

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-524849

(P2015-524849A)

(43) 公表日 平成27年8月27日 (2015. 8. 27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/12 (2015. 01)	A 6 1 K 35/12	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/28 (2006. 01)	A 6 1 P 25/28	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/16 (2006. 01)	A 6 1 P 25/16	4 C 0 8 7
A 6 1 P 9/10 (2006. 01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 25/08 (2006. 01)	A 6 1 P 25/08	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 54 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-527641 (P2015-527641)	(71) 出願人	399019892
(86) (22) 出願日	平成25年8月15日 (2013. 8. 15)		ザ・ユニバーシティ・オブ・シカゴ
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月13日 (2015. 4. 13)		THE UNIVERSITY OF C
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/055187		H I C A G O
(87) 国際公開番号	W02014/028763		アメリカ合衆国60637イリノイ州シカ
(87) 国際公開日	平成26年2月20日 (2014. 2. 20)		ゴ、サウス・エリス・アベニュー5801
(31) 優先権主張番号	61/683, 596		番
(32) 優先日	平成24年8月15日 (2012. 8. 15)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経変性疾患に対するエキソソームに基づく治療法

(57) 【要約】

エキソソームまたは脂質ナノ小胞を伴う方法および組成物を提供する。例えば、ある特定の局面は、酸化ストレスを受けるように誘導されているまたは刺激されている細胞から得られたエキソソームを含む組成物に関する。さらに、本発明のいくつかの局面は、組成物を用いて、脱髄性疾患のリスクがあるまたは脱髄性疾患を有する対象を治療する方法を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

酸化ストレスを受けるように誘導されている細胞から得られた単離エキソソームを含む薬学的組成物の有効量を患者に投与する工程を含む、脱髄性疾患のリスクがあるまたは脱髄性疾患を有する患者を治療するための方法。

【請求項 2】

脱髄性疾患が、認知低下、アルツハイマー病、パーキンソン病、脳卒中、てんかん、片頭痛、多発性硬化症、またはニューロパチーである、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

脱髄性疾患が、多発性硬化症またはニューロパチーである、請求項2に記載の方法。

10

【請求項 4】

患者が、吸入により経鼻的に、または静脈内に組成物を投与される、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

単離エキソソームが、少なくとも2種の異なるタイプのエキソソームを有する、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

細胞が、免疫細胞、神経細胞、または脂肪細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

細胞が免疫細胞である、請求項6に記載の方法。

20

【請求項 8】

細胞が神経細胞である、請求項6に記載の方法。

【請求項 9】

細胞が、サイトカインまたはオキシダントによって誘導されている、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

サイトカインがIFN- γ である、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

細胞が、前記患者から得られた細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

細胞が、前記患者が18歳未満であるときに前記患者から得られた細胞である、請求項11に記載の方法。

30

【請求項 13】

細胞が、前記患者が1歳未満であるときに前記患者から得られた細胞である、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

単離エキソソームが、少なくとも、外部から添加された治療用作用物質を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 15】

外部から添加された治療用作用物質がsiRNAである、請求項14に記載の方法。

40

【請求項 16】

単離エキソソームが、miR-219、miR-138、またはmiR-199aを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 17】

単離エキソソームが、抗オキシダント系タンパク質をコードするmRNAを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 18】

a) 外部からの酸化ストレスを受けるように誘導されている神経細胞を得る工程であって、該神経細胞がエキソソームを産生する、工程；および

b) 産生されたエキソソームを単離する工程

50

を含む、酸化ストレスを受けるように誘導されている神経細胞から単離エキソソームを得る方法。

【請求項 19】

単離エキソソームを含む薬学的組成物の有効量を、脱髄性疾患のリスクがあるまたは脱髄性疾患を有する患者に投与する工程をさらに含む、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

脱髄性疾患が、認知低下、アルツハイマー病、パーキンソン病、脳卒中、てんかん、片頭痛、多発性硬化症、またはニューロパチーである、請求項19に記載の方法。

【請求項 21】

脱髄性疾患が、多発性硬化症またはニューロパチーである、請求項20に記載の方法。

10

【請求項 22】

酸化ストレスを誘導する条件下で細胞を培養する工程をさらに含む、請求項18に記載の方法。

【請求項 23】

細胞が、サイトカインによって誘導されている、請求項18に記載の方法。

【請求項 24】

サイトカインがIFN- γ である、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

細胞が、患者から得られた細胞である、請求項18に記載の方法。

【請求項 26】

細胞が、前記患者が18歳未満であるときに前記患者から得られる、請求項25に記載の方法。

20

【請求項 27】

細胞が、前記患者が1歳未満であるときに前記患者から得られる、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

請求項18～27のいずれか一項に記載の方法に従って得られた、単離エキソソーム。

【請求項 29】

請求項28に記載の単離エキソソームと、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

30

【請求項 30】

請求項29に記載の薬学的組成物の有効量を患者に投与する工程を含む、脱髄性疾患のリスクがあるまたは脱髄性疾患を有する患者を治療するための方法。

【請求項 31】

miR-219、miR-138、およびmiR-199aのうちの少なくとも2種を含む、単離脂質ナノ小胞。

【請求項 32】

miR-219およびmiR-138を含む、請求項31に記載の単離脂質ナノ小胞。

【請求項 33】

ヒト細胞から得られた、請求項31に記載の単離脂質ナノ小胞。

40

【請求項 34】

脱髄性疾患のリスクがあるまたは脱髄性疾患を有する患者から得られた、請求項33に記載の単離脂質ナノ小胞。

【請求項 35】

インビトロで再構成された、請求項31に記載の単離脂質ナノ小胞。

【請求項 36】

請求項31～35のいずれか一項に記載の単離脂質ナノ小胞と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項 37】

請求項36に記載の薬学的組成物の有効量を患者に投与する工程を含む、脱髄性疾患の

50

スクがあるまたは脱髄性疾患を有する患者を治療するための方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年8月15日に提出された米国仮特許出願第61/683,596号に対する優先権の恩典を主張するものであり、参照によりその全体として本明細書によって組み入れられる。

【0002】

背景

本発明は、国立神経疾患・脳卒中研究所 (National Institutes of Neurological Disorders and Stroke) によって授与された契約第NS-19108号、国立衛生研究所の国立小児保健発達研究所 (National Institute of Child Health and Human Development) によって授与された第HD-09402号、および国立先進トランスレーショナル科学センター (National Center for Advancing Translational Sciences) によって授与された第1UH2TR000918号の下で政府支援によりなされた。政府は、本発明においてある程度の権利を有する。

【技術分野】

【0003】

1. 発明の分野

本発明は、概して、医学および神経学の分野に関する。特に、態様は、多発性硬化症 (MS) および脱髄に関連した他の神経学的疾患などの脱髄性疾患の治療に向けられている。

【0004】

2. 関連技術の説明

MSは、世界中で100万人を超える人々に影響を及ぼしている一般的な神経学的疾病である。その有病率は人種間および地理的緯度間で変動し、北および中央ヨーロッパにおける100,000人あたり100人超から南ヨーロッパにおける100,000人あたり50人に及ぶ。MSは、若年および中年成人における神経学的障害の最も一般的な原因である。疾病発症は、患者の約50%で30歳より前、患者の25%で30~40歳の間、および患者の残り25%で40~50歳の間である。女性対男性の比率は2:1である。

【0005】

MSによって引き起こされる神経学的ダメージは、患者および彼らの家族に対して、身体的、心理的、社会的、および金銭的に大きな影響を及ぼし得る。MSの最も一般的な臨床症状は、不全麻痺、知覚異常、視力障害、性的機能不全、腸管機能不全、および排尿 (urinary) 機能不全、痙縮、ならびに協調運動不能である。認知機能不全は、患者の40~50%に生じる。神経学的欠損の程度、進行の速度、および再発の頻度は、罹患した個体間で非常にばらつきがある。

【0006】

MSに対する既存の療法は、炎症を低減させ、ゆえに脱髄の程度を低減させるように設計されており、場合によっては髄鞘再生を促進する。しかしながら、脱髄を抑えるだけでなく、髄鞘形成も有意に促進しかつ酸化ストレス (OS) も有意に低下させる療法の必要性が依然として残っている。そのような療法は、MSなどの神経変性疾患、ならびに標準的な老化による認知低下の治療に役立つと考えられる。

【発明の概要】

【0007】

本発明の局面は、エキソソーム (本明細書では、エキソソーム、脂質ナノ小胞、またはナノ小胞と称される) を伴う新規な方法を提供することによって、当技術分野における主な欠陥を克服するものであって、該エキソソームは、髄鞘形成を促進し得または脱髄を修復し得、かつこれらのエキソソームにおいて同定された特定の核酸分子 (mRNAおよび/またはmiRNAなど) および/またはタンパク質を含有するように改変または負荷され得る。

【0008】

したがって、第一の態様において、脱髄性疾患のリスクがあるまたは脱髄性疾患を有する患者を治療するための方法が提供される。該方法は、酸化ストレスを受けるように誘導されているもしくは酸化ストレスによって刺激されている細胞から得られた単離エキソソーム、またはそのようなエキソソームと同じもしくは実質的に同様の組成を有する脂質ナノ小胞（例えば、エキソソーム）を含む薬学的組成物の有効量を患者に投与する工程を含んでよい。組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含んでよい。

【0009】

脱髄性疾患の非限定的な例には、老化による認知低下、アルツハイマー病、パーキンソン病、脳卒中、てんかん、片頭痛、多発性硬化症、およびニューロパチーが含まれる。ミエリンの重大な喪失をもたらす得る外傷性および虚血性の脳損傷も具体的に企図される。特定の例において、脱髄性疾患は、多発性硬化症、ニューロパチー、外傷性脳損傷、または新生児脳損傷である。

10

【0010】

いくつかの態様において、当業者に公知の任意の方法によって、組成物を対象に投与することができる。例には、静脈内に、経鼻的に、皮内に、動脈内に、腹腔内に、病変内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜内に、気管内に、硝子体内に、腔内に、直腸内に、局所的に、腫瘍内に、筋肉内に、皮下に、結膜下に（subconjunctival）、小胞内に、経粘膜的に、心膜内に、臍帯内に、眼球内に（intraocularly）、経口的に、局所的に、局部的に、注射、注入、連続注入、標的細胞を直接浸す限局的灌流、カテーテルにより、洗浄により、心腔内に直接的に、関心対象の臓器もしくは臓器の一部または疾病部位への直接注射、あるいは当業者に公知である他の方法または前述のものの任意の組み合わせによるものが含まれる。特定の局面において、組成物を経鼻的にまたは静脈内に投与することができる。いくつかの態様において、組成物は液体である。他の態様において、組成物はゲルまたは粉末である。組成物は、患者にミストとして提供される液体であり得ることが具体的に企図される。

20

【0011】

方法は、約、少なくとも約、または多くとも約0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、15.5、16.0、16.5、17.0、17.5、18.0、18.5、19.0、19.5、20.0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、410、420、425、430、440、445、450、460、470、475、480、490、500、510、520、525、530、540、550、560、570、575、580、590、600、610、620、625、630、640、650、660、670、675、680、690、700、710、720、725、730、740、750、760、770、775、780、790、800、810、820、825、830、840、850、860、870、875、880、890、900、910、920、925、930、940、950、960、970、975、980、990、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400

30

40

50

、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、6000、7000、8000、9000、10000ナノグラム（ng）、マイクログラム（mcg）、ミリグラム（mg）、もしくはグラムのエキソソーム、またはその中で導き出せる任意の範囲を含有する組成物を投与する工程を伴ってよい。上記の数値は、ng/kg、mg/kg、またはg/kgとして表現される、患者の重量に基づいて患者に投与される投薬量、およびそれらの値から導き出せる任意の範囲であってもよい。

【0012】

あるいは、組成物は、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、15.5、16.0、16.5、17.0、17.5、18.0、18.5、19.0、19.5、20.0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、410、420、425、430、440、441、450、460、470、475、480、490、500、510、520、525、530、540、550、560、570、575、580、590、600、610、620、625、630、640、650、660、670、675、680、690、700、710、720、725、730、740、750、760、770、775、780、790、800、810、820、825、830、840、850、860、870、875、880、890、900、910、920、925、930、940、950、960、970、975、980、990、1000ng/ml、μg/ml、mg/ml、もしくはg/ml、またはその中で導き出せる任意の範囲である、エキソソームの濃度を有してよい。

【0013】

組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20回もしくはそれを上回る回数、またはその中で導き出せる任意の範囲、患者に投与されてよく（または患者によって服用されてよく）、かつそれらは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24時間ごとに、もしくは1、2、3、4、5、6、7日ごとに、もしくは1、2、3、4、5週間ごとに、もしくは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ヶ月ごとに、またはその中で導き出せる任意の範囲で投与されてよい。組成物は、1日1回、1日2回、1日3回、1日4回、1日5回、もしくは1日6回（またはその中で導き出せる任意の範囲）、および/または必要に応じて患者に投与されることが具体的に企図される。あるいは、組成物は、2、4、6、8、12、または24時間ごとに（またはその中で導き出せる任意の範囲で）患者に投与または患者によって投与されてよい。いくつかの態様において、患者は、脱髄性疾患の症状を経験した後に、ある特定の期間またはある特定の投与数で組成物を投与される。

【0014】

ある特定の態様において、単離エキソソームは、1種のタイプ、または少なくとも2種、3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、もしくはそれを上回る異なるタイプのエキソソームを含んでよい。エキソソームのタイプは、それらの組成、例えば関心対象の核酸および/もしくはタンパク質のタイプ、または効果によって特徴付けされてよい。

【0015】

エキソソームを産生するための細胞は、1つまたは複数の対象の任意の細胞であり得る。例えば、細胞は、免疫細胞、神経細胞、または脂肪細胞であってよい。特定の局面において、細胞は、樹状細胞、リンパ球（T細胞またはB細胞）、マクロファージ、または免疫系の任意の細胞などの免疫細胞であってよい。

【0016】

特定の局面において、エキソソームを産生するための細胞は、ミクログリア、アストロサイト、ニューロン、オリゴデンドロサイト、スピンドルニューロン、または神経系の任意の細胞などの神経細胞であり得る。細胞は、細胞培養物、解離組織、またはそれらの一部の形態であり得る。例えば、細胞は、海馬薄片培養物の形態であり得る。

【0017】

ある特定の局面において、細胞は、エキソソームの収集前に酸化ストレスを受けるように誘導されているまたは酸化ストレスによって刺激されている。酸化ストレスは、IFN- γ もしくはTNF- α などの外因性サイトカイン、またはT細胞由来の他のサイトカイン、あるいは過酸化水素などのオキシダントによって誘導され得る。いくつかの態様において、細胞は、サイトカインまたはオキシダントによって誘導されている。いくつかの態様において、細胞は、サイトカインまたはオキシダントによって刺激されている。

【0018】

ある特定の態様において、組成物は自己組成物であってよく、または細胞は治療を受ける患者と同じ患者から得られてよい。特に、ヒト対象由来の細胞は、採集されかつ培養され、かつ誘導され、刺激され、または操作されて、本発明のある特定の局面に従った有効なエキソソーム含有組成物を分泌し得る。次いで、エキソソーム含有組成物を、同じヒトドナーに薬学的組成物の状態で投与してよい。

【0019】

この特定の態様において、自己供与のすべての利点が適用され得る。当業者であれば、用途に応じてかつ得策であるように、エキソソーム産生のためのドナー組織または細胞の性質および固有性を選定するであろう。ここでは、自己供与を用いるという決定および/またはドナー組織/細胞の選定にとって適切な基準および利点を考慮する必要があり得る。

【0020】

別の態様において、組成物は同種異系であってよく、つまり、エキソソーム産生細胞を提供するドナー生物と、治療を受けるレシピエント生物は、同じ種であるが異なる個体である。

【0021】

代替的な態様において、組成物は異種であってよい。このことは、それが異なる種の生物から採取されることを意味する。この目的のために、細胞をドナー生物、例えばラットまたは酵母などの動物から採取し、かつ誘導し、刺激し、または操作して、有効なエキソソーム含有組成物を産生し、それを、異なる種に属する治療を受ける個体、例えばヒトに薬学的組成物の状態で投与する。

【0022】

エキソソームを産生するための細胞を、比較的若齢の、例えば対象の予測される寿命の多くとも10分の1、5分の1、3分の1、または半分である年齢の対象から得てよい。例えば、エキソソームを、高くとも下記の年齢、下記未満の年齢、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ヶ月、または1、2、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、もしくは50歳、あるいはその中で導き出せる任意の年齢または範囲であるヒトから得てよい。特定の局面において、エキソソームを、1歳未満または18歳未満であるヒトから得てよい。特定の局面において、エキソソームを、18~50歳であるヒトから得てよい。ヒトは、治療を受ける患者と同じ患者であり得る。

【0023】

さらに、いくつかの局面において、単離エキソソームまたはナノ小胞（例えば、インビ

10

20

30

40

50

トロ再構成により人工的に操作されたエキソソーム)は、内因性エキソソームを含有してよく、または核酸もしくはタンパク質分子などの外部から添加される治療用作用物質が負荷されてよい。核酸は、DNA、またはsiRNA、miRNA、もしくはmRNAなどのRNAであってよい。ある特定の局面において、単離エキソソームは、miR-7a、miR-9、miR-9^{*}、miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-19b、miR-20a、miR-92a-1、miR-23a、miR-23a^{*}、miR-23b、miR-32、miR-128、miR-138、miR-138^{*}、miR-184、miR-199a-5p、miR-214、miR-219、miR-338、miR-338^{*}、miR-27a、miR-27b、miR-106a、miR-124、miR-141、miR-144、miR-145、miR-146a、miR-181a、miR-200a、miR-451、miR-532-5p、およびmiR-665のうちの1種または複数種などのmiRNAを含んでよい。ある特定の局面において、単離エキソソームは、抗オキシダント系タンパク質をコードするタンパク質もしくはmRNA、またはオキシダント/抗オキシダント恒常性に関与するmiRNAを含んでよい。いくつかの態様において、外部から添加される治療用作用物質は、ナイーブ(naive)エキソソームに添加される、オリゴデンドロサイト分化および/またはオキシダント/抗オキシダント恒常性に関与する操作されたsiRNA、mRNA、またはmiRNA(またはこれらの作用物質の組み合わせ)である。

10

【0024】

ある特定の局面において、ナノ小胞または負荷されたエキソソームは、miR-219、miR-138、miR-199a-5p、および/またはmiR-338のうちの1種または複数種などのmiRNAを含んでよい。ある特定の局面において、ナノ小胞は、抗オキシダント系タンパク質をコードするタンパク質またはmRNAを含んでよい。

【0025】

20

mRNAは、酵素的抗オキシダント(例えば、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD))または分泌型抗オキシダント(例えば、グルタチオン)などの抗オキシダント系タンパク質をコードしてよい。当業者であれば、作用物質の直接負荷、作用物質のキメラ型負荷(chimeric loading)、または間接負荷(産生細胞の改変による)のための方法が用いられ得ることを理解するであろう。直接負荷の特定の例は、エレクトロポレーションによるものであってよい。

【0026】

細胞の単離エキソソームを得るための方法も提供され得る。例えば、細胞は神経細胞であってよい。他の局面において、細胞は免疫細胞であってよい。該方法は、酸化ストレスを受けるように誘導されているまたは酸化ストレスによって刺激されている細胞を得る工程を伴ってよく、ここで該細胞はエキソソームを産生する。該方法は、産生されたエキソソームを単離する工程をさらに伴ってよい。

30

【0027】

上記で記載されるように、単離エキソソームは、認知低下(例えば、老化による)、アルツハイマー病、パーキンソン病、脳卒中、てんかん、片頭痛、多発性硬化症、ニューロパチー、外傷性脳損傷、および新生児脳損傷などの脱髄性疾患のリスクがあるまたは脱髄性疾患を有する患者の治療のための薬学的組成物中に含まれてよい。特定の例において、脱髄性疾患は、多発性硬化症、ニューロパチー、片頭痛、外傷性脳損傷、または新生児脳損傷である。

【0028】

40

ある特定の局面において、方法は、エキソソームの単離前に、酸化ストレスを誘導する条件下で細胞を培養する工程をさらに含んでよい。酸化ストレスは、IFN- γ などの外部から添加されたサイトカインによって、腫瘍壊死因子などの他の任意の活性化サイトカインによって、または過酸化水素などオキシダントによって誘導され得る。

【0029】

他の局面において、組成物は、単離エキソソームに見出されるものと同じタイプまたは実質的に同様のタイプの、mRNA、miRNAなどの核酸またはタンパク質を含有する脂質ナノ小胞を含んでよい。miRNAは、miR-7a、miR-9、miR-9^{*}、miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-19b、miR-20a、miR-92a-1、miR-23a、miR-23a^{*}、miR-23b、miR-32、miR-128、miR-138、miR-138^{*}、miR-184、miR-199a-5p、miR-214、miR-219、miR-338、miR-338^{*}、miR-27a、miR

50

-27b、miR-106a、miR-124、miR-141、miR-144、miR-145、miR-146a、miR-181a、miR-200a、miR-451、miR-532-5p、およびmiR-665のうちの1種または複数種であってよい。いくつかの態様において、miRNAは、miR-219、miR-138、miR-199a-5p、miR-338、miR-181a、miR-451、miR-532-5p、およびmiR-665のうちの1種または複数種であってよい。ある特定の局面において、ナノ小胞は、ヒト細胞のような細胞から、特に、脱髄性疾患のリスクがあるまたは脱髄性疾患を有するヒトから単離されたエキソソームであってよい。他の局面において、ナノ小胞は、脂質のインビトロ再構成により調製されてよい。他の局面において、ナノ小胞には、上記で列挙されたmiRNAのうちの1種または複数種が負荷されてよい。組成物は、脱髄性疾患のリスクがあるまたは脱髄性疾患を有する対象の治療のための薬学的組成物中に含まれてよく、かつ治療のために用いられてよい。ナノ小胞は、少なくとも、約、または多くとも1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000nm、またはその中で導き出せる任意の範囲の直径を有してよい。特定の局面において、エキソソームまたは小胞は、約40～約100nmの直径を有してよい。本明細書において使用するとき、「実質的に同様」とは、少なくとも50、55、60、65、70、75、80、90、95、99、もしくは100%同一であること、またはその中で導き出せる任意の範囲であることを指す。

10

【0030】

本発明の方法および/または組成物の文脈において詳述される態様を、本明細書において記載される他の任意の方法または組成物に対して採用してよい。ゆえに、1つの方法または組成物に関連する態様を、本発明の他の方法および組成物に同様に適用してよい。例えば、開示される投与の方法のいずれかを用いて、開示される脱髄性疾患のいずれかを治療してよい。ゆえに、本発明の態様には、経鼻的投与経路、静脈内投与経路、吸入投与経路、または他の任意の投与経路を用いて、多発性硬化症を有する患者を治療する方法が含まれる。他の態様において、同じ投与の経路を用いて、アルツハイマー病、パーキンソン病、脳卒中、または他の任意の脱髄性疾患を治療する。さらなる例として、本発明の態様には、miRNAを含むエキソソームで多発性硬化症を治療することが含まれる。本発明のさらなる態様には、miRNAを含むエキソソームで、アルツハイマー病、パーキンソン病、脳卒中、または他の任意の脱髄性疾患を治療することが含まれる。本発明のさらなる態様には、抗オキシダント系タンパク質をコードするmRNAを含むエキソソームで、多発性硬化症を治療することが含まれる。本発明のなおさらなる態様には、抗オキシダント系タンパク質をコードするmRNAを含むエキソソームで、アルツハイマー病、パーキンソン病、脳卒中、または他の任意の脱髄性疾患を治療することが含まれる。

20

30

【0031】

本明細書において使用するとき、「1つの(a)」または「1つの(an)」は、1つまたは複数を意味し得る。特許請求の範囲において使用するとき、「含む」という単語と合わせて用いられる場合、「1つの(a)」または「1つの(an)」という単語は、1つまたは1つを上回ることを意味し得る。

【0032】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、代替物のみを指すことまたは代替物が相互に排他的であることが明示的に表されていない限り、「および/または」を意味するために用いられるが、とはいえ本開示は、代替物のみならびに「および/または」を指す定義を支持する。本明細書において使用するとき、「別の」とは、少なくとも第二のものまたはそれを上回るものを意味し得る。

40

【0033】

本出願を通して、「約」という用語は、値が、該値を決定するために採用されている方法である、デバイスの固有の誤差変動、または調査対象の間に存在する変動を含むことを表すために用いられる。

【0034】

本出願を通して、「有効な」または「有効量」という用語は、化合物が、それを必要と

50

している対象における病状を治療するのに十分な量で投与されることを表すために用いられる。

【0035】

本明細書および特許請求の範囲において使用するとき、「含む (comprising)」(ならびに「含む (comprise)」および「含む (comprises)」など、含む (comprising) の任意の形態)、「有する (having)」(ならびに「有する (have)」および「有する (has)」など、有する (having) の任意の形態)、「含む (including)」(ならびに「含む (includes)」および「含む (include)」など、含む (including) の任意の形態)、または「含有する (containing)」(ならびに「含有する (contains)」および「含有する (contain)」など、含有する (containing) の任意の形態) という単語は、包括的またはオープンエンド形式であり、かつ挙げられていないさらなる要素または方法の工程を排除しない。

10

【0036】

本明細書において使用するとき、核酸に関する「コードする (encode)」または「コードする (encoding)」という用語は、当業者が本発明を容易に理解できるようにするために用いられるが、しかしながら、これらの用語は、それぞれ「含む (comprise)」または「含む (comprising)」と互換可能に用いられてよい。

【0037】

本発明の他の目的、特長、および利点は、以下の詳細な説明から明白になるであろう。しかしながら、この詳細な説明から、本発明の精神および範囲内の様々な変化および改変が当業者に明白になるため、詳細な説明および具体的な実施例は、本発明の好ましい態様を表しているものの、単なる例証として与えられていると理解されるべきである。

20

【図面の簡単な説明】

【0038】

添付の図面は、本明細書の一部を形成し、かつ本発明のある特定の局面をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書において提示される具体的な態様についての詳細な説明と組み合わせてこれらの図面の1つまたは複数を参照することにより、よりよく理解され得る。

【0039】

【図1】エキソソーム形成の略図。エキソソームは、エンドサイトーシス区画 (endocytic compartment) の膜の陥入によって形成され、小さな内腔間 (interluminal) 小胞の形成につながり、それはエンドソーム成熟体として形成されて、多小胞体 (MVB) になる。表面受容体の分子凝集は、それらをリサイクル区画ではなくMVBへ経路変更する。タンパク質および核酸は、生合成中にMVBに特異的に振り分けられる。MVBはリソソームと融合し得、それはその内容物の分解につながり、または原形質膜と融合してそれらを放出し得る。MVBが細胞の原形質膜と融合した場合、内腔間小胞は間質空間内にエキソソームとして放出される。

30

【図2】図2A~2C。血清からのエキソソーム回収の確認。低倍率 (A) および高倍率 (B) での血清エキソソームの電子顕微鏡画像。スケールバー = 200nm (A) および100nm (B)。ウェスタンブロット (C) は、十分に特徴付けされている2種のエキソソームタンパク質マーカーであるCD63およびAlixの存在を示している。

40

【図3】図3A~3C。インターフェロンガンマ (IFN- γ) への曝露からの海馬薄片培養物におけるOSの半定量的解析。(A) 細胞構築参照のための、およびOSの蛍光発生マーカーであるCellROX (商標) (Grinberg, YY, et al. (2012), J Neurochem. 122:221-9) によるOSの定量化に用いられた、関心対象のCA3エリア (点線の囲い) を示すための、海馬薄片培養物のNeuN免疫組織化学標識化。(B~C) 代表的なCellROX (商標) 標識画像は、IFN- γ 曝露 (500U/mL \times 7時間) が、対象と比較して (C)、OSを有意に ($p < 0.02$; $n = 3$ /群) 増加させたことを示している (B)。スケールバー = 200 μ m。以前に記載されているように (Grinberg, et al., 2012; Mitchell, et al., 2011; Pusic, et al., 2011)、薄片培養物を調製しかつ維持した。

50

【図4】図4A~4B。IFN- γ での生理学的かつ一時的な（すなわち、運動 - 休止 - 運動サイクルからなる環境富化（EE）の条件を模擬する、段階的な（phasic））刺激は、栄養的効果を誘発した。海馬薄片培養物の一時的な（すなわち、500U/mL x 12時間；すべての群n 5）曝露は、7日後に評価したときに栄養性であった。（A）ミエリン塩基性タンパク質（MBP）は、ベースラインを上回って有意に（ $p < 0.001$ ）増加し、かつ（B）OSは有意に（ $p < 0.001$ ）低下した。OSは、ミトコンドリア障害（メナジオンによる）への曝露によって誘導された。

【図5】図5A~5B。IFN- γ は、薄片培養物上に12時間パルスされた場合、IFN- γ へのパルス曝露の栄養的効果を模倣する栄養性エキソソームの放出を誘発した。海馬薄片培養物をIFN- γ （500U/mL x 12時間）に曝露し、3日後にエキソソームをそれらの周囲のインキュベーション培地から採集した。次いで、後者をナイーブ薄片培養物に適用し、7日後に測定を行った。すべての群の大きさは5であった；すべての有意性測定 $p < 0.001$ 。（A）IFN- γ で刺激された薄片培養物に由来するエキソソームは、ベースラインレベルを上回るMBPの有意な増大、および（B）OSの有意な低下を誘発した。OSは、ミトコンドリア障害（メナジオンによる）への曝露によって誘導された。

【図6】図6A~6B。加えて、パルスIFN- γ またはエキソソームは、末梢肥満細胞において見られる、OSに対する抵抗性の増加と一致して（Eldh M, et al. (2010). PLoS ONE 5(12): e15353）、海馬薄片培養物内のミクログリアにおいて抗オキシダントのグルタチオンを有意に増加させた。本発明者らは、グルタチオンの蛍光指標であるThiolTracker（商標）を用いて、薄片培養物グルタチオンのIFN- γ 誘導性増大を検出した。（A）グルタチオン（長い矢印）およびミクログリアマーカー（短い矢印）に対する共焦点イメージングにより、IFN- γ へのパルス曝露は、ミクログリアグルタチオンを選択的に増加させることが確認された。スケールバー = 10 μ m。（B）さらに、この増加は有意であり（ $p < 0.001$ ；n 5/群）、IFN- γ へのパルス曝露によって活性化された薄片培養物から単離されたエキソソームへの曝露によって模倣され得た。

【図7】図7A~7F。知的、身体的、および社会的な刺激に対する、意志に基づく機会の増加（すなわち、EE）を提供するための、ラットが4週間、食物および水、迷路、回し車、ならびに社会化エリアへのフリーアクセスを有するMarlau式富化ケージ（Obiang, et al., 2011；Sanchez, et al., 2009）が示されている。富化されていない（NE）ラットは、単一の標準的ケージで飼育される。EEケージは大きな2層の環境からなり（A）、上層の迷路（B）は1週間に3回（すなわち、月曜日、水曜日、および金曜日）変化する。複雑性は、迷路および前述のように迷路を頻繁に変化させることによる新規性によって提供される。（C）活動は回し車によって、かつ（D）社会化は赤色のプラスチックの休止エリアによって提供される。（E）ラットは、迷路を通過するためにはしごを上り、かつ（F）給餌エリアに入るために傾斜台を下りる。ラットは、一方向のドアを介して、給餌エリアから大きな社会化/運動エリアへと移動する。

【図8】図8A~8E。若齢エキソソームおよび環境富化されたエキソソームは、オリゴデンドロサイト分化および髄鞘形成に影響を及ぼす機能的miR-219を送達する。オリゴデンドロサイト分化におけるmiR-219の関与の図解。（A）多発性硬化症において、オリゴデンドロサイト前駆体細胞は、一部にはmiR-219の欠乏により、ミエリン産生細胞への分化を積極的に阻止される。（B）しかしながら、栄養性エキソソームに曝露されると、神経幹細胞は、神経発生促進性（proneurogenic）因子であるNeuroD1の障害により、オリゴデンドロサイト系列に優先的に入る。miR-219は、増殖を促進しかつ分化を禁止する分裂促進因子に対する受容体であるPDGFR など、OPC分化を障害する多数の他の因子の発現も抑制する。最後に、miR-219は、その過活性が脱髄につながり得る、脂質代謝の調節因子であるELOVL7のレベルを減少させる。（C~E）適用の1日後に、栄養性エキソソーム処理されたナイーブ薄片培養物（n = 3~10/群）は、未処理の対照薄片におけるレベルと比較して、有意に（*）より少ないNeuroD1、PDGFR、およびELOVL7（それぞれ、C、D、およびEに対して、0.04~0.002、0.03~0.003、および0.02~0.001のp値範囲）を発現させた。有意性は、スチューデントt検定によって判定された。

10

20

30

40

50

【図 9】図9A～9B。若齢エキソソームおよび環境富化されたエキソソームは、脱髄性損傷からの回復を改善させた。(A)薄片培養物において、脱髄を惹起する手段として、17時間のリゾレシチン(0.5mg/mL)曝露を用い、その後に髄鞘再生が続いた。回復の時間的経過を、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)に対する染色により判定した。対照薄片は、健全な成熟した薄片培養物における典型的なMBP免疫染色を示している。リゾレシチンは、2日目にピークに達し、5日目に回復の最初の兆候を示し、かつ12日目までに次第に正常に戻る、脱髄を誘導した。シャム処理(リゾレシチンを含まない新鮮な培地への17時間の曝露)は、ミエリンの含量および/または分布に有害な影響を有しなかった。スケールバー=200 μ m。(B)リゾレシチンへの曝露の直後に、培養物を、若齢動物、若齢-EE動物、または老化-EE動物に由来するエキソソームで処理した。5日後、髄鞘再生の開始時に、培養物を収集し、MBP含量をウェスタンブロットにより解析した。リゾレシチン(Lyso)曝露は、対照と比較して、すべての群においてMBPの有意な($^*p < 0.001$; $n = 6 \sim 16$)低下を誘発したが、一方でエキソソーム曝露は、リゾレシチン単独に関して見られるものと比較して、髄鞘再生の有意な($^*p < 0.001$)増加を促進した。同様に、リゾレシチン処理の5日後に収集された薄片培養物も、O4陽性細胞の存在の有意な($^*p < 0.001$; $n = 4 \sim 8$ /群)増加を明らかにした。すべてのエキソソーム処理は、リゾレシチン処理単独に関して見られるものを上回って、O4染色を有意に増強させた($^*p < 0.001$)。O1染色も、リゾレシチン処理の5日後に有意に増加した($^*p < 0.001$; $n = 3 \sim 4$ /群)が、一方でエキソソーム処理に関してさらなる増加は見られず、エキソソームは、成熟オリゴデンドロサイトを存続させることによって髄鞘再生を直接増加させ得ることを示唆した。有意性は、ANOVA + 事後Holm-Sidak検定によって判定された。

【図 10】IFN- γ で刺激された薄片培養物は、パルスIFN- γ 曝露の栄養的効果を模倣し、かつ片頭痛の根本的原因である可能性が最も高い拡張性抑制(SD)に対する感受性を低下させる、エキソソームを放出した。酸化ストレスに曝露された免疫細胞は、レシピエント細胞に酸化ストレスに対する防御を与えるエキソソームを分泌し得る。同様に、IFN- γ の12時間パルスで刺激された薄片培養物は、パルスIFN- γ への曝露のプラスの効果を模倣する栄養性エキソソームを放出した。薄片培養物をIFN- γ (500U/mL \times 12時間)に曝露し、かつ通常のインキュベーション条件に戻した。3日後に、エキソソームを順化培地から回収した。後者をナイーブ薄片培養物に適用し、7日後に測定を行った。IFN- γ 刺激エキソソームは、SD閾値の有意な($p < 0.01$)、200倍を上回る増加を誘発した。数値データは、平均 \pm SEMおよび有意性($^*p < 0.05$)である。群間比較は、対応のあるスチューデントt検定により行われた。

【図 11】図11A～11F。薄片培養物グルタチオン含量のIFN- γ 誘導性モジュレーション。図11A～11D。代表的な画像は、グルタチオンに関連する蛍光を(A)対照条件下でThiolTracker(商標)により評価したこと、および(B)IFN- γ (500U/mL)とのインキュベーションの30分後に顕著であるグルタチオンの下降を示している。(C)IFN- γ の12時間パルスへの曝露の7日後に、グルタチオン含量は、初期の下降から回復し、かつベースラインを上回って増加していた。(D)IFN- γ で刺激された薄片培養物に由来するエキソソームでの処理は、さらにより強力な増加をもたらした。(E)それぞれの場合において、これらの曝露は、対照とは有意に(それぞれ、 $p < 0.01$ 、 0.001 、および 0.001)異なった。(F)高倍率顕微鏡法により、グルタチオン陽性細胞は直径約10 μ mであることが示され、それらがミクログリアであることを示唆した。共焦点イメージングおよびイソレクチン-GS-IB4でのミクログリアの標識化は、この示唆を裏付けた。例示的な画像が示されている。矢頭はミクログリア表面を、矢印はグルタチオン含有細胞体を指し示している。数値データは、平均 \pm SEMおよび有意性($^*p < 0.05$)である。スケールバー=10 μ m。群間比較は、ANOVA + Holm-Sidak事後検定により行われた。

【図 12】図12A～12C。海馬薄片培養物におけるミエリン分布。(A)海馬薄片培養物のNeuN染色は、構造的に保存された三シナプスループ(歯状回-CA3-CA1)からなるニューロンの細胞構築を例証している。(B)ミエリン塩基性タンパク質に対する免疫染色は、インビボで見られるものに厳密に匹敵する、21日間のインビトロ海馬薄片培養物における

灰白質ミエリンの領域的分布を示している。スケールバー = 250 μm 。(C) 海馬薄片培養物におけるコンパクトミエリンの電子顕微鏡法による確認。例示的な画像は、構造的に正常な、蜜に積層した髄鞘の存在を実証している。スケールバー = 200nm。

【図13】図13A~13D。血清に由来するエキソソームは非毒性であり、かつ前オリゴデンドロサイトレベルを増加させた。(A) 血清からのエキソソーム単離を、電子顕微鏡法ならびに表面マーカーのCD63およびAlixに対するウェスタンブロットによって確認した。スケールバー = 40nm。(B) 海馬薄片培養物へのエキソソーム適用は非毒性であった。エキソソームをPBS中に再懸濁し、21日間のインビトロ薄片培養物に適用した。次いで、処理後の3日目、5日目、7日目、および12日目に、細胞死の蛍光マーカーであるSytoxで薄片を染色した。NeuN免疫染色画像(左)は、ニューロン構築を例証するために示されている。Sytox陽性画像(中央)は、20 μM N-メチル-d-アスパルテートへの24時間の曝露によって誘導されたニューロン損傷を有する対照を示している。Sytox強度の定量化($n=9/\text{群}$)により、エキソソーム適用は有意な損傷を引き起こさないことが確認された(右)。スケールバー = 250 μm 。(C) 栄養性エキソソーム処理された薄片培養物におけるO4陽性細胞の例示的な共焦点画像(左)。スケールバー = 25 μm 。低倍率画像を、CA3における関心対象の画一的エリアからの染色強度の定量化のために用いた。若齢エキソソーム、若齢-EEエキソソーム、および老化-EEエキソソームでの処理は、ベースライン、ならびに老化エキソソーム、NEエキソソーム、および老化-NEエキソソームで処理された薄片のO4 + 蛍光強度を有意に($p < 0.001$; $n=6\sim19/\text{群}$)増加させた。薄片への適用前の254nmの紫外線(UV)光への1時間のエキソソームの曝露は、この増加を消失させた。(D) 栄養性エキソソーム処理された薄片培養物におけるO1陽性細胞の例示的な共焦点画像(左)。スケールバー = 25 μm 。前にあるように、低倍率画像の定量化により、対照および非栄養性エキソソーム処理された薄片と比較して、栄養性エキソソーム処理された薄片におけるO1 + 蛍光強度の有意な($p < 0.001$; $n=6\sim19/\text{群}$)増加が明らかになった。再度、UV光に曝露されたエキソソームはそれらの効果を喪失し、関与する因子がRNA種であることを表した。有意性は、ANOVA + 事後Holm-Sidak検定によって判定された。

【図14】図14A~14D。若齢エキソソームおよび環境富化されたエキソソームは、髄鞘形成を増強した。(A) 栄養性エキソソームは、ベースラインの薄片培養物ミエリンレベルを増強した。薄片培養物をエキソソームで処理し、3日後に、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)含量のウェスタンブロット解析のために採集した。若齢ラット、環境富化された若齢(若齢-EE)ラット、および環境富化された老化(老化-EE)ラットの血清由来エキソソーム($n=3\sim18$)はすべて、対照を上回って、薄片培養物のMBP含量を有意に(それぞれ、 $p=0.004$ 、 0.008 、および 0.003)増加させ、一方でそれらの老化対応物、富化されていない(NE)対応物、および富化されていない老化(老化-NE)対応物は増加させなかった。薄片への適用前の254nmのUV光への1時間のエキソソームの曝露は、それらの効果を取り除いた。(B) 代表的な電子顕微鏡画像は、対照培養物(左)における、および若齢血清由来エキソソーム(中央)またはUV曝露されたエキソソーム(右)への曝露の3日後におけるミエリンの厚さを示している。スケールバー = 200nm。(C) g比(軸索径/線維径)算出($n=3/\text{群}$; 1群につき20~27本の軸索が測定された)により、対照およびUV-エキソソーム処理されたサンプルに対して、若齢エキソソーム処理されたサンプルにおける有意な($p < 0.001$)減少が明らかになり、ミエリンの厚さの改善を表した。(D) 軸索径は、対照およびUV-エキソソーム処理されたサンプルに対して、若齢エキソソーム処理されたサンプルにおいて有意には異ならなかった($n=3/\text{群}$; 1群につき20~27本の軸索が測定された)。有意性は、ANOVA + 事後Holm-Sidak検定によって判定された。

【図15】若齢エキソソームおよび環境富化されたエキソソームは、オリゴデンドロサイト分化に必要なmiRNAに富んでいた。若齢エキソソーム、若齢-EEエキソソーム、および老化-EEエキソソームのmiRNA含量を、2つの異なる方法:(A) SBIのRat Genome-wide micro RNA qPCR Array Panel、および(B) TaqMan Array Rodent MicroRNA Cardsを利用して、老化-NEエキソソームmiRNAと比較した。各分類のエキソソームにおいて有意に(すなわち、 >2 倍、 $n=2\sim3$)濃縮されていた成熟種は、濃い灰色で示されている。容易に検出可能

10

20

30

40

50

であったが有意には濃縮されていなかったmiRNAは、白色で示されている。検出できなかったmiRNAは、灰色で示されている。†TaqManマイクロアレイカードは、高い配列相同性によりrno-miR-219種と交差反応する可能性があるmmu-miR-219を含有していた。

【図16】図16A~16C。若齢血清由来のエキソソームの経鼻投与は、老化ラットにおけるミエリンを増加させた。50 μ Lのエキソソーム（約100 μ gのタンパク質）を、老化ラットに鼻腔内に送達した。3日後、脳を採集し、凍結させ、かつ染色のために運動皮質を切片（14 μ m）にした。（A）ミエリン塩基性タンパク質（MBP）に対する染色は、傍矢状運動皮質におけるミエリン分布を実証している（左）。例示的な画像は、UV曝露されたシャムエキソソーム（中央）または若齢血清由来エキソソーム（右）の経鼻投与後の、コンパクトミエリンのレベルを測定するFluoroMyelin（商標）との対応する細胞化学的染色を例証している。すべての画像の下部におけるより強い染色強度は、下層にある白質を描出している。スケールバー = 250 μ m。（B）染色強度の定量化は、若齢エキソソームで処理された動物の皮質におけるコンパクトミエリンの有意な（ $^*p = 0.001$ ； $n = 3$ 匹の動物/群、1匹の動物につき9枚の画像が定量化された）増加を示している。（C）MBPに対するウェスタンブロットは、染色結果を裏付けており、若齢エキソソームで処理された動物の皮質におけるMBPの有意な（ $^*p = 0.01$ ； $n = 3$ 匹の動物/群）増加を示している。有意性は、ANOVA + 事後Holm-Sidak検定によって判定された。

10

【図17】図17A~17D。ミエリンは、エキソソームの経鼻適用により増加した。ラットをイソフルランで麻酔し、50 μ Lのエキソソーム（約100 μ gのタンパク質）を経鼻的に送達した。3日後に、脳を採集した。画像は、対照培養物（A）、エキソソーム処理培養物（B）、またはUV曝露されたエキソソーム処理培養物（C）における嗅球のFluoroMyelin（商標）蛍光を示している。（D）定量化は、EE-エキソソームが、嗅球コンパクトミエリンの有意な増加（ $^*p < 0.001$ ）を誘発し、それはUV曝露されたEE-エキソソーム（UV-Exo）の投与で無効になったことを示している。有意性は、ANOVA + 事後Holm-Sidak検定によって判定された。

20

【図18】図18A~18D。酸化ストレスのEE-エキソソーム誘導性低下。OSをメナジオンによって誘導し、かつ反応性酸素種に対する固定可能な蛍光マーカーにより測定した。³⁵ 対照条件下（A）での、ならびにEE-エキソソーム（B）およびNE-エキソソーム（C）への曝露の3日後の代表的な画像が示されている。スケールバー = 200 μ m。（D）定量化は、3日間のEE-エキソソーム適用が、対照、NE-エキソソーム、およびUV曝露されたEE-エキソソームと比較して、OSの有意な（ $^*p < 0.001$ ）低下を誘発したことを示している。有意性は、ANOVA + 事後Holm-Sidak検定によって判定された。

30

【図19】図19A~19C。IFN 刺激-DC-Exoの経鼻投与は、皮質におけるミエリンの産生を増加させた。（A）PBS-シャム（左）またはIFN 刺激-DC-Exo（右）による経鼻投与の3日後に、脳を採集し、凍結させ、かつコンパクトミエリンのレベルを測定するFluoroMyelin（商標）での染色のために皮質を切片にした。calバー（cal bar）、100 μ m。（B）定量化は、IFN 刺激-DC-Exoの経鼻投与後のFluoroMyelin（商標）染色強度の有意な（ $^*p < 0.001$ ； $n = 3$ 匹の動物/群）増加を示した。（C）MBPに対するウェスタンブロットは、IFN 刺激-DC-Exoで処理された動物の傍矢状運動皮質エリアにおけるMBPレベルの有意な（ $^*p = 0.019$ ； $n = 3$ 匹の動物/群）増加を示している。運動皮質は、脳の例示的なエリアとして選定された。有意性は、スチューデントt検定によって判定された。

40

【図20】図20A~20D。IFN で刺激された樹状細胞は、非毒性エキソソームを産生した。エキソソーム単離を、（A）表面マーカーのCD63およびAlixに対するウェスタンブロットによって、ならびに（B）電子顕微鏡法によって確認した。スケールバー = 25nm。（C）薄片培養物へのエキソソーム適用は、毒性作用がないことを示した。処理後の3日目、6日目、9日目、および12日目に、Sytoxで薄片を染色した。NeuN免疫染色画像（左）は、正常なニューロン構築を示している。Sytox陽性画像（中央）は、20 μ M N-メチル-d-アスパルテートへの24時間の曝露によって誘導されたニューロン損傷を有する対照を示している。エキソソーム処理された培養物のSytox陰性画像（右）は、損傷がないことを示した。画像を反転させて、可視化を増強した。スケールバー = 250 μ m。（D）Sytox蛍光強度の定量

50

化 (n = 9枚の薄片/群) は、有意な変化がないことを裏付けた (ANOVA + 事後Holm-Sidak検定)。

【図 2 1】図21A ~ 21C。IFN 刺激-DC-Exoは、薄片培養物における髄鞘形成を増加させた。(A) 例示的な電子顕微鏡画像は、IFN -DC-Exo処理された薄片培養物におけるコンパクトミエリンの増加を例証している。左から右への処理：対照 (処理なし) ; IFN -DC-Exo ; UV-IFN -DC-Exo ; および未刺激-DC-Exo。スケールバー = 200nm。(B) 電子顕微鏡画像からのミエリン比の定量化 (n = 3枚の薄片/群、かつ10個の細胞/薄片) は、IFN -DC-Exo処理でのコンパクトミエリンの厚さの有意な (*、p = 0.008) 増加を示した。(C) ウェスタンブロットによる確認および定量化は、IFN -DC-Exoで処理された薄片培養物におけるミエリン塩基性タンパク質レベルの有意な (*、p = 0.02) 増加、およびUV-IFN -DC-Exoで処理された薄片培養物における有意な (#、p = < 0.001 ; それぞれ、n = 9、15、11、9枚の薄片/群) 減少を示した。有意性は、それぞれ、ANOVA + 事後Holm-Sidak検定およびANOVA検定によって判定された。

【図 2 2】図22A ~ 22D。前駆細胞集団は、IFN 刺激-DC-Exo処理によって影響を受けなかった。対照の未処理薄片培養物 (左のパネル) 、IFN 刺激-DC-Exo処理薄片培養物 (中央のパネル) 、および未刺激-DC-Exo処理薄片培養物 (右のパネル) における、(A) 神経幹細胞 (musashi、上) 、(B) オリゴデンドロサイト前駆細胞 (NG2、下) に対する、共焦点の典型的な画像が示されている。スケールバー = 10 μ m。各処理群における陽性の(C) 神経幹細胞および(D) オリゴデンドロサイト前駆細胞の数の定量化 (9枚の画像/群およびn = 3/群から判定される) 。ANOVA + 事後Holm-Sidak検定により、群間に有意な差異は見られなかった。

【図 2 3】図23A ~ 23D。IFN 刺激-DC-Exoは、薄片培養物における酸化ストレスを低下させた。(A) 例示的な画像は、メナジオン単独への曝露後の (左) 、ならびにIFN 刺激-DC-Exo (中央) および未刺激-DC-Exo (右) での処理後の、酸化ストレスの蛍光マーカであるCellROX (商標) により測定される、メナジオンへの急激な曝露によって誘導された酸化ストレスを示している。スケールバー = 200 μ m。蛍光強度の定量化 (B) は、CA3エリアにおいて実施され、IFN 刺激-DC-Exoが、酸化ストレスを有意に (*、p < 0.001 ; n = 8/群) 低下させることを示した。(C) 例示的な画像は、グルタチオン (ThiolTracker (商標)) およびミクログリア (イソレクチンB4) の共染色を示している。対照 (左) 、IFN 刺激-DC-Exo (中央) 、および未刺激-DC-Exo (右) 。スケールバー = 10 μ m。(D) ThiolTracker (商標) 蛍光強度の定量化により、対照と比較して、IFN 刺激-DC-Exoおよび未刺激-DC-Exoでの処理後のミクログリアのグルタチオン含量の有意な (*、p < 0.001 ; n = 9) 増加が明らかになった。有意性は、ANOVA + 事後Holm-Sidak検定によって判定された。

【図 2 4】図24A ~ 24B。IFN 刺激-DC-Exoは、ミエリン産生および抗炎症応答に關与するmiRNA種に富んでいた。IFN 刺激-DC-ExoのmiRNA含量を、未刺激-DC-Exoのものと比較した。結果は、(A) ミエリン産生/オリゴデンドロサイト分化、および(B) 抗炎症応答に關与する特異的miRNAの発現レベルを示している。黒色のパネルは、検出できなかった成熟miRNA種を表し ; 中間の灰色のパネルは、容易に検出可能であったが有意には濃縮されていなかったmiRNAを表し ; 薄い灰色は、有意に濃縮されていた (すなわち、> 2倍) miRNAを表し ; かつ濃い灰色は、非常に高く濃縮されていた (すなわち、> 10倍) miRNAを表す。

【図 2 5】図25A ~ 25D。miR-219模倣体およびIFN 刺激-DC-Exoは、OPC分化を同様に促進する。(A) DAPI対比染色を伴うO4陽性染色の代表的な画像。(B) DAPI対比染色を伴うO1陽性染色の代表的な画像。スケールバー = 20 μ m。(C) 形態を例証するO4染色の例示的な高倍率画像、および1つの視野あたり (1枚のカバースリップにつき3枚の画像、n = 3枚のカバースリップ/群) のO4陽性細胞のパーセントの定量化 (O4⁺細胞/全DAPI⁺細胞) 。miR-219模倣体およびIFN 刺激-DC-Exoでの処理は、T3補給と同様に、O4発現細胞へのOPCの分化を刺激し、かつすべての群は対照から有意に (*、p < 0.001) 増加した。(D) 形態を例証するO1染色の例示的な高倍率画像、および1つの視野あたり (1枚のカバースリップにつき3枚の画像、n = 3枚のカバースリップ/群) のO1陽性細胞のパーセントの定量化 (O1⁺

細胞/全DAPI⁺細胞)。miR-219模倣体およびIFN 刺激-DC-Exoでの処理は、T3補給と同様に、成熟したO1発現細胞へのOPCの分化を刺激し、かつすべての群は対照から有意に(*、 $p = 0.002$)増加した。有意性は、ANOVA + 事後Holm-Sidak検定によって判定された。

【図26】IFN 刺激-DC-Exoは、急性リゾレシチン誘導性脱髄の後の髄鞘再生を増加させた。薄片培養物をリゾレシチンに曝露して急性脱髄のモデルを作り、その後に髄鞘再生が続く、次いで異なるエキソソーム処理を与えた。処理後5日目、髄鞘再生の開始時に、培養物を収集し、MBP含量をウェスタンブロットにより定量化した。リゾレシチン(Lyso)曝露は、対照と比較して、すべての群においてMBPの有意な(*、 $p < 0.001$; $n = 9$ 枚の薄片/群)低下を引き起こしたが、一方でIFN 刺激-DC-Exoでの処理は、他のすべてのリゾレシチン曝露群と比較して、有意な(#、 $p < 0.001$)増加を誘導した。有意性は、それぞれ、ANOVA + 事後Holm-Sidak検定およびANOVA検定によって判定された。

【図27】図27A~27B。エキソソーム量子ドット(QD)タグ付けの確認。(A)未コンジュゲートQDナノ粒子(レーン1)およびCD63コンジュゲートQDナノ粒子(レーン2)のアガロースゲル電気泳動。(B)エキソソーム(矢印)にタグ付けされたQDナノ粒子(矢頭)の電子顕微鏡画像。スケールバー = 25nm。

【図28】図28A~28C。IFN 刺激-DC-Exoは、オリゴデンドロサイトに優先的に入る。(A)QDタグ付けされたIFN 刺激-DC-Exo(中央の行)および細胞特異的な免疫蛍光(下の行)のマージ画像(上の行)。(B)QDタグ付けされた未刺激-DC-Exo(中央の行)および細胞特異的な免疫蛍光(下の行)のマージ画像(上の行)。左から右へ：オリゴデンドロサイト(抗CNPアーゼ)、ミクログリア(抗Iba1)、アストロサイト(抗GFAP)、およびニューロン(抗NeuN)。スケールバー = 10 μ m。(C)各細胞タイプに対する、QDタグ付けされたIFN 刺激-DC-ExoおよびQDタグ付けされた未刺激-DC-Exoの取り込みパーセント。 $n = 3$ 枚の薄片/群からの、60個の細胞あたり算出された取り込みパーセント。これらの結果は、DCエキソソームが、特異的な脳細胞タイプまで追跡可能であることを表している。IFN 刺激-DC-Exoは、オリゴデンドロサイトに有意に(*、 $p < 0.001$)局在し、一方で未刺激-DC-Exoは、アストロサイトに有意に(*、 $p < 0.001$)局在した。有意性は、スチューデントt検定によって判定された。

【発明を実施するための形態】

【0040】

例証的な態様の説明

1. 序論

いくつかの局面において、本発明は、概して、インビトロで再構成された小胞などの脂質ナノ小胞、または酸化ストレスを受けるように誘導されているもしくは酸化ストレスによって刺激されている細胞から得られたエキソソームを伴う方法および組成物に関する。該方法および組成物は、神経学的疾患、特に脱髄疾患のリスクがあるまたは脱髄疾患を有する対象を治療するのに適している。本発明は、酸化ストレスを受けるように誘導されているまたは酸化ストレスによって刺激されている細胞に由来するエキソソームなど、ある特定のエキソソームが髄鞘形成能を増強させ得るという発見に部分的に基づく。

【0041】

これらの方法および組成物は、既存の最先端技術に比べて重要な改善を有する。ある特定の態様において、本発明者らは、変性神経疾患を含めた脱髄性疾患のための新規な治療戦略として、天然に存在する過程(すなわち、若さおよび環境富化、それらは血液媒介性エキソソームを刺激するサイトカイン曝露またはオキシダント曝露などの酸化シグナル、および関連酸化ストレス誘導により模倣され得る)の開発を記載している。

【0042】

本発明のある特定の態様において、細胞によって分泌される小さな小胞である天然に存在するエキソソームは、酸化ストレス(OS)を低下させ得、かつ血液脳関門を越えてさえ、細胞間コミュニケーションを容易にすることによって髄鞘形成を促進し得る。本発明者らの知る限りでは、この組み合わせを提供する治療は他にはない。エキソソームは、すべての細胞タイプに潜在的に入り得、かつ重要なことには、静脈内または経鼻的に投与され

た場合に血液脳関門を越え得る。さらに、それらを特異的な細胞タイプに標的化し得る。

【0043】

MSに対する既存の療法は、炎症を低減させ、ゆえに脱髄の程度を低減させるように設計されており、場合によっては髄鞘再生を促進する。本発明のある特定の態様の利点には、脱髄からの回復を改善すること（例えば、 $>44\%$ ）、対照レベルを上回って髄鞘形成を促進すること、ならびにMSおよび老化による認知低下の発病における根本的因子であるOSを低下させることが含まれる。

【0044】

例えば、ある特定の態様における方法および組成物は、対照と比較した場合に、OSの40~45%の低下、O4陽性オリゴデンドロサイト前駆体細胞の300~800%の増加、O1陽性オリゴデンドロサイト前駆体細胞の25~600%の増加、およびミエリン塩基性タンパク質（MBP）の50%の増加を示す。加えて、脱髄を誘発することが最近示された、片頭痛の原因である可能性が高い拡張性抑制の閾値は、該方法および組成物によって刺激すると、200倍を上回って上昇する。まとめると、これらの栄養的变化は、いくつかの態様における方法および組成物の強力な効果を例証している。

10

【0045】

ある特定の態様において、前記方法および組成物は、天然に存在するシグナル伝達経路を増強し、ゆえに大幅により優れたベネフィット/リスクプロファイルを有する可能性がある。MSに対する既存の免疫調節療法の使用によって引き起こされる感染症のリスクの上昇を考慮すると、このことはとりわけ重要である。最後に、ある特定の態様における方法および組成物は、MSに対する、ならびにその発病がOSおよびオリゴデンドロサイト損傷/髄鞘形成不全を伴う他のCNS変性疾患の治療に対する新規な療法であり得る。

20

【0046】

II. 定義

「エキソソーム」とは、多様な異なる細胞から放出されるナノ小胞である。これらの小さな小胞は、大きな多小胞エンドソームに由来し、細胞外環境に分泌され得る。エキソソーム放出/放散（shedding）の正確なメカニズムは、依然として不明のままである。それらは、後期エンドソームの境界膜からの陥入および出芽によって形成されるように見え、サイトゾルを含有する小胞、およびそれらの表面上に膜結合型細胞タンパク質の細胞外ドメインを曝露する小胞をもたらす。電子顕微鏡法を用いると、調査は、内部小胞の細胞外環境への分泌につながる、多小胞エンドソームと原形質膜との融合プロファイルを示した。

30

【0047】

「治療用作用物質」という用語は、当技術分野において認められており、対象において局部的または全身的に作用する、生物学的、生理学的、または薬理学的に活性な物質である任意の化学的部分を指す。「薬物」とも称される治療用作用物質の例は、the Merck Index、the Physicians Desk Reference、およびThe Pharmacological Basis of Therapeuticsなどの周知の文献参考資料に記載されており、それらには、限定されることなく、医薬；ビタミン；ミネラルサプリメント；疾病もしくは病気の治療、予防、診断、治癒、もしくは緩和に用いられる物質；身体の構造もしくは機能に影響を及ぼす物質；または、それらが生理学的環境に置かれた後に生物学的に活性になるもしくはより活性になるプロドラッグが含まれる。

40

【0048】

「治療効果」という用語は、当技術分野において認められており、動物、特に哺乳類、特にヒトにおいて、薬理学的に活性な物質によって引き起こされる局部的または全身的な効果を指す。ゆえに、該用語は、動物またはヒトにおける、疾病の診断、治癒、緩和、治療、もしくは予防における、または望ましい身体的もしくは精神的な発達および/もしくは状態の増強における使用を意図された任意の物質を意味する。「治療上有効量」という語句は、任意の治療に適用可能な合理的なベネフィット/リスク比で、ある所望の局部的または全身的な効果をもたらすような物質のその量を意味する。そのような物質の治療上

50

有効量は、治療を受けている対象および病態、対象の重量および年齢、病態の重症度、投与の様式等に応じて変動し、それは当業者によって容易に決定され得る。例えば、いくつかの局面におけるある特定の組成物は、そのような治療に適用可能な合理的なベネフィット/リスク比をもたらすのに十分な量で投与され得る。

【0049】

「約」および「およそ」は、一般的に、測定法の性質または精度を考慮して、測定された分量に対して許容される誤差の程度を意味するものとする。典型的に、例示的な誤差の程度は、所与の値または値の範囲の20パーセント(%)以内、好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内である。

【0050】

あるいは、生体系では特に、「約」および「およそ」という用語は、所与の値の1桁以内、好ましくは5倍以内、より好ましくは2倍以内である値を意味し得る。別様に明記されていない限り、本明細書において与えられる数量は近似的であり、はっきりと明記されていない場合には、「約」または「およそ」という用語が推測され得ることを意味する。

【0051】

III. エキソソーム

本発明のある特定の局面において、脳の健康または他の関連疾病の改善のための新規な治療様態として、エキソソームを調製しかつ使用してよい。

【0052】

エキソソームは、網状赤血球が、それらが成熟して赤血球になるにつれてトランスフェリン受容体を選択的に捨てるための手段として最初に記載された(Johnstone, et al., 1987)。その後長い間、それらは、不要な細胞構成成分の除去のための単なる「ゴミ箱」として見なされた。しかしながら、B細胞が、T細胞応答を誘導し得る抗原特異的MHC IIを含有するエキソソームを放つという発見(Raposo, et al., 1996)以来、豊富なエキソソーム研究により、これらの小さな小胞は、生理的および病的な両方で多数の機能に關与していることが明らかにされている。

【0053】

エキソソームとは、多くの細胞タイプによって分泌される、エンドサイトーシス起源の小さな膜小胞である。例えば、エキソソームは、約40~約100nmの直径を有し得る。それらは、後期エンドソームの内側への出芽によって形成され得、小胞を含有する多小胞体(MVB)の形成につながり、次いでそれは原形質膜と融合して、細胞外環境にエキソソームを放出する。それらの正確な組成および内容物は、細胞タイプおよび疾病状態に依存するが、エキソソームはすべて、ある特定の特徴を共有する。

【0054】

ある特定の局面において、エキソソームを、ショ糖密度勾配での超遠心分離によって精製し、次いで、AlixおよびCD63などのマーカータンパク質の存在(Schorey & Bhatnagar, 2008)またはテトラスパニンおよびヒートショックタンパク質70の濃縮(Lee, et al., 2011)によって同定してよく、そのすべてはエキソソーム上に特異的に発現している。さらに、悪性滲出液ならびに尿、血液、および脳脊髄液などの正常な体液から、インビボでエキソソームを単離することができ、それらを診断用バイオマーカーの有望な供給源にしている。いくつかの他の局面において、ExoQuick-TC(商標)単離キットを用いて、エキソソームを単離することができる。

【0055】

エキソソームは、それらの膜の物理的特性に依存した、特異的標的細胞への指向性ホーミングの潜在性も有する。それらの効果は、局部的、領域的、または全身的であり得る。エキソソームは、それらの親細胞の細胞質の無作為抽出サンプルを含有しないが、特異的なmRNA、miRNA、およびタンパク質に富んでいる(Bobrie, et al., 2011)。このカーゴはプロテアーゼおよびRNアーゼによる分解から保護され、一方で小胞は間質空間内にあり、レシピエント細胞によっていったん取り込まれると生物活性を保持する。このようにして、それらは、そうでなければ遺伝子発現に基づき個々の細胞に限定されるであろう、相

10

20

30

40

50

互作用的シグナル伝達および酵素活性の移行 (transfer) を容易にする (Lee, et al., 2011)。例えば、Skogおよび同僚らは、レポータータンパク質に対するmRNAが、エキソソーム内に組み入れられ、レシピエント細胞に移行し、かつ翻訳されることを示している (Skog, et al., 2008)。

【0056】

ある特定の局面によれば、様々な細胞の調製物を用いて、エキソソームおよび組成物を産生することができる。例えば、エキソソーム産生細胞を、サイトカインまたは酸化ストレスを誘導する他の試薬とともに培養してよく、例えばインターフェロンガンマ (IFN)、IL-1、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-4、および/またはIL-13; ならびに/あるいはCD2、CD3、CD28、TCRなどのT細胞表面マーカーに対する抗体、ならびに/あるいは可溶性MHCクラスIもしくはII四量体および/または可溶性CD1四量体の存在下で培養してよい。特定の局面において、エキソソーム産生細胞をIFN の存在下で培養してよい。培養する工程は、試薬を用いた細胞の急激な処理または段階的な処理を含んでよい。

10

【0057】

別の特定の態様において、細胞は、T細胞などの免疫細胞であってよい。該T細胞は、TCR活性化剤、またはCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、T細胞、NKT細胞などの任意の1種もしくは複数種のT細胞サブセットの存在下で、あるいはNK細胞に対して培養されていてよい。MHCクラスI/IIペプチドを送達するための特に好ましいT細胞サブセットは、CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞である。NK細胞も、ある特定の局面においてエキソソームを産生し得る。さらなる局面において、細胞の成熟および/または活性化を誘導する薬学的試薬または特定の処理とともに、例えば抗原、特異的な抗原またはスーパー抗原が負荷された自己または同種異系のAPC、分裂促進因子 (すなわち、PHA)、アグリニン、抗体 (抗CD3および抗CD28抗体など) またはそれらのフラグメント、PKCの活性化を誘発する試薬 (すなわち、ホルボールエステル)、細胞質Ca²⁺放出 (すなわち、カルシウムイオノフォア)、ホスファターゼ (phosphatase) の阻害 (すなわち、オカダ酸) 等の存在下で、細胞を培養してよい。特定の態様において、細胞は、培養下で拡張されかつ/または活性化されていてよい。

20

【0058】

さらなる態様において、細胞は、グリア細胞、アストロサイト、ニューロン、オリゴデンドロサイト、スピンドルニューロン、ミクログリア、または神経系の任意の細胞などの神経細胞であってよい。細胞は、細胞培養物、解離組織、またはそれらの一部の形態であり得る。例えば、細胞は、海馬薄片培養物の形態であり得る。

30

【0059】

さらに、特定の態様において、細胞は、治療を受ける患者に対して自己的であるが、とはいえ同種異系の細胞またはたとえ異種の細胞でさえも用いてよい。さらなる特定の態様において、細胞は、生物学的に活性な分子をコードする組換えポリヌクレオチドを産生し得る。この態様は、以下でより詳細に開示される。

【0060】

細胞によって産生されたまたは放出されたエキソソームを、いくつかの技術を用いて単離しかつ/または精製してよい。これらには、単独でのまたは組み合わせでの、濾過、遠心分離、イオンクロマトグラフィー、または濃縮が含まれる。例示的な精製方法は、密度勾配遠心分離の工程を含む。別の例示的な方法は、単独でのまたは遠心分離工程と連動した、限外濾過の工程を含む。適切な精製方法は、WO99/03499、WO00/44389、およびWO01/82958に記載されており、それらは参照により本明細書に組み入れられる。

40

【0061】

エキソソームの生理学的に活性な亜集団の選択的精製または濃縮は、いくつかの手順を介して達成され得る。ある特定の態様において、有効なエキソソームを、特異的表面タンパク質マーカーおよび関連した分離技術の使用により、濃縮サンプルへと濃縮してよい。他の態様において、有効なエキソソームを、有効なエキソソームを産生し得ると同定された濃縮初代細胞培養物から採集してよい。さらなる態様において、有効なエキソソーム候補を同定するために用いられたスクリーニング手順に基づき、標的 (すなわち、想定さ

50

れる) 治療用分子種を含有するエキソソームを選択的に産生するように設計された分子工学ストラテジーを用いて、他のエキソソームを作製してよい。後者は、作製された種を含有するエキソソームのナイブ培養物への適用によって確認されてよく、そこでは所望の効果(例えば、髄鞘形成の増加)が検証され得る。

【0062】

ある特定の態様において、エキソソームまたは小胞には、核酸分子などの治療用作用物質が負荷されてよい。方法には、以下のものが含まれてよいが、それらに限定されるわけではない。

【0063】

(a) エレクトロポレーション。この方法により、細胞/エキソソームにおいて、100~200V/cmの電場でそれらに短時間ショックを与えることによって、多数の穴を開ける。DNA/RNAは、電場によって開けられた穴を通して細胞/エキソソームに入ることができる。

【0064】

(b) リポフェクション。トランスフェクションと一般的に呼ばれる方法であり、所望の遺伝子構築物を含有する小胞を介して、細胞/エキソソームをDNA/RNAで形質転換するために用いることができる。小胞は細胞膜と融合し(ブロスの上部における2つの油点が融合する仕方と同様に)、小胞の内容物と細胞とが組み合わさる。市場には、いつでも使用できる状態になっている多数のトランスフェクションキット、例えばPanomics からのDeliverX siRNA Transfection Kit(カタログ番号DX0002)、RocheからのFuGENE(登録商標)HD Transfection Reagent(カタログ番号04709691001)、およびInvitrogenからのLIPOFECTAMINE(商標)2000(カタログ番号11668-027)が存在する。

【0065】

(c) 熱ショックを用いた形質転換。 Ca^{2+} (CaCl_2 の状態)などの二価陽イオンの存在下で細胞/エキソソームを冷やすことにより、それらの膜は、RNAまたはDNAのプラスミドまたはフラグメントに対して透過性になる。細胞またはエキソソームをDNAとインキュベートし、次いで短時間熱ショックを与え(30~120秒間42℃)、それによりDNAを細胞に入れさせる。この方法は、凝縮した環状プラスミドDNAに対して上手く機能し得、エキソソームまたは脂質ナノ小胞の構成要素に対して機能し得る。

【0066】

上記の方法は、RNAおよびDNAをレシピエント細胞に移行させるために、改変されたエキソソームの産生および送達をどのように達成し得るのかを簡潔に記載している。エキソソームを、RNA/DNAを含有するように操作するまたは関心対象の遺伝子を含有するように改変することができ、かつ、単離しかつレシピエント細胞に移動させて、それらの生物学的機能または生存に影響を及ぼし得る。結果的に、エキソソームは、それらの内容物を標的細胞の細胞質に配置し得、それは今度は、標的細胞における特異的タンパク質へのmRNAの翻訳につながる。さらに、エキソソームは、特異的遺伝子の翻訳を調節し得るマイクロRNAおよびsiRNAなど、小さなコードRNAおよび非コードRNAを運搬しかつ移行させ得る。

【0067】

本明細書において記載される、DNAまたはRNAの担体としての小胞である、改変されたまたは負荷されたエキソソームを用いて、造血系、非造血系、幹細胞、および臓器における遺伝性疾患を治療することができる。改変されたまたは負荷されたエキソソーム小胞を、ヒトまたは動物における微生物学的な感染症もしくは疾病もしくは機能不全の治療のための、または任意の生物学的膜を通した移行のための、DNAまたはRNA構築物の担体としても用いることができる。

【0068】

エキソソーム産生細胞に対する条件を変更することによる、エキソソームの遺伝子材料の変化または改変は、pH、温度、生育条件を変化させることによって、またはエキソソーム産生細胞に向けて抗体/化学物質を用いることによって達成される。これは、核酸内容物の変更をもたらす。また、エキソソーム産生細胞におけるサイトカイン、ケモカイン、および他の遺伝子の過剰発現または抑制を用いて、エキソソームの内容物を変化させるま

たは改変することができる。

【0069】

新たな遺伝子を添加するのではなく遺伝子のスイッチを切るために、エキソソーム小胞を用いてセンスまたはアンチセンスRNAを特異的細胞に移行させることは、特定遺伝子の翻訳の下方調節（減速）または阻止をもたらす。該方法は、RNA干渉（siRNA）と呼ばれる。

【0070】

レシピエント細胞または組織に核酸を投与するために、インビトロでの細胞培養物へのエキソソームの添加によって、あるいはこれらのエキソソームの静脈内への注射によって、または経鼻的にもしくは静脈内になど、当技術分野において公知であるインビボでの他の任意の経路によって、DNAまたはRNA含有エキソソームを細胞に投与することができる。心臓血管系における細胞、骨格筋細胞、関節細胞（joint cell）、神経細胞、腸細胞、肺細胞、肝細胞、もしくは腎細胞、または免疫系における細胞を含めた、身体における任意の細胞に、あるいは悪性細胞を含めた、ヒトまたは動物の身体における任意の機能または機能不全を有する任意の細胞タイプに、エキソソームを標的化することができる。

10

【0071】

本明細書において本発明に開示されるように、エキソソームを用いて、遺伝子材料をレシピエント細胞に送達して、ヒトまたは動物における任意の細胞において、任意の薬物もしくは任意の薬物の前駆体を産生する、または任意の薬物の機能もしくは代謝に影響を及ぼすことができる。

20

【0072】

IV. miRNA

本発明のある特定の態様において、マイクロRNA（miRNAと略記される）を含む単離エキソソームまたは脂質ナノ小胞を、脱髄性疾患のリスクがあるまたは脱髄性疾患を有する患者を治療するための方法および組成物に用いてよい。特定の態様において、miRNAには、miR-7a、miR-9、miR-9^{*}、miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-19b、miR-20a、miR-92a-1、miR-23a、miR-23a^{*}、miR-23b、miR-32、miR-128、miR-138、miR-138^{*}、miR-184、miR-199a-5p、miR-214、miR-219、miR-338、miR-338^{*}、miR-27a、miR-27b、miR-106a、miR-124、miR-141、miR-144、miR-145、miR-146a、miR-181a、miR-200a、miR-451、miR-532-5p、およびmiR-665のうちの1種、2種、またはすべてが含まれてよい。特定の態様において、miRNAには、miR-219、miR-138、miR-338、およびmiR-199a-5pのうちの1種、2種、またはすべてが含まれてよい。例えば、miRNAはmiR-219およびmiR-138であってよく；miRNAはmiR-219およびmiR-338であってよく；miRNAはmiR-219およびmiR-199a-5pであってよい。

30

【0073】

本明細書において開示されるように、若齢エキソソームでは特異的なmiRNA（miR-219、miR-138、miR-338、およびmiR-199a-5p）が選択的に濃縮されており、特に、最も有意な濃縮を示したmiR-219は、成熟した髄鞘形成性オリゴデンドロサイトへのOPC分化の多数の工程に影響を及ぼすことが知られている。

【0074】

miRNAとは、それらの生物学的に活性な形態で長さが約17～約25ヌクレオチド塩基（nt）である、天然に存在する小さな非コードRNAである。miRNAは、標的mRNA翻訳を抑制することによって、遺伝子発現を転写後に調節する。miRNAは負の調節因子として機能し、すなわち、より多量の特異的miRNAほど、より低レベルの標的遺伝子発現と相関すると考えられている。

40

【0075】

インビボに存在する3つの形態のmiRNAである、一次miRNA（pri-miRNA）、未成熟miRNA（pre-miRNA）、および成熟miRNAがある。一次miRNA（pri-miRNA）は、約数百塩基～1kbを超えるステム-ループ構造の転写物として発現される。pri-miRNA転写物は、ステムループの基部付近でステムの両方の鎖を切断する、ドロージャ（Drosha）と呼ばれるRNase IIエンドヌクレアーゼによって核内で切断される。ドロージャは、互い違いの切り口でRN

50

A二重鎖を切断し、5'ホスフェートおよび3'末端に2ntの突出を残す。

【0076】

切断産物である未成熟miRNA (pre-miRNA) は、折り畳み様式で形成されたヘアピン構造を有する約60～約110nt長である。Pre-miRNAは、Ran-GTPおよびエクスポートン (Exportin) -5によって、核から細胞質へ輸送される。Pre-miRNAは、ダイサー (Dicer) と呼ばれる別のRNase IIエンドヌクレアーゼによって細胞質でさらにプロセッシングされる。ダイサーは、5'ホスフェートおよび3'突出を認識し、かつステム-ループ接合部でループを切り離して、miRNA二重鎖を形成する。miRNA二重鎖は、RNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) に結合し、そこでアンチセンス鎖は優先的に分解され、センス鎖成熟miRNAはRISCをその標的部位へ向かわせる。miRNAの生物学的に活性な形態であり、かつ長さが約17～約25ntであるのは、成熟miRNAである。

10

【0077】

マイクロRNAは、それらの標的遺伝子のメッセージ (mRNA) における特異的配列との塩基対合 (完全または不完全) に携わることによって機能する。miRNAは、mRNAを分解またはmRNAの翻訳を抑制し、標的遺伝子の発現を転写後に下方調節させる、抑制する、または沈黙させる。動物では、miRNAは必ずしもそれらの標的部位に対して完全な相同性を有さず、部分的な相同性が翻訳抑制につながり、一方で植物では、miRNAは標的部位に対して完璧な相同性を示す傾向があり、メッセージ (mRNA) の分解が広がる。

【0078】

マイクロRNAは、ゲノムにおいて広く分布し、遺伝子調節を支配し、かつ多くの生理的および病的な過程に積極的に参加している。例えば、ある特定のmiRNAの調節様態は、細胞の増殖、分化、およびアポトーシスを制御することが見出されており、かつ異常なmiRNAプロファイルは、発癌と関連している。加えて、ウイルス感染は、「細胞生存促進」遺伝子を沈黙させることを標的とするmiRNAの増加、アポトーシス (プログラム細胞死) と関連する遺伝子を抑制するmiRNAの減少を引き起こし、ゆえにアポトーシスシグナル伝達を増やす方向にバランスを傾けることが示唆されている。

20

【0079】

V. 疾病

予防される、治療される、または診断される対象となる疾病は、本明細書において記載される組成物または方法の投与による療法または予防に適しているであろう対象に影響を及ぼす任意の疾病であり得る。例えば、疾病は、酸化ストレスに対する抵抗性を増加させる核酸または他の治療用作用物質を含有するエキソソームまたは脂質ナノ小胞を投与するための療法に適している疾病であってよい。特定の例において、脱髄性疾患を治療するための、酸化ストレスを受けるように誘導されているまたは酸化ストレスによって刺激されている細胞に由来する単離エキソソームを含む組成物を投与する工程を伴う方法および組成物が提供され得る。

30

【0080】

脱髄性疾患とは、ニューロンの髄鞘がダメージを受けている、神経系の任意の疾患または疾病である。これは、罹患神経におけるシグナルの伝導を損ない、関与する神経に応じて、感覚、動作、認知、または他の機能の障害を引き起こす。該用語は、疾病の影響よりもむしろその原因を記載しており、一部の脱髄性疾患は遺伝的なものによって引き起こされ、一部は感染物質によって、一部は自己免疫反応によって、一部は外傷性または虚血性の損傷によって、および一部は未知の因子によって引き起こされる。洗羊液、除草剤、ペット用のノミ処理調製物などの商業用殺虫剤中の活性成分である化学物質の一分類である有機リン酸エステル (organophosphate) は、神経を脱髄するとも考えられる。神経遮断薬は、脱髄を引き起こし得る。

40

【0081】

中枢神経系の脱髄性疾患の非限定的な例には、多発性硬化症 (特発性炎症性脱髄性疾患と呼ばれる同様の疾病とともに)、老化による認知低下、片頭痛、ビタミンB12欠乏症、橋中心髄鞘崩壊症、脊髄癆、横断性脊髄炎、デビック病、進行性多巣性白質脳症、視神経

50

炎、白質萎縮症、外傷性脳損傷、および新生児脳損傷が含まれる。末梢神経系の脱髄性疾患の非限定的な例には、ギラン・バレー症候群およびその慢性的対応物、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、抗MAG末梢性ニューロパチー、シャルコー・マリー・トゥース病、ならびに銅欠乏症が含まれる。

【0082】

脱髄とは、脱髄するという作用、または神経を覆う髄鞘の喪失である。ミエリンが分解した場合、神経に沿ったシグナルの伝導は損なわれまたは喪失し得、最終的に神経は萎縮する。これが、多発性硬化症および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーのようなある特定の神経変性疾患につながる。

【0083】

中枢神経系（CNS）の脱髄は、多様な神経学的疾病の原因および結果であり、とりわけMSおよび老化による認知低下によって例示され、それぞれ、再発寛解型であるがその後進行性の経過をたどる、およびより長期型であるが進行性の経過をたどる。両方の場合において、これらの病は、脳の髄鞘形成に関与するオリゴデンドロサイト系列の脳細胞にダメージを与える酸化ストレス（OS）の増加、および特異的miRNAを含めた髄鞘形成阻害因子の産生を伴う。

【0084】

本発明の態様によれば、本明細書において記載される方法は、多発性硬化症の発生を阻害するのにおよび/またはそれを治療するのに有用である。「播種性硬化症（disseminated sclerosis）」または「播種性脳脊髄炎（encephalomyelitis disseminata）」としても知られる多発性硬化症（MS）は、脳および脊髄の軸索を囲む脂肪性の髄鞘がダメージを受け、脱髄および瘢痕化ならびに広範囲の兆候および症状につながっている、炎症性疾患である。疾病発症は、通常若年成人で生じ、それは女性により多く見られる。それは、100,000人あたり2~150人に及ぶ有病率を有する。

【0085】

脱髄は、外傷性脳損傷の病態生理においても重要な役割を果たし得る。実験的調査において、脳損傷はミエリンの喪失を伴うことが示されている（Johnson, et al., 2013）。

【0086】

新生児脳疾患も、脱髄および髄鞘再生の不全に関連している。低酸素性虚血性脳症および脳室周囲白質軟化症など、新生児脳における白質損傷は、脳性麻痺および認知障害をもたらし得る。そのような病状における髄鞘再生の不全は、永久的脱髄病変の一因となる（Fancy, et al., 2011）。

【0087】

VI. エキソソームに対する治療用作用物質または診断用作用物質

いくつかの態様において、治療用作用物質または診断用作用物質を、エレクトロポレーションまたは当技術分野において公知の他の方法などによって、対象への送達のためのエキソソームに負荷してよい。治療用作用物質は、治療用核酸、タンパク質もしくは抗体フラグメント、または小分子であってよい。

【0088】

「治療用核酸」は、本明細書において、疾病を治療するまたは予防する目的のために、対象に投与され得る核酸を指すと定義される。核酸は、対象における疾病または健康関連状態の治療において有益であることが知られているまたは予想されるものである。

【0089】

治療的有益性は、例えば、核酸による、特定の1つの遺伝子または複数の遺伝子の発現の変更の結果として現れ得る。特定の1つの遺伝子または複数の遺伝子の発現の変更は、特定の遺伝子の発現の阻害または強化であってよい（例えば、miRNAによる）。ある特定の態様において、治療用核酸は、対象における疾病または健康関連状態の治療または予防（すなわち、mRNAによる）に適用され得る1種または複数種のタンパク質またはポリペプチドをコードする。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書において互換可能に用いられる。両用語は、2個またはそれを上回る数のアミノ酸残基を含む

10

20

30

40

50

アミノ酸配列を指す。

【0090】

疾病または健康関連状態の治療または予防において有益であることが知られているまたは予想される、当業者に公知の任意の核酸が、ある特定の局面において、治療用核酸として企図される。本出願を通して記述される「をコードする核酸配列」という語句は、特異的なタンパク質またはペプチドの発現を指揮する核酸を指す。核酸配列には、RNAに転写されるDNA鎖配列、およびタンパク質に翻訳されるRNA配列の両方が含まれる。いくつかの態様において、核酸には治療用遺伝子が含まれる。「遺伝子」という用語は、機能的なタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドコード単位をコードする核酸配列を指すために用いられる。

10

【0091】

当業者によって理解されるであろうように、「治療用核酸」という用語には、タンパク質、ポリペプチド、ドメイン、ペプチド、融合タンパク質、および変異体を発現するまたは発現するように適応させ得る、ゲノム配列、cDNA配列、およびより小さな操作された遺伝子セグメントが含まれる。核酸は、約5～約12000個またはより多くのヌクレオチド、ヌクレオシド、または塩基対の連続核酸配列を含んでよい。

【0092】

「治療用核酸」の定義内には、疾病または健康関連状態の治療または予防において有益であることが証明されている治療用核酸の「生物学的に機能的な同等物」が包含される。したがって、公知の核酸に対して約70%～約99%の相同性を有する配列が、ある特定の局面において企図される。

20

【0093】

A. サイトカインをコードする核酸

本明細書において記述される薬学的組成物のいくつかの態様において、核酸はサイトカインをコードする。「サイトカイン」という用語は、もう一方の細胞に対して細胞間調節因子として作用する、一方の細胞集団によって放出されるタンパク質に対する総称である。核酸配列は、サイトカインの全長核酸配列、ならびに全長配列に由来する任意の長さの非全長配列をコードし得る。上述のように、配列は、特異的宿主細胞においてコドン選択性を提供するために導入され得る、天然の1つまたは複数の配列の縮重コドンを含むことがさらに理解される。

30

【0094】

そのようなサイトカインの例は、リンフォカイン、モノカイン、成長因子、および伝統的ポリペプチドホルモンである。サイトカインの中には、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモンなどの成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラキシン；プロリラキシン；卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、および黄体形成ホルモン（LH）などの糖タンパク質ホルモン；肝細胞（hepatic）成長因子；プロスタグランジン、FGF- およびFGF- などの線維芽細胞成長因子（FGF）；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン、OBタンパク質；腫瘍壊死因子- および- ；ミューラー管阻害物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；NGF- などの神経成長因子；血小板成長因子；TGF- およびTGF- などの形質転換成長因子（TGF）；インスリン様成長因子-Iおよび-II；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導因子；インターフェロン- 、 - 、および- などのインターフェロン、マクロファージ-CSF（M-CSF）、顆粒球マクロファージ-CSF（GM-CSF）、および顆粒球-CSF（G-CSF）などのコロニー刺激因子（CSF）；IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、LIF、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、EPO、kitリガンド、FLT-3、またはMDA-7などのインターロイキン（IL）が含まれる。

40

【0095】

創傷治癒に関与する成長因子サイトカインの非限定的な例には、上皮成長因子、血小板

50

由来成長因子、ケラチノサイト成長因子、肝細胞 (hepatocyte) 成長因子、TGF- β および TGF- α などの形質転換成長因子 (TGF)、ならびに血管内皮成長因子 (VEGF) が含まれる。これらの成長因子は、Ras、MAPK、PI-3K/Akt、PLC- γ 、および Rho/Rac/アクチンのシグナル伝達を利用して、細胞分裂経路、運動源性 (motogenic) 経路、および生存経路を誘発する。低酸素は、HIFを介して血管新生促進遺伝子 (例えば、VEGF、アンジオポエチン) を活性化し、一方で血清応答因子 (SRF) は、VEGF誘導性血管新生、上皮再形成、および筋肉の回復に必須である。EGF、その受容体、HGF、および Cox2 は、上皮細胞の増殖、遊走、上皮再形成、および胃腺の再構築に重要である。VEGF、アンジオポエチン、一酸化窒素、エンドセリン、およびメタロプロテイナーゼは、血管新生、血管リモデリング、および潰瘍内の粘膜再生に重要である (Tarnawski, 2005)。

10

【0096】

B. 酵素をコードする核酸

治療用核酸の他の例には、酵素をコードする核酸が含まれる。例には、ACPデサチュラーゼ、ACPヒドロキシラーゼ、ADP-グルコースピロホリラーゼ (pyrophorylase)、ATPアーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、アミラーゼ、アミログルコシダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、シクロオキシゲナーゼ、デカルボキシラーゼ、デキストリナーゼ、エステラーゼ、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、ヒアルロン (hyaluron) シンターゼ、ガラクトシダーゼ、グルカナーゼ、グルコースオキシダーゼ、GTPアーゼ、ヘリカーゼ、ヘミセルラーゼ、ヒアルロニダーゼ、インテグララーゼ、インベルターゼ、イソメラーゼ、キナーゼ、ラクターゼ、リパーゼ、リボキシゲナーゼ、リアーゼ、リゾチーム、ペクチンエステラーゼ、ペルオキシダーゼ、ホスファターゼ、ホスホリパーゼ、ホスホリラーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテイナーゼ、ペプチダーゼ (peptidase)、プラーナーゼ (pullanase)、リコンビナーゼ、逆転写酵素、トポイソメラーゼ、キシラーナーゼ、またはレポーター遺伝子が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

20

【0097】

治療用遺伝子のさらなる例には、カルバモイルシンテターゼI、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギノコハク酸シンテターゼ、アルギノコハク酸リアーゼ、アルギナーゼ、フマリルアセト酢酸ヒドラーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、 α -1アンチトリプシン、グルコース-6-ホスファターゼ、低密度リボタンパク質受容体、ボルフォビリノーゲンデアミナーゼ、第VIII因子、第IX因子、シスタチオンシンターゼ、分岐鎖ケトン酸デカルボキシラーゼ、アルブミン、イソバレリル-CoAデヒドロゲナーゼ、プロピオニル-CoAカルボキシラーゼ、メチルマロニルCoAムターゼ、グルタリルCoAデヒドロゲナーゼ、インスリン、 α -グルコシダーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、肝ホスホリラーゼ (hepatic phosphorylase)、ホスホリラーゼキナーゼ、グリシンデカルボキシラーゼ、H-タンパク質、T-タンパク質、メンケス病銅輸送ATPアーゼ、ウィルソン病銅輸送ATPアーゼ、シトシンデアミナーゼ、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、グルコセレブロシダーゼ (glucocerebrosidase)、スフィンゴミエリナーゼ、 α -L-イソロニダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコシルトランスフェラーゼ、H SVチミジンキナーゼ、またはヒトチミジンキナーゼをコードする遺伝子が含まれる。

30

40

【0098】

治療用核酸は、分泌型抗オキシダント (例えば、アスコルビン酸またはグルタチオン) または酵素的抗オキシダント (例えば、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)) をコードしてよい。いくつかのアイソフォームで存在するSODは、スーパーオキシドラジカルを過酸化水素に中和する金属酵素である。2種のアイソフォームが細胞内にある：細胞質で発現しているCu/Zn-SOD、およびミトコンドリアで発現しているMn-SOD (Linchey and Fridovich, 1997)。Mn-SODは、MnSOD cDNAをトランスフェクトされた造血系腫瘍細胞株において放射線に対する抵抗性を増加させることが実証されている (Suresh et al., 1993)。Cu/Zn-SODのアデノウイルスによる送達、エタノール誘導性肝損傷を防御することが実証されている (Wheeler et al., 2001)。加えて、Mn-SODおよびCu/Zn-SODの両方の

50

アデノウイルス介在性遺伝子送達は、温虚血再灌流のモデルにおける酸化ストレスに対する防御において等しく効果的である (Wheeler et al., 2001)。

【0099】

C. ホルモンをコードする核酸

治療用核酸には、ホルモンをコードする核酸も含まれる。例には、成長ホルモン、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン、絨毛性ゴナドトロピン、甲状腺刺激ホルモン、レプチン、副腎皮質刺激ホルモン、アンジオテンシンI、アンジオテンシンII、 α -エンドルフィン、 α -メラニン細胞刺激ホルモン、コレシストキニン、エンドセリンI、ガラニン、胃抑制ペプチド、グルカゴン、インスリン、リポトロピン、ニューロフィジン、ソマトスタチン、カルシトニン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、 β -カルシトニン遺伝子関連ペプチド、悪性腫瘍因子の高カルシウム血症、副甲状腺ホルモン関連タンパク質、副甲状腺ホルモン関連タンパク質、グルカゴン様ペプチド、パankレアスタチン、膵臓ペプチド、ペプチドYY、PHM、セレクチン、血管作動性腸管ペプチド、オキシトシン、バソプレッシン、バソトシン、エンケファリンアミド、メトルフィンアミド (metorphinamide)、 α -メラニン細胞刺激ホルモン、心房性ナトリウム利尿因子、アミリン、アミロイドP構成成分、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出因子、黄体形成ホルモン放出ホルモン、ニューロペプチドY、サブスタンスK、サブスタンスP、および甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンが含まれるが、それらに限定されるわけではない。

10

20

【0100】

D. 抗体をコードする核酸

本明細書において記述される核酸は、抗体またはそのフラグメントをコードしてよい。「抗体」という用語は、抗原結合領域を有する任意の抗体様分子を指すために用いられ、Fab'、Fab、F(ab')₂、単一ドメイン抗体 (DAB)、Fv、scFv (一本鎖Fv) などの抗体フラグメントを含む。様々な抗体ベースの構築物およびフラグメントを調製するおよび使用するための技術は、当技術分野において周知である。抗体を調製するおよび特徴付けするための手段も、当技術分野において周知である。本明細書において使用するとき、「抗体」という用語は、IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEなどの任意の免疫学的結合物質を広く指すことを意図する。一般的に、IgGおよび/またはIgMが好ましく、なぜならそれらは生理学的状況で最もよく見られる抗体であり、かつなぜならそれらは実験室環境で最も容易に作製されるからである。

30

【0101】

ある特定の態様において、本明細書において記述される薬学的組成物の核酸は、一本鎖抗体をコードする。一本鎖抗体は、米国特許第4,946,778号および第5,888,773号に記載されており、そのそれぞれは参照により本明細書によって組み入れられる。

【0102】

E. 診断用核酸

いくつかの局面におけるエキソソームまたは小胞は、診断用核酸である核酸を含んでよい。「診断用核酸」とは、疾病または健康関連状態の診断に適用され得る核酸である。「診断用核酸」の定義には、1種または複数種のレポータータンパク質をコードする核酸配列も含まれる。「レポータータンパク質」とは、細胞または組織内に存在する場合に、検出可能であり、かつ細胞内に存在している他の遺伝子配列またはコードされたポリペプチドと区別可能であるアミノ酸配列を指す。いくつかの態様において、治療用遺伝子をレポーターに融合させてよく、または別個のタンパク質として産生してよい。例えば、関心対象の遺伝子およびレポーターを、共トランスフェクション (共感染) により別個の送達ビヒクル中の別個のプロモーターによって、または同じ送達ビヒクル中の別個のプロモーターによって誘導してよい。加えて、2種の遺伝子を、例えば内部リボソーム進入部位によって同じプロモーターに、または二方向性プロモーターに連結させてよい。そのような技術を用いると、関心対象の遺伝子およびレポーターの発現が相関する。ゆえに、関心対象の遺伝子の発現の位置、量、および持続期間を計測し得る。関心対象の遺伝子は、例えば

40

50

腫瘍抑制遺伝子またはアポトーシス促進遺伝子などの抗癌遺伝子であってよい。

【0103】

細胞にはレポーター遺伝子をトランスフェクトできるため、レポーターを用いて、細胞トラフィックを追跡し得る。例えば、インビトロにおいて特異的細胞にレポーターをトランスフェクトして、次いで動物に戻し、ホーミングを評価し得る。多発性硬化症に対する実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルにおいて、Costaら（2001）は、IL-12 p40およびルシフェラーゼを発現するように形質導入されたミエリン塩基性タンパク質特異的CD4+T細胞を移行させた。インビボにおいて、ルシフェラーゼを用いて、中枢神経系へのトラフィックを実証した。加えて、IL-12 p40は炎症を阻害した。別の系において、ポジトロン放出断層撮影法（PET）を用いて、Koehneら（2003）は、単純ヘルペスウイルス-1チミジンキナーゼ（HSV-TK）を発現しているエプスタイン・バールウイルス（EBV）特異的T細胞が、該T細胞の制限的HLA対立遺伝子を発現しているEBV+腫瘍に選択的にトラフィックすることをインビボで実証した。さらに、これらのT細胞は、標的とされた腫瘍を排除するそれらの能力を保持する。逐次的イメージングを活用して、Dubeyら（2003）は、マウス肉腫ウイルス/モロニー Maus 白血病ウイルス（M-MSV/M-MuLV）によって誘導された腫瘍への、HSV-TKを発現しているT細胞の抗原特異的局在を実証した。組織特異的プロモーターを用いて、分化、例えば幹細胞の分化、または肝細胞との融合、およびII型肺胞上皮細胞におけるサーファクタントプロモーターの活性化などの、分化した細胞の特徴の取り込みも評価し得る。

10

20

【0104】

好ましくは、レポーター配列は、その存在、検出可能な部分とのその会合によって、または検出可能なシグナルの産出をもたらすその活性によって、容易に検出可能であるタンパク質をコードする。ある特定の局面において、検出可能な部分には、放射性核種、フルオロフォア、ルミノフォア、微粒子、ミクロスフェア、酵素、酵素基質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ナノ粒子、および/またはナノスフェアが含まれてよく、そのすべては、レポーターを認識しかつ/またはレポーターと相互作用する抗体またはリガンドに結合され得る。

【0105】

様々な態様において、本発明の核酸配列はレポーター核酸配列を含む、または検出可能なポリペプチドを生じさせる産物をコードする。レポータータンパク質は、検出可能なシグナルを直接的または間接的に産出し得る。一般的に、必ずとは限らないが、レポーター遺伝子は核酸配列を含み、かつ/またはそうでなければ細胞によって産生されない検出可能なポリペプチドをコードする。多くのレポーター遺伝子が記載されており、いくつかは遺伝子調節の調査のために市販されている（例えば、Alam and Cook, 1990、その開示内容は参照により本明細書に組み入れられる）。検出され得るシグナルには、色、蛍光、発光、同位体または放射性同位体のシグナル、細胞表面タグ、細胞生存率、細胞栄養所要量の低減、細胞成長、および薬物抵抗性が含まれるが、それらに限定されるわけではない。レポーター配列には、 β -ラクタマーゼ、 β -ガラクトシダーゼ（LacZ）、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、ルシフェラーゼ、例えば、そこへ向けられるそれに対して高親和性の抗体もしくはリガンドが存在する、または従来的手段によって産生され得る、Gタンパク質共役受容体（GPCR）、ソマトスタチン受容体、CD2、CD4、CD8、インフルエンザ血球凝集素タンパク質、共輸送体（NISなど）、および当技術分野において周知の他のものを含めた膜結合型タンパク質、ならびに、中でもとりわけヘマグルチニンまたはMyc由来の抗原タグドメインに適当に融合した膜結合型タンパク質を含む融合タンパク質、をコードするDNA配列が含まれるが、それらに限定されるわけではない。Kundra et al., 2002は、生体内分布調査およびガンマカメライメージングを用いて、インビトロおよびインビボにおける、2型ソマトスタチン受容体キメラ遺伝子の移行についての非侵襲的モニタリングを実証した。

30

40

50

【0106】

いくつかの態様において、レポーター配列は蛍光タンパク質をコードする。本発明に従って用いられ得る蛍光タンパク質の例には、緑色蛍光タンパク質（GFP）、高感度（enhanced）緑色蛍光タンパク質（EGFP）、レニラ・レニフォルミス（*Renilla Reniformis*）緑色蛍光タンパク質、GFPmut2、GFPuv4、高感度黄色蛍光タンパク質（EYFP）、高感度シアン蛍光タンパク質（ECFP）、高感度青色蛍光タンパク質（EBFP）、シトリン、およびディスコソマ（*discosoma*）由来の赤色蛍光タンパク質（dsRED）が含まれる。蛍光タンパク質のこれらの例は排他的ではなく、赤外、可視、または紫外スペクトルの範囲内の任意の蛍光タンパク質など、後に開発される蛍光タンパク質を包含し得ることが理解されるべきである。

【0107】

様々な態様において、レポーター配列の少なくとも1つの所望の発現レベルは、診断用核酸の基礎的転写レベルと比較した、レポーター配列の発現レベルの増加、減少、または変化なしである。特定の態様において、レポーター配列の1つの所望の発現レベルは、レポーター配列の基礎的転写レベルと比較した、レポーター配列の発現レベルの増加である。

【0108】

様々な態様において、レポーター配列は、独立して、同時に、または独立してかつ同時に解析され得る、一意的に検出可能なタンパク質をコードする。他の態様において、宿主細胞は、真核細胞または原核細胞であってよい。例示的な真核細胞には、酵母および哺乳類細胞が含まれる。哺乳類細胞には、ヒト細胞、および癌細胞など、病的表現型を呈する様々な細胞が含まれる。

【0109】

例えば、いくつかのレポータータンパク質は、可視光および/または紫外線下で容易に観察され得る、細胞における色の変化を誘導する。レポータータンパク質は、当業者に公知の任意のレポータータンパク質であってよい。例には、GFP、RFP、BFP、およびルシフェラーゼが含まれる。

【0110】

レポータータンパク質をコードする核酸には、DNA、cRNA、mRNA、およびそれぞれのレポーターアミノ酸配列の活性フラグメントをコードするそれらの部分配列、ならびにこれらの配列を含むベクターが含まれる。

【0111】

レポータータンパク質のイメージングの例示的な例には、ガンマカメライメージング、CT、MRI、PET、SPECT、光学イメージング、および超音波が含まれる。いくつかの態様において、診断用核酸は、CTおよびMRI、PETおよびSPECTなど、1種を上回る様態を用いたイメージングに適している。

【0112】

イメージングにおけるレポーターの例に関するさらなる情報は、Kumar, 2005 ; Kundra et al., 2005 ; および Kundra et al., 2002 に記述されており、そのそれぞれは参照によりその全体として本明細書に具体的に組み入れられる。

【0113】

VII. 薬学的組成物

ある特定の局面において、前記方法における使用のための組成物または作用物質は、薬学的に許容される担体に適切に含有されている。担体は非毒性の生体適合性であり、かつ作用物質の生物学的活性に有害な影響を及ぼさないように選択される。本発明のいくつかの局面における作用物質は、錠剤、カプセル剤、粉末、顆粒、軟膏、溶液、デポジトリー（*depositories*）、吸入剤、および経口的、非経口的、または外科的な投与を可能にする注射液など、固体、半固体、ゲル、液体、または気体の形態で、局部的送達（すなわち、骨格筋または他の組織など、身体の特異的位置への）または全身的送達のための調製物中に製剤化されてよい。本発明のある特定の局面は、医療デバイス等を被覆することによる、組成物の局部的投与も企図する。

10

20

30

40

50

【0114】

注射物質、注入、または洗浄（irrigation）による非経口的送達、および局所的送達のための適切な担体には、蒸留水、生理的リン酸緩衝生理食塩水、通常のもしくは乳酸加したリンゲル液、デキストロス溶液、ハंकス液、またはプロパンジオールが含まれる。加えて、無菌の固定油を、溶媒または懸濁化溶剤として採用してよい。この目的のために、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含めた、任意の生体適合性油を採用してよい。加えて、オレイン酸などの脂肪酸は、注射物質の調製に用途を見出している。担体および作用物質を、液体、懸濁液、重合可能なもしくは重合不能なゲル、ペースト、または膏薬として配合してよい。

【0115】

担体は、作用物質の送達を持続させる（すなわち、延長する、遅らせる、または調節する）、または治療用作用物質の送達、取り込み、安定性、もしくは薬物動態を増強する送達ビヒクルも含んでよい。そのような送達ビヒクルには、非限定的な例として、微粒子、ミクロスフェア、タンパク質から構成されるナノスフェアまたはナノ粒子、リボソーム、炭水化物、合成有機化合物、無機化合物、ポリマー性またはコポリマー性ヒドロゲル、およびポリマー性ミセルが含まれてよい。

【0116】

ある特定の局面において、患者または対象に投与される組成物の実際の投薬量は、体重、病状の重症度、治療を受けている疾病のタイプ、以前のまたは併存の（concurrent）治療的介入、患者の特発性疾患、および投与の経路など、身体的および生理学的な因子によって決定され得る。いかなる場合にも、投与の責任を負う実践者が、個々の対象に対する組成物中の活性成分の濃度および適当な用量を決定する。

【0117】

ある特定の態様において、薬学的組成物は、例えば少なくとも約0.1%の、単離エキソソーム、関連脂質ナノ小胞、または治療用作用物質もしくは診断用作用物質が負荷されたエキソソームもしくはナノ小胞などの活性物質を含んでよい。他の態様において、活性物質は、例えば、単位の重量の約2%～約75%、または約25%～約60%、およびその中で導き出せる任意の範囲を構成してよい。他の非限定的な例において、用量は、1回の投与につき、約1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ から、約5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 、約10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 、約50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 、約100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 、約200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 、約350 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 、約500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 、約1mg/kg/体重、約5mg/kg/体重、約10mg/kg/体重、約50mg/kg/体重、約100mg/kg/体重、約200mg/kg/体重、約350mg/kg/体重、約500mg/kg/体重、約1000mg/kg/体重、またはそれを上回る量まで、およびその中で導き出せる任意の範囲を構成してもよい。本明細書において列挙される数から導き出せる範囲の非限定的な例において、約5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ ～約100mg/kg/体重、約5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ ～約500mg/kg/体重等の範囲が投与され得る。

【0118】

薬学的組成物の溶液を、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合した水で調製することができる。分散液も、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物で、ならびに油で調製することができる。保管および使用の通常の下で、これらの調製物は、微生物の成長を阻止する防腐剤を含有する。

【0119】

ある特定の局面において、薬学的組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとして注射可能な組成物の形態で有利に投与され、注射前に、液体の状態の溶液または懸濁液に適した固体形態も調製してよい。これらの調製物を乳化してもよい。そのような目的のための典型的な組成物は、薬学的に許容される担体を含む。例えば、組成物は、リン酸緩衝生理食塩水1mlあたり10mg、25mg、50mg、または最大約100mg未満の、それに等しい、またはそれを上回るヒト血清アルブミンを含有してよい。他の薬学的に許容される担体には、水溶液、塩を含めた非毒性の賦形剤、防腐剤、緩衝液等が含まれる。

【0120】

非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、および

10

20

30

40

50

オレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体には、水、アルコール性/水性溶液、生理食塩溶液、塩化ナトリウムなどの非経口用ビヒクル、リンゲルデキストロース等が含まれる。静脈内用ビヒクルには、流体および栄養補給剤が含まれる。防腐剤には、抗微生物剤、抗真菌剤、抗オキシダント、キレート剤、および不活性ガスが含まれる。薬学的組成物の様々な構成成分のpHおよび正確な濃度は、周知のパラメーターに従って調整される。

【0121】

さらなる製剤が経口投与に適している。経口製剤は、例えば、薬学的等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの典型的な賦形剤を含む。組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸薬、カプセル剤、持続放出性製剤、または粉末の形態をとる。

10

【0122】

さらなる局面において、薬学的組成物には、古典的な薬学的調製物が含まれてよい。ある特定の局面に従った薬学的組成物の投与は、標的組織がその経路を介して利用可能である限り、任意の一般的経路を介するものであってよい。これには、経口、経鼻、口腔、直腸、腔内、または局所的なものが含まれてよい。化学療法誘導性脱毛症または他の皮膚過剰増殖性疾患を防ぐための局所的投与は、皮膚癌の治療にとって特に有利であり得る。あるいは、投与は、同所的、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、または静脈内の注射によるものであってよい。そのような組成物は、生理学的に許容される担体、緩衝液、または他の賦形剤を含む薬学的に許容される組成物として通常投与される。肺の病状の治療のために、エアロゾル送達を用いることができる。エアロゾルの容量は、約0.01ml~0.5mlである。

20

【0123】

薬学的組成物の有効量は、意図される目標に基づいて決定される。「単位用量」または「投薬量」という用語は、対象における使用に適した物理的に個別の単位を指し、それぞれの単位は、その投与、すなわち適当な経路および治療レジメンに伴って、上述される所望の応答をもたらすように算出された薬学的組成物の所定の分量を含有する。治療の数および単位用量の両方に従って、投与されるべき分量は、所望される防御または効果に依存する。

【0124】

薬学的組成物の正確な量は、実践者の判断にも依存し、かつ各個体に特有である。用量に影響を及ぼす因子には、患者の身体的および臨床的な状態、投与の経路、治療の意図される目標（例えば、症状の軽減 対 治療）、ならびに特定の治療用物質の効力、安定性、および毒性が含まれる。

30

【0125】

VIII. キット

いくつかの態様は、診断用および治療用のキットなどのキット、ならびにエキソソームを調製するおよび/または送達するためのキットに関係する。例えば、キットは、本明細書において記載される1種または複数種の薬学的組成物、および任意でそれらの使用のための取扱説明書を含んでよい。キットは、そのような組成物の投与を達成するための1種または複数種のデバイスも含んでよい。例えば、対象キットは、薬学的組成物、および脱髄疾患を有するまたは脱髄疾患のリスクがある患者への該組成物の直接投与を達成するためのカテーテルを含んでよい。他の態様において、対象キットは、送達デバイスとともに使用するための、調合薬として任意で製剤化されたまたは凍結乾燥された、単離エキソソームのプレフィルドアンプルを含んでよい。

40

【0126】

キットは、ラベルを有する容器を含んでよい。適切な容器には、例えば瓶、バイアル、および試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの多様な材料から形成されていてよい。容器は、上記で記載されるものなど、治療的または非治療的な適用に有効である抗体を含む組成物を保有してよい。容器上のラベルは、組成物が特異的な療法または非治療的な適用に用いられることを表示してよく、かつ上記で記載されるものな

50

ど、インビボまたはインビトロのいずれかでの使用のための指図も表示してよい。いくつかの態様において、キットは、上記で記載される容器、ならびに緩衝液、希釈液、フィルター、針、シリンジ、および使用のための指示を有する添付文書を含めた、商業的なおよびユーザーの観点から望ましい材料を含む1つまたは複数の他の容器を含む。

【実施例】

【0127】

IX. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を実証するために含まれる。次に続く実施例に開示される技術は、本発明の実践において上手く機能することが本発明者によって発見された技術を表し、ゆえにその実践のための好ましい様式を構成すると見なされ得ることが、当業者によって解されるべきである。しかしながら、当業者であれば、本開示に照らして、多くの変化が、開示される具体的態様においてなされ得、かつ本発明の精神および範囲から逸脱することなく、類似のまたは同様の結果をなおも獲得し得ることを解するべきである。

【0128】

実施例1：環境富化

本発明者らは、ラット用のMarlau式EEケージを確立して、EE曝露された（図7A～7F）ラットの末梢血（図2A～2C）由来のエキソソーム（図1）が、富化されていない（NE）対応物と比較して、OSを低下させ得るかどうかおよび髄鞘形成を促進し得るかどうかを試験した。

【0129】

EEは、抗オキシダントの産生の増加を誘発する反応性酸素種の低レベルな産生の増加をもたらす。したがって、EEは、脳内OSの正味低下を誘発する。結果として、本発明者らは、EEを受けた（図7A～7F）動物の血液（図2A～2C）に由来するエキソソームが、NE対応物と比較して、海馬薄片培養物に適用された場合にこの効果を反復し得るかどうかを試験した。OSは、メナジオン曝露によって誘導された（図3A～3B）。これらの結果は、NE動物ではなくEE由来のエキソソームが、エキソソーム曝露の3日後に測定したときに、脳組織内OSを有意に低下させたことを裏付ける。さらに、OSのこの減少は、投与前にエキソソームをUV光に曝露したときには観察されず、それらの効果がRNA種によって仲介されたことを示唆する。具体的な値は、対照： 1.00 ± 0.071 ；EE： 0.55 ± 0.03 （ $p = 0.001$ ）；NE： 0.95 ± 0.08 ；EE+UV： 0.99 ± 0.05 （ $n = 6 \sim 18$ /群）であった。EEエキソソームの適用による脳内OSの低下についてのさらなる実証は、図18A～18Dにある。

【0130】

EEは、OSの増加とともに生じる（Sohal & Weindruch, 1996）、老化による認知低下を緩和し（Ahlskog, et al., 2011）、かつ抗オキシダントは髄鞘形成を促進する（Podratz, et al., 2004）ため、本発明者らは、EE由来のエキソソームが、脳内ミエリン含量を増加させ得るという仮説を立てた。したがって、本発明者らは、エキソソームに曝露された海馬薄片培養物中のMBP含量を測定し、かつ3日後に、MBPが、NE由来のエキソソームまたは対照ではなく、EE由来のエキソソームへの曝露後に有意に増加したことを見出した。さらに、EEエキソソームのこの効果は、UV光への曝露によって無効になり得、RNA種がこれらの効果を仲介することを再度示唆した。具体的な値は、対照： 1.00 ± 0.08 ；EE： 1.47 ± 0.09 （ $p = 0.001$ ）；NE： 1.01 ± 0.19 ；EE+UV： 0.81 ± 0.02 （ $n = 3 \sim 5$ /群）であった。

【0131】

上記のEE実験では、成体動物を用いた。本発明者らは、EE曝露された老化ラットのエキソソーム（ $> 500g$ ）が、脳組織の髄鞘形成能も改善し得るという仮説を立てた。本発明者らは、老化NEラットではなく老化EE（図7A～7F）由来のエキソソームが、海馬薄片培養物における分化性OPCの数（前オリゴデンドロサイトマーカーO4に対する免疫染色により定量化される）を増加させることを見出した。具体的な値は、対照： 1.00 ± 0.23 ；老化-EE： 2.95 ± 0.54 ；老化-NE： 1.36 ± 0.13 （ $n = 3 \sim 5$ /群）であった。別の実験において、若齢エキソソーム、若齢-EEエキソソーム、および老化-EEのエキソソームでの処理は、ベース

ライン、ならびに老化エキソソーム、NEエキソソーム、および老化-NEエキソソームで処理された薄片と比較して、04+ 蛍光強度を有意に ($p < 0.001$; $n = 6 \sim 19$ /群) 増加させた。(図13C)。薄片への適用前の254nmの紫外線への1時間のエキソソームの曝露は、この増加を消失させた。

【0132】

同様に、OSは、老化-EE由来のエキソソームでの3時間の処理によって、老化動物由来のそれらのNE対応物と比較して、ナイーブ薄片培養物において有意に ($p < 0.001$) 低下した。上記のように、OSのこの有意な低下は、紫外線でのEE-エキソソームの前処理によって無効になった。具体的な値は、対照: 1.00 ± 0.06 ; 老化-EE: 0.81 ± 0.04 ; 老化-NE: 1.21 ± 0.02 ; 老化-EE + UV: 1.22 ± 0.05 ($n = 6 \sim 9$ /群) であった。興味深いことに、老化-NE曝露された培養物は、対照と比較してOSの有意な ($p = 0.001$) 増加を示し、老化が、脱髄を促進し得る炎症促進性変化と関連しているという考えを支持した。

10

【0133】

海馬薄片培養物のエキソソーム処理が非毒性であることを実証するために、エキソソームをPBS中に再懸濁し、21日間のインビトロ薄片培養物に適用した。次いで、処理後の3日目、5日目、7日目、および12日目に、細胞死の蛍光マーカーであるSytoxで薄片を染色した。NeuN免疫染色(図13B左)は、ニューロン構築を例証するために示されている。Sytox陽性画像(図13B中央)は、20 μ M N-メチル-d-アスパルテートへの24時間の曝露によって誘導されたニューロン損傷を有する対照を示している。Sytox強度の定量化 ($n = 9$ /群) により、エキソソーム適用は有意な損傷を引き起こさないことが確認された(図13B右)。

20

【0134】

実施例2: 若齢/老化ラット由来のエキソソーム

老化による認知低下はOSの増加とともに生じ (Sohal & Weindruch, 1996)、若齢動物の全身環境は、老化したCNSの局面を若返らせ得る (Ruckh, et al., 2012)。したがって、著者らは、若齢動物由来のエキソソームが、細胞老化の重大な局面であるOSを緩和し得る(図3A~3C)という仮説を立てた。実際に、著者らは、老化ラットではなく若齢ラットの血液由来のエキソソームが、海馬薄片培養物におけるOSを有意に ($p < 0.001$) 減少させることを見出した。さらに、若齢エキソソームのこの栄養的効果は、エキソソームをUV光に曝露することによって無効になり得、若齢エキソソーム内のRNA種が関与していることを示唆した。具体的な値は、対照: 1.00 ± 0.1 ; 若齢: 0.59 ± 0.04 ($p < 0.001$); 老化: 0.90 ± 0.09 ; 若齢 + UV: 0.95 ± 0.05 ; ($n = 9$ /群) であった。

30

【0135】

エキソソームは、ミエリン含量 (MBP) の増加を刺激し得るため、本発明者らは、そのエキソソームが、脳組織のOPCプールに影響を及ぼし得るという仮説を立てた。上記で記載されるように、若齢および老齢ラットの血液に由来するエキソソームを海馬薄片に適用した。老化動物ではなく若齢由来のエキソソームに曝露された組織において、OPC分化 (オリゴデンドロサイト前駆体マーカー04に対する免疫染色により定量化される) は有意に ($p < 0.001$) 増加した。再度、「若齢」エキソソームのこの効果は、UV光によって無効になり得、RNA種がOPCプールの増加に関与していることを示唆した。具体的な値は、対照: 1.00 ± 0.22 ; 若齢: 2.36 ± 0.25 ; 老化: 0.69 ± 0.14 ; 若齢 + UV: 1.21 ± 0.43 ($n = 7 \sim 9$ /群) であった。

40

【0136】

上記で記載されるように、本発明者らは、EEで刺激された動物に由来するエキソソームが、ミエリン含量を改善し得ると記載した。本発明者らは、EEが動物を若返らせている可能性があるという仮説を立てた。したがって、本発明者らは、若齢動物の血液由来のエキソソームが、脳内ミエリンに対して、老化EE刺激動物由来のエキソソームと同様の効果を有するかどうかを試験した。実際に、MBP (ウェスタンブロットにより定量化される) は、老化動物血清ではなく、若齢由来のエキソソームに曝露された海馬薄片において有意に ($p < 0.05$) 増加した。さらに、若齢エキソソームは、3日間の曝露後にMBPレベルをすでに有意に増加させたが、この効果は、若齢エキソソームへの7日間の曝露後にさらに改善

50

した。3日間の曝露に関しての具体的な値は、対照： 1.00 ± 0.10 ；若齢： 1.56 ± 0.22 ；老化： 0.86 ± 0.08 であった。

【0137】

7日間のMBPの有意な ($p < 0.01$) 増加に関しての具体的な値は、対照： 1.00 ± 0.07 ；若齢： 1.95 ± 0.15 ；老化： 0.86 ± 0.08 ； $n = 4 \sim 6$ /群であった。まとめると、これらのデータは、若齢エキソソームが髄鞘形成を促進し、かつmRNAおよび/またはmiRNAシグナル伝達を介してそうし得ることを表している。

【0138】

若齢エキソソームおよび環境富化されたエキソソームの両方が髄鞘形成を増強するというさらなる実証として、若齢ラット、環境富化された若齢（若齢-EE）ラット、および環境富化された老化（老化-EE）ラットの血清由来エキソソームで処理された薄片培養物 ($n = 3 \sim 18$) はすべて、ウェスタンブロットによって示されるように（図14A）、対照を上回るMBP含量の有意な（それぞれ、 $^*p = 0.004$ 、 0.008 、および 0.003 ）増加を呈した。対照的に、老化エキソソーム、富化されていない（NE）エキソソーム、および富化されていない老化（老化-NE）エキソソームで処理された薄片培養物は、MBP含量の増加を呈さなかった（図14A）。薄片への適用前の254nmの UV光への1時間のエキソソームの曝露は、それらの効果を取り除いた。髄鞘形成を増加させることにおける若齢エキソソームの効果は、髄鞘の厚さの増強を示す電子顕微鏡写真によっても実証される（図14B～14D）。

【0139】

miRNAが、MSなどの神経変性疾患による脱髄の発病に関与しているという増加する証拠を考慮して、本発明者らは、次に、若齢および老化動物の血清由来エキソソームのmiRNA含量の差異についてスクリーニングした。これまでにOPC成熟に関係している21種のマイクロRNAのレベルを、若齢または老化動物の血清に由来するエキソソームにおいてアッセイした。両群とも、10種のマイクロRNA（miR-9、miR-19b、miR-23a、miR-23b、miR-128、miR-138、miR-145、miR-199a-5p、miR-219、miR-338、およびmiR-138）に対して陽性であった。特異的なマイクロRNA（miR-219、miR-138、miR-338、およびmiR-199a-5p）が、若齢エキソソームにおいて濃縮されていた。本発明者らはmiR-219に焦点を合わせる予定であり、なぜならそれは最も有意な濃縮を示し、かつ成熟した髄鞘形成性オリゴデンドロサイトへのOPC分化の多数の工程に影響を及ぼすことが知られているからである（図8A）。若齢エキソソームおよび環境富化されたエキソソームにおける、オリゴデンドロサイト分化に必要なmiRNAの濃縮を示した実験の結果が図15に示されている。さらに、図8C～8Eは、栄養性（つまり、ミエリン促進性および酸化ストレス低下性）エキソソームの適用1日後の薄片培養物における、miR-219によって標的とされるmRNAのタンパク質発現レベルの変化を示している（図8B）。

【0140】

実施例3：若齢エキソソームを用いた髄鞘再生

本発明者らは、次に、健全な組織におけるベースラインのミエリン含量を改善し得る若齢エキソソームが、脱髄の実験モデルの後の髄鞘再生も改善し得るという仮説を立てた。実際に、本発明者らは、若齢エキソソーム、若齢-EEエキソソーム、および老化-EEエキソソームが、リゾレシチンへの一時的曝露によって誘導された急性脱髄の後の回復を有意に（ $p < 0.001$ ）改善させることを実証した（図9A～9B）。リゾレシチンへの曝露の直後に、培養物を、若齢動物、若齢-EE動物、または老化-EE動物に由来するエキソソームで処理した。5日後、髄鞘再生の開始時に、培養物を収集し、MBP含量をウェスタンブロットにより解析した（図9B）。リゾレシチン（Lyso）曝露は、対照と比較して、すべての群においてMBPの有意な（ $^*p < 0.001$ ； $n = 6 \sim 16$ ）低下を誘発したが、一方でエキソソーム曝露は、リゾレシチン単独に関して見られるものと比較して、髄鞘再生の有意な（ $^{\#}p < 0.001$ ）増加を促進した。同様に、リゾレシチン処理の5日後に収集された薄片培養物も、O4陽性細胞の存在の有意な（ $^*p < 0.001$ ； $n = 4 \sim 8$ /群）増加を明らかにした。すべてのエキソソーム処理は、リゾレシチン処理単独に関して見られるものを上回って、O4染色を有意に増強させた（ $^{\#}p < 0.001$ ）。O1染色も、リゾレシチン処理の5日後に有意に増加した（ $^*p < 0.001$ ）。

； $n=3\sim 4$ /群）が、一方でエキソソーム処理に関してさらなる増加は見られず、エキソソームは、成熟オリゴデンドロサイトを存続させることによって髄鞘再生を直接増加させ得ることを示唆した。有意性は、ANOVA + 事後Holm-Sidak検定によって判定された。

【0141】

実施例4：IFN γ で刺激された樹状細胞に由来するエキソソーム

本発明者らは、樹状細胞由来のエキソソームを調査した。エキソソームは、それらの親細胞の細胞質の無作為抽出サンプルを含有しないが、特異的なmRNA、miRNA、およびタンパク質に富んでいる（Bobrie, et al., 2011）。このカーゴはプロテアーゼおよびRNアーゼによる分解から保護され、一方で小胞は間質空間内にあり、レシピエント細胞によっていったん取り込まれると生物活性を保持する。ゆえに、それらは、そうでなければ遺伝子発現に基づき個々の細胞に限定されるであろう、シグナル伝達および酵素活性の移行を容易にする（Lee, et al., 2011）。最近の研究によれば、OSに曝露された免疫細胞は、OSに対する抵抗性の増加を近隣細胞に伝えるエキソソームを放出することが示されている（Eldh, et al., 2010）。重要なことには、この効果は曝露の2時間後に見られ、最も可能性が高い抗オキシダントである防御タンパク質へのエキソソームmRNAの急速な翻訳（Eldh, et al., 2010）、またはオキシダント/抗オキシダント系関連miRNAの産生を暗示する。

【0142】

ExoQuick-TC（商標）単離キットを用いて、ラット海馬薄片培養物の順化培地および血液からエキソソームを単離した。T細胞（およびそれらのIFN γ の産生）がEEに基づく神経保護に関与していることを示唆する証拠により、インターフェロンガンマ（IFN γ ）を初期刺激として用いた。IFN γ への曝露は有害ではないが、反応性酸素種の固定可能なマーカーであるCellROX（商標）によって測定される、薄片のCA3領域における 1.00 ± 0.07 から 1.50 ± 0.27 へのOSの有意な（ $p < 0.02$ ； $n = 3$ /群）増加を誘発した。

【0143】

次に、本発明者らは、海馬脳薄片を生理学的用量のIFN γ に曝露し、かつ3日後に順化培地からエキソソームを採集した（培地のみに曝露された薄片からの順化培地を、対照のために収集した）。次いで、ミトコンドリア阻害（メナジオン）によるOSへの曝露前に、新たな薄片をこれらのエキソソームで3時間処理し、かつCellROX（商標）によりOSを測定した。IFN γ で刺激された培養物に由来するエキソソームでのこの処理は、 1.00 ± 0.06 から 0.63 ± 0.05 への、OSからの有意な（ $p < 0.002$ ； $n = 3$ /群）防御を誘発した。ゆえに、免疫細胞のように（Eldh M et al. (2010) PLoS ONE）、OSに曝露された神経細胞（ミクログリア）は、エキソソームを介して、OSに対する増加した回復力を移行させ得る。

【0144】

次に、本発明者らは、若齢および老化ラットの血液からエキソソームを単離した。薄片培養物（ $n = 9$ /群）に1日間適用した場合、彼らは、若齢ラット由来のエキソソームが、対照、若齢-UV処理エキソソーム、および老化エキソソーム（それぞれ、 1.00 ± 0.1 、 0.95 ± 0.05 、および 0.90 ± 0.10 ）と比較して、OSの有意な（ $p < 0.001$ ）低下（ 0.59 ± 0.04 ）を誘発することを見出した。

【0145】

さらに、若齢ラット血液由来のエキソソームは、OPC分化の有意な（ $p = 0.01$ ； $n = 3$ /群）増加を誘発した。したがって、血清由来のエキソソームは、髄鞘形成を促進する治療法としての開発によく適しているように思われる。

【0146】

本発明者らは、脳薄片培養物を500U/mLのIFN γ で刺激し、次いで、放出されたエキソソームを採集した。急激なIFN γ 曝露は、CA3海馬領域におけるOSの有意な（ $p < 0.02$ ； $n = 3$ /群）増大を誘発するため（注記： $p < 0.05$ （*）； $p < 0.01$ （**）； $p < 0.001$ （***））：対照 1.00 ± 0.07 ；IFN γ $1.50 \pm 0.27^*$ 、彼らはIFN γ をストレス誘導シグナルとして選定した。

【0147】

IFN γ を段階的（すなわち、7日間にわたって12時間ごと）に適用した場合、OSは有意に

10

20

30

40

50

($n=5$ /群)低下した:対照 1.00 ± 0.07 ; IFN $0.54 \pm 0.12^{***}$ 。さらに、これらのIFNで刺激された薄片培養物のエキソソームは、片頭痛の原因である可能性が最も高い拡張性抑制(SD)に対する感受性を有意に低下させた。ゆえに、末梢免疫細胞のように、OSに曝露された神経細胞(ミクログリア)は、エキソソームを介して、OSに対する増加した回復力を移行させる。本発明者らは、IFNの経鼻投与も、インビボでの新皮質SDに対する感受性を低下させることを示すことに進んだ。

【0148】

注目すべきことには、上記の研究は、IFNで刺激された薄片培養物のエキソソームが、別個の薄片培養物に適用された場合に、組織内MBPを増加させることも示している(データは記載されず)。Ruckh Jおよび同僚ら(2012)は、老化動物において実験的に誘導した脱髄後の髄鞘再生は、より若齢の対応物の全身環境(すなわち、血液)への曝露によって若返り得ることを示している。本発明者らは、この「全身環境」効果には、OSを低下させ、OPC分化を増加させ、かつMBPの産生を増加させる血清由来のエキソソームが伴うことを示した。具体的には、若齢対老化ラット由来のエキソソームの比較(ラット薄片培養物に適用した場合)により、OSは、「老化由来に対して若齢由来」のエキソソームへの曝露によって有意に低下した($n=9$ /群)ことが示され、効果を、本発明者らは、mRNAまたはmiRNAの関与について、これらのシグナル伝達分子をUV光への曝露により破壊することによって試験した:対照 1.00 ± 0.1 ; 若齢 $0.59 \pm 0.04^{***}$; 老化 0.90 ± 0.09 ; 若齢+UV 0.95 ± 0.05 。これらのデータは、RNA種がOSの低下に関与していることを示唆している。測定は、CellROX(商標)を用いて行われた。

【0149】

OPC分化は、老化由来に対して若齢由来のエキソソームへの曝露によって有意に増加し($n=7\sim9$ /群)、効果は若齢エキソソームのUV曝露によって除去された。

対照 1.00 ± 0.22

若齢 $2.36 \pm 0.25^{***}$

老化 0.69 ± 0.14

若齢+UV 1.21 ± 0.43

【0150】

これらのデータは、RNA種が、OPC分化を促進する若齢エキソソーム内に含有されていることも示唆している。測定は、半定量的免疫染色を用いて行われた。

【0151】

薄片培養物のMBP含量は、老化由来に対して若齢由来のエキソソームへの曝露によって有意に増加し、効果は若齢エキソソームのUV曝露によって除去された。

3時間:対照 1.00 ± 0.03

若齢 0.85 ± 0.09

老化 0.47 ± 0.07

若齢+UV 0.62 ± 0.16 ($n=3-6$ /群)

1日間:対照 1.00 ± 0.03

若齢 1.05 ± 0.12

老化 $0.53 \pm 0.08^{**}$

若齢+UV 0.62 ± 0.16 ($n=3-6$ /群)

【0152】

これらの2つの設定（すなわち、3時間および1日間）のデータは、「老化」エキソソーム（およびUVに曝露された若齢エキソソーム）が、髄鞘形成を妨げ得るシグナル伝達因子を含有することを示唆している。

3日間: 対照 1.00 ± 0.10

若齢 $1.56 \pm 0.22 *$

老化 0.86 ± 0.08 ($n=4-6$ /群)

7日間: 対照 1.00 ± 0.07

若齢 $1.95 \pm 0.15 **$

老化 0.86 ± 0.08 ($n=4$ /群)

10

【0153】

まとめると、これらのデータは、若齢エキソソームが髄鞘形成を促進し、かつmRNAおよび/またはmiRNAシグナル伝達を介してそうし得ることを表している。MBPはウェスタンブロットにより定量化された。

【0154】

miRNAが、多発性硬化症などの神経変性疾患による脱髄の発病に関与しているという増加する証拠を考慮して、本発明者らは、次に、若齢および老化エキソソーム間のmiRNA発現の差異についてスクリーニングした。これまでにOPC成熟に関係している21種のマイクロRNAのレベルを、若齢または老化動物の血清に由来するエキソソームにおいてアッセイした。

20

【0155】

両群とも、10種のマイクロRNA (miR-9、miR-19b、miR-23a、miR-23b、miR-128、miR-138、miR-145、miR-199a-5p、miR-219、miR-338、およびmiR-138) に対して陽性であった。特異的なマイクロRNA (miR-219、miR-138、およびmiR-199a-5p) が、若齢エキソソームにおいて選択的に濃縮されていた。

【0156】

miR-219に重点が置かれると考えられ、なぜならそれは最も有意な濃縮を示し、かつ成熟した髄鞘形成性オリゴデンドロサイトへのOPC分化の多数の工程に影響を及ぼすことが知られているからである。若齢エキソソームおよび環境富化されたエキソソームにおける、オリゴデンドロサイト分化に必要なmiRNAの濃縮を示したさらなる実験の結果が図15に示されている。さらに、図8C~8Eは、栄養性エキソソームの適用1日後の薄片培養物における、miR-219によって標的とされるmRNAのタンパク質発現の変化を示している（図8B）。

30

【0157】

本発明者らは、次に、若齢エキソソームが、リゾレシチンへの一時的曝露によってもたらされた急性脱髄の後の髄鞘再生を有意に改善させることを実証した。例えば、本発明者らは、リゾレシチンへの17時間曝露を用いて、薄片培養物がそれらのミエリン含量を一時的に約80%低下させることを示した。

40

【0158】

MBPレベルのウェスタンブロット定量化によって判定されるように、若齢エキソソームへの曝露は、5日目に、リゾレシチン誘導性脱髄からの有意に改善された回復を提供した ($n=5-6$)。

対照	1.00 ± 0.11
Lyso	0.34 ± 0.04
Lyso+若齢	0.73 ± 0.08 **

【0159】

環境富化（（EE）；すなわち、意志的に増加させた社会的、知的、および身体的な活動）は、抗オキシダントの産生の増加を誘発する反応性酸素種の低レベルな増加をもたらす。したがって、EEは、脳内OSの正味低下を誘発する。結果として、本発明者らは、通常の動物飼育（すなわち、富化されていない（NE））を受けたものに対して、EEを受けた動物の血清に由来するエキソソームが、若齢対老化動物のものと同様の比較を示すかどうかを試験した。結果は以下のことを裏付ける：OSは、NEエキソソームに対してEEへの曝露によって有意に低下し（ $n=6\sim 18$ /群）、効果は、UV光へのEEエキソソームの曝露によって無効になった。

対照	1.00 ± 0.071
EE	0.55 ± 0.03 ***
NE	0.95 ± 0.08

EE+UV 0.99 ± 0.05

【0160】

一般的方法。Wistarラットおよび海馬薄片培養物で実験を実施する。脱髄を惹起する手段としてリゾレシチン曝露、およびOSを誘導するメナジオンを用いて、薄片培養物を以前に記載されているように調製しかつ使用する（Grinberg, et al., 2012; Eldh, et al., 2010）。新たに開発されたラット富化ケージ（Lin, et al., 2008）をEEに用いる。富化されていない（NE）対照ラットを、標準的ケージで個々に飼育する。視覚認識課題を用いて、海馬に基づく記憶の変化を評価する（Obiang, et al., 2011）。本発明者らは、以前に記載されているように（Mitchell, et al., 2010）、SABioscienceのPCRアレイを用いてmRNAについて、およびSeraMir exosome miRNA amplification kit、それに続くmiRNA PCRアレイを用いてmiRNAについてスクリーニングする。薄片培養物にはCellROX（商標）を用いて、およびホール動物にはOxyBlot（商標）キット（カルボニルレベルを判定する）を用いて、OSを測定する。ミエリン含量の測定として、MBP（ウェスタンブロット（薄片）または免疫染色（ホール動物の海馬）により測定される）を用いる。

【0161】

簡潔には、本発明者らは、薄片培養物において脱髄およびOS（リゾレシチンによる）を低下させ得る、ならびに動物においてOS、ミエリン、および老化による認知喪失を低減させ得る、若齢動物由来のエキソソームの能力を評価する。結果を、老化動物血液のエキソソームからのものと比較する。

【0162】

エキソソーム採集前の刺激パラダイムは、EE対NEである。群は、EE-若齢、NE-若齢、EE-老化、およびNE-老化である。これらの動物由来のエキソソームを、薄片培養物に適用し（A）、またはナイーブの若齢および老化動物に7日間毎日注射する（B）。シャム対照（Bに対する）にピヒクルを毎日注射した。上記で規定される群由来のエキソソームを利用して、mRNAおよびmiRNAスクリーニング、ならびに脳における標的タンパク質についての後続の確認を実施する。最後に、本発明者らは、特異的RNA種を含有するように操作された（上記に記載される方法に基づいて判定される）樹状細胞由来のエキソソームを老化動物に投与する。処理は、静脈内にまたは経鼻投与により（Zhuang, et al., 2011）、7日間毎日与えられる。評価項目は上記に記載されるものであり、ホール動物におけるOS、ミエリン、および認知（すなわち、海馬に基づく記憶）に対する、ならびに薄片培養物におけるOSおよびミエリン含量に対する、エキソソーム処理の影響を判定するためのものである

。

【0163】

実施例5：エキソソーム介在性の処理

OSの緩和および髄鞘形成/髄鞘再生の増加のためのエキソソームの供給源として、樹状細胞を用いることができる。エキソソームを用いて、外傷性脳損傷および新生児脳損傷も治療し得る。

【0164】

一般的方法。薄片培養物を、以前に記載されているように調製しかつ維持する (Grinberg, et al., 2012; Mitchell, et al., 2011; Pusic, et al., 2011)。ミトコンドリア阻害剤のメナジオンへの短時間曝露によって酸化ストレスを誘導し (Grinberg, et al., 2012)、かつCellROX (商標) イメージングを用いてOSを定量する (Grinberg, et al., 2012)。ExoQuick-TC (商標) 単離キットを用いて、エキソソームを単離する。

10

【0165】

CO₂麻酔されかつ頭部を切り落とされた雄ラット (Wistarラット; 6~8週齢) の大腿骨および脛骨から、樹状細胞を単離する。周辺組織を除去した後、無傷の骨を70%エタノールで2分間消毒し、かつ両末端を除去する前にPBSでリンスした。次いで、21ゲージ針を備えた滅菌シリンジを用いて、セルストレーナーを通して10mLのRPMI培地で骨髓 (marrow) を押し流す。次いで、細胞をペレットにし、赤血球溶解緩衝液で処理し、洗浄し、かつ顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を含有する培養培地中に1mLあたり100万個の細胞の密度でプレートする。培養下で1週間後、未成熟な樹状細胞を収集する。最後に、IFN- γ で処理された細胞の培地からエキソソームを採集する (Eldh, et al., 2010)。IFN- γ で刺激された樹状細胞に由来するエキソソーム (IFN- γ -DC-Exo) は非毒性である (図20A~20D)。

20

【0166】

IFN- γ -DC-Exoは、薄片培養物におけるコンパクトミエリンのレベルを増加させる。異なるエキソソーム処理を海馬薄片培養物に適用し、かつ3日後にEMイメージングを実施して、コンパクトミエリンの変化を判定した。EMイメージングにより、IFN- γ -DC-Exoの適用でその厚さが増加した、無傷のかつ蜜に積層したミエリンが実証された (図21A)。それに続くg比の算出により、対照と比較して、IFN- γ -DC-Exo処理での積層ミエリンの有意な ($p = 0.008$) 改善が明らかになった (図21B)。

30

【0167】

ナイーブの24 DIV海馬薄片培養物に適用した場合、IFN- γ -DC-Exoは、免疫プロットにより測定されるミエリン塩基性タンパク質 (MBP) の産生を有意に ($p = 0.02$) 増加させた (図21C)。適用前のIFN- γ -DC-ExoのUV処理 (545nm、45分間の100 μ ワット/cm²) は、この効果を実効にし、観察されたミエリン産生の増加におけるRNA種の関与を表した (Eldh et al., 2010)。加えて、対照と比較して、MBPレベルの有意な ($p < 0.001$) 減少が、IFN- γ -DC-ExoのUV処理に関して見られた (図21C)。これは、UV処理によりダメージを受けた内容物の送達による可能性がある。

【0168】

IFN- γ -DC-Exo処理は、前駆細胞の枯渇を引き起こさない。OPC分化のエキソソーム介在性増加が、前駆細胞集団に有害な影響を有するかどうかを判定するために、未処理の対照と比較した、IFN- γ -DC-Exoおよび未刺激-DC-Exoで処理された海馬薄片培養物における神経前駆細胞およびOPCの存在を評価した。神経幹細胞に対するMusashi (Msi1/Msi2) での染色 (図22A) により、エキソソーム処理薄片と対照との間の陽性細胞カウントの数に有意な差異はないことが明らかになった (図22B)。同様に、オリゴデンドロサイト前駆細胞ステージにある細胞に対するNG2での染色により、陽性細胞の数に有意な差異はないことが示され (図22C~D)、前駆細胞プールは影響を受けていないことを示唆した。

40

【0169】

IFN- γ -DC-Exo処理は、薄片培養物の酸化耐性も有意に増加させた。メナジオン曝露の3時間前のこれらのエキソソームの投与は、CellROX (商標) 染色によって見られるように

50

、酸化ストレスを有意に ($p < 0.001$) 低下させた (図23A ~ 23B)。ThiolTracker (商標) 染色により測定される還元型グルタチオンレベルは、未処理の対照と比較して、両方のエキソソームで処理された培養物において有意に ($p = < 0.001$) 増加した (図23C ~ 23D)。しかしながら、IFN-DC-Exoでの処理は、未刺激-DC-Exo単独に関して見られるものよりも、還元型グルタチオンの有意により大きな増大を誘発した。グルタチオンは、イソレクチン-GS-IB₄二重染色によって見られるように、ミクログリアに局在することが見出された (図4C)。

【0170】

加えて、IFN-DC-Exoは、リゾレシチン誘導性脱髄後のミエリンレベルを回復させる。海馬薄片培養物におけるMSのモデルとして、脱髄を誘導する手段としてリゾレシチンを用いた (Birgbauer, et al., 2004)。リゾレシチン曝露後のIFN-DC-Exoでの処理は、リゾレシチン単独または所与のUV-IFN-DC-Exoで処理された培養物と比較して、損傷後の5日目に測定されるミエリンの回復を有意に ($p < 0.001$) 増加させた (図26)。

10

【0171】

オリゴデンドロサイト分化および抗炎症経路に關与する特異的miRNAは、IFN-DC-Exoにおいて非常に濃縮されている。エキソソームmiRNAのスクリーニングにより、IFN-DC-Exoおよび未刺激-DC-Exoの内容物の間の有意な差異が明らかになった。DC細胞のIFN処理は、図24Aに列挙される、オリゴデンドロサイト分化およびミエリン産生の経路に關与するmiRNAの発現およびエキソソーム内へのパッケージングを増加させた。注目すべきことには、miR-219は、IFN-DC-Exoにおいて非常に濃縮されており、かつ未刺激-DC-Exoにおいて検出不能であった。miR-181a、miR-451、miR-532-5p、およびmiR-665など、炎症経路の調節に關与するmiRNA種は、図24Bに示される未刺激-DC-Exoに対して、IFN-DC-Exoにおいてとりわけ非常に濃縮されていた (> 10 倍)。これらのmiRNA種の存在の増加は、IFN-DC-Exoが炎症および酸化ストレスを低減させ得る可能性を表している。

20

【0172】

IFN-DC-ExoがmiR-219を介してOPC分化を増加させるかどうかを判定するために、miR-219模倣体を初代OPC培養物に適用した。初代OPC培養物を、ガラス製カバースリップ上で低密度で成長させ、かつIFN-DC-Exoで処理したまたはmiR-219模倣体をトランスフェクトした。OPC分化を誘導するT3の補給を、陽性対照として用いた。処理の3日後、IFN-DC-Exo処理されたOPCは、O4 (図25A) およびO1 (図25B) 陽性細胞に対する染色の増加によって判定されるように、対照培養物と比較して、分化の増加を示した。miR-219模倣体をトランスフェクトされたOPC培養物は、同様に、分化の増加を示した (図25A ~ 25B)。処理群あたりのO4およびO1陽性細胞パーセントの定量化は、IFN-DC-ExoおよびmiR-219模倣体の両方とも、T3での処理 (陽性対照) と同じ程度までOPC分化を促進し、かつ対照から有意に (それぞれ、 $p = 0.002$ および $p < 0.001$) 増加した (図25C ~ 25D) ことを明らかにした。

30

【0173】

量子ドット (QD) タグ付けされたIFN-DC-Exoは、オリゴデンドロサイトによって優先的に取り込まれる。QDナノ粒子が抗CD63抗体へのコンジュゲーションに成功したかどうかを判定するために、未コンジュゲートQDナノ粒子およびコンジュゲートQD-CD63を、1.5% アガロースゲルで解析した。コンジュゲートQD-CD63 (図27A、レーン2) は、未コンジュゲートQD (図27A、レーン1) と比較して、より高分子量の位置に移動し、コンジュゲートの成功および相同種であるコンジュゲートQD-CD63を表した。エキソソーム (図27B、矢印) への、高電子密度コアを有する環状構造 (図27B、矢頭) として見られるQD-CD63の結合のさらなる確認を、EMイメージングによって可視化した。

40

【0174】

QD-IFN-DC-Exo (図28A) およびQD-未刺激-DC-Exo (図28B) を、海馬薄片培養物に適用し、かつ特異的細胞タイプに対して免疫染色した。両方のタイプのQD-Exoの追跡は、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、およびアストロサイトとの異なる割合での共局在をもたらし、ニューロンでの取り込みは観察されなかった。

50

【0175】

QD陽性細胞は、測定された細胞のパーセンテージとして列挙されている（図28C）。本発明者らは、細胞特異的染色の1群あたり60個の細胞をカウントし、QD陽性細胞の数を書き留めた。薄片におけるQD-IFN γ -DC-Exoは、それらがオリゴデンドロサイトによって優先的に（72%）、ならびにミクログリア（34%）およびアストロサイト（12%）によってより低い程度に取り込まれることを示した。比較して、QD-未刺激-DC-Exoも、オリゴデンドロサイトと共同在するがより低い程度に（7%）、QD-IFN γ -DC-Exoと同程度（38%）であるミクログリアによる取り込みを有し、かつアストロサイトは63%の最も高い取り込みを有した。このことは、IFN γ -DC-Exoがオリゴデンドロサイトを有意に（ $p < 0.001$ ）標的とし、かつ未刺激-DC-Exoがアストロサイトを有意に（ $p < 0.001$ ）標的とする、表面組成の差異を示唆している。

10

【0176】

エキソソームを用いて、ホール動物を処理することができる。若齢血清由来のエキソソームの経鼻投与は、老化ラットにおけるミエリンを増加させた。50 μ Lのエキソソーム（約100 μ gのタンパク質）を、老化ラットに鼻腔内に送達した。3日後、脳を採集し、凍結させ、かつ染色のために運動皮質を切片（14 μ m）にした。若齢エキソソームで処理された動物の皮質は、コンパクトミエリンの有意な増加を有した（図16A~16C）。嗅球において、ミエリンの同様の増加が観察された（図17A~17D）。

【0177】

同様に、IFN γ で刺激された樹状細胞に由来するエキソソーム（IFN γ -DC-Exo）の経鼻投与は、皮質ミエリンの産生を増加させる（図19A~19C）。インビボでミエリンを増加させ得るIFN γ -DC-Exoの能力を評価するために、IFN γ -DC-Exoをラットに経鼻投与し、かつインビボでミエリンを増加し得るそれらの能力を判定した。経鼻投与の3日後、脳を採集し、かつミエリンの増加をFluoroMyelin^{（商標）}染色によって運動皮質において観察した（図19A）。FluoroMyelin^{（商標）}染色は、コハク酸ナトリウム処理された（シャム）動物よりも、IFN γ -DC-Exo処理された動物において有意に（ $p < 0.001$ ）高かった（図19B）。ウェスタンブロット解析により、シャムと比較して、IFN γ -DC-Exoで処理された動物の皮質におけるMBPレベルの有意な（ $p = 0.019$ ）増加が同様に示された（図19C）。

20

【0178】

エキソソーム処理のさらなる効果は、海馬に基づく記憶の試験で実証され得る。視覚認識課題を用いて、海馬に基づく記憶の変化を評価する。この課題はストレスがかからず、かつ海馬依存的記憶をしっかりと試験する（Gobbo & O'Mara, 2004）。新規な物体対慣れ親しんだ物体の認識を、海馬依存的記憶の測定として用いる。視覚認識課題は4つの段階：慣れ、訓練、保持、および試験からなる。正常な物体認識記憶を有するラットは、慣れ親しんだ物体に対して、新規な物体についての探究の増加を示すと考えられる。記憶試験は、試験段階の最初の5分間の間の、両方の物体を探索するのに費やされた合計時間についてのパーセンテージとして、新規な物体を探索するのに費やされた時間の量として定量化される。

30

【0179】

ラットは、老化/認知研究のための最適な種である（Gallagher, et al., 2011）。本発明者らは、他の系統と比較して、EE関連の老化研究に役立つ、そのより多くの歩行行動が理由でWistar系統を用いた。

40

【0180】

ホール動物への投与後のOSに対するエキソソーム効果を、タンパク質カルボニルレベルについてのOxyBlot^{（商標）}測定により判定してよい。本発明者らは、採集および実験的変数の測定前に、短時間麻酔されたラットに7日間毎日エキソソームを送達する予定である。タンパク質がOSのエキソソーム誘導性低下に寄与するかどうかを判定するために、本発明者らは、（a）薄片培養物をIFN γ に3日間曝露し、培地からエキソソームを採集し、かつ質量分析計解析と連動したインビトロ翻訳アッセイを用いてよい（Valadi, et al., 2007）。本発明者らは、また、（b）前述のスクリーニングから関心対象のタンパク質/ペ

50

プチドを選択し、かつそれらが、OSを低下させかつミエリンを増加させる（すなわち、MBP、および電子顕微鏡法によって測定される肥厚した（thicked）ミエリン）、IFN γ /OS刺激神経エキソソームの適用を模倣し得るかどうかを判定するために、それらを薄片培養物に添加する。

【0181】

群は、（a）対照薄片；（b）刺激されたエキソソームに曝露された薄片；（c）UV光曝露によりRNAを枯渇した刺激されたエキソソームに曝露された薄片；および（d）未刺激のエキソソームに曝露された薄片、である。

【0182】

本発明者らは、UV光を用いて、シャム対照としてエキソソームRNAを不活性化する。この手順は、免疫細胞におけるOS抵抗性の細胞移行を効果的に除去し（Eldh, et al., 2010）、エキソソームによる有効なOS防御が、タンパク質ではなくmRNAまたはmiRNAを伴うことを示唆している。

【0183】

実施例6：酸化ストレスおよび脱髄のエキソソーム介在性の緩和

IFN γ は、生理的な条件性ホルメシス（Kraig, et al., 2010）と一致した、有害および有益な脳効果を有する。IFN γ は、多発性硬化症のモデルであるEAEによる脱髄を悪化させる。それにもかかわらず、疾病の発症前の低レベルのIFN γ は脱髄を防御し、効果は、オリゴデンドロサイトの酸化ストレス応答を伴う（OSR；Lin, et al., 2008）。また、拡張性抑制（SD）は、ラット海馬薄片培養物におけるMBPの一時的な（7日間ではなく、1および3日間の）下降を誘発し（Kunkler, et al., 2006）、かつ脱髄は、インビボでのSD感受性を増加させる（Merkler, et al., 2009）。

【0184】

海馬薄片培養物中にはT細胞が存在し、かつSDはそれらのIFN γ の産生を増加させるため（Pusic, et al., 2010）、本発明者らは、T細胞およびIFN γ がSD感受性にどのように影響を及ぼすかを検討した（Pusic, et al., 2011）。結果は、n = 3~6/群、およびシャムに対してなされた比較に基づいた。

【0185】

PCRアレイは、SDによるTh1効果の増強を表す、オステオポンチンの3.61倍の増加およびIL-10の2.22倍の減少を示した。Th1サイトカインのIFN γ （500U/mL）への曝露は、1日目にSDに対する感受性の有意な増加を誘発したが、重要なことには、3日目には感受性の有意な低下を誘発した。抗CD4によるT細胞の枯渇によるまたは中和性抗IFN γ 抗体によるIFN γ の除去は、SDに対する感受性の変更を阻止し、かつそうでなければEMによって示される髄鞘の断裂を誘発するSD誘導性脱髄を阻止した。インビボでの新皮質SDは、1日後にMBPの同様の低下を誘発した。

【0186】

最後に、IFN γ （500U/mL）での3日間の処理は、SDの数時間後に見られるもののような脳興奮性を増加させる生理学的手段である（Grinberg, et al., 2011）、化学的長期増強（cLTP）により産出される反応性酸素種を有意に低下させた。低レベルのIFN γ のこの有益な効果は、海馬学習とともに生じる富化（Kraig, et al., 2010）が、海馬のT細胞、IFN γ 、およびMBPの有意な上昇を誘発したというマウスからの結果によって支持される。

【0187】

これらの結果は、SDがT細胞を急激に活性化しかつ脳の酸化耐性を圧倒し得、SDに対する感受性の増加および脱髄をもたらすことを示している。これらの効果は、経時的に延長されるTh1偏向応答（すなわち、低レベルのIFN γ 産生）を好む免疫パラメーターをモジュレートする富化により阻止され得る。本発明者らの努力は、T細胞のこれらの二重効果に関連する神経免疫シグナル伝達を解明すること、ならびに再発性片頭痛およびその慢性片頭痛への推移を阻止する新規な治療法を開発するための手段としての活性依存的ストレス応答にそれらがどのように関係するのかを解明することに向けられている。

【0188】

10

20

30

40

50

実施例7：拡張性抑制（片頭痛）のエキソソーム介在性の緩和

T細胞により分泌されるインターフェロンガンマ（IFN- γ ）の、酸化ストレス（OS）および多発性硬化症における脱髄に対する有害な影響は十分に認識されている。しかしながら、疾病発症前の低レベルのIFN- γ は、EEによってもたらされるもののよう、脱髄を防御しかつOSを低下させることも知られている。SDはIFN- γ を上昇させ、かつSD閾値（SDT）は脱髄の実験モデルにおいて減少しており、SDにおけるT細胞の関与を示唆している。本発明者らは、ラット海馬薄片培養物内にT細胞を見出したため、本発明者らは、この調製物を利用して、拡張性抑制閾値、OS、およびMBPレベルに対するIFN- γ のT細胞介在性効果を探索した。SDは、7日間で徐々に回復するMBPの有意な喪失、SDTの有意な初期減少、およびOSの有意な増加を誘発した。MBP喪失は、T細胞枯渇、IFN- γ の中和、および中性スフィンゴミエリナーゼ-2の遮断によって無効になった。重要なことには、IFN- γ を薄片上にパルスして、EEの段階的变化（例えば、活動 - 休止）を模擬した場合、有意であるが逆の効果がみられ、対照を上回ってSDTは増加し、OSは低下し、かつMBPは上昇した。ストレスを受けた免疫細胞によって分泌されるエキソソームはOSに対する防御を与え得るように、本発明者らは、次に、これらの栄養的效果におけるエキソソームの関与を調べた。結果は、IFN- γ で刺激された薄片培養物に由来するエキソソームが、段階的な低レベルのIFN- γ での処理の効果を模擬することを裏付けた。最後に、内因性スフィンゴミエリナーゼ阻害剤であるグルタチオンは、ミクログリアにおいて有意に増加しており、ミエリンを増加させることにおけるそれらの関与を示唆した。これらの結果は、SDの予防のための、および延長として片頭痛の予防のための、新規な治療標的としてのIFN- γ のパルス適用を支持する。

【0189】

EEは、段階的に増強された学習および記憶による神経活動の生理学的増加とともに生じ、かつ脱髄性疾病を含めた神経変性疾患からの後続の損傷を縮小させた。EEは、脳におけるT細胞トラフィッキング（Ziv, et al., 2006）、IFN- γ の発現（Pusic, et al., 2010）を促進し、ミエリンの産生を増加させ（Zhao, et al., 2012）、かつOSを低下させる（Radak, et al., 2008）。重要なことには、神経活動の増強は、スフィンゴミエリナーゼを遮断することによって脱髄を阻害するグルタチオン（Liu et al., 1998）を含めた、抗オキシダントの産生の上昇につながり（Papadia, et al., 2008）、かつ抗オキシダントは、ミエリン遺伝子発現を刺激する（Podratz, et al., 2004）。

【0190】

T細胞が存在しかつ組織はSD後にIFN- γ の増大を示すため（Kunkler, et al., 2004）、本発明者らは、成熟海馬薄片培養物を用いて、脳内ミエリンに対するIFN- γ /OS - 抗オキシダント相互作用の潜在的な栄養的效果のさらなる証拠を探索した。SDは、片頭痛前兆のおよびおそらくは片頭痛の原因である可能性が最も高いと考えられている、脳の良性混乱である（Moskowitz, et al., 1993; Lauritzen & Kraig, 2005）。再発した場合、SDは、発作性から高頻度なかつ慢性の片頭痛への変換における役割も果たし得る（Kraig et al., 2010）。さらに、SDは、脱髄に寄与し得るOSを増加させ（Grinberg et al., 2012）、一方で実験的脱髄はSDを促進する（Merkler et al., 2009）。

【0191】

本発明者らの結果は、SDが髄鞘を分断させ、かつ7日後には解消される有意ではあるが一時的なMBPの喪失を引き起こしたことを示している。遺伝子発現解析のための定量的リアルタイムPCRアッセイにより、mRNA変化はT細胞の存在と一致することが明らかになり、示唆は、該細胞に対する免疫染色およびそれらのIFN- γ の産生によって裏付けられた。薄片へのIFN- γ の連続適用は、SD閾値（SDT）の有意な急激な低下を誘発し、OSを増加させ、かつMBPを低下させた。T細胞/IFN- γ の除去および中性スフィンゴミエリナーゼ-2の薬理的遮断は、これらの変化を無効にした。対照的に、EEを模倣するために、単回の12時間パルスとして適用されたまたは段階的に適用されたIFN- γ は、逆の有意な効果をもたらし、MBPは増加し、SDTは増加し、かつOSは低下した。これらの効果は、IFN- γ 刺激薄片培養培地から回収されたエキソソームの適用によっても得られ、かつミクログリアに局在する

グルタチオンのIFN- 誘導性産生によって惹起される適応変化を伴った（図10）。

【0192】

SDは、以前に記載されているように（Pusic et al., 2011 ; Grinberg et al., 2011 ; Grinberg et al., 2012）、静的な界面記録立体構造（interface recording configuration）で誘導された。すべての記録は、150mMの塩化ナトリウムを充填した2~4μmの先端径のマイクロピペットを用いて、CA3間質錐体ニューロン膝部エリアで行われた。第一に、薄片の電気生理学的挙動の常態を、双極性の歯状回電気刺激（0.2Hzで100μsパルス、および5~20μA）に対する間質の電場電位応答をモニタリングすることによって確認した。3mVのCA3電場シナプス後応答を有する薄片を実験に用いた。第二に、単回刺激からの半最大の電場電位応答を誘発するのに必要とされる量から始まる適用電流（10パルス、10 Hz（100μs/パルス））の量を次第に倍増させることによって、SD閾値を決定した。SD閾値に対する適用電流を、1~3分間に1回ほどの速さで適用し、それらは10~10,000nCに及んだ。

10

【0193】

刺激された免疫細胞は、レシピエント細胞においてOSを低下させ得るエキソソームを放出するため（Eldh et al., 2010）、本発明者らは、IFN- 曝露の栄養的效果を産出することにおけるエキソソームの関与を探究した。薄片培養物をIFN- に12時間曝露し、3日後に培地からエキソソームを採集した。彼らは、IFN- で刺激された培養物の培地からのエキソソームの産生および回収を確認し、次いで、これらのエキソソームをナイーブ培養物に適用し、かつ拡張性抑制閾値を評価した（図10）。エキソソームは、拡張性抑制閾値の有意な（ $p < 0.01$ ）増大（（ $n = 8$ /群）；対照： 1.00 ± 0.37 ；エキソソーム： 279 ± 94 ）、ならびにOSの有意な（ $p < 0.001$ ）減少（メナジオン刺激後にCellROX（商標）を用いて測定される；対照： 1.00 ± 0.03 （ $n = 6$ ）；エキソソーム： 0.72 ± 0.02 （ $n = 11$ ））を誘発した。

20

【0194】

パルスIFN への曝露またはIFN で刺激された培養物に由来するエキソソームへの曝露は、両方ともにOSを低下させた。抗オキシダントのグルタチオンは、脱髄に関係している中性スフィンゴミエリナーゼ-2の天然に存在する阻害剤であるため（Liu et al., 1998）、本発明者らは、Thiol Tracker（商標）を用いてグルタチオンの変化を測定した（図11A~図11E）。連続的な急激なIFN 曝露は、相対的グルタチオン含量の有意な低下を誘発し、一方でIFN へのパルス曝露またはIFN 刺激薄片培養物エキソソームへの曝露は、7日目にグルタチオン含量の有意な増大を誘発した。具体的な値は、対照： 1.00 ± 0.08 （ $n = 21$ ）；急激なIFN： 0.66 ± 0.07 （ $n = 9$ ）；IFN： 1.40 ± 0.06 （ $n = 5$ ）；エキソソーム： 1.82 ± 0.09 （ $n = 6$ ）であった。ミクログリアに対する細胞化学的染色および共焦点イメージングは、グルタチオンを含有する優勢細胞タイプとしてミクログリアを確認した（図11F）。ゆえに、T細胞/IFN 刺激エキソソームは、高頻度なまたは慢性の片頭痛に対する新規な治療法である。

30

【0195】

実施例8：外傷性脳損傷のエキソソーム介在性の治療

脳への外傷性損傷は、脳のミエリン産生細胞であるオリゴデンドロサイトの喪失、脱髄、および損傷した脳エリアが適切に髄鞘再生し得ないという不全に関連している（Flygt, et al., 2013）。しかしながら、新たな証拠によれば、損傷した脳は、適切に刺激された場合に髄鞘再生し得ることが表されている（Powers, et al., 2013）。

40

【0196】

本発明者らによる実験研究によれば、エキソソームは、外傷性脳損傷からの回復のための新規な治療法であり得ることが表されている。この結論は、以下の事実に従う。拡張性抑制（SD）は、外傷性脳損傷からの臨床転帰を悪化させ（Hartings, et al., 2011）、かつ本発明者らは、エキソソームがSDを有意に阻止し得ることを示した。

【0197】

例えば、環境富化（EE）に4~8週間曝露されたラットの血清に由来するエキソソームは

50

、海馬薄片培養物への3日間の適用後に、SDに対する感受性を低下させるエキソソームを産生する。EE-エキソソーム適用は、対照と比較して、SD感受性を有意に ($p = 0.006$) 低下させ、EE-Exo処理培養物： 304 ± 88 対 対照： 1.00 ± 0.35 ($n = 6/\text{群}$) という具体的な値を有した。

【0198】

加えて、IFN 刺激樹状細胞エキソソームの薄片培養物への3日間の適用も、対照と比較して、拡張性抑制感受性の有意な ($p < 0.001$) 低下をもたらした。具体的な値は、IFN - 樹状細胞エキソソーム処理薄片： 12.5 ± 1.52 対 対照： 1.00 ± 0.45 ($n = 8/\text{群}$) であった。

【0199】

実施例9：新生児脳損傷のエキソソーム介在性の治療

新生児脳損傷は、低髄鞘形成に関連した、オリゴデンドロサイトへの損傷を一般的にもたらす (Kauer & Ling EA, 2009)。環境富化された動物の血清に由来するエキソソーム、ならびにインビトロでIFN 刺激樹状細胞に由来するエキソソームは、オリゴデンドロサイト分化および関連したミエリン産生を促進するため、本発明者らは、新生児虚血性脳損傷に対するこれらの潜在的な治療用作用物質の影響を判定した。

【0200】

海馬薄片培養物を開発することにおいて実験を実施した。インビトロで4日後に培養物を無血清培地に移すという点を除いて、P9~P10の仔ラットを用いて、以前に記載されているように (Mitchell, et al., 2010)、薄片培養物を調製した。これは、そうでなければ初期培地の構成要素である、ウマ血清由来エキソソームの任意の混乱効果を阻止するために行われた。

【0201】

同時に、培養物を酸素 - グルコース欠如 (OGD; Markus, et al., 2009) に曝露して、新生児虚血性脳損傷のモデルを作った。

【0202】

OGD後に、培養物を、インビトロで成長させたIFN 刺激樹状細胞に由来するエキソソームで処理し、次いでインビトロで21日間まで成熟させた (すなわち、P31ラットと一致する)。次いで、ウェスタンブロットによるミエリン塩基性タンパク質 (MBP) の測定のために、培養物を採集した。

【0203】

エキソソーム処理は、OGD曝露後のMBPレベルの有意な ($p = 0.002$) 改善をもたらした。具体的な値は、対照： 1.00 ± 0.20 ; OGD処理培養物： 0.40 ± 0.03 ; およびOGD + IFN 刺激樹状細胞エキソソーム： 1.37 ± 0.17 ($n = 6/\text{群}$) であった。

【0204】

本明細書において開示されかつ主張される方法のすべては、本開示に照らして、過度の実験をすることなく、行われかつ実行され得る。本発明の組成物および方法は、好ましい態様の観点から記載されているが、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱することなく、本明細書において記載される方法に、および工程において、または方法の工程の配列において変化形が適用され得ることは、当業者に明白であろう。より具体的には、化学的にも生理学的にも両方に関連しているある特定の作用物質は、本明細書において記載される作用物質に代用され得る一方で、同じまたは同様の結果が達成されるであろうことは明白であろう。当業者にとって明白なすべてのそのような同様の代用物および改変は、添付の特許請求の範囲によって規定される、本発明の精神、範囲、および概念の範囲内にあると見なされる。

【0205】

参考文献

以下の参考文献は、それらが例示的な手順または本明細書において記述されるそうしたものに対する補足的な他の詳細を提供する程度まで、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

10

20

30

40

50

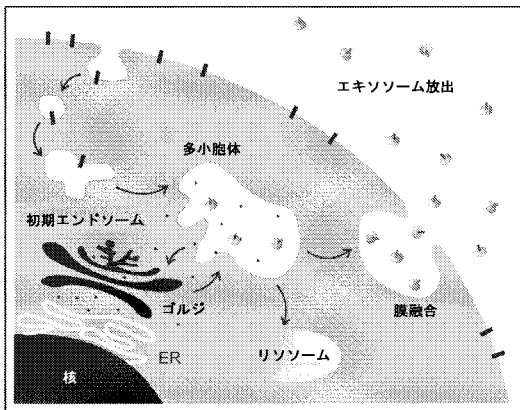
- Ahlskog, *et al.*, *May Clin Proc.* 86:876-884, 2011.
- Alam and Cook, 1990
- Birgbauer, *et al.*, *J Neurosci Res*, 2004.
- Bobrie, *et al.*, *Traffic* 12:1665-1668, 2011.
- Costa *et al.*, 2001.
- Dubey *et al.*, 2003.
- Eldh *et al.* *PLoS ONE* 5(12): e15353, 2010.
- Fancy *et al.*, *Nature Neuroscience* 14,1009–1016, 2011.
- Flygt, *et al.*, *Eur J Neurosci*, 2013. 10
- Gallagher *et al.*, *ILAR J* 8:52:32-40, 2011.
- Gobbo & O'Mara, *Behav Brain Res* 152:231–241, 2004.
- Grinberg *et al.*, *PLoS One* 6:e19294, 2011.
- Grinberg *et al.*, *J Neurochem* 122:221-229, 2012.
- Grinberg *et al.*, *PLoS ONE*, 2011.
- Grinberg, *et al.* *J Neurochem.* 122:221-9, 2012.
- Hartings, *et al.*, *Brain*, 2011.
- Johnson *et al.*, *Experimental Neurology*, 246:35–43, 2013.
- Johnstone, *et al.*, *J Biol Chem.* 262:9412-9420, 1987. 20
- Kauer & Ling, *Prog Neurobiol*, 2009.
- Koehne *et al.* (2003).
- Kraig *et al.*, *Dose Response* 8:389–413, 2010.
- Kumar, 2005.
- Kundra *et al.*, 2002.
- Kundra *et al.*, 2005.
- Kunkler *et al.*, *Soc Neurosci* 32:Prog#87.5, 2004.
- Kunkler *et al.*, *Soc Neurosci*, 2006.
- Lauritzen & Kraig, *Metab Brain Dis* 7:157-164, 2005. 30
- Lee, *et al.*, *Semin Immunopathol* 33:455-467, 2011.
- Lin *et al.*, *Am J Pathol*, 2008.
- Linchey and Fridovich, 1997.
- Liu *et al.*, *J Biol Chem* 273:11313–20, 1998.
- Markus *et al.*, *J Cereb Blood Flow & Met*, 29(1):73-86, 2009.
- Merkler *et al.*, *Ann Neurol* 66:355–365, 2009.
- Mitchell, *et al.*, *JoVE*, 43:2010.
- Mitchell, *et al.*, *J Neurochem.* 117:187-196, 2011.
- Moskowitz *et al.*, *J Neurosci.* 13:1167-1177, 1993. 40
- Obiang, *et al.* *Neurobiol Learn Mem.* 96:121-129, 2011.
- Papadia *et al.*, *Nat Neurosci* 11:476–487, 2008.

- Podratz *et al.*, *Glia*. 45:54–58, 2004.
 Powers, *et al.*, *PNAS*, 110(11):4075-80, 2013.
 Pusic, *et al.*, *Soc Neurosci*. 36: Prog #346.2, 2010.
 Pusic, *et al.*, *J Vis Exp*. 52, 2011.
 Pusic, *et al.*, *J Vis Exp*. doi: 10.3791/2910, 2011.
 Radak *et al.*, *Free Radic Biol Med*. 44:153–159, 2008.
 Raposo, *et al.*, *J Exp Med* 183:1161-1172, 1996.
 Ruckh, *et al.*, *Cell Stem Cell*, 10(1):96-103, 2012.
 Sanchez, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*. 106:9848-9853, 2009.
 Schorey & Bhatnagar, *Traffic*. 9:871-881, 2008.
 Skog, *et al.*, *Nat Cell Biol*. 10:1470-1476, 2008.
 Sohal & Weindruch, *Science*. 5:59-63, 1996.
 Suresh *et al.*, 1993.
 Valadi, *et al.*, *Nat Cell Biol*. 9:654-659, 2007.
 Wheeler *et al.*, 2001.
 WO99/03499
 WO00/44389
 WO01/82958
 Zhao, *et al.*, *Anat Rec*, 6:999-1005, 2012.
 Zhuang, *et al.*, *Mol Ther*. 19(10):1769-79, 2011.
 Ziv, *et al.*, *Nat Neurosci* 9:268–275, 2006.

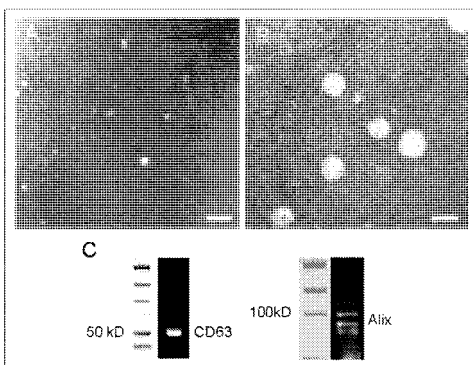
10

20

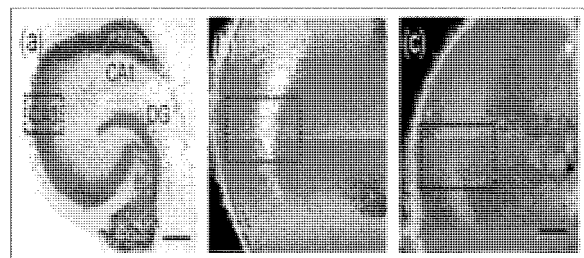
【図 1】



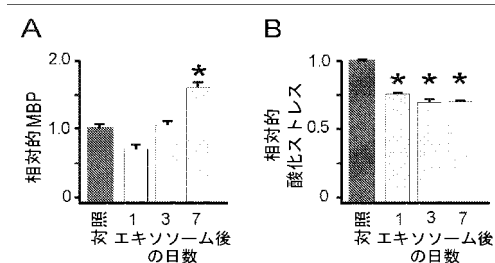
【図 2】



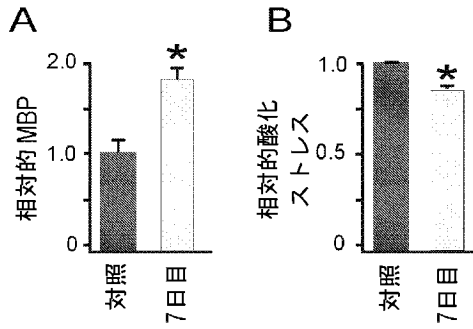
【図 3】



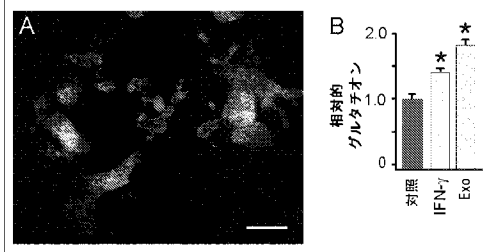
【図 4】



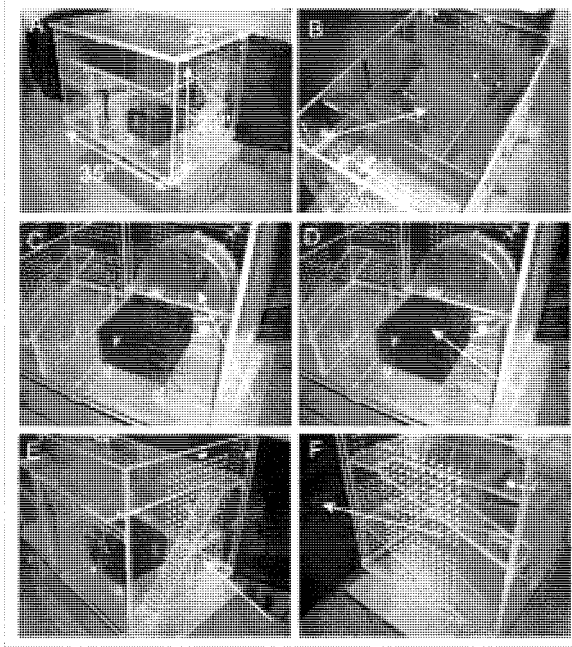
【図5】



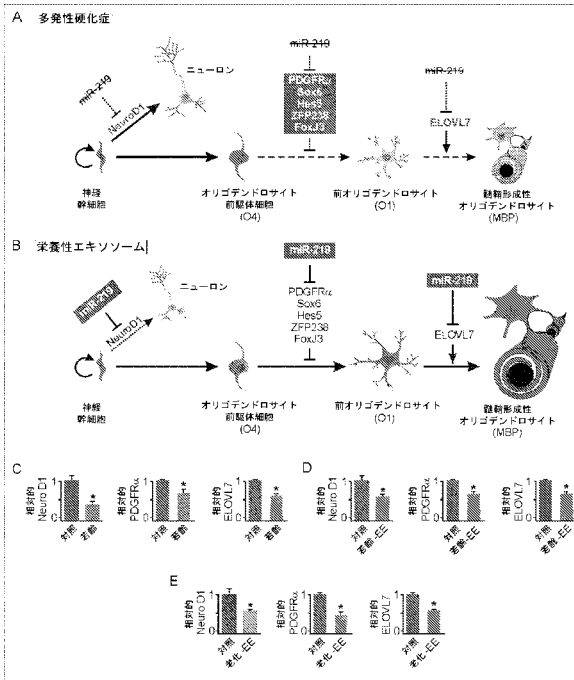
【図6】



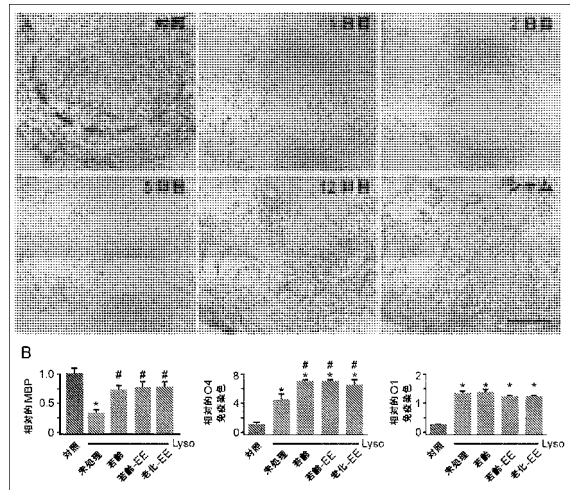
【図7】



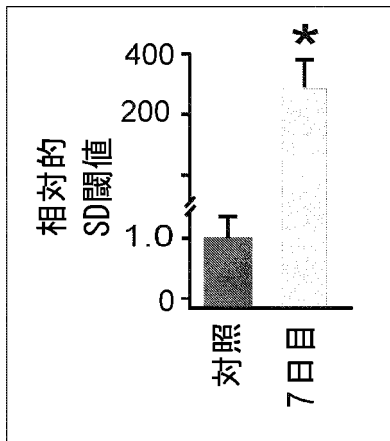
【図8】



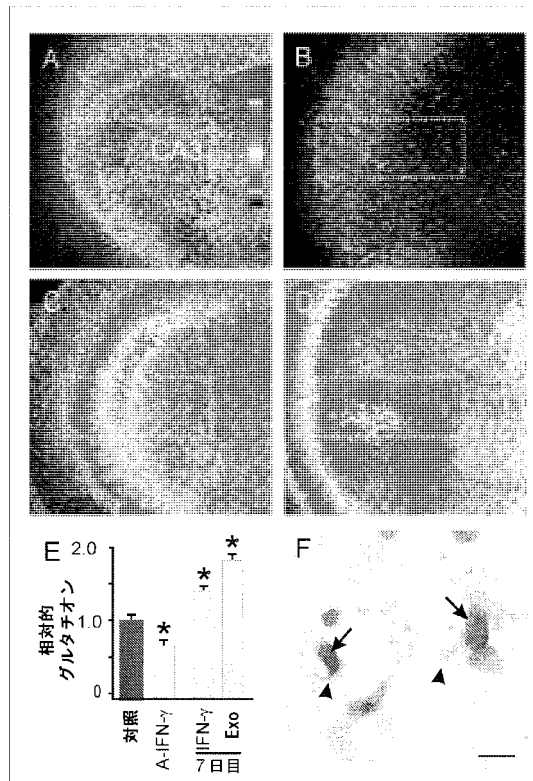
【図9】



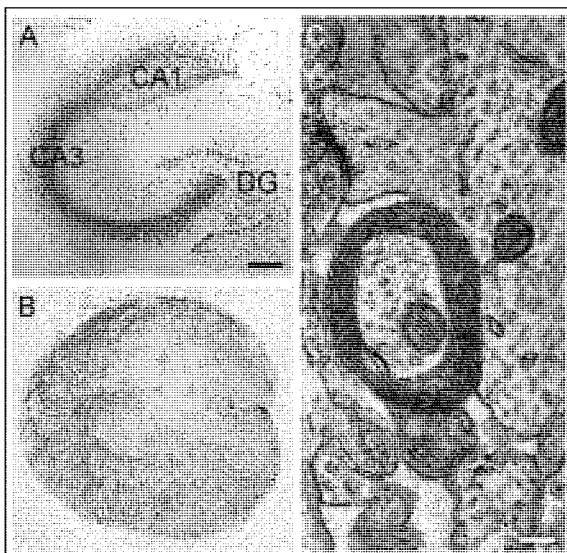
【図 10】



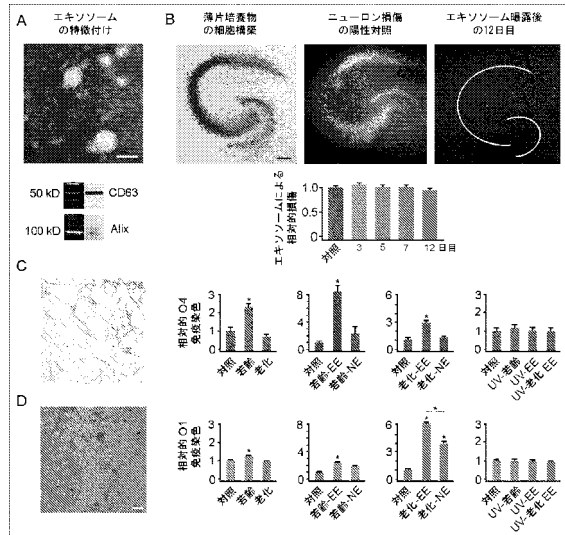
【図 11】



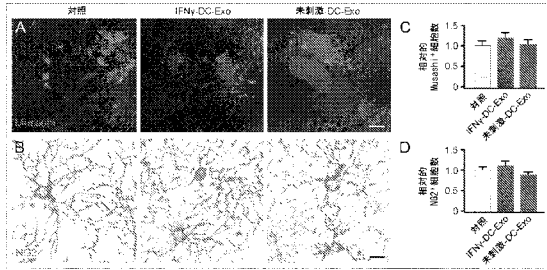
【図 12】



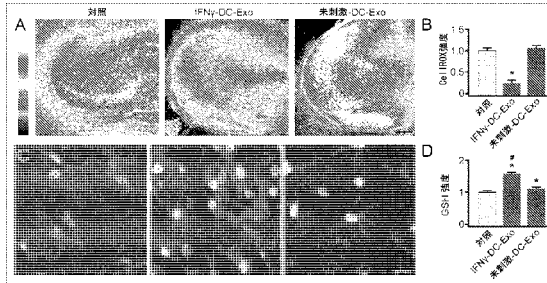
【図 13】



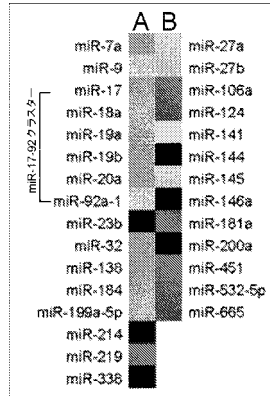
【図 2 2】



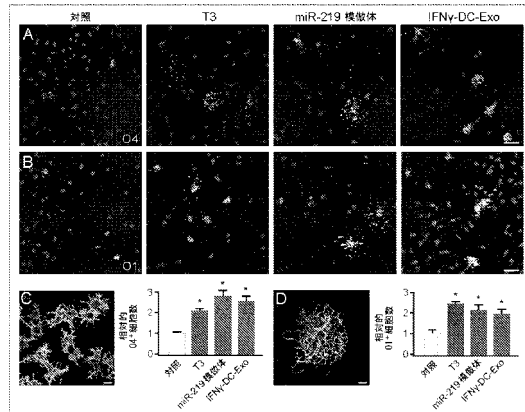
【図 2 3】



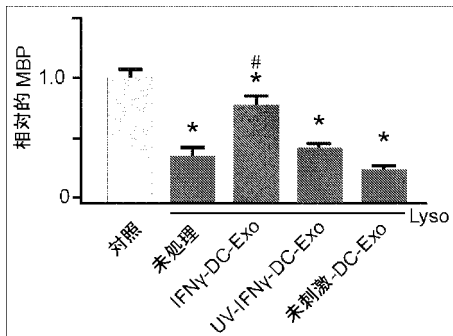
【図 2 4】



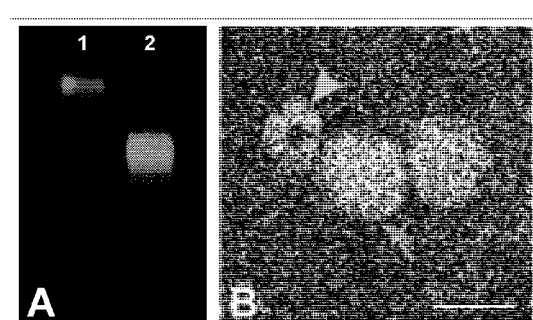
【図 2 5】



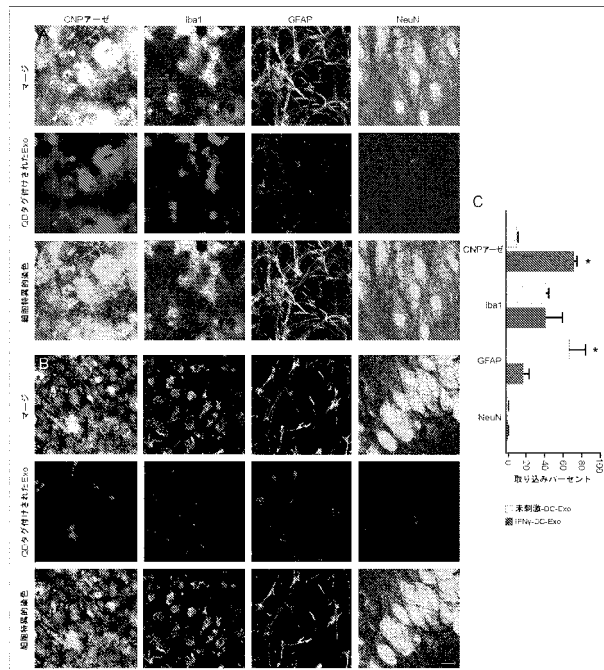
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/55187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12N 15/88; A61K 9/127 (2013.01)

USPC - 435/458, 455, 440, 450, 424/400; 514/44R, 43, 42, 23, 1.1, 1

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)

IPC(8): C12N 15/88; A61K 9/127 (2013.01)

USPC: 435/458, 455, 440; 424/450, 400; 514/44R

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

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

MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google Scholar/Google Patents; PubMed; Search terms - demyelinating disorder*, Exosome*, Microvesicle*, Oxidative stress, cognitive decline, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, stroke, epilepsy, migraine, multiple sclerosis, neuropathy

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2011/0003008 A1 (LIM, SK) January 6, 2011; paragraphs [0008], [0011], [0022], [0023], [0026], [0029], [0030], [0070], [0096], [0126], [0197]	1, 2, 4, 6, 7, 9, 17 ----- 3, 5, 8, 10-16, 18-30, 35-37
X — Y	US 2010/0151480 A1 (TAYLOR, DD et al.) June 17, 2010; abstract; paragraph [0019]; Tables 1, 2	31-33 ----- 16, 34-37
Y	LIN, W. et al. Enhanced Integrated Stress Response Promotes Myelinating Oligodendrocyte Survival In Response To Interferon-gamma. The American Journal of Pathology. 2008, Vol. 173, pages 1508-1517; abstract; page 1509; column 1; paragraph 2.	3, 8, 10, 21, 23, 24, 28/21, 28/23, 28/24, 29/28/21, 29/28/23, 29/28/24, 30/29/21, 30/29/23, 30/29/24
Y	MONTECALVO, A et al. Mechanism Of Transfer Of Functional microRNAs Between Mouse Dendritic Cells Via Exosomes. Blood. 2012, Vol. 119, pages 756-766; abstract; page 756, column 1, paragraph 1; page 764, column 1, paragraph 2.	5
Y	EIJNDEN, SV et al. Preferential Production Of The IL-12(p40)/IL-23(p19) Heterodimer By Dendritic Cells From Human Newborns. Cellular Immune Response. 2006, Vol. 36, pages 21-26; abstract.	11-13, 25-27, 28/25, 28/26, 28/27, 29/28/25, 29/28/26, 29/28/27, 30/28/25, 30/29/26, 30/28/27
Y	ALVAREZ-ERVITI, L et al. Delivery Of siRNA To The Mouse Brain By Systemic Injection Of Targeted Exosomes. Nature Biotechnology. 2011, Vol. 29, pages 341-345; abstract.	14, 15

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

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 December 2013 (11.12.2013)

Date of mailing of the international search report

16 DEC 2013

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/55187

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FRUHBEIS, C et al. Emerging Roles Of Exosomes In Neuron-Glia Communication. <i>Frontiers in Physiology</i> . 2012, Vol. 3, pages 1-5; abstract.	18-30
Y	WO 2010/056337 A2 (KUSLICH, C et al.) May 20, 2010; abstract; paragraph [00217]	34, 36/34, 37/36/34

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/06 (2006.01)		A 6 1 P 25/06		
A 6 1 P 25/00 (2006.01)		A 6 1 P 25/00		
A 6 1 P 25/02 (2006.01)		A 6 1 P 25/02		
A 6 1 K 35/17 (2015.01)		A 6 1 K 35/17	A	
A 6 1 K 35/30 (2015.01)		A 6 1 K 35/30		
A 6 1 K 35/35 (2015.01)		A 6 1 K 35/35		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 2 1	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)		A 6 1 K 31/713		
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ブシッチ ケー エム .
アメリカ合衆国 イリノイ州 シカゴ サウス エリス アベニュー 5 8 0 1 ザ ユニバーシ
ティ オブ シカゴ内

(72)発明者 グリンベルク エレーナ ワイ .
アメリカ合衆国 イリノイ州 シカゴ サウス エリス アベニュー 5 8 0 1 ザ ユニバーシ
ティ オブ シカゴ内

(72)発明者 クレイグ リチャード ピー .
アメリカ合衆国 イリノイ州 シカゴ サウス エリス アベニュー 5 8 0 1 ザ ユニバーシ
ティ オブ シカゴ内

(72)発明者 ブシッチ アヤ ディー .
アメリカ合衆国 イリノイ州 シカゴ サウス エリス アベニュー 5 8 0 1 ザ ユニバーシ
ティ オブ シカゴ内

F ターム(参考) 4C084 AA19 MA13 MA17 MA24 MA59 MA66 ZA021 ZA061 ZA081 ZA161
ZA201 ZA361 ZC751
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA13 MA17 MA24 MA59

	MA66	NA05	NA14	ZA02	ZA06	ZA08	ZA16	ZA20	ZA36	ZC75
4C087	AA01	AA02	BB43	BB45	BB63	CA04	MA13	MA17	MA24	MA59
	MA66	NA05	NA14	ZA02	ZA06	ZA08	ZA16	ZA20	ZA36	ZC75