

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6878274号  
(P6878274)

(45) 発行日 令和3年5月26日(2021.5.26)

(24) 登録日 令和3年5月6日(2021.5.6)

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	35/34 (2015.01)	A 6 1 K	35/34
A 6 1 P	9/04 (2006.01)	A 6 1 P	9/04
A 6 1 K	31/7105 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00

請求項の数 21 (全 70 頁)

(21) 出願番号	特願2017-518059 (P2017-518059)	(73) 特許権者	391049541
(86) (22) 出願日	平成27年10月2日 (2015.10.2)		シーダーズ-サイナイ・メディカル・センター
(65) 公表番号	特表2017-530158 (P2017-530158A)		CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER
(43) 公表日	平成29年10月12日 (2017.10.12)		アメリカ合衆国90048カリフォルニア州ロサンジェルス、ビバリー・ブルバード8700番
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/053853	(74) 代理人	100124431
(87) 国際公開番号	W02016/054591		弁理士 田中 順也
(87) 国際公開日	平成28年4月7日 (2016.4.7)	(74) 代理人	100174160
審査請求日	平成30年9月4日 (2018.9.4)		弁理士 水谷 馨也
(31) 優先権主張番号	62/059, 308	(74) 代理人	100175651
(32) 優先日	平成26年10月3日 (2014.10.3)		弁理士 迫田 恭子
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 筋ジストロフィーの処置における心筋球由来細胞およびこのような細胞によって分泌されたエキソソーム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験体において慢性退行性筋疾患に続発する心不全の処置のための組成物であって、心筋球由来細胞 (cardiosphere-derived cells; CDC) から単離された複数のエキソソームを含み、

前記複数のエキソソームが直径約90nm~約200nmのエキソソームを含み;

前記複数のエキソソームがCD81+、CD63+または両方であり;

前記組成物の投与が前記被験体を治療するものである、組成物。

【請求項2】

前記慢性退行性筋疾患がデュシェンヌ筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy) である、請求項1に記載の組成物。 10

【請求項3】

単回用量で約1~約100mgのエキソソームタンパク質を含む、請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項4】

用量が被験体に複数回投与される、請求項1~3のいずれかに記載の組成物。

【請求項5】

注射によって投与されるように構成される、請求項1~4のいずれかに記載の組成物。

【請求項6】

前記注射が経皮注射又は心筋内へ直接的であるものを含む、請求項5に記載の組成物。 20

## 【請求項 7】

前記エキソソームが、マイクロRNA miR-146a、miR148a、miR22、miR-24、miR-210、miR-150、miR-140-3p、miR-19a、miR-27b、miR-19b、miR-27a、miR-376c、miR-128、miR-320a、miR-143、miR-21、miR-130a、miR-9、miR-185およびmiR-23aからなる群より選択される1つ以上のマイクロRNAを含む、請求項1~6のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 8】

被験者において慢性筋疾患に続発する心不全の処置のための組成物であって、  
心筋球由来細胞 (cardiosphere-derived cells; CDC) を含む、組成物。

10

## 【請求項 9】

前記慢性筋疾患がデュシェンヌ筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy) である、請求項8に記載の組成物。

## 【請求項 10】

単回用量で約  $1 \times 10^5$  個 ~ 約  $1 \times 10^8$  個またはそれを超える CDC を含む、請求項8又は9に記載の組成物。

## 【請求項 11】

心筋注入されるように構成される、請求項1~10のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 12】

心筋注入が冠動脈内である、請求項11に記載の組成物。

20

## 【請求項 13】

心筋注入が動脈内または静脈内である、請求項11に記載の組成物。

## 【請求項 14】

前記被験体の処置が、線維化の減少、炎症の減少、ミトコンドリア機能の増加および/または心筋形成の増加をもたらす、請求項1~13のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 15】

線維化の減少が、コラーゲン蓄積の減少を含む、請求項14に記載の組成物。

## 【請求項 16】

コラーゲンが、コラーゲンIおよび/またはコラーゲンIIIを含む、請求項15に記載の組成物。

30

## 【請求項 17】

炎症の減少が、細胞質核因子 (赤血球由来2) 様2 (Nrf2) の増加、脂肪酸過酸化最終生成物の減少、炎症細胞の数の減少、および/または抗酸化物質の発現のアップレギュレートを含む、請求項14に記載の組成物。

## 【請求項 18】

抗酸化物質が、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ-2 (SOD-2) およびグルタミン酸-システインリガーゼ触媒 (GCLC) サブユニットを含む、請求項17に記載の組成物。

## 【請求項 19】

炎症細胞が、CD68+マクロファージおよびCD3+T細胞を含む、請求項17に記載の組成物。

40

## 【請求項 20】

ミトコンドリア機能の増加が、ミトコンドリア超微細構造の増加および/またはミトコンドリア生合成の増加を含む、請求項14に記載の組成物。

## 【請求項 21】

ミトコンドリア機能の増加が、核PPAR-コアクチベーター-1 (PGC-1) 発現の増加を含む、請求項14に記載の組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

50

## 【 0 0 0 1 】

## 連邦支援研究に関する声明

本発明は、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health) によって認められた R 0 1 H L 0 8 3 1 0 9 に基づいて政府支援によってなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

## 【 0 0 0 2 】

## 発明の分野

本発明は、心疾患の処置を含む治療的使用のための、細胞およびそれらの抽出物 (特に、細胞エキソソーム) の使用に関する。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 3 】

## 背景

米国では、約 2 0 , 0 0 0 人の少年および青年がデュシェンヌ筋ジストロフィー (DMD) に罹患している。中心的な原因は、ジストロフィン複合体の遺伝子異常であり、骨格筋および心臓組織に対する二次的損傷を伴う。実質的にすべての患者がコルチコステロイドで処置されるが、有効であると証明された処置はない。DMD に続発する心不全 (HF) は、15 歳超の年齢の実質的にすべての DMD 患者が罹患しており、しばしば死の原因となる。DMD 関連 HF は、積極的に、初期発作 (ジストロフィン複合体の遺伝子異常) から、心臓の構造および機能の無症候性異常 (ステージ B)、明白な症候性 HF (ステージ C)、進行性 HF (ステージ D)、そして死に至る。HF の進行は、高い入院リスク、および全体的なヘルスケア資源の消耗に関連する。DMD 関連 HF の経過中の死亡様式としては、突然心臓死 (これは、HF が悪化するにつれて増加する) または循環虚脱に至る進行性 HF が挙げられる。また、DMD の後期における障害の多くは、骨格筋疾患ではなく HF によるものである。したがって、DMD HF は、革新的治療のための放置されている重要な標的である。

## 【 0 0 0 4 】

心臓関連疾患および症状の治療の非常に有望な手段としては、梗塞心筋における再生、血管新生および機能的改善を刺激することができる心筋球由来細胞 (cardiosphere-derived cells; CDC) が挙げられる。CDC を用いる以前のまたは進行中の試験は、ステージ B (心機能は低下しているが、HF の症候はまだ現れていない) の成人患者を対象とする。DMD 関連 HF では、治療アプローチは、ステージ C および D に対して最も劇的であり得る。これらの後期疾患は、最適な内科治療 (これもまた、DMD 患者における疾患進行を実際に遅延することは示されていない) にもかかわらず、高い死亡率 (1 年当たり 2 0 % 超) に関連する。排他的な共存症により、心臓移植は、DMD 患者の選択肢ではない。これらの患者はまた、機械的循環支援デバイスの候補ではない。要約すると、現在利用可能な処置は、DMD 関連 HF の基礎となる病態生理 (これは、機能的心筋の喪失、および生きている心筋の瘢痕への変換である) に対処しない。

## 【 0 0 0 5 】

興味深いことに、CDC の肯定的な治療利益は、間接的な機構を介して生じ、新たに再生された心筋および血管系のほとんどは、内因性起源のものであることを示唆する証拠が増加している。恐らくは、CDC が、多くの成長因子およびサイトカインを分泌する豊富な生物学的工場であるという事実により、注射した細胞が除去された後においても、CDC の有益な治療効果が何とか長く持続する。これらの好ましい因子が、CDC によって産生される細胞エキソソーム (多小胞エンドソームが原形質膜と融合した場合に細胞によって分泌される脂質二重層ナノ小胞) 中に存在し得るかを理解することが重要な関心事である。これらのプロセスで分泌されたエキソソームの役割の確認はまだ検討されておらず、CDC によって開始される再生を管理するこれらのプロセスの理解は、新たな治療アプローチを開拓する可能性がある。既存の治療は、DMD HF の進行を止めることができないので、CDC 由来エキソソームは、HF の動物モデルで観察された様々な相乗的機構をリクルートすることによって、満たされていない主な医療ニーズに有効に対処し得る。こ

10

20

30

40

50

れは、内因性幹細胞を心筋傷害部位に誘引し、心筋および血管への分化を促進して、場合によりHFの病態生理を回復させる能力を含む。従来の治療が後期患者に対して利用不可能であることを考慮すると、細胞治療の代替としてのエキソソームベースのアプローチの潜在的利益は特に魅力的である。CDC由来エキソソームが、疾患の自然経過を根本的に変化させ得る可能性が存在する。

#### 【0006】

CDC由来エキソソームの作製および治療適用に関する組成物および技術が本明細書に記載される。これらの生物学的分子は、サイトカイン、成長因子、転写因子、核酸（マイクロRNAなどの非コード核酸を含む）を含む生物学的因子であって、CDCの治療効果の多くを開始および促進するように働く生物学的因子のユニークな環境を含有する。本発明者の研究は、エキソソームおよびそれらの構成マイクロRNAが、傷害心臓におけるアポトーシス、炎症および線維化を有利に調節して機能回復をもたらし、組織生存を増加させることを実証する。したがって、CDC由来エキソソームは、組織修復のための新規な「無細胞」治療候補である。

#### 【発明の概要】

#### 【0007】

処置の方法であって、慢性退行性筋疾患に続発する心不全の処置を必要とする被験体を選択することと、複数のエキソソームを含む組成物を前記被験体に投与することを含み、前記複数のエキソソームが、無血清培地中で成長した心筋球由来細胞（CDC）から単離されたものであり、直径約90nm～約200nmのエキソソームを含み、CD81+、CD63+または両方であり、さらに、前記組成物の投与が前記被験体を処置する方法が本明細書に記載される。他の実施形態では、慢性退行性筋疾患は、デュシェンヌ筋ジストロフィーである。他の実施形態では、組成物の投与は、単回用量で約1～約100mgのエキソソームタンパク質を含む。他の実施形態では、単回用量を被験体に複数回投与する。他の実施形態では、組成物の投与は、注射を含む。他の実施形態では、注射は、経皮注射を含む。他の実施形態では、注射は、心筋内へ直接的である。他の実施形態では、組成物の投与は、心筋注入を含む。他の実施形態では、心筋注入は、動脈内または静脈内である。他の実施形態では、被験体の処置は、線維化の減少、炎症の減少、ミトコンドリア機能の増加および/または心筋形成の増加をもたらす。他の実施形態では、線維化の減少は、コラーゲン蓄積の減少を含む。他の実施形態では、コラーゲンは、コラーゲンIおよび/またはコラーゲンIIIを含む。他の実施形態では、炎症の減少は、細胞質核因子（赤血球由来2）様2（Nrf2）の増加、脂肪酸過酸化最終生成物の減少、炎症細胞の数の減少、および/または抗酸化物質の発現のアップレギュレートを含む。他の実施形態では、抗酸化物質は、ヘムオキシゲナーゼ-1（HO-1）、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ-2（SOD-2）、グルタミン酸-システインリガーゼ触媒（GCLC）サブユニットを含む。他の実施形態では、炎症細胞は、CD68+マクロファージおよびCD3+T細胞を含む。他の実施形態では、ミトコンドリア機能の増加は、ミトコンドリア超微細構造の増加および/またはミトコンドリア合成の増加を含む。他の実施形態では、ミトコンドリア機能の増加は、核PPAR- $\gamma$ コアクチベーター-1（PGC-1）発現の増加を含む。他の実施形態では、エキソソームは、マイクロRNA miR-146a、miR148a、miR22、miR-24、miR-210、miR-150、miR-140-3p、miR-19a、miR-27b、miR-19b、miR-27a、miR-376c、miR-128、miR-320a、miR-143、miR-21、miR-130a、miR-9、miR-185およびmiR-23aからなる群より選択される1つ以上のマイクロRNAを含む。

#### 【0008】

処置の方法であって、慢性筋疾患に続発する心不全の処置を必要とする被験体を選択することと、心筋球由来細胞（CDC）を含む組成物を投与することを含み、前記組成物の投与が前記被験体を処置する方法が本明細書にさらに記載される。他の実施形態では、慢性筋疾患は、デュシェンヌ筋ジストロフィーである。他の実施形態では、組成物の投与は

、単回用量で約  $1 \times 10^5$  個 ~ 約  $1 \times 10^8$  個またはそれを超える CDC を含む。他の実施形態では、組成物の投与は、心筋注入を含む。他の実施形態では、心筋注入は、冠動脈内である。他の実施形態では、心筋注入は、動脈内または静脈内である。他の実施形態では、被験体の処置は、線維化の減少、炎症の減少、ミトコンドリア機能の増加および/または心筋形成の増加をもたらす。他の実施形態では、線維化の減少は、コラーゲン蓄積の減少を含む。他の実施形態では、コラーゲンは、コラーゲン I および/またはコラーゲン III を含む。他の実施形態では、炎症の減少は、細胞質核因子 (赤血球由来 2) 様 2 (Nrf2) の増加、脂肪酸過酸化最終生成物の減少、炎症細胞の数の減少、および/または抗酸化物質の発現のアップレギュレートを含む。他の実施形態では、抗酸化物質は、ヘムオキシゲナーゼ - 1 (HO-1)、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ - 2 (SOD-2)、グルタミン酸 - システインリガーゼ触媒 (GCLC) サブユニットを含む。他の実施形態では、炎症細胞は、CD68 + マクロファージおよび CD3 + T 細胞を含む。他の実施形態では、ミトコンドリア機能の増加は、ミトコンドリア超微細構造の増加および/またはミトコンドリア生合成の増加を含む。他の実施形態では、ミトコンドリア機能の増加は、核 PPAR- $\gamma$  コアクチベーター - 1 (PGC-1) 発現の増加を含む。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】心筋球由来細胞エキソソームの特性評価。(A)心筋球由来細胞(CDC)および正常ヒト真皮線維芽細胞(NHDF)由来エキソソームペレットで測定した、両サンプルからの馴化培地と比較でのRNA含量。(B)エキソソームRNAは、エキソソームの脂質二重層膜によってRNase分解から保護される。tritonの存在下または非存在下で、エキソソームペレットをRNase Aで処理して、RNase 媒介性分解からの保護を評価した。すべてのサンプルをプロテイナーゼKで処理して、複合体を解離させた(さもなければこれは、RNAを遮蔽し得る)(n = 技術的反復4回)。(C)CDCおよびNHDFエキソソームは、質量分析によって明らかになったように、普遍的なエキソソームマーカーを発現する。(D)保存されているCD63マーカーの発現に基づく、CDCおよびNHDF馴化培地からのエキソソーム定量(n = 技術的反復3回)。(E)CDCから単離したエキソソームの透過型電子顕微鏡による視覚化。3つの集団(サイズ別)が示されている。(F)透過型電子顕微鏡画像から測定したCDC由来エキソソームのサイズ分布; n = カウントしたエキソソーム100個。CDCエキソソームは、血管新生を促進し、インビトロで新生ラット心筋細胞(NRCM)の生存および増殖を促進する。

【図2】CDCエキソソームは、MI後のマウス心臓において構造的および機能的利益をもたらす(A)急性モデルでは、SCID BeigeマウスはMIを経験しており、CDCエキソソーム、NHDFエキソソームまたはビヒクル(対照)を心臓に注射した。1日目、15日目および30日目に、動物(n = 動物8匹/群)をエコーし、次いで、組織学的分析のために屠殺した。CDCエキソソームは、左心室駆出率(LVEF)を増加させる。(B~E)CDCエキソソームの構造的利益。3つの各群由来の心臓のマッソントリクローム染色切片(B)およびプール形態学的分析(C~E; n = 心臓3つ/群)は、CDCエキソソームを注射した心臓における癒痕の減少および生存心筋量の増加を明らかにしている。(F)慢性モデルでは、3カ月齢のSCID Beigeマウス(n = 動物6匹/群)は、MIを経験した。3週間後に、CDCエキソソームまたは対照を動物に心筋内注射した。注射24時間前(21日目)および3週間後(42日目)に、機能測定を行い、その後、動物を組織学的分析のために屠殺した。(G~J)急性MIモデルと同様に、CDCエキソソームは、慢性MIのモデルのマウス心臓(n = 心臓4つ/群)において機能的および構造的利益をもたらす。チューキー事後検定および両側スチューデントt検定による一元配置ANOVAを使用して、\*p < 0.05、\*\*p < 0.01および\*\*\*p < 0.001。データは、平均およびSEMとして表されている。図8および9も参照のこと。

【図3】エキソソーム阻害は、CDCによる利益を減少させる。(A)GW4869は、CDCにおけるエキソソーム産生を用量依存的に阻害した(n = 技術的反復3回)。(B

10

20

30

40

50

) GW4869は、GW4869またはその溶媒DMSOで処理したCDCのカルセインアッセイによって示されるように、CDC生存率に影響を与えない(n = 技術的反复4回)。(CおよびD)チャンバースライド上で、新生ラット心筋細胞(NRCM)を培養し、GW4869またはDMSOのいずれかに曝露したCDCによって馴化した培地で処理した。次いで、NRCMを培養培地で処理し、5日後、Ki67およびTUNELについてスライドを染色して、増殖およびアポトーシスを評価した(n = 技術的反复4回/群)。(E)左心室駆出率のプールデータ(n = 動物8匹/群)。(F~I)2つの群の代表的なマッソントリクローム染色心臓切片(F)およびプール形態学的分析(G~I; n = 心臓4つ/群)は、GW869処理CDCを注射した心臓における瘢痕量、生存心筋量および梗塞壁厚(IWT)のプールデータで明らかのように、CDCによる利益の減損を明らかにしている。スチューデントt検定を使用して、\*p < 0.05および\*\*p < 0.01。データは、平均およびSEMとして表されている。図10も参照のこと。

【図4】miR-146aは、CDCエキソソームにおいて非常に豊富であり、インビトロおよびインビボで治療利益を与える。(A)NHDFエキソソームと比較した、CDCエキソソームにおけるマイクロRNA存在量の倍率変化(n = 4回の独立した実験)。CDCエキソソームおよびNHDFエキソソームから、全RNA(マイクロRNAを含む)を単離した。マイクロRNAアレイによって、qRT-PCRを実施した。(B)CDCエキソソームとNHDFエキソソームと間の可変マイクロRNAプロファイルを示すベン図。フォントサイズは、各マイクロRNAの差次的発現の規模を反映する。(C)CDC由来エキソソームで処理した梗塞マウス心臓は、NHDFエキソソーム処理心臓と比較して高レベルのmiR-146aを有する(n = 動物2匹/群、技術的反复3回/群)。(D)miR-146aは、ストレス負荷された新生ラット心筋細胞を保護する。80nM miR-146a模倣物または模倣物対照で心筋細胞を前処理し、次いで、無血清培地中で100mM過酸化水素に2.5時間曝露した(n = 技術的反复4回; 研究対象の新生ラット心筋細胞は、3匹の異なる母からの20~30匹の仔ラットに由来していた)。(E)miR-146a処理心筋細胞と模倣物対照処理心筋細胞との間のmRNA存在量の倍率差を示すマイクロアレイデータ。miR-146aは、ストレス負荷された新生ラット心筋細胞におけるIrk1およびTrf6を抑制する。(F)急性MI後に、miR-146a欠損動物は、心機能および心構造が重度に損なわれている。左室駆出率のプールデータ(n = 動物8匹/群)。(G~J)3つの群の代表的なマッソントリクローム染色心臓切片(G)およびプール形態学的分析(H~J; n = 心臓4つ/群)は、GW869処理CDCを注射した心臓における瘢痕量、生存心筋量および梗塞壁厚(IWT)のプールデータで明らかのように、CDCによる利益の減損を明らかにしている。\*p < 0.05、{p < 0.05; \*\*p < 0.01および{{スチューデントt検定を使用して、p < 0.01(\*KO対WT; {KO対KO-R)。データは、平均およびSEMとして表されている。図11および12も参照のこと。

【図5】miR-146Aは、MLの急性および慢性マウスモデルにおける収縮機能を改善する(A)CDCエキソソームのmiR-146aノックダウンは、ストレス負荷されたNRVMをインビトロで保護するそれらの能力を低下させる(n = 技術的反复3回; 新生ラット心筋細胞は、3匹の異なる母からの20~30匹の仔ラットに由来していた)。miR-146a阻害剤、またはCaenorhabditis elegansマイクロRNAベースの配列を有するヘアピン対照(HP-CTRL)のいずれかで、CDCをトランスフェクトした。(B~F)急性MIプロトコールデータ。左室駆出率の時間経過(n = 動物6匹/群; B)。2つの各群の代表的なマッソントリクローム染色心臓切片(C)およびプール形態学的分析(n = 心臓4つ/群)は、マイクロRNA対照と比較した、miR-146aで処理した動物における瘢痕量の減少、生存心筋量の増加および梗塞壁厚の増加を明らかにしている(D~F)。(G~L)miR-146aは、慢性MIのマウスモデルのCDCエキソソーム処理心臓に見られる構造的および機能的利益のいくつかを再現する(MI後21日目に注射したmiR-146a模倣物または模倣物対照; n = 動物6匹/群)。3週間後(42日目)に、miR-146aで処理した動物は、対照

10

20

30

40

50

と同程度の心機能を示したが (G)、有害なりモデリングは有意に減少した (H)。癒痕量も同様であった (I)。生存率および梗塞壁厚は、有意な構造的利益であったが (JおよびK)、癒痕量は減少しなかった (I)。スチューデント t 検定を使用して、分析を行った；<sup>\*</sup>p < 0.05、<sup>\*\*</sup>p < 0.01および<sup>\*\*\*</sup>p < 0.001。データは、平均およびSEMとして表されている。図12および13も参照のこと。

【図6】miR-146aは、MI病理に関する遺伝子をターゲティングする。(AおよびB)miR-146Aまたは模倣物対照を注射した7日後の慢性MIマウス心臓における公知のmiR-146a標的のダウンレギュレーション。(A)IRAK、TRAF6、SMAD4、NOX4およびMPO(好中球浸潤のマーカー)のウエスタンブロット。1群当たり2つの心臓からプールしたタンパク質溶解物を各ウェルにロードしており、ブロットは、2匹の各動物のプールサンプルを表す(n=技術的反復4回)。(B)グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)に対して正規化した(A)のブロットのデンストメトリー分析。(C)本発明者らの研究仮説の略図。CDCは、傷害心筋において機能のおよび構造的利益を主にパラクリン的に促進する。CDCは、傷害心筋における利益を媒介するマイクロRNAを含有するエクソソームを分泌する。これらのマイクロRNAは、様々な心筋区画における転写産物をターゲティングし、MI後に心機能の増加、生存組織の増加および癒痕の減少が最終的にもたらされる。

10

【図7】CDCからのエクソソームの単離。(A)エクソソームの単離およびエクソソームの精製のグラフ表示。(B)15日間の無血清馴化期間にわたってCDCで実施した細胞生存(カルセイン)および細胞死(エチジウムホモダイマー-1)アッセイ。(C)無血清馴化前後のCDCの代表的な画像。

20

【図8】CDCエクソソームは、急性MIのマウスモデルにおける炎症を低減する。(A)40個の炎症促進性マーカーの代表的なタンパク質アレイ。(B)CDCエクソソーム、NHDFエクソソームまたは対照で処理したマウス心臓における炎症性タンパク質の定量。データは、1群当たり3つのマウス心臓からのものである。一元配置ANOVA(95%CI)を使用して、分析を行った(n=心臓3つ/群)。データは、平均および平均の標準誤差として表されている。

【図9】CDCエクソソームは、MI後のマウス心臓において構造的および機能的利益をもたらす。CDCエクソソームは、慢性MIのマウスモデルにおいて機能的改善を刺激し、有害なりモデリングおよび心肥大を軽減する。CDCエクソソームで処理した動物は、部分面積変化(A)、収縮末期容積(B)および拡張末期容積(C)(A~C、n=動物6匹/群)によって示されるように、対照と比較して有意な機能的改善を示した。CDCエクソソームで処理した動物はまた、癒痕(D)である組織切片の周囲の割合、コムギ胚芽凝集素およびDAPI(F)で染色することによって測定した心筋細胞肥大の減少(E)、ならびに梗塞領域における血管新生の増加(G)に見られるように、構造的改善を示した。CDCエクソソーム処理動物の境界領域では、対照と比較して少ない心筋細胞死が観察された。(H、I)(D~I n=心臓4つ/群)スチューデント t 検定を使用して、<sup>\*</sup>P < 0.05、<sup>\*\*</sup>P < 0.01、<sup>\*\*\*</sup>P < 0.001。スケールバーはすべて、50 μmを表す。データは、平均および平均の標準誤差として表されている。

30

【図10】CDCにおけるエクソソーム分泌の障害は、インピトロでCDCの保護効果を低下させる。50 μm H2O2で新生ラット心室筋細胞を15分間ストレス負荷し、続いて、5 μm のスピロエポキシド、20 μm のGW4869またはビヒクル(DMSO)で前処理したCDCでトランスウェル処理した。(A)TUNEL染色(赤色)、ファロイジン(緑色)およびDAPI(青色)を使用して、細胞死を測定した。(B)カウントした全細胞のTUNEL陽性心筋細胞核の割合として表される4つの群のプールデータ(n=技術的反復3回、新生ラット心筋細胞は、3匹の異なる母からの20~30匹の仔ラットに由来していた)(B)。スチューデント t 検定を使用して、<sup>\*</sup>P < 0.05、<sup>\*\*</sup>P < 0.01、<sup>\*\*\*</sup>P < 0.001。スケールバーはすべて、50 μmを表す。データは、平均および平均の標準誤差として表されている。

40

【図11】Mir PCRアレイのヒートマップは、最も差次的に発現されたマイクロR

50

NAとしてMir-146aを同定する。PCRアレイプレートレイアウト上にオーバーレイしたCDCエキソソームとNHDFエキソソームとの間の転写産物の差次的な存在量の調節倍率のデータを示すヒートマップ。

【図12】mir-146aは、ストレス負荷された新生ラット心筋細胞を保護する。(A) 80 nM mir-146a模倣物または模倣物対照で心筋細胞を前処理し、次いで、5 mM塩化コバルトに2時間曝露した(n = 技術的反復4回/群、新生ラット心筋細胞は、3匹の異なる母からの20~30匹の仔ラットに由来していた)(B、C) mir-146aヘアピン阻害剤でトランスフェクトしたCDCに由来するCDCエキソソーム。エキソソームは馴化培地に由来し、エキソソームにおけるqPCRによって、mir-146aノックダウンを確認した。(C)対照と比較した、146aフリーエキソソームで処理したNRVMにおけるmir-146aレベルの低下(n = 技術的反復3回/群、新生ラット心筋細胞は、3匹の異なる母からの20~30匹の仔ラットに由来していた)。影響を受けた経路を示すトランスクリプトームデータに由来する経路分析および(B)マイクロアレイデータ分析に基づく推定ハブとしてのMYC活性化を示す経路図。

【図13】mir-146aは、CDCエキソソームの全部ではないが一部の効果を再現する。mir-146aは、慢性MIのマウスモデルにおいて有害なリモデリングおよび心肥大を軽減する。(A、C) CDCエキソソームで処理した動物は、部分面積変化(A)、収縮末期容積(B)および拡張末期容積(AC、n = 動物6匹/群)によって示されるように、対照と比較して有意な機能的改善を示さなかった。しかしながら、瘢痕(D)である組織切片の周囲の割合、コムギ胚芽凝集素およびDAPIで染色することによって測定した心筋細胞肥大の減少(E)に見られるように、構造的改善が認められた。2つの群間で、血管新生の差異は観察されなかった(G)。mir-146a処理動物の境界領域では、対照と比較して少ない心筋細胞死が観察された。(H、I)(D~I n = 心臓4つ/群) スチューデントt検定を使用して、\*P < 0.05、\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.001。スケールバーはすべて、50 μmを表す。データは、平均および平均の標準誤差として表されている。

【図14】CDC処理は、Nrf2抗酸化経路の活性を強化し、Nrf2下流遺伝子産物の発現を増加させた。(A) ビヒクル(Mdx + ビヒクル)またはCDC(Mdx + CDC)で処理した3週間後のmdxマウス心臓におけるNrf2を示す代表的な免疫組織化学的画像。年齢適合野生型マウス(CTL)は、対照としての役割を果たした。(B) および(C) : ビヒクルまたはCDCで処理した3週間後のmdxマウス心臓における細胞質および核Nrf2含量(B)およびNrf2下流遺伝子産物(HO-1、グルタミン酸-システインリガーゼの調節(GCLM)および触媒(GCLC)サブユニット、SOD-1、カタラーゼおよびSOD-2)のタンパク質存在量(C)を実証する代表的なウエスタンブロットおよびプールデータ。10カ月齢時に、実験マウスをリクルートした。CDC処理mdxマウスでは、細胞質におけるリン酸化Nrf2(Nrf2-ps40)の顕著な増加は、核Nrf2含量の増大およびNrf2下流遺伝子産物の発現の増加を伴っていた(B、C)。データは、平均 ± SEMである; 各群でn = 7。†Mdx + ビヒクルおよび対照(CTL; 野生型)との対比で、P < 0.05; スケールバー: 5 μm。

【図15】Mdxマウスの心臓組織では、CDC処理は、ミトコンドリアの構造および含量を顕著に回復させ、呼吸鎖サブユニットの発現を増強した。(A) : ビヒクル(Mdx + ビヒクル)またはCDC(Mdx + CDC)で処理した3週間後のmdxマウスにおける心筋細胞ミトコンドリアの透過型電子顕微鏡の代表的な画像。10カ月齢のmdxマウスの心筋細胞では、クリステが変化した(円形/管状の)細長いミトコンドリアが優勢であった。CDC処理は、心筋細胞のミトコンドリアサイズおよびクリステ構造(層状クリステ)を有意に回復させた。(B) : 処理3週間後のビヒクル/CDC処理Mdxマウスおよび年齢適合野生型マウス(CTL)の心臓組織における核Nrf1タンパク質含量ならびに細胞質および核ミトコンドリア転写因子A(mtTFA)のタンパク質存在量を示す代表的なウエスタンブロットおよびプールデータ。(C) : 処理3週間後の実験動物の心臓組織におけるミトコンドリアDNAコピー数/細胞を実証する棒グラフ。(D) : ビ

10

20

30

40

50

ヒクル (Mdx + ビヒクル) および CDC (Mdx + CDC) で処理した3週間後の Mdx マウスの心臓組織におけるミトコンドリア呼吸鎖サブユニットのタンパク質含量を示す代表的なウエスタンブロットおよびプールデータ。Nrfl および mtTFA の同時アップレギュレーションは、ミトコンドリア DNA コピー数の増加に関連しており、ミトコンドリア呼吸鎖サブユニットの発現の回復を伴っていた。PC<sup>\*</sup>: 陽性対照。データは、平均 ± SEM である; 各群で n = 7。† Mdx + ビヒクル および 対照 (CTL; 野生型) との対比で、P < 0.05; †† Mdx + CDC および 対照 (CTL; 野生型) との対比で、P < 0.001。

【図16】10カ月齢の Mdx マウスの心臓における超微細構造変性変化は、CDC で処理した3週間後に顕著に減少した。(A): 10カ月齢の Mdx マウスにおける非晶質タンパク質の細胞内蓄積、サルコメアの広範な破壊および不規則性 (Z ストリーミング)、ならびに原線維間ミトコンドリアの無秩序な変化を示す心筋細胞の透過型電子顕微鏡の代表的な画像。心筋内注射3週間後に、CDC は、心筋細胞の変性変化を顕著に減少させた。(B): 野生型対照マウス (CTL) ならびに処理3週間後のビヒクル - (Mdx + ビヒクル) および CDC 処理 Mdx マウス (Mdx + CDC) のミトコンドリアにおけるミトコンドリアの平均長ならびに円形クリステの総数および割合 (%) を示す棒グラフ。データは、平均 ± SEM である; † Mdx + CDC および 対照 (CTL; 野生型) との対比で、P < 0.005; †† Mdx + ビヒクル および 対照 (CTL; 野生型) との対比で、P < 0.005。

【図17】CDC 処理は、心臓コラーゲン含量および線維化を減少させた。ビヒクル (Mdx + ビヒクル) または CDC (Mdx + CDC) で処理した3週間後の Mdx マウス心臓における線維化およびコラーゲン含量を表す代表的なマッソントリクローム画像 (A) ならびにウエスタンブロットおよびプールデータ (B)。年齢適合野生型マウス (CTL) は、対照としての役割を果たした。コラーゲンのバンドサイズ: 90 ~ 150 kDa。データは、平均 ± SEM である; 各群で n = 7; † Mdx + CDC および 対照 (CTL; 野生型) との対比で、P < 0.01。スケールバー: 1 mm

【図18】CDC 処理は、心筋細胞のサイクリングおよび増殖を増加させ、心臓系列に分化する C - Kit 陽性細胞 (C - Kit + Nkx2.5+) の数を増大させた。10カ月齢時に処理した Mdx マウスの代表的な免疫組織化学的画像およびプールデータ ((A) ~ (C); Kit67 (A)、aurora B (B)、c-kit および Nkx2.5 (C) について染色した CTL [野生型]、ビヒクル および CDC 処理 Mdx マウス心臓)。矢印は、Kit67+ (A) および aurora B+ (B) 心筋細胞、ならびに c-kit および Nkx2.5 の両方について陽性の細胞 (C) を指す。サイクリング (Kit67+) および増殖 (Aurora B+) 心筋細胞の比率は、Kit67+ および aurora B+ 心筋細胞の数を強拡大視野 (HPF) 当たりの心筋細胞の総数で割ったものとして表されている (プールデータ (A)、(B))。c-kit + Nkx2.5+ 細胞の割合は、c-kit + Nkx2.5+ 細胞の数を HPF 当たりの心筋細胞の総数で割ったものとして計算した (プールデータ (C))。細胞膜の染色および描写のために、WGA (コムギ胚芽凝集素) を適用した。データは、平均 ± SEM である; 各群で n = 7。† Mdx + ビヒクル および 対照 (CTL; 野生型) との対比で、P < 0.01。スケールバー: 10 μm。

【図19】心筋球由来細胞 (CDC) 移植後の機能的利益。左心室駆出率 (EF) ならびに LV 拡張末期 (LV EDV) および収縮末期 (LV ESV) 容積のプールデータは、10カ月齢時に CDC を投与した Mdx マウスでは、CDC 移植が、3カ月間にわたる EF、LV EDV および LV ESV の持続的改善をもたらしたことを示す。データは、平均 ± SEM である; n = 5 (対照野生型) および n = 12 (Mdx + ビヒクル、Mdx + CDC)。\* Gq + CDC との対比で、P < 0.05; \*\*\* Gq + CDC との対比で、P < 0.001。

【図20】CDC 処理による最大運動能力の改善。年齢適合野生型マウス (CTL) およびビヒクル (Mdx + ビヒクル) または CDC (Mdx + CDC) で処理した10カ月齢

10

20

30

40

50

のMdxマウスを、CDC/ビヒクル処理3週間後から高強度運動(疲労するまで、平均速度を2分ごとに段階的に増加させた)に週1回供した。CDC処理mdxマウスでは、ビヒクル処理マウスと比べて、運動能力の持続的改善が観察された。データは、平均±SEMである; n = 6(対照野生型)およびn = 11(Mdx + ビヒクル、Mdx + CDC)。<sup>\*</sup>Gq + ビヒクルとの対比で、P < 0.05。

【図21】ヒトCDC由来エキソソームの移植後の機能的利益。左心室駆出率(EF)ならびにLV拡張末期(LV EDV)および収縮末期(LV ESV)容積のプールデータは、10カ月齢のMdxマウスでは、エキソソーム移植が、心筋内注射3週間後にEF、LV EDVおよびLV ESVの改善をもたらしたことを示す。データは、平均±SEMである; 各群でn = 11。<sup>\*</sup>Gq + CDCとの対比で、P < 0.05。

10

【図22】CDC由来エキソソームは、心臓コラーゲン含量および線維化を低減する。ビヒクル(Mdx + ビヒクル)またはエキソソーム(Mdx + XO)で処理した3週間後のmdxマウス心臓におけるコラーゲンIおよびIIIタンパク質含量を示す代表的なウエスタンブロットおよびプールデータ。年齢適合野生型マウス(CTL)は、対照としての役割を果たした。コラーゲンのバンドサイズ: 90 ~ 150 kDa。データは、平均±SEMである; 各群でn = 7。<sup>†</sup>Mdx + XOおよび対照(CTL; 野生型)との対比で、P < 0.01。

【図23】mdxマウスにおけるCDC移植によって改善された機能、生存および抗酸化経路。A: ベースライン時(10カ月齢)および3カ月後(それぞれn = 12)の注射に応じた、CDC注射mdxマウス(Mdx + CDC)およびビヒクル注射mdxマウス(Mdx + ビヒクル)における駆出率(EF)。B: CDCまたはビヒクルを投与した3週間後から高強度トレッドミル運動に週1回供したマウスにおける運動能力(CTL: n = 7; Mdx + ビヒクルおよびMdx + CDC: それぞれn = 11)。C: Bと同じ動物における生存率のカプラン・マイヤー分析は、ビヒクル処理mdxマウスでは、CDC処理mdxマウスまたは野生型対照よりも、生存率が低いことを示す(p < 0.001、ログランク検定); しかしながら、後者の2つの群は、統計的に同程度であった。D: ビヒクルまたはCDCを投与した3週間後のmdxマウス心臓におけるNrf2の免疫組織化学的画像。年齢適合野生型マウス(CTL)は、対照としての役割を果たした。スケールバー: 10 μm。E: ビヒクルまたはCDCを投与した3週間後のmdxマウス心臓におけるリン酸化Akt (Akt - p<sup>T308</sup>)、細胞質リン酸化Nrf2 (Nrf2 - p<sup>S40</sup>)、核Nrf2および下流遺伝子産物(ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ2(SOD-2)、およびグルタミン酸-システインリガーゼ(GCLC)の触媒サブユニットのタンパク質存在量のウエスタンブロットおよびプールデータ(n = 4 ~ 6)。F: 注射3週間後の心筋マロンジアルデヒドタンパク質付加物のプールデータおよび代表的なウエスタンブロットは、Mdx + CDCにおける酸化ストレスの軽減を示す。プールデータは、平均±SEMである。<sup>\*</sup>Mdx + CDCとの対比で、P < 0.05; <sup>#</sup>Mdx + CDCとの対比で、P < 0.005; <sup>†</sup>Mdx + ビヒクルおよびCTL(WT、野生型マウス)との対比で、P < 0.05; <sup>‡</sup>Mdx + CDCおよびCTL(WT、野生型マウス)との対比で、P < 0.002。

20

30

【図24】mdxマウス心臓におけるCDC移植によって軽減されたミトコンドリア機能不全および炎症。A: ビヒクル(Mdx + ビヒクル)またはCDC(Mdx + CDC)を投与した3週間後のmdxマウス心臓の透過型電子顕微鏡(TEM)画像。年齢適合野生型マウス(CTL)は、対照としての役割を果たした。B: TEM画像のミトコンドリアの数。C: 処理3週間後の心臓組織におけるミトコンドリアDNAコピー数(核ゲノム当たり)。D: 処理3週間後のCTLおよびmdxマウス由来の心臓組織におけるミトコンドリア呼吸鎖サブユニットの代表的なウエスタンブロットおよびプールデータ(n = 4 ~ 6/群)。E: CTLおよび処理3週間後のCDCまたはビヒクル処理mdxマウスの心臓から単離したミトコンドリアの酸素消費速度(OCR)(CTL: n = 3; Mdx + ビヒクルおよびMdx + CDC: それぞれn = 8)。示されている場合には、酸化リン酸化の基質(ピルビン酸、リンゴ酸およびADP)、選択的脱共役剤(FCCP)および遮

40

50

断剤（オリゴマイシン [O l i g . ] ; アンチマイシンおよびロテノン [ A n t i . & R o t . ] ）を適用した。F : m d x マウス心臓における C D C 投与 3 日後および 3 週間後のミトコンドリア P I N K 1 および核 P P A R コアクチベーター - 1 ( P G C - 1 ) のタンパク質存在量を示すウエスタンブロットおよびプールデータ ( n = 4 ~ 6 ) 。 G : 炎症細胞マーカー C D 6 8 、 C D 2 0 および C D 3 について染色した心臓の免疫組織化学的画像。H : m d x マウス心臓における示されている炎症細胞の平均数を表すウエスタンブロット、プールデータおよび棒グラフ ( 右下 ) 。 C D C 処理マウスでは、C D 6 8 + マクロファージ ( 上段 ) および C D 3 + T 細胞 ( 下段 ) の蓄積は、N F - B 経路の阻害に関連して減少していた。データは、平均 ± S E M である。† M d x + ビヒクルおよび C T L ( W T 、野生型マウス) との対比で、P < 0 . 0 5 ; ‡ M d x + C D C および C T L ( W T 、野生型マウス) との対比で、P < 0 . 0 0 3 ; \* M d x + C D C との対比で、P < 0 . 0 5 。スケールバー : 5 μ m ( A ) ; 1 0 μ m ( G ) 。

【図 2 5】C D C エキソソームは、m d x マウスにおいて C D C の利益を再現する。A : m d x マウスにおける 2 回の各 C D C エキソソーム逐次注射による少なくとも 3 カ月間にわたる持続的な機能的利益 ( n = 1 1 ) 。 B および C : C D C エキソソームを注射した 3 週間後における心臓コラーゲン含量の減少 ( B ) および心筋形成の増強 ( C ) 。心臓コラーゲン I A および I I I A ( B ) のウエスタンブロットおよびプールデータ、ならびに免疫組織化学的画像およびプールデータ ( C : K i 6 7 [ C 1 ] および A u r o r a B [ C 2 ] ) について染色した C T L [ 野生型 ] 、ビヒクルおよび C D C エキソソーム処理 [ M d x + X O ] m d x マウス心臓 ; n = 4 ~ 6 / 群 ) 。矢印は、K i 6 7 + ( C I ) および A u r o r a B + ( C 2 ) 心筋細胞を指す。細胞膜の染色および描写のために、W G A ( コムギ胚芽凝集素 ) を適用した。データは、平均 ± S E M である ; \* M d x + X O との対比で、P < 0 . 0 5 ; † M d x + ビヒクルおよび C T L ( W T 、野生型マウス) との対比で、P < 0 . 0 2 ; ‡ M d x + X O および C T L ( W T 、野生型マウス) との対比で、P < 0 . 0 1 、スケールバー : 1 0 μ m 。

【図 2 6】ヒトデュシェンヌ心筋細胞における C D C エキソソームおよび m d x マウスにおける m i R - 1 4 8 。 A : 1 H z バーストペーシング中に測定した正常およびデュシェンヌヒト i P S 由来心筋細胞のカルシウムトランジェント。評価 1 週間前にビヒクル ( D M D C M ) または C D C エキソソーム ( D M D C M + X O ) でプライミングしたデュシェンヌ心筋細胞。カルシウムトランジェントの棒グラフ : ピーク到達時間および交互脈 ( 心拍間隔のカルシウムトランジェント振幅の変動 ) 。 B : 酸素消費速度 ( O C R ) 測定 1 週間前に C D C エキソソーム [ D M D C M ( C D C - X O ) ] または正常ヒト真皮線維芽細胞由来エキソソーム [ N H D F 、対照として ; D M D C M ( N H D F - X O + ) ] でプライミングしたヒトデュシェンヌ心筋細胞における O C R 。正常 ( 正常 C M ) および非処理デュシェンヌ心筋細胞 ( D M D C M ) を並行して研究した。略語については、図 2 の凡例を参照のこと。C : 正常酸素馴化培地 ( n = 2 ) から単離した C D C エキソソームと比較した、低酸素馴化培地 ( 2 % O 2 ) から単離した C D C エキソソームにおけるマイクロ RNA の差次的発現 ( 2 0 超の配列ヒットを有する m i R のみを含む ) 。 D : m i R - 1 4 8 模倣物の心筋内注射は、処理 3 週間後の m d x マウス心臓において心機能を部分的に回復した。E : m i R - 1 4 8 処理 3 週間後の m d x マウス心臓における核 p 6 5 ( 左 ) およびリン酸化 A k t ( 右 ) のウエスタンブロットおよびプールデータ。F : デュシェンヌ心筋症で機能する病態生理学的機構ならびに C D C およびそれらのエキソソーム ( X O ) によってリクルートされる細胞機構の模式図。すべてのデータは、ボックスプロットを除いて平均 ± S E M である ( 平均 ± S D ) 。

【図 2 7】心筋球由来細胞 ( C D C ) 、 C D C エキソソーム ( C D C - X O ) および m i R - 1 4 8 投与後の L V 拡張末期 ( L V E D V ) および収縮末期 ( L V E S V ) 容積。C D C および C D C - X O 移植は、プラセボと比べて、m d x マウスにおいて、1 回目および 2 回目 ( 3 カ月間隔 ) の両方の注射後に 3 カ月間にわたる L V E D V および L V E S V の持続的改善をもたらした。m i R 1 4 8 注射 3 週間後に、L V E D V および L V E S V は部分的に改善した。データは、平均 ± S E M である ; 各群で n = 1 2 。 #

10

20

30

40

50

Mdx + ビヒクルとの対比で、 $P < 0.05$ 。

【図28】移植1週間後、2週間後および3週間後のCDCの生着率。1週間の時点のCDCの生着率は約8%であり、2週間の時点では1%超であった。3週間で、生存CDCを検出することができなかった（各時点で $n = 3$ ）。

【図29】mdxマウスにおけるCDC処理による心筋形成および線維化の減少。mdxマウスにおけるCDC注射3週間後の心筋形成の増強（AおよびB）ならびに心筋線維化（C）およびコラーゲン含量（D）の減少。代表的な免疫組織化学的画像およびプールデータ（AおよびB：Ki67 [A]およびAurora B [B]）について染色したCTL [野生型]、ビヒクルおよびCDC処理 [Mdx + CDC] mdxマウス心臓； $n = 4 \sim 6$  / 群）。矢印は、Ki67<sup>+</sup> (A) およびAurora B<sup>+</sup> (B) 心筋細胞を指す。心臓コラーゲンIAおよびIIIAを示す代表的なマツソントリクローム画像（C）ならびにウエスタンブロットおよびプールデータ（D）。データは、平均 $\pm$ SEMである；Mdx + ビヒクルおよびCTL（対照）との対比で、 $P < 0.05$ ；# Mdx + CDCおよびCTL（対照）との対比で、 $P < 0.05$ 。スケールバー：10  $\mu$ m (A)。

【図30】低酸素馴化培地から単離したCDCエキソソームにおけるマイクロRNAの倍率変化。低酸素条件下（2% O<sub>2</sub>）と、正常酸素馴化培地から単離したCDCエキソソームと比較の比較；10倍超かつ20倍未満の倍率変化が含まれていた。エキソソームから抽出した低分子RNAのmiRNA配列ライブラリー調製のために、NEBNext Small RNA Library Prep kit (New England Biolabs, Ipswich, MA) を使用した。miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN, Germantown, MD) を使用して、エキソソームからRNAを抽出した。

【図31】超遠心分離によって単離したエキソソームを、ナノ粒子追跡によって分析した。NanoSight NS300システム (NanoSight Ltd, UK) を使用してビデオを収集し、NTAソフトウェア (バージョン2.3) を使用して分析した（最小予想粒子サイズ、最小トラック長およびぼかしの設定はすべて、自動に設定した）。カメラシャッター速度を30.01ミリ秒に固定し、カメラゲインを500に設定した。カメラ感度および検出閾値をそれぞれほぼ最大（15または16）および最小（3または4）に設定して、小粒子を表示させた。24~27の範囲で、周囲温度を手動で記録した。各サンプルについて、記録間に10秒間の遅延を入れた60秒間のビデオを5回記録して、5つのリプリケートヒストグラムを作製し、これを平均化した。サイズ/濃度を示す代表的な5つのリプリケートヒストグラム。5回反復で計算した平均濃度の標準誤差は、右のグラフにおいて赤色で示されている。

【発明の詳細な説明】

【0010】

本明細書で引用されるすべての参考文献は、完全に記載されているかのようにその全体が参照により組み込まれる。特に定義がない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。Allen et al., Remington: The Science and Practice of Pharmacy 22<sup>nd</sup> ed., Pharmaceutical Press (September 15, 2012); Hornyak et al., Introduction to Nanoscience and Nanotechnology, CRC Press (2008); Singleton and Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3<sup>rd</sup> ed., revised ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2006); Smith, March's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 7<sup>th</sup> ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2013); Singleton, Dictionary of DNA and Genome Technology 3<sup>rd</sup> ed., Wi

10

20

30

40

50

ley - Blackwell (November 28, 2012); および Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012) は、本出願で使用される用語の多くに関する一般的なガイドを当業者に提供する。抗体の調製方法の参考文献については、Greenfield, Antibodies A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor NY, 2013); Kohler and Milstein, Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, Eur. J. Immunol. 1976 Jul, 6(7): 511-9; Queen and Selick, Humanized immunoglobulins, 米国特許第5,585,089号(1996 Dec); および Riechmann et al., Reshaping human antibodies for therapy, Nature 1988 Mar 24, 332(6162): 323-7を参照のこと。

10

**【0011】**

当業者であれば、本明細書に記載されるものと類似または同等の多くの方法および材料であって、本発明の実施に使用され得る方法および材料を認識する。実際、本発明は、記載されている方法および材料に決して限定されない。本発明の目的のために、以下の用語を以下に定義する。

20

**【0012】**

本明細書の説明および以下の特許請求の範囲を通して使用される「a」、「an」および「the」の意味は、特に文脈上明確な指示がない限り、複数の対象を含む。また、本明細書の説明で使用される「in」の意味は、特に文脈上明確な指示がない限り、「in」および「on」を含む。

**【0013】**

早期死亡につながる厄介な遺伝病であるデュシェンヌ筋ジストロフィーは、心臓および骨格筋に影響を与える。実際、心筋症は、デュシェンヌ患者の主な死因である。心筋症のための承認された処置はなく、エキソスキッピングなどの新規のデュシェンヌ特異的実験アプローチは、心臓に有益ではない。本明細書では、本発明者らは、心筋梗塞後の治療的再生のための先進臨床試験において、心筋球由来細胞(CDC)が、mdxマウスにおけるデュシェンヌ心筋症の重要な病態生理学的特徴(酸化ストレス、炎症、線維化およびミトコンドリア機能不全)を回復させることを実証する。ヒトCDCによって分泌されるエキソソームは、mdxマウスにおいてCDCの利益を再現し、ヒトデュシェンヌ心筋細胞におけるカルシウムサイクリングおよびミトコンドリア呼吸の異常を回復させる。

30

**【0014】**

デュシェンヌ筋ジストロフィー(DMD)におけるジストロフィンの欠如は、膜の脆弱性および二次的な筋肉損傷(骨格および心臓の両方)をもたらす。早期障害は主に骨格筋障害によるものであるが、心不全が最も一般的な死因である。現在利用可能な処置モダリティは、DMD関連心不全、機能的な心筋の喪失、および生きている心筋の癒傷への変換の基礎となる病態生理に対処しない。心筋球由来細胞(CDC)は、実行可能な治療選択肢であり得る。心筋梗塞におけるCDCのファースト・イン・ヒューマンCADUCEUS試験では、健康心筋が再生し、癒傷が減少した;現在、これらの知見は、同種異系CDCの無作為化プラセボ対照多施設臨床試験でさらに試験されている。前臨床試験は、CDCが再生的であるだけでなく、抗炎症性および抗線維性でもあることを示している;それらは、マイクロRNA(miR)を含む非コードRNAを積載したエキソソームの分泌を介して間接的に作用する。心筋梗塞のマウスモデルでは、CDCエキソソームは、CDCの機能的および構造的利益を模倣する一方、エキソソーム生合成の遮断は、CDCを非有効にする。臨床データおよび作用機構を考慮して、本発明者らは、CDCがデュシェン

40

50

又心筋症の処置に有用であり得ると推論した。目標は、ジストロフィンを代替することではなく、再生をリクルートし、線維化を回復させ、炎症をターゲティングすることによって、ジストロフィン欠損の病態生理学的結果を補うことである。

【 0 0 1 5 】

エキソソーム（生物学的因子の豊富な環境を含有する分泌脂質小胞）は、幹細胞が、隣接細胞（罹患細胞または傷害細胞を含む）に対するそれらの生物学的効果を高めるための強力なパラクリンシグナルを提供する。タンパク質、生物活性脂質および核酸「カーゴ」の封入および輸送によって、これらの天然送達デバイスは、受容細胞において有意な表現型および機能的変化を誘導することができ、これが再生プログラムの活性化をもたらすという認識が高まっている。幹細胞によって開始される再生におけるこのような間接的機構の役割は、幹細胞が投与され、組織および器官における送達部位から除去された後でもなお、再生プロセスが持続し、内因性組織から生じるといった証拠が増加していることによって強く示唆される。

10

【 0 0 1 6 】

幹細胞再生活性の「パラクリン仮説」は、幹細胞によって分泌されるエキソソームベースの臨床適用が、幹細胞それ自体の移植および送達と比較して優れており、または異なる利点を提供し得るといったパラダイムシフトをもたらした。特に、間葉系間質（MSC）、（骨髄幹細胞）単核細胞（MNC）細胞、免疫細胞（樹状細胞およびCD34+）、ヒト神経細胞（hNSC）などの、実証された治療能力を有するいくつかの細胞型の上清から、幹細胞由来エキソソームが同定および単離されている。心臓病との関連では、ヒト心筋球由来細胞（CDC）は、心筋および血管系を改善することが公知である。CDCによって産生されるものを含む幹細胞由来エキソソームは、「無細胞」治療を開発するための強力かつ豊富な供給源を提供し得る。

20

【 0 0 1 7 】

加えて、エキソソームベースの「無細胞」治療は、細胞治療とは対照的に、再生医療において異なる利点を提供する。免疫原性または腫瘍形成能が低減しているかまたは存在しない非生存実体として、これらの特徴は、安全性の問題を著しく取り除く。例えば、幹細胞由来エキソソームは、MHC複合体分子を含む膜結合タンパク質の含量が低い結果として、親細胞よりも免疫原性が低い。生細胞の投与をそれらの分泌エキソソームで代替することにより、生存可能な複製細胞の移植に関連する安全性の懸念および限界の多くが緩和される。加えて、エキソソームによって生物活性成分が脂質小胞に封入されることにより、インビボにおける分解から内容物を保護することが可能になり、それにより、サイトカイン、成長因子、転写因子およびRNAなどの可溶性分子の送達に関連することが多い障害が除かれる可能性がある。投与に関するこの相対的容易性は、最終的には、患者への反復的および持続的な送達を可能にし、それにより、罹患組織および/または機能不全組織の再生および修復の可能性を最大化し得る。

30

【 0 0 1 8 】

また、規定条件下におけるエキソソーム生産は、より容易な製造およびスケールアップの機会を可能にする。エキソソームの製造は、従来の生物薬理学的製品の製造に似ているので、投与量および生物学的活性試験のための生産および品質管理における標準化が可能である。さらに、培養液中のエキソソームの耐久性は、一定期間にわたってエキソソームが分泌される培養培地からそれらを回収することによって、大量のエキソソームを取得することを可能にする。

40

【 0 0 1 9 】

エキソソームが、異なる細胞型間の細胞間伝達に関与することは現在では十分に立証されているが、元の親細胞内におけるそれらの産生機構および標的受容細胞に対する効果に関しては、多くが未発見である。エキソソームは、免疫調節プロセス、血管新生、腫瘍成長に関連する内皮細胞の遊走、または虚血再灌流傷害における損傷の減少を含む、多数の細胞、組織および生理学的プロセスに関与することが報告されている。心筋球由来細胞（CDC）などの細胞によって分泌されるエキソソームが、それらの親細胞の治療利益を再

50

現することができるか、または場合によりこのような治療利益の達成に不可欠であるかを立証することは、重要な科学的関心事である。

#### 【0020】

エキソソームの一般的特徴。広範囲の細胞型によって分泌されるエキソソームは、サイトカイン、成長因子、転写因子、脂質ならびにコード核酸および非コード核酸を含む様々な生物学的因子が豊富な脂質二重層小胞である。エキソソームは、血液、尿、羊水、間質腔および細胞外空間に見られる。エンドソーム起源のこれらのエキソサイトーシス小胞は、40~100nmのサイズを含む30~200nmのサイズの範囲であり得、電子顕微鏡によって見るとカップ状の形態を有する。それらの初期形成は、細胞膜の内側への出芽により開始してエンドソームを形成し、その後、後期エンドソームの境界膜が陥入して多小胞体(MVB)が形成される。MVBと原形質膜との融合は、エキソソームとして公知の小胞の形成を通じて、細胞外空間への内部小胞の放出をもたらす。

10

#### 【0021】

記載されているように、エキソソームの「カーゴ」内容物は、親細胞起源に関連する生物学的因子の異なるサブセットを含有するので、それらの親細胞起源を反映する(形成時の親細胞の細胞調節状態を含む)。エキソソーム内の異なるタンパク質(サイトカインおよび成長因子を含む)、脂質、コードRNA分子および非コードRNA分子の豊富な生物学的環境はすべて必ず、それらの親細胞に由来する。豊富な多くの細胞質ゾル誘導体を含有することに加えて、エキソソームは、膜表面において膜結合受容体の細胞外ドメインをさらに発現する。

20

#### 【0022】

記載される封入および形成プロセスは必ず、形成時の親細胞起源および調節状態に基づいて、エキソソーム組成の不均一性をもたらす。それにもかかわらず、一般的な出芽形成および放出機構は、それらの起源の結果として生じる一般的な一連の特徴、例えばエンドソーム関連タンパク質(例えば、RabGTPase、SNARE、アネキシンおよびフロチリン)、原形質膜またはエンドソームにおいてマイクロドメインにクラスタ化することが公知のタンパク質(4つの膜貫通ドメインテラスパニン、例えばCD63、CD81、CD82、CD53およびCD37)、脂質ラフト関連タンパク質(例えば、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカータンパク質およびフロチリン)、コレステロール、スフィンゴミエリンおよびヘキソシルセラミドなどを確立する。

30

#### 【0023】

それらの小胞起源を反映するこれらのコア成分に加えて、エキソソームの重要な特性は、シグナル伝達プロセスに関連するmRNAおよびマイクロRNAの両方を含有する実証された能力であり、両カーゴmRNAは、受容細胞において翻訳されることができ、またはマイクロRNAは、受容細胞において標的mRNAを機能的に分解する。遺伝子発現に影響を及ぼすことができる他の非コードRNAもまた、エキソソーム中に存在し得る。エキソソームへのmRNAまたはマイクロRNA集団の選択的取り込みを制御するプロセスは、完全に理解されていないが、エキソソームのカーゴRNAは元の細胞のRNAプロファイルと比較して豊富であると報告している研究によって明らかにされているように、RNA分子がエキソソームに無作為的ではなく選択的に取り込まれることは明らかである。このようなRNA分子が、疾患病因および再生プロセスにおいてどのような役割を果たすかの理解が進んでいることを考慮して、エキソソームにおけるRNA分子の存在、および標的受容細胞に影響を与える明確な効力は、治療アプローチにおいて展開され得る重要な特徴を示唆している。

40

#### 【0024】

重要なことに、エキソソームの天然二重層膜封入は、カーゴ内容物が、分解せずに血流中または組織内で持続または遊走することを可能にする保護および制御された内部微小環境を提供する。細胞外環境へのそれらの放出は、脂質リガンド受容体相互作用(エンドサイトーシス取り込みによる内在化)によって、または小胞と細胞膜との直接的な融合によって媒介される細胞表面への接着を介した受容細胞との相互作用を可能にする。これらの

50

プロセスは、標的細胞へのエキソソームカーゴ内容物の放出をもたらす。

【0025】

エキソソーム - 細胞相互作用の最終結果は、抗原提示、転写因子、サイトカイン、成長因子、核酸、例えば mRNA およびマイクロRNA の輸送を含むいくつかの異なる機構のいずれかによって誘導されるように、標的受容細胞における遺伝子経路の調節である。幹細胞との関連では、胚性幹細胞 (ESC) 由来エキソソームは、mRNA およびタンパク質を造血前駆細胞に往復させる / 輸送することが実証されている。他の研究により、成体幹細胞由来エキソソームもまた、転写、増殖および細胞免疫調節の制御に参与するいくつかの細胞機能に関連する選択的パターンの mRNA、マイクロRNA およびプレマイクロRNA を往復させることが示されている。

10

【0026】

エキソソームの単離および調製。エキソソームの単離は、それらの分離および分析のための一般的な生化学的および生物物理学的特徴の利用に依拠する。例えば、分画超遠心分離は、分泌されたエキソソームを培養細胞の上清から単離する主要技術となっている。このアプローチは、比較的低い浮遊密度を利用することによって、非膜性粒子からエキソソームを分離することを可能にする。サイズ排除は、生化学的に類似するが生物物理的に異なる微小小胞であって、最大 1,000 nm のより大きな直径を有する微小小胞からそれらを分離することを可能にする。浮遊速度の差異はさらに、異なるサイズのエキソソームを分離することを可能にする。一般に、エキソソームのサイズは、40 ~ 100 nm のサイズを含む 30 ~ 200 nm の範囲の直径を有する。さらなる精製は、目的の特定のエキソソームの特定の特性に依拠し得る。これは、例えば、目的のタンパク質との免疫吸着を使用して、原形質外配向性または外部配向性を有する特定の小胞を選択することを含む。

20

【0027】

現在の方法 (分画遠心分離、不連続密度勾配、免疫親和性、限外ろ過および高速液体クロマトグラフィー (HPLC)) の中でも、分画超遠心分離は、エキソソームの単離に最も一般的に使用されるものである。この技術は、2000 x g から 10,000 x g に増加する遠心力を利用して、100,000 x g でエキソソームペレットから中サイズおよび大サイズの粒子ならびに細胞残屑を分離する。遠心分離は単独で、馴化培地からエキソソームを有意に分離 / 収集することを可能にするが、一般的な混入物質である様々なタンパク質凝集体、遺伝物質、培地由来の微粒子および細胞残屑を除去するには不十分である。エキソソーム精製の高い特異性は、限外ろ過と組み合わせた連続遠心分離、またはスクロース密度勾配の平衡密度勾配遠心分離を展開して、より高純度のエキソソーム調製 (浮遊密度 1.1 ~ 1.2 g/ml) または調製における別個のシュガークッションの適用を提供し得る。

30

【0028】

重要なことに、限外ろ過は、生物学的活性を損なわずに、エキソソームを精製するために使用することができる。非中性 pH または非生理学的塩濃度の使用を回避するために、異なる孔径を有する膜 (例えば、より小さな粒子を排除するために、100 kDa 分子量カットオフ (MWCO) およびゲルろ過) が使用されている。現在利用可能な接線ろ過 (TFF) システムは、(10,000 L 超に) スケーリング可能であり、エキソソーム画分を精製するだけでなく濃縮することが可能であり、このようなアプローチは、分画遠心分離よりも所要時間が少ない。調製物が生理学的な pH および塩濃度で維持されるので、エキソソームを均一なサイズの粒子に精製し、それらの生物学的活性を保存するために、HPLC も使用され得る。

40

【0029】

他の化学的方法は、場合によりさらなる一連の遠心分離またはろ過と組み合わせて、体積排除ポリマー (例えば、ポリエチレングリコール (PEG)) に加えて、沈殿技術のためにエキソソームの差次的な溶解度を利用する。例えば、沈殿試薬 ExoQuick (登録商標) を馴化細胞培地に追加して、エキソソーム集団を迅速かつ容易に沈殿させ得るが、この技術によって調製されたペレットの再懸濁は困難であり得る。フローフィールドフ

50

ロー分画 ( F 1 F F F ) は、巨大分子 ( 例えば、タンパク質 ) およびナノサイズからマイクロサイズの粒子 ( 例えば、細胞小器官および細胞 ) を分離および特性評価するために使用される溶出系技術であり、培養培地からエキソソームを分画するために適用されて成功している。

#### 【 0 0 3 0 】

一般的な生化学的および生物物理学的特徴に依拠するこれらの技術の他に、集中的な技術が、目的の特定のエキソソームを単離するために適用され得る。これは、抗体免疫親和性に依拠して、特定のエキソソーム関連抗原を認識することを含む。記載されているように、エキソソームは、膜表面において膜結合受容体の細胞外ドメインをさらに発現する。これは、共通の抗原プロファイルに基づいて、それらの親細胞起源に関連するエキソソームを単離および分離するための好適な機会を提供する。磁気ビーズ、クロマトグラフィーマトリックス、プレートまたはマイクロ流体デバイスの併用は、目的の親細胞からのそれらの産生または関連細胞調節状態に関係し得るような目的の特定のエキソソーム集団を単離することを可能にする。他の親和性捕捉方法は、エキソソーム表面上の特定の糖残基に結合するレクチンを使用する。

10

#### 【 0 0 3 1 】

エキソソームベースの治療。エキソソームベースの治療を開発することの主な目的は、低いリスクで、または細胞治療が利用不可能な状況で、細胞治療の利益を提供し得る「無細胞」治療を作ることである。例えば、特に後期のデュシェンヌ筋ジストロフィー ( D M D ) 関連心不全 ( H F ) は、重大な排他的併存疾患を示し、後期 C および D の場合には、細胞、組織、心臓または機械的移植が選択肢となり得ない。記載されているように、心筋球由来細胞 ( C D C ) などの細胞ベースの治療の治療利益は、内因性起源から生じる再生心筋および血管系を伴う間接的機構によって生じると思われる。C D C によって産生される細胞エキソソームは、疾患進行を改善するだけでなく、罹患組織および / または機能不全組織を修復および再生するような様式で、新たな治療アプローチのための成長因子、転写因子、サイトカインおよび核酸の生産および送達を可能にする。これに関して、C D C 由来エキソソームは、相乗的機構をリクルートして内因性幹細胞を心筋傷害部位に誘引し、心筋および血管への分化を促進し、それにより、H F の病態生理を回復させることによって、満たされていない主な医療ニーズに有効に対処し得る。

20

#### 【 0 0 3 2 】

より具体的には、D M D は、様々な病理学的特徴によって例示されるように、筋障害 ( 筋線維における細胞膜損傷 ) を特徴とする X 連鎖劣性障害である。これは、発症から 3 ~ 5 年で始まる骨格筋の衰弱、発症から約 1 3 年の時点の進行性衰弱、車椅子依存を含む。重要なことに、心筋症は、発症から 1 3 年未満では患者の 1 / 3 で発症し、発症から 1 8 年未満では患者の 1 / 2 に増加し、1 8 年以降ではすべての患者で発症することが観察されている。拡張型心筋症は、左心室後底部支線維化を含む ; 伝導異常は主に、心房内 : 異常 A V 結節伝導を伴う S V T である。患者は、G I および尿路系の障害をさらに含む血管系機能不全を含む平滑筋障害をさらに患い得る。一般的な予後は、呼吸不全または心筋症による死亡である。これらの臨床的特徴の基礎は、ジストロフィンの喪失が細胞膜の損傷、および細胞内への細胞外  $C a^{2+}$  の漏出をもたらすジストロフィン遺伝子突然変異 ( 欠失 ) である。高い細胞内レベルは、最終的に、酸化ストレスおよび / またはニトロソ化ストレスおよび炎症の増加ならびにカルパインの活性化をもたらす。これらの効果の組み合わせは、筋肉タンパク質分解およびアポトーシスをもたらし、上記分解特徴につながる。

30

40

#### 【 0 0 3 3 】

D M D 患者のこの病態生理 ( 酸化ストレスおよび / またはニトロソ化トストレスの増加、炎症の増強、プロアポトーシスおよびリモデリング状態の状況を含む ) に基づいて、C D C を伴う治療アプローチは、疾患の経過を回復に向かわせる上で有意な利益を提供し得る。C D C は、再生能力の増強に加えて、抗酸化効果、抗炎症効果、抗アポトーシス効果、抗リモデリング効果を促進すると実証されている。これに関して、C D C 投与は D M D の遅延 / 回復に有益であり、C D C 由来エキソソーム集団は、細胞ベースの治療に関連す

50

る障害を回避しながら、これらの利益をもたらすことを可能にすることが示唆される。

【 0 0 3 4 】

特に、幹細胞由来エキソソームは、親細胞よりも免疫原性が低い可能性がある。生細胞の投与を分泌エキソソームで代替する可能性により、生存可能な細胞の移植に関連する安全性の懸念および限界の多くが緩和される。加えて、エキソソームによって生物活性成分が脂質小胞に封入されることにより、インビボにおける分解から内容物を保護することが可能になり、それにより、提供すべき濃度の増加を潜在的に可能にしながら、サイトカイン、成長因子、転写因子およびRNAなどの可溶性分子の送達に関連することが多い障害が除かれる可能性がある。特に、DMDなどの慢性疾患の場合、患者への反復送達および持続送達は、細胞ベースの治療では困難または危険であろう様式で、罹患組織および/または機能不全組織の再生および修復の可能性を最大化し得る。これらの利益の十分な実現は、CDCなどの幹細胞によって分泌されるエキソソームが単独で、それらの親細胞の治療利益を再現することができるか、またはこれらのプロセスにおいて不可欠である可能性があるかについての理解の向上を必要とする。このようなプロセスにおけるエキソソームの役割の確認は、デバイスベースの薬理的な介入または手術がこのような被験体に対して賢明な処置方式とはなり得ないので、新たな治療アプローチにおけるそれらの適用（例えば、細胞の移植または投与が利用不可能である被験体（例えば、後期心疾患）における「無細胞」使用）を可能にする。当技術分野では、細胞それ自体の投与または移植を伴う機構を用いずに幹細胞再生の利益をもたらす手段を同定することに対する大きな必要性が存在する。

10

20

【 0 0 3 5 】

エキソソームを伴う「無細胞」方法を介して、損傷組織または罹患組織の修復または再生において有意な利益を提供する組成物および方法および組成物が本明細書に記載される。具体的には、ヒト心筋球由来細胞（CDC）由来エキソソームは、瘢痕サイズの減少、生存可能な心筋の再生において有効であると実証される。このような結果は、CDC細胞治療の主な利益が、CDCにおいて豊富であると本発明者らが同定した特定のマイクロRNAを含むエキソソームによって媒介されることを裏付けている。

【 0 0 3 6 】

処置の方法であって、慢性退行性筋疾患に続発する心不全の処置を必要とする被験体を選択することと、複数のエキソソームを含む組成物を前記被験体に投与することを含み、前記複数のエキソソームが、無血清培地中で成長した心筋球由来細胞（CDC）から単離されたものであり、直径約90nm～約200nmのエキソソームを含み、CD81+、CD63+または両方であり、さらに、前記組成物の投与が前記被験体を処置する方法が本明細書に記載される。他の実施形態では、慢性退行性筋疾患は、デュシェンヌ筋ジストロフィーである。他の実施形態では、組成物の投与は、単回用量で約1～約100mgのエキソソームタンパク質を含む。他の実施形態では、単回用量を被験体に複数回投与する。他の実施形態では、組成物の投与は、注射を含む。他の実施形態では、注射は、経皮注射を含む。他の実施形態では、注射は、心筋内へ直接的である。他の実施形態では、組成物の投与は、心筋注入を含む。他の実施形態では、心筋注入は、動脈内または静脈内である。他の実施形態では、被験体の処置は、線維化の減少、炎症の減少、ミトコンドリア機能の増加および/または心筋形成の増加をもたらす。他の実施形態では、線維化の減少は、コラーゲン蓄積の減少を含む。他の実施形態では、コラーゲンは、コラーゲンIおよび/またはコラーゲンIIIを含む。他の実施形態では、炎症の減少は、細胞質核因子（赤血球由来2）様2（Nrf2）の増加、脂肪酸過酸化最終生成物の減少、炎症細胞の数の減少、および/または抗酸化物質の発現のアップレギュレートを含む。他の実施形態では、抗酸化物質は、ヘムオキシゲナーゼ-1（HO-1）、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ-2（SOD-2）、グルタミン酸-システインリガーゼ触媒（GCLC）サブユニットを含む。他の実施形態では、炎症細胞は、CD68+マクロファージおよびCD3+T細胞を含む。他の実施形態では、ミトコンドリア機能の増加は、ミトコンドリア超微細構造の増加および/またはミトコンドリア生合成の増加を含む。他の実施形態で

30

40

50

は、ミトコンドリア機能の増加は、核 P P A R - コアクチベーター - 1 ( P G C - 1 ) 発現の増加を含む。他の実施形態では、エキソソームは、マイクロRNA miR - 146a、miR148a、miR22、miR - 24、miR - 210、miR - 150、miR - 140 - 3p、miR - 19a、miR - 27b、miR - 19b、miR - 27a、miR - 376c、miR - 128、miR - 320a、miR - 143、miR - 21、miR - 130a、miR - 9、miR - 185およびmiR - 23aからなる群より選択される1つ以上のマイクロRNAを含む。

#### 【0037】

処置の方法であって、慢性筋疾患に続発する心不全の処置を必要とする被験体を選択することと、および心筋球由来細胞 ( C D C ) を含む組成物を投与することを含み、前記組成物の投与が前記被験体を処置する方法が本明細書にさらに記載される。他の実施形態では、慢性筋疾患は、デュシェンヌ筋ジストロフィーである。他の実施形態では、組成物の投与は、単回用量で約  $1 \times 10^5$  個 ~ 約  $1 \times 10^8$  個またはそれを超える C D C を含む。別の例では、投与される C D C の数は、エキソソーム投与量の別のベースラインとして、冠動脈当たり 2500 万個の冠動脈内 C D C (すなわち、合計 7500 万個の C D C ) を含む。様々な実施形態では、C D C の数は、エキソソーム投与量の別のベースラインとして、単回用量で  $1 \times 10^5$  個、 $1 \times 10^6$  個、 $1 \times 10^7$  個、 $1 \times 10^8$  個、 $1 \times 10^9$  個の C D C を含む。特定の場合では、これは、体重に比例し得る (総 C D C 用量で、体重 1 k g 当たり 100,000 ~ 100 万個の C D C の範囲)。他の実施形態では、組成物の投与は、心筋注入を含む。他の実施形態では、心筋注入は、冠動脈内である。他の実施形態では、心筋注入は、動脈内または静脈内である。他の実施形態では、被験体の処置は、線維化の減少、炎症の減少、ミトコンドリア機能の増加および/または心筋形成の増加をもたらす。他の実施形態では、線維化の減少は、コラーゲン蓄積の減少を含む。他の実施形態では、コラーゲンは、コラーゲン I および/またはコラーゲン III を含む。他の実施形態では、炎症の減少は、細胞質核因子 (赤血球由来 2) 様 2 ( N r f 2 ) の増加、脂肪酸過酸化最終生成物の減少、炎症細胞の数の減少、および/または抗酸化物質の発現のアップレギュレートを含む。他の実施形態では、抗酸化物質は、ヘムオキシゲナーゼ - 1 ( H O - 1 )、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ - 2 ( S O D - 2 )、グルタミン酸 - システインリガーゼ触媒 ( G C L C ) サブユニットを含む。他の実施形態では、炎症細胞は、C D 68 + マクロファージおよび C D 3 + T 細胞を含む。他の実施形態では、ミトコンドリア機能の増加は、ミトコンドリア超微細構造の増加および/またはミトコンドリア生合成の増加を含む。他の実施形態では、ミトコンドリア機能の増加は、核 P P A R - コアクチベーター - 1 ( P G C - 1 ) 発現の増加を含む。さらなる例は、米国特許出願第 11 / 666,685 号、米国特許出願第 12 / 622,143 号および米国特許出願第 12 / 622,106 号 (これらは、参照により本明細書に組み込まれる) に見られる。

#### 【0038】

複数のエキソソームを含む組成物が本明細書に記載される。特定の実施形態では、複数のエキソソームは、細胞集団を提供すること、前記細胞集団から複数のエキソソームを単離することを含む方法によって作製される。

#### 【0039】

様々な実施形態では、細胞は、幹細胞、始原細胞および/または前駆細胞である。他の実施形態では、幹細胞、始原細胞および/または前駆細胞は、心筋球由来細胞 ( C D C ) である。他の実施形態では、幹細胞、始原細胞および/または前駆細胞は、体内の様々な体細胞源、例えば線維芽細胞、血液および造血幹細胞 ( h S C )、免疫細胞、骨および骨髄、神経組織などのいずれか 1 つに由来する多能性幹細胞 ( p S C )、例えば胚性幹細胞 ( E S C ) および人工多能性幹細胞 ( i P S C ) である。他の実施形態では、幹細胞、始原細胞および/または前駆細胞は、h S C、間葉系幹細胞 ( M S C ) または内皮前駆細胞 ( E P C ) を含む。様々な実施形態では、細胞は、ヒト生検組織由来の幹細胞、始原細胞および/または前駆細胞である。様々な実施形態では、細胞は幹細胞であり、始原細胞お

10

20

30

40

50

よび/または前駆細胞は初代培養物である。様々な実施形態では、細胞は、連続継代が可能な細胞株を構成し得る幹細胞、始原細胞および/または前駆細胞である。

【0040】

様々な実施形態では、複数のエキソソームは、細胞集団の上清から単離される。これは、例えば、継代培養することができる細胞株をさらに含む培養液中の細胞集団によって馴化された培地中に分泌されたエキソソームを含む。特定の実施形態では、細胞は、無血清培地中で培養される。特定の実施形態では、エキソソームが単離される場合、培養液中の細胞は、10、20、30、40、50、60、70、80、90または90%またはそれを超えるコンフルエンスに増殖される。特定の実施形態では、細胞集団は、遺伝子操作されている。これは、例えば、内因性遺伝子が除去され、および/または安定的で持続的な様式で外因性が導入されているノックアウト(KO)またはトランスジェニック(TG)細胞株を含む。これは、当技術分野で公知の任意のいくつかの方法、例えばdsRNA、siRNA、マイクロRNAなどの導入を介した、細胞集団内の1つ以上の遺伝子ならびに関連コードおよび非コード転写産物の一過性ノックダウンをさらに含む。これは、当技術分野で公知の任意のいくつかの方法、例えばベクター、プラスミド、人工プラスミド、複製および/または非複製ウイルスなどの導入を介した、細胞集団内の1つ以上の遺伝子ならびに関連コードおよび非コード転写産物の一過性発現をさらに含む。他の実施形態では、細胞集団は、複数のエキソソームを単離する時点で、またはそれと実質的に同時に、細胞の調節状態を変化させる様式で、環境条件(例えば、低酸素)への曝露、小分子の追加、外因性因子(例えば、成長因子、サイトカイン)の存在/非存在によって変化されている。例えば、細胞の部分的または完全な分化を促進し、その後、複数のエキソソームを生成するために、分化剤を幹細胞、始原細胞および/または前駆細胞の集団に追加し得る。様々な実施形態では、細胞の調節状態の変化は、複数のエキソソームにおける1つ以上のエキソソームの組成を変化させる。

【0041】

様々な実施形態では、複数のエキソソームは、直径約10nm~約250nm、例えば、直径約10nm~約15nm、約15nm~約20nm、約20nm~約25nm、約25nm~約30nm、約30nm~約35nm、約35nm~約40nm、約40nm~約50nm、約50nm~約60nm、約60nm~約70nm、約70nm~約80nm、約80nm~約90nm、約90nm~約95nm、約95nm~約100nm、約100nm~約105nm、約105nm~約110nm、約110nm~約115nm、約115nm~約120nm、約120nm~約125nm、約125nm~約130nm、約130nm~約135nm、約135nm~約140nm、約140nm~約145nm、約145nm~約150nm、約150nm~約200nm、約200nm~約250nm、約250nmまたはそれを超える直径の1つ以上のエキソソームを含む。

【0042】

様々な実施形態では、複数のエキソソームは、バイオマーカーを発現する1つ以上のエキソソームを含む。特定の実施形態では、バイオマーカーは、テトラスパニンである。他の実施形態では、テトラスパニンは、CD63、CD81、CD82、CD53およびCD37を含む群から選択される1つ以上である。他の実施形態では、エキソソームは、1つ以上の脂質ラフト関連タンパク質(例えば、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカータンパク質およびフロチリン)、コレステロール、スフィンゴミエリンおよび/またはヘキサシルセラミドを発現する。

【0043】

複数の実施形態では、複数のエキソソームは、生物学的タンパク質を含有する1つ以上のエキソソームを含む。様々な実施形態では、生物学的タンパク質としては、転写因子、サイトカイン、成長因子、および標的細胞におけるシグナル伝達経路を調節することができる類似タンパク質が挙げられる。様々な実施形態では、生物学的タンパク質は、組織の再生および/または機能改善を促進することができる。様々な実施形態では、生物学的タンパク質は、Ira k 1、Traf 6、tol l様受容体(TLR)シグナル伝達経路、

10

20

30

40

50

NOX - 4、SMAD - 4 および / または TGF - に関係する経路を調節することができる。他の実施形態では、生物学的タンパク質は、エキソソームの形成および細胞質ゾルタンパク質（例えば、Hsp70、Hsp90、14-3-3、PKM2、GW182 および AGO2）のパッケージングに関係する。

【0044】

他の実施形態では、複数のエキソソームは、シグナル伝達脂質を含有する1つ以上のエキソソームを含む。これは、セラミドおよび誘導体を含む。他の実施形態では、複数のエキソソームは、コード核酸および / または非コード核酸を含有する1つ以上のエキソソームを含む。

【0045】

複数の実施形態では、複数のエキソソームは、マイクロRNAを含有する1つ以上のエキソソームを含む。様々な実施形態では、これらのマイクロRNAは、miR-146a、miR22、miR-24、miR-210、miR-150、miR-140-3p、miR-19a、miR-27b、miR-19b、miR-27a、miR-376c、miR-128、miR-320a、miR-143、miR-21、miR-130a、miR-9、miR-185 および / または miR-23a を含み得る。複数の実施形態では、複数のエキソソームは、miR-146a、miR22、miR-24、miR-210、miR-150、miR-140-3p、miR-19a、miR-27b、miR-19b、miR-27a、miR-376c、miR-128、miR-320a、miR-143、miR-21、miR-130a、miR-9、miR-185 および / または miR-23a の少なくとも1つが豊富な1つ以上のエキソソームを含む。複数の実施形態では、複数のエキソソームは、miR-146a、miR-22、miR-24 の少なくとも1つが豊富な1つ以上のエキソソームを含む。豊富さは、例えば、治療状況において有益な利益を提供しない細胞（例えば、線維芽細胞）と比較して、このような有益な利益を提供する細胞（例えば、心筋球由来細胞（CDC））から生成された際の記載されているマイクロRNAの1つ以上の量を比較することによって測定され得る。豊富さはまた、絶対量で、または例えば標準化希釈系列と比較した相対量で測定され得る。

【0046】

他の実施形態では、複数のエキソソームは、マイクロRNAを含有する1つ以上のエキソソームを含み得る。これは、当技術分野で公知の様々なマイクロRNA、例えばmiR-23a、miR-23b、miR-24、miR-26a、miR27-a、miR-30c、let-7e、mir-19b、miR-125b、mir-27b、let-7a、miR-19a、let-7c、miR-140-3p、miR-125a-5p、miR-132、miR-150、miR-155、mir-210、let-7b、miR-24、miR-423-5p、miR-22、let-7f および / または miR-146a を含む。

【0047】

他の実施形態では、複数のエキソソームは、マイクロRNAを含有する1つ以上のエキソソームを含み得る。これは、当技術分野で公知の様々なマイクロRNAは、例えばmiR-17、miR-21、miR-92、miR92a、miR-29、miR-29a、miR-29b、miR-29c、miR-34、mi-R34a、miR-150、miR-451、miR-145、miR-143、miR-144、miR-193a-3p、miR-133a、miR-155、miR-181a、miR-214、miR-199b、miR-199a、miR-210、miR-126、miR-378、miR-363 および miR-30b および miR-499 を含む。当技術分野で公知の他のマイクロRNAは、miR-92、miR-17、miR-21、miR-92、miR92a、miR-29、miR-29a、miR-29b、miR-29c、miR-34、mi-R34a、miR-150、miR-451、miR-145、miR-143、miR-144、miR-193a-3p、miR-133a、miR-155

10

20

30

40

50

、miR-181a、miR-214、miR-199b、miR-199a、miR-126、miR-378、miR-363およびmiR-30bおよび/またはmiR-499を含む。

【0048】

複数の実施形態では、細胞集団からの複数のエキソソームの単離は、細胞および/または細胞によって馴化された培地の遠心分離を含む。複数の実施形態では、超遠心分離が使用される。複数の実施形態では、細胞集団からの複数のエキソソームの単離は、サイズ排除によるものである。他の実施形態では、細胞集団からの複数のエキソソームの単離は、不連続密度勾配、免疫親和性、限外ろ過および/または高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の使用を含む。

10

【0049】

特定の実施形態では、分画超遠心分離は、1000~2000×g、2000~3000×g、3000~4000×g、4000~5000×g、5000×g~6000×g、6000~7000×g、7000~8000×g、8000~9000×g、9000~10,000×g、10,000×gまでまたはそれを超える遠心力を使用して、細胞に由来する複数のエキソソームから、より大きなサイズの粒子を分離することを含む。特定の実施形態では、分画超遠心分離は、10,000~20,000×g、20,000~30,000×g、30,000~40,000×g、40,000~50,000×g、50,000×g~60,000×g、60,000~70,000×g、70,000~80,000×g、80,000~90,000×g、90,000~100,000×g、100,000×gまでまたはそれを超える遠心力を使用して、細胞に由来する複数のエキソソームから、より大きなサイズの粒子を分離することを含む。

20

【0050】

他の実施形態では、細胞集団からの複数のエキソソームの単離は、ろ過または限外ろ過の使用を含む。特定の実施形態では、異なる孔径を有するサイズ排除膜が使用される。例えば、サイズ排除膜は、0.1~0.5μM、0.5~1.0μM、1~2.5μM、2.5~5μM、5μMまたはそれを超える孔径を有するフィルタの使用を含み得る。特定の実施形態では、孔径は、約0.2μMである。特定の実施形態では、ろ過または限外ろ過は、100~500ダルトン(Da)、500~1kDa、1~2kDa、2~5kDa、5~10kDa、10~25kDa、25~50kDa、50~100kDa、100~250kDa、250~500kDaの範囲、500kDaまたはそれを超えるサイズ排除を含む。特定の実施形態では、サイズ排除は、約2~5kDaである。特定の実施形態では、サイズ排除は、約3kDaである。他の実施形態では、ろ過または限外ろ過は、100~500ダルトン(Da)、500~1kDa、1~2kDa、2~5kDa、5~10kDa、10~25kDa、25~50kDa、50~100kDa、100~250kDa、250~500kDaの範囲、500kDaまたはそれを超える粒子を単離することができる中空糸膜の使用を含む。特定の実施形態では、サイズ排除は、約2~5kDaである。特定の実施形態では、サイズ排除は、約3kDaである。他の実施形態では、100~500ダルトン(Da)、500~1kDa、1~2kDa、2~5kDa、5~10kDa、10~25kDa、25~50kDa、50~100kDa、100~250kDa、250~500kDaの範囲、500kDaまたはそれを超える粒子を単離することができる分子量カットオフ(MWCO)ゲルろ過。特定の実施形態では、サイズ排除は、約2~5kDaである。特定の実施形態では、サイズ排除は、約3kDaである。様々な実施形態では、このようなシステムは、可変流体流動システムと組み合わせて使用される。

30

40

【0051】

他の実施形態では、細胞集団からの複数のエキソソームの単離は、エキソソーム画分を精製および/または濃縮するために使用される接線ろ過(TFF)システムの使用を含む。他の実施形態では、細胞集団からの複数のエキソソームの単離は、エキソソームを均一サイズの粒子に精製するためにも使用することができる(HPLC)の使用を含む。様

50

々な実施形態では、使用される密度勾配は、例えば、スクロース密度勾配における遠心分離、または調製における別個のシュガークッションの適用である。

【0052】

他の実施形態では、細胞集団からの複数のエキソソームの単離は、沈殿試薬の使用を含む。例えば、沈殿試薬 ExoQuick (登録商標) を馴化細胞培地に追加して、エキソソーム集団を迅速かつ容易に沈殿させ得る。他の実施形態では、細胞集団からの複数のエキソソームの単離は、使用される体積排除ポリマー (例えば、ポリエチレングリコール (PEG)) の使用を含み、これが使用される。別の実施形態では、細胞集団からの複数のエキソソームの単離は、溶出技術であるフローフィールドフロー分画 (FFFF) の使用を含む。

10

【0053】

特定の実施形態では、細胞集団からの複数のエキソソームの単離は、特定のバイオマーカーを有したまたは特定の生物学的分子を含有する1つ以上のエキソソームを単離するための1つ以上の捕捉剤の使用を含む。一実施形態では、1つ以上の捕捉剤は、少なくとも1つの抗体を含む。例えば、エキソソーム関連抗原を認識する抗体免疫親和性は、特定のエキソソームを捕捉するために使用される。他の実施形態では、少なくとも1つの抗体は、磁気ビーズ、クロマトグラフィーマトリックス、プレートまたはマイクロ流体デバイスなどの固定面にコンジュゲートされ、それにより、目的の特定のエキソソーム集団を単離することが可能になる。他の実施形態では、細胞集団からの複数のエキソソームの単離は、抗体ではない1つ以上の捕捉剤の使用を含む。これは、例えば、エキソソーム表面上の目的の対応する分子、例えば受容体または他のカップリング分子に相補的な抗原的特徴を提示する「ベイト」分子の使用を含む。一実施形態では、非抗体捕捉剤は、エキソソーム表面上の多糖残基に結合することができるレクチンである。

20

【0054】

様々な実施形態では、CDCは、哺乳動物のものである。他の実施形態では、CDCは、ヒトのものである。上記に開示されているように、いくつかの実施形態では、上記のものと類似の機構によって単離され得る合成エキソソームが作製される。様々な実施形態では、複数のエキソソームである組成物は、薬学的に許容され得る担体をさらに含む医薬組成物である。

【0055】

様々な実施形態では、複数のエキソソームは、30~300nmのサイズの範囲である。様々な実施形態では、複数のエキソソームは、40~100nmのサイズの範囲である。特定の実施形態では、複数のエキソソームは、心筋球由来細胞 (CDC) エキソソームである。特定の実施形態では、複数のエキソソームは、CD63+であるエキソソームを含む。様々な実施形態では、エキソソームは、マイクロRNA miR-146a、miR22、miR-24、miR-210、miR-150、miR-140-3p、miR-19a、miR-27b、miR-19b、miR-27a、miR-376c、miR-128、miR-320a、miR-143、miR-21、miR-130a、miR-9、miR-185および/またはmiR-23aを含む。他の実施形態では、エキソソームは、2~5kDa、例えば3kDaである。エキソソームを伴う組成物および技術に関する他の例または実施形態は、国際公開第2014/028,493号 (これは、参照により本明細書に全体的に組み込まれる) に示されている。

30

40

【0056】

処置の方法であって、処置を必要とする被験体を選択することと、複数のエキソソームを含む組成物を前記個体に投与することを含み、前記組成物の投与が前記被験体を処置する方法が本明細書に記載される。特定の実施形態では、被験体は、組織の損傷または機能不全を伴う疾患および/または症状の処置を必要とする。他の実施形態では、組織の損傷または機能不全を伴う疾患および/または症状は、心疾患である。他の実施形態では、複数のエキソソームは、1つ以上のマイクロRNAを含むエキソソームを含む。

【0057】

50

特定の実施形態では、複数のエキソソームは、細胞集団を提供することと、細胞集団から複数のエキソソームを単離することを含む方法によって作製される。様々な実施形態では、細胞は、幹細胞、始原細胞および/または前駆細胞である。他の実施形態では、幹細胞、始原細胞および/または前駆細胞は、心筋球由来細胞(CDC)である。他の実施形態では、幹細胞、始原細胞および/または前駆細胞は、体内の様々な体細胞源、例えば線維芽細胞、血液および造血幹細胞(hSC)、免疫細胞、骨および骨髄、神経組織などのいずれか1つに由来する多能性幹細胞(pSC)、例えば胚性幹細胞(ESC)および人工多能性幹細胞(iPSC)である。他の実施形態では、幹細胞、始原細胞および/または前駆細胞は、hSC、間葉系幹細胞(MSC)または内皮前駆細胞(EPC)を含む。様々な実施形態では、細胞は、ヒト生検組織由来の幹細胞、始原細胞および/または前駆細胞である。様々な実施形態では、細胞は幹細胞であり、始原細胞および/または前駆細胞は初代培養物である。様々な実施形態では、細胞は、連続継代が可能な細胞株を構成し得る幹細胞、始原細胞および/または前駆細胞である。特定の実施形態では、エキソソームは、合成のものである。

10

## 【0058】

様々な実施形態では、複数のエキソソームは、心筋球由来細胞(CDC)に由来する。他の実施形態では、複数のエキソソームは、1つ以上の生物学的分子を含むエキソソームを含む。他の実施形態では、複数のエキソソームは、CDCに由来する場合には、非CDC源に由来するエキソソームと比較して、1つ以上の生物学的分子が豊富なエキソソームを含む。様々な実施形態では、1つ以上の生物学的分子は、タンパク質、成長因子、サイトカイン、転写因子および/または形態形成因子である。他の実施形態では、複数のエキソソームは、1つ以上の生物学的分子が豊富なエキソソームを含み、CDCに由来する場合には、非CDC源に由来するエキソソームと比較して豊富なマイクロRNAをさらに含むマイクロRNAを含むエキソソームを含む。様々な実施形態では、これらのマイクロRNAは、miR-146a、miR22、miR-24、miR-210、miR-150、miR-140-3p、miR-19a、miR-27b、miR-19b、miR-27a、miR-376c、miR-128、miR-320a、miR-143、miR-21、miR-130a、miR-9、miR-185および/またはmiR-23aを含み得る。複数の実施形態では、複数のエキソソームは、miR-146a、miR-22、miR-24の少なくとも1つが豊富な1つ以上のエキソソームを含む。

20

30

## 【0059】

様々な実施形態では、CDCは、哺乳動物のものである。他の実施形態では、CDCは、ヒトのものである。特定の実施形態では、エキソソームは、合成のものである。特定の実施形態では、合成エキソソームは、CDC由来エキソソームと実質的に類似の内容物(例えば、マイクロRNA、生物学的分子)を有する。

## 【0060】

様々な実施形態では、複数のエキソソームの投与は、損傷組織もしくは機能不全組織における遺伝子発現を変化させ、損傷組織の生存能力を改善し、および/または個体における新たな組織の再生もしくは産生を増強する。様々な実施形態では、これらの効果を達成するために投与されるエキソソームの量は、 $1 \times 10^6$ 個 $\sim 1 \times 10^7$ 個、 $1 \times 10^7$ 個 $\sim 1 \times 10^8$ 個、 $1 \times 10^8$ 個 $\sim 1 \times 10^9$ 個、 $1 \times 10^9$ 個 $\sim 1 \times 10^{10}$ 個、 $1 \times 10^{10}$ 個 $\sim 1 \times 10^{11}$ 個、 $1 \times 10^{11}$ 個 $\sim 1 \times 10^{12}$ 個の範囲、 $1 \times 10^{12}$ 個またはそれを超える量である。他の実施形態では、エキソソームの数は、細胞治療方法のための臨床関連用量で使用される細胞数に関連する。例えば、3 mL /  $3 \times 10^5$ 個のCDCは、冠動脈内投与において治療利益を提供することができることが実証されているので、複数のエキソソームは、細胞治療方法のための臨床関連用量の細胞数から求められる。様々な実施形態では、投与は、反復投与であり得る。別の例では、投与されるCDCの数は、エキソソーム投与量の別のベースラインとして、冠動脈当たり2500万個の冠動脈内CDC(すなわち、合計7500万個のCDC)を含む。様々な実施形態では、CDCの数は、エキソソーム投与量の別のベースラインとして、単回用量で $1 \times 10^5$ 個、 $1 \times 10^6$ 個、 $1 \times 10^7$

40

50

個、 $1 \times 10^8$ 個、 $1 \times 10^9$ 個のCDCを含む。特定の場合では、これは、体重に比例し得る（総CDC用量で、体重1kg当たり100,000～100万個のCDCの範囲）。様々な実施形態では、エキソソーム量は、タンパク質量、例えば1～10mg、10～25mg、25～50mg、50～75mg、75～100mgまたは100mgまたはそれを超えるエキソソームタンパク質を含む投与量によって定義され得る。

#### 【0061】

有効用量範囲、投与レジメンおよび投与経路の定義は、蛍光標識エキソソームを使用し、標的組織保持（これは、スクリーニング基準として5分間、10分間、15分間、30分間または30分間を超えて測定した場合にバックグラウンドの10倍超、50倍超または100倍超であり得る）を測定した研究によってガイドされ得る。特定の実施形態では、30分間の時点で測定したバックグラウンドの100倍超が低用量および高用量のベースライン測定値であり、次いで、（例えば、MRIエンドポイント：瘢痕サイズ、全体的および局所的な機能を使用して）安全性および生物活性について評価される。様々な実施形態では、単回用量は、2回、3回、4回、4回以上の逐次用量と比較される。様々な実施形態では、投与は、反復投与であり得る。様々な実施形態では、急性疾患および/または症状の処置のために、反復投与または逐次投与が提供される。様々な実施形態では、慢性疾患および/または症状の処置のために、反復投与または逐次投与が提供される。

#### 【0062】

様々な実施形態では、被験体へのエキソソームの投与は、当技術分野で公知の技術のいずれかによって行われる。いくつかの実施形態では、これは、経皮送達を含む。他の実施形態では、心筋注入が使用され、例えば冠動脈内カテーテルが使用される。様々な実施形態では、送達は、動脈内または静脈内であり得る。さらなる送達部位としては、任意の1つ以上の心臓区画、例えば動脈部位、静脈部位および/または心室部位が挙げられる。特定の実施形態では、投与は、前記部位または罹患組織および/もしくは機能不全組織と異なる組織または器官部位への送達を含み得る。特定の実施形態では、送達は、吸入または経口投与によるものである。

#### 【0063】

様々な実施形態では、複数のエキソソームの投与は、損傷組織もしくは機能不全組織における遺伝子発現を変化させ、損傷組織の生存能力を改善し、および/または個体における新たな組織の再生もしくは産生を増強する。様々な実施形態では、エキソソームの投与は、組織における機能的改善をもたらす。複数の実施形態では、損傷組織または機能不全組織は、心臓組織を含む。

#### 【0064】

例えば、心臓組織が損傷または機能不全である特定の実施形態では、機能的改善は、（他の機能的改善の中でも）心拍出量、収縮性、心室機能の増加および/または不整脈の減少を含み得る。他の組織では、神経損傷の処置に応じた認知の増強、肺損傷の処置に応じた血液酸素移動の改善、損傷免疫学的関連組織の処置に応じた免疫機能の改善などの機能の改善も実現され得る。

#### 【0065】

様々な実施形態では、複数のエキソソームの投与は、損傷組織もしくは機能不全組織における遺伝子発現を変化させ、損傷組織の生存能力を改善し、および/または個体における新たな組織の再生もしくは産生を増強する。様々な実施形態では、エキソソームの投与は、組織において機能的改善をもたらす。複数の実施形態では、損傷組織または機能不全組織は、骨格筋組織を含む。

#### 【0066】

例えば、骨格筋組織が損傷しているまたは機能不全である特定の実施形態では、機能的改善は、収縮力の増加、歩行能力の改善（例えば、6分間歩行試験結果の増加）、座位から立ち上がる能力の改善、臥位もしくは背臥位から座る能力の改善、または手先の器用さ（マウスのポインティングおよび/またはクリック）の改善を含み得る。

#### 【0067】

様々な実施形態では、損傷組織または機能不全組織は、急性事象による修復、再生または機能の改善を必要とする。急性事象としては、限定されないが、外傷、例えば裂傷、挫傷または衝突損傷、ショック、血液または酸素流の喪失、感染、化学曝露または熱曝露、毒曝露または毒物曝露、薬物の過剰使用または過剰曝露などが挙げられる。他の実施形態では、損傷組織は心臓組織であり、急性事象は心筋梗塞を含む。いくつかの実施形態では、エキソソームの投与は、梗塞を受けている領域における心臓壁厚の増加をもたらす。

【0068】

他の実施形態では、組織はまた、慢性疾患、例えば鬱血性心不全（デュシェンヌ筋ジストロフィー、虚血性心疾患、高血圧症、心臓弁膜症、拡張型心筋症、感染症、糖尿病などの疾患に続発する症状を含む）などによる損傷を受ける。様々な実施形態では、投与は、反復投与、例えば2回、3回、4回、4回以上の逐次投与であり得る。様々な実施形態では、急性疾患および/または症状の処置のために、反復投与または逐次投与が提供される。様々な実施形態では、慢性疾患および/または症状の処置のために、反復投与または逐次投与が提供される。

【0069】

他の損傷原因としては、限定されないが、傷害、加齢性変性症、癌および感染症も挙げられる。複数の実施形態では、再生細胞は、修復または再生を必要とするものと同じ組織型に由来する。複数の他の実施形態では、再生細胞は、修復または再生を必要とする組織以外の組織型に由来する。

【0070】

特定の実施形態では、処置の方法は、心臓関連疾患および/または症状の処置を必要とする被験体を選択することと、複数のエキソソームを含む組成物を前記個体に投与することを含み、前記組成物の投与は、前記被験体を処置する。様々な実施形態では、心臓関連疾患および/または症状は、デュシェンヌ筋ジストロフィー関連心不全をさらに含む心不全を含む。様々な実施形態では、複数のエキソソームは、30~300nmのサイズの範囲である。様々な実施形態では、複数のエキソソームは、40~100nmのサイズの範囲である。特定の実施形態では、複数のエキソソームは、心筋球由来細胞（CDC）エキソソームである。特定の実施形態では、複数のエキソソームは、CD63+であるエキソソームを含む。様々な実施形態では、エキソソームは、マイクロRNA miR-146a、miR22、miR-24、miR-210、miR-150、miR-140-3p、miR-19a、miR-27b、miR-19b、miR-27a、miR-376c、miR-128、miR-320a、miR-143、miR-21、miR-130a、miR-9、miR-185および/またはmiR-23aを含む。他の実施形態では、エキソソームは、2~5kDa、例えば3kDaである。他の実施形態では、組成物の投与は、 $1 \times 10^8$ 個、 $1 \times 10^8$ 個~ $1 \times 10^9$ 個、 $1 \times 10^9$ 個~ $1 \times 10^{10}$ 個、 $1 \times 10^{10}$ 個~ $1 \times 10^{11}$ 個、 $1 \times 10^{11}$ 個~ $1 \times 10^{12}$ 個、 $1 \times 10^{12}$ 個またはそれ以上のエキソソームの投与量を含む。例えば、3mL/3x10<sup>5</sup>個のCDCは、冠動脈内投与において治療利益を提供することができることが実証されているので、複数のエキソソームは、細胞治療方法のための臨床関連用量の細胞数から求められる。様々な実施形態では、投与は、反復投与であり得る。別の例では、投与されるCDCの数は、エキソソーム投与量の別のベースラインとして、冠動脈当たり2500万個の冠動脈内CDC（すなわち、合計7500万個のCDC）を含む。様々な実施形態では、CDCの数は、単回用量で $1 \times 10^5$ 個、 $1 \times 10^6$ 個、 $1 \times 10^7$ 個、 $1 \times 10^8$ 個、 $1 \times 10^9$ 個のCDCを含む。特定の場合では、これは、体重に比例し得る（総CDC用量で、体重1kg当たり100,000~100万個のCDCの範囲）。様々な実施形態では、エキソソーム量は、タンパク質量、例えば1~10mg、10~25mg、25~50mg、50~75mg、75~100mgまたは100mgまたはそれ以上のエキソソームタンパク質を含む投与量によって定義され得る。様々な実施形態では、組成物の投与は、エキソソームの複数回投与を含む。様々な実施形態では、急性疾患および/または症状の処置のために、反復投与または逐次投与が提供される。様々な実施形態では、慢性疾患および/または症状の

10

20

30

40

50

処置のために、反復投与または逐次投与が提供される。他の実施形態では、組成物の投与は、経皮注射を含む。他の実施形態では、組成物の投与は、心筋注入を含む。他の実施形態では、組成物の投与は、冠動脈内カテーテルの使用を含む。他の実施形態では、組成物の投与は、動脈内送達または静脈内送達を含む。

#### 【0071】

被験体における心機能を改善する方法であって、被験体を選択することと、複数のエキソソームを含む組成物を前記個体に投与することを含み、前記組成物の投与が前記被験体における心機能を改善する方法が本明細書にさらに記載される。他の実施形態では、心機能の改善は、例えば、ベースライン駆出量の改善によって実証され得る。他の実施形態では、心機能の改善は、生存組織の増加、瘢痕量の減少、壁厚の改善、傷害部位の再生リモデリング、血管新生 (antio genesis) の増強、心筋形成効果の改善、アポトーシスの減少、および/または炎症促進性サイトカインレベルの減少に関する。

10

#### 【0072】

特定の実施形態では、心機能を改善する方法は、心臓関連疾患および/または症状の処置を必要とする被験体を選択することと、複数のエキソソームを含む組成物を前記個体に投与することを含み、前記組成物の投与は、前記被験体を処置する。様々な実施形態では、心臓関連疾患および/または症状は、デュシェンヌ筋ジストロフィー関連心不全をさらに含む心不全を含む。様々な実施形態では、複数のエキソソームは、30 ~ 300 nm のサイズの範囲である。様々な実施形態では、複数のエキソソームは、40 ~ 100 nm のサイズの範囲である。特定の実施形態では、複数のエキソソームは、心筋球由来細胞 (CDC) エキソソームである。特定の実施形態では、複数のエキソソームは、CD63+ であるエキソソームを含む。様々な実施形態では、エキソソームは、マイクロRNA miR-146a、miR22、miR-24、miR-210、miR-150、miR-140-3p、miR-19a、miR-27b、miR-19b、miR-27a、miR-376c、miR-128、miR-320a、miR-143、miR-21、miR-130a、miR-9、miR-185および/またはmiR-23aを含む。他の実施形態では、エキソソームは、2 ~ 5 kDa、例えば3 kDaである。他の実施形態では、組成物の投与は、 $1 \times 10^8$ 個、 $1 \times 10^8$ 個 ~  $1 \times 10^9$ 個、 $1 \times 10^9$ 個 ~  $1 \times 10^{10}$ 個、 $1 \times 10^{10}$ 個 ~  $1 \times 10^{11}$ 個、 $1 \times 10^{11}$ 個 ~  $1 \times 10^{12}$ 個、 $1 \times 10^{12}$ 個またはそれを超えるエキソソームの投与量を含む。例えば、3 mL /  $3 \times 10^5$ 個のCDCは、冠動脈内投与において治療利益を提供することができることが実証されているので、複数のエキソソームは、細胞治療方法のための臨床関連用量の細胞数から求められる。様々な実施形態では、投与は、反復投与であり得る。別の例では、投与されるCDCの数は、エキソソーム投与量の別のベースラインとして、冠動脈当たり2500万個の冠動脈内CDC (すなわち、合計7500万個のCDC) を含む。様々な実施形態では、CDCの数は、単回用量で $1 \times 10^5$ 個、 $1 \times 10^6$ 個、 $1 \times 10^7$ 個、 $1 \times 10^8$ 個、 $1 \times 10^9$ 個のCDCを含む。特定の場合では、これは、体重に比例し得る (総CDC用量で、体重1 kg 当たり100,000 ~ 100万個のCDCの範囲)。様々な実施形態では、エキソソーム量は、タンパク質量、例えば1 ~ 10 mg、10 ~ 25 mg、25 ~ 50 mg、50 ~ 75 mg、75 ~ 100 mgまたは100 mgまたはそれを超えるエキソソームタンパク質を含む投与量によって定義され得る。様々な実施形態では、組成物の投与は、エキソソームの複数回投与を含む。様々な実施形態では、急性疾患および/または症状の処置のために、反復投与または逐次投与が提供される。様々な実施形態では、慢性疾患および/または症状の処置のために、反復投与または逐次投与が提供される。他の実施形態では、組成物の投与は、経皮注射を含む。他の実施形態では、組成物の投与は、心筋注入を含む。他の実施形態では、組成物の投与は、冠動脈内カテーテルの使用を含む。他の実施形態では、組成物の投与は、動脈内送達または静脈内送達を含む。

20

30

40

#### 【0073】

本明細書では、本発明者らは、心筋梗塞後の治療的再生のための先進臨床試験において、心筋球由来細胞 (CDC) が、mdxマウスにおけるデュシェンヌ心筋症の重要な病態

50

生理学的特徴（酸化ストレス、炎症、線維化およびミトコンドリア機能不全）を回復させることを実証する。ヒトCDCによって分泌されるエキソソームは、mdxマウスにおいてCDCの利益を再現し、ヒトデュシェンヌ心筋細胞におけるカルシウムサイクリングおよびミトコンドリア呼吸の異常を回復させる。CDCおよびそれらのエキソソームは両方とも、mdxマウスにおいて心機能を改善する；CDCの単回注射は、最大運動能力を増加させ、生存を改善するために十分である。CDCエキソソームにおいて豊富なマイクロRNA（miR-148a）の送達は、CDCおよびCDCエキソソームの重要な効果を模倣する。したがって、CDCは、miR-148aを含むシグナル伝達分子のエキソソーム媒介性輸送を介して、デュシェンヌ心筋症を改善する。本知見は、デュシェンヌ心筋症を有する患者においてCDCを臨床試験する動機になる。

10

#### 【実施例】

#### 【0074】

##### 実施例1

##### CDCの培養

心室中隔の右心室面からの心内膜生検は、死亡した組織ドナーの健常心臓から得られる。心筋球由来細胞は、以前に記載されているように誘導した。Makkar et al., (2012). "Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial." *Lancet* 379, 895-904 (2012) (これは、参照により本明細書に全体的に組み込まれる)を参照のこと。

20

#### 【0075】

簡潔に言えば、心臓生検を小さな断片に細分化し、コラゲナーゼで短時間消化する。次いで、外植片を、20 mg/mlフィブロネクチンコーティングディッシュ上で培養した。間質様扁平細胞および相明円形細胞は、組織断片から自発的に成長し、2~3週間でコンフルエンスに達する。0.25%トリプシンを使用してこれらの細胞を採取し、20 mg/mlポリD-リシン上で懸濁培養して、自己凝集性心筋球を形成する。心筋球をフィブロネクチンコーティングディッシュに播種し、継代することによって、心筋球由来細胞（CDC）を得る。20% FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシンおよび0.1 mlの2-メルカプトエタノールを補充したIMDM基本培地を使用して、すべての培養物を5% CO<sub>2</sub>、37℃で維持する。

30

#### 【0076】

##### 実施例2

##### 培地の馴化およびエキソソームの精製

4継代のCDCから、エキソソームを採取する。正常ヒト真皮線維芽細胞（NHDF）（対照として有益な利益を提供しない対照として以前に利用されていた細胞）から、エキソソームを単離することもできる。

#### 【0077】

無血清培地中、100%コンフルエンスで、CDCおよびNHDFを15日間馴化する。次いで、吸引した培地を3,000×gで15分間遠心分離して、細胞残屑を除去する。次いで、Exoquickエキソソーム沈殿溶液を使用して、エキソソームを単離した。

40

#### 【0078】

エキソソームペレットを適切な培地に再懸濁し、アッセイに使用する。保存されているエキソソームマーカーCD63の発現を、ELISAを使用して検証する。Nanodrop分光光度計を使用して、エキソソームペレットのRNA含量も定量することができる。miR-146a欠損エキソソームの作製のために、懸濁液中、miRIDIAN miR-146aヘアピン阻害剤またはmiRIDIANヘアピン対照でCDCをトランスフェクションし、フィブロネクチンコーティングフラスコ上に播種する。無血清馴化培地

50

(48時間馴化)から、エキソソームを単離する。

【0079】

#### 実施例3

##### エキソソームRNAの分解

エキソソームペレットを2mlのPBSに懸濁することによって、エキソソームRNA分解を実施する。1つのサンプルに、100mlのTriton X-100 (Sigma Aldrich)を追加して、5%のtriton濃度を達成する。0.4mg/ml RNase A処理によって、エキソソームを37で10分間処理する。0.1mg/mlプロテイナーゼKによって、サンプルを37で20分間さらに処理する。マイクロRNA単離キットを使用して、サンプルからRNAを精製する。Nanodropを使用して、RNAレベルを測定する。

10

【0080】

#### 実施例4

##### エキソソームペレットの質量分析

消化のために、フィルタ支援サンプル調製(FASP)法を使用して、タンパク質を調製する。Qubit fluorometerを使用して、濃度を測定する。トリプシンを1:40の酵素対基質比で追加し、37のヒートブロック上で、サンプルを一晩インキュベートする。デバイスを遠心分離し、ろ液を回収した。消化したペプチドを、C18 stop-and-go extraction(STAGE)チップを使用して脱塩する。強陰イオン交換STAGEチップクロマトグラフィーによって、ペプチドを分画する。C18 STAGEチップからペプチドを溶出し、乾燥させる。液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析を用いて、各画分を分析する。サンプルを内径2cm x 100mmのトラップカラムにロードする。分析カラムは、ブルドチップエミッターを備える内径13cm x 75mmの溶融シリカである。データ依存的な取得によって、400~1,400 m/zのフルスキャンで上位15のイオンからタンデム質量スペクトルを取得するように、質量分析計をプログラミングする。msconvertを使用して、質量分析計のRAWデータファイルをMGF形式に変換する。X!Hunterを使用して、その時点においてGPMで利用可能な最新のスペクトルライブラリーに対して、MGFファイルをサーチする。また、ネイティブスコアリングアルゴリズムおよびk-スコアスコアリングアルゴリズムの両方を使用するX!!Tandemを使用して、OMSSAによって、MGF

タンパク質は、X!!Tandemでは0.01以下のペプチドE値スコア、OMSSAでは0.01以下、0.001以下、ならびにX!Hunterサーチでは0.5以上のシータ値、ならびにX!!TandemおよびX!Hunterでは0.0001以下のタンパク質E値スコアを有する1つ以上のユニークなペプチドを有することが必要である。

20

30

【0081】

#### 実施例5

##### 筋細胞の単離、血管新生アッセイ

エキソソーム適用の効果を立証する研究のために、様々な細胞型を使用することができる。例えば、1~2日齢のSprague Dawley仔ラットから新生ラット心筋細胞(NRCM)を単離し、単層培養することができる。別の有用な供給源は、血管新生をアッセイするために成長因子欠乏マトリゲル(BD Biosciences)上にプレATINGされたヒト臍静脈静脈内皮細胞を含む。

40

【0082】

次いで、細胞を、それぞれ $7 \times 10^8$ 個および $4.0 \times 10^8$ 個のCDCエキソソームまたはNHDFエキソソームと共にインキュベートする。用量の差異は、馴化中の細胞からの異なるエキソソーム産出量を反映する。細胞は、同様の条件下でエキソソームを産生することができたので、相対用量は、インビボにおける相対的なエキソソーム産生を表し得る。4時間後に、管形成を測定した。

【0083】

50

## 実施例 6

## インビトロ心筋細胞アッセイ、エキソソーム処理

本発明者らは、 $1.5 \times 10^4$ 個のNRCMをフィブロネクチンコーティング8チャンバースライドにプレATINGした。5日後に、培地を、それぞれ $3.5 \times 10^8$ 個または $2 \times 10^8$ 個のCDCまたはNHDFエキソソームを含有する新たな新鮮培地と交換する。次いで、細胞を、4%パラホルムアルデヒドによって4℃で30分間固定する。チャンバーを冷PBSで3回洗浄し、次いで、ブロッキングし、Dako/0.1%サポニン(Invitrogen)によって37℃で1時間透過処理する。細胞を、ウサギ抗Ki-67(1:100)一次抗体およびマウス抗 $\alpha$ -サルコメアアクチニン(Abeam)と共にインキュベートする(一晩、4℃)。次いで、細胞をPBSで3回洗浄し、TUNEL染色溶液中、ヤギ抗マウス(Cy5)およびヤギ抗ウサギ(FITC)と共に37℃で1時間インキュベートする。次いで、スライドをPBSで3回洗浄し、1:8,000 40,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール染色溶液で染色し、Prolong 延色防止溶液(Invitrogen)を使用してマウントする。共焦点顕微鏡法を使用して、スライドをイメージングした。

【0084】

## 実施例 7

## 心筋細胞ストレスアッセイ

第1の傷害モデルは、フィブロネクチンコーティング12ウェルプレート上に単層でプレATINGし、40nMのmiR-146aまたは模倣物のいずれかで24時間処理したNRCMの使用を含むことができる。次いで、培地を交換し、細胞をPBSで3回洗浄した。次いで、過酸化水素(無血清培地中100mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、2時間)または塩化コバルト(無血清培地中5mM CoCl<sub>2</sub>、2時間)を使用して、細胞にストレス負荷する。細胞をPBSで洗浄し、暗条件下、20mMカルセインPBS溶液によって37℃で20分間処理することによって、生存率を測定する。Soft Max Pro 5 Plate Reader(Molecular Devices)を使用して、蛍光を読み取る。1ウェル当たりのデータは、9回の連続測定の平均である。

【0085】

第2のモデルは、6ウェルプレート中で、心筋細胞を25mmプレコーティングガラスカバースリップ(Fischer Scientific)上にプレATINGすることを含む。50mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を使用して、細胞に15分間ストレス負荷し、続いて、CDCを含有するトランスウェルメンブレンインサートと共にインキュベートし、またはCDCエキソソームと共に4時間インキュベートする。次いで、上記で説明されているように、細胞を洗浄し、パラホルムアルデヒドで固定し、分析のために染色する。

【0086】

## 実施例 8

## CDCにおけるエキソソーム阻害

T175フラスコ中で、CDCをコンフルエンスまで成長させる。インビトロ研究では、20mM GW4869(Sigma Aldrich)の無血清培地、または等量のDMSOを含有する無血清培地中で、CDCを15日間馴化した。心筋細胞ストレスのインビトロトランスウェルインサートアッセイでは、20mM GW4869(Sigma Aldrich)または5mMスピロエポキシド(Santa Cruz Biotechnology)でCDCを12時間処理することができる。CDCをPBSで3回洗浄し、無血清培地と交換する。処理したCDCを含有するインサートを、心筋細胞を含有する6ウェルプレートに追加する。インビボ研究では、20mM GW4869または等量のDMSOでCDCを12時間処理する。注射前に、CDCフラスコをPBSで2回洗浄し、トリプシン処理し、カウントする；動物1匹当たり $10^5$ 個のCDCを注射した。

【0087】

## 実施例 9

## 急性および慢性心筋梗塞モデル

10

20

30

40

50

3カ月齢の雄性重症複合免疫不全(SCID) beigeマウスをイソフルランで麻酔する。外科的準備の後に、側方開胸のために、2cmの垂直切開を鎖骨中線に入れる。7-0シルクを使用して、左前下行を結紮した。エキソソーム、マイクロRNA、CDCまたは培地対照を、動物の2つの梗塞周辺部位に、40ml / 注射の容量で注射する。

#### 【0088】

MIの慢性モデルでは、いかなる処理も施さずに、動物を上記のように梗塞させる。3週間後に、上記と同じように、処理を動物に行う。エキソソーム処理では、ペレットをイスコフ改変ダルベッコ(IMDM)基礎培地に再懸濁する。それぞれ $2.8 \times 10^9$ 個および $1.56 \times 10^9$ 個のCDCおよびNHDFエキソソームを動物に注射する。80ngのmiPv-146aまたはマイクロRNA模倣物対照をマイクロRNA処理動物に注射する。簡潔に言えば、Dharmafect(Thermo Scientific)トランスフェクション試薬およびIMDM基礎培地中で、miRIDIAN miR-146aまたはmiRIDIAN陰性対照をボルテックスし、室温で10分間インキュベートして、複合体を形成させる。マイクロRNA複合体を注射用IMDMに再懸濁する。CDC処理では、 $10^5$ 個のCDCを前記のように動物に注射する。

#### 【0089】

心エコー検査。手術24時間後(ベースライン)、14日後および4週間後に、Vevo 770イメージングシステム(Visual Sonics)を使用して、心エコー検査によって、SCID beigeマウスを評価する。全身浅麻酔の誘導後に、最大左心室径のレベルで、心臓を長軸像で3Dイメージングする。Visual Sonics version 1.3.8ソフトウェアを用いて、LV拡張末期領域およびLV収縮末期領域の2D像から、左心室駆出率を測定することができる。1時間あたり各動物を複数回測定し、平均を統計分析に使用する。

#### 【0090】

##### 実施例10

##### 組織学

MIの4週間後に、動物を屠殺する。心臓を採取し、横切断をMI縫合の少し上に入れる。次いで、先端部分を、最適切断温度溶液中のベースモールド/包埋リングブロックに包埋する。冷2-メチルブタンに浸漬することによって、ブロックを急速凍結する。心臓を厚さ5mmで切片化する。

#### 【0091】

##### 実施例11

##### マッソントリクローム染色

心臓1つ当たり合計4個の切片を含有する2つのスライドを、マッソントリクローム染色を使用して染色する。簡潔に言えば、ブアン溶液中で、切片を一晩処理する。次いで、スライドを流水下で10分間リンスし、ワイゲルトヘマトキシリンで5分間染色する。その後、スライドをリンスし、スカーレット酸フクシンで5分間染色し、再びリンスする。次いで、リタングステン/リンモリブデン、アニリンブルーおよび2%酢酸で、スライドをそれぞれ5分間さらに染色する。次いで、スライドをリンスし、乾燥し、DPXマウント媒体を使用してマウントした。

#### 【0092】

##### 実施例12

##### 形態計測

Image Jソフトウェアを使用して、心臓切片の形態計測分析を実施した。簡潔に言えば、染色切片の2D画像を青色、赤色および緑色のチャンネルに分割する(青色のみを使用した)。各切片における青色の面積および強度を測定して梗塞サイズを計算することによって、梗塞サイズを立証することができる。心臓1つ当たり分析した4個の切片の梗塞率を平均化することによって、生存心筋量および梗塞量の割合を計算した。梗塞組織または生存組織の生成物、平均マウス心臓の高さ(3mm)および心臓組織の比重( $1.05 \text{ g/ml}$ )として、梗塞量および生存心筋量を計算した。梗塞の最薄面積を測定するこ

10

20

30

40

50

とによって、梗塞壁厚を計算する。有意な肥大および有害なリモデリングが起こったMIの慢性モデルでは、組織における心筋細胞の生成量に基づいて、各心臓の生存心筋量を調整することができる。

#### 【0093】

垂直に切片化した心筋細胞（赤色の細胞質および中央の可視的な核を有する円形細胞として定義される）の断面積を測定することによって、筋細胞の量を求める。本発明者らは、心臓1つ当たり少なくとも25個の筋細胞を測定した。円筒形の簡便な仮定を使用して、筋細胞の体積を定量する；体積に心筋細胞の比重（ $1.15 \text{ mg/ml}$ ）を掛けることによって、質量を求めた。各マウス心臓の生存心筋量を、その心臓における心筋細胞の量で割った。

10

#### 【0094】

##### 実施例13

CDCエキソソームは、血管新生を増強し、心筋細胞の生存および増殖を促進する

培養ヒトCDC（または、治療的に不活性な対照として正常ヒト真皮線維芽細胞（NHDF））によって15日間馴化した無血清培地から、エキソソームを単離する（オンラインで入手可能な図7）。培地を定期的に交換しなかったにもかかわらず、馴化期間の終了までに、ほとんどのCDCが依然として生存していた（図7Bおよび7C）。精製エキソソームペレットは、RNAが豊富であった（図1A）。本発明者らは、5% Tritonの存在下でペレットをRNase Aに曝露し（図1B）、プロテイナーゼKを追加して、RNAを遮蔽し得るタンパク質複合体を解離させることによって、RNAがエキソソーム内に存在することを確認した。質量分析により、保存されているエキソソーム生合成タンパク質（CD63を含む）（図1C）の存在を確認し、本発明者らは、エキソソームの収量を定量するためにこれを使用した（図1D）。透過型電子顕微鏡により、ほとんどのエキソソームは直径30~90nmであることが明らかになったが、血管細胞由来エキソソームの報告と一致して、より小さな粒子およびより大きな粒子も存在していた（図1Eおよび1F）。インビトロアッセイにより、血管新生、心筋細胞増殖およびアポトーシスに対するCDCエキソソームの主な効果が明らかになった。

20

#### 【0095】

NHDFエキソソームではなくCDCエキソソームは、ヒト臍帯内皮細胞における管形成（血管新生の増強の指標）を促進した（図1G）。CDCエキソソーム処理新生心筋細胞は、より高い割合のKi67陽性核によって証明されるように、NHDFエキソソームまたは培地のみに曝露したものよりも増殖した（図1H）。加えて、CDCエキソソーム処理心筋細胞は、より少ない末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼニックエンド標識（TUNEL）陽性核を示した（図1I）。したがって、CDCエキソソームは、血管新生を刺激し、心筋細胞増殖を促進し、プログラム化細胞死を減少させる。これらの効果は、親CDCのものを再現している。

30

#### 【0096】

##### 実施例14

CDCエキソソームは、MI後に心機能を改善し、構造的利益を付与し、生存心筋量を増加させる

40

CDCは、動物およびヒトの両方において、梗塞心筋における機能的改善および再生を刺激することが公知であるが、CDC由来エキソソームがこれらのプロセスを再現することができるか、またはこれらのプロセスに不可欠であるかは、本技術の主な重要事項である。確立された前臨床モデルにおける治療有効性を評価するために、本発明者らは、免疫不全マウスにおいて急性MIを誘発し、次いで、CDCエキソソーム、NHDFエキソソームまたは無血清培地をMI境界領域に注射した。

#### 【0097】

注射15日後および30日後に、CDCエキソソームを注射した動物では、NHDFエキソソームまたは培地対照と比較して、全体的な心機能が優れていた（図2A）。組織学的レベルでは、CDCエキソソーム処理心臓は、NHDFエキソソームおよび培地対照と

50

比較して、癒痕量の減少、生存心筋量の増加および梗塞壁厚の増加を示した（図 2 B ~ 2 E）。CDC エキソソーム処理心臓では、炎症促進性サイトカインレベルもより低かった（図 8）。これらすべての点において、CDC エキソソームは、CDC それ自体の公知の利益を模倣している。

#### 【 0 0 9 8 】

急性MIモデルは、生理活性を評価するために広く使用されているが、心臓保護効果と真の再生とを区別することができない。これを区別するために、本発明者らは別の一連の実験を実施し、本発明者らは、MIの21日後（この時点で、心筋癒痕は十分に確立されている）に、エキソソームを注射した。3週間後に、CDC エキソソームを注射した心臓は、複数の構造的および機能的利益：駆出率の改善（図 2 F；さらに機能的面積変化の改善、図 9 A）、癒痕量の減少（図 2 Gの代表的な画像および図 2 Hのプールデータ）、生存心筋量の増加（図 2 I）および梗塞壁の肥厚（図 2 J）を示した。また、CDC エキソソームで処理した心臓は、著しく変形した対照心臓と比べて、腔拡大の減少（図 9 Bおよび9 C）、梗塞周囲の縮小（図 9 D）および代償筋細胞肥大の減少（図 9 Eおよび9 F）を示した。CDC エキソソーム処理心臓では、微小血管の密度が増加し（図 2 Kおよび9 G）、アポトーシス心筋細胞核が低頻度であった（図 9 Hおよび9 I）。確立された癒痕の状況における新たな心筋の正味の成長は、治療的再生の中心的な基準を満たしている；機能の改善および有害なリモデリングの軽減は、生理学的に重要な組織変化の証拠である。本発明者らは、CDC エキソソームが実際に真の心臓再生を媒介し、血管新生および組織保存を促すと結論付ける。

#### 【 0 0 9 9 】

##### 実施例 1 5

エキソソーム分泌の阻害はCDCの利益を減少させる

エキソソームがCDC移植の治療効果を媒介するのであれば、エキソソーム分泌の阻害は、前記利益を遮断すると論理的に予想される。この考えを試験するために、本発明者らは、GW 4 8 6 9（エキソソーム放出を防止する中性スフィンゴミエリナーゼの可逆的阻害剤）でCDCを処理した。GW 4 8 6 9への曝露は、エキソソーム産生を用量依存的に遮断し（図 3 A）、20 mM（明らかな短期的細胞毒性害を伴わない用量；例えば、増殖の障害はない；図 3 B）で完全に抑制した。

#### 【 0 1 0 0 】

GW 4 8 6 9 処理 CDC によって馴化した培地は心筋細胞増殖を増強せず、アポトーシスを軽減しなかったため、エキソソーム放出の抑制は、インビトロにおけるCDCの間接的利益を無効化した（図 3 Cおよび3 D）。スピロエポキシド（中性スフィンゴミエリナーゼの特異的な不可逆的阻害剤）は、ストレス負荷した心筋細胞に対するGW 4 8 6 9の抗アポトーシス効果を模倣した（図 10 Aおよび10 B）。インビボでは、CDCのすべての予想治療効果を与えたピヒクルのみ（DMSO）の対照とは対照的に、GW 4 8 6 9で前処理したCDCは、急性MIにおいて機能的（図 3 E）または構造的（図 3 F ~ 3 I）利益を与えなかった。したがって、CDCによるエキソソーム分泌は、インビトロおよびインビボにおけるCDC媒介性利益に必要である。

#### 【 0 1 0 1 】

##### 実施例 1 6

CDCエキソソームは、MI病理において重要な役割を果たすmiR-146aが豊富である

CDCエキソソームの治療利益の根拠を調査するために、本発明者らは、88個の最も良く定義されたマイクロRNAのPCRマイクロアレイを使用して、それらのマイクロRNAレパートリーをNHDFエキソソームのものと比較した。2つの細胞型のマイクロRNA含量は、劇的に異なっていた。2つの群では、43個のマイクロRNAが差次的に存在していた；これらの中で、miR-146aは、CDCエキソソームにおいて最も豊富であった（NHDFエキソソームよりも262倍多かった；図 4 A、4 Bおよび11）。さらに、CDCエキソソームを注射した動物由来のMI後心臓では、NHDFエキソソ-

10

20

30

40

50

ムを注射したものと比較して、miR-146aの組織レベルが増加していたが(図4C)、これは、CDCエキソソームがmiR-146a輸送を介して作用し得るという考えを説得力のあるものにする。miR-146a模倣物への新生ラット心筋細胞の曝露は、心筋細胞生存率を増加させ、酸化ストレスから保護した(図4Dおよび12A)。全トランスクリプトームマイクロアレイにより、Ira k 1およびTraf 6(これら2つは、miR-146aの公知の標的であるTLR-NFkB線のシグナル伝達メディエーターである)のダウンレギュレーションが明らかになった(図4E)。本発明の経路分析により、細胞生存、細胞周期、細胞組織化および形態に關与する経路の変化(これらはすべて、虚血傷害に關連し(図11D)、基礎転写因子My cとの關連性を共有する(図11E))が示された。心筋傷害におけるmiR-146aの生物学的役割を証明するために、

10

#### 【0102】

MI後に、146a KOマウスは、WTまたは146a KO-Rと比較して、心機能の障害および有害なりモデリングを強く示した(図4Fおよび4G)。組織学的分析により、WTまたは146a KO-Rではなく146a KOでは、瘢痕量の有意な増加(図4H)および梗塞壁厚の減少が明らかになった(図4J)。146a KO-R群では、生存心筋量が最大であったが(図4I)、これは恐らく、注射したmiR-146a模倣物の超生理学的効果を示している。これらの知見は、MIにおけるmiR-146aの重要な役割を示しており、miR-146aがCDCエキソソームの治療利益のいくつかを媒介し得ることを推測する理由を与える。

20

#### 【0103】

重要なことに、本発明者らは、miR-146aが、心筋梗塞のマウスモデルにおいて、梗塞壁厚の肥厚および生存組織の増加をもたらすことをさらに立証した。より大きなエキソソーム効果に対するmiR-146aの寄与を調査するために、本発明者らは、miR-146aヘアピン阻害剤(または対照ヘアピン)でCDCをトランスフェクトし、続いて、培地を馴化し、エキソソームを単離することによって、miR-146a欠損エキソソームを開発した。得られたエキソソームに対する、および対照またはmiR-146a欠損エキソソームのいずれかに曝露したNRVMに対するqPCRによって、miR-146aのノックダウンの成功を確認した(図12Bおよび12C)。未処理NRVM(左の柱、図5A)のTUNEL陽性と、対照CDCエキソソームで処理したNRVM(右の柱、図5A)のものとを比較することによって、CDCエキソソームの抗アポトーシス効果は明白であった。miR-146a欠損エキソソームが付与した酸化ストレスからの保護は、対照CDCエキソソームよりも少なかったが、アポトーシスの抑制は依然として有意であった。これらのデータは、miR-146aが、CDCエキソソームの有益な効果の全部ではないが一部の基礎となることを示唆している。インビボでこの問題をさらに証明するために、本発明者は、miR-146a模倣物またはマイクロRNA模倣物対照のいずれかを注射した以外は図2と同じMIモデルを用いた。急性MI中にmiR-146a模倣物を注射したマウスは、ポンプ機能の改善(図5B)、瘢痕量の減少、および生存心臓組織の増加を示した(図5C~5F)。再生をより厳密に研究することができる慢性MIモデルでは、miR-146aで処理した動物は、ごくわずかな統計的に有意ではない機能的改善を示した(図5Gおよび13A)。さらに、組織学的分析により、瘢痕量の差異は示されなかった(図5Hおよび5I)。しかしながら、miR-146a模倣物で処理した心臓は、対照よりも、生存組織の増加、梗塞壁の肥厚(図5Jおよび5K)、および有害なりモデリングの減少を示した(図13B~13D)。血管新生の評価により、2つの群間で有意差は示されなかった(図5Lおよび図13G)。しかしながら、インビトロデータ(図5A)と一致して、miR-146a注射心臓では、心筋細胞アポトーシスの頻度の低下が観察された(図13Hおよび13I)。したがって、慢性MIモデル

30

40

50

では、miR-146aは、心筋形成および抗アポトーシス効果を再現するが、CDCエキソソームの他の機能的および構造的利益を再現しない(図2F~2Jおよび9A~9Cを参照のこと)。外因性miR-146aは、Irak-1およびTraf6(これらは両方とも、toll様受容体(TLR)シグナル伝達経路に關与する)のターゲティングを介して、虚血/再灌流傷害を抑制することが公知である。先天性免疫の基礎となるTLRシグナル伝達は、MIを含む無菌性炎症の病理において主要な役割を果たす。

#### 【0104】

CDCエキソソームによる炎症促進性サイトカインの減少(図8)ならびにmiR-146aによるIrak1およびTraf6の抑制(図4C)(これは、CDCエキソソームを注射した心臓では増大する)は、TLRシグナル伝達の鈍化と一致する。加えて、miR-146aは、NOX-4(これは酸化ストレスを与え、心臓傷害を促進することが示されている)およびSMAD4(形質転換成長因子b(TGF-b)線維化経路のメンバー)を抑制する。これらの標的が実際にダウンレギュレートされることを確認するために、本発明者らは、miR-146aによる処理の7日後に、慢性MI心臓のウエスタンブロットを実施した。実際、miR-146a処理心臓では、模倣物対照と比較して、上記標的のすべてがサイレンシングされていた(図6Aおよび6B)。本発明者らはまた、ミエロペルオキシダーゼのレベル(好中球浸潤の代理)がより低いことを見出した。

#### 【0105】

##### 実施例17

異なるマウス系統間におけるベースライン駆出率の差異

本発明者らは、これらの動物の著しく高いベースライン駆出率を観察した。この差異は、ノックアウトに使用したマウス系統(C57BL6)のバックグラウンドの差異に起因すると推測された。本稿におけるすべての他の実験において、使用したマウスの系統は、SCID-Beigeである。SCID-Beigeマウスは、成熟B細胞およびT細胞ならびにナチュラルキラー(NK)細胞を欠く。傷害に対するそれらの反応が異なるので、免疫能力のこの基本的差異は、ベースライン測定値の違いの主な原因である可能性が高い。SCID-Beigeマウスは、ヒト細胞(これは、CDCおよびエキソソームの供給源である)に対して許容性であるので、本稿の実験のほとんどにおいて、本発明者は、SCID-Beigeマウスを選択した。しかしながら、146aKOマウスの適切な対照は、BL6バックグラウンドと同じバックグラウンド系統の野生型であった。これは、以前に立証されている。系統は、心筋梗塞後の創傷治癒の重要な決定因子であることが以前に示されている。

#### 【0106】

##### 実施例18

免疫浸潤に対するmiR-146aの効果

炎症性免疫応答の軽減は、それを必ずしも完全に無効化するわけではない。マクロファージを含む先天性免疫細胞は、再生を促進する役割を果たすことが示されている。さらに、本発明者らの研究室の未発表データは、マクロファージ輸送はCDC処理によって影響を受けないが、CDCで処理したマクロファージは、M1(炎症促進性)から抗炎症性および治癒促進性の表現型M2に切り替わることを示している。

#### 【0107】

##### 実施例19

考察

心筋球由来細胞は、ヒト梗塞心臓の治療的再生を誘導することが示されている。伝統的に不可逆的であると考えられていた傷害の形態では、CDCは、癒痕の縮小および新たな機能的な心筋の成長をもたらした。同様の効果は、動物モデルにおいて確認されている。本明細書では、本発明者らは、エキソソームがCDC誘導性治療的再生を再現すること、およびエキソソーム産生の阻害がCDCの利益を損なうことを示す。エキソソームは、パラクリン機構を介して細胞挙動を変化させる能力を有するマイクロRNAを含有する(図6B)。これらの中で、本発明者らは、CDCエキソソームでは、miR-146aが特に

10

20

30

40

50

豊富であると同定した。単独で投与した場合、miR-146aは、CDCおよびCDCエキソソームの顕著な利益の全部ではないが一部を再現する(図3)。同様に、miR-146a欠乏エキソソームは、miR-146aが存在する場合よりも弱い、心筋細胞アポトーシスを依然として抑制することができた(図5A)。MIの慢性モデル(癒痕が永続的である)におけるmiR-146aによる心臓の処理は、治療的再生の特徴である生存心筋量の増加を再現するが、CDCエキソソームの2つの重要で有益な効果(癒痕量の減少および全体的な機能の改善)を模倣することができない:恐らくはmiR-146aによって誘発される血管新生は不十分であるので、生存心筋の増加は、機能を高めるために十分ではない。本発明者らは、miR-146aが、CDCエキソソームの効果の媒介において部分的に重要な役割を果たすが、単独で包括的な治療効果を与えるには十分ではないと結論付ける。レポーターにおける他のマイクロRNAは、miR-146aと同義的なまたはおそらく相乗的な効果を発揮し得る。例えば、miR-22(CDCエキソソームにおいて非常に豊富な別のマイクロRNA)は、心臓ストレスに対する適応反応に重要であることが示されている。同様に、miR-24(CDCエキソソームにおいても確認されている)は、フリリン(線維化促進性TGF- $\beta$ シグナル伝達経路のメンバー)をターゲティングすることによって、心臓線維化を調節する;MIのモデルにおけるmiR-24の過剰発現は、心筋癒痕形成を減少させた。CDCエキソソームの利益に関するメディエーターとしてのこれらのマイクロRNAの潜在的な役割は単独で、またはmiR-146aと組み合わせて研究中である。CDCエキソソーム内の活性成分の精査は有益であるが、ナノ小胞の解体は、治療的観点から非生産的であり得る。CDCエキソソームは本来的に細胞透過性であり、それらの脂質二重層コートは、粒子が細胞間を往復する際の分解からペイロードを保護するので、インタクトな粒子それ自体が、疾患適用に適切なものであり得る。

#### 【0108】

傷害心臓へのCDC由来エキソソームの注射は、CDC移植の構造的および機能的利益を模倣する;反対に、CDCによるエキソソーム分泌の阻害は、移植CDCの治療利益を無効化する。すべてのエキソソームが有益であるわけではない:真皮線維芽細胞(治療的に不活性な対照細胞)由来エキソソームの注射は、有益ではなかった。DCエキソソームは、傷害心臓における左心室(LV)リモデリングおよび線維化を軽減しながら、急性心筋細胞死および炎症性サイトカイン放出を減少させた。マイクロRNAアレイは、CDCエキソソームにおいて高度にアップレギュレートされるいくつかの「特徴的なマイクロRNA」を明らかにしている。対照的に、質量分析は、CDCエキソソームのタンパク質組成が従来の、線維芽細胞エキソソームのものと同程度であることを示している。

#### 【0109】

本研究は、エキソソームおよびそれらが含有するマイクロRNAが、CDC誘導性心臓再生の重要なメディエーターであることを示唆している。CDCは、多様だが協調的な効果を発揮する:それらは、内因性始原細胞をリクルートし、生存心臓細胞の増殖を促す;一方、注射したCDCは、MI後の不適応性LVリモデリング、アポトーシス、炎症および組織線維化を抑制する。CDCが、共同で多様な効果をもたらす一連の個々の成長因子およびサイトカインを分泌する可能性があるが、エキソソーム内のマスターレギュレーターマイクロRNAの関与は、多数の分泌タンパク質因子の複雑な混合物がなくても、様々な効果を互いに結びつけるのに役立つであろう。また、マイクロRNAは、組織中では短命であるにもかかわらず、長期の利益および傷害微小環境の基本的変化をもたらす、CDCの持続的利益を正当化するために役立つことが公知である。CDCエキソソームは、「永続的」傷害の状況で再生をもたらすことができると最初に示された細胞型によって与えられる豊富なシグナル伝達情報を含み、生細胞を移植しなくてもCDCと同じ利益を与える。すべてのこれらの理由により、CDCエキソソームは、無細胞治療候補としてさらなる開発に値する。

#### 【0110】

本明細書に記載される結果に基づいて、CDCエキソソームは、デュシェンヌ筋ジスト

10

20

30

40

50

ロフィー（DMD）に関連する心不全（HF）の処理など、心臓関連症状を処理することができることが実証された。細胞によって分泌されたエキソソームは、親細胞の治療利益を再現することができ、記載されているノックダウン研究に基づいて、このような治療利益の達成に不可欠と思われる。重要なことに、これらの結果により、様々なタンパク質およびRNAの豊富な生物学的カーゴ内で、マイクロRNAが、再生プロセスの活性化において中心的な役割を果たすことがさらに判明したが、これは、臨床治療における適用が有力であることを示唆している。エキソソームは、製造上の利点、定義および特性評価に関する相対的容易性、腫瘍原性および免疫原性の欠如、ならびに細胞、組織、器官または機械的移植が利用不可能な治療状況における投与可能性を含め、伝統的な細胞ベースの治療を超える有意な利点を有する。したがって、CDCエキソソームは、生物学的治療の重大な進歩である。

10

## 【0111】

## 実施例20

## 統計分析

すべての結果は、平均±SEMとして示されている；交互脈の結果は、平均±SDとして示されている。それぞれコルモゴロフ・スミルノフ検定およびレーベン検定を使用して、データセットの正規性および等分散性を試験した。両方とも確認された場合、t検定または分散分析とそれに続くボンフェローニ事後検定を、統計的有意性の決定に使用した；正規性または等分散性のいずれかが保証されなかった場合、ノンパラメトリック検定（ウイルコクソン検定またはクラスカル・ワリス検定とそれに続くダン事後検定）を適用した（SPSS Inc., Chicago, Illinois）。検出力分析について、予備データは利用不可能であった。初期パイロットプロジェクトとして1群当たり動物4匹のサンプルサイズで、実験を計画した。パイロットプロジェクトの結果から、本発明者らは、その後の研究を行うことができた。本研究は、記載されているように、臨床前報告基準に準拠していた。

20

## 【0112】

## 実施例21

## 心エコー検査

Vevo 770イメージングシステム（VisualSonics, Toronto, Canada）を使用して、1回目のCDC/CDCエキソソーム（CDC-XO）注射2日前（ベースライン）および3週間後、2カ月後および3カ月後に、ならびに2回目のCDC/CDC-XO注射3週間後、2カ月後および3カ月後に、心エコー検査研究を実施した。同じイメージングシステムを使用して、ベースライン（2日前）およびmiR-148a模倣物注射3週間後に、心エコー検査研究を実施した。全身浅麻酔の誘導後に、最大LV径のレベルで、心臓をイメージングした。VisualSonicsバージョン1.3.8ソフトウェアを用いて、2次元長軸像から、LV駆出率（LVEF）を測定した。左心室（LV）拡張末期および収縮末期容積の変化：1回目および2回目のCDCまたはCDC-XO移植は、プラセボと比べて、少なくとも6カ月間にわたるmdxマウスにおけるLV拡張末期（LV EDV）および収縮末期（LV ESV）容積の持続的改善をもたらした。miR-148aの送達は、LV EDVおよびLV ESVを部分的に改善した（図27）。

30

40

## 【0113】

## 実施例22

## トレッドミル運動試験

CDC/ビヒクル注射3週間後からExer-3/6オーブントレッドミル（Columbus Instruments, Columbus, OH）を用いて、運動能力を週1回評価した（術前1週間にmdxマウスのサブセットにおいて測定した運動能力は、術後3週間にMdx+ビヒクル群において測定したものと同等であった；データは示さず）。順応期間（10m/分で20分間）後、トレッドミル運動中は、マウスが疲労するまで、平均速度の段階的な増加（1m/分）を2分間ごとに適用した（ジョッカーで10秒間

50

超過す；トレッドミル中は、マウスがトラックに留まるのを支援するために、軽く押し続けた)。続いて、マウスをケージに戻し、総距離を記録した。週1回の運動を3カ月間行った後に、死亡率の評価のために、CDCノビヒクルmdxマウスを、野生型年齢適合性マウスと一緒に追跡した。トレッドミルプロトコールは、American Physiological Society<sup>3</sup>のガイドラインに準拠していた。

#### 【0114】

##### 実施例23

##### CDCの増殖

記載されているように<sup>2</sup>、野生型系統適合マウス心臓(C57BL/10ScSnJ野生型マウス心臓)から、マウスCDCを増殖させた。簡潔に言えば、心室組織を約1mmの外植片に細分化し、部分的に酵素消化し、接着性(フィブロネクチンコーティング)培養皿にプレーティングした。これらの外植片が自発的に産生した増殖細胞(外植片由来細胞)を、コンフルエント後に採取し、懸濁培養液にプレーティング(ポリ-D-リジンコーティングディッシュ上に細胞 $10^5$ 個/mL)して、三次元心筋球の自己集合を可能にした。続いて、心筋球を接着性培養皿上に再プレーティングしてCDCを得、これを、すべての実験において1継代目で使用した。

10

#### 【0115】

##### 実施例24

##### リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応によるCDC生着の評価

CDC注射1週間後、2週間後および3週間後に、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を実施して、細胞生着を評価した。TaqManアッセイ(Applied Biosystems, Foster City, CA)を使用して、Y染色体上に位置するSRY遺伝子を生着マーカーとして検出することを可能にするために、雄性CDCを注射した。全マウス心臓を採取し、計量し、ホモジナイズした。注射したCDCから単離したゲノムDNAの複数の希釈物を用いて、標準曲線を作成した。対照として非注射マウス心臓由来の等量のゲノムDNAで、すべてのサンプルをスパイクした。各反応では、50ngのゲノムDNAを使用した。リアルタイムPCRを3回反復で実施した。標準曲線から生着を定量した。1週間の時点のCDCの生着率は約8%であり、2週間の時点では1%未満であった。3週間で、生存CDCを検出することができなかった(図28)。

20

#### 【0116】

##### 実施例25

##### CDC注射後の心筋細胞増殖および心臓コラーゲン含量

各心臓の先端部、中央部および基底由来のパラフィン包埋切片を、マッソントリクローム染色ならびにKi67およびaurora Bに対する抗体による免疫染色に使用した。コラーゲンIA1およびコラーゲンIIIA1の心筋存在量を、ウエスタンブロット分析によって測定した(図29)。

30

#### 【0117】

##### 実施例26

##### エキソソーム

低酸素状態(2%O<sub>2</sub>、デフォルト状態)または正常酸素状態(20%O<sub>2</sub>、単にエキソソームのRNA含量を比較する研究のため)において、ヒトCDC(CDC-XO)[または対照として正常ヒト真皮線維芽細胞(NHDF)]によって一晩(24時間)馴化した無血清培地から、エキソソームを単離した。300g(10分間)および10,000g(30分間)の連続遠心分離ならびに0.22ミクロンフィルタによるろ過の後に、超遠心分離(100,000g、1時間)を使用して、馴化培地からエキソソームを単離した。単離したエキソソームを、RNA抽出および続いてRNA配列決定に供し(図30)、またはPBSに再懸濁し(インビボおよびインビトロ実験の場合)、それぞれマイクロBCAタンパク質アッセイキット(Life technologies, Grand Island, NY)およびNanosight粒子カウンターを使用して、エキソソームとタンパク質との比を測定した(図31)。予備的用量反応研究により、低酸素CDC

40

50

由来タンパク質 1 g 当たり  $2 \times 10^7$  個および  $1 \times 10^9$  個のエキソソームが、インビボおよびインビトロ実験のための有効用量であることが判明した。NHDFエキソソームを適用した実験では、同様の濃度のエキソソームを使用した。記載されているように、超遠心分離またはExoquickキット(SBI, Mountain View, CA)によって単離したエキソソームを使用して、予備的パイロットインビボ実験を実施して、2つの単離方法で同様の結果を得た。

【0118】

#### 実施例 27

##### CDC、CDCエキソソームおよびmiR-148の注射

CDC移植のプロセスを最適化するために、予備的用量反応実験を実施したところ、虚血マウスモデルおよび非虚血マウスモデルにおける先の用量範囲実験と一致して、1回目の注射では  $1 \times 10^5$  個の細胞および2回目の注射(1回目の注射3カ月後)では  $1 \times 10^4$  個の細胞が、有効用量であることが判明した。合計で細胞  $1 \times 10^5$  個 /  $40 \mu\text{L}$  リン酸緩衝生理食塩水(PBS; 1回目の注射)または細胞  $1 \times 10^4$  /  $40 \mu\text{L}$  PBS (2回目の注射)またはPBSのみを、記載されている4点間で等分して左心室(LV)心筋に注射した。LVを3つの領域(基底、中間および先端)に視覚的に分け、基底領域に1回注射し、中央領域に2回注射し、先端領域に1回注射した。CDC(Mdx + CDC、 $n = 12$ )またはビヒクル[プラセボ: Mdx + ビヒクル(PBS)、 $n = 12$ ](3カ月間隔)を10カ月齢のCDC/mdxおよびビヒクル/mdxマウスにそれぞれ2回注射した。開胸術中に、 $28^1/2$ ゲージ針によって、注射を行った。動物が全身麻酔(デクスメトミジン( $0.5 \text{ mg/kg}$ )/ケタミン( $75 \text{ mg/kg}$ ); IP; 術前に1回)中に、すべての外科手術を行った。心筋へのCDCエキソソームおよびmiR-148の注射のために、同様のプロトコールを使用したmiR-148a模倣物(hsa-miR-148a-3p、 $2 \mu\text{g}$ ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)をRNAiMAXトランスフェクション試薬(life technologies, Grand Island, NY)と総容量  $40 \mu\text{l}$ 、室温で30分間混合し、上記のように心臓1つ当たり4点に注射した。

【0119】

#### 実施例 28

##### 組織学

1回目のCDC/CDC-XO注射3週間後(CTL:  $n = 4$ ; Mdx + ビヒクル:  $n = 6$ ; Mdx + CDC/Mdx + CDC-XO: それぞれ  $n = 6$ )または3カ月後(CTL:  $n = 4$ ; Mdx + ビヒクル:  $n = 6$ ; Mdx + CDC/Mdx + CDC-XO:  $n = 6$ )およびmiR-148注射3週間後( $n = 6$ )に、マウスを屠殺した。組織学のために、各心臓の先端部、中央部および基底由来のパラフィン包埋切片を使用した。線維化の評価のために、マッソントリクローム染色(HT15 Trichrome Stain [Masson] Kit; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を実施した。それぞれマウスCD3、CD20およびCD68に対する抗体による免疫染色によって、T細胞、B細胞およびマクロファージを評価し、各心臓の先端領域(3個の切片;  $50 \mu\text{m}$ 間隔)、中央領域(4個の切片;  $50 \mu\text{m}$ 間隔)および基底領域(3個の切片;  $50 \mu\text{m}$ 間隔)から無作為に選択した10個の各切片から細胞を10視野(倍率20倍)でカウントして、各心臓における平均細胞数を計算した。活性なサイクリングおよび増殖( $Ki67^+$ およびAurora B<sup>+</sup>)心筋細胞を同様にカウントし、記載されているように、 $Ki67^+$ およびAurora B<sup>+</sup>心筋細胞の数を強拡大視野(HPF)当たりの心筋細胞の総数で割ったものとして、サイクリング画分および増殖画分をそれぞれ表した。各心臓について、測定結果を平均化した。免疫蛍光染色: 低pH緩衝液(DAKO, Carpinteria, CA)中で熱誘導性エピトープ回復を行い、続いて、1%サポニン(Sigma, St. Louis, MO; 3%サポニンを含有するタンパク質ブロッキング溶液をKi67の免疫蛍光染色に適用した)を含有するタンパク質ブロッキング溶液(DAKO, Carpinteria, CA)で2時間透過処理/ブロッキングし

10

20

30

40

50

た。続いて、各心臓の先端部、中央部および基底部由来の5  $\mu$ m切片の免疫蛍光染色のために、一次抗体のタンパク質ブロッキング溶液を4 で一晩適用した。PBSで3回洗浄(各10分間)した後に、Alexa Fluor二次抗体(Life Technologies, Grand Island, NY)を検出に使用した。Leica TCS SP5 X共焦点顕微鏡システムによって、画像を撮影した。マウス Ki-67 (SP6; 1:50; Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA)、WGA (コムギ胚芽凝集素; 1:200; Life Technologies, Grand Island, NY)、Nrf2 (C20; 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、aurora B (1:250; BD Biosciences, San Jose, CA)に対する抗体を使用して、免疫蛍光染色を行った。免疫ペルオキシダーゼ染色: Ventana Medical System (Tucson, AZ; CD68) および Cell Marque (Rocklin, CA; CD3, CD20) の予め希釈されているウサギモノクローナル抗体を使用して、CD3、CD20 および CD68 の免疫組織化学的検出を5  $\mu$ m切片で実施した。高pH ER2緩衝液(Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL)中でオンボード熱誘導性エピトープ回復法を使用して、Leica Bond-Max Ventana自動スライド染色機(Chicago, IL)によって、染色を行った。Dako Envision+ウサギ検出システムおよび Dako DAB (Carpinteria, CA) を使用して、染色を可視化した。続いて、メイヤーヘマトキシリンでスライドを1分間対比染色し、カバーガラスで覆った。電子顕微鏡法: 1 mm<sup>2</sup>の立方体を2%グルタルアルデヒドに浸漬することによって、各心臓由来の後壁の先端部(1つの立方体)、中央部(右側サブ部分、中央サブ部分および左側サブ部分から3つの立方体)および基底部(右側サブ部分、中央サブ部分および左側サブ部分から3つの立方体)(CTL: n=3; Mdx+ビヒクル: n=3; Mdx+CDC: n=3)を固定し、オスミウムで後固定し、エポンに包埋した。切片を銀厚で切断し、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で染色し、AMTデジタルカメラシステムを備えるJEOL 1010を用いて観察した。

【0120】

実施例29

ウエスタンブロット

ウエスタンブロットを実施して、Nrf2シグナル伝達[Nrf2、リン酸化Nrf2(Nrf2-p<sup>S40</sup>)およびNrf2下流遺伝子産物:ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ-2(SOD-2)、およびグルタミン酸-システインリガーゼ(GCLC)の触媒サブユニット]、Nrf2リン酸化[リン酸化Akt(Akt-p<sup>S08</sup>)]、酸化的リン酸化[C1(NDUF8サブユニット)、C1I(SDHBサブユニット)、C1V(MTCO1サブユニット)、C1II(UQCRC2サブユニット)およびCV(ATPSAサブユニット)]、ミトコンドリア合成(PGC-1)、マイトファジー(PINK1)、炎症(NF- およびMCP-1)および線維化(コラーゲンIA1およびコラーゲンIIIA1)に寄与する標的タンパク質の心筋存在量を比較した。ウエスタンブロッティング(WB)によって、マロンジアルデヒドタンパク質付加物(酸化ストレスのマーカー)の心筋密度も測定した。各心臓の先端部、中央部および基底部由来のサンプル(各1mm厚の横断面)を混合し、ホモジナイズし、製造業者の説明書(Cellytic Nuclear Extraction Kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)にしたがって、核画分および細胞質画分を抽出した。呼吸測定のセクションに記載されているように、新鮮な全心臓(CTL: n=3; Mdx+ビヒクル: n=8; Mdx+CDC: n=8)からミトコンドリアを抽出した。WB分析のための細胞質抽出物、核抽出物およびミトコンドリア抽出物を-80 で保存した。マイクロBCAタンパク質アッセイキット(Life technologies, Grand Island, NY)によって、抽出物中のタンパク質濃度を決定した。以下の抗体を使用してウエスタンブロット分析によって、細

10

20

30

40

50

胞質画分、核画分およびミトコンドリア画分の標的タンパク質を測定した：マウス Nrf 2、HO-1、カタラーゼ、SOD-2、GCLC、コラーゲン I A 1 およびコラーゲン I I I A 1 ならびに PGC-1 に対する抗体は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) から購入し、リン酸化 Nrf 2 (Nrf 2 - p<sup>s40</sup>; Biorbyt, San Francisco, CA)、呼吸鎖サブユニット (全 OXPHOS 齧歯類 WB 抗体カクテル抗体)、マロンジアルデヒド、クエン酸シターゼおよび TBP (Abeam, Cambridge, MA)、Akt および Akt - p<sup>T308</sup>、 - 、 - (Cell Signaling Technology, Denver, CO)、PINK1、MCP-1 および NF- $\kappa$ B p65 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 抗体は、引用されている供給業者から購入した。核 (TBP)、細胞質ゾルおよびミトコンドリア (クエン酸シターゼ) 標的タンパク質のハウスキーピングタンパク質の測定のために、TBP (TATA 結合タンパク質) およびクエン酸シターゼに対する抗体を使用した。ウエスタンブロット法：簡潔に言えば、8、10 および 4 ~ 12 % Bis-Tris ゲル (Life technologies, Grand Island, NY) 上で、20  $\mu$ g のタンパク質を含有するアリコートに 120 V で 2 時間分画し、PVDF 膜 (Life technologies, Grand Island, NY) に転写した。ブロッキング緩衝液 (1 x TBS、0.05 % Tween-20 および 5 % 脱脂乳) 中で膜を 1 時間インキュベートし、次いで、表 1 に記載されている最適希釈で所定の抗体を含有する同じ緩衝液中で一晩インキュベートした。

10  
20

【0121】

【表1】

表1. ウエスタンブロット分析で適用した抗体および最適希釈。

抗体	p-Akt	Akt	マロンジアルデヒド	NF- $\kappa$ B p65	Nrf2	HO-1	p-Nrf2
希釈	1:500	1:1000	1:1000	1:1000	1:500	1:500	1:250
抗体	TBP	コラーゲンI	コラーゲンIII	クエン酸シターゼ	p-I $\kappa$ B- $\alpha$	I $\kappa$ B- $\alpha$	PGC-1
希釈	1:2000	1:500	1:500	1:2000	1:500	1:1000	1:500
抗体	カタラーゼ	SOD-2	GCLC	MCP	OXPHOS	PINK1	
希釈	1:500	1:500	1:500	1:100	1:500	2 $\mu$ g/ml	

30

【0122】

膜を 1 x TBS、0.05 % Tween-20 で 5 分間にわたって 3 回洗浄してから、1:1000 ~ 3000 希釈の西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗ウサギ IgG、抗マウス IgG (Cell Signaling Technology, Denver, CO) および抗ヤギ IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を含有する緩衝液 (1 x TBS、0.05 % Tween-20 および 3 % 脱脂乳) 中で 2 時間インキュベートした。膜を 1 x TBS、0.05 % Tween-20 で 5 分間にわたって 3 回洗浄し、ECL 化学発光剤 (Super Signal West Pico 化学発光基質; Life Technologies, Grand Island, NY) を使用してオートラジオグラフィによって顕色した。目的のタンパク質の発現を正常化したハウスキーピングタンパク質として、クエン酸シターゼおよび TBP を使用した。全 Akt、Nrf 2 および I $\kappa$ B - に対して、リン酸化 Akt、Nrf 2 および I $\kappa$ B - を正規化した。非還元非変性条件下で、コラーゲン I およびコラーゲン I I I のウエスタンブロット分析を行った。

40

【0123】

実施例 30

ミトコンドリア DNA

製造業者の説明書 (NovaQUANT (商標) Mouse Mitochondri

50

al to Nuclear Ratio kit, EMD Millipore, Billerica, MA) にしたがって PCR フォーマットを使用して、ミトコンドリア DNA と核 DNA との比を測定するために、全心臓組織から抽出した DNA (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, Germantown, MD) を使用した。

#### 【0124】

##### 実施例 3 1

##### 呼吸測定

イソフルラン麻酔後に、頸部脱臼によってマウスを屠殺した。心臓を直ぐに摘出し、PBS でリンスし、1 mL の氷冷 HES 緩衝液 (250 mM スクロース、1 mM EDTA、10 mM HEPES、pH 7.4) 中でポリトロンによってホモジナイズした。溶解物を 4、1000 g で 5 分間スピンドウンして、破碎されていない細胞および大きな残屑を除去した。次いで、上清を 4、7000 g で 10 分間スピンドウンして、粗細胞質ゾルからミトコンドリアが豊富な画分を分離した。ペレットを 1 mL の HES 緩衝液 (WB のための溶解緩衝液の一部) に再懸濁した。タンパク質の定量を実施し、HES 緩衝液で調整して、50  $\mu$ L の緩衝液中に 10  $\mu$ g のタンパク質を含有するサンプルを得、これを 24 ウェル Seahorse 細胞培養プレートにロードし、これを 4、2000 g で 20 分間スピンドウンして、プレート表面へのミトコンドリア接着を可能にした。次いで、Seahorse XF24 ミトコンドリアストレス試験の前に、450  $\mu$ L MAS 緩衝液 (70 mM スクロース、220 mM マンニトール、5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EGTA、0.2% 脂肪酸不含 BSA、pH 7.4) を追加した。5 mM / 5 mM ピルビン酸 / リンゴ酸および 0.25 mM ADP を使用し、続いて、1  $\mu$ M オリゴマイシン、1  $\mu$ M FCCP、1  $\mu$ M アンチマイシン、500 nM ロテノンの混合物を使用して、ミトコンドリアの酸化的リン酸化を刺激した。サンプル溶解物中でクエン酸シンターゼ活性を測定して、試験のためにロードした実際のミトコンドリアの量について正規化した。記載されているように、Seahorse (商標) XF96 Extracellular Flux 分析器を使用して、正常およびヒトデュシェンヌ iPS 細胞由来心筋細胞に対する Seahorse 呼吸測定を実施した。

#### 【0125】

##### 実施例 3 2

##### 細胞内 Ca<sup>2+</sup> の記録

5  $\mu$ M の蛍光カルシウム感受性色素 Cal-520 (AAT Bioquest, Sunnyvale, CA) を iPS 由来心筋細胞に 30 分間ロードし、チャンバベースの両側に配置した 2 本の白金線 (約 1 cm の間隔) を介して 20 V の振幅と共に 0.2 ミリ秒二乗の電圧パルスを送達する Ion-Optix Myopacer (IonOptix Corp) を使用して、周波数 1 Hz の電場刺激によってペーシングした。本発明者らは、Leica TCS-SP5-II (Leica Microsystems Inc.; Wetzlar, Germany) の xyt モード (2D) を使用して、細胞内 Ca<sup>2+</sup> をイメージングした。488 nm レーザーで Cal520 を励起し、視野サイズに応じて 36 ~ 7 ミリ秒 / フレームのスキャン速度で、10 倍対物レンズ (Leica: NPLAN 10x / 0.25) を用いて、その発光 (> 505 nm) を収集した。Ca<sup>2+</sup> 濃度に比例する蛍光強度 (F) を、ベースライン蛍光 F<sub>0</sub> (F / F<sub>0</sub>) に対して正規化した。ソフトウェア Clampfit (ver. 10.2, Molecular Devices, Inc.) を用いて、ピーク到達時間および Ca<sup>2+</sup> トランジェント振幅 (F / F<sub>0</sub>) を分析した。各群における心拍間隔の交互脈を、1 Hz ペーシングの 5 ~ 10 秒間隔で計算した。ペーシング中に各細胞の各トランジェント振幅 (各群で n = 細胞 10 個) を測定し、平均および標準偏差を計算し、群間で比較した。

#### 【0126】

##### 実施例 3 3

mdx マウスにおける CDC 移植によって改善された機能、生存および抗酸化経路

md x マウスにおける第1用量および第2用量（より低用量）のCDCの心筋内注射は、プラセボと比べて、少なくとも6カ月間にわたる（駆出率[EF]によって表される）左心室機能および容積の持続的改善をもたらした（図23Aおよび27）。EFにおけるCDC誘導性改善は、生存CDCがmd x 心臓において検出不可能であった時点（CDC送達の3週間後；図28）を超えて持続した。EFの改善に加えて、CDC注射は、歩行機能を増強した（図23B）。年齢適合野生型マウス（CTL）および10カ月齢のmd x マウス（心機能の評価について研究したmd x マウスとは異なる）を、CDCまたはビヒクル投与の3週間後から、高強度トレッドミル運動に週1回供した。CDC処理md x マウスは、ビヒクル処理md x マウスと比べて、それを測定した3カ月間にわたって、最大運動能力の実質的な増加を示した；2つの群では、生存も異なっていた（図23C）。約23カ月齢までに、ビヒクル処理md x マウスはすべて死亡したのに対して、CDC処理md x マウスの50%超は依然として生存していた（図23C）。CDCの注射は、Nrf2抗酸化経路の活性化および下流遺伝子産物のアップレギュレーションをもたらした（図23E）。同時に、酸化ストレスが軽減した（図23F）。細胞質では、Nrf2は通常、そのリプレッサー分子Keap1への結合を介して隔離される。酸化ストレス（およびAktなどのプロテインキナーゼによるNrf2リン酸化）は、Nrf2-Keap1複合体の解離を引き起こし、その結果、Nrf2の核移行および抗酸化酵素の転写活性化が起こる。md x 心臓では、（酸化ストレスに応じて予想どおり）リン酸化Aktならびに細胞質および核Nrf2のレベルが高かった；CDC処理は、それらのタンパク質レベルをさらに増加させた（図23E）。結果として、CDC処理md x 心臓では、下流エフェクターのヘムオキシゲナーゼ-1（HO-1）、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ-2（SOD-2）、およびグルタミン酸-システインリガーゼ（GCLC）の触媒サブユニットがアップレギュレートされ（図23E）、マロンジアルデヒド付加物（脂肪酸過酸化最終生成物；図23F）が著しく減少していた。組織学的分析により、線維化は、典型的なビヒクル処理md x 心臓では広範であったが、CDC処理md x 心臓では非常に少なかった（年齢適合野生型[WT]対照と同程度）ことが明らかになった。同様に、ウエスタンブロット分析により、CDC処理は、処理3週間後のmd x 心臓組織におけるコラーゲンIおよびIIIの蓄積を大きく回復させたことが示された（図29）。

【0127】

#### 実施例34

md x マウス心臓におけるCDC移植によって軽減されたミトコンドリア機能不全および炎症

筋ジストロフィー関連心不全では、ミトコンドリアの構造および機能が異常である。md x 心臓では、CDC注射3週間後に、ミトコンドリア完全性が改善した：CDCは、ミトコンドリア超微細構造を回復させ（図24A）、ミトコンドリアDNAコピー数を増加させ（ミトコンドリア数ではない；図24BおよびC）、呼吸鎖サブユニットのレベルを増大させ（図24D）、単離したmd x ミトコンドリアの不十分な呼吸能を正常化した（図24E）。

【0128】

ミトコンドリア生合成およびマイトファジーの重要なレギュレーターであるそれぞれPGC-1（核PPARコアクチベーター1）およびPINK1は、CDC処理3日後ではアップレギュレートしており、CDC処理3週間後ではダウンレギュレートしていたが（図24F）、これは、最初の損傷ミトコンドリアのターンオーバーと、それに続く安定なコンピテントミトコンドリアを伴う再増殖と一致する。注目すべきことに、md x マウス心臓においてCDC処理3週間後に観察されたミトコンドリア完全性の改善およびミトコンドリアターンオーバーの減少は、抗酸化酵素のアップレギュレーションならびに酸化ストレスおよび炎症の減少に関連していた（図24GおよびH）。ビヒクルmd x 心臓では、炎症促進性サイトカインおよびケモカインのマスターレギュレーターであるNF- $\kappa$ Bが活性化していた：リン酸化Aktおよび核p65含量の増加は、MCP1（単球走化性タンパク質1）の顕著なアップレギュレーションならびにCD68<sup>+</sup>マクロファージおよ

びCD3<sup>+</sup>T細胞の蓄積を伴っていた。CDC注射3週間後のmdx心臓では、CDC処理は、NF- $\kappa$ Bの活性化を逆転させ、炎症細胞の数を減少させた(図24GおよびH)。本発明者らはまた、心筋形成に対するCDCの効果を実証した。ビヒクル処理mdx心臓は、恐らくは進行中の心筋細胞喪失の代償として、サイクリング(Ki67<sup>+</sup>)および増殖(aurora B<sup>+</sup>)心筋細胞の数の数倍の増加を示した(図29)。CDCは、虚血モデルおよび非虚血モデルにおける内因性心筋形成を増加させることが公知である。同様に、mdx心臓では、CDC処理は、Ki67<sup>+</sup>およびaurora B<sup>+</sup>心筋細胞の顕著な増加によって証明されるように、心筋形成を促進した(図29)。

【0129】

#### 実施例35

CDC分泌エキソソームは、mdxマウスにおいてCDCの利益を再現する。

CDCによって分泌されたエキソソーム(CDCエキソソーム)は、心筋梗塞のマウスモデルにおいてCDCの機能的および構造的利益を模倣する。DMDのmdxマウスモデルでは、同様に、CDCの機能的、抗線維化および心筋形成利益は、低酸素CDCによって馴化した培地から単離したエキソソームの投与によって再現される。2回反復用量のヒトCDCエキソソームの心筋内注射(3カ月間隔)は、ビヒクル処理マウスと比べて、mdxマウスにおいてEFの持続的改善をもたらした(図25Aおよび図27)。一方、CDCエキソソーム注射mdx心臓では、サイクリング(Ki67<sup>+</sup>、図25C1)および増殖(aurora B<sup>+</sup>、図25C2)心筋細胞の数の顕著な増加と共に、コラーゲンIおよびIIIの量が減少していた(図25B)。

【0130】

#### 実施例36

ヒトデュシェンヌ心筋細胞におけるCDCエキソソーム、およびmdxマウスにおけるmiR-148a。デュシェンヌヒトiPS由来心筋細胞(DMD-CM)は、mdxマウス心臓においても見られる多くの表現型の欠陥を示す。酸素消費速度(OCR)の減少(これは、mdx心臓のミトコンドリアにおいて観察されたものを思い起こさせる(図24E))および異常なカルシウムサイクリングが、報告されている欠陥である<sup>21</sup>。1週間前にCDCエキソソームでDMD-CMをプライミングするとOCRが正常化した。正常ヒト真皮線維芽細胞(NHDFエキソソーム)由来エキソソームによるプライミングは効果がなかった。1Hzのバーストペーシング中の心拍間隔のカルシウムトランジェントの変化(催不整脈性の尺度)は、CDCエキソソームでDMD-CMをプライミングすることによって同様に抑制された(図26AおよびB)。低酸素CDCおよび正常酸素CDCから単離したCDCエキソソームのマイクロRNA(miR)含量の比較により、miR発現の差異(図26C)、および低酸素におけるmiR-148aの顕著な増大が明らかになった。本発明者らのCDCエキソソームを低酸素下で成長させたことを考慮して、本発明者らは、miR-148a投与の効果を実験した。miR-148a模倣物の心筋内注射3週間後では、miR-148aによってEF率は部分的に回復し、NF- $\kappa$ Bは抑制されたが、リン酸化Aktレベルは減少した(図26DおよびE)。リン酸化Aktの変化は、CDC注射で見られるものと逆方向であるが(図23E)、これは、miR-148aが、CDCおよびCDCエキソソームの効果の全部ではないが一部を模倣することを示している。

【0131】

10

20

30

40

【表 2】

表 2. 差異の95%信頼区間

*pAkt (CDC) 1 (0.20, 0.43) 2 (0.11, 0.31)	*pNrf2 1 (0.46, 0.62) 2 (0.42, 0.56)	*核 Nrf2 1 (0.14, 0.20) 2 (0.06, 0.13)	*HO-1 1 (0.04, 0.23) 2 (0.02, 0.23)	
MDA 1 (1.37, 1.50) 3 (1.08, 1.21)	p-IκB 1 (0.43, 0.52) 3 (0.28, 0.37)	p65 1 (0.32, 0.36) 3 (0.28, 0.32)	MCP-1 1 (0.28, 0.41) 3 (0.27, 0.36)	10
CI II I 1 (-1.27, -1.07) 3 (-0.42, -0.29)	CV 1 (-0.82, -0.63) 3 (-0.57, -0.39)	コラーゲン I (CDC) 1 (0.10, 0.19) 3 (0.07, 0.14)	コラーゲン I I I (CDC) 1 (0.05, 0.23) 3 (0.05, 0.11)	
PINK1 (Wk3) 1 (0.22, 0.26) 3 (0.05, 0.16)	*PGC-1 (D3) 1 (0.36, 0.46) 2 (0.13, 0.22)	PGC-1 (Wk3) 1 (0.13, 0.26) 3 (0.11, 0.17)	コラーゲンI (XO) 1 (0.38, 0.71) 3 (0.36, 0.69)	
CD3 1 (0.79, 1.73) 3 (0.04, 1.08)	*AuroraB (CDC) 1 (0.001, 0.01) 2 (0.0001, 0.004)	*Ki67 (CDC) 1 (0.001, 0.01) 2 (0.0001, 0.01)	*AuroraB (XO) 1 (0.001, 0.004) 2 (0.0002, 0.004)	20
*カタラーゼ 1 (0.04, 0.21) 2 (0.07, 0.11)	*SOD-2 1 (0.16, 0.25) 2 (0.10, 0.14)	*GCLC 1 (0.09, 0.13) 2 (0.08, 0.15)		
CI 1 (-1.69, -1.56) 3 (-0.79, -0.70)	CI I 1 (-1.85, -1.72) 3 (-0.70, -0.54)	CI V 1 (-1.14, -0.97) 3 (-0.51, -0.41)		
P65 (miR-148) 1 (0.37, 0.46) 3 (0.08, 0.53)	pAkt (miR-148) 1 (0.096, 0.15) 3 (0.054, 0.15)	*PINK1 (D3) 1 (0.25, 0.34) 2 (0.05, 0.19)		30
コラーゲン I I I (XO) 1 (0.36, 0.59) 3 (0.25, 0.35)	交互脈 1 (-0.024, 0.83) 3 (-0.59, 0.37)	CD68 1 (0.18, 0.67) 3 (0.01, 0.56)		
*Ki67 (XO) 1 (0.001, 0.01) 2 (0.0001, 0.01)				

1:野生型2:Mdx+ピヒクル3:Mdx+CDCまたはMdx+CDCエキソソームまたはMdx+miR148

\*3と1との間の差異;3と2との間の差異の95%信頼区間(CI)。他は、2と1との間の差異;2と3との間の差異の95%CIを表す。

## 【0132】

## 実施例37

## 考察

DMD患者では、心疾患は、骨格筋症の診断後10年以上現れない可能性があるが、心筋症は、それが明白になったら急速に進行する。連続心臓磁気共鳴イメージング研究により、線維化は、最初は心臓のごく一部に限定されることが多いが、その後は迅速かつ無情に拡大することが明らかになった<sup>23</sup>。結果は、全体的な心機能の障害および早期死亡である。DMD心筋症の進行を停止させ、予防または遅延させる有効な処理はない。CDCが、DMDにおいて有益であり得る再生効果を発揮することを認識して、本発明者は、早

期のDMD心筋症においてCDC注射の効果を試験した。本発明者らは、CDCが、ポンプ機能を改善し、運動能力を増加させ、生存を増強しながら、mdx心臓において線維化および炎症を軽減することを発見した。CDCの顕著な利益は、CDCエキソソームによって再現された。本発明者の知見は、CDCが、(限定されないが)miR-148aを含む遺伝的シグナルを積載したエキソソームを分泌することによって作用するという仮説を裏付けている。これらのエキソソームは周囲の心筋に取り込まれ、DMD心筋症の基礎となる複数の病態生理学的経路をアンタゴナイズする。一連の効果は相乗的である：酸化ストレス、炎症および線維化は鈍化する一方、心筋形成およびミトコンドリア機能は増大する。CDCおよびそれらのエキソソームは進行を防ぐだけでなく、DMD心筋症の中心的な機能障害を実際に回復させるという点で、この結果は注目に値する。ジストロフィン

10

#### 【0133】

上記の様々な方法および技術は、本発明を実行するための多くの方法を提供する。当然のことながら、本明細書に記載される任意の特定の実施形態にしたがって、記載されているすべての目的または利点を必ずしも達成することができるわけではないことを理解すべきである。したがって、例えば、当業者であれば、本明細書で教示または示唆され得るような他の目的または利点を必ずしも達成することなく、本明細書で教示される1つの利点または利点群を達成または最適化するように、前記方法を実施することができる

20

#### 【0134】

さらに、当業者であれば、異なる実施形態から様々な特徴の適用可能性を認識する。同様に、当業者であれば、上記様々な要素、特徴および工程ならびにこのような各要素、特徴または工程の他の公知の均等物を融合および適合して、本明細書に記載される原理にしたがって方法を実施し得る。多様な実施形態では、様々な要素、特徴および工程の中で、いくつかのものが特に組み入れられ、他のものが特に除外され得る。

30

#### 【0135】

特定の実施形態および実施例との関連で本発明を開示したが、当業者であれば、本発明の実施形態は、具体的に開示されている実施形態を超えて他の代替的な実施形態ならびに/またはその使用および改変および均等物に拡大されることを理解する。

40

#### 【0136】

本発明の実施形態では、多くのバリエーションおよび代替要素が開示されている。またさらなるバリエーションおよび代替要素は、当業者に明らかである。これらのバリエーションは、限定されないが、心筋球由来細胞の供給源、心臓生検(外植片由来細胞)もしくは心臓由来細胞(心筋球)の自己会合クラスターに直接由来する細胞、このような細胞によって産生されたエキソソーム、このような細胞によって産生されたエキソソームを単離、特性評価または変化する方法、ならびに本発明の教示によって作られる生成物の特定の使用である。本発明の様々な実施形態は、これらのバリエーションまたは要素のいずれかを特に組み入れまたは除外し得る。

#### 【0137】

いくつかの実施形態では、本発明の特定の実施形態を記載および特許請求するために使

50

用される成分の量、濃度、反応条件などの特性を表す数字は、いくつかの場合では、「約」という用語によって修飾されると理解すべきである。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書および添付の特許請求の範囲に記載されている数値パラメータは、特定の実施形態が得ようとする所望の特性に応じて変動し得る近似値である。いくつかの実施形態では、数値パラメータは、報告されている有効桁数を考慮して、通常の上捨五入技術を適用することによって解釈されるべきである。本発明のいくつかの実施形態の広範囲を示す数値範囲およびパラメータが近似値であるにもかかわらず、特定の実施例に示されている数値は、可能な限り正確に報告されている。本発明のいくつかの実施形態に示されている数値は、それらの各試験測定結果に見られる標準偏差から必然的に生じる特定の誤差を含有し得る。

10

**【0138】**

いくつかの実施形態では、本発明の特定の実施形態の説明との関連で使用される（特に、以下の特許請求の範囲との関連で使用される）「a」および「an」および「the」という用語ならびに類似の言及は、単数形および複数形の両方を包含すると解釈され得る。本明細書における値域の記載は、この範囲内の個々の各値を個別に参照する簡略な方法となることを意図するに過ぎない。特に本明細書で指示がない限り、個々の各値は、それが個別に本明細書に記載されているかのように本明細書に組み込まれる。本明細書に記載されるすべての方法は、特に本明細書で指示がない限り、または特に文脈上明確な矛盾がない限り、任意の適切な順序で実施され得る。本明細書における特定の実施形態に関して提供される任意のおよびすべての実施例または例示的な文言（例えば、「など」）の使用は、本発明をより良く説明するためのものに過ぎず、別様に特許請求されている本発明の範囲を限定するものではない。本明細書におけるいかなる文言も、本発明の実施に不可欠な特許請求の範囲に記載されている任意の要素を示すと解釈されるべきではない。

20

**【0139】**

本明細書に開示される本発明の代替要素または実施形態の分類は、限定として解釈されるべきではない。各グループのメンバーは個別に、またはグループの他のメンバーもしくは本明細書に見られる他の要素の他のメンバーと任意に組み合わせて参照および特許請求され得る。グループの1つ以上のメンバーは、利便性および/または特許性の理由により、グループに組み入れられ得、またはグループから削除され得る。任意のこのような組入または削除が生じた場合、本明細書は、変更されたグループを含有するとみなされるので、添付の特許請求の範囲で使用されるすべてのマーカッシュグループの記載要件を満たす。

30

**【0140】**

本発明を実行するために本発明者らが把握する最良の形態を含む本発明の好ましい実施形態が本明細書に記載される。これらの好ましい実施形態のバリエーションは、上記説明を読めば、当業者にとって明らかである。当業者であれば、このようなバリエーションを適切に用いることができ、本発明は、本明細書に具体的に記載される以外の方法で実施され得ると考えられる。したがって、本発明の多くの実施形態は、準拠法によって許容されるように、本明細書に添付される特許請求の範囲に記載される主題のすべての改変物および均等物を含む。また、特に本明細書で指示がない限り、または特に文脈上明確な矛盾がない限り、上記要素の任意の組み合わせがそのすべての可能なバリエーションで本発明によって包含される。

40

**【0141】**

さらに、本明細書を通して、多数の言及が特許および刊行物に対してなされている。上記で引用されている参考文献および刊行物はそれぞれ、それらの全体が参照により本明細書に個々に組み込まれる。

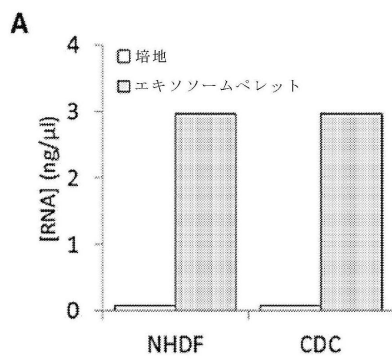
**【0142】**

最後に、本明細書に開示される本発明の実施形態は、本発明の原理の例示であることを理解すべきである。用いられ得る他の改変は、本発明の範囲内であり得る。したがって、限定ではなく例として、本明細書の教示にしたがって、本発明の代替構成が利用され得る

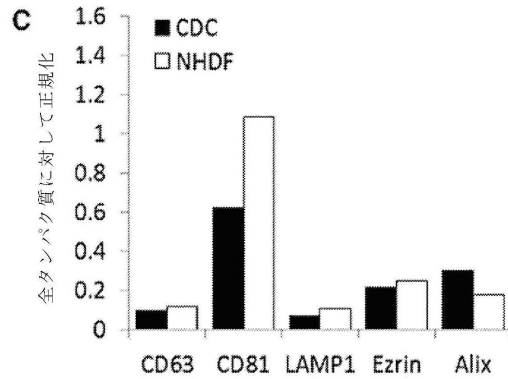
50

。したがって、本発明の実施形態は、厳密に示され記載されているものに限定されない。

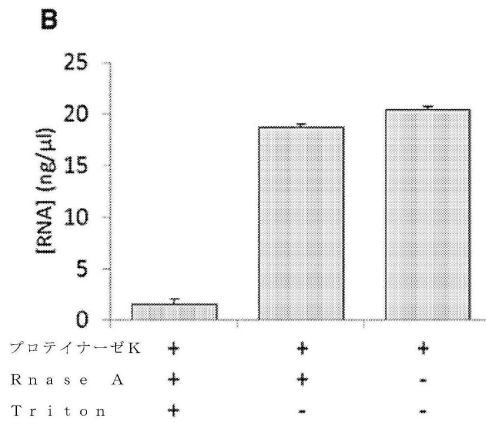
【図1A】



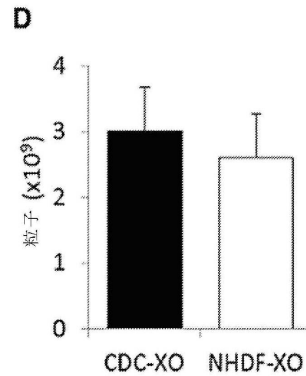
【図1C】



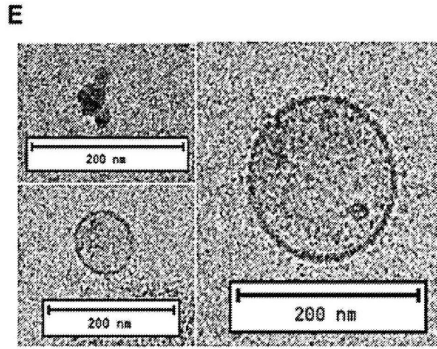
【図1B】



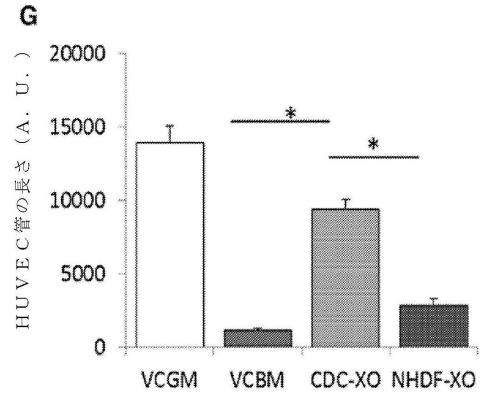
【図1D】



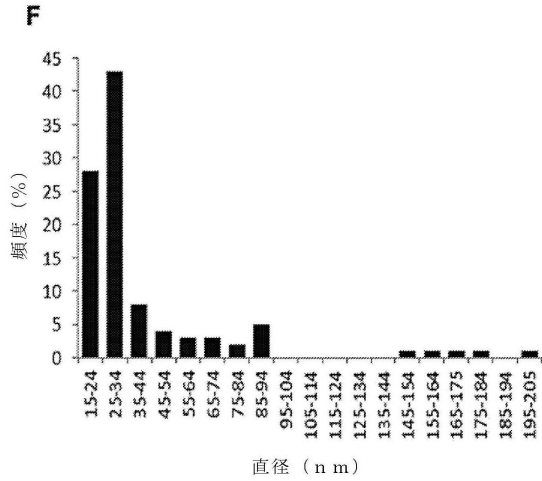
【図1E】



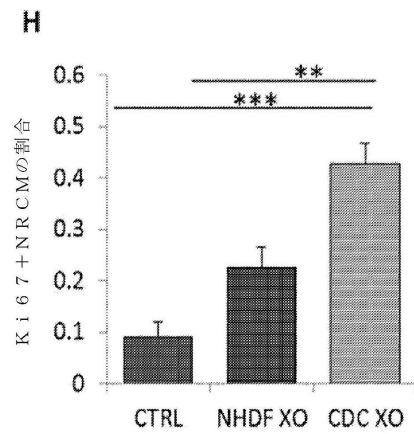
【図1G】



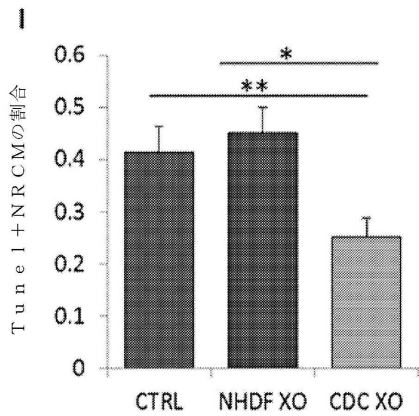
【図1F】



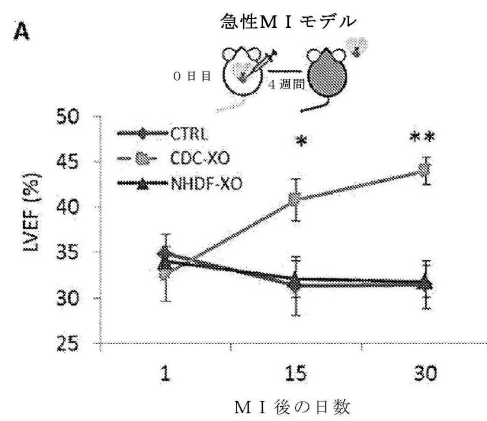
【図1H】



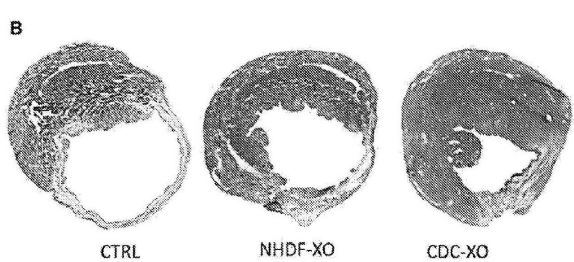
【図1I】



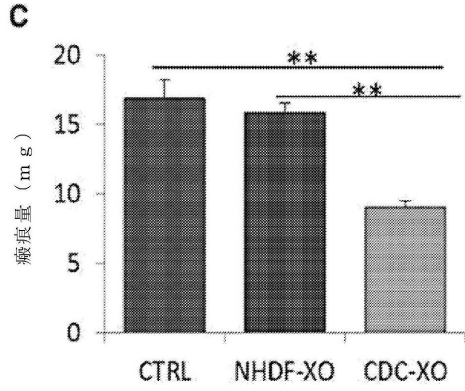
【図2A】



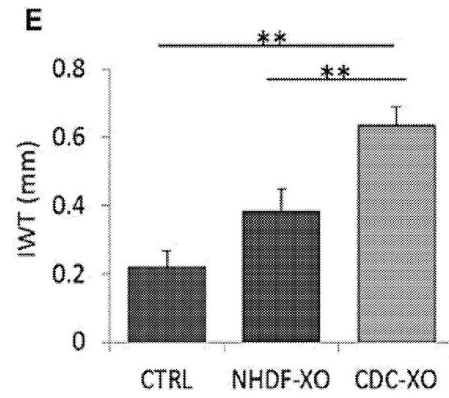
【図2B】



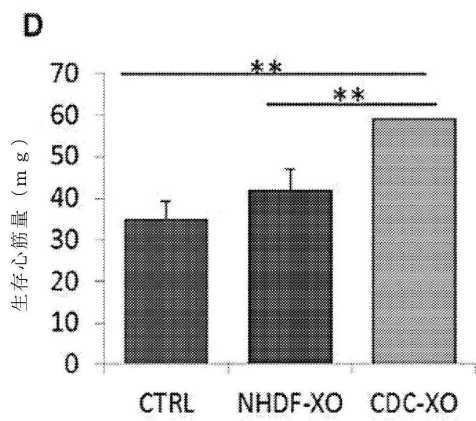
【図 2 C】



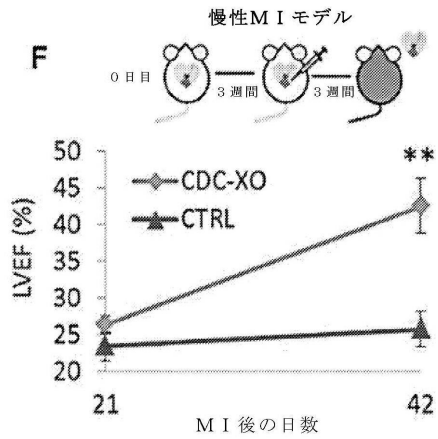
【図 2 E】



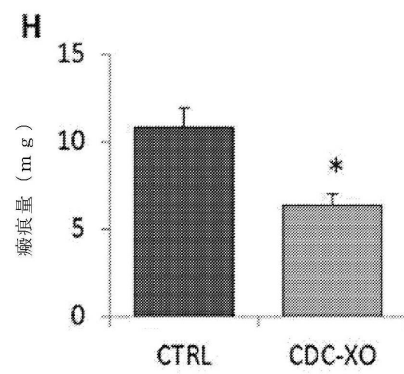
【図 2 D】



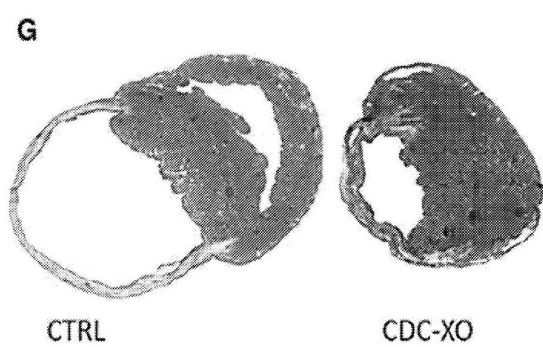
【図 2 F】



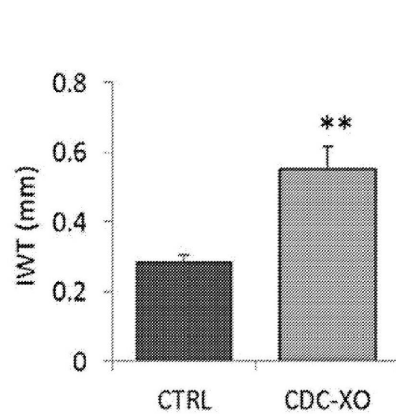
【図 2 H】



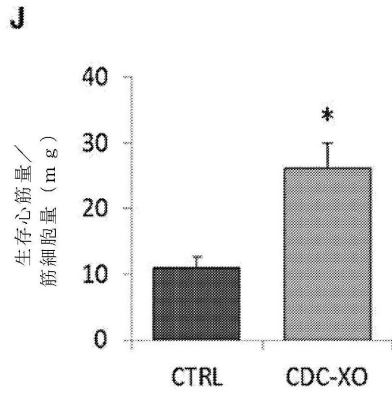
【図 2 G】



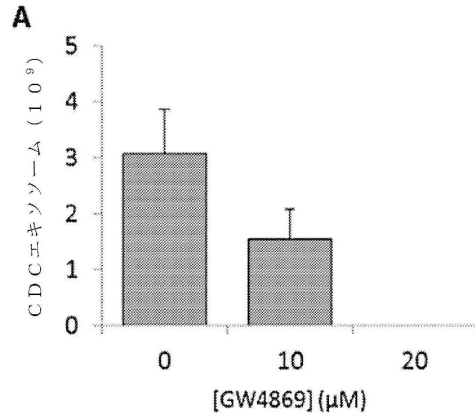
【図 2 I】



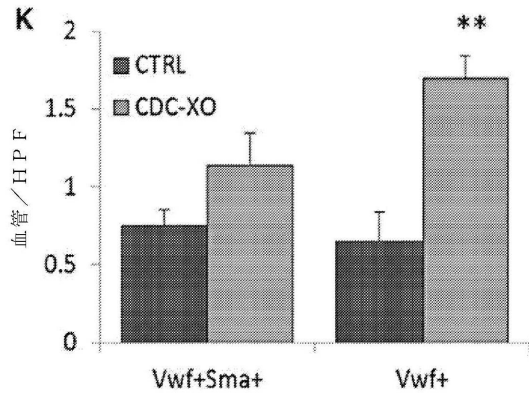
【図2J】



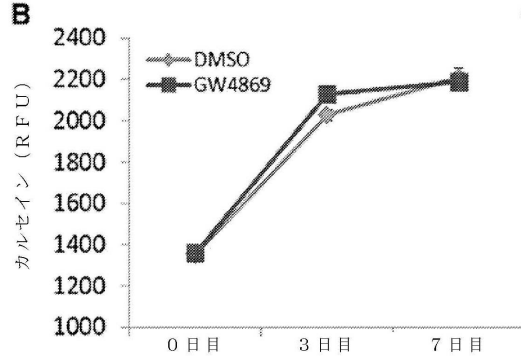
【図3A】



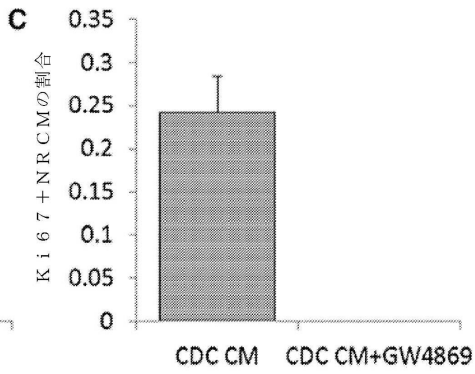
【図2K】



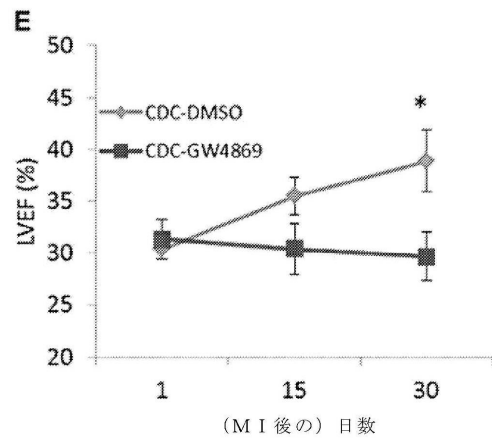
【図3B】



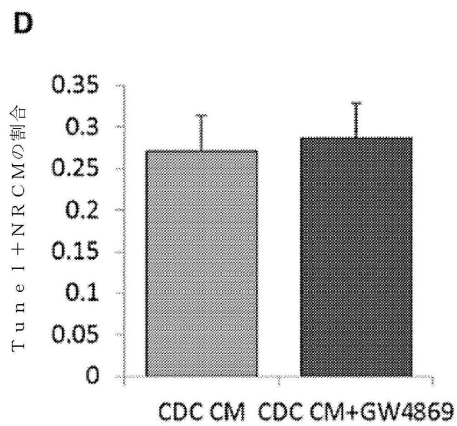
【図3C】



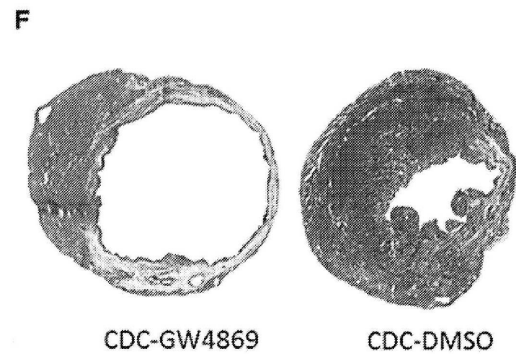
【図3E】



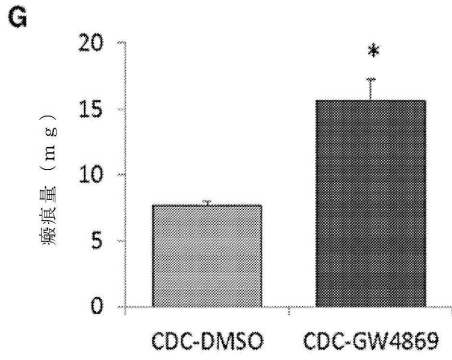
【図3D】



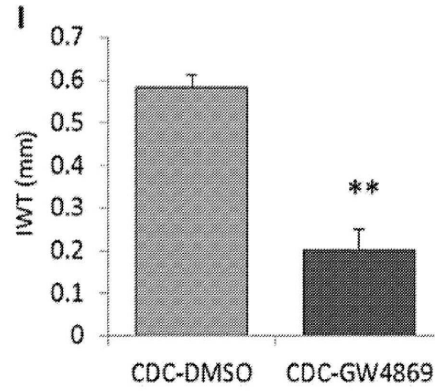
【図3F】



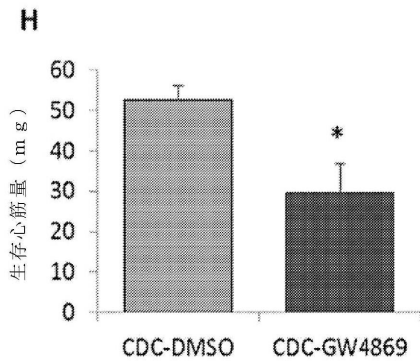
【 図 3 G 】



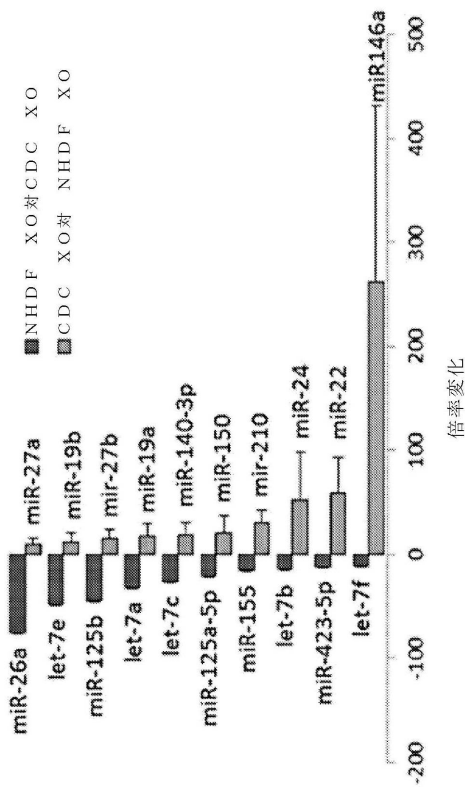
【 図 3 I 】



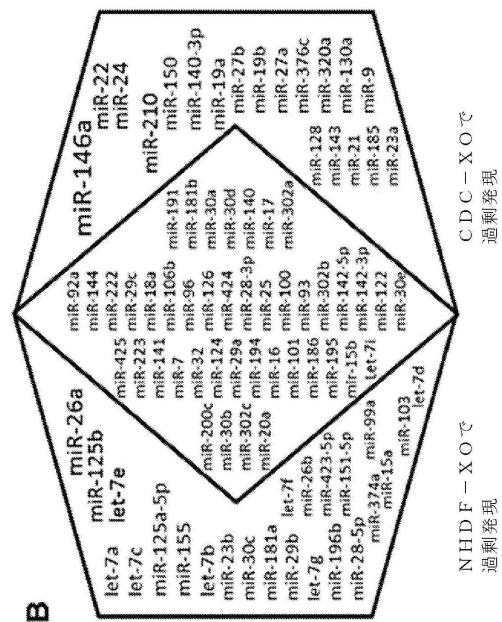
【 図 3 H 】



【 図 4 A 】



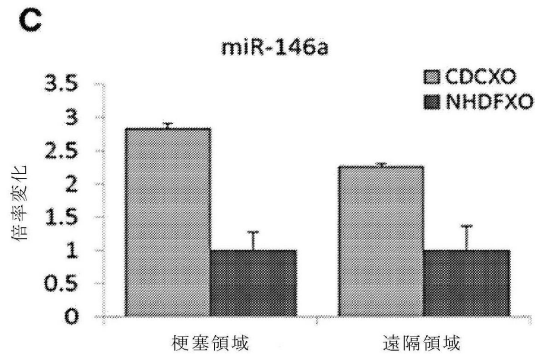
【 図 4 B 】



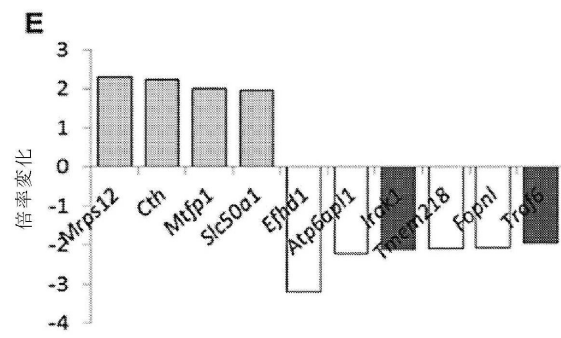
A

B

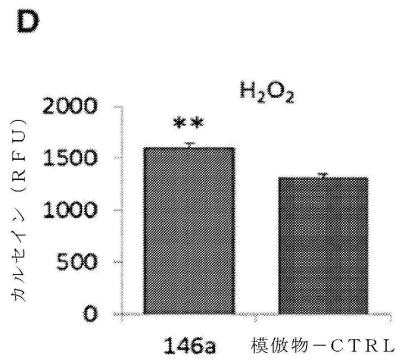
【 図 4 C 】



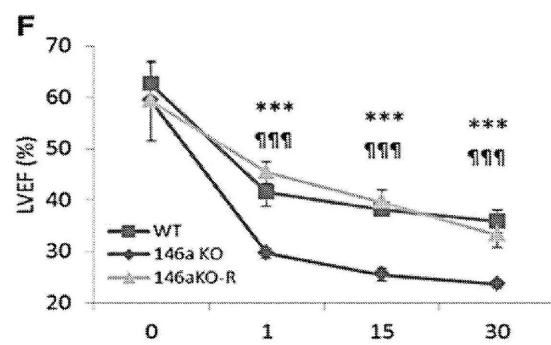
【 図 4 E 】



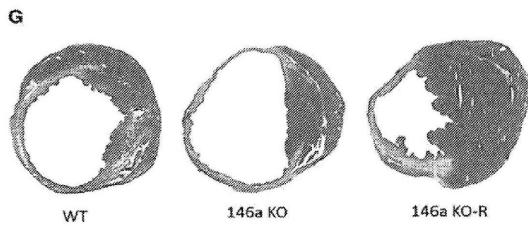
【 図 4 D 】



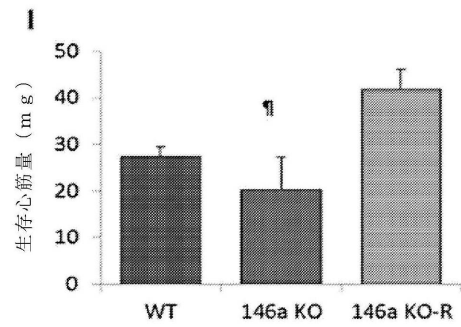
【 図 4 F 】



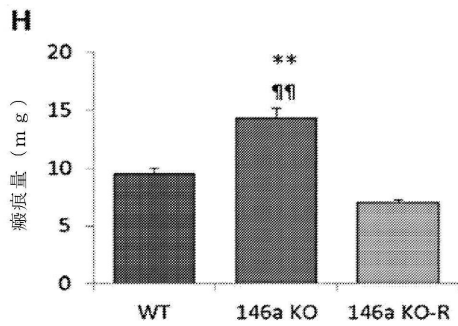
【 図 4 G 】



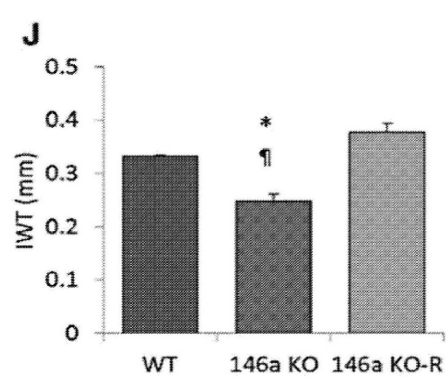
【 図 4 I 】



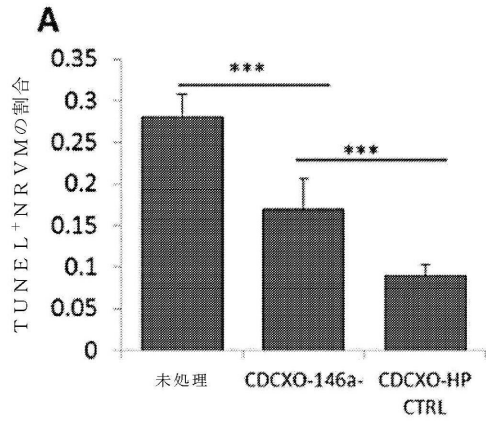
【 図 4 H 】



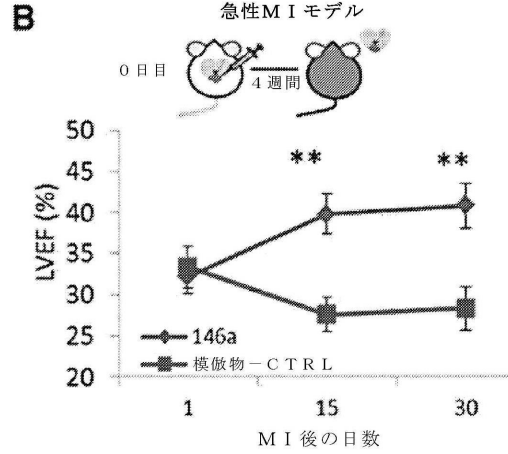
【 図 4 J 】



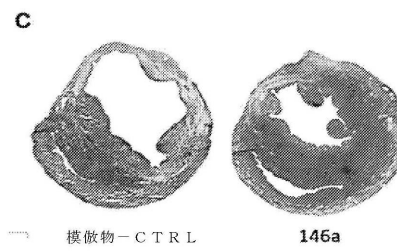
【図5A】



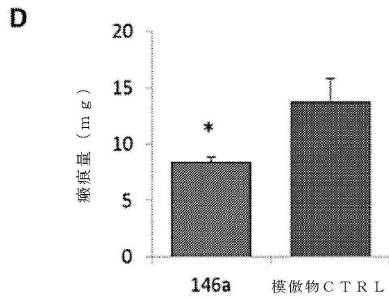
【図5B】



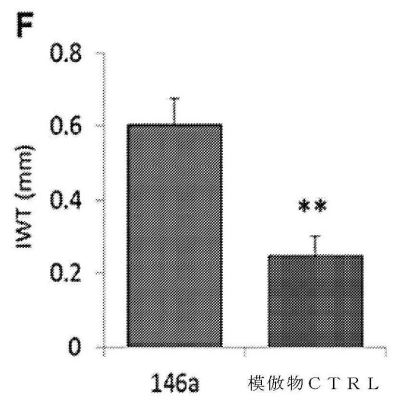
【図5C】



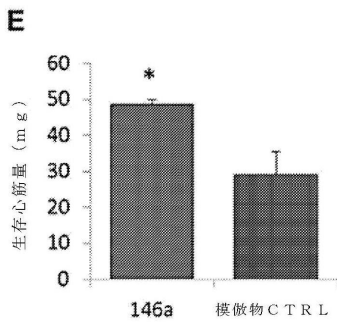
【図5D】



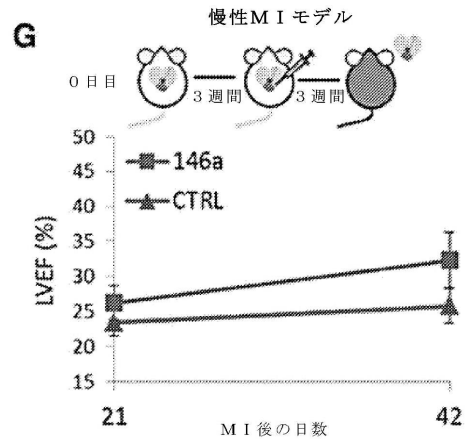
【図5F】



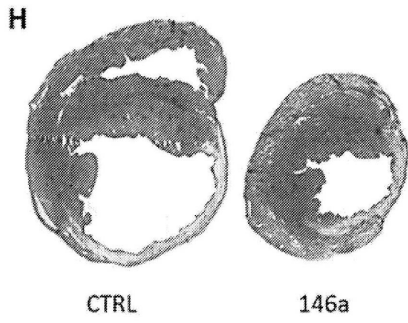
【図5E】



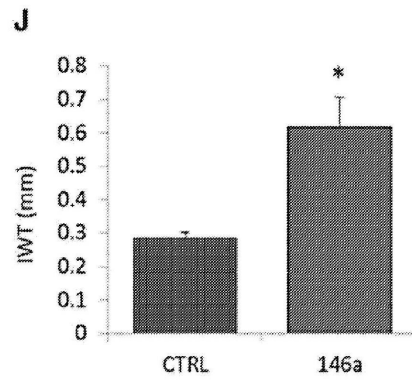
【図5G】



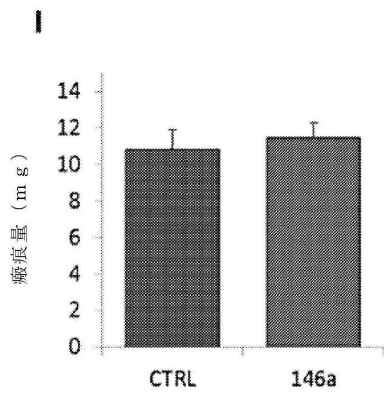
【図5H】



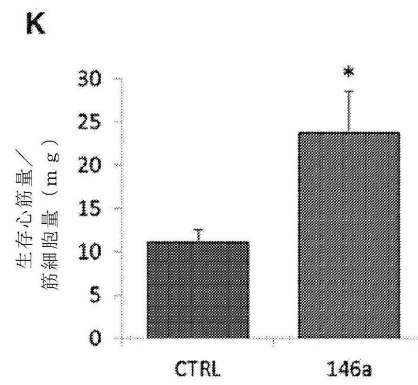
【図5J】



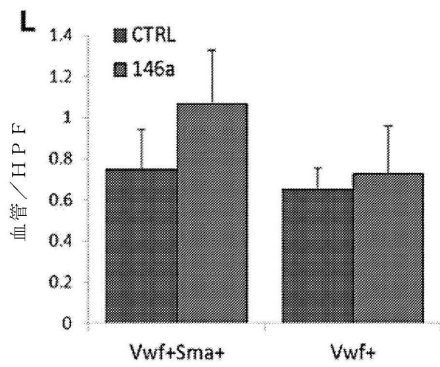
【図5I】



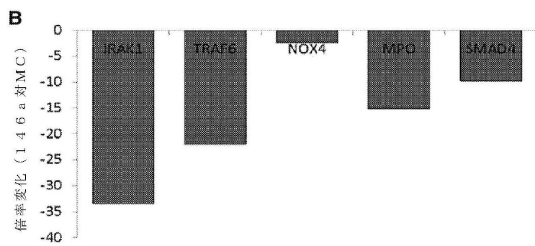
【図5K】



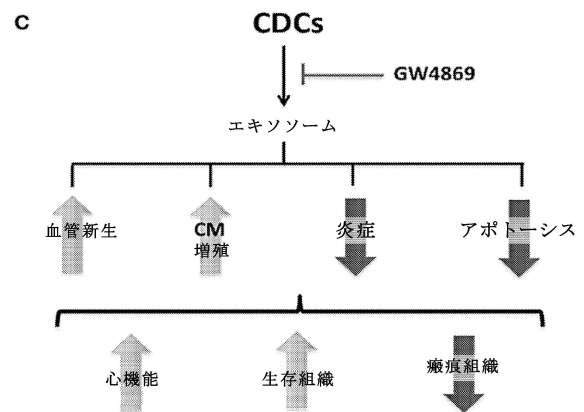
【図5L】



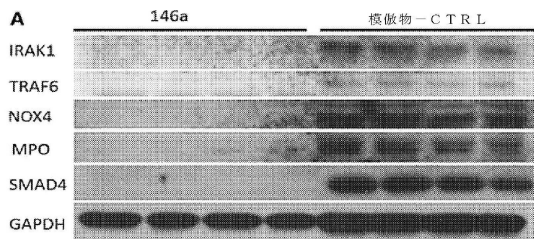
【図6B】



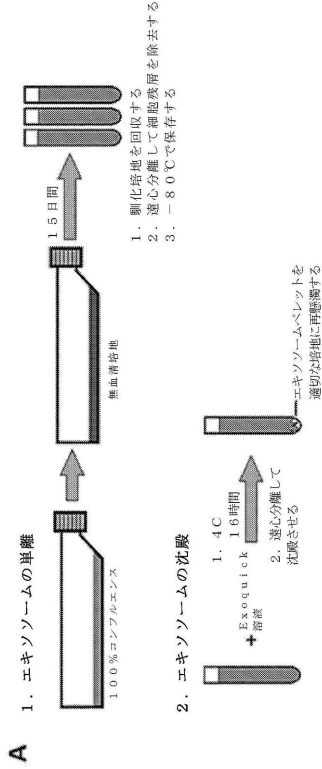
【図6C】



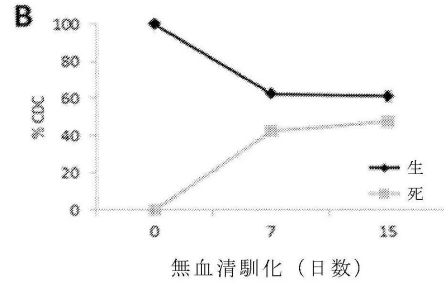
【図6A】



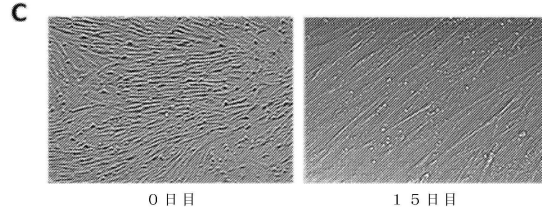
【図7A】



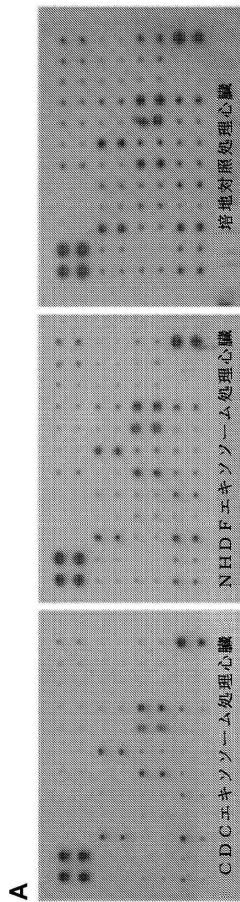
【図7B】



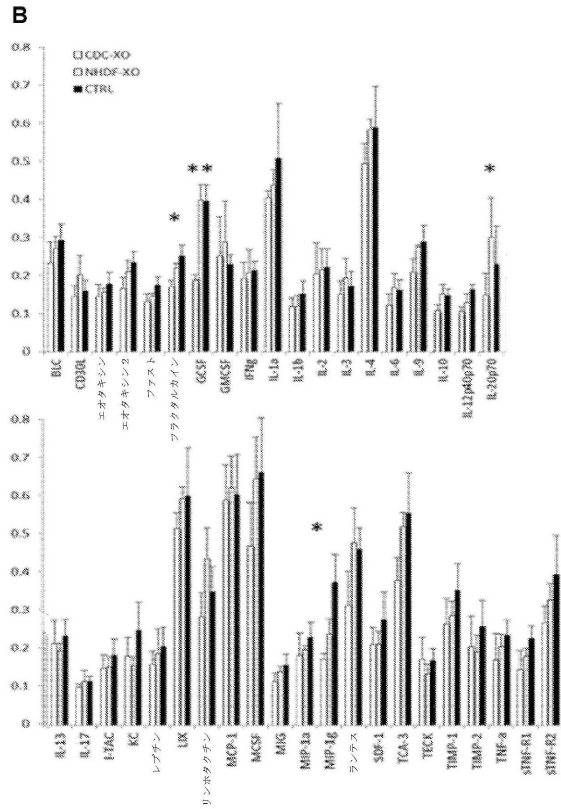
【図7C】



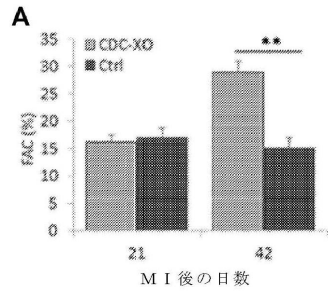
【図8A】



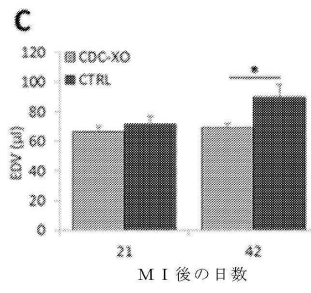
【図8B】



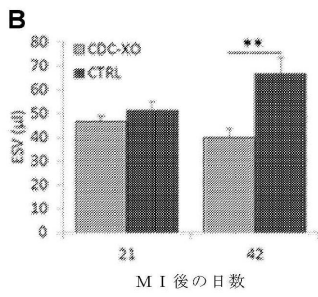
【 9 A】



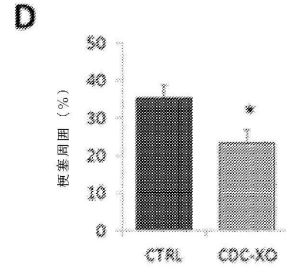
【 9 C】



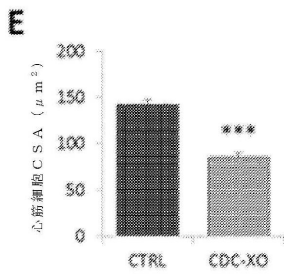
【 9 B】



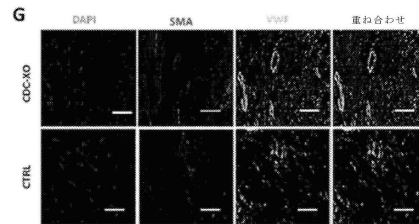
【 9 D】



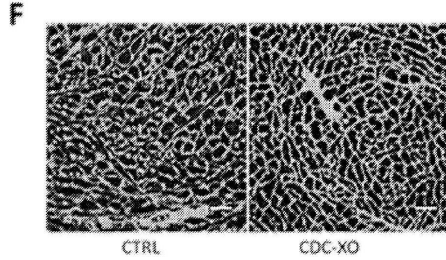
【 9 E】



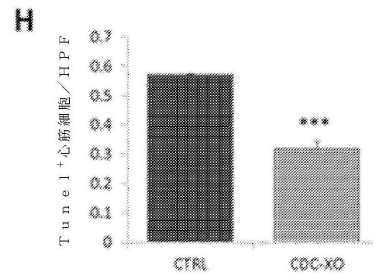
【 9 G】



【 9 F】



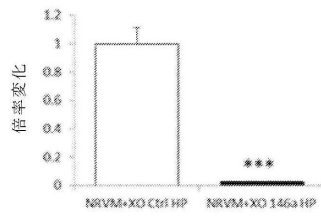
【 9 H】





【 1 2 C】

C



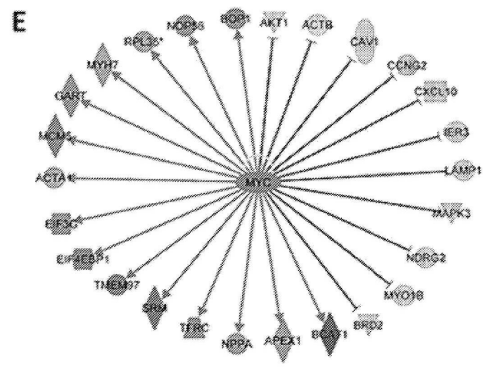
【 1 2 D】

D

分子および細胞の機能	p 値	分子数
細胞死および生存	8.15E-05 - 4.34E-02	65
細胞周期	1.11E-04 - 4.34E-02	53
細胞集合および組織化	3.15E-04 - 4.34E-02	45
細胞運動	3.56E-04 - 4.34E-02	54
細胞形態	8.11E-04 - 4.34E-02	54

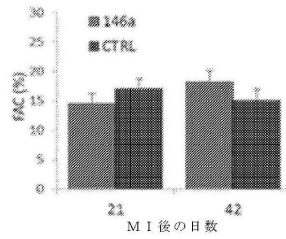
【 1 2 E】

E



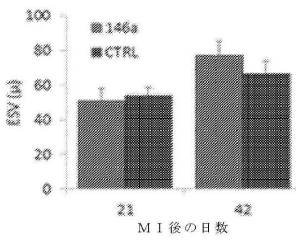
【 1 3 A】

A



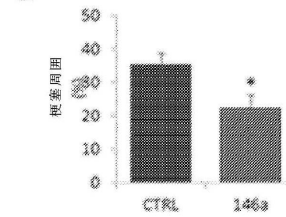
【 1 3 B】

B



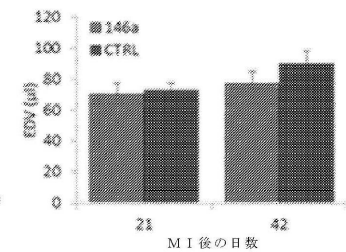
【 1 3 D】

D



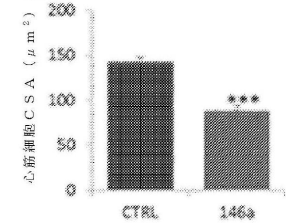
【 1 3 C】


C

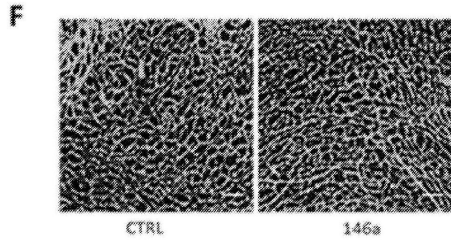



【 1 3 E】

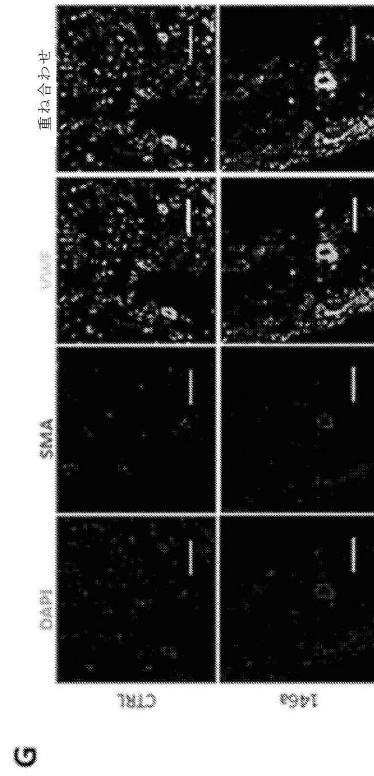
E




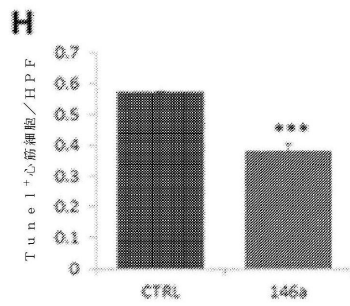
【 1 3 F】




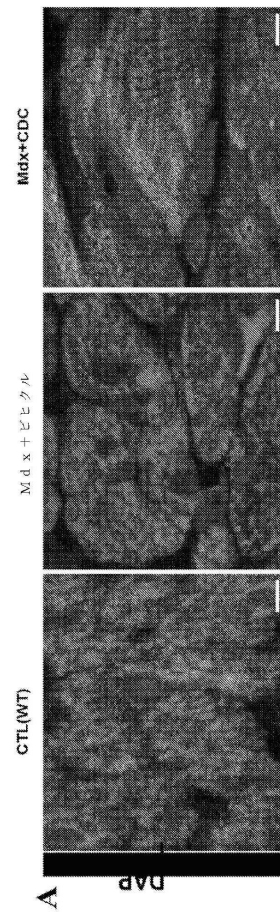
【 1 3 G】




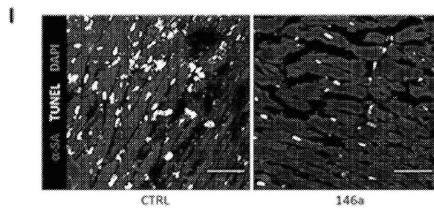
【 1 3 H】



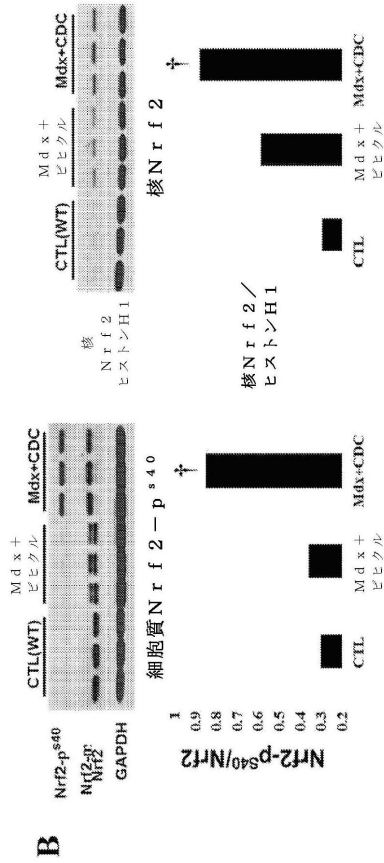
【 1 4 A】



【 1 3 I】



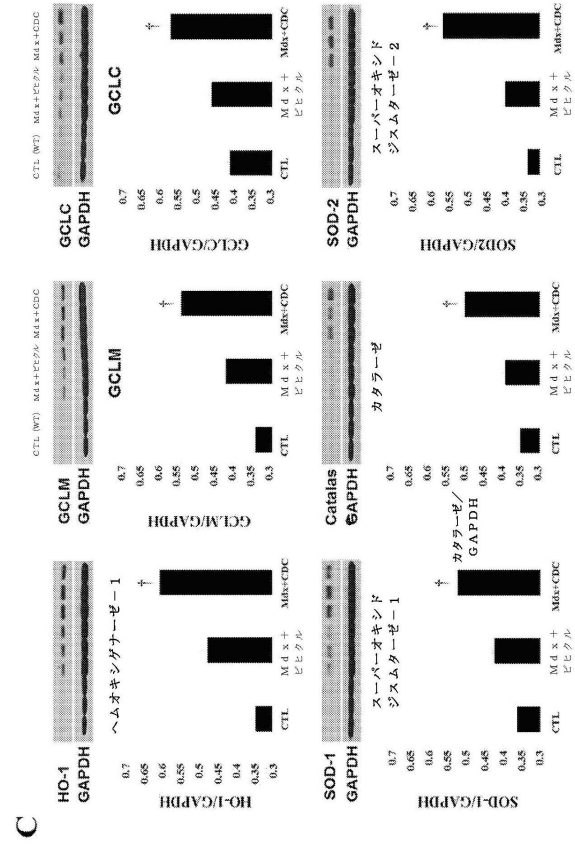
【図 1 4 B】



【図 1 5 A】

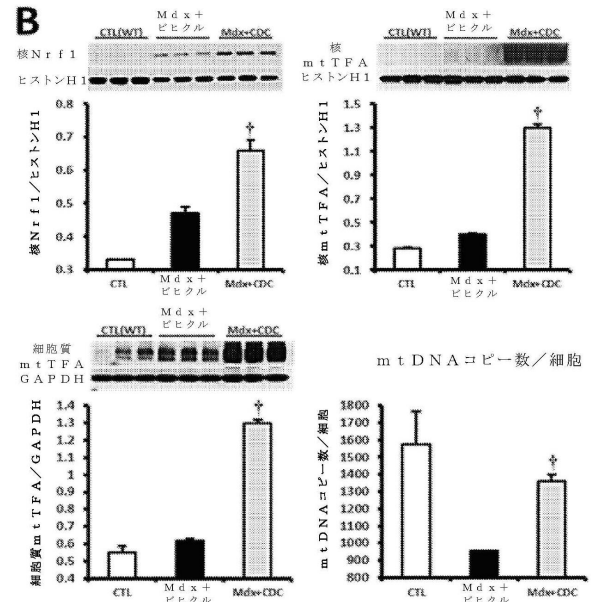


【図 1 4 C】

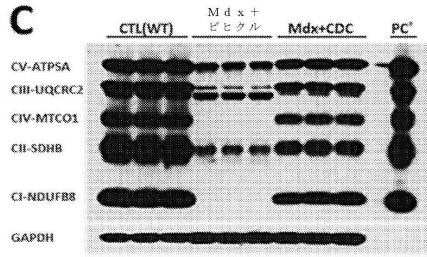


C

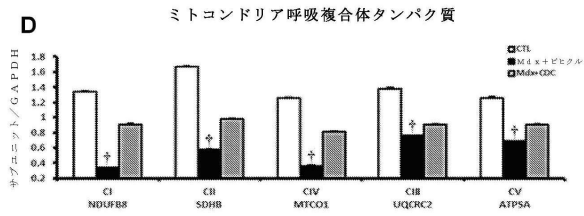
【図 1 5 B】



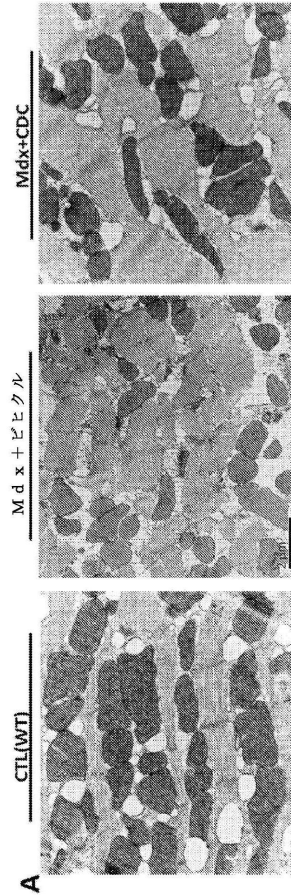
【図 15 C】



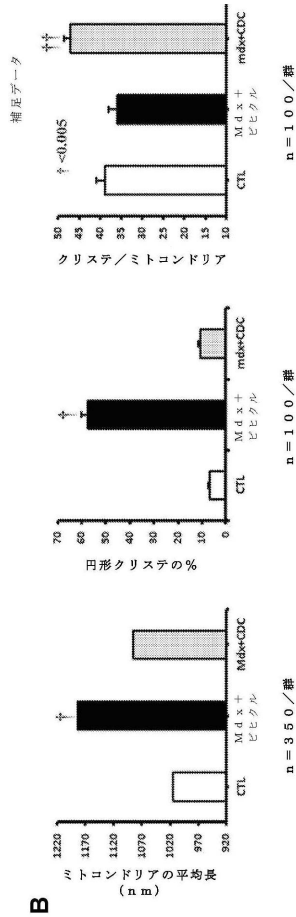
【図 15 D】



【図 16 A】



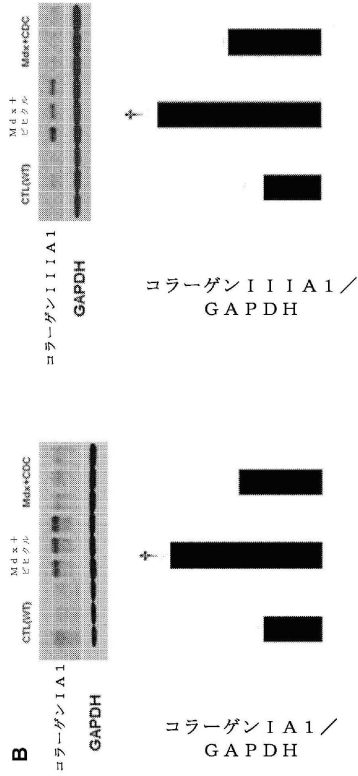
【図 16 B】



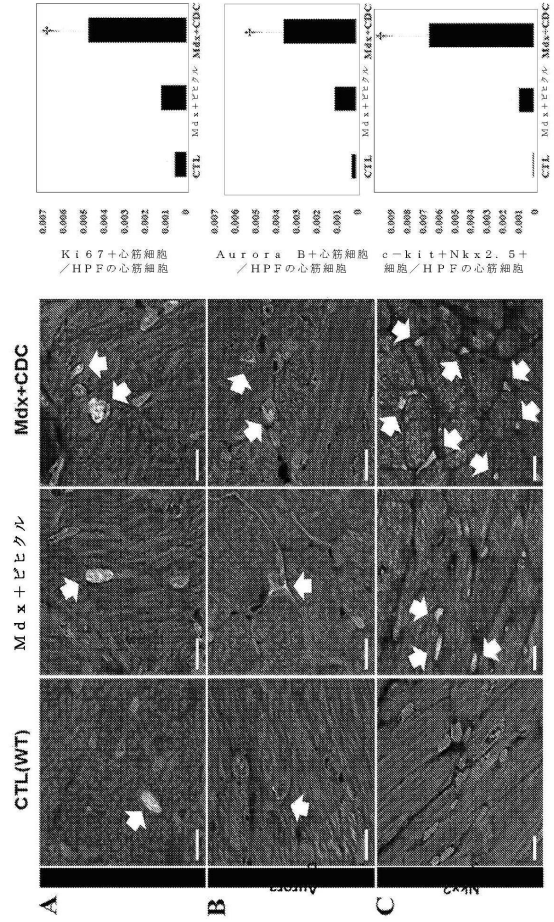
【図 17 A】



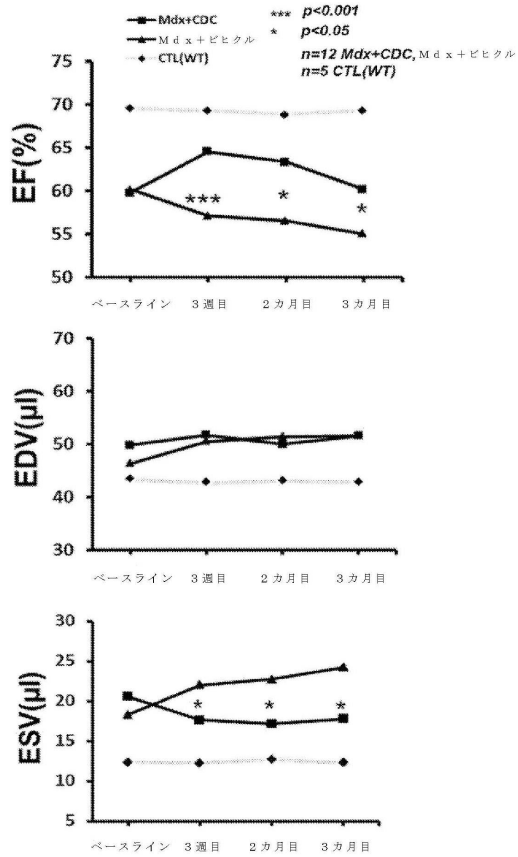
【 図 17 B 】



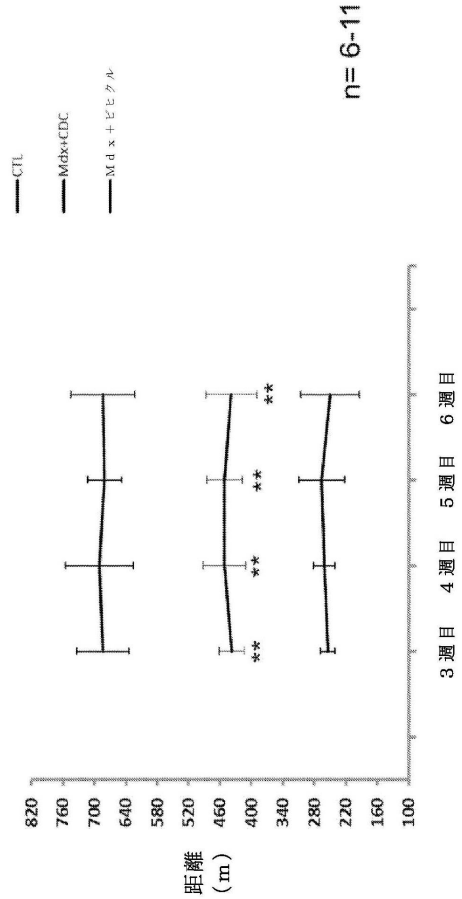
【 図 18 】



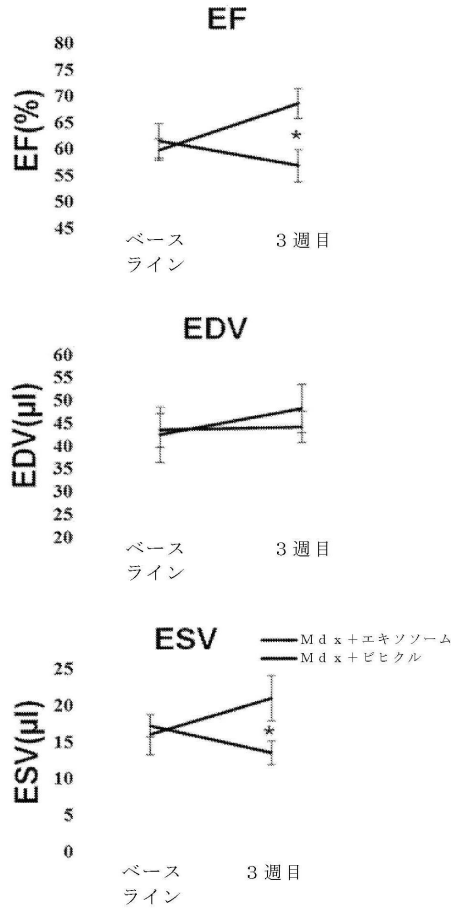
【 図 19 】



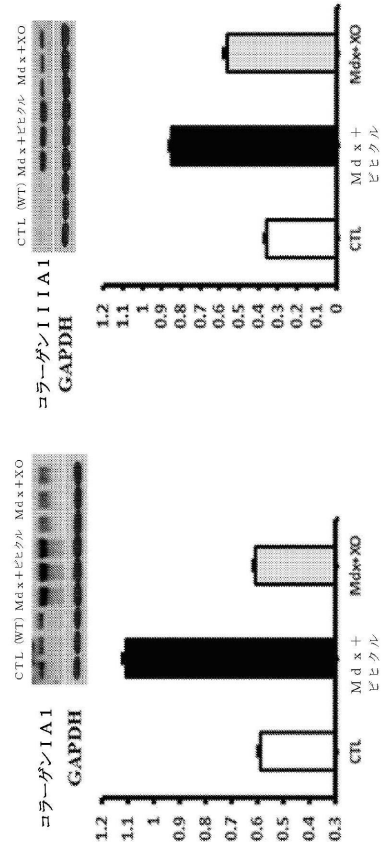
【 図 20 】



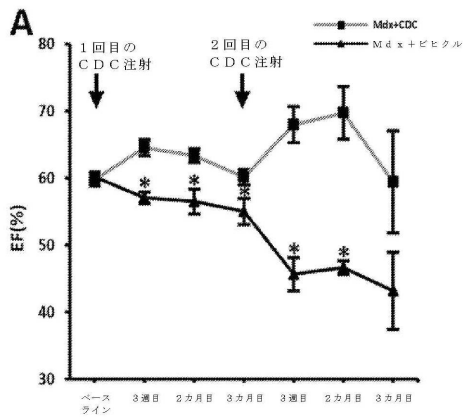
【図 2 1】



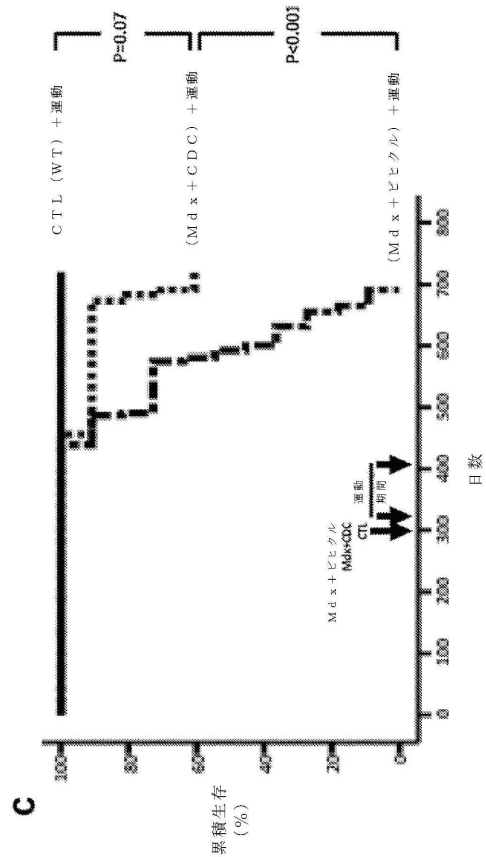
【図 2 2】



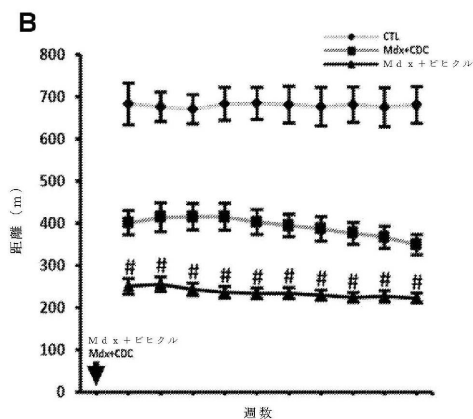
【図 2 3 A】



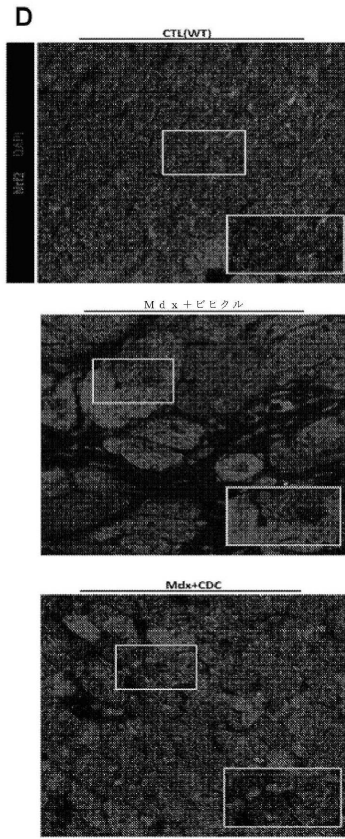
【図 2 3 C】



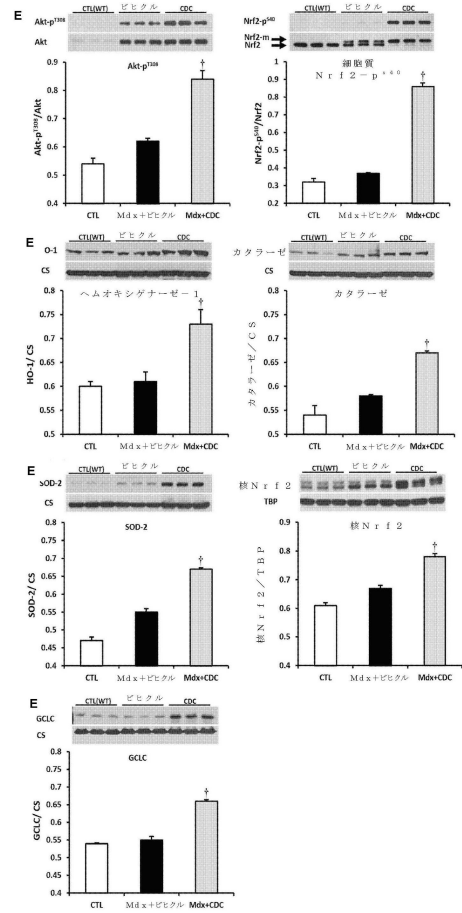
【図 2 3 B】



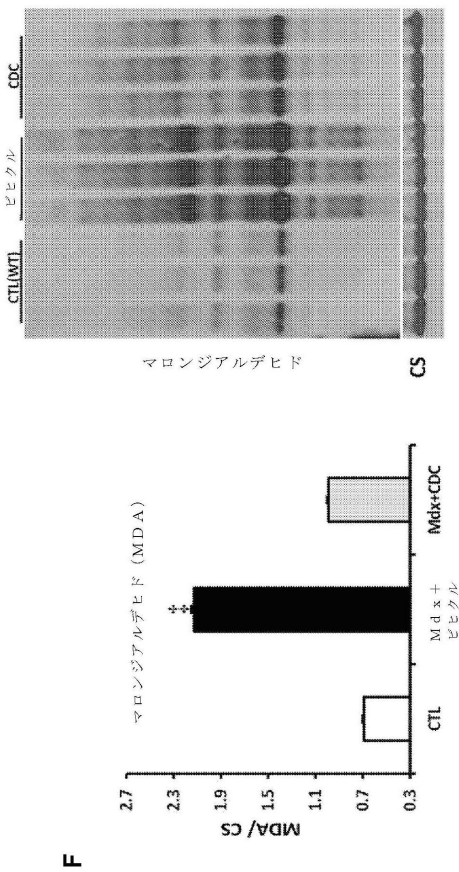
【 2 3 D 】



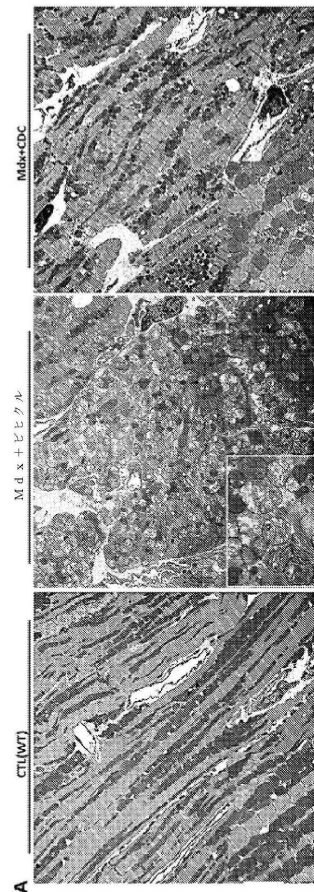
【 2 3 E 】



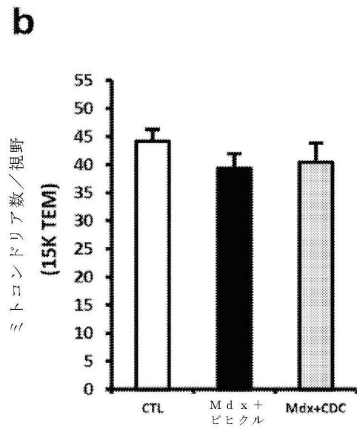
【 2 3 F 】



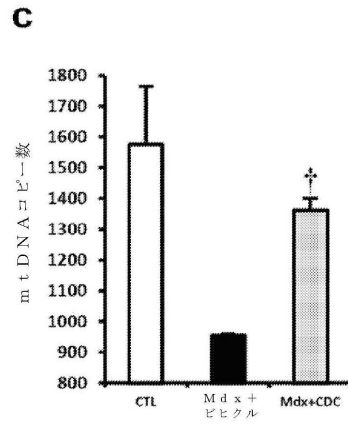
【 2 4 A 】



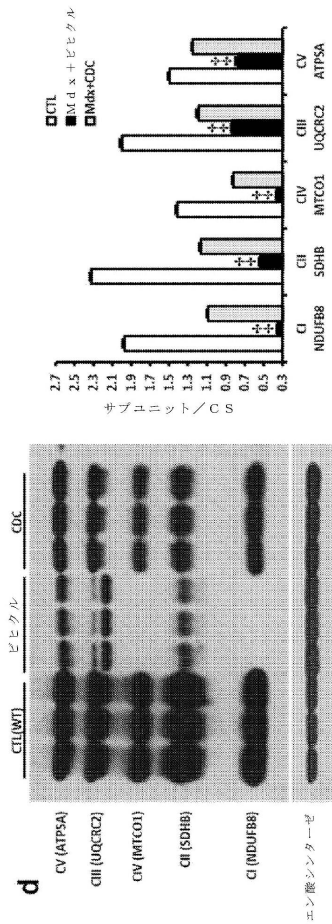
【 図 2 4 b 】



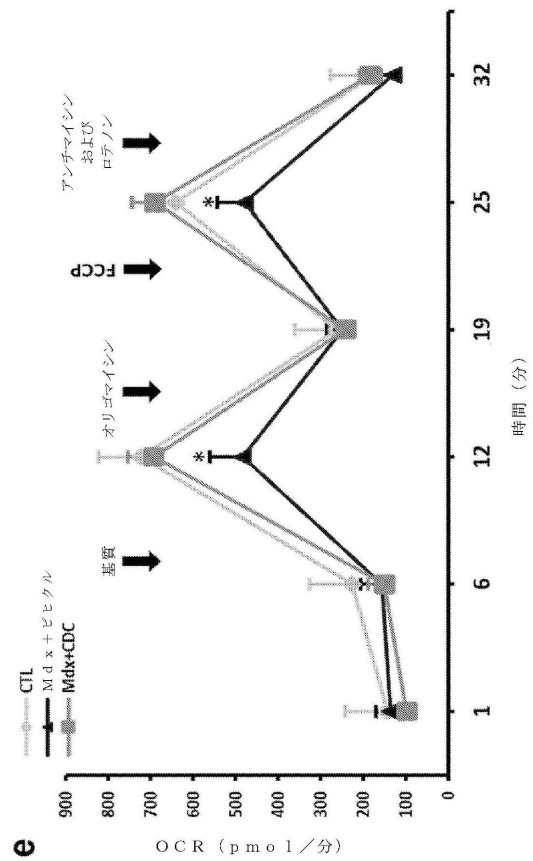
【 図 2 4 c 】



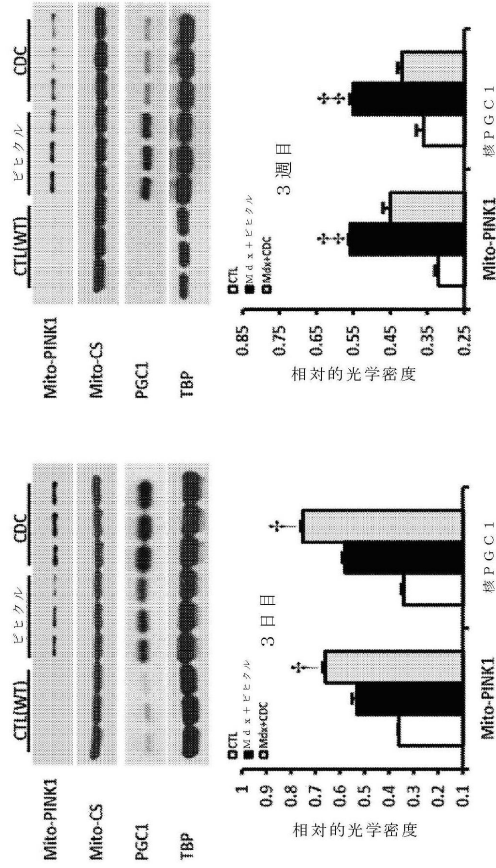
【 図 2 4 d 】



【 図 2 4 e 】

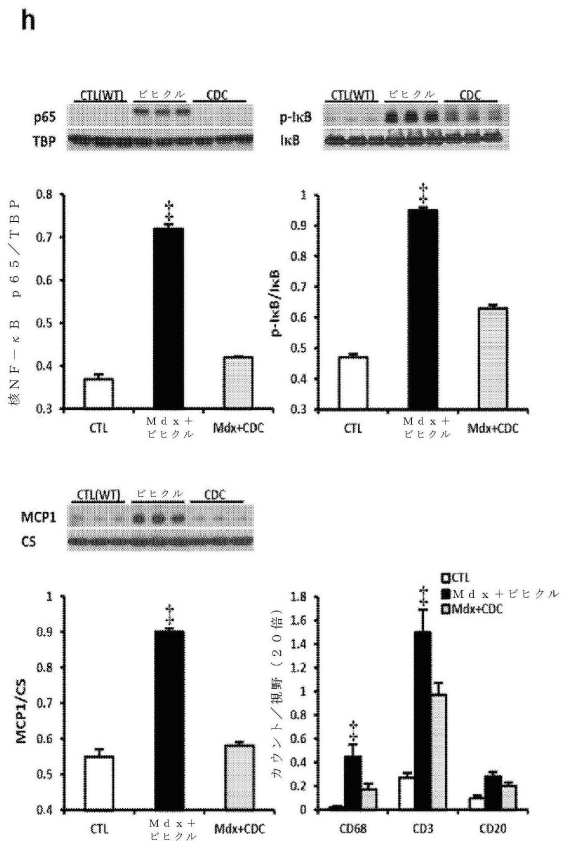


【 図 2 4 f 】



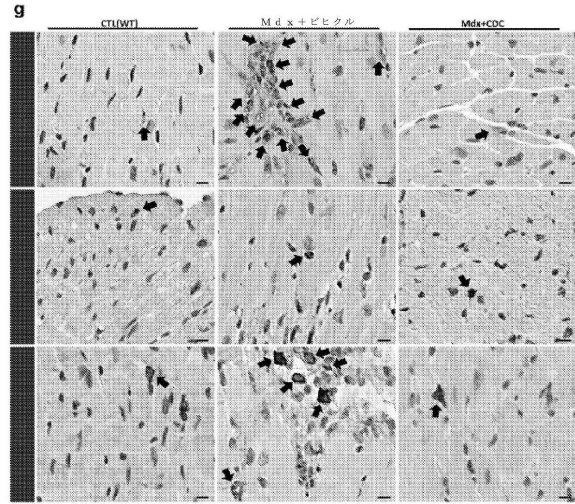
f

【 図 2 4 h 】

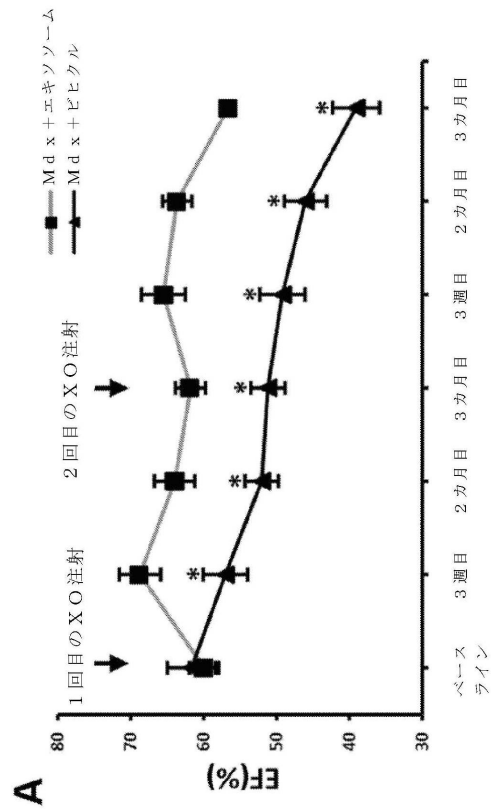


h

【 図 2 4 g 】

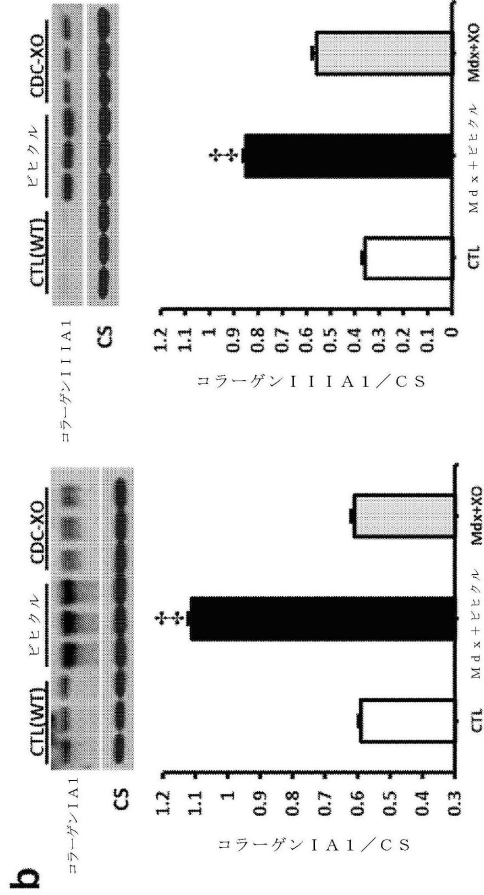


【 図 2 5 A 】

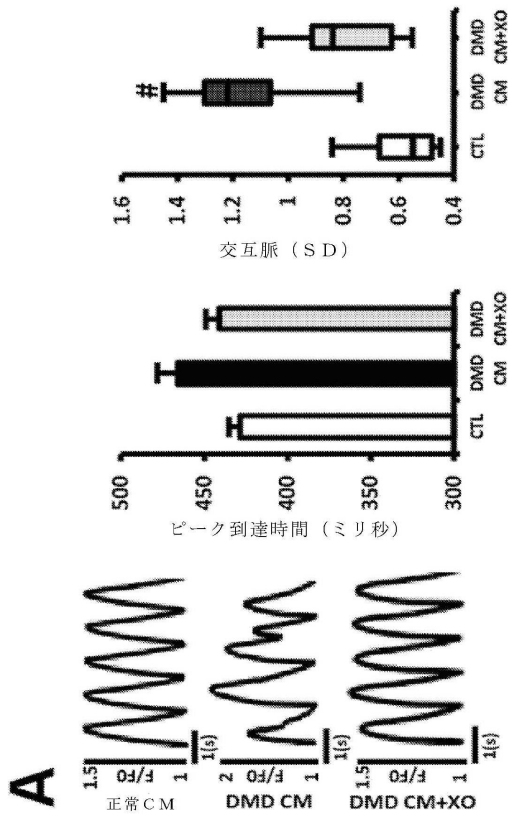


A

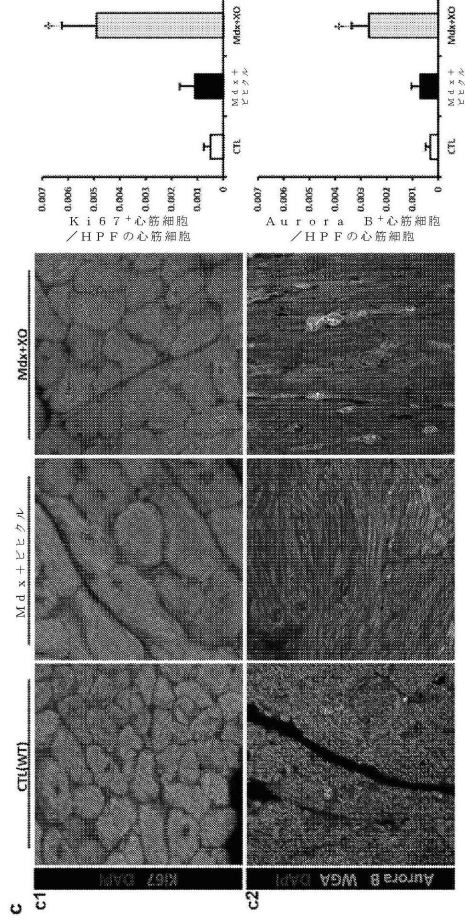
【図 2 5 b】



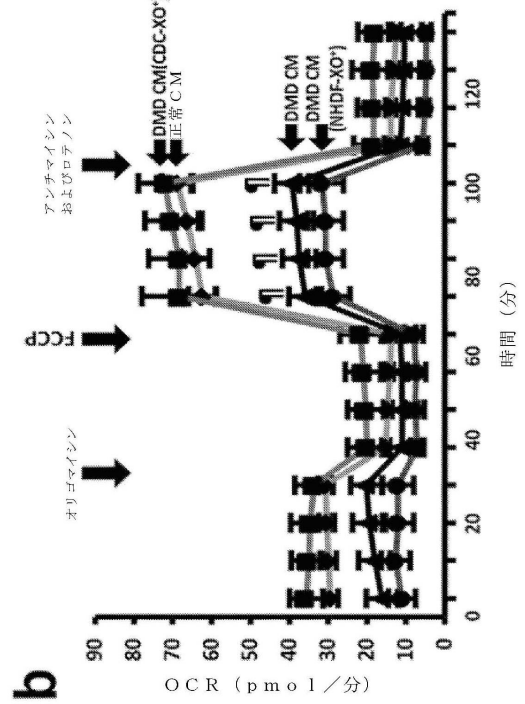
【図 2 6 A】



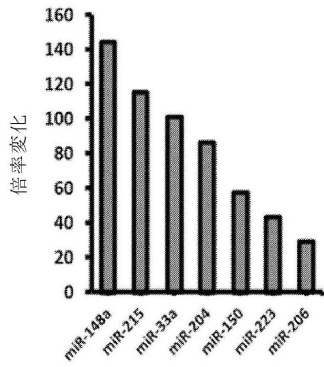
【図 2 5 c】



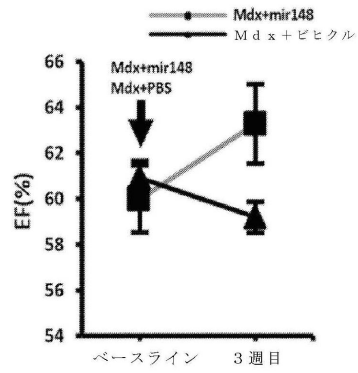
【図 2 6 b】



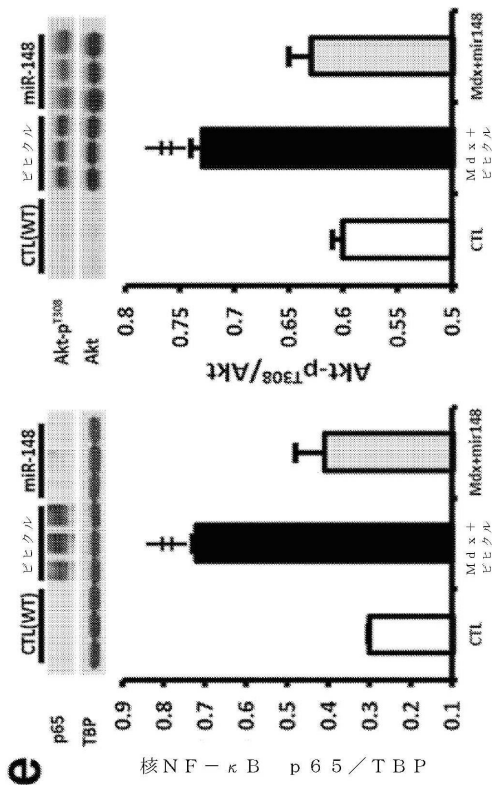
【 図 2 6 c 】  
c



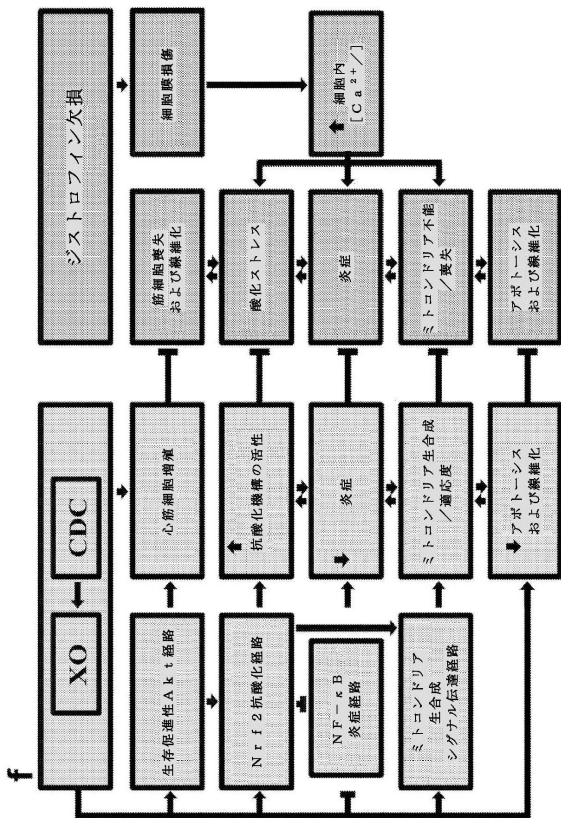
【 図 2 6 d 】  
d



【 図 2 6 e 】  
e



【 図 2 6 f 】  
f



## フロントページの続き

- (72)発明者 マーバン エドゥアルド  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 90402 サンタ モニカ 10 ストリート 342
- (72)発明者 アミンザデー マーク アミン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 90048 ロス アンジェルス 204 クラーク ドク  
ター アpartment 320 エス

審査官 長谷川 茜

- (56)参考文献 国際公開第2014/028493(WO, A1)  
医学のあゆみ, 2011年, Vol.239, No.14, pp.1440-1444  
Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2011年, Vol.23, No.132, pp.194-196  
難病と在宅ケア, 2013年, Vol.19, No.8, pp.55-57  
日本内科学会雑誌, 2014年 2月, Vol.103, No.2, pp.277-284  
Stem Cell Reports, 2014年 5月, Vol.2, pp.606-619  
Circulation Research, 2014年12月, Vol.115, pp.e90-e91 24248

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/34  
A61P 9/04  
A61K 31/7105  
A61K 48/00  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
WPI  
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)