

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7534055号  
(P7534055)

(45)発行日 令和6年8月14日(2024.8.14)

(24)登録日 令和6年8月5日(2024.8.5)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	35/545 (2015.01)	A 6 1 K	35/545
A 2 3 L	33/28 (2016.01)	A 2 3 L	33/28
A 6 1 K	31/428 (2006.01)	A 6 1 K	31/428
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10

請求項の数 6 (全31頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-510957(P2022-510957)
(86)(22)出願日	令和2年8月12日(2020.8.12)
(65)公表番号	特表2022-544698(P2022-544698 A)
(43)公表日	令和4年10月20日(2022.10.20)
(86)国際出願番号	PCT/KR2020/010640
(87)国際公開番号	WO2021/033990
(87)国際公開日	令和3年2月25日(2021.2.25)
審査請求日	令和4年2月18日(2022.2.18)
(31)優先権主張番号	10-2019-0103186
(32)優先日	令和1年8月22日(2019.8.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)
(31)優先権主張番号	10-2020-0097398
(32)優先日	令和2年8月4日(2020.8.4)

最終頁に続く

(73)特許権者	521504245 プレクソジェン インコーポレイテッド 大韓民国 05855 ソウル ソンパ-グ ポジョン-ロ 8-ギル 9 ルーム 90 1 ルーム 902 ルーム 903 ルー ム 904
(74)代理人	100107766 弁理士 伊東 忠重
(74)代理人	100070150 弁理士 伊東 忠彦
(74)代理人	100107515 弁理士 廣田 浩一
(74)代理人	100107733 弁理士 流 良広
(74)代理人	100115347

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞前駆細胞に由来するエキソソームを含む非アルコール性脂肪性肝炎の予防又は治療用組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPSC)由来間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)を、1-(6-ベンゾチアゾリルスルホニル)-5-クロロ-1水素-インドール-2ブタン酸[1-(6-benzothiazolylsulfonyl)-5-chloro-1H-indole-2-butanoic acid]及びエキセンジン-4(Exendin-4)からなる群から選ばれる前処理物質で処理する前処理工程と、前記前処理工程によって前処理された前記人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から、エキソソームを分離する分離工程と、

を含むことを特徴とする非アルコール性脂肪性肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis)の予防、緩和、抑制又は治療用薬剤学的組成物の製造方法。

【請求項2】

前記人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞は、SSEA-4(stage-specific embryonic antigen 4)タンパク質を発現しない人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞に由来する、請求項1に記載の非アルコール性脂肪性肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis)の予防、緩和、抑制又は治療用薬剤学的組成物の製造方法。

【請求項3】

前記人工多能性幹細胞は、ヒト由来の人工多能性幹細胞である、請求項1に記載の非ア

ルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis) の予防、緩和、抑制又は治療用薬剤学的組成物の製造方法。

【請求項 4】

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPSC) 由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell; MSC) を、1 - (6 - ベンゾチアゾリルスルホニル) - 5 - クロロ - 1 水素 - インドール - 2 ブタン酸 [1 - (6 - benzothiazolylylsulfonyl) - 5 - chloro - 1 H - indole - 2 - butanoic acid] 及びエキセンジン - 4 (Exendin - 4) からなる群から選ばれる前処理物質で処理する前処理工程と、前記前処理工程によって前処理された前記人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から、エキソソームを分離する分離工程と、

10

を含むことを特徴とする非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis) の緩和、抑制又は改善用食品組成物の製造方法。

【請求項 5】

前記人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞は、SSEA - 4 (stage-specific embryonic antigen 4) タンパク質を発現しない人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞に由来する、請求項 4 に記載の非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis) の緩和、抑制又は改善用食品組成物の製造方法。

【請求項 6】

前記人工多能性幹細胞は、ヒト由来の人工多能性幹細胞である、請求項 4 に記載の非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis) の緩和、抑制又は改善用食品組成物の製造方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本特許出願は、2019年8月22日に大韓民国特許庁に提出された大韓民国特許出願10 - 2019 - 0103186号、2020年8月4日に大韓民国特許庁に提出された大韓民国特許出願10 - 2020 - 0097398号に対して優先権を主張し、これらの特許出願の開示事項は、本明細書に援用により組み込まれる。

30

【0002】

本発明は、前処理物質で前処理した又は前処理していない人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞前駆細胞から分化した間葉系幹細胞に由来するエキソソームを有効成分として含む非アルコール性脂肪性肝炎の予防又は治療用組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

間葉系幹細胞は、多能性の間質細胞で、骨芽細胞、軟骨細胞、筋肉細胞、脂肪細胞などを含む様々な細胞へと分化可能な細胞のことを指す。間葉系幹細胞は、軟骨や骨組織、靭帯、骨髄間質細胞などの様々な結合組織へと分化可能なことから、関節炎や、外傷、火傷などによって生じた軟部組織の欠陥など、様々な疾患に対する治療用途として研究されている。

40

【0004】

最近では、間葉系幹細胞自体を使用せず、間葉系幹細胞が分泌するエキソソームを用いて、様々な疾患への治療効果を積極的に研究している。このようなエキソソームを商業的に用いるためには、多量かつ高品質のエキソソームが必要である。しかしながら、間葉系幹細胞から得られるエキソソームの量は非常に少なく、間葉系幹細胞の機能及び増殖能も継代を繰り返すと減少するため、間葉系幹細胞と比較して同等又はより優れた機能性を有しながらも、増殖能に優れた細胞を樹立する技術の開発の必要性が台頭した。

【0005】

一方、非アルコール性脂肪症は、過度なアルコール摂取がないにもかかわらず肝細胞に

50

トリグリセリドが蓄積されることが特徴である。非アルコール性脂肪症は、現代人の高脂質及び高炭水化物の摂取と関連する過剰な栄養によって増加し続けている。肥満や糖尿病において非アルコール性脂肪症がよく観察されるが、様々な因子が非アルコール性脂肪症と関連していると知られている。非アルコール性脂肪症を持つ成人の80%が、インスリン抵抗性糖尿病及び心臓疾患などの代謝性疾患を発症することが報告されている。

#### 【0006】

非アルコール性脂肪症は、非アルコール性の単純性脂肪肝 (*non-alcoholic simple steatosis*) と、炎症を伴う非アルコール性脂肪性肝炎 (*non-alcoholic steatohepatitis*; *NASH*) とに分類されるが、長期間治療せずに放置すると、肝炎、肝線維症、肝硬変などの重篤な肝疾患に発展することがある。非アルコール性脂肪症は、肝細胞 (*hepatocyte*) において脂肪の蓄積 (脂肪浸潤) を特徴とする。

10

非アルコール性の単純性脂肪肝は、非アルコール性脂肪性肝炎に進行することがある。非アルコール性脂肪性肝炎において、脂肪の蓄積は、様々な程度の肝臓の炎症及び肝臓の癒痕化と関連し、多くの場合にインスリン抵抗性、異常脂質血症、及び高血圧と関連すると知られている。非アルコール性脂肪性肝炎は、過剰な体重、過剰な血中コレステロール及びトリグリセリドレベル、及び/又はインスリン抵抗性を有する人々からしばしば発生する。

#### 【0007】

近年、肥満人口の増加に伴う非アルコール性脂肪性肝炎患者の増加に伴い、非アルコール性脂肪性肝炎の治療剤市場は大規模に発展している。非アルコール性脂肪性肝炎の発生原因及び機序の解明は、非アルコール性脂肪性肝炎の治療剤開発に強い関心を集めている。しかしながら、安全で長期的に服用可能な非アルコール性脂肪性肝炎の治療剤の開発は、まだごく僅かである。

20

非アルコール性脂肪性肝炎の治療のために、通常、肥満治療薬、インスリン耐性治療薬、高脂血症治療薬、肝保護剤、及び抗酸化剤などが使用される。しかしながら、それらの薬剤は、非アルコール性脂肪性肝炎の本質的な治療剤ではなく、症状改善剤として使用され、長期間服用すると副作用がある。

このため、より安全で且つ長期的な服用が可能であり、慢性疾患である非アルコール性脂肪性肝炎の治療に適する新しい治療用組成物の開発への要求は高まりつつある状況である。

30

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0008】

本発明者らは、間葉系幹細胞のエキソソームを用いた非アルコール性脂肪性肝炎治療剤の開発に関する集中的かつ徹底的な研究の結果、前駆細胞から分化した人工多能性幹細胞 (*induced pluripotent stem cell*; *iPSC*) 由来の間葉系幹細胞を樹立し、前処理物質で前処理した又は前処理していない前記前駆細胞から分化した人工多能性幹細胞 (*iPSC*) 由来の間葉系幹細胞に由来するエキソソームは、アルコール性脂肪性肝炎に対して優れた予防および治療効果を示すことを発見した。

40

#### 【0009】

したがって、本発明の目的は、人工多能性幹細胞 (*induced pluripotent stem cell*; *iPSC*) 由来間葉系幹細胞 (*mesenchymal stem cell*; *MSC*) から分離されたエキソソームを有効成分として含む、非アルコール性脂肪性肝炎 (*Non-alcoholic steatohepatitis*; *NASH*) の予防又は治療用薬剤学的組成物を提供することである。

本発明の他の目的は、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソームを提供することである。

本発明のさらに他の目的は、前処理物質で前処理された人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞 (*mesenchymal stem cell*; *MSC*) から分離されたエキソソ-

50

ムを有効成分として含む、非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis) の予防又は治療用薬剤学的組成物を提供することである。

本発明のさらに他の目的は、前処理物質で前処理された人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソームを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、間葉系幹細胞のエキソソームを用いた非アルコール性脂肪性肝炎治療剤の開発に関する集中的かつ徹底的な研究を行った。その結果、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPSC) から由来した間葉系幹細胞は、その前駆細胞の分化により樹立され、前処理物質で前処理した又は前処理して

10

いない前記人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞に由来するエキソソームは、非アルコール性脂肪性肝炎の優れた予防又は治療効果を示すことを究明した。

本発明は、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞から分化した間葉系幹細胞から分離されたエキソソーム、及びこれを有効成分として含む非アルコール性脂肪性肝炎の予防又は治療用薬剤学的組成物、並びに前処理物質で前処理された人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソーム、及びこれを有効成分として含む非アルコール性脂肪性肝炎の予防又は治療用薬剤学的組成物に関する。

【0011】

以下、本発明をより詳細に説明する。

本発明の一態様は、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPSC) 由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell; MSC) から分離されたエキソソームを有効成分として含む、非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis) の予防又は治療用薬剤学的組成物に関する。

20

本発明の他の態様は、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソームを有効成分として含む、非アルコール性脂肪性肝炎の予防、緩和、改善、又は治療用薬剤学的組成物に関する。

【0012】

本明細書上の用語“非アルコール性脂肪性肝炎”は、非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) の一つで、炎症又は繊維症を伴う脂肪肝を特徴とする進行性肝疾患であり、肝硬変や肝癌を誘発する前駆疾患を意味する。

30

【0013】

本明細書において、用語“幹細胞”は、自己複製能を有し、2つ以上の異なる種類の細胞に分化する能力を有する未分化細胞を示す。本発明の幹細胞は、自己幹細胞又は相同幹細胞であってよい。

【0014】

本明細書において、用語“人工多能性幹細胞”は、体細胞のような既に分化した細胞に脱分化 (dedifferentiation) を誘導し、未分化の多能性 (pluripotency) 状態にリプログラミングされた細胞のことを意味する。

40

前記脱分化は、特定の遺伝子 (例えば、Sox2、c-Myc、Klf4、Oct-4等) を導入して発現させるか、又は前記特定の遺伝子が導入された細胞で発現される脱分化誘導タンパク質を注入して誘導することができる。

前記多能性 (pluripotency) は、内胚葉 (endoderm)、中胚葉 (mesoderm)、及び外胚葉 (ectoderm) の3つの胚葉 (germ layer) の任意の起源の組織又は器官に分化し得る能力を意味する。

【0015】

本明細書において用語“間葉系幹細胞”は、骨細胞、軟骨細胞、筋細胞、脂肪細胞などを含む様々な細胞に分化可能な多能性細胞を指す。前記間葉系幹細胞は、骨髄由来の間葉系幹細胞が最も多用されているが、骨髄の他に、臍帯又は臍帯血、脂肪組織、羊膜液、奥歯

50

の歯蕾 (tooth bud) に由来してもよい。間葉系幹細胞は、間質細胞 (stromal cell) とも呼ばれる。

前記間葉系幹細胞の前駆細胞は、一般の間葉系幹細胞の前駆細胞ではなく、(本発明者らが開発した)人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPSC) に由来する間葉系幹細胞の前駆細胞である。

【0016】

本発明において、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞は、SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen 4) タンパク質を発現しないものであってよい。

本発明において、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞は、SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen 4) タンパク質を発現しない人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞から分化したものであってよい。

【0017】

前記“人工多能性幹細胞”は、分化した細胞からの人工的なリプログラミングプロセスによって、多能性分化能を有するように誘導された細胞を示し、リプログラミングされた幹細胞とも称する。

人工的なリプログラミングプロセスは、レトロウイルス、レンチウイルス、及びセンダイウイルスを用いたウイルス媒介リプログラミング因子、又は非ウイルス性ベクター、タンパク質、及び細胞抽出物などを用いる非ウイルス媒介リプログラミング因子の導入によって行われる。リプログラミングプロセスには、幹細胞抽出物、化合物などによるリプログラミングも含まれる。

人工多能性幹細胞は、胚性幹細胞とほぼ同じ特性を有し、特に類似の細胞形態を示し、遺伝子及びタンパク質の発現パターンが類似であり、*in vitro* 及び *in vivo* で多能性を有し、テラトーマ (teratoma) を形成し、マウスの胚盤胞 (blastocyst) に挿入するとキメラ (chimera) マウスを形成し、遺伝子の生殖細胞系伝達 (germline transmission) が可能である。

本発明の人工多能性幹細胞は、ヒト、サル、ブタ、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、マウス、ウサギなど全ての哺乳動物由来の人工多能性幹細胞を含むが、好ましくはヒト由来の人工多能性幹細胞である。

また、本発明の前記人工多能性幹細胞がリプログラミングする前の体細胞は、臍帯、臍帯血、骨髄、脂肪、筋肉、神経、皮膚、羊膜、羊水、又は胎盤などに由来する体細胞であるが、これに限定されない。具体的には、前記体細胞は、線維芽細胞 (fibroblast)、肝細胞 (hepatocyte)、脂肪細胞 (adipose cell)、上皮細胞 (epithelial cell)、表皮細胞 (epidermal cell)、軟骨細胞 (chondrocyte)、筋細胞 (muscle cell)、心筋細胞 (cardiac muscle cell)、メラノサイト (melanocyte)、神経細胞 (neural cell)、膠細胞 (glial cell)、星状膠細胞 (astroglial cell)、単球 (monocyte)、マクロファージ (macrophage) などを含むが、これに限定されるものではない。

【0018】

本発明の一実施形態において、本発明の間葉系幹細胞は、同等な数の他の間葉系幹細胞に比べて、ANKRD1、CPE、NKAIN4、LCP1、CCDC3、MAMDC2、CLSTN2、SFTA1P、EPB41L3、PDE1C、EMILIN2、SULT1C4、TRIM58、DENND2A、CADM4、AIF1L、NTM、SHISA2、RASSF4、及びACKR3からなる群から選ばれる少なくとも1以上の遺伝子をより高いレベルで発現する。

【0019】

本発明の他の一実施形態において、本発明の間葉系幹細胞は、同等な数の他の間葉系幹細胞に比べて、DHR3、BMPER、IFI6、PRSS12、RDH10、及びKCNE4からなる群から選ばれる少なくとも1以上の遺伝子をより低いレベルで発現する。

## 【 0 0 2 0 】

前記間葉系幹細胞及び同等な数の他の間葉系幹細胞は、同種組織由来である。より具体的には、前記間葉系幹細胞は、人工多能性幹細胞に由来する間葉系幹細胞の前駆細胞である。

## 【 0 0 2 1 】

本発明の一実施形態において、前記間葉系幹細胞は、臍帯組織の人工多能性幹細胞に由来する間葉系幹細胞であり、これと比較される同等な数の他の間葉系幹細胞は、臍帯組織由来の間葉系幹細胞である。

## 【 0 0 2 2 】

本発明者らは、前記人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞から分化した間葉系幹細胞を、B x C ( b r e x o g e n s t e m c e l l ) と命名した。本明細書において、前記“人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞 ( B x C ) ” は、“人工多能性幹細胞由来間葉系細胞”とも表現される。

10

## 【 0 0 2 3 】

本明細書上の用語“人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞”とは、人工多能性幹細胞から間葉系幹細胞に完全に分化する直前の段階の細胞であって、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の一種とみなされてよく、S S E A - 4 タンパク質を発現せず、追加培養によって完全な間葉系幹細胞となる細胞を意味する。

## 【 0 0 2 4 】

本発明の同一組織由来 (例えば、臍帯組織) の人工多能性幹細胞の間葉系幹細胞 ( B x C ) は、同一組織由来 (例えば、臍帯組織) の間葉系幹細胞 ( M S C ) と比較して、染色体の核型において異常がなく、増殖能にも優れている。具体的には、本発明の B x C は、継代を 9 回以上繰り返す場合に、同一組織由来の間葉系幹細胞 ( M S C ) と比較して 1 0 倍以上の増殖能の差を示し、1 2 回以上の継代を繰り返しても増殖能の減少が観察されない。また、B x C は、M S C に比べて、細胞増殖能と関連するマーカーである K i 6 7 の発現量も 2 倍以上高く現れる。

20

## 【 0 0 2 5 】

前記人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞 ( B x C ) は、エンドスタチン ( E n d o s t a t i n ) 、エンドセリン ( E n d o t h e l i n ) - 1 、 V E G F - A 、 トロンボスポンジン ( T h r o m b o s p o n d i n ) - 2 、 P L G F 、 P D G F - A A 、 b e t a - N G F 、 及び H B - E G F などの機能性タンパク質を、同等な数の他の間葉系幹細胞と比較して多量に分泌する。

30

## 【 0 0 2 6 】

本明細書において、前記エンドスタチンは、天然に生成された X V I I I 型コラーゲンに由来する 2 0 k D a の C 末端フラグメントであり、抗血管新生剤として報告されている。

本明細書において、前記エンドセリン - 1 は、プレプロエンドセリン ( p r e p r o e n d o t h e l i n ) - 1 ( P P E T 1 ) と知られており、E D N 1 遺伝子によってコードされるタンパク質であり、血管内皮細胞で生産される。エンドセリン - 1 は、強力な血管収縮剤として知られている。

本明細書において、血管内皮増殖因子 A ( V E G F - A ( v a s c u l a r e n d o t h e l i a l g r o w t h f a c t o r A ) ) は、V E G F A 遺伝子によってコードされるタンパク質で、血管内皮細胞の V E G F R 1 及び V E G F R 2 との相互作用によって血管の成長を誘導することが知られている。

40

本明細書において、前記トロンボスポンジン ( T h r o m b o s p o n d i n ) - 2 は、T H B S 2 遺伝子によってコードされるタンパク質で、細胞間相互作用又は細胞 - マトリックス相互作用を媒介するものと知られている。トロンボスポンジン - 2 の癌に対する役割には論議の余地があるが、間葉系幹細胞の細胞表面特性を調節することが報告されており、細胞接着及び細胞移動に関与するものと知られている。

本明細書において、胎盤成長因子 ( P L G F ( p l a c e n t a l g r o w t h f a c t o r ) ) は、P G F 遺伝子によってコードされるタンパク質で、V E G F サブファミ

50

リーのメンバーとして胚発生段階における血管新生に主要な役割を果たすタンパク質として知られている。

本明細書において、血小板由来成長因子 (PDGF-AA (platelet-derived growth factor)) は、細胞の成長及び分裂を調節する成長因子であり、血管の形成及び成長、及び間葉系幹細胞の増殖、化学走性、及び遊走において重要な役割を担うものと知られている。

本明細書において、神経成長因子 (NGF (Nerve growth factor)) は、主にニューロンの成長、維持、増殖、及び生存に關与する神経栄養因子、及び神経ペプチドである。NGFは、alpha-NGF、beta-NGF、及びgamma-NGFが、約2:1:2の割合で発現する3種のタンパク質の複合体である。gamma-NGFはセリンプロテアーゼとして作用し、beta-NGFのN末端を切断してNGFを活性化させるものと知られている。

10

本明細書において、ヘパリン結合性EGF様成長因子 (HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor)) は、HBEGF遺伝子によってコードされるEGFファミリータンパク質のメンバーである。HB-EGFは、心臓の発達及び血管分布に重要な役割を担うものと知られており、皮膚の創傷治癒において上皮化に必須なタンパク質であることが知られている。

#### 【0027】

本明細書において、用語“エキソソーム (exosome)” は、細胞が細胞外に分泌される、又は細胞内に存在する脂質二重層で構成された膜構造を有する膜小胞 (membrane vesicle) を指し、ほとんどの真核生物の体液に存在する。エキソソームの直径は、30~1000nm程度であり、多胞体 (multivesicular bodies) が細胞膜と融合するとき、細胞膜から直接エキソソームが放出される。エキソソームは、タンパク質、生物活性脂質、RNA (miRNA) などの細胞内生体分子を輸送することにより、凝固、細胞間コミュニケーション、細胞性免疫を仲介する機能的な役割を果たすことはよく知られています。

20

#### 【0028】

前記エキソソームは、微小胞 (microvesicle) を包含する概念である。エキソソームのマーカータンパク質としては、CD63、CD81などが知られている。さらに、例えば、EGFRのような細胞表面受容体、シグナル伝達関連分子、細胞接着関連タンパク質、MSC関連抗原、ヒートショックタンパク質 (heat shock protein)、小胞形成に関連しているアリックス (Alix) などのタンパク質が知られている。

30

#### 【0029】

本発明において、前記人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソームは、上述した人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞 (BxC) 内に存在するか、BxCから分泌されたエキソソームを意味する。

本発明において人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソームは、SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen 4) タンパク質を発現しない人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞から分化した間葉系幹細胞から分離されたものであってよい。

40

#### 【0030】

本明細書において、用語‘有効成分として含む’とは、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソームが、非アルコール性脂肪性肝炎の予防又は治療するための活性を達成するのに十分な量を含むことを意味する。

#### 【0031】

本発明において、薬剤学的組成物は、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソームを、エキソソームタンパク質基準で1~10000µg、1~1000µg、10~10000µg、10~1000µg、100~10000µg、100~1000µg、50~10000µg、50~1000µg、又は50~500µg含むも

50

のでよいが、これに限定されるものではない。

【0032】

本発明において使われる用語“予防”は、本発明の組成物の投与により非アルコール性脂肪性肝炎を抑制する、又は非アルコール性脂肪性肝炎の進行を遅延させる全ての行為を意味する。

【0033】

本明細書において使われる用語“治療”は、(a)非アルコール性脂肪性肝炎の進行の抑制；(b)非アルコール性脂肪性肝炎の軽減；及び、(c)非アルコール性脂肪性肝炎の除去を意味する。

【0034】

本発明に係る薬剤学的組成物は、有効成分に加え、薬剤学的に許容される担体を含むことができる。それが薬剤学的組成物を調製するために一般的に使用される限り、任意の薬剤学的に許容される担体が本開示の薬剤学的組成物に含まれ得る。薬剤学的に許容される担体の例にはラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、澱粉、アカシアガム、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、シロップ、メチルセルロース、ヒドロキシ安息香酸メチル、ヒドロキシ安息香酸プロピル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、及びミネラルオイルなどを含むが、これに限定されるものではない。また、これらの成分に加えて、本発明に係る薬剤学的組成物は、潤滑剤、保湿剤、甘味料、香味剤、乳化剤、懸濁剤、防腐剤などをさらに含むことができる。

【0035】

本発明の薬剤学的組成物は、目的とする方法に応じて、経口投与又は非経口投与（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、又は局所に適用）することができる。投与量は、患者の状態及び体重、疾病の重症度、製剤の種類、投与経路、及び投与時間を含む様々な要因によって異なるが、当業者にとって適宜に選択可能である。

本発明の薬剤学的組成物は、薬剤学的に有効な量で投与することができる。本発明において、“薬剤学的に有効な量”は、医学的治療に適用可能な合理的な利益/リスクの割合であり、疾患を治療するのに十分な量を意味する。有効量は、患者の疾患の種類、重症度、薬剤の活性、薬剤に対する感受性、投与時間、投与経路、排泄率、治療期間、同時使用される薬剤、及びその他医療分野によく知られた他の要素によって決定されてよい。

本発明に係る薬剤学的組成物は、個々の治療薬として単独で、又は他の治療薬と組み合わせ投与することができる。後者の場合、投与は順次又は同時に投与されてよい。また、組成物は、単回投与又は分割された複数回投与されてよい。前記要素を全て考慮して、副作用無しに最大効果が得られる最小量を投与することが重要であり、これは当業者にとって容易に決定可能である。

具体的には、本発明の薬剤学的組成物の有効量は、患者の年齢、性別、体重、体内での有効成分の吸収率、不活性率、排泄率、疾病の種類、及び併用される薬剤によって変わってよい。

【0036】

本発明のさらに他の態様は、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソームに関する。

本発明の前記人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞から分化した間葉系幹細胞から分離されたエキソソーム(BxC-e)は、従来のエキソソームとしての特性を有するエキソソームである。本発明の実施例から立証されるように、前記人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞から分離されたエキソソームは、脂質への分化に対して優れた抑制効果を有する(図2)。また、本発明のBxC-eは、脂肪症(Steatosis)誘発性肝細胞において脂質生成、及び炎症、並びに小胞体ストレスを抑制することを確認した(図5~図7)。

【0037】

本発明のさらに他の態様は、前記人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離された工

10

20

30

40

50

キソソームを個体に投与する段階を含む非アルコール性脂肪性肝炎治療方法に関する。

前記“個体”とは、疾病の治療を必要とする対象を意味し、より具体的には、ヒト又は非ヒトである霊長類、マウス(mouse)、イヌ、ネコ、ウマ及びウシなどの哺乳類を意味する。

【0038】

本発明のさらに他の態様は、前記人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソームの非アルコール性脂肪性肝炎治療用途に関する。

前記非アルコール性脂肪性肝炎治療方法及び治療用途は、上述した本発明の人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソーム、及びこれを含む薬剤学的組成物と構成成分が共通するので、これら両者に共通する内容は、本明細書の過度な複雑性を避けるためにその記載を省略する。

10

【0039】

本発明のさらに他の態様は、前処理物質で前処理された人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPSC)由来間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)から分離されたエキソソームを有効成分として含む、非アルコール性脂肪性肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis)の予防又は治療用薬剤学的組成物に関する。

【0040】

本発明において、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞は、SSEA-4(stage-specific embryonic antigen 4)タンパク質を発現しない人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞から分化したものであってよい。

20

【0041】

本明細書において、用語“前処理”とは、前駆細胞の培養過程において、前処理物質が添加された細胞培養培地を、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞に接触させる過程を意味する。

【0042】

前記前処理は、前記人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞を、前処理物質を含む細胞培養培地で培養する方法によって行われてよい。

前記細胞培養培地は、動物細胞培養に通常用いられるいかなる培地も利用可能である。

例えば、DMEM(Dulbecco's modification of Eagle's medium)、DMEMとF12との混合物、Eagles's MEM(Eagle's minimum essential medium)、-MEM、Iscove's MEM、199培地、CMRL1066、RPMI1640、F12、F10、Way-mouth's MB752/1、McCoy's 5A、及びMCDBシリーズなどが用いられてよい。

30

【0043】

前記培養は、6~48時間行われてよい。

具体的に、前記培養は、6~42時間、6~36時間、6~30時間、6~27時間、12~48時間、12~42時間、12~36時間、12~30時間、12~27時間、18~48時間、18~42時間、18~36時間、18~30時間、18~27時間、21~48時間、21~42時間、21~36時間、21~30時間、又は21~27時間行われてよい。

40

【0044】

前記前処理物質は、1-(6-ベンゾチアゾリルスルホニル)-5-クロロ-1水素-インドール-2ブタン酸[1-(6-benzothiazolylsulfonyl)-5-chloro-1H-indole-2-butanoic acid]、又はエキセンジン-4(Exendin-4)であってよい。

“ラニフィブラノール(Lanifibranor)”と名付けられた前記1-(6-ベンゾチアゾリルスルホニル)-5-クロロ-1水素-インドール-2ブタン酸[1-(6-benzothiazolylsulfonyl)-5-chloro-1H-ind

50

ole - 2 - butanoic acid ] は、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (peroxisome proliferator - activated receptors ; PPARs ) のアゴニストである。

【 0 0 4 5 】

前記ラニフィブラノールは、細胞培養培地中に 1 ~ 1 0 0 μ M の濃度で含まれてよい。

具体的に、前記ラニフィブラノールは、細胞培養培地中に 1 ~ 9 0 μ M、1 ~ 8 0 μ M、1 ~ 7 0 μ M、1 ~ 6 0 μ M、1 ~ 5 0 μ M、1 ~ 4 0 μ M、1 ~ 3 0 μ M、1 0 ~ 9 0 μ M、1 0 ~ 8 0 μ M、1 0 ~ 7 0 μ M、1 0 ~ 6 0 μ M、1 0 ~ 5 0 μ M、1 0 ~ 4 0 μ M、及び 1 0 ~ 3 0 μ M の濃度で含まれてよい。

【 0 0 4 6 】

本発明の一実施形態において、ラニフィブラノールは、培地中に 1 ~ 1 0 0 0 μ M、1 ~ 5 0 0 μ M、1 ~ 1 0 0 μ M、1 ~ 9 0 μ M、1 ~ 8 0 μ M、1 ~ 7 0 μ M、1 ~ 6 0 μ M、1 ~ 5 0 μ M、1 ~ 4 0 μ M、1 ~ 3 0 μ M、1 ~ 2 0 μ M、又は 1 0 μ M の濃度で添加されてよいが、これに制限されるものではない。

【 0 0 4 7 】

本発明の一実施形態において、エキソソームは、1 - ( 6 - ベンゾチアゾリルスルホニル ) - 5 - クロロ - 1 水素 - インドール - 2 ブタン酸が、1 0 0 0 μ M、1 ~ 5 0 0 μ M、1 ~ 1 0 0 μ M、1 ~ 9 0 μ M、1 ~ 8 0 μ M、1 ~ 7 0 μ M、1 ~ 6 0 μ M、1 ~ 5 0 μ M、1 ~ 4 0 μ M、1 ~ 3 0 μ M、1 ~ 2 0 μ M、1 0 ~ 9 0 μ M、1 0 ~ 8 0 μ M、1 0 ~ 7 0 μ M、1 0 ~ 6 0 μ M、1 0 ~ 5 0 μ M、1 0 ~ 4 0 μ M、1 0 ~ 3 0 μ M、又は 1 0 μ M の濃度で添加された培地で培養された人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞から分離されたエキソソームであってよい。

【 0 0 4 8 】

本発明のエキセンジン - 4 は、グルカゴン様ペプチド ( glucagon - like peptide ; GLP ) 受容体のペプチドアゴニストである。エキセンジン - 4 は、インスリン放出を刺激し、2 型糖尿病及びパーキンソン病の治療用途として臨床的に使用されてきた。

【 0 0 4 9 】

前記エキセンジン - 4 は、細胞培養培地中に 1 ~ 1 0 0 n M の濃度で含まれてよい。

具体的には、前記エキセンジン - 4 は、細胞培養培地中に 1 ~ 9 0 n M、1 ~ 8 0 n M、1 ~ 7 0 n M、1 ~ 6 0 n M、1 ~ 5 0 n M、1 ~ 4 0 n M、1 ~ 3 0 n M、1 0 ~ 9 0 n M、1 0 ~ 8 0 n M、1 0 ~ 7 0 n M、1 0 ~ 6 0 n M、1 0 ~ 5 0 n M、1 0 ~ 4 0 n M、1 0 ~ 3 0 n M、又は 2 0 n M の濃度で含まれてよい。

【 0 0 5 0 】

本発明の一実施形態において、エキソソームは、エキセンジン - 4 が 1 ~ 9 0 n M、1 ~ 8 0 n M、1 ~ 7 0 n M、1 ~ 6 0 n M、1 ~ 5 0 n M、1 ~ 4 0 n M、1 ~ 3 0 n M、1 0 ~ 9 0 n M、1 0 ~ 8 0 n M、1 0 ~ 7 0 n M、1 0 ~ 6 0 n M、1 0 ~ 5 0 n M、1 0 ~ 4 0 n M、1 0 ~ 3 0 n M 又は 2 0 n M の濃度で添加された培地で培養された人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞から分離されたものでよいが、これに限定されるものではない。

【 0 0 5 1 】

本発明において、薬剤学的組成物は、1 - ( 6 - ベンゾチアゾリルスルホニル ) - 5 - クロロ - 1 水素 - インドール - 2 ブタン酸で前処理された人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞から分離されたエキソソームを、エキソソームタンパク質基準で 1 ~ 1 0 0 0 0 μ g、1 ~ 1 0 0 0 μ g、1 0 ~ 1 0 0 0 0 μ g、1 0 ~ 1 0 0 0 μ g、1 0 0 ~ 1 0 0 0 0 μ g、1 0 0 ~ 1 0 0 0 μ g、5 0 ~ 1 0 0 0 0 μ g、5 0 ~ 1 0 0 0 μ g、又は 5 0 ~ 5 0 0 μ g 含むものでよいが、これに限定されるものではない。

【 0 0 5 2 】

本発明において、薬剤学的組成物は、エキセンジン - 4 で前処理された人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞から分離されたエキソソームを、エキソソームタンパク質

10

20

30

40

50

基準で1~10000 $\mu$ g、1~1000 $\mu$ g、10~10000 $\mu$ g、10~1000 $\mu$ g、100~10000 $\mu$ g、100~1000 $\mu$ g、50~10000 $\mu$ g、50~1000 $\mu$ g、又は50~500 $\mu$ g含むものでよいが、これに限定されるものではない。

【0053】

本発明のさらに他の態様は、前処理物質で前処理された人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソームに関する。

本発明の前記前処理物質で前処理された人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソーム(BxC-V37e及びBxC-G63e)は、従来のエキソソームとしての特性を有するエキソソームである。本発明の実施例から立証されるように、本発明のBxC-V37e及びBxC-G63eは、脂肪症(Steatosis)誘発性肝細胞において脂質形成、炎症、及び小胞体ストレスを抑制する(図5~図10)。

10

【0054】

本発明のさらに他の態様は、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソームを含む非アルコール性脂肪性肝炎の緩和、抑制又は改善用食品組成物である。

【0055】

本発明のさらに他の態様は、前処理物質で前処理された人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソームを含む、非アルコール性脂肪性肝炎の緩和、抑制又は改善用食品組成物である。

本発明に係る食品組成物は、上述した本発明の人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソーム、及びこれを含む薬剤学的組成物と構成成分が共通するので、これら両者に共通する内容は、本明細書の過度な複雑性を避けるためにその記載を省略する。

20

【0056】

本発明に係る食品組成物は、食品の製造時に通常添加される成分、例えば、タンパク質、炭水化物、脂質、栄養素、調味料、及び香味料を含むことができるが、これに限定されるものではない。

本発明に係る食品組成物に含有可能な炭水化物としては、グルコース及びフルクトースなどの単糖、マルトース及びスクロースなどの二糖、オリゴ糖、デキストリン、及びシクロデキストリンなどの多糖、キシリトール、ソルビトール、及びエリトリトールなどの糖アルコールなどが挙げられるが、これに限定されるものではない。

本発明に係る食品組成物に含有可能な香味料は、タウマチン、ステビア抽出物などの天然香料、及びサッカリン、アスパルテームなどの合成香料などが挙げられるが、これに限定されるものではない。

30

【0057】

本発明のさらに他の態様は、前記前処理物質で前処理された人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソームを個体に投与する段階を含む、非アルコール性脂肪性肝炎治療方法に関する。

【0058】

前記“個体”とは、疾病の治療を必要とする対象を意味し、より具体的には、ヒト又は非ヒトである霊長類、マウス(mouse)、イヌ、ネコ、ウマ及びウシなどの哺乳類を意味する。

40

【0059】

本発明のさらに他の態様は、前記前処理物質で前処理された人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソームの非アルコール性脂肪性肝炎治療用途に関する。

前記非アルコール性脂肪性肝炎治療方法及び治療用途は、上述した本発明の前処理物質で前処理された人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞から分離されたエキソソーム、及びこれを含む薬剤学的組成物と構成成分が共通するので、これら両者に共通する内容は、本明細書の過度な複雑性を避けるためにその記載を省略する。

【発明の効果】

【0060】

本発明は、前処理物質で前処理した又は前処理していない人工多能性幹細胞由来間葉系

50

幹細胞から分離されたエキソソームを有効成分として含む、非アルコール性脂肪性肝炎の予防又は治療用薬剤学的組成物に関する。本発明のエキソソームは、従来の間葉系幹細胞から分離されたエキソソームに比べて、より改善された非アルコール性脂肪性肝炎予防又は治療効果を示し、これに関連する研究開発及び製品化に有用に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1A】図1Aは、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-e)の平均サイズ及び分布を示す図である。

【図1B】図1Bは、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-e)の電子顕微鏡写真である。

10

【図2A】図2Aは、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-e)の脂質生成に対する抑制効果を示す写真である。

【図2B】図2Bは、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-e)の脂質生成に対する抑制効果を示す図である。

【図3A】図3Aは、ラニフィブラノール前処理した人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-V37e)の平均サイズ及び分布を示す図である。

【図3B】図3Bは、ラニフィブラノール前処理した人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-V37e)の電子顕微鏡写真である。

【図4A】図4Aは、エキセンジン-4前処理した人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-G63e)の平均サイズ及び分布を示す図である。

20

【図4B】図4Bは、エキセンジン-4前処理した人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-G63e)の電子顕微鏡写真である。

【図5】図5は、脂肪症(Steatosis)誘発性肝細胞において人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-e)及びラニフィブラノール前処理した人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-V37e)による脂質生成(Lipogenesis)抑制効果を示す図である。

【図6A】図6Aは、脂肪症(Steatosis)誘発性肝細胞において人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-e)及びラニフィブラノール前処理した人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-V37e)による炎症(Inflammation)抑制効果を示す図である。

30

【図6B】図6Bは、脂肪症(Steatosis)誘発性肝細胞において人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-e)及びラニフィブラノール前処理した人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-V37e)による炎症(Inflammation)抑制効果を示す図である。

【図7】図7は、脂肪症(Steatosis)誘発性肝細胞において人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-e)及びラニフィブラノール前処理した人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-V37e)による小胞体ストレス(ER Stress)抑制効果を示す図である。

40

【図8A】図8Aは、脂肪症(Steatosis)誘発性肝細胞においてエキセンジン-4及びエキセンジン-4前処理した人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から分離したエキソソーム(BxC-G63e)による脂質生成(Lipogenesis)抑制効果を示す図である。

【図8B】図8Bは、脂肪症(Steatosis)誘発性肝細胞においてエキセンジン-4及びエキセンジン-4前処理した人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞(BxC)から

50

分離したエキソソーム ( B x C - G 6 3 e ) による脂質生成 ( L i p o g e n e s i s ) 抑制効果を示す図である。

【図 8 C】図 8 C は、脂肪症 ( S t e a t o s i s ) 誘発性肝細胞においてエキセンジン - 4 及びエキセンジン - 4 前処理した人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞 ( B x C ) から分離したエキソソーム ( B x C - G 6 3 e ) による脂質生成 ( L i p o g e n e s i s ) 抑制効果を示す図である。

【図 9 A】図 9 A は、脂肪症 ( S t e a t o s i s ) 誘発性肝細胞においてエキセンジン - 4 及びエキセンジン - 4 前処理した人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞 ( B x C ) から分離したエキソソーム ( B x C - G 6 3 e ) による炎症 ( I n f l a m m a t i o n ) 抑制効果を示す図である。

10

【図 9 B】図 9 B は、脂肪症 ( S t e a t o s i s ) 誘発性肝細胞においてエキセンジン - 4 及びエキセンジン - 4 前処理した人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞 ( B x C ) から分離したエキソソーム ( B x C - G 6 3 e ) による炎症 ( I n f l a m m a t i o n ) 抑制効果を示す図である。

【図 1 0】図 1 0 は、脂肪症 ( S t e a t o s i s ) 誘発性肝細胞においてエキセンジン - 4 及びエキセンジン - 4 前処理した人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞 ( B x C ) から分離したエキソソーム ( B x C - G 6 3 e ) による小胞体ストレス ( E R S t r e s s ) 抑制効果を示す図である。

【図 1 1 A】図 1 1 A は、脂肪症誘発マウスの肝細胞に、物質を処理していないノーマル群 ( N o r m a l ) 、 P B S を処理した対照群 ( M C D - P B S ) 、及び B x C - V 3 7 e を処理した B x C - V 3 7 e 処理群 ( M C D - V 3 7 e ) のヘマトキシリン及びエオシン ( H e m a t o x y l i n & E o s i n ; H & E ) 染色結果を示す写真である。

20

【図 1 1 B】図 1 1 B は、脂肪症誘発マウスの肝細胞に、物質を処理していないノーマル群 ( N o r m a l ) 、 P B S を処理した対照群 ( M C D - P B S ) 、及び B x C - V 3 7 e を処理した B x C - V 3 7 e 処理群 ( M C D - V 3 7 e ) のオイルレッド O ( o i l r e d O ) 染色結果を示す写真である。

【図 1 2 A】図 1 2 A は、脂肪症誘発マウスの肝細胞に、物質を処理していないノーマル群 ( N o r m a l ) 、 P B S を処理した対照群 ( M C D - P B S ) 、及び B x C - G 6 3 e を処理した B x C - G 6 3 e 処理群 ( M C D - G 6 3 e ) のヘマトキシリン及びエオシン染色結果 ( H e m a t o x y l i n & E o s i n ; H & E ) を示す写真である。

30

【図 1 2 B】図 1 2 B は、脂肪症誘発マウスの肝細胞に、物質を処理していないノーマル群 ( N o r m a l ) 、 P B S を処理した対照群 ( M C D - P B S ) 、及び B x C - G 6 3 e を処理した B x C - G 6 3 e 処理群 ( M C D - G 6 3 e ) のオイルレッド O ( o i l r e d O ) 染色結果を示す写真である。

【図 1 3 A】図 1 3 A は、脂肪症誘発マウスの肝細胞に、物質を処理していないノーマル群 ( N o r m a l ) 、 P B S を処理した対照群 ( M C D - P B S ) 、及び B x C - V 3 7 e を処理した B x C - V 3 7 e ( M C D - V 3 7 e ) 処理群の N A S 点数を示すグラフである。

【図 1 3 B】図 1 3 B は、脂肪症誘発マウスの肝細胞に、物質を処理していないノーマル群 ( N o r m a l ) 、 P B S を処理した対照群 ( M C D - P B S ) 、及び B x C - G 6 3 e を処理した B x C - G 6 3 e ( M C D - V 6 3 e ) 処理群の N A S 点数を示すグラフである。

40

【図 1 4 A】図 1 4 A は、脂肪症誘発マウスの肝細胞に、物質を処理していないノーマル群 ( N o r m a l ) 、 P B S を処理した対照群 ( M C D - P B S ) 、及び B x C - V 3 7 e を処理した B x C - V 3 7 e 処理群 ( M C D - V 3 7 e ) の免疫組織化学染色結果を示す写真である。

【図 1 4 B】図 1 4 B は、脂肪症誘発マウスの肝細胞に、物質を処理していないノーマル群 ( N o r m a l ) 、 P B S を処理した対照群 ( M C D - P B S ) 及び B x C - G 6 3 e を処理した B x C - G 6 3 e 処理群 ( M C D - G 6 3 e ) の免疫組織化学染色結果を示す写真である。

50

【図15A】図15Aは、線維化誘発マウスの肝細胞に、物質を処理していないノーマル群 (Normal)、PBSを処理した対照群 (TAA - PBS)、及びBxC - V37eを処理したBxC - V37e (TAA - V37e) 処理群の肝組織を示す写真である。

【図15B】図15Bは、線維化誘発マウスの肝細胞に、物質を処理していないノーマル群 (Normal)、PBSを処理した対照群 (TAA - PBS)、及びBxC - G63eを処理したBxC - G63e (TAA - G63e) 処理群の肝組織を示す写真である。

【図16A】図16Aは、線維化誘発マウスの肝細胞に、物質を処理していないノーマル群 (Normal)、PBSを処理した対照群 (TAA - PBS)、及びBxC - V37eを処理したBxC - V37e (TAA - V37e) 処理群のヘマトキシリン及びエオシン染色結果を示す写真である。

10

【図16B】図16Bは、線維化誘発マウスの肝細胞に、物質を処理していないノーマル群 (Normal)、PBSを処理した対照群 (TAA - PBS)、及びBxC - G63eを処理したBxC - G63e (TAA - G63e) 処理群のヘマトキシリン及びエオシン染色結果を示す写真である。

【図17A】図17Aは、線維化誘発マウスの肝細胞に、物質を処理していないノーマル群 (Normal)、PBSを処理した対照群 (TAA - PBS)、及びBxC - V37eを処理したBxC - V37e (TAA - V37e) 処理群のピクロシリウスレッド (picrosirius red) 染色結果を示す写真である。

【図17B】図17Bは、線維化誘発マウスの肝細胞に、物質を処理していないノーマル群 (Normal)、PBSを処理した対照群 (TAA - PBS)、及びBxC - G63eを処理したBxC - G63e (TAA - G63e) 処理群のピクロシリウスレッド (picrosirius red) 染色結果を示す写真である。

20

【発明を実施するための形態】

【0062】

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPSC) 由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell; MSC) から分離されたエキソソームを有効成分として含む、非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis) の予防、緩和、抑制又は治療用薬剤学的組成物に関する。

【実施例】

30

【0063】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明する。これらの実施例は単に本発明を例示するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例によって制限されるものと解釈されないことは、当業界における通常の知識を有する者にとって明らかであろう。

本明細書全体を通じて、特定物質の濃度を示すために用いられる “%” は、特に言及しない限り、固体/固体は (重量/重量)%、固体/液体は (重量/体積)%、そして液体/液体は (体積/体積)%である。

【0064】

製造例：人工多能性幹細胞 (iPSC) 由来間葉系幹細胞 (BxC) の分離及び培養  
まず、人工多能性幹細胞 (iPSC) を、10%のFBS及び10ng/mlのbFGFを添加したDMEMで7日間培養した。次に、培養された人工多能性幹細胞から、FACSを用いて、細胞表面にSSEA-4 (stage-specific embryonic antigen 4) タンパク質を発現しないSSEA-4 (-) 細胞を分離し、人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の前駆細胞を得た。また、分離されたSSEA-4 (-) 細胞を継代して前記と同じ培地で7日間さらに培養し、本発明の人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞を作製した。本発明者らは、前記人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞をBxC (brexogen stem cell) と命名した。

40

BxCと命名された人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞を、培養培地 [高グルコースDMEM (Gibco, Cat no. 11995-065)、10%ウシ胎児血清 (HyClone)、1% MEM非必須アミノ酸溶液 (100X) (Gibco, Cat no

50

． 1 1 1 4 0 - 0 5 0 ) ] でさらに培養した。

#### 【 0 0 6 5 】

実施例 1：人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞 ( B x C ) 由来エキソソーム ( B x C - e ) の分離

前記製造例で培養された人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞 ( 以下、 B x C ) 培養培地を回収して 3 0 0 x g で 1 0 分間遠心分離し、残っている細胞及び細胞片を除去した。上清を取って 0 . 2 2 μ m フィルターを用いて濾過した後、高速遠心分離機 ( h i g h s p e e d c e n t r i f u g e ) を用いて 1 0 , 0 0 0 x g、4 で 7 0 分間遠心分離した。遠心分離された上清を再び取り、超遠心分離器 ( u l t r a c e n t r i f u g e ) を用いて 1 0 0 , 0 0 0 x g、4 で 9 0 分間遠心分離して上清を除去した。下層に残っているエキソソームを P B S ( p h o s p h a t e b u f f e r e d s a l i n ) に希釈し、以下の実験に使用した。

10

#### 【 0 0 6 6 】

実験例 1：人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞由来エキソソーム ( B x C - e ) の特性確認

前記実施例 1 で分離されたエキソソーム ( 以下、 B x C - e ) に対して、ナノ粒子トラッキングアッセイ ( n a n o p a r t i c l e t r a c k i n g a s s a y ) ( N a n o S i g h t N S 3 0 0 , M a l v e r n ) を用いてエキソソームのサイズ分布を確認し、電子顕微鏡を用いてエキソソームの形態を確認した。

図 1 A 及び図 1 B から確認できるように、本発明の B x C から由来したエキソソームは、エキソソームとしての特性を有することが分かる。

20

#### 【 0 0 6 7 】

実験例 2：人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞由来エキソソーム ( B x C - e ) の脂肪分化に対する抑制効果の確認

前記実施例 1 で分離されたエキソソームに対して、脂肪分化に対する抑制効果を確認した。

ヒト脂肪細胞 ( p r i m a r y h u m a n a d i p o c y t e , A T C C , U S A ) を 6 ウェルプレートに分注し、1 % ペニシリン - ストレプトマイシン及び 1 0 % C S が添加された D M E M 培地 ( G i b c o , U S A ) を用いて、3 7 、5 % C O 2 培養器でコンフルエント ( c o n f l u e n t ) な状態に育つまで ( 最大で 6 日 ) 培養した。

30

脂肪細胞を 6 日間培養した後、1 % ペニシリン - ストレプトマイシン及び 1 0 % F B S が添加された D M E M 培地 ( G i b c o , U S A ) に、脂肪分化培地 [ 3 4 μ M パントテン酸塩 ( p a n t o t h e n a t e , S i g m a ) 、6 6 μ M ビオチン ( b i o t i n , S i g m a ) 、0 . 5 m M インスリン ( S i g m a ) 、1 m M デキサメタゾン ( d e x a m e t h a s o n e , S i g m a ) 、及び 0 . 0 5 M I B M X ( S i g m a ) ] が添加された基本培地で 5 日間培養した。その後、D M E M 培地 ( G i b c o , U S A ) に脂肪分化培地 [ 3 4 μ M パントテン酸塩 ( p a n t o t h e n a t e , S i g m a ) 、6 6 μ M ビオチン ( b i o t i n , S i g m a ) 、0 . 5 m M インスリン ( S i g m a ) 及び 1 m M デキサメタゾン ( d e x a m e t h a s o n e , S i g m a ) ] が添加された培地からさらに 9 日間培養した。

40

このとき、陰性対照群 ( N e g a t i v e C o n t r o l ) は、1 0 % F B S が添加された D M E M 培地で 1 4 日間培養した脂肪細胞であり、ビークル対照群 ( V e h i c l e c o n t r o l ) は、B x C - e を処理せず、脂肪分化条件で 1 4 日間培養された脂肪細胞であり、B x C - e 処理群は、B x C - e が含まれた脂肪分化条件で 1 4 日間培養された脂肪細胞である。

培養液を完全に除去した後、P B S で 2 回洗浄し、1 0 % ホルマリン溶液を 4 0 0 μ l / w e l l で添加し、細胞を 1 時間固定させた。P B S で洗浄し、オイルレッド O ワーキング溶液 ( w o r k i n g s o l u t i o n ) を 4 0 0 μ l / w e l l で添加し、2 時間、分化した脂肪細胞内の脂肪を染色させた。その後、オイルレッド O ワーキング溶液を除去し、2 次蒸留水を用いてウェルの壁に付いているオイルレッド O ワーキング溶液を完

50

全に除去した後、乾燥器に入れて5分間乾燥させた後、イソプロピルアルコール ( i s o p r o p y l a l c o h o l ) を 5 0 0  $\mu$  l / w e l l となるようにウェルに添加した。マイクロプレートリーダー ( M o d e l 6 8 0 m i c r o p l a t e r e a d e r , B i o - R a d , U S A ) を用いて 4 9 0 n m で吸光度を測定し、脂質の量を定量的に比較した。

図 2 A 及び図 2 B から確認できるように、本発明の B x C から由来したエキソソーム ( B x C - e ) は、脂肪細胞の脂質生成 ( l i p o g e n e s i s ) を抑制する効果に優れていることが分かった。

#### 【 0 0 6 8 】

実施例 2 : 前処理物質の処理による人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞由来エキソソームの分離

10

2 - 1 . ラニフィブラノール処理による人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞由来エキソソーム ( B x C - V 3 7 e )

ラニフィブラノール 1 0  $\mu$  M が含まれた培養培地 [ 高グルコース DMEM ( G i b c o , C a t n o . 1 1 9 9 5 - 0 6 5 ) ; 1 0 % ウシ胎児血清 ( H y C l o n e ) 、 1 % MEM 非必須アミノ酸溶液 ( 1 0 0 X ) ( G i b c o , C a t n o . 1 1 1 4 0 - 0 5 0 ) ] で、前記製造例で製造された人工多能性幹細胞 ( i P S C ) 由来間葉系幹細胞 ( B x C ) を 2 4 時間培養した。

培養を完了した後、ラニフィブラノールが前処理された B x C を洗浄し、エキソソームが除去されたウシ胎児血清 ( F B S ) を 1 0 % 添加した培養培地でさらに 7 2 時間培養した。エキソソームが除去された F B S を使用する理由は、通常使用する F B S にはウシ血清由来のエキソソームが非常に多く含まれていることから、細胞が分泌するエキソソームの他に F B S 由来エキソソームが混入することを防止するためである。

20

7 2 時間培養後、前処理物質が処理された B x C 培養培地を回収して 3 0 0  $\times$  g で 1 0 分間遠心分離し、残っている細胞及び細胞片を除去した。上清を取り、0 . 2 2  $\mu$  m フィルターを用いて濾過した後、高速遠心分離機 ( h i g h s p e e d c e n t r i f u g e ) を用いて 1 0 , 0 0 0  $\times$  g 、 4 で 7 0 分間遠心分離した。遠心分離された上清を再び取り、超遠心分離器 ( u l t r a c e n t r i f u g e ) を用いて 1 0 0 , 0 0 0  $\times$  g 、 4 で 9 0 分間遠心分離し、上清を除去した。下層に残っているエキソソームを P B S ( p h o s p h a t e b u f f e r d s a l i n ) に希釈し、以下の実験に使用した。

30

#### 【 0 0 6 9 】

2 - 2 . エキセンジン - 4 処理による人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞由来エキソソーム ( B x C - G 6 3 e )

前記実施例 2 - 1 のラニフィブラノールに代えてエキセンジン - 4 ( 2 0 n M ) を処理した以外は、前記実施例 2 - 1 と同じ方法でエキソソームを分離した。

#### 【 0 0 7 0 】

実験例 3 : 前処理物質の処理による人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞由来エキソソームの特性確認

前記実施例 2 で分離されたそれぞれのエキソソーム ( B x C - V 3 7 e 及び B x C - G 6 3 e ) に対して、ナノ粒子トラッキングアッセイ ( N a n o S i g h t N S 3 0 0 , M a l v e r n ) を用いてエキソソームのサイズ分布を確認し、電子顕微鏡を用いてエキソソームの形態を確認した。

40

図 3 A ~ 図 4 B から確認できるように、本発明の I V A 3 3 7 処理による B x C 由来エキソソーム ( 図 3 A 及び図 3 B ) 、 及びエキセンジン - 4 処理による B x C 由来エキソソーム ( 図 4 A 及び図 4 B ) はいずれもエキソソームとしての特性を有することが分かる。

#### 【 0 0 7 1 】

実験例 4 : ラニフィブラノール処理による人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞由来エキソソーム ( B x C - V 3 7 e ) の非アルコール性脂肪性肝炎治療活性評価

前記実施例 1 で分離されたエキソソーム ( B x C - e ) 及び前記実施例 2 - 1 で分離されたエキソソーム ( B x C - V 3 7 e ) に対して、下記のように実験した。

50

## 【0072】

## 4-1. 脂肪症 (Steatosis) 誘導

材料及び試薬

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培地は Hyclone (Pittsburgh, PA, USA) 社から、FBS (fetal bovine serum) は Gibco (Grand Island, NY, USA) 社から購入した。遊離脂肪酸が含まれていない BSA (Fatty acid-free bovine serum albumin)、パルミチン酸塩 (palmitate)、及びオレイン酸塩 (oleate) は、Sigma (St. Louis, MO, USA) 社から購入した。

10

ヒト肝細胞株 (HepG2) の培養

ヒト肝細胞株 (HepG2, ATTC) は、10% FBS (Gibco)、1% ペニシリン - ストレプトマイシンが含まれた DMEM 培地で、37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件で培養した。培養された細胞は、6 ウェルプレートに一定の数 (5 × 10<sup>5</sup> 細胞 / 1000 μl / ウェル) で分注した後、細胞が完全な形態でウェルに完全に付着し、細胞が 95% コンフルエントに到達するまでインキュベートした。

遊離脂肪酸 (Free Fatty Acid; FFA) の製造

## (1) 1M パルミチン酸塩及び 1M オレイン酸塩貯蔵溶液の調製

溶液は、70% エタノール及び脱イオン蒸留水 (ddH<sub>2</sub>O) を溶媒として用いて、60℃ で調製し、0.2 μm のフィルターを用いて濾過した後、滅菌した。

20

## (2) 遊離脂肪酸が含まれていない 1% (w/v) の BSA 溶液の製造

溶媒として脱イオン蒸留水を用いて調製した後に滅菌し、4℃ で冷蔵した。

## (3) パルミチン酸塩及びオレイン酸塩の濃度が 100 mM となるように混合した混合脂肪酸の調製

前記 (2) で製造した遊離脂肪酸が含まれていない 1% (w/v) の BSA 溶液を溶媒として用いて、前記 (1) で製造した脂肪酸の濃度が 100 mM となるように調製した。[前記 (1) で製造した 1M パルミチン酸塩 10 μl + 1% (w/v) の BSA 290 μl (33 mM)]、及び [前記 (1) で製造した 1M オレイン酸塩 10 μl + 1% (w/v) の BSA 140 μl (66 mM)] を 70℃ ヒートブロック (heat block) 中で、1:1 の体積比で混合した。

30

## (4) 最終濃度 1 mM の混合遊離脂肪酸 (FFA) の調製

前記 (3) で製造した混合脂肪酸 100 mM 溶液 10 μl (1% (w/v) の BSA を含むオレイン酸塩及びパルミチン酸塩を 2:1 の濃度比で混合) を、1% ペニシリン - ストレプトマイシンが含まれた無血清 DMEM 培地 990 μl に混合し、FFA の最終濃度が 1 mM となるように調製した。

## (5) BSA 対照溶液の調製

前記 (2) で製造した 1% (w/v) の BSA を対照溶液として使用した。

脂肪症 (Steatosis) の誘導

前記 95% コンフルエントに到達した HepG2 細胞の培地を捨て、PBS で 1 回洗浄した後、前記 (4) で製造した 1 mM 混合遊離脂肪酸を、6 ウェルに各ウェルにつき 1 ml ずつ入れた。ビヒクル対照群 (Vehicle Control) には、同量のビヒクル (vehicle) で処理された無血清培地を入れた。全ての処理は一晚 (16 時間) 行われた。

40

## 【0073】

## 4-2. 非アルコール性脂肪性肝炎治療活性評価

前記 16 時間処理された HepG2 細胞を PBS で 1 回洗浄し、前記実施例で分離された BxC-e 100 μg 及び前記実施例 2 で分離された BxC-V37e 100 μg をそれぞれ 1 ml 無血清培地に 24 時間処理した後、下記各実験を行った。

## 【0074】

## [1] 脂質生成 (Lipogenesis) の抑制効果

50

6 ウェルプレート of ウェルにつきトリゾール溶液 1 ml を添加してヒト肝細胞を分解した。クロロホルム (chloroform) 200 μl を添加し、ボルテックス (vortex) した後、4、12,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移した後、イソプロパノール (isopropanol) 500 μl と混ぜた。50 回逆さまにし、氷上で 5 分間放置した後、12,000 rpm、4 で 10 分間遠心分離した。上清を除去し、残ったペレットに 70% エタノール 1 ml を加えた後、12,000 rpm、4 で 5 分間遠心分離した。エタノールを除去した後、RNA ペレットが入っているチューブを室温で乾燥させ不可視化した。ヌクレアーゼフリー水 (nuclease free water) を用いて RNA ペレットを溶解させた。ナノドロップ (nanodrop) を用いて 260 nm 及び 280 nm 波長で抽出された RNA サンプルの濃度を測定し、RT premix を用いて cDNA を合成した。

10

合成した cDNA について、合成されたプライマー (コスモジントック) (下記表 1 参照) を使用してリアルタイム PCR (Real time-polymerase chain reaction) を行い、FABP4 の mRNA 発現をモニターした。

【0075】

【表 1】

遺伝子	プライマー	配列(5'-3')
FABP4	F	GCATGGCCAAACCTAACATG(配列番号1)
	R	CCTGGCCCAGTATGAAGGAA(配列番号2)

20

【0076】

図 5 から確認できるように、脂肪症 (steatosis) 誘導したヒト肝細胞に、BxC-V37e を処理した群において、脂質生成に関連する FABP4 遺伝子の発現レベルが、処理していない群に比べて減少した。このことから、BxC-V37e の脂質生成に対して高度な抑制活性を持っていることが確認できた。

【0077】

[2] 炎症 (Inflammation) の抑制効果

前記実施例 4 - [1] と同じ方法を用いて、TNF-α 及び MCP1 の mRNA 発現変化を確認した。使用したプライマーは、下記表 2 に示した。

30

【0078】

【表 2】

遺伝子	プライマー	配列 (5'-3')
TNF-α	F	GAGCTGAACAATAGGCTGTTCCCA(配列番号3)
	R	AGAGGCTCAGCAATGAGTGACAGT(配列番号4)
MCP1	F	TCTGTGCCTGCTGCTCATAG(配列番号5)
	R	GGGCATTGATTGCATCTGGC(配列番号6)

40

【0079】

図 6 A 及び図 6 B から確認できるように、脂肪症 (steatosis) 誘導したヒト肝細胞に、BxC-V37e を処理した群において、炎症誘導時に発現する TNF-α と MCP-1 の発現レベルが、処理していない群に比べて顕著に減少した。このことから、脂質生成によって誘発された炎症状態において BxC-V37e の抗炎症活性が非常に優れていることが確認できた。

【0080】

[3] 小胞体ストレス (ER Stress) の抑制効果

前記実施例 4 - [1] と同じ方法を用いて、CHOP の mRNA 発現変化を確認した。使用したプライマーは、下記表 3 に示す。

50

【表 3】

遺伝子	プライマー	配列(5'-3')
CHOP	F	AGGGAGAACCAGGAAACGGAAACA(配列番号7)
	R	TCCTGCTTGAGCCGTTTCATTCTCT(配列番号8)

## 【0081】

図7から確認できるように、脂肪症 (steatosis) 誘導したヒト肝細胞に、BxC-V37eを処理した群において、小胞体ストレスに関連するCHOP遺伝子発現レベルが、処理していない群に比べて顕著に減少した。このことから、BxC-V37eの脂質生成によって誘導された小胞体ストレスに対する抑制活性が非常に優れていることが確認できた。

10

## 【0082】

実験例5：エキセンジン-4処理による人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞由来エキソソーム (BxC-G63e) の非アルコール性脂肪性肝炎治療活性評価

エキセンジン-4及び前記実施例2-2で分離されたエキソソーム (BxC-G63e) に対して、下記のように実験した。

## 【0083】

## 5-1. 脂肪症 (Steatosis) 誘導

## 材料及び試薬

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培地はHyclone (Pittsburgh, PA, USA) 社から、FBS (fetal bovine serum) はGibco (Grand Island, NY, USA) 社から購入した。遊離脂肪酸が含まれていないBSA (Fatty acid-free bovine serum albumin)、パルミチン酸塩 (パルミチン酸塩) 及びオレイン酸塩 (オレイン酸塩) はSigma (St. Louis, MO, USA) 社から購入した。

20

## ヒト肝細胞株 (HepG2) 培養

ヒト肝細胞株 (HepG2, ATTC) は、10% FBS (Gibco)、1% ペニシリン-ストレプトマイシンが含まれたDMEM培地で、37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件で培養した。培養された細胞は6ウェルプレートに一定の数 (5 × 10<sup>5</sup> 細胞 / 1000 µl / ウェル) で分注した後、細胞が完全な形態でウェルに完全に付着し、細胞が95% コンフルエントに到達するまでインキュベートした。

30

## 遊離脂肪酸 (Free Fatty Acid; FFA) 製造

## (1) 1Mパルミチン酸塩及び1Mオレイン酸塩貯蔵溶液の調製

溶液は、70% エタノール及び脱イオン蒸留水 (ddH<sub>2</sub>O) を溶媒として用いて、60℃ で調製し、0.2 µm のフィルターを用いて濾過した後、滅菌した。

## (2) 遊離脂肪酸が含まれていない1% (w/v) のBSA溶液の製造

脱イオン蒸留水を溶媒として用いて調製した後に滅菌し、4℃ で冷蔵した。

## (3) パルミチン酸塩及びオレイン酸塩の濃度が100mMとなるように混合した混合脂肪酸の調製

前記(2)で製造した遊離脂肪酸が含まれていない1% (w/v) のBSA溶液を溶媒として用いて、前記(1)で製造した脂肪酸の濃度が100mMとなるように調製した。[前記(1)で製造した1Mパルミチン酸塩10 µl + 1% (w/v) のBSA 290 µl (33mM)]、及び[前記(1)で製造した1Mオレイン酸塩10 µl + 1% (w/v) のBSA 140 µl (66mM)] を70℃ ヒートブロック (heat block) 中で、1:1の体積比で混合した。

40

## (4) 最終濃度1mMの混合遊離脂肪酸 (FFA) の調製

前記(3)で製造した混合脂肪酸100mM溶液10 µl (1% (w/v) のBSAを含むオレイン酸塩及びパルミチン酸塩を2:1の濃度比で混合) を、1% ペニシリン-ストレプトマイシンが含まれた無血清DMEM培地990 µl に混合し、FFAの最終濃度

50

が 1 m M となるように調製した。

( 5 ) B S A 対照溶液の調製

前記 ( 2 ) で製造した 1 % ( w / v ) の B S A を対照溶液として使用した。

脂肪症 ( S t e a t o s i s ) 誘導

前記 9 5 % コンフルエントに到達した H e p G 2 細胞の培地を捨て、 P B S で 1 回洗浄した後、前記 ( 4 ) で製造した 1 m M 混合遊離脂肪酸を 6 ウェルの各ウェルにつき 1 m l ずつ入れた。ピークル対照群 ( V e h i c l e C o n t r o l ) には、同量のピークル ( v e h i c l e ) で処理された無血清培地を入れた。全ての処理は一晚 ( 1 6 時間 ) 行われた。

【 0 0 8 4 】

5 - 2 . 非アルコール性脂肪性肝炎治療活性評価

前記 1 6 時間処理された H e p G 2 細胞を P B S で 1 回洗浄し、 2 0 n M エキセジン - 4 1 0 0 μ g 又は前記実施例 2 で分離された B x C - G 6 3 e 1 0 0 μ g を 1 m l 無血清培地に 2 4 時間処理した後、下記各実験を行った。

【 0 0 8 5 】

[ 1 ] 脂質生成 ( L i p o g e n e s i s ) の抑制効果

6 ウェルプレートのウェルにつきトリゾール溶液 1 m l を添加してヒト肝細胞を分解した。クロロホルム ( c h l o r o f o r m ) 2 0 0 μ l を添加し、ボルテックス ( v o r t e x ) した後、 4 , 1 2 , 0 0 0 r p m で 1 5 分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移した後、イソプロパノール ( i s o p r o p h a n o l ) 5 0 0 μ l と混ぜた。 5 0 回逆さまにし、氷上で 5 分間放置した後、 1 2 , 0 0 0 r p m 、 4 で 1 0 分間遠心分離した。上清を除去し、残ったペレットに 7 0 % エタノール 1 m l を加えた後、 1 2 , 0 0 0 r p m 、 4 で 5 分間遠心分離した。エタノールを除去した後、 R N A ペレットが入っているチューブを室温で乾燥させ不可視化した。ヌクレアーゼフリー水を用いて R N A ペレットを溶解させた。ナノドロップを用いて 2 6 0 n m 及び 2 8 0 n m 波長で抽出された R N A サンプルの濃度を測定し、 R T p r e m i x を用いて c D N A を合成した。

合成した c D N A について、合成されたプライマー ( コスモジントック ) ( 下記表 4 参照 ) を使用してリアルタイム P C R ( R e a l t i m e - p o l y m e r a s e c h a i n r e a c t i o n ) を行い、 F A B P 4 、 A C C 1 、 及び S R E B P 1 の m R N A 発現変化をモニターした。

【 0 0 8 6 】

【表 4】

遺伝子	プライマー	配列(5'-3')
FABP4	F	GCATGGCCAAACCTAACATG(配列番号1)
	R	CCTGGCCCAGTATGAAGGAA(配列番号2)
ACC1	F	GCTCCTTGTCACCTGCTTCT(配列番号9)
	R	CAAGGCCAAGCCATCCTGTA(配列番号10)
SREBP1	F	GGAGGGGTAGGGGCCAACGC(配列番号11)
	R	CATGTCTTCGAAAGTGCAAT(配列番号12)

【 0 0 8 7 】

図 8 A ~ 図 8 C から確認できるように、脂肪症 ( s t e a t o s i s ) 誘導したヒト肝細胞に、 B x C - G 6 3 e を処理した群において、脂質生成に関連する F A B P 4 、 A C C 1 、 S R E B P 1 遺伝子発現レベルが、処理していない群に比べて減少した。このことから、 B x C - G 6 3 e の脂質生成に対する抑制機能が非常に優れていることが確認できた。

【 0 0 8 8 】

[ 2 ] 脂肪生成 ( I n f l a m m a t i o n ) の抑制効果

前記実施例 5 - [ 1 ] と同じ方法を用いて、 T N F - 及び I L - 1 0 の m R N A 発現

10

20

30

40

50

変化を確認した。使用したプライマーは、下記表 5 に示す。

【表 5】

遺伝子	プライマー	配列(5'-3')
TNF- $\alpha$	F	GAGCTGAACAATAGGCTGTTCCCA(配列番号3)
	R	AGAGGCTCAGCAATGAGTGACAGT(配列番号4)
IL-10	F	TGAAAACAAGAGCAAGGCCG(配列番号13)
	R	GCCACCCTGATGTCTCAGTT(配列番号14)

【0089】

10

図9A及び図9Bから確認できるように、脂肪症(steatosis)誘導したヒト肝細胞に、BxC-G63eを処理した群において、TNF- $\alpha$ とIL-10の発現レベルを確認した結果、炎症誘発(pro-inflammation)機能をするTNF- $\alpha$ の発現レベルは顕著に減少し、抗炎症(anti-inflammation)機能をするIL-10の発現レベルは、対照群に比べて顕著に増加した。このことから、脂質生成によって誘導された炎症状況においてBxC-G63eの炎症抑制効果が非常に優れていることが確認できた。

【0090】

[3]小胞体ストレス(ER Stress)抑制効果

前記実施例5-[1]と同じ方法を用いて、CHOPのmRNA発現変化を確認した。使用した遺伝子のプライマーは、前記表3に示した。

20

図10から確認できるように、脂肪症(steatosis)誘導したヒト肝細胞に、BxC-G63eを処理した群において、小胞体ストレスに関連するCHOP遺伝子発現レベルが、処理していない群に比べて顕著に減少した。このことから、BxC-G63eの脂質生成によって誘導された小胞体ストレスに対する抑制活性が非常に優れていることが確認できた。

【0091】

実験例6：MCD-dietマウスモデルを用いたBxC-V37e及びBxC-G63eの非アルコール性脂肪性肝炎治療活性評価

前記実施例2-1で分離されたエキソソーム(BxC-V37e)及び前記実施例2-2で分離されたエキソソーム(BxC-G63e)に対して、下記のように実験した。

30

【0092】

6-1.MCDダイエットマウスの脂肪症誘導

MCDダイエットマウス飼育環境

C57BL/6NHsd雄マウスを温度 $23 \pm 3$ 、相対湿度 $55 \pm 15\%$ 、換気回数10~20回/hr、照明時間12時間(午前8時点灯~午後8時消灯)、及び照度150~300Luxに設定した環境で飼育しながら、環境条件を定期的に測定した。

MCDダイエット給与

6週齢のC57BL/6NHsd雄マウスに、MCD食餌を5日間供給し、その後2日間は通常の食餌を供給する方式で12週間、MCD食餌及び通常の食餌を交互に自由摂取させた。

40

投与試験物質の調製及び投与

BxC-G63e又はBxC-V37eをPBSに希釈してそれぞれの試験物質を調製した。試験物質のタンパク質量 $100 \mu\text{g}/\text{匹} \sim 400 \mu\text{g}/\text{匹}$ を、1日1回及び週3回、4週間静脈投与した。6週齢のC57BL/6NHsd雄マウスをホルダーに拘束し、26ゲージ注射針が装着された注射器を用いて、試験物質を尾静脈から1mL/分の速度で徐々に注入した。

【0093】

6-2.非アルコール性脂肪性肝炎治療活性評価

前記試験物質が投与されたC57BL/6NHsd雄マウスの肝臓を摘出して写真撮影

50

後に重量を測定した。右葉は10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、左葉は液体窒素を用いて急速冷凍させ、以下の実験に使用した。

#### 【0094】

##### [1] 脂質生成 (Lipogenesis) の抑制効果

###### 組織病理学的検査

トリミング、脱水、パラフィン包埋、切片化などの一般的な組織処理過程の後、固定された肝臓組織を用いて病理学的検査のための検体を作製した。検体をヘマトキシリン及びエオシン (Hematoxylin & Eosin; H&E) 及びオイルレッドO (oil red O) 染色を施し、光学顕微鏡 (Olympus BX53, Japan) を用いて組織病理学的変化を観察した。

10

###### NASスコアリング

微小空胞変性 (Microvesicular steatosis)、巨大空胞変性 (Macrovesicular steatosis)、肝細胞肥大 (hypertrophy) に対して、顕微鏡下で40倍から100倍の倍率で視野に影響を与えた総面積のパーセンテージに基づいて、0~3点に等級付けした。炎症は、100倍率視野における5つの病巣について、100倍の倍率で0~3点に点数化した後、群間で比較した。

図11A及び図11B、並びに図12A及び12Bから確認できるように、MCD食餌によって脂肪症 (steatosis) を誘導し、BxC-G63e又はBxC-V37eを処理した群は、脂肪滴 (lipid droplet) のサイズ及び数が、試験物質を処理していない対照群に比べて格段に減少していることが観察された。

20

また、図13A又は図13Bから分かるように、微小空胞変性 (Microvesicular steatosis)、巨大空胞変性 (Macrovesicular steatosis)、肝細胞肥大 (hypertrophy) のNASスコアがいずれも減少した。このことから、BxC-G63e又はBxC-V37eの脂質生成に対する抑制効果が非常に優れていることを確認した。

#### 【0095】

##### [2] 炎症 (Inflammation) の抑制効果

トリミング、脱水、パラフィン包埋、切片化などの一般的な組織処理過程の後、固定された肝臓組織を用いて病理学的検査のための検体を作製した。検体を、1次抗体として抗TNF- $\alpha$  (anti-TNF- $\alpha$ ) と反応させた後、これに特異的な2次抗体とさらに反応させた後、TNF- $\alpha$  タンパク質発現変化量を観察した。

30

図14A及び図14Bから観察できるように、MCD食餌を用いて炎症 (inflammation) を誘導し、BxC-G63e又はBxC-V37eを処理した群が、PBSを処理した対照群に比べて、TNF- $\alpha$  タンパク質発現レベルが格段に減少していることを確認した。また、図13Aから確認できるように、BxC-V37eを処理した群において、炎症スコア (inflammation score) が減少していた。したがって、BxC-G63e又はBxC-V37eの炎症に対する抑制活性が非常に優れていることを確認した。

#### 【0096】

実験例7: TAAマウスモデルを用いたBxC-V37e及びBxC-G63eの非アルコール性脂肪性肝炎治療活性評価

40

前記実施例2-1で分離されたエキソソーム (BxC-V37e) 及び前記実施例2-2で分離されたエキソソーム (BxC-G63e) に対して、下記のように実験した。

#### 【0097】

##### 7-1. TAAマウスの線維化誘導

###### TAAダイエットマウス飼育環境

C57BL/6雄マウスを温度 $23 \pm 3$ 、相対湿度 $55 \pm 15\%$ 、換気回数 $10 \sim 20$ 回/h、照明時間12時間 (午前8時点灯~午後8時消灯)、及び照度 $150 \sim 300$  Luxに設定した環境で飼育しながら、環境条件を定期的に測定した。

###### TAA薬物投与

50

6週齢のC57BL/6雄マウスに200mg/kg濃度のTAAを1日1回、週に3回、12週間投与した。

#### 投与試験物質の調製及び投与

BxC-G63e又はBxC-V37eをPBSに希釈してそれぞれの試験物質を調製した。試験物質を400µg/匹ずつ、1日1回、週3回、4週間皮下投与し、同時に200mg/kg濃度のTAAを1日1回、週2回、4週間投与した。物質の注射のために、投与部位を70%アルコールで消毒した。親指と人差し指で右側マウス大腿部の皮膚を引っ張って皮膚と筋肉との間に空間を作った後、動物の前方から親指と人差し指との間の皮下腔に、インスリン注射器を差し込みそのまま投与した。

【0098】

#### 7-2. 非アルコール性脂肪性肝炎治療活性評価

前記試験物質が投与されたC57BL/6雄マウスの肝臓を摘出して写真撮影した後、重量を測定した。右葉は10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、左葉は液体窒素を用いて急速冷凍させ、以下の実験に使用した。

【0099】

#### [1] 線維症(Fibrosis)の抑制効果

##### 組織病理学的検査

トリミング、脱水、パラフィン包埋、切片化などの一般的な組織処理過程の後、固定された肝臓組織を用いて病理学的検査のための検体を作製した。検体をヘマトキシリン及びエオシン(Hematoxylin&Eosin; H&E)及びピクロシリウスレッド(picrosirius red)染色を施し、光学顕微鏡(Olympus BX43, Japan)を用いて組織病理学的変化を観察した。

図15A及び図15Bから確認できるように、何ら処理もしていないノーマル群に比べて、TAA-PBS群の肝臓組織の表面が滑らかでないことが確認できた。BxC-G63e又はBxC-V37eによる処理は、肝臓組織を有意に回復させることが観察できた。

また、図16A及び図16Bから確認できるように、H&E染色の結果、TAAによって損傷した肝臓組織がBxC-G63e又はBxC-V37eによって著しく回復したことを観察できた。

そして、図17A及び図17Bから確認できるように、ピクロシリウスレッド染色の結果、TAAによる肝臓組織内に蓄積されたコラーゲン量が、BxC-G63e又はBxC-V37eによって大幅に減少したことが確認できた。

要するに、BxC-G63e又はBxC-V37eが線維症に対して優れた抑制活性を持っていることが確認できた

【0100】

#### まとめ

前記内容を総合すると、本発明のBxC-e、BxC-V37e、及びBxC-G63eは、脂肪症(Steatosis)誘発性肝細胞において脂質生成、炎症、及び小胞体ストレスも抑制するため、非アルコール性脂肪性肝炎の予防又は治療において非常に有利な用途を見出す。

【産業上の利用可能性】

【0101】

本発明は、前処理物質で前処理した又は前処理していない人工多能性幹細胞由来間葉系幹細胞前駆細胞から分化した間葉系幹細胞に由来するエキソソームを有効成分として含む、非アルコール性脂肪性肝炎の予防又は治療用組成物に関する。

10

20

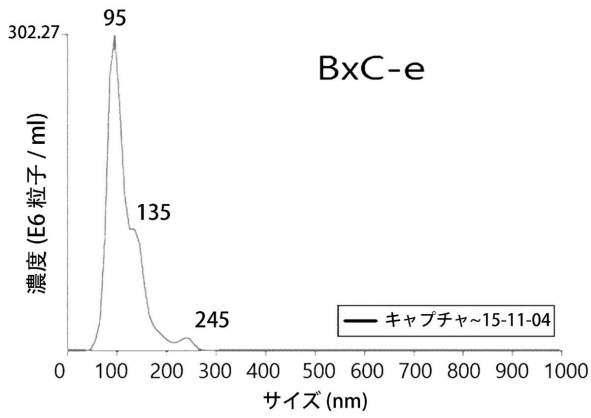
30

40

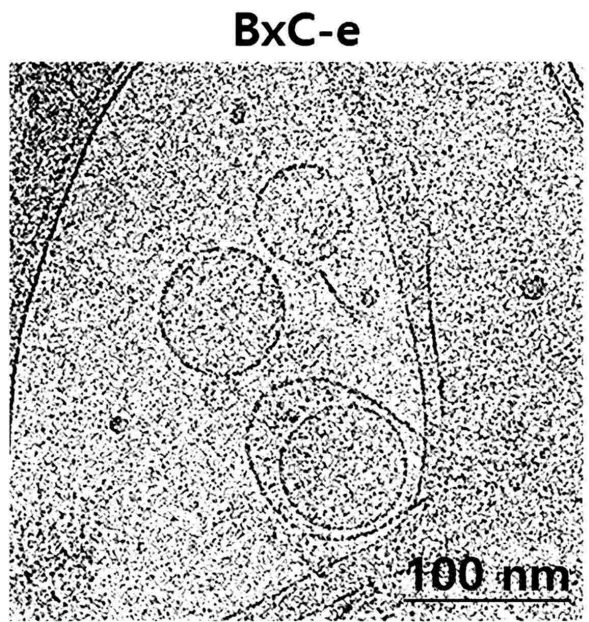
50

【図面】

【図 1 A】



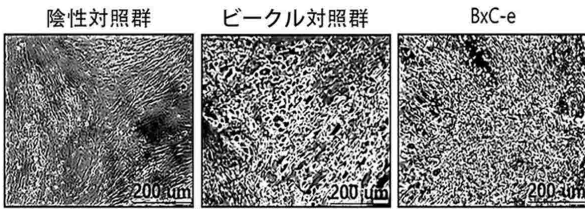
【図 1 B】



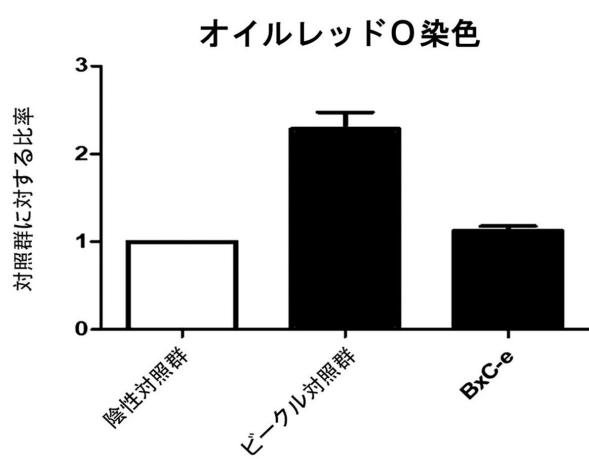
10

20

【図 2 A】



【図 2 B】

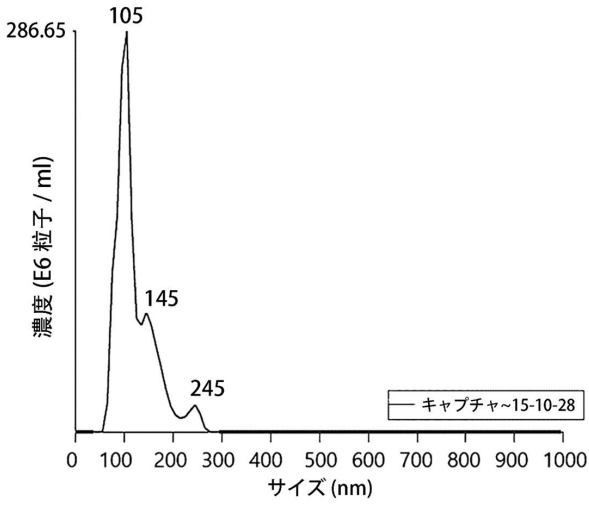


30

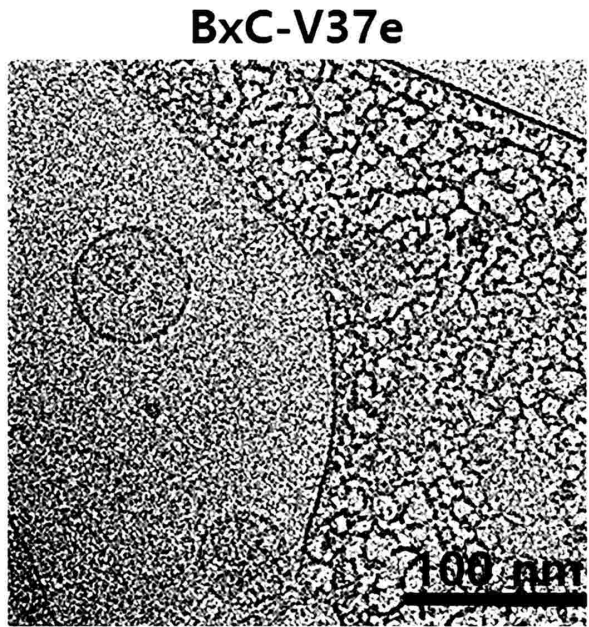
40

50

【図 3 A】

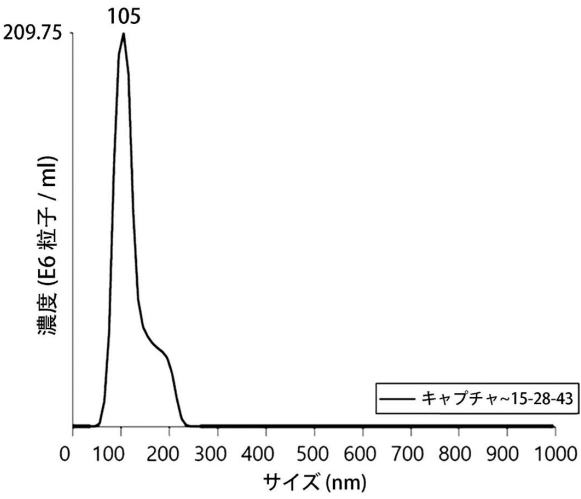


【図 3 B】

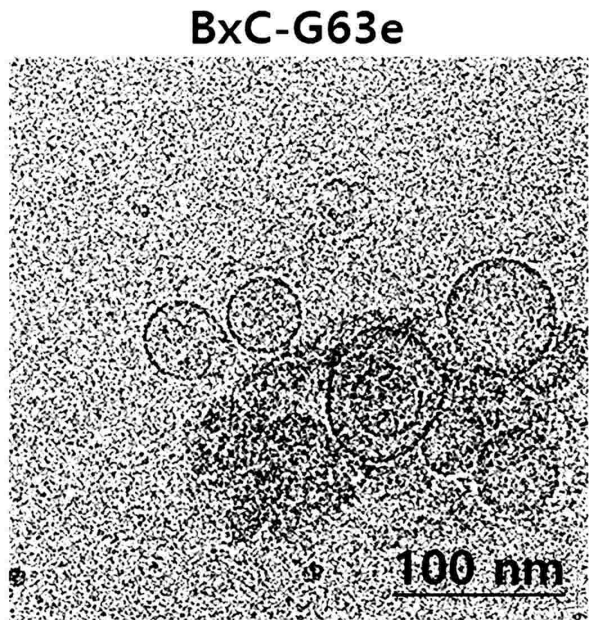


10

【図 4 A】



【図 4 B】



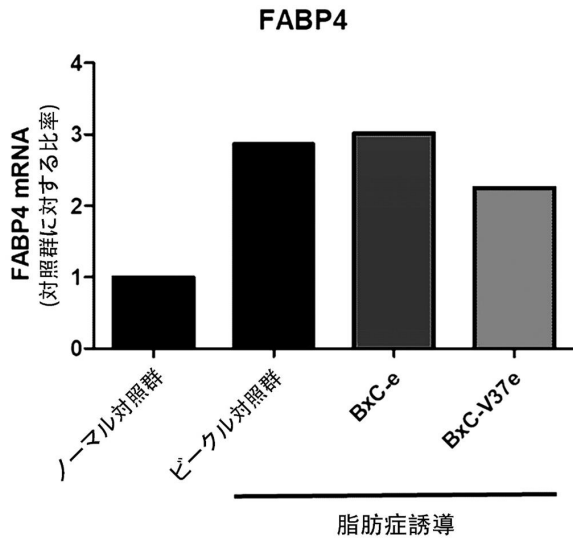
20

30

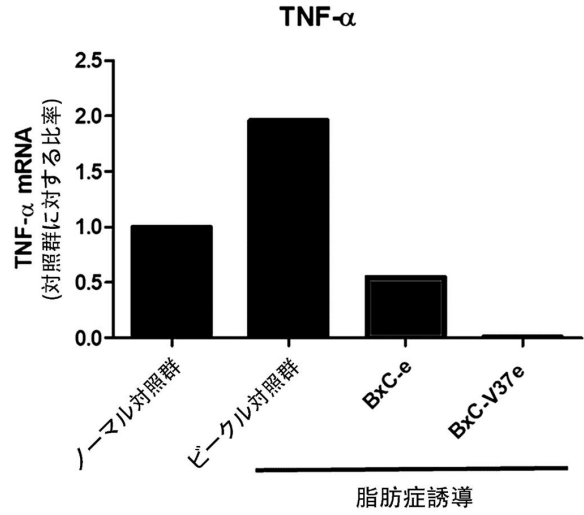
40

50

【 図 5 】

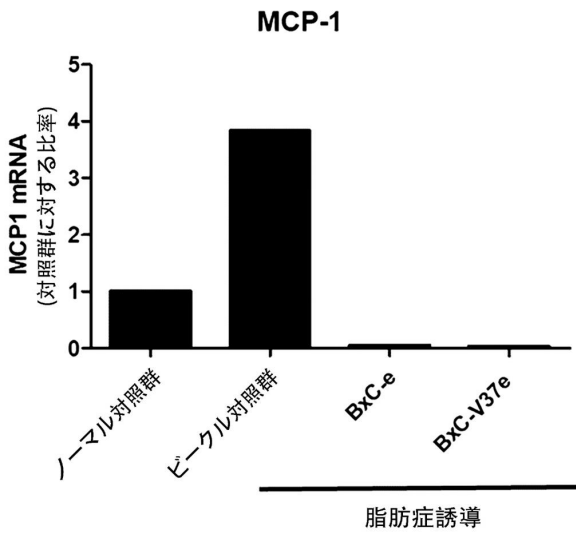


【 図 6 A 】

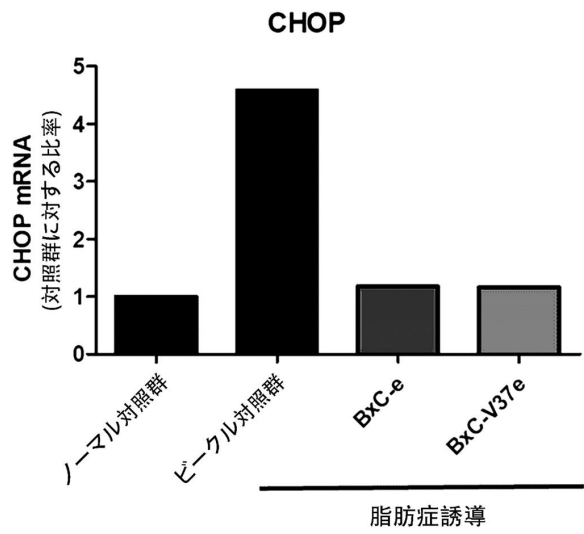


10

【 図 6 B 】



【 図 7 】



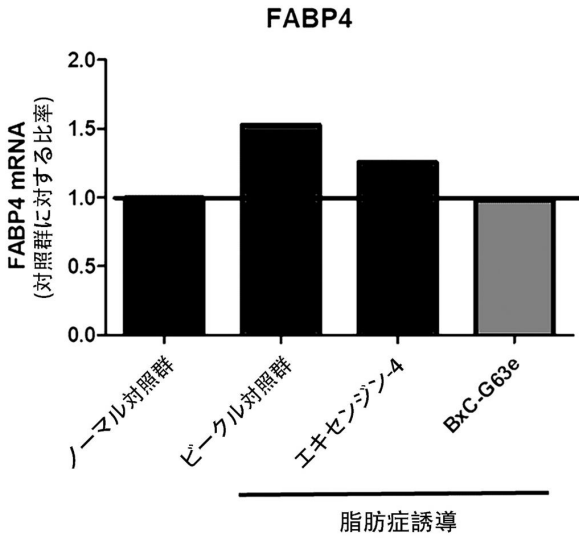
20

30

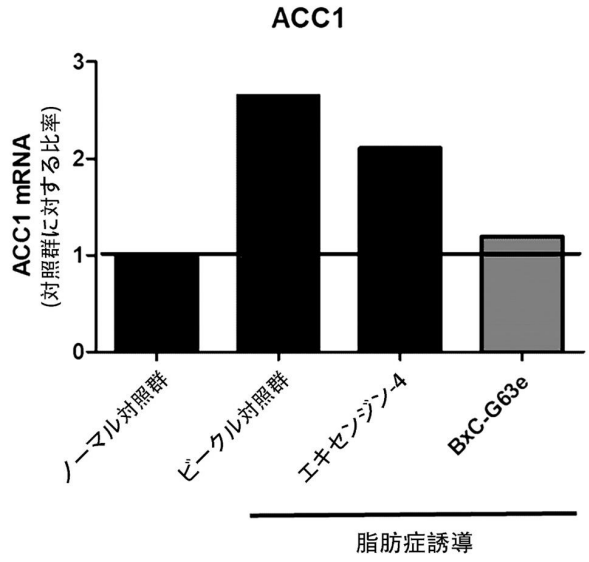
40

50

【図 8 A】

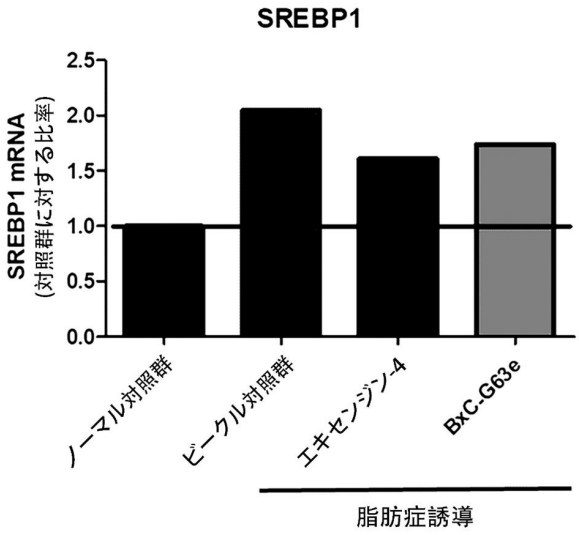


【図 8 B】

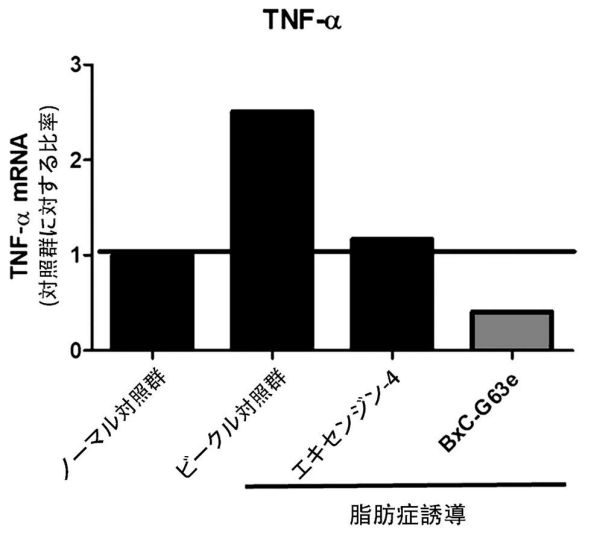


10

【図 8 C】



【図 9 A】



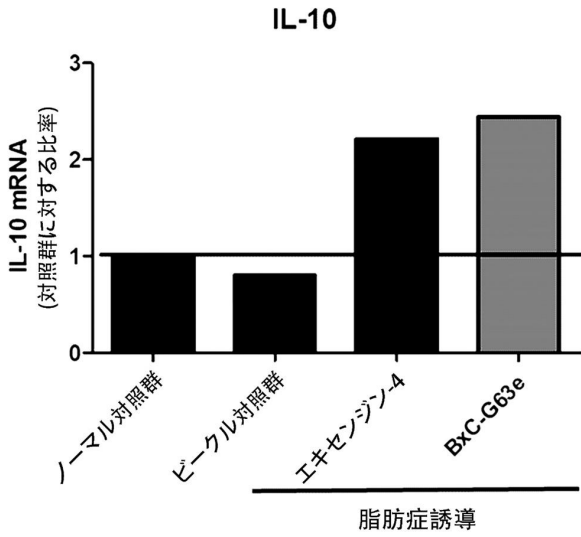
20

30

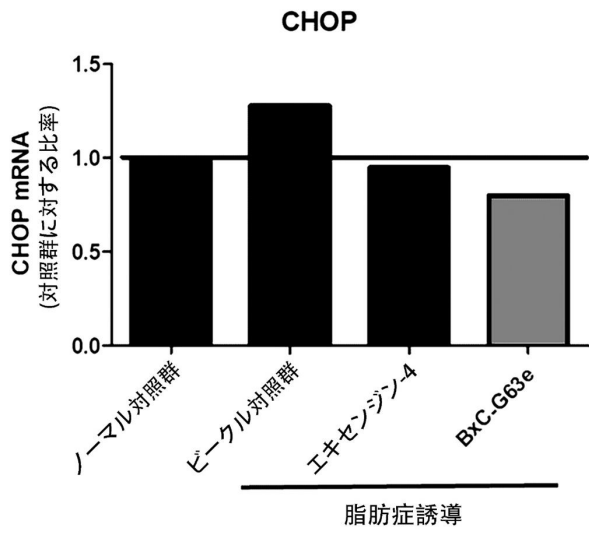
40

50

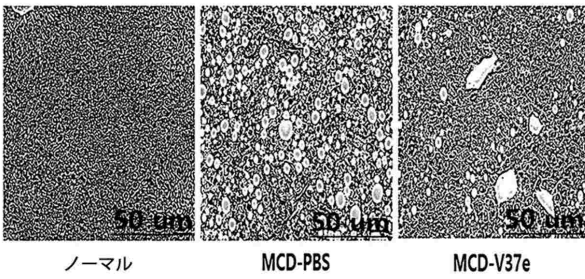
【図 9 B】



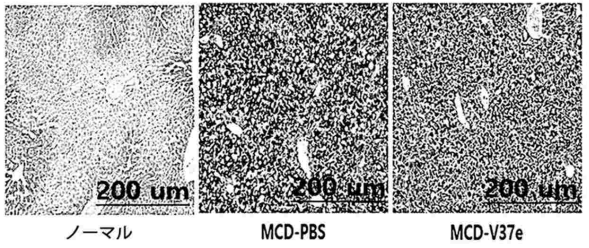
【図 10】



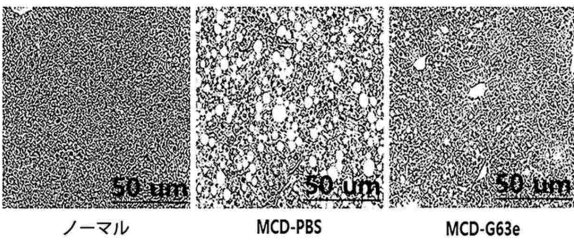
【図 11 A】



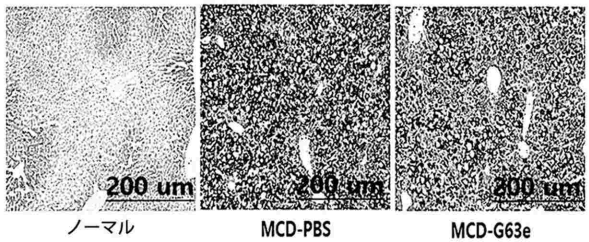
【図 11 B】



【図 12 A】



【図 12 B】



10

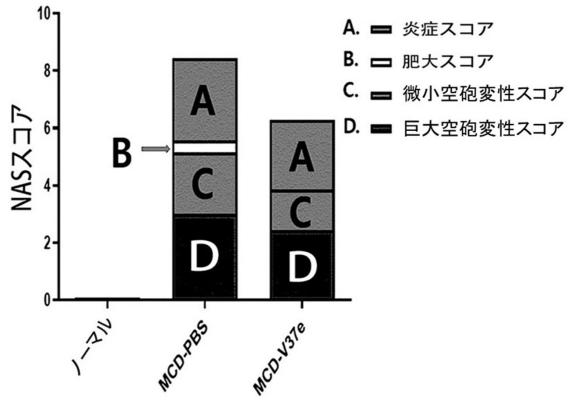
20

30

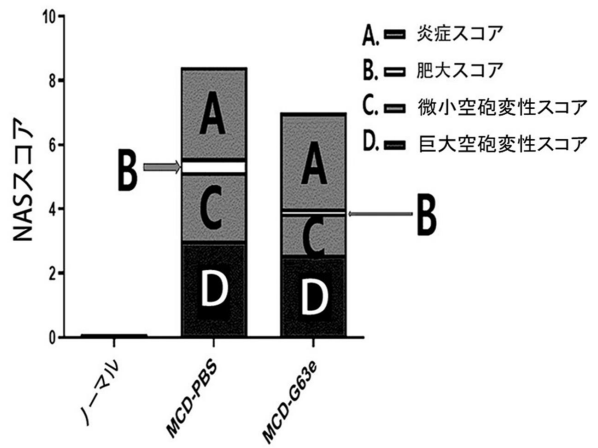
40

50

【図 1 3 A】

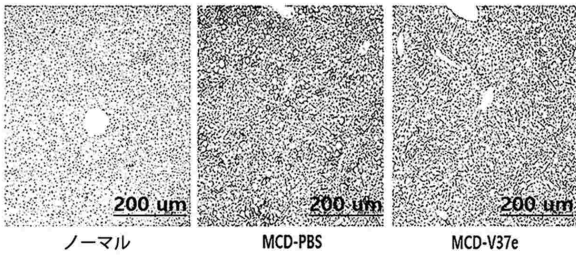


【図 1 3 B】

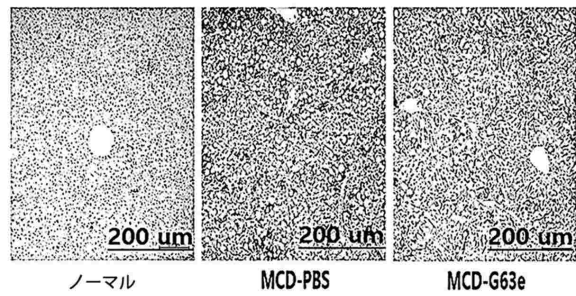


10

【図 1 4 A】

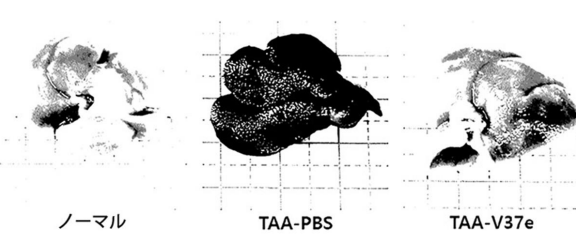


【図 1 4 B】

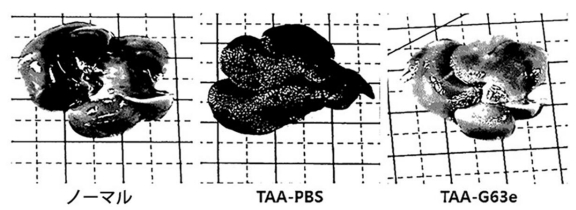


20

【図 1 5 A】



【図 1 5 B】

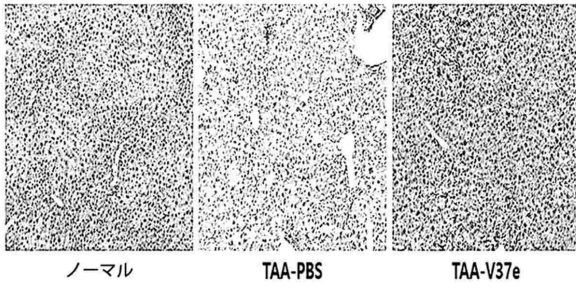


30

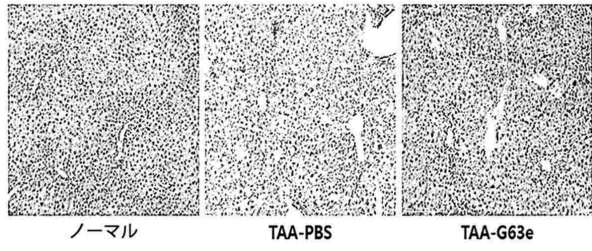
40

50

【図16A】

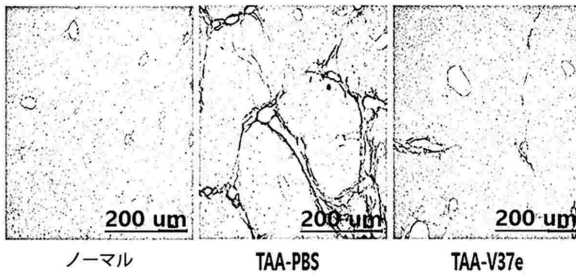


【図16B】

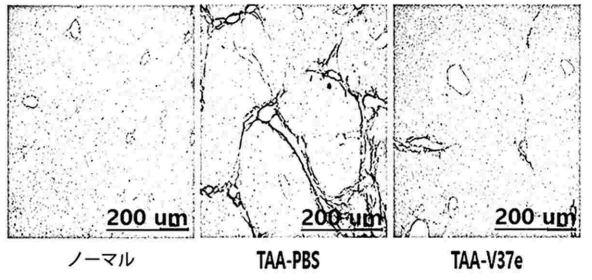


10

【図17A】



【図17B】



20

【配列表】

[0007534055000001.app](#)

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 1 2 N 5/10 (2006.01)  
C 1 2 N 5/0775(2010.01)

## F I

C 1 2 N 5/10 Z N A  
C 1 2 N 5/0775

## (33)優先権主張国・地域又は機関

韓国(KR)

弁理士 松田 奈緒子

## (72)発明者 スウ・キム

大韓民国 0 5 6 4 9 ソウル ソンパ - グ ヤンジエ - デロ 1 2 1 8 2 5 5 ドン 2 0 0 2 ホ

## (72)発明者 スルキ・リ

大韓民国 1 3 3 9 0 キョンギ - ド ソンナム - シ チュンウォン - グ シミン - ロ 2 8 ボン - ギル  
6 1 0 3 ドン 9 0 6 ホ

## (72)発明者 ジミン・キム

大韓民国 0 5 8 3 7 ソウル ソンパ - グ ソンパ - デロ 1 1 1 2 0 5 ドン シー 1 0 4 4 ホ

審査官 横田 倫子

## (56)参考文献

米国特許第 0 8 3 8 9 4 7 2 ( U S , B 2 )

Stem Cell Int. , 2018年 , Vol.2018 , Article ID.3212643 (p.1-15)

Int J Mol Sci. , 2018年 , Vol.19 , Article ID.3119 (p.1-16)

J Hepatol. , Vol.66 , 2017年 , p.S171 (THU-391)

Cytotherapy , 2016年 , Vol.18 , p.1548-1559

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 5 / 0 0

A 2 3 L 3 3 / 0 0

A 6 1 P

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

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

P u b M e d