

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年6月27日(27.06.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/135853 A1

(51) 国際特許分類:

C12P 1/00 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01) A61P 19/00 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 35/51 (2015.01) C07K 5/062 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01) C12N 1/00 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01) C12N 5/0775 (2010.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/046277

(22) 国際出願日: 2023年12月22日(22.12.2023)

(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 2022-207266 2022年12月23日(23.12.2022) JP

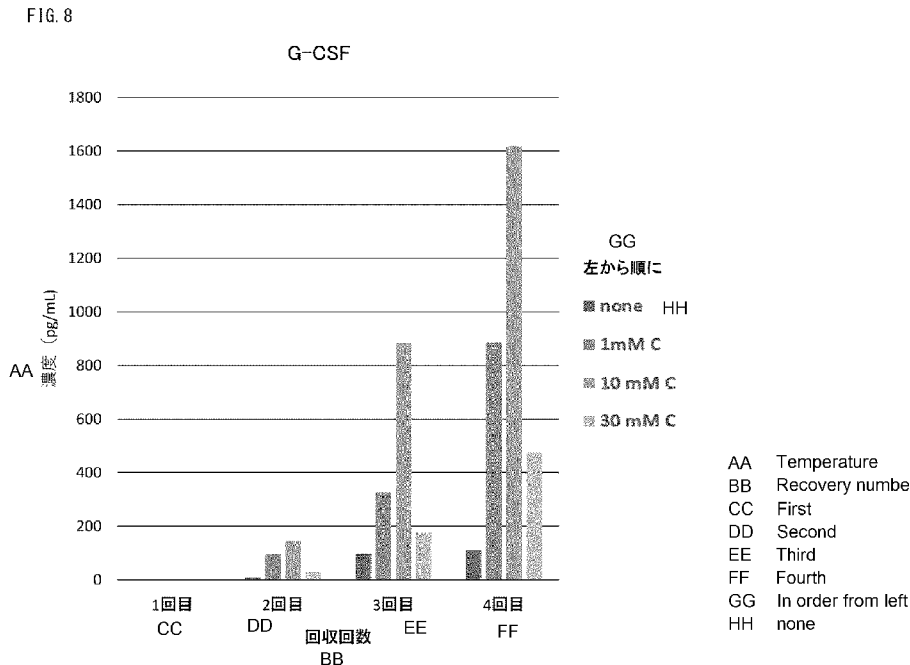
(71) 出願人: Cell Exosome Therapeutics株式会社(CELL EXOSOME THERAPEUTICS INC.) [JP/JP]; 〒1500011 東京都渋谷区東2丁目16番9号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 柳田 康友(YANAGITA, Yasutomo); 〒1500011 東京都渋谷区東2丁目16番9号 Tokyo (JP). 李家中豪(RINOIE, Chugo); 〒1500011 東京都渋谷区東2丁目16番9号 Tokyo (JP). 南一成(MINAMI, Itsunari); 〒1500011 東京都渋谷区東2丁目16番9号 Tokyo (JP).

(74) 代理人: S K弁理士法人, 外(SK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM et al.); 〒1500021 東京都渋谷区恵比寿西二丁目20番

(54) Title: UTILIZATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS OR CULTURE SUPERNATANT THEREOF

(54) 発明の名称: 間葉系幹細胞又はその培養上清の利用



(57) Abstract: Provided are a culture supernatant of mesenchymal stem cells or mesenchymal stem cells that are useful for suppressing or improving a disease. A method for producing a culture supernatant that includes a step that recovers a culture supernatant from a medium containing mesenchymal stem cells and an imidazole dipeptide is utilized. A method for producing cells that includes a step that cultures mesenchymal stem cells in medium containing an imidazole dipeptide and generates cultured cells may be utilized.

17号 ヒューリック代官山ビル3階
301号室 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(57) 要約: 疾患の抑制又は改善に有用な間葉系幹細胞の培養上清、又は間葉系幹細胞を提供する。間葉系幹細胞及びイミダゾールジペプチドを含む培地から培養上清を回収する工程を含む、培養上清の生産方法を利用する。間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養し、培養細胞を生成する工程を含む、細胞の生産方法を利用してもよい。

明 細 書

発明の名称： 間葉系幹細胞又はその培養上清の利用

技術分野

[0001] 本発明の技術分野は、間葉系幹細胞又は間葉系幹細胞の培養上清などに関する。

背景技術

[0002] 再生医療の分野において、間葉系幹細胞（MSC）及びMSCの培養上清が利用されている。MSCの培養上清は、サイトカインなどの細胞から分泌された成分を含有する。MSCの培養上清は、有効成分を単一に精製することなく患者へ投与できるため、コストの面でメリットを有する。

[0003] MSC又はMSCの培養上清に関するいくつかの研究が報告されている。例えば、特許文献1及び非特許文献1には、MSCの培養上清のサイトカイン量を調べたことが記載されている（特許文献1の実施例、非特許文献1のアブストラクト参照）。また、特許文献1には、MSCの細胞懸濁液を下肢虚血モデルのラットへ投与した結果、血流が増加したことが記載されている。非特許文献1には、MSCの培養上清に皮膚光損傷の修復促進や、血管再生の促進効果が見られたことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：W02021/200744

非特許文献

[0005] 非特許文献1：“Cytoplasm or Supernatant: Where Is the Treasury of the Bioactive Antiaging Factor from Mesenchymal Stem Cells?” Luo et al., Stem Cells Dev. 2022 Sep;31(17-18):529-540.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 疾患の抑制又は改善のために用いることを想定すると、従来のMSCの培養上

清の組成は改善の余地を有していた。

[0007] 一方で、本発明者らはMSCの培養方法について研究を行った。その結果驚くべきことに、MSC培養時の培地にイミダゾールジペプチドを添加することによって、疾患の抑制又は改善に有用な培養上清が得られた。また、得られた細胞も疾患の抑制又は改善に有用であった。そして、これらの知見に基づいて本発明を完成させた。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明の一態様によれば、間葉系幹細胞及びイミダゾールジペプチドを含む培地から培養上清を回収する工程を含む、培養上清の生産方法が提供される。この方法を用いれば、疾患の抑制又は改善に有用な培養上清を得ることができる。本発明の他の一態様によれば、間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養し、培養細胞を生成する工程を含む、細胞の生産方法が提供される。この方法を用いれば、疾患の抑制又は改善に有用な細胞を得ることができる。

[0009] また、本発明の他の一態様によれば、間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む血清フリーの培地で培養し、培養細胞を生成する工程を含む、細胞の培養方法が提供される。本発明の他の一態様によれば、間葉系幹細胞培養用の培地であって、イミダゾールジペプチドを含み、血清フリーである、培地が提供される。また、本発明の他の一態様によれば、間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養する工程を含む、骨芽細胞の生成抑制方法が提供される。本発明の他の一態様によれば、間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清と、間葉系幹細胞とを接触させる工程を含む、骨芽細胞の生成抑制方法が提供される。本発明の他の一態様によれば、イミダゾールジペプチドを含む、骨芽細胞の生成抑制用の組成物が提供される。本発明の他の一態様によれば、間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清を含む、骨芽細胞の生成抑制用の組成物が提供される。また、本発明の他の一態様によれば、間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養する工程を

含む、G-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームマーカーの発現促進方法が提供される。本発明の他の一態様によれば、イミダゾールジペプチドを含む、間葉系幹細胞のG-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームマーカーの発現促進用の組成物が提供される。本発明の他の一態様によれば、間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養する工程を含む、エクソソームの分泌促進方法が提供される。本発明の他の一態様によれば、イミダゾールジペプチドを含む、間葉系幹細胞のエクソソームの分泌促進用の組成物が提供される。本発明の他の一態様によれば、G-CSFを少なくとも500pg/ml含む、間葉系幹細胞の培養上清が提供される。本発明の他の一態様によれば、IL-6を少なくとも2700pg/ml含む、間葉系幹細胞の培養上清が提供される。本発明の他の一態様によれば、G-CSF又はIL-6を高発現又は高分泌する、臍帯由来間葉系幹細胞が提供される。本発明の他の一態様によれば、IL-34陽性の間葉系幹細胞が提供される。本発明の他の一態様によれば、ADAM8陽性の間葉系幹細胞が提供される。また、本発明の他の一態様によれば、間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた細胞を含む、骨分化抑制用の医薬組成物が提供される。本発明の他の一態様によれば、間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養し、培養細胞を生成する工程を含む、骨分化抑制用の医薬組成物の生産方法が提供される。また、本発明の他の一態様によれば、イミダゾールジペプチド及びLIF (leukemia inhibitory factor) 成分を含む、培地が提供される。本発明の他の一態様によれば、イミダゾールジペプチド及びLIF成分を含む、キットが提供される。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]カルノシン非含有培地で培養した後のMSCの顕微鏡写真である。

[図2]カルノシン1mM含有培地で培養した後のMSCの顕微鏡写真である。

[図3]カルノシン10mM含有培地で培養した後のMSCの顕微鏡写真である。

[図4]カルノシン30mM含有培地で培養した後のMSCの顕微鏡写真である。

[図5]MSCの細胞数のカウント結果を示す図である。

[図6]培養上清中のエクソソームマーカの量を調べた結果を示す図である。

回収回数1～4回にそれぞれ示される4つの棒グラフは、左から順に0mM、1mM、10mM、30mMのカルノシン添加条件下での結果を意味する。図7～14も同じである。

[図7]培養上清中のHGFの量を調べた結果を示す図である。

[図8]培養上清中のG-CSFの量を調べた結果を示す図である。

[図9]培養上清中のMCP-1の量を調べた結果を示す図である。

[図10]培養上清中のVEGF-Cの量を調べた結果を示す図である。

[図11]培養上清中のTGF- β 1の量を調べた結果を示す図である。

[図12]培養上清中のIL-6の量を調べた結果を示す図である。「 $>10,000$ 」及び「 $>7,000$ 」は各数値より大きい値が検出限界であったことを示す。

[図13]培養上清中のIL-7の量を調べた結果を示す図である。

[図14]培養上清中のIL-8の量を調べた結果を示す図である。

[図15]骨髓MSCのカルシウム沈着量の定量結果を示す図である。

[図16]骨髓MSCのアリザリンレッドS染色画像である。

[図17]骨髓MSC及び臍帯MSCの共培養時のカルシウム沈着量の定量結果を示す図である。

[図18]骨髓MSC及び臍帯MSCの共培養時のアリザリンレッドS染色画像である。

[図19]臍帯MSCの培養条件を示す図である。実施例に記載の%インクリーズ計算式では、RPM値に全て+1した上で、それぞれの%インクリーズを計算している。例えばM0のRPM値が0であっても、+1した状態で%インクリーズを出しているため、M0の%インクリーズ値は $(M0+1)/(M0+1)=(0+1)/(0+1)$ となり、その値は1になる。

[図20]10種類の遺伝子の%インクリーズ値の変化を示した図である。図20(a)～20(j)は、それぞれ順にgremlin 1, DAN family BMP antagonist、KIT liga

nd、R-spondin 2、semaphorin 3B、fibroblast growth factor 11、TNF receptor superfamily member 11b、ADAM metalloproteinase domain 8、interleukin 34、insulin like growth factor binding protein 2、dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1の結果である。

[図21]臍帯MSCのinterleukin 34発現量のRPM値を示した図である。

[図22]臍帯MSCのADAM metalloproteinase domain 8発現量のRPM値を示した図である。

[図23]OsteoprotegerinのELISA解析の結果を示す図である。

[図24]OsteoprotegerinのELISA解析の結果を示す図である。

[図25]OsteoprotegerinのELISA解析の結果を示す図である。

[図26]M-CSFのELISA解析の結果を示す図である。

[図27]M-CSFのELISA解析の結果を示す図である。

[図28]M-CSFのELISA解析の結果を示す図である。

[図29]OsteoprotegerinのqPCR解析の結果を示す図である。

[図30]M-CSFのqPCR解析の結果を示す図である。

[図31]OsteoprotegrinのELISA解析の結果を示す図である。図31(a)はカルノシン添加条件、図31(b)はアンセリン添加条件である。

[図32]OsteoprotegrinのqPCR解析の結果である。図32(a)はUC_B_C、図32(b)はBM_B_C、図32(c)はBM_C_Cの条件である。

[図33]OsteoprotegrinのqPCR解析の結果である。図33(a)はUC_B_A、図33(b)はBM_B_A、図33(c)はBM_C_Aの条件である。

[図34]M-CSFのELISA解析の結果を示す図である。図34(a)はカルノシン添加条件、図34(b)はアンセリン添加条件である。

[図35]M-CSFのqPCR解析の結果を示す図である。図35(a)はUC_B_C、図35(b)はBM_B_Cの条件である。

[図36]M-CSFのqPCR解析の結果を示す図である。図36(a)はUC_B_A、図36(b)はBM_B_Aの条件である。

[図37]群1及び2の細胞カウントの結果を示す図である。

[図38]群3及び4の細胞カウントの結果を示す図である。

[図39]群1～4のファロイジンの蛍光面積の測定結果を示す図である。

[図40]群1～4のCD44の蛍光面積の測定結果を示す図である。

[図41]群1及び3の蛍光画像の撮影結果（細胞核染色）を示す図である。

[図42]群1及び3の蛍光画像の撮影結果（ファロイジン染色）を示す図である。
。

[図43]群1及び3の蛍光画像の撮影結果（CD44染色）を示す図である。

[図44]群5及び6の細胞カウントの結果を示す図である。

[図45]群7及び8の細胞カウントの結果を示す図である。

[図46]群5及び6のファロイジンの蛍光面積の測定結果を示す図である。

[図47]群7及び8のファロイジンの蛍光面積の測定結果を示す図である。

[図48]群5及び6のCD44の蛍光面積の測定結果を示す図である。

[図49]群7及び8のCD44の蛍光面積の測定結果を示す図である。

[図50]群5及び7の蛍光画像の撮影結果（ファロイジン染色）を示す図である。
。

[図51]群5及び7の蛍光画像の撮影結果（CD44染色）を示す図である。

[図52]臍帯MSCをMSC培地Dで培養後のMSCマーカーの陽性率の測定結果を示す図である。

[図53]群9及び10の細胞カウントの結果を示す図である。

[図54]群9及び10のファロイジンの蛍光面積の測定結果を示す図である。

[図55]群9及び10の蛍光画像の撮影結果（ファロイジン染色）を示す図である。
。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。なお、同様な内容については繰り返しの煩雑を避けるために、適宜説明を省略する。

[0012] (1) 方法

本発明の一実施形態によれば、間葉系幹細胞（MSC）及びイミダゾールジペプチドを接触させる工程を含む、方法が提供される。この方法を利用すれば

、疾患の抑制又は改善に有用な培養上清（例えば、疾患の抑制又は改善に有用なサイトカインの少なくとも1つ以上を高濃度で含有する培養上清、又は骨分化抑制に有用な培養上清）を得ることができる。この方法は、例えば、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養し、培養されたMSCを生成する工程、又は培養されたMSCを含む培地から培養上清を回収する工程を含んでいてもよい。この方法は、例えば、細胞の生産方法もしくは培養方法、培養上清の生産方法、医薬組成物の生産方法、サイトカイン含有組成物の生産方法、サイトカインもしくはエクソソームの分泌促進方法、骨芽細胞の生成抑制方法、又は骨分化抑制方法を含む。また、本発明の一実施形態によれば、この方法を利用して得られる細胞、培養上清、医薬組成物、サイトカイン含有組成物、又はそれらを含む容器が提供される。

[0013] (2) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSC及びイミダゾールジペプチドを含む培地から培養上清を回収する工程を含む、培養上清の生産方法が提供される。この方法を利用すれば、疾患の抑制又は改善に有用な培養上清（例えば、疾患の抑制又は改善に有用なサイトカインの少なくとも1つ以上を高濃度で含有する培養上清、又は骨分化抑制に有用な培養上清）が得られる。

[0014] (3) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養し、培養細胞を生成する工程を含む、細胞の培養方法又は生産方法が提供される。この方法によれば、疾患の抑制又は改善に有用なMSC（例えば、疾患の抑制又は改善に有用なサイトカインの少なくとも1つ以上を高濃度で分泌するMSC、又は骨分化抑制に有用なMSC）を得ることができる。またこの方法において、血清フリー、血清アルブミンフリー、インスリンフリー、IGF (Insulin-like growth factor) フリー（例えば、IGF-1フリー）、FGF (Fibroblast growth factor) フリー（例えば、FGF-1又は2フリー）、成長因子フリー、サイトカインフリー、又は蛋白質フリーの培地でMSCを培養することによって、安全性に優れたMSCを得ることができる。この方法で得られた細胞を含む

培地から培養上清を回収すれば、疾患の抑制又は改善に有用な培養上清（例えば、疾患の抑制又は改善に有用なサイトカインの少なくとも1つ以上を高濃度で含有する培養上清、又は骨分化抑制に有用な培養上清）が得られる。

[0015] (4) 培養上清

本発明の一実施形態によれば、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清が提供される。この培養上清を利用すれば、例えば、MSCの培養上清が有する効果、又は疾患の抑制又は改善に有用な効果（例えば、疾患の抑制又は改善に有用な少なくとも1つ以上の高濃度のサイトカインがもたらす効果、又は骨分化を抑制する効果）が得られる。

[0016] (5) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清を対象に投与する工程含む、疾患の抑制方法が提供される。この方法を利用すれば、骨分化の抑制又は改善（例えば、骨分化に伴う疾患の抑制又は改善）ができる。別の側面によれば、疾患の抑制用の医薬組成物の製造における、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清を含む医薬組成物の使用が提供される。

[0017] (6) 組成物

本発明の一実施形態によれば、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清を含む、医薬組成物が提供される。この組成物を利用すれば、骨分化の抑制又は改善（例えば、骨分化に伴う疾患の抑制又は改善）ができる。別の側面によれば、疾患の抑制に使用するための医薬組成物であって、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清を含む医薬組成物が提供される。

[0018] (7) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた細胞を対象に投与する工程含む、疾患の抑制方法が提供される。この方法を利用すれば、骨分化の抑制又は改善（例えば、骨分化に伴う疾患の抑制又は改善）ができる。別の側面によれば、疾患の抑制用の医薬

組成物の製造における、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた細胞を含む医薬組成物の使用が提供される。

[0019] (8) 組成物

本発明の一実施形態によれば、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた細胞を含む、医薬組成物が提供される。この組成物を利用すれば、骨分化の抑制又は改善（例えば、骨分化に伴う疾患の抑制又は改善）ができる。別の側面によれば、疾患の抑制に使用するための医薬組成物であって、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた細胞を含む医薬組成物が提供される。

[0020] (9) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清を対象に投与する工程含む、対象の細胞の骨分化抑制方法が提供される。この方法を利用すれば、対象が有する細胞の骨分化を抑制できる。別の側面によれば、対象の細胞の骨分化抑制用の医薬組成物の製造における、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清を含む医薬組成物の使用が提供される。別の側面によれば、対象の細胞の骨分化抑制に使用するための、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清を含む医薬組成物が提供される。

[0021] (10) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた細胞を対象に投与する工程含む、対象の細胞の骨分化抑制方法が提供される。この方法を利用すれば、対象が有する細胞の骨分化を抑制できる。別の側面によれば、対象の細胞の骨分化抑制用の医薬組成物の製造における、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた細胞を含む医薬組成物の使用が提供される。別の側面によれば、対象の細胞の骨分化抑制に使用するための、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた細胞を含む医薬組成物が提供される。

[0022] (11) 培地

本発明の一実施形態によれば、MSC培養用の培地であって、イミダゾールジペプチドを含み、血清フリー、血清アルブミンフリー、インスリンフリー、IGFフリー、FGFフリー、成長因子フリー、サイトカインフリー、又は蛋白質フリーである、培地が提供される。この培地を用いてMSCを培養すれば、疾患の抑制又は改善に有用な細胞（例えば、疾患の抑制又は改善に有用なサイトカインの少なくとも1つ以上を高濃度で分泌する細胞、又は骨分化抑制に有用な細胞）が得られる。又は、疾患の抑制又は改善に有用な培養上清（例えば、疾患の抑制又は改善に有用なサイトカインの少なくとも1つ以上を高濃度で含有する培養上清、又は骨分化抑制に有用な培養上清）が得られる。この培地でMSCを培養することによって、安全性に優れたMSC又は培養上清を得ることができる。

[0023] (12) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSC及びイミダゾールジペプチドを接触させる工程を含む、骨芽細胞の生成抑制方法が提供される。この方法を利用すれば、骨芽細胞の生成を抑制できる。別の側面によれば、骨芽細胞の生成抑制用の組成物の製造における、イミダゾールジペプチドを含む組成物の使用が提供される。別の側面によれば、イミダゾールジペプチドを対象に投与する工程を含む、骨芽細胞の生成抑制方法が提供される。

[0024] (13) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養する工程を含む、骨芽細胞の生成抑制方法が提供される。この方法を利用すれば、骨芽細胞の生成を抑制できる。

[0025] (14) 組成物

本発明の一実施形態によれば、イミダゾールジペプチドを含む、骨芽細胞の生成抑制用の組成物が提供される。この組成物をMSCと接触させれば、骨芽細胞の生成を抑制できる。別の側面によれば、骨芽細胞の生成抑制に使用するための組成物であって、イミダゾールジペプチドを含む組成物が提供される。

[0026] (15) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清又はMSC分泌物と、MSCとを接触させる工程を含む、骨芽細胞の生成抑制方法が提供される。この方法を利用すれば、骨芽細胞の生成を抑制できる。別の側面によれば、骨芽細胞の生成抑制用の組成物の製造における、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清又はMSC分泌物を含む組成物の使用が提供される。別の側面によれば、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清又はMSC分泌物を対象に投与する工程を含む、骨芽細胞の生成抑制方法が提供される。

[0027] (16) 組成物

本発明の一実施形態によれば、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清又はMSC分泌物を含む、骨芽細胞の生成抑制用の組成物が提供される。この組成物をMSCと接触させれば、骨芽細胞の生成を抑制できる。別の側面によれば、骨芽細胞の生成抑制に使用するための組成物であって、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清又はMSC分泌物を含む組成物が提供される。

[0028] (17) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養する工程を含む、G-CSF（顆粒球コロニー形成刺激因子）、MCP-1（単球走化性因子）、VEGF-C（血管内皮増殖因子-C）、TGF- β 1（形質転換増殖因子ベータ1）、IL-6（interleukin 6）、IL-7（interleukin 7）、IL-8（interleukin 8）、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームマーカの発現促進方法が提供される。この方法を利用すれば、MSCからのG-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームマーカの発現又は分泌を促進できる。

[0029] (18) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSC及びイミダゾールジペプチドを接触させる工程を含む、G-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームマーカの発現促進方法が提供される。この方法を利用すれば、MSCからのG-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、又はエクソソームマーカの発現又は分泌を促進できる。別の側面によれば、MSCのG-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームマーカの発現促進用の組成物の製造における、イミダゾールジペプチドを含む組成物の使用が提供される。別の側面によれば、イミダゾールジペプチドを対象に投与する工程を含む、MSCのG-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームマーカの発現促進方法が提供される。

[0030] (19) 組成物

本発明の一実施形態によれば、イミダゾールジペプチドを含む、MSCのG-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームマーカの発現促進用の組成物が提供される。この組成物をMSCと接触させれば、MSCからのG-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームマーカの発現又は分泌を促進できる。

[0031] (20) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養する工程を含む、エクソソームの分泌促進方法が提供される。この方法

を利用すれば、MSCからのエクソソームの分泌を促進できる。

[0032] (21) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSC及びイミダゾールジペプチドを接触させる工程を含む、エクソソームの分泌促進方法が提供される。この方法を利用すれば、MSCからのエクソソームの分泌を促進できる。別の側面によれば、MSCのエクソソームの分泌促進用の組成物の製造における、イミダゾールジペプチドを含む組成物の使用が提供される。別の側面によれば、イミダゾールジペプチドを対象に投与する工程を含む、エクソソームの分泌促進方法が提供される。

[0033] (22) 組成物

本発明の一実施形態によれば、イミダゾールジペプチドを含む、MSCのエクソソームの分泌促進用の組成物が提供される。この組成物をMSCと接触させれば、MSCからのエクソソームの分泌を促進できる。

[0034] (23) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSC及びイミダゾールジペプチドを含む培地から培養上清を回収する工程を含む、組成物の生産方法が提供される。この組成物は培養上清又はサイトカイン含有組成物であってもよい。この組成物を利用すれば、MSCの培養上清が有する効果、又は疾患の抑制又は改善に有用な効果（例えば、疾患の抑制又は改善に有用な少なくとも1つ以上の高濃度のサイトカインがもたらす効果、又は骨分化を抑制する効果）が得られる。

[0035] (24) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSC及びイミダゾールジペプチドを接触させる工程を含む、MSCの分泌物を含有する組成物の生産方法が提供される。この組成物を利用すれば、MSCの分泌物が有する効果、又は疾患の抑制又は改善に有用な効果（例えば、疾患の抑制又は改善に有用な少なくとも1つ以上の高濃度のサイトカインがもたらす効果、又は骨分化を抑制する効果）が得られる。

[0036] (25) 培養上清

本発明の一実施形態によれば、蛋白質を含む、MSCの培養上清が提供される。培養上清は、例えば、G-CSFを少なくとも500pg/ml含む、MSCの培養上清であってもよい。この培養上清を利用すれば、高濃度のG-CSFによる疾患の抑制又は改善効果が得られる。培養上清は、例えば、IL-6を少なくとも2700pg/ml含む、MSCの培養上清であってもよい。この培養上清を利用すれば、高濃度のIL-6による疾患の抑制又は改善効果が得られる。

[0037] (26) 細胞

本発明の一実施形態によれば、G-CSF又はIL-6を高発現又は高分泌する、MSC（好ましくは臍帯由来MSC）が提供される。この培養上清を利用すれば、高濃度のIL-6による疾患の抑制又は改善効果が得られる。この細胞を利用すれば、高濃度のG-CSF又はIL-6による疾患の抑制又は改善効果が得られる。又はこの細胞を含む培地から培養上清を回収すれば、高濃度のG-CSF又はIL-6を含有する培養上清が得られる。別の側面によれば、MSCの細胞集団を含む組成物であって、組成物中の細胞のうち60%以上がG-CSF又はIL-6を高発現又は高分泌するMSC（好ましくは臍帯由来MSC）である、組成物が提供される。この組成物を利用すれば、高濃度のG-CSF又はIL-6による疾患の抑制又は改善効果が得られる。この組成物から培養上清を回収すれば、高濃度のG-CSF又はIL-6を含有する培養上清が得られる。

[0038] (27) 細胞

本発明の一実施形態によれば、G-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、又はsemaphorin 3B陽性のMSCが提供される。このMSCは、精製又は単離されたMSCであってもよい。別の側面によれば、精製又は単離された形態のMSCを含む組成物が提供される。別の側面によれば、G-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、又はsemaphorin 3Bの発現が上昇しているMSCが提供される。発現上昇は、例えば、イミダゾールジペプチドの非存在下で培養したMSCに比べたときの上昇

であってもよい。別の側面によれば、このMSCを含む医薬組成物が提供される。別の側面によれば、このMSCを対象に投与する工程を含む、疾患の治療方法が提供される。陽性かどうかは、例えば、免疫学的測定法（例えばELISA）又はPCR（例えば定量的PCR）等により評価することができる。

[0039] (28) 細胞

本発明の一実施形態によれば、IL-34陽性又はADAM8陽性のMSCが提供される。このMSCは、例えば、骨分化抑制に使用するために特に適したMSCである。このMSCは、精製又は単離されたMSCであってもよい。別の側面によれば、精製又は単離された形態のMSCを含む組成物が提供される。別の側面によれば、このMSCを含む医薬組成物が提供される。別の側面によれば、このMSCを対象に投与する工程を含む、疾患の治療方法が提供される。

[0040] (29) 方法

本発明の一実施形態によれば、イミダゾールジペプチドを培地に添加する工程を含む、培地の性質を、MSC培養時に、MSCからのG-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームマーカの分泌がより促進されるように変化させる方法が提供される。この方法を利用すれば、疾患の抑制又は改善に有用な培養上清又はMSCを生産するために適した、培地を調製することができる。別の側面によれば、本発明の一実施形態によれば、イミダゾールジペプチドを培地に添加する工程を含む、培地の調製方法が提供される。

[0041] (30) 培地

本発明の一実施形態によれば、イミダゾールジペプチド及びLIF成分を含む、培地が提供される。この培地を利用すれば、MSCの細胞増殖を促進することができる。

[0042] (31) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSCをイミダゾールジペプチド及びLIF成分を含む培地で培養し、培養細胞を生成する工程を含む、細胞又は培養上清の

生産方法が提供される。得られた細胞を利用すれば、骨分化を抑制する効果が得られる。得られた培養上清を利用すれば、MSCの培養上清が有する効果、又は疾患の抑制又は改善に有用な効果（例えば、疾患の抑制又は改善に有用な少なくとも1つ以上の高濃度のサイトカインがもたらす効果、又は骨分化を抑制する効果）が得られる。

[0043] (32) キット

本発明の一実施形態によれば、イミダゾールジペプチド及びLIF成分を含む、キットが提供される。このキットは、例えば、培地（例えばMSC培養用の培地）調製用のキットであってもよい。このキットに含まれる成分を混合して、培地を調製することができる。得られた培地を利用すれば、MSCの細胞増殖を促進することができる。別の側面によれば、イミダゾールジペプチド及びLIF成分を混合する工程を含む、培地の調製方法が提供される。

[0044] (33) 培地

本発明の一実施形態によれば、イミダゾールジペプチド及びラミニンフラグメント又はその改変体を含む、培地が提供される。この培地を利用すれば、MSCの細胞増殖を促進することができる。

[0045] (34) 方法

本発明の一実施形態によれば、MSCをイミダゾールジペプチド及びラミニンフラグメント又はその改変体を含む培地で培養し、培養細胞を生成する工程を含む、細胞又は培養上清の生産方法が提供される。得られた細胞を利用すれば、骨分化を抑制する効果が得られる。得られた培養上清を利用すれば、MSCの培養上清が有する効果、又は疾患の抑制又は改善に有用な効果（例えば、疾患の抑制又は改善に有用な少なくとも1つ以上の高濃度のサイトカインがもたらす効果、又は骨分化を抑制する効果）が得られる。

[0046] (35) キット

本発明の一実施形態によれば、イミダゾールジペプチド及びラミニンフラグメント又はその改変体を含む、キットが提供される。このキットは、例えば、培地（例えばMSC培養用の培地）調製用のキットであってもよい。このキ

ットに含まれる成分を混合して、培地を調製することができる。得られた培地を利用すれば、MSCの細胞増殖を促進することができる。別の側面によれば、イミダゾールジペプチド及びLIFを混合する工程含む、培地の調製方法が提供される。

[0047] (36) 方法

本発明の一実施形態によれば、本発明の実施形態に係る培養上清（例えば上記(4)又は(25)を含む）又は組成物（例えば上記(6)、(8)、(14)、(16)、(19)又は(22)を含む）を処理する工程を含む、サイトカイン含有組成物の生産方法が提供される。この方法で得られた組成物を利用すれば、MSCの培養上清が有する効果、疾患の抑制又は改善に有用な少なくとも1つ以上の高濃度のサイトカインがもたらす効果、又は骨分化を抑制する効果が得られる。処理は、例えば、製剤化、又は容器への充填であってもよい。

[0048] (37) 組成物

本発明の一実施形態によれば、本発明の実施形態（例えば上記(1)～(3)、(5)、(7)、(9)、(10)、(12)、(13)、(15)、(17)、(18)、(20)、(21)、(23)、(24)、(29)、(31)、(34)又は(36)を含む）の方法を実施して得られた、サイトカイン含有組成物が提供される。この組成物を利用すれば、MSCの培養上清が有する効果、疾患の抑制又は改善に有用な少なくとも1つ以上の高濃度のサイトカインがもたらす効果、又は骨分化を抑制する効果が得られる。

[0049] (38) 細胞

本発明の一実施形態によれば、本発明の実施形態（例えば上記(1)～(3)、(31)又は(34)を含む）の方法を実施して得られた、細胞が提供される。この細胞は疾患の抑制又は改善に有用なサイトカインの少なくとも1つ以上を高濃度で分泌することができる。この細胞は疾患の抑制又は改善に使用することができる。この細胞を含む培地から培養上清を回収すれば、疾患の抑制又は改善に有用なサイトカインの少なくとも1つ以上を高濃度で含有する培養上清、又は骨分化抑制に有用な培養上清が得られる。

[0050] (39) 細胞

本発明の一実施形態によれば、本発明の実施形態（例えば上記(26)～(28)又は(38)を含む）の細胞を含む細胞集団が提供される。この細胞を利用すれば、高濃度のG-CSF又はIL-6による疾患の抑制又は改善効果、又は骨分化を抑制する効果が得られる。又はこの細胞を含む培地から培養上清を回収すれば、高濃度のG-CSF又はIL-6を含有する培養上清、又は疾患の抑制又は改善に有用な培養上清が得られる。別の側面によれば、上記(25)又は(28)の細胞を含む細胞集団を含む組成物が提供される。この組成物を利用すれば、高濃度のG-CSF又はIL-6による疾患の抑制又は改善効果、又は骨分化を抑制する効果が得られる。又はこの組成物を含む培地から培養上清を回収すれば、高濃度のG-CSF又はIL-6を含有する培養上清、又は疾患の抑制又は改善に有用な培養上清が得られる。

[0051] (40) 方法

本発明の一実施形態によれば、本発明の実施形態に係る上清（例えば上記(4)又は(25)を含む）又は細胞（例えば(26)～(28)又は(38)を含む）を対象に投与する工程を含む、疾患の治療方法が提供される。治療する対象は、例えば、骨分化抑制を必要としている患者であってもよい。別の側面によれば、本発明の実施形態の上清又は細胞を含む、疾患の治療に使用するのための医薬組成物が提供される。別の側面によれば、疾患の治療のための医薬組成物の生産のための、本発明の実施形態の上清又は細胞の使用が提供される。

[0052] (41) 容器

本発明の一実施形態によれば、本発明の実施形態に係る培養上清（例えば上記(4)又は(25)を含む）又は組成物（例えば上記(6)、(8)、(14)、(16)、(19)、(22)又は(37)を含む）を含む容器が提供される。この容器を利用すれば、MSCの培養上清が有する効果、疾患の抑制又は改善に有用な少なくとも1つ以上の高濃度のサイトカインがもたらす効果、又は骨分化を抑制する効果が得られる。

[0053] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(3)、(5)、(7)、(9)、(10)、(12)、(13)、(15)、(17)、(18)、(20)、(21)、(23)、(24)、(29)、(31)、(34)、(36)

又は(40)を含む)の方法は、下記(i)～(ii)のいずれか1つ以上の工程を含んでいてもよい。(i)MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養し、培養されたMSCを生成する工程、又は(ii)培養されたMSC及びイミダゾールジペプチドを含む培地から培養上清を回収する工程。また本発明の実施形態(例えば上記(1)～(3)、(5)、(7)、(9)、(10)、(12)、(13)、(15)、(17)、(18)、(20)、(21)、(23)、(24)、(29)、(31)、(34)、(36)又は(40)を含む)の方法は、下記(iii)～(xvi)のいずれか1つ以上の工程を含んでいてもよい。(iii)MSCを培地に懸濁し、得られた細胞懸濁液を培養容器に播種する工程、(iv)MSCを播種及び培養後の培地に、接着因子を含む培地を添加する工程、(v)イミダゾールジペプチド及び培地成分を混合する工程、(vi)MSCを培養した培地をイミダゾールジペプチドを含む培地で置換する工程、(vii)イミダゾールジペプチドを含む培地でMSCを培養する工程、(viii)MSCを接着培養により培養して、細胞を増殖させる工程、(ix)培養後のMSC及びイミダゾールジペプチドを含む培地を遠心分離又はフィルターにかける工程、(x)培養上清又は培養後MSCを回収する工程、(xi)培養上清中のG-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームマーカー量を測定する工程、(xii)回収した培養上清を滅菌処理し、滅菌処理された培養上清を生成する工程、(xiii)培養上清又は培養後MSCを製剤化する工程、(xiv)治療上有効量の培養上清又は培養後MSCを対象に投与する工程、(xv)培養上清又は培養後MSCを医療用容器に移す工程、又は(xvi)医療用容器からシリンジ、バイアル又は医療用バッグに培養上清又は培養後MSCを移す工程。これらの1つ以上の工程を採用することは、疾患の抑制又は改善に有用なサイトカインの少なくとも1つ以上を高濃度で含有する培養上清、又は骨分化抑制に有用な培養上清もしくはMSCを得るために有用である。2つ以上を採用した場合、順番は任意であり、所望の操作に応じて順番を決定できる。

[0054] 本発明の実施形態(例えば上記(1)～(41)を含む)において、MSCは、例えば、臍帯由来MSC、脂肪由来MSC、骨髄由来MSC、胎盤由来MSC、又は臍帯血由

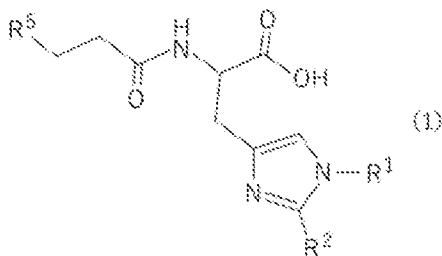
来MSCを含む。MSCは、哺乳動物のMSCであってもよく、好ましくはヒトMSCである。哺乳動物は、例えば、ヒト、サル、ネズミ目の動物（マウス、ハムスター等）、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、マーモセット等を含む。MSCは、細胞集団として存在していてもよい。本明細書において、特に指定しない限り、MSCへの言及は細胞集団として存在するMSCを含む。細胞集団は、細胞分裂によって生じた複数の細胞を含む。細胞集団中の本発明の実施形態のMSC（例えば上記(25)又は(28)を含む）の割合は、例えば、30、40、50、60、70、80、90、又は100%以上であってもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。MSCは、上述の方法で培養する前のMSC、及び上述の方法で培養することにより得られたMSCを含む。MSCは、イミダゾールジペプチドを含む培地で培養されたMSCを含む。MSCは、HLA-ABC陽性であるMSC、CD105陽性であるMSC、HLA-ABC陰性であるMSC、及びCD105陰性であるMSCを包含する。MSCは、CD44、CD73、CD90、もしくはCD105が陽性であり、又はCD45、CD34、CD31、もしくはHLA-DRが陰性であるMSCを含む。MSCは、単離又は精製されたMSCであってもよい。単離又は精製されたMSCは、例えば、実施的にMSC以外の細胞を含有しない細胞集団、又は不純物が除去された製剤中のMSCを含む。不純物は、例えば、培地成分を含んでもよく、除去は、例えば、一部除去を含んでもよい。

[0055] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、G-CSF又はIL-6を高発現又は高分泌するMSCは、例えば、カルノシン（例えば10mM）を添加した培地で72時間培養したときに、少なくとも 5.56×10^{-3} pg/細胞のG-CSFを分泌する細胞又は少なくとも 3×10^{-2} pg/細胞のIL-6を分泌する細胞であってもよい。G-CSFの分泌量は、例えば、少なくとも 5.56×10^{-3} 、 6×10^{-3} 、 8×10^{-3} 、 1×10^{-2} 、 1.2×10^{-2} 、 1.7×10^{-2} 、 2×10^{-2} 、 3×10^{-2} 、 1×10^{-1} 、1、又は3pg/細胞であってもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この値は、例えば、 $5.56 \times 10^{-3} \sim 3$ 、 $5.56 \times 10^{-3} \sim 3 \times 10^{-2}$ 、 $5.56 \times 10^{-3} \sim 2 \times 10^{-2}$ 、 $1.2 \times 10^{-2} \sim 3 \times 10^{-2}$ 、又は $1.2 \times 10^{-2} \sim 1.7 \times 10^{-2}$ pg/細胞であってもよい。IL-6の分泌量は、例えば、少なくとも 3×10^{-2} 、 4×10^{-2} 、 5×10^{-2} 、 6×10^{-2} 、 7×10^{-2} 、 8×10^{-2} 、

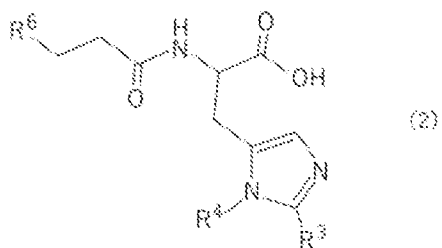
1×10^{-1} 、 1.5×10^{-1} 、 2×10^{-1} 、1、10、又は 20 pg/細胞 であってもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この値は、例えば、 $3 \times 10^{-2} \sim 20$ 、 $3 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-1}$ 、 $3 \times 10^{-2} \sim 8 \times 10^{-2}$ 、 $4 \times 10^{-2} \sim 8 \times 10^{-2}$ 、又は $4 \times 10^{-2} \sim 7 \times 10^{-2} \text{ pg/細胞}$ であってもよい。分泌量の計算は、細胞を培養後の培地中の分泌物濃度（単位は例えば pg/mL ） $\times$ 使用した培地量（単位は例えば mL ） $\div$ 培養後の細胞数で示すことができる。

[0056] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、イミダゾールジペプチドは、イミダゾール基を有するアミノ酸と別のアミノ酸とが結合した構造を有する化合物を含む。イミダゾールジペプチドは、例えば、下記の式(1)又は(2)の構造を有する化合物を含む。

[化1]



[化2]



[0057] 上記の式(1)及び式(2)において、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^6$ の意味は以下の通りである。 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は、それぞれ独立して、 H 又は C_{1-6} アルキルである。 R^5 及び R^6 は、それぞれ独立して、 $-\text{NHR}^7$ 又は $-\text{CH}_2\text{NHR}^7$ である。ここで、 R^7 は H 又は $-\text{COR}^8$ である。ここで、 R^8 は H 、 C_{1-6} アルキル、置換されていてもよいフェニル、 $-\text{OCH}_2\text{R}^9$ 、又は $-\text{CH}=\text{CHR}^9$ である。ここで、 R^9 は、 H 、 C_{1-6} アルキル、又は置換されていてもよいフェニルである。式(1)又は(2)の構造を有する化合物は、MSCのサイトカイン分泌促進作用を有していてもよい。

[0058] MSCのサイトカイン分泌をより効率的に促す観点からは、式(1)の R^1 及び R^2 は、一方がHであり且つ他方が C_{1-6} アルキルであることが好ましく、両方がHであることがより好ましい。ここで、式(1)の R^1 及び R^2 の一方が C_{1-6} アルキルの場合、 C_{1-6} アルキルはメチルであることが好ましい。MSCのサイトカイン分泌を促す観点からは、式(2)の R^3 及び R^4 は、一方がHであり且つ他方が C_{1-6} アルキルであることが好ましく、両方がHであることがより好ましい。ここで、式(2)の R^2 及び R^3 の一方が C_{1-6} アルキルの場合、 C_{1-6} アルキルはメチルであることが好ましい。MSCのサイトカイン分泌を促す観点からは、式(1)又は(2)の R^8 はH、 C_{1-6} アルキル、又は $-OCH_3$ であることが好ましく、メチルであることがより好ましい。MSCのサイトカイン分泌を促す観点からは、式(1)又は(2)の R^9 はH又は C_{1-6} アルキルであることが好ましい。式(1)又は(2)の R^7 はホルミル、アセチル、プロピオニル、ベンゾイル、又はアクリロイルであってもよい。式(1)又は(2)の置換されていてもよいフェニルは、例えば、無置換の、又は $-OH$ 、 C_{1-6} アルキル、もしくは $-OCH_3$ で置換されたフェニルであってもよい。置換位置はフェニルの2、3、4、5又は6位であってもよい。

[0059] MSCのサイトカイン分泌をより効率的に促す観点からは、式(1)及び式(2)において、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は、それぞれ独立して、H又は C_{1-6} アルキルであってもよく、 R^1 及び R^2 のいずれか一方はHであってもよく、 R^3 及び R^4 のいずれか一方はHであってもよく、 R^5 及び R^6 は、それぞれ独立して、 $-NHR^7$ 又は $-CH_2NHR^7$ であってもよく、 R^7 はH又は $-COCH_3$ であってもよい。

[0060] 上記のアルキルは、直鎖又は分枝状の炭化水素鎖を含む。上記の C_{1-6} は、炭素数が1、2、3、4、5、又は6の炭化水素である。即ち、 C_{1-6} アルキルは、炭素数が1、2、3、4、5、又は6のアルキルである。 C_{1-6} アルキルとしては、例えばメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチル、*n*-ヘキシル基等を含む。

[0061] 式(1)及び式(2)で表わされる化合物の製造方法に関しては、特開2020-022433、特開2019-131532、特開2010-31004、特開2006-232686、又は特表2006-504701等に記載されているイミダゾールジペプチドの製造方法及び原理を利用

することができる。

[0062] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、イミダゾールジペプチドは、カルノシン、カルノシンのメチル化体（例えば、アンセリン又はバレニン等）、又はホモカルノシンを含む。イミダゾールジペプチドは、式(1)又は(2)の構造を有し、抗酸化作用を有する化合物を含む。例えば、カルノシン、アンセリン、バレニン、及びホモカルノシンが抗酸化作用を有していることが知られている（例えば、Boldyrev et al., *Physiol Rev.* 2013 Oct;93(4):1803-45. 参照）。イミダゾールジペプチドは、L体又はD体であってもよい。

[0063] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、カルノシンは、特に指定しない限り、L-カルノシン又はD-カルノシンを含む。L-カルノシンはbeta-alanyl-L-histidineの名称でも表すことができる。L-カルノシンは305-84-0のCAS登録番号で示すことができる。

[0064] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、アンセリンは、特に指定しない限り、L-アンセリン又はD-アンセリンを含む。L-アンセリンはbeta-alanyl-3-methyl-L-histidineの名称でも表すことができる。L-アンセリンは584-85-0のCAS登録番号で示すことができる。

[0065] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、バレニンは、特に指定しない限り、L-バレニン又はD-バレニンを含む。L-バレニンはbeta-alanyl-1-methyl-L-histidineの名称でも表すことができる。L-バレニンは331-38-4のCAS登録番号で示すことができる。

[0066] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、ホモカルノシンは、特に指定しない限り、L-ホモカルノシン又はD-ホモカルノシンを含む。L-ホモカルノシンはgamma-aminobutyryl-L-histidineの名称でも表すことができる。L-ホモカルノシンは3650-73-5のCAS登録番号で示すことができる。

[0067] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、高濃度のサイトカインがもたらす効果は、例えば、高濃度のG-CSF、IL-6、MCP-1、VEGF-C

、TGF- β 1、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、又はsemaphorin 3Bがもたらす効果を含む。G-CSFは骨形成を抑制するサイトカインであるため、高濃度のG-CSFにより骨形成を抑制できると考えられる。IL-6は骨形成を抑制するサイトカインであるため、高濃度のIL-6により骨形成を抑制できると考えられる。IL-6、VEGF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、及びIL-8は血管新生因子であるため、高濃度のこれらのサイトカインにより血管新生を促進できると考えられる。G-CSF、MCP-1、TGF- β 1、及びIL-7は免疫調整因子であるため、これらのサイトカインにより自己免疫疾患などを抑制できると考えられる。M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、及びsemaphorin 3Bは、骨形成阻害に関与する因子であるため、これらのサイトカインの組み合わせにより骨形成を抑制できると考えられる。

[0068] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、抑制又は改善対象となる疾患又は症状は、例えば、骨分化、骨分化に伴う疾患（例えば異所性骨化）、虚血性疾患（例えば、下肢虚血、心筋梗塞、脳梗塞、脊髄梗塞、又は慢性動脈閉塞症等）、傷（例えば、上皮創傷又は熱傷等）、老化に伴うサルコペニア、関節炎（例えば、リウマチ、椎間板ヘルニア、変形性関節症等）、炎症性疾患（例えば、腎炎、角膜炎、サイトカインストーム等）、精神疾患（例えば、神経炎症が原因の一つと考えられる自閉症又は不眠症等）、免疫疾患（例えば、GVHD（移植片対宿主病）、シェーグレン症候群、アトピー性皮膚炎、膠原病、多発性硬化症、又は自己免疫性疾患等）、又はがんを含む。この疾患又は症状は、例えば、本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）における培養上清、細胞、又は組成物を対象に投与することで抑制又は改善されてもよい。この疾患又は症状は、例えば、高濃度のサイトカインがもたらす効果により、抑制又は改善が生じてもよい。上記の異所性骨化は、本来骨形成の起こらない部位に異常に骨形成が起こる現象を含む。異所性骨化は、例えば、軟部組織（例えば、腱、膜、靱帯、筋肉、関節包等）に生じる骨化を含む。異所性骨化は、骨梁構造を有する状態であっても

よい。異所性骨化は、例えば、後縦靱帯骨化症、黄色靱帯骨化症、進行性骨化性線維異形成症、進行性骨化性筋炎、外傷性骨化性筋炎、又はびまん性特発性骨増殖症を含む。

[0069] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、骨分化抑制は、例えば、骨分化に伴う疾患の抑制に有用である。骨分化に伴う疾患は、例えば、骨化（例えば異所性骨化）を含む。骨分化抑制は、例えば、異常な骨分化を抑制することを含む。また、骨分化抑制の用途は、骨分化に伴う疾患の抑制又は改善の用途を含む。骨分化抑制用の医薬組成物は、異所性骨化などの骨分化に伴う疾患用の医薬組成物を含む。骨分化抑制方法は、異所性骨化などの骨分化に伴う疾患の抑制又は改善方法を含む。

[0070] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、培養するとは、細胞を増殖又は維持に適した条件下でインキュベートすることを含む。インキュベートは、約37℃及び約5%CO₂雰囲気下において行ってもよい。培養は、血清フリー、無血清、血清アルブミンフリー、インスリンフリー、IGFフリー、FGFフリー、成長因子フリー、サイトカインフリー、又は蛋白質フリーの培地で実施してもよい。フリーは、対象成分が培地に添加されていない状態、培地が対象成分を完全に含まない状態、又は培地が成分を検出限界以上の濃度で含まない状態を含む。フリーは実質的にフリーであること、又は実質的に含まないことを含む。培養は、細胞接着因子の存在下（例えば、培地に混合下、又はプレコーティングした容器内）で、接着培養により実施してもよい。培養が細胞の増殖を伴う場合、培養は細胞の生産を含んでもよい。培養の時間は、例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、又は50日以上であってもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。培養は、細胞がコンフルエントの状態に達するまで実施してもよい。コンフルエントの状態は、細胞が培養容器の底面積の80%以上を覆っている状態を含む。より好ましくは、細胞が培養容器の底面積の80～90%を覆っている状態に達するまで実施することができる。MSCの培養は、イミダゾールジペプチドを含まない培地（例えば蛋白質含有培地）を培地X、イミダゾールジペプチド

ドを含む培地（例えば蛋白質不含培地）を培地Yとしたとき、XとYを交互に使用して実施してもよい。交互に使用は、X又はYで培養を開始した後に、Xで培養後はYに、Yで培養後はXに培地を置換し培養を実施することを含む。例えば、Xで培養、Yで置換及び培養、Xで置換及び培養、Yで置換及び培養、Xで置換及び培養、Yで置換及び培養、Xで置換及び培養、及びYで置換及び培養を順に実施してもよい。このようにXとYを交互に使用してMSCを培養する条件下において、Yの培養は、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、又は7回目実施してもよい。培養上清の回収は、Yで培養後のいずれのタイミングで実施してもよい。上記のようにXとYを交互に使用してMSCを培養する条件下において、培養上清の回収は、例えば、1、2、3、4、5、6、又は7回目のYの培養後に実施してもよい。又はそれらいずれかの2回以上のタイミング、又は全てのタイミングで上清を回収し、得られた全上清を混合した溶液を目的の上清としてもよい。培養開始から置換までの時間は、上記の培養の時間と同じ時間を採用できる。

[0071] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、MSCの培養は、例えば、イミダゾールジペプチドを0.1～100mM含む培地で実施してもよい。この濃度は、例えば、0.1、0.2、0.5、1、2、5、7、10、15、20、25、30、35、40、50、60、80、もしくは100mMであってもよく、それらの値以上、又はそれらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この濃度は、疾患の抑制又は改善に有用なサイトカインの少なくとも1つ以上を高濃度で含有する培養上清をより効率的に得る観点からは、1～50mMが好ましく、3～30mMがより好ましく、5～25mMがさらに好ましく、5～20mMが特に好ましく、10～20mMが最も好ましい。培養は、接着培養であってもよい。細胞が容器に接着しているかどうかは、例えば、容器を傾けて細胞の移動が生じないことを確認する工程、又は容器内の培地交換時に細胞の移動が生じないことを確認する工程、などの工程により、当業者は容易に確認できる。接着培養は、例えば、細胞を細胞接着因子の存在下で培養する工程（例えば、容器内で細胞及び接着因子を接触させる工程、細胞及び培地を含む細胞懸濁液と、接着因子とを混合

し、得られた混合物を容器に入れ、培養する工程、又は容器に接着因子をコート（例えば、プレコート）した後に細胞を容器内に播種する工程を含む）により実施してもよい。本明細書では、細胞接着因子と接着因子とは同じ対象を指す。接着因子は、例えば、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、テネイシン、カドヘリン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、コラーゲン、トロンボスポンジン、ガレクチン、もしくはニドゲン-1、又は細胞接着作用を有するそれらのフラグメントを含む。細胞の接着は、細胞外マトリックス（例えば、接着因子）を介して細胞と容器が接着している状態を含んでもよい。接着細胞は、接着培養可能な細胞、又は付着しながら増殖可能な細胞を含んでもよい。

[0072] 上記の接着培養において、培地中の接着因子の濃度は、例えば、0.01、0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、2、もしくは $3\mu\text{g/ml}$ であってもよく、それらの値以上、又はそれらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この値は、例えば、0.01~2、0.1~1.5、又は $0.5\sim 1\mu\text{g/ml}$ であってもよい。培地中の接着因子の濃度は、例えば、培養容器の培養面積 1cm^2 あたり0.005、0.01、0.1、0.25、0.5、1、1.5、もしくは $2\mu\text{g}$ であってもよく、それらの値以上、又はそれらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この値は、例えば、培養容器の培養面積 1cm^2 あたり0.01~1.5、0.1~1、又は $0.1\sim 0.5\mu\text{g}$ であってもよい。接着因子は、接着活性を有する因子であって、例えば、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、テネイシン、カドヘリン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、コラーゲン、トロンボスポンジン、ガレクチン、ニドゲン-1、それらのフラグメント、又はそれらの改変体であってもよい。接着因子は、ラミニンフラグメント又はその改変体であってもよい。ラミニンフラグメントはインテグリン結合活性を有していてもよく、ヒト由来であってもよい。ラミニンフラグメントはラミニンE8フラグメントであってもよい。ラミニンフラグメントは、ラミニン511 E8フラグメント、ラミニン521 E8フラグメント、ラミニン411 E8フラグメント、ラミニン421 E8フラグメント、ラミニン332 E8フラグメント、ラミニン311 E8フラグメント、ラミニン321 E

8フラグメント、ラミニン211 E8フラグメント、ラミニン221 E8フラグメント、ラミニン213 E8フラグメント、ラミニン111 E8フラグメント、又はラミニン121 E8フラグメントであってもよい。ラミニン511 E8フラグメントは、例えば、W02011/043405A1に記載の方法で調製することができる。ラミニン511は、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 及び $\gamma 1$ のサブユニット鎖から構成されるラミニンを含む。ラミニンフラグメントの改変体は、インテグリン結合活性を有するラミニンフラグメントと他の機能性分子とから構成される公知の複合体（例えば、インテグリン結合活性を有するラミニンフラグメントと細胞接着分子との複合体、又はインテグリン結合活性を有するラミニンフラグメントと増殖因子結合分子（例えばヘパラン硫酸）との複合体）であってもよい（例えば、W02012/137970、W02014/103534及びW02016/010082を参照）。ラミニンフラグメントの改変体は、公知の遺伝子組換え技術を用いることにより組換え蛋白質として製造することができる。上記のラミニンフラグメント又はその改変体は、インテグリン結合活性を有していてもよく、例えば、(a)配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、及び配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む三量体、(b)配列番号1で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号2で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、及び配列番号3で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む三量体、又は(c)配列番号1で示されるアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号2で示されるアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、及び配列番号3で示されるアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む三量体、を含んでもよい。上記のラミニンフラグメント、改変体、又はサブユニット鎖は、N又はC末端に任意にタグ（例

例えばMishra, Curr Protein Pept Sci. 2020;21(8):821-830参照)を有していてもよい。タグは、例えば、精製タグであってもよい。精製タグは、例えば、ペプチドタグ(例えばHisタグ)であってもよい。精製タグは、例えば、生化学的に不活性なタグを含む。細胞の播種密度は、例えば、 1×10^1 、 1×10^2 、 5×10^2 、 1×10^3 、 1.5×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、もしくは 1×10^6 細胞/mLであってもよく、それらの値以上、又はそれらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この値は、例えば、 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^4$ 、又は $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$ 細胞/mLであってもよい。細胞の播種密度は、例えば、0.002、0.01、0.1、1、50、100、300、500、1000、1500、2000細胞/cm²であってもよく、それらの値以上、又はそれらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この値は、例えば、0.01~2000、0.1~1000、1~1000、1~500、又は1~100細胞/cm²であってもよい。

[0073] 本発明の実施形態(例えば上記(1)~(41)を含む)において、培養上清は、細胞を培養して得られた培養上清を含む。培養上清は、例えば、サイトカイン含有培養上清を含む。培養上清は、例えば、細胞代謝物(例えば、アミノ酸、脂質、糖等)、分泌蛋白質類(例えば、ホルモン、ペプチド、サイトカイン、細胞外マトリックス等)、又はエクソソーム等を含んでもよい。イミダゾールジペプチドを含む培地でMSCを培養した場合、培養上清はイミダゾールジペプチドを含んでもよい。培養上清は、細胞成分から分離した上清に、各種処理(例えば、遠心処理、フィリター処理、凍結、凍結乾燥、保存、滅菌等)を経た上清もその範囲に含む。培養上清は、培養細胞としてMSCのみを含む培地を用いて得られる培養上清であってもよい。製造コスト低減又はロット間均一性の観点からは、培養上清に含まれるサイトカインは、培養細胞由来のサイトカインのみであることが好ましい。製造コスト低減の観点からは、培養上清は非濃縮であることが好ましい。培養上清は、例えば、HGF、G-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームを含んでもよい。

[0074] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、培養上清は、G-CSFを少なくとも500pg/mL又はIL-6を少なくとも2700pg/mL含んでもよい。この培養上清を利用すれば、高濃度のG-CSF又はIL-6による効果が得られる。この培養上清は、G-CSFを、例えば、500～2000、700～1700、800～1600、1000～1600pg/mL含んでもよい。この濃度は、例えば、少なくとも500、600、700、800、900、1000、1250、1500、1600、1700、1800、1900、又は2000pg/mLであってもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この培養上清は、IL-6を、例えば、2700～10000、3000～10000、4000～10000、又は3000～4000pg/mL含んでもよい。この濃度は、例えば、少なくとも2700、3000、3500、4000、4500、5000、6000、7000、8000、9000、10000、11000、又は12000pg/mLであってもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この培養上清は、上記濃度のG-CSF及びIL-6に加えて、MCP-1を少なくとも6000pg/mL、VEGF-Cを少なくとも150pg/mL、TGF- β 1を少なくとも670pg/mL、IL-7を少なくとも3.5pg/mL、又はIL-8を少なくとも6500pg/mL含んでもよい。この培養上清を利用すれば、高濃度のG-CSF、IL-6、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-7、又はIL-8による効果が得られる。この培養上清は、MCP-1を、例えば、少なくとも6000、7000、8000、9000、又は10000pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、VEGF-Cを、例えば、少なくとも150、200、250、300、350、又は400pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、TGF- β 1を、例えば、少なくとも670、700、750、800、850、900、950、又は1000pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、IL-7を、例えば、少なくとも3.5、4、5、6、7、8、9、又は10pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、IL-8を、例えば、少なくとも6500、7000、8000、9000、10000、11000、12000、又は15000pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。これらのサイトカインの効果を高める観点からは、培養上清は上記7つのサイトカインを上記の濃度範囲で含有することが好ましい。さらに、上

記の培養上清は、M-CSFを、例えば、少なくとも1350、1370、1390、1400、1420、1440、1450、1470、1490、又は1500pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。さらに、上記の培養上清は、Osteoprotegerinを、例えば、少なくとも95、100、110、120、130、又は140pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。

[0075] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、培養上清は、G-CSFを少なくとも100pg/mL、IL-6を少なくとも550pg/mL、MCP-1を少なくとも6000pg/mL、VEGF-Cを少なくとも150pg/mL、TGF- β 1を少なくとも670pg/mL、IL-7を少なくとも3.5pg/mL、IL-8を少なくとも6500pg/mL、又はCD9/CD63融合蛋白質を少なくとも120pg/mL含んでもよい。この培養上清は、G-CSFを、例えば、少なくとも100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1250、1500、1600、1700、1800、1900、又は2000pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、IL-6を、例えば、少なくとも550、800、1000、2000、2500、2700、3000、3500、4000、4500、5000、6000、7000、8000、9000、10000、11000、又は12000pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、MCP-1を、例えば、少なくとも6000、7000、8000、9000、又は10000pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、VEGF-Cを、例えば、少なくとも150、200、250、300、350、又は400pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、TGF- β 1を、例えば、少なくとも670、700、750、800、850、900、950、又は1000pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、IL-7を、例えば、少なくとも3.5、4、5、6、7、8、9、又は10pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、IL-8を、例えば、少なくとも6500、7000、8000、9000、10000、11000、12000、又は15000pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、CD9/CD63融合蛋白質を、例えば、少なくとも120、140、160、180、200、250、又は300pg/mL含んでもよく、それら

のいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。さらに、上記の培養上清は、M-CSFを、例えば、少なくとも1350、1370、1390、1400、1420、1440、1450、1470、1490、又は1500pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。さらに、上記の培養上清は、Osteoprotegrinを、例えば、少なくとも95、100、110、120、130、又は140pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。

[0076] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、培養上清は、M-CSFを少なくとも1350pg/mL又はOsteoprotegrinを少なくとも95pg/mL含んでもよい。この培養上清を利用すれば、高濃度のM-CSF又はOsteoprotegrinによる効果が得られる。この培養上清は、M-CSFを、例えば、1350～1500、1350～1450、1350～1420、1350～1400pg/mL含んでもよい。この濃度は、例えば、少なくとも1350、1370、1390、1400、1420、1440、1450、1470、1490、又は1500pg/mLであってもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この培養上清は、Osteoprotegrinを、例えば、95～140、95～130、95～120、又は95～110pg/mL含んでもよい。この濃度は、例えば、少なくとも95、100、110、120、130、又は140pg/mLであってもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この培養上清は、上記濃度のM-CSF及びOsteoprotegrinに加えて、G-CSFを少なくとも500pg/mL、IL-6を少なくとも2700pg/mL、MCP-1を少なくとも6000pg/mL、VEGF-Cを少なくとも150pg/mL、TGF- β 1を少なくとも670pg/mL、IL-7を少なくとも3.5pg/mL、又はIL-8を少なくとも6500pg/mL含んでもよい。この培養上清を利用すれば、高濃度のM-CSF、Osteoprotegrin、G-CSF、IL-6、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-7、又はIL-8による効果が得られる。また別の実施形態では、この培養上清は、G-CSFを、例えば、少なくとも100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1250、1500、1600、1700、1800、1900、又は2000pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、IL-6を、例えば、少なくとも550、800、1000、2000、2500、2700、3000、3500、4000、4500、5000、6000、7000、8000、9000、10000、11000、又は12000pg/mL含んでもよく、それらのい

いずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、MCP-1を、例えば、少なくとも6000、7000、8000、9000、又は10000pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、VEGF-Cを、例えば、少なくとも150、200、250、300、350、又は400pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、TGF- β 1を、例えば、670、700、750、800、850、900、950、又は1000pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、IL-7を、例えば、少なくとも3.5、4、5、6、7、8、9、又は10pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。この培養上清は、IL-8を、例えば、少なくとも6500、7000、8000、9000、10000、11000、12000、又は15000pg/mL含んでもよく、それらのいずれか2つの値の範囲内含んでもよい。

[0077] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、培地は、細胞の培養のために用いられる培地を含む。培地は、液体培地又は固体培地であってもよい。培地は、培養液を含む。培地は、一般的な任意の細胞培養培地を用いてもよく、組成は限定されない。培地は、例えば、アミノ酸、無機塩、ビタミン、ミネラル、又は炭素源（例えば、グルコース）を含んでもよい。培地には、例えば、血清培地（例えばFBS等）、基礎培地（MEM等）、複合培地、無血清培地等を使用してもよい。培地は、ヒトMSCの増殖用培地として市販されているものを使用してもよい。メーカーから入手可能な細胞培養用基本培地として、例えば、MEM（例えばThermo Fisher Scientific Inc.）、DMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium）（例えばSigma-Aldrich）、IMDM（例えばSigma-Aldrich）、Ham's F-12（例えば富士フイルム和光純薬(株)）、DMEM/F12（例えばSigma-Aldrich）、RPMI1640（例えばナカライテスク）等がある。培地は、例えば、DMEM/F12培地にアミノ酸を添加したものを使用することができる。添加されるアミノ酸としては、市販の培地添加用アミノ酸溶液、例えばMEM必須アミノ酸溶液（富士フイルム和光純薬株式会社）、MEM非必須アミノ酸溶液（富士フイルム和光純薬株式会社）を使用することができる。このDMEM/F12培地ベースの培地は、異種由来成分、サイトカイン、イ

ンスリン、蛋白質、ヒト血清のいずれも含まない。培養細胞や培養上清が再生医療や治療用途に利用されることを考えると、培地は、血清フリー、血清アルブミンフリー、インスリンフリー、IGFフリー、FGFフリー、成長因子フリー、サイトカインフリー、蛋白質フリー、又は異種由来成分を含まない（ゼノフリー）タイプの培地であることが望ましい。この場合、培養細胞由来成分以外の外来の活性成分が患者体内に入るリスクを排除できる利点がある。培地は、例えば、LIF成分、接着分子、FGF成分、インスリン成分、アルブミン成分、又はトランスフェリン成分を含んでもよい。MSCの細胞増殖を特に促進する観点からは、培地はLIF成分を含有することが好ましい。MSCの細胞増殖を特に促進する観点からは、培地は接着分子をさらに含有することが好ましい。

[0078] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、LIFは、例えば、leukemia inhibitory factor（白血病阻止因子）とも表記される成分を含む。LIFのアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているLIFのPrimary accession numberは、例えば、P15018である。LIFのアミノ酸配列は、例えば、配列番号4又は5で示されるアミノ酸配列であってもよい。LIFは、例えば、ヒト由来のLIFを含む。本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、LIF成分は、LIF活性を有し、且つ野生型ヒトLIFに由来する分子を含む。LIF成分は、例えば、(a)配列番号4又は5で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質又はその生物活性断片、(b)配列番号4又は5で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する蛋白質又はその生物活性断片、又は(c)配列番号4又は5で示されるアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を有する蛋白質又はその生物活性断片であってもよい。LIF活性は、例えば、LIFシグナル伝達を促す活性、LIF受容体への結合活性、又は白血病細胞の増殖を阻害する活性を含む。生物活性断片は、例えば、LIF活性に関与しないLIFの一部が欠失した、LIF活性を有するポリペプチドを含む。LIF成分は、N又はC末端に任意にタグ（例えばMishra,

Curr Protein Pept Sci. 2020;21(8):821-830参照) を有していてもよい。タグは、例えば、精製タグであってもよい。精製タグは、例えば、ペプチドタグ (例えばHisタグ) であってもよい。精製タグは、例えば、生化学的に不活性なタグを含む。培地中のLIF成分濃度は、例えば、0.01ng/mL以上であってもよい。この濃度は、例えば、0.01、0.05、0.1、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5、8、又は10ng/mLであってもよく、それらいずれかの値以上、又はそれらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この濃度は、例えば、0.1~4、0.1~3、0.5~2、又は0.8~1.2ng/mlであってもよい。MSCの増殖促進の観点からは、0.1ng/ml以上が好ましく、0.5ng/ml以上がより好ましく、0.8ng/ml以上がさらに好ましい。

[0079] 本発明の実施形態 (例えば上記(1)~(41)を含む) において、FGFは、例えば、Fibroblast growth factor (線維芽細胞増殖因子) とも表記される成分を含む。FGFは、例えば、bFGFを含む。bFGFは、basic fibroblast growth factor (塩基性線維芽細胞成長因子) とも表記される成分を含む。bFGFのアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているbFGFのPrimary accession numberは、例えば、P09038である。bFGFのアミノ酸配列は、例えば、配列番号6、7又は8で示されるアミノ酸配列であってもよい。bFGFは、例えば、ヒト由来のbFGFを含む。本発明の実施形態 (例えば上記(1)~(41)を含む) において、bFGF成分は、bFGF活性を有し、且つ野生型ヒトbFGFに由来する分子を含む。bFGF成分は、例えば、(a) 配列番号6、7又は8で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質又はその生物活性断片、(b) 配列番号6、7又は8で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する蛋白質又はその生物活性断片、又は(c) 配列番号6、7又は8で示されるアミノ酸配列に対して1~数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を有する蛋白質又はその生物活性断片であってもよい。bFGF活性は、例えば、bFGFシグナル伝達を促す活性、bFGF受容体への結合活性、又は線維芽細胞の増殖を促進する活性を含む。生物活性断片は、例えば、bFGF活性に関与しないbFGFの一部が欠失した、bFG

F活性を有するポリペプチドを含む。FGF成分は、N又はC末端に任意にタグ（例えばMishra, Curr Protein Pept Sci. 2020;21(8):821-830参照）を有していてもよい。タグは、例えば、精製タグであってもよい。精製タグは、例えば、ペプチドタグ（例えばHisタグ）であってもよい。精製タグは、例えば、生化学的に不活性なタグを含む。培地中のbFGF成分濃度は、例えば、0.1ng/mL以上であってもよい。この濃度は、例えば、0.1、0.5、1、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、30、40、50、80、又は100ng/mLであってもよく、それらいずれかの値以上、又はそれらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この濃度は、例えば、1~40、1~30、5~20、又は8~12ng/mlであってもよい。MSCの増殖促進の観点からは、1ng/ml以上が好ましく、5ng/ml以上がより好ましく、8ng/ml以上がさらに好ましい。

[0080] 本発明の実施形態（例えば上記(1)~(41)を含む）において、インスリンは、ホルモンの一種を含む。インスリンのアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているインスリンのPrimary accession numberは、例えば、P01308である。ヒトインスリンのアミノ酸配列は、例えば、配列番号9で示されるアミノ酸配列を含む。インスリンは、例えば、ヒト由来のインスリンを含む。本発明の実施形態（例えば上記(1)~(41)を含む）において、インスリン成分は、インスリン活性を有し、且つ野生型ヒトインスリンに由来する分子を含む。インスリン成分は、例えば、(a)配列番号9で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質又はその生物活性断片、(b)配列番号9で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する蛋白質又はその生物活性断片、又は(c)配列番号9で示されるアミノ酸配列に対して1~数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を有する蛋白質又はその生物活性断片であってもよい。インスリン活性は、例えば、インスリンシグナル伝達を促す活性、又はインスリン受容体チロシンキナーゼを活性化する活性を含む。生物活性断片は、例えば、インスリン活性に関与しないインスリンの一部が欠失した、インスリン活性を有するポリペプチドを含む。インスリン成分は、N又はC

末端に任意にタグ（例えばMishra, Curr Protein Pept Sci. 2020;21(8):821-830参照）を有していてもよい。タグは、例えば、精製タグであってもよい。精製タグは、例えば、ペプチドタグ（例えばHisタグ）であってもよい。精製タグは、例えば、生化学的に不活性なタグを含む。培地中のインスリン成分濃度は、例えば、 $0.1\mu\text{g/mL}$ 以上であってもよい。この濃度は、例えば、0.1、0.5、1、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、30、40、50、80、又は $100\mu\text{g/mL}$ であってもよく、それらいずれかの値以上、又はそれらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この濃度は、例えば、1~40、1~30、5~20、又は8~ $12\mu\text{g/mL}$ であってもよい。MSCの増殖促進の観点からは、 $1\mu\text{g/mL}$ 以上が好ましく、 $5\mu\text{g/mL}$ 以上がより好ましく、 $8\mu\text{g/mL}$ 以上がさらに好ましい。

[0081] 本発明の実施形態（例えば上記(1)~(41)を含む）において、アルブミンは、血清中に多く存在する蛋白質の一種を含む。アルブミンのアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているアルブミンのPrimary accession numberは、例えば、Q56G89である。ヒトアルブミンのアミノ酸配列は、例えば、配列番号10で示されるアミノ酸配列を含む。アルブミンは、例えば、ヒト由来のアルブミンを含む。本発明の実施形態（例えば上記(1)~(41)を含む）において、アルブミン成分は、アルブミン活性を有し、且つ野生型ヒトアルブミンに由来する分子を含む。アルブミン成分は、例えば、(a)配列番号10で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質又はその生物活性断片、(b)配列番号10で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する蛋白質又はその生物活性断片、又は(c)配列番号10で示されるアミノ酸配列に対して1~数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を有する蛋白質又はその生物活性断片であってもよい。アルブミン活性は、例えば、血液の浸透圧調節活性、又は脂肪酸もしくはビリルビンへの結合活性を含む。生物活性断片は、例えば、アルブミン活性に関与しないアルブミンの一部が欠失した、アルブミン活性を有するポリペプチドを含む。アルブミン成分は、N又はC末

端に任意にタグ（例えばMishra, Curr Protein Pept Sci. 2020;21(8):821-830参照）を有していてもよい。タグは、例えば、精製タグであってもよい。精製タグは、例えば、ペプチドタグ（例えばHisタグ）であってもよい。精製タグは、例えば、生化学的に不活性なタグを含む。培地中のアルブミン成分濃度は、例えば、 $10\mu\text{g/mL}$ 以上であってもよい。この濃度は、例えば、10、50、100、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、2000、3000、4000、5000、8000、又は $10000\mu\text{g/mL}$ であってもよく、それらいずれかの値以上、又はそれらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この濃度は、例えば、 $100\sim 4000$ 、 $10\sim 3000$ 、 $500\sim 2000$ 、又は $800\sim 1200\text{ng/mL}$ であってもよい。MSCの増殖促進の観点からは、 $100\mu\text{g/mL}$ 以上が好ましく、 $500\mu\text{g/mL}$ 以上がより好ましく、 $800\mu\text{g/mL}$ 以上がさらに好ましい。

[0082] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、トランスフェリンは、血清中に存在する蛋白質の一種を含む。トランスフェリンのアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているトランスフェリンのPrimary accession numberは、例えば、P02787である。ヒトトランスフェリンのアミノ酸配列は、例えば、配列番号11で示されるアミノ酸配列を含む。トランスフェリンは、例えば、ヒト由来のトランスフェリンを含む。本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、トランスフェリン成分は、トランスフェリン活性を有し、且つ野生型ヒトトランスフェリンに由来する分子を含む。トランスフェリン成分は、例えば、(a)配列番号11で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質又はその生物活性断片、(b)配列番号11で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する蛋白質又はその生物活性断片、又は(c)配列番号11で示されるアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を有する蛋白質又はその生物活性断片であってもよい。トランスフェリン活性は、例えば、トランスフェリン受容体への結合活性、又は鉄イオンへの結合活性を含む。生物活性断片は、例えば、トランスフェリン活性に関与しないトランスフェリンの一部が欠失した

、トランスフェリン活性を有するポリペプチドを含む。トランスフェリン成分は、N又はC末端に任意にタグ（例えばMishra, Curr Protein Pept Sci, 2020;21(8):821-830参照）を有していてもよい。タグは、例えば、精製タグであってもよい。精製タグは、例えば、ペプチドタグ（例えばHisタグ）であってもよい。精製タグは、例えば、生化学的に不活性なタグを含む。培地中のトランスフェリン成分濃度は、例えば、 $0.1\mu\text{g/mL}$ 以上であってもよい。この濃度は、例えば、0.1、0.5、1、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、30、40、50、80、又は $100\mu\text{g/mL}$ であってもよく、それらいずれかの値以上、又はそれらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この濃度は、例えば、1~40、1~30、5~20、又は $8\sim 12\mu\text{g/mL}$ であってもよい。MSCの増殖促進の観点からは、 $1\mu\text{g/mL}$ 以上が好ましく、 $5\mu\text{g/mL}$ 以上がより好ましく、 $8\mu\text{g/mL}$ 以上がさらに好ましい。

[0083] 本発明の実施形態（例えば上記(1)~(41)を含む）において、培養に用いられる容器は、例えば、平底容器であってもよい。平底容器は、例えば、プレート型、シャーレ型、又はフラスコ型であってもよい。容器の底面、又は上面の形状は、四角型又は丸型の形状であってもよい。

[0084] 本発明の実施形態（例えば上記(1)~(41)を含む）において、培養上清を収容する容器は、医療用容器であってもよい。この容器は、例えば、シリンジ、バイアル、ボトル、又はバッグを含む。医療用容器は、無菌（例えば、溶液収容部が無菌）、点滴用、又は凍結保存用の容器であってもよい。医療用バッグは、ソフトバッグ、チューブを接続したバッグを含む。

[0085] 本発明の実施形態（例えば上記(1)~(41)を含む）において、回収する工程は、例えば、細胞画分と培養上清とを分離させる工程、又は培養上清を容器に移す工程を含んでもよい。分離させる工程は、例えば、MSC及びイミダゾールジペプチドを含む培地を遠心分離又はフィルターにかけ、細胞画分と培養上清とを分離させる工程を含んでもよい。回収する工程は、上清を遠心分離もしくはフィルターにかけ、死細胞もしくは不純物を上清から除く工程、上清を滅菌処理する工程、又は上清を医療用容器に移す工程を含んでもよい。

回収する工程は、細胞及び培地を含む組成物から、培地成分を除去する工程を含んでもよい。回収する工程は、無菌環境下で実施してもよい。

[0086] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）の方法は、回収した培養上清を滅菌処理し、滅菌処理された培養上清を生成する工程を含んでもよい。滅菌処理は、例えば、滅菌フィルターに培養上清を通す工程を含んでもよい。

[0087] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、接触させる工程は、MSCをイミダゾールジペプチド含有培地で培養することによって接触させることにより実施してもよい。接触させる工程は、*in vitro*又は*in vivo*で実施してもよい。

[0088] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、疾患の抑制は、疾患の治療を含む。抑制は、例えば、患者の疾患、もしくは疾患に伴う1つ以上の症状の、抑制効果、再発抑制効果、症状改善効果、又は予防効果を発揮しうることを含む。また抑制は、例えば、患者の骨化を抑制させる、骨芽細胞の生成を抑制させる、又は細胞の骨分化を抑制させる（例えば、MSCの骨芽細胞又は軟骨細胞への分化を抑制させる）ことを含む。

[0089] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、医薬組成物は、培養上清又は培養したMSCを含んでもよい。医薬組成物が培養上清を含む場合、医薬組成物は培養上清からなる組成物を含む。医薬組成物は、例えば、サイトカイン又はエクソソームを含んでもよい。このとき、サイトカイン及びエクソソームマーカの濃度は、上記の培養上清の実施形態において説明した濃度範囲であってもよい。医薬組成物は、例えば、イミダゾールジペプチドを含んでもよい。イミダゾールジペプチドの濃度は、上記の培地の実施形態において説明した濃度範囲であってもよい。医薬組成物は、上記の疾患の抑制又は改善のために使用される組成物又は、上記の疾患発症の予防のために使用される組成物を含む。医薬組成物は、例えば、有効成分と薬学的に許容される1つ以上の担体とを混合し、製剤学の技術分野において知られる任意の方法により製造してもよい。また医薬組成物は、治療のために用いられ

る物であれば使用形態は限定されず、有効成分単独であってもよいし、有効成分と任意の成分との混合物であってもよい。また上記担体の形状は特に限定されず、例えば、固体又は液体（例えば、緩衝液）であってもよい。上記担体の含有量は、例えば、製剤学上有効量であってもよい。有効量は、例えば、有効成分の製剤学的な安定性又は送達のために十分量であってもよい。例えば、緩衝液は、容器中における有効成分の安定化に有効である。また医薬組成物は、安定剤、緩衝剤、又はpH調整剤を含んでもよい。投与量、投与間隔、投与方法、投与経路は、特に限定されず、患者の年齢や体重、症状、対象臓器等により、適宜選択できる。また医薬組成物は、治療上有効量、又は所望の作用を発揮する有効量の有効成分を含むことが好ましい。本発明の一実施形態において治療上有効量は、患者における症状の改善又は抑制が臨床的に観察されるために必要な量（例えば、対象の骨分化抑制（例えば異所性骨化抑制）に十分な量）を含む。本発明の一実施形態において薬学的に許容されるとは、妥当な医学的判断の範囲内で、合理的なベネフィット/リスク比に見合って使用するのに適した状態を含む。医薬組成物中の培養上清又はMSC以外の成分としては、本発明の効果を損なわない限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0090] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、対象（患者を含む）は、ヒト又はヒトを除く哺乳動物（例えば、マウス、モルモット、ハムスター、ラット、ネズミ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、マーモセット、サル、又はチンパンジー等の1種以上）を含む。また患者は、骨分化の抑制を必要としている患者、骨化を発症していると診断された患者、又は骨化の治療を必要としている患者、又はG-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームマーカーの発現上昇を必要としている患者であってもよい。

[0091] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、対象への培養上清、MSC、又は医薬組成物の投与経路は、治療に際して効果的なものを使用

するのが好ましく、例えば、静脈内、動脈内、皮下、リンパ節内、筋肉内、腹腔内、又は経口等であってもよい。投与形態は、治療に際して効果的なものを使用するのが好ましく、例えば、注射剤（例えば静脈内注射）、液剤、又は固形製剤であってもよい。

[0092] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、対象への培養上清、MSC、又は医薬組成物の投与量、投与間隔、投与方法は、患者の年齢や体重、症状、対象臓器等により、適宜選択できる。投与量は、例えば、上清の場合は0.01～1000mLであってもよく、細胞の場合は1回あたり $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{11}$ であってもよい。投与間隔は、例えば、1～28日又は1～4週毎に1又は2回投与してもよい。

[0093] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、骨芽細胞の生成抑制は、例えば、MSCの骨芽細胞への分化抑制によって生じる抑制、又は骨芽細胞の増殖抑制によって生じる抑制を含む。例えば、MSCとイミダゾールジペプチドとが接触することによって、MSCの骨芽細胞への分化抑制が生じてもよい。

[0094] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、骨芽細胞の生成抑制方法は、例えば、MSCをイミダゾールジペプチドを含む培地で培養し、MSC分泌物を回収する工程、及び前記MSC分泌物を別のMSCと接触させる工程、を含んでもよい。このとき、培養時のMSCと接触時のMSCは異なるMSCである。

[0095] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、MSC分泌物は、例えば、G-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP 2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームを含む。これらはヒト由来であってもよい。

[0096] 本発明の実施形態（例えば上記(1)～(41)を含む）において、組成物又は細胞集団が上記(26)～(28)又は(38)の細胞を含む割合は、例えば、30、40、50、60、70、80、90、95、98、99、もしくは100%であってもよく、それらの値以上、又はそれらのいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この割合は、

例えば、30～100%、60～100%、80～100%、60～90%、80～90%、又は90～100%であってもよい。

[0097] 本発明の一実施形態において、上記相同性(%)は、例えば、複数のアミノ酸配列間で相同なアミノ酸数の割合を、当該技術分野で公知の方法に従って算定してもよい。割合を算定する前には、比較する配列群を整列させ、相同/同一アミノ酸の割合を最大にするために必要である場合は配列の一部に間隙を導入する。整列方法、割合の算定方法、及びそれらに関連するコンピュータプログラムは、当該技術分野で従来からよく知られている。相同性は、例えば、グローバル又はローカルアライメントを使用して計算される。前者はNeedleman-Wunschアルゴリズム (Needleman et al., J Mol Biol. 1970 Mar;48(3):443-53.) で求めてもよく、EMBOSS Needle (Rice et al., EMBOSS User's Guide: Practical Bioinformatics, 25 July 2011.) を使用して計算してもよい。EMBOSS Needleのデフォルト設定は、例えば、MATRIX: BLOSUM62, Gap Open Penalty: 10, Gap Extend Penalty: 0.5, Output formats: pair, End Gap Penalty: false, End Gap Open Penalty: 10, End Gap Extend Penalty: 0.5を含んでもよい。後者はBLASTアルゴリズム (Altschul et al., J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-10.) で求めてもよく、blastp (The BLAST Sequence Analysis Tool. The NCBI Handbook, 2nd edition. March 15, 2013.) を使用して計算してもよい。blastpのデフォルト設定は、例えば、MATRIX: BLOSUM62, Gap Open Penalty: 11, Extension: 1, Compositional adjustments: Conditional compositional score matrix adjustmentを含んでもよい。相同性は、 $(\text{相同なアミノ酸数} / \text{比較元のアミノ酸配列のアミノ酸数}) \times 100$ で表してもよい。相同性は、好ましくは、グローバルアライメントを使用して計算される。特に指定されない場合、検査対象の相同性が特定の値以上であることは、上記のアルゴリズムの少なくとも1つによって特定の値以上の値が算出されることを含む。上記のアルゴリズムは、いずれもデフォルト設定で使用し得る。

[0098] 本発明の一実施形態において、相同性の値として記載されている上記90%

以上は、例えば、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100%であってもよく、それらいずれかの値以上、又はそれらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この割合は、機能的同等性をより維持する観点から95%以上が好ましく、97%以上がより好ましく、98%以上がさらに好ましく、99%以上が特に好ましい。本発明の一実施形態において、上記数個以内は、例えば、15、10、8、6、5、4、3、2、1、又は0個であってもよく、それらいずれかの値以下、又はそれらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この数は、機能的同等性をより維持する観点から15個以下が好ましく、10個以下がより好ましく、5個以下が特に好ましい。

[0099] 本発明の一実施形態において、元の配列に対して置換が生じる場合、保存的アミノ酸置換（例えば、French et al., J Mol Evol (1983) 19, 171-175 参照）が好ましい。本発明の一実施形態において、保存的アミノ酸置換は、あるアミノ酸残基を、同様の性質の側鎖を有するアミノ酸残基に置換することを含む。アミノ酸残基はその側鎖によって、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパルギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン）のように、いくつかのファミリーに分類されている。保存的アミノ酸置換は、好ましくは、同一のファミリー内のアミノ酸残基間の置換である。

[0100] 本発明の一実施形態において、上記アミノ酸は、アミノ基とカルボキシル基を持つ有機化合物の総称である。本発明の実施形態に係る蛋白質が「特定のアミノ酸配列」を含むとき、そのアミノ酸配列中のいずれかのアミノ酸が化学修飾を受けていてもよい。また、そのアミノ酸配列中のいずれかのアミノ酸が塩、又は溶媒和物を形成していてもよい。また、そのアミノ酸配列中

のいずれかのアミノ酸がL型、又はD型であってもよい。それらのような場合でも、本発明の実施形態に係る蛋白質は、上記「特定のアミノ酸配列」を含むといえる。蛋白質に含まれるアミノ酸が生体内で受ける化学修飾としては、例えば、N末端修飾（例えば、アセチル化、ミリスチル化等）、C末端修飾（例えば、アミド化、グリコシルホスファチジルイノシトール付加等）、又は側鎖修飾（例えば、リン酸化、糖鎖付加等）等が挙げられる。

[0101] 本発明の一実施形態において有意性は、例えば、統計学的有意差をスチューデントのt検定（片側又は両側）を使用し、 $p < 0.05$ 又は $p < 0.01$ のときに有意であると評価してもよい。又は、実質的に差異が生じているときに有意であると評価してもよい。

[0102] 本明細書において引用しているあらゆる刊行物は、その全体を参照により援用する。本明細書において「又は」は、文章中に列挙されている事項の「少なくとも1つ以上」を採用できるときに使用される。「もしくは」も同様である。本明細書において「2つの値の範囲内」と明記した場合、その範囲には2つの値自体も含む。本明細書において「A～B」は、A及びBを含む。本明細書において「上記(1)～(41)」は、(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)、(16)、(17)、(18)、(19)、(20)、(21)、(22)、(23)、(24)、(25)、(26)、(27)、(28)、(29)、(30)、(31)、(32)、(33)、(34)、(35)、(36)、(37)、(38)、(39)、(40)又は(41)のいずれか1つ以上への言及を含む。

[0103] 本発明の一実施形態は、例えば、以下の実施形態を含んでもよい。

1. 間葉系幹細胞及びイミダゾールジペプチドを含む培地から培養上清を回収する工程を含む、培養上清の生産方法。
2. 前記間葉系幹細胞は、イミダゾールジペプチドを含む培地で培養された間葉系幹細胞である、上記1に記載の生産方法。
3. 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養し、培養された間葉系幹細胞を生成する工程を含む、上記1又は2に記載の生産方法。
4. 前記回収する工程は、間葉系幹細胞及びイミダゾールジペプチドを含む培

地を遠心分離又はフィルターにかける工程を含む、上記1～3いずれかに記載の生産方法。

5. 回収した前記培養上清を滅菌処理し、滅菌処理された培養上清を生成する工程を含む、上記1～4いずれかに記載の生産方法。

6. 前記培養上清は、接着培養で得られた培養上清である、上記1～5いずれかに記載の生産方法。

7. 前記培養上清は、G-CSFを少なくとも500pg/mL又はIL-6を少なくとも2700pg/mL含む、上記1～6いずれかに記載の生産方法。

8. 前記培養上清は、G-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、及びエクソソームを含む、上記1～7いずれかに記載の生産方法。

9. 前記イミダゾールジペプチドは、前述の式(1)又は(2)の構造を有する化合物である、上記1～8いずれかに記載の生産方法。

10. 前記イミダゾールジペプチドは、カルノシン、アンセリン、バレニン、又はホモカルノシンである、上記1～9いずれかに記載の生産方法。

11. 前記イミダゾールジペプチドは、カルノシンである、上記1～10いずれかに記載の生産方法。

12. 前記イミダゾールジペプチドは、アンセリンである、上記1～10いずれかに記載の生産方法。

13. 上記1～12いずれかに記載の生産方法で得られた、培養上清。

14. 上記1～12いずれかに記載の生産方法で得られた、培養上清を含む、医薬組成物。

15. 骨分化抑制用の、上記13に記載の培養上清又は上記14に記載の医薬組成物。

16. 上記13に記載の培養上清又は上記14もしくは15に記載の医薬組成物を含む、シリンジ、バイアル、又は医療用バッグ。

17. 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む血清フリーの培地で培養し、培養細胞を生成する工程を含む、細胞の培養方法。

18. 前記培地から前記培養細胞を回収する工程を含む、上記17に記載の培養

方法。

19. 前記培養は、接着因子の存在下で培養する工程を含む、上記17又は18に記載の培養方法。

20. 前記培地はインスリンフリー、IGFフリー、又はFGFフリーの培地である、上記17～19いずれかに記載の培養方法。

21. 前記培地は成長因子フリーの培地である、上記17～19いずれかに記載の培養方法。

22. 前記培地は蛋白質フリーの培地である、上記17～19いずれかに記載の培養方法。

23. 上記17～22いずれかに記載の培養方法を実施する工程を含む、細胞の生産方法。

24. 上記23に記載の生産方法で得られた、細胞。

25. 上記24に記載の細胞の細胞集団を含む組成物。

26. 上記23に記載の生産方法で得られた細胞を含む、医薬組成物。

27. 骨分化抑制用の、上記26に記載の医薬組成物。

28. 間葉系幹細胞培養用の培地であって、イミダゾールジペプチドを含み、血清フリーである、培地。

29. インスリンフリー、IGFフリー、又はFGFフリーの培地である、上記28に記載の培地。

30. 成長因子フリーである、上記28又は29に記載の培地。

31. 蛋白質フリーである、上記28～30いずれかに記載の培地。

32. 間葉系幹細胞を含む、上記28～31いずれかに記載の培地。

33. 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養する工程を含む、骨芽細胞の生成抑制方法。

34. 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清と、間葉系幹細胞とを接触させる工程を含む、骨芽細胞の生成抑制方法。

35. イミダゾールジペプチドを含む、骨芽細胞の生成抑制用の組成物。

36. 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清を含む、骨芽細胞の生成抑制用の組成物。
37. 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養する工程を含む、G-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームマーカの発現促進方法。
38. イミダゾールジペプチドを含む、間葉系幹細胞のG-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームマーカの発現促進用の組成物。
39. 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養する工程を含む、エクソソームの分泌促進方法。
40. イミダゾールジペプチドを含む、間葉系幹細胞のエクソソームの分泌促進用の組成物。
41. G-CSFを少なくとも500pg/ml含む、間葉系幹細胞の培養上清。
42. IL-6を少なくとも2700pg/ml含む、間葉系幹細胞の培養上清。
43. G-CSF又はIL-6を高発現又は高分泌する、臍帯由来間葉系幹細胞。
44. 上記43に記載の細胞の細胞集団を含む組成物。
45. IL-34陽性の間葉系幹細胞。
46. 精製された、上記45に記載の間葉系幹細胞。
47. ADAM8陽性の間葉系幹細胞。
48. 精製された、上記47に記載の間葉系幹細胞。
49. Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、及びsemaphorin 3B陽性である、上記45～48いずれかに記載の間葉系幹細胞。
50. 精製された、上記49に記載の間葉系幹細胞。
51. 上記45～50いずれかに記載の間葉系幹細胞を含む、医薬組成物。
52. 骨分化抑制用の、上記51に記載の医薬組成物。

53. 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた細胞を含む、骨分化抑制用の医薬組成物。
54. 薬学的に許容される担体をさらに含む、上記53に記載の医薬組成物。
55. 前記細胞は、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、A DAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、及びsemaphorin 3B陽性である、上記53又は54に記載の医薬組成物。
56. 前記細胞は、イミダゾールジペプチド及びLIFを含む培地で培養して得られた細胞である、上記53～55いずれかに記載の医薬組成物。
57. 前記培養は、接着培養である、上記53～56いずれかに記載の医薬組成物。
58. 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養し、培養細胞を生成する工程を含む、骨分化抑制用の医薬組成物の生産方法。
59. 前記培地から前記培養細胞を回収する工程を含む、上記58に記載の生産方法。
60. 前記培養細胞と、薬学的に許容される担体を混合する工程を含む、上記58又は59に記載の生産方法。
61. イミダゾールジペプチド及びLIF (leukemia inhibitory factor) 成分を含む、培地。
62. 接着因子をさらに含む、上記61に記載の培地。
63. 間葉系幹細胞の培養用の、上記61又は62に記載の培地。
64. 間葉系幹細胞を含む、上記61～63いずれかに記載の培地。
65. 間葉系幹細胞を上記61～64いずれかに記載の培地で培養し、培養細胞を生成する工程を含む、細胞の生産方法。
66. 前記培養は、接着培養である。上記65に記載の生産方法。
67. 上記65又は66に記載の生産方法で得られた、細胞。
68. 上記67に記載の細胞の細胞集団を含む組成物。
69. 上記65又は66に記載の生産方法で得られた細胞を含む、医薬組成物。
70. 骨分化抑制用の、上記69に記載の医薬組成物。

71. イミダゾールジペプチド及びLIF成分を含む、キット。

72. 間葉系幹細胞の培養用の培地調製に使用するための、上記71に記載のキット。

[0104] 以上、本発明の実施形態について述べたが、これらは本発明に含まれ得る形態の例示であり、本発明はこれらに限定されるものではなく、上記以外の様々な構成を採用することもできる。また本発明は、上記実施形態に記載の各構成又は特徴を組み合わせ、又は独立して採用することもできる。

実施例

[0105] 以下、実施例によりさらに説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0106] 実施例1：培養上清の解析

1.1 実験方法：イミダゾールジペプチド含有培地を用いたMSCの培養及び培養上清回収

本実験ではイミダゾールジペプチドとしてカルノシンを使用した。実験手順は以下の通りである。ヒト臍帯由来間葉系幹細胞を 0.3×10^5 の細胞数で、MSC Expansion XSFM B（富士フイルム和光純薬株式会社）（以下、MSC培地Bともいう）20mlに懸濁した。細胞懸濁液20mlにiMatrix-511ラミニンフラグメント（ $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）（株式会社ニッピ）を $10 \mu\text{l}$ 添加し、得られた細胞懸濁液をT150フラスコ（住友ベークライト株式会社）に播種した。

[0107] 播種から7日後に、iMatrix-511ラミニンフラグメント（ $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）（株式会社ニッピ）を $5 \mu\text{l}$ 添加した10ml MSC培地Bを追加した。播種から14日後（day14）に、培地をPBSで2回置換して残存培地を洗浄した。その後、DMEM/F12培地をベースにアミノ酸を追加した蛋白質不含培地（以下、MSC培地Aともいう）を30ml添加した（以下、MSC培地Aで置換時は30mlを使用）。ここで追加されたアミノ酸は、MEM必須アミノ酸溶液（富士フイルム和光純薬株式会社）及びMEM非必須アミノ酸溶液（富士フイルム和光純薬株式会社）である。またこのとき、MSC培地AにイミダゾールジペプチドであるL-カルノシン（富士フイルム和光純薬株式会社）を無添加（0mM）、又は1mM、10mM、もしくは30mM添

加となるように添加した。これらのカルノシンを添加したMSC培地Aを細胞に添加して、3日間培養（生産培養）を行った。この培養を「1回目の生産培養」と表す。

[0108] 1回目の生産培養後に、MSC培地Aの培養上清を回収した。培養上清に含まれるサイトカインの量を、ELISA解析キット（R&D Systems社）又はMilliplexキット（Merck Millipore社）を用いて解析した。サイトカインとして、HGF（Hepatocyte growth factor）、G-CSF（Granulocyte colony stimulating factor）、MCP-1（Monocyte chemotactic protein 1）、VEGF-C（Vascular endothelial growth factor-C）、TGF- β 1（Transforming growth factor- β 1）、IL-6（Interleukin-6）、IL-7（Interleukin-7）、及びIL-8（Interleukin-8）を解析した。また、培養上清に含まれるエクソソームの量を、CD9/CD63 ELISAキット（コスモバイオ）を用いて、エクソソームマーカー蛋白質（CD9/CD63融合蛋白質）を指標として解析した。本実施例において、サイトカインの量、エクソソームマーカータンパク質の量は、特異的な抗体を用いてELISA法により測定される値を指す。

[0109] 1回目の生産培養後に、MSC培地Bに戻して2日間培養（回復培養）を行った。2日間の回復培養後に、再び上記と同様にカルノシンを添加したMSC培地Aに置換し、3日間培養を行った（カルノシン濃度は1回目の生産培養と同じ）。この培養を「2回目の生産培養」と表す。

[0110] 2回目の生産培養後に、カルノシンを添加したMSC培地Aの培養上清を回収した。培養上清に含まれるサイトカインを、ELISA解析キット（R&D Systems社）を用いて解析した。

[0111] 2回目の生産培養後に、MSC培地Bに戻して2日間培養（回復培養）を行った。2日間の回復培養後に、再び上記と同様にカルノシンを添加したMSC培地Aに置換し、3日間培養を行った（カルノシン濃度は1回目の生産培養と同じ）。この培養を「3回目の生産培養」と表す。

[0112] 3回目の生産培養後に、カルノシンを添加したMSC培地Aの培養上清を回収した。培養上清に含まれるサイトカインを、ELISA解析キット（R&D Systems社

）を用いて解析した。

[0113] 3回目の生産培養後に、MSC培地Bに戻して2日間培養（回復培養）を行った。2日間の回復培養後に、再び上記と同様にカルノシンを添加したMSC培地Aに置換し、3日間培養を行った（カルノシン濃度は1回目の生産培養と同じ）。この培養を「4回目の生産培養」と表す。

[0114] 4回目の生産培養後に、カルノシンを添加したMSC培地Aの培養上清を回収した。培養上清に含まれるサイトカインを、ELISA解析キット（R&D Systems社）を用いて解析した。

[0115] 以上述べた通り、計4回の生産培養を行い、カルノシンを各濃度で添加したMSC培地Aについて、計4回の培養上清回収とサイトカイン解析を行った。また、4回目の培養上清回収の後、細胞の形態を観察した。さらに、4回目の培養上清回収の後、TrypLE™ Select（Thermo Fisher Scientific）で20分間細胞を酵素処理し、細胞を分散させた後、細胞数のカウントを行った。これらの実験の結果を以下に記載する。

[0116] 1.2 細胞の形態観察

図1～4は、カルノシン含有培地又は非含有培地で培養した後のMSCの顕微鏡写真である。細胞死が多く見られることはなく、各カルノシン濃度で細胞の形態に明らかな差はみられなかった。

[0117] 1.3 細胞数のカウント

図5は、カルノシン含有培地又は非含有培地で培養した後のMSCの細胞数のカウント結果である。カルノシンを培地に添加したことで、大幅な細胞数の変化は見られなかった。

[0118] 1.4 エクソソームマーカ量

図6は、培養上清中のエクソソームマーカの量を調べた結果を示す。カルノシンを培地に添加したことで、エクソソームマーカが増加傾向を示した。

[0119] 1.5 サイトカイン量

図7～14は、培養上清中のHGF（HGF、3082）、G-CSF（CSF3、1440）、MCP-1

(CCL2、6347)、VEGF-C (VEGFC、7424)、TGF- β 1 (TGFB1、7040)、IL-6 (IL6、3569)、IL-7 (IL7、3574)、IL-8 (CXCL8、3576) の量を調べた結果を示す。カルノシンを培地に添加したことで、HGFの量はほとんど変化しなかった。一方で、G-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8は増加傾向を示した（各括弧内はNCBIのOfficial Symbol及びGene IDを意味する）。特に、G-CSF、IL-6の増加率が顕著であった。4回目の培養上清回収時と比較すると、カルノシン10mM添加時のG-CSF濃度は14.7倍（約1621pg/mL）、IL-6濃度は22倍以上（7000pg/mL以上）に増加していた。

[0120] また上記の実験方法のうち、臍帯由来MSCを脂肪由来MSCに代えて培養を行った。その後、培養上清中のG-CSF、MCP-1量を測定した。その結果、カルノシンを培地に添加したことで、いずれの量も増加していた。

[0121] 実施例2：培養上清の骨分化抑制効果

2.1 実験方法

2.1.1 イミダゾールジペプチド含有培地を用いたMSCの培養及び培養上清回収

本願発明者が樹立したヒト臍帯由来間葉系幹細胞（CET03株）を用いて、前述の実施例1の3回目の生産培養までの実験方法に従って、培養上清の回収を行った。但しこのとき、実施例1で使用したMSC培地Aを、DMEM(Sigma)、DMEM/F12(Sigma)、又はIMDM(Sigma)で置き換えた条件で実施した。また、カルノシンの添加濃度は0又は10mMに変えて実施した。その結果、1回目、2回目、3回目の生産培養上清を得た。さらに、1～3回目の生産培養上清を等量混合し、臍帯MSC上清を得た。得られた6種の臍帯MSC上清を、DMEM_上清、DMEM_C_上清、DMEM/F12_上清、DMEM/F12_C_上清、IMDM_上清、及びIMDM_C_上清と表す（これらの上清名は、左側に使用した培地名が記載されている。カルノシン添加条件で得られた上清には、培地名の右にCと記載されている。）。

[0122] 2.1.2 MSC骨分化誘導とカルシウム沈着解析

手順1。ヒト骨髄MSC（初代培養されたヒト骨髄MSC）を10%FBS(Hyclone)を含む α MEM培地で培養し、トリプシンEDTA溶液で処理後シングルセル化した。

得られたシングルセルを、10%FBSを含む基礎培地（0.6mM CaCl_2 を加えたDMEM（Sigma））で 8×10^4 cells/wellになるように、フィブロネクチンコートした24ウェルプレートに播種した。播種の翌日に、骨分化誘導成分（10%FBS、0.1 μM のデキサメタゾン、50 μM のアスコルビン酸、及び10mMの β -グリセロリン酸）、及び終濃度0又は10mMのカルノシンを添加した基礎培地（0.6mM CaCl_2 を加えたDMEM（Sigma））（以下、骨分化誘導培地ともいう）で培地交換した。この培地交換に使用した培地を用いて、2～3日ごとに培地交換を行い、細胞にカルシウムの沈着が見られるまで、10～14日間培養した。培養後の細胞について、カルシウムアッセイにより細胞内カルシウム沈着量を定量した。得られた細胞は、DMEM_培地_細胞、及びDMEM_C_培地_細胞と表す（これらの細胞名は、左側に使用した培地名が記載されている。カルノシン添加条件で得られた細胞には、培地名の右にCと記載されている。）。

[0123] 手順2。手順1について、基礎培地を、0.6mM CaCl_2 を加えたDMEM/F12（Sigma）に変えた条件で実施した。得られた細胞は、DMEM/F12_培地_細胞、及びDMEM/F12_C_培地_細胞と表す（これらの細胞名は、左側に使用した培地名が記載されている。カルノシン添加条件で得られた細胞には、培地名の右にCと記載されている。）。

[0124] 手順3。手順1について、基礎培地を、2mM L-glutaminを加えたIMDM（Sigma）に変えた条件で実施した。得られた細胞は、IMDM_培地_細胞、及びIMDM_C_培地_細胞と表す（これらの細胞名は、左側に使用した培地名が記載されている。カルノシン添加条件で得られた細胞には、培地名の右にCと記載されている。）。

また、手順3と同じ手順を別途実施し、骨分化誘導培養後の細胞について、アリザリンレッドS染色キット（コスモバイオ）でカルシウム沈着画像を撮影した。

[0125] 手順4。手順1について、骨分化誘導培地を、骨分化誘導のための成分（10% FBS、0.1 μM のデキサメタゾン、50 μM のアスコルビン酸、及び10mMの β -グリセロリン酸）を添加した、上記2.1.1で得られた臍帯MSC培養上清（DMEM_上清、又はDMEM_C_上清）に変えた条件で実施した。得られた細胞は、DMEM_上清_

細胞、及びDMEM_C_上清_細胞と表す（これらの細胞名は、左側に使用した培地名が記載されている。カルノシン添加条件で得られた細胞には、培地名の右にCと記載されている。）。

[0126] 手順5。手順2について、骨分化誘導培地を、骨分化誘導のための成分（10% FBS、 $0.1\mu\text{M}$ のデキサメタゾン、 $50\mu\text{M}$ のアスコルビン酸、及び 10mM の β -グリセロリン酸）を添加した、上記2.1.1で得られた臍帯MSC培養上清（DMEM/F12_上清、又はDMEM/F12_C_上清）に変えた条件で実施した。得られた細胞は、DMEM/F12_上清_細胞、及びDMEM/F12_C_上清_細胞と表す（これらの細胞名は、左側に使用した培地名が記載されている。カルノシン添加条件で得られた細胞には、培地名の右にCと記載されている。）。

[0127] 手順6。手順3について、骨分化誘導培地を、骨分化誘導のための成分（10% FBS、 $0.1\mu\text{M}$ のデキサメタゾン、 $50\mu\text{M}$ のアスコルビン酸、及び 10mM の β -グリセロリン酸）を添加した、上記2.1.1で得られた臍帯MSC培養上清（IMDM_上清、又はIMDM_C_上清）に変えた条件で実施した。得られた細胞は、IMDM_上清_細胞、及びIMDM_C_上清_細胞と表す（これらの細胞名は、左側に使用した培地名が記載されている。カルノシン添加条件で得られた細胞には、培地名の右にCと記載されている。）。また、手順6と同じ手順を別途実施し、骨分化誘導培養後の細胞について、アリザリンレッドS染色キット（コスモバイオ）でカルシウム沈着画像を撮影した。

[0128] 2.2 結果

図15は、骨髓MSCのカルシウム沈着量の定量結果を示す。図中の培地名は、使用した基礎培地の名前である。骨髓MSCの骨分化をカルシウム量で定量した結果、カルノシン無添加の培地を使用して得られた細胞（図中の培地_C_0mM。対応するサンプルはDMEM_培地_細胞、DMEM/F12_培地_細胞、及びIMDM_培地_細胞。）、及びカルノシン無添加の培地で培養して得られたMSCの上清を使用して得られた細胞（図中の上清_C_0mM。対応するサンプルはDMEM_上清_細胞、DMEM/F12_上清_細胞、及びIMDM_上清_細胞。）と比較して、カルノシン添加培地で培養して得られたMSCの上清を使用して得られた細胞（図中の上清

_C_10mM。対応するサンプルはDMEM_C_上清_細胞、DMEM/F12_C_上清_細胞、及びIMDM_C_上清_細胞)では、顕著にカルシウム量が少なかった。また、カルノシン添加培地を使用して得られた細胞(図中の培地_C_10mM。対応するサンプルはDMEM_C_培地_細胞、DMEM/F12_C_培地_細胞、及びIMDM_C_培地_細胞。)と比較しても、顕著にカルシウム量が少なかった。カルノシン添加培地で培養して得られたMSCの上清には、骨分化を顕著に抑制する効果が認められた。

[0129] 図16は、骨髓MSCのアリザリンレッドS染色画像である。骨分化誘導後の骨髓MSCをアリザリンレッドSで染色した結果、カルノシン無添加の培地を使用して得られた細胞(DMEM_培地_細胞)、及びカルノシン無添加の培地で培養して得られたMSCの上清を使用して得られた細胞(DMEM_上清_細胞)、並びにカルノシン添加培地を使用して得られた細胞(DMEM_C_培地_細胞)はそれぞれアリザリンレッドによる染色が認められた。一方で、カルノシン添加培地で培養して得られたMSCの上清を使用して得られた細胞(DMEM_C_上清_細胞)は、アリザリンレッドによる染色が見られなかった。カルノシン添加培地で培養して得られたMSCの上清には、骨分化を顕著に抑制する効果が認められた。

[0130] 実施例3: MSCの骨分化抑制効果

3.1 実験方法

3.1.1 イミダゾールジペプチド含有培地を用いた臍帯MSCの培養

本願発明者が樹立したヒト臍帯MSCを10ng/ml bFGF (ペプロテック, AF-100-18C)、10 μ g/mlインスリン (ナカライ, 12878-44)、1000 μ g/mlアルブミン (Sigma, A9511)、10 μ g/ml トランスフェリン (ナカライ, 12879-34)、1 ng/ml LIF (ペプロテック, AF-300-05)を含むDMEM/F12培地(以下、MSC培地Cともいう)で培養し、トリプシンEDTA溶液で処理後シングルセル化した。同じ培地にカルノシンを終濃度0又は5mM添加し、またiMatrix-511ラミニンフラグメント(株式会社ニッピ)を終濃度0.25 μ g/ml添加し、T25フラスコ(コーニング)に播種した。2週間培養した後、PBSで細胞を洗ってカルノシンを除

いた後、トリプシンEDTA溶液で処理後シングルセル化し、下記の骨髓MSCとの共培養に用いた。

[0131] 3.1.2 骨髓MSC及び臍帯MSCの共培養

骨髓MSC（初代培養されたヒト骨髓MSC）について、10%FBS(Hyclone)を含む α MEM培地で培養し、トリプシンEDTA溶液で処理後シングルセル化した。この骨髓MSCと、上記3.1.1のカルノシン0又は5mM添加培地で培養して得られた臍帯MSCを、それぞれ1:0、0:1、1:1、3:1の割合で混合した。さらに、それぞれのMSCを合わせた総細胞数が 8.0×10^4 /ウェルになるように、10%FBSの α MEM培地で24ウェルプレートに播種した。播種の翌日に、(1)骨分化誘導成分（ $0.1 \mu\text{M}$ のデキサメタゾン、 $50 \mu\text{M}$ のアスコルビン酸、及び 10 mM の β -グリセロリン酸）を添加した10%FBS α MEM培地、又は(2)骨分化誘導のための成分無しの10%FBS α MEM培地で、それぞれの共培養細胞条件のウェルを培地交換し、2～3日ごとに同じ培地で培地交換を継続し、9日間培養を行った。骨分化の評価は、カルシウムアッセイとアリザリンレッドS染色で行った。

[0132] 3.2 結果

図17は、骨髓MSC及び臍帯MSCの共培養時のカルシウム沈着量の定量結果を示す。骨髓MSC及び臍帯MSCの1:1共培養による骨分化条件（BM:UC(1:1)）では多くのカルシウムが沈着しているが、骨髓MSCとカルノシンでプレ培養した臍帯MSCとの1:1共培養による骨分化条件（BM:UC_preC(1:1)）では、カルシウムの沈着が顕著に抑えられている。カルノシンでプレ培養した臍帯MSCは、MSCの骨分化を抑制する効果があることが示された。プレ培養後にPBSで臍帯MSCを洗ってカルノシンを除いていること、骨分化誘導時の培地にカルノシンを添加していないことから、純粋に細胞（カルノシンでプレ培養した臍帯MSC）のみの効果が見られている。なお、図中の各用語の説明は以下の通りである。

BM：骨髓MSC 8×10^4 cells/wellを使用した非共培養条件。骨分化誘導成分有りの α MEM培地条件。

BM_NC：骨髓MSC 8×10^4 cells/wellを使用した非共培養条件。骨分化誘導成分無しの α MEM培地条件。

UC：カルノシン無添加のMSC培地Cで2週間プレ培養した臍帯MSC 8×10^4 cells/wellを使用した非共培養条件。骨分化誘導成分有りの α MEM培地条件。

UC_preC：5mMカルノシンを含むMSC培地Cで2週間プレ培養した臍帯MSC 8×10^4 cells/wellを使用した非共培養条件。骨分化誘導成分有りの α MEM培地条件。

BM:UC(1:1)：骨髓MSCと、カルノシン無添加のMSC培地Cで2週間プレ培養した臍帯MSCとを 4×10^4 cells/wellずつ混ぜて播種した共培養条件。骨分化誘導成分有りの α MEM培地条件。

BM:UC_preC(1:1)：骨髓MSCと、5mMカルノシンを含むCETオリジナル培地で2週間プレ培養した臍帯MSCとを 4×10^4 cells/wellずつ混ぜて播種した共培養条件。骨分化誘導成分有りの α MEM培地条件。

BM:UC(3:1)：骨髓MSC 6×10^4 cells/wellと、カルノシン無添加のMSC培地Cで2週間プレ培養した臍帯MSC 2×10^4 cells/wellとを混ぜて播種した共培養条件。骨分化誘導成分有りの α MEM培地条件。

BM:UC_preC(3:1)：骨髓MSC 6×10^4 cells/wellと、5mMカルノシンを含むCETオリジナル培地で2週間プレ培養した臍帯MSC 2×10^4 cells/wellとを混ぜて播種した共培養条件。骨分化誘導成分有りの α MEM培地条件。

[0133] 図18は、骨髓MSC及び臍帯MSCの共培養時のアリザリンレッドS染色画像である。骨髓MSC及び臍帯MSCの共培養による骨分化条件（BM:UC(1:1)）では多くのカルシウムが沈着しているが、骨髓MSCとカルノシンでプレ培養した臍帯MSCとの共培養による骨分化条件（BM:UC_preC(1:1)）では、カルシウムの沈着が顕著に抑えられている。カルノシンでプレ培養した臍帯MSCは、MSCの骨分化を抑制する効果があることが示された。

[0134] 実施例4：MSCの解析

4.1 実験方法

4.1.1 イミダゾールジペプチド含有培地を用いて培養したMSCのRNA回収

本願発明者が樹立したヒト臍帯由来間葉系幹細胞（CET03株）を用いて、前述の実施例1の3回目の生産培養までの実験方法に従って、培養上清の回収を

行った。但しこのとき、実施例1で使用した増殖用培地（MSC培地B）、上清回収用培地（MSC培地A）、カルノシン濃度、培養容器を図19に示すように変更して実施した。上清回収用培地は α MEM(Sigma)、DMEM(Sigma)、又はDMEM/F12(Sigma)を使用した。増殖用培地はMSC培地B、又はMSC培地C（組成は実施例3参照）を使用した。カルノシンの添加濃度は0mM、10、20又は30mMで実施した。その結果得られた1回目、2回目、3回目の生産培養上清をELISA試験に用いた。その後の細胞からRNAを抽出し、後述のRNAseq解析に用いた。

[0135] 4.1.2 RNAseq解析

上清回収後のday27で細胞を回収し、miRNeasy Mini Kit（キアゲン）を用いてRNAを回収しRNAseq解析に用いた。シークエンス解析機器にはNextSeq500（イルミナ社）を用いた。シークエンスリード長としては、シングルリード75bp、100万リード相当で解析を行った。解析プログラムはStrandNGS ver4.0（Strand Life Sciences Pvt Ltd社）を用いて、信頼性の低い塩基の除去後のfastq リードを用いて、ヒトリファレンスゲノムhg38にマッピングを行い、RPM発現量補正を行った。計19サンプルについて各遺伝子のRPM補正値を算出した。

[0136] 4.1.3 RNAseq解析による発現量増加遺伝子のリストアップ

カルノシン添加条件で得られた計13サンプルの細胞について、遺伝子発現の%インクリーズ値（カルノシン0mM条件時と、カルノシン10～30mM条件時との比較）の平均を求めた。カルノシン添加条件で得られた細胞の%インクリーズ平均値が高い遺伝子を上位からリストした。そのうち分泌蛋白質をコードする遺伝子の上位21種類について、以下の通りピックアップした。上位から順にgremlin 1, DAN family BMP antagonist, inhibin subunit beta E, thymic stromal lymphopoietin, hyaluronan and proteoglycan link protein 3、KIT ligand、R-spondin 2、semaphorin 3B、ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 13、fibroblast growth factor 11、TNF receptor superfamily member 11b、angiopoietin like 7、ADAM metalloproteinase domain 8、fibroblast growth factor binding protein 3、hyaluronan a

nd proteoglycan link protein 1、transforming growth factor beta regulator 4、interleukin 34、neurotrophin 3、insulin like growth factor binding protein 2、growth differentiation factor 6、amphiregulin、dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1。

[0137] 4.2 結果

RNAseq解析により、カルノシンにより発現量が増加した上位21種類の分泌蛋白質コード遺伝子がピックアップされた。このうち、以下の10種類は骨形成阻害に関与することが従来報告されている因子である。gremlin 1, DAN family BMP antagonist (GREM1、26585、Gremlin 1)、KIT ligand (KITLG、4254、SCF)、R-spondin 2 (RSP02、340419)、semaphorin 3B (SEMA3B、7869)、fibroblast growth factor 11 (FGF11、2256)、TNF receptor superfamily member 11b (TNFRSF11B、4982、Osteoprotegerin)、ADAM metalloproteinase domain 8 (ADAM8、101)、interleukin 34 (IL34、146433、IL-34)、insulin like growth factor binding protein 2 (IGFBP2、3485)、dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1 (DKK1、22943)。各括弧内はNCBIのOfficial Symbol及びGene ID、並びに別名を意味する。カルノシンにより発現が向上した分泌蛋白質のうち、骨形成阻害に関与する分泌蛋白質の割合が大きいこと、及びカルノシンにより多種類の骨形成阻害に関与する分泌蛋白質の発現が向上していることが示された。以上の結果から、カルノシン添加条件下で培養した臍帯MSCによって生じる骨分化抑制効果は、MSCからの分泌蛋白質によるパラクライン効果であることが示唆された。

[0138] 図20(a)～20(j)は、上記10種類の遺伝子の%インクリーズ値の変化を示した結果である。図20(a)～20(j)は、それぞれ順にgremlin 1, DAN family BMP antagonist、KIT ligand、R-spondin 2、semaphorin 3B、fibroblast growth factor 11、TNF receptor superfamily member 11b、ADAM metalloproteinase domain 8、interleukin 34、insulin like growth factor binding protein 2、dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1の結果である。図20～22はいずれも上清回収用培地にDMEM/F12(Sigma)、増殖用培地にMSC培地Bを使用

したときの結果である。図中の濃度は添加したカルノシン濃度である。図21は、臍帯MSCのinterleukin 34発現量のRPM値を示したグラフである。カルノシンを10mM、又は30mM添加した時にはinterleukin 34の発現が見られるが、添加無し（0mM）の場合は発現が見られなかった。図22は、臍帯MSCのADAM metalloproteinase domain 8発現量のRPM値を示したグラフである。カルノシンを10mM、20mM、又は30mM添加した時にはADAM metalloproteinase domain 8の発現が見られるが、添加無し（0mM）の場合は発現が見られなかった。

[0139] 実施例5：培養上清及びMSCの解析

5.1 イミダゾールジペプチド含有培地を用いたMSCの培養及び培養上清回収
本願発明者が樹立したヒト臍帯由来間葉系幹細胞（CET03株）を用いて、前述の実施例1の3回目の生産培養までの実験方法に従って、培養上清の回収を行った。但しこのとき、実施例1で使用したMSC培地Aを、 α MEM(Sigma)、DMEM(Sigma)、又はDMEM/F12(Sigma)で置き換えた条件で実施した。また、カルノシンの添加濃度は0又は30mMに変えて実施した（添加の際には蒸留水中500mMのカルノシン溶液を使用した。0mMの場合は同量の蒸留水を使用した。）。その結果、1回目、2回目、3回目の生産培養上清を得、ELISA試験に用いた。その後の細胞からRNAを抽出し、後述のRNAseq解析に用いた。

[0140] 5.2 ELISA解析

上記5.1で得た培養上清に含まれるサイトカインの量を、ELISA解析キット（R&D Systems社）を用いて解析した。サイトカインとして、Osteoprotegerin、M-CSF（CSF1、1435）を解析した。これら2種類のサイトカインは骨形成阻害に関与することが従来報告されている因子である。本実験において、サイトカインの量は、特異的な抗体を用いてELISA法により測定される値で示される。

[0141] 5.3 定量的PCR（qPCR）解析

上清回収後のday27で細胞を回収し、miRNeasy Mini Kit（キアゲン）を用いてRNAを回収し定量的PCR法（PowerUp SYBR Green Master Mix、サーモフィッシャー）を用いて、Osteoprotegerinの遺伝子であるTNFRSF11BとM-CSFの遺

伝子であるCSF1の発現量を、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子を内部標準として解析した。

[0142] 5.4 結果

図23～25は、OsteoprotegerinのELISA解析の結果であり、図26～28は、M-CSFのELISA解析の結果である。図中の濃度 (mM) はカルノシン濃度を意味する。上清回収用培地は、図23及び26は α MEM、図24及び27はDMEM、図25及び28はDMEM/F12を使用した。回収回数が1回目、2回目、3回目それぞれで、カルノシン添加により濃度依存的にOsteoprotegerin及びM-CSF分泌量が増加する傾向が見られた。図29は、OsteoprotegerinのqPCR解析の結果であり、図30は、M-CSFのqPCR解析の結果である。図中の濃度 (mM) はカルノシン濃度、培地名は使用した上清回収用培地を意味する。それぞれの条件で、カルノシン添加により濃度依存的にOsteoprotegerin及びM-CSF遺伝子発現量が増加する傾向が見られた。

[0143] 実施例6：培養上清及びMSCの解析

6.1 イミダゾールジペプチド含有培地を用いたMSCの培養及び培養上清回収

本願発明者が樹立したヒト臍帯由来間葉系幹細胞 (CET03株) 又はヒト骨髓由来間葉系幹細胞 (ATCC社) を用いて、前述の実施例1の3回目の生産培養までの実験方法に従って、培養上清の回収を行った。但しこのとき、増殖用培地 (実施例1はMSC培地B) は、MSC培地B、又はMSC培地C (組成は実施例3参照) を使用した。また、上清回収用培地 (実施例1はMSC培地A) は、DMEM/F12 (Sigma) を使用した。また、カルノシンの添加濃度は0、10、20、又は30mMに変えて実施した (添加の際には蒸留水中500mMのカルノシン溶液を使用した。0mMの場合は同量の蒸留水を使用した。)。また、カルノシンに変えて、イミダゾールジペプチドであるアンセリンを終濃度0、5、10、又は20mM添加して実施した。その結果、1回目、2回目、3回目の生産培養上清を得、ELISA試験に用いた。その後の細胞からRNAを抽出し、後述の定量的PCR試験に用いた。ELISA解析と定量的PCR試験の手順は実施例5と同様である。

[0144] 6.2 結果

図31は、OsteoprotegrinのELISA解析の結果である。図31(a)はカルノシン添加条件、図31(b)はアンセリン添加条件である。いずれも細胞は臍帯MSC、増殖用培地はMSC培地Bを使用した。回収回数が1回目、2回目それぞれで、カルノシン、又はアンセリン添加によりOsteoprotegrin分泌量が増加する傾向が見られた。

[0145] 図32～33は、OsteoprotegrinのqPCR解析の結果である。図32(a)～(c)はカルノシン添加条件、図33(a)～(c)はアンセリン添加条件である。各図中、UC_B_Cは、細胞に臍帯MSC、増殖用培地にMSC培地B、添加剤にカルノシンを使用したことを意味する。各図中、BM_B_Cは、細胞に骨髓MSC、増殖用培地にMSC培地B、添加剤にカルノシンを使用したことを意味する。各図中、BM_C_Cは、細胞に骨髓MSC、増殖用培地にMSC培地C、添加剤にカルノシンを使用したことを意味する。各図中、UC_B_Aは、細胞に臍帯MSC、増殖用培地にMSC培地B、添加剤にアンセリンを使用したことを意味する。各図中、BM_B_Aは、細胞に骨髓MSC、増殖用培地にMSC培地B、添加剤にアンセリンを使用したことを意味する。各図中、BM_C_Aは、細胞に骨髓MSC、増殖用培地にMSC培地C、添加剤にアンセリンを使用したことを意味する。それぞれの条件で、カルノシン、又はアンセリン添加によりOsteoprotegrin遺伝子発現量が増加する傾向が見られた。

[0146] 図34は、M-CSFのELISA解析の結果である。図34(a)はカルノシン添加条件、図34(b)はアンセリン添加条件である。いずれも細胞は臍帯MSC、増殖用培地はMSC培地Bを使用した。回収回数が1回目、2回目それぞれで、カルノシン、又はアンセリン添加によりM-CSF分泌量が増加する傾向が見られた。

[0147] 図35～36は、M-CSFのqPCR解析の結果である。図35(a)～(b)はカルノシン添加条件、図36(a)～(b)はアンセリン添加条件である。各図中、UC_B_Cは、細胞に臍帯MSC、増殖用培地にMSC培地B、添加剤にカルノシンを使用したことを意味する。各図中、BM_B_Cは、細胞に骨髓MSC、増殖用培地にMSC培地B、添加剤にカルノシンを使用したことを意味する。各図中、UC_B_Aは、細胞に臍帯MSC、増殖用培地にMSC培地B、添加剤にアンセリンを使用したことを意味する。

。各図中、BM_B_Aは、細胞に骨髓MSC、増殖用培地にMSC培地B、添加剤にアンセリンを使用したことを意味する。それぞれの条件で、カルノシン、又はアンセリン添加によりM-CSF遺伝子発現量が増加する傾向が見られた。

[0148] 実施例7：MSCの増殖促進効果

7.1 実験方法

7.1.1 MSC増殖培養

本願発明者が樹立したヒト臍帯由来間葉系幹細胞について、TrypLE Selectを用いて剥離し、24well plateに細胞数200又は2000 cells/cm²で播種した。培養液は（1）MSC Expansion XSFM B（富士フイルム和光純薬株式会社）（以下、MSC培地Bともいう）、（2）10ng/ml bFGF（ペプロテック）、10μg/mlインスリン（ナカライ）、1000μg/mlアルブミン（Sigma）、10ug/mlトランスフェリン（ナカライ）、1ng/ml LIF（ペプロテック）を含むDMEM/F12培地（以下、MSC培地Dともいう）、又は（3）MSC培地DからLIFを除いた培地（以下、MSC培地Eともいう）を用いた。また、それぞれの培地には、iMatrix-511ラミニンフラグメント（株式会社ニッピ）を最終濃度0又は0.1%、カルノシン又はアンセリンを最終濃度0、0.2、0.5、1、2、又は5mMとなるように添加し播種した。各サンプルについて、使用した培地と同じ培地で2～3日ごとに培地交換しながら、4～7日間培養した。その後、DAPI、ファロイジン、CD44抗体で染色し、共焦点定量イメージサイトメーターCellVoyager CQ-1（横川電機株式会社）を用いてそれぞれの蛍光画像を撮影し、DAPIによる細胞カウント、ファロイジン（アクチンフィラメントマーカー）、CD44（MSCマーカー）の蛍光面積の測定を行った。各実験条件の概要は表1の通りである。

[表1]

群	培地	イミダゾールジペプチド	接着分子	播種細胞密度
1	B	カルノシン 0、0.2、0.5、1、2、又は 5mM	ラミニンフラグメント	200cells/cm ²
2	B	カルノシン 0、0.2、0.5、1、2、又は 5mM	なし	2000cells/cm ²
3	D	カルノシン 0、0.2、0.5、1、2、又は 5mM	ラミニンフラグメント	200cells/cm ²
4	D	カルノシン 0、0.2、0.5、1、2、又は 5mM	なし	2000cells/cm ²
5	B	アンセリン 0、0.2、0.5、1、2、又は 5mM	ラミニンフラグメント	200cells/cm ²
6	B	アンセリン 0、0.2、0.5、1、2、又は 5mM	なし	2000cells/cm ²
7	D	アンセリン 0、0.2、0.5、1、2、又は 5mM	ラミニンフラグメント	200cells/cm ²
8	D	アンセリン 0、0.2、0.5、1、2、又は 5mM	なし	2000cells/cm ²

[0149] また、本願発明者が樹立した臍帯MSCについて、TrypLE Selectを用いて剥離し、24well plateに細胞数200 cells/cm²で播種した。培養液は（4）MSC培地D、又は（5）MSC培地DからLIFを除いた培地（以下、MSC培地Eともいう）を用いた。また、それぞれの培地には、iMatrix-511ラミニンフラグメント（株式会社ニッピ）を最終濃度0.1%、カルノシンを最終濃度0、0.2、1、又は5mMとなるように添加し播種した。各サンプルについて、使用した培地と同じ培地で2〜3日ごとに培地交換しながら、7日間培養した。その後、DAPI、ファロイジンで染色し、共焦点定量イメージサイトメーターCellVoyager CQ-1（横川電機株式会社）を用いてそれぞれの蛍光画像を撮影し、DAPIによる細胞カウント、ファロイジン（アクチンフィラメントマーカー）の蛍光面積の測定を行った。各実験条件の概要は表2の通りである。

[表2]

群	培地	イミダゾールジペプチド	接着分子	播種細胞密度
9	D	カルノシン 0、0.2、1、又は 5mM	ラミニンフラグメント	200cells/cm ²
10	E	カルノシン 0、0.2、1、又は 5mM	ラミニンフラグメント	200cells/cm ²

[0150] 7.1.2 MSCマーカーの陽性率の測定

MSC培地Dにカルノシンを添加し、臍帯MSCを200cells/cm²で播種し、T25フラスコで2週間培養（2継代）した。T25フラスコに播種した細胞をTrypLE Selectで剥がして回収し、シングルセル化した。回収した細胞を4%ホルムアルデヒド溶液で固定した後、CD31, 44, 45, 73, 90, 105, HLA-ABC, HLA-DRで免疫染色し、BD Accuri™ C6 Plusフローサイトメーター（BDバイオサイエンス）で各マーカーの陽性細胞率を測定した。

[0151] 7.2 結果

図37〜38は、群1〜4の細胞カウントの結果を示す。特に群3において、カルノシンの添加により細胞数の増加傾向が見られた。図39は、群1〜4のファロイジンの蛍光面積の測定結果を示す。特に群3において、カルノシンの添加によりファロイジン面積の増加傾向が見られた。図40は、群1〜4のCD44の蛍光面積の測定結果を示す。特に群3において、カルノシンの添加によりCD44面積の増加傾向が見られた。

[0152] 図41は、群1及び3の蛍光画像の撮影結果（細胞核染色）を示す。特に群3のカルノシン1mMの条件において、細胞数の増加傾向が見られた。図42は、群1及び3の蛍光画像の撮影結果（ファロイジン染色）を示す。特に群1及び3のカルノシン1mMの条件において、細胞数及びファロイジン面積の増加傾向が見られた。細胞形態に大きな差は見られなかった。図43は、群1及び3の蛍光画像の撮影結果（CD44染色）を示す。特に群3のカルノシン1mMの条件において、細胞数及びCD44面積の増加傾向が見られた。マーカー発現パターンに大きな差は見られなかった。

[0153] 図44～45は、群5～8の細胞カウントの結果を示す。特に群7において、アンセリンの添加により細胞数の増加傾向が見られた。図46～47は、群5～8のファロイジンの蛍光面積の測定結果を示す。特に群7において、アンセリンの添加によりファロイジン面積の増加傾向が見られた。図48～49は、群5～8のCD44の蛍光面積の測定結果を示す。特に群7において、アンセリンの添加によりCD44面積の増加傾向が見られた。

[0154] 図50は、群5及び7の蛍光画像の撮影結果（ファロイジン染色）を示す。特に群7のアンセリン1mMの条件において、細胞数及びファロイジン面積の増加傾向が見られた。細胞形態に大きな差は見られなかった。図51は、群5及び7の蛍光画像の撮影結果（CD44染色）を示す。特に群7のアンセリン1mMの条件において、細胞数及びCD44面積の増加傾向が見られた。マーカー発現パターンに大きな差は見られなかった。

[0155] 図52は、臍帯MSCをMSC培地Dで培養後のMSCマーカーの陽性率の測定結果を示す。細胞数はカルノシン添加により増加した一方で、各MSC陽性マーカーと陰性マーカーは、カルノシン添加によって変化していなかった。

[0156] 図53は、群9及び10の細胞カウントの結果を示す。群9において、カルノシンの添加により細胞数の増加傾向が見られた一方で、群10では増加傾向が見られなかった。図54は、群9及び10のファロイジンの蛍光面積の測定結果を示す。群9において、カルノシンの添加によりファロイジン面積の増加傾向が見られた一方で、群10では増加傾向が見られなかった。

[0157] 図55は、群9及び10の蛍光画像の撮影結果（ファロイジン染色）を示す。群9のカルノシン1mMの条件において、カルノシンの添加によりファロイジン面積の増加傾向が見られた一方で、群10のカルノシン1mMの条件では増加傾向が見られなかった。

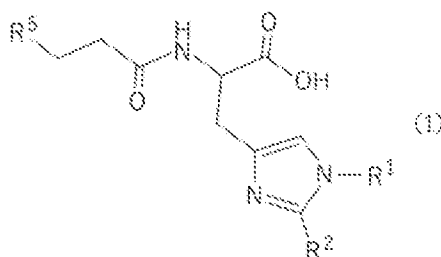
[0158] 以上の結果から、LIFを含有する培地にカルノシンを添加することにより、MSCの増殖が促進されることが示された。

[0159] 以上、本発明を実施例に基づいて説明した。この実施例はあくまで例示であり、種々の変形例が可能なこと、またそうした変形例も本発明の範囲にあることは当業者に理解されるところである。

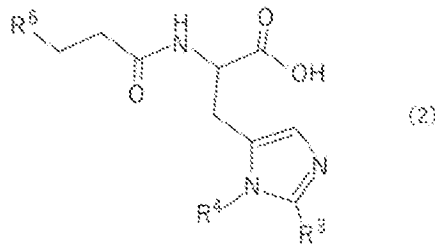
請求の範囲

- [請求項1] 間葉系幹細胞及びイミダゾールジペプチドを含む培地から培養上清を回収する工程を含む、培養上清の生産方法。
- [請求項2] 前記間葉系幹細胞は、イミダゾールジペプチドを含む培地で培養された間葉系幹細胞である、請求項1に記載の生産方法。
- [請求項3] 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養し、培養された間葉系幹細胞を生成する工程を含む、請求項1又は2に記載の生産方法。
- [請求項4] 前記回収する工程は、間葉系幹細胞及びイミダゾールジペプチドを含む培地を遠心分離又はフィルターにかける工程を含む、請求項1～3いずれかに記載の生産方法。
- [請求項5] 回収した前記培養上清を滅菌処理し、滅菌処理された培養上清を生成する工程を含む、請求項1～4いずれかに記載の生産方法。
- [請求項6] 前記培養上清は、接着培養で得られた培養上清である、請求項1～5いずれかに記載の生産方法。
- [請求項7] 前記培養上清は、G-CSFを少なくとも500pg/mL又はIL-6を少なくとも2700pg/mL含む、請求項1～6いずれかに記載の生産方法。
- [請求項8] 前記培養上清は、G-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、及びエクソソームを含む、請求項1～7いずれかに記載の生産方法。
- [請求項9] 前記イミダゾールジペプチドは、下記式(1)又は(2)の構造を有する化合物である、請求項1～8いずれかに記載の生産方法：

[化1]



[化2]



ここで、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は、それぞれ独立して、H又は C_{1-6} アルキルであり、 R^5 及び R^6 は、それぞれ独立して、 $-NHR^7$ 又は $-CH_2NHR^7$ であり、 R^7 はH又は $-COR^8$ であり、 R^8 はH、 C_{1-6} アルキル、置換されていてもよいフェニル、 $-OCH_2R^9$ 、又は $-CH=CHR^9$ であり、 R^9 は、H、 C_{1-6} アルキル、又は置換されていてもよいフェニルである。

[請求項10] 前記イミダゾールジペプチドは、カルノシン、アンセリン、バレニン、又はホモカルノシンである、請求項1～9いずれかに記載の生産方法。

[請求項11] 前記イミダゾールジペプチドは、カルノシンである、請求項1～10いずれかに記載の生産方法。

[請求項12] 前記イミダゾールジペプチドは、アンセリンである、請求項1～10いずれかに記載の生産方法。

[請求項13] 請求項1～12いずれかに記載の生産方法で得られた、培養上清。

[請求項14] 請求項1～12いずれかに記載の生産方法で得られた、培養上清を含む、医薬組成物。

[請求項15] 骨分化抑制用の、請求項13に記載の培養上清又は請求項14に記載の医薬組成物。

[請求項16] 請求項13に記載の培養上清又は請求項14もしくは15に記載の医薬組成物を含む、シリンジ、バイアル、又は医療用バッグ。

[請求項17] 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む血清フリーの培地で培養し、培養細胞を生成する工程を含む、細胞の培養方法。

[請求項18] 前記培地から前記培養細胞を回収する工程を含む、請求項17に記載の培養方法。

- [請求項19] 前記培養は、接着因子の存在下で培養する工程を含む、請求項17又は18に記載の培養方法。
- [請求項20] 前記培地はインスリンフリー、IGFフリー、又はFGFフリーの培地である、請求項17～19いずれかに記載の培養方法。
- [請求項21] 前記培地は成長因子フリーの培地である、請求項17～19いずれかに記載の培養方法。
- [請求項22] 前記培地は蛋白質フリーの培地である、請求項17～19いずれかに記載の培養方法。
- [請求項23] 請求項17～22いずれかに記載の培養方法を実施する工程を含む、細胞の生産方法。
- [請求項24] 請求項23に記載の生産方法で得られた、細胞。
- [請求項25] 請求項24に記載の細胞の細胞集団を含む組成物。
- [請求項26] 請求項23に記載の生産方法で得られた細胞を含む、医薬組成物。
- [請求項27] 骨分化抑制用の、請求項26に記載の医薬組成物。
- [請求項28] 間葉系幹細胞培養用の培地であって、イミダゾールジペプチドを含み、血清フリーである、培地。
- [請求項29] インスリンフリー、IGFフリー、又はFGFフリーの培地である、請求項28に記載の培地。
- [請求項30] 成長因子フリーである、請求項28又は29に記載の培地。
- [請求項31] 蛋白質フリーである、請求項28～30いずれかに記載の培地。
- [請求項32] 間葉系幹細胞を含む、請求項28～31いずれかに記載の培地。
- [請求項33] 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養する工程を含む、骨芽細胞の生成抑制方法。
- [請求項34] 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた培養上清と、間葉系幹細胞とを接触させる工程を含む、骨芽細胞の生成抑制方法。
- [請求項35] イミダゾールジペプチドを含む、骨芽細胞の生成抑制用の組成物。
- [請求項36] 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得ら

れた培養上清を含む、骨芽細胞の生成抑制用の組成物。

- [請求項37] 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養する工程を含む、G-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームマーカの発現促進方法。
- [請求項38] イミダゾールジペプチドを含む、間葉系幹細胞のG-CSF、MCP-1、VEGF-C、TGF- β 1、IL-6、IL-7、IL-8、M-CSF、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、semaphorin 3B、又はエクソソームマーカの発現促進用の組成物。
- [請求項39] 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養する工程を含む、エクソソームの分泌促進方法。
- [請求項40] イミダゾールジペプチドを含む、間葉系幹細胞のエクソソームの分泌促進用の組成物。
- [請求項41] G-CSFを少なくとも500pg/ml含む、間葉系幹細胞の培養上清。
- [請求項42] IL-6を少なくとも2700pg/ml含む、間葉系幹細胞の培養上清。
- [請求項43] G-CSF又はIL-6を高発現又は高分泌する、臍帯由来間葉系幹細胞。
- [請求項44] 請求項43に記載の細胞の細胞集団を含む組成物。
- [請求項45] IL-34陽性の間葉系幹細胞。
- [請求項46] 精製された、請求項45に記載の間葉系幹細胞。
- [請求項47] ADAM8陽性の間葉系幹細胞。
- [請求項48] 精製された、請求項47に記載の間葉系幹細胞。
- [請求項49] Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、及びsemaphorin 3B陽性である、請求項45～48いずれかに記載の間葉系幹細胞。
- [請求項50] 精製された、請求項49に記載の間葉系幹細胞。
- [請求項51] 請求項45～50いずれかに記載の間葉系幹細胞を含む、医薬組成物。
- [請求項52] 骨分化抑制用の、請求項51に記載の医薬組成物。

- [請求項53] 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養して得られた細胞を含む、骨分化抑制用の医薬組成物。
- [請求項54] 薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項53に記載の医薬組成物。
- [請求項55] 前記細胞は、Osteoprotegrin、Gremlin 1、SCF、FGF11、R-spondin 2、ADAM8、IL-34、IGFBP2、DKK1、及びsemaphorin 3B陽性である、請求項53又は54に記載の医薬組成物。
- [請求項56] 前記細胞は、イミダゾールジペプチド及びLIFを含む培地で培養して得られた細胞である、請求項53～55いずれかに記載の医薬組成物。
- [請求項57] 前記培養は、接着培養である、請求項53～56いずれかに記載の医薬組成物。
- [請求項58] 間葉系幹細胞をイミダゾールジペプチドを含む培地で培養し、培養細胞を生成する工程を含む、骨分化抑制用の医薬組成物の生産方法。
- [請求項59] 前記培地から前記培養細胞を回収する工程を含む、請求項58に記載の生産方法。
- [請求項60] 前記培養細胞と、薬学的に許容される担体を混合する工程を含む、請求項58又は59に記載の生産方法。
- [請求項61] イミダゾールジペプチド及びLIF (leukemia inhibitory factor) 成分を含む、培地。
- [請求項62] 接着因子をさらに含む、請求項61に記載の培地。
- [請求項63] 間葉系幹細胞の培養用の、請求項61又は62に記載の培地。
- [請求項64] 間葉系幹細胞を含む、請求項61～63いずれかに記載の培地。
- [請求項65] 間葉系幹細胞を請求項61～64いずれかに記載の培地で培養し、培養細胞を生成する工程を含む、細胞の生産方法。
- [請求項66] 前記培養は、接着培養である。請求項65に記載の生産方法。
- [請求項67] 請求項65又は66に記載の生産方法で得られた、細胞。
- [請求項68] 請求項67に記載の細胞の細胞集団を含む組成物。
- [請求項69] 請求項65又は66に記載の生産方法で得られた細胞を含む、医薬組成

物。

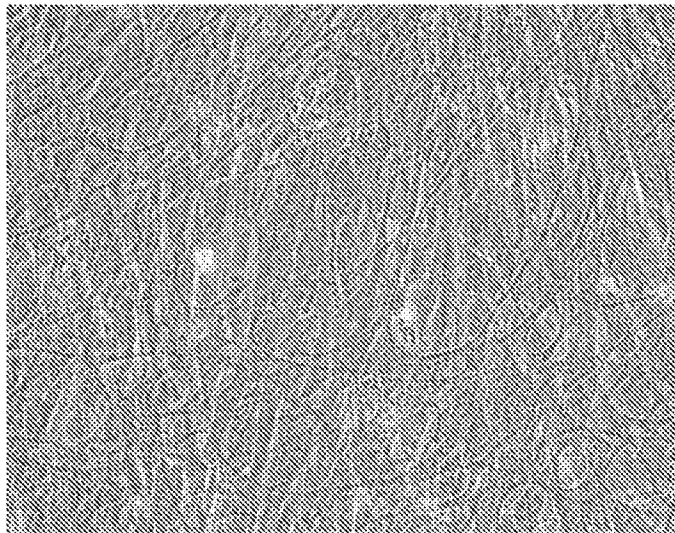
[請求項70] 骨分化抑制用の、請求項69に記載の医薬組成物。

[請求項71] イミダゾールジペプチド及びLIF成分を含む、キット。

[請求項72] 間葉系幹細胞の培養用の培地調製に使用するための、請求項71に記載のキット。

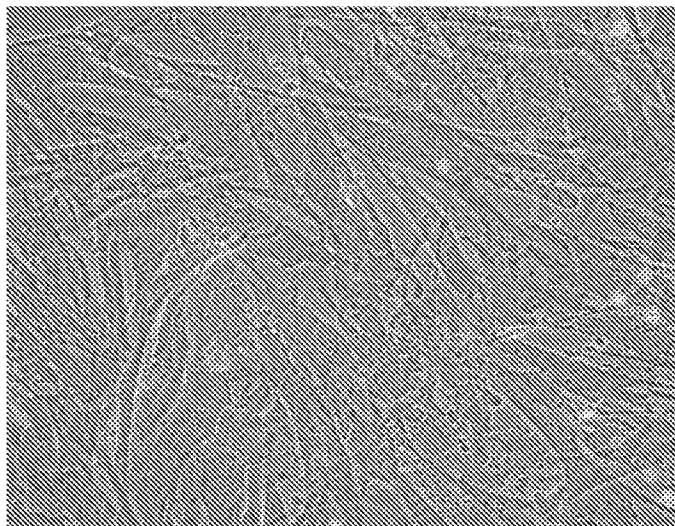
[図1]
FIG. 1

カルノシン(-)



[図2]
FIG. 2

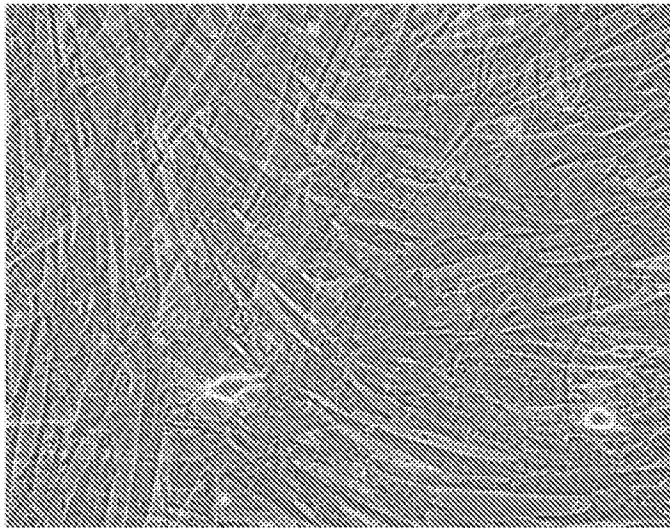
カルノシン(1mM)



[図3]

FIG. 3

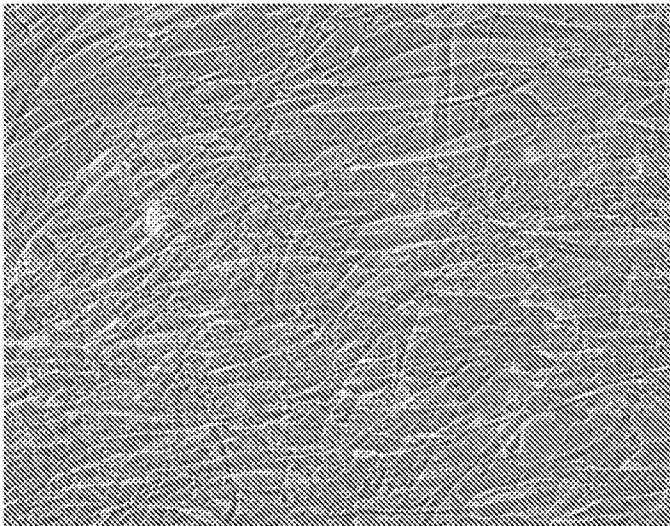
カルノシン(10mM)



[図4]

FIG. 4

カルノシン(30mM)

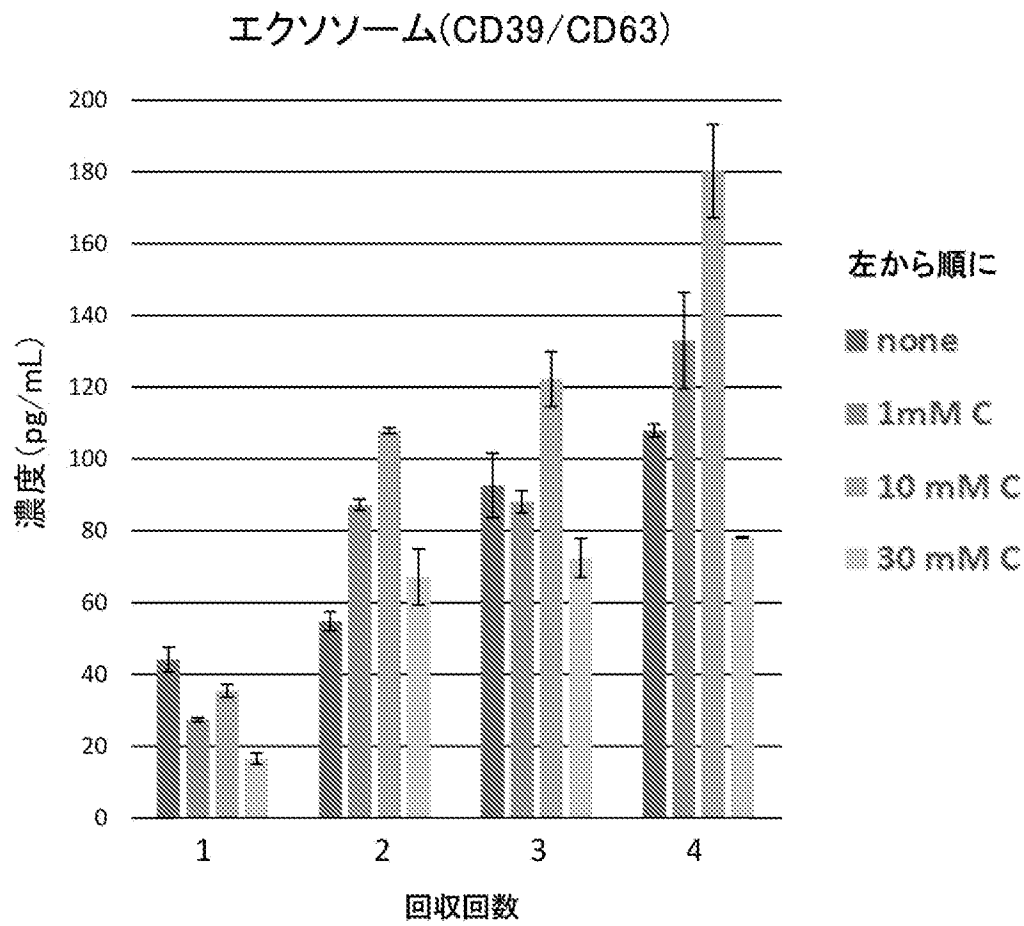


[図5]

FIG. 5

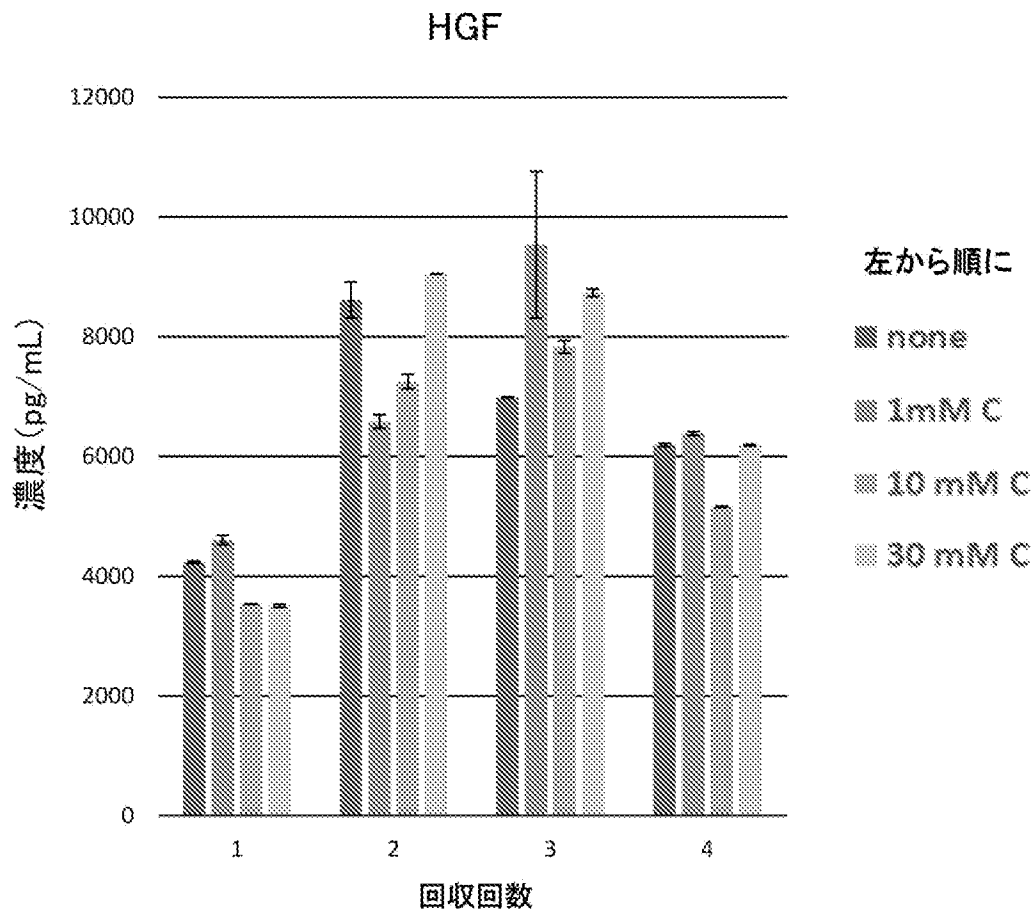
カルノシン濃度	細胞数
0 mM	2.9×10^6 cells
1 mM	4.4×10^6 cells
10 mM	2.7×10^6 cells
30 mM	3.6×10^6 cells

[図6]
FIG. 6

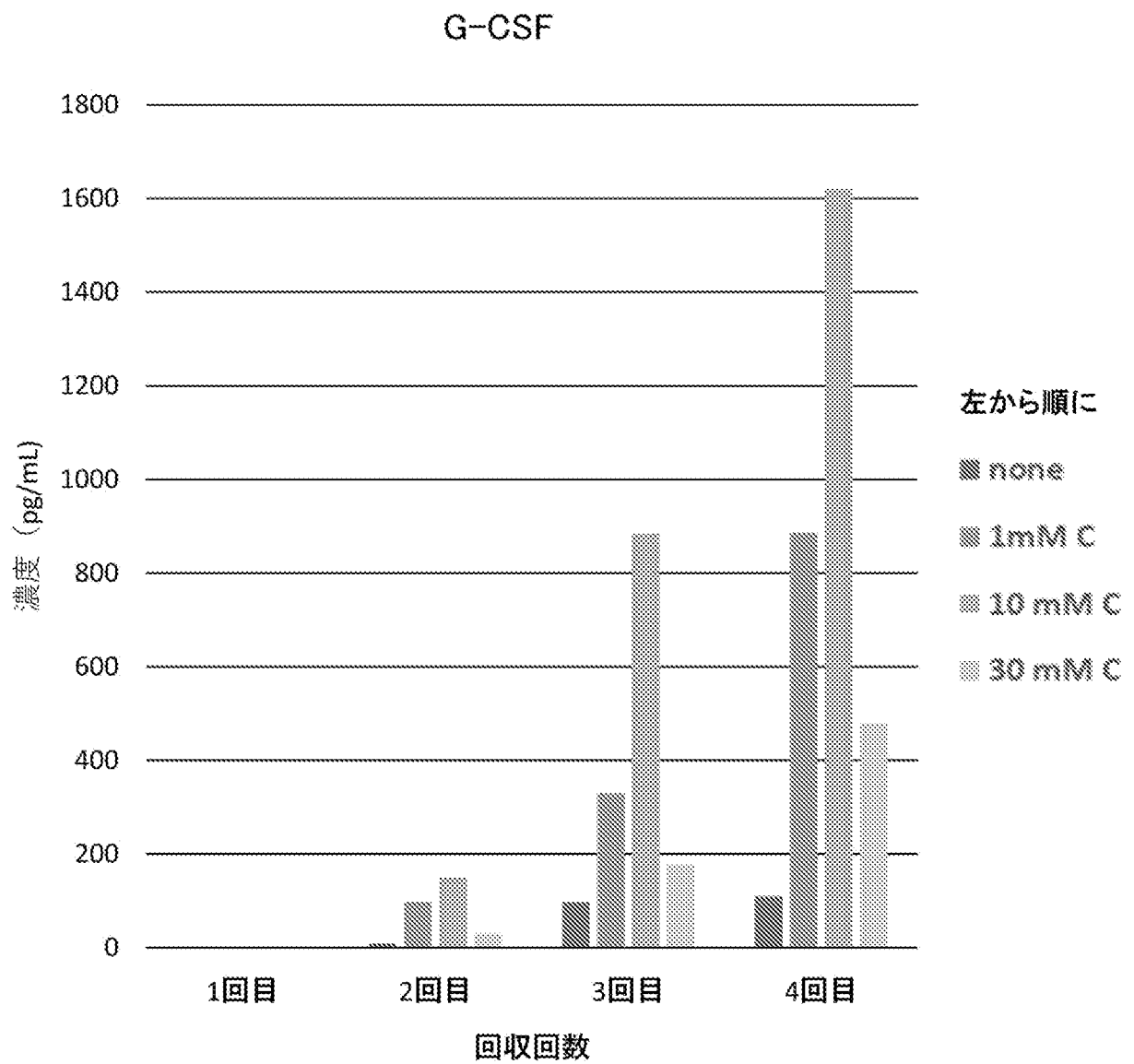


[図7]

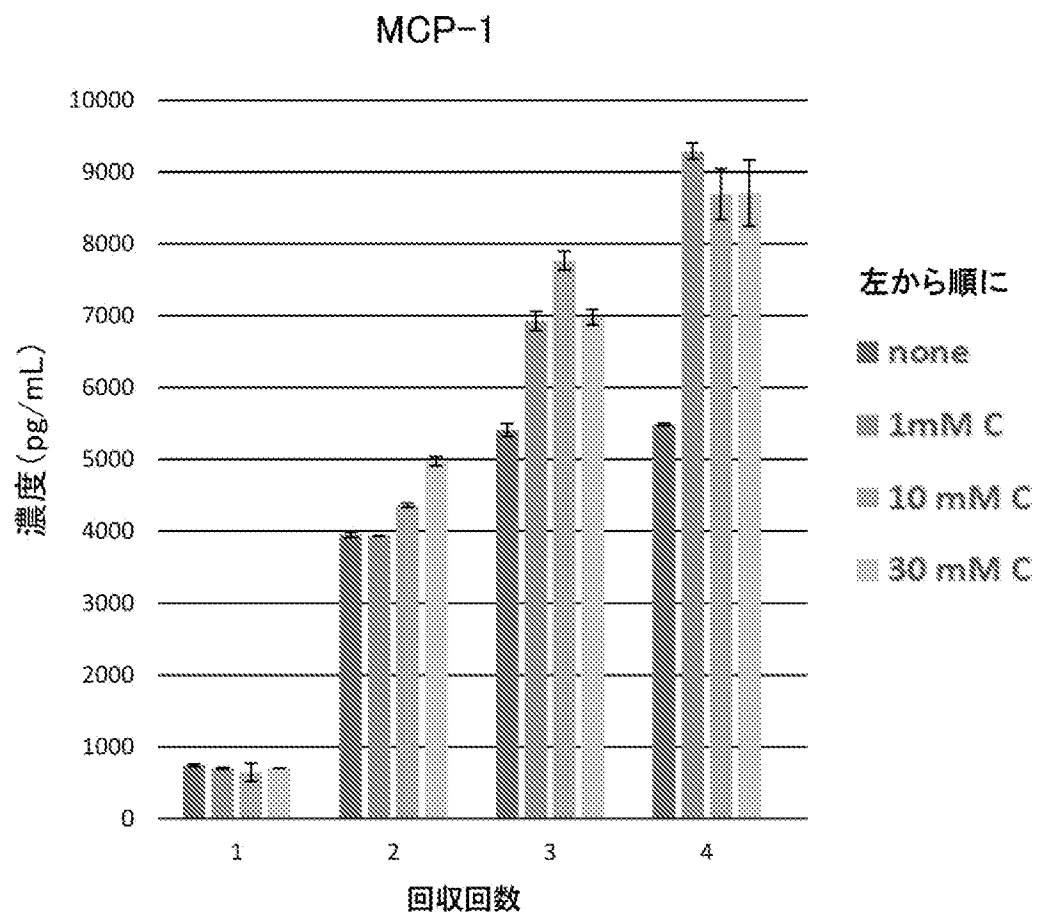
FIG. 7



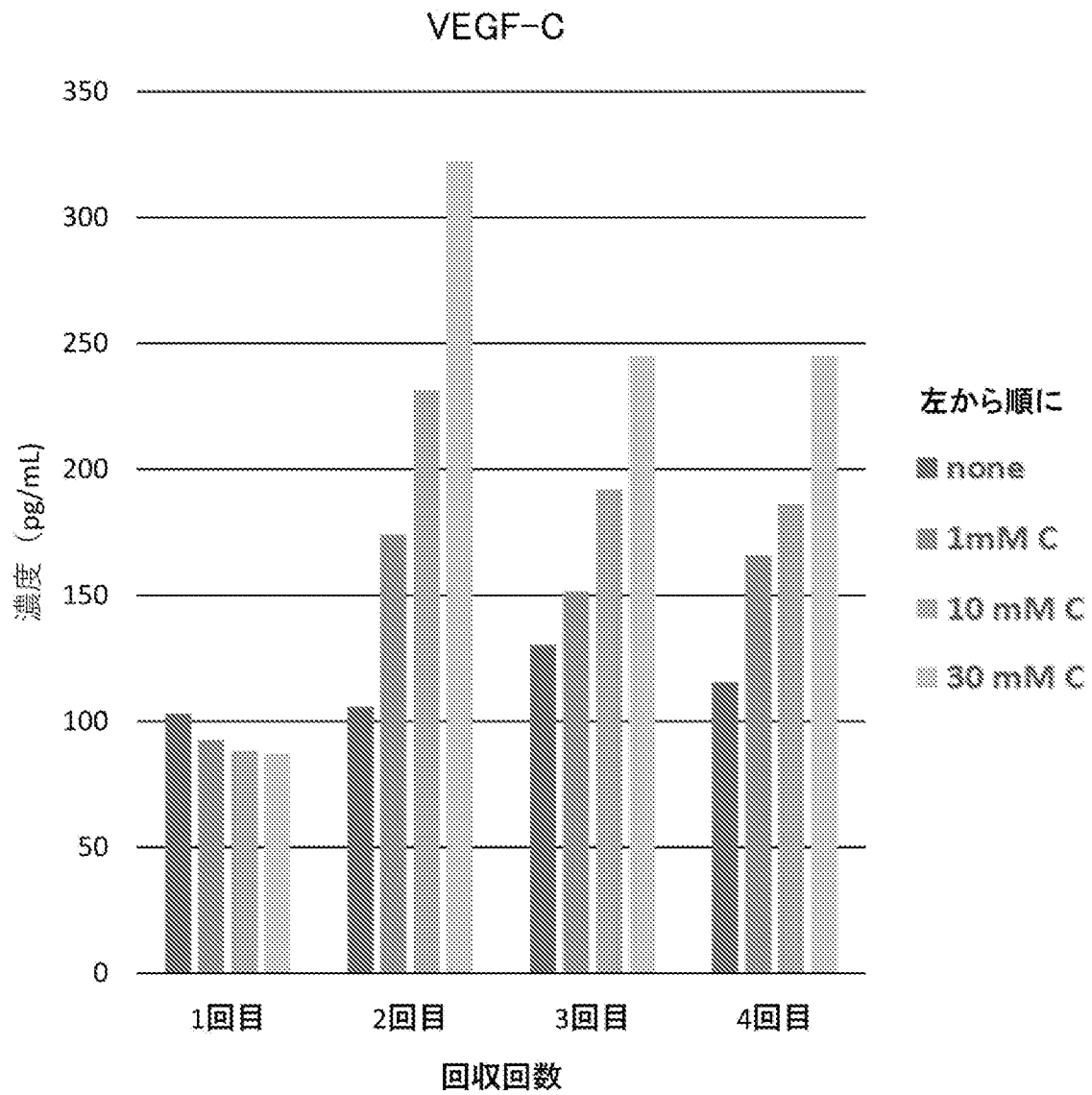
[図8]
FIG. 8



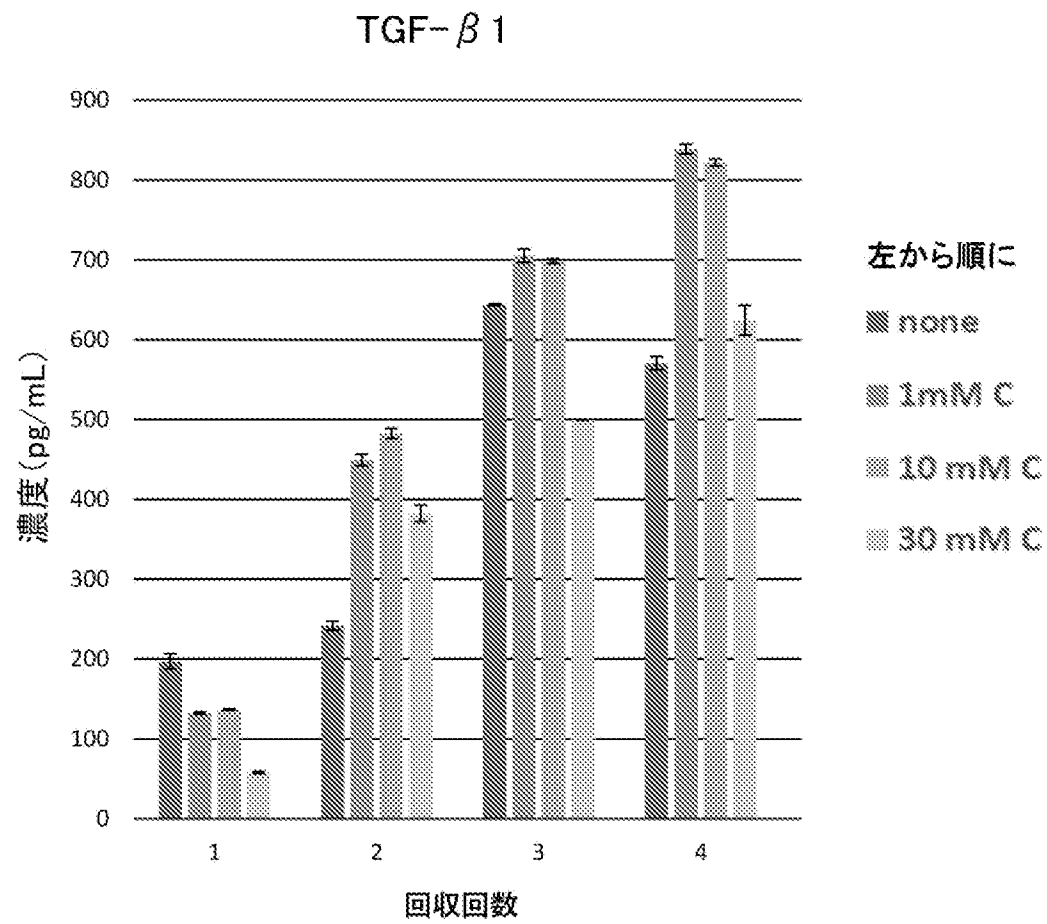
[図9]
FIG. 9



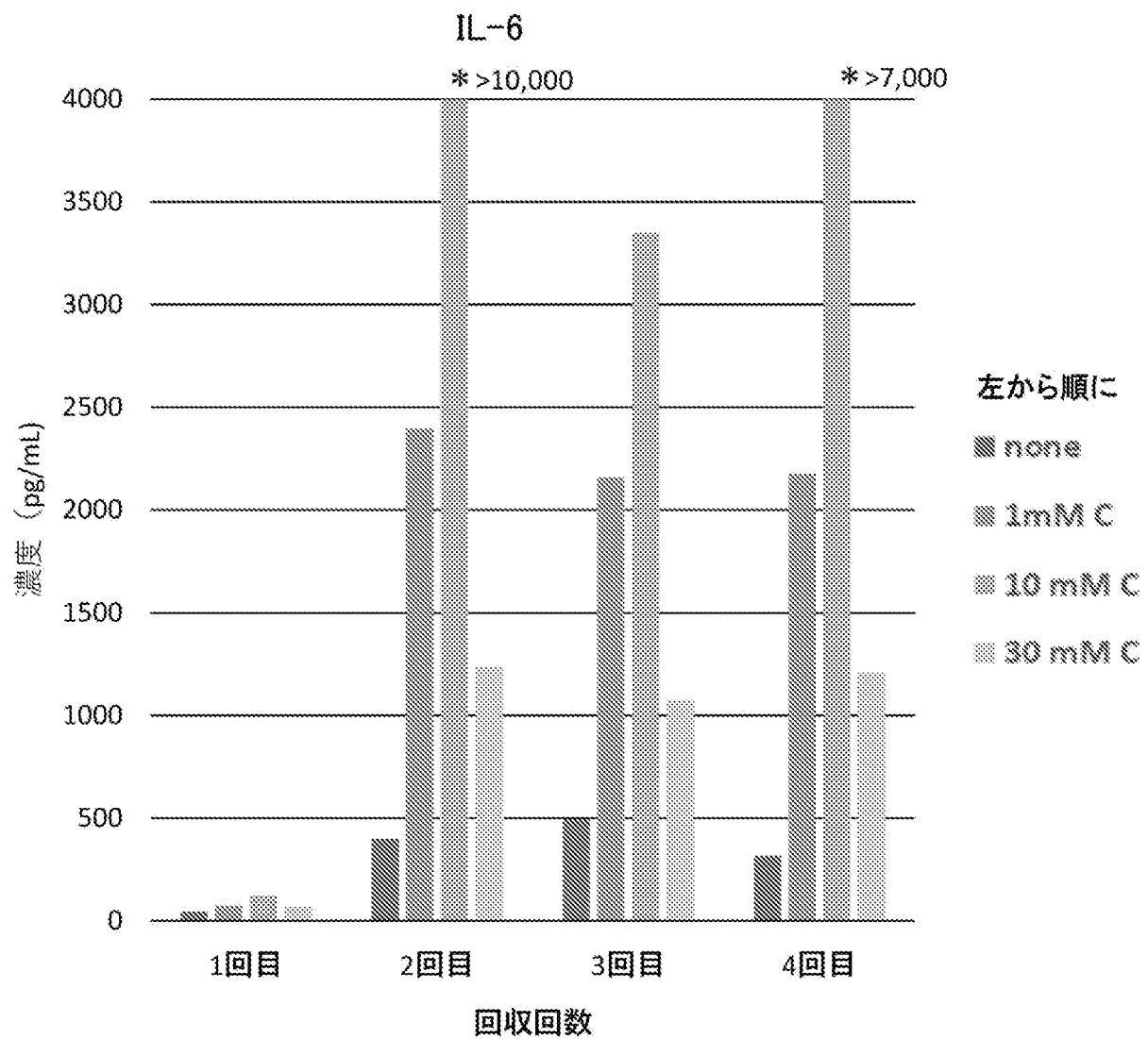
[図10]
FIG. 10



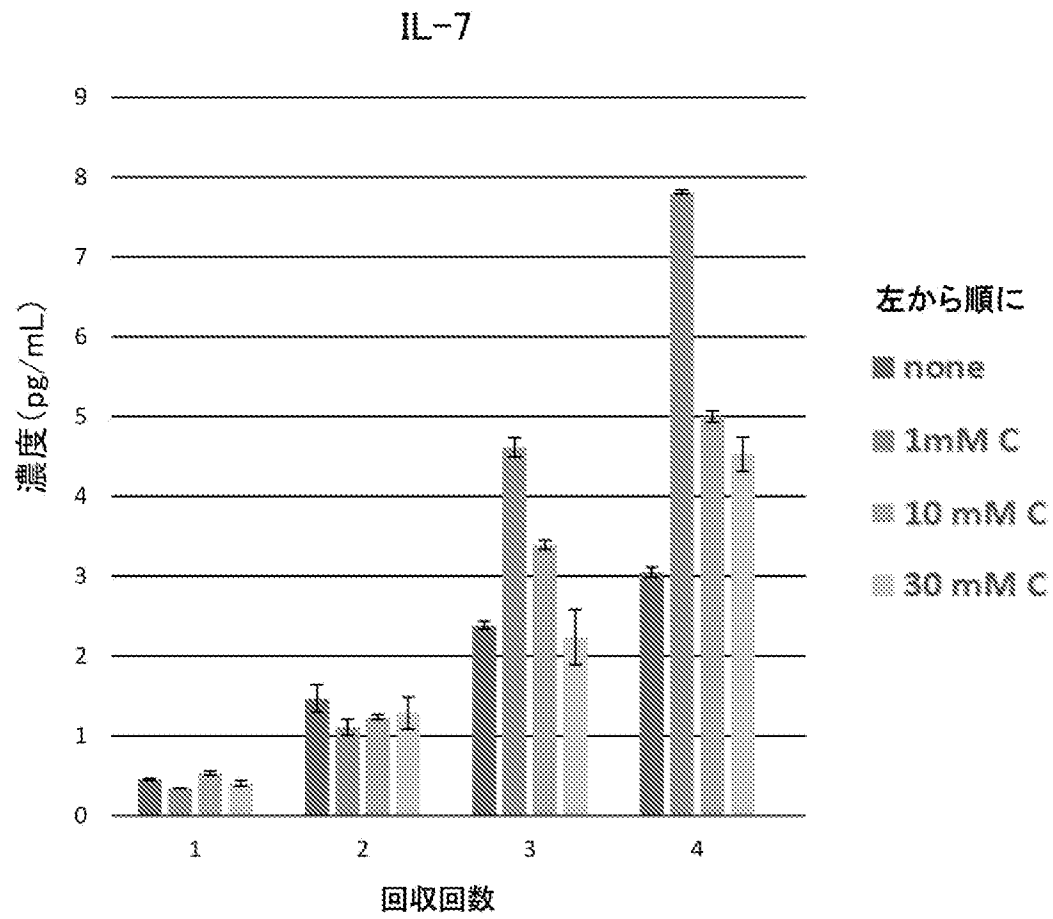
[図11]
FIG. 11



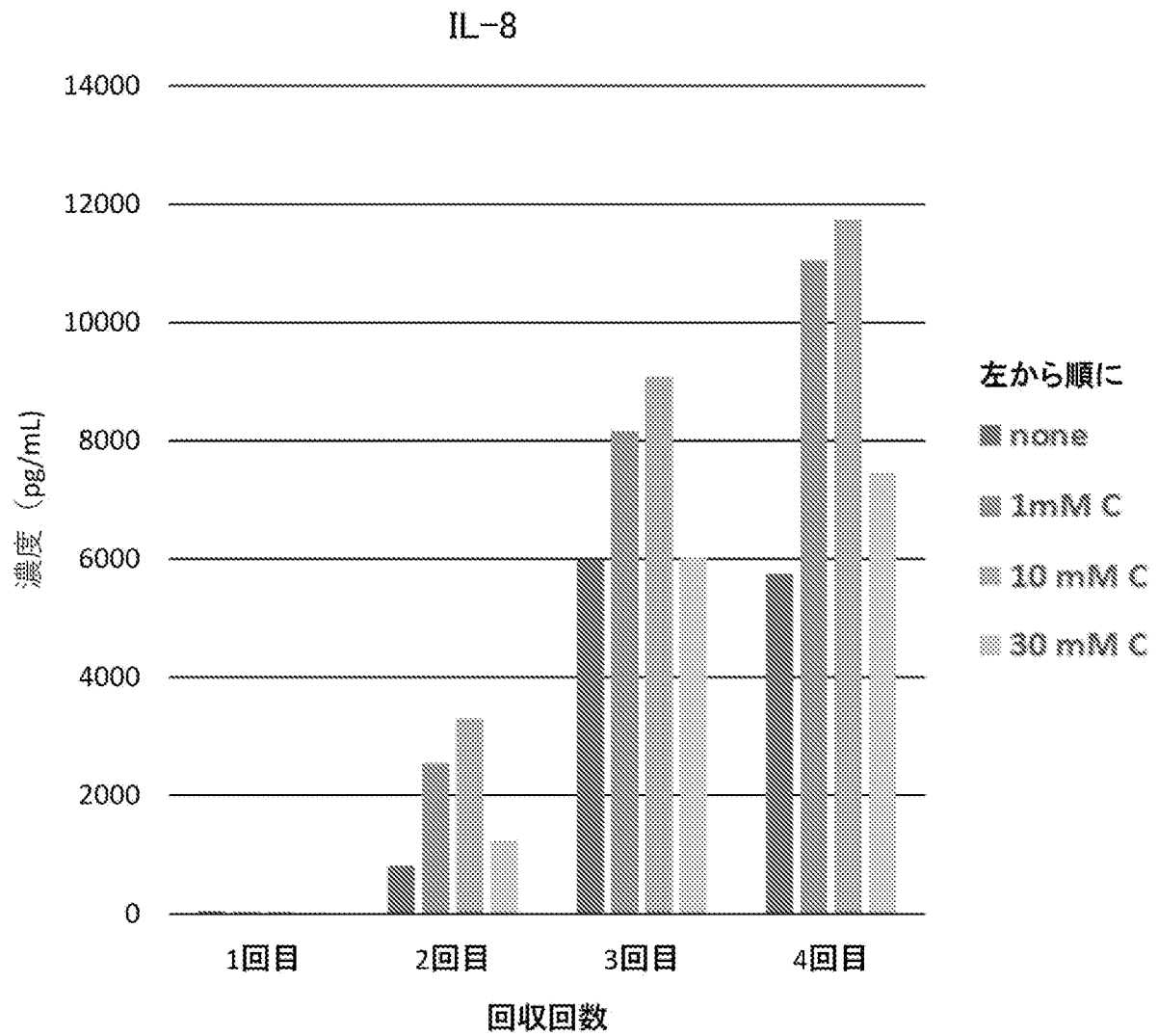
[図12]
FIG. 12



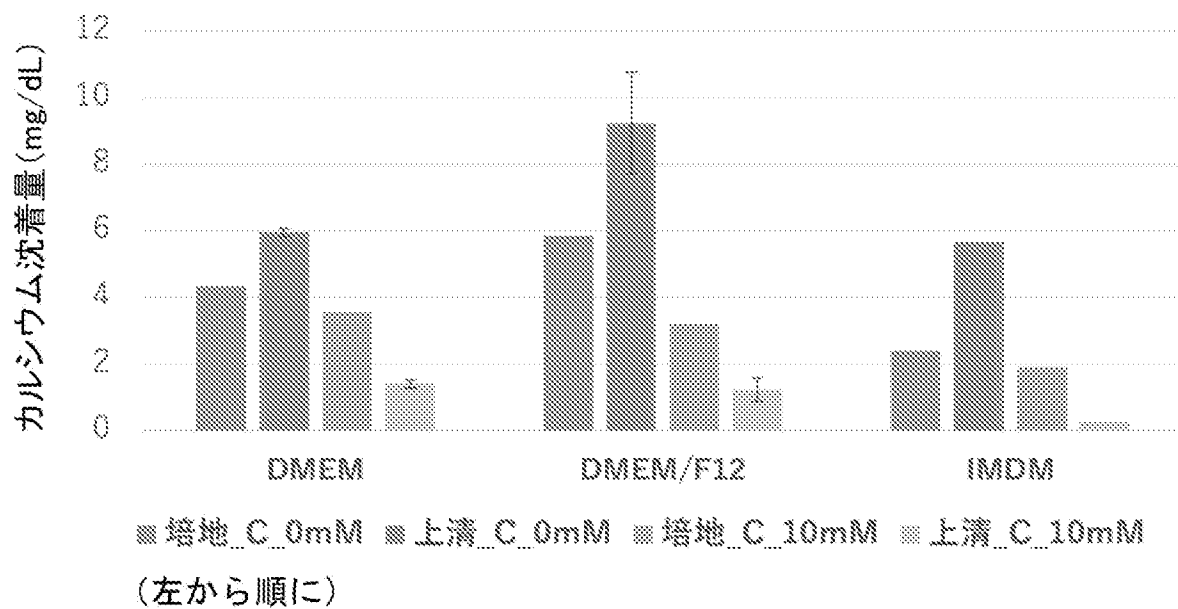
[図13]
FIG. 13



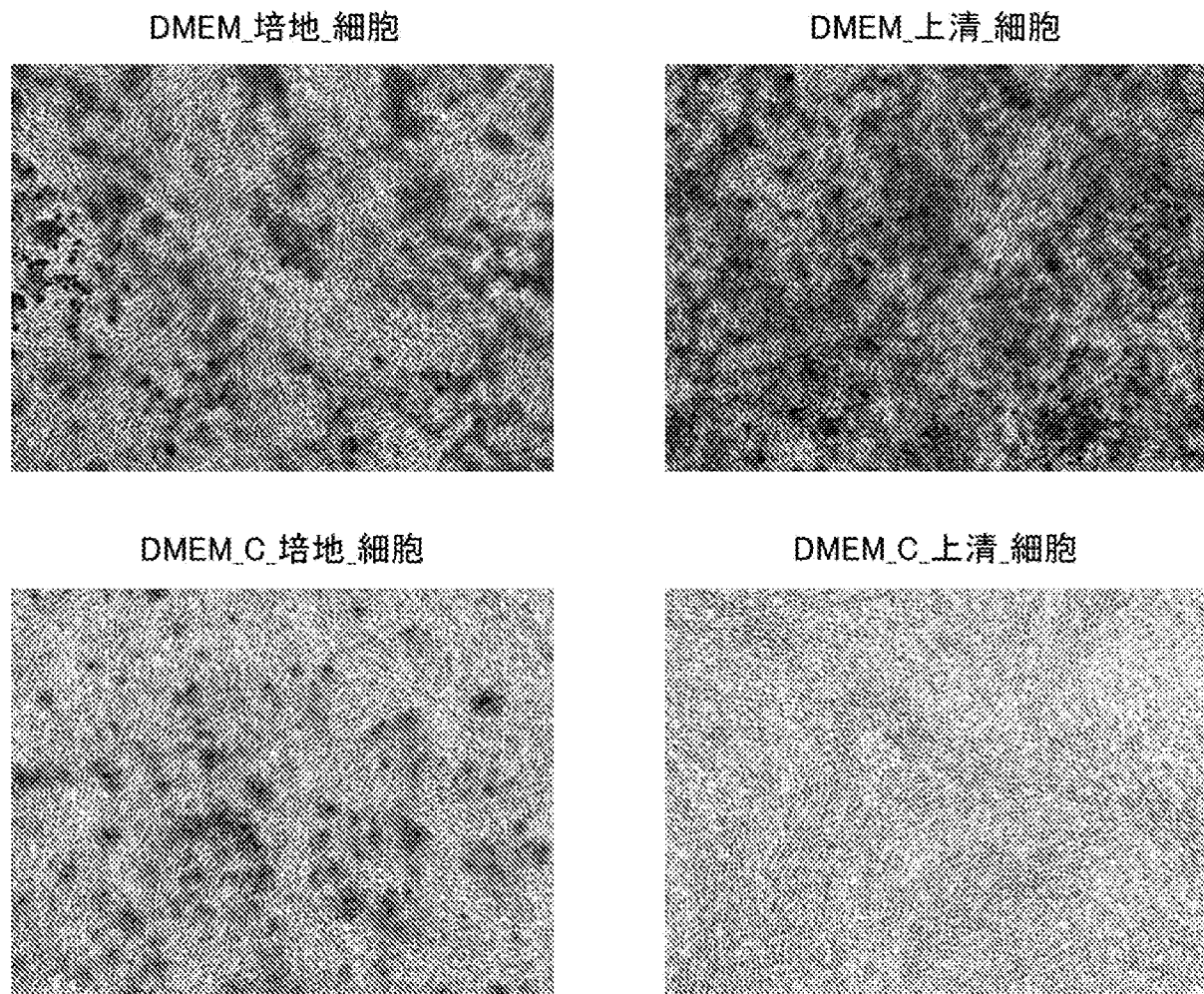
[図14]
FIG. 14



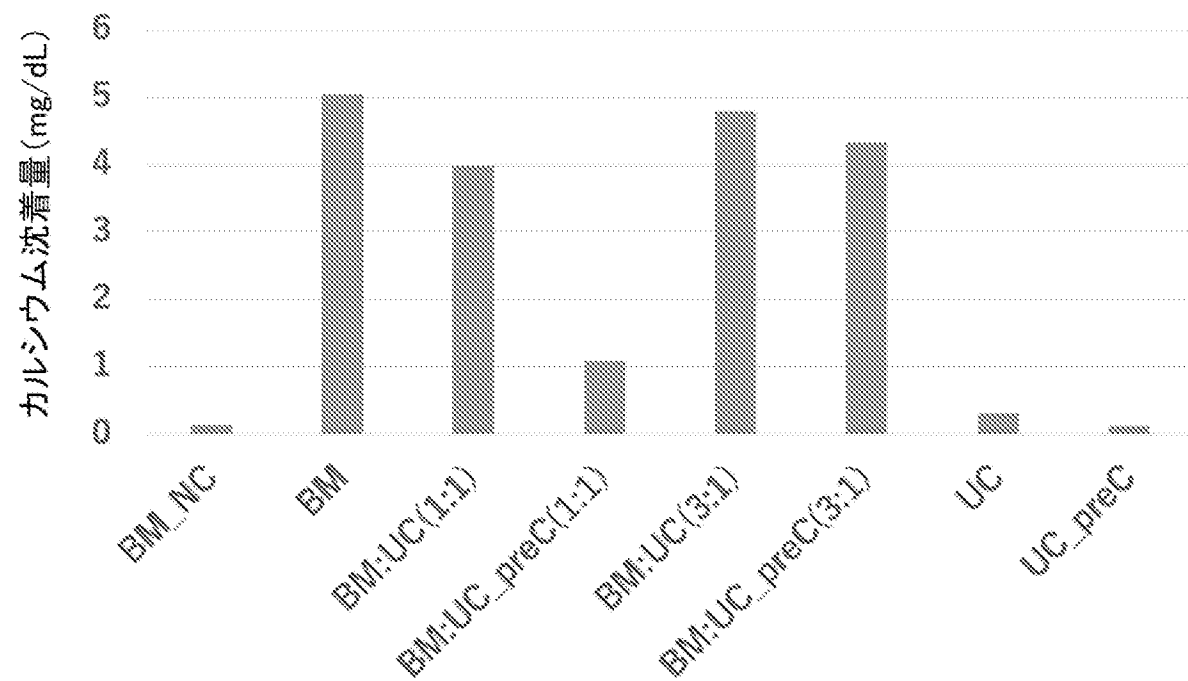
[図15]
FIG. 15



[図16]
FIG. 16

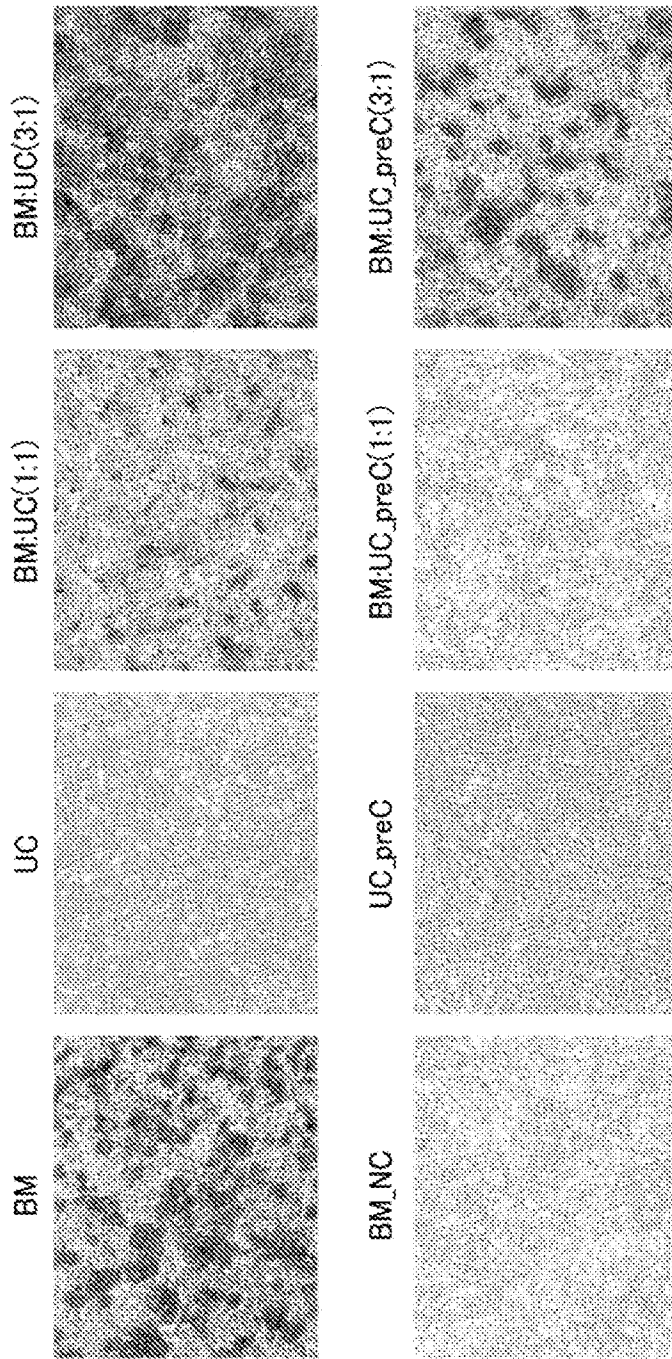


[図17]
FIG. 17



[図18]

FIG. 18

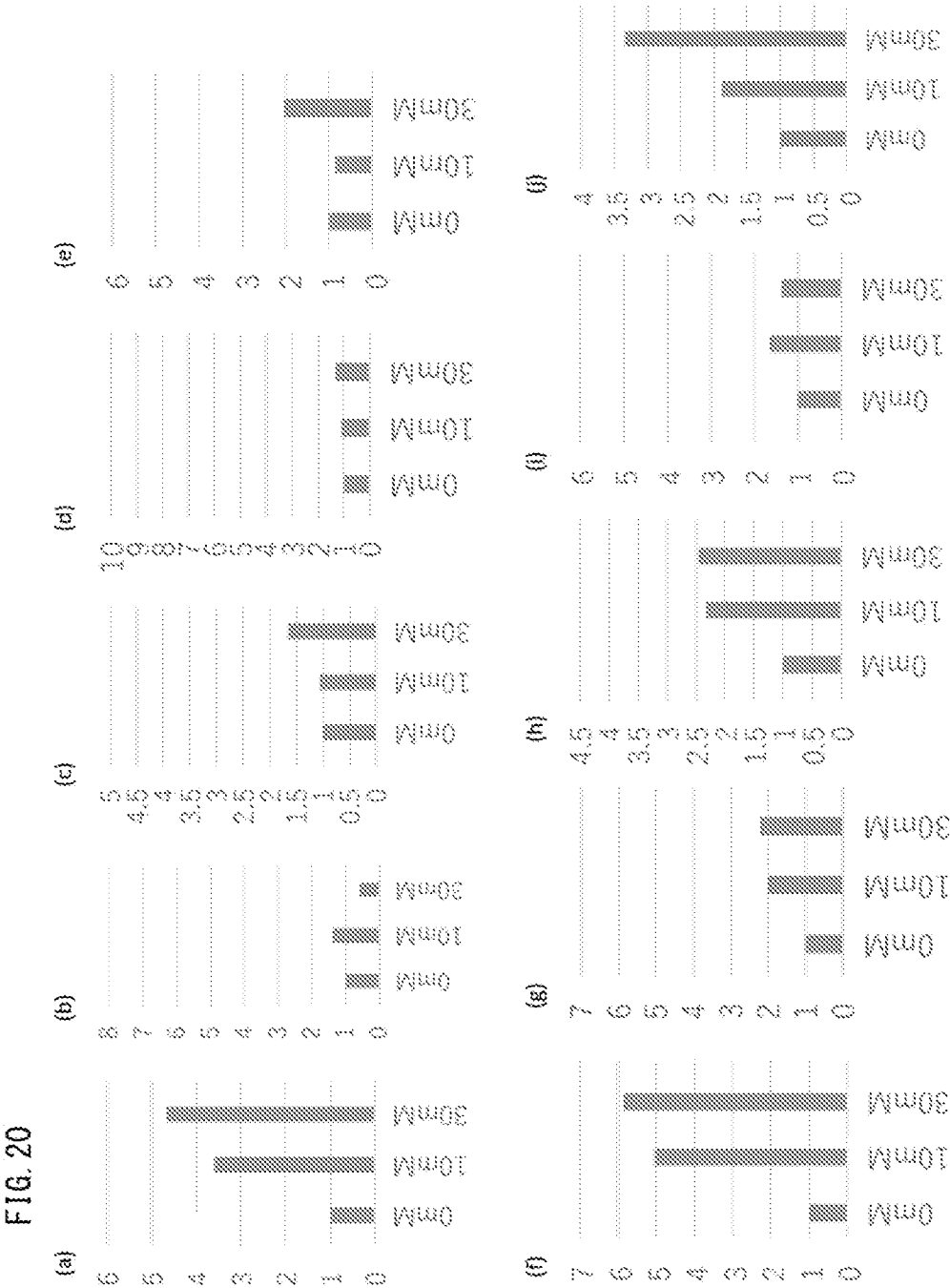


[図19]

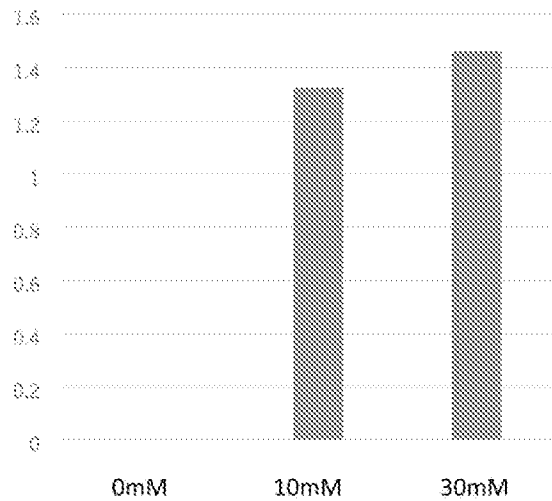
FIG. 19

[illegible]

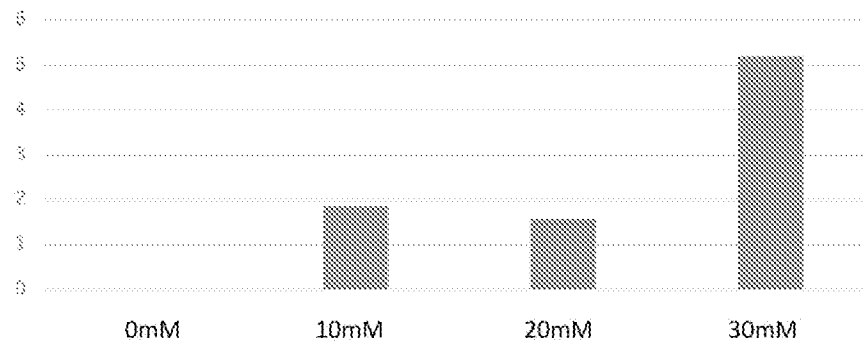
[図20]



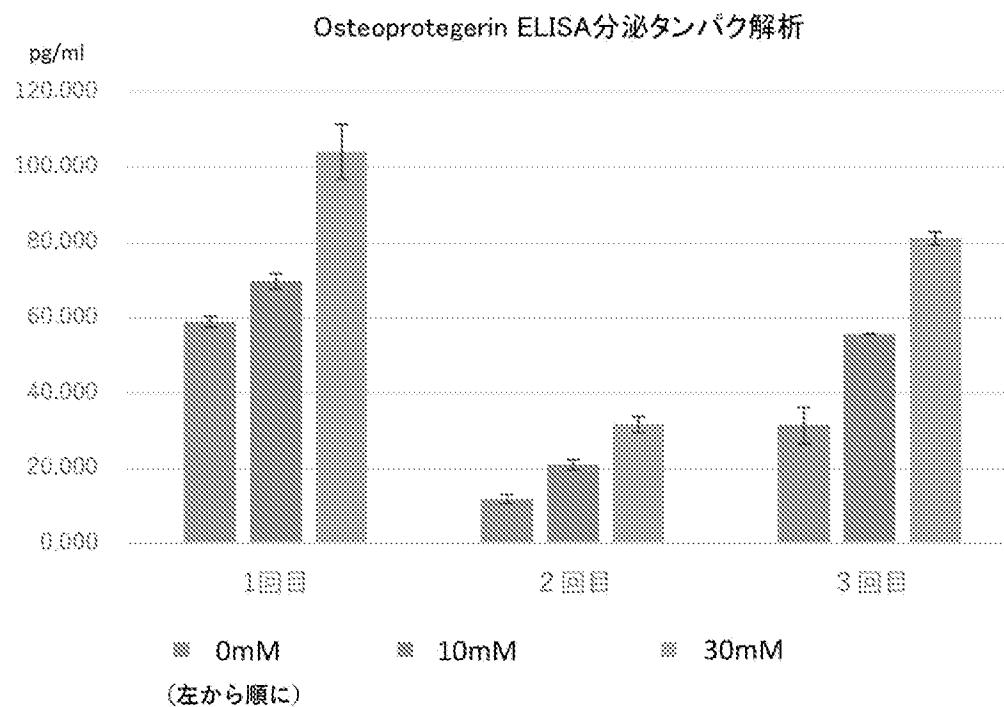
[図21]
FIG. 21



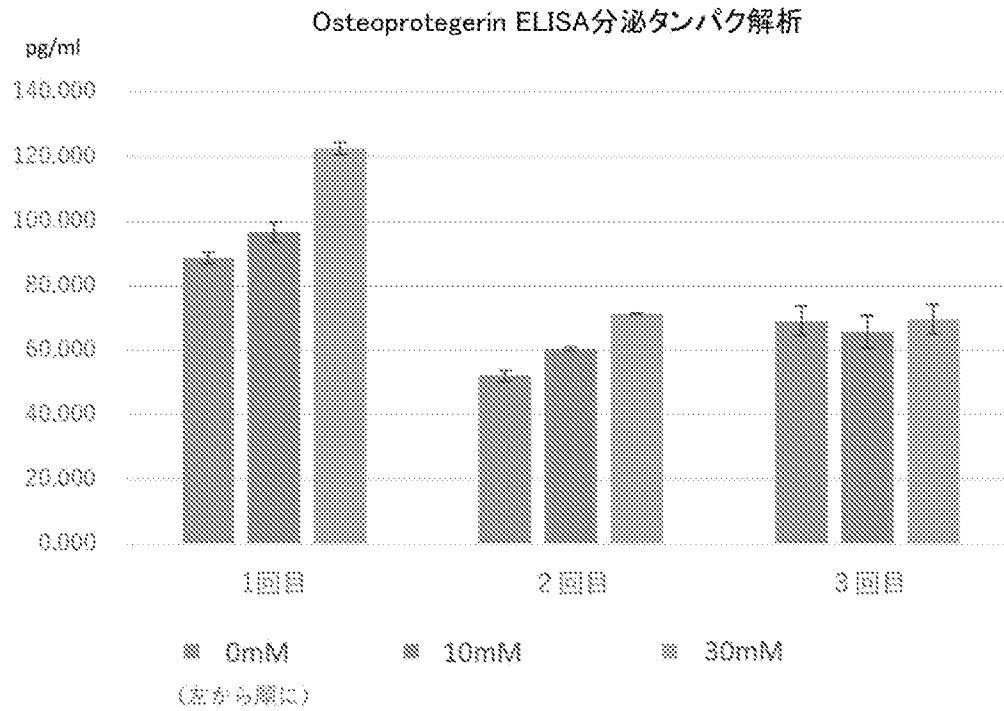
[図22]
FIG. 22



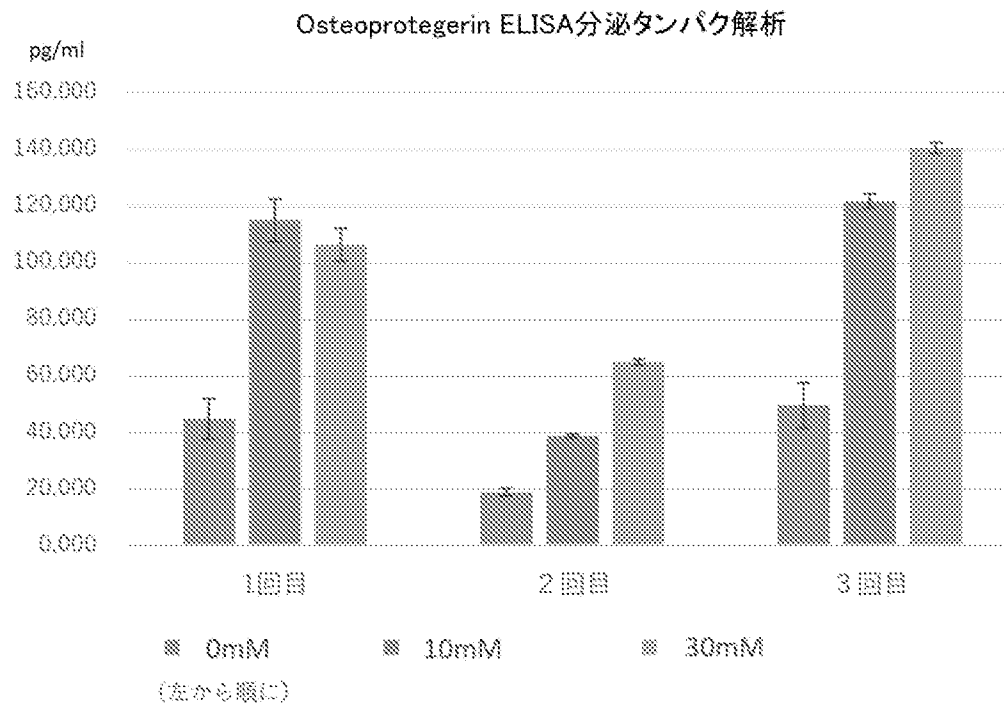
[図23]
FIG. 23



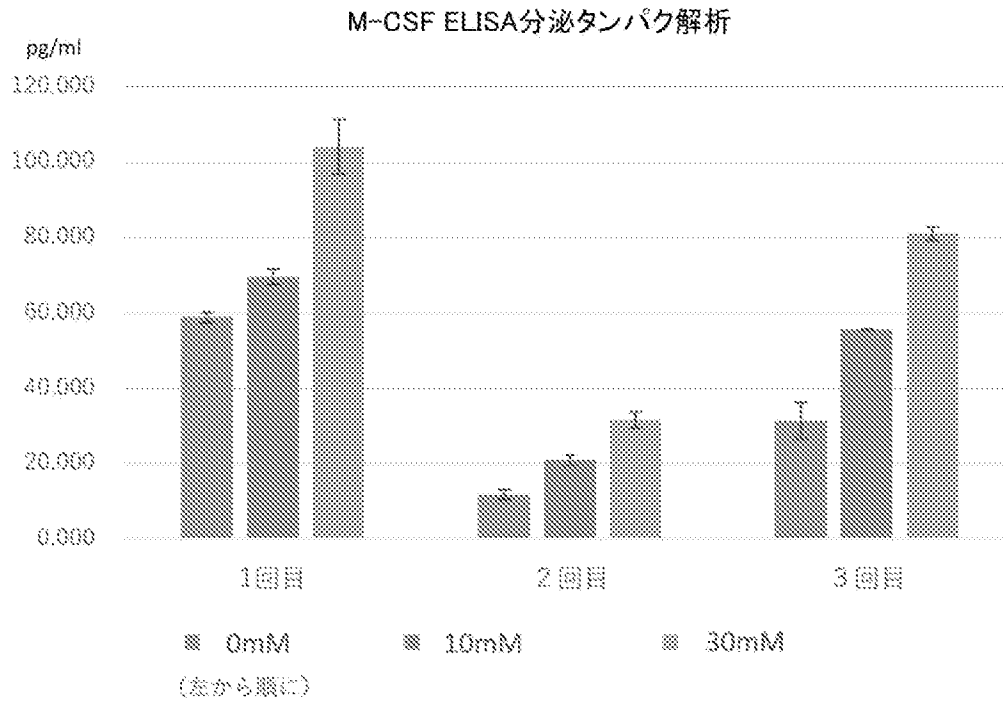
[図24]
FIG. 24



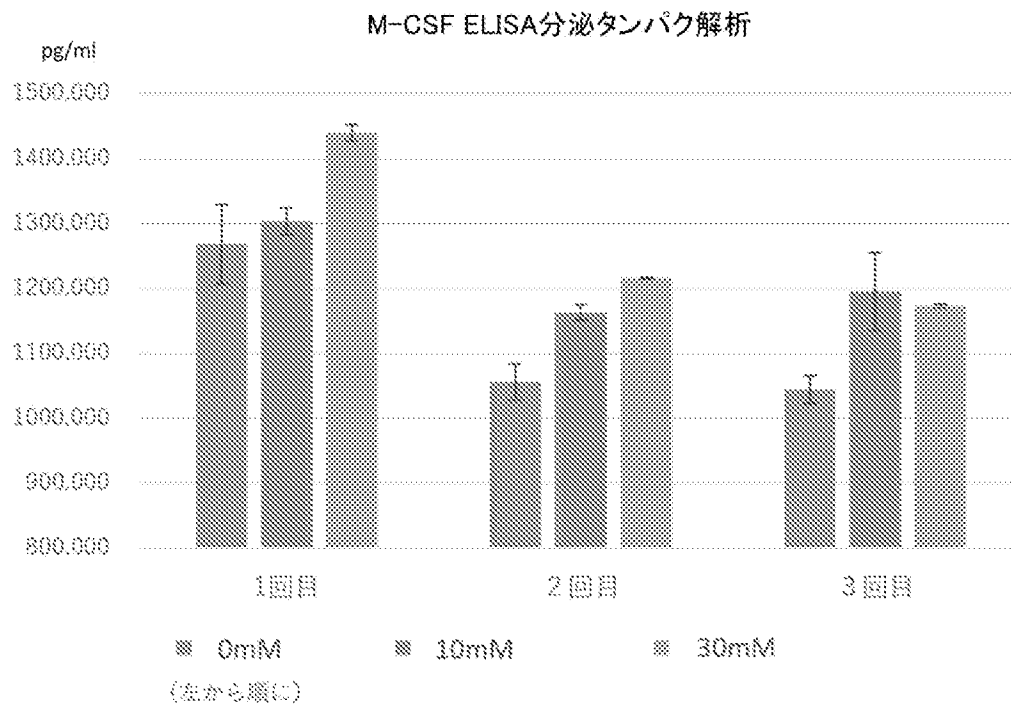
[図25]
FIG. 25



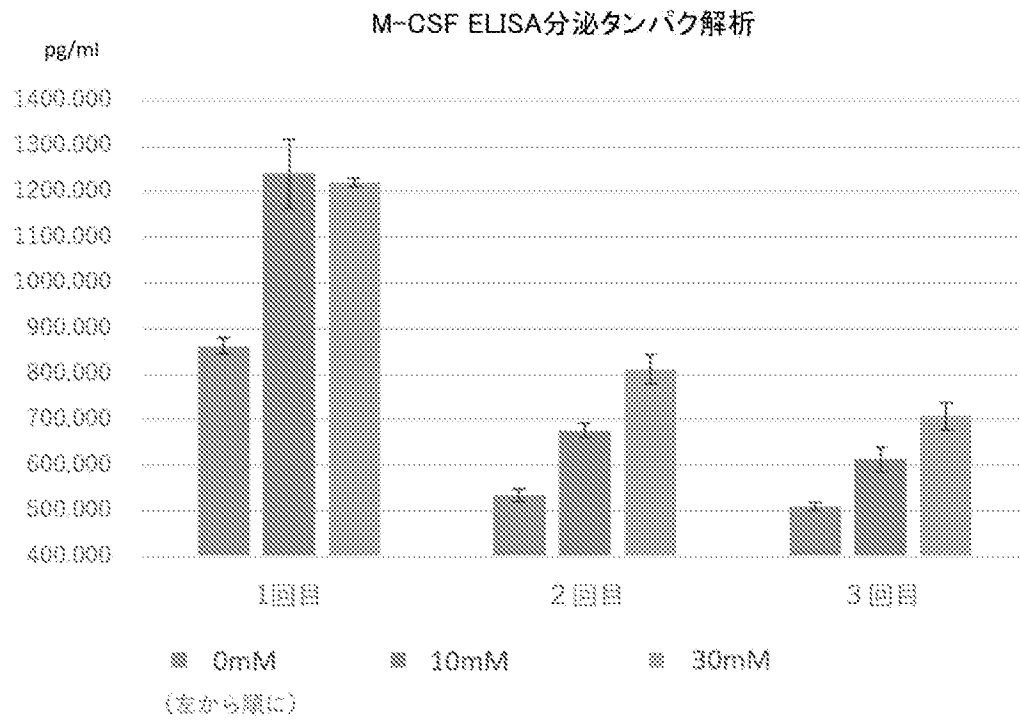
[図26]
FIG. 26



[図27]
FIG. 27



[図28]
FIG. 28



[図29]

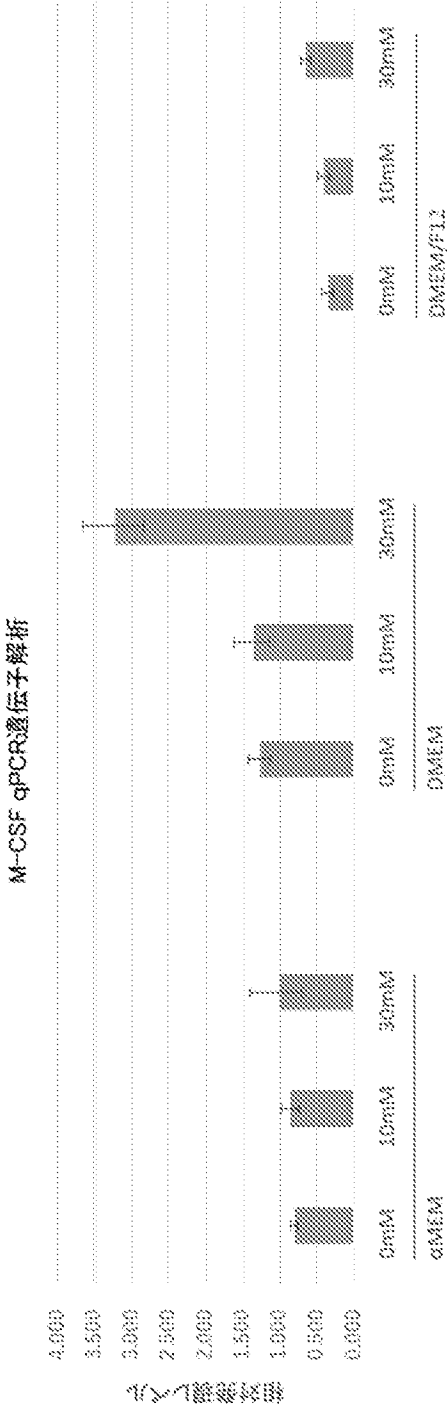
FIG. 29

Osteoprotegerin qPCR遺伝子解析



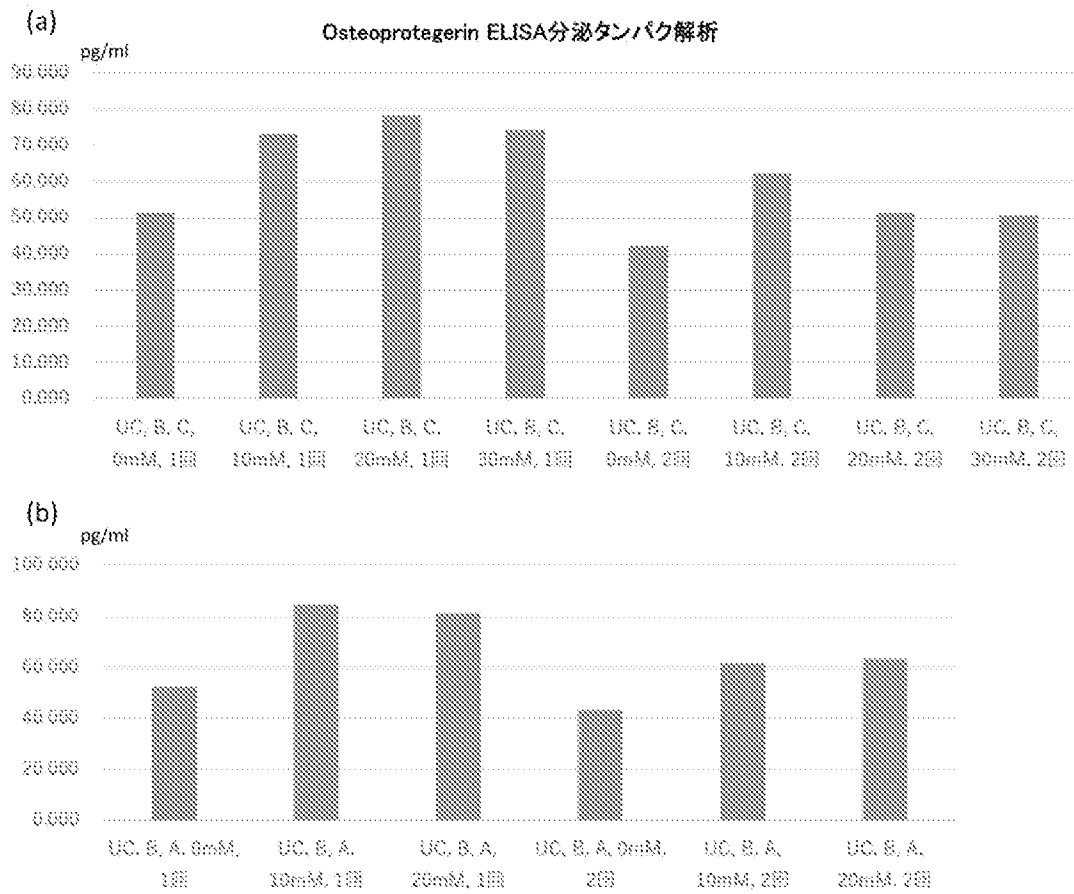
[図30]

FIG. 30



[図31]

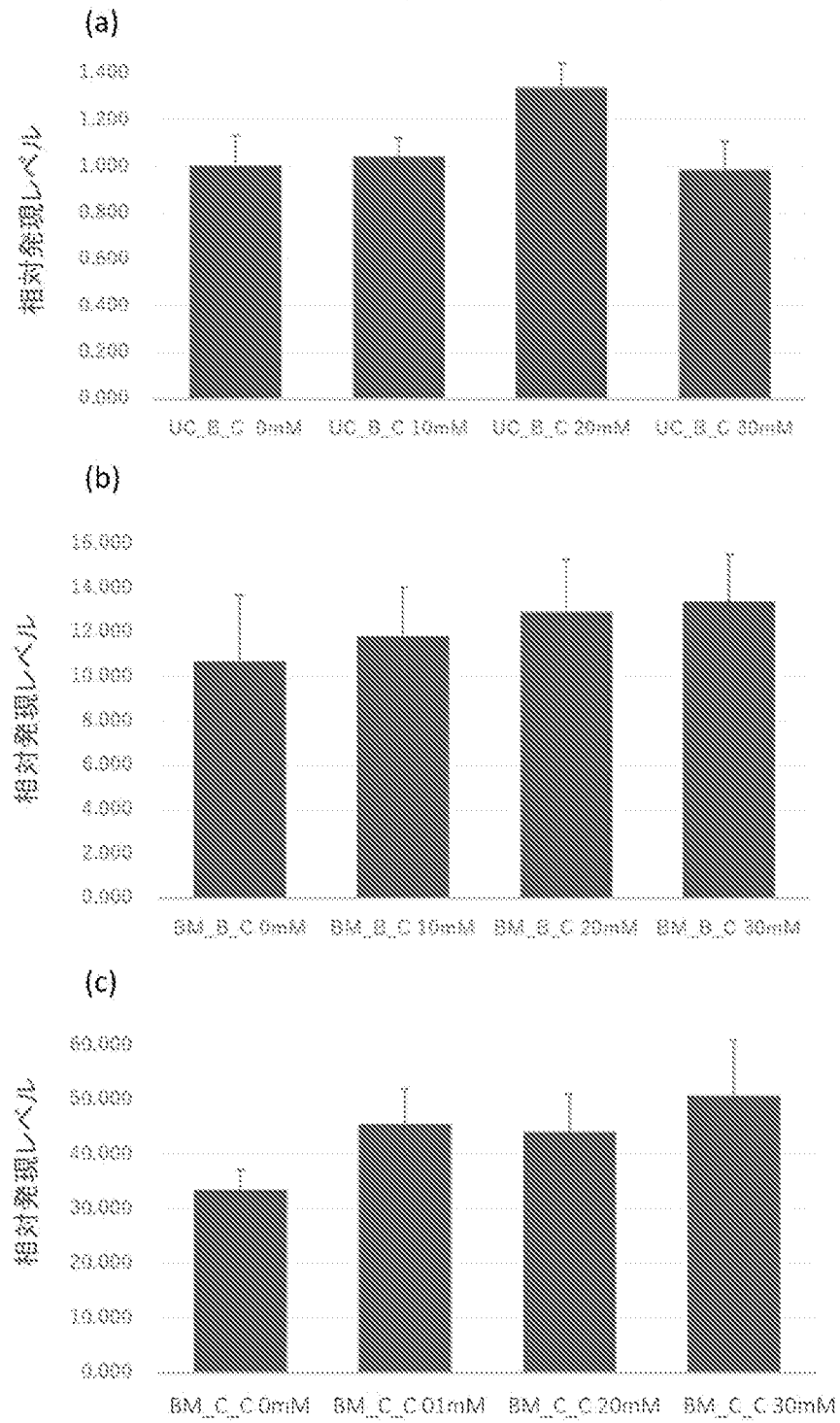
FIG. 31



[図32]

FIG. 32

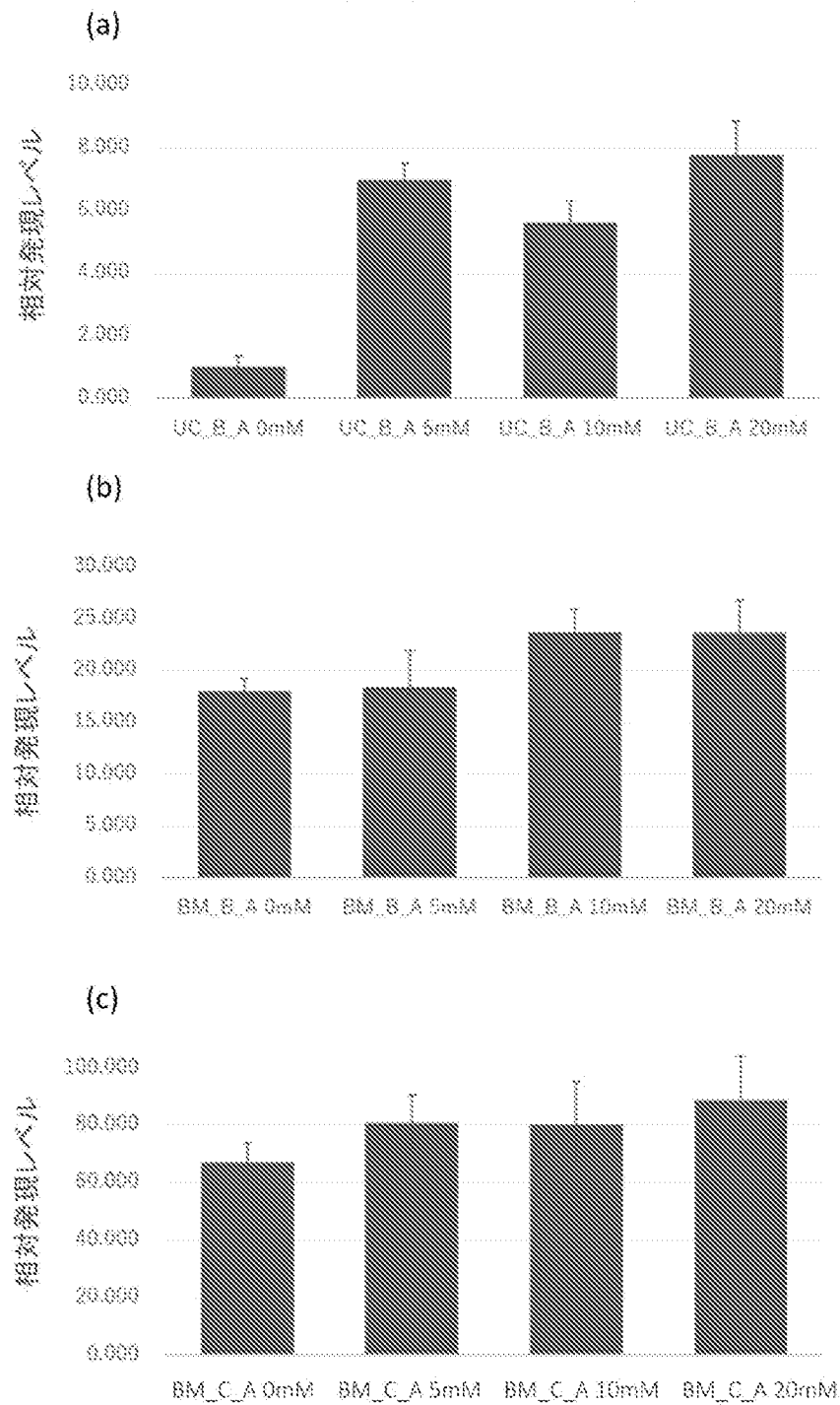
Osteoprotegerin qPCR遺伝子解析



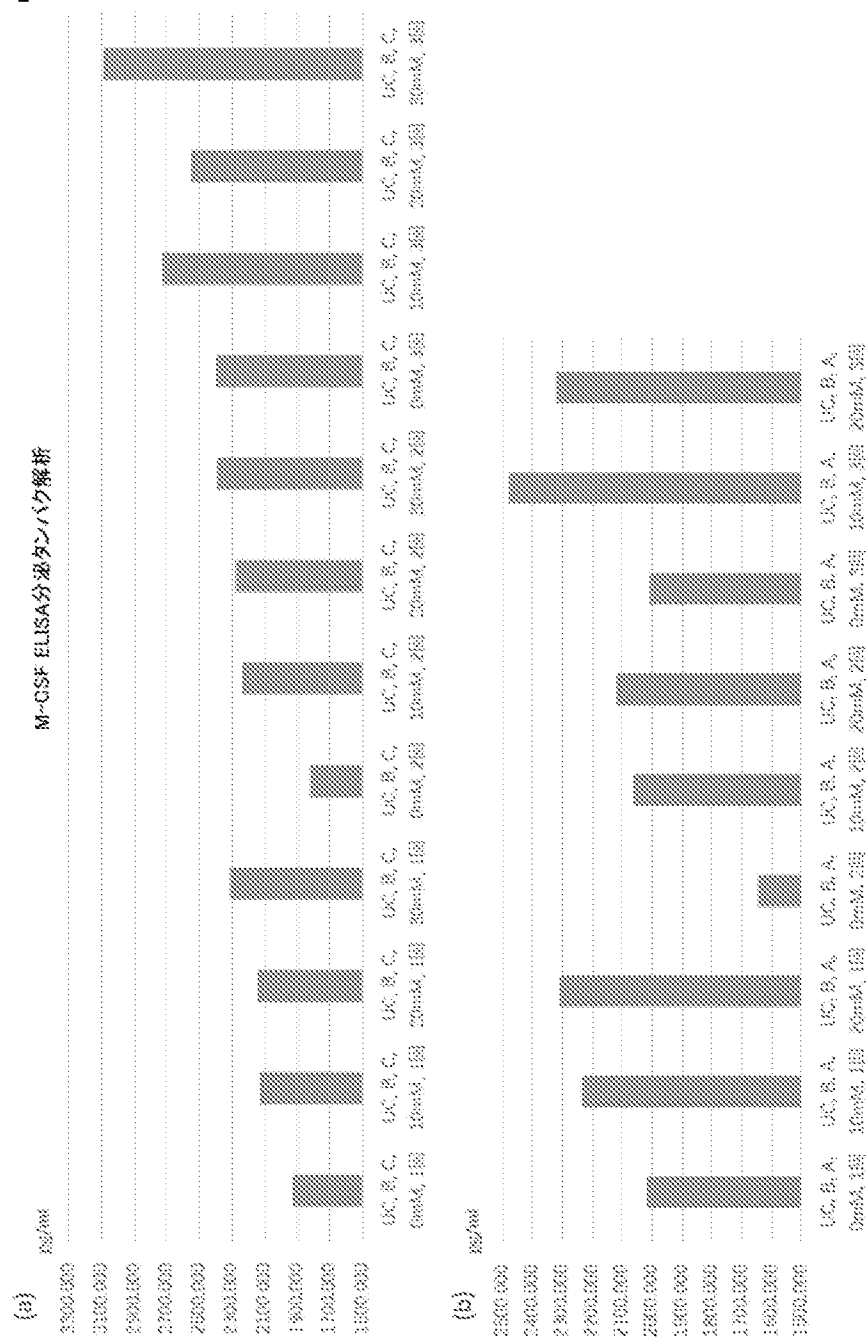
[図33]

FIG. 33

Osteoprotegerin qPCR遺伝子解析



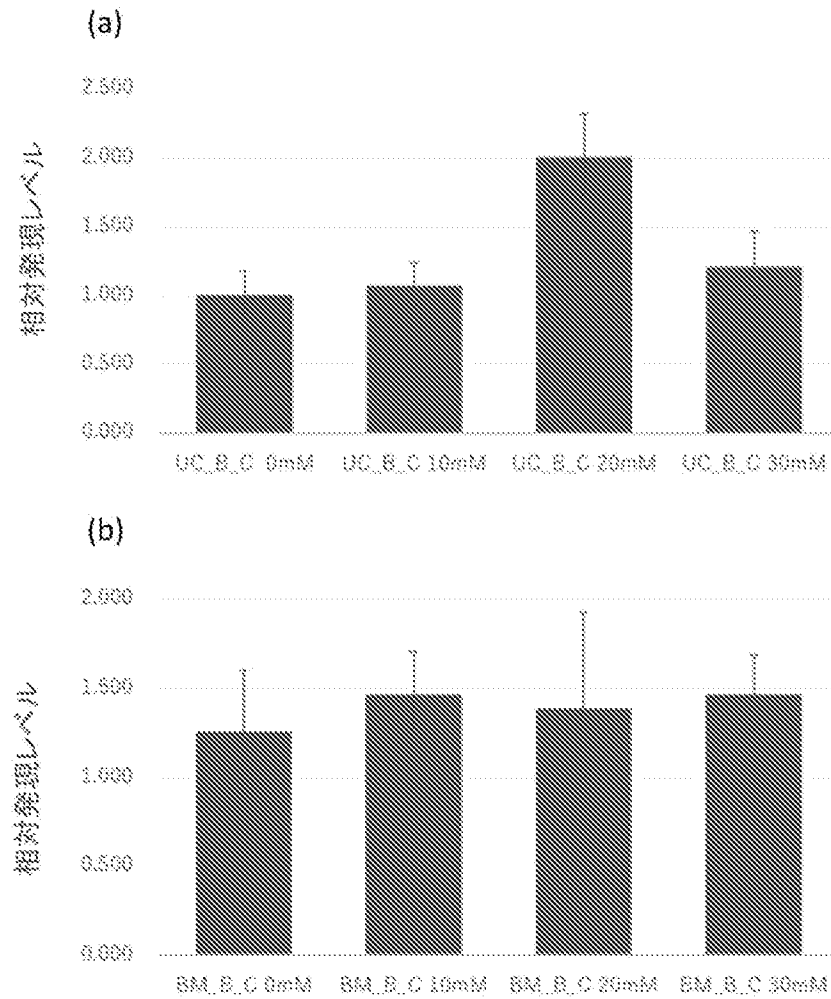
[図34]



[図35]

FIG. 35

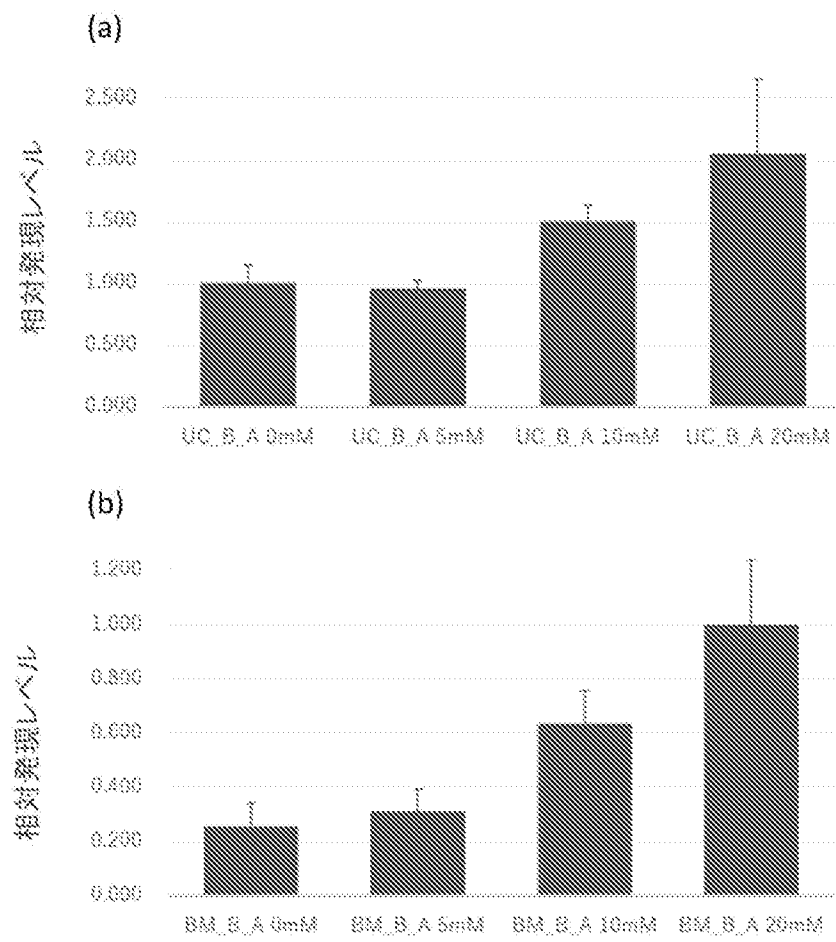
M-CSF qPCR遺伝子解析



[図36]

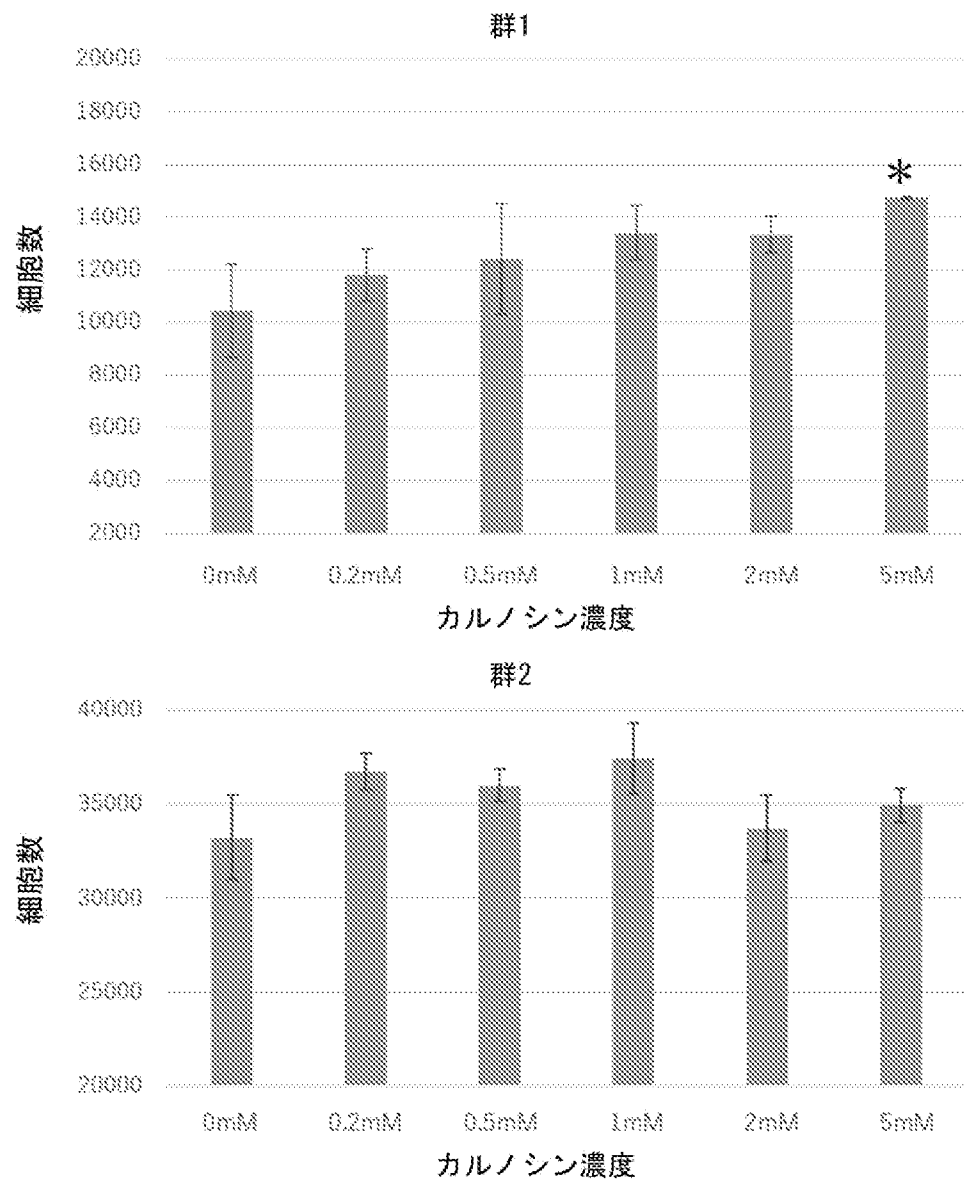
FIG. 36

M-CSF qPCR遺伝子解析



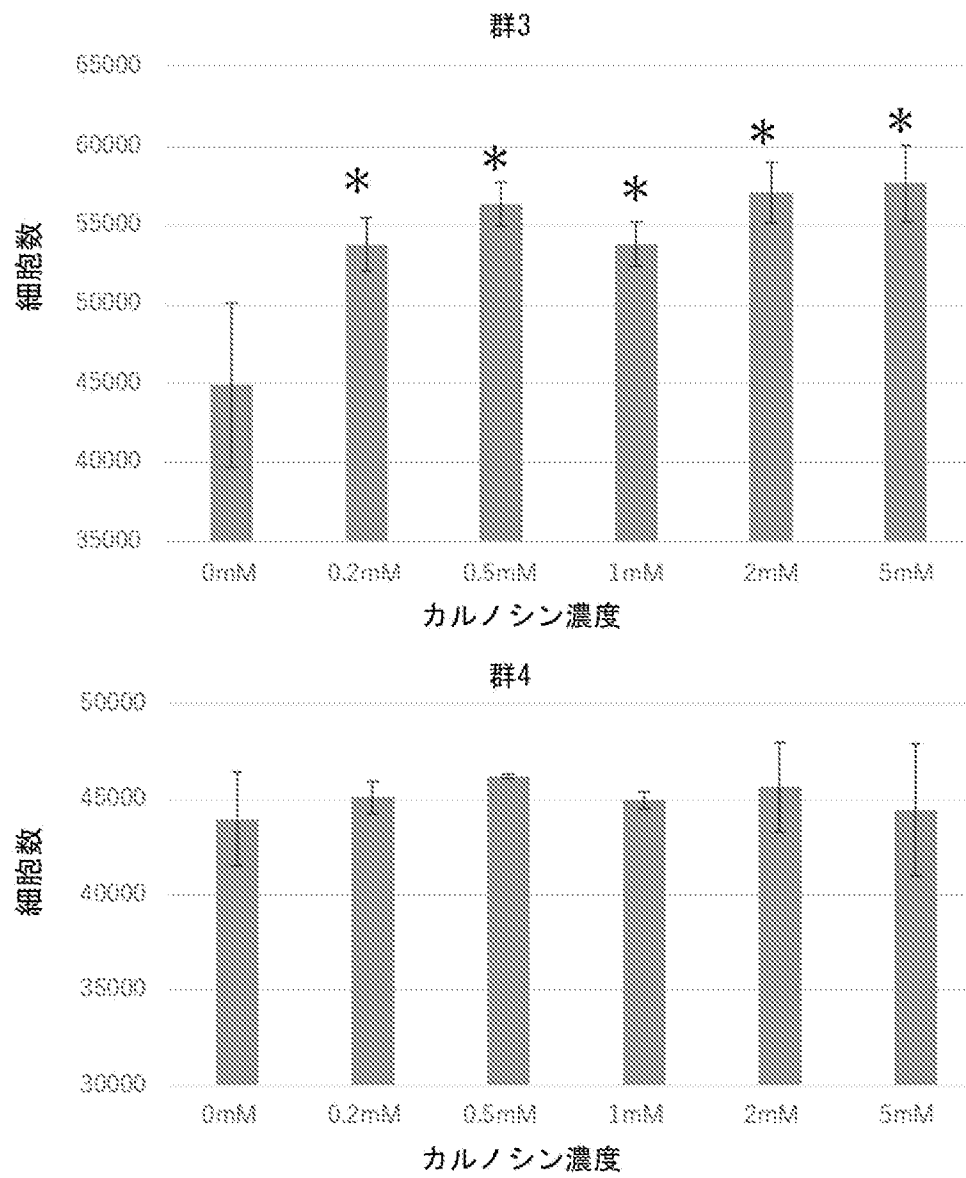
[図37]

FIG. 37



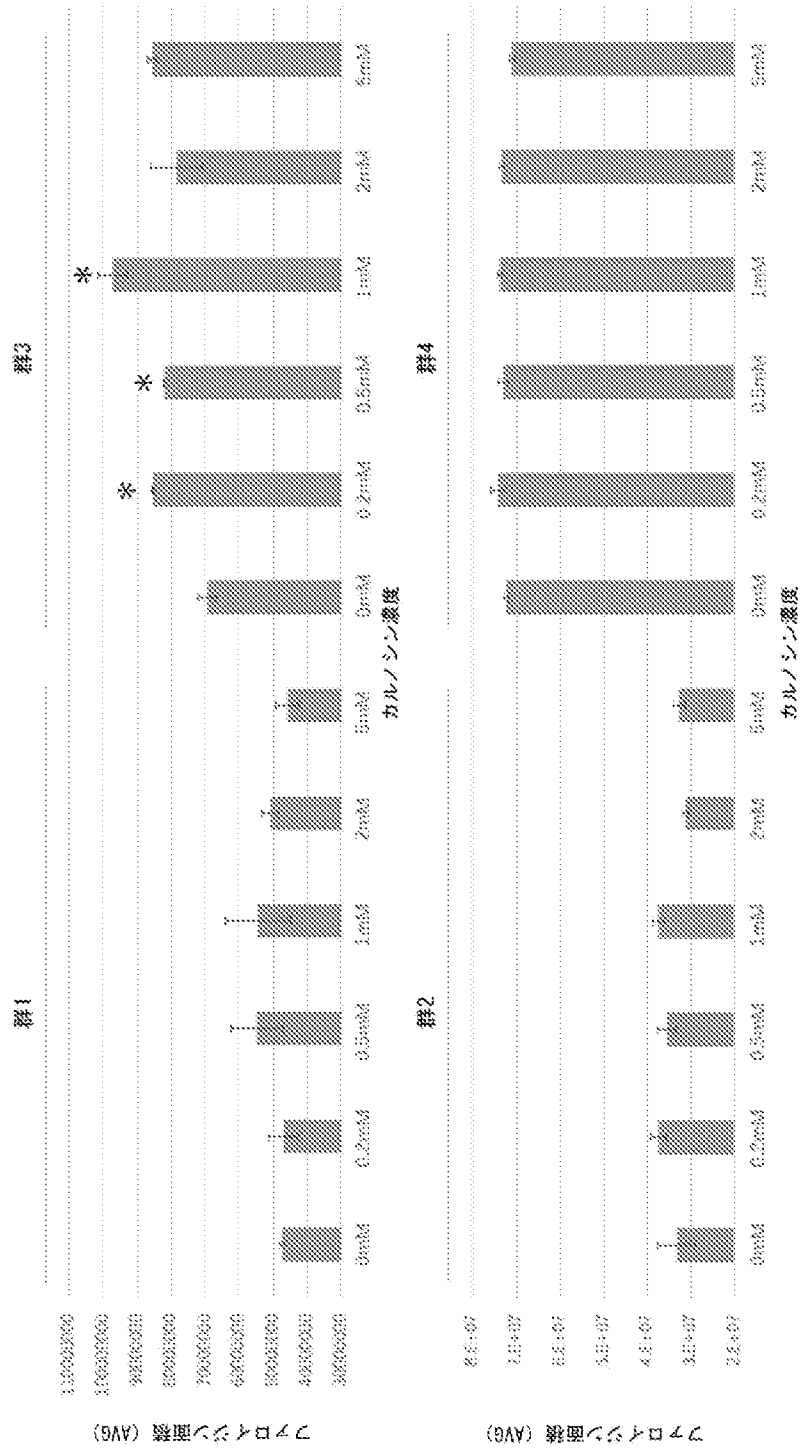
[図38]

FIG. 38



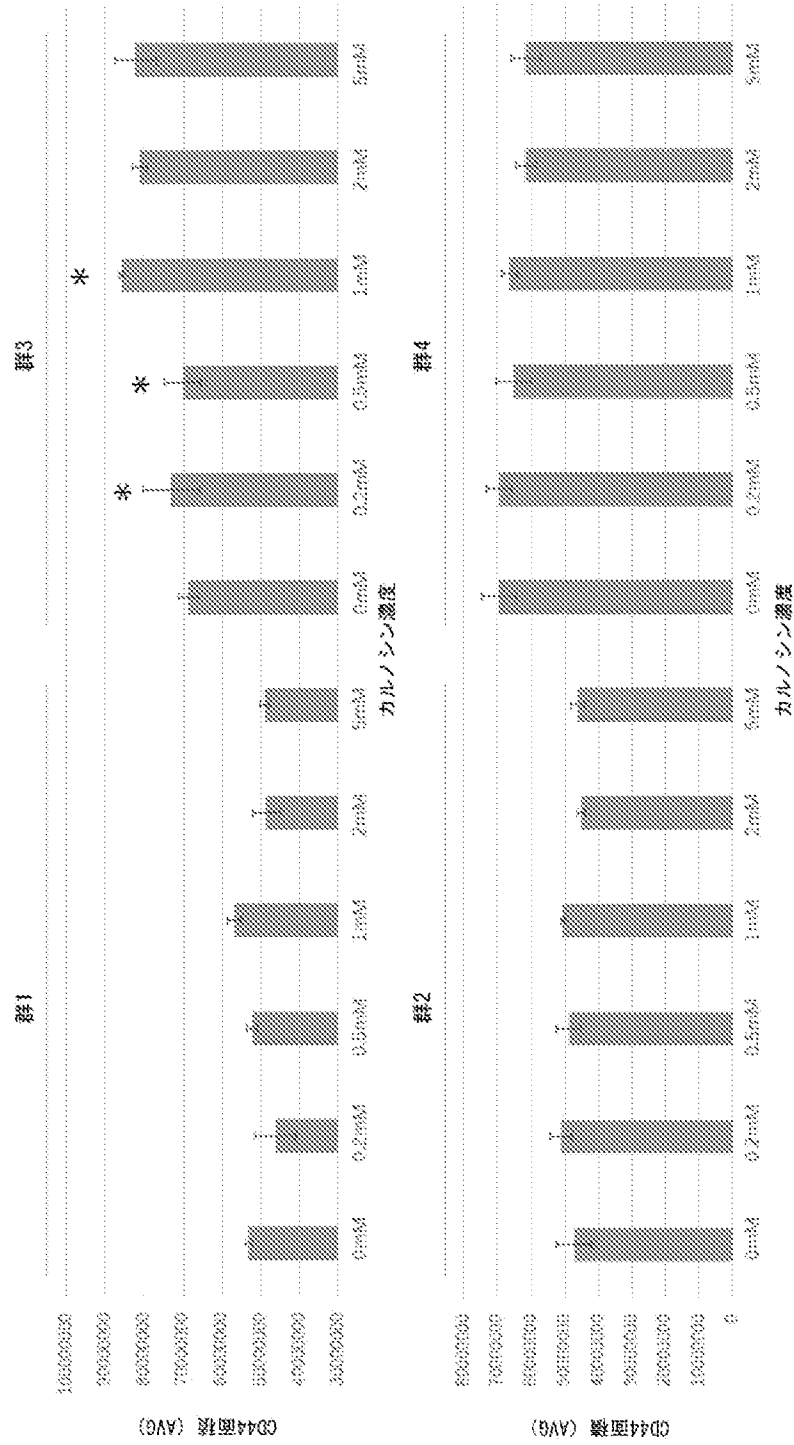
[図39]

FIG. 39



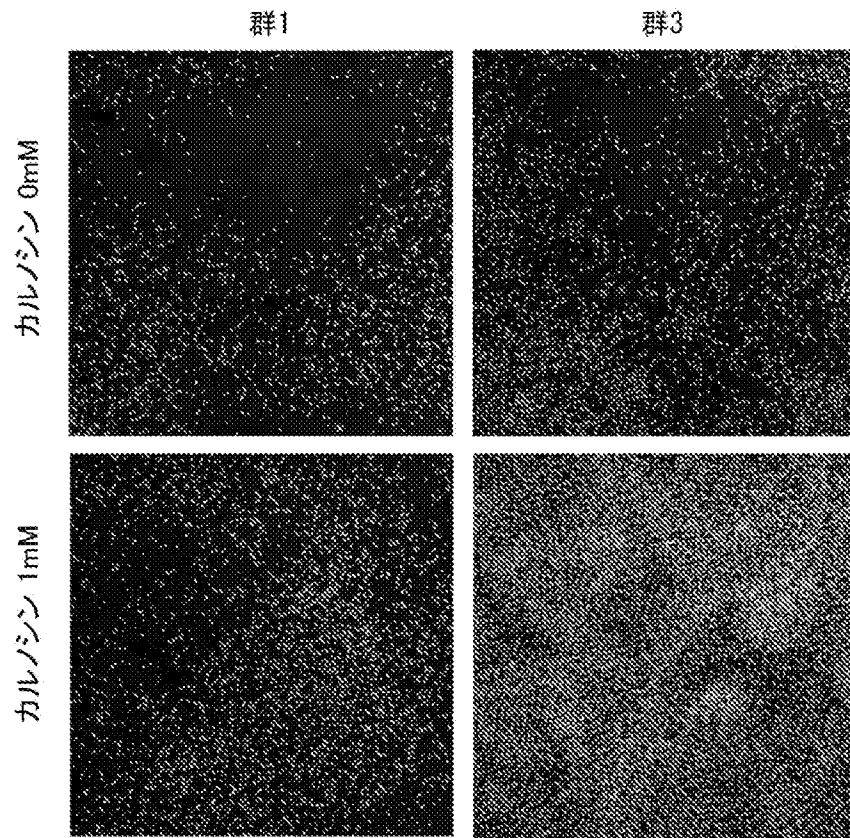
[図40]

FIG. 40



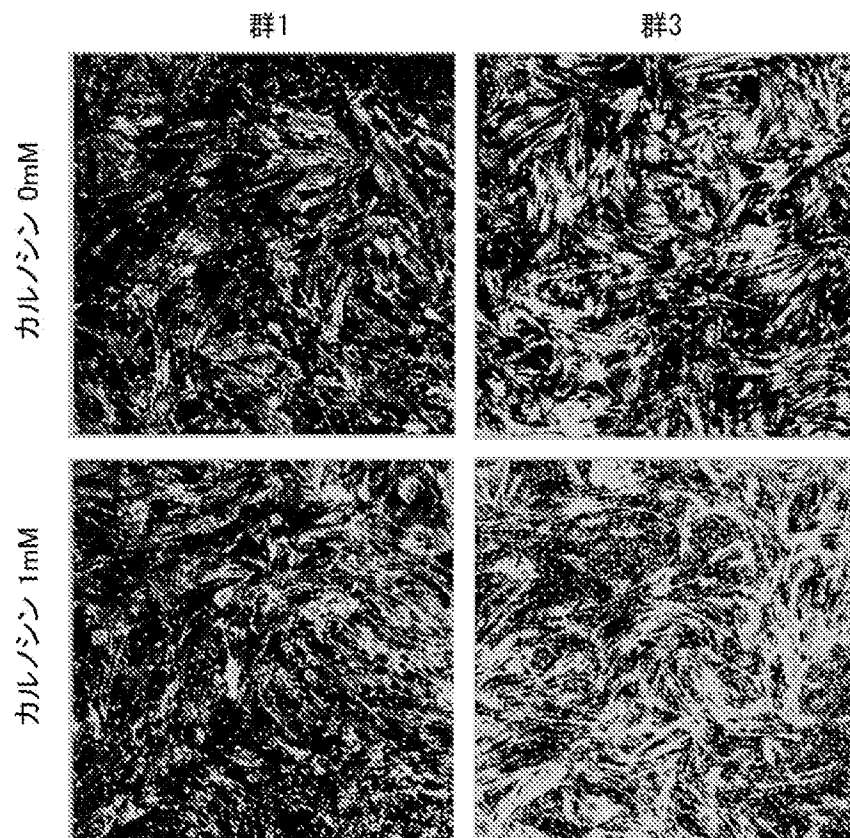
[図41]

FIG. 41



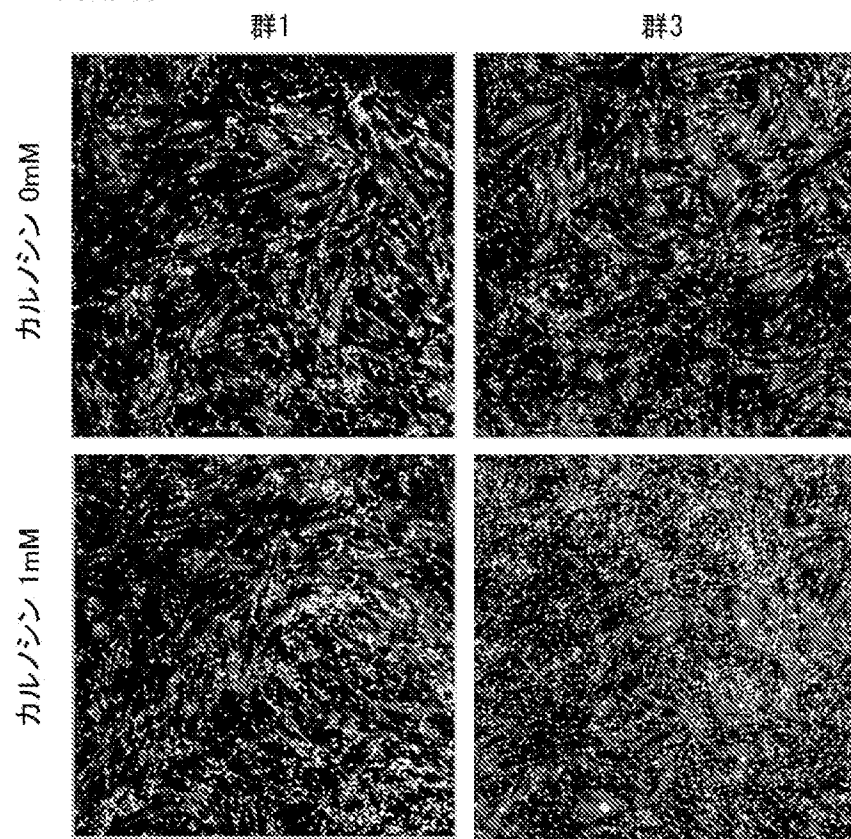
[図42]

FIG. 42



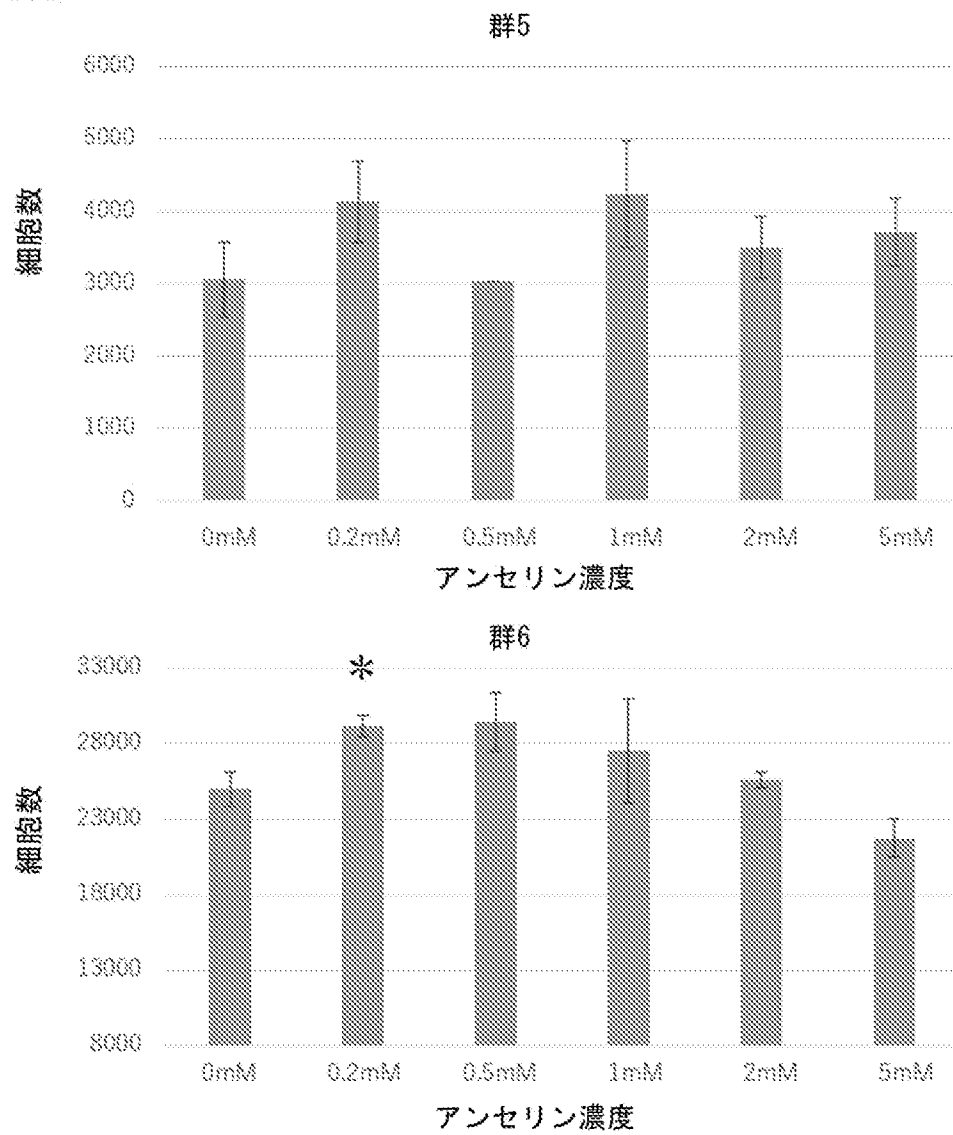
[図43]

FIG. 43



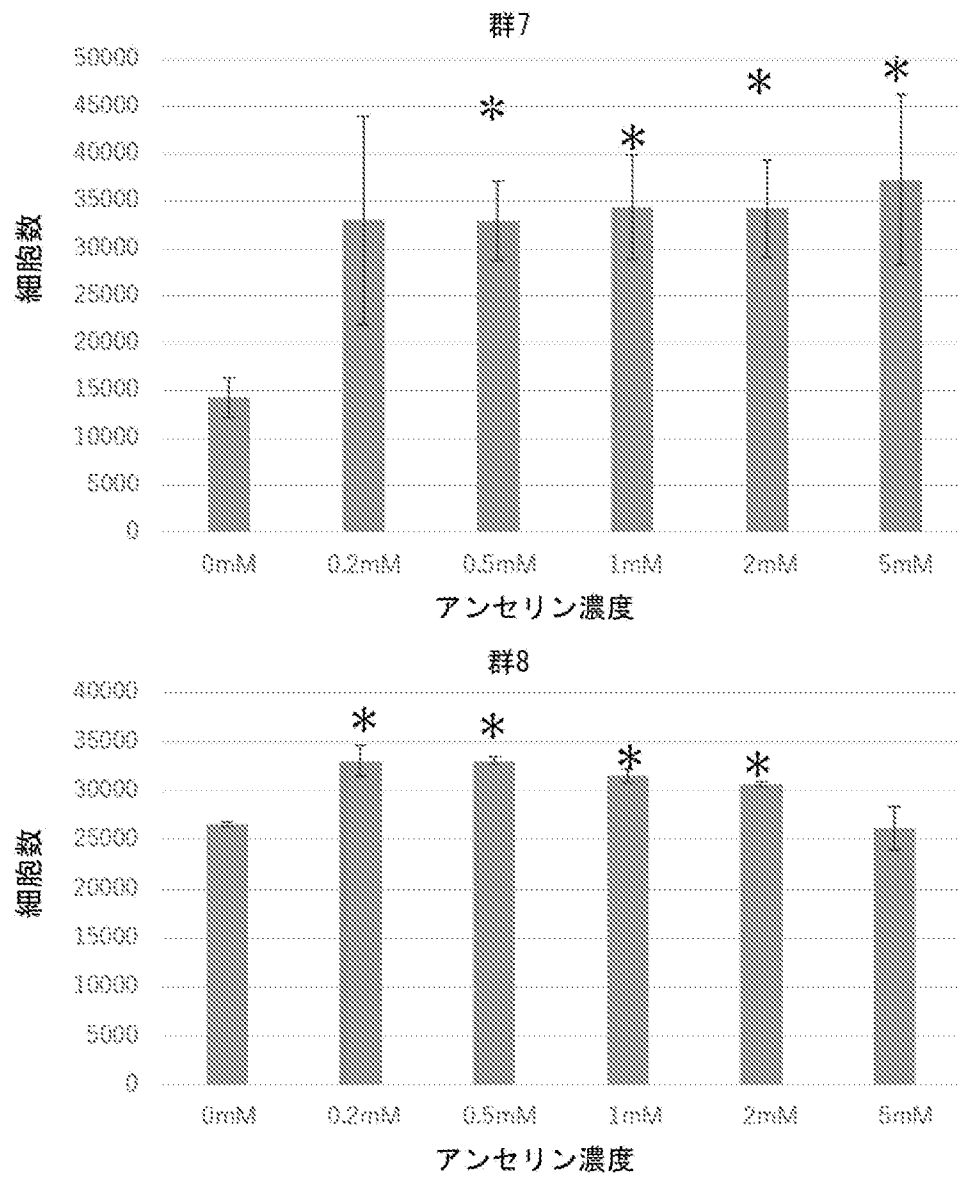
[図44]

FIG. 44



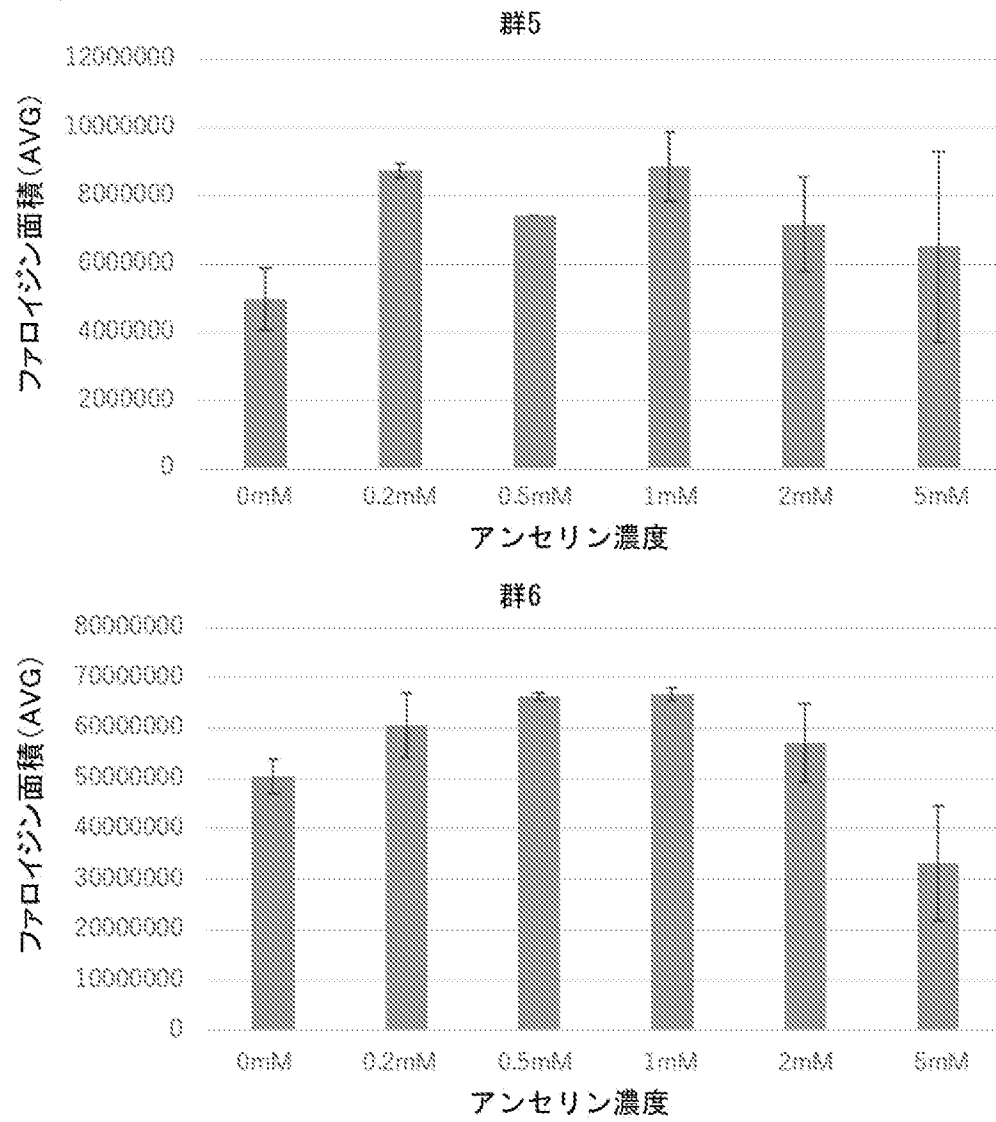
[図45]

FIG. 45



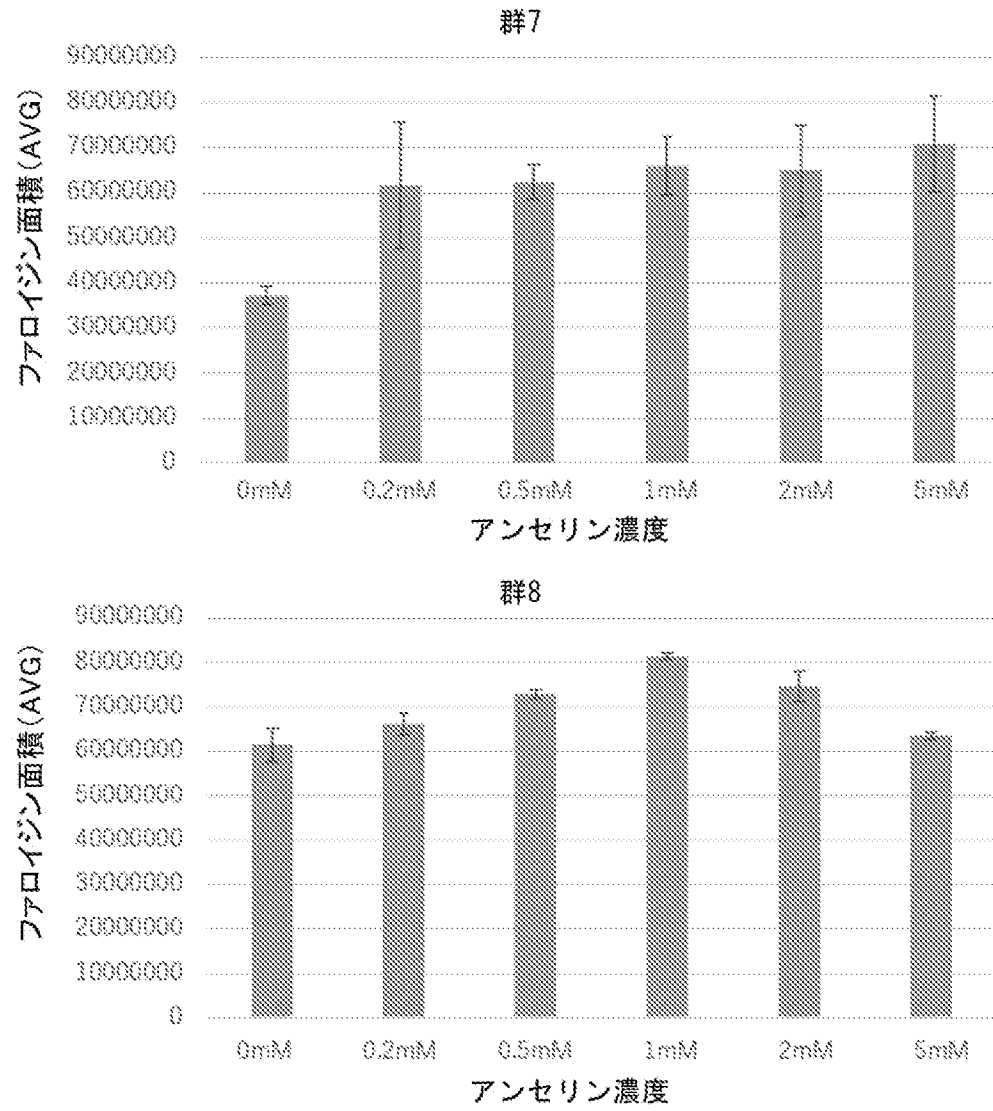
[図46]

FIG. 46



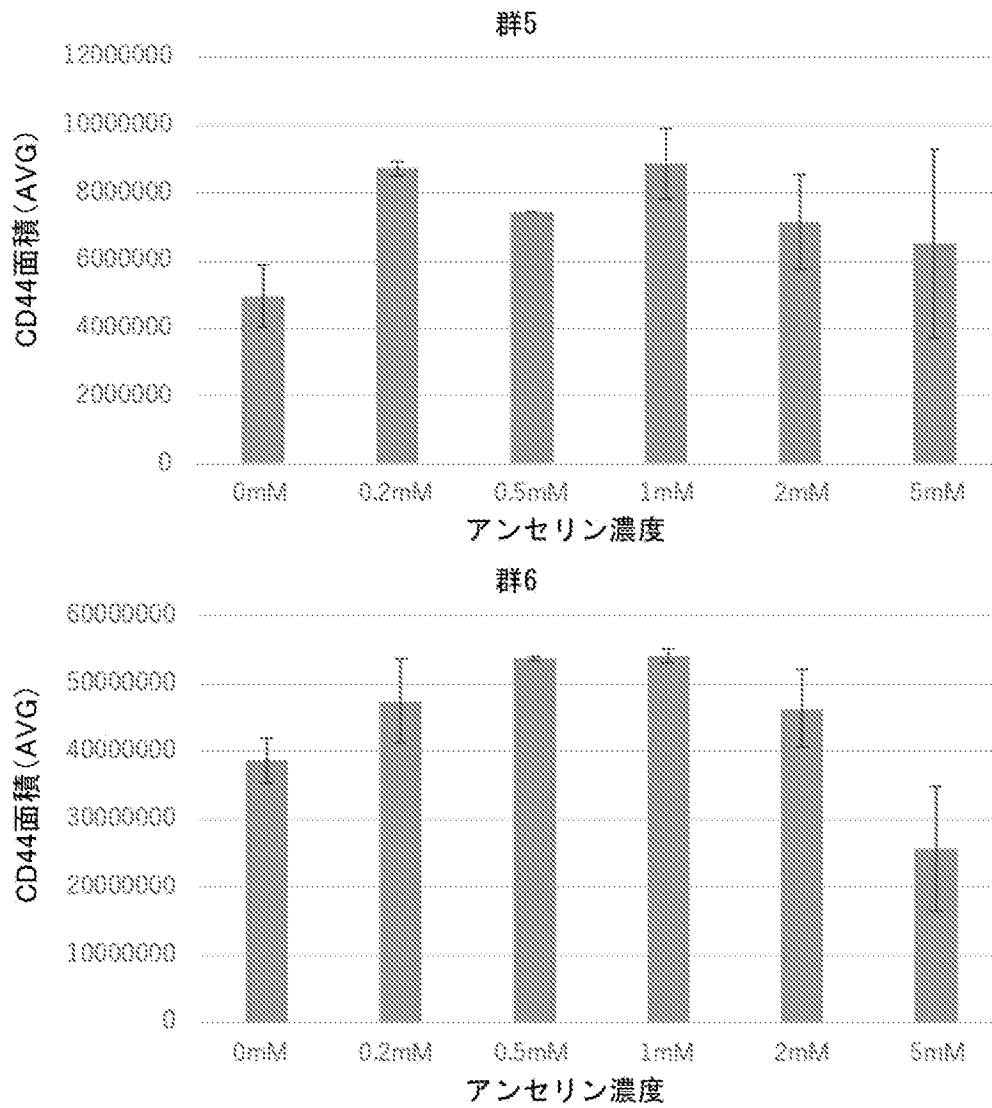
[図47]

FIG. 47



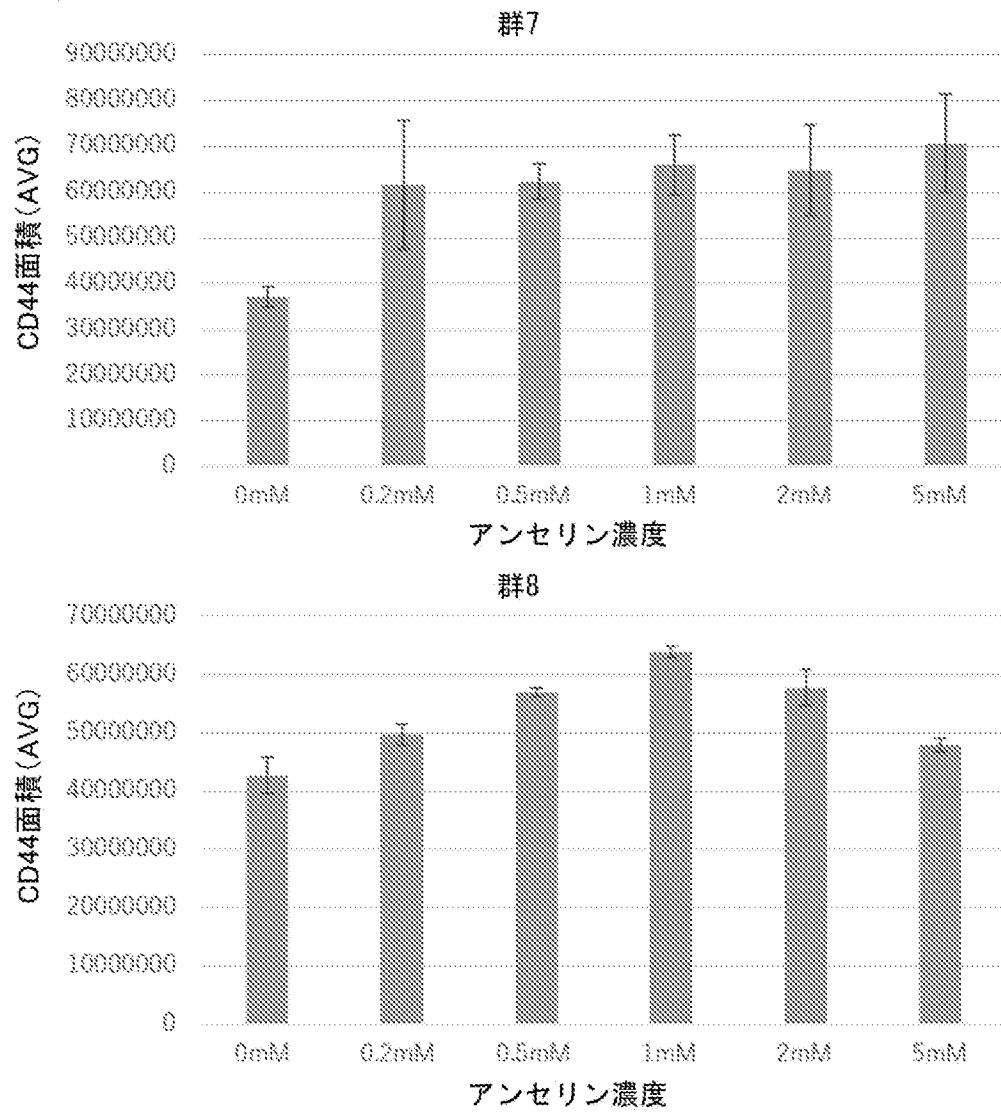
[図48]

FIG. 48



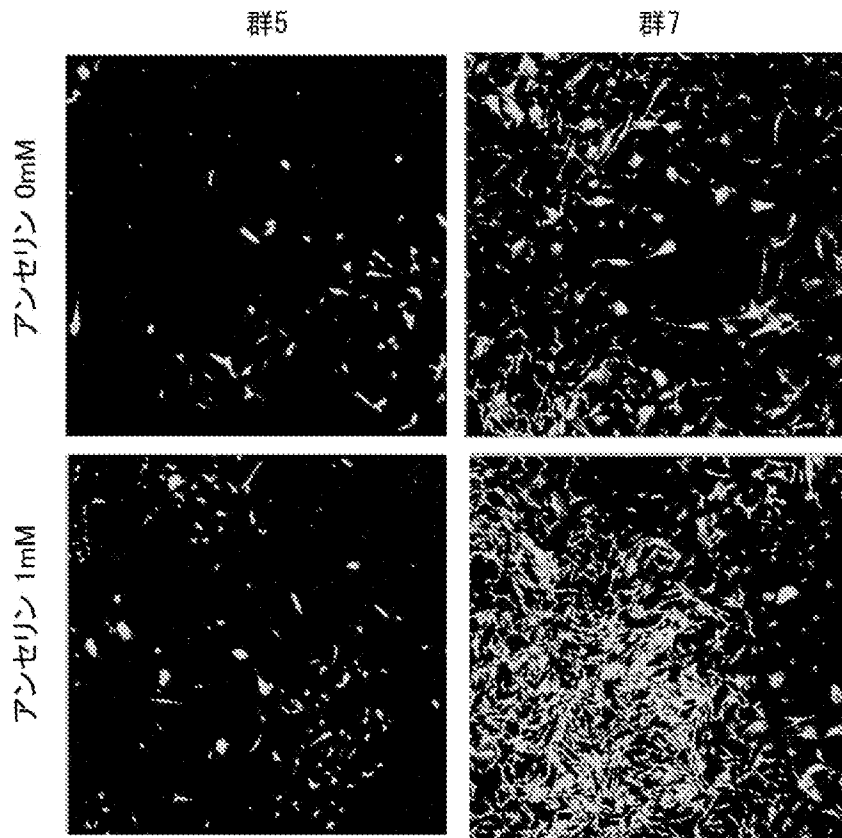
[図49]

FIG. 49



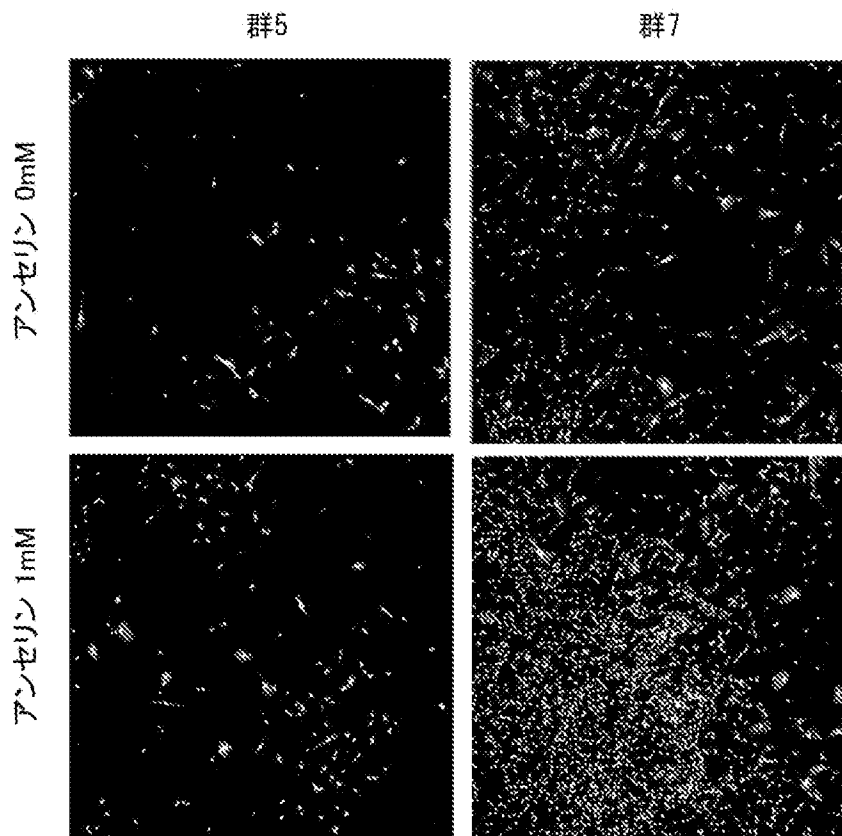
[図50]

FIG. 50



[図51]

FIG. 51



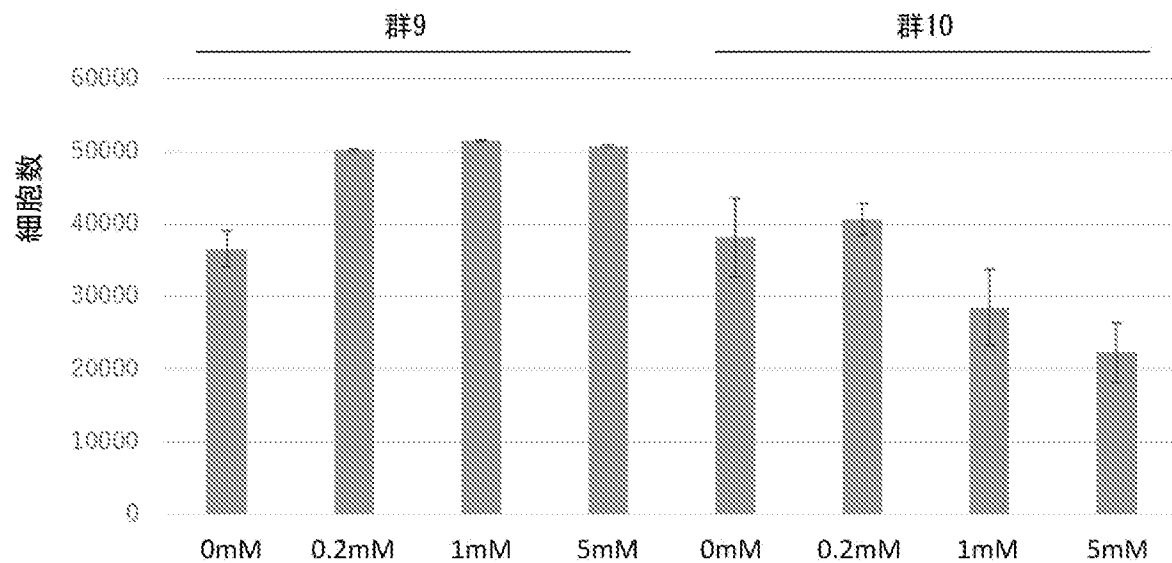
[図52]

FIG. 52

臍帯MSC	カルノシン0mM	カルノシン1mM	カルノシン5mM
CD44 %	100	100	100
CD45 %	0.3	0.4	0.3
CD73 %	98.5	98.9	96.5
CD90 %	99.8	100	99.9
CD105 %	99.2	99.2	99
HLA-ABC %	99.8	99.8	99.5
HLA-DR %	0.2	0.3	0.2
細胞数 cells	4.19x10e5	7.65x10e5	6.33x10e5

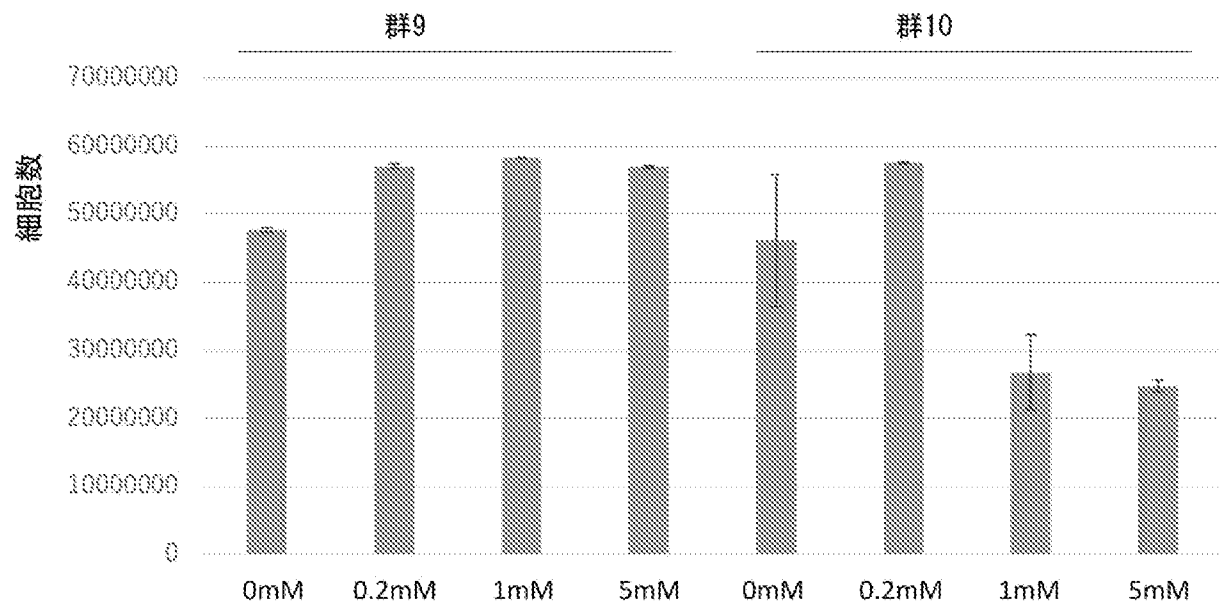
[図53]

FIG. 53



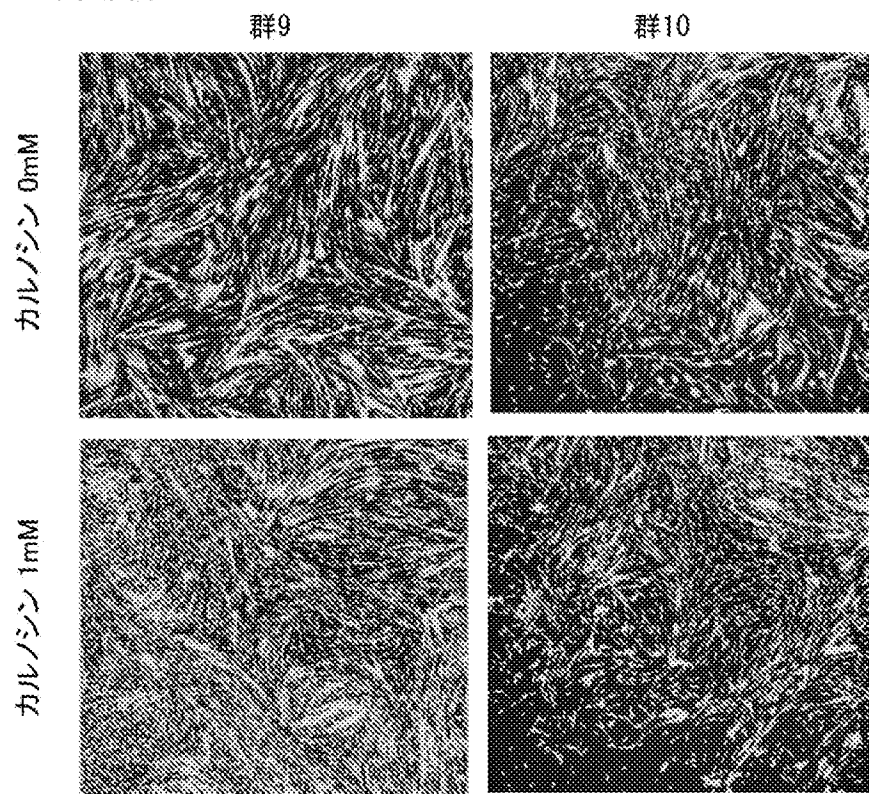
[図54]

FIG. 54



[図55]

FIG. 55



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/046277

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 1/00(2006.01)i; **A61K 35/12**(2015.01)i; **A61K 35/28**(2015.01)i; **A61K 35/51**(2015.01)i; **A61K 38/18**(2006.01)i; **A61K 38/19**(2006.01)i; **A61K 38/20**(2006.01)i; **A61P 19/00**(2006.01)i; **A61P 43/00**(2006.01)i; **C07K 5/062**(2006.01)i; **C12N 1/00**(2006.01)i; **C12N 5/0775**(2010.01)i

FI: C12P1/00 Z; A61K35/12; A61K35/28; A61K35/51; A61K38/18; A61K38/19; A61K38/20; A61P19/00; A61P43/00 111; C07K5/062; C12N1/00 G; C12N5/0775

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)

C12P1/00; A61K35/12; A61K35/28; A61K35/51; A61K38/18; A61K38/19; A61K38/20; A61P19/00; A61P43/00; C07K5/062; C12N1/00; C12N5/0775

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

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUN, Yi et al. Spheroid-cultured human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells attenuate hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. Scientific Reports. 2018, 8:2518	41
A	fig. 2b	1-40, 42-72
X	DORRONSORO, Akaitz et al. Intracellular role of IL-6 in mesenchymal stromal cell immunosuppression and proliferation. Scientific Reports. 2020, 10:21853	42
A	fig. 1C, E	1-41, 43-72

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 January 2024

Date of mailing of the international search report

30 January 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/046277

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WANG, Mei et al. Pre-treatment of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells with interleukin-6 abolishes their growth-promoting effect on gastric cancer cells. International Journal of Molecular Medicine. 2015, 35, 367-375 fig. 1	43,44 1-42, 45-72
X A	CHEMEL, Marguerite et al. Bone Morphogenetic Protein 2 and Transforming Growth Factor β 1 Inhibit the Expression of the Proinflammatory Cytokine IL-34 in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. The American Journal of Pathology. 2017, 187, 156-162 fig. 2, 3	45, 46, 51 1-44, 47-50, 52-72
X A	GAO, X. M. et al. Effects of interleukin-34 expressed by human bone marrow derived mesenchymal stem cells on THP-1 cells. Chinese Journal of Biotechnology. 2017, 33, 642-652 fig. 3	45, 46, 51 1-44, 47-50, 52-72
X A	DJOUAD, Farida et al. Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. Arthritis Research and Therapy. 2007, 9:R33 fig. 5(a)	47, 48, 51 1-46, 49, 50, 52-72
X A	JP 2013-518588 A (UNIVERSITY OF ROCHESTER) 23 May 2013 (2013-05-23) claim 36	47, 48, 51 1-46, 49, 50, 52-72
X A	CN 109504649 A (TIANJIN XIAOXI BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 22 March 2019 (2019-03-22) claims, examples	1-14, 16-26, 28-32, 61-69, 71, 72 15, 27, 33-60, 70
X A	CN 112094812 A (ZHENGZHOU ZUOJUE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 18 December 2020 (2020-12-18) claims, examples	1-8, 13, 14, 16-26, 28-35, 41, 42 9-12, 15, 27, 36-40, 43-72
X A	MAENO, Masao et al. Effect of β -alanyl-L-histidinato zinc on the differentiation pathway of human periodontal ligament cells. Life Sciences. 2004, 74, 2493-2504 abstract, fig. 1-7	1-14, 16-26, 28-32, 41, 42 15, 27, 33-40, 43-72
X A	KR 10-2022-0111374 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 09 August 2022 (2022-08-09) claims, examples	1-14, 16-26, 28-32, 41, 42 15, 27, 33-40, 43-72

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/046277

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/046277

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2013-518588	A	23 May 2013	US 2012/0294837 A1 claim 36	
CN	109504649	A	22 March 2019	(Family: none)	
CN	112094812	A	18 December 2020	(Family: none)	
KR	10-2022-0111374	A	09 August 2022	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12P 1/00(2006.01)i; A61K 35/12(2015.01)i; A61K 35/28(2015.01)i; A61K 35/51(2015.01)i; A61K 38/18(2006.01)i; A61K 38/19(2006.01)i; A61K 38/20(2006.01)i; A61P 19/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07K 5/062(2006.01)i; C12N 1/00(2006.01)i; C12N 5/0775(2010.01)i FI: C12P1/00 Z; A61K35/12; A61K35/28; A61K35/51; A61K38/18; A61K38/19; A61K38/20; A61P19/00; A61P43/00 111; C07K5/062; C12N1/00 G; C12N5/0775		
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）） C12P1/00; A61K35/12; A61K35/28; A61K35/51; A61K38/18; A61K38/19; A61K38/20; A61P19/00; A61P43/00; C07K5/062; C12N1/00; C12N5/0775 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2024年 日本国実用新案登録公報 1996-2024年 日本国登録実用新案公報 1994-2024年 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	SUN Yi et al., Spheroid-cultured human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells attenuate hepatic ischemia-reperfusion injury in rats, Scientific Reports, 2018, 8:2518 図2 b	41
A		1-40, 42-72
X	DORRONSORO Akaitz et al., Intracellular role of IL-6 in mesenchymal stromal cell immunosuppression and proliferation, Scientific Reports, 2020, 10:21853 図1 C、E	42
A		1-41, 43-72
☒ 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、一般的技术水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に 公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を 付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の 後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵 触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引 用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性 又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献 との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな いと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 19.01.2024	国際調査報告の発送日 30.01.2024	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 北田 祐介 4N 4868 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

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	WANG Mei et al., Pre-treatment of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells with interleukin-6 abolishes their growth-promoting effect on gastric cancer cells, International Journal of Molecular Medicine, 2015, 35, 367-375 図 1	43, 44 1-42, 45-72
X A	CHEMEL Marguerite et al., Bone Morphogenetic Protein 2 and Transforming Growth Factor β 1 Inhibit the Expression of the Proinflammatory Cytokine IL-34 in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts, The American Journal of Pathology, 2017, 187, 156-162 図 2、3	45, 46, 51 1-44, 47-50, 52-72
X A	GAO XM et al., Effects of interleukin-34 expressed by human bone marrow derived mesenchymal stem cells on THP-1 cells, Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33, 642-652 図 3	45, 46, 51 1-44, 47-50, 52-72
X A	DJOUD Farida et al., Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes, Arthritis Research and Therapy, 2007, 9:R33 図 5 (a)	47, 48, 51 1-46, 49, 50, 52-72
X A	JP 2013-518588 A (ユニバーシティ オブ ロチェスター) 23.05.2013 (2013 - 05 - 23) 請求項 3 6	47, 48, 51 1-46, 49, 50, 52-72
X A	CN 109504649 A (TIANJIN XIAOXI BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 22.03.2019 (2019 - 03 - 22) 請求の範囲、実施例	1-14, 16-26, 28-32, 61-69, 71, 72 15, 27, 33-60, 70
X A	CN 112094812 A (ZHENGZHOU ZUOJUE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 18.12.2020 (2020 - 12 - 18) 請求の範囲、実施例	1-8, 13, 14, 16-26, 28-35, 41, 42 9-12, 15, 27, 36-40, 43-72
X A	MAENO Masao et al., Effect of β -alanyl-L-histidinato zinc on the differentiation pathway of human periodontal ligament cells, Life Sciences, 2004, 74, 2493-2504 要約、図 1 - 7	1-14, 16-26, 28-32, 41, 42 15, 27, 33-40, 43-72
X A	KR 10-2022-0111374 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 09.08.2022 (2022 - 08 - 09) 請求の範囲、実施例	1-14, 16-26, 28-32, 41, 42 15, 27, 33-40, 43-72

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見：

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/046277

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2013-518588	A	23.05.2013	US 2012/0294837 A1 請求項 3 6	
CN	109504649	A	22.03.2019	(ファミリーなし)	
CN	112094812	A	18.12.2020	(ファミリーなし)	
KR	10-2022-0111374	A	09.08.2022	(ファミリーなし)	