

## 明 細 書

発明の名称：

高純度間葉系幹細胞を含む、ミトコンドリア病を治療及び／又は予防するための組成物

### 技術分野

[0001] 本発明は、高純度間葉系幹細胞を含む、ミトコンドリア病を治療及び／又は予防するための組成物等に関する。

### 背景技術

[0002] ミトコンドリア機能が障害され、臨床症状が出現する病態は、ミトコンドリア病と総称されている。ミトコンドリアは全身の細胞の中においてエネルギーを産生する機能を有するため、ミトコンドリアの機能が低下すると、様々な臓器においてエネルギー代謝障害等の病態が生ずる。

[0003] ミトコンドリア病の病因として、核DNA上の遺伝子の変異とミトコンドリアDNA (mtDNA) の異常が挙げられる。核DNA上の遺伝子では200近い遺伝子の変異が同定されており、mtDNA上では100個を超える病的点変異が同定されている。

[0004] ミトコンドリア病に関して、例えば特許文献1には特定の化合物を含むミトコンドリア病の治療又は予防のための医薬組成物が記載されており、特許文献2には機能的なミトコンドリアで富化されたヒト幹細胞を含むミトコンドリア病等に使用するための医薬組成物が記載されている。しかしながら、現在のところ、日本において治験で効果があると厳密に確定された治療薬はタウリン以外存在しない。また、タウリンについても、その承認された用途は、「ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作 (MELAS) 症候群における脳卒中様発作の抑制」に限られており、ミトコンドリア病に有効な薬剤は現在のところ存在しない。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0005] 特許文献1：特願2022-125211

特許文献2：特願2021-502844

### 非特許文献

[0006] 非特許文献1：Elad Jacoby et al., npj Regenerative Medicine volume 6, Article number: 58 (2021)

### 発明の概要

[0007] 一実施形態において、本発明は、ミトコンドリア病を治療及び／又は予防するための組成物を提供することを課題とする。一実施形態において、本発明はミトコンドリアの機能障害の改善剤を提供することを課題とする。

[0008] 本発明者は、LNGFR (CD271)が陽性、又はLNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)が共陽性の高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団又はその子孫がミトコンドリア病の治療及び／又は予防に有効であり得ることを見出した。

[0009] 本発明は、以下の実施形態を包含する。

(1) LNGFR (CD271)が陽性、又はLNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)が共陽性の高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団又はその子孫を含む、ミトコンドリア病を治療及び／又は予防するための組成物。

(2) ミトコンドリア病が、MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes) である、(1)に記載の組成物。

(3) 前記細胞集団又はその子孫の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、(1)又は(2)に記載の組成物。

(4) 前記細胞集団がヒト骨髄に由来する、(1)～(3)のいずれかに記載の組成物。

(5) 前記細胞集団が、

(a) 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の集団を得るステップ、

(b) 前記間葉系幹細胞のクローンを単一細胞培養するステップ、及び

(c) 増殖が速いクローンを回収し、拡大培養するステップ、

を含む方法によって得られる、(1)～(4)のいずれかに記載の組成物。

(6) 前記方法が、(d) フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数を測定するステップ、及び(e) フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が40%以下である集団を回収するステップ、をさらに含む、(5)に記載の組成物。

(7) 静脈内投与によって対象に投与される、(1)～(6)のいずれかに記載の組成物。

(8) LNGFR (CD271)が陽性、又はLNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)が共陽性の高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団又はその子孫を含む、ミトコンドリアの機能障害の改善剤。

(9) LNGFR (CD271)が陽性、又はLNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)が共陽性の高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団又はその子孫を対象に投与することを含む、ミトコンドリア病を治療及び／又は予防するための方法。

(10) ミトコンドリア病が、MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes) である、(9)に記載の方法。

(11) 前記細胞集団又はその子孫の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、(9)又は(10)に記載の方法。

(12) 前記細胞集団がヒト骨髄に由来する、(9)～(11)のいずれかに記載の方法。

(13) 前記細胞集団が、

(a) 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の集団を得るステップ、

(b) 前記間葉系幹細胞のクローンを単一細胞培養するステップ、及び

(c) 増殖が速いクローンを回収し、拡大培養するステップ、

を含む方法によって得られる、(9)～(12)のいずれかに記載の方法。

(14) 前記細胞集団を得るための前記方法が、(d) フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数を測定するステップ、及び(e) フローサイトメト

リーの前方散乱光の変動係数が40%以下である集団を回収するステップ、をさらに含む、(13)に記載の方法。

(15) LNGFR (CD271)が陽性、又はLNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)が共陽性の高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団又はその子孫を対象に投与することを含む、ミトコンドリアの機能障害を改善するための方法。

[0010] 本発明により、ミトコンドリア病を治療及び／又は予防するための組成物が提供され得る。また、本発明によりミトコンドリアの機能障害の改善剤が提供され得る。

### 図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、ミトコンドリア病患者からのiPS細胞の樹立、及びiPS細胞から神経細胞への分化方法の概要を示す。

[図2]図2は、MELAS患者由来のiPS細胞における、OCT-4、TRA1-50、及びNANOGの遺伝子発現の測定結果を示す。

[図3]図3は、MELAS患者由来の神経細胞における、NeuNの遺伝子発現及び遺伝子変異の測定結果を示す。

[図4]図4は、MELAS-N細胞へのREC及びMECによるミトコンドリア転移能を示す。

[図5]図5は、MELAS-N細胞におけるミトコンドリア活性酸素のREC及びMECによる低下作用を示す。

[図6]図6は、MELAS-N細胞における呼吸機能のREC及びMECによる回復作用を示す。

[図7]図7は、MELAS-N細胞におけるGDF-15のREC及びMECによる低下作用を示す。

[図8]図8は、REC及びMSCにおけるミトコンドリア含量及び性質を示す。Aはミトコンドリアの定量、Bは膨化したミトコンドリアの定量、Cは細胞呼吸活性の結果を示す。

[図9]図9は、ミトコンドリア病態モデルマウスにRECを静脈内投与して、1週間後のマウス各組織におけるREC由来ミトコンドリアの転移量の測定結果を示す。

す。

### 発明を実施するための形態

[0012] 一実施形態において、本発明は、LNGFR (CD271)が陽性、又はLNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)が共陽性の高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団又はその子孫を含む、ミトコンドリア病を治療及び／又は予防するための組成物に関する。

[0013] 間葉系幹細胞を得る方法

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方法としては、例えばW02009/31678号又はW02021/144995に記載の方法に従うことができる。当該間葉系幹細胞を得る方法の概要は以下の通りである。

[0014] 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 (Thy-1) 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。

[0015] ヒト間葉系幹細胞が含まれる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、骨髓や末梢血 (G-CSF投与後の末梢血を含む) 等が挙げられる。なお、骨髓としては、脊椎、胸骨、腸骨等の骨髓を用いることができる。例えば、ヒト骨髓又は脂肪・胎盤絨毛膜から調製した単核細胞を用いることができる。これらの材料から、公知の間葉系幹細胞のマーカー (例えばCD105 (SH2)、CD73 (SH3/4)、CD71、CD44等) を利用して、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事前に細胞集団を選抜してもよい。

[0016] 一実施形態では、ヒト間葉系幹細胞は、ミトコンドリア病の治療及び／又は予防を行う患者から得られるかまたは由来する。別の実施形態では、ヒト間葉系幹細胞は、ミトコンドリア病の治療及び／又は予防を行う患者とは異

なるドナーから得られるかまたは由来する。

[0017] 細胞調製の際、材料が間葉系幹細胞を含む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。

[0018] 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、適宜組み合わせることで、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。

[0019] 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。

[0020] REC細胞濃縮

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・遊走能にすぐれた高純度ヒト間葉系幹細胞（REC: Rapidly Expanding Clone）を得る。

[0021] まず、フローサイトメトリー（セルソータ）を用い、LNGFR陽性細胞、又はLNGFR陽性及びThy1陽性細胞を96穴培養プレートにクローンソートする。すなわち、1ウェルに細胞1個ずつ播種する。単一細胞培養2週間後に培養プレートを顕微鏡下で撮影し、コンフルエント又はセミコンフルエントになった

ウェルを選別し、当該ウェルに含まれる細胞をRECとする。

[0022] 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（例えば、倍加時間(ダブリングタイム)が $26 \pm 1$ 時間）を有することを意味する。

[0023] コンフルエントとは、培養容器表面（培養面）の例えば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）の例えば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週間後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ロットとし、これを後述の選別に使用してもよい。

[0024] ここで、本発明の細胞は、1ウェルに細胞1個ずつ播種するクローンソーッ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。

[0025] 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ユ

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、これを後述の選別に使用することもできる。

[0026] 本明細書に記載の細胞集団の子孫もまた、本発明において用いることができる。子孫は、細胞集団の継代培養により作製することができる。子孫は、LNGFR (CD271)が陽性 (CD271+)、又はCD271及びCD90 (Thy-1) が共陽性 (CD271+CD90+) であってもよいが、培養の過程でこれらのマーカーの発現を欠如しているものであってもよい。マーカーの発現が欠如した細胞は、分化能、増殖能、細胞サイズ、及び／又はこれらの均一性によって選抜してもよい。

[0027] 本発明の幹細胞集団の選別

本明細書に記載の細胞集団又はその細胞集団は、フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数 (Coefficient of Variation: CV値) 及び／又は細胞の平均サイズを指標としてさらに選別してもよい。

[0028] 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。

[0029] 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。

[0030] 本発明においては、上記CV値が40%以下のものを選別してもよい。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。

[0031] 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  $\mu\text{m}$  以下であってもよい。細胞サイズは、例えば18  $\mu\text{m}$  以下であり、14  $\mu\text{m}$  ~18  $\mu\text{m}$  の範囲の大きさである。

[0032] 上記のとおり選別された細胞集団を構成する細胞クローンの数は限定されるものではなく、例えば1mlの溶液に $0.8 \times 10^7$ ~ $1.2 \times 10^7$ 個程度の細胞を有して

もよい。

[0033] FSCのCV値が小さい細胞集団は、増殖能、分化能に優れているものでありうるため、このような細胞集団を用いることによりミトコンドリア病のより優れた改善効果が奏され得る。

[0034] 用途

本明細書に記載の細胞集団又はその子孫は、治療用間葉系幹細胞集団として、ミトコンドリア病を治療及び／又は予防するために用いることができる。本明細書に記載の細胞集団又はその子孫は、対象に投与することで、例えば（細胞集団又は子孫を投与していない）対照と比較して、当該投与対象のミトコンドリアの量を増加させる、ミトコンドリアの膨化を低減させる、ミトコンドリアにおける活性酸素種を低減させる、ミトコンドリアのATP産生機能を改善させる、及びミトコンドリアの呼吸機能を改善させるといった効果の少なくとも一つ、例えば2つ、3つ、又は4つの効果を奏し得る。

[0035] 一実施形態において、本発明は、本明細書に記載の細胞集団又はその子孫を含む、医薬組成物に関する。本明細書に記載の医薬組成物において、細胞集団又はその子孫の濃度は限定しないが、例えば医薬組成物が液体であれば、 $1 \times 10^3 \text{ cell/ml}$ 以上、 $1 \times 10^4 \text{ cell/ml}$ 以上、又は $1 \times 10^7 \text{ cell/ml}$ 以上であってよく、 $1 \times 10^9 \text{ cell/ml}$ 以下、 $1 \times 10^8 \text{ cell/ml}$ 以下、 $1 \times 10^7 \text{ cell/ml}$ 以下であってよく、例えば $1 \times 10^3 \text{ cell/ml} \sim 1 \times 10^9 \text{ cell/ml}$ 、 $1 \times 10^4 \text{ cell/ml} \sim 1 \times 10^8 \text{ cell/ml}$ 、 $1 \times 10^5 \text{ cell/ml} \sim 1 \times 10^7 \text{ cell/ml}$ 、又は約 $1 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ の濃度であってよい。本明細書に記載の医薬組成物は、細胞集団又はその子孫に加えて、一以上の薬学的に許容される担体を含んでもよい。担体の例としては、増量剤、希釈剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、増粘剤、着色剤、安定剤、乳化剤、分散剤、懸濁化剤、防腐剤等が挙げられる。本明細書に記載の医薬組成物の剤型は限定されず、例えば通常行われる手段に従って、無菌性溶液剤、懸濁液などの注射剤等にすることができる。

[0036] 一実施形態において、本発明は、本明細書に記載の細胞集団又はその子孫を含む、ミトコンドリア病を治療及び／又は予防するための医薬組成物に関

する。別の一実施形態において、本発明は、本明細書に記載の細胞集団又はその子孫を対象に投与することを含む、ミトコンドリア病を治療及び／又は予防するための方法に関する。

[0037] 本明細書に記載の医薬組成物、細胞集団又はその子孫を投与する「対象」とは、ヒト又はヒト以外の生物を意味する。ヒト以外の生物の例としては、鳥類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）が挙げられる。

[0038] 本明細書において「治療」とは、ミトコンドリア病に関連する症状が改善されることのほか、改善された症状が続くこと、再発抑制、他の治療の低減等、ミトコンドリア病に関連する治療全てを含む。本明細書において「予防」とは、ミトコンドリア病に関連する症状が生じるのを防ぐこと又はそのリスクを低減することを含む。

[0039] 本明細書において、ミトコンドリア病とは、ミトコンドリア機能が障害されることに起因して臨床症状が出現する病態を意味する。ミトコンドリア病の例として、MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes、脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様症候群)、カーンズ・セイヤー症候群 (KSS)、CPEO (慢性進行性外眼筋麻痺症候群)、MERRF (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers、赤色ぼろ線維・ミオクロヌステんかん症候群)、感音難聴 (Sensorineural hearing loss)、Fatal, infantile encephalopathy (致死的乳児脳症);リー／リー様症候群 (Leigh/Leigh-like syndrome)、Leber病 (レーバー病:レーバー遺伝性視神経症 [LHON])、バース症候群、Pearson病 (ピアソン病)、フリードライヒ失調症 (FRDA) が挙げられ、例えばMELASであってよい。

[0040] 一実施形態において、本発明は、本明細書に記載の細胞集団又はその子孫を含む、ミトコンドリアの機能障害の改善剤に関する。別の一実施形態において、本発明は、本明細書に記載の細胞集団又はその子孫を含む、ミトコン

ドリアの機能障害を改善するための医薬組成物に関する。さらに別の一実施形態において、本発明は、本明細書に記載の細胞集団又はその子孫を対象に投与することを含む、ミトコンドリアの機能障害を改善するための方法に関する。

- [0041] 本明細書において、ミトコンドリアの機能障害とは、ミトコンドリアの量の低下、ミトコンドリアの膨化、ミトコンドリアにおける活性酸素種の増加、ミトコンドリアのATP産生機能の低下、及びミトコンドリアの呼吸機能の低下の少なくとも一つ、例えば2つ、3つ、又は4つを意味する。
- [0042] 本明細書に記載の細胞集団又はその子孫、医薬組成物、又はミトコンドリアの機能障害の改善剤の投与量、投与頻度、投与回数、及び投与経路等は、対象の年齢、性別、体重、症状、投与経路、投与頻度、並びに剤型等に応じて選択することができる。効果的な用量は、ミトコンドリア病の治療及び／又は予防、又はミトコンドリアの機能障害の改善に必要な量である。本明細書に記載の細胞集団又はその子孫、医薬組成物、又はミトコンドリアの機能障害の改善剤の用量は、限定するものではないが、例えば前記細胞集団の量として、 $10^4$ cells/kg以上、 $10^5$ cells/kg以上、又は $10^6$ cells/kg以上であってよく、 $10^{10}$ cells/kg以下、 $10^9$ cells/kg以下、又は $10^8$ cells/kg以下であってよく、例えば $10^4$ cells/kg～ $10^{10}$ cells/kg、 $10^5$ cells/kg～ $10^9$ cells/kg、 $10^6$ cells/kg～ $10^8$ cells/kg、又は $10^7$ cells/kgであってよい。投与頻度は、例えば1日1回以上、2日に1回以上、3日に一回以上、また2月に1回以下、1月に1回以下、2週間に一回以下、例えば週1回であってよい。投与回数は、1回以上、2回以上、3回以上、また7回以下、6回以下、5回以下、例えば4回であってよい。投与経路は、例えば静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、又は皮下投与であってもよい。
- [0043] 一実施形態において、本発明は、本明細書に記載の細胞集団又はその子孫を得る工程、及び前記細胞集団又はその子孫を含む本明細書に記載の医薬組成物を調製することを含む、ミトコンドリア病を治療及び／又は予防するための組成物を生産するための方法に関する。他の一実施形態において、本発

明は、本明細書に記載の細胞集団又はその子孫を対象に投与することを含む、ミトコンドリア病を治療及び／又は予防するための方法に関する。

### 実施例

#### [0044] <実施例 1>

##### 細胞

MELAS患者3人および正常健康人から樹立したiPS細胞から分化した神経細胞 (MELAS-N, Control-N) を用いた。正常健康人から樹立したiPS細胞 (201B7、HSP-0063) 及びMELAS患者から樹立したiPS細胞 (HSP-2864、HSP-0458、及びHSP-0461) をRIKEN CELL BANK (日本) から入手した。

[0045] ミトコンドリア病患者からのiPS細胞の樹立、及びiPS細胞から神経細胞への分化方法の概要を図1に示す。具体的には、ミトコンドリア病患者の末梢血単核球に、エピゾーマルベクターを用いてOCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、mp53DD、及びEBNA1を導入してiPS細胞を樹立した (K.Fujimori et al., Stem Cell Reports, 9 (2017) 1675-1691)。iPS細胞からの神経分化については、K.Fujimori et al. (上掲) に従って行った。具体的には、3つの阻害剤 (3  $\mu$ M CHIR-99021 (REPROCELL、日本)、3  $\mu$ M SB-431542 (富士フィルム、日本)、3  $\mu$ M dorsomorphin (Sigma、USA) を含むStemFit AK02N培地で培養し、5日後にTrypLE Selectを用いて細胞を解離させ、2% B27-Minus vitamin A (Thermo Fisher Scientific, USA)、20 ng/ml bFGF (Peprotech、日本) を含むMHM培地 (KBM Neural Stem Cell Kit、KOHJIN BIO、日本) で培養した。方法のその他詳細は、K.Fujimori et al. (上掲) に従った。

[0046] 凍結したGMP相当RECはPuREC Co., Ltdから購入した。RECは、骨髓単核細胞から、LNGFR及びThy-1共陽性細胞を、96ウェルプレートに単一細胞として播種し、2週間後にコンフルエントに達した増殖が速い細胞として得られたものである。MSCsはLonzaから購入した。

#### [0047] 神経細胞の培養

MELAS患者3人および正常健康人から樹立したiPS細胞から分化した神経細胞 (MELAS-N, Control-N) を、MEFフィーダー細胞を含まないStemFit AK02N me

dium（味の素、日本）で未分化状態で培養した。続いて、iPSCをTrypLE select（Thermo Fisher Scientific, USA）で単一細胞に解離させ、iMatrix511（ニッピ、日本）で処理した6ウェルプレートにプレートあたり $2 \times 10^4$ 細胞の密度で再播種し、Y27632（富士フイルム、日本）を含むStemFit AK02Nで5%CO<sub>2</sub>及び37℃の条件で培養した。継代の翌日、Y27632除去のために培地を交換し、その後培地を2～3日毎に交換した。

[0048] MELAS患者由来のiPS細胞の遺伝子発現及びMELAS患者由来の神経細胞の性質

MELAS患者由来のiPS細胞において、幹細胞マーカーであるOCT-4、TRA1-50、及びNANOGの遺伝子発現を調べた。結果を図2に示す。また、MELAS患者由来の神経細胞において、神経細胞特異的マーカーであるNeuNの遺伝子発現及び遺伝子変異を調べた。結果を図3に示す。

[0049] MELAS-N細胞へのミトコンドリア転移

MELAS-N細胞を5  $\mu$ L/mL のVybrant™ DiD Cell-Labeling Solution（Thermo Fisher Scientific, USA）で37℃で20分間標識した。MSCおよびRECを200 nM MitoTracker™Green FM（Thermo Fisher Scientific, USA）を用いて37℃で20分間標識した。標識を行ったMELAS-N細胞と、MSC又はRECとを、それぞれ、1% ペニシリン-ストレプトマイシンおよび10%ウシ胎児血清（FBS; HyClone）を添加したRPMI1640増殖培地（和光、日本）で48時間共培養した。次に、細胞をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、TrypLE™ Express Enzyme（Thermo Fisher Scientific, USA）中で細胞を37℃で5分間インキュベートすることによって剥離した。細胞生存率は、4% トリパンブルー排除法と光学顕微鏡を使用して評価され、常に95%を超えていた。CytoFLEX（BECKMAN COULTER, USA）を使用して細胞を取得し、FlowJo™ソフトウェアバージョン10（BD Biosciences, USA）を使用してデータを分析した。MSC又はRECからのミトコンドリア特異的色素移動は、DiDイベントをゲートし、ダブレット（前方散乱幅対高さ）を除外し、フルオレセインチャンネルの蛍光を測定することによって測定した。

[0050] 結果を図4に示す。図4に示されるとおり、MELAS-N細胞に対するミトコンドリア転移能は、RECがMSCよりも優位に優れていた。

## [0051] 活性酸素の低下

MitoSOX™ 赤色蛍光プローブ(Thermo Fisher Scientific, USA)を使用して、製造業者のプロトコルに従ってミトコンドリアスーパーオキシド生成を視覚化した。具体的には、24ウェルプレート上で増殖させた細胞( $1 \times 10^5$ )をPBSで2回洗浄して培地を除去し、 $5 \mu\text{M}$  MitoSOX™ 作業溶液 (working solution) とともに $37^\circ\text{C}$ で10分間インキュベートした。その後、温緩衝液(Thermo Fisher Scientific, USA)で3回穏やかに洗浄した後、細胞を蛍光顕微鏡(BZ-X710、キーエンス、日本)で直ちに画像化した。MitoSOX™のミトコンドリア局在を確認するために、細胞を $0.1 \mu\text{mol/L}$  MitoBright LT-Green(Dojindo、日本)で $37^\circ\text{C}$ で15分間標識した。MitoSOX-RedおよびMitoBright LT-Greenの平均蛍光強度は、GloMax (登録商標) Discover Microplate Reader(Promega、USA)を使用して検出された。

[0052] 結果を図5に示す。図5に示されるとおり、MELAS-Nでは活性酸素種のレベルが高いが、活性酸素種のレベルはRECおよびMSCによって低減され、その低減の程度は、RECがMSCよりも優位に優れていた。

## [0053] 呼吸機能回復

Seahorse XF HS mini(Agilent technologies, USA)を使用して、酸素消費率(OCR)を直接測定することにより、ミトコンドリア機能の重要なパラメータを測定した。具体的には、製造業者のプロトコールに従って、各グループの細胞をXF細胞培養マイクロプレート(Agilent technologies, USA)にウェルあたり15,000細胞の密度で播種した。一晚培養した後、培地を、 $10 \text{ mM}$  グルコース、 $2 \text{ mM}$  L-グルタミン、 $1 \text{ mM}$  ピルビン酸ナトリウムを添加したSeahorse XF RPMI培地(Agilent technologies, USA)に交換し ( $\text{pH}7.4$ )、非 $\text{CO}_2$ インキュベーターに移し、その後60分間インキュベーターに置いた。ミトストレスアッセイは、 $1.5 \mu\text{M}$ /ウェルのオリゴマイシン (Olig)、 $1 \mu\text{M}$ /ウェルのFCCP、および $0.5 \mu\text{M}$ /ウェルのロテノン/アンチマイシンA (AA/Rot) を順次添加することによって処理した。ミトコンドリア呼吸のリアルタイム評価の各プロット値は、基礎OCRのパーセンテージとして

表された。XFe Wave ソフトウェア (Agilent technologies, USA)を使用して結果を分析した(Agilent technologies, USA)。

[0054] 結果を図6に示す。図6に示されるとおり、MELAS-Nでは酸素消費速度(OCR)が低い、OCRのレベルはRECおよびMSCによって増加し、その増加の程度は、RECがMSCよりも優位に優れていた。

[0055] GDF-15の低下

細胞培養培地上清をプロトコールに従って調製し、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) キット (Thermo Fisher Scientific, USA) を使用して、製造業者のプロトコールに従って、細胞培養培地上清を調整し、ミトコンドリア病のバイオマーカーであるGDF-15を測定した。サンプルの光学密度は、GloMax (登録商標) Discover Microplate Reader (Promega, USA)を使用して450 nmで測定した。

結果を図7に示す。図7に示されるとおり、MELAS-NではGDF-15の発現レベルが高い、GDF-15の発現のレベルはRECおよびMSCとの共培養によって低減した。

[0056] RECと通常MSCの比較

ミトコンドリアの定量

それぞれ3つのRECおよびMSCクローンを200 nM MitoTracker™ Green FM (Thermo Fisher Scientific, USA)で37℃で20分間標識した。MitoTracker™ Green FMの平均蛍光強度はセルフローサイトメトリー(CytoFLEX、BECKMAN COULTER, USA)によって検出され、データはFlowJo™ ソフトウェア バージョン 10(BD Biosciences, USA)を使用して定量した。

[0057] 結果を図8に示す。図8 Aに示されるとおり、ミトコンドリアの量は、RECの方がMSCよりも多かった。

[0058] 膨化したミトコンドリアの定量

それぞれ3つのRECおよびMSCクローンを35 mmディッシュで10～12時間増殖させた後、細胞を電子顕微鏡用の2.5%グルタルアルデヒド溶液(和光、日本)、2% PFA、および0.1 Mリン酸緩衝液(和光、日本)で室温で2時間事前固定し

、水で3回洗浄した。PBSで洗浄し、段階的に濃度を高めたエタノール(50%、70%、90%、95%、100%)でそれぞれ8分間脱水した。次に、浸透を助けるために酸化プロピレンを使用してセルをエポキシ樹脂に取り付け、60℃で24時間硬化させた。ダイヤモンドナイフを使用して極薄切片を採取し、銅メッシュグリッドに載せ、酢酸ウラニルで染色し、Topcon EB-002B透過型電子顕微鏡(キーエンス、日本)を使用して画像化した。得られた画像は、Image J ソフトウェア(Wayne Rasband、USA)を使用してミトコンドリアの膨化について定量的に解析した。

[0059] 結果を図8に示す。図8Bに示されるとおり、MELAS-Nでは膨化した細胞が多いが、膨化した細胞はRECおよびMSCによって低下し、その低下の程度は、RECがMSCよりも優位に優れていた。

[0060] ミトコンドリア呼吸機能

酸素消費速度(OCR)は、Seahorse XF Cell Mitoストレステストキット (Agilent technologies, USA) を使用して検査し、プロトコールに従ってフラックスアナライザー (Seahorse XF HS mini, Agilent technologies, USA) で測定した。具体的には、細胞をXF HSmini細胞培養プレート上に均一に播種した( $1.5 \times 10^4$ 細胞/ウェル)。細胞を、10 mMグルコース、1 mMピルビン酸ナトリウム、および2 mM L-グルタミンを補充したXF RPMI 培地(Agilent technologies, USA)で平衡化し、非CO<sub>2</sub> インキュベーターに移して1時間放置した。その後、まず、1.5  $\mu$ M オリゴマイシン(Olig)を使用して、共役呼吸と非共役呼吸を測定した。最大呼吸能力(Maximal Respiration)は、1  $\mu$ M FCCPを使用して決定された。最後に、非ミトコンドリア呼吸を、0.5  $\mu$ MアンチマイシンAとロテノン(AA/Rot)の組み合わせを使用して測定した。ミトコンドリア呼吸のリアルタイム評価の各プロット値は、基礎OCRのパーセンテージとして表示した。また、データセットは、Wave ソフトウェア(Agilent technologies, USA)を使用して解析した。

[0061] 結果を図8に示す。図8Cに示されるとおり、REC及びMSCとの共培養によりMELAS-Nの呼吸機能は正常な神経細胞のレベルまで回復し、呼吸機能回復作

用はRECのほうがMSCよりも有意に優れていた。

[0062] <実施例 2>

in vivoミトコンドリア転移試験

ND6遺伝子の変異によりミトコンドリア機能が低下したミトコンドリア病態モデルマウス（ND6ミトマウス）において、in vivoで、REC由来ミトコンドリアが各器官に転移するか、及び、ミトコンドリア機能を回復させることができるかを検証した。この試験で有効性が証明されれば、RECは確立された治療法が存在しないミトコンドリア病患者に対する有効な治療法となり得ると考えられる。

[0063] 動物の処置

8～9週齢のND6ミトマウスを2群（各4匹）用意し、麻酔下（イソフルラン）で尾静脈注射を行った〔疼痛カテゴリー：B〕。REC投与群には、 $2 \times 10^6$  cells RECをHSA-CP-1および0.5% HSA/RPMIの同量混合溶媒0.2 mLに懸濁して投与した。対照群には溶媒0.2 mLのみを投与した。投与から1週間後および2週間後、各群のマウスを頸椎脱臼により安楽死させ〔疼痛カテゴリー：B〕、組織を摘出した。摘出した組織および摘出後のマウスは適切に処理した。ND6変異は母性遺伝により100%子孫に伝達されることが確認されているため、本研究で得られた全てのマウスを用いて解析を行った。

[0064] ミトコンドリア転移効率

REC投与1週間後（投与群4匹、対照群4匹）および2週間後（投与群4匹、対照群4匹）に、対象とする器官（肺/腎臓/肝臓/ヒラメ筋/心臓/脳）の組織を摘出し、ゲノム解析（qPCR；コピー数解析）を行って、マウスミトコンドリアDNA（Ms-mtDNA）及びヒトミトコンドリアDNA（H-mtDNA、REC由来）に由来するND2遺伝子のコピー数を測定し、ヒトmtDNA（REC由来ミトコンドリア）の転移効率を検証した。REC投与1週間後の結果を図9に示す。

[0065] ミトコンドリア呼吸機能

REC投与1週間後（投与群4匹、対照群4匹）および2週間後（投与群4匹、対照群4匹）の組織からミトコンドリアを単離し、実施例1と同様にフラックス

アナライザーを用いてミトコンドリア呼吸機能を測定し、呼吸鎖複合体の酵素活性を測定した。

### 請求の範囲

- [請求項1] LNGFR (CD271)が陽性、又はLNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)が共陽性の高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団又はその子孫を含む、ミトコンドリア病を治療及び／又は予防するための組成物。
- [請求項2] ミトコンドリア病が、MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes) である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 前記細胞集団又はその子孫の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、請求項1又は2に記載の組成物。
- [請求項4] 前記細胞集団がヒト骨髓に由来する、請求項1に記載の組成物。
- [請求項5] 前記細胞集団が、  
(a) 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の集団を得るステップ、  
(b) 前記間葉系幹細胞のクローンを単一細胞培養するステップ、及び  
(c) 増殖が速いクローンを回収し、拡大培養するステップ、を含む方法によって得られる、請求項1に記載の組成物。
- [請求項6] 前記方法が、(d) フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数を測定するステップ、及び(e) フローサイトメトリーの前方散乱光の変動係数が40%以下である集団を回収するステップ、をさらに含む、請求項5に記載の組成物。
- [請求項7] 静脈内投与によって対象に投与される、請求項1に記載の組成物。
- [請求項8] LNGFR (CD271)が陽性、又はLNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)が共陽性の高速増殖性間葉系幹細胞クローンの細胞集団又はその子孫を含む、ミトコンドリアの機能障害の改善剤。