

明 細 書

発明の名称：

特定条件で刺激された細胞から得られる細胞外小胞、および当該細胞外小胞を含む医薬組成物

技術分野

[0001] 本開示は、特定条件で刺激された細胞から得られる細胞外小胞、および当該細胞外小胞を含む医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] エクソソームは、細胞から分泌される直径約50～150nmの膜に包まれた小胞である。エクソソームには、タンパク質、脂質、および核酸などの様々な生体分子が含まれ、細胞間の情報伝達、免疫応答、細胞分化などの様々な生理機能に関与しているとされる。

[0003] ヒートショックタンパク質（HSP）は、細胞がストレス（特に熱ストレス）に晒されたときに発現する。HSP70は、エクソソームの分泌量を増加させたり、エクソソームの膜を安定化させる役割を有する。また、ヒートショックは、間葉系幹細胞の抗炎症作用などの生理機能を向上させることが知られている（非特許文献1）。したがって、ヒートショックに供した細胞を含む医薬の調製が試みられている。

[0004] また、非特許文献1では、無血清、無アルブミン、無血小板ライセート、かつ無成長因子の条件下でヒートショックを与えた間葉系幹細胞を無血清、無アルブミン、無血小板ライセート、かつ無成長因子の条件下でさらに培養し、上清からエクソソームを回収したことが開示される。また、例えば、非特許文献2によれば、エクソソーム除去処理後のウシ胎児血清（FBS）を含む低グルコース培地中で細胞にヒートショックを与え、その後、37℃、5%CO₂条件下でエクソソームを得たことが開示されている。非特許文献3および4では、通常の培地条件下で培養した間葉系幹細胞を、無血清、無アルブミン、無血小板ライセート、かつ無成長因子の条件下でさらに培養し、

上清からエクソソームを回収したことが開示される。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1: M. Yuce and E. Albayrak, 2022, Journal of Cellular Biochemistry, 132(2): 1966-1979

非特許文献2: T. Yand et al., 2022, Journal of Biological Engineering, 16, Article number: 24

非特許文献3: R. Kore et al., 2021, American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 321(5): R639-R654

非特許文献4: L. Wang et al., 2022, Analytical Cellular Pathology, Article ID: 8708202

発明の概要

[0006] 本開示は、特定条件で刺激された細胞から得られる細胞外小胞、および当該細胞外小胞を含む医薬組成物を提供する。本開示はまた、当該細胞外小胞の製造方法を提供する。

[0007] 本開示によれば、以下の発明が提供され得る。

(1 A) 細胞外小胞を含む水性組成物であって、
細胞外小胞は、

(i) CD81を発現し、細胞外小胞1つあたりのCD81の発現量は第1の基準値以上であり(またはヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件(例えば、第2の培地中)で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞におけるCD81の発現量に対して第1の基準倍率以上であり、第1の基準倍率は0.6倍以上、0.7倍以上、0.8倍以上、0.9倍以上、または1倍以上(例えば、0.6倍~1.1倍、例えば、0.8倍~1.05倍、または0.9倍~1.1倍)の倍率であり)、かつ、

1gのCD63に対するCD81の相対発現量は第2の基準値以上であり、
第1の基準値は、12(ag/粒子)以上の値であり、

第2の基準値は、50 (g/g CD63) 以上の値であり、かつ、
(ii) 細胞外小胞は、以下 (ii-1) ~ (ii-2) :
(ii-1) miR-4516を発現し、その発現量は、第2の基準値以上であり、第2の基準値は500 amol/10⁹粒子以上の値 (例えば、500 amol/10⁹粒子 (好ましくは2500 amol/10⁹粒子) ~ 3900 amol/10⁹粒子 (または500 amol/10⁹粒子 ~ 45,000 amol/10⁹粒子) の範囲内の値) である、
(ii-2) ヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件 (例えば、第2の培地中) で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞におけるmiR-4516の発現量に対して第2の基準倍率以上の値であり、第2の基準倍率は、1.3倍以上の値 (例えば、1.3倍 ~ 2.2倍または約1.3倍 ~ 約2.6倍) である、
からなる群から選択される1以上を満たす {但し、第2の基準値は1800 amol/10⁹粒子以上である、第2の基準倍率は1.3倍以上である}、
水性組成物。

ここで、より好ましくは、
(1B) 細胞外小胞を含む水性組成物であって、
細胞外小胞は、
(i) CD81を発現し、細胞外小胞1つあたりのCD81の発現量は第1の基準値以上であり、第1の基準値は、80 (ag/粒子) 以上の値であるか、またはCD81の発現量がヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件 (例えば、第2の培地中) で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞におけるCD81の発現量の第1の基準倍率以上であり、第1の基準倍率は0.6倍以上、0.7倍以上、0.8倍以上、0.9倍以上、または1倍以上 (例えば、0.6倍 ~ 1.1倍、例えば、0.8倍 ~ 1.05倍、または0.9倍 ~ 1.1倍) の倍率であり、かつ、
(ii) 細胞外小胞は、以下 (ii-1) ~ (ii-2) :

(i i - 1) mi R - 4 5 1 6 を発現し、その発現量は、第 2 の基準値以上であり、第 2 の基準値は $500 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ 以上の値（例えば、 $500 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ （好ましくは $2500 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ ） $\sim 3900 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ （または $\sim 45,000 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ ）の範囲内の値）である、および

(i i - 2) ヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件（例えば、第 2 の培地中）で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞における mi R - 4 5 1 6 の発現量に対して第 2 の基準倍率以上の値であり、第 2 の基準倍率は、1.3 倍以上の値（例えば、1.3 倍 $\sim$ 2.2 倍（または約 1.3 倍 $\sim$ 約 2.6 倍））である、からなる群から選択される 1 以上を満たす、水性組成物。

以下、上記（1 A）と上記（1 B）を併せて単に「上記（1）」という。

（2）上記（1）に記載の水性組成物であって、

(i i - 1) mi R - 4 5 1 6 を発現し、その発現量は、第 2 の基準値以上であり、第 2 の基準値は $500 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ 以上の値（例えば、 $500 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ （好ましくは $2500 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ ） $\sim 3900 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ または $\sim 45,000 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ の範囲内の値）である、水性組成物。

（3）上記（1）または（2）に記載の水性組成物であって、

(i i - 2) ヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件（例えば、第 2 の培地中）で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞における mi R - 4 5 1 6 の発現量に対して第 2 の基準倍率以上の値であり、第 2 の基準倍率は、1.3 倍以上の値（例えば、1.3 倍 $\sim$ 2.2 倍（または約 1.3 倍 $\sim$ 約 2.6 倍））である、水性組成物。

（4）上記（1）に記載の水性組成物であって、

(i i - 1) および (i i - 3) を満たす、水性組成物。

（5）上記（1） $\sim$ （4）のいずれかに記載の組成物の凍結乾燥物。

(6) 上記(5)に記載の凍結乾燥物と、再構成用水とを含む、細胞外小胞製剤の用時調製キット。

(7) 細胞外小胞を含む水性組成物(例えば、上記水性組成物)の製造方法であって、

間葉系幹細胞を通常栄養条件下で培養することと、

その後、無血清、無アルブミン、無血小板ライセート、かつ無成長因子条件下で当該間葉系幹細胞にヒートショック応答を誘導することと、

さらにその後、外来エクソソームを含まず、細胞増殖に適した培地中で間葉系幹細胞を培養して、当該培地の上清中に細胞外小胞を分泌させ、細胞外小胞を含む上清を回収することと、

当該上清から細胞外小胞を分離して、細胞外小胞を含む水性組成物を得ることと、

を含む、方法。

(8) フィルター滅菌することを更に含む、上記(7)に記載の方法。

(9) 上記(7)または(8)に記載の方法により得られ得る、上記(1)～(4)のいずれかに記載の組成物、上記(5)に記載の凍結乾燥物、または上記(6)に記載のキット。

(10) 対象において炎症を処置することに用いるための医薬組成物である、上記(1)～(4)のいずれかに記載の組成物、上記(5)に記載の凍結乾燥物、または上記(6)に記載のキット。

(11) 炎症が、肺炎である、上記(9)に記載の組成物、凍結乾燥物、またはキット。

(12) 炎症が、全身性炎症である、上記(10)に記載の組成物、凍結乾燥物、またはキット。

(13) 炎症が、敗血症である、上記(10)または(12)に記載の組成物、凍結乾燥物、またはキット。

(14) 対象において血管内皮細胞の接着分子の発現を抑制することに用いるための、上記(1)～(4)のいずれかに記載の組成物、上記(5)に記

載の凍結乾燥物、または上記（６）に記載のキット。

（１５）前記接着分子が、Ｅーセレクトインである、上記（１４）に記載の組成物、凍結乾燥物、またはキット。

[0008] （２１）上記（７）に記載の方法であって、第１の培地が、無血清、無血小板ライセート、無アルブミン、かつ無成長因子である、方法。

（２２）上記（７）に記載の方法であって、第２の培地が、無血清培地であり、成長因子、インスリン、およびトランスフェリンからなる群から選択される１以上の栄養素を含む、方法。

（２３）上記（２２）に記載の方法であって、第２の培地が、外来エクソソームを含まないものである、方法。

（２４）上記（２１）に記載の方法であって、第２の培地が、無血清培地であり、成長因子、インスリン、およびトランスフェリンからなる群から選択される１以上の栄養素を含む、方法。

（２５）上記（２４）に記載の方法であって、第２の培地が、外来エクソソームを含まないものである、方法。

[0009] （３１）ヒートショック応答の誘導が、細胞を３８℃以上の温度条件下で細胞を維持することによる、上記いずれかに記載の方法。

（３２）ヒートショック応答の誘導が、細胞を３８．５℃以上の温度条件下で細胞を維持することによる、上記いずれかに記載の方法。

（３３）ヒートショック応答の誘導が、細胞を３９℃以上の温度条件下で細胞を維持することによる、上記いずれかに記載の方法。

（３４）ヒートショック応答の誘導が、ヒートショックタンパク質のいずれか１以上の亢進を含む、上記いずれかに記載の方法。

[0010] （４１）上清からの細胞外小胞の分離が、遠心分離、ろ過、および／または、サイズ除外クロマトグラフィーの工程を含む、上記いずれかに記載の方法。

（４２）上清からの細胞外小胞の分離が、遠心分離の工程を含む、上記（４１）に記載の方法。

(43) 上清からの細胞外小胞の分離が、ろ過（例えば、限外ろ過）の工程を含む、上記（41）に記載の方法。

(44) 上清からの細胞外小胞の分離が、サイズ除外クロマトグラフィーの工程を含む、上記（41）に記載の方法。

[0011] (51) 分離された細胞外小胞のCD81発現、およびmiR-4516発現からなる群から選択される1以上、またはすべての発現を確認することをさらに含む上記いずれかに記載の方法。

(52) 分離された細胞外小胞が、

(i) CD81を発現し、細胞外小胞1つあたりのCD81の発現量は第1の基準値以上であり、

第1の基準値は、80 (ag/粒子) 以上の値であるか、またはCD81の発現量がヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件（例えば、第2の培地中）で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞におけるCD81の発現量の0.6倍以上、0.7倍以上、0.8倍以上、0.9倍以上、または1倍以上（例えば、0.6倍～1.1倍、例えば、0.8倍～1.05倍、または0.9倍～1.1倍）であり、および/または、

(ii) 細胞外小胞は、以下(ii-1)～(ii-4)：

(ii-1) miR-4516を発現し、その発現量は、第2の基準値以上であり、第2の基準値は500 amol/10⁹粒子以上の値（例えば、5000 amol/10⁹粒子（好ましくは2500 amol/10⁹粒子）～39000 amol/10⁹粒子（または500 amol/10⁹粒子～45,000 amol/10⁹粒子）の範囲内の値）である、

(ii-2) ヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件（例えば、第2の培地中）で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞におけるmiR-4516の発現量に対して第2の基準倍率以上の値であり、第2の基準倍率は、1.3倍以上の値である、からなる群から選択される1以上を満たす、上記（51）に記載の方法。

(53) 分離された細胞外小胞が、

(i) CD81を発現し、細胞外小胞1つあたりのCD81の発現量は第1の基準値以上であり、

第1の基準値は、80 (ag/粒子) 以上の値であるか、またはCD81の発現量がヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件（例えば、第2の培地中）で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞におけるCD81の発現量に対して第1の基準倍率以上であり、第1の基準倍率は0.6倍以上、0.7倍以上、0.8倍以上、0.9倍以上、または1倍以上（例えば、0.6倍～1.1倍、例えば、0.8倍～1.05倍、または0.9倍～1.1倍）の倍率であり、および/または、

(ii) 細胞外小胞は、以下(ii-1)～(ii-4)：

(ii-1) miR-4516を発現し、その発現量は、第2の基準値以上であり、第2の基準値は500 amol/10⁹粒子以上の値（例えば、500 amol/10⁹粒子（好ましくは2500 amol/10⁹粒子）～3900 amol/10⁹粒子（または500 amol/10⁹粒子～45,000 amol/10⁹粒子）の範囲内の値）である、

(ii-2) ヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件（例えば、第2の培地中）で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞におけるmiR-4516の発現量に対して第2の基準倍率以上の値であり、第2の基準倍率は、1.3倍以上の値である、

からなる群から選択される1以上を満たすように実施される、上記(51)に記載の方法。

[0012] (61) 組織に炎症を発症させる可能性がある対象、組織に炎症を有する対象、および組織に線維化を有する対象を処置することに用いるための、上記いずれかに記載の組成物、凍結乾燥物、またはキット。

(62) 対象においてM2/M1マクロファージ比の増大、炎症の予防または治療、炎症組織の線維化の予防または治療、炎症組織内の血管の接着分子

発現の抑制に用いるための、上記いずれかに記載の組成物、凍結乾燥物、またはキット。

(63) 対象が、組織に炎症を発症させる可能性がある対象、組織に炎症を有する対象、および組織に線維化を有する対象である、上記(62)に記載の組成物、凍結乾燥物、またはキット。

[0013] (71) 上記いずれかに記載の用途に用いられる組成物、凍結乾燥物、またはキットの製造における、上記いずれかに記載の水性組成物の使用。

[0014] (81) 対象に細胞外小胞を投与方法であって、
上記いずれかに記載の組成物、凍結乾燥物、またはキットを当該対象に投与することを含む、方法。

(82) 対象が、組織に炎症を発症させる可能性がある対象、組織に炎症を有する対象、および組織に線維化を有する対象である、上記(81)に記載の方法。

[0015] (91) 細胞外小胞が、CD63陽性かつCD81陽性であり、かつ、 $50\mu\text{m}$ ～ $150\mu\text{m}$ の流体力学直径を有する、上記いずれかに記載の水性組成物、キット、または方法。

(92) 細胞外小胞が、CD63陽性かつCD81陽性である、上記いずれかに記載の水性組成物、キット、または方法。

(93) 細胞外小胞が、 $50\mu\text{m}$ ～ $150\mu\text{m}$ の流体力学直径を有する、上記いずれかに記載の水性組成物、キット、または方法。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]条件5により得られた上清から調製された細胞外小胞の粒度分布を示す。

[図2]肺胞上皮細胞におけるシリカ誘導細胞死に対する条件1～5のいずれかにより得られた上清からそれぞれ調製された細胞外小胞の細胞保護効果を示す。

[図3]条件1～5のいずれかにより得られた上清からそれぞれ調製された細胞外小胞のM0マクロファージのM1マクロファージへの分極(上パネル)お

よびM2マクロファージへの分極（下パネル）に対する効果を示す。

[図4A]急性呼吸逼迫症候群（ARDS）モデルにおける肺炎組織像に対する条件1または条件5により得られた上清からそれぞれ調製された細胞外小胞の効果を示す。

[図4B]急性呼吸逼迫症候群（ARDS）モデルにおける肺損傷スコアに対する条件1または条件5により得られた上清からそれぞれ調製された細胞外小胞の効果を示す。

[図5]ARDSモデルから得られた肺胞洗浄液中の白血球数に対する条件5により得られた上清から調製された細胞外小胞の効果を示す。

[図6]ARDS敗血症モデルの生存率に対する条件5により得られた上清から調製された細胞外小胞の効果を示す。

[図7]ARDSモデルの肺組織中の血管内皮細胞におけるE-セレクチン発現に対する条件5により得られた上清から調製された細胞外小胞の効果を示す。

発明を実施するための形態

[0017] <定義>

本明細書では、「対象」とは、哺乳動物、マウスおよびラットなどの齧歯類、ブタおよびウシなどの家畜動物、イヌおよびネコなどの愛玩動物、並びにヒトおよびサルなどの霊長類が挙げられる。対象は、好ましくはヒトである。対象は、健常者であるか、疾患もしくは状態（例えば、炎症または炎症性疾患）を発症するリスクのある対象であるか、または、疾患もしくは状態（例えば、炎症または炎症性疾患）を有する対象である。

[0018] 本明細書では、「処置」とは、治療（治療的処置）と予防（予防的処置）を含む意味で用いられる。本明細書では、「治療」とは、疾患若しくは障害の治療、治癒、防止若しくは、寛解の改善、または、疾患若しくは障害の進行速度の低減を意味する。本明細書では、「予防」とは、疾患もしくは病態の発症の可能性を低下させる、または疾患もしくは病態の発症を遅らせることを意味する。治療は、疾患または状態（例えば、炎症または炎症性疾患

）を有する対象に対して行われ得る。予防は、健常者、または、疾患もしくは状態（例えば、炎症または炎症性疾患）を発症するリスクのある対象（発症前の対象）に対して行われ得る。

[0019] 本明細書では、「治療上有効量」とは、疾患や状態を処置（予防または治療）するために有効な薬剤の量を意味する。治療上有効量の薬剤は、疾患または状態の症状の悪化速度を低下させること、前記症状の悪化を止めること、前記症状を改善すること、前記症状を治癒すること、または前記症状の発症または発展を抑制することが可能である。

[0020] 本明細書では、「有効量」とは、期待する効果を奏する有効成分の量を指す。

[0021] 本明細書では、「医薬組成物」は、医薬的作用を奏し、対象に投与するに適した組成を有する組成物を意味する。医薬組成物は、医薬有効成分（API）に加えて添加剤を含んでいてもよい。医薬組成物は、例えば、静脈内投与、経鼻投与、経気道投与、皮下投与、筋肉内投与、または塗布用に製剤化されており、それぞれ静脈内投与、経鼻投与、経気道投与、皮下投与、筋肉内投与、または塗布され得る。

[0022] 本明細書では、「間葉系幹細胞」とは、成体内に存在する幹細胞の一種であり、中胚葉系の組織である、骨や軟骨、脂肪に分化できる能力（すなわち多分化能（multipotency））を有する。間葉系幹細胞は、典型的には、骨髓、脂肪、歯髄、月経血、胎盤、ウォートン・ジェリー、臍帯、および臍帯血などの組織から取得することができる。ヒト間葉系幹細胞（ヒトMSC）は、標準的な培養条件下でプラスチックに接着性を有すること、細胞表面マーカーCD73陽性、CD90陽性、およびCD105陽性であり、かつ、CD11b陰性またはCD14陰性、CD19陰性またはCD79α陰性、CD34陰性、およびCD45陰性、HLA-DR陰性であることで特定され得る。

[0023] 本明細書では、「継代」は、細胞を培養容器で培養した後に、培養した細胞の一部または全部を培養容器から取り出し、新しい培地を含む培養容器に

移す操作を意味する。継代は、典型的には細胞が培養容器内の培養面を完全に覆う状態（コンフルエント）になる前に実施される。コンフルエントになると細胞間の密な接触により細胞の性質が変化してしまうリスク、または培地の栄養素が枯渇し、もしくは培地への細胞からの排泄物濃度が高まるリスクがあるためである。本明細書では、「継代回数」は、生体から取り出されたときを0として、その後の継代回数の累積値で示される。

[0024] 本明細書では、「細胞外小胞」は、細胞によって分泌される小胞である。細胞外小胞が有する膜は、細胞が有する膜に由来し、したがって、細胞膜上の構成要素（例えば、細胞膜を構成する脂質および膜タンパク質）の少なくとも1つ以上を含んでいる。細胞外小胞としては、アポトーシス小胞（粒径 $1\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m}$ ）、微小胞（粒径 $100\text{nm}\sim 1000\text{nm}$ ）、およびエクソソーム（粒径 $50\text{nm}\sim 150\text{nm}$ ）が挙げられる。生体内では、細胞は細胞外（特に体液中）に細胞外小胞を分泌し、培養条件下では、細胞は細胞外（特に培養液中）に細胞外小胞を分泌する。細胞外小胞は、間葉系幹細胞（MSC）を含む多くの細胞から分泌される。細胞外小胞は、典型的には、アフィニティクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、ポリマー沈降、超遠心分離、および限外ろ過、並びにこれらの組合せにより、細胞培養上清または組織上清から取得される。取得される細胞外小胞の特性は、取得方法により大きく異なる。また、細胞は様々な細胞外小胞を細胞外に分泌するため、その中から特定の性質を有する有用な細胞外小胞を特定すること、または濃縮、富化、単離、もしくは精製することは必ずしも容易ではない。間葉系幹細胞由来のエクソソームは、一般的には、抗老化作用、美白作用、皮膚再生作用、免疫調節、抗線維化作用、抗炎症作用、抗腫瘍効果、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病）に対する治療効果を有し得る。エクソソームは、由来する細胞により異なるが、Alix、Tsg101、テトラスパニン（CD81、CD63、およびCD9）、ヒートショックタンパク質（HSP60、HSP70、HSC70、およびHSP90等）、およびフロチリンからなる群から選択される1つ以上、典型的にはすべてを発

現する。エクソソームまたはその量は、例えば、テトラスパニンのいずれか 1 以上（好ましくは CD 6 3 および CD 8 1）の発現により確認され得る。エクソソームまたはその量はまた、粒径により確認され得る。微小胞（MV）は、細胞膜が外側へ芽出して形成され、100～1000nm程度の直径を有する。MVは、セレクチン、CD40などを発現することで知られる。アポトーシス小胞は、細胞がプログラム細胞死（アポトーシス）により生じさせる小胞であり、50～5000nmの直径を有する。アポトーシス小胞は、アネキシンV、ホスファチジルセリンなどを発現することで知られる。

[0025] 本明細書では、「水性組成物」とは、水を溶媒として含む組成物、または水溶液を意味する。水性組成物は、細胞外小胞の保持に適した組成（例えば、生理食塩水の組成）を有する。水性組成物はある好ましい態様では、医薬組成物である。

[0026] 本明細書では、「CD 6 3」は、テトラスパニンと呼ばれるタンパク質ファミリーの一員であり、膜貫通ドメインを有し、細胞膜やエクソソームの膜上に存在する。ヒトCD 6 3の標準的な配列は、米国バイオテクノロジー情報センター（NCBI）においてGenBank登録番号AAH13017.1として登録されている。CD 6 3には、上記GenBank登録番号AAH13017.1として登録されているに対応する配列を有し、CD 6 3の機能を有するタンパク質が含まれる。

[0027] 本明細書では、「CD 8 1」は、テトラスパニンと呼ばれるタンパク質ファミリーの一員であり、膜貫通ドメインを有し、細胞膜やエクソソームの膜上に存在する。ヒトCD 8 1の標準的な配列は、米国バイオテクノロジー情報センター（NCBI）においてGenBank登録番号AAH93047.1として登録されている。CD 8 1には、上記GenBank登録番号AAH93047.1として登録されているに対応する配列を有し、CD 8 1の機能を有するタンパク質が含まれる。

[0028] 本明細書では、「マイクロRNA」（miRNA）は、マイクロRNAと呼ばれるノンコーディングRNAの一種である。本明細書では、マイクロR

NAは、成熟miRNA (miR) を指す。マイクロRNAは、70塩基長程度の前駆体miRNA (「miRNAの前駆体」ともいう) から産生される。前駆体miRNAは、生体内ではmiRNAをコードする遺伝子から転写されて産生される。前駆体miRNAは多くの場合に細胞質においてプロセッシングを受けて成熟miRNAを産生する。成熟型miRNAは、典型的には20~25mer程度の長さを有する一本鎖RNAである。マイクロRNAは転写後レベルにおいて遺伝子発現を制御する。マイクロRNAは、広く様々な生物学的プロセスに関与する。成熟miRNAは典型的には20~25塩基長を有する。miRNAは、同定された順に番号が付され、miR- (番号) と命名されている。前駆体miRNAから2つの成熟miRNAが産生される場合、その発現量が顕著に高いものをmiR-xxと呼び、顕著に低いものをmiR-xx*と呼ぶ {ここで、xxは番号であり、発見された順番で付番されている}。但し、どちらが優性か不明な場合には、前駆体miRNAの5'末端から生じるものに「-5p」の接尾辞を付し、3'末端から生じるものに「-3p」の接尾辞を付す。また、ヒトmiRは、hsa-miRと命名される。

[0029] miR-4516は、マイクロRNAの一種である。miR-4516は、腎線維化を抑制すること等で知られる (Yoon et al., *CELLs*, 10(7):1682, 2021)。miR-4516はまた、乾癬治療において治療的意義を有する (Chowdhari et al., *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1863(12):3142-3152, 2017)。miR-4516はまた、網膜炎の発症を抑制する (Pao et al., *PLoS One*, 17(6): e0270526, 2022)。このようにmiR-4516は、抗線維化作用および抗炎症作用を有することが知られている。miR-4516の典型的な配列は、NCBI参照配列NR_039741.1として登録される配列の2~18番目のヌクレオチド配列によりコードされる。miR-4516は、NCBI参照配列NR_039741.1として登録される配列の2~18番目のヌクレオチド配列に対応する配列を有し、miR-4516の機能 (例えば、抗線維化作用および抗炎症作用) を少なくとも部

分的に有するマイクロRNAを含む。

[0030] miR-324-5pは、マイクロRNAの一種である。miR-324-5pは、TRAF3を介して心筋における虚血再灌流後のアポトーシス、炎症反応、酸化ストレスを抑制する (Jin et al., Int Immunopharmacol, 108:108740, 2022)。miR-324-5pはまた、ブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおいて線維化病変を減少させることがミミック分子の合成により示されている (Xu et al., Mol. Ther., 30(6):2370-2387, 2022)。このようにmiR-324-5pは、抗炎症作用と抗線維化作用を有することが知られている。miR-324-5pの典型的な配列は、NCBI参照配列NR_029896.1として登録される配列の16～37番目のヌクレオチド配列によりコードされる。miR-324-5pは、NCBI参照配列NR_029896.1として登録される配列の16～37番目のヌクレオチド配列に対応する配列を有し、miR-324-5pの機能（例えば、抗線維化作用および抗炎症作用）を少なくとも部分的に有するマイクロRNAを含む。

[0031] 本明細書では、「単離」とは、それが産生された環境から、少なくとも他の1以上の成分を除去することを指す。したがって、単離は、単一成分のみとなるまで精製することを要求せず、他の成分（例えば、薬学的に許容される夾雑物）が同一組成物中に存在していることを許容する。「単離マイクロRNA」は、遊離形態のマイクロRNAを意味する。遊離形態は、小胞や細胞内のマイクロRNAと区別する意味で用いられ、小胞や細胞外のマイクロRNA（小胞や細胞から分離されたマイクロRNAおよび人工的に合成されたマイクロRNAを含む）を意味する。

[0032] 「炎症」は、細胞または組織が損傷を受けると、損傷部位を回復させる一連の防御を目的として現れる現象であり得る。炎症は、外傷、凍傷、火傷、放射線などによる物理的要因、化学物質による化学的要因、及び抗体反応による免疫学的要因により誘発し得る。外傷により損傷した細胞は、炎症性サイトカインおよびケモカインなどの生理活性物質を分泌し、血管を拡張させ

、また、血管透過性を高め、抗体、補体、血漿、免疫細胞を炎症部位に誘導する。「炎症性疾患」は、物理的もしくは化学的刺激、病原菌による刺激、病原菌の構成要素による刺激、アレルゲンによる刺激などに対する、全身的または局所的な生体防御反応である。炎症性疾患としては、例えば、アトピー、乾癬、皮膚炎、アレルギー、歯肉炎、関節炎、肺炎、鼻炎、中耳炎、咽喉炎、扁桃炎、膀胱炎、腎炎、胃炎、肝炎、膵炎、骨盤炎、血管炎、炎症性腸疾患（例えば、クローン病、ベーチェット病に伴う腸内病変、潰瘍性大腸炎、出血性直腸潰瘍、回腸囊炎、潰瘍性結腸炎）、間質性肺炎、強直性脊椎炎、インフルエンザ脳症、全身性エリテマトーデス、子宮内膜症、急性呼吸窮迫症候群、心筋梗塞、喘息、動脈硬化、浮腫、関節リウマチ、遅延性アレルギー（ⅠⅤ型アレルギー）、移植拒絶、移植片対宿主病、自己免疫脳脊髄炎、多発性硬化症、関節炎、嚢胞性線維症、糖尿病性網膜症、糖尿病性神経症、禿瘡、脱毛症、虚血性一再灌流損傷、血管再狭窄、糸球体腎炎、および胃腸管アレルギーが挙げられる。炎症性疾患は、急性炎症疾患、または慢性炎症疾患（慢性炎症疾患の急性増悪を含む）であり得る。炎症性疾患はまた、アレルギー性であり得る。炎症性疾患はまた、壊死性であり得る。

[0033] 本明細書では、「線維症」は、慢性炎症に応答した線維芽細胞による細胞外マトリックスタンパク質の過剰な分泌と沈着により引き起こされる組織の硬化または瘢痕である。炎症、毒素、感染性病原体、自己免疫応答、機械的ストレスなどの有害な刺激により線維性の細胞応答が誘発される。したがって、炎症の治療は、線維症の治療または予防を導く。

[0034] <本開示の細胞外小胞を含む組成物>

本開示によれば、細胞外小胞を含む組成物（以下「本開示の組成物」という）が提供される。本開示の組成物において、細胞外小胞はCD81陽性（好ましくはCD63陽性かつCD81陽性）の細胞外小胞（エクソソームとして知られる細胞外小胞であり得る）を含む。

[0035] ある態様では、細胞外小胞はCD81を発現し、細胞外小胞1つあたりのCD81の発現量は第1の基準値以上であり得る。ある態様では、細胞外小

胞1つあたりのCD81の発現量は、ヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件（例えば、第2の培地中）で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞におけるCD81の発現量の0.6倍以上、0.7倍以上、0.8倍以上、0.9倍以上、または1倍以上（例えば、0.6倍～1.1倍、例えば、0.8倍～1.05倍、または0.9倍～1.1倍）である。

[0036] 第1の基準値（単位：a g／粒子）は、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、16以上、17以上、18以上、19以上、20以上、21以上、22以上、23以上、24以上、25以上、または26以上の値であり得る。第1の基準値は、14～26、16～26、18～26、または20～26の範囲の値であり得る。好ましくは、CD81の発現量は、CD81／CD81 Exosome ELISA Kit（（株）ハカレル、HAK-HEL8181-1）の製品プロトコルに従い測定することができる。また、より好ましくは、第1の基準値は、78以上、79以上、80以上、85以上、90以上、95以上、100以上、105以上、110以上、115以上、120以上、125以上、または130以上であり得る。第1の基準値はまた、80～200、100～170、110～150、120～140または約130であり得る。好ましくは、CD81の発現量は、LC-MS／MSにより測定することができる。また、細胞外小胞1つあたりのCD81の発現量は1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、16以上、17以上、18以上、19以上、20以上、21以上、22以上、23以上、24以上、25以上、または26以上の値であり得、14～26、16～26、18～26、または20～26の範囲の値であり得る。好ましくは、CD81の発現量は、CD81／CD81 Exosome ELISA Kit（（株）ハカレル、HAK-HEL8181-1）の製品プロトコルに従い測定することがで

き、より好ましくは、78以上、79以上、80以上、85以上、90以上、95以上、100以上、105以上、110以上、115以上、120以上、125以上、または130以上であり得、80～200、100～170、110～150、120～140または約130であり得る。

[0037] ある態様では、細胞外小胞は、miR-4516を発現する。ある好ましい態様では、miR-4516の発現量は、第2の基準値以上である。ここで、第2の基準値（単位： $\text{amol}/10^9$ 粒子）は、500以上、600以上、700以上、800以上、900以上、1000以上、1100以上、1200以上、1300以上、1400以上、1500以上、1600以上、1700以上、1800以上、1900以上、2000以上、2100以上、2200以上、2300以上、2400以上、2500以上、2600以上、2700以上、2800以上、2900以上、3000以上、3100以上、3200以上、3300以上、3400以上、3500以上、3600以上、3700以上、3800以上、または3900以上の値であり得る。第2の基準値（単位： $\text{amol}/10^9$ 粒子）は、45000以下、40000以下、35000以下、30000以下、25000以下、20000以下、15000以下、10000以下、9000以下、8000以下、7000以下、6000以下、5000以下、4000以下、3900以下、3800以下、3700以下、3600以下、3500以下、3400以下、3300以下、3200以下、3100以下、3000以下、2900以下、2800以下、2700以下、2600以下、2500以下、2400以下、2300以下、2200以下、2100以下、2000以下、1900以下、または1800以下であり得る。ある好ましい態様では、第2の基準値（単位： $\text{amol}/10^9$ 粒子）は、1800～3900であり得、より好ましくは、2300～3900または2300～45000であり得る。ある態様では、第2の基準値（単位： $\text{amol}/10^9$ 粒子）は、2000～3500、2500～3500、または3000～3500の数値範囲であり得る。これらの基準値は、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（

q R T - P C R) により測定され得る。

[0038] ある態様では、細胞外小胞は、m i R - 4 5 1 6 を発現する。ある好ましい態様では、m i R - 4 5 1 6 の発現量は、ヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件（例えば、第2の培地中で）で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞におけるm i R - 4 5 1 6 の発現量に対して第2の基準倍率以上の値である。第2の基準倍率は、1 . 1 倍以上、1 . 2 倍以上、好ましくは1 . 3 倍以上、1 . 4 倍以上、より好ましくは1 . 5 倍以上、1 . 6 倍以上、1 . 7 倍以上、1 . 8 倍以上、1 . 9 倍以上、さらに好ましくは2 倍以上、2 . 1 倍以上、または2 . 2 倍以上の値であり得る。また、第2の基準倍率は、2 6 倍以下、2 0 倍以下、1 5 倍以下、1 0 倍以下、9 倍以下、8 倍以下、7 倍以下、6 倍以下、5 倍以下、4 倍以下、3 倍以下、2 . 2 倍以下、2 . 1 倍以下、2 倍以下、1 . 9 倍以下、1 . 8 倍以下、1 . 7 倍以下、1 . 6 倍以下、1 . 5 倍以下、1 . 4 倍以下、1 . 3 倍以下、1 . 2 倍以下、または1 . 1 倍以下の値であり得る。第2の基準倍率は、例えば、1 . 1 倍～2 . 2 倍、好ましくは1 . 3 倍～2 . 2 倍、より好ましくは1 . 5 倍～2 . 2 倍、さらに好ましくは、2 倍～2 . 2 倍の範囲の値であり得る。

[0039] ある態様では、細胞外小胞は、m i R - 3 2 4 - 5 p を発現する。ある好ましい態様では、m i R - 3 2 4 - 5 p の発現量は、第3の基準値以上である。ここで、第3の基準値（単位：a m o l / 1 0 ⁹ 粒子）は、0 . 1 以上、0 . 2 以上、0 . 2 5 以上、0 . 3 以上、0 . 4 以上、0 . 5 以上、0 . 6 以上、0 . 7 以上、0 . 8 以上、または0 . 8 5 以上の数値であり得る。第3の基準値（単位：a m o l / 1 0 ⁹ 粒子）はまた、0 . 8 5 以下、0 . 8 以下、0 . 7 以下、0 . 6 以下、0 . 5 以下、0 . 4 以下、0 . 3 以下、または0 . 2 5 以下の数値であり得る。ある好ましい態様では、第3の基準値（単位：a m o l / 1 0 ⁹ 粒子）は、0 . 2 5 ～0 . 8 5 であり得、より好ましくは、0 . 6 ～0 . 8 5 であり得る。

[0040] ある態様では、細胞外小胞は、m i R - 3 2 4 - 5 p を発現する。ある好

ましい態様では、 $miR-324-5p$ の発現量は、ヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件（例えば、第2の培地中で）で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞における $miR-324-5p$ の発現量に対して第3の基準倍率以上の値である。第3の基準倍率は、1.1倍以上、1.2倍以上、好ましくは1.3倍以上、1.4倍以上、より好ましくは1.5倍以上、1.6倍以上、1.7倍以上、1.8倍以上、1.9倍以上、さらに好ましくは2倍以上、2.5倍以上、さらに好ましくは2.7倍以上、3倍以上、3.5倍以下、または4倍以上の値であり得る。また、第3の基準倍率は、4倍以下、3.5倍以下、3倍以下、2.5倍以下、2倍以下、1.9倍以下、1.8倍以下、1.7倍以下、1.6倍以下、1.5倍以下、1.4倍以下、1.3倍以下、1.2倍以下、または1.1倍以下の値であり得る。第2の基準倍率は、例えば、1.1倍～4倍、好ましくは2倍～4倍、より好ましくは2.5倍～4倍、さらに好ましくは、3倍～4倍の範囲の値であり得る。

[0041] ある好ましい態様では、細胞外小胞は、以下 (i i - 1) ～ (i i - 2)

:

(i i - 1) $miR-4516$ を発現し、その発現量は、第2の基準値以上であり、第2の基準値は $500\text{ amol} / 10^9\text{ 粒子} \sim 3900\text{ amol} / 10^9\text{ 粒子}$ （または $500\text{ amol} / 10^9\text{ 粒子} \sim 45,000\text{ amol} / 10^9\text{ 粒子}$ ）の範囲内の値である、

(i i - 2) ヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件（例えば、第2の培地中で）で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞における $miR-4516$ の発現量に対して第2の基準倍率以上の値であり、第2の基準倍率は、1.3倍以上の値である、
からなる群から選択される1以上を満たす。

[0042] ある好ましい態様では、細胞外小胞は、以下 (i i - 1) ～ (i i - 4)

:

(i i - 1) $miR-4516$ を発現し、その発現量は、第2の基準値以上

であり、第2の基準値は $500 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子} \sim 3900 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ （または $500 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子} \sim 45,000 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ ）の範囲内の値である、

(ii-2) ヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件（例えば、第2の培地中で）で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞におけるmiR-4516の発現量に対して第2の基準倍率以上の値であり、第2の基準倍率は、1.3倍以上の値である、

(ii-3) miR-324-5pを発現し、その発現量は、第3の基準値以上であり、第3の基準値は $0.1 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子} \sim 0.89 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ の範囲内の値である、および、

(ii-4) ヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件（例えば、第2の培地中で）で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞におけるmiR-324-5pの発現量に対して第3の基準倍率以上の値であり、第3の基準倍率は1.1倍以上（好ましくは1.3倍以上）の値である、

からなる群から選択される1以上を満たす {但し、第2の基準値は $1800 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ 以上である、第3の基準値は $0.25 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ 以上である、および第2の基準倍率は1.3倍以上である}。

[0043] ある好ましい態様では、細胞外小胞は、以下(ii-1)および(ii-3)：

(ii-1) miR-4516を発現し、その発現量は、第2の基準値以上であり、第2の基準値は $500 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子} \sim 3900 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ （または $500 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子} \sim 45,000 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ ）の範囲内の値である、および

(ii-3) miR-324-5pを発現し、その発現量は、第3の基準値以上であり、第3の基準値は $0.1 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子} \sim 0.89 \text{ amol} / 10^9 \text{ 粒子}$ の範囲内の値である、

からなる群から選択される1以上を満たす {但し、第2の基準値は 1800

a m o l / 1 0⁹ 粒子以上であるか、または第 3 の基準値は 0. 2 5 a m o l / 1 0⁹ 粒子以上である} 。

の全てを満たす。

[0044] ある好ましい態様では、以下 (i i - 2) および (i i - 4) :

(i i - 2) ヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件 (例えば、第 2 の培地中で) で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞における m i R - 4 5 1 6 の発現量に対して第 2 の基準倍率以上の値であり、第 2 の基準倍率は、1. 3 倍以上の値である、および (i i - 4) ヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件 (例えば、第 2 の培地中で) で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞における m i R - 3 2 4 - 5 p の発現量に対して第 3 の基準倍率以上の値であり、第 3 の基準倍率は 1. 1 倍以上の値である、からなる群から選択される 1 以上を満たす {但し、第 2 の基準倍率は 1. 3 倍以上であるか、または第 3 の基準倍率は 2. 7 倍以上である} 。

[0045] 本開示の細胞外小胞は、組織におけるマクロファージの M 1 / M 2 分極を制御し得る。ある好ましい態様では、本開示の細胞外小胞は、組織において、M 1 マクロファージを減少させ、および／または、M 2 マクロファージを増加させることができる。したがって、本開示の細胞外小胞を含む組成物は、組織において、M 1 マクロファージを減少させ、および／または、M 2 マクロファージを増加させることに用いることができる。ある好ましい態様では、本開示の細胞外小胞は、抗炎症作用を有する。抗炎症作用は、局所的または全身性に発揮され得る。炎症の慢性化は組織の線維化を誘発する。したがって、抗炎症作用は、組織の線維化の予防となる。

[0046] 本開示の細胞外小胞は、血管内皮細胞における接着分子の発現を低下させる。接着分子は好ましくは、E-セレクトリンである。

[0047] <本開示の組成物の製造方法>

本開示の組成物における細胞外小胞は、通常は細胞から分泌されるものであり、好ましくは多能性を有するストローマ細胞 (特に間葉系幹細胞) から

分泌されるものである。したがって、本開示の組成物は、上記細胞の分泌物として得ることができる。

- [0048] 間葉系幹細胞としては、骨髓由来間葉系幹細胞、脂肪由来間葉系幹細胞、歯髓由来間葉系幹細胞、臍帯由来間葉系幹細胞、臍帯血由来間葉系幹細胞、ウォートン・ジェリー由来間葉系幹細胞、胎盤由来間葉系幹細胞、月経血由来間葉系幹細胞、および歯髓由来間葉系幹細胞が挙げられ、いずれも細胞外小胞のソースとして好ましく用いられ得る。ある態様では、間葉系幹細胞は、骨髓由来間葉系幹細胞、脂肪由来間葉系幹細胞、および臍帯由来間葉系幹細胞からなる群から選択されるいずれか1以上であり、例えば、骨髓由来間葉系幹細胞、または臍帯由来間葉系幹細胞であり得る。
- [0049] 細胞は培地（例えば、富栄養培地）中で37℃5%CO₂の条件下で細胞を培養することが一般的であり、培養後、細胞外小胞を含む上清を回収する。細胞外小胞を医薬有効成分として活用する場合には、上清に動物性成分などが混入することを防ぐ目的で、培養後、培地を化学的に定義される培地に完全に交換し、その上で、当該培地中に放出された細胞外小胞を含む上清を回収されることも多い。
- [0050] 培地としては、基礎培地を用いることができる。基礎培地としては、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、 α MEM、最小必須培地（MEM）、ノックアウトDMEM（KO-DMEM）、グラスゴー最小必須培地（G-MEM）、イーグル基礎培地（BME）、DMEM／ハムF12、アドバンストDMEM／ハムF12、イスコフ改変ダルベッコ培地、ハムF-10、ハムF-12、培地199、RPMI1640培地、Williams培地E、MCDB培地、Fisher培地ならびにそれらの組み合わせおよび／またはそれらの改変物が挙げられる。
- [0051] ある態様では、培地は、基礎培地に加えて、グルコースなどの糖、アミノ酸（例えば、グルタミン）、トランスフェリン、サイトカイン、脂質、成長因子（例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、トランスフォーミング増殖因子（TGF） β 3、血小板由来増殖因子（PDGFbb））、抗

生物質、抗真菌剤、ステロイドホルモン、タンパク質ホルモン（例えば、インスリン）、微量金属（例えば、セレン）またはそれらの組み合わせをさらに含む。細胞を接着培養するためには、細胞接着性を有する培養面上で培養されることが好ましい。そのような培養面を有する培養容器は市販されており、適宜用いることができる。培地はpH緩衝剤で緩衝され、中性のpH（例えば、典型的にはpH 6.8～7.4、例えば、pH 7.2～7.4）を有する。

[0052] 本開示の組成物の製造方法は、以下工程を含みうる：

第1の培地中で細胞にヒートショック処置を行う工程、
ヒートショック処置を受けた細胞を第2の培地中で培養して細胞外小胞を上清に含む培養物を得る工程、および
培養物から細胞外小胞を含む上清を回収する工程。

[0053] ある態様では、第1の培地は、無血清培地である。第1の培地は、細胞に対してストレスや刺激を加えないものであることが好ましく、これによりヒートショックストレスのみを細胞に与えることができ、ヒートショックストレスの効果が安定し得る。ある好ましい態様では、第1の培地は、無血小板ライセートかつ無血清かつ無アルブミン培地である。また、ある好ましい態様では、第1の培地は、無血小板ライセート、無血清、無アルブミン、および無成長因子の培地であり得る。ある具体的態様では、第1の培地は、無血小板ライセート、無血清、無アルブミン、および無成長因子であり、かつ、トランスフェリンもインスリンも含まない。ここで、第1の培地は、グルコースを含まなくても、含んでいてもよいが、好ましくはグルコースを含まない。ある態様では、第1の培地は飢餓培地である。ある好ましい態様では、第1の培地は、細胞の短期間（例えば、1～4時間）の維持に適する。ある好ましい態様では、第1の培地は、基礎培地の組成を有する。ある好ましい態様では、第1の培地は、添加物を含む基礎培地の組成を有し、添加物は、グルコースである。

[0054] ある態様では、第2の培地は、無血清培地である。ある態様では、第2の

培地は、細胞増殖に適した培地である。ある好ましい態様では、第2の培地は、培地からのエクソソームの混入を防ぐ観点で、無血小板ライセートかつ無血清であり、細胞増殖に適した培地である。細胞増殖に適した培地は、有効量の細胞の増殖に必要な栄養素を含み、当該培地中で細胞を増殖させることができる。すなわち、第2の培地は、第1の培地と比較して、細胞をより強力に増殖させる。ある好ましい態様では、第2の培地は富栄養培地であり得る。ある好ましい態様では、第2の培地は、無血小板ライセートかつ無血清であり、アルブミン（好ましくは血清アルブミン、特に好ましくはヒト血清アルブミン）を含む。ある好ましい態様では、第2の培地は、培養上清への外来の細胞外小胞の混入を防ぐ観点で、外来の細胞外小胞（特にエクソソーム）を含まない培地である。通常は、意図的に外来の細胞外小胞を混合した場合以外は、外来の細胞外小胞を含まない培地を第2の培地として用いることが好ましい。外来の細胞外小胞とは、培養対象である細胞から放出される細胞外小胞以外のすべての細胞外小胞である。血小板ライセートや血清には外来の細胞外小胞が含まれているために第2の培地には混合しない方が好ましい。通常は、細胞外小胞を除去した血小板ライセートおよび血清にも、残存細胞外小胞が含まれることがあり、細胞外小胞を除去した血小板ライセートおよび血清も培地には混合しないことが好ましい。ある好ましい態様では、第2の培地は、成長因子をさらに含み、より好ましくは、トランスフェリン、およびインスリンをさらに含む。好ましい態様では、第2の培地は、第1の培地とは異なる組成を有する。ある態様では、第2の培地は、回復培地である。ある態様では、第2の培地は、第1の培地の組成に加えて、アルブミン、トランスフェリン、インスリン、および成長因子からなる群から選択される1以上をさらに含む。成長因子は、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、トランスフォーミング増殖因子（TGF、例えば、TGF- β 3、および血小板由来増殖因子（PDGF、例えば、PDGFbb）からなる群から選択される1つ、2つまたはすべてを含み得る。第2の培地による培養は、好ましくは、細胞が増殖するに十分な時間にわたって実施することが

できる。第2の培地による培養は、例えば、37℃で、例えば、24時間～96時間、24時間～36時間、24時間～48時間、または48～96時間行うことができる。

[0055] 本明細書において用いられる用語「培地」は、その培地のみで細胞の増殖および維持に十分な栄養を含む。培地（例えば、富栄養培地）は、血小板ライセート含有培地、血清含有培地、アルブミン含有培地、無血小板ライセート培地、無血清培地、無血清無アルブミン培地、ゼノフリー培地、または化学的に定義される培地であり得る。化学的に定義される培地とは、その成分が全て把握されている培地を意味する。化学的に定義される培地は、完全合成培地であり得る。血小板ライセートや血清には、細胞外小胞が混入していることがあるため、培養物からの細胞外小胞の回収の目的では、そのような混入を避けることが望まれる。この観点で、培地（特に富栄養培地）は、好ましくは、無血小板ライセート培地、無血清培地、無血清無アルブミン培地、ゼノフリー培地、または化学的に定義される培地であり得る。培地は、成長因子または増殖因子を含まなくてもよいが、成長因子および／または増殖因子を含んでもよい。

[0056] 本明細書において用いられる用語「飢餓培地」とは、無血清無アルブミンかつ無成長因子の培地である。飢餓培地には、典型的には、細胞に対して増殖や分化を指揮するための特異的なシグナル伝達経路の活性化を誘発させる因子は実質的に含まれない。例えば、飢餓培地は、グルコース及びL-グルタミンなどの細胞の増殖に必要な因子も含まなくてもよい。飢餓培地は、例えば、緩衝された生理食塩水、または緩衝された基礎培地であり得る。但し、飢餓培地は、細胞の1～5日間、例えば1日間、2日間、または3～5日間の培養に必要な栄養素（例えば、グルコース等）を含んでもよい。飢餓培地は、好ましくは化学的に定義される培地である。飢餓培地はある態様では、基礎培地とグルコースを含む。

[0057] 本明細書において用いられる用語「回復培地」とは、無血清培地であり、細胞の培養に必要な栄養素を含む培地である。回復培地は、上記「培地」に

において定義された培地を用いることができ、例えば、細胞の増殖および維持に十分な栄養を含む培地であり得、例えば、無血清である。回復培地は、好ましくはヒト血清アルブミン（HSA）を含む。回復培地は、無血清であり、好ましくは、HSAと成長因子を含む。成長因子は、例えば、bFGF、TGF- β 、およびPDGFからなる群から選択されるいずれか1以上またはすべてであり得、例えば、上記で例示した成長因子であり得る。回復培地は、好ましくは、HSAと成長因子とインスリン、およびトランスフェリンを含んでもよい。ある好ましい態様では、回復培地は、通常培地を超える好ましい増殖条件を提供する富栄養培地であり得る。

[0058] ヒートショックは、細胞にヒートショック応答を誘導する処置である。ヒートショックは、例えば、38℃以上、38.5℃以上、39℃以上、好ましくは40℃以上、特に約42℃の温度条件下で細胞を維持することにより細胞に与えることができる。維持時間は、例えば、1時間以上、好ましくは1時間から2時間であり得る。ヒートショック応答は、ヒートショックタンパク質（例えば、Hsp70、Hsc70、Hsp90、Hsp32、およびHsp27など）のいずれか1以上の亢進（例えば、活性化、または発現向上）を含む。ヒートショックが細胞に加わると、通常は当該細胞内でヒートショックタンパク質の発現レベルが上昇する。発現レベルは、ウェスタンブロット、ELISA、免疫蛍光染色などの手法により定量することができる。また、ヒートショックタンパク質のmRNA発現は、定量的リアルタイムPCRなどの手法により定量することができる。ヒートショックは、細胞の大半（例えば、約65%～約99%、特に約70%～約98%）が生存できる条件で行われ得る。

[0059] 細胞外小胞を含む上清から、細胞外小胞を単離または精製することができる。単離、または精製は、遠心分離、ろ過、および／または、サイズ除外クロマトグラフィーにより行うことができる。得られた細胞外小胞（特にエクソソーム）における上記の各マイクロRNAの存在量が基準値以上である細胞外小胞を医薬有効成分として用いてもよい。得られる細胞外小胞の品質は

、精製方法により変動しうる。したがって、得られた細胞外小胞の一部をサンプリングして上記の各マイクロRNAを定量し、それぞれ基準値と比較することによって有効成分として用いる細胞外小胞の品質管理を行ってもよいであろう。

[0060] 本開示の好ましい態様では、医薬組成物は、 1×10^8 /mL以上、 2×10^8 /mL以上、 3×10^8 /mL以上、 4×10^8 /mL以上、 5×10^8 /mL以上、 6×10^8 /mL以上、 7×10^8 /mL以上、 8×10^8 /mL以上、 9×10^8 /mL以上、 1×10^9 /mL以上、 2×10^9 /mL以上、 3×10^9 /mL以上、 4×10^9 /mL以上、 5×10^9 /mL以上、 6×10^9 /mL以上、 7×10^9 /mL以上、 8×10^9 /mL以上、 9×10^9 /mL以上、 1×10^{10} /mL以上、 2×10^{10} /mL以上、 3×10^{10} /mL以上、 4×10^{10} /mL以上、 5×10^{10} /mL以上、 6×10^{10} /mL以上、 7×10^{10} /mL以上、 8×10^9 /mL以上、 9×10^9 /mL以上、 1×10^{10} /mL以上、 2×10^{10} /mL以上、 3×10^{10} /mL以上、 4×10^{10} /mL以上、 5×10^{10} /mL以上、 6×10^{10} /mL以上、または 7×10^{10} /mL以上の濃度で細胞外小胞を含み得る。細胞外小胞の個数は、ZetaView (Particle Matrix) を用いたナノ粒子トラッキング法により決定することができる。

[0061] 濃縮された細胞外小胞は、例えば、100以下のD10、160以下のD50、および280以下のD90を有し得る。細胞外小胞は、例えば、D10が、90以下、88以下、86以下、84以下、82以下、80以下、78以下、76以下、74以下、72以下、または70以下であり、D50が、150以下、140以下、130以下、120以下、または110以下であり、D90が、250以下、240以下、230以下、220以下、210以下、200以下、190以下、180以下であり得る。D10は、粒子全体のうちでこの粒径以下の粒径の粒子が10%である粒径を意味し、D50は、粒径の中央値を意味し、D90は、粒子全体のうちでの粒径以下の粒径の粒子が90%である粒径を意味する。上記粒径分布に関する粒径（例え

ば、D10、D50、およびD90)は、ZetaView (Particle Matrix)を用いたナノ粒子トラッキング法により決定することができる。細胞外小胞中に含まれるエクソソームの量は、CD81の発現に基づいて、より好ましくはCD63およびCD81の発現に基づいて決定し得る。タンパク質の定量は、ELISAで行ってもよいが、好ましくは質量分析により決定することができる。質量分析は、LC-MS/MSにより実施され得る。質量分析では、内部標準を必要とする。内部標準は、タンパク質の部分ペプチドであり得る。

[0062] 本開示の医薬組成物は、細胞外小胞および水性溶媒に加えて、添加剤をさらに含んでもよい。水性溶媒としては、水があげられる。添加剤としては、塩、等張剤、pH緩衝剤などが挙げられる。本開示の医薬組成物は、経口投与、および非経口投与用に製剤化されている。非経口投与としては、特に限定されないが例えば、静脈内投与、経鼻投与、気管内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、脳室内投与、脳脊髄液内投与、門脈内投与、および心筋内投与、注腸が挙げられる。非経口投与はまた、病変部または患部への医薬組成物の注射であり得る。

[0063] 本開示の医薬組成物は、凍結乾燥製剤であり得る。凍結乾燥製剤は、本開示の医薬組成物の凍結乾燥物を含み得る。凍結乾燥製剤は、好ましくは、本開示の医薬組成物の凍結乾燥物と再構成用水との組合せ製剤であり得る。前記組合せ製剤は、細胞外小胞製剤の調製のためのキットであり得、細胞外小胞製剤の用時調整キットであり得る。医師等の医療従事者は、投与前に、本開示の医薬組成物の凍結乾燥物を再構成用水により再構成して細胞外小胞製剤を調製することができる。

[0064] <本開示の組成物の用途>

本開示の組成物は、様々な用途に用いることができる。そのような用途は、M2/M1マクロファージ比の増大、炎症の予防または治療、炎症組織の線維化の予防または治療、炎症組織内の血管の接着分子発現の抑制であり得る。また、本開示の組成物は、組織に炎症を発症させる可能性がある対象、

組織に炎症を有する対象、および組織に線維化を有する対象を処置すること
に用いることができる。

[0065] ある態様では、本開示の組成物は、対象においてM2/M1マクロファージ比の増大、炎症の予防または治療、炎症組織の線維化の予防または治療、炎症組織内の血管の接着分子発現の抑制に用いられ得る。対象は、組織に炎症を発症させる可能性がある対象、組織に炎症を有する対象、組織に線維化を有する対象、および血管の接着分子の向上した発現を有する対象であり得る。すなわち、ある態様では、本開示の組成物は、組織に炎症を発症させる可能性がある対象、組織に炎症を有する対象、組織に線維化を有する対象、または血管の接着分子の向上した発現を有する対象において、M2/M1マクロファージ比の増大、炎症の予防または治療、炎症組織の線維化の予防または治療、または炎症組織内の血管の接着分子発現の抑制に用いられ得る。接着分子は、例えば、E-セレクトインであり得る。M2/M1マクロファージ比の増大は、健常者の同一組織におけるM2/M1マクロファージ比と比較した増大、または病的な当該比の増大であり得る。

[0066] ある態様では、本開示の組成物は、炎症を有しない組織におけるM2/M1マクロファージ比と比較して、低下したM2/M1マクロファージ比を有する組織を有する対象に投与され得る。本開示の組成物は、低下したM2/M1マクロファージ比を改善し得る（すなわち、M2/M1マクロファージ比を向上させる、または炎症を有しない組織における比に近づける、もしくは当該比と同等にし得る）。

[0067] 本開示によれば、M2/M1マクロファージ比の増大、炎症の予防または治療、炎症組織の線維化の予防または治療、炎症組織内の血管の接着分子発現の抑制に用いるための医薬の製造における使用であって、本開示の細胞外小胞の使用が提供される。

[0068] 本開示によれば、M2/M1マクロファージ比の増大、炎症の予防または治療、炎症組織の線維化の予防または治療、炎症組織内の血管の接着分子発現の抑制に用いるための、本開示の細胞外小胞、または当該細胞外小胞を含

む、組成物（または医薬組成物）が提供される。

- [0069] 本開示によれば、対象を処置する方法であって、本開示の細胞外小胞を当該対象に投与することを含む方法が提供される。本開示によれば、その必要のある対象においてM2/M1マクロファージ比を増大させる、炎症を処置する、炎症組織の線維化を処置する、炎症組織内の血管の接着分子発現を抑制する方法であって、本開示の細胞外小胞を当該対象に投与することを含む方法が提供される。対象は、組織に炎症を発症させる可能性がある対象、組織に炎症を有する対象、組織に線維化を有する対象、および血管の接着分子の向上した発現を有する対象であり得る。

実施例

- [0070] 実施例1：各種条件下での培養による細胞外小胞の分泌促進と細胞外小胞の調製

本実施例では、間葉系幹細胞を通常の培地で培養して細胞外小胞を取得する方法に加えて、各種条件下でヒートショックを与えて細胞外小胞の分泌を促進させ、得られた細胞外小胞を分析した。

- [0071] 間葉系幹細胞を培地中で培養した。間葉系幹細胞としては骨髓由来間葉系幹細胞および臍帯由来間葉系幹細胞を用いた。

- [0072] 細胞は、37℃で3～4日間培養した。培養後、培地を第1の培地に交換して、第1の培地（本明細書では飢餓培地ともいう）中で42℃で1.5時間培養して、細胞にヒートショックを与えた。第1の培地（飢餓培地）は、無血清、かつ、無アルブミンのDMEM培地であり、並びにその他の成長因子、インスリン、およびトランスフェリンのいずれも含まなかった。しかし、第1の培地は、間葉系幹細胞の形態、脂肪細胞、骨芽細胞、および軟骨細胞への分化能、自己複製能、および細胞表面マーカー（特にCD73、CD90、CD105、HLA-ABC）の発現プロファイルを好適に維持した。ヒートショックを与えない条件の細胞は、37℃で1.5時間培養した。ヒートショック後、培地を第2の培地（本明細書では回復培地ともいう）に交換して、または第1の培地中で、細胞を37℃で48～96時間培養した。

。各条件とヒートショックの有無およびヒートショックの条件、並びにその後の培養条件は表1に示される通りであった。また、第2の培地としては、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）を基礎培地とする無血清ゼノフリー培地を用いた。第2の培地には、細胞増殖を活性化させる目的で、培地に典型的に添加される因子（4.5 g/L グルコース、アルブミン及び細胞増殖因子）が添加された。具体的には、第2の培地には、1～5%ヒト血清アルブミン（HSA）を添加した。第2の培地は、さらに塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、トランスフォーミング増殖因子（TGF） β 3、血小板由来増殖因子（PDGFbb）、トランスフェリン、およびインシュリンを含んだ。その後、各条件下で処理した細胞の上清をそれぞれ回収した。

[0073] [表1]

表1：培養条件

	ヒートショック	ヒートショック後
条件1	なし（第2の培地中）	第2の培地
条件2	あり（第2の培地中）	第2の培地
条件3	なし（第2の培地中）	第1の培地
条件4	あり（第1の培地中）	第1の培地
条件5	あり（第1の培地中）	第2の培地

[0074] 回収した培養上清を2,000×g、4℃で10分間遠心し、細胞成分や～1μm程度のアポトーシス小体の除去を行い、次に孔径0.22μmのフィルター処理でマイクロベシクルを除去した。その後、限外濾過で細胞外小胞（EV）の濃縮を行った。得られた細胞外小胞をさらにサイズ排除クロマトグラフィーによりエクソソームを含むEV溶液を得た。精製したEV溶液は孔径0.22μmのフィルター処理によって無菌化した。得られたEVの粒子径と粒子数はZetaview（パーティカル メトリクス社製）を使用し、測定した。条件5で得られたEVをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で50～500倍に希釈し、その粒子径と粒子数を3回繰り返し測定した（

図1参照)。条件により多少の相違は認められたが、粒径分布に大きな相違は認められなかった。

[0075] 次に上記で精製したEV中の各種マーカー濃度を測定した。EV中のCD81量についてCD81/CD81 Exosome ELISA Kit ((株)ハカレル、HAK-HEL8181-1)の製品プロトコルに従いELISAによる定量を行った。定量したCD81量を各サンプルの粒子数で補正し、粒子数あたりのCD81量を算出した。EV中のCD63量についてHuman CD63 ELISA Kit (abcam、ab275099)の製品プロトコルに従いELISAによる定量を行った。なお、CD81は、エクソソームのマーカーであると考えられており、マーカー発現は得られたEVにエクソソームが含まれていることを示す。

[0076] EV中のmiRNAは、マイクロRNAエキストラクター(商標)SPキット(富士フイルム和光純薬(株)、295-71701)を用い、製品プロトコルに従って抽出した。EVは比較サンプル間の粒子数が等量になるように溶媒を用いて適宜希釈した。抽出したmiRNAはMir-X miRNA qRT-PCR TB Green Kit (タカラバイオ(株)、638314)を用い、製品プロトコルに従って逆転写反応後に、製品付属の共通プライマーと表2に記載のプライマーを用いたqPCRにより定量した。また各miRNAについて濃度既知のmimicを用いてmiRNAサンプルと同様の逆転写反応を行い、段階希釈したものをスタンダードとした。スタンダードについてもmiRNAサンプルと同様にqPCRを行い、これによって作成したスタンダードカーブを用いてmiRNAの濃度を定量した。定量したmiRNA濃度と抽出時に使用したEV粒子数から粒子あたりのmiRNA含有量を算出した。

[0077]

[表2]

表 2 : 使用した m i R N A 固有プライマーの配列

miRNA	配列
miR-4516	GGGAGAAGGGUCGGGGC
miR-324-5p	CGCATCCCCTAGGGCATTGGTG

[0078] 結果は、表 3 に示される通りであった。

[表3]

表 3 : C D 8 1 の発現および m i R N A の発現

	CD81 発現量	miRNA*2
条件	粒子数あたりの CD81*1	miR-4516
1	<u>0.98</u>	1,700
2	<u>1.01</u>	2,200
3	0.59	64,000
4	0.43	47,000
5	<u>1.00</u>	3,900

*1 : 数値は条件 5 に対する相対比

*2 : 単位は $\text{amol}/10^9$ 粒子

[0079] 条件 1 は従来の標準的な手法である。条件 2 ～ 4 のうち、条件 5 においてのみ C D 8 1 含量が条件 1 と同等であり、かつ、上記 m i R - 4 5 1 6 の含量が条件 1 よりも高かった。条件 2 は、m i R N A の上記 m i R - 4 5 1 6 の含量の増加がほとんど認められず、条件 3 および 4 は、C D 8 1 発現が低かった。“amol” は、アットモル、すなわち 10^{-18} mol を意味する。“ag” は、アットグラム、すなわち 10^{-18} g を意味する。なお、細胞外小胞の品質管理の観点では、C D 8 1 陽性エクソソームの含有比率は高い方が好ましいと考えら

れる。条件3および4も一定のCD81陽性エクソソーム含有比率を示しており好ましいが、条件1、2および5はより高いCD81陽性エクソソーム含有比率を示しておりより好ましい。そして、条件1、2および5の中では、条件5が高いCD81陽性エクソソーム含有比率とmiR-4516濃度を両立させており、CD81に基づく品質管理の観点で最も好ましい。

[0080] 上記結果から、条件5は、粒子あたりのCD81陽性エクソソームの割合を高め、および／または、エクソソーム中のmiR-4516濃度を高めるのに適していると考えられた。

[0081] また、CD81量をより正確に定量するために、EV中のCD81量について、LC-MS/MSにより定量した。具体的には、高速液体クロマトグラフは、Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific社製)とし、質量分析計は、TSQ-Quantiva (Thermo Fisher Scientific社製)とし、イオン源は、HESI (Thermo Fisher Scientific社製)であった。CD81ペプチドを合成し、 $10\text{ fmol}/\mu\text{L} \sim 250\text{ fmol}/\mu\text{L}$ の濃度幅で7点の濃度を有する標準サンプルを調整し、内部標準法により、MRM (SRM) LC-MS/MSプロテオーム解析を行った。結果、EVに含まれるCD81は $0.13\text{ }\mu\text{g}/1 \times 10^9$ 粒子であり、 $0.13\text{ fg}/\text{粒子}$ ($130\text{ ag}/\text{粒子}$)であった。参考として、表3の比により条件3におけるCD81量を計算すると、約 $77\text{ ag}/\text{粒子}$ と考えられる。なお、この値は、ELISAによる測定値(条件5において $27\text{ ag}/\text{粒子}$)と整合した。測定系により数値が変わること自体は問題ではないが、測定系による誤差を考慮するとCD81は、ヒートショックしない場合のCD81発現量との比により規定することが望ましい。

[0082] また、miR-324-5pの発現は、条件1で $0.22\text{ amol}/10^9$ 粒子、条件2で $0.59\text{ amol}/10^9$ 粒子、条件3で $0.64\text{ amol}/10^9$ 粒子、条件4で $1.3\text{ amol}/10^9$ 粒子、条件4で $0.89\text{ amol}/10^9$ 粒子であった。このことから、条件5はmiR-4516以外の抗炎症性の因子の濃度をエクソソーム中において高めている可能性も示唆された。

[0083] 条件5は、飢餓培地で細胞にヒートショックを与えるものであり、もっともシンプルにヒートショックストレスが加わる条件であり、これにより放出されるエクソソームの抗炎症性が高まると共に、ヒートショック後に通常培地中で細胞を回復させることにより、処理細胞から放出させるエクソソームの品質を向上させた可能性がある。ヒートショック後の第2の培地には、少なくとも、貧栄養培地を超える栄養素（例えば、グルコース、及びレグルタミン等、好ましくはさらにアルブミン）が含まれていればよく、それにより、ヒートショックストレスによるシグナルに基づくエクソソームおよびその内容物の産生が促進され、したがって、抗炎症性のエクソソームを回収できるようになる。また、細胞増殖の促進のために、栄養素および好ましくは細胞増殖因子（bFGF、TGF β 、PDGF等）をさらに第2の培地に含めることにより、ヒートショックストレスによるシグナルに基づくエクソソームおよびその内容物の産生が、より促進されることとなる。当業者であれば、細胞増殖を活性化させる培地組成を適宜設計して用いることができるであろう。ヒートショックによりCD81発現量が低下する理由は不明である。しかし、CD81はエクソソームマーカーであることから、CD81の低下はヒートショックによるCD81陰性エクソソームの増加、または細胞膜やアポトーシス小胞の断片増加によるエクソソーム純度の低下を示唆する。第2の培地で細胞を増殖させることで、健康な細胞由来のエクソソームが増加した可能性がある。

[0084] なお、出発細胞の種類を変えると、miRNAの発現量が変動する場合があるが、試した細胞種（骨髄由来、および臍帯由来）では、いずれの場合も条件1～5の発現比率は概ね維持された。

[0085] 実施例2：肺胞上皮細胞におけるシリカ誘導細胞死の抑制効果

肺線維症は肺における過剰な細胞外マトリックスの蓄積により肺胞構造の破壊、肺胞壁の肥厚が引き起こされ、呼吸不全に至る病態である。肺線維症にはシリカやアスベストなど微粒子の吸入によるものもある。そこで、線維化を誘発する肺胞上皮細胞の傷害に対するEXP01の効果を評価するため

、A549細胞を播種した培養プレートに、シリカ（SIGMA）を添加し細胞死を誘導した。そして、細胞死誘導1時間前に各製造方法で作製したEVまたはPBSを添加し、48時間後の細胞数を測定した。細胞数は、市販のアッセイキットCell Counting Kit-8（同人化学研究所社）を用い、生細胞内で波長が変化する化学物質WST-8の吸光度を測定した。評価は、シリカ非添加条件の吸光度を生細胞率100%と換算し、各条件の細胞生存率を算出した。結果は、図2に示される通りであった。図2に示されるように、条件5で得られたEVは、シリカ誘導細胞死を顕著に抑制した。

[0086] 実施例3：EVによる抗炎症作用

実施例3-1：M1/M2マクロファージの分化に与える影響

M1マクロファージは、細菌やウイルスなどの病原体に対する防御を担当し、炎症反応を促進する免疫細胞である。これに対して、M2マクロファージは、炎症の収束と組織の修復をサポートする免疫細胞である。M1マクロファージとM2マクロファージは、その存在環境により単球であるM0からM1に分化したり、M0からM2に分化することができ、M1の減少とM2の増加は、組織の炎症抑制を意味する。

[0087] THP-1（ヒト単球由来細胞株）をホルボール12-ミリストート13-アセタート（PMA）添加によりM0マクロファージに分化させた後、一部はリポポリサッカライド（LPS）添加によりM1マクロファージへ、一部はインターロイキン（IL）-4添加によりM2マクロファージへとそれぞれ分化させた。EVは分化誘導の1時間前または24時間前に細胞に添加し、24または48時間後の各分化マーカーのmRNA（M1マーカーである腫瘍壊死因子（TNF）- α 、及びM2マーカーであるCCL17）の発現を定量RT-PCR法により解析した。解析には $\Delta\Delta Ct$ 法を用い、M0での発現量を1とした相対値で、発現量を算出した。結果は図3に示される通りであった。図3に示されるように、条件5により得られたEVは、LPSにより誘導されるM1マクロファージの増加を抑え、M2マクロファージ

の増加を促進した。これにより、条件 5 により得られた E V は、M 2 に対する分化を誘導することが示唆された。

[0088] 実施例 3－2：肺炎モデルにおける抗炎症作用

本実施例では、肺炎モデルとして、急性呼吸窮迫症候群（A R D S）を呈するマウスモデルに対して E V を投与してその抗炎症作用を確認した。具体的には、感染症による急性肺障害に対する E V の効果を評価するために、C 5 7 B L／6 J 系マウスに、ダルベッコリン酸緩衝食塩水（炎症非惹起群：S h a m）または E . c o l i 由来 L P S（炎症惹起群）を 1 0 0 μ g／h e a d で気管内投与し、肺障害マウスモデルを作成した。炎症惹起 1 時間後に、P B S（C o n t r o l 群）または E V を 0 . 1 m L／h e a d で静脈内投与した。7 2 時間後に肺胞洗浄液を回収し、その後 1 0 % 中性緩衝ホルマリン液を肺内に注入し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した右肺後葉の組織標本を作製した。顕微鏡を用いて病理組織学的検査を行った。各群の写真（低倍像と高倍像）を撮影した。低倍像は、対物 4 倍率として 1 視野を撮像し、高倍像は、対物 4 0 倍率として 2 0 視野を撮像した。代表的な写真を図 4 A に示す。5 0 % 以上肺胞を含み、気管及び血管の内腔が混在するフィールドは避けた以外は、無作為に撮像した。評価は以下の表 4 にしめされる肺損傷スコアに従った（Am J Respir Cell Mol Biol, 2011: 44: 725-737）。

[0089] [表4]

表 4：肺損傷スコア

パラメータ/スコア	0 点	1 点	2 点
A. 肺胞腔の好中球	なし	1～5 個	>5 個
B. 間質の好中球	なし	1～5 個	>5 個
C. Hyaline 膜	なし	1 個	>1 個
D. 蛋白様物質	なし	1 個	>1 個
E. 肺胞中隔肥厚	<2 倍	2 倍～4 倍	>4 倍

[0090] 観察した結果から次式により肺損傷スコアを算出した。

$$\text{スコア (点)} = [(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D) + (2 \times E)] / (\text{フィールド数} \times 100)$$

スコアリングの結果を図4Bに示す。図4Bに示されるように、条件5では肺損傷スコアの顕著な低下が認められた。

[0091] 上記で回収した肺胞洗浄液中の白血球数を多項目自動血球分析装置 (XT-200iV、シスメックス株式会社) を用いて測定した。結果は図5に示される通りであった。図5に示されるように、条件5で得られたEVは、肺胞洗浄液中の総白血球数を顕著に減少させ、このことから強い抗炎症作用を奏することが示唆された。

[0092] 実施例3-3: ARDS敗血症モデルにおける有効性

敗血症に対するEVの効果を評価するために、C57BL/6J系マウスに、大腸菌 (O111:B4) 由来LPS (15 mg/kg) をマウスに腹腔内投与し、敗血症モデルを作成した。LPS投与1時間後に、PBS (Control群) またはEVを0.1 mL/headで静脈内投与した。マウスを5日間観察し、生存率を評価した。結果は図6に示される通りであった。図6に示されるように条件5により得られたEVは敗血症モデルの生存率を顕著に改善した。

[0093] 実施例4: 血管内皮細胞の接着分子発現抑制効果

ARDSにおける肺組織などの炎症組織への炎症性細胞浸潤の初期反応には血管内皮細胞が産生する接着分子が関与しており、例えば、ARDS患者においては、血中接着分子の増加が報告されている。そこで血管内皮細胞の接着分子産生に対するEVの薬効について、ヒト不死化臍帯静脈血管内皮細胞HUEhT-1を用いた評価した。

[0094] 試験ではHUEhT-1細胞にEVを添加し、48時間後にLPS添加により炎症を惹起させ、その6時間後のE-セレクトインのmRNA発現を定量RT-PCR法を用いて解析した。解析には $\Delta\Delta Ct$ 法を用い、非刺激controlにおける発現量を1とした相対値で評価した。結果は、図7に示

される通りであった。図 7 に示されるように、条件 5 により得られた E V は、L P S により誘導される E ーセレクトンの発現を優位に阻害した。

請求の範囲

- [請求項1] 細胞外小胞を含む水性組成物であって、
細胞外小胞は、
(i) CD81を発現し、細胞外小胞1つあたりのCD81の発現量は第1の基準値以上であり、第1の基準値は、80 (ag/粒子) 以上の値であるか、またはヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件（例えば、第2の培地中）で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞におけるCD81の発現量第1の基準倍率以上であり、第1の基準倍率は0.6倍以上、0.7倍以上、0.8倍以上、0.9倍以上、または1倍以上（例えば、0.6倍～1.1倍、例えば、0.8倍～1.05倍、または0.9倍～1.1倍）の倍率であり、かつ、
(ii) 細胞外小胞は、以下(ii-1)～(ii-2)：
(ii-1) miR-4516を発現し、その発現量は、第2の基準値以上であり、第2の基準値は500 amol/10⁹粒子以上の値である、および
(ii-2) ヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件（例えば、第2の培地中）で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞におけるmiR-4516の発現量に対して第2の基準倍率以上の値であり、第2の基準倍率は、1.3倍以上の値である、
からなる群から選択される1以上を満たす、
水性組成物。
- [請求項2] 請求項1に記載の水性組成物であって、
(ii-1) miR-4516を発現し、その発現量は、第2の基準値以上であり、第2の基準値は2500 amol/10⁹粒子以上の値である、水性組成物。
- [請求項3] 請求項1に記載の水性組成物であって、

(i i - 2) ヒートショック処置をせず、かつ培地の種類を変える処置をしない条件（例えば、第2の培地中）で同じ細胞群から同一の分離法により得られる細胞外小胞における m i R - 4 5 1 6 の発現量に対して第2の基準倍率以上の値であり、第2の基準倍率は、1.3倍以上の値である、水性組成物。

- [請求項4] 請求項1に記載の水性組成物であって、
(i i - 1) および (i i - 2) を満たす、水性組成物。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物の凍結乾燥物。
- [請求項6] 請求項5に記載の凍結乾燥物と、再構成用水とを含む、細胞外小胞製剤の用時調製キット。
- [請求項7] 細胞外小胞を含む水性組成物の製造方法であって、
間葉系幹細胞を通常栄養条件下で培養することと、
その後、無血清、無アルブミン、無血小板ライセート、かつ無成長因子条件下で当該間葉系幹細胞にヒートショック応答を誘導することと、
さらにその後、外来エクソソームを含まず、細胞増殖に適した培地中で間葉系幹細胞を培養して、当該培地の上清中に細胞外小胞を分泌させ、細胞外小胞を含む上清を回収することと、
当該上清から細胞外小胞を分離して、細胞外小胞を含む水性組成物を得ることと、
を含む、方法。
- [請求項8] フィルター滅菌することを更に含む、請求項7に記載の方法。
- [請求項9] 請求項7または8に記載の方法により得られ得る、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物、請求項5に記載の凍結乾燥物、または請求項6に記載のキット。
- [請求項10] 対象において炎症を処置することに用いるための医薬組成物である、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物、請求項5に記載の凍結乾燥物、または請求項6に記載のキット。

- [請求項11] 炎症が、肺炎である、請求項 9 に記載の組成物、凍結乾燥物、またはキット。
- [請求項12] 炎症が、全身性炎症である、請求項 10 に記載の組成物、凍結乾燥物、またはキット。
- [請求項13] 炎症が、敗血症である、請求項 10 または 12 に記載の組成物、凍結乾燥物、またはキット。
- [請求項14] 対象において血管内皮細胞の接着分子の発現を抑制することに用いるための、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の組成物、請求項 5 に記載の凍結乾燥物、または請求項 6 に記載のキット。
- [請求項15] 前記接着分子が、E-セレクチンである、請求項 14 に記載の組成物、凍結乾燥物、またはキット。