

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5926240号  
(P5926240)

(45) 発行日 平成28年5月25日(2016.5.25)

(24) 登録日 平成28年4月28日(2016.4.28)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 5/077 (2010.01)	C 1 2 N 5/077
C 1 2 N 5/0775 (2010.01)	C 1 2 N 5/0775
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z

請求項の数 7 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-503171 (P2013-503171)  
 (86) (22) 出願日 平成23年4月8日(2011.4.8)  
 (65) 公表番号 特表2013-523146 (P2013-523146A)  
 (43) 公表日 平成25年6月17日(2013.6.17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2011/000547  
 (87) 国際公開番号 W02011/124894  
 (87) 国際公開日 平成23年10月13日(2011.10.13)  
 審査請求日 平成26年4月2日(2014.4.2)  
 (31) 優先権主張番号 61/321,982  
 (32) 優先日 平成22年4月8日(2010.4.8)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500219618  
 ザ・ユニバーシティ・コート・オブ・ザ・  
 ユニバーシティ・オブ・エディンバラ  
 The University Cour  
 t of the University  
 of Edinburgh  
 イギリス国, エディンバラ イーエイチ8  
 9ワイエル, サウス ブリッジ, オール  
 ド カレッジ  
 (74) 代理人 100149294  
 弁理士 内田 直人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟骨形成性始原細胞、細胞の派生のためのプロトコールおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

軟骨細胞前駆細胞を調製するための方法であって、  
 (a) 霊長類多能性幹 (p P S) 細胞が 75% を超えて集密になるまで p P S 細胞を培養するステップと、  
 (b) 軟骨形成培地中でさらに培養することによりステップ (a) の細胞を分化させるステップと、  
 (c) ステップ (b) で得られた細胞を、分化転換能の喪失を特徴とする軟骨細胞前駆細胞の集団に細胞が脱分化するまで、軟骨細胞分化に必要な因子を欠く限定最小成長培地で培養するステップと  
 を含む方法。

【請求項2】

軟骨細胞前駆細胞を調製するための方法であって、  
 (a) 霊長類多能性幹 (p P S) 細胞が 75% を超えて集密になるまで p P S 細胞を培養するステップと、  
 (b) 軟骨形成培地中でさらに培養することによりステップ (a) の細胞を分化させるステップと、  
 (c) ステップ (b) で得られた細胞を、細胞の 1% 以下が Oct 4、Nanog および / または tra - 1 - 60 を発現し、細胞の 85% 以上が C B F A 1 を発現することを特徴とする軟骨細胞前駆細胞の集団に細胞が脱分化するまで、軟骨細胞分化に必要な因子を

欠く限定最小成長培地で培養するステップとを含む方法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法により得られた細胞を軟骨形成培地で培養することを含む、軟骨細胞を調製するための方法。

【請求項 4】

対象の変性軟骨疾患または軟骨損傷を処置する組成物の調製における、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法によって得られた軟骨細胞前駆細胞の使用。

【請求項 5】

化合物を、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法によって得られた軟骨細胞前駆細胞の集団と組み合わせ、その効果を決定することにより、化合物を、軟骨細胞の成長、分化または軟骨成分の合成を調節するその能力についてスクリーニングする方法。

【請求項 6】

請求項 3 に記載の方法によって得られた非自己の軟骨細胞を含有する、*in vivo* で軟骨を生成、修復または維持するための医薬組成物。

【請求項 7】

生着された細胞組成物を拒絶する免疫応答を生じることなく対象に生着される細胞組成物の製造における、請求項 1 または 2 に記載の方法によって得られた非自己の軟骨細胞系細胞の使用であって、細胞組成物が非自己の軟骨細胞系細胞を含み、細胞組成物が免疫調節化合物を投与することなく対象に投与される、軟骨細胞系細胞の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、全般的に、細胞生物学、胚性幹細胞および細胞分化の分野に関する。本発明は、軟骨形成性始原細胞と、そのような細胞および完全に分化した軟骨細胞の調製のための方法とを開示し、それらには、当該細胞の使用も含まれる。

【背景技術】

【0002】

軟骨細胞は、軟骨で見出される特殊化された細胞である。軟骨中の軟骨細胞は、コラーゲン繊維、プロテオグリカンに富む基底質およびエラスチン繊維で構成される大量の細胞外基質を生成する。軟骨組織は、骨格関節における構造的および機械的な機能を果たし、いかなる疾患または損傷も結果的に患者を衰弱させる。

【0003】

軟骨分解は、2つの疾患群の特徴である：変性状態である変形性関節症および主に炎症により引き起こされる関節リウマチ。分解は、関節痛および身体障害になり得る程度の運動性障害を導く。

【0004】

このような疾患の進行を阻害するために効果的な抗炎症剤の開発が、著しく進んでいる。しかし、分解または損傷が既に生じている場合、関節軟骨の再生を支援するために新しい療法が必要とされている。

【0005】

再生医療の分野において、軟骨を修復できる細胞集団を開発することに努力が向けられている。関節軟骨細胞の樹立系統が、WO 96 / 18728 に記載され、軟骨細胞成長および分化の方法が、WO 98 / 55594 に報告されている。WO 00 / 27996 は、最小必須培地、増殖因子、脂質およびアミノ酸を含む軟骨細胞様細胞用の血清フリー培地を報告している。US 6,150,163 は、軟骨細胞培地処方および培養手順の概要を記載し、ここでは、分化したヒト関節軟骨細胞を、TGF とインスリンまたはインスリン様増殖因子のいずれかとを含有する培地で成長させる。*in vitro* で培養した初代軟骨細胞が、適当な因子で処理されないならば脱分化することも報告されている (Benyara, Cell 1982 30:215)。生成される細胞は、外観が線維芽細胞

10

20

30

40

50

状であり、MSC様であることがある。

【0006】

Jorgensenら(Ann. Rheum. Dis. 60:305、2001)は、関節炎における軟骨および骨の修復のための幹細胞における最近の進展について総説している。Jakobら(J. Cell. Biochem. 26:81、2001)は、軟骨形成(chondrogenesis)と軟骨形成(cartilage formation)とを増進する成体ヒト関節軟骨細胞の増殖および再分化に関与する特定の増殖因子について研究した。M. Brittberg(Clin. Orthop. 367 Suppl: S147、1999)は、純粋軟骨細胞またはその他の間葉系細胞を自己からまたは健常組織供給源から同種移植片として採集し、in vitroで増殖させ、次いで欠損に高密度で植え込む現在の軟骨細胞移植手順について総説している。

10

【0007】

今日までに報告されている臨床的方法の初期の成功にもかかわらず、軟骨細胞の現在の供給源は、診療所に現れる軟骨変性の事例のほとんどを処置するには不十分であることが明確である。さらに、免疫抑制薬の使用に関する問題が、新しい移植プロトコルの開発の成功を複雑にしている。

【0008】

再生医療は、様々な型の始原細胞の単離、培養および使用に関する最近の進歩からも恩恵を受けている。胚性幹細胞は、2つの非常に特別な特性を有する。まず、その他の典型的な哺乳動物細胞の型とは異なって、これらは、それらの多能性を維持しながらほぼ無期限に培養で増殖でき、実質的に無限の供給をもたらす。第2に、これらは、細胞療法で用いるための置換細胞および組織の供給源として、または医薬品のスクリーニングにおいて用いるための対象とする様々な組織の型を作製するために用いることができる。結果として、幹細胞は、軟骨細胞の潜在的な供給源とみなされる。

20

【0009】

Kramerら(Mech. Dev. 92:193、2000)は、マウス胚性幹細胞を、骨形成タンパク質(BMP-2およびBMP-4)を用いて調節して、軟骨細胞の特徴であるアルシアンブルーで染色され、転写因子スクレラキスを発現する細胞を生成できることを報告した。しかし、胚性幹細胞発生のマウスモデルは、他の種に用いることができる分化のための方策を必ずしももたらさない(例えばGinisら(2004)Dev. Biol. 269:360を参照されたい)。

30

【0010】

Thomsonら(US 5,843,780; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844、1995)は、霊長類からの多能性幹細胞の単離および増殖に初めて成功した。彼らは、その後、ヒト胚盤胞からのヒト胚性幹(hES)細胞系統を樹立した(Science 282:114、1998)。Gearhartらは、胎性生殖腺組織からのヒト胚性生殖(hEG)細胞系統を樹立した(Shambloottら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726、1998; およびUS 6,090,622)。hESおよびhEG細胞はともに多能性幹細胞の長年求められてきた特徴を有する。これらは分化なしで長期にわたって培養でき、これらは正常核型を有し、これらは3つ全ての一次胚葉からの細胞型を含むいくつかの重要な細胞型を生成できる。

40

【0011】

間葉系始原体は、hES細胞から、WO 03/004605に記載される方法に従って作製できる。hES由来間葉系細胞は、次いで、骨形成タンパク質(特にBMP-4)のような骨形成因子、ヒトTGF-受容体のリガンドまたはヒトビタミンD受容体のリガンドを含有する培地中で骨芽細胞系細胞にさらに分化できる(WO 03/004605; Sotileら、Cloning Stem Cells 2003; 5(2):149~55)。軟骨細胞またはそれらの始原体は、WO 03/050250に列挙される分化因子の効果的な組み合わせを有する微小凝集体中でhES細胞を培養することにより作製

50

できる。

【0012】

Hegertrら(J. Cell Sci. 115: 4617、2002)は、マウス胚性幹細胞で構成される胚葉体に由来する軟骨細胞の分化可塑性を報告した。Tohらは、ヒト胚性幹細胞からの増殖可能な軟骨形成性細胞の*in vitro*での分化および富化について記載している(J. Cell. Mol. Med.、2009 - 早期オンライン公開引用参照10.1111/j.1582-4934.2009.00762.x)。

【0013】

治療用および研究用の軟骨細胞始原細胞および成熟軟骨細胞の両方を含む十分な量の軟骨細胞系細胞を生成できる効率的で拡張できる方法に対する必要性がまだ存在する。また、拡張できる条件下の培養で維持でき、成熟軟骨細胞またはコラーゲンII、アグリカンおよびグリコサミノグリカンのようなタンパク質を発現する細胞に直ちに分化できる安定な軟骨細胞前駆体を単離できるならば、有用である。

10

【0014】

しかし、hES細胞のような未分化始原細胞集団に由来する軟骨細胞の調製物を用いても、軟骨細胞の細胞集団を用いる移植療法において免疫抑制薬を用いる必要性がまだ残っており、これは、患者における移植体の長期間の成功にとって好ましくない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

したがって、移植において免疫抑制薬を用いる必要性を回避する、霊長類多能性細胞を完全に機能的な軟骨細胞に分化させるため、およびそのような軟骨細胞を直ちに生じさせ得る軟骨細胞前駆細胞型に分化させるための新しいアプローチを開発することが必要である。霊長類多能性幹細胞から*in vitro*で分化した軟骨細胞のような軟骨細胞を、免疫抑制および/または抗炎症剤を用いることなく治療に用いるための新しいアプローチを開発することも必要である。免疫抑制および/または抗炎症剤を用いることなく、霊長類多能性幹細胞から*in vitro*で分化した軟骨細胞のような軟骨細胞を用いて対象を治療するための新しいアプローチを開発することがさらに必要である。

20

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明は、本明細書で定義するあるタンパク質マーカーの発現を特徴とする軟骨細胞始原細胞または前駆細胞の新規な集団を提供する。細胞は、分化転換能の喪失も特徴とし得る。

30

【0017】

軟骨細胞前駆体または始原体の集団は、pPS細胞を本発明の方法により分化させることにより得ることができ、成熟軟骨細胞の特徴を有する子孫を形成できる。軟骨細胞始原体は、もはや多能性でないが、軟骨細胞発生経路に方向付けされている。

【0018】

本発明は、軟骨細胞および軟骨細胞始原細胞または軟骨細胞前駆細胞の調製のための本明細書で定義するシステムも提供する。単離された軟骨細胞始原細胞もしくは軟骨細胞前駆細胞またはそれらの*in vitro*集団は、霊長類多能性幹(pPS)細胞の集団を、軟骨形成培地中で、細胞が75%を超えて集密になるまで分化させ、その後、細胞を洗浄し、限定最小成長培地に再懸濁し、さらなる期間、分化転換能の喪失を特徴とする細胞の集団(例えば細胞を骨形成培地中でその後培養して骨芽細胞を形成できない)に細胞が分化するまで培養することにより調製される。この培養物の細胞は、線維芽細胞の形態、ES多能性マーカーまたは間葉系幹細胞(MSC)マーカーの発現の非存在および軟骨形成マーカーの発現の非存在も特徴とする。この培養物の細胞は、肥大軟骨細胞および骨形成についての核マーカーの発現の存在も特徴とする。この特徴は、よって、これらの細胞を、初代(非肥大性)軟骨細胞から区別する。

40

【0019】

50

これらのマーカーを検出するための適切なアッセイは、本明細書に記載される。多能性マーカーは、Oct4、Nanogおよび/またはTra-1-60を含む。軟骨形成のマーカーは、コラーゲンIIを含む。肥大軟骨細胞および骨形成についての核マーカーは、CBFA1/RunX2を含む。

【0020】

分化転換能の喪失（例えば細胞を骨形成培地中でその後培養して骨芽細胞を形成できない）は、骨形成培地中でのさらなる培養による軟骨細胞前駆細胞における石灰化の非存在により示すことができる。

【0021】

本発明の方法に従って調製される軟骨細胞始原細胞または軟骨細胞前駆細胞の発現マーカーによる特徴決定を表1に示し、発現の非存在（「陰性」）は、よって「-」で示し、発現の存在（「陽性」）は、よって「+」で示す。

【0022】

【表1】

表1

マーカー	発現状態 (-/+)	特徴
Nanog	-	多能性
Oct4	-	多能性
Tra-1-60	-	多能性
コラーゲンII	低い	軟骨形成
CBFA1/RunX2	+	肥大軟骨細胞 / 骨形成
コラーゲンX	-	肥大軟骨細胞
オステオカルシン	-	骨形成
CD105	-	軟骨細胞
Stro-1	-	間葉系幹細胞

【0023】

集団の細胞の約7%未満はコラーゲンIIを発現しないが、集団の残りの93%はこのマーカーを低レベルで発現する。このマーカーの発現は、よって、完全に分化した軟骨細胞の集団で見られる発現レベル未満である。

【0024】

軟骨細胞始原細胞または軟骨細胞前駆細胞は、上記の特性の観点で、以前に既知の軟骨細胞または前駆細胞から区別される。細胞は、細胞を調製するために用いる手段により、脱分化定向軟骨細胞始原細胞（DCCPC）または誘導軟骨細胞前駆細胞（ICPC）とすることがある。細胞がその後軟骨細胞に分化する能力の観点で、細胞は、「フォワード-バック軟骨細胞」またはFBCと記載することもある。いずれのこれらの用語も、交換可能に用いてよい。

【0025】

DCCPCは、洗浄の後に軟骨形成培地でさらに培養できる。その後の培養は、コラーゲンIIおよびコラーゲンXのマーカーを用いて軟骨細胞と特徴決定できる細胞の集団をもたらす。生成される軟骨細胞は、高レベルのコラーゲンIIを発現するが、コラーゲンXをほとんどまたは全く発現しない。

## 【 0 0 2 6 】

本発明は、移植用の本発明により調製されたDCCPCから分化した軟骨細胞の集団も提供する。驚くべきことに、完全に分化した軟骨細胞の細胞集団は、FK-506、シクロスポリンなどのような免疫抑制化合物なしで対象に投与できる。さらに、プレドニゾンなどのような抗炎症剤も要求されない。本発明のこの実施形態は、本発明の軟骨細胞から調製されるDCCPCの集団を、それを必要とする対象に移植することを含む変性軟骨疾患または軟骨損傷を処置する方法に拡張される。

## 【 0 0 2 7 】

本発明は、本明細書に記載するDCCPCを分化させることにより得られた軟骨細胞を含む単離または*in vitro*の細胞集団も提供する。軟骨細胞系細胞は、例えばII型コラーゲンまたはアグリカンを生体内遺伝子から合成する能力により同定できる。好ましくは、集団は、弾性軟骨、線維軟骨、肥大軟骨または骨を合成する細胞を最小限の割合で含有する。

10

## 【 0 0 2 8 】

集団中の未分化多能性細胞の割合は、好ましくは最小限であり、いずれの残存未分化細胞も、さらなる増殖により軟骨細胞を形成することを担う細胞でない。

## 【 0 0 2 9 】

本発明の別の実施形態は、本発明の細胞集団を、結合組織タンパク質が生成される条件下でインキュベートすることにより軟骨を生成する方法である。本発明の別の実施形態は、化合物を、本発明の細胞集団と組み合わせ、その効果を決定することにより、化合物を軟骨細胞の成長、分化または軟骨成分の合成を調節するその能力についてスクリーニングする方法である。

20

## 【 0 0 3 0 】

本発明の別の実施形態は、pPS細胞を*in vitro*で軟骨細胞に分化させる方法であって、pPS細胞を軟骨細胞前駆細胞に分化させるために適切な培地中でpPSを培養することと、(場合によって軟骨細胞前駆細胞を単離することと)、線維芽細胞様形態および核CBFA-1発現を有する細胞に軟骨細胞前駆体が脱分化するように培養条件を変更することと、その後、細胞を完全に分化した軟骨細胞に再分化させることとを含む方法である。

## 【 0 0 3 1 】

場合によって、霊長類多能性幹細胞またはヒト胚性幹細胞のような幹細胞の再生能力は、テロメラーゼ活性を増加することにより改善できる。

30

## 【 0 0 3 2 】

本発明の別の実施形態は、本発明の細胞集団またはそれに由来する完全に分化した軟骨細胞の細胞集団を含有する、軟骨を*in vivo*で生成、修復または維持するための医薬組成物、および例えば整容手術においてまたは関節外傷、関節炎もしくは変形性関節症の処置において対象における関節軟骨を含む軟骨を再構築するためのそのような医薬品の使用である。

## 【 0 0 3 3 】

本発明のこれらのおよびその他の実施形態を、以下にさらに説明する。

40

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 3 4 】

【 図 1 】 DCCPC プロトコールによる形態変化を示す図である。14日間にわたる初期の軟骨形成性分化の後に、H7細胞は、密な3次元コロニーに濃縮される。大量の細胞死が観察され、ここでは、生存付着細胞の上の明位相差のクラスタとして観察される(A)。脱分化培地中で5日間の後に、細胞は、3次元コロニーからその周囲の遊離空間に遊出して、線維芽細胞様細胞の単層を形成する(B)。

【 図 2 】 DCCPC に対するCBFA-1 / RunX2 染色によるDCCPCにおける核CBFA-1タンパク質発現を示す図である。DCCPCプロトコールに入る前にmTESR(商標)または馴化培地(CM)で培養したH7細胞を、抗CBFA-1抗体で染色

50

した。hESC系統RCM1も同じ抗体で染色した。全ての場合において、CBFA-1抗体は、DNA結合色素DAPIとともに局在する。

【図3】骨形成培地を用いて分化したDCCPCにおけるI型コラーゲンおよび石灰化の存在を示す図である。DCCPCは、骨形成性分化の後にマトリックスを石灰化できない。H7(A)およびH1(B)細胞系統から作製されたDCCPCは、骨形成培地での培養後に細胞外I型コラーゲタンパク質生成の増加を示す。フォンコッサ染色プロトコールは、カルシウム沈着物が存在する場合に、濃茶/黒色の染色を示す。両方の細胞系統における染色の非存在は、カルシウムの非存在、よってマトリックス石灰化の非存在を示す。

【図4】再分化DCCPCを用いたWTラットにおける21日後のDCCPCによるin vivo軟骨修復の促進を示す図である。CMで前もって培養したH7系統から作製したDCCPCを、構築物フォーマットで培養し、WTラットに植え込んだ。1つの構築物を、ラット後肢の滑車溝中の1mm欠損に入れた。21日後に、肢を低温切開し、H&Eで染色した。矢印は、再生した物質の広がりを示す。

【図5】DCCPCプロトコールの模式図である。軟骨形成培地を用いて、pPSを軟骨始原細胞様細胞に向かって分化させる(1)。このプロセスは、高い細胞死、多能性および多分化能マーカーの喪失ならびにII型コラーゲン生成の開始を特徴とする。軟骨形成培地をさらに用いることにより、完全に分化した軟骨細胞が生成されるが、DCCPCプロトコールの一部ではなく(2)、代わりに、軟骨細胞前駆細胞を、脱分化培地中で、細胞が線維芽細胞様形態および核CBFA-1発現を示すまでインキュベートする。多能性および多分化能マーカーの非存在は維持される(3)。DCCPCは、次いで、軟骨形成培地を用いて完全に分化した軟骨細胞に再分化できる(4)。

【発明を実施するための形態】

【0035】

本発明は、重要で有用な特性を有するDCCPCの集団を調製する手段を提供する。これらは、大量に成長させて維持し、次いで、成熟軟骨細胞のようなコラーゲンIIを発現する細胞に直ちに分化できる。このような細胞から調製した分化した軟骨細胞は、本明細書に記載するように移植療法およびスクリーニング法のような用途に用いることができる。

【0036】

以下の本開示は、本発明の軟骨細胞前駆細胞およびそれに由来する軟骨細胞をどのように作製するかについての完全な記述を提供する。本開示は、これらの細胞を研究および薬学的開発においてどのように用いることができるかの網羅的な説明を提供する。本開示は、関節運動性を回復するための軟骨の再生およびリモデリングのためならびに整容目的のためのDCCPCの使用のための医薬組成物、デバイスおよび処置方法も提供する。

【0037】

定義

本発明の目的のために、そうでないと明記しない限り、用語「軟骨細胞」は、II型コラーゲンおよびアグリカンの合成により軟骨を形作ることができる成熟細胞のことをいう。用語「脱分化定向軟骨細胞始原細胞(DCCPC)」は、分化して成熟軟骨細胞を形成でき、以下に記載するマーカー発現プロファイルを特徴とする本発明の方法により調製される特殊化始原細胞のことをいうために用いられる。軟骨細胞形態の細胞は、丸い細胞体を有し、軟骨形成性培養において、細胞は密なコロニーにクラスタ形成する。

【0038】

細胞個体発生の関係において、形容詞「分化した」は相対的な用語である。「分化した細胞」は、比較する細胞よりも発生経路をさらに下方に進んだ細胞である。

【0039】

「分化誘導剤」は、本開示で用いる場合、本発明の培養系で用いて、軟骨細胞系の分化した細胞(DCCPCのような前駆細胞および成熟軟骨細胞のような終末分化細胞)を生成する一連の化合物の1つのことをいう。化合物の作用形態について制限することを意図

10

20

30

40

50

しない。例えば、誘導剤は、表現型の変更を誘導もしくは支援するか、特定の表現型を有する細胞の成長を促進するかまたはその他のものの成長を遅らせることにより分化プロセスを支援できる。これは、培地中に存在するかまたは細胞集団により合成されることがある、そうでなければ分化を望ましくない細胞型への経路の下方に向けるその他の因子の阻害剤として作用してもよい。

【 0 0 4 0 】

原型「霊長類多能性幹細胞」(pPS細胞)は、正しい条件下でいくつかの異なる細胞型の子孫を生成できる多能性細胞である。pPS細胞は、3つの胚葉、内胚葉、中胚葉および外胚葉のそれぞれの派生物である子孫を、当該技術において受け入れられている標準的な試験に従って生成でき、例えば適切な宿主において奇形腫を形成する能力、または3つ全ての胚葉の組織型についてのマーカーを有する細胞に培養において分化する能力である。

10

【 0 0 4 1 】

様々な型の胚性細胞、例えば以下で定義されるhES細胞；アカゲザルもしくはマーモセット幹細胞(Thomsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844、1995；Developmental Biology 38:133、1998)のようなその他の霊長類からの胚性幹細胞；およびヒト胚性生殖(hEG)細胞(Shambloottら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726、1998)は、pPS細胞の定義に含まれる。その他の型の多能性細胞もこの用語に含まれる。3つ全ての胚葉の派生物である子孫を生成できる霊長類起源の細胞はいずれも、それらが胚性組織、胎性組織またはその他の供給源に由来するかにかかわらず含まれる。核型が正常であり、悪性供給源に由来しないpPS細胞を用いることが有利である。

20

【 0 0 4 2 】

pPS細胞は、細胞および樹立細胞系統を含む。細胞は、受精後の任意の時間での前胚性、胚性または胎性の組織に由来してよい。上記の特徴を有する誘導多能性幹(iPS)細胞もこの用語に含まれる(例えばTakahashiら(2007)Cell 131:1を参照されたい)。

【 0 0 4 3 】

霊長類多能性幹細胞は、典型的に、段階特異的胚性抗原( SSEA )3および4、ならびにTRA-1-60およびTRA-1-81と命名される抗体を用いて検出可能なマーカーを発現する。未分化pPS細胞も、典型的に、RT-PCRにより検出されるように、転写因子Oct3/4、Crip1、Gastrin放出ペプチド(GRP)受容体、ポドカリキシン様タンパク質(PODXL)、nanogおよびテロメラーゼ逆転写酵素、例えばhTERT(US2003/0224411A1)を発現する。

30

【 0 0 4 4 】

原型「ヒト胚性幹細胞」(hES細胞)は、Thomsonらにより記載される(Science 282:1145、1998；米国特許第6,200,806号)。この用語の範囲は、3つの胚葉への細胞の実質的な分化前のin vitro受精卵のような未着床の胚盤胞に由来する多能性幹細胞をカバーする。当業者は、明示的にそうでないことが要求されない限り、この用語が、一次組織およびhES細胞の表現型の特徴を有する樹立系統ならびに3つの胚葉のそれぞれの子孫を生成する能力をまだ有するそのような系統の派生物を含むことを認識する。

40

【 0 0 4 5 】

hES細胞培養物のようなpPS細胞培養物は、集団における幹細胞およびそれらの派生物の実質的な割合が未分化細胞の形態的特徴を示し、胚または成体起源の分化した細胞からそれらが明確に区別される場合に「未分化」と記載される。未分化pPS細胞は、当業者により容易に認識され、典型的に、顕微鏡観察において2次元で観察され、高い核/細胞質比率および顕著な核小体を有する。集団内の未分化細胞のコロニーは、分化した隣接細胞にしばしば囲まれていると理解される。それにもかかわらず、未分化コロニーは、

50



集団を適当な条件下で培養または継代した場合に持続し、個別の未分化細胞は、細胞集団の実質的な割合を構成する。実質的に未分化の培養物は、進行中をベースとして少なくとも20%の未分化pPS細胞を含有し、好ましさを増加するために少なくとも40%、60%または80%を含有し得る（未分化である同じ遺伝子型を有する細胞のパーセンテージの点で）。

【0046】

上で論じたように、多能性細胞のその他の供給源は、誘導多能性幹（iPS）細胞を含む。iPS細胞は、Yamanakaらの技術により、線維芽細胞への遺伝子Oct-3/4、SOX2、c-MycおよびKlf4のレトロウイルス感染を用いて調製できる。マーカーNanogを用いるiPS細胞の選択が有利であると考えられる（Takahashi, K. およびYamanaka, S., Cell, 126:663, 2006; Yamanaka Sら、Nature 448:313, 2007; Wernig Mら、Nature 448:318, 2007; Maherali Nら、Cell Stem Cell 1:55, 2007）。より最近では、Thomsonらが、レンチウイルス系を用いて（Science, 318:1917, 2007）および非組み込み型エピソームベクター（Science, 324:797, 2009）もうまく用いて、遺伝子OCT4、SOX2、NANOGおよび異なる遺伝子LIN28のわずかに異なるミックスを用いた。

10

【0047】

培養物または細胞集団について、本開示において「分化なしで」増殖すると言及する場合いつでも、これは、増殖の後に、組成物が上記の定義に従って実質的に未分化であることを意味する。少なくとも4回の継代（約20回の倍加）を分化なしで増殖する集団は、元来の培養物と同じ集密の程度で評価する場合に、実質的に同じ割合の未分化細胞（またはおそらくより高い割合の未分化細胞）を含有する。

20

【0048】

「栄養培地」は、増殖を促進する栄養素を含有する細胞培養用の培地である。栄養培地は、典型的に、等張生理食塩水、緩衝剤、タンパク源（1または複数の添加タンパク質もしくははアミノ酸の形態で）ならびに可能であればその他の外添加栄養素および増殖因子を含有する。

【0049】

「軟骨形成培地」は、必須ミネラル、アミノ酸、ビタミンおよび細胞培養用基材ならびに細胞を軟骨細胞に分化させるために必要な因子を含む。典型的な軟骨形成培地は、少なくとも1つのホルモン、増殖因子、非必須アミノ酸および/または補因子を補充した限定最小成長培地を含み得る。

30

【0050】

「馴化培地」は、培地中で細胞の最初の集団を培養し、次いで培地を採集することにより調製される。馴化培地（細胞により培地中に分泌される全てのものとともに）は、次いで、細胞の2番目の集団の成長を支持するために用いることができる。特定の成分または因子を培地に加えたと記載する場合、これは、その因子（またはその因子を分泌するように工学的に操作された細胞または粒子）が、計画的な操作により培地に混合されたことを意味する。

40

【0051】

「限定最小成長培地」は、必須ミネラル、アミノ酸、ビタミンおよび細胞の培養用基材を含む。典型的な限定成長培地は、1または複数の無機塩、アミノ酸、ビタミン、糖、緩衝剤、指示色素もしくはは着色剤を含み得る。

【0052】

「新鮮培地」は、最終的に支持するように設計された細胞型とともに用いる前に異なる細胞型と培養することにより意図的に馴化されていない培地である。それ以外は、その調製方法、貯蔵または使用について制限することを意図しない。これは、最終培養物に新鮮なまま（交換または注入により）加えられ、ここでこれは存在する細胞型により消費また

50

はそうでなければ処理される。

【0053】

「骨形成培地」は、必須ミネラル、アミノ酸、ビタミンおよび細胞の培養用基材ならびに細胞を骨細胞に分化させるために必要な因子を含む。典型的な骨形成培地は、1または複数の血清タンパク質、アミノ酸、非必須アミノ酸および/もしくは補因子を補充した限定成長培地を含み得る。

【0054】

「フィーダー細胞」または「フィーダー」は、別の細胞型と共培養されて、第2の細胞型が成長できる環境を提供するある細胞型を記載するために用いられる用語である。ある型のpPS細胞は、初代マウス胚性線維芽細胞、不死化マウス胚性線維芽細胞またはhES細胞から分化したヒト線維芽細胞様細胞により支持できる。pPS細胞集団は、pPS細胞の成長を支持するために新鮮なフィーダー細胞が加えられない分離の後に少なくとも1回通して細胞が成長したならば、フィーダー細胞を「本質的に含まない」という。

【0055】

用語「胚葉体」は、pPS細胞が単層培養において過剰に成長したかまたは懸濁培養で維持された場合に出現する、分化した細胞と未分化細胞との凝集物に言及する「凝集体」と同意の当該技術における用語である。胚葉体を形成するための出発物質は、未分化多能性幹細胞の培養物である。胚葉体は、典型的にいくつかの胚葉からの異なる細胞型であるとともに、形態的基準および免疫細胞化学により検出可能な細胞マーカーにより区別可能な少なくともいくつかの多能性細胞の混合物である。典型的に、胚葉体中の多能性幹細胞の数は、分化した細胞の数が増加するにつれて時間とともに減少する。胚葉体の関係において生じる分化は、本質的に無作為な事象であり、よって、同一条件下で培養した各胚葉体は、細胞組成の点で典型的に同一でない。この用語は、軟骨細胞系細胞の作製において用いた構築培養物とは、構築培養物が出発物質が未分化多能性幹細胞を主に含む培養物でなく、むしろ多能性状態から離れて、典型的には軟骨細胞系経路の下方に分化し始めた細胞を含む培養物である点で区別される。よって、構築物が出発物質は、発生の点でより進展した細胞である。さらに、構築培養物は、典型的に、軟骨細胞経路のような所望の経路の下方の培養物の分化に特異的に向けられた1または複数の因子を含む。

【0056】

「成長環境」は、対象の細胞が*in vitro*で増殖、分化または成熟する環境である。環境の特徴は、細胞が培養される培地、存在し得る任意の増殖因子または分化誘導因子および存在するならば支持構造（例えば固体表面上の基材）を含む。

【0057】

細胞は、ポリヌクレオチドが人工的操作の任意の適切な手段により細胞に移された場合または細胞がそのポリヌクレオチドを受け継いだ元来変更された細胞の子孫である場合に、「遺伝子変更された」、「トランスフェクトされた」または「遺伝子転換された」という。ポリヌクレオチドは、対象のタンパク質をコードする転写可能配列をしばしば含み、これは細胞がタンパク質を上昇したレベルで発現することを可能にする。遺伝子変更は、変更された細胞の子孫が同じ変更を有するならば、「遺伝性」という。

【0058】

処置する(*Treat*)、処置、処置する(*treating*)は、本明細書で用いる場合、以下のいずれかを意味する：疾患もしくは状態の重篤度の低減；疾患経過の期間の低減；疾患もしくは状態と関連する1または複数の症状の改善；疾患もしくは状態を必ずしも治癒することなく疾患もしくは状態を有する対象に対する有利な効果の提供；疾患もしくは状態と関連する1または複数の症状の予防。

【0059】

全般的な技術

分子遺伝学および遺伝子工学における全般的な方法は、現行版の*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrookら、Cold Spring Harbor)；*Gene Transfer Vectors*

10

20

30

40

50

for Mammalian Cells (MillerおよびCalos編);および  
 Current Protocols in Molecular Biology (F.  
 M. Ausubelら編、Wiley & Sons)に記載される。細胞生物学、タンパ  
 ク質化学および抗体技術は、Current Protocols in Protei  
 n Science (J. E. Colliganら編、Wiley & Sons); Cur  
 rent Protocols in Cell Biology (J. S. Bonif  
 acinoら、Wiley & Sons)およびCurrent Protocols in  
 Immunology (J. E. Colliganら編、Wiley & Sons.)  
 で見出すことができる。本開示で言及する遺伝子操作のための試薬、クローニングベクタ  
 ーおよびキットは、BioRad、Stratagene、Invitrogen、Cl  
 onTechおよびSigma-Aldrich Co.のような商業的な業者から入手  
 可能である。

10

## 【0060】

細胞培養方法は、全般的に、現行版のCulture of Animal Cell  
 s: A Manual of Basic Technique (R. I. Freshn  
 ey編、Wiley & Sons); General Techniques of Ce  
 ll Culture (M. A. HarrisonおよびI. F. Rae、Cambri  
 dge Univ. Press)およびEmbryonic Stem Cells: M  
 ethods and Protocols (K. Turksen編、Humana P  
 ress)に記載される。対象のその他の参考文献は、Culture Is Our  
 Business (M. McLuhan、Ballantine Books、1970  
 );およびUnderstanding Media (M. McLuhan、Signe  
 t、1970)を含む。組織培養用品および試薬は、Gibco/BRL、Nalgen  
 e-Nunc International、Sigma Chemical Co.お  
 よびICN Biomedicalsのような商業的な業者から入手可能である。

20

## 【0061】

軟骨の生物学および病理学ならびに関節の維持における軟骨細胞の役割の全般的な局面  
 は、以下の参考書で見出すことができる: MechanoBiology: Cartil  
 age and Chondrocyte、J. F. Stoltz編、IOS Pres  
 s 2000; Biological Regulations of the Cho  
 ndrocytes、M. Adolphe編、CRC Press 1992; Bone  
 and Cartilage Allografts、G. E. Friedlaend  
 erら編、Amer. Acad. Orthopaedic 1991; Joint Ca  
 rtilage Degradation、J. F. WoessnerおよびD. S. H  
 owell編、Marcel Dekker 1992; Skeletal Tissu  
 e Mechanics、第2版、R. B. Martinら、Springer Ver  
 lag 1998; Molecular and Developmental Bio  
 logic of Cartilage、B. De Crombrugheら編、Ann  
 . N. Y. Acad. Sci. 第785巻: 1996;およびJoint Struct  
 ure and Function: A Comprehensive Analysi  
 s、第3版、P. K. LeVangieら編、F A Davis、2000。

30

40

## 【0062】

軟骨細胞および軟骨細胞始原細胞の調製

本発明の方法は、軟骨細胞および軟骨細胞始原細胞または前駆細胞の調製のための本明  
 細書で定義するシステムを提供する。hES細胞の培養物は、標準的なhES培養条件下  
 で、完全集密の4分の3より多くの胚葉体を形成することなく付着して成長する。

## 【0063】

培地を、次いで、本明細書に記載する軟骨形成分化培地に交換し、適当な期間、例えば  
 約13~15日間、適切には14日間培養し、洗浄し、脱分化培地に入れ、適当なさらなる  
 期間、例えば4~6日間、適切には5日間、構築培養物を形成することなく付着して培

50

養し、トリプシン処理し、再懸濁する。この時点で、細胞は、単離された初代軟骨細胞とは、形態および特性の点で異なる。さらに21日間の期間軟骨形成培地中で細胞をさらに培養することにより、軟骨細胞を生成できる。しかし、骨形成培地（デキサメタゾン、ベータグリセロールリン酸、アスコルビン酸、ピルビン酸ナトリウムおよびL-グルタミンを含む。適切な基本培地は、商業的に入手可能なKnockout（商標）D-MEM（Invitrogen）（これは、血清を含んで供給されることがある）を含み得る）中の同じ軟骨細胞前駆体の培養は、機能的骨芽細胞の派生を導かない。

【0064】

適切な型の軟骨形成培地は、デキサメタゾン、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸、ウシ血清アルブミンおよびリノール酸、L-プロリン、アスコルビン酸、ピルビン酸ナトリウムならびにTGF-（例えばTGF-3）を含む培地を含む。適切な基本培地は、DMEM（Life Technologies）のような商業的に入手可能な培地を含み得る。脱分化培地は、血清を補充したDMEMであってよい。

10

【0065】

軟骨細胞分化の適切なマーカーは、コラーゲンIIおよびアグリカンを含み、多能性の適切なマーカーは、Oct4、Tra-1-60およびNanogを含む。

【0066】

幹細胞の供給源

胚性幹細胞は、霊長類の種のメンバーの胚盤胞から単離できる（US5,843,780; Thomsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844、1995）。ヒト胚性幹（hES）細胞は、ヒト胚盤胞細胞から、初代マウス線維芽細胞フィーダー細胞を用いて、Thomsonら（US6,200,806; Science 282:1145、1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133、1998）およびReubinoffら、Nature Biotech. 18:399、2000に記載される技術に従って調製できる。hES細胞系統は、ヒトフィーダー上（US6,642,048）、またはフィーダー細胞を完全に含まない条件下（US2002/0081724）またはKlimanskayaら、Lancet、365（9471）:1636~41（2005）で派生させることもできる。hES細胞と等価な細胞型は、WO01/51610に概説されるような原始外胚葉様（EPL）細胞のようなそれらの多能性派生物を含む。胚性幹細胞は、胚性幹細胞系統から選択できるか、または一次胚性組織から直接得ることができる。

20

30

【0067】

本発明の実施は、本発明の実施のためにhESまたは胚性幹細胞を生成するためにヒト胚盤胞を脱凝集させることを決して必要としない。hES細胞は、公共の寄託機関から得ることができる樹立系統から得ることができる（例えば、WiCell Research Institute、Madison WI USAまたはthe American Type Culture Collection、Manassas VA、USA）。

【0068】

それらに限定されないがH1、H7、H9、H13およびH14（Thompsonら）; hESBGN-01、hESBGN-02、hESBGN-03（BresaGen, Inc., Athens, GA）; HES-1、HES-2、HES-3、HES-4、HES-5、HES-6（ES Cell International, Inc., Singapore）; HSF-1、HSF-6（University of California at San Francisco）; I3、I4、I6（Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel）; UCSF-1およびUCSF-2（Genbacevら、Fertil. Steril. 83（5）:1517~29、2005）; HUES1-17系統（Cowanら、NEJM 350（13）:1353~56、2004）; ならびにACT-14系統（Klimanskayaら、Lancet、365（9471）:1636

40

50

~ 41、2005)を含むいくつかの胚性幹細胞系統は、樹立されている。樹立hES細胞系統は、UK Stem Cell Bank (National Institute for Biological Standards and Control, UK)、the National Stem Cell Bank (University of Wisconsin-Madison, USA)またはWiCell (Madison, WI, USA)を含む様々な供給源から得ることができる。

【0069】

ヒト胚性生殖(hEG)細胞は、Shamblootta、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:13726、1998およびUS6,090,622に記載されるように原始生殖細胞から調製できる。US2003/0113910は、胚または胎性組織を用いることなく派生させた多能性幹細胞について報告している。多能性表現型を誘導する因子を用いることにより、その他の始原細胞をhES細胞に再プログラムすることもできる(Chambersら、Cell 113:643、2003; Mitsuiら、Cell 113:631、2003)。適当な条件下で、適当な増殖および分化能力を有するいずれの細胞も、本発明に従って用いるための分化した組織の派生のために用いることができる。

10

【0070】

細胞が多能性のままであるようなpPS細胞の増殖および維持は、記載されている。pPS細胞は、フィーダー細胞層またはフィーダーを含まない条件のいずれかを用いて増殖および維持してよい(例えばUS5,843,780; US6,090,622、6,800,480、WO01/51616; WO03/020920; WO06/017370; WO07/002086; WO09/099539; WO09/099555およびXuら(2001) Nature Biotechnology 19:971を参照されたい)。

20

【0071】

多くの適切な商業的に入手可能な基本培地が、増殖性の細胞型の培養のために開発されており、よって、hES細胞のようなpPS細胞を培養するために適切である。その例は、X-VIVO(商標)10増殖培地(Biowhitaker)およびQBSF(商標)-60(Quality Biological Inc.)である。WO98/30679(Life Technologies Inc.)およびUS5,405,772(Amgen)も参照されたい。X-VIVO(商標)10処方は、医薬グレードのヒトアルブミン、組換えヒトインスリンおよび低温殺菌ヒトトランスフェリンを含有する。外因性増殖因子、細胞増殖の人工的刺激物質または規定されない補充物質は、X-VIVO(商標)10培地に含まれない。これらは、いずれのプロテインキナーゼC刺激物質も含まない。QBSF(商標)-60は、組換えまたは低温殺菌ヒトタンパク質を含有する、血清を含まない処方である。その他の可能性のある代替物は、JRH Biosciencesにより製造されるEx-Cell VPRO(商標)培地およびHycloneにより製造されるHyQ CDM4(商標)およびStemCell TechnologiesからのmTESR(商標)である。

30

【0072】

基本培地に、分化を阻害しながら未分化表現型の増殖を促進する添加物を補充してよい。高濃度での線維芽細胞増殖因子は、分化なしでhES細胞増殖を促進するために特に効果的である。その例は、塩基性FGF(FGF-2)およびFGF-4であるが、このファミリーのその他のメンバーも用いることができる。等価な形は、種相同体、人工的類似体、各FGF受容体に対する抗体およびその他の受容体活性化分子である。遺伝子発現解析から、未分化hES細胞が、酸性FGF(FGF-1)についての受容体を発現することが決定されている。高濃度では、FGF単独で十分に未分化状態のhES細胞の成長が促進される。それら自体での未分化hES細胞成長を促進するために効果的なFGFの濃度は、約20、30または40ng/mLの下限と、約200、500または1000ng/mLの実際上の上限とを通常有する。少なくとも60、80または100ng/mL

40

50

の b F G F の濃度は、信頼でき、費用の面でも効果的である。F G F のその他の形および類似体の等価な濃度は、培養物を b F G F から離して提案される代替物にし、以下に記載するマーカーシステムに従う分化について培養物を監視することにより経験的に決定できる。

【 0 0 7 3 】

別の培養方法により増殖した（または一次供給源から得られた）p P S 細胞は、細胞を懸濁に保つように適合された容器に接種できる。容器の壁は、未分化 p P S 細胞の付着に対して典型的に不活性または抵抗性であってよい。細胞が定着することを妨げる手段、例えば攪拌機構、例えば磁力もしくは機械的に駆動される攪拌バーもしくは攪拌翼、振とう機構（典型的に容器の外側に装着される）または反転機構（すなわち細胞に対する重力の方向を変化させるように容器を回転させるデバイス）があってもよい。任意の適切な攪拌手段の使用が構想される。

10

【 0 0 7 4 】

プロセス開発のための懸濁培養に適切な容器は、通常の範囲の商業的に入手可能なスピナーフラスコまたは振とうフラスコを含む。商業的生産のために適切な発酵槽は、Celligen Plus（商標）（New Brunswick Scientific Co.）およびStirred-Tank Reactor（商標）（Applikon Inc.）である。その他の適切なバイリアクタは、Wave Bioreactor（GE Healthcare）を含む。これらのバイリアクタには培地を連続的に灌流させることができるか、または流加培養モードで用いることができ、様々なサイズで得ることができる。

20

【 0 0 7 5 】

懸濁での p P S 細胞の増殖に関するさらなる詳細は、W O 0 7 / 0 0 2 0 8 6 で見出すことができる。

【 0 0 7 6 】

懸濁培養系の最適化は、経験的な試験により達成できる。以前の表面または懸濁培養からの未分化細胞を試験条件に継代し、1週間以上培養できる。細胞を定期的に h E S 細胞の特徴について、例えば次の項に記載するマーカーシステムを用いて調べることができる。細胞は、よく確立された培養系に戻して継代し、未分化細胞の伝統的な形態的特徴および本明細書に記載する多能性幹細胞と関連するマーカーのいずれかについて評価することもできる。

30

【 0 0 7 7 】

本発明に従って用いる h E S 細胞は、軟骨細胞系の細胞への分化を最終的に意図する。培養中に用いる適当な試験は、未分化培養物のマーカープロファイルでなくてよいが、むしろ、要求されるように分化する細胞の能力である。h E S 懸濁培養物の多能性は、細胞をサンプリングし、S C I D マウスにおいて奇形腫を生成するかまたは E B 由来細胞を3つ全ての胚葉を表すマーカーについて染色するかのいずれかにより確認できる。多能性についてのマーカーは、O c t 4 および N a n o g を含む。

【 0 0 7 8 】

代わりにまたはさらに、懸濁培養物は、懸濁物中で表面を創出するが、細胞を3次元空間で培養する利点をまだ提供する粒子状担体を含むしてよい。細胞は、培地交換中に容器内に粒子を保持し、細胞が分離した場合はさらに粒子を加えること以外は同じ方法で培養および継代する。

40

【 0 0 7 9 】

ある型の微小担体は、ガラス、プラスチックおよび細胞接着を増強するため正電荷を有するデキストランから作製された固体の球状または半球状の粒子（C y t o d e x）などである。別の型は、New Brunswick Scientific Co, Inc. により販売される F i b r a - c e l D i s k s（商標）のようなディスク形の培養プラスチックである。これらのディスク1グラムは、1 2 0 0 c m<sup>2</sup>の表面積を提供する。別の型の微小担体は、細胞が内部および外部に存在することを許容して保護効果を潜在

50

的に増進する様々な孔サイズのマクロポーラス粒子である。最小限の混乱でhES細胞を回収するために、穏やかな機械的または酵素的作用により容易に溶解または分散でき、それにより採集またはさらなる培養のために細胞を遊離するアガロースのような材料で作製された粒子を用いることが有利である。固体担体は、接着した細胞が、固体表面上に播種された細胞と同じ微小環境を有するようにラミニン、Matrigel（登録商標）のようなhES細胞に優しい細胞外基質で場合によって被覆される。

#### 【0080】

未分化hES細胞の特徴決定

ヒトES細胞は、未分化幹細胞の特徴的な形態的特徴を有する。2次元の標準的な顕微鏡画像において、hES細胞は、画像の平面において高い核/細胞質比率、顕著な核小体および細胞接合部がほとんど識別できない密集したコロニー形成を有する。細胞系統は、標準的なG分染法を用いて核型決定し（日常的な核型決定サービスを提供する多くの臨床診断実験室、例えばOakland CAのCytogenetics Labで利用可能）、報告されているヒト核型と比較できる。細胞が正倍数体であることを意味する「正常核型」を有する細胞（全てのヒト染色体が存在し、顕著に変更されていない）を得ることが望ましい。

10

#### 【0081】

hES細胞は、抗体（フローサイトメトリーまたは免疫細胞化学）または逆転写酵素PCRにより検出可能な発現細胞マーカーにより特徴決定できる。hES細胞は、典型的に、抗体により検出可能なSSEA-3、SSEA-4、Tra-1-60およびTra-1-81を有するが、SSEA-1をほとんど有さず、アルカリホスファターゼ活性を有する。mRNAレベルで検出可能な適切なマーカーのパネルは、US2003/0224411に列挙される。その例は、Cripto、ガストリン放出ペプチド（GRP）受容体、ポドカリキシン様タンパク質（PODXL）、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）およびPOU転写因子Oct3/4である。

20

#### 【0082】

既に記載したように、増殖したhES細胞の重要な特徴は、3つ全ての胚葉：内胚葉、中胚葉および外胚葉の細胞に分化する能力である。hES細胞の多能性は、SCIDマウスで奇形腫を形成し、それらを、3つ全ての胚葉の代表的組織について調べることにより確認できる。代わりに、多能性は、hES細胞を非特異的に分化させ（例えば胚葉体を形成することにより）、次いで、培養物において示される細胞型を免疫細胞化学により決定することにより決定できる。

30

#### 【0083】

多能性細胞または軟骨細胞前駆細胞を軟骨細胞に分化させるための標準的な方法

軟骨細胞は、本発明のDCCPCから、所望の表現型を有する細胞を富化する（所望の細胞の増生またはその他の細胞型の阻害もしくは死滅のいずれかにより）特別な成長環境において軟骨細胞前駆細胞を培養、分化または再プログラム化することにより得ることができる。これらの方法は、本明細書に記載するiPS細胞を含む霊長類多能性幹（pPS）細胞を含む多くの型の幹細胞に用いることもできる。

#### 【0084】

pPS細胞の樹立系統に由来する場合、本発明の細胞集団および単離されたDCCPCは、それらが由来する系統と同じゲノムを有する。同じ遺伝子型を有する細胞という場合、細胞を人の手によって遺伝子操作できない（遺伝子変更された細胞を包含する実施形態は以下に記載する）か、または自発的に起こり得る変化が非常にわずか（例えばゲノム全体の数分の1パーセント未満）である（例えば非コード領域において）ことを含意すると意図するものではなく、pPS細胞からの細胞を軟骨細胞系の細胞に分化させる作用がそれ自体では変更された遺伝子型をもたらさないことを単に示唆する。典型的に、親（未分化細胞）とその分化した子孫との間の遺伝的同一性は、一卵性双生児の間で見出される遺伝的同一性と同様である。典型的に、pPS細胞系統とそのDCCPCまたは軟骨細胞の子孫は、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.9%の遺伝的同一性を共有

40

50

する。

【0085】

軟骨細胞前駆細胞を調製するための本発明の方法は、胚葉体の形成を要求しない。

【0086】

ある実施形態では、成熟軟骨細胞および/またはコラーゲンIIを発現する細胞を調製するための本発明の方法は、構築物の形成を要求しない。他の実施形態では、軟骨細胞始原細胞を含む構築物の形成は、成熟軟骨細胞および/またはコラーゲンIIを発現する細胞へのDCCPCの分化を容易にし得る。

【0087】

軟骨細胞前駆細胞培養物を軟骨細胞経路に向けるために、上記のようにして調製した前駆細胞を、軟骨細胞分化因子のカクテル中で培養できる。単独または組み合わせで、それぞれの因子は、軟骨細胞経路の下方に分化するように細胞を向け、軟骨細胞表現型を有する細胞の増生を引き起こし、その他の細胞型の成長を阻害するかまたは別の様式で軟骨細胞を富化できる。本発明の実施のために、軟骨細胞の富化をもたらす機構について理解する必要はない。

10

【0088】

軟骨細胞分化ミックスの成分は、トランスフォーミング増殖因子(特にTGF-1、TGF-2およびTGF-3)、線維芽細胞増殖因子(特に塩基性線維芽細胞増殖因子、FGF-2)、増殖および分化因子(特にGDF-5、GDF-6およびGDF-7)、骨形成タンパク質(特にBMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6およびBMP-7)、ヘッジホッグタンパク質(特にインディアンヘッジホッグ、IHH)、L-アスコルビン酸および副甲状腺ホルモン関連タンパク質(PTHrP)を含んでよい。Gibcoは、塩基性FGFの好ましい供給源である。その他の化合物のほとんどは、R&D Systems、Minneapolis MNから入手可能である。

20

【0089】

同じ受容体と結合するその他のリガンドまたは抗体は、本開示において言及する受容体リガンドのいずれとも等価とみなすことができる。

【0090】

トランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF)は、胚発生の様々な局面を調節し、交感神経副腎始原細胞の環境で発現される(Wallら、Curr. Opin. Genet. Dev. 4: 517、1994)。いくつかの系では、TGFは、副甲状腺ホルモン関連タンパク質(PTHrP)の発現を調節する(Patederら、J. Cell Physiol. 188: 343、2001)。BMPならびに増殖および分化因子(GDF)は、関節形成を含む骨格形成中の中心的な役割を演じると考えられている(Francis-Westら、Cell Tissue Res 1296: 111、1999)。インディアンヘッジホッグ(IHH)は、軟骨細胞増殖を刺激するためのメカノトランスダクション複合体の必須成分である(Wuら、J. Biol. Chem. 276: 35290、2001)。内軟骨性骨化中に、2つの分泌シグナル、IHHおよびPTHrPは、軟骨細胞の肥大分化の開始を調節する負のフィードバックループを形成すると考えられる。骨形成タンパク質(BMP)は、骨格要素のパターン化のためのシグナル伝達経路ならびに軟骨および骨形成の誘導のための機構のメディエーターであると考えられる(Hoffmannら、Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 11: 23、2001)。BMPは、IHH/PTHrPフィードバックループの潜在的なインタラクターと関係があるとされている(Mininaら、Development 128: 4523、2001)。BMPは、IHHおよびPTHrPと非常によく相互作用して、軟骨細胞の増殖および分化を調整できる。

30

40

【0091】

軟骨細胞の表現型マーカー

II型コラーゲンおよびアグリカンは、関節軟骨を形作る細胞についての特異的マーカーとして用いることができる。培養物を、それぞれ弾性軟骨および線維軟骨のマーカーで

50



あるエラスチンおよびⅠ型コラーゲンの非存在についてスクリーニングできる。培養物は、それぞれ肥大軟骨および骨のマーカーであるⅩ型コラーゲンおよびオステオカルシンの非存在についてもスクリーニングでき、このことは、軟骨内骨形成の進行中に生じる一過性の軟骨細胞表現型を示し得る。これらのヒトマーカーについての商業的に入手可能な抗体の表を以下に示す(表2)。

【0092】

組織特異的マーカーは、細胞表面マーカーについてのフロー免疫細胞化学または細胞内もしくは細胞表面マーカーについての免疫組織化学(例えば固定細胞または組織切片の)のような任意の適切な免疫学的技術を用いて検出できる。フローサイトメトリー分析についての詳細な方法は、Gallacherら、Blood 96:1740、2000に示されている。細胞表面抗原の発現は、場合によって細胞を固定した後の、そして場合によって標識2次抗体もしくは標識を増幅させるためのその他のコンジュゲートを用いた標準的な免疫細胞化学またはフローサイトメトリーアッセイにおいて著しく検出可能な量の抗体が抗原と結合するならば、陽性であると定義される。著しく検出可能な量の抗体は、例えば、無関係のエピトープに対するアイソタイプ抗体対照と比較した場合に過剰である量である。特異的抗体の可能性のある供給源を表2に示す。

【0093】

【表2】

表2

結合組織マーカーに対する抗体の商業的な供給源

抗体	供給源
Ⅰ型コラーゲン	Chemicon, cat. # AB758
Ⅱ型コラーゲン	Chemicon, cat # AB761
Ⅹ型コラーゲン	RDI, cat # RDI-COLL10abr
エラスチン	Chemicon, cat # AB2043
オステオカルシン	Biomed. Tech. Inc., cat # BT593
アグリカン	BioTrend, cat # 0195-8050

【0094】

組織特異的遺伝子生成物の発現は、ノザンプロット分析、ドットプロットハイブリダイゼーション分析または標準的な増幅方法において配列特異的プライマーを用いる逆転写酵素により開始されるポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によりmRNAレベルでも検出できる。さらなる詳細についてUS5,843,780を参照されたい。リアルタイムPCRも、TaqMan(登録商標)(Applied Biosystems)のような商業的に利用可能なシステムを用いて行うことができる。本開示で列挙する特定のマーカーについての配列データは、GenBankのような公共データベースから得ることができる。

【0095】

生着を容易にするために、軟骨細胞またはDCCPCのようなそれらの前駆体の特徴を有する細胞の集団中の割合を、分化因子の混合物、培養条件およびタイミングを改良し、これらのマーカーを追跡することにより最大限にすることが有利である。細胞の少なくとも5%がII型コラーゲンもしくはアグリカンのいずれかまたは両方を合成する集団も適切であることがある。細胞の少なくとも25%がII型コラーゲンもしくはアグリカンのいずれかを合成する点まで富化された集団は、いくつかの状況においてより有効である。

【0096】

軟骨再生に関する治療用途のために、弾性軟骨、線維軟骨、肥大軟骨および骨を形成する細胞の能力を最小限にすることが望ましいことがある。このことは、I型コラーゲン、X型コラーゲンまたはオステオカルシンを（単独または組み合わせで）合成する細胞の割合ができる限り低いこと、好ましくはII型コラーゲンまたはアグリカンについて染色が陽性である細胞の1/5未満または1%未満であることを意味する。未分化pPS細胞の残存割合が低い集団も望ましい。好ましい集団は、SSEA-4陽性(+ve)、Oct-4陽性(+ve)もしくは内因性テロメラーゼ逆転写酵素の発現についての陽性が1%または0.2%未満である。望ましくない細胞集団を排除するために、当該技術において既知の任意の除去技術を用いてよい。例えば、細胞外マーカーに特異的な抗体とコンジュゲートした磁性ビーズを用いてよい。

【0097】

動物モデル実験

臨床用途のための軟骨細胞の開発のために、宿主において軟骨を形作り、関節機能を回復する細胞集団の能力はかなり興味深い。軟骨細胞機能の再構築は、いくつかのよく確立された動物モデルを用いて試験できる。

【0098】

パイロット実験は、癒着した皮膚はインタクトなままにしてウサギの外耳に6mmの穴を設けたモデルを用いて行うことができる。軟骨細胞を播種したマトリックスを次いで植え込み、穴の閉鎖について動物をモニタリングする(ten Koppelら、Biomaterials 22:1407、2001)。

【0099】

代わりに、全層欠損を、ウサギの大腿骨の内側大腿骨顆部の荷重負荷表面に創出できる(Grigoloら、Biomaterials 22:2417、2001)。全層欠損により、血液が髄腔からその部位にしみ出ることができ、内因性幹細胞を含有する血餅が創出される。

【0100】

代わりに、皮下骨を貫かない部分層欠損を創出できるNehrerら(Biomaterials 19:2313~2328、1998)(Hunzikerら、Clin. Orthop. 391 Supp:S171、2001)。部分層欠損は、外傷による急性軟骨欠損のより正確なモデルである。このモデルでは、先天的軟骨修復の自発的治癒成分が低減され、内因性幹細胞が軟骨再成長にほとんど貢献しない。

【0101】

創傷は、生体材料上に播種されたか、単細胞として注射されたかまたは構築培養物からの多細胞凝集物として用いられた軟骨細胞を用いて修復される。一片の骨膜または筋膜のような生体膜を用いて、インプラントをその場所に保持してよい。代わりに、バイクルルまたはポリジオキサノンメッシュのような合成マトリックスを用いてよい。マトリックス-細胞インプラントも、外科的な矢を用いてその場所に保持できる。

【0102】

内側顆部よりもむしろ、作業は、滑車溝に創出した欠損を用いて行うことができる。これは、非荷重負荷部位であり、インプラントは内側顆部からほど容易に外れない。

【0103】

処置部位からの組織学的試料を、インプラント細胞の埋め込みおよび軟骨沈着のための手術の1~6ヵ月後に調べる。このことは、II型コラーゲンおよびアグリカンについて

10

20

30

40

50

の免疫染色を含む。インプラントの重要な形態的特徴は、軟骨厚さ、平滑関節面、インタクトもしくは再構築されたセメント線および欠損の境界でのインプラントと内因性軟骨との統合を含む。インプラントの長期安定性は、12ヵ月の点で確認できる。

【0104】

別の選択肢として、卵巣切除ウサギの膝関節にエストラジオールを注射して、ヒトの変形性関節症において観察される欠損に似た顆部表面調和の喪失を引き起こすことにより、変形性関節症をモデル化できる (Tsaiら、Clin Orthop. 291: 295、1993)。代わりに、支持靭帯との交流による関節不安定化を用いて変形性関節症をモデル化できる (Glasson S., OsteoArthritis and Cartilage (2007) 15、1061~1069)。

10

【0105】

その他の哺乳動物を動物モデルとして用いてよい。適切な哺乳動物は、ラットおよびマウスのようなげっ歯類、ブタ、ヒツジ、ウシおよびウマのような有蹄類、ネコ、イヌならびに非ヒト霊長類を含む。

【0106】

上記の動物モデルを用いて、植え込まれた細胞の受容または拒絶を調査してもよい。したがって、免疫拒絶の証拠を調査できる。免疫拒絶の証拠は、植え込み部位への白血球浸潤、炎症誘発性サイトカインの存在のような炎症の証拠を含み得る。植え込まれた細胞の喪失も、免疫拒絶を示唆し得る。免疫拒絶のその他の徴候は、リンパ球増殖およびインターフェロンガンマ生成の刺激を含み得る。

20

【0107】

分化した細胞の遺伝子改変

DCCPCのような本発明のある軟骨細胞前駆細胞集団は、実質的な増殖能力を有する。所望により、複製能力を、内因性遺伝子からの転写を増加するかまたは導入遺伝子を導入するかのいずれかによって細胞内のテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) のレベルを増加することによりさらに増進できる。特に適切なものは、国際特許出願WO98/14592に示されるヒトテロメラーゼ (hTERT) の触媒成分である。ヒト細胞におけるテロメラーゼのトランスフェクションおよび発現は、Bodnarら、Science 279: 349、1998およびJiangら、Nat. Genet. 21: 111、1999に記載される。遺伝子変異細胞は、RT-PCRによるhTERT発現、テロメラーゼ活性 (TRAPアッセイ)、hTERTについての免疫細胞化学染色または複製能力について標準的な方法に従って評価できる。myc、SV40ラージT抗原またはMOT-2をコードするDNAで細胞を形質転換することのような (US5,869,243、WO97/32972およびWO01/23555) 細胞を不死化するその他の方法も構想される。

30

【0108】

所望により、本発明の細胞は、未分化細胞を *in vitro* で除去するように、もしくは復帰変異体に対して *in vivo* で保護するように調製またはさらに処理できる。集団から未分化幹細胞を除去するある方法は、TERTプロモーターまたはOCT-4プロモーターのような未分化細胞における優先的発現を引き起こすプロモーターの制御下にエフェクター遺伝子があるベクターを集団にトランスフェクトすることである。エフェクター遺伝子は、緑色蛍光タンパク質のような細胞選別を手引きするレポーターであってよい。エフェクターは、例えば毒素またはカスパーゼのようなアポトーシスのメディエーターをコードする、細胞にとって直接溶解性であってよい (Shinouraら、Cancer Gene Ther. 7: 739、2000)。エフェクター遺伝子は、抗体またはプロドラッグのような外部薬剤の毒性効果に対して細胞を感受性にする効果を有してよい。その例は、それが発現される細胞をガンシクロビルに対して感受性にするヘルペス単純チミジンキナーゼ (tk) 遺伝子である (WO02/042445)。代わりに、エフェクターは、未分化表現型に復帰するいずれの細胞も *in vivo* に天然に存在する抗体に対して感受性にする外来決定因子の細胞表面発現を引き起こすことができる (WO0

40

50

2 / 0 4 2 4 4 5 )。望ましくない多能性細胞を排除するその他の方法は、多能性幹細胞上で発現される細胞表面タンパク質に対する抗体とコンジュゲートしたビーズのような免疫沈降試薬を用いることを含む。

【 0 1 0 9 】

増殖した軟骨細胞の使用

本発明は、多数の軟骨細胞またはDCCPCをpPS細胞、特にhES細胞から商業的規模で生成できる方法を提供する。軟骨細胞またはDCCPCは、いくつかの研究および商業的目的にとって有用である。

【 0 1 1 0 】

治療的使用

本発明は、DCCPCおよびそれらの派生物の、関節運動性の障害または内因性軟骨の*in vivo*機能的な能力と関連する欠損もしくは消耗を導く状態を処置するための使用も提供する。適切な対象は、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ネコ、イヌ、チンパンジーまたはマカークのような非ヒト霊長類およびヒトのような任意の哺乳動物を含む。

【 0 1 1 1 】

衝撃による外傷およびスポーツ損傷により引き起こされた傷害が含まれる。本発明の細胞は、変性を引き起こした一次的病変が十分良く制御されるという条件で、変形性関節症および関節リウマチのような変性状態を処置して、喪失された機能を回復させるのにも考慮することができる。本発明の細胞を、それらに限定されないが、耳、脊椎および鼻(すなわち吻)の手術を含む整容手術のために用いることも構想される。Aesthetic Reconstruction of the Nose、G.C. BurgetおよびF.J. Menick、Mosby Year Book 1994; The Nose、Nikolay Gogolら、David R. Godine publisher、1993; およびYooら、J. Urol. 162: 1119、1999を参照されたい。

【 0 1 1 2 】

本発明により作製されるDCCPCおよび/または軟骨細胞は、生理的に適合する賦形剤、例えば1.25 mL硫酸ゲンタマイシン(70  $\mu\text{mol/L}$ )、2.0 mLアンホテリシン(2.2  $\mu\text{mol/L}$ )、7.5 mL L-アスコルビン酸(300  $\mu\text{mol/L}$ )、25 mL血液の血清またはその等価物(10% vol/volまで)を300 mL中に含有する等張媒体を用いて細胞懸濁物(必要であればトリプシンまたはコラゲナーゼを用いて)での投与のために調製できる。細胞移植手順中に、傷害を受けた軟骨は、生体適合性フィブリン糊のような機械的または付着保持手段により固定されたキャップで覆われることができる。移植賦形剤中の培養細胞(約 $10 \times 10^6$ 軟骨細胞を含有する約0.6 mL)を、次いで、約23ゲージの針を用いて覆っているキャップの下に注射してよい。

【 0 1 1 3 】

代わりに、DCCPCおよび/または軟骨細胞は、例えばコラーゲン膜(商業的に入手可能なコラーゲンマトリックスパッドは、Ed. Geistlich Sohne、Switzerlandから入手可能である)を用いて形成されたマトリックス上に細胞を成長させることにより調製できる。移植の数日前に、成長培地を移植賦形剤に交換する。手術中に、細胞を載せたマトリックスを、生体適合性接着剤を用いて傷害を受けた軟骨の領域に貼り付ける。覆っているキャップまたはマトリックスは、軟骨修復を可能にするのに十分な期間その場所に留まり、次いで例えば植え込みから2~3ヵ月以内に体に吸収または再吸収される。再吸収性キャップおよびマトリックスの設計ならびに使用についてのさらなる詳細は、国際特許出願W001/08610で見出すことができる。

【 0 1 1 4 】

患者の選択、投与の形態ならびに支持構造および手術のオプションの選択は、担当臨床医の熟練の範囲内である。

【 0 1 1 5 】

商業的流通の目的のために、本発明の軟骨細胞は、ヒト投与のために十分な滅菌条件下で調製された等張賦形剤を含む医薬組成物の形で典型的に供給される。細胞組成物の医薬製剤における全般的な原則について、読者は、Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy、G. MorstynおよびW. Sheridan編、Cambridge University Press、1996を参照されたい。組成物は、治療後の最初の数ヶ月中に軟骨細胞をその場所に維持するためのマトリックスも含有してよい。吸収性生体材料は、その後の手術による除去の必要性を省く。WO 01/086101に記載されるコラーゲンマトリックスパッドの他に、その他の可能性のあるマトリックスは、生体再吸収性ポリマーフリーマトリックス (Rudertら、Cells Tissues Organs 167: 95、2000) ; ヒアルロン誘導体 (Grigoloら、Biomaterials 22: 2417、2001) ; ポリ(L-ラクチド-イブシロン-カプロラクトン)で作製されたスポンジ (Hondaら、J. Oral Maxillofac. Surg. 58: 767、2000) およびコラーゲン-フィブリンマトリックス (Clin. Exp. Rheumatol. 18: 13、2000) を含む。

10

## 【0116】

## スクリーニングの使用

軟骨細胞またはDCCPCは、培養している軟骨細胞またはDCCPCの特徴に影響する因子(例えば小分子薬物、ペプチド、ポリヌクレオチドなど)または条件(例えば培養条件または操作)を求めてスクリーニングするために用いることができる。このような培養物は、薬物研究において医薬組成物を試験するために用いることもできる。候補医薬組成物の活性の評価は、通常、軟骨細胞またはDCCPCのような本発明の分化した細胞を候補化合物と組み合わせることと、任意の得られた変化を決定することと、次いで、化合物の効果と観察された変化とを相関させることとを含む。因子または化合物で処理していない等価な培養物と比較することができる。細胞傷害性または代謝性の効果は、細胞生存力、形態、あるマーカー、受容体もしくは酵素の発現または放出、DNA合成または修復などにより決定できる。本発明に従って調製された細胞は、薬物スクリーニング、医薬組成物の調製、研究およびその他の多くの同様の目的のために用いることができる。

20

## 【0117】

一例では、DCCPCは、軟骨細胞への成熟を促進するかまたは長期培養における軟骨細胞の増殖および維持を促進する因子を求めてスクリーニングするために用いることができる。例えば、候補成熟因子または増殖因子は、それらを異なるウェル中の細胞に加え、次いで結果として得られる任意の表現型の変化(例えばコラーゲンIIおよび/またはアグリカンの発現)を、細胞のさらなる培養および使用のための望ましい基準に従って決定することにより試験できる。その因子で処理していない等価な培養物と比較できる。このことにより、pPS由来軟骨細胞だけでなく、軟骨から単離された軟骨細胞およびそれらの始原細胞についての派生および培養方法の改善を導くことができる。

30

## 【0118】

別の例は、ストレス条件下で軟骨細胞生存を促進できる分子の効果測定するためのDCCPCの使用である。例えば、損傷、手術または変形性関節症による外傷と関連するもの。

40

## 【0119】

別の例は、軟骨の成形またはリモデリングの役割において軟骨細胞活性に影響する能力を有する小分子薬物の効果を測定するための軟骨細胞前駆体の使用である。このために、細胞を試験化合物と*in vitro*で組み合わせ、遺伝子発現またはタンパク質合成に対する化合物の効果決定できる。スクリーニングは、動物モデルにおける細胞の挙動に対する化合物の効果測定することにより*in vivo*で行うこともできる。未処理の細胞または動物を比較のために用いてよい。

## 【0120】

50

本発明のその他のスクリーニング方法は、医薬化合物を、軟骨細胞の成長、発生または毒性に対する可能性のある効果について試験することに関する。この型のスクリーニングは、軟骨細胞自体に対する薬理学的効果を有するように化合物を設計した場合だけでなく、他の場所での一次的薬理学的効果のために設計された化合物の軟骨細胞関連副作用について試験する場合にも適当である。

#### 【0121】

候補医薬化合物の活性の評価は、通常、本発明の分化した細胞を、単独またはその他の薬物と組み合わせたいずれかの候補化合物と組み合わせることを含む(「*In vitro Methods in Pharmaceutical Research*」、Academic Press、1997; およびUS5,030,015)。研究者は、化合物に帰する形態、マーカー表現型または細胞の機能的活性における(未処理の細胞または不活性化化合物で処理した細胞と比較した)任意の変化を決定し、次いで、化合物の効果を観察された変化と関連させる。未処理の細胞を比較のために用いてよい。

10

#### 【0122】

細胞毒性は、まず、細胞生存力、生存、形態ならびにあるマーカーおよび受容体の発現に対する効果により決定できる。染色体DNAに対する薬物の効果は、DNA合成または修復を測定することにより決定できる。特に細胞周期中の計画されていない時間でのもしくは細胞複製に要求されるレベルを超える $[^3\text{H}]$ -チミジンまたはBrdU組み込みは、薬物の効果と矛盾しない。望ましくない効果は、中期伸展体により決定される通常でない比率の姉妹染色分体交換も含むことができる(A. Vickers、「*In vitro Methods in Pharmaceutical Research*」、Academic Press、1997中の375~410頁)。

20

#### 【0123】

##### 商業的流通

本発明の軟骨細胞分化培養システムの成分は、以下の2以上のような様々な有用な組み合わせにおいて一緒に調製してよい:

- ・DCCPCおよび/もしくは軟骨細胞を懸濁または付着して培養するために適切な培地
- ・培地中に存在するかもしくは加えられるかまたは適切な細胞成長表面に被覆された細胞外基質成分あるいは増粘剤
- ・培地に存在するかまたは加えられる微小担体
- ・懸濁培養または付着培養に適合された容器
- ・培養系において成長しているかまたは別の形態で保存されているが培養系での使用を意図するかのいずれかの軟骨細胞またはDCCPC自体
- ・培養されているかまたは適切な賦形剤もしくは緩衝剤中に貯蔵されているpPS細胞
- ・成熟軟骨細胞におけるpPS細胞および/もしくは軟骨細胞前駆細胞の成長、分化ならびに/または成熟を促進するために適切な1または複数のサイトカイン、増殖因子、モルフォゲンなど。

30

#### 【0124】

生成物または生成物の組み合わせは、場合によってキットの形で、適切な容器に包装してよく、本発明による物質の使用(例えば軟骨細胞を維持または増殖すること)についての書面での情報を伴ってよい。書面での情報は、容器もしくはキット上のラベル、または容器とともに包装され一緒に流通される製品挿入物の形態をとってよい。等価な形態は、使用者もしくは意図する使用者に商業的に流通される製品に関連する参照または情報源材料として利用可能なハードコピーまたは電子形態での書面の明細、使用説明書または説明である。

40

#### 【0125】

本発明は、それらの製造、流通または使用中の任意の時点に存在する細胞およびその他の成分のセットも含んでよい。細胞のセットは、本開示で記載する2以上の細胞集団の任意の組み合わせを含むことができ、それらに限定されないが、DCCPCのような本発明の方法により調製した、ある型の分化したpPS由来軟骨細胞前駆細胞と、未分化pPS

50

細胞またはその他の分化した細胞型（例えば完全に分化した軟骨細胞）（時折同じゲノムを共有する）との組み合わせが例示される。セットにおける各細胞型は、一緒にまたは別々の容器に包装してよい。本発明の製品は、軟骨欠損の処置、関節軟骨の再構築または整容手術のような所望の目的についての書面での使用説明とともに適切な容器またはキットに場合によって包装される。

【0126】

本発明は、軟骨形成培地中で14日間分化させたES細胞が、培地中に存在する分化因子が除去されるならば、脱分化状態に復帰できる(DCCPC)ことを示している。脱分化した細胞は、いくつかの理由のための価値がある：1)本明細書に記載する軟骨形成性プロトコルを用いる初期分化ステップが、多能性細胞を除去または分化するため、よって、奇形腫を形成するそれらの能力を制限するために効果的であり；2)脱分化が、細胞を増殖させ、第2の高増加段階をもたらすことを可能にし；3)初代軟骨細胞から脱分化した細胞が、プラスチック付着性であることが示されており、単細胞として継代する(hESCとは異なって)。脱分化した細胞は、安定であり、その後、接着条件下または構築物として懸濁されて成長する場合のいずれかにコラーゲンII発現細胞および/または成熟軟骨細胞に分化できる。これらの特徴は、細胞療法の大規模製造にとって非常に有利である。

10

【0127】

本発明のさらなる実施形態

1. 細胞培養および細胞集団

いくつかの実施形態では、本発明は、細胞の集団を含む細胞培養物であって、細胞の集団が、pPS細胞の*in vitro*子孫であり、細胞の集団が、CBFA1/RunX2を発現し、Ki67陰性であり、多能性マーカーTra1-60、Oct4およびnanogについて陰性である細胞培養物を提供する。細胞集団は、多能性マーカーSSEA3およびSSEA4について陰性であることもある。

20

【0128】

ある実施形態では、細胞培養物は、胚葉体を全く含まない。いくつかの実施形態では、細胞培養物は、付着細胞だけを含む。いくつかの実施形態では、培養物は、構築物を含まない。他の実施形態では、細胞培養物は、細胞の構築物を含んでよい。

【0129】

本発明のいくつかの実施形態では、細胞培養物は、細胞培養物中の細胞の10%より多く、20%より多く、30%より多く、40%より多く、50%より多く、60%より多く、70%より多く、80%より多くがCBFA1/RunX2を発現する細胞を含む。本発明のいくつかの実施形態では、集団中の細胞の85%が、CBFA1/RunX2を発現する。

30

【0130】

本発明のいくつかの実施形態では、細胞培養物は、細胞培養物中の細胞の20%未満、10%未満、5%未満、2%未満、1%未満が以下のマーカーの1または複数：Tra1-60、Oct4、nanog、SSEA4、SSEA3およびKi67を発現する細胞を含む。本発明の他の実施形態では、細胞培養物中の細胞はいずれも、以下のマーカーの少なくとも1つ：Tra1-60、Oct4、nanog、SSEA4、SSEA3およびKi67を検出できない。

40

【0131】

いくつかの実施形態では、細胞培養物は、細胞がプラスチック表面、例えばプラスチック組織培養皿と直接接触するように表面上で提供される。他の実施形態では、培養物は、組織培養表面を被覆する基材上で提供される。いくつかの実施形態では、基材は、1または複数の細胞外基質成分を含んでよい。いくつかの実施形態では、基材は、ラミニンを含んでよい。いくつかの実施形態では、基材は、マウス肉腫細胞の抽出物、例えばMatrigel（登録商標）を含んでよい。いくつかの実施形態では、基材は、コラーゲンでない。いくつかの実施形態では、基材は、ゼラチンでない。

50

## 【 0 1 3 2 】

いくつかの実施形態では、細胞培養物は、栄養培地を含む。栄養培地は、胎児ウシ血清のような血清などを含んでよい。いくつかの実施形態では、培地は、約5～20%の血清を含んでよい。いくつかの実施形態では、培地は、10%の血清を含む。いくつかの実施形態では、栄養培地は、DMEMのような商業的に入手可能な培地である。他の実施形態では、細胞培養物は、脱分化培地、例えばDMEM (Invitrogen) のような10% FBSである培地を含む。いくつかの実施形態では、栄養培地は、外添加TGF 1、FGF2およびPDGFbbを、10% FCSを含む培地で見出されるものを超えて含まない。

## 【 0 1 3 3 】

## 2. 軟骨細胞系細胞を生成するためのシステム

ある実施形態では、本発明は、軟骨細胞系細胞を生成するためのシステムを提供する。軟骨細胞系細胞は、成熟軟骨細胞、DCCPCおよび/または以下の1もしくは複数：コラーゲンII、アグリカン、グリコサミノグリカンを発現する細胞を含み得る。

## 【 0 1 3 4 】

軟骨細胞系細胞を生成するためのシステムは、1) pPS細胞を含む細胞の第1集団と、2) DCCPCを含む細胞の第2集団であって、DCCPCがpPS細胞の一部分の*in vitro*子孫である集団とを含み得る。

## 【 0 1 3 5 】

さらなる実施形態では、本発明は、軟骨細胞系細胞を生成するためのシステムであって、1) pPS細胞を含む細胞の第1集団と、2) CBFA1/RunX2を発現し、i67を発現しない細胞を含む細胞の第2集団であって、増殖マーカーKi67を発現することなくCBFA1/RunX2を発現する細胞が、pPS細胞の一部分の*in vitro*子孫である集団とを含むシステムを提供する。

## 【 0 1 3 6 】

pPS細胞は細胞系統として樹立され、よってそれらの多能性状態を維持しながら培養において継続的に成長し得るので、これらは、本質的に無限の供給で軟骨細胞系細胞を生成できる。生成される軟骨細胞系細胞は、親のpPS細胞系統と本質的に遺伝的に同一である。よって、このシステムは、互いに本質的に遺伝的に同一である軟骨細胞系細胞の継続的な無限の供給源を提供する。

## 【 0 1 3 7 】

いくつかの実施形態では、システムは、胚葉体を全く含まない。いくつかの実施形態では、システムは、構築物を全く含まない。いくつかの実施形態では、細胞は、全体を通して付着して維持される(継代、例えばトリプシン処理などに要求される時間を除く)。本発明のいくつかの実施形態では、システムを含む細胞集団の一方または両方の集団が、細胞培養物品の表面のようなプラスチック表面上で提供される。本発明の他の実施形態では、システムを含む細胞集団の一方または両方が、組織培養表面を被覆する基材上で提供される。いくつかの実施形態では、基材は、1または複数の細胞外基質成分を含んでよい。いくつかの実施形態では、基材は、ラミニンを含んでよい。いくつかの実施形態では、基材は、マウス肉腫細胞の抽出物、例えばMatrigel(登録商標)を含んでよい。いくつかの実施形態では、基材は、コラーゲンでない。いくつかの実施形態では、基材は、ゼラチンでない。他の実施形態では、細胞の第2集団は、構築物として提供してよい。構築物は、非付着細胞集団、例えばプラスチック表面または細胞マトリックスのような外因的に提供された基材のいずれにも接着しない細胞集団として提供してよい。構築物の細胞は、構築物内の他の細胞に接着してよい。

## 【 0 1 3 8 】

本発明のいくつかの実施形態では、システムは、1または複数の栄養培地をさらに含み得る。本発明のある実施形態では、細胞の第1集団は、以下の1または複数：リノール酸およびウシ血清アルブミンを含む培地中で提供される。いくつかの実施形態では、培地は、以下の1または複数：デキサメタゾン、インスリン、トランスフェリン、セレン、アス

10

20

30

40

50



コルビン酸、ピルビン酸ナトリウムおよびトランスフォーミング増殖因子 (GF)、例えばTGF<sub>3</sub>をさらに含んでよい。ある実施形態では、培地は、外添加骨形成タンパク質を含まない。ある実施形態では、培地は、ノックアウト血清置換物のような血清置換物を含まない。

#### 【0139】

リノール酸の適切な培地濃度は、約2 mg/mlから約10 mg/mlまで；約3 mg/mlから約7 mg/mlまで；約4 mg/mlから約6 mg/mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約5.35 mg/mlのリノール酸を含む。ウシ血清アルブミンの適切な培地濃度は、約0.5 mg/mlから約5 mg/mlまで；約0.8 mg/mlから約3 mg/mlまで；約1 mg/mlから約2 mg/mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約1.25 mg/mlのウシ血清アルブミンを含む。デキサメタゾンの適切な培地濃度は、約 $10^{-8}$  Mから約 $10^{-6}$  Mまで；約 $10^{-7}$  Mから約 $10^{-6}$  Mまで；約 $10^{-8}$  Mから約 $10^{-7}$  Mまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約 $10^{-7}$  Mのデキサメタゾンを含む。インスリンの適切な培地濃度は、約3 ng/mlから約20 ng/mlまで；約5 ng/mlから約15 ng/mlまで；約6 ng/mlから約9 ng/mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約6.25 ng/mlのインスリンを含む。トランスフェリンの適切な培地濃度は、約3 ng/mlから約20 ng/mlまで；約5 ng/mlから約15 ng/mlまで；約6 ng/mlから約9 ng/mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約6.25 ng/mlのトランスフェリンを含む。亜セレン酸の適切な培地濃度は、約3 ng/mlから約20 ng/mlまで；約5 ng/mlから約15 ng/mlまで；約6 ng/mlから約9 ng/mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約6.25 ng/mlの亜セレン酸を含む。プロリンの適切な培地濃度は、約20 μg/mlから約80 μg/mlまで；約30 μg/mlから約70 μg/mlまで；約40 μg/mlから約60 μg/mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約40 μg/mlのプロリンを含む。アスコルビン酸の適切な培地濃度は、約30 μg/mlから約90 μg/mlまで；約40 μg/mlから約80 μg/mlまで；約45 μg/mlから約60 μg/mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約50 μg/mlのアスコルビン酸を含む。TGF<sub>3</sub>の適切な培地濃度は、約1 ng/mlから約30 ng/mlまで；約5 ng/mlから約20 ng/mlまで；約8 ng/mlから約15 ng/mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約10 ng/mlのTGF<sub>3</sub>を含む。

#### 【0140】

本発明のいくつかの実施形態では、細胞の第2集団は、商業的に入手可能な培地、例えばDMEM (Invitrogen)のような栄養培地中で提供される。いくつかの実施形態では、栄養培地は、外添加GF<sub>3</sub>、FGF2およびPDGFbbを、10% FCSを含む培地で見出されるものを超えて含まない。

#### 【0141】

いくつかの実施形態では、細胞の第2集団は、血清を含む栄養培地中で提供される。栄養培地は、胎児ウシ血清のような血清などを含んでよい。いくつかの実施形態では、培地は、約5~20%の血清を含んでよい。いくつかの実施形態では、培地は、10%の血清を含む。いくつかの実施形態では、栄養培地は、DMEMのような商業的に入手可能な培地である。他の実施形態では、細胞培養物は、脱分化培地、例えばDMEM (Invitrogen)のような10% FBSである培地を含む。

#### 【0142】

本発明のいくつかの実施形態では、細胞の第2集団は、10%血清を含む栄養培地から細胞の第1集団を培養するために用いた培地に移すことができる。

#### 【0143】

3. 脱分化定向軟骨細胞始原細胞 (DCCPC) を生成する方法

10

20

30

40

50

ある実施形態では、本発明は、1) p P S細胞を軟骨形成培地中で培養することと、2) 軟骨形成培地を除去し、代わりに脱分化培地に置換することを含む(D C C P C)を生成する方法を提供する。

【0144】

他の実施形態では、本発明は、) p P S細胞を軟骨形成培地中で培養することと、2) 軟骨形成培地を除去し、代わりに脱分化培地に置換することを含むC B F A 1 / R u n X 2を発現する細胞を生成する方法を提供する。C B F A 1 / R u n X 2を発現する細胞は、K i 6 7陰性であってよい。C B F A 1 / R u n X 2を発現する細胞は、以下のマーカーO c t 4、n a n o g、S S E A 4、S S E A 3、T R A - 1 - 6 0の1または複数について陰性であってよい。C B F A 1 / R u n X 2を発現する細胞は、線維芽細胞様形態を有してよい。

10

【0145】

本発明のある実施形態では、軟骨形成培地は、リノール酸およびウシ血清アルブミンの1または複数を含む。培地は、以下の1または複数：デキサメタゾン、インスリン、トランスフェリン、セレン、アスコルビン酸、ビルビン酸ナトリウムおよびトランスフォーミング増殖因子(T G F)、例えばT G F 3をさらに含み得る。ある実施形態では、培地は、外添加骨形成タンパク質を含まない。ある実施形態では、培地は、ノックアウト血清置換物のような血清置換物を含まない。

【0146】

リノール酸の適切な培地濃度は、約2 mg / mlから約10 mg / mlまで；約3 mg / mlから約7 mg / mlまで；約4 mg / mlから約6 mg / mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約5 . 3 5 mg / mlのリノール酸を含む。ウシ血清アルブミンの適切な培地濃度は、約0 . 5 mg / mlから約5 mg / mlまで；約0 . 8 mg / mlから約3 mg / mlまで；約1 mg / mlから約2 mg / mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約1 . 2 5 mg / mlのウシ血清アルブミンを含む。デキサメタゾンの適切な培地濃度は、約 $10^{-8}$  Mから約 $10^{-6}$ まで；約 $10^{-7}$  Mから約 $10^{-6}$ まで；約 $10^{-8}$  Mから約 $10^{-7}$  Mまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約 $10^{-7}$  Mのデキサメタゾンを含む。インスリンの適切な培地濃度は、約3 ng / mlから約20 ng / mlまで；約5 ng / mlから約15 ng / mlまで；約6 ng / mlから約9 ng / mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約6 . 2 5 ng / mlのインスリンを含む。トランスフェリンの適切な培地濃度は、約3 ng / mlから約20 ng / mlまで；約5 ng / mlから約15 ng / mlまで；約6 ng / mlから約9 ng / mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約6 . 2 5 ng / mlのトランスフェリンを含む。亜セレン酸の適切な培地濃度は、約3 ng / mlから約20 ng / mlまで；約5 ng / mlから約15 ng / mlまで；約6 ng / mlから約9 ng / mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約6 . 2 5 ng / mlの亜セレン酸を含む。プロリンの適切な培地濃度は、約20  $\mu$  g / mlから約80  $\mu$  g / mlまで；約30  $\mu$  g / mlから約70  $\mu$  g / mlまで；約40  $\mu$  g / mlから約60  $\mu$  g / mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約40  $\mu$  g / mlのプロリンを含む。アスコルビン酸の適切な培地濃度は、約30  $\mu$  g / mlから約90  $\mu$  g / mlまで；約40  $\mu$  g / mlから約80  $\mu$  g / mlまで；約45  $\mu$  g / mlから約60  $\mu$  g / mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約50  $\mu$  g / mlのアスコルビン酸を含む。T G F の適切な培地濃度は、約1 ng / mlから約30 ng / mlまで；約5 ng / mlから約20 ng / mlまで；約8 ng / mlから約15 ng / mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約10 ng / mlのT G F を含む。

20

30

40

【0147】

本発明のいくつかの実施形態では、脱分化培地は、商業的に入手可能な培地、例えばD M E M ( I n v i t r o g e n ) を含む。培地は、胎児ウシ血清(F C S)のような血

50

清を含んでよい。ある実施形態では、培地は、約10% FCSである。いくつかの実施形態では、培地は、外添加 TGF 1、FGF 2 および PDGF bb を、10% FCS を含む培地で見出されるものを超えて含まない。

【0148】

本発明のいくつかの実施形態では、DCCPCを生成する方法は、pPS細胞を付着させて培養することを含む。本発明のいくつかの実施形態では、pPS細胞は、胚葉体を全く形成しない。本発明のある実施形態では、方法は、軟骨形成培地で培養した後に細胞を付着表面から取り除くことと、細胞を例えば遠心分離によりペレットにすることと、細胞を脱分化培地に再懸濁すること（および細胞をろ過して単細胞懸濁物を形成すること）と、細胞を脱分化培地中の新しい付着表面に再播種することとをさらに含み得る。

10

【0149】

本発明のいくつかの実施形態では、DCCPCを作製する方法のステップ1)は、軟骨細胞系経路の下方にpPS細胞が分化することをもたらす。したがって、ステップ1)は、軟骨細胞系の細胞にpPS細胞を分化させる方法を含む。軟骨細胞系の細胞は、コラーゲンII、コラーゲンI、コラーゲンX、アグリカンから選択されるマーカーの1または複数を発現し得る。軟骨細胞系の細胞は、丸い形態を有することがある。

【0150】

4. 軟骨細胞系細胞および軟骨細胞を生成する方法

いくつかの実施形態では、本発明は、1) DCCPCを得ることと、2) DCCPCを軟骨細胞に分化させることとを含む、軟骨細胞を生成する方法を提供する。

20

【0151】

他の実施形態では、本発明は、1) DCCPCを得ることと、2) DCCPCを以下のマーカーの1または複数：コラーゲンII、アグリカンおよびGAGを発現する細胞に分化させることとを含む、以下のマーカーの1または複数：コラーゲンII、アグリカンおよびGAGを発現する細胞を生成する方法を提供する。

【0152】

いくつかの実施形態では、DCCPCは、以下に記載する方法のいずれかによりDCCPCを作製することにより得ることができる。他の実施形態では、DCCPCは、それを生成した個体または実体から獲得できる。

【0153】

いくつかの実施形態では、DCCPCは、細胞を軟骨形成培地中で適切な長さの時間培養することにより軟骨細胞に分化する。他の実施形態では、DCCPCは、細胞を軟骨形成培地中で適切な長さの時間培養することにより以下のマーカーの1または複数：コラーゲンII、アグリカン、GAGを発現する細胞に分化する。

30

【0154】

本発明のいくつかの実施形態では、DCCPCは、脱分化培地でまず成長させる。ステップ2)に従って細胞の分化を開始するために、細胞を軟骨形成培地に切り替える。培地の切り替えは、細胞を継代し、例えばトリプシンのような適切な化合物または化合物の組み合わせを用いて付着表面から取り除き、遠心分離によりペレットにし、軟骨形成培地に再懸濁し、軟骨形成培地中の付着表面に再播種するかまたは細胞の構築物として懸濁を維持するステップを含み得る。他の実施形態では、細胞は、継代されない。代わりに、細胞を付着表面に接着させたままにし、培地をデカントする。場合によって、細胞をPBSのような適当な緩衝剤で洗浄し、次いで軟骨形成培地を供給してよい。

40

【0155】

軟骨形成培地は、リノール酸およびウシ血清アルブミンの1または複数を含み得る。培地は、以下の1または複数をさらに含み得る：デキサメタゾン、インスリン、トランスフェリン、セレン、アスコルビン酸、ピルビン酸ナトリウムおよびトランスフォーミング増殖因子 (TGF)、例えばTGF 3。ある実施形態では、培地は、外添加骨形成タンパク質を含まない。ある実施形態では、培地は、ロックアウト血清置換物のような血清置換物を含まない。

50

## 【0156】

リノール酸の適切な培地濃度は、約2 mg/mlから約10 mg/mlまで；約3 mg/mlから約7 mg/mlまで；約4 mg/mlから約6 mg/mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約5.35 mg/mlのリノール酸を含む。ウシ血清アルブミンの適切な培地濃度は、約0.5 mg/mlから約5 mg/mlまで；約0.8 mg/mlから約3 mg/mlまで；約1 mg/mlから約2 mg/mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約1.25 mg/mlのウシ血清アルブミンを含む。デキサメタゾンの適切な培地濃度は、約 $10^{-8}$  Mから約 $10^{-6}$ まで；約 $10^{-7}$  Mから約 $10^{-6}$ まで；約 $10^{-8}$  Mから約 $10^{-7}$  Mまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約 $10^{-7}$  Mのデキサメタゾンを含む。インスリンの適切な培地濃度は、約3 ng/mlから約20 ng/mlまで；約5 ng/mlから約15 ng/mlまで；約6 ng/mlから約9 ng/mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約6.25 ng/mlのインスリンを含む。トランスフェリンの適切な培地濃度は、約3 ng/mlから約20 ng/mlまで；約5 ng/mlから約15 ng/mlまで；約6 ng/mlから約9 ng/mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約6.25 ng/mlのトランスフェリンを含む。亜セレン酸の適切な培地濃度は、約3 ng/mlから約20 ng/mlまで；約5 ng/mlから約15 ng/mlまで；約6 ng/mlから約9 ng/mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約6.25 ng/mlの亜セレン酸を含む。プロリンの適切な培地濃度は、約20  $\mu$ g/mlから約80  $\mu$ g/mlまで；約30  $\mu$ g/mlから約70  $\mu$ g/mlまで；約40  $\mu$ g/mlから約60  $\mu$ g/mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約40  $\mu$ g/mlのプロリンを含む。アスコルビン酸の適切な培地濃度は、約30  $\mu$ g/mlから約90  $\mu$ g/mlまで；約40  $\mu$ g/mlから約80  $\mu$ g/mlまで；約45  $\mu$ g/mlから約60  $\mu$ g/mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約50  $\mu$ g/mlのアスコルビン酸を含む。TGFの適切な培地濃度は、約1 ng/mlから約30 ng/mlまで；約5 ng/mlから約20 ng/mlまで；約8 ng/mlから約15 ng/mlまでの範囲であってよい。本発明の一実施形態では、培地は、約10 ng/mlのTGFを含む。

10

20

## 【0157】

DCCPCを軟骨形成培地中で培養するために適切な長さの時間は、約4～28日間；約5～25日間；約7～21日間の範囲であってよい。いくつかの実施形態では、DCCPCは、軟骨形成培地中で約7日間；約10日間；約15日間；約21日間；約25日間培養される。一実施形態では、DCCPCは、軟骨形成培地中で21日間培養される。

30

## 【0158】

本発明のいくつかの実施形態では、軟骨細胞を生成する方法は、DCCPCを付着させて培養することを含む。本発明のいくつかの実施形態では、以下のマーカーの1または複数：コラーゲンII、アグリカン、GAGを発現する細胞を生成する方法は、DCCPCを付着させて培養することを含む。本発明のいくつかの実施形態では、DCCPCは、胚葉体を全く形成することなく得られる。本発明のいくつかの実施形態では、細胞は、方法全体を通して付着して維持される（細胞は、継代のために付着表面から短時間取り除かれ得るが、それ以外は付着して維持されると理解される）。

40

## 【0159】

いくつかの実施形態では、方法は、構築物を形成するステップを含む。構築物は、細胞を付着表面から取り除き、細胞を例えば遠心分離によりペレットにすることにより形成してよい。例えば、DCCPCの構築物は、ステップ2)を行う際に軟骨形成培地中で形成してこの培地中に入れてよい。他の実施形態では、方法は、細胞の構築物を形成するステップを含まないことがある。構築物を形成するために適切な数の細胞は、約100,000細胞から約600,000細胞まで；約200,000細胞から約500,000細胞まで；約250,000細胞から約350,000細胞までの範囲であってよい。一実施

50

形態では、約250,000細胞が、構築物を形成するために用いられる。

#### 【0160】

いくつかの実施形態では、DCCPCを付着して培養することは、それらをプラスチック組織培養表面上で培養することを含んでよい。本発明の他の実施形態では、DCCPCを付着して培養することは、DCCPCを基材上で培養することを含んでよい。基材は、細胞外基質成分を含んでよい。いくつかの実施形態では、基材は、ラミニンを含んでよい。いくつかの実施形態では、基材は、マウス肉腫細胞からの抽出物、例えばMatrigel（登録商標）を含んでよい。いくつかの実施形態では、基材は、コラーゲンでない。いくつかの実施形態では、基材は、ゼラチンでない。いくつかの実施形態では、方法のステップ1)およびステップ2)はともに、付着表面に接着した細胞に対して行われる。他の実施形態では、DCCPCは、付着表面から得られるが、ステップ2)は、細胞が懸濁されている、例えば構築物の形態にある場合に行われる。

10

#### 【0161】

##### 5. 対象に細胞組成物を投与する方法

ある実施形態では、本発明は、軟骨細胞系細胞を含む細胞組成物を、生着される細胞組成物を拒絶する細胞組成物に対する免疫応答を生じることなく細胞組成物が対象において生着されるように対象に投与する方法であって、1)軟骨細胞系細胞を含む細胞組成物を得ることと、2)軟骨細胞系細胞を、対象に免疫調節化合物を投与することなく対象に投与することを含む方法を提供する。適切な軟骨細胞系細胞は、例えば成熟軟骨細胞、DCCPC、以下のマーカーの1または複数：コラーゲンI、アグリカン、GAGを発現する細胞を含んでよい。他の実施形態では、免疫抑制薬は、しかし、適当であれば後で、同時にまたは別々に共投与してよい。

20

#### 【0162】

ある実施形態では、軟骨細胞系細胞は、約10日間、約30日間、約60日間、約90日間、約180日間、約1年間免疫応答を生じることなく移植片として維持される。他の実施形態では、軟骨細胞系細胞は、1ヵ月より長く、3ヵ月より長く、6ヵ月より長く、1年より長く免疫応答を生じることなく移植片として維持される。

#### 【0163】

軟骨細胞系細胞は、軟骨修復または回復を必要とする任意の部位に投与してよい。例えば、細胞は、関節炎の関節または急性損傷に罹患している部位に投与してよい(図4)。軟骨細胞を用いて患者の膝軟骨を修復するこのような手順は、当該技術において既知である。例えば、CARTICEL（商標）自己軟骨細胞植え込み(ACI)手順は、低荷重負荷位置から軟骨の試料を採取することと、外植された軟骨細胞を*in vitro*で増殖させることとを含む。その後の手術では、骨膜パッチを軟骨欠損の表面に縫合し、培養した軟骨細胞調製物をパッチの下に注入して欠損を充填する。

30

#### 【0164】

上記のように、軟骨細胞系細胞調製物は、細胞移植片とともに典型的に投与される免疫抑制薬のような免疫調節化合物なしで投与できる。代わりに、このような化合物は、適当であれば用いてよい。免疫抑制薬の例は、シクロスポリン、FK-506を含み、免疫調節化合物の例は、ステロイド化合物、例えばプレドニゾンなどのような抗炎症剤である。

40

#### 【0165】

投与された細胞組成物は、対象に関して同種であり得る。投与された細胞組成物は、対象に関して異種であり得る。よって、いくつかの実施形態では、細胞組成物は、MHC Iおよび/またはMHC IIのような主要組織適合複合体の1または複数の対立遺伝子に関して完全にまたは部分的にミスマッチである。いくつかの実施形態では、細胞組成物は、対象と同系である。適切な対象は、任意の哺乳動物、例えばマウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、非ヒト霊長類、ヒトを含む。

#### 【0166】

細胞組成物は、手術により部位に投与してよい。代わりに、細胞組成物は、注射によりまたは関節鏡技術を用いることにより部位に投与してよい。

50

## 【0167】

ある実施形態では、細胞組成物は、約  $1 \times 10^4$  細胞から約  $1 \times 10^8$  細胞までの範囲であってよい。いくつかの実施形態では、約  $1 \times 10^4$  細胞が、対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、約  $1 \times 10^5$  細胞が、対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、約  $1 \times 10^6$  細胞が、対象に投与され得る。他の実施形態では、約  $1 \times 10^7$  細胞が、対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、約  $1 \times 10^8$  細胞が、対象に投与され得る。

## 【0168】

本発明の第2およびその後の態様の好ましい特徴は、必要な変更を加えて第1の態様について記載したとおりである。

10

## 【0169】

以下の実施例は、請求される発明を限定することを意味しない説明である。

## 【実施例】

## 【0170】

材料および方法

フローサイトメトリーの方法：

細胞単層を、トリプシン (Gibco) を用いてそれらの基材から持ち上げてばらばらにした。トリプシンを除去し、細胞を PBS 中で洗浄し、1% FBS (Gibco) を含む PBS に最終的に再懸濁した。試料を、以下の抗体を 1:50 の希釈で含有する 5 本の試験管に等しく分けた。

20

## 【0171】

## 【表3】

表3

試験管	抗体
試験管 1	陰性対照
試験管 2	FITC 抗ヒト SSEA-1 AlexaFluor(登録商標)647抗ヒト SSEA-3 抗体 PE 抗ヒト TRA-1-81
試験管 3	AlexaFluor(登録商標)488抗ヒト SSEA-4 AlexaFluor(登録商標)647抗ヒト TRA-1-60-R
試験管 4	FITC マウス IgM, $\lambda$ アイグアイ <sup>o</sup> Ctrl 抗体 APC ラット IgM, $\kappa$ アイグアイ <sup>o</sup> Ctrl 抗体 PE マウス IgM, $\kappa$ アイグアイ <sup>o</sup> Ctrl 抗体
試験管 5	AlexaFluor(登録商標)647マウス IgM, $\kappa$ アイグアイ <sup>o</sup> Ctrl 抗体 AlexaFluor(登録商標)488マウス gG3 アイグアイ <sup>o</sup> Ctrl 抗体

30

40

## 【0172】

細胞を 30 分間、4 にてインキュベートし、その時間の後に細胞を PBS 中で洗浄した。細胞を、次いで、BD FACSFLOW (商標) シース液を用いる Becton Dickinson FACSCalibur (商標) フローサイトメーターにかけた。

## 【0173】

免疫細胞化学的方法：

Tra-1-60 発現の視覚化

50

細胞単層を、4% PFAで10分間固定し、PBS (Gibco) で次いで洗浄した。10%正常ヤギ血清および1% BSA (Sigma) を含有するブロッキング溶液を、室温にて1時間用いた。Tra-1-60マウス抗体 (Abcam ab16288) をPBS中の1% BSAおよび1%正常ヤギ血清中1:100の希釈で4℃にて1晩用いた。抗体の除去の後に、細胞をPBSで洗浄し、抗マウス2次抗体 (ヤギ抗マウスAlexa Fluor (登録商標) 488 (Molecular Probes)) と、PBS中の0.1% BSA、1%ヤギ血清中1:200にて、室温にて1時間インキュベートした。さらなるPBS洗浄の後に、細胞を、PBS中1:1000にてDAPI (Molecular Probes) で10分間染色した。細胞を、次いで、カバーガラスとともに蛍光装着剤 (Dako) 中に装着し、Zeiss 蛍光顕微鏡を用いて視覚化した。

10

## 【0174】

## Nanog発現の視覚化

細胞単層を、4% PFAで10分間固定し、PBS (Gibco) で次いで洗浄した。細胞を、0.4% triton X-100で15分間、室温にて透過にした。10%正常ヤギ血清 (Sigma) を含有するブロッキング溶液を、室温にて1時間用いた。Nanogウサギ抗体 (Abcam ab21624) を、PBST中の2.5% BSAおよび10%正常ヤギ血清中1:100の希釈にて、4℃にて1晩用いた。抗体の除去の後に、細胞をPBSで洗浄し、抗ウサギ2次抗体 (ヤギ抗ウサギAlexa Fluor (登録商標) 488 (Molecular Probes)) と、PBS中の1% BSA、1%ヤギ血清中1:200にて、室温にて1時間インキュベートした。さらなるPBS洗浄の後に、細胞を、PBS中1:1000にてDAPI (Molecular Probes) で10分間染色した。細胞を、次いで、カバーガラスとともに蛍光装着剤 (Dako) 中に装着し、Zeiss 蛍光顕微鏡を用いて視覚化した。

20

## 【0175】

## Oct4発現の視覚化

細胞単層を、4% PFAで10分間固定し、PBS (Gibco) で次いで洗浄した。細胞を、100%エタノールと2分間、室温にてインキュベートした。10%正常ヤギ血清および1% BSA (Sigma) および0.1% triton X-100を含有するブロッキング溶液を、室温にて1時間用いた。Oct4マウス抗体 (Santa Cruz SC-5279) を、1%ブロッキング緩衝剤中1:50希釈にて、4℃にて1晩用いた。抗体の除去の後に、細胞をPBSで洗浄し、抗マウス2次抗体 (ヤギ抗マウスAlexa Fluor (登録商標) 488 (Molecular Probes)) と、PBS中1:400にて、室温にて1時間インキュベートした。さらなるPBS洗浄の後に、細胞を、PBS中1:1000にてDAPI (Molecular Probes) で10分間染色した。細胞を、次いで、カバーガラスとともに蛍光装着剤 (Dako) 中に装着し、Zeiss 蛍光顕微鏡を用いて視覚化した。

30

## 【0176】

## I型コラーゲン発現の視覚化

細胞単層を、4% PFAで10分間固定し、PBS (Gibco) で次いで洗浄した。Dako cytomationプロテインブロックを室温にて1時間用いた。I型コラーゲンマウス抗体 (Sigma) を、Dako REAL抗体希釈剤中1:200の希釈にて、4℃にて1晩用いた。抗体の除去の後に、細胞をPBSで洗浄し、抗マウス2次抗体 (ヤギ抗マウスAlexa Fluor (登録商標) 488 (Molecular Probes)) と、PBS中1:1000にて、室温にて1時間インキュベートした。さらなるPBS洗浄の後に、細胞を、PBS中1:1000にてDAPI (Molecular Probes) で10分間染色した。細胞を、次いで、カバーガラスとともに蛍光装着剤 (Dako) 中に装着し、Zeiss 蛍光顕微鏡を用いて視覚化した。

40

## 【0177】

## II型コラーゲン発現の視覚化

50

細胞単層を、4% PFAで10分間固定し、PBS (Gibco) で次いで洗浄した。Dako cytomat ionプロテインブロックを室温にて1時間用いた。II型コラーゲンマウス抗体 (CII - C1クローン、University of Iowaハイブリドーマバンク) を、Dako REAL抗体希釈剤中1:20の希釈にて、4にて1晩用いた。抗体の除去の後に、細胞をPBSで洗浄し、抗マウス2次抗体 (ヤギ抗マウスAlexa Fluor (登録商標) 488 (Molecular Probes)) と、PBS中1:1000にて、室温にて1時間インキュベートした。さらなるPBS洗浄の後に、細胞を、PBS中1:1000にてDAPI (Molecular Probes) で10分間染色した。細胞を、次いで、カバーガラスとともに蛍光装着剤 (Dako) 中に装着し、Zeiss蛍光顕微鏡を用いて視覚化した。

10

## 【0178】

## X型コラーゲン発現の視覚化

細胞単層を、4% PFAで10分間固定し、PBS (Gibco) で次いで洗浄した。Dako cytomat ionプロテインブロックを室温にて1時間用いた。X型コラーゲンマウス抗体 (Sigma) を、Dako REAL抗体希釈剤中1:20の希釈にて、4にて1晩用いた。抗体の除去の後に、細胞をPBSで洗浄し、抗マウス2次抗体 (ヤギ抗マウスAlexa Fluor (登録商標) 488 (Molecular Probes)) と、PBS中1:1000にて、室温にて1時間インキュベートした。さらなるPBS洗浄の後に、細胞を、PBS中1:1000にてDAPI (Molecular Probes) で10分間染色した。細胞を、次いで、カバーガラスとともに蛍光装着剤 (Dako) 中に装着し、Zeiss蛍光顕微鏡を用いて視覚化した。

20

## 【0179】

## Cbfa1 / RunX2発現の視覚化

細胞単層を、4% PFAで10分間固定し、PBSTで次いで洗浄した。10%正常ヤギ血清および1% BSA (Sigma) および0.1% triton X - 100を含有するブロッキング溶液を、室温にて1時間用いた。Cbfa1ラット抗体 (R&D MAB2006) を、1%ブロッキング緩衝剤中1:200希釈にて、4にて1晩用いた。抗体の除去の後に、細胞をPBSTで洗浄し、抗ラット2次抗体 (ヤギ抗ラットAlexa Fluor (登録商標) 488 (Molecular Probes)) と、PBS中1:400にて、室温にて1時間インキュベートした。さらなるPBS洗浄の後に、細胞を、PBS中1:1000にてDAPI (Molecular Probes) で10分間染色した。細胞を、次いで、カバーガラスとともに蛍光装着剤 (Dako) 中に装着し、Zeiss蛍光顕微鏡を用いて視覚化した。

30

## 【0180】

## Ki67発現の視覚化

細胞単層を、4% PFAで10分間固定し、PBS (Gibco) で次いで洗浄した。細胞を、0.25% triton X - 100で10分間、室温にて透過にした。PBST中に10%正常ヤギ血清 (Sigma) および1% BSAを含有するブロッキング溶液を、室温にて1時間用いた。Ki67ウサギ抗体 (Abcam ab15580) を、PBST中の1% BSA中1:100の希釈で、4にて1晩用いた。抗体の除去の後に、細胞をPBSで洗浄し、抗ウサギ2次抗体 (ヤギ抗ウサギAlexa Fluor (登録商標) 488 (Molecular Probes)) と、PBS中の1% BSA、10%ヤギ血清中1:200にて、室温にて1時間インキュベートした。さらなるPBS洗浄の後に、細胞を、PBS中1:1000にてDAPI (Molecular Probes) で10分間染色した。細胞を、次いで、カバーガラスとともに蛍光装着剤 (Dako) 中に装着し、Zeiss蛍光顕微鏡を用いて視覚化した。

40

## 【0181】

## フォンコッサアッセイ

細胞単層を、4% PFAで10分間固定し、PBS (Gibco) で次いで洗浄した。ddH<sub>2</sub>Oでのさらなる洗浄の後に、試料を、ddH<sub>2</sub>O中の5%硝酸銀と、強い光の

50



下で1時間インキュベートした。ddH<sub>2</sub>Oでのさらなる洗浄の後に、試料を、5%チオ硫酸ナトリウムと5分間インキュベートした。ddH<sub>2</sub>O中でのさらなる洗浄の後に、試料を、明視野顕微鏡の下で画像化できた。

#### 【0182】

##### L D H 活性の視覚化

組織の切片を、厚さ10 μmで、低温保持装置上で作製し、使用時まで-20℃にて維持した。Polypep (商標)ストック溶液：ddH<sub>2</sub>O中の4% Polypep (商標)、0.05 M gly-gly、0.017 M NaOH。反応混合物：(Polypep (商標)ストック中の60 mM乳酸、1.75 mg/mlニコチンアミドアデニンヌクレオチド、3 mg/mlニトロブルーテトラゾリウム(試薬は全てSigmaから))。反応混合物に試料を加え、37℃にて3時間インキュベートする。試料を、次いで、ddH<sub>2</sub>O、次いでアセトンおよび最後にPBSですすいだ後に装着し、明視野顕微鏡で画像化する。

10

#### 【0183】

##### 培養培地

軟骨形成培地：DMEM (Sigma D5671)、1%インスリン、トランスフェリン、セレン(6.25 ng/mlインスリン、6.25 mgトランスフェリン、6.25 ng/ml亜セレン酸、1.25 mg/mlウシ血清アルブミンおよび5.35 mg/mlリノール酸)(BD Biosciences 354352)、1%L-グルタミン(Gibco 25036)、1%非必須アミノ酸(Gibco 11140)、1%ピルビン酸ナトリウム(Sigma S8636)、350 μg/ml L-プロリン(Sigma P5607)、0.1 μg/mlデキサメタゾン(Calbiochem 265005)、172.7 μg/mlアスコルビン酸(Sigma A8960)、10 ng/ml TGF-β3

20

#### 【0184】

脱分化培地：DMEM (Sigma D5671)、10%FBS (Gibco 10500-064)

#### 【0185】

骨形成培地：KnockOut DMEM (Gibco 10829)、10%FBS (Gibco 10500-064)、1%L-グルタミン(Gibco 25036)、1%非必須アミノ酸(Gibco 11140)、ベータメルカプトエタノール(Gibco 31350-010)、0.1 μg/mlデキサメタゾン(Calbiochem 265005)、50 μg/mlアスコルビン酸(Sigma A8960)、10 mMベータグリセロホスフェート(Calbiochem 35675)

30

#### 【実施例1】

#### 【0186】

##### 軟骨細胞始原細胞の生成

DCCPCは、以下のプロトコルを用いて生成した。最初に、H7 ES細胞を80%集密までMatrigel (登録商標)被覆フラスコおよび標準的なES培養条件を用いて成長させた。この時点で、培地を軟骨形成培地に置き換えた。細胞はそれらの元のフラスコでMatrigel (登録商標)上にまだ残り、よってコストおよび取り扱いを低減させた。細胞を、これらの条件でさらに14日間、軟骨形成培地を1週間に3回置き換えながら培養した。第14日に、細胞層をPBSで洗浄し、軟骨形成培地を脱分化培地に置き換えた。ここでもまた細胞は元のフラスコに残っていた。さらに5日間培養した後に、細胞は脱分化の徴候を示し、単細胞としてトリプシン継代した。

40

#### 【0187】

##### 材料

用いた材料は、馴化培地、bFGF (Peprotech)、組織培養フラスコ(Nunc)、Matrigel (登録商標)(BD Biosciences)、DMEM (Sigma)およびFBS (Gibco)であった。

50

## 【0188】

## プロトコール

hESCを集密までT25またはT75フラスコのいずれかの中のMatrigel（登録商標）上で標準的なフィーダーフリーhESC培養条件下で、10 ng/ml bFGFを補った馴化培地を用いて培養した。次いで、培地を吸引し、細胞をPBSで洗浄した。その後、完全軟骨形成培地を細胞に用いた（DMEM（Gibco）、 $10^{-7}$  Mデキサメタゾン（Calbiochem）、ITS+プレミックス（6.25 ng/ml インスリン、6.25 mg トランスフェリン、6.25 ng/ml 亜セレン酸、1.25 mg/ml ウシ血清アルブミンおよび5.35 mg/ml リノール酸、BD Biosciences）、40  $\mu$ g/ml L-プロリン（Sigma）、50  $\mu$ g/ml アスコルビン酸（Sigma）、100  $\mu$ g/ml ピルビン酸ナトリウム（Sigma）および10 ng/ml TGF- $\beta$ 3（Peprotech））。用いた容量は、日常的な培養に用いるものに匹敵し、すなわちT25について7 ml およびT75について15 mlであった。

10

## 【0189】

細胞を次いで軟骨形成培地中で14日間、培地を1週間に3回交換しながら培養した。第14日に、細胞は死滅および浮遊細胞の塊に囲まれたコロニーに凝縮したように観察された。培地を吸引し、細胞をPBSで洗浄した。培地を次いで10% FBS（Gibco）を含むDMEM（「脱分化培地」）に置き換え、さらに5日間、培地を1週間に3回交換しながら培養した。これらの5日間の間に、細胞は、第5日までにフラスコが>80%集密になるように増殖してコロニーから遊出した。この段階で、細胞は本発明のDCCPCである。

20

## 【0190】

第5日に、細胞を、標準的な方法を用いてトリプシンで継代した。細胞の大部分は、5分以内に単細胞として持ち上げられた。コロニーのより大きい塊は、フラスコを軽くたたかまたは培地をピペットで操作することにより表面から持ち上げられた。FBSを含むDMEMを加えてトリプシンを停止した。細胞を懸濁物からスピンして分離し、トリプシン上清を除去した。細胞に、50  $\mu$ m孔サイズのフィルタを通過させ、脱分化培地中の単細胞懸濁物を得た。

## 【0191】

細胞を、次いで、プラスチックまたはMatrigel（登録商標）上に播種した。代わりに、細胞を、hESCについて用いた標準的な方法を用いて構築物にした（15 ml試験管中の1 mlの軟骨形成培地中の250,000細胞を800 rpmにて5分間スピンし、このフォーマットで7~21日間、培地交換および遠心分離を3日毎に行いながら培養した）。構築物の方法を用いた場合、細胞は、軟骨形成培地中で16~48時間以内に構築物を形成した。播種方法を用いた場合、細胞を脱分化培地中で24時間保って表面上に付着させた後に、軟骨形成培地に交換した。

30

## 【0192】

これらの条件を用いて、プラスチック上に播種したDCCPCは、細胞数を維持するが、脱分化培地中ではいずれの程度にも増殖せず、すなわちこれらはこれらの条件下で嵩を増さないことが見出された。プラスチック付着細胞は、ESまたはMSCマーカーを発現しないことも見出された。Matrigel（登録商標）を基材として用いた場合、より高い播種効率が観察された。Matrigel（登録商標）表面上のDCCPCは、細胞を脱分化培地中で維持した場合に増殖の証拠を示した。DCCPCをMatrigel（登録商標）基材上に播種してEB培地（Knockout（商標）DMEM（Gibco）、10% FBS（Gibco）、1% L-グルタミン（Gibco）、1% 非必須アミノ酸（Gibco）および0.1 mM ベータメルカプトエタノール（Gibco））中で維持した場合、細胞は、高い割合の増殖を軟骨形成能の喪失なしで示した。

40

## 【実施例2】

## 【0193】

50

## 形態

細胞の形態は、プロトコールを通じて劇的に変化する。我々の軟骨形成培地中で14日間の後に、細胞は、丸い細胞体および密なコロニーへの細胞のクラスタ形成を有する従来の軟骨細胞形態を示す(図1)。第14日に、培地を脱分化培地に交換し、脱分化培地中の第15日から第19日に、細胞は、線維芽細胞様形態を示し、培養表面に再定住し始める。

## 【0194】

高い割合の元のES細胞が死滅し、死滅細胞のいかだを形成し、これは、細胞層のすぐ上の明位相差の塊として観察された。これらの塊は、実質的な攪拌なしでは洗い流すことはできなかった。14日後に、集密度は20%ほど低かった。しかし、コロニー密度の増加は、この集密度の減少が、細胞数の減少と直接関係しないことを示唆した。

10

## 【0195】

軟骨形成培地を脱分化培地に置き換えた後に、細胞形態は劇的に変化した。細胞は、コロニーから遊出し(時間経過顕微鏡写真を用いて観察されるように)、より線維芽細胞様の形態をとった。細胞は増殖し、その後5日間にわたってフラスコに再定住し始めた。死滅細胞のいかだも、この脱分化段階の間に洗い流され、第19日までには死滅細胞は残っていなかった。この時点で、細胞は、それらの元のフラスコ内で、したがって元のMatrigel(登録商標)コーティング上にまだあった。この状態で、細胞は増殖する。DCCPCが増殖を停止するのは、トリプシン処理およびプラスチック上への播種の後だけである。

20

## 【0196】

DCCPC細胞は、単離された初代軟骨細胞のものと異なる形態を有した。DCCPCは、運動性の単細胞として成長し、密な細胞クラスタから離れて移動した。このことは、密な3次元コロニーを活発に形成するより丸い初代軟骨細胞とは非常に異なった。

## 【実施例3】

## 【0197】

## DCCPCの特徴決定

脱分化した細胞は、トリプシン継代され、Matrigel(登録商標)から(およびより後の時点でプラスチックからも)<5分で単細胞として剥離された。この時点で、細胞の懸濁物を、特徴決定のために播種された構築物形成またはプラスチック付着細胞のいずれかのために用いた。

30

## 【0198】

## プラスチック付着細胞:

脱分化培地中で維持しフローサイトメトリーを用いて分析したプラスチック付着DCCPCは、ES多能性マーカーまたはMSCマーカーを示さなかった。

## 【0199】

フローデータと一致して、異なるTra-1-60抗体を用いる免疫細胞化学は、DCCPCにおけるTRA-1-60タンパク質発現の証拠を示さなかった。Tra-1-60染色は、プラスチック付着DCCPCに存在しなかった。未分化H7ES細胞を、抗体の対照として用い、明るい膜に結合した染色を示した。1053細胞を計数した後に、TRA-1-60陽性細胞はDCCPC集団中で観察されなかった。よって、TRA-1-60タンパク質発現は、この集団中では検出可能でない。

40

## 【0200】

DCCPCは、ICCにより決定して、多能性マーカーOct4を発現しなかった。Oct4核染色の証拠は、DCCPCでは観察されなかった。抗体についての陽性対照として用いたH7ES細胞は、明るい核染色を示す。一次抗体の非存在下でインキュベートした細胞は、染色についての陰性対照として用いた。計数した1537細胞のうち、いずれも核Oct4染色を示さなかった。

## 【0201】

DCCPCは、ICCにより決定して、多能性マーカーNanogを発現しなかった。

50

抗体についての陽性対照として用いたH7 ES細胞は、明るい核染色を示す。一次抗体の非存在下でインキュベートした細胞は、染色についての陰性対照として用いた。計数した479細胞のうち、いずれも核Nanog染色を示さず、このことは、Nanogタンパク質発現がこの集団中で検出可能でなかったことを示唆した。

#### 【0202】

プラスチック付着DCCPCも、コラーゲンII発現、軟骨形成のマーカーならびに骨形成および肥大軟骨細胞（これらの細胞型に限定されないが）についての核マーカーCBFA1/RunX2についてICCにより分析した。DCCPCの大部分は、CBFA1/RunX2について陽性であり（図2）、これは、CBFA1/RunX2タンパク質発現を欠く初代（非肥大性）軟骨細胞と異なる。1482の計数された細胞のうちの99（およそ7%）が、コラーゲンII発現を示さなかった。残りの細胞は、低レベルの細胞内コラーゲンIIタンパク質発現を示した。

10

#### 【0203】

図2において、核cbfa1/RunX2染色が、1575細胞のうち1336で存在することが見出された。よって、プラスチック付着DCCPCの85%は、核CBFA1/RunX2タンパク質発現を示す。

#### 【0204】

##### 構築物フォーマットでのDCCPC

以前に言及したように、DCCPCは、細胞を軟骨細胞に再分化させるために構築物として培養できる。1mlの軟骨形成培地中の250,000細胞を15mlの試験管に入れ、800rpmにて5分間スピンし、このフォーマットで7~21日間、培地交換および遠心分離を3日毎に行いながら培養した。この方法を用いた場合、細胞は、軟骨形成培地中で16~48時間以内に3次元構築物を形成した。プラスチック付着細胞を用いた場合と同様に、構築物フォーマット内の細胞も分析した。分析した細胞は、構築物フォーマットに7、14および21日間あった。

20

#### 【0205】

DCCPCから作製した構築物の成長状態を、Ki67に対して産生した抗体を用いて調査した。この抗原に対して産生された抗体は、細胞周期の全ての段階にある細胞を取り上げ、G0にあるものだけを染色しない。DCCPC構築物のいずれにも核Ki67染色の証拠はなく、このことは、細胞がもはや周期を経過せず（静止状態）、増殖性でないことを示唆した。

30

#### 【0206】

多能性マーカーを、ICCにより構築物フォーマット内で調査した。Oct4、TRA-1-60またはNanogタンパク質発現は細胞構築物のいずれにおいても、これにより第7、14または21日にて見出されなかった。ペレットにしたES細胞を、これらのアッセイについての陽性対照として用いた。

#### 【実施例4】

#### 【0207】

プラスチック付着DCCPCの軟骨形成性再分化：

軟骨形成性再分化：

40

DCCPCを、プラスチック上でさらに21日間、軟骨形成培地を用いることにより再分化させた。コラーゲンタンパク質発現を調査して、細胞が軟骨細胞様になっているかを決定した。以前に言及したように、DCCPCは、ICCにより分析した場合に低いII型コラーゲンタンパク質発現を示す。しかし、プラスチック付着DCCPCを軟骨形成培地で処理した場合、II型コラーゲンタンパク質発現は増加する。これとは対照的に、X型コラーゲン発現は、DCCPCプロトコールを通じて存在せず、再分化の後に増加しない。これらのデータは一緒に、軟骨形成培地での処理の後に、DCCPCが軟骨細胞系に向けて分化するが、肥大性にはならないことを示唆する。

#### 【0208】

骨形成性再分化：

50

DCCPCを分析して、これらを骨形成培地中で培養した場合に骨芽細胞に分化するかを検討した。骨芽細胞特異的ではないが、I型コラーゲンは骨形成に必須である。骨形成培地中で21日間培養した後に、細胞は、ICCアッセイで検出される細胞外I型コラーゲンを生成した(図3)。I型コラーゲンの形成は、プラスチック上の単層フォーマットにおいて培養した場合に脱分化する初代軟骨細胞により上方制御されることが既知であり、よって、ここでのタンパク質の出現は、骨形成についての決定的なマーカーではない。分化したDCCPCは、フォンコッサ反応を用いて分析した場合に、排出されたマトリックスを石灰化できなかった。フォンコッサ反応は、石灰化組織で見出されるカルシウムイオンのマーカーとして受け入れられている。石灰化は、骨形成の要件であり、ここでのその非存在は、細胞が機能的な骨芽細胞でないことを示す。対照として、この同じ骨形成培地中で直接処理したH1 hESCは、石灰化したマトリックスを生成することが示された。よって、このデータは、DCCPCプロトコールが、分化系列決定の程度の指標である分化能を制限したことを示唆する。このプロトコールは、軟骨形成系への細胞の分化能を限定すると考えられる。

10

#### 【実施例5】

##### 【0209】

構築物フォーマットでのDCCPCの軟骨形成性再分化：

構築物フォーマットにしたDCCPCを、細胞生存力について、乳酸脱水素酵素(LDH)アッセイを用いて分析した。このアッセイでは、全ての細胞は、活性LDHの指標である濃い染色を示した。このデータは、3次元構築物全体が第7、14および21日にて生存性であることを示唆する。

20

##### 【0210】

一次ヒト関節軟骨組織は、成熟組織の2容量%未満が軟骨細胞により占められるように、大量の細胞外基質で構成される(Hunziker, Quinnら、2002)。軟骨細胞により生成されるマトリックスの組成は、その機能にとって重要であり、軟骨形成性分化のマーカーとして用いることもできる。

##### 【0211】

pH1でのアルシアンブルー染色を用いて、ヒアルロン酸以外にグリコサミノグリカン(GAG)を視覚化した。DCCPC構築物は、第14日を除いて比較的低い染色を示した。サフラニンO染色も用いて、DCCPCにより生成されたマトリックスのGAG含量を分析した。サフラニンO染色(これは、GAGを均一に染色する)は、第7日の試料で最低であり、第14日までにならずに増加した。次いで、第21日に非常に劇的な増加があった。これらのデータは一緒に、DCCPC構築物のGAG含量が、培養を通じて増加し、これが主にヒアルロン酸およびその他の酸性GAGの増加であることを示唆する。

30

##### 【0212】

コラーゲンは、関節軟骨の乾燥重量のおよそ60%に寄与する。II型コラーゲンは、このコラーゲン成分の90~95%を占める。DCCPC構築物は、第7日にて低レベルのII型コラーゲン染色を示す。染色のレベルは、第14日から第21日の間に構築物を通じて増加し、これは、マトリックスのGAG含量において観察された増加と相関する。第7日のDCCPC構築物も、I型およびX型コラーゲンについて分析した。この早期の時点ではコラーゲンは観察されなかった。

40

##### 【0213】

DCCPCから作製された構築物は、第14日から第21日までサイズが迅速に成長する。このサイズ増加は、細胞増殖よりもむしろマトリックス生成によると考えられる。なぜなら、Ki67アッセイは、細胞が細胞周期にないことを示すからである。DAPI染色は、第21日のセクションにおいて構築物容量あたり非常に少ない細胞を示す。

#### 【実施例6】

##### 【0214】

*in vivo*モデルでの軟骨細胞の細胞構築物の植え込み

成体3ヵ月齢の雄Sprague-dawleyラット(免疫応答性野生型;WT)(

50

Harlan UK limited) をこの研究に用いた。全ての動物を、University of Edinburgh の施設動物保護および倫理委員会により設定されたガイドラインならびに UK Home Office ライセンスの下で承認された手順の下で維持した。全ての手順は、全身麻酔 (2 ~ 3.5% イソフルオラン) の下で行った。術後鎮痛を、手術後 24 時間で 2 回のブプレノルフィン注射 (0.05% mg/Kg) により誘導した。標準的な内側傍膝蓋アプローチを用いて膝を露出させた。直径 1mm の軟骨欠損を、ラットの膝の大腿骨滑車の荷重負荷領域において関節軟骨内に創出した。14 日間経過した DCCPC 構築物を欠損内に植え込み、フィブリン糊 (Tisseel (登録商標)、Baxter Healthcare Ltd、Newbury、UK) で密閉した。層状閉鎖を行った。免疫調節薬は用いなかった。動物は、適度な鎮痛を行って、術後に自由に移動させた。試料を 3 週間後に採集した。動物を、CO<sub>2</sub> の吸入により犠牲にし (Animals (Scientific Procedures) Act 1986 の条目 1 により承認されている)、切開した膝を 5% ポリビニルアルコール (PVA; Sigma-Aldrich) に短時間浸漬し、直ちに、-80 に維持したヘキサソ (Sigma-Aldrich) を用いて短時間で凍結させた。

10

## 【0215】

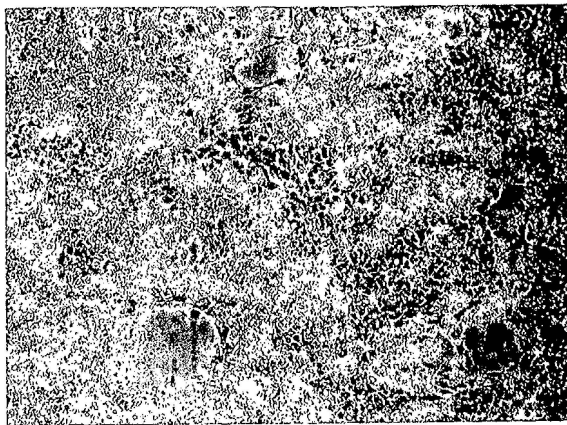
組織学的検査のために、凍結させた膝を、欠損に対して垂直に、矢状に低温切開し (10 μm)、組織学極薄テープ状に装着して組織の形態を維持した。低温切片は、4% (w/v) パラホルムアルデヒドで固定し、PBS で洗浄した。ヘマトキシリンおよびエオシン染色を、組織学的分析のために用いた。結果については図 4 を参照されたい。

20

## 【0216】

熟練した読者は、本発明の精神または添付の特許請求の範囲を逸脱することなく日常的な最適化として本発明を改変できることを認識する。

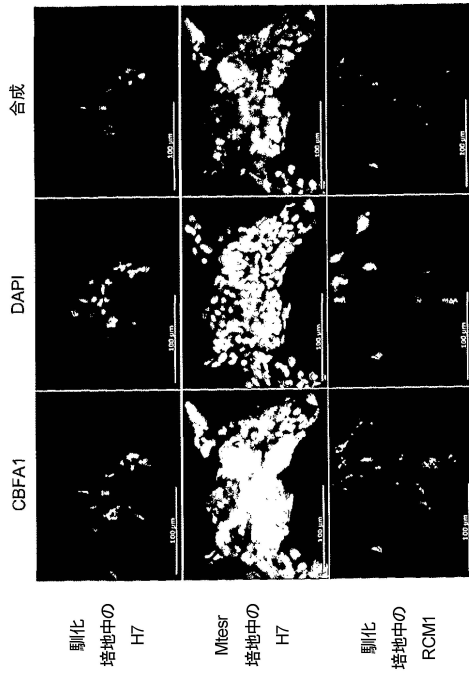
【図 1 A】



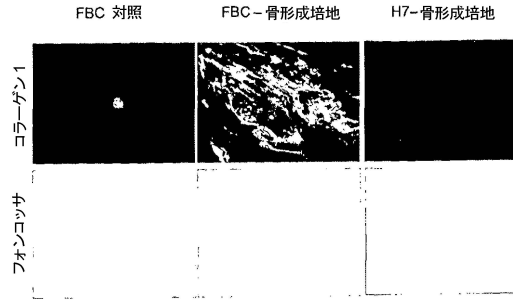
【図 1 B】



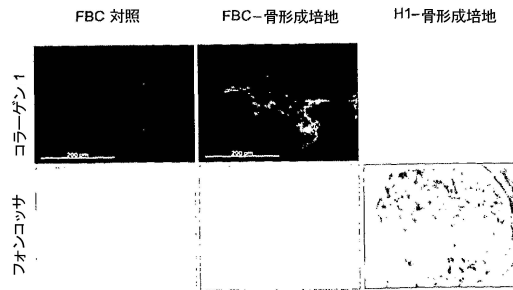
【 図 2 】



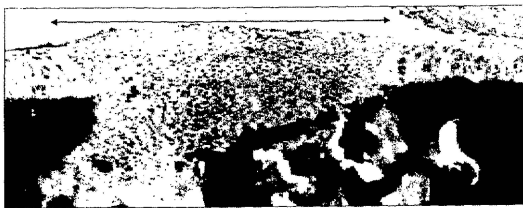
【 図 3 A 】



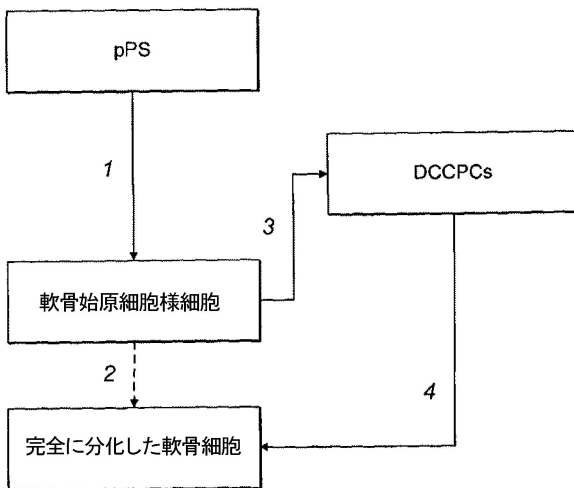
【 図 3 B 】



【 図 4 】



【 図 5 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 35/32	(2015.01)	A 6 1 K 35/32	
A 6 1 P 19/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 L 27/00	(2006.01)	A 6 1 L 27/00	G

(72)発明者 ノーブル, ブランドン, スチュアート  
イギリス国, アイピー4 1キュージェイ イプスウィッチ, ネプチューン キー 19, ウォーターフロント ビルディング, ユニバーシティ キャンパス サフォーク, サイエンス アンド ソーシャル ケア, スクール オブ ヘルス

(72)発明者 ピエル, デイビット, マシュー  
イギリス国, アイピー4 1キュージェイ イプスウィッチ, ネプチューン キー 19, ウォーターフロント ビルディング, ユニバーシティ キャンパス サフォーク, サイエンス アンド ソーシャル ケア, スクール オブ ヘルス

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特表2005-511083(JP, A)  
Eur. J. Radiol., 2006年, vol.57, no.1, pp.24-31  
Eur. Cell. Mater., 2009年, vol.18, suppl.1, p.48  
Osteoarthr. Cartil., 2009年, vol.17, suppl.1, p.S262[488]  
Cell Stem Cell, 2009年, vol.4, no.4, pp.324-335

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12N 5/00-5/28  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/  
WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
PubMed