

(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
2018年12月13日(13.12.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/225440 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 35/28 (2015.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 35/35 (2015.01) *A61P 9/04* (2006.01)
A61K 35/51 (2015.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/017807
- (22) 国際出願日: 2018年5月8日(08.05.2018)
- (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 2017-114240 2017年6月9日(09.06.2017) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP). ロート製薬株式会社 (ROHTO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西1丁目8番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 澤 芳樹 (SAWA Yoshiki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 宮川 繁 (MIYAGAWA Shigeru); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 梶田 大輔 (KAJITA Daisuke); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 倉田 隼人 (KURATA Hayato); 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西1丁目8番1号 ロート製薬株式会社内 Osaka (JP). 玉田 琴絵 (TAMADA Kotoe); 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西1丁目8番1号 ロート製薬株式会社内 Osaka (JP). 西田 浩之 (NISHIDA Hiroyuki); 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西1丁目8番1号 ロート製薬株式会社内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 津国, 外 (TSUKUNI & ASSOCIATES et al.); 〒1020083 東京都千代田区麹町5-3-1 麹町ビジネスセンター Tokyo (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, 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, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT FOR DILATED CARDIOMYOPATHY

(54) 発明の名称: 拡張型心筋症治療剤

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a therapeutic agent for dilated cardiomyopathy disease which produces excellent effects in the treatment of dilated cardiomyopathy (DCM) and provides a given benefit to a large number of patients. The present invention is a therapeutic agent for dilated cardiomyopathy comprising at least one selected from the group consisting of mesenchymal stem cell and fine particles derived from the mesenchymal stem cell. It is preferable that the mesenchymal stem cell is a cell having the ability to contain or secrete fine particles, that the fine particles have an average particle size of 1000 nm or less, and that they are exosomes.

(57) 要約: 本発明は、拡張型心筋症DCMの治療において優れた効果を奏し、かつ多くの患者に対して一定の効果が得られる拡張型心筋症疾患治療剤を提供することを目的とする。本発明は、間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子からなる群より選択される少なくとも1種を含有する、拡張型心筋症治療剤である。間葉系幹細胞は、微小粒子を含有又は分泌する能力を有する細胞であること、上記微小粒子はその平均粒子径が1, 000 nm以下であること、エクソソームであることが好ましい。

WO 2018/225440 A1

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称： 拡張型心筋症治療剤

技術分野

[0001] 本発明は拡張型心筋症治療剤に関する。

背景技術

[0002] 拡張型心筋症（DCM）は、特発性心筋症の中で、心筋収縮不全と左室内腔の拡張を特徴とする疾患群であり、多くの場合進行性である。また、拡張型心筋症は慢性心不全症状を特徴とし急性増悪を繰り返す予後不良の疾患である。さらに、致死性不整脈による突然死や動脈の血栓塞栓症を生ずることがある。拡張型心筋症は遺伝性と後天性の混合した疾患群であり、定義上は形態学的及び機能学的な分類に基づき、臨床上是、「左室拡大」と「左室収縮能障害」を来す類似の疾患が多く存在する。そのため、拡張型心筋症を考える上では、他の種々の類似の特定心筋症を除外する必要があるとされている。

[0003] 拡張型心筋症の病因は永らく不明とされてきたが、遺伝的素因とともにウイルス感染と自己免疫異常が関与することが明らかとなっており、様々な細胞性免疫異常が観察されている。拡張型心筋症患者の血清において制御性T細胞が減少し、代わりにヘルパーT細胞が増加していることや、心筋生検標本を用いた検討でMHCクラスII分子が発現していることが報告されている。また、拡張型心筋症患者の血清には様々な抗心筋自己抗体が存在する。このような抗心筋自己抗体は、家族性拡張型心筋症患者に多く検出されることも明らかにされている（非特許文献1）。さらに、家族性拡張型心筋症患者の約20%に何らかの遺伝子変異が検出され、その変異の多くは直接心収縮に関連するサルコメア蛋白をコードする遺伝子や心収縮力を伝達する役割を担うジストロフィン関連蛋白をコードする遺伝子の変異である。このような遺伝子変異は拡張型心筋症発症の直接の原因となるだけでなく、発症の遺伝的素地として働くこともあり、遺伝子変異を有する場合、ウイルス感染後

に持続的な自己免疫機序が作動し、拡張型心筋症に移行することが推定されている。また、拡張型心筋症患者は予後不良のため、しばしば心臓移植の対象となるが、ドナーが不足している上に、移植した際の拒絶反応も問題となっている。そのため、拡張型心筋症の新規治療法の開発が望まれている。

[0004] ドキソルビシン (doxorubicin)、5-アザシチジン (5-azacytidine) 等の薬物によって心筋症を誘発した動物に対して、これを拡張型心筋症病態モデルとして間葉系幹細胞 (MSC) による治療の効果の検討が行われている (非特許文献 2-3)。しかしながら、ドキソルビシン、5-アザシチジン等の薬物によって誘発された心筋症は薬剤誘発性心筋症と呼ばれ、拡張型心筋症と臨床的に類似した心筋症疾患群ではあるものの、拡張型心筋症ならびに関連する二次性心筋症の治療に関するガイドライン (循環器病の診断と治療に関するガイドライン 2011) によれば、拡張型心筋症とは異なる分類として取扱われている。また、拡張型心筋症の遺伝的な成因として、心筋 δ -サルコグリカン、アクチン、ミオシン等の細胞質に含まれるタンパク質の遺伝子異常が関与すると考えられているが、薬剤によって誘起される心筋症とは、その点で根本的に成因が異なる。従って、薬剤誘発性心筋症モデルで改善効果が見られたとしても、実際の拡張型心筋症に対して効果を奏するとはいい難い。

[0005] δ サルコグリカンを欠損した J2N ハムスターが報告されている。このハムスターは、生後 16W 程度で拡張型心筋症を発症し、心機能低下、心臓細胞肥大、線維化等の形態学的病変等がみられる。これらの形態学的病変等はヒト病態と類似していることから、ヒトの拡張型心筋症のモデルとして用いられている。また、ヒトの拡張型心筋症においても δ サルコグリカンの変異が認められており、J2N ハムスター及びヒトの拡張型心筋症において、ANT-1 の機能低下がみられることも知られている (非特許文献 4~6)。

[0006] 一方、間葉系幹細胞は、Friedenstein (1982) によって初めて骨髄から単離された多分化能を有する前駆細胞である (非特許文献 7)。この間葉系幹細胞は、骨髄、臍帯、脂肪等の様々な組織に存在すること

が明らかにされており、間葉系幹細胞移植は、様々な難治性疾患に対する新しい治療方法として、期待されている（特許文献1～4）。最近では、脂肪組織、胎盤、臍帯、卵膜等の胎児付属物の間質細胞に同等の機能を有する細胞が存在することが知られている。そのため、間葉系幹細胞を間質細胞（Mesenchymal Stromal Cell）と称することもある。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：特表2002-506831号公報
特許文献2：特表2000-508911号公報
特許文献3：特開2012-157263号公報
特許文献4：特表2012-508733号公報

非特許文献

- [0008] 非特許文献1：友池仁暢ら、循環器病の診断と治療に関するガイドライン2011
非特許文献2：Mol. Cell Biochem., 2014, 387, pp. 279-285
非特許文献3：Med. Sci. Monit. Basic Res., 2013. 14, pp. 20-31
非特許文献4：Circ. J., 2005, 69, pp. 107-113
非特許文献5：J. Biochem., 2003, 34 (2), pp. 269-76
非特許文献6：JCI., 2000, 106, pp. 655-662
非特許文献7：Pittenger F. M. et al., Science, 1999. 284, pp. 143-147

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明は上述のような事情に基づいてなされたものであり、拡張型心筋症

の治療において優れた効果を奏し、かつ多くの患者に対して一定の効果が得られる拡張型心筋症治療剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、拡張型心筋症に対して、間葉系幹細胞又は間葉系幹細胞由来の微小粒子を投与することにより、心機能等を顕著に改善させることができることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成されたものである。すなわち上記課題を解決するためになされた発明は、以下の通りである。

[0011] [1] 間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子からなる群より選択される少なくとも1種を含有する、拡張型心筋症治療剤。

[2] 上記間葉系幹細胞が、微小粒子を含有又は分泌する能力を有する、[1]に記載の拡張型心筋症治療剤。

[3] 上記微小粒子の平均粒子径が1,000nm以下である、[1]又は[2]に記載の拡張型心筋症治療剤。

[4] 上記微小粒子が、エクソソーム(exosome)である、[1]から[3]のいずれかに記載の拡張型心筋症治療剤。

[5] 上記微小粒子が、IL-10、HGF、アポリポrotein A-2 (Apoprotein A-2)、色素上皮由来因子(Pigment epithelium-derived factor (PEDF)、SERPINF1)、及びハプトグロビン(Haptoglobin)からなる群より選択される少なくとも1種の因子を含有する、[1]から[4]のいずれかに記載の拡張型心筋症治療剤。

[6] 上記間葉系幹細胞が、被験体に対して同種異系である、[1]から[5]のいずれかに記載の拡張型心筋症治療剤。

[7] 上記間葉系幹細胞が、脂肪由来、臍帯由来又は骨髄由来である、[1]から[6]のいずれかに記載の拡張型心筋症治療剤。

[8] 上記拡張型心筋症が、特発性拡張型心筋症、家族性拡張型心筋症及び遺伝性拡張型心筋症からなる群より選択される拡張型心筋症である、[1]

から [7] のいずれかに記載の拡張型心筋症治療剤。

[9] 上記間葉系幹細胞が、凍結保存した細胞である、 [1] から [8] のいずれかに記載の拡張型心筋症治療剤。

[1 0] 間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子からなる群より選択される少なくとも 1 種を含有する、拡張型心筋症における線維化抑制剤。

[1 1] 間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子からなる群より選択される少なくとも 1 種を含有する、拡張型心筋症における心肥大抑制剤。

[1 2] [1] から [9] のいずれかに記載の拡張型心筋症治療剤、 [1 0] に記載の線維化抑制剤又は [1 1] に記載の心肥大抑制剤、容器及びラベルを含む、拡張型心筋症治療用キット。

[1 3] 間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子からなる群より選択される少なくとも 1 種を投与することを特徴とする、拡張型心筋症の治療方法。

[1 4] 間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子からなる群より選択される少なくとも 1 種を投与することを特徴とする、拡張型心筋症における線維化抑制方法。

[1 5] 間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子からなる群より選択される少なくとも 1 種を投与することを特徴とする、拡張型心筋症における心肥大抑制方法。

発明の効果

[0012] 本発明の拡張型心筋症治療剤によると、拡張型心筋症の疾患に対して、間葉系幹細胞又は間葉系幹細胞由来の微小粒子を投与することにより、心臓等の疾患部位の機能、構造等を顕著に改善させることができる。上記間葉系幹細胞は同種異系の被験体に対しても拒絶反応を起こしにくいため、あらかじめ調製されたドナーの細胞を拡大培養して凍結保存したものを、本発明の拡張型心筋症治療剤における間葉系幹細胞として使用することができる。また、同様に、あらかじめ調製されたドナーの細胞を拡大培養して凍結保存した間葉系幹細胞から得られる間葉系幹細胞由来の微小粒子を、本発明の拡張型

心筋症治療剤における間葉系幹細胞由来の微小粒子として使用することができる。そのため、自己の間葉系幹細胞を調製して用いる場合と比較して、商品化も容易であり、かつ安定した一定の効果を得られ易いという利点もある。

図面の簡単な説明

- [0013] [図1]図1は、拡張型心筋症のモデル動物であるJ2N-kハムスターに対する本発明の拡張型心筋症治療剤の治療効果を示す図である（心機能評価）。
- [図2]図2は、拡張型心筋症のモデル動物であるJ2N-kハムスターに対する本発明の拡張型心筋症治療剤の治療効果を示す図である（心組織中のATP含有量）。
- [図3]図3は、拡張型心筋症のモデル動物であるJ2N-kハムスターに対する本発明の拡張型心筋症治療剤の治療効果を示す図である（心組織中ミトコンドリアのMt. ANT-1発現量）。
- [図4]図4は、拡張型心筋症のモデル動物であるJ2N-kハムスターに対する本発明の拡張型心筋症治療剤の治療効果を示す図である（心臓の直径）。
- [図5]図5は、拡張型心筋症のモデル動物であるJ2N-kハムスターに対する本発明の拡張型心筋症治療剤の治療効果（長期間）を示す図である（心機能評価）。
- [図6]図6は、ヒト心筋細胞に対する本発明の拡張型心筋症治療剤の機能亢進効果を示す図である。

発明を実施するための形態

- [0014] 以下に、本発明の拡張型心筋症治療剤、線維化抑制剤、心肥大抑制剤、及び拡張型心筋症治療用キットについて詳細に説明する。

[0015] <拡張型心筋症治療剤>

本発明の拡張型心筋症治療剤は、間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子からなる群より選択される少なくとも1種を含有する。

[0016] <間葉系幹細胞>

本発明において間葉系幹細胞とは、間葉系に属する細胞（骨細胞、心筋細

胞、軟骨細胞、腱細胞、脂肪細胞など)への分化能を有し、当該能力を維持したまま増殖できる細胞を意味する。本発明において用いる間葉系幹細胞なる用語は、間質細胞と同じ細胞を意味し、両者を特に区別するものではない。間葉系幹細胞を含む組織としては、例えば、脂肪組織、臍帯、骨髓、臍帯血、子宮内膜、胎盤、真皮、骨格筋、骨膜、歯小囊、歯根膜、歯髓、歯胚等が挙げられる。従って、例えば脂肪組織由来間葉系幹細胞とは、脂肪組織に含有される間葉系幹細胞を意味し、脂肪組織由来間質細胞と称してもよい。これらのうち、本発明の拡張型心筋症治療剤による内臓疾患改善等の作用効果の観点、及び入手容易性の観点等から、脂肪組織由来間葉系幹細胞、臍帯由来間葉系幹細胞、骨髓由来間葉系幹細胞、胎盤由来間葉系幹細胞、歯髓由来間葉系幹細胞が好ましく、脂肪組織由来間葉系幹細胞、臍帯由来間葉系幹細胞がより好ましい。

[0017] 本発明における間葉系幹細胞は、被験体に対して同種同系又は同種異系であることが好ましい。間葉系幹細胞は同種異系の被験体に対しても拒絶反応を起こしにくいため、あらかじめ調製されたドナーの細胞を拡大培養して凍結保存したものを、本発明の拡張型心筋症治療剤における間葉系幹細胞として使用することができる。そのため、自己の間葉系幹細胞を調製して用いる場合と比較して、商品化も容易であり、かつ安定して一定の効果を得られ易いという観点から、本発明における間葉系幹細胞は、同種異系であることがより好ましい。

[0018] 間葉系幹細胞は同種異系の被験体に対しても拒絶反応を起こしにくいため、あらかじめ調製されたドナーの細胞を拡大培養して凍結保存したものを、本発明の拡張型心筋症治療剤における間葉系幹細胞として使用することができる。また、同様に、あらかじめ調製されたドナーの細胞を拡大培養して凍結保存した間葉系幹細胞から得られる間葉系幹細胞由来の微小粒子を、本発明の拡張型心筋症治療剤における間葉系幹細胞由来の微小粒子として使用することができる。そのため、自己の間葉系幹細胞又は微小粒子を調製して用いる場合と比較して、商品化も容易であり、かつ安定して一定の効果を得ら

れ易いという観点から、本発明における間葉系幹細胞は、同種異系であることがより好ましい。

[0019] また、本発明において、間葉系幹細胞とは、間葉系幹細胞を含む任意の細胞集団を意味する。当該細胞集団は、少なくとも20%以上、好ましくは、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、93%、96%、97%、98%又は99%が間葉系幹細胞である。

[0020] 本発明において脂肪組織とは、脂肪細胞、及び微小血管細胞等を含む間質細胞を含有する組織を意味し、例えば、哺乳動物の皮下脂肪を外科的切除又は吸引して得られる組織である。脂肪組織は、皮下脂肪より入手され得る。後述する脂肪組織由来間葉系幹細胞の投与対象と同種動物から入手されることが好ましく、ヒトへ投与することを考慮すると、より好ましくは、ヒトの皮下脂肪である。皮下脂肪の供給個体は、生存していても死亡していてもよいが、本発明において用いる脂肪組織は、好ましくは、生存個体から採取された組織である。個体から採取する場合、脂肪吸引は、例えば、PAL（パワーアシスト）脂肪吸引、エルコーニアレーザー脂肪吸引、又は、ボディジェット脂肪吸引などが例示され、細胞の状態を維持するという観点から、超音波を用いないことが好ましい。

[0021] 本発明において臍帯とは、胎児と胎盤を結ぶ白い管状の組織であり、臍帯静脈、臍帯動脈、膠様組織（ウォートンゼリー；Wharton's Jelly）、臍帯基質自体等から構成され、間葉系幹細胞を多く含む。臍帯は、本発明の拡張型心筋症治療剤を使用する被験体（投与対象）と同種動物から入手されることが好ましく、本発明の拡張型心筋症治療剤をヒトへ投与することを考慮すると、より好ましくは、ヒトの臍帯である。

[0022] 本発明において骨髄とは、骨の内腔を満たしている柔組織のことをいい、造血器官である。骨髄中には骨髄液が存在し、その中に存在する細胞を骨髄細胞と呼ぶ。骨髄細胞には、赤血球、顆粒球、巨核球、リンパ球、脂肪細胞等の他、間葉系幹細胞、造血幹細胞、血管内皮前駆細胞等が含まれている。骨髄細胞は、例えば、ヒト腸骨、長管骨、又はその他の骨から採取すること

ができる。

[0023] 本発明において、脂肪組織由来間葉系幹細胞、臍帯由来間葉系幹細胞、骨髓由来間葉系幹細胞といった各組織由来間葉系幹細胞とは、それぞれ脂肪組織由来間葉系幹細胞、臍帯由来間葉系幹細胞、骨髓由来間葉系幹細胞といった各組織由来間葉系幹細胞を含む任意の細胞集団を意味する。当該細胞集団は、少なくとも20%以上、好ましくは、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、93%、96%、97%、98%又は99%が、脂肪組織由来間葉系幹細胞、臍帯由来間葉系幹細胞、骨髓由来間葉系幹細胞といった各組織由来間葉系幹細胞である。

[0024] 本発明における間葉系幹細胞は、例えば、成長特徴（例えば、継代から老化までの集団倍加能力、倍加時間）、核型分析（例えば、正常な核型、母体系統又は新生児系統）、フローサイトメトリー（例えば、FACS分析）による表面マーカー発現、免疫組織化学及び／又は免疫細胞化学（例えば、エピトープ検出）、遺伝子発現プロファイリング（例えば、遺伝子チップアレイ；逆転写PCR、リアルタイムPCR、従来型PCR等のポリメラーゼ連鎖反応）、miRNA発現プロファイリング、タンパク質アレイ、サイトカイン等のタンパク質分泌（例えば、血漿凝固解析、ELISA、サイトカインアレイ）、代謝産物（メタボローム解析）、本分野で知られている他の方法等によって、特徴付けられてもよい。

[0025] 〈間葉系幹細胞の調製方法〉

当該間葉系幹細胞は、当業者に周知の方法により調製することができる。以下に、一つの例として、脂肪組織由来間葉系幹細胞の調製方法を説明する。脂肪組織由来間葉系幹細胞は、例えば米国特許第6,777,231号に記載の製造方法によって得られて良く、例えば、以下の工程(i)～(iii)を含む方法で製造することができる：

- (i) 脂肪組織を酵素により消化して細胞懸濁物を得る工程；
- (ii) 細胞を沈降させ、細胞を適切な培地に再懸濁する工程；ならびに
- (iii) 細胞を固体表面で培養し、固体表面への結合を示さない細胞を除去

する工程。

[0026] 工程 (i) において用いる脂肪組織は、洗浄されたものを用いることが好ましい。洗浄は、生理学的に適合する生理食塩水溶液（例えばリン酸緩衝食塩水（PBS））を用いて、激しく攪拌して沈降させることによって行い得る。これは、脂肪組織に含まれる夾雑物（デブリとも言い、例えば損傷組織、血液、赤血球など）を組織から除去するためである。したがって、洗浄及び沈降は一般に、上清からデブリが総体的に除去されるまで繰り返される。残存する細胞は、さまざまなサイズの塊として存在するので、細胞そのものの損傷を最小限に抑えながら解離させるため、洗浄後の細胞塊を、細胞間結合を弱めるか、又は破壊する酵素（例えば、コラゲナーゼ、ディスパーゼ又はトリプシンなど）で処理することが好ましい。このような酵素の量及び処理期間は、使用される条件に依存して変わるが、当技術分野で既知である。このような酵素処理に代えて、又は併用して、細胞塊を、機械的な攪拌、超音波エネルギー、熱エネルギーなどの他の処理法で分解することができるが、細胞の損傷を最小限に抑えるため、酵素処理のみで行うことが好ましい。酵素を用いた場合、細胞に対する有害な作用を最小限に抑えるために、適切な期間をおいた後に培地等を用いて酵素を失活させることが望ましい。

[0027] 工程 (i) により得られる細胞懸濁物は、凝集状の細胞のスラリー又は懸濁物、ならびに各種夾雑細胞、例えば赤血球、平滑筋細胞、内皮細胞、及び線維芽細胞を含む。従って、続いて凝集状態の細胞とこれらの夾雑細胞を分離、除去してもよいが、後述する工程 (iii) での接着及び洗浄により、除去可能であることから、当該分離、除去は割愛してもよい。夾雑細胞を分離、除去する場合、細胞を上清と沈殿に強制的に分ける遠心分離によって達成しえる。得られた夾雑細胞を含む沈殿は、生理学的に適合する溶媒に懸濁させる。懸濁状の細胞には、赤血球を含む恐れがあるが、後述する個体表面への接着による選択により、赤血球は除外されるため、溶解する工程は必ずしも必要ではない。赤血球を選択的に溶解する方法として、例えば、塩化アンモニウムによる溶解による高張培地又は低張培地中でのインキュベーションなど

、当技術分野で周知の方法を使用することができる。溶解後、例えば濾過、遠心沈降、又は密度分画によって溶解物を所望の細胞から分離してもよい。

[0028] 工程 (ii) において、懸濁状の細胞において、間葉系幹細胞の純度を高めるために、1回もしくは連続して複数回洗浄し、遠心分離し、培地に再懸濁してもよい。この他にも、細胞を、細胞表面マーカープロファイルを基に、又は細胞のサイズ及び顆粒性を基に分離してもよい。

[0029] 再懸濁において用いる培地は、間葉系幹細胞を培養できる培地であれば、特に限定されないが、このような培地は、基礎培地に、血清を添加する、及び／又は、アルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、コレステロール、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を添加して作製してもよい。これらの培地は、必要に応じて、さらに脂質、アミノ酸、タンパク質、多糖、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの物質を添加してもよい。基礎培地は、例えば、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 α MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、MCDB201培地及びこれらの混合培地などが挙げられる。血清は、例えば、ヒト血清、ウシ胎児血清 (FBS)、ウシ血清、仔ウシ血清、ヤギ血清、ウマ血清、ブタ血清、ヒツジ血清、ウサギ血清、ラット血清などがあるがこれらに限定されない。血清を用いる場合、基礎培地に対して、5 v/v%~15 v/v%、好ましくは、10 v/v%を添加してもよい。脂肪酸は、リノール酸、オレイン酸、リノレイン酸、アラキドン酸、ミリスチン酸、パルミトイル酸、パルミチン酸、及びステアリン酸等が例示されるが、これらに限定されない。脂質は、フォスファチジルセリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルコリン等が例示されるが、これらに限定されない。アミノ酸は、例え

ば、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-アスパラギン、L-システイン、L-シスチン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-グリシンなどを含むがこれらに限定されない。タンパク質は、例えば、エコチン、還元型グルタチオン、フィブロネクチン及び β 2-ミクログロブリン等が例示されるが、これらに限定されない。多糖は、グリコサミノグリカンが例示され、グリコサミノグリカンのうち特に、ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸等が例示されるが、これらに限定されない。増殖因子は、例えば、血小板由来増殖因子（PDGF）、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、トランスフォーミング増殖因子ベータ（TGF- β ）、肝細胞増殖因子（HGF）、上皮成長因子（EGF）、結合組織増殖因子（CTGF）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）等が例示されるが、これらに限定されない。本発明において得られる脂肪由来間葉系幹細胞を細胞移植に用いるという観点から、血清等の異種由来成分を含まない（ゼノフリー）培地を用いることが好ましい。このような培地は、例えば、PromoCell社、Lonza社、Biological Industries社、Veritas社、R&D Systems社、Corning社及びRohto社などから間葉系幹細胞（間質細胞）用として予め調製された培地として提供されている。

[0030] 続いて、工程（iii）では、工程（ii）で得られた細胞懸濁液中の細胞を分化させずに固体表面上で、上述の適切な細胞培地を使用して、適切な細胞密度及び培養条件で培養する。本発明において、「固体表面」とは、本発明における脂肪組織由来間葉系幹細胞の結合を可能とする任意の材料を意味する。特定の態様では、このような材料は、その表面への哺乳類細胞の結合を促すように処理されたプラスチック材料である。固体表面を有する培養容器の形状は特に限定されないが、シャーレやフラスコなどが好適に用いられる。非結合状態の細胞及び細胞の破片を除去するために、インキュベーション後に細胞を洗浄する。

[0031] 本発明では、最終的に固体表面に結合した状態で留まる細胞を、脂肪組織

由来間葉系幹細胞の細胞集団として選択することができる。

[0032] 選択された細胞について、本発明における脂肪組織由来間葉系幹細胞であることを確認するために、表面抗原についてフローサイトメトリー等を用いて従来の方法で解析してもよい。さらに、各細胞系列に分化する能力について検査してもよく、このような分化は、従来の方法で行うことができる。

[0033] 本発明における間葉系幹細胞は、上述の通り調製することができるが、次の特性を持つ細胞として定義してもよい；

(1) 標準培地での培養条件で、プラスチックに接着性を示す、

(2) 表面抗原CD44、CD73、CD90が陽性であり、CD31、CD45、が陰性であり、及び

(3) 培養条件にて骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞に分化可能。

[0034] 〈間葉系幹細胞の凍結保存〉

本発明における間葉系幹細胞は、疾患治療効果を備えていれば、適宜、凍結保存及び融解を繰り返した細胞であってもよい。本発明において、凍結保存は、当業者に周知の凍結保存液へ間葉系幹細胞を懸濁し、冷却することによって行い得る。懸濁は、細胞をトリプシンなどの剥離剤によって剥離し、凍結保存容器に移し、適宜、処理した後、凍結保存液を加えることによって行い得る。

[0035] 凍結保存液は、凍害防御剤として、DMSO (Dimethyl sulfoxide) を含有してもよいが、DMSOは、細胞毒性に加えて、間葉系幹細胞を分化誘導する特性を有することから、DMSO含有量を減らすことが好ましい。DMSOの代替物として、グリセロール、プロピレングリコール又は多糖類が例示される。DMSOを用いる場合、5 v/v%~20 v/v%、好ましくは5 v/v%~10 v/v%、より好ましくは10 v/v%を含有する。この他にも、WO2007/058308に記載の添加剤を含んでもよい。このような凍結保存液として、例えば、バイオベルデ社、日本ジェネティクス株式会社、リプロセル社、ゼノアック社、コスモ・バイオ社、コージンバイオ株式会社、サーモフィッシャーサイエンティフィッ

ク社などから提供されている凍結保存液を用いてもよい。

- [0036] 上述の懸濁した細胞を凍結保存する場合、 -80°C ～ -100°C の間の温度（例えば、 -80°C ）で保管することで良く、当該温度に達成しえる任意のフリーザーを用いて行い得る。特に限定されないが、急激な温度変化を回避するため、プログラムフリーザーを用いて、冷却速度を適宜制御してもよい。冷却速度は、凍結保存液の成分によって適宜選択しても良く、凍結保存液の製造者指示に従って行われ得る。
- [0037] 保存期間は、上記条件で凍結保存した細胞が融解した後、凍結前と同等の性質を保持している限り、特に上限は限定されないが、例えば、1週間以上、2週間以上、3週間以上、4週間以上、2か月以上、3か月以上、4か月以上、5か月以上、6か月以上、1年以上、又はそれ以上が挙げられる。より低い温度で保存することで細胞障害を抑制することができるため、液体窒素上の気相（約 -150°C 以下から -180°C 以下）へ移して保存してもよい。液体窒素上の気相で保存する場合、当業者に周知の保存容器を用いて行うことができる。特に限定されないが、例えば、2週間以上保存する場合、液体窒素上の気相で保存することが好ましい。
- [0038] 融解した間葉系幹細胞は、次の凍結保存までに適宜、培養してもよい。間葉系幹細胞の培養は、上述した間葉系幹細胞を培養できる培地を用いて行われ、特に限定されないが、約 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは約 37°C の培養温度で、 CO_2 含有空気の雰囲気下で行われてもよい。 CO_2 濃度は、約 $2\sim 5\%$ 、好ましくは約 5% である。培養において、培養容器に対して適切なコンフルエンス（例えば、培養容器に対して、 50% から 80% を細胞が占有することが挙げられる）に達した後に、細胞をトリプシンなどの剥離剤によって剥離し、別途用意した培養容器に適切な細胞密度で播種して培養を継続してもよい。細胞を播種する際において、典型的な細胞密度として、約 100 細胞/ cm^2 ～約 $100,000$ 細胞/ cm^2 、約 500 細胞/ cm^2 ～約 $50,000$ 細胞/ cm^2 、約 $1,000\sim 10,000$ 細胞/ cm^2 、約 $2,000\sim 10,000$ 細胞/ cm^2 などが例示される。特定の態様では、細胞密

度は2,000~10,000細胞/cm²である。適切なコンフルエンスに達するまでの期間が、3日間から7日間となるように調整することが好ましい。培養中、必要に応じて、適宜、培地を交換してもよい。

[0039] 凍結保存した細胞の融解は、当業者に周知の方法によって行い得る。例えば、37℃の恒温槽内又は湯浴中にて静置又は振とうすることによって行う方法が例示される。

[0040] 〈間葉系幹細胞由来の微小粒子〉

本発明における間葉系幹細胞由来の微小粒子は、間葉系幹細胞から得られる微小粒子であり、間葉系幹細胞により産生される。本発明における間葉系幹細胞の微小粒子は、間葉系幹細胞中に含まれるものでもよく、間葉系幹細胞培養上清中に含まれるものでもよく、間葉系幹細胞中もしくは間葉系幹細胞培養上清から単離された微小粒子でもよい。すなわち、本発明における間葉系幹細胞由来の微小粒子は、いかなる形態であってもよく、微小粒子自体であることは勿論、微小粒子を含有又は分泌する能力を有する間葉系幹細胞の形態であってもよい。

[0041] 微小粒子の単離方法としては、超遠心法、精密濾過法、抗体による捕捉、マイクロ流体システムの利用等が挙げられる。単離された微小粒子は、間葉系幹細胞等の細胞を含んでいてもよく、また、間葉系幹細胞培養培地を含んでいてもよい。

[0042] 本発明における間葉系幹細胞由来の微小粒子は、間葉系幹細胞を上述の培地を用いて培養して得られる培養上清から回収することができる。培養上清を回収する場合には、例えば、間葉系幹細胞を培養容器中でサブコンフルエント又はコンフルエントの状態にし、新しい培地へと交換してから、更に1~5日間培養を行って、その培養上清を回収することができる。この培養上清を、本発明の拡張型心筋症治療剤として用いることもできるが、微小粒子を超遠心分離法、密度勾配遠心法、各種微小粒子分離キット等により分離して、それを本発明の拡張型心筋症治療剤の材料として用いることもできる。

[0043] 本発明の拡張型心筋症治療剤は、上記微小粒子に加えて、上記微小粒子を

包含する、又は分泌する能力を有する間葉系幹細胞自体を含んでいてもよい。なお、拡張型心筋症治療剤が上記微小粒子を含有する、又は分泌する能力を有する間葉系幹細胞を含む場合には、上記間葉系幹細胞を含むことで、同時に上記微小粒子を含むという要件を満たすこととなるとも解釈できる。

[0044] 本発明における間葉系幹細胞由来の微小粒子は、典型的には間葉系幹細胞から放出される、電子顕微鏡で確認することができるサイズの小胞である。微小粒子のサイズとしては、平均粒子径が1 nm以上1,000 nm以下であり、10 nm以上500 nm以下であることが好ましく、30 nm以上200 nm以下であることが更に好ましい。ここで、平均粒子径とは、動的光散乱法又は電子顕微鏡での測定による各粒子の直径の平均値である。上記微小粒子は、生体分子を囲む脂質二重層を有することができる。

[0045] また、上記微小粒子としては、例えば、膜粒子、膜小胞、微小胞、ナノ小胞、微小小胞体 (microvesicles、平均粒子径30~1,000 nm)、エクソソーム様小胞、エクソソーム (exosome、平均粒子径30~200 nm)、エクトソーム様小胞、エクトソーム (ectosome) 又はエキソベシクル等が挙げられ、好ましくはエクソソームである。異なる種類の間葉系幹細胞由来の微小粒子は、細胞内起源、スクロース中での微小粒子の密度、形状、沈降速度、脂質組成、タンパク質マーカー及び分泌の様式 (即ち、シグナル (誘導性) 後又は自発的 (構成的)) に基づいても区別される。微小粒子は、例えば、密度勾配遠心法では、1.0~1.5 g/mL、好ましくは1.1~1.3 g/mLに分画される。さらに、微小粒子はその構成脂質としてフォスファチジルセリン、コレステロール、スフィンゴミエリン及びセラミドのいずれかを含有する。

[0046] 本発明における間葉系幹細胞由来の微小粒子は、タンパク質、脂肪酸、miRNA等の核酸を含む。上記タンパク質、脂肪酸としては、例えば、IL-10、HGF (Hepatocyte Growth Factor)、アポリポプロテインA-2 (Apoprotein A-2)、色素上皮由来因子 (Pigment epithelium-derived fac

tor (PEDF)、SERPINF1)、ハプトグロビン (Haptoglobin)、ペラルゴン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデカン酸、イソペンタデカン酸、パルミチン酸、イソパルミチン酸、マルガリン酸、Isoheptadecanoic acid、ステアリン酸、イソステアリン酸、オレイン酸、エライジン酸、リノール酸、ノナデシル酸、イソノナデシル酸、アラキジン酸、11Z-eicosenoic acid、Dihomo- γ -linolenic acid、アラキドン酸、エルカ酸、13Z, 16Z-Docosadienoic acid、13Z, 16Z, 19Z-Docosadienoic acid、アドレン酸、Clupanodonic acid等、好ましくはIL-10、HGF、アポリipoprotein A-2 (Apoprotein A-2)、色素上皮由来因子 (Pigment epithelium-derived factor (PEDF)、SERPINF1)、ハプトグロビン (Haptoglobin)、ペラルゴン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデカン酸、イソペンタデカン酸、パルミチン酸、イソパルミチン酸、マルガリン酸、Isoheptadecanoic acid、ステアリン酸、イソステアリン酸、オレイン酸、エライジン酸、リノール酸、アラキジン酸、11Z-eicosenoic acid、アラキドン酸、エルカ酸、13Z, 16Z-Docosadienoic acid、更に好ましくはIL-10、HGF、アポリipoprotein A-2 (Apoprotein A-2)、色素上皮由来因子 (Pigment epithelium-derived factor (PEDF)、SERPINF1)、ハプトグロビン (Haptoglobin)、ミリスチン酸、ペンタデカン酸、パルミチン酸、マルガリン酸、Isoheptadecanoic acid、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、ノナデシル酸、エルカ酸、13Z, 16Z-Docosadienoic acid、特に好ましくはIL-10、HGF、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、オレイン酸、13Z, 16Z-Docosadienoic acidが挙げられ、本発明における間葉系幹細

胞由来の微小粒子は、これらを含む微小粒子であることが好ましい。

[0047] 〈間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子の形態〉

本発明の間葉系幹細胞は、いずれの状態の細胞であってもよいが、例えば培養中の細胞を剥離して回収された細胞でもよいし、凍結保存液中に凍結された状態の細胞でもよい。拡大培養して得られる同ロットの細胞を小分けして凍結保存したものを使用すると、安定した作用効果が得られる点、取扱い性に優れる点等において好ましい。凍結保存状態の間葉系幹細胞は、使用直前に融解し、凍結保存液に懸濁したまま直接投与してもよいし、輸液もしくは培地に懸濁した後に、投与してもよい。また、遠心分離等の方法により凍結保存液を除去してから輸液もしくは培地に混合してもよい。

[0048] 本発明の間葉系幹細胞由来の微小粒子は、いずれの状態の微小粒子であってもよいが、例えば培養中の細胞から単離された間葉系幹細胞由来の微小粒子でもよいし、凍結保存液中に凍結された状態の間葉系幹細胞由来の微小粒子でもよい。拡大培養して得られる同ロットの細胞から単離された間葉系幹細胞由来の微小粒子を小分けして凍結保存したものを使用すると、安定した作用効果が得られる点、取扱い性に優れる点等において好ましい。凍結保存状態の単離された間葉系幹細胞由来の微小粒子は、使用直前に融解し、凍結保存液に懸濁したまま直接投与してもよいし、輸液もしくは培地に懸濁した後に、投与してもよい。また、遠心分離等の方法により凍結保存液を除去してから輸液もしくは培地に混合してもよい。

[0049] ここで、本発明における「輸液」とは、ヒトの治療の際に用いられる溶液のことをいい、特に限定されないが、例えば、生理食塩水、日局生理食塩液、5%ブドウ糖液、日局ブドウ糖注射液、リンゲル液、日局リンゲル液、乳酸リンゲル液、酢酸リンゲル液、1号液（開始液）、2号液（脱水補給液）、3号液（維持液）、4号液（術後回復液）等が挙げられる。なお、上記の輸液もしくは培地等は、後述するその他の成分（薬学的に許容される担体や添加物）を含むように調製されてもよい。

[0050] 本発明の拡張型心筋症治療剤は、本発明の効果を損なわない範囲であれば

、その用途や形態に応じて、常法に従い、薬学的に許容される担体や添加物を含有させてもよい。このような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が挙げられるが、これらに限定されない。

[0051] 本発明の拡張型心筋症治療剤は、目的に応じて種々の形態、例えば、固形剤、半固形剤、液剤等の様々な剤形で提供することができる。例えば、固形剤（錠剤、粉末、散剤、顆粒剤、カプセル剤等）、半固形剤〔軟膏剤（硬軟膏剤、軟軟膏剤等）、クリーム剤等〕、液剤〔ローション剤、エキス剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、注射剤（輸液剤、埋め込み注射剤、持続性注射、用時調製型の注射剤を含む）、透析用剤、エアゾール剤、軟カプセル剤、ドリンク剤等〕、貼付剤、パップ剤等の形態で利用できる。また、本発明の拡張型心筋症治療剤は、油性又は水性のビヒクル中の溶液又は乳液等の形態でも利用できる。さらに、本発明の拡張型心筋症治療剤は噴霧により、患部に適用することもでき、本発明の拡張型心筋症治療剤は噴霧した後に患部でゲル化もしくはシート化される形態でも利用できる。本発明の拡張型心筋症治療剤は上記間葉系幹細胞をシート状または立体構造体とした後に、患部に適用することもできる。

[0052] 本発明の拡張型心筋症治療剤は、生理食塩水、日局生理食塩液、5%ブドウ糖液、日局ブドウ糖注射液、リンゲル液、日局リンゲル液、乳酸リンゲル液、酢酸リンゲル液、重炭酸リンゲル液、1号液（開始液）、2号液（脱水補給液）、3号液（維持液）、4号液（術後回復液）等の輸液、又は、DMEM等の細胞培養培地を用いて、懸濁もしくは希釈して用いることができ、好ましくは生理食塩液、5%ブドウ糖液、1号液（開始液）で、より好ましくは5%ブドウ糖液、1号液（開始液）で懸濁もしくは希釈して用いることができる。

- [0053] 本発明の拡張型心筋症治療剤が液剤である場合、拡張型心筋症治療剤のpHは、医薬上、薬理的に（製薬上）又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、一例として、2.5～9.0、好ましくは3.0～8.5、より好ましくは3.5～8.0となる範囲が挙げられる。
- [0054] 本発明の拡張型心筋症治療剤が液剤である場合、拡張型心筋症治療剤の浸透圧については、生体に許容される範囲内であれば、特に制限されない。本発明の組成物の浸透圧比の一例として、好ましくは0.7～5.0、より好ましくは0.8～3.0、さらに好ましくは0.9～1.4となる範囲が挙げられる。浸透圧の調整は無機塩、多価アルコール、糖アルコール、糖類等を用いて、当該技術分野で既知の方法で行うことができる。浸透圧比は、第十五改正日本薬局方に基づき286mOsm（0.9w/v%塩化ナトリウム水溶液）の浸透圧に対する試料の浸透圧の比とし、浸透圧は日本薬局方記載の浸透圧測定法（氷点降下法）を参考にして測定する。なお、浸透圧比測定用標準液（0.9w/v%塩化ナトリウム水溶液）は、塩化ナトリウム（日本薬局方標準試薬）を500～650℃で40～50分間乾燥した後、デシケーター（シリカゲル）中で放冷し、その0.900gを正確に量り、精製水に溶かし正確に100mLとして調製するか、市販の浸透圧比測定用標準液（0.9w/v%塩化ナトリウム水溶液）を用いる。
- [0055] 本発明の拡張型心筋症治療剤は、間葉系幹細胞又は間葉系幹細胞由来の微小粒子と、間葉系幹細胞又は間葉系幹細胞由来の微小粒子を懸濁するための溶液とが別々の容器に封入されて保管され、使用時に両者を混合して用いる形態であってもよい。なお、保管の際、上記間葉系幹細胞又は間葉系幹細胞由来の微小粒子、及び間葉系幹細胞又は間葉系幹細胞由来の微小粒子を懸濁するための溶液は凍結状態であってもよいし、冷蔵状態であってもよい。
- [0056] 本発明の拡張型心筋症治療剤は、拡張型心筋症の治療に好適に用いることができ、中でも、遺伝性拡張型心筋症、家族性拡張型心筋症もしくは特発性拡張型心筋症の治療により好適に用いることができる。

[0057] 本発明の拡張型心筋症治療剤の投与経路は、心臓表面への直接投与、心臓内投与、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、舌下投与、経直腸投与、経膈投与、経鼻投与、吸入、経皮投与等が挙げられるが、本発明の拡張型心筋症治療剤の有効性の観点から、好ましくは心臓表面への直接投与、筋肉内投与、静脈内投与、動脈内投与である。

[0058] 本発明の拡張型心筋症治療剤において、間葉系幹細胞の用量（投与量）は、患者の状態（体重、年齢、症状、体調等）、及び本発明の拡張型心筋症治療剤の剤形等によって異なりうるが、十分な拡張型心筋症治療剤の治療効果を奏する観点からは、間葉系幹細胞の量は多い方が好ましい傾向にあり、一方、副作用の発現を抑制する観点からは間葉系幹細胞の量は少ない方が好ましい傾向にある。通常、成人に投与（噴霧）する場合には、細胞数として、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{12}$ 個/回、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{11}$ 個/回、より好ましくは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{10}$ 個/回、さらに好ましくは $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ 個/回である。また、患者の体重あたりの間葉系幹細胞の投与（噴霧）量としては、 $1 \times 10 \sim 5 \times 10^{10}$ 個/kg、好ましくは $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^9$ 個/kg、より好ましくは $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^8$ 個/kg、さらに好ましくは $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^7$ 個/kgである。なお、本用量を1回量として、間葉系幹細胞複数回投与（噴霧）してもよく、本用量を複数回に分けて投与（噴霧）してもよい。

[0059] 本発明の拡張型心筋症治療剤において、微小粒子を分泌する間葉系幹細胞を含む場合、その用量（投与量）は、患者の状態（体重、年齢、症状、体調等）、及び本発明の拡張型心筋症治療剤の剤形等によって異なりうるが、十分な拡張型心筋症治療剤の治療効果を奏する観点からは、その量は多い方が好ましい傾向にあり、一方、副作用の発現を抑制する観点からはその量は少ない方が好ましい傾向にある。通常、成人に投与する場合には、細胞数として、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{12}$ 個/回、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{11}$ 個/回、更に好ましくは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{10}$ 個/回、特に好ましくは $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ 個/回である。なお、本用量を1回量として、複数回投与して

もよく、本用量を複数回に分けて投与しても良い。

[0060] 本発明の拡張型心筋症治療剤が、微小粒子を分泌する間葉系幹細胞を含む場合、その用量（投与量）は、患者の状態（体重、年齢、症状、体調等）、及び本発明の拡張型心筋症治療剤の剤形等によって異なりうるが、通常、成人に投与する場合には、細胞数として、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^{10}$ 個/kg、好ましくは $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$ 個/kg、更に好ましくは $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{11}$ 個/kg、特に好ましくは $1 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{12}$ 個/kgである。なお、本用量を1回量として、複数回投与してもよく、本用量を複数回に分けて投与しても良い。

[0061] 本発明の拡張型心筋症治療剤が、単離された微小粒子又は微小粒子を含む間葉系幹細胞培養上清を含む場合、その用量（投与量）は、患者の状態（体重、年齢、症状、体調等）、及び本発明の拡張型心筋症治療剤の剤形等によって異なりうるが、通常、成人に投与する場合には、微小粒子として、 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^{13}$ 個/kg、好ましくは $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^{12}$ 個/kg、更に好ましくは $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^{11}$ 個/kg、特に好ましくは $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^{10}$ 個/kgである。なお、本用量を1回量として、複数回投与してもよく、本用量を複数回に分けて投与しても良い。

[0062] 本発明の拡張型心筋症治療剤は、1又は2以上の他の薬剤と共に投与してもよい。他の薬剤としては、心臓疾患の拡張型心筋症治療剤として用いることができる任意の剤を薬剤が挙げられ、たとえばACE阻害薬、アンギオテンシンII受容体拮抗薬、 β 遮断薬、抗血小板薬、ワーファリン、カルシウム拮抗薬、硝酸薬、利尿剤、HMG-C o A還元酵素阻害薬、アンカロン等が挙げられる。なお、本発明の拡張型心筋症治療剤が、1又は2以上の他の薬剤と共に投与される場合とは、本発明の拡張型心筋症治療剤と他の薬剤とを同時に使用する場合、どちらか一方を投与した後に一定の時間が経過してから他方の薬剤を投与する場合、これらの組み合わせ等、種々の場合を含む。

[0063] 本発明の拡張型心筋症治療剤は、拡張型心筋症を罹患した被験体に対して、顕著な治療効果を奏する。上記治療効果は、例えば心エコー検査や、病理

組織学的検査（心肥大、線維化の検査）によって確認することができる。具体的には、本発明の拡張型心筋症治療剤は、拡張型心筋症を罹患した被験体の心肥大、心組織の線維化を抑制し、心機能を回復させることができる。さらにその効果は長期間に渡って維持され得る。また、本発明の拡張型心筋症治療剤は、拡張型心筋症を罹患した被験体の心組織中のATP含有量の上昇、ミトコンドリア中のANT-1タンパクの発現上昇等に寄与し、生存率を上昇させることができる。

[0064] <拡張型心筋症治療剤の調製方法>

本発明の拡張型心筋症治療剤は、それぞれの剤型に合わせて、常法に従って、間葉系幹細胞又は間葉系幹細胞由来の微小粒子と、適切な、細胞又は微小粒子懸濁用液体等（薬学的に許容される担体や添加物を含む）とを混合することにより得られる。一つの好ましい例としては、間葉系幹細胞又は間葉系幹細胞由来の微小粒子をフィブリノーゲン溶液に懸濁し、得られた懸濁液とトロンビン溶液とを、又は、間葉系幹細胞又は間葉系幹細胞由来の微小粒子をトロンビン溶液に懸濁し、得られた懸濁液とフィブリノーゲン溶液とを、実質的に同時に疾患部位に直接噴霧して、ゲル状の拡張型心筋症治療剤を調整する方法が挙げられる。

[0065] <線維化抑制剤>

本発明は、間葉系幹細胞又は間葉系幹細胞由来の微小粒子を含有する、拡張型心筋症における線維化抑制剤も含む。上述した本発明の拡張型心筋症治療剤は、拡張型心筋症における線維化を特に抑制する顕著な効果を有することから、拡張型心筋症における線維化抑制剤としても有効である。なお、本発明の拡張型心筋症における線維化抑制剤の具体的な説明については、上述した拡張型心筋症治療剤の説明を適用できる。

[0066] <心肥大抑制剤>

本発明は、間葉系幹細胞又は間葉系幹細胞由来の微小粒子を含有する、拡張型心筋症における心肥大抑制剤も含む。上述した本発明の拡張型心筋症治療剤は、拡張型心筋症における心肥大を特に効果的に抑制する効果を有する

ことから、拡張型心筋症における心肥大抑制剤としても有効である。なお、本発明の拡張型心筋症における心肥大抑制剤の具体的な説明については、上述した拡張型心筋症治療剤の説明を適用できる。

[0067] <拡張型心筋症治療用キット>

本発明は、上述した本発明の拡張型心筋症治療剤、線維化抑制剤又は心肥大抑制剤、容器及びラベルを含む拡張型心筋症治療用のキットも含む。本発明のキットが含む適切な容器としては、特に限定されないが、例えば、間葉系幹細胞又は間葉系幹細胞由来の微小粒子凍結用のクライオチューブ、間葉系幹細胞又は間葉系幹細胞由来の微小粒子懸濁用溶液用のボトル、バイアル、試験管等が挙げられる。これらの容器は、ガラス、金属、プラスチック又はこれらの組み合わせ等の多様な材料から形成されていてもよい。これらの容器上のラベルには、内容物を説明する内容が記載されている。

[0068] <治療方法>

本発明は、間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子からなる群より選択される少なくとも1種を投与することを特徴とする、拡張型心筋症の治療方法も含む。本発明の治療方法によると、拡張型心筋症の疾患に対して、間葉系幹細胞又は間葉系幹細胞由来の微小粒子を投与することにより、心臓等の疾患部位の機能、構造等を顕著に改善させることができる。上記間葉系幹細胞は同種異系の被験体に対しても拒絶反応を起こしにくいため、あらかじめ調製されたドナーの細胞を拡大培養して凍結保存したものを使用することができる。また、同様に、あらかじめ調製されたドナーの細胞を拡大培養して凍結保存した間葉系幹細胞から得られる間葉系幹細胞由来の微小粒子を使用することができる。そのため、自己の間葉系幹細胞を調製して用いる場合と比較して、商品化も容易であり、かつ安定した一定の効果を得られ易いという利点もある。なお、本発明の治療方法は、上述した本発明の拡張型心筋症治療剤を投与することにより拡張型心筋症を治療する方法とも言え、間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子についての説明やその他の説明は、上述した拡張型心筋症治療剤の項における説明を適用できる。

[0069] また、本発明は、間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子からなる群より選択される少なくとも1種を投与することを特徴とする、線維化の抑制方法、特に拡張型心筋症における線維化の抑制方法も含む。さらに、本発明は、間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子からなる群より選択される少なくとも1種を投与することを特徴とする、心肥大、特に拡張型心筋症における心肥大の抑制方法も含む。なお、なお、本発明の抑制方法は、上述した本発明の拡張型心筋症治療剤を投与することにより線維化や心肥大をする方法とも言え、本発明の抑制方法における間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子についての説明やその他の説明は、上述した拡張型心筋症治療剤の項における説明を適用できる。

[0070] 本発明のキットは、その他の添加剤、その他の薬剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、使用法を記載した添付文書を含めた、商業的、及び利用者の観点から望ましい他の材料を包含することができる。

実施例

[0071] 以下の実施例にて本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

[0072] [1] 本発明の拡張型心筋症治療剤の調製
(脂肪組織由来間葉系幹細胞の調製)

ヒトドナーから同意を得た後、脂肪吸引法で得た皮下脂肪組織を生理食塩液で洗浄した。細胞外基質の破壊、及び細胞の単離を達成するために、コラゲナーゼ (R o c h e 社) (溶媒は生理食塩液) を添加し、37℃で90分間振倒し、分散した。続いて、この細胞を回収し、細胞懸濁液を800gで5分間、遠心分離して間質血管細胞群の沈殿を得た。上記細胞の沈殿に間葉系幹細胞用無血清培地 (R o h t o 社) を加え、当該細胞懸濁液を400gで5分間遠心分離し、上清除去後に間葉系幹細胞用無血清培地 (R o h t o 社) に再懸濁し、フラスコに細胞を播種した。細胞を37℃で数日間、5% CO₂中で培養した。数日後に培養物をPBSで洗浄して、培養液中に含まれていた血球や脂肪組織の残存等を除去し、プラスチック容器に接着している

脂肪組織由来間葉系幹細胞 (Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells; ADSC) を得た。

[0073] (脂肪組織由来間葉系幹細胞の凍結保存)

得られた脂肪組織由来間葉系幹細胞を、トリプシンを用いて剥離し、遠沈管に移し、400gで5分間、遠心分離し細胞の沈殿を得た。上清を除去した後、細胞凍結保存液 (STEM-CELL BANKER (ゼノアック社)) を適量加え懸濁した。当該細胞懸濁液を、クライオチューブに分注した後、フリーザー内で-80度にて保存後、液体窒素上の気相に移し、保存を継続した。

[0074] (細胞表面マーカーの解析 (フローサイトメトリー))

脂肪組織由来間葉系幹細胞上の種々の表面マーカーの評価は、フローサイトメトリーによって実施した。脂肪組織由来間葉系幹細胞を、FACS染色用バッファーに再懸濁した。FACS分析に用いた抗体は、FITC (蛍光イソシアニン) 又はPE (フェコエリスリン) 標識のマウス抗ヒト抗体CD11b、CD45、CD73、CD90、及び相当するマウスIgG1アイソタイプコントロール抗体であった。細胞は室温で30分間染色し、次に洗浄し、BDFADSCantol1 (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて解析した。データは、BD FACSDiva SoftwCre (BD Biosciences) を用いて分析した。その結果、脂肪組織由来間葉系幹細胞は、CD45は陰性、CD73、CD90は陽性であった。

[0075] (スプレー用拡張型心筋症治療剤の調製)

スプレー用のフィブリノーゲン溶液及びトロンビン溶液は、BeriplastRP Combi-Set Tissue adhesion (CLS Behring, Co, Ltd) を用いて調製した。フィブリノーゲン溶液 (ベリプラストA液) は、フィブリノーゲン 80mg/mL、ファクターXIII 60IU、及び牛アプロチニン 5,000KIEを含む。トロンビン溶液 (ベリプラストB液) は、トロンビン 300単位/mLを

含む。具体的には、凍結保存の脂肪組織由来間葉系幹細胞（ADSC）はスプレーする直前に解凍し、下記表1に示した量のHBSS（×1）に懸濁後、ベリプラストA液を添加して溶液Aを調製した。また、下記表1に示した量のHBSS（×1）にベリプラストBを添加し、溶液Bを調製した。これらの溶液をそれぞれ別のシリンジ内に封入して準備し、下記の移植試験に用いた。

[表1]

溶液A 2.0mL	ベリプラストA液（フィブリノーゲン）	400 μ L (32mg)
	ADSC in HBSS(X1)（脂肪組織由来間葉系幹細胞）	1 X 10 ⁸ cells/1.6mL
溶液B 2.0mL	ベリプラストB液（トロンビン）	400 μ L (120単位)
	HBSS (X1)	1.6mL

[0076] [2] 移植試験1

（移植試験のプロトコール）

J2N-kハムスター（20週齢、雄）を開胸後、それぞれ別のシリンジ内に封入した上記表1に示す組成の溶液A及びBを、拡張型心筋症を発症している心臓の表面（心嚢膜内）に、同時に直接滴下して疾患部位を被覆した（ADSC群）。媒体投与グループにおいて、J2N-kハムスター（20週齢、雄）を開胸後、それぞれ別のシリンジ内に封入した下記表2に示す組成の溶液A'及びBを、拡張型心筋症を発症している心臓の表面（心嚢膜内）に、同時に直接噴霧して疾患部位を被覆した（Control群）。偽手術では、J2N-kハムスター（20週齢、雄）及び心筋症を発症しない正常ハムスターのJ2N-nハムスター（20週齢、雄）に対して、開胸のみを行い、上記の薬剤の滴下は行わなかった（それぞれSham群、Normal）。

[0077]

[表2]

溶液A' 2.0mL	ベリプラストA液 (フィブリノーゲン)	400 μ L (32mg)
	HBSS (X1)	1.6mL
溶液B 2.0mL	ベリプラストB液 (トロンピン)	400 μ L (120単位)
	HBSS (X1)	1.6mL

[0078] 移植前（ベースライン）、移植後の1週、2週、3週及び4週に、心エコー検査を実施した。この研究の最終期には、動物は心臓組織の組織学的及び生化学的分析のために、細胞移植の4週後に人道的に殺処分した。以下に移植試験について詳細に説明する。

[0079] (脂肪由来間葉系幹細胞移植実験)

J2N-kハムスター（20週齢、雄）及びJ2N-nハムスター（20週齢、雄）に対して、全身麻酔下で胸骨正中切開を行い、脂肪組織由来間葉系幹細胞、媒体の移植又は偽手術のいずれかを実施した。心筋梗塞を発症している部位は、表面の瘢痕及び異常な壁運動に基づいて視覚的に確認することができる。具体的には、ADSCグループでは、それぞれ別のシリンジ内に封入した上記表1に示す組成（ 1×10^6 個の脂肪組織由来間葉系幹細胞を含む）の溶液A（20 μ L）及びB（20 μ L）を、心筋梗塞を発症している部位の表面（心表面）に、同時に直接噴霧して疾患部位を被覆した。J2N-kハムスター及びJ2N-nハムスターは、温度制御された個々のケージで回復させた。

[0080] (脂肪組織由来間葉系幹細胞移植の効果)

J2N-kハムスター及びJ2N-nハムスターに対する、脂肪組織由来間葉系幹細胞の移植の効果、心機能及び病理組織学的検査により評価した。心機能の検査として、心エコー検査によりLVEFを計測した。病理組織学的検査では、心肥大と線維化について評価した。また、心筋組織中のATP含量を測定した。さらに、心組織よりミトコンドリアを単離し、ミトコンドリアに発現するadenine nucleotide translocator-1 (Mt. ANT-1, gene symbol: SLC

25A4) を、ウエスタンブロット法により測定した。それぞれの評価方法について以下に説明する。

[0081] (心エコー検査)

J2N-kハムスター及びJ2N-nハムスターは上記の通り麻酔した。超音波心臓検査は市販のエコー機器(HITACHI: PROSOUND F75 PremierCV)を用いて実施した。8.0-MHzの環状アレイトランスデューサを心臓評価に用いた。J2Nハムスター及びJ2N-nハムスターは左側臥位で検査した。LV拡張終末期及び収縮終末期容積(LVEDV及びLVESV)はタイヒホルツ(Teichholz)式から計算した。LVエジェクションフラクション(LVEF)は下記の式から計算した。結果を図1に示した。

$$LVEF(\%) = 100 \times (LVEDV - LVESV) / (LVEDV)$$

[0082] 図1に示すとおり、開胸のみを行ったSham群、媒体を投与したControl群においては、経時的にLVEFが低下し、心機能の低下がみられたが、脂肪組織由来間葉系幹細胞の移植群では、LVEFの低下が見られず、拡張型心筋症の進行を抑制した。

[0083] (心組織中のATP含有量の測定)

移植後2週における心組織中のATP含有量を、市販のATP測定キットを用いて測定した。図2に示すとおり、開胸のみを行ったSham群、媒体を投与したControl群においては、正常ハムスターに比べATP含有量が有意に低下した。これに対して、脂肪組織由来間葉系幹細胞の移植群では、ATP含有量の低下が見られず、Sham群に比べ、ATP含有量が有意に上昇した。

[0084] (心組織中ミトコンドリアのMt. ANT-1/COX4の測定)

移植後2週における心組織よりミトコンドリアを単離し、ミトコンドリアに発現するadenine nucleotide translocator-1(Mt. ANT-1、gene symbol:SLC25A4)を、ウエスタンブロット法により測定した。なお、cytochrome

c o x i d a s e 4 (C O X 4) をウエスタンブロット法における内在性コントロールとした。

[0085] 図3に示すとおり、正常ハムスターと比較して、開胸のみを行ったS h a m群、媒体を投与したC o n t r o l群においては、M t. A N T-1発現量が有意に低かった。これに対して、脂肪組織由来間葉系幹細胞の移植群 (A D S C) では、M t. A N T-1の発現量は、S h a m群及びC o n t r o l群に比べ、有意に高かった。同様に、移植後4週における心組織中のM t. A N T-1を測定した。その結果、移植後2週と同様に、s h a m群及びC o n t r o l群では、M t. A N T-1の発現量は、有意に低値であったが、脂肪組織由来間葉系幹細胞の移植群 (A D S C) では、N o r m a l群との間に有意な差が無い程度にまで発現量が高くなっていた。

[0086] (心臓サイズの測定)

移植後4週における、心臓のH E染色標本を用いて心臓の直径を、顕微鏡下により測定した。図4に示すとおり、開胸のみを行ったS h a m群、媒体を投与したC o n t r o l群においては、拡張型心筋症が進行し、正常ハムスターに比べ心臓が肥大した。これに対して、脂肪組織由来間葉系幹細胞の移植群では、S h a m群に比べ、心臓肥大が有意に抑制され、拡張型心筋症を改善した。

[0087] (線維化面積の測定)

移植後4週における、心臓のシリウスレッド染色標本を用いて線維化面積を測定した。開胸のみを行ったS h a m群の線維化面積に対して、脂肪組織由来間葉系幹細胞の移植J群の線維化面積は78.3%であり、間葉系幹細胞により、拡張型心筋症の線維化が抑制されることが明らかとなった。

[0088] (δ サルコグリカン発現量の測定)

移植後4週における、心臓の δ サルコグリカン発現を、免疫染色法により測定した。S h a m群、S h a m群及びA D S C群のいずれにおいても、 δ サルコグリカンの発現は認められず、脂肪組織由来間葉系幹細胞によって、 δ サルコグリカン遺伝子は影響を受けないことが明らかとなった。

[0089] [3] 移植試験2

移植試験1と同様に、J2N-kハムスター（20週齢、雄）に対して、全身麻酔下で胸骨正中切開を行い、脂肪組織由来間葉系幹細胞（ADSC）又は媒体（Control）を移植した。具体的には、移植試験1と同様に、ADSCグループでは、それぞれ別のシリンジ内に封入した上記表1に示す組成（ 1×10^6 個の脂肪組織由来間葉系幹細胞を含む）の溶液A（ $20 \mu\text{L}$ ）及びB（ $20 \mu\text{L}$ ）を、心筋症を発症している部位の表面（心表面）に、同時に直接滴下して疾患部位を被覆した。これらのJ2N-kハムスターは、温度制御された個々のケージで回復させた。J2N-kハムスターに対する、脂肪組織由来間葉系幹細胞の移植の効果を、移植前（ベースライン）、移植後の2週、4週、8週、12週、16週及び20週に、心エコー検査を実施し、心機能により評価した。心機能の検査として、移植試験1と同様に、心エコー検査によりLVEFを計測した。なお、試験に使用した動物は、細胞移植の20週後に人道的に殺処分した。

[0090] 図5に示すとおり、媒体を投与したControl群においては、経時的にLVEFが低下したが、脂肪組織由来間葉系幹細胞の移植群（ADSC）では、LVEFの低下が見られず、拡張型心筋症の症状の進行を抑制した。また、この拡張型心筋症の症状の進行を抑制する効果は、移植後20週という長期間に渡って維持された。

[0091] [4] 移植試験3

移植試験1と同様に、J2N-kハムスター（20週齢、雄）に対して、全身麻酔下で胸骨正中切開を行い、脂肪組織由来間葉系幹細胞（ADSC）又は媒体（Control）の移植のいずれかを実施した。具体的には、移植試験1と同様に、ADSCグループでは、それぞれ別のシリンジ内に封入した上記表1に示す組成（ 1×10^6 個の脂肪組織由来間葉系幹細胞を含む）の溶液A（ $20 \mu\text{L}$ ）及びB（ $20 \mu\text{L}$ ）を、心筋梗塞を発症している部位の表面（心表面）に、同時に直接噴霧して疾患部位を被覆した。J2N-kハムスターは、温度制御された個々のケージで回復させた。

[0092] その結果、12週間後の死亡率は、Control群で28.6%であったのに対して、ADSC投与群では12.5%と、脂肪組織由来間葉系幹細胞を移植することにより、死亡率が低下することが示された。

[0093] [5] 微小粒子の調製及び心筋細胞に対する効果の検討

前述と同様に調製した脂肪由来間葉系幹細胞の培養上清を回収し、回収した培養上清をフィルター(0.22 μ m、メルクミリポア)でろ過した後、遠心(35,000rpm、70分、4 $^{\circ}$ C、BECKMAN Optima XE-90)により微小粒子を回収した。得られた微小粒子の平均粒子径は、155 \pm 6nmであった(平均 \pm 標準誤差、n=3)。

[0094] 間葉系幹細胞の培養上清60mLから回収した微小粒子を0.5mLのPBSに懸濁した。得られた脂肪由来間葉系幹細胞由来微小粒子をヒト由来心筋細胞(PromoCell社製、 5×10^5 cells/dish)に、それぞれ10 μ L、30 μ L及び100 μ L添加して、エネルギー産生量としてNADPH活性を測定したところ、微小粒子量依存的にエネルギー産出量が増加した(図6)。このことより、間葉系幹細胞による心機能改善効果には、間葉系幹細胞が分泌する微小粒子が関与している可能性が示唆された。

[0095] [6] 微小粒子が含むタンパクの解析

脂肪由来間葉系幹細胞の培養上清(無血清培地)100mLにTotal Exosome Isolation(Thermo Fisher Scientific Inc.、品番:4478359)を50mL加え、十分に転倒混和した。冷蔵庫(2~8 $^{\circ}$ C)で一晩保存した後、遠心分離(10,000 \times g、1時間、2~8 $^{\circ}$ C)し、その上清を除去した。その時得られた沈渣を500 μ LのPBSで懸濁し、この懸濁液を微小粒子含有懸濁液とした。微小粒子含有懸濁液150 μ Lに20%トリクロロ酢酸(Trichloroacetic acid(TCA)、和光純薬工業(株)社製)を150 μ L加え、タンパク質を凝集させ沈殿させた。得られた沈殿全量にトリス塩酸緩衝液(Tris Hydrochloride Acid Buffer(Tris-HCl)、pH8.5)20 μ Lを加えて、沈殿を

溶解した。さらに、0.01%のトリプシン (Trypsin、アプロサイエンス社製) を含むトリスバッファー (Tris-HCl、pH8.0) を加え、37℃で20時間反応させた。その後、得られたサンプル溶液をLC-MS/MS (LC: Michrom BioResources社製、MS: ThermoFisherScientific社製) で分析したところ、アポリポrotein A-2 (Apolipoprotein A-2)、色素上皮由来因子 (Pigment epithelium-derived factor (PEDF)、SERPINF1) 及びハプトグロビン (Haptoglobin) が検出された。

産業上の利用可能性

[0096] 本発明の拡張型心筋症治療剤によると、拡張型心筋症の心臓の機能等を顕著に改善させることができる。上記間葉系幹細胞は同種異系の被験体に対しても拒絶反応を起こしにくいため、あらかじめ治療効果が確認されたドナーの細胞を拡大培養して凍結保存したものを、本発明の拡張型心筋症治療剤における間葉系幹細胞として使用することができる。そのため、自己の間葉系幹細胞を調製して用いる場合と比較して、商品化も容易であり、かつ一定の効果を得られ易いという利点もある。

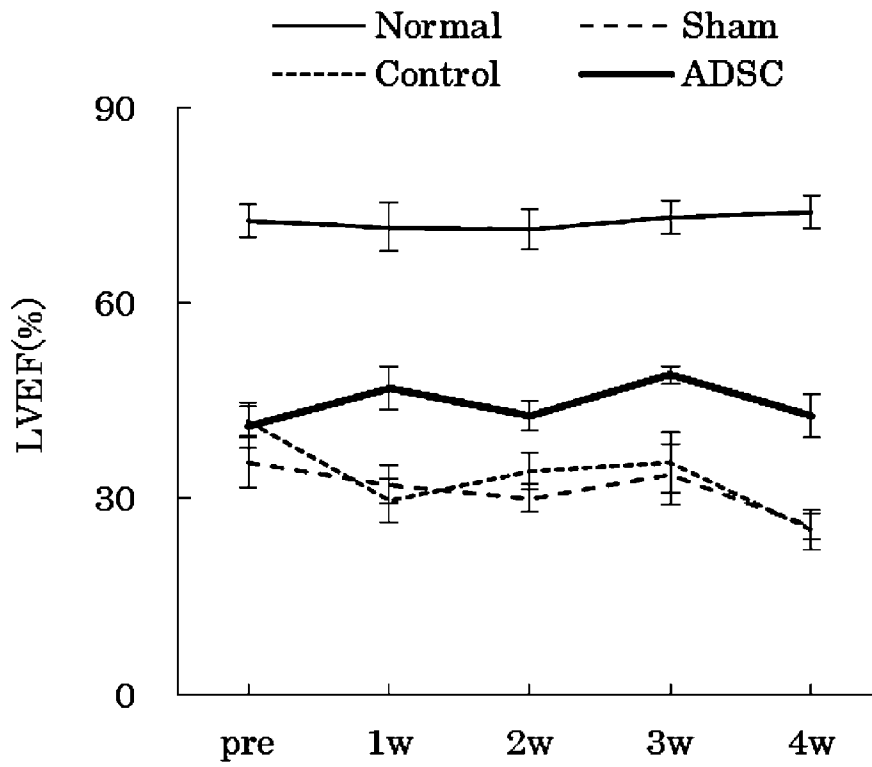
請求の範囲

- [請求項1] 間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子からなる群より選択される少なくとも1種を含有する、拡張型心筋症治療剤。
- [請求項2] 上記間葉系幹細胞が、微小粒子を含有又は分泌する能力を有する、請求項1に記載の拡張型心筋症治療剤。
- [請求項3] 上記微小粒子の平均粒子径が1,000nm以下である、請求項1又は2に記載の拡張型心筋症治療剤。
- [請求項4] 上記微小粒子が、エクソソーム(exosome)である、請求項1から3のいずれか1項に記載の拡張型心筋症治療剤。
- [請求項5] 上記微小粒子が、IL-10、HGF、アポリポプロテインA-2(Apoprotein A-2)、色素上皮由来因子(Pigment epithelium-derived factor(PEDF)、SERPINF1)、及びハプトグロビン(Haptoglobin)からなる群より選択される少なくとも1種の因子を含有する、請求項1から4のいずれか1項に記載の拡張型心筋症治療剤。
- [請求項6] 上記間葉系幹細胞が、被験体に対して同種異系である、請求項1から5のいずれか1項に記載の拡張型心筋症治療剤。
- [請求項7] 上記間葉系幹細胞が、脂肪由来、臍帯由来又は骨髄由来である、請求項1から6のいずれか1項に記載の拡張型心筋症治療剤。
- [請求項8] 上記拡張型心筋症が、特発性拡張型心筋症、家族性拡張型心筋症及び遺伝性拡張型心筋症からなる群より選択される拡張型心筋症である、請求項1から7のいずれか1項に記載の拡張型心筋症治療剤。
- [請求項9] 上記間葉系幹細胞が、凍結保存した細胞である、請求項1から8のいずれか1項に記載の拡張型心筋症治療剤。
- [請求項10] 間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子からなる群より選択される少なくとも1種を含有する、拡張型心筋症における線維化抑制剤。
- [請求項11] 間葉系幹細胞及び間葉系幹細胞由来の微小粒子からなる群より選択

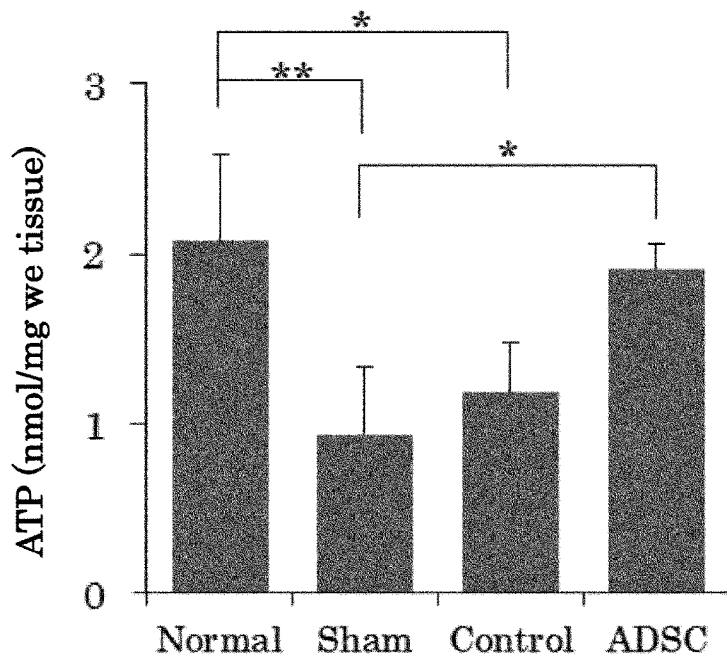
される少なくとも1種を含有する、拡張型心筋症における心肥大抑制剤。

[請求項12] 請求項1から9のいずれか1項に記載の拡張型心筋症治療剤、請求項10に記載の線維化抑制剤又は請求項11に記載の心肥大抑制剤、容器及びラベルを含む、拡張型心筋症治療用キット。

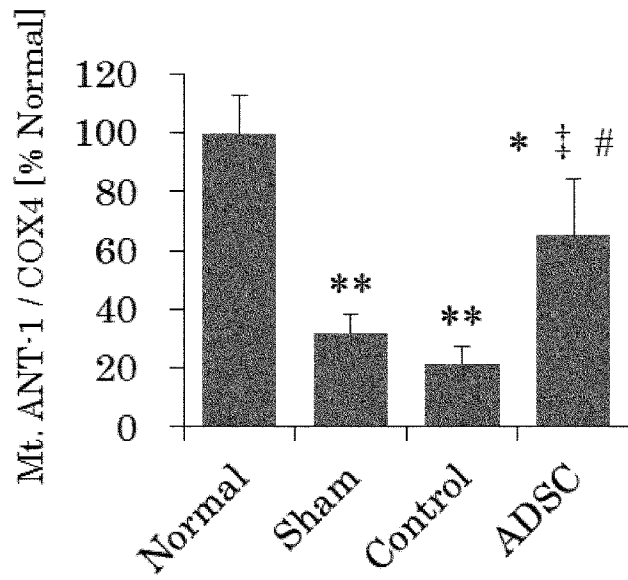
[図1]



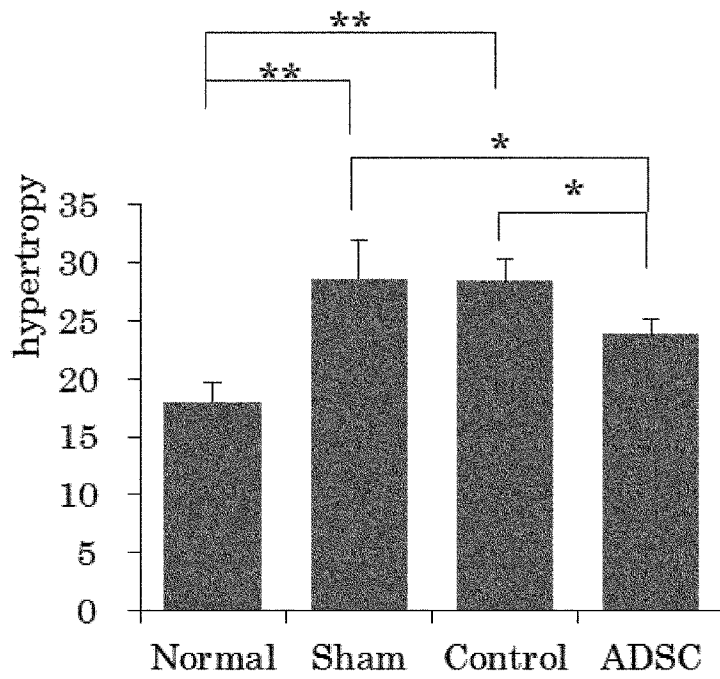
[図2]



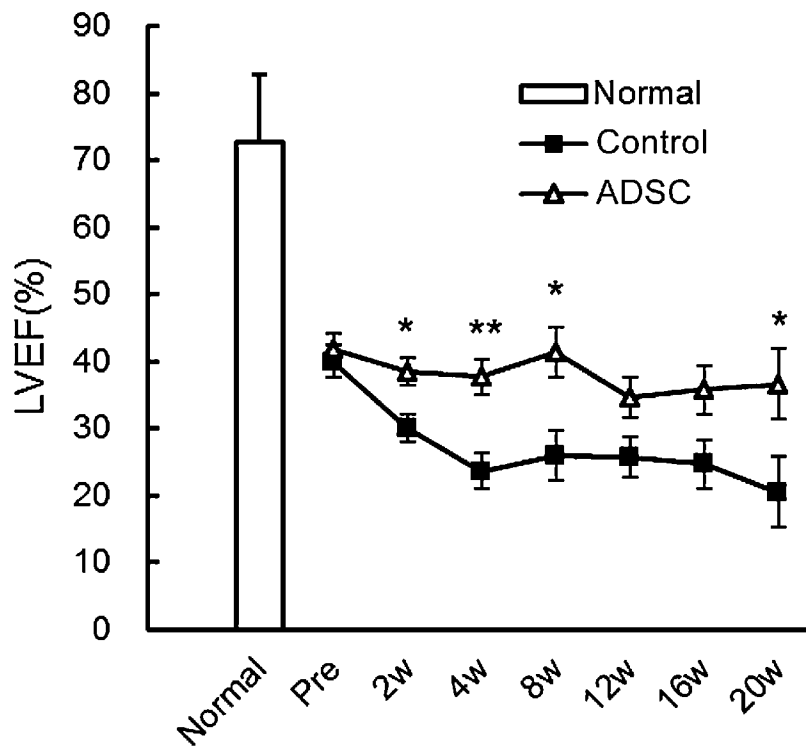
[図3]



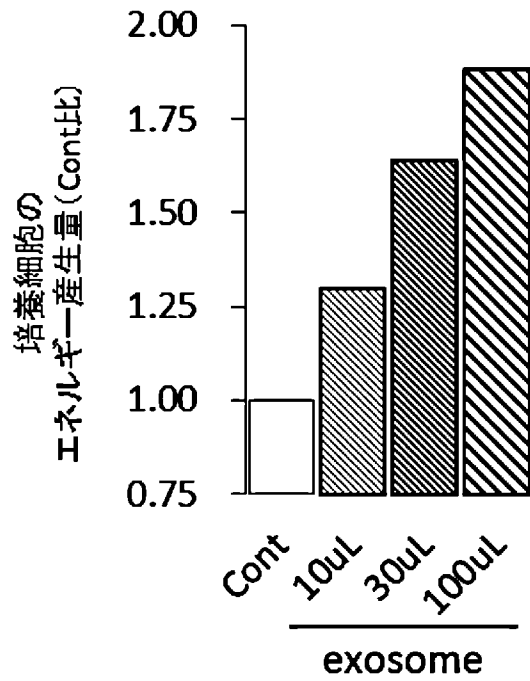
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/017807

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A61K35/28(2015.01) i, A61K35/35(2015.01) i, A61K35/51(2015.01) i,
A61K38/17(2006.01) i, A61P9/04(2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. A61K35/28, A61K35/35, A61K35/51, A61K38/17, A61P9/04

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	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2005-35945 A (CARDIO INCORPORATED) 10 February 2005 (claim 18, paragraphs [0041], [0009], [0017], [0059], example 6) (Family: none)	1, 6-12 1, 6-12
X Y	WO 2015/076717 A2 (ISLESTONE AB) 28 May 2015 (claims 1, 5, 9, 10, page 11, paragraph [0003], page 31, paragraph [0002], page 32, paragraphs [0003]-[0005]) (Family: none)	1-12 1-12

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 31 July 2018 (31.07.2018)	Date of mailing of the international search report 07 August 2018 (07.08.2018)
--	---

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/JP2018/017807

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2016/094932 A1 (CELL IDEAS PTY LTD.) 23 June 2016 (claims 10, 33, paragraph [0069], example 10) & JP 2018-501241 A & EP 3233097 A1 & AU 2015/367275 A	1, 6-12 1-12
Y	SAHOO, S. et al., "Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction", Circ Res., 2014, vol. 114, pp. 315-324 ISSN; 0009-7330 (entire description)	1-12
Y	ZHANG, H. et al., "Inhibition of myocardial ischemia/reperfusion injury by exosomes secreted from mesenchymal stem cells", Stem Cell Int., 2016, vol. 2016, article ID4328362, pp. 1-8 ISSN; 1687-966X (entire description)	1-12
Y	LAI, RC. et al., "Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury", Stem Cell Res., 2010, vol. 4, pp. 214-222 ISSN; 1873-5061 (entire description)	1-12
A	CHANG, YL. et al., "Therapeutic potential of stem cells strategy for cardiovascular diseases", Stem Cell Int., 2016, vol. 2016, article ID 4285938, pp. 1-10 ISSN; 1687-966X (entire description)	1-12
A	LIANG, H. et al., "Increased expression of pigment epithelium-derived factor in aged mesenchymal stem cells impairs their therapeutic efficacy for attenuating myocardial infarction injury", Eur Heart J., 2013, vol. 34, pp. 1681-1690 ISSN; 0195-668X (entire description)	1-12

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K35/28(2015.01)i, A61K35/35(2015.01)i, A61K35/51(2015.01)i, A61K38/17(2006.01)i, A61P9/04(2006.01)i</p>			
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K35/28, A61K35/35, A61K35/51, A61K38/17, A61P9/04</p>			
<p>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</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018年</p>			
<p>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)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)、Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			
<p>C. 関連すると認められる文献</p>			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X A	JP 2005-35945 A (株式会社カルディオ) 2005.2.10 (請求項18[0041][0009][0017][0059]実施例6) (ファミリーなし)	1,6-12 1,6-12	
X Y	WO 2015/076717 A2 (ISLESTONE AB) 2015.5.28 (請求項1, 5, 9, 10, p.11 第3段落、p.31 第2段落、p.32 第3-5段落) (ファミリーなし)	1-12 1-12	
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>			
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献</p>			
国際調査を完了した日	31.07.2018	国際調査報告の発送日	07.08.2018
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 横田 倫子	4 C	3764
	電話番号 03-3581-1101 内線		3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	WO 2016/094932 A1 (CELL IDEAS PTY LTD) 2016.6.23 (請求項 1 0, 3 3, [0 0 6 9]、実施例 1 0) & JP 2018-501241 A & EP 3233097 A1 & AU 2015/367275 A	1,6-12 1-12
Y	SAHOO S. et al., Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction. Circ Res., 2014, Vol.114, p.315-324 ISSN:0009-7330 (全体)	1-12
Y	ZHANG H. et al., Inhibition of myocardial ischemia/reperfusion injury by exosomes secreted from mesenchymal stem cells. Stem Cell Int., 2016, Vol.2016, Article ID4328362, p.1-8 ISSN:1687-966X (全体)	1-12
Y	LAI RC. et al., Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. Stem Cell Res., 2010, Vol.4, p.214-222 ISSN:1873-5061 (全体)	1-12
A	CHANG YL. et al., Therapeutic potential of stem cells strategy for cardiovascular diseases. Stem Cell Int., 2016, Vol.2016, Article ID 4285938, p.1-10 ISSN:1687-966X (全体)	1-12
A	LIANG H. et al., Increased expression of pigment epithelium-derived factor in aged mesenchymal stem cells impairs their therapeutic efficacy for attenuating myocardial infarction injury. Eur Heart J., 2013, Vol.34, p.1681-1690 ISSN:0195-668X (全体)	1-12