意の幹細胞増殖が、初期培養（33）において存在する、外因性サイトカインの直接的な効果または非幹細胞によって媒介される間接的な効果に起因するか否かを分類することを困難にする。さらに、インビトロの培養は、特異的な細胞表面マーカー（ヒト体内で見つけられない表面分子の組み合わせを生じる）の欠失を生じ得る。

【0227】

U C Bの幹細胞の増殖方法は、造血組織または非造血組織であろうと、同じである。細胞周期を刺激する任意の因子を有するU C B細胞集団の処理は、幹細胞（造血組織／細胞および非造血組織／細胞の両方に生じ得る）の数の増加を導く。非造血組織を生じる幹細胞はまれな集団であり得、そして最小増殖期間は、検出可能レベルが多様であるために必要とされ得る。あるいは、細胞分裂は、これらの幹細胞の潜在力を増大する造血幹細胞を調節解除し得るので、これらは胚性幹細胞（E S細胞）に類似の特徴を発現する。任意の理論に拘束されることを望まないが、このデータは、後者を示唆する。

【0228】

マウス骨髄細胞を用いる研究は、これらの細胞は、非造血組織になる潜在力を有することを実証している。分化転換に対する細胞の能力は、組織療法に対して有力なツールとなる。ヒト臍帯血幹細胞は、インビボおよびインビトロにおいて、いくつかの非血液組織を生じ得るということを、本明細書中で実証した。ここで、2工程の培養系を報告する。特殊の分化培養物（組織特異的）に曝露する前に、U B C細胞を特殊な増殖培地へ置いた場合、U B C細胞は、多能性胚性幹細胞の特徴を発現するように誘導し得る。新鮮な単離U C B幹細胞は、特殊な細胞を産生しない。この細胞は、これらの組織の潜在力を増大させるために、増殖培養において、前培養／増殖されなければならない。前培養は、細胞分裂を増大するために作用する（おそらく、「白紙状態」の表現型を生じる正常な遺伝子調節を中断する）。最低限1週間増殖された細胞は、P C R、酵素分析、F A C Sまたは免疫組織化学によって検出される場合、多数の非血液マーカーに対して陽性である。増殖培地中で増殖された細胞は、胎性組織マーカーまたは初期非血液組織マーカー（例えば、初期筋マーカーD e s m i n）に対して陽性であるが、成熟マーカーM y o - Dに対して陰性である。破骨細胞および内皮細胞に対して示した通り、少なくとも7日間の増殖培地中での増殖後、この細胞は、特殊な分化培地中でこれらを増殖することによって、さらに成熟細胞型および機能的な細胞型へと分化され得る。これらは、胚性幹細胞と同じ特徴である。

【0229】

（増殖因子）

増殖因子は、増殖、誘導および組織のパターニングにおいて、直接的または間接的のい

ずれかで含まれる。細胞増殖を、細胞周期のG1期の間、細胞外シグナル（ホルモン、増殖因子およびサイトカイン）により調節する。これらのシグナル（セリン／スレオニンキナーゼの別個のセットによって、刺激性および抑制性の両方である）に応答する細胞は、サイクリンと呼ばれる短活動性調節タンパク質との結合に起因するサイクリン依存性キナーゼに対してcdkと称した。四つの哺乳類G1サイクリンは、D1、D2、D3およびEで特徴付けられている。各Dサイクリンは、一つ以上のキナーゼcdk2、cdk4およびcdk6に結合し得る（34）。さらに、これらは増殖因子刺激に対して直接応答し、そして、正常な内因性細胞周期シグナルに対してより小さく応答する（35）ので、Dサイクリンは特有であると思われる。Dサイクリンに対する決定的な応答期間は、酵母で定義された通り、G1（START）である。このポイント後、この細胞は、増殖因子にもはや依存せず細胞周期を継続する（36）。 10

【0230】

G1からSまでの移行は、各種の増殖因子によって誘導され得るが、神経幹細胞または造血幹細胞はいずれにせよ、G1ではなく、主にG₀に存在する（37）。サイトカインを用いてG1へ入るように誘導されたCD34+細胞は、サイトカインで処置されたCD34+細胞と比較した場合、再増殖のコホートにはより寄与しなかったが、G₀にとどまっているようであった（38）。この結果は、細胞周期への入り口は分化へ導き得るという事実を強調する。増殖プロモーター（例えば、FGF-4またはSCF（幹細胞因子）およびその他）の添加は、幹細胞周期を維持することにより分化を妨げ得る。さらに、FGFおよびSCFの両方は、アポトーシスの直接のブロッカーとして関係している（39, 40）。線維芽細胞増殖因子（FGF）、上皮細胞増殖因子（EGF）およびアクチビンは、潜在性の増殖刺激剤（これは、Dサイクリンレベルを変更し、増殖を促進し得る（41, 42））である。増殖因子の脱落は、サイクリンレベルおよび分化を減少に導く。従って、増殖因子は、増殖および分化の調節剤である。 20

【0231】

細胞は種々のサイトカインに反応し、そして、研究は、いくつかの細胞が他の細胞よりも、強いマイトジェン特性を有することを示す。Laddらにおいて、SCF、FLT3、IL-3およびIL-6の全て（43）は、細胞増殖を刺激する能力を有するが、IL-3だけは、高い増殖率を維持する能力を有した。他の研究は、これらが強いマイトジェンではないが、特異的なサイトカイン（例えば、SCF）は分化を妨げ得ることを示している。SCFは、CFU数を単独で増加する能力を有するか、または他の増殖因子と共に相乗的に増加する能力を有する。インビトロのSCFは、前駆体の集団（生存を増加させる）を維持し得るが、細胞増殖を引き起こさなかった。IL-3またはG-CSFとの組み合わせを使用して、SCFは、長期にわたって前駆細胞数に相加的な影響を有した（44）。FLT3リガンドは、IL-3の強いマイトジェン性活性の存在下で、CD34陽性細胞集団の維持に関係している（45）。SCFまたはFLT-3リガンドと対照的に、これは、他の因子（例えば、BMP-4、レチノイン酸またはTGF-β）は強い分化因子であることが明白である。TGF-βファミリーメンバー（BMP）は、細胞分化の誘導剤として重要である。マウス胎児において、BMPは、神経分化の開始に重要である。このメカニズムは明白に理解されていないが、BMPは、この細胞周期にマイナスの効果 40
を有し、その結果、より長い細胞周期の時間を生じ、そして分化を生じる遺伝子活性を増加させる。例えば、BMP-6は、間葉細胞を誘導し、骨芽細胞へ分化させ、そして、骨髄において、BMP-6は間質誘導性のIL-6レベルを減少させる（46）。IL-3は、全部の細胞数の増加を引き起こすが、CD34表面マーカーによって測定される場合は幹細胞／前駆細胞の減少を引き起こし、TNFαは、LTC-IC数の減少を引き起こし（47）、そして、TGF-βは、マウスBM移植を減少する（48）。いくつかの条件において、IL-3は前駆細胞増殖に対してポジティブな効果を有したが、IL-3はHSCを骨髄に向かわせる能力を阻害し得る。従って、インビトロにおける細胞数の増加は、骨髄移植の増加を伴わない（49）。 50

【0232】

(結論)

増殖系は、造血組織および非造血組織を生じる能力を有するヒト臍帯血誘導性幹細胞の発達およびその後の増殖を可能にする記載される。

【0233】

(実施例2)

(造血幹細胞増殖)

本実施例において検討される実験は、一人の成人患者または複数の成人患者に対して、首尾よい骨髄移植を実施するのに十分な細胞を獲得するため、単一UCBサンプル由来の造血組織をより産生するように設計された。これが臨床設定に適さないのも、これは血清および馴化培地の必要性の両方を排除するために重要である。さらに、血清培地および馴化培地に対する依存を減少することは、幹細胞表現型および細胞増殖の維持に対するさらなる制御を提供する。このために、ヒト胚性線維芽細胞株(CM-HEF)由来の馴化培地存在下で、UCB-HSCを維持するための種々の増殖因子の能力を試験した。次いで、無血清培地／馴化培地非含有培地において、細胞を試験した。幹細胞の維持および増殖を、コロニー形成単位(CFU)アッセイおよび細胞表面マーカー分析を幹細胞増殖の初期指標として用いて試験した(図17)。その後の実験において、LTC-ICアッセイおよびNOD/SCIDアッセイを、幹細胞表現型を確認するために、そしてこれらの細胞の移植の能力を確認するために使用した(図5)。

10

【0234】

無血清の馴化培地+FGF-4は細胞増殖を補助したが、血清+の馴化培地+FGF-4ほどは補助しなかった。馴化培地が排除されるように設定される培養は、10%血清およびFGF-4を有する培地を用いる。二つの培地(DMEMおよびIMDM)を試験した。FGF-4を含む培地へのSCFの添加は、増殖率を増加した。TPO、またはFGF-4+/-IL-3、SCF、FLT-3リガンドの組み合わせを用いて交換することにより、この血清を馴化培地から除去した。IL-3は、幹細胞を骨髄へ向かわせるように影響し得ることに留意のこと。

20

【0235】

等価な幹細胞の増殖の結果は、非馴化培地、25ng/ml TPOまたは25ng/ml FGF-4の添加を有する無血清IMDM、血清+馴化培地に+ [SCF、およびFLT-3リガンド]を用いて獲得した。一週につき2~3回供給することは、幹細胞表現型の高い増殖レベルおよびメンテナンスを維持するために必要である。同じ頻度で、100ng/mlの各増殖因子の添加は、効果を有さなかった。

30

【0236】

LTC-IC、CD34+/CD38-細胞に対するフローサイトメトリー、系統の欠損(Lin-)およびNOD/SCIDマウス試験によって分析される場合、上記の無血清培地／馴化培地非含有培地の使用は、0日目の細胞に対する最初の8日の間にわたって、CFUおよびLTC-ICの増加を生じた。細胞をさらに8日間(8~16日)の増殖をさせた場合、全体の細胞数は増加したが、この造血幹細胞集団は枯渇した。

【0237】

本発明は、現在、好ましい実施形態と考えられる参考文献に関して記載しているが、本発明は、開示された実施形態に限定されていないことが理解される。反対に、本発明は、添付の特許請求の範囲の意図および範囲内に含まれる各種の改変体および同等の組み合わせを包含することが意図される。

40

【0238】

全ての刊行物、特許および特許出願が、その全体が同じ程度に参考として援用され、あたかも全ての刊行物、特許および特許出願は、本明細書中において、同じ範囲においてその全体が参考として援用されると具体的にそして個々に表示される。

【0239】

【数 1】

参考文献のリスト

1. Rubenstein et al, 1998, N Engl. J. Med. 339, 1565-77
2. Sambrook, Fritsch, & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y)
3. DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985);
4. Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984);
5. Nucleic Acid Hybridization B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985);
6. Transcription and Translation B.D. Hames & S.J. Higgins eds (1984);
7. Animal Cell Culture R.I. Freshney, ed. (1986);
8. Immobilized Cells and enzymes IRL Press, (1986); and
9. B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984).
10. Stites et al. (eds) Basic and Clinical Immunology, 8th Ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn. (1994);
11. Mishell and Shigi (eds), Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., New York (1980).
12. Givol and Yayon, 1992, FASEB J., 6:3362-2269
13. Dionne et al., 1990, EMBO J., 9:2685-2692
14. Ornitz and Leder, 1992, J. Biol. Chem., 267:16305-16311
15. Chellaiiah et al., 1994, J. Biol. Chem., 269(15):11620-11622,
16. Small et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:459-463
17. Buhring et al. in Schlossman et al., (Eds), Leucocyte Typing V, Oxford University Press, Oxford 1995, pp. 1882-1888)
18. Zsebo et al., 1990, Cell 63: 213-224,
19. Gluckman et al, 1993, N Engl J Med 337, 373-81
20. Van der Putten, 1985, Proc Natl Acad Sci U S A.;82:6148-52;
21. Stewart et al. 1987, EMBO J. 6:383-388).
22. Heim et al, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:12501,
23. M. Zernicka-Goetz et al, 1997, Development 124:1133-1137,
24. Okabe, M. et al, FEBS Letters 407:313-319, 1997;
25. D.P. Hill and W. Wurst, 1993, Methods in Enzymology, 225: 664
26. Dick JE, Ann N Y Acad Sci. 1999 Apr 30;872:211-7
27. Tropepe V, et al., 2000, Science 287, pp.2032)
28. Minkin Cedric, "Bone Acid Phosphatase: Tartrate-resistant acid phosphatase as a Marker of Osteoclast Function", Calcif Tissue Int (1982) 34:285-290.
29. Jiang et al., 2002, Nature 418, 41-49
30. Quirici, et al., 2002, Experimental Haematology 30, 783-791
31. Tropepe et al., Dev Biol 1999 Apr 1;208(1):166-88)
32. Piacibello et al, 1999, Blood 93, 3736-49
33. Madlambayan et al., 2001, J Hematother Stem Cell Res. 10, 481-492
34. Sicinski et al., 1995, Cell, 82, 621-30

10

20

30

【 0 2 4 0 】

【数 2】

35. Matsushime et al, 1991, Cell 65, 701-713
36. Merrill et al., 1992, BioEssay 14, 823-830
37. Ogawa, M. 1993, Blood 81, 2844-2853
38. Gothot et al., 1998, Blood 92, 2641-2649
39. Huang et al, 1999, Blood 93, 2569-2577
40. Gruber et al., 1999, Blood 94, 1077-85
41. Sherr 1992, Ciba Found Symp, 170, 209-219
42. Rao and Kohtz, 1995, J. Biol. Chem, 270, 4093-4100
43. Ladd et al., 1997, Blood 90, 658-68
44. Li C, Johnson G, Blood 84; 1994; 408-414
45. Nielsen, J. Hemato stem cell res 2000, 9(5):695-701).
46. Ahmed N, et al 2000, Exp. Hematology 28:1495).
47. Petzer et al., 1996, J Exp Med, 183, 2551-2558
48. Gao et al 1998, PNAS 95, 13006-13011
49. Yonemura et al, 1996, PNAS 93:4040
50. C. Basilico and D. Moscatelli, Adv. Cancer Re. 59, 115(1992)
51. Moroni E, Dell'Era P, Rusnati M, Presta M.J. Hematother Stem Cell Res 2002 Feb;11(1):19-32
52. Goldfarb M.Sci STKE 2001 Oct 30;2001(106):PE37
53. Gilliland DG and Griffin JD. Blood 2002 Sep 1;100(5):1532-42
54. Smith MA, Court EL, Smith JG Blood Rev 2001 Dec;15(4):191-7

10

【図面の簡単な説明】

【0241】

20

本発明は、ここで、以下の図に関して記載される。

【図1】図1は、 $L i n^{-}$ 幹細胞の増殖および維持を示す。異なる増殖因子を用いて、7日間増殖後、 $L i n^{-}$ 幹細胞の増加があった。 $L i n^{-}$ 細胞を、 $F G F-4$ 、 $S C F$ および $F l t-3$ リガンドの組み合わせを用いて、無血清培地で増殖した。幹細胞の最良の増殖および維持は、三つの増殖因子が全て存在した場合に生じる。

【図2】図2は、 $L i n^{-}$ 幹細胞が、 $H L A-A B C^{+}$ および $C D 4 5^{+}$ であることを示す。 $L i n^{-}$ 細胞を選択し、そして $C D 4 5$ および $H L A-A B C$ 陽性細胞に対してフローサイトメトリーで分析した。0日目の $L i n^{-}$ 細胞および7日間増殖したこの同一の細胞は、100%の $C D 4 5^{+}$ および $H L A-A B C^{+}$ である。0日目の $L i n^{-}$ 細胞は、 $C D 4 5^{+} / H L A-A B C^{+}$ 細胞の二つの集団を含み、一方は、発現レベルが低い、明らかに陽性である。

30

【図3】図3は、生着させた $N O D / S C I D$ マウスにおけるヒト間質細胞の存在を示す。 $C D 4 5^{-} / H L A-A B C^{+}$ 細胞を、 $F G F$ 、 $S C F$ 、 $F L T-3$ リガンド細胞または0日目の $L i n^{-}$ 細胞を生着させた $N O D / S C I D$ マウス由来の骨髓吸引物から単離した。これらの細胞は、支質様細胞であり得る。これは、培養物中の間質細胞/間葉細胞の所見を支持する。

【図4】図4は、培養時間に対する細胞集団の変化を示す。 $C D 3 4^{+}$ 細胞の初期増加は、初めの2~3週の増殖で生じるが、次いで減少する。 $C D 3 3^{+}$ 細胞は迅速に増加し、これは既存の細胞が、このマーカーを発現し始めていることを示唆している。細胞の主な集団は $C D 4 5^{+}$ である。

40

【図5】図5は、8日間、 $F g f$ 、 $S C F$ 、 $F L T 3$ リガンドで増殖させた細胞を、 $N O D / S C I D$ マウスに移植した結果を示す。細胞の増殖は、3×投入量である。マウスにつき同じ細胞数を移植することは、同等の生着レベルという結果となった。

【図6】図6は、破骨細胞を示す。4~28日間、 $F g f$ 、 $S C F$ 、 $F L T 3$ リガンドで増殖した $L i n^{-}$ 細胞は、A) $T R A P$ 染色陽性、およびB) 血清および $G M-C S F$ 存在下でのクエン酸カルシウム基質の吸収、によって決定されるように、破骨細胞を産生した。

【図7】図7は、 $D e s m i n$ 陽性細胞を示す。0日目の $L i n^{-}$ 細胞は、早期筋マーカー ($D e s m i n$) に対して陰性である。7日間増殖した $L i n^{-}$ 細胞は、 $P C R$ で決定されるように、 $d e s m i n$ 陽性になる。これらの細胞は、成熟筋マーカーにおいては陰

50

性のままである。

【図8】図8は、筋アクチン陽性細胞（下のパネル）およびMyo-D陽性細胞（上のパネル）を示す。7日間、Fgf、SCF、FLT3リガンドで増殖し、次いで、筋肉細胞増殖を支持する条件下で増殖したLin⁻細胞は、筋特異的なアクチンおよびMyo-Dに対して陽性の細胞という結果となった。成熟筋マーカーMyo-Dに対して陽性の細胞は少なかった。

【図9】図9は、内皮細胞を示す。Lin⁻細胞は、Fgf、SCF、FLT3リガンドの条件で増殖後に、Flk-1に対して陽性である。これらの細胞をVEGF存在下で増殖する場合、この細胞は伸長し、そして内皮細胞の発達について予測される通り、Flk-1を喪失する（A）。マトリックス内に位置する同じ細胞は、脈管様構造のネットワークへと増殖する（B～F）。

【図10】図10は、CD31陽性の内皮細胞を示す。CD31陽性細胞のほとんどは、UCB Lin⁻細胞から獲得され得る。細胞を、本明細書に記載される条件で増殖し、IgGコントロール（A）、および抗CD31抗体（BおよびC）を用いて染色した。

【図11】図11は、UCB細胞由来の肝細胞を示す。CYP1A2陽性肝細胞は、ヒトUCB Lin⁻細胞を生着させたNOD/SCIDマウスの肝臓で発見された。ヒト非血液細胞（CD45⁻/HLA⁺）をフローサイトメトリーによって、生着されたマウス肝臓から単離した（A）。CD45⁺/HLA⁺ヒト血液細胞およびヒト非血液細胞の両方を、CYP1A2の存在について試験した（BおよびC）。CYP1A2陽性細胞は、機能的な肝細胞を表す。これらの細胞は、肝臓で見出されたヒト非血液細胞の総数よりも少ない数である。CYP1A2を発現するマウス細胞またはヒト血液細胞はない。

【図12】図12は、生着したマウス肝臓の免疫組織化学を示す。CYP1A2抗体を用いて肝臓切片の免疫組織化学を実施した。陽性細胞を検出した。

【図13】図13は、Lin⁻集団において検出した星状細胞を示す。Lin⁻細胞は、Fgf、SCF、FLT3リガンドで最初に増殖しない限り、星状細胞マーカーGFAPに対して陰性である。PCRをGFAP mRNAの存在を検出するために使用した。

【図14】図14は、神経陽性細胞を示す。7～14日間増殖したLin⁻細胞は、PCRによるネスチンmRNAについて陽性である。

【図15】図15は、神経細胞の免疫組織化学を示す。Fgf、SCFおよびFlt3リガンドでプレ増殖し、次いで、DME+血清へ移し変えたLin⁻細胞は、神経フィラメントおよびParkinに対して陽性である。レチノイン酸（RA）の添加は、最初にニューロスフィア（neurosphere）の形成を生じ、そして、さらに培養すると神経フィラメント陽性細胞を生じる。RAは、培養中の非神経細胞を死滅させる。

【図16】図16は、脂肪細胞陽性細胞を示す。破骨細胞の増殖を生じる条件と同じ条件下で、脂肪細胞を検出し得る。細胞培養において脂肪細胞を検出するために、Sudan IV染色を使用した。

【図17】Lin⁻細胞を0日間、4日間または8日間、FGF、SCF、FLT3リガンドで増殖した。約3×の細胞増殖が、8日にわたって生じた。500細胞/アッセイを使用し、そして16日後コロニーを計数した。三つの群の間に有意な相違はない。これは、増殖された細胞が、処置していない集団と同等であることを示した。

10

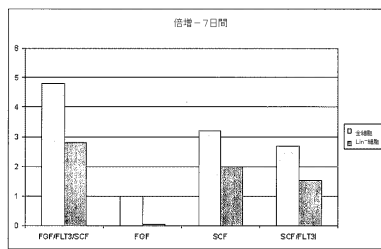
20

30

40

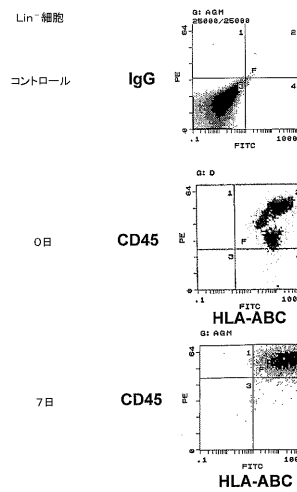
【 図 1 】

FIGURE 1



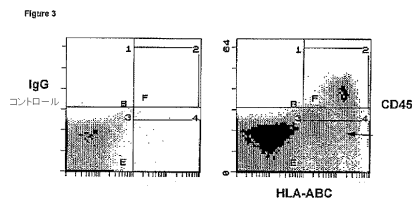
【図 2】

FIGURE 2



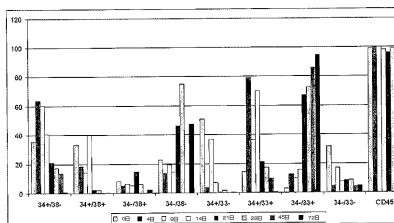
【図 3】

FIGURE 3



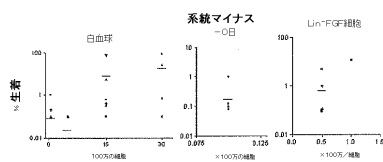
【図 4】

FIGURE 4



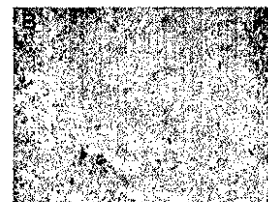
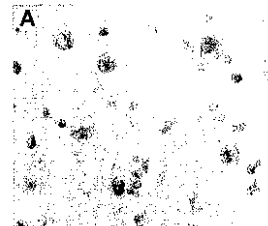
【図 5】

FIGURE 5



【図 6】

FIGURE 6



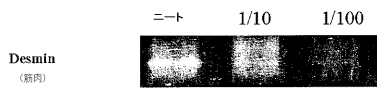
**GM-CSF/
無血清**



**GM-CSF/
+ 血清**

【図 7】

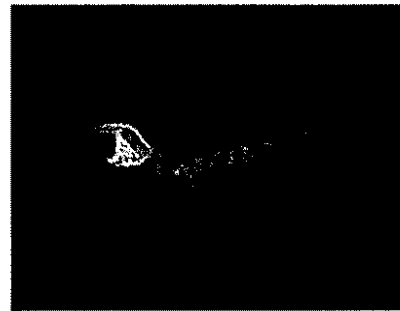
FIGURE 7



【図 8】

FIGURE 8

MYO D

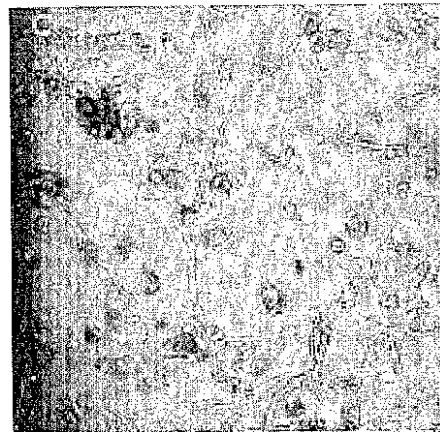
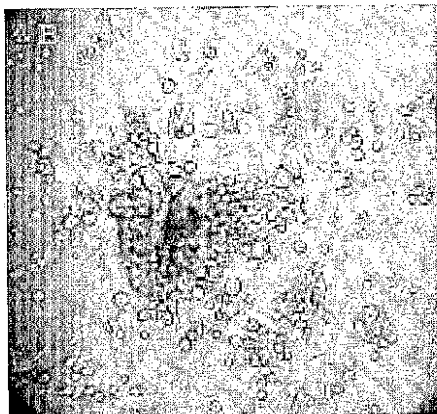
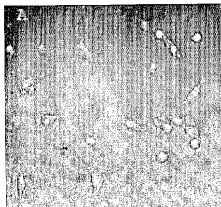


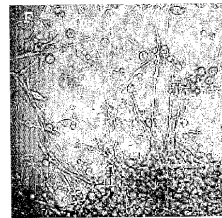
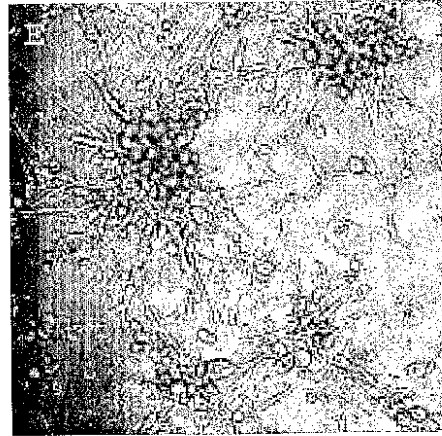
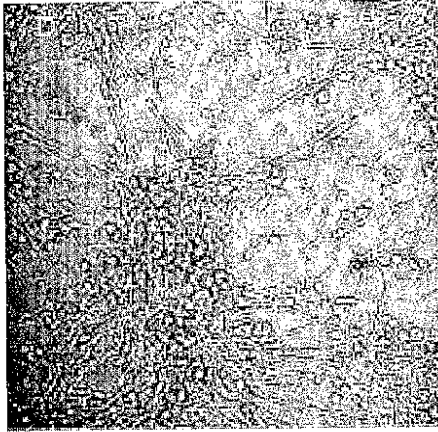
筋
アクチン



【図 9】

FIGURE 9

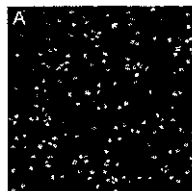




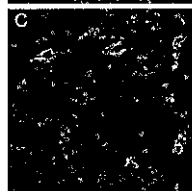
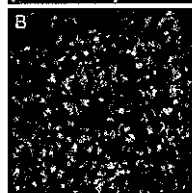
【図 1 0】

FIGURE 10

IgGコントロール

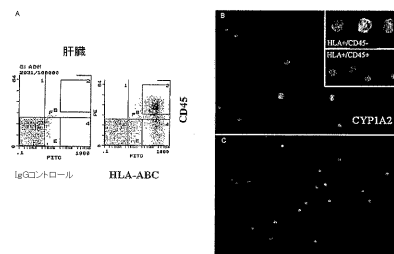


CD31



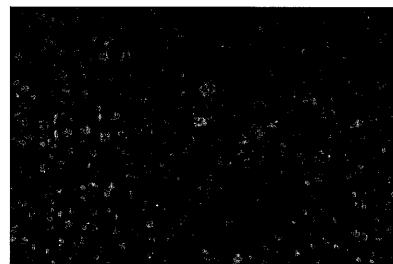
【図 1 1】

FIGURE 11



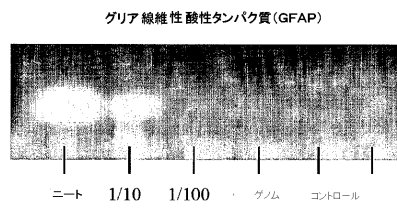
【図 1 2】

FIGURE 12



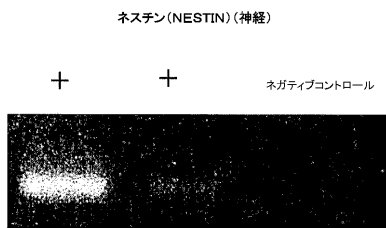
【図 13】

FIGURE 13



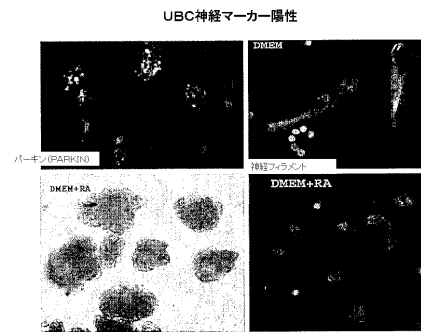
【図 14】

FIGURE 14



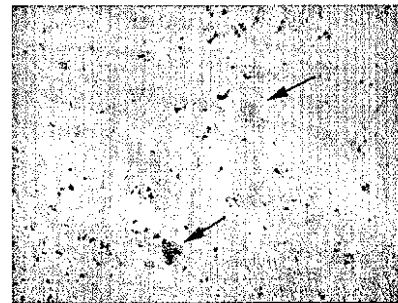
【図 15】

FIGURE 15



【図 16】

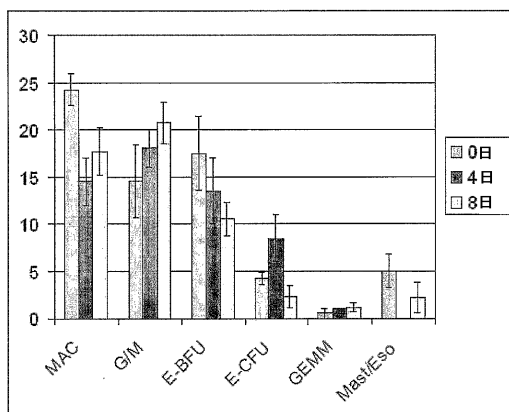
FIGURE 16



脂肪細胞
陽性

【図 17】

FIGURE 17



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No		
PCT/CA 02/01979		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N5/08 C12N5/10 A61K35/14 A61K48/00 G01N33/50 A61P7/00 A61P37/00		
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) IPC 7 C12N A61K G01N A61P		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, MEDLINE, EMBASE, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 66698 A (CRYO CELL INT ;UNIV SOUTH FLORIDA (US)) 13 September 2001 (2001-09-13) page 8, line 12 - line 32 page 9, line 6 - line 10 page 9, line 29 - line 33 page 10, line 1 - line 11 page 11 page 12, line 1 - line 2 page 20 page 27, line 19 - line 24 page 29, line 8 - line 16 --- -/--	1-33
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
4 September 2003		22/09/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Grötzing, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten Application No
PCT/CA 02/01979

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 71016 A (WEISSMAN IRVING L ;STEMCELLS INC (US); LAGASSE ERIC (US)) 27 September 2001 (2001-09-27) page 2, line 24 - line 25 page 3, line 25 - line 36 page 4, line 1 - line 2 page 7, line 29 - line 36 page 8 page 9, line 32 - line 35 page 10, line 1 - line 20 page 11, line 19 - line 22 page 12, line 15 - line 16 page 17; example 1 ---	1-33
X	WO 00 17326 A (EISENBERG CAROL A ;MUSC FOUND FOR RES DEV (US)) 30 March 2000 (2000-03-30) page 5, line 21 - line 26 page 6, line 18 - line 23 page 9, line 15 - line 27 page 10, paragraph 3 page 16, last paragraph page 17, paragraph 1 page 17, line 27 - line 29 page 18, paragraphs 1,3 page 19, paragraphs 2,3 page 24, last paragraph ---	1-33
X	WO 98 18486 A (ICOGEN CORP ;SEATTLE BIOMEDICAL RESEARCH IN (US)) 7 May 1998 (1998-05-07) page 7, line 24 - line 33 page 8, line 4 - line 8 page 10, line 35 - line 37 page 11, line 1 page 14, line 16 - line 23 page 15, paragraphs 2,3 page 17, line 4 - line 11 page 21, line 12 - line 16 ---	1-33
X	PIACIBELLO WANDA ET AL: "Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood." BLOOD, vol. 89, no. 8, 1997, pages 2644-2653, XP002253363 ISSN: 0006-4971 page 2645, paragraph "CD34+ cell purification" page 2645, right-hand column, paragraph 2 --- -/--	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern — il Application No

PCT/CA 02/01979

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GALIMI F ET AL: "HEPATOCYTE GROWTH FACTOR INDUCES PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF MULTIPOTENT AND ERYTHROID HEMOPOIETIC PROGENITORS" JOURNAL OF CELL BIOLOGY, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, NEW YORK, US, US, vol. 127, no. 6, PART 1, 1 December 1994 (1994-12-01), pages 1743-1754, XP000564573 ISSN: 0021-9525 abstract page 1744, paragraph "CD34+ cell separation" page 1745, left-hand column, paragraph 2 -----	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/CA 02/01979

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0166698	A	13-09-2001	AU 4346401 A EP 1263930 A1 WO 0166698 A1 US 2002028510 A1 US 2003036729 A1	17-09-2001 11-12-2002 13-09-2001 07-03-2002 20-02-2003
WO 0171016	A	27-09-2001	AU 5096601 A WO 0171016 A1 US 2001049139 A1	03-10-2001 27-09-2001 06-12-2001
WO 0017326	A	30-03-2000	AU 6056299 A WO 0017326 A1	10-04-2000 30-03-2000
WO 9818486	A	07-05-1998	AU 5083098 A WO 9818486 A1	22-05-1998 07-05-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 キャスパー, ロバート
カナダ国 オンタリオ エム4ダブリュー 1ティー7, トロント, クレセント ロード 8
9

(72)発明者 ロジャース, イアン
カナダ国 エル4シー 4ケー9 オンタリオ, トロント, ペンドリス ストリート 65

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 DA03 EA04 FA10 GA11 HA14
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ13 QQ43 QQ52 QQ79 QR08 QR32
QR56 QR62 QR69 QR77 QR80 QS24 QS25 QS34 QS36 QS38
QX01
4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 BA25 BB34 CA44 CA46
4C087 AA01 AA02 BB44 BB57 BB64 NA14 ZA51 ZB01 ZC01

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005512592A5	公开(公告)日	2006-03-16
申请号	JP2003556509	申请日	2002-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	西奈山医院		
申请(专利权)人(译)	西奈山医院		
[标]发明人	キャスパークバート ロジャースイアン		
发明人	キャスパー, ロバート ロジャース, イアン		
IPC分类号	C12N5/06 A61K35/14 A61K35/28 A61P7/00 A61P37/00 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	A61K35/28 A61K35/51 A61P1/16 A61P3/10 A61P19/02 A61P19/08 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/32 C12N5/0607 C12N5/0647 C12N2500/25 C12N2500/36 C12N2500/90 C12N2501/11 C12N2501/115 C12N2501/119 C12N2501/12 C12N2501 /125 C12N2501/13 C12N2501/145 C12N2501/165 C12N2501/22 C12N2501/23 C12N2501/26 C12N2501/385 C12N2501/42 C12N2502/13 C12N2503/02 C12N2506/11 C12N2510/00 G01N33/5073 G01N33/56966		
FI分类号	C12N5/00.E A61K35/14 A61K35/28 A61P7/00 A61P37/00 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.Y C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/FA10 4B024 /GA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR69 4B063 /QR77 4B063/QR80 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS38 4B063/QX01 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA25 4B065/BB34 4B065/CA44 4B065 /CA46 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB44 4C087/BB57 4C087/BB64 4C087/NA14 4C087/ZA51 4C087/ZB01 4C087/ZC01		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/342586 2001-12-21 US		
其他公开文献	JP2005512592A		

摘要(译)

本发明涉及一种包含造血细胞与潜在的或增强的潜力用于形成非造血细胞，制造这种细胞的组合物的方法的细胞的组合物;本发明的细胞组合物细胞外，非造血细胞，生理特性，功能特性和/或用于分化成代表免疫学特性的细胞的方法的形态特征;涉及使用和细胞组合物。本发明还涉及增殖造血干细胞和造血祖细胞的方法。该方法：(a)一种步骤获得的造血细胞;可以通过(B)阳性选择或阴性选择，富集的造血细胞对造血干细胞和造血祖细胞的获取步骤，造血细胞制剂富集;以及(c)培养造血干细胞和在生长条件下富集的造血祖细胞，其结果是，细胞的制备中，图示潜在的或增强的潜在不同类型的非造血细胞的并形成一部电影。