

(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
2016年12月8日(08.12.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/194816 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 35/36 (2015.01) *A61P 17/02* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/065735
- (22) 国際出願日: 2016年5月27日(27.05.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-110656 2015年5月29日(29.05.2015) JP
- (71) 出願人: 日本臓器製薬株式会社(NIPPON ZOKI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5410046 大阪府大阪市中央区平野町2丁目1番2号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 出澤 真理(DEZAWA, Mari); 〒9808575 宮城県仙台市青葉区星陵町2-1 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP), 大津 見枝子(OHTSU, Mieko); 〒0100001 秋田県秋田市中通5-5-3 Akita (JP).
- (74) 代理人: 藤井 郁郎, 外(FUJII, Ikuro et al.); 〒5410046 大阪府大阪市中央区平野町2丁目1番2号 日本臓器製薬株式会社 技術法務部 Osaka (JP).

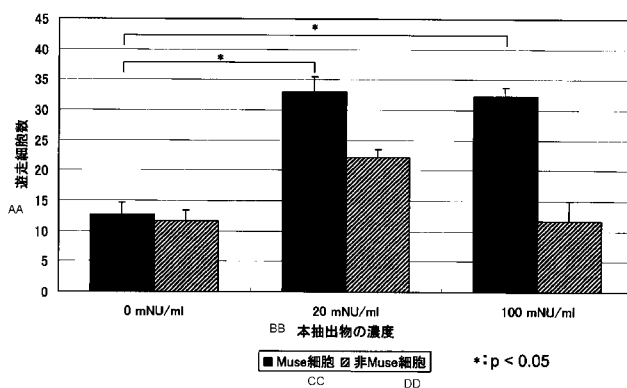
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: PLURIPOTENT STEM CELL MIGRATION PROMOTER

(54) 発明の名称: 多能性幹細胞遊走促進剤



AA Number of migrating cells
BB Concentrations of extract of the invention
CC Muse cells
DD Non-Muse cells

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide: a pluripotent stem cell migration promoter comprising an extract from a tissue having inflammation induced by the inoculation of a vaccinia virus; and others. In the present invention, it is demonstrated that an extract from a tissue having inflammation induced by the inoculation of a vaccinia virus can promote the migration of Muse cells. Thus, the present invention provides: a pluripotent stem cell migration promoter for various diseases on which the migration of pluripotent stem cells is expected to be effective; and others.

(57) 要約: 本発明の目的は、ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物を含有する多能性幹細胞遊走促進剤等を提供することにある。本発明において、ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物が Muse 細胞の遊走を促進することが示された。従って、本発明は多能性幹細胞の遊走により効果の期待される各種の疾患に対する多能性幹細胞遊走促進剤等を提供するものである。

WO 2016/194816 A1

明 細 書

発明の名称：多能性幹細胞遊走促進剤

技術分野

[0001] 本発明は、ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物（以下「本抽出物」と表記することがある。）の新規な医薬用途等に関するものである。より具体的には、本抽出物を含有する多能性幹細胞遊走促進剤等に関する。

背景技術

[0002] 幹細胞（stem cell）とは自己増殖能と多分化能を有する細胞であり、胚性幹細胞（embryonic stem cell；ES細胞）や人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell；iPS細胞）がよく知られている。しかし、ES細胞は受精卵を破壊して取り出すことになるため、倫理的な問題がある。また、受精卵は患者本人の細胞ではないため拒絶反応が問題となる。一方、iPS細胞は、その樹立のために特定の遺伝子や特定の化合物を体細胞に導入するという複雑な操作を必要とする上、人工的な初期化因子の導入による遺伝子損傷又は未分化細胞の残存が原因で引き起こされる腫瘍化が問題となる。

[0003] ところで、生体内にはもともと間葉系幹細胞とよばれる幹細胞が存在し、骨、軟骨、脂肪細胞、神経細胞、骨格筋等への分化能を有することが知られている。この分化能を利用して、骨関節疾患、脊椎損傷、パーキンソン病、糖尿病等の治療のための研究が行われている。間葉系幹細胞は、骨髓、脂肪組織、胎盤組織、臍帯組織、歯髄等の組織から取得できることが知られているが、様々な細胞を含む細胞群であるため、その治療効果にバラつきが大きいことが問題とされている。

[0004] 本発明者らの研究により、間葉系細胞画分に存在し、遺伝子導入等の複雑な誘導操作なしに得られる、SSEA-3（Stage-Specific Embryonic Antigen-3）を表面抗原として発現している多能性幹細胞（Multilineage-differentiating Stress Enduring cell；Muse細胞）が見出された。Muse細胞は、生体内の皮膚や骨髓、脂肪等の間葉系組織に存在しており、脊髄損傷、肝臓損傷、

腓腹筋損傷等の様々なモデルマウス（ヒト細胞を拒絶しない免疫欠損マウス）において、移植されたMuse細胞が損傷部位に集積し、損傷組織の細胞に分化することが明らかにされている（国際公開WO2011/007900）。また、本発明者らにより、ウサギ心筋梗塞モデルにおいても、移植されたMuse細胞が梗塞部位に集積し、梗塞サイズを縮小すること（国際公開WO2014/027474）、スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）等がMuse細胞の遊走能を亢進し、間葉系組織に存在するMuse細胞の損傷部位への遊走を誘導することが明らかにされている（国際公開WO2014/133170）。

[0005] 本発明に係る多能性幹細胞遊走促進剤に含有されるワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物（本抽出物）又はこれを含有する製剤については、鎮痛作用、鎮静作用、抗ストレス作用、抗アレルギー作用（特許文献1参照）、免疫促進作用、抗癌作用、肝硬変抑制作用（特許文献2参照）、特発性血小板減少性紫斑病に対する治療効果（特許文献3参照）、帯状疱疹後神経痛、脳浮腫、痴呆、脊髄小脳変性症等への治療効果（特許文献4参照）、レイノー症候群、糖尿病性神経障害、スモン後遺症等への治療効果（特許文献5参照）、カリクレイン産生阻害作用、末梢循環障害改善作用（特許文献6参照）、骨萎縮改善作用（特許文献7参照）、敗血症やエンドトキシンショックの治療に有効な一酸化窒素産生抑制作用（特許文献8参照）、骨粗鬆症に対する治療効果（特許文献9参照）、Ne f 作用抑制作用やケモカイン産生抑制作用に基づくエイズ治療効果（特許文献10、11参照）、脳梗塞等の虚血性疾患に対する治療効果（特許文献12参照）、線維筋痛症に対する治療効果（特許文献13参照）、感染症に対する治療効果（特許文献14参照）、抗癌剤による末梢神経障害の予防又は軽減作用（特許文献15参照）、慢性前立腺炎、間質性膀胱炎及び／又は排尿障害の治療効果（特許文献16参照）、BDNF等の神経栄養因子の産生促進作用（特許文献17参照）、軟骨細胞におけるコラーゲン及びプロテオグリカン合成促進作用（特許文献18参照）など非常に多岐に及ぶ作用・効果が知られている。しかしながら、本抽出物又はこれを含有する製剤が、多能性幹細胞の遊走促進作用を有することはこれ

まで知られていない。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特開昭53－101515号公報
特許文献2：特開昭55－87724号公報
特許文献3：特開平1－265028号公報
特許文献4：特開平1－319422号公報
特許文献5：特開平2－28119号公報
特許文献6：特開平7－97336号公報
特許文献7：特開平8－291077号公報
特許文献8：特開平10－194978号公報
特許文献9：特開平11－80005号公報
特許文献10：特開平11－139977号公報
特許文献11：特開2000－336034号公報
特許文献12：特開2000－16942号公報
特許文献13：国際公開WO2004／039383号公報
特許文献14：特開2004－300146号公報
特許文献15：国際公開WO2009／028605号公報
特許文献16：国際公開WO2011／111770号公報
特許文献17：国際公開WO2011／162317号公報
特許文献18：国際公開WO2012／051173号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、本抽出物を含有する多能性幹細胞遊走促進剤等を提供するものである。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは、有効な治療法が求められている損傷の薬剤治療について鋭

意研究を行った結果、本抽出物が優れた多能性幹細胞の遊走促進作用を有することを見出し、本発明を完成した。

発明の効果

[0009] 本抽出物は、多能性幹細胞の遊走を促進するという優れた薬理作用を有する。また、該抽出物を含有する製剤は、副作用等の問題点の少ない安全性の高い薬剤であるため、本発明は極めて有用性の高いものである。

[0010] 本発明において、損傷とは、生体が、内的及び／又は外的要因により全身的若しくは局所的に何らかの障害を受けることをいう。従って、本発明における損傷には、種々の外傷の他、梗塞、退行性病変、組織破壊等様々な状態が含まれる。また、損傷部位も、全身の種々の組織、例えば、脳、神経、腎臓、脾臓、肝臓、心臓、皮膚、骨、軟骨等様々なところが挙げられるが、これらに限定されるものではない。損傷を引き起こす要因としては、例えば、物理的な外力（事故、火傷、被爆等）、心筋梗塞等の虚血性心疾患、種々の炎症、糖尿病、種々の感染症、自己免疫疾患、腫瘍、毒物への暴露、神経変性疾患等が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1はPETメンブレンを通過したMuse細胞の染色像である。

[図2]図2は本抽出物のMuse細胞遊走活性を調べた試験結果である。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明は、ヒト脂肪細胞由来間葉系幹細胞から単離したMuse細胞を用い、当該細胞の遊走に対する本抽出物の作用を調べた結果に基づくものである。本発明の好ましい実施態様としては以下のようなものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。なお、本願において、「ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物を含有する多能性幹細胞遊走促進剤」という発明は、ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物自体が多能性幹細胞遊走促進剤である発明と、ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物を含有する製剤が多能性幹細胞遊走促進剤である発明を包含することを意味する。

[0013] (1) ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物を含有する多能性幹細胞遊走

促進剤。

(2) 多能性幹細胞の遊走促進が生体の損傷部位への誘導である上記(1)に記載の多能性幹細胞遊走促進剤。

(3) 多能性幹細胞がSSEA-3陽性細胞である上記(1)又は(2)に記載の多能性幹細胞遊走促進剤。

(4) 多能性幹細胞がMuse細胞である上記(1)～(3)のいずれかに記載の多能性幹細胞遊走促進剤。

(5) 炎症組織が皮膚組織である上記(1)～(4)のいずれかに記載の多能性幹細胞遊走促進剤。

(6) 炎症組織がウサギの皮膚組織である上記(1)～(4)のいずれかに記載の多能性幹細胞遊走促進剤。

(7) 注射剤である上記(1)～(6)のいずれかに記載の多能性幹細胞遊走促進剤。

(8) 経口剤である上記(1)～(6)のいずれかに記載の多能性幹細胞遊走促進剤。

(9) 経口剤が固形剤である上記(8)に記載の多能性幹細胞遊走促進剤。

(10) 固形剤が錠剤である上記(9)に記載の多能性幹細胞遊走促進剤。

(11) 経口剤が液剤である上記(8)に記載の多能性幹細胞遊走促進剤。

(12) カテーテルによって投与される上記(1)～(6)のいずれかに記載の多能性幹細胞遊走促進剤。

[0014] (13) 多能性幹細胞の遊走促進剤の製造におけるワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物の使用。

(14) 多能性幹細胞の遊走促進が生体の損傷部位への誘導である上記(13)に記載の使用。

(15) 多能性幹細胞がSSEA-3陽性細胞である上記(13)又は(14)に記載の使用。

(16) 多能性幹細胞がMuse細胞である上記(13)～(15)のいずれかに記載の使用。

(17) 炎症組織が皮膚組織である上記(13)～(16)のいずれかに記載の使用。

(18) 炎症組織がウサギの皮膚組織である上記(13)～(16)のいずれかに記載の使用。

(19) 多能性幹細胞の遊走促進剤が注射剤である上記(13)～(18)のいずれかに記載の使用。

(20) 多能性幹細胞の遊走促進剤が経口剤である上記(13)～(18)のいずれかに記載の使用。

(21) 経口剤が固形剤である上記(20)に記載の使用。

(22) 固形剤が錠剤である上記(21)に記載の使用。

(23) 経口剤が液剤である上記(20)に記載の使用。

(24) 多能性幹細胞の遊走促進剤がカテーテルによって投与される上記(13)～(18)のいずれかに記載の使用。

[0015] (25) 多能性幹細胞の遊走促進作用を指標とするワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤の判定又は評価方法。

(26) 多能性幹細胞が培養細胞である上記(25)に記載の判定又は評価方法。

(27) 多能性幹細胞がSSEA-3陽性細胞である上記(25)又は(26)に記載の判定又は評価方法。

(28) 多能性幹細胞がMuse細胞である上記(25)～(27)のいずれかに記載の判定又は評価方法。

(29) 炎症組織が皮膚組織である上記(25)～(28)のいずれかに記載の判定又は評価方法。

(30) 炎症組織がウサギの皮膚組織である上記(25)～(28)のいずれかに記載の判定又は評価方法。

[0016] (31) 上記(25)～(30)のいずれかに記載の判定又は評価方法によって品質規格が担保されたワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤。

(32) 上記(25)～(30)のいずれかに記載の判定又は評価を行うことによってワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤の品質規格を担保する方法。

[0017] (33) 損傷を予防、治療又は進行を抑制するために用いるワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤。

(34) 損傷の予防、治療又は進行抑制が多能性幹細胞の損傷部位への遊走によるものである上記(33)に記載のワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤。

(35) 多能性幹細胞がSSEA-3陽性細胞である上記(34)に記載のワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤。

(36) 多能性幹細胞がMuse細胞である上記(34)又は(35)に記載のワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤。

(37) 炎症組織が皮膚組織である上記(33)～(36)のいずれかに記載のワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤。

(38) 炎症組織がウサギの皮膚組織である上記(33)～(36)のいずれかに記載のワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤。

(39) 投与が注射によるものである上記(33)～(38)のいずれかに記載のワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤。

(40) 投与が経口によるものである上記(33)～(38)のいずれかに記載のワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤。

(41) 投与がカテーテルによるものである上記(33)～(38)のいずれかに記載のワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤。

[0018] (42) 治療が必要な患者にワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤を有効量投与することからなる損傷の予防、治療又は進行抑制方法。

(43) 損傷の予防、治療又は進行抑制が多能性幹細胞の生体の損傷部位へ

の遊走によるものである上記（４２）に記載の方法。

（４４）多能性幹細胞がSSEA-3陽性細胞である上記（４３）に記載の方法。

（４５）多能性幹細胞がMuse細胞である上記（４３）又は（４４）に記載の方法。

（４６）炎症組織が皮膚組織である上記（４２）～（４５）のいずれかに記載の方法。

（４７）炎症組織がウサギの皮膚組織である上記（４２）～（４５）のいずれかに記載の方法。

（４８）投与が注射によるものである上記（４２）～（４７）のいずれかに記載の方法。

（４９）投与が経口によるものである上記（４２）～（４７）のいずれかに記載の方法。

（５０）投与がカテーテルによるものである上記（４２）～（４７）のいずれかに記載の方法。

[0019] 本抽出物は、ワクシニアウイルスを接種して発痘した動物の炎症組織から抽出分離した非蛋白性の活性物質を含有する抽出物である。本抽出物は、抽出された状態では液体であるが、乾燥することにより固体にすることもできる。本抽出物を含有する製剤（以下「本製剤」という。）は、医薬品として非常に有用なものである。本製剤として出願人が日本において製造し販売している具体的な商品に「ワクシニアウイルス接種家兎炎症皮膚抽出液含有製剤」（商品名：ノイロトロピン／NEUROTROPIN〔登録商標〕）（以下「ノイロトロピン」という。）がある。ノイロトロピンには、注射剤と錠剤があり、いずれも医療用医薬品（ethical drug）である。

[0020] ノイロトロピンの注射剤の適応症は、「腰痛症、頸肩腕症候群、症候性神経痛、皮膚疾患（湿疹、皮膚炎、蕁麻疹）に伴う掻痒、アレルギー性鼻炎、スモン（SMON）後遺症状の冷感・異常知覚・痛み」である。ノイロトロピンの錠剤の適応症は、「带状疱疹後神経痛、腰痛症、頸肩腕症候群、肩関節周囲炎、変形性関節症」である。本製剤は、出願人が創製し、医薬品として開

発したものであり、その有効性と安全性における優れた特長が評価され、長年にわたり販売されて、日本の医薬品市場で確固たる地位を確立しているものである。

[0021] 本発明におけるワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物はワクシニアウイルスを接種して発痘した炎症組織を破碎し、抽出溶媒を加えて組織片を除去した後、除蛋白処理を行い、これを吸着剤に吸着させ、次いで有効成分を溶出することによって得ることができる。即ち、例えば、以下のような工程である。

(A) ワクシニアウイルスを接種し発痘させたウサギ、マウス等の皮膚組織等を採取し、発痘組織を破碎し、水、フェノール水、生理食塩液またはフェノール加グリセリン水等の抽出溶媒を加えた後、濾過または遠心分離することによって抽出液（濾液または上清）を得る。

(B) 前記抽出液を酸性のpHに調整して加熱し、除蛋白処理する。次いで除蛋白した溶液をアルカリ性に調整して加熱した後に濾過または遠心分離する。

(C) 得られた濾液または上清を酸性とし活性炭、カオリン等の吸着剤に吸着させる。

(D) 前記吸着剤に水等の抽出溶媒を加え、アルカリ性のpHに調整し、吸着成分を溶出することによってワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物を得ることができる。その後、所望に応じて、適宜溶出液を減圧下に蒸発乾固または凍結乾燥することによって乾固物とすることもできる。

[0022] ワクシニアウイルスを接種し炎症組織を得るための動物としては、ウサギ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、サル、ラット、マウスなどワクシニアウイルスが感染する種々の動物を用いることができ、炎症組織としてはウサギの炎症皮膚組織が好ましい。ウサギはウサギ目に属するものであればいかなるものでもよい。例としては、アナウサギ、カイウサギ（アナウサギを家畜化したもの）、ノウサギ（ニホンノウサギ）、ナキウサギ、ユキウサギ等がある。これらのうち、カイウサギが使用するには好適である。日本では過去から飼育され家畜又は実験用動物として繁用されている家兎（イエウサギ）と呼

ばれるものがあるが、これもカイウサギの別称である。カイウサギには、多数の品種（ブリード）が存在するが、日本白色種やニュージーランド白色種（ニュージーランドホワイト）といった品種が好適に用いられ得る。

[0023] ワクシニアウイルス (vaccinia virus) は、いかなる株のものであってもよい。例としては、リスター (Lister) 株、大連 (Dairen) 株、池田 (Ikeda) 株、EM-63株、ニューヨーク市公衆衛生局 (New York City Board of Health) 株等が挙げられる。

[0024] 上記した本抽出物の基本的な抽出工程 (A) ~ (D) は、より詳しくは、例えば、以下のようなものとして実施できる。

工程 (A) について

ウサギの皮膚にワクシニアウイルスを皮内接種して発痘させた炎症皮膚組織を採取する。採取した皮膚組織はフェノール溶液等で洗浄、消毒を行なう。この炎症皮膚組織を破碎し、その1乃至5倍量の抽出溶媒を加える。ここで、破碎とは、ミンチ機等を使用してミンチ状に細かく砕くことを意味する。また、抽出溶媒としては、蒸留水、生理食塩水、弱酸性乃至弱塩基性の緩衝液などを用いることができ、フェノール等の殺菌・防腐剤、グリセリン等の安定化剤、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム等の塩類などを適宜添加してもよい。この時、凍結融解、超音波、細胞膜溶解酵素又は界面活性剤等の処理により細胞組織を破壊して抽出を容易にすることもできる。得られた懸濁液を、5日乃至12日間放置する。その間、適宜攪拌しながら又は攪拌せずに、30乃至45℃に加温してもよい。得られた液を固液分離（濾過又は遠心分離等）によって組織片を除去して粗抽出液（濾液又は上清）を得る。

[0025] 工程 (B) について

工程 (A) で得られた粗抽出液について除蛋白処理を行う。除蛋白は、通常行われている公知の方法により実施でき、加熱処理、蛋白質変性剤（例えば、酸、塩基、尿素、グアニジン、アセトン等の有機溶媒など）による処理、等電点沈澱、塩析等の方法を適用することができる。次いで、不溶物を除去

する通常の方法、例えば、濾紙（セルロース、ニトロセルロース等）、ガラスフィルター、セライト、ザイツ濾過板等を用いた濾過、限外濾過、遠心分離などにより析出してきた不溶蛋白質を除去した濾液又は上清を得る。

[0026] 工程（C）について

工程（B）で得られた濾液又は上清を、酸性、好ましくはpH3.5乃至5.5に調整し、吸着剤への吸着操作を行う。使用可能な吸着剤としては、活性炭、カオリン等を挙げることができ、抽出液中に吸着剤を添加し攪拌するか、抽出液を吸着剤充填カラムに通過させて、該吸着剤に有効成分を吸着させることができる。抽出液中に吸着剤を添加した場合には、濾過や遠心分離等によって溶液を除去して、活性成分を吸着させた吸着剤を得ることができる。

[0027] 工程（D）について

工程（C）で得られた吸着剤から活性成分を溶出（脱離）させるには、当該吸着剤に溶出溶媒を加え、塩基性、好ましくはpH9乃至12に調整し、室温又は適宜加熱して或いは攪拌して溶出し、濾過や遠心分離等の通常の方法で吸着剤を除去する。用いられる溶出溶媒としては、塩基性の溶媒、例えば塩基性のpHに調整した水、メタノール、エタノール、イソプロパノール等又はこれらの適当な混合溶液を用いることができ、好ましくはpH9乃至12に調整した水を使用することができる。溶出溶媒の量は適宜設定することができる。このようにして得られた溶出液を、原薬として用いるために、適宜pHを中性付近に調整するなどして、最終的にワクシニアウイルス接種ウサギ炎症皮膚抽出物（本抽出物）を得ることができる。

[0028] 本抽出物は、できた時点では液体であるので、適宜濃縮・希釈することによって所望の濃度のものにすることもできる。本抽出物から製剤を製造する場合には、加熱滅菌処理を施すのが好ましい。注射剤にするためには、例えば塩化ナトリウム等を加えて生理食塩液と等張の溶液に調製することができる。また、液体あるいはゲル等の状態で経口投与することも可能であるが、本抽出物に適切な濃縮乾固等の操作を行うことによって、錠剤等の経口用固形製剤を製造することもできる。本抽出物からこのような経口用固形製剤を

製造する具体的な方法は、日本特許第3818657号や同第4883798号の明細書に記載されている。本製剤はこうして得られる注射剤や経口用製剤等である。また、本製剤は、カテーテルにより、Muse細胞を遊走させたい局所に投与するものとすることも可能である。

- [0029] 治療に必要な患者へ薬学的に有効な量を投与する方法としては、特に限定されず、治療目的に応じて適宜選択することができる。例えば、経口投与の他に皮下、筋肉内、静脈内投与、経皮投与等が挙げられるが、多能性幹細胞を損傷部位に集積させることを目的とした場合、例えばカテーテル等を用いて損傷部位に直接投与することが望ましい。投与量はワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物の種類によって適宜設定することができる。市販の製剤で認められている投与量は、基本的には内服では1日16NU、注射剤では1日3.6乃至7.2NUを投与するよう医療用医薬品としては示されているが、疾患の種類、重傷度、患者の個人差、投与方法、投与期間等によって適宜増減可能である（NU：ノイロトロピン単位。ノイロトロピン単位とは、疼痛閾値が正常動物より低下した慢性ストレス動物であるSARTストレスマウスを用い、Randall-Selitto変法に準じて試験を行い、鎮痛効力のED₅₀値をもって規定する。1NUはED₅₀値が100 mg/kgであるときのノイロトロピン製剤の鎮痛活性含有成分1mgを示す活性である。）。

- [0030] 以下に、本抽出物の製造方法の例、並びに本抽出物の新規な薬理作用、多能性幹細胞の遊走促進作用に関する薬理試験結果を示すが、本発明はこれらの実施例の記載によって何ら制限されるものではない。

実施例

- [0031] 実施例1（本抽出物の製造）

健康な成熟家兔の皮膚にワクシニアウイルスを皮内接種し、発痘した皮膚を切り取り採取した。採取した皮膚はフェノール溶液で洗浄・消毒を行なった後、余分のフェノール溶液を除去し、破碎して、フェノール溶液を加え混合し、3～7日間放置した後、さらに3～4日間攪拌しながら35～40℃に加温した。その後、固液分離して得た抽出液を塩酸でpH4.5～5.2に調整し、90～1

00℃で30分間、加熱処理した後、濾過して除蛋白した。さらに、濾液を水酸化ナトリウムでpH9.0～9.5に調整し、90～100℃で15分間、加熱処理した後、固液分離した。

[0032] 得られた除蛋白液を塩酸でpH4.0～4.3に調整し、除蛋白液質量の2%量の活性炭を加えて2時間攪拌した後、固液分離した。採取した活性炭に水を加え、水酸化ナトリウムでpH9.5～10とし、60℃で90～100分間攪拌した後、遠心分離して上清を得た。遠心分離で沈澱した活性炭に再び水を加えた後、水酸化ナトリウムでpH10.5～11とし、60℃で90～100分間攪拌した後、遠心分離して上清を得た。両上清を合せて、塩酸で中和し、本抽出物を得た。

[0033] 実施例2（試験方法と試験結果）

次に、上記実施例1で得られた本抽出物の、Muse細胞の細胞遊走活性化作用を示す薬理試験の試験方法及び試験結果を示す。

[0034] 試験例1 ボイデンチャンバー法を用いた評価

細胞及び試薬

ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞（Lonza）を、15%ウシ胎児血清（FBS）及び0.1mg/mLのカナマイシン硫酸塩（Gibco）を含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM；Gibco）を用いて37℃のCO₂インキュベーター内で培養した。

[0035] Muse細胞遊走能の測定

測定前日にMuse細胞および非Muse細胞をFACS（fluorescence activated cell sorting）により単離し、37℃、5%CO₂条件下で一晩培養した。測定日にCorning BioCoat Matrigel（登録商標、以下同様）Invasion Chamber（24 well, 8.0μm, BD Bioscience）のカルチャーインサート（上段）をアッセイ用培地に浸し、37℃、5%CO₂インキュベーターで2時間インキュベートした。2時間後、コンパニオンプレート（下段）に、各濃度（0, 20, 100 mNU/mL）の本抽出物を含む培地を1ウェルあたり750μL添加した。前日に単離したMuse細胞及び非Muse細胞を、トリパンブルー排除法でカウントし、各々5×10⁴細胞/500μLになるよう10%FBSを含む培地に懸濁した。カルチャーインサートに、各細胞懸濁液を1ウェルあたり500μL添加し、Corning BioCoat Matrigel Invasion

Chamberを37℃、5%CO₂条件下で静置した。静置24時間後、カルチャーインサートの上側表面に残存するPETメンブレンを通過していない細胞を綿棒で擦り取り、カルチャーインサートから除去した。カルチャーインサートの下側表面のPETメンブレンを通過した遊走細胞をディフ・ウィックキット（シスメックス）を用いて染色した。メンブレンを風乾後、PETメンブレン下側の細胞を1メンブレンあたり倍率200倍下で独立した4視野を観察し、細胞数を計測した。4視野の平均細胞数を1メンブレンあたりの遊走細胞数とした。PETメンブレンを通過した遊走細胞の染色像を図1に示した。細胞の本来の色は紫色であるが、染色像においては、淡い色に染まっているのが細胞である（黒い点に見えるものは細胞ではない）。

[0036] 統計解析

2群間は、student のt-検定を用いて比較し、 $p < 0.05$ であった場合を「有意」とした。試験は3回実施し、平均細胞数及び標準誤差を求めた。3回の試験では同様の結果が得られたので、代表的なデータを提示した。

[0037] 試験結果

Muse細胞群では、本抽出物の濃度が20mNU/mL及び100mNU/mLの時、遊走細胞数が有意に増加した。すなわち、本抽出物は、Muse細胞に対して遊走促進作用を有することが示された。一方、非Muse細胞群では、遊走細胞数の有意な増加はみられなかった。以上のことから、本抽出物は、Muse細胞の遊走を特異的に促進することが示された。結果の一例を図2に示した。図中、横軸は、本抽出物の異なる濃度を示し、縦軸は、本抽出物により遊走されたMuse細胞数を示す。

[0038] 試験例2 細胞動態解析技術（TAXIScanテクノロジー）を用いた評価細胞及び試薬

ヒト骨髓由来間葉系幹細胞を、ダルベッコPBS、0.5%ウシ血清アルブミン及び2mM EDTA（エチレンジアミン四酢酸）を含むFACSバッファーを用いて細胞濃度が 1×10^7 細胞/mLとなるように調製した。1次抗体として抗SSEA-3抗体（400倍希釈）を添加し、氷上で1時間、適時懸濁しながら反応させた後、遠心分離

し上清を除去した。その後、FACSバッファの添加と除去を3回繰り返して洗浄した。2次抗体としてFITC標識抗ラットIgM抗体（100倍希釈）を添加し、上記同様、氷上で1時間反応させた後、FACSバッファの添加と除去を3回繰り返して洗浄した。

[0039] Muse細胞遊走能の測定

測定前日にSSEA-3陽性の細胞をFACSにより単離し、37℃、5%CO₂条件下で一晩培養した。測定日に培養した細胞を回収し、25mM HEPES（2-[4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-イル]エタンスルホン酸）を加えた遊走能測定用培地を用いて細胞を懸濁した。EZ-TAXIScan（登録商標、以下同様）ホルダーチャンバー（GE Healthcare）の各ウェルに細胞懸濁液を注入し、水位差法にて細胞をテラス前に整列させた。なお、テラスの深さは6μmとした。EZ-TAXIScanホルダーチャンバーを37℃、5%CO₂条件下でインキュベーターに入れた。その後、EZ-TAXIScanホルダーチャンバーをインキュベーターから取り出し、EZ-TAXIScan（GE Healthcare）の本体プレートに設置後、試料側ウェルに本抽出物50mNU/mL又は陽性対照として、スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）2μMを添加した。10分毎に各ウェルの写真を撮影し、遊走能を経時的に測定した。S1Pはスフィンゴ脂質由来の脂質メディエーターであり、S1P受容体を介して細胞の生存、増殖、分化、運動等を調節する。さらに、S1PがMuse細胞の遊走促進作用を有することが明らかにされている（国際公開WO 2014 / 133170）。

[0040] 試験結果

本抽出物添加群では、添加した方向にMuse細胞が移動し、チャンバー外部まで移動する細胞が複数個認められた。陽性対照として使用したS1P添加群でも同様にMuse細胞の移動が確認された。

産業上の利用可能性

[0041] 以上のとおり、本抽出物がMuse細胞の遊走促進作用を示すことが明らかにされた。この結果から、本抽出物又はこれを含む製剤の投与は、損傷の治療を促進する効果的な方法になり得ると考えられた。

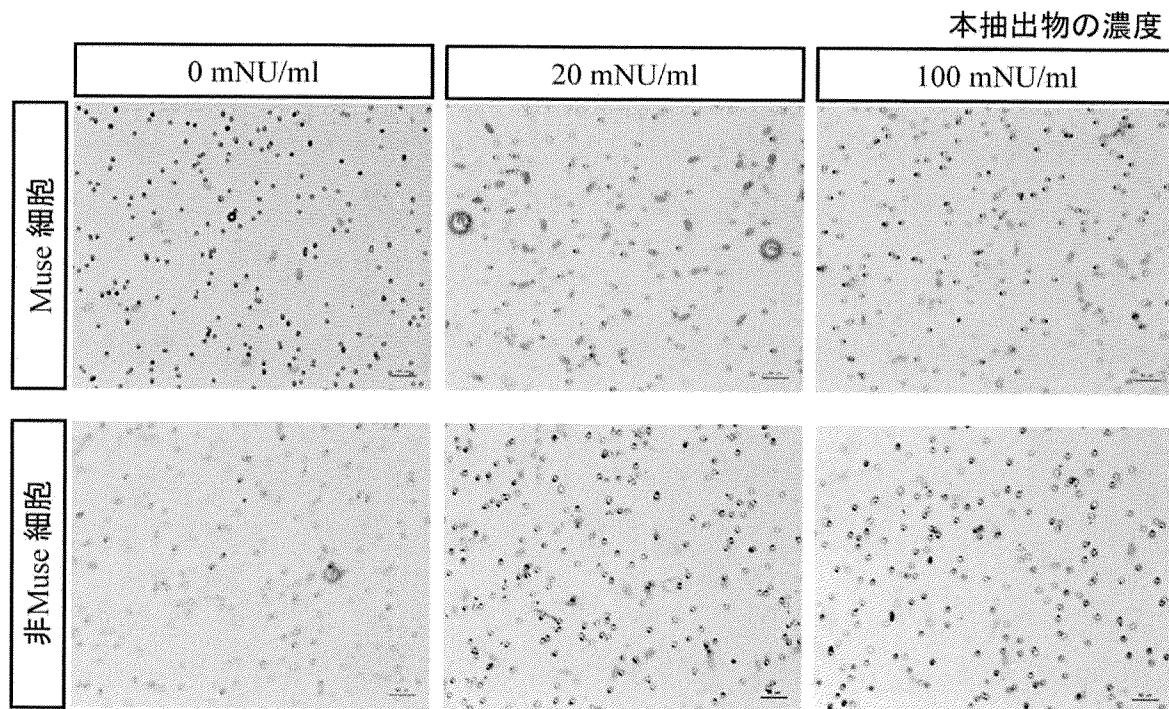
請求の範囲

- [請求項1] ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物を含有する多能性幹細胞遊走促進剤。
- [請求項2] 多能性幹細胞の遊走促進が生体の損傷部位への誘導である請求項1に記載の多能性幹細胞遊走促進剤。
- [請求項3] 多能性幹細胞がSSEA-3陽性細胞である、請求項1又は2に記載の多能性幹細胞遊走促進剤。
- [請求項4] 多能性幹細胞がMuse細胞である請求項1乃至3のいずれか一項に記載の多能性幹細胞遊走促進剤。
- [請求項5] 炎症組織が皮膚組織である請求項1乃至4のいずれか一項に記載の多能性幹細胞遊走促進剤。
- [請求項6] 炎症組織がウサギの皮膚組織である請求項1乃至4のいずれか一項に記載の多能性幹細胞遊走促進剤。
- [請求項7] 注射剤である請求項1乃至6のいずれか一項に記載の多能性幹細胞遊走促進剤。
- [請求項8] 経口剤である請求項1乃至6のいずれか一項に記載の多能性幹細胞遊走促進剤。
- [請求項9] カテーテルによって投与される請求項1乃至6のいずれか一項に記載の多能性幹細胞遊走促進剤。
- [請求項10] 多能性幹細胞の遊走促進剤の製造におけるワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物の使用。
- [請求項11] 多能性幹細胞の遊走促進が生体の損傷部位への誘導である請求項10に記載の使用。
- [請求項12] 多能性幹細胞がSSEA-3陽性細胞である請求項10又は11に記載の使用。
- [請求項13] 多能性幹細胞がMuse細胞である請求項請求項10乃至12のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項14] 炎症組織が皮膚組織である請求項10乃至13のいずれか一項に記

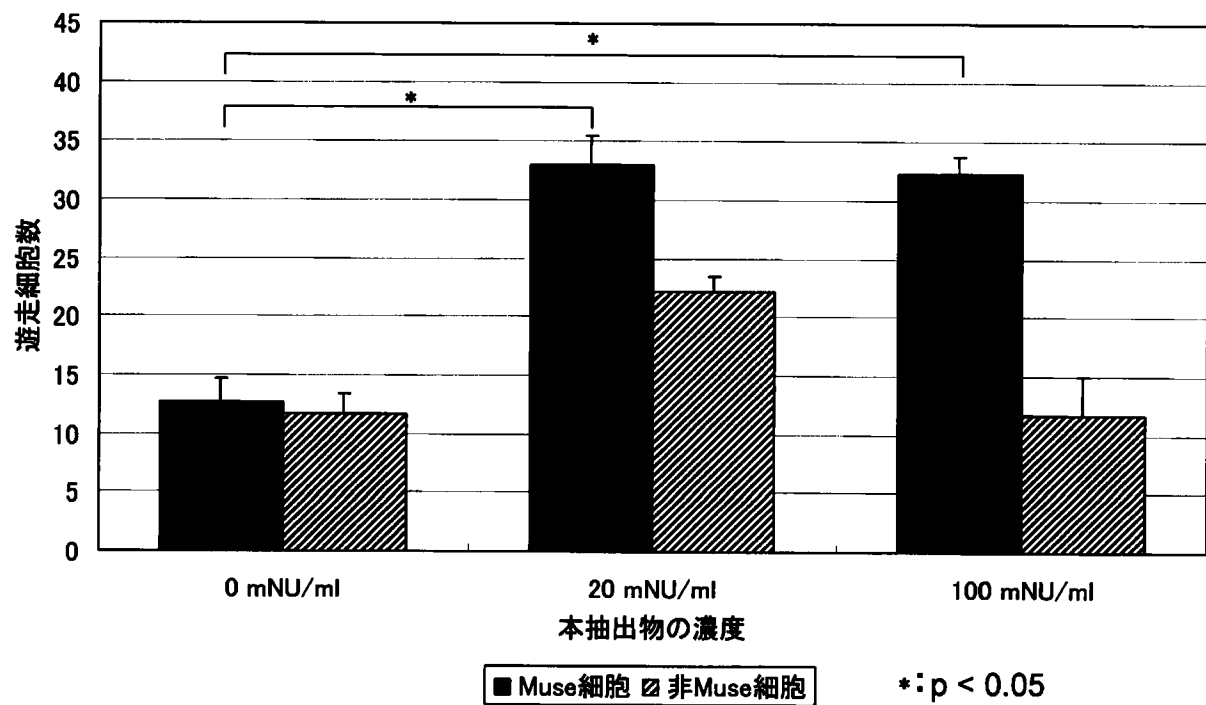
載の使用。

- [請求項15] 炎症組織がウサギの皮膚組織である請求項10乃至13のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項16] 多能性幹細胞の遊走促進剤が注射剤である請求項10乃至15のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項17] 多能性幹細胞の遊走促進剤が経口剤である請求項10乃至15のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項18] 多能性幹細胞の遊走促進剤がカテーテルによって投与される請求項10乃至15のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項19] 多能性幹細胞の遊走促進作用を指標とするワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含む製剤の判定又は評価方法。
- [請求項20] 多能性幹細胞が培養細胞である請求項19に記載の判定又は評価方法。
- [請求項21] 多能性幹細胞がSSEA-3陽性細胞である請求項19又は20に記載の判定又は評価方法。
- [請求項22] 多能性幹細胞がMuse細胞である請求項19乃至21のいずれか一項に記載の判定又は評価方法。
- [請求項23] 炎症組織が皮膚組織である請求項19乃至22のいずれか一項に記載の判定又は評価方法。
- [請求項24] 炎症組織がウサギの皮膚組織である請求項19乃至22のいずれか一項に記載の判定又は評価方法。
- [請求項25] 請求項19乃至24のいずれか一項に記載の判定又は評価方法によって品質規格が担保されたワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物。
- [請求項26] 請求項19乃至24のいずれか一項に記載の判定又は評価を行うことによってワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物の品質規格を担保する方法。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/065735

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K35/36(2015.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K35/36, A61P17/00, A61P17/02, G01N33/15

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),
CAplus/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	WO 2014/178394 A1 (Nippon Zoki Pharmaceutical Co., Ltd.), 06 November 2014 (06.11.2014), claim 1; paragraph [0001] & US 2016/0089402 A1 claim 1; 0001 & EP 2992889 A1 & CA 2909234 A & AU 2014260736 A & CN 105163746 A & TW 201521748 A & KR 10-2016-0002767 A	25
A	JP 2001-58950 A (Fujimoto Brothers Co., Ltd.), 06 March 2001 (06.03.2001), (Family: none)	1-24, 26

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 July 2016 (07.07.16)

Date of mailing of the international search report
19 July 2016 (19.07.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/065735

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-544785 A (Nippon Zoki Pharmaceutical Co., Ltd.), 19 December 2013 (19.12.2013), & US 2013/0164383 A1 & US 2016/0010135 A1 & WO 2012/051173 A2 & EP 2627343 A1 & AU 2011316756 A & CA 2808927 A & CN 103476923 A & KR 10-2014-0020225 A	1-24, 26
A	JP 2013-156265 A (Nippon Zoki Pharmaceutical Co., Ltd.), 15 August 2013 (15.08.2013), & JP 2014-209129 A & US 2009/0272649 A1 & US 7923254 B2 & WO 2008/029836 A1	1-24, 26
A	KOTWAL G.J. et al, The inflammation modulatory protein(IMP) of cowpox virus drastically diminishes the tissue damage by down-regulating cellular infiltration resulting from complement activation., Mol. Cell. Biochem., 1998, Vol.185, No.1/2, Page.39-46	1-24, 26

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K35/36(2015.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K35/36, A61P17/00, A61P17/02, G01N33/15

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 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)

WPI, 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	WO 2014/178394 A1 (日本臓器製薬株式会社) 2014. 11. 06, 特許請求の範囲請求項 1, 段落 0001 & US 2016/0089402 A1, claim1, 0001 & EP 2992889 A1 & CA 2909234 A & AU 2014260736 A & CN 105163746 A & TW 201521748 A & KR 10-2016-0002767 A	25
A	JP 2001-58950 A (株式会社フジモト・ブラザーズ) 2001. 03. 06, (ファミリーなし)	1-24, 26

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 7 . 0 7 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

1 9 . 0 7 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4 U

9 7 3 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2013-544785 A (日本臓器製薬株式会社) 2013.12.19, & US 2013/0164383 A1 & US 2016/0010135 A1 & WO 2012/051173 A2 & EP 2627343 A1 & AU 2011316756 A & CA 2808927 A & CN 103476923 A & KR 10-2014-0020225 A	1-24, 26
A	JP 2013-156265 A (日本臓器製薬株式会社) 2013.08.15, & JP 2014-209129 A & US 2009/0272649 A1 & US 7923254 B2 & WO 2008/029836 A1	1-24, 26
A	KOTWAL G.J. et al, The inflammation modulatory protein(IMP) of cowpox virus drastically diminishes the tissue damage by down-regulating cellular infiltration resulting from complement activation., Mol. Cell. Biochem., 1998, Vol.185, No.1/2, Page.39-46	1-24, 26