

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7547032号
(P7547032)

(45)発行日 令和6年9月9日(2024.9.9)

(24)登録日 令和6年8月30日(2024.8.30)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	35/51 (2015.01)	A 6 1 K	35/51
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	19/04 (2006.01)	A 6 1 P	19/04
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 5
請求項の数 13 外国語出願 (全15頁)			
(21)出願番号	特願2019-54780(P2019-54780)	(73)特許権者	504187858
(22)出願日	平成31年3月22日(2019.3.22)		佛教慈濟醫療財團法人
(65)公開番号	特開2020-152698(P2020-152698 A)		BUDDHIST TZU CHI MEDICAL FOUNDATION
(43)公開日	令和2年9月24日(2020.9.24)		台湾花蓮市中央路三段707號
審査請求日	令和1年10月8日(2019.10.8)		No. 707, Sec. 3, Chung-Yang Rd. Hualien Taiwan
審判番号	不服2021-16268(P2021-16268/J 1)	(74)代理人	100077012
審判請求日	令和3年11月29日(2021.11.29)		弁理士 岩谷 龍
(31)優先権主張番号	108109188	(72)発明者	丁 大清
(32)優先日	平成31年3月18日(2019.3.18)		台湾花蓮市中央路三段707号
(33)優先権主張国・地域又は機関	台湾(TW)	(72)発明者	吳 坤佑
特許法第30条第2項適用 (1)第11届汎太平洋幹細胞及癌症研討会,開催日 平成30年3月24日 (2)		(72)発明者	台湾花蓮市中央路三段707号
最終頁に続く		(72)発明者	張 宇勳
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 間葉系幹細胞のエキソソームおよびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

関節疾患を予防または治療する医薬組成物を調製するための、間葉系幹細胞のエキソソームの使用であって、
前記間葉系幹細胞は、分化誘導されておらず、
前記間葉系幹細胞は、ヒト臍帯間葉系幹細胞であり、
前記関節疾患は、前十字靱帯損傷である、
間葉系幹細胞のエキソソームの使用。

【請求項2】

上記の間葉系幹細胞は、未分化多能性間葉系幹細胞である、請求項1に記載の使用。

10

【請求項3】

上記の間葉系幹細胞は、CD44、CD73、CD90、CD105およびHLA-A、B、Cのうちの少なくとも1つの細胞表面マーカーを示す、請求項1に記載の使用。

【請求項4】

上記の間葉系幹細胞は、CD34、CD45、CD56およびHLA-DRの細胞表面マーカーを示さない、請求項1に記載の使用。

【請求項5】

上記の間葉系幹細胞は、CD44、CD73、CD90、CD105およびHLA-A、B、Cの細胞表面マーカーを示し、CD34、CD45、CD56およびHLA-DRの細胞表面マーカーを示さない、請求項1に記載の使用。

20

【請求項 6】

上記の間葉系幹細胞は、第 3 継代～第 6 継代まで培養される、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 7】

上記の間葉系幹細胞は、血清を含まない培地で培養される、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 8】

上記のエキソソームは、CD 9、CD 63 および CD 81 のうちの少なくとも 1 つの細胞表面マーカーを示す、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 9】

上記のエキソソームは、GM 130 を示さない、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 10】

上記のエキソソームは、CD 9、CD 63 および CD 81 の細胞表面マーカーを示し、GM 130 を示さない、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 11】

上記の医薬組成物は、軟骨組織の保持のために使用されることにより、関節疾患を予防または治療する、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 12】

上記の医薬組成物は、軟骨再生の増進のために使用されることにより、関節疾患を予防または治療する、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 13】

上記の医薬組成物は、必要とする対象に注射で投与される、請求項 1 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、間葉系幹細胞のエキソソームを含む医薬組成物、およびその関節疾患を予防または治療するための使用に関する。

【背景技術】

【0002】

骨関節炎 (osteoarthritis, OA) は、退行性関節疾患とも呼ばれ、関節軟骨の退化および損傷、例えば、軟骨下骨の変化および骨棘の形成を特徴とし、よく見られる慢性変性関節疾患であり、主に高齢者の膝やお尻のような荷重の係る関節に影響を及ぼす。統計によると、10%を超えるアメリカ成人が臨床的に骨関節炎と診断されており、これは入院のよくある原因の 4 位であり、総膝関節置換術および股関節置換術の最も一般的な原因でもある (Murphy, L. & Helmick, C. G., The American Journal of Nursing, 112, S13-19 (2012))。骨関節炎に罹りやすい全身的要因は、年齢、性別、民族、骨密度、エストロゲン補給、遺伝および栄養が含まれ、局所的な生体力学的要因は、肥満、関節損傷、関節変形、運動および筋力低下が含まれ、これらは骨関節炎の悪化を引き起こす (Felson, D. T. et al., Annals of Internal Medicine, 133, 635-646 (2000))。

【0003】

また、骨関節炎は単純な退行性疾患だけではない。最近の研究では、低い炎症作用は、疾患の症状を悪化させるだけでなく、疾患の進行をも加速させることを発見した。例えば、活性化したマクロファージおよび他の先天性免疫細胞は、軟骨損傷を促進させる炎症性サイトカインを放出することができる (Liu-Bryan, R. & Terkeltaub, R., Nat. Rev. Rheumatol., 11, 35-44, (2015))。また、骨関節炎患者から得られた滑膜組織では、TNF- α 、IL1 β 、IL6、IL8 および IL22 などを含む炎症誘発性サイトカインの発現に関連する免疫細胞の数の増加が見られる。一方、MMP 1、3、13 は、細胞外マトリックスのリモデリングに直接関与する。

【0004】

10

20

30

40

50

現在、骨関節炎に対する治療および処置は、薬物治療、非薬物治療および外科的処理が含まれている。

【0005】

骨関節炎を緩和する薬物治療としては、アセトアミノフェン、非ステロイド系抗炎症薬、オピオイド薬、局所鎮痛薬、コルチコステロイド注射剤およびヒアルロン酸注射剤が含まれ (Sinusas, K., Am. Fam. Physician., 2012 Jan. 1; 85 (1): 49 - 56)、グルコサミンおよび硫酸コンドロイチンは一定の保護作用がある (Lee, Y. H., Woo, J. H., Choi, S. J., Ji, J. D. & Song, G. G., Rheumatology International, 30, 357 - 363 (2010))。また、薬物治療と非薬物治療との併用は、疼痛の制御においてはより有効であることを見出した。さらに、運動は、有効な介入治療だけでなく、骨関節炎を予防する方法でもあり、他の物理学療法としては、装具および足用の補助器具が含まれる。

10

【0006】

それにもかかわらず、膝関節、股関節および肩甲上腕関節の総関節置換術は、依然として最も有効な治療方法であり、関節機能をほぼ正常に回復させることができる。しかしながら、通常、骨関節炎の軟骨欠損は大きすぎるので、骨軟骨 (osteochondral) 移植、自己軟骨膜、骨膜移植および軟骨細胞の移植がいずれも適用できない可能性がある (Gilbert, J. E., The American Journal of Knee Surgery, 11, 42 - 46 (1998), Versier, G., Dubrana, F. & French Arthroscopy, S., Orthopaedics & Traumatology, Surgery & Research: OTSR 97, S140 - 15 (2011))。最近の研究では、新たに発見されたカルトゲニン (kartogenin, KGN) は、軟骨組織における間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) を刺激して軟骨細胞に分化させることができ、骨関節炎の初期段階において、KGNの局所投与により、損傷関節を改善できることが示されている (Johnson, K. et al., A stem cell - based approach to cartilage repair, Science 336, 717 - 721 (2012))。

20

【0007】

また、組織工学および幹細胞療法も、骨関節炎の研究に適用されている (Matsumoto, T. et al., Arthritis and Rheumatism, 60, 1390 - 1405 (2009); Toghraie, F. S. et al., The Knee, 18, 71 - 75 (2011))。幹細胞療法は、永久的な生物学的治療を提供することができるが、胚性幹細胞 (embryonic stem cells, ESCs)、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs)、胎児幹細胞および成人幹細胞などの様々な起源の幹細胞はいずれもある程度の分化能があり、骨関節炎を治療するための幹細胞療法は幹細胞の軟骨に分化する能力に依存するので、移植した幹細胞が罹患関節において生存することが必要となり、幹細胞の自己複製能と分化能が再生医療にとって非常に重要となる。

30

40

【0008】

近年、広範囲の幹細胞研究では、ヒト胚性幹細胞 (human embryonic stem cells, hESCs) および iPSCs は、ほとんどすべての種類のヒト細胞に分化でき、高い自己複製能の利点を有することを見出した。組織工学および再生医療において、hESCs は幹細胞療法の優先的な選択であり、例えば、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄損傷、卒中、心臓病、糖尿病、造血系疾患、肝疾患および肺疾患などの多くの疾患の治療に使用されている (Keller, G., Genes & Development, 19, 1129 - 1155, (2005)) が、iPSCs は、個人カスタマイズの潜在力をより有するので、ESCs よりも好ましい。

【0009】

50

しかしながら、h E S C s および i P S C s の幹細胞療法は欠点がある。例えば、幹細胞由来のヒト細胞は、奇形腫の形成や免疫反応を引き起こすリスクがある (Thomson, J. A. et al., Science, 282, 1145 - 1147 (1998))。また、マウス胚性線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts、MEFs) は、h E S C s の成長を維持するための最も一般的に使用されているフィーダー層であるが、ヒト細胞成分ではないので、ヒトにおける臨床的使用を制限する可能性があるため、このような h E S C s 培養法は疑問視されている。h E S C s および i P S C s を培養するための新しい方法としては、例えば、フィーダー層なしおよび血清なし、ならびに他のヒト由来細胞との共培養などの方法が開発されているが、腫瘍形成性が依然としてこれらの幹細胞の臨床応用を制限している (Xu, C. et al., Nature Biotechnology, 19, 971 - 974, (2001); Richards, M., Fong, C. Y., Chan, W. K., Wong, P. C. & Bongso, A., Nature Biotechnology, 20, 933 - 936 (2002))。

10

【0010】

さらに、骨関節炎の関節に存在するインターロイキン - 1 α や TNF - α などの異化因子は、幹細胞の軟骨細胞分化を阻害することによって軟骨生成を減少させるので、患者の関節の修復に対しては、軟骨細胞の導入に加えて、炎症性サイトカインの減少も同様に重要である。

【0011】

20

したがって、骨関節炎の治療法は、依然として打破する必要がある、安全で有効な治療法のさらなる開発が必要となる。

【発明の概要】

【0012】

本開示は、間葉系幹細胞のエキソソームを含む医薬組成物、およびその関節疾患を予防または治療するための使用を提供する。具体的には、本開示は、対象の関節疾患を予防または治療する方法であって、対象に医薬組成物を投与することを含み、当該医薬組成物は治療有効量の間葉系幹細胞のエキソソームを含む方法を提供する。

【0013】

本開示の一つの具体的な実施形態において、前記間葉系幹細胞は、臍帯間葉系幹細胞、胎児間葉系幹細胞、臍帯血間葉系幹細胞、胎盤間葉系幹細胞、羊水間葉系幹細胞、骨髄間葉系幹細胞または脂肪間葉系幹細胞である。別の具体的な実施形態において、前記間葉系幹細胞は、ヒト臍帯間葉系幹細胞である。さらに別の実施形態において、前記間葉系幹細胞は、分化誘導されていない。一つの具体的な実施形態において、前記間葉系幹細胞は、未分化多能性間葉系幹細胞である。別の具体的な実施形態において、前記間葉系幹細胞は、第3継代～第6継代まで培養される。さらに別の実施形態において、前記間葉系幹細胞は、血清を含まない培地で培養される。

30

【0014】

本開示の一つの具体的な実施形態において、前記間葉系幹細胞は、CD44、CD73、CD90、CD105 および HLA - ABC のうちの少なくとも1つの細胞表面マーカーを示す。別の具体的な実施形態において、前記間葉系幹細胞は、CD34、CD45、CD56 および HLA - DR の細胞表面マーカーを示さない。さらに別の実施形態において、前記間葉系幹細胞は、CD44、CD73、CD90、CD105 および HLA - ABC の細胞表面マーカーを示し、CD34、CD45、CD56 および HLA - DR の細胞表面マーカーを示さない。

40

【0015】

一つの具体的な実施形態において、前記対象はヒトである。別の具体的な実施形態において、前記関節疾患は、関節軟骨欠損、骨関節炎、慢性関節リウマチ、変形性関節症、肩関節周囲炎、軟骨退化または前十字靱帯損傷である。さらに別の実施形態において、前記関節疾患は骨関節炎である。一つの具体的な実施形態において、前記医薬組成物は、必要

50

とする対象に注射で投与される。

【 0 0 1 6 】

一つの具体的な実施形態において、前記医薬組成物は、損傷した関節の修復、軟骨組織の保持、または軟骨再生の増進のために使用されることにより、関節疾患を予防または治療する。

【 0 0 1 7 】

一つの具体的な実施形態において、本開示の関節疾患を予防または治療するための医療組成物を使用した対象は、本開示の組成物を使用していない対象に比べて、より厚い軟骨組織を有する。別の具体的な実施形態において、本開示の関節疾患を予防または治療するための医療組成物を使用した対象は、使用していない対象に比べて、軟骨組織の厚さが少なくとも2倍となる。さらに別の具体的な実施形態において、本開示の関節疾患を予防または治療するための医療組成物を使用した対象は、使用していない対象に比べて、軟骨組織の厚さが2.5倍以上となる。

10

【 0 0 1 8 】

一つの具体的な実施形態において、前記医療組成物における前記エキソソームは、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ 個の間葉系幹細胞から産生される。別の具体的な実施形態において、前記エキソソームは、CD9、CD63およびCD81のうちの少なくとも1つの細胞表面マーカーを示す。さらに別の具体的な実施形態において、前記エキソソームは、GM130の細胞表面マーカーを示さない。またさらに別の具体的な実施形態において、前記エキソソームは、CD9、CD63およびCD81の細胞表面マーカーを示し、GM130の細胞表面マーカーを示さない。

20

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 9 】

【図1】動物モデルにおいて、エキソソームで修復されていないOA群およびエキソソームで修復されたOA + EXO群の関節を目で検査することを示す図である。図中の矢印は関節軟骨が破壊された箇所を示す。

【 0 0 2 0 】

【図2】正常の膝関節とOA群の関節についての組織学的評価および免疫組織化学的分析の結果を示す図である。

【 0 0 2 1 】

【図3A - D】ヒト臍帯間葉系幹細胞の細胞表面マーカーの特徴および分化能を示す図である。図3Aにおいて、第3継代のヒト臍帯間葉系幹細胞のフローサイトメトリー結果は、当該細胞が細胞表面マーカーCD44、CD73、CD90、CD105およびHLA-ABCを示すが、細胞表面マーカーCD34、CD45、CD56およびHLA-DRを示さないことを示す。図3Bにおいて、14日後のヒト臍帯間葉系幹細胞は、脂肪細胞の生成を示すオイルレッド染色を示す。図3Cにおいて、14日間の骨形成作用後のヒト臍帯間葉系幹細胞は、骨細胞の生成を示すアリザリンレッド染色を示す。図3Dにおいて、軟骨生成培地中で3週間培養したヒト臍帯間葉系幹細胞は、軟骨細胞の生成を示す塊を形成する。スケールバー = $100 \mu\text{m}$ 。

30

【 0 0 2 2 】

【図4】細胞表面マーカーCD9、CD63およびCD81を示すが、細胞表面マーカーGM130は示さないという、精製されたヒト臍帯間葉系幹細胞エキソソームの細胞表面マーカーの特徴を示す図である。

40

【 0 0 2 3 】

【図5A - F】エキソソームで修復されていないOA群（図5A、図5C、図5E）およびエキソソームで修復されたOA + EXO群（図5B、図5D、図5F）の関節の異なる拡大倍率でのアグリカン（aggrecan）の免疫組織化学的分析の結果を示す図である。図5Cおよび図5Dにおけるスケールバー = $1000 \mu\text{m}$ 、図5Eおよび図5Fにおけるスケールバー = $100 \mu\text{m}$ 、矢印は骨関節炎が発生した軟骨の内側を示す。

【 0 0 2 4 】

50

【図6】エキソソームで修復されていないOA群およびエキソソームで修復されたOA + EXO群の軟骨の厚さの比較統計図である。* * $p < 0.01$ 。マン-ホイットニー検定を用いて比較する ($n = 5$)。

【発明を実施するための形態】

【0025】

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells、MSCs) は、異なる起源に由来する様々な種類、例えば、骨髄間葉系幹細胞 (bone marrow-mesenchymal stem cells、BM-MSCs)、臍帯血間葉系幹細胞 (umbilical cord blood-mesenchymal stem cells、UCB-MSCs)、ヒト臍帯間葉系幹細胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells、HUCMSCs)、脂肪組織間葉系幹細胞 (adipose tissue-derived stem cells、ADSCs)、筋肉幹細胞 (muscle-derived stem cells、MDSCs) および歯髄幹細胞 (dental pulp stem cells、DPSCs) などを含み、これらは幹細胞療法における軟骨細胞の再生に使用されている。これらの間葉系幹細胞において、骨髄間葉系幹細胞、脂肪組織間葉系幹細胞および筋肉幹細胞は、数が豊富であり、骨関節炎のリスクがある成人から単離できるため、骨関節炎の幹細胞療法に使用される潜在力を有する。

【0026】

軟骨細胞への直接分化により損傷した骨関節炎の関節を修復することに加えて、間葉系幹細胞のパラクリン (paracrine) 作用は、免疫細胞に対して重要な抗炎症作用および免疫抑制作用を有する。間葉系幹細胞は、T細胞と相互作用し、初代Tリンパ球の増殖を阻害し、Th1またはTh17表現型に分化する。環境からの可溶性および接触依存性のシグナルはいずれも間葉系幹細胞の治療効果を引き起こすことができるので、間葉系幹細胞によって細胞外環境に分泌される様々なインターロイキンおよび細胞外小胞 (extracellular vesicles、EVs) は、骨関節炎の治療において重要な役割を果たす。

【0027】

細胞外小胞は、細胞間コミュニケーションの重要なメディエータであり、正常な生理学的機能に関与するだけでなく、疾患の発生および発症にも関与する。エキソソームは、細胞外小胞の一種であり、直径が40~100nmであり、血液、尿液、気管支肺泡洗浄液、母乳、羊水、滑液、胸膜滲出液および腹水などを含むあらゆる種類の体液から遠心分離によって単離できる。また、エキソソームは特異的なマーカーが欠乏することが知られている。

【0028】

間葉系幹細胞の細胞外小胞 (MSC-EV) は、本来の機能を失うことなく保存することができ、また安全性を有するので、間葉系幹細胞の直接移植に代わる代替的な無細胞療法となり得る。間葉系幹細胞の細胞外小胞は、心血管疾患、急性腎臓または肝臓の損傷、肺損傷および皮膚創傷治癒の様々な動物モデルにおいて研究されている (Rani, S. et al., Mol. Ther., 23, 812-823, (2015)) が、これまで、骨関節炎モデルにおける間葉系幹細胞の細胞外小胞に関する研究がなかった。

【0029】

骨関節炎の病原性メカニズムを代表できる動物モデルは、新しい治療法の開発にとっては非常に重要であり、患者の関節に関連する臨床的および病理学的変化を模倣しなければならない。本開示は、前十字靱帯切断術 (anterior cruciate ligament transection、ACLT) の骨関節炎のウサギモデルを使用し、このモデルは、骨関節炎の病因を究明するために使用されたことがあり、また、幹細胞療法を含む骨関節炎治療法のためにも使用されたこともある。これまで、この動物モデルは、エキソソーム治療法に関する研究がなされていなかった。

【0030】

10

20

30

40

50

以下、特定の具体的な実施形態により本開示の実施形態を説明するが、当業者は本開示の内容に基づいて、本開示の利点および効果を容易に理解することができる。本開示は、他の異なる実施形態によっても実施または適用することができ、本明細書における詳細は、異なる観点および用途に基づいて、本開示の精神から逸脱することなく、異なる修正および変更を行うこともできる。以下の実施例は、例示のみを目的としており、本開示の限定として解釈されるべきではない。

【実施例】

【0031】

実施例1：動物モデルの確立

【0032】

この実施例では、12匹の14ヶ月齢ニュージーランド白ウサギ(New Zealand White, NZW)を使用した。ウサギの膝関節を、(1)OA群：骨関節炎を誘発し、未治療、n = 6、および(2)実験群(OA + EXO)：骨関節炎を誘発し、エキソソームによる治療を施し、n = 6という2つの群に分けた。

【0033】

すべてのウサギをケタミン(100 mg / kg)およびキシラジン(8 mg / kg)の筋肉内注射で麻酔した。両膝を剃毛して、ポビドンヨード液(Betadine (R))で消毒した。経皮的に内側膝蓋骨の切り口を作り、関節切開術を行って、膝蓋骨を横方向に転位させ、膝を完全に屈曲させ、前十字靱帯(anterior cruciate ligament, ACL)が見られるようになった後、15番の刃でクロスカットし、関節を滅菌食塩水で洗浄して、縫合した。関節包および関節腔滑膜を4 - 0ポリプロピレン縫合糸で縫合し、皮膚を3 - 0ナイロン縫合糸で縫合した。手術後、すべてのウサギをケージに戻し、自由に動かして、痛みを緩和するために7日間0.2 mg / kg / 日のメロキシカムを経口で投与した。

【0034】

前十字靱帯切断術の2ヶ月後、各群のウサギ膝関節の変化を以下の方法で調べた。

【0035】

まず、関節の表面を目で検査した。ウサギを安楽死させた後、大腿骨遠位端および脛骨近位端の表面を露出させて目で検査し、2 mLのインディアンインクをシリンジで脛骨プラトーに注入し、2分間後、表面を食塩水で洗浄し、脛骨プラトーの染色パターンを目で観察した。その結果、図1に示すように、OA群の軟骨内側は軟骨が激しく破壊されたことを示し(矢印箇所)、また、OA群の膝関節は有意な軟骨破壊を示した(矢印箇所)。

【0036】

組織変化を顕微鏡で直接観察し、軟骨破壊箇所をランダムに6点を選んでそれらの厚さを測定し、その結果は、図6におけるOA群で示した通りであった。図6の全てのデータは、中央値および範囲として表されている。

【0037】

組織学的評価は以下の通りであった。大腿骨遠位端および近位脛骨近位端のプラトーを除去し、10%緩衝ホルマリン(Sigma)で48時間固定した後、試料を10%EDTA(Gibco、グランドアイランド、NY、米国)で2週間脱灰し、4つの切片に切った。全ての切片をパラフィンに包埋し、連続的な矢状切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン(hematoxylin & eosin, H & E, Sigma)およびサフラニンO(safranin O, Sigma)で染色した。

【0038】

免疫組織化学的分析の方法は以下の通り行われた。各群の2つの大腿骨遠位端を得た後、最適切断温度(optimal cutting temperature, OCT)化合物(Miles, Elkhart, IN)に急速に包埋し、液体窒素中で急速凍結し、使用するまで-80℃で保存した。

【0039】

大腿骨関節の切片を補水した後、内在性ペルオキシダーゼを3%過酸化水素(Sigma)

10

20

30

40

50

a) でブロックし、PBS (pH 7.4、Sigma) 中の 2.5% ヒアルロニダーゼ (Sigma) および 1 mg/mL プロナーゼ (Pronase) の混合物を 37 で 1 時間処理し、II 型コラーゲンを回収し、また、X 型コラーゲンの回収は、37 で 0.1 ユニット/mL のコンドロイチナーゼ ABC (Sigma) で 1 時間処理し、トリス-HCl (pH 3.0、MDBio、台北、台湾) 中の 1 mg/mL ペプシン (Sigma) で 37 で 15 分間処理した。次に、Ultra V Block (Thermo Scientific、フレモント、CA) を用いて切片を 10 分間ブロックし、一次抗体 (II 型コラーゲンは、マウスモノクローナル抗体であり、1:200、CP18、Calbiochem、La Jolla、CA。X 型コラーゲンは、ラットポリクローナル抗体であり、1:200、ab58632、Abcam、Cambridge、MA) と 37 で 4 時間反応した。

10

【0040】

二次抗体と 30 分間反応した後、II 型コラーゲンは、ビオチン化ヤギ抗マウス免疫グロブリン (Dako、Carpinteria、CA) を使用し、また、X 型コラーゲンは、ビオチン化ヤギ抗ラット免疫グロブリン (Biocare Medical、Walnut Creek、CA) を使用し、続いてワサビペルオキシダーゼ結合したストレプトアビジン (Biocare Medical) を使用して反応した。

【0041】

0.01% 過酸化水素を含有する 3,3'-ジアミノベンジジン溶液で切片を染色した後、ヘマトキシリン (Sigma) で対比染色し、Image-Pro Plus 5.0 版ソフトウェアを用いて、各大腿骨の関節軟骨において総面積に対する II 型コラーゲンおよび X 型コラーゲン染色領域の比率を測定した。

20

【0042】

結果は図 2 に示すように、H&E 染色、サフラニン O 染色および II 型コラーゲン免疫組織化学的分析では、OA 群関節においては有意な軟骨破壊を示したため、この動物モデルは、OA の病理性メカニズムを模倣し、類似の疾患特徴を示すことができると考えられるので、OA 療法を効果的に評価するためのモデルとすることができる。

【0043】

実施例 2: ヒト臍帯間葉系幹細胞 (HUCMSCs) の増幅

【0044】

ヒト臍帯の入手および使用方法は、仏教慈濟総合病院の人体試験委員会 (IRB 100-166) によって承認され、本実験方法は、ヘルシンキ宣言に従って行われ、地域の倫理審査委員会の許可も得られ、また、実験の前に全被験者のインフォームド・コンセントが得られた。ヒト臍帯間葉系幹細胞を得るための詳細な方法は、当技術分野において公知であり、この実施例の具体的な実施形態は以下の通りであった。

30

【0045】

簡単に説明すると、ヒト臍帯試料 (長さ 20 cm、重量 20 g) を、ハンク平衡塩溶液 (Gibco/BRL 14185-052、グランドアイランド、NY、米国) を含む滅菌容器に収集し、24 時間以内に血管および羊膜からウォートンゼリー (Wharton's jelly, WJ) を単離した。

40

【0046】

まず、 Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まないリン酸緩衝液 (PBS、Bioest、Nuaille、フランス) でヒト臍帯を 3 回洗浄し、正中方向にハサミで切断し、臍動脈、静脈血管および輪郭膜をウォートンゼリーと解離し、ウォートンゼリーを 0.5 cm³ 未満の断片に切断し、I 型コラーゲナーゼ (Sigma、St. Louis、MO、米国) で処理し、37、95% 空気および 5% CO₂ の加湿環境で 14~18 時間反応させた。

【0047】

次に、上記の外植片を、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum、FBS、Biological Industries、Kibbutz Beit Haemek、イスラエル) と抗生物質とを含有する低グルコース DMEM 培地 (Dulbe

50

cco's modified Eagle's medium、LG、Sigma) 中に、37、95% 空気および5 CO₂の加湿環境で培養した。細胞を外植片から移行させるように5~7日間静置し、得られたヒト臍帯間葉系幹細胞を第1継代とした。培地を週に2回交換し、細胞が90%コンフルエントに達したときに、細胞を継代培養した。

【0048】

実施例3：ヒト臍帯間葉系幹細胞(HUCMSCs)の特徴および分化能

【0049】

第3継代または第4継代の培養したヒト臍帯間葉系幹細胞の表面分子特徴をフローサイトメトリーによって測定した。Accutase(R)(Millipore、Billerica、MA、米国)を使用して、細胞をPBS中で単離し、2%ウシ胎児血清アルブミン(Sigma)と0.1%アジ化ナトリウム(Sigma)とを含有するPBSで洗浄し、続いてCD29、CD34、CD44、CD45、CD56、CD73、CD90、CD105、HLA-ABCおよびHLA-DR(BD Pharmingen、フランクリンレイクス、NJ、米国)などを含んでフルオレセインイソチオシアネートまたはフィコエリスリンに結合した種々な抗体と一緒に反応し、フローサイトメーター(Beckton Dickinson、San Jose、CA、米国)を使用して細胞を分析した。

10

【0050】

その結果、図3Aに示すように、ヒト臍帯間葉系幹細胞が示す細胞表面マーカーは、CD44、CD73、CD90、CD105およびHL-ABCがあり、一方、示さない細胞表面マーカーは、CD34、CD45、CD56およびHLA-DRがあった。

20

【0051】

ヒト臍帯間葉系幹細胞の脂肪細胞に分化する能力は、脂質生成の誘導という方式によって試験した。合計 5×10^4 個のヒト臍帯間葉系幹細胞を、脂肪生成培地(10% FBS、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のインスリン、0.5 mmol/L のイソブチルメチルキサンチン、1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ のデキサメタゾンおよび60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ のインドメタシンを添加したDME M。全ての化合物はSigmaから購入)を含む12ウェルプレート上に接種した。ヒト臍帯間葉系幹細胞を脂肪生成培地で14日間培養し、培地を3日ごとに交換した。分化を行った14日間後、分化した脂肪細胞をオイルレッド(oil red O、Sigma)で染色し、写真撮影した。

30

【0052】

その結果、図3Bに示すように、分化したヒト臍帯間葉系幹細胞は、細胞質においてオイルレッド染色された大きな油滴を示した。

【0053】

ヒト臍帯間葉系幹細胞の骨細胞に分化する能力は、誘導という方式によって試験した。合計 1×10^4 個のヒト臍帯間葉系幹細胞を、骨生成培地(10% FBS、0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ のデキサメタゾン、10 mmol/L の β -グリセロリン酸エステルおよび50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ のアスコルビン酸を添加したDME M)を含む12ウェルプレート上に接種した。培地を3日ごとに交換し、分化を行った14日間後、骨細胞をアリザリンレッド(alizarin red、Sigma)で染色し、写真撮影した。

40

【0054】

その結果、図3Cに示すように、分化したヒト臍帯間葉系幹細胞は、細胞形態が直方体形状に変換され、アリザリンレッド染色が陽性を示した。

【0055】

ヒト臍帯間葉系幹細胞の軟骨細胞生成能は、微小集積培養(micromass culture)という方式によって試験した。密度が 25×10^6 個細胞/ mL であり、総体積が30 μL であるヒト臍帯間葉系幹細胞を、乾燥した15 mL チューブ(BD Pharmingen)の底に接種し、37の加湿環境でCO₂インキュベーターに2時間置いて、各チューブに追加の軟骨生成培地(0.75 mL)を加えた。培地を48時間ごとに交換し、3週間培養後、微小集積軟骨細胞が生成された。微小集積軟骨細胞を回収し

50

て写真撮影した後、微小集積軟骨細胞を4%パラホルムアルデヒドで4℃で24時間固定した。次に、PBSで洗浄し、70%エタノールに移し、組織処理を行って、パラフィン切片した(5μm)後、アグリカン(aggreccan、1:100、GeneTex、Irvine CA、米国)を用いて免疫組織化学(immunohistochemistry、IHC)の染色を行うことにより、軟骨細胞の生成を評価した。

【0056】

その結果、図3Dに示すように、ヒト臍帯間葉系幹細胞は、軟骨生成誘導した21日間後、集合して集団状に凝集し、アグリカン染色が陽性を示した。

【0057】

上記の結果は、ヒト臍帯間葉系幹細胞が、脂肪細胞、骨細胞および軟骨細胞に分化できることを示した。

【0058】

実施例4：ヒト臍帯間葉系幹細胞(HUCMSCs)エキソソームの精製

【0059】

ヒト臍帯間葉系幹細胞の馴化培地(conditioned media、CM)からHPLCによりMSC-EVエキソソームを精製することは、当技術分野において公知の技術である(Lai, R. C. et al., Stem Cell Res., 4, 214-222, (2010); Sze, S. K. et al., Mol. Cell Proteomics, 6, 1680-1689, (2007))。簡単に説明すると、馴化培地の調製方法は以下の通りであった。第3継代～第6継代まで培養した80%コンフルエントのヒト臍帯間葉系幹細胞をPBSで3回洗浄し、化学的に規定された培地中で一晚培養した。前記培地は、フェノールレッドフリー低グルコースDMEM(Invitrogen)からなり、インスリン-トランスフェリン-セレノプロテイン(Insulin-Transferrin-Selenium、ITS、Invitrogen)、5ng/mlのFGF2(Invitrogen)、5ng/mlのPDGF AB(Peprotech、Rocky Hill、NJ)、グルタミン酸-ペニシリン-ストレプトマイシンおよびβ-メルカプトエタノールを添加し、PBSで培養物を3回洗浄し、新鮮な化学的に規定された培地を添加した。3日後、培地を収集して500×gで遠心分離し、上清液を0.2μmフィルターを用いて濾過した。馴化培地の調製過程において、血清を使用しておらず、また、細胞を分化誘導していなかった。ヒト臍帯間葉系幹細胞培養物からの無血清馴化培地は、100kDaのMWCO(Molecular Weight Cut Off)膜(Sartorius、Goettingen、ドイツ)で接線流濾過により収集し、50倍に濃縮した。

【0060】

濃縮した馴化培地を収集し、3000×gで15分間遠心分離することにより、細胞および細胞断片を除去した。上清液を滅菌容器に移し、適切な体積のExoQuick-TC(System Biosciences、Palo Alto、CA、米国)を加え、十分に混合するように容器をひっくり返すかまたはフリックし、4℃で一晩(少なくとも12時間)冷蔵した。反応の期間においては、容器を直立させたままで、回転させたり混合したりしなかった。ExoQuick-TC/馴化培地の混合物を1500×gで30分間遠心分離した(遠心分離は室温または4℃で実施することができる)。遠心分離した後、エキソソームは、容器の底にベージュ色または白色の沈殿物として表示された。上清液を吸引し、1500×gで5分間遠心分離し、残ったExoQuick-TC溶液を収集し、沈殿したエキソソームの集団状物資を壊さないように残りの液体をすべて吸引して除去した。エキソソームの沈殿物を100～500μlの滅菌した1×PBSで再懸濁し、関節に注射した。

【0061】

マイクロビシンコニン酸タンパク質アッセイ(micro-bicinchoninic acid assay、Thermo Fisher Scientific、Dreieich、ドイツ)を用いてエキソソーム試料のタンパク質濃度を測定し、また、精製

10

20

30

40

50

されたエクソソームをウエスタンブロッティングによって測定した。5 μ g の濃縮したエクソソーム試料を用いて、試料緩衝液（ジチオトレイトール、0.1% SDS、0.1 M トリス-HCl、pH 7.0）で処理し、95℃で5分間煮沸し、次いで、12% SDS-PAGE 電気泳動で単離した。試料を PVDF 膜（Merck Millipore、Darmstadt、ドイツ）に移し、エクソソームのマーカータンパク質 CD9、CD63 および CD81（BD Biosciences）またはネガティブマーカー GM130（Sigma-Aldrich）を認識できる抗体を使用した。

【0062】

その結果、図4に示すように、上記の方法によって精製されたヒト臍帯間葉系幹細胞エクソソームは、典型的なエクソソームの細胞表面マーカーの特徴（CD9、CD63 および CD81 は陽性を示し、GM130 は陰性を示すことを含む）を示した。

10

【0063】

実施例4：ヒト臍帯間葉系幹細胞（HUCMSCs）のエクソソームによる修復

【0064】

ACLT手術した8週間後に、0.4 mL のエクソソームを OA + EXO 群の膝関節に注射した。各群のウサギは、EXO 治療した12週間後に、15 ~ 40 mg/kg のペントバルビタール（3%）で鎮静され、CO₂ を吸入させて犠牲にさせた。目で検査すると、エクソソームで修復された OA + EXO 群の膝軟骨は軟骨損傷が少ないと示すことが確認された（図1）。

【0065】

20

各群における膝軟骨のアグリカン（aggrecan）含有量を上記の免疫組織化学的分析法により調べ、その結果は図5に示すように、エクソソームで修復された OA + EXO 群（図5B、図5D、図5F）は、エクソソームで修復されていない OA 群に比べて（図5A、図5C および図5E）、軟骨内側に有意量のアグリカン（aggrecan）を含んでいた。エクソソームで修復された OA + EXO 群（図5F）の軟骨の厚さは、エクソソームで修復されていない OA 群（図5E）の2.5倍であった。

【0066】

実施例において、各群の軟骨破壊箇所をランダムに6点を選んでそれらの厚さを測定した後、以下の方法で統計し、結果を図6に示した。図6における全てのデータは、中央値および範囲として表され、また、ノンパラメトリック検定（例えば、マン-ホイットニーのU検定）病理組織学的等級を用いて統計的に比較され、p値が<0.05の場合、差は有意と見なされ、全ての統計分析はSPSSを用いて行った。その結果、OA + EXO 群の軟骨の厚さは、修復されていない OA 群とは有意な差があることを示した。

30

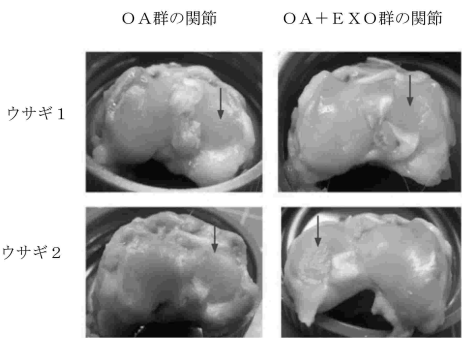
【0067】

上記の実施形態は、本開示の例示に過ぎず、限定を意図するものではなく、当業者は本発明の精神および範囲から逸脱することなく上記実施形態に修正および変更を加えることができる。したがって、本開示の保護範囲は、下記の特許出願の範囲に記載されたとおりであるべきである。

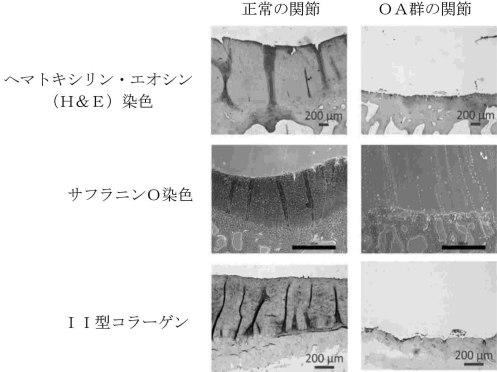
40

【図面】

【図 1】

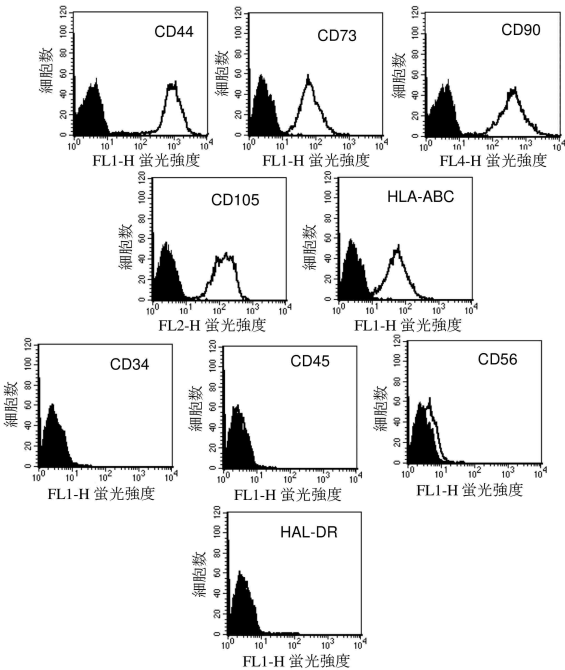


【図 2】

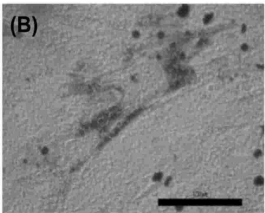


10

【図 3 A】



【図 3 B】



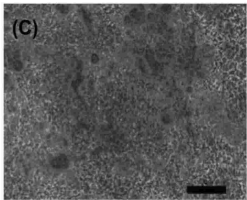
20

30

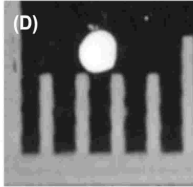
40

50

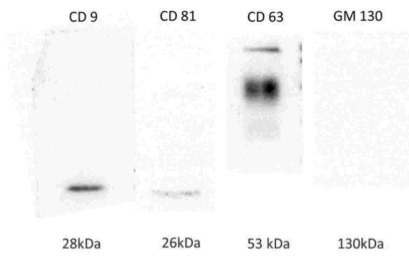
【図 3 C】



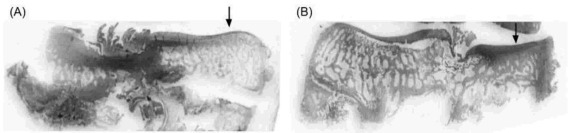
【図 3 D】



【図 4】

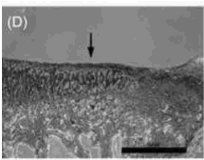
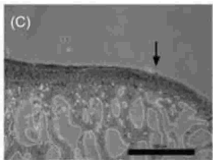


【図 5 A - B】

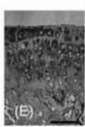


10

【図 5 C - D】



【図 5 E】



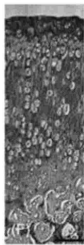
20

30

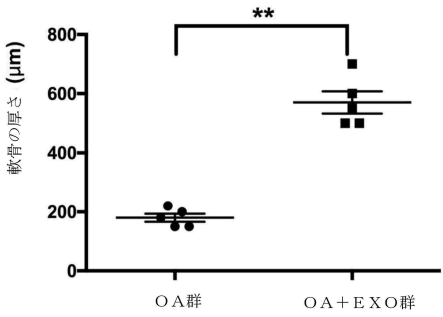
40

50

【 図 5 F 】



【 図 6 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

） 2018 年幹細胞研究国際学会年会，開催日 平成 30 年 6 月 20 日
台湾花蓮市中央路三段 707 号

合議体

審判長 光本 美奈子

審判官 田村 直寛

審判官 齋藤 恵

(56)参考文献 国際公開第 2017/211906 (WO, A1)
国際公開第 2017/094260 (WO, A1)
Nanomaterials, 2019 年 2 月, 9, 261, pp. 1 - 21
Cell Proliferation, 2019 年 1 月 20 日, 52, e12570, p
p. 1 - 12
Am J Transl Res, 2019 年 3 月 15 日, 11 (3), pp. 1230 - 1
240
STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE, 2018 年 12 月
, 8, pp. 215 - 224
SCIENTIFIC REPORTS, 2017 年, Vol. 7, Article No
. 16214, pp. 1 - 12

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB 名)

A61K35/12
A61P19
A61P29
A61P43