(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
2021年10月7日(07.10.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/200299 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 35/28 (2015.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/011546

(22) 国際出願日： 2021年3月19日(19.03.2021)

(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 2020-065052 2020年3月31日(31.03.2020) JP

(71) 出願人: 富士フイルム和光純薬株式会社 (**FUJIFILM WAKO PURE CHEMICAL CORPORATION**) [JP/JP]; 〒5408605 大阪府大阪市中央区道修町三丁目１番２号 Osaka (JP).

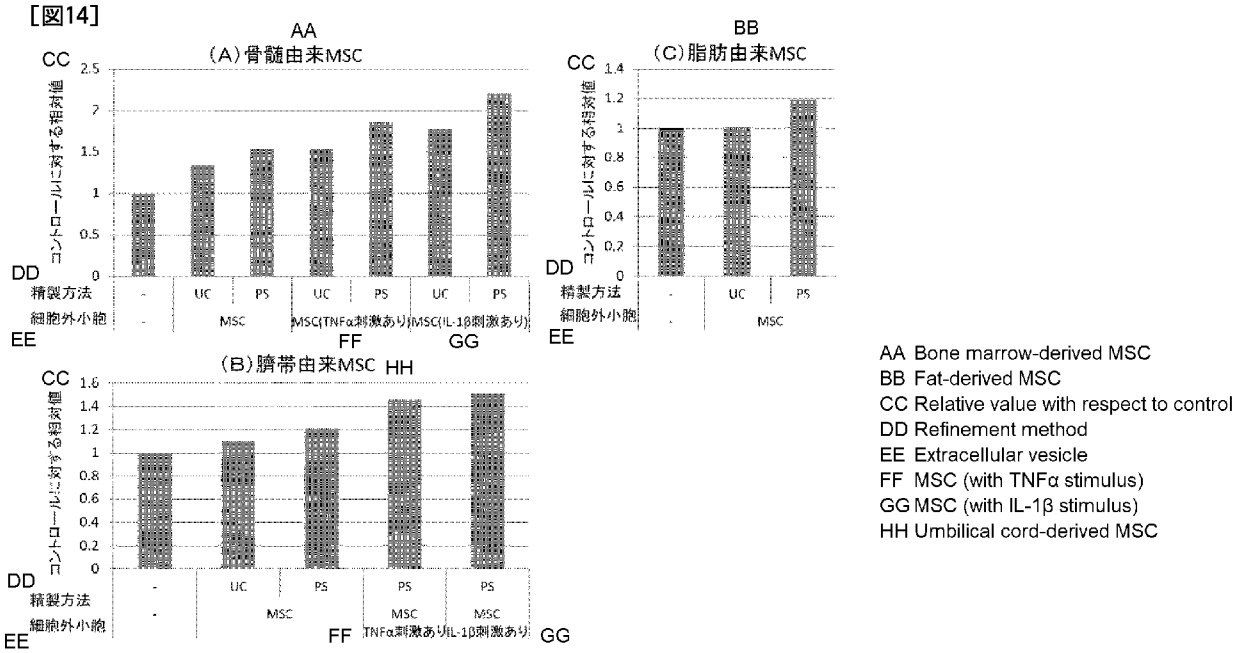
(72) 発明者: 石止 貴将 (**ISHIDOME Takamasa**); 〒6610963 兵庫県尼崎市高田町６番１号 Hyogo (JP). 山根 昌之 (**YAMANE Masayuki**); 〒6610963 兵庫県尼崎市高田町６番１号 Hyogo (JP).

(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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,

(54) **Title:** CELLULAR AGING INHIBITOR, BIOLOGICAL TISSUE REPAIR PROMOTER, GENE EXPRESSION REGULATOR, AND MANUFACTURING METHOD

(54) 発明の名称： 細胞老化抑制剤、生体組織修復促進剤、遺伝子発現調節剤及び製造方法

[図14]



AA Bone marrow-derived MSC
BB Fat-derived MSC
CC Relative value with respect to control
DD Refinement method
EE Extracellular vesicle
FF MSC (with TNFα stimulus)
GG MSC (with IL-1β stimulus)
HH Umbilical cord-derived MSC

(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing a cellular aging inhibitor, a biological tissue repair promoter, a gene expression regulator, and a topical skin composition constituted from a population of extracellular vesicles having high cell aging inhibitory activity and/or biological tissue repair promoting activity. The present invention pertains to a cellular aging inhibitor, a biological tissue repair promoter, a gene expression regulator, and a topical skin composition having, as an active ingredient, extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells, wherein the extracellular vesicles are derived from mesenchymal stem cells stimulated by inflammatory cytokines, and/or the extra-

WO 2021/200299 A1

[続葉有]

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, 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))

— 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))

cellular vesicles are obtained by a method utilizing a substance having an affinity for phosphatidylserine.

(57) 要約:本発明の課題は、細胞老化抑制活性や生体組織修復促進活性が高い細胞外小胞の集団により構成された細胞老化抑制剤、生体組織修復促進剤、遺伝子発現調節剤、及び皮膚外用組成物を提供することである。本発明は、間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞を有効成分とする、細胞老化抑制剤、生体組織修復促進剤、遺伝子発現調節剤、及び皮膚外用組成物であって、細胞外小胞が炎症性サイトカイン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、又は/及び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に関する。

明　細　書

発明の名称 ：

細胞老化抑制剤、生体組織修復促進剤、遺伝子発現調節剤及び製造方法

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細胞老化抑制剤、生体組織修復促進剤、遺伝子発現調節剤に関する。

背景技術

[0002] 細胞老化とは、細胞が分裂を停止する、細胞外基質の産生が低下する、あるいは周辺組織を傷害する因子が放出される現象である。生体組織は、個々の細胞が増殖し、細胞外基質を産生することにより維持されているため、細胞老化は組織の劣化に大きな影響を与える。例えば、細胞分裂によるＤＮＡ複製エラーの蓄積、酸化ストレス、放射線、がん遺伝子の活性化等によりＤＮＡに損傷が生じると、ＤＮＡ損傷応答により、ｐ５３遺伝子、ｐ２１遺伝子、ｐ１６遺伝子等の細胞増殖抑制遺伝子の発現が亢進し、細胞老化が引き起こされると考えられている。また、例えば、表皮細胞や繊維芽細胞、コラーゲン、ヒアルロン酸、エラスチン等の細胞外マトリックス等から構成されている皮膚は、紫外線や乾燥、ストレス、加齢等により特に細胞外マトリックス、繊維芽細胞の機能が低下し、しわやたるみ、しみ等の症状が生じると考えられている。

[0003] 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）。

[0004] 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。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、接着性がある、

ＣＤ１０５、ＣＤ７３、およびＣＤ９０が陽性、ＣＤ４５、ＣＤ３４、ＣＤ１４、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ７９ａ、ＣＤ１９、およびＨＬＡ－Ｃｌａｓｓ　ＩＩ（ＤＲ）が陰性、骨、脂肪、および軟骨への分化能を有するという共通点を持つと一般的に考えられている。

[0005] 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、超遠心法により取得された間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞が細胞増殖を促進すること（非特許文献２）、真皮の修復（非特許文献３）や靭帯の修復（非特許文献４）を促進することが報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開ＷＯ２０１６／０８８６８９

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Ｍａｔｈｉｅｕ　Ｍ，Ｍａｒｔｉｎ－Ｊａｕｌａｒ　Ｌ，Ｌａｖｉｅｕ　Ｇ，Ｔｈｅｒｙ　Ｃ（２０１９）Ｎａｔ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ，２１（１）：９－１７

非特許文献2：Ａｒｓａｌａｎ　Ｓ　ｅｔ　ａｌ．ＳＴＥＭ　ＣＥＬＬＳ　ＡＮＤ　ＤＥＶＥＬＯＰＭＥＮＴ　Ｖｏｌｕｍｅ　２４，Ｎｕｍｂｅｒ　１４，２０１５

非特許文献3：Ｂｏｃｈｅｎｇ　Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．　Ｃｅｌｌ　Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ　Ｖｏｌｕｍｅ　２９：1-14

非特許文献4：Ｃｏｎｎｉｅ　Ｓ．Ｃｈａｍｂｅｒｌａｉｎ　ａｌ．Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ．２０２１；３９：５５-６１．

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、超遠心法により取得された間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞の細胞老化抑制活性や生体組織修復促進活性について本発明者が検証したところ、これらの活性が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、より細胞老化抑制活性や生体組織修復促進活性が高い細胞外小胞の集団により構成された細胞老化抑制剤、生体組織修復促進剤、遺伝子発現調節剤、皮膚外用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

[0009] 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、炎症性サイトカイン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又は／及び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が、細胞老化抑制剤として高い細胞老化抑制活性を有すること、遺伝子発現調節剤として高い遺伝子発現調節活性を有すること、生体組織修復促進剤として高い生体組織修活性を有することを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0010] 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、細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤であって、

細胞外小胞が炎症性サイトカイン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、又は／及び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、細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤；

（２）前記間葉系幹細胞が、ｉＰＳ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、歯髄、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）に記載の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤；

（３）前記間葉系幹細胞が、腫瘍壊死因子α、インターロイキン１、インターロイキン６、インターロイキン８、インターロイキン１２、インターロイキン１８及びインターフェロンγから選ばれる少なくとも１種の炎症性サイトカインにより刺激を加えたものである、上記（１）又は（２）に記載の細

胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤；

（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）のいずれか１つに記載の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤；

（５）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が、Ｔｉｍタンパク質である、上記（４）に記載の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤；

（６）前記Ｔｉｍタンパク質が、Ｔｉｍ４タンパク質、Ｔｉｍ３タンパク質及びＴｉｍ１タンパク質から選択されるものである、上記（５）に記載の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤；

（７）前記細胞外小胞が、炎症性サイトカイン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）に記載の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤；

（８）前記細胞老化抑制又は生体組織修復促進が、細胞増殖促進作用、コラーゲンの産生促進若しくは分解抑制作用、ヒアルロン酸の産生促進若しくは分解抑制作用、及びエラスチンの産生促進若しくは分解抑制作用から選ばれる少なくとも１種の作用によるものである、上記（１）～（７）のいずれか１つに記載の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤；

である。

[0011] また本発明は、かかる細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤としての細胞外小胞の製造法でもあり、具体的には、

（９）炎症性サイトカイン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、又は／及び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、細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用を有する細胞外小胞の製造方法；

（１０）前記間葉系幹細胞が、ｉＰＳ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、歯髄、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（９）に記載の細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用を有する細胞外小胞の製造方法；

（１１）前記間葉系幹細胞が、腫瘍壊死因子α、インターロイキン１、インターロイキン６、インターロイキン８、インターロイキン１２、インターロイキン１８及びインターフェロンγから選ばれる少なくとも１種の炎症性サイトカインにより刺激を加えたものである、上記（９）又は（１０）に記載の細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用を有する細胞外小胞の製造方法；

（１２）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（９）～（１１）のいずれか１つに記載の細胞老化抑制作用又は生体組織修作用を有する細胞外小胞の製造方法；

（１３）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が、Ｔｉｍタンパク質である、上記（９）～（１２）のいずれか１つに記載の細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用を有する細胞外小胞の製造方法；

（１４）前記Ｔｉｍタンパク質が、Ｔｉｍ４タンパク質、Ｔｉｍ３タンパク質及びＴｉｍ１タンパク質から選択されるものである、上記（１３）に記載の細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用を有する細胞外小胞の製造方法；

（１５）前記細胞外小胞が、炎症性サイトカイン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（９）又は（１０）に記載の細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用を有する細胞外小胞の製造方法；

（１６）前記細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用が、コラーゲンの産生促進若しくは分解抑制作用、ヒアルロン酸の産生促進若しくは分解抑制作用、及びエラスチンの産生促進若しくは分解抑制作用から選ばれる少なく

とも１種の作用によるものである、上記（９）～（１５）のいずれか１つに記載の細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用を有する細胞外小胞の製造方法；

である。

[0012] また本発明は、遺伝子発現調節剤でもあり、具体的には、

（１７）間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞を有効成分とする、遺伝子発現調節剤であって、細胞外小胞が、炎症性サイトカイン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、又は／及び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り、且つ

遺伝子が、細胞増殖抑制遺伝子、コラーゲン遺伝子、コラーゲン分解酵素遺伝子、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子、ヒアルロン酸分解酵素遺伝子、エラスチン遺伝子、及びエラスチン分解酵素遺伝子から選ばれる少なくとも１種の遺伝子である、遺伝子発現調節剤；

である。

[0013] また本発明は、かかる遺伝子発現調節剤としての細胞外小胞の製造法でもあり、具体的には、

（１８）炎症性サイトカイン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、又は／及び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、遺伝子発現調節作用を有する細胞外小胞の製造方法；

（１９）前記間葉系幹細胞が、ｉＰＳ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、歯髄、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（１８）に記載の遺伝子発現調節作用を有する細胞外小胞の製造方法；

（２０）前記間葉系幹細胞が、腫瘍壊死因子α、インターロイキン１、インターロイキン６、インターロイキン８、インターロイキン１２、インターロイキン１８及びインターフェロンγから選ばれる少なくとも１種の炎症性サ

イトカインにより刺激を加えたものである、上記（１８）又は（１９）に記載の遺伝子発現調節作用を有する細胞外小胞の製造方法；

（２１）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（１８）～（２０）のいずれか１つに記載の遺伝子発現調節作用を有する細胞外小胞の製造方法；

（２２）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が、Ｔｉｍタンパク質である、上記（２１）に記載の遺伝子発現調節作用を有する細胞外小胞の製造方法；

（２３）前記Ｔｉｍタンパク質が、Ｔｉｍ４タンパク質、Ｔｉｍ３タンパク質及びＴｉｍ１タンパク質から選択されるものである、上記（２２）に記載の遺伝子発現調節作用を有する細胞外小胞の製造方法；

（２４）前記細胞外小胞が、炎症性サイトカイン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（１８）～（２０）のいずれか１つに記載の遺伝子発現調節作用を有する細胞外小胞の製造方法；

（２５）前記遺伝子が、細胞増殖抑制遺伝子、コラーゲン遺伝子、コラーゲン分解酵素遺伝子、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子、ヒアルロン酸分解酵素遺伝子、エラスチン遺伝子、及びエラスチン分解酵素遺伝子から選ばれる少なくとも１種の遺伝子である、上記（１８）～（２４）のいずれか１つに記載の遺伝子発現調節作用を有する細胞外小胞の製造方法；

である。

[0014] また本発明は、細胞老化抑制用又は生体組織修復促進用皮膚外用組成物でもあり、具体的には、

（２６）上記（１）～（８）のいずれか１つに記載の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤を含有する細胞老化抑制用又は生体組織修復促進用皮膚外用組成物；

である。

[0015] また本発明は、細胞老化抑制用又は生体組織修復促進用皮膚外用組成物の製造法でもあり、具体的には、

（２７）炎症性サイトカイン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、又は／及び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、細胞老化抑制用又は生体組織修復促進用皮膚外用組成物の製造方法；

（２８）前記間葉系幹細胞が、ｉＰＳ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、歯髄、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（２７）に記載の細胞老化抑制用又は生体組織修復促進用皮膚外用組成物の製造方法；

（２９）前記間葉系幹細胞が、腫瘍壊死因子α、インターロイキン１、インターロイキン６、インターロイキン８、インターロイキン１２、インターロイキン１８及びインターフェロンγから選ばれる少なくとも１種の炎症性サイトカインにより刺激を加えたものである、上記（２７）又は（２８）に記載の細胞老化抑制用又は生体組織修復促進用皮膚外用組成物の製造方法；

（３０）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（２７）～（２９）のいずれか１つに記載の細胞老化抑制用又は生体組織修復促進用皮膚外用組成物の製造方法；

（３１）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が、Ｔｉｍタンパク質である、上記（２７）～（３０）のいずれか１つに記載の細胞老化抑制用又は生体組織修復促進用皮膚外用組成物の製造方法；

（３２）前記Ｔｉｍタンパク質が、Ｔｉｍ４タンパク質、Ｔｉｍ３タンパク質及びＴｉｍ１タンパク質から選択されるものである、上記（３１）に記載の細胞老化抑制用又は生体組織修復促進用皮膚外用組成物の製造方法；

（３３）前記細胞外小胞が、炎症性サイトカイン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（２７）～（２９）のいずれか１つに記載の細胞老化抑制用又は生体組織修復促進用皮膚外用組成物の製造方法；

（３４）前記細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用が、コラーゲンの産生促進若しくは分解抑制作用、ヒアルロン酸の産生促進若しくは分解抑制作用、及びエラスチンの産生促進若しくは分解抑制作用から選ばれる少なくとも１種の作用によるものである、上記（２７）～（３３）のいずれか１つに記載の細胞老化抑制用又は生体組織修復促進用皮膚外用組成物の製造方法；

である。

発明の効果

[0016] 本発明により、間葉系幹細胞から細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用を有する細胞外小胞を有効成分とする細胞老化抑制剤、生体組織修復促進剤、遺伝子発現調節剤、皮膚外用組成物が提供される。本発明が提供する細胞老化抑制剤、生体組織修復促進剤、及び皮膚外用組成物は、細胞老化関連遺伝子又は生体組織修復関連遺伝子の遺伝子発現を調節し、細胞増殖促進作用、コラーゲンの産生促進若しくは分解抑制作用、ヒアルロン酸の産生促進若しくは分解抑制作用、エラスチンの産生促進若しくは分解抑制作用等により細胞老化を抑制し、生体組織の修復を促進する。また、本発明が提供する遺伝子発現調節剤は、細胞増殖抑制遺伝子、コラーゲン遺伝子、コラーゲン分解酵素遺伝子、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子、ヒアルロン酸分解酵素遺伝子、エラスチン遺伝子、及びエラスチン分解酵素遺伝子から選ばれる少なくとも１種の遺伝子の発現調節作用を有する。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]図１は、超遠心分離法により取得したＭＳＣ由来細胞外小胞の粒子径分布をＮＴＡにより解析した結果である。

[図2]図２は、ＰＳアフィニティー法により取得したＭＳＣ由来細胞外小胞の粒子径分布をＮＴＡにより解析した結果である。

[図3]図３は、定量ＰＣＲに使用したプライマーを示した図である。

[図4]図４は、ｐ２１遺伝子（細胞増殖抑制遺伝子）のｍＲＮＡ発現量を指標として、ヒト胎児肺由来線維芽細胞（ＴＩＧ３細胞）を用いて、骨髄由来ＭＳＣから取得した細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を評価した結果である。

[図5]図５は、ｐ５３遺伝子（細胞増殖抑制遺伝子）のｍＲＮＡ発現量を指標として、ヒト胎児肺由来線維芽細胞を用いて、骨髄由来ＭＳＣから取得した細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を評価した結果である。

[図6]図６は、ＭＭＰ－１遺伝子（コラーゲン分解酵素遺伝子）のｍＲＮＡ発現量を指標として、ヒト胎児肺由来線維芽細胞を用いて、骨髄由来ＭＳＣから取得した細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を評価した結果である。

[図7]図７は、ｐ２１遺伝子（細胞増殖抑制遺伝子）のｍＲＮＡ発現量を指標として、ヒト胎児肺由来線維芽細胞を用いて、臍帯由来ＭＳＣから取得した細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を評価した結果である。

[図8]図８は、ｐ５３遺伝子（細胞増殖抑制遺伝子）のｍＲＮＡ発現量を指標として、ヒト胎児肺由来線維芽細胞を用いて、臍帯由来ＭＳＣから取得した細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を評価した結果である。

[図9]図９は、ＭＭＰ－１遺伝子（コラーゲン分解酵素遺伝子）のｍＲＮＡ発現量を指標として、ヒト胎児肺由来線維芽細胞を用いて、臍帯由来ＭＳＣから取得した細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を評価した結果である。

[図10]図１０は、定量ＰＣＲに使用したプライマーを示した図である。

[図11]図１１は、ｐ１６遺伝子（細胞増殖抑制遺伝子）のｍＲＮＡ発現量を指標として、ヒト皮膚由来線維芽細胞（ＴＩＧ３Ｓ細胞）を用いて、（Ａ）

骨髄由来ＭＳＣ、または（Ｂ）脂肪由来ＭＳＣから取得した細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を評価した結果である。

[図12]図１２は、ｐ２１遺伝子（細胞増殖抑制遺伝子）のｍＲＮＡ発現量を指標として、ヒト皮膚由来線維芽細胞を用いて、（Ａ）骨髄由来ＭＳＣ、（Ｂ）臍帯由来ＭＳＣ、または（Ｃ）脂肪由来ＭＳＣからそれぞれ取得した細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を評価した結果である。

[図13]図１３は、ＭＭＰ－１遺伝子（コラーゲン分解酵素遺伝子）のｍＲＮＡ発現量を指標として、ヒト皮膚由来線維芽細胞を用いて、（Ａ）骨髄由来ＭＳＣ、（Ｂ）臍帯由来ＭＳＣ、または（Ｃ）脂肪由来ＭＳＣからそれぞれ取得した細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を評価した結果である。

[図14]図１４は、ＣＯＬ１Ａ１遺伝子（Ｉ型Ｃｏｌｌａｇｅｎ遺伝子）のｍＲＮＡ発現量を指標として、ヒト皮膚由来線維芽細胞を用いて、（Ａ）骨髄由来ＭＳＣ、（Ｂ）臍帯由来ＭＳＣ、または（Ｃ）脂肪由来ＭＳＣからそれぞれ取得した細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を評価した結果である。

[図15]図１５は、ＣＯＬ３Ａ１遺伝子（ＩＩＩ型Ｃｏｌｌａｇｅｎ遺伝子）のｍＲＮＡ発現量を指標として、ヒト皮膚由来線維芽細胞を用いて、（Ａ）骨髄由来ＭＳＣ、（Ｂ）臍帯由来ＭＳＣ、または（Ｃ）脂肪由来ＭＳＣからそれぞれ取得した細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を評価した結果である。

[図16]図１６は、ＨＡＳ１遺伝子（ヒアルロン酸合成酵素遺伝子）のｍＲＮＡ発現量を指標として、ヒト皮膚由来線維芽細胞を用いて、（Ａ）骨髄由来ＭＳＣ、（Ｂ）臍帯由来ＭＳＣ、または（Ｃ）脂肪由来ＭＳＣからそれぞれ取得した細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を評価した結果である。

発明を実施するための形態

[0018] 本発明の基本は、上記したように、炎症性サイトカイン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又は／及び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を有効成分とする細胞老化抑制剤、生体組織修復促進剤、及び遺伝子発現調節剤である。

[0019] 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に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。

[0020] 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。

[0021] 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。

[0022] ＭＳＣ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。ＭＳＣ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ＭＳＣ（以下、「本発明に係るＭＳＣ」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ｉＰＳ細胞、ＥＳ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ＭＳＣとしては、臍帯、臍帯血、骨髄、脂肪、筋肉、神経、皮膚、歯髄、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、ｉＰＳ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ＭＳＣ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ＭＳＣは、炎症性サイトカインにより刺激を加えたものが好ましい。当該炎症性サイトカインとしては、生体内における炎症症状を引き起こしうるサイトカインであれば何れでもよく、例えば、腫瘍壊死因子α、インターロイキン１、インターロイキン６、インターロイキン８、インターロイキン１２、インターロイキン１８、インターフェロンγが挙げられ、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）、インターロイキン１、インターフェロンγが好ましく、腫瘍壊死因子α、インターロイキン１がより好ましく、腫瘍壊死因子αが特に好ましい。前記炎症性サイトカインによる刺激は、少なくとも１つ以上の前記した如きサイトカインを用いればよく、２つ以上のサイトカインを用いてもよい。

[0023] ＜本発明に係る細胞外小胞＞

本発明が提供する細胞老化抑制剤、生体組織修復促進剤、遺伝子発現調節剤、皮膚外用組成物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、炎症性サイトカインにより刺激を加えた本発明に係るＭＳＣに由来する細胞外小胞（以下、「刺激ＭＳＣ由来細胞外小胞」と略記する場合がある）、又は／及び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取得した細胞外小胞（以下、「ＰＳ陽性細胞外小胞」と略記する場合がある）である。

[0024] 刺激ＭＳＣ由来細胞外小胞は、前記炎症性サイトカインにより刺激を加えたＥＶを含む本発明に係るＭＳＣの細胞培養上清液から単離することにより

得られる。

[0025] 刺激ＭＳＣ由来細胞外小胞の取得方法は、試料からＥＶを単離す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、ＰＳ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（ＭＡＣＳ）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、ＰＥＧ沈殿法等が挙げられ、高い精製度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、ＰＳ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。

[0026] 前記炎症性サイトカインにより刺激を加えたＥＶを含む本発明に係るＭＳＣの細胞培養上清液は、例えば、前記炎症性サイトカインにより刺激を加えた本発明に係るＭＳＣを細胞培養により増殖させ、増殖させた細胞をさらにＥＶ産生培地により培養することにより得られる。前記炎症性サイトカインによる本発明に係るＭＳＣへの刺激は、前記炎症性サイトカイン共存下、本発明に係るＭＳＣを培養することにより行えばよい。本発明に係るＭＳＣの細胞培養やＥＶ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。

[0027] ＰＳ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、ＰＳ陽性（ＰＳを含有する）の前記細胞外小

胞である。

[0028] 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、「ＰＳ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；ＭＦＧ－Ｅ８；Ｔｉｍ１タンパク質（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）、Ｔｉｍ２タンパク質（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）、Ｔｉｍ３タンパク質（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）、Ｔｉｍ４タンパク質（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）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、Ｔｉｍ４タンパク質、Ｔｉｍ３タンパク質、及びＴｉｍ１タンパク質から選択されるものがより好ましく、Ｔｉｍ４タンパク質、Ｔｉｍ１タンパク質がさらに好ましく、Ｔｉｍ４タンパク質が特に好ましい。

[0029] ＰＳ陽性細胞外小胞は、ＥＶを含む本発明に係るＭＳＣの細胞培養上清液（以下、「ＥＶ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ＥＶを含む本発明に係るＭＳＣ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ＥＶを取得した後、得られたＥＶ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、ＥＶを含む本発明に係るＭＳＣ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ＥＶを含む細胞培養上清液は、例えば、本発明に係るＭＳＣを細胞培養により増殖させ、増殖させた細胞をさらにＥＶ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ＭＳＣの細胞培養やＥＶ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。

[0030] 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、「ＰＳ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、ＰＳ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。

[0031] 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。

[0032] 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）。

[0033] 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。

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 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物等の有機物；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。

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 前記不溶性担体に結合させるＰＳ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１ｍｇに対して、例えば０．１μｇ～５０μｇであればよく、０．１μｇ～３０μｇが好ましく、０．１μｇ～２０μｇがより好ましい。

[0040] ＰＳ親和性物質と前記不溶性担体との物理的吸着は、例えば、ＰＳ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。

[0041] ＰＳ親和性物質を含有する溶液において、ＰＳ親和性物質を溶解させる溶液としては、ＰＳ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ｐＨ６．０～９．８、好ましくは７．０～９．６に緩衝作用を有する緩衝液（例えばＭＯＰＳなどのグッド緩衝液、炭酸緩衝液、ＰＢＳ、ＴＢＳ、ＴＢＳ－Ｔ、ＨＢＳ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５～１００ｍＭ、好ましくは１０～１００ｍＭの範囲から適宜選択すればよい。ＮａＣｌを含有させる場合の濃度は、例えば１００～２００ｍＭが挙げられ、１４０～１６０ｍＭが好ましい。また、ＰＳ親和性物質を含有する溶液中には、ＰＳ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、ＮａＣｌ等の塩類、Ｔｗｅｅｎ２０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。

[0042] ＰＳ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１ｍｇと、０．１μｇ～５０μｇ、好ましくは０．１μｇ～３０μｇ、より好ましくは０．１μｇ～２０μｇ含有する前記ＰＳ親和性物質を含有する溶液とを接触させ、２℃～３７℃、好ましくは４℃～１１℃で０．５～４８時間、好ましくは０．５～２４時間反応させる。

[0043] 前記のようにして得られたＰＳ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キング処理に付してもよい。

[0044] 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、ＰＳ親和性物質と前記ＥＶを含む細胞培養上清液中のＰＳ陽性細胞外小

胞とを接触させる際に存在させる。ＰＳ親和性物質と前記ＥＶを含む細胞培養上清液中のＰＳ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０．５ｍＭ～１００ｍＭ、好ましくは１．０ｍＭ～１０ｍＭ、より好ましくは２．０ｍＭ～５．０ｍＭである。

ＰＳ親和性物質と前記ＥＶを含む細胞培養上清液中のＰＳ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。

[0045] 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。

[0046] ＰＳ親和性物質と前記ＥＶを含む細胞培養上清液中のＰＳ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、ＰＳ親和性物質と前記ＥＶを含む細胞培養上清液中のＰＳ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ＥＶを含む細胞培養上清液、又は／及びＰＳ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、ＰＳ親和性物質と前記ＥＶを含む細胞培養上清液中のＰＳ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ＥＶを含む細胞培養上清液と、ＰＳ親和性物質を含有する溶液とを混合させてもよい。

[0047] 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、ＰＳ陽性細胞外小胞とＰＳ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、ｐＨ７．０～ｐＨ８．０に緩衝作用を有する緩衝液が挙げられ、ｐＨ７．２～ｐＨ７．６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る。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。

[0048] 本発明に係るカルシウムイオン含有溶液中には、ＰＳ陽性細胞外小胞と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、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Ｔｗｅｅｎ　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０．０００００１％～０．２％、好ましくは通常０．０００５％～０．１％である。

[0049] 複合体形成工程において、ＰＳ親和性物質（前記不溶性担体に固定化されていてもよい）１μｇと接触させる前記ＥＶを含む細胞培養上清液の量は、通常０．１ｍｌ～１００ｍｌであり、０．１ｍｌ～１０ｍｌが好ましく、０．１ｍｌ～１．０ｍｌがより好ましい。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る際の温度は、通常２～３７℃であり、４～３７℃が好ましく、４～３０℃がより好ましい。前記ＥＶを含む細胞培養上清液とＰＳ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。

[0050] 複合体形成工程において、ＰＳ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１ｍＬ当たり通常０．１ｍｇ～２０ｍｇであり、０．３ｍｇ～１０ｍｇが好ましく、０．５ｍｇ～６．０ｍｇがより好ましい。

[0051] 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ＥＶを含む細胞培養上清液と、ＰＳ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１ｍＬ当たり通常０．１ｍｇ～２０ｍｇ、好ましくは０．３ｍｇ～１０ｍｇ、より好ましくは０．５ｍ

ｇ～６．０ｍｇとなる量のＰＳ親和性物質を固定化した不溶性担体と、前記ＥＶ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０．５ｍＭ～１００ｍＭ、好ましくは１．０ｍＭ～１０ｍＭ、より好ましくは２．０ｍＭ～５．０ｍＭとなる量の本発明に係るカルシウムイオン含有溶液と、ＰＳ親和性物質を固定化した不溶性担体１ｍｇ当たり通常０．１ｍｌ～１００ｍｌ、好ましくは０．１ｍｌ～１０ｍｌ、より好ましくは０．１ｍｌ～１．０ｍｌの前記ＥＶを含む細胞培養上清液とを、通常４．０～３７℃、好ましくは４．０～２５℃、より好ましくは４．０℃～１１℃、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ＰＳ親和性物質と前記ＥＶを含む細胞培養上清液中のＰＳ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。

[0052] 複合体分離工程は、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。

[0053] （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。

[0054] 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。

[0055] 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。

[0056] 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ｔｗｅｅｎ　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。

[0057] 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行ってもよい。

[0058] 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。

[0059] 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二酢酸）、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。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 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。

[0065] 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。

[0066] 取得工程を、不溶性担体にＴｉｍタンパク質を結合させた担体（Ｔｉｍ担体）を用いる方法を例に取り説明すれば、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Ｔｉｍ担体１ｍｇ当たり通常１０μＬ～５００μＬ、好ましくは２０μＬ～２００μＬμＬ、より好ましくは５０μＬ～１００μＬμＬ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ＰＳ陽性細胞外小胞を分離させる。

[0067] 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、ＰＳ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ＰＳ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、ＰＳ陽性細胞外小胞を含有する溶液を得ることが出来る。

[0068] 本発明に係る細胞外小胞は、刺激ＭＳＣ由来細胞外小胞が好ましく、前記炎症性サイトカイン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がより好ましく、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）、インターロイキン１、インターロイキン６、インターロイキン８、インターロイキン

１２、インターロイキン１８及びインターフェロンγから選ばれる少なくとも１つ以上の炎症性サイトカイン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Ｔｉｍ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、腫瘍壊死因子α、インターロイキン１及びインターフェロンγから選ばれる少なくとも１種の炎症性サイトカイン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Ｔｉｍ４タンパク質、Ｔｉｍ３タンパク質又はＴｉｍ１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より好ましく、腫瘍壊死因子α又はインターロイキン１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特に好ましく、腫瘍壊死因子α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。

[0069] ＜本発明の細胞老化抑制剤＞

本発明の細胞老化抑制剤は、本発明に係る細胞外小胞を有効成分として含む。本発明の細胞老化抑制剤によれば、細胞老化関連遺伝子の遺伝子発現が調節されることによる細胞増殖促進作用、コラーゲンの産生促進若しくは分解抑制作用、ヒアルロン酸の産生促進若しくは分解抑制作用、及びエラスチン産生促進作用若しくは分解抑制作用から選ばれる少なくとも１種の細胞老化抑制作用に基づき、細胞老化を抑制することができる。

[0070] 前記細胞老化関連遺伝子としては、細胞老化に関連する遺伝子であれば何れでもよく、例えば、ｐ５３遺伝子、ｐ２１遺伝子、ｐ１６遺伝子等の細胞増殖抑制遺伝子；Ｉ型コラーゲン遺伝子（ＣＯＬ１Ａ１遺伝子、ＣＯＬ１Ａ２遺伝子）、ＩＩＩ型コラーゲン遺伝子（ＣＯＬ３Ａ１遺伝子）、Ｖ型コラーゲン遺伝子（ＣＯＬ５Ａ１遺伝子、ＣＯＬ５Ａ２遺伝子）、ＸＶＩＩ型コラーゲン遺伝子（ＣＯＬ１７Ａ１遺伝子）等のコラーゲン遺伝子；ＭＭＰ－１遺伝子、ＭＭＰ－２遺伝子、ＭＭＰ－３遺伝子、ＭＭＰ－８遺伝子、ＭＭＰ－９遺伝子、ＭＭＰ－１３遺伝子等のコラーゲン分解酵素遺伝子；ヒアル

ロン酸合成酵素１遺伝子（ＨＡＳ１遺伝子）、ヒアルロン酸合成酵素２遺伝子（ＨＡＳ２遺伝子）等のヒアルロン酸合成酵素遺伝子；ＨＹＡＬ１遺伝子、ＨＹＡＬ２遺伝子、ＨＹＡＬ３遺伝子等のヒアルロン酸分解酵素遺伝子；ＥＬＮ遺伝子等のエラスチン遺伝子；ＭＭＰ－２遺伝子、ＭＭＰ－９遺伝子等のエラスチン分解酵素遺伝子が挙げられ、細胞増殖抑制遺伝子、コラーゲン遺伝子、コラーゲン分解酵素遺伝子、ヒアルロン酸合成酵素が好ましく、ｐ５３遺伝子、ｐ２１遺伝子、ｐ１６遺伝子、ＭＭＰ－１遺伝子、ＣＯＬ１Ａ１遺伝子、ＣＯＬ３Ａ１遺伝子、ＨＡＳ１遺伝子がより好ましい。前記細胞増殖抑制遺伝子とは、細胞増殖の抑制に関わる遺伝子であれば何れでもよく、例えば細胞増殖抑制因子をコードする遺伝子が挙げられる。細胞増殖抑制因子をコードする遺伝子の発現を調節することにより、細胞分裂に関与するサイクリンキナーゼが阻害され、細胞増殖が抑制されると考えられる。

[0071] 本発明における細胞老化関連遺伝子の遺伝子発現の調節とは、前記細胞老化関連遺伝子の発現促進及び／又は発現抑制を意味し、具体的には、例えばコラーゲン遺伝子の発現促進、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子の発現促進、エラスチン遺伝子の発現促進、細胞増殖抑制遺伝子の発現抑制、コラーゲン分解酵素遺伝子の発現抑制、ヒアルロン酸分解酵素遺伝子の発現抑制、エラスチン分解酵素遺伝子の発現抑制が挙げられ、コラーゲン遺伝子の発現促進、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子の発現促進、細胞増殖抑制遺伝子の発現抑制、コラーゲン分解酵素遺伝子の発現抑制が好ましく、ＣＯＬ１Ａ１遺伝子の発現促進、ＣＯＬ３Ａ１遺伝子の発現促進、ＨＡＳ１遺伝子の発現促進、ｐ５３遺伝子の発現抑制、ｐ２１遺伝子の発現抑制、ｐ１６遺伝子の発現抑制、ＭＭＰ－１遺伝子の発現抑制がより好ましい。

[0072] 本発明の細胞老化抑制剤が抑制する細胞老化の対象となる細胞は特に限定されず、例えば、線維芽細胞が挙げられ、真皮繊維芽細胞がより好ましい。

[0073] 本発明の細胞老化剤中における本発明に係る細胞外小胞の含有率は、本発明に係る細胞外小胞による細胞老化抑制活性（細胞老化抑制効果）が発揮される限り特に限定されない。また、本発明の細胞老化剤の形態及び本発明に

係る細胞外小胞以外の成分配合の有無等については、なんら制限されない。また、本発明における細胞老化抑制活性は、前記細胞老化関連遺伝子の発現量を指標として評価することができる。

[0074] 本発明の細胞老化抑制剤は、本発明に係る細胞外小胞を有効成分として含むものであり、例えば医薬組成物として提供される。本発明の細胞老化抑制剤の投与剤形は、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が挙げられる。

[0075] 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。

[0076] 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。

[0077] 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トルエン、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。

[0078] 安定化剤としては、例えば、ジブチルヒドロキシトルエン、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。

[0079] 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。

[0080] 本発明の細胞老化抑制剤にあっては、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、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。

[0081] 本発明の細胞老化抑制剤が液剤、懸濁剤又はリポ化剤である場合、そのｐＨは、医薬上、薬理学的に、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。

[0082] 本発明の細胞老化抑制剤の投与経路は、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、1×10^{5}～1×10^{17}個／回であり、5×10^{5}～5×10^{16}個／回が好ましく、1×10^{6}～1×10^{16}個／回が更に好ましく、5×10^{6}～5×10^{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。

[0083] また、本発明の細胞老化抑制剤は、経皮医薬品、経皮医薬部外品等の皮膚外用剤として製剤化されてもよい。皮膚外用剤における本発明に係る細胞外小胞の含有率は、本発明に係る細胞外小胞による細胞老化抑制活性が発揮さ

れる限り特に限定されず、例えば、１ｘ１０^{6}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ～１ｘ１０^{15}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬが好ましく、１ｘ１０^{7}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ～１ｘ１０^{14}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬがより好ましく、１ｘ１０^{8}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ～１ｘ１０^{13}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬが特に好ましい。

[0084] 皮膚外用剤の剤型は任意であり、例えば、ローションなどの可溶化系やカラミンローション等の分散系、クリームや乳液などの乳化系として提供することができる。さらに、噴射剤と共に充填するエアゾール形態、ポンプスプレー剤、軟膏剤、パップ剤、テープ剤、注射剤などの種々の剤型で提供することもできる。また、皮膚外用剤には、本発明に係る細胞外小胞の他に、その用途と必要に応じて、経皮医薬品、経皮医薬部外品等に通常配合される任意の成分（基材）が配合されていてもよく、例えば水、油性成分、保湿剤、粉体、色素、乳化剤、可溶化剤、ゲル化剤、洗浄剤、紫外線吸収剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤、増粘剤、ｐＨ調整剤、キレート剤、薬剤（薬効成分）、香料、樹脂、防菌防かび剤、防腐剤（保存剤）、抗酸化剤、痩身剤、アルコール類、界面活性剤、紫外線吸収剤、保湿剤、エモリント剤、ビタミン類、着色料、天然抽出物等が挙げられる。さらに、本発明の効果を損なわない範囲において、他の細胞老化抑制作用を有する化合物等を適宜配合することができる。また、これらの任意の成分の含有量も特に限定されず、所望の剤型や用途等に応じて適宜選択することができる。

[0085] ＜本発明の生体組織修復促進剤＞

本発明の生体組織修復促進剤は、本発明に係る細胞外小胞を有効成分として含む。本発明の生体組織修復促進剤によれば、生体組織修復関連遺伝子の発現が調節され、細胞が増殖し膠原繊維や弾性繊維等の生体組織を構成する線維の修復が促進されること等により、恒常的機能が低下又は消失した生体組織の修復が促進される。具体的には、細胞増殖抑制遺伝子の遺伝子発現が調節されることによる細胞増殖促進作用、コラーゲンの産生促進若しくは分解抑制作用による膠原繊維（コラーゲン線維）の修復促進作用、エラスチン

産生促進作用若しくは分解抑制作用による弾性繊維（エラスチン線維）の修復作用、及びヒアルロン酸の産生促進若しくは分解抑制作用から選ばれる少なくとも１種の生体組織修復促進作用に基づき、生体組織の修復を促進することができる。

[0086] 前記生体組織修復関連遺伝子としては、生体組織修復関連遺伝子であれば何れでもよく、例えば、ｐ５３遺伝子、ｐ２１遺伝子、ｐ１６遺伝子等の細胞増殖抑制遺伝子；Ｉ型コラーゲン遺伝子（ＣＯＬ１Ａ１遺伝子、ＣＯＬ１Ａ２遺伝子）、ＩＩＩ型コラーゲン遺伝子（ＣＯＬ３Ａ１遺伝子）、Ｖ型コラーゲン遺伝子（ＣＯＬ５Ａ１遺伝子、ＣＯＬ５Ａ２遺伝子）、ＸＶＩＩ型コラーゲン遺伝子（ＣＯＬ１７Ａ１遺伝子）等のコラーゲン遺伝子；ＭＭＰ－１遺伝子、ＭＭＰ－２遺伝子、ＭＭＰ－３遺伝子、ＭＭＰ－８遺伝子、ＭＭＰ－９遺伝子、ＭＭＰ－１３遺伝子等のコラーゲン分解酵素遺伝子；ヒアルロン酸合成酵素１遺伝子（ＨＡＳ１遺伝子）、ヒアルロン酸合成酵素２遺伝子（ＨＡＳ２遺伝子）等のヒアルロン酸合成酵素遺伝子；ＨＹＡＬ１遺伝子、ＨＹＡＬ２遺伝子、ＨＹＡＬ３遺伝子等のヒアルロン酸分解酵素遺伝子；ＥＬＮ遺伝子等のエラスチン遺伝子；ＭＭＰ－２遺伝子、ＭＭＰ－９遺伝子等のエラスチン分解酵素遺伝子が挙げられ、細胞増殖抑制遺伝子、コラーゲン遺伝子、コラーゲン分解酵素遺伝子、ヒアルロン酸合成酵素が好ましく、ｐ５３遺伝子、ｐ２１遺伝子、ｐ１６遺伝子、ＭＭＰ－１遺伝子、ＣＯＬ１Ａ１遺伝子、ＣＯＬ３Ａ１遺伝子、ＨＡＳ１遺伝子がより好ましい。前記細胞増殖抑制遺伝子とは、細胞増殖の抑制に関わる遺伝子であれば何れでもよく、例えば細胞増殖抑制因子をコードする遺伝子が挙げられる。細胞増殖抑制因子をコードする遺伝子の発現を調節することにより、細胞分裂に関与するサイクリンキナーゼが阻害され、細胞増殖が抑制されると考えられる。

[0087] 本発明における生体組織修復関連遺伝子の発現の調節とは、前記生体組織修復関連遺伝子の発現促進及び／又は発現抑制を意味し、具体的には、例えばコラーゲン遺伝子の発現促進、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子の発現促進、エラスチン遺伝子の発現促進、細胞増殖抑制遺伝子の発現抑制、コラーゲン

分解酵素遺伝子の発現抑制、ヒアルロン酸分解酵素遺伝子の発現抑制、エラスチン分解酵素遺伝子の発現抑制が挙げられ、コラーゲン遺伝子の発現促進、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子の発現促進、細胞増殖抑制遺伝子の発現抑制、コラーゲン分解酵素遺伝子の発現抑制が好ましく、ＣＯＬ１Ａ１遺伝子の発現促進、ＣＯＬ３Ａ１遺伝子の発現促進、ＨＡＳ１遺伝子の発現促進、ｐ５３遺伝子の発現抑制、ｐ２１遺伝子の発現抑制、ｐ１６遺伝子の発現抑制、ＭＭＰ－１遺伝子の発現抑制がより好ましい。

[0088] 本発明の生体組織修復促進剤が修復を促進する組織としては、膠原繊維や弾性繊維を有する組織やヒアルロン酸を有する組織が挙げられ、具体的には、例えば、真皮、靭帯、結合組織、動脈、肺等であり、真皮、靭帯が好ましい。

[0089] 本発明の生体組織修復促進剤中における本発明に係る細胞外小胞の含有率は、本発明に係る細胞外小胞による生体組織修復促進活性（生体組織修復促進効果）が発揮される限り特に限定されない。また、本発明の生体組織修復促進剤の形態及び本発明に係る細胞外小胞以外の成分配合の有無等については、なんら制限されない。また、本発明における生体組織修復促進活性は、前記生体組織修復関連遺伝子の発現量を指標として評価することができる。

[0090] 本発明の生体組織修復促進剤は、本発明に係る細胞外小胞を有効成分として含むものであり、例えば医薬組成物として提供される。本発明の生体組織修復促進剤の投与剤形は、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。

[0091] 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、前述した本発明の細胞老化抑制剤と同じものが挙げられ、好ましいものを同じである。本発明の生体組織修復促進剤にあっては、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、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。

[0092] 本発明の生体組織修復促進剤が液剤、懸濁剤又はリポ化剤である場合、そのｐＨは、医薬上、薬理学的に、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。

[0093] 本発明の生体組織修復促進剤の投与経路は、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、１×１０^{5}～１×１０^{17}個／回であり、５×１０^{5}～５×１０^{16}個／回が好ましく、１×１０^{6}～１×１０^{16}個／回が更に好ましく、５×１０^{6}～５×１０^{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。

[0094] また、本発明の生体組織修復促進剤は、経皮医薬品、経皮医薬部外品等の皮膚外用剤として製剤化されてもよい。皮膚外用剤における本発明に係る細胞外小胞の含有率は、本発明に係る細胞外小胞による生体組織修復促進活性が発揮される限り特に限定されず、例えば、１ｘ１０^{6}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ～１ｘ１０^{15}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬが好ましく、１ｘ１０^{7}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ～１ｘ１０^{14}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬがより好ましく、１ｘ１０^{8}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ～１ｘ１０^{13}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬが特に好ましい。

[0095] 皮膚外用剤の剤型は任意であり、前述した本発明の細胞老化抑制剤を皮膚外用剤として提供するものと同様である。また、皮膚外用剤には、本発明に係る細胞外小胞の他に、その用途と必要に応じて、経皮医薬品、経皮医薬部

外品等に通常配合される任意の成分（基材）が配合されていてもよく、前述した本発明の細胞老化抑制剤を皮膚外用剤として提供するものと同様である。さらに、本発明の効果を損なわない範囲において、他の生体組織修復促進作用を有する化合物等を適宜配合することができる。また、これらの任意の成分の含有量も特に限定されず、所望の剤型や用途等に応じて適宜選択することができる。

[0096] ＜本発明の皮膚外用組成物＞

本発明の細胞老化抑制用又は生体組織修復促進用皮膚外用組成物（以下、「本発明の皮膚外用組成物」と略記する場合がある）は、本発明に係る細胞外小胞を有効成分として含み、皮膚に外用される全ての外用組成物を意味する。本発明の皮膚外用組成物は、具体的には、例えば、化粧料、経皮医薬品、経皮医薬部外品等の用途に適用することができる。

[0097] 本発明の皮膚外用組成物中における本発明に係る細胞外小胞の含有率は、本発明に係る細胞外小胞による細胞老化抑制活性（細胞老化抑制効果）又は生体組織修復促進活性（生体組織修復促進効果）が発揮される限り特に限定されない。本発明の皮膚外用組成物中における本発明に係る細胞外小胞の含有量は、例えば、１ｘ１０^{6}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ～１ｘ１０^{15}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬが好ましく、１ｘ１０^{7}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ～１ｘ１０^{14}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬがより好ましく、１ｘ１０^{8}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ～１ｘ１０^{13}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬが特に好ましい。

[0098] 本発明の皮膚外用組成物の剤型は任意であり、例えば、ローションなどの可溶化系やカラミンローション等の分散系、クリームや乳液などの乳化系として提供することができる。さらに、噴射剤と共に充填するエアゾール形態、ポンプスプレー剤、軟膏剤、パップ剤、テープ剤、注射剤などの種々の剤型で提供することもできる。

[0099] 具体的には、乳液、クリーム、ローション、化粧水、パック、美容液、洗浄料、ジェル、メイクアップ化粧料等の各種化粧料；液剤、軟膏、粉末、顆粒、エアゾール剤、ポンプスプレー剤、貼付剤、パップ剤、テープ剤等の様

々な形態の化粧料、経皮医薬品、経皮医薬部外品などが例示できる。

[0100] 本発明の皮膚外用組成物には、本発明に係る細胞外小胞の他に、その用途と必要に応じて、皮膚化粧料等の化粧料、経皮医薬品、経皮医薬部外品、並びに洗浄料等に通常配合される任意の成分（基材）が配合されていてもよく、例えば水、油性成分、保湿剤、粉体、色素、乳化剤、可溶化剤、ゲル化剤、洗浄剤、紫外線吸収剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤、増粘剤、ｐＨ調整剤、キレート剤、薬剤（薬効成分）、香料、樹脂、防菌防かび剤、防腐剤（保存剤）、抗酸化剤、痩身剤、アルコール類、界面活性剤、紫外線吸収剤、美白剤、保湿剤、エモリント剤、ビタミン類、着色料、天然抽出物等が挙げられる。さらに、本発明の効果を損なわない範囲において、他の細胞老化抑制作用を有する化合物や生体組織修復促進作用を有する化合物等を適宜配合することができる。また、これらの任意の成分の含有量も特に限定されず、所望の剤型や用途等に応じて適宜選択することができる。

[0101] 本発明の皮膚外用組成物が抑制する細胞老化の対象となる細胞は、前記本発明の細胞老化抑制剤が抑制する細胞老化の対象となる細胞又は本発明の生体組織修復促進剤が修復を促進する組織と同様であり、好ましいものも同様である。

[0102] 本発明の皮膚外用組成物の製造は、本発明に係る細胞外小胞や本発明の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤の製造方法に準じて行えばよく、具体例や好ましい方法も同様である。

[0103] 本発明の皮膚外用組成物は、本発明に係る細胞外小胞を含むことにより、細胞老化抑制活性又は生体組織修復促進活性が発揮される。本発明の皮膚外用組成物を例えば顔の皮膚や頭皮に適用した場合、少なくとも１種の前記細胞老化関連遺伝子又は前記生体組織修復関連遺伝子の発現が調節されることによる、細胞増殖促進作用、コラーゲンの産生促進若しくは分解抑制作用、ヒアルロン酸の産生促進若しくは分解抑制作用、エラスチン産生促進若しくは分解抑制作用等に基づき、老化に伴うシワやたるみ等の改善、脱毛又は薄毛の治療又は予防等、或いは機能障害や機能不全に陥った細胞や生体組織、

臓器の機能再生を図ること等を期待し得る。

[0104] ＜本発明の遺伝子発現調節剤＞

本発明の遺伝子発現調節剤は、本発明に係る細胞外小胞を有効成分として含むものであり、ｐ５３遺伝子、ｐ２１遺伝子、ｐ１６遺伝子等の細胞増殖抑制遺伝子；Ｉ型コラーゲン遺伝子（ＣＯＬ１Ａ１遺伝子遺伝子、ＣＯＬ１Ａ２遺伝子）、ＩＩＩ型コラーゲン遺伝子（ＣＯＬ３Ａ１遺伝子）、Ｖ型コラーゲン遺伝子（ＣＯＬ５Ａ１遺伝子、ＣＯＬ５Ａ２遺伝子）、ＸＶＩＩ型コラーゲン遺伝子（ＣＯＬ１７Ａ１遺伝子）等のコラーゲン遺伝子；ヒアルロン酸合成酵素１遺伝子（ＨＡＳ１遺伝子）、ヒアルロン酸合成酵素２遺伝子（ＨＡＳ２遺伝子）等のヒアルロン酸合成酵素遺伝子；ＥＬＮ遺伝子等のエラスチン遺伝子；ＭＭＰ－１遺伝子、ＭＭＰ－２遺伝子、ＭＭＰ－３遺伝子、ＭＭＰ－８遺伝子、ＭＭＰ－９遺伝子、ＭＭＰ－１３遺伝子等のコラーゲン分解酵素遺伝子；ＨＹＡＬ１遺伝子、ＨＹＡＬ２遺伝子、ＨＹＡＬ３遺伝子等のヒアルロン酸分解酵素遺伝子；ＭＭＰ－２遺伝子、ＭＭＰ－９遺伝子等のエラスチン分解酵素遺伝子から選ばれる少なくとも１種の遺伝子（以下、「発現調節対象遺伝子」と略記する場合がある）の遺伝子発現調節の用途に適用される。前記発現調節対象遺伝子としては、細胞増殖抑制遺伝子、コラーゲン遺伝子、コラーゲン分解酵素遺伝子、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子が好ましく、ｐ５３遺伝子、ｐ２１遺伝子、ｐ１６遺伝子、ＭＭＰ－１遺伝子、ＣＯＬ１Ａ１遺伝子、ＣＯＬ３Ａ１遺伝子、ＨＡＳ１遺伝子がより好ましい。

[0105] また、本発明の遺伝子発現調節剤による遺伝子発現調節とは、前記発現調節対象遺伝子の発現促進及び／又は発現抑制を意味し、コラーゲン遺伝子の発現促進、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子の発現促進、エラスチン遺伝子の発現促進、細胞増殖抑制遺伝子の発現抑制、コラーゲン分解酵素遺伝子の発現抑制、ヒアルロン酸分解酵素遺伝子の発現抑制、エラスチン分解酵素遺伝子の発現抑制が挙げられ、コラーゲン遺伝子の発現促進、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子の発現促進、細胞増殖抑制遺伝子の発現抑制、コラーゲン分解酵素

遺伝子の発現抑制が好ましく、ｐ５３遺伝子の発現抑制、ｐ２１遺伝子の発現抑制、ｐ１６遺伝子の発現抑制、ＭＭＰ－１遺伝子の発現抑制、ＣＯＬ１Ａ１遺伝子の発現促進、ＣＯＬ３Ａ１遺伝子の発現促進、ＨＡＳ１遺伝子の発現促進がより好ましい。

[0106] 本発明の遺伝子発現調節剤が遺伝子発現を調節する対象となる細胞は特に限定されず、例えば、線維芽細胞、肝細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、間葉系間質細胞、間葉系幹細胞等が挙げられ、真皮線維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、間葉系間質細胞、間葉系幹細胞が好ましく、真皮線維芽細胞、血管内皮細胞、間葉系間質細胞、間葉系幹細胞がより好ましい。

[0107] 本発明の遺伝子発現調節剤中における本発明に係る細胞外小胞の含有率は、本発明に係る細胞外小胞による本発明の遺伝子発現調節活性（本発明の遺伝子発現調節効果）が発揮される限り特に限定されない。また、本発明の遺伝子発現調節剤の形態及び本発明に係る細胞外小胞以外の成分配合の有無等については、なんら制限されない。

[0108] 本発明の遺伝子発現調節剤は、本発明に係る細胞外小胞を有効成分（主薬）として含むものであり、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。

[0109] 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、前述した本発明の細胞老化抑制剤と同じものが挙げられ、好ましいものを同じである。

[0110] 本発明の遺伝子発現調節剤にあっては、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、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。

[0111] 本発明の遺伝子発現調節剤が液剤、懸濁剤又はリポ化剤である場合、そのｐＨは、医薬上、薬理学的に、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。

[0112] 本発明の遺伝子発現調節剤の投与経路は、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、１×１０^{5}～１×１０^{17}個／回であり、５×１０^{5}～５×１０^{16}個／回が好ましく、１×１０^{6}～１×１０^{16}個／回が更に好ましく、５×１０^{6}～５×１０^{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。

[0113] また、本発明の遺伝子発現調節剤は、経皮医薬品、経皮医薬部外品等の皮膚外用剤として製剤化されてもよい。皮膚外用剤における本発明に係る細胞外小胞の含有率は、本発明に係る細胞外小胞による本発明の遺伝子発現調節活性が発揮される限り特に限定されず、例えば、１ｘ１０^{6}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ～１ｘ１０^{15}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬが好ましく、１ｘ１０^{7}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ～１ｘ１０^{14}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬがより好ましく、１ｘ１０^{8}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ～１ｘ１０^{13}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬが特に好ましい。

[0114] 皮膚外用剤の剤型は任意であり、例えば、ローションなどの可溶化系やカラミンローション等の分散系、クリームや乳液などの乳化系として提供することができる。さらに、噴射剤と共に充填するエアゾール形態、ポンプスプレー剤、軟膏剤、パップ剤、テープ剤、注射剤などの種々の剤型で提供することもできる。また、皮膚外用剤には、本発明に係る細胞外小胞の他に、その用途と必要に応じて、経皮医薬品、経皮医薬部外品等に通常配合される任

意の成分（基材）が配合されていてもよく、例えば水、油性成分、保湿剤、粉体、色素、乳化剤、可溶化剤、ゲル化剤、洗浄剤、紫外線吸収剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤、増粘剤、ｐＨ調整剤、キレート剤、薬剤（薬効成分）、香料、樹脂、防菌防かび剤、防腐剤（保存剤）、抗酸化剤、痩身剤、アルコール類、界面活性剤、紫外線吸収剤、保湿剤、エモリント剤、ビタミン類、着色料、天然抽出物等が挙げられる。さらに、本発明の効果を損なわない範囲において、他の本発明の遺伝子発現調節作用を有する化合物等を適宜配合することができる。また、これらの任意の成分の含有量も特に限定されず、所望の剤型や用途等に応じて適宜選択することができる。

[0115] 本発明の遺伝子発現調節剤の製造は、本発明に係る細胞外小胞や本発明の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤の製造方法に準じて行えばよく、具体例や好ましい方法も同様である。

実施例

[0116] 以下、実施例およ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。

[0117] 実施例１．超遠心法による骨髄由来間葉系幹細胞からの細胞外小胞の取得

（１）細胞培養

骨髄由来間葉系幹細胞であるＰｏｉｅｔｉｃｓ™ヒト間葉系幹細胞（ＬＯＮＺＡ社）を、１５％ＦＢＳ（Ｓｅｌｂｏｒｎｅ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｓｅｖｉｃｅ　Ｐｔｙ．社）含有ＭＥＭα（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１００ｍｍ細胞培養用ディッシュ（Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ社）に播種し、５％CO_2、３７℃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）炎症性サイトカインによる刺激

（１）で増殖させた骨髄由来間葉系幹細胞にＴＮＦα（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ社）を終濃度２０ｎｇ／ｍＬで添加して刺激し、さらに２４時間培養

した。

（３）細胞外小胞の産生

（２）で培養し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％ＧＩＢＣＯ：Ｆｅｔａｌ Ｂｏｖｉｎｅ Ｓｅｒｕｍ，ｅｘｏｓｏｍｅ－ｄｅｐｌｅｔｅｄ，Ｏｎｅ Ｓｈｏｔ™ ｆｏｒｍａｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）含有Ｄ－ＭＥＭ（富士フイルム和光純薬（株））２０ｍＬに置換し、５％CO_2、３７℃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５０ｍＬの遠沈管に回収して２０００×ｇで２０分間遠心し、上清を回収した。

（４）超遠心法による細胞外小胞の取得

次いで、（３）で回収した培養上清を、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により溶解した。以下、得られた溶液を「細胞外小胞溶液（骨髄由来ＭＳＣ、超遠心法、ＴＮＦα刺激）」と記載する場合がある。

[0118] 実施例２．超遠心法による臍帯由来間葉系幹細胞からの細胞外小胞の取得

「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１と同様の方法により超遠心法により細胞外小胞を取得した。以下、得られた溶液を「細胞外小胞溶液（臍帯由来ＭＳＣ、超遠心法、ＴＮＦα刺激）」と記載する場合がある。

[0119] 比較例１．超遠心法による骨髄由来間葉系幹細胞からの細胞外小胞の取得

「実施例１（２）炎症性サイトカインによる刺激」を行わなかった以外は

、実施例１と同様の方法により、超遠心法により細胞外小胞を取得した。以下、得られた溶液を「細胞外小胞溶液（骨髄由来ＭＳＣ、超遠心法）」と記載する場合がある。

[0120] 比較例２．超遠心法による臍帯由来間葉系幹細胞からの細胞外小胞の取得

「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、比較例１と同様の方法により、超遠心法により細胞外小胞を取得した。以下、得られた溶液を「細胞外小胞溶液（臍帯由来ＭＳＣ、超遠心法）」と記載する場合がある。

[0121] 実施例３．ＰＳアフィニティー法による骨髄由来間葉系幹細胞からの細胞外小胞の取得

「実施例１（４）超遠心法による細胞外小胞の取得」の代わりに、下記手順に従ってＰＳアフィニティー法により細胞外小胞を取得した以外は、実施例１と同様の方法により細胞外小胞を取得した。実施例１（３）で回収した培養上清１ｍＬから、ＭａｇＣａｐｔｕｒｅ™　Ｅｘｏｓｏｍｅ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ　ＰＳ（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、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１ｍＭ　ＥＤＴＡ含有ＰＢＳ（Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ－ｂｕｆｆｅｒｅｄ　ｓａｌｉｎｅ）中に細胞外小胞を得た。その後、ビバスピン５００（ザルトリウス社、分画分子量：１００，０００（１００Ｋ）、膜材質：ＰＥＳ）を用いて、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った。以下、得られた溶液を「細胞外小胞溶液（骨髄由来ＭＳＣ、ＰＳ法、ＴＮＦα刺激）」と記載する場合がある。

[0122] 実施例４．ＰＳアフィニティー法による臍帯由来間葉系幹細胞からの細胞外小胞の取得

「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３と同様の方法によりＰＳ法により細胞外小胞を取得した。以下、得られた溶液を「細胞外小胞溶液（臍帯由来ＭＳＣ、ＰＳ法、ＴＮＦα刺激）」と記載する場合がある。

[0123] 実施例５．ＰＳアフィニティー法による臍帯由来間葉系幹細胞からの細胞外小胞の取得

「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）」を使用し、「実施例１（２）炎症性サイトカインによる刺激」を行わなかった以外は、実施例１と同様の方法によりＰＳ法により細胞外小胞を取得した。以下、得られた溶液を「細胞外小胞溶液（臍帯由来ＭＳＣ、ＰＳ法）」と記載する場合がある。

[0124] 実験例１－７．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１－５および比較例１－２でそれぞれ得られた「細胞外小胞溶液」の単位体積当たりの粒子数を、ＮａｎｏＳｉｇｈｔ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｐａｎａｌｙｔｉｃａｌ社）を用いて、ナノ粒子トラッキング解析法（Ｎａｎｏ　Ｔｒａｃｋｉｎｇ　Ａｎａｌｙｓｉｓ法）により、ＮａｎｏＳｉｇｈｔ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［ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ］を算出した。測定に用いた「細胞外小胞溶液」および得られた平均粒子径と単位体積当たりの平均粒子数を下記表１に示す。また、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。

[0125]

[表1]

	測定した細胞外小胞溶液	平均粒子径 [nm]	単位体積当たりの平均粒子数 [particles／mL]
実験例1	実施例1で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、超遠心法、TNFα刺激）」	176.9±7.3	4.46×10^{10}
実験例2	実施例2で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、超遠心法、TNFα刺激）」	146.6±1.5	7.66×10^{10}
実験例3	比較例1で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、超遠心法）」	136.2±1.1	4.86×10^{10}
実験例4	比較例2で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、超遠心法）」	143.3±1.8	2.40×10^{11}
実験例5	実施例3で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、PS法、TNFα刺激）」	141.6±0.4	5.00×10^{10}
実験例6	実施例4で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、PS法、TNFα刺激）」	143.1±1.5	1.57×10^{11}
実験例7	実施例5で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、PS法）」	140.3±3.8	1.41×10^{11}

[0126] 実施例６－１１．ＰＳアフィニティー法で取得した細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性の評価

実施例１で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来ＭＳＣ、超遠心法、ＴＮＦα刺激）」および実施例３で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来ＭＳＣ、ＰＳ法、ＴＮＦα刺激）」を用いて、細胞老化関連遺伝子および生体組織修復関連遺伝子であるｐ２１遺伝子、ｐ５３遺伝子、ＭＭＰ－１遺伝子のｍＲＮＡ発現量をそれぞれ定量ＰＣＲにより測定することにより細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を評価した。具体的には、以下の方法により実施した。１０％ＦＢＳ（Ｂｉｏｓｅｒａ社）含有ＤＭＥＭ（富士フイルム和光純薬（株））にヒト胎児肺由来線維芽細胞であるＴＩＧ３細胞（ＪＣＲＢより分譲、７０回以上分裂後のもの）を懸濁し、９６ ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅ（Ｃｏｒｎｉｎｇ社）に１ウェルあたり細胞数2×10^{3}、培地量１００μＬでそれぞれ播種した。細胞播種から１６時間後、下記表２に記載の「細胞外小胞溶液」を終濃度3×10^{9}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬとなる量それぞれのウェルに添加し、９６時間培養した。ＰｕｒｅＬｉｎｋ™ ＲＮＡ Ｍｉｎｉ キット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）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ＲＮＡをそれぞれ抽出した。抽出したＲＮＡ５０ｎｇから、ＲｅｖｅｒＴｒａ

Ａｃｅ™ ｑＰＣＲ ＲＴ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ ｗｉｔｈ ｇＤＮＡ Ｒｅｍｏｖｅｒ（東洋紡（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ｃＤＮＡを合成した。合成したｃＤＮＡを用いて、ＫＯＤ ＳＹＢＲ ｑＰＣＲ Ｍｉｘ （東洋紡（株））により、細胞老化関連遺伝子および生体組織修復関連遺伝子であるｐ２１遺伝子、ｐ５３遺伝子、ＭＭＰ－１遺伝子および内部標準であるＧＡＰＤＨのｍＲＮＡ発現量を、それぞれ定量ＰＣＲにより測定した。定量ＰＣＲに使用したプライマーを図３にそれぞれ示す。

図４はｐ２１遺伝子のｍＲＮＡ発現量、図５はｐ５３遺伝子のｍＲＮＡ発現量、図６はＭＭＰ－１遺伝子のｍＲＮＡ発現量の結果である。各遺伝子の発現量は、各遺伝子に対するプライマーを用いて行ったｑＰＣＲから得られた数値をＧＡＰＤＨに対してノーマライズし、コントロールに対する相対値（△△ｃｔ値）として示し、各図の縦軸とした。図中、横軸の「ＥＶ（－）精製方法（－）」は、ＥＶ非添加のＴＩＧ３細胞（コントロール）を用いた場合の結果、「ＥＶ（ＭＳＣ） 精製方法（ＵＣ）」は、比較例１で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来ＭＳＣ、超遠心法）」を用いた場合の結果、「ＥＶ（ＭＳＣ ＴＮＦα刺激あり） 精製方法（ＵＣ）」は、実施例１で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来ＭＳＣ、超遠心法、ＴＮＦα刺激）」を用いた場合の結果、「ＥＶ（ＭＳＣ） 精製方法（ＰＳ）」は、実施例３で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来ＭＳＣ、ＰＳ法、ＴＮＦα刺激）」を用いた場合の結果をそれぞれ示す。各実施例において測定に用いた細胞外小胞溶液、発現量を確認したｍＲＮＡ、結果を示した図の番号を、比較例３－５のものとあわせて下記表２にそれぞれ示す。

[0127]

[表2]

	測定に用いた細胞外小胞溶液	発現量を確認したmRNA	結果を示した図
実施例6	実施例1で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、超遠心法、TNFα刺激）」	p21	図4
実施例7	実施例3で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、PS法、TNFα刺激）」	p21	図4
比較例3	比較例1で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、超遠心法）」	p21	図4
実施例8	実施例1で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、超遠心法、TNFα刺激）」	p53	図5
実施例9	実施例3で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、PS法、TNFα刺激）」	p53	図5
比較例4	比較例1で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、超遠心法）」	p53	図5
実施例10	実施例1で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、超遠心法、TNFα刺激）」	MMP-1	図6
実施例11	実施例3で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、PS法、TNFα刺激）」	MMP-1	図6
比較例5	比較例1で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、超遠心法）」	MMP-1	図6

[0128] 比較例３－５．超遠心法で取得した細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性の評価

「細胞外小胞溶液」として比較例１で得られた「細胞外小胞溶液（骨髄由来ＭＳＣ、超遠心法）」を用いた以外は、実施例６－１１と同様の方法により、細胞老化関連遺伝子および生体組織修復関連遺伝子であるｐ２１遺伝子、ｐ５３遺伝子、ＭＭＰ－１遺伝子のｍＲＮＡ発現量をそれぞれ定量ＰＣＲにて測定することにより細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を評価した。各比較例において測定に用いた細胞外小胞溶液、発現量を確認したｍＲＮＡは、上記表２に記載の通りである。定量ＰＣＲの結果を実施例６－１１の結果と併せて、図４－６にそれぞれ示す。

[0129] 実施例１２－１８．ＰＳアフィニティー法で取得した細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性の評価

「細胞外小胞溶液」として実施例２で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来ＭＳＣ、超遠心法、ＴＮＦα刺激）」、実施例４で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来ＭＳＣ、ＰＳ法、ＴＮＦα刺激）」および実施例５で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来ＭＳＣ、ＰＳ法）」を終濃度７．５×１０^{9}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬとなる量用いた以外は、実施例６－１１と同様の方

法により、細胞老化関連遺伝子および生体組織修復関連遺伝子であるｐ２１遺伝子、ｐ５３遺伝子、ＭＭＰ－１遺伝子のｍＲＮＡ発現量をそれぞれ定量ＰＣＲにて測定することにより細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を評価した。各実施例において測定に用いた細胞外小胞溶液、発現量を確認したｍＲＮＡ、結果を示した図の番号を、比較例６－８の条件とあわせて下記表３にそれぞれ示す。定量ＰＣＲの結果を比較例６－８の結果と併せて、図７－９にそれぞれ示す。

[0130] [表3]

	測定に用いた細胞外小胞溶液	発現量を確認したmRNA	結果を示した図
実施例12	実施例2で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、超遠心法、TNFα刺激）」	p21	図7
実施例13	実施例4で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、PS法、TNFα刺激）」	p21	図7
比較例6	比較例2で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、超遠心法）」	p21	図7
実施例14	実施例2で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、超遠心法、TNFα刺激）」	p53	図8
実施例15	実施例4で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、PS法、TNFα刺激）」	p53	図8
比較例7	比較例2で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、超遠心法）」	p53	図8
実施例16	実施例2で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、超遠心法、TNFα刺激）」	MMP-1	図9
実施例17	実施例4で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、PS法、TNFα刺激）」	MMP-1	図9
比較例8	比較例2で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、超遠心法）」	MMP-1	図9
実施例18	実施例5で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、PS法）」	MMP-1	図9

[0131] 比較例６－８．超遠心法で取得した細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性の評価

「細胞外小胞溶液」として比較例２で得られた「細胞外小胞溶液（臍帯由来ＭＳＣ、超遠心法）」を終濃度７．５×１０^{9}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬとなる量用いた以外は、実施例６－１１と同様の方法により、細胞老化関連遺伝子および生体組織修復関連遺伝子であるｐ２１遺伝子、ｐ５３遺伝子、ＭＭＰ－１遺伝子のｍＲＮＡ発現量をそれぞれ定量ＰＣＲにより測定することにより評価した。各比較例において測定に用いた細胞外小胞溶液、発現量を

確認したｍＲＮＡは、上記表３に記載の通りである。定量ＰＣＲの結果を実施例１２－１８の結果と併せて、図７－９にそれぞれ示す。

[0132] 図４－９より、炎症性サイトカインにより刺激を加えた間葉系幹細胞から取得した細胞外小胞やＰＳアフィニティー法により間葉系幹細胞から取得した細胞外小胞は、間葉系幹細胞の種類によらず、超遠心法により間葉系幹細胞から取得した細胞外小胞よりも細胞老化関連遺伝子および生体組織修復関連遺伝子のｍＲＮＡ発現量を抑制した。すなわち、間葉系幹細胞を炎症性サイトカインにより刺激を加えることにより、取得される細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性が高まること、ＰＳ法により間葉系幹細胞から取得した細胞外小胞は超遠心法により間葉系幹細胞から取得した細胞外小胞よりも高い細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を有することが判った。特に、炎症性サイトカインにより刺激を加えた間葉系幹細胞からＰＳ法により取得した細胞外小胞は著しく高い細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を有することが判った。

[0133] 実施例１９－２８および比較例９．間葉系幹細胞からの細胞外小胞の取得

下記表４に記載の条件（間葉系幹細胞、取得方法、刺激）に従った以外は、実施例１－５および比較例１－２と同様の方法により、それぞれ細胞外小胞を取得した。表４中、「骨髄由来ＭＳＣ」は「骨髄由来間葉系幹細胞であるＰｏｉｅｔｉｃｓ™ヒト間葉系幹細胞（ＬＯＮＺＡ社）」、「臍帯由来ＭＳＣ」は「臍帯由来間葉系幹細胞であるＨｕｍａｎ Ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ ｆｒｏｍ Ｕｍｂｉｌｉｃａｌ Ｃｏｒｄ Ｍａｔｒｉｘ（ＰｒｏｍｏＣｅｌｌ社）」、「脂肪由来ＭＳＣ」は「脂肪由来間葉系幹細胞であるＨｕｍａｎ Ａｄｉｐｏｓｅ－Ｄｅｒｉｖｅｄ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ（ＬＯＮＺＡ社）」、「ＰＳ法」はＰＳアフィニティー法、「刺激」は炎症性サイトカインによる刺激をそれぞれ示す。

[0134]

[表4]

	間葉系幹細胞	取得方法	刺激	調製した細胞外小胞溶液の略称
実施例19	骨髄由来MSC	PS法	-	「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、PS法）」
実施例20	脂肪由来MSC	PS法	-	「細胞外小胞溶液（脂肪由来MSC、PS法）」
比較例9	脂肪由来MSC	超遠心法	-	「細胞外小胞溶液（脂肪由来MSC、超遠心法）」
実施例21	骨髄由来MSC	超遠心法	TNFα（1ng/mL）	「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、超遠心法、TNFα刺激）」
実施例22	臍帯由来MSC	超遠心法	TNFα（20ng/mL）	「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、超遠心法、TNFα刺激）」
実施例23	骨髄由来MSC	超遠心法	IL-1β（1ng/mL）	「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、超遠心法、IL-1β刺激）」
実施例24	臍帯由来MSC	超遠心法	IL-1β（1ng/mL）	「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、超遠心法、IL-1β刺激）」
実施例25	骨髄由来MSC	PS法	TNFα（1ng/mL）	「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、PS法、TNFα刺激）」
実施例26	臍帯由来MSC	PS法	TNFα（20ng/mL）	「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、PS法、TNFα刺激）」
実施例27	骨髄由来MSC	PS法	IL-1β（1ng/mL）	「細胞外小胞溶液（骨髄由来MSC、PS法、IL-1β刺激）」
実施例28	臍帯由来MSC	PS法	IL-1β（1ng/mL）	「細胞外小胞溶液（臍帯由来MSC、PS法、IL-1β刺激）」

[0135] 実施例２９－６９および比較例１０－２６．細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性の評価

実施例１９－２８および比較例９で得られた細胞外小胞溶液を用いて、細胞老化関連遺伝子および生体組織修復関連遺伝子であるｐ１６遺伝子、ｐ２１遺伝子、ＭＭＰ－１遺伝子、Ｉ型Ｃｏｌｌａｇｅｎ遺伝子（ＣＯＬ１Ａ１遺伝子）、ＩＩＩ型Ｃｏｌｌａｇｅｎ遺伝子（ＣＯＬ３Ａ１遺伝子）、ＨＡＳ１遺伝子のｍＲＮＡ発現量をそれぞれ定量ＰＣＲにより測定することにより細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を評価した。具体的には、以下の方法により実施した。１０％ＦＢＳ（Ｂｉｏｓｅｒａ社）含有ＤＭＥＭ（富士フイルム和光純薬（株））にヒト皮膚由来線維芽細胞であるＴＩＧ３Ｓ細胞（ＪＣＲＢより分譲、５０回以上分裂後のもの）を懸濁し、９６ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅ（Ｃｏｒｎｉｎｇ社）に１ウェルあたり細胞数３×１０^{3}、培地量１００μＬでそれぞれ播種した。細胞播種から１６時間後、下記表５及び６に記載の「細胞外小胞溶液」を終濃度２×１０^{8}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬとなる量それぞれのウェルに添加し、９６時間培養した

。その後、ＰｕｒｅＬｉｎｋ™ ＲＮＡ Ｍｉｎｉ キット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）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ＲＮＡをそれぞれ抽出した。抽出したＲＮＡ５０ｎｇから、ＲｅｖｅｒＴｒａ Ａｃｅ™ ｑＰＣＲ ＲＴ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ ｗｉｔｈ ｇＤＮＡ Ｒｅｍｏｖｅｒ（東洋紡（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ｃＤＮＡを合成した。合成したｃＤＮＡを用いて、ＫＯＤ ＳＹＢＲ ｑＰＣＲ Ｍｉｘ （東洋紡（株））により、細胞老化関連遺伝子および生体組織修復関連遺伝子であるｐ１６遺伝子、ｐ２１遺伝子、ＭＭＰ－１遺伝子、Ｉ型Ｃｏｌｌａｇｅｎ遺伝子（ＣＯＬ１Ａ１遺伝子）、ＩＩＩ型Ｃｏｌｌａｇｅｎ遺伝子（ＣＯＬ３Ａ１遺伝子）、ＨＡＳ１遺伝子および内部標準であるＧＡＰＤＨのｍＲＮＡ発現量を、それぞれ定量ＰＣＲにより測定した。図１０に使用したプライマーの配列を示す。図１１はｐ１６遺伝子のｍＲＮＡ発現量、図１２はｐ２１遺伝子のｍＲＮＡ発現量、図１３はＭＭＰ－１遺伝子のｍＲＮＡ発現量、図１４はＩ型Ｃｏｌｌａｇｅｎ遺伝子のｍＲＮＡ発現量、図１５はＩＩＩ型Ｃｏｌｌａｇｅｎ遺伝子のｍＲＮＡ発現量、図１６はＨＡＳ１遺伝子のｍＲＮＡ発現量の結果である。各遺伝子の発現量は、各遺伝子に対するプライマーを用いて行ったｑＰＣＲから得られた数値をＧＡＰＤＨに対してノーマライズし、コントロールに対する相対値（△△ｃｔ値）として示し、各図の縦軸とした。図中、横軸の「精製方法（－） 細胞外小胞（－）」は、細胞外小胞非添加のＴＩＧ３Ｓ細胞（コントロール）を用いた場合の結果、「精製方法」の「ＵＣ」は超遠心法、「ＰＳ」はＰＳアフィニティー法、「細胞外小胞」の「ＭＳＣ」は炎症性サイトカインによる刺激なし、「ＭＳＣ ＴＮＦα」はＴＮＦαによる刺激あり、「ＭＳＣ ＩＬ－１β」はＩＬ－１βによる刺激ありをそれぞれ示す。各実施例及び比較例において発現量を確認したｍＲＮＡ、及び結果を示した図の番号を下記表５及び表６にそれぞれ示す。

[0136]

[表5]

	測定に用いた細胞外小胞溶液	発現量を確認したmRNA	結果を示した図
比較例10	比較例1で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、超遠心法)」	p16	図11(A)
実施例29	実施例19で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、PS法)」	p16	図11(A)
比較例11	比較例9で得られた「細胞外小胞溶液(脂肪由来MSC、超遠心法)」	p16	図11(B)
実施例30	実施例20で得られた「細胞外小胞溶液(脂肪由来MSC、PS法)」	p16	図11(B)
比較例12	比較例1で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、超遠心法)」	p21	図12(A)
実施例31	実施例19で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、PS法)」	p21	図12(A)
実施例32	実施例25で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、PS法、TNFα刺激)」	p21	図12(A)
比較例13	比較例2で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、超遠心法)」	p21	図12(B)
実施例33	実施例5で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、PS法)」	p21	図12(B)
実施例34	実施例22で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、超遠心法、TNFα刺激)」	p21	図12(B)
実施例35	実施例26で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、PS法、TNFα刺激)」	p21	図12(B)
実施例36	実施例24で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、超遠心法、IL-1β刺激)」	p21	図12(B)
実施例37	実施例28で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、PS法、IL-1β刺激)」	p21	図12(B)
比較例14	比較例9で得られた「細胞外小胞溶液(脂肪由来MSC、超遠心法)」	p21	図12(C)
実施例38	実施例20で得られた「細胞外小胞溶液(脂肪由来MSC、PS法)」	p21	図12(C)
比較例15	比較例1で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、超遠心法)」	MMP-1	図13(A)
実施例39	実施例19で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、PS法)」	MMP-1	図13(A)
実施例40	実施例21で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、超遠心法、TNFα刺激)」	MMP-1	図13(A)
実施例41	実施例25で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、PS法、TNFα刺激)」	MMP-1	図13(A)
実施例42	実施例23で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、超遠心法、IL-1β刺激)」	MMP-1	図13(A)
実施例43	実施例27で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、PS法、IL-1β刺激)」	MMP-1	図13(A)
比較例16	比較例2で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、超遠心法)」	MMP-1	図13(B)
実施例44	実施例5で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、PS法)」	MMP-1	図13(B)
実施例45	実施例22で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、超遠心法、TNFα刺激)」	MMP-1	図13(B)
実施例46	実施例26で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、PS法、TNFα刺激)」	MMP-1	図13(B)
実施例47	実施例24で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、超遠心法、IL-1β刺激)」	MMP-1	図13(B)
実施例48	実施例28で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、PS法、IL-1β刺激)」	MMP-1	図13(B)
比較例17	比較例9で得られた「細胞外小胞溶液(脂肪由来MSC、超遠心法)」	MMP-1	図13(C)
実施例49	実施例20で得られた「細胞外小胞溶液(脂肪由来MSC、PS法)」	MMP-1	図13(C)

[0137] [表6]

	測定に用いた細胞外小胞溶液	発現量を確認したmRNA	結果を示した図
比較例18	比較例1で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、超遠心法)」	I型 Collagen	図14(A)
実施例50	実施例19で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、PS法)」	I型 Collagen	図14(A)
実施例51	実施例21で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、超遠心法、TNFα刺激)」	I型 Collagen	図14(A)
実施例52	実施例25で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、PS法、TNFα刺激)」	I型 Collagen	図14(A)
実施例53	実施例23で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、超遠心法、IL-1β刺激)」	I型 Collagen	図14(A)
実施例54	実施例27で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、PS法、IL-1β刺激)」	I型 Collagen	図14(A)
比較例19	比較例2で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、超遠心法)」	I型 Collagen	図14(B)
実施例55	実施例5で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、PS法)」	I型 Collagen	図14(B)
実施例56	実施例26で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、PS法、TNFα刺激)」	I型 Collagen	図14(B)
実施例57	実施例28で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、PS法、IL-1β刺激)」	I型 Collagen	図14(B)
比較例20	比較例9で得られた「細胞外小胞溶液(脂肪由来MSC、超遠心法)」	I型 Collagen	図14(C)
実施例58	実施例20で得られた「細胞外小胞溶液(脂肪由来MSC、PS法)」	I型 Collagen	図14(C)
比較例21	比較例1で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、超遠心法)」	III型 Collagen	図15(A)
実施例59	実施例19で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、PS法)」	III型 Collagen	図15(A)
実施例60	実施例25で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、PS法、TNFα刺激)」	III型 Collagen	図15(A)
実施例61	実施例27で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、PS法、IL-1β刺激)」	III型 Collagen	図15(A)
比較例22	比較例2で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、超遠心法)」	III型 Collagen	図15(B)
実施例61	実施例5で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、PS法)」	III型 Collagen	図15(B)
実施例62	実施例26で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、PS法、TNFα刺激)」	III型 Collagen	図15(B)
実施例63	実施例28で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、PS法、IL-1β刺激)」	III型 Collagen	図15(B)
比較例23	比較例9で得られた「細胞外小胞溶液(脂肪由来MSC、超遠心法)」	III型 Collagen	図15(C)
実施例64	実施例20で得られた「細胞外小胞溶液(脂肪由来MSC、PS法)」	III型 Collagen	図15(C)
比較例24	比較例1で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、超遠心法)」	HAS1	図16(A)
実施例65	実施例19で得られた「細胞外小胞溶液(骨髄由来MSC、PS法)」	HAS1	図16(A)
比較例25	比較例2で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、超遠心法)」	HAS1	図16(B)
実施例66	実施例5で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、PS法)」	HAS1	図16(B)
実施例67	実施例26で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、PS法、TNFα刺激)」	HAS1	図16(B)
実施例68	実施例28で得られた「細胞外小胞溶液(臍帯由来MSC、PS法、IL-1β刺激)」	HAS1	図16(B)
比較例26	比較例9で得られた「細胞外小胞溶液(脂肪由来MSC、超遠心法)」	HAS1	図16(C)
実施例69	実施例20で得られた「細胞外小胞溶液(脂肪由来MSC、PS法)」	HAS1	図16(C)

[0138] 図１１－１４より、炎症性サイトカインにより刺激を加えた間葉系幹細胞から取得した細胞外小胞やＰＳアフィニティー法により間葉系幹細胞から取得した細胞外小胞は、間葉系幹細胞の種類によらず、超遠心法により間葉系幹細胞から取得した細胞外小胞よりも細胞老化関連遺伝子および生体組織修

復関連遺伝子のｍＲＮＡ発現量を抑制した。すなわち、間葉系幹細胞を炎症性サイトカインにより刺激を加えることにより、取得される細胞外小胞の細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性が高まること、ＰＳ法により間葉系幹細胞から取得した細胞外小胞は超遠心法により間葉系幹細胞から取得した細胞外小胞よりも高い細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を有することが判った。特に、炎症性サイトカインにより刺激を加えた間葉系幹細胞からＰＳ法により取得した細胞外小胞は著しく高い細胞老化抑制活性および生体組織修復促進活性を有することが判った。

産業上の利用可能性

[0139] 本発明により間葉系幹細胞から細胞老化抑制作用を有する細胞外小胞を有効成分とする細胞老化抑制剤、生体組織修復促進剤、遺伝子発現調節剤、及び皮膚外用組成物が提供される。本発明が提供する細胞老化抑制剤及び皮膚外用組成物は、細胞老化関連遺伝子および生体組織修復関連遺伝子の遺伝子発現を調節し、細胞増殖促進作用、コラーゲンの産生促進若しくは分解抑制作用、ヒアルロン酸の産生促進若しくは分解抑制作用、エラスチンの産生促進若しくは分解抑制作用等により細胞老化が抑制される点で産業上の利用性は多大なものである。また、本発明が提供する遺伝子発現調節剤は、細胞増殖抑制遺伝子、コラーゲン遺伝子、コラーゲン分解酵素遺伝子、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子、ヒアルロン酸分解酵素遺伝子、エラスチン遺伝子、エラスチン分解酵素遺伝子から選ばれる少なくとも１種の遺伝子発現が調節される。本発明が提供する生体組織修復促進剤は、細胞増殖促進作用、コラーゲンの産生促進若しくは分解抑制作用、ヒアルロン酸の産生促進若しくは分解抑制作用、エラスチンの産生促進若しくは分解抑制作用等により、例えば機能障害や機能不全に陥った細胞や生体組織、臓器の機能再生を図ることができる。

請求の範囲

[請求項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、細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤であって、
細胞外小胞が炎症性サイトカイン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、又は／及び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、細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤。

[請求項2] 前記間葉系幹細胞が、ｉＰＳ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、歯髄、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に記載の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤。

[請求項3] 前記間葉系幹細胞が、腫瘍壊死因子α、インターロイキン１、インターロイキン６、インターロイキン８、インターロイキン１２、インターロイキン１８及びインターフェロンγから選ばれる少なくとも１種の炎症性サイトカインにより刺激を加えたものである、請求項１に記載の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤。

[請求項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、請求１に記載の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤。

[請求項5] 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が、Ｔｉｍタンパク質である、請求項１に記載の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤。

[請求項6] 前記Ｔｉｍタンパク質が、Ｔｉｍ４タンパク質、Ｔｉｍ３タンパク質及びＴｉｍ１タンパク質から選択されるものである、請求項５に記載の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤。

[請求項7] 前記細胞外小胞が、炎症性サイトカイン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、請求項

１に記載の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤。

[請求項8] 前記細胞老化抑制又は生体組織修復促進が、細胞増殖促進作用、コラーゲンの産生促進若しくは分解抑制作用、ヒアルロン酸の産生促進若しくは分解抑制作用、及びエラスチンの産生促進若しくは分解抑制作用から選ばれる少なくとも１種の作用によるものである、請求項１に記載の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤。

[請求項9] 炎症性サイトカイン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、又は／及び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、細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用を有する細胞外小胞の製造方法。

[請求項10] 前記間葉系幹細胞が、ｉＰＳ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、歯髄、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９に記載の細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用を有する細胞外小胞の製造方法。

[請求項11] 前記間葉系幹細胞が、腫瘍壊死因子α、インターロイキン１、インターロイキン６、インターロイキン８、インターロイキン１２、インターロイキン１８及びインターフェロンγから選ばれる少なくとも１種の炎症性サイトカインにより刺激を加えたものである、請求項９に記載の細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用を有する細胞外小胞の製造方法。

[請求項12] 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、請求項９に記載の細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用を有する細胞外小胞の製造方法。

[請求項13] 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が、Ｔｉｍタンパク質である、請求項９に記載の細胞老化抑制作用又は生体組織

修復促進作用を有する細胞外小胞の製造方法。

[請求項14] 前記Ｔｉｍタンパク質が、Ｔｉｍ４タンパク質、Ｔｉｍ３タンパク質及びＴｉｍ１タンパク質から選択されるものである、請求項１３に記載の細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用を有する細胞外小胞の製造方法。

[請求項15] 前記細胞外小胞が、炎症性サイトカイン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、請求項９に記載の細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用を有する細胞外小胞の製造方法。

[請求項16] 前記細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用が、細胞増殖促進作用、コラーゲンの産生促進若しくは分解抑制作用、ヒアルロン酸の産生促進若しくは分解抑制作用、及びエラスチンの産生促進若しくは分解抑制作用から選ばれる少なくとも１種の作用によるものである、請求項９に記載の細胞老化抑制作用又は生体組織修復促進作用を有する細胞外小胞の製造方法。

[請求項17] 間葉系幹細胞に由来する細胞外小胞を有効成分とする、遺伝子発現調節剤であって、

細胞外小胞が、炎症性サイトカイン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、又は／及び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り、且つ

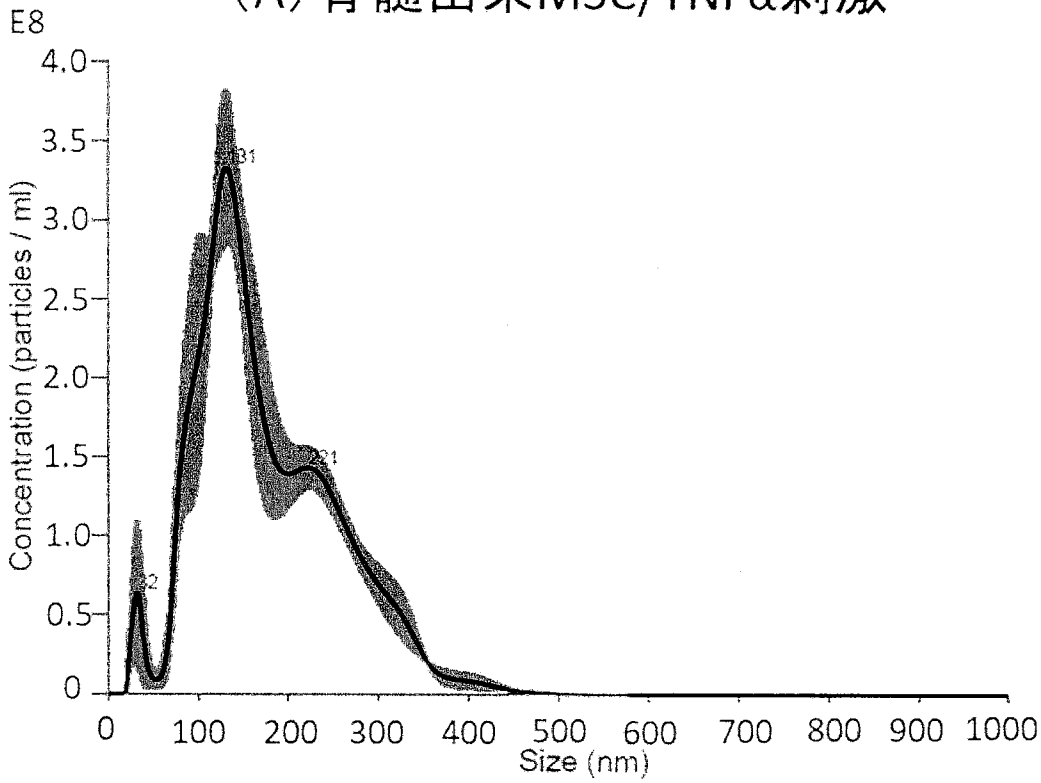
遺伝子が、細胞増殖抑制遺伝子、コラーゲン遺伝子、コラーゲン分解酵素遺伝子、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子、ヒアルロン酸分解酵素遺伝子、エラスチン遺伝子、及びエラスチン分解酵素遺伝子から選ばれる少なくとも１種の遺伝子である、遺伝子発現調節剤。

[請求項18] 請求項１～請求項８のいずれか１項に記載の細胞老化抑制剤又は生体組織修復促進剤を含有する細胞老化抑制用又は生体組織修復促進用

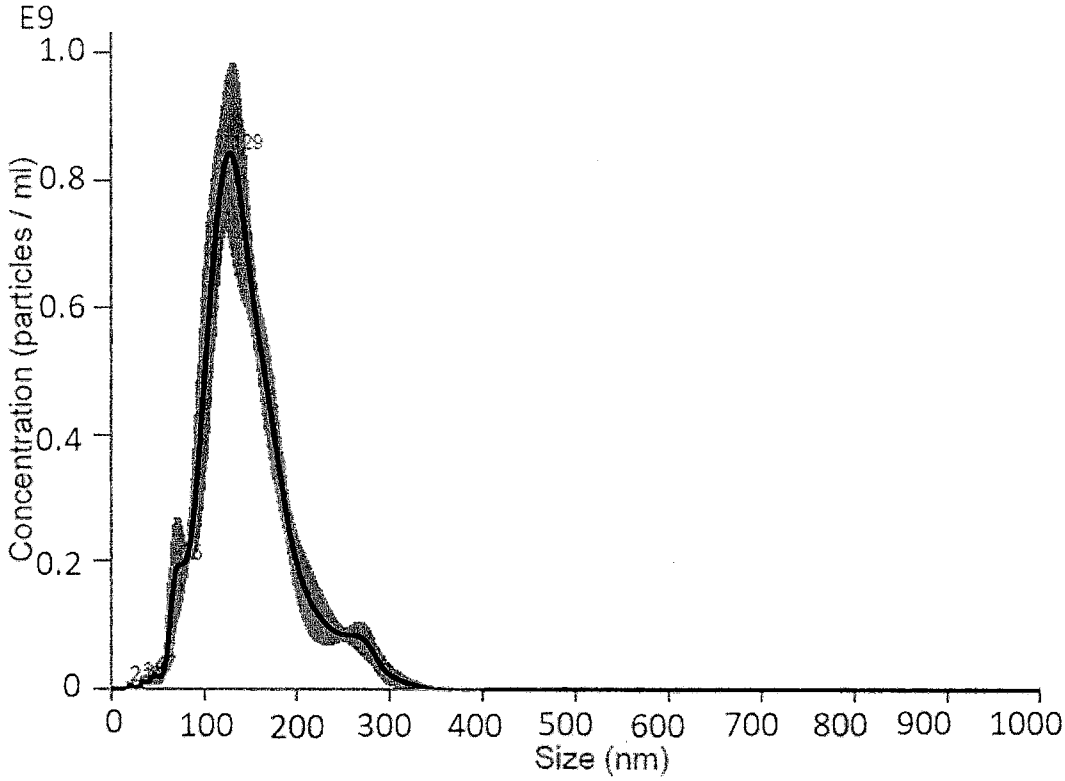
皮膚外用組成物。

【図１】

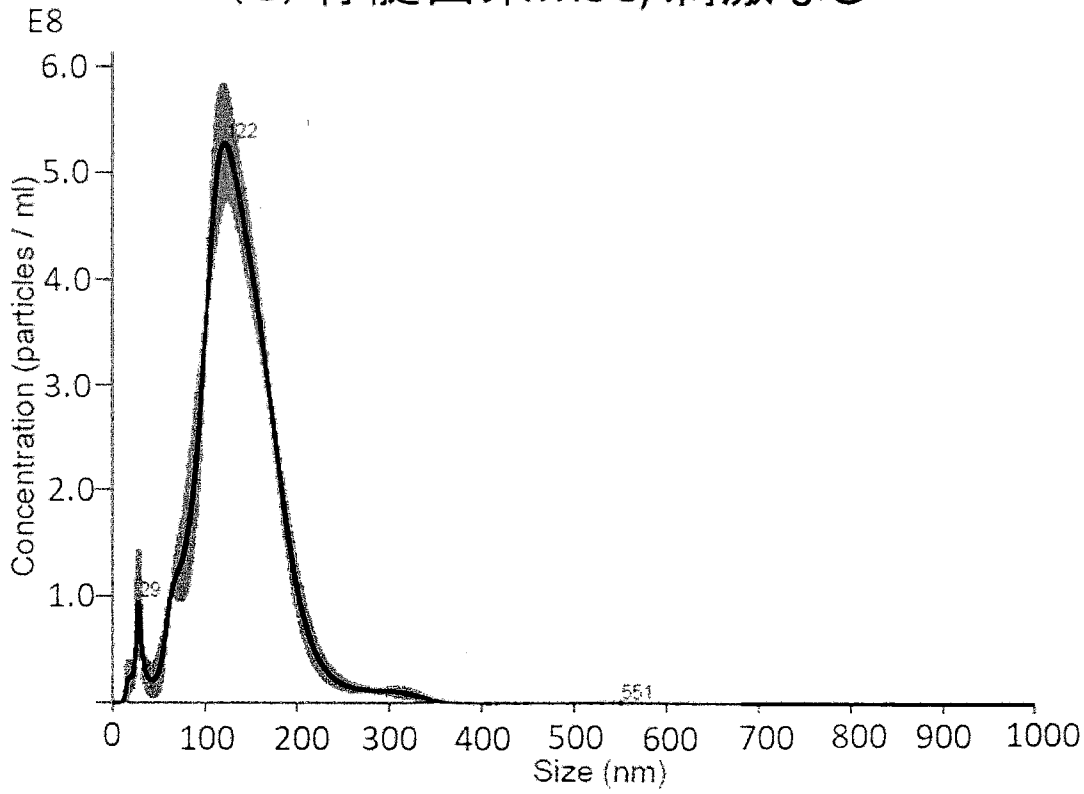
（A）骨髄由来MSC/TNFα刺激



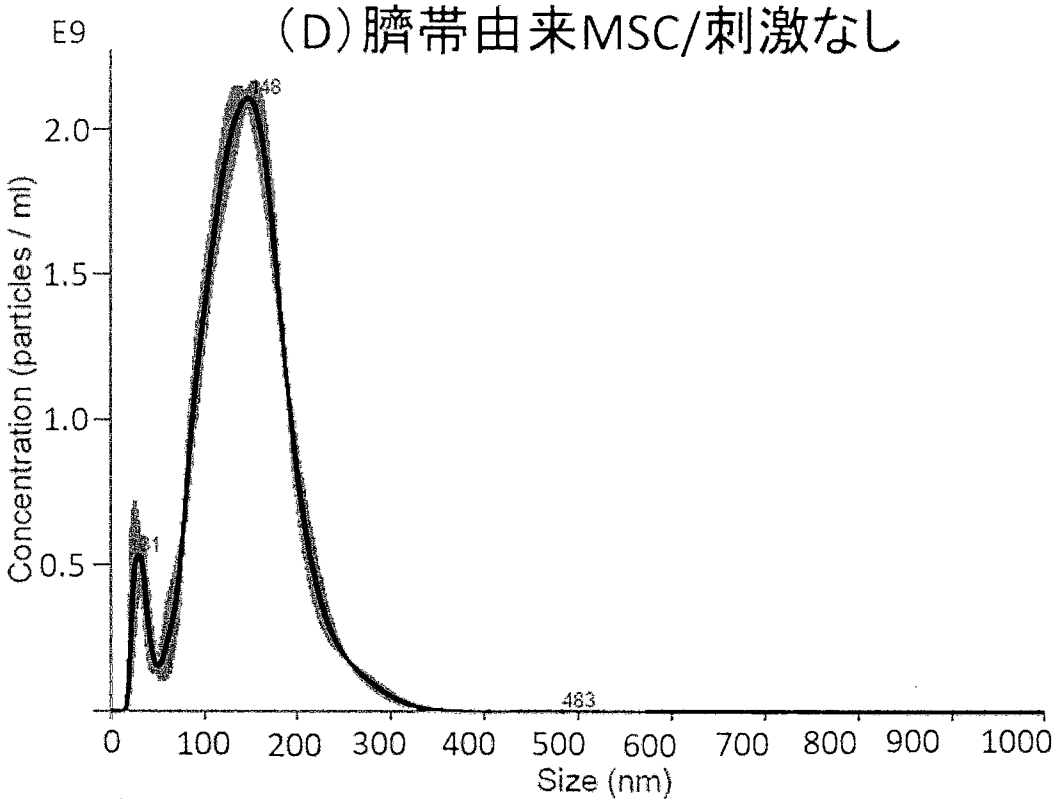
（B）臍帯由来MSC/TNFα刺激



（C）骨髄由来MSC/刺激なし

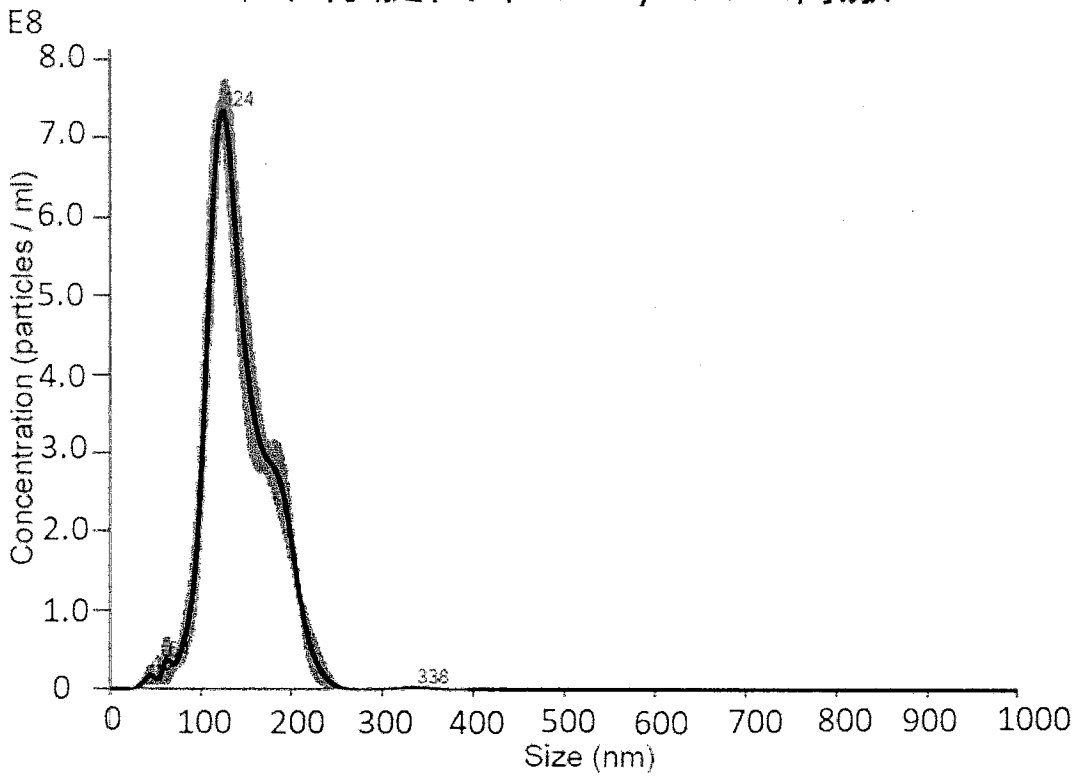


（D）臍帯由来MSC/刺激なし

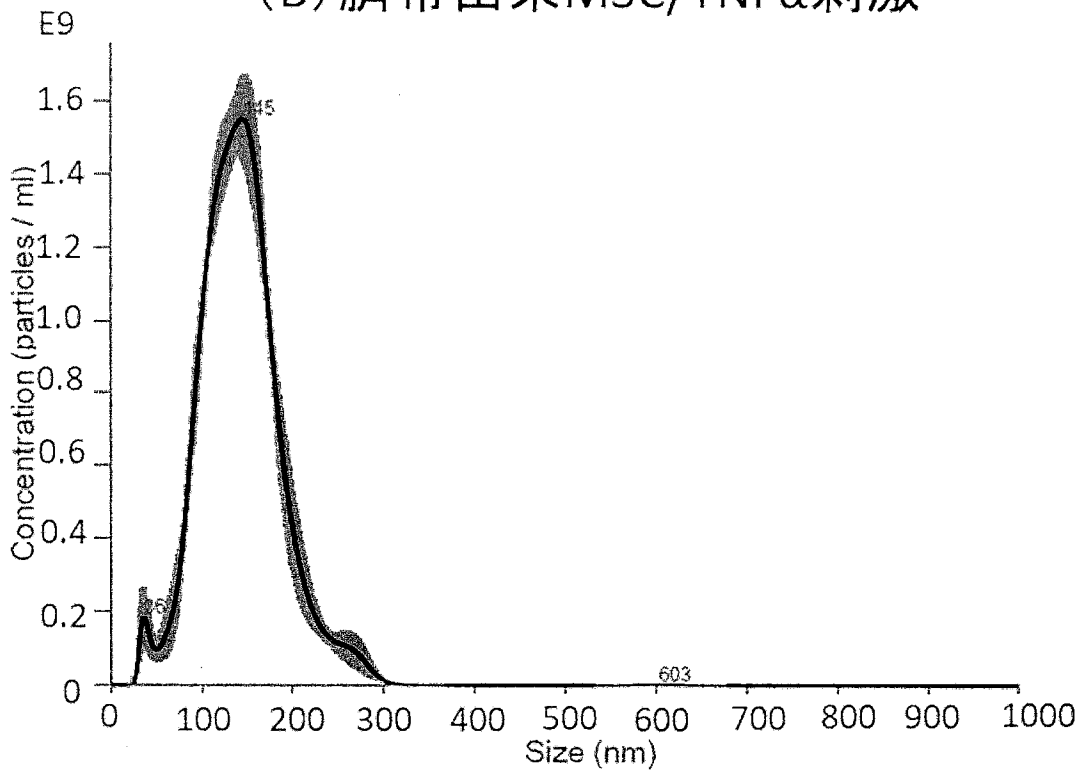


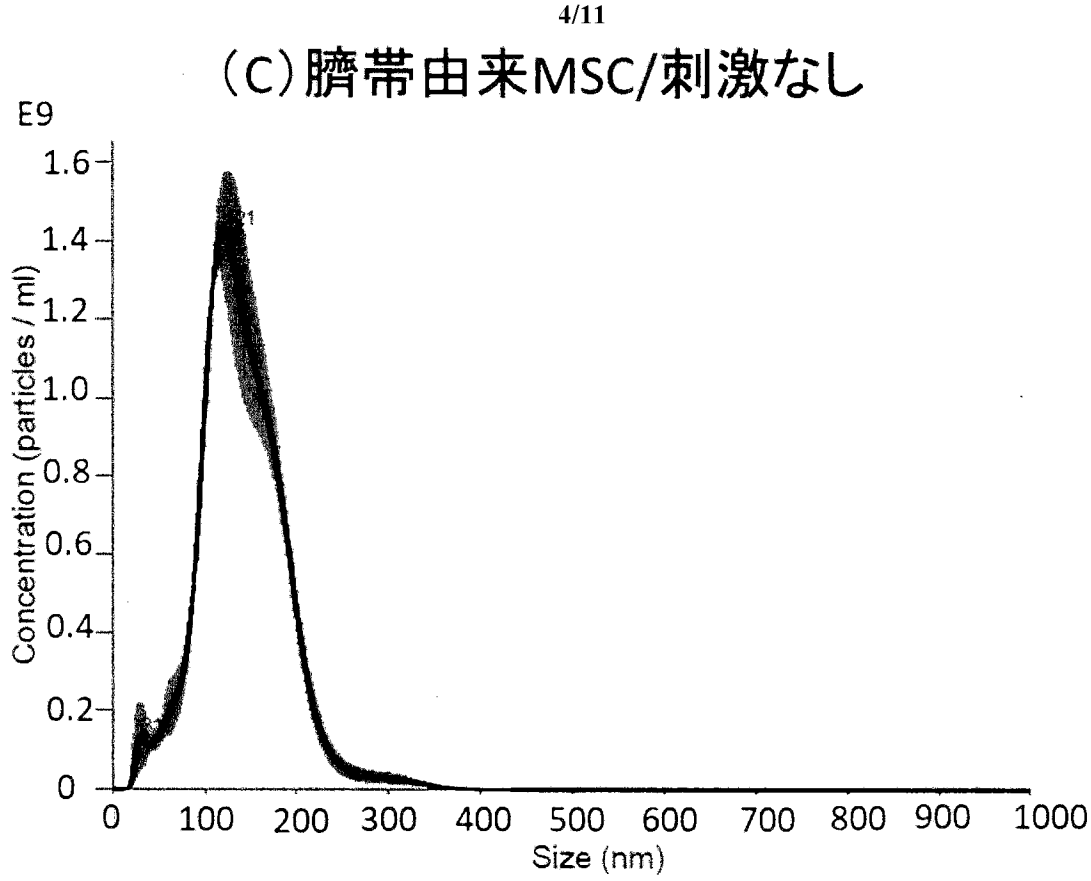
【図２】

（A）骨髄由来MSC/TNFα刺激



（B）臍帯由来MSC/TNFα刺激

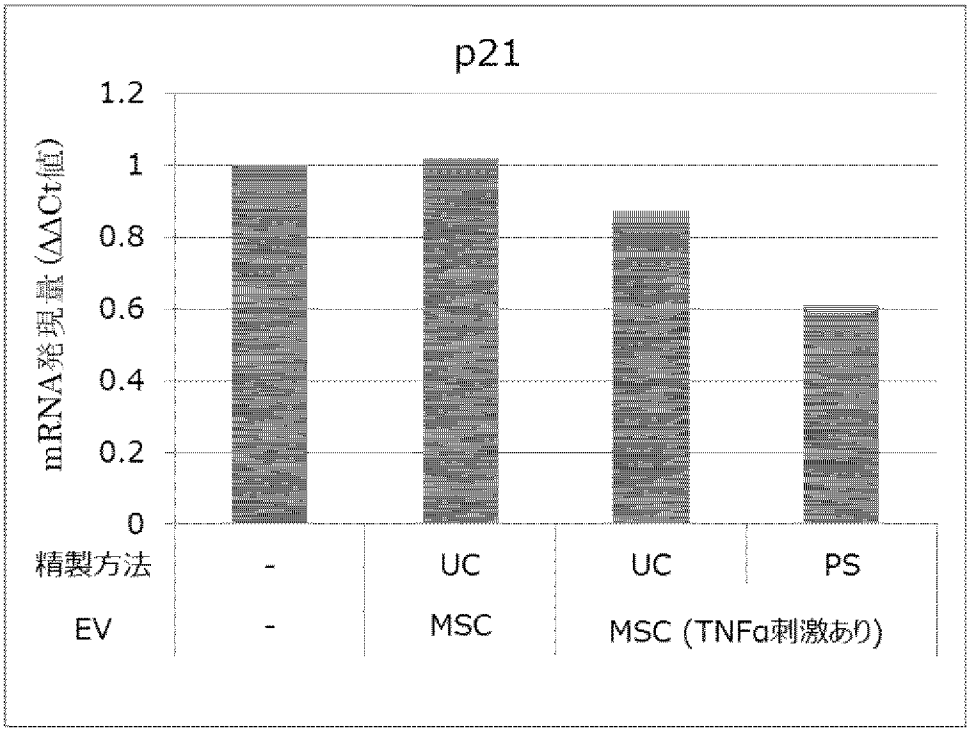



(C)臍帯由来MSC/刺激なし
E9
Concentration (particles / ml)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
Size (nm)

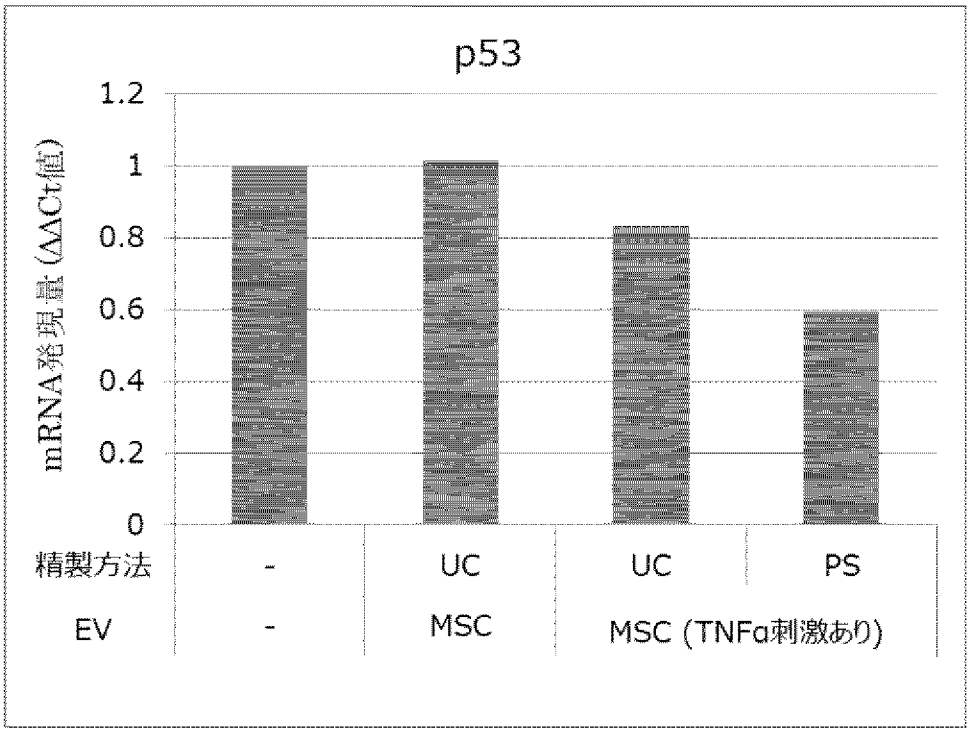
[図3]

	Forward	Reverse
p21	gacaccactggagggtgact	caggtccacatggtcttcct
p53	gcccaacaacaccagctcct	cctgggcatccttgagttcc
MMP-I	catcgtgttgcagctcatga	atgggctggacaggattttg

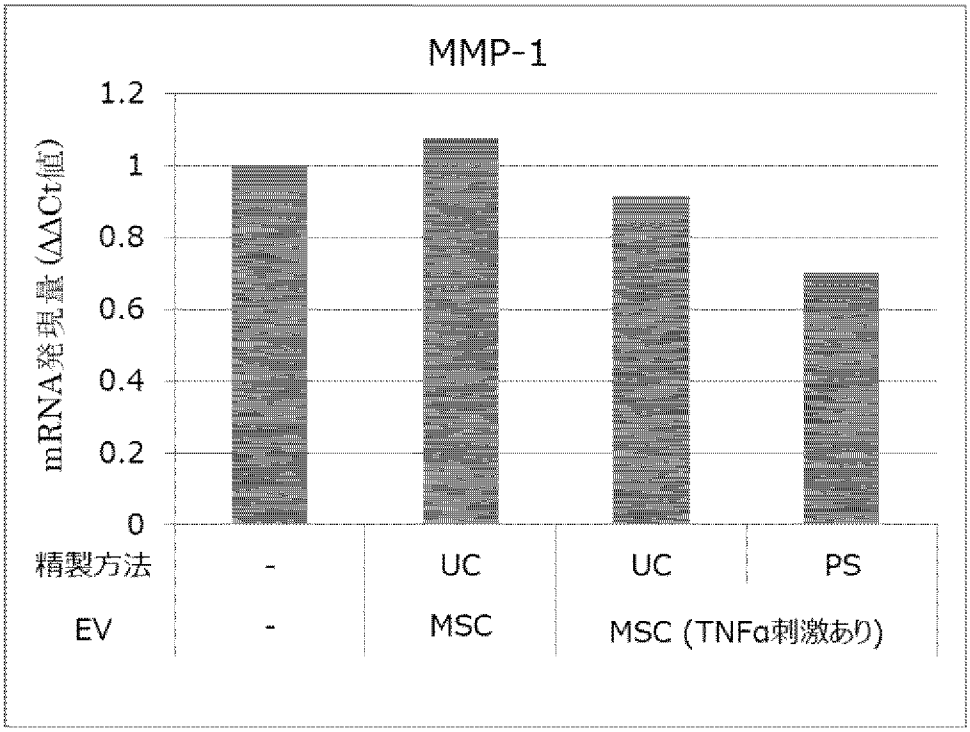
[図4]



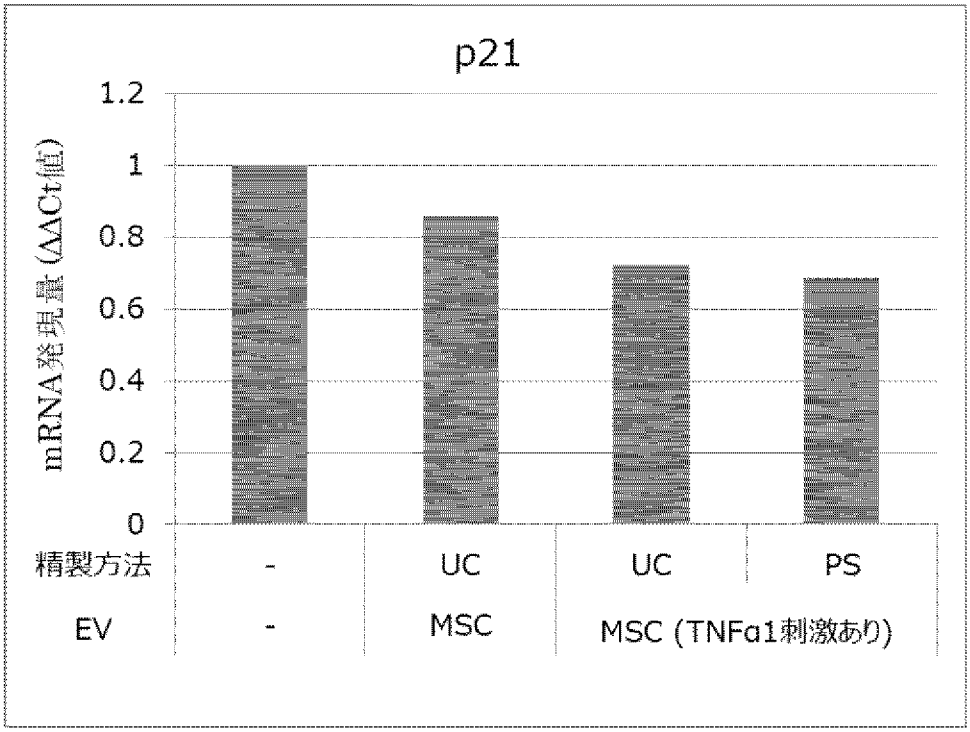
[図5]



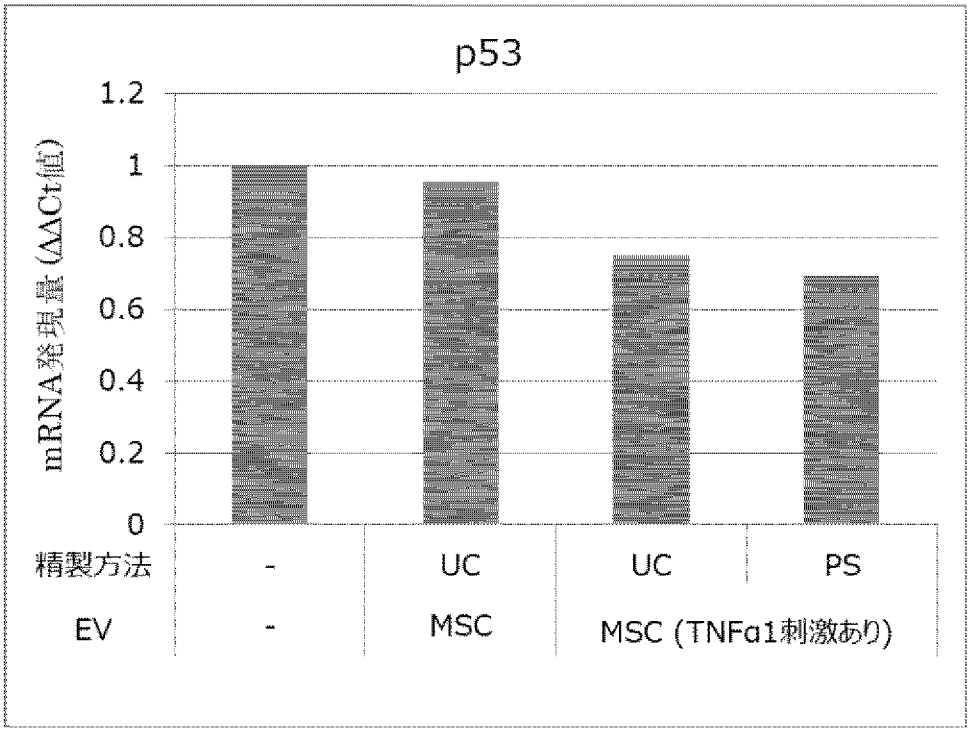
[図6]


MMP-1
mRNA発現量 (ΔΔCt値)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
精製方法
-
UC
UC
PS
EV
-
MSC
MSC (TNFα刺激あり)

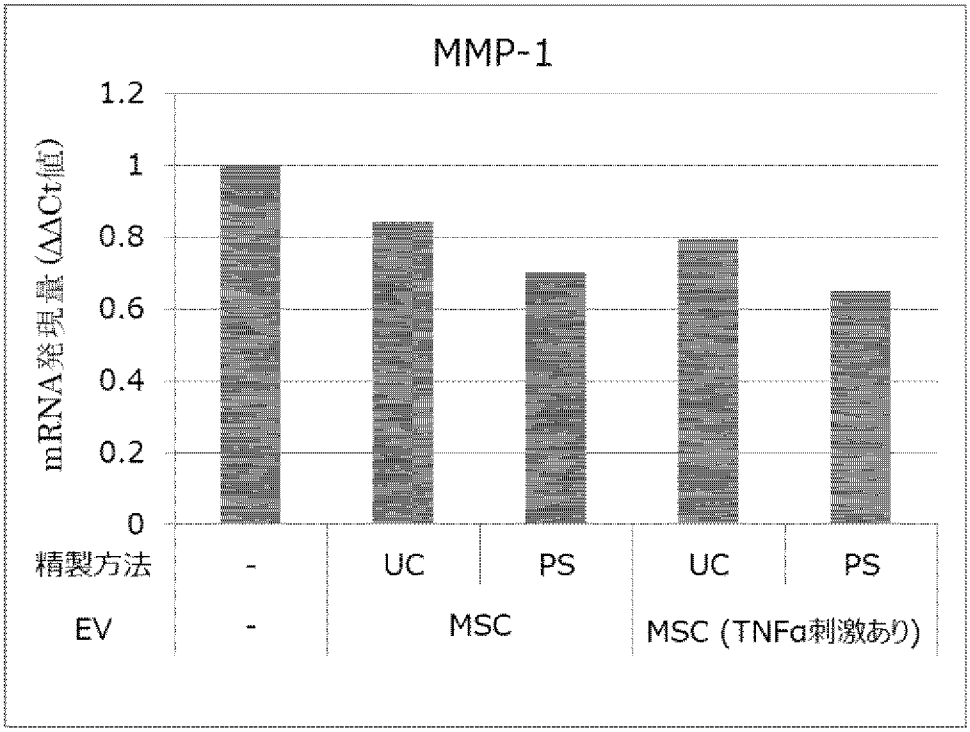
[図7]


p21
mRNA発現量 (ΔΔCt値)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
精製方法
-
UC
UC
PS
EV
-
MSC
MSC (TNFα1刺激あり)

[図8]


p53
mRNA発現量 (ΔΔCt値)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
精製方法
-
UC
UC
PS
EV
-
MSC
MSC (TNFa1刺激あり)

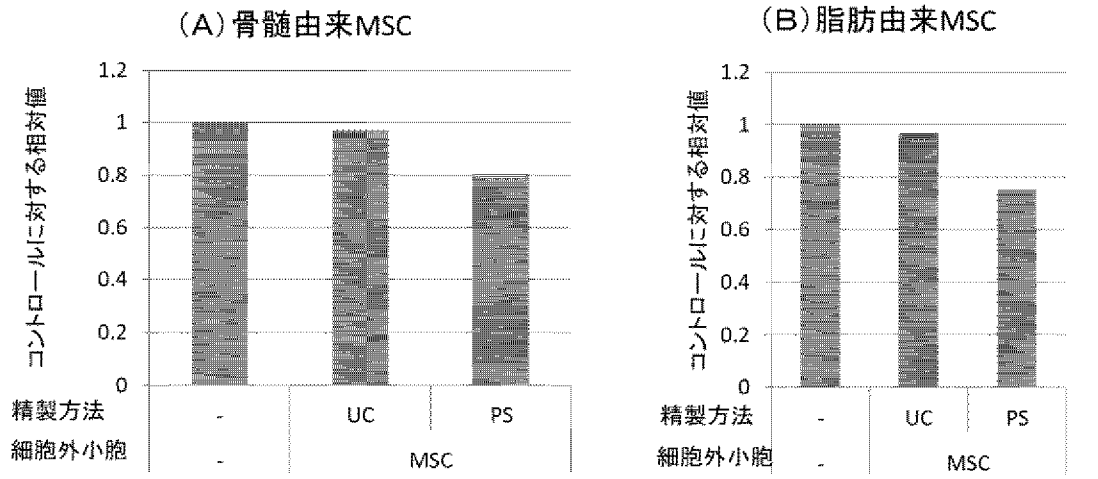
[図9]


MMP-1
mRNA発現量 (ΔΔCt値)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
精製方法
-
UC
PS
UC
PS
EV
-
MSC
MSC (TNFa刺激あり)

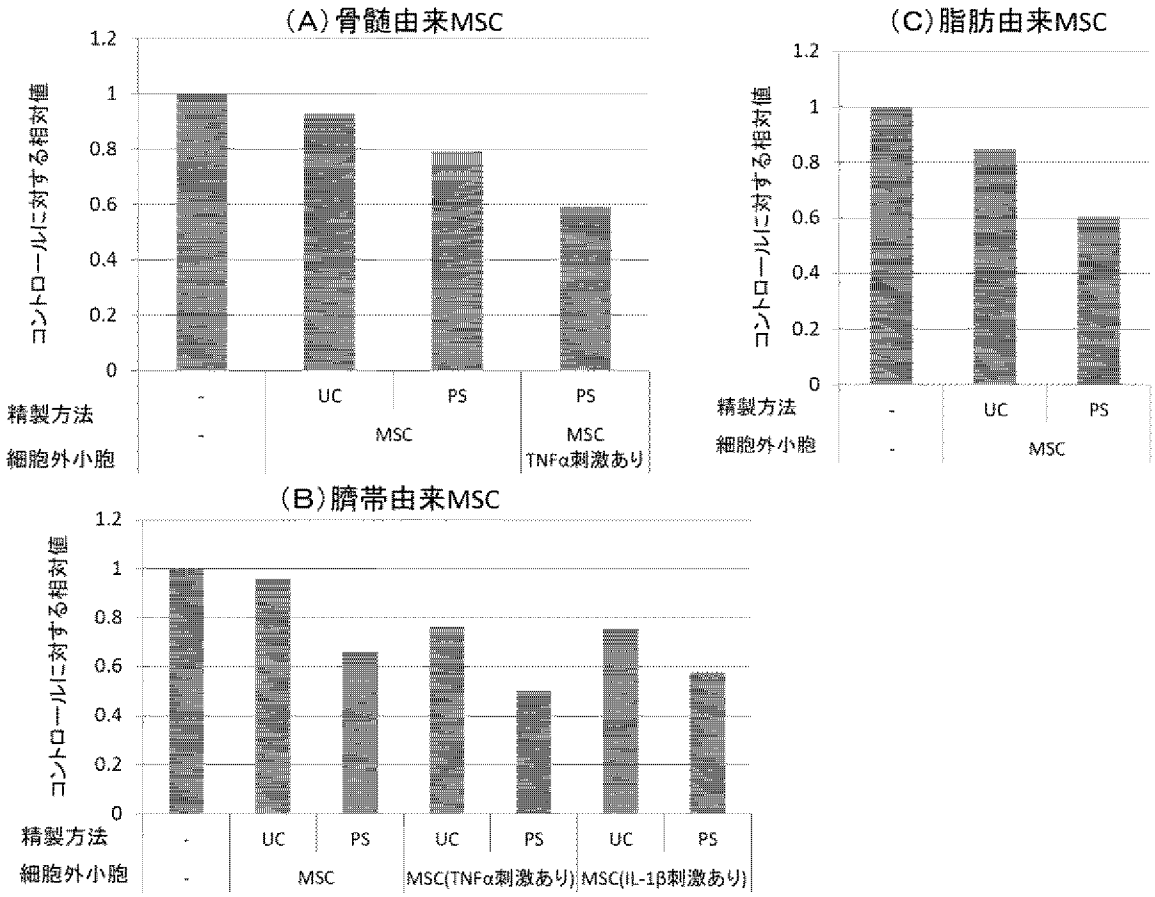
[図10]

遺伝子	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	cctctgacttcaacagcgac	cgttgtcataccaggaaatgag
p21	gacaccactggagggtgact	caggtccacatggtcttcct
p53	gcccaacaacaccagctcct	cctgggcatccttgagttcc
p16	tggacctggctgaggagctg	cctgtaggaccttcggtgac
MMP-I	catcgtgttgcagctcatga	atgggctggacaggattttg
HAS I	cttcaaggcgctcggagat	gttaaggatccgcacgtccc
I型 Collagen	cctgggcatccttgagttcc	acgtcgaagccgaattcct
III型 Collagen	attgctgggatcactggagcac	cctggtttcccactttcacccttg

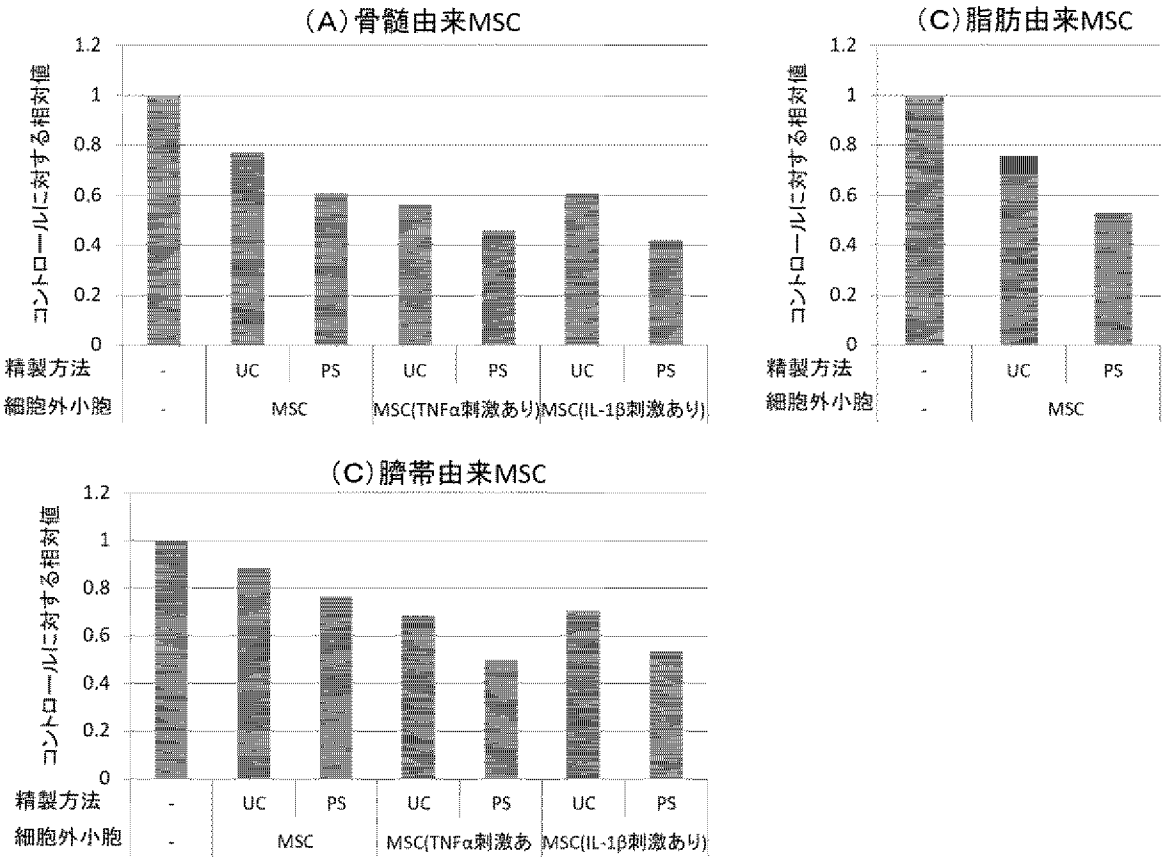
[図11]



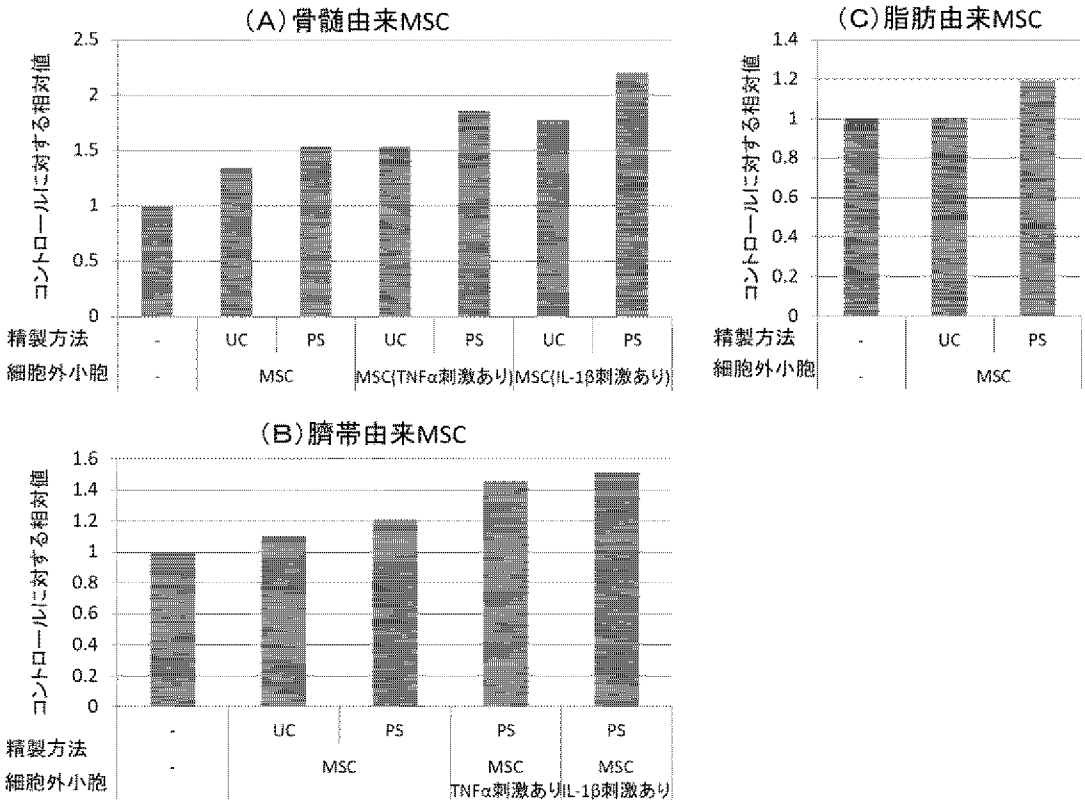
[図12]


(A)骨髄由来MSC
コントロールに対する相対値
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
精製方法
細胞外小胞
-
UC
PS
PS
MSC
MSC
TNFα刺激あり
(C)脂肪由来MSC
コントロールに対する相対値
精製方法
細胞外小胞
MSC
(B)臍帯由来MSC
コントロールに対する相対値
精製方法
細胞外小胞
MSC
MSC(TNFα刺激あり)
MSC(IL-1β刺激あり)

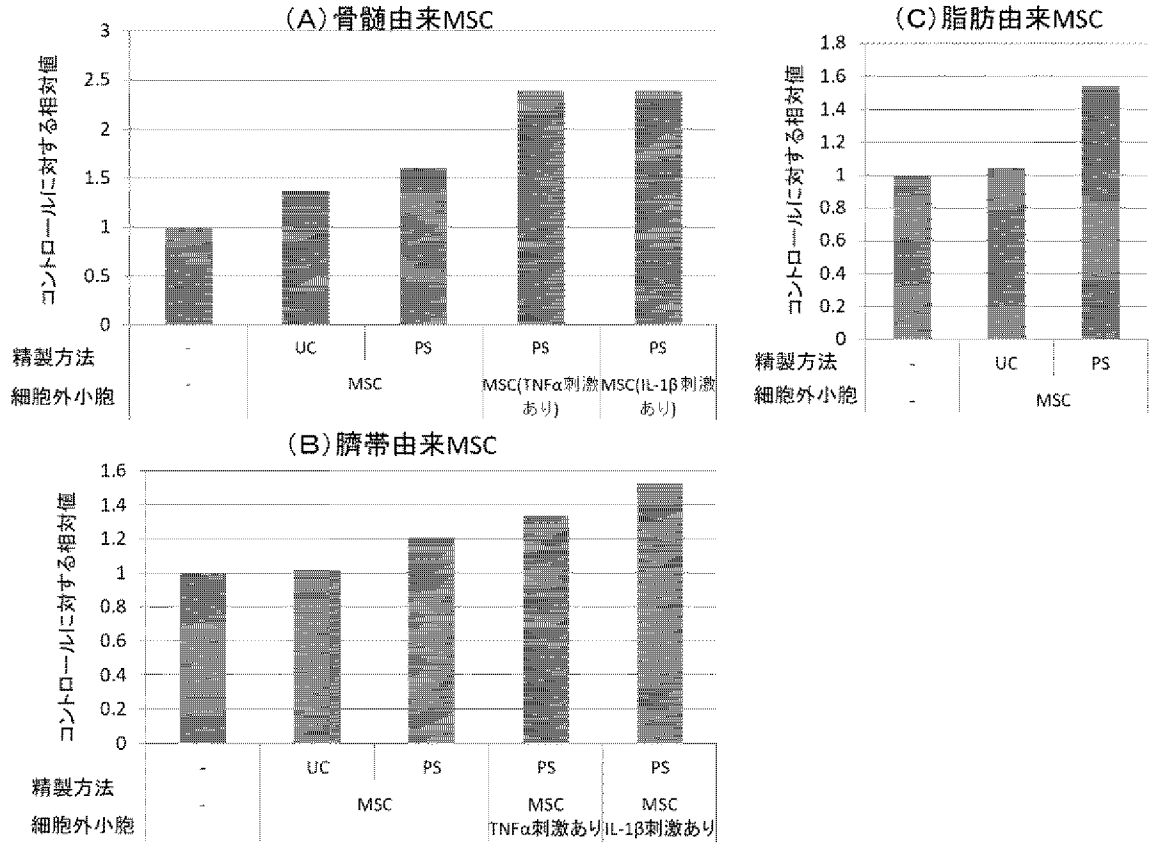
[図13]


(A)骨髄由来MSC
コントロールに対する相対値
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
精製方法
細胞外小胞
-
UC
PS
MSC
MSC(TNFα刺激あり)
MSC(IL-1β刺激あり)
(C)脂肪由来MSC
コントロールに対する相対値
精製方法
細胞外小胞
MSC
(C)臍帯由来MSC
コントロールに対する相対値
精製方法
細胞外小胞
MSC
MSC(TNFα刺激あ
MSC(IL-1β刺激あり)

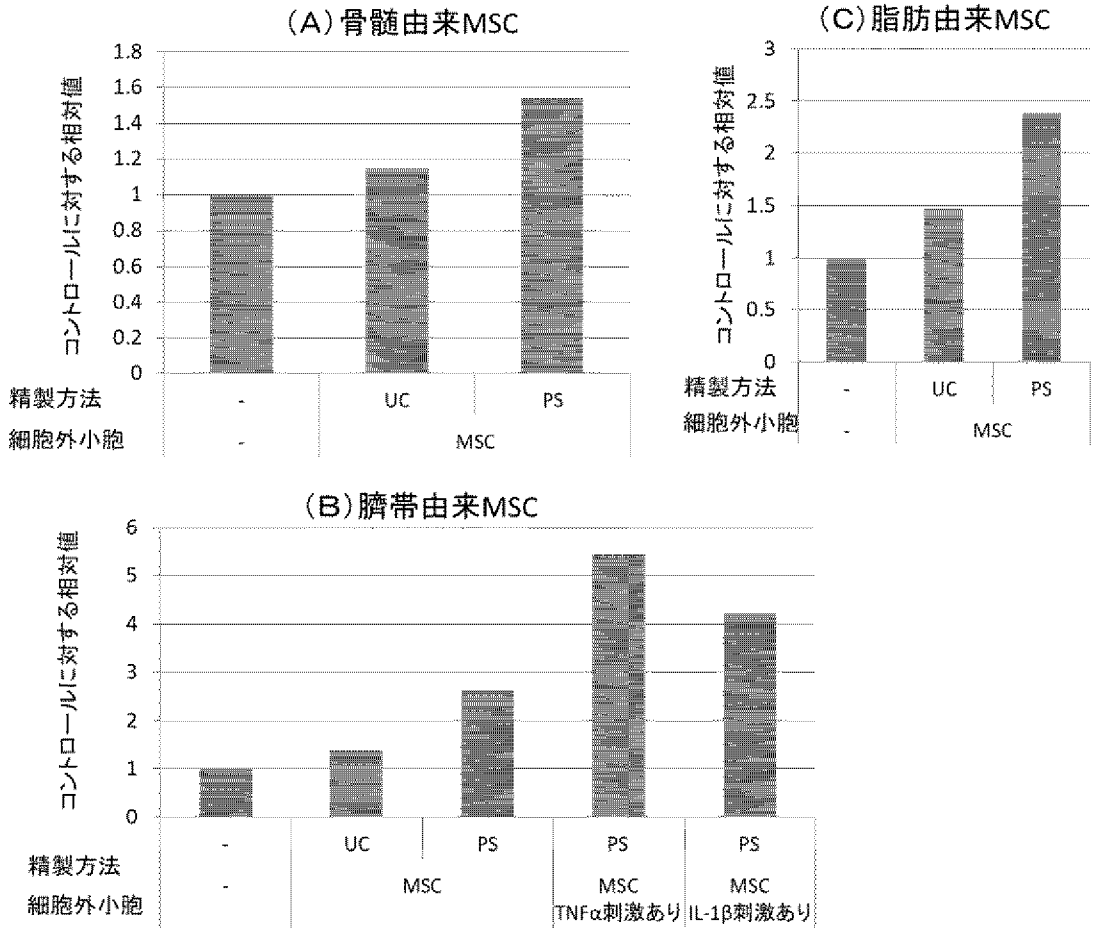
[図14]


(A)骨髄由来MSC
コントロールに対する相対値
2.5
2
1.5
1
0.5
0
精製方法
細胞外小胞
-
UC
PS
MSC
MSC(TNFα刺激あり)
MSC(IL-1β刺激あり)
(C)脂肪由来MSC
1.4
1.2
(B)臍帯由来MSC
1.6
TNFα刺激あり
IL-1β刺激あり

[図15]


(A)骨髄由来MSC
コントロールに対する相対値
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
精製方法
細胞外小胞
-
UC
PS
MSC
MSC(TNFα刺激あり)
MSC(IL-1β刺激あり)
(C)脂肪由来MSC
1.8
1.6
1.4
1.2
(B)臍帯由来MSC
TNFα刺激あり
IL-1β刺激あり

[図16]


（A）骨髄由来MSC
コントロールに対する相対値
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
精製方法
細胞外小胞
-
-
UC
PS
MSC
（C）脂肪由来MSC
コントロールに対する相対値
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
精製方法
細胞外小胞
-
-
UC
PS
MSC
（B）臍帯由来MSC
コントロールに対する相対値
6
5
4
3
2
1
0
精製方法
細胞外小胞
-
-
UC
PS
MSC
PS
MSC
TNFα刺激あり
PS
MSC
IL-1β刺激あり

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/011546

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. A61K35/28(2015.01)i, A61K38/17(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i
FI: A61K35/28ZNA, A61K45/00, A61K38/17, A61P43/00107, A61P17/00
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)
Int.Cl. A61K35/28, A61K38/17, A61K45/00, A61P17/00, A61P43/00

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 1971-2021
Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
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.
Y	CN 110548001 A (SHENYANG ENGINEERING REARCH & DEVELOPMENT CENTER OF CELL THERAPY CO., LTD.) 10 December 2019 (2019-12-10), claims, examples, tables 7-9	1-18
Y	CN 109172859 A (SHANGHAI CHANGHAI HOSPITAL) 11 January 2019 (2019-01-11), claims, examples, particularly, fig. 5, Comparison between "control group 1" and "blank group"	1-18
Y	CN 108392494 A (JIANGSU UNIVERSITY) 14 August 2018 (2018-08-14), claims, examples, drawings	1-18
Y	ZHANG, J. et al., Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis, Journal of Translational Medicine, 2015, vol. 13, article number 49, pp. 1-14, abstract, drawings, particularly, fig. 2, fig. 5, E-G	1-18

☒ 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	Date of mailing of the international search report
23 April 2021	11 May 2021
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/JP2021/011546

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KIM, Y. J. et al., Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, vol. 493, pp. 1102-1108, abstract, drawings, particularly, fig. 4	1-18
Y	WANG, L. et al., Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodeling, Scientific Reports, 2017, vol. 7, article number 13321, pp. 1-12, abstract, drawings	1-18
Y	DENG, M. et al., Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived and dermal fibroblast-derived extracellular vesicles protect dermal fibroblasts from ultraviolet radiation-induced photoaging in vitro, Photochemical & Photobiological Sciences, 01 March 2020, vol. 19, no. 3, pp. 406-414, abstract, drawings, particularly, fig. 4, H-I	1-18
Y	KATSUDA, T. et al., The therapeutic potential of mesenchymal stem cell1-derived extracellular vesicles, Proteomics, 2013, vol. 13, pp. 1637-1653, p. 1647, right column, first paragraph	1-18
Y	SONG, Y. et al., Exosomal miR-146a contributes to the enhanced therapeutic efficacy of interleukin-1β-primed mesenchymal stem cells against sepsis, Stem Cells, 2017, vol. 35, pp. 1208-1221, abstract, p. 1208, right column, second paragraph to p. 1209, left column, first paragraph	1-18
Y	WO 2016/088689 A1 (WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 09.06.2016 (2016-06-09), claims, examples	1-18
X	ZHANG, S. et al., Pretreatment of exosomes derived from hUCMSCs with TNF-α ameliorates acute liver failure by inhibiting the activation of NLRP3 in macrophage, Life Sciences, 06 February 2020, vol. 246, article number 117401, pp. 1-12, abstract	1-3, 8-11, 16-17
X	LIANG, Y. C. et al., TNF-α-induced exosomal miR-146a mediates mesenchymal stem cell-dependent suppression of urethral stricture, Journal of Cellular Physiology, 2019, vol. 234, pp. 23243-23255, abstract	1-3, 8-11, 16-17
X	ZULUETA, A. et al., Lung mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles attenuate the inflammatory profile of cystic fibrosis epithelial cells, Cellular Signalling, 2018, vol. 51, pp. 110-118, abstract	1-3, 8-11, 16-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/011546

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU, Z. et al., Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells prevent cardiomyocyte apoptosis induced by oxidative stress, Cell Death Discovery, 2019, vol. 5, article number 79, pp. 1-7, abstract	1-2, 4-6, 8-10, 12-14, 16-17
P, X	山根 昌之, 石止 貴将, PS アフィニティー法が実現した高活性な MSC 由来エクソソームの精製 -エクソソーム再生医療における全く新たな戦略の提案-, 和光純薬時報, October 2020, vol. 88, no. 4, pp. 10, 11, p. 10, left column, last paragraph to p. 11, middle column, drawings	1-2, 4-6, 9-10, 12-14
L	p. 11, 末尾「エクソソーム関連製品」, (YAMANE, Masayuki, ISHITOME, Takamasa, Wako Pure Chemical Time Report), non-official translation (Purification of highly active MSC-derived exosomes realized by PS affinity method -Proposal of a completely new strategy in exosome regenerative medicine, at the end "Exosome-related products")	1-18
P, Y	SHI, H. Z. et al., Extracellular vesicles of GMSCs alleviate aging-related cell senescence, Journal of Dental Research, 17 October 2020, vol. 100, no. 3, pp. 283-292, fig. 4, D	1-18

CN 110548001 A	10 December 2019	(Family: none)
CN 109172859 A	11 January 2019	(Family: none)
CN 108392494 A	14 August 2018	(Family: none)
WO 2016/088689 A1	09 June 2016	US 2018/0120299 A1 claims, examples EP 3228709 A1 CN 107002072 A KR 10-2017-0085493 A

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/011546

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; A61K 38/17(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i
FI: A61K35/28 ZNA; A61K45/00; A61K38/17; A61P43/00 107; A61P17/00

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; A61K38/17; A61K45/00; A61P17/00; A61P43/00

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	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１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); CAplus/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
Y	CN 110548001 A (SHENYANG ENGINEERING REARCH & DEVELOPMENT CENTER OF CELL THERAPY CO., LTD.) 10.12.2019 (2019-12-10) 特許請求の範囲、実施例、表７－表９	1-18
Y	CN 109172859 A (SHANGHAI CHANGHAI HOSPITAL) 11.01.2019 (2019-01-11) 特許請求の範囲、実施例、特に、図５の「対照組１」と「空白組」との比較	1-18
Y	CN 108392494 A (JIANGSU UNIVERSITY) 14.08.2018 (2018-08-14) 特許請求の範囲、実施例、各図	1-18
Y	ZHANG, J. et al., Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis, Journal of Translational Medicine, 2015, Vol. 13, article number 49, pp. 1-14 要約、各図、特に、図２、図５のＥ－Ｇ	1-18
Y	KIM, Y-J. et al., Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, Vol. 493, pp. 1102-1108 要約、各図、特に図４	1-18

☑ 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	国際調査報告の発送日
23.04.2021	11.05.2021

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）
原口　美和 4U 3844

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

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
Y	WANG, L. et al., Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodeling, SCIENTIFIC REPORTS, 2017, Vol. 7, article number 13321, pp. 1-12 要約、各図	1-18
Y	DENG, M. et al., Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived and dermal fibroblast-derived extracellular vesicles protect dermal fibroblasts from ultraviolet radiation-induced photoaging in vitro, Photochemical & Photobiological Sciences, 2020.03.01, Vol. 19, No. 3, pp. 406-414 要約、各図、特に、図４のＨ－Ｉ	1-18
Y	KATSUDA, T. et al., The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles, Proteomics, 2013, Vol. 13, pp. 1637-1653 第１６４７頁右欄第１段落	1-18
Y	SONG, Y. et al., Exosomal miR-146a Contributes to the Enhanced Therapeutic Efficacy of Interleukin-1β-Primed Mesenchymal Stem Cells Against Sepsis, STEM CELLS, 2017, Vol. 35, pp. 1208-1221 要約及び第１２０８頁右欄第２段落－第１２０９頁左欄第１段落	1-18
Y	WO 2016/088689 A1 (和光純薬工業株式会社) 09.06.2016 (2016-06-09) 特許請求の範囲、実施例	1-18
X	ZHANG, S. et al., Pretreatment of exosomes derived from hUCMSCs with TNF-α ameliorates acute liver failure by inhibiting the activation of NLRP3 in macrophage, Life Sciences, 2020.02.06, Vol. 246, article number 117401, pp. 1-12 要約	1-3, 8-11, 16-17
X	LIANG, Y-C. et al., TNF-α-induced exosomal miR-146a mediates mesenchymal stem cell-dependent suppression of urethral stricture, Journal of Cellular Physiology, 2019, Vol. 234, pp. 23243-23255 要約	1-3, 8-11, 16-17
X	ZULUETA, A. et al., Lung mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles attenuate the inflammatory profile of Cystic Fibrosis epithelial cells, Cellular Signalling, 2018, Vol. 51, pp. 110-118 要約	1-3, 8-11, 16-17
X	LIU, Z. et al., Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells prevent cardiomyocyte apoptosis induced by oxidative stress, Cell Death Discovery, 2019, Vol. 5, article number 79, pp. 1-7 要約	1-2, 4-6, 8-10, 12-14, 16-17
P, X	山根　昌之、石止　貴将, PSアフィニティー法が実現した高活性なMSC由来エクソソームの精製　－エクソソーム再生医療における全く新たな戦略の提案－, 和光純薬時報, 2020.10, Vol. 88, No. 4, pp. 10-11 第１０頁左欄最終段落－第１１頁中欄、各図	1-2, 4-6, 9-10, 12-14
L	第１１頁末尾「エクソソーム関連製品」	1-18
P, Y	SHI, H. Z. et al., Extracellular Vesicles of GMSCs Alleviate Aging-Related Cell Senescence, Journal of Dental Research, 2020.10.17, Vol. 100, No. 3, pp. 283-292 図４のD	1-18

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/011546

第Ⅰ欄　　ヌ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ヌ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
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

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/JP2021/011546

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
CN 110548001 A	10.12.2019	（ファミリーなし）	
CN 109172859 A	11.01.2019	（ファミリーなし）	
CN 108392494 A	14.08.2018	（ファミリーなし）	
WO 2016/088689 A1	09.06.2016	US 2018/0120299 A1 claims, examples EP 3228709 A1 CN 107002072 A KR 10-2017-0085493 A	