

明 細 書

[発明の名称] 骨疾患治療用医薬組成物

[技術分野]

[0001]

本発明は、骨疾患治療用医薬組成物に関する。

[背景技術]

[0002]

低ホスファターゼ症 (Hypophosphatasia, HPP) は、ALPL遺伝子変異による常染色体劣性遺伝症であり、アルカリホスファターゼ (ALP) の欠損による石灰化障害を起こす。そして、ALPの活性低下にともない蓄積するピロリン酸が石灰化を障害することや、局所のリン濃度が低下することにより、骨の低石灰化、くる病様変化が引き起こされる。

[0003]

血清学的には、ALPの基質であるphosphoethanolamine、inorganic pyrophosphate (ピロリン酸)、pyridoxal 5'-phosphateの上昇がみられる。骨関連の臨床像として、骨の湾曲、易骨折性、歯の脱落等が確認され、中枢神経症状としては、けいれんや難聴、発達遅滞が確認される。重症例は致死的な臨床経過をたどるか、軽症例でも日常生活が制限されることが多い。特に肋骨をはじめとする胸郭の低形成による呼吸障害がある場合、生命予後が不良である。最も重症な周産期に発症する患者の死亡率は50～100%である。現状国内患者数は100～200人とされ、効果的な治療法は未確立である (対症療法のみ)。

[0004]

現在行われているHPPの治療法は、ALP酵素補充療法である。この酵素製剤を投与することで骨の石灰化が改善し、重症HPP患者の生命予後が改善するだけでなく、軽症例でも運動機能が回復し得る。しかし、補充療法であるため生涯に渡って定期的に投与する (週3回皮下注射) 必要があること、酵素に対する抗体が産生して効果が減弱すること、脳血液関門を通らないため中枢神経系症状は改善しないこと、医療費が高額であること (最も投与量が少ない患者でも年間2,000万円以上) などの問題点がある。

[0005]

ところで、間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) は、骨髄、脂肪組織、胎盤、歯髄、羊膜等様々な組織から比較的容易に分離可能な細胞である。その組織修復作用、免疫抑制能に着目し、多数の疾患を対象として数百もの臨床試験が進行中である。しかしながら、後期臨床段階に至った試験は少数であり、また各国規制当局により承認されたものは、日本における重症GvHDを対象にしたTemcel (JCR-Pharma社)、2019年当初に欧州で承認推奨を受けたTigenix社のAlfisel (対象はクローン病に由来する肛門裂傷) など、数が限られている。

[0006]

このようなMSCの実用化の困難さの原因としては、投与する細胞を大量かつ均質に製造する上での品質管理が難しく、また投与後の患部への送達の難しさ、非侵襲的な細胞トラッキング技術の欠如 (体内動態の把握困難) 等、種々の原因が指摘されている。

[0007]

以前、本発明者らは、LNGFR (CD271) 及びThy1 (CD90) の2種の抗体を用いることで極めて効率よくヒトMSCを選別することができることを明らかにし、骨髄、末梢血、胎盤絨毛膜及び歯髄からセルソーターを用いてヒトMSCを直接分離する技術を開発した。この技術によって得られた細胞群 (Rapidly Expanding Clone: REC) は、優れた増殖能、分化能及び遊走能を示し、高品質かつ高純度なヒトMSCであることが確認されている (特許文献1、非特許文献2)。

[0008]

また、本発明者により、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に係る指針」に基づき、重症HP P患者に対する骨髄移植併用同種骨髄由来MSC移植治療が行われた (非特許文献1)。この臨床研究では、骨髄移植によりドナー由来の免疫細胞 (骨髄細胞) に置換した後にMSCを移植することで、移植したMSCの一部が拒絶されることなく骨髄に生着して正常骨が形成されることが示唆された。

[先行技術文献]

[特許文献]

[0009]

[特許文献1] 特許6363950号

[特許文献2] 国際公開2016/017795号パンフレット

[非特許文献]

[0010]

[非特許文献1] T. Taketani et al., "Ex vivo expanded allogeneic mesenchymal stem cells with bone marrow transplantation improved osteogenesis in infants with severe hypophosphatasia," Cell Transplant., vol. 24, no. 10, pp. 1931-1943, 2015

[非特許文献2] Mabuchi Y et al., "LNGFR+ Thy-1+ Vcam-1hi+ cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells". Stem Cell Reports 1(2): 152-165, 2013

[発明の概要]

[発明が解決しようとする課題]

[0011]

骨髄移植と併用した同種骨髄由来MSC移植による臨床上的著明な効果として、(i)骨の石灰化及び生命予後の改善、(ii)中枢神経系症状の回復及び精神発達が挙げられる。しかし、MSC移植後の患者において正常な骨構造を形成させ、さらなる効能を得るためには、より高い遊走能や骨分化能を有した高純度なMSCを使用することが求められている。

[課題を解決するための手段]

[0012]

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、高純度間葉系幹細胞の投与とともに造血幹細胞移植を併用することにより、上記課題を解決することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 高純度間葉系幹細胞を含む、対象において骨芽細胞を増加させる医薬組成物であって、当該対象への造血幹細胞移植と併用するように用いられる、前記医薬組成物。

[2] 造血幹細胞が臍帯血由来のものである[1]に記載の医薬組成物。

[3] 造血幹細胞が、対象以外のドナーの骨髄由来のものである[1]又は[2]に記載の医薬組成物。

[4] 対象が先天性骨系統疾患患者である[1]～[3]のいずれか1項に記載の医

薬組成物。

[5] 先天性骨系統疾患が低ホスファターゼ症である[4]に記載の医薬組成物。

[6] 高純度間葉系幹細胞が、ヒト骨髄由来の高速増殖性間葉系幹細胞である[1]～[5]のいずれか1項に記載の医薬組成物。

[7] 高速増殖性間葉系幹細胞が、LNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)が共陽性の幹細胞クローンの細胞集団であって、以下の(a)及び(b)の少なくとも1つの特徴を満たすものである、[6]に記載の医薬組成物。

(a) フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が40%以下である

(b) 平均細胞サイズが $20\mu\text{m}$ 以下である

[7-1] 前記ヒト骨髄由来高純度間葉系幹細胞は、LNGFR (CD271)が陽性、又はLNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)が共陽性であることを指標に分離された、高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団であって、以下の(a)及び(b)の少なくとも1つの特徴を満たす細胞集団である、[6]に記載の組成物。

(a) フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が40%以下である

(b) 平均細胞サイズが $20\mu\text{m}$ 以下である

[7-2] 前記ヒト骨髄由来高純度間葉系幹細胞は、LNGFR (CD271)が陽性、又はLNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)が共陽性の細胞に由来する高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団であって、以下の(a)及び(b)の少なくとも1つの特徴を満たす細胞集団である、[6]に記載の組成物。

(a) フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が40%以下である

(b) 平均細胞サイズが $20\mu\text{m}$ 以下である

[8] 細胞は、対象の体重1kgあたり 1×10^7 cellsを週1回投与し、これを4回繰り返すように用いられる、[1]～[7-2]のいずれか1項に記載の医薬組成物。

[9] 細胞が少なくとも 1×10^6 cell/mlの濃度で用いられる、[8]に記載の医薬組成物。

[10] 高純度間葉系幹細胞の提供者のHLAが、対象のHLAと不一致である、[1]～[9]のいずれか1項に記載の組成物。

[11] 高純度間葉系幹細胞の提供者のHLAが、対象のHLAの3座6抗原中少なくとも4抗原と一致する、[1]～[9]のいずれか1項に記載の組成物。

[12] 高純度間葉系幹細胞の提供者のHLAが、対象のHLAの3座6抗原中少なくとも3抗原と一致する、[1]～[9]のいずれか1項に記載の組成物

[発明の効果]

[0013]

本発明により、対象において骨芽細胞を増加させることが可能となった。その結果、本発明の医薬組成物を、低ホスファターゼ症等の先天性骨系統疾患に対し使用することができる。

[図面の簡単な説明]

[0014]

[図1]低ホスファターゼ症病態モデルマウスに対する高純度間葉系幹細胞REC-01の有効性検証のための移植試験方法を示す図である。

[図2]アスホターゼ アルファ（ストレンジック（登録商標））投与によるAlpl^{-/-}マウスの生存曲線（延命効果の検証結果）を示す図である。

[図3]細胞移植後の各マウスの体重の推移を示す図である。図は、細胞移植後のAlpl^{-/-}マウス（左）、およびAlpl^{+/-}マウス（正常群：右）の体重経時的変化である。比較対象として用いたAlpl^{+/-}マウスは、Alpl^{-/-}のlittermate（同腹仔）である。縦軸：移植日当日の体重を1として移植後の体重の推移を比で示した。横軸：移植後の日数を示した。

[図4]REC-01 移植2ヶ月後の骨髄内ALP 活性の検討結果を示す図である。図は、マウス大腿骨の凍結切片のALP染色像を示す。マウス骨髄細胞のみを投与したAlpl^{-/-}マウス（左）、マウス骨髄細胞+REC01を投与したAlpl^{-/-}マウス（中左および中右）、ALP 活性のポジティブ対照群であるAlpl^{+/-}マウス（右）矢印（青）の箇所は、ALP 染色陽性（青紫）であることを示した。

[図5]REC-01 移植による長期生着と骨髄内ALP 活性を示す図である。図は、移植3か月後のマウス大腿骨及び頭蓋骨凍結切片のALP染色像を示す。矢印（青）はALP染色陽性部位（青紫色）

[図6]REC-01移植の有無によるAlpl^{-/-}マウスの生存曲線を示す図である。

[発明を実施するための形態]

[0015]

1. 概要

一般的に細胞治療による治療効果のメカニズムとしては、レシピエントの組織

及び臓器に移植細胞が組み込まれ、レシピエントの細胞を移植細胞で置換することにより機能回復を行う細胞置換（Cellular Replacement）によるものと、移植細胞が産生する栄養因子、サイトカイン及び細胞外基質の作用により、ホストの細胞への保護効果又は組織の修復能力が高められて機能修復が行われる栄養効果（Trophic Action）を期待するものに大別される。

[0016]

低ホスファターゼ症（HPP）の治療では細胞置換が必須であり、患部への細胞の到達と長期的な生存と分化が最も重要な要素となる。また、本疾患は全身症状を示す骨形成不全疾患であるため、経静脈の全身投与が必要となる。しかし、通常の間葉系幹細胞（MSC）は大部分が遊走能を失っており、大量の細胞を経静脈投与した場合に肺塞栓や血栓形成などの副作用をひき起こすという危険性があり、一回で移植可能な細胞数に限りがある。また、HPP以外にも、治療法未確立の遺伝的骨形成疾患が450種類以上存在する。先天性骨系統疾患（Congenital Skeletal Diseases: CSD）は確立した治療法がなく、致死的な経過をとるか、著しく日常生活が障害されている。CSDでは骨を形成する骨芽細胞の起源であるMSCが骨化する経路が障害されているため、骨化能が正常な同種MSCによる骨再生医療は有望な治療法と考えられる。

[0017]

本発明は、間葉系幹細胞の中でも分化能及び遊走能に優れるとともに、高速増殖能を有する間葉系幹細胞、すなわち高純度間葉系幹細胞に着目して完成されたものであり、骨芽細胞を増加させ、ひいては骨疾患に対する医薬として使用することを特徴とする。

すなわち、本発明は、高純度間葉系幹細胞を含む、対象において骨芽細胞を増加させる医薬組成物を提供する。そして、本発明の医薬組成物は、対象への造血幹細胞移植と併用するように用いられる。

[0018]

2. 高純度間葉系幹細胞

本発明において使用される間葉系幹細胞は、中胚葉性組織（間葉）に由来する体性幹細胞であり、骨や血管、心筋の再構築などの再生医療への応用が期待されている。

間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪組織、胎盤組織、歯髄又は臍帯組織等の種々の組織から取得できる。その精製プロセスは、例えば以下のとおりである。

[0019]

ヒト又は非ヒト哺乳動物（例えば、ウシ、サル、ネコ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、イヌ、ウサギ、ヒツジ、ウマ、およびヤギ等）から採取した少量の脂肪片を酵素処理して得られる細胞型の混合集団から、遠心分離によって浮遊性の脂肪細胞集団を分離し、培養液を満たした培養器の天井面に接触させた状態で静置したときに下床面に沈降して増殖する線維芽様細胞を継代培養によって増殖させる。

また、本発明においては、iPS細胞由来の間葉系幹細胞や、市販の間葉系幹細胞を使用することも可能である。

[0020]

本発明者は、以前の研究により、LNGFR (CD271)が陽性の間葉系幹細胞 (CD271+細胞)、又はLNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)が共陽性の間葉系幹細胞 (CD271+CD90+細胞)の中から、増殖が早い高速増殖性の細胞クローン (Rapidly Expanding Clone: REC) を単離することに成功した。このRECクローンは、本発明における「高純度間葉系幹細胞」の一種である。

[0021]

RECは、96ウェルプレートに1個ずつ細胞を播種して培養したときに、2週間でコンフルエントに達することができる細胞であり、従来法で得た間葉系幹細胞と比較し、増殖能、分化能及び遊走能の全てが1000倍以上の能力を有する。そして、特に遊走能を保持しているため、経静脈内投与が可能となり、骨及び軟骨形成不全症等の重篤な全身性疾患に適用することができる。

高純度間葉系幹細胞の一種であるRECは、骨髓の単核球画分から、セルソーターでLNGFR (CD271)が陽性、又はLNGFR (CD271)及びThy1 (CD90)が共陽性の細胞を分離し、1細胞ずつプレートに播種して増殖能が早い高速増殖性のMSCだけを選別するため、極めて均一な細胞集団である。

[0022]

このようにして分離精製したRECは、分化能、増殖能、遊走能を保持したまま、単一の細胞から1012個を超えて増幅可能である。特に遊走能を保持しているため、経静脈内投与が可能となり、骨・軟骨形成不全症等の重篤な全身性疾患への応用が期待できる。

本発明においては、上記RECクローンのうち、分化能や増殖能においてばらつきの少ない細胞クローンを使用することができる。

[0023]

本発明において、LNGFR (CD271)が陽性、又はLNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)が共陽性の間葉系幹細胞を得るには、例えばW02009/31678号に記載の方法に従うことができる。その方法の概要は以下の通りである。

[0024]

まず、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、LNGFR (CD271)が陽性 (CD271+)、又はCD271及びCD90が共陽性 (CD271+CD90+) の細胞分画を選別することにより、間葉系幹細胞を高度に濃縮する。なお、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団に血球系細胞が含まれる場合は、非血球系の細胞を選別するために、CD45及びCD235aが共陰性 (CD45-CD235a-) の細胞を選別する工程を加えてもよい。

[0025]

間葉系幹細胞が含まれる細胞集団は、フローサイトメトリーやアフィニティー・クロマトグラフィーによって調製することができる。

この細胞集団を得るための材料は特に限定されないが、例えば、骨髄、脂肪組織、臍帯血、末梢血 (G-CSF投与後の末梢血を含む) 等が挙げられる。なお、骨髄は、脊椎、胸骨、腸骨等の骨髄を用いればよい。また、細胞として、ES細胞及びiPS細胞を挙げることもできる。

[0026]

細胞調製の際、材料が間葉系幹細胞を巻き込んだ細胞塊になっている場合には、必要により、材料に対してピペッティング等による物理的処理や、トリプシン、コラゲナーゼ等による酵素処理を行うことができる。また、材料に赤血球が混入している場合には、予め赤血球を溶血しておくことが好ましい。

上記の通り調製された細胞集団を用い、CD271+細胞又はCD271+CD90+細胞を選別する。

[0027]

CD271+細胞又はCD271+CD90+細胞を選別する方法としては、例えば、抗体を用いる方法が挙げられる。抗体は、CD271+細胞又はCD271+CD90+細胞を選別することが可能な、抗CD271抗体及び/又は抗CD90抗体である。選別にフローサイトメトリーを用いる場合には、FITC、PE、APC等の異なる蛍光色素で標識された抗CD271抗体、又は抗CD271抗体と抗CD90抗体を、適宜組み合わせ用いることにより、生細胞を短時間で選別することが可能になる。また、フローサイトメトリー以外にも、磁気ビーズを用いる方法やアフィニティー・クロマトグラフィーを用いる

方法によって、CD271+CD90+細胞を選別することが可能である。

[0028]

なお、これらの方法を用いる前に、予め、死細胞を染色する蛍光色素（例えば、PI）を細胞集団と反応させ、蛍光で染色された細胞を除去することにより、死細胞を除去してもよい。

次に、選別したLNGFR陽性細胞、又はLNGFR及びThy1共陽性細胞を単一細胞（クローン）培養し、増殖が速いロットを選択することで、増殖能、分化能及び遊走能にすぐれたRECを得る。

[0029]

ここで、「増殖が速い」、「高速増殖性」とは、96穴培養プレートの1ウェルに細胞1個ずつ播種して培養したときに、培養開始2週間後又はそれ以前に培養プレートがコンフルエント又はセミコンフルエントになる程度の増殖速度（倍時間（ダブリングタイム）が 26 ± 1 時間）を有することを意味する。

[0030]

コンフルエントとは、培養容器表面（培養面）の90%以上を培養細胞が覆っている状態である。また、セミコンフルエントとは、培養容器表面（培養面）の70～90%を培養細胞が覆っている状態である。使用する培養器具のサイズ及び種類は、細胞の増殖速度に応じ適宜変更可能である。遅れて増殖している細胞（Moderately/Slowly Expanding Cells）、すなわち単一細胞培養2週間になってもセミコンフルエント又はコンフルエントにならなかった細胞は破棄する。RECとして選別した各ウェルから回収したRECを各ウェル毎に培養フラスコに移入し、さらにコンフルエントになるまで培養する（拡大培養）。その後、拡大培養した細胞を別々に回収する。1ウェル由来のRECを1ロットとする。

[0031]

本発明において使用されるRECは、1ウェルに細胞1個ずつ播種するクローンソートにより得られたものであるから、増殖した細胞同士の遺伝形質はすべて同じである。従って、本発明においては細胞集団全体を「クローン」と言うことも、細胞集団を構成する個々の細胞を「クローン」ということもある。

[0032]

また、本発明において、選別に使用するためのRECは、RECマーカー（抗Ror2）により予め評価しておくこともできる。例えば、前記拡大培養後、全ロットから付着増殖した細胞を回収し、各ロットの一部（ $1 \sim 3 \times 10^5$ 個程度）の細胞をとりわ

けて、抗Ror2に対するモノクローナル抗体で単一染色を行う。抗Ror2に対するモノクローナル抗体で単一染色を行う手法は公知である（W02016/17795）。要約すると、RECマーカーを用いたフローサイトメトリー解析により、回収細胞におけるRECマーカー陽性細胞の比率を求める。比率は、定量的PCRを用いてRor2のmRNA発現を定量してもよいし、顕微鏡により同比率をマニュアルにより求めてもよい。上記陽性比率が一定値（例えば65%）以上のロット（細胞集団）を合格とし、これを選別に使用することもできる。

[0033]

本発明の細胞クローンを含む細胞集団は、LNGFR（CD271）及びThy-1（CD90）が共陽性であり、かつ、増殖が早い間葉系幹細胞クローンの集団であり、以下の（a）及び（b）の少なくとも1つの特徴を満たす。

（a）フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が40%以下である

（b）平均細胞サイズが20 μ m以下である

[0034]

本発明の一態様において、前記ヒト骨髄由来高純度間葉系幹細胞は、LNGFR（CD271）が陽性、又はLNGFR（CD271）及びThy-1（CD90）が共陽性であることを指標に分離された、高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団であって、以下の（a）及び（b）の少なくとも1つの特徴を満たす細胞集団である。

（a）フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が40%以下である

（b）平均細胞サイズが20 μ m以下である

[0035]

また本発明の一態様において、前記ヒト骨髄由来高純度間葉系幹細胞は、LNGFR（CD271）が陽性、又はLNGFR（CD271）及びThy-1（CD90）が共陽性の細胞に由来する高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団であって、以下の（a）及び（b）の少なくとも1つの特徴を満たす細胞集団である。

（a）フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が40%以下である

（b）平均細胞サイズが20 μ m以下である

[0036]

本発明においては、個々のロットのRECクローンについて、細胞の増殖能、脂肪分化能、REC特異的マーカー発現量、細胞サイズの均一性を調べ、それぞれの相関性を解析することにより、高純度かつ均一でより細胞性能の高いRECを選別することが可能となった。

[0037]

本発明においては、前方散乱光の変動係数 (Coefficient of Variation: CV値) 及び細胞の平均サイズを選別の指標とする。

前方散乱光 (Forward Scatter) とは、レーザー光の軸に対して前方向の小さい角度で散乱する光である。前方散乱光は、細胞表面で生じるレーザー光の散乱光、回折光及び屈折光からなり、サンプルの大きさに関する情報が得られる。

[0038]

変動係数 (Coefficient of Variation: CV) は、標準偏差を平均値で割った値のことで、単位の異なるデータのばらつきや、平均値に対するデータとばらつきの関係を相対的に評価する際に用いる数値である。

本発明においては、上記CV値が40%以下のものを選別する。CV値が40%以下の細胞集団は、大きさが均一な細胞により構成されている細胞集団である。好ましくは、CV値は35%以下、30%以下、25%以下、又は20%以下である。

また、本発明により選別された細胞集団における細胞の平均サイズは、20 μm 以下である。好ましくは18 μm 以下であり、14 μm ~18 μm の範囲の大きさである。

[0039]

3. 本発明の組成物

(1) 対象

本発明の組成物は、ヒト、またはヒト以外の生物、例えば、トリおよび非ヒト哺乳動物 (例えば、ウシ、サル、ネコ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、イヌ、ウサギ、ヒツジ、およびウマ) に適用し、骨芽細胞を増殖させ、骨の再生を促進するために用いられる。

[0040]

適用の対象となる疾患は、骨芽細胞の増加が求められる骨系統疾患であり、先天性であると後天性であるを問わない。骨系統疾患とは、骨や軟骨などの骨格を形作る組織の障害により、骨格の異常をきたす疾患の総称名である。そして、先天性骨系統疾患は異骨症と骨軟骨異形成症の2つのカテゴリーに大別される。

[0041]

先天性骨系統疾患としては、例えば胸郭不全症候群、低ホスファターゼ症、軟骨無形成症、軟骨低形成症、骨形成不全症、大理石骨病、多発性軟骨性外骨腫症、内軟骨腫症、2型コラーゲン異常症関連疾患、点状軟骨異形成症、偽性軟骨無

形成症、ラーセン（Larsen）症候群、進行性骨化性線維異形成症、TRPV4異常症、骨硬化性疾患、ビールズ（Beals）症候群などが挙げられる。特に本発明においては、先天性骨系統疾患である低ホスファターゼ症が好ましい。

[0042]

（２）細胞濃度、投与量

細胞は、少なくとも 1×10^6 cell/mlの濃度の細胞集団で用いられる。例えば、 1×10^6 cell/ml、 5×10^6 cell/ml、 1×10^7 cell/ml等であり、使用目的に応じて適宜設定することができる。

細胞は、対象の体重1 kgあたり 1×10^7 cellsの細胞集団を週1回投与し、これを1～4回（1クルールの投与期間が1～4週）、好ましくは4回繰り返すように用いられる。

[0043]

（３）組成物

本発明において、間葉系幹細胞は医薬組成物の形態で投与される。1つの形態において、そのような組成物は医薬上許容される担体及び／又は賦形剤を含む。投与形態は、静脈注射、点滴静注等の注射である。

「担体」及び「賦形剤」とは、細胞の貯蔵、投与、及び／又は生物学的活性を促進するために当該分野で慣用的に用いられる組成物をいう。

[0044]

本発明の組成物において使用される担体としては、例えば、生理食塩水、水性デキストロース、ラクトース、リンゲル液、緩衝液等が挙げられる。また賦形剤としては、澱粉、セルロース、グルコース、ラクトース等が挙げられる。

本発明の間葉系幹細胞を含む組成物は、例えば緩衝溶液又は培養液中にて、適切な液体懸濁液として調製する。注射に用いるための懸濁液は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、デキストラン等を含有させてもよい。

[0045]

４．造血幹細胞移植との併用

一般に、間葉系幹細胞（MSC）を静脈内投与するだけでは、骨髄に生着する細胞はごくわずかである。そこで本発明においては、間葉系幹細胞を投与するに際し、造血幹細胞移植を併用する。

[0046]

まず、骨形成能が障害された対象（患者）由来のMSCから、骨形成能が正常なM

SCに置換する。そのために、抗がん剤や放射線療法などにより患者由来MSCを取り除く。このとき、患者由来造血幹細胞も除去されるため、本発明の高純度間葉系幹細胞を投与する際に、血液細胞の維持のために造血幹細胞移植を併用する。

「併用」とは、高純度間葉系幹細胞の投与と造血幹細胞移植とを、1つの治療クールの中で使用することを意味し、造血幹細胞移植の時期は、高純度間葉系幹細胞の投与の前後を問わず、前でも後でも、同時でもよい。「同時」には、高純度間葉系幹細胞と造血幹細胞とを上記担体に混合した懸濁液を作製し、これを注射することを含む。但し、本発明においては造血幹細胞移植を行った後に、高純度間葉系幹細胞を投与することが好ましい。

[0047]

移植された造血幹細胞は同時に投与されたMSCを自己と認識しつつ血球細胞へと分化するため、移植されたMSCがレシピエントの免疫細胞により拒絶を受ける可能性はごくわずかである。

[0048]

本発明においては、高純度間葉系幹細胞の供給源となるドナー、及び造血幹細胞移植における造血幹細胞の供給源となるドナーは、いずれも対象患者とは異なる者（例えば健常者）に由来する。また、高純度間葉系幹細胞のドナーと造血幹細胞のドナーとは同一であっても異なってもよい。造血幹細胞移植では、HLA型のA座、B座、C座及びDR座という4座（8抗原）の一致する割合が重要だとされているが、多くの場合は、高純度間葉系幹細胞の提供者（ドナー）のHLAが、対象のHLAと不一致である。しかしながら、対象のHLAがドナーのHLAと完全一致でなく不一致でも適用することができる。

[0049]

言い換えると、高純度間葉系幹細胞の提供者のHLAが、対象のHLAの3座（HLA-A, B, DR-B）6抗原中、少なくとも3抗原と一致するもの、あるいは、少なくとも4抗原と一致するものを使用することができる。

[0050]

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の範囲はこれらの実施例により限定されるものではない。

[製造例]

本発明において使用する高純度間葉系幹細胞は、健常なドナーから採取された骨髓液を密度勾配遠心法により単核球分離し、CD90及びCD271抗体を用いて共陽

性細胞のみを選択的に分離、シングルセル化し、さらにP4まで拡大培養し、CV値40%以下の細胞クローンを選別することにより取得した。

得られた細胞クローンを「REC-01」という。

[0051]

[試験例]

ストレンジック投与によるAlpl^{-/-}マウスの延命効果の検証

179匹の低ホスファターゼ症病態モデルマウス（アルカリホスファターゼ欠損マウス：ALP^{-/-}マウス）を作製及び飼育し、これにストレンジック（アスホターゼ アルファ）を、隔日で皮下投与した。

[0052]

その結果、Alpl^{-/-}マウス179匹のうち、41匹（22.9%）は出産当日に死亡した（死産含む）。遺伝子判定後まで生存したマウスに対し、酵素（ストレンジック）を隔日にて皮下投与した結果を図2に示す。生後2週間以内に88匹（49.2%）、30日以内に98匹（54.7%）、60日以内に生後158匹（88.3%）、100日以内に168匹（93.9%）が死亡した。

ストレンジックを投与しない場合、全個体が2週間以内に死亡することから（Millan JL, et al. J Bone Miner Res. 2008）、ストレンジック単独投与によって多少の延命効果が認められるが、生命予後に対する効果は限局的であることが考えられる。

[実施例1]

[0053]

ALP^{-/-}マウスに対する高純度間葉系幹細胞RECの移植試験

本実施例では、低ホスファターゼ症モデルマウスである Alpl^{-/-}マウスを用いて、REC-01 移植による有効性を評価した。

[0054]

1. 方法

（1）レシピエントマウスへのREC-01投与

Alpl ヘテロ（Alpl^{+/-}）マウス同士を交配して得られた、day0～day5の仔マウス尾よりゲノムDNAを抽出し、PCRにて遺伝型の判定を行った。出生後、Alpl^{-/-}マウスには週2, 3回の頻度で8mg/kgのストレンジックを継続的に皮下投与した（図1）。

[0055]

REC-01移植の前日に、ドナーである野生型マウス (B6 メス) と、レシピエントであるAlpl^{-/-}マウスに免疫抑制剤 (0.5mg/1mL グラセプター) を体重10gあたり0.1mL投与した。移植当日、生後33~159日齢 (n=9) のAlpl^{-/-}マウスに、体重10gあたり0.1mLの3種混合麻酔薬 (0.75mg/kg ドミトール、4mg/kg ミダゾラム、5mg/kg ベトルファール) を投与し、完全に鎮静化させた。その後、8Gyの放射線を照射し、直後に 5×10^6 cellsのB6マウス由来骨髄細胞と 5×10^6 cellsのRECを懸濁してマウスの尾静脈から投与した (液量として計200 μ L)。比較対照となるAlpl^{-/-}マウスには、同数の骨髄細胞のみを投与した (図1)。

[0056]

(2) 細胞投与後の維持

細胞移植後のマウスには、免疫抑制剤 (0.5mg/1mL グラセプター) を体重10gあたり0.1 mLの量で、ほぼ毎日投与した。また、Alpl^{-/-}マウスには細胞移植の有無に関わらず、Alpl^{-/-}マウスが死亡あるいは実験に供して安楽死させるまで週2,3回の頻度で8mg/kgのストレンジックを継続的に皮下投与した。

[0057]

(3) レシピエントマウス生存曲線解析

カプランマイヤー生存曲線は、統計解析ソフトEZRを用いて解析した。解析方法は、既存の各種マニュアルを参照した (自治医科大学附属さいたま医療センター血液科)。

[0058]

2. 結果

(1) 細胞移植後の各マウスの体重の推移

REC-01細胞移植後のAlpl^{-/-} (n=4)、および正常群であるAlp^{+/+} (n=5) について、定期的に体重を測定し、経時変化を観察した。細胞移植当日の各マウスの体重を1として、移植後の体重比の推移をグラフに示した (図3)。

その結果、Alpl^{-/-}移植群はレシピエントごとに差が認められ、Homo-1 (#1233) はヘテロマウスに準じた体重増加を示したものの、Homo-2 (#1313) は移植一ヶ月後より体重が減少し始め、50日目に死亡した。一方、Homo-3 (#1375) およびHomo-4 (#1399) は大きな増減は認められなかった。

[0059]

(2) REC-01移植後の骨髄内ALP 活性の検討

ALP活性のポジティブ対照群として用意した正常マウス (#1237, hetero-2) で

は、通常骨芽細胞が多く局在する大腿骨骨頭部海綿骨（成長板付近）および皮質骨表面にてALP活性（薄紫部分）が検出された（図4 右）。また、REC-01を移植後の観察期間中に体重が減少した#1313（homo-2，図4 中右）マウスでは、大腿骨のごく一部の箇所からALP活性が出された。ALP活性は骨芽細胞のマーカーであることから、REC-01が骨芽細胞に分化したものとと言える。一方、ネガティブ対照群である骨髓細胞（BM）のみを移植した#1359の大腿骨では、いずれの部位からもALP活性は検出されなかった（図4 左）。

[0060]

注目すべきことに、造血幹細胞移植とREC-01を併用したAlpl^{-/-}マウスのうち、正常な体重増加を示した#1233（homo-1，図4中左）では正常マウスと同様に骨頭部海綿骨、および皮質骨表面にてALP 活性が検出された。

[0061]

レシピエントとして用いたALP^{-/-}マウスは、全個体が、出生直後から死亡あるいは検体として屠殺するまでの期間中、継続的にストレンジックを投与されている。骨髓のみを移植した群ではALP活性が全く検出されなかったことから、投与したALP 製剤であるストレンジックは血中ALP濃度を高めることは可能でも骨髓内にとどまることはないこと、REC-01投与後に体重増加が認められた個体では骨髓内に生着したREC-01が骨芽細胞に分化してALPを産生することが体重増加（成長）に寄与したこと、などが示唆された。

[0062]

次に手技的に限界期間である、移植100日後のマウス大腿骨及び頭部の凍結切片のALP 染色を行った。

BM+REC-01を移植したAlpl^{-/-}マウス（#1375 および#1399）では、骨端部・皮質骨・海綿骨でのALP 活性が正常マウス（#1237+/-， hetero-5）と同様に認められた。さらに、頭部の切片においても、頭蓋骨の一部や、他の脳組織と思われる部位で、大腿骨と比較すると若干弱めであるがALP 活性が検出された（図5）。

[0063]

間葉系幹細胞の骨髓内での生存期間は実験的に全く証明されていないが、造血幹細胞移植では3ヶ月を経由してドナー細胞が検出された場合に、長期生着、と規定されており（Osawa et al. Science 273 (5272): 242-5, 1996）、その規定を適用すればREC-01 の骨髓内での長期生着が認められたと判定できる。

[0064]

(3) REC-01 移植の有無による生存率の向上 (図6)

非移植群 (n=67, 酵素あり、右図：黒線) と移植群 (n=9, BM+REC+酵素あり、右図：赤線) の生存曲線をカプランマイヤー法を用いてlog-rank 検定で評価した。

[0065]

その結果、REC-01移植によりAlpl^{-/-}マウスの生存率が有意に改善した (図6, p=0.00045)。

酵素 (ストレンジック) は血液脳関門を通過できないため、低ホスファターゼ症の主症状の1つであるてんかん発作を抑えることができないことが問題点として指摘されている。実際、移植なし (酵素あり) の観察群では、てんかん発作を起こして死亡するマウスが高頻度で観察された。

[0066]

これに対し、REC-01移植群では、てんかん発作自体が殆ど確認できず、図5に示したように頭蓋骨でALP陽性細胞が検出されたことから、REC-01投与がてんかん発作抑制にも奏効することが示された。

[0067]

3. まとめ

REC-01を移植したAlpl^{-/-}レシピエントマウスでは、骨髄内での正常なALPの産生 (ALP染色によるALP活性の確認)、および移植されたREC-01由来のヒト細胞のマウス大腿骨への長期生着 (ALP, STEM121抗体陽性) が確認できた。また、REC-01 移植群は非移植群と比較し有意な生存率上昇が認められた。

[0068]

以上の結果より、ストレンジック投与のみでの臨床成績 (生存率上昇) に加え、REC-01を移植することによって、移植したREC-01が低ホスファターゼ症患者の大腿骨内に生着、骨芽細胞への分化、正常な骨型ALPの産生を通じて患者の骨組織の正常化し、さらにはてんかん発作の抑制などの機能改善により患者QOLに対し、より高い効果をもたらすことが期待できる。

[0069]

ヒト・マウスいずれの場合も経静脈投与による培養後間葉系幹細胞の長期生着成功例はこれまで報告がない。

これに対し、本発明においては、免疫系が正常な遺伝子変異動物をレシピエントとして用い、免疫抑制剤を併用した異種間移植であり、組織適合性が極めて低

い。したがって移植されたREC-01が3ヶ月に渡って検出可能であったことは驚異的な結果である。

[0070]

本発明により、異種間での経静脈投与によるヒト間葉系幹細胞移植と造血幹細胞移植との併用の成功を意味しており、骨疾患に対する医薬として極めて有用である。

請 求 の 範 囲

1. 高純度間葉系幹細胞を含む、対象において骨芽細胞を増加させる医薬組成物であって、当該対象への造血幹細胞移植と併用するように用いられる、前記医薬組成物。
2. 造血幹細胞が臍帯血由来のものである請求項1に記載の医薬組成物。
3. 造血幹細胞が、対象以外のドナーの骨髄由来のものである請求項1又は2に記載の医薬組成物。
4. 対象が先天性骨系統疾患患者である請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬組成物。
5. 先天性骨系統疾患が低ホスファターゼ症である請求項4に記載の医薬組成物。
6. 高純度間葉系幹細胞が、ヒト骨髄由来の高速増殖性間葉系幹細胞である請求項1～5のいずれか1項に記載の医薬組成物。
7. 高速増殖性間葉系幹細胞が、LNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)が共陽性の幹細胞クローンの細胞集団であって、以下の(a)及び(b)の少なくとも1つの特徴を満たすものである、請求項6に記載の医薬組成物。
 - (a) フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が40%以下である
 - (b) 平均細胞サイズが20 μ m以下である
8. 前記ヒト骨髄由来高純度間葉系幹細胞は、LNGFR (CD271)が陽性、又はLNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)が共陽性であることを指標に分離された、高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団であって、以下の(a)及び(b)の少なくとも1つの特徴を満たす細胞集団である、請求項6に記載の組成物。
 - (a) フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が40%以下である
 - (b) 平均細胞サイズが20 μ m以下である
9. 前記ヒト骨髄由来高純度間葉系幹細胞は、LNGFR (CD271)が陽性、又はLNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)が共陽性の細胞に由来する高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団であって、以下の(a)及び(b)の少なくとも1つの特徴を満たす細胞集団である、請求項6に記載の組成物。
 - (a) フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が40%以下である
 - (b) 平均細胞サイズが20 μ m以下である
10. 細胞は、対象の体重1 kgあたり 1×10^7 cellsを週1回投与し、これを4回繰

り返すように用いられる、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物

。

- 1 1．細胞が少なくとも 1×10^6 cell/ml の濃度で用いられる、請求項 8 に記載の医薬組成物。
- 1 2．高純度間葉系幹細胞の提供者の HLA が、対象の HLA と不一致である、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。
- 1 3．高純度間葉系幹細胞の提供者の HLA が、対象の HLA の 3 座 6 抗原中少なくとも 4 抗原と一致する、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。
- 1 4．高純度間葉系幹細胞の提供者の HLA が、対象の HLA の 3 座 6 抗原中少なくとも 3 抗原と一致する、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の組成物