(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年12月5日(05.12.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/247651 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 35/32 (2015.01) *A61P 43/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/017330

(22) 国際出願日： 2024年5月10日(10.05.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-086930 2023年5月26日(26.05.2023) JP

(71) 出願人: 株式会社Ｕ－Ｆａｃｔｏｒ(**U-FACTOR CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒1020085 東京都千代田区六番町７－１１ ＥＳＣＡＬＩＥＲ六番町 １Ｆ Tokyo (JP).

(72) 発明者: 舒 宇静(**SHU, Yujing**); 〒1020085 東京都千代田区六番町７－１１ ＥＳＣＡＬＩＥＲ六番町 １Ｆ 株式会社Ｕ－Ｆａｃｔｏｒ内 Tokyo (JP). 堀 圭吾(**HORI, Keigo**); 〒1020085 東京都千代田区六番町７－１１ ＥＳＣＡＬＩＥＲ六番町 １Ｆ 株式会社Ｕ－Ｆａｃｔｏｒ内 Tokyo (JP). ▲瀬▼田 康弘(**SETA, Yasuhiro**); 〒1020085 東京都千代田区六番町７－１１ ＥＳＣＡＬＩＥＲ六番町 １Ｆ 株式会社Ｕ－Ｆａｃｔｏｒ内 Tokyo (JP). 大竹 賢人(**OTAKE, Masato**); 〒1020085 東京都千代田区六番町７－１１ ＥＳＣＡＬＩＥＲ六番町 １Ｆ 株式会社Ｕ－Ｆａｃｔｏｒ内 Tokyo (JP). 寺村 裕治(**TERAMURA, Yuji**); 〒3058560 茨城県つくば市梅園１－１－１ 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 大庭 義郎(**OBA, Yoshio**); 〒3058560 茨城県つくば市梅園１－１－１ 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 倉持 明子(**KURAMOCHI, Akiko**); 〒3058560 茨城県つくば市梅園１－１－１ 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 奥山 尚一, 外(**OKUYAMA, Shoichi** et al.); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目１７番７号 赤坂溜池タワー１１階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）

WO 2024/247651 A1

(54) **Title:** CELL ACTIVATOR

(54) 発明の名称： 細胞賦活化剤

(57) **Abstract:** This cell activator comprises a fraction isolated from a culture supernatant of dental pulp stem cells of milk teeth, wherein the fraction does not contain a component of less than 3.5 kDa.

(57) 要約：乳歯歯髄幹細胞の培養上清から単離された分画を含んでなる細胞賦活化剤であって、前記分画が３．５ｋＤａ未満の成分を含まない、細胞賦活化剤。

明　細　書

発明の名称 ： 細胞賦活化剤

技術分野

[0001]　本発明は、細胞賦活化剤に関する。

背景技術

[0002]　間葉系幹細胞（ＭＳＣ）の培養上清には、種々の成長因子やサイトカインが含まれることが知られており、現在、美容から再生医療まで幅広い分野において、その有用性が期待されている。ＭＳＣは、骨髄、歯髄、脂肪組織、臍帯などの様々な組織から容易に採取することができるが、とりわけ、乳歯から採取できるＭＳＣである乳歯歯髄幹細胞は、従来廃棄されてきた乳歯から容易に調製することができ、かつ、増殖能も高いことから、特に有用なＭＳＣとして有望視されている。

[0003]　これまでに、乳歯歯髄幹細胞の培養上清が、脳梗塞などの損傷組織の修復や、皮膚組織の保護に有用であることが報告されている（特許文献１、２）。しかし、培養上清中のどの成分が有効成分であるかは明らかではない。また、培養上清には、有効成分に対して阻害的に作用する成分も含まれ得るが、それについても明らかにされていない。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第２０１１／１１８７９５

特許文献2：国際公開第２０１４／１２６１７６

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005]　本発明は、乳歯歯髄幹細胞の培養上清を精製し、細胞賦活化効果に優れた組成物を提供することを目的としてなされたものである。

課題を解決するための手段

[0006]　本発明者らは、鋭意研究の結果、乳歯歯髄幹細胞の培養上清のうち、高い

細胞賦活活性を有する分画、および細胞賦活活性を阻害する分画を特定し、本発明を完成するに至った。

[0007] すなわち、本発明は、一実施形態によれば、乳歯歯髄幹細胞の培養上清から単離された分画を含んでなる細胞賦活化剤であって、前記分画が３．５ｋＤａ未満の成分を含まない、細胞賦活化剤を提供するものである。

[0008] また、本発明は、一実施形態によれば、乳歯歯髄幹細胞の培養上清から単離された分画の細胞賦活化剤としての使用であって、前記分画が３．５ｋＤａ未満の成分を含まない、使用を提供するものである。

[0009] 前記分画は、５０～１００ｋＤａの成分を含み、かつ、３０ｋＤａ未満の成分を含まないことが好ましい。

[0010] 前記分画は、１００ｋＤａ超の成分および／または３０～５０ｋＤａの成分を含まないことが好ましい。

[0011] 前記乳歯歯髄幹細胞は、初代培養細胞であってよい。

[0012] あるいは、前記乳歯歯髄幹細胞は、不死化細胞であってよい。

[0013] また、本発明は、一実施形態によれば、対象において細胞を賦活化するための方法であって、前記対象に上記の細胞賦活化剤を投与するステップを含む、方法を提供するものである。

発明の効果

[0014] 本発明に係る細胞賦活化剤は、乳歯歯髄幹細胞の培養上清から容易かつ安価に調製でき、かつ、細胞賦活活性を阻害する成分を含まないため、効果と安全性に優れており、有用である。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図１は、ＳＨＥＤ－ＣＭおよびその分画のポリアクリルアミドゲル電気泳動像である。

[図2]図２は、ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭおよびその分画のポリアクリルアミドゲル電気泳動像である。

[図3]図３は、濃縮倍率の異なるＳＨＥＤ－ＣＭ分画を添加して培養されたＮＩＨ３Ｔ３細胞の細胞内脱水素酵素活性を評価したＷＳＴアッセイの結果を

示すグラフである。

[図4]図４は、濃縮倍率の異なるＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭ分画を添加して培養されたＮＩＨ３Ｔ３細胞の細胞内脱水素酵素活性を評価したＷＳＴアッセイの結果を示すグラフである。

[図5]図５は、タンパク質濃度に基づいて調整されたＳＨＥＤ－ＣＭまたはその分画の希釈液を添加して培養されたＮＩＨ３Ｔ３細胞の細胞内脱水素酵素活性を評価したＷＳＴアッセイの結果を示すグラフである。

[図6]図６は、タンパク質濃度に基づいて調整されたＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭまたはその分画の希釈液を添加して培養されたＮＩＨ３Ｔ３細胞の細胞内脱水素酵素活性を評価したＷＳＴアッセイの結果を示すグラフである。

[図7]図７は、ＳＨＥＤ－ＣＭ由来の５０－１００ｋＤａ分画の、＞１００ｋＤａ分画または３０－５０ｋＤａ分画による希釈液を添加して培養されたＮＩＨ３Ｔ３細胞の細胞内脱水素酵素活性を評価したＷＳＴアッセイの結果を示すグラフである。

[図8]図８は、ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭ由来の５０－１００ｋＤａ分画の、＞１００ｋＤａ分画または３０－５０ｋＤａ分画による希釈液を添加して培養されたＮＩＨ３Ｔ３細胞の細胞内脱水素酵素活性を評価したＷＳＴアッセイの結果を示すグラフである。

[図9]図９は、ＳＨＥＤ－ＣＭ／ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭまたはその分画を添加して培養されたＮＩＨ３Ｔ３細胞におけるＭＡＰＫの発現量およびリン酸化を比較したウェスタンブロット解析の結果を示す図である。

[図10]図１０は、ＳＨＥＤ－ＣＭ／ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭまたはその分画を添加して培養されたＮＩＨ３Ｔ３細胞におけるＡｋｔの発現量およびリン酸化を比較したウェスタンブロット解析の結果を示す図である。

[図11]図１１は、同じタンパク質濃度のＳＨＥＤ－ＣＭ／ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭまたはその分画を添加して培養されたＮＩＨ３Ｔ３細胞におけるＭＡＰＫの発現量およびリン酸化を比較したウェスタンブロット解析の結果を示す図である。

[図12]図１２は、同じタンパク質濃度のＳＨＥＤ－ＣＭ／ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭまたはその分画を添加して培養されたＮＩＨ３Ｔ３細胞におけるＡｋｔの発現量およびリン酸化を比較したウェスタンブロット解析の結果を示す図である。

[図13]図１３は、ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭまたはその分画を添加して培養されたＮＩＨ３Ｔ３細胞についてのスクラッチアッセイの結果を示す図である。

[図14]図１４は、ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭまたはその＞３．５ｋＤａ分画を添加して培養されたＮＩＨ３Ｔ３細胞の細胞内脱水素酵素活性を評価したＷＳＴアッセイの結果を示すグラフである。

[図15]図１５は、ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭまたはその＞３．５ｋＤａ分画を添加して培養されたＮＩＨ３Ｔ３細胞についてのスクラッチアッセイの結果を示す図である。

[図16]図１６は、タンパク質濃度に基づいて調整されたＳＨＥＤ－ＣＭまたはその５０－１００ｋＤａ分画の希釈液を添加して培養されたＨＵＶＥＣの細胞内脱水素酵素活性を評価したＷＳＴアッセイの結果を示すグラフである。

[図17]図１７は、タンパク質濃度に基づいて調整されたＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭまたはその５０－１００ｋＤａ分画の希釈液を添加して培養されたＨＵＶＥＣの細胞内脱水素酵素活性を評価したＷＳＴアッセイの結果を示すグラフである。

[図18]図１８は、ＳＨＥＤ－ＣＭの５０－１００ｋＤａ分画、または＞１００ｋＤａ、５０－１００ｋＤａおよび３０－５０ｋＤａ分画の混合物を添加して培養されたＨＵＶＥＣの細胞内脱水素酵素活性を示すグラフである。

[図19]図１９は、ＳＨＥＤ－ＣＭの５０－１００ｋＤａ分画、または５０－１００ｋＤａおよび＜３０ｋＤａ分画の混合物を添加して培養されたＨＵＶＥＣの細胞内脱水素酵素活性を示すグラフである。

[図20]図２０は、ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭの５０－１００ｋＤａ分画、または＞１００ｋＤａ、５０－１００ｋＤａおよび３０－５０ｋＤａ分画の混合物

を添加して培養されたＨＵＶＥＣの細胞内脱水素酵素活性を示すグラフである。

[図21]図２１は、ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭの５０－１００ｋＤａ分画、または５０－１００ｋＤａおよび＜３０ｋＤａ分画の混合物を添加して培養されたＨＵＶＥＣの細胞内脱水素酵素活性を示すグラフである。

[図22]図２２は、ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭの、過酸化水素処理による細胞障害に対する抑制効果を評価したＷＳＴアッセイの結果を示すグラフである。

[図23]図２３は、ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭの５０－１００ｋＤａ分画の、過酸化水素処理による細胞障害に対する抑制効果を評価したＷＳＴアッセイの結果を示すグラフである。

[図24]図２４は、ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭの＞１００ｋＤａ分画の、過酸化水素処理による細胞障害に対する抑制効果を評価したＷＳＴアッセイの結果を示すグラフである。

[図25]図２５は、ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭの３０－５０ｋＤａ分画の、過酸化水素処理による細胞障害に対する抑制効果を評価したＷＳＴアッセイの結果を示すグラフである。

[図26]図２６は、図１３および図１５におけるスクラッチの回復を定量的に解析した結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明を詳細に説明するが、本発明は本明細書中に説明した実施形態に限定されるものではない。

[0017] 本発明は、第一の実施形態によれば、乳歯歯髄幹細胞の培養上清から単離された分画を含んでなる細胞賦活化剤であって、前記分画が３．５ｋＤａ未満の成分を含まない、細胞賦活化剤である。

[0018] 本実施形態において、「細胞賦活化」（およびその文法的変形）は、細胞の増殖および代謝などの機能を正常化または向上させることを意味する。したがって、本実施形態における「細胞賦活化」には、例えば、細胞の増殖および代謝に関連する酵素（各種脱水素酵素、Ａｋｔ、ＡＭＰＫなど）や、酸

化ストレスを抑制する酵素（スーパーオキシドジスムターゼ（ＳＯＤ）、カタラーゼ（ＣＡＴ）、グルタチオンペルオキシダーゼ（ＧＰｘ）など）の活性化が含まれ得る。ここで、「細胞」は、任意の脊椎動物におけるものであってよく、好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ、サル、ヒトなどの哺乳動物の細胞であり、特に好ましくはヒト細胞である。また、細胞の種類も特に限定されず、例えば、線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞、神経細胞、幹細胞、白血球、骨細胞、筋肉細胞、脂肪細胞などであってよく、好ましくは線維芽細胞または内皮細胞であってよい。

[0019] 「乳歯歯髄幹細胞」とは、乳歯の歯髄から採取される間葉系幹細胞である。本実施形態における乳歯歯髄幹細胞は、任意の脊椎動物由来のものであってよく、好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ、サル、ヒトなどの哺乳動物由来であり、特に好ましくはヒト由来である。

[0020] 乳歯歯髄幹細胞の調製方法はすでに確立されており（例えば、国際公開第２０１１／１１８７９５）、当分野において公知の方法にしたがって、乳歯歯髄から単離され、調製され得る。

[0021] 本実施形態における乳歯歯髄幹細胞は、初代培養細胞であってもよいし、不死化細胞であってもよい。「不死化細胞」とは、一定回数の分裂を繰り返した後もなお増殖可能な状態を維持する、すなわち、細胞が無限増殖能を有することを意味する。細胞を不死化する方法はすでに確立されており、公知の手法を採用することができる。例えば、ＳＶ４０Ｔ抗原遺伝子やテロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）遺伝子などを細胞に導入することにより、細胞を不死化することができる。

[0022] 乳歯歯髄幹細胞の培養方法はすでに確立されており、（例えば、国際公開第２０１１／１１８７９５）、当分野において公知の方法にしたがって、乳歯歯髄幹細胞を培養することができる。具体的には、例えば、ＤＭＥＭ、ＩＭＤＭ、ハムＦ－１２、ＲＰＭＩ－１６４０またはそれらの混合物などを基礎培地として、ＦＢＳなどの血清またはＫＳＲなどの血清代替物、グルコース、アミノ酸、ビタミンなどを適宜添加した培地中で、例えば５×１０^{4}～２

×１０^{5}細胞／ｍＬの濃度で播種することにより、乳歯歯髄幹細胞を培養すればよい。本実施形態の細胞賦活化剤は、乳歯歯髄幹細胞を血清を含まない培地により培養して得られた培養上清から調製されることが好ましい。

[0023] 本実施形態の細胞賦活化剤は、乳歯歯髄幹細胞の培養上清由来の３．５ｋＤａ未満の成分を含まない。ここで、「含まない」とは、通常行われる検出手段（例えば免疫化学的手法など）によって除去対象の成分が検出されないことを意味する。したがって、本実施形態の細胞賦活化剤は、未精製の培養上清に含まれる３．５ｋＤａ未満の成分の少なくとも８５重量％、９０重量％以上、９５重量％以上、９７重量％以上、９８重量％以上、または９９重量％以上が除去されたものであり得る。言い換えれば、本実施形態の細胞賦活化剤は、未精製の培養上清に含まれる３．５ｋＤａ未満の成分の、最大で１５重量％、１０％重量未満、５％重量未満、３％重量未満、２％重量未満、または１重量％未満を含み得る。本実施形態の細胞賦活化剤は、乳歯歯髄幹細胞の培養上清から３．５ｋＤａ未満の成分が除去されることにより、改善された細胞賦活効果を示す。

[0024] 本実施形態における「ｋＤａ」は、例えばＳＤＳ－ＰＡＧＥや限外ろ過などに基づいて算出されてよく、市販の限外ろ過フィルターユニットにより培養上清を精製する場合には、製品に表示された公称分画分子量（ＮＭＷＬ）または分子量カットオフ（ＭＷＣＯ）の値であってよい。

[0025] 本実施形態の細胞賦活化剤は、５０～１００ｋＤａの成分を含む分画を含むことが好ましく；一方、３０ｋＤａ未満の成分を含む分画を含まないことが好ましい。本実施形態の細胞賦活化剤は、さらに、１００ｋＤａ超の成分を含む分画および／または３０～５０ｋＤａの成分を含む分画を含まないことがより好ましい。５０～１００ｋＤａの成分がより高い細胞賦活活性を有し、一方で、３．５ｋＤａ未満の成分のみならず、１００ｋＤａ超の成分や３０～５０ｋＤａの成分も、５０～１００ｋＤａの成分の細胞賦活活性に対して悪影響を及ぼす場合があり得るためである。

[0026] 本実施形態の細胞賦活化剤は、例えば、１００，０００ＭＷＣＯ、５０，

０００ＭＷＣＯ、３０，０００ＭＷＣＯおよび３，５００ＭＷＣＯの限外ろ過膜を組み合わせて用いることにより調製され得る。例えば、１００，０００ＭＷＣＯの限外ろ過膜により培養上清から１００ｋＤａ超の成分を除去し、得られたろ液を５０，０００ＭＷＣＯの限外ろ過膜により濃縮することにより、乳歯歯髄幹細胞の培養上清からの５０～１００ｋＤａの成分を含み、かつ、３０～５０ｋＤａの成分および３０ｋＤａ未満の成分を含まない細胞賦活化剤を調製することができる。

[0027] 本実施形態の細胞賦活化剤は、乳歯歯髄幹細胞の培養上清から精製された分画のみから構成されてもよいが、一般的には、さらに任意の成分として、薬学的に許容される担体および添加物を含んでもよい。

[0028] 本実施形態の細胞賦活化剤は、液剤または固形剤として調製されてよく、例えば、注射剤、ゼリー剤、スプレー剤、錠剤、顆粒剤など、種々の剤型に製剤化され得るが、好ましくは液剤として調製される。液剤として調製する場合、滅菌水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液などを担体として使用でき、さらに所望により、殺菌剤、等張化剤、安定化剤などを配合してよい。固形剤として調製する場合、デンプン、ラクトース、マンニトール、無機塩などの添加剤や、さらに所望により、結合剤、崩壊剤、滑沢剤などを配合することができる。

[0029] 本実施形態の細胞賦活化剤における、乳歯歯髄幹細胞の培養上清由来の５０～１００ｋＤａの成分の含有量（タンパク質重量換算）は、細胞賦活化剤の総質量を１００％としたとき、例えば６０重量％以上、７０重量％以上、８０重量％以上、９０重量％以上であってよく、好ましくは６０～７０重量％であってよい。

[0030] 本実施形態の細胞賦活化剤は、乳歯歯髄幹細胞の培養上清由来の成分のうち、細胞賦活活性を有する成分を含み、それを阻害する成分を含まない。そのため、本実施形態の細胞賦活化剤は、乳歯歯髄幹細胞の未精製の培養上清よりも細胞賦活化効果に優れており、有用である。

[0031] 本発明は、第二の実施形態によれば、対象において細胞を賦活化するため

の方法であって、前記対象に上記細胞賦活化剤を投与するステップを含む、方法である。本実施形態における「細胞を賦活化する」および「細胞」は、第一の実施形態において定義したものと同様である。

[0032] 本実施形態における「対象」は、任意の脊椎動物であってよいが、好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ、サル、ヒトなどの哺乳動物であり、特に好ましくはヒトである。対象は、乳幼児、若年、青年、成人および老人対象を含めた任意の年齢であり得る。

[0033] 本実施形態の方法における細胞賦活化剤は、第一の実施形態で定義したような種々の剤型に製剤化されたものであってよく、剤型に適した任意の投与方法により、例えば、経口投与、静脈内投与、皮下投与、経皮投与、筋肉内投与、経鼻投与、腹腔内投与、標的組織への直接注射、吸入投与などにより投与されてよい。細胞賦活化剤の投与量は、対象の年齢、体重、健康状態などに応じて異なってよいが、例えば０．１～１０ｍｇ／ｋｇ（体重）、好ましくは０．５～２ｍｇ／ｋｇ（体重）であってよい。前記投与量は、１回で投与されてもよいし、複数回にわたって投与されてもよい。

[0034] 本発明は、第三の実施形態によれば、乳歯歯髄幹細胞の培養上清から単離された分画の細胞賦活化剤としての使用であって、前記分画が５０～１００ｋＤａの成分を含み、かつ、３０ｋＤａ未満の成分を含まない、使用である。本実施形態における「乳歯歯髄幹細胞」、「細胞賦活化剤」、「細胞」、「含まない」および「ｋＤａ」は、第一の実施形態で定義したものと同様である。第一および第二の実施形態において記載された内容にしたがって、５０～１００ｋＤａの成分を含み、かつ、３０ｋＤａ未満の成分を含まない乳歯歯髄幹細胞の培養上清由来の分画を、細胞賦活化剤として使用することができる。

実施例

[0035] 以下に実施例を挙げ、本発明についてさらに説明する。なお、これらは本発明を何ら限定するものではない。

[0036] ＜材料および試薬＞

ＮＩＨ３Ｔ３細胞をＪＣＲＢ細胞バンクから購入した。ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）、ＥＢＭ™－２基本培地（ＣＣ－３１５６）およびＥＧＭ™－２添加因子キット（ＣＣ－４１７６）をＬｏｎｚａから購入した。Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ Ｍｅｄｉｕｍ（ＤＭＥＭ）をＧＩＢＣＯから購入した。Ｂｏｖｉｎｅ Ｃａｌｆ Ｓｅｒｕｍ（以下、「ＣＳ」と記載する）および抗真菌剤溶液（１００×）をＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから購入した。ウシ胎児血清（ＦＢＳ）および０．０５％トリプシン／ＥＤＴＡ溶液をＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎから購入した。Ｃｈａｒｃｏａｌ（ｐｏｗｄｅｒ，ａｃｔｉｖａｔｅｄ）（以下、「活性炭」と記載する）をナカライテスクから購入した。ダルベッコリン酸緩衝液（ＰＢＳ）およびＲＩＰＡバッファー、クイックＣＢＢ染色液を富士フイルム和光純薬から購入した。限外ろ過ユニット（Ｖｉｖａｓｐｉｎ Ｔｕｒｂｏ １５ ｍｅｍｂｒａｎｅ ３０，０００、５０，０００、１００，０００ ＭＷＣＯ）をＳＡＲＴＯＲＩＵＳから購入した。Ｍｉｌｌｅｘ－ＧＶ ｌｏｗ ｐｒｏｔｅｉｎ ｂｉｎｄｉｎｇ ｄｕｒａｐｏｒｅ（ＰＶＤＦ）Ｍｅｍｂｒａｎｅ ０．２２μｍをメルクミリポアから購入した。Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ™ ７ Ｄｉａｌｙｓｉｓ Ｍｅｍｂｒａｎｅ（ＭＷＣＯ：３．５ｋＤ）をＲＥＰＬＩＧＥＮから購入した。ＰＤ－１０カラムをＣｙｔｉｖａから購入した。Ｍｉｃｒｏ ＢＣＡ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔをサーモフィッシャー・サイエンティフィックから購入した。Ｃｅｌｌ Ｃｏｕｎｔｉｎｇ Ｋｉｔ－８を同仁化学研究所から購入した。アクリルアミド、タンパク質スタンダードマーカーおよびＣｌａｒｉｔｙ Ｗｅｓｔｅｒｎ ＥＣＬ ＳｕｂｓｔｒａｔｅをＢｉｏ－Ｒａｄから購入した。プロテアーゼインヒビターｃｏｍｐｌｅｔｅ（＃１１ ６９７ ４９８ ００１）をＲｏｃｈｅから購入した。ａｎｔｉ－ｐｈｏｓｐｈｏ ｐ４４／４２抗体（＃９１０６）およびａｎｔｉ－ｐｈｏｓｐｈｏ Ａｋｔ抗体（＃９２７１）をＣｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙから購入した。ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ ＩｇＧ－ＨＲＰ 抗体（＃６２－６５２０）およびａｎｔｉ

－ｒａｂｂｉｔ　ＩｇＧ－ＨＲＰ抗体（＃６５－６１２０）をＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎから購入した。

[0037] ＜１．乳歯歯髄由来幹細胞培養上清およびその分画の調製＞

（１－１）ヒト乳歯歯髄由来幹細胞（ＳＨＥＤ）の調製

脱落または抜去したヒト乳歯の歯牙を５％クロロヘキシジン液（山善製薬）または１０％ポビドンヨード液（岩城製薬）で消毒した後、歯冠部を分割し、歯科用リーマーを用いて歯髄組織を回収した。歯髄組織を１０体積％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭに懸濁し、２ｍｇ／ｍｌのコラゲナーゼ（富士フイルム和光純薬）およびディスパーゼ（富士フイルム和光純薬）を添加し、３７℃で１時間インキュベートした。７７７×ｇで５分間遠心分離し、上清を除去し、歯髄細胞を回収した。１０体積％ＦＢＳおよび１体積％抗生物質－抗真菌剤（Ｇｉｂｃｏ™ Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃ－Ａｎｔｉｍｙｃｏｔｉｃ）を添加したＤＭＥＭ（４ｍＬ）により歯髄細胞を懸濁し、６ウェルプレートに播種した。細胞がサブコンフルエントになるまで３７℃、５％ＣＯ２条件下で培養した。０．０５％トリプシン／ＥＤＴＡ溶液を添加して３７℃で５分間インキュベートし、細胞を回収し、接着細胞用１０ｃｍディッシュ（ビオラモ）に播種した。その後、３回継代培養し、約１×10^7細胞になるまで増殖させた。０．０５％トリプシン／ＥＤＴＡ溶液を添加して３７℃で５分間インキュベートし、回収した細胞を「ＳＨＥＤ（Ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ ｆｒｏｍ Ｈｕｍａｎ Ｅｘｆｏｌｉａｔｅｄ Ｄｅｃｉｄｕｏｕｓ ｔｅｅｔｈ）」と名付けた。

[0038] （１－２）不死化ヒト乳歯歯髄由来幹細胞（ＩＭ－ＳＨＥＤ）の調製

ＳＶ４０遺伝子をウイルスベクターより導入することにより不死化されたＳＨＥＤ（ＩＭ－ＳＨＥＤ）を、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍａｔｅｒｉａｌｓに委託して調製した。

[0039] （１－３）培養上清の調製

上で調製したＳＨＥＤまたはＩＭ－ＳＨＥＤを１０体積％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭにて継代培養した。培養上清の調製には、ＳＨＥＤは８回以内、ＩＭ－

ＳＨＥＤは５０～５５回継代したものを用いた。培地を無血清のＤＭＥＭに交換し、４８時間培養した。その後、培地を回収し、分離膜（Ｓｔｅｒｉｃｕｐ　Ｑｕｉｃｋ　Ｒｅｌｅａｓｅ－ＧＰ，ＰＶＤＦ，０．２２μｍ；メルクミリポア）でろ過することにより、培養上清（馴化培地：ＣＭ）を得た。以下、ＳＨＥＤ由来の培養上清を「ＳＨＥＤ－ＣＭ」、ＩＭ－ＳＨＥＤ由来の培養上清を「ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭ」と記載する。

[0040] （１－４）培養上清の分画および濃縮

ＣＭを、室温、１，０００ｒｐｍで３分間；４℃、５００×ｇで３０分間；および４℃、２，０００×ｇで３０分間で遠心分離し、Ｍｉｌｌｅｘ－ＧＶ　ｌｏｗ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｄｕｒａｐｏｒｅ（ＰＶＤＦ）Ｍｅｍｂｒａｎｅ　０．２２μｍでろ過することにより細胞などの不純物を除去した。その後、ＣＭを１００，０００ＭＷＣＯの限外ろ過ユニットに供し、４℃、２，０００×ｇで２０分間遠心分離した。ろ液（以下、「ＰＴ」と表記する）を５０，０００ＭＷＣＯの限外ろ過ユニットに供し、４℃、２，０００×ｇで２０分間で遠心分離した。そのＰＴを３０，０００ＭＷＣＯの限外ろ過ユニットに供し、４℃、２，０００×ｇで２０分間で遠心分離した。

[0041] さらに、上記１００，０００ＭＷＣＯの限外ろ過ユニットに１０ｍＬのＰＢＳを添加して、４℃、２，０００×ｇで２０分間遠心分離した。これを５回繰り返すことにより、＞１００ｋＤａ分画濃縮液を得た。ここで得られたＰＴを上記の５０，０００ＭＷＣＯの限外ろ過ユニットに供し、４℃、２，０００×ｇで２０分間で遠心分離し、５０－１００ｋＤａ分画濃縮液を得た。そのＰＴを上記の３０，０００ＭＷＣＯの限外ろ過ユニットに供し、４℃、２，０００×ｇで２０分間で遠心分離し、３０－５０ｋＤａ分画濃縮液を得た。そのＰＴをＰＤ－１０カラムに供し、バッファーをＰＢＳに置換し、＜３０ｋＤａ分画液を得た。分画濃縮液を凍結乾燥後、ミリＱ水で溶解し、サンプルバッファー（ＳＤＳ含有または不含）を添加し、１２．５％ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。

[0042] ＳＨＥＤ－ＣＭおよびその分画の電気泳動結果を図１に、ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭおよびその分画の電気泳動結果を図２に示す。ＳＨＥＤ－ＣＭおよびＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭのいずれも、５０－１００ｋＤａ分画に多くのタンパク質成分を含むことが確認された。

[0043] ＜２．ＳＨＥＤ－ＣＭ／ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭ分画による細胞増殖および生存能力の活性化（ＷＳＴアッセイ）＞

活性炭処理ＣＳ（以下、「ＣＨ－ＣＳ」と記載する）を以下の手順により調製した：１ｍＬのＣＳに１０ｍｇの活性炭を添加し、１５秒間穏やかにボルテックスした。３７℃で１０分間インキュベートした後、４℃、１２，０００ｒｐｍで２０分間で遠心分離し、上清を０．２２μｍＰＶＤＦフィルターに供することにより、ＣＨ－ＣＳを得た。ＮＩＨ３Ｔ３細胞を９６ウェルプレート（ビオラモ）に播種し（５，０００細胞／ウェル）、１０％ＣＳ／ＤＭＥＭ中で一晩培養した。血清飢餓状態にするために、ＤＭＥＭで１回洗浄した後、０．４％ＣＨ－ＣＳ／ＤＭＥＭに培地を交換し、２４時間培養した。その後、上記１で調製した分画を０．４％ＣＨ－ＣＳ／ＤＭＥＭにより希釈して添加し、４４時間培養した。Ｃｅｌｌ Ｃｏｕｎｔｉｎｇ Ｋｉｔ－８のＷＳＴ溶液（１０μＬ／ウェル）を添加し、さらに４時間培養した後、４５０ｎｍの吸光度を測定した。

[0044] 結果を図３および４に示す。４５０ｎｍの吸光度の上昇は細胞内脱水素酵素の活性の上昇を示し、４５０ｎｍの吸光度が高いほど細胞の増殖能力および生存能力が高いと解釈される。図中、「１０％ＣＳ」は１０％ＣＳ／ＤＭＥＭを意味し、「ＣＭ×１／２ｄｉｌ．」は０．４％ＣＨ－ＣＳ／ＤＭＥＭによりＣＭを１／２希釈した培地を意味する。これらの結果から、ＳＨＥＤ－ＣＭおよびＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭのいずれも、５０－１００ｋＤａ分画に細胞の増殖および生存能力を活性化する成分が含まれることが示された。ヒト子宮頸がん由来細胞株であるＨｅＬａ細胞や、ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞、ヒトｉＰＳ細胞（４０９Ｂ２株）でも同様の結果が得られた（データは省略）。

[0045] さらに、同じタンパク質濃度における各分画の活性を比較した結果を図５および６に示す。図中、「計算値」は、ＣＭの結果を、上記１における電気泳動結果およびＭｉｃｒｏ ＢＣＡ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔによるタンパク質濃度の定量結果から算出された各分画のタンパク質濃度により補正した数値を示す。ＳＨＥＤ－ＣＭおよびＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭから精製された分画のうち、５０－１００ｋＤａ分画のみが細胞の増殖および生存能力を活性化する成分を含むことが明らかになった。

[0046] ＜３．ＳＨＥＤ－ＣＭ／ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭ分画による細胞増殖および生存能力の阻害＞

上記１で調製した５０－１００ｋＤａ分画の、０．４％ＣＨ－ＣＳ／ＤＭＥＭ、＞１００ｋＤａ分画または３０－５０ｋＤａ分画による希釈液を調製し、上記２と同様の手順により、細胞内脱水素酵素活性を評価した。

[0047] 結果を図７および８に示す。５０－１００ｋＤａ分画と、＞１００ｋＤａ分画または３０－５０ｋＤａ分画とを混合することにより、細胞内の脱水素酵素の活性が低下した。特に、ＩＭ－ＳＨＥＤ由来の３０－５０ｋＤａ分画による阻害効果が大きく（図８）、細胞の増殖能力および生存能力を阻害する因子の存在が示唆された。

[0048] ＜４．ＳＨＥＤ－ＣＭ／ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭ分画による細胞内シグナル伝達の活性化＞

ＮＩＨ３Ｔ３細胞を１２ウェルプレートに播種し（６×10^4細胞／ウェル）、１０％ＣＳ／ＤＭＥＭ中で一晩培養した。血清飢餓状態にするために、ＤＭＥＭで１回洗浄した後、０．４％ＣＨ－ＣＳ／ＤＭＥＭに培地を交換し、２４時間培養した。その後、上記１で調製したＣＭまたはその分画を０．４％ＣＨ－ＣＳ／ＤＭＥＭにより希釈して添加した。対照には、１０％ＦＢＳまたはヒトＴＮＦα（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ）（５０ｎｇ／ｍＬ）を添加した。３０分間培養した後、細胞をＰＢＳで２回洗浄し、プロテアーゼインヒビターを添加したＲＩＰＡバッファーにより溶解した。細胞溶解液をマイクロチューブに回収し、４℃で３０分間振盪した。４℃、１５，０００ｒｐｍ

で２０分間で遠心分離し、上清を回収した。ＳＤＳ含有サンプルバッファーを添加し、９５℃で５分間インキュベートした後、１０％ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。タンパク質をニトロセルロース膜に転写した後、５％スキムミルク／ＴＢＳＴ溶液によりブロッキングした（室温、１時間）。その後、ニトロセルロース膜を、一次抗体溶液中、４℃で一晩インキュベートした。一次抗体溶液を除去し、ニトロセルロース膜をＴＢＳＴで３回洗浄した後、二次抗体溶液中、室温で１時間インキュベートした。一次抗体としてａｎｔｉ－ｐｈｏｓｐｈｏ　ｐ４４／４２抗体（１：２０００）またはａｎｔｉ－ｐｈｏｓｐｈｏ　Ａｋｔ抗体（１：２０００）、二次抗体としてａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ－ＨＲＰ抗体（１：５０００）またはａｎｔｉ－ｒａｂｂｉｔ　ＩｇＧ－ＨＲＰ抗体（１：５０００）を用いた。検出反応にはＣｌａｒｉｔｙ　Ｗｅｓｔｅｒｎ　ＥＣＬ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅを用いた。

[0049] 結果を図９および１０に示す。５０－１００ｋＤａ分画の添加により、ＭＡＰＫおよびＡｋｔの発現量およびリン酸化が顕著に増加した。また、同じタンパク質濃度に調製したＣＭと５０－１００ｋＤａ分画とを比較した結果を図１１および１２に示す。ＣＭと比較して、５０－１００ｋＤａ分画によるリン酸化の上昇が確認された。これらの結果から、５０－１００ｋＤａ分画が細胞内のリン酸化シグナル伝達を活性化するを含むことが示された。

[0050] ＜５．ＳＨＥＤ－ＣＭ／ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭ分画による細胞遊走の活性化（スクラッチアッセイ）＞

ＮＩＨ３Ｔ３細胞を４８ウェルプレートに播種し（３．７５×10^4細胞／ウェル）、１０％ＣＳ／ＤＭＥＭ中で一晩培養した。血清飢餓状態にするために、ＤＭＥＭで１回洗浄した後、０．４％ＣＨ－ＣＳ／ＤＭＥＭに培地を交換し、２４時間培養した。２００μＬピペットチップにより細胞単層を一直線に傷つけ、スクラッチを作製した。ＤＭＥＭで２回洗浄した後、ＣＭ（０．４％ＣＨ－ＣＳ／ＤＭＥＭにより１／２倍希釈）；１０％ＦＢＳ／ＤＭＥＭ；または＞１００ｋＤａ、５０－１００ｋＤａもしくは３０－５０ｋＤ

ａの各分画（原液に対して各分画のタンパク質濃度が５倍になるように０．４％ＣＨ－ＣＳ／ＤＭＥＭにより希釈）を添加し、２４時間培養した。

[0051] 結果（顕微鏡像）を図１３に示す。さらに、顕微鏡像における細胞面積をＩｍａｇｅＪソフトウェアにより数値化し、定量解析した結果を図２６に示す。５０－１００ｋＤａ分画がＣＭと同等の創傷治癒活性を保持していることが確認された。

[0052] ＜６．ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭの≧３．５ｋＤａ分画の調製および解析＞

ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭをＳｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ™ ７透析膜（ＭＷＣＯ：３．５ｋＤａ）に封入し、１００倍量のミリＱ水に対して７２時間透析した。その間、ミリＱ水を８回交換した。透析後の溶液を凍結乾燥し、出発体積の１／１０量のＰＢＳに溶解し（氷上、＞３０分間）、０．２２μｍＰＶＤＦフィルターによりろ過した。得られた≧３．５ｋＤａ分画の細胞内脱水素酵素および細胞遊走に対する活性を、上記２および５と同様の手順により評価した。

[0053] ＷＳＴアッセイの結果を図１４に示す。高タンパク質濃度（１００μｇ／ｍＬ）に調製された≧３．５ｋＤａ分画は、同じタンパク質濃度に調製されたＣＭよりも、細胞内の脱水素酵素を活性化した。スクラッチアッセイの結果を図１５に、その定量解析の結果を図２６に示す。≧３．５ｋＤａ分画は、スクラッチへの細胞の遊走を著しく増加させた。これらの結果から、＜３．５ｋＤａ分画を除去することにより、ＣＭと同等以上の細胞賦活効果を得ることができることが示された。

[0054] ＜７．ＳＨＥＤ－ＣＭ／ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭ分画による細胞増殖および生存能力の性化（２）＞

ＮＩＨ３Ｔ３細胞に代えてＨＵＶＥＣを用いて、上記２と同様の手順により、ＳＨＥＤ－ＣＭおよびＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭから精製された５０－１００ｋＤａ分画による細胞内脱水素酵素活性化を評価した。ＨＵＶＥＣを、ＥＢＭ™－２基本培地（ＣＣ－３１５６）およびＥＧＭ™－２添加因子キットにより調製した培地（以下、「ＥＧＭ－２培地」と記載する）を用いて接着

細胞用１０ｃｍディッシュで８０～９０％コンフルエントまで増殖させ、０．０５トリプシン／ＥＤＴＡ溶液により剥離し、回収した。ＥＧＭ－２培地を加えて細胞を懸濁し、Ｃｏｕｎｔｅｓｓ２自動セルカウンターおよびトリパンブルーを用いて細胞数と細胞生存率を測定し、細胞懸濁液の濃度を２５，０００細胞／ｍＬに調製した。９６ウェルプレートに細胞を播種した（１００μＬ／ウェル）。１日後、ＣＭまたは５０－１００ｋＤａ分画が添加されたＥＧＭ－２培地に交換した。３日間培養した後、Ｃｅｌｌ Ｃｏｕｎｔｉｎｇ Ｋｉｔ－８のＷＳＴ溶液（１０μＬ／ウェル）を添加し、３～４時間の培養後に４５０ｎｍの吸光度を測定した。

[0055] 結果を図１６および１７に示す。図中、「計算値」は、ＣＭの結果を、上記１における電気泳動結果およびＭｉｃｒｏ ＢＣＡ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔによるタンパク質濃度の定量結果から算出された各分画のタンパク質濃度により補正した数値を示す。ＳＨＥＤ－ＣＭおよびＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭ由来の５０－１００ｋＤａ分画のいずれも、同じタンパク質濃度におけるＣＭよりも、細胞内脱水素酵素活性を増加させた。この結果から、ＳＨＥＤ－ＣＭおよびＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭ由来の５０－１００ｋＤａ分画がＨＵＶＥＣの増殖能力および生存能力を活性化する成分を含むことが示された。

[0056] ＜８．ＳＨＥＤ－ＣＭ／ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭ分画による細胞増殖および生存能力の阻害（２）＞

＞１００ｋＤａ、５０－１００ｋＤａおよび３０－５０ｋＤａ分画の混合物（混合比１：１：１）、ならびに５０－１００ｋＤａおよび＜３０ｋＤａ分画の混合物（混合比１：１）を調製した。５０－１００ｋＤａ分画および上記の混合物を、ＥＧＭ－２培地を用いて段階希釈し、上記７と同様の手順により細胞内脱水素酵素活性を評価した。

[0057] ＳＨＥＤ－ＣＭ由来分画およびその混合物の結果を図１８および２０に、ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭ由来分画およびその混合物の結果を図１９および２１に示す。図中、「Ｍｉｘ ＞１００，５０，３０ｋＤａ」は、＞１００ｋＤ

ａ、５０－１００ｋＤａおよび３０－５０ｋＤａ分画の混合物を意味し、「Ｍｉｘ　５０ｋＤａ，３０ＰＴ」は、５０－１００ｋＤａおよび＜３０ｋＤａ分画の混合物を意味し、「５０ｋＤａ」は、５０－１００ｋＤａ分画を意味する。＞１００ｋＤａ、５０－１００ｋＤａおよび３０－５０ｋＤａ分画の混合溶液では、５０－１００ｋＤａ分画と比較して、細胞内脱水素酵素活性の大きな低下は見られなかった（図１８および２０）。これに対し、５０－１００ｋＤａおよび＜３０ｋＤａ分画の混合溶液では、５０－１００ｋＤａ分画と比較して、細胞内脱水素酵素活性の著しい低下が見られた（図１９および２１）。これらの結果から、ＣＭ中の３０ｋＤａ未満の成分によりＨＵＶＥＣの増殖能力および生存能力が阻害されたことが明らかになった。

[0058] ＜９．ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭ分画の過酸化水素誘導性の細胞傷害抑制効果＞

ＨＵＶＥＣを、ＥＧＭ－２培地を用いて接着細胞用１０ｃｍディッシュで８０～９０％コンフルエントまで増殖させ、０．０５トリプシン／ＥＤＴＡ溶液により剥離し、回収した。ＥＧＭ－２培地を加えて細胞を懸濁し、Ｃｏｕｎｔｅｓｓ２自動セルカウンターおよびトリパンブルーを用いて細胞数と細胞生存率を測定し、細胞懸濁液の濃度を５０，０００細胞／ｍＬに調製した。９６ウェルプレートに細胞を播種した（１００μＬ／ウェル）。１日後、培地を、ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭおよびそれらの分画のＥＧＭ－２培地による段階希釈液により交換し、３日間培養した。細胞に過酸化水素（終濃度０．００５～０．０００３１％）を添加し、３７℃で１時間インキュベートした。希釈液を除去し、ＥＧＭ－２培地（１００μＬ／ウェル）およびＣｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｉｎｇ　Ｋｉｔ－８のＷＳＴ溶液（１０μＬ／ウェル）を添加し、３～４時間の培養後に４５０ｎｍの吸光度を測定した。

[0059] ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭの段階希釈液を添加した細胞についての結果を図２２に示す。ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭを添加しなかった細胞（対照）では、過酸化水素処理により４５０ｎｍにおける吸光度が減少しており、過酸化水素の濃度依存的にさらに大きく減少した。この結果から、過酸化水素処理による細胞障害が確認された。一方、ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭの段階希釈液を添加し

た細胞では、過酸化水素の濃度依存的に４５０ｎｍにおける吸光度が減少するものの、対照と比較して、４５０ｎｍにおける吸光度の減少が抑制された。この結果から、ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭが酸化ストレスによる細胞障害を抑制したことが確認された。

[0060] ＩＭ－ＳＨＥＤ－ＣＭの５０－１００ｋＤａ分画の段階希釈液を添加した細胞についての結果を図２３に、＞１００ｋＤａ分画の段階希釈液を添加した細胞についての結果を図２４に、３０－５０ｋＤａ分画の段階希釈液を添加した細胞についての結果を図２５に示す。５０－１００ｋＤａ分画を添加した細胞では、分画のタンパク質濃度依存的に４５０ｎｍにおける吸光度が上昇し、５０－１００ｋＤａ分画の濃度依存的に酸化ストレスによる細胞障害が抑制されたことが示された。

請求の範囲

[請求項1] 乳歯歯髄幹細胞の培養上清から単離された分画を含んでなる細胞賦活化剤であって、前記分画が３．５ｋＤａ未満の成分を含まない、細胞賦活化剤。

[請求項2] 前記分画が５０～１００ｋＤａの成分を含み、かつ、３０ｋＤａ未満の成分を含まない、請求項１に記載の細胞賦活化剤。

[請求項3] 前記分画が１００ｋＤａ超の成分および／または３０～５０ｋＤａの成分を含まない、請求項１または２に記載の細胞賦活化剤。

[請求項4] 前記乳歯歯髄幹細胞が初代培養細胞である、請求項１～３のいずれか１項に記載の細胞賦活化剤。

[請求項5] 前記乳歯歯髄幹細胞が不死化細胞である、請求項１～３のいずれか１項に記載の細胞賦活化剤。

[請求項6] 対象において細胞を賦活化するための方法であって、前記対象に請求項１～５のいずれか１項に記載の細胞賦活化剤を投与するステップを含む、方法。

[請求項7] 乳歯歯髄幹細胞の培養上清から単離された分画の細胞賦活化剤としての使用であって、前記分画が３．５ｋＤａ未満の成分を含まない、使用。

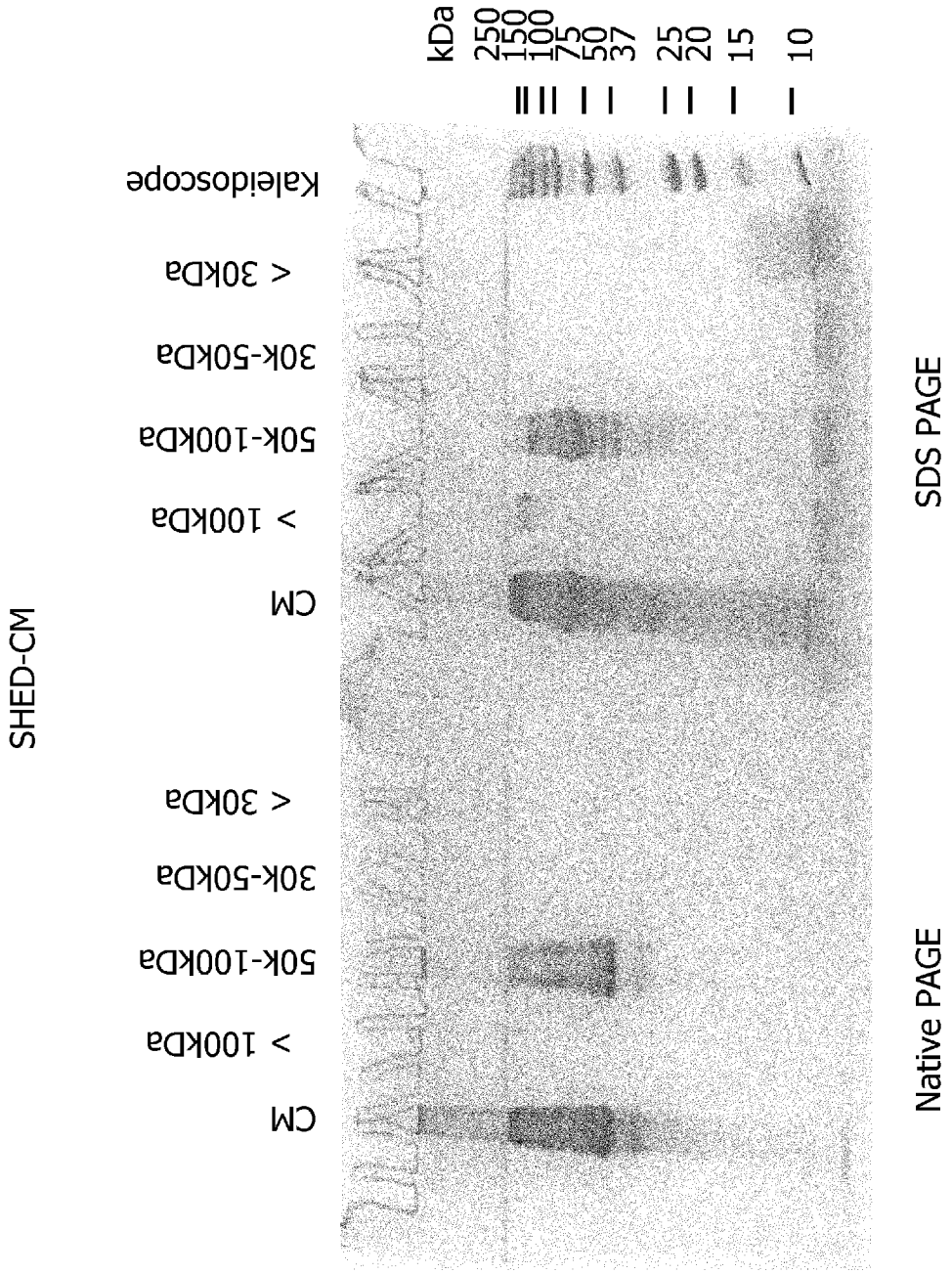
[請求項8] 前記分画が５０～１００ｋＤａの成分を含み、かつ、３０ｋＤａ未満の成分を含まない、請求項７に記載の使用。

[請求項9] 前記分画が１００ｋＤａ超の成分および／または３０～５０ｋＤａの成分を含まない、請求項７または８に記載の使用。

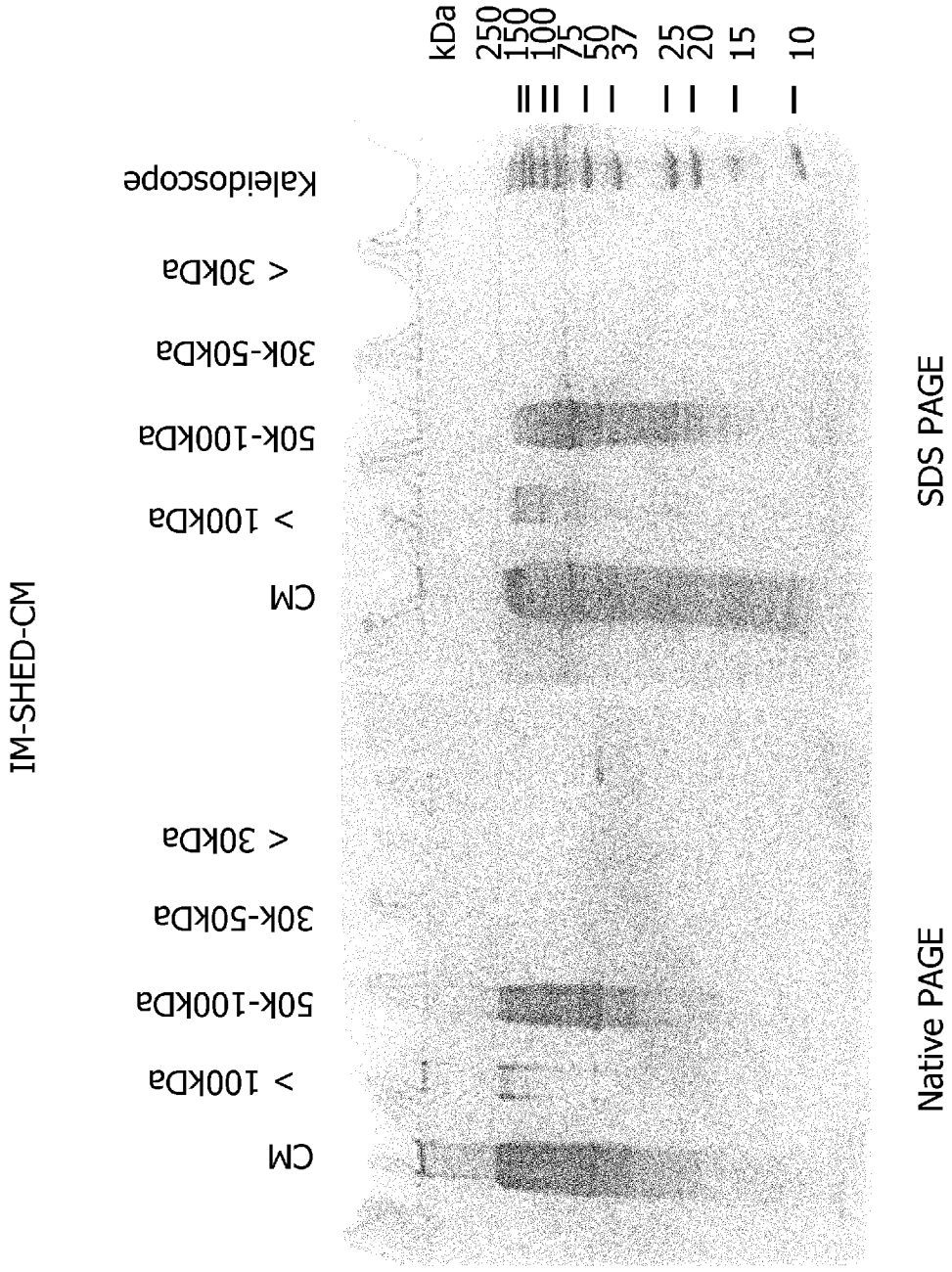
[請求項10] 前記乳歯歯髄幹細胞が初代培養細胞である、請求項７～９のいずれか１項に記載の使用。

[請求項11] 前記乳歯歯髄幹細胞が不死化細胞である、請求項７～９のいずれか１項に記載の使用。

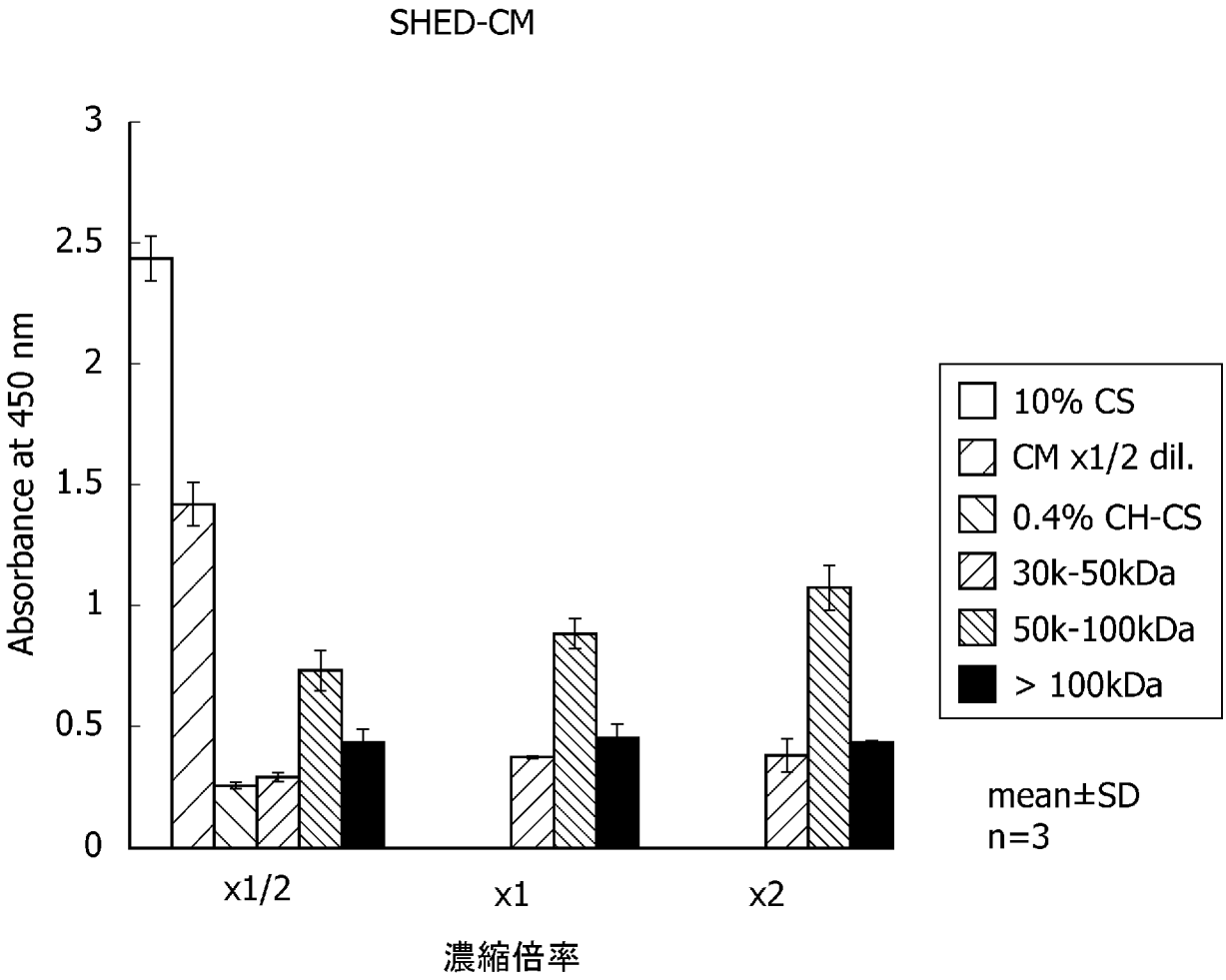
[図1]


kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
SDS PAGE
Native PAGE
SHED-CM
CM
> 100kDa
50k-100kDa
30k-50kDa
< 30kDa
CM
> 100kDa
50k-100kDa
30k-50kDa
< 30kDa
Kaleidoscope

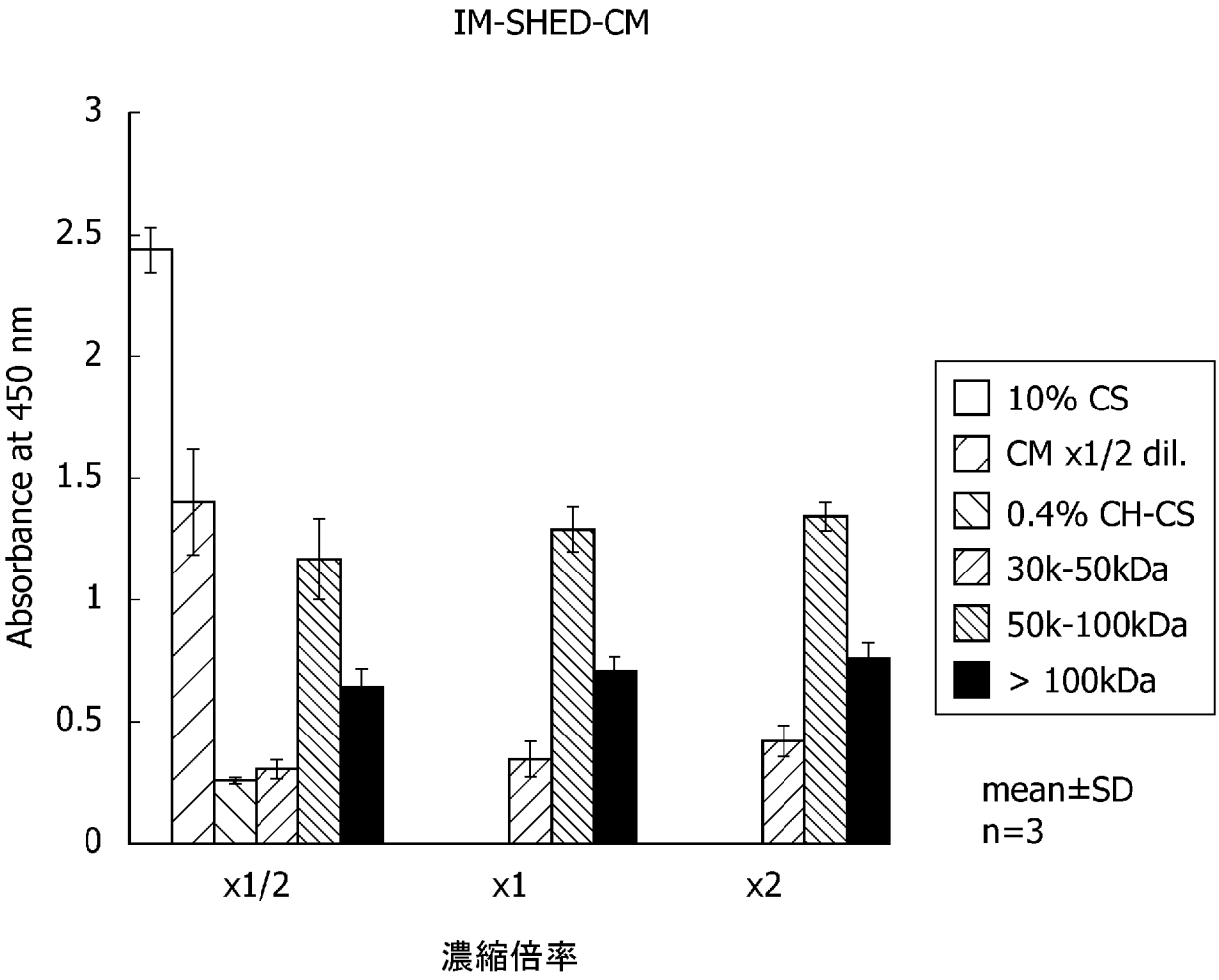
[図2]


kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
SDS PAGE
Native PAGE
IM-SHED-CM
CM
> 100kDa
50k-100kDa
30k-50kDa
< 30kDa
CM
> 100kDa
50k-100kDa
30k-50kDa
< 30kDa
Kaleidoscope

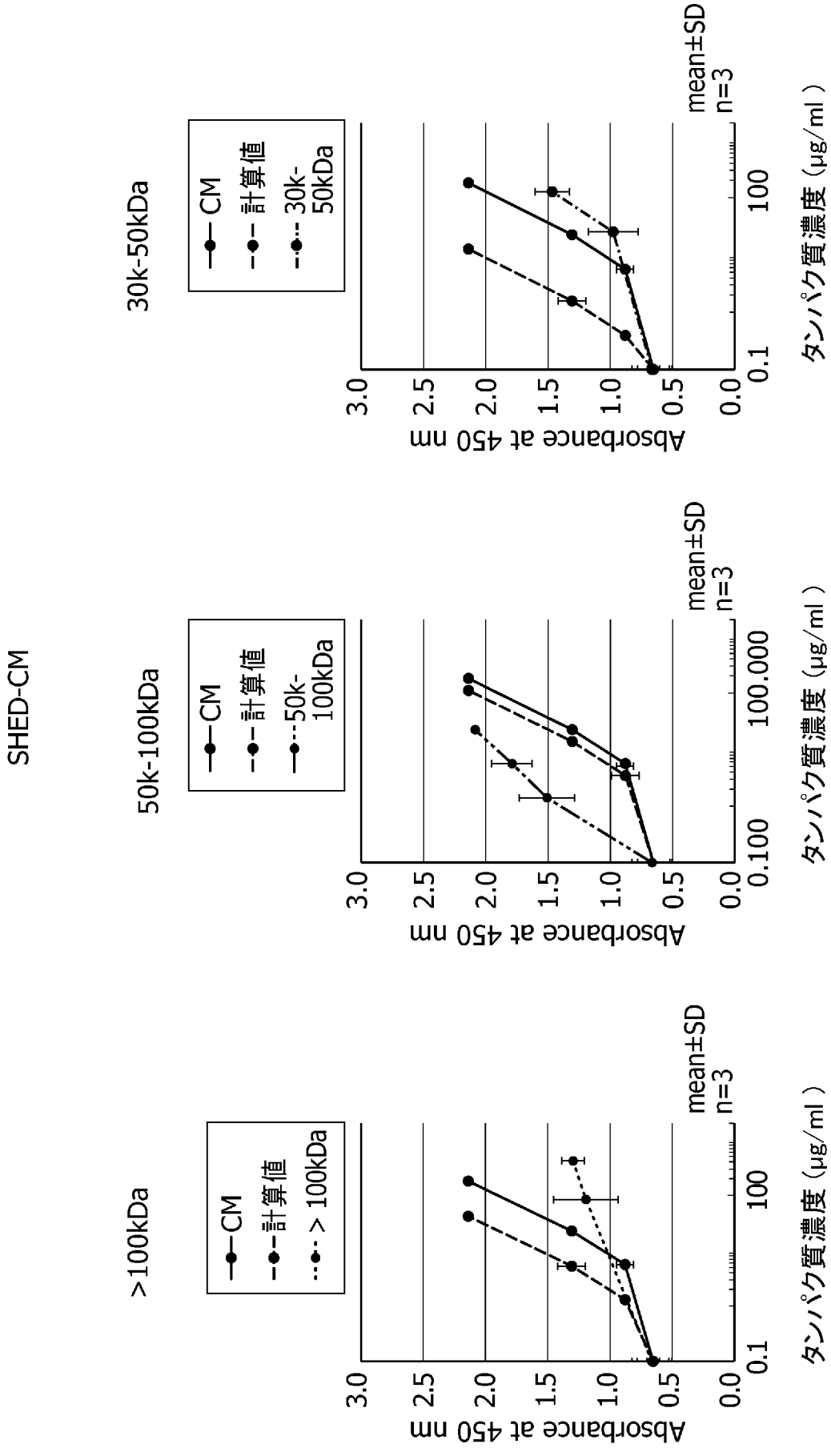
[図3]


SHED-CM
Absorbance at 450 nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
x1/2
x1
x2
濃縮倍率
10% CS
CM x1/2 dil.
0.4% CH-CS
30k-50kDa
50k-100kDa
> 100kDa
mean±SD
n=3

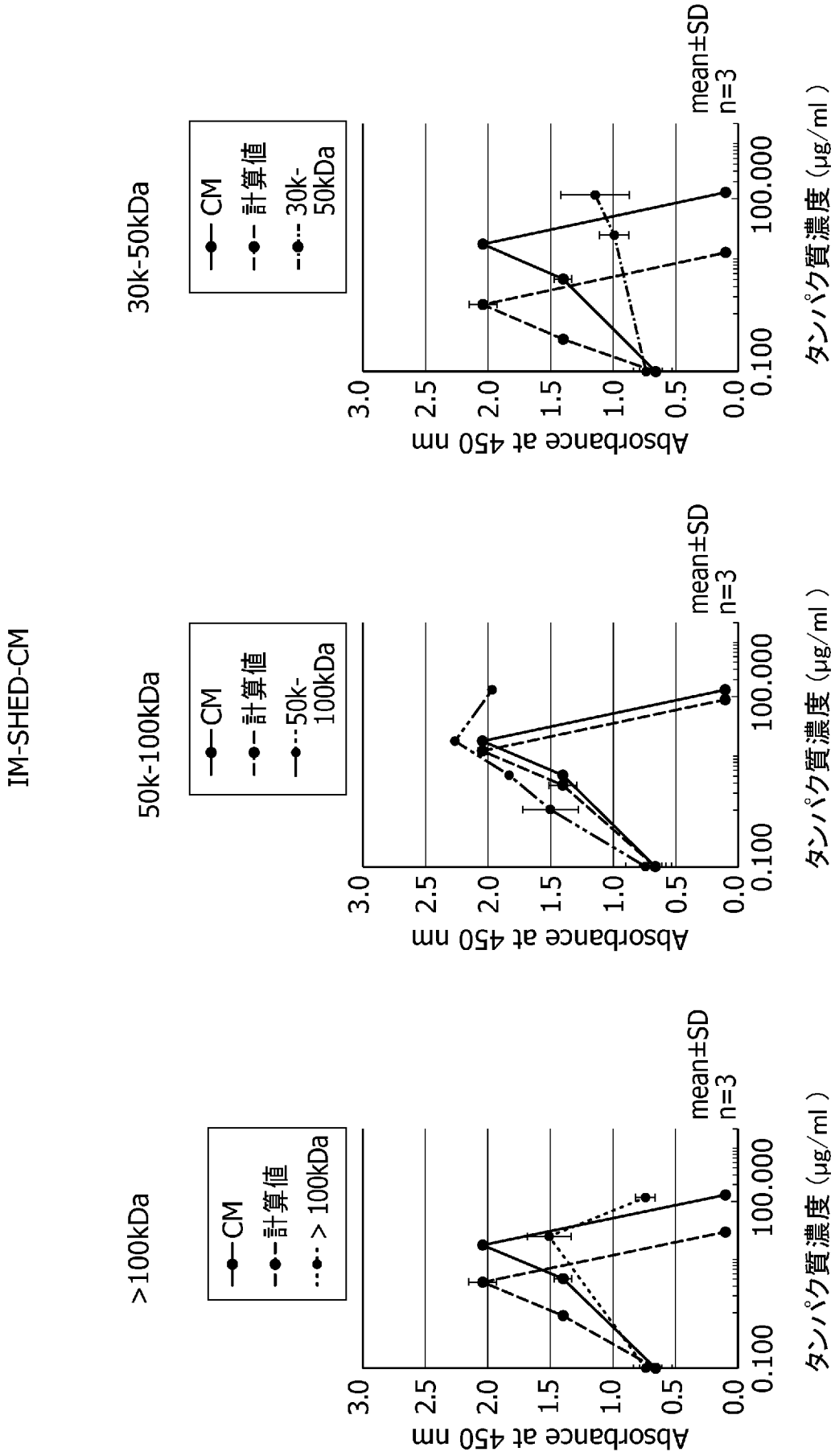
[図4]


IM-SHED-CM
Absorbance at 450 nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
x1/2
x1
x2
濃縮倍率
10% CS
CM x1/2 dil.
0.4% CH-CS
30k-50kDa
50k-100kDa
> 100kDa
mean±SD
n=3

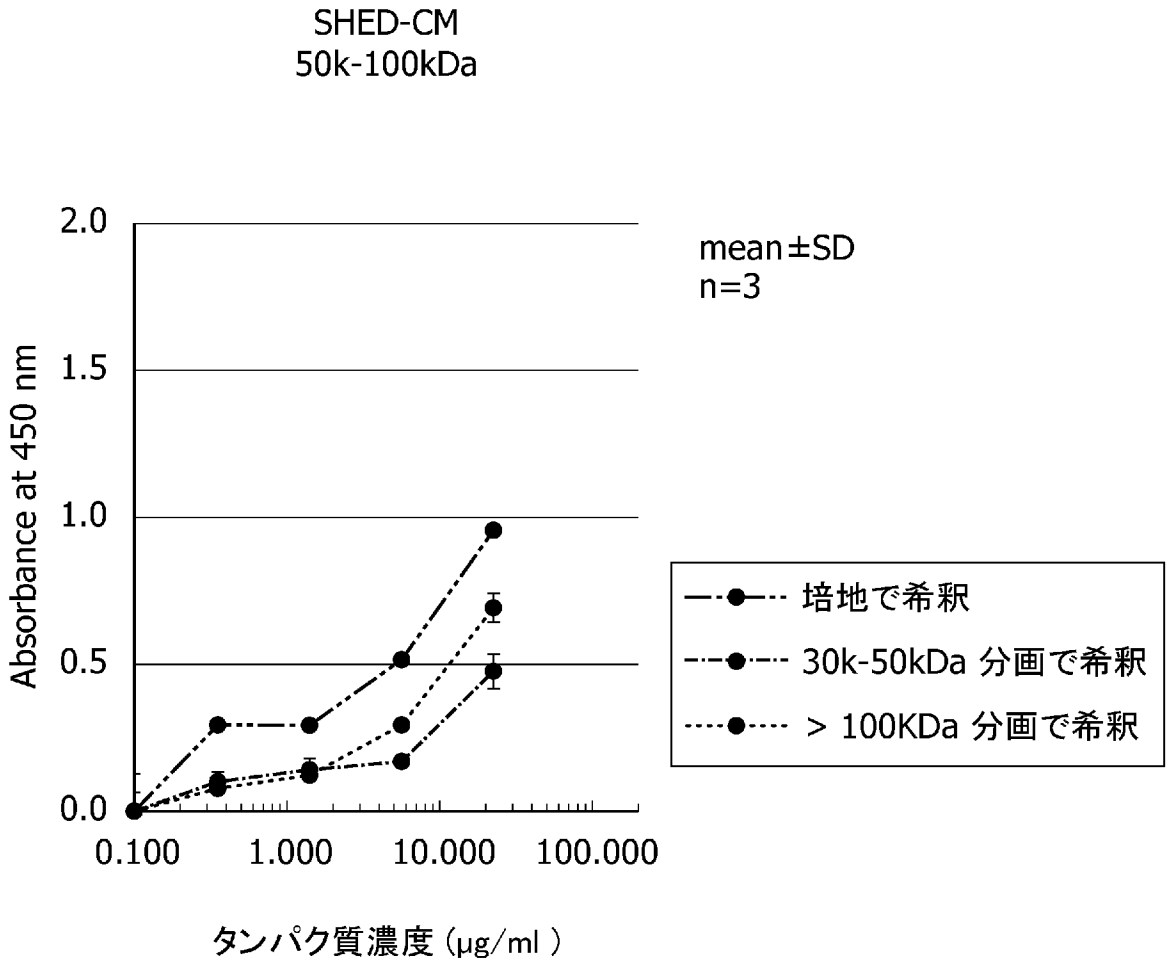
[図5]


SHED-CM
>100kDa
50k-100kDa
30k-50kDa
CM
計算値
> 100kDa
50k-100kDa
30k-50kDa
Absorbance at 450 nm
タンパク質濃度（μg/ml）
mean±SD
n=3

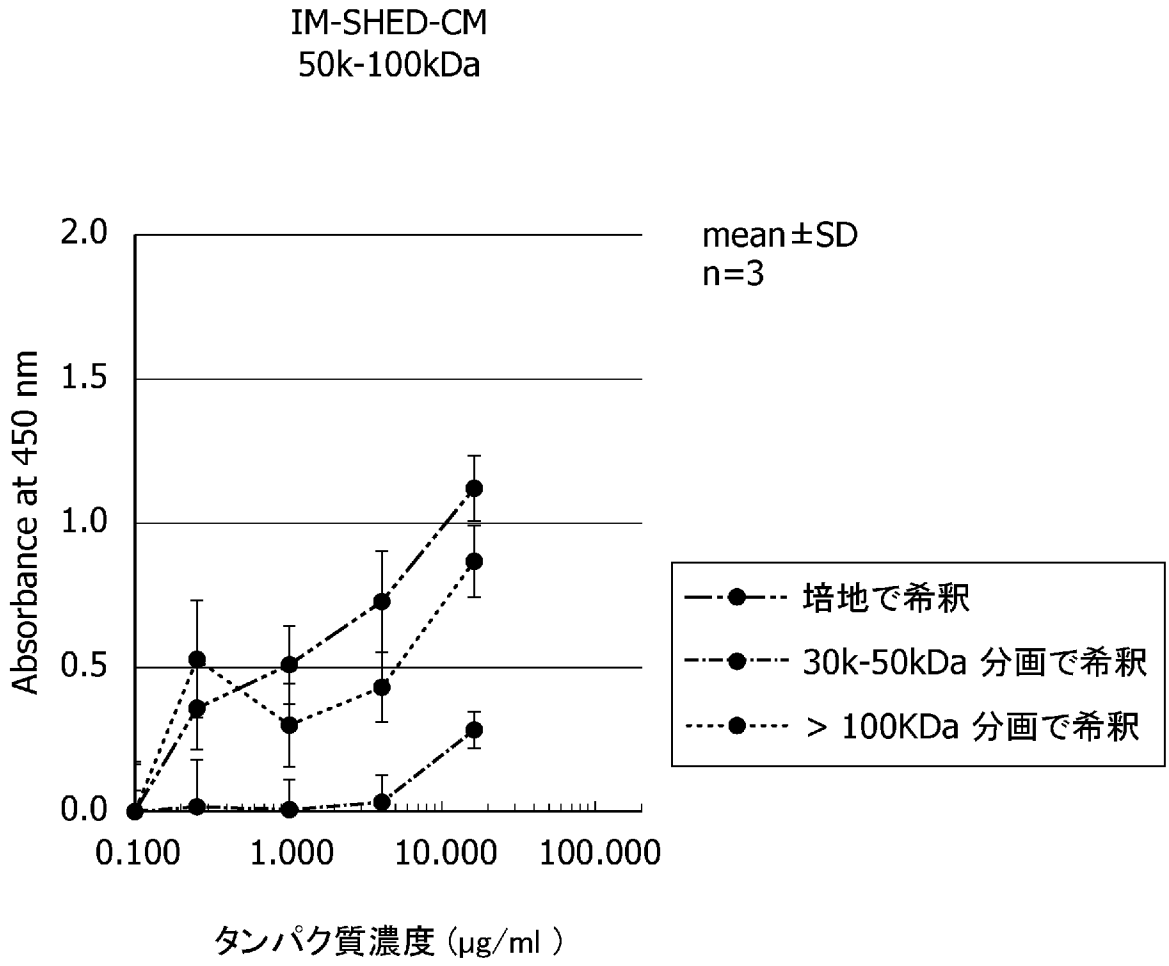
[図6]


IM-SHED-CM
>100kDa
50k-100kDa
30k-50kDa
CM
計算値
> 100kDa
50k-100kDa
30k-50kDa
Absorbance at 450 nm
タンパク質濃度（μg/ml）
mean±SD
n=3
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
0.100
100.000

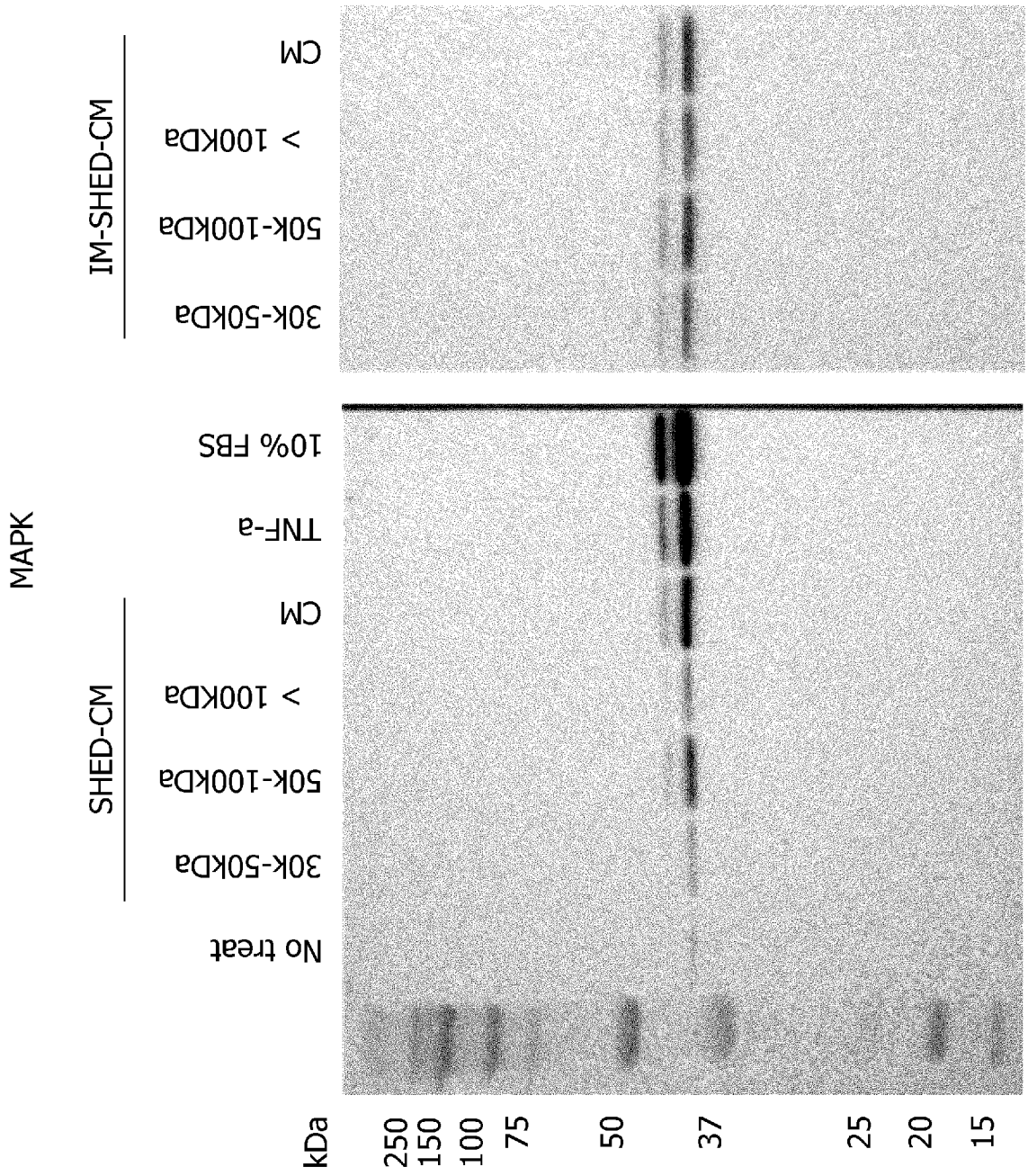
[図7]


SHED-CM
50k-100kDa
mean±SD
n=3
Absorbance at 450 nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.100
1.000
10.000
100.000
タンパク質濃度（μg/ml）
培地で希釈
30k-50kDa 分画で希釈
> 100KDa 分画で希釈

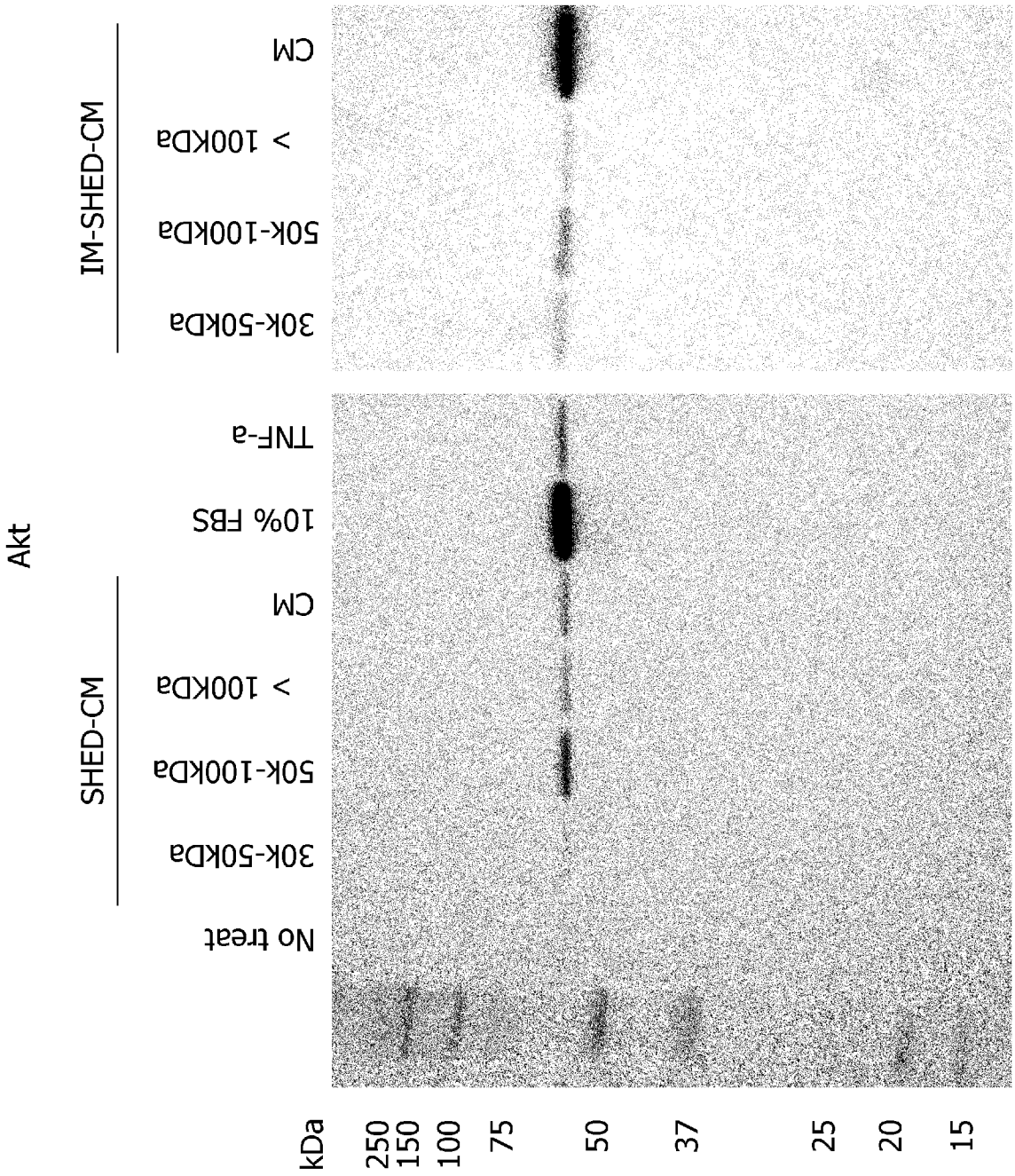
[図8]


IM-SHED-CM
50k-100kDa
mean±SD
n=3
Absorbance at 450 nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.100
1.000
10.000
100.000
タンパク質濃度（μg/ml）
培地で希釈
30k-50kDa 分画で希釈
> 100KDa 分画で希釈

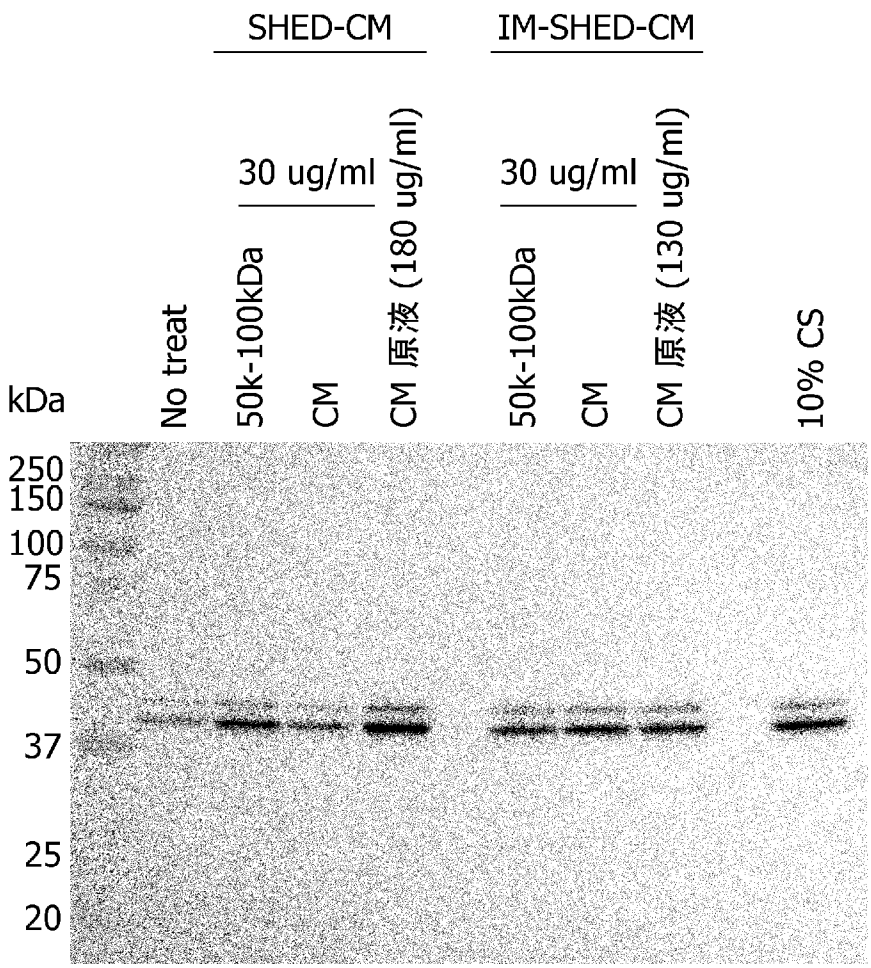
[図9]


MAPK
SHED-CM
IM-SHED-CM
No treat
30k-50kDa
50k-100kDa
> 100kDa
CM
TNF-a
10% FBS
30k-50kDa
50k-100kDa
> 100kDa
CM
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15

[図10]

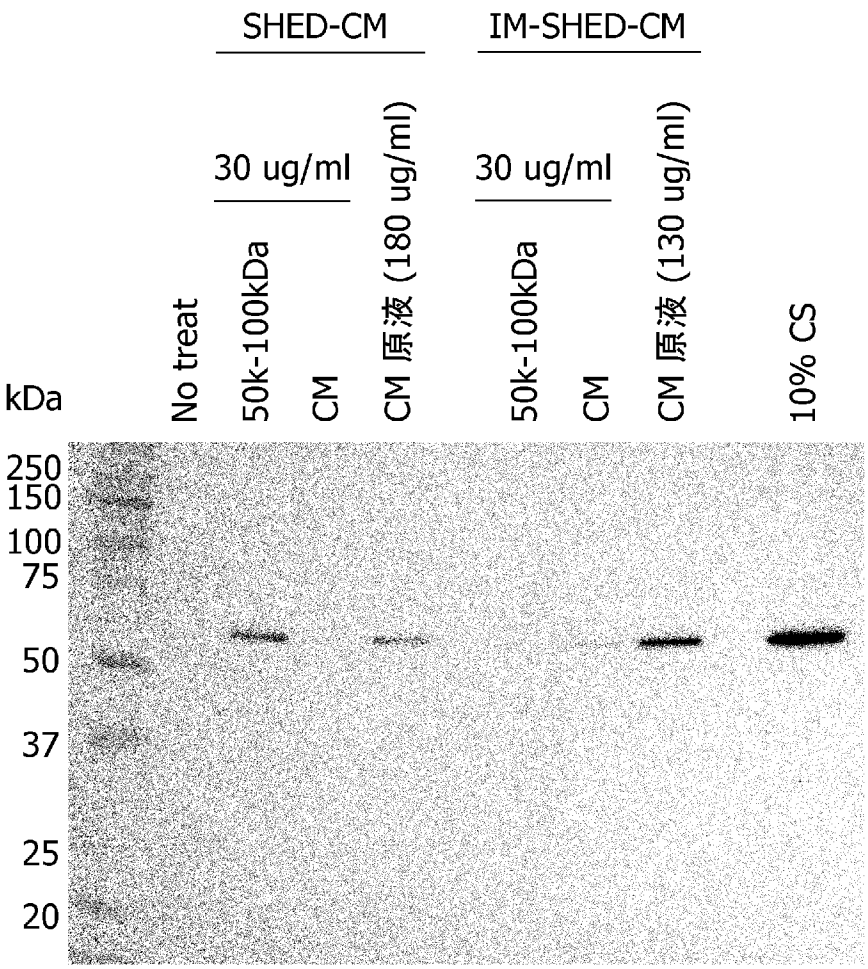

Akt
SHED-CM
No treat
30k-50kDa
50k-100kDa
> 100kDa
CM
10% FBS
TNF-a
IM-SHED-CM
30k-50kDa
50k-100kDa
> 100kDa
CM
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15

[図11]


SHED-CM
IM-SHED-CM
30 ug/ml
30 ug/ml
No treat
50k-100kDa
CM
CM 原液 (180 ug/ml)
50k-100kDa
CM
CM 原液 (130 ug/ml)
10% CS
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20

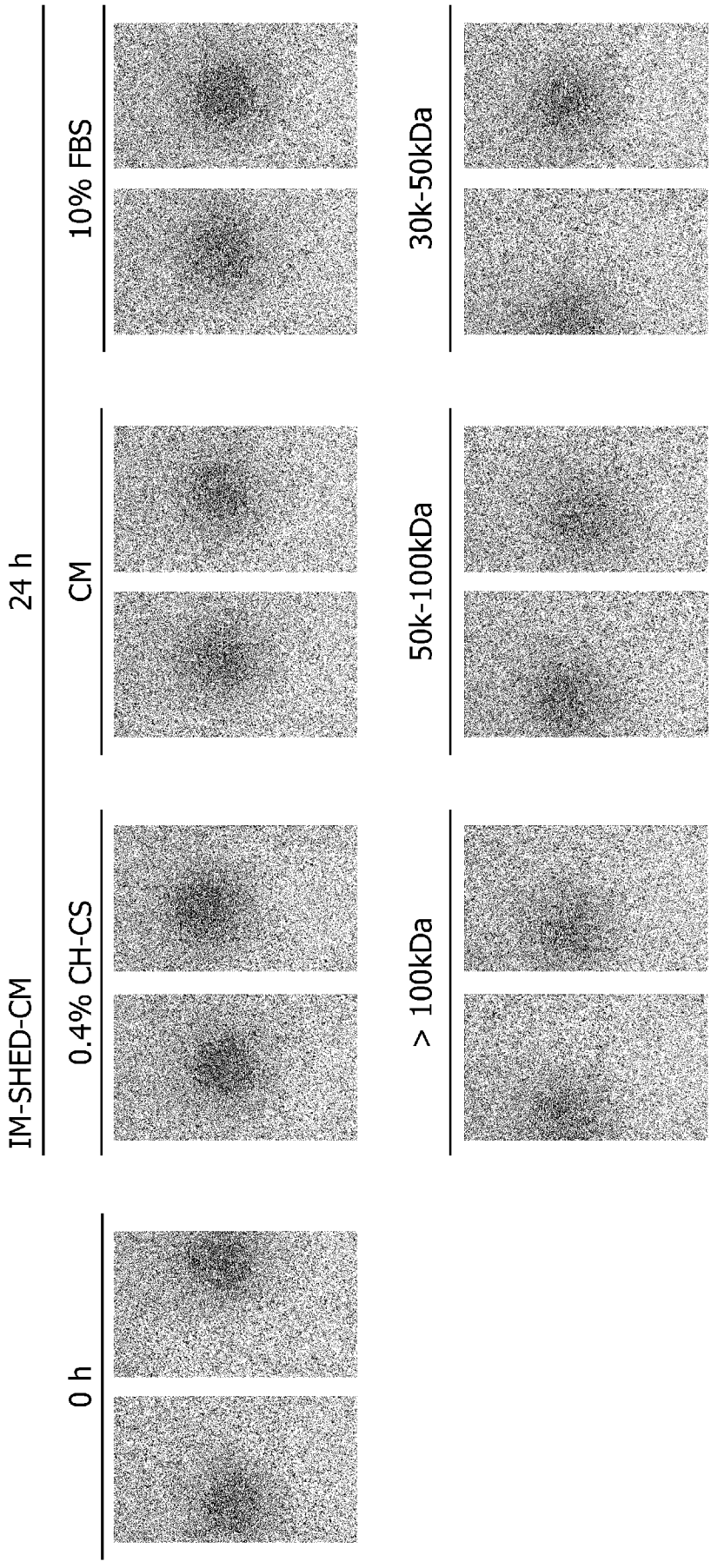
MAPK

[図12]

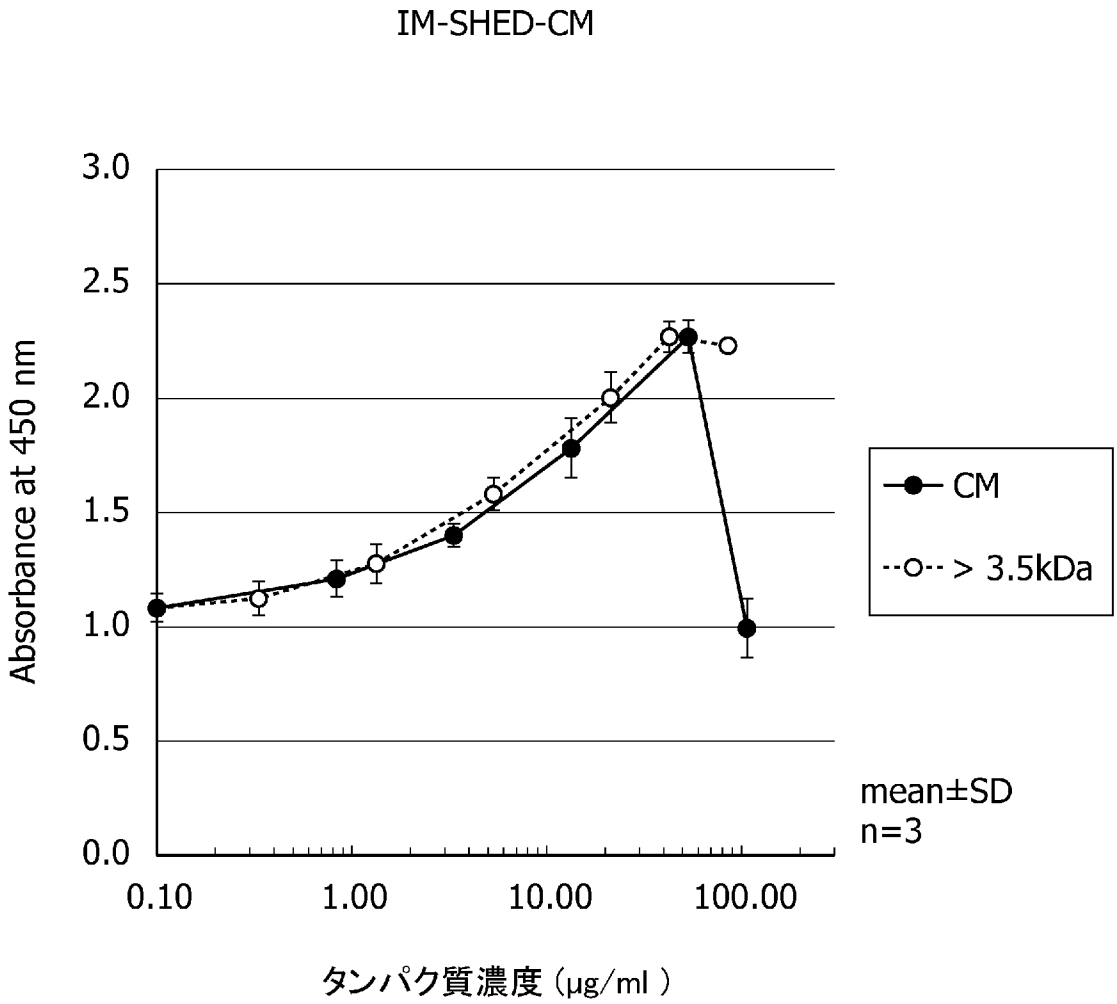

SHED-CM
IM-SHED-CM
30 ug/ml
30 ug/ml
No treat
50k-100kDa
CM
CM 原液 (180 ug/ml)
50k-100kDa
CM
CM 原液 (130 ug/ml)
10% CS
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20

Akt

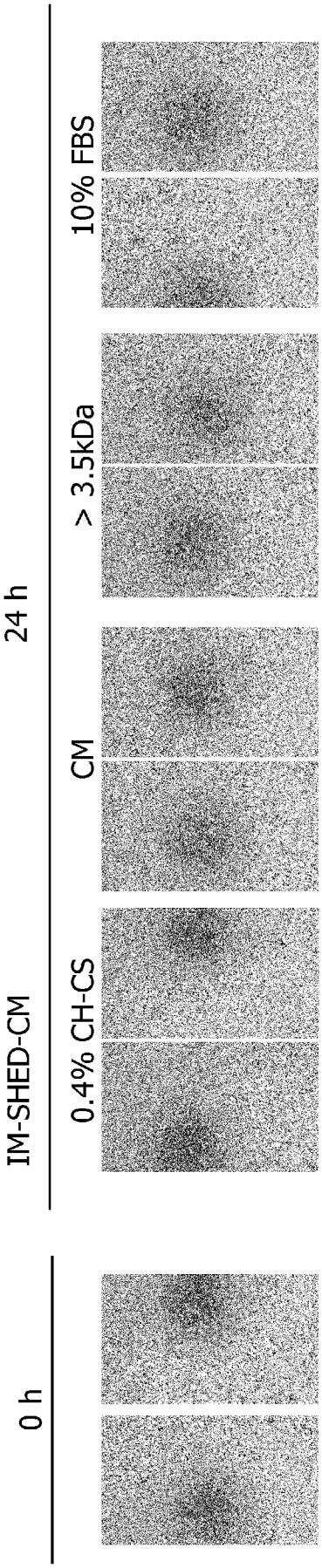
[図13]



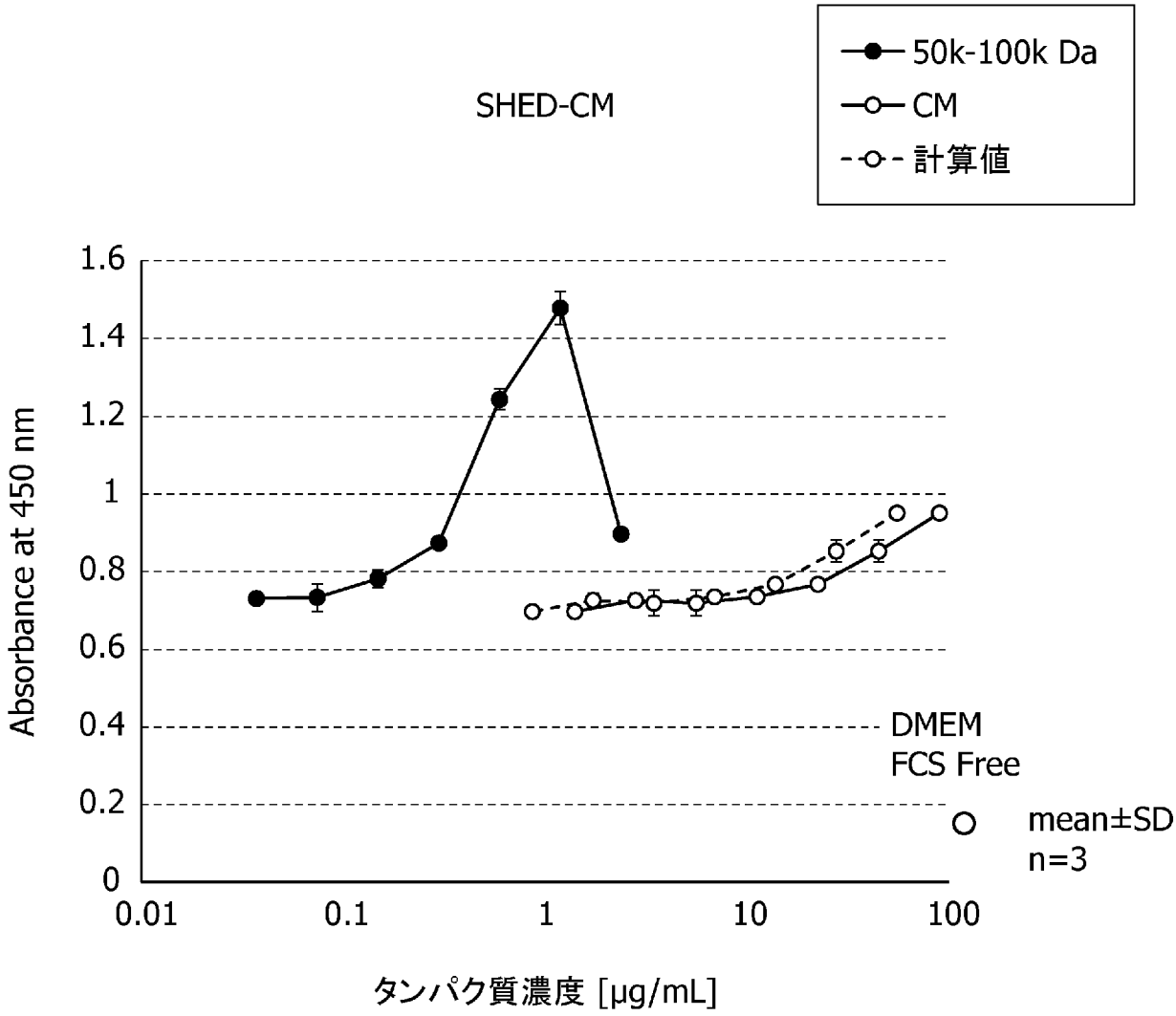
[図14]


IM-SHED-CM
Absorbance at 450 nm
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.10
1.00
10.00
100.00
タンパク質濃度（μg/ml）
CM
> 3.5kDa
mean±SD
n=3

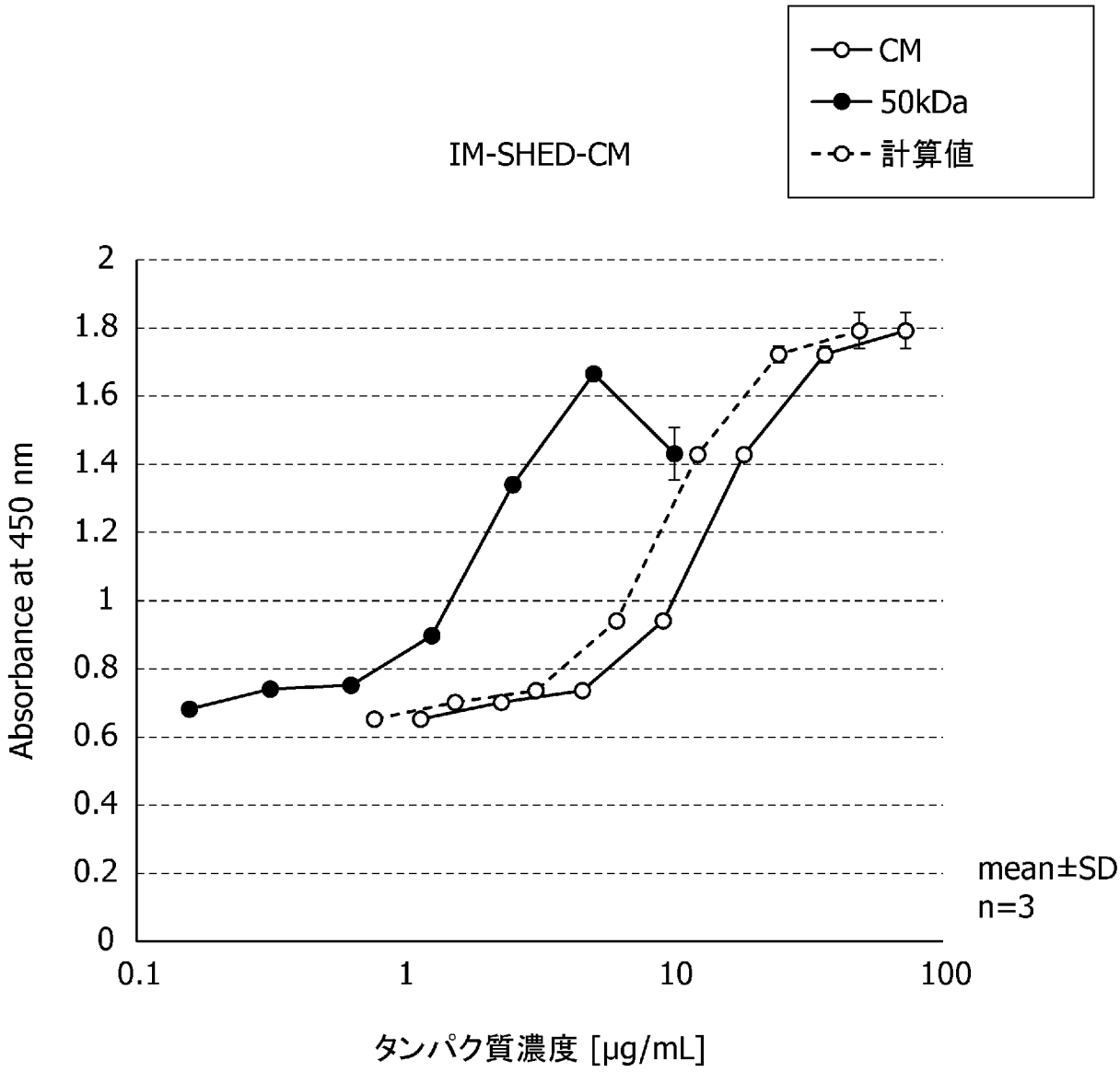
[図15]



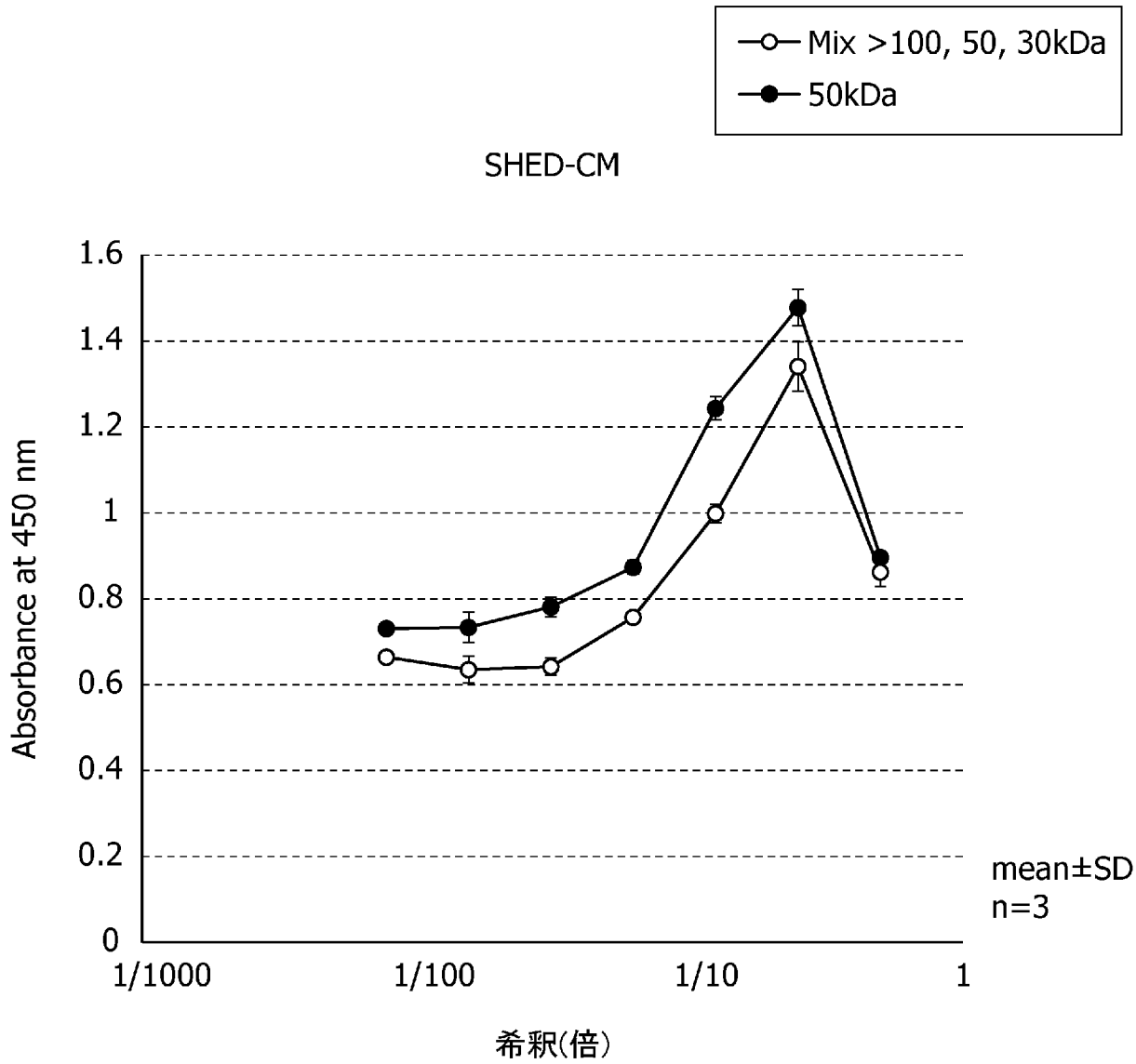
[図16]


SHED-CM
50k-100k Da
CM
計算値
Absorbance at 450 nm
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.01
0.1
1
10
100
DMEM
FCS Free
mean±SD
n=3
タンパク質濃度 [μg/mL]

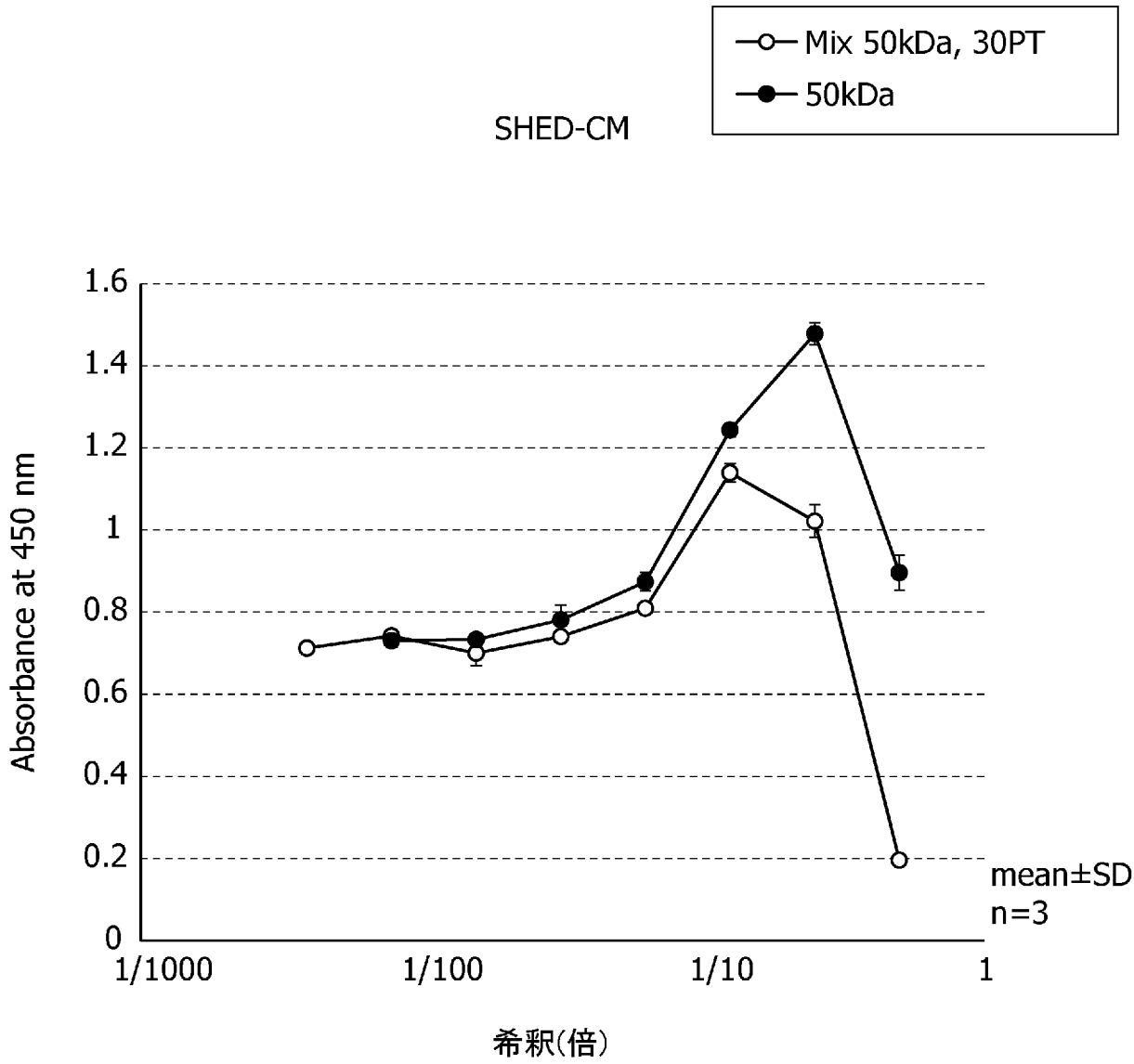
[図17]


IM-SHED-CM
CM
50kDa
計算値
Absorbance at 450 nm
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.1
1
10
100
mean±SD
n=3
タンパク質濃度 [μg/mL]

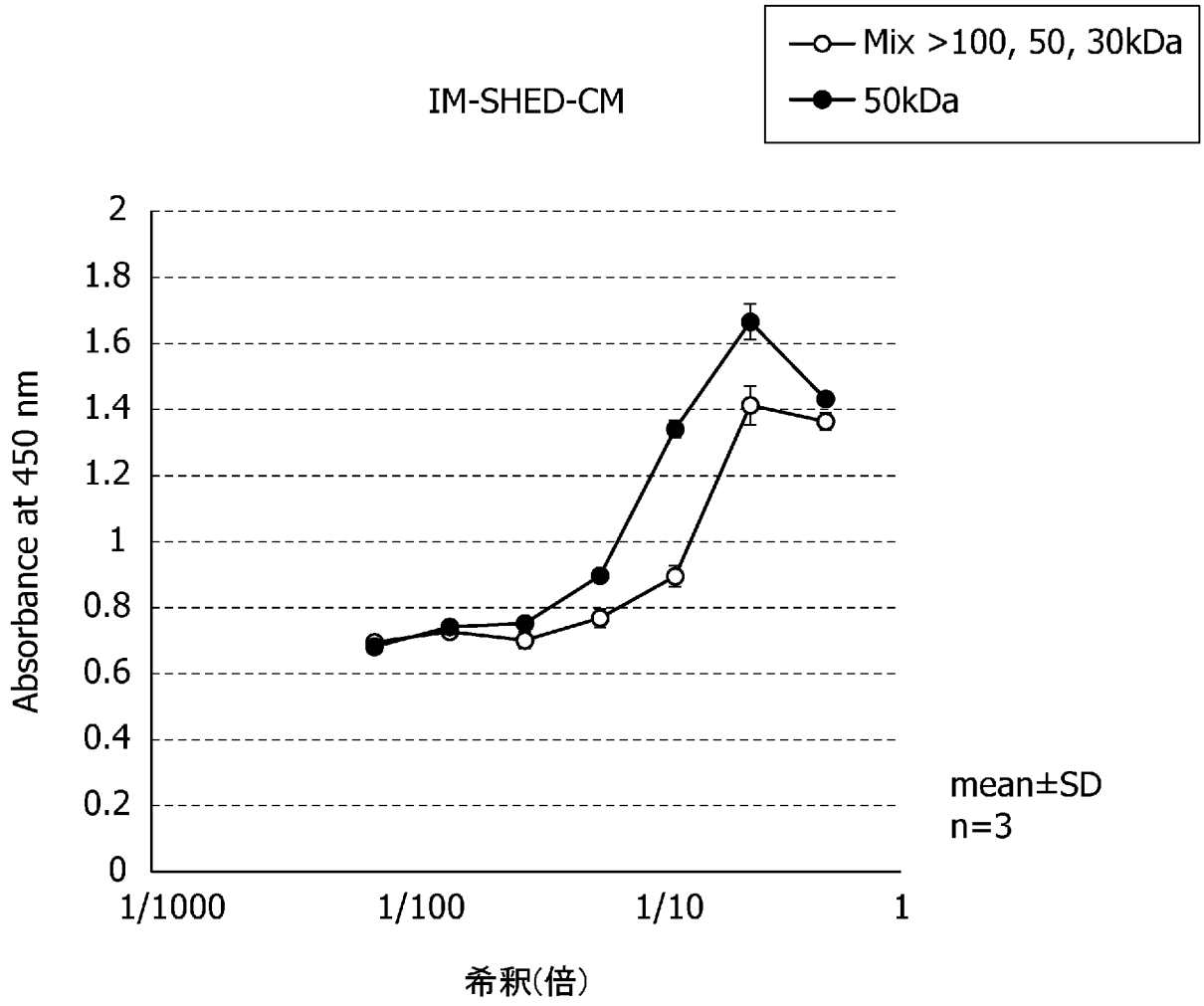
[図18]


Mix >100, 50, 30kDa
50kDa
SHED-CM
Absorbance at 450 nm
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1/1000
1/100
1/10
1
希釈(倍)
mean±SD
n=3

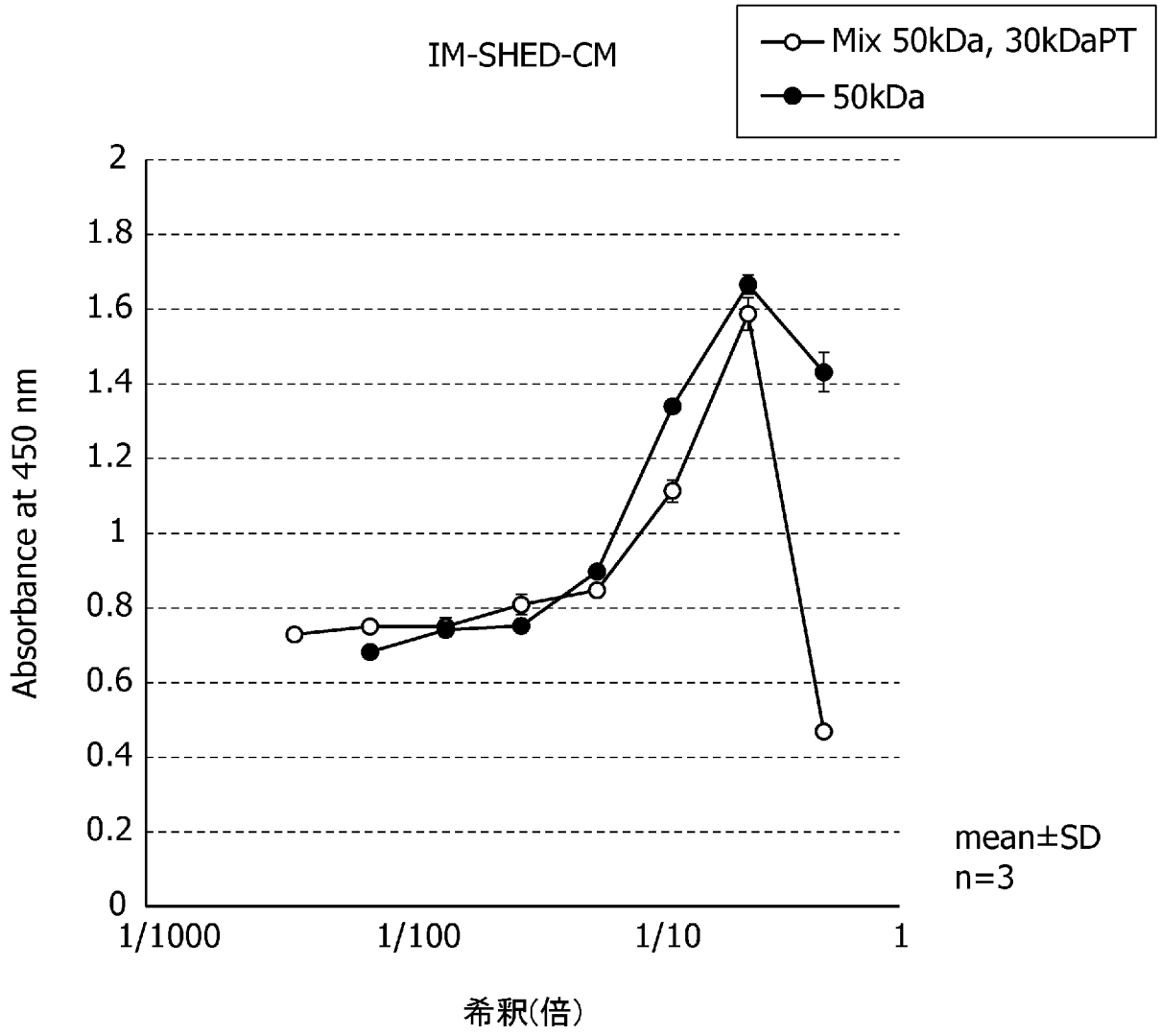
[図19]


Mix 50kDa, 30PT
50kDa
SHED-CM
Absorbance at 450 nm
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1/1000
1/100
1/10
1
mean±SD
n=3
希釈(倍)

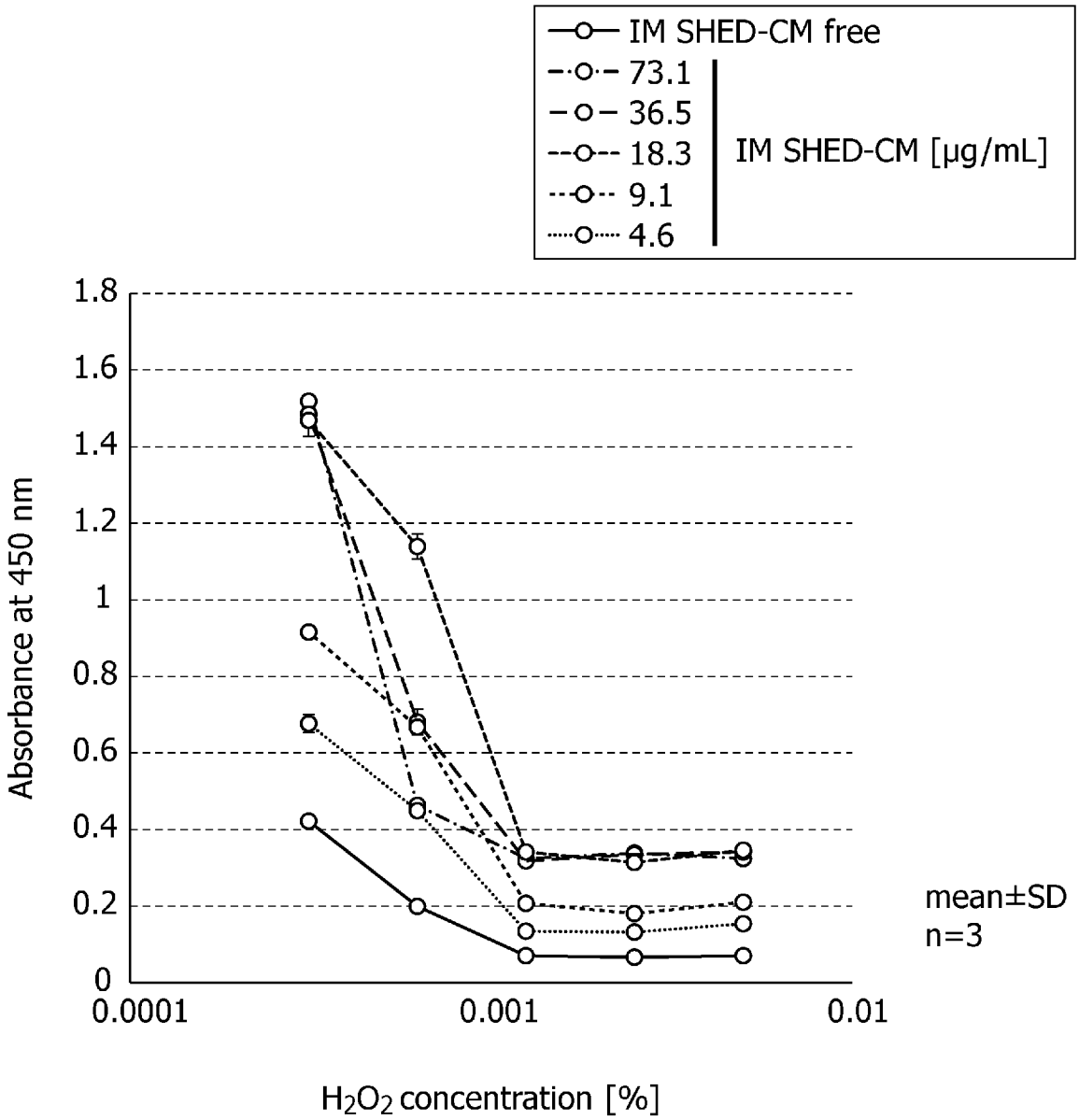
[図20]


Mix >100, 50, 30kDa
50kDa
IM-SHED-CM
Absorbance at 450 nm
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1/1000
1/100
1/10
1
希釈(倍)
mean±SD
n=3

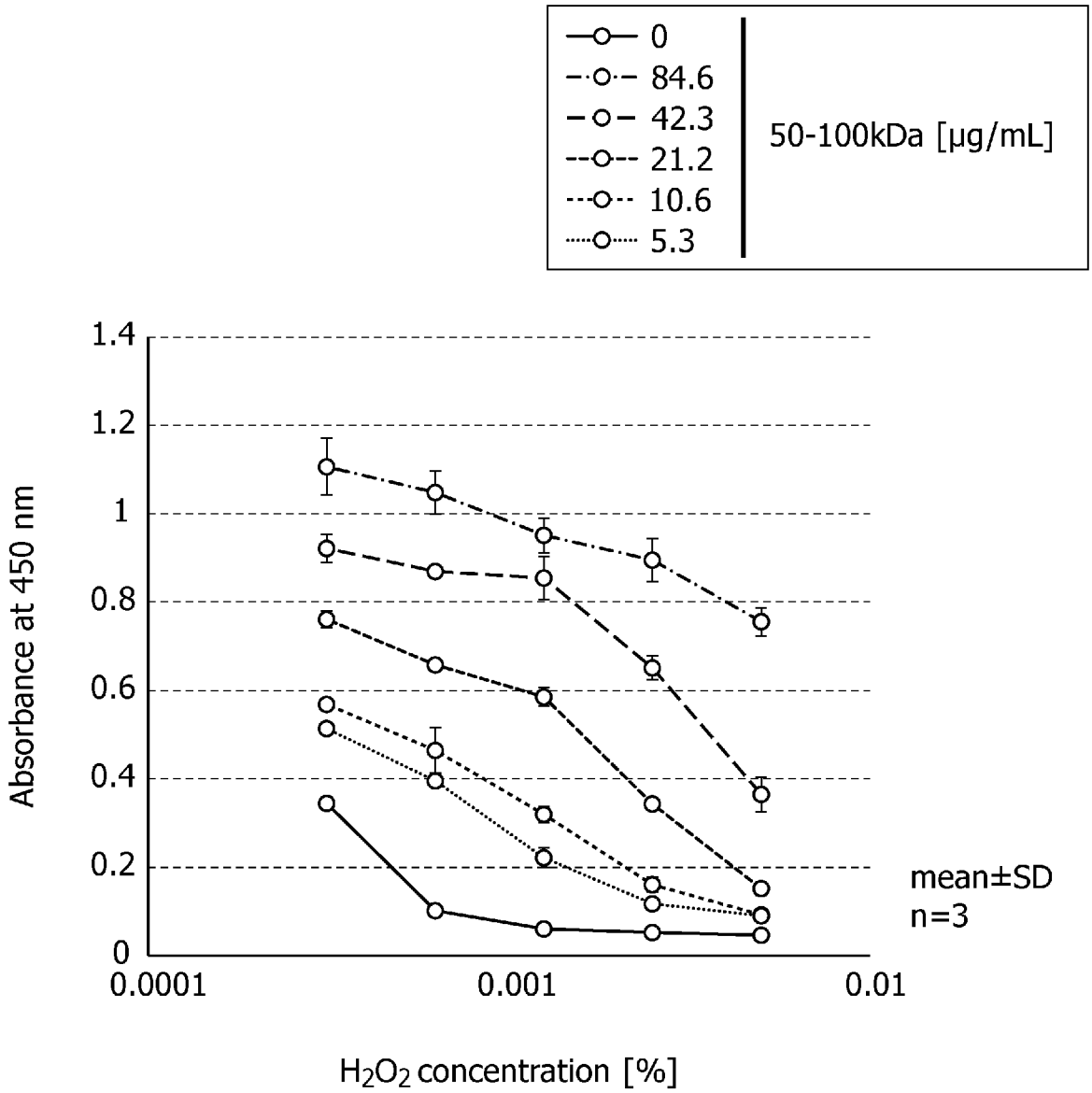
[図21]


IM-SHED-CM
Mix 50kDa, 30kDaPT
50kDa
Absorbance at 450 nm
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1/1000
1/100
1/10
1
希釈(倍)
mean±SD
n=3

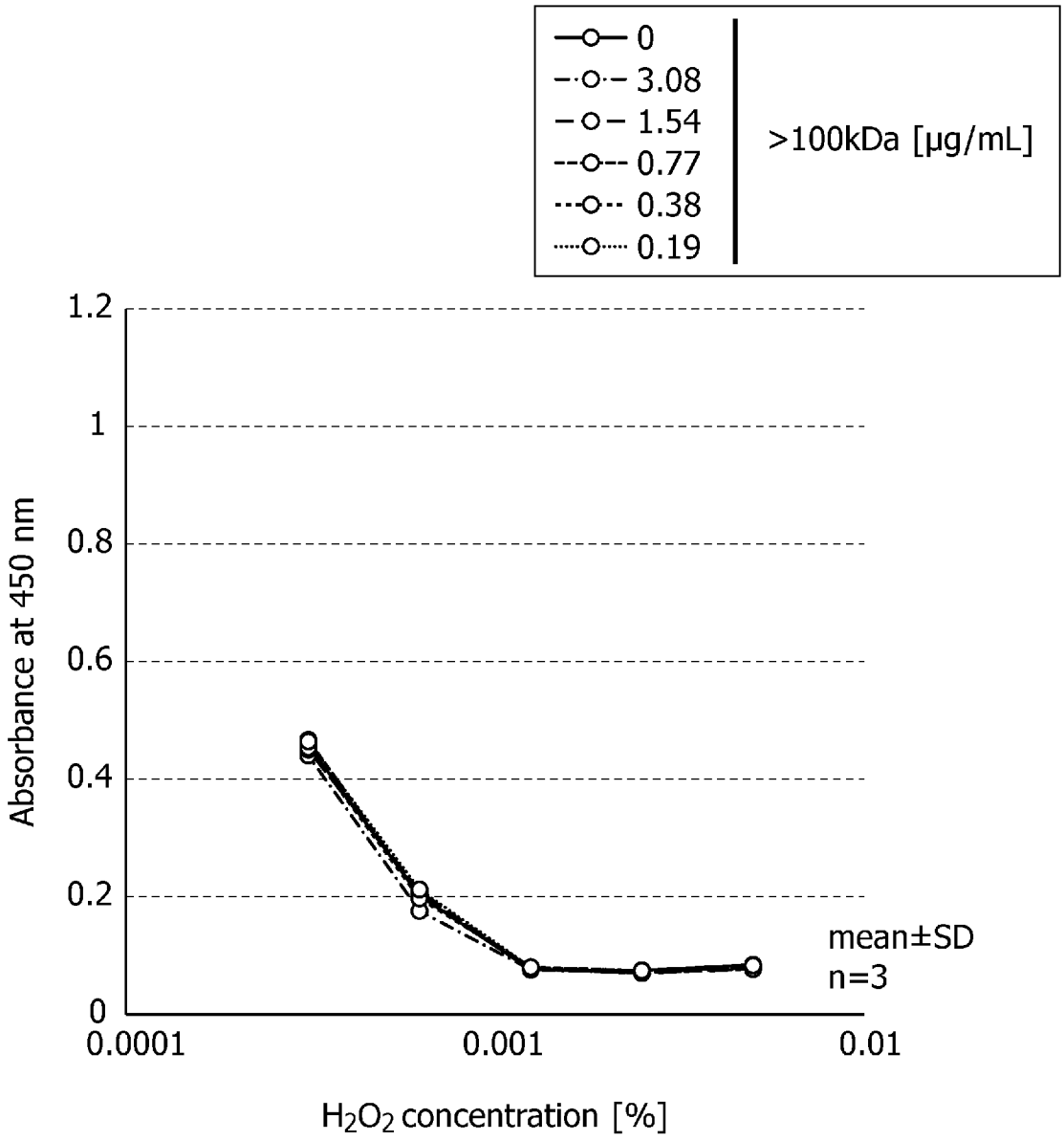
[図22]


IM SHED-CM free
73.1
36.5
18.3
9.1
4.6
IM SHED-CM [μg/mL]
Absorbance at 450 nm
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.0001
0.001
0.01
H2O2 concentration [%]
mean±SD
n=3

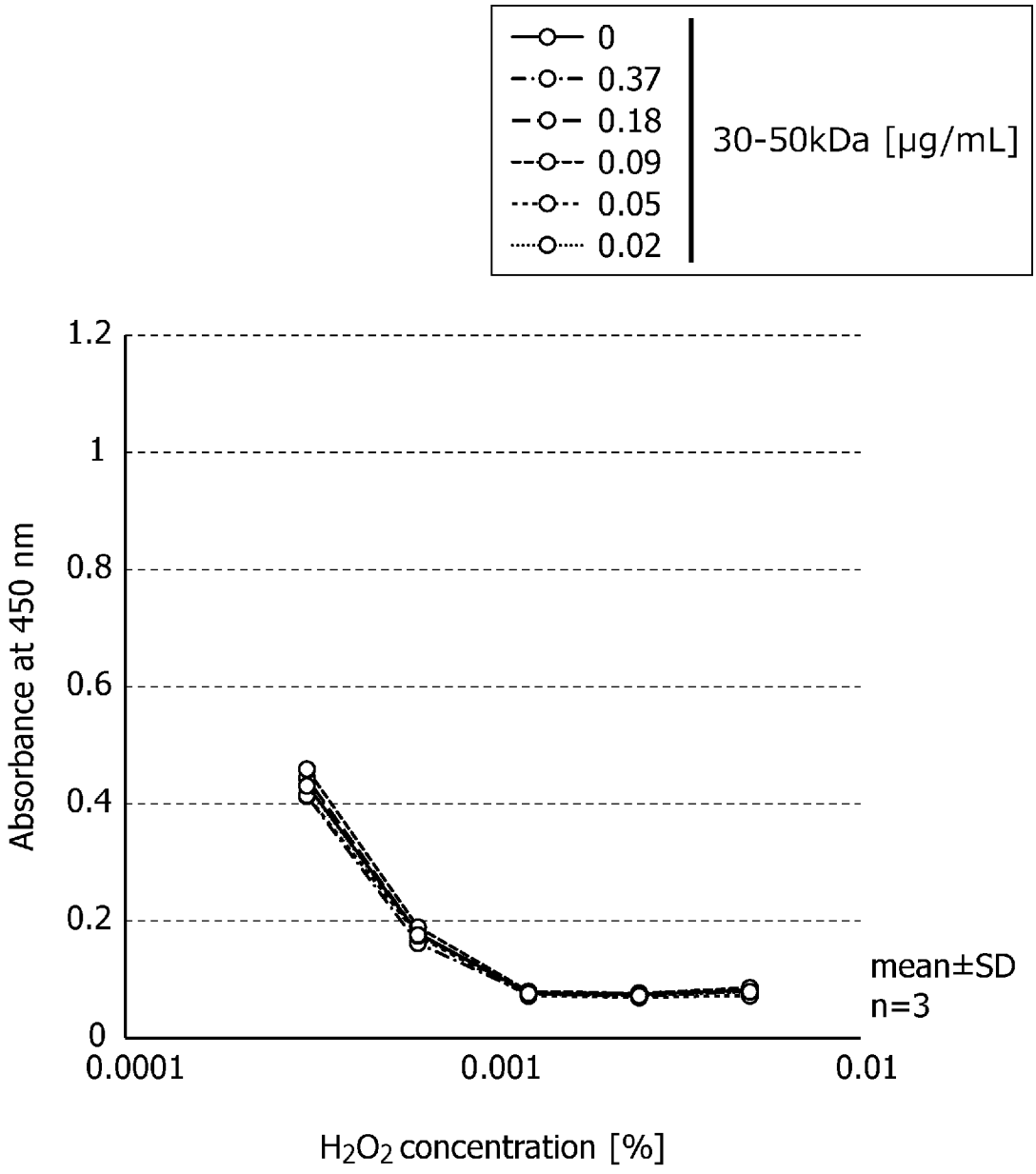
[図23]


0
84.6
42.3
21.2
10.6
5.3
50-100kDa [μg/mL]
Absorbance at 450 nm
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.0001
0.001
0.01
mean±SD
n=3
H2O2 concentration [%]

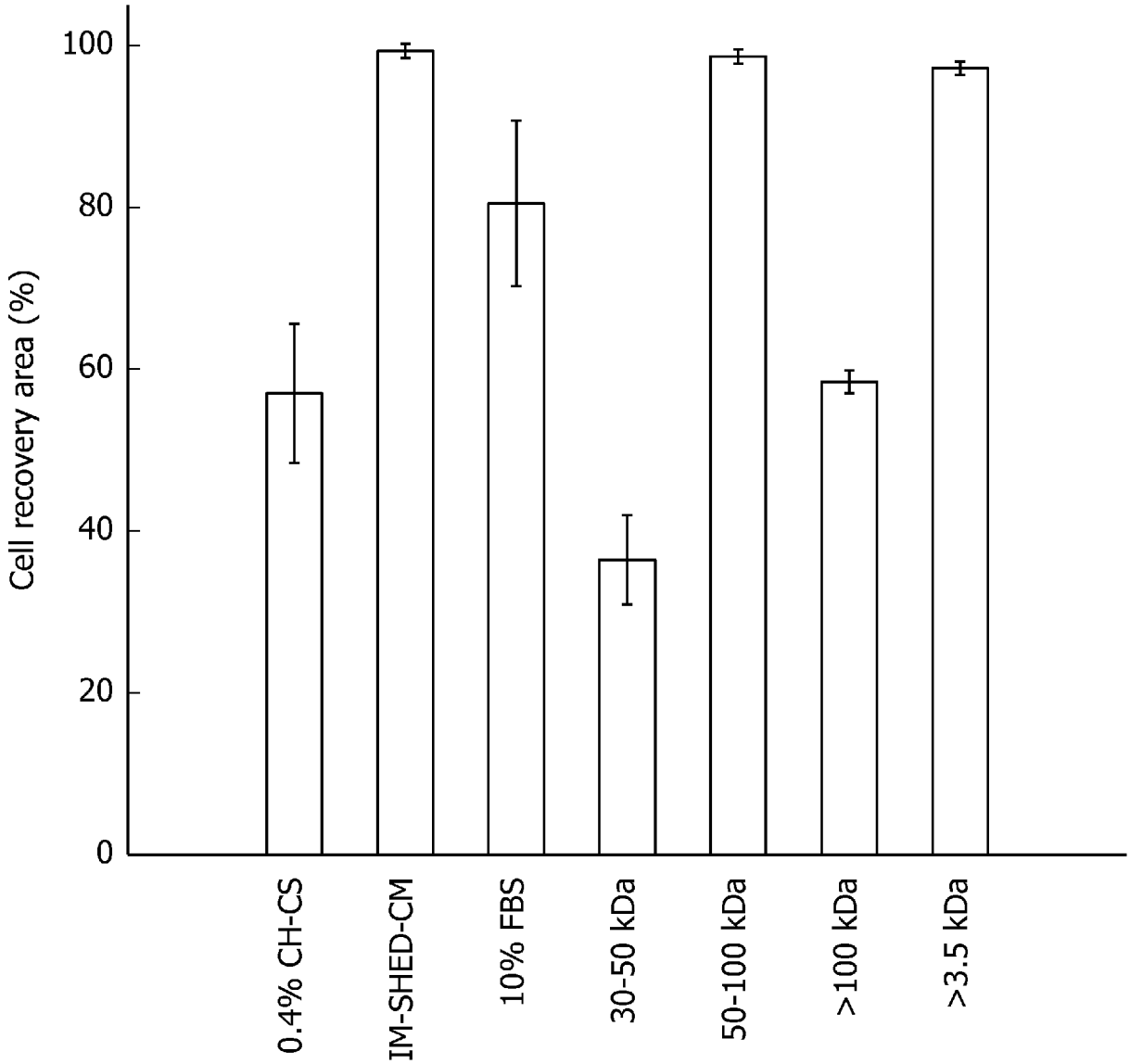
[図24]


0
3.08
1.54
0.77
0.38
0.19
>100kDa [μg/mL]
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Absorbance at 450 nm
mean±SD
n=3
0.0001
0.001
0.01
H2O2 concentration [%]

[図25]


0
0.37
0.18
0.09
0.05
0.02
30-50kDa [μg/mL]
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Absorbance at 450 nm
mean±SD
n=3
0.0001
0.001
0.01
H2O2 concentration [%]

[図26]


Cell recovery area (%)
100
80
60
40
20
0
0.4% CH-CS
IM-SHED-CM
10% FBS
30-50 kDa
50-100 kDa
>100 kDa
>3.5 kDa

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/017330

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/32(2015.01)i; ***A61P 43/00***(2006.01)i
FI: A61K35/32; A61P43/00 107

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)

A61K35/32; A61P43/00

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2014-230685 A (TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIV.) 11 December 2014 (2014-12-11) claim 1, example 3, fig. 4, 5, paragraphs [0018], [0021]	1, 3-7, 9-11
A		2, 8
X	加藤誠 他, ヒト乳歯歯髄幹細胞培養上清が血管神経に及ぼす効果の検討, 糖尿病合併症, vol. 34, supplement 1, 2020, page 259 (W27-4), (KATO, Makoto et al., Diabetic Complications), non-official translation (Examination of the effect of human deciduous dental pulp stem cell culture supernatant on vascular nerves) method, results	1, 4, 6, 7, 10
Y		1, 3-7, 9-11
A		2, 8

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 July 2024	**23 July 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/017330

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	加藤誠 他, 血管新生に対するヒト乳歯歯髄幹細胞培養上清の効果の検討, 糖尿病, vol. 63, Suppl., 2020, p. S-338, ISSN1881-588X, (KATO, Makoto et al., Journal of the Japan Diabetes Society), non-official translation (Examination of the effect of human deciduous tooth pulp stem cell culture supernatant on angiogenesis) method, results	1, 4, 6, 7, 10
Y		1, 3-7, 9-11
A		2, 8
Y	JP 2020-195363 A (PANAGY CO., LTD.) 10 December 2020 (2020-12-10) claim 1, example 1, paragraph [0047]	1, 3-7, 9-11
A		2, 8
Y	WO 2020/130038 A1 (GENESIS INC.) 25 June 2020 (2020-06-25) claims 1, 2, paragraphs [0036], [0037], [0081], test example 1, table 1	1, 3-7, 9-11
A		2, 8
Y	照沼裕 他, 不死化体性幹細胞の培養上清による糖尿病治療の安全性に関する臨床研究, 再生医療, 2015, vol. 14, suppl., page 327 (P-02-032), ISSN 1347-7919, (TERUNUMA, Hiroshi et al., Regenerative Medicine), non-official translation (Clinical research on the safety of diabetes treatment using immortalized somatic stem cell culture supernatants) lines 5-17, 19-21	5, 6, 11
A		2, 8
A	JP 2021-155335 A (UNIV. OF TOKUSHIMA) 07 October 2021 (2021-10-07) claims	1-11
A	CN 109966317 A (CLAIRE MEDICAL-BIOTECHNOLOGY INTERNATIONAL CO.) 05 July 2019 (2019-07-05) claims	1-11
A	MIURA-YURA, Emiri et al., Secreted factors from cultured dental pulp stem cells promoted neurite outgrowth of dorsal root ganglion neurons and ameliorated neural functions in streptozotocin-induced diabetic mice, Journal of Diabetes Investigation, 2020, DOI: 10.1111/jdi.13085 abstract	1-11
P, A	KR 2023-0161580 A (CELL&MATTER) 28 November 2023 (2023-11-28) claims	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/017330

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2014-230685 A	11 December 2014	(Family: none)	
JP 2020-195363 A	10 December 2020	US 2020/0407679 A1 claim 1, example 1, paragraphs [0132], [0133] WO 2020/241132 A1	
WO 2020/130038 A1	25 June 2020	(Family: none)	
JP 2021-155335 A	07 October 2021	WO 2019/230859 A1 claims	
CN 109966317 A	05 July 2019	GB 2568928 A claims TW 201925463 A	
KR 2023-0161580 A	28 November 2023	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/017330

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 35/32(2015.01)i; A61P 43/00(2006.01)i
FI: A61K35/32; A61P43/00 107

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K35/32; A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2014-230685 A (国立大学法人 東京医科歯科大学) 11.12.2014 (2014-12-11) 請求項１、実施例３、図４，５、[0018][0021]	１，３－７，９－１１
A		２，８
X	加藤誠　他，ヒト乳歯歯髄幹細胞培養上清が血管神経に及ぼす効果の検討，糖尿病合併症，Vol.34 Supplement 1 , 2020, p.259 (W27-4) 方法、結果	１，４，６，７，１０
Y		１，３－７，９－１１
A		２，８
X	加藤誠　他，血管新生に対するヒト乳歯歯髄幹細胞培養上清の効果の検討，糖尿病，Vol.63 Suppl , 2020, p.S.338, ISSN1881-588X 方法、結果	１，４，６，７，１０
Y		１，３－７，９－１１
A		２，８

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
16.07.2024	23.07.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
横田　倫子 4U 3764
電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	JP 2020-195363 A (パナジー株式会社) 10.12.2020 (2020-12-10) 請求項１、実施例１、[００４７]	１，３－７，９－１１
A		２，８
Y	WO 2020/130038 A1 (株式会社ジェネシス) 25.06.2020 (2020-06-25) 請求項１，２、[0036][0037][0081]、試験例１、表１	１，３－７，９－１１
A		２，８
Y	照沼裕　他，不死化体性幹細胞の培養上清による糖尿病治療の安全性に関する臨床研究，再生医療，2015，Vol.14 Suppl，p.327(P-02-032)，ISSN 1347-7919 5-17行目、19-21行目	５，６，１１
A		２，８
A	JP 2021-155335 A (国立大学法人徳島大学) 07.10.2021 (2021-10-07) 特許請求の範囲	１－１１
A	CN 109966317 A (CLAIRE MEDICAL-BIOTECHNOLOGY INTERNATIONAL CO.) 05.07.2019 (2019-07-05) claims	１－１１
A	MIURA-YURA, Emiri et al., Secreted factors from cultured dental pulp stem cells promoted neurite outgrowth of dorsal root ganglion neurons and ameliorated neural functions in streptozotocin-induced diabetic mice, Journal of Diabetes Investigation, 2020, DOI: 10.1111/jdi.13085 abstract	１－１１
P, A	KR 2023-0161580 A (CELL&MATTER) 28.11.2023 (2023-11-28) claims	１－１１

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/017330

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2014-230685 A	11.12.2014	（ファミリーなし）	
JP 2020-195363 A	10.12.2020	US 2020/0407679 A1 claim1, Exam1, [0132] [0133] WO 2020/241132 A1	
WO 2020/130038 A1	25.06.2020	（ファミリーなし）	
JP 2021-155335 A	07.10.2021	WO 2019/230859 A1 claims	
CN 109966317 A	05.07.2019	GB 2568928 A claims TW 201925463 A	
KR 2023-0161580 A	28.11.2023	（ファミリーなし）	