

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 2 月 9 日(09.02.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/022809 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/0775 (2010.01) *A61P 27/02* (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/072855
- (22) 国際出願日: 2016 年 8 月 3 日(03.08.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-153412 2015 年 8 月 3 日(03.08.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人大阪大学(OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 Osaka (JP). ロート製薬株式会社(ROHTO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西 1 丁目 8 番 1 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 西田 幸二(NISHIDA, Kohji); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 林 竜平(HAYASHI, Ryuuhei); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 本間 陽一(HONMA, Yoichi); 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西 1 丁目 8 番 1 号 ロート製薬株式会社内 Osaka (JP). 大久保 徹(OKUBO, Toru); 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西 1 丁目 8 番 1 号 ロート製薬株式会社内 Osaka (JP). 柴田 峻(SHIBATA, Shun); 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西 1 丁目 8 番 1 号 ロート製薬株式会社内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 津国, 外(TSUKUNI & ASSOCIATES et al.); 〒1020083 東京都千代田区麹町 5-3-1 麹町ビジネスセンター Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: MESENCHYMAL STEM CELL-DERIVED EXOSOME

(54) 発明の名称: 間葉系幹細胞由来エキソソーム

(57) Abstract: The present invention relates to a mesenchymal stem cell-derived microparticle that has corneal epithelial stem cell and/or corneal epithelial cell growth-promoting activity, undifferentiated corneal epithelial stem cell maintenance activity, corneal epithelial stem cell colony formation-promoting activity, or a corneal epithelium protection effect.

(57) 要約: 本発明は、角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞の増殖促進活性、角膜上皮幹細胞の未分化維持活性又はコロニー形成促進活性、或いは角膜上皮保護作用を有する、間葉系幹細胞由来微粒子に関する。



WO 2017/022809 A1

明 細 書

発明の名称： 間葉系幹細胞由来エキソソーム

技術分野

[0001] 本発明は、角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞の増殖促進活性、角膜上皮幹細胞の未分化維持活性又は角膜上皮幹細胞のコロニー形成促進活性、或いは角膜上皮保護作用を有する、間葉系幹細胞由来微粒子に関する。

背景技術

[0002] 角膜上皮幹細胞は、角膜と結膜の間の輪部に存在し、角膜上皮幹細胞疲弊症、角膜上皮障害、糖尿病角膜症の原因や治療過程において重要な役割を果たしている。これら疾患の従来の治療法として、人口涙液、抗生剤の点眼や角膜移植が挙げられるが点眼剤では奏功しないケースが存在し、また他家角膜移植は拒絶反応の危険性とドナー不足という問題点があった。

[0003] 眼表皮細胞由来の i P S 細胞より、角膜上皮細胞および角膜上皮幹細胞へ分化誘導する方法が記載されている（特許文献 1）。しかしながら、i P S 細胞より分化させた角膜上皮細胞および角膜上皮幹細胞は、臨床における開発途上にある。

[0004] 角膜上皮幹細胞は、例えば、N I H／3 T 3 細胞をフィーダー細胞とした共培養系などによって、コロニーを形成することが知られている。また、角膜上皮幹細胞のマーカーとしては、K 1 4（ケラチン 1 4）、K 1 5（ケラチン 1 5）、p 6 3、N-c a d h e r i n が知られている。一方、分化した角膜上皮細胞のマーカーとしては、眼組織特異的マーカー（例えば、p a x 6）、角膜上皮特異的分化マーカー（例えば、K 3（ケラチン 3）K 1 2（ケラチン 1 2））などが知られている。

[0005] 一方、E x o s o m e（エキソソーム又はエクソソーム）は、種々の細胞から分泌される脂質二重膜で形成される直径 3 0～1 5 0 n m 程度の小胞である。近年、エキソソームの膜には、テトラスパニン類（C D 6 3、C D 8 1、C D 9 等）が存在し、また様々なタンパク質や m R N A、m i R N A が

含まれることが明らかになった。また、エクソソームは、例えば、細胞の培養上清より超遠心分離によって得られることが報告されている（非特許文献1）。

[0006] 間葉系幹細胞（MSC）は、間葉系細胞型のみに、即ち脂肪細胞系統、軟骨細胞系統及び骨細胞系統に分化する可能性を有する、系統制限された幹細胞である。間葉系幹細胞は、骨髄、血液、脂肪及び他の体細胞組織等の様々な起源に由来する。

[0007] 特許文献2には、胚性幹細胞由来の間葉系幹細胞のエクソソームが、心保護作用を含む治療手段のために使用し得ることが記載されている。

[0008] また、特許文献3には、神経幹細胞由来のエクソソームが、創傷治癒効果、血管新生や神経突起伸長を刺激すること効果を有することが記載されている。

[0009] 角膜上皮疾患は、何らかの原因により角膜上皮が傷ついた疾患であり、例えば、角膜上皮幹細胞疲弊症の原因には、先天性のものとして無虹彩症や強膜化角膜、外因性のものとしてアルカリ腐食や熱傷、内因性のものとしてステーブンス・ジョンソン症候群や眼類天疱瘡、そのほか特発性のものが挙げられる。

[0010] 更に、近年、角膜上皮幹細胞のコロニー形成促進作用に着目して、角膜上皮幹細胞疲弊症等の治療薬の研究が行われているが、エクソソームが角膜上皮幹細胞のコロニー形成促進作用を有することは報告されていない。（非特許文献2～4）。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：WO2012／144582

特許文献2：特表2011－513217

特許文献3：特表2015－513906

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Graca Raposo and Willem Stoorvogel, J. Cell Biol. Vol. 2

00 No. 4 373-383.

非特許文献2: Zhou Q. et al., Tissue Eng Part C Methods. 2013 Jul;19(7):531-7.

非特許文献3: Park, K. et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.. 2006; 47(3):892-900.

非特許文献4: Zhou, Q. et al., Stem Cells (Dayton, Ohio), 33(5), 1566-76

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明の課題は、角膜上皮疾患の予防及び／又は治療に有用であり、角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞の増殖促進活性、角膜上皮幹細胞の未分化維持活性又は角膜上皮幹細胞のコロニー形成促進活性、或いは角膜上皮保護作用を有する、間葉系幹細胞由来微粒子を提供することである。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは、前記の課題を解決するべく鋭意研究を重ねた結果、間葉系幹細胞由来微粒子が、角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞の増殖促進活性、角膜上皮幹細胞の未分化維持活性又は角膜上皮幹細胞のコロニー形成促進活性、或いは角膜上皮保護作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0015] 本発明は、以下に関する。

[0016] 項1. 角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞の増殖促進活性、角膜上皮幹細胞の未分化維持活性又は角膜上皮幹細胞のコロニー形成促進活性、或いは角膜上皮保護作用を有する、間葉系幹細胞由来微粒子。

[0017] 項2. 間葉系幹細胞微粒子が、密度勾配遠心法による密度: 1. 13~1. 19 g/mLを有する、項1記載の間葉系幹細胞由来微粒子。

[0018] 項3. 間葉系幹細胞微粒子がエキソソームである、項1又は2記載の間葉系幹細胞由来微粒子。

[0019] 項4. 間葉系幹細胞由来微粒子を有効成分として含有する、角膜上皮幹細胞

及び／又は角膜上皮細胞の増殖促進剤、角膜上皮幹細胞の未分化維持剤又は角膜上皮幹細胞のコロニー形成促進剤、或いは角膜上皮保護剤。

[0020] 項 5. 間葉系幹細胞由来微粒子を有効成分として含有する、角膜上皮疾患の予防又は治療剤。

[0021] 項 6. 角膜上皮疾患が、熱腐蝕、アルカリ腐蝕、酸腐蝕、薬剤毒性、S t e v e n s - J o h n s o n 症候群、眼類天疱瘡、（再発）翼状片、遷延性角膜上皮欠損、角膜穿孔、角膜周辺部潰瘍、角膜潰瘍、エキシマレーザー術後の上皮剥離、放射線角膜症、無虹彩症、トラコーマ後角膜混濁、S a l z m a n n 角膜変性、角膜びらん、瞼球癒着、原因不明の角膜上皮の幹細胞の消失した疾患、輪部腫瘍、宿主対移植片疾患（G V H D）、角膜炎、点状表層角膜症、ドライアイ、乾性角結膜炎、角膜上皮幹細胞疲弊症、角膜ジストロフィー、糖尿病角膜症、及び角膜上皮障害からなる群より選択される、項 5 記載の角膜上皮疾患の予防又は治療剤。

[0022] 項 7. 角膜上皮疾患が、角膜上皮障害、点状表層角膜症、角膜びらん、角膜周辺部潰瘍、遷延性角膜上皮欠損、ドライアイ、エキシマレーザー術後の上皮剥離、熱腐蝕、アルカリ腐食、酸腐蝕、薬剤毒性、糖尿病角膜症、角膜上皮幹細胞疲弊症、S t e v e n s - J o h n s o n 症候群、眼類天疱瘡、無虹彩症、原因不明の角膜上皮の幹細胞の消失した疾患、及び移植片対宿主病（G V H D）からなる群より選択される、項 5 記載の角膜上皮疾患の予防又は治療剤。

[0023] 項 8. 角膜上皮疾患が、角膜上皮障害、点状表層角膜症、角膜びらん、角膜周辺部潰瘍、遷延性角膜上皮欠損、ドライアイ、エキシマレーザー術後の上皮剥離、熱腐蝕、アルカリ腐食、酸腐蝕、薬剤毒性、糖尿病角膜症である、項 5 記載の角膜上皮疾患の予防又は治療剤。

[0024] 項 9. 角膜上皮幹細胞疲弊症が、外的要因、内的要因、先天的な欠損、又は腫瘍性疾患により引き起こされる、項 8 記載の角膜上皮疾患の予防又は治療剤。

[0025] 項 10. 間葉系幹細胞由来微粒子の存在下で培養することを特徴とする、角

膜上皮幹細胞の培養方法。

[0026] 項 1 1. 項 1 0 記載の培養方法によって得られる、角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞。

[0027] 項 1 2. 角膜上皮幹細胞のコロニー形成を指標とする、角膜上皮疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法。

[0028] 本発明は、以下にも関する。

[0029] 項 1 3. 有効量の間葉系幹細胞由来微粒子を含有する、角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞の増殖を促進する、角膜上皮幹細胞の未分化性を維持する、又は角膜上皮幹細胞のコロニー形成を促進する、或いは角膜上皮を保護するための組成物。

[0030] 項 1 4. 治療有効量の間葉系幹細胞由来微粒子を含有する、角膜上皮疾患の予防又は治療用の医薬組成物。

[0031] 項 1 5. 角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞の増殖を促進する、角膜上皮幹細胞の未分化性を維持する、又は角膜上皮幹細胞のコロニー形成を促進する、或いは角膜上皮を保護する方法における、間葉系幹細胞由来微粒子の使用。

[0032] 項 1 6. 角膜上皮疾患の予防又は治療方法における、間葉系幹細胞由来微粒子の使用。

[0033] 項 1 7. 角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞の増殖を促進する、角膜上皮幹細胞の未分化性を維持する、又は角膜上皮幹細胞のコロニー形成を促進する、或いは角膜上皮を保護する組成物の製造における、間葉系幹細胞由来微粒子の使用。

[0034] 項 1 8. 角膜上皮疾患の予防又は治療用の医薬の製造における、間葉系幹細胞由来微粒子の使用。

[0035] 項 1 9. 有効量の間葉系幹細胞由来微粒子を投与すること特徴とする、角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞の増殖を促進する、角膜上皮幹細胞の未分化性を維持する、又は角膜上皮幹細胞のコロニー形成を促進する、或いは角膜上皮を保護する方法。

[0036] 項 20. 治療有効量の間葉系幹細胞由来微粒子を投与すること特徴とする、角膜上皮疾患の予防又は治療方法。

[0037] なお、項 1 から項 20 の各構成は、任意に 2 以上を選択して組み合わせることができる

発明の効果

[0038] 本発明の間葉系幹細胞由来微粒子によれば、種々の角膜上皮疾患の患者において、角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞の増殖を促進させ、角膜上皮幹細胞の未分化維持活性又は角膜上皮幹細胞のコロニー形成促進活性を増加させ、或いは角膜上皮を保護することができる。そのため、本発明の間葉系幹細胞由来微粒子は、種々の角膜上皮疾患の予防及び／又は治療のために用いることができる。

図面の簡単な説明

[0039] [図1]本発明の間葉系幹細胞由来微粒子の分離条件を示す図である。

[図2]本発明の間葉系幹細胞由来微粒子のコロニー形成促進作用を示す図である。

[図3]本発明の間葉系幹細胞由来微粒子のコロニー形成促進作用（コロニー数）を示す図である。

[図4]本発明の間葉系幹細胞由来微粒子のコロニー形成促進作用（コロニーの大きさ）を示す図である。

[図5]本発明の間葉系幹細胞由来微粒子の未分化維持活性を示す図である。

[図6]本発明の間葉系幹細胞由来微粒子による K 1 2 の発現抑制を示す図である。

発明を実施するための形態

[0040] 本発明の間葉系幹細胞由来微粒子について以下に説明する。

[0041] <間葉系幹細胞>

本発明における間葉系幹細胞としては、例えば、骨髄、脂肪、筋肉、神経、皮膚、羊膜、胎盤、絨毛膜、脱落膜又は臍帯由来の間葉系幹細胞が挙げられ、好ましくは骨髄、脂肪、胎盤由来の間葉系幹細胞であり、更に好ましく

は脂肪由来の間葉系幹細胞である。

[0042] 本発明における間葉系幹細胞は、例えば、成長特徴（例えば、継代から老化までの集団倍加能力、倍加時間）、核型分析（例えば、正常な核型、母体系統又は新生児系統）、フローサイトメトリー（例えば、FACS分析）による表面マーカー発現、免疫組織化学及び／又は免疫細胞化学（例えば、エピトープ検出）、遺伝子発現プロファイリング（例えば、遺伝子チップアレイ；逆転写PCR、リアルタイムPCR、従来型PCR等のポリメラーゼ連鎖反応）、miRNA発現プロファイリング、タンパク質アレイ、サイトカイン等のタンパク質分泌（例えば、血漿凝固解析、ELISA、サイトカインアレイ）、代謝産物（メタボローム解析）、本分野で知られている他の方法等によって、特徴付けられてもよい。

[0043] <間葉系幹細胞の培養方法>

本発明における間葉系幹細胞は、例えば以下の方法によって培養することができる。即ち、組織由来の間葉系幹細胞、株化された間葉系幹細胞等の間葉系幹細胞を馴化培地中で間葉系幹細胞を培養し、続いて非馴化培地中で間葉系幹細胞を培養することができる。

[0044] 前記馴化培地としては、当業者に従来公知の培地を間葉系幹細胞の種類毎にそれぞれ選択して用いることができ、特に限定されない。馴化培地としては、例えば、Promo Cell社、Life Line社、Lonza社等の間葉系幹細胞培養用培地等が挙げられる。馴化培地は、生物由来原料（例えば、動物血清）を含有してもよいが、得られる細胞やその培養上清を動物（ヒトを含む）の疾患の治療のために用いることを考慮すると、できるだけ生物由来原料を含まない培地（例えば、無血清培地）であることが好ましい。

[0045] 非馴化培地とは、細胞が十分に馴化された後に用いる培地のことであり、馴化培地と同じ組成の培地であってもよいし、異なる組成の培地であってもよい。本発明における間葉系幹細胞の培養に適している培地であれば特に限定されない。前記非馴化培地としては、間葉系幹細胞の種類毎にそれぞれ選

択して用いることができる培地であり、例えば、通常間葉系幹細胞の細胞培養に用いられる培地、通常間葉系幹細胞以外の細胞培養に用いられる培地、馴化培地から特定の成分を除いた培地、馴化培地に特定の成分を加えた培地等を用いることができる。非馴化培地としては、得られる微粒子を動物（ヒトを含む）の疾患の治療のために用いることを考慮すると、できるだけ生物由来原料を含まない培地（例えば、無血清培地）であることが好ましいが、必要に応じて、アルブミン、FCS等の生物由来原料を添加することもできる。例えば、MSCGM-CD培地等、又はこれらの基本培地にFCSを、0.1%～10%の範囲で含む培地等が挙げられる。

[0046] 前記無血清培地としては、添加剤としての動物血清を含まない培地であればよく、特に限定されない。公知の基本培地に、動物血清を除くその他添加剤を含有した組成を有するものを用いることができる。基本培地の組成は、培養すべき細胞の種類に応じて適宜選択することができる。例えば、イーグル培地のような最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、最小必須培地 α （MEM- α ）、間葉系細胞基礎培地（MSCBM）、Ham's F-12及びF-10培地、DMEM/F12培地、Williams培地E、RPMI-1640培地、MCDB培地、199培地、Fisher培地、Iscove改変ダルベッコ培地（IMDM）、McCoy改変培地等が挙げられる。

[0047] 基本培地に加えるその他の添加剤としては、アミノ酸類、無機塩類、ビタミン類及び炭素源や抗生物質等の他の添加剤を挙げることができる。これらの添加剤の使用濃度は特に限定されず、通常の哺乳動物細胞用培地に用いられる濃度で用いることができる。

[0048] アミノ酸類としては、例えば、グリシン、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-シスチン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロ

シン、L-バリン等が挙げられる。

[0049] 無機塩類としては、例えば、塩化カルシウム、硫酸銅、硝酸鉄（ⅠⅠⅠ）、硫酸鉄、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カリウム、炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム等が挙げられる。

[0050] ビタミン類としては、例えば、コリン、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB4、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB12、ビタミンB13、ビタミンB15、ビタミンB17、ビタミンBh、ビタミンBt、ビタミンBx、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンF、ビタミンK、ビタミンM、ビタミンP等が挙げられる。

[0051] 他の添加剤としては、繊維芽細胞増殖因子（FGF）、内皮細胞増殖因子（EGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、上皮成長因子（EGF）、インスリン様成長因子（IGF）、トランスフォーミング成長因子（TGF）、神経成長因子（NGF）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、エリスロポエチン（EPO）、トロンボポエチン（TPO）、肝細胞増殖因子（HGF）等の増殖因子；ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン等の抗生物質；グルコース、ガラクトース、フルクトース、スクロース等の炭素源；マグネシウム、鉄、亜鉛、カルシウム、カリウム、ナトリウム、銅、セレン、コバルト、スズ、モリブデン、ニッケル、ケイ素等の微量元素； β -グリセロリン酸、デキサメタゾン、ロシグリタゾン、イソブチルメチルキサンチン、5-アザシチジン等の幹細胞分化誘導剤；2-メルカプトエタノール、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、N-アセチルシステイン等の抗酸化剤；アデノシン5'-リン酸、コルチコステロン、エタノールアミン、インスリン、還元型グルタチオン、リポ酸、メラトニン、ヒポキサンチン、フェノールレッド、プロゲステロン、プトレシン、ピルビン酸

、チミジン、トリヨードチロニン、トランスフェリン、ラクトフェリン、アルブミン、Wntシグナル活性化剤、ROCK阻害剤、増殖因子、ステロイド性化合物、PTEN阻害剤、p53阻害剤、p38阻害剤等が挙げられる。

[0052] 本発明における間葉系幹細胞に好適な無血清培地としては、市販の無血清培地が挙げられる。この無血清培地は、抗酸化剤、動物血清アルブミン、成長因子、界面活性剤、Edgリガンド、セロトニンリガンド、Wntシグナル活性化剤、ROCK阻害剤、増殖因子、ステロイド性化合物、PTEN阻害剤、p53阻害剤、p38阻害剤等から選択される成分をさらに含有してもよい。

[0053] 本発明における間葉系幹細胞の培養条件は、それぞれの間葉系幹細胞に適した方法であれば特に限定されず、従来と同様の方法が用いられる。通常、30℃～37℃の温度、2%～7%CO₂環境下、5%～21%O₂環境下で行われる。また、間葉系幹細胞の継代の時期及び方法もそれぞれの細胞に適していれば特に限定されず、細胞の様子を見ながら、従来と同様に行うことができる。

[0054] <間葉系幹細胞由来微粒子>

本発明の間葉系幹細胞由来微粒子は、間葉系幹細胞から得られる微粒子である。間葉系幹細胞由来微粒子は、間葉系幹細胞により産生される微粒子である。典型的には、微粒子は間葉系幹細胞から分泌される。

[0055] 本発明の間葉系幹細胞由来微粒子は、間葉系幹細胞から放出される、電子顕微鏡で確認することができる小胞である。間葉系幹細胞微粒子は、生体分子を囲む脂質二重層を有することができる。間葉系幹細胞微粒子は、例えば、膜粒子、膜小胞、微小胞、エキソソーム様小胞、エキソソーム、エクソソーム様小胞、エクソソーム又はエキソベシクル等を含む。異なる種類の間葉系幹細胞微粒子は、直径、細胞内起源、スクロース中での微粒子の密度、形状、沈降速度、脂質組成、タンパク質マーカー及び分泌の様式（即ち、シグナル（誘導性）後又は自発的（構成的））に基づいて区別される。エキソソ

ームは、例えば、密度勾配遠心法では、 $1.13 \sim 1.19 \text{ g/mL}$ に分画され、動的光散乱法等によって、粒子径を測定することもできる。

[0056] 本発明の間葉系幹細胞由来微粒子は、例えば、CD9、CD63、CD81、GAPDH、PKM、Enolase-1、40S ribosomal protein S2、S5、SA、S13、S23、S4、S16、S9、60S acidic ribosomal protein P0、P1、60S ribosomal protein L9、HSPB1、HSP7C、14-3-3 protein zeta/delta、epsilon、theta、beta/alpha、gamma、eta、Syntenin、TSG101、Actin Cytoplasmic-1、Cofilin-1、Annexin A1、A2、A5、A6、A7、A11、Rab-1B、7a、8B、11A、13、35、ICAM-1、Integrin alphaV、alpha-2、alpha-4、alpha-5、beta-1、beta-5、MMP-14、Brain acid soluble protein1、Lysyl oxidase、Rap-2c、Catenin β -1等を含む。

[0057] <間葉系幹細胞由来微粒子の回収方法>

本発明における間葉系幹細胞由来微粒子は、間葉系幹細胞を馴化培地で拡大培養を行ってサブコンフルエント（あるいはコンフルエント）にし、新しい馴化培地へと交換してから、更に通常1～5日（例えば、1日、2～3日、3～4日）間培養を行って、その培養上清より回収することができる。

[0058] 本発明における間葉系幹細胞由来微粒子の回収方法としては、例えば、超遠心分離法、密度勾配遠心法、及び各種エキソソーム分離キット（遠心によるペレットダウン、免疫沈降、磁気ビーズによる精製、粒子のサイズによる分画、カラム吸着等）が挙げられる。

[0059] 本発明における間葉系幹細胞由来微粒子の回収方法は、例えば、間葉系幹細胞の培養上清を0.5～2時間、約50,000～150,000Gで超遠心することを含む。超遠心を行う前に、間葉系幹細胞の培養上清を0.1

～2時間、約100～20,000Gで遠心することを含むことができる。
本発明における間葉系幹細胞由来微粒子は、PBS等の溶液に溶解した状態であれば、4℃で1週間程度、-20℃で1か月程度、-80℃で6か月程度、凍結乾燥した状態であれば4℃で3年程度保存が可能である。

[0060] 本発明の間葉系幹細胞由来微粒子は、角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞の増殖促進活性、角膜上皮幹細胞の未分化維持活性又は角膜上皮幹細胞のコロニー形成促進活性、或いは角膜上皮保護作用を有する。

[0061] <角膜上皮幹細胞>

角膜上皮幹細胞は、増殖能（未分化性又はコロニー形成能）を有し、そして角膜上皮幹細胞特異的マーカーを発現する。角膜上皮幹細胞は、角膜上皮細胞に分化することができる。角膜と結膜の間の輪部には、角膜上皮細胞及び／又は角膜上皮幹細胞が存在する。

[0062] <間葉系幹細胞由来微粒子の評価方法>

本発明の間葉系幹細胞由来微粒子が、角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞の増殖促進活性、角膜上皮幹細胞の未分化維持活性又は角膜上皮幹細胞のコロニー形成促進活性、或いは角膜上皮保護作用を有することについては、当業者に公知の手法により評価することができる。

[0063] 本発明において、「増殖促進活性」とは、細胞が増殖することを促進することを意味し、例えば、角膜上皮幹細胞の場合、継代培養でコロニーを形成させて、コロニー数やコロニーの大きさを測定することにより確認することができ、また角膜上皮細胞の場合、角膜上皮幹細胞の増殖が促進され、その後、角膜上皮幹細胞が角膜上皮細胞に分化することを含む。

[0064] 本発明において、「コロニー形成促進活性」とは、培養される細胞が増殖しコロニーを形成することを促進することを意味し、例えば、角膜上皮幹細胞の場合、継代培養でコロニーを形成させて、コロニー数やコロニーの大きさを測定することにより確認することができる。

[0065] 本発明において、「未分化維持活性」とは、培養される細胞が未分化の細胞、例えば、角膜上皮幹細胞の場合、その未分化の状態を維持することを意

味し、例えばK 1 4（ケラチン14）、K 1 5（ケラチン15）および／またはp 6 3および／またはN-c a d h e r i nなどのマーカーを測定することにより、培養中の角膜上皮幹細胞が分化していないかを評価することができる。

[0066] 本発明において、「角膜上皮保護作用」とは、角膜上皮を保護することを意味し、例えば、角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞を増殖させることによって、何らかの原因によって減少又は消失した角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞を補填することにより、角膜上皮を保護することができる。

[0067] <間葉系幹細胞由来微粒子による角膜上皮幹細胞の増殖能の促進>

角膜上皮幹細胞の増殖能は、例えば、本発明の間葉系幹細胞由来微粒子の存在下で、角膜上皮幹細胞を培養系へと播種し継代培養を行い、角膜上皮幹細胞が増殖することを確認することによって、評価することができるが、これに限定されない。角膜上皮幹細胞が増殖することは、継代培養でコロニーを形成することにより確認することができる。好ましくは、コロニーを形成することを確認するための継代培養は、フィーダー細胞（例えば、N I H／3 T 3細胞など）との共培養系で行なうこと、または、上皮系細胞や上皮幹細胞用の培地で行なうことができるが、これに限定されるものではない。前記増殖能は、自己複製能であることが好ましい。細胞が自己増殖能を有することの評価については、これに限定されるものではないが、例えば、細胞が増殖能を有することに加えて、増殖後の細胞が有する特質が継代培養によって変化しないことを指標とすることができる。

[0068] <角膜上皮幹細胞マーカー>

増殖能を有する角膜上皮幹細胞は、後述の角膜上皮幹細胞マーカーによって確認することができるが、これに限定されるものではない。

[0069] 細胞が角膜上皮幹細胞特異的マーカーを発現していることの評価については、当業者に公知の手法により行なうことができる。角膜上皮幹細胞マーカーとしては、例えば重層上皮幹細胞（および前駆細胞）の特異的マーカーであるK 1 4（ケラチン14）、K 1 5（ケラチン15）および／またはp 6

3 および／または N-c a d h e r i n などが例示されるが、これに限定されるものではない。加えて、眼組織特異的マーカー（例えば、p a x 6）および／または角膜上皮特異的分化マーカー（例えば、K 3（ケラチン 3）、K 1 2（ケラチン 1 2））を検出することができる。また、角膜上皮特異的分化マーカー（K 1 2）を検出した後に、角膜上皮幹細胞に特異的に発現している細胞表面マーカー（例えば、I n t e g r i n a l p h a 6、N-c a d h e r i n など）を検出することもできる。

[0070] ＜角膜上皮幹細胞マーカーの検出方法＞

角膜上皮幹細胞マーカーを発現していることの具体的な検出方法は公知であるが、例えば、レポーター遺伝子の発現を検出するか、または免疫細胞化学による検出することができる。分化誘導を行なう多能性幹細胞に上記角膜上皮幹細胞マーカーのレポーター遺伝子（例えば、角膜上皮幹細胞マーカーをコードする遺伝子のプロモーター領域と、緑色蛍光タンパク質（G F P）等の蛍光タンパク質とを連結したレポーター遺伝子）を導入し、分化誘導後にレポーター遺伝子の発現を検出してもよい。抗体染色法を用いた顕微鏡観察による検出、セルソーター（フローサイトメーター）による細胞表面マーカーの検出などが例示される。

[0071] ＜角膜上皮幹細胞の培養方法＞

本発明は、間葉系幹細胞由来微粒子の存在下で培養することを特徴とする、角膜上皮幹細胞の培養方法にも関する。

[0072] 本発明の角膜上皮幹細胞の培養方法は、下記の工程を含む：

（１）間葉系幹細胞由来微粒子の存在下で、角膜の輪部から採取した角膜上皮系細胞を培養する工程、および

（２）前記培養した細胞から、角膜上皮幹細胞を選択する工程。

[0073] 前記工程（１）には、ヒト輸入角膜の輪部から採取した角膜上皮系細胞を用いて、N I H／3 T 3細胞をフィーダー細胞とした共培養することが含まれる。

[0074] 工程（２）には、工程（１）で培養した細胞（集団）から、自己増殖能及

び／又は角膜上皮幹細胞特異的マーカーの発現を指標として、角膜上皮幹細胞を選択することを含む。

[0075] なお、本発明の製造方法により得られる角膜上皮幹細胞は、角膜上皮前駆細胞を含んでもよい。また、前記角膜上皮系細胞は、角膜上皮細胞及び／角膜上皮幹細胞を含む。

[0076] 角膜上皮幹細胞の培養を行なうための培地は、角膜上皮幹細胞を培養できる培地（例えば、当業者において公知の *k e r a t i n o c y t e - c o n d i t i o n e d m e d i u m* (KCM培地)、*k e r a t i n o c y t e s e r u m - f r e e m e d i u m* (KSFM培地、Invitrogen社等から購入可能)、CnT-20培地 (CELLnTEC社)、CnT-50培地 (CELLnTEC社) など) である限り、特に限定されるものではない。前記継代培養において、例えば12wellのplateを用いる場合は、再播種密度は2000~16000cells/well程度とすることが好ましい。

[0077] <角膜上皮細胞シート>

本発明の角膜上皮細胞シートは、本発明の培養方法により得られる角膜上皮幹細胞および／または角膜上皮前駆細胞に由来する、角膜上皮細胞シートである。前記角膜上皮細胞シートは、角膜上皮細胞シートの重層化シートであってもよい。

[0078] 角膜上皮細胞シートの製造方法は、当業者が公知の手法および今後開発される手法より適宜選択することができる。

[0079] 角膜上皮細胞シートの製造方法としては、特に限定されるものではないが、前記角膜上皮幹細胞を、フィーダー細胞の存在下で、温度応答性培養皿もしくはキャリア上で培養を行なう工程、および前記工程により得られる細胞シートを回収する工程を含む手段が挙げられる。場合により、本発明の間葉系幹細胞由来微粒子の存在下、前記角膜上皮幹細胞を培養することを含む。

[0080] <間葉系幹細胞由来微粒子の医薬用途>

本発明は、間葉系幹細胞由来微粒子を有効成分として含有する、角膜上皮

疾患の予防又は治療剤にも関する。

[0081] 本発明は、間葉系幹細胞由来微粒子を有効成分として含有する、角膜上皮疾患の予防又は治療用の医薬組成物にも関する。

[0082] 本発明は、角膜上皮疾患の予防及び／又は治療のための医薬の製造における、間葉系幹細胞由来微粒子の使用にも関する。

[0083] 本発明は、それを必要とする対象に予防及び／治療有効量の間葉系幹細胞由来微粒子を投与することを含む、角膜上皮疾患の予防及び／又は治療のための方法にも関する。

[0084] 前記角膜上皮疾患は、何らかの原因により角膜上皮が傷ついた疾患であり、角膜上皮細胞及び／又は角膜上皮幹細胞が減少及び／又は消失した疾患を含み、例えば、熱腐蝕、アルカリ腐蝕、酸腐蝕、薬剤毒性、Stevens-Johnson症候群、眼類天疱瘡、（再発）翼状片、遷延性角膜上皮欠損、角膜穿孔、角膜周辺部潰瘍、角膜潰瘍、エキシマレーザー術後の上皮剥離、放射線角膜症、無虹彩症、トラコーマ後角膜混濁、Salzmann角膜変性、角膜びらん、瞼球癒着、原因不明の角膜上皮の幹細胞の消失した疾患、輪部腫瘍、宿主対移植片疾患（GVHD）、角膜炎、点状表層角膜症、ドライアイ、乾性角結膜炎、角膜上皮幹細胞疲弊症、角膜ジストロフィー、糖尿病角膜症、角膜上皮障害を含む。前記角膜上皮疾患は、好ましくは角膜上皮障害、点状表層角膜症、角膜びらん、角膜周辺部潰瘍、遷延性角膜上皮欠損、ドライアイ、エキシマレーザー術後の上皮剥離、熱腐蝕、アルカリ腐食、酸腐蝕、薬剤毒性、糖尿病角膜症、角膜上皮幹細胞疲弊症、Stevens-Johnson症候群、眼類天疱瘡、無虹彩症、原因不明の角膜上皮の幹細胞の消失した疾患、移植片対宿主病（GVHD）であり、更に好ましくは角膜上皮障害、点状表層角膜症、角膜びらん、角膜周辺部潰瘍、遷延性角膜上皮欠損、ドライアイ、エキシマレーザー術後の上皮剥離、熱腐蝕、アルカリ腐食、酸腐蝕、薬剤毒性、糖尿病角膜症である。また、前記角膜上皮幹細胞疲弊症は、例えば、外的要因（熱、化学外傷や薬剤毒性など）、内的要因（Stevens-Johnson症候群、眼類天疱瘡、GVHDなど

の眼疾患）、先天的な欠損（無虹彩症と強膜化角膜など胎生期における発生異常による輪部の形成不全）、又は腫瘍性疾患（輪部を原発とする重層扁平上皮癌など）により引き起こされる。

[0085] 本発明の予防又は治療剤、及び医薬組成物は、他の薬剤と同時に投与してもよいし、他の薬剤を投与する前後の適切な時期に投与してもよい。

[0086] 本発明の予防又は治療剤、及び医薬組成物は、常法によって適宜の製剤とすることができる。製剤の剤型としては散剤、顆粒剤などの固形製剤であってもよいが、優れた予防・治療効果を得る観点からは、溶液剤、乳剤、懸濁剤などの液剤とすることが好ましい。特に点眼剤とする場合には、溶液剤であることがより好ましい。上記液剤の製造方法としては、例えば、あらかじめ調製した間葉系幹細胞由来の微粒子や間葉系幹細胞の培養上清を溶剤と混合する方法や、さらに懸濁化剤や乳化剤を混合する方法を好適に例示することができる。以上のように、本発明における医薬組成物の製剤においては、製剤上の必要に応じて、適宜の薬学的に許容される担体、例えば、賦形剤、結合剤、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化剤、緩衝剤、安定化剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、滑沢剤、崩壊剤、湿潤剤、吸着剤、甘味剤、希釈剤などの任意成分を配合することができる。なお、本発明の医薬組成物が細胞を含む場合には、細胞製剤に許容され得る成分を配合することができる。

[0087] 本発明の予防又は治療剤、及び医薬組成物の製剤の投与方法としては特に制限されないが、血管内投与（好ましくは静脈内投与）、腹腔内投与、腸管内投与、皮下投与、点眼による投与等が好ましい。

[0088] 本発明の予防又は治療剤、及び医薬組成物の製剤の投与量としては、疾患の種類や、その症状の度合い、剤型、投与対象の体重等によって変わり得るが、間葉系幹細胞由来微粒子の量として、例えば、1日当たり、 $1 \text{ pg} / \text{kg} \sim 100 \text{ mg} / \text{kg}$ の範囲を好適に例示することができ、中でも、 $100 \text{ pg} / \text{kg} \sim 10 \text{ mg} / \text{kg}$ の範囲をより好適に例示することができる。なお、本発明の予防又は治療剤、及び医薬組成物の投与は、1日のうち1～複

数回に分けて行ってもよい。また、本発明の予防又は治療剤、及び医薬組成物の製剤の投与は、単回投与でもよいし、継続的行ってもよい。継続的に行う場合は、例えば、3日に1回以上の頻度で、2回以上継続して投与することができ、中でも、2日に1回以上の頻度で、3回以上継続して投与することが好ましく、1日に1回以上の頻度で4回以上継続して投与することがより好ましい。

[0089] 本発明の予防又は治療剤、及び医薬組成物の製剤が点眼剤である場合、点眼剤に汎用されている技術を用い、必要に応じて製薬学的に許容され得る添加剤を用いて調製することができる。

[0090] 例えば、塩化ナトリウム、濃グリセリンなどの等張化剤；塩酸、水酸化ナトリウムなどのpH調整剤；リン酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなどの緩衝化剤；ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート、ステアリン酸ポリオキシル40、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などの界面活性剤；クエン酸ナトリウム、エデト酸ナトリウムなどの安定化剤；塩化ベンザルコニウム、パラベンなどの防腐剤などから必要に応じて選択して用い、調製することができる。本点眼液のpHは眼科製剤に許容される範囲内にあればよいが、通常4～8の範囲内が好ましい。

[0091] 本発明の予防又は治療剤、及び医薬組成物の製剤の投与対象となる動物としては、特に制限されないが、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ等が好ましく、中でもヒトがより好ましい。また、本発明の予防又は治療剤、及び医薬組成物が細胞及び／又はその培養上清を含む場合、本発明の予防又は治療剤、及び医薬組成物の製剤の投与対象となる動物の種類と一致していることが、疾患に対するより安定して優れた予防及び／又は治療効果を得る観点から好ましい。

実施例

[0092] 以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されない。

[0093] <脂肪由来間葉系幹細胞>

脂肪由来間葉系幹細胞 (AD-MSC) は、Poietics Adipose-derived stem cells (PT-5006、Lonza) を使用した。

[0094] <ヒト角膜上皮系細胞>

ヒト角膜上皮系細胞 (HCEC) は、以下のようにして調製した。ヒト輸入角膜 (Sight Life、WA) の輪部からヒト角膜上皮系細胞を採取し、10cmdish (353003、Falcon) においてCnT-Prime、Epithelial Culture Medium (CnT-PR、CELLnTEC) を用いて37℃、5%CO₂の環境下のインキュベーターにて培養し、70-90%の密度まで培養した。PBS (14190-144、Gibco) 10mlで1回washした後、TrypLE Express (12605-010、Gibco) 2mlで5~10分間、37℃、5%CO₂のインキュベーター内にて酵素反応後、PBS 8mlを添加して、遠心機 (LC-230、TOMY) 1300rpm、5分間遠心操作を行い、上清を除去した。ペレットをSTEM-CELLBANKER (CB046、ZENOAQ) を用いて 1×10^6 cells/mlとなるように懸濁し、使用時まで-150℃の冷凍庫に保管した。

[0095] <培地>

AD-MSC培養およびエキソソーム回収のための培地は、MSCGM-CD BulletKit (00190632、Lonza) を使用した。

[0096] NIH/3T3細胞の培養のための培地は、10%FBS、および1%Antibiotic-Antimycotic (15240-062、Gibco) を添加したDMEM, High Glucose, Pyruvate (11995-065、Gibco) を用いた。

[0097] また、コロニーアッセイ実施時に使用したHCECを拡大培養するための培地には、CnT-Prime (CnT-PR、CELLnTEC) を用い、コロニー形成時の培地は5%FBSを添加したKCM培地 (Hayashi, Ryuhe

i, et al. "Validation system of tissue-engineered epithelial cell sheets for corneal regenerative medicine." *Tissue Engineering Part C: Methods* 16.4 (2009): 553-560.)を用いた。

[0098] <エキソソームの調製>

1. エキソソーム抽出用培養上清の回収

AD-MSC (PT-5006、Lonza) (Passage 4~6) を T-75 フラスコ (353136、Falcon) にて 5000 cells/cm² の密度にて 13 ml の MSCGM-CD を用いて 37℃、5% CO₂ の環境下のインキュベーターで培養を行った。70~90% の密度に達したら新しい 13 ml MSCGM-CD へと交換し、それから 3 日間同様の環境下で培養を行い、その培養上清をエキソソーム単離用に回収した。エキソソームの単離に使用するまでは 15 ml チューブ (352096、Falcon) に分注して -80℃ にて保管した。

[0099] 2. 超遠心法によるエキソソームの単離

以下の報告に従って超遠心を行った。参考にした方法を図 1 に示す。

(Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology* / Editorial Board, Juan S. Bonifacino [et Al.], Chapter 3, Unit 3.22. doi:10.1002/0471143030.cb0322s30)

[0100] 遠心機は日立、CP80WX を使用し、ロータは P90AT、また超遠心用チューブは 121℃、20 分でオートクレーブ滅菌処理をした 10PC ボトルクミ (日立、325952A) を使用した。培養上清 8 ml / チューブを室温で 10 分間 300 G で遠心し、上清を回収してペレットの生細胞を除き、次に 4℃ で 10 分間 2,000 G で遠心して上清 8 ml を回収し、ペレットの死細胞を除去した。さらにそれを 4℃ で 30 分間 10,000 G で遠心し、上清 8 ml を回収し、ペレットの細胞破片等を除いた。その後は超遠心チューブにうつし、4℃ で 70 分間 100,000 G で超遠心し、上清を

除き、エキソソームをペレットとして得、PBS 8 ml で再懸濁後、再度 4℃で 70 分間 100,000 G で超遠心し、上清を除いて、最終的にペレットとしてエキソソームを得た。

[0101] <コロニー形成試験>

1. エキソソームの効果検討

フィーダーとして、24 well plate (353047、Falcon) にマイトマイシンC (マイトマイシン注用 2 mg、協和発酵キリン株式会社) $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ で 2 時間処理した NIH/3T3 細胞を $1.0 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$ として 10% FBS DMEM を用いて播種した。サブコンフルエントになるまで 10 cm dish で培養した HCEC (passage = 2) の培養上清を除き、PBS 10 ml で wash 後、TrypLE Express (12605-010、Gibco) 2 ml を添加し 37℃、5% CO₂ の環境下のインキュベーターにて酵素反応後細胞をはがし、PBS 8 ml を添加して 15 ml チューブへと移し、遠心機 (LC-230、TOMY) にて 1300 rpm で室温で 5 分間遠心を行い HCEC のペレットを調製し、それを 5% FBS KCM にて懸濁後、 $200 \text{ cells}/\text{well}$ となるよう、NIH/3T3 フィーダーの上へと播種した。培地量は合計 $300 \mu\text{l}/\text{well}$ となるようにした。培地は 2-3 日に 1 度、合計 3 度交換し、エキソソームはそのたびに新しいものへと交換し、10 日間同じ環境下で培養を続けた。エキソソームは BCA アッセイにより測定したタンパク量換算で 20 あるいは $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるように 5% FBS KCM 培地で調整し処理を行った。

[0102] 2. コロニーアッセイ (染色)

培養液を除去し、PBS $500 \mu\text{l}$ で 1 回洗い、10% ホルムアルデヒド緩衝液 $300 \mu\text{l}$ を入れ 2 時間以上 RT で固定した。その後、超純水 $500 \mu\text{l}$ で well を 1 回洗い、2% Rhodamine B 溶液 $300 \mu\text{l}$ を加え、室温で 30 分間以上反応させた後、0.2 M HCl で 1~3 回ウェルを洗い、室温にて乾燥後、ウェルをスキャナー (GT-F740、EPSON

）でスキャン、あるいはEVOS FL AUTO (Thermo Fisher Scientific)で撮影して、画像を得た(図2)。それを基にコロニー数を計測した。Colony-Forming Efficiency (CFE) (%)は「 $100 \times \text{コロニー数} / \text{播種した細胞の数}$ 」で算出した。図3に示すようにコントロールの細胞のCFEは、5.6%であり、エキソソーム処理した細胞のCFEは、9.1%であり、エキソソーム処理によって有意にコロニー形成が増加した。以上の結果から、AD-MSC由来のエキソソームはHCECのコロニー形成促進作用を有することが確認された。

[0103] 3. コロニー面積の解析

スキャナーで取り込んだウェルの画像をImage J 1.45Sを用いて解析して、それぞれのコロニーの面積値を得た。結果を図4に示す。エキソソームによって、一つあたりのコロニーを大きくする効果があることが明らかとなった。このことからエキソソームがHCECのコロニーに対して細胞増殖促進活性を有していることが示された。

[0104] 4. 統計解析

<統計解析>

統計解析はR version 3.1.1、EZR version 1.25を用いて行った。

[0105] <コロニーの遺伝子発現解析>

1. K12の遺伝子発現解析

培養上清を除去後、PBS 500 μ lにて1度洗浄し、得られたHCECのコロニーをウェルごとにQIAzol Lysis Reagent (79306、QIAGEN) 1ml添加して、Total RNAを回収し、プロトコールにしたがって、total RNAを精製後、SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (18080400、Thermo Fisher Scientific)を用いて逆転写反応を行い、cDNAを得た。GAPDH、およびK12のTaqMan (R) Gene E

xpression assay (それぞれ、Hs99999905__m1、Hs00165015__m1)を用いてApplied Biosystems 7500 Fastを使用し、リアルタイムPCR法を実施した。結果は比較Ct法を用いて、GAPDHの発現量に対する相対的量として示した。結果を図5に示す。

[0106] 2. K12の免疫蛍光染色

形成したコロニーをPBS 500 μ lで1度洗い、 -30°C で冷却したMeOH 300 μ lで30分間、室温で固定した。その後5%NST (5% Normal Donkey Serum、0.3% Triton/TBS) 300 μ lで1時間、室温でブロッキングを行い、1%NST (1% Normal donkey serum、0.3% Triton/TBS) で100倍に希釈したCytokeratin 12 Antibody (N-16) (SC-17098、Santa Cruz Biotechnology) 300 μ lを加えて、3時間、室温で処理した。3回PBS 300 μ lで洗った後、200倍に希釈したDonkey anti-Goat IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 647 conjugate (A21447、Thermo Fisher Scientific) 300 μ lを加えて、で1時間、室温で処理し、最後の10分間Hoechstで処理をし、核を染色した。3回PBS μ lで洗った後、PBS 300 μ lを加え、蛍光倒立顕微鏡AxioObserver D1 (Carl Zeiss) で647の波長でサンプルを撮影した。結果を図6に示す。以上の結果から、HCECの分化マーカーに対するAD-MS C由来エキソソームの抑制作用が示された。

[0107] 3. その他のマーカーの遺伝子解析

K3、K14、K15、p63 (TP63)、N-cadherin (CDH2)、PAX6は、K12の遺伝子発現解析方法にしたがって行った。Taqman Gene Expression Assayは以下のものを用いた。K3 (Hs00365080__m1)、K12 (0016501

5__m1)、K14 (Hs00559328__m1)、K15 (Hs00267035__m1)、p63 (Hs00978339__m1)、N-Cadherin (Hs00983056__m1)、PAX6 (Hs00240871__m1) これらの結果を図5に示す。角膜上皮細胞の分化マーカーであるK3や分化の際に重要な役割を果たすPAX6などの発現を抑制する一方、角膜上皮幹細胞の幹細胞マーカーである、K14、K15、p63、N-Cadherinの発現は増加させることがわかった。以上のことからAD-MS C由来エクソソームは角膜上皮幹細胞の分化を抑制し、未分化な状態を維持することでコロニー形成の促進作用を示すことが示唆された。

[0108] <エクソソームのプロテオーム解析>

・エクソソーム中タンパクのショットガン解析

前記の方法に従ってエクソソームペレットを得た。エクソソームペレットは10 μ lの100mM Tris-HCl pH8.0に2% Sodium Deoxycholate (190-08313、Wako)、および1X Protease Inhibitor CocktailセットI (165-26021、Wako)を添加したものを加え、ボルテックス後4℃、O/Nで静置して懸濁した。。BCAアッセイキット (Pierce、23227)によるタンパク定量を行い、1 μ g/ μ lに希釈したものを10 μ lをショットガン解析に使用した。解析はQTRAP 5500 (AB SCIEX)を使用した。

前記のエクソソームは、CD9、CD63、CD81、GAPDH、PKM、Enolase-1、40S ribosomal protein S2、S5、S6、S13、S23、S4、S16、S9、60S acidic ribosomal protein P0、P1、60S ribosomal protein L9、HSPB1、HSP7C、14-3-3 protein zeta/delta、epsilon、theta、beta/alpha、gamma、eta、Syntenin、TSG101、Actin Cytoplasmic-1、Cofilin-

1、Annexin A1、A2、A5、A6、A7、A11、Rab-1 B、7a、8B、11A、13、35、ICAM-1、Integrin α V、 α -2、 α -4、 α -5、 β -1、 β -5を含むことが確認された。

[0109] <Western BlotによるエクソソームのCD63発現量の評価>
骨髓由来間葉系幹細胞 (BM) は、D10132 (タカラ)、臍帯由来間葉系幹細胞 (UC) はKW-4009 (KURABO) ヒト正常皮膚繊維芽細胞 (NHDF) はKF-4009 (KURABO) を使用して、前記の方法によってAD-MSCを含むそれぞれの培養上清からエクソソームを単離した。コントロール群 (CTL) では細胞を培養していないMSCGM-CDに対して同様の処理を行ったものを使用した。エクソソームペレットをProtease Inhibitor Cocktail Set I (Wako、165-26021) を添加したRIPA Lysis and buffer (89900、Thermo Fisher Scientific) 10 μ lを使用して懸濁した。微量超音波ホモジナイザーQSONICA Q125を用いて20%、5秒で処理してエクソソームを破碎し、4℃、15分間14,000Gで遠心して上清を回収した。BCAキット (Pierce、23227) によって上清のタンパク定量後、サンプルに4 x NuPAGE LDS Sample Buffer (Bio-Rad) 4分の1量添加して70℃、10分間処理したヒートブロックで処理したサンプルをタンパク量換算で3 μ gずつ4-12%のNuPAGE Novex Bis-Trisゲル (Invitrogen) へとアプライし、SDS-PAGEを行った。iBlotシステム (Invitrogen) を用いてPVDFメンブレンに転写した後、5% skim milk/PBS中で室温にて1時間ブロッキングした。0.05% Tween 20含有TBS (TBS-T) で5分間3回洗浄したメンブレンを4℃、オーバーナイトで一次抗体に反応させ、TBS-Tで5分間3回洗浄した後、二次抗体に室温で1時間反応させた。一次抗体には、抗CD63抗体 (10628D、The

rm o F i s h e r S c i e n t i f i c、1 : 1 0 0 0希釈 (TBS)) を使用し、二次抗体には、HRP標識抗マウスIgG抗体 (1 : 1 0, 0 0 0倍希釈 (TBS)) を使用した。発光にはECL prime (GE healthcare Bio-Sciences) を使用し、Chem i Doc XRS (Bio-Rad) にて検出した。AD-MSC由来のエキソソームは、CD63を発現し、UC-MSC (臍帯由来の間葉系幹細胞) 及びBM-MSC (骨髄由来の間葉系幹細胞) 由来のエキソソームも、AD-MSC由来のエキソソームより少ないものCD63を発現していた。これらのことから、他の細胞と比較し、AD-MSCがより多くのエキソソームを分泌している可能性が示唆された。

産業上の利用可能性

[0110] 本発明の間葉系幹細胞由来微粒子は、角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞の増殖促進活性、角膜上皮幹細胞の未分化維持活性又はコロニー形成促進活性、或いは角膜上皮保護作用を有するので、産業上利用可能性がある。

請求の範囲

- [請求項1] 角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞の増殖促進活性、角膜上皮幹細胞の未分化維持活性又は角膜上皮幹細胞のコロニー形成促進活性、或いは角膜上皮保護作用を有する、間葉系幹細胞由来微粒子。
- [請求項2] 間葉系幹細胞微粒子が、密度勾配遠心法による密度：1.13～1.19 g/mLを有する、請求項1記載の間葉系幹細胞由来微粒子。
- [請求項3] 間葉系幹細胞微粒子がエキソソームである、請求項1又は2記載の間葉系幹細胞由来微粒子。
- [請求項4] 間葉系幹細胞由来微粒子を有効成分として含有する、角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞の増殖促進剤、角膜上皮幹細胞の未分化維持剤又は角膜上皮幹細胞のコロニー形成促進剤、或いは角膜上皮保護剤。
- [請求項5] 間葉系幹細胞由来微粒子を有効成分として含有する、角膜上皮疾患の予防又は治療剤。
- [請求項6] 角膜上皮疾患が、熱腐蝕、アルカリ腐蝕、酸腐蝕、薬剤毒性、Stevens-Johnson症候群、眼類天疱瘡、（再発）翼状片、遷延性角膜上皮欠損、角膜穿孔、角膜周辺部潰瘍、角膜潰瘍、エキシマレーザー術後の上皮剥離、放射線角膜症、無虹彩症、トラコーマ後角膜混濁、Salzmann角膜変性、角膜びらん、瞼球癒着、原因不明の角膜上皮の幹細胞の消失した疾患、輪部腫瘍、宿主対移植片疾患（GVHD）、角膜炎、点状表層角膜症、ドライアイ、乾性角結膜炎、角膜上皮幹細胞疲弊症、角膜ジストロフィー、糖尿病角膜症、及び角膜上皮障害からなる群より選択される、請求項5記載の角膜上皮疾患の予防又は治療剤。
- [請求項7] 角膜上皮疾患が、角膜上皮障害、点状表層角膜症、角膜びらん、角膜周辺部潰瘍、遷延性角膜上皮欠損、ドライアイ、エキシマレーザー術後の上皮剥離、熱腐蝕、アルカリ腐食、酸腐蝕、薬剤毒性、糖尿病角膜症、角膜上皮幹細胞疲弊症、Stevens-Johnson症

候群、眼類天疱瘡、無虹彩症、原因不明の角膜上皮の幹細胞の消失した疾患、及び移植片対宿主病（GVHD）からなる群より選択される、請求項5記載の角膜上皮疾患の予防又は治療剤。

[請求項8] 角膜上皮疾患が、角膜上皮障害、点状表層角膜症、角膜びらん、角膜周辺部潰瘍、遷延性角膜上皮欠損、ドライアイ、エキシマレーザー術後の上皮剥離、熱腐蝕、アルカリ腐食、酸腐蝕、薬剤毒性、糖尿病角膜症である、請求項5記載の角膜上皮疾患の予防又は治療剤。

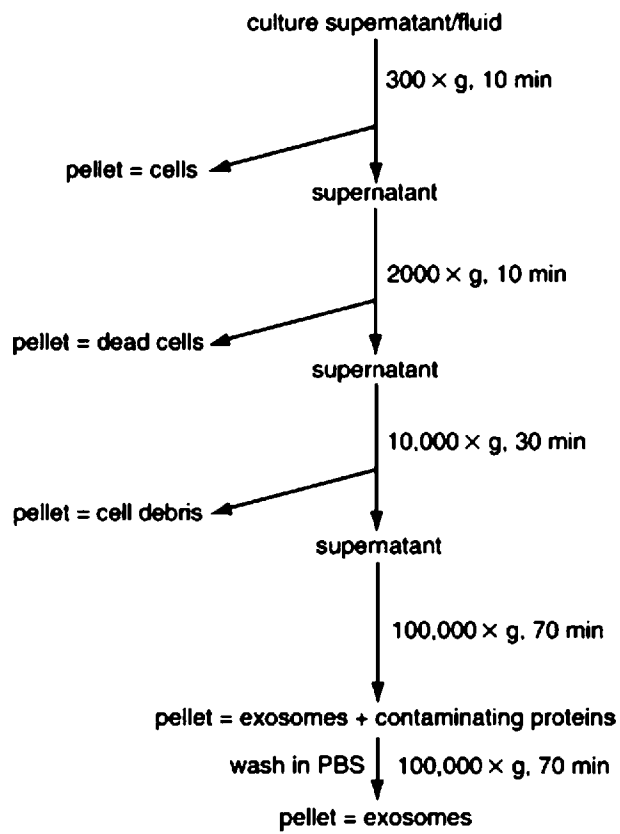
[請求項9] 角膜上皮幹細胞疲弊症が、外的要因、内的要因、先天的な欠損、又は腫瘍性疾患により引き起こされる、請求項8記載の角膜上皮疾患の予防又は治療剤。

[請求項10] 間葉系幹細胞由来微粒子の存在下で培養することを特徴とする、角膜上皮幹細胞の培養方法。

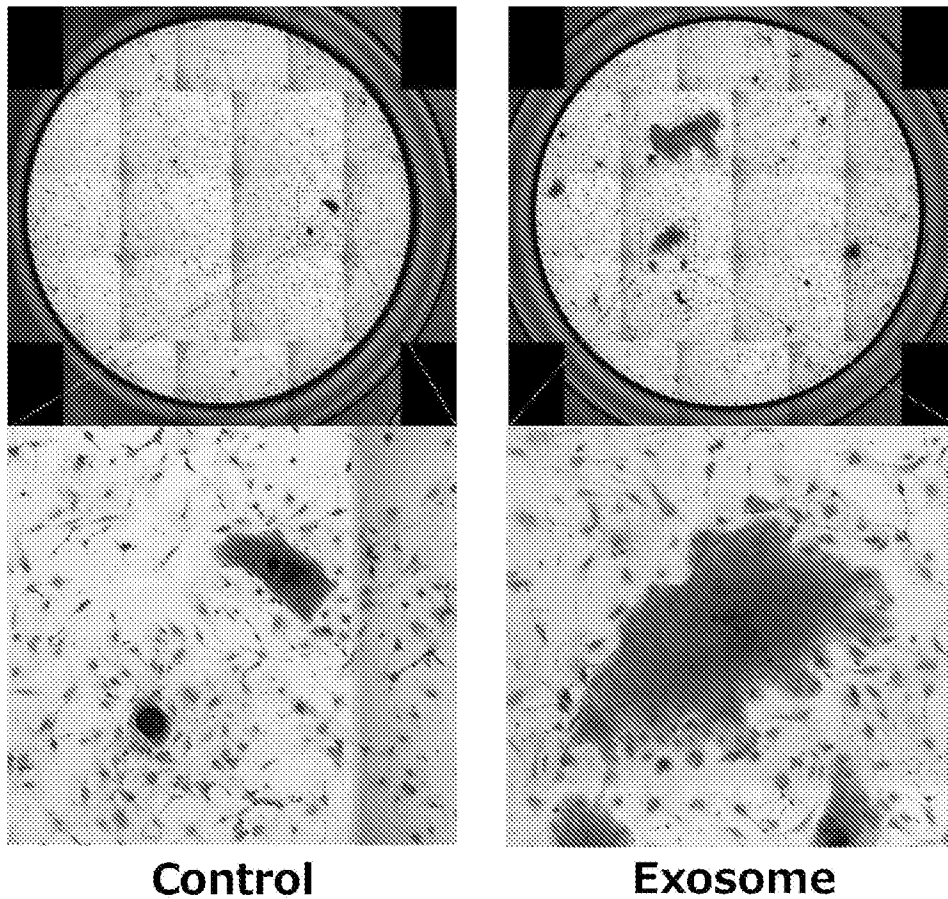
[請求項11] 請求項10記載の培養方法によって得られる、角膜上皮幹細胞及び／又は角膜上皮細胞。

[請求項12] 角膜上皮幹細胞のコロニー形成を指標とする、角膜上皮疾患の予防又は治療剤のスクリーニング方法。

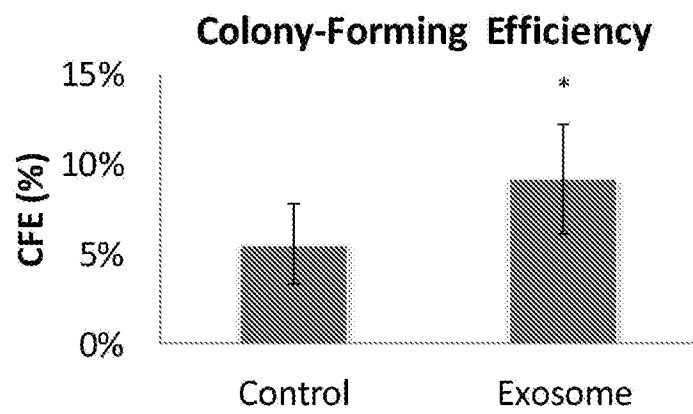
[図1]



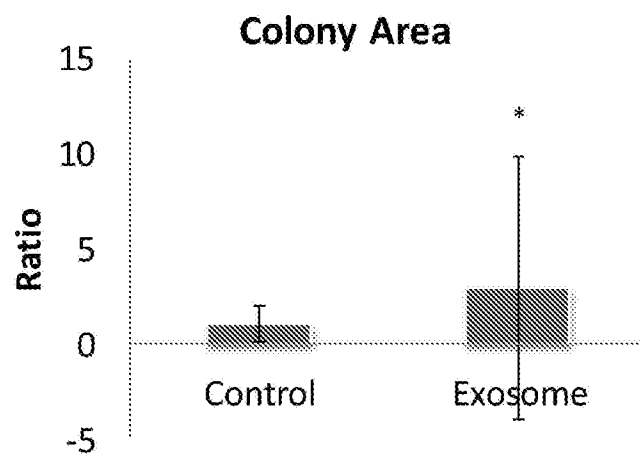
[図2]



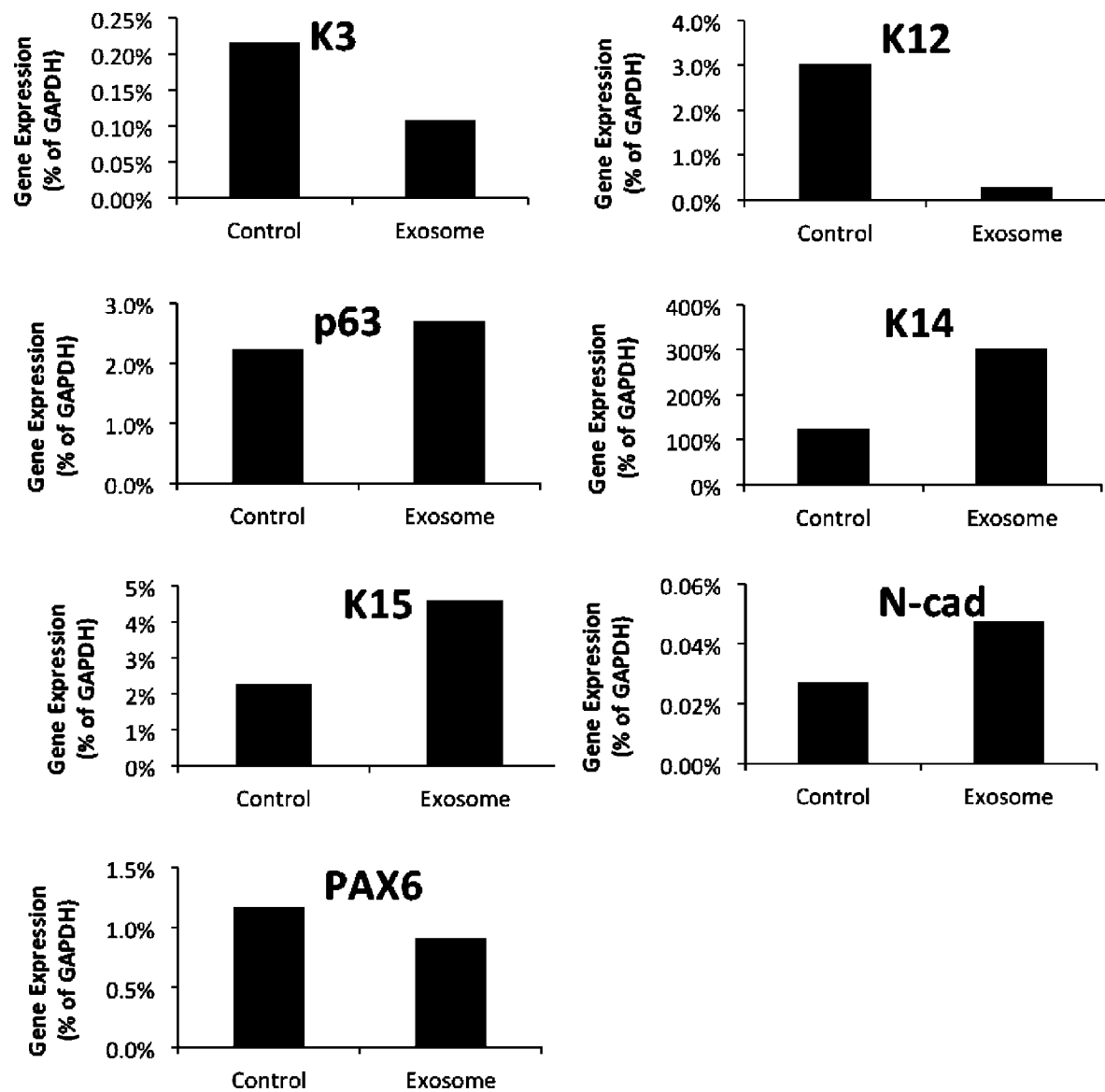
[図3]



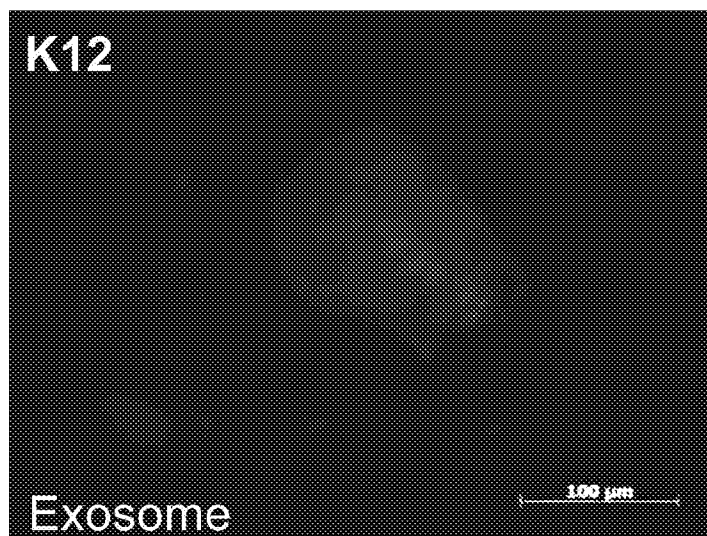
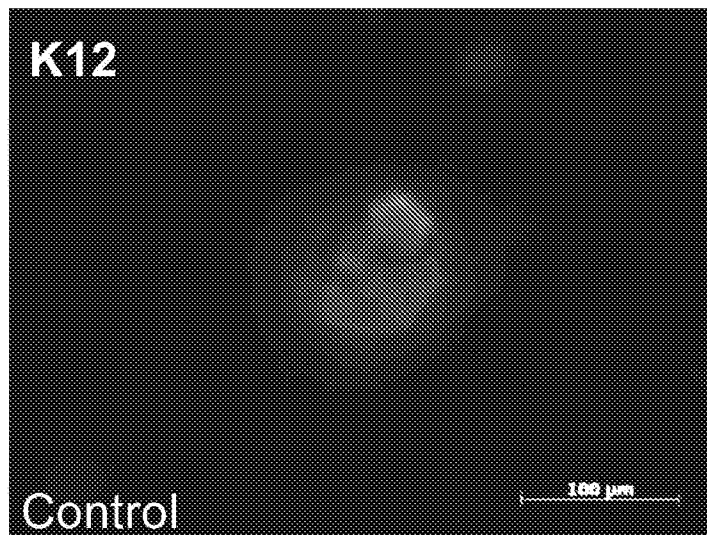
[図4]



[5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/072855

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/0775(2010.01)i, A61K35/28(2015.01)i, A61P27/02(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/0775, A61K35/28, A61P27/02, C12Q1/02

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016

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

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), PubMed, CiNii, WPIDS/WPIX(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{A}$	Asami YOKOYAMA et al., "Kan'yokei Kansaibo Oyobi Kan Gan Saibo Yurai Exosome Bunri to Kino Hikaku Kensho", 95th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan in Spring (2015) Koen Yokoshu II, 11 March 2015 (11.03.2015), page 535, 1BP-058	$\frac{1-3}{4-12}$
$\frac{X}{A}$	JP 2013-540150 A (Agency for Science, Technology and Research), 31 October 2013 (31.10.2013), claims; paragraphs [0191] to [0210] & US 2013/0209528 A1 & US 2015/0024011 A1 & WO 2012/053976 A1 claims; pages 33 to 37 & EP 2629782 A1	$\frac{1-9}{10-12}$

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

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

"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
14 October 2016 (14.10.16)Date of mailing of the international search report
25 October 2016 (25.10.16)Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/072855

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>A</u>	WO 2014/142038 A1 (JCR Pharmaceuticals Co., Ltd.), 18 September 2014 (18.09.2014), paragraphs [0027] to [0031] & US 2016/0008408 A1 & EP 2975117 A1 paragraphs [0027] to [0031]	<u>10, 11</u> <u>1-9, 12</u>
<u>X</u> <u>A</u>	WO 2009/011139 A1 (Mitsubishi Tanabe Pharma Corp.), 22 January 2009 (22.01.2009), paragraphs [0011] to [0013] & JP 5409359 B & US 2010/0184221 A1 & EP 2177602 A1 paragraphs [0011] to [0013]	<u>10, 11</u> <u>1-9, 12</u>
<u>X</u> <u>A</u>	WO 2005/035739 A1 (Koji NISHIDA), 21 April 2005 (21.04.2005), pages 10 to 17 & EP 1690929 A1 pages 3 to 8	<u>11, 12</u> <u>1-10</u>

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/0775(2010.01)i, A61K35/28(2015.01)i, A61P27/02(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/0775, A61K35/28, A61P27/02, C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed, CiNii, WPIDS/WPIX (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 A	横山亜紗実, 他, 間葉系幹細胞及び肝がん細胞由来エクソソーム分離と機能比較検証, 日本化学会第95回春季年会(2015)講演予稿集II, 2015.03.11, p. 535, 1BP-058	1-3 4-12
X A	JP 2013-540150 A (エージェンシー フォー サイエンス, テクノロジー アンド リサーチ) 2013.10.31, 【特許請求の範囲】、【0191】-【0210】 & US 2013/0209528 A1 & US 2015/0024011 A1 & WO 2012/053976 A1 :CLAIMS, p. 33-37 & EP 2629782 A1	1-9 10-12

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.10.2016

国際調査報告の発送日

25.10.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

太田 雄三

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3959

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	WO 2014/142038 A1 (J C Rファーマ株式会社) 2014.09.18, [0027] - [0031] & US 2016/0008408 A1 & EP 2975117 A1: [0027]-[0031]	10, 11 1-9, 12
X A	WO 2009/011139 A1 (田辺三菱製薬株式会社) 2009.01.22, [0011] - [0013] & JP 5409359 B & US 2010/0184221 A1 & EP 2177602 A1: [0011]-[0013]	10, 11 1-9, 12
X A	WO 2005/035739 A1 (西田幸二) 2005.04.21, p. 10-17 & EP 1690929 A1: p. 3-8	11, 12 1-10