

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7538150号
(P7538150)

(45)発行日 令和6年8月21日(2024.8.21)

(24)登録日 令和6年8月13日(2024.8.13)

(51)国際特許分類	F I
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28
A 6 1 K 35/30 (2015.01)	A 6 1 K 35/30
A 6 1 K 35/34 (2015.01)	A 6 1 K 35/34
A 6 1 K 35/50 (2015.01)	A 6 1 K 35/50

請求項の数 4 (全26頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-571239(P2021-571239)	(73)特許権者	306037311 富士フイルム株式会社 東京都港区西麻布2丁目2番30号
(86)(22)出願日	令和3年1月14日(2021.1.14)	(74)代理人	110000109 弁理士法人特許事務所サイクス
(86)国際出願番号	PCT/JP2021/001132	(72)発明者	石止 貴将 兵庫県尼崎市高田町6番1号
(87)国際公開番号	WO2021/145396	(72)発明者	山根 昌之 兵庫県尼崎市高田町6番1号
(87)国際公開日	令和3年7月22日(2021.7.22)	審査官	濱田 光浩
審査請求日	令和4年7月13日(2022.7.13)		
(31)優先権主張番号	特願2020-4764(P2020-4764)		
(32)優先日	令和2年1月15日(2020.1.15)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血管新生剤、及び血管新生作用を有する細胞外小胞の製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

間葉系幹細胞由来の細胞外小胞から T i m 4 タンパク質を用いる方法により細胞外小胞を得ることを含む、血管新生作用を有する細胞外小胞の製造方法。

【請求項2】

前記間葉系幹細胞が、i P S細胞に由来するもの、或いは臍帯、臍帯血、骨髄、脂肪、筋肉、神経、皮膚、羊膜及び胎盤からなる群より選択される1種以上の組織に由来するものである、請求項1に記載の細胞外小胞の製造方法。

【請求項3】

増殖因子により刺激を加えた間葉系幹細胞から細胞外小胞を得ることを含む、請求項1に記載の細胞外小胞の製造方法。

【請求項4】

請求項1乃至3から選ばれる何れか一項に記載の細胞外小胞を有効成分として含有させることを含む、血管新生剤の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、間葉系幹細胞由来細胞外小胞を用いた血管新生剤に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞に由来する、脂質二重膜で構成される小型膜小胞である細胞外小胞 (Extracellular vesicle) は、内包する mRNA や microRNA といった核酸、あるいはタンパク質の運搬を介した細胞間情報伝達を担っていると考えられている (非特許文献 1)。

【0003】

また、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell、以下「MSC」と略記する場合がある) は、中胚葉組織に由来する体性幹細胞である。MSC は脂肪、骨髄、および臍帯マトリクス等から分離することが可能であるが、いずれも、接着性、CD105、CD73、CD90 陽性、CD45、CD34、CD14、CD11b、CD79a、CD19、HLA-Class II (DR) 陰性、骨、脂肪、軟骨への分化能という共通点を持つと考えられている。

10

【0004】

近年、細胞外小胞が種々の疾患に関与している可能性が示唆されている。また、間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞から超遠心法により取得された細胞外小胞が、血管新生作用 (血管新生効果) を有することが報告されている (非特許文献 2)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】国際公開 WO 2016/088689

【非特許文献】

20

【0006】

【文献】Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavie G, Thery C (2019) Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. Nat Cell Biol, 21(1): 9-17

【文献】Ferguson et al. (2018) The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view. Sci Rep, 8(1): 1419

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、本発明者が間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞から超遠心法により取得された細胞外小胞の血管新生作用について検証したところ、当該作用は弱く、産業利用するには不十分であることが判った。前記状況に鑑み、本発明の課題は、より治療効果が高い細胞外小胞の集団により構成された治療用製剤、特に血管新生剤を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記の課題を解決するため、種々の細胞外小胞の取得方法で選択的に回収した細胞外小胞について鋭意検討した結果、ホスファチジルセリン (PS) に対する親和性を有する物質を利用した方法 (PS アフィニティー法) により取得された PS 陽性という特長を有する細胞外小胞の集団、又は / 及び増殖因子により刺激を加えた間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞の集団が、血管新生剤として高い効果を有することを見出し、本発明を完成させるに至った。

40

【0009】

すなわち本発明は、その基本的態様は、
(1) 間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞を有効成分とする、血管新生剤であって、細胞外小胞がホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を利用する方法により得られるものである、又は / 及び細胞外小胞が増殖因子により刺激を加えた間葉系幹細胞に由来するものである、血管新生剤；

50

(2) 前記間葉系幹細胞が、i P S細胞に由来するもの、或いは臍帯、臍帯血、骨髄、脂肪、筋肉、神経、皮膚、羊膜及び胎盤からなる群より選択される1種以上の組織に由来するものである上記(1)に記載の血管新生剤；

(3) 前記間葉系幹細胞が、増殖因子により刺激を加えたものである上記(1)又は(2)に記載の血管新生剤；

(4) 前記細胞外小胞が、ホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を利用する方法により得られるものである上記(1)～(3)の何れか1つに記載の血管新生剤；

(5) ホスファチジルセリンに対する親和性を有する物質が、T i mタンパク質である上記(4)に記載の血管新生剤；

(6) T i mタンパク質が、T i m 4タンパク質、T i m 3タンパク質及びT i m 1タンパク質から選択されるものである上記(5)に記載の血管新生剤；

10

(7) 前記細胞外小胞が、増殖因子により刺激を加えた間葉系幹細胞に由来するものであり、且つホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を利用する方法により得られるものである、上記(1)又は(2)に記載の血管新生剤；

(7-2) 前記増殖因子が、血管内皮細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、及び塩基性線維芽細胞成長因子からなる群より選択される1種以上の増殖因子である上記(1)～(7)の何れか1つに記載の血管新生剤；

である。

【0010】

また本発明は、かかる血管新生剤としての細胞外小胞の製造法でもあり、具体的には、(8) 間葉系幹細胞由来の細胞外小胞からホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を用いる方法により細胞外小胞を得ること、又は、及び増殖因子により刺激を加えた間葉系幹細胞から細胞外小胞を得ることを含む、血管新生作用を有する細胞外小胞の製造方法；

20

(9) 間葉系幹細胞由来の細胞外小胞からホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を用いる方法により細胞外小胞を得ることを含む、上記(8)に記載の細胞外小胞の製造方法；

(10) ホスファチジルセリンに対する親和性を有する物質が、T i mタンパク質である上記(8)又は(9)に記載の細胞外小胞の製造方法；

(11) T i mタンパク質が、T i m 4タンパク質、T i m 3タンパク質及びT i m 1タンパク質から選択されるものである上記(10)に記載の細胞外小胞の製造方法；

30

(12) 増殖因子により刺激を加えた間葉系幹細胞から細胞外小胞を得ることを含む、上記(8)～(11)の何れか1つに記載の細胞外小胞の製造方法；

(12-2) 前記増殖因子が、血管内皮細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、及び塩基性線維芽細胞成長因子からなる群より選択される1種以上の増殖因子である上記(8)～(12)の何れか1つに記載の血管新生剤；

である。

【発明の効果】

【0011】

本発明により、間葉系幹細胞から血管新生作用を有する細胞外小胞を有効成分とする血管新生剤が提供される。本発明の血管新生剤によれば、血管新生が誘導されることにより、機能障害や機能不全に陥った生体組織及び臓器の機能再生を図ることができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】 図1は、P Sアフィニティー法及び超遠心分離法により取得したM S C由来細胞外小胞の粒子径分布をN T A法(ナノ粒子トラッキング解析法)により解析した結果を示した図である。

【図2】 図2は、P Sアフィニティー法及び超遠心分離法により取得したM S C由来細胞外小胞のC D 9、C D 6 3、およびC D 8 1をウエスタンブロット法により検出した結果を示した図である。

50

【図3】図3は、H U V E C細胞におけるチューブ形成を指標として、M S C由来細胞外小胞の血管新生作用を評価した結果を示した細胞の画像である。

【図4】図4は、H U V E C細胞におけるチューブ形成を指標として、M S C由来細胞外小胞の血管新生作用を評価した結果を示した図である。

【図5A】図5Aは、H U V E C細胞におけるチューブ形成を指標として、骨髄M S C由来細胞外小胞の血管新生作用を評価した結果を示した細胞の画像である。

【図5B】図5Bは、H U V E C細胞におけるチューブ形成を指標として、脂肪M S C由来細胞外小胞の血管新生作用を評価した結果を示した細胞の画像である。

【図5C】図5Cは、H U V E C細胞におけるチューブ形成を指標として、臍帯M S C由来細胞外小胞の血管新生作用を評価した結果を示した細胞の画像である。

10

【図6A】図6Aは、H U V E C細胞におけるチューブ形成を指標として、骨髄M S C由来細胞外小胞の血管新生作用を評価した結果を示した図である。

【図6B】図6Bは、H U V E C細胞におけるチューブ形成を指標として、脂肪M S C由来細胞外小胞の血管新生作用を評価した結果を示した図である。

【図6C】図6Cは、H U V E C細胞におけるチューブ形成を指標として、臍帯M S C由来細胞外小胞の血管新生作用を評価した結果を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明の基本は、上記したように、間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞からホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を利用する方法により得られる細胞外小胞又は/及び増殖因子により刺激を加えた間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞を有効成分とする血管新生剤である。

20

【0014】

細胞外小胞（以下、「EV」と略記する場合がある）は、細胞に由来する、脂質二重膜で構成される小型膜小胞である。当該細胞外小胞は、通常20nm~1000nmの直径を有するものが挙げられ、50nm~800nmのものが好ましく、50nm~500nmのものがより好ましく、50nm~200nmのものが特に好ましい。前記細胞外小胞としては、例えば、Nature Reviews Immunology 9, 581-593 (August 2009)、「肥満研究」Vol.13 No.2 2007トピックス 青木直人等に記載の通り、その発生起源や小型膜小胞の大きさ等により様々な分類されるものが挙げられる。具体的には、エクソソーム、微小胞、エクトソーム、膜粒子、エクソソーム様小胞、アポトーシス小体、アディポソーム等が挙げられ、エクソソーム及び微小胞が好ましく、エクソソームがより好ましい。

30

【0015】

前記エクソソームは、細胞に由来する、脂質二重膜で構成された小型膜小胞であり、例えば、50nm~200nmの直径を有するものが挙げられ、50nm~150nmのものが好ましく、50nm~100nmのものがより好ましい。なお、エクソソームは、後期エンドソームに由来すると考えられている。

【0016】

前記微小胞は、細胞に由来する、脂質二重膜で構成された小型膜小胞であり、例えば、100nm~1000nmの直径を有するものが挙げられ、100nm~800nmのものが好ましく、100nm~500nmのものがより好ましい。なお、微小胞は、細胞膜に由来すると考えられている。

40

【0017】

M S Cは、骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞などの中胚葉由来の組織（間葉系）に属する細胞への分化能をもつ幹細胞である。M S Cは、脂肪、骨髄、臍帯マトリクス等から分離することが可能であり、本発明で使用するM S C（以下、「本発明に係るM S C」と略記する場合がある）は、例えば、中胚葉由来の組織から分離する方法やi P S細胞、E S細胞等の幹細胞から誘導する方法により得られる。本発明に係るM S Cとしては、臍帯、臍帯血、骨髄、脂肪、筋肉、神経、皮膚、羊膜及び胎盤からなる群より選択される

50

1種以上の組織に由来するもの、i P S細胞に由来するものが好ましく使用される。本発明に係るM S Cは、回収、濃縮、精製、単離、緩衝液等による希釈、ろ過滅菌等の前処理を行ったものであってもよい。これら前処理は、常法に従い適宜行えばよい。また、本発明に係るM S Cは、血管内皮細胞増殖因子(V E G F)、トランスフォーミング増殖因子(例えば、T G F 1、T G F 3)、塩基性線維芽細胞成長因子(b F G F)等の増殖因子により刺激を加えたものが好ましく、血管内皮細胞増殖因子、塩基性線維芽細胞成長因子により刺激を加えたものがより好ましい。

【0018】

本発明が提供する血管新生剤における有効成分である細胞外小胞(以下、「本発明に係る細胞外小胞」と略記する場合がある。)は、本発明に係るM S Cに由来する細胞外小胞からホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を用いて単離、取得した細胞外小胞(以下、「P S陽性細胞外小胞」と略記する場合がある)、又はノ及び増殖因子により刺激を加えた本発明に係るM S Cに由来する細胞外小胞(以下、「刺激M S C由来細胞外小胞」と略記する場合がある)である。

10

【0019】

P S陽性細胞外小胞は、ホスファチジルセリンが細胞外小胞の膜表面に露出しているものと考えられる、P S陽性(P Sを含有する)の前記細胞外小胞である。

【0020】

前記ホスファチジルセリンに対する親和性を有する物質(以下、「P S親和性物質」と略記する場合がある)としては、細胞外小胞の膜を構成するホスファチジルセリンに対して特異的に結合することが可能な物質であればいずれでもよく、例えば、Annexin V; M F G - E 8; Tim 1 (T細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子1、T-cell immunoglobulin-mucin-domain 1)タンパク質、Tim 2 (T細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子2、T-cell immunoglobulin-mucin-domain 2)タンパク質、Tim 3 (T細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子3、T-cell immunoglobulin-mucin-domain 3)タンパク質、Tim 4 (T細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子4、T-cell immunoglobulin-mucin-domain 4)タンパク質等のTimタンパク質が挙げられ、効率的に細胞外小胞を取得可能であることから、Timタンパク質が好ましく、Tim 4タンパク質、Tim 3タンパク質、及びTim 1タンパク質から選択されるものがより好ましく、Tim 4タンパク質、Tim 1タンパク質がさらに好ましく、Tim 4タンパク質が特に好ましい。

20

30

【0021】

P S陽性細胞外小胞は、E Vを含む本発明に係るM S Cの細胞培養上清液(以下、「E Vを含む細胞培養上清液」と略記する場合がある)から、ホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を用いて単離すること、又はE Vを含む本発明に係るM S Cの細胞培養上清液から例えば超遠心法等のこの分野の常法によりE Vを取得した後、得られたE Vからホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を用いて単離することにより得られる。なかでも、E Vを含む本発明に係るM S Cの細胞培養上清液からホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を用いて直接単離するのが好ましい。また、前記E Vを含む細胞培養上清液は、例えば、本発明に係るM S Cを細胞培養により増殖させ、増殖させた細胞をさらにE V産生培地により培養することにより得られる。本発明に係るM S Cの細胞培養やE V産生培地による培養は、この分野で行われる常法に従って行えばよく、用いられる培地や培養条件は特に限定されない。

40

【0022】

ホスファチジルセリンに対する親和性を有する物質を利用する方法により細胞外小胞を取得する方法(以下、「P Sアフィニティー法」と略記する場合がある)の概要を以下に記載する。また、P Sアフィニティー法としては、例えば、特許文献1に具体例が記載されている。

【0023】

50

PSアフィニティー法は、カルシウムイオン存在下、前記EVを含む細胞培養上清液とPS親和性物質とを接触させて、当該細胞培養上清液中の細胞外小胞とPS親和性物質との複合体（以下、「本発明に係る複合体」と略記する場合がある）を形成させた後、当該複合体からPS親和性物質を分離し、PS陽性細胞外小胞を取得することによりなされる。

【0024】

PSアフィニティー法の好ましい方法は、具体的には下記工程を含む。

(1)カルシウムイオン存在下、EVを含む細胞培養上清液とPS親和性物質とを接触させて、当該細胞培養上清液中のPS陽性細胞外小胞とPS親和性物質との複合体（本発明に係る複合体）を形成させること（以下、「複合体形成工程」と略記する場合がある）、
(2)前記EVを含む細胞培養上清液から、複合体形成工程で得られた本発明に係る複合体を分離すること（以下、「複合体分離工程」と略記する場合がある）、
(3)本発明に係る複合体からPS陽性細胞外小胞を分離し、PS陽性細胞外小胞を取得すること（以下、「取得工程」と略記する場合がある）。

10

【0025】

PSアフィニティー法におけるEVを含む細胞培養上清液、PS親和性物質は、前記したものと同様であり、好ましいものや具体例も同様である。

【0026】

複合体形成工程で用いられるPS親和性物質は、不溶性担体に固定化（結合）されたものであることが好ましい。この場合、本発明に係る複合体は、複合体分離工程において、公知のB/F分離法により、前記EVを含む細胞培養上清液から分離することができる。

20

【0027】

PS親和性物質を不溶性担体に固定化する方法の例を以下に説明するが、例えば特許文献1に記載された方法により得ることが出来る。

【0028】

PS親和性物質を固定化する不溶性担体としては、例えば、免疫学的測定法で用いられる不溶性の担体が挙げられる。具体的には、例えば、ポリスチレン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリメタクリル酸メチル、ポリアクリルアミド、ポリグリシジルメタクリレート、ポリプロピレン、ポリオレフィン、ポリイミド、ポリウレタン、ポリエステル、ポリ塩化ビニール、ポリエチレン、ポリクロロカーボネート、シリコーン樹脂、シリコーンラバー、アガロース、デキストラン、エチレン-無水マレイン酸共重合体等の有機物；ガラス、酸化ケイ素、ケイソウ、多孔性ガラス、スリガラス、アルミナ、シリカゲル、金属酸化物等の無機物質；鉄、コバルト、ニッケル、マグネタイト、クロマイト等の磁性体等；及びこれらの磁性体の合金を材料として調製されたものが挙げられる。また、これら担体の使用形態としては、例えば、粒子（ビーズ）、マイクロプレート、チューブ、ディスク状片等が挙げられる。前記不溶性担体の形態は、粒子（ビーズ）であることが好ましく、粒子の大きさは特に限定されないが、例えば10nm~100μmのものが挙げられ、100nm~10μmのものが好ましい。

30

【0029】

PS親和性物質と前記不溶性担体との結合方法としては、タンパク質を担体に結合させる自体公知の方法が挙げられる。例えば、アフィニティー結合により結合させる方法、化学結合により結合させる方法（例えば、特許3269554号公報、WO2012/039395公報に記載の方法）、物理的吸着により結合させる方法（例えば、特公平5-41946号公報に記載の方法）等が挙げられ、物理的吸着により結合させる方法及びアフィニティー結合により結合させる方法が好ましく、簡便であることから物理的吸着により結合させる方法がより好ましい。

40

【0030】

PS親和性物質と前記不溶性担体とを物理的吸着により結合させる方法としては、自体公知の方法に従い、PS親和性物質と前記不溶性担体とが結合する条件下で、PS親和性物質と前記不溶性担体とを接触させればよい。

【0031】

50

前記不溶性担体に結合させる P S 親和性物質の量は、例えば不溶性担体が粒子（ビーズ）の場合、不溶性担体 1 m g に対して、例えば 0 . 1 μ g ~ 5 0 μ g であればよく、0 . 1 μ g ~ 3 0 μ g が好ましく、0 . 1 μ g ~ 2 0 μ g がより好ましい。

【 0 0 3 2 】

P S 親和性物質と前記不溶性担体との物理的吸着は、例えば、P S 親和性物質を含有する溶液と前記不溶性担体とを接触させることにより行えばよい。

【 0 0 3 3 】

P S 親和性物質を含有する溶液において、P S 親和性物質を溶解させる溶液としては、P S 親和性物質を安定な状態で溶解させる溶液であればよく、例えば精製水、例えば p H 6 . 0 ~ 9 . 8、好ましくは 7 . 0 ~ 9 . 6 に緩衝作用を有する緩衝液（例えば M O P S などのグッド緩衝液、炭酸緩衝液、P B S、T B S、T B S - T、H B S 等）が挙げられる。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常 5 ~ 1 0 0 m M、好ましくは 1 0 ~ 1 0 0 m M の範囲から適宜選択すればよい。N a C l を含有させる場合の濃度は、例えば 1 0 0 ~ 2 0 0 m M が挙げられ、1 4 0 ~ 1 6 0 m M が好ましい。また、P S 親和性物質を含有する溶液中には、P S 親和性物質と前記不溶性担体との結合を妨げない量であれば、例えば糖類、N a C l 等の塩類、T w e e n ^{T M} 2 0 等の界面活性剤、防腐剤、タンパク質等が含まれていてもよい。

10

【 0 0 3 4 】

P S 親和性物質と前記不溶性担体を物理的吸着により結合させる方法の具体例としては、例えば以下の方法が挙げられる。例えば、ビーズ（粒子）担体 1 m g と、0 . 1 μ g ~ 5 0 μ g、好ましくは 0 . 1 μ g ~ 3 0 μ g、より好ましくは 0 . 1 μ g ~ 2 0 μ g 含有する前記 P S 親和性物質を含有する溶液とを接触させ、2 ~ 3 7、好ましくは 4 ~ 1 1 で 0 . 5 ~ 4 8 時間、好ましくは 0 . 5 ~ 2 4 時間反応させる。

20

【 0 0 3 5 】

前記のようにして得られた P S 親和性物質を固定化した不溶性担体は、通常この分野で行われるブロッッキング処理に付してもよい。

【 0 0 3 6 】

複合体形成工程は、カルシウムイオンの存在下に行う。カルシウムイオンは、P S 親和性物質と前記 E V を含む細胞培養上清液中の P S 陽性細胞外小胞とを接触させる際に存在させる。P S 親和性物質と前記 E V を含む細胞培養上清液中の P S 陽性細胞外小胞とを接触させる際のカルシウムイオン濃度は、通常 0 . 5 m M ~ 1 0 0 m M、好ましくは 1 . 0 m M ~ 1 0 m M、より好ましくは 2 . 0 m M ~ 5 . 0 m M である。P S 親和性物質と前記 E V を含む細胞培養上清液中の P S 陽性細胞外小胞との本発明に係る複合体が形成され、複合体分離工程を実施するまで、即ち、本発明に係る複合体を分離する工程に付すまでの本発明に係る複合体を含有する溶液中には、前記した如き濃度のカルシウムイオンが必要である。

30

【 0 0 3 7 】

カルシウムイオンの由来は特に限定されず、例えば塩化カルシウム、水酸化カルシウム、炭酸水素カルシウム、ヨウ化カルシウム、臭化カルシウム、酢酸カルシウム等が挙げられ、塩化カルシウム、炭酸水素カルシウム、ヨウ化カルシウムが好ましく、塩化カルシウム、炭酸水素カルシウムがより好ましい。

40

【 0 0 3 8 】

P S 親和性物質と前記 E V を含む細胞培養上清液中の P S 陽性細胞外小胞とを接触させる際にカルシウムイオンを存在させる方法としては、P S 親和性物質と前記 E V を含む細胞培養上清液中の P S 陽性細胞外小胞とを接触させる際のカルシウムイオン濃度が上記した範囲となるように、前記 E V を含む細胞培養上清液、又は / 及び P S 親和性物質を含有する溶液に、前記した如きカルシウムイオンを含有させればよい。また、P S 親和性物質と前記 E V を含む細胞培養上清液中の P S 陽性細胞外小胞とを接触させる際のカルシウムイオン濃度が上記した範囲となる量のカルシウムイオンを含有させた溶液（以下、「本発明に係るカルシウムイオン含有溶液」と略記する場合がある。）と、前記 E V を含む細胞

50

培養上清液と、P S 親和性物質を含有する溶液とを混合させてもよい。

【0039】

本発明に係るカルシウムイオン含有溶液において、カルシウムイオンを溶解させる溶液としては、P S 陽性細胞外小胞とP S 親和性物質との結合を妨げないものであればよく、例えば水、pH 7.0 ~ pH 8.0 に緩衝作用を有する緩衝液が挙げられ、pH 7.2 ~ pH 7.6 に緩衝作用を有する緩衝液（例えばTBS、HBS等）等が好ましい。尚、リン酸バッファはカルシウムと結合して沈殿が生じるので好ましくない。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5 mM ~ 50 mM、好ましくは10 mM ~ 30 mM の範囲から適宜選択される。NaClを含有させる場合の濃度は通常100 mM ~ 200 mM、好ましくは140 mM ~ 160 mM の範囲から適宜選択される。

10

【0040】

本発明に係るカルシウムイオン含有溶液中には、P S 陽性細胞外小胞とP S 親和性物質との結合を妨げない量であれば、例えば糖類、NaCl等の塩類、界面活性剤、防腐剤、BSA等のタンパク質等が含まれていても良い。界面活性剤としては、例えばTweenTM 20等が挙げられ、当該本発明に係るカルシウムイオン含有溶液における界面活性剤の濃度は、通常0.00001% ~ 0.2%、好ましくは通常0.0005% ~ 0.1% である。

【0041】

複合体形成工程において、P S 親和性物質（前記不溶性担体に固定化されていてもよい）1 μg と接触させる前記E Vを含む細胞培養上清液の量は、通常0.1 mL ~ 100 mL であり、0.1 mL ~ 10 mL が好ましく、0.1 mL ~ 1.0 mL がより好ましい。前記E Vを含む細胞培養上清液とP S 親和性物質とを接触させる際の温度は、通常2 ~ 37 °C であり、4 ~ 37 °C が好ましく、4 ~ 30 °C がより好ましい。前記E Vを含む細胞培養上清液とP S 親和性物質との接触時間は、通常0.5 ~ 24 時間であり、0.5 ~ 8 時間が好ましく、0.5 ~ 4 時間がより好ましい。

20

【0042】

複合体形成工程において、P S 親和性物質を固定化した不溶性担体を用いる場合の当該担体の量としては、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液1 mL 当たり通常0.1 mg ~ 20 mg であり、0.3 mg ~ 10 mg が好ましく、0.5 mg ~ 6.0 mg がより好ましい。

30

【0043】

複合体形成工程は、例えば以下の方法で行えばよい。即ち、前記E Vを含む細胞培養上清液と、P S 親和性物質を固定化した不溶性担体と、本発明に係るカルシウムイオン含有溶液とを混合後の溶液1 mL 当たり通常0.1 mg ~ 20 mg、好ましくは0.3 mg ~ 10 mg、より好ましくは0.5 mg ~ 6.0 mg となる量のP S 親和性物質を固定化した不溶性担体と、前記E Vを含む細胞培養上清液と当該担体と本発明に係るカルシウムイオン含有溶液とを混合後の溶液中のカルシウムイオン濃度が通常0.5 mM ~ 100 mM、好ましくは1.0 mM ~ 10 mM、より好ましくは2.0 mM ~ 5.0 mM となる量のP S 親和性物質を固定化した不溶性担体1 mg 当たり通常0.1 mL ~ 100 mL、好ましくは0.1 mL ~ 10 mL、より好ましくは0.1 mL ~ 1.0 mL の前記E Vを含む細胞培養上清液とを、通常4.0 ~ 37 °C、好ましくは4.0 ~ 25 °C、より好ましくは4.0 ~ 11 °C、通常0.5 ~ 24 時間、好ましくは0.5 ~ 8.0 時間、より好ましくは0.5 ~ 4.0 時間接触させて、担体に結合したP S 親和性物質と前記E Vを含む細胞培養上清液中のP S 陽性細胞外小胞との複合体（本発明に係る複合体）を形成させる。

40

【0044】

複合体分離工程は、本発明に係る複合体と前記E Vを含む細胞培養上清液とを分離して本発明に係る複合体を取得することができるのであればどのような方法であってもよいが、例えば以下のような方法が挙げられる。

【0045】

50

(1) PS親和性物質を固定化した不溶性担体の当該担体が磁気担体の場合：複合体形成工程により得られた本発明に係る複合体を含む容器を、要すればマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に本発明に係る複合体を集合させ、上清を除くことによりこれらを分離する方法。(2) PS親和性物質を固定化した不溶性担体の当該担体がビーズ状である場合：複合体形成工程により得られた本発明に係る複合体を含む容器を遠心分離処理し、本発明に係る複合体を沈殿として集合させた後、上清を除くことによりこれらを分離する方法。(3) ろ過により本発明に係る複合体と前記EVを含む細胞培養上清液とを分離する方法。

【0046】

複合体分離工程の具体例としては、例えば以下の方法が挙げられる。磁気担体を不溶性担体として用いる場合、複合体形成工程をおこなった容器を要すればマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に得られた本発明に係る複合体を集合させ、上清の試料を除く。

10

【0047】

複合体分離工程の後、要すれば得られた本発明に係る複合体を、カルシウムイオン含有洗浄溶液を用いて洗浄してもよい(以下、「洗浄操作」と略記する場合がある)。洗浄操作により、PS親和性物質を固定化した不溶性担体表面に付着した細胞由来成分等の生体試料中の夾雑物を除去することができる。洗浄方法としては、カルシウムイオン含有洗浄溶液を使用する以外は、通常この分野で行われている洗浄方法が使用できる。

【0048】

20

当該洗浄操作において用いられるカルシウムイオン含有洗浄溶液としては、カルシウムイオンを通常0.5~100mM、好ましくは1~10mM、より好ましくは2mM~5mM含有しPS陽性細胞外小胞と不溶性担体に固定化されたPS親和性物質との結合に影響を与えない溶液であればいずれでもよく、例えば、カルシウムイオンを通常0.5mM~100mM、好ましくは通常1mM~10mM、より好ましくは通常2mM~5mM含有する、pH7.0~pH8.0、好ましくはpH7.2~pH7.6に緩衝作用を有するカルシウムを沈殿させない緩衝液(例えばTBS、TBS-T、HBS)が挙げられる。尚、リン酸バッファーはカルシウムと結合して沈殿が生じるので好ましくない。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5mM~50mM、好ましくは10mM~30mMの範囲から適宜選択され、NaClを含有する場合の濃度は通常100mM~200mM、好ましくは140mM~160mMの範囲から適宜選択される。この溶液中には、PS陽性細胞外小胞と不溶性担体に固定化されたPS親和性物質との結合を妨げない量であれば、例えば糖類、NaCl等の塩類、界面活性剤、防腐剤、タンパク質等が含まれていても良い。界面活性剤としては、例えばTweenTM 20(富士フイルム和光純薬(株))等が挙げられ、当該洗浄溶液における界面活性剤の濃度は、通常0.00001%~0.2%、好ましくは通常0.0005%~0.1%である。

30

【0049】

PS親和性物質を固定化する不溶性担体として磁性粒子を用いた洗浄操作を例に取り、洗浄操作の具体例を説明する。すなわち、複合体分離工程により得られた本発明に係る複合体を含む容器内に本発明に係るカルシウムイオン含有洗浄溶液を加え、攪拌する。その後、前記容器を、マグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に本発明に係る複合体を集合させ、前記容器内の溶液を捨てる。これらの洗浄操作は、必要に応じて数回繰り返して行ってもよい。

40

【0050】

取得工程は、本発明に係る複合体からPS陽性細胞外小胞を取得できる方法であれば何れでもよく、カルシウムイオン濃度を低下させる方法が好ましい。カルシウムイオンの濃度を低下させる方法としては、例えばカルシウムイオンキレート剤を使用する方法が挙げられる。すなわち、複合体分離工程後、要すれば洗浄操作後、反応系中のカルシウムイオン(本発明に係る複合体と結合しているカルシウムイオン及び本発明に係る複合体を含有する溶液から持ち込まれたカルシウムイオン)にカルシウムイオンキレート剤を作用させ

50

てカルシウムイオンをキレートさせ、反応系中のカルシウムイオンの有効濃度を低下させることによって、本発明に係る複合体からPS陽性細胞外小胞を分離させればよい。

【0051】

この方法に用いられるカルシウムイオンキレート剤としては、カルシウムイオンをキレートし得る化合物であればいずれでもよく、例えば、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）、NTA（ニトリロ三酢酸）、DTPA（ジエチレントリアミン五酢酸）、GLDA（L-グルタミン酸二酢酸）、HEDTA（ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸）、GEDTA（エチレングリコールビス（ β -アミノエチルエーテル）-N,N,N,N'-四酢酸）、TTHA（トリエチレンテトラミン-N,N,N',N'',N''',N''''-六酢酸）、HIDA（2-ヒドロキシエチルイミノニ（酢酸））、DHEG（N,N-ビス（2-ヒドロキシエチル）グリシン）、CyDTA（trans-1z,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, monohydrate）等が挙げられ、EDTA、GEDTA、CyDTAが好ましい。

【0052】

前記カルシウムイオンキレート剤は、通常溶液として用いる。前記カルシウムイオンキレート剤を溶解させる溶液としては、前記カルシウムイオンキレート剤を溶解させるものであればよく、例えば、精製水、緩衝液等が挙げられる。緩衝液としては、通常pH7.0~pH8.0、好ましくはpH7.2~pH7.6に緩衝作用を有する緩衝液（例えばPBS、TBS、HBS等）が好ましい。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5mM~50mM、好ましくは10mM~30mMの範囲から適宜選択され、NaClを含有させる場合の濃度は通常100mM~200mM、好ましくは140mM~160mMの範囲から適宜選択される。カルシウムイオンキレート剤を含有する溶液（以下、「カルシウムイオンキレート剤含有溶液」と略記する場合がある）は、例えば糖類、NaCl等の塩類、防腐剤、タンパク質等が含まれていても良い。

【0053】

前記カルシウムイオンキレート剤含有溶液中の前記カルシウムイオンキレート剤の濃度としては、通常0.5mM~500mMであり、0.5mM~100mMが好ましく、0.5mM~50mMがより好ましい。また、カルシウムイオンキレート剤含有溶液のpHは、通常pH6.0~pH9.0であり、pH7.0~pH8.0が好ましく、pH7.2~pH7.6がより好ましい。

【0054】

カルシウムイオンキレート剤を本発明に係る複合体と結合しているカルシウムイオンに作用させるには、前記カルシウムイオンキレート剤含有溶液を（例えばペレット状の）本発明に係る複合体と接触させ、本発明に係る複合体と結合しているカルシウムイオンとカルシウムイオンキレート剤含有溶液中のカルシウムイオンキレート剤とを反応させることにより行われる。

【0055】

カルシウムイオンキレート剤含有溶液と本発明に係る複合体との接触は、例えばカルシウムイオンキレート剤含有溶液に本発明に係る複合体を懸濁させる方法（PS親和性物質を固定化した不溶性担体の不溶性担体がビーズである場合等）、カルシウムイオンキレート剤含有溶液に本発明に係る複合体を浸漬させる方法（PS親和性物質を固定化した不溶性担体の不溶性担体がディスク状片、チューブである場合等）等により行うことができる。

【0056】

本発明に係る複合体と接触させるカルシウムイオンキレート剤含有溶液の量としては、本発明に係る複合体と接触後の溶液中のカルシウムイオンの濃度が有効濃度未満となり、本発明に係る複合体から細胞外小胞が分離される量であればよい。

【0057】

本発明に係る複合体にカルシウムイオンキレート剤を作用（接触）させる温度や時間としては、通常4.0~37であり、10~30が好ましく、20~30がより好ましく、通常1~10分間であり、5~15分間が好ましい。

【0058】

取得工程を、不溶性担体にT i mタンパク質を結合させた担体（T i m担体）を用いる方法を例にとり説明すれば、以下の通りである。即ち、複合体分離工程の後、要すればさらに洗浄操作の後、得られた本発明に係る複合体に、通常0.5mM～500mM、好ましくは0.5mM～100mM、より好ましくは0.5mM～50mMのカルシウムイオンキレート剤を含有する溶液をT i m担体1mg当たり通常10μL～500μL、好ましくは20μL～200μL、より好ましくは50μL～100μL添加し、通常4.0～37、好ましくは10～30、より好ましくは20～30で通常1～30分間、好ましくは5～15分間反応させ、本発明に係る複合体からP S陽性細胞外小胞を分離させる。

10

【0059】

取得工程を実施することにより、本発明に係る複合体と接触させたカルシウムイオンキレート剤含有溶液は、P S親和性物質を固定化した不溶性担体と、本発明に係る複合体から分離（遊離）した細胞外小胞が含有していることとなる。従って、当該溶液からP S親和性物質を固定化した担体を除去し、溶液だけを回収すれば、P S陽性細胞外小胞を含有する溶液を得ることが出来る。

【0060】

刺激M S C由来細胞外小胞は、増殖因子により刺激を加えたE Vを含む本発明に係るM S Cの細胞培養上清液（すなわち、増殖因子により刺激を加えた前記E Vを含む細胞培養上清液）から単離することにより得られる。

20

【0061】

刺激M S C由来細胞外小胞の取得方法は、試料からE Vを単離する際に行われる常法であれば何れでもよく、例えば、アフィニティー法（例えば、P Sアフィニティー法）、分画遠心分離法（例えば、ペレットダウン法、スクロースクッション法、密度勾配遠心法等の超遠心法）、免疫沈降法、クロマトグラフィー法（例えば、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル浸透クロマトグラフィー法）、密度勾配法（例えば、ショ糖密度勾配法）、電気泳動法（例えば、オルガネラ電気泳動法）、磁気分離法（例えば、磁気活性化細胞選別（M A C S）法）、限外濾過濃縮法（例えば、ナノ膜限外濾過濃縮法）、パーコール勾配単離法、マイクロ流体デバイスを利用した方法、P E G沈殿法等が挙げられ、高い精製の細胞外膜小胞を得られるアフィニティー法、又は理論的に偏りの無い回収が可能である分画遠心分離法が好ましく、アフィニティー法又は超遠心法がより好ましく、アフィニティー法が特に好ましい。アフィニティー法の中でも、P Sアフィニティー法が好ましい。アフィニティー法及び分画遠心分離法は、例えば、特開2016-088689に記載の方法に準じておこなえばよい。これらの単離方法は、1種のみを用いても、2種以上を組み合わせてもよい。また、1種の単離方法による単離を2回以上繰り返してもよい。

30

【0062】

前記E Vを含む増殖因子により刺激を加えた本発明に係るM S Cの細胞培養上清液は、例えば、増殖因子により刺激を加えた本発明に係るM S Cを細胞培養により増殖させ、増殖させた細胞をさらにE V産生培地により培養することにより得られる。増殖因子による本発明に係るM S Cへの刺激は、増殖因子の共存下、本発明に係るM S Cを培養することにより行えばよい。本発明に係るM S Cの細胞培養やE V生産培地による培養は、この分野で行われる常法に従って行えばよく、用いられる培地や培養条件は特に限定されない。

40

【0063】

本発明に係る細胞外小胞は、P S陽性細胞外小胞が好ましく、増殖因子により刺激を加えた本発明に係るM S Cに由来するものであり、且つホスファチジルセリンに対して親和性を有する物質を利用する方法（P Sアフィニティー法）により得られるものがより好ましく、増殖因子により刺激を加えた本発明に係るM S Cに由来するものであり、且つT i mタンパク質を用いたP Sアフィニティー法により得られるものがさらに好ましく、増殖因子により刺激を加えた本発明に係るM S Cに由来するものであり、且つT i m4タンパク質、T i m3タンパク質又はT i m1タンパク質を用いたP Sアフィニティー法により

50

得られるものが特に好ましく、増殖因子（VEGF、TGF-1、TGF-3、bFGF）により刺激を加えた本発明に係るMSCに由来するものであり、且つTim4タンパク質を用いたPSアフィニティー法により得られるものがさらに好ましく、VEGF又はbFGFにより刺激を加えた本発明に係るMSCに由来するものであり、且つTim4タンパク質を用いたPSアフィニティー法により得られるものが最も好ましい。

【0064】

かくして調製された本発明に係る細胞外小胞は、血管新生作用（血管新生効果）を有するものであった。したがって、本発明が提供する血管新生剤は、有効成分としての本発明に係る細胞外小胞による血管新生作用に基づくものであり、血管新生作用が関与しうる疾患、例えば閉塞性動脈硬化症、慢性閉塞性動脈硬化症、糖尿病、壊疽、レイノー病、パー
ジャー病等の末梢性血管疾患、心筋梗塞症、拡張型心筋症、狭心症等の心臓疾患、脳挫傷、パーキンソン病、多発性硬化症や脳梗塞等の脳疾患患に対する有効な治療薬となり得るものである。本発明の血管新生剤は、損傷を受けた自己皮膚再生の促進、表皮等皮膚移植における移植皮膚の被覆部位への生着率の向上等により、皮膚再生医療の分野の有効な治療薬となり得るものである。本発明の血管新生剤は、骨折時等の固定器具による治療において、固定器具に本発明の血管新生剤を担持させることにより、骨形成を促進し、治療速度を速めることができる。また、本発明の血管新生剤に骨芽細胞、軟骨細胞等を含有させ、骨形成を更に促進させることが可能となる。

10

【0065】

本発明が提供する血管新生剤は、基本的には、本発明に係るMSC由来の細胞外小胞から単離して得られた本発明に係る細胞外小胞を有効成分とするものであり、その投与剤形は、本発明に係る細胞外小胞を含有する溶液をそのまま、或いは必要に応じて薬学的に許容される担体、添加剤と共に液剤、懸濁化剤、リポ化剤等として製剤化されるか、さらには、凍結乾燥により粉末物として、薬学的に許容される添加剤と共に錠剤等の固形剤として製剤化されたものである。

20

【0066】

製剤化にあたって使用される薬学的に許容される担体や添加物としては、例えば、等張化剤、増粘剤、糖類、糖アルコール類、防腐剤（保存剤）、殺菌剤又は抗菌剤、pH調節剤、安定化剤、キレート剤、油性基剤、ゲル基剤、界面活性剤、懸濁化剤、結合剤、賦形剤、滑沢剤、崩壊剤、発泡剤、流動化剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、溶解補助剤、抗酸化剤、甘味剤、酸味剤、着色剤、呈味剤、香料又は清涼化剤等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

30

【0067】

なお、代表的な担体、添加物等を例示すれば、例えば、以下のものを挙げることができる。担体としては、例えば、水、含水エタノール等の水性担体を挙げることができる。等張化剤としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム等の無機塩を挙げることができる。多価アルコールとしては、例えば、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等を挙げることができる。増粘剤としては、例えば、カルボキシビニルポリマー、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、アルギン酸、ポリビニルアルコール（完全、又は部分ケン化物）、ポリビニルピロリドン、マクロゴール等を挙げることができる。

40

【0068】

糖類としては、例えば、シクロデキストリン、ブドウ糖、果糖、乳糖等を挙げることができる。糖アルコール類としては、例えば、キシリトール、ソルビトール、マンニトール等の糖アルコールを挙げることができる。防腐剤、殺菌剤又は抗菌剤としては、例えば、ジブチルヒドロキシルエーテル、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、グルコン酸クロルヘキシジン、デヒドロ酢酸ナトリウム、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル糖を挙げることができる。pH調節剤としては、例えば、塩酸、ホウ酸、アミノエチルスルホン酸、クエン酸、酢酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウ

50

ム、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、ホウ砂、トリエタノールアミン、モノエタノールアミン、ジイソプロパノールアミン、硫酸、硫酸マグネシウム、リン酸、ポリリン酸、プロピオン酸、シュウ酸、グルコン酸、フマル酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸等を挙げることができる。

【0069】

安定化剤としては、例えば、ジブチルヒドロキシルエン、トロメタモール、ナトリウムホルムアルデヒドスルホキシレート（ロンガリット）、トコフェロール、ピロ亜硫酸ナトリウム、モノエタノールアミン、モノステアリン酸アルミニウム、モノステアリン酸グリセリン、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム等を挙げることができる。また、基剤としては、例えば、オリーブ油、トウモロコシ油、大豆油、ゴマ油、綿実油等の植物油；中鎖脂肪酸トリグリセリド等の油性基剤；マクロゴール400等の水性基剤；カルボキシビニルポリマー、ガム質等のゲル基剤を挙げることができる。界面活性剤としては、例えば、ポリソルベート80、硬化ヒマシ油、グリセリン脂肪酸エステル、セスキオレイン酸ソルビタン等が挙げられ、懸濁化剤としては、例えば、サラシミツロウや各種界面活性剤、アラビアゴム、アラビアゴム末、キサンタンガム、大豆レシチン等を挙げることができる。

10

【0070】

さらに、結合剤としては、例えば、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等を、また、賦形剤としては、例えば、ショ糖、乳糖、デンプン、コーンスターチ、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸等を挙げることができ、滑沢剤としては、例えば、ショ糖脂肪酸エステル、ステアリン酸マグネシウム、タルク等が挙げられ、崩壊剤としては、例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、クロスポビドン、クロスカルメロースナトリウム等が挙げられ、流動化剤としては、例えば、メタケイ酸アルミン酸ナトリウム、軽質無水ケイ酸等を挙げることができる。

20

【0071】

本発明が提供する血管新生剤にあっては、好ましくは液剤、懸濁剤又はリポ化剤として製剤化されるのがよく、基本的には、MSC由来の細胞外小胞から単離して得られた本発明に係る細胞外小胞を含む溶液を必要に応じて上記した担体、添加剤と共に、例えば、生理食塩水、5%ブドウ糖溶液、リポ乳剤等にて混合して得られる。なお、凍結乾燥粉末を用い、用時溶解、または懸濁型の製剤とすることもできる。

30

【0072】

本発明が提供する血管新生剤が液剤、懸濁剤又はリポ化剤である場合、そのpHは、医薬上、薬理的に、または生理学的に許容される範囲内であれば特に限定されるものではないが、例えば、pH2.5~9.0、好ましくは3.0~8.5、更に好ましくは3.5~8.0となる範囲が挙げられ、適宜pH調整剤にて調整することができる。

【0073】

本発明が提供する血管新生剤の投与経路は、剤形に応じて、経口投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、動脈内投与、髄腔内投与、腹腔内投与が挙げられる。その投与量は、対象となる患者の状態（体重、年齢、症状、体調等）、及び投与剤形等によって異なるが、通常、成人に投与する場合には、粒子数として、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{17}$ 個/回であり、 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^{16}$ 個/回が好ましく、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{16}$ 個/回が更に好ましく、 $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^{15}$ 個/回が特に好ましい。なお、本用量を1回投与量として、一日複数回投与してもよく、本用量を複数回に分けて投与することができる。

40

【実施例】

【0074】

以下、実施例及び比較例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの例によって何ら限定されない。

【0075】

50

実施例 1 . P S 法による細胞外小胞の取得

(1) 細胞培養

骨髄由来間葉系幹細胞である P o i e t i c s ^{T M} ヒト間葉系幹細胞 (L O N Z A 社) を、15% FBS (S e l b o r n e B i o l o g i c a l S e r v i c e P t y . 社) 含有 MEM (L - グルタミン、フェノールレッド含有、富士フイルム和光純薬 (株)) を増殖培地として用いて培養した。その後、培養した骨髄由来間葉系幹細胞を細胞数 3×10^5 で 100 mm 細胞培養用ディッシュ (C o r n i n g I n t e r n a t i o n a l 社) に播種し、5% CO₂、37 °C の条件に設定した細胞培養用インキュベータ内で 72 時間培養し、細胞数 3×10^6 まで増殖させた。

(2) 細胞外小胞の産生

(1) で増殖させた骨髄由来間葉系幹細胞を、細胞外小胞産生培地である 10% G I B C O : F e t a l B o v i n e S e r u m , e x o s o m e - d e p l e t e d , O n e S h o t ^{T M} f o r m a t (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 社) 含有 D - M E M (富士フイルム和光純薬 (株)) 20 mL に置換し、5% CO₂、37 °C の条件に設定した細胞培養用インキュベータ内で 120 時間培養を行った。その後、得られた培養上清を 50 mL の遠沈管に回収して 2,000 × g で 20 分間遠心し、上清を回収した。

(3) P S アフィニティー法による細胞外小胞の取得

(2) で回収した培養上清 1 mL から、M a g C a p t u r e ^{T M} E x o s o m e I s o l a t i o n K i t P S (富士フイルム和光純薬 (株)) を用いて、当該キットに添付の説明書に記載の手順に従って細胞外小胞を単離し、E V - S a v e ^{T M} 細胞外小胞ブロッキング試薬 (富士フイルム和光純薬 (株)) を添加した 1 mM E D T A 含有 P B S (P h o s p h a t e - b u f f e r e d s a l i n e) 中に細胞外小胞を得た。その後、ピバスピ 500 (ザルトリウス社、分画分子量：100,000 (100 K)、膜材質：P E S) を用いて、E V - S a v e ^{T M} 細胞外小胞ブロッキング試薬を添加した P B S へバッファー交換を行った。以下、得られた溶液を「細胞外小胞溶液 (P S アフィニティー法) 」と記載する場合がある。

【 0 0 7 6 】

比較例 1 . 超遠心法による細胞外小胞の取得

実施例 1 (1) - (2) と同様の方法に従って調製した培養上清を、超遠心分離機 (B e c k m a n : O p t i m a ^{T M} L - 100 X P) を用いて 110,000 × g で 70 分間遠心分離した。得られたペレットに 1 mL の P B S を添加し、再度 110,000 × g で 70 分間遠心分離した。最終的に得られたペレットを E V - S a v e ^{T M} 細胞外小胞ブロッキング試薬 (富士フイルム和光純薬 (株)) を添加した P B S により溶解した。以下、得られた溶液を、「細胞外小胞溶液 (超遠心法) 」と記載する場合がある。

【 0 0 7 7 】

実験例 1 . ナノトラッキング解析法による細胞外小胞粒子数の測定

実施例 1 で得られた「細胞外小胞溶液 (P S アフィニティー法) 」の単位体積当たりの粒子数を、N a n o S i g h t (M a l v e r n P a n a l y t i c a l 社) を用いて、ナノ粒子トラッキング解析法 (N a n o T r a c k i n g A n a l y s i s 法) により、N a n o S i g h t の説明書に記載の手順に従って測定し、平均粒子径と単位体積当たりの平均粒子数 [p a r t i c l e s / m L] を算出した。得られた粒径分布のグラフを実験例 2 の結果と併せて図 1 に示す。図 1 のグラフにおいて、縦軸は粒子数、横軸は粒径をそれぞれ示す。P S アフィニティー法により取得した細胞外小胞の平均粒径は、 138.1 ± 0.2 nm、単位体積当たりの平均粒子数は、 1.76×10^{10} [p a r t i c l e s / m L] であった。

【 0 0 7 8 】

実験例 2 . ナノトラッキング解析法による細胞外小胞粒子数の測定

「細胞外小胞溶液 (P S アフィニティー法) 」の代わりに、比較例 1 で得られた「細胞外小胞溶液 (超遠心法) 」を用いた以外は、実験例 1 と同様の方法により、平均の粒子径

10

20

30

40

50

と単位体積当たりの平均粒子数 [P a r t i c l e s / m L] を算出した。得られた粒径分布のグラフを実験例 1 の結果と併せて図 1 に示す。超遠心法により取得した細胞外小胞の平均粒径は、 138.1 ± 2.9 nm、単位体積当たりの平均粒子数は、 1.68×10^{10} [p a r t i c l e s / m L] であった。

【 0 0 7 9 】

実験例 3 . ウエスタンブロッティング法による細胞外小胞マーカートンパク質の解析

実施例 1 で得られた「細胞外小胞溶液 (P S アフィニティー法) 」を用いて、細胞外小胞マーカートンパク質である C D 9、C D 6 3、および C D 8 1 についてウエスタンブロット法により解析した。

実験例 1 で算出した「細胞外小胞溶液 (P S アフィニティー法) 」中の単位体積当たりの平均粒子数に基づいて、 3.0×10^8 p a r t i c l e s 分の「細胞外小胞溶液 (P S アフィニティー法) 」に 1 / 4 量の S D S - P A G E S a m p l e B u f f e r 4 倍濃縮液 (還元剤不含) (富士フイルム和光純薬 (株)) を混合し、全量を用いて 1 0 - 2 0 % アクリルアミドゲル (富士フイルム和光純薬 (株)) により電気泳動した。その後、転写バッファー (富士フイルム和光純薬 (株)) を用いて、P V D F メンブレン (B i o R a d 社) に転写した。転写を行ったメンブレンは、1 % スキムミルク含有 P B S - T 溶液 (0 . 1 (w / v) % T w e e n ^{T M} 2 0 含有 P B S 溶液) に 1 時間浸してブロッ

10

ッキング処理を行い、抗 C D 9 抗体 (富士フイルム和光純薬 (株))、抗 C D 6 3 抗体 (富士フイルム和光純薬 (株))、および抗 C D 8 1 抗体 (富士フイルム和光純薬 (株)) をそれぞれ P B S - T 溶液で $1.1 \mu\text{g} / \text{mL}$ に調整した一次抗体溶液と反応させた。その後、抗 C D 9 抗体、抗 C D 8 1 抗体を反応させたメンブレンは、H R P 標識抗ラット I g G 抗体 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h 社) を P B S - T 溶液で 1 0 0 0 0 倍希釈した二次抗体溶液と反応させ、抗 C D 6 3 抗体を反応させたメンブレンは、H R P 標識抗マウス I g G 抗体 (D A K O 社) P B S - T 溶液で 1 0 0 0 0 倍希釈した二次抗体溶液とそれぞれ反応させた。その後、検出試薬としてイムノスター ^{T M} ゼータ (富士フイルム和光純薬 (株)) を使用し、A m e r s h a m I m a g e r 6 0 0 (G E ヘルスケア社) を用いてシグナルを検出した。ウエスタンブロットの結果を、実験例 4 の結果と併せて図 2 に示す。図中、横軸の P S は「細胞外小胞溶液 (P S アフィニティー法) 」を用いた場合の結果 (実験例 3)、U C は「細胞外小胞溶液 (超遠心法) 」を用いた場合の結果 (実験例 4) をそれぞれ示す。また、縦軸の矢印は、検出した細胞外小胞マー

20

カートンパク質のバンド位置を示す。

30

【 0 0 8 0 】

実験例 4 . ウエスタンブロッティング法による細胞外小胞マーカートンパク質の解析

「細胞外小胞溶液 (P S アフィニティー法) 」の代わりに、比較例 1 で得られた「細胞外小胞溶液 (超遠心法) 」を用いた以外は、実験例 3 と同様の方法により、細胞外小胞マーカートンパク質である C D 9、C D 6 3、および C D 8 1 についてウエスタンブロット法により解析した。ウエスタンブロットの結果を、実験例 3 の結果と併せて図 2 に示す。

【 0 0 8 1 】

図 2 より、P S アフィニティー法で取得した細胞外小胞 [「細胞外小胞溶液 (P S アフィニティー法) 」中の細胞外小胞、実験例 3] の方が、超遠心法で取得した細胞外小胞 [「細胞外小胞溶液 (超遠心法) 」中の細胞外小胞、実験例 4] よりも、C D 9 と C D 6 3 の発現量が多いことが判った。

40

【 0 0 8 2 】

実施例 2 . P S アフィニティー法で取得した細胞外小胞の血管新生作用の評価

実施例 1 で調製した「細胞外小胞溶液 (P S アフィニティー法) 」中の細胞外小胞の血管新生作用を評価した。

G e l t r e x (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 社) を 9 6 w e l l p l a t e (C o r n i n g 社) に $35 \mu\text{L}$ 添加し、 37°C で 3 0 分間静置した。ヒト臍帯静脈内皮細胞である H U V E C 細胞 (S a r t o r i u s 社) を M e d i u m 2 0 0 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 社) に懸濁し、実施例 1 で得

50

られた「細胞外小胞溶液（PSアフィニティー法）」を、実験例1で算出した「細胞外小胞溶液（PSアフィニティー法）」中の単位体積当たりの平均粒子数に基づいて終濃度 6×10^8 particles/mLとなるように添加し、細胞外小胞 - HUVEC細胞含有培地を得た。その後、上記のGeltrexでコーティングした96well plateに1wellあたり細胞数 5×10^5 となる量の細胞外小胞 - HUVEC細胞含有培地をそれぞれ播種した。37℃で8時間培養後、Clone Select Image r (Molecular Devices社)を用いてそれぞれ細胞の画像を取得した(実施例2)。

【0083】

得られた細胞の画像の結果を、実施例3-4、比較例2の結果と併せて図3に示す。図中、エクソソーム(-)は細胞外小胞を添加しないコントロールの結果、PS法精製MSC由来エクソソーム(+)は「細胞外小胞溶液（PSアフィニティー法）」を用いた場合の結果(実施例2)、UC法精製MSC由来エクソソーム(+)は「細胞外小胞溶液（超遠心法）」を用いた場合の結果(比較例2)、PS法精製MSC(VEGF刺激あり)由来エクソソーム(+)は「細胞外小胞溶液（PSアフィニティー法、VEGF刺激）」を用いた場合の結果(実施例3)、UC法精製MSC(VEGF刺激あり)由来エクソソーム(+)は「細胞外小胞溶液（超遠心法、VEGF刺激）」を用いた場合の結果(実施例4)をそれぞれ示す。

【0084】

比較例2．超遠心法で取得した細胞外小胞の血管新生作用の評価

「細胞外小胞溶液（PSアフィニティー法）」の代わりに、比較例1で得られた「細胞外小胞溶液（超遠心法）」を用いた以外は、実施例2と同様の方法により、細胞外小胞の血管新生作用を評価した。得られた細胞の画像の結果を、実施例2-4の結果と併せて図3に示す。

【0085】

実施例3．PSアフィニティー法で取得したVEGF刺激間葉系幹細胞由来細胞外小胞の血管新生作用の評価

実施例1(1)細胞培養と同様の方法により骨髓由来間葉系幹細胞を増殖させた後、さらにVEGF(富士フィルム和光純薬(株)) 100 ng/mL で刺激し、さらに24時間培養を行った。次いで、実施例1(2)細胞外小胞の産生、実施例1(3)PSアフィニティー法による細胞外小胞の取得と同様の方法により細胞外小胞を単離し、EV-SaveTM細胞外小胞ブロッキング試薬を添加したPBSへバッファー交換を行った。以下、得られた溶液を「細胞外小胞溶液（PSアフィニティー法、VEGF刺激）」と記載する場合がある。得られた「細胞外小胞溶液（PSアフィニティー法、VEGF刺激）」の平均粒子径と単位体積当たりの平均粒子数 [particles/mL] を実験例1と同様の方法により算出した。また、「細胞外小胞溶液（PSアフィニティー法）」の代わりに、「細胞外小胞溶液（PSアフィニティー法、VEGF刺激）」を用いた以外は、実施例2と同様の方法により、細胞外小胞の血管新生作用を評価した。得られた細胞の画像の結果を、実施例2、4、比較例2の結果と併せて図3に示す。

【0086】

実施例4．超遠心法で取得したVEGF刺激間葉系幹細胞由来細胞外小胞の血管新生作用の評価

実施例1(1)細胞培養と同様の方法により骨髓由来間葉系幹細胞を増殖させた後、さらにVEGF(富士フィルム和光純薬(株)) 100 ng/mL で刺激し、さらに24時間培養を行った。次いで、実施例1(2)細胞外小胞の産生と同様の方法により調製した培養上清を、超遠心分離機(Beckman: OptimaTM L-100XP)を用いて $110,000 \times g$ で70分間遠心分離した。得られたペレットに1mLのPBSを添加し、再度 $110,000 \times g$ で70分間遠心分離した。最終的に得られたペレットをEV-SaveTM細胞外小胞ブロッキング試薬(富士フィルム和光純薬(株))を添加したPBSにより溶解した。以下、得られた溶液を、「細胞外小胞溶液（超遠心法、VEG

10

20

30

40

50

F刺激)」と記載する場合がある。得られた「細胞外小胞溶液（P Sアフィニティー法、V E G F刺激）」の平均粒子径と単位体積当たりの平均粒子数[particles / mL]を実施例1と同様の方法により算出した。また、「細胞外小胞溶液（P Sアフィニティー法）」の代わりに、「細胞外小胞溶液（超遠心法、V E G F刺激）」を用いた以外は、実施例2と同様の方法により、細胞外小胞の血管新生作用を評価した。得られた細胞の画像の結果を、実施例2 - 3、比較例2の結果と併せて図3に示す。

【0087】

実施例5 . P Sアフィニティー法で取得した細胞外小胞の血管新生作用の評価

実施例2で取得した細胞の画像を画像解析ソフトImage Jのangiogenesis analyzerを用いてチューブの全長の合計を解析し、P Sアフィニティー法で取得した細胞外小胞[「細胞外小胞溶液（P Sアフィニティー法）」中の細胞外小胞]によるH U V E C細胞の血管新生作用を評価した。得られたチューブ全長の合計の結果を、実施例6、7、比較例3の結果と併せて図4に示す。図4中、縦軸はチューブの全長の合計、横軸は用いた細胞外小胞の取得条件をそれぞれ示し、「精製方法(-) エクソソーム(-)」は細胞外小胞を添加しないコントロールの結果を示し、「精製方法UC エクソソームMSC」は「細胞外小胞溶液（超遠心法）」を用いた場合の結果（比較例3）を示し、「精製方法P S エクソソームMSC」は「細胞外小胞溶液（P Sアフィニティー法）」を用いた場合の結果（実施例5）を示し、「精製方法UC エクソソームMSC（V E G F刺激あり）」は「細胞外小胞溶液（超遠心法、V E G F刺激）」を用いた場合の結果（実施例7）を示し、「精製方法P S エクソソームMSC（V E G F刺激あり）」は「細胞外小胞溶液（P Sアフィニティー法、V E G F刺激）」（実施例6）の結果をそれぞれ示す。

【0088】

比較例3 . 超遠心法で取得した細胞外小胞の血管新生作用の評価

比較例2で取得した細胞の画像を画像解析ソフトImage Jのangiogenesis analyzerを用いてチューブの全長の合計を解析し、超遠心法で取得した細胞外小胞（「細胞外小胞溶液（超遠心法）」中の細胞外小胞）によるH U V E C細胞の血管新生作用を評価した。得られたチューブ全長の合計の結果を、実施例5 - 7の結果と併せて図4に示す。

【0089】

実施例6 . P Sアフィニティー法で取得したV E G F刺激間葉系幹細胞由来細胞外小胞の血管新生作用の評価

実施例3で取得した細胞の画像を画像解析ソフトImage Jのangiogenesis analyzerを用いてチューブの全長の合計を解析し、P Sアフィニティー法で取得したV E G F刺激間葉系幹細胞由来細胞外小胞[「細胞外小胞溶液（P Sアフィニティー法、V E G F刺激）」中の細胞外小胞]によるH U V E C細胞の血管新生作用を評価した。得られたチューブ全長の合計の結果を、実施例5、7、比較例3の結果と併せて図4に示す。

【0090】

実施例7 . 超遠心法で取得したV E G F刺激間葉系幹細胞由来細胞外小胞の血管新生作用の評価

実施例4で取得した細胞の画像を画像解析ソフトImage Jのangiogenesis analyzerを用いてチューブの全長の合計を解析し、超遠心法で取得したV E G F刺激間葉系幹細胞由来細胞外小胞[「細胞外小胞溶液（超遠心法、V E G F刺激）」中の細胞外小胞]によるH U V E C細胞の血管新生作用を評価した。得られたチューブ全長の合計の結果を、実施例5 - 6、比較例3の結果と併せて図4に示す。

【0091】

図3及び図4より、P Sアフィニティー法により取得した細胞外小胞（実施例2、3、5、6）は、H U V E C細胞による血管新生を反映するチューブ形成を促進すること（血管新生作用を有すること）が判った。また、P Sアフィニティー法により取得した細胞外

10

20

30

40

50

小胞（実施例 2、3、5、6）は、超遠心法により取得した細胞外小胞（比較例 2、3）よりも高い血管新生作用があることが判った。また、VEGFにより刺激した間葉系幹細胞から取得した細胞外小胞（実施例 3、4、6、7）は、刺激を行っていない間葉系幹細胞から取得した細胞外小胞（実施例 2、5、比較例 2、3）よりも高い血管新生作用があることが判った。さらに、VEGFにより刺激した間葉系幹細胞からPSアフィニティー法により取得した細胞外小胞（実施例 3、6）は、VEGFにより刺激した間葉系幹細胞から超遠心法により取得した細胞外小胞（実施例 4、7）等他の手法により取得された細胞外小胞よりも特に顕著に血管新生作用を有することが判った。

【0092】

実施例 8 - 9 . PSアフィニティー法による細胞外小胞の取得

10

骨髄由来間葉系幹細胞であるPoietics™ヒト間葉系幹細胞（LONZA社）の代わりに、「脂肪由来間葉系幹細胞であるHuman Adipose-Derived Stem Cells（LONZA社）」又は「臍帯由来間葉系幹細胞であるHuman Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Matrix（PromoCell社）」を用いた以外は、実施例 1と同様の方法により細胞外小胞の取得を行い、「細胞外小胞溶液（PSアフィニティー法、脂肪由来MSC）」（実施例 8）及び「細胞外小胞溶液（PSアフィニティー法、臍帯由来MSC）」（実施例 9）をそれぞれ得た。

【0093】

比較例 4 - 5 . 超遠心法による細胞外小胞の取得

20

「骨髄由来間葉系幹細胞であるPoietics™ヒト間葉系幹細胞（LONZA社）」の代わりに、「脂肪由来間葉系幹細胞であるHuman Adipose-Derived Stem Cells（LONZA社）」又は「臍帯由来間葉系幹細胞であるHuman Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Matrix（PromoCell社）」をそれぞれ用いた以外は、実施例 1（1）-（2）と同様の方法に従って調製した培養上清を、超遠心分離機（Beckman: Optima™ L-100XP）を用いて110,000×gで70分間遠心分離した。得られたペレットに1mLのPBSを添加し、再度110,000×gで70分間遠心分離した。最終的に得られたペレットをEV-Save™細胞外小胞ブロッキング試薬（富士フイルム和光純薬（株））を添加したPBSにより溶解し、「細胞外小胞溶液（超遠心法、脂肪由来MSC）」（比較例 4）及び「細胞外小胞溶液（超遠心法、臍帯由来MSC）」（比較例 5）をそれぞれ得た。

30

【0094】

実施例 10 - 12 . PSアフィニティー法による刺激を加えた骨髄MSC由来細胞外小胞の取得

実施例 1（1）細胞培養と同様の方法により骨髄由来間葉系幹細胞を増殖させた後、さらにVEGF 100ng/mL（富士フイルム和光純薬（株））、bFGF 10ng/mL、又はTGF 120ng/mLでそれぞれ刺激し、さらに24時間培養を行った。次いで、実施例 1（2）細胞外小胞の産生、実施例 1（3）PSアフィニティー法による細胞外小胞の取得と同様の方法により細胞外小胞を単離し、EV-Save™細胞外小胞ブロッキング試薬を添加したPBSへバッファー交換を行い、「細胞外小胞溶液（PSアフィニティー法、骨髄由来MSC、VEGF刺激）」（実施例 10）、「細胞外小胞溶液（PSアフィニティー法、骨髄由来MSC、bFGF刺激）」（実施例 11）、及び「細胞外小胞溶液（PSアフィニティー法、骨髄由来MSC、TGF 1刺激）」（実施例 12）をそれぞれ得た。

40

【0095】

実施例 13 - 15 . PSアフィニティー法による刺激を加えた脂肪MSC由来細胞外小胞の取得

「骨髄由来間葉系幹細胞であるPoietics™ヒト間葉系幹細胞（LONZA社）」の代わりに、「脂肪由来間葉系幹細胞であるHuman Adipose-Deri

50

ved Stem Cells (LONZA社)」を用いた以外は、実施例10-11と同様の方法により、「細胞外小胞溶液 (PSアフィニティー法、脂肪由来MSC、VEGF刺激)」(実施例13)、及び「細胞外小胞溶液 (PSアフィニティー法、脂肪由来MSC、bFGF刺激)」(実施例14)を得た。また、「骨髄由来間葉系幹細胞であるPoietics™ ヒト間葉系幹細胞 (LONZA社)」の代わりに、「脂肪由来間葉系幹細胞であるHuman Adipose-Derived Stem Cells (LONZA社)」を使用し、TGF β 3 (20 ng/mL)により刺激を行った以外は、実施例10と同様の方法により、「細胞外小胞溶液 (PSアフィニティー法、脂肪由来MSC、TGF β 3刺激)」(実施例15)をそれぞれ得た。

【0096】

実施例16. PSアフィニティー法による刺激を加えた臍帯MSC由来細胞外小胞の取得
「骨髄由来間葉系幹細胞であるPoietics™ ヒト間葉系幹細胞 (LONZA社)」の代わりに、「臍帯由来間葉系幹細胞であるHuman Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Matrix (PromoCell社)」を用いた以外は、実施例10と同様の方法により、「細胞外小胞溶液 (PSアフィニティー法、臍帯由来MSC、VEGF刺激)」を得た。

【0097】

実施例17-19. 超遠心法による刺激を加えた骨髄MSC由来細胞外小胞の取得
実施例1(1)細胞培養と同様の方法により骨髄由来間葉系幹細胞を増殖させた後、さらにVEGF 100 ng/mL (富士フイルム和光純薬(株)、bFGF 10 ng/mL、又はTGF β 1 20 ng/mLでそれぞれ刺激し、さらに24時間培養を行った。次いで、実施例1(2)細胞外小胞の産生、実施例1(3)PSアフィニティー法による細胞外小胞の取得と同様の方法により細胞外小胞を単離し、EV-Save™ 細胞外小胞プロッキング試薬を添加したPBSヘパッファー交換を行い、「細胞外小胞溶液 (超遠心法、骨髄由来MSC、VEGF刺激)」(実施例17)、「細胞外小胞溶液 (超遠心法、骨髄由来MSC、bFGF刺激)」(実施例18)、及び「細胞外小胞溶液 (超遠心法、骨髄由来MSC、TGF β 1刺激)」(実施例19)をそれぞれ得た。

【0098】

実施例20-21. 超遠心法による刺激を加えた脂肪MSC由来細胞外小胞の取得
実施例1(1)細胞培養と同様の方法により脂肪由来間葉系幹細胞「脂肪由来間葉系幹細胞であるHuman Adipose-Derived Stem Cells (LONZA社)」を増殖させた後、さらにVEGF 100 ng/mL (富士フイルム和光純薬(株))、又はbFGF 10 ng/mLでそれぞれ刺激し、さらに24時間培養を行った。次いで、実施例1(2)細胞外小胞の産生、実施例1(3)PSアフィニティー法による細胞外小胞の取得と同様の方法により細胞外小胞を単離し、EV-Save™ 細胞外小胞プロッキング試薬を添加したPBSヘパッファー交換を行い、「細胞外小胞溶液 (超遠心法、脂肪由来MSC、VEGF刺激)」(実施例20)、及び「細胞外小胞溶液 (超遠心法、脂肪由来MSC、bFGF刺激)」(実施例21)をそれぞれ得た。

【0099】

実施例22. 超遠心法による刺激を加えた臍帯MSC由来細胞外小胞の取得
実施例1(1)細胞培養と同様の方法により臍帯由来間葉系幹細胞「臍帯由来間葉系幹細胞であるHuman Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Matrix (PromoCell社)」を増殖させた後、さらにVEGF 100 ng/mL (富士フイルム和光純薬(株))で刺激し、さらに24時間培養を行った。次いで、実施例1(2)細胞外小胞の産生、実施例1(3)PSアフィニティー法による細胞外小胞の取得と同様の方法により細胞外小胞を単離し、EV-Save™ 細胞外小胞プロッキング試薬を添加したPBSヘパッファー交換を行い、「細胞外小胞溶液 (超遠心法、臍帯由来MSC、VEGF刺激)」を得た。

【0100】

実施例23-38及び比較例6-8. 超遠心法およびPSアフィニティー法で取得した細

10

20

30

40

50

胞外小胞の血管新生作用の評価

実施例 1 及び 8 - 2 2、並びに比較例 1 及び 4 - 5 で調製した各「細胞外小胞溶液」中の細胞外小胞の血管新生作用をそれぞれ評価した。各実施例及び比較例で使用した「細胞外小胞溶液」を下記表 1 に示す。Corning マトリゲル (Corning 社) を 9 6 well plate (Corning 社) に 4 0 μ L 添加し、3 7 ° C で 3 0 分間静置した。ヒト臍帯静脈内皮細胞である H U V E C 細胞 (Sartorius 社) を D - M E M (富士フイルム和光純薬 (株)) に懸濁し、各「細胞外小胞溶液」を、終濃度 2.5×10^9 particles/mL となるように添加し、細胞外小胞 H U V E C 細胞含有培地を得た。その後、上記の Corning マトリゲル (Corning 社) でコーティングした 9 6 well plate に 1 well あたり細胞数 3×10^4 となる量の細胞外小胞 H U V E C 細胞含有培地をそれぞれ播種した。3 7 ° C で 1 5 時間培養後、Clone Select Imager (Molecular Devices 社) を用いてそれぞれ細胞の画像を取得した。得られた細胞の画像の結果を、図 5 に示す。図 5 (A) は骨髄由来 M S C から取得した細胞外小胞を用いた結果を、図 5 (B) は脂肪由来 M S C から取得した細胞外小胞を用いた結果を、図 5 (C) は臍帯由来 M S C から取得した細胞外小胞を用いた結果をそれぞれ示す。図中、「U C 法精製」は超遠心法で精製した細胞外小胞を使用したことを、「P S 法精製」は P S アフィニティー法で精製した細胞外小胞を使用したことを示す。また、細胞外小胞 (-) は細胞外小胞の添加なしを、細胞外小胞 (+) は各細胞外小胞を添加したことをそれぞれ示す。

【 0 1 0 1 】

【表 1】

	細胞外小胞溶液	結果
比較例 6	細胞外小胞溶液 (超遠心法、骨髄由来 MSC)	図 5(A)
実施例 23	細胞外小胞溶液 (PS アフィニティー法、骨髄由来 MSC)	図 5(A)
実施例 24	細胞外小胞溶液 (超遠心法、骨髄由来 MSC、VEGF 刺激あり)	図 5(A)
実施例 25	細胞外小胞溶液 (PS アフィニティー法、骨髄由来 MSC、VEGF 刺激あり)	図 5(A)
実施例 26	細胞外小胞溶液 (超遠心法、骨髄由来 MSC、bFGF 刺激あり)	図 5(A)
実施例 27	細胞外小胞溶液 (PS アフィニティー法、骨髄由来 MSC、bFGF 刺激あり)	図 5(A)
実施例 28	細胞外小胞溶液 (超遠心法、骨髄由来 MSC、TGF β 1 刺激あり)	図 5(A)
実施例 29	細胞外小胞溶液 (PS アフィニティー法、骨髄由来 MSC、TGF β 1 刺激あり)	図 5(A)
比較例 7	細胞外小胞溶液 (超遠心法、脂肪由来 MSC)	図 5(B)
実施例 30	細胞外小胞溶液 (PS アフィニティー法、脂肪由来 MSC)	図 5(B)
実施例 31	細胞外小胞溶液 (超遠心法、脂肪由来 MSC、VEGF 刺激あり)	図 5(B)
実施例 32	細胞外小胞溶液 (PS アフィニティー法、脂肪由来 MSC、VEGF 刺激あり)	図 5(B)
実施例 33	細胞外小胞溶液 (超遠心法、脂肪由来 MSC、bFGF 刺激あり)	図 5(B)
実施例 34	細胞外小胞溶液 (PS アフィニティー法、脂肪由来 MSC、bFGF 刺激あり)	図 5(B)
実施例 35	細胞外小胞溶液 (PS アフィニティー法、脂肪由来 MSC、TGF β 3 刺激あり)	図 5(B)
比較例 8	細胞外小胞溶液 (超遠心法、臍帯由来 MSC)	図 5(C)
実施例 36	細胞外小胞溶液 (PS アフィニティー法、臍帯由来 MSC)	図 5(C)
実施例 37	細胞外小胞溶液 (超遠心法、臍帯由来 MSC、VEGF 刺激あり)	図 5(C)
実施例 38	細胞外小胞溶液 (PS アフィニティー法、臍帯由来 MSC、VEGF 刺激あり)	図 5(C)

【 0 1 0 2 】

実施例 3 9 - 5 4 及び比較例 9 - 1 1、超遠心法および P S アフィニティー法で取得した細胞外小胞の血管新生作用の評価

実施例 23 - 38 及び比較例 6 - 8 で取得した細胞の画像を画像解析ソフト Image J の angiogenesis analyzer を用いてチューブの全長の合計を解析し、各「細胞外小胞溶液」中の細胞外小胞による HUVEC 細胞の血管新生作用（チューブ形成促進作用）をそれぞれ評価した。各実施例及び比較例で使用した「細胞外小胞溶液」を下記表 2 に示す。得られたチューブ全長の合計の結果を、図 6 にそれぞれ示す。図 6 中、縦軸はチューブの全長のコントロールに対する相対値、横軸は用いた細胞外小胞の取得条件をそれぞれ示し、精製方法「UC」は超遠心法で精製した細胞外小胞、精製方法「PS」は PS アフィニティー法で精製した細胞外小胞を使用した結果を示す。また、細胞外小胞（-）は細胞外小胞添加なしの場合を、細胞外小胞「MSC」は刺激を加えていない各 MSC 由来細胞外小胞を使用した場合を、細胞外小胞「MSC 刺激あり」は、増殖因子で刺激した MSC 由来細胞外小胞を使用した場合をそれぞれ示す。

【 0 1 0 3 】

【表 2】

	細胞外小胞溶液	結果
比較例9	細胞外小胞溶液(超遠心法、骨髄由来MSC)	図6(A)
実施例39	細胞外小胞溶液(PSアフィニティー法、骨髄由来MSC)	図6(A)
実施例40	細胞外小胞溶液(超遠心法、骨髄由来MSC、VEGF刺激あり)	図6(A)
実施例41	細胞外小胞溶液(PSアフィニティー法、骨髄由来MSC、VEGF刺激あり)	図6(A)
実施例42	細胞外小胞溶液(超遠心法、骨髄由来MSC、bFGF刺激あり)	図6(A)
実施例43	細胞外小胞溶液(PSアフィニティー法、骨髄由来MSC、bFGF刺激あり)	図6(A)
実施例44	細胞外小胞溶液(超遠心法、骨髄由来MSC、TGF β 1刺激あり)	図6(A)
実施例45	細胞外小胞溶液(PSアフィニティー法、骨髄由来MSC、TGF β 1刺激あり)	図6(A)
比較例10	細胞外小胞溶液(超遠心法、脂肪由来MSC)	図6(B)
実施例46	細胞外小胞溶液(PSアフィニティー法、脂肪由来MSC)	図6(B)
実施例47	細胞外小胞溶液(超遠心法、脂肪由来MSC、VEGF刺激あり)	図6(B)
実施例48	細胞外小胞溶液(PSアフィニティー法、脂肪由来MSC、VEGF刺激あり)	図6(B)
実施例49	細胞外小胞溶液(超遠心法、脂肪由来MSC、bFGF刺激あり)	図6(B)
実施例50	細胞外小胞溶液(PSアフィニティー法、脂肪由来MSC、bFGF刺激あり)	図6(B)
実施例51	細胞外小胞溶液(PSアフィニティー法、脂肪由来MSC、TGF β 3刺激あり)	図6(B)
比較例11	細胞外小胞溶液(超遠心法、臍帯由来MSC)	図6(C)
実施例52	細胞外小胞溶液(PSアフィニティー法、臍帯由来MSC)	図6(C)
実施例53	細胞外小胞溶液(超遠心法、臍帯由来MSC、VEGF刺激あり)	図6(C)
実施例54	細胞外小胞溶液(PSアフィニティー法、臍帯由来MSC、VEGF刺激あり)	図6(C)

【 0 1 0 4 】

図 5 及び図 6 より、PS アフィニティー法により取得した細胞外小胞は、間葉系幹細胞の種類によらず、HUVEC 細胞による血管新生を反映するチューブ形成を促進することが判った。また、PS アフィニティー法により取得した細胞外小胞は、超遠心法により取得した細胞外小胞よりも血管新生を促進することが判った。また、増殖因子である VEGF、bFGF、又は TGF により刺激した間葉系幹細胞から取得した細胞外小胞は、刺激を行っていない間葉系幹細胞から取得した細胞外小胞よりも血管新生を促進することが判った。さらに、増殖因子である VEGF、bFGF、又は TGF により刺激した間葉系幹細胞から PS アフィニティー法により取得した細胞外小胞は、VEGF により刺激した間葉系幹細胞から超遠心法により取得した細胞外小胞等他の手法により取得された細胞外小胞よりも特に顕著に血管新生を促進することが判った。

【産業上の利用可能性】**【0105】**

本発明により間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞から取得した血管新生作用を有する細胞外小胞を有効成分とする血管新生剤が提供される。本発明が提供する血管新生剤は、前記血管新生作用が関与する疾患に対する有効な治療薬が提供される点で産業上の利用性は多大なものである。

10

20

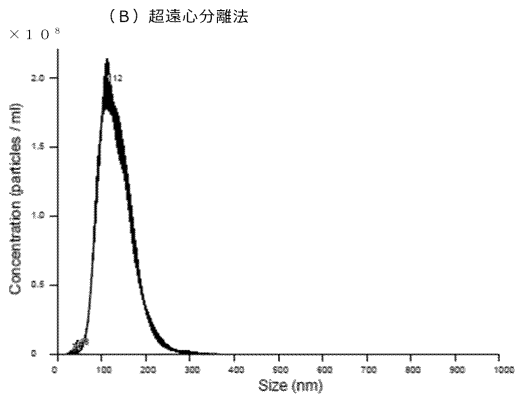
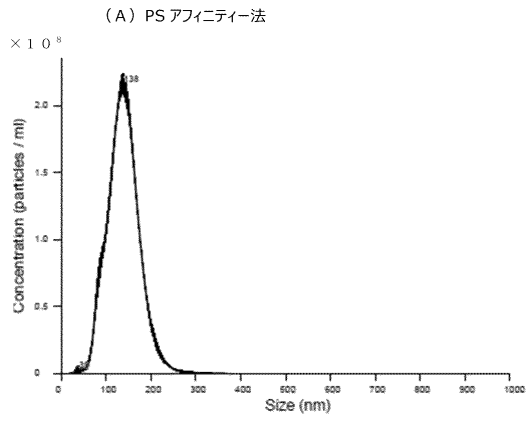
30

40

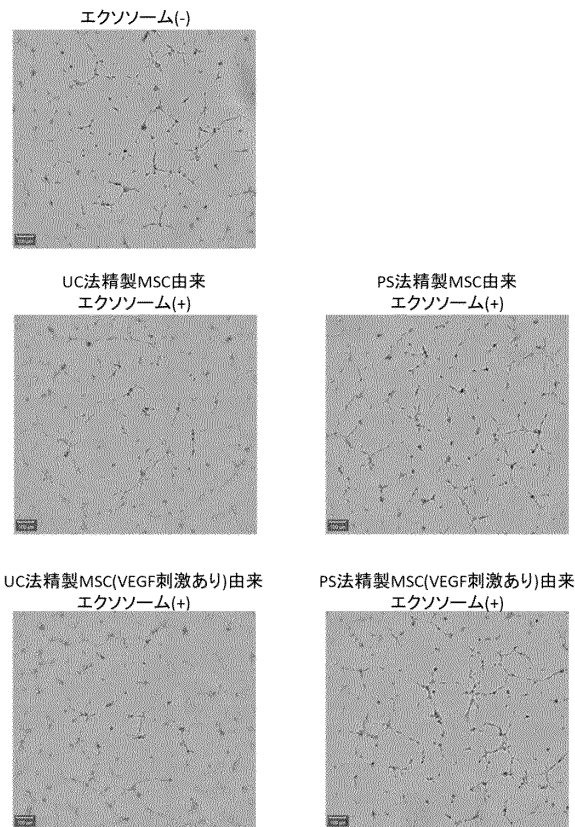
50

【図面】

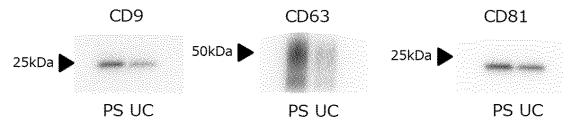
【図 1】



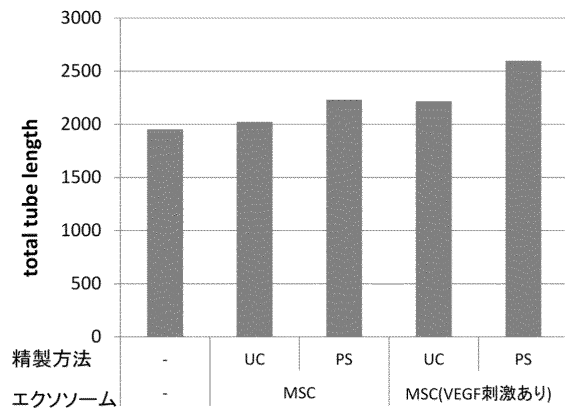
【図 3】



【図 2】



【図 4】



10

20

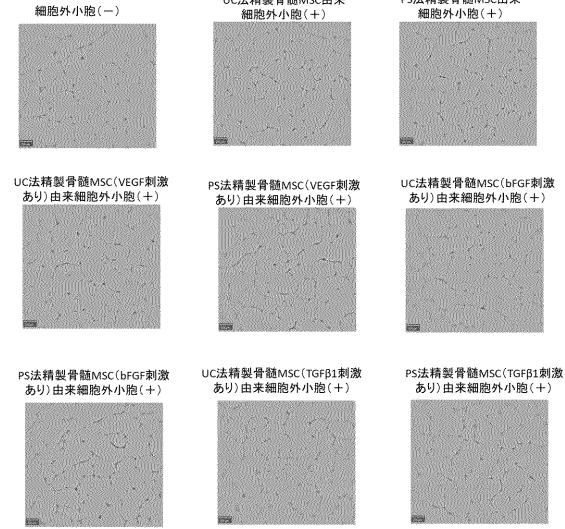
30

40

50

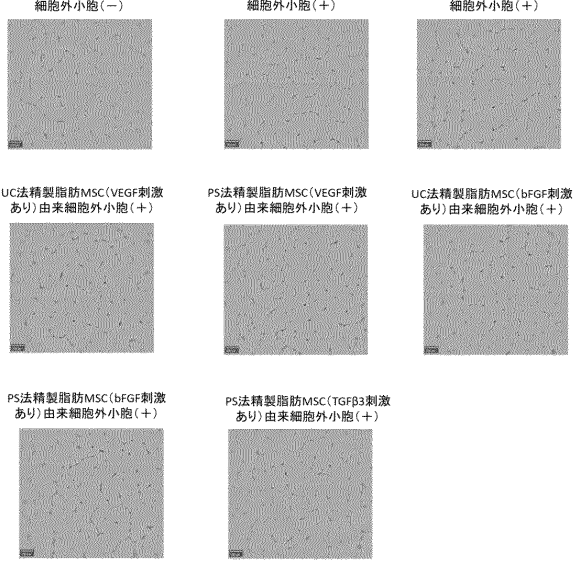
【図 5 A】

(A) 骨髄由来MSC



【図 5 B】

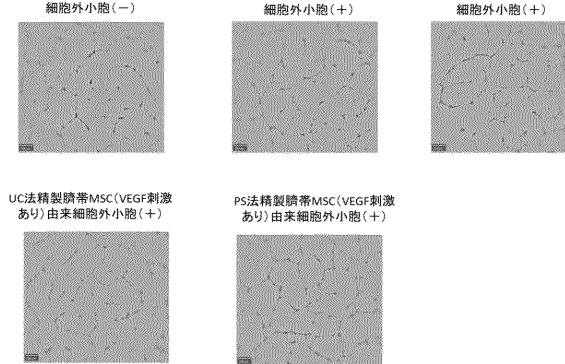
(B) 脂肪由来MSC



10

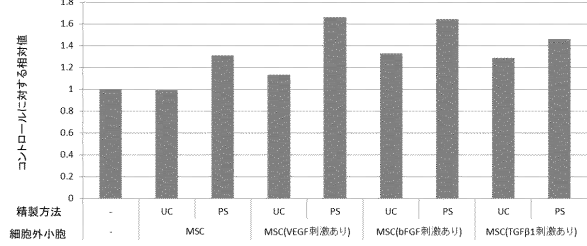
【図 5 C】

(C) 臍帯由来MSC



【図 6 A】

(A) 骨髄由来MSC



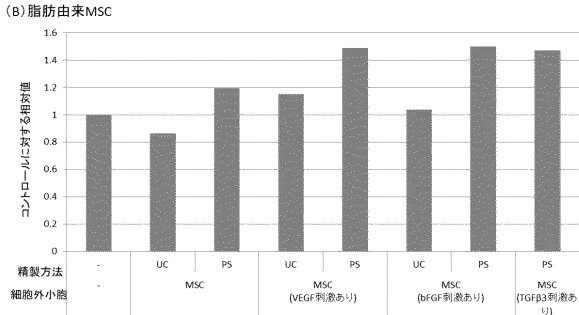
20

30

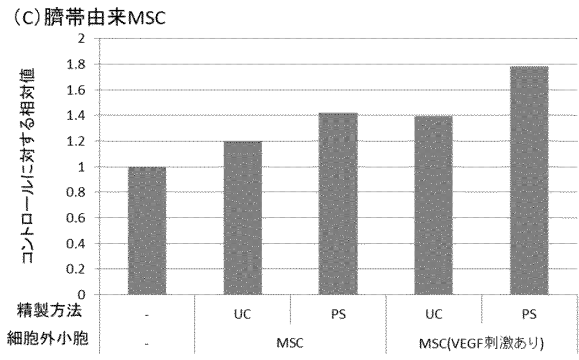
40

50

【図 6 B】



【図 6 C】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 35/51 (2015.01)
 A 6 1 P 9/00 (2006.01)
 C 1 2 N 5/0775(2010.01)

F I

A 6 1 K 35/51
 A 6 1 P 9/00
 C 1 2 N 5/0775

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 6 / 0 8 8 6 8 9 (W O , A 1)

HU, Guo-wen et al. , Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells attenuate limb ischemia by promoting angiogenesis in mice , Stem Cell Research & Therapy , 2015年 , Vol. 6, No. 10 , p. 1-15 , <http://stemcellres.com/content/6/1/10>

MA, Teng et al. , MicroRNA-132, Delivered by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes, Promote Angiogenesis in Myocardia Infarction , Stem Cells International , 2018年 , Vol. 2018 , Article ID 3290372 , <https://doi.org/10.1155/2018/3290372>

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 5 / 1 2

A 6 1 P 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)