

明 細 書

発明の名称：

間葉系細胞を含む細胞集団、細胞集団を含む医薬組成物、細胞集団から得られたエクソソーム及び細胞集団を作製する方法

技術分野

[0001] 本開示は所定の細胞表面抗原分子を発現する間葉系細胞を含んだ細胞集団や、その細胞集団を含む三次元細胞培養体や、その細胞集団を含む医薬組成物や、その細胞集団から得られたエクソソームや、その細胞集団を作製する方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、細胞移植療法が様々な疾患や組織損傷に対する有効な治療手段として注目されている。細胞を移植するにあたって、単に細胞を移植しても細胞が組織に着床し難い。そのため、細胞移植療法においては、移植する細胞をシート状に培養した細胞シートが用いられている。この細胞シートを用いることで、移植する細胞を所定の組織に定着させることが可能となる。

[0003] 本発明者らは、線維芽細胞を培養した細胞シートの開発を進めており、所定の温度及び低酸素条件にて、所定の期間培養する工程を含んだ細胞シートを製造する方法（特許文献1参照）や、難治性皮膚潰瘍治療用移植材料として用いる末梢血単核球と線維芽細胞を含む細胞シート（特許文献2参照）や、培地を加えた培養基材上で、所定の線維芽細胞を播種して培養する工程を含む、積層化細胞シートの作製方法（特許文献3参照）を開示した。

[0004] 上記それぞれの細胞シートにおいては線維芽細胞が用いられている。ここで、線維芽細胞は結合組織を構成する細胞の一つであり、コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸等の真皮成分を作り出し、真皮に存在する細胞と考えられている。この線維芽細胞は全身に存在し、増殖能が強いという特徴を有する。一方で、細胞表面抗原分子の特徴についてはあまり研究が進んでいないのが現状である。心臓細胞培養材料としては、たとえばVCAM-1（血

管細胞接着分子 1 : C D 1 0 6) を発現している線維芽細胞が開示されている (特許文献 4 参照)。

[0005] 線維芽細胞は間葉系由来の細胞である。これまで、間葉系幹細胞に関しては、E G F R 及び M I C - A B からなる群より選択される少なくとも 1 種の細胞表面マーカーを高発現する間葉系幹細胞 (特許文献 5 参照) や、C D 2 0 1、C D 4 6、C D 5 6、C D 1 4 7 及び C D 1 6 5 からなる群より選択される少なくとも 1 種の細胞表面マーカーを発現する間葉系幹細胞 (特許文献 6、7 参照) が開示されている。

[0006] さらに口腔内あるいは歯肉由来の幹細胞としては、口腔内粘膜 (m u c o s a) 由来の線維芽細胞の細胞集団において C D 5 6 陽性率が 4 3 % であること (非特許文献 1 参照) や、歯肉由来の幹細胞において既存の M S C の細胞表面マーカーを発現しているため、C D 1 0 5 陽性率は 9 9 % となっていること (非特許文献 2 参照) や、歯肉由来の幹細胞において C D 2 9、C D 4 4、C D 9 0、C D 1 0 5 がいずれも陽性で C D 4 5 及び C D 1 0 6 が陰性であること (非特許文献 3 参照) や、歯肉由来の間葉系幹細胞及び前駆細胞に関するレビューにおける細胞表面抗原分子の発現 (非特許文献 4 参照) や、歯肉由来間葉系幹細胞の細胞集団は、C D 1 0 5 陽性率が 9 6 % であること (非特許文献 5 参照) が開示されている。

[0007] 一方、細胞シートの作製においては、細胞培養時間を短縮することがコスト低減に大きく影響する。一般に細胞が倍になるまでの時間 (倍加時間) は 2 5 ~ 5 3 時間といわれている (非特許文献 6 参照)。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献 1 : 国際公開第 2 0 1 6 / 0 4 3 2 0 1 号パンフレット
特許文献 2 : 国際公開第 2 0 1 6 / 0 6 8 2 1 7 号パンフレット
特許文献 3 : 特開 2 0 1 9 - 3 8 号公報
特許文献 4 : 特開 2 0 1 6 - 2 7 7 9 7 号公報
特許文献 5 : 国際公開第 2 0 1 7 / 1 7 0 9 2 5 号パンフレット

特許文献6：国際公開第2017/188403号パンフレット

特許文献7：特開2022-120128号公報

非特許文献

- [0009] 非特許文献1：Higa, K. et al. Future Sci. OA (2017) 3(4), FS0243
- 非特許文献2：Lingqian Du. et al. Journal of Dental Sciences (2016) 11, 304e314
- 非特許文献3：Ihsene Taihi et al. Stem Cell Research & Therapy (2022) 13:125
- 非特許文献4：Karim M. Fawzy El-Sayed et al. Stem Cells International Volume 2016, Article ID 7154327, 16 pages.
- 非特許文献5：Tomas I Mitrano et al. J Periodontol. 2010 Jun;81(6):917-25.
- 非特許文献6：Endo Tomohiko et al., Journal of Dental Health (1995) 45, 322-333

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本開示の課題は、所定の細胞表面抗原分子を有し、細胞シート作製に利用可能な間葉系細胞を含む、生体から分離された細胞集団を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは、術後合併症予防及び難治性皮膚潰瘍治療に対して、同種（他家）細胞シート移植の研究を行っていた。その過程で、10代から20代の若い方が親知らずの抜歯を受ける際に切除して破棄される歯肉に着目した。そして、口腔内組織から採取された間葉系細胞の細胞表面抗原分子の特徴を分析し、本開示を完成した。
- [0012] すなわち、本開示は、以下のとおりである。
- [1] CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からな

る群から選択される少なくとも1種の細胞表面抗原分子を発現する間葉系細胞を80%以上含む、生体から分離された細胞集団。

〔2〕間葉系細胞が、口腔内組織から採取された細胞又はその培養物であることを特徴とする、上記〔1〕に記載の細胞集団。

〔3〕間葉系細胞が、CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも3種以上の細胞表面抗原分子を発現することを特徴とする、上記〔1〕又は〔2〕に記載の細胞集団。

〔4〕CD274を発現する間葉系細胞を60%以上含む、上記〔1〕又は〔2〕に記載の細胞集団。

〔5〕SSEA-3を発現する間葉系細胞を5%以下含む、上記〔1〕又は〔2〕に記載の細胞集団。

〔6〕上記〔1〕又は〔2〕に記載の細胞集団を含む三次元細胞培養体。

〔7〕上記〔1〕又は〔2〕に記載の細胞集団を含む医薬組成物。

〔8〕さらに薬学的に許容される添加剤を含む上記〔7〕に記載の医薬組成物。

〔9〕三次元細胞培養体の形態である、上記〔7〕又は〔8〕に記載の医薬組成物。

〔10〕細胞シートの形態である、上記〔7〕又は〔8〕に記載の医薬組成物。

〔11〕上記〔1〕又は〔2〕に記載の細胞集団から得られたエクソソーム。

〔12〕（a）生体組織から間葉系細胞を採取する工程；（b）採取した間葉系細胞を培養する工程；

を順次含む、上記〔1〕又は〔2〕に記載の細胞集団を作製する方法。

〔13〕さらに工程（b）の後に、（c）CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも1種の細胞表面抗原分子を認識する抗体を用いて、その細胞表面抗原分子の発現を確認する工程；

を含む、上記〔12〕に記載の方法。

〔14〕工程（b）において、炎症性サイトカインを含む培地で培養することを特徴とする、上記〔12〕又は〔13〕に記載の方法。

〔15〕さらに工程（b）の後に、（d）培養した細胞を凍結保存する工程；

を含む、上記〔12〕又は〔13〕に記載の方法。

[0013] さらに、本開示の他の態様1は以下のとおりである。

〔1'〕CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも1種の細胞表面抗原分子を発現する間葉系細胞を80%以上含む、生体から分離された細胞集団。

〔2'〕間葉系細胞が、口腔内組織から採取された細胞又はその培養物であることを特徴とする、上記〔1'〕に記載の細胞集団。

〔3'〕間葉系細胞が、CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも3種以上の細胞表面抗原分子を発現することを特徴とする、上記〔1'〕又は〔2'〕に記載の細胞集団。

〔4'〕CD274を発現する間葉系細胞を60%以上含む、上記〔1'〕～〔3'〕のいずれかに記載の細胞集団。

〔5'〕SSEA-3を発現する間葉系細胞を5%以下含む、上記〔1'〕～〔4'〕のいずれかに記載の細胞集団。

〔6'〕上記〔1'〕～〔5'〕のいずれかに記載の細胞集団を含む三次元細胞培養体。

〔7'〕上記〔1'〕～〔5'〕のいずれかに記載の細胞集団を含む医薬組成物。

〔8'〕さらに薬学的に許容される添加剤を含む上記〔7'〕に記載の医薬組成物。

〔9'〕三次元細胞培養体の形態である、上記〔7'〕又は〔8'〕に記載の医薬組成物。

〔10'〕細胞シートの形態である、上記〔7'〕～〔9'〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔11'〕上記〔1'〕～〔5'〕のいずれかに記載の細胞集団から得られたエクソソーム。

〔12'〕（a）生体組織から間葉系細胞を採取する工程；（b）採取した間葉系細胞を培養する工程；

を順次含む、上記〔1'〕～〔5'〕のいずれかに記載の細胞集団を作製する方法。

〔13'〕さらに工程（b）の後に、（c）CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも1種の細胞表面抗原分子を認識する抗体を用いて、その細胞表面抗原分子の発現を確認する工程；

を含む、上記〔12'〕に記載の方法。

〔14'〕工程（b）において、炎症性サイトカインを含む培地で培養することを特徴とする、上記〔12'〕又は〔13'〕に記載の方法。

〔15'〕さらに工程（b）の後に、（d）培養した細胞を凍結保存する工程；

を含む、上記〔12'〕～〔14'〕のいずれかに記載の方法。

[0014] さらに、本開示の他の態様2は以下のとおりである。

〔16〕上記〔7'〕～〔10'〕のいずれかに記載の医薬組成物を、移植を必要とする対象に移植することを特徴とする、虚血組織、難治性皮膚潰瘍、熱傷、虚血性心疾患、重症下肢虚血、若しくは術後合併症の予防又は治療方法。

〔17〕虚血組織、難治性皮膚潰瘍、熱傷、虚血性心疾患、重症下肢虚血、若しくは術後合併症の予防又は治療用医薬組成物を製造するための上記〔1'〕～〔5'〕のいずれかに記載の細胞集団の使用。

発明の効果

[0015] 本開示の細胞集団により、細胞移植治療やその治療に利用する細胞シート

の作製が可能となる。また、歯肉から採取された間葉系細胞を培養して細胞集団を作製すれば、健常者の歯科治療等のタイミングで歯肉から簡便に採取が可能である。さらに、本開示の細胞集団は細胞の増殖が速く、細胞シートを迅速に作製することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]図1は、実施例5において、作製した細胞シートの写真を示す図である。

[図2]図2は、実施例8において、細胞シートからの血管内皮細胞増殖因子（VEGF）の分泌を調べた結果を示す図である。

[図3]図3は、実施例9において、歯肉由来間葉系細胞におけるSSEA-3の発現を調べた結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0017] <細胞集団>

本開示の細胞集団としては、CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも1種の細胞表面抗原分子を発現する間葉系細胞を80%以上含む、生体から分離された細胞集団であれば特に制限されず、以下、「本件細胞集団」ともいう。

[0018] 本明細書において「間葉系細胞」とは、発生学的に外胚葉と内胚葉との間に形成される結合組織である間葉組織に存在する細胞の総称を意味し、線維芽細胞を例示することができる。また、この間葉系細胞は、歯肉若しくは唾液腺下部（頬の内側）等の口腔内組織、脂肪組織、骨髓、又は皮膚から採取された間葉系細胞又はその培養物を好適に挙げることができる。なお、上記「その培養物」とは、上記間葉系細胞の培養細胞であって、上記間葉系細胞における細胞表面分子の発現が維持されている細胞を意味する。

[0019] 本明細書における「線維芽細胞」とは、体内の組織や臓器を維持して結合させる線維状の材料である結合組織の形成に寄与する細胞型である。正常組織においては特に顕著な機能を有しないが、損傷が加わると損傷部に遊走し、組織の網状構造を維持するのを補助するコラーゲン、エラスチン又はヒア

ルロン酸等を分泌することで、細胞外マトリックスの産生を開始し、細胞外マトリックスを更新する機能を有する。このほか、創の収縮を誘起する等、創傷治癒過程の中で重要な働きを果たしている。この線維芽細胞の調製方法については上記特許文献2に記載の方法の他、後述する間葉系細胞の調製方法を挙げることができるがこれに限定されるものではなく、当該技術分野において線維芽細胞画分として通常調製される条件により取得した細胞群であればよい。

- [0020] 間葉系細胞の由来は、特に制限されるものではない。例えば、ヒト、ブタ、サル、チンパンジー、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラット等の哺乳類を挙げることができる。なお、上記「由来」とは、その細胞が採取された動物種を表すために用いる用語である。
- [0021] 本明細書における細胞表面抗原分子のCD (cluster of differentiation) 分類は、HGNCのウェブサイト (www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/471) に記載のCD分類に基づいて定めてある。また、本明細書における遺伝子名は、GeneCards (登録商標) ウェブサイト (www.genecards.org) に記載の遺伝子名に基づいて定めてある。
- [0022] 本件細胞集団において、上記間葉系細胞を80%以上含むことが好ましく、85%以上含むことがより好ましく、90%以上含むことがさらに好ましく、95%以上含むことが特に好ましく、98%以上含むことが最も好ましい。ここで、本件細胞集団に含まれる間葉系細胞は、CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも1種の細胞表面抗原分子を発現する細胞であるかぎり、1種であっても2種以上の組み合わせであってもよい。すなわち、本件細胞集団は、たとえばCD13、CD59、CD49e、CD151又はCD280のみを発現する間葉系細胞を80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、又は98%以上含んでもよく、CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される2種、3種、4種又は5種を発現する

間葉系細胞を80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、又は98%以上含んでもよい。

[0023] 本明細書における間葉系細胞は、CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも1種の細胞表面抗原分子を発現する細胞であれば特に制限されないが、CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも2種を発現することが好ましくCD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも3種を発現することがより好ましく、CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも4種を発現することがさらに好ましく、CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280を発現することが特に好ましい。

[0024] CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも2種を発現する場合においては、その少なくとも2種としては、CD13及びCD59；CD13及びCD49e；CD13及びCD151；CD13及びCD280；CD59及びCD49e；CD59及びCD151；CD59及びCD280；CD49e及びCD151；CD49e及びCD280；CD151及びCD280のいずれであってもよい。

[0025] CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも3種を発現する場合においては、その少なくとも3種としては、CD13、CD59、及びCD49e；CD13、CD59、及びCD151；CD13、CD59、及びCD280；CD13、CD49e、及びCD151；CD13、CD49e、及びCD280；CD13、CD151及びCD280；CD59、CD49e、及びCD151；CD59、CD49e、及びCD280；CD59、CD151、及びCD280；CD49e、CD151、及びCD280のいずれでもよい。

[0026] CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群

から選択される少なくとも4種を発現する場合においては、その少なくとも4種としては、CD13、CD59、CD49e及びCD151；CD13、CD59、CD49e及びCD280；CD13、CD59、CD151及びCD280；CD13、CD49e、CD151及びCD280；CD59、CD49e、CD151及びCD280のいずれであってもよい。

[0027] 上記細胞集団は、さらにCD29、CD63、CD90、CD73、CD44、CD13、及び／又はHLA class Iを発現する間葉系細胞を50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上含んでいる細胞集団を挙げることができる。

[0028] また、上記細胞集団は、CD304、CD106、CD34、及び／又はCD45を発現する間葉系細胞を10%以下、好ましくは5%以下、より好ましくは3%以下、さらに好ましくは1%以下含んでいる細胞集団を挙げることができる。

[0029] さらに、上記細胞集団は、CD105を発現する間葉系細胞を80%以下、好ましくは70%以下、さらに好ましくは15～68%含んでいる細胞集団を挙げることができる。

[0030] 加えて、上記細胞集団は、多能性幹細胞のマーカーの細胞表面抗原分子として知られているSSEA-3 (Stage-Specific Embryonic Antigen-3)を発現する間葉系細胞を5%以下、好ましくは3%以下、さらに好ましくは1%以下、特に好ましくは0.3%以下、最も好ましくは0%含んでいる細胞集団を挙げることができる。

[0031] なお、上記細胞集団を含み、同種他家移植に用いる細胞シート形態の医薬組成物とする場合には、免疫拒絶反応を抑制するために、CD274を発現する間葉系細胞を50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上含む細胞集団を挙げることができる。

[0032] 細胞における上記細胞表面抗原分子の発現は、たとえば上記細胞表面抗原

分子に結合可能な抗体を用いて確認することができる。具体的には、CD 13の発現を確認する場合を例にすると、上記細胞集団の懸濁液を調製し、抗CD 13抗体を用いて上記細胞集団を構成する細胞におけるCD 13の発現を確認することができる。

[0033] 本明細書において「発現する」とは細胞表面抗原分子のタンパク質が発現していることを意味するが、細胞表面に細胞表面抗原分子が提示していることが好ましい。

[0034] また、本件細胞集団において、上記間葉系細胞以外に含まれる細胞としては特に制限されないが、T細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、B細胞等のリンパ球系細胞や、単球、マクロファージ、樹状細胞等の抗原提示細胞や、好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞等の顆粒球を挙げることができる。

[0035] <三次元細胞培養体>

本明細書における三次元細胞培養体は、上記本件細胞集団を含むものであれば特に限定されるものではない。三次元細胞培養体の形態は、細胞同士が接着分子、細胞外マトリックス等を介して物理的、機能的に連結して目的とする三次元構造を有するものである。ここで、「三次元細胞培養体」には、細胞シート、スフェロイド、オルガノイド等が含まれるが、これらに限定されるものではない。三次元細胞培養体の形状としては、シート、臓器状、球状、組織状、中空状、又はブロック状等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。なお、典型的には細胞シートのように、付着細胞（培養基材に付着して増殖する細胞、例えば、線維芽細胞）は細胞同士が物理的及び／又は機能的に連結して三次元構造の細胞集合体を形成しやすいが、例えばスフェロイドのように、浮遊細胞（すなわち、培地中に培地中に浮遊して増殖する細胞、例えば、造血細胞、血球）であっても細胞同士が物理的及び／又は機能的に連結して三次元構造の細胞集合体を形成する場合には、本明細書における三次元細胞培養体に該当する。

[0036] 三次元細胞培養体の製造方法は、当業者に公知の方法で行えばよく、特に

制限されるものではない。三次元細胞培養体の製造方法としては、例えば、特開2012-120696号公報、特開2017-176025号公報、特開2015-149905号公報等の文献に教示されている方法を挙げることができる。

[0037] 三次元細胞培養体の厚みは、特に制限されるものではない。三次元細胞培養体の厚みとしては、例えば、0.01mm以上10mm以下であり、0.1mm以上5mm以下、0.5mm以上4mm以下、1.0mm以上3mm以下であってもよい。

[0038] 細胞集団を含む三次元培養体において、その培養する三次元培養体の細胞の密度としては、例えば、 5×10^1 細胞/cm³以上 5×10^{10} 細胞/cm³以下である。より好ましくは 5×10^2 細胞/cm³以上 5×10^9 細胞/cm³以下、さらに好ましくは 5×10^3 細胞/cm³以上 1×10^9 細胞/cm³以下、特に好ましくは 5×10^4 細胞/cm³以上 5×10^8 細胞/cm³以下である。

[0039] <医薬組成物>

本開示の医薬組成物は、上記細胞集団を含むものであれば特に制限されず、以下、「本件医薬組成物」ともいう。本件医薬組成物は薬学的に許容可能な添加剤を含んでもよい。本件医薬組成物の形態としては、懸濁液形態、三次元細胞培養体の形態等を挙げることができ、細胞シート形態であることが好ましい。

[0040] 本件医薬組成物は、虚血組織医療用の医薬組成物であることが好ましい。ここで、「虚血組織」とは、血流が低下した状態にある組織をいう。虚血組織においては、血流の低下に伴って組織の崩壊が生じる。本件医薬組成物は、このような虚血組織においてVEGFの分泌により血管新生を促して血流の改善効果を奏するものである。治療対象疾患としては、褥瘡、閉塞性動脈硬化症、糖尿病、静脈不全、膠原病、血管炎等に代表される難治性皮膚潰瘍を挙げることができる。また、本件医薬組成物を用いて難治性皮膚潰瘍の予防又は治療方法を行う場合には、本件医薬組成物を、移植を必要とする対象

、たとえば難治性皮膚潰瘍患者に移植することができる。他に、治療対象疾患としては、虚血組織、熱傷、虚血性心疾患、重症下肢虚血、術後合併症（例えば、各種臓器の縫合不全、気管支断端瘻、脾液瘻、胆汁漏）を挙げることができる。

[0041] さらに、本件医薬組成物は、虚血性潰瘍、膠原病に伴う潰瘍、放射線治療に伴う潰瘍等の難治性皮膚潰瘍の治療や手術後の合併症予防、その予防を目的とした補強剤に用いることもできる。

[0042] 本明細書において「薬学的に許容可能な添加剤」とは、生理食塩水、緩衝生理食塩水、細胞培養培地、デキストロース、注射用水、グリセロール、エタノール及びこれらの組合せ、安定剤、可溶化剤、界面活性剤、緩衝剤、防腐剤、等張化剤、充填剤、並びに潤滑剤等を挙げることができる。

[0043] 本件医薬組成物における細胞シート形態は、細胞同士が直接、若しくは接着分子、細胞外マトリックス等を介して物理的、機能的に連結してシート構造を有する形態である。細胞シートの製造方法は、当業者に公知の方法で行えばよく、特に制限されるものではない。細胞シートの製造方法としては、例えば、上記特許文献1～3、特開2011-006490号公報、国際公開第2015/068505号パンフレット、特開2022-8269号公報等の文献に教示されている方法を挙げることができる。

[0044] 本明細書における「細胞シート」は、1の細胞層から構成される単層構造であってもよいし、2以上の細胞層から構成される積層構造でもよい。積層構造としては、特に制限されるものではないが、2層、3層、4層、5層等の多層構造を挙げることができる。

[0045] 本明細書における細胞シートの厚みは、特に制限されるものではない。細胞シートの厚みとしては、例えば、0.001mm以上2.0mm以下である。より好ましくは0.01mm以上1.5mm以下、さらに好ましくは0.03mm以上1.2mm以下、特に好ましくは0.05mm以上1.0mm以下である。細胞シートの厚みを上記範囲とすることにより、細胞シート内での高い細胞生存率、及び細胞移植に有利な優れた形状維持能を発揮する

ことができる。

[0046] 本明細書における懸濁液形態は、細胞が単独又は他の細胞と接触した形態で培地、PBS、生理食塩水等の溶液に懸濁した状態である。

[0047] <エクソソーム>

本明細書のエクソソームは、上記本件細胞集団から得られたエクソソームであれば特に制限されず、以下、「本件エクソソーム」ともいう。なお、本明細書において「エクソソーム」とは、細胞由来の膜質二重膜からなる小胞を指す。エクソソームはほとんどの細胞種から放出され、多くの体液で見つけることができ、DNA、mRNA若しくはmicroRNA等の核酸や、タンパク質を内包している。本明細書に係るエクソソームは、好ましい実施の形態において、ヒトの歯肉から採取された間葉系細胞を含む本件細胞集団から得られたエクソソームである。本件細胞集団から得られたエクソソームは、抗炎症作用や創傷の治癒促進効果を有する点、間葉系細胞は無血清培養可能であるためエクソソームを回収しやすい点、また間葉系細胞はがん化のリスクがほとんどないため、そのエクソソームも安全性が高いことが示唆され、種々の成長因子を内包している点において好ましい。本件エクソソームのサイズとしては、例えば直径20nm～140nmを挙げることができる。

[0048] 本件エクソソームの製造方法は、本件細胞集団を培養した培養上清を遠心分離機又は限外濾過にかけて、細胞及び夾雑物を除去して上澄みを回収することによって得ることができる。上記遠心分離は、例えば、1000rpm～3000rpmで2分～10分の条件で行うことができる。その後、市販のエクソソームを単離するキットを用いてさらに精製したエクソソームを回収してもよいし、超遠心分離（例えば、100,000g～1,000,000g、30分～12時間）によりエクソソームを精製・回収してもよい。

[0049] <細胞集団を作製する方法>

本明細書の細胞集団を作製する方法としては、（a）生体組織から間葉系細胞を採取する工程；（b）採取した間葉系細胞を培養する工程；を順次含

む方法であれば特に制限されず、以下、単に「本件細胞集団を作製する方法」ともいう。

[0050] 工程（b）の後に、（c）CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも1種の細胞表面抗原分子を認識する抗体を用いて、その細胞表面抗原分子の発現を確認する工程；を含んでもよいが特に限定されるものではない。さらに、工程（b）の後に、（d）培養した細胞を凍結保存する工程；を含んでもよいが特に限定されるものではない。凍結保存の期間及び凍結保存方法については後述する。

[0051] 細胞を培養する方法は、特に制限されるものではなく、再生医療、医薬品、医薬部外品等の分野において使用されている通常の手段を用いることができる。具体的には、例えば、培養容器内に培養液を加えると共に培養する細胞を播種し、目的とする状態まで最適な環境下で培養する方法等を挙げることができる。

[0052] 上記細胞を培養する方法に用いる培養液は、細胞の培養に必要な成分を含んだ溶液である。培養液は、培養する細胞に適したものであれば、特に制限されるものではない。培養液成分としては、例えば、糖類、アミノ酸、ビタミン類、無機塩、微量金属、添加物等を挙げることができる。

[0053] また、これらの培養液成分は、単独で配合してもよいし、二種以上を組み合わせ合わせて配合してもよい。これらの培養液成分については、培養する細胞等に応じて公知のものから適宜調整することができる。

[0054] 糖類としては、例えば、グルコースやフルクトース、マンノース、ガラクトース等の単糖類、スクロースやスクラロース、トレハロース、マルトース、ラクトース等の二糖類、グルコシルスクロースやラクトスクロース、ラフィノース等の三糖類、アカルボースやマルトテトラオース等の四糖類、シクロデキストリン、オリゴ糖等を挙げることができる。

[0055] アミノ酸としては、例えば、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-アルギニン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-セリン、L-ス

レオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-ヒドロキシプロリン等を挙げることができる。

[0056] ビタミン類としては、例えば、アスコルビン酸ナトリウム、コリン、葉酸、ナイアシン、ビオチン、パントテン酸、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、チミジン、ビタミンB12等を挙げることができる。

[0057] 無機塩としては、例えば、塩化ナトリウム、水酸化ナトリウム、硫酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、塩化カリウム、水酸化カリウム、硫酸カリウム、リン酸カリウム、リン酸水素二カリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム、塩化カルシウム、硫酸カルシウム、硝酸カルシウム、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、リン酸マグネシウム、炭酸マグネシウム等を挙げることができる。

[0058] 微量金属としては、例えば、硫酸鉄、硝酸鉄、硫酸銅、硝酸銅、硫酸亜鉛等を挙げることができる。

[0059] 添加物としては、例えば、ウシ胎児血清やウマ血清、ヒト血清等の血清、FGF2やEGF、HGF、VEGF、PDGF等の増殖因子、アルブミン等のタンパク質、グルタチオンやアスコルビン酸、アスコルビン酸誘導体等の抗酸化剤、ペニシリンやストレプトマイシン等の抗生物質、HEPES（2-〔4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニル〕-エタンスルホン酸）等のpH調整剤、乳酸やプロピオン酸等の有機酸、コレステロール等の脂質、リノレン酸等の脂肪酸、エタノールアミンやブトレシン等のアミン類、メルカプトエタノールや3-メルカプト-1,2-プロパンジオール等の還元剤、アルギン酸ナトリウムやポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、プルラン等の増粘剤、Rhoキナーゼ阻害剤等を挙げることができる。

[0060] なお、培養する細胞が幹細胞や前駆細胞の場合は、培養液に分化誘導因子を添加し、培養時に分化誘導処理をしてもよい。分化誘導因子としては、例

えば、アクチビンA、BMP4、bFGF、VEGF、SCF、DKK1、BMPシグナルインヒビター、TGF β /アクチビン/NODALシグナルインヒビター、Wntシグナルインヒビター、レチノイン酸シグナルインヒビター等を挙げることができる。

[0061] また、上記工程(b)において、IFN- γ 、インターロイキン-17(IL-17)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)(TNF- α)、IL-1、IL-2、IL-12、IL-18等の炎症性サイトカインを含む培地で培養してもよい。

[0062] 工程(c)においては、CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも1種の細胞表面抗原分子を認識する抗体を用いて、その細胞表面抗原分子の発現を確認することができるが、CD13、CD59、CD49e、CD151又はCD280を認識する抗体で、それぞれの細胞表面分子の発現を確認してもよい。さらに、細胞集団を構成する細胞数と、それぞれの細胞表面分子を発現する細胞数をカウントすることで、細胞集団におけるそれぞれの細胞表面分子を発現する細胞の割合(%)を確認することができる。なお、間葉系細胞か否かはCD90を認識する抗体を用いて確認することができる。

[0063] 上記の培養液成分を含んだ培養液としては、具体的には、AIM(登録商標) V medium、HFD-1 Medium、ダルベッコリン酸緩衝食塩液(D-PBS)やハンクス平衡塩溶液(HBSS)等の平衡緩衝液、DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)、EMEM(Eagle's Minimum Essential Medium)、 α -MEM(Minimum Essential Medium alpha Modification)、IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)、GMEM(Glasgow's MEM)、Ham's F-10 medium、Ham's F-12 medium、Ham's F-12K medium、RPMI medium 1640、M-199 m

edium、L-15 medium、McCoy's 5A Medium、MCDB105 medium、MCDB107 medium、MCDB131 medium、MCDB153 medium、MCDB201 medium、NCTC109 medium、NCTC135 medium、Waymouth's MB752/1 medium、CMRL-1066 medium、Williams' medium E、Brinster's BMOC-3 Medium、E8 medium等の培養液を挙げることができる。

[0064] 培養条件は、培養細胞を目的とする状態にできるのであれば、特に制限されるものではない。一般的な培養条件としては、例えば、調整した基礎培養液を用いた37℃、5%CO₂の環境下である。培養条件については、培養する細胞等に応じて適宜設定すればよい。また、細胞培養の期間は、培養細胞が目的とする状態になるのであれば、特に制限されるものではない。細胞培養の期間としては、例えば、28日以内、21日以内、14日以内、7日以内、5日以内、3日以内である。

[0065] 培養容器に播種する細胞数は、培養する細胞、培養容器に適したものであれば、特に制限されるものではない。培養容器に播種する細胞数としては、例えば、 1×10^3 細胞/mL以上 1×10^7 細胞/mL以下である。より好ましくは 1×10^4 細胞/mL以上 1×10^6 細胞/mL以下、さらに好ましくは 5×10^4 細胞/mL以上 5×10^6 細胞/mL以下、特に好ましくは 1×10^5 細胞/mL以上 1×10^6 細胞/mL以下である。

[0066] 培養する細胞の密度は、培養する細胞、培養容器、培養細胞の用途に適したものであれば、特に制限されるものではない。培養する細胞の平面密度としては、例えば、 1×10^4 細胞/cm²以上 1×10^9 細胞/cm²以下である。より好ましくは 1×10^5 細胞/cm²以上 1×10^8 細胞/cm²以下、さらに好ましくは 2×10^5 細胞/cm²以上 1×10^7 細胞/cm²以下、特に好ましくは 5×10^5 細胞/cm²以上 1×10^6 細胞/cm²以下である。

[0067] 細胞集団を含む医薬組成物として、細胞集団を含んだ細胞シート若しくは

三次元培養体とする場合には、その培養する細胞シート、三次元培養体の細胞の密度としては、例えば、 5×10^1 細胞/ cm^3 以上 5×10^{10} 細胞/ cm^3 以下である。より好ましくは 5×10^2 細胞/ cm^3 以上 5×10^9 細胞/ cm^3 以下、さらに好ましくは 5×10^3 細胞/ cm^3 以上 1×10^9 細胞/ cm^3 以下、特に好ましくは 5×10^4 細胞/ cm^3 以上 5×10^8 細胞/ cm^3 以下である。

[0068] 本明細書における間葉系細胞は、医薬組成物を用いる対象の患者由来である自家細胞であってもよく、同種の別の対象、例えば他の患者に由来する他家細胞であってもよい。

[0069] 本件医薬組成物の投与量は、懸濁状態の場合には、細胞数として、 $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{12}$ 個/回、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{11}$ 個/回、より好ましくは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{10}$ 個/回を挙げることができる。なお、本用量を1回量として、複数回投与してもよく、本用量を複数回に分けて投与してもよい。また、通常、成人に投与する場合には、体重当たりの細胞数として、 $1 \times 10 \sim 5 \times 10^{10}$ 個/kg、好ましくは $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^9$ 個/kg、より好ましくは $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^8$ 個/kgである。なお、本用量を1回量として、複数回投与してもよく、本用量を複数回に分けて投与してもよい。

<凍結保存>

本件細胞集団、本件三次元細胞培養体、本件医薬組成物、本件エクソソームは凍結保存されてもよい。具体的には -20°C 以下、好ましくは -80°C で1日以上、1週間以上10年以下、1ヶ月以上5年以下、1年以上3年以下凍結保存することもできる。凍結方法としては、生物工学的に広く用いられている細胞凍結保存液を用いて凍結する方法、特開2022-8269号公報に記載の凍結方法、緩慢凍結法、又はガラス化法を挙げることができる。上記凍結の期間及び凍結方法は、上記細胞集団を作製する方法において、工程(b)の後に、(d)培養した細胞を凍結保存する工程においても適用できる。

[0070] 凍結保存した本件細胞集団は細胞バンクにバンク化することもできる。歯肉組織から間葉系細胞を採取する場合を例に挙げると、具体的には、同意を得られた患者の親知らず抜歯時に、その後の縫合時に切除する歯肉組織から間葉系細胞を採取し、培養する（P 0）。次に、採取した間葉系細胞（P 0）を播種して1時間後に培地交換を行い、接着した細胞を培養する。培養した細胞を培地から剥離して得た細胞（P 1）を凍結保存し、バンク化することができる。

[0071] 再生医療へ活用する際には、たとえば上記でバンク化された凍結保存細胞（P 1）をプレートに播種してP 4まで培養して凍結保存する。使用する際に解凍して移植に用いることができる。なお、上記P 0、P 1、P 4における数字は継代数を意味する。

実施例

[0072] 以下、実施例により本開示をより具体的に説明するが、本開示の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

[0073] [実施例1] 歯肉組織から採取した間葉系細胞の調製

まず、歯肉由来の細胞を以下の方法で培養してP 1細胞、P 2細胞又はP 3細胞を作製し、後の実施例に用いた。なお、上記P 1、P 2、P 3における数字は継代数を意味する。

[0074] <P 1細胞の調製>

・5人のドナー（No 1～5）の歯肉組織をピンセットとメスで細切し、6-w e l l p l a t e（#MS-80060S：住友ベークライト社）に細切した歯肉組織を貼り付けた。

・50mLチューブ1本にウシ由来細胞培養用血清N e o S E R A（登録商標）（ジャパン・バイオメディカル社）1.5mL、A I M-V M e d i u m（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）15mL、及びH F D M-1（+）（細胞科学研究所社）15mLを入れて、ピペティングして培養液を調整した。

・ 6-well plate の1ウェルにその培養液を5 mL ずつ入れ、上記細切した歯肉組織を培養した。細切した歯肉組織から生え出てきた細胞 P0 を回収し、90 mmシャーレ (#MS-13900S:住友ベークライト社) に細胞を播種して1時間後に培地交換を行い、接着した細胞を培養した。

・ 90 mmシャーレ 1枚の培地は、AIM-V Medium 4.5 mL、HFDm-1 (+) 4.5 mL、NeoSERA 1 mLとした。

・ 90 mmシャーレで培養した細胞の密度が70~95%に到達したときにP1細胞を回収し、STEM-CELLBANKER (登録商標) GMP grade (製品コード#CB045:ゼノアックリソース社) でP1細胞を 1×10^6 cells/mL に調整し、クライオチューブに1 mL ずつ分注してP1細胞を含む細胞保存液とし、使用時まで -80°C で冷凍保管した。

[0075] <P1細胞におけるCD90の発現>

以下の方法でP1細胞におけるCD90の発現を確認した。

・ P1細胞をPBSで 1×10^6 cells/mL となるように調整し、15 mLチューブをon iceにした。

・ 1. 5 mLチューブに表1に記載の抗CD90抗体又はアイソ (ISO) タイプコントロール抗体を20 μL ずつ入れた後に、上記P1細胞 (1×10^6 cells/mL) を100 μL 入れてピペティングし、on iceで遮光し、30分間静置した。なお、表1中、ISOはアイソタイプコントロールを意味する。

・ 1. 5 mLチューブにPBS 400 μL を入れてピペティングし、セルストレーナー・キャップ付き5 mLポリスチレンラウンドチューブ (#REF352235、Becton Dickinson社) に通した。

・ PP製 スタンダードテストチューブ (丸底) (#A26428、ベックマン・コールター社) に移し、サンプル測定開始まで氷上に置いた。

・ No1は、Novocyte (ACEA Biosciences

）で蛍光波長を測定し、No2～5は、Cytomics FC 500（ベックマン・コールター社）で蛍光波長を測定した。

[0076] [表1]

	メーカー	製品番号	クローン	IsoType	製品名
CD90	ThermoFisherScientific (LifeTechnologies)	11-0995-42	αB220 (B220)	Mouse IgG1, kappa	CD90 (Thy-1) Monoclonal Antibody αB220 (B220), FITC αBioscience®
EGFP110	BD Biosciences	55843	MO3D-21	Mouse IgG1, κ	FITC Mouse IgG1, κ Isotype Control

[0077] 結果を表2に示す。表2の結果より、得られた細胞集団は間葉系細胞のマーカーであるCD90を95%以上含んでおり、得られたP1細胞集団の多くは、間葉系細胞であると判断した。なお、細切した歯肉組織の培養開始を0日目とした場合に、培養13日目におけるP1細胞の生細胞数は、No1～5それぞれ順に $13.8 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 、 $43.1 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 、 $45.6 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 、 $37 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 、 $22 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ であった。

[0078] [表2]

	No1	No2	No3	No4	No5
CD90	95.1	99.8	99.9	99.8	99.8

[0079] ＜P2細胞の調製＞

- P2細胞の調製は以下の工程で行った。
- ・上記クライオチューブに分注したP1細胞を含む細胞保存液を解凍した。
 - ・15mLチューブに、AIM-V Medium（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）3.5mL、ウシ由来細胞培養用血清NeoSERA（登録商標）（ジャパン・バイオメディカル社）0.5mL、及び解凍したP1細胞を含む細胞保存液1mLを入れ、1200rpm、1分、室温で遠心した。
 - ・上清を吸引除去し、P1細胞を10cm dish（#93100：BM機器社）2枚にP1細胞を播種してインキュベーター（37℃、5%CO₂）で4日間培養した。
- 10cm dishの培地は、AIM-V Medium 5mL+H

FDM-1 (+) (細胞科学研究所社) + NeoSERA 1 mL を用いた。

- ・ 10 cm dish から培養液を吸引除去し、10 cm dish 1 枚に PBS (細胞科学研究所社) を 5 mL 入れて dish 内を洗浄後、PBS を吸引除去した。

- ・ 10 cm dish 1 枚にリコンビナントトリプシン/EDTA 溶液である r-TE (細胞科学研究所社) を 2 mL 入れ、10 cm dish をインキュベーター (37℃、5%CO₂) で 3 分間静置した。

- ・ 50 mL チューブに 40 μm セルストレイナー (#352340 : コーニング社) を取り付けた。

- ・ ピペティングで細胞を 10 cm dish から剥離し、上記 50 mL チューブに移した。

- ・ 10 cm dish 1 枚に合成トリプシン中和剤溶液である s-TI (細胞科学研究所社) を 2 mL 入れ、10 cm dish 内を洗浄し、その洗浄液を上記 50 mL チューブに移した。

- ・ 上記 50 mL チューブを 1200 rpm、1 分、室温で遠心した。

- ・ 遠心後、上清を吸引除去し AIM-V Medium 2 mL で細胞を懸濁して P2 細胞を含む懸濁液を得た。その細胞懸濁液 10 μL とトリパンプルー 10 μL を混合後に、混合液 10 μL を血球計算盤にアプライし、細胞数を数えた。

- ・ 後述の倍加実験の為に、3 個の細胞培養フラスコ (#MS-23800 225 cm² : 住友ベークライト社) それぞれに P2 細胞を 2.5×10^5 cells 播種した。細胞培養フラスコ 1 個の培養液は、AIM-V Medium 25 mL + HFDM-1 (+) 25 mL + NeoSERA 2 mL を用いた。

- ・ 残った細胞は、STEM-CELL BANKER (登録商標) GMP grade (製品コード #CB045 : ゼノアックリソース社) で P2 細胞を 1×10^6 cells/mL に調整し、クライオチューブに 1 mL ずつ

分注してP 2細胞を含む細胞保存液とし、使用時まで -80°C で冷凍保管した。

[0080] <P 3細胞の調製>

- ・ N o 1 はP 2細胞を細胞培養フラスコに播種して3日後に継代し、N o 2～5はP 2細胞を細胞培養フラスコに播種して5日後に継代した。

- ・ N o 2～N o 5は細胞播種して3日後に培地を半量交換した。

- ・ 細胞培養フラスコ1個から培養液を吸引除去し、細胞培養フラスコ1個にP B Sを25 mL入れて細胞培養フラスコ内を洗浄後、P B Sを吸引除去した。

- ・ 細胞培養フラスコ1個にリコンビナントトリプシン／E D T A溶液であるr－T E（細胞科学研究所社）を5 mL入れ、細胞培養フラスコをインキュベーター（ 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ ）で3分間静置した。

- ・ 50 mLチューブに40 μm セルストレイナー（# 3 5 2 3 4 0：コーニング社）を取り付けた。

- ・ ピペッティングで細胞を細胞培養フラスコから剥離し、50 mLチューブに移した。

- ・ 細胞培養フラスコ1個に合成トリプシン中和剤溶液であるs－T I（細胞科学研究所社）を5 mL入れ、細胞培養フラスコ内を洗浄し、その洗浄液を50 mLチューブに移した。

- ・ 50 mLチューブを1200 rpm、2分、室温で遠心した。

- ・ 遠心後、上清を吸引除去しA I M－V M e d i u m 20 mLで細胞を懸濁し、P 3細胞を含む懸濁液を得た。その細胞懸濁液10 μL とトリプンブルー10 μL を混合後に、混合液10 μL を血球計算盤にアプライし、細胞数を数えた。

- ・ 倍加実験の為に、3個の細胞培養フラスコ（# M S－2 3 8 0 0 2 5 c m²：住友ベークライト社）それぞれにP 3細胞を 2.5×10^5 c e l l s播種した。

- ・ S T E M－C E L L B A N K E R（登録商標） G M P g r a d e

(製品コード#CB045:ゼノアックリソース社)でP3細胞を 1×10^6 cells/mLに調整し、クライオチューブに1mLずつ分注してP3細胞を含む細胞保存液とし、使用時まで -80°C で冷凍保管した。

[0081] [実施例2] 歯肉組織から採取した間葉系細胞の細胞表面抗原分子の発現

数多くの細胞表面抗原分子があるなかで、本発明者らはこれまでの知見やノウハウを基にCD13、CD29、CD59、CD49e、CD151、CD280、CD304、CD274、CD63及びCD106や、HLA class I、HLA class IIに着目し、間葉系幹細胞のマーカーとして知られている細胞表面分子と共に、その細胞表面抗原分子の発現を、抗体を用いて調べた。

[0082] ・実施例1で作製したクライオチューブ1本(P3細胞を含む細胞保存液)を -80°C から取り出して解凍した。

・15mLチューブに、AIM-V Medium (サーモフィッシューサイエンティフィック社) 3.5mL、ウシ由来細胞培養用血清NeoSERA (登録商標) (ジャパン・バイオメディカル社) 0.5mL、及び解凍したP3細胞を含む細胞保存液1mLを入れ、1200rpm、1分、室温で遠心した。

・上清を吸引除去し、P3細胞を10cm dish 2枚に播種した。10cm dish 1枚の培地は、AIM-V Medium 5mL + HFDm-1 (+) (細胞科学研究所社) + NeoSERA 1mLを用いた。

・10cm dishをインキュベーター(37°C 、5% CO_2)で4日間培養した。

・10cm dishから培養液を吸引除去し、10cm dish 1枚にPBS (細胞科学研究所社)を5mL入れてdish内を洗浄後に、PBSを吸引除去した。

・10cm dish 1枚にリコンビナントトリプシン/EDTA溶液であるr-TE (細胞科学研究所社)を2mL入れ、10cm dish

hをインキュベーター（37℃、5%CO₂）で3分間静置した。

- ・50mLチューブに40μmセルストレイナー（#352340：コーニング社）を取り付けた。

- ・ピペティングで細胞を10cm dishから剥離し、50mLチューブに移した。

- ・10cm dish 1枚に合成トリプシン中和剤溶液であるs-TI（細胞科学研究所社）を2mL入れ、10cm dish内を洗浄し、その洗浄液を50mLチューブに移した。

- ・50mLチューブを1200rpm、1分、室温で遠心した。

- ・遠心後、上清を吸引除去しPBS 2mLで細胞を懸濁してP4細胞を含む懸濁液とし、その細胞懸濁液10μLとトリパンブルー10μLを混合後に、混合液10μLを血球計算盤にアプライし、細胞数を数えた。

- ・細胞濃度が、 $1 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ になるようにPBSで調整後、50mLチューブをon iceにした。

- ・1. 5mLチューブに表3に記載の抗体を20μLずつ入れた後に、細胞懸濁液（ $1 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ ）を100μL入れてピペティングし、on iceで遮光し、30分間静置した。

- ・1. 5mLチューブにPBS 400μLを入れてピペティングし、セルストレイナー・キャップ付き5mLポリスチレンラウンドチューブ（#REF352235：Becton Dickinson社）に通した。

- ・PP製 スタンダードテストチューブ（丸底）（#A26428：ベックマン・コールター社）に移し、サンプル測定開始まで氷上に置いた。

- ・Cytomics FC 500（ベックマン・コールター社）で蛍光波長を測定した。

[0083]

[表3]

	メーカー	カタログ番号	クローン	宿主種	特異性
CD90	ThermoFisher Scientific (Life Technologies)	11-0998-42	cd90G10 (G81)	Mouse / IgG1, kappa	CD90 (Thy-1) Monoclonal Antibody (eBioscience™, FITC, eBioscience™)
CD13	BD Biosciences	561256	8D3	Mouse IgG1, κ	FITC Mouse Anti-Human CD13
CD34	BD Biosciences	56478	13A1 2B	Mouse IgG2b, κ	FITC Mouse Anti-Human CD34
CD45	BD Biosciences	561443	2B6	Mouse IgA1,2/3 IgG1, κ	FITC Mouse anti-Human CD45
CD49e	BD Biosciences	560655	5B1	Mouse IgG1, κ	PE Mouse Anti-Human CD49e
CD151	BD Biosciences	561821	5H1	Mouse IgG1, κ	FITC Mouse Anti-Human CD151
CD49b	BD Biosciences	565480	4H50	Mouse IgG1, κ	FITC Mouse Anti-Human CD49b
CD90	Sigma-Aldrich	FG01-18975-05.9		Mouse IgG2b, κ	Monoclonal Anti-CD90 FITC antibody produced in mouse
CD13	ThermoFisher Scientific (Life Technologies)	11-0133-42	WM-15 (CD13)	Mouse / IgG1, kappa	CD13 Monoclonal Antibody (278 (H 099715)), FITC, eBioscience™
CD29	ThermoFisher Scientific (Life Technologies)	11-0279-42	TS2/21	Mouse / IgG1, kappa	CD29 (Integrin beta 1) Monoclonal Antibody (TS2/21, FITC, eBioscience™)
CD49	ThermoFisher Scientific (Life Technologies)	11-0998-42	CD49A2	Mouse / IgG1, kappa	CD49 (Hemidesmosomal Antibody (CD49A2, FITC, eBioscience™)
CD49e	BD Biosciences	561617	5B1	Mouse IgG1/2a IgG1, κ	PE Mouse Anti-Human Integrin α1 chain (CD49e)
CD34	BD Biosciences	566567	13A1.2B1	Mouse IgA1,2/3 IgG1, κ	PE Mouse Anti-Human CD34
CD29	BD Biosciences	566617	21/129	Mouse IgG1, κ	PE Mouse Anti-Human CD29
CD151	BD Biosciences	561822	15A1.2B2	Mouse IgG2b, κ	PE Mouse Anti-Human Integrin α1 (CD151)
CD71	BD Biosciences	561609	4D7/2.1	Mouse IgG1, κ	FITC Mouse IgG1, κ Mouse Control
CD71	BD Biosciences	561674	6E10.128	Mouse IgA1,2/3 IgG2a, κ	PE Mouse IgG2a, κ Mouse Control
CD49b	BD Biosciences	564882	12C2	Mouse IgG2a, κ	PE anti-human CD49b (Integrin α1) Antibody
CD90	ThermoFisher Scientific (Life Technologies)	12-0830-42	95C6	Mouse / IgG1, kappa	CD90 Monoclonal Antibody (95C6), FITC, eBioscience™
HLA class I	BD Biosciences	561446	W6/32	Mouse IgG2a, κ	FITC anti-Human HLA-A,B,C Antibody
HLA class II	BD Biosciences	566553	7C39 (also known	Mouse IgG2a, κ	FITC Mouse Anti-Human HLA-DP, DM, DQ
CD274	ThermoFisher Scientific (Life Technologies)	12-1583-42	36H11	Mouse / IgG1, kappa	CD274 (TNF-α, BT, H1) Monoclonal Antibody (36H11), FITC, eBioscience™
CD49b	BD Biosciences	561670	12.1009	Mouse IgG1, κ	PE Mouse Anti-Human CD49b

[0084] 結果を表4に示す。表4から明らかなように、No 1～5のいずれの歯肉組織由来の間葉系細胞を培養して得られた細胞集団においても、CD13、CD29、CD59、CD49e、CD151、又はCD280を発現する細胞を95%以上含んでいることが確認された。また、No 1～5のいずれの歯肉組織由来の間葉系細胞を培養して得られた細胞集団においても、間葉系幹細胞のマーカーであるCD90又はCD73を発現する細胞を97%以上含んでいた。さらに、上記細胞集団はCD274を発現する細胞を60%以上、CD105を発現する細胞は、16～66%含んでいた。一方、上記いずれの細胞集団においても、CD34、CD45、CD56、CD304、CD106の発現は確認されず、HLA class IIを発現する細胞は0～0.4%含んでいるにとどまっていた。なお、CD13、CD59、CD49e、CD151、CD280についてはこれまで歯肉由来の細胞集団において発現が確認されておらず、歯肉由来の間葉系細胞における新たな細胞表面分子を確認することができた。

[0085] [表4]

	No1	No2	No3	No4	No5
CD99	99.8	99.8	99.8	99.9	99.7
CD73	98.6	99.3	97.3	99.3	99.7
CD44	99.6	99.6	99.7	99.8	99.9
CD195	16.4	65.7	55.2	66.7	61.3
CD166	62.8	87.3	91.1	94.4	76.8
CD34	0	0	0	0	0
CD45	0	0	0	0	0
CD56	0	0	0	0	0
CD13	99.4	99.4	99.3	99.7	99.7
CD29	99.6	99.2	98.7	99.5	99.5
CD69	99.7	99.6	99.5	99.8	99.7
CD49e	98.5	95.2	98.2	95.5	97.8
CD151	99.2	97.7	98.4	98.7	99.2
CD230	99	96.8	98	97.4	96.6
CD304	0	0	0	0	0
HLA class I	99.7	98.9	99.4	99.4	99.7
HLA class II	0.1	0.2	0.3	0	0.4
CD274	68.5	70.4	69.9	86.2	95.2
CD63	96	99.6	93.1	96.4	96.2
CD106	0	0	0	0	0

[0086] [実施例3] 細胞の増殖能

細胞の増殖能を評価するために、倍加時間を測定する実験を行った。なお、ここで倍加時間とは、細胞が2倍になる時間、つまり、1個の細胞が分裂して2個になるために要する時間である。

[0087] 以下の方法でパッセージ毎の細胞数測定による細胞の倍加時間測定を行った。

- ・上記実施例1に記載のように、3個の細胞培養フラスコ（#MS-23800 225 cm²：住友ベークライト社）それぞれに実施例1で調製したP2細胞を2.5×10⁵ cells播種し、5日後（培地交換から2日後）に、細胞を回収すると共に細胞数を数えた（P3の倍加実験）。
- ・同様に、上記実施例1に記載のように、3個の細胞培養フラスコ（#MS-23800 225 cm²：住友ベークライト社）それぞれに実施例1で調製したP3細胞を2.5×10⁵ cells播種し、5日後（培地交換から2日後）に、細胞を回収すると共に細胞数を数えた（P4の倍加実験）。
- ・以下、実施例1及び上記に記載と同じ方法によって継代培養すると共に細胞数を数え、継代細胞（P5細胞～P10細胞）を得ると共に細胞数を

確認し、倍加時間を測定した。

[0088] 結果を表5に示す。表5中の数字は倍加時間（h r）であり、上段の「P 3」はP 2からP 3までの倍加時間を示す（「P 4」はP 3からP 4までの倍加時間：P 5～P 10も同じ）。N o 2～5はいずれも倍加時間は3 5時間以内であり、特にP 3、P 4、及びP 5は2 6時間以内であった。上記非特許文献6の表1によれば、細胞の倍加時間（doubling time）は通常は2 5～5 3時間である。そのため上記N o 2～5の細胞集団は倍加時間が1 9～3 5時間という非常に短時間で細胞が増殖することが確認された。

[0089] [表5]

倍加時間（h）								
	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
No2	23.46	24.63	25.49	25.58	28.30	27.68	29.56	27.82
No3	23.05	24.49	23.77	28.68	24.71	25.31	30.16	29.65
No4	23.08	25.06	24.09	24.54	26.26	27.64	30.38	34.56
No5	19.62	23.52	21.45	25.22	24.47	24.63	31.23	33.68

[0090] [実施例4] 細胞の生存率

細胞移植療法においては、単離された細胞を凍結保存し、それを解凍した細胞が用いられることが想定される。ここで、凍結保存した細胞の生存率を高く維持することが必要である。そこで、口腔内組織から採取した間葉系細胞（4検体）を培養して得られた細胞集団を用いて細胞生存率を調べた。

[0091] ・ 静脈うっ滞に起因する難治性皮膚潰瘍患者（4 0～8 0歳）から約2 0 0 m L採血し、セルエイド（血清採取用、# J B－S B 2 0 0 C S A：ジェイ・エム・エス社）で自己血清を作製した。

・ 静脈うっ滞に起因する難治性皮膚潰瘍患者の唾液腺下部（頬の内側）組織から細胞を採取し、その組織をピンセットとメスで細切し、6－w e l l p l a t e（# M S－8 0 0 6 0 S：住友ベークライト社）に細切した歯肉組織を貼り付けた。

・ 5 0 m Lチューブ1本に自己血清1．3 m L、A I M－V M e d i u m（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）1 3 m L、H F D M－1（+）（細胞科学研究所社）1 3 m L、M e i j i C o l l a g e n a

se Gを130 μ L (#COLGS:Meiji Seika ファルマ社)、Meiji Collagenase Hを52 μ L (#COLHS:Meiji Seika ファルマ社)、を入れて、ピペッティングして培養液を調整した。

・6-well plateの1ウェルにその培養液を2 mLずつ入れて一晩培養した。

・50 mLチューブ1本に自己血清1.5 mL、AIM-V Medium (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) 15 mL、HFD M-1 (+) (細胞科学研究所社) 15 mLを入れて、ピペッティングして培養液を調整した。

・6-well plateのウェルから培養液を除去し、6-well plateの1ウェルにその培養液を2 mLずつ入れて、上記細切した唾液腺下部(頬の内側)組織を培養した。細切した組織から生え出てきた細胞P0を回収し、90 mmシャーレ(#MS-13900S:住友ベークライト社)に細胞を播種して1時間後に培地交換を行い、接着した細胞を培養した。90 mmシャーレ1枚の培地は、AIM-V Medium 4.45 mL、HFD M-1 (+) 4.45 mL、NeoSERA 0.5 mLとした。

・90 mmシャーレで培養した細胞の密度が70~95%に到達したときにP1細胞を回収し、細胞培養フラスコ(#MS-23800S 225 cm²:住友ベークライト社)それぞれにP1細胞を 2.5×10^5 cells播種して培養した。細胞培養フラスコ1個の培養液は、AIM-V Medium 25 mL + HFD M-1 (+) 25 mL + 自己血清 1 mLを用いた。

・細胞培養フラスコから培養液を吸引除去し、細胞培養フラスコ1個にPBS (細胞科学研究所社)を25 mL入れて細胞培養フラスコ内を洗浄後、PBSを吸引除去した。

・細胞培養フラスコ1個にリコンビナントトリプシン/EDTA溶

液である r-T E (細胞科学研究所社) を 7 m L 入れ、細胞培養フラスコをインキュベーター (37℃、5%CO₂) で3分間静置した。

- ・ 50 m L チューブに 40 μ m セルストレイナー (# 352340 : コーニング社) を取り付けた。

- ・ ピペティングで細胞を細胞培養フラスコから剥離し、上記 50 m L チューブに移した。

- ・ 細胞培養フラスコ 1 個に合成トリプシン中和剤溶液である s-T I (細胞科学研究所社) を 7 m L 入れ、10 c m d i s h 内を洗浄し、その洗浄液を上記 50 m L チューブに移した。

- ・ 上記 50 m L チューブを 1200 r p m、2 分、20℃で遠心した。

- ・ 遠心後、上清を吸引除去し H F D M-1 (+) (細胞科学研究所社) 10 m L で細胞を懸濁して P 2 細胞を含む懸濁液を得た。その細胞懸濁液 10 μ L とトリパンブルー 10 μ L を混合後に、混合液 10 μ L を血球計算盤にアプライし、細胞数を数えた。

- ・ P 2 細胞の一部を、S T E M-CELL BANKER (登録商標) G M P g r a d e (製品コード # C B 045 : ゼノアックリソース社) を用いて 1×10^6 c e l l s / m L に調整し、クライオチューブに 1 m L ずつ分注して P 2 細胞を含む細胞保存液とし、使用時まで -80℃で冷凍保管した。

[0092] 所定の時間 -80℃で凍結保存した上記クライオチューブ 1 本 (P 2 細胞を含む細胞保存液) を解凍し、細胞生存率を以下の方法で測定した。

- ・ 15 m L チューブに、A I M-V M e d i u m 8.5 m L、N e o S E R A 0.5 m L、解凍された上記 P 2 細胞を含む保存液を入れ、遠心 (1200 r p m、2 m i n、20℃) した。

- ・ 上清を吸引除去し、A I M-V M e d i u m 2 m L で細胞を浮遊させ、10 μ L で実施例 1 に記載と同じ方法で細胞数をカウントし、P 2 の細胞生存率を測定した。

- ・ 10 c m d i s h 2 枚にそれぞれ細胞を播種した。

10 cm dish : A I M - V Medium 5 mL + H F D M -
1 (+) (細胞科学研究所社) + N e o S E R A 1 mL、細胞懸濁液 1
m L

・培養して4～10日後に、10 cm dishから、r - T E / s -
T Iで細胞を剥離して遠心後に、A I M - V Medium 2 mLで細胞
を浮遊させ、10 μ Lで細胞カウントし、細胞生存率を測定した。

[0093] 結果を表6に示す。表6より、-80℃で434～1457日保存しても
、細胞生存率が71～88.5%と高く維持されていた。

[0094] [表6]

	細胞生存率[%]	細胞培養日数[Day]*	細胞の-80℃での 保存日数[day]**
No1	88.5	22	1457
No2	71	19	1011
No3	84.4	18	526
No4	78.3	29	434

*口腔内組織採取から細胞を保存するまでに培養した日数

**細胞P2をクライオチューブに移して-80℃で保存した日数

[0095] [実施例5] 細胞シートの作製

間葉系細胞 (N o 1 ~ N o 5) を用いて細胞シートを以下の方法で作製し
た。

実施例1で倍加実験の為に、3個の細胞培養フラスコ (# M S - 2 3 8 0
0 2 2 5 c m ² : 住友ベークライト社) それぞれに P 3 細胞を 2 . 5 × 1 0
⁵ c e l l s 播種し、N o 1 は細胞播種して3日後に継代し、N o 2 ~ 5 は細胞
播種して5日後に継代した。この継代時に細胞培養フラスコから細胞を剥
離して細胞数をカウントした後に、継代の為に細胞 P 4 を細胞培養フラスコ
に播種すると同時に、2 4 - w e l l p l a t e の 1 ウェルに間葉系細胞
5 × 1 0 ⁵ c e l l s を播種して72時間培養し、その上清を E L I S A 解
析用に保存した。細胞は上記特許文献3に記載の方法で P 4 細胞から細胞シ
ートを作製し、細胞シートが縮小しないように C e l l S h i f t e r TM に
接着させた後に、10%中性ホルマリンで固定し、切片作製を行った。

[0096] 作製した細胞シートの切片を常法によりヘマトキシリンエオジン (H E)

染色及びMT染色した写真（4倍）を図1に示す。図1のHE染色により、細胞が細胞シート構造になっていることが確認された。また、MT染色により、細胞シートは豊富な細胞外マトリックスを含んでいることが確認された。なお、P3細胞、P5～P10細胞でも同様に細胞シートを作製することができた（図示なし）。

[0097] [実施例6] 口腔内組織から採取した細胞の細胞表面抗原分子の発現

上記実施例2では歯肉から採取した細胞を用いたが、唾液腺下部（頬の内側）組織から採取したP4細胞（4検体）を用いて実施例2と同様に細胞表面抗原分子の解析を行った。用いた細胞及び培養方法は実施例4、細胞表面抗原分子の解析方法及び用いた抗体や試薬は実施例2と同じである。結果を表7に示す。唾液腺下部（頬の内側）組織から採取した間葉系細胞から得られた細胞集団においてもCD90、CD73、CD44、CD13、CD29、又はCD59を発現する細胞を99%含んでおり、CD105については27%～35%、CD166については62%以上、CD49eについては56%以上、CD151については93%以上、CD280については97%以上、CD63については63%以上含んでいることが確認された。一方、CD34、及びCD45を発現する細胞は確認されなかった。

[0098] [表7]

	No1	No2	No3	No4
CD90	99.2	99.7	99.6	99.4
CD73	99.2	99.5	99.5	99.3
CD44	99.1	99.6	99.5	99.3
CD105	35.4	48.1	27.8	31.9
CD166	77.3	62.3	82.7	86.2
CD34	0	0	0	0
CD45	0	0	0	0
CD13	99.2	99.6	99.6	99.3
CD29	99.1	99.6	99.5	99.2
CD59	99.1	99.6	99.5	99.2
CD49e	56.6	92.3	76.8	76.5
CD151	94.9	98.9	97	93.7
CD280	98.6	99.3	97.3	97.4
CD63	63.2	65.8	91.7	96.9

[0099] [実施例7] IFN- γ 処理した、歯肉から採取された間葉系細胞を培養し

た細胞集団の細胞表面抗原解析

以下の手順により、IFN- γ 処理した間葉系細胞を培養した細胞集団の細胞表面抗原解析（HLA class I、HLA class II、CD 106、CD 274）を行った。

- ・実施例1で作製したクライオチューブ1本（P3を含む細胞保存液）を-80℃から取り出して解凍した。

- ・15 mLチューブにAIM-V Medium 3.5 mL、NeoSERA 0.5 mL、解凍した細胞保存液を入れ、遠心（1200 rpm、1 min、20℃）した。

- ・上清を吸引除去し、10 cm dish 2枚に播種し、3日間培養した（37℃、5%CO₂）。10 cm dish 1枚の培地はAIM-V Medium 5 mL+HFDM-1（+） 5 mL、NeoSERA 1 mLを用いた。

- ・細胞をPBSで洗浄後にr-TE/s-TIで剥離して、遠心（1200 rpm、1 min、20℃）、上清を吸引除去し、AIM-V Medium 2 mLに細胞を浮遊し、10 μ Lで細胞カウントした。

- ・それぞれの細胞を10 cm dish 2枚に播種し、一晚培養した。10 cm dish 1枚に細胞は 3×10^5 cells播種した。

10 cm dish 1枚：AIM-V Medium 5.5 mL+HFDM-1（+） 4.5 mL、NeoSERA 1 mL

- ・15 mLチューブ10本に、それぞれ、AIM-V Medium 4.5 mL+HFDM-1（+） 4.5 mL、NeoSERA 1 mL入れた。

- ・上記の5本の15 mLチューブには、0.2 mg/mL（R&D Recombinant Human IFN- γ #285-IF/CF、大塚蒸留水（大塚製薬工場社）で溶解）を5 μ Lずつ入れた（最終濃度：100 ng/mL）。

別の5本の15 mLチューブには、大塚蒸留水（大塚製薬工場社）を5

μLずつ入れた。

・10cm dishから培養液を吸引除去し、上記の調整した培地を入れて、48時間培養し、細胞表面抗原解析を実施した。

[0100] 細胞表面抗原解析は上記実施例2と同じ方法で行った。抗体は上記表3に記載の抗体を用いた。結果を表8、9に示す。なお、CD106とCD274は独立して実施した実験であるため、表を分けて示す。

[0101] 表8より、IFN-γ処理することによって、HLA class IIの発現が増加することが確認された。また、CD106はIFN-γの処理に関係なく発現が確認されなかった。さらに、表9よりIFN-γ処理することによって、HLA class IIの発現が増加することだけでなく、CD274の発現が増加し、陽性率が91～96%になることが確認された。

[0102] [表8]

	No1		No2		No3		No4		No5	
	control	IFN-γ	control	IFN-γ	control	IFN-γ	control	IFN-γ	control	IFN-γ
HLA class I	99.7	99.5	99.3	99.6	99.6	99.6	99.5	99.6	99.3	99.8
HLA class II	0.1	81.3	0.4	46.6	0.3	76.4	0.1	57.2	0.2	76.5
CD106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[0103] [表9]

	No1		No2		No3		No4		No5	
	control	IFN-γ	control	IFN-γ	control	IFN-γ	control	IFN-γ	control	IFN-γ
HLA class I	99.2	99.1	99.1	99.1	99.7	99.6	99.7	99.4	99.6	99.7
HLA class II	0.2	91.7	0.2	56.9	0.2	87.8	0.6	74.3	0.5	72.2
CD274	65.1	95.9	79.1	94.4	62.9	95.8	57.8	96.1	68.7	91.4

[0104] 間葉系幹細胞であるMSCの免疫原性は低い、炎症環境下では、HLA class II (MHC class II) が発現することで、免疫原性を獲得すると報告されている。また、CD274 (PD-L1) を発現している細胞は、周囲の免疫細胞の機能を抑制する作用を有すると報告されている (Yu Yoshinaga et al., Stem Cell Reports,

2022;17:1714-1729.)。そのため、同種細胞による細胞移植療法において、移植された同種細胞が、CD274を発現すると、生体側の免疫細胞からの攻撃を抑制することで、移植された同種細胞の免疫原性が低下すると考えられる。本開示により樹立した細胞集団におけるCD274を発現する細胞の

割合は60%以上であるが、IFN- γ を添加した培地で培養することで、細胞集団におけるCD274を発現する細胞の割合は91%以上となった。この結果は、本開示により樹立した間葉系細胞から培養して得られた細胞集団を同種細胞として移植した場合、生体側の免疫細胞からの攻撃を抑制することで、強烈的な免疫拒絶反応を低減させることが可能であると考えられる。

[0105] [実施例8] VEGFの分泌

細胞シートとして利用するにはVEGFの分泌が重要である。そこで細胞シートからのVEGFの分泌を調べた。歯肉組織から採取した間葉系細胞から作製した細胞シートの上清は、実施例5の細胞シートの作製においてELISA解析用に保存した上清を用いた。唾液腺下部（頬の内側）組織から採取した間葉系細胞から作製した細胞シートの上清は、以下の方法で調製した。

[0106] 実施例4で調製した、唾液腺下部（頬の内側）組織から採取した間葉系細胞から調製したP2細胞保存液を-80℃から取り出して解凍した。実施例1に記載の方法と同様でP2細胞からP3細胞を調製し、24-well plate (1.8 cm²/ウェル、MS-80240：住友ベークライト社) に2.78×10⁵個/cm²播種し（1ウェルの播種数は5.0×10⁵個）、インキュベーター（37℃、5%CO₂）で72時間培養後、その培養液を1.5 mLチューブに移して、3000 rpm、5分、4℃で遠心し、その上清をELISA解析用として、-80℃に保存した。

[0107] ELISA解析は、測定当日に、上記それぞれのELISA解析用の上清を入れた1.5 mLチューブを氷上で解凍後、その上清中のVEGF濃度をHuman VEGF Quantikine ELISA Kit (R&D systems社 #DVE00) を用いて測定した。吸光度の測定と濃度計算には、iMark Microplate Reader (BIO-RAD社製) とMPM6. exe (BIO-RAD社) を用いた。

[0108] (結果)

唾液腺下部（頬の内側）組織から採取した間葉系細胞と歯肉組織から採取

した間葉系細胞を培養して細胞シートを作製した際の培地中のVEGF濃度を図2に示す。図2より、いずれも細胞シートとして十分なVEGFの分泌がみられるが、歯肉組織から採取した間葉系細胞で作製した細胞シートは、唾液腺下部（頬の内側）組織から採取した間葉系細胞で作製した細胞シートと比較してVEGFを少なくとも2倍以上分泌していることが確認された。

[0109] [実施例9] SSEA-3の発現の有無について

SSEA-3は多能性幹細胞の代表的なマーカーとして知られている細胞表面抗原分子である。歯肉由来間葉系細胞がSSEA-3を発現しているかを調べた。

[0110] 実施例1に記載の方法で5人のドナーNo1～5の歯肉由来間葉系細胞から調製したクライオチューブ1本（P3細胞を含む細胞保存液）を用いて、実施例2と同様の方法でSSEA-3の発現を調べた。抗体は、抗SSEA-3抗体（#330311: PE anti-human/mouse SSEA-3 Antibody、BioLegends社）及びコントロール（#400807: PE Rat IgM, κ Isotype Ctrl Antibody、BioLegends社）を用いた。結果を図3に示す。

[0111] 図3より、ピークの右側へのシフトがなく、陽性率の数値が変化していなかった。したがって、歯肉由来間葉系細胞はSSEA-3を発現していないことが確認された。

請求の範囲

- [請求項1] CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも1種の細胞表面抗原分子を発現する間葉系細胞を80%以上含む、生体から分離された細胞集団。
- [請求項2] 間葉系細胞が、口腔内組織から採取された細胞又はその培養物であることを特徴とする、請求項1に記載の細胞集団。
- [請求項3] 間葉系細胞が、CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも3種以上の細胞表面抗原分子を発現することを特徴とする、請求項1又は2に記載の細胞集団。
- [請求項4] CD274を発現する間葉系細胞を60%以上含む、請求項1又は2に記載の細胞集団。
- [請求項5] SSEA-3を発現する間葉系細胞を5%以下含む、請求項1又は2に記載の細胞集団。
- [請求項6] 請求項1又は2に記載の細胞集団を含む三次元細胞培養体。
- [請求項7] 請求項1又は2に記載の細胞集団を含む医薬組成物。
- [請求項8] さらに薬学的に許容される添加剤を含む請求項7に記載の医薬組成物。
- [請求項9] 三次元細胞培養体の形態である、請求項7又は8に記載の医薬組成物。
- [請求項10] 細胞シートの形態である、請求項7又は8に記載の医薬組成物。
- [請求項11] 請求項1又は2に記載の細胞集団から得られたエクソソーム。
- [請求項12] (a) 生体組織から間葉系細胞を採取する工程；(b) 採取した間葉系細胞を培養する工程；
を順次含む、請求項1又は2に記載の細胞集団を作製する方法。
- [請求項13] さらに工程(b)の後に、(c) CD13、CD59、CD49e、CD151及びCD280からなる群から選択される少なくとも1種の細胞表面抗原分子を認識する抗体を用いて、その細胞表面抗原分子

の発現を確認する工程；

を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

[請求項14] 工程（b）において、炎症性サイトカインを含む培地で培養することを特徴とする、請求項 1 2 又は 1 3 に記載の方法。

[請求項15] さらに工程（b）の後に、（d）培養した細胞を凍結保存する工程；
を含む、請求項 1 2 又は 1 3 に記載の方法。