(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115361956 A
(43)申请公布日 2022.11.18

(21)申请号 202180010028.1
(22)申请日 2021.01.14
(30)优先权数据
2020-004765 2020.01.15 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.07.15
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2021/001131 2021.01.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/145395 JA 2021.07.22
(71)申请人 富士胶片株式会社
地址 日本东京
(72)发明人 山根昌之 石止贵将
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 王灵菇
(51)Int.Cl.
A61K 35/28(2015.01)
A61K 35/30(2015.01)
A61K 35/34(2015.01)
A61K 35/35(2015.01)
A61K 35/36(2015.01)
A61K 35/50(2015.01)
A61K 35/51(2015.01)
A61K 35/545(2015.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)
C12N 5/0775(2010.01)

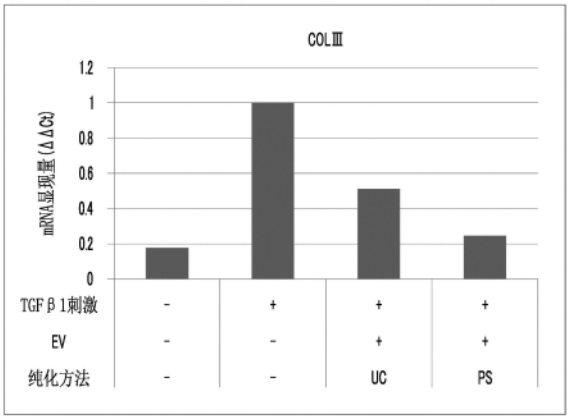
权利要求书1页 说明书18页
序列表2页 附图10页

(54)发明名称

抗纤维化剂及具有抗纤维化作用的细胞外囊泡的制造方法

(57)摘要

本发明的课题在于提供一种由治疗效果高的细胞外囊泡的群体构成的治疗用制剂、尤其抗纤维化剂。本发明涉及一种抗纤维化剂以及作为这种抗纤维化剂的细胞外囊泡的制造方法，所述抗纤维化剂将来源于间充质干细胞的细胞外囊泡作为有效成分，所述细胞外囊泡通过利用对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质的方法而获得，或/及所述细胞外囊泡来源于通过成纤维细胞生长因子施加了刺激的间充质干细胞。



CN 115361956 A

1.一种抗纤维化剂,将来源于间充质干细胞的细胞外囊泡作为有效成分,其中,

细胞外囊泡通过利用对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质的方法而获得。

2.根据权利要求1所述的抗纤维化剂,其中,

所述间充质干细胞为来源于iPS细胞的细胞、或者来源于选自由脐带、脐带血、骨髓、脂肪、肌肉、神经、皮肤、羊膜及胎盘组成的组中的1种以上的组织的细胞。

3.根据权利要求1所述的抗纤维化剂,其中,

所述细胞外囊泡通过利用对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质的方法而获得。

4.根据权利要求3所述的抗纤维化剂,其中,

对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质为Tim蛋白质。

5.根据权利要求4所述的抗纤维化剂,其中,

Tim蛋白质为选自Tim4蛋白质、Tim3蛋白质及Tim1蛋白质中的蛋白质。

6.一种具有抗纤维化作用的细胞外囊泡的制造方法,其包括:

通过使用对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质的方法从间充质干细胞来源的细胞外囊泡获得细胞外囊泡的工序。

7.根据权利要求6所述的细胞外囊泡的制造方法,其中,

对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质为Tim蛋白质。

8.根据权利要求7所述的细胞外囊泡的制造方法,其中,

Tim蛋白质为选自Tim4蛋白质、Tim3蛋白质及Tim1蛋白质中的蛋白质。

抗纤维化剂及具有抗纤维化作用的细胞外囊泡的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种使用了间充质干细胞来源细胞外囊泡的抗纤维化剂。

背景技术

[0002] 认为来源于细胞的作为由脂质二重膜构成的小型膜囊泡的细胞外囊泡(Extracellular vesicle)担负经由内含的mRNA或microRNA等核酸或者蛋白质的搬运进行的细胞间信息传递(非专利文献1)。

[0003] 并且,间充质干细胞(Mesenchymal stem cell,以下有时简称为“MSC”)为来源于中胚层组织的成体干细胞。MSC能够从脂肪、骨髓及脐带基质等中分离,但认为均具有粘接性、CD105、CD73、CD90阳性、CD45、CD34、CD14、CD11b、CD79a、CD19、HLA-Class II(DR)阴性、分化成骨、脂肪、软骨的能力等共同点。

[0004] 近年来,启示了细胞外囊泡与各种疾病有关的可能性。并且,报告有通过超离心法从来源于间充质干细胞的细胞外囊泡获取的细胞外囊泡具有抗纤维化作用(抗纤维化效果)(非专利文献2)。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:国际公开WO2016/088689

[0008] 非专利文献

[0009] 非专利文献1:Mathieu M,Martin-Jaular L,Lavieu G,Thery C(2019)Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication.Nat Cell Biol,21(1):9-17

[0010] 非专利文献2:Ferruson et al.(2018)The microRNA regulation landscape of MSC-developed exosomes:a systems view.Scientific Rep,8(1):1419

发明内容

[0011] 发明要解决的技术课题

[0012] 然而,本发明人对通过超离心法从来源于间充质干细胞的细胞外囊泡获取的细胞外囊泡的抗纤维化作用进行了验证的结果,得知该作用较弱,且不足以进行产业利用。鉴于所述情况,本发明的课题在于提供一种由治疗效果更高的细胞外囊泡的群体构成的治疗用制剂、尤其抗纤维化剂。

[0013] 用于解决技术课题的手段

[0014] 本发明人等为了解决上述课题,对通过各种细胞外囊泡的获取方法选择性回收的细胞外囊泡进行深入研究的结果,发现通过利用了对磷脂酰丝氨酸(PS)具有亲和性的物质的方法(PS亲和法)获取的具有PS阳性等特点的细胞外囊泡的群体或/及来源于通过成纤维细胞生长因子施加了刺激的间充质干细胞的细胞外囊泡的群体作为抗纤维化剂具有高效果,从而完成了本发明。

[0015] 即本发明中,其基本方式为如下:

[0016] (1)一种抗纤维化剂,将来源于间充质干细胞的细胞外囊泡作为有效成分,其中,细胞外囊泡通过利用对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质的方法而获得,或/及细胞外囊泡来源于通过成纤维细胞生长因子施加了刺激的间充质干细胞;

[0017] (2)根据上述(1)所述的抗纤维化剂,其中,所述间充质干细胞为来源于iPS细胞的细胞、或者来源于选自包含脐带、脐带血、骨髓、脂肪、肌肉、神经、皮肤、羊膜及胎盘的组中的1种以上的组织的细胞;

[0018] (3)根据上述(1)或(2)所述的抗纤维化剂,其中,所述间充质干细胞通过转化生长因子β施加了刺激;

[0019] (4)根据上述(3)所述的抗纤维化剂,其中,转化生长因子β为TGFβ1或TGFβ3;

[0020] (5)根据上述(1)～(4)中任一个所述的抗纤维化剂,其中,所述细胞外囊泡通过利用对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质的方法而获得;

[0021] (6)根据上述(5)所述的抗纤维化剂,对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质为Tim蛋白质;

[0022] (7)根据上述(6)所述的抗纤维化剂,其中,Tim蛋白质为选自Tim4蛋白质、Tim3蛋白质及Tim1蛋白质的蛋白质;

[0023] (8)根据上述(1)或(2)所述的抗纤维化剂,其中,所述细胞外囊泡来源于通过转化生长因子β施加了刺激的间充质干细胞,并且通过利用对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质的方法而获得。

[0024] 并且本发明也是作为这种抗纤维化剂的细胞外囊泡的制造方法,具体而言如下:

[0025] (9)一种具有抗纤维化作用的细胞外囊泡的制造方法,其包括:通过使用对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质的方法从间充质干细胞来源的细胞外囊泡获得细胞外囊泡的工序;或/及从通过转化生长因子β施加了刺激的间充质干细胞获得细胞外囊泡的工序;

[0026] (10)根据上述(9)所述的细胞外囊泡的制造方法,所述方法包括通过使用对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质的方法从间充质干细胞来源的细胞外囊泡获得细胞外囊泡的工序;

[0027] (11)根据上述(10)所述的细胞外囊泡的制造方法,其中,对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质为Tim蛋白质;

[0028] (12)根据上述(11)所述的细胞外囊泡的制造方法,其中,Tim蛋白质为选自Tim4蛋白质、Tim3蛋白质及Tim1蛋白质的蛋白质;

[0029] (13)根据上述(9)～(12)所述的细胞外囊泡的制造方法,所述方法包括从通过转化生长因子β施加了刺激的间充质干细胞获得细胞外囊泡的工序。

[0030] 发明效果

[0031] 根据本发明,提供一种将来自间充质干细胞的具有抗纤维化作用的细胞外囊泡作为有效成分的抗纤维化剂。关于本发明所提供的抗纤维化剂,由于具有作为组织的纤维化所涉及的因子例如纤维症相关基因的Collagen(胶原蛋白)III、Collagen(胶原蛋白)V、α-SMA胶原蛋白的产生调整作用,因此通过抑制活体组织或器官的纤维化的进行,能够实现陷入功能障碍或功能不全的活体组织及器官的功能再生。

附图说明

[0032] 图1是表示通过NTA法(纳米粒子追踪分析法)分析了通过PS亲和法及超离心分离法所获取的MSC来源细胞外囊泡的粒径分布的结果的图。

[0033] 图2是表示通过蛋白质印迹法检测了通过PS亲和法及超离心分离法所获取的MSC来源细胞外囊泡的CD9、CD63及CD81的结果的图。

[0034] 图3是表示定量PCR中所使用的引物的图。

[0035] 图4是表示以Collagen(胶原蛋白)III的mRNA显现量为指标评价了骨髓MSC来源细胞外囊泡的抗纤维化作用的结果的图。

[0036] 图5是表示以Collagen(胶原蛋白)V的mRNA显现量为指标评价了骨髓MSC来源细胞外囊泡的抗纤维化作用的结果的图。

[0037] 图6是表示以αSMA的mRNA显现量为指标评价了骨髓MSC来源细胞外囊泡的抗纤维化作用的结果的图。

[0038] 图7是表示以Collagen(胶原蛋白)III的mRNA显现量为指标评价了骨髓MSC来源细胞外囊泡的抗纤维化作用的结果的图。

[0039] 图8是表示以Collagen(胶原蛋白)V的mRNA显现量为指标评价了骨髓MSC来源细胞外囊泡的抗纤维化作用的结果的图。

[0040] 图9是表示以α-SMA的mRNA显现量为指标评价了骨髓MSC来源细胞外囊泡的抗纤维化作用的结果的图。

[0041] 图10是表示以Collagen(胶原蛋白)III的mRNA显现量为指标评价了脂肪MSC来源细胞外囊泡及脐带MSC来源细胞外囊泡的抗纤维化作用的结果的图。

[0042] 图11是表示以Collagen(胶原蛋白)V的mRNA显现量为指标评价了脂肪MSC来源细胞外囊泡及脐带MSC来源细胞外囊泡的抗纤维化作用的结果的图。

[0043] 图12是表示以αSMA的mRNA显现量为指标评价了脂肪MSC来源细胞外囊泡及脐带MSC来源细胞外囊泡的抗纤维化作用的结果的图。

具体实施方式

[0044] 如上所述,本发明的基本为将通过利用对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质的方法从来源于间充质干细胞的细胞外囊泡获得的细胞外囊泡或/及来源于通过转化生长因子β施加了刺激的间充质干细胞的细胞外囊泡作为有效成分的抗纤维化剂。

[0045] 细胞外囊泡(以下,有时简称为“EV”)为来源于细胞的由脂质二重膜构成的小型膜囊泡。该细胞外囊泡中,通常可举出具有20nm～1000nm的直径的细胞外囊泡,优选50nm～800nm,更优选50nm～500nm,尤其优选50nm～200nm。作为所述细胞外囊泡,例如,如Nature Reviews Immunology 9,581-593(August 2009)、“肥胖研究”Vol.13No.2 2007Topix青木直人等中所记载,可举出根据其发生起源或小型膜囊泡的大小等分类为各种各样。具体而言,可举出外泌体、微囊泡、核外粒体、膜粒子、外泌体样囊泡、凋亡小体、脂肪体等,优选外泌体及微囊泡,更优选外泌体。

[0046] 所述外泌体为来源于细胞的由脂质二重膜构成的小型膜囊泡,例如,可举出具有50nm～200nm的直径的外泌体,优选50nm～150nm,更优选50nm～100nm。另外,认为外泌体来源于晚期内体。

[0047] 所述微囊泡为来源于细胞的由脂质二重膜构成的小型膜囊泡，例如，可举出具有100nm～1000nm的直径的微囊泡，优选100nm～800nm，更优选100nm～500nm。另外，认为微囊泡来源于细胞膜。

[0048] MSC为具有分化成属于成骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞、软骨细胞等中胚层来源的组织(间充质)的细胞的能力的干细胞。MSC能够从脂肪、骨髓、脐带基质等分离，本发明中使用的MSC(以下，有时简称为“本发明所涉及的MSC”)例如通过从中胚层来源的组织分离的方法或从iPS细胞、ES细胞等干细胞诱导的方法来获得。作为本发明所涉及的MSC，优选使用来源于选自包含脐带、脐带血、骨髓、脂肪、肌肉、神经、皮肤、羊膜及胎盘的组中的1种以上的组织的细胞、来源于iPS细胞的细胞。本发明所涉及的MSC可以进行回收、浓缩、纯化、分离、基于缓冲液等的稀释、过滤灭菌等预处理。这些预处理按照常规方法适当地进行即可。并且，关于本发明所涉及的MSC，优选通过转化生长因子β施加刺激，更优选通过TGFβ1或TGFβ3施加刺激。

[0049] 本发明所提供的抗纤维化剂中的作为有效成分的细胞外囊泡(以下，有时简称为“本发明所涉及的细胞外囊泡”。)为使用对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质从来源于本发明所涉及的MSC的细胞外囊泡分离并获取的细胞外囊泡(以下，有时简称为“PS阳性细胞外囊泡”)或/及来源于通过转化生长因子β施加了刺激的本发明所涉及的MSC的细胞外囊泡(以下，有时简称为“刺激MSC来源细胞外囊泡”)。

[0050] PS阳性细胞外囊泡是被认为磷脂酰丝氨酸暴露在细胞外囊泡的膜表面的PS阳性(含有PS)的所述细胞外囊泡。

[0051] 作为对所述磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质(以下，有时简称为“PS亲和性物质”)，只要是能够与构成细胞外囊泡的膜的磷脂酰丝氨酸特异性键合的物质，则可以是任意物质，例如，可举出Annexin V;MFG-E8;Tim1(含T细胞免疫球蛋白·粘蛋白域分子1、T-cell immunoglobulin-mucin-domain 1)蛋白质、Tim2(含T细胞免疫球蛋白·粘蛋白域分子2、T-cell immunoglobulin-mucin-domain 2)蛋白质、Tim3(含T细胞免疫球蛋白·粘蛋白域分子3、T-cell immunoglobulin-mucin-domain 3)蛋白质、Tim4(含T细胞免疫球蛋白·粘蛋白域分子4、T-cell immunoglobulin-mucin-domain 4)蛋白质等Tim蛋白质，从能够有效地获取细胞外囊泡的观点出发，优选Tim蛋白质，更优选选自Tim4蛋白质、Tim3蛋白质及Tim1蛋白质的蛋白质，进一步优选Tim4蛋白质、Tim1蛋白质，尤其优选Tim4蛋白质。

[0052] PS阳性细胞外囊泡是通过使用对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质从包含EV的本发明所涉及的MSC的细胞培养上清液(以下，有时简称为“包含EV的细胞培养上清液”)分离，或者例如通过超离心法等本领域的常规方法从包含EV的本发明所涉及的MSC的细胞培养上清液获取EV之后，使用对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质从所获得的EV分离而获得的。其中，优选使用对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质从包含EV的本发明所涉及的MSC的细胞培养上清液直接分离。并且，所述包含EV的细胞培养上清液是例如通过细胞培养使本发明所涉及的MSC增殖，进一步通过EV产生培养基来培养增殖的细胞而获得的。本发明所涉及的MSC的细胞培养或基于EV生产培养基的培养按照本领域中进行的常规方法进行即可，所使用的培养基或培养条件并无特别限定。

[0053] 以下记载通过利用对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质的方法获取细胞外囊泡的方法(以下，有时简称为“PS亲和法”)的概要。并且，作为PS亲和法，例如在专利文献1中记载

有具体例。

[0054] PS亲和法是通过如下完成的，在钙离子的存在下，使所述包含EV的细胞培养上清液与PS亲和性物质接触，形成该细胞培养上清液中的细胞外囊泡与PS亲和性物质的复合体(以下，有时简称为“本发明所涉及的复合体”)之后，从该复合体分离PS亲和性物质，从而获取PS阳性细胞外囊泡。

[0055] PS亲和法的优选方法具体而言包括下述工序。

[0056] (1)在钙离子的存在下，使包含EV的细胞培养上清液与PS亲和性物质接触，从而形成该细胞培养上清液中的PS阳性细胞外囊泡与PS亲和性物质的复合体(本发明所涉及的复合体)的工序(以下，有时简称为“复合体形成工序”)；

[0057] (2)从所述包含EV的细胞培养上清液分离复合体形成工序中所获得的本发明所涉及的复合体的工序(以下，有时简称为“复合体分离工序”)；

[0058] (3)从本发明所涉及的复合体分离PS阳性细胞外囊泡，从而获取PS阳性细胞外囊泡的工序(以下，有时简称为“获取工序”)。

[0059] PS亲和法中的包含EV的细胞培养上清液、PS亲和性物质与所述的相同，优选的或具体例也相同。

[0060] 复合体形成工序中使用的PS亲和性物质优选为固定(键合)在不溶性载体的物质。在该情况下，本发明所涉及的复合体在复合体分离工序中，通过公知的B/F分离法，能够从所述包含EV的细胞培养上清液分离。

[0061] 以下对将PS亲和性物质固定在不溶性载体的方法的例子进行说明，但例如能够通过专利文献1中所记载的方法而获得。

[0062] 作为固定PS亲和性物质的不溶性载体，例如，可举出免疫学的测定法中使用的不溶性载体。具体而言，例如，可举出聚苯乙烯、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸缩水甘油酯、聚丙烯、聚烯烃、聚酰亚胺、聚氨酯、聚酯、聚氯乙烯、聚乙烯、聚氯碳酸酯、硅酮树脂、硅橡胶、琼脂糖、葡聚糖、乙烯-马来酸酐共聚物等有机物；玻璃、氧化硅、硅藻、多孔玻璃、磨砂玻璃、氧化铝、硅胶、金属氧化物等无机物质；铁、钴、镍、磁铁矿、铬铁矿等磁性体等；及将这些磁性体的合金作为材料制备的物质。并且，作为这些载体的使用形式，例如可举出粒子(珠子)、微板、管、盘状片等。所述不溶性载体的形式优选为粒子(珠子)，粒子的大小并无特别限定，但例如可举出10nm～100μm的粒子，优选100nm～10μm的粒子。

[0063] 作为PS亲和性物质与所述不溶性载体的键合方法，可举出使蛋白质与载体键合的自身公知的方法。例如，可举出通过亲和键合进行键合的方法、通过化学键合进行键合的方法(例如，日本专利公开3269554号公报、WO2012/039395公报中记载的方法)、通过物理吸附进行键合的方法(例如，日本专利公告平5-41946号公报中记载的方法)等，优选通过物理吸附进行键合的方法及通过亲和键合进行键合的方法，从简便的观点出发，更优选通过物理吸附进行键合的方法。

[0064] 作为通过物理吸附使PS亲和性物质与所述不溶性载体键合的方法，按照自身公知的方法，在PS亲和性物质与所述不溶性载体键合的条件下，使PS亲和性物质与所述不溶性载体接触即可。

[0065] 关于与所述不溶性载体键合的PS亲和性物质的量，例如不溶性载体为粒子(珠子)

的情况下，相对于不溶性载体1mg，例如为0.1μg～50μg即可，优选0.1μg～30μg，更优选0.1μg～20μg。

[0066] 关于PS亲和性物质与所述不溶性载体的物理吸附，例如通过使含有PS亲和性物质的溶液与所述不溶性载体接触来进行即可。

[0067] 含有PS亲和性物质的溶液中，作为使PS亲和性物质溶解的溶液，只要是使PS亲和性物质在稳定的状态下溶解的溶液即可，例如可举出纯净水，例如在pH6.0～9.8、优选在7.0～9.6下具有缓冲作用的缓冲液(例如MOPS等Good's缓冲液、碳酸缓冲液、PBS、TBS、TBS-T、HBS等)。并且，作为这些缓冲液中的缓冲剂浓度，通常从5～100mM，优选从10～100mM的范围适当地进行选择即可。关于含有NaCl时的浓度，例如可举出100～200mM，优选140～160mM。并且，含有PS亲和性物质的溶液中，只要是不妨碍PS亲和性物质与所述不溶性载体的键合的量，则例如可以包含糖类、NaCl等盐类、Tween™20等表面活性剂、防腐剂、蛋白质等。

[0068] 作为通过物理吸附使PS亲和性物质与所述不溶性载体键合的方法的具体例，例如可举出以下方法。例如，使珠子(粒子)载体1mg与含有所述PS亲和性物质的溶液接触，所述PS亲和性物质含有0.1μg～50μg，优选含有0.1μg～30μg，更优选含有0.1μg～20μg，在2℃～37℃下，优选在4℃～11℃下反应0.5～48小时，优选0.5～24小时。

[0069] 如上所述获得的固定有PS亲和性物质的不溶性载体可以附于通常本领域中进行的封闭处理。

[0070] 复合体形成工序在钙离子的存在下进行。钙离子在使PS亲和性物质与所述包含EV的细胞培养上清液中的PS阳性细胞外囊泡接触时存在。使PS亲和性物质与所述包含EV的细胞培养上清液中的PS阳性细胞外囊泡接触时的钙离子浓度通常为0.5mM～100mM，优选为1.0mM～10mM，更优选为2.0mM～5.0mM。直到形成PS亲和性物质与所述包含EV的细胞培养上清液中的PS阳性细胞外囊泡的本发明所涉及的复合体，并实施复合体分离工序为止，即直到附于分离本发明所涉及的复合体的工序为止，含有本发明所涉及的复合体的溶液中，需要如上所述的浓度的钙离子。

[0071] 钙离子的来源并无特别限定，例如可举出氯化钙、氢氧化钙、碳酸氢钙、碘化钙、溴化钙、乙酸钙等，优选氯化钙、碳酸氢钙、碘化钙，更优选氯化钙、碳酸氢钙。

[0072] 作为使PS亲和性物质与所述包含EV的细胞培养上清液中的PS阳性细胞外囊泡接触时使钙离子存在的方法，以使PS亲和性物质与所述包含EV的细胞培养上清液中的PS阳性细胞外囊泡接触时的钙离子浓度成为上述范围的方式，使所述包含EV的细胞培养上清液、或/及含有PS亲和性物质的溶液中含有如上所述的钙离子即可。并且，也可以使含有使PS亲和性物质与所述包含EV的细胞培养上清液中的PS阳性细胞外囊泡接触时的钙离子浓度成为上述范围的量的钙离子的溶液(以下，有时简称为“本发明所涉及的含钙离子溶液”。)、所述包含EV的细胞培养上清液及含有PS亲和性物质的溶液混合。

[0073] 本发明所涉及的含钙离子溶液中，作为使钙离子溶解的溶液，只要是不妨碍PS阳性细胞外囊泡与PS亲和性物质的键合的溶液即可，例如可举出水、在pH7.0～pH8.0下具有缓冲作用的缓冲液，优选在pH7.2～pH7.6下具有缓冲作用的缓冲液(例如TBS、HBS等)等。另外，由于磷酸缓冲液与钙键合而产生沉淀，因此不优选。并且，作为这些缓冲液中的缓冲剂浓度，通常从5mM～50mM，优选从10mM～30mM的范围适当地进行选择。关于含有NaCl时的浓

度,通常从100mM～200mM,优选从140mM～160mM的范围适当地进行选择。

[0074] 在本发明所涉及的含钙离子溶液中,只要是不妨碍PS阳性细胞外囊泡与PS亲和性物质的键合的量,则例如可以包含糖类、NaCl等盐类、表面活性剂、防腐剂、BSA等蛋白质等。作为表面活性剂,例如可举出Tween™ 20等,该本发明所涉及的含钙离子溶液中的表面活性剂的浓度通常为0.00001%～0.2%,优选通常为0.0005%～0.1%。

[0075] 在复合体形成工序中,与PS亲和性物质(可以固定在所述不溶性载体)1μg接触的所述包含EV的细胞培养上清液的量通常为0.1ml～100ml,优选为0.1ml～10ml,更优选为0.1ml～1.0ml。使所述包含EV的细胞培养上清液与PS亲和性物质接触时的温度通常为2～37℃,优选为4～37℃,更优选为4～30℃。所述包含EV的细胞培养上清液与PS亲和性物质的接触时间通常为0.5～24小时,优选为0.5～8小时,更优选为0.5～4小时。

[0076] 在复合体形成工序中,作为使用固定有PS亲和性物质的不溶性载体时的该载体的量,形成本发明所涉及的复合体时的溶液每1mL中,通常为0.1mg～20mg,优选为0.3mg～10mg,更优选为0.5mg～6.0mg。

[0077] 复合体形成工序例如用以下方法进行即可。即,使不溶性载体(即,混合所述包含EV的细胞培养上清液、固定有PS亲和性物质的不溶性载体及本发明所涉及的含钙离子溶液后的溶液每1mL中通常成为0.1mg～20mg、优选成为0.3mg～10mg、更优选成为0.5mg～6.0mg的量的固定有PS亲和性物质的不溶性载体)、本发明所涉及的含钙离子溶液(即,混合所述包含EV的细胞培养上清液、该载体及本发明所涉及的含钙离子溶液后的溶液中的钙离子浓度通常成为0.5mM～100mM、优选成为1.0mM～10mM、更优选成为2.0mM～5.0mM的量的本发明所涉及的含钙离子溶液)、以及所述包含EV的细胞培养上清液(即,固定有PS亲和性物质的不溶性载体每1mg中通常为0.1ml～100ml、优选为0.1ml～10ml、更优选为0.1ml～1.0ml的所述包含EV的细胞培养上清液),通常在4.0～37℃下,优选在4.0～25℃下,更优选在4.0℃～11℃下,接触通常0.5～24小时,优选0.5～8.0小时,更优选0.5～4.0小时,从而形成键合在载体的PS亲和性物质与所述包含EV的细胞培养上清液中的PS阳性细胞外囊泡的复合体(本发明所涉及的复合体)。

[0078] 关于复合体分离工序,只要能够分离本发明所涉及的复合体和所述包含EV的细胞培养上清液而获取本发明所涉及的复合体,则可以是任何方法,但例如可举出如下方法。

[0079] (1)固定有PS亲和性物质的不溶性载体中该载体为磁载体的情况:将包含通过复合体形成工序获得的本发明所涉及的复合体的容器,根据需要设置在磁铁架,使用磁力使本发明所涉及的复合体聚集在管壁上,并通过去除上清液将它们分离的方法。(2)固定有PS亲和性物质的不溶性载体中该载体为珠子状的情况:对包含通过复合体形成工序获得的本发明所涉及的复合体的容器进行离心分离处理,使本发明所涉及的复合体作为沉淀聚集之后,通过去除上清液将它们分离的方法。(3)通过过滤分离本发明所涉及的复合体和所述包含EV的细胞培养上清液的方法。

[0080] 作为复合体分离工序的具体例,例如可举出以下方法。

[0081] 在将磁载体用作不溶性载体的情况下,将进行了复合体形成工序的容器根据需要设置在磁铁架,使用磁力使获得的本发明所涉及的复合体聚集在管壁上,并去除上清液的试样。

[0082] 在复合体分离工序之后,根据需要,可以使用含钙离子清洗溶液来清洗所获得的

本发明所涉及的复合体(以下,有时简称为“清洗操作”)。通过清洗操作,能够去除附着在固定有PS亲和性物质的不溶性载体表面的细胞来源成分等活体试样中的掺杂物。作为清洗方法,除了使用含钙离子清洗溶液以外,能够使用本领域中通常进行的清洗方法。

[0083] 作为该清洗操作中使用的含钙离子清洗溶液,只要是含有通常为0.5～100mM,优选为1～10mM,更优选为2mM～5mM的钙离子且不影响PS阳性细胞外囊泡与固定在不溶性载体的PS亲和性物质的键合的溶液,则可以是任何溶液,例如,可举出含有通常为0.5mM～100mM,优选通常为1mM～10mM,更优选通常为2mM～5mM的钙离子,并且在pH7.0～pH8.0下,优选在pH7.2～pH7.6下具有缓冲作用的不使钙沉淀的缓冲液(例如TBS、TBS-T、HBS)。另外,由于磷酸缓冲液与钙键合而产生沉淀,因此不优选。并且,作为这些缓冲液中的缓冲剂浓度,通常从5mM～50mM,优选从10mM～30mM的范围适当地进行选择,关于含有NaCl时的浓度,通常从100mM～200mM,优选从140mM～160mM的范围适当地进行选择。在该溶液中,只要是不妨碍PS阳性细胞外囊泡与固定在不溶性载体的PS亲和性物质的键合的量,则例如可以包含糖类、NaCl等盐类、表面活性剂、防腐剂、蛋白质等。作为表面活性剂,例如可举出Tween™ 20(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)等,该清洗溶液中的表面活性剂的浓度通常为0.00001%～0.2%,优选通常为0.0005%～0.1%。

[0084] 以使用磁性粒子作为固定PS亲和性物质的不溶性载体的清洗操作为例,对清洗操作的具体例进行说明。即,在包含通过复合体分离工序获得的本发明所涉及的复合体的容器内加入本发明所涉及的含钙离子清洗溶液,并进行搅拌。之后,将所述容器设置在磁铁架,使用磁力使本发明所涉及的复合体聚集在管壁上,并扔掉所述容器内的溶液。这些清洗操作可以根据需要重复进行多次。

[0085] 关于获取工序,只要是能够从本发明所涉及的复合体获取PS阳性细胞外囊泡的方法,则可以是任何方法,优选降低钙离子浓度的方法。作为降低钙离子浓度的方法,例如可举出使用钙离子螯合剂的方法。即,复合体分离工序之后,根据需要进行清洗操作之后,使钙离子螯合剂作用于反应体系中的钙离子(与本发明所涉及的复合体键合的钙离子及从含有本发明所涉及的复合体的溶液带入的钙离子)而使钙离子螯合,并降低反应体系中的钙离子的有效浓度,由此使PS阳性细胞外囊泡从本发明所涉及的复合体分离即可。

[0086] 作为该方法中使用的钙离子螯合剂,只要是能够螯合钙离子的化合物,则可以是任何化合物,例如,可举出EDTA(乙二胺四乙酸)、NTA(次氮基三乙酸)、DTPA(二乙烯三胺五乙酸)、GLDA(L-谷氨酸二乙酸)、HEDTA(羟乙基乙二胺三乙酸)、GEDTA(乙二醇双(β-氨基乙基醚)-N,N,N,N,-四乙酸)、TTHA(三乙烯四胺-N,N,N',N",N"',N"'-六乙酸)、HIDA(2-羟乙基亚氨基二乙酸)、DHEG(N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸)、CyDTA(trans-1z,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid,monohydrate:反式-1z,2-环己二氨-N,N,N',N'-四乙酸,水合物)等,优选EDTA、GEDTA、CyDTA。

[0087] 所述钙离子螯合剂通常作为溶液而使用。作为使所述钙离子螯合剂溶解的溶液,只要是使所述钙离子螯合剂溶解的溶液即可,例如,可举出纯净水、缓冲液等。作为缓冲液,优选通常在pH7.0～pH8.0下,优选在pH7.2～pH7.6下具有缓冲作用的缓冲液(例如PBS、TBS、HBS等)。并且,作为这些缓冲液中的缓冲剂浓度,通常从5Mm～50Mm,优选从10Mm～30Mm的范围适当地进行选择,关于含有NaCl时的浓度,通常从100Mm～200Mm,优选从140Mm～160Mm的范围适当地进行选择。含有钙离子螯合剂的溶液(以下,有时简称为“含钙离子螯合

剂溶液”)例如可以包含糖类、NaCl等盐类、防腐剂、蛋白质等。

[0088] 作为所述含钙离子螯合剂溶液中的所述钙离子螯合剂的浓度,通常为0.5mM～500mM,优选为0.5mM～100mM,更优选为0.5mM～50mM。并且,含钙离子螯合剂溶液的pH通常为pH6.0～pH9.0,优选为pH7.0～pH8.0,更优选为pH7.2～pH7.6。

[0089] 使钙离子螯合剂作用于与本发明所涉及的复合体键合的钙离子时,通过使所述含钙离子螯合剂溶液与(例如颗粒状的)本发明所涉及的复合体接触,并使与本发明所涉及的复合体键合的钙离子与含钙离子螯合剂溶液中的钙离子螯合剂反应来进行。

[0090] 含钙离子螯合剂溶液与本发明所涉及的复合体的接触能够通过例如使本发明所涉及的复合体悬浮于含钙离子螯合剂溶液的方法(固定有PS亲和性物质的不溶性载体中不溶性载体为珠子的情况等)、使本发明所涉及的复合体浸渍于含钙离子螯合剂溶液的方法(固定有PS亲和性物质的不溶性载体中不溶性载体为盘状片、管的情况等)等来进行。

[0091] 作为与本发明所涉及的复合体接触的含钙离子螯合剂溶液的量,与本发明所涉及的复合体接触后的溶液中的钙离子的浓度小于有效浓度,只要是从本发明所涉及的复合体分离出细胞外囊泡的量即可。

[0092] 作为使钙离子螯合剂作用(接触)于本发明所涉及的复合体的温度或时间,通常为4.0℃～37℃,优选为10℃～30℃,更优选为20℃～30℃,通常为1～10分钟,优选为5～15分钟。

[0093] 若以使用使Tim蛋白质键合于不溶性载体而成的载体(Tim载体)的方法为例对获取工序进行说明,则如下。

[0094] 即,复合体分离工序之后,根据需要进一步进行清洗操作之后,将含有通常为0.5mM～500mM、优选为0.5mM～100mM、更优选为0.5mM～50mM的钙离子螯合剂的溶液以每1mg的Tim载体中通常为10μL～500μL,优选为20μL～200μLμL,更优选为50μL～100μLμL的量添加到所获得的本发明所涉及的复合体中,通常在4.0℃～37℃下,优选在10℃～30℃下,更优选在20℃～30℃下通常使其反应1～30分钟,优选5～15分钟,从而使PS阳性细胞外囊泡从本发明所涉及的复合体分离。

[0095] 通过实施获取工序,与本发明所涉及的复合体接触的含钙离子螯合剂溶液含有固定有PS亲和性物质的不溶性载体及从本发明所涉及的复合体分离(游离)出的细胞外囊泡。因此,若从该溶液去除固定有PS亲和性物质的载体,仅回收溶液,则能够获得含有PS阳性细胞外囊泡的溶液。

[0096] 刺激MSC来源细胞外囊泡通过从通过转化生长因子β施加了刺激的包含EV的本发明所涉及的MSC的细胞培养上清液(即,通过转化生长因子β施加了刺激的包含所述EV的细胞培养上清液)中分离而获得。

[0097] 刺激MSC来源细胞外囊泡的获取方法只要是从试样分离EV时进行的常规方法,则可以是任何方法,例如可举出亲和法(例如PS亲和法)、分级离心分离法(例如颗粒沉降法、蔗糖垫法、密度梯度离心法等超离心法)、免疫沉淀法、色谱法(例如离子交换色谱法、凝胶渗透色谱法)、密度梯度法(例如蔗糖密度梯度法)、电泳法(例如细胞器电泳法)、磁分离法(例如磁激活细胞分选(MACS)法)、超滤浓缩法(例如纳米膜超滤浓缩法)、Percoll梯度分离法、利用了微流体器件的方法、PEG沉淀法等,优选获得高纯化度的细胞外膜囊泡的亲和法或理论上能够无偏离地回收的分级离心分离法,更优选亲和法或超离心法,尤其优选亲和

法。亲和法之中，优选PS亲和法。亲和法及分级离心分离法例如按照日本特开2016-088689中记载的方法进行即可。这些分离方法可以仅使用1种，也可以组合2种以上。并且，可以重复2次以上基于1种分离方法的分离。

[0098] 通过所述转化生长因子β施加了刺激的包含EV的本发明所涉及的MSC的细胞培养上清液例如通过细胞培养使通过转化生长因子β施加了刺激的本发明所涉及的MSC增殖，进一步通过EV产生培养基来培养增殖的细胞而获得。

[0099] 作为该转化生长因子，并无特别限定，优选TGFβ1、TGFβ3。基于转化生长因子β的对本发明所涉及的MSC的刺激通过在转化生长因子β的共存下培养本发明所涉及的MSC来进行即可。

[0100] 本发明所涉及的MSC的细胞培养或基于EV生产培养基的培养按照本领域中进行的常规方法进行即可，所使用的培养基或培养条件并无特别限定。

[0101] 本发明所涉及的细胞外囊泡优选PS阳性细胞外囊泡，更优选来源于通过转化生长因子β施加了刺激的本发明所涉及的MSC，并且通过利用对磷脂酰丝氨酸具有亲和性的物质的方法(PS亲和法)获得的细胞外囊泡，进一步优选来源于通过转化生长因子β施加了刺激的本发明所涉及的MSC，并且通过使用了Tim蛋白质的PS亲和法获得的细胞外囊泡，尤其优选来源于通过TGFβ1或TGFβ3施加了刺激的本发明所涉及的MSC，并且通过使用了Tim4蛋白质、Tim3蛋白质或Tim1蛋白质的PS亲和法获得的细胞外囊泡，最优选来源于通过TGFβ1或TGFβ3施加了刺激的本发明所涉及的MSC，并且通过使用了Tim4蛋白质的PS亲和法获得的细胞外囊泡。

[0102] 如此制备的本发明所涉及的细胞外囊泡具有作为组织的纤维化所涉及的因子例如纤维症相关基因的Collagen(胶原蛋白)III、Collagen(胶原蛋白)V、α-SMA胶原蛋白的产生调整作用。因此，本发明所提供的抗纤维化剂是基于由作为有效成分的本发明所涉及的细胞外囊泡引起的作为纤维症相关基因的例如Collagen(胶原蛋白)III、Collagen(胶原蛋白)V、α-SMA胶原蛋白的产生调整作用，通过抑制活体组织或器官的纤维化的进行，能够实现陷入功能障碍或功能不全的活体组织及器官的功能再生。

[0103] 本发明所提供的抗纤维化剂能够成为对可产生纤维化的疾病例如肺纤维化症、特发性肺纤维化症、腹膜后纤维化症、骨髓纤维化症、类风湿性关节炎、肝纤维化症、肝硬化、肾脏纤维症(肾纤维化)、肾小管间质性肾炎、慢性胰腺炎、硬化性胃癌、胰腺囊性纤维症、心肌纤维化、心内膜纤维症、尿道结核或间质性膀胱炎、放射性膀胱炎等膀胱炎、手术后的疤痕、烧伤性疤痕、瘢痕疙瘩、肥厚性疤痕、硬皮病、子宫肌瘤、前列腺肥大症、阿尔茨海默病、硬化性腹膜炎、I型糖尿病、手术后器官粘连等有效的治疗药。

[0104] 本发明所提供的抗纤维化剂是基本上将从MSC来源的细胞外囊泡分离而获得的本发明所涉及的细胞外囊泡作为有效成分，关于其给药剂型，将含有本发明所涉及的细胞外囊泡的溶液直接或者根据需要与药学上允许的载体、添加剂一起作为溶液剂、悬浮剂、脂化剂等进行制剂化，或者进一步通过冷冻干燥制成粉末物，并与药学上允许的添加剂一起作为片剂等固形剂进行制剂化。

[0105] 作为制剂化中使用的药学上允许的载体或添加物，例如能够举出等渗剂、增稠剂、糖类、糖醇类、防腐剂(保存剂)、杀菌剂或抗菌剂、pH调节剂、稳定化剂、螯合剂、油性基剂、凝胶基剂、表面活性剂、悬浮剂、粘结剂、赋形剂、润滑剂、崩解剂、发泡剂、流化剂、分散剂、

乳化剂、缓冲剂、助溶剂、抗氧化剂、甜味剂、酸味剂、着色剂、呈味剂、香料或清凉剂等，但并不限定于这些。

[0106] 另外，若例示代表性的载体、添加物等，则例如能够举出以下例子。作为载体，例如能够举出水、含水乙醇等水性载体。作为等渗剂，例如能够举出氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁等无机盐。作为多元醇，例如能够举出甘油、丙二醇、聚乙二醇等。作为增稠剂，例如能够举出羧乙烯基聚合物、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、藻酸、聚乙烯醇(完全或部分皂化物)、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇等。

[0107] 作为糖类，例如能够举出环糊精、葡萄糖、果糖、乳糖等。作为糖醇类，例如能够举出木糖醇、山梨糖醇、甘露糖醇等糖醇。作为防腐剂、杀菌剂或抗菌剂，例如能够举出二丁基羟基甲苯、苯扎氯铵、苄索氯铵、葡萄糖酸氯己定、脱氢乙酸钠、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁糖酯。作为pH调节剂，例如能够举出盐酸、硼酸、氨基乙磺酸、柠檬酸、乙酸、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化镁、碳酸氢钠、碳酸钠、硼砂、三乙醇胺、单乙醇胺、二异丙醇胺、硫酸、硫酸镁、磷酸、聚磷酸、丙酸、草酸、葡萄糖酸、富马酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等。

[0108] 作为稳定化剂，例如能够举出二丁基羟基甲苯、氨丁三醇、甲醛次硫酸氢钠(Rongalit)、生育酚、焦亚硫酸钠、单乙醇胺、单硬脂酸铝、单硬脂酸甘油酯、亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等。并且，作为基剂，例如能够举出橄榄油、玉米油、大豆油、芝麻油、棉籽油等植物油；中链脂肪酸甘油三脂等油性基剂；聚乙二醇400等水性基剂；羧乙烯基聚合物、胶质等凝胶基剂。作为表面活性剂，例如可举出聚山梨酯80、氢化蓖麻油、甘油脂肪酸酯、脱水山梨醇倍半油酸酯等，作为悬浮剂，例如能够举出白蜂蜡或各种表面活性剂、阿拉伯胶、阿拉伯胶粉、黄原胶、大豆卵磷脂等。

[0109] 而且，作为粘结剂，例如能够举出羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇等，并且，作为赋形剂，例如能够举出蔗糖、乳糖、淀粉、玉米淀粉、结晶纤维素、轻质无水硅酸等，作为润滑剂，例如可举出蔗糖脂肪酸酯、硬脂酸镁、滑石等，作为崩解剂，例如可举出低取代度羟丙基纤维素、交联聚维酮、交联羧甲基纤维素钠等，作为流化剂，例如能够举出偏硅酸铝酸钠、轻质无水硅酸等。

[0110] 本发明所提供的抗纤维化剂中，优选作为溶液剂、悬浮剂或脂化剂进行制剂化为较佳，基本上，将包含从MSC来源的细胞外囊泡分离而获得的本发明所涉及的细胞外囊泡的溶液，根据需要与上述的载体、添加剂一起，例如通过生理盐水、5％葡萄糖溶液、脂乳剂等进行混合而获得。另外，也能够使用冷冻干燥粉末制成使用时溶解或悬浮型的制剂。

[0111] 在本发明所提供的抗纤维化剂为溶液剂、悬浮剂或脂化剂的情况下，其pH只要在医药上、药理学上或生理学上允许的范围内，则并无特别限定，但例如可举出pH2.5～9.0、优选3.0～8.5、进一步优选3.5～8.0的范围，能够通过pH调整剂适当地进行调整。

[0112] 本发明所提供的抗纤维化剂的给药途径根据剂型，可举出口服给药、皮下给药、肌肉内给药、静脉内给药、动脉内给药、髓腔内给药、腹腔内给药。

[0113] 其给药量根据成为对象的患者的状态(体重、年龄、症状、身体状况等)及给药剂型等而不同，但通常对成人进行给药的情况下，作为粒子数，为1×10^{5}～1×10^{17}个/次，优选5×10^{5}～5×10^{16}个/次，进一步优选1×10^{6}～1×10^{16}个/次，尤其优选5×10^{6}～5×10^{15}个/次。另外，可以将本用量作为1次给药量，一天给药多次，能够将本用量分为多次进行给药。

[0114] 实施例

[0115] 以下,根据实施例及比较例对本发明进行具体说明,但本发明不受这些例子的任何限定。

[0116] 实施例1.基于PS亲和法的细胞外囊泡的获取

[0117] (1)细胞培养

[0118] 使用含有15%FBS(Selborne Biological Sevice Pty.Ltd.)的MEMα(含有L-谷氨酰胺、酚红,FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)作为增殖培养基,培养了作为骨髓来源间充质干细胞的Poietics™人间充质干细胞(LONZA Group)。之后,将所培养的骨髓来源间充质干细胞以细胞数3×10^5播种到100mm细胞培养用培养皿(Corning International Corporation)中,并在设定为5%CO_2、37℃的条件的细胞培养用恒温箱内培养72小时,使其增殖至细胞数3×10^6。

[0119] (2)细胞外囊泡的产生

[0120] 将(1)中增殖的骨髓来源间充质干细胞替换成作为细胞外囊泡产生培养基的含有10%GIBCO:Fetal Bovine Serum,exosome-depleted,One Shot™ format(胎牛血清,去外泌体,One Shot™格式)(Thermo Fisher Scientific Inc.)的D-MEM(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)20mL,并在设定为5%CO_2、37℃的条件的细胞培养用恒温箱内进行了120小时的培养。之后,在50mL的离心管中回收所获得的培养上清液并以2,000×g离心20分钟,从而回收了上清液。

[0121] (3)基于PS亲和法的细胞外囊泡的获取

[0122] 从(2)中回收到的培养上清液1mL,使用MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS(MagCapture™外泌体分离试剂盒PS)(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation),按照该试剂盒所附的说明书中记载的顺序分离出细胞外囊泡,在添加了EV-Save™细胞外囊泡封闭试剂(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)的1mM的含有EDTA的PBS(Phosphate-buffered saline:磷酸盐缓冲盐水)中获得了细胞外囊泡。之后,使用Vivaspin 500(Sartorius公司、截留分子量:100,000(100K)、膜材质:PES),对添加了EV-Save™细胞外囊泡封闭试剂的PBS进行了缓冲液交换。以下,有时将所获得的溶液记载为“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”。

[0123] 比较例1.基于超离心法的细胞外囊泡的获取

[0124] 使用超离心分离机(Beckman:Optima™ L-100XP),将按照与实施例1(1)～(2)相同的方法制备的培养上清液以110,000×g离心分离了70分钟。在所获得的颗粒中添加1mL的PBS,再次以110,000×g离心分离了70分钟。通过添加了EV-Save™细胞外囊泡封闭试剂(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)的PBS溶解了最终获得的颗粒。以下,有时将所获得的溶液记载为“细胞外囊泡溶液(超离心法、骨髓来源MSC)”。

[0125] 实验例1.基于纳米追踪分析法的细胞外囊泡粒子数的测定

[0126] 使用NanoSight(Malvern Panalytical Ltd),通过纳米粒子追踪分析法(Nano Tracking Analysis法),并按照NanoSight的说明书中记载的顺序,对实施例1中所获得的“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”的每单位体积的粒子数进行测定,并计算出平均粒径和每单位体积的平均粒子数[particles/mL:颗粒/mL]。在图1中与实验例2的结果一并示出所获得的粒径分布的图表。图1的图表中,纵轴表示粒子数,横轴表示粒径。通过PS亲

和法获取的细胞外囊泡的平均粒径为138.1±0.2nm,每单位体积的平均粒子数为1.76×10^{10}[particles/mL]。

[0127] 实验例2.基于纳米追踪分析法的细胞外囊泡粒子数的测定

[0128] 除了使用比较例1中所获得的“细胞外囊泡溶液(超离心法、骨髓来源MSC)”来代替“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”以外,通过与实验例1相同的方法,计算出平均粒径和每单位体积的平均粒子数[Particles/mL]。在图1中与实验例1的结果一并示出所获得的粒径分布的图表。通过超离心法获取的细胞外囊泡的平均粒径为138.1±2.9nm,每单位体积的平均粒子数为1.68×10^{10}[particles/mL]。

[0129] 实验例3.基于蛋白质印迹法的细胞外囊泡标记蛋白质的分析

[0130] 使用实施例1中所获得的“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”,通过蛋白质印迹法对作为细胞外囊泡标记蛋白质的CD9、CD63及CD81进行了分析。

[0131] 根据实验例1中计算出的“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”中的每单位体积的平均粒子数,在3.0×10^{8}particles(颗粒)量的“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”中混合1/4量的SDS-PAGE Sample Buffer(样品缓冲液)4倍浓缩液(不含还原剂)(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation),使用所有量通过10～20%丙烯酰胺凝胶(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)进行了电泳。之后,使用转印缓冲液(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation),转印到PVDF膜(BioRad公司)上。进行了转印的膜在含有1%脱脂牛奶的PBS-T溶液(0.1(w/v)%含有Tween™20的PBS溶液)中浸渍1小时并进行封闭处理,使抗CD9抗体(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)、抗CD63抗体(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)及抗CD81抗体(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)分别与用PBS-T溶液调整为1.1μg/mL的一次抗体溶液进行反应。之后,使抗CD9抗体、抗CD81抗体反应的膜与将HRP标志抗大鼠IgG抗体(Jackson Immuno Research Inc.)用PBS-T溶液稀释10000倍而得到的二次抗体溶液反应,使抗CD63抗体反应的膜与将HRP标志抗小鼠IgG抗体(DAKO公司)用PBS-T溶液稀释10000倍而得到的二次抗体溶液分别反应。之后,作为检测试剂使用ImmunoStar™ Zeta(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation),并使用Amersham Imager 600(GE Healthcare公司)检测了信号。在图2中与实验例4的结果一并示出蛋白质印迹的结果。图中,横轴的PS表示使用了“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”时的结果(实验例3),UC表示使用了“细胞外囊泡溶液(超离心法、骨髓来源MSC)”时的结果(实验例4)。并且,纵轴的箭头表示检测出的细胞外囊泡标记蛋白质的条带位置。

[0132] 实验例4.基于蛋白质印迹法的细胞外囊泡标记蛋白质的分析

[0133] 除了使用比较例1中所获得的“细胞外囊泡溶液(超离心法、骨髓来源MSC)”来代替“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”以外,通过与实验例3相同的方法,并通过蛋白质印迹法对作为细胞外囊泡标记蛋白质的CD9、CD63及CD81进行了分析。在图2中与实验例3的结果一并示出蛋白质印迹的结果。

[0134] 根据图2得知,用PS亲和法获取的细胞外囊泡[“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”中的细胞外囊泡、实验例3]与用超离心法获取的细胞外囊泡[“细胞外囊泡溶液(超离心法、骨髓来源MSC)”中的细胞外囊泡、实验例4]相比,CD9和CD63的显现量更多。

[0135] 实施例2～4.用PS亲和法获取的细胞外囊泡的抗纤维化作用的评价

[0136] 对实施例1中所制备的“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”中的细胞外囊泡的抗纤维化作用进行了评价。

[0137] 将作为人胎肺来源成纤维细胞的TIG3细胞(从JCRB分让)悬浮在含有10％FBS(Biosera公司)的DMEM(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)中,以每1孔中细胞数为2.5×10^4、培养基量为500μL的方式分别播种到24well plate(孔板)(Corning公司)中。细胞播种24小时之后,将实施例1中所获得的“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”以实验例1的测定结果为参考以终浓度成为1×10^9particles/mL的量添加到各个孔中,并培养了16小时。之后,将终浓度成为5ng/mL量的TGFβ1(R&D Systems,Inc.)添加到各个孔中并进行刺激,进一步培养了24小时。使用PureLink™ RNA Mini试剂盒(Thermo Fisher Scientific Inc.),并按照该试剂盒所附的说明书中记载的顺序分别提取了RNA。从所提取的RNA200ng中,使用ReverTra Ace™ qPCR RT Master Mix with gDNARemover(Toyobo Co.,Ltd.),并按照该试剂盒所附的说明书中记载的顺序合成了cDNA。使用合成的cDNA,通过KOD SYBR qPCR Mix(Toyobo Co.,Ltd.),对作为纤维症相关基因的Collagen(胶原蛋白)III(实施例2)、Collagen(胶原蛋白)V(实施例3)、α-SMA(实施例4)及作为内标准的GAPDH的mRNA显现量,分别通过定量PCR进行了测定。在图3(序列号1～6)中分别示出定量PCR中所使用的引物。

[0138] 分别在图4～6中与比较例2～4的结果一并示出定量PCR的结果。图4是Collagen(胶原蛋白)III的mRNA显现量的结果,图5是Collagen(胶原蛋白)V的mRNA显现量的结果,图6是α-SMA的mRNA显现量的结果。图中,横轴的“TGFβ1刺激(-)EV(-)纯化方法(-)”表示未施加刺激的TIG3中的结果,“TGFβ1刺激(+)EV(-)纯化方法(-)”表示施加了TGFβ1刺激的TIG3(对照)中的结果,“TGFβ1刺激(+)EV(+)纯化方法(PS)”表示施加了TGFβ1刺激的TIG3中使用了“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”时的结果(实施例2(图4)、实施例3(图5)、实施例4(图6))、“TGFβ1刺激(+)EV(+)纯化方法(UC)”表示施加了TGFβ1刺激的TIG3中使用了“细胞外囊泡溶液(超离心法、骨髓来源MSC)”时的结果(比较例2(图4)、比较例3(图5)、比较例4(图6))。关于各基因的显现量,将使用对各基因的引物进行的从qPCR获得的数值对GAPDH进行标准化,作为与对照中的对象mRNA显现相对的Δ Δct值进行表示,并设为各图的纵轴。

[0139] 比较例2～4.用超离心法获取的细胞外囊泡的抗纤维化作用的评价

[0140] 除了使用比较例1中所获得的“细胞外囊泡溶液(超离心法、骨髓来源MSC)”来代替“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”以外,通过与实施例2～4相同的方法,对作为纤维症相关基因的Collagen(胶原蛋白)III(比较例2)、Collagen(胶原蛋白)V(比较例3)、α-SMA(比较例4)及作为内标准的GAPDH的mRNA显现量,分别通过定量PCR进行测定,并对细胞外囊泡的抗纤维化作用进行了评价。分别在图4～6中与实施例2～4的结果一并示出定量PCR的结果。

[0141] 根据图4～6确认到,关于任何纤维症相关基因的mRNA显现量,都通过进行TGFβ1刺激而上升。得知由这种TGFβ引起的mRNA显现量的上升通过使用通过PS亲和法所获取的细胞外囊泡而得到抑制(具有抗纤维化作用)。并且,得知通过PS亲和法获取的细胞外囊泡(实施例2～4)与通过超离心法获取的细胞外囊泡(比较例2～4)相比,具有明显高的抗纤维化作用(抗纤维化效果)。

[0142] 实施例5～7.用PS亲和法获取的细胞外囊泡的抗纤维化作用的评价

[0143] 除了将实施例1中所获得的“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”使用“终浓度成为6×10^{8}particles/mL的量”来代替将实施例1中所获得的“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”使用“终浓度成为1×10^{9}particles/mL的量”以外，通过与实施例2～4相同的方法，对作为纤维症相关基因的Collagen(胶原蛋白)III(实施例5)、Collagen(胶原蛋白)V(实施例6)、α-SMA(实施例7)及作为内标准的GAPDH的mRNA显现量，分别通过定量PCR进行测定，并对用PS亲和法获取的细胞外囊泡的抗纤维化作用进行了评价。分别在图7～9中与实施例8～11、比较例5～7的结果一并示出定量PCR的结果。图7是Collagen(胶原蛋白)III的mRNA显现量的结果，图8是Collagen(胶原蛋白)V的mRNA显现量的结果，图9是α-SMA的mRNA显现量的结果。图中的横轴表示与图4～6相同的含义。

[0144] 比较例5～7.用超离心法获取的细胞外囊泡的抗纤维化作用的评价

[0145] 除了将比较例1中所获得的“细胞外囊泡溶液(超离心法、骨髓来源MSC)”使用“终浓度成为6×10^{8}particles/mL的量”来代替将比较例1中所获得的“细胞外囊泡溶液(超离心法、骨髓来源MSC)”使用“终浓度成为1×10^{9}particles/mL的量”以外，通过与比较例2～4相同的方法，对作为纤维症相关基因的Collagen(胶原蛋白)III(比较例5)、Collagen(胶原蛋白)V(比较例6)、α-SMA(比较例7)及作为内标准的GAPDH的mRNA显现量，分别通过定量PCR进行测定，并对用超离心法获取的细胞外囊泡的抗纤维化作用进行了评价。分别在图7～9中与实施例5～11的结果一并示出定量PCR的结果。

[0146] 实施例8～10.用PS亲和法获取的TGFβ1刺激的间充质干细胞来源细胞外囊泡的抗纤维化作用的评价

[0147] 通过与实施例1的(1)细胞培养相同的方法使骨髓来源间充质干细胞增殖之后，以终浓度20ng/mL添加TGFβ1(R&D Systems,Inc.)并进行刺激，进一步进行了24小时培养。接着，通过与实施例1的(2)细胞外囊泡的产生、实施例1的(3)基于PS亲和法的细胞外囊泡的获取相同的方法分离细胞外囊泡，并对添加了EV-Save™细胞外囊泡封闭试剂的PBS进行了缓冲液交换。以下，有时将所获得的溶液记载为“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC、TGFβ1刺激)”。通过与实验例1相同的方法对所获得的“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC、TGFβ1刺激)”的平均粒径和每单位体积的平均粒子数[particles/mL]进行了计算。并且，除了使用“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC、TGFβ1刺激)”来代替“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”以外，通过与实施例2～4相同的方法，对作为纤维症相关基因的Collagen(胶原蛋白)III(实施例8)、Collagen(胶原蛋白)V(实施例9)、α-SMA(实施例10)及作为内标准的GAPDH的mRNA显现量，分别通过定量PCR进行测定，并对用PS亲和法获取的细胞外囊泡的抗纤维化作用进行了评价。分别在图7～9中与实施例5～7、11、比较例5～7的结果一并示出定量PCR的结果。

[0148] 实施例11.用超离心法获取的TGFβ1刺激的间充质干细胞来源细胞外囊泡的抗纤维化作用的评价

[0149] 通过与实施例1的(1)细胞培养相同的方法使骨髓来源间充质干细胞增殖之后，以终浓度20ng/mL添加TGFβ1(R&D Systems,Inc.)并进行刺激，进一步进行了24小时培养。接着，使用超离心分离机(Beckman:Optima™ L-100XP)，将通过与实施例1的(2)细胞外囊泡的产生相同的方法制备的培养上清液以110,000×g离心分离了70分钟。在所获得的颗粒中添

加1mL的PBS，再次以110,000×g离心分离了70分钟。通过添加了EV-Save™细胞外囊泡封闭试剂(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)的PBS溶解了最终获得的颗粒。以下，有时将所获得的溶液记载为“细胞外囊泡溶液(超离心法、骨髓来源MSC、TGFβ1刺激)”。通过与实验例1相同的方法对所获得的“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC、TGFβ1刺激)”的平均粒径和每单位体积的平均粒子数[particles/mL]进行了计算。并且，除了使用“细胞外囊泡溶液(超离心法、骨髓来源MSC、TGFβ1刺激)”来代替“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”以外，通过与实施例4相同的方法，对作为纤维症相关基因的α-SMA(实施例11)及作为内标准的GAPDH的mRNA显现量，分别通过定量PCR进行测定，并对用PS亲和法获取的细胞外囊泡的抗纤维化作用进行了评价。分别在图7～9中与实施例5～10、比较例5～7的结果一并示出定量PCR的结果。

[0150] 根据图7～9得知，由TGFβ引起的纤维症相关基因的mRNA显现量的上升通过使用通过PS亲和法获取的细胞外囊泡而得到抑制(通过PS亲和法获取的细胞外囊泡具有抗纤维化作用)。并且，得知通过PS亲和法获取的细胞外囊泡(实施例5～7)与通过超离心法获取的细胞外囊泡(比较例5～7)相比，具有明显高的抗纤维化作用。根据图7～9得知，从通过TGFβ刺激到的间充质干细胞获取的细胞外囊泡(实施例8～13)与从未进行刺激的间充质干细胞获取的细胞外囊泡(实施例5～7、比较例5～7)相比，具有更高的抗纤维化作用。而且，得知通过PS亲和法从通过TGFβ刺激到的间充质干细胞获取的细胞外囊泡(实施例10)与通过超离心法从通过TGFβ刺激到的间充质干细胞获取的细胞外囊泡(实施例11)等通过其他方法获取的细胞外囊泡相比，具有尤其明显的抗纤维化作用。

[0151] 实施例12～13:基于PS亲和法的细胞外囊泡的获取

[0152] 除了使用“作为脂肪来源间充质干细胞的Human Adipose-Derived Stem Cells(人脂肪来源干细胞)(LONZA Group)”(实施例12)或“作为脐带来源间充质干细胞的Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Matrix(人脐带基质来源间充质干细胞)(PromoCell公司)”(实施例13)来代替“作为骨髓来源间充质干细胞的Poietics™人间充质干细胞(LONZAGroup)”以外，通过与实施例1相同的方法进行细胞外囊泡的获取，从而分别获得了“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、脂肪来源MSC)”(实施例12)及“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、脐带来源MSC)”(实施例13)。

[0153] 比较例8.基于超离心法的细胞外囊泡的获取

[0154] 除了使用“作为脂肪来源间充质干细胞的Human Adipose-Derived Stem Cells(人脂肪来源干细胞)(LONZA Group)”来代替“作为骨髓来源间充质干细胞的Poietics™人间充质干细胞(LONZAGroup)”以外，对按照与实施例1的(1)～(2)相同的方法制备的培养上清液，使用超离心分离机(Beckman:Optima™ L-100XP)以110,000×g离心分离了70分钟。在所获得的颗粒中添加1mL的PBS，再次以110,000×g离心分离了70分钟。通过添加了EV-Save™细胞外囊泡封闭试剂(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)的PBS溶解了最终获得的颗粒，从而获得了“细胞外囊泡溶液(超离心法、脂肪来源MSC)”。

[0155] 实施例14～19.用PS亲和法获取的细胞外囊泡的抗纤维化作用的评价

[0156] 对实施例12及13中制备的“细胞外囊泡溶液(PS亲和法)”中的细胞外囊泡的抗纤维化作用进行了评价。

[0157] 除了使用实施例12中所获得的“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、脂肪来源MSC)”来代

替“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”以外,通过与实施例5～7相同的方法,对作为纤维症相关基因的Collagen(胶原蛋白)VIII(实施例14)、Collagen(胶原蛋白)V(实施例16)、α-SMA(实施例18)以及作为内标准的GAPDH的mRNA显现量,分别通过定量PCR进行了测定。相同地,除了使用实施例13中所获得的“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、脐带来源MSC)”来代替“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”以外,通过与实施例5～7相同的方法,对Collagen(胶原蛋白)III(实施例15)、Collagen(胶原蛋白)V(实施例17)、α-SMA(实施例19)以及作为内标准的GAPDH的mRNA显现量,分别通过定量PCR进行了测定。在图3(序列号1～6)中分别示出定量PCR中所使用的引物。

[0158] 分别在图10～12中与比较例9～11的结果一并示出定量PCR的结果。图10是Collagen(胶原蛋白)III的mRNA显现量的结果,图11是Collagen(胶原蛋白)V的mRNA显现量的结果,图12是α-SMA的mRNA显现量的结果。图中,横轴的“TGFβ(-)EV(-)来源(-)”表示未施加刺激的TIG3中的结果,“TGFβ刺激(+)EV(-)来源(-)”表示施加了TGFβ1刺激的TIG3(对照)中的结果,“TGFβ刺激(+)EV(PS)来源(脂肪)”表示施加了TGFβ1刺激的TIG3中使用了“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、脂肪来源MSC)”时的结果[实施例14(图10)、实施例16(图11)、实施例18(图12)],“TGFβ刺激(+)EV(UC)来源(脂肪)”表示施加了TGFβ1刺激的TIG3中使用了“细胞外囊泡溶液(超离心法、脂肪来源MSC)”时的结果[比较例9(图10)、比较例10(图11)、比较例11(图12)],“TGFβ刺激(+)EV(PS)来源(脐带)”表示施加了TGFβ1刺激的TIG3中使用了“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、脐带来源MSC)”时的结果[实施例15(图10)、实施例17(图11)、实施例19(图12)]。关于各基因的显现量,将使用对各基因的引物进行的从qPCR获得的数值对GAPDH进行标准化,作为与对照中的对象mRNA显现相对的Δ Δct值进行表示,并设为各图的纵轴。

[0159] 比较例9～11.用超离心法获取的细胞外囊泡的抗纤维化作用的评价

[0160] 除了使用“细胞外囊泡溶液(超离心法、脂肪来源MSC)”来代替“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、骨髓来源MSC)”以外,通过与实施例14～19相同的方法,对作为纤维症相关基因的Collagen(胶原蛋白)III(比较例9)、Collagen(胶原蛋白)V(比较例10)、α-SMA(比较例11)及作为内标准的GAPDH的mRNA显现量,分别通过定量PCR进行了测定。在图3(序列号1～6)中分别示出定量PCR中所使用的引物。分别在图10～12中与实施例14～19的结果一并示出定量PCR的结果。

[0161] 根据图10～12得知,在使用了“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、脂肪来源MSC)”的情况(实施例14、16、18)及使用了“细胞外囊泡溶液(PS亲和法、脐带来源MSC)”的情况(实施例15、17、19)下,也抑制由TGFβ引起的纤维症相关基因的mRNA显现量的上升,即,通过PS亲和法获取的细胞外囊泡具有抗纤维化作用。从这些结果得知,通过PS亲和法获取的细胞外囊泡(实施例14～19)与通过超离心法获取的细胞外囊泡(比较例9～11)相比,与间充质干细胞的种类无关地具有明显高的抗纤维化作用。

[0162] 产业上的可利用性

[0163] 根据本发明,提供一种将从来源于间充质干细胞的细胞外囊泡获取的具有抗纤维化作用的细胞外囊泡作为有效成分的抗纤维化剂。本发明所提供的抗纤维化剂具有活体组织或器官的纤维化涉及的因子例如纤维症相关基因的产生调整作用,因此抑制活体组织或器官的纤维化的进行,由此提供对可产生所述纤维化的疾病有效的治疗药,在这一点上,产

业上的利用性是极大的。

序 列 表

<110> 富士胶片株式会社

<120> 抗纤维化剂及具有抗纤维化作用的细胞外囊泡的制造方法

<130> 2157PCT

<150> JP2020-004765

<151> 2020-01-15

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 1

attgctggga tcactggagc ac 22

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 2

cctggtttcc cactttcacc cttg 24

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 3

actgggacga catggaaaag 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 4
tacatggctg ggacattgaa 20
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 5
gtggtctgaa gggcacaaag 20
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 6
tccgagtttt cccttctccc 20

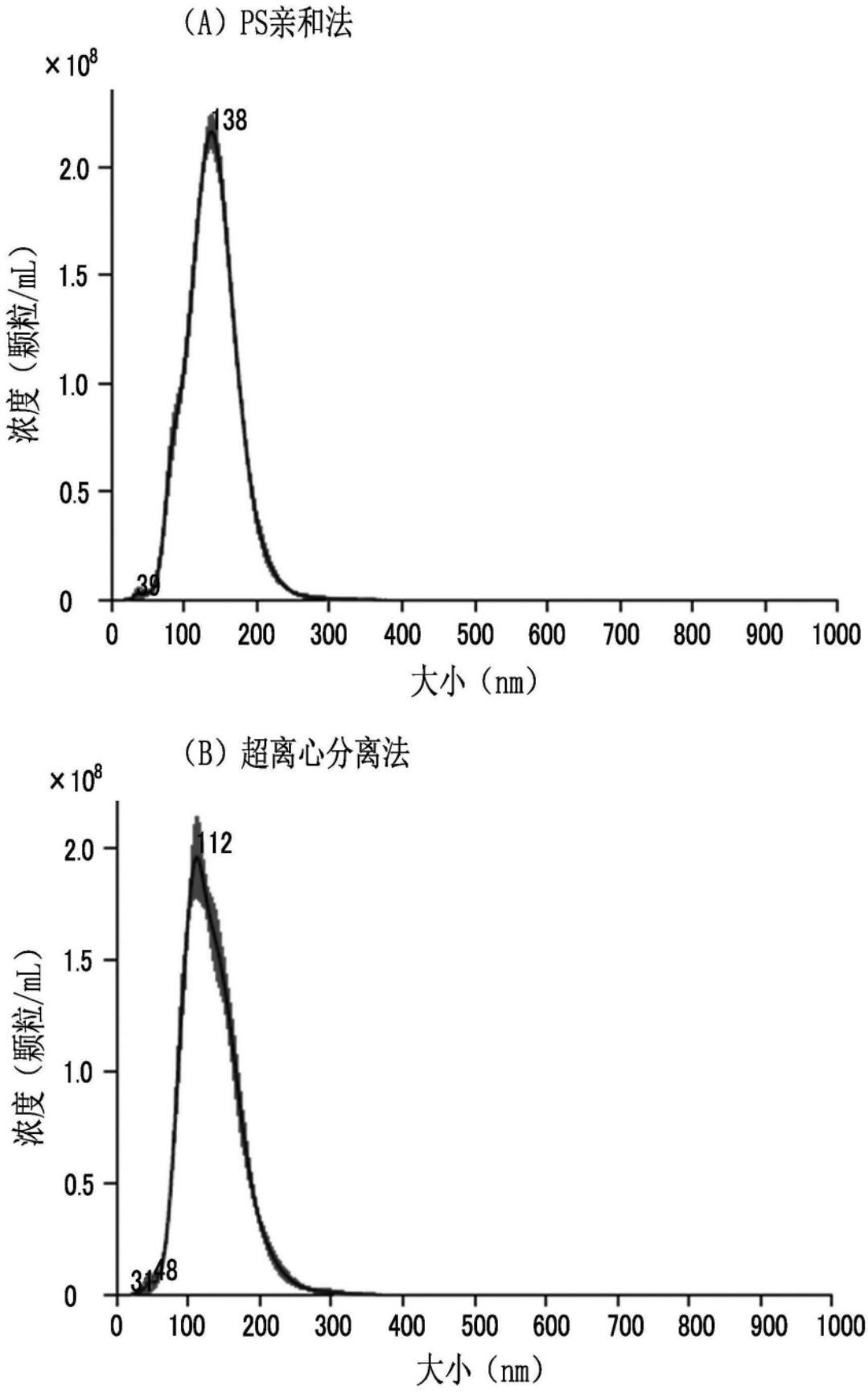

(A) PS亲和法
×10^8
2.0
1.5
1.0
0.5
0
浓度（颗粒/mL）
138
39
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
大小（nm）
(B) 超离心分离法
×10^8
2.0
1.5
1.0
0.5
0
浓度（颗粒/mL）
112
31
48
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
大小（nm）

图1

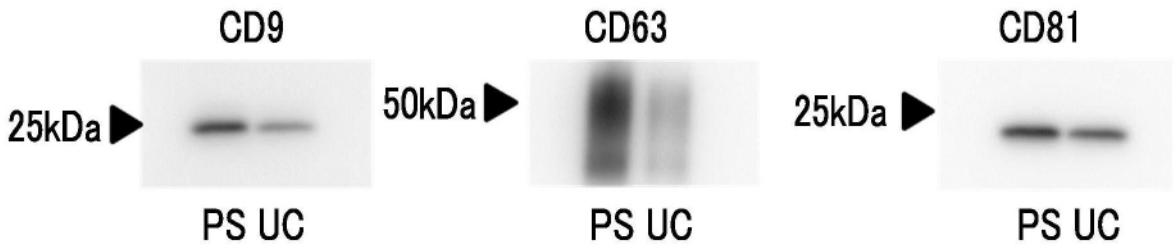


图2

	正向	反向
胶原蛋白 Ⅲ	attgctgggatcactggagcac (序列号1)	cctggtttcccactttcacccttg (序列号2)
α-SMA	actgggacgacatggaaaag (序列号3)	tacatggctgggacattgaa (序列号4)
胶原蛋白 Ⅴ	gtggtctgaagggcacaaag (序列号5)	tccgagttttcccttctccc (序列号6)

图3

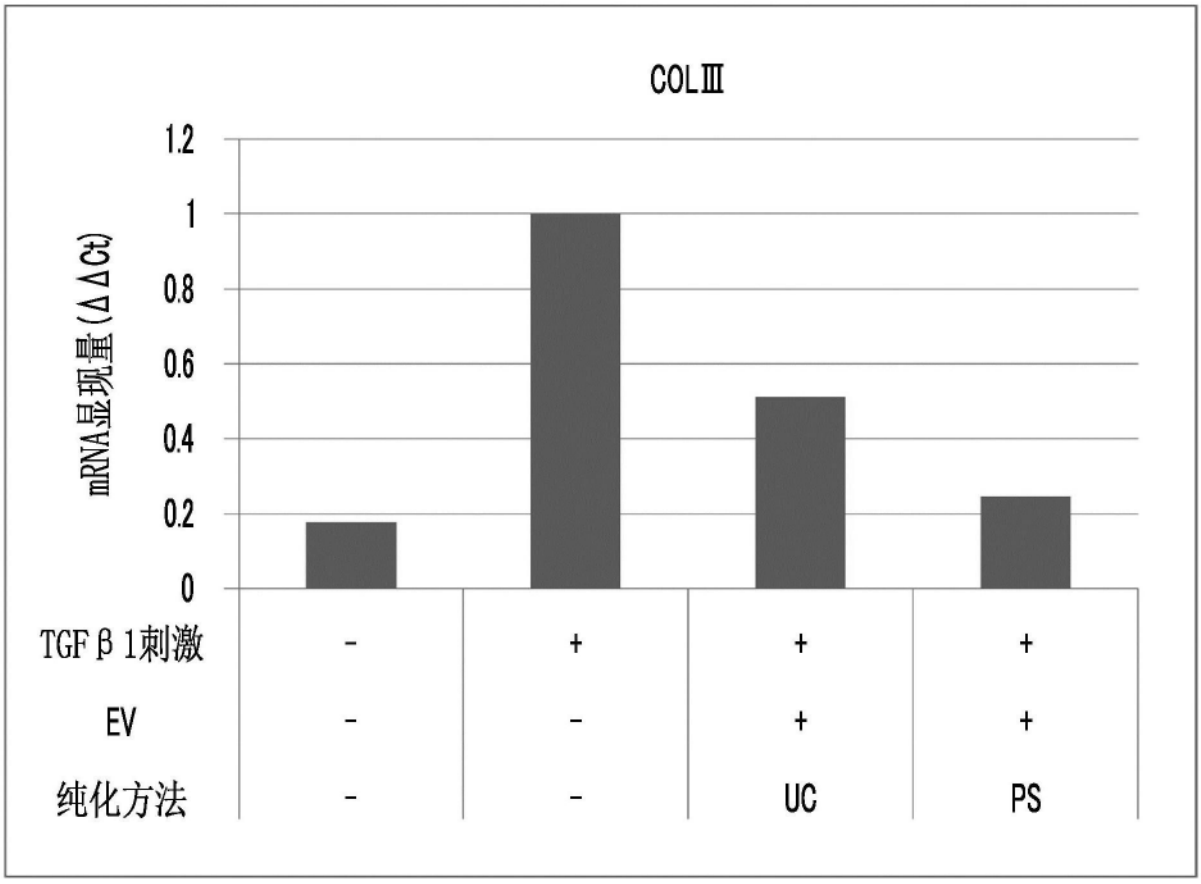


图4

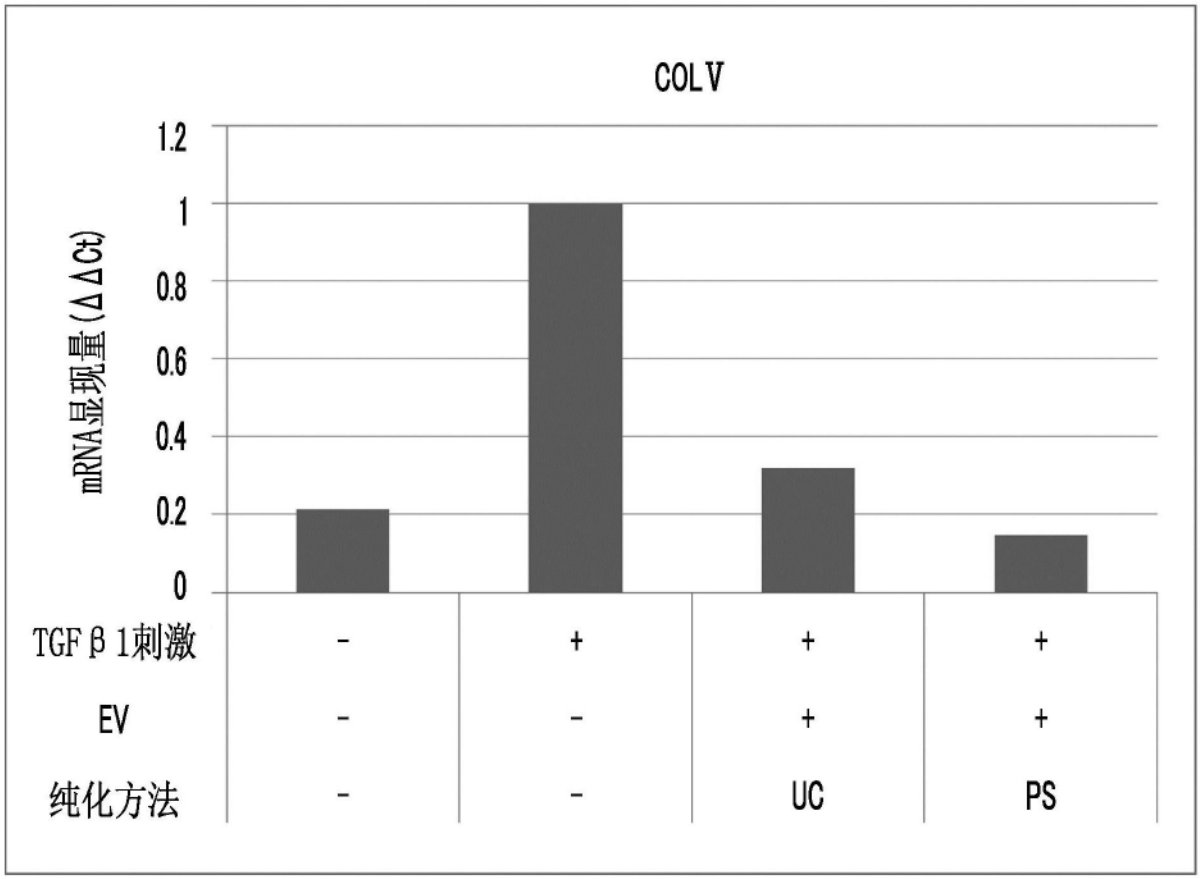


图5

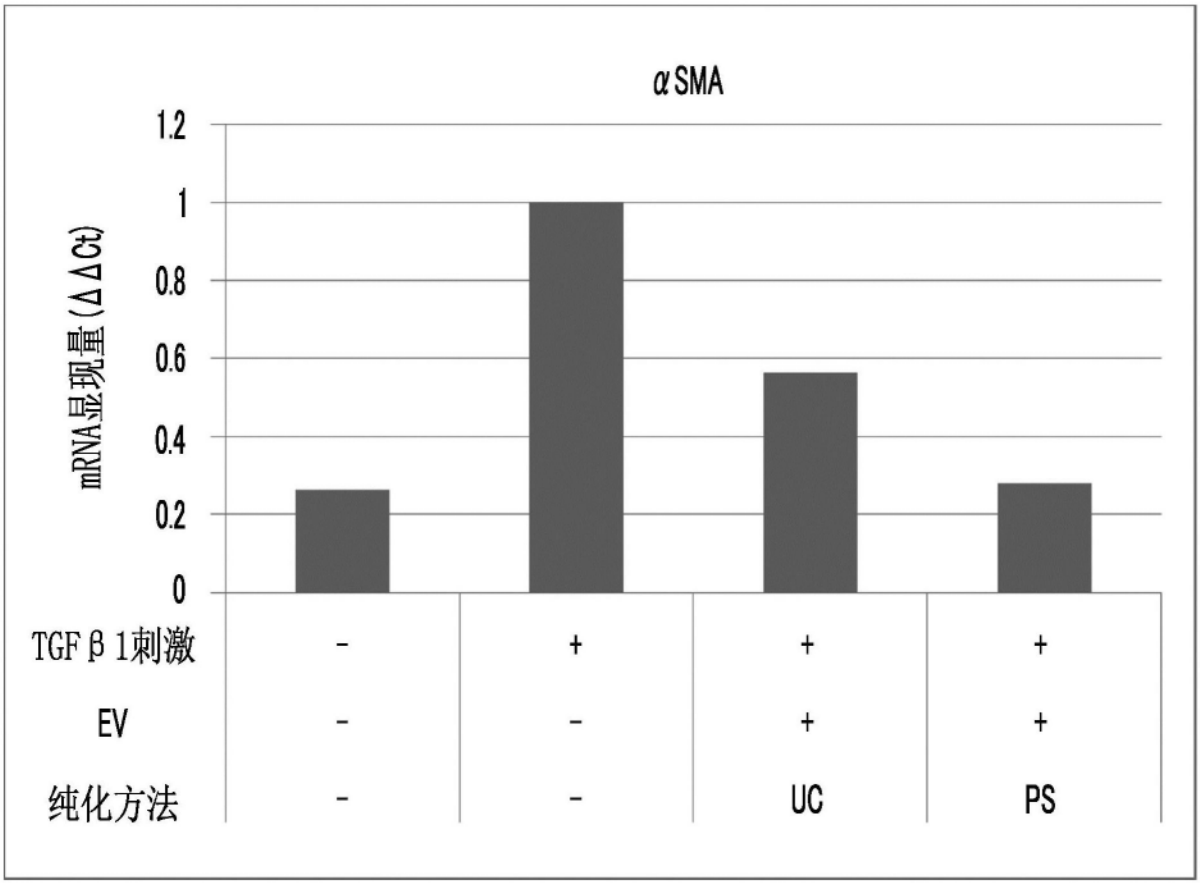


图6

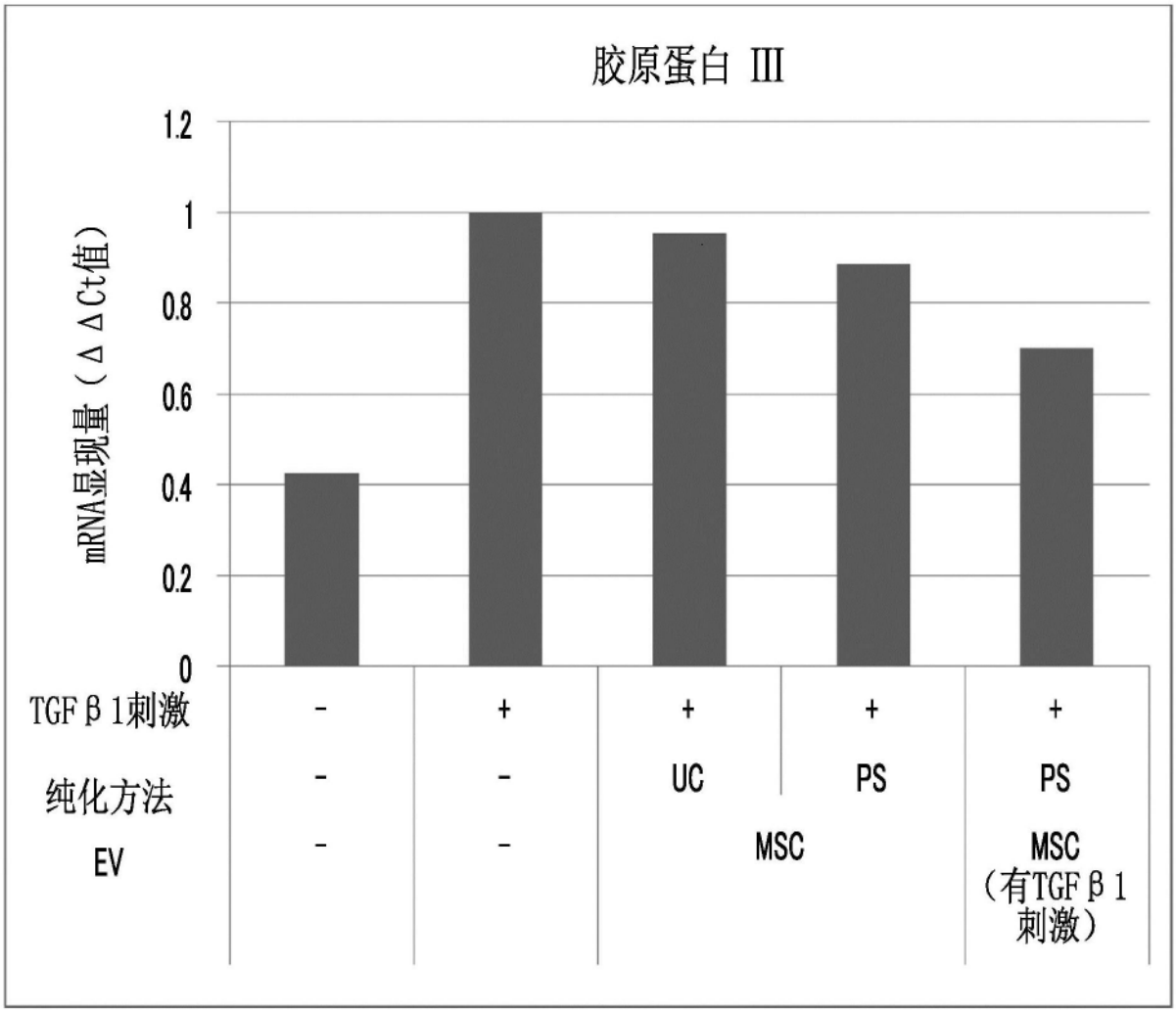

胶原蛋白 III
mRNA显现量（ΔΔCt值）
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
TGFβ1刺激
纯化方法
EV
-
-
-
+
-
-
+
UC
MSC
+
PS
PS
MSC
（有TGFβ1
刺激）

图7

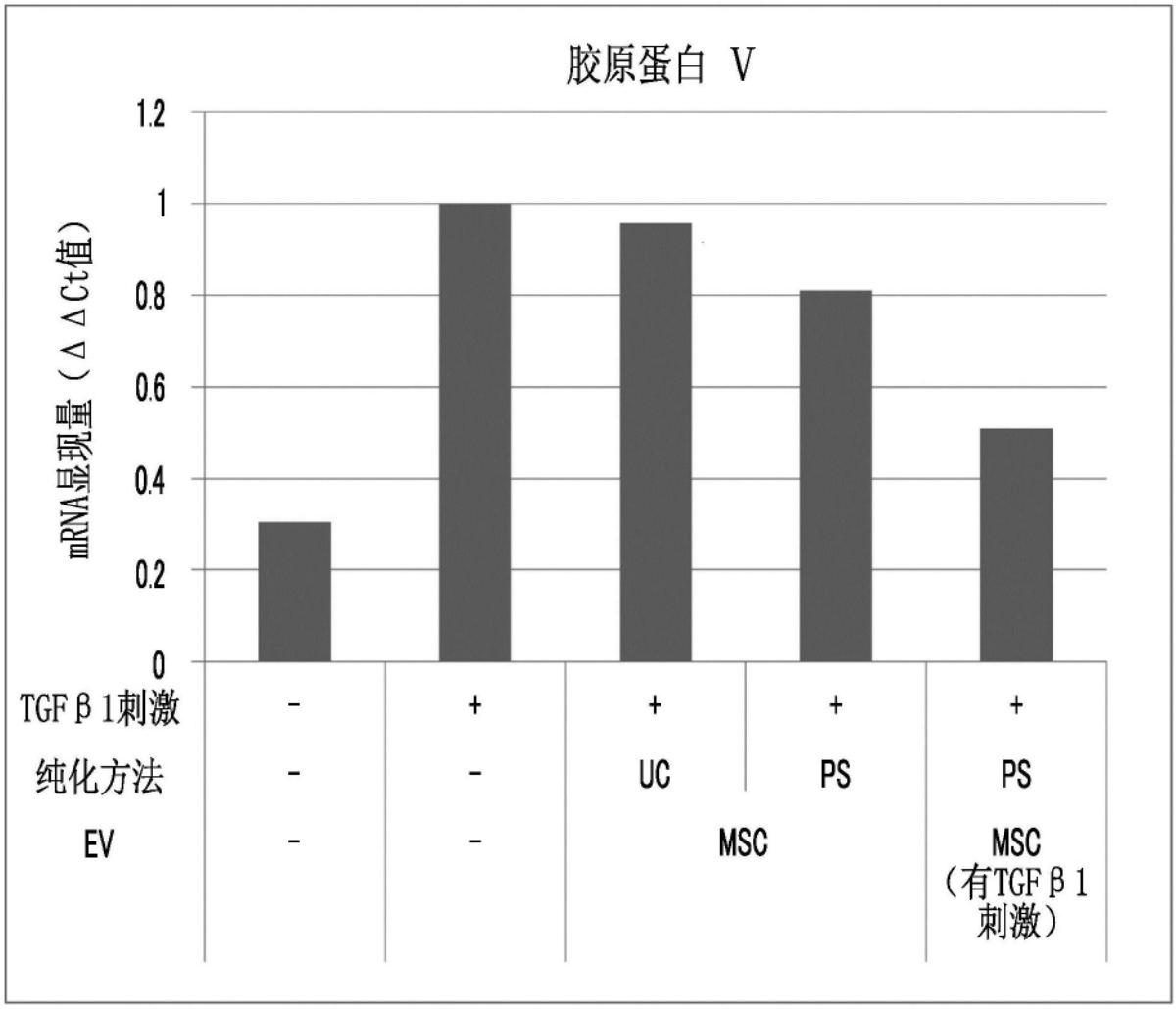

胶原蛋白 V
mRNA显现量（ΔΔCt值）
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
TGFβ1刺激
纯化方法
EV
-
-
-
+
-
-
+
UC
MSC
+
PS
MSC
+
PS
MSC
（有TGFβ1
刺激）

图8

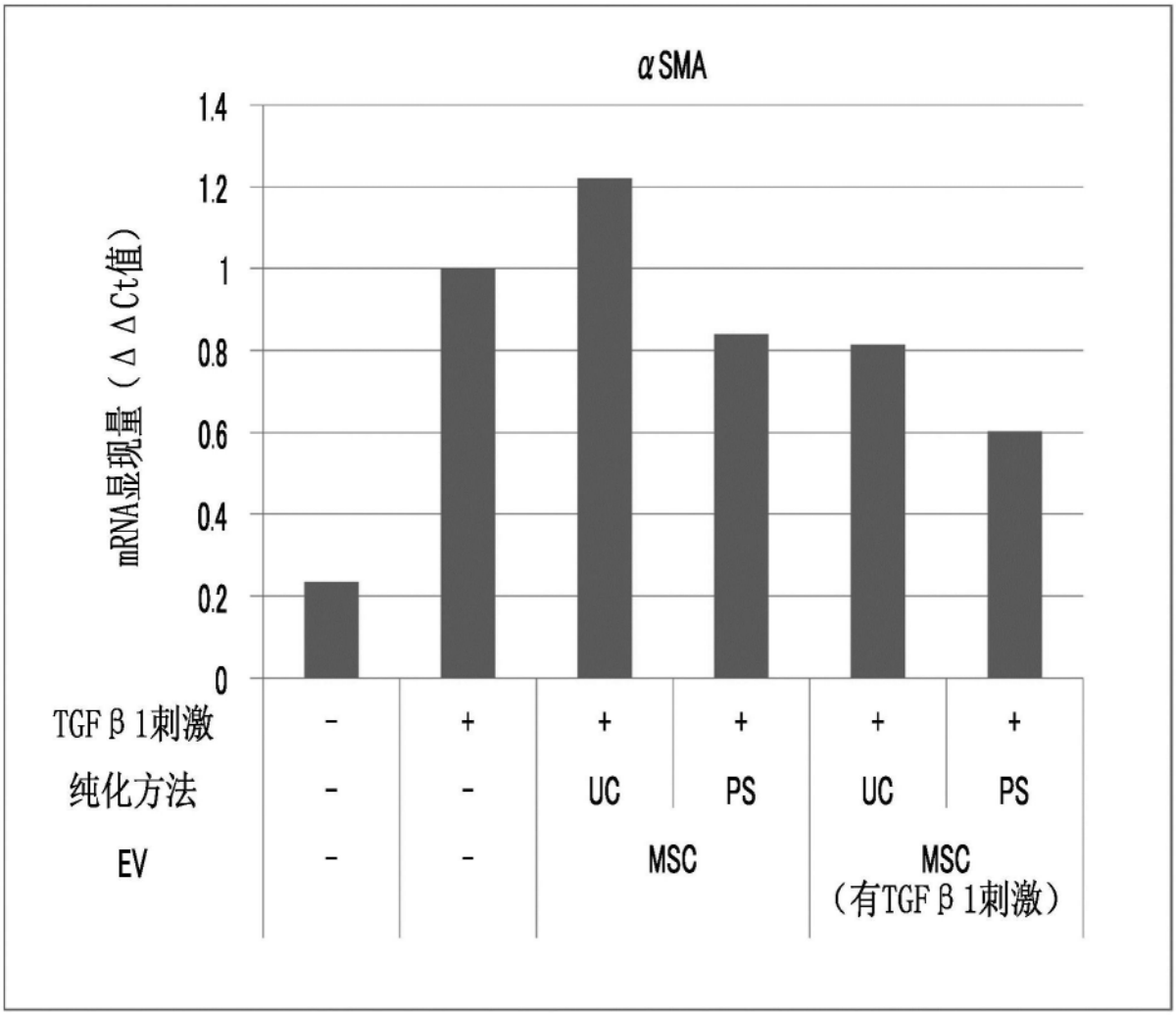

αSMA
mRNA显现量（ΔΔCt值）
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
TGFβ1刺激 - + + + + +
纯化方法 - - UC PS UC PS
EV - - MSC MSC（有TGFβ1刺激）

图9

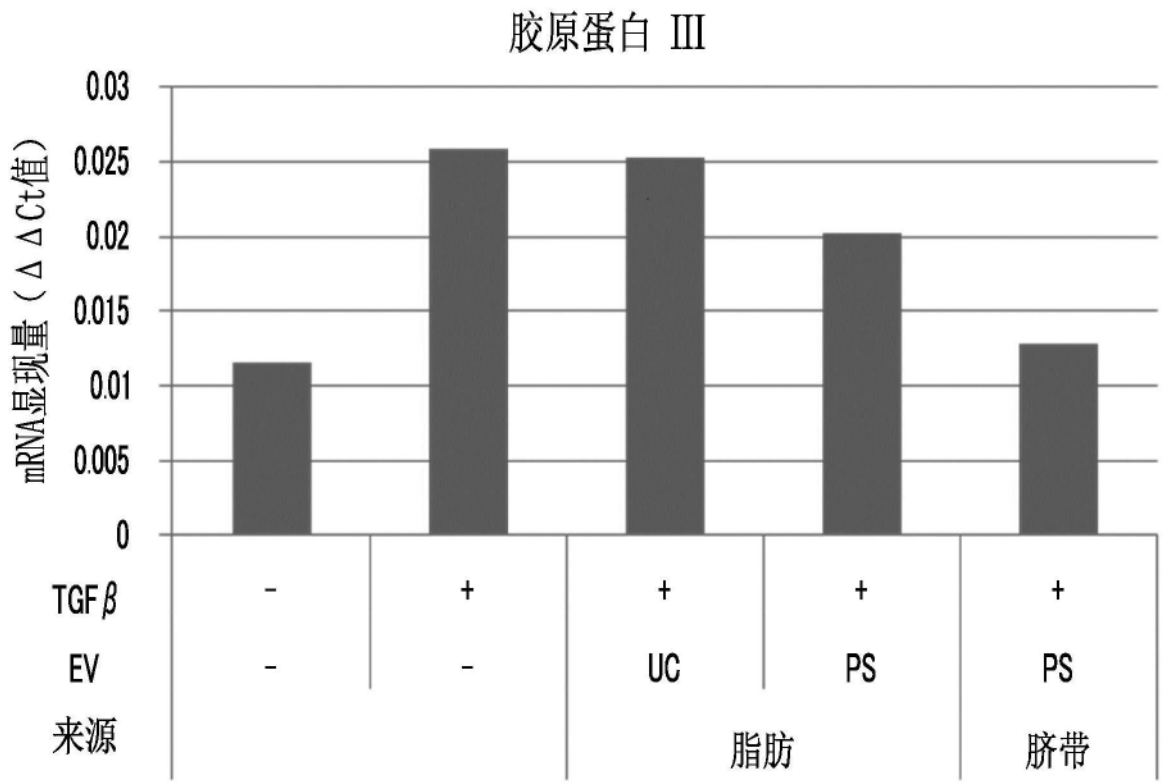

胶原蛋白 III
mRNA显现量（ΔΔCt值）
0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
TGFβ
EV
来源
-
+
+
+
+
-
-
UC
PS
PS
脂肪
脐带

图10

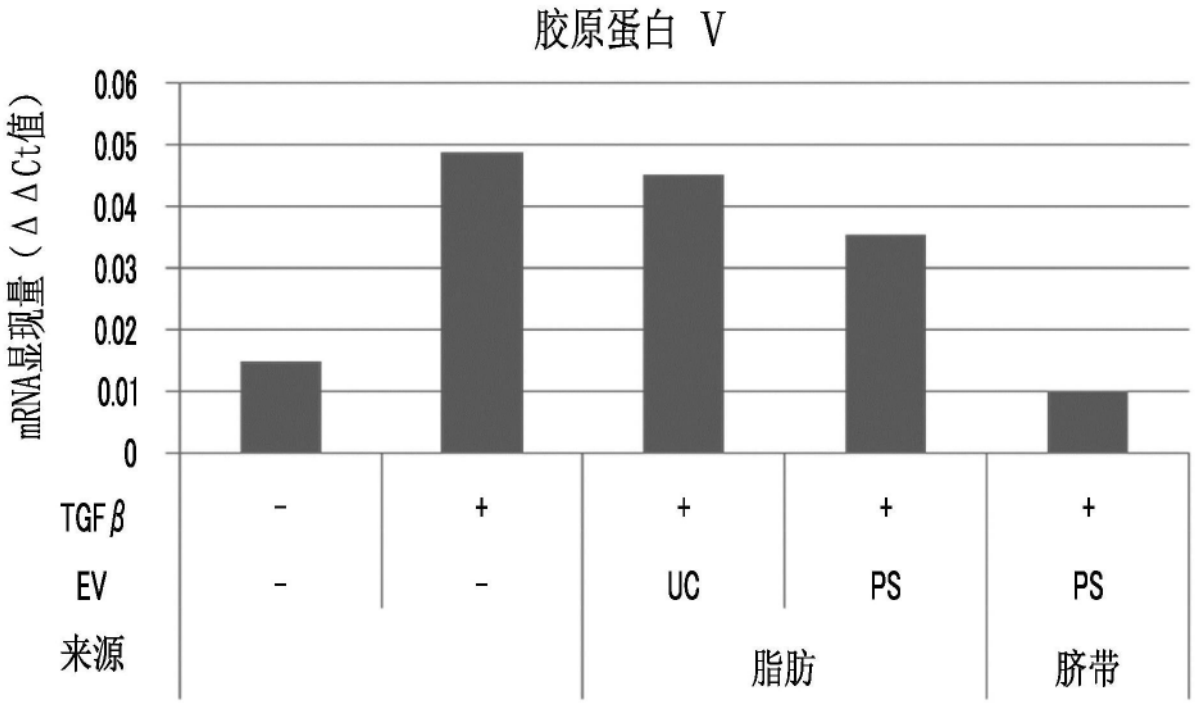

胶原蛋白 V
mRNA显现量（ΔΔCt值）
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
TGFβ
EV
来源
-
+
+
+
+
-
-
UC
PS
PS
脂肪
脐带

图11

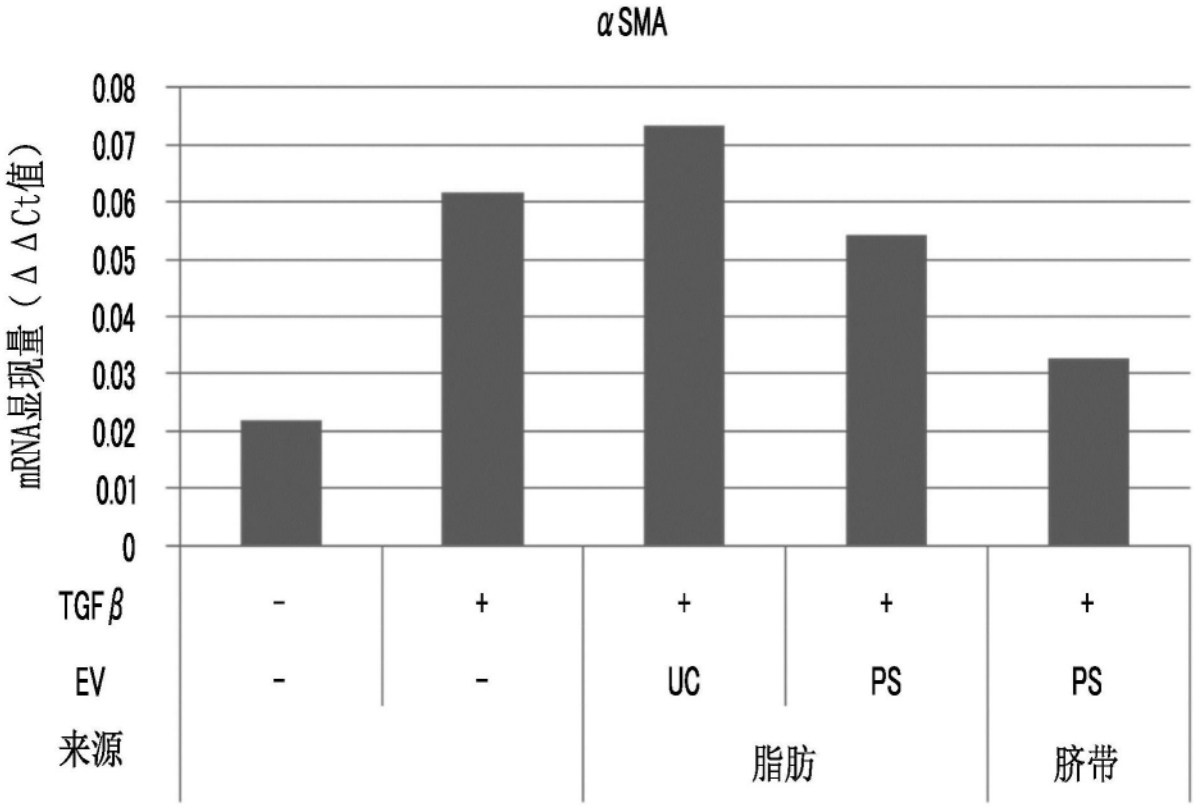

αSMA
mRNA显现量（ΔΔCt值）
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
TGFβ
EV
来源
-
+
+
+
+
-
-
UC
PS
PS
脂肪
脐带

图12