

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2017年6月29日(29.06.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/111153 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 35/28 (2015.01) A61P 9/10 (2006.01)  
A61P 7/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/088646
- (22) 国際出願日: 2016年12月26日(26.12.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2015-254410 2015年12月25日(25.12.2015) JP
- (71) 出願人: 北海道公立大学法人 札幌医科大学  
(SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目  
291番地85 Hokkaido (JP). ニプロ株式会社  
(NIPRO CORPORATION) [JP/JP]; 〒5318510 大阪府  
大阪市北区本庄西3丁目9番3号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 本望 修(HONMOU Osamu); 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目 北海道公立  
大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 中崎  
公仁(NAKAZAKI Masahito); 〒0608556 北海道札幌  
市中央区南1条西17丁目 北海道公立大学法  
人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 佐々木 祐典  
(SASAKI Masanori); 〒0608556 北海道札幌市中央  
区南1条西17丁目 北海道公立大学法人札幌  
医科大学内 Hokkaido (JP). 佐々木 優子(SASAKI  
Yuko); 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西1  
7丁目 北海道公立大学法人札幌医科大学内  
Hokkaido (JP). 岡 真一(OKA Shinichi); 〒0608556

北海道札幌市中央区南1条西17丁目 北海道  
公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP).

- (74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO Seiji et al.); 〒  
1000005 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号  
丸の内北口ビル21階 大野総合法律事務所  
Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保  
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,  
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,  
CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,  
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,  
IN, IR, IS, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC,  
LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,  
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG,  
PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保  
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,  
MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー  
ラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー  
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,  
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,  
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: MEDICAL DRUG FOR TREATING CEREBRAL INFARCTION

(56) 発明の名称: 脳梗塞の治療用医薬

(57) Abstract: Provided is a novel means for: reducing the risk of cerebral hemorrhage as a result of recanalization therapy for occluded blood vessels (e.g., administration of medical drugs including thrombolytic agent, platelet aggregation inhibitor, and blood coagulation inhibitor, or physical removal of blood clots); and more effectively treating ischemic vascular disorders. The present invention is a mesenchymal stem cell-containing medical drug for treating ischemic vascular disorders, characterized by being concurrently used with recanalization therapy for occluded blood vessels. More specifically, the present invention is a medical drug for treating ischemic vascular disorders, characterized by reducing the risk of cerebral hemorrhage as a result of recanalization therapy for occluded blood vessels and by extending the period during which the medical drug can be applied.

(57) 要約: 閉塞血管の再開通療法(例えば、血栓溶解剤、血小板凝集阻害薬、血液凝固阻害薬を含む医薬の投与や血栓の物理的除去)に伴う脳出血のリスクを低減し、虚血性血管障害をより効果的に治療するための新たな手段を提供すること。閉塞血管の再開通療法と併用されることを特徴とする、間葉系幹細胞を含む虚血性血管障害の治療用医薬。より詳しくは、閉塞血管の再開通療法に伴う脳出血のリスクを低減し、その適用可能時間を延長することを特徴とする虚血性血管障害の治療用医薬。



WO 2017/111153 A1

## 明 細 書

発明の名称： 脳梗塞の治療用医薬

### 技術分野

#### [0001] [関連出願]

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願 2015-254410 号（2015 年 12 月 25 日出願）の明細書に記載された内容を包含する。

#### [技術分野]

本発明は、間葉系幹細胞を含む虚血性血管障害の治療薬に関する。より詳しくは、本発明は、血栓溶解療法等の閉塞血管の再開通療法に伴う脳出血のリスクを低減し、その投与可能時間を延長することが可能な虚血性血管障害の治療薬に関する。

### 背景技術

[0002] 脳梗塞は、脳動脈の閉塞または狭窄のために脳虚血を来し、脳組織が壊死またはこれに近い状態になる病態を言う。脳梗塞（とくに急性期又は超急性期の脳梗塞）や心筋梗塞では、虚血による壊死を防止するため、血栓溶解あるいは血栓の物理的除去が治療の第一選択となる。しかしながら、閉塞血管の再開通はしばしば脳出血のリスクを伴うという問題がある。

[0003] t-P A 静注療法は、ウロキナーゼ等の他の血栓溶解剤に比べて血栓溶解活性が高く、出血のリスクも低いため、超急性期又は急性期脳梗塞の再開通治療において、標準治療となっている。しかし、t-P A による治療効果は時間とともに低下し、出血のリスクが高まるため、その治療は通常発症から 4.5 時間以内に開始しなければならない。そこで、出血のリスクを減らし、t-P A による治療可能時間を延長するために、内皮障害を抑制する新たな治療が求められている。

[0004] 一方、間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cell：MSC）には脳（実質及び血管）の保護作用があることが知られている。脳梗塞後の MSC 投与は、梗塞体積を減らし、行動機能を改善することが、実験

的梗塞モデルを用いて確認されている（非特許文献１～３、特許文献１）。

また、MSCの静脈投与による脳梗塞患者の治療も多数実施され、運動機能や損傷部位の改善が報告されている（非特許文献４、特許文献２）。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0005] 特許文献１：WO 2002/000849号

特許文献２：WO 2009/002503号

### 非特許文献

[0006] 非特許文献１：Iihoshi S. et al., Brain Res. 2004;1007:1-9.

非特許文献２：Nomura T. et al., Neuroscience. 2005;136:161-169.

非特許文献３：Honma T. et al., Exp. Neurol. 2006;199:56-66.

非特許文献４：Honmou O. et al., Brain. 2011;134:1790-1807.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の課題は、閉塞血管の再開通療法に伴う脳出血の新たな治療方法を提供することにある。とくに、血栓溶解療法に伴う脳出血のリスクを低減し、虚血性血管障害に伴う運動機能及び高次機能の障害を治療するための手段を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

[0008] 発明者らは、動脈に塞栓糸を挿入することで誘導した一過性中大脳動脈閉塞モデルに対し、MSCの静脈投与をrt-PAによる血栓溶解療法と併用することで、出血性梗塞が顕著に抑制され、経時的な運動機能も良好な改善を示すことを確認した。

[0009] すなわち、本発明は以下の（１）～（１８）に関する

（１）閉塞血管の再開通療法と併用されることを特徴とする、間葉系幹細胞を含む虚血性血管障害の治療用医薬；

（２）閉塞血管の再開通療法に伴う脳出血のリスクを低減することを特徴と

する、上記（１）記載の医薬；

（３）閉塞血管の再開通療法が、血栓溶解剤、血小板凝集阻害薬、及び血液凝固阻害薬の投与、ならびに血栓の物理的除去から選ばれるいずれか１又は２以上を含む、上記（１）又は（２）に記載の医薬；

（４）閉塞血管の再開通療法が血栓溶解剤の投与を含む、上記（１）～（３）のいずれか１に記載の医薬；

（５）血栓溶解剤がプラスミノゲンアクチベーターである、上記（４）に記載の医薬；

（６）血栓溶解剤の投与可能な時間を延長することを特徴とする、上記（３）～（５）のいずれか１に記載の医薬；

（７）虚血性血管障害が虚血性脳血管障害又は心筋梗塞である、上記（１）～（６）のいずれか１に記載の医薬；

（８）虚血性血管障害が超急性期又は急性期の虚血性脳血管障害又は急性心筋梗塞である、上記（１）～（６）のいずれか１に記載の医薬；

（９）間葉系幹細胞が骨髄由来の間葉系幹細胞である、上記（１）～（８）のいずれか１に記載の医薬；

（１０）間葉系幹細胞を含む、閉塞血管の再開通療法に伴う脳出血を予防するための医薬。

（１１）閉塞血管の再開通療法が、血栓溶解剤、血小板凝集阻害薬、及び血液凝固阻害薬の投与、ならびに血栓の物理的除去から選ばれるいずれか１又は２以上を含む、上記（１０）に記載の医薬；

（１２）閉塞血管の再開通療法が血栓溶解剤の投与を含む、上記（１０）又は（１１）に記載の医薬；

（１３）血栓溶解剤がプラスミノゲンアクチベーターである、上記（１２）に記載の医薬；

（１４）血栓溶解剤の投与可能な時間を延長することを特徴とする、上記（１１）～（１３）のいずれか１に記載の医薬；

（１５）虚血性血管障害の患者に使用される、上記（１０）～（１４）のい

いずれか 1 に記載の医薬；

(16) 虚血性血管障害が虚血性脳血管障害又は心筋梗塞である、上記 (15) に記載の医薬；

(17) 虚血性血管障害が超急性期又は急性期の虚血性脳血管障害又は心筋梗塞である、上記 (15) 又は (16) に記載の医薬；

(18) 間葉系幹細胞が骨髄由来の間葉系幹細胞である、上記 (10) ～ (17) のいずれか 1 に記載の医薬。

## 発明の効果

[0010] 本発明によれば、t-P A療法等の閉塞血管の再開通療法に伴う脳出血のリスクが低減されるとともに、MSCの治療効果（運動機能の改善、梗塞病変の減少）が向上するという相乗効果が達成される。また、脳出血のリスクが低減されることにより、通常発症4.5時間とされるt-P A療法等、血栓溶解療法の適用可能時間が延長可能となる。

## 図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は実験プロトコルの概要を示す。中大脳動脈閉塞(MCAO)の60分後にDWIを取得し、無作為に4群に分けた後、閉塞を再開通させてrt-P Aか生理食塩水を投与し(閉塞後90分)、さらに30分後に培地かMSCを投与する。

[図2]図2はrt-P A療法とMSC投与の併用後における急性出血の発症を示す。A：各グループ(生理食塩水+培地、rt-P A+培地、生理食塩水+MSC、rt-P A+MSC)の画像、B：1日目における脳出血の発症率、C：1日目におけるT2WI-MRIで評価した出血体積(\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , Tukey's post-hoc test)。

[図3]図3はゼラチンザイモグラフィーの結果を示す。A：MMP-9の発現量(左から、マーカー、シャム、対側：生理食塩水+培地、rt-P A+培地、生理食塩水+MSC、rt-P A+MSC、同側：生理食塩水+培地、rt-P A+培地、生理食塩水+MSC、rt-P A+MSC)。B：デン

シトメトリ測定によるMMP-9活性 (\*\* $P < 0.01$ , Tukey's post-hoc test)。

[図4]図4は、MRI解析による虚血病変部位の特性を示す。A：各グループにおける閉塞前のDWI（カラム1）、再開通後4日目（カラム2）、7日目（カラム3）、14日目（カラム4）、28日目（カラム5）のT2WI。B：DWI（閉塞前）及び再開通後1、4、7、14、21、28日目のT2WIで評価した各グループの病変体積。C：PWIで評価したrCBF (\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , Tukey's post-hoc test)。

[図5]図5は、トレッドミル負荷試験の結果を示す。各グループにつき、再開通後1日目、4日目、7日目、14日目、21日目、28日目において、ラットがトレッドミル上を走行できた最大速度 (\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , Tukey's post-hoc test)。

### 発明を実施するための形態

#### [0012] 1. 虚血性血管障害治療薬

本発明は、閉塞血管の再開通療法（例えば、血栓溶解剤、血小板凝集阻害薬、血液凝固阻害薬を含む医薬の投与や血栓の物理的除去）と併用されることを特徴とする、間葉系幹細胞を含む虚血性血管障害の治療用医薬に関する。

#### [0013] [間葉系幹細胞]

本発明で使用される間葉系幹細胞とは、間葉系組織の間質細胞の中に微量に存在する多分化能および自己複製能を有する幹細胞であり、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などの結合組織細胞に分化するだけでなく、神経細胞や心筋細胞への分化能を有することが知られている。

[0014] 間葉系幹細胞のソースとしては、骨髓、末梢血、臍帯血、胎児胚、脳などが挙げられるが、骨髓由来の間葉系幹細胞（骨髓間葉系幹細胞）、とくにヒト骨髓間葉系幹細胞が好ましい。骨髓由来の間葉系幹細胞は、1）顕著な効果が期待できる、2）副作用の危険性が低い、3）十分なドナー細胞の供給

が期待できる、4) 非侵襲的な治療であり自家移植が可能であるので、5) 感染症のリスクが低い、6) 免疫拒絶反応の心配がない、7) 倫理的問題がない、8) 社会的に受け入れられやすい、9) 一般的な医療として広く定着しやすいなどの利点がある。さらに、骨髄移植療法は既に臨床の現場で用いられている治療であり、安全性も確認されている。また、骨髄由来の幹細胞は遊走性が高く、局所への移植ばかりか、静脈内投与によっても目的の損傷組織へ到達し、治療効果が期待できる。

[0015] 細胞はES細胞や誘導多能性幹細胞(iPS細胞等)から分化誘導した細胞であっても、株化された細胞であっても、生体から単離・増殖させた細胞であってもよい。細胞は、他家細胞由来でも自家細胞由来であってもよいが、自家細胞由来(患者自身の細胞に由来する)間葉系幹細胞が好ましい。

[0016] 本発明で使用される間葉系幹細胞は未分化な状態であることが好ましい。未分化な状態の細胞は増殖率および生体内導入後の生存率が高いからである。発明者らは、そのような細胞の取得方法も開発しており、その詳細はWO 2009/002503号に記載されている。

[0017] 発明者らが開発した前記方法では、骨髄液等から抗凝固剤(ヘパリン等)と実質的に接触しない条件で分離した細胞を、ヒト血清(好ましくは、自家血清)を含み、かつ、抗凝固剤(ヘパリン等)を含まないかあるいは極めて低濃度で含む培地を用いて増殖させる。

[0018] 培地における細胞の密度は、細胞の性質および分化の方向性に影響を与える。間葉系幹細胞の場合、培地中の細胞密度が8,500個/cm<sup>2</sup>を超えると、細胞の性質が変化してしまうため、最大でも8,500個/cm<sup>2</sup>以下で継代培養させることが好ましく、より好ましくは、5,500個/cm<sup>2</sup>以上になった時点で継代培養させる。

[0019] 発明者らが開発した前記方法ではヒト血清含有培地を使用するため、血清ドナーの負担を考慮して、培地交換はなるべく少ない回数であることが望ましく、例えば、少なくとも週1回、より好ましくは週1~2回の培地交換を行う。

[0020] 培養は、細胞の総数が $10^8$ 個以上になるまで継代培養を繰り返し行う。必要とされる細胞数は、使用目的に応じて変化し得るが、例えば、脳梗塞などの虚血性脳疾患の治療のための移植に必要とされる間葉系幹細胞の数は、 $10^7$ 個以上と考えられている。発明者らが開発した方法によれば、12日間程度で $10^7$ 個の間葉系幹細胞を得ることができる。

[0021] 増殖したMSCは、必要に応じて、使用されるまで凍結保存などの手法で（例えば、 $-152^{\circ}\text{C}$ のディープフリーザーにて）保存してもよい。凍結保存には、血清（好ましくはヒト血清、より好ましくは自家血清）、デキストラン、DMSOを含む培地（RPMI等の哺乳動物細胞用の培地）を凍結保存液として使用する。例えば、通常の濾過滅菌したRPMI 20.5 mLと、患者から採取した自己血清20.5 mL、デキストラン5 mL、DMSO 5 mLを含む凍結保存液に細胞を懸濁して $-150^{\circ}\text{C}$ で凍結保存することができる。例えば、DMSOとしては、ニプロ株式会社製のクライオザーブ、デキストランは大塚製薬製の低分子デキストランL注を使用できるが、これらに限定されない。

[0022] 本発明の医薬に含まれるMSCの細胞数は多い程好ましいが、対象への投与時期や、培養に要する時間を勘案すると、効果を示す最小量であることが実用的である。したがって、本発明の医薬の好ましい態様において、間葉系幹細胞の細胞数は、 $10^7$ 個以上、好ましくは $5 \times 10^7$ 個以上、より好ましくは $10^8$ 個以上、さらに好ましくは $5 \times 10^8$ 個以上である。

[0023] 本発明の医薬は、好ましくは非経口投与製剤、より好ましくは非経口全身投与製剤、特に静脈内投与製剤である。非経口投与に適した剤形としては、溶液性注射剤、懸濁性注射剤、乳濁性注射剤、用時調製型注射剤等の注射剤や移植片などが挙げられる。非経口投与用製剤は、水性または非水性の等張性無菌溶液または懸濁液の形態であり、例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、培地（とくに、RPMI等の哺乳動物細胞の培養に用いられる培地）、PBSなどの生理緩衝液、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、賦形剤、ビヒクル、防腐剤、結

合剤等とを適宜組み合わせ、適切な単位投与形態に製剤化される。

[0024] 注射用の水溶液としては、例えば、生理食塩水、培地、PBSなどの生理緩衝液、ブドウ糖やその他の補助剤を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム等が挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールや非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80、HCO-50等と併用してもよい。

[0025] [虚血性血管障害]

本発明の医薬は虚血性血管障害を治療するために使用される。虚血性血管障害とは、動脈血流の減少により、局所的な血管障害（例えば、変性、閉塞）を呈する状態を言い、例えば、虚血性脳血管障害や虚血性心疾患を挙げることができる。

[0026] [虚血性脳血管障害]

本発明の医薬は虚血性脳血管障害を治療するために使用される。前述のとおり、MSCには脳（実質及び血管）の保護作用があることが知られており、既に静脈投与による脳梗塞等の虚血性脳血管障害の治療にも使用されている。

[0027] 虚血性脳血管障害としては、例えば、脳梗塞（例えば、アテローム血栓性脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、ラクナ梗塞、BAD（Branch Atheromatous Disease）、Trousseau症候群、血液凝固異常、動脈解離、静脈梗塞、血管炎、抗リン脂質抗体症候群）、及び一過性脳虚血発作（TIA）等が挙げられる。

[0028] [虚血性心疾患]

本発明の医薬は心筋梗塞等の虚血性心疾患を治療するためにも使用される。心筋梗塞は心臓に酸素や栄養を供給する冠動脈血管に閉塞や狭窄が起きて血液の流量が下がり、心筋が虚血状態になり壊死する状態を言う。

[0029] 本発明の医薬は、閉塞血管の再開通療法、とくに血栓溶解療法が適用される超急性期（8時間以内）又は急性期（8時間～24時間）の虚血性脳血管

障害や急性心筋梗塞（発症から3日以内）に適しているが、適用時期は患者の症状に応じて適宜判断する。

[0030] [血栓溶解剤]

虚血性血管障害（とくに急性期又は超急性期の虚血性脳血管障害や心筋梗塞）では、虚血による壊死を防止するため、血栓溶解あるいは血栓の物理的除去等による閉塞血管の再開通が治療の第一選択となる。

[0031] 血栓溶解剤は、ウロキナーゼ、プロウロキナーゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター（tissue-Plasminogen Activator: t-PA）、ナサルプラーゼ、ストレプトキナーゼ等が挙げられる。

[0032] 現在使用されているt-PAはいずれも組換え型t-PA（rt-PA）である。rt-PAには、天然型t-PAと同じアミノ酸配列を有するアルテプラゼ（alteplase）、チソキナーゼ（tisokinase）のほか、半減期延長のためにアミノ酸改変を加えたパミテプラゼ（pamiteplase）等がある。現在、国内で販売されているt-PAを含む医薬としては、アクチバシン（ACTIVACIN）（登録商標）注、グルトパ（GRTPA）（登録商標）注、クリアクター（Cleactor）（登録商標）注が市販されており、前二者は虚血性脳血管障害及び急性心筋梗塞への適用が承認されている。また、後一者は、急性心筋梗塞と急性肺塞栓症への適用が承認されている。

[0033] 血栓溶解剤は、血栓を溶解することで虚血を改善し、脳組織の壊死を防止することができるが、一方で出血のリスクが伴う。また、ウロキナーゼは発症6時間以内、t-PAは発症4.5時間以内と言うように、投与可能時間が限られている。

[0034] t-PAは血栓の主成分であるフィブリンを溶解するプラスミンを活性化させることにより他の血栓溶解剤よりも高い血栓溶解力を有するため、現在血栓溶解療法の第一選択となっている。また、t-PAは血小板凝集阻害薬及び血液凝固阻害薬としての作用も併せ持つ。しかしながら、前述のように、脳出血のリスクと4.5時間と言う短い投与可能時間がその適用を制限し

ている。

[0035] 本発明の医薬は、血栓溶解剤を含む医薬、とくにt-P Aを含む医薬と併用されることにより、その脳出血のリスクを低減させ、その投与可能時間を延長させることができる。

[0036] [血小板凝集阻害薬（抗血小板薬）]

血小板凝集阻害薬（抗血小板薬）は、血小板の凝集を阻害することで血栓形成を予防することができる。血小板凝集阻害薬としては、例えば、アスピリン、クロピドグレル、シロスタゾール、チクロピジン等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0037] [血液凝固阻害薬（抗凝固剤）]

血液凝固阻害薬（抗凝固剤）は、凝固因子の機能を阻害することで血栓形成を予防することができる。血液凝固阻害薬としては、例えば、ヘパリン、低分子ヘパリン、アルガトロバン、ダナパロイドナトリウム、ダルテパリン、ナドロパリン、ベミパリン、フォンダパリヌクス、アルガトロバン等のアンチトロンビン剤等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0038] 本発明の医薬は、閉塞血管の再開通療法の前に適用しても、後に適用しても、同時に適用してもよい。本発明の医薬（MSC）は、静脈投与という簡便な方法により、容易に患部に到達することができる。

[0039] [血栓の物理的除去]

血栓の物理的除去方法は、血管内手術等による機械的血栓回収療法や頸動脈内膜剥離術などが挙げられるが、これらに限定されない。また、バイパス手術、ステント治療、バルーン治療、吸引治療、超音波等による破砕等、による血流再開等でも良い。

[0040] [相乗効果]

本発明の医薬は、閉塞血管の再開通療法（例えば、血栓溶解剤、血小板凝集阻害薬、血液凝固阻害薬を含む医薬の投与や血栓の物理的除去）と併用されることで、閉塞血管の再開通療法に伴う脳出血のリスクを軽減することができる。とくに、血栓溶解剤ではその投与可能時間が短いことがその適用を

制限しているが、本発明の医薬は、血栓溶解剤の投与可能な時間を延長することができる。例えば、本発明の医薬を併用することにより、 $t-PA$ の投与可能時間は少なくとも4.5時間、6時間、8時間、12時間、24時間あるいはそれ以上延長されることが期待できる。

[0041] さらに、血栓溶解剤は、微小循環を改善させることで、MSCの治療効果を向上させ、MSCによる運動機能の改善、組織修復効果を単独投与の場合に比べて顕著に増大させる。このように、血栓溶解剤を含む医薬と本発明の医薬の併用は、単独投与からは予測できない、相乗的效果をもたらす。

[0042] 2. 閉塞血管の再開通療法に伴う脳出血の予防薬

本発明は、間葉系幹細胞を含む、閉塞血管の再開通療法（例えば、血栓溶解剤、血小板凝集阻害薬、血液凝固阻害薬を含む医薬の投与や血栓の物理的除去等）に伴う脳出血を予防するための医薬も提供する。前述のとおり、虚血性血管障害における閉塞血管の再開通療法には脳出血のリスクを伴うが、本発明の医薬は、MMP (Matrix metalloproteinase) -9活性化を抑制することで、これに伴う内皮障害を抑制し、脳出血のリスクを低減させることができる。

[0043] 3. 虚血性血管障害の治療方法

本発明は、閉塞血管の再開通療法（血栓溶解剤、血小板凝集阻害薬、血液凝固阻害薬を含む医薬の投与や血栓の物理的除去等）と、MSCを含む医薬を併用することを特徴とする虚血性血管障害の治療方法を提供する。一実施形態において、閉塞血管の再開通療法は $t-PA$ 等の血栓溶解剤の投与、あるいは血栓の物理的除去を含む。また、対象となる疾患は、好適には、脳梗塞等の虚血性脳血管障害や心筋梗塞等の虚血性心疾患であり、より好適には超急性期又は急性期の虚血性脳血管障害（脳梗塞等）及び急性心筋梗塞である。

[0044] また、本発明は、閉塞血管の再開通療法（血栓溶解剤、血小板凝集阻害薬、血液凝固阻害薬を含む医薬の投与や血栓の物理的除去等）と、MSCを含む医薬を併用することを特徴とする、（とくに虚血性脳血管障害や虚血性心

疾患における）血栓溶解療法に伴う脳出血を低減又は予防する方法を提供する。一実施形態において、閉塞血管の再開通療法は t - P A 等の血栓溶解剤の投与、あるいは血栓の物理的除去を含む。また、対象となる疾患は、好適には、脳梗塞等の虚血性脳血管障害や心筋梗塞等の虚血性心疾患であり、より好適には超急性期又は急性期の虚血性脳血管障害（脳梗塞等）及び急性心筋梗塞である。

[0045] さらに、本発明は、閉塞血管の再開通療法（血栓溶解剤、血小板凝集阻害薬、血液凝固阻害薬を含む医薬の投与や血栓の物理的除去等）と、MSCを含む医薬を併用することを特徴とする、（とくに虚血性脳血管障害における）血栓溶解療法の投与可能期間を延長させる治療方法も提供する。

[0046] とくに、本発明の医薬は、血栓溶解剤（例えば、t - P A）の投与に伴う脳出血を予防し、その投与可能な時間を延長させることで、従来血栓溶解療法が適用できなかった患者に対して血栓溶解療法の適用を可能にする。本発明の医薬は、MSCの有する組織再生・修復効果により、虚血性脳血管障害に伴う運動機能障害を改善し、梗塞病変部位の治癒を促進させることができるが、血栓溶解剤は微小循環を改善することで、このMSC本来の効果をさらに向上させる。

[0047] このように、本発明の医薬は、血管内皮を保護し、内皮障害を抑制することで、脳出血のリスクを低減させ、安全な閉塞血管の再開通療法（例えば、血栓溶解療法や血栓の物理的除去）を実現させるとともに、MSC本来の機能である梗塞部位の組織修復と、それに伴う運動機能及び高次機能障害改善効果を有し、これまでにない虚血性血管障害の治療を可能にする。

## 実施例

[0048] 以下、実施例により本発明について具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0049] 1. 方法

（1）ラット骨髓由来間葉系幹細胞の調製

実験は札幌医科大学の動物実験管理規定にしたがって実施した。既報に従

い、成熟SDラットの大腿骨から得た骨髄をダルベッコの改変イーグル培地 (DMEM) で25 mlに希釈し、加熱不活化した10% FBS、2 mM L-グルタミン、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシンを添加し、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下37℃で3日間インキュベートした (Kim S. et al., Brain Res. 2006;1123:27-33. Ukai R. et al., J. Neurotrauma. 2007;24:508-520.)。コンフルエントになるまで培養し、接着細胞をトリプシン-EDTAで剥離し、 $1 \times 10^4$  cells/mlの密度で3回継代培養して間葉系幹細胞 (MSC) を得た。

[0050] (2) 脳梗塞モデル

脳梗塞モデルとして、ラット一過性中大脳動脈閉塞 (tMCAO) モデルを使用した。既報にしたがい、成熟雄性SDラット (280-330 g : n = 171) をケタミン (75 mg/kg) 及びキシラジン (10 mg/kg) で麻酔し、20.0-22.0 mmの塞栓糸 (MONOSOF) を外頸動脈から挿入して、一過性中大脳動脈閉塞を誘導した (Honma T. et al., Exp. Neurol. 2006;199:56-66. Sasaki M. et al., Methods Mol. Biol. 2009;549:187-195.)。

[0051] (3) 実験プロトコル (図1)

一過性中大脳動脈閉塞誘導60分後に、DWI-MRIを撮影して初期梗塞体積を評価した。初期梗塞体積が基準 (220~370 mm<sup>3</sup>) に満たない動物は実験から除外した。DWI-MRI撮影30分後に、挿入した塞栓糸を除去し、以下のとおりラットを無作為に4群に分けた。

グループ1 (生理食塩水+培地 ; n = 43)

再開通後すぐに通常の生理食塩水 (食塩水 ; 1 ml) を静脈投与し、30分後に新鮮な培養液 (DMEM ; 1 ml) を投与した。

グループ2 (rt-PA+培地 ; n = 48)

再灌流後すぐにrt-PA (10 mg/kg ; 1 ml) を静脈投与し、30分後に新鮮な培地 (DMEM ; 1 ml) を投与した。

グループ3 (生理食塩水+MSC ; n = 42)

再開通後すぐに通常の生理食塩水（食塩水；1 ml）を静脈投与し、30分後に新鮮な培地（DMEM）で全量1 mlとしたMSCs（ $1.0 \times 10^6$  cells）を静脈投与した。

グループ4（rt-PA+MSC；n=38）

では、再開通後すぐにrt-PA（10 mg/kg；1 ml）を静脈投与し、新鮮な培地（DMEM）で全量1 mlとしたMSCs（ $1.0 \times 10^6$  cells）を静脈投与した。

すべてのラットに毎日シクロスポリンA（10 mg/kg）を腹腔内投与した。静脈投与はすべて左大腿静脈から行った。

[0052] （4）MRI及び梗塞体積の測定

ラットをケタミン（75 mg/kg）及びキシラジン（10 mg/kg）で麻酔し、MRI撮影を行った。MRI撮影は、既報にしたがい、7-Tesla、18 cmボア径の縦型超伝導磁石（Oxford Magnet Technologies）を備えたNMRスペクトロメーターUNITY-INOVA（Oxford Instruments）を用いて行った（Honma T. et al., Exp. Neurol. 2006;199:56-66., Komatsu K. et al., Brain Res. 2010;1334:84-92.）。

[0053] DWI-MRIは一過性中大脳動脈閉塞60分後に撮影し、T2WI-MRIは閉塞後1、4、7、14、21及び28日に測定した。虚血病変領域はScion Image, Version Beta 4.0.2（Scion Corporation）を用いてMRI画像から計算した。病変体積（mm<sup>3</sup>）は大腦から集めた連続画像の高信号領域を解析して決定した。各スライスについて、DWI-MRI及びT2WI-MRIにおいてシグナル強度が反対側の脳の損傷に比べて1.25倍高い高度損傷部位を梗塞病変領域とし、スライス厚（1 mm）を考慮して梗塞体積を計算した。脳出血の存在はT2WI-MRIが低信号領域にあるときに計測した。初期梗塞体積が基準に満たない動物は実験から除外した。

[0054] 灌流画像（Perfusion-weighted imaging：P

WI) は T2 強調 (TR = 13 ms, TE = 6.0 ms) グラジエントエコーシーケンスを用いて測定した。PWI 測定は中大脳動脈閉塞の再開通から 2 時間後に行った。PWI による脳血流量 (CBF) マップには、Bregma より 0.4 mm の大脳スライス冠状切片を血流測定するために選んだ。関心領域 (ROI : 60 × 60 ピクセル) は虚血脳半球の梗塞病変周辺領域とした。ROI の Bregma に対する相対配向は、DWI-MRI : 0.3 mm 尾側、1.25 mm 外側、0.1 mm 深さであった。各 ROI における局所脳血流量 (rCBF) は Perfusion Solver ソフトウェアを用いて定量化した。rCBF 率は、梗塞脳半球と非梗塞脳半球の比率として求めた。

[0055] (5) ゼラチンザイモグラフィー

ゼラチンザイモグラフィーは、一過性中大脳動脈閉塞 1 日後にラットから取り出した脳組織を用いて実施した。脳サンプルは開通後すぐに、プロテアーゼ阻害剤を含む 10 倍量の溶解バッファー (150 mM NaCl、1% SDS、0.1% デオキシコール酸、及び 50 mM Tris-HCl、pH 7.5) 中に氷上でホモジナイズし、遠心力 : 9000 g、15 分間、4℃で遠心後、上清を集め、使用するまで -80℃で保存した。全タンパク濃度は、Thermo BCA プロテインアッセイ (Pierce) を用いて測定し、MMP (Matrix Metalloproteinase) -9 活性はゼラチンザイモグラフィーキット (Primary Cell) を用いて測定した。

[0056] (6) トレッドミル負荷試験

ラットは、一過性中大脳動脈閉塞前に、傾斜 20°、速度 20 m/min に設定したトレッドミル (Muromachi Inc.) 上で 1 週間に 2 日間、1 日あたり 20 分走らせて馴化した。ラットがトレッドミル上を走行できる最大スピードを、一過性中大脳動脈閉塞後 1、4、7、14、21 及び 28 日に測定した。

[0057] (7) 統計解析

すべてのデータは特記しない限り平均±標準偏差で示し、統計解析はJMP統計解析ソフトウェア(JMP10, SAS Institute Inc)を用いて行った。各群の相違はANOVAとTukey's post hoc testを用いて評価した。

[0058] 2. 結果

(1) rt-PA静脈投与後の出血

グループ2 (rt-PA+培地)における急性出血は、他の3つのグループよりも発症率(グループ1=9.5%、グループ2=50%、グループ3=3.6%、グループ4=10%、 $p<0.01$ 、ANOVA:図2B)及び出血体積(グループ1= $0.14\pm0.01\text{ mm}^3$ ; グループ2= $3.20\pm1.54\text{ mm}^3$ ; グループ3= $0.01\pm0.01\text{ mm}^3$ ; グループ4= $0.48\pm0.39\text{ mm}^3$ 、 $p<0.01$ 、ANOVA:図2C)が高かった。注目すべきことに、グループ4では、rt-PA療法後の脳出血の発症率がMSC投与により、グループ2よりも低減した(発症率40%減少、 $p<0.01$ 、Tukey's post-hoc:体積 $2.72\text{ mm}^3$ 減少、 $p<0.05$ 、Tukey's post-hoc)。このことは、MSCの静脈投与により脳出血の発症と体積が低減できることを示唆する。

[0059] (2) ゼラチンザイモグラフィー

ゼラチンザイモグラフィーにより、同側の脳では、グループ4 (rt-PA+MSC)のMMP-9活性はグループ2 (rt-PA+培地)よりも低く( $p<0.01$ 、Tukey's post-hoc)、グループ3(生理食塩水+MSC)のMMP-9活性はグループ1(生理食塩水+培地)よりも低いことが確認された( $p<0.01$ 、Tukey's post-hoc:図3)。MMP-9活性のアップレギュレーションは再開通後の出血に寄与する。これらの結果はMSCの静脈投与によりMMP-9活性が低下し、出血が抑制しうることを示唆する。

[0060] (3) MRI解析による虚血病変体積

DWI-MRIを用いて虚血病変体積を4つの試験群で評価した。DWI

ーMRIを60分（カラム1）で撮影したが、初期梗塞体積に差異は認められなかった（グループ1 =  $274 \pm 33 \text{ mm}^3$  ;  $n = 9$ 、グループ2 =  $279 \pm 27 \text{ mm}^3$  ;  $n = 12$ 、グループ3 =  $267 \pm 38 \text{ mm}^3$  ;  $n = 11$ 、グループ4 =  $276 \pm 38 \text{ mm}^3$  ;  $n = 9$ 、ANOVA、 $p = 0.75$ ）。T2WI- MRIを一過性中大脳動脈閉塞後1日（カラム2）、4日（カラム3）、14日（カラム4）、28日（カラム5）に撮影した（図4A）。

[0061] すべての群において、評価した虚血病変体積は一過性中大脳動脈閉塞後28日の間に経時的に徐々に低減した（図4B）。MSC投与群では、14、21、および28日で、培地を投与した群に比べて大きな病変体積の減少を示した（ $p < 0.01$ 、Tukey's post-hoc：図4B）。rt-PAとMSCを投与した群（グループ4）の虚血病変体積は14日で22%、21日で22%、28日で25%と、いずれもrt-PAと培地を投与した群（グループ2）よりも小さかった。

[0062] 統計的差異は認められないものの、4、7、14、21、28日目の虚血病変体積の減少はrt-PAとMSCを投与した群（グループ4）で最も大きく、虚血病変体積は28日間を通してrt-PAと培地を投与した群（グループ2）で最も高かった（図4B）。これらの結果は、rt-PA療法を実施しても、MSCを投与すれば虚血病変体積を減少させることができることを示す。

[0063] （4）脳血流の解析

rCBF評価のために、PWIによるCBFマップを用いることにより、虚血病変部位における血流動態変化のさらなる定量的解析ができた。一過性中大脳動脈閉塞の再開通1時間後では、rt-PA療法群間（グループ2と4）のrCBF率、非rt-PA療法群間（グループ1と3）のrCBF率はそれぞれ似ているが、rt-PA療法群のrCBF率は非rt-PA療法群に比べて約23%高い（図4C）。これらの結果は、rt-PA療法後のMSC投与にかかわらず、rCBF率はrt-PA療法群で23%増加することを示す（ $p < 0.01$ 、ANOVA）。

[0064] (5) 行動機能

ラットがトレッドミル上を走行できた最大スピードを記録したところ、一過性中大脳動脈閉塞前では、すべてのラットは70 m/minに到達できたが、閉塞後24時間において最大速度は低下した。MSC投与群（グループ3：n=11、グループ4：n=9）は4～28日において非MSC投与群（グループ1：n=9、グループ2：n=12）よりも高い速度を示したが、グループ4は7～28日においてグループ3よりも高い速度を示した。これらの結果は、rt-PA療法にMSCの静脈投与を組み合わせることで、MSC単独投与に比べて梗塞後の回復が促進されることを示す（図5）。

[0065] 3. 考察

一過性中大脳動脈閉塞の急性期におけるMSC静脈投与を併用したrt-PA療法後の脳出血発症率および出血体積を評価することで、MSCの投与によって血管内皮機能不全を抑制できることが示された。MSCを併用しないrt-PA療法群では、脳出血の発症率が高く、梗塞体積も大きいが、一過性中大脳動脈閉塞後のrt-PA療法にMSCを併用することで脳出血の発症率と梗塞体積の両方を顕著に減少させることができる。

[0066] rt-PA療法後の出血の分子メカニズムは明らかではないが、これまでの研究で、MMP-9が急性梗塞後の再開通における血管破壊に関与することが知られている。

[0067] MSCには脳の保護作用がある。更に、MSCの静脈投与はMMP-9の発現を低減し、血管破壊を防御させることが予測される。脳梗塞の急性期にrt-PA投与されても、MSCを投与することで、脳出血の発症率と梗塞体積の両方を抑制することができる。MSCの治療効果は、これまでの研究結果と一致するものであるが、rt-PA療法とMSC投与の虚血梗塞における相乗効果、すなわち、顕著な機能改善と梗塞体積の減少は注目すべき結果である。

[0068] rt-PA投与群（グループ2及び4）では、再開通2時間後において、病変部位のrCBF（脳血流）増加がみられた。グループ2は、rt-PA

投与により  $rCBF$  増加はみられるが、治療効果は無かった。この為、単に脳血流が改善しても治療効果は無い。しかし、MSCと組み合わせると（グループ4）治療効果に相乗効果が見られた。この治療効果は、MSC単独投与（グループ3）と比べても高かった。よって、 $rt-PA$ 療法は、微小循環を改善させることによりMSCの治療効果を相乗的に向上させ、MSCによる運動機能及び梗塞病変の改善に寄与することが考えられる。

[0069] 脳梗塞を含む多くの神経疾患において細胞療法の適用が考慮されている。

$rt-PA$ の使用は今や虚血梗塞数時間内の確立した治療法である。将来的には、急性期に $rt-PA$ 療法を受けた患者はMSCを臨床において投与されるようになるだろう。本研究結果はこのプロトコルを支持する。すなわち、MSC投与は $rt-PA$ による脳出血のリスクを減らす。さらに、 $rt-PA$ 療法はMSCの治療効果を向上させる。

[0070] 本実施例で用いた一過性脳虚血モデルは、塞栓子を脳血管に挿入することで脳梗塞を誘発するモデルで、一定時間以上、血流遮断をした後に、糸を引き抜く（物理的除去）ことで物理的に血流を再開通させるものである。4つのグループのうち、グループ3（生理食塩水+MSC； $n=42$ ）では、MSCの投与による脳出血抑制効果が認められており、このことは、血栓の物理的除去による閉塞血管の再開通療法においても、MSCは脳出血抑制効果を有することを示す。物理的除去は例えば血管内治療等による血栓除去、機械的血栓回収療法、頸動脈内膜剥離術や、バイパス手術などがあるが、これらの方法にも同様に本発明の方法は適用できる。

[0071] さらに、 $t-PA$ （ $rt-PA$ 含む）は血小板凝集阻害薬、及び血液凝固阻害薬としての効果も併せ持つことから、本実施例により、血小板凝集阻害薬、及び血液凝固阻害薬による閉塞血管の再開通においても、MSCは脳出血抑制効果を有することを示唆する。

### 産業上の利用可能性

[0072] 本発明によれば、閉塞血管の再開通療法（例えば、血栓溶解剤、血小板凝集阻害薬、血液凝固阻害薬を含む医薬の投与や血栓の物理的除去）に伴う脳

出血のリスクを低減し、かつ、虚血性血管障害における治療効果を向上させることができる。本発明は、脳梗塞や心筋梗塞をはじめとする虚血性血管障害の治療に有用である。

[0073] 本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

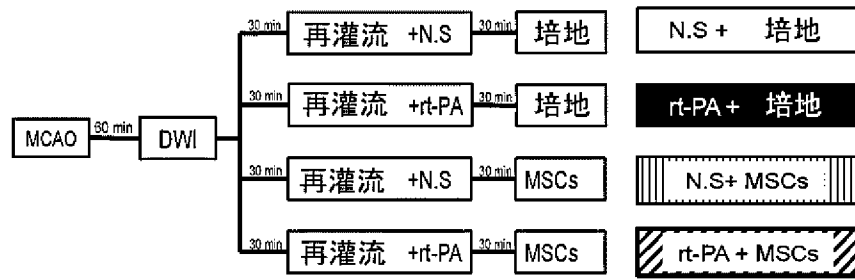
### 請求の範囲

- [請求項1] 閉塞血管の再開通療法と併用されることを特徴とする、間葉系幹細胞を含む虚血性血管障害の治療用医薬。
- [請求項2] 閉塞血管の再開通療法に伴う脳出血のリスクを低減することを特徴とする、請求項1に記載の医薬。
- [請求項3] 閉塞血管の再開通療法が、血栓溶解剤、血小板凝集阻害薬、及び血液凝固阻害薬の投与、ならびに血栓の物理的除去から選ばれるいずれか1又は2以上を含む、請求項1又は2に記載の医薬。
- [請求項4] 閉塞血管の再開通療法が血栓溶解剤の投与を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬。
- [請求項5] 血栓溶解剤がプラスミノーゲンアクチベーターである、請求項4に記載の医薬。
- [請求項6] 血栓溶解剤の投与可能な時間を延長することを特徴とする、請求項3～5のいずれか1項に記載の医薬。
- [請求項7] 虚血性血管障害が虚血性脳血管障害又は心筋梗塞である、請求項1～6のいずれか1項に記載の医薬。
- [請求項8] 虚血性血管障害が超急性期又は急性期の虚血性脳血管障害又は急性心筋梗塞である、請求項1～6のいずれか1項に記載の医薬。
- [請求項9] 間葉系幹細胞が骨髄由来の間葉系幹細胞である、請求項1～8のいずれか1項に記載の医薬。
- [請求項10] 間葉系幹細胞を含む、閉塞血管の再開通療法に伴う脳出血を予防するための医薬。
- [請求項11] 閉塞血管の再開通療法が、血栓溶解剤、血小板凝集阻害薬、及び血液凝固阻害薬の投与、ならびに血栓の物理的除去から選ばれるいずれか1又は2以上を含む、請求項10に記載の医薬。
- [請求項12] 閉塞血管の再開通療法が血栓溶解剤の投与を含む、請求項10又は11に記載の医薬。
- [請求項13] 血栓溶解剤がプラスミノーゲンアクチベーターである、請求項12

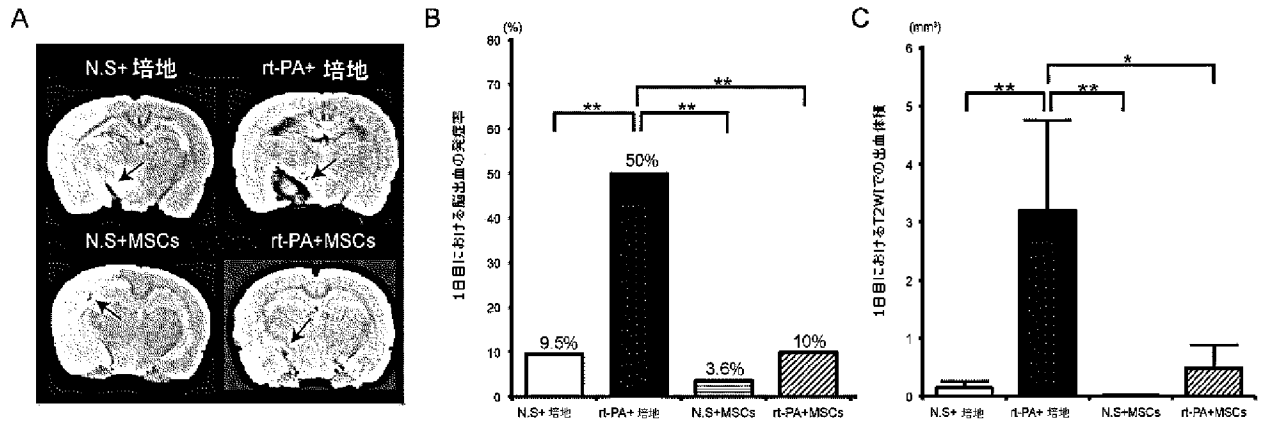
に記載の医薬。

- [請求項14] 血栓溶解剤の投与可能な時間を延長することを特徴とする、請求項 11～13 のいずれか1項に記載の医薬。
- [請求項15] 虚血性血管障害の患者に使用される、請求項10～14 のいずれか 1項に記載の医薬。
- [請求項16] 虚血性血管障害が虚血性脳血管障害又は心筋梗塞である、請求項 15 に記載の医薬。
- [請求項17] 虚血性血管障害が超急性期又は急性期の虚血性脳血管障害又は急性心筋梗塞である、請求項 15 又は 16 に記載の医薬。
- [請求項18] 間葉系幹細胞が骨髓由来の間葉系幹細胞である、請求項 10～17 のいずれか1項に記載の医薬。

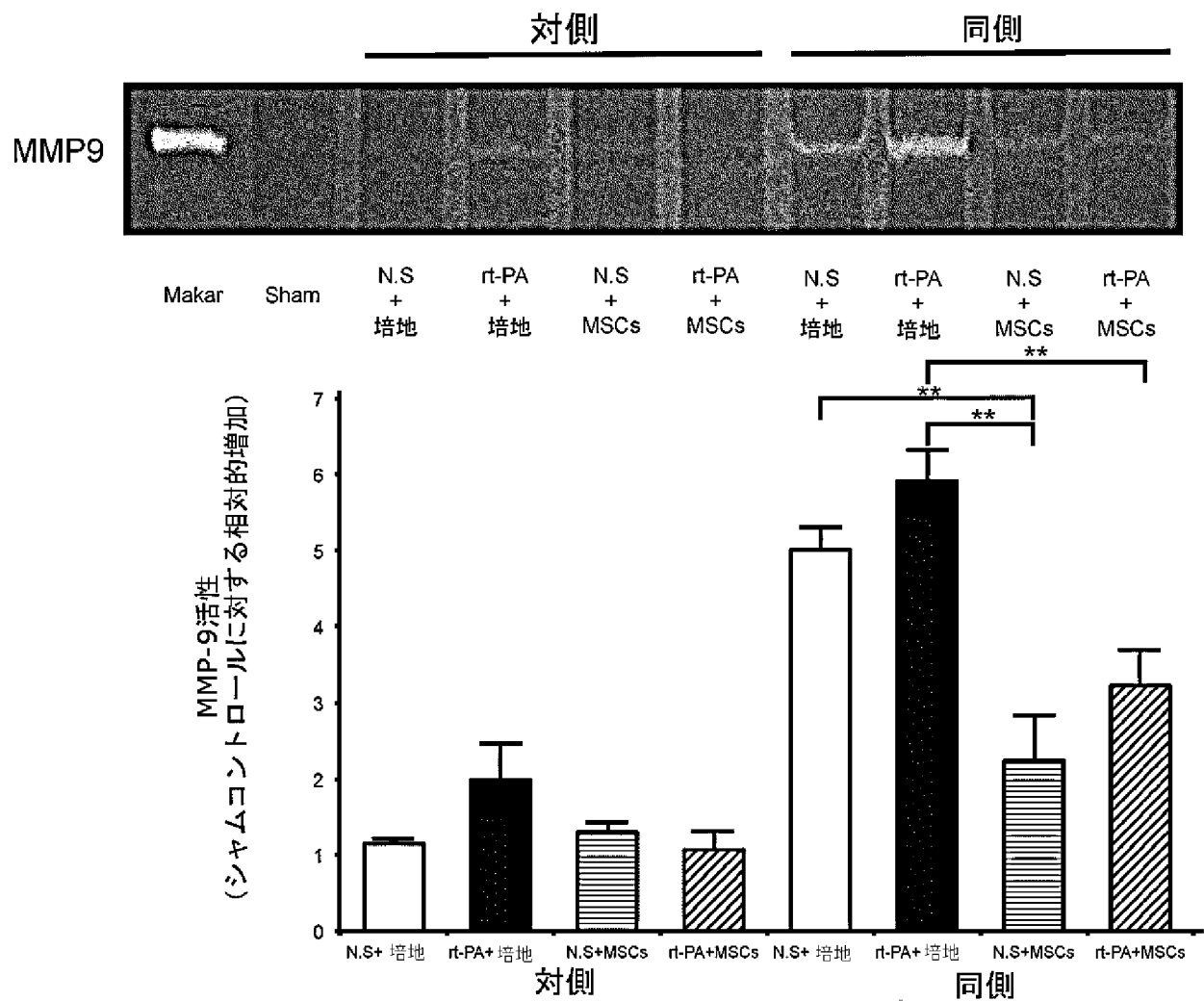
[図1]



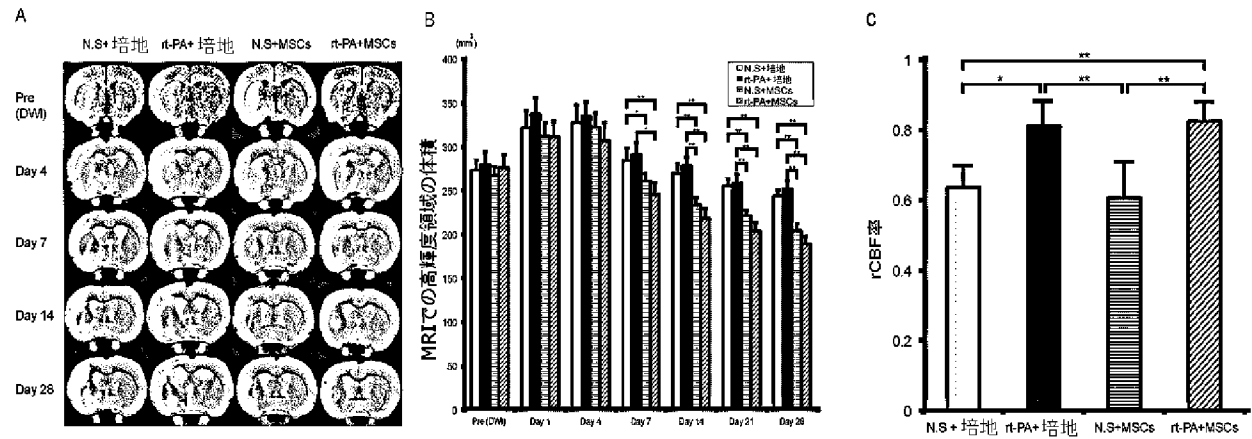
[図2]



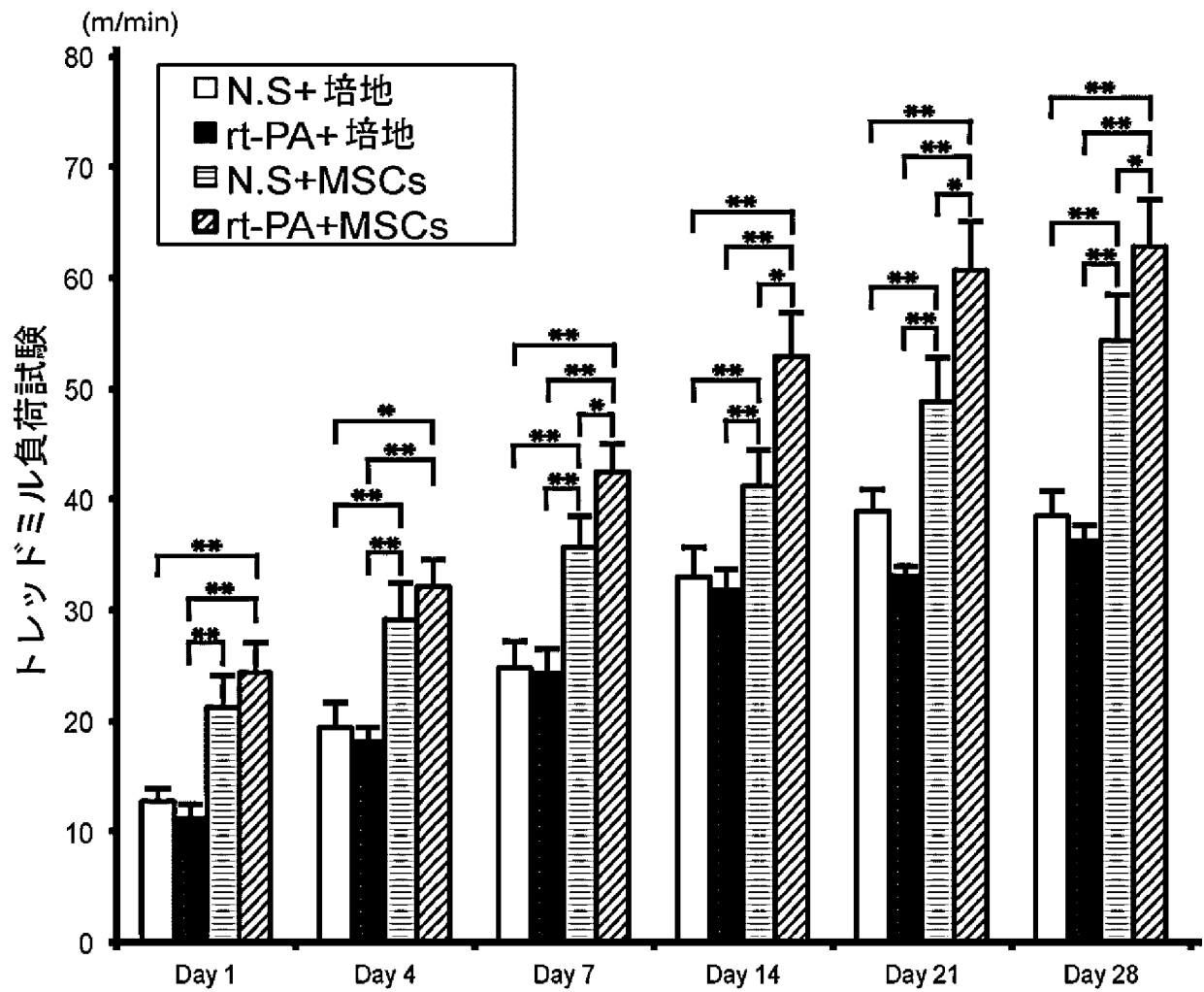
[図3]



[図4]



[図5]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/088646

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K35/28(2015.01)i, A61P7/04(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K35/28, A61P7/04, A61P9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2017 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2017 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2017 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),  
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                               | Relevant to claim No.                           |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| X<br>Y<br>A | JP 2013-542178 A (University of Miami),<br>21 November 2013 (21.11.2013),<br>claims; examples 2, 3<br>& WO 2012/027740 A1<br>examples 2, 3; claims               | 1, 3, 7-9<br>2, 3, 7-11,<br>15-18<br>4-6, 12-14 |
| X<br>Y<br>A | WO 2005/007176 A1 (Renomedix Institute Inc.),<br>27 January 2005 (27.01.2005),<br>claims; page 11<br>& US 2006/0210544 A1<br>paragraphs [0099] to [0101]; claims | 1, 3, 7-9<br>2, 3, 7-11,<br>15-18<br>4-6, 12-14 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 February 2017 (07.02.17)

Date of mailing of the international search report  
28 February 2017 (28.02.17)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/088646

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                        | Relevant to claim No.                  |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| X<br>Y<br>A | Jun'ichi KAWABE, "Tokushu Kessensho ni Kansuru Q&A PART6, 8. Yakuzai, Q57 Prostacycline to Kekkan Saisei ni Tsuite Oshiete Kudasai", Thrombosis and Circulation, 2011, vol.19, no.1, pages 189 to 191 page 189, left column, 1st paragraph, page 190, middle column, page 191, left column, 1st paragraph | 1,3<br>2,3,7-11,<br>15-18<br>4-6,12-14 |
| Y<br>A      | Atsushi NAGAI et al., "Tokushu Rinsho eno Kanosei o Saguru Nosocchu Saisei Iryo no Saisentan, Kotsuzui Kan'yokei Kansaibo ni yoru Noshukketsu Saisei Iryo", Molecular cerebrovascular medicine, 2006, vol.5, no.4, pages 33 to 39 Abstract, page 36                                                       | 2,3,7-11,<br>15-18<br>1,4-6,12-14      |
| Y<br>A      | LIU, J., et al., The Repairing Effect of Human Mesenchymal Stem Cells(hMSCs) on Cynomolgus Macaque with intracerebral hemorrhage, Experimental animals, 2009, Vol.58, No.3, p.232, 2PO-162 entire text                                                                                                    | 2,3,7-11,<br>15-18<br>1,4-6,12-14      |
| A           | JP 2012-100662 A (Sapporo Medical University), 31 May 2012 (31.05.2012), (Family: none)                                                                                                                                                                                                                   | 1-18                                   |
| A           | WO 2015/174087 A1 (Foundation for Biomedical Research and Innovation), 19 November 2015 (19.11.2015), (Family: none)                                                                                                                                                                                      | 1-18                                   |

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K35/28(2015.01)i, A61P7/04(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K35/28, A61P7/04, A61P9/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |            |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2017年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2017年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2017年 |

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                  | 関連する<br>請求項の番号                               |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| X<br>Y<br>A     | JP 2013-542178 A (ユニバーシティ・オブ・マイアミ) 2013.11.21<br>特許請求の範囲、実施例2、3<br>& WO 2012/027740 A1, Example2, Example3, Claims | 1, 3, 7-9<br>2, 3, 7-11, 15-18<br>4-6, 12-14 |
| X<br>Y<br>A     | WO 2005/007176 A1 (株式会社レノメディクス研究所) 2005.01.27<br>特許請求の範囲、第11頁<br>& US 2006/0210544 A1, [0099]-[0101], Claims       | 1, 3, 7-9<br>2, 3, 7-11, 15-18<br>4-6, 12-14 |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.02.2017

国際調査報告の発送日

28.02.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

佐々木 大輔

4 C

3962

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                             |                                             |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                           | 関連する<br>請求項の番号                              |
| X<br>Y<br>A           | 川辺 淳一, 特集 血栓症に関するQ&A P A R T 6, 8. 薬剤, Q<br>5 7 プロスタサイクリンと血管再生について教えてください,<br>Thrombosis and Circulation, 2011, Vol.19, No.1, pp.189-191<br>第189頁左欄第1段落、第190頁中欄、第191頁左欄第1段落                                 | 1, 3<br>2, 3, 7-11, 15-<br>18<br>4-6, 12-14 |
| Y<br>A                | 長井 篤, 他, 特集 臨床への可能性を探る脳卒中再生医療の最先<br>端, 骨髓間葉系幹細胞による脳出血再生医療,<br>分子脳血管病, 2006, Vol.5, No.4, pp.33-39<br>Abstract、第36頁                                                                                          | 2, 3, 7-11, 15-<br>18<br>1, 4-6, 12-14      |
| Y<br>A                | LIU, J., et al., The Repairing Effect of Human Mesenchymal Stem<br>Cells(hMSCs) on Cynomolgus Macaque with intracerebral<br>hemorrhage,<br>Experimental animals, 2009, Vol.58, No.3, p.232, 2P0-162<br>文献全体 | 2, 3, 7-11, 15-<br>18<br>1, 4-6, 12-14      |
| A                     | JP 2012-100662 A (北海道公立大学法人 札幌医科大学) 2012.05.31<br>(ファミリーなし)                                                                                                                                                 | 1-18                                        |
| A                     | WO 2015/174087 A1 (公益財団法人先端医療振興財団) 2015.11.19<br>(ファミリーなし)                                                                                                                                                  | 1-18                                        |