

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-91241
(P2015-91241A)

(43) 公開日 平成27年5月14日(2015.5.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Q
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	P
	G 0 1 N 33/53	D

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-246874 (P2014-246874)
 (22) 出願日 平成26年12月5日 (2014.12.5)
 (62) 分割の表示 特願2012-533068 (P2012-533068)
 の分割
 原出願日 平成22年8月5日 (2010.8.5)
 (31) 優先権主張番号 10-2009-0095620
 (32) 優先日 平成21年10月8日 (2009.10.8)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 512002884
 イオン メディックス インコーポレイテッド
 大韓民国 ギョンブク 790-330、
 ポハン-シ、ナム-グ、ヒョジャ-ドン、
 サン 31 ボンジ、ポストェック バイオ
 テック センター、208 ホ
 (74) 代理人 110000729
 特許業務法人 ユニアス国際特許事務所
 (72) 発明者 キム、ユン-グン
 大韓民国 ギョンサンブク-ド 790-
 751、ポハン-シ、ナム-グ、ジゴク-
 ドン、プロフェッサーアパートメント、1
 302ホ 8-ドン

最終頁に続く

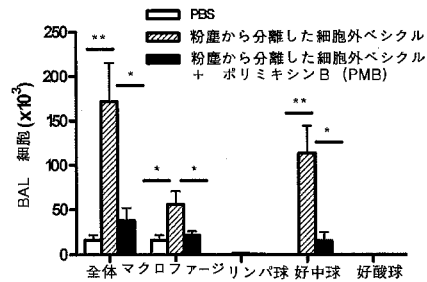
(54) 【発明の名称】 室内空気由来細胞外ベシクルを含む組成物及びその用途

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】室内空気由来細胞外ベシクルを含む組成物などの提供。

【解決手段】前記細胞外ベシクルを用いて炎症性呼吸器疾患及び肺癌などを診断、予防、及び/又は治療する方法。室内空気中存在する細胞外ベシクルを動物に投与して呼吸器疾患動物モデルを製造し、前記動物モデルを用いて呼吸器疾患に対する予防及び治療候補薬物の検索及び/又は発掘を可能とし、呼吸器疾患に対する予防及び/又は治療用ワクチン、呼吸器疾患の原因物質を診断する方法、呼吸器疾患の発生及び悪化を予防するための目的で室温空気中の細胞外ベシクルの活性を抑制し或いは細胞外ベシクルを除去する方法。

【選択図】 図 1 2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

室内空気に存在するイエダニ由来細胞外ベシクルを用いて好中球性肺炎症の存在を検出するための *in vitro* 方法。

【請求項 2】

前記の方法は室内空気に存在する細胞外ベシクルの遺伝物質の塩基配列を分析することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記の方法は室内空気に存在する細胞外ベシクルのタンパク質を測定することを含む、請求項 1 又 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記の方法は、室内空気に存在する細胞外ベシクルに対する免疫反応を測定することを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記の方法は気管支肺胞洗浄液 (BAL fluid) における炎症細胞の数の増加を指標とすることを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記の方法は気管支肺胞洗浄液 (BAL fluid) における TNF - 及び IL - 6 の増加を指標とすることを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記の方法は気管支肺胞洗浄液 (BAL fluid) における IL - 17 量の増加を指標とすることを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、室内空気由来細胞外ベシクルを含む組成物、並びに前記細胞外ベシクルを用いて炎症性呼吸器疾患などを診断、予防、及び / 又は治療する方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

室内空気の質 (indoor air quality) は、建築物 (buildings) を含む構造物 (structures) の内部と周辺空気の質 (air quality) を意味し、特に、居住者又は棲息者の健康及び安楽な生活に関連している。室内空気には、身体に有害な気体、微細粉塵、細菌、カビなどが汚染している。有害な気体としてはベンゼン、ホルムアルデヒド、ペンタクロロベンゼン、酢酸ブチル、トルエンキシレン、スチレンなどの揮発性有機化合物 (volatile organic chemicals、VOC)、ラドンなどが知られている。生物学的汚染物質 (biological contaminants) には細菌、カビ、ウイルス、イエダニ、ゴキブリ、動物のフケ、唾液、花粉などが含まれる。特に、イエダニ、カビ、ペット (pet)、ゴキブリ (cockroach)、細菌などから分泌される物質のサイズがマイクロメートル又はそれ以下の場合、吸入されて免疫反応を誘導して炎症性呼吸器疾患を引き起こす。

【0003】

室内空気にはヒト、ペット、イエダニ、ゴキブリなどを含む様々な生命体の皮膚、胃腸管、呼吸器系などに生息している多種の細菌及びカビと共に、建築物を含む構造物の内部と周辺に生息する或いは流入した多様な種類の細菌及びカビが存在する。

【0004】

室内空気に生息すると知られている細菌としては、バシラス (Bacillus sp.)、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)、表皮ブドウ球菌 (Staphylococcus epidermidis)、スタフィロコッカス・ホミニス (Staphylococcus hominis)、シュードモナス・スタツェリ (Pseudomonas stutzeri)、シュードモナス・ルテオラ (Pseudomonas luteola)、ストレプトミセテス (Streptomyces)、コリネバクテリアセエ (Corynebacteriaceae)、大腸菌 (Escherichia coli) などが含まれる。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

また、前記室内空気に存在する多様な細菌又はこれらに由来する内毒素 (lipopolysaccharide、LPS) やペプチドグリカン (peptidoglycan) などによって免疫細胞及び肺表皮細胞で炎症性サイトカインの生成が誘導されることが知られている。

【 0 0 0 6 】

一方、グラム陰性細菌は、常に外部へ細胞外ベシクル (outer membrane vesicles) を分泌し、グラム陰性細菌から分泌される細胞外ベシクルは、球状のリン脂質二重層からなっており、20 ~ 200 nm のサイズを有する。前記細胞外ベシクルは、LPS だけでなく、宿主の炎症反応を調節することが可能な外膜タンパク質 (outer membrane protein) を持っている。最近、本発明者らは、グラム陽性細菌が外部に細胞外ベシクルを分泌し、プロ

10

【 0 0 0 7 】

炎症性呼吸器疾患は、上気道に発生する鼻炎及び副鼻腔炎、下気道に発生する喘息及び気管支炎、小気道に発生する細気管支炎、肺実質に発生する肺気腫、肺炎などに大別することができる。臨床的に気道閉塞をもたらす疾患として、可逆的な気道閉塞を特徴とする喘息と、非可逆的気道閉塞を特徴とする慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease、COPD) に分類することができる。慢性閉塞性肺疾患の原因疾患として、慢性閉塞性気管支炎、慢性閉塞性細気管支炎、肺気腫などが含まれる。喘息の原因物質に関連して、室内空気中に存在するタンパク質 (アレルゲン) が重要であると知られており、慢性閉塞性肺疾患の原因に関連して、喫煙などの刺激性因子が重要であると知られている。

20

【 0 0 0 8 】

喘息と慢性閉塞性肺疾患の発生における炎症の重要性は既に報告されているが、炎症の様相が異なると知られている。喘息の場合は好酸球性炎症が、慢性閉塞性疾患の場合は非好酸球性又は好中球性炎症が重要であると知られている。ところが、重症喘息患者にはむしろ好中球性炎症が重要であり、特に非可逆的気道閉塞を伴う喘息患者には好中球性炎症が重要であると報告されている。特に、慢性的な肺炎症の発生においては、気道及び肺実質に発生する免疫機能の異常が重要であると知られている。本発明者らは、好酸球性炎症の発生にはTh2免疫反応が、好中球性炎症の発生にはTh1及びTh17免疫反応が重要であることを報告したことがある。

30

【 0 0 0 9 】

また、炎症が癌を引き起こすという事実は前々から提起されていた。最近では、腸内に生息する細菌に由来する毒素に対するTh17免疫反応によって大腸癌が発生すると報告されており、胃に共生すると知られているヘリコバクターピロリ (Helicobacter pylori) によって慢性胃炎だけでなく胃癌も発生すると知られている。慢性閉塞性肺疾患と肺癌の病因に関連して、同一の原因因子により発生する疾病群であるという仮説が提起されているが、最近、臨床研究では吸煙と関係なく慢性閉塞性肺疾患自体が肺癌発生の重要な危険因子であるという事実がこれを裏付ける。

【 発明の概要 】

40

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

本発明者らは、室内空気には各種細菌などから分泌される細胞外ベシクルが存在し、前記細胞外ベシクルが哺乳動物に吸収されるときに炎症性呼吸器疾患を引き起こすという事実に見出すことにより、これに基づいて本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 1 】

本発明は、室内空気に存在する細胞外ベシクルを含む組成物、及び前記細胞外ベシクルを用いて炎症性呼吸器疾患などを診断、予防、及び/又は治療する方法などを提供しようとする。

【 0 0 1 2 】

50

具体的に、本発明は、室内空気に存在する細胞外ベシクルを動物に投与して呼吸器疾患動物モデルを製造し、前記動物モデルを用いて呼吸器疾患に対する予防又は治療候補薬物をスクリーニングする方法などを提供しようとする。また、本発明は、呼吸器疾患に対する予防用又は治療用ワクチン、呼吸器疾患の原因物質を診断する方法、呼吸器疾患の発生及び悪化を予防するための目的で室内空気中の細胞外ベシクルの活性を抑制し或いは前記細胞外ベシクルを除去する方法、室内空気中の細胞外ベシクルの濃度を測定し、呼吸器疾患の発生に関連した室内空気の質を評価する方法などを提供しようとする。

【0013】

ところが、本発明が解決しようとする技術的課題は上述した課題に制限されず、上述していない他の課題は下記の記載から当業者に明確に理解できるであろう。

10

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明の一側面は、室内空気由来細胞外ベシクルを含む組成物を提供する。

【0015】

前記本発明の一具現例によれば、前記細胞外ベシクルは、室内粉塵、イエダニ、カビ、ゴキブリ、ペットの分泌物、ヒトのフケ、花粉などに由来することができるが、これに限定されるものではない。

【0016】

前記本発明の他の具現例によれば、前記細胞外ベシクルは室内空気に存在する細菌から分泌でき、前記細菌は室内粉塵、イエダニ、カビ、ゴキブリ、ペットの分泌物、植物、ヒトのフケで生息する細菌であってもよいが、これに限定されるものではない。

20

【0017】

前記本発明の別の具現例によれば、前記細胞外ベシクルは、2種以上の細菌から分泌された細胞外ベシクルの混合物であってもよい。

【0018】

前記本発明の別の具現例によれば、前記細菌はスタフィロコッカス(*Staphylococcus*)、マイクロコッカス(*Micrococcus*)、エンテロコッカス(*Enterococcus*)、シュードモナス(*Pseudomonas*)、ストレプトミセテス(*Streptomyces*)、及びコリネバクテリウム(*Corinebacterium*)を含む。

【0019】

前記本発明の別の具現例によれば、前記細菌は黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、スタフィロコッカス・ホミニス(*Staphylococcus hominis*)、マイクロコッカス・ライレ(*Micrococcus lylae*)、大便連鎖球菌(*Enterococcus faecalis*)、シュードモナス・スタツェリ(*Pseudomonas stutzeri*)、シュードモナス・ルテオラ(*Pseudomonas luteola*)、及び大腸菌(*Escherichia coli*)を含む。

30

【0020】

前記本発明の別の具現例によれば、前記細胞外ベシクルは、室内空気に存在するカビから分泌されるものを含む。前記カビから分泌される細胞外ベシクルは、室内粉塵に生息するカビから分泌されるものであってもよい。

【0021】

前記本発明の別の具現例によれば、前記細菌又はカビ由来細胞外ベシクルは細菌又はカビ培養液から分離したものであってもよく、前記細胞外ベシクルは細菌又はカビ培養液から自然に分泌されるもの及び人工的に分泌されるものを含む。

40

【0022】

本発明の別の側面は、室内空気由来細胞外ベシクルを動物に投与して製造された疾病モデルを提供する。

【0023】

前記本発明の細胞外ベシクルは前述と同じである。

【0024】

前記本発明の一具現例によれば、前記動物モデルはマウスであってもよいが、これに限

50

定されるものではない。

【0025】

前記本発明の疾病は鼻炎、副鼻腔炎、鼻咽頭癌、喘息、気管支炎、慢性閉塞性肺疾患、細気管支炎、肺炎、及び肺癌などを含む。

【0026】

前記本発明の投与は鼻腔投与、口腔投与、及び気管 (trachea) 投与を含む。

【0027】

本発明の別の側面は、室内空気由来細胞外ベシクルを用いて疾病予防又は治療候補薬物を探索する方法を提供する。

【0028】

前記本発明の細胞外ベシクルは前述と同じである。

【0029】

前記本発明の疾病は、室内空気に存在する細胞外ベシクルにより発生又は悪化する、鼻炎、副鼻腔炎、鼻咽頭癌、気管支炎、喘息、慢性閉塞性肺疾患、細気管支炎、肺炎、及び肺癌などを含む。

【0030】

前記本発明の一具現例によれば、前記探索方法は、前記本発明の動物疾病モデルに候補薬物を投与することを特徴とする。

【0031】

前記本発明の他の具現例によれば、前記探索方法は、室内空気由来細胞外ベシクルを体外で細胞に処理するとき候補薬物を処理することを特徴とする。前記細胞は炎症細胞、上皮細胞、及び線維芽細胞などを含む。

【0032】

前記本発明の別の具現例によれば、前記探索方法は、室内空気に存在する細胞外ベシクルと共に候補薬物を投与した後、炎症関連媒介体の水準を測定するものであってもよいが、これに限定されるものではない。

【0033】

本発明の別の側面は、疾病を予防又は治療するために室内空気由来細胞外ベシクルを含むワクチンを提供する。

【0034】

前記本発明の細胞外ベシクルは前述と同じである。

【0035】

前記本発明の疾病は、室内空気に存在する細胞外ベシクルによる鼻炎、副鼻腔炎、鼻咽頭癌、喘息、慢性閉塞性肺疾患、気管支炎、気管支拡張症、細気管支炎、肺炎、肺癌などを含む。

【0036】

前記本発明の一具現例によれば、前記疾病は、室内空気に存在する細菌又はカビによる副鼻腔炎、気管支拡張症、肺炎などを含む。

【0037】

前記本発明の他の具現例によれば、前記細胞外ベシクルは、効能を増加させるか副作用を減少させる目的で形質転換された細菌又はカビに由来するものを使用することができるが、これに限定されるものではない。

【0038】

前記本発明の別の具現例によれば、前記細胞外ベシクルは、効能を増加させるか副作用を減少させるために化学物質が処理された細菌又はカビに由来するものを使用することができるが、これに限定されるものではない。

【0039】

前記本発明の別の具現例によれば、前記細胞外ベシクルは、効能を増加させるか副作用を減少させる目的で化学物質が処理されたものを使用することができるが、これに限定されるものではない。

10

20

30

40

50

【0040】

前記本発明の別の具現例によれば、前記細胞外ベシクルは、効能を増加させるか副作用を減少させる目的で薬物を併用投与して使用することができるが、これに限定されるものではない。

【0041】

本発明の別の側面は、室内空気由来細胞外ベシクルを含む感染予防又は治療用ワクチンを提供する。

【0042】

前記本発明の細胞外ベシクルは前述と同じである。

【0043】

前記本発明の感染は、室内空気に存在する細菌又はカビによる感染を含み、例えば、病院の室内空気に存在する細菌又はカビによる感染を挙げることができる。

【0044】

前記本発明の一具現例によれば、前記感染は、細菌又はカビによる副鼻腔炎、気管支炎、気管支拡張症、肺炎及び敗血症などを含む。

【0045】

前記本発明の他の具現例によれば、前記細胞外ベシクルは、効能を増加させるか副作用を減少させる目的で形質転換された細菌又はカビに由来するものを使用することができるが、これに限定されるものではない。

【0046】

前記本発明の別の具現例によれば、前記細胞外ベシクルは、効能を増加させるか副作用を減少させるために化学物質が処理された細菌又はカビに由来するものを使用することができるが、これに限定されるものではない。

【0047】

前記本発明の別の具現例によれば、前記細胞外ベシクルは、効能を増加させるか副作用を減少させるために化学物質が処理されたものを使用することができるが、これに限定されるものではない。

【0048】

前記本発明の別の具現例によれば、前記細胞外ベシクルは、効能を増加させるか副作用を減少させる目的で薬物を併用投与して使用することができるが、これに限定されるものではない。

【0049】

本発明の別の側面は、室内空気由来細胞外ベシクルを用いて、前記細胞外ベシクルによる疾病の発生又は悪化に関連した原因因子を診断する方法を提供する。

【0050】

本発明の別の側面は、室内空気由来細胞外ベシクルを用いて、室内空気に存在する細菌又はカビによる感染の発生又は悪化に関連した原因因子を診断する方法を提供する。

【0051】

前記本発明の細胞外ベシクルは前述と同じである。

【0052】

前記本発明の細胞外ベシクルによる疾病は、室内空気に存在する細胞外ベシクルによる鼻炎、副鼻腔炎、鼻咽頭癌、喘息、慢性閉塞性肺疾患、気管支炎、気管支拡張症、細気管支炎、肺炎、及び肺癌などを含む。

【0053】

前記本発明の一具現例によれば、前記疾病は、室内空気に存在する細菌又はカビによる副鼻腔炎、気管支拡張症、及び肺炎などを含む。

【0054】

前記細菌又はカビによる感染は、副鼻腔炎、喘息、慢性閉塞性肺疾患、気管支拡張症、肺炎、及び敗血症などを含む。

【0055】

10

20

30

40

50

前記本発明の別の具現例によれば、前記診断方法は、室内空気に存在する細胞外ベシクルに含まれた遺伝物質の塩基配列を分析することであってもよいが、これに限定されるものではない。前記遺伝物質は 16S rRNA であってもよいが、これに限定されるものではない。

【0056】

前記本発明の別の具現例によれば、前記診断方法は、室内空気に存在する細胞外ベシクルに含まれたタンパク質を測定することであってもよいが、これに限定されるものではない。

【0057】

前記本発明の別の具現例によれば、前記診断方法は、室内空気に存在する細胞外ベシクルに対する免疫反応を測定することであってもよいが、これに限定されるものではない。前記免疫反応の測定は、室内空気に存在する細胞外ベシクルに対する抗体を測定することであってもよいが、これに限定されるものではない。

10

【0058】

前記本発明の診断は室内粉塵を用いて行われてもよい。また、前記診断は、喀痰に由来する試料、胸水に由来する試料、鼻水に由来する試料、小便に由来する試料、及び血液に由来する試料などを用いて行われてもよい。

【0059】

本発明の別の側面は、疾病の発生及び悪化を予防する目的で室内空気中の細胞外ベシクルの活性を抑制し或いは前記細胞外ベシクルを除去する方法を提供する。

20

【0060】

前記本発明の疾病は、室内空気に存在する細胞外ベシクルによる鼻炎、副鼻腔炎、鼻咽頭癌、喘息、慢性閉塞性肺疾患、気管支炎、気管支拡張症、細気管支炎、肺炎、及び肺癌などを含む。

【0061】

前記細胞外ベシクルの活性の除去は、細胞外ベシクルに熱を処理し、或いは細胞外ベシクルに特異的に作用する化学物質を処理して行われてもよいが、これに限定されるものではない。前記化学物質は、細胞外ベシクル内のタンパク質、LPS (lipopolysaccharide)、ペプチドグリカンの活性を抑制する物質などを含み、前記LPS活性抑制化学物質はポリミキシンB (polymyxin B) であってもよい。

30

【0062】

前記本発明の一具現例として、前記細胞外ベシクルの活性を除去する装置を用いることができる。前記装置は、前記細胞外ベシクルに熱を処理し、或いは細胞外ベシクルに特異的に作用する化学物質を処理する方法などを用いることができるが、これに限定されるものではない。

【0063】

前記本発明の他の具現例として、前記細胞外ベシクルを除去する装置を用いてもよい。前記装置は、微細フィルターを含むことができ、10nm ~ 200nmの孔径(pore size)を有してもよいが、これに限定されるものではない。

【0064】

本発明の別の側面は、呼吸器疾患の発生又は悪化に関連した室内空気の質を評価する方法であって、室内空気中の細胞外ベシクルの濃度を測定することを特徴とする方法を提供する。

40

【0065】

前記本発明の一具現例として、前記細胞外ベシクルの濃度測定は、細胞外ベシクルの遺伝物質を測定することにより行われてもよく、前記遺伝物質は 16S rRNA であってもよい。

【0066】

前記本発明の他の具現例として、前記細胞外ベシクルの濃度測定は、細胞外ベシクルのタンパク質を測定することにより行われてもよい。

50

【 0 0 6 7 】

前記本発明の別の具現例として、前記細胞外ベシクルの濃度測定は、顕微鏡で細胞外ベシクルの数を測定することにより行われてもよく、前記顕微鏡で高解像度光学顕微鏡又は電子顕微鏡を用いてもよい。

【 0 0 6 8 】

本発明の別の側面は、室内空気由来細胞外ベシクルを哺乳動物に投与することを含む、疾病を予防又は治療する方法を提供する。

【 0 0 6 9 】

前記本発明の細胞外ベシクルは前述と同じである。

【 0 0 7 0 】

前記本発明の疾病は、室内空気に存在する細胞外ベシクルによる鼻炎、副鼻腔炎、鼻咽頭癌、喘息、慢性閉塞性肺疾患、気管支炎、気管支拡張症、細気管支炎、肺炎、及び肺癌などを含む。

【 0 0 7 1 】

前記本発明の一具現例によれば、前記疾病は、室内空気に存在する細菌又はカビによる副鼻腔炎、気管支拡張症、肺炎、及び敗血症などを含む。

【 0 0 7 2 】

前記本発明の投与は皮下注射及び粘膜投与などを含む。

【 発明の効果 】

【 0 0 7 3 】

本発明者らは、室内空気中に細菌等由来の細胞外ベシクルが存在し、前記細胞外ベシクル（特に、グラム陰性細菌由来細胞外ベシクル）が吸入されたとき、肺にTh17及び/又はTh1免疫反応を誘導し、これにより好中球性肺炎症が発生して重症喘息と慢性閉塞性肺疾患などの呼吸器疾患が発生するという事実を発見し、これに基づいて本発明を完成した。したがって、本発明の室内空気由来細胞外ベシクルを応用して次の多様な効果を得ることが可能である。

【 0 0 7 4 】

具体的に、本発明は、室内空気に存在する細胞外ベシクルを動物に投与して呼吸器疾患動物モデルを製造し、前記動物モデルを用いて呼吸器疾患に対する予防又は治療候補薬物を検索及び発掘することを可能とする。すなわち、疾病を予防又は治療する薬物を開発するためには、正確な原因物質を把握することが極めて重要である。例えば、原因物質を体外で細胞に投与する過程で候補薬物を処理して効能を検証することができ、前記動物モデルに候補薬物を投与して効能を検証することができる。したがって、本発明は、室内空気に存在する細胞外ベシクルによる疾病を予防又は治療する薬物を開発するために、室内空気に存在する細胞外ベシクルを用いた体外スクリーニングシステム及び/又は動物モデルを介して、室内空気に存在する細胞外ベシクルにより発生する呼吸器疾患を予防又は治療するための薬物を効率よく発掘することができる。

【 0 0 7 5 】

また、本発明は、重症喘息、慢性閉塞性肺疾患、肺癌などの呼吸器疾患の原因因子を正確に診断することを可能とする。すなわち、室内空気に存在する細胞外ベシクルの遺伝物質の塩基配列分析、タンパク質分析、又は免疫反応の測定によって呼吸器疾患の原因因子を診断する方法への応用が可能である。

【 0 0 7 6 】

疾病の原因因子を正確に把握することは、疾病を予防又は治療することが可能なワクチンの開発に必須的である。ウイルス性感染疾患の場合は、原因ウイルスを弱毒化した形で体内に投与することにより、ウイルスに対する免疫反応を誘導して予防ワクチンを開発して使用しており、現在、ウイルスにより発生する疾患を予防ワクチンで効率よく予防することができた。本発明は、室内空気に存在する細胞外ベシクルが呼吸器疾患の原因因子であるという事実により、細胞外ベシクルを応用して体内で起きる免疫反応を調節することにより効率的なワクチンの開発を可能とする。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 7 】

また、本発明は、室内空気に存在する細胞外ベシクルが呼吸器疾患の原因因子であるという事実を通じて、室内空気に存在する細胞外ベシクルの濃度を測定することにより、呼吸器疾患の発生又は悪化に関連した室内空気の質を評価することを可能とする。これに加えて、熱処理又は化学物質の処理が可能な空気浄化装置などによって室内空気中の細胞外ベシクルの活性を抑制し或いは病原性細胞外ベシクルを除去することにより、呼吸器疾患の発生及び悪化を予防又は治療することを可能とする。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 7 8 】

【 図 1 】 採集した室内粉塵から細胞外ベシクルを分離する過程を示す図である。 10

【 図 2 】 室内粉塵から分離した細胞外ベシクルの形状とサイズを透過電子顕微鏡 (transmission electron microscope、TEM) で分析した結果を示す図である。

【 図 3 】 室内粉塵をマウスの鼻腔内に投与して炎症性呼吸器疾患 (肺炎症) を誘導する過程を示す図である。

【 図 4 】 室内粉塵をマウスの鼻腔内に投与したときの気管支肺胞洗浄液 (BAL fluid) における炎症細胞の数を測定した結果である。

【 図 5 】 室内粉塵をマウスの鼻腔内に投与して炎症性呼吸器疾患 (肺炎症) を誘導したときに、肺組織から CD4 + T 細胞におけるサイトカインの発現を細胞内サイトカイン染色 (intracellular cytokine staining) で測定した結果である。

【 図 6 】 マウスマクロファージに、室内粉塵から分離した細胞外ベシクル (Dust - EV) と水溶性成分 (Dust - soluble) を処理し、分泌されたサイトカインの量を ELISA 法で測定した結果である。 20

【 図 7 】 マウスマクロファージに、室内粉塵から分離した細胞外ベシクル (Dust - EV) を処理したとき、細胞外ベシクルを投与する用量が増加するにつれて TNF - と IL - 6 の分微量が増加することを示す結果である。

【 図 8 】 室内空気に存在する細胞外ベシクル (Dust - EV) にポリミキシン B (PMB) 又は熱 (heat) 処理した後、マウスマクロファージに投与したときに TNF - と IL - 6 の分泌量を測定した結果である。

【 図 9 】 室内空気に存在する細胞外ベシクル (Dust - EV) による *in vivo* 先天免疫反応を評価するためのプロトコルである。 30

【 図 10 】 図 9 のプロトコルに従い、室内空気に存在する細胞外ベシクル (Dust - EV) による *in vivo* 先天免疫反応を評価するために、肺炎症の指標である気管支肺胞洗浄液 (BAL fluid) における炎症細胞の数を測定した結果である。

【 図 11 】 室内空気に存在する細胞外ベシクル (Dust - EV) を反復的に投与して誘導した *in vivo* 後天免疫反応及びその結果により発生する肺炎症の発生に対する細胞外ベシクル及びベシクル内 LPS の役目を評価するためのプロトコルである。

【 図 12 】 図 11 のプロトコルに従い、室内空気に存在する細胞外ベシクル (Dust - EV) 及びベシクルへのポリミキシン (Polymyxin B、PBM) 処理による肺炎症の発生を評価したものであって、肺炎症の指標である気管支肺胞洗浄液 (BAL fluid) における炎症細胞の数を示すものである。 40

【 図 13 】 図 11 のプロトコルに従い、室内空気に存在する細胞外ベシクル (Dust - EV) 及びベシクルへのポリミキシン (Polymyxin B、PBM) 処理による後天免疫反応を評価するために、局所リンパ節から免疫細胞を分離して免疫細胞における IFN - と IL - 17 の発現様相を細胞内サイトカイン染色 (intracellular cytokine staining) で評価した結果を示すものである。

【 図 14 】 図 11 のプロトコルに従い、室内空気に存在する細胞外ベシクル (Dust - EV) 及びベシクルにポリミキシン B (Polymyxin B、PMB) 処理を施したとき、室内粉塵から分離したベシクルに対する血清内特異抗体を ELISA 法で測定した結果である。

【 図 15 】 室内粉塵から分離した細胞外ベシクル (Dust - EV) に大腸菌の 16Sr 50

R N A 及び大腸菌由来ベシクル (E . c o l i - O M V) 特異抗体に反応するタンパク質が存在することを示す結果である。

【図 1 6】大腸菌由来細胞外ベシクルの 1 回鼻腔投与の際に炎症性サイトカインの分泌を気管支肺胞洗浄液 (B A L f l u i d) で測定した結果である。

【図 1 7】大腸菌由来ベシクル (E C - E V) を 3 週間反復投与したときに発生する肺炎症を評価するためのプロトコルである。

【図 1 8】大腸菌由来ベシクル (E C - E V) を反復投与したときの、肺炎症の指標である気管支肺胞洗浄液 (B A L f l u i d) における炎症細胞の数を示すものである。

【図 1 9】高用量の大腸菌由来細胞外ベシクル (E C - E V) を 4 週間反復投与したときの組織学的変化を評価するためのプロトコルである。

【図 2 0】図 1 9 のプロトコルに従い、大腸菌由来ベシクル (E C - E V) 投与の際に肺組織に、肺胞の破壊を特徴とする肺気腫が発生することを示す結果である。

【図 2 1】イエダニに存在する細胞外ベシクルを分離するためのプロトコルである。

【図 2 2】イエダニから分離した細胞外ベシクルの形状とサイズを透過電子顕微鏡 (t r a n s m i s s i o n e l e c t r o n m i c r o s c o p e 、 T E M) と動的光散乱法 (d y n a m i c l i g h t s c a t t e r i n g 、 D L S) で分析した結果を示すものである。

【図 2 3】マウスマクロファージにイエダニ由来細胞外ベシクル (H D M - E V) 処理を施したときのサイトカインの量を測定した結果である。

【図 2 4】イエダニ由来細胞外細胞外ベシクル (H D M - E V) による *i n v i v o* 先天免疫反応を評価するために、肺炎症の指標である気管支肺胞洗浄液 (B A L f l u i d) における炎症細胞の数を示す図である。

【図 2 5】イエダニ由来細胞外ベシクル (H D M - E V) による *i n v i v o* 先天免疫反応を評価するために、気管支肺胞洗浄液 (B A L f l u i d) におけるサイトカインの生成を測定した結果である。

【図 2 6】イエダニ由来細胞外ベシクル (H D M - E V) による *i n v i v o* 後天免疫反応を評価するために、肺炎症の指標である気管支肺胞洗浄液 (B A L f l u i d) における炎症細胞の数を示す図である。

【図 2 7】イエダニ由来細胞外ベシクル (H D M - E V) による *i n v i v o* 後天免疫反応を評価するために、気管支肺胞洗浄液における、T h 1 7 細胞から分泌される I L - 1 7 の生成を測定した結果である。

【図 2 8】室内粉塵で細菌とカビを培養した結果を示すものである。

【図 2 9】室内粉塵に生息する細菌を分離して同定するための過程を示すものである。

【図 3 0】ブドウ球菌由来細胞外ベシクル (S - E V) 及び熱処理したベシクルによる *i n v i t r o* 先天免疫反応を評価するために、マウスマクロファージに前記細胞外ベシクルを投与したときの T N F - と I L - 6 を測定した結果を示すものである。

【図 3 1】ブドウ球菌由来細胞外ベシクルによる *i n v i v o* 先天免疫反応を評価するためのプロトコルを示すものである。

【図 3 2】図 3 0 のプロトコルに従い、ブドウ球菌由来細胞外ベシクル (S - E V) を鼻腔内に投与し、気管支肺胞洗浄液 (B A L f l u i d) における炎症細胞の数を測定した結果である。

【図 3 3】図 3 0 のプロトコルに従い、ブドウ球菌由来細胞外ベシクル (S - E V) による I L - 6 の分泌を気管支肺胞洗浄液 (B A L f l u i d) で測定した結果である。

【図 3 4】ブドウ球菌由来細胞外ベシクルによる免疫反応の発生に対する、ベシクル内タンパク質又は熱に抵抗する成分の役割を評価するためのプロトコルを示すものである。

【図 3 5】図 3 3 のプロトコルに従い、ブドウ球菌由来細胞外ベシクル (S - E V) に熱処理を施した後、鼻腔投与したときに、気管支肺胞洗浄液における炎症細胞の数を測定した結果である。

【図 3 6】図 3 3 のプロトコルに従い、ブドウ球菌由来細胞外ベシクル (S - E V) に熱処理を施した後、鼻腔投与したときに、気管支肺胞洗浄液における I L - 6 の量を E L I S A 法によって測定した結果である。

10

20

30

40

50

【図37】大腸菌由来細胞外ベシクル(EC__EV) 1 μ g を1週間隔で3回腹腔投与する過程でマウス血液内のベシクル特異抗体の量を測定して示すグラフである。

【図38】大腸菌由来細胞外ベシクル(EC__EV) ワクチンを投与したマウスの脾臓細胞に体外で大腸菌由来細胞外ベシクルを処理したときに分泌される IFN - の量を示すグラフである。

【図39】大腸菌由来細胞外ベシクル(EC__EV) ワクチンを投与したマウスの脾臓細胞に体外で大腸菌由来細胞外ベシクルを処理したときに分泌される IL - 17 の量を示すグラフである。

【図40】大腸菌(EC) 感染による敗血症モデルのマウス致死率を示す結果である。

【図41】大腸菌(EC) 腹腔投与による敗血症モデルにおける、敗血症による致死率に対する大腸菌由来細胞外ベシクル(EC__EV) ワクチンの効能を示すグラフである。

【図42】大腸菌(EC) 腹腔投与による敗血症モデルにおける、大腸菌由来細胞外ベシクル(EC__EV) の接種有無による血液内大腸菌数(CFU) を示すグラフである。

【図43】大腸菌由来細胞外ベシクル(EC__EV) を接種したマウスに高用量の大腸菌由来細胞外ベシクル(5 μ g) を反復的に(3回) 腹腔投与し、6時間後にマウスの血清における IL - 6 を測定した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0079】

室内空気に存在する有害物質を吸入したとき、呼吸器疾患が発生する。アレルギー反応は、免疫学的過敏反応を特徴とし、タンパク質を単独で吸入したときに免疫寛容が誘導されるが、先天免疫反応によりタンパク質に対する免疫寛容の代わりに免疫反応を誘導する物質がタンパク質と共に吸入されたときに、タンパク質に対する記憶を特徴とする後天免疫反応(感作) が発生する。タンパク質に対する感作が誘導されると、低い濃度のタンパク質が吸入されても、タンパク質に対する免疫反応で炎症を誘発する可能性がある。室内空気に存在する有害物質のうち、気体の場合には気体自体の毒性により炎症が誘導されるが、後天免疫反応による炎症を誘導しない。これに対し、室内空気に存在する生物学的汚染物質は先天免疫反応を誘導する物質とタンパク質を共に持っており、先天免疫反応と後天免疫反応を同時に誘導することができるという特徴がある。ところが、未だ室内空気に細菌等由来の細胞外ベシクルが存在し、或いは室内空気に存在する細胞外ベシクルが呼吸器疾患の原因物質であるという事実が報告されたことがない。本発明者らは、室内空気中に細菌等由来の細胞外ベシクルが存在し、これを吸入したときに呼吸器疾患が誘導されるという事実を最初に解明し、本発明を完成するに至った。

【0080】

一方、炎症は好酸球の浸潤有無によって好酸球性炎症と非好酸球性(又は好中球性) 炎症に区別することができる。慢性炎症はタンパク質に対する過敏反応(後天免疫反応) を特徴とする免疫機能の異常により発生し、好酸球性炎症はタンパク質に対する Th 2 免疫反応の結果として発生し、好中球性炎症は Th 1 7 及び / 又は Th 1 免疫反応の結果として発生する。

【0081】

本発明者らは、室内粉塵を吸入したときに好中球性炎症が誘導され、室内粉塵に存在する成分の中でも細胞外ベシクルが好中球性炎症を引き起こす主要原因因子であり、細胞外ベシクルの活性が、グラム陰性細菌に由来する内毒素(エンドトキシン(endotoxin) 又は L P S (lipopolysaccharide)) の活性を拮抗する薬物(ポリミキシン B (Polymyxin B)) を処理したときに抑制されるという事実に基づいて、室内空気に存在するグラム陰性細菌由来細胞外ベシクルが、好中球性炎症反応を特徴とする呼吸器疾患を引き起こす原因物質であるという事実を最初に解明した。

【0082】

好中球性肺炎は、非可逆的気道閉塞を伴う重症喘息と慢性閉塞性肺疾患の発生に重要な病態生理である。喫煙を問わず、好中球性炎症を特徴とする慢性閉塞性肺疾患は、肺癌発生の重要な危険因子であって、実際に慢性閉塞性肺疾患の1/3は肺癌で死亡する。

また、Th 17免疫反応及びこれによる好中球性炎症により大腸癌が発生するという動物実験結果が最近報告された。これは肺に発生するTh 17免疫反応及び/又は好中球性炎症は重症喘息と慢性閉塞性肺疾患の病因に重要であるうえ、肺癌の発生にも密接な関連があることを意味する。

【0083】

本発明は、室内空気由来細胞外ベシクルを含む組成物、及び前記細胞外ベシクルを用いて炎症性呼吸器疾患などを診断、予防、及び/又は治療する方法などを提供する。

【0084】

本発明において、「室内」とは建築物 (buildings) を含む構造物 (structures) の内部と周辺を含む意味であり、「室内空気」とは室内粉塵だけでなく、室内に生息するイエダニ、ゴキブリ、ペット、植物、ヒトなどから分泌される物質を含む意味である。

10

【0085】

本発明において、「室内空気由来細胞外ベシクル」とは、建築物を含む構造物の内部と周辺にある空気中存在する細胞外ベシクルを含む意味であり、たとえば、室内空気由来細胞外ベシクルは、室内空気に生息する細菌から分泌された細胞外ベシクル、及び室内に生息するイエダニ、ゴキブリ、ペット、植物、ヒトなどに存在する細菌が分泌して室内空気に存在する細胞外ベシクルを含み、サイズが元来の細胞より小さいことを特徴とするが、これに限定されるものではない。

【0086】

室内空気には様々な細菌とカビが生息するうえ、ヒト、ペット、イエダニ、ゴキブリなどを含む多様な生命体の皮膚、消火器、呼吸器などに生息している多種の細菌及びカビとともに、建築物を含む構造物の内部と周辺に生息する或いは流入した多様な種類の細菌とカビが存在する。室内、特に寝台マットレスやカーペットなどには多量の粉塵が存在し、粉塵には多様な細菌とカビが生息するうえ、イエダニなどの動物から分泌される物質が存在する。真空掃除機を用いて室内粉塵を得た後、ガーゼを用いて髪の毛などの大きい物質を除去してから培養する。この際、室内粉塵で多数のカビと細菌が培養された。また、サイズの大きい物質を除去した室内粉塵を生理食塩水 (phosphate buffer saline、PBS) に溶かした後、多数回の遠心分離過程を経て細胞外ベシクルを抽出した。透過電子顕微鏡写真を介して、室内空気から分離した細胞外ベシクルはサイズ50~100nmの球状であることを確認した。

20

30

【0087】

また、室内に在る粉塵が炎症性呼吸器疾患を発生させるかを評価するために、C57BL/6マウスに粉塵を3週間鼻腔投与した。粉塵を最後に鼻腔投与してから24時間経過の後に評価したとき、マウスの気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid、BALF) における炎症細胞の数が増加し、特に好中球の数が著しく増加することが観察された。前記結果により、室内に在る粉塵が、好中球の浸潤を特徴とする炎症性呼吸器疾患 (肺炎症) を誘導することを確認した。

【0088】

前記呼吸器疾患を引き起こす免疫学的メカニズムを評価するために、T細胞に発現するサイトカインをフローサイトメトリー (Flow cytometry) 方法で評価した。T細胞による後天免疫反応は、IFN- γ を分泌するTh 1細胞による免疫反応、IL-4、IL-5、IL-13などを分泌するTh 2細胞による免疫反応、及びIL-17を分泌するTh 17細胞による免疫反応に分けることができる。粉塵により発生した好中球性肺炎症は、主にIL-17を生成するCD4+T細胞 (Th 17細胞) とIFN- γ を分泌するTh 1細胞によって媒介される炎症反応であることが分かった。Th 1及びTh 17免疫反応は気道及び肺実質に好中球性炎症を特徴とする炎症性呼吸器疾患 (喘息、慢性閉塞性肺疾患、気管支拡張症、肺炎など) 及び肺癌の発生に重要な役割を果たすが、特にTh 1炎症は肺気腫の発生に重要であり、Th 17炎症は肺癌の発生に重要であると知られている。

40

【0089】

室内粉塵による炎症反応の誘導と関連して、室内粉塵中存在する細胞外ベシクルと水溶

50

性成分の役割を評価するために、マウスマクロファージ (RAW 264.7) に、粉塵から分離した細胞外ベシクルと水溶性因子を投与したとき、TNF- α の分泌はいずれにおいても増加したが、IL-6 の分泌は主に細胞外ベシクルを投与した場合に増加した。これは、IL-6 を基とした免疫反応及び炎症の発生に、室内空気に存在する細胞外ベシクルが重要であることを意味する。

【0090】

室内空気に存在する細胞外ベシクルは、室内空気に生息している細菌又はヒト、ペット、イエダニ、ゴキブリなどを含む多様な生命体に生息し、或いは建築物を含む構造物の内部と周辺に生息する多様な種類の細菌によって分泌できる。このような細胞外ベシクルは、細菌タンパク質、LPS、ペプチドグリカンなどの物質を持っており、炎症反応を誘導することができる。

10

【0091】

室内空気に存在する細胞外ベシクルによる *in vitro* 先天免疫反応を評価するために、マウスマクロファージ (RAW 264.7) に、室内粉塵から分離した細胞外ベシクルを処理した。マクロファージは、炎症を誘導することが可能な TNF- α 及び IL-6 などを分泌し、前記細胞外ベシクル処理の際に TNF- α 及び IL-6 の量が細胞外ベシクルの用量に比例して増加することが分かった。

【0092】

IL (interleukin) - 6 は、炎症反応の際に初期に分泌される炎症性サイトカインであって、初期炎症反応の尺度の役割を果たし、Th 17 細胞免疫反応によって好中球性炎症を誘導することに重要な媒介体として知られている。また、IL-6 は、体内細胞で STAT3 シグナリング (signaling) を増加させて肺細胞の増殖、血管新生、免疫反応抑制などを介して肺癌の発生と関連しているだけでなく、抗原に対する T 細胞の後天免疫反応の発生において naive T 細胞が Th 17 細胞に分化することに重要な役割を果たす。

20

【0093】

したがって、室内空気に存在する細胞外ベシクルがマクロファージで IL-6 の量を増加させるという事実は、前記細胞外ベシクルが炎症反応を誘導して喘息、慢性閉塞性肺疾患、気管支拡張症、肺炎などの炎症性呼吸器疾患だけでなく、肺癌などを発生させることができることを意味する。

【0094】

前述したように、室内空気に存在する細胞外ベシクルは、炎症反応を誘導しうる様々なタンパク質と LPS などの物質を含むことができるので、室内空気に存在する細胞外ベシクルにより誘導される炎症反応における前記物質の役割を評価した。

30

【0095】

ポリミキシン B (Polymyxin B) は、LPS の作用基であるリポド A (lipid A) に反応して LPS の機能を抑制する役割を果たす。これに基づいて、マウスマクロファージに、粉塵から分離した細胞外ベシクルとポリミキシン B (Polymyxin B) を共に処理したとき、細胞外ベシクルにより誘導される IL-6 及び TNF- α の分泌が阻害されたが、これはグラム陰性細菌に由来する細胞外ベシクルが前記媒介体を分泌することに重要であることを意味する。

40

【0096】

一方、細胞外ベシクルには様々なタンパク質が存在するが、ベシクルに存在するタンパク質の役割を評価するために、100℃ で 20 分間加熱した細胞外ベシクルをマウスマクロファージに処理した。前記ベシクルに熱処理を施した場合、TNF (Tumor necrosis factor)- α の分泌は減少したが、IL-6 の分泌はむしろ増加した。これは TNF- α の分泌にはベシクル内タンパク質が重要であるが、IL-6 の分泌には熱に耐性を有するベシクル成分が重要であることを意味する。

【0097】

また、室内空気から分離した細胞外ベシクルを実験動物に投与して呼吸器疾患の動物モデルを製造することができる。これに関連して、粉塵から分離した細胞外ベシクルをマウ

50

スに投与して肺炎症の発生及びIL-6の分泌に対する影響を評価した。多様な濃度の細胞外ベシクルをマウスの気道に投与したとき、濃度に応じて炎症細胞の流入が増加することを確認した。細胞外ベシクルを投与したマウスにおけるIL-6の生成量が増加した。前記結果は、*in vitro*実験でベシクルによって炎症細胞からのIL-6の分泌が増加する現象が*in vivo*システムにおいても再現されることを意味する。

【0098】

室内粉塵から分離した細胞外ベシクルを反復的に投与したとき、炎症性呼吸器疾患の発生有無を評価した。ベシクルを3週間気道に投与したときに好中球性炎症が発生した。これに対し、ポリミキシンB (Polymyxin B) とベシクルを共に投与したときには炎症が顕著に抑制された。これは炎症の発生にグラム陰性細菌由来細胞外ベシクルが重要であることを意味する。

10

【0099】

また、肺炎症の発生に關与する免疫学的病因を評価した結果、粉塵から分離したベシクルを投与した場合には肺組織内IFN- γ 及びIL-17を発現するT細胞が顕著に増加し、ポリミキシンB (Polymyxin B) を前記ベシクルと共に投与した場合には前記細胞の浸潤が顕著に減少した。前記結果は、粉塵に存在する細胞外ベシクルにより発生する好中球性肺炎症がTh1及びTh17免疫反応により誘導され、その発生にはベシクル内のLPS成分が重要な役割を果たすことを意味する。

【0100】

また、室内空気に由来する細胞外ベシクル特異抗体を測定した結果、ベシクルを投与した場合にはベシクル特異IgG1及びIgG2a抗体が有意に増加した。これは、ポリミキシンB (Polymyxin B) をベシクルと共に投与した場合には顕著に減少した。前記結果は室内粉塵に存在する細胞外ベシクルが気道に吸入されたときに血清内ベシクル特異抗体が形成され、その生成にはベシクル内LPS成分が重要な役割を果たすことを意味する。

20

【0101】

大腸菌はグラム陰性細菌として腸内に存在するが、室内粉塵に大腸菌が存在し、大腸菌が細胞外ベシクルを分泌することが報告されたことがある。室内粉塵から分離した細胞外ベシクルに大腸菌由来細胞外ベシクルが存在するかを評価した。大腸菌由来細胞外ベシクルに特異的に存在する16SrRNAに対するプライマー (primer) から遺伝型を分析したとき、陽性所見を示した。また、大腸菌由来細胞外ベシクルに対する抗体を作り、これを用いて、粉塵から分離した細胞外ベシクルタンパク質に対するウエスタンブロット (Western Blot) を施行したとき、粉塵から分離した細胞外ベシクル内タンパク質が大腸菌由来細胞外ベシクル特異抗体と結合した。前記結果は、室内粉塵には大腸菌由来細胞外ベシクルが存在することを意味する。大腸菌は、主に大腸に生息する菌であって、イエダニ、ゴキブリ、ペット、ヒトなどの腸に生息しながら持続的に細胞外ベシクルを分泌する。これはイエダニなどが大便を介して大腸菌由来細胞外ベシクルを持続的に分泌することを意味する。

30

【0102】

大腸菌由来細胞外ベシクルを1回気道内に投与して炎症媒介体の分泌を体内で評価したとき、細胞外ベシクルの投与用量に比例してTNF- α とIL-6の分泌が増加した。

40

【0103】

大腸菌由来細胞外ベシクルを反復的に投与したときに炎症性呼吸器疾患が発生するかを評価するために、週2回3週間鼻腔投与したとき、気管支肺胞洗浄液における炎症細胞の数が大腸菌由来細胞外ベシクルの投与用量に依存的に増加した。

【0104】

前記の方法で高用量 (100 ng) の細胞外ベシクルを4週間反復投与して肺気腫の発生を評価したとき、細胞外ベシクルを投与した場合に肺気腫が発生した。これは室内粉塵に大腸菌由来細胞外ベシクルのような病原性ベシクルが高濃度で存在してこれを吸入したとき、非可逆的気道閉塞をもたらす肺気腫が誘導されることを意味する。

【0105】

50

室内粉塵由来細胞外ベシクルは、粉塵に存在する様々な細菌により生成されてもよく、室内空気に存在するイエダニ、ゴキブリ、ヒト、ベッドなどを含む多様な生命体に生息する細菌が細胞外ベシクルを分泌することができる。

【0106】

本発明者らは、室内粉塵に生息するイエダニから細胞外ベシクルを分離した。イエダニ由来細胞外ベシクルによる *in vitro* 免疫反応を評価するために、細胞外ベシクルをマウスマクロファージに処理した。マクロファージからの TNF - と IL - 6 の分泌がベシクルの濃度に比例して増加した。また、ベシクルにより分泌される前記炎症媒介体は、LPS を拮抗するポリミキシン B (Polymyxin B) の処理によって抑制された。これはイエダニに由来する細胞外ベシクルが呼吸器疾患を誘導することができ、これにはグラム陰性細菌から分泌された細胞外ベシクルが含まれていることを意味する。

10

【0107】

前述したように、イエダニに由来する細胞外ベシクルは *in vitro* 実験で先天免疫反応を誘導することが分かった。これを *in vivo* システムで再現されることを評価するために、イエダニ由来細胞外ベシクルを 1 回マウスの気道に投与して先天免疫反応を評価した。細胞外ベシクルの濃度に依存的に肺への炎症細胞の浸潤が増加した。これと共に、炎症媒介体としての TNF - 及び IL - 6 の分泌も増加した。

【0108】

前記 *in vivo* システムにおける先天免疫反応結果に基づいて、イエダニ由来細胞外ベシクルを反復的に吸入投与したときに肺炎症の発生有無を評価した結果、イエダニ由来細胞外ベシクルを 3 週間投与したときに好中球性肺炎症が誘導され、これと共に IL - 17 の分泌も増加した。

20

【0109】

前記結果より、イエダニに由来する細胞外ベシクルによって好中球性肺炎症が発生し、これは主に Th 17 免疫反応によって媒介される現象であることが分かった。

【0110】

本発明者らは、室内粉塵に生息する細菌を分離し、グラム陽性細菌の存在を同定した。その結果、グラム陽性細菌として黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)、スタフィロコッカス・ホミニス (*Staphylococcus hominis*) などが同定された。

【0111】

ブドウ球菌はグラム陽性細菌である。最近、本発明者らは、細胞外ベシクルを分泌することを最初に報告したことがある。ブドウ球菌由来細胞外ベシクルによる *in vitro* 免疫反応を評価するために、ブドウ球菌由来細胞外ベシクルをマウスマクロファージに処理した。ブドウ球菌由来ベシクルによってマクロファージから TNF - と IL - 6 の分泌が増加した。前記結果は、ブドウ球菌由来細胞外ベシクルが炎症性呼吸器疾患及び肺癌を誘導することができることを示唆する。

30

【0112】

前述したように、ブドウ球菌に由来する細胞外ベシクルは、*in vitro* 実験で先天免疫反応を誘導することを確認した。これは *in vivo* システムで確認するために互いに異なる濃度 (1 μ g、10 μ g) のブドウ球菌由来細胞外ベシクルをマウスの気道内に投与した。細胞外ベシクルの投与量が増加するにつれて、マウスの肺に流入した炎症細胞が増加した。特に、好中球の過度な流入を確認することができた。気管支肺胞洗浄液における IL - 6 の分泌量も細胞外ベシクルの濃度が増加するにつれて増加した。

40

【0113】

前記結果より、ブドウ球菌由来細胞外ベシクルにより肺炎症が発生することが確認された。IL - 6 による Th 17 後天免疫反応との関連性も予想することができる。

【0114】

これに加えて、*in vivo* システムにおけるブドウ球菌由来細胞外ベシクル内タンパク質の役割を確認するために熱処理した細胞外ベシクルをマウスの気道内に投与した。この際、肺癌及びタンパク質特異 Th 17 後天免疫反応を引き起こすことに核心的な役割

50

を果たすIL-6の生成量が全て減少することを確認した。前記結果より、粉塵吸入により発生するTh17免疫反応による肺炎症の発生においてブドウ球菌由来細胞外ベシクル内のタンパク質はIL-6の生成を増加させる役割を果たすことが分かる。

【0115】

疾病の原因因子を解明することは、原因因子を用いた免疫調節を可能とする。本発明者らは、室内空気に存在する大腸菌由来細胞外ベシクルが吸入されたときに炎症性呼吸器疾患が誘発されることを確認した。大腸菌由来細胞外ベシクルを低用量で注射したときに細胞外ベシクル特異抗体が形成され、ベシクルに対する特異T細胞反応でIFN- γ とIL-17を分泌するTh1及びTh17免疫反応が誘導された。よって、大腸菌由来細胞外ベシクルをワクチンとして予め注射した後、大腸菌感染を誘導したときに、大腸菌感染が顕著に抑制された。また、前記ベシクルワクチンを予め投与したとき、大腸菌由来細胞外ベシクルの血管吸収により起こる炎症媒介体の分泌が有意に抑制された。これは細菌由来細胞外ベシクルを注射することにより免疫反応を誘導し、これにより室内空気に存在する細胞外ベシクルによる疾病だけでなく、室内空気に存在する細菌に対する感染を効率よく予防することができることを意味する。

10

【0116】

以下、本発明の理解を助けるために好適な実施例を提示する。ところが、下記の実施例は本発明をより容易に理解するために提供されるものに過ぎず、本発明の内容を限定するものではない。

【実施例】

20

【0117】

実施例1. 室内粉塵からの細胞外ベシクルの抽出及び特性解明

本発明者らは、室内空気に細胞外ベシクルが存在するか否かを確認するために、室内粉塵から細胞外ベシクルを分離、同定する実験を行った。

【0118】

具体的に、真空掃除機を用いて、特定住居地の寝具に存在する粉塵を収去した。真空掃除機のフィルター内に存在する粉塵を綺麗なガラス瓶に移して質量を測定した。室内粉塵5gを200mLのPBS入りのビーカーに4で12時間溶解させた。その後、一次的にガーゼを用いて大きな異物を濾過し、濾過した溶液を高速遠心分離チューブ(high speed centrifuge tube)に分けて入れた後、4で10,000xgにて15分間高速遠心分離(high speed centrifugation)を連続的に2回行った。180mLの上澄液を孔径0.45 μ mのメンブレインフィルター(membrane filter)を1回通過させた後、容量70mLの超遠心分離チューブ(ultracentrifuge tube)に分けて入れ、4で100,000xgにて4時間超遠心分離(ultracentrifugation)を行った。上澄液は捨て、チューブの下に存在する沈殿物はPBSで溶かして細胞外ベシクルを抽出した。

30

【0119】

室内粉塵由来細胞外ベシクルの特性解明のために細胞外ベシクルを分離したとき、スクロースクッション方法で追加精製を行った。容量35mLの超遠心分離チューブに0.5mLの2.5Mスクロース、1mLの0.8Mスクロース、及び32mLの異物が除去された溶液を順次仕込み、4で100,000xgにて4時間超遠心分離を行った。超遠心分離の後、細胞外ベシクルはその密度によって2.5Mスクロース層と0.8Mスクロース層との間に位置した。チューブの上方から溶液を除去して細胞外ベシクル含有層を分離した。

40

【0120】

図1は室内粉塵から細胞外ベシクルを得た過程を示す。図2は室内粉塵由来細胞外ベシクルの形状とサイズを透過電子顕微鏡(transmission electron microscope、TEM)で撮影した結果を示すもので、前記細胞外ベシクルは脂質二重層からなっており、50~100nmのサイズを有し、球状をしていることが分かる。

【0121】

前記結果より、室内粉塵に細胞外ベシクルが存在し、これは室内空気に細胞外ベシクル

50

が存在することを意味する。

【0122】

実施例2．室内から採集した粉塵による炎症性呼吸器疾患（肺炎症）の誘導

本発明者らは、室内から採集した粉塵が哺乳動物で炎症性呼吸器疾患を引き起こすか否かを評価するための実験を行った。

【0123】

具体的に、室内粉塵又は40 μ mのフィルター（filter）を通過した室内粉塵100ngを30 μ LのPBSに溶かした。マウスはC57BL/6、6週齢雌（各群当たり5匹）を使用した。PBS（phosphate buffered saline）に溶かした粉塵を0、1、7、8、14、15日目にマウスの気道内に投与し、16日目にマウスに対して肺炎症を測定した。この際、PBSを投与したマウスを対照群とし、前記粉塵を投与したマウスを実験群とした。

10

【0124】

ケタミン（ketamin）とキシラジン（xylazine）とを混合した麻酔液をマウスの腹腔に投与して麻酔した後、胸部を切開し、気管を露出させてカテーテルを気道に挿入し、結紮させた。無菌性生理食塩水を1mLずつ2回注入し、気道を洗浄して気管支肺胞洗浄液を得た。気管支肺胞洗浄液を4 \times で800 \times gにて10分間遠心分離した後、細胞ペレット（cell pellet）をPBS溶液に溶かした。前記細胞ペレットをサイトスピン（cytospin）してスライドに塗抹し、DiffQuick染色を行って光学顕微鏡の100倍視野で300個以上の炎症細胞を観察し、これをマクロファージ、リンパ球、好中球、好酸球に分類して各炎症細胞数を測定した。

20

【0125】

図3は室内粉塵をマウスの鼻腔内に投与して炎症性呼吸器疾患（肺炎症）を誘導する過程を示し、図4は気管支肺胞洗浄液における炎症細胞の数を測定した結果を示す。

【0126】

図4に示すように、粉塵を鼻腔内投与した場合に肺炎症が発生（BAL細胞の増加）することが分かった。特に、好中球（neutrophil）の浸潤が顕著であった。また、粉塵を40 μ mのフィルター（filter）を通過させることによりサイズの大きい物質を除去して鼻腔投与したとき、好中球の浸潤を特徴とする好中球性肺炎症が発生した。これは、好中球性肺炎症を誘導する物質が、室内粉塵に存在する物質の中で40 μ m未満の成分であることを意味する。

30

【0127】

前記結果より、室内から採集した粉塵が哺乳動物に吸入されたとき、好中球性炎症を特徴とする呼吸器疾患が誘発できることが分かる。

【0128】

実施例3．室内から採集した粉塵による好中球性肺炎症の免疫学的発生メカニズム

前記実施例2の結果より、室内粉塵によって哺乳動物で好中球性肺炎症が誘発されることを確認した。これに関連し、本発明者らはその免疫学的メカニズムを解明するための実験を行った。

【0129】

具体的に、前記実施例2の方法によって肺炎症を誘導したマウスから肺を摘出した。摘出された肺組織を剃刀の刃で切り刻んだ後、コラゲナーゼI V型（collagenase type I V）を添加し、37 \times で10分間培養した。その後、セルストレーナー（cell strainer）を用いて組織から細胞を分離した後、4 \times で800 \times gにて10分間遠心分離した。

40

【0130】

遠心分離した肺細胞は、赤血球溶解溶液に10分間入れて赤血球を破壊した。その後、さらに前記の条件で遠心分離を行った。ヘマトサイトメーター（hematocytometer）を用いて細胞を計数し、2 \times 10⁶/mLの濃度でRPMI 1640、10% FBS（fetal bovine serum）及び抗生物質（antibiotics）が入っている溶液に溶解させた。細胞を48ウェルプレート（well plate）に入れる一日前に、48ウェルプレート（well plate）にCD

50

3とCD28に対する抗体を各 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度となるようにPBSを用いて希釈した後、ウェル当たり $250\mu\text{L}$ を入れて10～18時間4を維持させて抗体をウェル(well)にコート(coating)させた。

【0131】

肺細胞が前記の濃度で準備されると、抗体がコート(coating)されている48ウェルプレート(well plate)をPBSで洗浄することにより、プレート(plate)の底部にコート(coating)されずにフリーフォーム(free form)で駆け巡る抗体を除去した。その後、肺細胞を仕込んでから4時間後、細胞外にタンパク質などの物質が分泌されることを阻害するブレフェルジンA(brefeldin A)を $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 入れて2時間さらに培養し、細胞外に分泌されるサイトカインを細胞内に閉じ込めた。培養済みの細胞は、蛍光付きCD4(FITC)、CD8(PE-Cy5)、CD3(APC)抗体を用いて、肺細胞の表面にある各タンパク質を染色した。30分が経過すると、4で $800\times\text{g}$ にて10分間遠心分離して洗浄した後、4%ホルマリン(formalin)を用いて、細胞表面に孔を穿設してサイトカインに対する抗体がよく挿入されるようにした。ホルマリン(formalin)を10分間処理した後、蛍光付きIFN-(PE)、IL-4(PE)、IL-10(PE)、IL-17(PE)抗体を用いてサイトカインを30分間染色した。FACSCaliburを用いて、肺に流入したT細胞におけるサイトカインの発現を測定した。

10

【0132】

図5は前記の方法でCD4+T細胞におけるサイトカインの発現量をフローサイトメトリ(Flow cytometry)方法で測定した結果である。図5の濾過された粉塵(filtered dust)は前記実施例2と同様に粉塵を $40\mu\text{m}$ のフィルター(filter)を通過させたものである。T細胞による後天免疫反応は、IFN-を分泌するTh1細胞による反応、IL-4を分泌するTh2細胞による反応、及びIL-17を分泌するTh17細胞による反応に大別される。

20

【0133】

図5に示すように、粉塵により肺炎を誘導したマウスは、対照群(PBS)に比べて、IFN-とIL-17を発現するCD4+T細胞が肺組織で増加し、粉塵を $40\mu\text{m}$ のサイズにフィルタリングした場合にはIL-17を発現するCD4+T細胞がさらに増加した。これは、室内粉塵により発生した好中球性肺炎はIFN-とIL-17を生成するCD4+T細胞(Th1細胞とTh17細胞)によって起こることを意味する。Th1及びTh17免疫反応は、気道及び肺実質に発生する炎症性呼吸器疾患、例えば重症喘息、慢性閉塞性肺疾患、気管支拡張症、肺炎などの発生だけでなく、肺癌の発生においても重要な免疫学的過敏反応であって、Th1細胞から分泌されるIFN-は肺気腫の発生に重要であり、Th17細胞から分泌されるIL-17は肺癌の発生に重要な役割を果たす。

30

【0134】

前記結果より、室内粉塵が、Th1及びTh17免疫反応を誘導し、好中球性肺炎を特徴とする喘息、慢性閉塞性肺疾患、気管支拡張症、肺炎などの炎症性呼吸器疾患と肺癌を引き起こすことが分かる。

【0135】

実施例4.室内空気に存在する細胞外ベシクルによるin vitro先天免疫反応
前記実施例1で室内粉塵、すなわち室内空気に細胞外ベシクルが存在することを確認したとともに、室内粉塵から分離した細胞外ベシクルによるin vitro先天免疫反応を評価した。このために、マウスマクロファージ(RAW264.7)に、室内粉塵から分離した細胞外ベシクルを処理した。

40

【0136】

まず、室内粉塵をPBSに溶かした後、細胞外ベシクルと水溶性成分を分離した。前記のベシクルと水溶性成分による先天免疫反応を評価するために、細胞外ベシクルと水溶性成分をマウスマクロファージに処理し、上澄液を集めてサイトカインの量を測定した後、その結果を図6に示した。

50

【0137】

具体的に、マウスマクロファージ (RAW 264.7) を 1×10^5 となるように 24 ウェルプレート (well plate) に 24 時間培養した。PBS で洗浄した後、DMEM 培地に、粉塵から分離した細胞外ベシクル (Dust-EV、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$) 及び水溶性成分 (Dust-soluble、 $8 \mu\text{g}/\text{mL}$) をそれぞれ処理した後、15 時間培養した。培養液を集めて 4 で $800 \times g$ にて 10 分間遠心分離し、上澄液を集めてサイトカインの量を ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法によって測定した。

【0138】

図 6 に示すように、室内粉塵から分離したベシクルと水溶性成分により TNF- α の分泌が増加したのとは異なり、IL-6 の分泌は主にベシクルにより誘導されることが分かる。これは、IL-6 を基とする炎症疾患の発生に、室内粉塵に存在する細胞外ベシクルが重要であることを意味する。

10

【0139】

これに加えて、前記と同様の方法を用いて細胞外ベシクル $100 \text{ ng}/\text{mL}$ と $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ を処理した後、サイトカインの量を測定した結果、ベシクルを投与する用量が増加するにつれて TNF- α と IL-6 の分泌量が増加することを確認した (図 7 参照)。

【0140】

一方、グラム陰性細菌の外膜 (outer membrane) には LPS が存在し、室内粉塵には LPS が含まれており、LPS が先天免疫反応を誘導するという事実はよく知られている。図 8 は室内粉塵から分離した細胞外ベシクルによる免疫反応における LPS の役割 (LPS 役割阻害剤: ポリミキシン B (Polymyxin B、PMB)) とタンパク質の役割 (熱処理による破壊) を評価した結果である。ベシクルによる TNF- α の分泌は PMB 又は熱を処理した場合の両方ともにおいて顕著に減少した。これに対し、ベシクルによる IL-6 の分泌は、PMB を処理した場合には顕著に減少したが、熱処理を施した場合にはむしろ増加した。

20

【0141】

実施例 3 の結果より、室内粉塵が Th17 免疫反応を誘導して好中球性肺炎症を誘発することを予想することができる。これに加えて、前記実施例 4 の結果より、室内粉塵による Th17 免疫反応による好中球性肺炎症は室内粉塵から分離した細胞外ベシクルによって IL-6 の分泌が増加したのに関連があることを意味する。すなわち、室内空気に存在する細胞外ベシクルが T 細胞を Th に分解させるのに核心となるサイトカイン IL-6 の分泌を増加させ、その結果として Th17 免疫反応を誘導して好中球性肺炎症を発生させることを予想することができる。また、このような炎症性呼吸器疾患を誘導する病原性ベシクルは LPS を含有しているベシクルが重要であることを意味する。

30

【0142】

実施例 5 . 室内空気に存在する細胞外ベシクルによる *in vivo* 先天免疫反応

本発明者らは、実施例 4 で確認した *in vitro* 先天免疫反応に加えて、室内空気に存在する細胞外ベシクルによる *in vivo* 先天免疫反応を評価するための実験を図 9 の実験プロトコルに従って行った。

【0143】

具体的に、C57BL/6、6 週齢雌マウス (各群当たり 4 匹) を用いて、室内粉塵から分離した細胞外ベシクル 0.01 mg 、 0.1 mg 、 1 mg を $30 \mu\text{L}$ の PBS に溶かして鼻腔内に 1 回投与し、24 時間後に評価した。この際、PBS を投与したマウスを対照群とした。前述の方法によって、麻酔液を用いてマウスを麻酔した後、気管支肺胞洗浄液を得た。気管支肺胞洗浄液を 4 で $800 \times g$ にて 10 分間遠心分離した後、細胞ペレット (cell pellet) を PBS 溶液に溶かし、流入した炎症細胞の数を測定した。

40

【0144】

図 10 は肺炎症の指標である気管支肺胞洗浄液 (BAL) における炎症細胞の数を測定した結果である。図 10 に示すように、対照群 (PBS) に比べて、細胞外ベシクルを投与した場合 (Dust-EV) はベシクルの用量に比例して気管支肺胞洗浄液における炎

50

症細胞の数が増加することが分かる。また、Th 17免疫反応を引き起こす核心サイトカインIL - 6の場合、細胞外ベシクルの投与量に比例してその分泌量が増加することが分かる。

【0145】

前記結果より、*in vitro*システム及び*in vivo*システムで室内粉塵から分離した細胞外ベシクルが先天免疫反応を誘導するという事実を確認し、ひいては室内粉塵から分離した細胞外ベシクルがIL - 6の分泌を促進させ、これによりTh 17免疫反応が誘導され、好中球性肺炎症を特徴とする呼吸器疾患を引き起こすことが明白である。

【0146】

実施例6．室内空気に存在する細胞外ベシクルによる*in vivo*後天免疫反応

図11に示したプロトコルに従って、室内粉塵から分離した細胞外ベシクルによる*in vivo*後天免疫反応を評価する実験を行った。

【0147】

具体的に、C57BL/6、6週齢雌マウス(各群当たり4匹)に、室内粉塵から分離した細胞外ベシクル1 μ gを30 μ LのPBSに溶かして週2回3週間鼻腔内投与し、最終投与24時間後に評価した。また、LPSを含有している細胞外ベシクルの役割を評価するために、ベシクルにPMBを処理してこれを投与した実験を同時に行った。

【0148】

図12は肺炎症の指標である気管支肺胞洗浄液における炎症細胞の数を示すもので、対照群(PBS)に比べて、細胞外ベシクル投与群(Dust-EV)における炎症細胞の数が顕著に増加することを確認することができる。また、室内粉塵から分離した細胞外ベシクルにPMBを処理したとき(Dust-EV+PMB)、ベシクルにより増加した炎症細胞の数が顕著に減少した。これは、室内空気に存在するベシクルに反復的に露出されたときに好中球性肺炎症が発生し、その発生にはLPSを含有しているベシクルが重要であることを意味する。

【0149】

これに加えて、本発明者らは、肺炎症の発生に関連した免疫学的病因メカニズムを評価するために、局所リンパ節から免疫細胞を分離して免疫細胞におけるIFN - とIL - 17の発現様相を評価した結果を図13に示した。その結果、粉塵から分離したベシクルを投与した場合、PBSを投与した場合に比べて局所リンパ節内T細胞の数が顕著に増加し、特にIFN - とIL - 17を発現するT細胞が顕著に増加した。また、細胞外ベシクルにPMBを処理した場合には、局所リンパ節内T細胞の数が減少し、IFN - とIL - 17を発現するT細胞の数も顕著に減少した。

【0150】

図14は血清内に存在する室内粉塵から分離したベシクル特異抗体をELISA法で測定した結果である。その結果、ベシクル特異IgG1及びIgG2aの量が、室内粉塵から分離したベシクルを投与した場合には顕著に増加し、ベシクルにPMBを処理した場合にはPBS投与群と同様の程度に減少した。

【0151】

前記結果は、室内空気に存在する細胞外ベシクルによる肺炎症は、好中球性炎症を特徴とし、Th 1及びTh 17免疫反応によって発生し、その誘発にはLPSを含有しているベシクルが重要であることを意味する。また、室内空気に存在するベシクルを吸入したときに血清内ベシクル特異IgG1及びIgG2a抗体が増加することが分かるため、血清でベシクル特異抗体を測定することにより、反復的に露出された病原性ベシクルを診断することができる。

【0152】

実施例7．室内空気に存在する細胞外ベシクルに対する大腸菌由来細胞外ベシクルの存在確認

前記実施例5及び実施例6の結果より、室内空気に存在する細胞外ベシクルによる*in vivo*先天免疫反応及び後天免疫反応の発生に、LPSを含有しているベシクルが重要

10

20

30

40

50

であることが分かった。L P S はグラム陰性細菌の外膜に存在する物質であり、L P S を含有しているベシクルはグラム陰性細菌に由来することが自明である。

【0153】

大腸菌はグラム陰性細菌として室内空気に存在し、L P S を含有する細胞外ベシクルを分泌し、ベシクル内にはL P S だけでなく、免疫及び炎症反応を誘導するタンパク質を含有していることを本発明者らが報告したことがある。そこで、本発明者らは、室内粉塵から分離した細胞外ベシクルに対して大腸菌由来細胞外ベシクルの存在を評価した。

【0154】

室内粉塵から分離した細胞外ベシクルに大腸菌由来ベシクルが存在するかを評価するために、大腸菌特異的な16S rRNAプライマー(primer)を用いて遺伝型を評価した。具体的には、粉塵から分離した細胞外ベシクルを100 で20分間加熱してDNAとRNAを溶出させ、これを鋳型(template)としてcDNAを合成した。合成したcDNAを鋳型として大腸菌特異的な16S rRNAプライマー(primer)を入れ、94 (40秒)と72 (40秒)を1サイクルとして2段階(2step)ポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase Chain Reaction、PCR)を40サイクル行った。

10

【0155】

その結果、大腸菌由来細胞外ベシクル(E. coli-EV)と同様に、室内粉塵から分離した細胞外ベシクル(Dust-EV)にも大腸菌の16S rRNAが存在することを確認した(図15参照)。

【0156】

また、室内粉塵から分離したベシクルに対して、大腸菌由来ベシクルに含有されたタンパク質の存在を確認した。このために、大腸菌由来ベシクルにより生成された抗体(anti-E. coli EV Ab)を用いてウエスタンブロット(Western Blot)を行った結果、室内粉塵には細菌などを含んでいるペレット(pellet)成分及び室内粉塵から分離したベシクルに、大腸菌由来ベシクル特異抗体に反応するタンパク質が存在することを確認した(図15参照)。

20

【0157】

前記結果より、室内空気には大腸菌由来細胞外ベシクルが存在することが明白である。

【0158】

実施例8. 大腸菌由来細胞外ベシクルによるin vivo先天免疫反応

30

実施例7では室内空気に大腸菌由来細胞外ベシクルが存在することが分かった。これに基づいて、大腸菌由来細胞外ベシクルによるin vivo先天免疫反応を評価した。

【0159】

大腸菌由来細胞外ベシクルは大腸菌培養液から抽出した。具体的に、大腸菌を3mLのLB溶液が入っている試験管に37 で4時間培養した後、その10μLずつを500mLのLB溶液が入っている2Lの8つの三角フラスコに移して37 で4時間培養した。培養液を容量350mLの12つの高速遠心分離チューブに分けて入れた後、4 で5000×gにて15分間連続的に2回行った。4L程度の上澄液を孔径0.45μmのメンブレインフィルター(membrane filter)を1回通過させた後、100kDa以下の分子のみを通過させることが可能なQuixstand systemを用いて300mLの量まで濃縮した。濃縮液を孔径0.22μmのメンブレインフィルターを1回通過させた後、容量50mLの超遠心分離チューブ(ultracentrifuge tube)に分けて入れた後、4 で150,000×gにて3時間超遠心分離(ultracentrifugation)を行った。上澄液は捨て、チューブの下部に存在する沈殿物をPBSで溶かして腸内大腸菌由来細胞外ベシクルを抽出した。

40

【0160】

免疫反応を測定するために、C57BL/6、6週齢雌マウス(各群当たり4匹)を用いて前記の方法で抽出した大腸菌由来細胞外ベシクル1ng、10ng、100ngを30μLのPBSに溶かして1回鼻腔内投与し、2、8、24時間の経過後に媒介体の分泌を評価した。この際、PBSを投与したマウスを対照群とした。前述の方法によって麻酔

50

液を用いてマウスを麻酔した後、気管支肺胞洗浄液(BAL fluid)を得た。

【0161】

図16は大腸菌由来細胞外ベシクルによる炎症性サイトカインの分泌を気管支肺胞洗浄液で測定した結果である。その結果、ベシクルを投与した場合、対照群に比べて気管支肺胞洗浄液内TNF- α とIL-6の量が8時間目に増加し、これはベシクルの用量に比例して増加することが分かる。

【0162】

実施例9. 大腸菌由来細胞外ベシクルの反復投与による肺炎症

実施例8で大腸菌由来ベシクルが用量依存的にTh17免疫反応を誘導するIL-6の分泌を誘導するという事実に基づいて、大腸菌由来ベシクルを反復的に投与して肺炎症を評価した。

10

【0163】

図17に示したプロトコルに従って、C57BL/6、6週齢雌マウス(各群当たり4匹)に大腸菌由来細胞外ベシクル10ng、100ngを30 μ LのPBSに溶かして週2回3週間鼻腔内に投与した後、最終ベシクル投与24時間後に評価した。

【0164】

図18は肺炎症の指標である気管支肺胞洗浄液における炎症細胞の数を示すもので、対照群(PBS)に比べて、大腸菌由来細胞外ベシクル投与群(EC-EV)における炎症細胞の数が増加し、これはベシクルの投与用量に依存的に増加することが分かる。

20

【0165】

実施例10. 大腸菌由来細胞外ベシクルによる肺気腫

実施例9で大腸菌由来細胞外ベシクルを3週間気道内に反復投与したとき、用量依存的に肺炎症が発生するという事実に基づいて、高用量のベシクルを4週間反復投与して構造的な変化を評価した。

【0166】

図19に示したプロトコルに従って、C57BL/6、6週齢雌マウス(各群当たり4匹)に大腸菌由来細胞外ベシクル100ngを30 μ LのPBSに溶かして週2回4週間鼻腔内投与した後、24時間目に組織学的変化を評価した。

【0167】

図20は肺組織における肺胞の破壊を示す結果であって、大腸菌由来ベシクルを投与した場合、対照群に比べて、肺胞の破壊を特徴とする肺気腫が発生することが分かる。これをコード長(chord length)に定量したとき、ベシクルを投与した場合は対照群に比べてコード長が大きく増加することが分かる。

30

【0168】

前記結果は、大腸菌由来細胞外ベシクルを比較的高い濃度で反復的に露出させる場合、非可逆的気道閉塞をもたらす肺気腫が発生することを意味する。

【0169】

実施例11. 室内空気に生息するイエダニからの生エキス(crude extract)の製造及び細胞外ベシクルの抽出及び特性解明

本発明者らは、室内に生息するイエダニ(house dust mite、HDM)に細胞外ベシクルが存在するか否かを調べるために、イエダニから細胞外ベシクルを抽出して特性を解明する実験を行った。

40

【0170】

具体的に、韓国の延世大学校医用節足動物素材銀行からイエダニ20gを購入して綺麗なビーカーに移し、500mLのPBSを入れた後、4で24時間攪拌した。その後、高速遠心分離チューブ(high speed centrifuge tube)に分けて入れた後、4で10,000 \times gにて15分間高速遠心分離(high speed centrifugaion)を連続的に2回行った。450mL程度の上澄液を孔径0.22 μ mのメンブレインフィルター(membrane filter)を1回通過させた後、容量70mLの超遠心分離チューブ(ultracentrifuge tube)に分けて入れ、4で100,000 \times gにて3時間超遠心分離(ultracentrifugation

50

)を行った。上澄液は捨て、チューブの下部に存在する沈殿物はPBSで溶かして細胞外ベシクルを抽出した。

【0171】

イエダニ由来細胞外ベシクルの特性解明のために細胞外ベシクルを分離するとき、opti-prep溶液を用いて追加精製を行った。容量10mLの超遠心分離チューブに分離した沈殿物を溶かした4.8mLの50%opti-prep溶液、3mLの40%opti-prep溶液、及び2.5mLの10%opti-prep溶液を順次入れ、4で100,000×gにて2時間超遠心分離を行った。超遠心分離の後、40%opti-prep層と10%opti-prep層との間に白層が位置することを確認した。チューブの上方から1mLずつ分けて入れた後、opti-prepsolutionを除去するためにそれぞれ9mLのPBSと混ぜた後、容量10mLの超遠心分離チューブに入れ、4で100,000×gにて2時間超遠心分離(ultracentrifugation)を行った。上澄液を捨て、チューブの下部に存在する沈殿物はさらに1mLのPBSに溶かして細胞外ベシクルを抽出した。

10

【0172】

図21はイエダニから細胞外ベシクルを得る過程を示す図である。図22はイエダニ由来細胞外ベシクルの形状とサイズを透過電子顕微鏡(transmission electron microscope、TEM)及び動的光散乱法(dynamic light scattering、DLS)を用いて測定した結果を示す。図22より、イエダニ由来細胞外ベシクルは脂質二重層からなっており、100~200nmのサイズを有し、球状をしていることが分かる。

20

【0173】

前記結果は、イエダニ抽出物(extract)に細胞外ベシクルが存在することを示す結果である。

【0174】

実施例12.室内空気に生息するイエダニ由来細胞外ベシクルによるinvitro先天免疫反応

実施例11ではイエダニ由来細胞外ベシクルが存在することが分かった。イエダニから分離した細胞外ベシクルによるinvivo先天免疫反応を評価した。このために、マウスマクロファージ(RAW264.7)にイエダニ由来細胞外ベシクルを処理した。

【0175】

具体的に、マウスマクロファージ(RAW264.7)を 1×10^5 となるように24ウェルプレート(well plate)に24時間培養した。PBSで洗浄した後、DMEM培地に、イエダニから分離した細胞外ベシクル(HDM-EV)100ng、1 μ g、10 μ gをそれぞれ処理した後、15時間培養した。培養液を集めて4で800×gにて10分間遠心分離し、上澄液を集めてサイトカインの量をELISA法によって測定した。

30

【0176】

図23に示すように、イエダニから分離したベシクルによってTNF- α とIL-6の分泌が誘導されることが分かる。処理用量が増加するにつれてTNF- α とIL-6の生成が増加することを確認した。

【0177】

実施例13.室内空気に生息するイエダニ由来細胞外ベシクルによるinvivo先天免疫反応

実施例11ではイエダニ由来細胞外ベシクルが存在することが分かり、実施例12ではイエダニ由来ベシクルによる免疫反応を確認することができた。これに基づいて、イエダニ由来細胞外ベシクルによるinvivo先天免疫反応を評価した。

40

【0178】

具体的に、C57BL/6、6週齢雌マウス(各群当たり5匹)を用いて、イエダニ由来細胞外ベシクル0.1 μ g、1 μ g、10 μ gを30 μ LのPBSに溶かして鼻腔投与し、12時間後に炎症細胞の浸潤と媒介体の分泌を評価した。この際、PBSを投与したマウスを対照群とした。前述の方法によって麻酔液を用いてマウスを麻酔した後、気管支

50

肺胞洗浄液(BAL fluid)を得た。

【0179】

図24はイエダニ由来細胞外ベシクルによる炎症を評価した結果であって、肺炎症の指標である気管支肺胞洗浄液における炎症細胞の数を示す。図24に示すように、対照群(PBS)に比べてイエダニ由来細胞外ベシクル投与群(EV)における炎症細胞の数が増加し、これはベシクルの投与用量に比例して増加することが分かる。

【0180】

図25はサイトカインの分泌を気管支肺胞洗浄液で測定した結果である。図25に示すように、ベシクルを投与した場合、対照群に比べてBAL fluid内TNF- α とIL-6の量が増加し、これはベシクルの用量に依存的に増加することが分かる。特に10 μ gのベシクルを投与した群ではTNF- α とIL-6の量が有意に増加することを確認した。

10

【0181】

実施例14.室内空気に生息するイエダニ由来細胞外ベシクルの反復投与による肺炎症
実施例13ではイエダニ由来細胞外ベシクルによる免疫反応を確認することができた。これに基づいて、イエダニ由来細胞外ベシクルによる*in vivo*後天免疫反応を評価した。

【0182】

具体的に、C57BL/6、6週齢雌マウス(各群当たり5匹)を用いて、実施例13で効果があったイエダニ由来細胞外ベシクル10 μ gを1日1回3日間鼻腔投与して感作させた後、週2回2週間鼻腔投与した。24時間後、炎症細胞の浸潤及び炎症媒介体の分泌を評価した。この際、PBSを投与したマウスを対照群とした。前述の方法によって麻酔液を用いてマウスを麻酔した後、気管支肺胞洗浄液(BAL fluid)を得た。

20

【0183】

図26は炎症細胞の浸潤を示す結果であって、イエダニ由来ベシクル(HDMEV)を投与した場合、対照群(PBS)に比べて気管支肺胞洗浄液内の炎症細胞の数が大きく増加し、特に好中球の数が顕著に増加していた。

【0184】

図27は後天免疫反応の類型を分析するために気管支肺胞洗浄液におけるサイトカインの生成量をELISA法で測定した結果であって、Th17細胞から分泌されるIL-17がイエダニ由来細胞外ベシクルの投与によって有意に増加することを確認することができた。

30

【0185】

前記結果は、イエダニに存在する細胞外ベシクルが吸入されたとき、Th17免疫反応を媒介とする好中球性肺炎症が発生することを意味する。

【0186】

実施例15.室内粉塵における細菌とカビの培養及び細菌同定

室内空気に存在する細胞外ベシクルは、室内粉塵に存在する多様な細菌又はカビによって生成できる。本発明者らは、真空掃除機を用いて、特定住居地の寝具に存在する粉塵を収去した。真空掃除機のフィルター内に存在する粉塵を綺麗なガラス瓶に移して質量を測定した。室内粉塵5gを200mLのPBSが入っているビーカーに4で12時間溶かし、カーゼを用いてサイズの大きい物質を除去した。このときの粉塵液を1とし、濃度を1/10ずつ希釈して細菌とカビの成長が可能な培養液入りのプレート(plate)に粉塵液を塗抹した。一定の時間が経過した後、成長した細菌とカビを確認した。図28に示すように、室内粉塵に多様な細菌とカビが生息していることが分かった。

40

【0187】

その後、本発明者らは、室内粉塵に生息する細菌を分離、同定する実験を行った。室内粉塵に生息する細菌を分離する方法を図29に示した。具体的に、寝台から集めた粉塵を実施例1と同様の方法で溶かした後、ガーゼ(gauze)を用いてサイズの大きい物質を除去した。このときの粉塵液を1とし、濃度を1/10ずつ希釈し、細菌の成長が可能な培

50

養液入りのプレート (plate) に粉塵液を塗抹した。一定の時間が経過した後、サイズと色が異なる様々なコロニー (colony) を確認し、各コロニー (colony) を接種して 3 mL の栄養液入りの試験管に 37 で培養した。生化学的方法を用いて細菌を同定する微生物自動検査システム (VIT EK) 装備を用いて、粉塵に生息する細菌を同定した。その結果、グラム陽性細菌として黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)、スタフィロコッカス・ホミニス (Staphylococcus hominis) などを同定した。

【0188】

これにより、粉塵にある細胞外ベシクルはグラム陽性細菌から分泌されるものを含んでいることを予測することができる。

【0189】

実施例 16 . ブドウ球菌由来細胞外ベシクルによる *in vitro* 免疫反応及びベシクル内タンパク質の役割

最近、本発明者らは、グラム陽性細菌としてのブドウ球菌が細胞外ベシクルを分泌することを最初に発見して報告した。室内空気に存在するグラム陽性細菌由来細胞外ベシクルによる呼吸器疾患の発生への役割を評価するために、ブドウ球菌培養液から、実施例 1 の方法でブドウ球菌から分泌される細胞外ベシクルを分離し、呼吸器疾患の病因に対する役割を評価した。

【0190】

具体的に、ブドウ球菌を 3 mL の栄養液が入っている試験管に接種した後、37 で 6 時間培養し、その 5 mL を 500 mL の栄養液が入っている 2 L の三角フラスコに移して 37 で 4 時間培養して吸光度 (600 nm) 値が 1.0 となるようにした。培養液を容量 500 mL の高速遠心分離チューブ (high speed centrifuge tube) に入れた後、4 で 10,000 × g にて 20 分間遠心分離を行った。細菌を除去した上澄液を孔径 0.45 μm のメンブレインフィルター (membrane filter) を 1 回通過させた後、分子量 100 kDa 以下のタンパク質を除去することが可能なメンブレインを装着した Quix stand system を用いて 25 倍濃縮した。濃縮液を孔径 0.22 μm のメンブレインフィルターを 1 回通過させた後、容量 70 mL の超遠心分離チューブ (ultracentrifuge tube) に入れ、4 で 150,000 × g にて 3 時間超遠心分離 (ultracentrifugation) した。沈殿物を PBS (phosphate buffered saline) で懸濁 (resuspension) した後、ブドウ球菌由来細胞外ベシクルを得た。

【0191】

ブドウ球菌由来細胞外ベシクルによる *in vitro* 免疫反応を評価するために、マウスマクロファージ (RAW 264.7) を 1×10^5 となるように 24 ウェルプレート (well plate) に 24 時間培養し、PBS で洗浄して FBS (fetal bovine serum) を除去した後、D MEM 培地にブドウ球菌由来細胞外ベシクルを 1 μg/mL、10 μg/mL で処理して対照群とした。この際、100 で 20 分間沸かして熱に弱い成分の機能を除去したブドウ球菌由来細胞外ベシクルを処理した細胞を実験群とした。各細胞外ベシクルを 15 時間処理した後、培養液を集めて 4 で 800 × g にて 10 分間遠心分離し、上澄液を集めてサイトカインの量を ELISA 法によって測定した。図 30 はそれぞれ代表的な炎症性サイトカインとしての TNF-α と IL-6 を測定した結果を示す。

【0192】

図 30 に示すように、TNF-α の場合、熱を処理した細胞外ベシクル (Heat-S-EV) 1 μg/mL を処理した群はその生成量が 1/2 以下に減少したが、10 μg/mL を処理した群は大きい差異がなかった。これに対し、IL-6 の場合、ブドウ球菌由来細胞外ベシクルに熱を処理した群 (Heat-S-EV) は IL-6 の生成量がベシクルの濃度を問わず顕著に減少することが分かる。

【0193】

前記結果は、ブドウ球菌由来細胞外ベシクル内のタンパク質又は熱に弱い成分が IL-6 による炎症反応を起こすことに重要な役割を果たすことを意味する。

【0194】

10

20

30

40

50

実施例 17 . ブドウ球菌由来細胞外ベシクルによる *in vivo* 先天免疫反応及び肺炎

ブドウ球菌由来細胞外ベシクルによる *in vivo* 免疫反応を評価するために、C57BL/6、6週齢雌マウス(各群当たり3匹)を使用した。PBSに溶かしたブドウ球菌由来細胞外ベシクル1 μ g、10 μ gをマウスの気道内に投与した群を実験群とし、PBSを気道内に投与した群を対照群とした。細胞外ベシクルを1回投与した後、翌日にマウスに対して初期肺炎とサイトカインIL-6の量を測定した(図31の実験プロトコルを参照)。

【0195】

図32はブドウ球菌由来細胞外ベシクルを気道内に投与し、気管支肺胞洗浄液から炎症を評価した結果である。その結果、細胞外ベシクルを気道内に投与した群(S-EV)の場合、濃度に比例して気管支肺胞洗浄液における炎症細胞の数が増加した。特に炎症細胞中の好中球の数が顕著に増加することが分かる。

10

【0196】

また、気管支肺胞洗浄液からTh17免疫反応における核心物質IL-6の生成量をELISA法で確認した結果、図33に示すように、ブドウ球菌由来細胞外ベシクル(S-EV)の濃度に比例してIL-6の分泌量も増加することが分かる。

【0197】

前記結果より、ブドウ球菌由来細胞外ベシクルを哺乳動物に吸入させたときに好中球性肺炎が発生し、ブドウ球菌由来細胞外ベシクルはTh17免疫反応において核心的な役割を果たすIL-6の生成を増加させることが分かる。

20

【0198】

実施例 18 . ブドウ球菌由来細胞外ベシクルによる先天免疫反応の発生におけるタンパク質又は熱に弱い成分の役割

前記実施例16の*in vitro*実験に加えて、先天免疫反応の発生に対するブドウ球菌由来細胞外ベシクル内のタンパク質の役割を*in vivo*実験によって検証した。

【0199】

具体的に、マウスはC57BL/6、6週齢雌(各群当たり3匹)を使用した。細胞外ベシクル1 μ g、10 μ gをマウスの気道内に投与した群を対照群とした。細胞外ベシクルを100で20分間沸かした群を実験群とした。マウスに細胞外ベシクルを1回投与した後、翌日にマウスに対して初期肺炎とサイトカインIL-6の量を測定した(図34の実験プロトコルを参照)。

30

【0200】

図35はブドウ球菌由来細胞外ベシクルを気道内に投与し、気管支肺胞洗浄液における炎症反応を評価した結果である。その結果、熱処理を施した細胞外ベシクル10 μ gを気道内に処理した群(Heat-S-EV10 μ g)と、対照群(S-EV10 μ g)とは肺炎(気管支肺胞洗浄液における炎症細胞の数)に大きい差異が無かった。

【0201】

図36は気管支肺胞洗浄液におけるIL-6の量をELISA法で測定した結果を示すもので、肺炎結果とは異なり、熱処理を施したブドウ球菌由来細胞外ベシクル(1 μ g、10 μ g)を投与した群は対照群に比べてIL-6の生成量が顕著に減少することを確認した。

40

【0202】

前記結果より、ブドウ球菌由来細胞外ベシクルのタンパク質又は熱に弱い成分がIL-6による免疫反応及び炎症性呼吸器疾患の発生に重要な役割を果たすことを再び確認した。

【0203】

実施例 19 . 大腸菌由来細胞外ベシクルワクチンの免疫学的特性

実施例8の方法によって分離した大腸菌由来細胞外ベシクル1mgを1週間隔で3週間3回C57BL/6(雄、6週、グループ当たり10匹)の腹腔に注入した。毎注入6時

50

間、24時間、7日後にマウスの血液を得て、血液内に存在する細胞外ベシクル特異的な抗体を測定した。大腸菌由来ベシクル200ngがコートされた黒色86ウェルプレートに、1%BSA/PBSで1:500希釈されたマウス血清を入れ、常温で2時間培養した後、ペルオキシダーゼ(oxidase)が結合したマウス抗体を介して観察した。

【0204】

図37はマウス血液内大腸菌由来細胞外ベシクル(CEV)特異抗体の量を時間経過に伴って観察した結果である。図37に示すように、細胞外ベシクル特異抗体は、1回細胞外ベシクル投与7日後から形成され始め、2番目と3番目の細胞外ベシクル投与後にさらに多くの抗体が形成され、3番目のベシクルワクチン接種完了7日後に最も高い抗体形成の度合いを示した。

【0205】

前記の方法で3回の大腸菌由来細胞外ベシクル(CEV)接種が完了した7日後にマウスから脾臓細胞を分離した。分離された脾臓細胞(2×10^4)に大腸菌由来細胞外ベシクル100ngを入れて72時間培養した後、脾臓細胞が分泌する免疫反応関連サイトカインとしてのIFN- γ 、IL-17、IL-4の量をそれぞれELISA法で測定した。

【0206】

図38はマウス脾臓細胞に大腸菌由来細胞外ベシクル(CEV)を処理したときに分泌されるIFN- γ の量を示す結果である。図38に示すように、大腸菌由来細胞外ベシクルを接種していないマウスグループから得た脾臓細胞に比べて、細胞外ベシクルを接種したマウスから得た脾臓細胞におけるIFN- γ の分泌が増加した。

【0207】

図39はマウス脾臓細胞に大腸菌由来細胞外ベシクル(CEV)を処理したときに分泌されるIL-17の量を示す結果である。図39に示すように、大腸菌由来細胞外ベシクルを接種していないマウスグループから得た脾臓細胞に比べて、細胞外ベシクルを接種したマウスから得た脾臓細胞におけるIL-17の分泌が増加した。

【0208】

前記結果より、大腸菌由来細胞外ベシクルの接種の際に細菌感染に対する防御メカニズムとしてのB細胞で生成される抗体反応とT細胞免疫反応が誘導されることを確認した。特に、T細胞免疫反応は、細菌感染に対する防御に重要なIFN- γ を分泌するTh1免疫反応とIL-17を分泌するTh17免疫反応が大腸菌由来細胞外ベシクルの接種によって効率的に誘導された。

【0209】

実施例20. 大腸菌感染による敗血症に対する大腸菌由来細胞外ベシクルワクチンの効能

大腸菌由来細胞外ワクチンの効能を評価するために、大腸菌の感染による敗血症動物モデルを確立した。大腸菌 1×10^6 、 1×10^8 、 1×10^{10} CFUをC57BL/6(雄、6週、グループ当たり10匹)の腹腔内に注入して5日間8時間間隔でマウスの生存率を観察した。

【0210】

図40は大腸菌(EC)の感染によるマウス致死率を示す結果である。図40に示すように、大腸菌 1×10^{10} CFUを注入した場合はマウスが24時間内に死亡し、大腸菌 1×10^6 、 1×10^8 CFUを注入した場合はマウスの生存には影響がなかった。

【0211】

実施例19の方法によって大腸菌由来細胞外ベシクル0.5 μ g、1 μ gを1週間隔で3週間3回C57BL/6(雄、6週、グループ当たり10匹)の腹腔内に注入した。3回の大腸菌由来細胞外ベシクルの接種が完了した7日後、大腸菌 1×10^{10} CFUを腹腔に注入して5日間8時間間隔でマウスの生存率を観察した。図41は前述の方法で確立された大腸菌の感染による敗血症の発生に対する大腸菌由来細胞外ベシクルワクチンの効能を観察した結果である。図41に示すように、5日後に大腸菌由来細胞外ベシクルが接

10

20

30

40

50

種されていないマウスの生存率20%に比べて、大腸菌由来細胞外ベシクルが接種されたマウスグループの生存率は80~100%であった。

【0212】

前記方法によって、大腸菌由来細胞外ベシクル1 μ gを1週間隔で3回腹腔内に接種した後、大腸菌 1×10^{10} CFUをマウスの腹腔に注入して6時間後に、血液内に存在する大腸菌の数を測定して図42に示した。

【0213】

図42に示すように、大腸菌由来細胞外ベシクルの接種の際に、大腸菌由来細胞外ベシクルが接種されていないマウスから得た血液内の大腸菌数に比べて、ベシクルが接種されたマウスから得た血液内の大腸菌数が顕著に減少した。

10

【0214】

前記結果は、大腸菌由来細胞外ベシクルをワクチンとして予め投与したとき、大腸菌による感染を効率よく予防することができることを意味する。

【0215】

実施例21．大腸菌由来細胞外ベシクルによる炎症の発生に対する大腸菌由来細胞外ベシクルワクチンの効能

大腸菌由来細胞外ベシクルによる炎症の発生に対するベシクルワクチンの効能を評価するために、実施例19の方法によって大腸菌由来細胞外ベシクル1 μ gを1週間隔で3回C57BL/6(雄、6週、グループ当たり5匹)の腹腔に注射して接種した後、大腸菌由来細胞外ベシクルを腹腔投与し、しかる後に、血液から炎症媒介体の分泌を測定した。

20

【0216】

図43は大腸菌由来細胞外ベシクルが接種されたマウスに高用量の大腸菌由来細胞外ベシクル(5 μ g、3回)を注入して6時間後に、マウスの血液を採取し、血清内のTh17免疫反応を誘導する炎症媒介体IL-6の量を測定した結果である。大腸菌由来細胞外ベシクルを接種していないマウスグループに比べて、大腸菌由来細胞外ベシクルを接種したマウスグループにおけるIL-6の量が顕著に減少した。

【0217】

前記結果は、低用量の大腸菌由来細胞外ベシクルをワクチンとして予め投与したとき、大腸菌由来細胞外ベシクルにより発生する炎症を効率よく予防することができることを意味する。

30

【0218】

以上の説明は本発明を例示的に説明したものに過ぎない。本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者であれば、本発明の本質的な特性から逸脱しない範囲内において、多様な修正、変更及び置換が可能であろう。よって、本発明に開示された実施例及び添付図面等は、本発明の技術思想を限定するためのものではなく、説明するためのものである。これらの実施例及び添付図面等によって本発明の技術思想の範囲が限定されないのは、当業者には明白である。

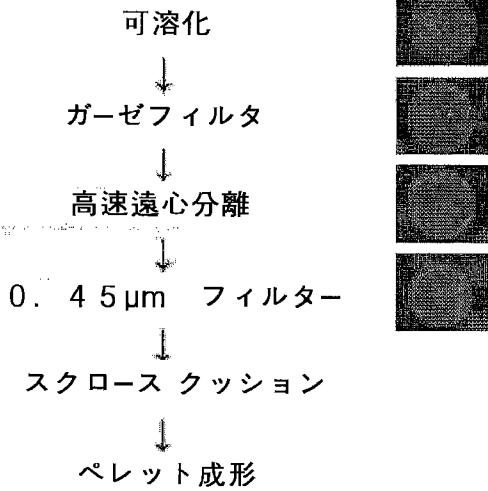
【産業上の利用可能性】

【0219】

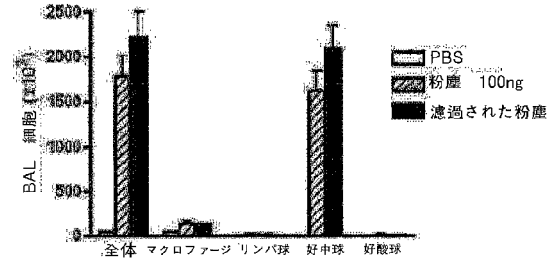
本発明の室内空気由来細胞外ベシクルを用いて炎症性呼吸器疾患などを診断、予防、及び/又は治療することができる。具体的に、本発明の室内空気由来細胞外ベシクルを動物に投与して呼吸器疾患の動物モデルを製造し、前記動物モデルを用いて呼吸器疾患に対する予防又は治療候補薬物を効率よく検索及び/又は発掘することが可能である。また、本発明は重症喘息、慢性閉塞性肺疾患、肺癌などの呼吸器疾患の原因因子を正確に診断することを可能とし、ひいては前記疾病を予防及び/又は治療することが可能なワクチンの開発に利用可能である。

40

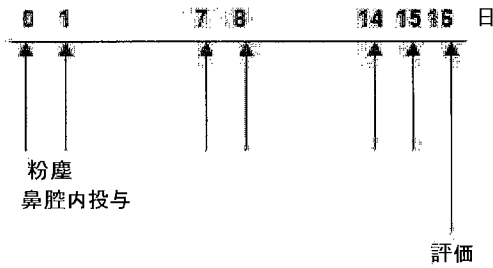
【 図 1 】



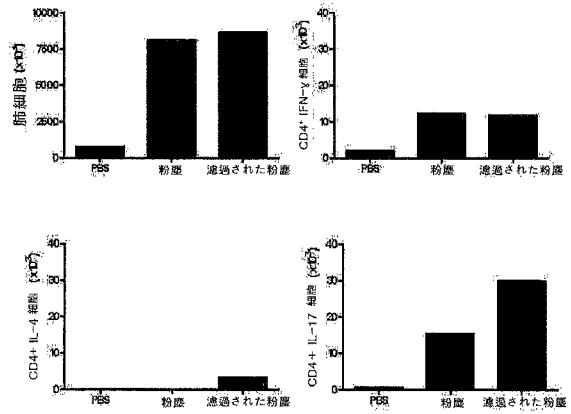
【 図 4 】



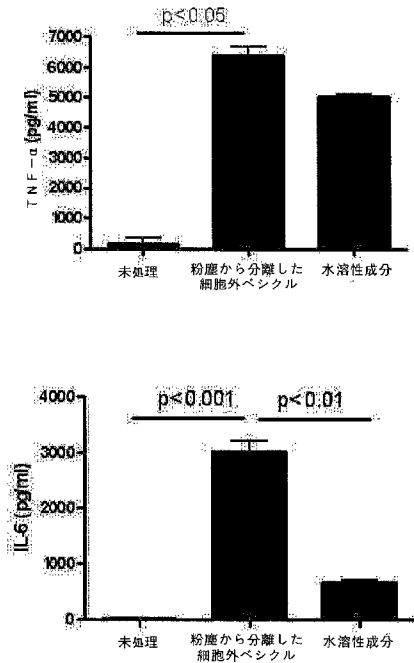
【 図 3 】



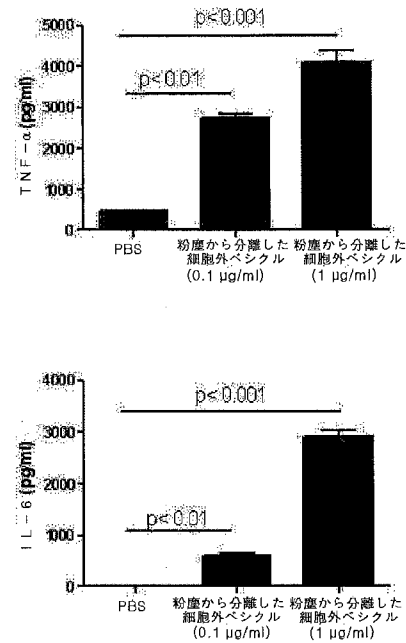
【 図 5 】



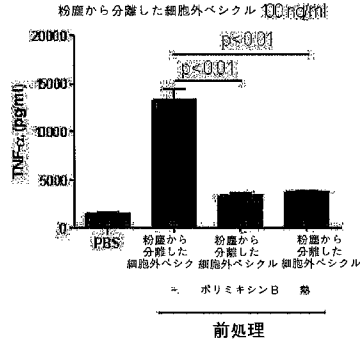
【 図 6 】



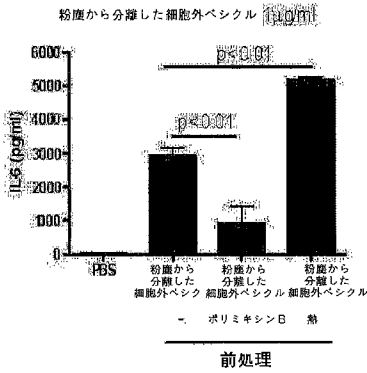
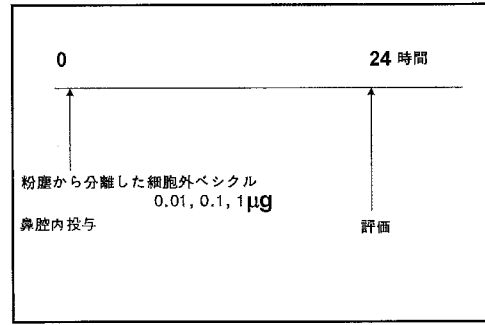
【 図 7 】



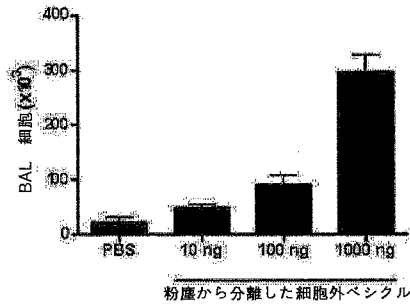
【 図 8 】



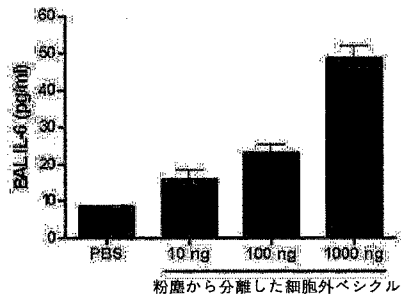
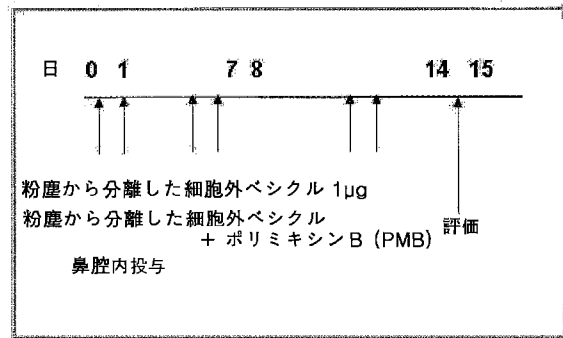
【 図 9 】



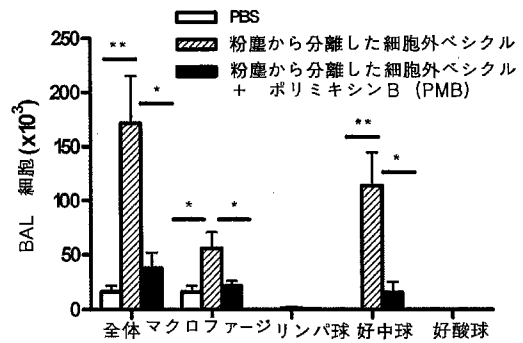
【 図 1 0 】



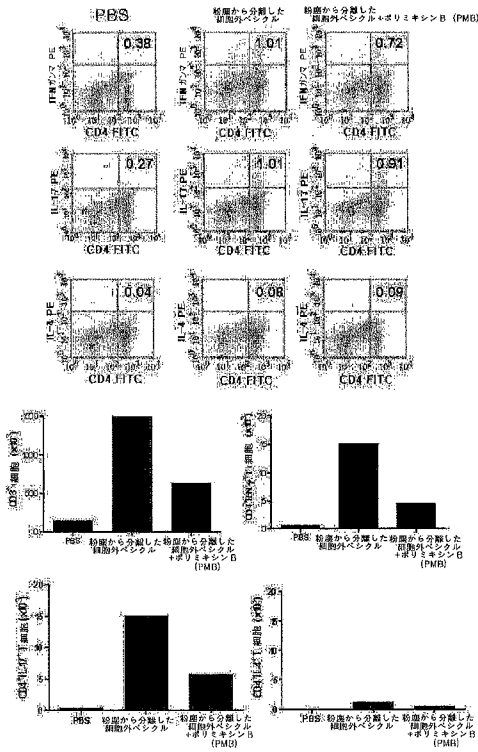
【 図 1 1 】



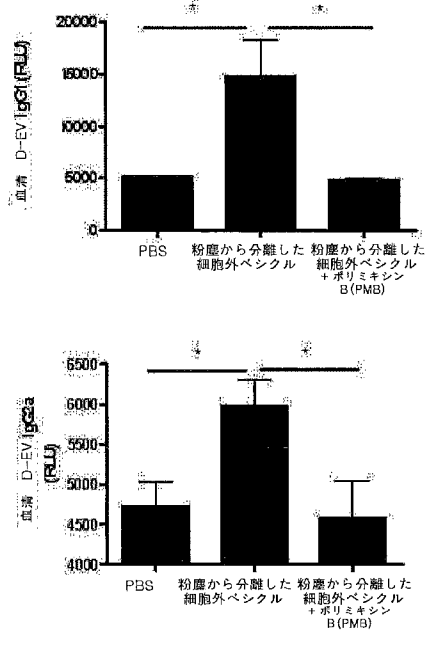
【 図 1 2 】



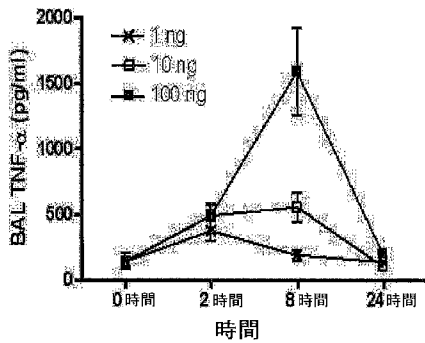
【 図 1 3 】



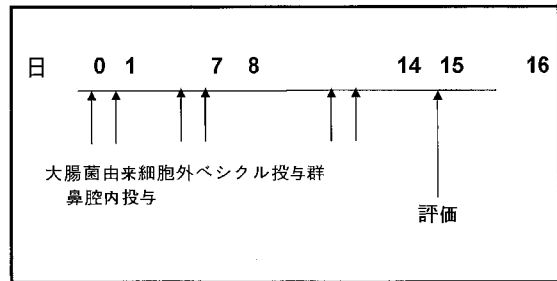
【 図 1 4 】



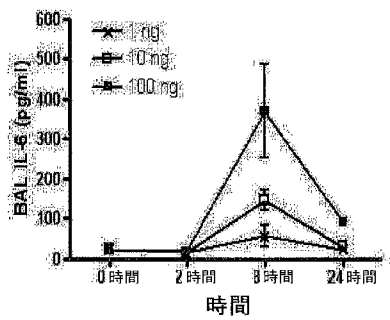
【 図 1 6 】



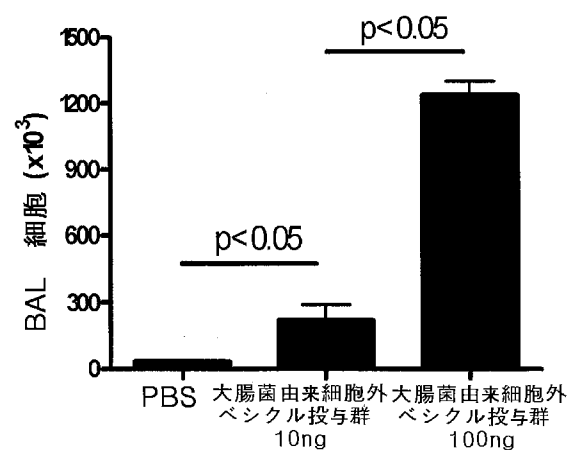
【 図 1 7 】



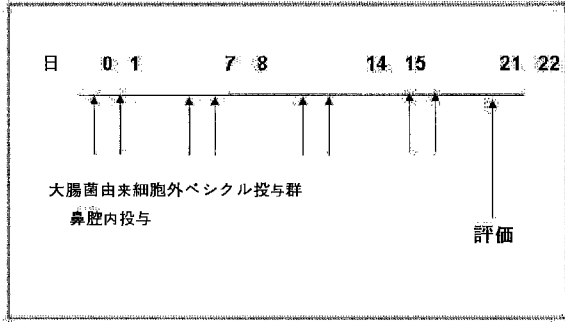
【 図 1 8 】



【 図 1 8 】



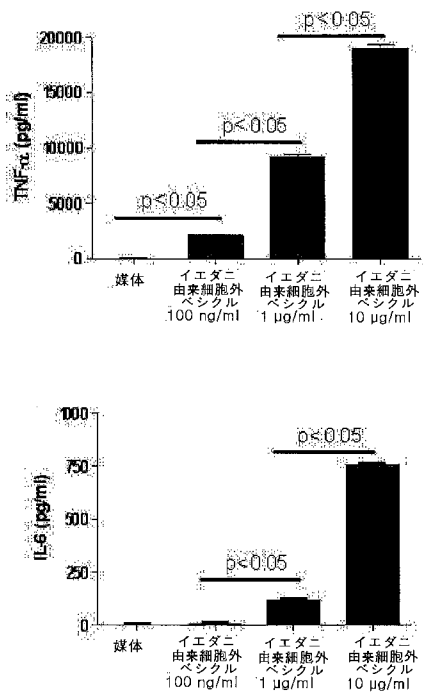
【 図 1 9 】



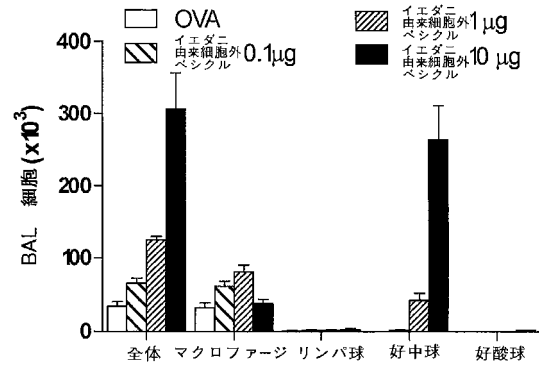
【 図 2 1 】

- イエダニ 20g : 濾過されたPBSで洗う (4℃, 24時間)
- ↓
- 高速遠心分離 (4℃, 10000 g, 15分)
- ↓
- 高速遠心分離 (4℃, 10000 g, 15分)
- ↓
- 0.22μm 濾過
- ↓
- 超遠心分離 (4℃, 150000 g, 3時間)
- ↓
- ペレット成形
- ↓
- オプティブレップ
- ↓
- 超遠心分離 (4℃, 100000 g, 2時間)
- ↓
- タンパク質レベル評価 & 透過型電子顕微鏡 (TEM)

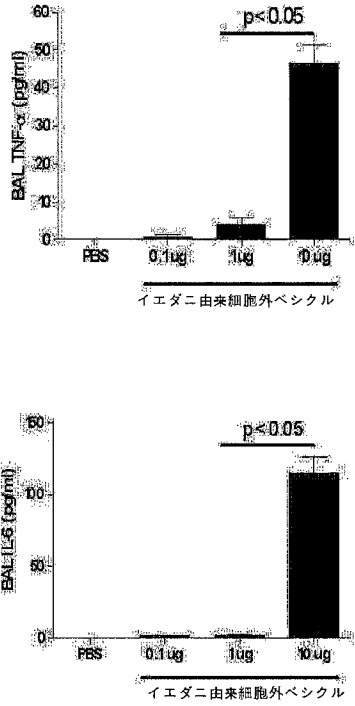
【 図 2 3 】



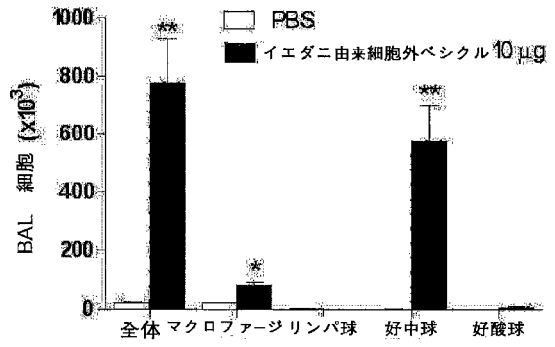
【 図 2 4 】



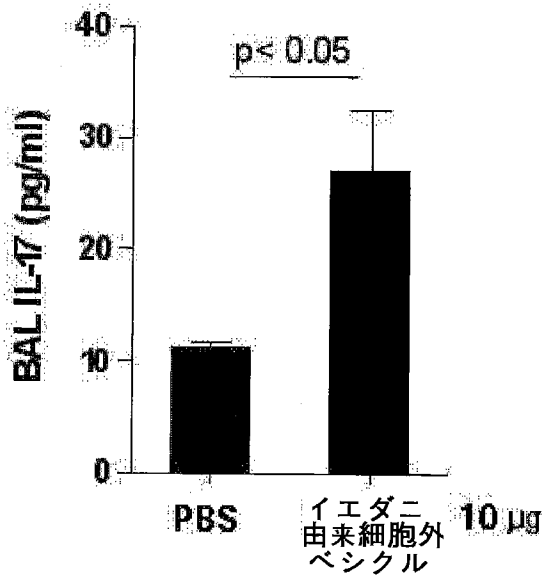
【 図 2 5 】



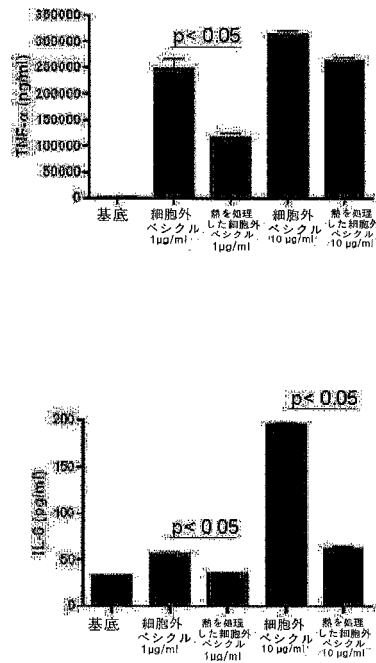
【 図 2 6 】



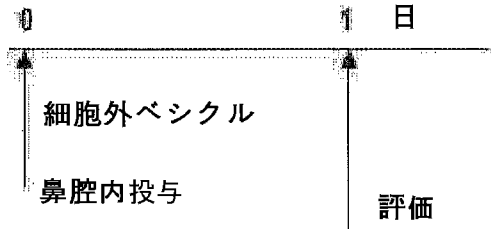
【 図 2 7 】



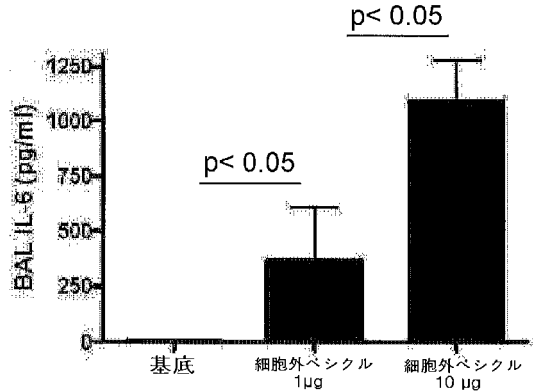
【 図 3 0 】



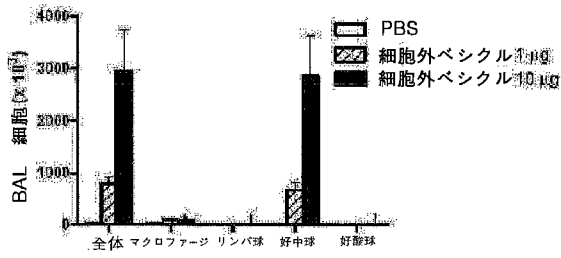
【図 3 1】



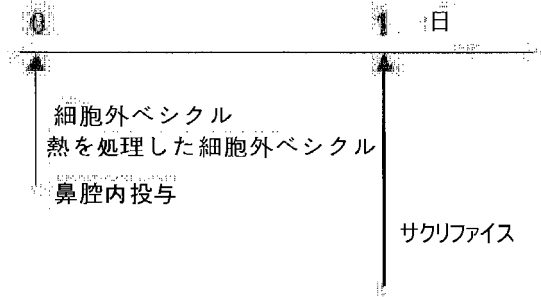
【図 3 3】



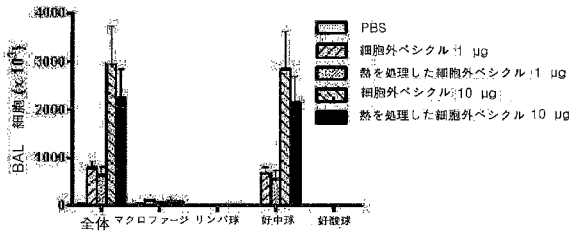
【図 3 2】



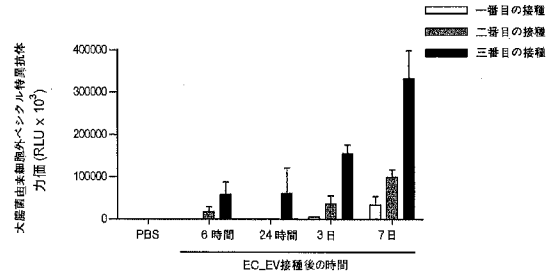
【図 3 4】



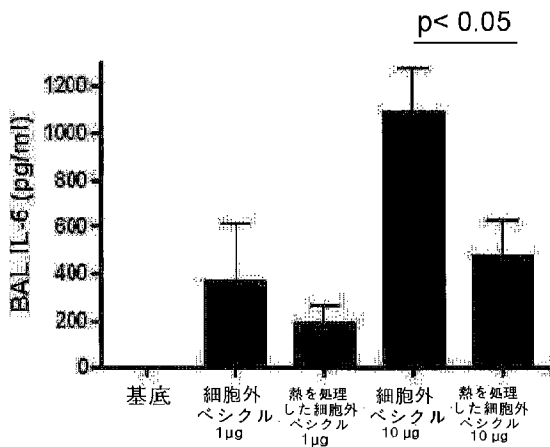
【図 3 5】



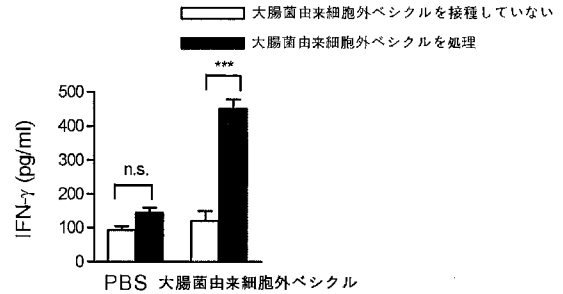
【図 3 7】



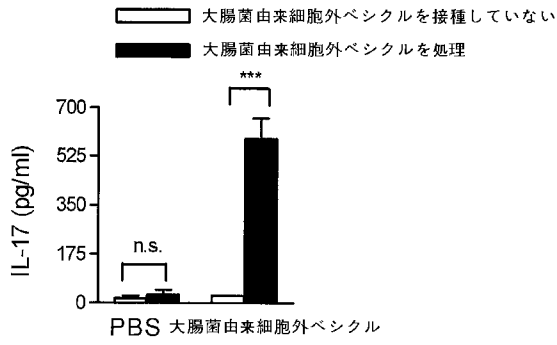
【図 3 6】



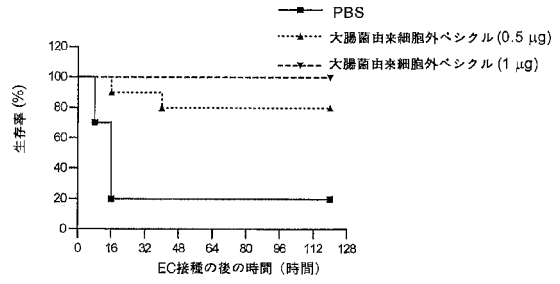
【図 3 8】



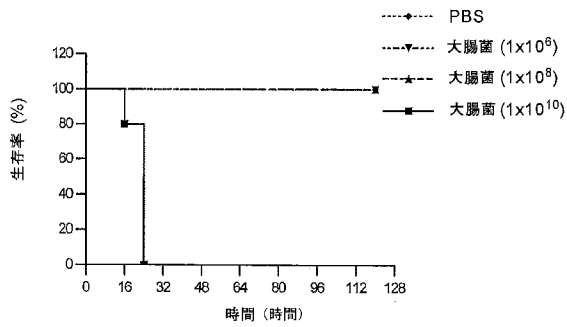
【 図 3 9 】



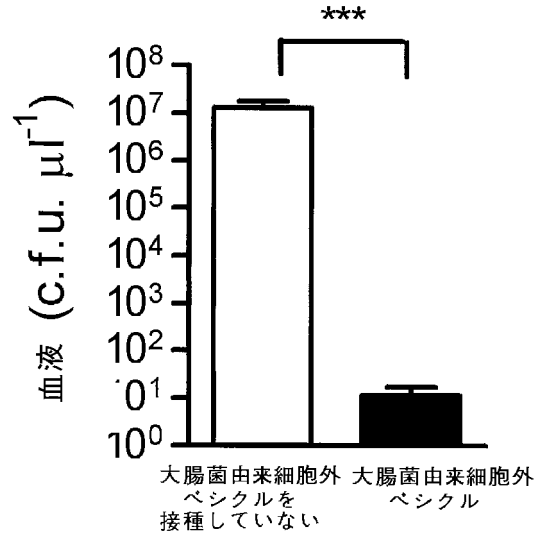
【 図 4 1 】



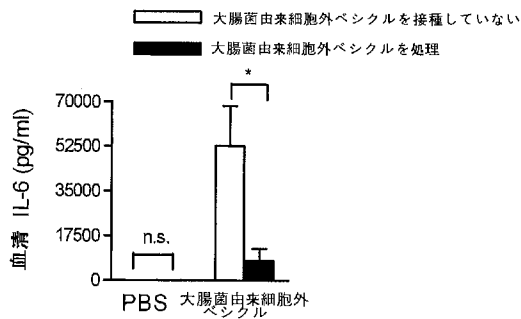
【 図 4 0 】



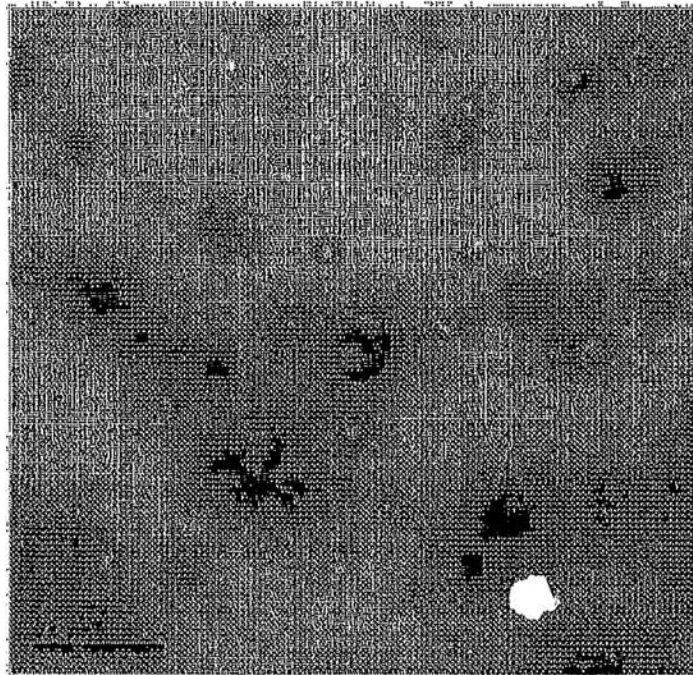
【 図 4 2 】



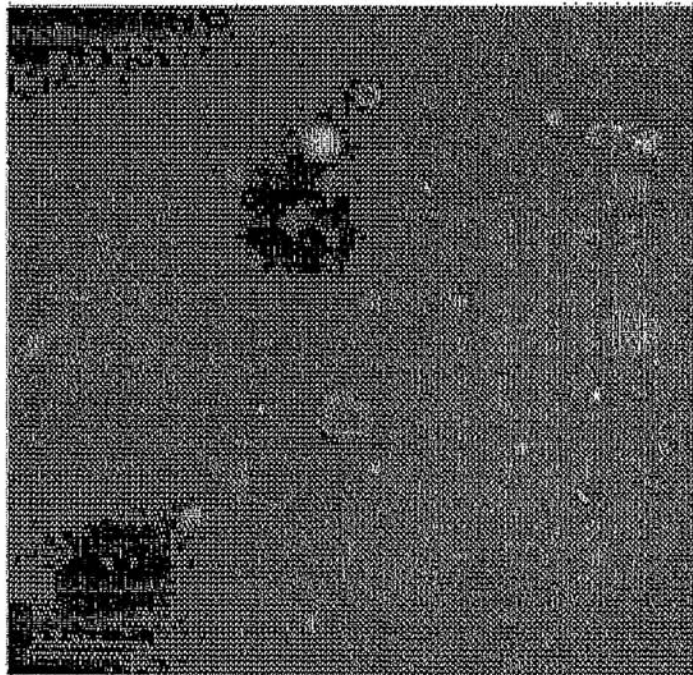
【 図 4 3 】



【図 2】



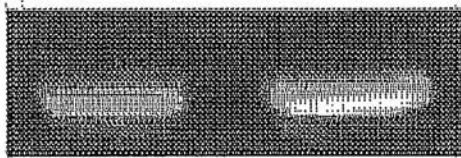
スケールバー = 0.5 μm



スケールバー = 0.2 μm

【 図 1 5 】

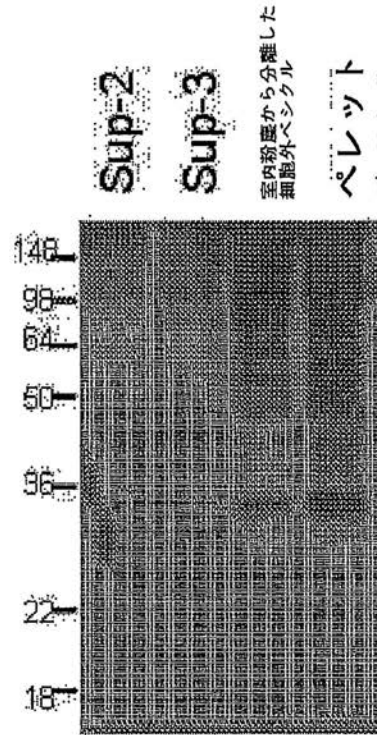
遺伝型評価
(大腸菌由来細胞外ベシクル
特異16s rRNA)



大腸菌由来細胞外ベシクル

室内粉塵から分離した細胞外ベシクル

ウェスタンブロット
(大腸菌由来ベシクルにより
生成された抗体)



Sup-2

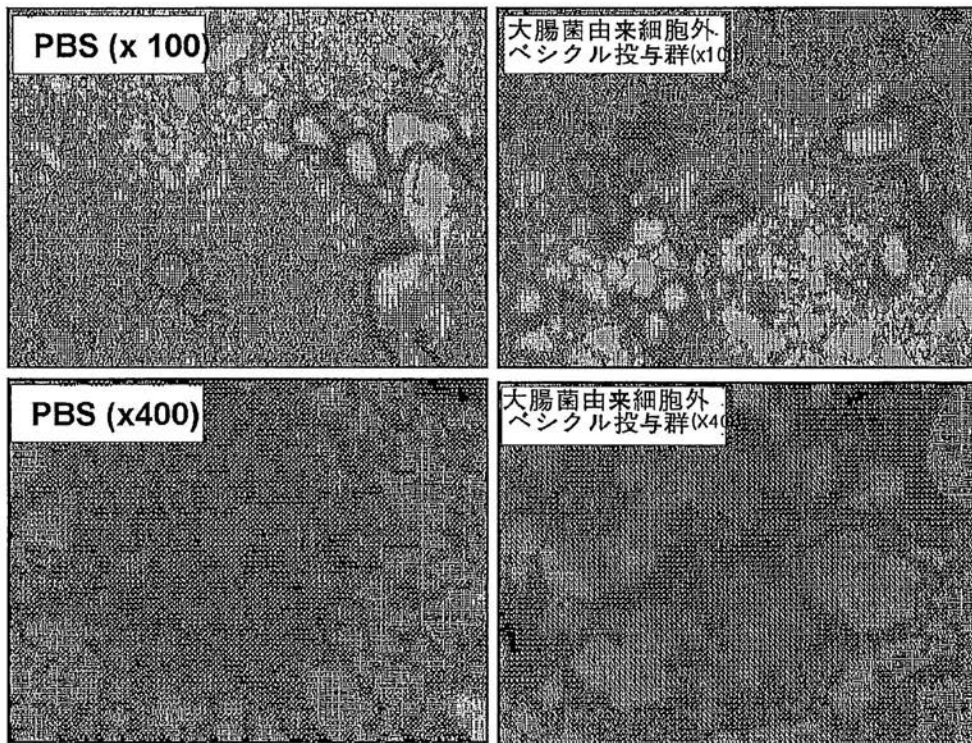
Sup-3

室内粉塵から分離した
細胞外ベシクル

ペレット

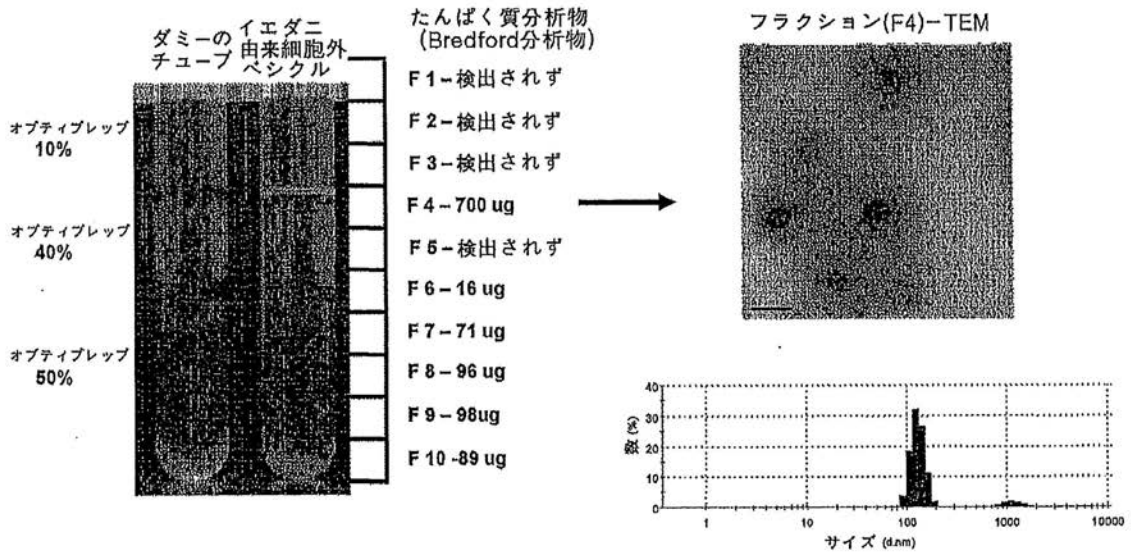
146
98
64
50
36
22
18

【図 20】

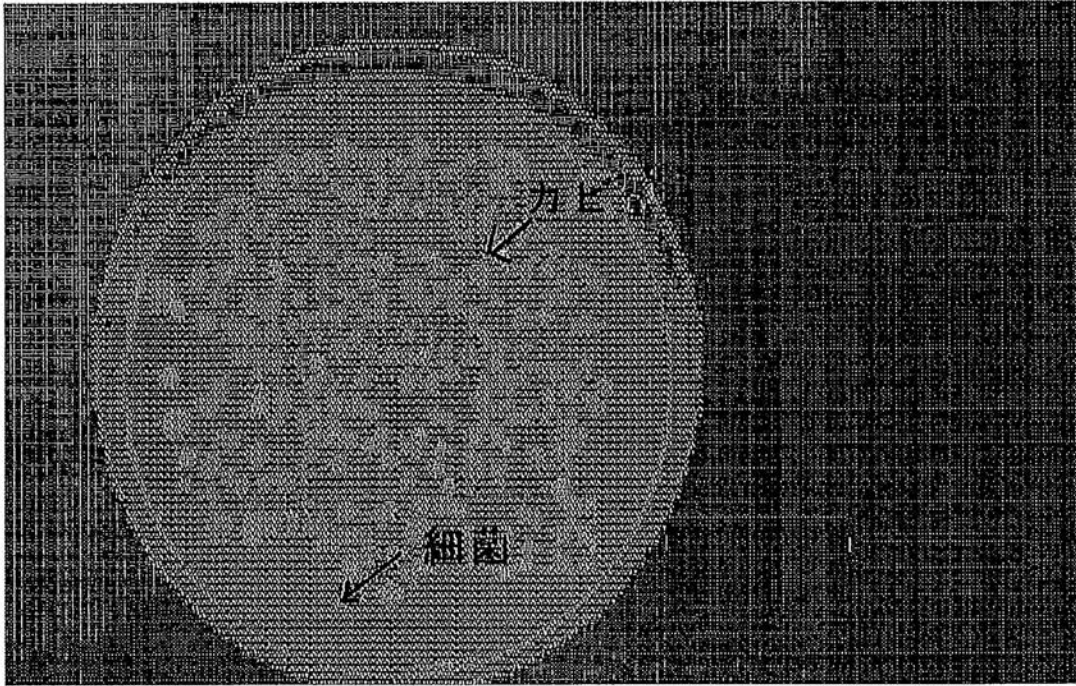


グループ	コード長, μm
PBS	30.5 (2.1)
大腸菌由来細胞外ベシクル投与群 100 ng	40.1 (1.9)

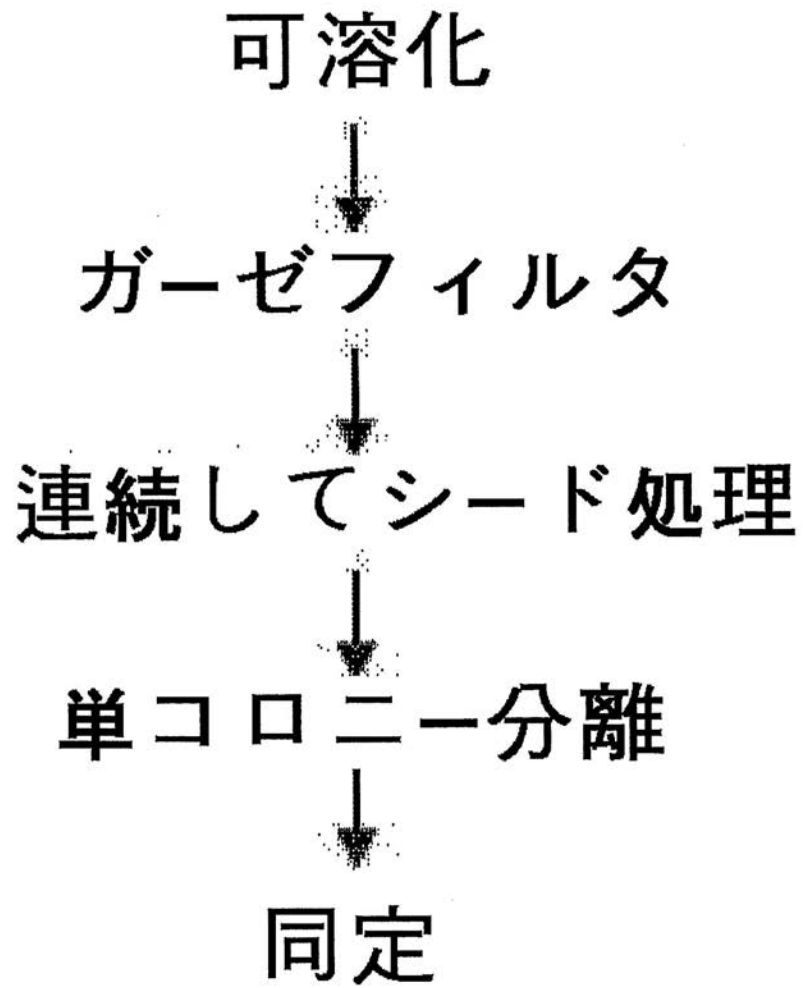
【 図 2 2 】



【 図 2 8 】



【図 29】



フロントページの続き

- | (51) Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|--------------|---|------------|
| | C 1 2 Q 1/06 | |
| (72)発明者 | コ、ヨン スン
大韓民国 ギョンサンブク ド 790 751、ポハン シ、ナム グ、ジゴク ドン、プロフ
ェッサーアパートメント、1003ホ 4 ドン | |
| (72)発明者 | キム、ユ スン
大韓民国 ギョンサンブク ド 790 784、ポハン シ、ナム グ、ヒョジャ ドン、ポス
テック バイオテック センター、207ホ | |
| (72)発明者 | チェ、ユン ジュン
大韓民国 プサン 612 883、ヘウンデ グ、チョン2 ドン、ギョンドンメルヴィル ア
partment、703ホ 103 ドン | |
| (72)発明者 | ホン、ソン ウク
大韓民国 カンウォン ド 217 753、ソクチョ シ、キョ ドン、デーウ アパートメン
ト、206ホ 106 ドン | |
| (72)発明者 | リ、ユン ヨン
大韓民国 ギョンサンブク ド 790 863、ポハン シ、ナム グ、ヘド2 ドン、160
6 ベンジ | |
| (72)発明者 | ホン、ボク シル
大韓民国 ギョンサンブク ド 790 784、ポハン シ、ナム グ、ヒョジャ ドン、ポス
テック バイオテック センター、378ホ | |
| (72)発明者 | チェ、ジョン ピョ
大韓民国 ギョンサンブク ド 790 784、ポハン シ、ナム グ、ヒョジャ ドン、ポス
テック バイオテック センター、381ホ | |
| (72)発明者 | ジ、ヨン ク
大韓民国 ギョンギ ド 463 010、ソンナム - シ、ブンダン グ、チョンジャ ドン、ハ
ンソルマウル、1702ホ 208 ドン | |

专利名称(译)	含有来自室内空气的细胞外组合物的组合物及其用途		
公开(公告)号	JP2015091241A	公开(公告)日	2015-05-14
申请号	JP2014246874	申请日	2014-12-05
[标]申请(专利权)人(译)	AEON MEDIX		
申请(专利权)人(译)	离子医务人员公司		
[标]发明人	キムユンゴン コヨンスン キムユスン チェユンジユン ホンソンウク リユンヨン ホンボクシル チェジョンピョ ジョンク		
发明人	キム、ユン-ゴン コ、ヨン-スン キム、ユ-スン チェ、ユン-ジユン ホン、ソン-ウク リ、ユン-ヨン ホン、ボク-シル チェ、ジョン-ピョ ジ、ヨン-ク		
IPC分类号	C12Q1/68 A61K45/00 G01N33/53 C12Q1/06		
CPC分类号	A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/04 G01N33/5088 G01N2800/122		
FI分类号	C12Q1/68.A A61K45/00 G01N33/53.Q G01N33/53.P G01N33/53.D C12Q1/06 C12N15/31 C12Q1/689.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QQ02 4B063/QQ06 4B063/QQ07 4B063/QQ18 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR75 4B063/QR76 4B063/QS02 4B063/QS07 4B063/QS13 4B063/QS17 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA591		
优先权	1020090095620 2009-10-08 KR		
其他公开文献	JP6293649B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种包含源自室内空气的细胞外囊泡的组合物。一种使用细胞外囊泡诊断，预防和/或治疗炎性呼吸系统疾病，肺癌等的方法。将室内空气中存在的细胞外囊泡施用于动物以产生呼吸道疾病的动物模型，这使得能够使用该动物模型搜索和/或发现用于预防和/或治疗呼吸道疾病的候选药物。预防和/或治疗疾病的疫苗，诊断呼吸道疾病的病原体，在室温下抑制空气中或细胞外的细胞外囊泡活性的方法，目的是预防呼吸道疾病的发生和恶化 如何去除囊泡。 [选择图]图12

