

(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2015-523058

(P2015-523058A)

(43) 公表日 平成27年8月13日(2015.8.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/077 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 G	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/0775 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 H	4 C 0 5 9
A 6 1 C 8/00 (2006.01)	A 6 1 C 8/00 Z	4 C 0 8 1
A 6 1 F 2/32 (2006.01)	A 6 1 F 2/32	4 C 0 8 7
A 6 1 F 2/38 (2006.01)	A 6 1 F 2/38	4 C 0 9 7
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-511419 (P2015-511419)
(86) (22) 出願日 平成25年5月10日 (2013.5.10)
(85) 翻訳文提出日 平成26年12月8日 (2014.12.8)
(86) 国際出願番号 PCT/SE2013/050526
(87) 国際公開番号 W02013/169202
(87) 国際公開日 平成25年11月14日 (2013.11.14)
(31) 優先権主張番号 1250477-5
(32) 優先日 平成24年5月10日 (2012.5.10)
(33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)

(71) 出願人 514281072
バイオマトセル アクチエボラグ
B i o m a t c e l l A B
スウェーデン王国 エス-4 1 1 2 6
ヨーテボリ, エリク ダールバリガータン
1 1 アー
(74) 代理人 110001302
特許業務法人北青山インターナショナル
(72) 発明者 エクストレーム, カリン
スウェーデン王国 エス-4 2 8 3 4
コーレド, ステンミュルスヴェーゲン
1 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 間葉系幹細胞の骨形成分化

(57) 【要約】

本発明は、細胞外小胞を使用して骨形成分化を誘発するおよび/または促進するための方法ならびにその使用に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

標的細胞の骨形成分化を誘発するおよび/または促進するための方法において、

a. 非標的細胞から放出された、骨形成分化を誘発するおよび/または促進する単離細胞外小胞を提供するステップと、

b. 前記細胞外小胞を前記標的細胞に追加するステップと、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、前記非標的細胞が、刺激単球、マクロファージ、もしくは間葉系幹細胞または他の炎症細胞もしくは非炎症細胞であることを特徴とする方法。

10

【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法において、前記非標的細胞が、リポ多糖、サイトカイン、ケモカイン、または任意の他の刺激薬により刺激されることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 2 に記載の方法において、前記非標的細胞が、間葉系幹細胞の骨形成分化を促進するおよび/または誘発する細胞外小胞を放出するように、任意の他の方法によって刺激されるまたは修飾されることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 の何れか一項に記載の方法において、前記細胞外小胞が、単球から放出されることを特徴とする方法。

20

【請求項 6】

請求項 1 乃至 4 の何れか一項に記載の方法において、提供される前記小胞が、2 つ以上の異なるタイプの細胞から放出された小胞の組み合わせであるまたは 2 つ以上の異なるタイプの刺激剤を使用して刺激された細胞から放出された小胞の組み合わせであるまたは 2 つ以上の異なる細胞型から放出された EV の組み合わせであって、それぞれの細胞型が、少なくとも 1 つの異なるタイプの刺激剤を使用して刺激される、EV の組み合わせであることを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 6 の何れか一項に記載の方法において、前記細胞外小胞が、エキソソームであることを特徴とする方法。

30

【請求項 8】

標的細胞の骨形成分化のための、非標的細胞由来の、単離された、骨形成分化を促進するおよび/または誘発する細胞外小胞の使用。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の小胞において、前記非標的細胞が、刺激単球、マクロファージ、もしくは間葉系幹細胞または他の炎症細胞もしくは非炎症細胞であることを特徴とする小胞。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の小胞において、前記非標的細胞が、リポ多糖、サイトカイン、ケモカイン、または任意の他の刺激薬により刺激されることを特徴とする小胞。

【請求項 11】

請求項 8 乃至 10 の何れか一項に記載の小胞において、前記小胞が、エキソソームであることを特徴とする小胞。

40

【請求項 12】

請求項 8 乃至 11 の何れか一項に記載の小胞において、前記小胞が、培地中に懸濁されることを特徴とする小胞。

【請求項 13】

骨形成分化を誘発するおよび/または促進する細胞外小胞に曝露されたコーティングを含むことを特徴とするインプラント。

【請求項 14】

骨形成分化を誘発するおよび/または促進する細胞外小胞を産生することができる、固

50

定され刺激された単球、マクロファージ、または間葉系幹細胞のコーティングを含むことを特徴とするインプラント。

【請求項 15】

請求項 13 または 14 に記載のインプラントにおいて、前記インプラントが、歯科用の適用、股関節、膝、ねじ、または修復プレートのためのインプラントであることを特徴とするインプラント。

【請求項 16】

請求項 8 乃至 12 の何れか一項に記載の使用において、損傷、骨粗しょう症、骨形成の治療のためのまたは骨修復におけることを特徴とする使用。

【請求項 17】

骨損傷、骨空隙充填物質、骨増殖体、頭蓋骨癒合症、変形性関節症、様々な骨炎疾患、骨粗しょう症、または骨形成の治療のための、単離された、骨形成分化を促進するおよび/または誘発する細胞外小胞を含むことを特徴とする組成物。

【請求項 18】

単離された、骨形成分化を促進するおよび/または誘発する細胞外小胞を含むことを特徴とする骨空隙充填剤。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の骨空隙充填剤において、標的性幹細胞をさらに含むことを特徴とする骨空隙充填剤。

【請求項 20】

患者を治療するための方法において、血液または組織サンプルを前記患者から収集するステップと、非標的細胞を単離するステップと、前記非標的細胞を培養し、かつ刺激するステップと、前記非標的細胞によって産生された細胞外小胞を単離するステップと、前記細胞外小胞を前記患者に投与するステップと、を含むことを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞の分化を誘発するまたは促進するための方法、前記分化を誘発するまたは促進するのに使用するための細胞外小胞、前記小胞の使用、および前記小胞を使用する治療の方法に関する。

【背景技術】

【0002】

序論

インプラント表面または傷害の部位での初期の骨形成のメカニズムならびに骨 - インプラントの接触、安定性、および機能の維持に影響を及ぼす因子は、完全には理解されていない。炎症細胞および幹細胞および前駆細胞がインプラントの表面で連絡する経路についての知識の増加は、临床上の使用のための次世代のインプラントをどのように最適化するべきかを理解するのに重要である。より優れた知識により、将来、発明者らは、うまく行けば、骨結合の改善のための新しくてよりよいインプラントまたは骨治療のためのよりよい薬剤を産生することができるであろう。

【0003】

単球/マクロファージ系は、バイオマテリアル表面で、宿主防御、創傷治癒、および免疫調節における中心的な役割を果たす。単球および間葉系幹細胞は、移植された物質表面に速やかに移動し、細胞外マトリックスの沈着および骨形成の前に、互いにすぐ近くに局在化する。たとえば炎症促進性サイトカインを含有する、ヒト単球由来の条件培地が、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の骨形成分化を促進することが示された。単球およびMSC が直接的な細胞間接触の非存在下において連絡することが示唆されているが、単球がMS

10

20

30

40

50

Cとどのように連絡するかは完全には決定されていない。

【0004】

エキソソームを含む細胞外小胞(EV)は、細胞間の連絡において重要な役割を果たす。細胞間の連絡について示唆される一般的なメカニズムは、おそらく微小環境においてあるが、可能性として少し離れてでも起こるであろう、エキソソームを通しての移動によるRNAの送達に関係する。エキソソームは、多胞体の形質膜との融合に際して細胞外環境へ放出される、エンドサイトーシス起源の小さな膜小胞(40~100nm)である。エキソソームは、細胞間の連絡の手段を提供し、ここで、一方の細胞は、微小環境におけるまたはある距離を置いた他方の細胞に影響を及ぼすことができるエキソソームを放出することができる。

10

【0005】

エキソソームは、多くの細胞から放出され、それらの機能は、それらに細胞の特徴的な組成物を与える産生細胞についての細胞起源および状態に依存する。たとえば、酸化ストレスに曝露された細胞に起源を持つエキソソームは、ストレスに対する保護的なメッセージをレシピエント細胞に伝えることが示された。

【0006】

しかしながら、EVがレシピエント細胞の分化に影響を及ぼすかどうか、また、どのように影響を及ぼすのかは、ほとんど知られていない。

【発明の概要】

【0007】

本発明の目的は、細胞、好ましくは間葉系幹細胞、より好ましくはヒト間葉系幹細胞(hMSC)の骨形成分化を誘発するおよび/または促進するための方法を提供することである。本発明はまた、骨再生を増加させ、かつインプラントの骨結合を支持するための、細胞外小胞の使用に関する。

20

【0008】

第1の態様において、本発明は、標的幹細胞の骨形成分化を誘発するおよび/または促進するための方法において、

a. 非標的細胞の細胞培養由来の条件培地または非標的細胞から単離された細胞外小胞を提供するステップと、

b. 培地または細胞外小胞を標的幹細胞に追加するステップと、を含む方法に関する。

30

【0009】

第2の態様において、本発明は、標的幹細胞の骨形成分化において使用するための単離細胞外小胞に関する。

【0010】

第3の態様において、本発明は、標的幹細胞の骨形成分化において使用するための、非標的細胞によって得られた細胞外小胞を含む培地に関する。

【0011】

第4の態様において、本発明は、細胞外小胞に曝露されたコーティングを含むインプラント表面に関する。

【0012】

第5の態様において、本発明は、エキソソームを産生することができる、固定され刺激された単球、マクロファージ、または間葉系幹細胞のコーティングを含むインプラント表面に関する。

40

【0013】

第6の態様において、本発明は、患者を治療するための方法において、血液または組織サンプルを患者から収集するステップと、非標的細胞を単離するステップと、非標的細胞を培養し、かつ刺激するステップと、非標的細胞によって産生されたエキソソームを単離するステップと、エキソソームを患者に投与するステップと、を含む方法に関する。

【0014】

第7の態様において、本発明は、骨損傷、骨粗しょう症、骨形成の治療のためのまたは

50

骨修復における単離細胞外小胞の使用に関する。

【0015】

第8の態様において、本発明は、骨損傷、骨空隙、骨粗しょう症、または骨形成の治療のための単離細胞外小胞を含む組成物に関する。

【0016】

第9の態様において、本発明は、単離細胞外小胞を含む骨空隙充填剤に関する。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、ヒト単球細胞系HMC-1の条件培地から単離され、かつCD63に対して免疫金標識されたエキソソームの透過型電子顕微鏡観察写真を示す図である。

10

【図2】図2は、抗CD63ラテックスビーズにコンジュゲートした単球由来エキソソームのフローサイトメトリー分析を示す図である。エキソソームは、テトラスパニンCD9、CD63、およびCD81（右のパネル）ならびにアイソタイプ一致コントロール（左のパネル）に対して免疫染色した。

【図3】図3は、単球エキソソームおよびそれらのドナー細胞から抽出されたタンパク質のウエスタンブロット分析を示す図である。

【図4】図4は、単球由来のエキソソームおよび細胞の全RNAおよび小型RNAの検出を示す図である。（a）単球エキソソームおよび細胞（b）における全RNAならびにエキソソーム（c）および細胞（d）における小型RNAのヌクレオチドにおけるサイズ分布（nt）ならびに蛍光強度（FU）を明らかにする電気泳動図。

20

【図5】図5は、フローサイトメトリー分析（単球エキソソームと同様）を、間葉系幹細胞由来のエキソソームの検出に適用したことを示す図である。データは、間葉系幹細胞が、CD9、CD63、およびCD81についてポジティブなエキソソームを放出することを示す。

【図6】図6は、MSCエキソソームのナノ粒子トラッキング分析（nanoparticle tracking analysis）を示す図である。

【図7】図7は、CD63に対して免疫金標識されたMSCエキソソームの透過型電子顕微鏡観察写真を示す図である（バー20nm）。

【図8】図8は、MSC培養物から単離されたMSCおよびエキソソームにおける全RNAのヌクレオチドにおけるサイズ分布（nt）および蛍光強度（FU）を明らかにする電気泳動図を示す図である。

30

【図9】図9は、MSCエキソソームの単球への移動を示す図である。MSCエキソソームを単離し、緑色蛍光色素（PKH67、SIGMA）により標識し、培養物中の単球に追加した。標識小胞の取込みは、（a）フローサイトメーターおよび（b）蛍光顕微鏡によって24時間後に分析した。コントロール；PKH67染色PBS。DAPIは核染色に使用した。緑色の細胞は、緑色のエキソソームについてポジティブな単球であり、それらがエキソソームを取込んだまたはエキソソームがそれらの表面に付着したことを示す。

【図10】図10は、図9と同様のMSCエキソソームのMSCへの移動を示す図である。MSCエキソソームを単離し、緑色蛍光色素（PKH67、SIGMA）により標識し、MSC培養物に追加した。取込みは、（a）フローサイトメーターおよび（b）蛍光顕微鏡によって24時間後に分析した。コントロール；PKH67染色PBS。DAPIは核染色に使用した。緑色の細胞は、緑色のエキソソームについてポジティブなMSCであり、それらがエキソソームを取込んだまたはエキソソームがそれらの表面に付着したことを示す。

40

【図11】図11は、LPSにより刺激した単球/マクロファージから放出されたエキソソームを単離し、緑色の蛍光色素（PKH67、SIGMA）により標識し、培養中のMSCに追加したことを示す図である。MSCを約72時間、緑色のエキソソームの存在下において培養し、その後、細胞をフローサイトメーター（a）によって、蛍光顕微鏡（b）において分析した。DAPIは核染色に使用した。緑色の細胞は、緑色のエキソソームについてポジティブなMSCであり、それらがエキソソームを取込んだまたはエキソソ-

50

ムがそれらの表面に付着したことを示す。単球/マクロファージ由来のエキソソームは、間葉系幹細胞に取込まれる/付着する。

【図12】図12は、無条件コントロール培地(control)において、単球条件培地(CM)において、またはエキソソームを補足した培地(exo)において、72時間、培養したhMSCにおけるRunx2およびBMP-2の遺伝子発現を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明において、用語「標的幹細胞」は、非標的細胞由来の条件培地または細胞外小胞によって骨形成分化が誘発される細胞を意味する。

【0019】

用語「条件培地」は、培養細胞を除去した後に、細胞培養に使用される培地を意味する。

【0020】

細胞へのシグナル伝達は、一般に、可溶性の形態でおよび/または細胞の形質膜であるもしくはマトリックス結合性である表面上に示される分子の効果と見なされる。本発明は、たとえばタンパク質、mRNA、およびマイクロRNAを含有する、細胞由来の約20~400nmまたは50~200nmの細胞外小胞によって媒介される細胞間連絡に関する。小胞は、標的細胞に付着し、融合し、または標的細胞によって内部移行され、標的細胞において調節作用を及ぼす。この連絡は、幹細胞、とりわけヒト間葉系幹細胞などのような細胞の骨形成分化を誘発し得るおよび/または促進し得る。

【0021】

本発明者らは、標的細胞の骨形成分化を誘発するおよび/または促進するための方法を開発した。方法は、非標的細胞の細胞培養物由来の条件培地または非標的細胞から放出された単離細胞外小胞を提供するステップを含む。一実施形態において、細胞外小胞が、エキソソームである。細胞外小胞は、前記小胞を放出させるために、任意選択での非標的細胞の刺激の間に、非標的細胞を培養することおよび条件培地または小胞の単離によって、提供される。非標的細胞は、様々な時間、たとえば1時間以上または1日以上または2日以上または3日以上、培養されてもよい。培地または小胞は、幹細胞であってもよい標的細胞に追加されてもよいまたはそれと接触させてもよい。次いで、小胞は、標的細胞によって取込まれまたはそれに付着し、骨形成分化を誘発するおよび/または促進する。

【0022】

標的細胞は、任意の適した細胞型であってもよいが、細胞型はまた、前駆細胞もしくは幹細胞であってもよい。細胞は、たとえば、骨芽細胞、破骨細胞、肥満細胞、筋細胞、脂肪細胞、またはヒトMSCなどのような間葉系幹細胞(MSC)であってもよい。

【0023】

本発明者らの知る限りでは、骨形成分化を誘発するおよび/または促進するための、細胞外エキソソームまたは同様の特性を有する他の細胞外小胞を介しての、炎症細胞および間葉系幹細胞などのような標的細胞などのような細胞の間のクロストーク(crosstalk)について記載している刊行物はない。発明者らは、炎症細胞などのような細胞が、間葉系幹細胞などのような他の細胞にメッセージを送り、レシピエント細胞、たとえば幹細胞における骨分化遺伝子の発現の増加をもたらすことを発見した。これらのメッセージは、エキソソームおよび/または他の細胞外小胞である。

【0024】

本発明による標的幹細胞の骨形成分化の誘発および/または促進は、本明細書において非標的細胞と呼ばれる、標的細胞以外の細胞を刺激することによって実行されてもよい。これらの刺激非標的細胞は、任意の適した細胞であってもよく、たとえば単球、マクロファージ、赤血球、破骨細胞、肥満細胞、筋芽細胞、ケラチノサイト、脂肪細胞、または任意の他の炎症細胞もしくは非炎症細胞および幹細胞、たとえば間葉系幹細胞とすることができる。好ましくは、非標的細胞は、単球、マクロファージ、または幹細胞であり、好ましい実施形態において、これらは、ヒト単球、マクロファージ、または幹細胞、たとえば

10

20

30

40

50

hMSCである。方法は、インビボにおいてまたインビトロにおいて実行することができる。

【0025】

理論によって拘束されないが、標的または非標的細胞の表現型は、骨形成分化の誘発および/または促進の成功において役割を果たし得る。異なる表現型を有する非標的細胞由来のEVがまた、異なる表現型および機能をも有することが知られている。さらに、標的細胞の表現型は、EVが標的細胞に結合し、それらのメッセージを送達することができるかどうかおよびさらに、標的細胞を特異的な方向に向けることができるかどうかに影響を及ぼし得る。本発明の一実施形態において、非標的細胞が、自己由来または非自己由来のものである。他の実施形態において、標的細胞が、自己由来または非自己由来のものである。自己由来のものを使用することの有益性は、免疫応答が限られているということとなり得るが、健康な人または治療される疾患に罹患していない人由来の非自己由来の細胞は、再生または治療プロセスに関しては、有益となり得る。

10

【0026】

細胞は、様々な方法において、たとえば、リポ多糖(LPS)、サイトカイン、ケモカイン、もしくは任意の他の刺激薬またはその組み合わせなどのような刺激剤の使用によって刺激することができる。刺激剤の量は、1~100ng/mlの範囲、たとえば1ng/ml以上または5ng/ml以上または10ng/ml以上または20ng/ml以上または100ng/ml以下または70ng/ml以下または50ng/ml以下または30ng/ml以下であってもよい。一実施形態において、刺激剤の濃度範囲が、1~20ng/mlであり、他の実施形態において、濃度が、5~50ng/mlであり、他の実施形態において、濃度が、5~15ng/mlである。

20

【0027】

理論によって拘束されないが、非標的細胞、とりわけ刺激非標的細胞は、細胞から放出された細胞膜の小さな囊である分化刺激細胞外小胞、たとえばエキソソームを産生し、これは、標的幹細胞と接触した場合にまたはそれによって取込まれた場合に、骨形成分化を誘発すると考えられる。これらの小胞、骨形成分化を促進するおよび/または誘発する小胞は、非標的細胞、たとえば単球、マクロファージ、赤血球、破骨細胞、肥満細胞、脂肪細胞、および幹細胞、たとえば間葉系幹細胞のいずれか由来の条件培地から単離することができる。小胞は、増殖因子などのような他の生体分子と混合することができる。細胞外小胞のサイズは、20~400nmの範囲、たとえば20nm以上または50nm以上または80nm以上または100nm以上または400nm以下または300nm以下または250nm以下または200nm以下または150nm以下であってもよい。図1は、条件培地から単離されたエキソソームを明らかにする。

30

【0028】

一実施形態において、単離EVが、2つ以上の異なる細胞型から放出されたEVの組み合わせである。他の実施形態において、単離EVが、2つ以上の異なるタイプの刺激剤を使用して刺激された細胞から放出されたEVの組み合わせである。他の実施形態において、単離EVが、2つ以上の異なる細胞型から放出されたEVの組み合わせであり、それぞれの細胞型が、少なくとも1つの異なるタイプの刺激剤を使用して刺激される。

40

【0029】

分化を担うサイトカイン、増殖因子、もしくは他のシグナル物質または物質の組み合わせは、まだ完全には決定されていない。サイトカイン、増殖因子、および他のシグナル物質はまた、たとえば特異的な表現型および/または機能を有する細胞外小胞を放出するように、非標的細胞を刺激するために使用されてもよい。他のシグナル物質は、たとえばホルモンとすることができる。可能性のあるサイトカインは、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、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、I

50

L-31、IL-32、IL-33、IL-34、IL-35、もしくはIFN型またはその組み合わせである。可能性のある増殖因子は、BMP、TGF、VEGF、TNF、もしくはFGFまたはその組み合わせである。ケモカインの例は、CCL2、CCL3、CCL5、CCL7、CCL8、CCL11、CCL13、CCL17、CCL22、CCL24、CCL26、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、またはその組み合わせなどのような、型CC、XC、XC3C、およびXCのいずれか1つとなるであろう。他のシグナル物質は、たとえばホルモンとすることができる。

【0030】

小胞は、他のタンパク質、増殖因子(BMP、TGF、VEGF、TNF、もしくはFGFまたはその組み合わせ)、mRNA、miRNA、またはsiRNAもしくは他の小さな調節性RNAなどのような他の物質を含む。

10

【0031】

一実施形態において、非標的性細胞が、リポ多糖(LPS)、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子(BMP、TGF、VEGF、TNF、もしくはFGFまたはその組み合わせ)、または任意の他の刺激薬またはその組み合わせを使用して、タンパク質、増殖因子(BMP、TGF、VEGF、TNF、もしくはFGFまたはその組み合わせ)、mRNA、miRNA、またはsiRNAもしくは他の小さな調節性RNAまたはその組み合わせを含有する細胞外小胞を放出するように、刺激される。

【0032】

他の実施形態において、非標的性細胞が、リポ多糖(LPS)、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子(BMP、TGF、VEGF、TNF、もしくはFGFまたはその組み合わせ)、または任意の他の刺激薬またはその組み合わせを使用して、タンパク質、増殖因子(BMP、TGF、VEGF、TNF、もしくはFGFまたはその組み合わせ)、mRNA、miRNA、またはsiRNAもしくは他の小さな調節性RNAまたはその組み合わせを含有する細胞外小胞を放出するように、刺激される。次いで、これらの小胞は、リポ多糖(LPS)、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、もしくは任意の他の刺激薬またはその組み合わせと組み合わせ、標的細胞に追加されるまたはそれと接触させられる。

20

【0033】

本発明者らは、MSCおよび単球の両方が、RNAを含有する細胞外小胞を放出することを示し、図1~8、また、本発明者らはまた、標的MSCが、放出された細胞外小胞を取込むことをも示した、図9~10。本発明者らはまた、RUNX2およびBMP-2の遺伝子発現の増加によって例証されるように、hMSCを本発明に従って処理した場合に、骨形成分化が促進されたことをも示した(図12)。

30

【0034】

細胞外小胞は、PBSバッファーまたは任意の他の食塩水バッファーまたは任意の他の培地などのような細胞培養培地(または調整培地)と混合することができる。培地は、2つ以上のタイプの非標的細胞、たとえば2つ、3つ、または4つの細胞型由来の小胞を含有してもよい。たとえば、培地は、単球およびhMSCまたは単球、hMSC、およびマクロファージ由来の小胞の混合物を含有してもよい。細胞外小胞は、インビトロおよびインビボの両方において、標的細胞に提供されてもよい。

40

【0035】

非標的の細胞培養由来の条件培地または単離細胞外小胞は、骨再生が必要とされる部位に追加することができる。条件培地または小胞はまた、標的細胞と一緒に送達することもできる。標的細胞が位置する部位に培地または小胞を送達することによって、骨形成分化が誘発されるであろう。送達は、送達ビヒクルの注射によってまたは移植を通して行うことができる。エキソソームなどのような細胞外小胞は、たとえば合成のリボソームと比較して、中程度の免疫応答しか引き起こさないまたは免疫応答を全く引き起こさないという有益性を有する。

50

【0036】

細胞外小胞は、骨形成分化を誘発するおよび/または促進するのに十分な量で、標的細胞に追加されるまたはそれと接触させられる。

【0037】

さらに、小胞は、表面上に、たとえばインプラント表面上に小胞をコーティングするもしくは固定することによってまたは薬剤送達系の一部として、幹細胞に提供されてもよい。インプラント表面は、チタンもしくは酸化チタンなどのような金属表面またはリン酸カルシウム表面などのようなセラミック表面とすることができる。薬剤送達系は、たとえば、小胞をゆっくり放出するヒドロゲルまたは生分解性物質とすることができる。ヒドロゲルは、たとえばヒアルロン酸またはキトサンまたはポリビニルアルコールまたはその組み合わせとすることができる。他の実施形態において、インプラント表面が、細胞外小胞のインビボにおける放出のために、細胞でコーティングされるまたは固定される。たとえば、表面は、インプラントの部位で骨形成分化を誘発するおよび/または促進するために、数が増加したエキソソームを放出するであろう刺激単球、マクロファージ、または間葉系幹細胞でコーティングされてもよいまたは固定されてもよい。

10

【0038】

本発明による方法はまた、患者を治療するために使用されてもよい。方法は、
 - ヒト、たとえば患者彼自身から、任意の利用可能な適した技術を使用して、血液または組織サンプルを収集するステップと、
 - 促進するおよび/または誘発する細胞外小胞を産生するために、非標的細胞を単離し、細胞を培養し、任意選択で、非標的細胞を刺激するステップと、
 - 非標的細胞によって産生された前記細胞外小胞を単離するステップと、
 - 細胞外小胞を患者に投与するステップと、を含む。

20

【0039】

投与は、全身的にまたは局所的に、任意の適した技術によって、たとえば注射器によって、骨形成分化が必要とされるまたは求められる位置に対して実行されてもよい。

【0040】

本発明は、骨手術、インプラント手術、骨治癒治療、または骨もしくは歯の修復治療の間の補足の治療として使用することができる。単離細胞外小胞は、歯などのような歯科用の適用のためのインプラント、股関節または膝または任意の他の骨インプラントなどのような、様々な足場およびインプラント上に固定することができる。小胞はまた、ねじまたは修復プレートなどのような骨修復インプラント上に固定することもできる。さらに、本発明は、骨空隙充填物質、骨増殖体、頭蓋骨癒合症、変形性関節症、様々な骨炎疾患、大理石骨病、骨減少症、骨粗しょう症、または骨形成などのような、様々な骨関連性の疾患および損傷を治療するために使用することができる。

30

【実施例】

【0041】

実施例 1

プロセスについての一般的な説明

単球の単離および培養：単球は、磁気分離を使用してヒト血液から単離し、異なるパイオマテリアル上で、刺激（たとえばLPS）ありまたはなしで培養する。間葉系幹細胞は、勾配分離によってヒト骨髄から得る。72時間後、細胞を収集し、エキソソームを条件培地から単離する。

40

【0042】

エキソソーム単離および検出：エキソソームは、繰り返しの遠心分離およびろ過のステップに基づく方法を使用して、細胞デブリ、アポトーシス小体などを除去し、その後、超遠心分離を使用して、エキソソームをペレットにして、単離する。代替の単離方法もまた、使用されてもよい。エキソソームは、電子顕微鏡観察ならびにフローサイトメトリーおよびウェスタンブロットを使用する、エキソソーム上でよく見つけられる多くのマーカー（たとえばCD9、CD63、CD81、Tsg101）およびエキソソームに不在であ

50

るはずである多くのマーカー（カルネキシン）についての検出を含む方法の組み合わせを使用して検出する。

【0043】

エキソソームのmRNAおよびマイクロRNAの含有量：マイクロアレイは、mRNAおよびマイクロRNAの含有量を評価するために、異なる刺激に曝露された単球およびMSC由来のエキソソームに対して実行する。

【0044】

取込み実験：単離エキソソームに蛍光色素を標識し、培養中のMSCに追加し、取込みを、様々な時点の後に、蛍光顕微鏡観察およびフローサイトメトリーを使用して分析した。

【0045】

骨形成の評価：組織学的染色（フォン コッサ）および骨形成についてのマーカー（オステオカルシン、runx2、コラーゲンI型）をRT-PCRを使用して評価する。

【0046】

材料&方法

ヒト単球は、磁気分離によってパフィーコートから得た（純度90~95%、n=4）。単球をLPS（10ng/ml）により72時間処理し、条件培地（CM）を収集した。ヒト脂肪由来間葉系幹細胞（MSC）を培養し、条件培地を収集した。エキソソームを繰り返しの遠心分離およびろ過のステップによってCMから単離し、フローサイトメトリーを使用して検出した。フローサイトメトリー分析については、エキソソームを抗CD63ラテックスビーズにコンジュゲートし、テトラスパニンCD9、CD63、およびCD81に対して免疫染色した。エキソソームはまた、透過型電子顕微鏡観察およびナノ粒子トラッキング分析を使用して視覚化した。様々なタイプの小胞およびそれらのドナー細胞由来のRNAを抽出し、サイズ分布パターンをバイオアナライザーを使用して分析した。hMSCは、単球エキソソームを補足した培地、CM、またはコントロール培地において72時間、培養した。骨形成分化を、リアルタイムPCR分析を使用して評価した（Runx2、BMP-2、n=4）。標的遺伝子発現の相対的な定量化について、dd-Ct法によって計算した。別々の実験において、ヒト単球またはhMSCを、PKH67染色小胞を補足した培地において培養し、取込みを、フローサイトメトリーおよび顕微鏡観察を使用して検査した。

【0047】

結果

フローサイトメトリー分析は、LPS刺激単球およびMSCが、エキソソーム検出のためによく使用されるマーカーであるテトラスパニンCD9、CD63、およびCD81についてポジティブなエキソソームを放出することを明らかにした。図2および5を参照されたい。

【0048】

図11は、単球/マクロファージ由来のエキソソームが、間葉系幹細胞に取込まれる/付着することを明らかにする。緑色PKH67染色エキソソームの存在下において培養したMSCは、ネガティブコントロールと比較して、FL-1においてポジティブであり、エキソソームがMSCに付着するもしくはそれと融合するまたはMSCによって内部移行されることを示す。さらに、PKH67標識緑色MSCエキソソームを補足した培地におけるhMSCの培養は、MSCが緑色色素についてポジティブであることを示し、MSCがエキソソームを介して他のMSCと連絡することを示唆する。図10を参照されたい。そのうえ、緑色MSCエキソソームとの単球の培養はまた、単球の一部が緑色エキソソームを取込んだまたは内部移行したことをも明らかにした。図9を参照されたい。

【0049】

単球CMまたはCMから単離した純粋なエキソソームを補足した培地における72時間のhMSCの培養は、Runx2（それぞれ 1.7 ± 0.3 および 1.4 ± 0.2 倍の変化）ならびにBMP-2（それぞれ 15.4 ± 1.7 および 2.3 ± 0.3 倍の変化）の

10

20

30

40

50

発現レベルの有意な増加をコントロール培地と比較してもたらした。図 1 2 を参照されたい。

【 0 0 5 0 】

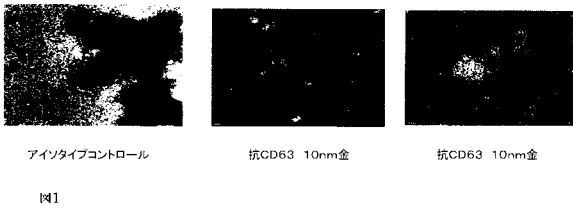
結果は、L P S 刺激ヒト単球が、間葉系幹細胞の骨形成分化を増強する因子を放出することおよびこの効果の少なくとも一部がエキソソームを介しての連絡によるものであることを実証する。

【 0 0 5 1 】

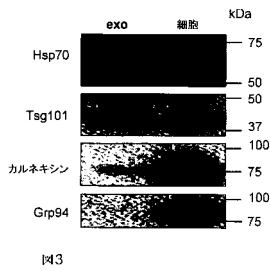
実施例 2

ヒト初代 L P S 刺激単球。エキソソームを 3 日間の培養の後に単離し、R N A を抽出した。細胞およびエキソソームの全 R N A および小型 R N A の B i o a n a l y z e r 分析を実行した。電気泳動図、図 4 は、(a) エキソソームおよび細胞 (b) における全 R N A ならびにエキソソーム (c) および細胞 (d) における小型 R N A のヌクレオチドにおけるサイズ分布 (n t) ならびに蛍光強度 (F U) を示す。

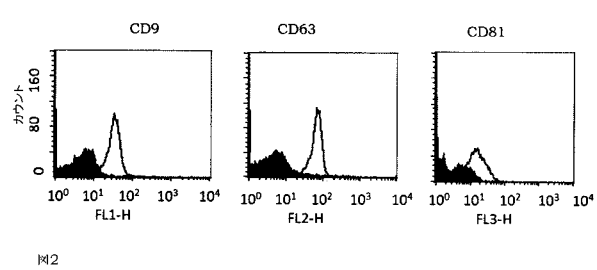
【 図 1 】



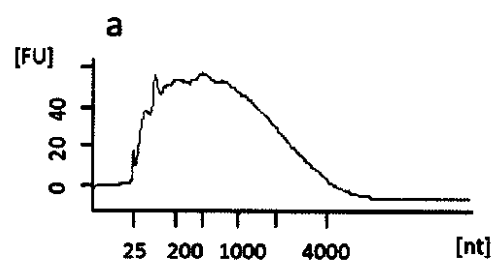
【 図 3 】



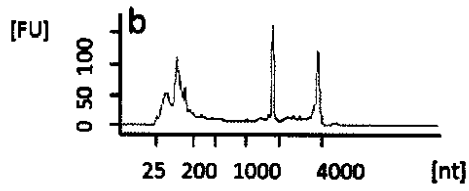
【 図 2 】



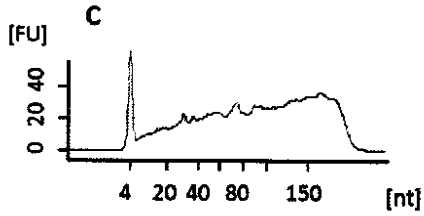
【 図 4 a 】



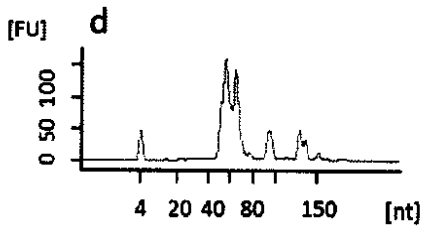
【 図 4 b 】



【 図 4 c 】



【 図 4 d 】



【 図 5 】

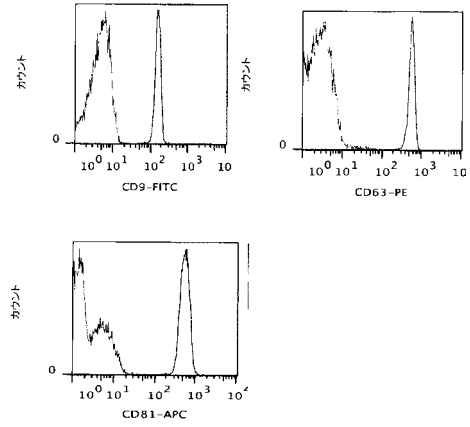


図5

【 図 6 】

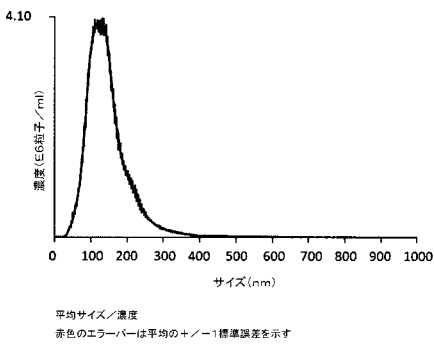


図6

【 図 8 】

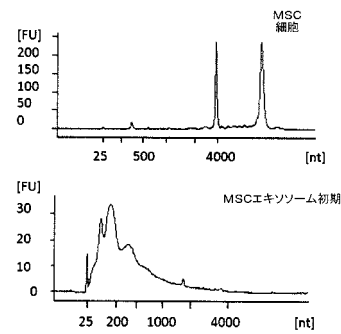
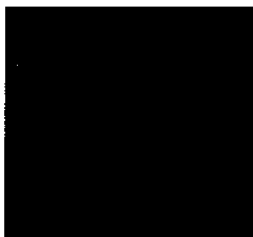


図8

【 図 7 】



【 図 9 】

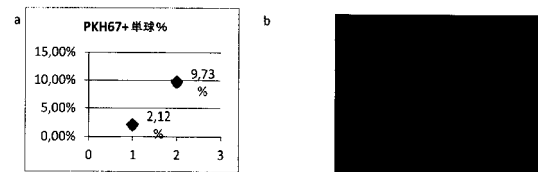


図9

Figure 7.

【 図 1 0 】

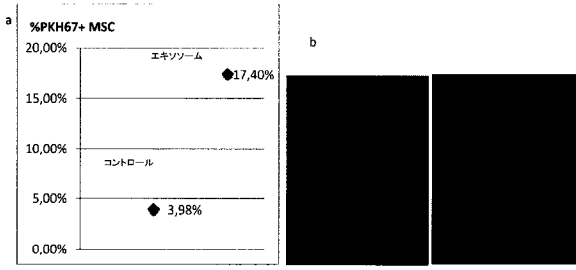


図10

【 図 1 2 】

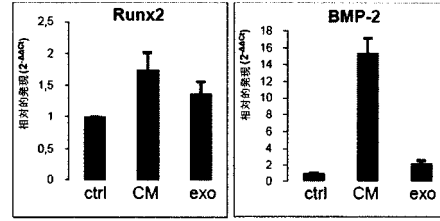


図12

【 図 1 1 】

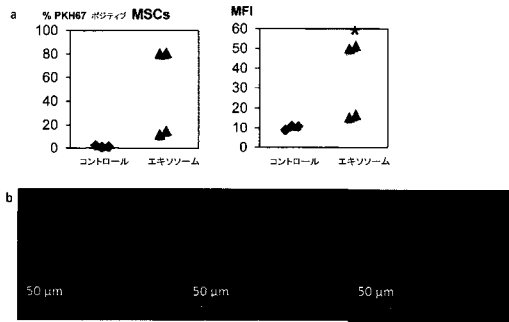


図11

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2013/050526
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: see extra sheet 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: A61K, A61L, A61P, C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched SE, DK, FI, NO classes as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-internal, PAJ, WPI data, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	Omar O. M. et al., The stimulation of an osteogenic response by classical monocyte activation, 2011, Biomaterials, Vol. 32, pages 8190-8204; abstract; page 8190, column 1 --	1-20										
Y	Ismail N. et al., MicroRNA Expression in Macrophages-Derived Microvesicles May Contribute to Cellular Survival and Differentiation, 2008, Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Vol. 112, Abstract 3557; abstract --	1-20										
X	US 20040082511 A1 (WATZEK GEORG ET AL), 29 April 2004 (2004-04-29); paragraphs [0036]-[0038], [0057]-[0059] and [0070]-[0073] --	1-3, 6-13, 15-18, 20										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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											
"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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 28-06-2013		Date of mailing of the international search report 05-07-2013										
Name and mailing address of the ISA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. + 46 8 666 02 86		Authorized officer Anna Björklund Telephone No. + 46 8 782 25 00										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2013/050526
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Itoh T. et al., Microvesicles released from hormone-refractory prostate cancer cells facilitate mouse pre-osteoblast differentiation, 2012, Journal of Molecular Histology, Vol. 43, pages 509-515, published online 17 April 2012; abstract; pages 510-511 --	1-3, 7-12
X	Wei Zhou et al., The performance of bone marrow mesenchymal stem cell - Implant complexes prepared by cell sheet engineering techniques, 2010, Biomaterials, Vol. 31, pages 3212-3221; abstract; pages 3218, 3213 --	14
X	US 20090007923 A1 (DANCU MICHAEL), 8 January 2009 (2009-01-08); paragraphs [0375] and [0372] --	14
X	WO 2009087361 A1 (LYDAC NEUROSCIENCE LTD ET AL), 16 July 2009 (2009-07-16); page 5, line 1 - line 10; claims 3, 5, 20 --	1-3, 7-12, 16-17, 20
X	WO 2012020307 A2 (UNIV GLASGOW ET AL), 16 February 2012 (2012-02-16); claims 1, 15, 17; paragraph [0136] --	1-3, 7-12, 16-17, 20
P, X	Thomsen P. et al., The role of cell-cell communication for the transition from inflammation to bone regeneration, 2012, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Vol. 6, Suppl. 1, pages 1-429; abstract -- -----	1-4, 7-12, 17-17, 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2013/050526
--

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

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

1. Claims Nos.: 1-12 (all partly), 16, 20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 16 and 20 relate to a method for treatment of the human or animal body by
.../...
2. Claims Nos.: 1-4 and 6-19
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Present claims 1-4 and 6-19 relate to vesicles defined by reference to a
.../...
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2013/050526**Continuation of:** Box No. II

desirable characteristic or property, namely the ability to induce and/or promote osteogenic differentiation. The claims cover all vesicles having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and / or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such vesicles. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the vesicles by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to vesicles from activated monocytes. The search also included vesicles in general, having effect on osteogenic differentiation or on the bone related diseases and conditions disclosed in the application.

Thence it follows that a reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability only can be established for those parts which have been searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2013/050526
--

Continuation of: Box No. II

therapy, see PCT rule 39.1(iv). Claims 1-12 cover the embodiment where the vesicles are added to the target cells in vivo and therefore also claims 1-12 (all partly) relate to a method for treatment of the human or animal body by therapy, see PCT rule 39.1(iv). Nevertheless, a search has been made for these claims. The search has been directed to the technical content of the claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2013/050526

Continuation of: second sheet
International Patent Classification (IPC)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61L 27/34 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/SE2013/050526

US	20040082511 A1	29/04/2004	CA	2435248 A1	25/07/2002
			EP	1351697 A2	15/10/2003
			WO	02056897 A3	17/10/2002
US	20090007923 A1	08/01/2009	US	8409847 B2	02/04/2013
WO	2009087361 A1	16/07/2009	AU	2009203638 A1	16/07/2009
			CA	2711218 A1	16/07/2009
			EP	2240189 A1	20/10/2010
			NZ	586497 A	27/07/2012
			US	20110014251 A1	20/01/2011
WO	2012020307 A2	16/02/2012	AU	2011288262 A1	04/04/2013
			EP	2603592 A2	19/06/2013
			US	20130143314 A1	06/06/2013
			WO	2012020308 A3	11/04/2013

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 B 17/68 (2006.01)	A 6 1 B 17/58	3 1 0	4 C 1 6 0
A 6 1 K 35/15 (2015.01)	A 6 1 K 35/15	Z	
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28		
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00		
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02		
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/10		
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00		
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00	G	

(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, T M), 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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 トムセン, ペータ
スウェーデン王国 エス - 4 2 1 6 7 ヴァストラ フレールンダ, ヘンゲステンヴェーゲン
2

(72) 発明者 ラウスマ, ユッカ
スウェーデン王国 エス - 4 1 5 0 3 ヨーテボリ, トロイエンボリプラトセン 3

(72) 発明者 オマール, オマール
スウェーデン王国 エス - 4 1 5 2 2 ヨーテボリ, シリウスガータン 8 6

(72) 発明者 ヴァン, シャオシン
スウェーデン王国 エス - 4 1 2 6 2 ヨーテボリ, ビョリクッツガータン 1 8, セーノオー
モナ クロンランド - ハンセン

F ターム(参考) 4B065 AA90X AC20 BA12 BB34 CA44
4C059 AA02 AA08
4C081 AB04 CD34
4C087 AA01 AA02 BB34 BB37 CA04 DA19 DA27 NA14 ZA96 ZA97
ZB11 ZB21
4C097 AA04 AA07 BB01 CC03 DD15
4C160 LL32 LL42