

(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9月26日(26.09.2024)



(10) 国際公開番号
WO 2024/195878 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 35/28 (2015.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/011521

(22) 国際出願日: 2024年3月22日(22.03.2024)

(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 2023-047351 2023年3月23日(23.03.2023) JP

(71) 出願人: セルソース株式会社(**CELLSOURCE CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒1500002 東京都渋谷区渋谷一丁目2番21号 Tokyo (JP). 国立大学法人大阪大学(**OSAKA UNIVERSITY**)

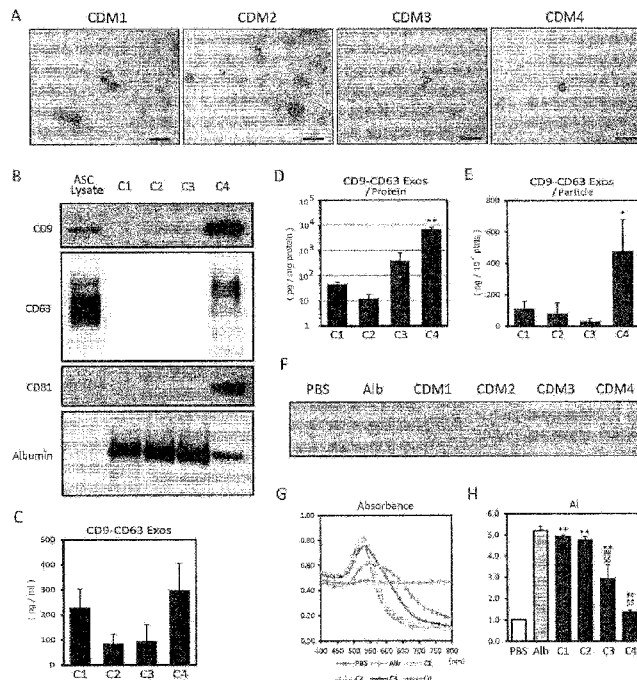
[JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 裾本 理人(**TSUMAMOTO, Masato**); 〒1500002 東京都渋谷区渋谷一丁目2番21号 渋谷キャスト11F セルソース株式会社内 Tokyo (JP). 山木 琢生(**YAMAKI, Takuo**); 〒1500002 東京都渋谷区渋谷一丁目2番21号 渋谷キャスト11F セルソース株式会社内 Tokyo (JP). 大西 和夫(**OHNISHI, Kazuo**); 〒1500002 東京都渋谷区渋谷一丁目2番21号 渋谷キャスト11F セルソース株式会社内 Tokyo (JP). 花井 洋人(**HANAI, Hiroto**); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 中村 憲正(**NAKAMURA, Norimasa**); 〒5650871 大阪府

(54) Title: COMPOSITION FOR TREATING ARTHROSIS

(54) 発明の名称: 関節症治療用組成物

[図3]



(57) Abstract: The present invention provides a pharmaceutical composition for treating arthrosis, the pharmaceutical composition comprising a composition containing extracellular vesicles derived from a culture supernatant of mesenchymal stem cells. The pharmaceutical composition is characterized in that a culture medium for the mesenchymal stem cells satisfies the following requirements (1) and (2): (1) the culture medium is a chemically defined medium that does not contain a component derived from an animal of a different species from a subject to be

吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪
大学内 Osaka (JP). 岡田 誠司(OKADA, Seiji);
〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国
立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 鎌田 光宜, 外(KAMADA, Mitsunori et
al.); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四
丁目 1 番 1 号 明治安田生命大阪御堂筋ビ
ル 高島国際特許事務所 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, 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).

規則4. 17に規定する申立て:

- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関
する申立て (規則4. 17(v))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 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))

treated; and (2) the number of microparticles each having a particle diameter of 1 to 1000 nm is less than 1×10^9 particles/mL before use.

(57) 要約: 本発明は、間葉系幹細胞の培養上清由来の細胞外小胞含有組成物を含む、関節症治療用医薬組成物であって、該間葉系幹細胞の培地は以下の条件: (1) 治療対象にとって異種の動物由来成分を含まない既知組成培地である; および (2) 使用前の状態において、粒子径が $1 \sim 1000$ nm である微粒子の個数が、 1×10^9 個/mL 未満であるを満たすことを特徴とする、医薬組成物を提供する。

明 細 書

発明の名称： 関節症治療用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、関節症治療用組成物に関する。

背景技術

[0002] 変形性関節症（O A）は、関節の軟骨と骨の劣化を特徴とする変性疾患であり、関節の健全性に対するさまざまな障害が引き金となって起こる。O Aは、複数の原因による関節変性の総称である。O Aの進行には、炎症と自然免疫の炎症促進反応が関与している。2019年には、世界のO A患者数は約5億2,800万人にのぼり、1990年以降113%増加している。そのため、O Aの治療は世界的な医療費負担の大きな要因となっている。O Aは、膝、股、手、足、脊椎などの関節において発症し、特に膝関節での発症が最も多い。一般に、変形性膝関節症（K O A）の治療法は限られており、早期には理学療法や薬物療法などの保存療法が試みられるが、下肢の変形を伴う進行期には骨切り術や人工膝関節置換術（T K A）などの大きな外科的治療に移行することが少なくない。近年、関節表面の生物学的修復に着目した再生医療が注目されている。具体的には、間葉系幹細胞（M S C）を用いた細胞治療が提案されており、K O Aの治療としてM S Cの関節内投与に関する多くのヒト試験が実施されている。ほとんどの試験で、主要な有害事象を伴わない様々なレベルの機能回復が報告されており、M S Cを用いた治療は、将来的に有効な治療法の選択肢として浮上している。

近年、M S Cの主な作用機序として、細胞増殖促進、化学誘引、抗アポトーシス効果などの栄養作用が注目されている。M S Cの栄養活性は、細胞外マトリックス（E C M）産生、細胞間接触、またはシグナル伝達分子の分泌によって引き起こされる可能性がある。

その中で、細胞外小胞（E V）、特にエクソソームは、M S Cの効果を媒介する重要な成分の一つとして浮上している。エクソソームは直径約100

n mの小胞であり、エンドサイトーシスによって細胞膜と融合する多胞体から合成・放出される。エクソソームは脂質二重層に囲まれ、核酸（m i R N A）、タンパク質、脂質など様々な生体分子を含むカーゴである。エクソソームは、分泌されたエクソソームを受容細胞が取り込み、そのカーゴ内容を取り込むという、細胞間コミュニケーションのメディエーターとして重要な役割を持つことが明らかにされている。培養細胞から放出されたエクソソームは培養液中に存在することが知られているが、採取時にマイクロベシクルなどの他のベシクルと完全に分離することは困難であった。そのため、エクソソームを主体とする細胞外ベシクルは、運用上、細胞外小胞（E V）と定義されている。

筋骨格系組織の分野では、M S C由来E V（M S C－E V）の治療効果に関するいくつかの研究が行われている。軟骨損傷や変形性関節症に対するM S C－E Vの治療効果がマウスモデルを用いて報告されており、今後M S C－E Vを用いた治療法の臨床応用が、これらの疾患に対する新しい無細胞治療法として期待される。

このような応用を実現するためには、安全性と有効性を確保するために、E Vの精製方法の最適化が必要である。基礎研究において、培地からE Vを分離するためのゴールドスタンダードが超遠心分離法（U C）であることは広く認知されている。しかし、クリーンな環境で培地を扱い、単一の分取方法でE Vを高収率で得ることは困難であり、臨床現場での製造要件を考慮すると、最終的には非現実的な状況であると思われる。これに対し、タンジェンシャルフローろ過（T F F）を用いた限外ろ過（U F）や、サイズ排除クロマトグラフィー（S E C）の後にU Fを行う方法が、臨床現場においてより適切であると考えられる。

さらに、純粋な臨床グレードのM S C－E Vを得るためには、細胞培養の過程で培地由来の物質の汚染を避ける必要がある。この点で、E Vの供給源にもなりうる牛胎児血清（F B S）やヒト血小板溶解液（h P L）を含む培地は使用しないことが望ましい。このようなE Vを含む調製品の汚染は、M

SCの増殖能と生存率に影響を与える可能性がある（非特許文献1参照）。これらを総合すると、製造工程全体のGMP要件を満たすために、純粋なMSC-EVの単離を確実にするために、無血清及び動物由来成分（異種由来成分）を含まない化学的に組成が明らかな培地（CDM）を用いて細胞を培養することが望ましいと言える。

先行技術文献

非特許文献

- [0003] 非特許文献1: Thery, C., et al., Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. J Extracell Vesicles, 2018. 7(1): p.1535750.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0004] 本発明の目的は、関節症治療に用いることができる新規な組成物を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0005] 本発明者らは、上記課題に対して鋭意検討した結果、特定成分からなる培地を用いて間葉系幹細胞を培養したとき、（１）間葉系幹細胞１細胞当たりの細胞外小胞量が増加すること、（２）間葉系幹細胞におけるタンパク質発現プロファイルが、既存の間葉系幹細胞培養培地を用いて培養された間葉系幹細胞のプロファイルとは大きく異なること、（３）得られた培養上清において、有用成分である細胞外小胞以外の夾雑成分（非EV成分）が比較的少ないこと、（４）得られた細胞外小胞は、インビトロにおいてヒト関節軟骨細胞（hAC）の増殖能、遊走能、細胞外マトリックス発現、および抗アポトーシス活性を亢進すること、および（５）得られた細胞外小胞をコラゲナーゼ誘発変形性関節症マウスモデルに投与することにより、関節症を治療し得ること等を見出し、かかる知見に基づいてさらに研究を進めることによ

て本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下の通りである。

[0006] [1]

間葉系幹細胞の培養上清由来の細胞外小胞含有組成物を含む、関節症治療用医薬組成物であって、該間葉系幹細胞の培地は以下の条件：

- (1) 治療対象にとって異種の動物由来成分を含まない既知組成培地である；および
 - (2) 使用前の状態において、粒子径が $1 \sim 1000 \text{ nm}$ である微粒子の個数が、 1×10^9 個/ mL 未満である
- を満たすことを特徴とする、医薬組成物。

[2]

培地が、さらに次の条件：

- (3) 培地の使用前の状態において、培地に含まれる総タンパク質量が $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下である；
 - (4) 界面活性剤を含有しない、又は、界面活性剤を臨界ミセル濃度未満で含有する；および
 - (5) $\text{TNF}-\alpha$ および $\text{TRAIL}/\text{APO2L}$ を含む
- から選ばれる1以上の条件を満たす、[1]記載の医薬組成物。

[3]

前記(5)における $\text{TNF}-\alpha$ および $\text{TRAIL}/\text{APO2L}$ の含有量が、培地の使用前の状態において、それぞれ、 $0.0001 \sim 2.0 \text{ mg}/\text{L}$ である、[2]記載の医薬組成物。

[4]

細胞外小胞含有組成物中の単位重量当たりのタンパク質に対する微粒子数(単位： 10^9 個/ mg タンパク質)が $10 \sim 1,000$ である、[1]～[3]のいずれか記載の医薬組成物。

[5]

培地が、GMPグレードである、[1]～[4]のいずれか記載の医薬組成物。

[6]

細胞外小胞含有組成物が培養上清またはそれを精製処理したものである、
[1] ～ [5] のいずれか記載の医薬組成物。

[7]

関節症が、変形性関節症である、[1] ～ [6] のいずれか記載の医薬組成物。

[8]

関節症が、膝関節症である、[1] ～ [7] のいずれか記載の医薬組成物。
。

[9]

以下の工程を含む、関節症治療用医薬組成物の製造方法：

(工程 1) 以下の条件を満たす培地において間葉系幹細胞を培養する工程

(1) 治療対象にとって異種の動物由来成分を含まない既知組成培地である；および

(2) 使用前の状態において、粒子径が $1 \sim 1000 \text{ nm}$ である微粒子の個数が、 1×10^9 個/mL 未満である

(工程 2) 工程 1 で得られる培養物から細胞外小胞含有組成物を回収する工程。

[1 0]

培地が、さらに次の条件：

(3) 培地の使用前の状態において、培地に含まれる総タンパク質量が $100 \mu\text{g/mL}$ 以下である；

(4) 界面活性剤を含有しない、又は、界面活性剤を臨界ミセル濃度未満で含有する；および

(5) $\text{TNF-}\alpha$ および TRAIL/APO2L を含む
から選ばれる 1 以上の条件を満たす、[9] 記載の製造方法。

[1 1]

前記 (5) における $\text{TNF-}\alpha$ および TRAIL/APO2L の含有量が

、培地の使用前の状態において、それぞれ、 $0.0001 \sim 2.0 \text{ mg/L}$ である、[10] 記載の製造方法。

[12]

細胞外小胞含有組成物中の単位重量当たりのタンパク質に対する微粒子数（単位： 10^9 個/ mg タンパク質）が $10 \sim 1,000$ である、[9]～[11] のいずれか記載の製造方法。

[13]

培地が、GMPグレードである、[9]～[12] のいずれか記載の製造方法。

[14]

細胞外小胞含有組成物が培養上清またはそれを精製処理したものである、[9]～[13] のいずれか記載の製造方法。

[15]

関節症が、変形性関節症である、[9]～[14] のいずれか記載の製造方法。

[16]

関節症が、膝関節症である、[9]～[15] のいずれか記載の製造方法。

[A1]

関節症の治療における使用のための、間葉系幹細胞の培養上清由来の細胞外小胞含有組成物であって、該間葉系幹細胞の培地は以下の条件：

（1）治療対象にとって異種の動物由来成分を含まない既知組成培地である；および

（2）使用前の状態において、粒子径が $1 \sim 1000 \text{ nm}$ である微粒子の個数が、 1×10^9 個/ mL 未満であることを満たすことを特徴とする、組成物。

[A2]

培地が、さらに次の条件：

(3) 培地の使用前の状態において、培地に含まれる総タンパク質量が $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下である；

(4) 界面活性剤を含有しない、又は、界面活性剤を臨界ミセル濃度未満で含有する；および

(5) $\text{TNF}-\alpha$ および $\text{TRAIL}/\text{APO2L}$ を含む
から選ばれる 1 以上の条件を満たす、[A1] 記載の組成物。

[A3]

前記 (5) における $\text{TNF}-\alpha$ および $\text{TRAIL}/\text{APO2L}$ の含有量が、培地の使用前の状態において、それぞれ、 $0.0001 \sim 2.0 \text{ mg}/\text{L}$ である、[A2] 記載の組成物。

[A4]

細胞外小胞含有組成物中の単位重量当たりのタンパク質に対する微粒子数 (単位： 10^9 個/ mg タンパク質) が $10 \sim 1,000$ である、[A1] ～ [A3] のいずれか記載の組成物。

[A5]

培地が、GMP グレードである、[A1] ～ [A4] のいずれか記載の組成物。

[A6]

細胞外小胞含有組成物が培養上清またはそれを精製処理したものである、[A1] ～ [A5] のいずれか記載の組成物。

[A7]

関節症が、変形性関節症である、[A1] ～ [A6] のいずれか記載の組成物。

[A8]

関節症が、膝関節症である、[A1] ～ [A7] のいずれか記載の組成物。

[B1]

関節症を罹患する対象に間葉系幹細胞の培養上清由来の細胞外小胞含有組

成物を投与することを含む、関節症の治療方法であって、該間葉系幹細胞の培地は以下の条件：

(1) 治療対象にとって異種の動物由来成分を含まない既知組成培地である；および

(2) 使用前の状態において、粒子径が $1 \sim 1000 \text{ nm}$ である微粒子の個数が、 1×10^9 個/ mL 未満である

を満たすことを特徴とする、方法。

[B 2]

培地が、さらに次の条件：

(3) 培地の使用前の状態において、培地に含まれる総タンパク質量が $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下である；

(4) 界面活性剤を含有しない、又は、界面活性剤を臨界ミセル濃度未満で含有する；および

(5) $\text{TNF}-\alpha$ および $\text{TRAIL}/\text{APO2L}$ を含むから選ばれる1以上の条件を満たす、[B 1]記載の方法。

[B 3]

前記(5)における $\text{TNF}-\alpha$ および $\text{TRAIL}/\text{APO2L}$ の含有量が、培地の使用前の状態において、それぞれ、 $0.0001 \sim 2.0 \text{ mg}/\text{L}$ である、[B 2]記載の方法。

[B 4]

細胞外小胞含有組成物中の単位重量当たりのタンパク質に対する微粒子数(単位： 10^9 個/ mg タンパク質)が $10 \sim 1,000$ である、[B 1]～[B 3]のいずれか記載の方法。

[B 5]

培地が、GMPグレードである、[B 1]～[B 4]のいずれか記載の方法。

[B 6]

細胞外小胞含有組成物が培養上清またはそれを精製処理したものである、

[B 1] ～ [B 5] のいずれか記載の方法。

[B 7]

関節症が、変形性関節症である、[B 1] ～ [B 6] のいずれか記載の方法。

[B 8]

関節症が、膝関節症である、[B 1] ～ [B 7] のいずれか記載の方法。

[C 1]

関節症の治療のための医薬の製造における間葉系幹細胞の培養上清由来の細胞外小胞含有組成物の使用であって、該間葉系幹細胞の培地は以下の条件：

- (1) 治療対象にとって異種の動物由来成分を含まない既知組成培地である；および
- (2) 使用前の状態において、粒子径が $1 \sim 1000 \text{ nm}$ である微粒子の個数が、 1×10^9 個/mL未満であることを満たすことを特徴とする、使用。

[C 2]

培地が、さらに次の条件：

- (3) 培地の使用前の状態において、培地に含まれる総タンパク質量が $100 \mu\text{g/mL}$ 以下である；
- (4) 界面活性剤を含有しない、又は、界面活性剤を臨界ミセル濃度未満で含有する；および
- (5) $\text{TNF-}\alpha$ および TRAIL/APO2L を含むから選ばれる1以上の条件を満たす、[C 1] 記載の使用。

[C 3]

前記(5)における $\text{TNF-}\alpha$ および TRAIL/APO2L の含有量が、培地の使用前の状態において、それぞれ、 $0.0001 \sim 2.0 \text{ mg/L}$ である、[C 2] 記載の使用。

[C 4]

細胞外小胞含有組成物中の単位重量当たりのタンパク質に対する微粒子数（単位： 10^9 個／mgタンパク質）が $10 \sim 1,000$ である、[C1]～[C3]のいずれか記載の使用。

[C5]

培地が、GMPグレードである、[C1]～[C4]のいずれか記載の使用。

[C6]

細胞外小胞含有組成物が培養上清またはそれを精製処理したものである、[C1]～[C5]のいずれか記載の使用。

[C7]

関節症が、変形性関節症である、[C1]～[C6]のいずれか記載の使用。

[C8]

関節症が、膝関節症である、[C1]～[C7]のいずれか記載の使用。

[0007] また、別の一ある態様において、本発明は膝関節症治療用組成物を提供する。当該膝関節症治療用組成物は、使用前の状態において、粒子径が $1 \sim 1000$ nmである微粒子の個数が、 1×10^9 個／mL未満である培地でヒト間葉系幹細胞を培養して得られた細胞外小胞を含み、膝関節症の治療に用いられる。

上記態様の膝関節症治療用組成物において、前記膝関節症が、変形性膝関節症であってもよい。前記培地が、TNF- α 及びTRAIL/APO2Lを含んでもよい。

前記培地の使用前の状態において、前記培地における前記TNF- α 及び前記TRAIL/APO2Lの含有量が、それぞれ、 $0.0001 \sim 2.0$ mg/Lであってもよい。

前記培地の使用前の状態において、前記培地に含まれる総タンパク質量が $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であってもよい。前記培地が、界面活性剤を含有しなくてもよい。

また、前記培地が非ヒト動物由来成分、好ましくはヒトを含む動物由来成分を含まなくてもよい。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、関節症治療に用いられる新規な組成物に関する技術を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、培養液中に放出されたEVを定量化するためのExoScreenアッセイを示すグラフである。ASCを各表示の培地で24時間または48時間培養し、その上清をExoScreenアッセイで分析した。図1A、図1Bは、それぞれ、24時間または48時間におけるCD9 x CD9 EVのシグナル強度(SI)および細胞単位で収集したデータである。図1C、図1Dは、それぞれ、CD63 x CD63 EVの24時間または48時間におけるSIと細胞単位で収集されたデータである。バーでつながれた2つのグループ間、または他のグループとそれぞれ比較して、*、## : $p < 0.01$ 。C1~C4は、それぞれCDM1~CDM4に対応する。

[図2]図2は、異なる培地から分離したEVとBGからの粒子とタンパク質の分布を示す。各培地由来のEVと各無培養液からの濃縮物(BG)を抽出し、比較した。図2A、図2Bは、それぞれ、NTAで検出した粒子の代表的なキャプチャ画像、粒径分布のヒストグラムである。図2C、図2Dは、各サンプルの粒子濃度およびタンパク質濃度のデータである。図2Eは、銀染色によるタンパク質の分布である。Alb : アルブミン。図2Fは、各細胞培地由来EV群の純度データであり、タンパク質あたりの粒子数として算出した。ND(not detected)は、粒子数が20個/フレーム以下、またはタンパク質濃度が範囲外であることを示し、統計解析では0として扱われる。棒でつながれた2つのグループ間の比較で、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 。C1~C4は、それぞれCDM1~CDM4に対応する。

[図3]図3は、各細胞培地由来のEVのTEM像、エクソソームマーカー、ナノプラズモニックアッセイの評価を示す。図3Aは、代表的なTEM画像である。図3Bは、ウェスタンブロッティングによる古典的なエクソソームマーカー蛋白質とアルブミンの評価を示す。図3Cは、ELISAにより測定したCD9-CD63のEVの定量分析を示す。CD9/CD63融合タンパク質を標準として計算した値である。図3D、図3Eは、それぞれ、タンパク質または粒子数によるCD9-CD63陽性EVの調整済みデータである。n=3。*：p<0.05、**：p<0.01（他のグループと比較した場合）。図3F-図3Hは、それぞれ、代表的な可視化溶液の色、吸光度の代表的なスペクトル、および凝集指数（AI）である。**、##、\$\$\$：PBS対照、アルブミン（AIb）対照、または他の試験群と比較して、それぞれp<0.01である。C1~C4は、それぞれCDM1~CDM4に対応する。

[図4]図4は、hACの増殖、遊走、ECM合成、抗アポトーシスに関する各培地由来EVおよびBGの治療効果を示す。各培地由来のEVまたは対応するBG、あるいはビヒクル対照（PBS）を、各EVについては同じ粒子濃度、各BGまたは対照については等量で培養hACに添加した。図4Aは、4日目および7日目に評価した細胞増殖アッセイを示す。n=6。図4B、図4Cは、それぞれ、移動した細胞の染色顕微鏡画像とその相対数を示し、コントロールに対する相対的な値を示している。各グループにつき3フィールドを無作為に選択した。スケールバー：200μm。図4Dは、定量的PCRによる遺伝子発現解析を示す。各遺伝子の発現はACTBで正規化し、コントロール群に対する相対発現として示した。n=3。図4E、図4Fは、それぞれ、アポトーシス検出のためのフローサイトメトリー解析、初期アポトーシスと定義されるアネキシンV（+）7-AAD（-）細胞による占有率を示す。*、#：p<0.05、**、##：p<0.01、それぞれコントロールまたはバーでつながれた2つのグループと比較した。NS：コントロール群との比較において、有意ではない。

[図5]図5は、MSCの表面マーカーに関するフローサイトメトリー解析を示すグラフである。

[図6]図6は、使用前の状態における、CDM4及び従来培地の様子を示す写真である。

[図7]図7は、使用前の状態における、CDM4及び従来培地の粒度分布である。

[図8]図8は、3人の異なるドナーに由来するCDM4-EVの銀染色によるタンパク質の分布を示す。

[図9]図9は、CIOAマウスに対するCDM4-EVの治療効果を示す図である。右膝関節にコラゲナーゼを注射してKOAを誘発し、8日目に同じ部位にCDM4-EV（処理）またはCDM4-BG（未処理）を注射した。マウスは28日目に屠殺し、注射した膝から脛骨を分離した。反対側の脛骨は正常対照（ノーマル）として使用した。図9A、図9Bは、脛骨関節表面の巨視的画像および巨視的軟骨障害スコアを示す。スケールバー：500 μ m。図9C、図9Dは、サフラニンOで染色した脛骨内側の組織切片およびOARS Iスコアを示す。スケールバー：200 μ m。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明の実施形態について、詳細に説明する。なお、本明細書中、数値範囲の説明における「a～b」との表記は、特に断らない限り、a以上b以下であることを表す。

[0011] 1. 関節症治療用医薬組成物

本発明は、間葉系幹細胞の培養上清由来の細胞外小胞含有組成物を含む、関節症治療用医薬組成物（以下、「本発明の医薬組成物」と称することがある）を提供する。ここで、該間葉系幹細胞の培地は以下の条件：

（1）治療対象にとって異種の動物由来成分を含まない既知組成培地（CDM）である；および

（2）使用前の状態において、粒子径が1～1000 nmである微粒子の個数が、 1×10^9 個/mL未満である

を満たすことを特徴とする。

[0012] 本発明の医薬組成物に含まれる「細胞外小胞含有組成物」は、特定の条件を満たす培地（以下、「本発明に用いられる培地」と称することがある）において間葉系幹細胞を培養した場合に、当該間葉系幹細胞が分泌する細胞外小胞（E V）を含み、関節症の治療活性に望ましくない影響を及ぼさない範囲で、該培養上清中に含まれるE V以外の成分を含んでもよい。当該E Vが関節症治療における実質的な有効成分である。

[0013] 本発明に用いられる培地において培養される間葉系幹細胞は、哺乳動物（例えば、マウス、ラットなどの実験動物、イヌ、ネコなどの愛玩動物、ブタ、ウマ、ウシなどの家畜動物、ヒト、サル、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類）由来の間葉系幹細胞であれば特に制限はないが、治療対象である動物と同種の動物由来であることが好ましい。本発明の好ましい一実施態様においては、治療対象はヒトであるので、間葉系幹細胞としてヒト由来の細胞が好ましく用いられる。間葉系幹細胞が由来する組織は特に限定されず、脂肪、骨髓、臍帯、歯髄または胎盤などのいずれの組織であってもよいが、好ましくは、間葉系幹細胞は脂肪由来間葉系幹細胞（A S C）であり得る。

[0014] 本発明に用いられる培地において間葉系幹細胞を培養する条件は、間葉系幹細胞がE Vを分泌することができる限り特に制限されない。例えば、培養中に間葉系幹細胞の増殖が停止するような培養条件であってもE Vの分泌が生じているのであれば、当該培養条件を採用してもよい。

[0015] 本発明に用いられる培地は、特に断らない限り、細胞に細胞外小胞（E V）を分泌させるときに使用するE V分泌用培地を意味する。

[0016] 本発明に用いられる培地を構成する基本成分は、幹細胞増殖用培地（例えば間葉系幹細胞増殖用培地）に含まれる成分と同じであってもよい。本発明に用いられる培地の基本成分として、例えば、アミノ酸、ビタミン、無機塩類及びその他成分を挙げることができる。具体的には、アミノ酸として、必須アミノ酸であるイソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニル

アラニン、トレオニン（スレオニン）、トリプトファン、バリン及びヒスチジン、並びに、非必須アミノ酸であるチロシン、システイン、アスパラギン酸、アスパラギン、セリン、グルタミン酸、グルタミン、プロリン、グリシン、アラニン及びアルギニン；ビタミンとして、アスコルビン酸、コリン、ミノイノシトール、ナイアシンアミド、パントテン酸、ピリドキシン、ピリドキサル、チアミン、プトレシン、ビオチン、シアノコバラミン、葉酸及びリボフラビン；無機塩類として、 FeSO_4 、 CuSO_4 、 MnSO_4 、 Na_2SiO_3 、 ZnSO_4 、 MgSO_4 、 CaCl_2 、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 NaCl 、 KCl 及び NaHCO_3 ；その他成分として、HEPES等の緩衝剤、グルコースやピルビン酸等の炭素源、及びグルタチオン（還元型）等の抗酸化物質を挙げることができる。

[0017] ただし、血清（例、ウシ血清またはヒト血清）などの動物由来の未知の成分を含有する添加物が含まれる培地を用いて調製された培養上清は、企図する有効成分以外の夾雑成分をも含有しているため、医薬には適さない。血清には、大量のタンパク質が含まれることに加え、ロット間で性能が異なること、さらには狂牛病などのプリオン病やヒト感染症等への感染といったリスクがある。また、後述の実施例で示される通り、既存の既知組成の間葉系幹細胞培養用培地は、それ自体がヒト関節軟骨細胞の増殖や遊走等に影響を与える成分を含んでいることが実証されており、かかる意図しない活性を有する夾雑成分を含む培地を用いての医薬品の製造は忌避されるべきである。かかる観点から、本発明に用いられる培地は、（１）少なくとも治療対象にとって異種の動物由来成分を含まない既知組成培地である。好ましくは、該培地は、治療対象である動物由来の成分も含まない既知組成培地である。さらに、本発明に用いられる培地は、（２）使用前の状態において、粒子径が $1 \sim 1000 \text{ nm}$ である微粒子の個数が、 1×10^9 個/mL未満である。従来培地（基礎培地に血清を添加した培地、又は基礎培地にホルモン及び特定の栄養成分等を添加した培地（無血清培地ともいう）等）は、分泌される細胞外小胞と同等の粒径を有する細胞外小胞様粒子を多く含む。分泌工程の際に

、このような細胞外小胞様粒子を含む培地を用いた場合、後述の物理的指標によっては細胞外小胞の分泌の有無及び分泌量を確認できない。したがって、本発明に用いられる培地は、細胞外小胞様粒子を極力排除した培地であり、好適には（2'）使用前の状態において、粒子径が1～1000nmである微粒子の個数が、 5×10^8 個/mL未満であることを条件とする。本発明に用いられる培地に含まれる微粒子の粒子径範囲は、目的の細胞外小胞に合わせて設定することができ、後述するエクソソームを回収する場合、10～500nmの範囲の微粒子数が上記の数値未満であることが好ましく、30～200nmがさらに好ましく、50～150nmが特に好ましい。微粒子の個数がこのような範囲内であると、物理的指標による細胞外小胞の検出の際に、妨害（細胞外小胞様粒子が細胞外小胞と共に検出されること）の程度が許容範囲内となる。

[0018] 本明細書において、「微粒子」とは、電子顕微鏡やレーザー光による散乱を利用して検出可能なナノスケール（1nm～1000nm）の粒子を意味する。本発明の医薬組成物における、本発明に用いられる培地または細胞外小胞含有組成物中の微粒子の個数は、以下の測定機器および測定条件で、ナノ粒子トラフィック解析（NTA）法により測定した場合の、検体1mLあたりの粒子径1～1000nmの粒子数として定義される。

[測定機器]

NanoSight LM10（Malvern社製）

[測定条件]

- ・ビデオ撮影時間：60秒間
- ・カメラレベル：14
- ・検出閾値7
- ・粒子数が20個/フレーム以下の場合、未検出（ND）と定義する

しかしながら、当該微粒子数は、上記測定機器と同等の測定能力を有するNTA法を測定原理とする他の測定機器を用い、上記測定条件と等価な条件にて測定してもよく、当業者であれば、そのような測定機器および測定条件を

適宜選択することができる。

本発明の医薬組成物における、本発明に用いられる培地または細胞外小胞含有組成物中の微粒子の例としては、細胞外小胞、脂質により形成される小胞（例、リポソーム）や界面活性剤により形成されるミセルなどの、細胞外小胞様の粒子が挙げられる。

[0019] 本発明に用いられる培地は、好適には、脂質類を含まない、又は、脂質類を100 nM未満（好適には50 nM未満、より好適には10 nM未満）含む。脂質類は、培地内に微粒子を形成させる原因となり得るからである。加えて、脂質類は、細胞が増殖する際に細胞膜の構成成分として必要とされるが、本発明に用いられる培地は細胞増殖を前提としていないのでそもそも不要である。ここで、細胞増殖用培地に含まれ得る脂質類は、典型的には、不飽和脂肪酸、飽和脂肪酸及びステロールから選択される少なくとも一つである。また、間葉系幹細胞の細胞膜を構成する主な脂質類として、オレイン酸、アラキドン酸、リノール酸、ステアリン酸及びパルミチン酸が挙げられる。したがって、本発明に用いられる培地は、オレイン酸、アラキドン酸、リノール酸、ステアリン酸、及びパルミチン酸の合計濃度が、100 nM未満であることがより好適であり、50 nM未満であることがさらに好適であり、10 nM未満であることが特に好適であり、5 nM未満であることが最も好適である。

[0020] また、本発明に用いられる培地は、好適には、界面活性剤を含まない、又は、界面活性剤を臨界ミセル濃度未満で含む。従来培地においては、前述の脂質類や一部の栄養成分等の不溶性成分を培地に可溶化させるため、又は細胞増殖を促すために界面活性剤が添加されている。物理的指標による細胞外小胞の検出では、この可溶化により形成されたミセルが、細胞外小胞様粒子として細胞外小胞と共に検出され得る。また、本発明者らは、培地中の界面活性剤が臨界ミセル濃度未満であっても、細胞外小胞様粒子が形成される事象を確認している。これは、ミセル様体（培地中の脂質の周りを包み込むように形成されたミセルのようなもの）が形成されたためと推定される。当該

ミセル様体の形成による細胞外小胞の検出への影響を抑えるため、界面活性剤の濃度は、臨界ミセル濃度の10倍希釈濃度（臨界ミセル濃度の $1/10$ の濃度）以下が好適であり、50倍希釈濃度以下がより好適であり、100倍希釈濃度以下がさらに好適であり、500倍希釈濃度以下が特に好適であり、1000倍希釈濃度以下が特に好適である。界面活性剤としては、例えば、Tween 80、SDS、Tergitol 7、Irgasan及びモネシンを挙げることができる。なお、界面活性剤の臨界ミセル濃度は、例えば以下の方法で測定可能である：表面張力計Sigma（KSV Instruments社製）を用いて、Sigmaシステム中の解析プログラムを用いて解析を行う。界面活性剤を水系媒体に対して0.01%ずつ滴下し、攪拌、静置後の界面張力を測定する。得られた表面張力カーブから、界面活性剤の滴下によっても界面張力が低下しなくなる界面活性剤濃度を臨界ミセル濃度として算出する。この手法にて、水系媒体に対するTween 80の臨界ミセル濃度を表面張力計Sigmaで測定を行ったところ、15 mg/Lであった。

[0021] さらに、本発明に用いられる培地は、好適には、TNF（tumor necrosis factor；腫瘍壊死因子）ファミリーに属するサイトカインを含む。具体的には、本発明に用いられる培地は、好適には、サイトカインとしてTNF- α 及びTRAIL/APO2Lを含む。これらのサイトカインは細胞死の誘導等に寄与するため、細胞を増殖又は維持するための培地には添加されない。通常、細胞外小胞の分泌時には、細胞が高い生存率を示す、細胞の増殖又は維持に適した培地を使用する。しかしながら、上述の通り、本発明に用いられる培地は、細胞増殖を前提としていない。細胞外小胞分泌用培地がこれらのサイトカインを含むことで、これらのサイトカインを含まない場合に比べて細胞の増殖や維持が抑制されるにも関わらず、細胞から分泌される細胞外小胞の量が増える。TNF- α 及びTRAIL/APO2Lの含有量は、使用前の状態において、それぞれ、0.0001～2.0 mg/Lが好ましく、0.001～1.0 mg/Lが特に好ましい。TNF- α 及びTRAIL

／A P O 2 Lの含有量がこのような範囲内であると、細胞へのダメージが最小限になり、且つ、細胞から効率的に細胞外小胞が分泌される。なお、本発明に用いられる培地は、上述の理由から、従来培地に含まれ得る成長因子（例えば、b F G F、E G F、P D G F及び／又はT G F - β 1）を含有していなくてもよい。なお、培地の構成成分が未知の場合は、従来公知のタンパク質検出法（例えば、E L I S A法、ウェスタンブロットティング法）等により上記タンパク質含有の有無を判断することができる。

[0022] 本発明に用いられる培地は、好適には、使用前の状態において、総タンパク質量が100 μ g / mL以下である。従来培地は、細胞の増殖又は維持のために多様且つ大量のタンパク質を含む。しかしながら、これらのタンパク質は細胞外小胞を精製する際に不純物として製品中に残存し得る。したがって、本発明に用いられる培地は、細胞外小胞の分泌に不要なタンパク質を極力排除した培地であり、使用前の状態において、総タンパク質量が好適には50 μ g / mL以下であり、さらに好適には30 μ g / mL以下であり、特に好適には20 μ g / mL以下である。総タンパク質量がこのような範囲であると、精製時の不純物が許容範囲内となる。培地中の総タンパク質量は、従来公知の測定方法により測定できる。総タンパク質量の測定方法としては、例えば、Q u b i t法、B r a d f o r d法、W S T法、B i u r e t法、L o w r y法及びB C A法が挙げられる。なお、これらの測定方法は、培地中の界面活性剤等により干渉され得るため、培地を適宜希釈して測定に供する必要がある。

[0023] また、一態様において、本発明の医薬組成物に含まれる細胞外小胞含有組成物は、培養上清そのものであってもよく、或いは、細胞外小胞についての精製処理を経たものであってもよい。培養上清を精製する方法は、細胞外小胞が濃縮され、他の夾雑成分の濃度を低減させることができる方法であれば特に限定されない。培養上清を細胞外小胞について精製する方法の一例としては、タンジェンシャルフローフィルトレーション（T F F）、抗体アフィニティーによる精製、サイズ排除クロマトグラフィーカラム、密度勾配超遠

心法などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0024] また、一態様において、本発明の医薬組成物に含まれる細胞外小胞含有組成物（例えば、培養上清について、100kDa膜でろ過して約10倍に濃縮して得た精製物）中の単位重量当たりのタンパク質に対する微粒子数を純度（10⁹個/mg タンパク質）と定義するとき、細胞外小胞含有組成物の純度が通常10以上、好ましくは100以上、より好ましくは150以上であることを特徴とする。該純度の上限に特に制限はないが、例えば1,000以下、800以下、500以下等を挙げることができる。該純度の範囲としては、通常10～1,000、好ましくは100～1,000、より好ましくは150～1,000、あるいは、通常10～800、好ましくは100～800、より好ましくは150～800、またあるいは、通常10～500、好ましくは100～500、より好ましくは150～500を挙げることができる。

[0025] また、好ましい一態様において、本発明に用いられる培地はGMP（Good Manufacturing Practice）グレードであり得る。

[0026] 本発明に用いられる培地の具体例としては、例えば、以下の表1に示される組成からなる培地が例示される。（本培地は、以下の実施例においては「CDM4」と称される培地である。）

[0027]

[表1]

原 料			
Amino acids		Inorganic salts	
L-Tyrosine	127.31 mg	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.695 mg
L-Alanine	116.955 mg	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.001375 mg
L-Arginine HCl	68.335 mg	MnSO ₄ 5H ₂ O	0.0000795 mg
L-Asparagine H ₂ O	132.5 mg	Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	0.071 mg
L-Aspartic acid	116.995 mg	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.072 mg
L-Cysteine	147.54 mg	MgSO ₄ 7H ₂ O	174.25 mg
L-Glutamic acid	44.86 mg	CaCl ₂ 2H ₂ O	279.5 mg
L-Glutamine	584 mg	NaH ₂ PO ₄	61 mg
Glycine	28.76 mg	Na ₂ HPO ₄	141.96 mg
L-Histidine HCl · H ₂ O	27.21 mg	NaCl	7198.6 mg
L-Isoleucine	26.99 mg	KCl	255.92 mg
L-Leucine	58.8 mg	NaHCO ₃	1700 mg
L-Lysine HCl	45.385 mg	Proteins	
L-Methionine	109.74 mg	TNF-α	0.01 mg
L-Phenylalanine	18.48 mg	TRAIL/APO2L	0.01 mg
L-Proline	37.27 mg	Others	
L-Serine	44.025 mg	HEPES	3350 mg
L-Threonine	29.95 mg	D-Glucose	1040 mg
L-Tryptophan	6.53 mg	Pyruvic acid Na	110 mg
L-Valine	40.575 mg	L-Glutathione (reduced)	0.5 mg
L-Cystine 2HCl	20.4 mg		
Vitamins			
L-Ascorbic acid Na	5 mg		
Choline chloride	7.48 mg		
myo-Inositol	1.01 mg		
Niacinamide	0.5185 mg		
D-Pantothenic acid 1/4Ca	0.619 mg		
Pyridoxine HCl	0.03085 mg		
Pyridoxal HCl	0.5 mg		
Thiamine HCl	0.6685 mg		
Putrescine 2HCl	0.08 mg		
D-Biotin	0.0575 mg		
Cyanocobalamin	0.885 mg		
Folic acid	0.9 mg		
Riboflavin	0.069 mg		

[0028] 本発明の医薬組成物は関節症の治療または予防に用いられ得る。本発明の医薬組成物が適用される「関節症」は、滑膜関節（例、膝関節、肩関節、肘関節、股関節、足関節、手関節、指関節、脊椎椎間関節および顎関節など）

に生じるあらゆる関節疾患（炎症性および非炎症性疾患の両方を含む）であり得る。そのような関節症としては、例えば、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害（例、テニス肘）、先天性骨系統疾患（例、軟骨無形成症、多発性骨端異形成症、脊椎骨端異形成症、骨幹端異形成症、Stickler症候群、偽性軟骨無形成症、多発性外骨腫、片側肥大、オリエール病、マフッチ症候群等）、骨軟骨腫、軟骨腫などが挙げられるが、それらに限定されない。一態様において、関節症は変形性関節症であり得る。変形性関節症としては、変形性膝関節症、変形性肩関節症、変形性肘関節症、変形性股関節症、変形性足関節症、変形性手関節症、変形性指関節症、変形性脊椎関節症および変形性顎関節症などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい一態様において、本発明の医薬組成物は、変形性関節症の治療または予防に適用され、より好ましくは、変形性膝関節症の治療または予防に適用される。

[0029] また、本発明の医薬組成物の適用対象もまた、関節症を罹患し得る動物であれば特に限定されない。適用対象としては、例えば、マウス、ラットなどの試験動物、イヌ、ネコなどの愛玩動物、ブタ、ウマ、ウシなどの家畜動物、ヒト、サル、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類などが挙げられ、特にヒトが好ましい。

[0030] 本発明の医薬組成物における細胞外小胞含有組成物の含有量は特に制限されないが、例えば、細胞外小胞の個数（NTA法により測定される微粒子数で代表される）として、 $10^6 \sim 10^{10}$ 個/ μL の範囲内で適宜選択することができる。

[0031] 本発明の医薬組成物は、所望の治療または予防効果が維持される限り、本発明に用いられる培地での培養により間葉系幹細胞が分泌した細胞外小胞を含む培養上清由来の組成物以外の、医薬上許容される成分を含んでいてもよい。かかる成分としては、例えば、抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤などが含まれていてもよい。好ましい一実施態様において、本発明の医薬組成物は、水性または非水性の注射用液剤として製

剤化することができる。

[0032] 本発明の医薬組成物は、非経口的に適用対象に投与することができる。非経口的な投与としては、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与などが挙げられるが、対象における関節症の部位や症状に応じて適宜決定すればよい。

本発明の医薬組成物の対象への投与量は、投与する対象、投与方法、投与形態などによって異なり得る。当業者であれば、適切な投与量を適宜決定することができる。

[0033] なお、本明細書における疾患の「治療」には、疾患の治癒のみならず、疾患の寛解、疾患の程度の改善および疾患の進展抑制も含まれ得る。

[0034] また、本明細書における疾患の「予防」には、疾患の発症を防ぐことに加えて、疾患の発症を遅らせることが含まれる。加えて、本明細書における疾患の「予防」には、治療後の該疾患の再発を防ぐこと、または治療後の該疾患の再発を遅らせることも含まれ得る。

[0035] また、本明細書における「医薬組成物」との用語は、「医薬用剤」または「薬剤」などとも言い換えることができる。

[0036] 2. 関節症治療用医薬組成物の製造方法

本発明はまた、以下の工程を含む、関節症治療用医薬組成物の製造方法（以下、「本発明の製造方法」と称することがある）を提供する：

（工程1）以下の条件を満たす培地において間葉系幹細胞を培養する工程

（1）治療対象にとって異種の動物由来成分を含まない既知組成培地である；および

（2）使用前の状態において、粒子径が1～1000nmである微粒子の個数が、 1×10^9 個/mL未満である

（工程2）工程1で得られる培養上清由来の細胞外小胞含有組成物を回収する工程。

[0037] 本発明の製造方法の工程1における、間葉系幹細胞、その培養条件、用いられる培地などは本発明の医薬組成物で説明したものと同様である。

[0038] 本発明の製造方法の工程2においては、本発明に用いられる培地において培養された間葉系幹細胞から分泌された細胞外小胞を含む培養上清由来の組成物が回収される。該細胞外小胞含有組成物は培養上清自体であってもよいし、培養上清から細胞外小胞を精製処理したものであってもよい。培養上清の回収方法は特に限定されず、自体公知の方法（例、ろ過、遠心分離等）を用いればよい。

[0039] 細胞外小胞含有組成物が培養上清を精製処理したものである場合、工程2は、当該精製処理工程をさらに含む。細胞外小胞について精製する方法もまた、本発明の医薬組成物において説明したものと同様の方法を用いることができる。

[0040] 以下の実施例において本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの例によってなんら限定されるものではない。

実施例

[0041] （使用前培地中の粒子及び総タンパク質量の測定）

実験に用いたCDM4、および、比較のための培地として従来培地について、使用前における培地成分を測定した。具体的には、CDM4（培地1000mLあたりの組成は上述の表1を参照）及び従来培地〔無血清培地：KBM（登録商標）ADSC-4（コージンバイオ株式会社製）〕について、粒度分布及び総タンパク質量を測定した。なお、表1より、CDM4は、TNF- α 及びTRAIL/APO2Lの含有量が、使用前の状態において、それぞれ、0.01mg/Lであった。

[0042] （粒度分布の測定）

CDM4および従来培地について、NANOSIGHT（登録商標）LM10-HS（Malvern Panalytical社製）を用いて、培地中の粒子数及び粒子径を測定した。なお、各培地はそれぞれ20～200倍に希釈した。図6に、測定時に観察された各培地の写真を示す。図6に、測定時に観察された各培地の写真を示す。図6より、従来培地は使用前の時点で多量に含まれている一方、CDM4はほとんど粒子を含まないことが分

かった。また、このときの培地 1 mL あたりの粒径 1 ~ 1 0 0 0 nm における粒度分布（横軸に 1 nm 刻みで粒子径を、縦軸に粒子数をそれぞれプロットした）を図 7 に、各粒径範囲における粒子数を表 2 に、それぞれ示す。

[0043] [表2]

粒子径 [nm]	細胞外小胞分泌用培地 (CDM4) [個/mL]	従来培地 [個/mL]
1~1000	7.21×10^7	3.66×10^{10}
10~500	7.21×10^7	3.57×10^{10}
30~200	7.21×10^7	3.04×10^{10}
50~150	7.21×10^7	2.37×10^{10}

[0044] 使用前の状態において、従来培地は粒子径が 1 ~ 1 0 0 0 nm の微粒子を多量に含むのに対し、CDM4 はほとんど当該微粒子を含まなかった。具体的には、表 2 により、CDM4 は、使用前の状態において、粒子径が 1 ~ 1 0 0 0 nm である微粒子の個数が、 1×10^9 個/mL 未満であった。

[0045] (総タンパク質量の測定)

CDM4 および従来培地について、総タンパク質測定キット Qubit (登録商標) タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて、総タンパク質量を測定した。具体的には、0.5 ~ 5 % 量の総タンパク質測定試薬を添加し、ボルテックスミキサーにより混合した。このとき、標準タンパク質濃度液及びその段階希釈液についても、同様に総タンパク質測定試薬を添加、混合した。サンプルについて、Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて蛍光強度を測定した。標準タンパク質濃度液及びその段階希釈液の蛍光強度から、サンプルの総タンパク質濃度を算出した。その結果を、表 3 に示す。

[0046]

[表3]

	細胞外小胞分泌用培地 (CDM4)	従来培地
総タンパク質濃度	$<12.5 \mu\text{g/mL}$	$2460 \mu\text{g/mL}$

[0047] 表3より、使用前の状態において、従来培地は多量のタンパク質を含むのに対し、CDM4の総タンパク質量は検出限界（ $12.5 \mu\text{g/mL}$ ）未満であった。

[0048] （ヒト脂肪由来幹細胞（ASC）の培養）

ASCは変形性関節症の治療に臨床的に使用されているため、ASCをEVの供給源として使用した。ASCは、ドナー患者（ $N=3$ ）の腹部皮下脂肪組織から脂肪吸引により入手し、MSCを培養して増殖させた後に使用した。具体的には、乳酸リンゲル液（扶桑薬品工業社製）で数回洗浄した後、コラゲナーゼとサーモリシン（ともに天野エンザイム社製）で 37°C 、45分間脂肪組織を分解した。細胞は分解された組織から遠心分離によって得られ、NeoSERA（日本バイオメディカル社製）およびHuman Recombinant basic fibroblast growth factor（bFGF、REPROCELL）を添加したDMEM/F-12（和光純薬社製）からなる拡張培地にプラスチック培養皿上で再懸濁させた。すべての実験に2-4期の細胞を使用した。

フローサイトメトリー解析によると、当該細胞はCD73、CD90、CD105の95%以上の陽性発現を示し、CD11b/CD19/CD31/CD45/HLA-DRの混合からなる陰性マーカーカクテルの発現は<2%であった（図5参照）。正常ヒト関節軟骨細胞（hAC）はLonzaから購入し、製造元のプロトコルにしたがって培養を行った。すべての細胞は、 37°C 、5% CO_2 の湿式インキュベーターで培養し、培地は週に2回交換した。

[0049] (ExoScreenアッセイ)

EV比較のための抽出・精製工程には、動物由来成分を含まない無血清化学的定義培地（下記CDM1～4）を使用した。

CDM1 : KBM ADSC4、コージンバイオ

CDM2 : MSC NutriStem XF、Sartorius

CDM3 : StemPro MSC SFM XenoFree、Gibco（商業的に利用できるGMP準拠の血清、動物由来成分およびフェノールレッドを含まない培地である。）

CDM4 : 限外ろ過法を用いて精製したEVに未知の物質が混入することを避ける目的で、新たに開発したGMP準拠の血清・動物由来成分を含まない培地である（特許第7371975号および特許第7423016号参照）。

培養上清中のEVの量を評価するために、吉岡ら（Yoshioka, Y., et al., Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. Nat Commun, 2014, 5: p. 3591.）が開発したエクソソーム評価の超高感度法であるExoScreenアッセイを実施した。簡単に説明すると、ASCsを96ウェルプレートに7500細胞/wellで0日目に増殖培地中に播種した。

培養2日目に培地を吸引し、細胞を滅菌PBSで洗浄し、培地を各CDM（CDM1～4）100μLに交換した。24時間後と48時間後に各培地に特異的な上清を回収した。その後、各サンプル25μLを5nMビオチン化抗ヒトCD9またはCD63抗体（コスモ・バイオ）および抗ヒトCD9またはCD63抗体を結合した50μg/mL AlphaLISA acceptor beads（パーキンエルマー）にさらし、96ウェルハーフエリア白プレートに投入した。

暗所で37℃、3時間インキュベートした後、80μg/mLのAlphaScreenストレプトアビジンコートしたドナービーズ（パーキンエルマー）を25μL加え、混合物をさらに1時間インキュベートした。その後

、AlphaScreen測定モードを使用して、EnVision（パーキンエルマー）でプレートを評価した。PBSサンプルのシグナル強度は、実験値からバックグラウンド値として差し引いた。また、細胞数の補正のため、ExoScreenアッセイ用サンプル採取後の細胞培養ウェルに残った培地をCell Counting Kit-8（CCK-8、同仁化学研究所製）を用いて染色し、得られた吸光度をプロトコルに従って数値化した。表示波長は、Multiskan GO（Thermo Fisher Scientific社製）を用いて評価した。

[0050]（EVの抽出・精製）

ASCが80%コンフルエントに拡大した時点で、PBSで細胞を洗浄した後、培地を各CDMに変更した。さらに2日間培養した後、各上清を回収し、2,000g、4℃で10分間遠心分離して残渣を沈殿させた。その後、得られた上清を0.22μmのフィルターで濾過し、次の抽出工程まで4℃で保存した。

その後、各調整培養液サンプルをさらにタンジェンシャルフローろ過装置で抽出した。各サンプルを100kDa膜でろ過して約10倍に濃縮し、洗浄用のPBSを加えて同じ工程を3回繰り返し、最終的にEVを得た。細胞外小胞の研究については、（MIEV）2018ガイドラインでは、馴化培地由来のEVの特性を評価するための陰性コントロール比較対象として、細胞培養を行わない非馴化培地から分離した試料を用いることが望ましいとされている。

そこで、馴化（conditioned）CDM由来EVの単離に用いたのと同じ工程で、各非馴化CDMからの濃縮物をバックグラウンドコントロール（BG）として調製した。対応するEVとBGは、同じ濃縮率で調製した。調製物は、実験に使用される前に、4℃で1ヶ月未満保存された。

[0051]（ナノ粒子追跡解析（NTA））

ナノ粒子の濃度とサイズ分布は、NanoSight LM10、またはNS300（Malvern社製）を用いて測定した。サンプルはコンタ

ミネーションフリーのPBSを用いて最適な濃度（40－100倍）に希釈し、60秒間のビデオを撮影した。カメラレベルは14、検出閾値は7とした。また、Qubit Protein Assay KitとQubit Fluorometer（インビトロジェン社製）を用いて、メーカーの説明書に従ってタンパク質濃度を測定した。NTAで粒子数が20個／フレーム以下、またはQubitでタンパク質濃度が範囲外の場合、未検出（ND）と定義された。

[0052] （銀染色）

RIPAバッファ（Thermo Fisher Scientific社製）で500ngのタンパク質に調整したサンプルをローディングバッファ（NuPAGE, Thermo Fisher Scientific社製）と混合し、ジチオスレイトール（DTT）を用いて還元した。成分は4－12% Bis-Trisゲル（Thermo Fisher Scientific社製）を用いて、MOPSランニングバッファ（Thermo Fisher Scientific社製）中、200V一定で40分間電気泳動により分離された。比較のため、対応するEVと同量のBGサンプル、および同タンパク質量のウシ血清アルブミン（BSA, Sigma-Aldrich社製）も電気泳動に付された。Silver Stain Kit II（和光純薬社製）を用いて、メーカーのプロトコルに従ってゲルを染色し、染色したゲルをChemi Doc Touch（Bio-Rad社製）を用いて写真撮影した。

[0053] （透過型電子顕微鏡（TEM））

EVのTEM評価は株式会社花市電子顕微鏡技術研究所に委託した。簡単に説明すると、試料を400メッシュのカーボンフィルム担持銅グリッドに載置し、固定・洗浄後、2%酢酸ウラニルで造影し、風乾後にTEM（H-7600、日立製）で観察した。各CDM由来のEVは5倍に希釈して用いた。観察倍率は10,000倍であった。

[0054] （ウェスタンブロッティングおよび酵素免疫吸着法（ELISA））

ゲルは、還元条件または非還元条件を除き、銀染色と同じ方法で調製した。D T T は、アルブミンには混合し、C D 9、C D 6 3、C D 8 1 には混合しないようにした。A S C の細胞溶解液はR I P A バッファで回収し、各E V サンプルの5 倍量のタンパク質をロードした。評価するターゲットタンパク質に応じて、同じタンパク質比率を維持したままローディング量を調整した。P V D F 膜に転写後、B l o c k i n g O n e （ナカライ社製）で1 時間ブロッキングした。

この膜を、C D 9 （1 : 2 0 0 0）、C D 6 3 （1 : 5 0 0）、C D 8 1 （1 : 1 0 0 0）に対する一次マウスモノクローナル抗ヒト抗体（すべてコスモ・バイオ社製）、およびアルブミンに対するウサギポリクローナル抗体（1 : 4 0 0 0 0、P r o t e i n t e c h 社製）とともにC a n G e t シグナル溶液1（東洋紡績社製）中で4℃にて一晩浸漬させた。その後、マウスまたはウサギに対する二次I g G 西洋わさびペルオキシダーゼ（H R P）結合抗体（共に1 : 2 0 0 0 0 希釈、B i o c o m p a r e 社製）と共に、C a n G e t S i g n a l S o l u t i o n 2 中で室温で1 時間インキュベートした。タンパク質の発現は、I m m u n o S t a r L D （和光純薬社製）を用いて検出した。

各E V サンプル中のE V 量は、C D 9 / C D 6 3 E x o s o m e E L I S A K i t f o r H u m a n （コスモバイオ社製）を用いて、メーカーの説明書に従って測定した。検量線には、キットに付属のC D 9 / C D 6 3 融合タンパク質を用いた。

[0055]（発色性ナノプラズモニックアッセイ）

サンプルの純度を判定するために、比色式ナノプラズモニックアッセイを利用した。E V の試験サンプルをP B S で4 倍に希釈し、6 n M 金ナノ粒子（1 5 n m、C y t o d i a g n o s t i c s 社製）と2 : 1 の容量比で混ぜ合わせた。室温で2 0 分間インキュベートした後、混合物をキュベットに移し、4 0 0 ~ 8 0 0 n m のU V - v i s スペクトルを測定した。陰性コントロールとして試験サンプルをP B S に、陽性コントロールとして0. 2 %

w/v BSAに置き換えて測定した。

[0056] (細胞増殖アッセイおよび遊走アッセイ)

0日目に96ウェルプレートに3,000個のhACを播種した。一晚培養後、培地を2%Exosome-depleted FBS (Gibco) および1%Antimycotic Solution (AA, Sigma社製)を含む高グルコースDMEMに変更し、EV、BGまたはビークルコントロール(PBS)の各サンプルをEV群要素のそれぞれについて 5×10^9 粒子/mLの濃度で、またはBGまたはコントロール群のそれぞれについて等量で添加した。4日目および7日目にCCK-8を用いて吸光度を測定した。

hACの遊走への影響は、Cytoselect Cell Migration Assay kit (Cell Biolab社製)を用いて評価した。簡単に説明すると、1%AAを含む無血清DMEM中のhACを上側のチャンバーに 1.5×10^5 個播種し、0.1%Exosome-depleted FBSと1%AAを含むDMEM中の各サンプルを増殖アッセイと同じ濃度で下側のチャンバーに添加した。8時間培養後、孔径 $8 \mu\text{m}$ のメンブレン下面の細胞を染色用緩衝液で染色し、10倍の倍率でランダムに選んだ3つの可視化フィールドを用いて移動した細胞数をカウントした。

[0057] (遺伝子発現解析)

ECM合成能を評価するために、hACを12ウェルプレート上でマイクロマス($10 \mu\text{L}$ 中 1×10^5 個)として培養した。3時間培養後、軟骨基底培地とEV、BGサンプルまたはビヒクル対照(PBS)の各々を添加した。軟骨基底培地は、高グルコース含有DMEM (ナカライ社製)、 $50 \mu\text{g/mL}$ L-アスコルビン酸、 $40 \mu\text{g/mL}$ L-プロリン (和光純薬社製)、1%ITS+Premix (コーニング社製)、1%AAからなり、それぞれのサンプルの添加様式は上記と同じであった。2日間培養後、QIAzol (Qiagen社製)により細胞塊を回収した。

RNAはDirect-zol RNA Microprep kit (

Zymo Research社製)で分離し、cDNAはReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡績社製)を用いて製造者の指示に従い合成した。遺伝子発現は、Step One Plusシステム (Applied Biosystems社製)上でリアルタイムPCRにより解析した。 β -アクチン (ACTB) を正規化のための内部対照遺伝子として使用し、相対的な遺伝子発現を $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法で算出した。プライマー配列を表4に記載した。

[0058] [表4]

Gene		Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	SEQ ID NO
ACTB	Forward	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC	135	1
	Reverse	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT		2
COL1A1	Forward	TAAAGGGTCACCGTGGCT	355	3
	Reverse	CGAACCACATTGGCATCA		4
COL2A1	Forward	CGTCCAGATGACCTTCCTACG	122	5
	Reverse	TGAGCAGGGCCTTCTTGAG		6

[0059] (アポトーシスアッセイ)

24ウェルプレートに 1×10^5 hAC/wellを充填し、一晩インキュベートした。培地をアポトーシス誘導用の無血清DMEMに変更し、各サンプルを上記と同じパターンで添加した。さらに24時間培養後、細胞を回収し、Annexin-V APC (Biolegend社製)、および7-AAD (7-Amino-ActinomycinD, BD Biosciences社製)とともに、光のない室温で15分間インキュベートした。蛍光標識した細胞をフローサイトメトリーで解析し、Annexin-V (+) 7-AAD (-) 細胞を初期アポトーシスと定義し、その陽性率を算出した。

[0060] (コラゲナーゼ誘導性変形性関節症 (CIOA) モデルマウス)

すべての動物は室温で12時間の明暗サイクルで飼育され、水と餌は自由に

利用可能とした。8週齢のC57BL/6雄マウスの膝にCIOAを誘発した。マウスのCIOAモデルは、OAの薬理学的評価のモデルとして確立されている(Kuyinuら、J Orthop Surg Res. 2016 Feb 2:11:19; Maumusら、Front Immunol. 2016 Sep 27:7:392)。16匹のマウスに、1日目に8 μ LのPBSに1UのコラゲナーゼVII(シグマ社製)を入れたものを、麻酔下で右膝関節に経皮的に注射した。8日目に無作為に2群に割り付け、治療群には8 μ LのEV(微粒子数: 1×10^9 個)を、対照群には同量のBGを投与した。28日目にマウスを屠殺し、脛骨を採取した。無作為に選んだ反対側の脛骨5本を正常対照とした。脛骨の関節面を巨視的に観察し、Guingamp分類(Guingamp et al., Arthritis Rheum. 1997 Sep; 40(9):1670-9)に基づく膝関節の軟骨障害スコアリングシステムを用いて評価した。スコアは0点(正常)から4点(最悪)までの間で割り当てられる(表5)。

[0061] [表5]

Grade	巨視的特徴
0	正常な外観
1	軟骨表面がわずかに黄色く変色している
2	荷重領域の軟骨のびらんは少ない
3	軟骨下骨まで及ぶ大きなびらん
4	軟骨下骨の広範囲の露出を伴う大きなびらん

[0062] 内側脛骨プラトーと外側脛骨プラトーを別々に採点し、その合計点を最終得点とした。その後、脛骨サンプルをホルマリンで固定し、エタノールで連続脱水後、EDTAで脱灰した。パラフィン固定後、脛骨中央部の冠状面の切片を3 μ mの厚さで作成した。切片をサフラニンOで染色し、OARSI(Osteoarthritis Research Society I

international) の半定量的スコアリングシステム (Glasson et al. Osteoarthritis Cartilage, 2010 Oct; 18 Suppl 3: S17-23) を用いて脛骨の内側を評価した。スコアは0点 (正常) から6点 (最悪) までの間で割り当てられる (表6)。

[0063] [表6]

グレード	変形性関節症による損傷
0	正常
0.5	構造変化を伴わないSafranin-Oの消失
1	軟骨の消失を伴わない小さな線維形成
2	表層のすぐ下の層まで縦に裂け目があり、表面のラミナが若干失われている
3	関節面の25%未満に及ぶ石灰化軟骨の縦裂／びらん
4	関節面の25～50%に及ぶ石灰化軟骨の垂直性裂開／びらん
5	関節面の50～75%に及ぶ石灰化軟骨の縦裂／びらん
6	関節面の75%以上に及ぶ石灰化軟骨の縦裂／びらん

[0064] (統計解析)

データは平均値＋／－標準偏差 (SD) または箱ひげ図として表現した。Not detected (ND) データは、統計解析では0として扱った。2群間比較ではStudent's t-test、多群間比較ではANOVAを用い、in vitroデータにはTukey-Kramer test、in vivoデータにはSteel-Dwass検定のポストホック解析をJMP pro 14.0.0 (SAS Institute社製) を用いて行い、有意性は $p < 0.05$ とした。

[0065] (培養液中に分泌されたEVの量)

分離工程前に各培養液中に放出されたEVの量を評価するため、CD9またはCD63陽性EVの定量をExoScreen法により評価した。ビオチン化抗CD9抗体と抗CD9抗体を結合したAlphaLISAアクセプタービーズに挟まれた小胞 (CD9 x CD9) は、AlphaScreen

e n ストレプトアビジンをコートしたドナービーズの励起によって引き起こされる発光シグナルとして検出された（図 1 A, B）。各培養液サンプルは C D 9 陽性 E V を含み、24 時間のタイムポイントで採取したサンプルを比較すると、C D M 4 と C D M 3 グループは C D M 1 と C D M 2 グループより有意に多く含み（ $p < 0.01$ ）、48 時間サンプルについても同様のパターンが観察された（図 1 A）。

各培地が細胞に与える増殖能が異なるため、各時点で各培地の細胞数で補正すると、C D M 4 群は評価したどの時点でも他の試料よりも C D 9 陽性 E V s の数が有意に多かった（ $p < 0.01$ ）（図 1 B）。C D 6 3 陽性 E V の検出数は、24 時間および 48 時間の両方で、C D M 3 グループが他のグループよりも有意に高かった（ $p < 0.01$ ）。しかし、細胞数で補正すると、C D M 4 グループは、両時点で C D 6 3 陽性 E V s の数を有意に多く含んでいた（ $p < 0.01$ ）（図 1 C, D）。以上より、C D M 4 培地は A S C s からの E V s の放出を最も効率的に促進することが分かった。

[0066] （異なる C D M ソースから単離した E V の純度評価）

各調整培地由来の E V 調製物および各無培養培地（B G）の濃縮物は、T F F システムを用いて抽出した。すべての E V サンプルは、N T A から取り込まれた画像によって決定されるように、いくつかの非 E V 粒子を含んでいた（図 2 A）。注目すべきは、C D M 1、2、3 の B G 試料にも、分布のピークが直径約 80 ~ 140 nm の粒子が含まれていたが、細胞の分泌物に由来するものではなかったことである。

逆に、C D M 4 では B G サンプルに検出可能な粒子はなかった（図 2 B）。各 E V と B G の粒子濃度を比較すると、C D M 1 および 2 群では有意差は検出されなかった（図 2 C）。C D M 3 - E V は、C D M 3 - B G 群よりも有意に粒子数が少なかった（ $p < 0.05$ ）。逆に、C D M 4 - E V は C D M 4 - B G 群よりも有意に粒子が多く、後者の群では E V 以外の粒子は検出されなかった（ $p < 0.05$ ）。

E V サンプルの潜在的な汚染の指標として、タンパク質濃度を評価した（

図2D)。CDM1、2、4群では、BG群と比較してEVで有意に高い値を示したが($p < 0.01$)、CDM3群では有意差は認められなかった($p = 1.0$)。注目すべきは、CDM4-BG群については検出可能なタンパク質濃度がなかったことであり、これも上述した、非EV粒子の検出不能と一致する。各サンプル中のタンパク質含有量を確認するために、ゲル染色を行った(図2E)。

CDM1、2、3群のBGとEVの主要バンドは60-70 kDaで検出され、参照アルブミン(66 kDaで検出)と同様の分子量であった。このことから、これらのサンプルに含まれる主要なタンパク質は、購入前に培地に添加されたと推定されるアルブミンである可能性が示唆された。一方、図2Dに示したように、CDM4-BGのレーンではタンパク質バンドが検出されなかった(図2E)。CDM1、2、3群の他のEVsサンプルとは異なり、CDM4由来のEVsでは幅広い種類のタンパク質バンドが検出され、様々なタンパク質の存在が示唆された。これらのバンドパターンは、3種類のドナーの細胞でも同様に検出された(図8参照)。また、EVサンプルの純度は、粒子濃度をタンパク質濃度で割ることで算出した。CDM4-EVの純度は、CDM1、2、3-EVs群の純度と比較して最も高かった(図2F)。

[0067] (各細胞培養培地由来EVにおけるTEM画像、エクソソームマーカー、ナノプラズモニックアッセイの比較)

TEMでは、すべてのEV群で直径約50-100 nmの膜構造を持つ粒子をとらえたが、特にCDM1、2、3-EVs群では棒状の不純物が多数検出された(図3A)。各EV群におけるエクソソームの存在を評価するため、古典的なエクソソームマーカー蛋白の発現を調べた。CD9、CD63およびCD81の発現は、ウェスタンブロッティングによりCDM4-EVでのみ検出され、そのタンパク質含有量を基準に比較すると、ASC溶解液の場合よりも5倍濃縮されていた(図3B)。

一方、CDM1、2、3-EV群はCDM4-EV群より高いアルブミン

量を含んでいた。サンプル量で比較すると、ELISA法でCD9とCD63陽性物質（EVと同じ）が全群で検出された（図3C）。CDM4-EVの平均値が最も高かったが、有意差は検出されなかった（ $p=0.06$ ）。しかし、これらの値をタンパク質あたりの値に換算すると、CDM4-EVのCD9およびCD63陽性EVは、他のCDM-EVの約17～570倍であり、有意差が検出された（ $p<0.01$ ）（図3D）。また、CDM4-EVは、数を1粒子あたりの値に換算すると、他のCDMよりも4～16倍高かった（ $p<0.05$ ）（図3E）。

また、金ナノプラズモニクス、タンパク質と脂質膜の相互作用を評価することにより、各EVサンプルの純度を決定するためにナノプラズモニックアッセイを実施した（図3F-H）。簡単に説明すると、PBS中のEVを試薬に添加すると溶液の色が赤から青に変わるが、単一で凝集した外来タンパク質を多数添加すると溶液は最初の赤色を維持する。目視では、CDM1および2-EVは、アルブミン対照と同様の色を示した。一方、CDM4-EVsを添加した液は赤色から変化し、これもPBSコントロールの反応と異なった。

CDM3-EVで得られた色は中間色であり、CDM1、2-EVやCDM4-EVの色とは異なっていた（図3F）。スペクトル解析でも同様のパターンが観察された（図3G）。CDM4-EVの値は、アルブミン対照および試験した他のグループの値より有意に低かった（ $p<0.01$ ）。CDM-EV1-3サンプルの値は、540nmと650nmの値の波長の比として示される凝集指数（AI）について、PBSコントロールよりも有意に高かった（ $p<0.01$ ）（図3H）。まとめると、CDM4-EVサンプルは、EVとしての脂質膜を有する粒子と外来タンパク質との関係に関して評価したすべてのサンプルの中で最も純粋なサンプルであると考えられる。

[0068]（EVとBGの*in vitro*における機能的側面の評価）

ヒト関節軟骨細胞（hAC）に対するEVの影響を評価するため、EV、BGまたはビヒクル対照（PBS）の各サンプルを、EV群については5×

10⁹粒子/mLの濃度で、BGまたは対照群についてはそれぞれ等量で添加した。ヒトACの増殖は、3日目のコントロール（PBS）値と比較して、培地由来のEV添加後に有意に増強された（CDM2-EVsを除く $p < 0.01$: $p < 0.05$ ）（図4A）。

CDM4-BGを除く各未培養CDM由来BG添加後にも、PBS対照群と比較して有意な増殖効果が認められた（ $p < 0.01$ 、CDM3-BGを除く : $p < 0.05$ ）。CDM4系列添加の場合のみ、CS-BGと比較して有意差が認められ、EV添加による増殖効果が促進された（ $p < 0.01$ ）。7日目では、CDM4系列でのみ、EVsはhACsの増殖能の促進を維持し、BGおよびPBS対照群の両方と比較して有意差が認められた（ $p < 0.01$ ）。

検出されたBG群とPBS対照群との間に有意差はなかった（ $p = 1.0$ ）。hACの移動能力も、対応するBG群またはPBS対照群と比較して、すべてのCDM由来のEV群の添加により有意に増強された（ $p < 0.01$ ）（図4B、C）。CDM1、2、3由来のBG群もPBS対照群と比較して有意な変化を生じたが（ $p < 0.01$ ）、CDM4-BG群のみPBS対照群と比較して有意差は認められなかった（ $p = 0.98$ ）。

hACsによるECMの合成と抗アポトーシス活性についても同様の傾向が見られた（図4D-F）。hACによるCOL1A1およびCOL2A1の遺伝子発現量は、対応するBGおよびPBS対照群と比較してCDM4-EV試料で有意に増強された（ $p < 0.01$ 、ただしCOL1A1はCDM4-BG vs. CDM4-EVs : $p < 0.05$ ）（図4D）。

CDM4-BG群もPBS対照群と比較して有意差はなかった（COL1A1は $p = 0.68$ 、COL2A1が 0.93 ）。CDM1シリーズでは、BG群はEV群と比較してECM合成が有意に促進された（ $p < 0.01$ ）。CDM4-EV群では、BG群およびPBS群と比較して、hACに誘導される初期アポトーシスが有意に抑制され（ $p < 0.01$ ）、CDM4-BG群とPBS対照群の間には有意差は認められなかった（ $p = 1.0$ ）（図

4 E, 図 4 F)。CDM 1、2 および 3 群については、BG および EV の両方が PBS 対照と比較して有意にアポトーシスを抑制した ($p < 0.01$)。

[0069] 本発明において、分離した ASC-EV の純度および治療効果に培地由来物質が及ぼす影響を明らかにした。粒子やタンパク質を含まない培地の使用は、培地成分の影響を受けない高純度な EV の抽出と治療効果の評価の両面において、EV の臨床応用を考える上で非常に有用であると考えられる。

[0070] (CDM 4-EV の CIA マウスに対する *in vivo* での影響の評価)

上述の結果から、CDM 4-EV s サンプルは、対応する BG および PBS コントロールと比較して、非 EV 成分による汚染が最も少なく、hAC に対して明確な生物学的効果を示した唯一のサンプルであると結論づけられた。そこで、CIA マウスモデルを用いて、CDM 4 由来の EV が *in vivo* で変形性関節症様の病態の発症に影響を与えるかどうかを試験した。これらの試験に関しては、対照群として対応する BG を投与した。BG サンプル投与後 28 日目のマクロ観察では、発赤を伴う軟骨下骨の露出を伴う脛骨関節表面の損傷が認められた (図 9 A)。対照的に、関節軟骨の厚さと白さは、EV 製剤で処置した動物で保たれていた (図 9 A)。巨視的な軟骨障害スコアでは、BG 対照群と治療群との間に有意差が検出された ($p < 0.05$) (図 9 B)。同様に、組織学的評価でも、BG 群では脛骨関節表面の軟骨にびらん性変化が認められ、サフラニン O 赤色染色の強度が低下していた。

[0071] 以上、本発明の実施形態および実施例について述べたが、これらは本発明の例示であり、上記以外の様々な構成を採用することもできる。

産業省の利用可能性

[0072] 本発明によれば、関節症治療（特に、変形性関節症）に用いられる新規な組成物に関する技術を提供することができる。従って、本発明は、医療分野において極めて有益である。

[0073] 本出願は、日本で出願された特願２０２３－０４７３５１（出願日：２０２３年３月２３日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

- [請求項1] 間葉系幹細胞の培養上清由来の細胞外小胞含有組成物を含む、関節症治療用医薬組成物であって、該間葉系幹細胞の培地は以下の条件：
- (1) 治療対象にとって異種の動物由来成分を含まない既知組成培地である；および
- (2) 使用前の状態において、粒子径が $1 \sim 1000 \text{ nm}$ である微粒子の個数が、 1×10^9 個/ mL 未満であることを満たすことを特徴とする、医薬組成物。
- [請求項2] 培地が、さらに次の条件：
- (3) 培地の使用前の状態において、培地に含まれる総タンパク質量が $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下である；
- (4) 界面活性剤を含有しない、又は、界面活性剤を臨界ミセル濃度未満で含有する；および
- (5) $\text{TNF-}\alpha$ および $\text{TRAIL}/\text{APO2L}$ を含むから選ばれる1以上の条件を満たす、請求項1記載の医薬組成物。
- [請求項3] 前記(5)における $\text{TNF-}\alpha$ および $\text{TRAIL}/\text{APO2L}$ の含有量が、培地の使用前の状態において、それぞれ、 $0.0001 \sim 2.0 \text{ mg}/\text{L}$ である、請求項2記載の医薬組成物。
- [請求項4] 細胞外小胞含有組成物中の単位重量当たりのタンパク質に対する微粒子数（単位： 10^9 個/ mg タンパク質）が $10 \sim 1,000$ である、請求項1～3のいずれか一項記載の医薬組成物。
- [請求項5] 培地が、GMPグレードである、請求項1～4のいずれか一項記載の医薬組成物。
- [請求項6] 細胞外小胞含有組成物が培養上清またはそれを精製処理したものである、請求項1～5のいずれか一項記載の医薬組成物。
- [請求項7] 関節症が、変形性関節症である、請求項1～6のいずれか一項記載の医薬組成物。
- [請求項8] 関節症が、膝関節症である、請求項1～7のいずれか一項記載の医

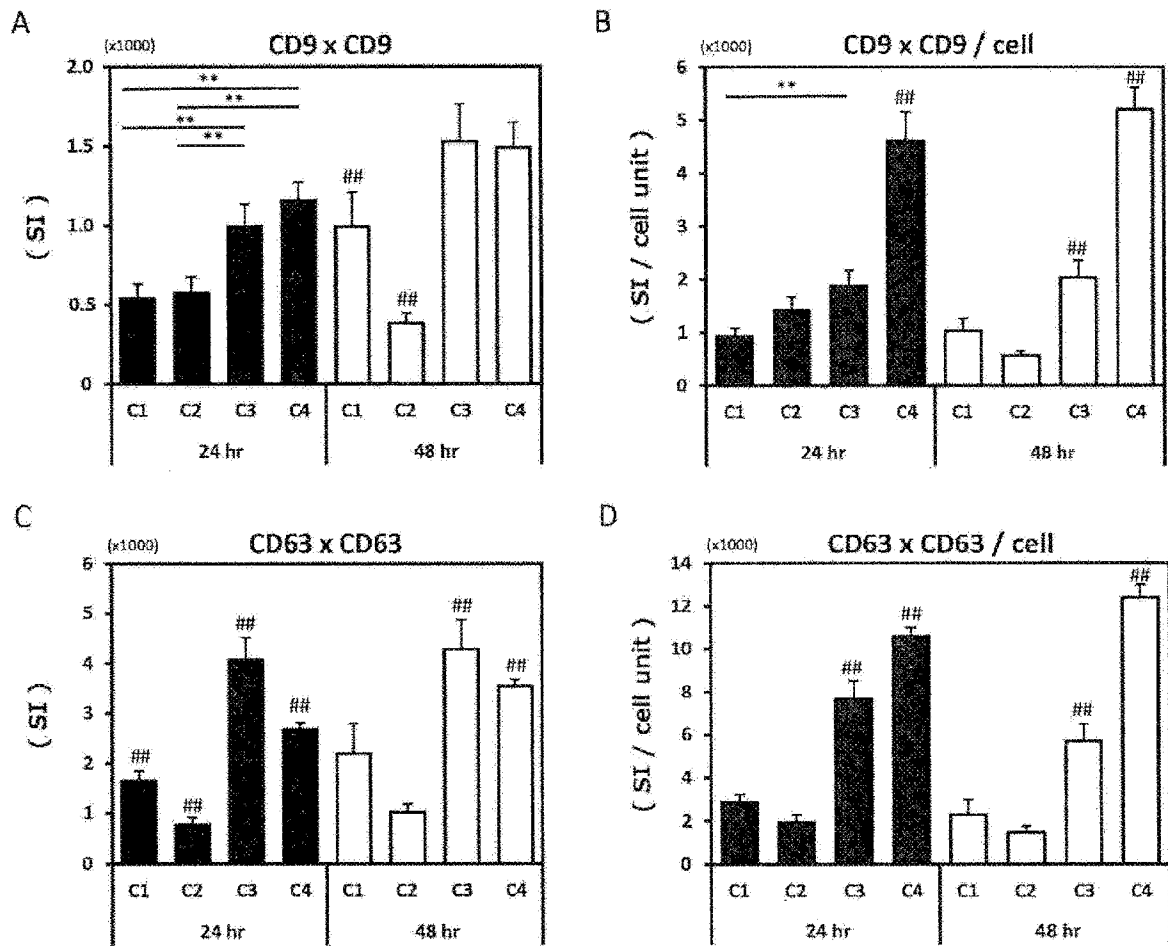
薬組成物。

- [請求項9] 以下の工程を含む、関節症治療用医薬組成物の製造方法：
(工程1) 以下の条件を満たす培地において間葉系幹細胞を培養する工程
(1) 治療対象にとって異種の動物由来成分を含まない既知組成培地である；および
(2) 使用前の状態において、粒子径が $1 \sim 1000 \text{ nm}$ である微粒子の個数が、 1×10^9 個/mL未満である
(工程2) 工程1で得られる培養物から細胞外小胞含有組成物を回収する工程。
- [請求項10] 培地が、さらに次の条件：
(3) 培地の使用前の状態において、培地に含まれる総タンパク質量が $100 \mu\text{g/mL}$ 以下である；
(4) 界面活性剤を含有しない、又は、界面活性剤を臨界ミセル濃度未満で含有する；および
(5) $\text{TNF-}\alpha$ および TRAIL/APO2L を含むから選ばれる1以上の条件を満たす、請求項9記載の製造方法。
- [請求項11] 前記(5)における $\text{TNF-}\alpha$ および TRAIL/APO2L の含有量が、培地の使用前の状態において、それぞれ、 $0.0001 \sim 2.0 \text{ mg/L}$ である、請求項10記載の製造方法。
- [請求項12] 細胞外小胞含有組成物中の単位重量当たりのタンパク質に対する微粒子数(単位： 10^9 個/mgタンパク質)が $10 \sim 1,000$ である、請求項9～11のいずれか一項記載の製造方法。
- [請求項13] 培地が、GMPグレードである、請求項9～12のいずれか一項記載の製造方法。
- [請求項14] 細胞外小胞含有組成物が培養上清またはそれを精製処理したものである、請求項9～13のいずれか一項記載の製造方法。
- [請求項15] 関節症が、変形性関節症である、請求項9～14のいずれか一項記

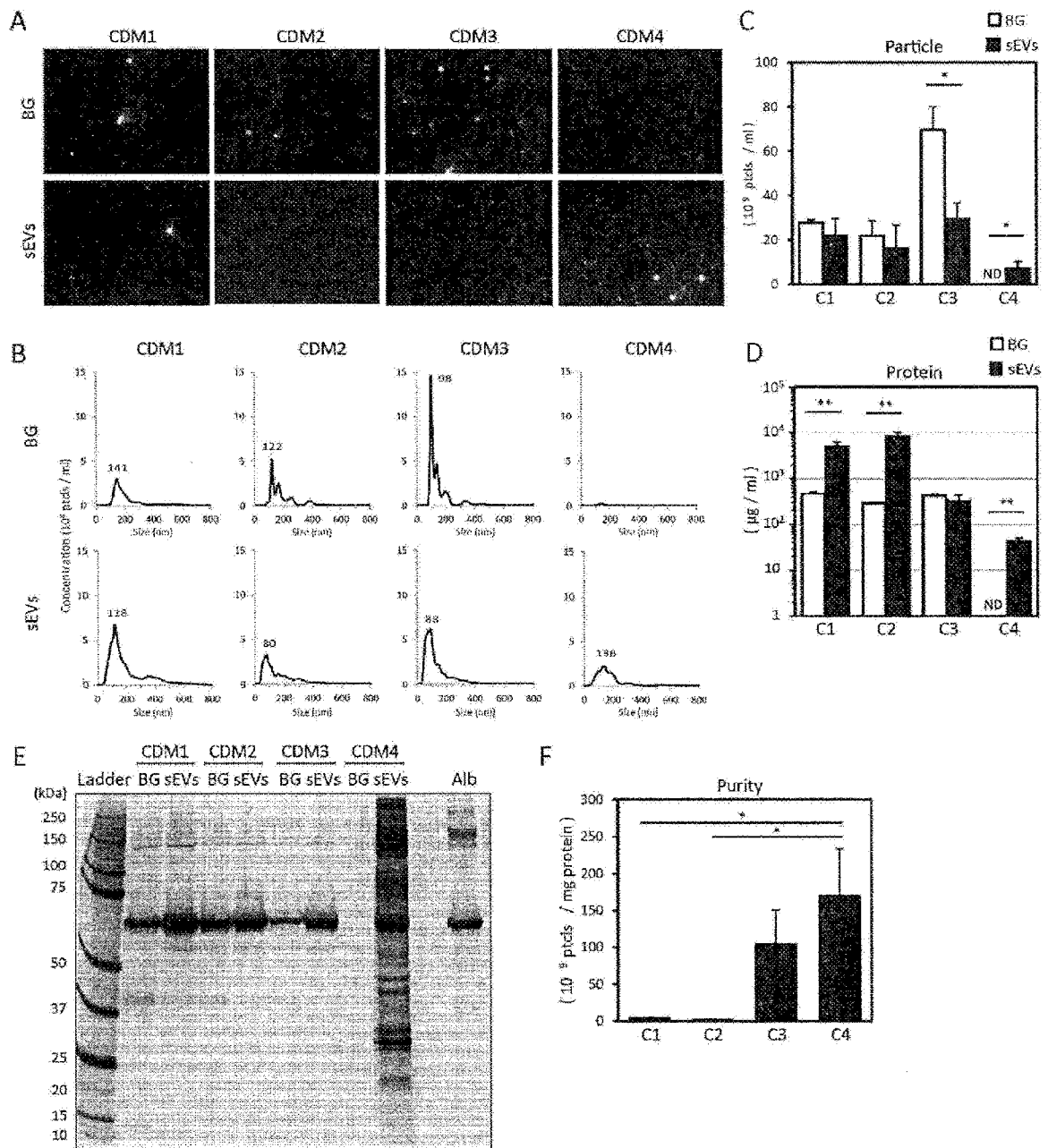
載の製造方法。

[請求項16] 関節症が、膝関節症である、請求項9～15のいずれか一項記載の製造方法。

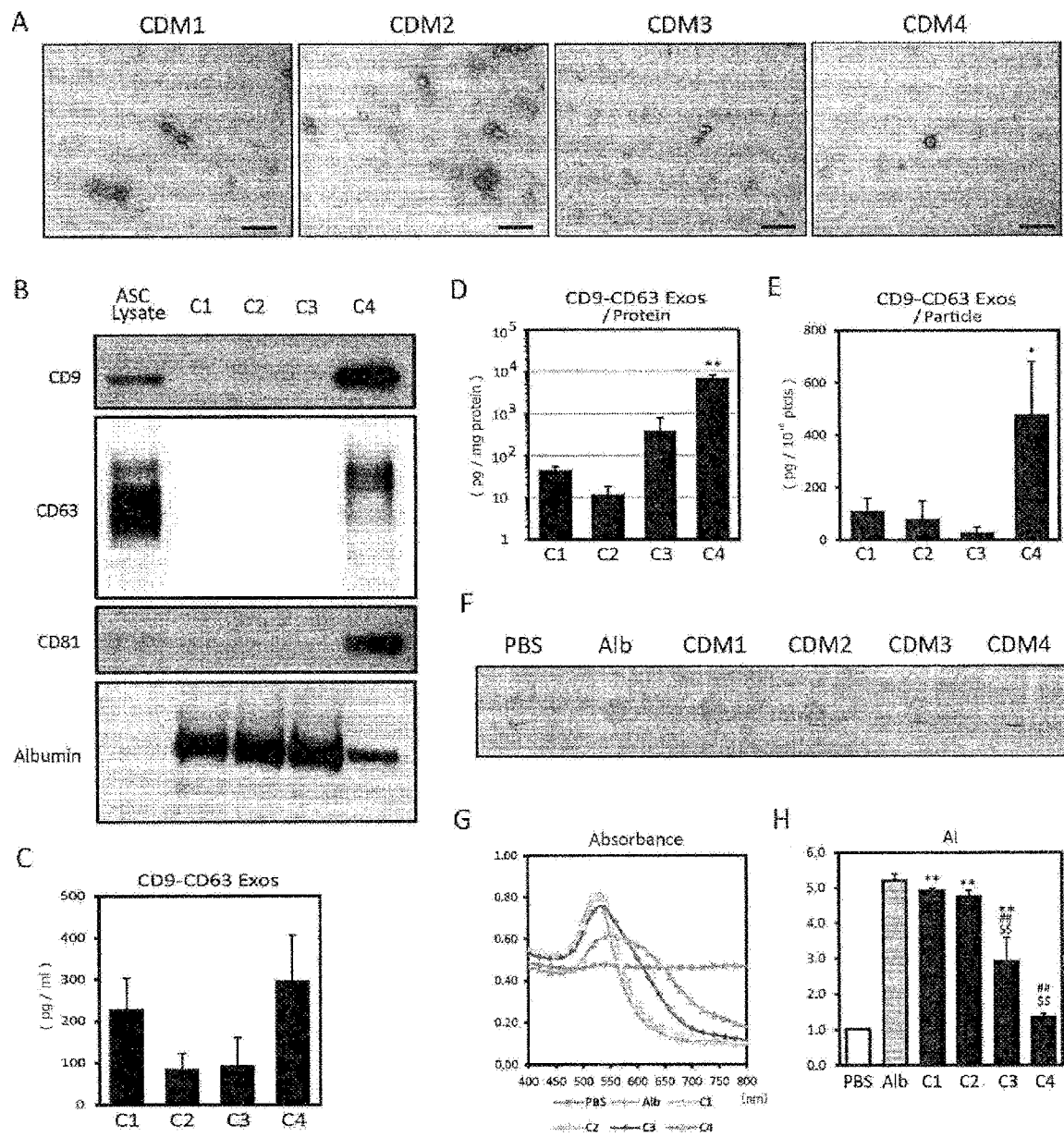
[図1]



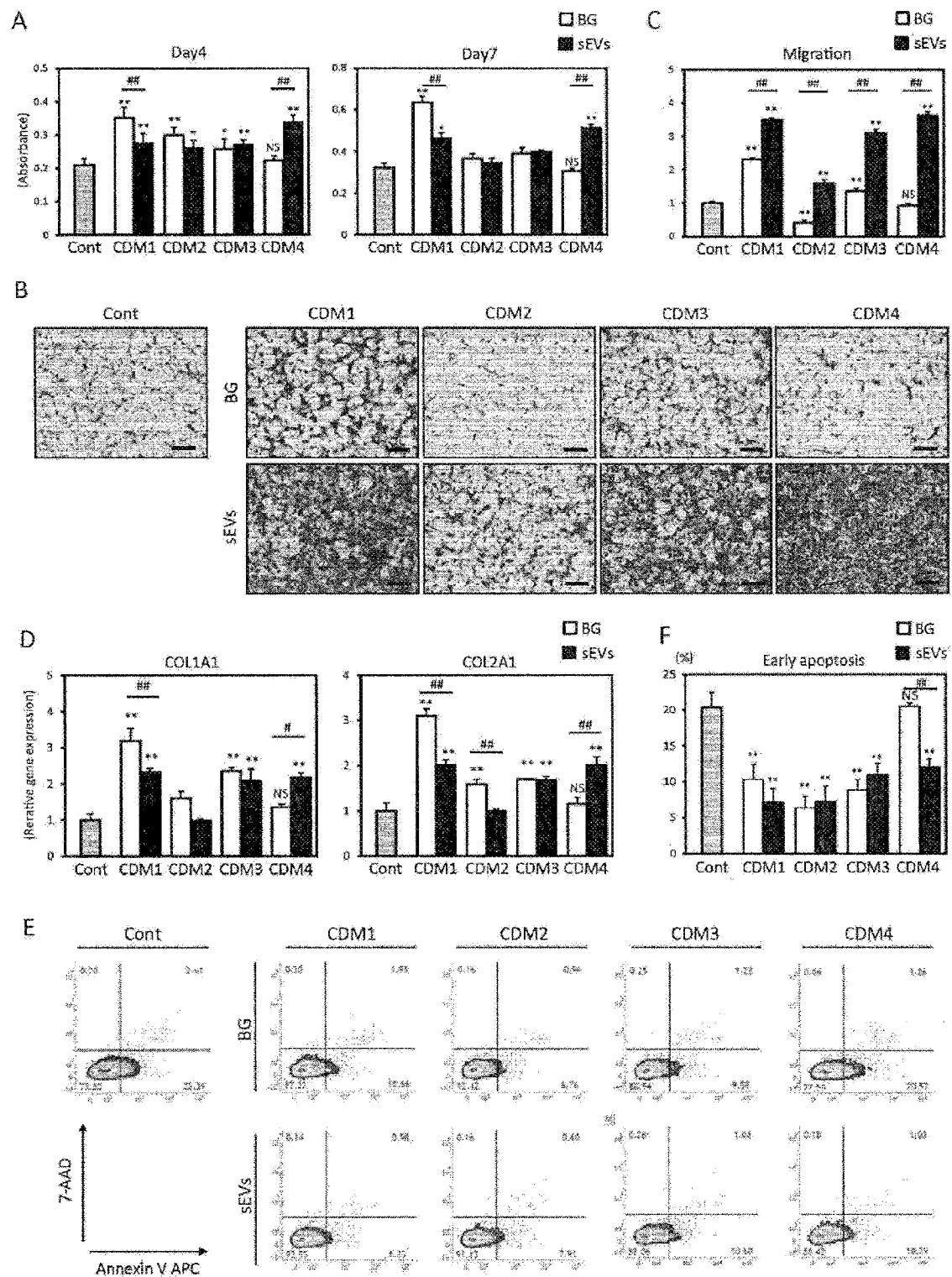
[図2]



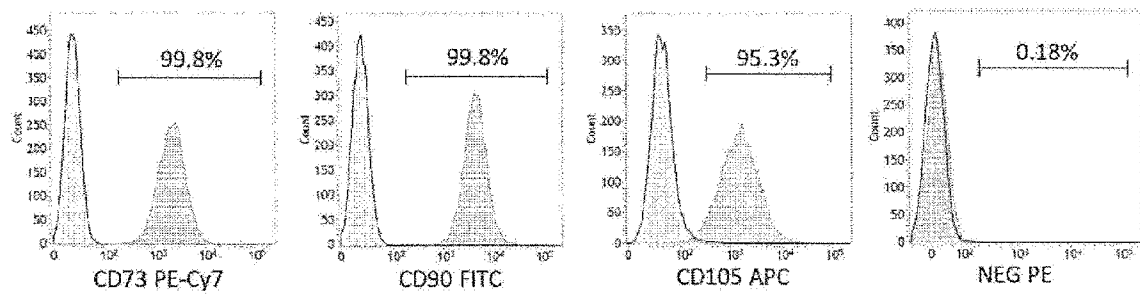
[図3]



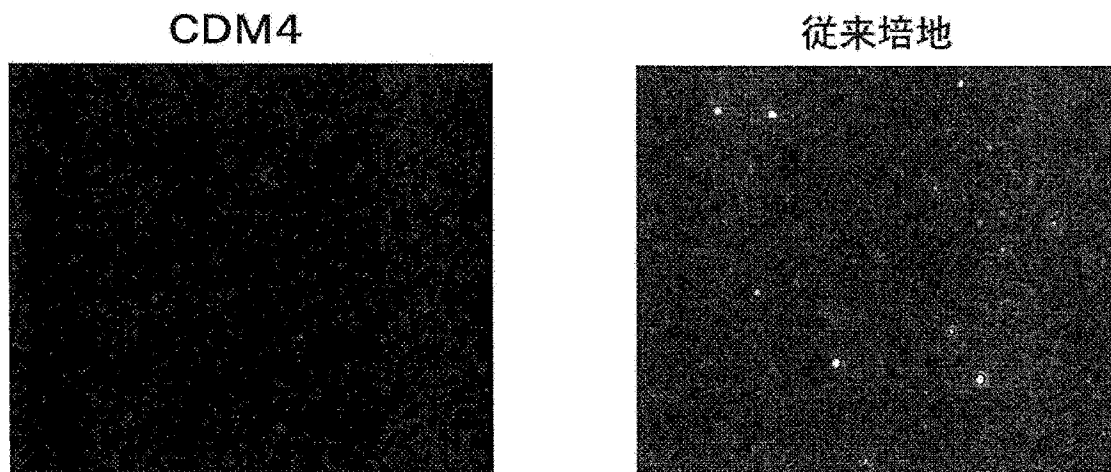
[圖4]



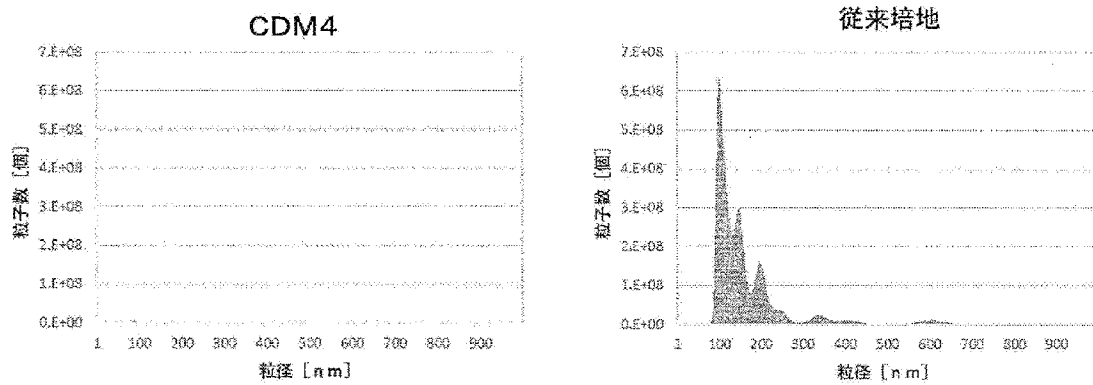
[図5]



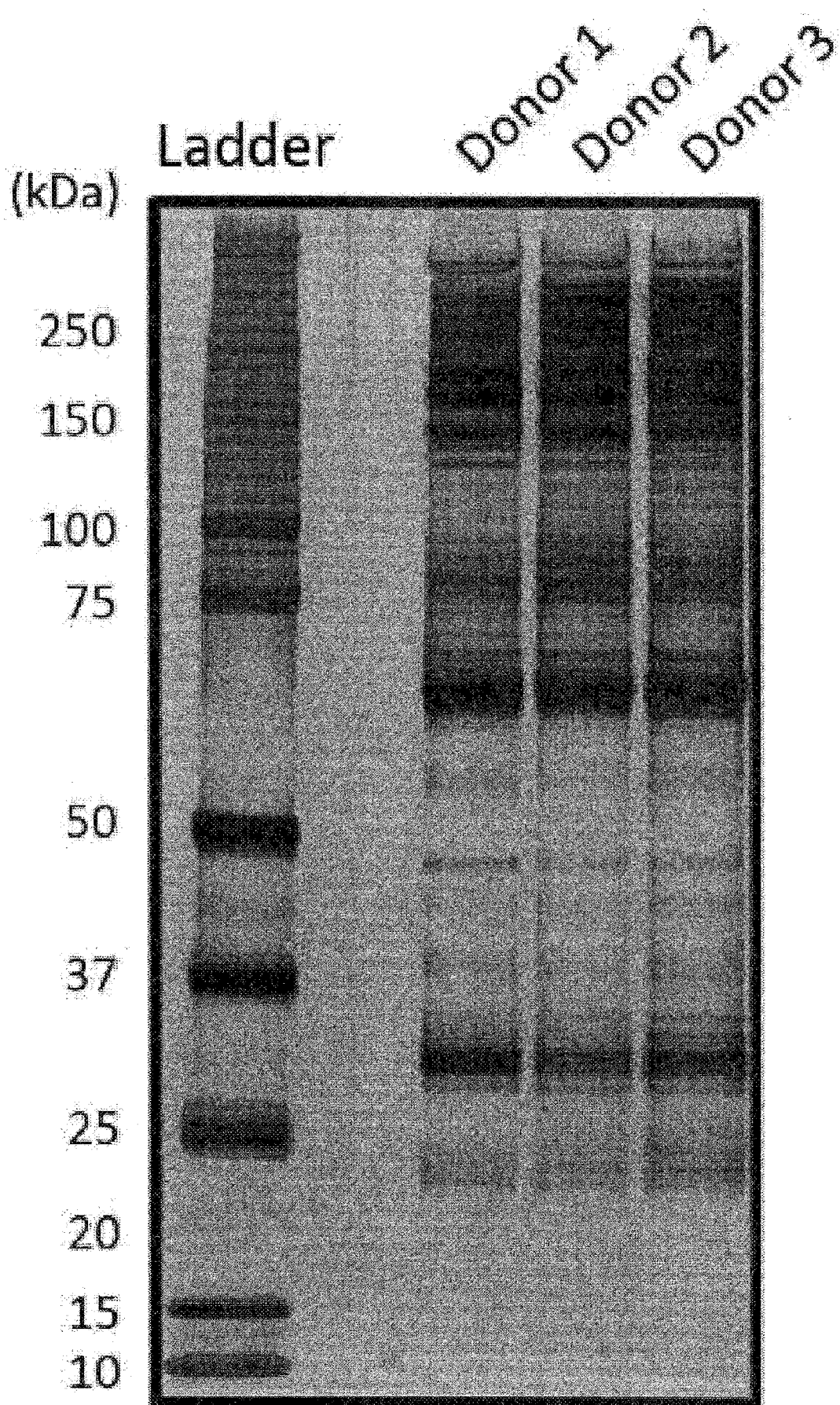
[図6]



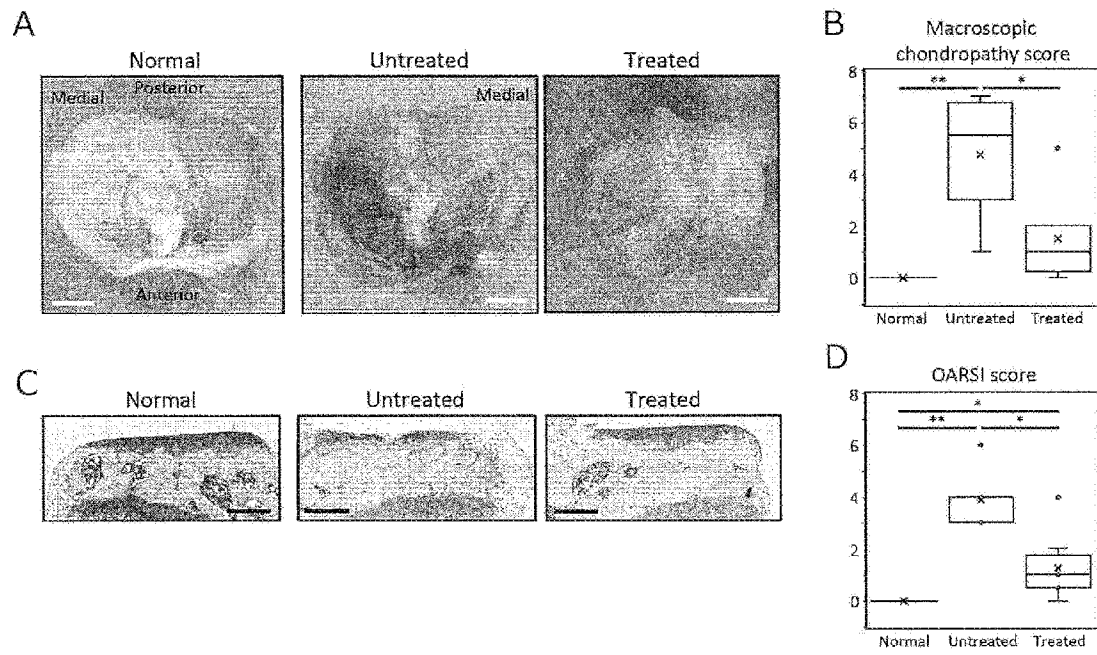
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/011521

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 35/28 (2015.01)i; A61P 19/02 (2006.01)i; C12N 5/0775 (2010.01)n FI: A61K35/28; A61P19/02; 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) A61K35/28; A61P19/02; 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); Cplus/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	JP 2020-152698 A (BUDDHIST TCBC MEDICAL FOUND) 24 September 2020 (2020-09-24)	1-8
Y	claims, paragraphs [0011]-[0013], [0025], example 4	9-10, 12-16
Y	"ヒト間葉系幹細胞用無血清培地 MSH、エクソソーム産生用培地 MSH-EV 発売のお知らせ", [online], 島津ダイアグノスティクス株式会社, 19 October 2022, [retrieved on 03 June 2024], Internet:<URL: https://cell-culture.biz.sdc.shimadzu.co.jp/news/p1097/ >, (SHIMADZU DIAGNOSTICS CORPORATION), non-official translation (Serum-free media MSH for human mesenchymal stem cell. Announcement of release of exosome production medium MSH-EV.) p. 1	9-10, 12-16
A	KR 10-2019-0066885 A (DESIGNED CELLS CO., LTD.) 14 June 2019 (2019-06-14) claims, paragraphs [0006]-[0010], [0027], examples	1-16
☒ 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 03 June 2024		Date of mailing of the international search report 11 June 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.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	HANAI, Hiroto et al. Small extracellular vesicles derived from human adipose-derived mesenchymal stromal cells cultured in a new chemically-defined contaminate-free media exhibit enhanced biological and therapeutic effects on human chondrocytes in vitro and in a mouse osteoarthritis model. Journal of Extracellular Vesicles. July 2023, 12, e12337 column "Abstract", p. 13, 4th paragraph, etc.	4, 12
P, Y	JP 7371975 B1 (CELLSOURCE CO., LTD.) 31 October 2023 (2023-10-31)	4, 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/011521

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/JP2024/011521

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2020-152698	A	24 September 2020	US 2020/0297761 A1 claims, paragraphs [0011]- [0013], [0025], example 4 TW 202034932 A	
KR	10-2019-0066885	A	14 June 2019	WO 2019/112177 A1 CN 112601533 A	
JP	7371975	B1	31 October 2023	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

A61K 35/28(2015.01)i; A61P 19/02(2006.01)i; C12N 5/0775(2010.01)n
FI: A61K35/28; A61P19/02; 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））
A61K35/28; A61P19/02; 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	JP 2020-152698 A (佛教慈濟醫療財團法人) 24.09.2020 (2020 - 09 - 24) 特許請求の範囲、段落0011-0013, 0025、実施例4	1-8
Y		9-10, 12-16
Y	”ヒト間葉系幹細胞用無血清培地 MSH、エクソソーム産生用培地 MSH-EV 発売 のお知らせ”, [online], 島津ダイアグノスティクス株式会社, 2022.10.19, [検 索日 2024.06.03], インターネット: <URL: https://cell-culture.biz.sdc. shimadzu.co.jp/news/pl097/ > 第1頁	9-10,12-16
A	KR 10-2019-0066885 A (DESIGNED CELLS CO LTD) 14.06.2019 (2019 - 06 - 14) 請求の範囲、[0006]-[0010]、[0027]、実施例	1-16

☒ 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

03.06.2024

国際調査報告の発送日

11.06.2024

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）

堂畑 厚志 4U 7880

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

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
P, Y	HANAI, Hiroto et al., Small extracellular vesicles derived from human adipose-derived mesenchymal stromal cells cultured in a new chemically-defined contaminate-free media exhibit enhanced biological and therapeutic effects on human chondrocytes in vitro and in a mouse osteoarthritis model, Journal of Extracellular Vesicles, 2023.07, 12, e12337 Abstract欄、第13頁第4段落等	4, 12
P, Y	JP 7371975 B1 (セルソース株式会社) 31.10.2023 (2023 - 10 - 31)	4, 12

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/JP2024/011521

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2020-152698 A	24.09.2020	US 2020/0297761 A1 Claims, [0011]-[0013], [0025], Example 4 TW 202034932 A	
KR 10-2019-0066885 A	14.06.2019	WO 2019/112177 A1 CN 112601533 A	
JP 7371975 B1	31.10.2023	(ファミリーなし)	