

明 細 書

発明の名称：

関節疾患の治療及び／又は予防のための剤及び医薬組成物

技術分野

[0001] [関連出願の相互参照]

本出願は、2022年2月7日に出願された、日本国特許出願第2022-017120号明細書（その開示全体が参照により本明細書中に援用される）に基づく優先権を主張する。本発明は、関節疾患の治療及び／又は予防のための剤及び医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] エクソソームは、細胞のエンドサイトーシス経路を介して形成され放出される直径30nm～100nmの膜小胞体であり、元の細胞に由来する核酸（例えば、マイクロRNA及びメッセンジャーRNA）とタンパク質などを内包している。

[0003] エクソソームは、細胞間の情報伝達を担うことが知られている。具体的には、細胞から放出されたエクソソームは、他の細胞に受け取られ、受け手側の細胞表面に存在する受容体に作用してシグナル伝達を引き起こしうる。さらに、エクソソームの内包物は、受け手側の細胞内に取り込まれ、遺伝子の転写調節などを行いうる。例えば、エクソソームに内包されるマイクロRNA（miRNA）は、受け手側の細胞内で、標的となるメッセンジャーRNA（mRNA）に結合して、標的遺伝子の発現を抑制しうる。

[0004] 下記非特許文献1及び2において、軟骨細胞シート由来のエクソソームmiRNA（Exosomal miRNA）について報告されている。非特許文献1には、エクソソームmiRNAがパラクライン効果に関与する可能性があることが開示されている。非特許文献2には、細胞シートが分泌するエクソソームはレシピエント側細胞にmiRNAを伝達することにより、遺伝子発現／翻訳の制御を行う可能性があることが開示されている。

[0005] また、近年、エクソソームを介した情報伝達機構が医学分野で注目されており、エクソソームの生理的機能を解明するための研究とともに、当該生理的機能を疾病の治療に応用するための技術開発も行われている。例えば、下記特許文献1には、特定のマイクロRNAが高発現した間葉系幹細胞由来のエクソソーム、及び当該間葉系幹細胞由来のエクソソームを含有する疾患治療剤が開示されている。下記非特許文献3には、軟骨形成誘導下のhBMSC (human bone mesenchymal stem cells) 由来エクソソームにおいていくつかのアップレギュレートされたmiRNAを同定したこと、及び、これらのmiRNAが軟骨再生及び最終的には関節炎の治療においてMSC (mesenchymal stem cells) 由来エクソソームで重要な役割を果たす可能性があることが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2019-156739号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：豊田ら、第32回日本整形外科学会基礎学術集会 抄録 「軟骨細胞シート分泌エクソソーム含有miRNAの解析」 (2017年)

非特許文献2：豊田ら、第32回日本整形外科学会基礎学術集会 ポスター 「軟骨細胞シート分泌エクソソーム含有miRNAの解析」 (2017年)

非特許文献3：Sun et al., Journal of Cellular Biochemistry, 2019; 120: 171-181

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、関節疾患の新規な治療剤及び／又は予防剤を提供することを主目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、関節組織由来の細胞から得られたエクソソームの内包物に

、関節疾患の治療剤及び／又は予防剤に適したmiRNAが存在することを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0010] すなわち、本発明は、miRNAを有効成分として含有する、関節疾患の治療剤及び／又は予防のための剤を提供する。

一実施形態においては、前記miRNAは、hsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、hsa-miR-1290、hsa-miR-141-5p及びhsa-miR-4700-5pからなる群より選択される少なくとも1つであってもよい。

また、別の一実施形態においては、前記miRNAは、以下の要件(i)及び(ii)の一方又は両方を満たすものであってもよい：

(i) ヒト滑膜肉腫細胞株に対しトランスフェクションした場合に、標的遺伝子を有さないNegative control miRNA mimicをトランスフェクションしたヒト滑膜肉腫細胞株と比較して、MMP-3、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MMP-13、ADAMTS5及びVEGFAからなる群より選択される少なくとも1つの因子の発現量を抑制するようなmiRNA、

(ii) ヒト軟骨肉腫細胞株に対しトランスフェクションした場合に、標的遺伝子を有さないNegative control miRNA mimicをトランスフェクションしたヒト軟骨肉腫細胞株と比較して、MMP-3及びRUNX2からなる群より選択される少なくとも1つの因子の発現量を抑制するようなmiRNA。

また、前記miRNAが、エクソソームに内包されていてよい。

前記エクソソームが、関節組織由来の細胞から得られたものであってよい。

前記関節組織由来の細胞が、関節組織由来の細胞培養物から得られたものであってよい。

前記関節疾患の治療剤及び／又は予防が、関節における炎症の治療剤及び／又は予防であってよい。

前記関節疾患の治療剤及び／又は予防が、関節における炎症の治療剤及び／又は予防であり、前記有効成分が、前記hsa-miR-1199-5p、前記hsa-miR-1246及び前記hsa-miR-4700-5pからな

る群より選択される少なくとも1つあってよい。

前記関節疾患の治療及び／又は予防が、関節における軟骨変性の治療及び／又は予防であってよい。

前記関節疾患の治療及び／又は予防が、関節における軟骨変性の治療及び／又は予防であり、前記有効成分が、hsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、hsa-miR-1290及びhsa-miR-4700-5pからなる群より選択される少なくとも1つであってよい。

前記関節における軟骨変性の治療及び／又は予防が、関節における軟骨損傷の治療及び／又は予防であってよい。

前記剤の形態が、注射剤であってよい。

本発明は、前記剤が注射筒内に充填されている、注射器も提供する。

本発明は、前記剤を含有する、関節疾患の治療及び／又は予防のための医薬組成物も提供する。

本発明は、hsa-miR-1199-5pの前駆体、hsa-miR-1246の前駆体、hsa-miR-1290の前駆体、hsa-miR-141-5pの前駆体及びhsa-miR-4700-5pの前駆体からなる群より選択される少なくとも1つの前駆体を含有する、関節疾患の治療及び／又は予防のための医薬組成物も提供する。

本発明は、hsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、hsa-miR-1290、hsa-miR-141-5p及びhsa-miR-4700-5pからなる群より選択される1つ以上のmiRNAを発現するベクターを含有する、関節疾患の治療及び／又は予防のための医薬組成物も提供する。

前記医薬組成物の形態が、注射剤であってよい。

本発明は、医薬組成物が注射筒内に充填されている、注射器も提供する。

発明の効果

[0011] 本発明により、関節疾患の新規な治療剤及び／又は予防剤が提供される。

なお、本発明の効果は、ここに記載された効果に限定されず、本明細書内に

記載されたいずれかの効果であってもよい。

図面の簡単な説明

- [0012] [図1]マイクロアレイによるmiRNA解析の手順を示す図である。
- [図2]マイクロアレイによるmiRNA解析の結果を示す図である。
- [図3]qPCRによるmiRNA発現確認試験の結果を示す図である。
- [図4]ヒト軟骨肉腫細胞株SW1353におけるMMP-3遺伝子の発現量を表すグラフである。
- [図5]ヒト滑膜肉腫細胞株SW982におけるMMP-3遺伝子の発現量を表すグラフである。
- [図6]Small RNA-sequence解析結果を示す。
- [図7]ヒト軟骨肉腫細胞株SW1353における各種遺伝子の発現量を表すグラフである。
- [図8]ヒト滑膜肉腫細胞株SW982における各種遺伝子の発現量を表すグラフである。

発明を実施するための形態

- [0013] 以下、本発明を実施するための好適な形態について説明する。以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態を示したものであり、本発明の範囲がこれらの実施形態のみに限定されることはない。
- [0014] 1. 関節疾患の治療及び／又は予防のための剤
- [0015] 本発明の一実施形態は、miRNAを有効成分として含有する、関節疾患の治療及び／又は予防のための剤である。関節疾患の治療及び／又は予防のための剤の有効成分として用い得るmiRNAとしては、例えば、ヒト滑膜肉腫細胞株に対しトランスフェクションした場合に、標的遺伝子を有さないNegative control miRNA mimicをトランスフェクションしたヒト滑膜肉腫細胞株と比較して、MMP-3の発現量を抑制するようなmiRNA等が挙げられる。また一実施形態において、関節疾患の治療及び／又は予防のための剤の有効成分として用い得るmiRNAとしては、hsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、hsa-miR-1290、hsa-

miR-141-5p及びhsa-miR-4700-5pからなる群より選択される1つ以上のmiRNA等が挙げられる。本明細書において、本実施形態に係る関節疾患の治療及び／又は予防のための剤に有効成分として含有されるmiRNAを、単に「有効成分のmiRNA」ともいう。以下、本実施形態の詳細について説明する。

[0016] 1-1. 成分

[0017] miRBase (<http://www.mirbase.org/>) は、miRNAの塩基配列及びアノテーションが保管されているオンラインデータベースである。miRBaseに登録されているhsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、hsa-miR-1290、hsa-miR-141-5p及びhsa-miR-4700-5pの塩基配列及びアクセッション番号、並びに配列番号を下記表1に示す。なお、本明細書内に記載の塩基配列は、他に言及されない限り、左端が5'端であり、右端が3'端である。

[0018] [表1]

miRNA	塩基配列	アクセッション番号	配列番号
hsa-miR-1199-5p	CCUGAGCCCGGGCCGCGCAG	MIMAT0031119	1
hsa-miR-1246、	AAUGGAUUUUUGGAGCAGG	MIMAT0005898	2
hsa-miR-1290	UGGAUUUUUGGAUCAGGGA	MIMAT0005880	3
hsa-miR-141-5p	CAUCUCCAGUACAGUGUUGGA	MIMAT0004598	4
hsa-miR-4700-5p	UCUGGGGAUGAGGACAGUGUGU	MIMAT0019796	5

[0019] 本明細書において「hsa-miR-1199-5p」は、配列番号1の塩基配列からなるmiRNA及び／又はそのホモログである。「hsa-miR-1246」は、配列番号2の塩基配列からなるmiRNA及び／又はそのホモログである。「hsa-miR-1290」は、配列番号3の塩基配列からなるmiRNA及び／又はそのホモログである。「hsa-miR-141-5p」は、配列番号4の塩基配列からなるmiRNA及び／又はそのホモログである。「hsa-miR-4700-5p」は、配列番号5の塩基配列からなるmiRNA及び／又はそのホモログである。

[0020] 本実施形態に係る関節疾患の治療及び／又は予防のための剤に含有されるmiRNAは、成熟miRNA (Mature miRNA) である。成熟miRNAの典型的な生成プロセスは次のとおりである。RNAポリメラーゼ

11によって、miRNA遺伝子から、ヘアピン構造を1又は複数有する1本鎖の一次転写産物（Primary miRNA：pri-miRNA）が生成される。pri-miRNAは、リボヌクレアーゼ111系酵素であるDroshaによって切断されて、ヘアピン形態をとる中間前駆体である前駆体miRNA（Precursor miRNA：pre-miRNA）が生成される。pre-miRNAは、細胞質においてリボヌクレアーゼ111系酵素であるDicerによって切断されて、成熟miRNAとそのアンチセンス側のmiRNA*からなる2本鎖miRNAが生成される。2本鎖miRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体（RISC）に取り込まれる。RISCに取り込まれた2本鎖miRNAはRISC中で解かれ、2つの1本鎖miRNAとなる。そのうち、一方の不安定な1本鎖は分解され、他方の安定な1本鎖が成熟miRNAとして機能する。

[0021] 本発明の一実施形態における上記関節疾患の治療及び／又は予防のための剤において、有効成分のmiRNAとしては、以下の要件（i）及び（ii）の一方又は両方を満たすものが挙げられる：

（i）ヒト滑膜肉腫細胞株に対しトランスフェクションした場合に、標的遺伝子を有さないNegative control miRNA mimicをトランスフェクションしたヒト滑膜肉腫細胞株と比較して、MMP-3、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MMP-13、ADAMTS5及びVEGFAからなる群より選択される少なくとも一種の因子の発現量を抑制するようなmiRNAである

（ii）ヒト軟骨肉腫細胞株に対しトランスフェクションした場合に、標的遺伝子を有さないNegative control miRNA mimicをトランスフェクションしたヒト軟骨肉腫細胞株と比較して、MMP-3及びRUNX2からなる群より選択される少なくとも一種の因子の発現量を抑制するようなmiRNAである。

典型的には、上記因子の発現量の測定方法は、本願実施例に記載の方法によって実施することができる。従って、かかる実施形態において、上記因子の発現量の測定においてはヒト滑膜肉腫細胞株としてはSW982株を用いる

ことができる。また、上記因子の発現量の測定においてはヒト軟骨肉腫細胞株としてはSW1353株を用いることができる。また、上記因子の発現量の測定においては、実施例と同様にIL-1 β 刺激によって炎症や軟骨変性に関わる遺伝子が発現しやすい状態で行うことが好ましい。

本発明の好ましい一実施形態における上記関節疾患の治療及び／又は予防のための剤において、有効成分のmiRNAは、上記で述べたとおり、hsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、hsa-miR-1290、hsa-miR-141-5p及びhsa-miR-4700-5pからなる群より選択される1つ以上のmiRNAである。有効成分のmiRNAは、好ましくは、hsa-miR-1246及び／若しくはhsa-miR-1290、hsa-miR-4700-5p又は、hsa-miR-1199-5pとhsa-miR-1246とhsa-miR-1290との組み合わせである。すなわち、有効成分のmiRNAは、好ましくは、hsa-miR-1246単独、hsa-miR-1290単独、hsa-miR-4700-5p単独、hsa-miR-1246及びhsa-miR-1290の組み合わせ、又は、hsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、及びhsa-miR-1290の組み合わせである。これにより、より効果的な関節疾患の治療及び／又は予防が望める。

[0022] 上記有効成分のmiRNAは、例えば、生物体内で生成されたもの、生物から採取された細胞若しくは細胞株において生成されたもの、人工的に合成されたもの、又は商業的に入手されたものなどであってよい。

[0023] 上記有効成分のmiRNAは、好ましくは、エクソソームmiRNA (Exosomal miRNA) である。本明細書において「エクソソームmiRNA」は、エクソソームから抽出されたmiRNA及びエクソソームに内包されているmiRNAの両方を包含する。

[0024] 上記有効成分のmiRNAは、薬学的に許容される担体とともに（例えば、担体に内包された状態で、又は担体との複合体の状態）、本実施形態の剤に含有されてよい。当該有効成分のmiRNAは、例えば担体に内包され

ていてよく、好ましくはエクソソームに内包されている。

[0025] 上記有効成分のm i R N Aがエクソソームから抽出されたm i R N A又はエクソソームに内包されているm i R N Aである場合（すなわちエクソソームm i R N Aである場合）、当該エクソソームは、細胞内において形成され当該細胞から放出されたもの（すなわち細胞から得られたもの）であってもよく、又は人工的に作製されたものであってもよい。当該エクソソームは、好ましくは細胞から得られたものであり、より好ましくは関節組織由来の細胞から得られたものであり、さらにより好ましくは軟骨細胞から得られたものである。これらの細胞が、上記有効成分のm i R N Aを得るために適している。上記関節組織由来の細胞は、好ましくは関節組織由来の細胞培養物から得られたものである。上記軟骨細胞は、好ましくは軟骨組織由来の細胞培養物から得られたものである。これらの細胞培養物が、上記有効成分のm i R N Aを効率的に又は多量に得るために適している。当該細胞培養物は、例えば、二次元培養（平面培養）又は三次元培養によって得られてよい。当該細胞培養物の形状は、細胞の種類及び培養条件などに応じて適宜選択されてよく、例えばシート状、粒状、繊維状（糸状）、又は網状（メッシュ状）であってよい。

[0026] 上記関節組織由来の細胞又は上記軟骨組織由来の細胞は、例えば、多指症の動物の関節組織若しくは軟骨組織に由来するもの、多趾症の動物の関節組織若しくは軟骨組織に由来するもの、又は動物の軟骨組織（例えば、膝軟骨組織）に由来するものであってもよい。当該動物は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは霊長類の動物であり、さらにより好ましくはヒトである。上記関節組織又は軟骨組織は、例えば、ヒトの余剰指若しくは余剰趾の切除術時に得られる組織から採取されてよい。上記軟骨組織は、ヒト（成人）の人工関節置換術時に得られる廃棄組織から採取されてよい。

[0027] 細胞からエクソソームを得る処理は、当業者に既知の方法によって行われてよい。例えば、細胞を液体培地にて培養して当該液体培地中にエクソソームを放出させ、その後培地上清からエクソソームを回収すればよい。また、

細胞から得られたエクソソームが上記有効成分のm i R N Aを内包することは、当業者に既知の手法によって確認されてよい。

[0028] 本実施形態の剤は、上記で説明した有効成分のm i R N A、及び必要に応じて上記担体（例えばエクソソーム）を、当技術分野において既知の手法により製剤化することにより得られうる。製剤化のため、本実施形態の剤は、上記有効成分のm i R N A及び上記担体以外に、本発明の効果を損なわない範囲において薬学的に許容される成分を含んでいてよい。当該薬学的に許容される成分は、例えば、当技術分野において既知の成分の中から用途及び形態に応じて当業者により適宜選択されてよい。当該薬学的に許容される成分として、例えば、賦形剤、希釈剤、懸濁剤、分散剤、保存剤、安定剤、及び緩衝剤などが挙げられる。

[0029] 1－2．形態

[0030] 本実施形態に係る剤の形態は、当技術分野において既知の形態であってよく、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、丸剤、懸濁剤、乳剤、液剤、及びシロップ剤などの経口剤、並びに、注射剤、点滴剤、及び外用剤などの非経口剤であってよい。当該剤の形態は、好ましくは、注射剤である。これにより、関節疾患の治療及び／又は予防を、低侵襲且つ効果的に行うことができる。注射剤は、例えば、溶液状、懸濁状、又は乳濁状であってよく、用時溶解して用いられる固形製剤であってもよい。

[0031] 本実施形態の剤が注射剤である場合、当該注射剤は注射器の注射筒内に充填されている状態であってよい。すなわち、本発明は、上記関節疾患の治療及び／又は予防のための剤が注射筒内に充填されている注射器も提供することができる。

[0032] また、本実施形態において、前述した関節組織由来の細胞培養物であって、有効成分のm i R N Aを含むものを関節疾患の治療及び／又は予防のための剤として用いてもよい。本発明において、細胞培養物は、細胞集合体と言い換えることもできる。本発明において、細胞培養物（細胞集合体）は、生体外で形成した細胞培養物又は生体外に摘出した細胞培養物を示す。前述し

たように、細胞培養物には、二次元培養（平面培養）又は三次元培養により得られたものが包含される。従って、細胞培養物（細胞集合体）としては、平板状（シート状）の細胞培養物（細胞集合体）、立体的な細胞塊等が挙げられる。細胞培養物（細胞集合体）の大きさは限定されないが、平板状のものの場合、平面（片面）の面積が $1 \sim 1000 \text{ cm}^2$ が好ましく、 $1 \sim 700 \text{ cm}^2$ がより好ましく、 $3 \sim 100 \text{ cm}^2$ がさらに好ましい。平板状のものの場合、厚みも限定されず、例えば、 $1 \sim 100 \mu\text{m}$ が好ましく、 $3 \sim 60 \mu\text{m}$ がより好ましい。

[0033] 1-3. 対象

[0034] 本実施形態において、関節疾患の治療及び／又は予防の対象となる動物は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは霊長類の動物であり、さらに好ましくはヒトである。

[0035] 1-4. 用途

[0036] 本実施形態の剤は、関節疾患の治療及び／又は予防のための剤である。本明細書において「関節疾患」とは、関節において、例えば変形、損傷、及び炎症などの異常が生じた疾患をいう。当該関節は、骨と骨とを接続させる可動性の結合部であり、具体的には軟骨、滑膜、半月板、及び靱帯などを含む。

[0037] 本実施形態において、上記関節疾患の治療及び／又は予防は、好ましくは、関節における炎症の治療及び／又は予防である。すなわち、本実施形態の剤は、好ましくは、関節における炎症の治療及び／又は予防のための剤である。

[0038] 上記関節における炎症の治療及び／又は予防のための剤は、好ましくは、 hsa-miR-1199-5p 、 hsa-miR-1246 及び hsa-miR-4700-5p からなる群より選択される少なくとも1つを有効成分として含有する。すなわち、当該関節における炎症の治療及び／又は予防のための剤において、有効成分は、好ましくは、 hsa-miR-1199-5p 単独、 hsa-miR-1246 単独、 hsa-miR-4700-

5 p 単独、又は h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 p 及び h s a - m i R - 1 2 4 6 の組み合わせであってよい。このような有効成分を含有する剤が、関節における炎症の治療及び／又は予防に特に適していることは、下記実施例の結果によって支持される。

[0039] また、上記関節疾患の治療及び／又は予防は、好ましくは、関節における軟骨変性の治療及び／又は予防である。すなわち、本実施形態の剤は、好ましくは、関節における軟骨変性の治療及び／又は予防のための剤である。当該関節における軟骨変性治療及び／又は予防は、例えば、関節における軟骨損傷の治療及び／又は予防である。すなわち、本実施形態の剤は、例えば、関節における軟骨損傷の治療及び／又は予防のための剤であってよい。本明細書において「軟骨損傷」は、Ousterbridge分類 (Ousterbridge classification) においてグレード1以上に分類される状態であり、上記軟骨変性の一態様である。

[0040] 上記関節における軟骨変性（例えば軟骨損傷）の治療及び／又は予防のための剤は、好ましくは、h s a - m i R - 1 2 4 6 及び／若しくは h s a - m i R - 1 2 9 0、h s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 p、又は、h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 p と h s a - m i R - 1 2 4 6 と h s a - m i R - 1 2 9 0 との組み合わせを有効成分として含有する。すなわち、当該関節における軟骨変性（例えば軟骨損傷）の治療及び／又は予防のための剤において、有効成分は、好ましくは、h s a - m i R - 1 2 4 6 単独、h s a - m i R - 1 2 9 0 単独、h s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 p 単独、h s a - m i R - 1 2 4 6 及び h s a - m i R - 1 2 9 0 の組み合わせ、又は、h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 p、h s a - m i R - 1 2 4 6、及び h s a - m i R - 1 2 9 0 の組み合わせである。このような有効成分を含有する剤が上述した用途に適していることは、下記実施例の結果によって支持される。

[0041] 2. 関節疾患の治療及び／又は予防のための剤を含有する医薬組成物（第1の医薬組成物）

[0042] 本発明は、上記で説明した関節疾患の治療及び／又は予防のための剤を含

有する、関節疾患の治療及び／又は予防のための医薬組成物（以下、「第１の医薬組成物」ともいう。）も提供する。本発明の一実施形態に係る第１の医薬組成物において、当該関節疾患及び／又は予防のための剤は、上記「１．関節疾患の治療及び／又は予防のための剤」において説明したとおりの剤であり、当該説明が本実施形態にも当てはまる。

[0043] 本実施形態に係る第１の医薬組成物は、上記関節疾患の治療及び／又は予防のための剤以外に、当技術分野において既知の他の剤のうちの１つ又は２つ以上の組み合わせを含んでいてよい。当該他の剤は、例えば、関節疾患の治療及び／又は予防に有効な他の剤であってよく、具体例として、関節疾患治療剤、関節疾患予防剤、炎症治療剤、炎症予防剤、軟骨変性治療剤、軟骨変性予防剤、軟骨損傷治療剤、及び軟骨損傷予防剤からなる群より選択される１つ又は２つ以上の組み合わせが挙げられる。また、上記他の剤は、例えば、関節疾患の治療及び／又は予防の効果を補完及び／又は補強するための剤であってもよい。

[0044] 本実施形態に係る第１の医薬組成物は、当技術分野において既知の手法により製剤化されてよい。製剤化のため、上記で説明した成分以外に、本発明の効果を損なわない範囲において薬学的に許容される成分を含んでいてよい。当該薬学的に許容される成分は、例えば、当技術分野において既知の成分の中から用途及び形態に応じて当業者により適宜選択されてよい。当該薬学的に許容される成分として、例えば、賦形剤、希釈剤、懸濁剤、分散剤、保存剤、安定剤、及び緩衝剤などが挙げられる。

[0045] 本実施形態に係る第１の医薬組成物の形態は、上記「１．関節疾患の治療及び／又は予防のための剤」の「１－２．形態」において説明した形態と同様であってよい。すなわち、当該第１の医薬組成物の形態は、好ましくは注射剤である。当該注射剤は注射器の注射筒内に充填されている状態であってよい。すなわち、本発明は、当該第１の医薬組成物が注射筒内に充填されている注射器も提供することができる。また、関節疾患の治療及び／又は予防のための剤と同様に、有効成分の *miRNA* を含む関節組織由来の細胞培養

物を医薬組成物として用いることもできる。

[0046] また、本実施形態に係る第1の医薬組成物の対象及び用途は、上記「1. 関節疾患の治療及び／又は予防のための剤」の「1-3. 対象」及び「1-4. 用途」において説明した内容と同様であってよい。

[0047] 3. miRNAの前駆体を含有する医薬組成物（第2の医薬組成物）

[0048] 本発明は、前記「有効成分のmiRNA」の前駆体を含有する、関節疾患の治療及び／又は予防のための医薬組成物（以下、「第2の医薬組成物」ともいう。）、例えば、hsa-miR-1199-5pの前駆体、hsa-miR-1246の前駆体、hsa-miR-1290の前駆体、hsa-miR-141-5pの前駆体及びhsa-miR-4700-5pの前駆体からなる群より選択される1つ以上の前駆体を含有する、関節疾患の治療及び／又は予防のための医薬組成物も提供する。

[0049] 本発明の一実施形態に係る第2の医薬組成物は、好ましくは、hsa-miR-1246の前駆体及び／若しくはhsa-miR-1290の前駆体、hsa-miR-4700-5pの前駆体、又は、hsa-miR-1199-5pの前駆体とhsa-miR-1246の前駆体とhsa-miR-1290の前駆体との組み合わせを含有する。すなわち、本実施形態に係る第2の医薬組成物は、好ましくは、hsa-miR-1246の前駆体単独、hsa-miR-1290の前駆体単独、hsa-miR-4700-5pの前駆体単独、hsa-miR-1246の前駆体及びhsa-miR-1290の前駆体の組み合わせ、又は、hsa-miR-1199-5pの前駆体、hsa-miR-1246の前駆体、及びhsa-miR-1290の前駆体の組み合わせを含有する。これにより、より効果的な関節疾患の治療及び／又は予防が望める。

[0050] 本明細書において「前駆体」は、切断又は2本鎖の開裂などによって成熟miRNAを生成しうるRNAである。上記第2の医薬組成物に含有される上記前駆体は、好ましくは、pri-miRNA、pre-miRNA、及び成熟miRNAとそのアンチセンス鎖からなる2本鎖miRNA（以下、

単に「2本鎖miRNA」ともいう。)からなる群より選択される1つ以上の前駆体である。すなわち、本実施形態に係る第2の医薬組成物は、好ましくは、hsa-miR-1199-5pのpri-miRNA、pre-miRNA、及び2本鎖miRNA、hsa-miR-1246のpri-miRNA、pre-miRNA、及び2本鎖miRNA、hsa-miR-1290のpri-miRNA、pre-miRNA、及び2本鎖miRNA、hsa-miR-141-5pのpri-miRNA、pre-miRNA、及び2本鎖miRNA、並びにhsa-miR-4700-5pのpri-miRNA、pre-miRNA、及び2本鎖miRNAからなる群より選択される1つ以上の前駆体を含有する。

[0051] 上記第2の医薬組成物は、より好ましくは、下記(A)から(F)のいずれかを含有する。

(A) hsa-miR-1246のpri-miRNA、pre-miRNA、及び2本鎖miRNAからなる群より選択される1つ以上の前駆体。

(B) hsa-miR-1290のpri-miRNA、pre-miRNA、及び2本鎖miRNAからなる群より選択される1つ以上の前駆体。

(C) (c-1) hsa-miR-1246のpri-miRNA、pre-miRNA、及び2本鎖miRNAからなる群より選択される1つ以上の前駆体と、(c-2) hsa-miR-1290のpri-miRNA、pre-miRNA、及び2本鎖miRNAからなる群より選択される1つ以上の前駆体と、の組み合わせ。

(D) (d-1) hsa-miR-1199-5pのpri-miRNA、pre-miRNA、及び2本鎖miRNAからなる群より選択される1つ以上の前駆体と、(d-2) hsa-miR-1246のpri-miRNA、pre-miRNA、及び2本鎖miRNAからなる群より選択される1つ以上の前駆体と、(d-3) hsa-miR-1290のpri-miRNA、pre-miRNA、及び2本鎖miRNAからなる群より選択される1つ以上の前駆体と、の組み合わせ。

(E) h s a - m i R - 1 4 1 - 5 p の p r i - m i R N A、p r e - m i R N A、及び2本鎖m i R N Aからなる群より選択される1つ以上の前駆体。

(F) h s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 p の p r i - m i R N A、p r e - m i R N A、及び2本鎖m i R N Aからなる群より選択される1つ以上の前駆体。

[0052] 本実施形態に係る第2の医薬組成物は、上述した1つ以上の前駆体を含有することによって、当該前駆体に対応する1つ以上のm i R N Aを生成しうる。例えば、当該第2の医薬組成物は、関節疾患の治療及び／又は予防の対象となる動物に投与されることにより、当該動物の体内においてh s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 p、h s a - m i R - 1 2 4 6、h s a - m i R - 1 2 9 0、h s a - m i R - 1 4 1 - 5 p及びh s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 pからなる群より選択される1つ以上のm i R N Aを生成しうる。生成された当該1つ以上のm i R N Aは、上記「1. 関節疾患の治療及び／又は予防のための剤」において説明したとおり、上記動物の体内において関節疾患の治療及び／又は予防のために機能しうる。

[0053] 上記h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 pの前駆体、h s a - m i R - 1 2 4 6の前駆体、h s a - m i R - 1 2 9 0の前駆体、h s a - m i R - 1 4 1 - 5 pの前駆体及びh s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 pは、例えば、生物体内で生成されたもの、生物から採取された細胞若しくは細胞株において生成されたもの、人工的に合成されたもの、又は商業的に入手されたものなどであってよい。

[0054] 上記h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 pの前駆体、h s a - m i R - 1 2 4 6の前駆体、h s a - m i R - 1 2 9 0の前駆体、h s a - m i R - 1 4 1 - 5 pの前駆体及びh s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 pは、薬学的に許容される担体とともに（例えば、担体に内包された状態で、又は担体との複合体の状態で）、本実施形態に係る第2の医薬組成物に含有されてよい。

[0055] 本実施形態に係る第2の医薬組成物は、上記1つ以上の前駆体、及び必要

に応じて上記担体以外に、当技術分野において既知の剤のうちの1つ又は2つ以上の組み合わせを含んでいてよい。当該剤は、例えば、関節疾患の治療及び／又は予防に有効な剤であってよく、具体例として、関節疾患治療剤、関節疾患予防剤、炎症治療剤、炎症予防剤、軟骨変性治療剤、軟骨変性予防剤、軟骨損傷治療剤、及び軟骨損傷予防剤からなる群より選択される1つ又は2つ以上の組み合わせが挙げられる。また、上記剤は、例えば、関節疾患の治療及び／又は予防の効果を補完及び／又は補強するための剤であってもよい。

[0056] 本実施形態に係る第2の医薬組成物は、上当技術分野において既知の手法により製剤化されてよい。製剤化のため、上記で説明した成分以外に、本発明の効果を損なわない範囲において薬学的に許容される成分を含んでいてよい。当該薬学的に許容される成分は、例えば、当技術分野において既知の成分の中から用途及び形態に応じて当業者により適宜選択されてよい。当該薬学的に許容される成分として、例えば、賦形剤、希釈剤、懸濁剤、分散剤、保存剤、安定剤、及び緩衝剤などが挙げられる。

[0057] 本実施形態に係る第2の医薬組成物の形態は、上記「1. 関節疾患の治療及び／又は予防のための剤」の「1-2. 形態」において説明した形態と同様であってよい。すなわち、第2の医薬組成物の形態は、好ましくは注射剤である。当該注射剤は注射器の注射筒内に充填されている状態であってよい。すなわち、本発明は、当該第2の医薬組成物が注射筒内に充填されている注射器も提供することができる。

[0058] また、本実施形態に係る第2の医薬組成物の対象及び用途は、上記「1. 関節疾患の治療及び／又は予防のための剤」の「1-3. 対象」及び「1-4. 用途」において説明した内容と同様であってよい。

[0059] 本実施形態の用途において、関節疾患の治療及び／又は予防が関節における炎症の治療及び／又は予防である場合、すなわち、上記第2の医薬組成物が関節における炎症の治療及び／又は予防のための医薬組成物である場合、上記第2の医薬組成物は、好ましくは、h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 p の

前駆体、*hsa-miR-1246*の前駆体及び*hsa-miR-4700-5p*の前駆体からなる群より選択される少なくとも1つを含有する。関節における炎症の治療及び／又は予防のための第2の医薬組成物に含まれる前駆体は、好ましくは、*hsa-miR-1199-5p*の前駆体単独、*hsa-miR-1246*前駆体単独、*hsa-miR-4700-5p*の前駆体単独、又は*hsa-miR-1199-5p*の前駆体及び*hsa-miR-1246*の前駆体の組み合わせである。これらの前駆体が、関節における炎症の治療及び／又は予防に特に適している。

[0060] 上記関節における炎症の治療及び／又は予防のための第2の医薬組成物は、より好ましくは、下記(A)から(D)のいずれかを含有する。

(A) *hsa-miR-1199-5p*の*pri-miRNA*、*pre-miRNA*、及び2本鎖*miRNA*からなる群より選択される1つ以上の前駆体。

(B) *hsa-miR-1246*の*pri-miRNA*、*pre-miRNA*、及び2本鎖*miRNA*からなる群より選択される1つ以上の前駆体。

(C) (c-1) *hsa-miR-1199-5p*の*pri-miRNA*、*pre-miRNA*、及び2本鎖*miRNA*からなる群より選択される1つ以上の前駆体と、(c-2) *hsa-miR-1246*の*pri-miRNA*、*pre-miRNA*、及び2本鎖*miRNA*からなる群より選択される1つ以上の前駆体と、の組み合わせ。

(D) *hsa-miR-4700-5p*の*pri-miRNA*、*pre-miRNA*、及び2本鎖*miRNA*からなる群より選択される1つ以上の前駆体。

[0061] 本実施形態の用途において、関節疾患の治療及び／又は予防が関節における軟骨変性（例えば軟骨損傷）の治療及び／又は予防である場合、すなわち、上記第2の医薬組成物が関節における軟骨変性（例えば軟骨損傷）の治療及び／又は予防のための医薬組成物である場合、上記第2の医薬組成物は、好ましくは、*hsa-miR-1246*の前駆体、*hsa-miR-129*

0の前駆体及びh s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 pの前駆体からなる群より選択される少なくとも1つ、又は、h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 pの前駆体とh s a - m i R - 1 2 4 6の前駆体とh s a - m i R - 1 2 9 0の前駆体との組み合わせを含有する。関節における軟骨変性（例えば軟骨損傷）の治療及び／又は予防のための第2の医薬組成物に含まれる前駆体は、好ましくは、h s a - m i R - 1 2 4 6の前駆体単独、h s a - m i R - 1 2 9 0の前駆体単独、h s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 pの前駆体単独、h s a - m i R - 1 2 4 6の前駆体及びh s a - m i R - 1 2 9 0の前駆体の組み合わせ、又は、h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 pの前駆体、h s a - m i R - 1 2 4 6の前駆体、及びh s a - m i R - 1 2 9 0の前駆体の組み合わせである。これらの前駆体が、関節における軟骨変性（例えば軟骨損傷）の治療及び／又は予防に特に適している。

[0062] 上記関節における軟骨変性（例えば軟骨損傷）の治療及び／又は予防のための第2の医薬組成物は、より好ましくは、下記（A）から（E）のいずれかを含有する。

（A）h s a - m i R - 1 2 4 6のp r i - m i R N A、p r e - m i R N A、及び2本鎖m i R N Aからなる群より選択される1つ以上の前駆体。

（B）h s a - m i R - 1 2 9 0のp r i - m i R N A、p r e - m i R N A、及び2本鎖m i R N Aからなる群より選択される1つ以上の前駆体。

（C）（c-1）h s a - m i R - 1 2 4 6のp r i - m i R N A、p r e - m i R N A、及び2本鎖m i R N Aからなる群より選択される1つ以上の前駆体と、（c-2）h s a - m i R - 1 2 9 0のp r i - m i R N A、p r e - m i R N A、及び2本鎖m i R N Aからなる群より選択される1つ以上の前駆体と、の組み合わせ。

（D）（d-1）h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 pのp r i - m i R N A、p r e - m i R N A、及び2本鎖m i R N Aからなる群より選択される1つ以上の前駆体と、（d-2）h s a - m i R - 1 2 4 6のp r i - m i R N A、p r e - m i R N A、及び2本鎖m i R N Aからなる群より選択される

1つ以上の前駆体と、(d-3) hsa-miR-1290のpri-miRNA、pre-miRNA、及び2本鎖miRNAからなる群より選択される1つ以上の前駆体と、の組み合わせ。

(E) hsa-miR-4700-5pのpri-miRNA、pre-miRNA、及び2本鎖miRNAからなる群より選択される1つ以上の前駆体。

[0063] 4. ベクターを含有する医薬組成物(第3の医薬組成物)

[0064] 本発明は、前記「有効成分のmiRNA」を発現するベクターを含有する、関節疾患の治療及び／又は予防のための医薬組成物(以下、「第3の医薬組成物」ともいう。)、例えば、hsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、hsa-miR-1290、hsa-miR-141-5p及びhsa-miR-4700-5pからなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAを発現するベクターを含有する、関節疾患の治療及び／又は予防のための医薬組成物も提供する。

[0065] 本発明の一実施形態に係る第3の医薬組成物は、好ましくは、hsa-miR-1246、hsa-miR-1290及びhsa-miR-4700-5pからなる群より選択される少なくとも1つを発現するベクター、又は、hsa-miR-1199-5pとhsa-miR-1246とhsa-miR-1290とを発現するベクターを含有する。本実施形態に係る第3の医薬組成物は、好ましくは、hsa-miR-1246を発現するベクター、hsa-miR-1290を発現するベクター、hsa-miR-1246及びhsa-miR-1290を発現するベクター、hsa-miR-4700-5pを発現するベクター又は、hsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、及びhsa-miR-1290を発現するベクターを含有する。これにより、より効果的な関節疾患の治療及び／又は予防が望める。

[0066] 本実施形態に係る第3の医薬組成物に含有される上記ベクターは、当業者により適宜選択された適切なベクターに、hsa-miR-1199-5p

、h s a - m i R - 1 2 4 6、h s a - m i R - 1 2 9 0、h s a - m i R - 1 4 1 - 5 p 及び h s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 p からなる群より選択される1つ以上のm i R N A をコードするポリヌクレオチドを挿入することにより得られうる。h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 p をコードするポリヌクレオチド、h s a - m i R - 1 2 4 6 をコードするポリヌクレオチド、h s a - m i R - 1 2 9 0 をコードするポリヌクレオチド、h s a - m i R - 1 4 1 - 5 p をコードするポリヌクレオチド及びh s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 p をコードするポリヌクレオチドは、同一のベクターに挿入されてよく、異なるベクターに挿入されてもよい。当該第3の医薬組成物に含有されるベクターは、非ウイルスベクターであってよく、ウイルスベクターであってもよい。

[0067] 本実施形態に係る第3の医薬組成物は、上述したベクターを含有することによって、当該ベクターに対応する1つ以上のm i R N A を発現しうる。例えば、当該第3の医薬組成物は、関節疾患の治療及び／又は予防の対象となる動物に投与されることにより、当該動物の体内においてh s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 p、h s a - m i R - 1 2 4 6、h s a - m i R - 1 2 9 0、h s a - m i R - 1 4 1 - 5 p 及びh s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 p からなる群より選択される1つ以上のm i R N A を発現しうる。発現された当該1つ以上のm i R N A は、上記「1. 関節疾患の治療及び／又は予防のための剤」において説明したとおり、上記動物の体内において関節疾患の治療及び／又は予防のために機能しうる。

[0068] 本実施形態に係る第3の医薬組成物は、上記ベクター以外に、当技術分野において既知の剤のうちの1つ又は2つ以上の組み合わせを含んでいてよい。当該剤は、例えば、関節疾患の治療及び／又は予防に有効な剤であってよく、具体例として、関節疾患治療剤、関節疾患予防剤、炎症治療剤、炎症予防剤、軟骨変性治療剤、軟骨変性予防剤、軟骨損傷治療剤、及び軟骨損傷予防剤からなる群より選択される1つ又は2つ以上の組み合わせが挙げられる。また、上記剤は、例えば、関節疾患の治療及び／又は予防の効果を補完及

び／又は補強するための剤であってもよい。

[0069] 本実施形態に係る第3の医薬組成物は、当技術分野において既知の手法により製剤化されてよい。製剤化のため、上記で説明した成分以外に、本発明の効果を損なわない範囲において薬学的に許容される成分を含んでいてよい。当該薬学的に許容される成分は、例えば、当技術分野において既知の成分の中から用途及び形態に応じて当業者により適宜選択されてよい。当該薬学的に許容される成分として、例えば、賦形剤、希釈剤、懸濁剤、分散剤、保存剤、安定剤、及び緩衝剤などが挙げられる。

[0070] 本実施形態に係る第3の医薬組成物の形態は、上記「1. 関節疾患の治療及び／又は予防のための剤」の「1-2. 形態」において説明した形態と同様であってよい。すなわち、第3の医薬組成物の形態は、好ましくは注射剤である。当該注射剤は注射器の注射筒内に充填されている状態であってよい。すなわち、本発明は、当該第3の医薬組成物が注射筒内に充填されている注射器も提供することができる。

[0071] また、本実施形態に係る第3の医薬組成物の対象及び用途は、上記「1. 関節疾患の治療及び／又は予防のための剤」の「1-3. 対象」及び「1-4. 用途」において説明した内容と同様であってよい。

[0072] 本実施形態の用途において、関節疾患の治療及び／又は予防が関節における炎症の治療及び／又は予防である場合、すなわち、上記第3の医薬組成物が関節における炎症の治療及び／又は予防のための医薬組成物である場合、上記第3の医薬組成物は、好ましくは、*h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 p*、*h s a - m i R - 1 2 4 6*及び*h s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 p*からなる群より選択される少なくとも1つを発現するベクターを含有する。関節における炎症の治療及び／又は予防のための第3の医薬組成物は、好ましくは、*h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 p*を発現するベクター、*h s a - m i R - 1 2 4 6*を発現するベクター、*h s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 p*を発現するベクター又は*h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 p*及び*h s a - m i R - 1 2 4 6*を発現するベクターを含有する。これらのベクターが、関節における炎症の治

療及び／又は予防に特に適している。

- [0073] 本実施形態の用途において、関節疾患の治療及び／又は予防が関節における軟骨変性（例えば軟骨損傷）の治療及び／又は予防である場合、すなわち、上記第3の医薬組成物が関節における軟骨変性（例えば軟骨損傷）の治療及び／又は予防のための医薬組成物である場合、上記第3の医薬組成物は、好ましくは、*hsa-miR-1246*、*hsa-miR-1290*及び*hsa-miR-4700-5p*からなる群より選択される少なくとも1つを発現するベクター、又は、*hsa-miR-1199-5p*と*hsa-miR-1246*と*hsa-miR-1290*とを発現するベクターを含有する。すなわち、関節における軟骨変性（例えば軟骨損傷）の治療及び／又は予防のための第3の医薬組成物は、好ましくは、*hsa-miR-1246*を発現するベクター、*hsa-miR-1290*を発現するベクター、*hsa-miR-1246*及び*hsa-miR-1290*を発現するベクター、*hsa-miR-4700-5p*を発現するベクター又は、*hsa-miR-1199-5p*、*hsa-miR-1246*、及び*hsa-miR-1290*を発現するベクターを含有する。これらのベクターが、関節における軟骨変性（例えば軟骨損傷）の治療及び／又は予防に特に適している。

- [0074] 5. 判定方法及びマーカー

前述のように、「有効成分の*miRNA*」は、関節疾患の治療及び／又は予防に有効である。従って、あるドナーから採取した細胞（当該細胞から構築した細胞集合体も包含する）が関節疾患の治療及び／又は予防に有効か否かを判定するのに、当該「有効成分の*miRNA*」を指標とすることができ。従って、好ましい実施形態において、本発明は、対象となる関節組織由来の細胞から放出されるエクソソームにおける*miRNA*を指標として関節疾患の治療及び／又は予防に有効か否かを判定する方法であって、該*miRNA*が*hsa-miR-1199-5p*、*hsa-miR-1246*、*hsa-miR-1290*、*hsa-miR-141-5p*及び*hsa-miR-4700-5p*からなる群より選択される少なくとも1つである

、方法を提供する。また、本発明は、対象となる関節組織由来の細胞から放出されるエクソソームにおけるmiRNAを指標として関節疾患の治療及び／又は予防に有効か否かを判定する方法であって、
該miRNAが、以下の要件（i）及び（ii）の一方又は両方を満たす、方法もを提供する：

（i）ヒト滑膜肉腫細胞株に対しトランスフェクションした場合に、標的遺伝子を有さないNegative control miRNA mimicをトランスフェクションしたヒト滑膜肉腫細胞株と比較して、MMP-3、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MMP-13、ADAMTS5及びVEGFAからなる群より選択される少なくとも1つの因子の発現量を抑制するようなmiRNAである。

（ii）ヒト軟骨肉腫細胞株に対しトランスフェクションした場合に、標的遺伝子を有さないNegative control miRNA mimicをトランスフェクションしたヒト軟骨肉腫細胞株と比較して、MMP-3及びRUNX2からなる群より選択される少なくとも1つの因子の発現量を抑制するようなmiRNAである。

当該実施形態において、典型的には、対象となる関節組織由来の細胞から放出されるエクソソームにおける「有効成分のmiRNA」の量があらかじめ設定した基準値以上の場合に、対象となる関節組織由来の細胞が関節疾患の治療及び／又は予防に有効か否かを判定することができる。「有効成分のmiRNA」の量の測定方法は限定されず、qPCR、ELISA法、miRNAマイクロアレイ、RNA sequence等が挙げられる。基準値としては、例えば、関節疾患の治療及び／又は予防に有効であることがすでに分かっている関節組織由来の細胞を用いて、当該細胞から放出されるエクソソームにおける「有効成分のmiRNA」の量を測定し、基準値とすることができる。また、有効性が明らかな細胞のエクソソームのシグナルと比較して何倍以上（例えば、1倍以上、2倍以上、3倍以上等）などの基準をあらかじめ決めることもできる。本実施形態において、用語「関節組織由来の細胞」には、関節組織由来の細胞から生体外又は生体内で構築された細胞集合体も包含される。

上記のように、「有効成分のmiRNA」は、あるドナーから採取した細胞が関節疾患の治療及び／又は予防に有効か否かを判定するためのマーカーとして使用することができる。従って、本発明は、前記「有効成分のmiRNA」からなる、細胞集合体が関節疾患の治療及び／又は予防に有効か否かを判定するためのマーカーを提供する。具体的には、本発明は、hsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、hsa-miR-1290、hsa-miR-141-5p及びhsa-miR-4700-5pからなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAからなる、細胞集合体が関節疾患の治療及び／又は予防に有効か否かを判定するためのマーカーを提供する。また、別の実施形態において、本発明は、miRNAからなる、細胞集合体が関節疾患の治療及び／又は予防に有効か否かを判定するためのマーカーであって、該miRNAが、以下の要件(i)及び(ii)の一方又は両方を満たす、マーカーを提供する：

(i) ヒト滑膜肉腫細胞株に対しトランスフェクションした場合に、標的遺伝子を有さないNegative control miRNA mimicをトランスフェクションしたヒト滑膜肉腫細胞株と比較して、MMP-3、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MMP-13、ADAMTS5及びVEGFAからなる群より選択される少なくとも1つの因子の発現量を抑制するようなmiRNAである

(ii) ヒト軟骨肉腫細胞株に対しトランスフェクションした場合に、標的遺伝子を有さないNegative control miRNA mimicをトランスフェクションしたヒト軟骨肉腫細胞株と比較して、MMP-3及びRUNX2からなる群より選択される少なくとも1つの因子の発現量を抑制するようなmiRNAである。本発明のマーカーは、上記判定方法に使用することができる。

[0075] 6. エクソソームの製造方法

別の実施形態において、本発明は、「有効成分のmiRNA」を含む細胞を培養する工程を含む、「有効成分のmiRNA」を含むエクソソームの製造方法を提供する。好ましくは、本発明は、hsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、hsa-miR-1290、hsa-mi

R-141-5p及びhsa-miR-4700-5pからなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAを含む細胞を培養する工程を含む、hsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、hsa-miR-1290、hsa-miR-141-5p及びhsa-miR-4700-5pからなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAを含むエクソソームの製造方法を提供する。細胞としては、例えば、関節組織由来の細胞（より好ましくは軟骨細胞）が挙げられる。ヒト細胞が好ましい。培養方法、「有効成分のmiRNA」の詳細等については前述したもの（例えば、「1. 関節疾患の治療及び／又は予防のための剤」「1-1. 成分」等に記載されたもの）と同様である。当該実施形態において、本発明のエクソソームの製造方法は、上記培養工程で得られたエクソソームを回収する工程をさらに含んでもよい。エクソソームを回収する方法は公知の方法を適宜採用できる。

実施例

[0076] 以下で実施例を参照して本発明をより詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0077] 実施例 1

(1-1) 細胞シートの培養

[0078] 多指症手術時廃棄組織より軟骨細胞を単離し、第1継代細胞ストックを作製した。細胞ストックを解凍し、第2継代細胞を温度応答性培養インサート（UpCell（登録商標）インサート、セルシード社製）に $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ の密度で播種した。3～4日おきに培地交換を行い、2週間培養し完成した細胞シート（PDシート）を実験に用いた。初代培養細胞の播種時には20%FBSと1%Anti-Biotics含DMEM-F12培地を用い、その後の培養には20%FBSと1%Anti-Bioticsと100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ascorbic Acid含DMEM-F12培地を用いた。

[0079] (1-2) 細胞シート培養上清の回収

[0080] 細胞シートから放出されるエクソソームを回収するため、培養開始11日

目から72時間経過したタイミングで培養上清を回収した。2000g、10分、4℃の条件で遠心処理し、0.22μmフィルターを通し細胞デブリ等を取り除いた。サンプルは-80℃にて保存した。

[0081] 細胞シート培養上清中に放出されるエクソソームのプロパティ確認実験（金コロイド免疫電顕によるエクソソームマーカの確認、ナノ粒子解析システムによるパーティクルカウント、及びエクソソームの細胞内トラッキング確認）に使用するサンプルに関しては、シート完成後72時間、無血清培地にて培養した。

[0082] (1-3) 金コロイド免疫電顕によるエクソソームマーカの確認

[0083] 次に示す手順により、エクソソームの表面マーカの発現確認を行った。

a. ExoQuick-TCを使用し、プロトコルに従ってエクソソームを抽出した。

b. 1次抗体としてExosome specific primary antibody (CD63, CD81)を使用し、2次抗体としてAnti-Rabbit IgG (whole molecule)-Goldを使用した。

c. 4% paraformaldehydeでエクソソームを固定し、carbon-Formvar coated 200 mesh nickel gridに、固定したエクソソーム溶液を載せた。

d. Blocking Buffer (0.4% BSA in PBS)にmeshを浸漬した。

e. 1st Antibody in Blocking Buffer及び2nd Antibody in 2nd Ab Dilutionにmeshを順次浸漬した。

f. Uranylacetateでnegative stainを行った。

g. meshを乾燥させ、電子顕微鏡で観察した。

[0084] 以上の結果、エクソソームマーカであるCD63及びCD81の発現が確認された。すなわち、細胞シートは培養液中にエクソソームを放出していたことが確認された。

[0085] (1-4) ナノ粒子トラッキング解析システムによるパーティクルカウント

[0086] a. ExoQuick-TCを使用し、プロトコルに従ってエクソソームを抽出した。

b. 溶液内をブラウン運動により動くエクソソーム粒子を、レーザー光散乱法で撮影した。撮影にはLM10 NanoSight instrumentを用いた。

c. 粒子の測定は3回行い、エクソソーム粒子の平均粒径、モード径、及び濃度を算出した。

[0087] 以上の結果、細胞シートが培養液に放出する膜小胞体(エクソソーム)は、一般的に知られる100nmの径の小胞体であることが確認された。

[0088] (1-5) エクソソームの細胞内トラッキング確認

[0089] a. ExoQuick-TCを使用し、プロトコルに従ってエクソソームを抽出した。

b. 抽出したエクソソームをPKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kitで染色したのち、Exosome Spin Columnsを用いて未反応色素の除去を行った。

c. 実験前日に8wellチャンバースライドに、 1×10^4 cells/wellで軟骨細胞又はhuman bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBM-MSC) を播種し、標識エクソソームを細胞に添加した。

d. 37℃遮光下で3時間インキュベートしたのち、培地を除き、4% PFAを添加して細胞を固定した。

e. Alexa Fluor 594 Falloidin Conjugateで細胞骨格を染色し、DAPI含封入剤でサンプルを封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

[0090] 以上の結果、細胞シートが放出したエクソソームは、軟骨細胞及びhBM-MSCに取り込まれることが確認された。エクソソームは関節内に投与された場合、これらの細胞に取り込まれ、作用すると考えられる。

[0091] (1-6) 多指症軟骨細胞シート中のmiRNA、及び培養上清中のエクソソームmiRNAのマイクロアレイ解析

[0092] 図1及び下記に示される手順にしたがって、多指症軟骨細胞シート中のmiRNA、及び培養上清中のエクソソームmiRNA(エクソソームに内包されているmiRNA)のマイクロアレイ解析を行った。

[0093] a. 3ドナー(n=4)の多指症患者由来軟骨細胞から、異なる培養条件(培養条件A及びB)下にて2種類の細胞シート(PD-A Exo群及びPD-B Exo群)を作製した。この2種類の培養条件で作成された細胞シートは、異種同所性モデル動物を用いたin vivo実験にて軟骨組織修復能が大きく異なることは事前に確認済みであった。これらの細胞シート培養上清中

エクソソームに内包されているmiRNAをexoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kitを用いて抽出し、軟骨修復能の優れた培養条件Aにて有意に変動するmiRNAをマイクロアレイ解析により絞り込んだ($p < 0.05$ 、Fold Change > 2)。これを「実験1」とした。

b. 3ドナー ($n = 7$) の多指症患者由来軟骨細胞から作製した細胞シートに含まれるmiRNA (Sheet群)、及びその培養上清中エクソソームに内包されているmiRNA (Exosome群) を、RNeasy Mini KitもしくはexoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kitを用いてそれぞれ抽出し、培養上清中エクソソームで有意に変動するmiRNAをマイクロアレイ解析により絞り込んだ($p < 0.05$ 、Fold Change > 2)。これを「実験2」とした。

c. 実験1及び2のマイクロアレイ解析には、Agilent Human miRNA microarray (2549probe)を使用した。マイクロアレイ解析後、実験1及び2のそれぞれで絞り込んだmiRNAの中で共通の変動miRNAを抽出した。

d. 血清由来のエクソソームによる影響を減算するために、コントロールサンプルとして、20%FBSと1%Antibiotics含DMEM-F12培地を用いた。

[0094] 以上の結果、152miRNAが細胞シート分泌エクソソーム内に有意にパッケージングされ、200miRNAが軟骨修復能の優れた培養条件A (PD-AExo群) で有意に発現した(図2)。両者に共通の発現変動miRNAは16個抽出された(図2)。

[0095] (1-7) qPCRによるmiRNA発現の確認

[0096] 上記(1-6)の実験で絞り込まれたmiRNAについて、qPCRによるバリデーション試験を実施した。プローブごとにマイクロアレイの結果との相関を確認し、上記実験1及び2の両方の実験において相関が認められたmiRNAを特定した(相関係数 $R > 0.5$)。なお、インターナルコントロールとして、マイクロアレイデータにおいてサンプル内での変動が最も少なかったhsa-miR-6734-5pを使用した。

[0097] 以上の結果、16 miRNAのうち、実験1及び2の少なくとも一方において、PCRで2倍以上の変動が確認できたmiRNAは7個であった。実験1及び2の両方において、アレイのシグナル値とPCRの $-\Delta CT$ 値との間に相関係数0.5以上の正相関が認められたmiRNAは3個であった（表2及び図3）。当該3個のmiRNAは、具体的には、hsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、及びhsa-miR-1290であった。なお、図3において、グラフの縦軸はマイクロアレイのシグナル値、横軸はPCRの $-\Delta CT$ 値を示す。

[0098] [表2]

	PD vs Exo (n=7)				PD-B Exo vs PD-A Exo (n=4)			
	PD $-\Delta CT$ average *1	Exo $-\Delta CT$ average *2	Log FC *3	Corr. *4	PD-A Exo $-\Delta CT$ average *5	PD-B Exo $-\Delta CT$ average *6	Log FC *7	Corr. *4
hsa-miR-1199-5p	-11.4	-1.9	9.4	0.52	0.0	-15.9	15.9	0.80
hsa-miR-1246	-6.1	1.1	7.2	0.93	0.7	-3.0	3.7	0.97
hsa-miR-1290	-6.6	0.3	6.9	0.93	0.0	-4.2	4.2	0.98

[0099] 上記表2中の*1～*7は以下を意味する。 *1：PD群のPCRデータ（平均の $-\Delta CT$ 値）

*2：Exo群のPCRデータ（平均の $-\Delta CT$ 値）

*3：PD群とExo群の間に何倍の発現の差があるか（底を2とする対数）

*4：マイクロアレイの結果との相関（Rは相関係数）

*5：PD-A Exo群のPCRデータ（平均の $-\Delta CT$ 値）

*6：PD-B Exo群のPCRデータ（平均の $-\Delta CT$ 値）

*7：PD-A Exo群とPD-B Exo群の間に何倍の発現の差があるか（底を2とする対数）

[0100] (1-8) miRNAの軟骨異化遺伝子及び炎症関連遺伝子に対するサイレンシングの検証

[0101] 上記(1-7)で同定した3個のmiRNAについて、標的細胞内での軟骨異化遺伝子及び炎症関連遺伝子に対する機能を調査した。なお、本明細書

において「軟骨異化遺伝子」とは、軟骨変性の誘導に関与する遺伝子を意味する。

[0102] a. ヒト軟骨肉腫細胞株 (Human Bone chondrosarcoma cell line) SW1353 ($n=4$) 又はヒト滑膜肉腫細胞株 (Human Synovial sarcoma cell line) SW982 ($n=4$) に対し、各 miRNA を単独で又は3種類混合してトランスフェクションした。

b. 細胞播種24時間後に、hsa-miR-1199-5p、1246、1290 mimic (mirVana miRNA Mimics) を、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagentを用いてトランスフェクションした。

c. その24時間後、炎症、血管新生、及び軟骨破壊などを促進する既知の遺伝子の発現を惹起することを目的とし、IL-1 β を添加した。

d. さらに24時間後に、軟骨異化遺伝子 (MMP-3 及び RUNX2) 並びに炎症関連遺伝子 (IL-1 β 、IL-6、及び TNF- α) の発現抑制効果を qPCR により確認し、標的遺伝子を持たない Negative control miRNA mimic をトランスフェクションした群と比較した。

[0103] Negative control miRNA mimic と比較して発現が有意に抑制された遺伝子と、その有意確率 (p 値) を下記表3に示す。また、SW1353におけるMMP-3の発現量を表すグラフを図4に示し、SW982におけるMMP-3の発現量を表すグラフを図5に示す。

[0104] [表3]

標的細胞種	遺伝子名	hsa-miR-1199-5p	hsa-miR-1246	hsa-miR-1290	miRNA Mix
SW1353	MMP-3			0.048	0.008
	RUNX2		0.001	0.009	0.009
SW982	MMP-3			0.003	0.049
	IL-1 β	0.009	0.002		
	IL-6	0.023			
	TNF- α	0.036			

[0105] 上記表3に示されるとおり、hsa-miR-1199-5pは、滑膜細胞におけるIL-1 β 、IL-6、及びTNF- α の発現を有意に抑制した。hsa-miR-1246は、滑膜細胞におけるIL-1 β の発現を有意に抑制した。hsa-miR-1290は、軟骨細胞及び滑膜細胞における

MMP-3の発現を有意に抑制した。hsa-miR-1246及び1290は、軟骨細胞におけるRUNX2の発現を有意に抑制した。hsa-miR-1199-5p、1246、及び1290の3種のmiRNAを混合したmiRNAMixは、軟骨細胞及び滑膜細胞におけるMMP-3の発現、並びに、軟骨細胞におけるRUNX2の発現を有意に抑制した。

[0106] また、図4及び5に示される結果から、hsa-miR-1199-5p、1246、及び1290の3種のmiRNAを組み合わせることにより、軟骨細胞におけるMMP-3に対する遺伝子のサイレンシングは、miRNA単独と比べて、増強される可能性が示された。

[0107] 上記で説明した一連の実験の結果は以下のことを支持している。

[0108] hsa-miR-1199-5p及び1246は、炎症の誘導に関与する遺伝子及び軟骨変性の誘導に関与する遺伝子の発現を抑制可能であるため、関節における炎症の誘導の抑制及び軟骨変性の誘導の抑制に寄与しうる。したがって、hsa-miR-1199-5p及び1246は、関節における炎症の治療及び／又は予防、並びに関節における軟骨変性の治療及び／又は予防に有効であり、ひいては関節疾患の治療及び／又は予防に有効である。

[0109] hsa-miR-1290は、軟骨変性の誘導に関与する遺伝子の発現を抑制可能であるため、関節における軟骨変性の誘導の抑制に寄与しうる。したがって、hsa-miR-1290は、関節における軟骨変性の治療及び／又は予防に有効であり、ひいては関節疾患の治療及び／又は予防に有効である。

[0110] hsa-miR-1199-5p、1246、及び1290のmiRNAの組み合わせは、関節における軟骨変性の治療及び／又は予防に有効であると考えられ、ひいては関節疾患の治療及び／又は予防に有効であると考えられる。

[0111] また、上記(1-7)の試験結果(表2及び図3)において、相関係数は、hsa-miR-1199-5pよりも、hsa-miR-1246及びhsa-miR-1290の方が高かった。この結果から、hsa-miR

－ 1 2 4 6 及び／又は h s a - m i R - 1 2 9 0 は、関節疾患（特には、関節における軟骨変性）の治療及び／又は予防においてより高い効果を示すと考えらえる。

[0112] 実施例 2

(2-1) 実験手順

(2-1-1) 細胞シートの培養

- － 8ドナー(donor 1~8) から採取した多指症手術時廃棄組織（男4人、女4人、8-17ヵ月齢、平均12.6ヵ月齢）より軟骨細胞を単離し、第1継代細胞ストックを作製した。
- － 細胞シート（PDシート）作製時には、細胞ストックを解凍し、第3継代細胞を温度応答性UpCellインサート（CellSeed）に $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ の密度で播種した。細胞シートの培養は、PD-A Exoの条件で行った。具体的には、培地として20%FBSと1%Anti-Bioticsと $100 \mu\text{g/mL}$ Ascorbic Acid含DMEM-F12培地を用い、培養容器として温度応答性培養インサート（UpCell（登録商標）インサート、セルシード社製）を用い、培養温度で、静置培養を行った。
- － 3-4日おきに培地交換を行った。

[0113] (2-1-2) 培養上清および細胞シートサンプルの回収

- －細胞シートサンプルは、培養開始から2週間後にサンプリングし、実験に用いた。
- －培養上清サンプルは、培養開始11日目から72時間経過時に回収した。
- －2000 g、10分、4℃の条件で遠心処理し、 $0.22 \mu\text{m}$ フィルターを通しエクソソーム分画から外れる細胞小胞および細胞デブリを取り除いた。サンプルは-80℃にて保存した。－培養液中に存在するFBS由来のExosomal miRNAの影響を排除することを目的とし、20%FBS含培地をnegative controlとして使用した。

[0114] (2-1-3) in vitro評価系(PDシート由来ペレット)を用いたPDシートの有効性確認試験

-完成したPDシートをUpCellインサートより回収し、低接着性の6 wellプレートにて浮遊培養し、a. 遺伝子発現解析、b. 組織学的評価 の2項目にて評価した。

a. 遺伝子発現解析：

-浮遊培養7日目のPDシート由来ペレットを、1mlのTRIzol reagent (Qiagen) 中に回収し、ステンレスビーズとSHAKE Master Neo (BMS) を用いて破碎し、実験に使用するまで-80 °Cにて保存した。

-解凍したサンプルを用い、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用してtotal RNAを抽出し、QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いてcDNAを合成した。

- Power SYBR GreenMaster Mix (Thermo Fisher Scientific) を使用して、q-PCR法によりCollagen Type 1 (COL1A1) およびType2 (COL2A1) の遺伝子発現を確認した。

- 各ドナーの硝子軟骨形成能をCOL2A1 およびCOL1A1の遺伝子発現比(COL2A1/COL1A1値)を用いて評価した。

b. 組織学的評価：

-浮遊培養28日目のPDシート由来ペレットをホルマリン固定後パラフィン包埋し、ブロックを作製した。

- ミクロトームで厚み3 μ mの薄切切片を作製し、定法に従いSafranin O (Safranin O/Fast Green/Hematoxylin) およびToluidine Blue染色を実施し、PDシート自身が軟骨への分化能を有するかを評価した。

[0115] (2-1-4) Small RNA-sequenceと、q-PCRによるバリデーション試験
上記(2-1-3)で有効性を評価したPDシートに関し、以下の試験を行った。

-培養上清サンプルについて、exoRNeasy Serum/Plasma Midi Kit(QIAGEN)を使用してエクソソームよりRNAを抽出した。

- 細胞シートサンプルについて、TRIzol reagent(Thermo Scientific)を使用し、メーカーのプロトコルに従ってRNAを抽出した。

- Small RNA-sequenceにより、GroupAおよびGroupBの2つの比較実験を実施し、抽出されたmiRNAのうち、両Groupに共通して高発現するmiRNAを抽出した；

GroupA：

有効性が低いPDシートと比較し、有効性が高いPDシートにおいて有意にup-regulateされたExosomal miRNAの抽出 ($p < 0.05$, $\text{LogFC} > 1$)

GroupB：

有効性の高い細胞シートがシートを構成する細胞内において発現しているmiRNAと比較して、細胞シートが放出するエクソソーム内にExosomal miRNAとして有意に濃縮されているmiRNAの抽出 ($p < 0.05$, $\text{LogFC} > 1$)

-シーケンスライブラリは、QIAseq miRNA Library Kit (QIAGEN)およびQIAseq miRNA NGS 96 Index IL(QIAGEN)を用いて調整した。シーケンス解析はNextSeq500 (ILLUMINA)システムを使用し、シングルエンド法(75bp)により実施した。

- GroupAおよびBに共通して有意に発現が上方制御される109個のmiRNAを抽出し、このうちLog2FCの値が上位となる15個のmiRNAについて、q-PCRによるバリデーション試験を実施した。

-RNAサンプルから合成したcDNAを用い、miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN)およびmiRCURYプローブPCRKit (QIAGEN)を使用して、q-PCR反応を行った。

[0116] (2-1-5) RNA-seqデータ解析

- small RNA-seqのシーケンスリードを用い、GeneGlobe: Data Analysis CenterにてmiRBase 21vによるアライメントを実施した。TMM法による正規化後、miRNA発現に対する全サンプルの階層的クラスタリング解析、主成分分析、変動遺伝子解析 ($p < 0.05$, $\text{Log2FC} > 1$) を行った。この時、Negative controlにおけるリードカウント(Normalized)が3.0<となるmiRNAはその後の解析対象外とした。

[0117] (2-1-6) miRNAの軟骨異化および炎症関連遺伝子に対するサイレンシングの検証

hsa-miR-141-5p, 4700-5pの標的細胞内での軟骨異化および炎症関連遺伝子

に対する機能を調査した。

- Human Bone chondrosarcoma cell line SW1353 (n=3)もしくはHuman Synovial sarcoma cell line SW982 (n=3)に対し、各miRNAをTransfectionした。

-細胞播種24時間後に、hsa-miR-141-5p, 4700-5p mimic (mirVana (登録商標) miRNA Mimics)を、Lipofectamine (登録商標) RNAiMAX Transfection Reagentを用いてTransfectionした。

-その24時間後、Inflammation, Angiogenesis, Cartilage degradationなどを促進する既知の遺伝子の発現を惹起することを目的とし、IL-1bを添加した。

-さらに24時間後に、軟骨異化および炎症関連遺伝子の発現抑制効果をqPCRにより確認し、標的遺伝子を持たないNegative control miRNA mimicをTransfectionした群と比較した。

ここまでの実験結果から、特定した2種類のmiRNAのうち、4700-5pの方がより関節疾患に対する治療効果が高いことが予想された(実験結果(2-2-4), (2-2-5)参照)。そのため、以下の実験は4700-5pに関してのみ実施した。

[0118] (2-1-7) RIP-Assay

- Human Bone chondrosarcoma cell line SW1353 (n=3)もしくはHuman Synovial sarcoma cell line SW982 (n=3)に対し、hsa-miR-4700-5pもしくは標的遺伝子を持たないNegative control miRNA mimicをTransfectionした。24時間後、細胞を回収し、RIP-Assay Kit for microRNA (MBL) およびAnti-EIF2C2(AG02)(Human) mAb(MBL)を用いてRNA binding protein Assayを実施し、RNA結合タンパクであるAG02を介してmiRNAとペアリングしたmRNAを選択的に回収し、Total RNAを抽出した。

- Low Input Quick Amp Labeling KitおよびSurePrint G3 Human GE Microarray 8 x 60K Ver3.0 (Design ID: 072363)を用いてマイクロアレイ解析を実施した。

- Negative controlをトランスフェクションした細胞と比較し、miRNA-4700-5pをトランスフェクションした細胞にて有意にUp regulateされた遺伝子を絞りこんだ。
- RIP-Assayにて、miRNA-4700-5pをトランスフェクションした細胞で2倍以上上方制御された遺伝子群に対し、Panther Classification System v.16.0を使用してエンリッチメント解析を実施し、遺伝子候補群が有意にエンリッチするPathwayを調べた。これらのPathwayに割り付けられた遺伝子のうち、RIP-Assayにて、miRNA-4700-5pをトランスフェクションした細胞で5倍以上上方制御された遺伝子をピックアップし、関節疾患に関与する遺伝子の機能を調査した。

[0119] (2-2) 実験結果

(2-2-1.) PDシートの有効性確認試験結果

a. 遺伝子発現解析結果

COL2A1は関節軟骨を構成する硝子軟骨、COL1A1は硝子軟骨と比較し質の劣る線維軟骨のマーカー遺伝子として知られている。8ドナーのうち、COL2A1の発現量が最も低かったdonor-1のCOL2A1/COL1A1値を基準とし、相対的に遺伝子発現量を比較した結果、8ドナーのうち、donor-2, 3, 4は1と比較しCOL2A1/COL1A1値が7~11倍であったのに対し、donor-5, 6, 7, 8は86~4091倍と高値であった。すなわち、donor-5~7がdonor-1~4と比較し、より高い硝子軟骨形成能を有することが示唆された。

このうち、これまでに我々が蓄積したin vivo 評価系の実験で得られた組織学的評価のスコア (International Cartilage Repair Society score; ICRS score) のデータが存在するドナー1, 2, 3, 5, 6, 7の6ドナー (Toyoda et al., 2019) について、ICRS score値とCOL2A1/COL1A1値の相関を確認した結果、決定係数 (R^2) は0.794であり、高い相関が認められた。

b. 組織学的評価結果

遺伝子発現解析の結果からCOL2A1/COL1A1値が高値である、すなわち硝子軟骨形成能が高いことが予想されたdonor-1~4由来ペレットは、Safranin Oの

強い染色性およびToluidine Blueの異染色性が認められ、高い硝子軟骨分化能を有することが示された。一方、硝子軟骨形成能が低いと予想されたドナーdonor-5～7由来ペレットは、Safranin Oの弱い染色性およびToluidine Blueの弱い異染色性が確認され、硝子軟骨方向への分化が起こりにくいことが示唆された。

以上a. およびb. の結果から、有効性の高いPDシートとしてdonor-1～4、有効性の低いPDシートとしてdonor-5～8の各4ドナーを選出した。

[0120] (2-2-2) Small RNA-sequence解析結果

変動遺伝子解析の結果、GroupAの比較では、上方制御された595個のmiRNAのうち有意に発現が変動したmiRNAは218個であった。Negative controlの影響を排除し、真に発現が変動したと考えられるmiRNAは128個であった（図6）。

GroupBの比較では、上方制御された838個のmiRNAのうち有意に発現が変動したmiRNAは681個であった。Negative controlの影響を排除し、真に発現が変動したと考えられるmiRNAは300個であった（図6）。

[0121] (2-2-3) q-PCRによるバリデーション試験結果

GroupAおよびBに共通して有意に発現が上方制御される109個のmiRNAのうちLog2FCの値が上位となる15個のmiRNAについて、q-PCRによるバリデーション試験を実施した。GroupAおよびBの両比較において、 $p < 0.05$, $\text{Log2FC} > 1$ の有意な発現変動が認められたmiRNAはhsa-miR-141-5pおよびhsa-miR-4700-5pの2つであった（表4）。Small RNA-seqのデータとの傾向を比較するために、リードカウントデータとq-PCRの $-\Delta\text{CT}$ 値の間の相関を確認したところ、いずれのmiRNAにおいてもGroupA, Bの両比較において、相関係数（R）=0.6～0.74の高い相関を認めた（表4）。

[0122]

[表4]

表. RNA-seqデータおよびq-PCRバリデーション試験の相関確認

比較グループ	Name	miRNA-seqデータ		q-PCRデータ		相関係数 (R)
		p-value (Corr)	Log FC	p-value	Log FC	
Group A	hsa-miR-141-5p	0.0085	3.7	0.0265	2.7	0.60
Group B		0.0015	3.7	0.0023	5.4	0.60
Group A	hsa-miR-4700-5p	0.0001	3.3	0.0459	5.0	0.74
Group B		0.0000	3.3	0.0068	10.3	0.74

[0123] 有効性の高いPDシートExosome内で特徴的に高発現する2つのmiRNA hsa-miR-141-5pおよびhsa-miR-4700-5pを同定した。

[0124] (2-2-4) miRNAの軟骨異化および炎症関連遺伝子に対するサイレンシングの検証結果 (図7及び8)

軟骨細胞内の遺伝子発現に対し、miR-141-5pおよび4700-5pはCOL1の発現を抑制し、miR-141-5pにおいてはSox9の遺伝子発現を亢進した。

滑膜細胞内の遺伝子発現に対しては、miR-141-5pおよび4700-5pでADAMTS5およびVEGFAの遺伝子発現を抑制し、さらにmiR-4700-5pはMMP3, MMP13といったマトリックスメタプロテアーゼ、炎症系マーカー遺伝子であるIL6の発現も抑制した。

これらの結果から、miRNA-141-5pの標的遺伝子は、OA病態や軟骨変性の誘導や促進、血管新生を制御するような上流遺伝子抑制である可能性が高く、この結果、COL1、ADAMTS5、VEGFAの遺伝子発現の抑制と、SOX9の遺伝子発現亢進をもたらし、軟骨変性の誘導の抑制に寄与しうることが分かる。

また、miRNA-4700-5pの標的遺伝子は、炎症反応の誘導、OA病態や軟骨変性の誘導や促進、血管新生を制御するような上流遺伝子抑制である可能性が高く、この結果、COL1、MMP3、MMP13、ADAMTS5、VEGFA、IL-6の遺伝子発現の抑制をもたらし、関節内環境の改善(炎症の抑制、血管新生の抑制など)や軟骨修復に寄与する可能性がある。

[0125] (2-2-5) RIP-AssayによるTarget geneの探索

RIP-Assayにて、Negative controlをトランスフェクションした細胞と比較

し、miRNA-4700-5pをトランスフェクションした細胞にて有意にUp regulateされた遺伝子を抽出した結果、Human Bone chondrosarcoma cell line SW1353ではFC>2で246個、FC>5で21個、FC>10で1個、Human Synovial sarcoma cell line SW982 (n=3)ではFC>2で598個、FC>5で68個、FC>10で11個が抽出された。

miRNA-4700-5pをトランスフェクションした細胞で2倍以上上方制御された遺伝子群 (Human Bone chondrosarcoma cell line SW1353で246個、Human Synovial sarcoma cell line SW982 (n=3)で598個) に対し、Panther Classification System v.16.0を使用してエンリッチメント解析を実施した結果、Human Bone chondrosarcoma cell line SW1353では遺伝子候補群が有意にエンリッチするPathwayは検出されなかったが、Human Synovial sarcoma cell line SW982においては13種のPathwayが検出され、Angiogenesis (P00005)、Interleukin signaling pathway (P00036)、VEGF signaling pathway (P00056)、Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)などが含まれていた。

[0126] [表5]

表 5 腫瘍細胞内で発現する遺伝子のうち、hsa-miR-4700-5pとペアリングしたmiRNAがエンリッチしたPathway

PANTHER Pathways	Path Enrichment	P-value
Angiogenesis (P00005)	2.94	0.001
Ras Pathway (P04393)	4.31	0.001
CCAR signaling map (P06959)	3.6	0.005
Interleukin signaling pathway (P00036)	3.22	0.006
VEGF signaling pathway (P00056)	3.61	0.006
Plasminogen activating cascade (P00050)	7.23	0.011
Cell cycle (P00013)	5.34	0.023
Axon guidance mediated by Slit/Robo (P00038)	4.91	0.026
Notch signaling pathway (P00045)	3.64	0.029
PDGF signaling pathway (P00047)	2.26	0.031
TCA cycle (P00051)	7.44	0.037
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)	3.86	0.042
FGF signaling pathway (P00021)	2.26	0.042

[0127] Human Synovial sarcoma cell line SW982にて有意に検出された13種のPathwayに割り付けられた遺伝子のうち、RIP-Assayにて、miRNA-4700-5pをトランスフェクションした細胞で5倍以上上方制御された遺伝子は4つであった(PDHA1, RAB11B, IL6R, PRKG1)。このうち、IL-6Rは炎症、免疫反応、造血など

のプロセスにおいて重要な役割を果たし、軟骨前駆細胞の分化を直接阻害することなどが報告されているIL-6のレセプターである。IL-6産生の増加は多くの炎症性疾患の発症機序に関与することが知られている。ヒト化抗ヒトIL-6Rモノクローナル抗体『トシリズマブ』は、関節リウマチ患者における骨破壊や軟骨破壊を抑制する。また、PRKG1は骨再生に関与することが報告されており、PRKG1遺伝子のKOマウスでは骨芽細胞においてVEGFやBMP2/4の遺伝子発現が低下、骨再生が抑制されたとの報告がある。

miRNA-4700-5pとAG02タンパクを介してペアリングした遺伝子の機能は、炎症反応の誘導、OA病態や軟骨変性の誘導や促進、血管新生を制御する遺伝子群であった。

上記結果から明らかなように、miR-4700-5pは、有効性の高いPDシートが放出するExosome内に特徴的に高発現するExosomal miRNAである。滑膜細胞における血管新生、炎症、軟骨の変性に関与するPathwayに属するIL6R, PRKG1を含む遺伝子群を標的とし、OAの病態に深く関与する下流遺伝子であるMMP13, MMP3, ADAMTS5, VEGFなどの発現を抑制し、関節内環境の改善や軟骨修復に寄与する可能性がある。

請求の範囲

- [請求項1] h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 p、h s a - m i R - 1 2 4 6、h s a - m i R - 1 2 9 0、h s a - m i R - 1 4 1 - 5 p 及び h s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 p からなる群より選択される少なくとも1つの m i R N A を有効成分として含有する、関節疾患の治療及び／又は予防のための剤。
- [請求項2] m i R N A を有効成分として含有する、関節疾患の治療及び／又は予防のための剤であって、該 m i R N A が、以下の要件 (i) 及び (i i) の一方又は両方を満たす、剤：
- (i) ヒト滑膜肉腫細胞株に対しトランスフェクションした場合に、標的遺伝子を有さないNegative control miRNA mimicをトランスフェクションしたヒト滑膜肉腫細胞株と比較して、MMP - 3、I L - 1 β 、I L - 6、TNF - α 、MMP - 1 3、ADAMTS 5 及び V E G F A からなる群より選択される少なくとも1つの因子の発現量を抑制するような m i R N A である
- (i i) ヒト軟骨肉腫細胞株に対しトランスフェクションした場合に、標的遺伝子を有さないNegative control miRNA mimicをトランスフェクションしたヒト軟骨肉腫細胞株と比較して、MMP - 3 及び R U N X 2 からなる群より選択される少なくとも1つの因子の発現量を抑制するような m i R N A である。
- [請求項3] 前記 m i R N A が、エクソソームに内包されている、請求項 1 又は 2 に記載の剤。
- [請求項4] 前記エクソソームが、関節組織由来の細胞から得られたものである、請求項 3 に記載の剤。
- [請求項5] 前記関節組織由来の細胞が、関節組織由来の細胞培養物から得られたものである、請求項 4 に記載の剤。
- [請求項6] 前記関節疾患の治療及び／又は予防が、関節における炎症の治療及び／又は予防である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の剤。

- [請求項7] 前記関節疾患の治療及び／又は予防が、関節における炎症の治療及び／又は予防であり、
前記有効成分が、前記 h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 p、h s a - m i R - 1 2 4 6 及び h s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 p からなる群より選択される少なくとも1つである、請求項1～5のいずれか一項に記載の剤。
- [請求項8] 前記関節疾患の治療及び／又は予防が、関節における軟骨変性の治療及び／又は予防である、請求項1～5のいずれか一項に記載の剤。
- [請求項9] 前記関節疾患の治療及び／又は予防が、関節における軟骨変性の治療及び／又は予防であり、
前記有効成分が、h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 p、h s a - m i R - 1 2 4 6、h s a - m i R - 1 2 9 0、h s a - m i R - 1 4 1 - 5 p 及び h s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 p からなる群より選択される少なくとも1つである、請求項1～5のいずれか一項に記載の剤。
- [請求項10] 前記関節における軟骨変性の治療及び／又は予防が、関節における軟骨損傷の治療及び／又は予防である、請求項8又は9に記載の剤。
- [請求項11] 前記剤の形態が、注射剤である、請求項1～10のいずれか一項に記載の剤。
- [請求項12] 請求項11に記載の剤が注射筒内に充填されている、注射器。
- [請求項13] 請求項1～12のいずれか一項に記載の剤を含有する、関節疾患の治療及び／又は予防のための医薬組成物。
- [請求項14] h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 p の前駆体、h s a - m i R - 1 2 4 6 の前駆体、及び h s a - m i R - 1 2 9 0 の前駆体、h s a - m i R - 1 4 1 - 5 p の前駆体及び h s a - m i R - 4 7 0 0 - 5 p の前駆体からなる群より選択される少なくとも1つの前駆体を含有する、関節疾患の治療及び／又は予防のための医薬組成物。
- [請求項15] h s a - m i R - 1 1 9 9 - 5 p、h s a - m i R - 1 2 4 6、h s a - m i R - 1 2 9 0、h s a - m i R - 1 4 1 - 5 p 及び h s a -

miR-4700-5pからなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAを発現するベクターを含有する、関節疾患の治療及び／又は予防のための医薬組成物。

[請求項16] 前記医薬組成物の形態が、注射剤である、請求項13～15のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項17] 請求項16に記載の医薬組成物が注射筒内に充填されている、注射器。

[請求項18] hsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、hsa-miR-1290、hsa-miR-141-5p及びhsa-miR-4700-5pからなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAからなる、細胞集合体が関節疾患の治療及び／又は予防に有効か否かを判定するためのマーカー。

[請求項19] miRNAからなる、細胞集合体が関節疾患の治療及び／又は予防に有効か否かを判定するためのマーカーであって、該miRNAが、以下の要件(i)及び(ii)の一方又は両方を満たす、マーカー：

(i) ヒト滑膜肉腫細胞株に対しトランスフェクションした場合に、標的遺伝子を有さないNegative control miRNA mimicをトランスフェクションしたヒト滑膜肉腫細胞株と比較して、MMP-3、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MMP-13、ADAMTS5及びVEGFAからなる群より選択される少なくとも1つの因子の発現量を抑制するようなmiRNAである

(ii) ヒト軟骨肉腫細胞株に対しトランスフェクションした場合に、標的遺伝子を有さないNegative control miRNA mimicをトランスフェクションしたヒト軟骨肉腫細胞株と比較して、MMP-3及びRUNX2からなる群より選択される少なくとも1つの因子の発現量を抑制するようなmiRNAである。

[請求項20] 対象となる関節組織由来の細胞から放出されるエクソソームにおけるmiRNAを指標として関節疾患の治療及び／又は予防に有効か否か

を判定する方法であって、

該miRNAがhsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、hsa-miR-1290、hsa-miR-141-5p及びhsa-miR-4700-5pからなる群より選択される少なくとも1つである、方法。

[請求項21] 対象となる関節組織由来の細胞から放出されるエクソソームにおけるmiRNAを指標として関節疾患の治療及び／又は予防に有効か否かを判定する方法であって、

該miRNAが、以下の要件(i)及び(ii)の一方又は両方を満たす、方法：

(i) ヒト滑膜肉腫細胞株に対しトランスフェクションした場合に、標的遺伝子を有さないNegative control miRNA mimicをトランスフェクションしたヒト滑膜肉腫細胞株と比較して、MMP-3、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MMP-13、ADAMTS5及びVEGFAからなる群より選択される少なくとも1つの因子の発現量を抑制するようなmiRNAである

(ii) ヒト軟骨肉腫細胞株に対しトランスフェクションした場合に、標的遺伝子を有さないNegative control miRNA mimicをトランスフェクションしたヒト軟骨肉腫細胞株と比較して、MMP-3及びRUNX2からなる群より選択される少なくとも1つの因子の発現量を抑制するようなmiRNAである。

[請求項22] hsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、hsa-miR-1290、hsa-miR-141-5p及びhsa-miR-4700-5pからなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAを含む細胞を培養する工程を含む、hsa-miR-1199-5p、hsa-miR-1246、hsa-miR-1290、hsa-miR-141-5p及びhsa-miR-4700-5pからなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAを含むエク

ソソームの製造方法。