(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7425092号
(P7425092)

(45)発行日　令和6年1月30日(2024.1.30)

(24)登録日　令和6年1月22日(2024.1.22)

(51)国際特許分類		FI		
Ａ６１Ｋ　35/28　(2015.01)		Ａ６１Ｋ	35/28	
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	43/00	１０５
Ａ６１Ｋ　35/545 (2015.01)		Ａ６１Ｋ	35/545	
Ａ６１Ｋ　35/51　(2015.01)		Ａ６１Ｋ	35/51	
Ａ６１Ｋ　35/34　(2015.01)		Ａ６１Ｋ	35/34	

請求項の数　6　（全24頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-571238(P2021-571238)
(86)(22)出願日　令和3年1月14日(2021.1.14)
(86)国際出願番号　PCT/JP2021/001131
(87)国際公開番号　WO2021/145395
(87)国際公開日　令和3年7月22日(2021.7.22)
審査請求日　令和4年7月13日(2022.7.13)
(31)優先権主張番号　特願2020-4765(P2020-4765)
(32)優先日　令和2年1月15日(2020.1.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　306037311
富士フイルム株式会社
東京都港区西麻布２丁目２６番３０号
(74)代理人　110000109
弁理士法人特許事務所サイクス
(72)発明者　山根　昌之
兵庫県尼崎市高田町６番１号
(72)発明者　石止　貴将
兵庫県尼崎市高田町６番１号
審査官　佐々木　大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　抗線維化剤、及び抗線維化作用を有する細胞外小胞の製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞であって、ホスファチジルセリンが細胞外小胞の膜表面に露出しており、Ｔｉｍタンパク質が上記ホスファチジルセリンに対して特異的に結合することが可能な細胞外小胞を有効成分とする抗線維化剤。

【請求項２】

前記間葉系幹細胞が、ｉＰＳ細胞に由来するもの、或いは臍帯、臍帯血、骨髄、脂肪、筋肉、神経、皮膚、羊膜及び胎盤からなる群より選択される１種以上の組織に由来するものである、請求項１に記載の抗線維化剤。

【請求項３】

Ｔｉｍタンパク質が、Ｔｉｍ４タンパク質、Ｔｉｍ３タンパク質及びＴｉｍ１タンパク質から選択されるものである、請求項１又は２に記載の抗線維化剤。

【請求項４】

前記抗線維化剤に含まれる前記細胞外小胞は、前記Ｔｉｍタンパク質と結合していない、請求項１に記載の抗線維化剤。

【請求項５】

間葉系幹細胞由来の細胞外小胞からＴｉｍタンパク質を用いる方法により細胞外小胞を得ることを含む、抗線維化作用を有する細胞外小胞の製造方法。

【請求項６】

Ｔｉｍタンパク質が、Ｔｉｍ４タンパク質、Ｔｉｍ３タンパク質及びＴｉｍ１タンパク

質から選択されるものである、請求項５に記載の細胞外小胞の製造方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、間葉系幹細胞由来細胞外小胞を用いた抗線維化剤に関する。
【背景技術】
【０００２】
細胞に由来する、脂質二重膜で構成される小型膜小胞である細胞外小胞（Ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｖｅｓｉｃｌｅ）は、内包するｍＲＮＡやｍｉｃｒｏＲＮＡといった核酸、あるいはタンパク質の運搬を介した細胞間情報伝達を担っていると考えられている（非特許文献１）。
【０００３】
また、間葉系幹細胞（Ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ、以下「ＭＳＣ」と略記する場合がある）は、中胚葉組織に由来する体性幹細胞である。ＭＳＣは脂肪、骨髄、および臍帯マトリクス等から分離することが可能であるが、いずれも、接着性、ＣＤ１０５、ＣＤ７３、ＣＤ９０陽性、ＣＤ４５、ＣＤ３４、ＣＤ１４、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ７９ａ、ＣＤ１９、ＨＬＡ－Ｃｌａｓｓ ＩＩ（ＤＲ）陰性、骨、脂肪、軟骨への分化能という共通点を持つと考えられている。
【０００４】
近年、細胞外小胞が種々の疾患に関与している可能性が示唆されている。また、間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞から超遠心法により取得された細胞外小胞が、抗線維化作用（抗線維化効果）を有することが報告されている（非特許文献２）。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００５】
【文献】国際公開ＷＯ２０１６／０８８６８９
【非特許文献】
【０００６】
【文献】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
【文献】Ｆｅｒｇｕｓｏｎ ｅｔ ａｌ.（２０１８）Ｔｈｅ ｍｉｃｒｏＲＮＡ ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ ｌａｎｄｓｃａｐｅ ｏｆ ＭＳＣ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｅｘｏｓｏｍｅｓ：ａ ｓｙｓｔｅｍｓ ｖｉｅｗ. Ｓｃｉ Ｒｅｐ, ８（１）：１４１９
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
しかしながら、本発明者が間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞から超遠心法により取得された細胞外小胞の抗線維化作用について検証したところ、当該作用は弱く、産業利用するには不十分であることが判った。前記状況に鑑み、本発明の課題は、より治療効果が高い細胞外小胞の集団により構成された治療用製剤、特に抗線維化剤を提供することである。
【課題を解決するための手段】
【０００８】
本発明者らは、上記の課題を解決するため、種々の細胞外小胞の取得方法で選択的に回収した細胞外小胞について鋭意検討した結果、ホスファチジルセリン（ＰＳ）に対する親和性を有する物質を利用した方法（ＰＳアフィニティー法）により取得されたＰＳ陽性という特長を有する細胞外小胞の集団又は／及び線維芽細胞増殖因子により刺激を加えた間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞の集団が、抗線維化剤として高い効果を有することを見

出し、本発明を完成させるに至った。
【０００９】
すなわち本発明は、その基本的態様は、
（１）間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞を有効成分とする、抗線維化剤であって、細胞外小胞がホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を利用する方法により得られるものである、又は／及び細胞外小胞が線維芽細胞増殖因子により刺激を加えた間葉系幹細胞に由来するものである、抗線維化剤；
（２）前記間葉系幹細胞が、ｉＰＳ細胞に由来するもの、或いは臍帯、臍帯血、骨髄、脂肪、筋肉、神経、皮膚、羊膜及び胎盤からなる群より選択される１種以上の組織に由来するものである、上記（１）に記載の抗線維化剤；
（３）前記間葉系幹細胞が、トランスフォーミング増殖因子βにより刺激を加えたものである、上記（１）又は（２）に記載の抗線維化剤；
（４）トランスフォーミング増殖因子βがＴＧＦβ１又はＴＧＦβ３である、上記（３）に記載の抗線維化剤；
（５）前記細胞外小胞が、ホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を利用する方法により得られるものである、上記（１）～（４）の何れか１つに記載の抗線維化剤；
（６）ホスファチジルセリンに対する親和性を有する物質が、Ｔｉｍタンパク質である、上記（５）に記載の抗線維化剤；
（７）Ｔｉｍタンパク質が、Ｔｉｍ４タンパク質、Ｔｉｍ３タンパク質及びＴｉｍ１タンパク質から選択されるものである、上記（６）に記載の抗線維化剤；
（８）前記細胞外小胞が、トランスフォーミング増殖因子βにより刺激を加えた間葉系幹細胞に由来するものであり、且つホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を利用する方法により得られるものである、上記（１）又は（２）に記載の抗線維化剤；
である。
【００１０】
また本発明は、かかる抗線維化剤としての細胞外小胞の製造法でもあり、具体的には、
（９）間葉系幹細胞由来の細胞外小胞からホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を用いる方法により細胞外小胞を得ること、又は／及びトランスフォーミング増殖因子βにより刺激を加えた間葉系幹細胞から細胞外小胞を得ることを含む、抗線維化作用を有する細胞外小胞の製造方法；
（１０）間葉系幹細胞由来の細胞外小胞からホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を用いる方法により細胞外小胞を得ることを含む、上記（９）に記載の細胞外小胞の製造方法；
（１１）ホスファチジルセリンに対する親和性を有する物質が、Ｔｉｍタンパク質である、上記（１０）に記載の細胞外小胞の製造方法；
（１２）Ｔｉｍタンパク質が、Ｔｉｍ４タンパク質、Ｔｉｍ３タンパク質及びＴｉｍ１タンパク質から選択されるものである、上記（１１）に記載の細胞外小胞の製造方法；
（１３）トランスフォーミング増殖因子βにより刺激を加えた間葉系幹細胞から細胞外小胞を得ることを含む、上記（９）～（１２）に記載の細胞外小胞の製造方法；
である。
【発明の効果】
【００１１】
本発明により、間葉系幹細胞から抗線維化作用を有する細胞外小胞を有効成分とする抗線維化剤が提供される。本発明が提供する抗線維化剤は、組織の線維化に係わる因子、例えば、線維症関連遺伝子であるＣｏｌｌａｇｅｎ ＩＩＩ、Ｃｏｌｌａｇｅｎ Ｖ、α－ＳＭＡコラーゲンの産生調整作用を有することから、生体組織又は臓器の線維化の進行を抑えることにより、機能障害や機能不全に陥った生体組織及び臓器の機能再生を図ることができる。
【図面の簡単な説明】
【００１２】

【図１】図１は、ＰＳアフィニティー法及び超遠心分離法により取得したＭＳＣ由来細胞外小胞の粒子径分布をＮＴＡ法（ナノ粒子トラッキング解析法）により解析した結果を示した図である。
【図２】図２は、ＰＳアフィニティー法及び超遠心分離法により取得したＭＳＣ由来細胞外小胞のＣＤ９、ＣＤ６３、及びＣＤ８１をウエスタンブロット法により検出した結果を示した図である。
【図３】図３は、定量ＰＣＲに使用したプライマーを示した図である。
【図４】図４は、Ｃｏｌｌａｇｅｎ　ＩＩＩのｍＲＮＡ発現量を指標として、骨髄ＭＳＣ由来細胞外小胞の抗線維化作用を評価した結果を示した図である。
【図５】図５は、Ｃｏｌｌａｇｅｎ　Ｖのｍ ＲＮＡ発現量を指標として、骨髄ＭＳＣ由来細胞外小胞の抗線維化作用を評価した結果を示した図である。
【図６】図６は、αＳＭＡのｍＲＮＡ発現量を指標として、骨髄ＭＳＣ由来細胞外小胞の抗線維化作用を評価した結果を示した図である。
【図７】図７は、Ｃｏｌｌａｇｅｎ　ＩＩＩのｍＲＮＡ発現量を指標として、骨髄ＭＳＣ由来細胞外小胞の抗線維化作用を評価した結果を示した図である。
【図８】図８は、Ｃｏｌｌａｇｅｎ　Ｖのｍ ＲＮＡ発現量を指標として、骨髄ＭＳＣ由来細胞外小胞の抗線維化作用を評価した結果を示した図である。
【図９】図９は、α－ＳＭＡのｍＲＮＡ発現量を指標として、骨髄ＭＳＣ由来細胞外小胞の抗線維化作用を評価した結果を示した図である。
【図１０】図１０は、Ｃｏｌｌａｇｅｎ　ＩＩＩのｍＲＮＡ発現量を指標として、脂肪ＭＳＣ由来細胞外小胞及び臍帯ＭＳＣ由来細胞外小胞の抗線維化作用を評価した結果を示した図である。
【図１１】図１１は、Ｃｏｌｌａｇｅｎ　Ｖのｍ ＲＮＡ発現量を指標として、脂肪ＭＳＣ由来細胞外小胞及び臍帯ＭＳＣ由来細胞外小胞の抗線維化作用を評価した結果を示した図である。
【図１２】図１２は、αＳＭＡのｍＲＮＡ発現量を指標として、脂肪ＭＳＣ由来細胞外小胞及び臍帯ＭＳＣ由来細胞外小胞の抗線維化作用を評価した結果を示した図である。
【発明を実施するための形態】
【００１３】
本発明の基本は、上記したように、間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞からホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を利用する方法により得られる細胞外小胞又は／及びトランスフォーミング増殖因子βにより刺激を加えた間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞を有効成分とする抗線維化剤である。
【００１４】
細胞外小胞（以下、「ＥＶ」と略記する場合がある）は、細胞に由来する、脂質二重膜で構成される小型膜小胞である。当該細胞外小胞は、通常２０ｎｍ～１０００ｎｍの直径を有するものが挙げられ、５０ｎｍ～８００ｎｍのものが好ましく、５０ｎｍ～５００ｎｍのものがより好ましく、５０ｎｍ～２００ｎｍのものが特に好ましい。前記細胞外小胞としては、例えば、Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　９，５８１－５９３　（Ａｕｇｕｓｔ　２００９）、「肥満研究」Ｖｏｌ．１３　Ｎｏ．２　２００７　トピックス　青木直人等に記載の通り、その発生起源や小型膜小胞の大きさ等により様々に分類されるものが挙げられる。具体的には、エクソソーム、微小胞、エクトソーム、膜粒子、エクソソーム様小胞、アポトーシス小体、アディポソーム等が挙げられ、エクソソーム及び微小胞が好ましく、エクソソームがより好ましい。
【００１５】
前記エクソソームは、細胞に由来する、脂質二重膜で構成された小型膜小胞であり、例えば、５０ｎｍ～２００ｎｍの直径を有するものが挙げられ、５０ｎｍ～１５０ｎｍのものが好ましく、５０ｎｍ～１００ｎｍのものがより好ましい。なお、エクソソームは、後期エンドソームに由来すると考えられている。
【００１６】

前記微小胞は、細胞に由来する、脂質二重膜で構成された小型膜小胞であり、例えば、１００ｎｍ～１０００ｎｍの直径を有するものが挙げられ、１００ｎｍ～８００ｎｍのものが好ましく、１００ｎｍ～５００ｎｍのものがより好ましい。なお、微小胞は、細胞膜に由来すると考えられている。

【００１７】

ＭＳＣは、骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞などの中胚葉由来の組織（間葉系）に属する細胞への分化能をもつ幹細胞である。ＭＳＣは、脂肪、骨髄、臍帯マトリクス等から分離することが可能であり、本発明で使用するＭＳＣ（以下、「本発明に係るＭＳＣ」と略記する場合がある）は、例えば、中胚葉由来の組織から分離する方法やｉＰＳ細胞、ＥＳ細胞等の幹細胞から誘導する方法により得られる。本発明に係るＭＳＣとしては、臍帯、臍帯血、骨髄、脂肪、筋肉、神経、皮膚、羊膜及び胎盤からなる群より選択される１種以上の組織に由来するもの、ｉＰＳ細胞に由来するものが好ましく使用される。本発明に係るＭＳＣは、回収、濃縮、精製、単離、緩衝液等による希釈、ろ過滅菌等の前処理を行ったものであってもよい。これら前処理は、常法に従い適宜行えばよい。また、本発明に係るＭＳＣは、トランスフォーミング増殖因子βにより刺激を加えたものが好ましく、ＴＧＦβ１又はＴＧＦβ３により刺激を加えたものがより好ましい。

【００１８】

本発明が提供する抗線維化剤における有効成分である細胞外小胞（以下、「本発明に係る細胞外小胞」と略記する場合がある。）は、本発明に係るＭＳＣに由来する細胞外小胞からホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を用いて単離、取得した細胞外小胞（以下、「ＰＳ陽性細胞外小胞」と略記する場合がある）、又は／及びトランスフォーミング増殖因子βにより刺激を加えた本発明に係るＭＳＣに由来する細胞外小胞（以下、「刺激ＭＳＣ由来細胞外小胞」と略記する場合がある）である。

【００１９】

ＰＳ陽性細胞外小胞は、ホスファチジルセリンが細胞外小胞の膜表面に露出しているものと考えられる、ＰＳ陽性（ＰＳを含有する）の前記細胞外小胞である。

【００２０】

前記ホスファチジルセリンに対する親和性を有する物質（以下、「ＰＳ親和性物質」と略記する場合がある）としては、細胞外小胞の膜を構成するホスファチジルセリンに対して特異的に結合することが可能な物質であればいずれでもよく、例えば、ＡｎｎｅｘｉｎＶ；ＭＦＧ－Ｅ８；Ｔｉｍ１（Ｔ細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子１、Ｔ－ｃｅｌｌ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ－ｍｕｃｉｎ－ｄｏｍａｉｎ １）タンパク質、Ｔｉｍ２（Ｔ細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子２、Ｔ－ｃｅｌｌ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ－ｍｕｃｉｎ－ｄｏｍａｉｎ ２）タンパク質、Ｔｉｍ３（Ｔ細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子３、Ｔ－ｃｅｌｌ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ－ｍｕｃｉｎ－ｄｏｍａｉｎ ３）タンパク質、Ｔｉｍ４（Ｔ細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子４、Ｔ－ｃｅｌｌ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ－ｍｕｃｉｎ－ｄｏｍａｉｎ ４）タンパク質等のＴｉｍタンパク質が挙げられ、効率的に細胞外小胞を取得可能であることから、Ｔｉｍタンパク質が好ましく、Ｔｉｍ４タンパク質、Ｔｉｍ３タンパク質、及びＴｉｍ１タンパク質から選択されるものがより好ましく、Ｔｉｍ４タンパク質、Ｔｉｍ１タンパク質がさらに好ましく、Ｔｉｍ４タンパク質が特に好ましい。

【００２１】

ＰＳ陽性細胞外小胞は、ＥＶを含む本発明に係るＭＳＣの細胞培養上清液（以下、「ＥＶを含む細胞培養上清液」と略記する場合がある）から、ホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を用いて単離すること、又はＥＶを含む本発明に係るＭＳＣの細胞培養上清液から例えば超遠心法等のこの分野の常法によりＥＶを取得した後、得られたＥＶからホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を用いて単離することにより得られる。なかでも、ＥＶを含む本発明に係るＭＳＣの細胞培養上清液からホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を用いて直接単離するのが好ましい。また、前記ＥＶを含む細胞培養上清液は、例えば、本発明に係るＭＳＣを細胞培養により増殖させ、増殖さ

せた細胞をさらにＥＶ産生培地により培養することにより得られる。本発明に係るＭＳＣの細胞培養やＥＶ生産培地による培養は、この分野で行われる常法に従って行えばよく、用いられる培地や培養条件は特に限定されない。

【００２２】

ホスファチジルセリンに対する親和性を有する物質を利用する方法により細胞外小胞を取得する方法（以下、「ＰＳアフィニティー法」と略記する場合がある）の概要を以下に記載する。また、ＰＳアフィニティー法としては、例えば、特許文献１に具体例が記載されている。

【００２３】

ＰＳアフィニティー法は、カルシウムイオン存在下、前記ＥＶを含む細胞培養上清液とＰＳ親和性物質とを接触させて、当該細胞培養上清液中の細胞外小胞とＰＳ親和性物質との複合体（以下、「本発明に係る複合体」と略記する場合がある）を形成させた後、当該複合体からＰＳ親和性物質を分離し、ＰＳ陽性細胞外小胞を取得することによりなされる。

【００２４】

ＰＳアフィニティー法の好ましい方法は、具体的には下記工程を含む。

（１）カルシウムイオン存在下、ＥＶを含む細胞培養上清液とＰＳ親和性物質とを接触させて、当該細胞培養上清液中のＰＳ陽性細胞外小胞とＰＳ親和性物質との複合体（本発明に係る複合体）を形成させること（以下、「複合体形成工程」と略記する場合がある）、

（２）前記ＥＶを含む細胞培養上清液から、複合体形成工程で得られた本発明に係る複合体を分離すること（以下、「複合体分離工程」と略記する場合がある）、

（３）本発明に係る複合体からＰＳ陽性細胞外小胞を分離し、ＰＳ陽性細胞外小胞を取得すること（以下、「取得工程」と略記する場合がある）。

【００２５】

ＰＳアフィニティー法におけるＥＶを含む細胞培養上清液、ＰＳ親和性物質は、前記したものと同様であり、好ましいものや具体例も同様である。

【００２６】

複合体形成工程で用いられるＰＳ親和性物質は、不溶性担体に固定化（結合）されたものであることが好ましい。この場合、本発明に係る複合体は、複合体分離工程において、公知のＢ／Ｆ分離法により、前記ＥＶを含む細胞培養上清液から分離することができる。

【００２７】

ＰＳ親和性物質を不溶性担体に固定化する方法の例を以下に説明するが、例えば特許文献１に記載された方法により得ることが出来る。

【００２８】

ＰＳ親和性物質を固定化する不溶性担体としては、例えば、免疫学的測定法で用いられる不溶性の担体が挙げられる。具体的には、例えば、ポリスチレン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリメタクリル酸メチル、ポリアクリルアミド、ポリグリシジルメタクリレート、ポリプロピレン、ポリオレフィン、ポリイミド、ポリウレタン、ポリエステル、ポリ塩化ビニール、ポリエチレン、ポリクロロカーボネート、シリコーン樹脂、シリコーンラバー、アガロース、デキストラン、エチレン－無水マレイン酸共重合物等の有機物；ガラス、酸化ケイ素、ケイソウ、多孔性ガラス、スリガラス、アルミナ、シリカゲル、金属酸化物等の無機物質；鉄、コバルト、ニッケル、マグネタイト、クロマイト等の磁性体等；及びこれらの磁性体の合金を材料として調製されたものが挙げられる。また、これら担体の使用形態としては、例えば、粒子（ビーズ）、マイクロプレート、チューブ、ディスク状片等が挙げられる。前記不溶性担体の形態は、粒子（ビーズ）であることが好ましく、粒子の大きさは特に限定されないが、例えば１０ｎｍ～１００μｍのものが挙げられ、１００ｎｍ～１０μｍのものが好ましい。

【００２９】

ＰＳ親和性物質と前記不溶性担体との結合方法としては、タンパク質を担体に結合させる自体公知の方法が挙げられる。例えば、アフィニティー結合により結合させる方法、化学結合により結合させる方法（例えば、特許３２６９５５４号公報、ＷＯ２０１２／０３

９３９５公報に記載の方法）、物理的吸着により結合させる方法（例えば、特公平５－４１９４６号公報に記載の方法）等が挙げられ、物理的吸着により結合させる方法及びアフィニティー結合により結合させる方法が好ましく、簡便であることから物理的吸着により結合させる方法がより好ましい。

【００３０】

ＰＳ親和性物質と前記不溶性担体とを物理的吸着により結合させる方法としては、自体公知の方法に従い、ＰＳ親和性物質と前記不溶性担体とが結合する条件下で、ＰＳ親和性物質と前記不溶性担体とを接触させればよい。

【００３１】

前記不溶性担体に結合させるＰＳ親和性物質の量は、例えば不溶性担体が粒子（ビーズ）の場合、不溶性担体１ｍｇに対して、例えば０．１μｇ～５０μｇであればよく、０．１μｇ～３０μｇが好ましく、０．１μｇ～２０μｇがより好ましい。

【００３２】

ＰＳ親和性物質と前記不溶性担体との物理的吸着は、例えば、ＰＳ親和性物質を含有する溶液と前記不溶性担体とを接触させることにより行えばよい。

【００３３】

ＰＳ親和性物質を含有する溶液において、ＰＳ親和性物質を溶解させる溶液としては、ＰＳ親和性物質を安定な状態で溶解させる溶液であればよく、例えば精製水、例えばｐＨ６．０～９．８、好ましくは７．０～９．６に緩衝作用を有する緩衝液（例えばＭＯＰＳなどのグッド緩衝液、炭酸緩衝液、ＰＢＳ、ＴＢＳ、ＴＢＳ－Ｔ、ＨＢＳ等）が挙げられる。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常５～１００ｍＭ、好ましくは１０～１００ｍＭの範囲から適宜選択すればよい。ＮａＣｌを含有させる場合の濃度は、例えば１００～２００ｍＭが挙げられ、１４０～１６０ｍＭが好ましい。また、ＰＳ親和性物質を含有する溶液中には、ＰＳ親和性物質と前記不溶性担体との結合を妨げない量であれば、例えば糖類、ＮａＣｌ等の塩類、Ｔｗｅｅｎ^{TM}２０等の界面活性剤、防腐剤、タンパク質等が含まれていてもよい。

【００３４】

ＰＳ親和性物質と前記不溶性担体を物理的吸着により結合させる方法の具体例としては、例えば以下の方法が挙げられる。例えば、ビーズ（粒子）担体１ｍｇと、０．１μｇ～５０μｇ、好ましくは０．１μｇ～３０μｇ、より好ましくは０．１μｇ～２０μｇ含有する前記ＰＳ親和性物質を含有する溶液とを接触させ、２℃～３７℃、好ましくは４℃～１１℃で０．５～４８時間、好ましくは０．５～２４時間反応させる。

【００３５】

前記のようにして得られたＰＳ親和性物質を固定化した不溶性担体は、通常この分野で行われるブロッキング処理に付してもよい。

【００３６】

複合体形成工程は、カルシウムイオンの存在下に行う。カルシウムイオンは、ＰＳ親和性物質と前記ＥＶを含む細胞培養上清液中のＰＳ陽性細胞外小胞とを接触させる際に存在させる。ＰＳ親和性物質と前記ＥＶを含む細胞培養上清液中のＰＳ陽性細胞外小胞とを接触させる際のカルシウムイオン濃度は、通常０．５ｍＭ～１００ｍＭ、好ましくは１．０ｍＭ～１０ｍＭ、より好ましくは２．０ｍＭ～５．０ｍＭである。ＰＳ親和性物質と前記ＥＶを含む細胞培養上清液中のＰＳ陽性細胞外小胞との本発明に係る複合体が形成され、複合体分離工程を実施するまで、即ち、本発明に係る複合体を分離する工程に付すまでの本発明に係る複合体を含有する溶液中には、前記した如き濃度のカルシウムイオンが必要である。

【００３７】

カルシウムイオンの由来は特に限定されず、例えば塩化カルシウム、水酸化カルシウム、炭酸水素カルシウム、ヨウ化カルシウム、臭化カルシウム、酢酸カルシウム等が挙げられ、塩化カルシウム、炭酸水素カルシウム、ヨウ化カルシウムが好ましく、塩化カルシウム、炭酸水素カルシウムがより好ましい。

【００３８】
ＰＳ親和性物質と前記ＥＶを含む細胞培養上清液中のＰＳ陽性細胞外小胞とを接触させる際にカルシウムイオンを存在させる方法としては、ＰＳ親和性物質と前記ＥＶを含む細胞培養上清液中のＰＳ陽性細胞外小胞とを接触させる際のカルシウムイオン濃度が上記した範囲となるように、前記ＥＶを含む細胞培養上清液、又は／及びＰＳ親和性物質を含有する溶液に、前記した如きカルシウムイオンを含有させればよい。また、ＰＳ親和性物質と前記ＥＶを含む細胞培養上清液中のＰＳ陽性細胞外小胞とを接触させる際のカルシウムイオン濃度が上記した範囲となる量のカルシウムイオンを含有させた溶液（以下、「本発明に係るカルシウムイオン含有溶液」と略記する場合がある。）と、前記ＥＶを含む細胞培養上清液と、ＰＳ親和性物質を含有する溶液とを混合させてもよい。
【００３９】
本発明に係るカルシウムイオン含有溶液において、カルシウムイオンを溶解させる溶液としては、ＰＳ陽性細胞外小胞とＰＳ親和性物質との結合を妨げないものであればよく、例えば水、ｐＨ７．０～ｐＨ８．０に緩衝作用を有する緩衝液が挙げられ、ｐＨ７．２～ｐＨ７．６に緩衝作用を有する緩衝液（例えばＴＢＳ、ＨＢＳ等）等が好ましい。尚、リン酸バッファーはカルシウムと結合して沈殿が生じるので好ましくない。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常５ｍＭ～５０ｍＭ、好ましくは１０ｍＭ～３０ｍＭの範囲から適宜選択される。ＮａＣｌを含有させる場合の濃度は通常１００ｍＭ～２００ｍＭ、好ましくは１４０ｍＭ～１６０ｍＭの範囲から適宜選択される。
【００４０】
本発明に係るカルシウムイオン含有溶液中には、ＰＳ陽性細胞外小胞とＰＳ親和性物質との結合を妨げない量であれば、例えば糖類、ＮａＣｌ等の塩類、界面活性剤、防腐剤、ＢＳＡ等のタンパク質等が含まれていても良い。界面活性剤としては、例えばＴｗｅｅｎ™ ２０等が挙げられ、当該本発明に係るカルシウムイオン含有溶液における界面活性剤の濃度は、通常０．０００００１％～０．２％、好ましくは通常０．０００５％～０．１％である。
【００４１】
複合体形成工程において、ＰＳ親和性物質（前記不溶性担体に固定化されていてもよい）１μｇと接触させる前記ＥＶを含む細胞培養上清液の量は、通常０．１ｍｌ～１００ｍｌであり、０．１ｍｌ～１０ｍｌが好ましく、０．１ｍｌ～１．０ｍｌがより好ましい。前記ＥＶを含む細胞培養上清液とＰＳ親和性物質とを接触させる際の温度は、通常２～３７℃であり、４～３７℃が好ましく、４～３０℃がより好ましい。前記ＥＶを含む細胞培養上清液とＰＳ親和性物質との接触時間は、通常０．５～２４時間であり、０．５～８時間が好ましく、０．５～４時間がより好ましい。
【００４２】
複合体形成工程において、ＰＳ親和性物質を固定化した不溶性担体を用いる場合の当該担体の量としては、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液１ｍＬ当たり通常０．１ｍｇ～２０ｍｇであり、０．３ｍｇ～１０ｍｇが好ましく、０．５ｍｇ～６．０ｍｇがより好ましい。
【００４３】
複合体形成工程は、例えば以下の方法で行えばよい。即ち、前記ＥＶを含む細胞培養上清液と、ＰＳ親和性物質を固定化した不溶性担体と、本発明に係るカルシウムイオン含有溶液とを混合後の溶液１ｍＬ当たり通常０．１ｍｇ～２０ｍｇ、好ましくは０．３ｍｇ～１０ｍｇ、より好ましくは０．５ｍｇ～６．０ｍｇとなる量のＰＳ親和性物質を固定化した不溶性担体と、前記ＥＶを含む細胞培養上清液と当該担体と本発明に係るカルシウムイオン含有溶液とを混合後の溶液中のカルシウムイオン濃度が通常０．５ｍＭ～１００ｍＭ、好ましくは１．０ｍＭ～１０ｍＭ、より好ましくは２．０ｍＭ～５．０ｍＭとなる量の本発明に係るカルシウムイオン含有溶液と、ＰＳ親和性物質を固定化した不溶性担体１ｍｇ当たり通常０．１ｍｌ～１００ｍｌ、好ましくは０．１ｍｌ～１０ｍｌ、より好ましくは０．１ｍｌ～１．０ｍｌの前記ＥＶを含む細胞培養上清液とを、通常４．０～３７℃、

好ましくは４．０～２５℃、より好ましくは４．０℃～１１℃、通常０．５～２４時間、好ましくは０．５～８．０時間、より好ましくは０．５～４．０時間接触させて、担体に結合したＰＳ親和性物質と前記ＥＶを含む細胞培養上清液中のＰＳ陽性細胞外小胞との複合体（本発明に係る複合体）を形成させる。

【００４４】

複合体分離工程は、本発明に係る複合体と前記ＥＶを含む細胞培養上清液とを分離して本発明に係る複合体を取得することができるのであればどのような方法であってもよいが、例えば以下のような方法が挙げられる。

【００４５】

（１）ＰＳ親和性物質を固定化した不溶性担体の当該担体が磁気担体の場合：複合体形成工程により得られた本発明に係る複合体を含む容器を、要すればマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に本発明に係る複合体を集合させ、上清を除くことによりこれらを分離する方法。（２）ＰＳ親和性物質を固定化した不溶性担体の当該担体がビーズ状である場合：複合体形成工程により得られた本発明に係る複合体を含む容器を遠心分離処理し、本発明に係る複合体を沈殿として集合させた後、上清を除くことによりこれらを分離する方法。（３）ろ過により本発明に係る複合体と前記ＥＶを含む細胞培養上清液とを分離する方法。

【００４６】

複合体分離工程の具体例としては、例えば以下の方法が挙げられる。

磁気担体を不溶性担体として用いる場合、複合体形成工程をおこなった容器を要すればマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に得られた本発明に係る複合体を集合させ、上清の試料を除く。

【００４７】

複合体分離工程の後、要すれば得られた本発明に係る複合体をカルシウムイオン含有洗浄溶液を用いて洗浄してもよい（以下、「洗浄操作」と略記する場合がある）。洗浄操作により、ＰＳ親和性物質を固定化した不溶性担体表面に付着した細胞由来成分等の生体試料中の夾雑物を除去することができる。洗浄方法としては、カルシウムイオン含有洗浄溶液を使用する以外は、通常この分野で行われている洗浄方法が使用できる。

【００４８】

当該洗浄操作において用いられるカルシウムイオン含有洗浄溶液としては、カルシウムイオンを通常０．５～１００ｍＭ、好ましくは１～１０ｍＭ、より好ましくは２ｍＭ～５ｍＭ含有しＰＳ陽性細胞外小胞と不溶性担体に固定化されたＰＳ親和性物質との結合に影響を与えない溶液であればいずれでもよく、例えば、カルシウムイオンを通常０．５ｍＭ～１００ｍＭ、好ましくは通常１ｍＭ～１０ｍＭ、より好ましくは通常２ｍＭ～５ｍＭ含有する、ｐＨ７．０～ｐＨ８．０、好ましくはｐＨ７．２～ｐＨ７．６に緩衝作用を有するカルシウムを沈殿させない緩衝液（例えばＴＢＳ、ＴＢＳ－Ｔ、ＨＢＳ）が挙げられる。尚、リン酸バッファーはカルシウムと結合して沈殿が生じるので好ましくない。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常５ｍＭ～５０ｍＭ、好ましくは１０ｍＭ～３０ｍＭの範囲から適宜選択され、ＮａＣｌを含有する場合の濃度は通常１００ｍＭ～２００ｍＭ、好ましくは１４０ｍＭ～１６０ｍＭの範囲から適宜選択される。この溶液中には、ＰＳ陽性細胞外小胞と不溶性担体に固定化されたＰＳ親和性物質との結合を妨げない量であれば、例えば糖類、ＮａＣｌ等の塩類、界面活性剤、防腐剤、タンパク質等が含まれていても良い。界面活性剤としては、例えばＴｗｅｅｎ™ ２０（富士フイルム和光純薬（株））等が挙げられ、当該洗浄溶液における界面活性剤の濃度は、通常０．０００１％～０．２％、好ましくは通常０．０００５％～０．１％である。

【００４９】

ＰＳ親和性物質を固定化する不溶性担体として磁性粒子を用いた洗浄操作を例に取り、洗浄操作の具体例を説明する。すなわち、複合体分離工程により得られた本発明に係る複合体を含む容器内に本発明に係るカルシウムイオン含有洗浄溶液を加え、攪拌する。その後、前記容器を、マグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に本発明に係る複合体

を集合させ、前記容器内の溶液を捨てる。これらの洗浄操作は、必要に応じて数回繰り返し行ってもよい。

【００５０】

取得工程は、本発明に係る複合体からＰＳ陽性細胞外小胞を取得できる方法であれば何れでもよく、カルシウムイオン濃度を低下させる方法が好ましい。カルシウムイオンの濃度を低下させる方法としては、例えばカルシウムイオンキレート剤を使用する方法が挙げられる。すなわち、複合体分離工程後、要すれば洗浄操作後、反応系中のカルシウムイオン（本発明に係る複合体と結合しているカルシウムイオン及び本発明に係る複合体を含有する溶液から持ち込まれたカルシウムイオン）にカルシウムイオンキレート剤を作用させてカルシウムイオンをキレートさせ、反応系中のカルシウムイオンの有効濃度を低下させることによって、本発明に係る複合体からＰＳ陽性細胞外小胞を分離させればよい。

【００５１】

この方法に用いられるカルシウムイオンキレート剤としては、カルシウムイオンをキレートし得る化合物であればいずれでもよく、例えば、ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）、ＮＴＡ（ニトリロ三酢酸）、ＤＴＰＡ（ジエチレントリアミン五酢酸）、ＧＬＤＡ（Ｌ－グルタミン酸二酢酸）、ＨＥＤＴＡ（ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸）、ＧＥＤＴＡ（エチレングリコールビス（β－アミノエチルエーテル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ，Ｎ，－四酢酸）、ＴＴＨＡ（トリエチレンテトラミン－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’’，Ｎ’’’，Ｎ’’’－六酢酸）、ＨＩＤＡ（２－ヒドロキシエチルイミノ二（酢酸））、ＤＨＥＧ（Ｎ，Ｎ－ビス（２－ヒドロキシエチル）グリシン）、ＣｙＤＴＡ（ｔｒａｎｓ－１ｚ，２－Ｄｉａｍｉｎｏｃｙｃｌｏｈｅｘａｎｅ－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－ｔｅｔｒａａｃｅｔｉｃ ａｃｉｄ，ｍｏｎｏｈｙｄｒａｔｅ）等が挙げられ、ＥＤＴＡ、ＧＥＤＴＡ、ＣｙＤＴＡが好ましい。

【００５２】

前記カルシウムイオンキレート剤は、通常溶液として用いる。前記カルシウムイオンキレート剤を溶解させる溶液としては、前記カルシウムイオンキレート剤を溶解させるものであればよく、例えば、精製水、緩衝液等が挙げられる。緩衝液としては、通常ｐＨ７．０～ｐＨ８．０、好ましくはｐＨ７．２～ｐＨ７．６に緩衝作用を有する緩衝液（例えばＰＢＳ、ＴＢＳ、ＨＢＳ等）が好ましい。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常５Ｍｍ～５０Ｍｍ、好ましくは１０Ｍｍ～３０Ｍｍの範囲から適宜選択され、ＮａＣｌを含有させる場合の濃度は通常１００Ｍｍ～２００Ｍｍ、好ましくは１４０Ｍｍ～１６０Ｍｍの範囲から適宜選択される。カルシウムイオンキレート剤を含有する溶液（以下、「カルシウムイオンキレート剤含有溶液」と略記する場合がある）は、例えば糖類、ＮａＣｌ等の塩類、防腐剤、タンパク質等が含まれていても良い。

【００５３】

前記カルシウムイオンキレート剤含有溶液中の前記カルシウムイオンキレート剤の濃度としては、通常０．５ｍＭ～５００ｍＭであり、０．５ｍＭ～１００ｍＭが好ましく、０．５ｍＭ～５０ｍＭがより好ましい。また、カルシウムイオンキレート剤含有溶液のｐＨは、通常ｐＨ６．０～ｐＨ９．０であり、ｐＨ７．０～ｐＨ８．０が好ましく、ｐＨ７．２～ｐＨ７．６がより好ましい。

【００５４】

カルシウムイオンキレート剤を本発明に係る複合体と結合しているカルシウムイオンに作用させるには、前記カルシウムイオンキレート剤含有溶液を（例えばペレット状の）本発明に係る複合体と接触させ、本発明に係る複合体と結合しているカルシウムイオンとカルシウムイオンキレート剤含有溶液中のカルシウムイオンキレート剤とを反応させることにより行われる。

【００５５】

カルシウムイオンキレート剤含有溶液と本発明に係る複合体との接触は、例えばカルシウムイオンキレート剤含有溶液に本発明に係る複合体を懸濁させる方法（ＰＳ親和性物質を固定化した不溶性担体の不溶性担体がビーズである場合等）、カルシウムイオンキレート剤含有溶液に本発明に係る複合体を浸漬させる方法（ＰＳ親和性物質を固定化した不溶

性担体の不溶性担体がディスク状片、チューブである場合等）等により行うことができる。
【００５６】
本発明に係る複合体と接触させるカルシウムイオンキレート剤含有溶液の量としては、本発明に係る複合体と接触後の溶液中のカルシウムイオンの濃度が有効濃度未満となり、本発明に係る複合体から細胞外小胞が分離される量であればよい。
【００５７】
本発明に係る複合体にカルシウムイオンキレート剤を作用（接触）させる温度や時間としては、通常４．０℃～３７℃であり、１０℃～３０℃が好ましく、２０℃～３０℃がより好ましく、通常１～１０分間であり、５～１５分間が好ましい。
【００５８】
取得工程を、不溶性担体にＴｉｍタンパク質を結合させた担体（Ｔｉｍ担体）を用いる方法を例にとり説明すれば、以下の通りである。
即ち、複合体分離工程の後、要すればさらに洗浄操作の後、得られた本発明に係る複合体に、通常０．５ｍＭ～５００ｍＭ、好ましくは０．５ｍＭ～１００ｍＭ、より好ましくは０．５ｍＭ～５０ｍＭのカルシウムイオンキレート剤を含有する溶液をＴｉｍ担体１ｍｇ当たり通常１０μＬ～５００μＬ、好ましくは２０μＬ～２００μＬμＬ、より好ましくは５０μＬ～１００μＬμＬ添加し、通常４．０℃～３７℃、好ましくは１０℃～３０℃、より好ましくは２０℃～３０℃で通常１～３０分間、好ましくは５～１５分間反応させ、本発明に係る複合体からＰＳ陽性細胞外小胞を分離させる。
【００５９】
取得工程を実施することにより、本発明に係る複合体と接触させたカルシウムイオンキレート剤含有溶液は、ＰＳ親和性物質を固定化した不溶性担体と、本発明に係る複合体から分離（遊離）した細胞外小胞が含有していることとなる。従って、当該溶液からＰＳ親和性物質を固定化した担体を除去し、溶液だけを回収すれば、ＰＳ陽性細胞外小胞を含有する溶液を得ることが出来る。
【００６０】
刺激ＭＳＣ由来細胞外小胞は、トランスフォーミング増殖因子βにより刺激を加えたＥＶを含む本発明に係るＭＳＣの細胞培養上清液（すなわち、トランスフォーミング増殖因子βにより刺激を加えた前記ＥＶを含む細胞培養上清液）から単離することにより得られる。
【００６１】
刺激ＭＳＣ由来細胞外小胞の取得方法は、試料からＥＶを単離する際に行われる常法であれば何れでもよく、例えば、アフィニティー法（例えば、ＰＳアフィニティー法）、分画遠心分離法（例えば、ペレットダウン法、スクロースクッション法、密度勾配遠心法等の超遠心法）、免疫沈降法、クロマトグラフィー法（例えば、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル浸透クロマトグラフィー法）、密度勾配法（例えば、ショ糖密度勾配法）、電気泳動法（例えば、オルガネラ電気泳動法）、磁気分離法（例えば、磁気活性化細胞選別（ＭＡＣＳ）法）、限外濾過濃縮法（例えば、ナノ膜限外濾過濃縮法）、パーコール勾配単離法、マイクロ流体デバイスを利用した方法、ＰＥＧ沈殿法等が挙げられ、高い精製度の細胞外膜小胞を得られるアフィニティー法、又は理論的に偏りの無い回収が可能である分画遠心分離法が好ましく、アフィニティー法又は超遠心法がより好ましく、アフィニティー法が特に好ましい。アフィニティー法の中でも、ＰＳアフィニティー法が好ましい。アフィニティー法及び分画遠心分離法は、例えば、特開２０１６－０８８６８９に記載の方法に準じておこなえばよい。これらの単離方法は、１種のみを用いても、２種以上を組み合わせてもよい。また、１種の単離方法による単離を２回以上繰り返してもよい。
【００６２】
前記トランスフォーミング増殖因子βにより刺激を加えたＥＶを含む本発明に係るＭＳＣの細胞培養上清液は、例えば、トランスフォーミング増殖因子βにより刺激を加えた本発明に係るＭＳＣを細胞培養により増殖させ、増殖させた細胞をさらにＥＶ産生培地により培養することにより得られる。

当該トランスフォーミング増殖因子としては、特に限定されず、ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ３が好ましい。トランスフォーミング増殖因子βによる本発明に係るＭＳＣへの刺激は、トランスフォーミング増殖因子β共存下、本発明に係るＭＳＣを培養することにより行えばよい。

本発明に係るＭＳＣの細胞培養やＥＶ生産培地による培養は、この分野で行われる常法に従って行えばよく、用いられる培地や培養条件は特に限定されない。

【００６３】

本発明に係る細胞外小胞は、ＰＳ陽性細胞外小胞が好ましく、トランスフォーミング増殖因子βにより刺激を加えた本発明に係るＭＳＣに由来するものであり、且つホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を利用する方法（ＰＳアフィニティー法）により得られるものがより好ましく、トランスフォーミング増殖因子βにより刺激を加えた本発明に係るＭＳＣに由来するものであり、且つＴｉｍタンパク質を用いたＰＳアフィニティー法により得られるものがさらに好ましく、ＴＧＦβ１又はＴＧＦβ３により刺激を加えた本発明に係るＭＳＣに由来するものであり、且つＴｉｍ４タンパク質、Ｔｉｍ３タンパク質又はＴｉｍ１タンパク質を用いたＰＳアフィニティー法により得られるものが特に好ましく、ＴＧＦβ１又はＴＧＦβ３により刺激を加えた本発明に係るＭＳＣに由来するものであり、且つＴｉｍ４タンパク質を用いたＰＳアフィニティー法により得られるものが最も好ましい。

【００６４】

かくして調製された本発明に係る細胞外小胞は、組織の線維化に係わる因子、例えば、線維症関連遺伝子であるＣｏｌｌａｇｅｎ ＩＩＩ、Ｃｏｌｌａｇｅｎ Ｖ、α－ＳＭＡコラーゲン産生調整作用を有するものであった。したがって、本発明が提供する抗線維化剤は、有効成分としての本発明に係る細胞外小胞による線維症関連遺伝子である、例えば、Ｃｏｌｌａｇｅｎ ＩＩＩ、Ｃｏｌｌａｇｅｎ Ｖ、α－ＳＭＡコラーゲン産生の調整作用に基づくものであり、生体組織又は臓器の線維化の進行を抑えることにより、機能障害や機能不全に陥った生体組織及び臓器の機能再生を図ることができる。

【００６５】

本発明が提供する抗線維化剤は、線維化が生じうる疾患、例えば、肺線維化症、特発性肺線維化症、後腹膜線維化症、骨髄線維化症、関節リウマチ、肝線維化症、肝硬変、腎臓繊維症（腎線維化）、尿細管間質性腎炎、慢性膵炎、スキルス胃癌、膵嚢胞性線維症、心筋線維化、心内膜線維症、尿路結核や間質性膀胱炎、放射線性膀胱炎等の膀胱炎、手術後の瘢痕、熱傷性瘢痕、ケロイド、肥厚性瘢痕、強皮症、子宮筋腫、前立腺肥大症、アルツハイマー病、硬化性腹膜炎、Ｉ型糖尿病、手術後臓器癒着等に対する有効な治療薬となり得るものである。

【００６６】

本発明が提供する抗線維化剤は、基本的には、ＭＳＣ由来の細胞外小胞から単離して得られた本発明に係る細胞外小胞を有効成分とするものであり、その投与剤形は、本発明に係る細胞外小胞を含有する溶液をそのまま、或いは必要に応じて薬学的に許容される担体、添加剤と共に液剤、懸濁化剤、リポ化剤等として製剤化されるか、さらには、凍結乾燥により粉末物として、薬学的に許容される添加剤と共に錠剤等の固形剤として製剤化されたものである。

【００６７】

製剤化にあたって使用される薬学的に許容される担体や添加物としては、例えば、等張化剤、増粘剤、糖類、糖アルコール類、防腐剤（保存剤）、殺菌剤又は抗菌剤、ｐＨ調節剤、安定化剤、キレート剤、油性基剤、ゲル基剤、界面活性剤、懸濁化剤、結合剤、賦形剤、滑沢剤、崩壊剤、発泡剤、流動化剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、溶解補助剤、抗酸化剤、甘味剤、酸味剤、着色剤、呈味剤、香料又は清涼化剤等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【００６８】

なお、代表的な担体、添加物等を例示すれば、例えば、以下のものを挙げることができ

る。担体としては、例えば、水、含水エタノール等の水性担体を挙げることができる。等張化剤としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム等の無機塩を挙げることができる。多価アルコールとしては、例えば、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等を挙げることができる。増粘剤としては、例えば、カルボキシビニルポリマー、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、アルギン酸、ポリビニルアルコール（完全、又は部分ケン化物）、ポリビニルピロリドン、マクロゴール等を挙げることができる。

【００６９】

糖類としては、例えば、シクロデキストリン、ブドウ糖、果糖、乳糖等を挙げることができる。糖アルコール類としては、例えば、キシリトール、ソルビトール、マンニトール等の糖アルコールを挙げることができる。防腐剤、殺菌剤又は抗菌剤としては、例えば、ジブチルヒドロキシトルエン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、グルコン酸クロルヘキシジン、デヒドロ酢酸ナトリウム、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル糖を挙げることができる。ｐＨ調節剤としては、例えば、塩酸、ホウ酸、アミノエチルスルホン酸、クエン酸、酢酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、ホウ砂、トリエタノールアミン、モノエタノールアミン、ジイソプロパノールアミン、硫酸、硫酸マグネシウム、リン酸、ポリリン酸、プロピオン酸、シュウ酸、グルコン酸、フマル酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸等を挙げることができる。

【００７０】

安定化剤としては、例えば、ジブチルヒドロキシトルエン、トロメタモール、ナトリウムホルムアルデヒドスルホキシレート（ロンガリット）、トコフェロール、ピロ亜硫酸ナトリウム、モノエタノールアミン、モノステアリン酸アルミニウム、モノステアリン酸グリセリン、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム等を挙げることができる。また、基剤としては、例えば、オリーブ油、トウモロコシ油、大豆油、ゴマ油、綿実油等の植物油；中鎖脂肪酸トリグリセリド等の油性基剤；マクロゴール４００等の水性基剤；カルボキシビニルポリマー、ガム質等のゲル基剤を挙げることができる。界面活性剤としては、例えば、ポリソルベート８０、硬化ヒマシ油、グリセリン脂肪酸エステル、セスキオレイン酸ソルビタン等が挙げられ、懸濁化剤としては、例えば、サラシミツロウや各種界面活性剤、アラビアゴム、アラビアゴム末、キサンタンガム、大豆レシチン等を挙げることができる。

【００７１】

さらに、結合剤としては、例えば、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等を、また、賦形剤としては、例えば、ショ糖、乳糖、デンプン、コーンスターチ、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸等を挙げることができ、滑沢剤としては、例えば、ショ糖脂肪酸エステル、ステアリン酸マグネシウム、タルク等が挙げられ、崩壊剤としては、例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、クロスポビドン、クロスカルメロースナトリウム等が挙げられ、流動化剤としては、例えば、メタケイ酸アルミン酸ナトリウム、軽質無水ケイ酸等を挙げることができる。

【００７２】

本発明が提供する抗線維化剤にあっては、好ましくは液剤、懸濁剤又はリポ化剤として製剤化されるのがよく、基本的には、ＭＳＣ由来の細胞外小胞から単離得られた本発明に係る細胞外小胞を含む溶液を必要に応じて上記した担体、添加剤と共に、例えば、生理食塩水、５％ブドウ糖溶液、リポ乳剤等にて混合して得られる。なお、凍結乾燥粉末を用い、用時溶解、または懸濁型の製剤とすることもできる。

【００７３】

本発明が提供する抗線維化剤が液剤、懸濁剤又はリポ化剤である場合、そのｐＨは、医

薬上、薬理学的に、または生理学的に許容される範囲内であれば特に限定されるものではないが、例えば、ｐＨ２．５～９．０、好ましくは３．０～８．５、更に好ましくは３．５～８．０となる範囲が挙げられ、適宜ｐＨ調整剤にて調整することができる。

【００７４】

本発明が提供する抗線維化剤の投与経路は、剤形に応じて、経口投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、動脈内投与、髄腔内投与、腹腔内投与が挙げられる。

その投与量は、対象となる患者の状態（体重、年齢、症状、体調等）、及び投与剤形等によって異なるが、通常、成人に投与する場合には、粒子数として、1×10^{5}～1×10^{17}個／回であり、5×10^{5}～5×10^{16}個／回が好ましく、1×10^{6}～1×10^{16}個／回が更に好ましく、5×10^{6}～5×10^{15}個／回が特に好ましい。なお、本用量を１回投与量として、一日複数回投与してもよく、本用量を複数回に分けて投与することができる。

【実施例】

【００７５】

以下、実施例及び比較例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの例によって何ら限定されない。

【００７６】

実施例１．ＰＳアフィニティー法による細胞外小胞の取得

（１）細胞培養

骨髄由来間葉系幹細胞であるＰｏｉｅｔｉｃｓ^{TM}ヒト間葉系幹細胞（ＬＯＮＺＡ社）を、１５％ＦＢＳ（Ｓｅｌｂｏｒｎｅ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｅｖｉｃｅ Ｐｔｙ．社）含有ＭＥＭα（Ｌ－グルタミン、フェノールレッド含有、富士フイルム和光純薬（株））を増殖培地として用いて培養した。その後、培養した骨髄由来間葉系幹細胞を細胞数3×10^{5}で１００mm細胞培養用ディッシュ（Ｃｏｒｎｉｎｇ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ社）に播種し、５％CO_2、３７℃の条件に設定した細胞培養用インキュベータ内で７２時間培養し、細胞数3×10^{6}まで増殖させた。

（２）細胞外小胞の産生

（１）で増殖させた骨髄由来間葉系幹細胞を、細胞外小胞産生培地である１０％ＧＩＢＣＯ：Ｆｅｔａｌ Ｂｏｖｉｎｅ Ｓｅｒｕｍ， ｅｘｏｓｏｍｅ－ｄｅｐｌｅｔｅｄ，Ｏｎｅ Ｓｈｏｔ^{TM} ｆｏｒｍａｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）含有Ｄ－ＭＥＭ（富士フイルム和光純薬（株））２０mＬに置換し、５％CO_2、３７℃の条件に設定した細胞培養用インキュベータ内で１２０時間培養を行った。その後、得られた培養上清を５０mＬの遠沈管に回収して２，０００×ｇで２０分間遠心し、上清を回収した。

（３）ＰＳアフィニティー法による細胞外小胞の取得

（２）で回収した培養上清１mＬから、ＭａｇＣａｐｔｕｒｅ^{TM} Ｅｘｏｓｏｍｅ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔ ＰＳ（富士フイルム和光純薬（株））を用いて、当該キットに添付の説明書に記載の手順に従って細胞外小胞を単離し、ＥＶ－Ｓａｖｅ^{TM} 細胞外小胞ブロッキング試薬（富士フイルム和光純薬（株））を添加した１mＭ ＥＤＴＡ含有ＰＢＳ（Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ－ｂｕｆｆｅｒｅｄ ｓａｌｉｎｅ）中に細胞外小胞を得た。その後、ビバスピン５００（ザルトリウス社、分画分子量：１００，０００（１００Ｋ）、膜材質：ＰＥＳ）を用いて、ＥＶ－Ｓａｖｅ^{TM} 細胞外小胞ブロッキング試薬を添加したＰＢＳへバッファー交換を行った。以下、得られた溶液を「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」と記載する場合がある。

【００７７】

比較例１．超遠心法による細胞外小胞の取得

実施例１（１）－（２）と同様の方法に従って調製した培養上清を、超遠心分離機（Ｂｅｃｋｍａｎ：Ｏｐｔｉｍａ^{TM} Ｌ－１００ＸＰ）を用いて１１０，０００×ｇで７０分間遠心分離した。得られたペレットに１mＬのＰＢＳを添加し、再度１１０，０００×ｇで７０分間遠心分離した。最終的に得られたペレットをＥＶ－Ｓａｖｅ^{TM} 細胞外小胞ブ

ロッキング試薬（富士フイルム和光純薬（株））を添加したＰＢＳにより溶解した。以下、得られた溶液を、「細胞外小胞溶液（超遠心法、骨髄由来ＭＳＣ）」と記載する場合がある。

【００７８】

実験例１．ナノトラッキング解析法による細胞外小胞粒子数の測定

実施例１で得られた「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」の単位体積当たりの粒子数を、ＮａｎｏＳｉｇｈｔ（Ｍａｌｖｅｒｎ Ｐａｎａｌｙｔｉｃａｌ社）を用いて、ナノ粒子トラッキング解析法（Ｎａｎｏ Ｔｒａｃｋｉｎｇ Ａｎａｌｙｓｉｓ法）により、ＮａｎｏＳｉｇｈｔの説明書に記載の手順に従って測定し、平均粒子径と単位体積当たりの平均粒子数［ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ］を算出した。得られた粒径分布のグラフを実験例２の結果と併せて図１に示す。図１のグラフにおいて、縦軸は粒子数、横軸は粒径をそれぞれ示す。ＰＳアフィニティー法により取得した細胞外小胞の平均粒径は、１３８．１±０．２ｎｍ、単位体積当たりの平均粒子数は、１．７６×１０^{10}［ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ］であった。

【００７９】

実験例２．ナノトラッキング解析法による細胞外小胞粒子数の測定

「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」の代わりに、比較例１で得られた「細胞外小胞溶液（超遠心法、骨髄由来ＭＳＣ）」を用いた以外は、実験例１と同様の方法により、平均の粒子径と単位体積当たりの平均粒子数［Ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ］を算出した。得られた粒径分布のグラフを実験例１の結果と併せて図１に示す。超遠心法により取得した細胞外小胞の平均粒径は、１３８．１±２．９ｎｍ、単位体積当たりの平均粒子数は、１．６８×１０^{10}［ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ］であった。

【００８０】

実験例３．ウエスタンブロッティング法による細胞外小胞マーカータンパク質の解析

実施例１で得られた「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」を用いて、細胞外小胞マーカータンパク質であるＣＤ９、ＣＤ６３、及びＣＤ８１についてウエスタンブロット法により解析した。

実験例１で算出した「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」中の単位体積当たりの平均粒子数に基づいて、３．０×１０^{8} ｐａｒｔｉｃｌｅｓ分の「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」に１／４量のＳＤＳ－ＰＡＧＥ Ｓａｍｐｌｅ Ｂｕｆｆｅｒ ４倍濃縮液（還元剤不含）（富士フイルム和光純薬（株））を混合し、全量を用いて１０－２０％アクリルアミドゲル（富士フイルム和光純薬（株））により電気泳動した。その後、転写バッファー（富士フイルム和光純薬（株））を用いて、ＰＶＤＦメンブレン（ＢｉｏＲａｄ社）に転写した。転写を行ったメンブレンは、１％スキムミルク含有ＰＢＳ－Ｔ溶液（０．１ （ｗ／ｖ）％ Ｔｗｅｅｎ^{TM}２０含有ＰＢＳ溶液）に１時間浸してブロッキング処理を行い、抗ＣＤ９抗体（富士フイルム和光純薬（株））、抗ＣＤ６３抗体（富士フイルム和光純薬（株））、及び抗ＣＤ８１抗体（富士フイルム和光純薬（株））をそれぞれＰＢＳ－Ｔ溶液で１．１μｇ／ｍＬに調整した一次抗体溶液と反応させた。その後、抗ＣＤ９抗体、抗ＣＤ８１抗体を反応させたメンブレンは、ＨＲＰ標識抗ラットＩｇＧ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ社）をＰＢＳ－Ｔ溶液で１００００倍希釈した二次抗体溶液と反応させ、抗ＣＤ６３抗体を反応させたメンブレンは、ＨＲＰ標識抗マウスＩｇＧ抗体（ＤＡＫＯ社）ＰＢＳ－Ｔ溶液で１００００倍希釈した二次抗体溶液とそれぞれ反応させた。その後、検出試薬としてイムノスター^{TM} ゼータ（富士フイルム和光純薬（株））を使用し、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｉｍａｇｅｒ ６００（ＧＥヘルスケア社）を用いてシグナルを検出した。ウエスタンブロットの結果を、実験例４の結果と併せて図２に示す。図中、横軸のＰＳは「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」を用いた場合の結果（実験例３）を、ＵＣは「細胞外小胞溶液（超遠心法、骨髄由来ＭＳＣ）」を用いた場合の結果（実験例４）をそれぞれ示す。また、縦軸の矢印は、検出した細胞外小胞マーカータンパク質のバンド位置を示す。

【００８１】
実験例４．ウエスタンブロッティング法による細胞外小胞マーカータンパク質の解析
「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」の代わりに、比較例１で得られた「細胞外小胞溶液（超遠心法、骨髄由来ＭＳＣ）」を用いた以外は、実験例３と同様の方法により、細胞外小胞マーカータンパク質であるＣＤ９、ＣＤ６３、及びＣＤ８１についてウエスタンブロット法により解析した。ウエスタンブロットの結果を、実験例３の結果と併せて図２に示す。
【００８２】
図２より、ＰＳアフィニティー法で取得した細胞外小胞［「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」中の細胞外小胞、実験例３］の方が、超遠心法で取得した細胞外小胞［「細胞外小胞溶液（超遠心法、骨髄由来ＭＳＣ）」中の細胞外小胞、実験例４］よりも、ＣＤ９とＣＤ６３の発現量が多いことが判った。
【００８３】
実施例２－４．ＰＳアフィニティー法で取得した細胞外小胞の抗線維化作用の評価
実施例１で調製した「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」中の細胞外小胞の抗線維化作用を評価した。
１０％ＦＢＳ（Ｂｉｏｓｅｒａ社）含有ＤＭＥＭ（富士フイルム和光純薬（株））にヒト胎児肺由来線維芽細胞であるＴＩＧ３細胞（ＪＣＲＢより分譲）を懸濁し、２４ ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅ（Ｃｏｒｎｉｎｇ社）に１ウェルあたり細胞数２．５×１０^{4}、培地量５００μＬでそれぞれ播種した。細胞播種から２４時間後、実施例１で得られた「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」を、実験例１の測定結果を参考に終濃度１×１０^{9} ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬとなる量それぞれのウェルに添加し、１６時間培養した。その後、終濃度５ｎｇ／ｍＬ ＴＧＦβ１（Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ社）となる量をそれぞれのウェルに添加して刺激し、さらに２４時間培養した。ＰｕｒｅＬｉｎｋ^{TM} ＲＮＡ Ｍｉｎｉ キット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を用いて、当該キットに添付の説明書に記載の手順に従ってＲＮＡをそれぞれ抽出した。抽出したＲＮＡ２００ｎｇから、ＲｅｖｅｒＴｒａ Ａｃｅ^{TM} ｑＰＣＲ ＲＴ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ ｗｉｔｈ ｇＤＮＡ Ｒｅｍｏｖｅｒ（東洋紡（株））を用いて、当該キットに添付の説明書に記載の手順に従ってｃＤＮＡを合成した。合成したｃＤＮＡを用いて、ＫＯＤ ＳＹＢＲ ｑＰＣＲ Ｍｉｘ （東洋紡（株））により、線維症関連遺伝子であるＣｏｌｌａｇｅｎ ＩＩＩ（実施例２）、Ｃｏｌｌａｇｅｎ Ⅴ（実施例３）、α－ＳＭＡ（実施例４）、及び内部標準であるＧＡＰＤＨのｍＲＮＡ発現量を、それぞれ定量ＰＣＲにより測定した。定量ＰＣＲに使用したプライマーを図３（配列番号１－６）にそれぞれ示す。
【００８４】
定量ＰＣＲの結果を比較例２－４の結果と併せて、それぞれ図４－６に示す。図４はＣｏｌｌａｇｅｎ ＩＩＩのｍＲＮＡ発現量、図５はＣｏｌｌａｇｅｎ ⅤのｍＲＮＡ発現量、図６はα－ＳＭＡのｍＲＮＡ発現量の結果である。図中、横軸の「ＴＧＦβ１刺激（－） ＥＶ（－） 精製方法（－）」は、刺激を加えていないＴＩＧ３における結果を示し、「ＴＧＦβ１刺激（＋） ＥＶ（－） 精製方法（－）」は、ＴＧＦβ１刺激を加えたＴＩＧ３（コントロール）における結果を示し、「ＴＧＦβ１刺激（＋） ＥＶ（＋） 精製方法（ＰＳ）」は、ＴＧＦβ１刺激を加えたＴＩＧ３に「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」を用いた場合の結果を示し（実施例２（図４）、実施例３（図５）、実施例４（図６））、「ＴＧＦβ１刺激（＋） ＥＶ（＋） 精製方法（ＵＣ）」は、ＴＧＦβ１刺激を加えたＴＩＧ３に「細胞外小胞溶液（超遠心法、骨髄由来ＭＳＣ）」を用いた場合の結果（比較例２（図４）、比較例３（図５）、比較例４（図６））をそれぞれ示す。各遺伝子の発現量は、各遺伝子に対するプライマーを用いて行ったｑＰＣＲから得られた数値をＧＡＰＤＨに対してノーマライズし、コントロールにおける対象ｍＲＮＡ発現に相対するΔΔｃｔ値として示し、各図の縦軸とした。
【００８５】

比較例２－４．超遠心法で取得した細胞外小胞の抗線維化作用の評価

「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」の代わりに、比較例１で得られた「細胞外小胞溶液（超遠心法、骨髄由来ＭＳＣ）」を用いた以外は、実施例２－４と同様の方法により、線維症関連遺伝子であるＣｏｌｌａｇｅｎ　ＩＩＩ（比較例２）、Ｃｏｌｌａｇｅｎ　Ｖ（比較例３）、α－ＳＭＡ（比較例４）及び内部標準であるＧＡＰＤＨのｍＲＮＡ発現量を、それぞれ定量ＰＣＲにより測定し、細胞外小胞の抗線維化作用を評価した。定量ＰＣＲの結果を実施例２－４の結果と併せて、それぞれ図４－６に示す。

【００８６】

図４－６より、いずれの線維症関連遺伝子のｍＲＮＡ発現量についても、ＴＧＦβ１刺激を行うことにより上昇することが確認された。このようなＴＧＦβによるｍＲＮＡ発現量の上昇は、ＰＳアフィニティー法により取得した細胞外小胞を用いることにより抑制されること（抗線維化作用を有すること）が判った。また、ＰＳフィニティー法により取得した細胞外小胞（実施例２－４）は、超遠心法により取得した細胞外小胞（比較例２－４）よりも顕著に高い抗線維化作用（抗線維化効果）を有することが判った。

【００８７】

実施例５－７．ＰＳアフィニティー法で取得した細胞外小胞の抗線維化作用の評価

実施例１で得られた「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」を「終濃度１×10^9 ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬとなる量」用いる代わりに、実施例１で得られた「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」を「終濃度６×10^8 ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬとなる量」用いた以外は、実施例２－４と同様の方法により、線維症関連遺伝子であるＣｏｌｌａｇｅｎ　ＩＩＩ（実施例５）、Ｃｏｌｌａｇｅｎ　Ｖ（実施例６）、α－ＳＭＡ（実施例７）及び内部標準であるＧＡＰＤＨのｍＲＮＡ発現量を、それぞれ定量ＰＣＲにより測定し、ＰＳアフィニティー法で取得した細胞外小胞の抗線維化作用を評価した。定量ＰＣＲの結果を実施例８－１１、比較例５－７の結果と併せて、それぞれ図７－９に示す。図７はＣｏｌｌａｇｅｎ　ＩＩＩのｍＲＮＡ発現量、図８はＣｏｌｌａｇｅｎ　Ｖのｍ ＲＮＡ発現量、図９はα－ＳＭＡのｍＲＮＡ発現量の結果である。図中の横軸は、図４－６と同様の意味を表す。

【００８８】

比較例５－７．超遠心法で取得した細胞外小胞の抗線維化作用の評価

比較例１で得られた「細胞外小胞溶液（超遠心法、骨髄由来ＭＳＣ）」を「終濃度１×10^9 ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬとなる量」用いる代わりに、比較例１で得られた「細胞外小胞溶液（超遠心法、骨髄由来ＭＳＣ）」を「終濃度６×10^8 ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬとなる量」用いた以外は、比較例２－４と同様の方法により、線維症関連遺伝子であるＣｏｌｌａｇｅｎ　ＩＩＩ（比較例５）、Ｃｏｌｌａｇｅｎ　Ｖ（比較例６）、α－ＳＭＡ（比較例７）及び内部標準であるＧＡＰＤＨのｍＲＮＡ発現量を、それぞれ定量ＰＣＲにより測定し、超遠心法で取得した細胞外小胞の抗線維化作用を評価した。定量ＰＣＲの結果を実施例５－１１の結果と併せて、それぞれ図７－９に示す。

【００８９】

実施例８－１０．ＰＳアフィニティー法で取得したＴＧＦβ１刺激間葉系幹細胞由来細胞外小胞の抗線維化作用の評価

実施例１（１）細胞培養と同様の方法により骨髄由来間葉系幹細胞を増殖させた後、ＴＧＦβ１（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ社）を終濃度２０ｎｇ／ｍＬで添加して刺激し、さらに２４時間培養を行った。次いで、実施例１（２）細胞外小胞の産生、実施例１（３）ＰＳアフィニティー法による細胞外小胞の取得と同様の方法により細胞外小胞を単離し、ＥＶ－Ｓａｖｅ^{TM} 細胞外小胞ブロッキング試薬を添加したＰＢＳへバッファー交換を行った。以下、得られた溶液を「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ、ＴＧＦβ１刺激）」と記載する場合がある。得られた「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ、ＴＧＦβ１刺激）」の平均粒子径と単位体積当たりの平均粒子数［ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ］を実験例１と同様の方法により算出した。また、「細胞

外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」の代わりに、「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ、ＴＧＦβ１刺激）」を用いた以外は、実施例２－４と同様の方法により、線維症関連遺伝子であるＣｏｌｌａｇｅｎ ＩＩＩ（実施例８）、Ｃｏｌｌａｇｅｎ Ⅴ（実施例９）、α－ＳＭＡ（実施例１０）及び内部標準であるＧＡＰＤＨのｍＲＮＡ発現量を、それぞれ定量ＰＣＲにより測定し、ＰＳアフィニティー法で取得した細胞外小胞の抗線維化作用を評価した。定量ＰＣＲの結果を実施例５－７、１１、比較例５－７の結果と併せて、それぞれ図７－９に示す。

【００９０】

実施例１１．超遠心法で取得したＴＧＦβ１刺激間葉系幹細胞由来細胞外小胞の抗線維化作用の評価

実施例１（１）細胞培養と同様の方法により骨髄由来間葉系幹細胞を増殖させた後、ＴＧＦβ１（Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ社）を終濃度２０ｎｇ／ｍＬで添加して刺激し、さらに２４時間培養を行った。次いで、実施例１（２）細胞外小胞の産生と同様の方法により調製した培養上清を、超遠心分離機（Ｂｅｃｋｍａｎ：Ｏｐｔｉｍａ™ Ｌ－１００ＸＰ）を用いて１１０，０００×ｇで７０分間遠心分離した。得られたペレットに１ｍＬのＰＢＳを添加し、再度１１０，０００×ｇで７０分間遠心分離した。最終的に得られたペレットをＥＶ－Ｓａｖｅ™ 細胞外小胞ブロッキング試薬（富士フイルム和光純薬（株））を添加したＰＢＳにより溶解した。以下、得られた溶液を、「細胞外小胞溶液（超遠心法、骨髄由来ＭＳＣ、ＴＧＦβ１刺激）」と記載する場合がある。得られた「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ、ＴＧＦβ１刺激）」の平均粒子径と単位体積当たりの平均粒子数［ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ］を実験例１と同様の方法により算出した。また、「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」の代わりに、「細胞外小胞溶液（超遠心法、骨髄由来ＭＳＣ、ＴＧＦβ１刺激）」を用いた以外は、実施例４と同様の方法により、線維症関連遺伝子であるα－ＳＭＡ（実施例１１）及び内部標準であるＧＡＰＤＨのｍＲＮＡ発現量を、それぞれ定量ＰＣＲにより測定し、ＰＳアフィニティー法で取得した細胞外小胞の抗線維化作用を評価した。定量ＰＣＲの結果を実施例５－１０、比較例５－７の結果と併せて、それぞれ図７－９に示す。

【００９１】

図７－９より、ＴＧＦβによる線維症関連遺伝子のｍＲＮＡ発現量の上昇は、ＰＳアフィニティー法により取得した細胞外小胞を用いることにより抑制されること（ＰＳアフィニティー法により取得した細胞外小胞が抗線維化作用を有すること）が判った。また、ＰＳフィニティー法により取得した細胞外小胞（実施例５－７）は、超遠心法により取得した細胞外小胞（比較例５－７）よりも顕著に高い抗線維化作用を有することが判った。図７－９より、ＴＧＦβにより刺激した間葉系幹細胞から取得した細胞外小胞（実施例８－１３）は、刺激を行っていない間葉系幹細胞から取得した細胞外小胞（実施例５－７、比較例５－７）よりも、高い抗線維化作用を有することが判った。さらに、ＴＧＦβにより刺激した間葉系幹細胞からＰＳアフィニティー法により取得した細胞外小胞（実施例１０）は、ＴＧＦβにより刺激した間葉系幹細胞から超遠心法により取得した細胞外小胞（実施例１１）等他の手法により取得された細胞外小胞よりも特に顕著に抗線維化作用を有することが判った。

【００９２】

実施例１２－１３：ＰＳアフィニティー法による細胞外小胞の取得

「骨髄由来間葉系幹細胞であるＰｏｉｅｔｉｃｓ™ ヒト間葉系幹細胞（ＬＯＮＺＡ社）」の代わりに、「脂肪由来間葉系幹細胞であるＨｕｍａｎ Ａｄｉｐｏｓｅ－Ｄｅｒｉｖｅｄ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ（ＬＯＮＺＡ社）」（実施例１２）又は「臍帯由来間葉系幹細胞であるＨｕｍａｎ Ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ ｆｒｏｍ Ｕｍｂｉｌｉｃａｌ Ｃｏｒｄ Ｍａｔｒｉｘ（ＰｒｏｍｏＣｅｌｌ社）」（実施例１３）を用いた以外は、実施例１と同様の方法により細胞外小胞の取得を行い、「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、脂肪由来ＭＳＣ）」（実施例１２）及び「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、臍帯由来ＭＳＣ）」（実施例１３）をそれぞれ得た。

【００９３】
比較例８．超遠心法による細胞外小胞の取得
「骨髄由来間葉系幹細胞であるＰｏｉｅｔｉｃｓ™ ヒト間葉系幹細胞（ＬＯＮＺＡ社）」の代わりに、「脂肪由来間葉系幹細胞であるＨｕｍａｎ Ａｄｉｐｏｓｅ－Ｄｅｒｉｖｅｄ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ（ＬＯＮＺＡ社）」を用いた以外は、実施例１（１）－（２）と同様の方法に従って調製した培養上清を、超遠心分離機（Ｂｅｃｋｍａｎ：Ｏｐｔｉｍａ™ Ｌ－１００ＸＰ）を用いて１１０，０００×ｇで７０分間遠心分離した。得られたペレットに１ｍＬのＰＢＳを添加し、再度１１０，０００×ｇで７０分間遠心分離した。最終的に得られたペレットをＥＶ－Ｓａｖｅ™ 細胞外小胞ブロッキング試薬（富士フイルム和光純薬（株））を添加したＰＢＳにより溶解し、「細胞外小胞溶液（超遠心法、脂肪由来ＭＳＣ）」を得た。
【００９４】
実施例１４－１９．ＰＳアフィニティー法で取得した細胞外小胞の抗線維化作用の評価
実施例１２及び１３で調製した「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法）」中の細胞外小胞の抗線維化作用を評価した。
「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」の代わりに、実施例１２で得られた「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、脂肪由来ＭＳＣ）」を用いた以外は、実施例５－７と同様の方法により、線維症関連遺伝子であるＣｏｌｌａｇｅｎ ＩＩＩ（実施例１４）、Ｃｏｌｌａｇｅｎ Ⅴ（実施例１６）、α－ＳＭＡ（実施例１８）、並びに内部標準であるＧＡＰＤＨのｍＲＮＡ発現量をそれぞれ定量ＰＣＲにより測定した。同様に、「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」の代わりに、実施例１３で得られた「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、臍帯由来ＭＳＣ）」を用いた以外は、実施例５－７と同様の方法により、Ｃｏｌｌａｇｅｎ ＩＩＩ（実施例１５）、Ｃｏｌｌａｇｅｎ Ⅴ（実施例１７）、α－ＳＭＡ（実施例１９）、並びに内部標準であるＧＡＰＤＨのｍＲＮＡ発現量をそれぞれ定量ＰＣＲにより測定した。定量ＰＣＲに使用したプライマーを図３（配列番号１－６）にそれぞれ示す。
【００９５】
定量ＰＣＲの結果を比較例９－１１の結果と併せて、図１０－１２にそれぞれ示す。図１０はＣｏｌｌａｇｅｎ ＩＩＩのｍＲＮＡ発現量、図１１はＣｏｌｌａｇｅｎ ⅤのｍＲＮＡ発現量、図１２はα－ＳＭＡのｍＲＮＡ発現量の結果である。図中、横軸の「ＴＧＦβ（－） ＥＶ（－） 由来（－）」は、刺激を加えていないＴＩＧ３における結果、「ＴＧＦβ刺激（＋） ＥＶ（－） 由来（－）」は、ＴＧＦβ１刺激を加えたＴＩＧ３（コントロール）における結果を示し、「ＴＧＦβ刺激（＋） ＥＶ（ＰＳ） 由来（脂肪）」は、ＴＧＦβ１刺激を加えたＴＩＧ３に「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、脂肪由来ＭＳＣ）」を用いた場合の結果［実施例１４（図１０）、実施例１６（図１１）、実施例１８（図１２）］を示し、「ＴＧＦβ刺激（＋） ＥＶ（ＵＣ） 由来（脂肪）」は、ＴＧＦβ１刺激を加えたＴＩＧ３に「細胞外小胞溶液（超遠心法、脂肪由来ＭＳＣ）」を用いた場合の結果［比較例９（図１０）、比較例１０（図１１）、比較例１１（図１２）］を示し、「ＴＧＦβ刺激（＋） ＥＶ（ＰＳ） 由来（臍帯）」は、ＴＧＦβ１刺激を加えたＴＩＧ３に「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、臍帯由来ＭＳＣ）」を用いた場合の結果［実施例１５（図１０）、実施例１７（図１１）、実施例１９（図１２）］をそれぞれ示す。各遺伝子の発現量は、各遺伝子に対するプライマーを用いて行ったｑＰＣＲから得られた数値をＧＡＰＤＨに対してノーマライズし、コントロールにおける対象ｍＲＮＡ発現に相対するΔΔｃｔ値として示し、各図の縦軸とした。
【００９６】
比較例９－１１．超遠心法で取得した細胞外小胞の抗線維化作用の評価
「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、骨髄由来ＭＳＣ）」の代わりに、「細胞外小胞溶液（超遠心法、脂肪由来ＭＳＣ）」を用いた以外は、実施例１４－１９と同様の方法により、線維症関連遺伝子であるＣｏｌｌａｇｅｎ ＩＩＩ（比較例９）、Ｃｏｌｌａｇｅｎ Ⅴ（比較例１０）、α－ＳＭＡ（比較例１１）、及び内部標準であるＧＡＰＤＨ

のｍＲＮＡ発現量を、それぞれ定量ＰＣＲにより測定した。定量ＰＣＲに使用したプライマーを図３（配列番号１－６）にそれぞれ示す。定量ＰＣＲの結果を実施例１４－１９の結果と併せて、図１０－１２にそれぞれ示す。

【００９７】

図１０－１２より、「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、脂肪由来ＭＳＣ）」を用いた場合（実施例１４、１６、１８）、及び「細胞外小胞溶液（ＰＳアフィニティー法、臍帯由来ＭＳＣ）」を用いた場合にも（実施例１５、１７、１９）、ＴＧＦβによる線維症関連遺伝子のｍＲＮＡ発現量の上昇が抑制されること、即ち、ＰＳアフィニティー法により取得した細胞外小胞が抗線維化作用を有することが判った。これらの結果から、ＰＳフィニティー法により取得した細胞外小胞（実施例１４－１９）は、超遠心法により取得した細胞外小胞（比較例９－１１）よりも、間葉系幹細胞の種類によらず、顕著に高い抗線維化作用を有することが判った。

【産業上の利用可能性】

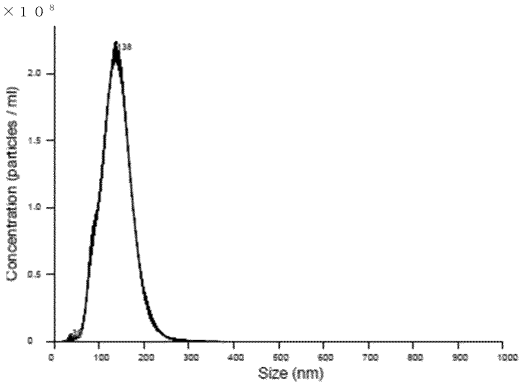
【００９８】

本発明により間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞から取得した抗線維化作用を有する細胞外小胞を有効成分とする抗線維化剤が提供される。本発明が提供する抗線維化剤は、生体組織又は臓器の線維化に係わる因子、例えば、線維症関連遺伝子の産生調整作用を有することから、生体組織又は臓器の線維化の進行を抑えることで、前記線維化が生じうる疾患に対する有効な治療薬が提供される点で産業上の利用性は多大なものである。

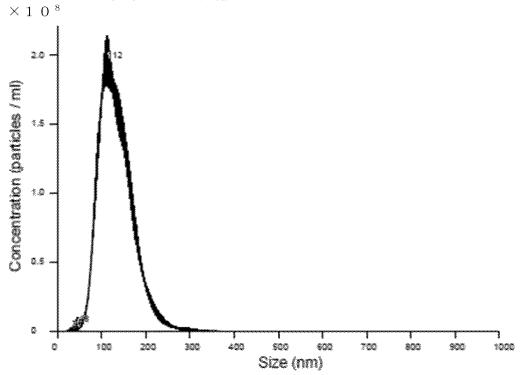
【図面】

【図１】

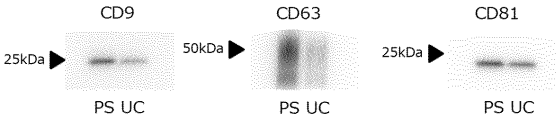
（Ａ）PS アフィニティー法



（Ｂ）超遠心分離法



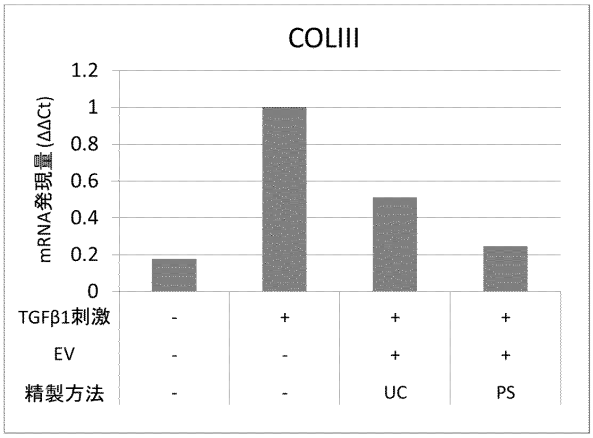
【図２】



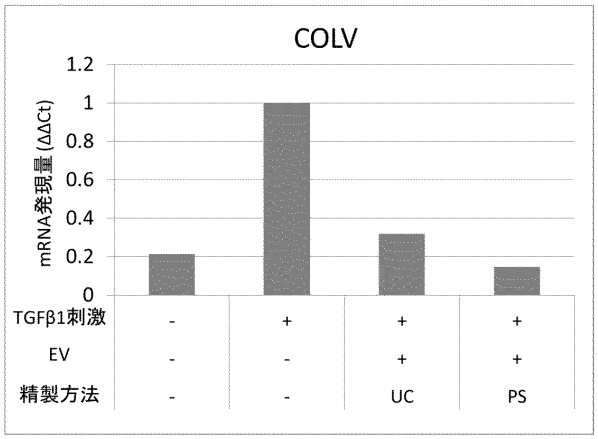
【図３】

	Forward	Reverse
Collagen III	attgctgggatcactggagcac (配列番号1)	cctggtttcccactttcacccttg (配列番号2)
α-SMA	actgggacgacatggaaaag (配列番号3)	tacatggctgggacattgaa (配列番号4)
Collagen V	gtggtctgaagggcacaaag (配列番号5)	tccgagttttccctctccc (配列番号6)

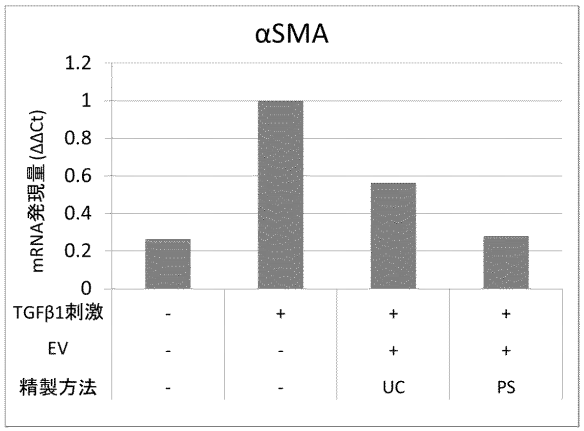
【図４】



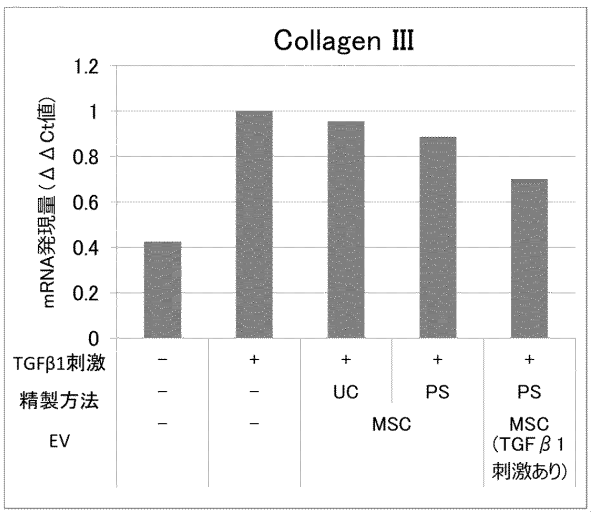
【図５】


COLV
mRNA発現量 (ΔΔCt)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
TGFβ1刺激 - + + +
EV - - + +
精製方法 - - UC PS

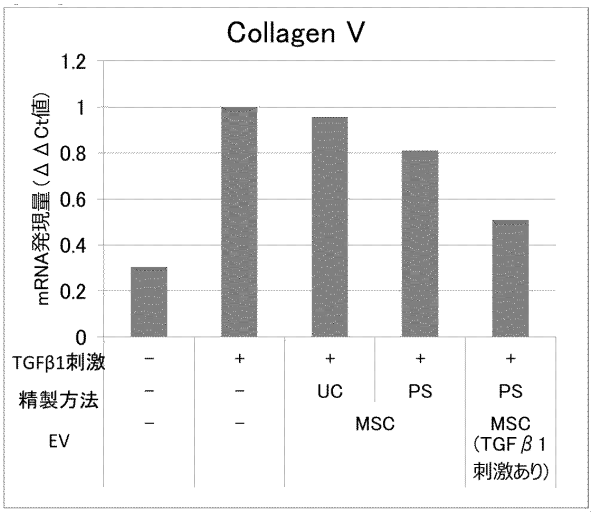
【図６】


αSMA
mRNA発現量 (ΔΔCt)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
TGFβ1刺激 - + + +
EV - - + +
精製方法 - - UC PS

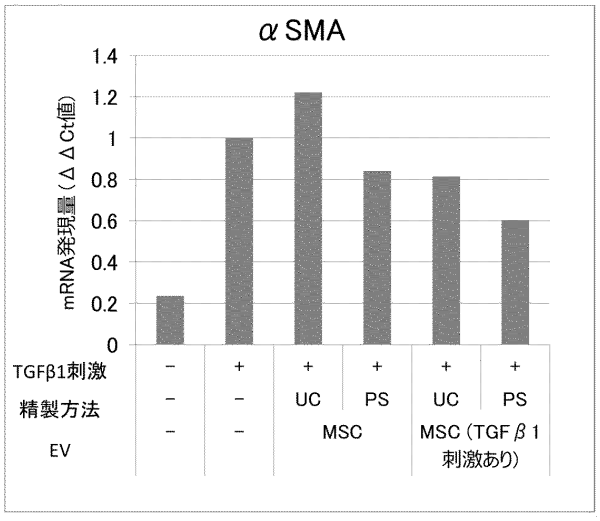
【図７】


Collagen III
mRNA発現量（ΔΔCt値）
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
TGFβ1刺激 − + + + +
精製方法 − − UC PS PS
EV − − MSC MSC (TGFβ1 刺激あり)

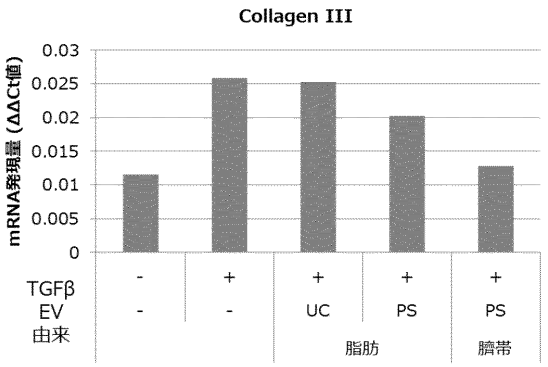
【図８】


Collagen V
mRNA発現量（ΔΔCt値）
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
TGFβ1刺激 − + + + +
精製方法 − − UC PS PS
EV − − MSC MSC (TGFβ1 刺激あり)

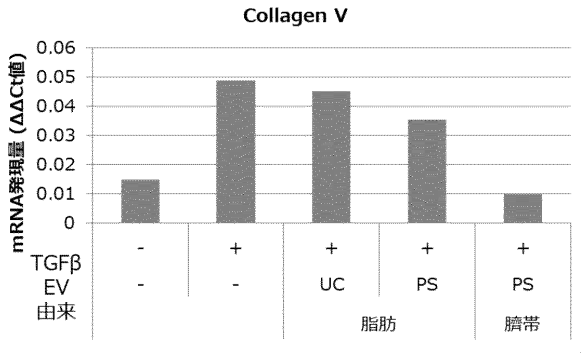
【図９】



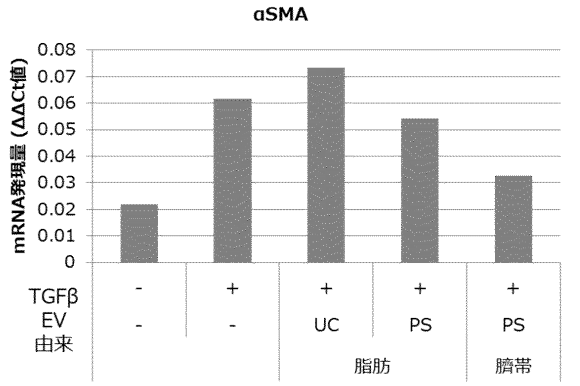
【図１０】



【図１１】



【図１２】



【配列表】

0007425092000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
A61K 35/30 (2015.01)		A61K	35/30	
A61K 35/36 (2015.01)		A61K	35/36	
A61K 35/50 (2015.01)		A61K	35/50	
C12N 5/0775(2010.01)		C12N	5/0775	ZNA
C07K 14/46 (2006.01)		C07K	14/46	

(56)参考文献 国際公開第２０１６／０８８６８９（WO，Ａ１）
OHARA, M., et al.，Extracellular Vesicles from Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Hepatic Inflammation and Fibrosis in Rats，Stem Cells International，2018年，Vol.2018, Article ID 3212643，pp.1-15，https://doi.org/10.1155/2018/3212643
PHINNEY, D. G., et al.，Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy，Stem Cells，2017年，Vol.35, No.4，pp.851-858，http://dx.doi.org/10.1002/stem.2575
FERGUSON, S. W., et al.，The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view，Scinetific Reports，2018年，Vol.8, Article No.1419，pp.1-12，DOI:10.1038/s41598-018-19581-x
NAKAI, W., et al.，A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles，Scientific Reports，2016年，Vol.6, Article No.33935，pp.1-11，DOI: 10.1038/srep33935
TOLOMEO, A. M., et al.，Annexin a5(An5)-bound extracellular vesicles (EVs) from mesenchymal stromal cells (MSCs) show enhanced and specific antiinflammatory effects，J. Extracellular Vesicles，2018年，Vol.7, Supplement 1，p.10，DOI:10.1080/20013078.2018.1461450，ISSN: 2001-3078
山根 昌之 ほか，PSアフィニティー法が実現した高活性なMSC由来エクソソームの精製 －エクソソーム再生医療における全く新たな戦略の提案－，和光純薬時報，2020年10月15日，Vol.88, No.4，pp.10-11

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ３５／００－３５／７６８
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）