

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7014449号
(P7014449)

(45)発行日 令和4年2月1日(2022.2.1)

(24)登録日 令和4年1月24日(2022.1.24)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	25/18 (2006.01)	A 6 1 P	25/18

F I

請求項の数 12 (全26頁)

(21)出願番号 特願2019-508178(P2019-508178)
 (86)(22)出願日 平成29年8月14日(2017.8.14)
 (65)公表番号 特表2019-524824(P2019-524824)
 A)
 (43)公表日 令和1年9月5日(2019.9.5)
 (86)国際出願番号 PCT/IL2017/050899
 (87)国際公開番号 WO2018/033911
 (87)国際公開日 平成30年2月22日(2018.2.22)
 審査請求日 令和2年7月17日(2020.7.17)
 (31)優先権主張番号 62/374,852
 (32)優先日 平成28年8月14日(2016.8.14)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73)特許権者 507253749
 ラモット アット テル アビブ ユニバー
 シティ , リミテッド
 イスラエル国 6 1 3 9 2 テル アビブ ,
 ピー . オー . ボックス 3 9 2 9 6
 (74)代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
 (74)代理人 100121511
 弁理士 小田 直
 (74)代理人 100202751
 弁理士 岩堀 明代
 (74)代理人 100191086
 弁理士 高橋 香元
 (72)発明者 オフェン , ダニエル
 イスラエル国 , 6 1 3 9 2 0 1 テル ア
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 神経障害を処置するための間葉系細胞由来エキソソーム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

間葉系幹細胞 (MSC) 由来のエキソソームを含む、神経発達障害の処置における使用のための医薬組成物。

【請求項2】

間葉系幹細胞 (MSC) 由来のエキソソームを含む、自閉症スペクトラム障害 (ASD) の処置における使用のための医薬組成物。

【請求項3】

前記神経発達障害が統合失調症である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記神経発達障害が注意欠陥多動性障害である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記神経発達障害が強迫性障害である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項6】

鼻腔内投与を介した使用のための、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項7】

前記間葉系幹細胞が歯髄由来である、請求項1～6の何れか1項に記載の医薬組成物。

【請求項8】

前記間葉系幹細胞が骨髄由来である、請求項1～6の何れか1項に記載の医薬組成物。

【請求項9】

前記間葉系幹細胞が脂肪組織由来である、請求項 1 ~ 6の何れか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記 M S C がヒト M S C である、請求項 1 ~ 9の何れか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記 M S C が同種である、請求項 1 ~ 10の何れか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記 M S C が非同種である、請求項 1 ~ 10の何れか 1 項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本発明は、そのいくつかの実施形態において、神経障害の処置および、より具体的には自閉症であるが限定されないものの処置のための間葉系幹細胞由来の粒子に関する。

【背景技術】

【0002】

自閉症スペクトラム障害 (A S D) は、3つのコアとなる症状：社会的相互作用およびコミュニケーションスキルの重度障害、反復行動増加および認知の不变性を特徴とする神経発生障害である (B l e n n e r , R e d d y および A u g u s t y n , 2 0 1 1) 。 A S D の基礎となる病態生理学は依然として不明であるが、近年の証拠から、様々な分子的機能不全、例えば神経発生における欠陥 (W e g i e l ら、2 0 1 0) 、神経免疫学的過程 (A shwood ら、2 0 1 1 ; L i ら、2 0 0 9) および神経栄養因子の利用可能性 (N i c k l - J o c k s c h a t および M i c h e l , 2 0 1 1) などが関与することが示唆される。 B T B R マウスは、コミュニケーションおよび社会的相互作用の欠陥ならびに認知不变性および反復行動増加 (B o l i v a r ら、2 0 0 7) を示す近交ストランド (i n b r e d s t r a n d) である。神経学的に、B T B R では海馬の神経発生が減少しており、これは自閉症のヒトと関連する (S t e p h e n s o n ら、2 0 1 1) 。脳室下ゾーンに隣接する B T B R マウスの脳の側脳室への M S C の移植は、見慣れない雄マウスへの関心の向上、反復行動および認知の不变性の軽減など、それらの自閉症様行動に有益となる能力を有することが示されている (S e g a l - G a v i s h ら、2 0 1 5) 。

20

【0003】

30

統合失調症 (S C Z) は、世界的におよそ 1 % の生涯リスクがあり、陽性症状 (例えば妄想および幻覚) 、陰性症状 (例えば情動の平板化、感情鈍麻および引きこもり) および認知機能不全を特徴とする重度の神経発達障害である。 S C Z は、遺伝的要素および、出生前感染、周産期合併症および大麻使用を含む、環境的障害の組み合わせにより引き起こされる。 S C Z の長期経過の根本にある病態機構は、まだ完全には明らかになっていない。結果的に、 S C Z に対する最新の抗精神病薬処置は、この壊滅的な疾病的基本的な特性であると考えられる、陰性症状および認知欠陥における効果が不十分となっている。

【0004】

40

エキソソームは、最初、網状赤血球からの不要な膜タンパク質を除去するための機序であると考えられたが、最新の研究から、ある細胞から別の細胞への遺伝情報の輸送による細胞と細胞とのコミュニケーションのためにそれらが使用されることが示されている。一部の研究では、 M S C 由来エキソソームが、組織損傷の修復、炎症反応の抑制および免疫系の調整など、 M S C と同様の機能を有することが報告されている (Y u ら、2 0 1 4) 。エキソソームは、容易に追跡可能であり、特異的な領域に標的化され得、これにより、細胞と比較してそれらの作用機序を追跡することが容易となる (V a l a d i ら、2 0 0 7) 。さらに、エキソソームは、それらが鼻腔内投与される場合、炎症の軽減など、脳において著しい生物学的効果を有することが示されている (Z h u a n g ら、2 0 1 1) 。

【0005】

米国特許出願公開第 2 0 1 5 0 1 9 0 4 3 0 号明細書は、アルツハイマー病およびパーキンソン病を処置するための M S C のエキソソームを教示する。

50

【 0 0 0 6 】

国際公開第 2 0 1 3 1 5 0 3 0 3 号パンフレットは、N D 障害を処置するための神経幹細胞のエキソソームを教示する。Y u e t a l . , I n t J M o l S c i . 2 0 1 4 M a r ; 1 5 (3) : 4 1 4 2 - 4 1 5 7 は、アルツハイマー病を処置するためのM S C のエキソソームを教示する。

【発明の概要】**【 0 0 0 7 】**

本発明の態様によれば、対象において神経疾患を処置する方法であって、対象に治療的有効量の間葉系幹細胞 (M S C) 由来の粒子を投与することを含み、神経疾患がアルツハイマー病またはパーキンソン病ではなく、それによって対象において神経疾患を処置する、方法が提供される。

10

【 0 0 0 8 】

本発明の態様によれば、対象において自閉症スペクトラム障害 (A S D) を処置する方法であって、対象に治療的有効量の間葉系幹細胞由来の微粒子を投与することを含み、それによって自閉症スペクトラム障害を処置する、方法が提供される。

【 0 0 0 9 】

本発明の態様によれば、脳卒中の処置を必要とする対象において脳卒中を処置する方法であって、対象に治療的有効量の間葉系幹細胞由来の粒子を鼻腔内投与することを含み、それによって前記対象における脳卒中を処置する、方法が提供される。

20

【 0 0 1 0 】

記載される好ましい実施形態におけるさらなる特性によれば、神経疾患は統合失調症である。

【 0 0 1 1 】

記載される好ましい実施形態におけるさらなる特性によれば、投与は鼻腔内投与を含む。

【 0 0 1 2 】

記載される好ましい実施形態におけるさらなる特性によれば、粒子は、エキソソーム、微小胞、膜粒子、膜小胞、エクトソームおよびエキソベシクル (e x o v e s i c l e) からなる群から選択される。

【 0 0 1 3 】

記載される好ましい実施形態におけるさらなる特性によれば、粒子はエキソソームである。

30

【 0 0 1 4 】

記載される好ましい実施形態におけるさらなる特性によれば、粒子は微粒子である。

【 0 0 1 5 】

記載される好ましい実施形態におけるさらなる特性によれば、間葉系幹細胞は歯髄由来である。

【 0 0 1 6 】

記載される好ましい実施形態におけるさらなる特性によれば、間葉系幹細胞は骨髄由来である。

【 0 0 1 7 】

記載される好ましい実施形態におけるさらなる特性によれば、M S C はヒトM S C である。

40

【 0 0 1 8 】

別段の定めがない限り、本明細書中で使用される全ての技術および / または科学用語は、本発明が属する技術分野の熟練者により一般的に理解される意味と同じである。本明細書中に記載のものと同様または同等の方法および材料が本発明の実施形態の実施または試験において使用され得るが、代表的な方法および / または材料を以下に記載する。矛盾がある場合、定義を含む本特許明細書が優先される。さらに、材料、方法および実施例は単なる例示であり、必ずしも限定することを意図するものではない。

【 0 0 1 9 】

添付の図面を参照して、単なる例として本発明のいくつかの実施形態を本明細書中で記載する。ここで詳細に図面を具体的に参照して、示される項目は例であり、本発明の実施形

50

態の例示的な考察の目的のためであることが強調される。この点において、図面とともにとられる説明により、本発明の実施形態がどのように実施され得るかが当業者にとって明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】静脈内、鼻腔内および定位投与される場合にPKH26で染色されたMSC-エキソーム。投与1時間後に脳を分析した。収率は定位投与により100%、鼻腔内により68.5%および静脈内により11.2%となった。

【図2】図2A-図2B。鼻腔内MSC-エキソームがニューロンで見られた。DAP 10
I-NEUN-PKH26.X60。

【図3】図3A-図3C。MSC-エキソームの鼻腔内投与後の超音波発声の特異的な改善。A. BTBR MSC-exoは、食塩水BTBRと比較して、超音波発声の音節がより多かった。B. 社会的接触（鼻と鼻および鼻と生殖器）において群間で有意差はなく、このことから、超音波発声での特異的効果が示唆される。C. 各群の典型的な音節の可視化。BTBR MSC-exoは、音節継続時間および複雑性の特性においてC57b1とより近くなかった。**p<0.01, ***p<0.001, SEM。

【図4】図4A-図4B。MSC-エキソームにより、雄と雄との社会的相互作用が増加し（A）、社会的相互作用中の反復行動が減少する（B）。基本的行動（灰色）について各群を試験し、処置（食塩水またはMSC-exo、黒）から3週間後に再び試験した。BTBR MSC-exoは、社会的相互作用および社会的相互作用中の反復行動に費やす時間において、処置前後で有意差があった唯一の群であった（対応のあるT検定、SEM）。BTBR MSC-exoは、処置前にC57b1食塩水群とは有意に異なり、BTBR食塩水群と有意に異なった（ANOVA 1, SEM）。***p<0.001。

【図5】MSC-エキソームによって、セルフグルーミングの反復行動が減少した。基本的行動（灰色）について各群を試験し、処置（食塩水またはMSC-exo、黒）から3週間後に再び試験した。BTBR MSC-exoは、セルフグルーミングに費やす時間において処置前後で有意差があった唯一の群であった（対応のあるT検定、SEM）。BTBR MSC-exoは、処置前にC57b1食塩水群とは有意に異なり、BTBR食塩水群と有意に異なった（ANOVA 1, SEM）。*p<0.05。

【図6】図6A-図6B。MSC-エキソームによって認知の硬さが低下する。BTBR-exoマウスは、T型水迷路アッセイの逆転を学習する可能性がより高く、第1日および第2日に学習したパターンに立ち戻る可能性がより低かった（A）。BTBR-exoマウスはそれらの学習においてより速く、4匹のマウスは6回目の試行までに逆転した経路を着実に進むことを学習した。BTBR-食塩水マウスは、学習により長い時間を要し、一貫して正しい道を曲がる可能性がより少なかった。10回の試行後、6匹のBTBR-食塩水マウスのうち3匹が新しい経路を学習したが、確実にそれを追跡し得たのはそのうち2匹のみであった。各1回の試行での群間の比較は有意ではないが、正確に曲がる総数は食塩水群と比較してMSC-exo群で有意に高く、群の合計成功数の間の差は有意である（B）、（t=0.026）。

【図7】MSC-エキソームは母性行動の学習を改善する。C57b1母マウスは平均9.9秒で全ての仔マウスをシェルターに回収し（C57b1、白色）、ナイーブバージンマウスは、180秒後において仔マウスを全く回収せず（C57b1、薄灰色）、C57BL母マウスとともに3日間過ごしたバージンマウスは、平均37秒で、全ての仔マウスを回収することを学習した（C57b1、濃灰色）。食塩水投与されたBTBR母マウスは180秒後に仔マウスの殆どを回収せず、BTBRナイーブバージンは180秒後に仔マウスを全く回収しなかった。BTBR食塩水母マウスとともに2日間過ごした後、BTBR MSC-exoは、平均55秒で全ての仔マウスを回収した（SEM）。

【図8】図8A-図8B。図8A-Bは、対照と比較して、PCP注射後にMSC-エキソーム処置マウスの活動性が低下したことを例示するグラフである。

【図9】図9は、中枢情報処理過程におけるPCP亜慢性処置の効果を例示するグラフで

10

20

30

40

50

ある。バーのプロットは、潜在的抑制タスクの条件づけ期の間、音CS中に、前曝露なし(NPE)および前曝露あり(PE)対象においてすくみが起こっているパーセント時間を示す。印(*)および(**)は、それぞれ $P < 0.05$ および $P < 0.01$ の統計学的有意性を指す。値は全て平均 \pm SEMである。

【図10】図10は、全身性アンフェタミン(2.5mg/kg、i.p.)に対する感受性におけるPCP亜慢性処置の効果を例示するグラフである。PCP処置によって、オープンフィールドでのマウスの移動距離(cm)により測定した場合、全身性アンフェタミンに対する自発運動反応が増加した。統計学的有意性は、活動性の40分のピークの後のみ示した。

【図11】図11は、スリーチャンバー社会的アプローチテストの結果を例示するグラフである。ソーシャルケージおよび非ソーシャルケージに近接して過ごした時間を測定した。選好指標が与えられるが、これは、社会的および非社会的刺激の両方の近くで過ごした時間に対する、社会的刺激に近接して過ごした時間の量を示す。印(*)および(**)はそれぞれ $P < 0.05$ および $P < 0.01$ の統計学的有意性を指す。値は全て平均 \pm SEMである。

【図12A】図12Aは、NSC由来エキソソームではなくMSC由来エキソソームが、BTBRマウスにおいて、雄と雄との社会的相互作用を改善し、社会的相互作用中の反復行動を減少させることを例示するグラフである。食塩水処置およびNSC-exo処置マウスと比較して、MSC-exo処置マウスのみが社会的相互作用において費やす時間の有意な増加を示し、反復行動を有意に減少させた(対応のないT検定、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.001$)。データは平均 \pm SEMとして与える。

【図12B】図12Bは、MSC-exoの鼻腔内投与後に超音波発声の有意な改善があることを例示するグラフである。NSC-exoは効果がなかった。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明は、そのいくつかの実施形態において、神経障害の処置、より具体的には自閉症であるが限定されないものの処置のための間葉系幹細胞由来の粒子に関する。

【0022】

少なくとも1つの本発明の実施形態を詳細に説明する前に、本発明が、続く記載または実施例により示される記載において示される詳細に必ずしもその出願において限定されないことを理解されたい。本発明は、他の実施形態が可能であるか、または様々な方法で実施もしくは行うことが可能である。

【0023】

エキソソームは、最初、網状赤血球からの不要な膜タンパク質を除去するための機序であると考えられた。しかし、最新の研究から、ある細胞から別の細胞への遺伝情報の輸送を通じた細胞と細胞とのコミュニケーションのためにもそれらが使用されることが示されている。エキソソームは主にタンパク質、ならびにRNAおよび多数のマイクロRNAを含有する。これらのタンパク質およびRNAのおよそ25パーセントが細胞増殖および維持に寄与する。

【0024】

本発明者らは、間葉系幹細胞由来エキソソームが神経疾患に対する薬効を有するか否かを調べた。

【0025】

第1の場合において、発明者らは、社会的相互作用およびコミュニケーションスキルの重度障害、反復行動および認知の不变性の増加という、自閉症の3つの診断症状に関連する複数の行動表現型を組み込む近交系マウス系列BTBR-T1tf/J(BTBR)を使用して、自閉症における間葉系幹細胞由来エキソソームの効果を調べた。BTBRマウスは、C57BL対照と比較して、社会的アプローチの選択的低下、低いレシプロカル社会的相互作用および幼若動物の遊び(juvenile play)の障害を示す。

【0026】

10

20

30

40

50

本発明者らは、間葉系幹細胞由来エキソソーム（本明細書中で M S C - e x o とも呼ぶ。）を鼻腔内投与されたマウスが社会的相互作用ドメインにおける有意な改善を示すことを示した。M S C 由来エキソソームで処置した雄 B T B R マウスは、処置前のそれら自身のベースライン行動と比較して、および他の食塩水処置雄と比較して、他の見慣れない雄への社会的関心の向上を示した（図 4 A - B）。社会的相互作用において費やす時間は、c 5 7 b 1 群と同等であった。雄と雌との超音波発声（U S V）コミュニケーションにおいて、M S C - e x o で処置したマウスは、雌に対して食塩水処置群と比較して、U S V 数が有意に高くなつた（図 3 A - C）。B T B R マウスの自閉症様行動の第 2 のコア症状は、穴掘り様動作およびグルーミングの反復行動において費やす時間の延長である。ここで、本発明者らは、M S C 由来エキソソームで処置したマウスが、それらのベースラインと比較して、社会的相互作用中および単離されている間に反復行動に費やす時間が短縮したことを示す（図 5）。B T B R マウスの自閉症様行動の第 3 のコア症状は認知の硬さである。本発明者らは、M S C 由来エキソソーム処置マウスが、T 型水迷路アッセイ中に、食塩水処置群と比較して、レスキュープラットフォーム（rescue platform）の逆転状態中に誤りが有意に少なかったことを示す（図 6 A - B）。

【 0 0 2 7 】

本発明者らは、仔マウス回収行動における M S C 由来エキソソームの効果も調べた。出産後、母マウスは新生仔マウスのために巣作りをし、仔マウスが引き離されると、母マウスはすぐにそれを取り返し、巣に戻すことが知られている。ナイーブバージン雌マウスは引き離された仔を取り返さないが、バージンマウスが母マウスと数日過ごすと、バージンマウスは仔マウス回収行動を学習し得、したがって経験を積んだバージンマウスとなる（M a r l i n , M i t r e , D ' a m o u r , C h a o および F r o e m k e , 2 0 1 5）。ここで、本発明者らは、B T B R 母マウスも B T B R 経験バージンマウスも、c 5 7 b 1 母マウスが行うような仔マウス回収のベースライン行動を示さないことを示す。しかし、M S C 由来エキソソームで処置した場合、B T B R 経験バージンマウスは、c 5 7 b 1 経験バージンマウスと同じ仔マウス回収行動をとる（図 7）。

【 0 0 2 8 】

第 2 の場合において、発明者らは、N M D A グルタメート受容体アンタゴニストとして作用するフェンシクリジン（P C P）に基づく薬理学げっ歯類モデルを使用して、統合失調症における間葉系幹細胞由来エキソソームの効果を調べた。

【 0 0 2 9 】

図 8 A - B および 1 0 は、間葉系幹細胞由来エキソソームで処置したマウスが、P C P とともに投与した場合、全身性アンフェタミン投与に対して自発運動反応の低下を示したことを示す。図 9 は、P C P 処置マウスでの中枢情報処理過程における M S C 由来エキソソームの好ましい効果を示し、聴覚性驚愕反射を評価することにより分析した。さらに、エキソソーム処置マウスは、このモデルにおいて社会的刺激に対する最大の選好性を示した（図 1 1）。

【 0 0 3 0 】

まとめると、本発明者らは、非常に異なる病因を有する 2 つの神経障害における間葉系幹細胞由来エキソソームの好ましい効果を明らかにした。したがって、本発明者らは、間葉系幹細胞由来エキソソームが一般に神経疾患に対する有用な治療薬となろうことを提案する。

【 0 0 3 1 】

したがって、本発明の第 1 の態様によれば、対象において神経疾患を処置する方法であつて、対象に治療的有効量の間葉系幹細胞由来の粒子を投与することを含み、神経疾患がアルツハイマー病またはパーキンソン病ではなく、それによって対象において神経疾患を処置する、方法が提供される。

【 0 0 3 2 】

「間葉系幹細胞」という用語は、骨芽細胞（骨細胞）、軟骨細胞（軟骨の細胞）、筋細胞（筋肉の細胞）および脂肪細胞（脂肪の細胞）を含む、様々な細胞型に分化し得る多能性

10

20

30

40

50

間質細胞を指す。

【0033】

それらの多能性状態において、間葉系幹細胞は、一般的に、次のマーカー：CD105、CD166、CD29、CD90およびCD73を発現し、CD34、CD45およびCD133を発現しない。

【0034】

間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪組織、歯髄、口腔粘膜、末梢血および羊水を含むが限定されない様々な組織から単離され得る。

【0035】

間葉系幹細胞（MSC）を単離し、精製し、増殖させる方法は当技術分野で公知であり、
10 例えばCaplanおよびHaynesworth、米国特許第5,486,359号明細書およびJones E. A. et al., 2002, Isolation and characterization of bone marrow multipotent mesenchymal progenitor cells, Arthritis Rheum. 46(12):3349-60により開示されるものが含まれる。

【0036】

好ましくは、間葉系幹細胞培養物は、BM吸引液（通常20ml）を等体積のハンクス平衡塩類溶液（HBSS；GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, USA）で希釈し、約10mlのFicollカラム（Ficoll-Paque；Pharmacia, Piscataway, NJ, USA）上に希釈細胞を層状に載せることによって作り出される。2,500×gでの30分間の遠心分離後、単核細胞層を界面から除去し、HBSS中で懸濁する。次に、細胞を1,500×gで15分間遠心分離し、完全培地（MEM、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド不含の培地；GIBCO）；MSCの急速増殖のために選択されたロット由来の20%ウシ胎仔血清（FCS）（Atlanta Biologicals, Norcross, GA）；100単位/mlペニシリン（GIBCO）、100μg/mlストレプトマイシン（GIBCO）；および2mM L-グルタミン（GIBCO）中で再懸濁する。再懸濁した細胞を10cm培養皿（Corning Glass Works, Corning, NY）において約25mlの培地内でプレーティングし、5%加湿CO₂で37にて温置する。培養24時間後、未接着細胞を廃棄し、接着細胞をリン酸緩衝食塩水（PBS）
20 で2回徹底的に洗浄する。約14日間にわたり3または4日ごとに培地を新鮮な完全培地に交換する。次に、37にて5分間、0.25%トリプシンおよび1mM EDTA（トリプシン/EDTA、GIBCO）を用いて接着細胞を回収し、6cmプレートに再プレーティングし、さらに14日間培養する。次に、細胞をトリプシン処理し、例えば血球計算盤（Hausser Scientific, Horsham, PA）などの細胞計数器具を使用して細胞数を数える。培養細胞を遠心分離により回収し、5%DMSOおよび30%FCSとともに細胞1~2×10⁶個/mlの濃度で再懸濁する。約1mlのアリコートそれをゆっくりと凍結し、液体窒素中で保存する。

【0037】

間葉系幹細胞の一部を増殖させるために、凍結細胞を37で凍結融解し、完全培地で希釈し、遠心分離により回収してDMSOを除去する。細胞を完全培地中で再懸濁し、細胞約5,000個/cm²の濃度でプレーティングする。培養24時間後、未接着細胞を除去し、トリプシン/EDTAを使用して接着細胞を回収し、狭くなったバスクールピペットに通過させることにより解離させ、好ましくは細胞約1.5~約3.0個/cm²の密度で再プレーティングする。これらの条件下で、約50世代にわたり倍加してMSC培養物が増殖し得、約2000倍増殖させ得る[Colter DC. et al., Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. Proc Natl Acad Sci USA. 97:3213-3218, 2000]。

10

20

30

40

50

【0038】

本発明のいくつかの実施形態により利用されるM S C 培養物は、好ましくは、それらの形態学的特徴により定められる3つの群の細胞を含む：小型および無顆粒細胞（本明細書中で以下、R S - 1と呼ぶ）、小型および顆粒細胞（本明細書中で以下、R S - 2と呼ぶ）および大型のやや顆粒のある細胞（本明細書中で以下、成熟M S Cと呼ぶ）。培養物中のこののような細胞の存在および濃度は、様々な細胞表面マーカーの有無を同定することにより、例えば免疫蛍光、原位置ハイブリッド形成および活性アッセイを使用することにより、アッセイされ得る。

【0039】

言及されるように、本発明は、神経疾患を処置するための間葉系幹細胞由来の粒子の使用を企図する。

10

【0040】

「粒子」という用語は、本明細書中で使用される場合、タンパク質および／またはR N Aなどの生物学的物質を組み込む個別の実体を指す。本発明のこの態様の粒子が生物学的な細胞ではないことが理解されよう。

【0041】

粒子は、いくつかの手段のうちの何れかにより、例えば、M S Cからの、分泌、出芽または分散により、M S Cから導き出され得る。例えば、本粒子は、M S Cから、生成、浸出、放出または脱落させられ得る。M S Cが細胞培養中にある場合、粒子は細胞培養培地に分泌され得る。

20

【0042】

本粒子は特に小胞を含み得る。本粒子はエキソソームを含み得る。本明細書中に記載の粒子は、本明細書中に記載のエキソソームの特性の何れか1つ以上を含み得る。

【0043】

本粒子は、脂質二重層により限定される小胞または平板化された球体を含み得る。本粒子は40～100nmの直径を含み得る。本粒子は、エンドソーム膜の内向きの出芽により形成され得る。本粒子は、約1.13～1.19g/mlの密度を有し得、スクロース勾配上で浮遊し得る。本粒子は、コレステロールおよびスフィンゴミエリンおよび脂質ラフトマーカー、例えばG M 1、G M 3、フロチリンおよびs r cタンパク質キナーゼL y nなどに富み得る。本粒子は、M S CまたはM S C - C Mに特徴的または特異的なタンパク質など、間葉系幹細胞または間葉系幹細胞馴化培地（M S C - C M）中に存在する1つ以上のタンパク質を含み得る。これらは、R N A、例えばm i R N Aを含み得る。

30

【0044】

特定の実施形態によれば、本粒子はエキソソームである。

【0045】

本明細書中で使用される場合、「エキソソーム」という用語は、原形質膜との多胞体（M V B）の融合時に細胞から放出される細胞外小胞を指す。

【0046】

エキソソームは、（a）電子顕微鏡により決定した場合に50nm～100nmのサイズを有し得；（b）<100kDaのタンパク質を含む分子量>100kDaの複合体を含み；（c）<300kDaのタンパク質を含む分子量>300kDaの複合体を含み；（d）分子量>1000kDaの複合体を含み；（e）0.2pMフィルターに対するろ過および10kDaの分子量カットオフの膜に対する濃縮により決定した場合に2nm～200nmのサイズを有するか；または（f）レーザー回折または動的光散乱により決定される場合に100nmを下回る流体力学半径を有する。

40

【0047】

本粒子は、間葉系幹細胞（M S C）または間葉系幹細胞馴化培地（M S C - C M）から単離可能である何かであり得る。本粒子は、少なくとも、M S CまたはM S C - C Mの活性に関与し得る。本粒子は、M S CまたはM S C - C Mの機能の実質的に殆どまたは全てに関与し、それを行い得る。例えば、本粒子は、M S CまたはM S C - C Mに対する代用物

50

(または生物学的代用物) であり得る。

【 0 0 4 8 】

本粒子は、好ましくは間葉系幹細胞の少なくとも 1 つの特性を有する。本粒子は生物学的特性、例えば生物学的活性などを有し得る。本粒子は、 M S C の生物学的活性の何れかを有し得る。本粒子は、例えば M S C の治療的または回復性活性を有し得る。

【 0 0 4 9 】

本粒子は、多くの方法で作製または単離され得る。このような方法は、間葉系幹細胞 (M S C) から粒子を単離することを含み得る。このような方法は、間葉系幹細胞馴化培地 (M S C - C M) から粒子を単離することを含み得る。

【 0 0 5 0 】

本粒子は、例えば粒子の何れかの特性に基づいて非会合成分から分離されることにより単離され得る。例えば、本粒子は、分子量、サイズ、形態、組成または生物学的活性に基づいて単離され得る。

【 0 0 5 1 】

馴化培地に対して、分離中、分離前または分離に統いて、ろ過または濃縮またはその両方が行われ得る。例えば膜、例えばサイズまたは分子量カットオフであるもの、を通じてこれをろ過し得る。これは接線ろ過または限外ろ過に対する対象であり得る。

【 0 0 5 2 】

例えば、この文書の他の部分の分子量に対するアッセイにおいて記載されるように、適切な分子量またはサイズカットオフの膜でのろ過を使用し得る。

10

【 0 0 5 3 】

場合によってはろ過または濃縮されるか、またはその両方が行われる馴化培地は、カラムクロマトグラフィーなど、さらなる分離手段に対する対象であり得る。例えば様々なカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (H P L C) を使用し得る。カラムは、サイズ排除カラムまたは結合カラムであり得る。

【 0 0 5 4 】

間葉系幹細胞馴化培地 (M S C - C M) の分画中でその活性を追跡するために本粒子の 1 つ以上の特性または生物学的活性を使用し得る。例として、粒子を追うために、光散乱、屈折率、動的光散乱または U V - 可視光検出器を使用し得る。例えば、分画中の活性を追跡するために、心保護的活性などの治療活性を使用し得る。

20

【 0 0 5 5 】

次の段落は、エキソソームなどの間葉系幹細胞粒子がどのように得られ得るかの具体例を提供する。

【 0 0 5 6 】

間葉系幹細胞を馴化させるための培地中で間葉系幹細胞を培養することによって、間葉系幹細胞粒子が作製され得る。培地は D M E M を含み得る。D M E M はフェノールレッドを含まないようなものであり得る。培地にはインスリン、トランスフェリンまたはセレノプロテイン (I T S) または何らかのそれらの組み合わせが補給され得る。これは F G F 2 を含み得る。これは、 P D G F A B を含み得る。F G F 2 の濃度は約 5 n g / m l F G F 2 であり得る。P D G F A B の濃度は約 5 n g / m l であり得る。培地は、グルタミン - ペニシリン - ストレプトマイシンまたは - メルカプトエタノールまたは何らかのそれらの組み合わせを含み得る。

30

【 0 0 5 7 】

細胞は、約 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 日間またはそれ以上、例えば 3 日間培養し得る。馴化培地は培地から細胞を分離することにより得られ得る。馴化培地を例えば 5 0 0 g で遠心分離し得る。膜を通じたろ過によってこれを濃縮し得る。膜は > 10 0 0 k D a 膜を含み得る。馴化培地は約 50 倍以上濃縮し得る。

【 0 0 5 8 】

馴化培地は、 H P L C などの液体クロマトグラフィーの対象であり得る。馴化培地をサイズ排除により分離し得る。セファロースなどの何らかのサイズ排除マトリクスを使用し得

40

50

る。例として、T S K Guardカラム SWXL、6 x 40 mmまたはT S KゲルG 4000 SWXL、7.8 x 300 mmを使用し得る。溶出緩衝液は、食塩水などの何らかの生理的溶液を含み得る。これは、pH 7.2の150 mMのNaCl入りの20 mMリン酸緩衝液を含み得る。クロマトグラフィー系は0.5 ml/分の流速で平衡化し得る。溶出方式は均一濃度であり得る。220 nmでのUV吸収を使用して、溶出の進行を追跡し得る。準弾性光散乱 (QELS) 検出器を使用して動的光散乱 (DLS) について分画を調べ得る。

【0059】

動的光散乱を呈することが見られる分画を保持し得る。例えば、上記のような一般的方法により生成される、および11~13分間、例えば12分間の保持時間で溶出される分画は、動的光散乱を呈することが分かる。このピークでの粒子のr.subb.hは約45~55 nmである。このような分画は、エキソソームなどの間葉系幹細胞粒子を含む。

10

【0060】

本粒子は2 nmより大きいサイズを有し得る。本粒子は5 nm、10 nm、20 nm、30 nm、40 nmまたは50 nmより大きいサイズを有し得る。本粒子は、100 nmより大きい、例えば150 nmより大きいサイズを有し得る。本粒子は、実質的に200 nm以上のサイズを有し得る。

【0061】

本粒子は、2 nm~20 nm、2 nm~50 nm、2 nm~100 nm、2 nm~150 nmまたは2 nm~200 nmなどのサイズ範囲を有し得る。本粒子は、20 nm~50 nm、20 nm~100 nm、20 nm~150 nmまたは20 nm~200 nmのサイズを有し得る。本粒子は、50 nm~100 nm、50 nm~150 nmまたは50 nm~200 nmのサイズを有し得る。本粒子は、100 nm~150 nmまたは100 nm~200 nmのサイズを有し得る。本粒子は、150 nm~200 nmのサイズを有し得る。

20

【0062】

サイズは様々な手段により決定され得る。原則としては、サイズは、適切なサイズカットオフの膜を通じたサイズ分画およびろ過により決定され得る。次に、粒子サイズは、SDS-PAGEでの成分タンパク質の分離を追跡することによって、または生物学的アッセイによって決定され得る。

30

【0063】

サイズは流体力学半径を含み得る。粒子の流体力学半径は、100 nmを下回り得る。これは約30 nm~約70 nmであり得る。流体力学半径は、約40 nm~約60 nm、例えば約45 nm~約55 nmなどであり得る。流体力学半径は、約50 nmであり得る。

【0064】

粒子の流体力学半径は、何らかの適切な手段、例えばレーザー回折または動的光散乱により決定され得る。

【0065】

本粒子は、間葉系幹細胞により分泌される1つ以上のタンパク質またはポリヌクレオチドを含み得る。本粒子は、間葉系幹細胞馴化培地 (MSC-CM) 中に存在する1つ以上のタンパク質またはポリヌクレオチドを含み得る。特定の実施形態において、本粒子は、MSCに由来するmRNAを含み得る。

40

【0066】

例えば、本粒子は、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上または70%以上のこれらのタンパク質および/またはポリヌクレオチドを含み得る。本粒子は、実質的に約75%のこれらのタンパク質および/またはポリヌクレオチドを含み得る。タンパク質は、遺伝子のリストのタンパク質または遺伝子産物のリストを参照することにより定められ得る。

【0067】

既に述べたように、本発明のこの態様の粒子は、神経疾患の処置に有用である。

50

【0068】

処置され得る対象としては、哺乳動物対象、例えばヒト、マウス、ラット、サル、イヌおよびネコが挙げられる。

【0069】

「神経疾患」という用語は、脳、脊椎および/またはそれらを連結する神経の疾患を指す。

【0070】

一実施形態によれば、疾患は記憶疾患である。

【0071】

好ましい実施形態において、疾患は神経発達障害、例えば自閉症または統合失調症などである。

10

【0072】

別の実施形態によれば、疾患は、統合失調症、注意欠陥多動性障害、自閉症、トゥーレット症候群、強迫性障害ならびに神経系の変性の神経行動関連症状、例えばパーキンソン病、本態性振戦、ハンチントン病、アルツハイマー病、多発性硬化症および器質精神病などの行動疾患である。

【0073】

ある実施形態において、神経疾患はパーキンソン病またはアルツハイマー病(AD)ではない。

【0074】

別の実施形態において、神経疾患は脳卒中ではない。

20

【0075】

特定の実施形態によれば、神経疾患は自閉症スペクトラム障害(ASD)である。

【0076】

既に述べたように、薬剤(互いに交換可能に医薬組成物と呼ばれる)を調製するために、本発明の実施形態の粒子を使用し得、それによりこのような薬剤が神経疾患を処置するために処方される。

【0077】

本発明の粒子は、様々な移植アプローチを使用して処置される個体に投与され得、その性質は移植部位に依存する。

【0078】

「移植」、「細胞補充」または「グラフト」注入という用語または句は、本明細書中で互いに交換可能に使用され、脳、灰白質などの標的組織への本発明の粒子の導入を指す。粒子が得られる間葉系幹細胞は、レシピエント(同種)由来または非同種もしくは異種ドナー由来であり得る。

30

【0079】

本粒子は、脊髄に(髄腔内に)直接、静脈内に、脳に直接、またはそれが脳に到達するようなものの組み合わせで移植され得る。ある実施形態において、本粒子は非侵襲性に、例えば鼻腔内送達される。他の投与方式は全身投与なども企図される。

【0080】

処置のために(例えば鼻腔内)投与され得る粒子(例えばエキソソーム)の代表的な用量は、70kgヒトに対して、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{20}$ 個、より好ましくは $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{15}$ 個であり得る。

40

【0081】

本明細書中に記載の方法の何れかにおいて、本粒子は、それ自体、または好ましくは薬学的に許容可能な担体をさらに含む医薬組成物の一部としての何れかで投与され得る。

【0082】

本明細書中で使用される場合、「医薬組成物」は、薬学的に適切な担体および賦形剤などの他の化学成分を伴う、本明細書中に記載の粒子の調製物を指す。医薬組成物の目的は、対象への粒子の投与を促進することである。

【0083】

50

本明細書中で以後、「薬学的に許容可能な担体」という用語は、対象に対して顕著な刺激性を引き起こさず、投与される化合物の生物学的活性および特性を抑止しない担体または希釈剤を指す。担体の非限定例は、プロピレングリコール；食塩水；エマルジョン；緩衝液；培地、例えばD M E M またはR P M I など；フリー・ラジカルを除去する成分を含有する低温保存培地であり、p H 緩衝、膨張／浸透圧的サポート、低温での細胞内の状態のバランスをとるエネルギー基質およびイオン濃度および水との有機溶媒の混合物が提供される。

【0084】

一般的には、薬学的担体は、少なくとも24時間、少なくとも48時間またはさらに少なくとも96時間にわたり、組成物中で粒子数を保つ（例えば90%超減少しない）。

10

【0085】

本明細書中で「賦形剤」という用語は、化合物の投与をさらに促進し、移植／注射前に適切な時間にわたり予め決定された温度で細胞生存能を維持するために、医薬組成物に添加される不活性物質を指す。賦形剤の非限定例としては、アルブミン、血漿、血清および脳脊髄液（C S F）、抗酸化剤、例えばN - アセチルシステイン（N A C）またはレスベラトロールなど、が挙げられる。

【0086】

本発明の好ましい実施形態によれば、薬学的担体は、緩衝液の水溶液またはD M E Mなどの培養液である。

20

【0087】

本発明の方法で使用される何らかの調製物に対して、治療的有効量または用量は、最初にインピトロおよび細胞培養アッセイから推定され得る。好ましくは、用量は、所望の濃度または力価を達成するために、動物モデルにおいて処方される。このような情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定し得る。

【0088】

本明細書中に記載の活性成分の毒性および治療効果は、インピトロでの標準的な薬学的手順により、細胞培養物または実験動物において決定され得る。

30

【0089】

これらのインピトロおよび細胞培養アッセイおよび動物実験から得られるデータは、ヒトでの使用のための投与量の範囲を処方することにおいて使用され得る。さらなる情報は、臨床試験から得られ得る（例えばS a l e m H K et al . , S t e m c e l l s 2 0 1 0 ; 2 8 : 5 8 5 - 9 6 ; およびU c c e l l i et al . , Lancet Neurol . 2 0 1 1 ; 1 0 : 6 4 9 - 5 6 を参照）。

【0090】

投与量は、使用される剤型および利用される投与経路に依存して変動し得る。的確な処方、投与経路および投与量は、患者の状態を考慮して個別の医師により選択され得る（例えばF i n g l et al . , 1 9 7 5 , " T h e P h a r m a c o l o g i c a l B a s i s o f T h e r a p e u t i c s " , Ch . 1 p . 1 参照）。

40

【0091】

注射に対して、本医薬組成物の活性成分は、水溶液中で、好ましくはハンクス溶液、リンゲル溶液または生理食塩水緩衝液などの生理学的に適合する緩衝液および本明細書中で上記に記載のようなさらなる薬剤中で処方され得る。

【0092】

神経障害を有効に処置するのに十分である活性成分のレベルに対して個々に投与量および間隔が調整され得る。所望の効果を達成するのに必要な投与量は、個々の特徴および投与経路に依存する。

【0093】

処置しようとする状態の重症度および反応性に依存して、粒子の投与は、数日～数週間または数か月続く一連の処置で、疾患状態の減少がいつ達成されるかに依存して、単回または複数回投与であり得る。

50

【0094】

投与しようとする粒子の量は、当然ではあるが、処置されている個体、苦痛の重症度、投与方式、処方医師の判断などに依存する。投与量および投与のタイミングは、個体の変化の状態の慎重で継続的な監視に対応する。

【0095】

投与後、それらが標的部位に到達したことを確認するために、粒子を追跡し得る。これは金ナノ粒子を使用して行われ得、例えば国際公開第2013186735A3号パンフレットを参照のこと。

【0096】

少なくともいくつかの実施形態において、本発明の粒子は、即時使用型シリンジ中に単位剤型で予め包装され得る。シリンジに、粒子の名称およびそれらの起源付きのラベルを付し得る。ラベルは、粒子の機能に関する情報も含み得る。シリンジは、粒子に関する情報を伴うラベルも付されるパッケージ中で包装され得る。

10

【0097】

少なくともいくつかの実施形態において、本発明の粒子は、神経障害を処置するのに有用な治療剤、ガングリオシドなど；抗生物質、神経伝達物質、神経ホルモン、毒素、神経突起促進分子；および代謝拮抗低分子剤およびL-DOPAなどの神経伝達物質分子の前駆体と同時投与し得る。さらに、またはあるいは、少なくともいくつかの実施形態において、本発明の粒子は、神経疾患のうち少なくとも1つの症状を軽減可能な他の細胞と同時投与され得る。

20

【0098】

本明細書中で使用される場合、「約」という用語は±10%を指す。

【0099】

「含む (comprises)」、「含むこと (comprising)」、「含む (includes)」、「含むこと (including)」、「有すること (having)」という用語およびそれらの同根語は「含むが限定されない」を意味する。

【0100】

「からなる (consisting of)」という用語は、「含み、限定される (includingおよびlimited to)」を意味する。

30

【0101】

「基本的にからなる (consisting essentially of)」という用語は、組成物、方法または構造が、さらなる成分、段階および/または部分を含み得るが、さらなる成分、段階および/または部分が、主張される組成物、方法または構造の基本的および新規特徴を実質的に変更しない場合のみであることを意味する。

【0102】

本明細書中で使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈から別段明らかに示されない限り、複数の参照物を含む。例えば「化合物」または「少なくとも1つの化合物」という用語は、それらの混合物を含め、複数の化合物を含み得る。

【0103】

本願を通じて、本発明の様々な実施形態は範囲方式で表され得る。範囲方式の記載は単に利便性および簡潔性のためであり、本発明の範囲に対する変更できない限定として解釈すべきではないことを理解されたい。したがって、範囲の記載は、可能なサブ範囲ならびにその範囲内の個々の数値全てが具体的に開示されていると考えるべきである。例えば、1~6などの範囲の記載は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6など、ならびにその範囲内の個々の数値、例えば1、2、3、4、5および6など、具体的に開示されるサブ範囲を有すると考えるべきである。これは、範囲の幅に関わりなく適用される。

40

【0104】

本明細書中で数値が示される場合はいつでも、示される範囲内のあらゆる引用される数字（分数または整数）を含むものとする。第1の指定数と第2の指定数との「間の範囲である (ranging) / 範囲である (ranges between)」および第1の指

50

定数から第2の指定数「まで」の「範囲である (ranging) / 範囲である (ranges from)」という句は、本明細書中で交換可能に使用され、第1および第2の指定数およびその間の分数および整数全てを含むものとする。

【0105】

本明細書中で使用される場合、「方法」という用語は、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の技術分野の実務家にとって公知であるか、またはそれらにより公知の方式、手段、技術および手順から容易に開発されるかの何れかの、方式、手段、技術および手順を含むが限定されない、ある種の課題を完遂するための、方式、手段、技術および手順を指す。

【0106】

本明細書中で使用される場合、「処置する (treating)」という用語は、状態の進行を抑止する、実質的に阻害する、減速させる、または逆転させる、状態の臨床もしくは審美的症状を実質的に寛解させる、または状態の臨床もしくは審美的症状の出現を実質的に防ぐことを含む。

【0107】

明確にするために、個々の実施形態の文脈で記載される本発明のある一定の特性はまた、単一の実施形態で組み合わせて提供され得ることが理解される。逆に、簡略化のために、単一の実施形態の文脈で記載される本発明の様々な特性はまた、個別に、または何らかの適切なサブコンビネーションで、または本発明の何らかの他の記載される実施形態において適切なように、提供され得る。様々な実施形態の文脈で記載されるある種の特性は、実施形態がこれらの要素がない場合に無効とならない限り、これらの実施形態の必須の特性であるものとはみなされない。

【0108】

本明細書上記で説明されるような、および下記の特許請求の範囲のセクションで主張されるような本発明の様々な実施形態および態様は、次の実施例において実験的支援を見出す。

【0109】

実施例

ここで、上の記載と一緒に非限定的に本発明のいくつかの実施形態を例示する次の実施例を参照する。

【0110】

一般に、本明細書中で使用される命名法および本発明で利用される実験室での手順は、分子的、生化学的、微生物学的および組み換えDNA技術を含む。このような技術は、文献で徹底的に説明される。例えば、「Molecular Cloning: A laboratory Manual」Sambrook et al., (1989); 「Current Protocols in Molecular Biology」Volumes I-III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel et al., 「Current Protocols in Molecular Biology」, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, 「A Practical Guide to Molecular Cloning」, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., 「Recombinant DNA」, Scientific American Books, New York; Birren et al., (eds) 「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 米国特許第4,666,828号明細書；同第4,683,202号明細書；同第4,801,531号明細書；同第5,192,659号明細書および同第5,272,057号明細書で示される方法論；「Cell Biology: A Laboratory Handbook」, Volumes I-III Cellis, J.E., ed. (1994); 「Culture of Animal Cells - A Manual of Basic

10

20

30

40

50

c Techniques」, by Freshney, Wiley-Liss, N.Y. (1994), Third Edition; 「Current Protocols in Immunology」 Volumes I-III Coligan J.E., ed. (1994); Stites et al., (eds), 「Basic and Clinical Immunology」 (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), 「Selected Methods in Cellular Immunology」, W.H. Freeman and Co., New York (1980) を参照; 利用可能な免疫アッセイは、特許および科学文献で徹底的に記載されており、例えば、米国特許第3,791,932号明細書; 同第3,839,153号明細書; 同第3,850,752号明細書; 同第3,850,578号明細書; 同第3,853,987号明細書; 同第3,867,517号明細書; 同第3,879,262号明細書; 同第3,901,654号明細書; 同第3,935,074号明細書; 同第3,984,533号明細書; 同第3,996,345号明細書; 同第4,034,074号明細書; 同第4,098,876号明細書; 同第4,879,219号明細書; 同第5,011,771号明細書および同第5,281,521号明細書; 「Oligonucleotide Synthesis」 Gait, M.J., ed. (1984); 「Nucleic Acid Hybridization」 Hames, B.D., および Higgins S.J., eds. (1985); 「Transcription and Translation」 Hames, B.D., および Higgins S.J., eds. (1984); 「Animal Cell Culture」 Freshney, R.I., ed. (1986); 「Immobilized Cells and Enzymes」 IRL Press, (1986); 「A Practical Guide to Molecular Cloning」 Perbal, B., (1984) および 「Methods in Enzymology」 Vol. 1-317, Academic Press; 「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., 「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」 CSHL Press (1996) を参照; これらは全て、本明細書中で完全に示されるようかのように参照により組み込まれる。他の一般的な参考文献は、この文書全体で提供される。その中の手順は、当技術分野で周知であると考えられ、読者の利便性のために提供される。その中に含有される情報は全て、参照により本明細書中に組み込まれる。

【0111】

実施例 1

自閉症を処置するためのMSC由来エキソソーム

材料および方法

間葉系幹細胞 (MSC) 調製: ヒトMSCはLonza (Basel, Switzerland) から購入した。既に記載のように細胞を培養し、増殖させた (Sadanら、2012)。

【0112】

精製プロトコール:

培養液を採取し、それを300gで10分間遠心分離することによりエキソソームを精製した。上清を回収し、2000gで10分間遠心分離した。もう一度、上清を回収し、10000gで30分間遠心分離した。上清を採取し、0.22μmフィルターに通し、100000gで70分間遠心分離した。エキソソームおよびタンパク質を含有するペレットをPBS中で洗浄し、次いで100000gで70分間遠心分離した。精製エキソソームを含有するペレットを200μlの滅菌PBS中で再懸濁した。各遠心分離は4で行った。

10

20

30

40

50

投与粒子数 / マウス = 8.5×10^9 particles / ui

【 0 1 1 3 】

染色プロトコール : $500 \mu l$ 希釀剤中で $2 \mu l$ の p K H 26 を混合することによって、保存溶液を作製した。保存液から、P B S 中 $50 \mu l$ のエキソソームに $100 \mu l$ を添加した。5分後、 $100 \mu l$ のエキソソーム不含血小板を前の混合物に添加し、4にて $100 g$ で 90 分間遠心分離した。 $200 \mu l$ の P B S 中でペレットを再懸濁した。M a e s t r o C R i 、励起フィルター 523 および発光フィルター 560 を用いて、全脳蛍光イメージングを撮影した。

【 0 1 1 4 】

動物 : 元来 J a c k s o n L a b o r a t o r y (B a r H a r b o r , M E) から購入した成獣ペアから B T B R T l t f / J マウスを繁殖させた。5週齢で、同腹仔雄マウスの第1のコホートを食塩水鼻腔内投与 (食塩水、n = 7) または M S C - e x o 鼻腔内投与 (M S C - e x o 、n = 7) の何れかに無作為に割り当てた。5週齢で、同腹仔雌マウスの第1のコホートを食塩水鼻腔内投与 (食塩水、n = 9) または M S C - e x o 鼻腔内投与 (M S C - e x o 、n = 6) に無作為に割り当てた。

10

【 0 1 1 5 】

元来 J a c k s o n L a b o r a t o r y (B a r H a r b o r , M E) から購入した成獣ペアから C 5 7 b 1 / 6 マウスを繁殖させた。5週齢で、同腹仔雄マウスの第1のコホートに鼻腔内投与により食塩水を与えた (食塩水、n = 7)。5週齢で、同腹仔雌マウスの第1のコホートを食塩水鼻腔内投与 (食塩水、n = 7) および食塩水なし (なし、n = 11) に無作為に割り当てた。

20

【 0 1 1 6 】

ケージあたり 3 ~ 5 匹の同腹仔の群でマウスを飼育した。第 7 ~ 9 週で行ったエキソソームの投与前に 5 ~ 7 週でベースライン行動についてマウスを最初に試験した (14日間にわたり 1 日おきに、全部で $35 \mu l$ 、 $5 \mu l$ のエキソソームまたは食塩水を投与した)。

【 0 1 1 7 】

エキソソームの投与から 3 週間後、母性学習行動のために、6 匹の B T B R - M S C - e x o バージン雌マウスを 1 匹の B T B R - 食塩水妊娠雌マウスと一緒に置いた。母性学習行動のために、5 匹の B T B R - 食塩水バージン雌マウスを 1 匹の C 5 7 - 食塩水妊娠雌マウスと一緒に置いた。

30

【 0 1 1 8 】

行動試験 :

オープンフィールド : マウスを全部で 20 分間、 $45 \times 45 \times 45 \text{ cm}$ に置いた。E t h o v i s i o n v 1 0 . 1 1 を使用して、移動した総距離および中心部で費やした時間量を測定した。

【 0 1 1 9 】

超音波発声 : A v i s o f t - R E C O R D E R v . 4 . 2 . 2 1 録音プログラムを使用して、雄から雌への超音波発声を試験した。この設定には、250 kHz のサンプリングレートおよび 16 ビット方式が含まれた。スペクトログラム生成のために、録音を A v i s o f t - S A S L a b P r o V e r s i o n 5 . 2 . 0 7 に移し、高速フーリエ変換 (F F T) を行った。256 ポイントの F F T 長および 50 % の時間窓重複を用いてスペクトログラムを生成させた (100 % フレーム、フラットトップ窓)。B T B R T l t f / J および C 5 7 b 1 / 6 雄マウスの両方を C 5 7 b 1 / 6 雌マウスと会わせた。各雄を 1 時間にわたり個別ケージに入れ、次いで雌をそのケージに入れた。出会いの最初の 5 分間にわたり超音波発声を録音し、雄 - 雌社会的相互作用分析のために撮影した。

40

【 0 1 2 0 】

レシプロカル・ダイアディック社会的相互作用 (R e c i p r o c a l d y a d i c s o c i a l i n t e r a c t i o n) 試験 : 社会的刺激として 5 週齢雄 C 5 7 B L / 6 ストレンジャーマウスを使用して、レシプロカル・ダイアディック社会的相互作用 (R e c i p r o c a l d y a d i c s o c i a l i n t e r a c t i o n) 試験 (S i l

50

vermanら、2012)を行った。試験マウスとともにストレンジャーマウスを40X40X20cmケージに入れた。両マウスを20分間記録し；処置について盲検となる観察者によって最後の10分間を定量した。試験前に両マウスを1時間引き離した。Colog V3ソフトウェアを使用して、試験マウスによって開始される社会的接触のスコア化を行った(Helsinki University, Helsinki, Finland)。社会的行動においてマウスがストレンジャーマウスに関する持続時間により、スコアを判定した。次の社会的行動を定量した：鼻と鼻とのスニッフィング（すなわちストレンジャーに向き合うように接近）、鼻と生殖器とのスニッフィング（すなわちストレンジャーの背後へ接近）、攻撃（すなわち試験マウスがストレンジャーマウスとの戦いを開始）および回避（すなわちストレンジャーマウスがそれを開始するときに試験マウスが故意に相互作用を回避する場合）。社会的相互作用中、反復行動、すなわちグルーミングおよび穴掘り様動作に費やした時間も観察し、定量した。

【0121】

社会的相互作用中ではない反復行動：マウスを単独で20分間にわたり寸法40X40X20cmの領域に置き；グルーミングおよび穴掘り様動作について最後の10分間を定量した。グルーミング行動を観察する一方で、穴掘り様動作を防ぐために、木片チップを含有しない清潔なケージにマウスを入れた。穴掘り様動作行動を観察している間、セルフグルーミングは測定しなかった。

【0122】

母性行動学習：4匹のc57b1母マウスおよび3匹のBTBR母マウスに対して、仔マウスを回収し、その仔を巣に戻すまでのそれらの待ち時間について試験した。3匹の仔マウスを使用して各母マウスを試験した。仔マウスが巣の外に置かれた後180秒で母マウスが仔マウスを巣に戻さなかった場合、失敗とみなした。数日間にわたり、各母マウスを3匹のバージン雌マウス（学習バージンマウス）と同じケージに入れた。BTBR食塩水およびC57食塩水バージンマウスはC57b1母マウスおよびその仔マウスと過ごし、BTBR MSC-exo雌マウスはBTBR雌マウスおよびその仔マウスと過ごした。前に仔マウスと過ごしたことがなかったナイーブバージンマウスの群も試験した(BTBRナイーブバージンマウス、c57b1ナイーブバージンマウス)。試験中、全ての雌をケージから取り出し、各試験終了時にマウスをホームケージに戻し、15分間の再順化時間を与えた。各仔マウスは試験時点で2~4日齢であった。SAMSUNGリンクカメラ（limp camera）を使用して試験を撮影した。

【0123】

T型水迷路アッセイ：T型水迷路(GuarigliaおよびChadman, 2013; KarvatおよびKimchi, 2013)は、22X3X11cmのサイズの3本のアームおよび11X3X11cmのサイズのセンターゾーンがあるT型プレキシガラスチャンバーであった。迷路に15cmの水深になるように水を満たし、25+1に維持した。スライド長3cmのプラットフォームを沈めて、最上部が液面の下0.5cmになるようにした。各動物に対して、3日の実験日の各日に10回試行し、合計30回試行した。センターゾーンに面する開始アームに動物を置き、プラットフォームを見つけるために90秒を与えた。動物をプラットフォームに置いたとき、それを5秒間その上に滞在させた。マウスが90秒以内にプラットフォームを見つけられなかった場合、マウスを穏やかにプラットフォームに導き、マウスをその上に15秒間滞在させた。試行間の間隔は>5分であった。第1日および第2日に、プラットフォームを右側のアームに配置し、一方で第3日にそれを逆側の左側のアームに配置し；開始アームは各日同一とした。マウスが10回のうち8回の試行で成功するまで、反対側の試行を開始させず、その結果、一部のマウスにおいては、学習日を追加し、全部で最大40回の試行を行った。マウスがプラットフォーム上に立つまで、マウスが水に入る時間からプラットフォームに到達するまでに要する時間量、エラー回数および正しいかまたは正しくない道で曲がる傾向を測定した。

【0124】

結果

10

20

30

40

50

M S C - エキソソームの鼻腔内投与の高効率：P K H 2 6 染色エキソソームの静脈内、鼻腔内および定位投与間の比較を行った。補正された総細胞蛍光（C T C F）計算を使用して、異なる投与ストラテジーの効率を推定した（M c C l o y ら、2 0 1 4）。定位注射に対する蛍光定量から、鼻腔内投与エキソソームの 6 8 . 5 % が脳内で見出され、一方で静脈内エキソソームの 1 1 . 2 % が脳内で見出されたことが示された（図 1）。免疫染色 D A P I およびN e u N から、エキソソームが細胞およびそれらの膜上で見出されたことが示された（図 2 A - B）。

【 0 1 2 5 】

M S C - エキソソームは雄から雌への超音波発声を改善した：超音波発声は、雄マウスと雌マウスとの間の交尾コミュニケーション形態であるとみなされる。コミュニケーション欠陥は、自閉症におけるコア症状であり、したがってこのタイプの行動における処置の効果を評価した。雌との相互作用の最初の 5 分間において B T B R 食塩水マウスは 3 1 7 音節を発し（S E M = 3 9 . 4）、一方で B T B R M S C - e x o は、同じ時間中に 5 7 1 音節を発し、これは 1 8 0 % の増加であり（S E M = 7 4）、一方で C 5 7 b 1 マウス（対照）は最初の 5 分間あたり 8 5 4 . 5 音節を発した（S E M = 6 5 . 2）。（図 3 A、A N O V A 1、F = 1 9 . 2 P < 0 . 0 0 1）。雌の生殖器または顔面をスニッフィングするのに費やす時間の有意差はなく、これは、この効果が、超音波発声に特異的に影響を及ぼし、雌のフェロモンへの関心には影響がないと思われることを意味する（図 3 B）。質的に、これは、B T B R M S C - e x o 発声がより複雑になり、B T B R 食塩水群と比較して長くなるスペクトログラムから見られ得、これにより C 5 7 b 1 とより同等になる（図 3 C）。

10

【 0 1 2 6 】

M S C - エキソソームは、雄と雄との社会的相互作用および社会的相互作用中の反復行動を改善する：M S C - e x o または食塩水投与前後に雄と雄との相互作用についてマウスを試験した。対象内分析から、処置後に B T B R M S C - e x o 群が顕著に改善し、雄ストレンジヤーマウスとの社会的接触に費やす時間がより長くなり、一方で B T B R 食塩水および C 5 7 b 1 食塩水群では影響がなかったことが示される（図 4 A、対応のある T 検定。t < 0 . 0 0 0 1）。群の比較分析から、処置前に B T B R M S C - e x o と B T B R 食塩水の基本行動との間で差がなく、それらの両方が c 5 7 b 1 食塩水の基本行動とは有意に異なることが示される（A N O V A 1、F = 1 4 . 4、p < 0 . 0 1）。処置後、B T B R M S C - e x o は、B T B R 食塩水群とは有意に異なる（A N O V A 1、F = 9 . 4 4、p < 0 . 0 1）。

20

【 0 1 2 7 】

社会的相互作用中の反復行動も測定した。対象内分析から、B T B R M S C - e x o 群が処置後に顕著に改善し、反復行動に費やす時間が短縮し、一方で B T B R 食塩水および C 5 7 b 1 食塩水群は影響がなかったことが示される（図 4 B、対応のある T 検定。t < 0 . 0 0 1）。群の比較分析から、処置前に B T B R M S C - e x o と B T B R 食塩水の基本行動との間で差がなく、それらの両方が c 5 7 b 1 食塩水の基本行動とは有意に異なることが示される（A N O V A 1、F = 1 3 . 7 1、p < 0 . 0 0 1）。処置後、B T B R M S C - e x o は、B T B R 食塩水群および C 5 7 b 1 群とは有意に異なるが、処置前後で B T B R M S C - e x o からの有意な変化がある。

30

【 0 1 2 8 】

M S C - エキソソームはセルフグルーミングおよび穴掘り様動作を減少させる：社会的相互作用なしでセルフグルーミングおよび穴掘り様動作も測定した。M S C - e x o または食塩水投与前後で雄と雄との相互作用についてマウスを試験した。グルーミング試験において、対象内分析から、B T B R M S C - e x o 群が処置後に有意に改善し、セルフグルーミングに費やす時間が短縮し、一方で B T B R 食塩水および C 5 7 b 1 食塩水群は変化しなかったことが示された（図 4 A、対応のある T 検定。t < 0 . 0 5）。群の比較分析から、処置前に B T B R M S C - e x o と B T B R 食塩水の基本行動との間で差がなく、それらの両方が c 5 7 b 1 食塩水の基本行動とは有意に異なることが示される（A N

40

50

O V A 1、 $F = 12.4$ 、 $p < 0.05$ ）。処置後、B T B R M S C - e x o は、B T B R 食塩水群とは有意に異なる (A N O V A 1、 $F = 13.83$ 、 $p < 0.01$)。

【 0 1 2 9 】

M S C - エキソームは、T型水迷路において認知の硬さを改善する：T型水迷路アッセイを使用して、学習行動および認知の硬さを分析した。c 5 7 b 1 と B T B R マウスとの間の水泳能力が異なるので、試験におけるそれらの行動は同等ではなく、したがって c 5 7 b 1 マウスを排除した。まとめると、B T B R M S C - e x o 処置マウスは、全部で 10 回の試行において逆転学習で誤りが顕著に減少するようになった (図 6 A)。逆転条件の各試行での成功率を分析することにより、実験用の 4 匹の M S C - e x o 処置マウスが正しく角を曲がることにおいて食塩水群よりも成功率が高かったことが示される (図 6 B)。

10

【 0 1 3 0 】

M S C - e x o は母性行動学習を改善する：全ての C 5 7 b 1 母マウスは全ての仔マウス (12 / 12) を平均時間 9.9 秒で回収して巣に戻した (S E M = 1.08)。C 5 7 b 1 ナイープバージンマウスのうち、180 秒以内に仔マウスを回収して戻したものはない。C 5 7 b 1 学習バージンマウス群は、平均時間 38.3 秒 (S E M = 11.9) で全ての仔マウスを回収して戻した。3 匹の試験 B T B R 母マウスのうち 1 匹のみが仔マウスを回収したが、150 秒後、この母マウスは、仔マウスを巣に戻さず、むしろ無作為な場所にそれらを置き；この母マウスの行動は、C 5 7 b 1 母マウスおよび学習バージンマウスと比較して混乱していた。B T B R ナイープバージンマウスのうち、180 秒以内に何れの仔マウスも回収したものはなかった。B T B R 学習バージンマウスのうち、C 5 7 b 1 母マウスと数日過ごした後でさえも、仔マウスを回収したものはなかった。B T B R M S C - E X O は、平均時間 55.7 秒 (S E M = 12.8) で全ての仔マウスを回収し、興味深いことに、B T B R M S C - e x o は、仔マウスをそれ自身で回収可能ではなかった B T B R 母マウスと数日過ごした。

20

【 0 1 3 1 】

実施例 2

統合失調症を処置するための M S C 由来エキソーム

材料および方法

アンフェタミン誘導性の自発運動亢進活動に対する感受性：いくつかの相で実験を行った。第 1 相において、30 匹の C 5 4 / b 1 マウスを無作為に 3 つの群に割り当てた；食塩水処置群、P C P 処置群および P C P + エキソーム処置群 (処置群)。P C P 群には、10 mg / kg の P C P の皮下注射を 14 日間にわたり毎日行った。同時に、食塩水群には等体積の食塩水注射を行い、エキソーム群には、P C P 注射ならびに鼻腔内投与により 2 μ l のエキソームを投与した。他の群には、同じ技術を使用して 2 μ l の食塩水を投与した。注射終了から 1 週間後、マウスに対して行動試験を行った。

30

【 0 1 3 2 】

全群に対して全身性アンフェタミン注射を行い、120 分間にわたりオーブンフィールド試験で監視し、活動性指数について平均 5 分ごとに測定した。

【 0 1 3 3 】

潜在抑制。聴覚性驚愕反射を評価することによって、P C P 処置マウスにおける中枢情報処理過程に対するエキソームの効果を分析した。各群からの 3 匹のマウスを前曝露なし (N P E) 群に割り当て、7 匹のマウスを前曝露 (P E) 群に割り当てた。P E マウスに 30 - s の音刺激を 50 回提示し (条件刺激 - C S)、一方で、前曝露なし (N P E) 対象は、刺激提示せずに、同等の時間にわたってチャンバーに閉じ込めた。その後すぐに、P E および N P E の両群に対して条件付けを行い、これは、C S と非条件刺激 (U S) との間での 3 回の対形成 (three pairing) から構成され：音刺激とその直後に 0.3 mA で設定される 1 s 足刺激を送達する。24 時間後、試験段階を行った。最初の 360 秒の順化後、音 C S を送達し、90 秒間継続し、音刺激に対する条件付けすくみの時間を評価した。

40

50

【0134】

3 - チャンバー社会的相互作用における社会的相互作用：3群のマウスを次のように処置した：

1. 食塩水群 (n = 19)、
2. P C P 群 (n = 17)、
3. P C P + エキソソーム (n = 18)

【0135】

結果

アンフェタミン誘導性自発運動亢進活動に対する感受性：アンフェタミン注射後、全てのアンフェタミン処置マウスの自発運動活性が向上し、注射から約40分後にピークとなつた。測定時間全体を通じて、全身性アンフェタミンの効果促進は、P C P 処置対象において有意により顕著であった。

10

【0136】

図8 A ~ B および10で例示されるように、P C P 処置マウス（エキソソーム処置なし）は、食塩水処置陰性対照群よりも活動性が高く、より長い距離を移動し、またエキソソーム処置群よりも活動性が高かった。これは、アンフェタミンにより触発された活動性のピーク後、40分後に最も明らかであった。

【0137】

潜在抑制：試験段階の間に対象間で差は見られなかった（結果は示さない）。条件付け中、食塩水処置群およびエキソソーム処置群の両方が、P E およびN P E 群におけるそれらのすくみ反応間で有意差を示し、一方で、P C P 処置群は、N P E のすくみの有意な増加を示さず（図9）、これにより、P C P 処置マウスにおけるL I 効果の低下およびエキソソーム処置の好ましい効果が示された。

20

【0138】

アンフェタミン誘導性自発運動亢進活動性に対する感受性：全てのアンフェタミン処置マウスの自発運動活性が向上し、注射から40分後にピークとなつた。測定時間の殆どを通じて、全身性アンフェタミンの促進効果は、P C P 処置対象において有意により顕著であった。図10で例示されるように、エキソソームの鼻腔内投与を受けた食塩水処置群（群4）は影響を受けなかった（食塩水群（1）とは有意差がなかった。P C P 処置マウス（群2）は、食塩水処置対照群（群1）よりも、活動性が高く、より長い距離を移動し、またエキソソーム処置群（群3）よりも活動性が高かった。これは、アンフェタミンにより触発された活動性のピーク後、40分後に最も明らかである。

30

【0139】

3 - チャンバー社会的相互作用における社会的相互作用：3 - チャンバーの枠組みにおいて、P C P 処置マウス (n = 17) は、選好指標により明らかになるように、ストレンジヤー馴らしケージ（社会的刺激）よりも、空のケージ（すなわち非社会的刺激）に対する選好性の向上を示した。食塩水処置群 (n = 19) は、マウス馴らしケージに対する選好性を示し、一方でエキソソーム処置マウス (n = 18) は、社会的刺激に対して最大の選好性を示した（図11）。

40

【0140】

実施例 3

自閉症B T B R モデルにおける、骨髓由来M S C からのエキソソーム対神経幹細胞からのエキソソームの比較

材料および方法

N S C 由来エキソソーム：神経幹細胞株 (C T X 0 E 0 3) (R e N e u r o n) を使用した。

処置群：マウスに対して、1日おきに1日5 μ l (2.5 μ l \times 2) で12日間にわたりM S C - e x o (N = 5)、N S C - e x o (N = 5) または食塩水 (N = 7) の鼻腔内投与（全部でマウスあたり30 μ l）を行つた。

【0141】

50

結果

図12A～Bで例示されるように、MSC由来エキソソームの投与によって、食塩水処置群と比較して、社会的相互作用が向上し、反復行動が減少し、コミュニケーションが増加し、一方で神経幹細胞由来エキソソーム(NSC-exo)処置マウスは、食塩水処置群と比較して、同じ行動の相違を示さなかった(ANOVA1、 $F_{2,14} = 4.28$ 、 $p < 0.05$ 、ボンフェローニ)。

【0142】

具体的なその実施形態と組み合わせて本発明を記載してきたが、多くの代替物、改変および変形が当業者にとって明らかであることは明白である。したがって、添付の特許請求の範囲の精神および広い範囲内に入る全てのこのような代替物、改変および変形を包含することが意図される。

10

【0143】

本明細書中で言及される全ての刊行物、特許および特許出願は、それぞれ個々の刊行物、特許または特許出願が本明細書中に具体的および個々に参照により本明細書中に組み込まれることが示される場合と同程度に、参照によりそれらの全体において本明細書中に組み込まれる。さらに、本願における何らかの参考文献の引用または特定は、このような参考文献が本発明に対する先行技術として利用可能であることを受け入れるものと解釈すべきではない。セクションの表題が使用される範囲まで、それらが必ずしも限定するものとして解釈されるべきではない。

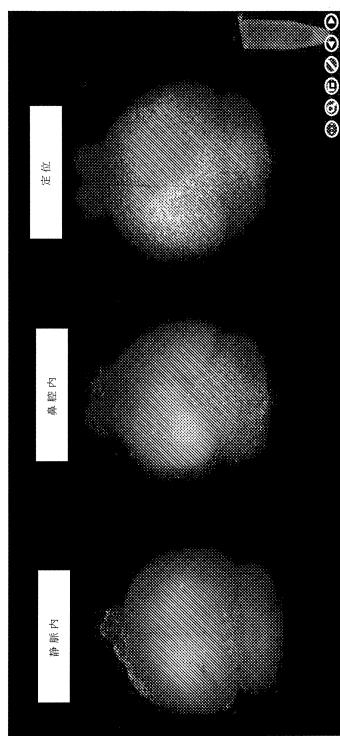
20

30

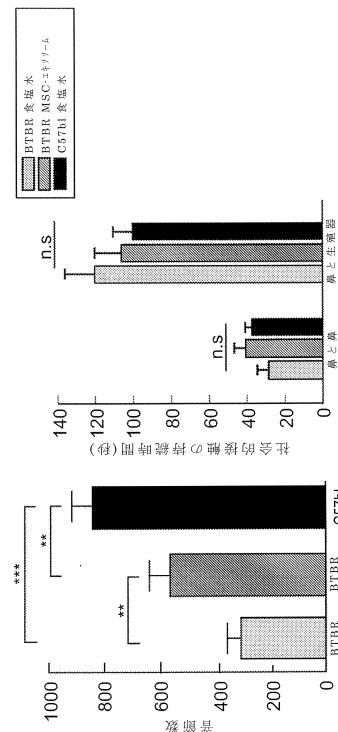
40

50

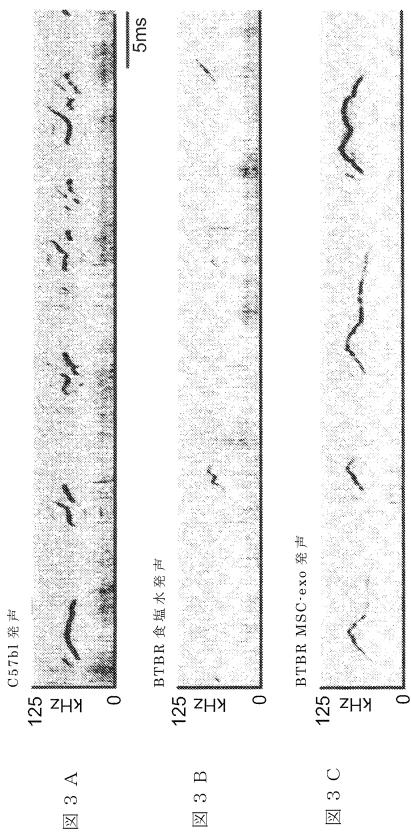
【図面】
【図 1】



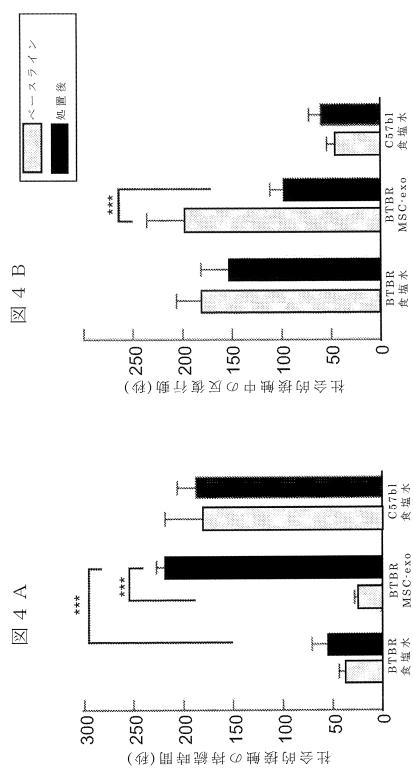
【図 2】



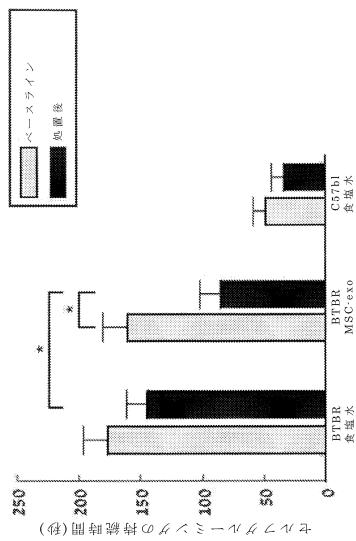
【図 3】



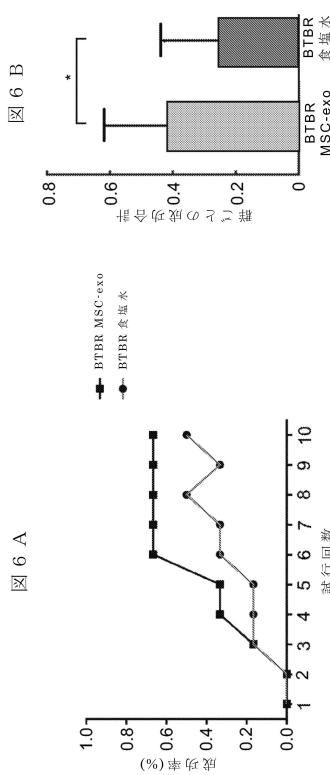
【図 4】



【図 5】



【図 6】



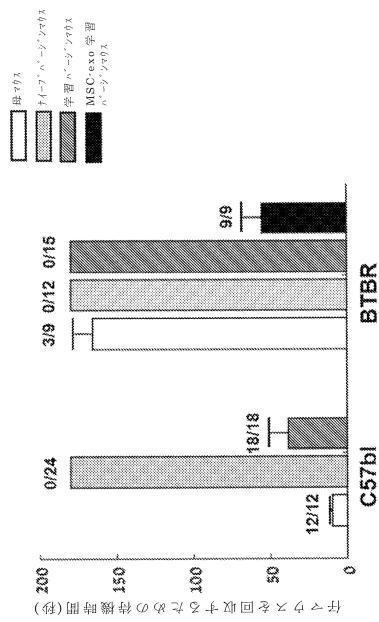
10

20

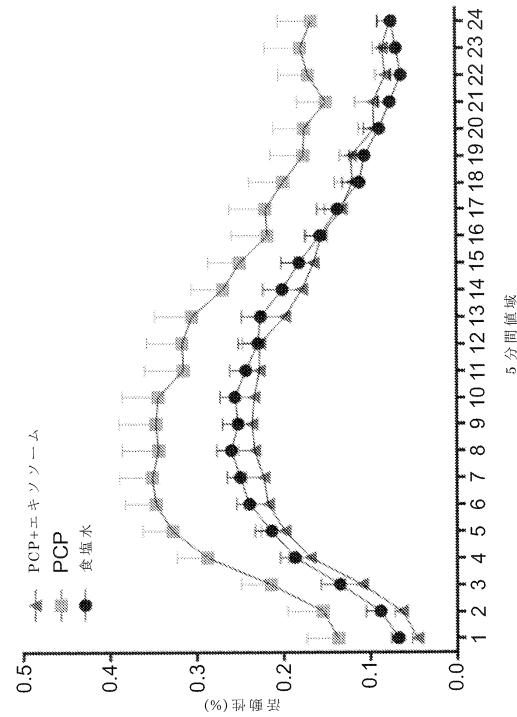
30

40

【図 7】

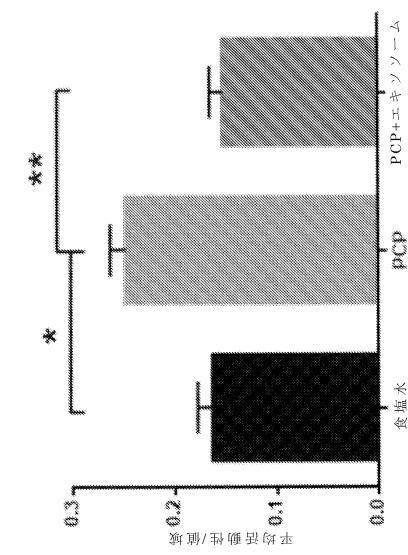


【図 8 A】

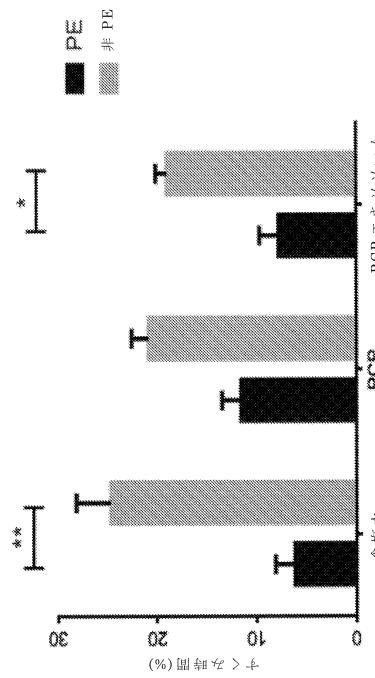


50

【図 8 B】



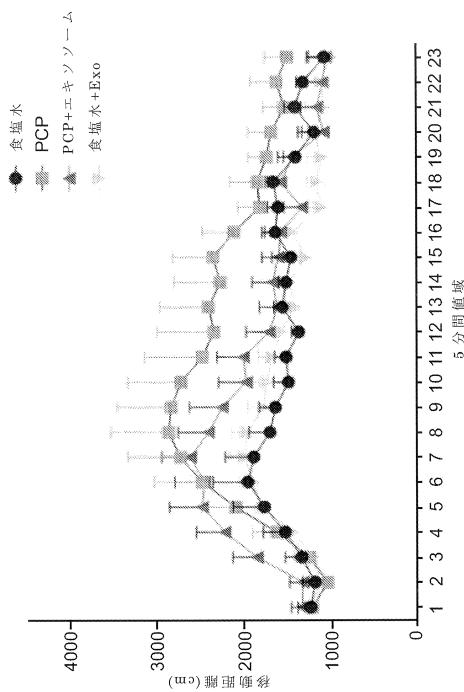
【図 9】



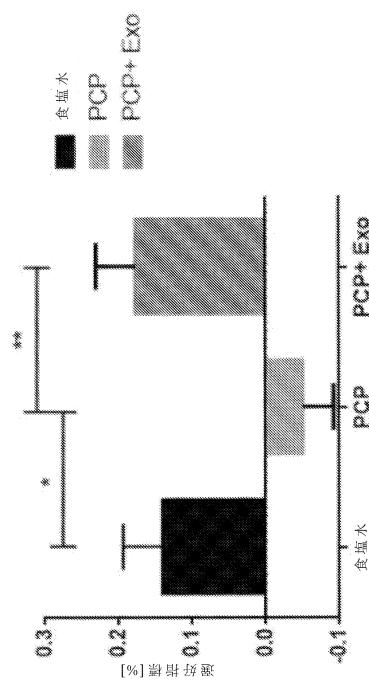
10

20

【図 10】



【図 11】

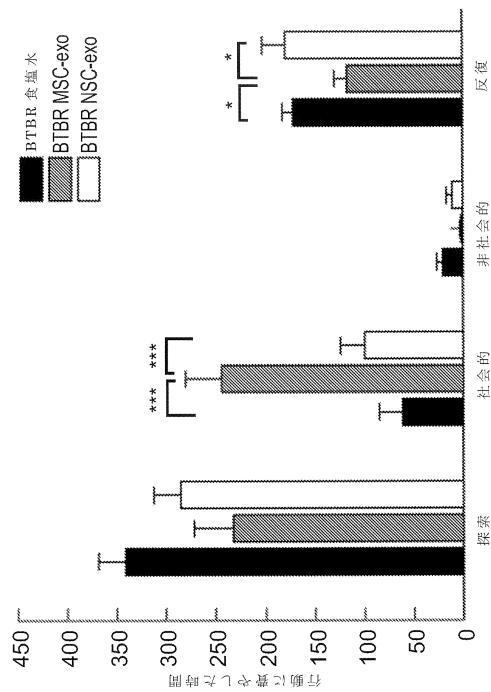


30

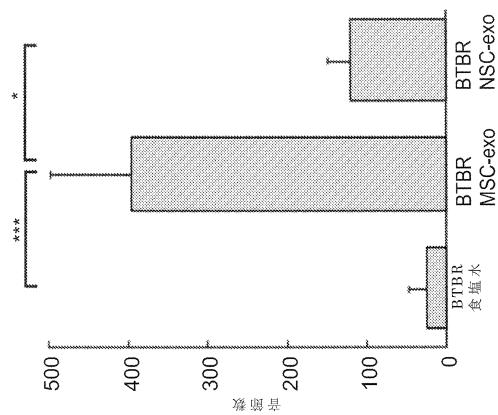
40

50

【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

ビブ, ピーオー ボックス 39296, ラモット アット テル アビブ ユニバーシティ リミテッド内
(72)発明者 ペレツ, ニシム
イスラエル国, 6139201 テル アビブ, ピーオー ボックス 39296, ラモット アット
テル アビブ ユニバーシティ リミテッド内

審査官 福山 則明

(56)参考文献 特表 2012-508733 (JP, A)
特開 2016-065106 (JP, A)
国際公開第 2012/156968 (WO, A2)
国際公開第 2016/149358 (WO, A1)
米国特許出願公開第 2011/0014251 (US, A1)
特開 2011-219432 (JP, A)
STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE, 2015年, Vol. 4, pp. 1131-1143
Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, Vol. 33, 2013年, pp. 1711-1715
Autism Research, 2015年08月10日, (2016) Vol. 9, pp. 17-32

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)
A 61 K 35/00 - 35/768
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)