

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 2 月 2 日(02.02.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/018382 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/02 (2006.01) *C12Q 1/32* (2006.01)
C12Q 1/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/071740
- (22) 国際出願日: 2016 年 7 月 25 日(25.07.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
62/196,346 2015 年 7 月 24 日(24.07.2015) US
- (71) 出願人: ロート製薬株式会社(ROHTO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西 1 丁目 8 番 1 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 宇野 栄子(UNO, Eiko); 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西 1 丁目 8 番 1 号 ロート製薬株式会社内 Osaka (JP). 湯本 真代(YUMOTO, Masayo); 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西 1 丁目 8 番 1 号 ロート製薬株式会社内 Osaka (JP). 吉野 みほ子(YOSHINO, Mihoko); 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西 1 丁目 8 番 1 号 ロート製薬株式会社内 Osaka (JP). 池山 芳史(IKEYAMA, Yoshifumi); 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西 1 丁目 8 番 1 号 ロート製薬株式会社内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 津国, 外(TSUKUNI & ASSOCIATES et al.); 〒1020083 東京都千代田区麹町 5-3-1 麹町ビジネスセンター Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: CELL EVALUATION METHOD, HIGH-PERFORMANCE CELL OR DRUG SCREENING METHOD, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION

(54) 発明の名称: 細胞の評価方法、高機能細胞又は薬剤をスクリーニングする方法、及び医薬組成物

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: a method for evaluating whether cells are effective in the treatment of diseases, and the like, associated with intracellular mitochondrial dysfunction and a reduction in mitochondrial activity, and in the amelioration of symptoms associated with aging and the like; high-performance cells judged to be effective by this method; and a method for obtaining a drug capable of inducing such high-performance cells. The present invention is a cell evaluation method for evaluating a cell using, as the indicator, the capability of mitochondrial transference to other cells. Further, mitochondrial activity is preferred as the indicator. The mitochondrial activity is at least one selected from the group consisting of mitochondrial dehydrogenase activity, mitochondrial content, and mitochondrial membrane potential.

(57) 要約: 本発明は、細胞内のミトコンドリア機能障害やミトコンドリア活性の低下が関与する疾患等の治療、老化等に伴う症状の回復に有効な細胞であるか否かを評価する方法、またこの方法により有効であると判断される高機能細胞、そのような高機能細胞を誘導できる薬剤を得る方法を提供することを課題とする。本発明は、他の細胞へのミトコンドリアトランスファー能を指標にして細胞を評価する、細胞の評価方法である。さらに、ミトコンドリア活性を指標とすることが好ましい。上記ミトコンドリア活性は、ミトコンドリア脱水素酵素活性、ミトコンドリア含有量及びミトコンドリア膜電位からなる群より選択される少なくとも 1 種である。



WO 2017/018382 A1

明 細 書

発明の名称：

細胞の評価方法、高機能細胞又は薬剤をスクリーニングする方法、及び医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、細胞の評価方法、高機能細胞又は薬剤をスクリーニングする方法、及び医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 遺伝的背景、老化、環境要因等により、細胞内でミトコンドリア機能障害やミトコンドリア活性の低下が起こる場合があることが知られている。また、炎症性疾患、ミトコンドリア病等の種々の疾患においても、細胞内のミトコンドリア機能の低下が起こる場合があることも知られている（非特許文献1参照）。例えばミトコンドリア病は、ミトコンドリアの機能低下を原因とする疾患の総称であり、代表的なものとして慢性進行性外眼麻痺症候群、赤色ぼろ線維・ミオクロヌステんかん症候群、及びミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様症候群等がある。これらの疾患は、生体内全ての細胞において一様に異常が発生するわけではなく、その病態は多彩であり、根本的な治療法の無い難病である。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Nature、2011 Jan 13；469（7329）：p. 221－5

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] このような状況の中、細胞内のミトコンドリア機能障害やミトコンドリア活性の低下が関与する疾患等の治療、老化等に伴う症状の回復に有効な薬剤

等が求められている。そこで本発明は、細胞内のミトコンドリア機能障害やミトコンドリア活性の低下が関与する疾患等の治療、老化等に伴う症状の回復に有効な細胞であるか否かを評価する方法、またこの方法により有効であると判断される高機能細胞、そのような高機能細胞を誘導できる薬剤を得る方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0005] 上記課題を解決するために、本発明者が種々検討した結果、細胞のミトコンドリアトランスファー能を指標とすることで、細胞の、疾患に対する治療効果、老化等に伴う症状の回復効果、細胞自体の健康状態等を効率よく評価することができることを見出した。また、この細胞を評価する方法は、高機能細胞、高機能細胞を誘導できる薬剤、細胞をより健康な状態に回復させる薬剤等のスクリーニング方法としても用いることができる。さらに、このスクリーニング方法により得られた高機能細胞及び／又は薬剤を含む医薬組成物は、疾患に対する治療、老化等に伴う症状の回復のために好適に使用され得る。

[0006] 即ち、本発明の要旨は、以下に記載する通りである。

〔１〕ミトコンドリアトランスファー能を指標にして細胞を評価する、細胞の評価方法。

〔２〕さらに、ミトコンドリア活性を指標とする、〔１〕記載の方法。

〔３〕上記ミトコンドリア活性が、ミトコンドリア脱水素酵素活性、ミトコンドリア含有量及びミトコンドリア膜電位からなる群より選択される少なくとも１種である、〔２〕記載の方法。

〔４〕細胞のミトコンドリアトランスファー能を測定する工程、及び得られたミトコンドリアトランスファー能を、基準となる細胞のミトコンドリアトランスファー能と比較する工程を含む、細胞の評価方法。

〔５〕細胞のミトコンドリア活性を測定する工程、及び得られたミトコンドリア活性を、基準となる細胞のミトコンドリア活性と

比較する工程

をさらに含む、〔４〕記載の方法。

〔６〕上記ミトコンドリア活性が、ミトコンドリア脱水素酵素活性、ミトコンドリア含有量及びミトコンドリア膜電位からなる群より選択される少なくとも１種である、〔５〕記載の方法。

〔７〕上記細胞が、間葉系幹細胞、表皮幹細胞、角膜上皮幹細胞、結膜上皮幹細胞又はこれらに由来する細胞である、〔１〕から〔６〕のいずれか記載の方法。

〔８〕上記間葉系幹細胞が、臍帯由来又は脂肪組織由来である、〔７〕記載の方法。

〔９〕〔１〕から〔８〕のいずれか記載の方法を用いた、高機能細胞又は高機能細胞を誘導できる薬剤をスクリーニングする方法。

〔１０〕〔９〕記載の方法により得られた、ウーロン茶抽出液、グリチルリチン酸ジカリウム、セイヨウノコギリソウ抽出液、アシタバ葉／茎エキス、アマチャエキス、ウコン根茎エキス、ゼニアオイ花エキス、ヒキオコシ葉／茎エキス、キハダ樹皮エキス、オウレン根エキス、グレープフルーツ果実エキス、カシア樹皮エキス、サッカロミセスセレビスシアエエキス、ゴボウ根エキス、コメヌカエキス、ウスバサイシン根エキス、クチナシ果実エキス、マタタビ果実エキス、スギナエキス、セイヨウキズタ葉／茎エキス、センブリエキス、フユムシナツクサタケエキス、トマト果実エキス、ヒノキ水、ブクリョウエキス、ブッチャーブルーム根エキス、ムクロジ果皮エキス、ウメ果実エキス、ヤエヤマアオキ果汁、モモ葉エキス、筍の皮エキス、アマモエキス、水ナスエキス、ハトムギエキス、マグワ根皮エキス、ハマメリス葉エキス、センチフォリアバラ花エキス、マドンナリリー根エキス、ヒノキ水、ローズマリー葉エキス、セージエキス２、セイヨウオオバコ種子エキス、レモングラス抽出液、クララエキス及びベルベリンからなる群より選択される少なくとも一種の薬剤で処理したことを特徴とする高機能細胞を含む医薬組成物。

〔１１〕〔９〕記載の方法により得られた、ウーロン茶抽出液、グリチルリチン酸ジカリウム、セイヨウノコギリソウ抽出液、アシタバ葉／茎エキス、アマチャエキス、ウコン根茎エキス、ゼニアオイ花エキス、ヒキオコシ葉／茎エキス、キハダ樹皮エキス、オウレン根エキス、グレープフルーツ果実エキス、カシア樹皮エキス、サッカロミセスレビスシアエエキス、ゴボウ根エキス、コメヌカエキス、ウスバサイシン根エキス、クチナシ果実エキス、マタタビ果実エキス、スギナエキス、セイヨウキズタ葉／茎エキス、センブリエキス、フユムシナツクサタケエキス、トマト果実エキス、ヒノキ水、ブクリョウエキス、ブッチャーブルーム根エキス、ムクロジ果皮エキス、ウメ果実エキス、ヤエヤマアオキ果汁、モモ葉エキス、筍の皮エキス、アマモエキス、水ナスエキス、ハトムギエキス、マグワ根皮エキス、ハマメリス葉エキス、センチフォリアバラ花エキス、マドンナリリー根エキス、ヒノキ水、ローズマリー葉エキス、セージエキス２、セイヨウオオバコ種子エキス、レモングラス抽出液、クララエキス及びベルベリンからなる群より選択される少なくとも一種の薬剤を含む医薬組成物。

〔１２〕軟骨分解、関節リウマチ、乾癬性関節炎、脊椎関節炎、変形性関節症、痛風、乾癬、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、中枢神経疾患、うっ血性心不全等の心不全、心筋梗塞、脳卒中、大動脈弁狭窄症、腎不全、腎臓移植後の生着不全、狼瘡、脾炎、アレルギー、アトピー性皮膚炎、線維症、貧血、アテローム性動脈硬化症等の動脈硬化、再狭窄、化学療法／放射線関連合併症、Ⅰ型糖尿病、Ⅱ型糖尿病、肺炎、自己免疫性肝炎、Ｃ型肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、劇症肝炎、セリアック病、非特異性大腸炎、アレルギー性結膜炎、糖尿病性網膜症、シェーグレン症候群、ブドウ膜炎アレルギー性鼻炎、喘息、石綿症、珪肺、慢性閉塞性肺疾患、慢性肉芽腫性炎症、嚢胞性線維症、サルコイドーシス、糸球体腎炎、脈管炎、皮膚炎、ＨＩＶ関連悪液質、大脳マラリア、強直性脊椎炎、らい病、肺線維症、線維筋痛、食道癌、胃食道逆流症、バレット食道、胃癌、十二指腸癌、小腸癌、虫垂癌、大腸癌、結腸癌、直腸

癌、肛門癌、膵臓癌、肝臓癌、胆嚢癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、前立腺癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、乳癌、肺癌、甲状腺癌、慢性疲労症候群、てんかん、心筋症、高血圧、糖尿病、肥満、腎障害、不妊、難聴、慢性進行性外眼麻痺症候群、赤色ぼろ線維・ミオクロオヌステんかん症候群、リー脳症、レーバー病、ミトコンドリア糖尿病、パーソン病(汎血球減少症)及びミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様症候群、皮膚老化（しわ、たるみ、コラーゲン減少等）、ターンオーバー鈍化、表皮ひ薄化、角結膜上皮障害、ドライアイ、角結膜炎、涙液分泌不全、涙腺炎のいずれかの処置のために用いられる、〔10〕又は〔11〕に記載の医薬組成物。

〔13〕ベルベリン配合点眼剤である、〔11〕又は〔12〕に記載の医薬組成物。

〔14〕ミトコンドリアトランスファー剤又はミトコンドリアトランスファー促進剤である、〔10〕から〔13〕のいずれかに記載の医薬組成物。

発明の効果

[0007] 本発明の細胞の評価方法によると、ミトコンドリアトランスファー能を指標にすることで、その細胞の疾患に対する治療効果、老化等に伴う症状の回復効果、細胞自体の健康状態等を効率よく評価することができる。また、この評価方法を用いることで、疾患に対する治療効果、老化等に伴う症状の回復効果等を有する高機能細胞、このような高機能細胞を誘導できる薬剤、細胞をより健康な状態に回復させる薬剤、他の細胞へのミトコンドリアトランスファーを制御する薬剤等を、効率よくスクリーニングすることができる。また、本発明の方法によってスクリーニングされた高機能細胞や薬剤を含む医薬組成物は、ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリア活性の低下等が関連する疾患や老化等に伴う症状に対して、広く用いることができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞のミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図2]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞のミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図3]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞のミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図4]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞のミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図5]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞のヒト気管支平滑筋細胞へのミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図6]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞のヒト気管支平滑筋細胞へのミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図7]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞のヒト気管支平滑筋細胞へのミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図8]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞のヒト気管支平滑筋細胞へのミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図9]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞のヒト気管支平滑筋細胞へのミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図10]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞のヒト気管支平滑筋細胞へのミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図11]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト臍帯由来間

葉系幹細胞のヒト皮膚線維芽細胞へのミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図12]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞のヒト皮膚線維芽細胞へのミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図13]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞のヒト皮膚線維芽細胞へのミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図14]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞のヒト皮膚線維芽細胞へのミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図15]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞のヒト皮膚線維芽細胞へのミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図16]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞のヒト心筋細胞へのミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図17]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞のヒト心筋細胞へのミトコンドリアトランスファー能に対する各種薬剤の効果を示す図である。

[図18]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞のヒト角膜上皮細胞へのミトコンドリアトランスファー能に対するベルベリンの効果を示す図である。

[図19]本発明の実施形態である評価方法を用いて解析した、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞のヒト角膜上皮細胞へのミトコンドリアトランスファー能に対するベルベリンの効果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、本発明について詳細に説明する。

[0010] <細胞の評価方法>

本発明の方法は、ミトコンドリアトランスファー能を指標にして、その細胞の、疾患に対する治療効果、老化等に伴う症状の回復効果等を効率よく評価することができる。さらに評価の精度や効率を向上させるために、ミトコンドリアトランスファー能に加えて、ミトコンドリア活性をも指標とすることが好ましい。具体的には、他の細胞へのミトコンドリアトランスファー能を測定する工程（以下「工程１」ともいう）、及び得られたミトコンドリアトランスファー能を、基準となるミトコンドリア能と比較する工程（以下「工程２」ともいう）を含む。さらに、ミトコンドリア活性を測定する工程（工程３）、及び得られたミトコンドリア活性を、基準となるミトコンドリア活性と比較する工程（工程４）を含むことが好ましい。また、本発明の効果を損なわない範囲で、上記以外のその他の工程を含んでいてもよい。

[0011] 本発明において「ミトコンドリアトランスファー能」とは、細胞がミトコンドリアを他の細胞に移行させることができる能力、或いはミトコンドリア自身が他の細胞に移行する能力をいい、複数の細胞を共培養した場合に、受容側の細胞全体のうちミトコンドリアのトランスファーを受けた細胞の割合（％）でその程度を表す。なお、ここでトランスファーされるミトコンドリアとしては、ミトコンドリア自体の他、ミトコンドリアが含むミトコンドリア遺伝子（DNA、RNA）、及び各種タンパク、並びにこれらと他のタンパクや小胞体等の他の器官との複合体も挙げられる。ミトコンドリアトランスファー能を指標として評価することで、各種疾患に対する治療効果、老化等に伴う症状の回復効果等が高い高機能細胞を選択することができる。なお、本発明において、ミトコンドリアトランスファー能の測定値をミトコンドリアトランスファー活性としている。

[0012] 本発明において「ミトコンドリア活性」とは、細胞内のミトコンドリア自身が有する種々の活性をいう。具体的なミトコンドリア活性としては、細胞内のミトコンドリア脱水素酵素活性、細胞内のミトコンドリア膜電位、細胞内酸化ストレスレベル、ミトコンドリア呼吸活性、ATP合成酵素活性等が

挙げられ、さらには細胞内のミトコンドリア含有量も含めることができる。

[0013] 本発明において「高機能細胞」とは、少なくとも1種の疾患や症状に対して、治療、改善、予防効果を発揮することができる細胞をいう。特に、ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリア活性の低下等が関連する疾患や老化等に伴う症状に対して、それらを改善等する機能に優れる細胞のことを指す。例えば、高機能細胞は、抗炎症機能、免疫賦活機能、免疫抑制機能、抗腫瘍機能、抗前癌性症状機能、抗神経変性疾患機能、代謝促進機能、心血管疾患・骨疾患・胃腸疾患・肺疾患・肝疾患・腎疾患等に対する治療機能、加齢や一時的なストレス等に伴って機能が低下した細胞の機能を回復させる機能等に優れる細胞である。さらには、加齢や一時的なストレス等に伴って低下した機能が回復し、より優れた健康状態を示す細胞も、本発明における高機能細胞に含まれる。高機能細胞における高機能の程度は、本発明の細胞の評価方法において相対的に判断され、比較対象とする細胞に対して相対的に高い機能を有するものであれば、特に限定されて解釈されるものではない。

[0014] 従って、本発明の細胞の評価方法によると、例えばミトコンドリアを他の細胞にトランスファーする能力の高い細胞、さらには、細胞内のミトコンドリアの量が多い細胞、又はミトコンドリア自体のポテンシャルが高くエネルギー状態が高いレベルの細胞（膜電位が高い細胞、脱水素酵素活性が高い、酸化ストレスレベルが低い細胞等）等を高機能細胞と評価して選択することができる。

[0015] 以下に、各工程について詳細に説明する。

[0016] [工程1：他の細胞へのミトコンドリアトランスファー能を測定する工程]

本工程においては、他の細胞へのミトコンドリアトランスファー能を測定する。

[0017] 上記ミトコンドリアトランスファーとは、ある細胞から別の細胞へとミトコンドリア等が移行する現象を言う。この移行は、例えば、細胞と細胞をつなぐトンネリングナノチューブと呼ばれるトンネルの中をって行われるが、移行経路は特に限定されず、エキソサイトーシス及びエンドサイトーシス

を介した経路等でもよい。

[0018] ミトコンドリアトランスファー能の測定方法としては、例えば、以下のようにしてミトコンドリアトランスファー率を算出する方法が挙げられる。即ち、ミトコンドリアの供給側となる細胞をミトコンドリア染色試薬で染色し、ミトコンドリアの受容側となる細胞を細胞質染色試薬で染色する。これらの試薬による細胞の染色は、例えば、37℃で所定の時間インキュベートすることにより行われる。ミトコンドリア染色試薬としては、CytoPainter Cell Tracking Staining Kit-Green Fluorescence (abcam社製)、MitoTracker Mitochondrion-Selective Probes Green FM (Molecular Probes社製) 等を用いることができる。また、細胞質染色試薬としては、例えば、CellTrace Violet Cell Proliferation Kit, for flow cytometry (Life tech. 社製)、CellTrace Red Cell Proliferation Kit, for flow cytometry (Life tech. 社製) を用いることができる。染色後、細胞をHBSS (+) 等で洗浄し、トリプシン等の酵素、EDTA等にて細胞を剥離して、HBSS (+) 等で洗浄後、両方の細胞をプレート (96well plate 等) に播種して、4時間～24時間程度共培養を行う。その後、核染色試薬を添加して所定時間、37℃でインキュベートし、ImageXpress等の共焦点レーザーイメージシステムで画像撮影する。上記核染色試薬としては、例えばDAPI、DRAQ5 (biostatus社製)、Hoechst 33342 (Dojindo社製) 等を使用することができる。細胞カウントプログラム等を用いて解析し、ミトコンドリアトランスファー率を計算することができる。

[0019] 上記細胞カウントプログラムでの解析は以下のように行うことができる。

(1) Cy5フィルター、DAPIフィルター等の核染色を認識するフィルターで観察し、赤いドット等で識別できる核を認識、計測させる (=細胞数

の測定)。

(2) DAPIフィルター等の受容側細胞染色を認識するフィルターで観察し、ミトコンドリアを受け取る側の細胞(受容側)である細胞質を認識、計測させる(例えば、violet染色された細胞=受容側)。

(3) GFPフィルター等のミトコンドリア染色を認識するフィルターで観察し、ミトコンドリアを持つ細胞(供給側)を認識、計測させる(例えば、green染色された細胞、又はtracker染色された細胞=供給側)

(4) 下記計算式により、ミトコンドリアトランスファー率(%)を算出することができる。また、(1)の細胞数を計測することで薬剤の細胞毒性を評価することができる。

計算式： $\left(\frac{(2) \text{ の細胞数}}{(2) \text{ の細胞数}} \right) \times 100$

[0020] [工程2：得られたミトコンドリアトランスファー能を、基準となるミトコンドリアトランスファー能と比較する工程]

本工程においては、工程1で得られた、細胞のミトコンドリアトランスファー能の測定値(ミトコンドリアトランスファー率)を、実施する試験系において基準と決めた細胞のミトコンドリアトランスファー能の測定値(ミトコンドリアトランスファー率)と比較する。得られた細胞のミトコンドリアトランスファー率を基準と決めた細胞のミトコンドリアトランスファー率と比較し、評価する機能に合わせて評価を行うことができる。多くの場合には、得られた細胞のミトコンドリアトランスファー率が基準と決めた細胞のミトコンドリアトランスファー率より高い場合に、その細胞は高機能細胞であると判断される。逆に、評価する機能や細胞によっては、得られた細胞のミトコンドリアトランスファー率が基準と決めた細胞のミトコンドリアトランスファー率よりも低い場合、その細胞は基準の細胞と比較して機能が低い細胞であると判断される場合もある。

[0021] 本発明の細胞の評価方法は、本工程において、ミトコンドリアトランスファー能が基準より高い細胞又は低い細胞を、精度よく、かつ容易に評価し、選択することができる。そのため、ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリ

ア活性の低下等が関連する疾患や老化等に伴う症状に対して、ミトコンドリアトランスファーを介してそれらを改善等する機能に優れる細胞を特に効率よく選択することができる。

[0022] [工程3：ミトコンドリア活性を測定する工程]

本工程においては、細胞のミトコンドリア活性を測定する。ミトコンドリア活性としては、細胞内のミトコンドリア脱水素酵素活性、細胞内のミトコンドリア含有量、細胞内のミトコンドリア膜電位、細胞内の酸化ストレスレベル、ミトコンドリア呼吸活性、ATP合成酵素活性等が挙げられる。工程1及び2に加えて、本工程及び後述する工程4によってミトコンドリア活性をも指標として評価を行うことにより、ミトコンドリアトランスファー能によって機能の高い細胞を選択できるだけでなく、さらに、ミトコンドリア自体の活性が高く、かつその含有量も多い細胞を選択したり、逆に評価する機能や細胞に応じて、ミトコンドリア自体の活性が低く、かつその含有量も少ない細胞を選択することができる。これにより、さらに高機能な細胞であるか否かの評価を精度よく行うことができる。本工程においては、1種のミトコンドリア活性を測定してもよいし、複数種のミトコンドリア活性を測定してもよいが、複数種を組み合わせることで、より精度よく細胞の評価を実施することができる。

[0023] ミトコンドリア脱水素酵素活性とは、細胞内のミトコンドリア内膜に位置し、NADHからユビキノンへ電子を転移させてATP合成、膜電位の維持に寄与する還元酵素の活性をいう。ミトコンドリア脱水素酵素活性は、MTT、XTT、MTS、WST等のテトラゾリウム塩を用いる方法（テトラゾリウム塩が細胞膜を透過し、ミトコンドリアに集積して、補酵素であるリボフラビンにより還元されて形成されるホルマザンを定量することによる測定方法）等により測定することができる。

[0024] 細胞のミトコンドリア含有量及びミトコンドリア膜電位は、ミトコンドリア指示薬を用いて細胞内のミトコンドリアを標識することにより、定量化することができる。ここで、ミトコンドリア含有量及びミトコンドリア膜電位

を反映するミトコンドリア指示薬由来シグナルの絶対値は、用いる細胞の種類により、また標識試薬の種類、暴露時間などの暴露条件により変化する。そのため、本発明においては、ミトコンドリア指示薬由来シグナル量の絶対値ではなく、比較する細胞間でのミトコンドリア指示薬由来シグナル量の相対値で判断される。具体的には、予備的実験において、ミトコンドリア含有量及び／又はミトコンドリア膜電位を指標として、選択すべき細胞のミトコンドリア指示薬由来シグナル量の範囲を区分けし、例えば、相対的に高い又は低いミトコンドリア含有量及びミトコンドリア膜電位を示す細胞を回収するように設定することができる。

[0025] 本発明において、ミトコンドリア指示薬とは、生細胞中のミトコンドリアを特異的に標識でき、その存在量を測定しうる物質、生細胞中のミトコンドリアを特異的に標識できてミトコンドリア膜電位を測定しうる物質、又は生細胞中のミトコンドリアを特異的に標識できてその存在量とミトコンドリア膜電位の両方を測定しうる物質であれば、どのような物質であってもよい。例えば、蛍光を有し、ミトコンドリア構造物質（例えば、タンパク質、脂質、糖鎖、核酸又はこれらの代謝産物等）と結合する物質；蛍光を有し、ミトコンドリアの膜電位によってミトコンドリア内に選択的に取り込まれる物質；ミトコンドリア構造物質の作用により蛍光を発する物質に変換される物質；ミトコンドリア構造物質の作用によりミトコンドリア外に拡散できなくなる物質等が挙げられる。

[0026] ミトコンドリア指示薬の市販品の具体例として、Nonyl Acridine Orange (A1372)、3, 3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide (D273、D378)、4-Di-1-ASP (D288)、2-(4-(dimethylamino)styryl)-N-Ethylpyridinium Iodide (D426)、Dihydrorhodamine 123 (D632、D23806、R302、R22420)、dihydrorhodamine 6G (D633)、JC-9 Dye Mitochondrial Mem

brane Potential Probe (D22421)、Lucigenin (bis-N-Methylacridinium Nitrate) (L6868)、MitoFluor Green (M7502)、Orange CMTMRos (M7510)、Orange CM-H₂TMRos (M7511)、Red CMXRos (M7512)、Red CM-H₂Xros (M7513)、Benzoxazolium (M7514)、Red FM (M22425)、Deep Red FM (M22426)、Rhodamine 6G Chloride (R634)、Rhodamine B, Hexyl Ester, Perchlorate (R648)、Red CC-1 (R14060)、SYBR Green (S7563)、Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate (T668)、Tetramethylrhodamine, Ethyl Ester, Perchlorate (T669) 又は 5, 5', 6, 6' - tetrachloro-1, 1', 3, 3' - tetraethylbenzimidazolyldicyanide iodide (T3168) 等 (以上、Molecular Probe 社製品番号)、タカラ社、Life technologies、Abcam 社等の上記同等品を使用することができるが、これらのものに限定されない。

[0027] ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリア活性の低下等が関連する疾患や老化等に伴う症状に対して、ミトコンドリアトランスファーを介してそれらを改善等する機能に優れる細胞であるか否かを効率よく評価することができるという観点から、本工程において測定するミトコンドリア活性としては、中でもミトコンドリア含有量が好ましい。

[0028] [工程4：得られたミトコンドリア活性を、基準となるミトコンドリア活性と比較する工程]

本工程においては、工程3で得られた、細胞のミトコンドリア活性を、実施する試験系において基準と決めた細胞のミトコンドリア活性と比較する。

多くの場合、得られた細胞のミトコンドリア活性が基準と決めた細胞のミトコンドリア活性よりも高い場合、その細胞は高機能細胞であると判断される。逆に、得られた細胞のミトコンドリア活性が基準と決めた細胞のミトコンドリア活性よりも低い場合、その細胞は基準の細胞と比較して機能が低い細胞であると判断される。但し、評価する機能や細胞によっては、上記とは反対に、得られた細胞のミトコンドリア活性が基準と決めた細胞のミトコンドリア活性よりも低い場合、その細胞は高機能細胞であると判断される場合もある。

[0029] 本発明の評価方法を適用できる細胞としては、特に限定されないが、炎症部位の細胞、老化・ストレス等により機能の低下した細胞に対してミトコンドリアトランスファーを起こす能力の高い細胞である、角化細胞、色素細胞、メラノサイト、脂肪細胞、毛母細胞、毛乳頭細胞、血管内皮細胞、神経細胞、褐色脂肪細胞、ランゲルハンス細胞、メルケル細胞、皮膚（真皮）線維芽細胞、皮膚上皮細胞、免疫細胞（マクロファージ、樹状細胞等）、筋細胞、角膜上皮細胞、結膜上皮細胞、杯細胞、胚細胞・胚性幹（ES）細胞・iPS細胞・生殖幹細胞・卵子・精子・造血幹細胞・表皮幹細胞・角膜上皮幹細胞・結膜上皮幹細胞・角膜幹細胞・結膜幹細胞・間葉系幹細胞等の幹細胞が好ましく、表皮幹細胞・角膜上皮幹細胞・結膜上皮幹細胞・間葉系幹細胞等の幹細胞がより好ましく、間葉系幹細胞がさらに好ましく、骨髄、脂肪、筋肉、神経、皮膚、羊膜、胎盤、絨毛膜、脱落膜、臍帯由来の間葉系幹細胞が特に好ましく、臍帯由来間葉系幹細胞、脂肪由来間葉系幹細胞が最も好ましい。上記臍帯由来間葉系幹細胞としては、例えば、臍帯血、臍帯静脈内皮下層、又はワルトン膠様質由来の臍帯由来間葉系幹細胞が挙げられるが、中でもワルトン膠様質由来の臍帯由来間葉系幹細胞が好ましい。

[0030] [高機能細胞のスクリーニング方法、及び高機能細胞の誘導剤のスクリーニング方法]

本発明は、高機能細胞、及び高機能細胞を誘導できる薬剤のスクリーニング方法も含む。本発明のスクリーニング方法においては、上述した本発明の

細胞の評価方法が用いられる。本発明のスクリーニング方法においては、ミトコンドリアトランスファー能を指標にするため、ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリア活性の低下等が関連する疾患や老化等に伴う症状に対して、それらを改善等する機能に優れる細胞、又はこのような細胞を誘導できる薬剤、さらにその細胞の機能を促進することができる薬剤を選択することができる。本発明のスクリーニング方法においては、このミトコンドリアトランスファー能に加えて、ミトコンドリア活性も指標とすることが好ましい。ミトコンドリア活性としては、細胞の評価方法において指標として採用した活性と同様の活性を採用することができる。

[0031] 具体的には、上述の細胞の評価方法における工程 1 及び工程 2、並びに工程 3 及び工程 4 と同様の方法で行われる。但し、高機能細胞の誘導剤のスクリーニングを行う場合には、工程 1 又は工程 3 の前に、細胞をスクリーニング用の各種薬剤でそれぞれ処理し、工程 1 又は工程 3 においてその処理した細胞のミトコンドリアトランスファー能又はミトコンドリア活性を測定する。或いは、工程 1 又は工程 3 においてミトコンドリアトランスファー能又はミトコンドリア活性を測定する際に、スクリーニング用の各種薬剤を共存させてもよい。その結果、よりミトコンドリアトランスファー能又はミトコンドリア活性の高い、高機能な細胞や、そのような細胞を誘導できる薬剤を、選択することができる。但し、評価する機能や細胞によっては、上記とは反対に、ミトコンドリアトランスファー能又はミトコンドリア活性が低い場合、その細胞は高機能細胞であると判断される場合もある。その場合には、ミトコンドリアトランスファー能又はミトコンドリア活性の低い細胞や、そのような細胞を誘導できる薬剤を、選択することができる。これら選択された細胞又は薬剤は、ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリア活性の低下等が関連する疾患や老化等に伴う症状に対して、それらを改善等する効果を奏するものである。

[0032] [医薬組成物]

本発明は、本発明のスクリーニング方法により選択された高機能細胞及び

／又は高機能細胞を誘導できる薬剤を含む医薬組成物も含む。本発明の医薬組成物は、上述の高機能細胞及び／又は高機能細胞を誘導できる薬剤を含むため、ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリア活性の低下等が関連する疾患や老化等に伴う症状に対して、優れた治療、予防、又は改善効果を有する。本発明の医薬組成物は、ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリア活性の低下等が起こっている細胞に対してミトコンドリア活性の高いミトコンドリアをトランスファーすることによって、それぞれの疾患や老化等に伴う症状に対して優れた効果を奏する。即ち、本発明の医薬組成物は、ミトコンドリアトランスファー剤として好適に用いることができる。

[0033] 本発明のスクリーニング方法により、高機能細胞を誘導できる薬剤として、ウーロン茶抽出液（1／10～1／1,000,000希釈）、セイヨウノコギリソウ抽出液（1／10～1／10,000希釈）、グリチルリチン酸ジカリウム（最終濃度1 μ g／ml～100mg／ml）、を選択することができる。さらに、アシタバ葉／茎エキス、アマチャエキス、ウコン根茎エキス、ゼニアオイ花エキス、ヒキオコシ葉／茎エキス、キハダ樹皮エキス、オウレン根エキス、グレープフルーツ果実エキス、カシア樹皮エキス、サッカロミセスセレピシアエエキス、ゴボウ根エキス、コメヌカエキス、ウスバサイシン根エキス、クチナシ果実エキス、マタタビ果実エキス、スギナエキス、セイヨウキズタ葉／茎エキス、センブリエキス、フユムシナツクサタケエキス、トマト果実エキス、ヒノキ水、ブクリョウエキス、ブッチャーズ・ブルーム根エキス、ムクロジ果皮エキス、ウメ果実エキス、ヤエヤマアオキ果汁、モモ葉エキス、筍の皮エキス、アマモエキス、水ナスエキス、ハトムギエキス、ベルベリンを選択することができる。これらの薬剤を添加することにより（1／10～1,000,000希釈）、細胞のミトコンドリアトランスファー能を増強することができる。これらのうち、細胞のミトコンドリアトランスファー能の増強効果により優れる観点から、ウーロン茶抽出液、グリチルリチン酸ジカリウム、ベルベリン、キハダ樹皮エキス、オウレン根エキス、ハトムギエキス、筍の皮エキスが好ましい。なお、上記薬剤

としては、市販品を用いることができる。また、これらの薬剤で処理された各種細胞は、ミトコンドリアトランスファー能に優れ、ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリア活性の低下等が起こっている細胞に対してミトコンドリアをトランスファーすることによって、それぞれの疾患や老化・ストレス等に伴う症状に対して優れた効果を奏する。

[0034] 本発明において抽出液とは、植物から溶媒中にその成分が抽出されたものであれば特に限定されない。上記成分としては、植物からの抽出が可能な成分であれば限定されないが、通常、溶媒に溶解する成分を意味する。また、溶媒に溶解しなくとも、単独で液状である成分であれば、それらも抽出液に含み得る。また、本発明において抽出液とエキスとは同義で用いられる。

[0035] 本発明において、上記抽出液の抽出方法は限定されず、植物の種類等に応じて適宜公知の方法を用いることができる。具体的には、抽出するための溶媒としては水、エタノール、エタノール以外の有機溶剤、油脂類等が挙げられる。抽出液が本発明の医薬組成物の有効成分として用いられることを考慮すると、水、エタノール等の安全性の高い溶媒を用いることが好ましい。また、溶媒を用いずに抽出することも可能であり、例えば、植物を加熱してプレス等するによって得ることが出来る。

[0036] 本発明の医薬組成物は、高機能細胞及び／又は高機能細胞を誘導できる薬剤以外に、本発明の効果を損なわない範囲で、一般的な医薬品、医薬部外品等を含むことができる有効成分以外の成分を含むことができる。本発明の医薬組成物は、高機能細胞及び／又は高機能細胞を誘導できる薬剤に、上記成分を混合して製造することができる。

[0037] 本発明の医薬組成物が用いられる疾患としては、例えば、炎症性疾患、免疫疾患、癌、前癌性症状、神経変性疾患、代謝疾患、心血管疾患、骨疾患、胃腸疾患、肺疾患、肝疾患、腎疾患等が挙げられる。また、本発明の医薬組成物は、加齢・老化・ストレス等に伴う各種の症状に対しても有効に用いることができる。

[0038] 本発明の医薬組成物が用いられる疾患としては、例えば心筋細胞、肺胞上

皮細胞、腎尿細管細胞、アストロサイト、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、免疫性細胞（マクロファージ等）、表皮幹細胞、真皮線維芽細胞、角結膜上皮幹細胞等が関与する疾患が挙げられる。

[0039] 上記疾患、症状の具体例としては、軟骨分解、関節リウマチ、乾癬性関節炎、脊椎関節炎、変形性関節症、痛風、乾癬、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、中枢神経疾患、うっ血性心不全等の心不全、心筋梗塞、脳卒中、大動脈弁狭窄症、腎不全、腎臓移植後の生着不全、狼瘡、膵炎、アレルギー、アトピー性皮膚炎、線維症、貧血、アテローム性動脈硬化症等の動脈硬化、再狭窄、化学療法／放射線関連合併症、Ⅰ型糖尿病、Ⅱ型糖尿病、肺炎、自己免疫性肝炎、Ｃ型肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、劇症肝炎、セリアック病、非特異性大腸炎、アレルギー性結膜炎、糖尿病性網膜症、シェーグレン症候群、ブドウ膜炎アレルギー性鼻炎、喘息、石綿症、珪肺、慢性閉塞性肺疾患、慢性肉芽腫性炎症、嚢胞性線維症、サルコイドーシス、糸球体腎炎、脈管炎、皮膚炎、ＨＩＶ関連悪液質、大脳マラリア、強直性脊椎炎、らい病、肺線維症、線維筋痛、食道癌、胃食道逆流症、バレット食道、胃癌、十二指腸癌、小腸癌、虫垂癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肛門癌、膵臓癌、肝臓癌、胆嚢癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、前立腺癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、乳癌、肺癌、甲状腺癌、慢性疲労症候群、てんかん、心筋症、高血圧、糖尿病、肥満、腎障害、不妊、難聴、慢性進行性外眼麻痺症候群、赤色ぼろ線維・ミオクローヌステんかん症候群、リー脳症、レーバー病、ミトコンドリア糖尿病、パーソン病（汎血球減少症）及びミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様症候群、皮膚老化（しわ、たるみ、コラーゲン減少等）、ターンオーバー鈍化、表皮ひ薄化、角結膜上皮障害、ドライアイ、角結膜炎、涙液分泌不全、涙腺炎等が挙げられる。

[0040] これらのうち、ミトコンドリア病、心筋梗塞、心不全等の心筋細胞が関与する疾患；慢性閉塞性肺疾患、肺炎等の肺胞上皮細胞が関与する疾患；腎不全、特に腎臓移植後の生着不全等の腎尿細管細胞が関与する疾患；アルツハ

イマー病、中枢神経疾患等のアストロサイトが関与する疾患；動脈硬化等の血管平滑筋細胞・血管内皮細胞・免疫性細胞（マクロファージ等）が関与する疾患；皮膚老化、ターンオーバー鈍化、表皮ひ薄化等の表皮幹細胞が関与する症状；しわ、たるみ、コラーゲン減少等の真皮線維芽細胞が関与する疾患；角結膜上皮障害、ドライアイ、角結膜炎、涙液分泌不全、涙腺炎等の眼病等に対しては、本発明の医薬組成物が好適に用いられる。

[0041] 本発明の医薬組成物の一実施形態であるベルベリン配合点眼剤は、生体にもとより存在する角膜上皮幹細胞から角膜上皮細胞へ、また結膜上皮幹細胞から結膜上皮細胞へのミトコンドリアトランスファーを誘導、促進させることで、角膜上皮細胞・結膜上皮細胞の増殖、角膜上皮・結膜上皮の創傷治癒促進、角膜上皮・結膜上皮の保護などの角膜上皮・結膜上皮への優れた効果を奏する。このような効果を期待する疾患としては、角膜上皮障害・結膜上皮障害、ドライアイ、角膜炎・結膜炎、涙液分泌不全、涙腺炎が挙げられる。他にも、眼炎症の抑制、眼脂減少、抗菌効果、涙液成分の分泌、抗酸化もしくは抗糖化作用、紫外線などによる角膜へのダメージの軽減、白内障や緑内障など眼病に対する予防、かすみ目や疲れ目の軽減、花粉などに対するアレルギー症状の緩和、結膜充血の軽減、異物感の軽減など様々な効果が期待できる。

[0042] また、近年では、上記のような主に外因性の疾患だけでなく内因性の疾患も注目されており、角膜上皮幹細胞、結膜上皮幹細胞自体の異常により角膜上皮細胞、結膜上皮細胞の供給が滞る角膜上皮幹細胞疲弊症、結膜上皮幹細胞疲弊症が問題視されている。この疾患に対しては、本発明の高機能細胞を含む医薬組成物を投与方法により、高い治療効果が期待できる。さらには、上記ベルベリン配合点眼剤の点眼により、生体にもとより存在する角膜上皮幹細胞、結膜上皮幹細胞を活性化することでミトコンドリアトランスファーが誘導され、角膜上皮幹細胞疲弊、結膜上皮幹細胞疲弊を簡易に治療することも可能となる。

[0043] 本発明の医薬組成物は、常法によって適宜の製剤とすることができる。本

発明の医薬組成物が高機能細胞を含む場合には、一般的な細胞製剤が含む成分を配合することができる。また、本発明の医薬組成物が高機能細胞の誘導剤を含む場合には、製剤の剤型としては散剤、顆粒剤などの固形製剤であってもよいが、優れた予防・治療効果を得る観点からは、溶液剤、乳剤、懸濁剤などの液剤とすることが好ましい。上記液剤の製造方法としては、例えば高機能細胞の誘導剤を溶剤と混合する方法や、さらに懸濁化剤や乳化剤を混合する方法を好適に例示することができる。また、眼疾患、眼の症状に対しては、点眼剤、洗眼剤、眼軟膏、注射剤、貼布剤、ゲル、挿入剤とすることが好ましい。以上のように、本発明における医薬組成物の製剤においては、製剤上の必要に応じて、適宜の薬学的に許容される担体、例えば、賦形剤、結合剤、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化剤、緩衝剤、安定化剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、滑沢剤、崩壊剤、湿潤剤、吸着剤、甘味剤、希釈剤などの任意成分を配合することができる。

[0044] 本発明の医薬組成物の投与方法としては特に制限されないが、血管内投与（好ましくは静脈内投与）、腹腔内投与、腸管内投与、皮下投与等が好ましく、中でも、血管内投与がより好ましい。また、眼疾患、眼の症状に対しては、点眼剤、洗眼剤又は眼軟膏として投与することが好ましい。

[0045] 本発明の医薬組成物の投与量としては、疾患の種類や、その症状の度合い、剤型、投与対象の体重等によって変わり得るが、高機能細胞の誘導剤が、例えば、1日当たり、 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10 \text{g}/\text{kg}$ の範囲で含むものを好適に例示することができ、中でも、 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 1 \text{g}/\text{kg}$ の範囲をより好適に例示することができる。また、本発明の医薬組成物が高機能細胞を含む場合には、1日当たり、高機能細胞を 1×10^3 個 $\sim 1 \times 10^9$ 個の範囲で投与することができる。なお、これらの投与は、1日のうち1～複数回に分けて行ってもよい。また、本発明の医薬組成物の投与は、単回投与でもよいし、継続的に行ってもよい。継続的に行う場合は、例えば、3日に1回以上の頻度で、2回以上継続して投与することができ、中でも、2日に1回以上の頻度で、3回以上継続して投与することが好ましく、1日に1回以上の

頻度で4回以上継続して投与することがより好ましい。

[0046] 本発明の医薬組成物の投与対象となる哺乳動物としては、特に制限されないが、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ等が好ましく、中でもヒトがより好ましい。また、本発明の医薬組成物に含まれる高機能細胞は、本発明の医薬組成物の投与対象となる哺乳動物の種類と一致していることが、疾患に対する、より安定して優れた予防及び／又は治療効果を得る観点から好ましい。

[0047] [外用組成物]

本発明は、本発明のスクリーニング方法により選択された高機能細胞を誘導できる薬剤を含む外用組成物を提供することができる。本発明の外用組成物は、上述の高機能細胞を誘導できる薬剤を含むため、ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリア活性の低下等が関連する疾患や老化等に伴う症状に対して、優れた治療、予防、又は改善効果を有する。本発明の外用組成物は、老化等によりミトコンドリア機能障害、ミトコンドリア活性の低下等が起こっている細胞に作用して、ミトコンドリアをトランスファーできるように、皮膚上皮細胞、表皮幹細胞、真皮線維芽細胞等を高機能細胞とすることができるので、化粧品用の外用組成物としても広く用いることができる。

実施例

[0048] 以下に本発明を実施例に基づいて更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0049] 《実施例1》

[ミトコンドリアトランスファー能を指標とした高機能細胞及び薬剤のスクリーニング]

凍結保存のUC-MSC細胞又はA549細胞を起眠し、複数のT-25フラスコに播種した。(1×10⁵ cells/フラスコ)。Rotenone処理が必要な細胞に対しては、最終濃度100nMとなるように、上記フラスコにRotenoneを添加し、12時間処理した。ミトコンドリアの

供給側となる細胞のフラスコにミトコンドリア染色試薬を、ミトコンドリアの受容側となる細胞のフラスコに細胞質染色試薬を添加し2時間、37℃でインキュベートした。上記Rotenone処理は、障害を受けた細胞（疾患部位を模倣）を誘導する処理である。なお、ミトコンドリア染色試薬としてMitotrackerを用いた場合は、インキュベート時間を45分とした。染色後、HBSS（+）で3回洗浄し、トリプシン-EDTAにて細胞を剥離した。剥離した細胞をHBSS（+）で洗浄し、両方の細胞をそれぞれ2,000 cells/wellとなるようにプレート（96well plate）に播種して共培養を開始した。ここで、同時にスクリーニング薬剤を添加した。翌日、核染色試薬をHBSS（+）に希釈し、well内培地と置換した。1.5時間、37℃でインキュベートした後、ImageExpressで画像撮影した（9視野/well）。細胞カウントプログラム*で解析し、ミトコンドリアトランスファー率を計算した。

[0050] 細胞カウントプログラム*での解析は以下のように行った。

（1）Cy5フィルターで観察し、赤いドットを認識、計測させた（＝細胞数の測定）。

（2）DAPIフィルターで観察し、ミトコンドリアを受け取る側の細胞（受容側）である青色の細胞を認識、計測させた（violet染色された細胞＝受容側）。

（3）GFPフィルターで観察し、ミトコンドリアを持つ細胞（供給側）である緑色の細胞を認識、計測させた（green染色された細胞、又はtracker染色された細胞＝供給側）。

（4）3枚の画像を重ね合わせ（ドットの色で、細胞の状態を表示）、赤の細胞数と、ピンクの細胞数を計測する。赤の細胞はミトコンドリアを受容する側の細胞の内、ミトコンドリアを受容していない細胞、ピンクの細胞は、ミトコンドリアを受容する側の細胞の内、ミトコンドリアを受容した細胞を示す。

（5）下記計算式により、ミトコンドリアトランスファー率（%）を算出し

た。

計算式：（ピンクの細胞数／ピンク＋赤の細胞数）×１００

[0051] 上記実験に使用した細胞、培地、薬剤、染色試薬を以下に示す。

細胞：

(1) 臍帯由来間葉系幹細胞 (UC-MSC; Umbilical Cord derived Mesenchymal Stem Cells W h a r t o n ' s J e l l y (HMSC-WJ)、FC-0020、L i f e L i n e 社)

(2) A549細胞 (ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞)

[0052] 培地：

(1) Stemlife MSC Comp Kit (Lifeline、LL-0034) 培地 (UC-MSC起眠時、UC培養時)

(2) DMEM/F-12 (Gibco) 培地 (+10%FCS、+1%AB*) (A549培養時、共培養時)

AB*: Antibiotic-Antimycotic (Gibco社)

[0053] 薬剤：

(1) Rotenone (R8875-1G、Sigma-Aldrich) (最終濃度100nMで使用)

(2) グリチルリチン酸ジカリウム (最終濃度1mg/mlで使用)

(3) ウーロン茶抽出液 (エキスを1/10,000で使用)

(4) セイヨウノコギリソウ抽出液 (エキスを1/500で使用)

[0054] 染色試薬：

(ミトコンドリア染色試薬)

(1) CytoPainter Cell Tracking Staining Kit-Green Fluorescence (500回分: ab112143、200回分: ab138891、abcam) (最終濃度5uMで使用)

(2) MitoTracker Mitochondrion-Sele

tive Probes Green FM (M7514、Molecular Probes) (最終濃度100–1000nMで使用)

[0055] (細胞質染色試薬)

(1) CellTrace Violet Cell Proliferation Kit, for flow cytometry (C34557、Life tech.)

(2) CellTrace Red Cell Proliferation Kit, for flow cytometry (C34564、Life tech.) (最終濃度5uMで使用)

[0056] (核染色試薬)

(1) DRAQ5 (DR50050、biostatus)

(2) Hoechst 33342 (346-07951、Dojindo)

[0057]

[表1]

	供給側細胞	受容側細胞		スクリーニング薬剤
	種類	種類	Rotenone 処理(nM)	種類
試験例1	UC-MSC	UC-MSC	0	—
試験例2	UC-MSC	UC-MSC	100	—
試験例3	UC-MSC	UC-MSC	0	グリチルリチン酸ジカリウム
試験例4	UC-MSC	UC-MSC	100	グリチルリチン酸ジカリウム
試験例5	UC-MSC	UC-MSC	0	ウーロン茶抽出液
試験例6	UC-MSC	UC-MSC	100	ウーロン茶抽出液
試験例7	UC-MSC	UC-MSC	0	セイヨウノコギリソウ抽出液
試験例8	UC-MSC	UC-MSC	100	セイヨウノコギリソウ抽出液
試験例9	A549	A549	0	—
試験例10	A549	A549	100	—
試験例11	A549	A549	0	グリチルリチン酸ジカリウム
試験例12	A549	A549	100	グリチルリチン酸ジカリウム
試験例13	A549	A549	0	ウーロン茶抽出液
試験例14	A549	A549	100	ウーロン茶抽出液
試験例15	A549	UC-MSC	0	—
試験例16	A549	UC-MSC	100	—
試験例17	A549	UC-MSC	0	グリチルリチン酸ジカリウム
試験例18	A549	UC-MSC	100	グリチルリチン酸ジカリウム
試験例19	A549	UC-MSC	0	ウーロン茶抽出液
試験例20	A549	UC-MSC	100	ウーロン茶抽出液
試験例21	UC-MSC	A549	0	—
試験例22	UC-MSC	A549	100	—
試験例23	UC-MSC	A549	0	グリチルリチン酸ジカリウム
試験例24	UC-MSC	A549	100	グリチルリチン酸ジカリウム
試験例25	UC-MSC	A549	0	ウーロン茶抽出液
試験例26	UC-MSC	A549	100	ウーロン茶抽出液

[0058] 図1（試験例1～8）に示すように、ミトコンドリアの供給側及び受容側の細胞がどちらも無処理のUC-MSCである場合、グリチルリチン酸ジカリウム、ウーロン茶抽出液の添加で、有意にミトコンドリアトランスファー率が上昇した。また、受容側のUC-MSCがRotenone処理細胞である場合も、同様にグリチルリチン酸ジカリウム、ウーロン茶抽出液の添加で、有意にミトコンドリアトランスファー率が上昇した。

[0059] 図2（試験例9～14）に示すように、ミトコンドリアの供給側及び受容側の細胞がどちらも無処理のA549である場合、グリチルリチン酸ジカリウムの添加で、有意にミトコンドリアトランスファー率が上昇した。しかし

、受容側のUC-MSCがRotenone処理細胞である場合は、スクリーニング薬剤を入れていないコントロールのA549でも、十分に高いミトコンドリアトランスファー率を示したためか、スクリーニング薬剤の添加による効果が確認できなかった。

[0060] 図3（試験例15～20）に示すように、ミトコンドリアの供給側がA549であり、受容側が無処理のUC-MSCである場合、グリチルリチン酸ジカリウムの添加で、ミトコンドリアトランスファー率の上昇が見られた。また、受容側のUC-MSCがRotenone処理細胞である場合は、グリチルリチン酸ジカリウムの添加で、ミトコンドリアトランスファー率の上昇が確認できたものの、スクリーニング薬剤を入れていないコントロールのUC-MSCでも十分に高いミトコンドリアトランスファー率を示したためか、スクリーニング薬剤の添加による効果がわずかしき確認できなかった。

[0061] 図4（試験例21～26）に示すように、ミトコンドリアの供給側がUC-MSCであり、受容側が無処理のA549である場合、受容側のA549がRotenone処理されている場合は、処理されていない場合に比べて、常にミトコンドリアトランスファー率が高かった。しかし、スクリーニング薬剤による促進効果は確認できなかった。

[0062] このように、本発明の評価方法／スクリーニング方法によると、ミトコンドリアトランスファー能を増強させる薬剤を、効率よく選択することができる。例えば、本発明の評価方法／スクリーニング方法によって、細胞間のミトコンドリアトランスファー能を増強する薬剤として、例えばグリチルリチン酸ジカリウム、ウーロン茶抽出液を見出すことができた。また、本発明の評価方法／スクリーニング方法によると、ミトコンドリアの供給側の細胞のうち、ミトコンドリアトランスファー率が高い高機能細胞を選択することができ、このような細胞は、障害を受けた細胞や、疾患部位の細胞に対して、ミトコンドリアをトランスファーすることで、細胞の機能回復や、疾患の治療に有効であると考えられる。

[0063] 《実施例2》UC-MSCからBSMCへのMt-TF

凍結保存のUC-MSC細胞又はBSMC-COPD（ヒト気管支平滑筋細胞細胞）を起眠し、複数のT-25フラスコに播種した。（ 2×10^5 cells／フラスコ）。Rotenone処理が必要な細胞に対しては、最終濃度 $1 \mu\text{M}$ となるように、上記フラスコにRotenoneを添加し、12時間処理した。ミトコンドリアの供給側となるUC-MSC細胞のフラスコにミトコンドリア染色試薬を、ミトコンドリアの受容側となるBSMC-COPD細胞のフラスコに細胞質染色試薬を添加し2時間、 37°C でインキュベートした。上記Rotenone処理は、障害を受けた細胞（疾患部位を模倣）を誘導する処理である。なお、ミトコンドリア染色試薬としてMitoTrackerを用いた場合は、インキュベート時間を30分とした。染色後、HBSS（+）で3回洗浄し、トリプシン-EDTAにて細胞を剥離した。剥離した細胞をHBSS（+）で洗浄し、両方の細胞をそれぞれ $1,000$ cells／wellとなるようにプレート（96well plate）に播種して共培養を開始した。ここで、同時にスクリーニング薬剤を添加した。翌日、核染色試薬をPBS（-）に希釈し、well内培地と置換した。15分、室温でいた後、ImageXpressで画像撮影した（16視野／well）。実施例1と同様の細胞カウントプログラムで解析し、ミトコンドリアトランスファー率を計算した。

[0064] 実施例2に使用した細胞、培地、薬剤を以下に示す。染色試薬は実施例1と同様のものを使用した。

細胞：

（1）臍帯由来間葉系幹細胞（UC-MSC）：実施例1と同様のものを使用した。

（2）BSMC-COPD細胞（慢性閉塞性肺疾患のヒト気管支平滑筋細胞；Bronchial Smooth Muscle cell Chronic Obstructive Pulmonary Disease（Lonza 00195274））

[0065] 培地：

(1) Stemlife MSC Comp Kit (Lifeline、LL-0034) 培地 (UC-MSC 起眠時、UC-MSC 培養時、共培養時)

(2) SmGMTM-2 培地 + Bullet Kit (Lonza CC-3182) + 10% FCS + 1% AB* (BSMC-COPD 細胞培養時)

AB*: Antibiotic-Antimycotic (Gibco 社)

[0066] 薬剤:

(1) Rotenone (R8875-1G、Sigma-Aldrich) (最終濃度 1 μ M で使用)

(2) グリチルリチン酸ジカリウム (GR2K: 最終濃度 0.5 mg/ml 又は 1 mg/ml で使用)

[0067] (3) スクリーニングに供した薬剤

(図5; 終濃度 1/1000 で使用)

ブドウ葉エキス、アシタバ葉/茎エキス、アセンヤクエキス、アマチャエキス、アルテア根エキス、アルニカ花エキス、アロエフェロックス葉エキス、イチヨウ葉エキス、セイヨウイラクサ葉エキス、カワラヨモギ花エキス、ウイキョウ果実エキス、チャ葉エキス、ウコン根茎エキス、ゼニアオイ花エキス、ノイバラ果実エキス、ヒキオコシ葉/茎エキス、オウゴン根エキス、キハダ樹皮エキス、オウレン根エキス、セイヨウオトギリソウ花/葉/茎エキス、オノニスエキス、オリーブ葉エキス、オレンジ果汁、ヒバマタエキス、ヒジキエキス、ワカメエキス、ヨモギ葉エキス、カミツレ花エキス、カンゾウ根エキス、カンゾウ葉エキス、キイチゴエキス、キナノキ樹皮エキス、キュウリ果実エキス、アンズ種子エキス

[0068] (図6; 終濃度 1/1000 で使用)

キラヤ樹脂エキス液、スイカズラ花エキス、クマザサ葉エキス、クララ根エキス、グレープフルーツ果実エキス、カシア樹皮エキス、ゲットウ葉エキス、ゲンチアナ根茎/根エキス、ゲンノショウコ花/葉/茎エキス、チャ葉エキス、サッカロミセスエレビシアエエキス、ゴボウ根エキス、コメヌカエ

キス、ウスバサイシン根エキス、サボンソウ葉エキス、セージ葉エキス、サンザシエキス、クチナシ果実エキス、サンショウ果皮エキス、シイタケエキス、ジオウ根エキス、シソ葉エキス、フユボダイジュ花エキス、シャクヤク根エキス、ドクダミエキス、ワレモコウエキス、ショウガ根茎エキス、ショウブ根エキス、ヨーロッパシラカバ樹皮エキス、マタタビ果実エキス、加水分解コンキオリン、スギナエキス、ゴレンシ葉エキス、セイヨウキズタ葉／茎エキス

[0069] (図7 ; 終濃度 1 / 1000 で使用)

セイヨウニワトコ花エキス、セイヨウノコギリソウエキス、センキュウ根茎エキス、センブリエキス、マグワ根皮エキス、ナツメ果実エキス、タチジャコウソウ花／葉／茎エキス、チョウジエキス、ウンシュウミカン果皮エキス、ツボクサエキス、テンチャエキス、テンニンカ果実エキス、トウガラシ果実エキス、トウキ根エキス、トウキンセンカ花エキス、フユムシナツクサタケエキス、モモ種子エキス、イザヨイバラエキス、トマト果実エキス、トルメンチラ根エキス

[0070] (図8 ; 終濃度 1 / 1000 で使用)

オタネニンジン葉エキス、スイカズラエキス、パセリエキス、ハマメリス葉エキス、センチフォリアバラ花エキス、マドンナリリー根エキス、ヒノキ水、オニイチゴ根エキス、ビワ葉エキス、フキタンポポ花エキス、ブクリョウエキス、ブッチャーブルーム根エキス、プルーン分解物、ヘチマエキス、ベニバナ花エキス、セイヨウハッカ葉エキス、ボタンエキス、ホップ花エキス、マヨラナ葉エキス、セイヨウトチノキ種子エキス、ムクロジ果皮エキス、メリッサ葉エキス、モモ葉エキス、ヤグルマギク花エキス、ユーカリ葉エキス、ユキノシタエキス、ユズ果実エキス、ハトムギ種子エキス、ライム果汁、ラベンダー花エキス、チャ葉エキス、リンゴ果実エキス、ルイボスエキス、レイシ柄エキス、レタス葉エキス、レモン果実エキス、カニナバラ果実エキス、ローズマリー葉エキス、ローヤルゼリーエキス、ワイルドタイムエキス、ウメ果実エキス、ヤエヤマアオキ果汁

[0071] (図9 ; 終濃度 1 / 1000 で使用)

セージエキス1、セージエキス2、オウゴンエキス、クロレラエキス、モモ葉エキス、カモミラエキス、アマチャヅルエキス、サイシンエキス、サンショウエキス、ジオウエキス、シソエキス、セージエキス3、チョウジエキス、ドクダミエキス、トルメンチラエキス、シナノキエキス、ボタンエキス、ダイズエキス、サクラ葉抽出液、ニーム葉エキス、ヒメフロウエキス、チンピエキス、セイヨウオオバコ種子エキス、レモングラス抽出液、クララエキス

[0072] (図10 ; 終濃度 1 / 1000 で使用)

筍の皮エキス、キンメダイエキス、ゲンチアナの根エキス、アマモエキス1、コンブエキス1、アマモエキス2、オタネニンジンエキス、精白米エキス、米ヌカエキス、黒大豆エキス、アッケシソウエキス、サンパギータエキス、アブラナ科の種子エキス、水ナスエキス、パウダルコ樹皮エキス、ユリの蕾エキス、コンブエキス、コンブ／キリンサイ／アオサ／カミツレ混合エキス、ハイビスカスの萼エキス、ハトムギエキス、豆乳エキス、カミツレエキス、ヘチマエキス、党参エキス、桑の根皮エキス、コンブ／キリンサイ混合エキス、コンブ／キリンサイ／アオサ／ゲンチアナ混合エキス、イネの葉エキス、ロイヤルゼリー、コンブエキス2、紫蘭の根エキス

[0073] 図5～図10に示す結果より、アシタバ葉／茎エキス、アマチャエキス、ウコン根茎エキス、ゼニアオイ花エキス、ヒキオコシ葉／茎エキス、キハダ樹皮エキス、オウレン根エキス、グレープフルーツ果実エキス、カシア樹皮エキス、サッカロミセスエレビスシアエエキス、ゴボウ根エキス、コメヌカエキス、ウスバサイシン根エキス、クチナシ果実エキス、マタタビ果実エキス、スギナエキス、セイヨウキズタ葉／茎エキス、センブリエキス、フユムシナツクサタケエキス、トマト果実エキス、ヒノキ水、ブクリョウエキス、ブッチャーブルーム根エキス、ムクロジ果皮エキス、ウメ果実エキス、ヤエヤマアオキ果汁、モモ葉エキス、筍の皮エキス、アマモエキス1、アマモエキス2、水ナスエキス、ハトムギエキスで処理したUC-MSCは、未処理の

UC-MSC（コントロール）と比較して、BSMC-COPDに対するミトコンドリアトランスファー能が増強していることがわかった。

[0074] 上記ミトコンドリアトランスファー能の増強効果を示したエキスについて、複数の濃度でのミトコンドリアトランスファー能の増強効果を確認する実験を行ったところ、キハダ樹皮エキス、オウレン根エキス、ハトムギエキスに、特に顕著なミトコンドリアトランスファー能の増強効果があることがわかった。

[0075] 《実施例3》UC-MSCからNHDFへのMt-TF

凍結保存のUC-MSC細胞又はNHDF（ヒト皮膚線維芽細胞）を起眠し、複数のT-25フラスコに播種した。（ 2×10^5 cells／フラスコ）。Rotenone処理が必要な細胞に対しては、最終濃度 $1 \mu\text{M}$ となるように、上記フラスコにRotenoneを添加し、12時間処理した。ミトコンドリアの供給側となるUC-MSC細胞のフラスコにミトコンドリア染色試薬を、ミトコンドリアの受容側となるNHDF細胞のフラスコに細胞質染色試薬を添加し1時間、 37°C でインキュベートした。上記Rotenone処理は、障害を受けた細胞（疾患部位を模倣）を誘導する処理である。なお、ミトコンドリア染色試薬としてMitotrackerを用いた場合は、インキュベート時間を30分とした。染色後、HBSS（+）で3回洗浄し、トリプシン-EDTAにて細胞を剥離した。剥離した細胞をHBSS（+）で洗浄し、両方の細胞をそれぞれ $2,000$ cells／wellとなるようにプレート（96 well plate）に播種して共培養を開始した。ここで、同時にスクリーニング薬剤を添加した。翌日、核染色試薬をPBS（-）に希釈し、well内培地と置換した。15分、室温でいった後、ImageXpressで画像撮影した（16視野／well）。実施例1と同様の細胞カウントプログラムで解析し、ミトコンドリアトランスファー率を計算した。

[0076] 実施例3に使用した細胞、培地、薬剤を以下に示す。染色試薬は実施例1と同様のものを使用した。

細胞：

(1) 臍帯由来間葉系幹細胞 (UC-MSC)：実施例1と同様のものを使用した。

(2) NHDF細胞 (ヒト皮膚線維芽細胞)：Human Dermal Fibroblast (KURABO KF-4009)

[0077] 培地：

(1) Stemlife MSC Comp Kit (Lifeline、LL-0034) 培地 (UC-MSC起眠時、UC-MSC培養時)

(2) DMEM (Gibco) 培地+10%FCS+1%AB* (NHDF細胞培養時、共培養時)

AB*：Antibiotic-Antimycotic (Gibco社)

[0078] 薬剤：

(1) Rotenone (R8875-1G、Sigma-Aldrich) (最終濃度1 μ Mで使用)

(2) グリチルリチン酸ジカリウム (GR2K：最終濃度0.5mg/ml又は1mg/mlで使用)

[0079] (3) スクリーニングに供した薬剤

(図11；終濃度1/1000で使用)

ブドウ葉エキス、アシタバ葉／茎エキス、アセンヤクエキス、アマチャエキス、アルテア根エキス、アルニカ花エキス、アロエフェロックス葉エキス、イチヨウ葉エキス、セイヨウイラクサ葉エキス、カワラヨモギ花エキス、ウイキョウ果実エキス、チャ葉エキス、ウコン根茎エキス、ゼニアオイ花エキス、ノイバラ果実エキス、ヒキオコシ葉／茎エキス、オウゴン根エキス、キハダ樹皮エキス、オウレン根エキス、セイヨウオトギリソウ花／葉／茎エキス、オノニスエキス、オリーブ葉エキス、オレンジ果汁、ヒバマタエキス、ヒジキエキス、ワカメエキス、ヨモギ葉エキス、カミツレ花エキス、カンゾウ根エキス、カンゾウ葉エキス、キイチゴエキス、キナノキ樹皮エキス、キュウリ果実エキス、アンズ種子エキス

[0080] (図12; 終濃度1/1000で使用)

スイカズラ花エキス、クマザサ葉エキス、クララ根エキス、グレープフルーツ果実エキス、カシア樹皮エキス、ゲットウ葉エキス、ゲンチアナ根茎／根エキス、ゲンノショウコ花／葉／茎エキス、チャ葉エキス、サッカロミセスセレビスシアエエキス、ゴボウ根エキス

コメヌカエキス、ウスバサイシン根エキス、サボンソウ葉エキス、セージ葉エキス、サンザシエキス、クチナシ果実エキス、サンショウ果皮エキス、シイタケエキス、ジオウ根エキス、シソ葉エキス、フユボダイジュ花エキス、シャクヤク根エキス、ドクダミエキス、ワレモコウエキス、ショウガ根茎エキス、ショウブ根エキス、ヨーロッパシラカバ樹皮エキス、マタタビ果実エキス、加水分解コンキオリン、スギナエキス、ゴレンシ葉エキス、セイヨウキズタ葉／茎エキス

[0081] (図13; 終濃度1/1000で使用)

セイヨウニワトコ花エキス、セイヨウノコギリソウエキス、センキュウ根茎エキス、センブリエキス、マグワ根皮エキス、ナツメ果実エキス、タチジャコウソウ花／葉／茎エキス、チョウジエキス、ウンシュウミカン果皮エキス、ツボクサエキス、テンチャエキス、テンニンカ果実エキス、トウガラシ果実エキス、トウキ根エキス、トウキンセンカ花エキス、フユムシナツクサタケエキス、モモ種子エキス、イザヨイバラエキス、トマト果実エキス、トルメンチラ根エキス

[0082] (図14; 終濃度1/1000で使用)

オタネニンジン葉エキス、スイカズラエキス、パセリエキス、ハマメリス葉エキス、センチフォリアバラ花エキス、マドンナリリー根エキス、ヒノキ水、オニイチゴ根エキス、ビワ葉エキス、フキタンポポ花エキス、ブクリョウエキス、ブッチャーブルーム根エキス、プルーン分解物、ヘチマエキス、ベニバナ花エキス、セイヨウハッカ葉エキス、ボタンエキス、ホップ花エキス、マヨラナ葉エキス、セイヨウトチノキ種子エキス、ムクロジ果皮エキス、メリッサ葉エキス、モモ葉エキス、ヤグルマギク花エキス、ユーカリ葉エ

キス、ユキノシタエキス、ユズ果実エキス、ハトムギ種子エキス、ライム果汁、ラベンダー花エキス、チャ葉エキス、リンゴ果実エキス、ルイボスエキス、レイシ柄エキス、レタス葉エキス、レモン果実エキス、カニナバラ果実エキス、ローズマリー葉エキス、ローヤルゼリーエキス、ワイルドタイムエキス、ウメ果実エキス、ヤエヤマアオキ果汁

[0083] (図15; 終濃度1/1000で使用)

セージエキス1、セージエキス2、オウゴンエキス、クロレラエキス、モモ葉エキス、カモミラエキス、アマチャヅルエキス、サイシンエキス、サンショウエキス、ジオウエキス、シソエキス、セージエキス3、チョウジエキス、ドクダミエキス、トルメンチラエキス、シナノキエキス、ボタンエキス、ダイズエキス、サクラ葉抽出液、ニーム葉エキス、ヒメフロウエキス、チンピエキス、セイヨウオオバコ種子エキス、レモングラス抽出液、クララエキス、筍の皮エキス

[0084] 図11～図15に示す結果より、キハダ樹皮エキス、マグワ根皮エキス、ハマメリス葉エキス、センチフォリアバラ花エキス、マドンナリリー根エキス、ヒノキ水、ローズマリー葉エキス、セージエキス2、セイヨウオオバコ種子エキス、レモングラスエキス、クララエキス、筍の皮エキスで処理したUC-MSCは、未処理のUC-MSC（コントロール）と比較して、NHDFに対するミトコンドリアトランスファー能が増強していることがわかった。

[0085] 上記ミトコンドリアトランスファー能の増強効果を示したエキスについて、複数の濃度でのミトコンドリアトランスファー能の増強効果を確認する実験を行ったところ、キハダ樹皮エキス、筍の皮抽出液に、特に顕著なミトコンドリアトランスファー能の増強効果があることがわかった。

[0086] 《実施例4》UC-MSC、AD-MSCからHCM（ヒト心筋細胞）へのMt-TF

凍結保存のUC-MSC細胞、AD-MSC細胞、HCM細胞（ヒト心筋細胞）を起眠し、複数のT-25フラスコに播種した。（ 2×10^5 cell

s／フラスコ)。各細胞をグリチルリチン酸ジカリウム又はウーロン茶エキスを前処理した後、ミトコンドリアの供給側となるUC-MSC細胞又はAD-MSC細胞のフラスコにミトコンドリア染色試薬を、ミトコンドリアの受容側となるHCM細胞のフラスコに細胞質染色試薬を添加し1時間、37℃でインキュベートした。なお、ミトコンドリア染色試薬としてMitotrackerを用いた場合は、インキュベート時間を30分とした。染色後、HBSS(+)で3回洗浄し、トリプシン-EDTAにて細胞を剥離した。剥離した細胞をHBSS(+)で洗浄し、両方の細胞をそれぞれ1,000 cells/wellとなるようにプレート(96well plate)に播種して共培養を開始した。ここで、同時にスクリーニング薬剤を添加した。翌日、核染色試薬をPBS(-)に希釈し、well内培地と置換した。15分、室温でインキュベートした後、ImageExpressで画像撮影した(16視野/well)。実施例1と同様の細胞カウントプログラムで解析し、ミトコンドリアトランスファー率を計算した。

[0087] 実施例4に使用した細胞、培地、薬剤を以下に示す。染色試薬は実施例1と同様のものを使用した。

細胞：

(1) 臍帯由来間葉系幹細胞(UC-MSC)：実施例1と同様のものを使用した。

(2) 脂肪由来間葉系幹細胞(AD-MSC)：Adipose-derived mesenchymal stem cell (LifeLine)

(3) CEM細胞(ヒト心筋細胞)：Human Cardiac Myocytes (HCM (PromoCell))

[0088] 培地：

(1) StemLife MSC Comp Kit (LifeLine、LL-0034) 培地(UC-MSC及びAD-MSC起眠時、UC-MSC及びAD-MSC培養時)

(2) Myocyte Basal Medium (PromoCell, C-22170), Myocyte Growth Medium Supplement Pack (PromoCell, C-39270) (HCM細胞培養時、共培養時)

[0089] 薬剤：

(1) Rotenone (R8875-1G, Sigma-Aldrich) (最終濃度 $1\ \mu\text{M}$ で使用)

(2) グリチルリチン酸ジカリウム (GR2K : 最終濃度 1 mg/ml)

(3) ウーロン茶抽出液 (エキスを $1/1,000$ で使用)

[0090] 図13 (UC-MSC)、図14 (AD-MSC) に示す通り、UC-MSC及びAD-MSCからHCMへミトコンドリアトランスファーが起こること、またグリチルリチン酸ジカリウムを添加することで、UC-MSC及びAD-MSCからHCMへのミトコンドリアトランスファーが促進されることがわかった。

[0091] 《実施例5》ベルベリンの効果：UC-MSC、AD-MSCからHCE (ヒト角膜上皮細胞) へのMt-TF

凍結保存のUC-MSC細胞、AD-MSC細胞、HCE細胞 (ヒト角膜上皮細胞) を起眠し、複数のT-25フラスコに播種した。 ($1 \times 10^5\text{ cells}$ / フラスコ)。各細胞をグリチルリチン酸ジカリウム又はベルベリンで前処理した後、ミトコンドリアの供給側となるUC-MSC細胞又はAD-MSC細胞のフラスコにミトコンドリア染色試薬を、ミトコンドリアの受容側となるHCE細胞のフラスコに細胞質染色試薬を添加し2時間、 37°C でインキュベートした。なお、ミトコンドリア染色試薬としてMitotrackerを用いた場合は、インキュベート時間を45分とした。染色後、HBSS (+) で3回洗浄し、トリプシン-EDTAにて細胞を剥離した。剥離した細胞をHBSS (+) で洗浄し、UC-MSC又はAD-MSC細胞を $1,000\text{ cells/well}$ 、HCE細胞を $2,000\text{ cells/well}$ となるようにプレート (96well plate) に播種して

共培養を開始した。ここで、同時にスクリーニング薬剤を添加した。翌日、核染色試薬をPBS（－）に希釈し、well内培地と置換した。15分、室温でいた後、ImageXpressで画像撮影した（16視野／well）。実施例1と同様の細胞カウントプログラムで解析し、ミトコンドリアトランスファー率を計算した。

[0092] 実施例5に使用した細胞、培地、薬剤を以下に示す。染色試薬は実施例1と同様のものを使用した。

細胞：

（1）臍帯由来間葉系幹細胞（UC-MSC）：実施例1と同様のものを使用した。

（2）脂肪由来間葉系幹細胞（AD-MSC）：実施例4と同様のものを使用した。

（3）HCE細胞（ヒト角膜上皮細胞）：ヒト角膜上皮細胞株 HCE-T（理化学研究所バイオリソースセンター）

[0093] 培地：

（1）Stemlife MSC Comp Kit（Lifeline、LL-0034）培地（UC-MSC及びAD-MSC起眠時、UC-MSC及びAD-MSC培養時）

（2）DMEM F12（gibco）＋5％FCS（DSファーマ）、0.5％DMSO（Wako）、5μg/mL insulin（sigma）、10ng/mL hEGF（R&D）（HCE細胞培養時）

なお、共培養時は、（1）の培地と（2）の培地を1：1で混合した培地を用いた。

[0094] 薬剤：

（1）Rotenone（R8875-1G、Sigma-Aldrich）（最終濃度100nMで使用）

（2）グリチルリチン酸ジカリウム（GR2K：最終濃度1mg/mL）

（3）ベルベリン（ベルベリン硫酸塩；CAS. No. 316-41-6；

最終濃度 0.001% で使用)

[0095] 図 15 (UC-MSC)、図 16 (AD-MSC) に示す通り、MSC と HCE の共培養時にベルベリンを添加すると、MSC から HCE へのミトコンドリアトランスファーが顕著に促進されることがわかった。

産業上の利用可能性

[0096] 本発明によると、細胞から細胞へのミトコンドリアトランスファーを促進する薬剤、ミトコンドリアトランスファー能の高い細胞を誘導する薬剤、又はミトコンドリアトランスファー能の高い細胞を、効率よく評価し、スクリーニングすることができる。また、本発明の方法によってスクリーニングされた高機能細胞や薬剤は、ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリア活性の低下等に関連する疾患や老化等に伴う症状に対して、広く用いることができ、優れた効果を奏する。

請求の範囲

- [請求項1] ミトコンドリアトランスファー能を指標にして細胞を評価する、細胞の評価方法。
- [請求項2] さらに、ミトコンドリア活性を指標とする、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 上記ミトコンドリア活性が、ミトコンドリア脱水素酵素活性、ミトコンドリア含有量及びミトコンドリア膜電位からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項2記載の方法。
- [請求項4] 細胞のミトコンドリアトランスファー能を測定する工程、及び
得られたミトコンドリアトランスファー能を、基準となる細胞のミトコンドリアトランスファー能と比較する工程
を含む、細胞の評価方法。
- [請求項5] 細胞のミトコンドリア活性を測定する工程、及び
得られたミトコンドリア活性を、基準となる細胞のミトコンドリア活性と比較する工程
をさらに含む、請求項4記載の方法。
- [請求項6] 上記ミトコンドリア活性が、ミトコンドリア脱水素酵素活性、ミトコンドリア含有量及びミトコンドリア膜電位からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項5記載の方法。
- [請求項7] 上記細胞が、間葉系幹細胞、表皮幹細胞、角膜上皮幹細胞、結膜上皮幹細胞又はこれらに由来する細胞である、請求項1から6のいずれか1項記載の方法。
- [請求項8] 上記間葉系幹細胞が、臍帯由来又は脂肪組織由来である、請求項7記載の方法。
- [請求項9] 請求項1から8のいずれか1項記載の方法を用いた、高機能細胞又は高機能細胞を誘導できる薬剤をスクリーニングする方法。
- [請求項10] 請求項9記載の方法により得られた、ウーロン茶抽出液、グリチルリチン酸ジカリウム、セイヨウノコギリソウ抽出液、アシタバ葉／茎エキス、アマチャエキス、ウコン根茎エキス、ゼニアオイ花エキス、

ヒキオコシ葉／茎エキス、キハダ樹皮エキス、オウレン根エキス、グレープフルーツ果実エキス、カシア樹皮エキス、サッカロミセスレビシアエエキス、ゴボウ根エキス、コメヌカエキス、ウスバサイシン根エキス、クチナシ果実エキス、マタタビ果実エキス、スギナエキス、セイヨウキズタ葉／茎エキス、センブリエキス、フユムシナツクサタケエキス、トマト果実エキス、ヒノキ水、ブクリョウエキス、ブッチャーブルーム根エキス、ムクロジ果皮エキス、ウメ果実エキス、ヤエヤマアオキ果汁、モモ葉エキス、筍の皮エキス、アマモエキス、水ナスエキス、ハトムギエキス、マグワ根皮エキス、ハマメリス葉エキス、センチフォリアバラ花エキス、マドンナリリー根エキス、ヒノキ水、ローズマリー葉エキス、セージエキス2、セイヨウオオバコ種子エキス、レモングラス抽出液、クララエキス及びベルベリンからなる群より選択される少なくとも一種の薬剤で処理したことを特徴とする高機能細胞を含む医薬組成物。

[請求項11]

請求項9記載の方法により得られた、ウーロン茶抽出液、グリチルリチン酸ジカリウム、セイヨウノコギリソウ抽出液、アシタバ葉／茎エキス、アマチャエキス、ウコン根茎エキス、ゼニアオイ花エキス、ヒキオコシ葉／茎エキス、キハダ樹皮エキス、オウレン根エキス、グレープフルーツ果実エキス、カシア樹皮エキス、サッカロミセスレビシアエエキス、ゴボウ根エキス、コメヌカエキス、ウスバサイシン根エキス、クチナシ果実エキス、マタタビ果実エキス、スギナエキス、セイヨウキズタ葉／茎エキス、センブリエキス、フユムシナツクサタケエキス、トマト果実エキス、ヒノキ水、ブクリョウエキス、ブッチャーブルーム根エキス、ムクロジ果皮エキス、ウメ果実エキス、ヤエヤマアオキ果汁、モモ葉エキス、筍の皮エキス、アマモエキス、水ナスエキス、ハトムギエキス、マグワ根皮エキス、ハマメリス葉エキス、センチフォリアバラ花エキス、マドンナリリー根エキス、ヒノキ水、ローズマリー葉エキス、セージエキス2、セイヨウオオバコ種

子エキス、レモンガラス抽出液、クララエキス及びベルベリンからなる群より選択される少なくとも一種の薬剤を有効成分として含む医薬組成物。

[請求項12]

軟骨分解、関節リウマチ、乾癬性関節炎、脊椎関節炎、変形性関節症、痛風、乾癬、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、中枢神経疾患、うっ血性心不全等の心不全、心筋梗塞、脳卒中、大動脈弁狭窄症、腎不全、腎臓移植後の生着不全、狼瘡、膵炎、アレルギー、アトピー性皮膚炎、線維症、貧血、アテローム性動脈硬化症等の動脈硬化、再狭窄、化学療法／放射線関連合併症、Ⅰ型糖尿病、Ⅱ型糖尿病、肺炎、自己免疫性肝炎、Ｃ型肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、劇症肝炎、セリアック病、非特異性大腸炎、アレルギー性結膜炎、糖尿病性網膜症、シェーグレン症候群、ブドウ膜炎アレルギー性鼻炎、喘息、石綿症、珪肺、慢性閉塞性肺疾患、慢性肉芽腫性炎症、嚢胞性線維症、サルコイドーシス、糸球体腎炎、脈管炎、皮膚炎、ＨＩＶ関連悪液質、大脳マラリア、強直性脊椎炎、らい病、肺線維症、線維筋痛、食道癌、胃食道逆流症、バレット食道、胃癌、十二指腸癌、小腸癌、虫垂癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肛門癌、膵臓癌、肝臓癌、胆嚢癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、前立腺癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、乳癌、肺癌、甲状腺癌、慢性疲労症候群、てんかん、心筋症、高血圧、糖尿病、肥満、腎障害、不妊、難聴、慢性進行性外眼麻痺症候群、赤色ぼろ線維・ミオクロームスてんかん症候群、リー脳症、レーバー病、ミトコンドリア糖尿病、パーソン病(汎血球減少症)及びミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様症候群、皮膚老化(しわ、たるみ、コラーゲン減少等)、ターンオーバー鈍化、表皮ひ薄化、角結膜上皮障害、ドライアイ、角結膜炎、涙液分泌不全、涙腺炎のいずれかの処置のために用いられる、請求項１０又は１１に記載の医薬組成物。

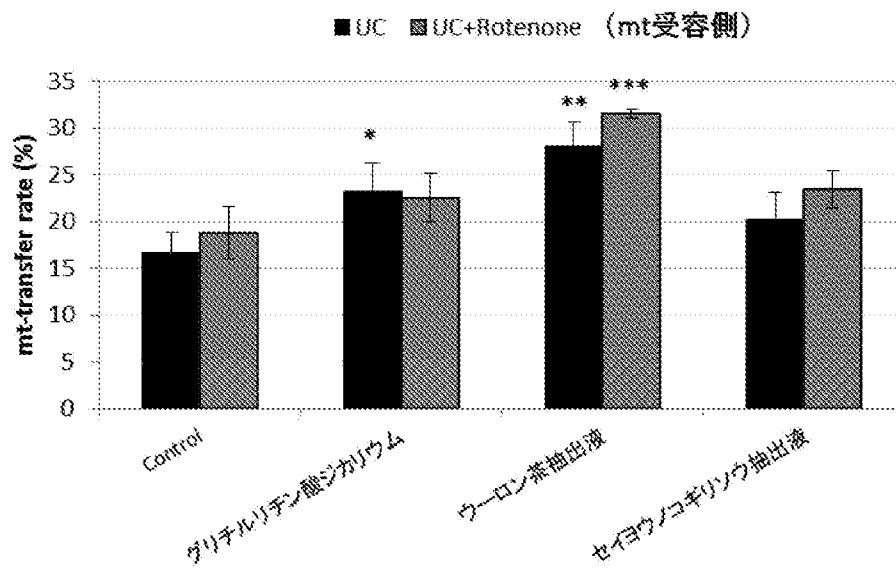
[請求項13]

ベルベリン配合点眼剤である、請求項１１又は１２記載の医薬組成

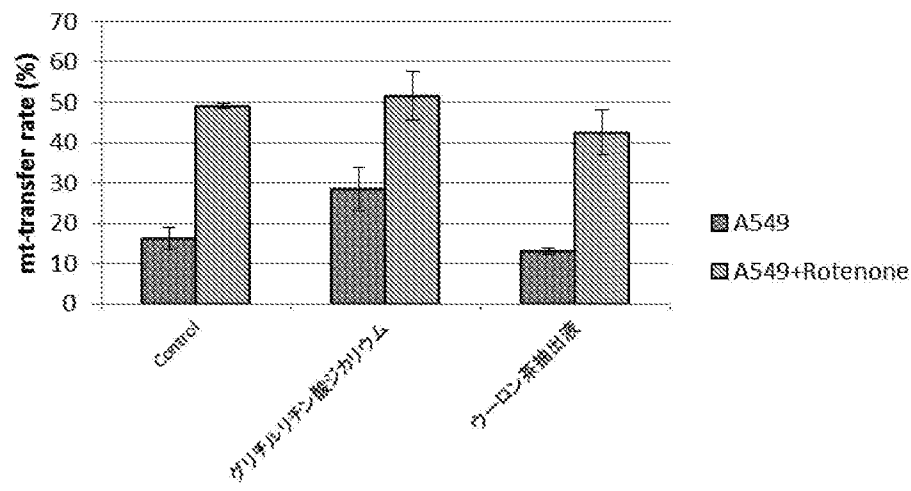
物。

[請求項14] ミトコンドリアトランスファー剤又はミトコンドリアトランスファー促進剤である、請求項10から13のいずれか1項記載の医薬組成物。

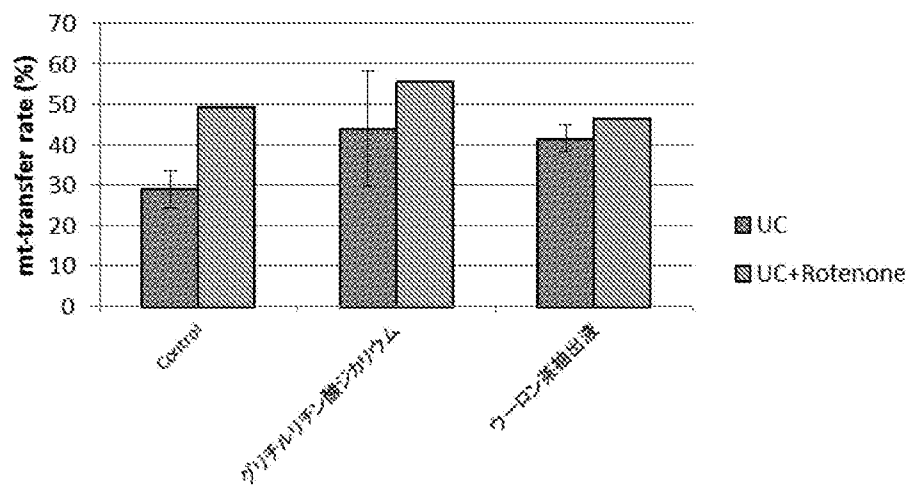
[図1]



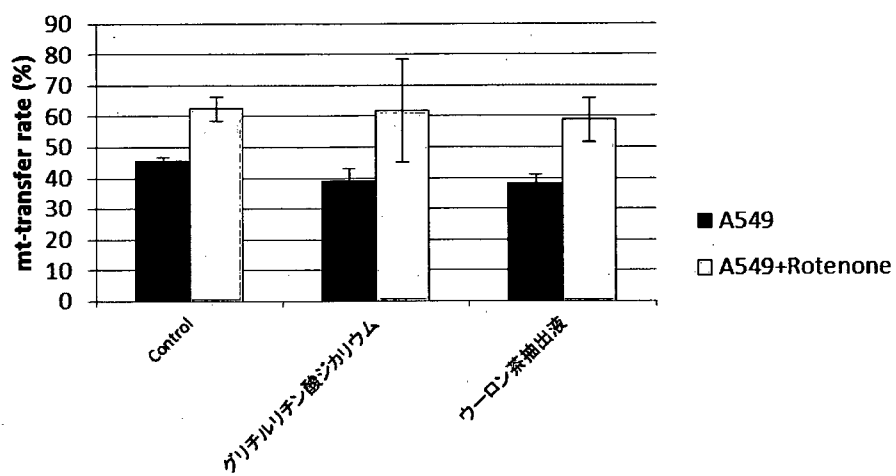
[図2]



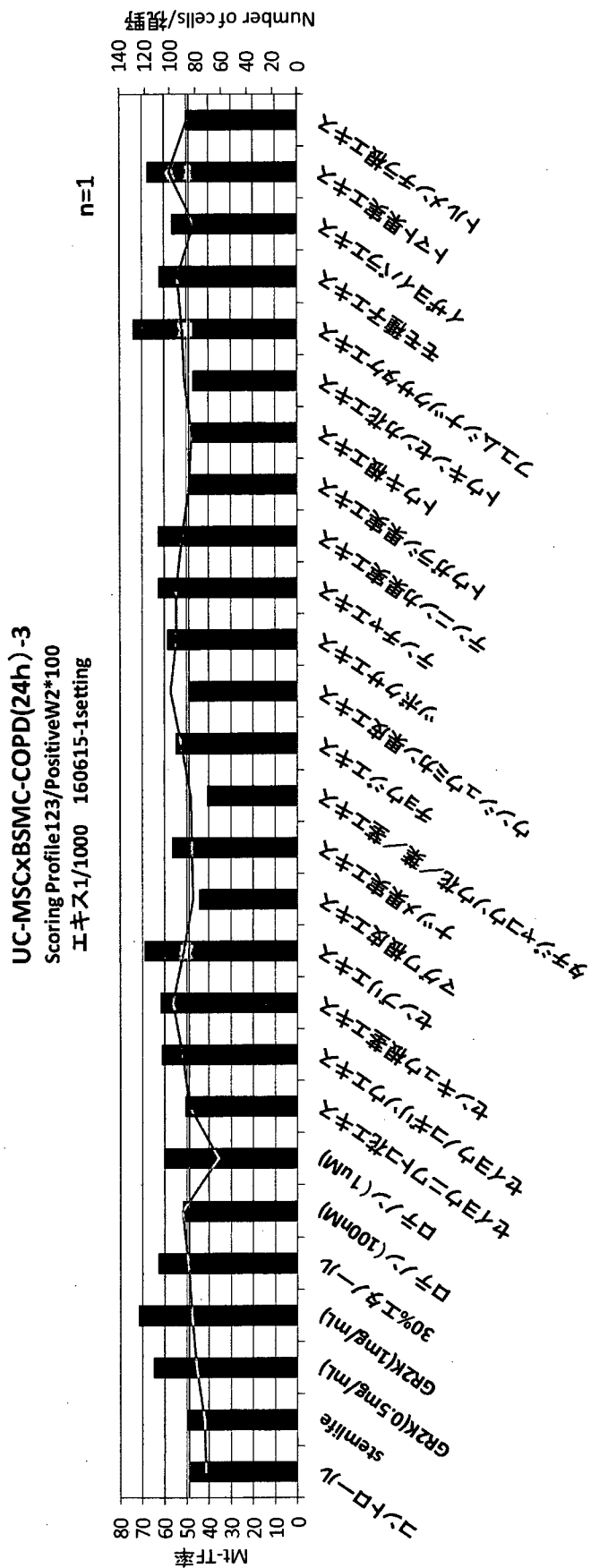
[図3]



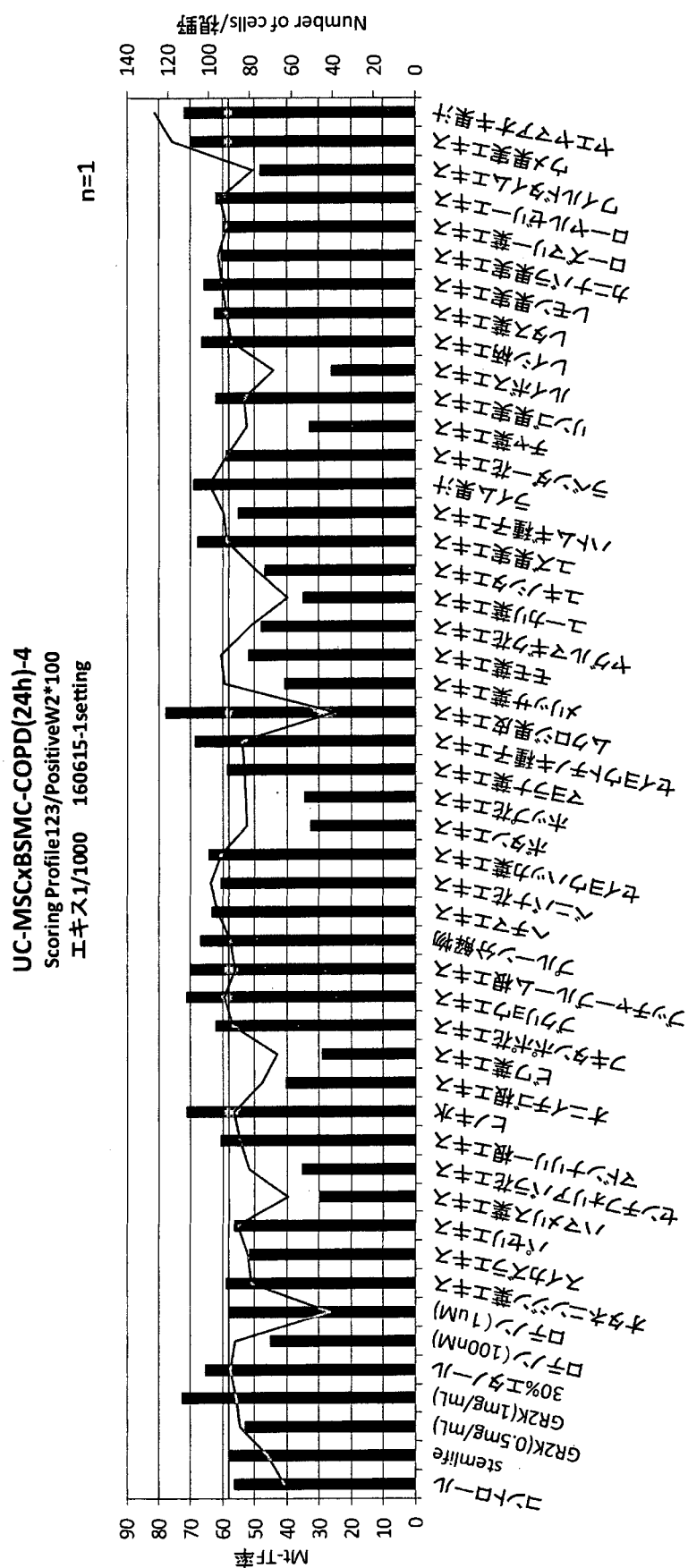
[図4]



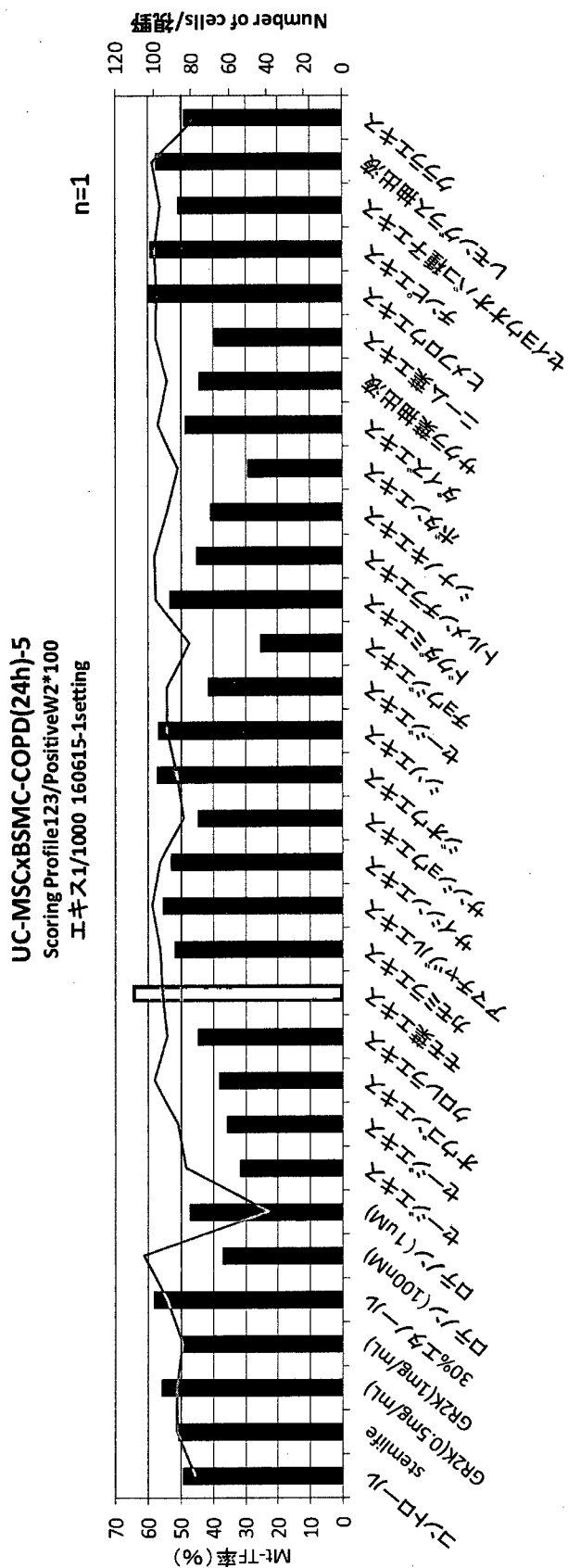
【図7】



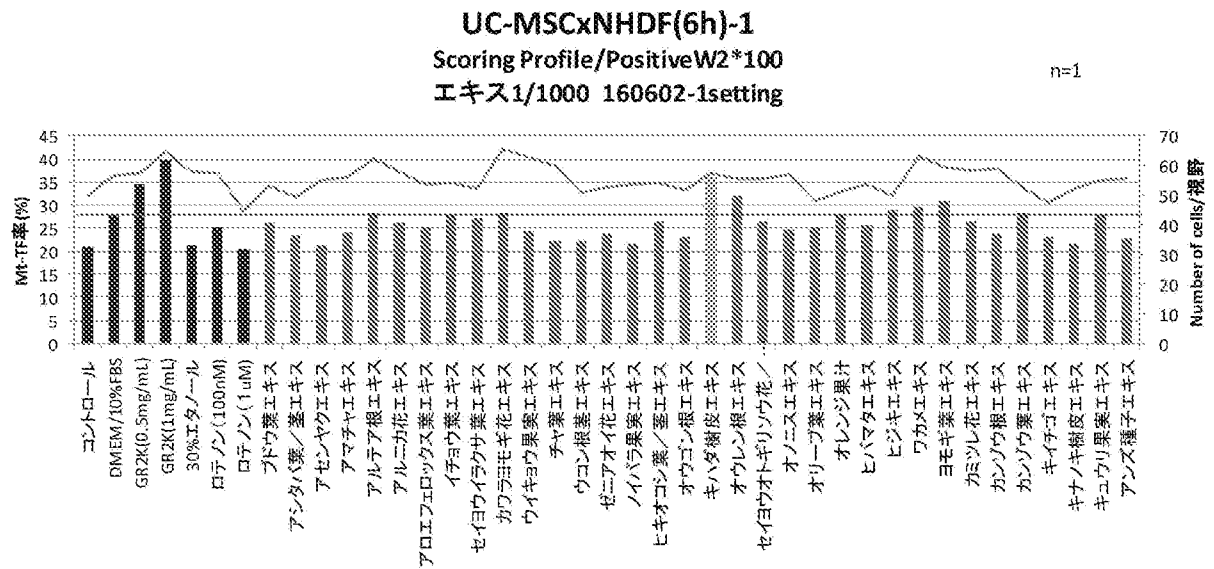
[圖8]



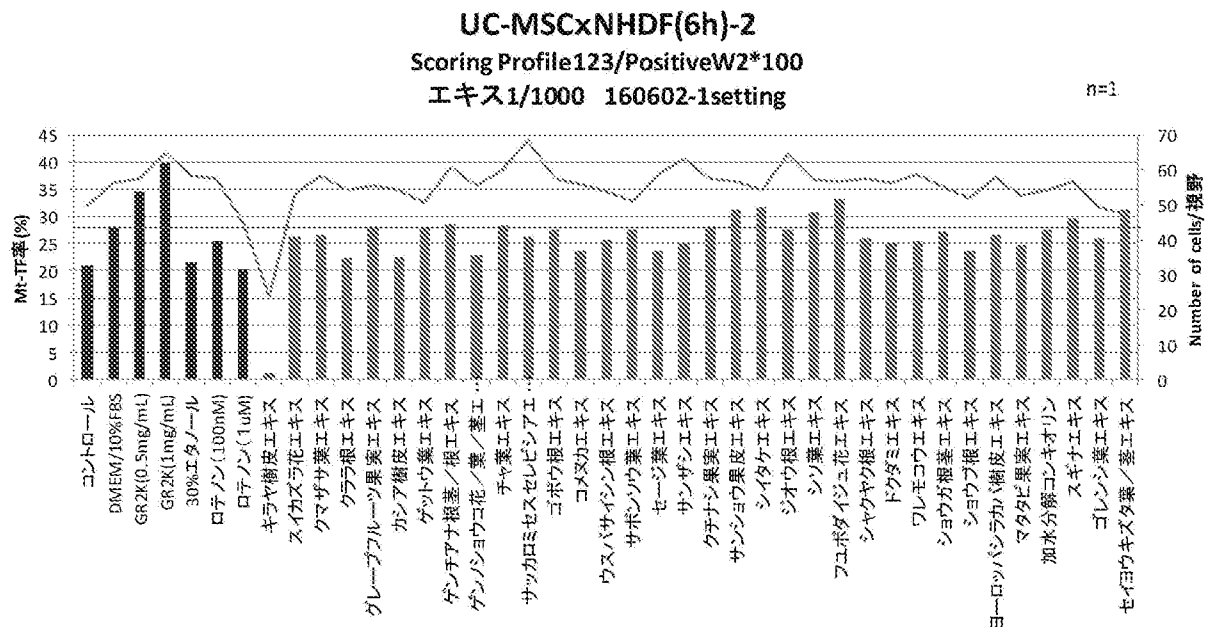
[図9]



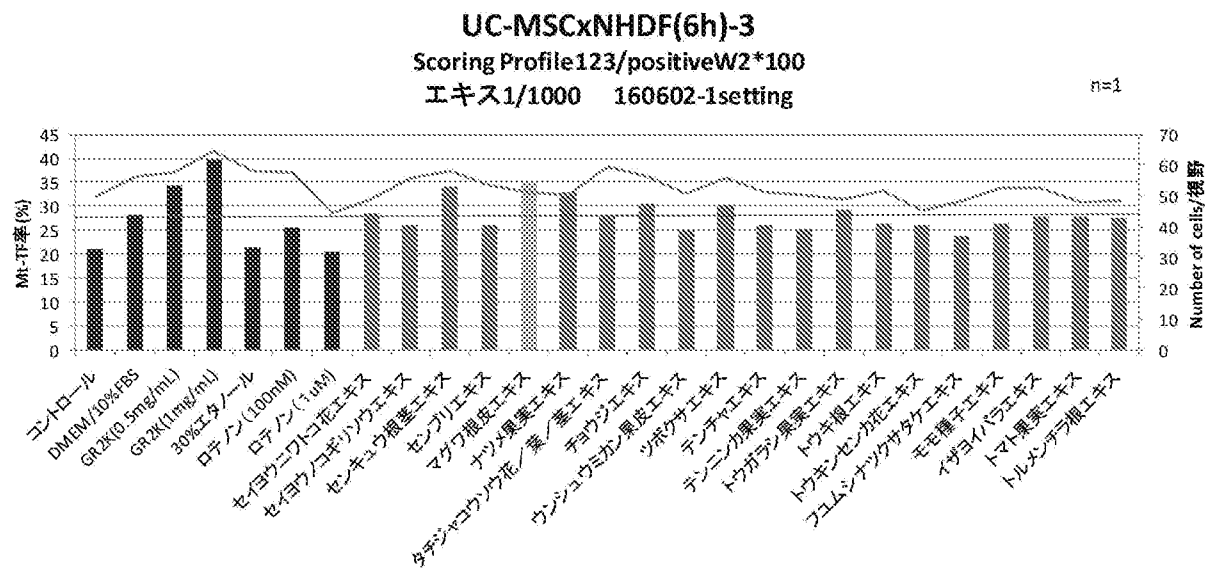
[図11]



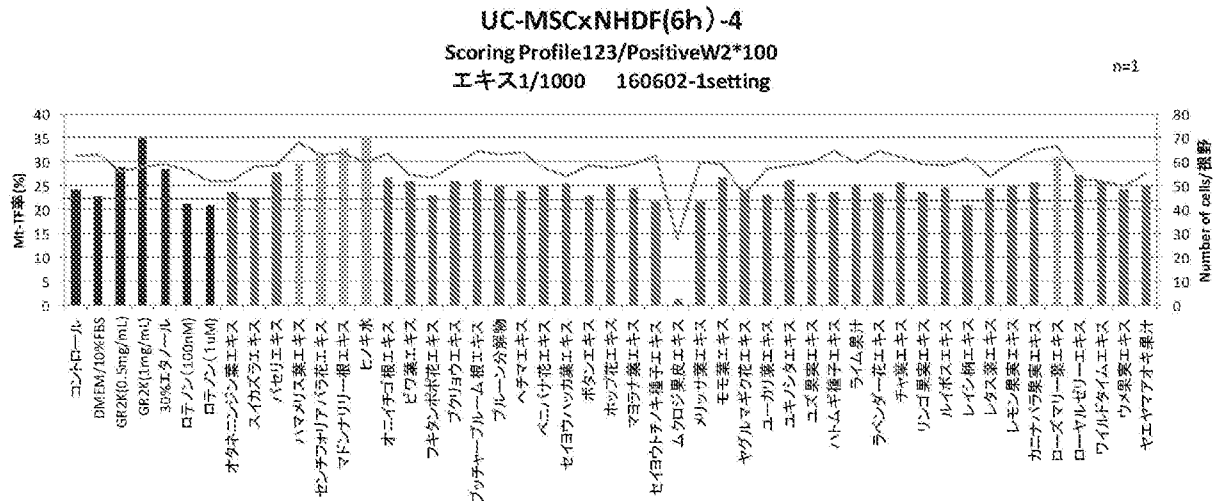
[図12]



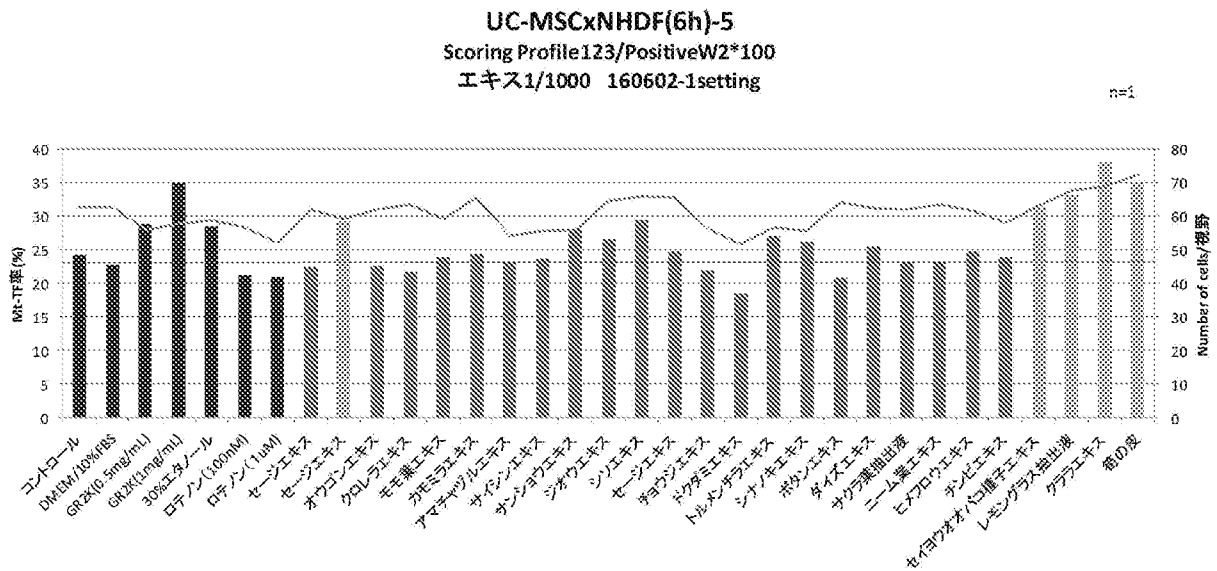
[図13]



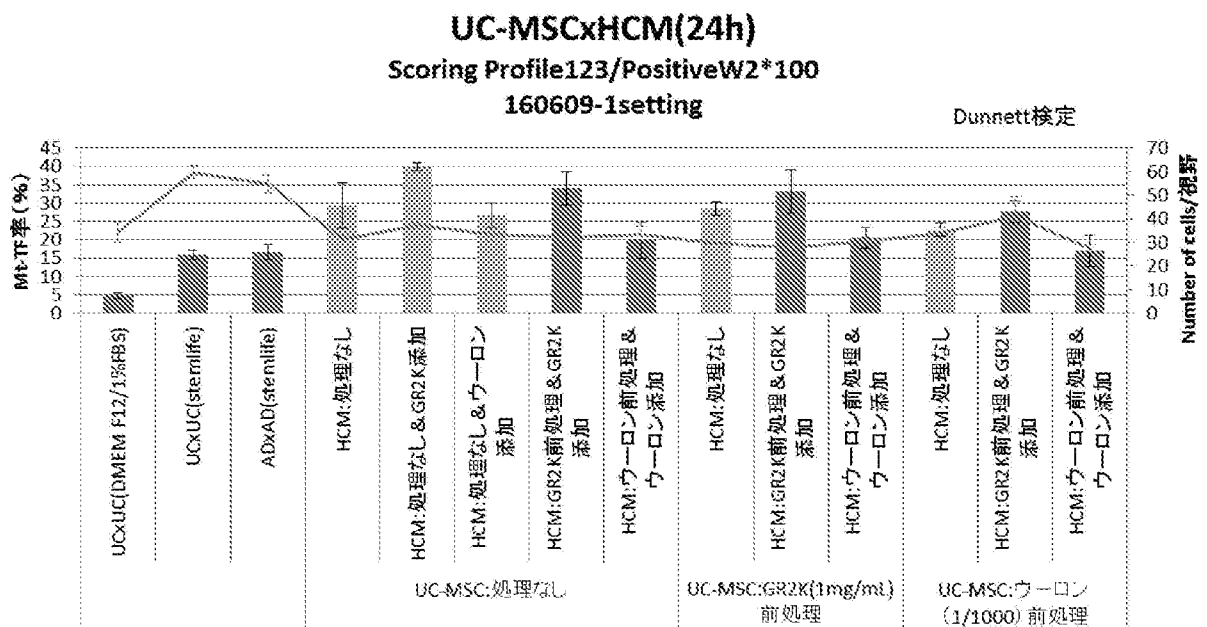
[図14]



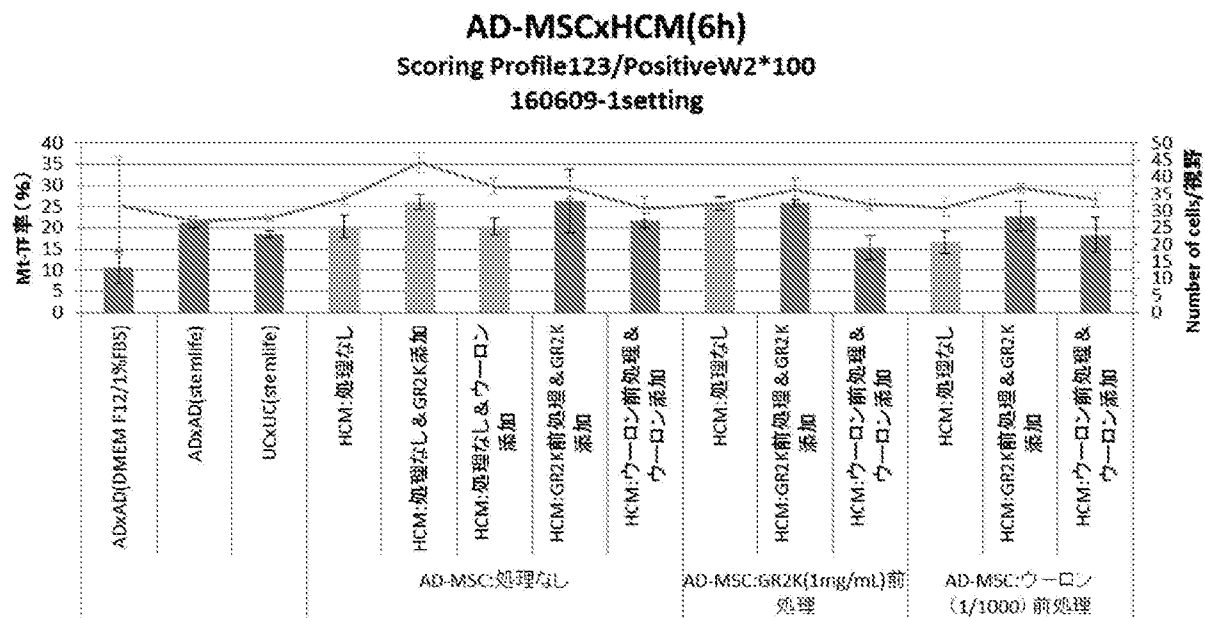
[図15]



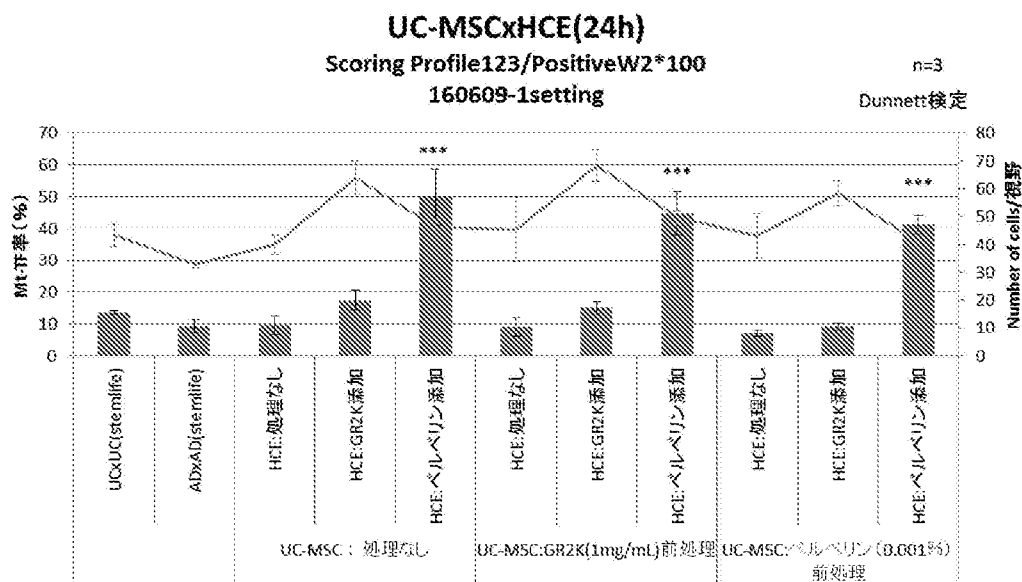
[図16]



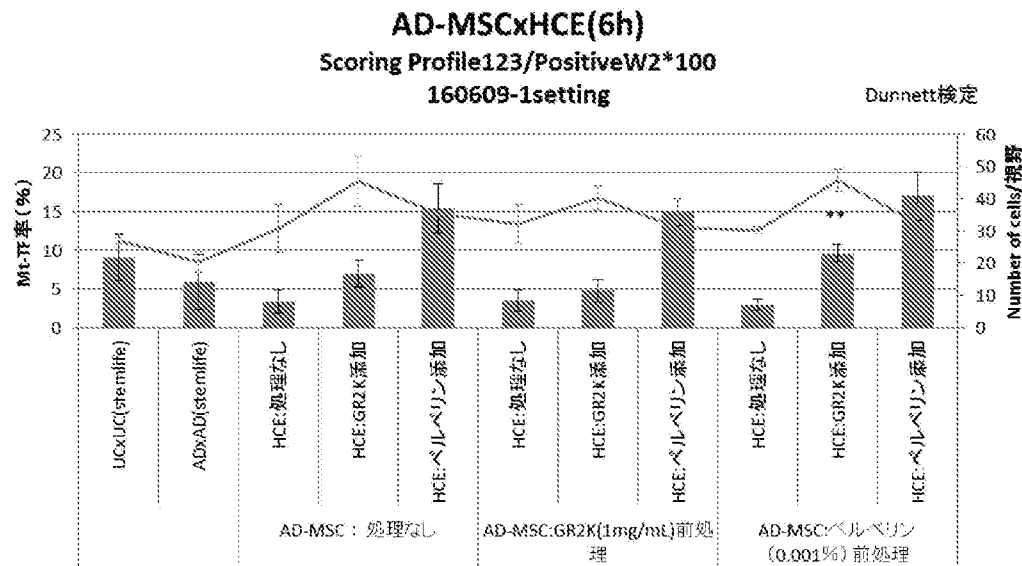
[図17]



[図18]



[図19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/071740

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/06(2006.01)i, C12Q1/32(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/02, C12Q1/06, C12Q1/32

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SPEES J. L. et al., Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration, Proc. Natl. Acad. Sci., 2006, Vol.103, No.5, p.1283-1288, ISSN 0027-8424, page 1283, left column, Results, paragraph of "Functional Measurements of Mitochondrial Activity in Rescued Clones.", paragraph of "Interactions Between hMSCs and A549p° Cells.", Discussion, the last paragraph, Fig. 5	1-9
Y		3, 6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 October 2016 (11.10.16)

Date of mailing of the international search report

18 October 2016 (18.10.16)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/071740

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	CAICEDO A. et al., MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function, SCIENTIFIC REPORTS, 2015.03, Vol.5, 9073, Abstract, Results, paragraph of "MSCs transfer mitochondria to cancer cells.", paragraph of "Quantification of the transfer of mitochondria by MitoCeption.", Figure 1, 5	1-9 3, 6
Y	JP 2007-029074 A (Riken, Japan), 08 February 2007 (08.02.2007), claim 1; paragraph [0004] (Family: none)	3, 6
Y	JP 2009-095291 A (Hamamatsu Photonics Kabushiki Kaisha), 07 May 2009 (07.05.2009), paragraphs [0029], [0030] (Family: none)	3, 6
A	LEE-HUANG S. et al., Live-cell real-time imaging reveals role of mitochondria in cell-to-cell transmission of HIV-1, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, Vol.415, p.384-389	1-9
A	SUGIMOTO Y. et al., "Development of the method to evaluate mitochondrial movement in the soma", Biophysics, 2014, vol.54, no.suppl.1 to 2, S302, 3P324	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/071740

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1-9

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/071740

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Document 1: SPEES J. L. et al., Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration, Proc. Natl. Acad. Sci., 2006, Vol.103, No.5, p.1283-1288, ISSN 0027-8424, page 1283, left column, Results, paragraphs of "Functional Measurements of Mitochondrial Activity in Rescued Clones.", "Interactions Between hMSCs and A549p° Cells.", Discussion, the last paragraph, Fig. 5

Document 2: JP 2015-065815 A (Nippon Menard Cosmetic Co., Ltd.), 13 April 2015 (13.04.2015), claims; paragraphs [0022], [0023], [0065] (Family: none)

Document 3: WO 2015/064795 A1 (BBHCCO., LTD.), 07 May 2015 (07.05.2015), claim 7 & CN 105264066 A

Claims are respectively classified into the following eighty nine inventions.

(Invention 1) claims 1-9

In document 1, it is described that ethidium bromide-treated cells (A549p°) in each of which mtDNA is mutated and depleted and which do not exhibit aerobic respiration or growth are co-cultured with mature non-hematopoietic stem cells/progenitor cells (hMSCs) collected from a human bone marrow or dermal fibroblasts to examine whether or not the stem cells/the progenitor cells or other somatic cells can repair non-functional mitochondrial cells through the migration of functional mitochondria or mtDNA.

Specifically, it is described that the co-culture of A549p° with hMSCs having, introduced thereto, a vector that encodes both hrGFP and DsRed2 capable of staining mitochondria was observed over time with a microscope, and that the various mitochondrial functions including a membrane potential were evaluated.

And it is described that, as a result, it was confirmed that mitochondria migrated together with mtDNA from hMSCs and dermal fibroblasts toward A549p° cells and the migration of mitochondria from mature stem cells or somatic cells enabled the recovery of aerobic respiration of cells in each of which mitochondria were inactive (see left column on p. 1283, the section "Functional Measurements of Mitochondrial Activity in Rescued Clones." and the section "Interactions Between hMSCs and A549p°" in "Results", fig. 5, etc.).

It is recognized that hMSCs mentioned in document 1 are mesenchymal stem cells.

Therefore, the inventions of claims 1-3 have no special technical feature, since the inventions are disclosed in the document 1 and lack novelty in the light of the document 1.

Claims 7-9 are dependent on claim 1, and are therefore classified into Invention 1.

The inventions of claims 4-6 are addition and so on of a well-known art or a conventionally used art onto the inventions of claims 1-3 and do not exhibit any new effect, and are therefore classified into Invention 1.

(Inventions 2-45) claim 10 and the parts of claims 12-14 which refer to claim 10

(Continued to next extra sheet)

Although both a part of the invention described in claim 10 which relates to an oolong tea extract that is the first-mentioned choice and parts of the inventions described in claims 12-14 which refer to the part of the invention described in claim 10 which relates to an oolong tea extract refer to claim 9 which depends on claim 1, these parts of the inventions do not belong to the same category as that of claim 1. Therefore, the above-mentioned claims cannot be regarded as claims that depend on claim 1.

In addition, these inventions have no relationship such that said inventions are substantially same as or equivalent to any claim classified into Invention 1.

Consequently, both the part of the invention described in claim 10 which relates to an oolong tea extract that is the first-mentioned choice and the parts of the inventions described in claims 12-14 which refer to the part of the invention described in claim 10 which relates to an oolong tea extract cannot be classified into Invention 1, and are classified into Invention 2.

In addition, in claim 10, 44 choices, i.e., an oolong tea extract to berberine, are described ("*Chamaecyparis obtusa* water" is duplicated), and the invention relating to an oolong tea extract that is the first-mentioned choice and each of the inventions in which 43 choices, i.e., dipotassium glycyrrhizinate to berberine, are respectively selected share a common technical feature "a pharmaceutical composition containing highly functional cells treated with a chemical substance (mentioned as a choice)" with each other.

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the documents 2 and 3.

Further, there is no other same or corresponding special technical feature between these inventions.

Consequently, parts of the inventions described in claim 10 in which 43 choices, i.e., dipotassium glycyrrhizinate to berberine, are respectively selected cannot be classified into one category (Invention 2), and are classified into Invention 3 to Invention 45, respectively.

(Inventions 46-89) claim 11 and the parts of claims 12-14 which refer to claim 11

Although both a part of the invention described in claim 11 which relates to an oolong tea extract that is the first-mentioned choice and parts of the inventions described in claims 12-14 which refer to the part of the invention described in claim 11 which relates to an oolong tea extract refer to claim 9 which depends on claim 1, these parts of the inventions do not belong to the same category as that of claim 1. Therefore, the above-mentioned claims cannot be regarded as claims that depend on claim 1.

In addition, these invention have no relationship such that said inventions are substantially same as or equivalent to any claim classified into Invention 1.

Consequently, both the part of the invention described in claim 11 which relates to an oolong tea extract that is the first-mentioned choice and the parts of the inventions described in claims 12-14 which refer to the part of the invention described in claim 11 which relates to an oolong tea extract cannot be classified into Invention 1, and are classified into Invention 46.

(Continued to next extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/071740

In addition, in claim 11, 44 choices, i.e., an oolong tea extract to berberine, are described ("*Chamaecyparis obtusa* water" is duplicated), and the invention relating to an oolong tea extract that is the first-mentioned choice and each of the inventions in which 43 choices, i.e., dipotassiumglycyrrhizinate to berberine, are respectively selected share a common technical feature "a pharmaceutical composition containing highly functional cells treated with a chemical substance (mentioned as a choice)" with each other.

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the document 2.

Further, there is no other same or corresponding special technical feature between these inventions.

Consequently, parts of the inventions described in claim 11 in which 43 choices, i.e., dipotassium glycyrrhizinate to berberine, are respectively selected cannot be classified into one category (Invention 46), and are classified into Invention 47 to Invention 89, respectively.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/06(2006.01)i, C12Q1/32(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/02, C12Q1/06, C12Q1/32

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

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

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X - Y	SPEES J. L. et al., Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration, Proc. Natl. Acad. Sci., 2006, Vol.103, No.5, p.1283-1288, ISSN 0027-8424, 第1283頁左欄、Resultsの“Functional Measurements of Mitochondrial Activity in Rescued Clones.”の項、“Interactions Between hMSCs and A549 ρ ⁰ Cells.”の項、Discussionの最終段落、Fig.5等	1-9 - 3, 6

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

11.10.2016

国際調査報告の発送日

18.10.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 悠美子

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

4501

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X - Y	CAICEDO A. et al., MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function, SCIENTIFIC REPORTS, 2015.03, Vol.5, 9073, Abstract, Results の “MSCs transfer mitochondria to cancer cells.” の項、“Quantification of the transfer of mitochondria by MitoCeption.” の項、Figure 1, 5 等	1-9 - 3, 6
Y	JP 2007-029074 A (独立行政法人理化学研究所) 2007.02.08, 請求項1、段落 0004 等 (ファミリーなし)	3, 6
Y	JP 2009-095291 A (浜松ホクトニクス株式会社) 2009.05.07, 段落 0029, 0030 (ファミリーなし)	3, 6
A	LEE-HUANG S. et al., Live-cell real-time imaging reveals role of mitochondria in cell-to-cell transmission of HIV-1, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, Vol.415, p.384-389	1-9
A	SUGIMOTO Y. et al., 細胞体におけるミトコンドリア移動の評価法の開発, 生物物理, 2014, Vol.54, No. suppl.1-2, S302, 3P324	1-9

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

請求項 1 - 9

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

第 III 欄の続き

文献 1 : SPEES J. L. et al., Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration, Proc. Natl. Acad. Sci., 2006, Vol.103, No.5, p.1283-1288, ISSN 0027-8424, 第 1283 頁左欄、Results の “Functional Measurements of Mitochondrial Activity in Rescued Clones.” の項、“Interactions Between hMSCs and A549 ρ° Cells.” の項、Discussion の最終段落、Fig.5 等

文献 2 : JP 2015-065815 A (日本メナード化粧品株式会社) 2015.04.13, 特許請求の範囲、段落 0022, 0023, 0065 (ファミリーなし)

文献 3 : WO 2015/064795 A1 (BBHC CO., LTD.) 2015.05.07, 請求項 7 & CN 105264066 A

請求の範囲は、以下の 89 の発明に区分される。

(発明 1) 請求項 1-9

文献 1 には、mtDNA が変異、枯渇し、好氣的呼吸と成長を示さない臭化エチジウム処置した細胞 (A549 ρ°) をヒト骨髄からの成熟非造血幹細胞/前駆細胞 (hMSCs) 又は皮膚線維芽細胞と共培養し、幹細胞/前駆細胞やその他の体細胞が機能的ミトコンドリアや mtDNA の移動により非機能性ミトコンドリア細胞を修復するかどうかを検討したことが記載されている。具体的には、hrGFP とミトコンドリアを染色する DsRed2 とをコードするベクターを導入した hMSCs と A549 ρ° との共培養を経時的に顕微鏡で観察したこと、及び、膜電位を含む種々のミトコンドリア機能について評価したことが記載されている。そして、その結果として、hMSCs 及び皮膚線維芽細胞から A549 ρ° 細胞へ mtDNA と共にミトコンドリアが移動することを確認し、成熟幹細胞や体細胞からのミトコンドリアの移動はミトコンドリアが不活性の細胞の好氣的呼吸を回復し得たことが記載されている (第 1283 頁左欄、Results の “Functional Measurements of Mitochondrial Activity in Rescued Clones.” の項、“Interactions Between hMSCs and A549 ρ° Cells.” の項、Fig.5 等)。

文献 1 に記載の hMSC は、間葉系幹細胞であると認められる。

よって、請求項 1-3 に係る発明は、文献 1 に記載されたものであり、文献 1 により新規性が欠如しているため、特別な技術的特徴を有しない。

請求項 7-9 は、請求項 1 の従属請求項であるため、発明 1 に区分する。

請求項 4-6 に係る発明は、請求項 1-3 に係る発明に対し、周知技術、慣用技術の付加等をしたものであり、新たな効果を奏するものではないから、発明 1 に区分する。

(次頁に続く)

(発明 2-45) 請求項 10 及び請求項 12-14 のうち、請求項 10 を引用する部分

請求項 10 の最初の選択肢であるウーロン茶抽出液に係る発明、及び請求項 12-14 のうち、請求項 10 のウーロン茶抽出液に係る発明を引用する部分は、請求項 1 に従属する請求項 9 を引用しているが、請求項 1 と同一カテゴリーの発明ではないから、請求項 1 の従属請求項であるとはいえない。

また、これらの発明は、発明 1 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項 10 の最初の選択肢であるウーロン茶抽出液に係る発明、及び請求項 12-14 のうち、請求項 10 のウーロン茶抽出液に係る発明を引用する部分は、発明 1 に区分できず、発明 2 に区分する。

さらに、請求項 10 には、ウーロン茶抽出物からベルベリンまで 44 種の選択肢が記載されているが（ヒノキ水は重複している）、最初の選択肢であるウーロン茶抽出液に係る発明とグリチルリチン酸ジカリウムからベルベリンまでの 43 種の選択肢それぞれを選択してなる発明との間には、「(選択肢に示された) 薬剤で処理した高機能細胞を含む医薬組成物」という共通の技術的特徴が存在する。しかしながら、当該技術的特徴は、文献 2、3 の開示内容に照らして先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

よって、請求項 10 に記載のグリチルリチン酸ジカリウムからベルベリンまでの 43 種の選択肢それぞれを選択してなる発明は、1 つの区分（発明 2）に区分できず、それぞれ発明 3～45 に区分する。

(発明 46-89) 請求項 11 及び請求項 12-14 のうち、請求項 11 を引用する部分

請求項 11 の最初の選択肢であるウーロン茶抽出液に係る発明、及び請求項 12-14 のうち、請求項 11 のウーロン茶抽出液に係る発明を引用する部分は、請求項 1 に従属する請求項 9 を引用しているが、請求項 1 と同一カテゴリーの発明ではないから、請求項 1 の従属請求項であるとはいえない。

また、これらの発明は、発明 1 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項 11 の最初の選択肢であるウーロン茶抽出液に係る発明、及び請求項 12-14 のうち、請求項 11 のウーロン茶抽出液に係る発明を引用する部分は、発明 1 に区分できず、発明 46 に区分する。

さらに、請求項 11 には、ウーロン茶抽出物からベルベリンまで 44 種の選択肢が記載されているが（ヒノキ水は重複している）、最初の選択肢であるウーロン茶抽出液に係る発明とグリチルリチン酸ジカリウムからベルベリンまでの 43 種の選択肢それぞれを選択してなる発明との間には、「(選択肢に示された) 薬剤を含む医薬組成物」という共通の技術的特徴が存在する。しかしながら、当該技術的特徴は、文献 2 の開示内容に照らして先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

よって、請求項 11 に記載のグリチルリチン酸ジカリウムからベルベリンまでの 43 種の選択肢それぞれを選択してなる発明は、1 つの区分（発明 46）に区分できず、それぞれ発明 47～89 に区分する。