

明 細 書

発明の名称：

多能性幹細胞を損傷部位に誘導する遊走因子を含む医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞を損傷部位に誘導する遊走因子を含む医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 近年、組織再生に貢献し得る生体由来の細胞が注目されつつある。成体から得られる分化能を有する細胞として、例えば、骨、軟骨、脂肪細胞、神経細胞、骨格筋等への分化能を有する骨髄間葉系細胞画分（MSC）（非特許文献1及び2）が知られているが、これは様々な細胞を含む細胞群であり、その分化能を担う細胞の実体が分かっておらず、治療効果にバラつきが大きかった。また、成体由来の多能性幹細胞としてiPS細胞（特許文献1）が報告されているが、iPS細胞の樹立には、間葉系細胞である皮膚線維芽細胞画分等に特定の遺伝子や特定の化合物を体細胞に導入するという極めて複雑な操作を必要とすることに加え、iPS細胞が高い腫瘍形成能力を有することから、臨床応用への極めて高いハードルが存在している。

[0003] 本発明者らの一人である出澤氏の研究により、間葉系細胞画分に存在し、誘導操作なしに得られる、SSEA-3（Stage-Specific Embryonic Antigen-3）を表面抗原として発現している多能性幹細胞（Multilineage-differentiating Stress Enduring cells；Muse細胞）が間葉系細胞画分の有する多能性を担っており、組織再生を目指した疾患治療に応用できる可能性があることが分かってきた（特許文献2；非特許文献3；非特許文献4）。また、多能性幹細胞（Muse細胞）は、生体内の間葉系組織に存在し、生体組織に損傷が起こると、その部位に集積し、組織再生を担うことが分かってきた（特許文献2；非特許文献3）。しかしながら、Mu

s e細胞が、損傷した組織に誘導されるメカニズムは解明されていないだけでなく、M u s e細胞を損傷部位に誘導する遊走因子も同定されていない。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特許第4 1 8 3 7 4 2号公報

特許文献2：国際公開第W O 2 0 1 1 / 0 0 7 9 0 0号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：D e z a w a, M. , e t a l. , J. C l i n. I n v e s t. , V o l. 1 1 3, p. 1 7 0 1 - 1 7 1 0 (2 0 0 4)

非特許文献2：D e z a w a, M. , e t a l. , S c i e n c e, V o l. 3 0 9, p. 3 1 4 - 3 1 7 (2 0 0 5)

非特許文献3：K u r o d a, Y. , e t a l. , P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A, V o l. 1 0 7, p. 8 6 3 9 - 8 6 4 3 (2 0 1 0)

非特許文献4：W a k a o, S, e t a l. , P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A, V o l. 1 0 8, p. 9 8 7 5 - 9 8 8 0 (2 0 1 1)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、再生医療において、多能性幹細胞（M u s e細胞）を用いた医療用途を提供することを目的とし、M u s e細胞の遊走能活性を亢進し、損傷部位にM u s e細胞を効率的に集積させるための遊走因子を同定するとともに、遊走因子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

[0007] 本発明者らは、プロテオーム解析を駆使することによって、M u s e細胞を損傷部位に誘導する遊走因子を同定することに成功し、遊走因子の1つとしてスフィンゴシン-1-リン酸（S 1 P）がM u s e細胞の遊走能活性を

亢進し、損傷部位への集積に関与することを見出し、本発明を完成するに至った。遊走能活性を亢進するとは、間葉系組織内に存在するM u s e細胞の損傷部位への遊走を開始させることを含む。

[0008] すなわち、本発明は、以下の通りである。

[1] スフィンゴシンー1ーリン酸受容体2を活性化する化合物を有効成分として含む、多能性幹細胞の遊走を活性化するための医薬組成物。

[2] スフィンゴシンー1ーリン酸受容体2を活性化する化合物が、スフィンゴシンー1ーリン酸受容体2のアゴニストである、上記[1]に記載の医薬組成物。

[3] スフィンゴシンー1ーリン酸受容体2のアゴニストが、スフィンゴシンー1ーリン酸又はその誘導体である、上記[2]に記載の医薬組成物。

[4] スフィンゴシンー1ーリン酸受容体2のアゴニストが、1ー(2ー(1ーベンジルー2, 5ージメチルー1 Hーピロールー3ーイル)ー2ーオキソエチル)ー5ー(トリフルオロメチル)ピリジンー2(1 H)ーオン、1ー(2ー(1ーベンジルー2, 5ージメチルー1 Hーピロールー3ーイル)ー2ーオキソエチル)ピロリジンー2, 5ージオン、1ー(2ー(1ーベンジルー2, 5ージメチルー1 Hーピロールー3ーイル)ー2ーオキソエチル)ー3ーメチルイミダゾリジンー2, 4, 5ートリオン、1ー(1ーベンジルー2, 5ージメチルー1 Hーピロールー3ーイル)ー2ー((1ーメチルー1 Hーテトラゾールー5ーイル)チオ)エタノン、及び(S)ー1ー(2ー(1ーベンジルー2, 5ージメチルー1 Hーピロールー3ーイル)ー2ーオキソエチル)ー2', 3'ージヒドロスピロ[イミダゾリジンー4, 1'ーインデン]ー2, 5ージオンからなる群から選択される、上記[2]に記載の医薬組成物。

[5] スフィンゴシンー1ーリン酸受容体2を活性化する化合物が、スフィンゴシンー1ーリン酸リアーゼ阻害剤である、上記[1]に記載の医薬組成物。

[6] スフィンゴシンー1ーリン酸リアーゼ阻害剤が、(E)ー1ー(4ー

((1 R, 2 S, 3 R) - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロキシブチル) - 1
H - イミダゾール - 2 - イル) エタノンオキシム、 (1 R, 2 S, 3 R) -
1 - (2 - (イソキサゾール - 3 - イル) - 1 H - イミダゾール - 4 - イル
) ブタン - 1, 2, 3, 4 - テトラオール、及び 1 - (5 - ((1 R, 2 S
, 3 R) - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロキシブチル) - 1 H - イミダゾール
- 2 - イル) エタノン からなる群から選択される、上記 [5] に記載の医
薬組成物。

[7] 遊走の活性化が生体の損傷部位への誘導である、上記 [1] ~ [6]
に記載の医薬組成物。

[8] 前記多能性幹細胞が、S S E A 3 陽性である、上記 [1] ~ [7] に
記載の医薬組成物。

[9] 前記多能性幹細胞が、C D 1 0 5 陽性である、上記 [1] ~ [8] に
記載の医薬組成物。

[1 0] 前記多能性幹細胞が、C D 1 1 7 陰性及び C D 1 4 6 陰性である、
上記 [1] ~ [9] に記載の医薬組成物。

[1 1] 前記多能性幹細胞が、C D 1 1 7 陰性、C D 1 4 6 陰性、N G 2 陰
性、C D 3 4 陰性、v W F 陰性、及び C D 2 7 1 陰性である、上記 [1] ~
[1 0] のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

[1 2] 前記多能性幹細胞が、C D 3 4 陰性、C D 1 1 7 陰性、C D 1 4 6
陰性、C D 2 7 1 陰性、N G 2 陰性、v W F 陰性、S o x 1 0 陰性、S n a
i 1 陰性、S l u g 陰性、T y r p 1 陰性、及び D c t 陰性である、上記 [1]
~ [1 1] に記載の医薬組成物。

[1 3] 前記多能性幹細胞が、以下の性質の全てを有する多能性幹細胞であ
る、上記 [1] ~ [1 2] に記載の医薬組成物：

- (i) テロメラゼ活性が低い又は無い；
- (i i) 三胚葉のいずれの胚葉の細胞に分化する能力を持つ；
- (i i i) 腫瘍性増殖を示さない；及び
- (i v) セルフリニューアル能を持つ。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、M u s e細胞による組織再生において、M u s e細胞の遊走能活性を亢進し、損傷部位にM u s e細胞を誘導する遊走因子を含む医薬組成物が提供される。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]M u s e細胞における各種スフィンゴシンー１ーリン酸受容体（S 1 P R）の発現量をリアルタイムPCR（定量的PCR）を用いてNHDF（正常ヒト皮膚線維芽細胞）での発現量を基準とした相対値として測定した結果を示す図である。

[図2]M u s e細胞の遊走を測定するために使用したボイデンチャンバーと遊走因子による細胞遊走を模式的に示す図である。ボイデンチャンバーは、その内部に微孔径が8 μ mであるインサートを有する。インサートの上部にM u s e細胞又は非M u s e細胞を含む培養液を添加し、インサートの下部に遊走因子を含む培養液を添加し、18時間後にインサートを通過した細胞数をカウントする。

[図3]ボイデンチャンバーを用いて測定した遊走細胞のカウントを相対的に評価した図である。図中、横軸は、遊走因子の異なる濃度を示し、縦軸は、遊走因子（0 nM）により遊走されるM u s e細胞を1とした場合の相対値を示す。

[図4]M u s e細胞の遊走を測定するために使用した簡易型細胞動態解析装置（E Z-T A X I S c a n）の概念図である。装置には2つのスリットがあり、それぞれに細胞及び遊走因子を添加し、プレート上を細胞が遊走因子に指向される様子を矢印で示す。

[図5]簡易型細胞動態解析装置を用いて測定した細胞遊走を示す写真である。M u s e細胞は、テラスと呼ばれる長さ250 μ m、深さ8 μ mの構造を潜るようにして、遊走因子の濃度勾配に従って移動する。写真左は、スフィンゴシンー１ーリン酸（S 1 P）を2 μ M添加した場合であり、写真右はS 1 Pを添加していない場合の細胞移動を示す。

[図6] S 1 P による M u s e 細胞の遊走を簡易型細胞動態解析装置によって解析した結果を示す。左図は、M u s e 細胞が S 1 P に向かって直線的に遊走する様子をリアルタイムで測定した結果を示す。右図は、S 1 P を含まない場合には、M u s e 細胞がランダムに広がる様子をリアルタイムで測定した結果を示す。

[図7] マウスを用いた遊走因子による M u s e 細胞の遊走試験手順を説明する図である。使用したマウスは、ヒト細胞を拒絶しない免疫不全の S C I D マウス（7 週齢）である。S 1 P 溶液を染み込ませた生分解性ハイドロゲルをマウスの背中に移植し、G F P 陽性ヒト M u s e 細胞を尾静脈投与後、ハイドロゲルの移植部位周辺の組織を採取し、該部位に M u s e 細胞が集積されたかを検証する。

[図8] ハイドロゲルに染み込ませる S 1 P 溶液の濃度を 5 0 0 n M 及び 1 , 0 0 0 n M とした場合のハイドロゲルに集積した G F P 陽性ヒト M u s e 細胞の集積を示す図である。G F P の染色には、抗 G F P 抗体（A l e x a 5 6 8）を用いた。これらの結果は、M u s e 細胞が S 1 P 溶液の濃度に依存して集積されることを示す。

[図9] ハイドロゲルに集積された M u s e 細胞を 1 m m ² あたりの細胞数として評価した。図 8 の結果と同様に、M u s e 細胞は S 1 P 濃度に依存して集積された。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、多能性幹細胞を損傷部位に誘導する遊走因子を含む組成物及びその利用に関する。本発明を以下に詳細に説明する。

[0012] 1. 多能性幹細胞（M u s e 細胞）

本発明の遊走因子によって損傷部位に誘導される多能性幹細胞は、本発明者らの一人である出澤が、ヒト生体内にその存在を見出し、「M u s e（M u l t i l i n e a g e - d i f f e r e n t i a t i n g S t r e s s E n d u r i n g）細胞」と命名した細胞である。M u s e 細胞は、骨髓液や真皮結合組織等の皮膚組織から得ることができ、各臓器の結合組織にも

散在する。また、この細胞は、多能性幹細胞と間葉系幹細胞の両方の性質を有する細胞であり、例えば、それぞれの細胞表面マーカーである「SSEA-3 (Stage-specific embryonic antigen-3)」と「CD105」のダブル陽性として同定される。したがって、Muse細胞又はMuse細胞を含む細胞集団は、例えば、これらの抗原マーカーを指標として生体組織から分離することができる。Muse細胞の分離法、同定法、及び特徴などの詳細は、国際公開第WO2011/007900号に開示されている。また、Wakaoら(2011、上述)によって報告されているように、骨髓、皮膚などから間葉系細胞を培養し、それをMuse細胞の母集団として用いる場合、SSEA-3陽性細胞の全てがCD105陽性細胞であることが分かっている。したがって、本発明における医薬組成物においては、生体の間葉系組織又は培養間葉系幹細胞からMuse細胞を分離する場合は、単にSSEA-3を抗原マーカーとしてMuse細胞を精製し、使用することができる。なお、本明細書においては、SSEA-3を抗原マーカーとして、生体の間葉系組織又は培養間葉系組織から分離された多能性幹細胞(Muse細胞)又はMuse細胞を含む細胞集団を単に「SSEA-3陽性細胞」と記載することがある。また、本明細書においては、「非Muse細胞」とは、生体の間葉系組織又は培養間葉系組織に含まれる細胞であって、「SSEA-3陽性細胞」以外の細胞を指す。

[0013] 簡単には、Muse細胞又はMuse細胞を含む細胞集団は、細胞表面マーカーであるSSEA-3に対する抗体を単独で用いて、又はSSEA-3及びCD105に対するそれぞれの抗体を両方用いて、生体組織(例えば、間葉系組織)から分離することができる。ここで、「生体」とは、哺乳動物の生体をいう。本発明において、生体には、受精卵や胞胚期より発生段階が前の胚は含まれないが、胎児や胞胚を含む胞胚期以降の発生段階の胚は含まれる。哺乳動物には、限定されないが、ヒト、サル等の霊長類、マウス、ラット、ウサギ、モルモット等のげっ歯類、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ロバ、ヤギ、フェレット等が挙げられる。本発明において対象とさ

れるM u s e細胞は、生体の組織由来である点で、胚性幹細胞（E S細胞）や胚性生殖幹細胞（E G細胞）と明確に区別される。また、「間葉系組織」とは、骨、滑膜、脂肪、血液、骨髓、骨格筋、真皮、靱帯、腱、歯髄、臍帯などの組織及び各種臓器に存在する結合組織をいう。例えば、M u s e細胞は、骨髓や皮膚から得ることができる。例えば、生体の間葉系組織を採取し、この組織からM u s e細胞を分離し、利用することが好ましい。また、上記分離手段を用いて、培養間葉系細胞からM u s e細胞を分離してもよい。

[0014] 上記のように、M u s e細胞又はM u s e細胞を含む細胞集団は、例えば、S S E A - 3陽性又はS S E A - 3陽性とC D 1 0 5陽性の二重陽性を指標にして生体組織から分離することができるが、ヒト成人皮膚には、種々のタイプの幹細胞及び前駆細胞を含むことが知られている。しかしながら、M u s e細胞は、これらの細胞と同じではない。このような幹細胞及び前駆細胞には、皮膚由来前駆細胞（S K P）、神経堤幹細胞（N C S C）、メラノブラスト（M B）、血管周囲細胞（P C）、内皮前駆細胞（E P）、脂肪由来幹細胞（A D S C）が挙げられる。これらの細胞に固有のマーカーの「非発現」を指標として、M u s e細胞を分離することができる。より具体的には、M u s e細胞は、C D 3 4（E P及びA D S Cのマーカー）、C D 1 1 7（c - k i t）（M Bのマーカー）、C D 1 4 6（P C及びA D S Cのマーカー）、C D 2 7 1（N G F R）（N C S Cのマーカー）、N G 2（P Cのマーカー）、v W F因子（フォンビルブランド因子）（E Pのマーカー）、S o x 1 0（N C S Cのマーカー）、S n a i 1（S K Pのマーカー）、S l u g（S K Pのマーカー）、T y r p 1（M Bのマーカー）、及びD c t（M Bのマーカー）からなる群から選択される11個のマーカーのうち少なくとも1個、例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個又は11個のマーカーの非発現を指標に分離することができる。例えば、限定されないが、C D 1 1 7及びC D 1 4 6の非発現を指標に分離することができ、さらに、C D 1 1 7、C D 1 4 6、N G 2、C D 3 4、v W F及びC D 2 7 1の非発現を指標に分離することができ、さらに、上記の1

1 個のマーカ－の非発現を指標に分離することができる。

[0015] また、本発明において対象とされる上記特徴を有する Muse 細胞は、以下：

- (i) テロメラーゼ活性が低いか又は無い；
- (ii) 三胚葉のいずれの胚葉の細胞に分化する能力を持つ；
- (iii) 腫瘍性増殖を示さない；及び
- (iv) セルフリニューアル能を持つ

からなる群から選択される少なくとも1つの性質を有してもよい。本発明の一局面では、本発明において対象とされる Muse 細胞は、上記性質を全て有する。ここで、上記 (i) について、「テロメラーゼ活性が低いか又は無い」とは、例えば、TRAPEZE XL telomerase detection kit (Millipore 社) を用いてテロメラーゼ活性を検出した場合に、低いか又は検出できないことをいう。テロメラーゼ活性が「低い」とは、例えば、体細胞であるヒト線維芽細胞と同程度のテロメラーゼ活性を有しているか、又は HeLa 細胞に比べて $1/5$ 以下、好ましくは $1/10$ 以下のテロメラーゼ活性を有していることをいう。上記 (ii) について、Muse 細胞は、in vitro 及び in vivo において、三胚葉（内胚葉系、中胚葉系、及び外胚葉系）に分化する能力を有し、例えば、in vitro で誘導培養することにより、肝細胞、神経細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、骨細胞、脂肪細胞等に分化し得る。また、in vivo で精巢に移植した場合にも三胚葉に分化する能力を示す場合がある。さらに、静注により生体に移植することで損傷を受けた臓器（心臓、皮膚、脊髄、肝、筋肉等）に遊走及び生着し、分化する能力を有する。上記 (iii) について、Muse 細胞は、浮遊培養では増殖速度約 1.3 日で増殖するが、10 日間程度で増殖が止まるという性質を有し、さらに精巢に移植した場合、少なくとも半年間は癌化しないという性質を有する。また、上記 (iv) について、Muse 細胞は、セルフリニューアル（自己複製）能を有する。ここで、「セルフリニューアル」とは、1 個の Muse 細胞を浮遊培

養することにより得られる胚様体様細胞塊に含まれる細胞を培養し、再度胚様体様細胞塊を形成させることをいう。セルフリニューアルは1回又は複数回のサイクルを繰り返せばよい。

[0016] 2. Muse細胞に特異的に発現しているタンパク質の同定

これまで、Muse細胞は成体に投与されると損傷部位にホーミングし、一方、非Muse細胞は損傷部位にホーミングしないことが知られているが、Muse細胞を損傷部位に誘導する遊走因子は知られていない。そこで、損傷部位にMuse細胞を誘導する遊走因子が存在すると仮定した場合、最初に、Muse細胞に特異的に発現しているが、非Muse細胞には発現していないタンパク質（特に、受容体）を特定することにより、それに対するリガンドなどが遊走因子である可能性が高いと考えられる。

[0017] 一般に、未知の因子を同定するための手法としては、プロテオーム解析が有用であることが知られている。この解析は、細胞又は組織から抽出したタンパク質の生化学的及び物理化学的特性を分析し、ゲノム解析により明らかにされた遺伝子情報を利用して、上記タンパク質とそれをコードする遺伝子との対応を明らかにすること、さらにゲノム配列情報を利用しながら、全ての遺伝子の翻訳産物について機能を解明していくことを目的とする研究のための解析手法である。

[0018] プロテオーム解析において、現在よく使用されている手法としては、ペプチドマスフィンガープリンティング（peptide mass-finger printing: PMF）法が挙げられる。PMF法では、二次元電気泳動等によってタンパク質を分離し、そのタンパク質をトリプシンなどの消化酵素でペプチドに消化後、ペプチド混合物の質量スペクトル（ペプチドマスフィンガープリント）を質量分析装置を用いて取得し、これとゲノムデータベースからのDNAの塩基配列に対応するアミノ酸配列から計算される理論的な質量スペクトルとを検索することにより、タンパク質及び該タンパク質をコードする遺伝子を同定することができる。

[0019] 本発明によれば、Muse細胞の遊走因子に対するレセプターを同定する

ことを目的として、首都大学東京の磯辺俊明教授らのグループによって開発されたプロテオーム解析を用いることができる。より具体的には、比較する2つの細胞群（M u s e細胞群と非M u s e細胞群）からタンパク質（混合物）を抽出し、これらの混合物を分子量の違いに基づいて電気泳動することによって分離する。分離されたタンパク質は、ゲル上では各バンドとして識別される。次に、ゲルから切り出されたバンドの各々をL C－M S分析によって質量を測定する。さらに、これらの質量値を用いて、データベース上からタンパク質を自動検索して選び出し、2つの細胞群間において異なるタンパク質を同定することができる（例えば、田岡万悟ら、「決定版！プロテオーム解析マニュアル」（磯辺俊明、高橋信弘編集）p p. 92－100、羊土社、2004を参照されたい）。なお、上記データベースは、限定されないが、既に公開されているタンパク質データベースである「S w i s s P r o t」を使用することができる。本発明者らは、上記プロテオーム解析を用いることにより、非M u s e細胞と比較して、M u s e細胞に特異的に発現しているタンパク質を特定した（データ示さず）。後述するように、これらの特定されたタンパク質のうち、例えば、スフィンゴシン－1－リン酸受容体2（単に、「S 1 P R 2」と記載することがある）は、M u s e細胞において特異的に発現しているが、非M u s e細胞においては発現していないタンパク質であることが分かった（実施例2）。

[0020] 3. 遊走因子の同定及び確認

上記で同定されたM u s e細胞に特異的に発現しているタンパク質のうち、例えば、遊走因子の受容体となり得るものを選択し、これらの受容体に対するリガンドが遊走因子となり得るかどうかを検討することによって、M u s e細胞の遊走因子を特定することができる。一般に、細胞の遊走を測定する方法としては、限定されないが、i n v i t r oの実験系ではボイデンチャンバー法、細胞動態解析技術等を用いることができる。簡単には、ボイデンチャンバー法は、細胞走化性を定量する有効な方法であり、ボイデンチャンバー内に別のコンパートメントとしてインサートがあり、このインサー

トの底面は均一なサイズ(例えば、約 $8\mu\text{m}$)の微細孔を多数有するフィルターが装着されている。そのフィルター上に細胞を含む細胞培養液を添加し、インサートの下部に遊走因子を含む培養液を添加することによって、フィルター上の微細孔に生じる遊走因子の濃度勾配に沿って細胞がフィルターを潜り抜けて下方に移動することを利用したものである(図2)(例えば、Borden, S., J. Exp. Med., Vol. 115, p. 453-466 (1962)を参照されたい)。このように、フィルターを通過した細胞数をカウントすることによって走化性の程度を定量的に測定することができ、本発明では、遊走因子の候補物質をインサートの下側に添加し、上側にMuscle細胞を添加後、Muscle細胞の移動数をカウントすることによって、添加した候補物質が遊走因子として作用し得るかを評価することができる。

[0021] 一方、細胞動態解析技術とは、ECI社が開発した細胞遊走能解析法であり(Nitita, et al., Journal of Immunology, 155-163 (2007)を参照された)、最新の微細加工技術を駆使して作成したシリコンエハーチップを用いて、ガラス基板上で一定の走化性因子の濃度勾配を形成させ、その勾配依存的な細胞の水平方向への遊走性を測定することができるシステムである。このシステムを用いて得られた画像をリアルタイムで解析することによって、方向性(例えば、Muscle細胞が遊走因子の高濃度側に対してどれだけ方向的に進んだか)を定量化することができる。後述するように、候補物質の1つとしてスライコシン-1-リン酸(S1P)を用いた場合、ポイデシンチャンバー法及び細胞動態解析技術を用いたいずれの実験系においてもMuscle細胞の遊走性が顕著に観察された(実施例2)。

[0022] また、in vivoの実験系では、例えば、マウスを実験モデルとした系を用いて遊走因子を同定することができる。より具体的には、ヒト細胞を拒絶しない免疫不全マウスの組織内に遊走因子を染み込ませたゲル(例えば、ハイドロゲル)を移植し、その後、尾静脈からGFP標識されたヒトMu

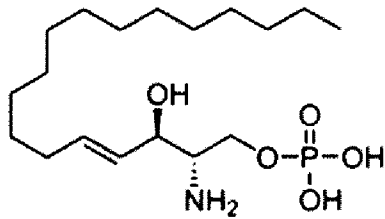
s e細胞を投与することにより、このM u s e細胞が移植された遊走因子を含むゲルに集積し得るかどうかを組織化学的に観察することにより遊走因子を特定することができる。後述する実施例2に示したように、G F P陽性M u s e細胞がS 1 P濃度に依存して集積されることが分かった。

[0023] 4. 遊走因子の利用

本発明は、M u s e細胞の遊走能活性を亢進し、M u s e細胞を損傷部位に誘導する遊走因子を有効成分として含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物に使用される「遊走因子」とは、例えば、M u s e細胞の細胞表面上に発現している受容体に結合し、その結合を介して、細胞の遊走に関するシグナル伝達系が活性した結果、細胞を遊走因子に指向されて遊走させる物質を意味する。また、本発明において使用するとき、用語「損傷部位」とは、生体内における各種の臓器、器官、及び組織において、外傷、炎症、疾患、虚血、壊死、腫瘍形成、又は加齢等を原因とした各種細胞及び組織との変性又は脱落によって失われた特定の部位を意味する。本発明によれば、M u s e細胞を損傷部位に集積させるためには、遊走因子を医薬として許容される担体、及び／又は希釈剤を配合した医薬組成物として使用してもよく、又は遊走因子を単独で用いてもよい。ここで、本発明の医薬組成物に含有する遊走因子としては、M u s e細胞を損傷部位に誘導する能力を有する物質（例えば、タンパク質、ペプチド、脂質、化合物等）であれば特に限定されない。より好ましくは、遊走因子は、スフィンゴシンー１ーリン酸（S 1 P）、スフィンゴシンー１ーリン酸誘導体、並びにスフィンゴシンー１ーリン酸受容体のアゴニストである。ここで、「スフィンゴシンー１ーリン酸（S 1 P）」とは、下記式：

[0024]

[化1]

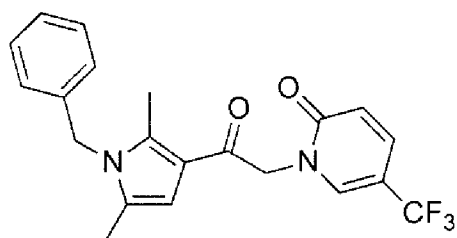


[0025] を有する、細胞膜を構成するスフィンゴ脂質の代謝産物である。S 1 P は、ある種の酵素によって細胞膜から切り出されて遊離した後、細胞膜上に発現している G タンパク質共役受容体に結合することにより、細胞遊走などを引き起こす生理活性物質としても知られている。また、S 1 P に対する受容体としては、G タンパク質共役受容体である S 1 P 受容体が知られ、これまでに S 1 P R 1 ～ S 1 P R 5 の 5 種類が存在することが分かっている。ここで、M u s e 細胞及び非 M u s e 細胞における S 1 P 受容体の発現を調べてみると、S 1 P R 1 は、両細胞に発現しているが、S 1 P R 2 は M u s e 細胞に発現していることが本発明者らによって明らかにされた（データ示さず）。

[0026] 本発明によれば、本発明の医薬組成物に使用される遊走因子としては、M u s e 細胞の遊走性を高める物質であれば S 1 P に限定されず、その S 1 P 誘導体も使用可能である。S 1 P 誘導体としては、特に限定されないが、スフィンゴシルコリン、ガラクトシルスフィンゴシン（サイコシン）、グルコシルスフィンゴシン（グルコサイコシン）、スルホガラクトシルスフィンゴシン（リゾスルファチド）、N, N-ジメチルスフィンゴシン 1-リン酸、N, N, N-トリメチルスフィンゴシン 1-リン酸、セラミド 1-リン酸、ジヒドロスフィンゴシン 1-リン酸、フィトスフィンゴシン 1-リン酸、及びデハイドロフィトスフィンゴシン 1-リン酸、並びにそれらの塩を挙げることができる。また、本発明によれば、本発明の医薬組成物に使用される遊走因子として、S 1 P R 2 に対するアゴニストを用いることができる。この

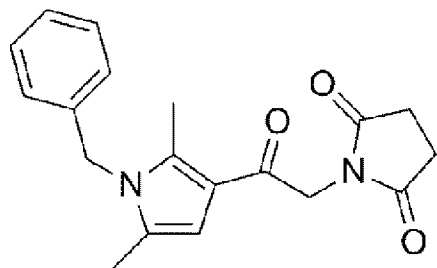
ようなアゴニストとしては、下記の構造：

[0027] [化2]



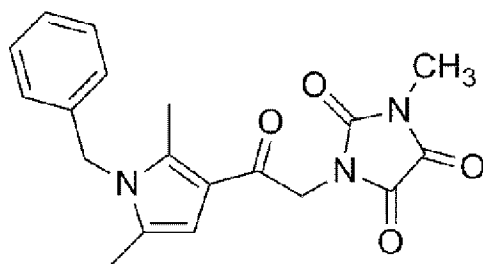
[0028] を有する 1 - (2 - (1 - ベンジル - 2, 5 - ジメチル - 1 H - ピロール - 3 - イル) - 2 - オキシエチル) - 5 - (トリフルオロメチル) ピリジン - 2 (1 H) - オン (例えば、Park, S. W., et al., J. Am. Soc. Nephrol., 23, p. 266-80 (2012) 参照)、下記の構造：

[0029] [化3]



[0030] を有する 1 - (2 - (1 - ベンジル - 2, 5 - ジメチル - 1 H - ピロール - 3 - イル) - 2 - オキシエチル) ピロリジン - 2, 5 - ジオン、下記構造：

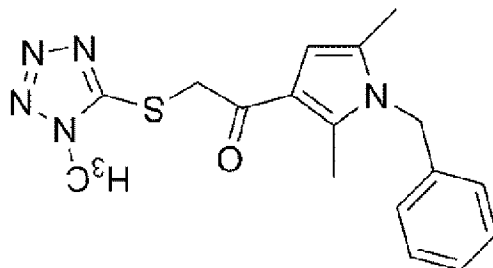
[0031] [化4]



[0032] を有する 1 - (2 - (1 - ベンジル - 2, 5 - ジメチル - 1 H - ピロール -

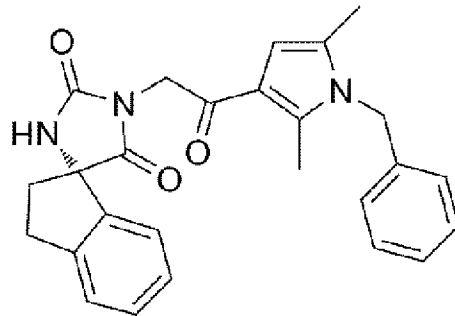
3-イール)-2-オキソエチル)-3-メチルイミダゾリジン-2, 4, 5-トリオン、下記構造:

[0033] [化5]



[0034] を有する 1-(1-ベンジル-2, 5-ジメチル-1H-ピロール-3-イール)-2-(1-メチル-1H-チトラゾール-5-イール)チオ)エタノ、及び下記の構造:

[0035] [化6]

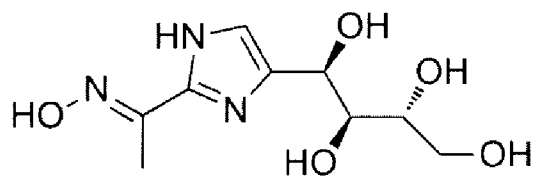


[0036] を有する (S)-1-(2-(1-ベンジル-2, 5-ジメチル-1H-ピロール-3-イール)-2-オキソエチル)-2', 3'-ジヒドロスピロイミダゾリジン-4, 1'-イソジン]-2, 5-ジオン等が挙げられる。

[0037] また、S1Pは、生体内において、小胞体存在するスフィンゴシン-1-リン酸リパーゼにより脱リン酸化され、trans-2-ヘキサデセナールとエタノールアミンリン酸に分解されるが、通常、この脱リン酸化反応とtrans-2-ヘキサデセナールにリン酸を付加する反応とは平衡状態にあることが知られている。そこで、S1Pの濃度を高めるために、脱リン酸化反応を担うS1Pリパーゼを阻害する物質もまた本発明の医薬組成物に使用することができる。このようなS1Pリパーゼを阻害する物質としては

、下記の構造：

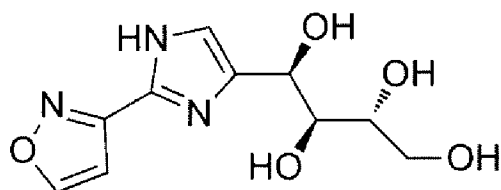
[0038] [化7]



[0039] を有する (E) - 1 - (4 - ((1 R, 2 S, 3 R) - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロキシブチル) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル) エタノンオキシム (例えば、Bagdanoff, J. T., et al., J. Med. Chem., vol. 53, p. 8650-8662 (2010) を参照) ;

[0040] [化8]

構造：

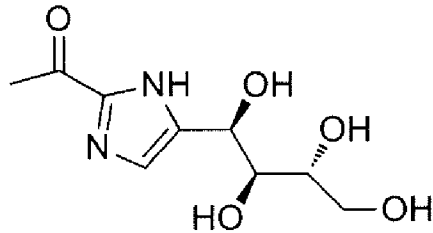


[0041] を有する (1 R, 2 S, 3 R) - 1 - (2 - (イソキサゾール - 3 - イル) - 1 H - イミダゾール - 4 - イル) ブタン - 1, 2, 3, 4 - テトラオール (Bagdanoffら、上述) ; 及び

[0042]

[化9]

構造：



[0043] を有する 1-（5-（（1R，2S，3R）-1，2，3，4-テトラヒドロキシブチル）-1H-イミダゾール-2-イル）エタノン（例えば、Cayman Chemical Item Number 13222 Cayman Chemical Com.，Michigan，USA）等が挙げられる。

[0044] 本発明の遊走因子を含む医薬組成物を組織再生を目的とした治療に用いる場合、投与経路は、特に限定されないが、治療目的に応じて適宜選択することができる。例えば、注射剤、経口剤、坐剤、吸入剤等のいずれでもよいが、Muscle細胞を損傷部位に集積させることを目的とした場合、本発明の遊走因子又は医薬組成物を損傷部位に直接投与することがより好ましい。他方、本発明の医薬組成物が損傷部位に送達されるように修飾等されている場合には、損傷部位に直接注入することに限定されず、医薬組成物を静脈投与することもできる。また、生体内の間葉系組織に存在するMuscle細胞の遊走を開始させる目的で静脈投与など全身性に投与することもできる。なお、これらの投与形態に適した医薬組成物は、公知の製剤方法を利用することによって製造することができる。

[0045] 注射剤を調製する場合は、遊走因子にpH調節剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤、局所麻酔剤等を添加し、常法を利用して局所用注射剤を製造することができる。pH調製剤及び緩衝剤としては、例えば、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム等が挙げられる。安定化剤としては、

例えば、ピロ亜硫酸ナトリウム、EDTA（エデト酸ナトリウム）、チオグリコール酸、チオ乳酸等が挙げられる。局所麻酔剤としては、例えば、塩酸プロカイン、塩酸リドカイン等が挙げられる。等張化剤としては、例えば、塩化ナトリウム、ブドウ糖等が挙げられる。

[0046] また、本発明の医薬組成物又は遊走因子を損傷部位に直接注入する場合、上記注射剤の成分を含む生分解性ハイドロゲルなどの担体に本発明の医薬組成物又は遊走因子を含めたシートを用いてもよい。使用可能な生分解性ハイドロゲルとしては、限定されないが、コラーゲン、フィブロネクチン、ゼラチン、アガロース等を主成分とするゲルが挙げられる。また、損傷部位への直接注入のみならず、梗塞等が起きた際には血管拡張を行うためのステントの内径に本発明の医薬組成物又は遊走因子を塗布することもできる。また、Muse細胞による組織再生を支援することを目的として、集積されたMuse細胞の生存性を高める成分（例えば、増殖因子、サイトカイン）を混入してもよい。

[0047] 本発明の医薬組成物に含める遊走因子の濃度は、損傷部位における損傷の程度、遊走因子の種類によって適宜変更することができる。Muse細胞を誘導させるために有効な遊走因子の濃度は、限定されないが、例えば、 $1\text{ nM} \sim 100\text{ }\mu\text{M}$ である。また、医薬組成物として遊走因子を注入又は投与する場合には、上記の遊走因子の濃度又は損傷の程度を考慮して、医薬組成物の注入量又は投与量、投与形態、及びその回数、期間等を適宜決定することができる。

[0048] 以下の実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

実施例

[0049] 実施例1：プロテオーム解析による遊走因子の候補物質の選出

Muse細胞を損傷部位に誘導する遊走因子の候補物質を選出するために、首都大学東京の磯辺教授らのグループによって開発されたプロテオーム解析法を用いた（田岡ら（2004）、上述参照）。この方法は、タンパク質

混合物のプロテアーゼ消化で生じる複雑なペプチド混合物を分析することにより、もとの試料に含まれるタンパク質を多量に同定する方法であり、「ショットガン法」とも呼ばれる。この方法を実施するための自動化システムは、イオン交換ＬＣ、分離用の逆相ＬＣ、及び脱塩システムを連結した複合型ＬＣシステムと、ハイブリッド型質量分析計、データ解析システムから構成されている。複合型ＬＣシステムでは、特に、分離様式の異なる２種類のＬＣ（イオン交換系及び逆相系）を組み合わせることを特徴とし、システム全体の分離能は、それぞれの分離法がもつ分離能の積として得られるため、非常に多数のタンパク質又はペプチドを分離することができる。次に、生体試料を質量に依存して高解像度で分離し、さらに質量情報を与えるＭＳを利用することにより、続く配列情報のデータベース検索によりタンパク質又はペプチドを同定することができる。例えば、細胞又は組織の粗抽出液をトリプシン消化して得られた非常に複雑なペプチド混合物から、１回の分析で訳１０，０００～１５，０００のＭＳ／ＭＳスペクトルを取得し、ほぼ１，０００種類のタンパク質に由来する２，０００～３，０００種類のペプチドを同定することができる。本実施例においては、上記の磯辺らの自動化システムを用いることにより、非Ｍｕｓｅ細胞と比較して、Ｍｕｓｅ細胞に特異的に発現しているタンパク質を特定した。

[0050] 実施例２：遊走因子の同定

（１）ヒトＭｕｓｅ細胞の調製

ヒトＭｕｓｅ細胞の調製は、国際公開第ＷＯ２０１１／００７９００号パンフレットに記載された方法に従って行った。より具体的には、ヒト骨髓液から接着性を有する間葉系細胞を培養し、増殖を経て、レンチウイルス－ＧＦＰを細胞に導入した。ＧＦＰで標識されたＭｕｓｅ細胞又はＭｕｓｅ細胞を含む細胞集団をＧＦＰとＳＳＥＡ－３の二重の陽性細胞としてＦＡＣＳにて分離した。また、非Ｍｕｓｅ細胞は、上記間葉系細胞のうち、ＳＳＥＡ－３陰性であるＧＦＰ陽性の細胞群であり、対照として用いた。その後、リン酸緩衝生理食塩水又は培養液を用いて、所定濃度に調整し、以下のボイデン

チャンバー法及び細胞動態解析技術に使用した。なお、骨髄間葉系細胞などの間葉系細胞を培養して得たものをM u s e細胞の母集団として用いる場合、W a k a oら（2011、上述）によって報告されているように、S S E A－3陽性細胞は全て、C D 1 0 5陽性細胞であることが分かっている。

[0051] 上記実施例1で得られた遊走因子の候補の1つであるスフィンゴシン－1－リン酸受容体2（S 1 P R 2）は、M u s e細胞に特異的に発現されている可能性が示唆された。そこで、M u s e細胞及び非M u s e細胞におけるS 1 Pに対する受容体の発現をプロテオーム解析で調べてみると、S 1 P R 2はM u s e細胞にのみ発現していることが分かった（データ示さず）。また、S 1 P R 1は、M u s e細胞及び非M u s e細胞ともに発現していた（データ示さず）。さらに、S 1 P Rは、その発現部位、アミノ酸配列、塩基配列等の相違からS 1 P R 1、S 1 P R 2、S 1 P R 3、S 1 P R 4、及びS 1 P R 5の5種が知られ、M u s e細胞において、これらの発現の有無及び発現量の相違をリアルタイムPCR（定量的PCR）によって比較した（図1）。上記の結果を考慮すると、S 1 P R 2がM u s e細胞において特異的に発現していることが示唆された。そこで、以下の実験系を用いて、S 1 P R 2に結合するS 1 PがM u s e細胞に特異的な遊走因子の1つであることを確認した。

[0052] （2）ボイデンチャンバー法

遊走因子によるM u s e細胞の遊走を定量的に測定するためにボイデンチャンバー法を用いた。使用したボイデンチャンバーは、M i l l i p o r eから市販されているQ C M C h e m o t a x i s C e l l M i g r a t i o n A s s a y K i t（Q C M 24 W e l l C o l o r i m e t r i c C e l l M i g r a t i o n A s s a y）を使用した。このボイデンチャンバーは、チャンバー内部に、8 μ mの均一な微細孔を有するフィルターを底部に有するインサートを含む。インサートのフィルター上部にM u s e細胞又は非M u s e細胞を含む培養液を添加し、インサートの下部に遊走因子を含む培養液を添加し、18時間培養後、フィルターの微細

孔を通過した細胞数をカウントする(図2参照)。この方法を用いれば、実施例1で得られた、遊走因子の候補をそれぞれ試験することにより、Mus e細胞に対する遊走因子を特定することができる。

[0053] より具体的には、マイクロタール上にMus e細胞又は非Mus e細胞を1×

10⁵細胞/ウェルの濃度で播種し、インサートの下部にS1Pを所定濃度(0、100、500、1000、5000nM)で含む培養液を添加した。

細胞を18時間インキュベート後、マイクロタールの微細孔を通過した細胞をカウントした。結果を図3に示す。図中、横軸は、S1Pの異なる濃度を示し、縦軸は、S1P(0nM)により遊走したMus e細胞を1とした場合の各濃度に対する細胞数の相対値を示す。図3からも明らかなように、Mus e細胞を添加した系では、S1Pの濃度に依存して、遊走された細胞数が増大していることから、S1Pは、Mus e細胞に対して遊走因子として機能することが示唆された。一方、非Mus e細胞は、いずれの濃度のS1Pに対しても遊走性を示さないことから、S1PはMus e細胞に特異的な遊走因子であることが示唆された。

[0054] (3) 細胞動態解析技術(TAXIScanテクノロジー)

細胞動態解析技術は、ECI社が開発した細胞遊走能解析法である(N! method; 320, 155-163 (2007)を参照されたい)。この解析法に使用される装置では、最新の微細加工技術を駆使して作成したシリコンウエハーチップを用いて、一定の走化性因子の濃度勾配を形成させ、その勾配依存的な細胞の水平方向への遊走活性測定が可能なシステムを用いる(図4)。このシステムから結果として得られる画像を解析することによって、方向性(例えば、Mus e細胞が遊走因子高濃度側に対してどれだけ方向的に進んだか)を定量化することができる(図5)。

[0055] より具体的には、チップ上部のチャンバーに設けられた約1mmφの穴の一方にMus e細胞を任意の細胞密度で添加し、もう一方のスリットからは遊走因子としてS1P(2μM)を添加した。細胞及びS1Pを添加後から

タイムラプス撮影を開始し、約14時間観察した。シリコンウエハーチップに設けられた幅 $1200\mu\text{m}$ 、テラス長 $250\mu\text{m}$ 、及び深さ $8\mu\text{m}$ の構造を有するテラスを、各細胞がその長さ方向に移動した距離を測定することにより細胞の遊走性を評価した。なお、S1Pを添加していない系を対照とした。図6左は、S1Pを $2\mu\text{M}$ 添加した場合のMuse細胞(A~N)の遊走性をリアルタイムで観察した結果である。図6右は、S1Pを添加しなかった場合のMuse細胞の動きを観察した結果を示す。S1Pを添加した系では、Muse細胞(A~N)は、S1Pの濃度勾配に従ってテラスを直線的に通過する様子がわかる。また、一部の細胞では、テラスを通過できなかった細胞も存在するが、これらは、テラスに設けられた柱によって遊走を阻害されたものがメインと考えられる(図6右)。一方、S1Pを添加していない系では、Muse細胞(a~j)は、ランダムに拡がるに留まった(図6左)。上記の結果から、ボイデンチャンバー法を用いて評価した場合と同様に、S1PはMuse細胞に特異的な遊走因子であることが強く示唆された。

[0056] また、S1Pの代わりに、S1PR2のアゴニストである1-(2-(1-ベンジル-2,5-ジメチル-1H-ピロール-3-イル)-2-オキソエチル)-5-(トリフルオロメチル)ピリジン-2(1H)-オンを用いて、上記と同様に、Muse細胞の遊走性をリアルタイムで観察した(データ示さず)。該アゴニスト($2\mu\text{M}$)を添加した系では、Muse細胞は、該アゴニストの濃度勾配に従ってテラスを直線的に通過する様子がわかる。上記の結果から、Muse細胞に対する該アゴニストの遊走活性が確認された。

[0057] (4) *in vivo*における遊走因子によるMuse細胞の集積

マウスを実験モデルとして、生体内において遊走因子によってMuse細胞が集積されるかどうかを以下のように行った(図7参照)。使用したマウスは、ヒト細胞を拒絶しない免疫不全であるSCIDマウス(雄性7週齢)を日本SLC株式会社又は日本チャールス・リバー株式会社から購入した。

遊走因子としてS1Pを用いた。予めS1P溶液(500nM又は1,000nM)を染み込ませた、大きさ0.5cm×0.5cmの生分解性ハイドロゲル(MedGel(登録商標)製)をマウスの背中の任意部位に移植した。その後、実施例1で調製したGF P標識されたヒトMus e細胞をマウスの尾静脈から注入した。2日後、移植した部位からハイドロゲル周辺の組織を取り出し、GF Pの抗体を用いてGF P標識を検出し、GF P陽性のMus e細胞をレーザー顕微鏡にてカウントした。

[0058] より具体的には、取り出されたハイドロゲルをGF Pに対する抗GF P抗体(Alexa568、Invitrogenより購入)を用いて、一般的に使用される組織化学的手法によって染色を行った。染色図を図8として示す。矢印で示した部分は、GF P陽性Mus e細胞を示す。S1Pの濃度を500nMとした場合(図8左)と1,000nMとした場合(図8右)を比較すると、S1Pの濃度に依存して、Mus e細胞の数が増加していることが分かる。図中、右上の画像は、中央部の四角で囲った部分の拡大図である。また、それぞれ得られた画像に基づいて細胞数をカウントした結果を図9に示す。この結果からもMus e細胞はS1Pの濃度に依存して集積されることが分かった。

産業上の利用可能性

[0059] 本発明の医薬組成物は、損傷部位にMus e細胞を集積させることができ、Mus e細胞を用いた再生医療において、効率的な組織再生を目的とした新たな医療用途を提供することができる。

[0060] 本明細書に引用する全ての刊行物及び特許文献は、参照により全体として本明細書中に援用される。なお、例示を目的として、本発明の特定の実施形態を本明細書において説明したが、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、種々の改変が行われる場合があることは、当業者に容易に理解されるであろう。

請求の範囲

- [請求項1] スフィンゴシンー1ーリン酸受容体2を活性化する化合物を有効成分として含む、多能性幹細胞の遊走を活性化するための医薬組成物。
- [請求項2] スフィンゴシンー1ーリン酸受容体2を活性化する化合物が、スフィンゴシンー1ーリン酸受容体2のアゴニストである、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項3] スフィンゴシンー1ーリン酸受容体2のアゴニストが、スフィンゴシンー1ーリン酸又はその誘導体である、請求項2に記載の医薬組成物。
- [請求項4] スフィンゴシンー1ーリン酸受容体2のアゴニストが、1－（2－（1－ベンジル－2，5－ジメチル－1H－ピロール－3－イル）－2－オキソエチル）－5－（トリフルオロメチル）ピリジン－2（1H）－オン、1－（2－（1－ベンジル－2，5－ジメチル－1H－ピロール－3－イル）－2－オキソエチル）ピロリジン－2，5－ジオン、1－（2－（1－ベンジル－2，5－ジメチル－1H－ピロール－3－イル）－2－オキソエチル）－3－メチルイミダゾリジン－2，4，5－トリオン、1－（1－ベンジル－2，5－ジメチル－1H－ピロール－3－イル）－2－（（1－メチル－1H－テトラゾール－5－イル）チオ）エタノン、及び（S）－1－（2－（1－ベンジル－2，5－ジメチル－1H－ピロール－3－イル）－2－オキソエチル）－2'，3'－ジヒドロスピロ〔イミダゾリジン－4，1'－インデン〕－2，5－ジオンからなる群から選択される、請求項2に記載の医薬組成物。
- [請求項5] スフィンゴシンー1ーリン酸受容体2を活性化する化合物が、スフィンゴシンー1ーリン酸リアーゼ阻害剤である請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項6] スフィンゴシンー1ーリン酸リアーゼ阻害剤が、（E）－1－（4－（（1R，2S，3R）－1，2，3，4－テトラヒドロキシブチ

ル) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル) エタノンオキシム、(1 R, 2 S, 3 R) - 1 - (2 - (イソキサゾール - 3 - イル) - 1 H - イミダゾール - 4 - イル) ブタン - 1, 2, 3, 4 - テトラオール、及び 1 - (5 - ((1 R, 2 S, 3 R) - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロキシブチル) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル) エタノンからなる群から選択される、請求項 5 に記載の医薬組成物。

[請求項7] 遊走の活性化が生体の損傷部位への誘導である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

[請求項8] 前記多能性幹細胞が、S S E A 3 陽性である、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

[請求項9] 前記多能性幹細胞が、C D 1 0 5 陽性である、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

[請求項10] 前記多能性幹細胞が、C D 1 1 7 陰性及び C D 1 4 6 陰性である、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

[請求項11] 前記多能性幹細胞が、C D 1 1 7 陰性、C D 1 4 6 陰性、N G 2 陰性、C D 3 4 陰性、v W F 陰性、及び C D 2 7 1 陰性である、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

[請求項12] 前記多能性幹細胞が、C D 3 4 陰性、C D 1 1 7 陰性、C D 1 4 6 陰性、C D 2 7 1 陰性、N G 2 陰性、v W F 陰性、S o x 1 0 陰性、S n a i 1 陰性、S l u g 陰性、T y r p 1 陰性、及び D c t 陰性である、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

[請求項13] 前記多能性幹細胞が、以下の性質の全てを有する多能性幹細胞である、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物：

- (i) テロメラゼ活性が低いか又は無い；
- (i i) 三胚葉のいずれの胚葉の細胞に分化する能力を持つ；
- (i i i) 腫瘍性増殖を示さない；及び
- (i v) セルフリニューアル能を持つ。