

明 細 書

発明の名称：

リンパ管新生促進因子発現線維芽細胞及びそれを含む医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、リンパ管新生促進因子発現線維芽細胞、特に特定の遺伝子やタンパク質（*adrenomedullin*（以下、ADMとも言う）及び／又は*Hematopoietically-expressed homeobox protein*（以下、HHEXとも言う））を発現したリンパ管新生促進因子発現線維芽細胞、及びそれを含む医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] リンパ管は、血管系と並列に走行し、全身に分布している導管ネットワークである。線維症の治療・改善（非特許文献1）、生体の組織液の恒常性維持（非特許文献2）、脂質及びビタミンの輸送（非特許文献3）、免疫監視の調節において重要な役割を果たしている（非特許文献4）。心臓においても、リンパ管は正常な心拍出量の維持のために、体液のバランス維持を行っている。

近年、リンパ管の形成促進効果（以下、リンパ管新生と呼ぶ）は心筋虚血及び心筋梗塞後の心拍出量回復のための治療標的として有用であることが報告されており、また、浮腫を軽減させるための治療ターゲットとしても注目されている（非特許文献1）。

[0003] ADMは心血管系及びリンパ系の発達において重要な機能を担う心臓保護ペプチドである。ADMはリンパ管内皮細胞のバリアを安定化し、リンパ管新生を促進することが報告されている（非特許文献5）。臨床においても、急性心筋梗塞患者へADMを静脈内投与することによって有意な心血管系の改善をもたらすことが報告されている（非特許文献6）。

[0004] HHEXは、*VEGFA*、*VEGFR1*及び*VEGFR2*の直接的な転写調節因子として知られている他、*VEGFC*／*FLT4*／*PROX1*シグナ

ルを介してリンパ管新生を調節することが報告されている（非特許文献7）。

[0005] また、間質性肺炎は、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）などのウイルス感染、加齢、喫煙などの危険因子や、膠原病やサルコイドーシスといった疾患などによって、肺胞の炎症反応が暴走状態（サイトカインストーム）となり、肺胞内で線維化が進行することで、肺のガス交換機能が損なわれる病態を指す（非特許文献8）。間質性肺炎のなかでも、発症要因を特定し得ない症状は特発性間質性肺炎（IIPs）と呼ばれ、本疾患は本邦における「難病（特定疾患）」に指定されている。IIPs患者の80～90%が該当する特発性肺線維症（IPF）は特に現行治療に対して抵抗性を示し、診断後の平均生存期間が3～5年で、急性増悪後の平均生存期間は2か月以内と、多くのがんより予後不良な疾患として知られている。こうした背景から、IPFを含む間質性肺炎及び肺線維症の治療方法の開発が進められており、いくつかの医薬品が臨床応用されている。例えば、Pirfenidoneは強制換気量（FVC）と6分間歩行距離の減少を遅らせ、特定の患者において死亡率を改善する可能性があることが示された。Nintedanibもまた、FVCの減少を遅らせ、死亡率を低下させる傾向があることが示された。しかしながら、これらの治療方法では呼吸器症状の改善が認められず、急性増悪率も顕著な改善には至っていない。従って、肺機能は引き続き悪化の一途を辿ることが明らかとなっている。

これらの問題点を克服するために、結合組織成長因子、インターロイキン（IL）-4及びIL-13抗体、ガレクチン-3阻害剤、リゾホスファチジン酸受容体拮抗剤、ホスホイノシトイド3キナーゼ経路阻害剤、間葉系幹細胞（MSC）を始めとする数十種類の新規治療薬が開発されており、そのいくつかは臨床試験が進行しているが、肺線維症の急性増悪に対しては、現時点では有効な治療法が存在しない。

[0006] 近年、肺線維症は喘息や慢性閉塞性肺疾患（COPD）と同様に、慢性的かつ反復的な炎症反応の賦活化が病態生理学的な発症要因として報告されて

いる。健常肺においては、炎症性サイトカインがウイルス感染や傷害に対して肺の炎症反応の制御を担うことで組織の修復や恒常性維持に寄与しているが、肺線維症では炎症性サイトカインが過剰に産生され、炎症反応が暴走状態（サイトカインストーム）となることで、筋線維芽細胞病巣の形成が誘発され、その結果、細胞外マトリックス（ECM）の過剰な沈着が生じ、線維化を誘導することが示されている（非特許文献9）。このような過剰な炎症反応による線維化の誘導には、リンパ管の構造的・機能的変化が関わっていることが示唆されている（非特許文献10）。

[0007] 肺において、リンパ管は不連続な基底膜を持つ単一のリンパ内皮細胞（LEC）壁で構成されており、末梢組織からリンパ節への抗原や抗原提示細胞の輸送管路や間質液のクリアランスとして機能している。線維症においてはリンパ管の障害が生じており、例えば放射線誘導性IPF動物モデルでは、リンパ管密度の著しい減少が線維化の誘導に相関していることが報告されており（非特許文献11）、ブレオマイシン誘導性IPF動物モデルでは、血小板由来増殖因子受容体（PDGFR）- β 陽性壁細胞が肺の損傷および修復における重要な分子であるヒアルロنانの排出を阻害することで肺のリンパ管障害を誘導していることが報告されている（非特許文献12）。一方で、ヒトのIPFは肺組織内のリンパ管密度が増加しているが、形成されたリンパ管は構造的・機能的な欠陥を有しており、PDGFR陽性壁細胞の局在や断続的に破壊されたリンパ管の形成が観察される（非特許文献13）。また、創傷治癒において線維症誘発性の線維芽細胞によるトランスフォーミング増殖因子（TGF）- β 1の過剰発現が、リンパ管内皮細胞の増殖と機能を阻害し、リンパ管を選択的に破壊することも報告されている（非特許文献14）。

[0008] 本発明者らは、これまでに、心臓のリンパ管新生を効率的に誘導し、心不全の心収縮力を大きく改善することができる心臓由来のVascular cell adhesion molecule-1（VCAM-1、CD106）陽性線維芽細胞を見出しており（非特許文献15）、成体心臓由来

のVCAM-1陽性線維芽細胞を作製する手法も見出している（特許文献1）。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第2020/045547号

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Circulation. 2016;133: 1484-1497

非特許文献2：Bull N Y Acad Med., 1938; 14: 231-251

非特許文献3：Am J Physiol Endocrinol Metab., 2009; 296: E1183-E1194

非特許文献4：Front Immunol., 2016; 7: 613

非特許文献5：Peptides, 2008; 29: 2243-2249

非特許文献6：J Cardiovasc Pharmacol., 2010; 56: 413-419

非特許文献7：Nat Commun., 2018; 9; Article number 2704

非特許文献8：Ann Intern Med., 2020;172(9):629-632

非特許文献9：Semin Respir Crit Care Med., 2006;27:600-612

非特許文献10：Lymphat Res Biol., 2009;7:197-203

非特許文献11：Lymphat Res Biol., 2014;12:238-250

非特許文献12：Blood, 2012;119:5931-5942

非特許文献13：Lymphat Res Biol., 2010;8:199-207

非特許文献14：Am J Physiol - Heart Circ Physiol., 2008;295:2113-2127

非特許文献15：PLoS One., 2020;15:e0237810

非特許文献16：Pulm Pharmacol Ther., 2012 Aug;25:281-285

非特許文献17：Stem Cells Transl Med. 2017;6(10):1905-1916

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、リンパ管新生能を有する線維芽細胞及びそれを含む医薬組成物を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0012] 本発明者らは上記課題を解決すべく検討を進め、 $\text{TNF-}\alpha$ 及び IL-4 と接触させた線維芽細胞が、ADM及び／又はHHEXの遺伝子発現レベルを有意に向上させることを見出し、本発明を完成させた。
- [0013] すなわち、本発明は以下の第1の側面（発明A）を含む。
- （A1）ADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞を含む医薬組成物。
 - （A2）前記線維芽細胞が成体由来の線維芽細胞である、（A1）に記載の医薬組成物。
 - （A3）前記細胞のADM及び／又はHHEXの遺伝子発現量が、対照となる線維芽細胞と比較して、1.20倍以上高いものである、（A1）又は（A2）に記載の医薬組成物。
 - （A4）線維症を治療するための、（A1）～（A3）のいずれかに記載の医薬組成物。
 - （A5）リンパ管新生能が低下している状態を改善するための、（A1）～（A4）のいずれかに記載の医薬組成物。
 - （A6）組織液の恒常性の障害を改善するための、（A1）～（A5）のいずれかに記載の医薬組成物。
 - （A7）浮腫を軽減するための、（A1）～（A6）のいずれかに記載の医薬組成物。
 - （A8）脂質及び／又はビタミンの輸送能の障害を改善するための、（A1）～（A7）のいずれかに記載の医薬組成物。
 - （A9）免疫監視機構を活性化するための、（A1）～（A8）のいずれかに記載の医薬組成物。
 - （A10）注射用組成物である、（A1）～（A9）のいずれかに記載の医薬組成物。
 - （A11）前記細胞が、平面状又は立体状の細胞組織として構築されたものである、（A1）～（A9）のいずれかに記載の医薬組成物。
 - （A12）前記線維芽細胞が心臓由来の線維芽細胞である、（A1）～（A

11) のいずれかに記載の医薬組成物。

[0014] また、本発明は以下の第2の側面（発明B）を含む。

（B1）対象において、線維症を治療する方法であって、ADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞を含む医薬組成物を、該対象に投与又は移植することを含む、方法。

（B2）対象において、リンパ管新生能が低下している状態を改善する方法であって、ADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞を含む医薬組成物を、該対象に投与又は移植することを含む、方法。

（B3）対象において、組織液の恒常性の障害を改善する方法であって、ADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞を含む医薬組成物を、該対象に投与又は移植することを含む、方法。

（B4）対象において、浮腫を軽減する方法であって、ADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞を含む医薬組成物を、該対象に投与又は移植することを含む、方法。

（B5）対象において、脂質及び／又はビタミンの輸送能の障害を改善する方法であって、ADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞を含む医薬組成物を、該対象に投与又は移植することを含む、方法。

（B6）対象において、免疫監視機構を活性化する方法であって、ADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞を含む医薬組成物を、該対象に投与又は移植することを含む、方法。

（B7）対象において、臓器不全を治療する方法であって、ADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞を含む医薬組成物を、該対象に投与又は移植することを含む、方法。

[0015] また、本発明は以下の第3の側面（発明C）を含む。

（C1）ADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞を含む医薬組成物の、不全臓器組織及び／若しくはその周辺領域、又は線維化組織及び／若しくはその周辺領域に投与するための注射剤としての使用。

（C2）ADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞を含む医薬組成物の

、不全臓器組織及び／若しくはその周辺領域、又は線維化組織及び／若しくはその周辺領域に移植するための移植材料としての使用。

[0016] 本発明は以下の第４の側面（発明Ｄ）を含む。

（Ｄ１）ＡＤＭ高発現の線維芽細胞の製造方法であって、
線維芽細胞に、 $TNF-\alpha$ 及び $IL-4$ を接触させること、並びに
前記接触させた線維芽細胞を、ＡＤＭが高発現になり得る条件下で培養すること、

を含む、ＡＤＭ高発現の線維芽細胞の製造方法。

（Ｄ２）前記線維芽細胞が、 $VEGF-C$ 高発現である、（Ｄ１）に記載の方法。

（Ｄ３）前記線維芽細胞が、 $CD106$ 陽性である、（Ｄ１）又は（Ｄ２）に記載の方法。

（Ｄ４）抗 $CD106$ 抗体を用いて、ＡＤＭ高発現の線維芽細胞を選択又は濃縮することを含む、（Ｄ３）に記載の方法。

（Ｄ５）前記線維芽細胞が肺由来の線維芽細胞である、（Ｄ１）～（Ｄ４）のいずれかに記載の方法。

（Ｄ６）（Ｄ１）～（Ｄ５）のいずれかに記載する製造方法によって得られる、ＡＤＭ高発現の線維芽細胞。

（Ｄ７）（Ｄ６）に記載する細胞を含む、線維芽細胞集団。

[0017] 本発明は以下の第５の側面（発明Ｅ）を含む。

（Ｅ１）ＡＤＭ高発現の線維芽細胞。

（Ｅ２） $VEGF-C$ 高発現である、（Ｅ１）に記載の線維芽細胞。

（Ｅ３） $CD106$ 陽性である、（Ｅ１）又は（Ｅ２）に記載の線維芽細胞。

（Ｅ４）前記細胞の $VEGF-C$ 及び／又はＡＤＭの遺伝子発現量が、対照となる線維芽細胞と比較して、それぞれ１．２０倍以上高いものである、（Ｅ１）～（Ｅ３）のいずれかに記載の細胞。

（Ｅ５）前記線維芽細胞が肺由来の線維芽細胞である、（Ｅ１）～（Ｅ４）

のいずれかに記載の細胞。

(E 6) (E 1) ~ (E 5) のいずれかに記載の細胞を含む、線維芽細胞集団。

(E 7) C D 1 0 6 陽性である肺由来線維芽細胞を含む細胞集団であって、前記C D 1 0 6 陽性である肺由来線維芽細胞の割合（細胞数基準）が、前記細胞集団中に含まれる全線維芽細胞に対して18.01%超である、細胞集団。

[0018] 本発明は以下の第6の側面（発明F）を含む。

(F 1) (D 6) 及び (E 1) ~ (E 5) のいずれかに記載の細胞又は (D 7) 及び (E 6) ~ (E 7) のいずれかに記載の細胞集団を含む、医薬組成物。

(F 2) 肺疾患を治療するための、(F 1) に記載の医薬組成物。

(F 3) 前記肺疾患が、肺線維症又は間質性肺炎である、(F 2) に記載の医薬組成物。

(F 4) リンパ管新生能が低下している状態を改善するための、(F 1) に記載の医薬組成物。

(F 5) 注射用組成物である、(F 1) ~ (F 4) のいずれかに記載の医薬組成物。

(F 6) 前記細胞または前記細胞集団が、平面又は立体の形状の細胞組織として構築されたものである、(F 1) ~ (F 4) のいずれかに記載の医薬組成物。

[0019] 本発明は以下の第7の側面（発明G）を含む。

(G 1) 対象において、肺疾患を治療する方法であって、(D 6) 及び (E 1) ~ (E 5) のいずれかに記載の細胞、(D 7) 及び (E 6) ~ (E 7) のいずれかに記載の細胞集団又は (F 1) に記載の医薬組成物を、該対象に投与又は移植することを含む、方法。

(G 2) 前記肺疾患が、肺線維症又は間質性肺炎である、(G 1) に記載の方法。

(G3) 対象において、リンパ管新生能が低下している状態を改善する方法であって、(D6) 及び (E1) ~ (E5) のいずれかに記載の細胞、(D7) 及び (E6) ~ (E7) のいずれかに記載の細胞集団又は (F1) に記載の医薬組成物を、該対象に投与又は移植することを含む、方法。

[0020] 本発明は以下の第8の側面(発明H)を含む。

(H1) (D6) 及び (E1) ~ (E5) のいずれかに記載の細胞、(D7) 及び (E6) ~ (E7) のいずれかに記載の細胞集団又は (F1) に記載の医薬組成物の、肺組織及び／又はその周辺領域に投与するための注射剤としての使用。

(H2) (D6) 及び (E1) ~ (E5) のいずれかに記載の細胞、(D7) 及び (E6) ~ (E7) のいずれかに記載の細胞集団又は (F1) に記載の医薬組成物の、肺組織及び／又はその周辺領域に移植するための移植材料としての使用。

発明の効果

[0021] 本発明により、リンパ管新生能を有する線維芽細胞を含む医薬組成物、すなわちADM及び／又はHHEX高発現細胞を含む医薬組成物を提供することができ、また該医薬組成物を用いた線維症を治療する手段やリンパ管新生能低下状態を改善する手段、組織液の恒常性や脂質及び／又はビタミンの輸送や免疫監視の調節や臓器不全を治療する手段を提供することができた。また、ADM高発現の線維芽細胞を提供すること、及び該細胞を用いた肺疾患を治療する手段を提供することができた。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]各培養条件における成体由来心臓線維芽細胞の特徴を表す図である。Aは、培養した心臓線維芽細胞の顕微鏡写真である(スケールバー: 500 μ m)。無処置(NT)はサイトカインを添加していない無処置の心臓線維芽細胞を表し、+CKsはTNF- α とIL-4を添加した心臓線維芽細胞を表す。Bはフローサイトメトリの解析図である。散布図は横軸がCD90発現量を示し、縦軸がCD106発現量を示す。ヒストグラムはそれぞれCD

90発現量及びCD106発現量を示す。

[図2]各培養条件における成体由来心臓線維芽細胞のリンパ管新生遺伝子の発現量を表す図である。Aは、ADMのmRNA発現量を示すリアルタイム定量RT-PCR (RT-qPCR) の解析結果である。すべての群における線維芽細胞のADM遺伝子発現量は、 β -Actinの遺伝子発現量で標準化し、各条件の遺伝子発現量の差をFold increaseで表した。NTは無処置の心臓線維芽細胞を表し、+CKsはTNF- α とIL-4を添加した心臓線維芽細胞を表す。Bは、HHEXのmRNA発現量を示すRT-qPCRの解析結果である。ADMと同様に、すべての群のHHEX遺伝子発現量は、 β -Actinで標準化し、Fold increaseで表した (**P<0.01 vs. NT)。

[図3]ヒト成体由来心臓線維芽細胞のリンパ管新生効果を表す図である。Aは、蛍光顕微鏡観察による各種ヒト心臓線維芽細胞の心臓リンパ管の脈管形成効果を示す写真である。キャピラリー様構造はVascular endothelial (VE)-Cadherin陽性細胞を示し、心臓由来細胞から回収したリンパ管内皮細胞により形成された脈管を指す。その他の細胞領域はVimentinで各種の心臓線維芽細胞を示す。核はHoechst 33258で示した (10×倍率)。NTは無処置の心臓線維芽細胞を表し、+CKsはTNF- α とIL-4を添加した心臓線維芽細胞を表す。Bは、蛍光顕微鏡観察画像の定量評価を表す。NTの値を1とし、Fold increaseで表した (**P<0.01 vs. NT、*P<0.05 vs. NT、N=12)。

[図4]各種の線維芽細胞のフローサイトメトリ解析図を表す図である。上段は、ヒト成体由来心臓線維芽細胞 (A-HCF)、成体由来心臓線維芽細胞にTNF- α 及びIL-4を添加し、72時間培養した成体由来心臓線維芽細胞 (uA-HCF) 及び成体由来心臓線維芽細胞にTNF- α とIL-4を添加し、72時間培養した後に、CD90を指標にセルソーティングしたCD90陽性成体由来心臓線維芽細胞 (uA90-HCF) におけるCD90

発現量及びCD106発現量を示す。下段は、ヒト胎児由来心臓線維芽細胞（F-HCF）、CD106陰性胎児由来心臓線維芽細胞（F-VNCF）及びCD106陽性胎児由来心臓線維芽細胞（F-VCF）におけるCD90発現量及びCD106発現量を示す。

[図5]ヒト成体由来心臓線維芽細胞による線維症治療効果を表す図である。Aは、各種成体由来心臓線維芽細胞（+A-HCFs、+uA-HCFs、+uA90-HCFs）を投与した慢性心不全ラット心臓組織のシリウスレッド（SR）染色画像を表す顕微鏡写真である。Bは、各種成体由来心臓線維芽細胞を投与した慢性心不全ラット心臓組織の線維化領域の定量評価を示す図である（N=4）。Cは、胎児由来心臓線維芽細胞（+F-VCF）を投与した慢性心不全ラット心臓組織のシリウスレッド染色画像を表す顕微鏡写真である。Dは、胎児由来心臓線維芽細胞（+F-VCF）を投与した慢性心不全ラット心臓組織の線維化領域の定量評価を示す図である（NS=not significant、N=4、** $P<0.01$ vs. Control、* $P<0.05$ vs. Control、†† $P<0.01$ vs. Sham、† $P<0.05$ vs. Sham、‡ $P<0.05$ vs. +A-HCFs）。

[図6]ヒト成体由来心臓線維芽細胞による線維症治療効果を表す図である。Aは、各種成体由来心臓線維芽細胞（+A-HCFs、+uA-HCFs、+uA90-HCFs）を投与した慢性心不全ラット心臓組織のヘマトキシリン・エオジン（HE）染色画像を表す顕微鏡写真である。Bは、Aに記載されるa~lの部分拡大した顕微鏡写真である。Cは、病理学的定性スコアリングを示す表である。病理変化の程度は、変化なし（スコア0）、軽度（スコア1）、中等度（スコア2）、重度（スコア3）として定性的に評価した。スコアリング項目は、炎症細胞の凝集（Inflammatory cell aggregation）、線維芽細胞の増殖（Proliferation of fibroblasts）、線維症（Fibrosis）、石灰化（Lime deposition）、及び左室壁の菲薄化（T

hinning of the left ventricular) である。

[図7] ヒト成体由来心臓線維芽細胞による心筋内のリンパ管新生効果を示す。成体由来心臓線維芽細胞 (+A-HCFs、+uA-HCFs、+uA90-HCFs) を投与した慢性心不全ラット心臓組織の Lyve-1 染色画像を表す顕微鏡写真である (in situ hybridization)。右列の各パネルは、それぞれ左列の各パネル中の四角枠内を拡大したものである。

[図8] ラット心臓のリンパ管内皮細胞の局在を示す図である。成体由来心臓線維芽細胞 (+A-HCFs、+uA-HCFs、+uA90-HCFs) を投与した慢性心不全モデルラット心臓組織の免疫組織染色画像を表す顕微鏡写真である。+uA90-HCFs は、低倍率及び高倍率の写真を示す。心筋構造を cTnT で示し、中央の管腔構造を Prox-1 または VEGFR3 で示し、核を DAPI で示した。

[図9] ヒト成体由来肺線維芽細胞の形態とリンパ管新生能を示す図である。A は、ヒト肺線維芽細胞の明視野観察像を示す顕微鏡写真である (5×倍率)。B は、ヒト肺線維芽細胞 (Control) と、TNF- α (50 ng/mL) と IL-4 (2 ng/mL) を添加して 24 時間培養したヒト肺線維芽細胞 (+Factor-X) の明視野観察像を示す顕微鏡写真である (5×倍率)。C 及び D は、フローサイトメトリ (FCM) 解析による各種ヒト肺線維芽細胞の CD90 (線維芽細胞マーカー) 及び CD106 (VCAM-1) 陽性細胞率を示す (N=3、**P<0.01、スチューデントの t 検定による、N.S. は有意差なしを表す)。E は、RT-qPCR 解析による各種ヒト肺線維芽細胞の vascular endothelial growth factor (VEGF)-C 及び Adrenomedullin (ADM) 遺伝子発現量の相対比較図を示す。Control の遺伝子発現量を 1 として表した (N=3、**P<0.01、*P<0.05、スチューデントの t 検定による)。

[図10]ヒト肺由来細胞から回収したリンパ管内皮細胞の形態とヒト成体由来肺線維芽細胞のリンパ管新生効果を示す図である。Aは、ヒト微小血管内皮細胞の明視野観察像を示す顕微鏡写真である（5×倍率）。Bは、FCM解析によるヒト微小血管内皮細胞のVascular endothelial (VE)-Cadherin及びPodoplanin (PDPN) 陽性細胞率を示す（各グラフ中、左側のピークはアイソタイプコントロール染色サンプルを示し、右側のピークは各種抗体染色サンプルを示す）。Cは、蛍光顕微鏡観察による各種ヒト肺線維芽細胞の肺リンパ管の脈管形成効果を示す写真である。キャピラリー様構造はVE-Cadherin陽性細胞を示し、肺由来細胞から回収したリンパ管内皮細胞により形成された脈管を指す。その他の細胞領域はVimentinで各種肺線維芽細胞を示す。核はHoechst 33258で示した（10×倍率）。

[図11]マウス成体由来肺線維芽細胞の形態とリンパ管新生能を示す図である。Aは、マウス肺線維芽細胞の明視野観察像を示す顕微鏡写真である（5×倍率）。Bは、FCM解析によるマウス肺線維芽細胞のVCAM-1 陽性細胞率を示す（各グラフ中、左側のピークはアイソタイプコントロール染色サンプルを示し、右側のピークは各種抗体染色サンプルを示す）。Cは、RT-qPCR解析による各種マウス肺線維芽細胞のVEGF-C及びADM遺伝子発現量の相対比較を示す。Controlの遺伝子発現量を1として表した（N=3、**P<0.01、*P<0.05、スチューデントのt検定による）。

[図12]ADM高発現且つVCAM-1 発現向上型成体由来肺線維芽細胞（VPPF）による間質性肺炎・肺線維症の治療効果を示す図である。Aは、動物実験デザインを示す。ブレオマイシン溶液投与7日後の病態モデルマウスに細胞を投与し、その4週間後にマウスを犠牲死して肺を採材した。Bは、各群のKaplan-meier法による生存分析図を示す。ドットは打ち切り点を指す。Cは、各群のシリウスレッド染色画像を表す顕微鏡写真である。

[図13]投与2週後における各種線維芽細胞の治療効果を示す図である。Aは、生存分析図を示す。PF投与群(+mPF)は $n=7$ 、mVPF投与群(+mVPF)は $n=5$ 、生理食塩液投与群(Ctrl)は $n=11$ で実施した。P値はログランク(マンテル・コックス)検定で算出した。Bは、各群の肺の線維化領域と肺胞構造を示す顕微鏡写真である。細胞投与14日後に採材した肺組織をMasson's Trichrome染色した。BLMは細胞投与0日の肺組織を示し、Ctrlは生理食塩液投与群の肺組織を示す(スケールバー: $500\mu\text{m}$)。Cは、各群の肺の線維化領域の定量評価(BLM: $n=5$ 、Ctrl: $n=6$ 、+mPF: $n=4$ 、+mVPF: $n=5$ 、 $*P<0.05$ 、 $***P=0.0006$ 、nsは有意差なしを表す、ordinary one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test)。

[図14]プライマリーにより回収したrPFとrVPFの細胞特性を示す図である。Aは、各継代数のrPFの様子を示す顕微鏡写真である。PNはPassage number(継代数)を指す。Bは、rPFとrVPFの明視野観察画像を示す写真である。Cは、フローサイトメトリ解析図を示す。

[図15]投与2週後における各種線維芽細胞の治療効果を示す図である。Aは、各群の肺の線維化領域と肺胞構造を示す顕微鏡写真である。細胞投与0日又は14日後に採材した肺組織をMasson's Trichrome染色した。BLMは細胞投与0日の肺組織を示し、Ctrlは生理食塩液投与群の肺組織を示す。Bは、各群の肺の線維化領域の定量評価を示すグラフである(BLM: $n=5$ 、Ctrl: $n=6$ 、+rPF: $n=7$ 、+rVPF: $n=8$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P=0.0001$ 、 $****P<0.0001$ 、nsは有意差なしを表す、ordinary one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons testにより計算)。

[図16]フローサイトメトリ(FCM)解析による各種ヒト肺線維芽細胞のCD90(線維芽細胞マーカー)及びCD106(VCAM-1)陽性細胞率

を示す (N=5、****P<0.0001、nsは有意差なしを表す、2-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons testにより計算)。hPFはヒト肺線維芽細胞を指し、hPF+CKsはTNF- α (50 ng/mL) とIL-4 (2 ng/mL) を添加して72時間培養したヒト肺線維芽細胞を指す。hVPFはCD106を指標にセルソーティングを行ったhPF+CKsを指す。

発明を実施するための形態

[0023] 以下、本発明について具体的実施形態を用いて詳細に説明するが、本発明は示された具体的実施形態にのみ限定されるものではない。

[0024] <ADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞を含む医薬組成物>

第1の発明の一実施形態は、ADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞を含む医薬組成物である。

[0025] 線維芽細胞の由来に制限はなく、胚性幹細胞 (ES細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS細胞) 及びMuse細胞等の多能性幹細胞や、間葉系幹細胞などの成体幹細胞を分化させて用いてもよい。また、動物 (ヒトを含む) から採取したプライマリー細胞を用いてもよく、株化した細胞を用いてもよい。

線維芽細胞の由来臓器は、例えば、心臓由来、腎臓由来、皮膚由来、肺由来などが挙げられる。

線維芽細胞は、特に限定されないが、成体由来であることが好ましい。

ADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞の由来となる線維芽細胞は、ADM及び／又はHHEXはもともと一定量発現していてもよく、全く発現していなくてもよい。

また、本実施形態において線維芽細胞とは、通常の線維芽細胞が発現している細胞表面マーカーを発現している細胞のことであってもよく、さらに後述の本発明の細胞の製造方法によって、追加で他のマーカーが発現した又は一部のマーカーが発現していない細胞であってもよい。

[0026] ADMが高発現であるとは、特に限定されないが、例えば、mRNA発現量をRT-qPCRで測定した時に、対照となる線維芽細胞のmRNA発現

量を1とした場合、本実施形態の医薬組成物中の線維芽細胞におけるADMのmRNA発現量が、1.20倍以上、1.40倍以上、1.50倍以上、1.60倍以上、1.70倍以上、1.80倍以上、1.90倍以上、2.00倍以上、2.30倍以上、3.00倍以上、4.00倍以上、5.00倍以上、6.00倍以上、7.00倍以上、8.00倍以上、9.00倍以上、10.0倍以上、又はそれ以上の倍数増加していることが好ましい。

なお、対照となる線維芽細胞のmRNA発現量とは、未処置の線維芽細胞におけるmRNA発現量であってもよく、また処置後の細胞全体の平均mRNA発現量であってもよい。

またタンパク質発現量をフローサイトメトリ法によって測定した時に、ADMポジティブ（以下、ADM+とも言う）線維芽細胞の割合が細胞数基準でそれぞれ0.1%以上であってよく、1%以上であってよく、2%以上であってよく、4%以上であってよく、5%以上であってよく、10%以上であってよく、20%以上であってよく、30%以上であってよく、40%以上であってよく、50%以上であってよく、60%以上であってよく、70%以上であってよく、80%以上であってよく、90%以上であってよく、95%以上であってよく、98%以上であってよく、99%以上であってよい。

[0027] HHEXが高発現であるとは、特に限定されないが、例えば、mRNA発現量をRT-qPCRで測定した時に、対照となる線維芽細胞のmRNA発現量を1とした場合、本実施形態の医薬組成物中の線維芽細胞におけるHHEXのmRNA発現量が、1.20倍以上、1.40倍以上、1.50倍以上、1.60倍以上、1.70倍以上、1.80倍以上、1.90倍以上、2.00倍以上、2.58倍以上、3.00倍以上、4.00倍以上、5.00倍以上、6.00倍以上、7.00倍以上、8.00倍以上、9.00倍以上、10.0倍以上、又はそれ以上の倍数増加していることが好ましい。

なお、対照となる線維芽細胞のmRNA発現量とは、未処置の線維芽細胞

におけるmRNA発現量であってもよく、また処置後の細胞全体の平均mRNA発現量であってもよい。

またタンパク質発現量をフローサイトメトリ法によって測定した時に、HHEXポジティブ（以下、HHEX+とも言う）線維芽細胞の割合が細胞数基準でそれぞれ0.03%以上であってよく、0.1%以上であってよく、1%以上であってよく、2%以上であってよく、4%以上であってよく、5%以上であってよく、10%以上であってよく、20%以上であってよく、30%以上であってよく、40%以上であってよく、50%以上であってよく、60%以上であってよく、70%以上であってよく、80%以上であってよく、90%以上であってよく、95%以上であってよく、98%以上であってよく、99%以上であってよい。

[0028] 本実施形態において、リンパ管新生促進因子とは、好ましくはADM又はHHEXの遺伝子又タンパク質のことである。

リンパ管新生促進因子の有する塩基配列やアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、ADMは、配列番号1で表される塩基配列を有する遺伝子、又はその塩基配列と90%以上、95%以上若しくは98%以上同一の塩基配列を有する遺伝子であって、配列番号1で表される塩基配列の全体又は一部に対する相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、リンパ管新生能を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよく、HHEXは、配列番号2で表される塩基配列を有する遺伝子、又はその塩基配列と90%以上、95%以上若しくは98%以上同一の塩基配列を有する遺伝子であって、配列番号2で表される塩基配列の全体又は一部に対する相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、リンパ管新生能を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。

[0029] 本実施形態の医薬組成物中の線維芽細胞は、細胞表面マーカーとしてCD106を発現していてもよい。

[0030] 本実施形態の医薬組成物中の線維芽細胞は、上述のADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞を含む、線維芽細胞集団であってもよい。

本実施形態において、後述のADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞の製造方法によって製造された線維芽細胞を含む線維芽細胞集団のうちCD106陽性細胞の割合は高くてもよいが、その逆は必ずしも成り立たなくてもよい。

[0031] (線維芽細胞の準備)

線維芽細胞の準備において、線維芽細胞の由来は特に限定はされず、既に述べたとおりである。一方で、自己由来の細胞であってよく、例えば心臓疾患を患っている患者の心臓組織から単離した心臓線維芽細胞や、患者の成体(体性)幹細胞を分化させて単離した腎臓線維芽細胞を準備する。また、自己の細胞由来のiPS細胞等の多能性幹細胞を分化させて、回収した線維芽細胞であってもよい。加えて、自己以外の細胞であってよく、例えば心臓細胞を提供するドナー由来の心臓組織や、動物等を利用して作製した心臓組織から単離した心臓線維芽細胞や、ドナーの成体(体性)幹細胞を分化させて単離した心臓線維芽細胞を準備する。また、ドナー由来のiPS細胞やES細胞等の多能性幹細胞を分化させて、回収した線維芽細胞であってもよい。

[0032] (線維芽細胞の分離)

準備された線維芽細胞は、典型的にはディスパーゼ、コラゲナーゼのような酵素により処理されることで分離され得る。分離はディスパーゼ、コラゲナーゼのような酵素により行われる他、必要とされる分離が可能であれば、その他の処理、例えば機械的処理であってよい。

[0033] (ADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞の製造方法)

線維芽細胞にTNF- α 及びIL-4を接触させること、並びに前記接触させた線維芽細胞を、ADM及び／又はHHEX高発現になり得る条件下で培養すること、を含むものである。

[0034] 線維芽細胞とTNF- α 及びIL-4との接触の方法はADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞の誘導が顕著に害されない限り特段限定されず、典型的には線維芽細胞を含む培地にTNF- α 及びIL-4を添加することであるが、これに限られない。TNF- α 及びIL-4は、1種類のみ添

加してもよく、複数種類を添加してもよい。複数種類の場合は、それぞれ別々に線維芽細胞と接触させてもよく、同時に接触させてもよい。例えば、 $\text{TNF-}\alpha$ 及び IL-4 を水、培地、血清、またはジメチルスルホキシド（ DMSO ）に溶解させた後で、培地に添加してもよい。

[0035] $\text{TNF-}\alpha$ 及び IL-4 を添加した培地で線維芽細胞を培養できることから、線維芽細胞における ADM 及び／又は HHEX の発現レベルを維持したまま線維芽細胞を培養できる。そのため、高い ADM 及び／又は HHEX 発現レベルを有する線維芽細胞を製造することができる。

[0036] $\text{TNF-}\alpha$ 及び IL-4 を培地（ mL ）に添加する場合、 $\text{TNF-}\alpha$ の添加量は特段限定されないが、通常 0.1 ng/mL 以上であり、 0.5 ng/mL 以上であってよく、 1 ng/mL 以上であってよく、 10 ng/mL 以上であってよく、 50 ng/mL 以上であってよい。上限は特に限定されず、通常 500 ng/mL 以下であり、 100 ng/mL 以下であってよい。

また、 IL-4 の添加量は特段限定されないが、通常 0.1 ng/mL 以上であり、 0.5 ng/mL 以上であってよく、 1 ng/mL 以上であってよく、 2 ng/mL 以上であってよい。上限は特に限定されず、通常 10 ng/mL 以下であり、 5 ng/mL 以下であってよく、 1 ng/mL 以下であってよい。

添加する $\text{TNF-}\alpha$ と IL-4 の比（重量比）は、 $\text{TNF-}\alpha$ ： IL-4 で通常 $10000:1\sim1:1$ であり、 $50000:1\sim10:1$ であってよい。また、 $1:1\sim1:10000$ であり、 $1:10\sim1:50000$ であってよい。

[0037] $\text{TNF-}\alpha$ 及び IL-4 を接触させた線維芽細胞を更に培養することで、 ADM 及び／又は HHEX ＋線維芽細胞を製造することができる。

線維芽細胞の培養は、線維芽細胞が ADM 及び／又は HHEX ポジティブになり得る条件下であれば特段限定されず、既知の細胞培養方法により行つてよい。

[0038] 培養に用いられる培地は、培養する細胞の種類等により適宜設定可能であ

るが、例えば、DMEM、 α -MEM、RPMI-1640、HFD-1 (+)等が使用可能である。該培地にFCSやFBS等の栄養物質や増殖因子、サイトカイン、抗生物質等を添加してもよい。さらに、TNF- α 及びIL-4を含む培地で培養してもよい。

培養期間は、培養した細胞が所望の細胞数となるまで、及び／又は培養した細胞が所望の機能が備わるまで等の目的に応じて培養時間や培養日数を適宜設定できる。例えば、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、15時間、18時間、21時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、2週間、1か月、2か月、3か月、6か月等の期間があげられる。

培養温度は、培養する細胞の種類に合わせて適宜設定可能であるが、例えば10℃以上、15℃以上、20℃以上、25℃以上、30℃以上であってよく、また60℃以下、55℃以下、50℃以下、45℃以下、40℃以下であってよい。

培養は複数回行ってもよい。例えば選択又は濃縮により所望の線維芽細胞の純度を向上させ、その都度培養を行うことができる。

[0039] 線維芽細胞の製造において、さらに抗CD106抗体を用いてADM及び／又はHHEXを高発現する線維芽細胞を選択又は濃縮することを含んでもよい。選択又は濃縮の方法は特に限定されず、当業者に既知の方法で行うことができ、例えば、ヒトCD106 (VCAM-1) -ビオチン (Miltenyi Biotec) で一次免疫染色を実施し、抗ビオチンマイクロビーズ (Miltenyi Biotec) で二次免疫染色し、染色した細胞をautoMACS (Miltenyi Biotec) で、回収することによって行うことができる。また、選択又は濃縮はどのタイミングで行ってもよい。

抗CD106抗体は、既知のものを使用することが可能であり、市販品を入手して使用できる。

抗CD106抗体を用いて選択又は濃縮することで、線維芽細胞集団におけるCD106陽性線維芽細胞の割合を増加させることができ、さらにはADM及び／又はHHEX＋線維芽細胞の割合を増加させることができる。

[0040] 培養した線維芽細胞の回収は、例えば、トリプシン等のプロテアーゼにより細胞を剥離して回収してよいが、温度応答性培養皿を使用して、温度変化により細胞を剥離させ、回収してもよく、セルスクレーパーなどの器具を使用して細胞を剥離させ、回収してもよい。

[0041] 本実施形態の医薬組成物を生体内に投与又は移植することにより、生体内でリンパ管新生を促進させることができる。そのため、特に限定されないが、例えば臓器組織の障害、欠損、機能不全に起因する、リンパ管新生能が低下している状態を改善することや、組織液の恒常性の障害や脂質及び／又はビタミンの輸送能の障害を改善することや、免疫監視機構を活性化することができる。また、臓器不全を有する患者に投与することができるものであってもよく、これにより臓器不全を治療することができるものであってもよい。

臓器不全としては、臓器が期待される機能を実行しない状態のこと及び／又は臨床的介入なしには正常な恒常性を維持できない程度の臓器機能障害のことを言う。具体的な臓器としては、特に限定されないが、例えば心臓、腎臓、副腎、甲状腺、副甲状腺、声帯、胸腺、大脳、小脳、脳幹、脊髄、末梢神経、皮膚、筋肉、眼球、舌、食道、胃、胆嚢、胆管、膵臓、膵管、肝臓、脾臓、小腸、大腸、直腸、肛門、気管、気管支、肺、膀胱、尿管、前立腺、動脈、静脈、リンパ管、リンパ節、骨、骨髄、軟骨、腱、歯、睾丸、精管、陰茎、子宮、卵巣、卵管、膣などが挙げられる。例えば、心臓や腎臓において臓器不全とは、臓器の機能が正常時と比較して低下した状態のことであってもよく、特に臓器の機能が正常時と比較して30%以下に低下した状態のことであってもよい。

本実施形態の医薬組成物を生体内に投与又は移植することにより、線維症を治療又は改善することができる。線維症の発症部位は特に限定されず、例

えば、心臓、肺、腎臓などが挙げられる。

- [0042] 本実施形態の医薬組成物を生体に投与又は移植する方法は、特に限定されないが、例えば注射により投与できる。医薬組成物を不全臓器若しくはその梗塞周辺領域（例えば、被膜下など）、又は線維症を発症した臓器における損傷領域、線維化領域若しくはその周辺領域に直接投与又は移植することで、上記の疾患状態の改善や臓器不全の治療が可能となる。また、医薬組成物は、静脈、動脈、リンパ節、リンパ管、骨髄、皮下、海綿体、腹腔内、筋肉、髄腔内、関節腔へ投与してもよい。静脈、動脈、リンパ管への投与は、脈管内への注射によるものでもよく、カテーテルにより注入されるものでもよく、その他の既知の手法を用いてもよい。

注射の方法は特段限定されず、有針注射、無針注射等既知の注射手法を適用することができ、注入に用いるカテーテルの方法も既知の方法を適用することができ、特段限定されない。

- [0043] また、本実施形態の医薬組成物は、特に限定されないが、人工臓器材料として生体に適用されるものでもよく、例えば、その人工臓器材料は、細胞が平面状又は立体状の細胞組織として構築されたものでもよい。この平面状又は立体状の細胞組織は、線維芽細胞を単独で培養したものでもよく、又は線維芽細胞と他の細胞、例えば腎細胞を共培養した上で平面状又は立体状の細胞組織としたものでもよい。平面状又は立体状の細胞組織としては、特に限定されないが、例えば細胞シートや、セルフアイバー、3Dプリンタにて形成された組織などが例示される。

本実施形態において、平面状又は立体状の細胞組織の大きさや形状は、壊死、損傷又は線維化した臓器組織及び／又はその周辺領域及び／又は病変領域に適用できる限り特に限定されない。また平面状とは、単層又は複数層のいずれでもよい。

なお、細胞培養における培地組成、温度、湿度といった条件は、ADM及び／又はHHEX+線維芽細胞を培養することができ、かつ平面状又は立体状の細胞組織を構築できる限り特に限定されない。

このような平面状又は立体状の細胞組織を壊死、損傷又は線維化した臓器組織及び／又はその周辺領域に適用することで、又は人工臓器として壊死、損傷又は線維化した臓器組織及び／又はその周辺領域と交換することで、リンパ管新生能が低下している状態を改善することや、組織液の恒常性の障害や脂質及び／又はビタミンの輸送能の障害を改善することや、免疫監視機構を活性化することや、臓器不全を治療することや、線維症を治療若しくは改善することができる。

[0044] 医薬組成物に含まれるADM及び／又はHHEX＋線維芽細胞の割合は、患者への投与又は移植の態様等に基づいて適宜設定され、有効成分として治療上有効量のADM及び／又はHHEX＋線維芽細胞が含まれていればよい。

医薬組成物中に他の線維芽細胞を含む場合、例えば、医薬組成物に含まれる線維芽細胞全量に対し、ADM及び／又はHHEX＋線維芽細胞の割合は細胞数基準で0.03%以上であってよく、0.1%以上であってよく、1%以上であってよく、2%以上であってよく、4%以上であってよく、5%以上であってよく、10%以上であってよく、20%以上であってよく、30%以上であってよく、40%以上であってよく、50%以上であってよく、60%以上であってよく、70%以上であってよく、80%以上であってよく、90%以上であってよく、95%以上であってよく、98%以上であってよく、99%以上であってよい。

また、ヒト由来の線維芽細胞を用いた場合、医薬組成物に含まれるADM及び／又はHHEX＋線維芽細胞数において、対照となる線維芽細胞のADM及び／又はHHEX発現量に対する、ADM及び／又はHHEX＋線維芽細胞のADM及び／又はHHEX発現量は、1.20倍以上、1.40倍以上、1.50倍以上、1.60倍以上、1.70倍以上、1.80倍以上、1.90倍以上、2.00倍以上、3.00倍以上、4.00倍以上、5.00倍以上、6.00倍以上、7.00倍以上、8.00倍以上、9.00倍以上、10.00倍以上であってよい。

また、医薬組成物に含まれるADM及び／又はHHEX+線維芽細胞数は、例えば $1.0 \times 10^2 \text{ cells/mL}$ 以上、 $1.0 \times 10^3 \text{ cells/mL}$ 以上、 $1.0 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 以上、 $1.0 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 以上、 $1.0 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上、 $5.0 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上、 $1.0 \times 10^7 \text{ cells/mL}$ 以上とすることができる。注射用組成物に含まれるCD106陽性線維芽細胞数は、疾患の程度に応じてさらに増減させてもよい。

[0045] 医薬組成物による上記治療及び／又は上記改善の効果の確認方法は、特に限定されず、例えば組成物投与又は移植前と比較して組成物投与又は移植後のリンパ管新生が増加することや、組成物投与又は移植前と比較して組成物投与又は移植後の臓器の機能が回復すること、組成物投与又は移植前と比較して組成物投与又は移植後の臓器の損傷の程度や線維化の程度が軽減することなどが例示される。

[0046] 医薬組成物は、医薬組成物として生理学的に許容される他の成分を含有してもよい。このような他の成分としては、生理食塩水、細胞保存液、細胞培養液、ハイドロゲル、細胞外マトリクス、凍結保存液等があげられる。

[0047] 第1の発明の別の実施形態としては、上記ADM及び／若しくはHHEX高発現細胞を含む医薬組成物を、線維化組織及び／又はその周辺領域に投与又は移植することにより、線維症を治療又は改善する方法であり得る。

また、第1の発明の別の実施形態としては、上記ADM及び／若しくはHHEX高発現細胞を含む医薬組成物を、不全臓器組織及び／又はその周辺領域に投与又は移植することにより、リンパ管新生能が低下している状態を改善することや、組織液の恒常性の障害改善や、浮腫を軽減することや、脂質及び／又はビタミンの輸送能の障害を改善することや、免疫監視機構を活性化することや、臓器不全を治療する方法であり得る。

[0048] また、第1の発明の別の実施形態としては、上記ADM及び／若しくはHHEX+細胞を含む組成物の、不全臓器組織及び／若しくはその周辺領域、又は線維化組織及び／若しくはその周辺領域に投与又は移植するための注射

剤又は移植材料としての使用であり得る。

[0049] <ADM高発現の線維芽細胞>

第2の発明の一実施形態は、ADM高発現の線維芽細胞である。本実施形態の線維芽細胞は、好ましくはCD106陽性である。さらにVEGF-C高発現であってもよい。

[0050] 線維芽細胞の由来に制限はなく、胚性幹細胞（ES細胞）、人工多能性幹細胞（iPS細胞）及びMuse細胞等の多能性幹細胞や、間葉系幹細胞などの成体幹細胞を分化させて用いてもよい。また、動物（ヒトを含む）から採取したプライマリー細胞を用いてもよく、株化した細胞を用いてもよい。

線維芽細胞の由来臓器は、例えば、肺由来、心臓由来、腎臓由来、皮膚由来などが挙げられる。

線維芽細胞は、特に限定されないが、成体由来であることが好ましい。

本実施形態の細胞の由来となる線維芽細胞は、VEGF-CやADMをもともと一定量発現していてもよく、全く発現していなくてもよい。

また、本実施形態において線維芽細胞とは、通常の線維芽細胞が発現している細胞表面マーカーを発現している細胞のことであってもよく、さらに後述の本発明の細胞の製造方法によって、追加で他のマーカーが発現した又は一部のマーカーが発現していない細胞であってもよい。

[0051] VEGF-Cが高発現であるとは、特に限定されないが、例えば、mRNA発現量をRT-qPCRで測定した時に、対照となる線維芽細胞のmRNA発現量を1とした場合、本実施形態の細胞におけるVEGF-CのmRNA発現量が、1.20倍以上、1.40倍以上、1.50倍以上、1.60倍以上、1.70倍以上、1.80倍以上、1.90倍以上、2.00倍以上、2.60倍以上、2.99倍以上、3.00倍以上、3.38倍以上、3.52倍以上、4.00倍以上、4.11倍以上、4.70倍以上、5.00倍以上、6.00倍以上、7.00倍以上、8.00倍以上、9.00倍以上、10.0倍以上、又はそれ以上の倍数増加していることが好ましい。

なお、対照となる線維芽細胞のmRNA発現量とは、未処置の線維芽細胞におけるmRNA発現量であってもよく、また処置後の細胞全体の平均mRNA発現量であってもよい。

またタンパク質発現量をフローサイトメトリ法によって測定した時に、VEGF-Cポジティブ（以下、VEGF-C+とも言う）線維芽細胞の割合が細胞数基準でそれぞれ0.03%以上であってよく、0.1%以上であってよく、1%以上であってよく、2%以上であってよく、4%以上であってよく、5%以上であってよく、10%以上であってよく、20%以上であってよく、30%以上であってよく、40%以上であってよく、50%以上であってよく、60%以上であってよく、70%以上であってよく、80%以上であってよく、90%以上であってよく、95%以上であってよく、98%以上であってよく、99%以上であってよい。

[0052] ADMが高発現であるとは、特に限定されないが、例えば、mRNA発現量をRT-qPCRで測定した時に、対照となる線維芽細胞のmRNA発現量を1とした場合、本実施形態の細胞におけるADMのmRNA発現量が、1.20倍以上、1.40倍以上、1.43倍以上、1.50倍以上、1.60倍以上、1.70倍以上、1.80倍以上、1.90倍以上、1.91倍以上、1.97倍以上、2.00倍以上、2.46倍以上、3.00倍以上、3.15倍以上、4.00倍以上、5.00倍以上、6.00倍以上、7.00倍以上、8.00倍以上、9.00倍以上、10.0倍以上、又はそれ以上の倍数増加していることが好ましい。

なお、対照となる線維芽細胞のmRNA発現量とは、未処置の線維芽細胞におけるmRNA発現量であってもよく、また処置後の細胞全体の平均mRNA発現量であってもよい。

またタンパク質発現量をフローサイトメトリ法によって測定した時に、ADMポジティブ（以下、ADM+とも言う）線維芽細胞の割合が細胞数基準でそれぞれ0.1%以上であってよく、1%以上であってよく、2%以上であってよく、4%以上であってよく、5%以上であってよく、10%以上で

あってもよく、20%以上であってもよく、30%以上であってもよく、40%以上であってもよく、50%以上であってもよく、60%以上であってもよく、70%以上であってもよく、80%以上であってもよく、90%以上であってもよく、95%以上であってもよく、98%以上であってもよく、99%以上であってもよい。

[0053] 本実施形態において、VEGF-C及びADMの有する塩基配列及びアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、VEGF-Cは、配列番号13又は14で表される塩基配列を有する遺伝子、又はその塩基配列と90%以上、95%以上若しくは98%以上同一の塩基配列を有する遺伝子であって、配列番号13又は14で表される塩基配列の全体又は一部に対する相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、VEGF-Cの活性を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよく、ADMは、配列番号1又は15で表される塩基配列を有する遺伝子、又はその塩基配列と90%以上、95%以上若しくは98%以上同一の塩基配列を有する遺伝子であって、配列番号1又は15で表される塩基配列の全体又は一部に対する相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ADMの活性を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。

[0054] 本実施形態の細胞は、好ましくは細胞表面マーカーとしてCD106を発現する。

[0055] 本実施形態は、上述のADM高発現の線維芽細胞を含む、線維芽細胞集団であってもよい。

[0056] (線維芽細胞の準備)

線維芽細胞の準備において、線維芽細胞の由来は特に限定はされず、既に述べたとおりである。一方で、自己由来の細胞であってもよく、例えば肺疾患を患っている患者の肺組織から単離した肺線維芽細胞や、患者の成体（体性）幹細胞を分化させて単離した肺線維芽細胞を準備してもよい。また、自己の細胞由来のiPS細胞等の多能性幹細胞を分化させて、回収した線維芽細胞であってもよい。加えて、自己以外の細胞であってもよく、例えば肺細胞を

提供するドナー由来の肺組織や、動物等を利用して作製した肺組織から単離した肺線維芽細胞や、ドナーの成体（体性）幹細胞を分化させて単離した肺線維芽細胞を準備してもよい。また、ドナー由来のiPS細胞やES細胞等の多能性幹細胞を分化させて、回収した線維芽細胞であってもよい。

[0057]（線維芽細胞の分離）

準備された線維芽細胞は、典型的にはディスパーゼ、コラゲナーゼのような酵素により処理されることで分離され得る。分離はディスパーゼ、コラゲナーゼのような酵素により行われる他、必要とされる分離が可能であれば、その他の処理、例えば機械的処理であってもよい。

[0058]（線維芽細胞の培養）

線維芽細胞を、TNF- α 及びIL-4と、後述の方法で接触させてもよく、所望の細胞数となるまで、及び／又は所望の機能が備わるまで等の目的で、培養に供してもよい。培養の条件に制限はなく、既知の細胞培養方法により行ってよい。

培養に用いられる培地は、培養する細胞の種類等により適宜設定可能であるが、例えば、HFD-1（+）、DMEM、 α -MEM、RPMI-1640等が使用可能である。該培地にNBCS、FCSやFBS等の栄養物質や増殖因子、サイトカイン、抗生物質等を添加してもよい。さらに、TNF- α 及びIL-4を含む培地で培養してもよい。

培養期間は、培養した細胞が所望の細胞数となるまで、及び／又は培養した細胞が所望の機能が備わるまで等の目的に応じて培養時間や培養日数を適宜設定できる。例えば、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、15時間、18時間、21時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、2週間、1か月、2か月、3か月、6か月等の期間があげられる。

培養温度は、培養する細胞の種類に合わせて適宜設定可能であるが、例えば10℃以上、15℃以上、20℃以上、25℃以上、30℃以上であって

よく、また60℃以下、55℃以下、50℃以下、45℃以下、40℃以下であってよい。

培養は複数回行ってもよい。例えば選択又は濃縮により所望の線維芽細胞の純度を向上させ、その都度培養を行うことができる。

[0059] (線維芽細胞の回収)

培養した線維芽細胞の回収は、トリプシン等のプロテアーゼにより細胞を剥離して回収してよいが、温度応答性培養皿を使用して、温度変化により細胞を剥離させ、回収してもよく、セルスクレーパーなどの器具を使用して細胞を剥離させ、回収してもよい。

[0060] 第2の発明の別の実施形態は、ADM高発現の線維芽細胞の製造方法であって、線維芽細胞に、TNF- α 及びIL-4を接触させること、並びに前記接触させた線維芽細胞を、ADMが高発現になり得る条件下で培養することを含む、ADM高発現の線維芽細胞の製造方法である。本実施形態の線維芽細胞は、好ましくはCD106陽性である。さらにVEGF-C高発現であってもよい。

[0061] 線維芽細胞とTNF- α 及びIL-4との接触の方法はADM高発現の線維芽細胞の誘導、又はADM高発現並びにVEGF-C高発現及び／若しくはCD106陽性である線維芽細胞の誘導が顕著に害されない限り特段限定されず、典型的には線維芽細胞を含む培地にTNF- α 及びIL-4を添加することであるが、これに限られない。TNF- α 及びIL-4は、それぞれ別々に線維芽細胞と接触させてもよく、同時に接触させてもよい。例えば、TNF- α 及びIL-4を水、培地、血清、またはジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解させた後で、培地に添加してもよい。

[0062] 本実施形態では、TNF- α 及びIL-4を添加した培地で線維芽細胞を培養できることから、線維芽細胞におけるADMの発現レベルを維持したまま、さらにはVEGF-Cの発現レベルを維持したまま、線維芽細胞を培養できる。そのため、高いADM発現レベル、さらには高いVEGF-Cの発現レベルを有する線維芽細胞を製造することができる。

[0063] $\text{TNF-}\alpha$ 及び IL-4 を培地 (mL) に添加する場合、 $\text{TNF-}\alpha$ の添加量は特段限定されないが、通常 0.1 ng/mL 以上であり、 0.5 ng/mL 以上であってよく、 1 ng/mL 以上であってよく、 10 ng/mL 以上であってよく、 50 ng/mL 以上であってよい。上限は特に限定されず、通常 500 ng/mL 以下であり、 100 ng/mL 以下であってよい。

また、 IL-4 の添加量は特段限定されないが、通常 0.1 ng/mL 以上であり、 0.5 ng/mL 以上であってよく、 1 ng/mL 以上であってよく、 2 ng/mL 以上であってよい。上限は特に限定されず、通常 10 ng/mL 以下であり、 5 ng/mL 以下であってよく、 2 ng/mL 以下であってよい。

添加する $\text{TNF-}\alpha$ と IL-4 の比 (重量比) は、 $\text{TNF-}\alpha : \text{IL-4}$ で通常 $10000 : 1 \sim 1 : 1$ であり、 $50000 : 1 \sim 10 : 1$ であってよい。また、 $1 : 1 \sim 1 : 10000$ であり、 $1 : 10 \sim 1 : 50000$ であってよい。

[0064] $\text{TNF-}\alpha$ 及び IL-4 を接触させた線維芽細胞を更に培養することで、ADM高発現の線維芽細胞を製造することができる。該線維芽細胞は、さらに VEGF-C 高発現であってよい。

線維芽細胞の培養は、線維芽細胞がADM高発現になり得る条件下であれば特段限定されず、既知の細胞培養方法により行ってよい。また、 VEGF-C 高発現になり得る条件下であってよい。 CD106 陽性になり得る条件下であることが好ましい。上記線維芽細胞の製造方法における (線維芽細胞の培養) の項に記載される方法が例示される。

[0065] 本実施形態は、線維芽細胞が CD106 陽性である場合、抗 CD106 抗体を用いてADM高発現の CD106 陽性線維芽細胞を選択又は濃縮することができる。該線維芽細胞はさらに VEGF-C 高発現であってよい。選択又は濃縮の方法は特に限定されず、当業者に既知の方法で行うことができ、例えば、ヒト CD106 (VCAM-1) -ビオチン (Miltenyi

B i o t e c) で一次免疫染色を実施し、抗ビオチンマイクロビーズ (M i l t e n y i B i o t e c) で二次免疫染色し、染色した細胞を a u t o M A C S (M i l t e n y i B i o t e c) で、回収することによって行うことができる。また、選択又は濃縮はどのタイミングで行ってもよい。

抗 C D 1 0 6 抗体は、既知のものを使用することが可能であり、市販品を入手して使用できる。

抗 C D 1 0 6 抗体を用いて選択又は濃縮することで、線維芽細胞集団における A D M 高発現の線維芽細胞の割合を増加させることができる。

[0066] 培養した線維芽細胞の回収は、上記線維芽細胞の製造方法における（線維芽細胞の回収）の項に記載される方法が例示される。

[0067] 本実施形態の A D M 高発現の線維芽細胞の製造方法により、A D M 高発現の線維芽細胞が得られ、該線維芽細胞又は該細胞を含む線維芽細胞集団が第2の発明の別の実施形態である。該線維芽細胞はさらに V E G F - C 高発現であってもよく、C D 1 0 6 陽性であってもよい。線維芽細胞は、T N F - α 及び I L - 4 により刺激されることで、A D M や V E G F - C の発現量が高まるため、A D M 高発現の線維芽細胞、さらに V E G F - C 高発現である線維芽細胞は、リンパ管新生能が低下する疾患や、肺線維症又は間質性肺炎等の肺疾患に対する治療用組成物として好適に使用できる。本実施形態において、線維芽細胞の由来は特に限定されないが、好ましくは肺由来である。

別の実施形態としては、上述の A D M 高発現の線維芽細胞により得られた細胞を含む、線維芽細胞集団であってもよい。

[0068] < C D 1 0 6 陽性の肺由来線維芽細胞を含む細胞集団 >

第2の発明の別の実施形態は、C D 1 0 6 陽性の肺由来線維芽細胞を含む細胞集団である。本実施形態の線維芽細胞は、A D M 高発現であってもよく、V E G F - C 高発現であってもよい。

[0069] 線維芽細胞の由来に制限はなく、胚性幹細胞 (E S 細胞)、人工多能性幹細胞 (i P S 細胞) 及び M u s e 細胞等の多能性幹細胞や、間葉系幹細胞などの成体幹細胞を分化させて用いてもよい。また、動物 (ヒトを含む) から

採取したプライマリー細胞を用いてもよく、株化した細胞を用いてもよい。

線維芽細胞は、特に限定されないが、成体由来であることが好ましい。

本実施形態の細胞の由来となる線維芽細胞は、VEGF-CやADMをもとと一定量発現していてもよく、全く発現していなくてもよい。

また、本実施形態において線維芽細胞とは、通常の線維芽細胞が発現している細胞表面マーカーを発現している細胞のことであってもよく、さらに後述の本発明の細胞の製造方法によって、追加で他のマーカーが発現した又は一部のマーカーが発現していない細胞であってもよい。

[0070] 線維芽細胞集団において、全線維芽細胞に対するCD106陽性の線維芽細胞の割合は特段限定されないが、細胞数基準で、18.01%超であってよく、27.97%超であってよく、30%超であってよく、31.38%超であってよく、34.79%超であってよく、40%超であってよく、50%超であってよく、60%超であってよく、70%超であってよく、80%超であってよく、90%超であってよく、95%超であってよく、97.10%超であってよい。また、細胞数基準で、18.01%以上であってよく、27.97%以上であってよく、30%以上であってよく、31.38%以上であってよく、34.79%以上であってよく、40%以上であってよく、50%以上であってよく、60%以上であってよく、70%以上であってよく、80%以上であってよく、90%以上であってよく、95%以上であってよく、97.10%以上であってよい。

[0071] 本実施形態の線維芽細胞集団は、さらにCD90陽性の線維芽細胞集団であってもよい。このとき、線維芽細胞集団において、全線維芽細胞に対するCD106陽性かつCD90陽性の線維芽細胞の割合は特段限定されないが、細胞数基準で、17.97%超であってよく、27.91%超であってよく、30%超であってよく、31.21%超であってよく、34.51%超であってよく、40%超であってよく、50%超であってよく、60%超であってよく、70%超であってよく、80%超であってよく、90%超であってよく、95%超であってよく、96.29%超であってよい。また、細

胞数基準で、17.97%以上であってよく、27.91%以上であってよく、30%以上であってよく、31.21%以上であってよく、34.51%以上であってよく、40%以上であってよく、50%以上であってよく、60%以上であってよく、70%以上であってよく、80%以上であってよく、90%以上であってよく、95%以上であってよく、96.29%以上であってよい。

[0072] ADM高発現であることやVEGF-C高発現であることに關しては、上述の＜ADM高発現の線維芽細胞＞の項における記載を援用することができる。

[0073] (線維芽細胞の準備)

線維芽細胞の準備において、線維芽細胞の由来は特に限定はされず、既に述べたとおりである。一方で、自己由来の細胞であってよく、例えば肺疾患を患っている患者の肺組織から単離した肺線維芽細胞や、患者の成体(体性)幹細胞を分化させて単離した肺線維芽細胞を準備してもよい。また、自己の細胞由来のiPS細胞等の多能性幹細胞を分化させて、回収した線維芽細胞であってもよい。加えて、自己以外の細胞であってよく、例えば肺細胞を提供するドナー由来の肺組織や、動物等を利用して作製した肺組織から単離した肺線維芽細胞や、ドナーの成体(体性)幹細胞を分化させて単離した肺線維芽細胞を準備してもよい。また、ドナー由来のiPS細胞やES細胞等の多能性幹細胞を分化させて、回収した線維芽細胞であってもよい。

[0074] (線維芽細胞の分離)

準備された線維芽細胞は、典型的にはディスパーゼ、コラゲナーゼのような酵素により処理されることで分離され得る。分離はディスパーゼ、コラゲナーゼのような酵素により行われる他、必要とされる分離が可能であれば、その他の処理、例えば機械的処理であってよい。

[0075] (線維芽細胞の培養)

線維芽細胞を、TNF- α 及びIL-4と、後述の方法で接触させてもよく、所望の細胞数となるまで、及び／又は所望の機能が備わるまで等の目的

で、培養に供してもよい。培養の条件に制限はなく、既知の細胞培養方法により行ってよい。

培養に用いられる培地は、培養する細胞の種類等により適宜設定可能であるが、例えば、HFD M-1 (+)、DMEM、 α -MEM、RPMI-1640等が使用可能である。該培地にNBCS、FCSやFBS等の栄養物質や増殖因子、サイトカイン、抗生物質等を添加してもよい。さらに、TNF- α 及びIL-4を含む培地で培養してもよい。

培養期間は、培養した細胞が所望の細胞数となるまで、及び／又は培養した細胞が所望の機能が備わるまで等の目的に応じて培養時間や培養日数を適宜設定できる。例えば、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、15時間、18時間、21時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、2週間、1か月、2か月、3か月、6か月等の期間があげられる。

培養温度は、培養する細胞の種類に合わせて適宜設定可能であるが、例えば10℃以上、15℃以上、20℃以上、25℃以上、30℃以上であってよく、また60℃以下、55℃以下、50℃以下、45℃以下、40℃以下であってよい。

培養は複数回行ってよい。例えば選択又は濃縮により所望の線維芽細胞の純度を向上させ、その都度培養を行うことができる。

[0076] (線維芽細胞の回収)

培養した線維芽細胞の回収は、トリプシン等のプロテアーゼにより細胞を剥離して回収してよいが、温度応答性培養皿を使用して、温度変化により細胞を剥離させ、回収してもよく、セルスクレーパーなどの器具を使用して細胞を剥離させ、回収してもよい。

[0077] (CD106陽性線維芽細胞のセルソーティング)

線維芽細胞がCD106陽性である場合、線維芽細胞はCD106陽性線維芽細胞の選択又は濃縮に供してもよい。選択又は濃縮を経ずともCD10

6陽性線維芽細胞を入手できる場合には、選択又は濃縮は省略し得る。CD106陽性線維芽細胞の選択又は濃縮には、抗CD106抗体（抗VCAM-1抗体）を用いた、フローサイトメトリ法、磁気ビーズ法、アフィニティークラム法、又はパニング法等の方法が例示される。具体的には磁気細胞分離法（MACS）や蛍光標識細胞分離法（FACS）などを用いることができる。抗CD106抗体は市販のものを用いてよく、また既知の方法により作製したものを用いてもよい。また、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれを用いてもよいが、特異性の観点からモノクローナル抗体を用いることが好ましい。更には、薬剤耐性遺伝子を導入し、CD106陰性線維芽細胞を除外することで、CD106陽性線維芽細胞を得てもよい。また、蛍光タンパク質コード遺伝子を導入し、蛍光タンパク質ポジティブ細胞を、FACSなどを用いて単離してもよい。また、リアルタイムPCR、次世代シーケンサー及びin situハイブリダイゼーション等の手法を用いて、細胞におけるCD106遺伝子の発現を確認し、CD106遺伝子の発現群を単離してもよい。

[0078] <ADM高発現の線維芽細胞又はその細胞集団を含む医薬組成物、又はCD106陽性の肺由来線維芽細胞の細胞集団を含む医薬組成物>

第2の発明の別の実施形態は、上記ADM高発現の線維芽細胞又はその細胞集団を含む医薬組成物、又は上記CD106陽性の肺由来線維芽細胞の細胞集団を含む医薬組成物である。本実施形態の線維芽細胞は、好ましくはCD106陽性である。さらにVEGF-C高発現であってもよい。

ADM及びVEGF-Cはリンパ管新生因子であるため、例えば、本実施形態の医薬組成物を生体の肺などの臓器またはその周辺領域に投与又は移植することにより、肺などの臓器においてリンパ管新生能が低下している状態を改善することができる。そのため、特に限定されないが、例えば肺などの臓器において、リンパ管新生能が低下している状態を改善することができる。特に肺線維症又は間質性肺炎といった肺疾患の治療に有用である。本実施形態において、線維芽細胞の由来は特に限定されないが、好ましくは肺由来

である。

- [0079] 本実施形態の医薬組成物を生体に投与又は移植する方法は、特に限定されないが、例えば注射により投与できる。医薬組成物を肺などの臓器における損傷領域、線維化領域若しくはその周辺領域に直接投与又は移植することで、上記の疾患状態の改善や肺などの臓器疾患の治療が可能となる。また、医薬組成物は、静脈、動脈、リンパ節、リンパ管、骨髓、皮下、海綿体、腹腔内、筋肉、髄腔内、関節腔へ投与してもよい。静脈、動脈、リンパ管への投与は、脈管内への注射によるものでもよく、カテーテルにより注入されるものでもよく、その他の既知の手法を用いてもよい。

注射の方法は特段限定されず、有針注射、無針注射等既知の注射手法を適用することができ、注入に用いるカテーテルの方法も既知の方法を適用することができ、特段限定されない。

- [0080] また、本実施形態の医薬組成物は、特に限定されないが、人工臓器材料として生体に適用されるものでもよく、例えば、その人工臓器材料は、細胞が平面状又は立体状の細胞組織として構築されたものでもよい。この平面状又は立体状の細胞組織は、線維芽細胞を単独で培養したものでもよく、又は線維芽細胞と他の細胞、例えば肺細胞を共培養した上で平面状又は立体状の細胞組織としたものでもよい。平面状又は立体状の細胞組織としては、特に限定されないが、例えば細胞シートや、セルファイバー、3Dプリンタにて形成された組織などが例示される。

本実施形態において、平面状又は立体状の細胞組織の大きさや形状は、損傷又は線維化した肺組織及び／又はその周辺領域及び／又は病変領域に適用できる限り特に限定されない。また平面状とは、単層又は複数層のいずれでもよい。

なお、細胞培養における培地組成、温度、湿度といった条件は、VEGF-C及び／又はADM高発現のCD106陽性線維芽細胞を培養することができ、かつ平面状又は立体状の細胞組織を構築できる限り特に限定されない。例えば、上記線維芽細胞の製造方法における（線維芽細胞の培養）及び／

又は（線維芽細胞の回収）の項に記載した培養条件に準じるものが例示できる。

このような平面状又は立体状の細胞組織を、損傷又は線維化した臓器組織及び／又はその周辺領域に適用することで、又は人工臓器として、損傷又は線維化した臓器組織及び／又はその周辺領域と交換することで、リンパ管新生能が低下している状態を改善することや、肺線維症又は間質性肺炎といった肺疾患を治療することができる。

[0081] 医薬組成物に含まれるADM高発現の線維芽細胞の割合は、患者への投与又は移植の態様等に基づいて適宜設定され、有効成分として治療上有効量のADM高発現の線維芽細胞が含まれていればよい。

医薬組成物中に他の線維芽細胞を含む場合、例えば、医薬組成物に含まれる線維芽細胞全量に対し、ADM高発現の線維芽細胞の割合は細胞数基準で0.03%以上であってよく、0.1%以上であってよく、1%以上であってよく、2%以上であってよく、4%以上であってよく、5%以上であってよく、10%以上であってよく、20%以上であってよく、30%以上であってよく、40%以上であってよく、50%以上であってよく、60%以上であってよく、70%以上であってよく、80%以上であってよく、90%以上であってよく、95%以上であってよく、98%以上であってよく、99%以上であってよい。

[0082] 医薬組成物に含まれるCD106陽性の肺由来線維芽細胞の割合は、患者への投与又は移植の態様等に基づいて適宜設定され、有効成分として治療上有効量のADM高発現の線維芽細胞が含まれていればよい。具体的には、上記<CD106陽性の肺由来線維芽細胞を含む細胞集団>の項に記載したCD106陽性の肺由来線維芽細胞の割合を援用できる。

[0083] また、医薬組成物に含まれるADM高発現の線維芽細胞数又はCD106陽性の肺由来線維芽細胞数は、例えば $1.0 \times 10^2 \text{ cells/mL}$ 以上、 $1.0 \times 10^3 \text{ cells/mL}$ 以上、 $1.0 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 以上、 $1.0 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 以上、 $1.0 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上

上、 $5.0 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上、 $1.0 \times 10^7 \text{ cells/mL}$ 以上とすることができる。注射用組成物に含まれる該細胞数は、疾患の程度に応じてさらに増減させてもよい。

[0084] 医薬組成物による上記治療及び／又は上記改善の効果の確認方法は、特に限定されず、例えば組成物投与又は移植前と比較して組成物投与又は移植後のリンパ管新生が増加することや、組成物投与又は移植前と比較して組成物投与又は移植後の肺などの臓器の機能性が回復すること、組成物投与又は移植前と比較して組成物投与又は移植後の肺などの臓器の損傷の程度や線維化の程度が軽減することなどが例示される。

[0085] 医薬組成物は、医薬組成物として生理学的に許容される他の成分を含有してもよい。このような他の成分としては、生理食塩水、細胞保存液、細胞培養液、ハイドロゲル、細胞外マトリクス、凍結保存液等があげられる。

[0086] 第2の発明の別の実施形態としては、上記ADM高発現の線維芽細胞、その細胞集団、CD106陽性の肺由来線維芽細胞の細胞集団、またはこれらを含む医薬組成物を、肺などの臓器組織及び／又はその周辺領域に投与又は移植することにより、肺線維症又は間質性肺炎といった肺疾患を治療する方法であり得る。本実施形態の線維芽細胞は、好ましくはCD106陽性である。さらにVEGF-C高発現であってもよい。

また、第2の発明の別の実施形態としては、上記ADM高発現の線維芽細胞、その細胞集団、CD106陽性の肺由来線維芽細胞の細胞集団、またはこれらを含む医薬組成物を、肺などの臓器組織及び／又はその周辺領域に投与又は移植することにより、リンパ管新生能が低下している状態を改善する方法であり得る。本実施形態の線維芽細胞は、好ましくはCD106陽性である。さらにVEGF-C高発現であってもよい。

[0087] また、第2の発明の別の実施形態としては、上記ADM高発現の線維芽細胞、その細胞集団又はこれらを含む組成物の、肺などの臓器組織及び／又はその周辺領域に投与又は移植するための注射剤又は移植材料としての使用であり得る。本実施形態の線維芽細胞は、好ましくはCD106陽性である。

さらにVEGF-C高発現であってもよい。

実施例

[0088] 以下実施例により、本発明をより詳細に説明するが、本発明の範囲が実施例のみに限定されないことは言うまでもない。

[0089] <実施例A：ADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞を含む医薬組成物に関する実施例>

<ヒト成体由来心臓線維芽細胞のCD106陽性細胞率の上昇>

ヒト成体心臓をScience Careから購入し、Liberase MNP-S (Roche) で酵素処理した後に、ヒト成体由来心臓線維芽細胞を単離した。この細胞を1%新生仔ウシ血清 (newborn calf serum (NBCS、Hyclone)) を添加したリコンビナントヒト上皮細胞成長因子 (rh-EGF) 含有線維芽細胞用無血清培養液 (HFDm-1 (+)、Cell Science & Technology) にて培養した。5回の継代後に細胞培養皿にて培養し、未処理で培養した群 (NT) と、TNF- α (50 ng/mL) (Peprotech) とIL-4 (2 ng/mL) (Wako) を2剤混合で処置した群 (+CKs) を設けた。すべての群は、1%NBCSを添加したHFDm-1 (+) を基本培地とし、1日間 (24時間) 培養した。

[0090] <フローサイトメトリ>

線維芽細胞は、BV421 マウス抗ヒトCD106 (VCAM1) 抗体 (BD Biosciences) とヒトCD90-PE (Miltenyi Biotec、Bergisch Gladbach, Germany) で免疫蛍光染色した。アイソタイプコントロールは、BV421 マウスIgG1; κ アイソタイプコントロール (BD Biosciences) とREAコントロール (S)-PE (Miltenyi Biotec) を用いた。細胞は生細胞のまま抗体と30分間、4°Cで反応させた。

免疫蛍光染色した細胞はフローサイトメーター (MACSQuant Analyzer 10、Miltenyi Biotec) で解析した。F

SC-A及びSSC-Aで細胞領域を認識後、CD106タンパク質に対する陽性細胞率（%、細胞数換算）を評価した。

[0091] <ヒト成体由来心臓線維芽細胞のADM及び／又はHHEX遺伝子の発現上昇>

ヒト成体由来心臓線維芽細胞は、細胞培養皿にて培養し、未処理で培養した群（NT）と、TNF- α （50 ng/mL）（Peprotech）とIL-4（2 ng/mL）（Wako）を2剤混合で処置した群（+CKs）を設けた。すべての群は、1%NBCSを添加したHFDm-1（+）を基本培地とし、1日間（24時間）培養した。

[0092] <プライマーとプローブの作製>

使用したプライマーは、NCBIに公開されているヒトmRNA配列（ADM, NM_001124.3（配列番号1）；HHEX, NM_002729.5（配列番号2）；ACTB（ β -Actin）, NM_001101.5（配列番号3））を基に、最近接塩基対法で計算されるアニール温度が60℃前後であって、1つ以上のイントロンを挟むように配列を設計した（配列番号4～9）。5'ヌクレアーゼプローブ配列も同じく公開ヒトmRNA配列データを基に設計しており、このプローブのアニール温度はプライマーより5℃以上高く、またこのプローブの結合位置が、測定対象の遺伝子上における、フォワードプライマーの結合位置とリバースプライマーの結合位置の間の塩基に結合するように設計した。またプローブの5'末端には蛍光色素6-FAMを、そこから9塩基分3'側にはクエンチャー色素ZEN、そして3'末端には2つ目のクエンチャー色素Iowa Black FQを結合させたデュアルクエンチャープローブとし、RT-PCR解析におけるバックグラウンドシグナルを低減させている（配列番号10～12）。以上のプライマーとプローブは全てIntegrated DNA Technologies社に合成を委託した（表1）。

[表1]

表1. プライマーとプローブの配列情報

遺伝子		配列
ADM	Forward Primer	5' -atgtacctgggttcgctcgc-3' (配列番号 4)
	Reverse Primer	5' -ccacgactcagagcccaatt-3' (配列番号 5)
	Probe	56-FAM/ttcgaaact/ZEN/ccgacgcgacatcc/3IABkFQ (配列番号 10)
HHEX	Forward Primer	5' -agcgagagacaggtcaaac-3' (配列番号 6)
	Reverse Primer	5' -ctgttctactgggcaaatcttg-3' (配列番号 7)
	Probe	56-FAM/cctccattt/ZEN/agcgcgtcgattctga/3IABkFQ (配列番号 11)
β -Actin	Forward Primer	5' -accttctacaatgagctgcg-3' (配列番号 8)
	Reverse Primer	5' -cctggatagcaacgtacatgg-3' (配列番号 9)
	Probe	56-FAM/atctgggtc/ZEN/atcttctcgcggttg/3IABkFQ (配列番号 12)

[0093] <RNA抽出>

心臓線維芽細胞からの全RNAの抽出は、Qiagen RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて行った。その際、細胞ライセートの調製はQIAshredder (QIAGEN) を用いて行い、DNase処理を含めたその他の操作は、キットのメーカーの推奨プロトコルに従った。得られた全RNAの濃度測定は、Nanodrop One/One分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、波長260nmにおける吸光度を測定した。同時に、タンパク質の混入度を示すA260/A280の値を算出し、A260/A280 > 2.0であることを確認した。

[0094] <リアルタイム定量RT-PCR>

One Step PrimeScript 3 RT-qPCR Mix, with UNG Kit (TaKaRa) を用いて、逆転写反応とRT-PCRを同じチューブでまとめて行った。反応は、1×One Step PrimeScript 3 RT-qPCR Mix, with UNG

、 $0.2\mu\text{M}$ Forward & Reverseプライマー、 $0.2\mu\text{M}$ 特異的プローブ、 10ng 鋳型RNA溶液を含む反応液（総量 $12.5\mu\text{L}$ ）で行った。最初に 52°C で5分間加温することにより逆転写反応を行い、その後、逆転写酵素を失活させるために 95°C で10秒間加熱した。続いて 95°C で5秒間、 60°C で30秒間を加熱するサイクルを40回繰り返し、サイクルごとの蛍光強度を測定した。一連の反応と測定は、Thermal Cycler Dice Real Time System 3（TaKaRa）を用いて行った。同時に、検量線作成のための標品として、ADMとHHEXの発現を確認済のサンプルより抽出したRNA溶液を用い、 $1\mu\text{g}$ から10倍ずつ4段階希釈したRNA溶液を用いて上記の測定を行った。すべてのサンプルは、 $N=3$ で測定を行った。

PCR終了後、得られた増幅曲線について標的遺伝子ごとに蛍光強度のベースラインと閾値を設定し、その閾値に蛍光シグナルが到達したサイクル数（Ct値）をサンプルごとに求めた。これらの解析はThermal Cycler Dice Real Time System 3 Software（TaKaRa）を用いて行った。それぞれの遺伝子の検量線は、相関係数が 0.98 以上で増幅効率が 90% 以上であり検量線として十分と考えられたため、対象サンプルのCt値を検量線に当てはめ目的とする遺伝子のmRNA含有量を相対値として算出した。この相対値を $\beta\text{-Actin}$ の値で標準化した。

[0095] <リンパ管の脈管形成アッセイ>

リンパ管の脈管形成アッセイは、当業者に既知の手法により、心臓由来細胞から回収したヒトリンパ管内皮細胞と各種のヒト心臓線維芽細胞を共培養し、各種の心臓線維芽細胞による心臓リンパ管新生効果の評価を行った（非特許文献15）。具体的には、ヒト心臓由来細胞から回収したヒトリンパ管内皮細胞と各種のヒト成体由来心臓線維芽細胞を $2.45\times 10^5\text{cells}/\text{cm}^2$ の濃度で2：8の割合で播種し、EGM-2MV Microvascular Endothelial Cell Growth Medi

um-2 Bullet Kit (Lonza, Basel, Switzerland) で3日間共培養した。共培養後、細胞は4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.1% Triton Xで膜透過処理後、免疫蛍光染色を行った。一次抗体は、抗VE-Cadherinウサギポリクローナル抗体 (abcam, Cambridge, UK) と抗Vimentinマウスポリクローナル抗体 (abcam) を使用した。二次抗体は、ヤギ抗ウサギ IgG H&L (Alexa Fluor 488) (abcam) とヤギ抗マウス IgG H&L (Alexa Fluor 647) (abcam) を使用した。核染色はHoechst 33258 solution (同仁化学研究所、熊本、日本) で行った。染色サンプルは、IN Cell Analyzer 2200 (Cytiva, Marlborough, MA) で撮影した。

定量評価は、Analyzer for ImageJ (v. 1.0.0, Gilles Carpentier, 2012; available online: <http://imagej.nih.gov/ij/macros/toolsets/Angiogenesis%20Analyzer.txt>) を使用した。具体的には、Icy (v. 2.0.3.0; BioImage Analysis Lab, Institut Pasteur) で、関心のあるチャネルを抽出し、背景をサブトラクター化した。その後、anisotropic PDE-based filter (Icyプラグイン: "Membrane Filter", v. 0.1.0.1) を適用して画像を補正し、フィルタリングされた画像のコントラストを強調して正規化し、背景を差し引くことでROIを定義した。最後に、得られた画像をAngiogenesis Analyzerマクロで解析した。詳細なプロトコルは、[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bhtaj6ie](https://doi.org/10.17504/protocols.io.bhtaj6ie) にオンラインで公開した。

定量データは、成熟リンパ管の全長とジャンクション数を図示し、NTの平均値を1として、Fold increaseで表した。

[0096] <移植用細胞の調製>

細胞は、次のメーカーから購入した：ヒト成体由来心臓線維芽細胞（Lonza）；ヒト胎児由来心臓線維芽細胞（Cell Applications, San Diego, CA）。細胞は線維芽細胞培養培地（HFD-1（+）medium（株式会社細胞科学研究所、宮城、日本）で拡大培養し、移植実験に用いた。

[0097] <セルソーティング>

線維芽細胞は、ヒトCD106（VCAM-1）-ビオチン（Miltenyi Biotec）、またはヒトCD90-ビオチン（Miltenyi Biotec）で一次免疫染色を実施し、抗ビオチンマイクロビーズ（Miltenyi Biotec）で二次免疫染色した。染色した細胞は、autoMACS（Miltenyi Biotec）で、CD106とCD90陽性細胞を回収した。

[0098] <慢性心不全モデルラットの作製>

本研究で行った全ての動物実験のプロトコルは、LSIメディエンス（東京、日本）の倫理審査委員会の承認を受けた。なお、全ての動物に苦痛軽減措置を実施した。

ヌードラット（F344/N Jcl-rnu/rnu）8週齢、雄は日本クレア（東京、日本）から購入した。1週間以上の馴化後、動物は実験動物用吸入麻酔器（ソフトランダー（新鋭工業株式会社、埼玉、日本）を用いて、2%イソフルラン（麻酔補助剤；笑気：酸素＝7：3）で吸入麻酔し、刈毛した。すばやく気管挿管を行い、そのまま0.5-2%イソフルラン（麻酔補助剤；笑気：酸素＝7：3）吸入麻酔ガスを人工呼吸器に接続して、麻酔を維持した。人工呼吸管理のもと、仰臥位に固定し、左第3肋骨から第5肋骨までの間で2-3本、肋軟骨の位置で縦方向に切断して開胸した。開創器により、術野を拡大後、心嚢膜を剥離して心臓を露出させた。左心房を持ち上げ、血管用糸付弱弯丸針（6-0：ネスコスーチャー）を用いて左心室の深さ約2mm、長さ4-5mmに糸を通した。糸の両端を合わせてポリ

エチレンチューブで作製したスネアを通し、動脈クレンメを用いて糸を絞り（スネア法）冠動脈を30分間虚血した。30分後、再灌流させ、状態が安定したら、出血がない事を確認し、胸腔ドレナージを行い、筋層及び皮膚を縫合した。皮膚は、皮内縫合を行うが、通常縫合を行った場合には、術後状態を観察しながら抜糸を行った。モデル作製後1週間の細胞投与日前日に、超音波画像診断装置（Xario SSA-660A、東芝メディカルシステムズ、栃木、日本）を用いて心エコーを測定した。左室駆出率（LVEF = $(LVIDd3 - LVIDs3) / LVIDd3$ ）が55%以下の個体を慢性心不全モデルとみなし、線維芽細胞の投与実験を行った。

[0099] <慢性心不全モデルラットへの線維芽細胞の投与>

投与試験当日に凍結保存した各種の線維芽細胞を解凍し、high-glucose DMEM+10%NBCSで希釈し、生存細胞数として、各個体につき、 $2.0 \times 10^6 \text{ cells} / 50 \mu\text{L}$ の細胞懸濁液を投与した。動物は、モデル作製時と同一の手法で麻酔を維持し、人工呼吸管理のもと、梗塞巣の2ヶ所に分けて、30G針付きカテーテルを用いて細胞懸濁液を50 μL 全量投与した。状態が安定した後に、投与液の漏出及び出血がない事を確認し、胸腔ドレナージを行い、筋層及び皮膚を縫合した。皮膚は、皮内縫合を行うが、通常縫合を行った場合には、術後状態を観察しながら抜糸を行った。

[0100] <心臓の採材と組織染色>

細胞投与18週後のラットを犠牲死し、心臓を採材した。採材した心臓は4%パラホルムアルデヒドでの固定後、パラフィン包埋によりパラフィン切片を作成し、また凍結切片を作成した。パラフィン切片は、シリウスレッド（SR）染色、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行い、またin situ hybridizationに用いた。成体由来心臓線維芽細胞投与群はバーチャルスライドスキャナ（NanoZoomer S210、浜松ホトニクス、静岡、日本）で撮像した。胎児由来心臓線維芽細胞投与群はAperio ScanScope slide scannerで撮像

した。SR染色画像は、成体由来心臓線維芽細胞投与群はImage Jを用いて、胎児由来心臓線維芽細胞投与群はHALO (Indica Labs、Albuquerque、NM) で線維化領域を定量した。HE染色画像は定性的スコアリングで次の項目を評価した：Inflammatory cell aggregation、proliferation of fibroblasts、fibrosis、lime deposition、thinning of the left ventricular。病理変化の程度は、変化なし(スコア0)、軽度(スコア1)、中等度(スコア2)、重度(スコア3)として定性的に評価した。in situ hybridizationは、RNAscope Target Probe Rn-Lyve-1-C2 (Bio-Techne、Minneapolis、MN) を用い、メーカー推奨プロトコルに従って染色を行った。なお、プローブの処理はHybEZ Oven (Bio-Techne) で実施した。凍結切片は、抗cardiac troponin T (cTnT) 抗体 (Abcam、Cambridge、UK)、抗prospere-related homeobox 1 (Prox-1) 抗体 (Proteintech、Rosemont、IL)、及び抗Vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) 抗体 (Bioss Antibodies、Woburn、MA) で免疫組織染色を行い、FV1200共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus、東京、日本) にて撮像を行った。

[0101] <統計解析>

NT群と、+CKs群の平均値の比較は、スチューデントのt検定で統計解析を行った。

[0102] <実施例A1：TNF- α 及びIL-4との接触による成体由来心臓線維芽細胞のCD106陽性細胞率向上>

ヒト成体由来心臓線維芽細胞を細胞培養皿にて培養し、NT群と、+CKs群を設けた。すべての群のヒト成体由来心臓線維芽細胞は、平らで紡錘形

の形状であり、典型的な線維芽細胞様の形状であった（図1A）。

フローサイトメトリでCD90、CD106、CD90及びCD106両陽性細胞率（%）を評価したところ、NT群はそれぞれ、48.88%（CD90）、0.20%（CD106）、0.14%（両陽性、DP）であったのに対して、+CKs群はそれぞれ、57.55%（CD90）、50.78%（CD106）、34.76%（DP）となり、CD90陽性細胞率、CD106陽性細胞率、両陽性細胞率（%）が大きく向上した（図1B）。本結果より、TNF- α 及びIL-4を線維芽細胞と接触させることにより、線維芽細胞のCD90、CD106、両陽性細胞率（%）が向上することが示された。

[0103] <実施例A2：TNF- α 及びIL-4との接触により、成体由来心臓線維芽細胞においてADM及び／又はHHEXの発現量が増強した>

すべての群（NT群、+CKs群）の成体由来心臓線維芽細胞から全RNAを抽出し、RNAサンプルの品質チェックを行った後、プローブ検出系（5'ヌクレアーゼ法）によりmRNAコピー数と相関した蛍光強度を検出し、検量線法によりmRNAコピー数の相対量を算出した（N=3）。すべての群の線維芽細胞のADM及びHHEXの遺伝子発現量を、 β -Actinの遺伝子発現量で標準化し、NT群のADM及び／又はHHEXの遺伝子発現量（平均値）を1.00として、Fold increaseで表した。その結果、ADMの発現量は、+CKs群で2.30倍向上したことが示され、有意なmRNAの発現量の差が確認された（図2A）。一方で、HHEXの発現量は、+CKs群で2.58倍向上したことが示され、すべての群間で有意なmRNAの発現量の差が確認された（図2B）。これらの結果から、TNF- α 及びIL-4を線維芽細胞と接触させることにより、線維芽細胞のADM及び／又はHHEXの遺伝子発現量が向上することが示された。

[0104] <実施例A3：TNF- α 及びIL-4と接触させた成体由来心臓線維芽細胞は心臓リンパ管の新生効果が高い>

TNF- α とIL-4で処理した成体由来心臓線維芽細胞のリンパ管新生効果を評価するため、リンパ管内皮細胞を含有するヒト心臓血管内皮細胞を拡大培養した。内皮細胞マーカーであるVE-cadherinとPDPNに両陽性のリンパ管内皮細胞を用いて試験を行った。

心臓由来細胞から回収したヒトリンパ管内皮細胞と各種のヒト成体由来心臓線維芽細胞を共培養し、免疫蛍光染色によってリンパ管を観察したところ、未処理の成体由来心臓線維芽細胞（NT）はリンパ管が分断された不連続な脈管形成を示すのに対し、TNF- α （50 ng/mL）とIL-4（2 ng/mL）を添加し、24時間培養した成体由来心臓線維芽細胞（+CKs）は、分断されることのない連続的な脈管を形成することが明らかとなった（図3A）。また、定量解析の結果からも、+CKsは有意に成熟リンパ管の全長を伸長し、NTに対して2.21 $\pm$ 0.76倍だった（図3B）。ジャンクション数も有意な増大が認められ、+CKsはNTに対し、1.84 $\pm$ 0.65倍増大していた（図3B）。本結果から、TNF- α とIL-4で処理した成体由来心臓線維芽細胞はリンパ管新生効果が高い細胞であることが明らかとなった。

[0105] <実施例A4：TNF- α 及びIL-4と接触させ、CD90及びCD106両陽性となった成体由来心臓線維芽細胞は線維症治療効果を有する>

リンパ管新生は臓器組織の障害に伴い形成される瘢痕形成（線維症）を治療できることが多くの先行研究により報告されている。本効果を確認するため、まず次の成体由来心臓線維芽細胞を用意した（図4）：未処理の成体由来心臓線維芽細胞（A-HCF）；TNF- α （50 ng/mL）とIL-4（2 ng/mL）を添加し、72時間培養した成体由来心臓線維芽細胞（uA-HCF）；uA-HCFのうちCD90とCD106両陽性である細胞集団を、CD90を指標としてMACSでセルソーティングし、回収した細胞群（uA90-HCF）。なお、天然に存在するCD90及びCD106両陽性心臓線維芽細胞との比較のために、胎児由来心臓線維芽細胞を、CD106を指標としてMACSでセルソーティングし、回収した（F-VC

F)。各々の線維芽細胞の特徴をFCMで評価した結果を図4に示す。

慢性心不全モデルラットに次の細胞を投与し、シリウスレッド染色で線維症領域の観察を行った(図5)。試験1：A-HCF投与群；uA-HCF投与群；uA90-HCF投与群；Control群(培地だけを投与した群)；Sham群(偽手術のみを行い心不全を発症していない群)の各群において顕微鏡観察を行った(図5A及びB)。試験2：F-VCF投与群、Control群(培地だけを投与した群)の各群において顕微鏡観察を行った(図5C及びD)。その結果、TNF- α (50 ng/mL)とIL-4 (2 ng/mL)を添加した線維芽細胞は心筋線維化領域の面積が少なく、特にTNF- α とIL-4の効果によってCD90とCD106両陽性となった細胞集団のみを投与した群(uA90-HCF)では著しく線維化領域が小さかった。興味深いことに天然に存在するCD90及びCD106両陽性心臓線維芽細胞(F-VCF)投与群を投与した結果では線維化領域の治療効果は認められなかった。以上の結果から、TNF- α (50 ng/mL)とIL-4 (2 ng/mL)を添加し、人工的に作製したリンパ管新生線維芽細胞の線維症に対する機能性の違いを見出すことができた。また、各種の成体由来心臓線維芽細胞を投与した群のHE染色画像をもとに病理評価を行ったところ、SR染色結果と同様に、TNF- α (50 ng/mL)とIL-4 (2 ng/mL)を添加した線維芽細胞はProliferation of fibroblast、Fibrosis、Lime depositionのスコアが減少傾向にあり、特にTNF- α とIL-4の効果によってCD90とCD106両陽性となった細胞集団のみを投与した群(uA90-HCF)では著しくそれぞれの値が減少した(図6)。

次に、in situ hybridizationで、リンパ管細胞内皮マーカーであるlymphatic vessel endothelial receptor 1 (Lyve-1)を染色し、心筋梗塞巣に動員するリンパ管内皮細胞を観察した。その結果、SR染色やHE染色の結果と同様に、TNF- α (50 ng/mL)とIL-4 (2 ng/mL)を添加

した線維芽細胞はリンパ管内皮細胞の動員効果（リンパ管新生効果）が高く、特にTNF- α とIL-4の効果によってCD90とCD106両陽性となった細胞集団のみを投与した群（uA90-HCF）では著しくその効果が増大した（図7）。

[0106] <実施例A5：CD90及びCD106両陽性の心臓線維芽細胞による生体内のリンパ管新生効果>

慢性心不全モデルラットに、線維芽細胞（A-HCF、uA-HCF、又はuA90-HCF）又はVehicle Control（培地のみ）を経心外膜心筋内投与し、各群の生体内におけるリンパ管新生を観察した（図8）。免疫組織化学的観察の結果、uA90-HCF投与群でのみリンパ管内皮細胞（LEC）マーカーであるProx-1及びVEGFR3の局在が確認できたが、他の群ではLECの局在が確認できなかった（図8）。

[0107] <実施例B：ADM高発現の線維芽細胞に関する実施例>

<ヒト肺線維芽細胞の培養とADM高発現且つVCAM-1発現向上型線維芽細胞の作製>

ヒト成体肺線維芽細胞はPromoCell（Heidelberg、Germany）から購入し、5%（v/v）NBCS（Newborn Calf Serum）を添加した線維芽細胞培養培地（HFD-1（+）medium（株式会社細胞科学研究所、宮城、日本）で拡大培養した。ヒト肺微小血管内皮細胞はLonza（Basel、Switzerland）から購入し、EBM-2培地（Lonza）で拡大培養した。明視野観察は、Leica DMI1（Leica GmbH、Wetzlar、Germany）で行った。

ADM高発現且つVCAM-1発現向上型線維芽細胞を作製するために、ヒト肺線維芽細胞を細胞培養皿にて拡大培養し、未処理で培養した群（Control）と、TNF- α （50ng/mL）（Peprotech、Cranbury、NJ）とIL-4（2ng/mL）（富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本）を2剤混合で処置した群（+Factor-X）

を設けた。すべての群は、5%NBCSを添加したHFD M-1 (+)を基本培地とし、1日間(24時間)培養した。

[0108] <フローサイトメトリ>

ヒト肺線維芽細胞は、ヒトCD90-PE (Miltenyi Biotec、Bergisch Gladbach、Germany) 及びBV421 マウス抗ヒトCD106 (BD Biosciences、San Jose、CA) で免疫蛍光染色した。アイソタイプコントロールは、REAコントロール(S)-PE (Miltenyi Biotec) 及びBV421 マウスIgG1 κ アイソタイプコントロール (BD Biosciences) を用いた。一方で、マウス肺線維芽細胞は、マウスCD90.2-PE (Miltenyi Biotec) 及びマウスCD106 (VCAM-1)-APC (Miltenyi Biotec) で免疫蛍光染色した。アイソタイプコントロールは、ラットIgG2b-PE (Miltenyi Biotec) 及びラットIgG2a-APC (Miltenyi Biotec) を用いた。細胞は生細胞のまま抗体と30分間、4℃で反応させた。免疫蛍光染色した細胞はフローサイトメーター (MACSQuant Analyzer 10、Miltenyi Biotec) で解析した。FSC-A及びSSC-Aで細胞領域を認識後、CD90及びCD106タンパク質に対する陽性細胞率(%)、細胞数換算)を評価した。

[0109] <肺線維芽細胞の遺伝子発現量評価>

使用したプライマーは、NCBIに公開されているヒトmRNA配列 (VEGF-C, NM_005429.5 (配列番号13); ADM, NM_001124.3 (配列番号1); ACTB (β -Actin), NM_001101.5 (配列番号3)) およびマウスmRNA配列 (VEGF-C, NM_009506.2 (配列番号14); ADM, NM_009627.2 (配列番号15); GAPDH, NM_001289726.1 (配列番号16)) を基に、最近接塩基対法で計算されるアニール温度が60℃前後であって、1つ以上のイントロンを挟むように配列を設計した (配列番号1

7～18（ヒトVEGF-Cプライマー）、配列番号4～5（ヒトADMプライマー）、配列番号8～9（ヒトACTBプライマー）、配列番号19～24（マウスVEGF-Cプライマー、マウスADMプライマー、マウスGAPDHプライマー））。5'ヌクレアーゼプローブ配列も同じく公開ヒト及びマウスmRNA配列データを基に設計しており、このプローブのアニール温度はプライマーより5℃以上高く、またこのプローブの結合位置が、測定対象の遺伝子上における、フォワードプライマーの結合位置とリバースプライマーの結合位置の間の塩基に結合するように設計した。またプローブの5'末端には蛍光色素6-FAMを、そこから9塩基分3'側にはクエンチャー色素ZEN、そして3'末端には2つ目のクエンチャー色素Iowa Black FQを結合させたデュアルクエンチャープローブとし、RT-PCR解析におけるバックグラウンドシグナルを低減させている（配列番号25（ヒトVEGF-Cプローブ）、配列番号10（ヒトADMプローブ）、配列番号12（ヒトACTBプローブ）、配列番号26～28（マウスVEGF-Cプローブ、マウスADMプローブ、マウスGAPDHプローブ））。以上のプライマーとプローブは全てIntegrated DNA Technologies社に合成を委託した（表2）。

[表2]

表2. プライマーとプローブの配列情報

遺伝子		配列
human VEGF-C	Forward Primer	5'-gtacctcagcaagacgttatttg-3' (配列番号 17)
	Reverse Primer	5'-atcggcaggaagtgtgattg-3' (配列番号 18)
	Probe	56-FAM/aattacagt/ZEN/gcctctctctcaaggcccc/3IABkFQ (配列番号 25)
human ADM	Forward Primer	5'-atgtacctgggttcgctcgc-3' (配列番号 4)
	Reverse Primer	5'-ccacgactcagagcccactt-3' (配列番号 5)
	Probe	56-FAM/ttcgaaact/ZEN/ccgacgcgacatcc/3IABkFQ (配列番号 10)
human β -Actin	Forward Primer	5'-accttctacaaatgagctgcg-3' (配列番号 8)
	Reverse Primer	5'-cctggatagcaacgtacatgg-3' (配列番号 9)
	Probe	56-FAM/atctgggtc/ZEN/atcttctcgcggttg/3IABkFQ (配列番号 12)
mouse VEGF-C	Forward Primer	5'-gcttcttgtctctggcgtg-3' (配列番号 19)
	Reverse Primer	5'-gacacagaccgcaactgc-3' (配列番号 20)
	Probe	56-FAM/tctttgcct/ZEN/tcaaaagccttgacctcgcc/3IABkFQ (配列番号 26)
mouse ADM	Forward Primer	5'-ggggccagatactccttcgca-3' (配列番号 21)
	Reverse Primer	5'-ctggcggtagcgtttgacac-3' (配列番号 22)
	Probe	56-FAM/tccgaaaga/ZEN/agtgaataagtgggcgc/3IABkFQ (配列番号 27)
mouse GAPDH	Forward Primer	5'-gaggccggtgctgagtatg-3' (配列番号 23)
	Reverse Primer	5'-acccttttggtccaccct-3' (配列番号 24)
	Probe	56-FAM/tcaagtggg/ZEN/ccccggcctt/3IABkFQ (配列番号 28)

肺線維芽細胞からの全RNAの抽出は、Qiagen RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて行った。その際、細胞ライセートの破砕はQIAshredder (QIAGEN) を用いて行い、DNase処理を含めたその他の操作は、キットのメーカーの推奨プロトコルに従った。得られた全RNAの濃度測定は、Nanodrop One/One分光光度計 (Thermo Fisher Scientific

）を用いて、波長260nmにおける吸光度を測定した。同時に、タンパク質の混入度を示す A_{260}/A_{280} の値を算出し、 $A_{260}/A_{280} > 2.0$ であることを確認した。

リアルタイム定量RT-PCRは、One Step PrimeScript 3 RT-qPCR Mix, with UNG Kit (Takara)を用いて、逆転写反応とRT-PCRを同じチューブでまとめて行った。反応は、1×One Step PrimeScript 3 RT-qPCR Mix, with UNG, 0.2 μM フォワード&リバースプライマー、0.2 μM 特異的プローブ、10 ng（ヒト肺線維芽細胞）または100 ng（マウス肺線維芽細胞） 鋳型RNA溶液を含む反応液（総量15 μL）で行った。最初に52℃で5分間加温することにより逆転写反応を行い、その後、逆転写酵素を失活させるために95℃で10秒間加熱した。続いて95℃で5秒間、60℃で30秒間を加熱するサイクルを40回繰り返し、サイクルごとの蛍光強度を測定した。一連の反応と測定は、7500 Rast Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。同時に、検量線作成のための標品として、ADMとVEGF-Cの発現を確認済のサンプルより抽出したRNA溶液を用い、1 μgから10倍ずつ4段階希釈したRNA溶液を用いて上記の測定を行った。すべてのサンプルは、N=3で測定を行った。

PCR終了後、得られた増幅曲線について標的遺伝子ごとに蛍光強度のベースラインと閾値を設定し、その閾値に蛍光シグナルが到達したサイクル数（Ct値）をサンプルごとに求めた。それぞれの遺伝子の検量線は、相関係数が0.99以上で増幅効率が85%以上であり検量線として十分と考えられたため、対象サンプルのCt値を検量線に当てはめ目的とする遺伝子のmRNA含有量を相対値として算出した。この相対値を同様にして算出したハウスキーピング遺伝子（β-ActinまたはGAPDH）の値で標準化した。また、線維芽細胞の遺伝子発現量は、ハウスキーピング遺伝子発現量で標準化したControlの遺伝子発現量を1として、Fold incr

e a s eで表した。

[0110] <リンパ管の脈管形成アッセイ>

リンパ管の脈管形成アッセイは、当業者に既知の手法により、ヒト肺由来細胞から回収したリンパ管内皮細胞と各種ヒト肺線維芽細胞を共培養し、各種肺線維芽細胞による肺リンパ管新生効果の評価を行った（非特許文献15）。具体的には、ヒト肺由来細胞から回収したリンパ管内皮細胞と各種ヒト成体由来肺線維芽細胞を $2.5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ の濃度で1:9の割合で播種し、EBM-2培地で3日間共培養した。共培養後、細胞は4%パラホルムアルデヒドで固定し、免疫蛍光染色を行った。一次抗体は、抗VE-Cadherinウサギポリクローナル抗体（abcam、Cambridge、UK）と抗Vimentinマウスポリクローナル抗体（abcam）を使用した。二次抗体は、ヤギ抗ウサギIgG H&L（Alexa Fluor 488）（abcam）とヤギ抗マウスIgG H&L（Alexa Fluor 647）（abcam）を使用した。核染色はHoechst 33258 solution（同仁化学研究所、熊本、日本）で行った。染色サンプルは、IN Cell Analyzer 2200（Cytiva、Marlborough、MA）で撮影した。

[0111] <マウス肺線維芽細胞の単離・初代培養とADM高発現且つVCAM-1発現向上型線維芽細胞の作製>

本研究で行った全ての動物実験は、ナノ医療イノベーションセンター（神奈川、日本）の倫理審査委員会の承認を受けた（動物実験計画書承認番号：A20-003）。なお、全ての動物に苦痛軽減措置を実施した。

マウスC57BL/6J（オス、10週齢）は日本チャールス・リバー（神奈川、日本）から購入した。マウス成体由来肺線維芽細胞は、肺組織から回収したプライマリー細胞であり、このプライマリー細胞を拡大培養したものである。具体的には、回収した成体マウス肺組織（C57BL/6マウス、10週齢）をメスで1mm角にミンスし、0.14 Wunsch units/mLのLiberase TM（Sigma Aldrich、S

t. Louis, MO) を添加して 37℃ インキュベータ内で酵素処理を行い、プライマリー肺線維芽細胞の単離・培養を行った。なお、培養培地は 15% FBS を添加した DMEM/F12 培地を用いた。明視野観察は、Leica DMI1 (Leica GmbH, Wetzlar, Germany) で行った。

ADM 高発現且つ VCAM-1 発現向上型成体由来肺線維芽細胞 (VPF) を作製するために、マウス成体由来肺線維芽細胞を細胞培養皿にて拡大培養し、未処理で培養した群 (Control) と、リコンビナントマウス TNF- α (50 ng/mL) (Peprotech) とリコンビナントマウス IL-4 (2 ng/mL) (Peprotech) を 2 剤混合で処置した群 (+Factor-X) を設けた。すべての群を、15% FBS を添加した DMEM/F12 培地を基本培地とし、3 日間 (72 時間) 培養することで ADM 高発現且つ VCAM-1 発現向上型成体由来肺線維芽細胞 (VPF) を作成した。この VPF を後述の実施例 B3 及び B4 で用いた。

また、同様の手法により、日本チャールス・リバー (神奈川、日本) から購入した C57BL/6 マウス (メス、10 週齢) から肺を採材し、初代培養により肺線維芽細胞 (PF) の拡大培養を行い、さらに ADM 高発現且つ VCAM1 発現向上型 PF (VPF) を作製した。この VPF を後述の実施例 B5 で用いた。

なお、本明細書や図等において、マウス由来の PF を mPF ということもあり、ラット由来の PF を rPF ということもある。また、マウス由来の VPF を mVPF ということもあり、ラット由来の VPF を rVPF ということもある。

[0112] <マウス間質性肺炎・肺線維症モデルの作製>

間質性肺炎及び肺線維症に対する ADM 高発現且つ VCAM-1 発現向上型成体由来肺線維芽細胞 (VPF) の治療効果を評価するため、ブレオマイシン誘導性マウス C57BL/6J モデルを日本チャールス・リバーから購入した。ブレオマイシンによる間質性肺炎及び肺線維症の誘導は当業者に既

知の手法により行った（非特許文献16）。具体的には、ブレオマイシン溶液（0.9%生理食塩液中、1U/ml）をliquid MicroSprayer（PennCentury、Wyndmoor、PA）に充填し、50mL中、2mg/kgの濃度でマウス（オス、9週齢）の肺に深麻酔下で経気道投与し、ブレオマイシン溶液の投与7日後のマウスを間質性肺炎・肺線維症モデルとみなした。

[0113] <マウス間質性肺炎・肺線維症モデルへの細胞投与及び投与後のVPFの治療効果の評価>

間質性肺炎・肺線維症モデルマウスに、線維芽細胞を尾静脈経由で静脈投与した。各種線維芽細胞は、 $1.0 \times 10^5 \text{ cells} / 100 \mu\text{L}$ 生理食塩液/bodyで投与した。それぞれのマウスにmPF、mVPFまたはコントロールとしての生理食塩液（Ctrl）を投与した。

各細胞の治療効果は、Kaplan-meier法による生存分析と病理学的評価により行った。実施例B3及びB4においては、試験終了時である細胞投与4週後（28日後）に動物を犠牲死して肺を採材した。採材した肺は、4%パラホルムアルデヒドでの固定後、パラフィン包埋を行った。パラフィン切片はシリウスレッド（SR）染色し、バーチャルスライドスキャナ（NanoZoomer S210、浜松ホトニクス、静岡、日本）で撮像した。また、実施例B5においては、試験終了時である細胞投与2週後（14日後）に動物を犠牲死して肺を採材した。採材した肺は、4%パラホルムアルデヒドでの固定後、パラフィン包埋を行った。パラフィン切片はMasson's Trichrome染色した後にBZ-X710（Keyence、大阪、日本）で撮像した。撮像した画像は、ImageJ softwareで線維化領域の定量を行った。

[0114] <ラット肺線維芽細胞の初代培養とADM高発現且つVCAM-1発現向上型線維芽細胞の作製>

日本チャールス・リバー（神奈川、日本）から購入したWKY/NCrl CrIjラット（メス、6週齢）から肺を採材し、初代培養によりラット肺

線維芽細胞 (rPF) の拡大培養を行った。具体的には、プライマリーにより回収したラット肺組織をメスで1mm角にミンスし、 $0.14 \text{ Wunsc units/mL}$ のLiberase TM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) を添加して37℃インキュベータ内で酵素処理を行い、DMEM (Low Glucose) で拡大培養を行った。

ADM高発現且つVCAM-1発現向上型rPF (rVPF) は、上述のmVPFの作製手法と同様の手法で作製した。具体的には、rPFにラット組換えTNF- α 及びIL-4を添加し(最終濃度: 50 ng/mL TNF- α 、 2 ng/mL IL-4)、72時間の培養を行うことで作製した。rVPFのVCAM-1陽性細胞率はMACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) でフローサイトメトリにより評価した。

[0115] <ラット間質性肺炎・肺線維症モデルの作製>

病態モデルラットの作出は、日本チャールス・リバー(神奈川、日本)に委託した。BN/CrI CrI jラット(オス、6週齢)にブレオマイシン溶液(5 mg/kg 生理食塩液)をLiquid MicroSprayerで単回気管内噴霧投与し、間質性肺炎・肺線維症モデルラットを作製した。なお、下記の理由により、このラットの系統を選択した:(1)BNラットとWKYラットはそれぞれ近交系統で免疫学的に乖離しており、両系統の選択は他家細胞医薬品の有効性試験として広く使用されている;(2)本系統において間質性肺炎・肺線維症モデル作製の報告がある(非特許文献17)。

[0116] <ラット間質性肺炎・肺線維症モデルへの細胞投与及び投与2週後の治療効果の評価>

ブレオマイシン溶液を投与して5日後の間質性肺炎・肺線維症モデルラットに、次の種類の細胞を $5.0 \times 10^5 \text{ cells/500 } \mu\text{L}$ 生理食塩液/bodyで経静脈投与した。それぞれのラットにrPF、rVPFまたはコントロールとしての生理食塩液(Ctrl)を投与した。

各細胞の治療効果は、Kaplan-meier法による生存分析と病理学的評価により行った。試験終了時である細胞投与2週後（14日後）に動物を犠牲死して肺を採材した。採材した肺は、4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋を行った。パラフィン切片はMasson's Trichrome染色した後にBZ-X710（Keyence、大阪、日本）で撮像した。撮像した画像は、ImageJ softwareで線維化領域の定量を行った。

[0117] <ヒト肺線維芽細胞の培養とVCAM-1発現向上型線維芽細胞の作製>

ヒト成体肺線維芽細胞はPromoCell（Heidelberg、Germany）から購入し、5%（v/v）NBCS（Newborn Calf Serum）を添加した線維芽細胞培養培地（HFDm-1（+）medium（株式会社細胞科学研究所、宮城、日本）で拡大培養した。

VCAM-1発現向上型線維芽細胞を作製するために、ヒト肺線維芽細胞を細胞培養皿にて拡大培養し、未処理で培養した群（hPF）と、TNF- α （50 ng/mL）（Peprtech、Cranbury、NJ）とIL-4（2 ng/mL）（富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本）を2剤混合で処置した群（hPF+CKs）を設けた。すべての群は、5%NBCSを添加したHFDm-1（+）を基本培地とし、3日間（72時間）培養した。hVPFはhPF+CKsを抗CD106（VCAM-1）-Biotin, human抗体（Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany）とAnti-Biotin microBeads（Miltenyi Biotec）で免疫染色し、autoMACS pro Separator（Miltenyi Biotec）でセルソーティングにより回収した。

[0118] <統計解析>

実験結果は平均値±標準偏差（SD）で表した。有意差検定はKaplan-meier法による生存分析はログランク（マンテル・コックス）検定及びログランク・トレンド検定で算出し、その他の実験はスチューデントの

t 検定で算出した。P<0.05を有意差とみなした。

また、線維化領域の統計解析及びフローサイトメトリによる細胞特性解析は、GraphPad Prism 9 for Windows 64-bit, Version 9.2.0 (332)で行った。マウスへの同系移植実験においては、ordinary one-way ANOVAを実施し、Ctrlを基準としたmultiple comparisonsをDunnett's multiple comparisons testで実施した。ラットへの同種移植実験においては、ordinary one-way ANOVAを実施し、各群のmultiple comparisonsをTukey's multiple comparisons testで実施した。ヒト肺線維芽細胞の細胞特性解析においては、2-way ANOVAを実施し、各群のmultiple comparisonsをTukey's multiple comparisons testで実施した。いずれの試験においても、P<0.05を有意差とみなした。

[0119] <実施例B1：ADM高発現且つVCAM-1発現向上型線維芽細胞のリンパ管新生能>

ヒト成体由来肺線維芽細胞は細胞培養皿にて接着培養により拡大培養した。明視野観察により、培養したヒト成体由来肺線維芽細胞は紡錘型の線維芽細胞様形態であることを示した(図9A)。培養したヒト成体由来肺線維芽細胞にTNF- α (50 ng/mL)とIL-4 (2 ng/mL)を2剤混合(Factor-X)で添加して24時間培養し(図9B)、フローサイトメトリ(FCM)で線維芽細胞マーカーであるCD90とVCAM-1(CD106)の陽性細胞率を評価した(図9C及び9D)。ヒト成体由来肺線維芽細胞はほぼ全ての細胞がCD90に陽性で、未処理のヒト成体由来肺線維芽細胞(Control)のCD90陽性細胞率は96.00 $\pm$ 4.33%であったのに対し、TNF- α とIL-4を添加したヒト成体由来肺線維芽細胞(+Factor-X)のCD90陽性細胞率は95.56 $\pm$ 4.

51%だった。また、ControlのCD106陽性細胞率が $6.03 \pm 1.91\%$ であったのに対し、+Factor-XのCD106陽性細胞率は $31.96 \pm 5.78\%$ だった。CD90とCD106の両陽性(Double(+))細胞率は、Controlが $5.86 \pm 1.94\%$ であったのに対し、+Factor-Xは $31.25 \pm 6.27\%$ だった。これらの結果から、TNF- α とIL-4は有意にヒト肺線維芽細胞のCD106陽性細胞率を向上することが明らかとなった。

次に、Factor-XによってCD106陽性細胞率の向上したヒト成体由来肺線維芽細胞のリンパ管新生能の評価を行うため、リンパ管新生因子として代表的なVEGF-CとADMの遺伝子発現レベルをRT-qPCRで評価した(図9E)。その結果、VEGF-CとADMの遺伝子発現量は、Factor-Xの添加によってそれぞれ 2.99 ± 0.39 倍、 2.46 ± 0.69 倍高く発現しており、両群には有意な差が認められた。以上の結果から、TNF- α とIL-4によってVCAM-1発現レベルを向上させたヒト肺線維芽細胞はリンパ管新生遺伝子を高発現しており、肺のリンパ管新生能に富む細胞であることが示唆された。

[0120] <実施例B2：ADM高発現且つVCAM-1発現向上型線維芽細胞のリンパ管新生効果>

ヒト由来のADM高発現且つVCAM-1発現向上型成体由来肺線維芽細胞(VPF)のリンパ管新生効果を評価するため、ヒト肺由来細胞から回収したリンパ管内皮細胞を含有するヒト肺微小血管内皮細胞を拡大培養した。明視野観察により、培養した細胞は、敷石状の形態を示し(図10A)、FCM解析により本細胞は内皮細胞マーカーであるVE-Cadherinに $99.71 \pm 0.09\%$ 陽性で(N=3)、リンパ管内皮細胞マーカーであるPDPNに $96.77 \pm 0.37\%$ 陽性であることが明らかとなった(N=3)(図10B)。内皮細胞マーカーであるVE-Cadherinとリンパ管内皮細胞マーカーであるPDPNに両陽性のリンパ管内皮細胞を用いて試験を行った。

ヒト肺由来細胞から回収したリンパ管内皮細胞と各種ヒト成体由来肺線維芽細胞を共培養し、免疫蛍光染色によってリンパ管を観察したところ、未処理の成体由来肺線維芽細胞はリンパ管が分断された不連続な脈管形成を示すのに対し、 $\text{TNF-}\alpha$ (50 ng/mL) と IL-4 (2 ng/mL) を添加し、24時間培養した成体由来肺線維芽細胞 (+Factor-X) は、分断されることのない連続的な脈管を形成することが明らかとなった (図10C)。本結果から、 $\text{TNF-}\alpha$ と IL-4 で処理した肺線維芽細胞はリンパ管新生効果が高い細胞であることが明らかとなった。

[0121] <実施例B3：ADM高発現且つVCAM-1発現向上型線維芽細胞による間質性肺炎・肺線維症の治療効果>

リンパ管新生効果の高い $\text{TNF-}\alpha$ と IL-4 で処理した成体由来肺線維芽細胞の間質性肺炎・肺線維症の治療効果を評価するため、同系移植実験をデザインした。C57BL/6成体マウスから肺由来の線維芽細胞を回収し、拡大培養を行った。明視野観察により、培養したプライマリー成体由来肺線維芽細胞は紡錘型の線維芽細胞様形態であることを示した (図11A)。培養したマウス成体由来肺線維芽細胞に $\text{TNF-}\alpha$ (50 ng/mL) と IL-4 (2 ng/mL) を添加して3日間培養し、それぞれのマウス成体由来肺線維芽細胞のCD106陽性細胞率をFCMにより評価した (図11B)。その結果、Controlは $84.89 \pm 11.42\%$ であったのに対し ($N=3$)、Factor-Xを添加した線維芽細胞は $96.52 \pm 3.32\%$ であった ($N=3$)。本結果から、マウス肺線維芽細胞は、ヒト肺線維芽細胞と比較して通常状態でもCD106陽性細胞率が高めであるが、 $\text{TNF-}\alpha$ と IL-4 は種を超えてCD106陽性細胞率を向上できることが分かった。

マウス由来のADM高発現且つVCAM-1発現向上型成体由来肺線維芽細胞 (VPF) のリンパ管新生能を評価するために、それぞれの成体由来肺線維芽細胞のVEGF-CとADMの遺伝子発現量をRT-qPCRで評価したところ、ヒト成体由来肺線維芽細胞と同様に、VEGF-CとADMの

遺伝子発現量は、 $\text{TNF-}\alpha$ (50 ng/mL) と IL-4 (2 ng/mL) (Factor-X) の添加によってそれぞれ 4.11 ± 0.59 倍 ($N=3$)、 1.70 ± 0.27 倍 ($N=3$) 高く発現しており、両群には有意な差が認められた (図 11C)。本結果から、マウス肺線維芽細胞はヒト肺線維芽細胞と同様に $\text{TNF-}\alpha$ と IL-4 によってリンパ管新生遺伝子を有意に高発現させることが明らかとなり、マウス由来の VPF もリンパ管新生に富む細胞であることが明らかとなった。

[0122] <実施例 B4：ADM 高発現且つ VCAM-1 発現向上型線維芽細胞による間質性肺炎・肺線維症の治療効果>

間質性肺炎・肺線維症に対する ADM 高発現且つ VCAM-1 発現向上型成体由来肺線維芽細胞 (VPF) の治療効果を評価するため、マウス間質性肺炎・肺線維症モデルに図 12A に記載の実験スケジュールで細胞を投与した。モデル動物は次の 3 群を設けた：マウス成体由来肺線維芽細胞投与群 (+PFs、 $N=8$)、マウス VPF 投与群 (+VPFs、 $N=10$)、生理食塩水投与群 (Control、 $N=10$)。

Kaplan-meier 法による生存分析で各群の生命予後に対する効果を評価したところ、Day 28 の生存率はそれぞれ 40.00% (Control)、 37.50% (+PFs)、 80.00% (+VPFs) だった (図 12B)。また、生存期間中央値はそれぞれ 14.5 日 (Control)、14 日 (+PFs)、80% 個体生存のため定義不可 (+VPFs) であり、VPF 投与による生命予後の改善が認められた。

細胞投与 4 週後に肺を回収し、各群の肺組織をシリウスレッド染色し、病理学的観察により肺胞構造と線維症の進行の程度を評価したところ、Control 群と +PFs 群は肺胞構造の明瞭な区画が観察されず、気管支周辺を中心に線維化領域が確認されたのに対し、+VPFs 群は明瞭な肺胞区画が観察され、線維化領域は観察されなかった (図 12C)。

[0123] <実施例 B5：マウス間質性肺炎・肺線維症モデルへの mVPF の投与及び投与 2 週後の治療効果の評価>

さらに、マウス間質性肺炎・肺線維症モデルマウスにそれぞれm P F、m V P Fまたは生理食塩液（C t r l）を投与し、投与後2週間の生存率を比較評価したところ、C t r l群はD a y 1 0とD a y 1 4に2例ずつの死亡が確認され、生存率は63.64%を示した（7/11例）（図13A）。一方で、m P F投与群はD a y 7とD a y 9に1例ずつの死亡が確認され、生存率は71.43%（5/7例）であった。さらに、m V P F投与群では、1例も死亡が確認されず、生存率は100%だった（5/5例）。本結果から、m V P Fの間質性肺炎・肺線維症に対する高い生存率改善効果が示唆された。

次に、細胞投与14日後に採材した肺組織のM a s s o n' s T r i c h r o m e染色を実施し、病理観察を行ったところ、m V P F投与群が最も少ない線維症領域を示し、正常な肺胞構造を示すことが明らかとなった（図13B）。また、各群の線維化領域を定量評価したところ、m V P F投与群が最も線維化領域が少なく、C t r l群と比較して有意にその領域が小さいことが明らかとなった（図13C）。また、細胞投与0日の個体と比較し、C t r l群は有意に線維化領域が増大したのに対し、その他の群（m P F投与群、m V P F投与群）では有意差が見られなかった。また、m P F投与群と比較して、m V P F投与群は線維化領域が小さいことも分かった。これらの結果から、m V P Fの同系移植・投与はブレオマイシン投与によるマウス間質性肺炎・肺線維症モデルの生存率を高め、線維化の病態進行を抑制する働きがあることが分かった。

[0124] <実施例B6：ラット肺線維芽細胞の単離及びV C A M-1陽性ラット肺線維芽細胞の作製>

W K Y / N C r l C r l jラットから肺線維芽細胞（r P F）を単離し、D M E M（L o w G l u c o s e）培地で拡大培養を行った（図14A）。次に、r P Fにラット組換えT N F- α （終濃度：50ng/mL）及びI L-4（終濃度：2ng/mL）を添加しr V P Fの作製を試みた（図14B）。F C M解析により、r P FはV C A M-1（C D 1 0 6）陽性細胞

率が25.18%であったのに対し、TNF- α 及びIL-4を添加し作製したrVPFは80.02%の陽性細胞率を示した(図14C)。従って、rPFはmPFと同様にTNF- α 及びIL-4に応答性を示し、rVPFを作製できることが分かった。

[0125] <実施例B7：ラット間質性肺炎・肺線維症モデルへのrVPFの投与及び投与2週後の治療効果の評価>

ラット間質性肺炎・肺線維症モデルマウスへそれぞれrPF、rVPF又は生理食塩液(Ctrl)を投与し、投与後2週間の生存率を比較評価したところ、ラットモデルはマウスモデルと異なり、細胞または生理食塩液投与後2週間ではどの群も死亡及び瀕死個体は確認されなかったため、各群間の生存率に差は見られなかった。

一方で、細胞投与14日後に採材した肺組織のMasson's Trichrome染色を実施し、病理観察を行ったところ、各群間に大きな違いが確認された。ブレオマイシン投与後5日の細胞投与前の肺(BLM)で確認された広範囲の線維症像は、生理食塩液投与(Ctrl)によって更に悪化し、肺全体で線維化及び異常な構造形成を示すことが分かった(図15A及び15B)。一方で、rPF及びrVPF投与群では、線維化及び肺の異常な構造形成は限局的にしか確認されず、Ctrlよりも有意に線維化領域が少なかった。その中でも、rVPF投与群は細胞投与前よりも線維化領域が有意に減少しており、線維化領域の改善効果を有することが分かった(図15A及び15B)。これは、マウスへの同系移植実験の結果と類似しており、VPFは自家細胞医薬品としても他家細胞医薬品としても、肺線維症に対する改善・予防効果が示唆された。

[0126] <実施例B8：VCAM-1発現向上型ヒト肺線維芽細胞の細胞特性解析>

ヒト成体由来肺線維芽細胞(hPF)は細胞培養皿にて接着培養により拡大培養した。培養したhPFにTNF- α (50ng/mL)とIL-4(2ng/mL)を2剤混合(Factor-X)で添加して72時間培養し、hPF+CKsを作製した。hPF+CKsはVCAM-1(CD106

）を指標にセルソーティングし、hVPFを作製した。

フローサイトメトリ（FCM）で線維芽細胞マーカーであるCD90とVCAM-1（CD106）の陽性細胞率を評価した（図16A）。ヒト成体由来肺線維芽細胞はほぼ全ての細胞がCD90に陽性で、hPFのCD90陽性細胞率は $99.68 \pm 0.06\%$ （N=5）であったのに対し、hPF+CKsのCD90陽性細胞率は $98.81 \pm 0.51\%$ （N=5）であった。また、hVPFのCD90陽性細胞率は $99.08 \pm 0.41\%$ （N=5）であり、各群に有意差は認められなかった（図16B）。

一方で、hPFのVCAM-1（CD106）陽性細胞率は $15.49 \pm 2.52\%$ （N=5）であったのに対し、hPF+CKsのCD106陽性細胞率は $31.38 \pm 3.41\%$ （N=5）であった。また、hVPFのCD106陽性細胞率は $98.11 \pm 1.01\%$ （N=5）であり、hPF+CKsはhPFよりも有意にCD106陽性細胞率が高く、hVPFはhPF+CKsよりも更に有意に陽性細胞率が高いことが分かった（図16B）。

CD90とCD106の両陽性細胞率（DP）も同様に、hPFのDPは $15.38 \pm 2.59\%$ （N=5）であったのに対し、hPF+CKsのDPは $31.21 \pm 3.30\%$ （N=5）であった。また、hVPFのDPは $97.47 \pm 1.18\%$ （N=5）であり、hPF+CKsはhPFよりも有意にDPが高く、hVPFはhPF+CKsよりも更に有意にDPが高いことが分かった（図16B）。

[0127] 以上より、TNF- α とIL-4によって処理した線維芽細胞は、線維芽細胞のADM高発現且つVCAM-1陽性細胞率を向上すること、またADM高発現且つVCAM-1の発現を向上した線維芽細胞は、リンパ管新生能が向上するため、連続的なリンパ管の脈管形成を促進することが明らかとなった。そして当該線維芽細胞、特に肺由来の当該線維芽細胞の同系の経静脈投与により、マウス間質性肺炎・肺線維症の生命予後を有意に改善し、本細胞が線維症の改善に有効であることが明らかとなった。さらに、ADM高発

現且つVCAM-1発現向上型成体由来線維芽細胞、特にVPFは自家細胞医薬品としても他家細胞医薬品としても、肺線維症に対する改善・予防効果が示唆された。そのため、ADM高発現且つVCAM-1発現向上型成体由来線維芽細胞、特にVPFの静脈投与は予後不良な疾患として知られているIPFをはじめとする肺線維症の新規治療薬として期待できる。

請求の範囲

- [請求項1] ADM及び／又はHHEX高発現の線維芽細胞を含む医薬組成物。
- [請求項2] 前記線維芽細胞が成体由来の線維芽細胞である、請求項1に記載の医薬組成物
- [請求項3] 前記細胞のADM及び／又はHHEXの遺伝子発現量が、対照となる線維芽細胞と比較して、1.20倍以上高いものである、請求項1又は2に記載の医薬組成物。
- [請求項4] 線維症を治療するための、請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項5] リンパ管新生能が低下している状態を改善するための、請求項1～4のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項6] 組織液の恒常性の障害を改善するための、請求項1～5のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項7] 浮腫を軽減するための、請求項1～6のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項8] 脂質及び／又はビタミンの輸送能の障害を改善するための、請求項1～7のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項9] 免疫監視機構を活性化するための、請求項1～8のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項10] 注射用組成物である、請求項1～9のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項11] 前記細胞が、平面状又は立体状の細胞組織として構築されたものである、請求項1～9のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項12] 前記線維芽細胞が心臓由来の線維芽細胞である、請求項1～11のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項13] ADM高発現の線維芽細胞の製造方法であって、
線維芽細胞に、TNF- α 及びIL-4を接触させること、並びに
前記接触させた線維芽細胞を、ADMが高発現になり得る条件下で

- 培養すること、
を含む、A D M高発現の線維芽細胞の製造方法。
- [請求項14] 前記線維芽細胞が、V E G F－C高発現である、請求項13に記載の方法。
- [請求項15] 前記線維芽細胞が、C D 1 0 6陽性である、請求項13又は14に記載の方法。
- [請求項16] 抗C D 1 0 6抗体を用いて、A D M高発現の線維芽細胞を選択又は濃縮することを含む、請求項15に記載の方法。
- [請求項17] 前記線維芽細胞が肺由来の線維芽細胞である、請求項13～16のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項18] 請求項13～17のいずれか一項に記載する製造方法によって得られる、A D M高発現の線維芽細胞。
- [請求項19] 請求項18に記載する細胞を含む、線維芽細胞集団。
- [請求項20] A D M高発現の線維芽細胞。
- [請求項21] V E G F－C高発現である、請求項20に記載の線維芽細胞。
- [請求項22] C D 1 0 6陽性である、請求項20又は21に記載の線維芽細胞。
- [請求項23] 前記細胞のV E G F－C及び／又はA D Mの遺伝子発現量が、対照となる線維芽細胞と比較して、それぞれ1．20倍以上高いものである、請求項20～22のいずれか一項に記載の細胞。
- [請求項24] 前記線維芽細胞が肺由来の線維芽細胞である、請求項20～23のいずれか一項に記載の細胞。
- [請求項25] 請求項20～24のいずれか一項に記載の細胞を含む、線維芽細胞集団。
- [請求項26] C D 1 0 6陽性である肺由来線維芽細胞を含む細胞集団であって、前記C D 1 0 6陽性である肺由来線維芽細胞の割合（細胞数基準）が、前記細胞集団中に含まれる全線維芽細胞に対して18．01％超である、細胞集団。
- [請求項27] 請求項18及び20～24のいずれか一項に記載の細胞又は請求項

19及び25～26のいずれか一項に記載の細胞集団を含む、医薬組成物。

[請求項28] 肺疾患を治療するための、請求項27に記載の医薬組成物。

[請求項29] 前記肺疾患が、肺線維症又は間質性肺炎である、請求項28に記載の医薬組成物。

[請求項30] リンパ管新生能が低下している状態を改善するための、請求項27に記載の医薬組成物。

[請求項31] 注射用組成物である、請求項27～30のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項32] 前記細胞または前記細胞集団が、平面又は立体の形状の細胞組織として構築されたものである、請求項27～30のいずれか一項に記載の医薬組成物。