

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5841952号
(P5841952)

(45) 発行日 平成28年1月13日 (2016. 1. 13)

(24) 登録日 平成27年11月20日 (2015. 11. 20)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 5/074 (2010. 01)

C 1 2 N 5/00 2 O 2 D

C 1 2 N 5/075 (2010. 01)

C 1 2 N 5/00 2 O 2 H

A 6 1 K 35/12 (2015. 01)

A 6 1 K 35/12

A 6 1 K 31/704 (2006. 01)

A 6 1 K 31/704

A 6 1 K 31/475 (2006. 01)

A 6 1 K 31/475

請求項の数 11 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-555384 (P2012-555384)
 (86) (22) 出願日 平成23年2月28日 (2011. 2. 28)
 (65) 公表番号 特表2013-520971 (P2013-520971A)
 (43) 公表日 平成25年6月10日 (2013. 6. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/052945
 (87) 国際公開番号 W02011/107437
 (87) 国際公開日 平成23年9月9日 (2011. 9. 9)
 審査請求日 平成26年2月12日 (2014. 2. 12)
 (31) 優先権主張番号 10425052.7
 (32) 優先日 平成22年3月2日 (2010. 3. 2)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 597075904
 フレゼニウス メディカル ケア ドイツ
 チェランド ゲゼルシャフト ミット ベ
 シュレンクテル ハフツング
 ドイツ連邦共和国 デー6 1 3 5 2 パッ
 ト ホンブルク エルゼ クレーナー ス
 トラーセ 1
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稔
 (74) 代理人 100101454
 弁理士 山田 卓二
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
 (74) 代理人 100156100
 弁理士 西野 満

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍性疾患の治療的処置にて用いるための成体幹細胞由来の微細小胞 (MV)

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍性疾患の治療的処置のための多能性または複能性成体幹細胞由来の微細小胞 (MV) を含む、医薬。

【請求項 2】

多能性または複能性成体幹細胞が間充織幹細胞および肝臓幹細胞からなる群より選択される、請求項 1 記載の医薬。

【請求項 3】

多能性または複能性成体幹細胞が骨髄由来のヒト間充織幹細胞 (BM - MSC)、脱糸球体囊由来のヒト間充織幹細胞 (GI - MSC) およびヒト非楕円形肝臓幹細胞 (HLS C) からなる群より選択される、請求項 2 記載の医薬。

【請求項 4】

腫瘍性疾患が肝臓腫瘍、上皮腫瘍、乳房腫瘍、肺腫瘍、前立腺腫瘍、胃腫瘍、結腸腫瘍および卵巣腫瘍からなる群より選択される、請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 5】

腫瘍性疾患の治療的処置が、その必要とする患者に、患者の体重 1 kg 当たり 0 . 1 - 2 0 0 マイクログラムの用量で微細小胞を投与することを含む、請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 6】

腫瘍性疾患の治療的処置が、その必要とする患者に、患者の体重 1 kg 当たり 1 - 1 5

0 マイクログラムの用量で微細小胞を投与することを含む、請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 7】

腫瘍性疾患の治療的処置が、その必要とする患者に、患者の体重 1 k g 当たり 3 - 1 2 0 マイクログラムの用量で微細小胞を投与することを含む、請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 8】

局所的または全身的投与に適する医薬剤形の、請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 9】

治療的処置が 1 または複数の細胞傷害性および / または細胞増殖抑制性薬剤を投与することを含む、請求項 1 ないし 8 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 10】

細胞傷害性および / または細胞増殖抑制性薬剤が、パクリタキセル、レナリドミド、ボマリドミド、エピルピシン、5 F U、スニチニブ、ラパチニブ、カネルチニブ、シクロホスファミド、ドキシソルピシン、レナリドミド / デキサメタゾン、ボマリドミド / デキサメタゾン、カルボプラチン、ラパマイシン、ミトキサントロン、オキサリプラチン、ドキセタセル、ピノレルピン、ピンクリスチンおよびその組み合わせからなる群より選択される、請求項 9 記載の医薬。

【請求項 11】

細胞傷害性および / または細胞増殖抑制性薬剤がドキシソルピシンまたはピンクリスチンである、請求項 10 記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願発明は腫瘍性疾患の治療的処置に関する。

【背景技術】

【0002】

造血幹細胞移植は、充実性腫瘍の患者にて腫瘍阻害作用を発揮し、ならびに転移性の乳癌、腎臓癌、卵巣癌、前立腺癌および膵臓癌にて抗腫瘍作用を発揮することが知られている。

【0003】

ヒト骨髓間充織幹細胞 (B M - M S C) は多種の器官の修復および組織の修復に寄与することが明らかにされ、実証研究は M S C の移植が心臓、肝臓および腎臓を含むいくつかの器官の機能性および構造的回復に有益な効果のある可能性があることを示唆した。

【0004】

幹細胞の微小環境は、増殖を阻害し、分化を促進するシグナルを提供することで発癌を防止するのに不可欠な役割を発揮するようである。

【0005】

しかしながら、幹細胞の治療指標における使用は、かかる幹細胞療法の腫瘍形成能の危険性が報告されていることを考えれば、それほど望ましいものではない (Amariglio N ら、Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. PLoS Med. 2009 Feb 17;6 (2)) 。

【0006】

細胞由来の微細小胞 (M V) は、特徴的な抗原を発現する細胞によって放出される小胞であって、その細胞から膜および細胞質成分を生成して担持し、細胞通信の新たな機構であると記載されている。最近になって、本願発明者らはヒト内皮前駆細胞 (E P C)、B M - M S C および肝臓幹細胞から由来の微細小胞が、標的となる分化した細胞を内皮細胞、尿管上皮細胞および肝細胞として再プログラム化し (Deregibus MC ら、Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothel

10

20

30

40

50

ial cells by a horizontal transfer of mRNA. Blood. 2007 Oct 1;110(7):2440-8; Bruno S^ら, Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. J Am Soc Nephrol. 2009 May;20(5):1053-67; Herrera MB^ら, Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats. J Cell Mol Med. 2009 Jul 24)、組織の再生および修復に貢献し得る、遺伝物質(mRNA)の移動のためのビヒクルとして供し得ることを明らかにした。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

国際特許出願WO2009/087361は、誘導物質を未分化細胞の第一集団に適用することで分化細胞を産生し、ついで微細小胞をその分化細胞より単離することを開示する。この点については、WO2009/087361の30頁の第1段落のすべてを参照のこと。未分化細胞の第1集団は、例えば、骨髓間充織幹細胞である。しかし、WO2009/087361は未分化細胞より微細小胞を直接得ることを開示していない。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本願発明者らは、この度、成体幹細胞、好ましくは骨髓または系球体間充織幹細胞より、あるいは非楕円形肝臓幹細胞より由来の微細小胞(MV)が、インビトロおよびインビボの両方で顕著な抗腫瘍活性を示し、それにより癌の治療的処置のための対応するすべての幹細胞にわたって別途利点を示しうることを見出した。本願発明の成体幹細胞より由来の微細小胞の抗腫瘍活性は、該微細小胞の、種々のヒト癌細胞株の増殖およびアポトーシスに対する効果、ならびにその毛細血管様構造の形成に対する効果を測定することによりインビボにて明らかにされた。微細小胞の抗腫瘍活性もまた、MV-処置の腫瘍増殖に対する効果を測定することでインビボのマウス実験にて確認された。

【0009】

成体幹細胞より由来の微細小胞の抗腫瘍活性の観察は先行技術では全く予期せぬものである。間充織幹細胞(MSC)の調製物は、実際、いくつかの組織にて再生作用を発揮することが知られている。例えば、骨髓由来のMSCは、可溶性細胞外マトリックス糖蛋白、サイトカインおよび成長因子を含む、多くの栄養性分子を分泌することにより、自然と、血液生成を支持することが知られている。その上、内皮幹細胞より由来の微細小胞は、WO2009/050742より、インビトロおよびインビボの両方で、血管形成およびアポトーシスに対する耐性を促進することが分かっている。WO2009/057165では、幹細胞より由来の微細小胞は、損傷した組織または器官の内皮および上皮再生を誘発することが明らかにされた。

【0010】

WO2009/105044にて、間充織幹細胞より由来の微細小胞は、多数かつ多種の疾患の治療に用いるのに適すると推論している。癌の処置について、実験的証拠はなく、理論的説明もなく、具体的な方法も提供されていない。

【0011】

かくして、本願発明の第1の態様は、腫瘍性疾患の治療的処置に用いるための成体幹細胞より由来の微細小胞である。

【0012】

これに関連して、微細小胞は、それらを投与する同一患者より採取される成体幹細胞に由来する必要はないことを理解すべきである。むしろ、違う対象に由来して調製され、医薬の形態にて維持され、次にその必要とする患者に投与されてもよい。これはいわゆる同種アプローチである。

【0013】

好ましい実施態様において、成体幹細胞はヒト間充織幹細胞またはヒト肝臓幹細胞である。好ましいヒト肝臓幹細胞は、WO2006/126219に開示される間充織および胚幹細胞マーカーの両方を発現するヒト非楕円形肝臓幹細胞(HLSC)である。この細

10

20

30

40

50

胞株は、成体幹細胞が、肝細胞マーカーを発現し、成熟肝細胞、インスリン産生細胞、骨形成原細胞および上皮細胞への分化能を有する、好ましくはアルブミン、 α -フェト蛋白、CK18、CD44、CD29、CD73、CD146、CD105、CD90からなる群より選択されるマーカーを発現し、好ましくはCD133、CD117、CK19、CD34、チトクロムP450からなる群より選択されるマーカーを発現しない、成体組織より単離される、非楕円形ヒト肝臓多能性前駆細胞株である点で特に特徴付けられる。

【0014】

もう一つ別の好ましい実施態様において、ヒト間充織幹細胞は、ヒト成体骨髄(BM-MSC)より誘導される。もう一つ別の好ましい実施態様にて、ヒト間充織幹細胞は、欧州特許出願番号第08425708.8に開示されるように、ヒト成体脱系球体囊(GL-MSC)より誘導される。これらの細胞はさらには、該細胞がCD133陰性、CD146陽性およびCD34陰性であり、有足細胞、内皮細胞およびメサングウム細胞への分化可能を有し、好ましくはまたCD24、Pax-2、CD31、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD166、ナノグ、ムサシ、ビメンチン、ネスチンからなる群より選択されるマーカーを発現し、好ましくは α -SMA、Oct-4、CD45、サイトケラチン、CD80、CD86、CD40からなる群より選択されるマーカーを発現しない点で特徴付けられる。

【0015】

本願発明の一の実施態様によれば、腫瘍性疾患は、肝臓腫瘍(例、肝癌)、上皮腫瘍(例、カポシ肉腫)、乳房腫瘍(例、乳腺腺癌)、肺腫瘍、前立腺腫瘍、胃腫瘍、結腸腫瘍および卵巣腫瘍からなる群より選択される。

【0016】

本願発明のもう一つ別の態様は、上記した腫瘍性疾患の治療的処置のための医薬の製造にて、上記の成体幹細胞より誘導される微細小胞を用いることである。

【0017】

一の実施態様にて、該治療的処置は、一または複数の細胞傷害性または細胞増殖抑制剤を投与することを含む。適当な細胞傷害性および細胞増殖抑制剤として、例えば、パクリタセル(Paclitaxel)、レナリドミド(Lenalidomide)、ポマリドミド(Pomalidomide)、エピルビシン(Epirubicin)、5FU、スニチニブ(Sunitinib)、ラ-パチニブ(La-patinib)、カネルチニブ(Canertinib)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、ドキソルビシン(doxorubicin)、レナリドミデン/デキサメタゾン(Lenalidomiden/Dexamethason)、ポ-マリドミド(Po-malidomide)/デキサメタゾン、カルボプラチン(Carboplatin)、ラパマイシン(Rapamycin)、ミトキサントロン(mitoxantron)、オキサリプラチン(oxaliplatin)、ドキセタセル(docetaxel)、ビンORELビン(vinorelbin)、ビンクリスチン(vincristine)およびその組み合わせが挙げられる。ドキソルビシンおよび/またはビンクリスチンと、成体幹細胞より由来のMVとの組み合わせの投与が極めて好ましい。というのも、かかる組み合わせは相乗作用を発揮することが示されたからである(図13を参照)。

【0018】

微細小胞は、その必要とする患者に、局所または全身投与のいずれかで投与される。局所および全身投与の両方に適する医薬剤形は、例えば、注射可能な剤形である。一例として、微細小胞が、充実性腫瘍で局所的な腫瘍内(i.t.)注射にて、あるいは充実性腫瘍の場合と、転移癌の場合の両方で静脈内注射または注入にて投与される。投与されるべきMVの適当な用量は複数の因子に依存するが、一般に、受容者の体重1kg当たり0.1-200 μ g、好ましくは受容者の体重1kg当たり1-150 μ g、さらにより好ましくは受容者の体重1kg当たり3-120 μ gで構成される。

【0019】

本願明細書にて用いられる「成体幹細胞より由来の微細小胞(MV)」なる語は、少なくとも部分的に成体幹細胞より誘導される、膜粒子に言及する。同様に、「成体幹細胞」なる語は、増殖能(自己再生能)および分化能(塑性能)を有し、それによってライフサ

10

20

30

40

50

イクルの終わりを迎える特化された細胞系統の成熟細胞に取って代わる、未分化または一部未分化の細胞を包含する。本願明細書にて用いられる「成体幹細胞」なる語は、無制限の自己再生能および多能性塑性を有する幹細胞、および複能性塑性を有し、ある場合には制限された自己再生能を有する前駆細胞の両方を包含する。好ましい実施態様において、「成体幹細胞」は、少なくとも2種の、より好ましくは少なくとも3種の異なる型の特化された、十分に分化された成熟細胞への分化能を有する、多能性または複能性塑性を有することを意味する。

【0020】

本願明細書の文脈の中で、「成体幹細胞」なる語は、胚盤胞の内細胞塊より単離される「胚幹細胞」とは異なり、意図的に、成体組織より単離される幹細胞を意味する。成体幹細胞はまた、「体性幹細胞」としても知られている。

10

【0021】

本願明細書の文脈の中で、「成体幹細胞より由来の微細小胞(MV)」なる表現は、意図的に、微細小胞が未分化の幹細胞より直接誘導されることを意味する。

【0022】

本願明細書の文脈の中で、「直接」なる語は、微細小胞を得る前にいずれの分化工程がなされることも、生じることもなく、微細小胞が未分化の成体幹細胞より誘導されることを意味する。

【0023】

本願発明にて使用される成体幹細胞より誘導される微細小胞は、一般に、形状が球体であり、100nm~5μm、より典型的には0.2~1μmの範囲の直径を有する。仮に粒子の形状が球体でない場合、上記した値は該粒子の最大の寸法に言及するものである。

20

【0024】

本願発明にて使用される微細小胞をもたらす幹細胞は、本願明細書の実験のセクションにて記載されるように単離されてもよい。次に、微細小胞(MV)は、単離された幹細胞の上澄から、例えば本願明細書の実験のセクションに開示される超遠心分離により得られてもよい。ついで、その単離されたMVは、1または複数の抗凍結剤を配合した懸濁液中、超低温、例、-80で凍らせることで使用するまで貯蔵されてもよい。適当な抗凍結剤は、例えば、ジメチルスルホキシド(DMSO)およびグリセロールである。DMSOの細胞懸濁液の1容量%濃度での使用は、細胞の良好な保存および患者に再び注入された場合の毒性作用の制限を保証する。抗凍結剤として言及されてもよい他の物質は、いわゆる、密なバリアを細胞表面に形成し、細胞内脱水を減らすように作用する高分子量物質である。

30

【0025】

本願発明のさらなる目的および利点は、単に例示として用いられる、以下の実施例からさらに明らかになるであろう。実施例において、以下の図面が参照される。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1AおよびBは、HepG2細胞(図1A)およびKS細胞(図1B)を異なる量の微細小胞(MV)と一緒にインキュベートすることで、ピヒクル単独でインキュベートされた対照となる細胞と比べて、増殖が顕著に阻害されることを示す。HepG2およびKS細胞の増殖は、異なる量のBM-MSCからのMV(1、10および30μg/ml)、またはRNaaseで前処理されている、もしくはされていないG1-MSCからのMVと一緒にインキュベーションした48時間後に、BrdU取り込みアッセイで評価された。結果は3回の実験の平均値±SDで表される。

40

【図2】図2AおよびBは、HepG2およびKS細胞とMVとのインキュベーションが、ピヒクル単独でインキュベートされた対照と、同様にドキソルビシン刺激と比べて、アポトーシスを顕著に促進することを示す。HepG2およびKS細胞のアポトーシスは、BM-MSC(RNaaseで前処理されているか、されていない)またはG1-MSCからの異なる量のMVと一緒にインキュベーションした24時間および/または48時間後

50

のアポトーシス細胞の割合としてT u n e l アッセイで評価された。結果は3回の平均値 \pm SDで表される。

【図3】図3Aおよび3Bは、M C F - 7細胞(図3A)およびS K O V - 3細胞(図3B)を、B M - M S Cからの30 μ g/mlのMVと一緒に48時間インキュベートすることで、ビヒクル単独でインキュベートされた対照細胞と比べて増殖が顕著に阻害されることを示す。M C F - 7およびS K O V - 3細胞の増殖をB M - M S Cからの、またはG l - M S Cからの30 μ g/mlのMVと一緒にインキュベートした48時間後にB r d U取り込みアッセイにより評価した。結果は3回の実験の平均値 \pm SDで表される。

【図4】B M - M S CからのMVが、特にS K O V - 3細胞のG 0 / G 1フェーズにて細胞の増加を誘発することを示す。DNA含量を、10% F C Sと共に、F C Sを除き(飢餓)、30 μ g/mlのMVの存在下で24時間培養したS K O V - 3細胞にて測定した。MVの存在下、G 0 / G 1フェーズにて細胞数の増加が観察される。

【図5】図5Aおよび5BはMVのインビトロでの血管形成における作用を評価するのに実施された実験の結果を示す。H U V E CおよびT E Cのマトリゲル内での毛細血管様構造を形成する能力について評価した。

【図6】MVのインビトロでのアポトーシスにおける作用を評価するのに実施された実験の結果を示す。H U V E CおよびT E Cのアポトーシスを、異なる量のMVと一緒にインキュベートした48時間後のアポトーシス細胞の割合としてT u n e l アッセイで評価した。

【図7】MVのT E Cの増殖に対する作用を評価するのに実施された実験の結果を示す。T E Cの増殖は、R N a s eで前処理されているか、またはされていないB M - M S Cからの異なる量のMV(10および30 μ g/ml)と一緒にインキュベートした48時間後にB r d U取り込みアッセイで評価した。結果は2回の実験の平均値 \pm SDとして表される。

【図8】H e p G 2異種移植片のS C I Dマウスに腫瘍内投与された、R N a s eで処理されているか、またはされていないMVのインビボでの抗腫瘍活性を示す。腫瘍塊を毎週該移植片の2つの直交する寸法をキャリパーを用いて測定することにより決定した。結果は腫瘍塊の増大の割合として表され：第1処置(H e p G 2注射の1週間後)の腫瘍塊を慣例により100%値として固定する。

【図9】B M - M S Cから由来のMVがインビボにて腫瘍増殖を減少させることを示す。A) B M - M S Cから由来のMVで処置されている(右図)または処理されていない(左図)H e p G 2腫瘍の代表例；B) B M - M S CからのMVで処置されている(右図)または処理されていない(左図)切除されたH e p G 2腫瘍の代表例；C) B M - M S CからのMVで処置されている(右図)または処理されていない(左図)H e p G 2腫瘍のヘマトキシリンおよびエオシン染色。

【図10】MVのR N a s eを用いる前処理がB M - M S Cから由来のMVの抗腫瘍活性を無効にすることを示す。A) M V - R N a s eで処置されている切除されたH e p G 2腫瘍の代表例；B) M V - R N a s eで処置されているH e p G 2腫瘍のヘマトキシリンおよびエオシン染色。

【図11】H e p G 2上のB r d Uをベースとする増殖アッセイの結果を示すグラフである。H e p G 2をD M E M単独中に、あるいは異なる量のH L S Cより由来のMVを補足したD M E Mにて培養した。3日後、H e p G 2増殖がB r d U取り込みアッセイを用いて定量された。

【図12】H e p G 2細胞上のアポトーシスアッセイの結果を示すグラフである。H e p G 2細胞は、D M E M単独中で、または10% F C Sを含むD M E M中で、ピンクリスチン(100ng/ml)またはM V - H L S C(30 μ g/ml)またはM V - H L S C(R N a s eで前処理されている、30 μ g/ml)を補足して培養された。24時間後に分析を行った。

【図13】基底条件下のH e p G 2細胞、あるいはピトロネクチン、ドキソルビシン、M V - H L S Cまたはピトロネクチン+M V - H L S Cおよびドキソルビシン+M V - H L

10

20

30

40

50

SCで処理したHepG2細胞でのアポトーシスアッセイの結果を示すグラフである。

【図14】MV-HLSC (n=3)、ビヒクル (n=2) またはRNAse処理のMV-HLSC (n=3) でi.t. 処理された後で、マウスを殺した際の、回収されたHepG2腫瘍の体積を測定することで得られたデータを示すグラフである。腫瘍の体積は該移植片の2つの直交する寸法をキャリパーを用いて毎週測定することにより決定された。

【図15】HLSC-MV処理によるインビボでの腫瘍増殖の阻害および腫瘍内アポトーシスの誘発を示す顕微鏡写真を図示する。A) 4週間後に回収されたHepG2腫瘍のアポトーシス、PCNAおよびヘマトキシリン&エオシン染色を示す代表的顕微鏡写真；B) MV-処理されたマウスから回収されたHepG2腫瘍のアポトーシス、PCNAおよびヘマトキシリン&エオシン染色を示す代表的顕微鏡写真；C) MV-RNAse処理されたマウスから回収されたHepG2腫瘍のアポトーシス、PCNAおよびヘマトキシリン&エオシン染色を示す代表的顕微鏡写真。

【図16】MCF-7細胞を異なる濃度のHLSC-MVと共にインキュベートすることにより実施されたインビトロでの増殖アッセイの結果を示すグラフである。MCF-7細胞の増殖は、2、10、15および30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のHLSC細胞から由来のMVと共に48時間インキュベートした後に、BrdU取り込みアッセイにより評価された。該実験を3回重複して行った。P<0.05。

【図17】カポジ細胞(KS)を異なる濃度のHLSC-MVと共にインキュベートすることにより実施されたインビトロでの増殖アッセイの結果を示すグラフである。カポジ細胞の増殖は、2、10、15および30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のHLSC細胞から由来のMVと共に48時間インキュベートした後に、BrdU取り込みアッセイにより評価された。該実験を3回重複して行った。P<0.05。

【図18】MCF-7細胞およびカポジ細胞をHLSC-MVと共にインキュベートすることにより実施されたインビトロでのアポトーシスアッセイの結果を示すグラフである。アポトーシスは異なる量のMV (2、10、15および30 $\mu\text{l}/\text{ml}$) および30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のRNAse処理されたMVと共にインキュベートされた48時間後のアポトーシス細胞の割合としてTUNELアッセイにより評価された。アポトーシス誘発の陽性対照としてドキソルビシンを用いた。陰性対照にて、MCF-7細胞およびカポジ細胞をビヒクル単独で処理した。該実験を3回重複して行った。P<0.05。

【発明を実施するための形態】

【0027】

1. 間充織幹細胞(MSC)からの微細小胞(MV)

【0028】

1.1 MSCの単離および特徴付け

【0029】

骨髓細胞をフィコール(Ficoll)グラジエント(密度: 1022 g/ml ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)上に積層させ、1500rpmで30分間遠心分離に付した。単核細胞を間充織幹細胞基底培地(MSCBM, Lonza)の存在下で培養させた。5日間培養した後、培地を変換した。単離された細胞を拡張させるために、付着した単層を、第1継代について15日目に、その後の継代については7日毎に37℃で5分間トリプシン処理に付して分離した。細胞を10000細胞/ cm^2 の密度で播き、継代6より後の細胞は使用されなかった。

【0030】

糸球体からのMSC集団(G1-MSC)が、Bruno Sら、Isolation and characterization of resident mesenchymal stem cells in human glomeruli. Stem Cells Dev. 2009;18:867-880に記載されるように、手術で摘出された腎臓の皮質の正常な部分より得られた。皮質の切開した後で、糸球体の懸濁液を標準的な確立された方法を用いて集めた：一連の等級別のメッシュ(60および120メッシュ)に通した後、最上部にある120メッシュのシーブで糸球体を集めた。次に、糸球体を自然沈降(室温で10分間)により円錐管の底部で集め、ボーマン嚢の臓側板を、10mlのピペットを用いて吸引/排出を

10

20

30

40

50

数回行うことで機械的に、かつコラゲナーゼ I (Sigma, St.Louis, MO) を用いて 2 分間消化することで酵素的に除去した。ついで、細胞およびボーマン嚢を取り出すために、系球体を自然沈降により円錐管の底部に集め、それをフィブロネクチンを被覆した T 2 5 フラスコ (Falcon, BD Bioscience, Two Oak Park, Bedford, MA) に移した。系球体を間充織幹細胞基礎培地 (MSCBM, Lonza) の存在下で培養した。細胞を放置し、継代前に集密とさせた：継代 4 になるまでの継代間の間隔は変動し (3 - 7 日)、それから約 7 日で確立された。

【0031】

各継代の際に、細胞を計数し、細胞蛍光分析および免疫蛍光分析により免疫表現型について分析した。細胞蛍光分析は、次の抗体、すべてのフィコエリトリン (PE) またはフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 接合体：抗 - CD 105、- CD 29、- CD 31、- CD 146、- CD 44、- CD 90 (Dakocytomation, Copenhagen, Denmark)；- CD 73、- CD 34、- CD 45、- CD 80、- CD 86、- CD 166、HLA - I (Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San Jose, CA)；- CD 133 (Miltenyi Biotec, Auburn)；KDR (R&D Systems, Abington, U.K.)；- HLA - II (Chemicon International Temecula, CA)、- CD 40 (Immunotech, Beckman Coulter)、- CD 154 (Serotec, Raleigh, NC USA) モノクローナル抗体を用いて実施された。マウス IgG 同形対照は Dakocytomation からのものであった。インキュベーションはすべて、0.1% ウシ血清アルブミンおよび 0.1% アジ化ナトリウムを含有する、100 μ l のリン酸緩衝セイライン (PBS) 中、4℃で行われた。各サンプルについて、10000 個の細胞を FACSCalibur 血球計数器 (BD Biosciences Pharmingen) で分析した。ゲーティングは陰性対照に基づいて構成され、行われたすべての分析にて補償対照が含まれた。セルクエストソフトウェア (Cell Quest software) (BD Biosciences Pharmingen) を用いて各実験からゲート化された集団についての集団割合および数が生成された。

【0032】

間接免疫蛍光を、チャンバースライド (Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA) 上で培養され、2% シュークロースを含有し、必要ならば、ヘプス - トリトン X 100 緩衝剤 (Sigma, St. Louis, MO) で透過処理された、4% パラホルムアルデヒドに固定された、MSC について行った。次の抗体：マウスモノクローナル抗ビネンチン (Sigma) およびウサギポリクローナル抗 - フォン・ヴィレブランド因子 (Dakocytomation) を用いた。一次抗体を省略したもの、または非免疫ウサギまたはマウス IgG と置き換えられたものが、適当であるならば、対照として使用された。Alexa Fluor 488 抗 - ウサギおよび抗 - マウス Texas Red (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) が二次抗体として使用された。共焦点顕微鏡分析が、Zeiss LSM 5 Pascal Model Confocal Microscope (Carl Zeiss International, Germany) を用いて実施された。ヘキスト 33258 染料 (Sigma) が核染色のために添加された。

【0033】

BM - MSC および GL - MSC 調製物は、CD 45、CD 14 および CD 34 などの造血マーカーを発現しなかった。該調製物は副刺激性分子 (CD 80、CD 86 および CD 40) も内皮マーカー (CD 31、フォン・ヴィレブランド因子、KDR) も発現しなかった。異なる培養継代での細胞調製物はすべて典型的な MSC マーカー：CD 105、CD 73、CD 44、CD 90、CD 166 および CD 146 を発現した。それらはまた HLA クラス I も発現した。

【0034】

MSC の脂質生成、骨形成および軟骨形成の分化能は、Pittenger MF、Martin BJ、Mesenchymal and their potential as cardiac therapeutics. Circ. Res 2004；95：9-20 に記載されるように測定された。簡単には、MSC を Adipogenic Medium (Lonza) で 3 週間培養した。分化を評価するのに、細胞を 4% パラホルムアルデヒド中室温で 20 分間固定し、メタノール (Sigma) 中 0.5% の Oil Red O (Sigma) を用いて室温で 20 分間染色

10

20

30

40

50

した。

【0035】

骨形成分化は、MSCをOsteogenic Medium (Lonza) で培養することにより評価された。培地を週に二回3週間変えた。分化を評価するのに、細胞を4%パラホルムアルデヒド中20分間固定し、Alizarin Red (pH 4.1) (Lonza) を用いて室温で20分間染色した。

【0036】

軟骨形成の分化では、 2.5×10^5 のMSCを15mlの円錐形ポリプロピレン管 (Falcon BD Bioscience) 中150gで5分間遠心分離に付し、DMEMで2回洗浄した。該ペレットを10ng/mlのTransforming Growth Factor β 3 (Lonza) を補足した軟骨培地 (Lonza) にて培養した。該培地を28日間で3日毎に変えた。ペレットを4%パラホルムアルデヒド中に一夜固定し、パラフィン包埋切片を0.1%サフラニンO (Sigma) を用いてグリコサミノグリカンについて、および1%アルシャンブルーを用いて硫酸化プロテオグリカンについて染色した。

【0037】

1.2 MSCから由来のMVの単離および特徴付け

【0038】

FCSを除去し、0.5%のBSA (Sigma) を補足したRPMIにて培養された、上記のように得られたBM-MSCまたはGL-MSCの上澄から微細小胞 (MV) を得た。2000gで20分間遠心分離に付して残骸を除去した後、無細胞上澄を100000gで超遠心分離器 (Beckman Coulter Optima L-90K) を用いて4℃で1時間遠心分離に付し、25mMのN-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (HEPES) (Sigma) を含有する無血清培地199にて洗浄し、同条件下で第2の超遠心分離に供した。MVのエンドトキシン汚染物を、Limulus試験により、製造業者の使用説明書 (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA, USA) に従って排除し、MVを-80℃で貯蔵した。

【0039】

選択される実験においては、MVを1U/mlのRNase (Ambion Inc., Austin, TX, USA) を用いて37℃で1時間処理し、10U/mlのRNase阻害剤 (Ambion Inc.) を添加することで反応を停止させ、超遠心分離によりMVを洗浄した。

【0040】

1.3 MSCから由来のMVを用いて行われるインビトロ実験

【0041】

癌細胞株 ヒト肝臓癌細胞株 (HepG2)、ヒト乳腺腺癌細胞株 (MCF-7) およびヒト卵巣癌細胞株 (SKOV-3) を、10%ウシ胎仔血清 (FCS, Euroclone)、100U/mlのペニシリン、100mg/mlのストレプトマイシンおよび1%のグルタミン (すべて、Sigmaより入手) を含有する低グルコースDMEM (Euroclone) 中に培養し、5%CO₂、37℃の加湿雰囲気下でインキュベーターに維持した。カボジ肉腫細胞 (KS細胞) の初代培養を、免疫抑制療法下にある、腎臓同種移植を受けた患者の皮膚病変より得、10%のFCS、100μg/mlのペニシリンおよび100μg/mlのストレプトマイシンを補足したRPMI 1640培地にて培養した。

【0042】

腫瘍内皮細胞 (TEC) : 単離および培養 MACSシステム (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) を用いる磁気細胞分類により、磁気ビーズに結合した抗-CD105抗体を用いて、明細胞型腎細胞癌の試料よりTECを単離した。TEC細胞株を確立し、上皮細胞増殖因子 (10ng/ml)、ヒドロコルチゾン (1mg/ml)、ウシ脳抽出物 (すべて、Lonzaより入手) および10%のFCSを補足した内皮基底完全培地 (EBM) 中に培養を維持した。TECは形態学、vWF抗原、CD105、CD146および血管内皮カドヘリンに対して陽性染色を示し、サイトケラチンおよびデスミン (Bussolati Bら、Altered angiogenesis and survival in endothelial cells derived from renal ca

10

20

30

40

50

rcinoma. FASEB J 2003;17:1159-1161) に対して陰性染色を示すことにより、内皮細胞として特徴付けられる。

【0043】

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (H U V E C) : 単離および培養 ヒト臍帯静脈内皮細胞 (H U V E C) を、以前に記載されるように (Bussolati Bら、Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. Am J Pathol. 2001Sep;159(3):993-1008)、臍帯静脈より得、E B Mおよび10% F C Sに維持された。実験は第2および第3継代のH U V E Cで行われた。

【0044】

細胞増殖 Hep G 2、M C F - 7、S K O V - 3、K S細胞またはH U V E Cを、2000または4000細胞/ウェルで、F C Sを除く、R N a s eで前処理されている、または前処理されていない異なる濃度の微細小胞を有するD M E M (Sigma) 中の96-ウェルに播種した。D N A合成が、48時間培養した後、5-プロモ-2'-デオキシ-ウリジン (B r d U) の細胞D N Aへの取り込みとして検出された。ついで、細胞を0.5 Mのエタノール/H C lで固定し、ヌクレアーゼと共にインキュベートし、該D N Aを消化した。D N AへのB r d Uの取り込みを抗-B r d Uペルオキシダーゼ接合のm A bを用いて検出し、可溶性発色基質 (Roche Applied Science、Mannheim、Germany) で可視化した。光学密度を405 nmの下でE L I S Aを用いて測定した。

【0045】

細胞周期分析 ヒト癌細胞株を、30 μg / mlの異なるM Vの調製物を用いて24時間刺激し、トリプシンにより分離し、冷80%エタノール中に固定した。細胞を-20に少なくとも24時間維持し、次にP B Sで洗浄した。ついで、該細胞を室温でヨウ化プロピジウム (50 μg / ml) (Sigma) と一緒に1時間インキュベートし、R N a s e (200 μg / ml) (Sigma) および0.5%のN o n i d e t P 4 0 (Sigma) 含有の溶液中で該D N Aを染色した。各サンプルについて、50000個の細胞をF A C S C a l i b u r 血球計算器 (BD Biosciences Pharmingen) で分析した。

【0046】

アポトーシスアッセイ Hep G 2、M C F - 7、S K O V - 3、K S細胞、H U V E CまたはT E Cが、8000個の細胞/ウェルで、10% F C Sを含み、ドキシソルピシン (100 ng / ml、Sigma) または異なる濃度 (10および30 μg / ml) のR N a s eで前処理されている、またはされていないM Vの存在下で、D M E M (Sigma) 中に配置された96-ウェルに播種された。アポトーシスをT U N E Lアッセイ (ApopTag On cor、Gaithersburg、MD、USA) により評価した。処理して24または48時間経過した後、該細胞をP B Sで洗浄し、1%パラホルムアルデヒド (p H 7.4) 中に4で15分間固定させ、P B Sにて2回洗浄し、ついで予め冷却したエタノール-酢酸 (2:1) に-20で5分間ポスト固定させた。試料を酵素末端デオキシヌクレオチルトランスフェラーゼ (T d T) で処理した。ついで、該細胞をフルオレセインとの加熱した抗ジゴキシゲニン接合体で処理し、室温で30分間インキュベートした。試料を1 μg / mlのヨウ化プロピジウム含有の培地に取り込み、該細胞を免疫蛍光により分析した。結果は赤色蛍光発光性細胞 (全細胞) に対する緑色蛍光発光性細胞 (アポトーシスを起こした細胞) の割合として表される。

【0047】

インビトロでの血管形成 24ウェルのプレートで成長因子を減少させるマトリゲル (BD Biosciences) を用いて4で被覆し、加湿雰囲気下、37、5% C O₂ で30分間インキュベートさせた。H U V E CまたはT E Cを、マトリゲル被覆のウェルの5% F C Sを含むR P M IまたはE B M中に、5 × 10⁴ 個細胞/ウェルの密度で、異なる濃度の、R N a s eで処理されているか、処理されていないM Vの存在または不在の下で播種させた。インキュベーションから6時間経過した後、該細胞をニコン倒立顕微鏡 (Nikon) で観察し、実験結果を記録した。結果は、管の長さの平均として表され、MicroImage分析

10

20

30

40

50

システム (Cast Imaging) で測定され、任意単位にて表され、3回の異なる実験からの2つの重複したウェルにて20xの倍率で5個所の異なるフィールドにて評価された。

【0048】

統計分析 異なる実験操作からのデータはすべて平均値 \pm SDとして表される。統計分析は、必要に応じて、Newmann - Keulsのマルチ比較試験を備えたANOVAで行われた。

【0049】

1.4 インビトロ結果

【0050】

1.4.1 BM - MSCおよびGL - MSCより由来のMVの腫瘍細胞株に対するインビトロ生物学的効果

10

ヒトBM - MSCから由来のMVの抗腫瘍活性を、HepG2、MCF - 7、SKOV - 3およびKS細胞株に対してその増殖を阻害し、そのアポトーシスを誘発する能力を測定することによりインビトロにて評価した。

【0051】

図1はHepG2細胞 (図1A) およびKS細胞 (図1B) を異なる量のMVと共に48時間インキュベートすると、ビヒクル単独でインキュベートされた対照細胞と比べて増殖が顕著に阻害されることを示す。

【0052】

図2はHepG2細胞 (図2A) およびKS細胞 (図2B) をMVと共に24および48時間インキュベートすると、ビヒクル単独でインキュベートされた対照細胞と比べて、ドキソルビシン刺激と同様に、アポトーシスが顕著に促進されることを示す。

20

【0053】

MVによりシャトルされるRNAの完全な分解を誘発するようにMVをRNaseと一緒にインキュベートした場合、MVにより惹起されるHepG2およびKS細胞に対するアンチ増殖およびプロアポトーシス作用は小さくなった (図1および2)。MVのRNase処理そのものはドキソルビシンにより誘発される癌細胞株のアポトーシスを干渉しなかった (図2)。

【0054】

反対に、MCF - 7細胞およびSKOV - 3細胞と30 μ g / mlのBM - MSCからのMVとの48時間に及ぶインキュベーションは、ビヒクル単独でインキュベートされた対照細胞と比べて増殖を顕著に阻害した (図3Aおよび3B) が、アポトーシスを促進しなかった。これら2種の腫瘍細胞株にて、本願発明者らはまた、細胞がG0 / G1フェーズにある割合を、細胞がSおよびG2フェーズにある割合と比較して評価するために、細胞周期をヨウ化プロピジウム染色技法を用いて検討した。本願発明者らは、BrdUの取り込みで観察される増殖の阻害を説明しうる、BM - MSCからのMVがG0 / G1フェーズにある細胞、特にSKOV - 3細胞 (図4) の増大を誘発することを観察した。

30

【0055】

本願発明者らはまた、GL - MSCから由来のMVの腫瘍細胞株の増殖およびアポトーシスに対する作用を試験した。GL - MSCはHepG2細胞株の増殖およびアポトーシスに影響を与えなかった。反対に、GL - MSCから由来のMVはKS細胞の増殖を阻害し、そのアポトーシスを誘発した (図1および2)。その上、MCF - 7およびSKOV - 3細胞と30 μ g / mlのGL - MSCから由来のMVとの48時間に及ぶインキュベーションは、ビヒクル単独でインキュベートした対照の細胞と比べて増殖を阻害した (図3) が、アポトーシスを促進しなかった。

40

【0056】

1.4.2 ヒト線維芽細胞から由来のMV

【0057】

ヒト線維芽細胞から由来のMVは種々の癌細胞株の増殖を阻害せず、そのアポトーシスを誘発しなかった (図示せず)。

50

【 0 0 5 8 】

1 . 4 . 3 B M - M S C から由来の M V の内皮細胞に対するインビトロでの効果

【 0 0 5 9 】

本願発明者らはまた、B M - M S C から由来の M V の H U V E C および腫瘍内皮細胞 (T E C) の増殖、アポトーシスおよび毛細血管様形成に対するインビトロ作用を検討した。

【 0 0 6 0 】

M V 処理は H U V E C の増殖に影響を及ぼさず (図 5 A)。加えて、H U V E C の種々の量の M V との 4 8 時間にわたるインキュベーションはアポトーシスを誘発しなかった (図 6)。

10

【 0 0 6 1 】

反対に、T E C の種々の量の M V との 4 8 時間にわたるインキュベーションは、ビヒクル単独でインキュベートした対照となる細胞と比べて、増殖を顕著に阻害し (図 7)、アポトーシスを顕著に促進した (図 6)。T E C の増殖は、R N a s e で前処理されている、またはされていない B M - M S C からの種々の量 (1 0 および 3 0 μ g / m l) の M V と共にインキュベートして 4 8 時間経過した後 B r d U の取り込みアッセイにより評価した。図 7 の結果は 2 回の実験の平均値 \pm S D として表される。

【 0 0 6 2 】

M V を R N a s e と共にインキュベートした場合、M V により惹起される T E C に対するアポトーシス作用は著しく減少した。マトリゲルに播種された T E C の種々の量の M V とのインキュベーションは、T E C の毛細血管様構造をインビトロにて形成する能力を著しく阻害した。M V の R N a s e での前処理は、M V の細管形成に対する阻害作用を失効させた (図 5 B)。

20

【 0 0 6 3 】

1 . 5 M S C より由来の M V を用いるインビボ実験

【 0 0 6 4 】

腫瘍形成 3 \times 1 0 ⁶ 個の H e p G 2 細胞を集め、S C I D マウス (Charles River、Jackson Laboratories、Bar Harbor、ME) に皮下移植した。トリプシン - E D T A を用いて収獲した培養細胞を P B S で洗浄し、マイクロ血球計算器のチャンバーにて計数し、1 0 0 μ l の D M E M および 1 0 0 μ l のマトリゲルマトリックス (Becton Dickinson) に再び懸濁させた。細胞を氷冷させ、1 m l のシリンジを用いる 2 6 - ゲージ針を介して S C I D マウスの左背中に皮下注射した。動物を活動および健康状態について毎日モニター観察し、体重測定および腫瘍塊の測定を 3 日毎に行った。腫瘍塊は移植片の 2 つの直交する直径をキャリパー計測により測定し、式：1 / 2 a \times b ² (式中、a は長軸であり、b は短軸である) を用いて計算した (Hou J ら、Experimental therapy of hepatoma with artemisin and its derivatives : in vitro and in vivo activity、chemosensitization and mechanism of action. Clin Cancer Research. 2008;14 : 5519-5530)。1 週間後、移植された腫瘍が約 1 5 m m ³ の体積に達した時に、本願発明者らは、週に一度の M V の腫瘍内注射を開始した。最初の処理は 1 0 0 μ g の M V (R N a s e で処理された、またはされていない) で、最大容量が 2 0 μ l であり ; その後の腫瘍内注射は 5 0 μ g の M V (R N a s e で処理された、またはされていない) で、最大容量が 2 0 μ l であった。対照となるマウスには、発明者らは同じ容量のビヒクルを単独で腫瘍内注射した。マウスをランダムに 3 つの処理群 : a) M V を腫瘍内注射した群 (n = 8) ; b) R N a s e で処理された M V を腫瘍内注射した群 (n = 8) ; および c) 同じ容量のビヒクルを単独で注射した対照群 (n = 5) に分けた。マトリゲル注射から 3 週間後に、マウスを殺し、腫瘍を回収し、組織構造について加工処理した。

30

40

【 0 0 6 5 】

1 . 6 インビボ結果

【 0 0 6 6 】

1 . 6 . 1 B M - M S C から由来の M V の H e p g 2 腫瘍増殖に対するインビボでの生

50

物学的作用

【0067】

腫瘍形成および増殖がS C I DマウスにてB M - M S Cより由来のM Vにより阻害される。B M - M S Cより由来のM Vのインビボにおける腫瘍形成および増殖に対する効果を測定するために、S C I Dマウスに、マトリゲルの存在下にてH e p G 2を皮下注射した。注射した1週間後に、腫瘍の体積が約 15 mm^3 であったならば、発明者らは週に一度のM V (R N a s eで処理された、またはされていない)の腫瘍内注射を、 $20\text{ }\mu\text{l}$ の最大容量にて開始した。最初の処理は $100\text{ }\mu\text{g}$ のM Vであり；その後の腫瘍内注射は $50\text{ }\mu\text{g}$ のM Vであった。対照となるマウスには、発明者らは $20\text{ }\mu\text{l}$ のビヒクルを単独で腫瘍内注射した。

10

【0068】

マトリゲル注射から3週間経過した後、すべての腫瘍を回収し、分析した。H e p G 2異種移植片実験にて、M Vの腫瘍内注射は腫瘍増殖に対して阻害剤作用を示した(図8)。腫瘍の大きさおよび体積は、M Vで処理されたS C I Dマウスにて有意に小さく(図9 AおよびB)、組織学的分析はM Vで処理されたH e p G 2腫瘍にて壊死の部分を示した(図9 C)。R N a s eで前処理されたM Vを注射された腫瘍は、対照となる腫瘍と大きさおよび組織構造にて差異がなかった(図10 AおよびB)。

【0069】

2. 肝臓幹細胞から由来の微細小胞(M V)

【0070】

20

2. 1 成体ヒト肝臓幹細胞(H L S C)の単離および特徴付け

【0071】

H L S Cは、L - グルタミン(5 mM)、ヘペス(12 mM 、 $\text{pH } 7.4$)、ペニシリン(50 IU/ml)、ストレプトマイシン($50\text{ }\mu\text{g/ml}$) (すべて、Sigma、St. Louisより入手)、F C S (10%)を補足した、最小必須培地/内皮細胞基底培地 - 1 (- M E M / E B M) ($3:1$) (Gibco/Cambrex)にて培養された、Cambrex Bio Science Verviers S.p.r.l. (Verviers、Belgium)より入手の、低温保存された正常なヒト肝細胞より単離された。拡張した細胞をT - 75フラスコに移し、それらが集密に達した時に分析された。

【0072】

30

肝癌細胞株H e p G 2を 10% ウシ胎仔血清(F B S)含有のダルベッコ修飾イーグル培地(D M E M)で培養させた。

【0073】

2. 2 H L S Cから由来のM Vの単離

【0074】

M Vを 2% ウシ胎仔血清(F B S)補足のM E M - アルファにて培養されたH L S Cの上澄より得た。血清無しで一夜インキュベートされた細胞の生存能をトリパンブルーの排除により検出した。 2000 g で20分間遠心分離に付し、残骸を取り除いた後、無細胞上澄を 100000 g (Beckman Coulter Optima L-90K超遠心分離器)で4 で1時間遠心分離に付し、 25 mM のN - 2 - ヒドロキシエチルピペラジン - N' - 2 - エタンスルホン酸(H E P E S) (Sigma)含有の無血清培地199で洗浄し、同じ条件下で第2の超遠心分離に供した。インビトロおよびインビボにて、蛍光顕微鏡法またはF A C S分析によりM Vを追跡するのに、幹細胞由来のM Vが赤色蛍光脂肪族発色団を脂質二重層中に挿入するP K H 26色素(Sigma)で標識された。標識後、M Vを洗浄し、 100000 g で1時間4 で超遠心分離に供した。M Vベレットを培地199に懸濁させ、蛋白含量をブラッドフォード法(BioRad、Hercules、CA)により定量した。M Vの汚染エンドトキシンをリムルス試験により製造者の説明書(Charles River Laboratories、Inc.、Wilmington、MA)に従って排除し、M Vを -80 で貯蔵した。ヨウ化プロビジウムで染色した後のM V懸濁液上でなされた形態学的分析はアポトーシス体の存在を明らかにしなかった。

40

【0075】

50

選択された実験にて、H L S C からの M V は $1 \text{ U} / \text{m l}$ の R N a s e (Ambion Inc., Austin, TX) で 1 時間 37°C で処理され、 $10 \text{ U} / \text{m l}$ の R N a s e 阻害剤 (Ambion Inc.) を添加することで反応を停止させ、M V を超遠心分離で洗浄した。R N a s e 処理の効果を、T R I Z O L 試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて R N A 抽出を行った後に、抽出された全 R N A を分光光度計分析により評価した (未処理: $1.3 \pm 0.2 \mu\text{g R N A} / \text{mg}$ の蛋白 M V ; R N a s e 処理: $< 0.2 \mu\text{g R N A} / \text{mg}$ の蛋白 M V)。加えて、R N a s e 処理および処理されていない M V より抽出された R N A をオリゴ d T でなされるレトロトランスクリプションにより標識し、 0.6% アガロース上で分析し、R N a s e 処理による R N A の完全な分解を示した。対照として、M V を $1 \text{ U} / \text{m l}$ の D N a s e (Ambion Inc.) で 1 時間 37°C で処理した。

10

【0076】

2.3 H L S C より単離された M V を用いて実施されたインビトロ実験

【0077】

増殖アッセイ D N A 分析は、製造者の仕様説明書に従って酵素免疫吸着測定キット (Chemicon, Temecula, CA) を用いる 5 - ブロモ - 2 - デオキシウリジン (B r d U) の細胞 D N A への取り込みとして検出された。簡単には、洗浄した後、細胞を $10 \text{ モル} / \text{L}$ の B r d U と一緒に $6 \sim 10$ 時間、 37°C で、 $5\% \text{ CO}_2$ にて、加湿雰囲気下でインキュベートさせ、 $0.5 \text{ モル} / \text{L}$ のエタノール / H C l で固定し、ヌクレアーゼと一緒にインキュベートし、D N A を消化した。D N A 中に取り込まれた B r d U を、抗 B r d U ペルオキシダーゼ接合モノクローナル抗体を用いて検出し、可溶性発色基質で可視化した。光学密度を酵素免疫吸着測定リーダーを用いて 405 nm で測定した。

20

【0078】

アポトーシスアッセイ アポトーシスを末端 d U T P ニックエンド標識アッセイ (ApoTag; Oncor, Gaithersburg, MD) を用いて評価した。細胞 (8×10^3 / ウェル) を 96 ウェルプレートで培養し、リン酸緩衝セイライン (P B S) に懸濁させ、P B S 中の 1% パラホルムアルデヒド (p H 7.4) にて 15 分間、 4°C で、つづいて予め冷却したエタノール / 酢酸 ($2:1$) で 5 分間 - 20°C で固定させた。細胞を末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ酵素で処理し、加湿チャンバーにて 1 時間 37°C でインキュベートし、ついで加温したフルオレセインイソチオシアネート接合のアンチジゴキシゲニンで 30 分間室温で処理した。洗浄した後、試料を $1 \text{ g} / \text{m l}$ のヨウ化プロピジウム含有の培地に固定し、細胞を免疫蛍光により分析した。

30

【0079】

統計分析 種々の実験操作のデータはすべて平均 \pm S D として表される。統計分析は、必要に応じて、ニューマン - クールズの多重比較試験の A N O V A により実施された。

【0080】

2.4 インビトロ結果

【0081】

2.4.1 H L S C より由来の M V の H e p G 2 肝癌細胞株の増殖に対する効果

【0082】

本願発明者らは H L S C より由来の M V の H e p G 2 肝癌細胞株の増殖に対する効果を評価した。簡単には、H e p G 2 細胞を種々の量の (10 、 20 および $30 \mu\text{g} / \text{m l}$) の H L S C 由来の M V そのものと共にインキュベートするか、または R N a s e で 3 日間処理した。インキュベーションの終わりに、H e p G 2 培養物を計数するか、 0.5 M のエタノール / H C l に固定し、ヌクレアーゼと一緒にインキュベートし、その D N A を消化した。該 D N A に取り込まれた B r d U を抗 B r d U ペルオキシダーゼ接合モノクローナル抗体を用いて検出し、可溶性発色基質で可視化した。光学密度を E L I S A リーダーを用いて 405 nm で測定した。図 11 に示されるように、H L S C より由来の M V は H e p G 2 増殖を顕著に阻害しうる。このことはまた R N a s e 処理の M V にも適用する。

40

【0083】

2.4.2 H L S C より由来の M V の H e p G 2 肝癌細胞株のアポトーシスに対する

50

効果

【0084】

H L S C 誘導の M V の H e p G 2 のアポトーシス誘発能を評価した。簡単には、H e p G 2 を 8 0 0 0 細胞 / ウェルの密度で 9 6 - ウェルプレートに 1 0 % F C S を補足した D M E M に播種し、F C S の不在下で、癌の化学療法にて使用される 2 種の有糸分裂阻害剤である、ビンクリスチン (1 0 0 n g / m l) またはドキソルビシン (5 0 n g / m l) で処理することにより、あるいは M V 処理 (3 0 μ g / m l) で培養してアポトーシスを誘発した。対照として、M V をまた 1 U / m l の R N a s e 1 8 (Ambion、Austin、TX) で 3 7 ° C 1 時間処理し、癌細胞増殖の阻害への寄与が M V によって癌細胞にデリバリーされた m R N A の水平移動に依存するかどうかを評価した。アポトーシスを T U N E L アッセイ分析を用いて 2 4 および 7 2 時間で評価した。図 1 2 に示されるように、H L S C より由来の M V は、ビンクリスチンにより誘発されるアポトーシスと比べて、H e p G 2 のアポトーシスを誘発することが可能であった。反対に、R N a s e 処理はアポトーシスを誘発しなかった。加えて、H e p G 2 のビンクリスチン + M V - H L S C またはドキソルビシン + M V - H L S C での処理は図 1 3 に示されるように相加作用をもたらす。

10

【0085】

2 . 5 H L S C より単離される M V で行われるインビボ実験

【0086】

細胞培養 ヒト肝癌細胞 H e p G 2 を、1 0 % ウシ胎仔血清、1 0 0 μ g / m l のペニシリンおよび 1 0 0 μ g / m l のストレプトマイシンを補足した D E M E で培養し、5 % C O ₂、3 7 ° C の加湿雰囲気インキュベーター中に維持した。

20

【0087】

ヒト肝臓幹細胞 (H L S C) を、1 0 % ウシ胎仔血清、1 0 0 μ g / m l のペニシリンおよび 1 0 0 μ g / m l のストレプトマイシンを補足した、- M E M / E B M (3 : 1) にて培養した。E B M は h E G F (ヒト上皮成長因子)、ヒドロコルチゾン、G A (ゲンタマイシン)、B B E (ウシ脳抽出物) で復元された。

【0088】

微細小胞 (M V) の H L S C からの単離 M V を 2 % ウシ胎仔血清を補足した - M E M 培地にて培養した H L S C の上澄より得た。2 0 0 0 g で 2 0 分間遠心分離に付して残骸を除去した後、無細胞上澄を 1 0 0 0 0 0 g で 1 時間 4 ° C で遠心分離に付し、2 5 m M の N - 2 - ヒドロキシエチルピペラジン - N ' - 2 - エタンスルホン酸 (H E P E S) を含有する血清不含培地 1 9 9 で洗浄し、同じ条件下で第 2 の超遠心分離に供した。M V ペレットを 0 . 1 % の D M S O の培地 1 9 9 に懸濁させ、蛋白含量をブラッドフォード法を用いて定量した。

30

【0089】

実験の設計 雄の 4 ないし 5 月齢の S C I D を Charles River laboratories より得た。すべてのマウスを無菌状態の檻に入れ、1 週間保持して順応させた。0 日目に、マトリゲル基底膜マトリックスを含む血清不含 D M E M に再び懸濁させた 3 × 1 0 ⁶ の H e p G 2 腫瘍細胞を 1 : 1 の割合で 2 回注射して投与した。細胞懸濁液を合計 0 . 2 m l の容量で S C I D マウスの左鼠径部に注射した。すべてのマウスを無作為に 3 つの処理群：2 0 μ l の腫瘍内 (i . t .) M V 注射 (n = 3) ; 2 0 μ l の i . t . P B S 注射 (n = 2) および 2 0 μ l の i . t . M V - R N a s e 処理の注射 (n = 3) に分けた。7 日目に、腫瘍細胞移植後の処理を開始した。腫瘍は 7 日目より触診可能となり ; 0 . 1 % の D M S O を補足した M 1 9 9 に懸濁させた、5 0 または 1 0 0 μ g の M V を腫瘍移植の 7、1 2、1 4 および 1 8 日後に注射した。腫瘍の体積が約 1 5 m m ³ になった時に治療を開始した。動物を活性および健康状態について毎日モニター観察し、体重測定および腫瘍塊の測定を 3 日毎に行った。

40

【0090】

腫瘍をキャリパーで測定した。腫瘍塊を、キャリパーにより移植片の 2 つの直交する直径を測定し、式：1 / 2 a × b ² (式中、a は長軸であり、b は短軸である) を用い

50

て計算した。28日目に動物を殺し、さらなる分析のために腫瘍を集めた。

【0091】

形態学研究 腫瘍を10%緩衝化中性ホルマリンに固定し、慣用的に加工処理し、パラフィンに包埋し、5 μ mの薄片にし、顕微鏡試験のためにH&Eで染色した。増殖を検出するための免疫組織化学を抗PCNAモノクローナル抗体を用いて行った。切片を抗マウスHRP二次抗体で遮断して標識化した(1:300希釈)。一次抗体を省略したもの、または非免疫マウスIgGと置き換えられたものが、対照として使用された。アポトーシスをTUNELによりパラフィン包埋組織の切片にて評価した。10個の連続しない切片をアポトーシスの陽性腫瘍細胞について630の倍率で計数した。ヘキスト33258色素を核染色のために添加した。

10

【0092】

統計分析 種々の実験操作のデータはすべて平均 \pm SDとして表される。統計分析は、必要に応じて、ニューマン-クールズの多重比較試験のANOVAにより実施された。

【0093】

2.6 インビボ結果

【0094】

2.6.1 腫瘍の成長および増殖がSCIDマウスの肝癌異種移植片実験にてHLS Cから由来のMVによって阻害された

【0095】

HLS Cから由来のMVのインビボでの腫瘍増殖に対する効果を測定するために、SCIDマウスに、ヒト肝細胞癌の細胞株HepG2を皮下移植した。HepG2注射の1および2週間後で、腫瘍の体積が約15 mm³であった際に、マウスにMV(50または100 μ g)を最大20 μ lの容量で腫瘍内注射して処理した。対照となるマウスにおいては、腫瘍に20 μ lのビヒクルを単独で注射した。HepG2の注射から3および4週間後に、すべての腫瘍を回収し、分析した。この異種移植片実験にて、MVの腫瘍内注射(図14)は腫瘍成長に対して阻害剤の効果を示した。加えて、組織学的分析はMVで処理された腫瘍にて壊死の領域を示し(図15B)、抗増殖作用がPCNA染色を用いて観察された(図15B)。

20

【0096】

2.6.2 HLS Cより由来のMVによるSCIDマウスにおける肝癌異種移植片実験でのアポトーシスの誘発

30

【0097】

腫瘍内アポトーシスの効果を測定するために、MVで処理された腫瘍からのパラフィン切片をTUNELで分析した。MV処理はビヒクル単独で処理された腫瘍と比べて腫瘍を誘発した(図15A)。

【0098】

2.7 HLS Cから由来のMVの、MCF-7乳腺腺癌およびカポジ肉腫(KS)細胞に対するインビトロでの生物学的効果

【0099】

1.7.1 材料および方法

40

【0100】

細胞培養 ヒト非楕円形肝臓幹細胞(HLS C)を、10%ウシ胎仔血清、100 μ g/mlのペニシリンおよび100 μ g/mlのストレプトマイシンを補足した、-MEM/EBM(3:1)にて培養した。EBMはhEGF(ヒト上皮成長因子)、ヒドロコルチゾン、GA(ゲンタマイシン)、BBE(ウシ脳抽出物)で還元された。

【0101】

MCF-7乳腺腺癌細胞株をAmerican Type Culture Collection(Manassas, VA)より入手し、10%FCS、100 μ g/mlのペニシリンおよび100 μ g/mlのストレプトマイシンを補足した、DMEMにて培養し、インキュベーター中、5%CO₂の加湿

50

雰囲気下、37℃で維持した。

【0102】

カボジ肉腫細胞（KS細胞）の初代培養を、免疫抑制療法を受けている腎同種移植片を有する患者の皮膚病変から入手し、10% FCS、100 µg/mlのペニシリンおよび100 µg/mlのストレプトマイシンを補足した、RPMI 1640培地にて培養した。

【0103】

MVの単離 2%ウシ胎仔血清（FBS）を補足した、MEM-アルファにて18時間培養したHLS Cの上澄からMVを得た。選択された実験にて、MVをFBSの不在下で集めた。2%のFBSおよび血清無しで一夜インキュベートされた細胞の生存能をトリパンブルーの排除により検出した（90%より大きい、データは示さず）。2000 gで20分間遠心分離に付し、残骸を取り除いた後、無細胞の上澄を100000 g（Beckman Coulter Optima L-90K超遠心分離器）で1時間4℃で遠心分離に付し、25 mMのN-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸（HEPES）含有の無血清培地199で洗浄し、同じ条件下で第2の超遠心分離に供した。MV細胞を培地199に懸濁させ、蛋白含量をブラッドフォード法で測定した。MVを-80℃で貯蔵した。ヨウ化プロビジウムで染色した後のMV懸濁液上でなされた形態学的分析はアポトーシス体の存在を明らかにしなかった。

【0104】

RNase処理 選択された実験にて、HLS CからのMVを1 U/mlのRNaseで1時間37℃で処理した。10 U/mlのRNase阻害剤を添加することで反応を停止させ、MVを超遠心分離により洗浄した。

【0105】

細胞増殖 HLS Cから由来のMVが種々の腫瘍に対してその抗腫瘍活性を発揮するかどうかを調べるために、MCF-7乳腺腺癌細胞およびカボジ肉腫細胞から由来の細胞株を、各々、8000細胞/ウェルの密度で、種々の濃度のMV（2；10；15；および30 µg/mlおよび30 µg/mlのRNase処理のMV）を含む、96-ウェルプレートのDMEMおよびRPMIに播種した。DNA合成を、48時間培養した後の、5-プロモ-2'-デオキシ-ウリジン（BrdU）の細胞DNAへの取り込みとして検出した。次に、細胞を0.5 Mのエタノール/HClで固定し、ヌクレアーゼと一緒にインキュベートし、DNAを消化させた。該DNAに取り込まれたBrdUを、抗-BrdUペルオキシダーゼ接合mAbを用いて検出し、可溶性発色基質を用いて可視化した。光学密度は405 nmでELISAリーダーを用いて測定された。

【0106】

アポトーシスアッセイ MCF-7およびKS細胞を8000細胞/ウェルの密度で96-ウェルの10% FCSを含み、ドキソルビシン（100 ng/ml）または種々の濃度のMV（2；10；15および30 µg/mlおよび30 µg/mlのRNase処理されたMV）の存在する低グルコースのDMEMに播種した。アポトーシスをTUNELアッセイを用いて評価した。

【0107】

2/7/2 結果：HLS Cより由来のMVはMCF-7細胞およびKS細胞のインビトロでの増殖を阻害した

【0108】

MCF-7乳腺腺癌細胞およびカボジ肉腫細胞と、2、10、15および30 µg/mlのHLS C-6Bから由来のMV（図16および17）との48時間に及ぶインキュベーションは、ビヒクル単独でインキュベートされた対照細胞と比べて、細胞増殖を顕著に阻害する。これらの結果は組織固有の幹細胞の抗腫瘍作用が同じ組織から形成される腫瘍に対して特異的ではないことを示す。その上、MCF-7乳腺腺癌細胞およびカボジ肉腫細胞の48時間にわたる2、10、15および30 µg/mlの、HLS C-6B細胞から由来のMV（図18）が、ビヒクル単独でインキュベートされた対照となる細胞と比べ

て、アポトーシスを誘発し、その効果も化学療法薬であるドキソルビシンのアポトーシスの誘発と同じくらいである。このことはさらに、組織固有の幹細胞の抗腫瘍作用が同じ組織より生成される腫瘍に対して特異的でないことを確認するものである。

【図 1】

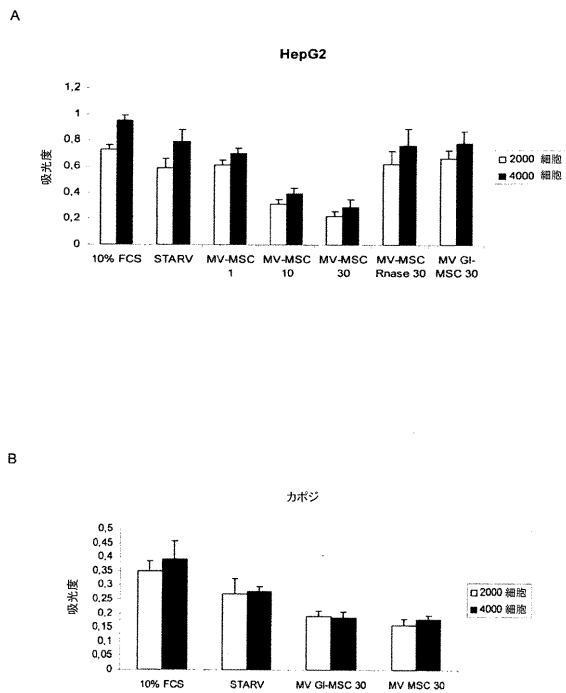


FIG. 1

【図 2】

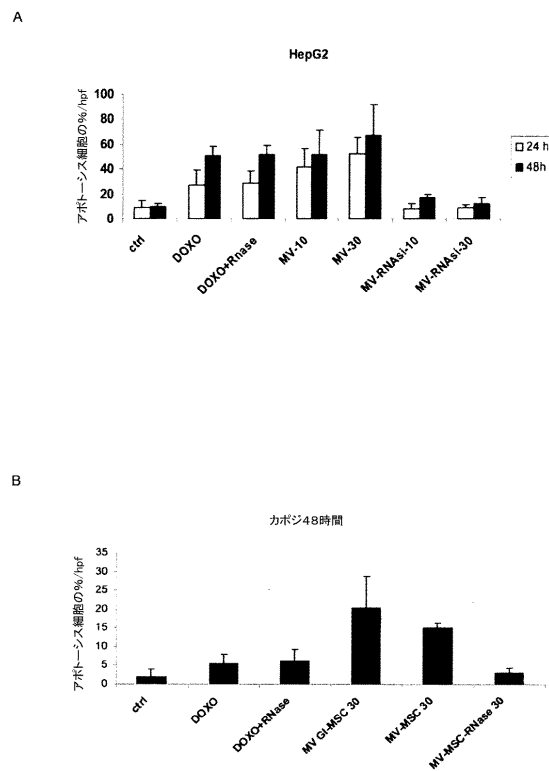
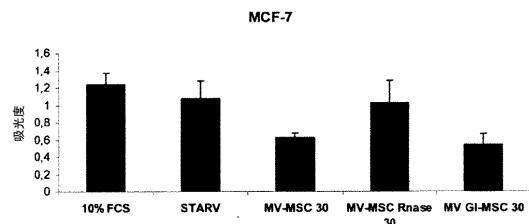


FIG. 2

【図3】

A



B

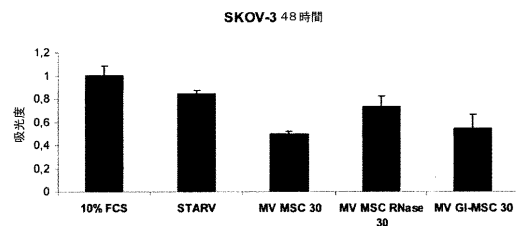


FIG. 3

【図4】

SKOV-3

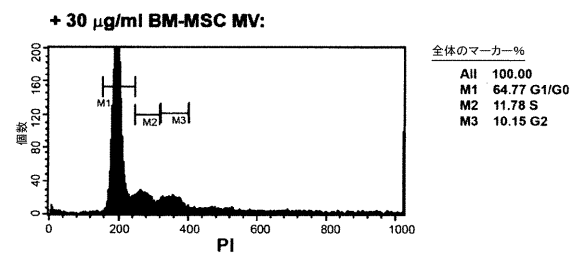
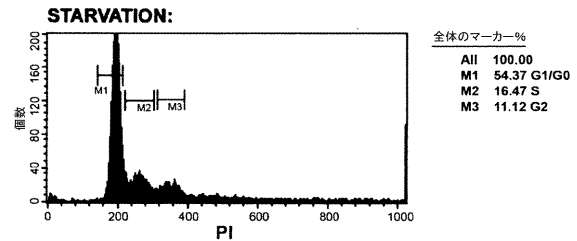
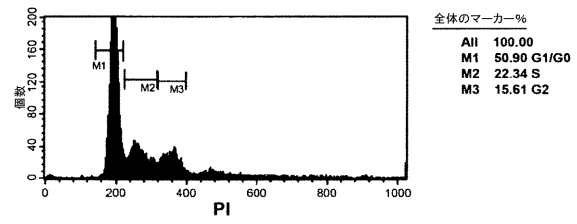
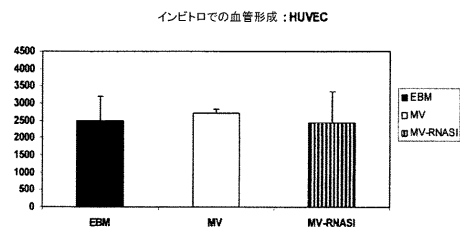


FIG. 4

【図5】

A



B

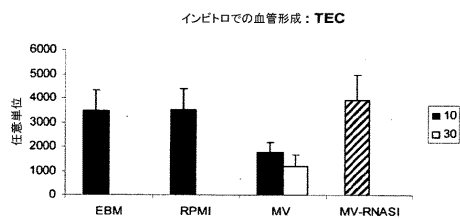


FIG. 5

【図6】

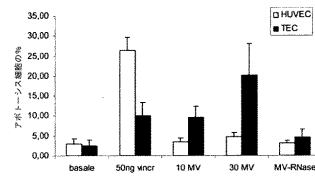


FIG. 6

【図7】

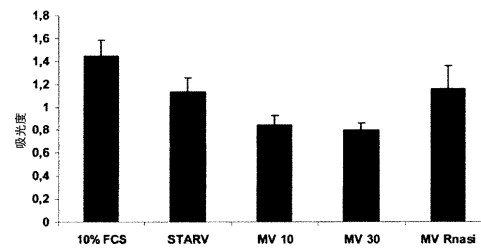


FIG. 7

【図8】

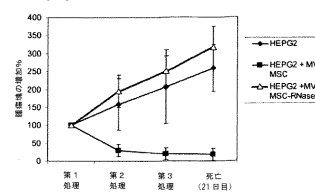


FIG. 8

【図 9】

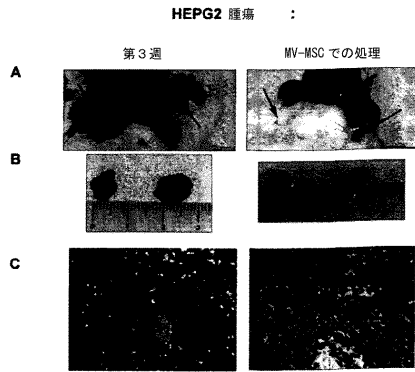


FIG. 9

【図 10】

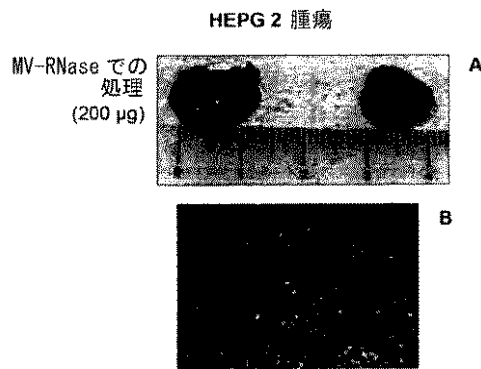


FIG. 10

【図 13】

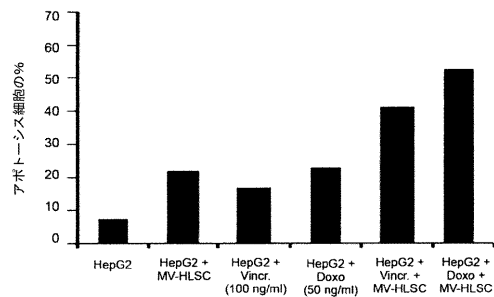


FIG. 13

【図 14】

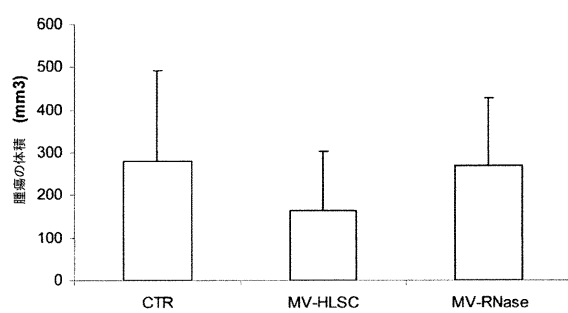


FIG. 14

【図 11】

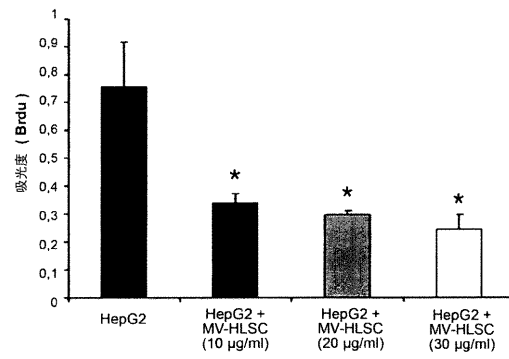


FIG. 11

【図 12】

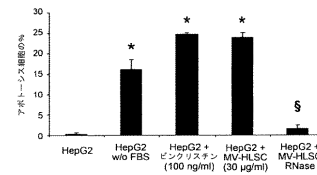


FIG. 12

【図 15】

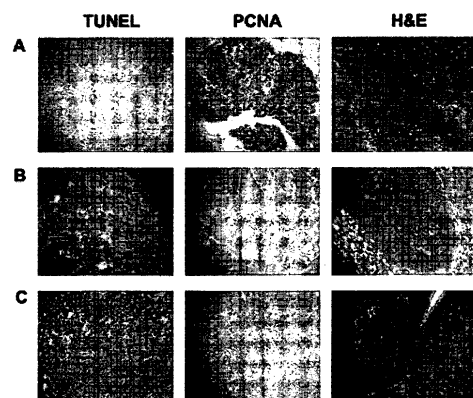


FIG. 15

【図 16】

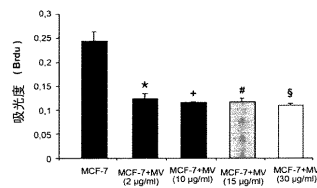


FIG. 16

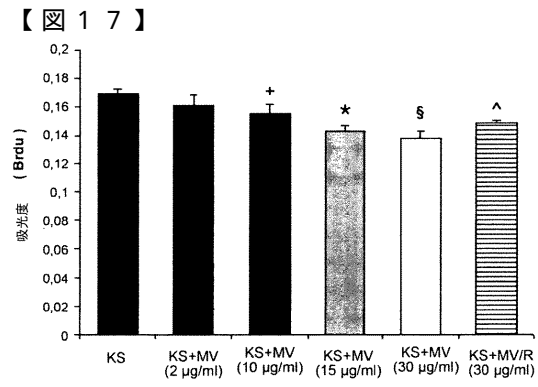


FIG. 17

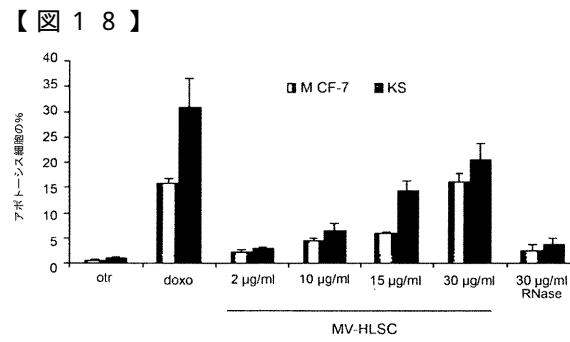


FIG. 18

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1

- (72)発明者 ステファニア・ブルーノ
イタリア、イ - 1 0 0 6 4 ピネローロ (トリノ)、ヴィア・トスカニーニ 9 4 番
- (72)発明者 マリア・ベアトリス・エレラ・サンチェス
イタリア、イ - 1 0 1 2 6 トリノ、ヴィア・ニッツァ 1 3 6 番
- (72)発明者 ヴァレンティーナ・フォンサト
イタリア、イ - 1 0 0 2 0 ペチェット・トリネーゼ (トリノ)、ストラダ・デ・マッティス 1 2 番
- (72)発明者 ジョヴァンニ・カムッシ
イタリア、イ - 1 0 1 3 2 トリノ、コルソ・カサーレ 2 8 4 / 7 番
- (72)発明者 チーロ・テッタ
イタリア、イ - 4 1 0 3 7 ミランドーラ (モデナ)、ヴィア・デイ・ミレ 2 3 番

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 9 / 0 8 7 3 6 1 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 0 9 / 1 0 5 0 4 4 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 0 9 / 0 5 0 7 4 2 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 0 9 / 0 5 7 1 6 5 (WO, A 1)
特表 2 0 0 8 - 5 0 1 3 3 6 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 2 8
A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S /
W P I D S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
P u b M e d