

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2007年7月26日 (26.07.2007)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2007/083504 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61L 27/00 (2006.01) A61L 31/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/326152
- (22) 国際出願日: 2006年12月27日 (27.12.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2006-013231 2006年1月20日 (20.01.2006) JP
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者: 中村 憲正 (NAKAMURA, Norimasa) [JP/JP];  
〒6620082 兵庫県西宮市苦楽園二番町15-12  
Hyogo (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 吉川 秀樹  
(YOSHIKAWA, Hideki) [JP/JP]; 〒5600004 大阪府豊  
中市小路2-111-1-605 Osaka (JP). 安藤  
渉 (ANDO, Wataru) [JP/JP]; 〒5670009 大阪府茨木市  
山手台2-6 13-201 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 山本 秀策, 外(YAMAMOTO, Shusaku et al.);  
〒5406015 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号  
クリスタルタワー15階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護  
が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,  
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,  
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,  
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,  
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可  
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,  
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,  
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,  
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SCAFFOLD-FREE SELF-ORGANIZED 3D SYNTHETIC TISSUE

(54) 発明の名称: スキャフォールドフリー自己組織性三次元人工組織 (Scaffold-free Self-Organized 3D synthetic tissue)

(57) Abstract: It is intended to provide an artificial tissue or complex which is usable in a transplantation surgery in practice without using a scaffold, can be obtained by incubation and has a potent differentiation ability. It is also intended to provide a therapeutic method and a medicine for tissue repair and regeneration with the use of replacement, coating, etc., in particular for treating cartilage. It is found out that when cells are incubated under specific conditions (i.e., in a medium containing an extracellular matrix production promoter), tissue organization proceeds and the cells can be easily stripped off from the culture dish. The above-described objects can be established by transplanting the thus obtained tissue without treating the target cartilage with chondroitinase.

(57) 要約: 本発明は、スキャフォールドなしで実際の移植手術時に使用可能であり、培養によって生産され得、分化能に富む、人工組織または複合体を提供することを課題とする。本発明はまた、置換および被覆などを利用した組織修復・再生、特に軟骨処置のための治療法および医薬を提供することを課題とする。本発明において、細胞外マトリクス産生促進因子を含む培地中での培養という特定の培養条件によって細胞を培養することによって組織化が進展し、培養皿から剥離しやすくなるという現象を見出し、これを、対象となる軟骨をコンドロイチナーゼでの処置なしで移植することによって上記課題が解決された。

WO 2007/083504 A1

## 明 細 書

スキヤフォールドフリー自己組織性三次元人工組織 (Scaffold-free Self-Organized 3D synthetic tissue)

### 技術分野

[0001] 本発明は、再生医療の分野に関する。より詳細には、移植後も機能する人工組織、複合体ならびにその製造法およびその利用法に関する。本発明の人工組織は、生物学的結合能を有する。

### 背景技術

[0002] 近年、重症臓器不全や難治性疾患に対し、遺伝子工学や細胞組織工学、再生医学等を駆使した再生型治療が新しい治療法として注目され、21世紀における先端医療の最重要かつ最難関な研究テーマの一つとして、世界的に多くの研究者が精力的に取り組んでいる。

[0003] 推定される再生(組織工学)医療関連の市場は、新エネルギー・産業技術総合開発機構の資料では世界で約48兆円、日本国内が約5兆円、組織工学関連製品のみに限っても世界で約10兆円とされており、この分野の次世代の新産業としての世界の期待は大きい。

[0004] 本発明者らも、筋骨格組織および循環器組織領域において再生型治療の開発に取り組む、細胞移植と増殖因子との併用法、組織工学による組織移植再生法を報告してきた。しかし、このような細胞移植や組織移植による再生医療を行うためには、自己由来の細胞源の確保が急務かつ最重要である。筋骨格系組織の細胞には自己修復力の高いものが多く、幹細胞としての機能を有する細胞の存在が報告されてきている。

[0005] 骨格筋(Jankowski RJ, Huand J et al, Gene Ther. 9:642-647, 2002=非特許文献5)、脂肪(Wickham MQ et al., Clin. Orthop. 2003, 412, 196-212=非特許文献6)、臍帯血(Lee OK et al., Blood, 2004, 103:1669-75=非特許文献7)、臍(Salingcarnboriboon R., Exp. Cell. Res. 287:289-300, 2002=非特許文献8)、骨髄(Pitterger MF et al., Science, 28

4:143-147, 1999=非特許文献9)、滑膜(非特許文献1=Arthritis Rheum. 2001 44:1928-42)などに由来する細胞が、未分化で多様な細胞へ分化する能力を有することが明らかとなってきた。

- [0006] 一方、これまで組織修復、再生をめざした細胞治療を行う場合、細胞の集積の維持、細胞増殖、分化機能の安定化、さらには治療部位にかかる力学的ストレスからの保護などのために大多数の研究では生体スキャフォールド(Scaffold)が使用されてきた。しかしスキャフォールドの多くは生物(動物)材料、生体高分子材料等を含み、それらの材料の使用が生体に及ぼす安全性は長期にわたっては予測しきれない問題があった。
- [0007] 基盤材料を用いない細胞移植方法としては、非特許文献3などにおいて報告されるように、岡野らのグループによる温度感受性培養皿を利用した細胞シート工学技術が代表的であり、独創的技術として国際的評価を得ている。しかし、この細胞シート技術を使用する場合、単独のシートでは脆弱であることが多く、移植等の外科的操作に耐える強度を得るためにはシートを重ね合わせる操作等の工夫が必要であった。
- [0008] このようなナノバイオインターフェース技術では、温度応答性ポリマー(PIPAAm)を、細胞培養用のシャーレ等プラスチック成型体に固定すると、ポリマー表面は31℃を境に親水性⇔疎水性に可逆的に変化する。つまり31℃以上ではシャーレ表面は疎水性なので、細胞などが付着できる状態になる。この状態では、細胞は細胞外マトリックス(例えば、接着因子(“のり”)のような機能を持ったタンパク質))を練り出し、シャーレ表面に接着し、増殖させることができる(非特許文献2~4)。
- [0009] しかし、31℃以下ではシャーレ表面は親水性に変化するので、それまで付着していた細胞は、接着因子を保持したまま非常に剥がれやすくなる。これはそれまで吸着していたシャーレの表面それ自体が、31℃以下では無くなってしまふからである。
- [0010] このように温度応答性ポリマーを固定化したシャーレ(例えば、商品名:UpCellおよびRepCell)を用いて細胞培養・剥離を行っても、細胞外マトリックスなどが三次元レベルで適切に配置されず、真の意味での移植可能な人工組織は生産されてこなかった(非特許文献2~4)。
- [0011] さらに、特許文献1(WO00/51527)および特許文献2(WO03/024463)では

、アルギン酸ゲルを用いて半透膜上で細胞を培養することが報告されているが、この組織は、細胞外マトリクスとの一体性が悪く、スキャフォールドフリーではなく、自己組織化が行われておらず、自己支持性もなく、分化誘導能がなくなっており、三次元化という意味で形態学的な可塑性が減失しており、従って、細胞移植をするという意味でも好ましい組織とはいえない。

[0012] スキャフォールドの使用は、特に、移植医療では、副作用の問題から重要視されており、このようなスキャフォールドを使用しない技術の登場が待ち焦がれている。

[0013] 従来のシートの調製方法では、あまり大型のものができないこと、三次元方向にわたり生物学的結合を持った人工組織はできないことなどの欠点があり、しかもシート調製が終わった後に培養基材からはがすとぼろぼろになるなどの欠点があった。

[0014] 従って、移植手術に耐え得る、実際の手術に使用可能な、培養によって生産され得る人工組織を提供することが渴望されている。

[0015] 従来の技術によって調製された人工組織は、組織培養の後培養基材からの単離が困難であり、大型の組織片を作製することが実質上不可能であった。従って、従来の組織シートのような人工組織は、サイズ、構造、機械的強度などの面で医療用途における使用に耐えないという問題点があった。従来技術によって調製された人工組織は、調製自体が困難であることから、供給数が限定されているという問題点も指摘されている。

非特許文献1:De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP., Arthritis Rheum . 2001 44:1928-42

非特許文献2:Okano T,Yamada N,Sakai H,Sakurai Y., J Biomed MaterRes.1993;27:1243-1251

非特許文献3:Kushida A, Yamato M, Konno C, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T., J Biomed. Mater. Res. 45:355-362,1999

非特許文献4:Shimizu T, Yamato M, Akutsu T et al., Circ Res.2002 Feb 22;90(3):e40

非特許文献5:Jankowski RJ, Huand J et al, Gene Ther. 9:642-647, 2002

非特許文献6:Wickham MQ et al. , Clin. Orthop. 2003, 412, 196-212

非特許文献7:Lee OK et al. , Blood, 2004, 103:1669-75

非特許文献8:Salingcarnboriboon R. , Exp. Cell. Res. 287:289-300, 2002

非特許文献9:Pitterger MF et al. , Science, 284:143-147, 1999

特許文献1:WO00/51527

特許文献2:WO03/024463

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0016] 本発明は、移植手術に使用可能な、培養によって生産され得る人工組織を提供することを課題とする。
- [0017] 特に、本発明は、三次元形態を有し、自己支持性を有する人工組織を、スキャフォールドフリーで、分化誘導能を可能であれば保持したままの状態を提供することを課題とする。
- [0018] 本発明はまた、組織における損傷を治療する場合のような、置換療法の必要性および周囲を被覆する必要がある状況において、その治療法および医薬を提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

- [0019] 上記課題は、一部、本発明において細胞外マトリクス産生促進因子を含む培地での培養という特定の培養条件によって細胞を培養することによって組織化が進展し、培養皿から剥離し易くなるという性質をもつ人工組織を見出したことによって解決された。
- [0020] 上記課題はまた、本発明によって提供される人工組織が、例えば、スキャフォールドを必要とせず、自己支持性を有し、三次元化が容易であり、形態可塑性もあり、周囲との生物学的接着能に優れ、分化誘導能を有するなどの性質を持つことによって置換療法においておよび損傷部位を被覆する治療法において有効であることを見出したことによって解決された。
- [0021] 本発明はまた、積層化を必要とせず、生物学的結合能を有する、移植可能な人工

組織の生産方法を提供する。

- [0022] 本発明はまた、物理的刺激または化学的刺激を調節することによって所望の厚みに人工組織を調節することができることを見出したことによって上記課題を解決した。
- [0023] 本発明者らは脂肪由来細胞、滑膜由来細胞などの種々の細胞を用いた細胞治療システムとして、スキャフォールドを用いずに培養細胞および細胞自身が産生するマトリックスのみから構成される三次元人工組織の作成を可能とした。本発明の人工組織は多様な形状へ構築させることが可能であり、しかも十分な強度を有するために移植などの外科的操作も容易で、本発明では、例えば、 $10^6 \sim 10^8$ 個と多量の細胞を、組織移植の要領で容易に確実に局所へ供給することが可能である。またマトリックス内にはコラーゲン(例えば、I型、III型)、フィブロネクチン、ビトロネクチン等の細胞接着因子を豊富に存在し、特に、その存在形態が細胞と一体化しているという特徴を有していること、混在して存在することなどの特異的な特徴のため、移植周囲との生物学的接着性に優れており、複合体および移植先の組織は、きわめて短時間で生物学的に癒合する。さらにこの人工組織は培養条件を変化させることにより骨や軟骨組織への誘導が可能である。このような分化誘導の保持という性質もまた、本発明者らが初めて見出した本発明の人工組織の特徴である。このような人工組織は安全でかつ効率の良い、細胞治療システムにおいて有用である。
- [0024] 本発明の一つの目的として、このような人工組織を用いた関節組織再生技術の臨床応用がある。本発明は、上記のような人工組織または細胞とそれに由来する成分との複合体を提供することによって、特にこれまでに治療が困難であった軟骨処置に特に適した移植片の製造が可能となった。
- [0025] 本発明において、細胞外マトリックス産生促進因子を含む培地中での培養という特定の培養条件によって細胞を培養することによって組織化が進展し、培養皿から剥離しやすくなるという現象を見出し、培養することにより軟骨処置に適した条件を見出したことにより解決された。さらに本発明は剥離後浮遊培養を続けることにより組織の自己収縮を調節することが可能で、3次元形状の調節が可能な人工組織を提供した。本発明はまた、積層化を必要としない移植可能な人工組織の生産方法を提供する。本発明は、細胞外マトリックスに富み、移植時に補助固定手段を必要とせず、生物学的

結合が優良であるという有利な点において特徴的である。

[0026] 本発明はまた、特に、軟骨の処置時にコンドロイチナーゼなしで処置をすることによって、本発明の人工組織が効率的に移植され得ることが判明したことによって上記課題を解決した。

[0027] 従って、本発明は、以下を提供する。

(1)コンドロイチナーゼ非処理での移植に使用するための、人工組織。

(2)第三次元方向に生物学的に結合されている (integrated)、項目1に記載の人工組織。

(3)周囲との生物学的結合能 (integration capability) を有する、項目1に記載の人工組織。

(4) 上記細胞外マトリクスは、コラーゲンI、コラーゲンIII、ビトロネクチンおよびフィブロネクチンからなる群より選択される少なくとも1つを含む、項目7に記載の人工組織。

(5) 細胞外マトリクスが分散して配置され、上記細胞外マトリクスは、任意の2つの1cm<sup>2</sup>のセクションにおける分布密度を比較したときに、約1:3~3:1の範囲内の比率に収まる、項目1に記載の人工組織。

(6) スキャフォールドフリーである、項目1に記載の人工組織。

(7) 上記移植は、関節であり、上記関節が上記コンドロイチナーゼで処理されていないことを特徴とする、項目1に記載の人工組織。

(8) 上記関節は、関節軟骨を含む、項目7に記載の人工組織。

(9) コンドロイチナーゼの非存在下で関節軟骨を処置するための人工組織を生産するための方法であって、

A) 細胞を提供する工程；

B) 上記細胞を、細胞外マトリクス産生促進因子を含む細胞培養液を収容する、所望の人工組織のサイズを収容するに十分な底面積を有する容器に配置する工程；

C) 上記容器中の上記細胞を、細胞外マトリクス産生促進因子を含む細胞培養液とともに、上記所望の大きさのサイズを有する人工組織を形成するに十分な時間培養する工程；および

D) 上記細胞を上記容器から分離する工程、  
を包含する、方法。

(10) 細胞から、コンドロイチナーゼの非存在下で関節軟骨を処置するための人工組織を生産するための細胞培養組成物であって、

A) 上記細胞を維持するための成分; および

B) 細胞外マトリクス産生促進因子、  
を含む、組成物。

(11) コンドロイチナーゼの非存在下で関節軟骨を補強するための方法であって、

A) 細胞と上記細胞に由来する成分とを含む複合体を、上記部分を置換することまたは上記部分を被覆するように配置するかあるいはその両方を行う工程; および

B) 上記複合体と上記部分とが生物学的に結合するに十分な時間上記複合体を保持する工程、

を包含する、方法。

(12) コンドロイチナーゼの非存在下で関節軟骨を処置するための方法であって、

A) 細胞と上記細胞に由来する成分とを含む複合体を、上記部分を置換することまたは上記部分を被覆するように配置するかあるいはその両方を行う工程; および

B) 上記生体の部分の状態が改善するに十分な時間保持する工程、  
を包含する、方法。

[0028] 以下に、本発明の好ましい実施形態を示すが、当業者は本発明の説明および当該分野における周知慣用技術からその実施形態などを適宜実施することができ、本発明が奏する作用および効果を容易に理解することが認識されるべきである。

### 発明の効果

[0029] 本発明は、スキャフォールド(足場、基盤材料)フリーの人工組織または複合体を提供する。このようなスキャフォールドフリーの人工組織を提供することによって、移植後の経過に優れた治療法および治療剤が提供される。

[0030] 本発明はまた、スキャフォールドフリーの人工組織という点により、生物製剤における長期にわたる規制の問題の一つである、スキャフォールド自体の混入に起因する問題を一挙に解決する。また、スキャフォールドがないにもかかわらず、治療効果は



従来のものに比べても遜色ないどころか、より良好である。

- [0031] このほか、スキャフォールドを用いた場合に、スキャフォールド内の移植細胞の配向性、細胞間接着性の問題、スキャフォールド自体の生体における変化(炎症惹起)およびスキャフォールドのレシピエント組織への生着性などの問題を解決することができる。
- [0032] 本発明の人工組織および複合体はまた、自己組織化しており、内部において生物学的結合が行われているという点で、従来の細胞治療とも一線を画すことができる。
- [0033] 本発明の人工組織および複合体はまた、三次元形態を容易に形成することができ、所望の形態に容易に設計することができることから、その汎用性に留意されるべきである。
- [0034] 本発明の人工組織および複合体は、周囲の組織、細胞などのレシピエント組織との生物学的結合を有することから、術後の定着がよく、細胞が局所に確実に供給されるなどの優れた効果が奏される。本発明の効果としては、このような生物学的結合性の良好さから、他の人工組織などと複合組織を形成することによって複雑な治療を行うことができる点にもある。
- [0035] 本発明の別の効果は、人工組織および複合体として提供した後、分化誘導をかけることができるという点にある。あるいは、人工組織および／または複合体として提供する前に、分化誘導をかけて、そのような人工組織および／または複合体を形成することができる点にもある。
- [0036] 本発明の他の効果は、細胞移植という観点から、従来の細胞のみの移植、シートを用いた移植などと比べて、三次元レベルでの組織置換が可能、被覆することによる総合的な細胞供給などの効果が奏される点にある。
- [0037] 本発明によって、生物学的結合能を有し、移植可能な人工組織が提供される。このような組織は、上記特徴および効果を有することによって、従来人工物での移植処置が考えられなかった部位の処置が可能になった。本発明の人工組織は、組織内およびレシピエント組織との間で生物学的結合を有しており、実際に移植治療において機能する。このような人工組織は、従来技術では提供されるものではなく、初めて提供されるものである。本発明の人工組織または複合体は、移植時の周囲の組織、細

胞などと生物学的に結合する能力を十分に有し(好ましくは細胞外マトリクスによる)、従って、術後の経過に優れる。このような三次元レベルで瀰漫性に生物学的結合能を有する人工組織は、従来存在しておらず、従って、本発明は、従来の人工組織では達成できなかった治療効果を奏することになる。

- [0038] さらに、本発明により、疾患部分を充填し、置換させること、および／または疾患部位を被覆することによって治療効果をもたらす医療処置が可能となった。
- [0039] また、本発明は、他の人工組織(例えば、ハイドロキシアパタイトでできた人工骨、微線維性コラーゲン医療材料など)とともに用いることにより、他の人工組織と生物学的に結合することによって、従来では達成できなかった人工組織の定着の向上が得られた。
- [0040] 本発明の人工組織は、組織全体にフィブロネクチン、ビトロネクチンなどの細胞外マトリクスまたは細胞接着因子が微慢性に分布し、一方細胞シート工学では培養細胞のシャーレへの接着面に細胞接着因子は局在している。そして最たる違いは細胞シート工学ではシートの主体は細胞であり、シートは接着因子のノリを底面に付けた細胞の塊に近いものであるが、本発明者らの人工組織は文字通り細胞外マトリクスが細胞を包んだ「組織」であるという点が従来のものとは顕著に異なるといえる。
- [0041] スキャフォールド(基盤)材料を用いない細胞移植方法としては、東京女子医大のグループによる温度感受性培養皿を利用した細胞シート工学技術が代表的であり、独創的技術として国際的評価を得ている。しかし、この細胞シート技術を使用する場合、単独のシートでは脆弱であることが多く、移植等の外科的操作に耐えうる強度を得るためにはシートを重ね合わせる操作等の工夫が必要であった。本発明はこのような問題を解決した。
- [0042] 本研究で開発する細胞・マトリクス複合体は細胞シート技術とは異なり、温度感受性培養皿を必要とせず、また細胞・マトリクスを重層化させることが容易であることが特徴である。げっ歯類のストローマ細胞などのいわゆるFeeder細胞の使用無しに10層以上に重層した複合体を3週間程度で作成できる技術は世界的に見当たらない。また、滑膜細胞のマトリクス産生条件を調節させることにより、特殊な器具を必要とすることなく複合体の把持、移動といった外科的操作が可能となる強度を保持する複

合体の作成も可能であり、本発明は、世界的に見ても、細胞移植を確実にかつ安全に行うための独創的で画期的な手法となるという点でも効果を有するといえる。

### 図面の簡単な説明

[0043] [図1]図1は、本発明の人工組織のインビボでの軟骨移植実験方法およびその結果を示す。上部パネルに移植培養の方法を示す。人工組織は、部分損傷軟骨においてインビトロで接着させた。表在性帯を取り除き、コンドロイチナーゼABCで消化した(Hinziker EB, JBJS, 1996)。左下の図は、×40の写真を示し、右下の図は×200の図を示す。示されるように、損傷面に密に密着している様子がわかる。

[図2]図2は、本発明の軟骨移植実験の例および結果を示す。これは、部分損傷軟骨への人工組織の接着を示す。左には、10日目の細胞(間葉系幹細胞)を示す。左側上には×40の拡大写真および左側下には×200の拡大写真を示す。

[図3]図3は、本発明の人工組織の軟骨移植実験における癒合を示す。10日目の様子が例示される。右にはHE染色が示され、中にはフィブロネクチン染色が示され、左にはビトロネクチン染色が示される。

[図4]図4に示されるように、同様に、人工組織が炎症を起こさずに定着していたことを示す図である。人工組織を軟骨損傷部へ移植後1ヶ月の組織像である。人工組織内に炎症細胞の浸潤は認められない。また人工組織の表層部は線維芽細胞様細胞が多数を占めている(図5において拡大)が、深層部分では軟骨細胞様細胞が多数を占めており(図6において拡大)、移植後の人工組織の軟骨への分化誘導(特に深層で)が示唆される。

[図5]図5は、図4の表層部の拡大図である。示されるように、人工組織の表層部は線維芽細胞様細胞が多数を占めている。

[図6]図6は、図4の深層部の拡大図である。深層部分では軟骨細胞様細胞が多数を占めている。従って、移植後の人工組織の軟骨への分化誘導(特に深層で)が示唆される。

[図7]図7は、損傷1ヶ月後の成体ミニブタの全層関節軟骨損傷の自然治癒を示す。

[図8]図8は、損傷後1ヶ月における3月齢のブタの半層関節損傷の治癒を示す。左は、コンドロイチナーゼABC処理なしの場合、右は、コンドロイチナーゼありの場合を

示す。

[図9]図9は、3月齢ブタの半層関節軟骨損傷部の表面に対する3DSTの移植を示す。この図の左は、3DSTの移植のみを示す。右は、損傷部の基底の表面でコンドロイチナーゼABC処理の後の3DSTの移植を示す。

[図10]図10は、損傷の1ヶ月後で、幼若ブタの全層関節損傷の自然治癒について示す。

[図11]図11は、軟骨欠損の作製および3DSTの移植の一例を示す。上述の欠損部の隅は、長方形であるべきである。なぜならば、ボウル形状の欠損部は、関節内の液圧によるせん断応力に曝されやすいからである。これらの実験の後に、発明者らは、全層欠損部／半層欠損部の作製においていくつかの改善点をあたえた。欠損部の位置および深さは、Acufex (登録商標) misaicplasty<sup>TM</sup> DP (Smith and Nephew) を用いてマークし (A) ; ダイヤモンドディスクグラインダー (Shofu INC; 日本 京都) を使用して電気ルーター (13000rpm, Proxxon: Niersbach: Germany) で大まかに穿孔し (B) ; 歯科用探針でその欠損部の周りを掘り起こし (C) ; そして、イヤモンドディスクグラインダーを手動で用いて底面を滑らかにした (D) 。欠損部を作製して (E) 、そして、3DSTを移植した (F) 。その被膜をとじた。

#### 発明を実施するための最良の形態

[0044] 以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞 (例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など) は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当上記分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書 (定義を含めて) が優先する。

[0045] (用語の定義)

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

## [0046] (再生医療)

本明細書において使用される「再生」(regeneration)とは、個体の組織の一部が失われた際に残った組織が増殖して復元される現象をいう。動物種間または同一個体における組織種に応じて、再生のその程度および様式は変動する。ヒト組織の多くはその再生能が限られており、大きく失われると完全再生は望めない。大きな傷害では、失われた組織とは異なる増殖力の強い組織が増殖し、不完全に組織が再生され機能が回復できない状態で終わる不完全再生が起こり得る。この場合には、生体内吸収性材料からなる構造物を用いて、組織欠損部への増殖力の強い組織の侵入を阻止することで本来の組織が増殖できる空間を確保し、さらに細胞増殖因子を補充することで本来の組織の再生能力を高める再生医療が行われている。この例として、軟骨、骨、心臓および末梢神経の再生医療がある。軟骨、神経細胞および心筋は再生能力がないかまたは著しく低いとこれまでは考えられてきた。近年、これらの組織へ分化し得る能力および自己増殖能を併せ持った組織幹細胞(体性幹細胞)の存在が報告され、組織幹細胞を用いる再生医療への期待が高まっている。胚性幹細胞(ES細胞)はすべての組織に分化する能力をもった細胞であり、それを用いた腎臓、肝臓などの複雑な臓器の再生が試みられているが実現には至っていない。

[0047] 本明細書において使用される「細胞」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、多細胞生物の組織の構成単位であって、外界を隔離する膜構造に包まれ、内部に自己再生能を備え、遺伝情報およびその発現機構を有する生命体をいう。本発明の方法においては、どのような細胞でも対象とされ得る。本発明で使用される「細胞」の数は、光学顕微鏡を通じて計数することができる。光学顕微鏡を通じて計数する場合は、核の数を数えることにより計数を行う。当該組織を組織切片スライスとし、ヘマトキシリン-エオシン(HE)染色を行うことにより細胞外マトリクス(例えば、エラスチンまたはコラーゲン)および細胞に由来する核を色素によって染め分ける。この組織切片を光学顕微鏡にて検鏡し、特定の面積(例えば、 $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ )あたりの核の数を細胞数と見積って計数することができる。本明細書において使用される細胞は、天然に存在する細胞であっても、人工的に改変された細胞(例えば、融合細胞、遺伝子改変細胞)であってもよい。細胞の供給源としては、例

例えば、単一の細胞培養物であり得、あるいは、正常に成長したトランスジェニック動物の胚、血液、または体組織、または正常に成長した細胞株由来の細胞のような細胞混合物が挙げられるがそれらに限定されない。細胞としては、例えば、初代培養の細胞が用いられ得るが、継代培養した細胞もまた使用され得る。好ましくは、継代が3代～8代経過した細胞が用いられる。本明細書において、細胞密度は、単位面積(例えば、 $\text{cm}^2$ )あたりの細胞数で表すことができる。

[0048] 本明細書において「幹細胞」とは、自己複製能を有し、多分化能(すなわち多能性) (「pluripotency」)を有する細胞をいう。幹細胞は通常、組織が傷害を受けたときにその組織を再生することができる。本明細書では幹細胞は、胚性幹(ES)細胞または組織幹細胞(組織性幹細胞、組織特異的幹細胞または体性幹細胞ともいう)であり得るがそれらに限定されない。また、上述の能力を有している限り、人工的に作製した細胞(たとえば、本明細書において記載される融合細胞、再プログラム化された細胞など)もまた、幹細胞であり得る。胚性幹細胞とは初期胚に由来する多能性幹細胞をいう。胚性幹細胞は、1981年に初めて樹立され、1989年以降ノックアウトマウス作製にも応用されている。1998年にはヒト胚性幹細胞が樹立されており、再生医学にも利用されつつある。組織幹細胞は、胚性幹細胞とは異なり、分化の方向が限定されている細胞であり、組織中の特定の位置に存在し、未分化な細胞内構造をしている。従って、組織幹細胞は多能性のレベルが低い。組織幹細胞は、核/細胞質比が高く、細胞内小器官が乏しい。組織幹細胞は、概して、多分化能を有し、細胞周期が遅く、個体の一生以上に増殖能を維持する。本明細書において使用される場合は、幹細胞は好ましくは胚性幹細胞であり得るが、状況に応じて組織幹細胞も使用され得る。

[0049] 由来する部位により分類すると、組織幹細胞は、例えば、皮膚系、消化器系、骨髄系、神経系などに分けられる。皮膚系の組織幹細胞としては、表皮幹細胞、毛嚢幹細胞などが挙げられる。消化器系の組織幹細胞としては、膵(共通)幹細胞、肝幹細胞などが挙げられる。骨髄系の組織幹細胞としては、造血幹細胞、間葉系幹細胞(例えば、脂肪由来、骨髄由来)などが挙げられる。神経系の組織幹細胞としては、神経幹細胞、網膜幹細胞などが挙げられる。

- [0050] 本明細書において「体細胞」とは、卵子、精子などの生殖細胞以外の細胞であり、そのDNAを次世代に直接引き渡さない全ての細胞をいう。体細胞は通常、多能性が限定されているかまたは消失している。本明細書において使用される体細胞は、天然に存在するものであってもよく、遺伝子改変されたものであってもよい。
- [0051] 細胞は、由来により、外胚葉、中胚葉および内胚葉に由来する幹細胞に分類され得る。外胚葉由来の細胞は、主に脳に存在し、神経幹細胞などが含まれる。中胚葉由来の細胞は、主に骨髄に存在し、血管幹細胞、造血幹細胞および間葉系幹細胞などが含まれる。内胚葉由来の細胞は主に臓器に存在し、肝幹細胞、膵幹細胞などが含まれる。本明細書では、体細胞はどのような間葉由来でもよい。好ましくは、体細胞は、間葉系由来の細胞が使用され得る。
- [0052] 本発明の人工組織、複合体、三次元構造体を構成する細胞としては、例えば、上述の外胚葉、中胚葉および内胚葉に由来する分化細胞または幹細胞が使用され得る。このような細胞としては、例えば、間葉系の細胞が挙げられる。ある実施形態では、このような細胞として、筋芽細胞(例えば、骨格筋芽細胞など)、線維芽細胞、滑膜細胞などが使用され得る。このような細胞としては、分化細胞をそのまま利用したり、幹細胞をそのまま利用することもできるが、幹細胞から所望される方向に分化させた細胞を使用することができる。
- [0053] 本明細書において「間葉系幹細胞」とは、間葉に見出される幹細胞をいう。本明細書ではMSCと略されることがある。ここで、間葉とは、多細胞動物の発生各期に認められる、上皮組織間の間隙をうめる星状または不規則な突起をもつ遊離細胞の集団と、それに伴う細胞間質によって形成される組織をいう。間葉系幹細胞は、増殖能と、骨細胞、軟骨細胞、筋肉細胞、ストローマ細胞、腱細胞、脂肪細胞への分化能を有する。間葉系幹細胞は、患者から採取した骨髄細胞等を培養または増殖、軟骨細胞あるいは骨芽細胞に分化させるために使用され、または歯槽骨、関節症等の骨、軟骨、関節などの再建材料として使用されており、その需要は大きい。従って、本発明の間葉系幹細胞または分化した間葉系幹細胞を含む人工組織、複合体または三次元構造体は、これらの用途において構造体が必要である場合に特に有用である。
- [0054] 本明細書において「単離された」とは、通常的环境において天然に付随する物質が

少なくとも低減されていること、好ましくは実質的に含まないことをいう。従って、単離された細胞、組織などとは、天然の環境において付随する他の物質(たとえば、他の細胞、タンパク質、核酸など)を実質的に含まない細胞をいう。組織についていう場合、単離された組織とは、その組織以外の物質(例えば、人工組織または複合体の場合は、その人工組織を作製するに際して使用された物質、スキャフォールド、シート、コーティングなど)が実質的に含まれていない状態の組織をいう。本明細書において、単離されたとは、好ましくは、スキャフォールドが含まれていないこと(すなわち、スキャフォールドフリー)をいう。従って、単離された状態では、培地など本発明の人工組織または複合体を生産する際に使用される成分は入っていてもよいことが理解される。核酸またはポリペプチドについていう場合、「単離された」とは、たとえば、組換えDNA技術により作製された場合には細胞物質または培養培地を実質的に含まず、化学合成された場合には前駆体化学物質またはその他の化学物質を実質的に含まない、核酸またはポリペプチドを指す。単離された核酸は、好ましくは、その核酸が由来する生物において天然に該核酸に隣接している(flanking)配列(即ち、該核酸の5'末端および3'末端に位置する配列)を含まない。

[0055] 本明細書において「スキャフォールドフリー(足場フリー、基盤材料なし;scaffold-free)」とは、人工組織を生産するときに従来使用されている材料(基盤材料=スキャフォールド)を実質的に含まないことをいう。そのようなスキャフォールドの材料としては、例えば、化学高分子化合物、セラミック、あるいは多糖類、コラーゲン、ゼラチン、ヒアルロン酸などの生物製剤などを挙げることができるがそれらに限定されない。スキャフォールドとは、実質的に固形であり、細胞または組織を支持することができる強度を含む材料をいう。

[0056] 本明細書において、「樹立された」または「確立された」細胞とは、特定の性質(例えば、多分化能)を維持し、かつ、細胞が培養条件下で安定に増殖し続けるようになった状態をいう。したがって、樹立された幹細胞は、多分化能を維持する。

[0057] 本明細書において、「非胚性」とは、初期胚に直接由来しないことをいう。従って、初期胚以外の身体部分に由来する細胞がこれに該当するが、胚性幹細胞に改変(例えば、遺伝的改変、融合など)を加えて得られる細胞もまた、非胚性細胞の範囲内



にある。

- [0058] 本明細書において「分化(した)細胞」とは、機能および形態が特殊化した細胞(例えば、筋細胞、神経細胞など)をいい、幹細胞とは異なり、多能性はないか、またはほとんどない。分化した細胞としては、例えば、表皮細胞、腓実質細胞、腓管細胞、肝細胞、血液細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、骨格筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色素細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞などが挙げられる。
- [0059] 本明細書において「組織」(tissue)とは、細胞生物において、同一の機能・形態をもつ細胞集団をいう。多細胞生物では、通常それを構成する細胞が分化し、機能が専能化し、分業化がおこる。従って細胞の単なる集合体であり得ず、ある機能と構造を備えた有機的細胞集団、社会的細胞集団としての組織が構成されることになる。組織としては、外皮組織、結合組織、筋組織、神経組織などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明の組織は、生物のどの臓器または器官由来の組織でもよい。本発明の好ましい実施形態では、本発明が対象とする組織としては、骨、軟骨、腱、靭帯、半月、椎間板、骨膜、血管、血管様組織、心臓、心臓弁、心膜、硬膜などの組織が挙げられるがそれらに限定されない。
- [0060] 本明細書において「細胞シート」とは、単層の細胞から構成される構造体をいう。このような細胞シートは、少なくとも二次元の方向に生物学的結合を有する。生物学的結合を有するシートは、製造された後、単独で扱われる場合でも、細胞相互の結合が実質的に破壊されないことが特徴である。そのような生物学的結合には、細胞外マトリクスを介した細胞間の結合が含まれる。このような細胞シートは、部分的に2、3層構造を含むものであってもよい。
- [0061] 本明細書において「人工組織」とは、天然の状態とは異なる組織をいう。本明細書において、代表的には、人工組織は、細胞培養によって調製される。生物の中に存在する形態の組織をそのまま取り出してきたものは本明細書では人工組織とはいわない。従って、人工組織は、生体に由来する物質および生体に由来しない物質を含み得る。本発明の人工組織は、通常細胞および/または生体物質で構成されるが、それ以外の物質を含んでいてもよい。より好ましくは、本発明の人工組織は、実質的

に細胞および／または生体物質のみで構成される。このような生体物質は、好ましくはその組織を構成する細胞に由来する物質(例えば、細胞外マトリクスなど)であることが好ましい。

- [0062] 本明細書において「移植可能な人工組織」とは、人工組織のうちで、実際の臨床において移植することができ、移植後も少なくとも一定期間移植された部位において組織としての役割を果たすことができる人工組織をいう。移植可能な人工組織は通常、十分な生体適合性、十分な生体定着性を有する。
- [0063] 移植可能な人工組織において十分な強度は、移植を目的とする部分に依存して変動するが、当業者は適宜、その強度を設定することができる。この強度は、自己支持性に十分な強度があり、移植される環境に応じて設定することができる。そのような強度は、後述の応力、歪み特性を測定したり、クリープ特性インデンテーション試験を行うことによって測定され得る。強度はまた、最大荷重を観察することによって評価され得る。
- [0064] 移植可能な人工組織において十分な大きさは、移植を目的とする部分に依存して変動するが、当業者は適宜、その大きさを設定することができる。この大きさは、移植される環境に応じて設定することができる。
- [0065] しかし、移植される場合は少なくとも一定の大きさを有することが好ましく、そのような大きさは、通常、面積について少なくとも $1\text{cm}^2$ であり、好ましくは少なくとも $2\text{cm}^2$ であり、より好ましくは少なくとも $3\text{cm}^2$ である。さらに好ましくは少なくとも $4\text{cm}^2$ であり、少なくとも $5\text{cm}^2$ であり、少なくとも $6\text{cm}^2$ であり、少なくとも $7\text{cm}^2$ であり、少なくとも $8\text{cm}^2$ であり、少なくとも $9\text{cm}^2$ であり、少なくとも $10\text{cm}^2$ であり、少なくとも $15\text{cm}^2$ であり、あるいは少なくとも $20\text{cm}^2$ であり得るが、それらに限定されず、面積は、用途に応じて $1\text{cm}^2$ 以下または $20\text{cm}^2$ 以上であり得る。本発明の本質は、どのような大きさ(面積、容積)のものでも作製することができる点にあり、サイズに限定されないことが理解される。
- [0066] 容積で表す場合は、上記大きさは、少なくとも $2\text{mm}^3$ であり得、少なくとも $40\text{mm}^3$ であり得るがそれに限定されず、 $2\text{mm}^3$ 以下であっても、 $40\text{mm}^3$ 以上であってもよいことが理解される。
- [0067] 移植可能な人工組織において十分な厚みは、移植を目的とする部分に依存して変

動するが、当業者は適宜、その厚みを設定することができる。この厚みは、移植される環境に応じて設定することができる。5mmを超えてもよい。心臓へ移植する場合は、この最低限の厚みさえ有していればよいが、他の用途が意図される場合、厚みはより厚い方がよい場合があり得、そのような場合、例えば、少なくとも2mm、より好ましくは少なくとも3mm、さらに好ましくは5mmであることが意図される。例えば、骨、軟骨、靭帯、腱などに適用される場合、心臓と同様に、通常、少なくとも約1mmであり得、例えば、少なくとも2mm、より好ましくは少なくとも3mm、さらに好ましくは5mmおよびそれ以上でも、1mm未満であってもよい。本発明の本質は、どのような暑さの組織または複合体でも作製することができる点にあり、サイズに限定されないことが理解される。

[0068] 移植可能な人工組織において十分な生体適合性は、移植を目的とする部分に依存して変動するが、当業者は適宜、その生体適合性の程度を設定することができる。通常、所望される生体適合性としては、例えば、炎症などを起こさず、免疫反応を起こさずに、周囲組織と生物学的結合を行うことなどが挙げられるが、それらに限定されない。場合によって、例えば、角膜などでは、免疫反応を起こしにくいことから、他の臓器において免疫反応を起こす可能性がある場合でも、本発明の目的では生体適合性を有するとすることができる。生体適合性のパラメータとしては、例えば、細胞外マトリクスの存否、免疫反応の存否、炎症の程度などが挙げられるがそれらに限定されない。そのような生体適合性は、移植後における移植部位での適合性を見ること（例えば、移植された人工組織が破壊されていないことを確認する）によって判定することができる（ヒト移植臓器拒絶反応の病理組織診断基準 鑑別診断と生検標本の取り扱い（図譜）腎臓移植、肝臓移植および心臓移植 日本移植学会 日本病理学会編、金原出版株式会社（1998）を参照）。この文献によれば、Grade 0、1A、1B、2、3A、3B、4に分けられ、Grade 0 (no acute rejection) は、生検標本に急性拒絶反応、心筋細胞障害などを示す所見がない状態である。Grade 1A (focal, mild acute rejection) は、局所的、血管周囲または間質に大型リンパ球が浸潤しているが、心筋細胞傷害は無い状態である。この所見は、1つまたは複数の生検標本で認められる。Grade 1B (diffuse, mild acute rejection) は、血管周囲、間質またはその両方に大型リンパ球

がよりびまん性に浸潤しているが、心筋細胞傷害は無い状態である。Grade2 (focal, moderate acute rejection) は、明瞭に周囲と境界された炎症細胞浸潤巣がただ一箇所で見出されるような状態である。炎症細胞は、大型の活性化されたリンパ球からなり、好酸球をまじえることもある。心筋構築の改変を伴った心筋細胞傷害が病変内に認められる。Grade3A (multifocal, moderate acute rejection) は、大型の活性化したリンパ球からなる炎症細胞浸潤巣が多発性に形成され、好酸球をまじえることもある状態である。これらの多発性の炎症性の炎症細胞浸潤巣の2箇所以上が心筋細胞傷害を伴っている。ときに、心内膜への粗な炎症細胞浸潤を伴っている。この浸潤巣は生検標本のひとつまたは複数の標本で認められる。Grade3B (multifocal, borderline severe acute rejection) は、3Aで見られた炎症細胞浸潤巣がより融合性またはびまん性となり、より多くの生検標本で認められる状態である。大型リンパ球および好酸球、ときに好中球を交える炎症細胞浸潤とともに、心筋細胞傷害がある。出血はない。Grade4 (severe acute rejection) は、活性化したリンパ球、好酸球、好中球を含む多彩な炎症細胞浸潤がびまん性に認められる。心筋細胞傷害と心筋細胞壊死とは常に存在する。浮腫、出血、血管炎も通常認められる。「Quilty」効果とは異なる心内膜への炎症細胞浸潤が通常認められる。かなりの期間、免疫抑制剤で強力に治療されている場合には、細胞浸潤よりも浮腫と出血とが顕著となり得る。

[0069] 移植可能な人工組織において十分な生体定着性は、移植を目的とする部分に依存して変動するが、当業者は適宜、その生体定着性の程度を設定することができる。生体適合性のパラメータとしては、例えば、移植された人工組織と移植された部位との生物学的結合性などが挙げられるがそれらに限定されない。そのような生体定着性は、移植後における移植部位での生物学的結合の存在によって判定することができる。本明細書において好ましい生体定着性とは、移植された人工組織が移植された部位と同じ機能を発揮するように配置されていることが挙げられる。

[0070] 本明細書において「自己支持性」とは、組織(例えば、人工組織)の少なくとも1点が空間上に固定されるときに、その人工組織が実質的に破壊されない特性をいう。本明細書において、自己支持性は、0.5~3.0mmの太さの先端を有するピンセットで組織(例えば、人工組織)をつまみあげた(好ましくは、1~2mmの太さの先端を有す

るピンセット、1mmの太さの先端を有するピンセットで組織をつまむ;ここで、ピンセットは、先曲がりであることが好ましい)ときに、実質的に破壊されないことによって観察される。そのようなピンセットは、市販されており、例えば、夏目製作所などから入手可能である。ここで採用される、つまみ上げる力は、通常、医療従事者が組織をハンドリングする際に掛ける力に匹敵する。従って、自己支持性は、手でつまみあげたときに破壊されないという特長によっても表現することが可能である。そのようなピンセットとしては、例えば、先曲がり先細無鉤ピンセット(例えば、夏目製作所から販売される番号A-11(先端は1.0mmの太さ)、A-12-2(先端は0.5mmの太さ)などを挙げることができるがそれらに限定されない。先曲がりのほうが人工組織を摘み上げやすいが、先曲がりであることに限定されない。

[0071] 例えば、関節における処置を行う場合、置換が主に行われるが、そのような場合に使用される本発明の人工組織は、強度として、上記最低限の自己支持性を有するだけで十分であり、その後は、含まれる細胞が罹患部の細胞に置換され、マトリックスを形成することにより力学的強度を増し、治癒が進む。また、本発明は、人工関節とともに使用され得ることが理解される。

[0072] 本発明では、自己支持性は、実際に人工組織を作製したときの支持性を評価することも重要である。本発明の人工組織を作製する際、容器中に細胞のシートが作製され、そのシートを容器より剥離する際に従来の技術では、シートが破壊されていた(自己支持性がない)。従って、従来技術では、移植可能な人工組織は実質的に作製できず、特に、大型の人工組織が必要な局面では、従来技術は役に立たなかったといえる。本発明の技術を用いれば、人工組織を作製する際に、剥離の前の単層のシートの状態において、容器から分離する時点ですでに十分耐え得る強度、すなわち、自己支持性を有することから、本発明の人工組織は、実質的に任意の局面に応用可能であることが理解される。ここで、単層とは、部分的に2~3層構造を有し得る層を含むことをいうことが理解される。また、通常、人工組織の作製および剥離後は、その人工組織の強度および自己支持性は、上昇することが本発明において観察されたことから、本発明においては、自己支持性は、作製時における評価が一つの重要な局面であり得ることが理解される。本発明では、当然、移植局面での強度も重要であ

ることから、作製後ある程度時間が経過した後の自己支持性を評価することも重要であり得る。従って、このような関係式をもとに、当業者は、使用される時期を見越して逆算して、出荷の時の強度、タイミングを設定することができることが理解される。

- [0073] 本明細書において「膜状組織」とは、「平面状組織」ともいい、膜状の組織をいう。膜状組織には、骨膜、心膜、硬膜、角膜などの器官の組織が挙げられる。
- [0074] 本明細書において「臓器」と「器官」(organ)とは、互換的に用いられ、生物個体のある機能が個体内の特定の部分に局在して営まれ、かつその部分が形態的に独立性をもっている構造体をいう。一般に多細胞生物(例えば、動物、植物)では器官は特定の空間的配置をもついくつかの組織からなり、組織は多数の細胞からなる。そのような臓器または器官としては、皮膚、血管、角膜、腎臓、心臓、肝臓、臍帯、腸、神経、肺、胎盤、膵臓、脳、関節、骨、軟骨、四肢末梢、網膜などが挙げられるがそれらに限定されない。このような臓器または器官はまた、表皮系、腓実質系、腓管系、肝系、血液系、心筋系、骨格筋系、骨芽系、骨格筋芽系、神経系、血管内皮系、色素系、平滑筋系、脂肪系、骨系、軟骨系などの器官または臓器が挙げられるがそれらに限定されない。
- [0075] 本明細書において「袋状臓器」とは、三次元方向に一定の広がりを持ち、その臓器の内部は管状の組織によって外部と接続され得る臓器をいい、例えば、心臓、肝臓、腎臓、胃、脾臓などが挙げられる。
- [0076] 好ましい実施形態では、本発明が対象とする器官は、椎間板、軟骨、関節、骨、半月、滑膜、靭帯、腱などが挙げられるがそれらに限定されない。別の好ましい実施形態では、本発明が対象とする器官は、血管、血管様組織、心臓、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨である。さらに別の好ましい実施形態では、本発明が対象とする器官は、心臓、心臓弁、心膜および血管である。別の好ましい実施形態では、本発明が対象とする器官は、上記の他、骨格筋、脂肪などが挙げられるがそれらに限定されない。
- [0077] 本明細書において、ある部分(例えば損傷部位)の周囲に人工組織、三次元構造体などを、「巻く」とは、その人工組織などを、その部分を被覆するように(すなわち、損傷などがかくれるように)配置することをいい、その部分を「被覆するように配置」す

ると交換可能に用いられる。ある部分を被覆するように配置したかどうかは、その部分と配置された人工組織または三次元構造体などとの間の空間的配置を確認することによって判定することができる。好ましい実施形態では、巻く工程によって、ある部位にはその人工組織などが一回転するように巻き付けられることができる。

[0078] 本明細書において「置換する」とは、病変部(生体の部位)を置換する、病変部にもともとある細胞などが、本発明の人工組織または複合体によって供給される細胞などによって置き換えられることをいう。置換が適切な疾患としては、例えば、断裂している箇所などが挙げられるがそれらに限定されない。置換するとは、別の表現では、「充填」するともいえる。

[0079] 本明細書において「人工組織と部分とが生物学的に結合するに十分な時間」は、その部分と人工組織との組み合わせによって変動するが、当業者であれば、その組み合わせに応じて適宜容易に決定することができる。このような時間としては、例えば、術後1週間、2週間、1カ月、2カ月、3カ月、6カ月、1年などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明では、人工組織は、好ましくは実質的に細胞およびそれ由来する物質のみを含むことから、特に術後に摘出する物質が必要であるというわけではないので、この十分な時間の下限は特に重要ではない。従って、この場合、長ければ長いほど好ましいといえるが、実質的には極端に長い場合は、実質的に補強が完了したといえる。

[0080] 本明細書において「免疫反応」とは、移植片と宿主との間の免疫寛容の失調による反応をいい、例えば、超急性拒絶反応(移植後数分以内)( $\beta$ -Galなどの抗体による免疫反応)、急性拒絶反応(移植後約7~21日の細胞性免疫による反応)、慢性拒絶反応(3カ月以降の細胞性免疫による拒絶反応)などが挙げられる。

[0081] 本明細書において免疫反応を惹起するかどうかは、HE染色などを含む染色、免疫染色、組織切片の検鏡によって、移植組織中への細胞(免疫系)浸潤について、その種、数などの病理組織学的検討を行うことにより判定することができる。

[0082] 本明細書において「石灰化」とは、生物体で石灰質が沈着することをいう。

[0083] 本明細書において生体内で「石灰化する」かどうかは、アリザリンレッド染色、カルシウム濃度を測定することによって判定することができ、移植組織を取り出し、酸処理な

どにより組織切片を溶解させ、その溶液を原子吸光度などの微量元素定量装置により測定し、定量することができる。

- [0084] 本明細書において「生体内」または「インビボ」(in vivo)とは、生体の内部をいう。特定の文脈において、「生体内」は、目的とする組織または器官が配置されるべき位置をいう。
- [0085] 本明細書において「インビトロ」(in vitro)とは、種々の研究目的のために生体の一部分が「生体外に」(例えば、試験管内に)摘出または遊離されている状態をいう。インビボと対照をなす用語である。
- [0086] 本明細書において「エキソビボ」とは、遺伝子導入を行うための標的細胞を被験体より抽出し、インビトロで治療遺伝子を導入した後に、再び同一被験体に戻す場合、一連の動作をエキソビボという。
- [0087] 本明細書において「細胞に由来する物質」とは、細胞を起源とする物質すべてをいい、細胞を構成する物質の他、細胞が分泌する物質。代謝した物質などをが含まれるがそれらに限定されない。代表的な細胞に由来する物質としては、細胞外マトリクス、ホルモン、サイトカインなどが挙げられるがそれらに限定されない。細胞に由来する物質は、通常、その細胞およびその細胞の宿主に対して有害な影響をもたらさないことから、そのような物質は人工組織、三次元構造体などに含まれていても通常悪影響を有しない。
- [0088] 本明細書において「細胞外マトリクス」(ECM)とは「細胞外基質」とも呼ばれ、上皮細胞、非上皮細胞を問わず体細胞(somatic cell)の間に存在する物質をいう。細胞外マトリクスは、通常細胞が産生し、従って生体物質の一つである。細胞外マトリクスは、組織の支持だけでなく、すべての体細胞の生存に必要な内部環境の構成に関与する。細胞外マトリクスは一般に、結合組織細胞から産生されるが、一部は上皮細胞や内皮細胞のような基底膜を保有する細胞自身からも分泌される。線維成分とその間を満たす基質とに大別され、線維成分としては膠原線維および弾性線維がある。基質の基本構成成分はグリコサミノグリカン(酸性ムコ多糖)であり、その大部分は非コラーゲン性タンパクと結合してプロテオグリカン(酸性ムコ多糖-タンパク複合体)の高分子を形成する。このほかに、基底膜のラミニン、弾性線維周囲のマイクロフィブリ



ル(microfibril)、線維、細胞表面のフィブロネクチンなどの糖タンパクも基質に含まれる。特殊に分化した組織でも基本構造は同一で、例えば硝子軟骨では軟骨芽細胞によって特徴的に大量のプロテオグリカンを含む軟骨基質が産生され、骨では骨芽細胞によって石灰沈着が起こる骨基質が産生される。ここで、代表的な細胞外マトリクスとしては、例えば、コラーゲンI、コラーゲンIII、コラーゲンV、エラスチン、ビトロネクチン、フィブロネクチン、ラミニン、トロンボスポンディン、プロテオグリカン類(例えば、デコリン、バイグリカン、フィブロモジュリン、ルミカン、ヒアルロン酸、アグリカンなど)などを挙げるができるがそれらに限定されず、細胞接着を担う細胞外マトリクスであれば、種々のものが本発明において利用され得る。

[0089] 本発明の1つの実施形態では、本発明の人工組織、三次元構造体などは、細胞外マトリクス(たとえば、エラスチン、コラーゲン(例えば、I型、III型、IV型など)、ラミニンなど)は、移植が企図される器官の部位における細胞外マトリクスの組成に類似することが有利であり得る。本発明において、細胞外マトリクスは、細胞接着分子を包含する。本明細書において「細胞接着分子」(Cell adhesion molecule)または「接着分子」とは、互換可能に使用され、2つ以上の細胞の互いの接近(細胞接着)または基質と細胞との間の接着を媒介する分子をいう。一般には、細胞と細胞の接着(細胞間接着)に関する分子(cell-cell adhesion molecule)と、細胞と細胞外マトリクスとの接着(細胞-基質接着)に関与する分子(cell-substrate adhesion molecule)に分けられる。本発明の人工組織、三次元構造体は、通常、このような細胞接着分子を含む。従って、本明細書において細胞接着分子は、細胞-基質接着の際の基質側のタンパク質を包含するが、本明細書では、細胞側のタンパク質(例えば、インテグリンなど)も包含され、タンパク質以外の分子であっても、細胞接着を媒介する限り、本明細書における細胞接着分子または細胞接着分子の概念に入る。

[0090] 本発明において特に注目されるのは、本発明の人工組織が細胞およびその細胞自体が精製する(自己由来)の細胞外マトリクスを含むことである。従って、コラーゲンI、コラーゲンIII、コラーゲンV、エラスチン、ビトロネクチン、フィブロネクチン、ラミニン、トロンボスポンディン、プロテオグリカン類(例えば、デコリン、バイグリカン、フィブロモジュリン、ルミカン、ヒアルロン酸、アグリカンなど)などが配合された複雑な組成を

有することが特徴である。このような細胞由来成分が配合された人工組織は従来提供されていない。このような配合を有する人工組織は、人工材料を使用した場合は実質的に不可能に近く、このような配合をしていること(特に、コラーゲンI、コラーゲンIIIなど)の配合自体がネイティブな配合であるといえる。

- [0091] より好ましくは、細胞外マトリクスは、コラーゲン(I型、III型など)、ビトロネクチンおよびフィブロネクチンをすべて含む。特に、ビトロネクチンおよび/またはフィブロネクチンが配合された人工組織はこれまで提供されておらず、従って、その点でもすでに、本発明の人工組織または複合体は新規なものであることが理解される。
- [0092] 本明細書において、細胞外マトリクスが「配置される」とは、本発明の人工組織に関して言及するとき、その人工組織中に細胞外マトリクスが存在することをいう。そのような配置は、目的とする細胞外マトリクスを免疫染色などによって染色して、可視化することによって観察することができることが理解される。
- [0093] 本明細書において細胞外マトリクスが「分散して」配置される、とは、局在化しないで存在することをいう。そのような細胞外マトリクスの分散は、任意の2つの $1\text{cm}^2$ のセクションにおける分布密度を比較したときに、通常約1:10~10:1、代表的には約1:3~3:1の範囲内の比率に収まる分散をいい、好ましくは、任意の2つの $1\text{cm}^2$ のセクションにおける分布密度を比較したときに、約1:2~2:1の範囲内の比率に収まる分散をいう。より好ましくは、どのセクションにおいてもほぼ同等の比率に収まることが有利であるがそれに限定されない。局所化されず、分散して細胞外マトリクスが表面に存在することによって、本発明の人工組織は、周囲に対して満遍なく生物学的結合能を有し、従って、移植後の経過に優れるという効果を奏する。
- [0094] 細胞間接着に関しては、カドヘリン、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する多くの分子(NCAM、L1、ICAM、ファシクリンII、IIIなど)、セレクチンなどが知られており、それぞれ独特な分子反応により細胞膜を結合させることも知られている。従って、1つの実施形態では、本発明の人工組織、三次元構造体などは、このようなカドヘリン、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する分子などの組成もまた、移植が意図される部位と同程度の組成であることが好ましい。
- [0095] このように多種多様な分子が細胞接着に関与しており、それぞれの機能は異なって

いることから、当業者は、目的に応じて、適宜本発明の人工組織、三次元構造体に含まれるべき分子を選択することができる。細胞接着に関する技術は、上述のものほかの知見も周知であり、例えば、細胞外マトリックス—臨床への応用—メディカルレビュー社に記載されている。

[0096] ある分子が細胞接着分子であるかどうかは、生化学的定量(SDS—PAG法、標識コラーゲン法)、免疫学的定量(酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫組織学的検討)、PCR法、ハイブリダイゼーション法などのようなアッセイにおいて陽性となることを決定することにより判定することができる。このような細胞接着分子としては、コラーゲン、インテグリン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、フィブリノゲン、免疫グロブリンスーパーファミリー(例えば、CD2、CD4、CD8、ICM1、ICAM2、VCAM1)、セレクトリン、カドヘリンなどが挙げられるがそれに限定されない。このような細胞接着分子の多くは、細胞への接着と同時に細胞間相互作用による細胞活性化の補助シグナルを細胞内に伝達する。従って、本発明の組織片において用いられる接着因子としては、そのような細胞活性化の補助シグナルを細胞内に伝達するものが好ましい。細胞活性化により、組織片としてある組織または臓器における損傷部位に適用された後に、そこに集合した細胞および／または組織もしくは臓器にある細胞の増殖を促すことができるからである。そのような補助シグナルを細胞内に伝達することができるかどうかは、生化学的定量(SDS—PAG法、標識コラーゲン法)、免疫学的定量(酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫組織学的検討)、PCR法、ハイブリダイゼーション法というアッセイにおいて陽性となることを決定することにより判定することができる。

[0097] 細胞接着分子としては、例えば、組織固着性の細胞系に広く知られる細胞接着分子としてカドヘリンがあり、カドヘリンは、本発明の好ましい実施形態において使用することができる。一方、非固着性の血液・免疫系の細胞では、細胞接着分子としては、例えば、免疫グロブリンスーパーファミリー分子(LFA—3、CD2、CD4、CD8、ICAM—1、ICAM2、VCAM1など);インテグリンファミリー分子(LFA—1、Mac—1、gpIIbIIIa、p150、95、VLA1、VLA2、VLA3、VLA4、VLA5、VLA6など);セレクトリンファミリー分子(L—セレクトリン、E—セレクトリン、P—セレクトリンなど)などが挙げられるがそれらに限定されない。従って、そのような分子は、血液・免疫系の組

織または臓器を処置するための特に有用であり得る。

[0098] 細胞接着分子は、非固着性の細胞が特定の組織で働くためにはその組織への接着が必要となる。その場合、恒常的に発現するセレクトリン分子などによる一次接着、それに続いて活性化されるインテグリン分子などの二次接着によって細胞間の接着は段階的に強くなると考えられている。従って、本発明において用いられる細胞接着分子としては、そのような一次接着を媒介する因子、二次接着を媒介する因子、またはその両方が一緒に使用され得る。

[0099] 本明細書において「アクチン調節物質」とは、細胞内のアクチンに対して直接的または間接的に相互作用して、アクチンの形態または状態を変化させる機能を有する物質をいう。アクチンへの作用に応じて、アクチン脱重合促進因子とアクチン重合促進因子とに分類されることが理解される。そのような物質としては、例えば、アクチン脱重合促進因子として、Slingshot、コフィリン、CAP(シクラーゼ関連タンパク質)、AI P1(actin-interacting-protein 1)、ADF(actin depolymerizing factor)、デストリン、デパクチン、アクトフォリン、サイトカラシンおよびNGF(nerve growth factor)を挙げることができ、例えば、アクチン重合促進因子として、RhoA、mDi、プロフィリン、Rac1、IRSp53、WAVE2、ROCK、LIMキナーゼ、コフィリン、cdc42、N-WASP、Arp2/3、Drf3、Mena、LPA(lysophosphatidic acid)、インスリン、PDGFa、PDGFb、ケモカインおよびTGF $\beta$ などを挙げることができるがそれらに限定されないことが理解される。そのようなアクチン調節物質には、以下のようなアッセイによって同定される物質が含まれる。本明細書において、アクチンへの相互作用の評価は、アクチン染色試薬(Molecular Probes, Texas Red-X phalloidin)などによりアクチンを可視化した後、顕鏡し、アクチン凝集や細胞伸展を観察することによってアクチンの凝集、再構成および/または細胞伸展速度の向上という現象が確認されることによって判定される。これらの判定は、定量的または定性的に行われ得る。このようなアクチン調節物質は、人工組織の分離を促進または重層化の促進をさせるために本発明において利用される。本発明において用いられるアクチン調節物質が生体に由来する場合、その由来は何でもよく、例えば、ヒト、マウス、ウシなどの哺乳動物種があげられる。

- [0100] 上記のようなアクチン重合に関与する因子は、例えば、Rho関連でアクチンの重合制御であり、以下が挙げられる(例えば、「細胞骨格・運動がわかる」(編集/三木裕明)羊土社を参照のこと)。
- [0101] アクチン重合(Takenaka T et al. J. Cell Sci., 114: 1801-1809, 2001を参照のこと)
- RhoA→mDi→プロフィリン⇒アクチン重合
- RhoA→ROCK/Rho→LIMキナーゼ→コフィリンをリン酸化(抑制)⇒アクチン重合
- Rac1→IRSp53→WAVE2→プロフィリン、Arp2/3⇒アクチン重合
- cdc42→N-WASP→プロフィリン、Arp2/3⇒アクチン重合
- cdc42→Drf3→IRSp53→Mena⇒アクチン重合
- (以上において、→はリン酸化などのシグナル伝達経路を示す。)本発明では、このような経路に関与する任意の因子を使用することができる。
- [0102] アクチン脱重合
- Slingshot→コフィリンの脱リン酸化(活性化)⇒アクチン脱重合
- コフィリンのLIMキナーゼ活性によるリン酸化とSlingshotによる脱リン酸化のバランスでアクチンの脱重合を制御している。コフィリンを活性化させる他の因子としては、CAP(cyclase-associated protein)およびAIP1(actin-interacting-protein 1)が同定されており、これらは、任意のものを使用することができることが理解される。
- [0103] LPA(リゾフォスファチジン酸)は、どのような鎖長のものでも使用することができる。
- [0104] ケモカインとしては、任意のものを使用することができるが、好ましくは、インターロイキン8、MIP-1、SDF-1などを挙げるすることができる。
- [0105] TGF $\beta$ としては、任意の物を使用することができるが、好ましくは、TGF- $\beta$ 1およびTGF- $\beta$ 3を使用することができる。TGF $\beta$ 1およびTGF $\beta$ 3は、細胞外マトリクス産生促進作用も有することから、本発明においては、留意して使用することができる。
- [0106] 本明細書において「組織強度」とは、組織または器官の機能を示すパラメータをい

い、その組織または器官の物理的強度である。組織強度は一般に、引っ張り強さ(例えば、破断強度、剛性率、ヤング率など)を測定することによって判定することができる。そのような一般的な引っ張り試験は周知である。一般的な引っ張り試験によって得られたデータの解析により、破断強度、剛性率、ヤング率などの種々のデータを得ることができ、そのような値もまた、本明細書において組織強度の指標として用いることができる。本明細書では、通常、臨床適用することができる程度の組織強度を有することが必要とされる。

[0107] ここで、本発明の人工組織、三次元構造体などが有する引っ張り強さは、応力・歪み特性を測定することによって測定することができる。手短に述べると、試料に荷重を加え、例えば、1chは歪み、2chは荷重の各々のAD変換器(例えば、ELK-5000)に入力して、応力および歪みの特性を測定することによって引っ張り強さを決定することができる。引っ張り強さはまた、クリープ特性を試験することによっても達成することができる。クリープ特性インデンテーション試験とは、一定の荷重を加えた状態で時間とともにどのように伸びていくかを調べる試験である。微小な素材、薄い素材などのインデンテーション試験は、先端の半径0.1~1 $\mu$ m程度の、例えば、三角錐の圧子を用いて実験を行う。まず、試験片に対して圧子を押し込み、付加を与える。そして、試験片に数十nmから数 $\mu$ m程度押し込んだところで、圧子を戻し除荷する。このような試験方法によって得られるものを荷重除荷曲線と呼ぶ。この曲線から得られた負荷荷重と押し込み深さの挙動とによって硬さ、ヤング率などを求めることができる。

[0108] 本発明の人工組織は、引っ張り強度は弱くてもいい。引っ張り強度は、細胞・細胞外マトリクス比率におけるマトリクス比率を上げる強くなり、細胞比率を上げると弱くなる。本発明は、必要に応じて強度も自由に調整できることが特徴の一つである。移植される組織に対して相対的に近似して強くも弱くもできることが特徴である。従って、そのような任意の場所に応じて目的と設定することができることが理解される。

[0109] 本明細書において「生理活性物質」(physiologically active substance)とは、細胞または組織に作用する物質をいう。生理活性物質には、サイトカインおよび増殖因子が含まれる。生理活性物質は、天然に存在するものであっても、合成されたもの

でもよい。好ましくは、生理活性物質は、細胞が産生するものまたはそれと同様の作用を有するものである。本明細書では、生理活性物質はタンパク質形態または核酸形態あるいは他の形態であり得るが、実際に作用する時点においては、サイトカインは通常はタンパク質形態を意味する。本発明において、生理活性物質は、本発明の人工組織の移植の際に、定着を促進するためなどに使用され得る。

[0110] 本明細書において使用される「サイトカイン」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、細胞から産生され同じまたは異なる細胞に作用する生理活性物質をいう。サイトカインは、一般にタンパク質またはポリペプチドであり、免疫応答の制禦作用、内分泌系の調節、神経系の調節、抗腫瘍作用、抗ウイルス作用、細胞増殖の調節作用、細胞分化の調節作用などを有する。本明細書では、サイトカインはタンパク質形態または核酸形態あるいは他の形態であり得るが、実際に作用する時点においては、サイトカインは通常はタンパク質形態を意味する。

[0111] 本明細書において用いられる「増殖因子」または「細胞増殖因子」とは、本明細書では互換的に用いられ、細胞の増殖を促進または制御する物質をいう。増殖因子は、成長因子または発育因子ともいわれる。増殖因子は、細胞培養または組織培養において、培地に添加されて血清高分子物質の作用を代替し得る。多くの増殖因子は、細胞の増殖以外に、分化状態の制御因子としても機能することが判明している。

[0112] サイトカインには、代表的には、インターロイキン類、ケモカイン類、コロニー刺激因子のような造血因子、腫瘍壊死因子、インターフェロン類が含まれる。増殖因子としては、代表的には、血小板由来増殖因子(PDGFa、PDGFb)、上皮増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、肝実質細胞増殖因子(HGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)のような増殖活性を有するものが挙げられる。

[0113] サイトカインおよび増殖因子などの生理活性物質は一般に、機能重複現象(redundancy)があることから、他の名称および機能で知られるサイトカインまたは増殖因子であっても、本発明に使用される生理活性物質の活性を有する限り、本発明において使用され得る。また、サイトカインまたは増殖因子は、本明細書における好ましい活性を有してさえいれば、本発明の治療法または医薬の好ましい実施形態において使用することができる。

- [0114] 従って、1つの実施形態において、本発明は、このようなサイトカインまたは増殖因子(例えば、BMP-2など)を、移植部位(例えば、軟骨損傷部位)に本発明の人工組織または三次元構造体と同時に投与することによって、人工組織または三次元構造体の定着および移植部位の機能向上が見られることが明らかにされ、そのような併用療法を提供する。
- [0115] 本明細書において「分化」とは、細胞、組織または器官のような生物の部分の状態の発達過程であって、特徴のある組織または器官を形成する過程をいう。「分化」は、主に発生学(embryology)、発生生物学(developmental biology)などにおいて使用されている。1個の細胞からなる受精卵が分裂を行い成体になるまで、生物は種々の組織および器官を形成する。分裂前または分裂が十分でない場合のような生物の発生初期は、一つ一つの細胞や細胞群が何ら形態的または機能的特徴を示さず区別することが困難である。このような状態を「未分化」であるという。「分化」は、器官のレベルでも生じ、器官を構成する細胞がいろいろの違った特徴的な細胞または細胞群へと発達する。これも器官形成における器官内での分化という。従って、本発明の人工組織、三次元構造体は、分化した状態の細胞を含む組織を用いてもよい。本発明の人工組織を作製する場合、分化が必要な場合は、組織化を始める前に分化させてもよく、組織化の後に分化させても良い。
- [0116] 本明細書において「分化因子」とは、「分化促進因子」ともいい、分化細胞への分化を促進することが知られている因子(例えば、化学物質、温度など)であれば、どのような因子であってもよい。そのような因子としては、例えば、種々の環境要因を挙げることができ、そのような因子としては、例えば、温度、湿度、pH、塩濃度、栄養、金属、ガス、有機溶媒、圧力、化学物質(例えば、ステロイド、抗生物質など)などまたはそれらの任意の組み合わせが挙げられるがそれらに限定されない。代表的な分化因子としては、細胞生理活性物質が挙げられるがそれらに限定されない。そのような因子のうち代表的なものとしては、DNA脱メチル化剤(5-アザシチジンなど)、ヒストン脱アセチル化剤(トリコスタチンなど)、核内レセプターリガンド(例えば、レチノイン酸(ATRA)、ビタミンD<sub>3</sub>、T3など)、細胞増殖因子(アクチビン、IGF-1、FGF、PDGFa、PDGFb、TGF- $\beta$ 、BMP2/4など)、サイトカイン(LIF、IL-2、IL-6など)、へ



キサメチレンビスアセトアミド、ジメチルアセトアミド、ジブチルcAMP、ジメチオルスルホキシド、ヨードデオキシウリジン、ヒドロキシル尿素、シトシンアラビノシド、マイトマイシンC、酪酸ナトリウム、アフィディオリン、フルオロデオキシウリジン、ポリブレン、セレンなどが挙げられるがそれらに限定されない。

[0117] 具体的な分化因子としては、以下が挙げられる。これらの分化因子は、単独でまたは組み合わせて用いられ得る。

[0118] A) 角膜: 上皮増殖因子 (EGF);

B) 皮膚 (ケラチノサイト): TGF- $\beta$ 、FGF-7 (KGF: keratinocyte growth factor)、EGF

C) 血管内皮: VEGF、FGF、アンギオポエチン (angiopoietin)

D) 腎臓: LIF、BMP、FGF、GDNF

E) 心臓: HGF、LIF、VEGF

F) 肝臓: HGF、TGF- $\beta$ 、IL-6、EGF、VEGF

G) 臍帯内皮: VEGF

H) 腸管上皮: EGF、IGF-I、HGF、KGF、TGF- $\beta$ 、IL-11

I) 神経: 神経成長因子 (NGF)、BDNF (脳由来神経栄養因子)、GDNF (グリア細胞由来神経栄養因子)、ニューロトロフィン (neurotrophin)、IL-6、TGF- $\beta$ 、TNF

J) グリア細胞: TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、EGF、LIF、IL-6

K) 末梢神経細胞: bFGF、LIF、TGF- $\beta$ 、IL-6、VEGF、

L) 肺 (肺胞上皮): TGF- $\beta$ 、IL-13、IL-1 $\beta$ 、KGF、HGF

M) 胎盤: 成長ホルモン (GH)、IGF、プロラクチン、LIF、IL-1、アクチビンA、EGF

N) 膵臓上皮: 成長ホルモン、プロラクチン

O) 膵臓ランゲルハンス氏島細胞: TGF- $\beta$ 、IGF、PDGFa、PDGFb、EGF、TGF- $\beta$ 、TRH (thyroropin)

P) 滑膜細胞: FGF、TGF- $\beta$  (特にTGF- $\beta$  1、TGF- $\beta$  3)

Q) 骨芽細胞: BMP (特に、BMP-2、BMP-4、BMP-7)、FGF

R) 軟骨芽細胞: FGF、TGF- $\beta$  (特にTGF- $\beta$  1、TGF- $\beta$  3)、BMP (特に、BMP-2、BMP-4、BMP-7)、TNF- $\alpha$ 、IGF

S) 網膜細胞: FGF、CNTF (絨毛神経栄養因子=ciliary neurotrophic factor)

T) 脂肪細胞: インスリン、IGF、LIF

U) 筋肉細胞: LIF、TNF- $\alpha$ 、FGF。

[0119] 本明細書において「骨分化」とは、任意の細胞を骨に分化させることをいう。そのような骨分化は、デキサメタゾン、 $\beta$  グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸2リン酸の存在下で促進されることが知られる。骨形成因子 (BMP、(特に、BMP-2、BMP-4、BMP-7))、を付加してもよい。骨形成が促進されるからである。

[0120] 本明細書において「軟骨分化」とは、任意の細胞を軟骨に分化させることをいう。そのような軟骨分化は、ピルビン酸、デキサメタゾン、アスコルビン酸2リン酸、インスリン、トランスフェリンおよび亜セレン酸亜セレン酸の存在下で促進されることが知られる。骨形成因子 (BMP (特に、BMP-2、BMP-4、BMP-7))、TGF- $\beta$  (特にTGF- $\beta$  1、TGF- $\beta$  3)、FGF、TNF- $\alpha$ などを付加してもよい。軟骨形成が促進されるからである。

[0121] 本明細書において「脂肪分化」とは、任意の細胞を脂肪に分化させることをいう。そのような脂肪分化は、インスリン、IGF、LIFおよびアスコルビン酸2リン酸の存在下で促進されることが知られる。

[0122] 本明細書において「移植片」、「グラフト」および「組織グラフト」は、交換可能に用いられ、身体の特定期部位に挿入されるべき同種または異種の組織または細胞群であって、身体への挿入後その一部となるものをいう。従って、本発明の人工組織、三次元構造体は、移植片として用いることができる。移植片としては、例えば、臓器または臓器の一部、血管、血管様組織、皮片、心臓、心臓弁、心膜、硬膜、関節膜、骨片、軟骨片、角膜骨片、歯などが挙げられるがそれらに限定されない。従って、移植片には、ある部分の欠損部に差し込んで欠損を補うために用いられるものすべてが包含される。移植片としては、そのドナー (donor) の種類によって、自己 (自家) 移植片 (autograft)、同種移植片 (同種異系移植片) (allograft)、異種移植片が挙げられるが

それらに限定されない。

- [0123] 本明細書において自己移植片(組織、細胞、臓器など)または自家移植片(組織、細胞、臓器など)とは、ある個体についていうとき、その個体に由来する移植片(組織、細胞、臓器など)をいう。本明細書において「自己移植片(組織、細胞、臓器など)」というときは、広義には遺伝的に同じ他個体(例えば一卵性双生児)からの移植片(組織、細胞、臓器など)をも含み得る。本明細書では、このような自己との表現は、被験体に由来すると交換可能に使用される。従って、本明細書では、ある被験体に由来しないとの表現は、自己ではない(すなわち、非自己)と同一の意味を有する。
- [0124] 本明細書において「同種移植片(同種異系移植片)(組織、細胞、臓器など)」とは、同種であっても遺伝的には異なる他個体から移植される移植片(組織、細胞、臓器など)をいう。遺伝的に異なることから、同種異系移植片(組織、細胞、臓器など)は、移植された個体(レシピエント)において免疫反応を惹起し得る。そのような移植片(組織、細胞、臓器など)の例としては、親由来の移植片(組織、細胞、臓器など)などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明の人工組織は、同種異系移植片でも使用可能であり、良好な治療成績が立証されているという意味で注目されるべきである。
- [0125] 本明細書において「異種移植片(組織、細胞、臓器など)」とは、異種個体から移植される移植片(組織、細胞、臓器など)をいう。従って、例えば、ヒトがレシピエントである場合、ブタからの移植片(組織、細胞、臓器など)は異種移植片(組織、細胞、臓器など)という。
- [0126] 本明細書において「レシピエント」(受容者)とは、移植片(組織、細胞、臓器など)または移植体(組織、細胞、臓器など)を受け取る個体といい、「宿主」とも呼ばれる。これに対し、移植片(組織、細胞、臓器など)または移植体(組織、細胞、臓器など)を提供する個体は、「ドナー」(供与者)という。
- [0127] 本発明の人工組織形成技術を用いれば、どのような細胞に由来する人工組織でも使用することができる。なぜなら、本発明の方法により形成された人工組織(例えば、膜状組織、器官など)は、治療目的に損傷のない程度の組織損傷率を保持しつつ(すなわち、低く保ちながら)、目的の機能を発揮することができるからである。従って、

従来そのままの組織または臓器自体を移植物として使用するしかなかった状況にあった。このような状況において、細胞から三次元的に結合した組織を形成することができたことによって、そのような三次元的な人工組織を用いることが可能になったことは、従来技術では達成することができなかつた本発明の格別の効果の一つといえる。

[0128] 本明細書において「被験体」とは、本発明の処置が適用される生物をいい、「患者」ともいわれる。患者または被験体は好ましくは、ヒトであり得る。

[0129] 本発明の人工組織、三次元構造体、組織グラフトで必要に応じて使用される細胞は、同系由来(自己(自家)由来)でも、同種異系由来(他個体(他家)由来)でも、異種由来でもよい。拒絶反応が考えられることから、自己由来の細胞が好ましいが、拒絶反応が問題でない場合同種異系由来であってもよい。また、拒絶反応を起こすものも必要に応じて拒絶反応を解消する処置を行うことにより利用することができる。拒絶反応を回避する手順は当該分野において公知であり、例えば、新外科学体系、第12巻、臓器移植(心臓移植・肺移植 技術的、倫理的整備から実施に向けて)(改訂第3版)、中山書店に記載されている。そのような方法としては、例えば、免疫抑制剤、ステロイド剤の使用などの方法が挙げられる。拒絶反応を予防する免疫抑制剤は、現在、「シクロスポリン」(サンディミュン/ネオーラル)、「タクロリムス」(プロGRAF)、「アザチオプリン」(イムラン)、「ステロイドホルモン」(プレドニン、メチルプレドニン)、「T細胞抗体」(OKT3、ATGなど)があり、予防的免疫抑制療法として世界の多くの施設で行われている方法は、「シクロスポリン、アザチオプリン、ステロイドホルモン」の3剤併用である。免疫抑制剤は、本発明の医薬と同時期に投与されることが望ましいが、必ずしも必要ではない。従って、免疫抑制効果が達成される限り免疫抑制剤は本発明の再生・治療方法の前または後にも投与され得る。

[0130] 本発明で用いられる細胞は、どの生物(例えば、脊椎動物、無脊椎動物)由来の細胞でもよい。好ましくは、脊椎動物由来の細胞が用いられ、より好ましくは、哺乳動物(例えば、霊長類、齧歯類など)由来の細胞が用いられる。さらに好ましくは、霊長類由来の細胞が用いられる。最も好ましい実施形態において、ヒト由来の細胞が用いられる。通常は、宿主と同じ種の細胞を用いることが好ましい。

[0131] 本発明が対象とする被験体と、人工組織との組合せとしては、例えば、心疾患(例

例えば、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症および拡張型心筋症など)を起こした心臓への移植、心膜パッチ、脳外科手術時の硬膜移植、心筋梗塞、下肢、上肢などへの血管移植、関節損傷または変性、軟骨損傷または変性、骨壊死、半月損傷または変性、椎間板変性、靭帯損傷または変性、骨折、骨欠損を有する患者への関節、軟骨、骨の移植、損傷した角膜を有する患者に本発明の角膜を移植することなどが挙げられるがそれらに限定されない。

[0132] 本発明が対象とする組織は、生物のどの臓器または器官でもよく、また、本発明が対象とする組織は、どのような種類の生物由来であり得る。本発明が対象とする生物としては、脊椎動物または無脊椎動物が挙げられる。好ましくは、本発明が対象とする生物は、哺乳動物(例えば、霊長類、齧歯類など)である。より好ましくは、本発明が対象とする生物は、霊長類である。最も好ましくは、本発明はヒトを対象とする。

[0133] 本明細書において「可撓性」の人工組織とは、外的環境からの物理的刺激(例えば、圧力)などに対して、抵抗性を有することをいう。可撓性を有する人工組織は、移植される部位が、自律的にまたは他からの影響で運動したり変形したりする場合に好ましい。

[0134] 本明細書において「伸縮性」を有する人工組織とは、外的環境からの伸縮性の刺激(例えば、拍動)に対して抵抗性を有する性質をいう。伸縮性を有する人工組織は、移植される部位が伸縮性の刺激を伴う場合好ましい。そのような伸縮性の刺激を伴う部位としては、例えば、心臓、筋肉、関節、軟骨、腱などが挙げられるがそれらに限定されない。1つの実施形態では、心臓の拍動運動に耐え得る程度の伸縮性が要求され得る。

[0135] 本明細書中で使用される場合、用語「部分」とは、任意の身体中の部分、組織、細胞、器官を指す。そのような部分、組織、細胞、器官としては、骨格筋芽細胞、線維芽細胞、滑膜細胞、幹細胞によって治療され得る部分が挙げられるが、それらに限定されない。特異的なマーカーであれば、核酸分子(mRNAの発現)、タンパク質、細胞外マトリクス、特定の表現型、細胞の形状などどのようなパラメータでも使用することができる。従って、本明細書において具体的に記載されていないマーカーであつ

ても、その部分由来であることを示すことができるマーカーであれば、どのようなマーカーを利用して、本発明の人工組織を判定してもよい。このような部分の代表例としては、例えば、心筋以外の心臓の部分、間葉系幹細胞またはそれに由来する細胞を含む部分、組織、器官、筋芽細胞(例えば、骨格筋芽細胞)、線維芽細胞、滑膜細胞などが挙げられるがそれらに限定されない。

[0136] 軟骨組織などを見る場合、以下のようなマーカーを指標にすることができる。

[0137] Sox9とは、(ヒト:アクセッション番号 NM\_000346)であり、軟骨細胞に特異的なマーカーである。このマーカーは主にmRNAの存在を見ることによって確認することができる(Kulyk WM, Franklin JL, Hoffman LM. Sox9 expression during chondrogenesis in micromass cultures of embryonic limb mesenchyme. Exp Cell Res. 2000 Mar 15;255(2):327-32.)。

[0138] Col 2A1 とは、(ヒト:アクセッション番号 NM\_001844)であり、軟骨細胞に特異的なマーカーである。このマーカーは主にmRNAの存在を見ることによって確認することができる(Kulyk WM, Franklin JL, Hoffman LM. Sox9 expression during chondrogenesis in micromass cultures of embryonic limb mesenchyme. Exp Cell Res. 2000 Mar 15;255(2):327-32.)。

[0139] アグリカン(Aggrecan)とは、(ヒト:アクセッション番号 NM\_001135)であり、軟骨細胞に特異的なマーカーである。このマーカーは主にmRNAの存在を見ることによって確認することができる(Kulyk WM, Franklin JL, Hoffman LM. Sox9 expression during chondrogenesis in micromass cultures of embryonic limb mesenchyme. Exp Cell Res. 2000 Mar 15;255(2):327-32.)。

[0140] 骨シアロタンパク質(Bone sialoprotein)とは、(ヒト:アクセッション番号 NM\_004967)であり、骨芽細胞に特異的なマーカーである。このマーカーは主にmRNAの存在を見ることによって確認することができる(Haase HR, Ivanovski S, Waters MJ, Bartold PM. Growth hormone regulates osteogenic marker mRNA expression in human periodontal fibroblasts and alveolar bone-derived cells. J Periodontal Res. 2003 Aug;38(4):366-74.)。

[0141] オステオカルシン(Osteocalcin)とは、(ヒト:アクセッション番号 NM199173)で

あり、骨芽細胞に特異的なマーカーである。このマーカーは主にmRNAの存在を見ることによって確認することができる (Haase HR, Ivanovski S, Waters MJ, Bartold PM . Growth hormoneregulates osteogenic marker mRNA expression in human periodontal fibroblastsand alveolar bone-derived cells. J Periodontal Res. 2003 Aug;38(4):366-74.)。

[0142] GDF5とは、(ヒト:アクセッション番号 NM\_000557)であり、靭帯細胞に特異的なマーカーである。このマーカーは主にmRNAの存在を見ることによって確認することができる (Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, Dub e JL, DiBlasio-Smith E, Nove J, Song JJ, Wozney JM, Rosen V. Ectopicinduction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. J Clin Invest. 1997 Jul15;100(2):321-30.)。

[0143] Six1とは、(ヒト:アクセッション番号NM\_005982)であり、靭帯細胞に特異的なマーカーである (Dreyer SD, Naruse T, Morello R, Zabel B, Winterpacht A, Johnson RL , Lee B, Oberg KC. Lmx1b expression during joint andtendon formation: localization and evaluation of potential downstream targets. Gene Expr Patterns. 2004 Jul;4(4):397-405.)。このマーカーは主にmRNAの存在を見ることによって確認することができる。

[0144] スクレラキシス (Scleraxis)とは、(ヒト:アクセッション番号BK000280)であり、靭帯細胞に特異的なマーカーである (BrentAE, Schweitzer R, Tabin CJ. A somitic compartment of tendon progenitors. Cell.2003 Apr 18;113(2):235-48.)。このマーカーは主にmRNAの存在を見ることによって確認することができる。

[0145] 本明細書中で使用される場合、「成体の心筋以外の部分」、「成体の心臓以外の部分」はまた、骨格筋芽細胞、線維芽細胞、滑膜細胞、幹細胞などを含む成体の心筋に由来する細胞または成体心臓に由来する細胞に特徴的なマーカー (本明細書においてそれぞれ「非成体心筋マーカー」または「非成体心臓マーカー」という)を一定レベル、例えば、特異的に発現するものの少なくとも約100%未満、好ましくは約80%未満、より好ましくは約50%未満、さらに好ましくは、約25%未満、場合によっては約1%未満発現することによって同定することができる。このようなマーカーとしては、

ミオシン重鎖IIA、ミオシン重鎖IIB、ミオシン重鎖IID(IIX)、CD56、MyoD、Myf5、myogeninなどが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書において具体的に記載されていない非成体心臓マーカーであっても、成体心臓以外の由来であることを示すことができるマーカーであれば、どのようなマーカーを利用して、本発明の人工組織を判定してもよい。

[0146] 他の実施形態では、他の組織に特異的な別のマーカーを利用することができる。そのようなマーカーとしては、例えば、胚性幹細胞についてはOct-3/4、SSEA-1、Rex-1、Otx2などが挙げられ；内皮細胞についてはVE-カドヘリン、Flk-1、Tie-1、PECAM1、vWF、c-kit、CD34、Thy1、Sca-1などが挙げられ；骨格筋について上述のもののほか骨格筋 $\alpha$ アクチンなどが挙げられ；神経細胞についてNestin、Gluレセプター、NMDAレセプター、GFAP、ニューレグリン-1などが挙げられ；造血細胞系についてc-kit、CD34、Thy1、Sca-1、GATA-1、GATA-2、FOGなどが挙げられる。

[0147] 本明細書中で使用される場合、用語「由来する」とは、ある種の細胞が、その細胞が元々存在していた細胞塊、組織、器官などから分離、単離、または抽出されたこと、あるいはその細胞を、幹細胞から誘導されたことを意味する。

[0148] 本明細書中で使用される用語「心臓に適用可能な」とは、適用された心臓が拍動するような能力を意味する。このような心臓に適用可能な組織は、拍動する場合の伸縮に耐え得る強度を有することになる。ここでは、心臓への適用可能性は、心筋への適用可能性を含む。

[0149] 本明細書中で使用される場合、用語「三次元構造体」とは、マトリクスが三次元配向され細胞が三次元に配列しており、細胞間の結合および配向を保持している細胞を含む、三次元方向に広がる物体を指す。

[0150] 本明細書において「生物学的結合」(biological integration)とは、生物学的存在(biological entity)相互の関係に言及する場合、2つの生物学的存在の間に生物学的になんらかの相互作用があることをいう。そのような相互作用としては、例えば、生体分子(例えば、細胞外マトリクス)を介した相互作用、情報伝達を介した相互作用、電気的相互作用(電気信号の同期などの電気的結合)が挙げられるがそれらに



限定されない。生物学的結合には、人工組織内部の生物学的結合と、ある人工組織が、周囲(たとえば、移植後の周囲組織、周囲細胞など)と有する生物学的結合とがある。相互作用を確認する場合は、その相互作用の特性によって適切なアッセイ方法を用いる。例えば、生体分子を介した物理的相互作用を確認する場合は、人工組織、三次元構造体などの強度(例えば、引っ張り試験)を確認する。情報伝達を介した場合は、シグナル伝達がなされるかどうかを、遺伝子発現などを介して確認する。あるいは、電気的な相互作用の場合は、人工組織、三次元構造体などにおける電位の状況を測定し、一定の波をもって電位が伝播しているかどうかを見ることによって確認することができる。本発明において、通常生物学的結合は、三次元すべての方向に生物学的結合を有する。好ましくは、三次元すべての方向にほぼ均等に生物学的結合を有することが有利であることがあるが、別の実施形態では、二次元方向にほぼ均等に生物学的結合を有するが、第三の方向にはすこし弱い生物学的結合を有する人工組織、三次元構造体なども使用され得る。あるいは、細胞外マトリクスを介した生物学的結合の場合は、細胞外マトリクスを染色してその染色度を観察することもできる。インビボで生物学的結合を観察する方法としては、軟骨を用いた結合実験がある。この実験では、軟骨の表面を切除しコンドロイチナーゼABC(Hunziker EB et al., J Bone Joint Surg Am. 1996 May;78(5):721-33)で消化して、目的とする組織をその切除された表面に移植して7日程度培養して、その後の結合を組織学的に観察する。このような軟骨を用いた実験によって、周囲の細胞および/または細胞外マトリクスとの接着能を測定することができることが理解される。しかし、本発明では、コンドロイチナーゼ処理が無い方が、ある方よりも接着性に優れていることを予想外に見出した。

[0151] 本発明の人工組織、三次元構造体などは、医薬品として提供され得るが、あるいは、動物薬、医薬部外品、水産薬および化粧品等として、公知の調製法により提供され得る。

[0152] 従って、本発明が対象とする動物は、臓器または器官を有するものであれば、どの生物(例えば、動物(たとえば、脊椎動物、無脊椎動物))でもよい。好ましくは、脊椎動物(たとえば、メクラウナギ類、ヤツメウナギ類、軟骨魚類、硬骨魚類、両生類、爬

虫類、鳥類、哺乳動物など)であり、より好ましくは、哺乳動物(例えば、単孔類、有袋類、貧歯類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目など)であり得る。例示的な被験体としては、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物が挙げられるがそれらに限定されない。さらに好ましくは、霊長類(たとえば、チンパンジー、ニホンザル、ヒト)が用いられる。最も好ましくはヒトが対象とされ得る。移植治療において限界があるからである。

[0153] 本発明が医薬として使用される場合、本発明の医薬は、薬学的に受容可能なキャリアなどをさらに含み得る。本発明の医薬に含まれる薬学的に受容可能なキャリアとしては、当該分野において公知の任意の物質が挙げられる。

[0154] そのような適切な処方材料または薬学的に受容可能なキャリアとしては、抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または薬学的アジュバントが挙げられるがそれらに限定されない

本発明の処置方法において使用される医薬(人工組織、併用される医薬化合物など)の量は、使用目的、対象疾患(種類、重篤度など)、患者の年齢、体重、性別、既往歴、組織の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明の処置方法を被験体(または患者)に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患(種類、重篤度など)、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。頻度としては、例えば、毎日一ヶ月に1回(例えば、1週間に1回-1ヶ月に1回)の投与が挙げられる。1週間-1ヶ月に1回の投与を、経過を見ながら施すことが好ましい。

[0155] 本明細書中、「投与する」とは、本発明の人工組織、三次元構造体などまたはそれを含む医薬を、単独で、または他の治療剤と組み合わせて投与することを意味する。本発明の人工組織は、以下のような治療部位(例えば、障害心臓など)への導入方法、導入形態および導入量が使用され得る。すなわち、本発明の人工組織および三次元構造体の投与方法としては、例えば心筋梗塞、狭心症等で虚血性の障害を受けた心筋組織の障害部位への直接貼付、貼付後に縫合、挿入等の方法があげられ

る。組み合わせは、例えば、混合物として同時に、別々であるが同時にもしくは並行して;または逐次的にかのいずれかで投与され得る。これは、組み合わせられた薬剤が、治療混合物としてともに投与される提示を含み、そして組み合わせた薬剤が、別々であるが同時に(例えば、人工組織などが直接手術によって提供され、他の薬剤は静脈注射によって与えられる場合)投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与は、第1に与えられ、続いて第2に与えられる化合物または薬剤のうちの1つを別々に投与することをさらに含む。

[0156] 本明細書において「補強」とは、意図される生体の部分の機能を改善させることをいう。

[0157] 本明細書において「指示書」は、試薬の取り扱い、使用方法、調合方法、人工組織の作成方法、収縮方法など、本発明の医薬などを投与する方法または診断する方法などを医師、患者など投与を行う人、診断する人(患者本人であり得る)に対して記載したものである。この指示書は、本発明の診断薬、医薬などを投与する手順を指示する文言が記載されている。この指示書は、本発明が実施される国の監督官庁(例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局(FDA)など)が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書(package insert)であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体(例えば、インターネットで提供されるホームページ(ウェブサイト)、電子メール)のような形態でも提供され得る。

[0158] 本明細書において「細胞外マトリクス産生促進因子」とは、細胞の細胞外マトリクスの産生を促進する任意の因子をいう。本発明において、細胞外マトリクス産生促進因子を細胞シートに添加すると、その細胞シートを培養容器からの剥離が促進される環境を提供し、そのようなシートが三次元方向に生物学的結合する。ここで、生物学的結合は、組織中の細胞と細胞外マトリクスとの結合および細胞外マトリクス同士の結合を含む。ここで、自己収縮によりさらに三次元化が促進される。そのような因子としては、代表的には、細胞外マトリクスの分泌を促進するような因子(例えば、TGF- $\beta$  1、TGF- $\beta$  3など)が挙げられる。本発明において、代表的な細胞外マトリクス産生促進因子としては、TGF- $\beta$  1、TGF- $\beta$  3、アスコルビン酸、アスコルビン酸2リ

ン酸またはその誘導体あるいはその塩が挙げられる。好ましくは、このような細胞外マトリクス産生促進因子は、適用が意図される部分の細胞外マトリクスの組成成分および／またはその量に類似するように細胞外マトリクスの分泌を促す成分(単数または複数)であることが好ましい。そのような細胞外マトリクス産生促進因子が複数の成分を含む場合は、そのような複数成分は、適用が意図される部分の細胞外マトリクスの組成成分および／またはその量に類似するように組成され得る。

[0159] 本明細書において「アスコルビン酸またはその誘導体」には、アスコルビン酸およびその類似体(例えば、アスコルビン酸2リン酸など)、およびその塩(例えば、ナトリウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩など)が含まれる。アスコルビン酸は、L体であることが好ましいがそれに限定されない。

[0160] (発明を実施するための最良の形態)

以下に本発明の最良の形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本発明のよりよい理解のために提供されるものであり、本発明の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本発明の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。

[0161] 一つの局面において、本発明が提供する人工組織および複合体は、培養時にディスパーゼ、トリプシン等で代表されるタンパク質分解酵素による損傷を受けていない。そのため、基材から剥離された人工組織および複合体は、細胞－細胞間、細胞－細胞外マトリクス間、および細胞外マトリクス－細胞外マトリクス間のタンパク質による結合が保持された強度ある細胞塊として回収することができ、三次元構造体としての細胞－細胞外マトリクス複合体としての機能を何ら損なうことなく保有している。トリプシン等の通常のタンパク質分解酵素を使用した場合、細胞－細胞間のおよび細胞－細胞外マトリクス間の結合は殆ど保持されておらず、従って細胞は個々に分かれた状態となって剥離される。その中でタンパク質分解酵素であるディスパーゼに関しては、細胞、基材間の基底膜様タンパク質を殆ど破壊してしまい、得られる三次元構造体および人工組織は強度の弱いものである。特に、本発明の人工組織が対象とする軟骨(例えば、関節軟骨)は、コンドロイチナーゼで処置されていないことが好ましい。理論は不明であるが、コンドロイチナーゼで処理すると、関節軟骨での治療成績

が悪かった。

[0162] 本発明の方法においては、人工組織または三次元構造体の使用目的に合わせて培養時間を設定すればよい。培養した人工組織または三次元構造体を支持体材料から剥離回収するには、培養された細胞シートまたは三次元構造体を単独で、若しくは高分子膜に密着させて剥離することができる。なお、人工組織または三次元構造体を剥離することは細胞を培養していた培養液において行うことも、その他の等張液において行うことも可能であり、目的に合わせて選択することができる。また、単層の細胞シートを作製する場合は、必要に応じ細胞シートまたは三次元構造体を密着させる際に使用する高分子膜としては、例えば、親水化処理が施されたポリビニリデンジフルオライド(PVDF)、ポリプロピレン、ポリエチレン、セルロースおよびその誘導体、キチン、キトサン、コラーゲン、和紙等の紙類、ウレタン、スパンデックス等のネット状・スリキネット状高分子材料を挙げることができる。ここで、ネット状、ストックネット状高分子材料であれば人工組織および複合体は自由度が増し、収縮弛緩機能を更に増大させることができる。本発明における細胞の人工組織および三次元構造体の製法は特に限定されるものではないが、例えば、上記した高分子膜に密着した培養細胞シートを利用することで製造することができる。

[0163] 本発明の人工組織および複合体を高収率で剥離、回収する目的で、細胞培養支持体を軽くたたいたり、ゆらしたりする方法、さらにはピペットを用いて培地を攪拌する方法等を単独で、あるいは併用して用いてもよい。加えて、必要に応じて人工組織および三次元構造体は、培養容器の底面の変形、等張液等で洗浄して剥離回収してもよい。基材から剥離された人工組織、または三次元構造体は、特定方向に引き伸ばすことで、さらに配向された三次元構造体となる。その引き伸ばす方法は、何ら制約されるものではないが、テンシロンなどの引っ張り装置を用いる方法、あるいは、単純にピンセットで引っ張る方法等が挙げられる。配向させることで、三次元構造体自身の動きに方向性を持たせることができ、このことは、例えば、特定の臓器の動きに合わせて、人工組織あるいは三次元構造体を重ね合わせることを可能とするため、人工組織あるいは三次元構造体を臓器に適用する場合に効率が良い。

[0164] 上述の方法により得られた人工組織および複合体は、従来の方法では得られな

ったものである。

[0165] 本発明の人工組織および複合体は、コラーゲン(I、IIIなど)、ビトロネクチン、フィブロネクチンなど細胞外マトリクスなどの接着因子を豊富に含むために、周囲の組織に生着する。それにより、移植細胞を移植部位に安定して生着させることができる。これまでの細胞移植では、スキャフォールドなしでの細胞移植はもちろんのこと、追加の安定化処置(例えば、パッチの縫い付け、スキャフォールドの使用など)を用いた細胞移植においても、細胞の安定した移植先での生着は、従来困難であったが、本発明を用いれば、安定化させることが容易になった。細胞のみの場合は、他の組織による補強、スキャフォールド自身の固定などが必要であったが、本発明の方法を用いれば、そのような必要なしに、人工組織または複合体の中に含まれている多分化能を有し得る細胞を別途の固定なしに安定して移植部にとどめさせることができる。

[0166] (細胞外マトリクス産生促進因子による人工組織の調製)

別の局面において、本発明は、人工組織を生産するための方法を提供する。この人工組織生産法は、A)細胞を提供する工程;B)該細胞を、細胞外マトリクス産生促進因子を含む細胞培養液を収容する、所望の人工組織のサイズを収容するに十分な底面積を有する容器に配置する工程;およびC)該容器中の該細胞を、該所望の大きさのサイズを有する人工組織を形成するに十分な時間培養する工程、を包含する。好ましくは、移植時には、対象となる軟骨は、コンドロイチナーゼ(コンドロイチナーゼABC)での処置なしで行われる。本発明により、コンドロイチナーゼ処置しない方が、軟骨、特に、関節軟骨を効果的に処置することができるからである。

[0167] ここで用いられる細胞は、どのような細胞であってもよい。細胞を提供する方法は、当該分野において周知であり、例えば、組織を摘出してその組織から細胞を分離する方法、あるいは、血液細胞などを含む体液から細胞を分離する方法、あるいは、細胞株を人工培養によって調製する方法などが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において使用される細胞は任意の幹細胞または分化細胞であり得るが、特に、筋芽細胞、間葉系幹細胞、脂肪細胞、滑膜細胞、骨髄細胞などを用いることができる。本明細書において使用される間葉系幹細胞としては、例えば、脂肪組織由来の幹細胞、骨髄由来の幹細胞などを用いることができる。

- [0168] 本発明の人工組織生産法では、細胞外マトリクス産生促進因子を含む細胞培養液が使用される。このような細胞外マトリクス産生促進因子としては、例えば、アスコルビン酸またはその誘導体などが挙げられ、例えば、アスコルビン酸2リン酸、L-アスコルビン酸などが挙げられるがそれらに限定されない。
- [0169] 本発明において使用される細胞培養液は、目的とする細胞が増殖する限りどのような培地であってもよいが、例えば、DMEM、MEM、F12、DME、RPMI1640、MCDB104、199、MCDB153、L15、SkBM、Basal培地などを適宜グルコース、FBS(ウシ胎仔血清)またはヒト血清、抗生物質(ペニシリン、ストレプトマイシンなど)を加えたものが使用され得る。
- [0170] 本発明の方法において使用される容器は、所望の人工組織のサイズを収容するのに十分な底面積を有する限り、当該分野において通常使用されるような容器を用いることができ、例えば、シャーレ、フラスコ、型容器など、好ましくは底面積が広い(例えば、 $1\text{cm}^2$ 以上)容器が使用され得る。その容器の材質もまた、どのような材料を利用してもよく、ガラス、プラスチック(例えば、ポリスチレン、ポリカーボネートなど)、シリコーンなどが用いられ得るがそれらに限定されない。
- [0171] 好ましい実施形態では、本発明の人工組織生産法では、さらに、生産された人工組織を分離する工程を包含し得る。本明細書において「分離する」とは、本発明の人工組織が容器中で形成された後、その容器からその人工組織を分離することをいう。分離は、例えば、物理的手段(例えば、培地のピペッティングなど)、化学的手段(物質の添加)などによって達成することができる。本発明では、タンパク質分解酵素処理などの積極的に人工組織に対して侵襲を与えずに、人工組織の周囲に物理的手段または化学的手段によって刺激を与えることによって人工組織を分離することができるという点で従来達成できなかった簡便さおよびそれによってもたらされる人工組織の傷のなさなどの移植片としての性能の高さという効果を奏することに留意すべきである。
- [0172] 好ましい実施形態では、本発明は、人工組織化された細胞を分離する工程、をさらに包含する。ここで、より好ましい実施形態では、この分離する工程は、人工組織を収縮させる刺激を加えることができる。物理的な刺激(例えば、ピペッティング)を含む

。このような物理的刺激は、作製された人工組織に直接作用しないことが本発明において好ましい特徴である。このように人工組織に直接作用させないことによって、人工組織の損傷を抑えることができるからである。あるいは、分離する工程は、アクチン調節物質の添加のような化学的手段を含む。このようなアクチン調節物質は、アクチン脱重合促進因子およびアクチン重合促進因子からなる群より選択される化学物質を含む。例えば、アクチン脱重合促進因子は、Slingshot、コフィリン、CAP(シクラーゼ関連タンパク質)、AIP1(actin-interacting-protein1)、ADF(actindepolymerizing factor)、デストリン、デパクチン、アクトフォリン、サイトカラシンおよびNGF(nerve growth factor)などを挙げる事ができる。他方、アクチン重合促進因子は、RhoA、mDi、プロフィリン、Rac1、IRSp53、WAVE2、ROCK、LIMキナーゼ、コフィリン、cdc42、N-WASP、Arp2/3、Drf3、Mena、LPA(lysophosphatidicacid)、インスリン、PDGFa、PDGFb、ケモカインおよびTGF $\beta$ などを挙げる事ができる。

[0173] 理論に束縛されることを望まないが、これらのアクチン調節物質は、アクト-ミオシン系の細胞骨格の収縮または弛緩を引き起こし、それにより、細胞自体の収縮または伸縮を調節することになり、結果として、容器の底面から、人工組織自体が分離することを促進または遅延する作用になると考えられる。

[0174] 別の実施形態において、本発明の人工組織または複合体は、単層培養された細胞から作製されることが特徴の一つである。単層培養するにもかかわらず、結果として、種々の厚みを持つ人工組織を構築することができるようになったということは、従来の例えば、温度応答性シートなどを用いた場合に複数のシートを重ね合わせないと厚い組織が構成できなかつたということからは予想できなかつた効果であるといえる。フィーダー細胞が不要で、十層以上の細胞の重層化が可能な三次元化の方法は、本発明が初めて達成したものである。スキヤフォールドを用いない細胞移植方法としては、非特許文献3による温度感受性培養皿を利用した細胞シート工学技術が代表的であり、独創的技術として国際的評価を得ている。しかし、この細胞シート技術を使用する場合、単独のシートでは脆弱であることが多く、移植等の外科的操作に耐えうる強度を得るためにはシートを重ね合わせる操作等の工夫が必要であった。

[0175] 本研究で開発する細胞・マトリックス複合体は細胞シート技術とは異なり、温度感受



性培養皿を必要とせず、また細胞・マトリックスを重層化させることが容易であることが特徴である。げっ歯類のストローマ細胞などのいわゆるFeeder細胞の使用無しに10層以上に重層した複合体を3週間程度で作成できる技術は世界的に見当たらない。また、滑膜細胞のマトリックス産生条件を調節させることにより、特殊な器具を必要とすることなく複合体の把持、移動といった外科的操作が可能となる強度を保持する複合体の作成も可能であり、本法は、世界的に見ても、細胞移植を確実にかつ安全に行うための独創的で画期的な手法となる可能性がある。

[0176] 好ましい実施形態では、本発明の人工組織生産法に用いられる細胞外マトリクス産生促進因子は、アスコルビン酸2リン酸を含む(Hata R, Senoo H.J Cell Physiol. 1989 ; 138(1):8-16参照)。本発明では、アスコルビン酸2リン酸を一定量以上加えることによって、細胞外マトリクスの生産が促進され、その結果、得られる人工組織または複合体が硬化され、剥離しやすくなる。この後、剥離の刺激を与えることによって自己収縮が行われる。このようなアスコルビン酸を加えて培養した後、組織が硬化し、剥離しやすくなる性質を獲得することは、Hataらの報告には記載されていない。理論に束縛されないが、一つの顕著な相違点として、Hataらは、使用した細胞密度が顕著に異なるという点にある。また、Hataらは、硬化効果を示唆すらしておらず、このような硬化および収縮効果、および剥離しやすくなるという効果は、本発明によって初めて見出されたものであり、本発明の人工組織は、従来製造されてきたものとは硬化、収縮、剥離などの手順を経て生産されている点で、少なくとも全く異なるものであるということができる。

[0177] 培養物を剥がしたときに収縮し、三次元化、重層化などが促進されたということは驚くべき効果である。そのようなことは、従来報告されていない。

[0178] 好ましい実施形態では、本発明において使用されるアスコルビン酸2リン酸は、通常少なくとも0.01mMで存在し、好ましくは少なくとも0.05mMで存在し、さらに好ましくは少なくとも0.1mMで存在する。より好ましくは少なくとも0.2mMの濃度で存在することが好ましい。さらに好ましくは、0.5mMの濃度、さらにより好ましくは1.0mMの濃度で存在することが好ましい。ここでは、0.1mM以上であればどのような濃度でも用いることができるが、好ましくは、10mM以下であることが所望され得る局面

も存在し得る。

- [0179] ある好ましい実施形態では、本発明において使用される細胞外マトリクス産生促進因子は、アスコルビン酸2リン酸またはその塩およびL-アスコルビンまたはその塩を含む。
- [0180] 好ましい実施形態では、本発明の人工組織生産法では、培養した工程に続き、D) 人工組織を剥離させ自己収縮させる工程、をさらに含む。剥離は、物理的な刺激(例えば、容器の角に棒などで物理的的刺激(ずり応力印加、ピペッティング、容器の変形など)を与えるなど)を行うことによって促進することができる。自己収縮は、このような剥離の後、物理的的刺激が与えられる場合、自然に起こる。化学的刺激の場合は、自己収縮および剥離が並行して生じる。自己収縮により、特に第三次元方向(シート上の組織に関する場合、二次元方向と鉛直な方向)の生物学的結合が促進される。このようにして製造されることから、本発明の人工組織は、三次元構造体という形態をとるといえる。
- [0181] 本発明の人工組織生産法では、十分な時間とは、目的とする人工組織の用途によって変動するが、好ましくは少なくとも3日間を意味する(例示的な期間としては、3〜7日間を挙げることができる)。
- [0182] 別の実施形態において、本発明の人工組織生産法は、人工組織を分化させる工程、をさらに含み得る。分化させることによって、所望の組織により近い形態を採らせることができるからである。そのような分化としては、例えば、軟骨分化、骨分化を挙げることができるがそれらに限定されない。好ましい実施形態では、骨分化は、デキサメタゾン、 $\beta$ グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸2リン酸を含む培地中で行われ得る。より好ましくは、骨形成タンパク質(BMP類)を加える。このようなBMP2、BMP-4、BMP-7は、骨の形成をより促進するからである。
- [0183] さらに別の実施形態において、本発明の人工組織生産法は、人工組織を分化させる工程であって、分化としては、例えば、軟骨分化を行う形態が挙げられる。好ましい実施形態では、軟骨分化は、ピルビン酸、デキサメタゾン、アスコルビン酸2リン酸、インスリン、トランスフェリンおよび亜セレン酸亜セレン酸を含む培地中で行われ得る。より好ましくは、骨形成タンパク質(BMP-2、BMP-4、BMP-7、TGF- $\beta$ 1、T

GF- $\beta$ 3)を加える。このようなBMPは、軟骨の形成をより促進するからである。

[0184] 本発明において留意されるべき点として、骨および軟骨などの種々の分化細胞への分化能を有する組織を製造できることがある。軟骨組織への分化は、これまで他のスキャフォールドフリーの人工組織では困難であった。ある程度の大きさが必要な場合は、従来では、スキャフォールドと共培養し、三次元化させて、軟骨分化培地を入れることが必要であった。従来では、スキャフォールドフリーで軟骨分化させることは困難であった。本発明において、初めて、人工組織中の軟骨分化も可能になった。これはかつて実証されていない結果であって、本発明の特徴的な効果の一つである。組織再生を目指す細胞治療においてスキャフォールドなしに有効かつ安全に、十分な大きさの組織を用いて治療を行う方法は困難であった。本発明は、この意味では、顕著な効果を達成するといえる。特に、軟骨など、従来では不可能であった、分化細胞でも自在に操れるようになったという点でその意義は深い。従来であれば、例えば、ペレット状に細胞を集めて、その細胞塊を分化させて $2\text{mm}^3$ 程度のものを作ることはできていたが、このような大きさを超える場合は、スキャフォールドを使用せざるを得ない。

[0185] 本発明の人工組織作製法に含まれる分化工程は、前記細胞の提供の前または後に行われ得る。

[0186] 本発明において使用される細胞は、初代培養のものを使用することができるが、それに限定されず、継代した細胞(例えば、3代以上)を用いることもできる。好ましくは、継代した細胞を用いる場合、細胞は、4継代以上の細胞を用いることが好ましく、より好ましくは、5継代以上の細胞を用い、さらに好ましくは、6継代以上の細胞を用いることが有利である。細胞密度の上限が、継代数を一定程度上げるに従って上がっていくことから、より密な人工組織を作製することができると考えられるからであるが、それに限定されず、むしろ、一定範囲の継代数(例えば、3代~8代)が適切であるようである。

[0187] 本発明では、細胞は、好ましくは、 $5.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 以上の細胞密度で提供されるがそれに限定されない。細胞密度を十分上げることによって、より強度の高い人工組織を提供することができるからである。ただし、下限は、これよりも低くあり得ることが理

解される。当業者は、本明細書の記載に基づき、そのような下限を規定することができることが理解される。

[0188] 1つの実施形態において、本発明において使用され得る細胞としては、例えば、筋芽細胞、滑膜細胞、脂肪細胞、間葉系幹細胞（例えば、脂肪組織または骨髄由来）を用いることができるが、それらに限定されない。このような細胞は、例えば、心臓、骨、軟骨、腱、靭帯、関節、半月などに適用可能である。

[0189] （人工組織および複合体）

別の局面において、本発明は、人工組織または複合体を提供する。本明細書では、本発明の人工組織は、移植可能な人工組織である。これまでも細胞培養によって人工組織を作製することが試みられているが、いずれも、大きさ、強度、培養容器からの剥離のときの物理的損傷などによって移植に適した人工組織とはなっていなかった。本発明は、上述のような細胞外マトリクス産生促進因子の存在下で細胞を培養することによって、大きさ、強度などの点で問題が無く、剥離させるときに特に困難を伴わない組織培養方法が提供された。このような組織培養法が提供されたことによって、初めて移植可能な人工組織が提供されたことになる。好ましくは、本発明では、軟骨への移植は、その軟骨（例えば、関節軟骨）に対してコンドロイチナーゼ（コンドロイチナーゼABC）での処置なしで行われる。本発明により、コンドロイチナーゼ処置しない方が、軟骨、特に、関節軟骨を効果的に処置することができるからである。

[0190] 別の局面において、本発明は、細胞と、該細胞に由来する成分とを含む複合体を提供する。ここで、好ましくは、この複合体は、実質的に細胞と該細胞に由来する成分からなることが理解される。ここで、本発明の複合体は、生体の部分を補強、修復または再生するために提供される。

[0191] 本明細書において、「複合体」とは、細胞と、他の成分とが何らかの相互作用によって、複合体化したものを指す。従って、本発明の複合体は、人工組織様の外観を呈することが多く、その意味で、人工組織と指すものが重複することが理解される。

[0192] 本発明は、スキャフォールドフリーの人工組織または複合体を提供する。このようなスキャフォールドフリーの人工組織を提供することによって、移植後の経過に優れた治療法および治療剤が提供される。

- [0193] 本発明はまた、スキャフォールドフリーの人工組織という点により、生物製剤における長期にわたる規制の問題の一つである、スキャフォールド自体の混入に起因する問題を一举に解決する。また、スキャフォールドがないにもかかわらず、治療効果は従来のものに比べても遜色ないどころか、より良好である。
- [0194] このほか、スキャフォールドを用いた場合に、スキャフォールド内の移植細胞の配向性、細胞間接着性の問題、スキャフォールド自体の生体における変化(炎症惹起)およびスキャフォールドのレシピエント組織への生着性などの問題を解決することができる。
- [0195] 本発明の人工組織および複合体はまた、自己組織化しており、内部において生物学的結合が行われているという点で、従来の細胞治療とも一線を画することができる。
- [0196] 本発明の人工組織および複合体はまた、三次元形態を容易に形成することができ、所望の形態に容易に設計することができることから、その汎用性に留意されるべきである。
- [0197] 本発明の人工組織および複合体は、周囲の組織、細胞などの移植後環境との生物学的結合を有することから、術後の定着がよい、細胞が良好の供給されるなどの優れた効果が奏される。本発明の効果としては、このような生物学的結合性の良好さから、他の人工組織などと複合組織を形成することによって複雑な治療を行うことができる点にもある。
- [0198] 本発明の別の効果は、人工組織および複合体として提供した後、分化誘導をかけることができるという点にある。あるいは、人工組織および／または複合体として提供する前に、分化誘導をかけて、そのような人工組織および／または複合体を形成することができる点にもある。
- [0199] 本発明の他の効果は、細胞移植という観点から、従来の細胞のみの移植、シートを用いた移植などと比べて、置換性がよい、被覆することによる総合的な細胞供給などの効果が奏される点にある。
- [0200] 本発明によって、生物学的結合能を有し、移植可能な人工組織が提供される。このような組織は、上記特徴および効果を有することによって、従来人工物での移植処置が考えられなかった部位の処置が可能になった。本発明の人工組織は、組織内およ

び他の組織との間での生物学的結合を有しており、実際に移植治療において機能する。このような人工組織は、従来技術では提供されるものではなく、初めて提供されるものである。本発明の人工組織は、移植後の周囲の組織、細胞などと生物学的に結合する能力を有し(好ましくは細胞外マトリクスによる)、従って、術後の経過に優れる。このような生物学的結合能を有する人工組織は、従来存在しておらず、従って、本発明は、従来の人工組織では達成できなかった治療効果を奏することになる。

[0201] さらに、本発明により、疾患部分を充填し、置換させること、および／または疾患部位を被覆することによって治療効果をもたらす医療処置が可能となった。

[0202] また、本発明は、他の人工組織(例えば、ハイドロキシアパタイトでできた人工骨など、微線維性コラーゲン医療材料など)とともに用いることにより、他の人工組織と生物学的に結合することによって、従来では達成できなかった人工組織の定着の向上が得られた。

[0203] 本発明の人工組織は、組織全体にコラーゲンI、コラーゲンIII、フィブロネクチン、ビトロネクチンなどの細胞外マトリクスまたは細胞接着因子が分布、一方細胞シート工学では培養細胞のシャーレへの接着面に細胞接着因子は局在している。そして最たる違いは細胞シート工学ではシートの主体は細胞であり、シートは接着因子のノリを底面に付けた細胞の塊といえるが、本発明者らの人工組織は文字通り細胞外マトリクスが細胞を包んだ「組織」であるという点が従来のものとは顕著に異なるといえる。

[0204] スキャフォールド(基盤)材料を用いない細胞移植方法としては、非特許文献3に記載される温度感受性培養皿を利用した細胞シート工学技術が代表的であり、独創的技術として国際的評価を得ている。しかし、この細胞シート技術を使用する場合、単独のシートでは脆弱であることが多く、移植等の外科的操作に耐えうる強度を得るためにはシートを重ね合わせる操作等の工夫が必要であった。本発明はこのような問題を解決した。

[0205] 本研究で開発する細胞・マトリクス複合体は細胞シート技術とは異なり、温度感受性培養皿を必要とせず、また細胞・マトリクスを重層化させることが容易であることが特徴である。げっ歯類のストローマ細胞などのいわゆるFeeder細胞の使用無しに10層以上に重層した複合体を3週間程度で作成できる技術は世界的に見当たらない。

また、滑膜細胞のマトリックス産生条件を調節させることにより、特殊な器具を必要とすることなく複合体の把持、移動といった外科的操作が可能となる強度を保持する複合体の作成も可能であり、本発明は、世界的に見ても、細胞移植を確実にかつ安全に行うための独創的で画期的な手法となるという点でも効果を有するといえる。

[0206] 好ましい実施形態では、本発明の人工組織は、周囲との生物学的結合能 (integration capability) を有する。ここで、周囲とは、代表的には、移植される環境をいい、例えば、組織、細胞などを挙げるができる。周囲の組織、細胞などの生物学的結合能は、例えば、顕微鏡写真、物理的試験、生物学的マーカーの染色などによって確認することができる。従来の人工組織は、移植された環境にある組織などの親和性は少なく、生物学的結合能が発揮できるなどとは想定すらされていなかった。むしろ、従来の人工組織は、生体の持つ再生能力に依拠し、自己細胞などが集積し、再生するまでの橋渡しの役割を果たしており、従って、恒久的な使用は意図されていなかった。従って、本発明の人工組織は、真の意味で移植治療を構成することができる解釈されるべきである。従って、本発明において言及される生物学的結合能は、周囲の細胞および／または細胞外マトリックスとの接着能を含むことが好ましい。そのような接着能は、組織片 (例えば、軟骨片) とのインビトロ培養アッセイによって測定することができる。

[0207] 本発明が対象とする「疾患」としては、変性、壊死、損傷などを伴う任意の疾患をいい、例えば、変形性関節症、骨軟骨損傷、難治性骨折、骨壊死、軟骨損傷、半月損傷、靭帯損傷、腱損傷、軟骨変性、半月変性、椎間板変性、靭帯変性または腱変性、組織に傷害がある任意の心疾患であり得る。そのような心疾患としては、心不全、難治性心不全、心筋梗塞、心筋症、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症などが挙げられる。本発明の併用療法は、組織傷害の再生を目的とする限り、心臓以外の臓器の傷害を再生するためにも適用され得る。特定の実施形態において、本発明の方法が対象とする疾患は、難治性心不全である。

[0208] 本明細書において「予防」(prophylaxisまたはprevention)とは、ある疾患または障害について、そのような状態が引き起こされる前に、そのような状態が起こらないようにするか、そのような状態を低減した状態で生じさせるかまたはその状態が起こるこ

とを遅延させるように処置することをいう。

- [0209] 本明細書において「治療」とは、ある疾患または障害について、そのような状態になった場合に、そのような疾患または障害の悪化を防止、好ましくは、現状維持、より好ましくは、軽減、さらに好ましくは消長させることをいう。本明細書では「根治的治療」とは、病的過程の根源または原因の根絶を伴う治療をいう。従って、根治的治療がなされる場合は、原則として、その疾患の再発はなくなる。
- [0210] 本明細書において「予後」とは、予後の処置ともいい、ある疾患または障害について、治療後の状態を診断または処置することをいう。
- [0211] 好ましい実施形態では、本発明の人工組織または複合体は、三次元方向に生物学的に結合されている。ここで、生物学的結合は、本明細書において他の場所において説明されており、例えば、細胞外マトリクスによる物理的結合、電気的結合などが挙げられるがそれらに限定されない。特に、細胞を含む好ましい実施形態では、組織内の細胞外マトリクスが生物学的に結合されていることが重要である。そのような生物学的に結合された状態の人工組織は、これまでに提供されていないことから、この実施形態の本発明の人工組織は、構造上も新規であるといえる。さらに、周囲との生物学的結合能を有する好ましい実施形態では、移植後も生体の一部を構成することができる人工組織を提供するという点で、従来になかった人工組織であるといえる。本発明は、一旦凍らせて、細胞を死滅させたような真の意味での細胞が含まれていない人工組織を提供することができる。このような場合でも、周囲との接着性を有するという点は依然としてユニークである。
- [0212] 1つの実施形態において、本発明の人工組織は、従来の人工組織とは、細胞を含むという点で異なるということが出来る。特に、細胞密度が、例えば、最大 $5 \times 10^6 / \text{cm}^2$ までも含めることができるという点でその高密度性が留意されるべきである。組織として移植するというよりは、細胞を移植するのに適しているという点で注目されるべきである。
- [0213] 好ましくは、本発明の人工組織または複合体は、実質的に細胞または該細胞に由来する物質から構成される。実質的に細胞および細胞に由来する物質(例えば、細胞外マトリクス)のみから構成されることによって、生体適合性および生体定着性を上



げることができる。ここで、「実質的に・・・構成される」とは、細胞とその細胞に由来する物質とを含み、他に有害な影響(ここでは、主に、移植への悪影響)を与えない限り、他の物質を含んでいてもいいと定義され、本明細書においてはそのように理解されるべきである。そのような有害な影響を与えない物質は、当業者に公知であるか、または簡単な試験を行うことによって確認することができる。代表的には、厚生労働省、FDAなどにおいて認可されている任意の添加成分、細胞培養に伴う成分などを挙げることができるがそれらに限定されない。ここで、細胞に由来する物質は、代表的に細胞外マトリクスを含む。特に、本発明の人工組織または複合体では、細胞と細胞外マトリクスが適切な割合で含まれていることが好ましい。そのような適切な割合とは、例えば、細胞と細胞外マトリクスとの比が1:3~20:1の範囲、細胞と細胞外マトリクスの比率によって組織の強度が調節されるので、細胞移植の用途および移植先での力学環境に応じて細胞と細胞外マトリクスとの比を調節して使用することができる。好ましい比率は、目的とする処置によって変動するが、そのような変動は、当業者には自明であり、目的とする臓器における細胞および細胞外マトリクスの比率を調査することによって、推定することができる。

[0214] 特に、実質的に細胞および該細胞に由来する細胞外マトリクスから構成される人工組織は、これまでに知られておらず、従って、本発明は、全く新規の人工組織を提供するといえる。

[0215] 好ましくは、本発明を構成する細胞外マトリクスとしては、コラーゲンI、コラーゲンIII、ビトロネクチンおよびフィブロネクチンなどを挙げることができる。好ましくは、このような種々の細胞外マトリクスは、列挙したものすべて含まれていることが好ましく、それらは一体化して混合されていることが好ましい。あるいは、これらは、全体にわたって細胞外マトリクスが散在していることが好ましい。このような分布は移植された場合に環境との適合性および親和性を向上させるという点で格別な効果を奏する。本発明では、特に、コラーゲン(I、III型)をはじめ、ビトロネクチン、フィブロネクチンなどが含まれていることにより、基質への細胞接着、細胞伸展、および細胞走化性を促進する、細胞間マトリクスの接着も促進されるという特徴を有することで知られている。しかし、コラーゲン(I、III型)、ビトロネクチン、フィブロネクチンなどが一体化されて含まれて

いるような人工組織はこれまで提供されていなかった。理論に束縛されることを希望しないが、コラーゲン(I、III型)、ビトロネクチン、フィブロネクチンなどは、周囲との生物学的結合能を発揮するのに役割を果たしていると考えられる。従って、好ましい実施形態では、本発明の人工組織または複合体においてビトロネクチンが分散して表面に配置されていることが有利である。移植後の接着、定着、安定性が格段に異なると考えられるからである。

[0216] フィブロネクチンもまた、本発明の人工組織または複合体において配置されることが好ましい。フィブロネクチンは、細胞接着、細胞の形の制御、細胞移動を調節する役割を有することが知られている。しかし、フィブロネクチンが発現しているような人工組織はこれまで提供されていなかった。理論に束縛されることを希望しないが、フィブロネクチンもまた周囲との生物学的結合能を発揮するのに役割を果たしていると考えられる。従って、好ましい実施形態では、本発明の人工組織においてフィブロネクチンもまた分散して表面に配置されていることが有利である。移植後の接着、定着、安定性が格段に異なると考えられるからである。

[0217] 好ましい実施形態では、本発明において使用される細胞外マトリクスを人工組織または複合体に配置することは、本発明の人工組織生産方法によって、容易に達成されることが理解されるが、作製方法としてはそれに限定されないことが理解される。

[0218] より好ましい実施形態では、本発明において使用される細胞外マトリクスは、分散して配置されることが有利である。そのような分散形態での細胞外マトリクスの配置は、従来の人工組織では、不可能であったことであり、本発明により初めて提供されることが理解される。

[0219] 好ましい実施形態において、人工組織または複合体に分散して配置される細胞外マトリクスは、任意の2つの $1\text{cm}^2$ のセクションにおける分布密度を比較したときに、約1:3~3:1の範囲内の比率に収まるのが好ましい。分布密度の測定は、当該分野において公知の任意の手法を用いることができ、例えば、免疫染色などを挙げることができる。

[0220] より好ましい実施形態において、本発明において使用される細胞外マトリクスは、任意の2つの $1\text{cm}^2$ のセクションにおける分布密度を比較したときに、約1:2~2:1、さら

に好ましくは約1.5:1~1.5:1の範囲内の比率に収まる。細胞外マトリクスの配置の分散は、均等に分散されていることが有利である。従って、好ましくは、ほぼ均一に分散されていてもよいが、それに限定されない。

[0221] 1つの実施形態において、本発明において配置される細胞外マトリクスは、コラーゲンI、コラーゲンIII、ビトロネクチン、フィブロネクチンなどを含み得る。

[0222] 別の実施形態において、本発明の人工組織または複合体は、異種細胞、同種異系細胞、同系細胞または自家細胞を用いることができる。本発明では、同種異系細胞であっても、特に、間葉系細胞を用いた場合、免疫拒絶などの有害な副反応がほとんど生じないことが分かった。従って、本発明は、エキソビボのような治療の他、免疫拒絶抑制剤などを使用せずに、他人の細胞を用いて人工組織を生産して利用するという治療法に途を啓くことになる。

[0223] 1つの好ましい実施形態において、本発明の人工組織または複合体が含む細胞は、幹細胞であっても分化細胞であっても両方を含んでいてもよい。好ましい実施形態では、本発明の三次元構造体が含む細胞は、間葉系細胞である。理論に束縛されないが、間葉系細胞が好ましいのは、間葉系細胞自体が心臓など臓器と適合性が優れているからであり、種々の組織または臓器などへ分化する能力を有し得るからである。

[0224] そのような間葉系細胞は、間葉系幹細胞であっても間葉系の分化細胞であってもよい。

[0225] 本発明において使用される間葉系細胞としては、例えば、骨髄、脂肪細胞、滑膜細胞、筋芽細胞、骨格筋細胞、などが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において使用される間葉系幹細胞としては、例えば、脂肪組織由来の幹細胞、骨髄由来の幹細胞などを用いることができる。

[0226] 好ましい実施形態において、本発明において使用される細胞は、人工組織または複合体が適用される被験体に由来する細胞であることが有利である。このような場合、本明細書において使用される細胞は自己細胞ともいわれるが、自己細胞を用いることによって、免疫拒絶反応を防ぐかまたは低減することができる。

[0227] あるいは、別の実施形態では、本発明において使用される細胞は、人工組織また

は複合体が適用される被験体に由来しない細胞であってもよい。この場合、好ましくは、免疫拒絶反応を防ぐ手段が講じられることが好ましい。

[0228] 本発明の人工組織または複合体は、医薬として提供されていてもよい。あるいは、本発明の人工組織または複合体は、医師などが医療現場で調製してもよく、または、医師が細胞を調製した後、その細胞を第三者が培養して三次元構造体として調製し、手術に用いてもよい。この場合、細胞の培養は、医師でなくても、細胞培養の当業者であれば実施することができる。従って、当業者であれば、本明細書における開示を読めば、細胞の種類および目的とする移植部位に応じて、培養条件を決定することができる。

[0229] 別の実施形態において、本発明の人工組織または複合体は、単離されていることが好ましい。単離とは、この場合、培養に用いたスキャフォールド、支持体、培養液などから分離されていることを意味する。スキャフォールドなどの物質が実質的に存在しないことによって、本発明の人工組織は、移植後の免疫拒絶反応、炎症反応などの有害反応を抑えることができる。

[0230] 本発明の人工組織の底面積は、例えば、 $1\text{cm}^2 \sim 20\text{cm}^2$ であり得るが、それに限定されず、 $1\text{cm}^2$ 以下でもよく、 $20\text{cm}^2$ 以上でもよい。本発明の本質は、どのような大きさ(面積、容積)のものでも作製することができる点にあり、サイズに限定されないことが理解される。

[0231] 好ましい実施形態において、本発明の人工組織は、肉厚である。肉厚とは、通常移植対象の部位を被覆するに十分な強度を有する程度の厚みをいう。そのような面積は、例えば、少なくとも約 $50\ \mu\text{m}$ 以上であり、より好ましくは、少なくとも約 $100\ \mu\text{m}$ 以上であり、少なくとも約 $200\ \mu\text{m}$ 以上であり、少なくとも約 $300\ \mu\text{m}$ 以上であり、さらに好ましくは少なくとも約 $400\ \mu\text{m}$ 以上であり、あるいは少なくとも約 $500\ \mu\text{m}$ または約 $1\text{mm}$ であることがさらに好ましい。場合によっては、 $3\text{mm}$ 以上および $5\text{mm}$ 以上の厚さのものも作製できることが理解される。あるいは、このような厚さは、 $1\text{mm}$ 未満であってもよい。本発明の本質は、どのような厚さの組織または複合体でも作製することができる点にあり、サイズに限定されないことが理解される。

[0232] 本発明は、スキャフォールドフリーの人工組織または複合体を提供する。このような

スキャフォールドフリーの人工組織を提供することによって、移植後の経過に優れた治療法および治療剤が提供される。

- [0233] 本発明はまた、スキャフォールドフリーの人工組織という点により、生物製剤における長期にわたる規制の問題の一つである、スキャフォールド自体の混入に起因する問題を一举に解決する。また、スキャフォールドがないにもかかわらず、治療効果は従来のものに比べても遜色ないどころか、より良好である。
- [0234] このほか、スキャフォールドを用いた場合に、スキャフォールド内の移植細胞の配向性、細胞間接着性の問題、スキャフォールド自体の生体における変化(炎症惹起)およびスキャフォールドのレシピエント組織への生着性などの問題を解決することができる。
- [0235] 本発明の人工組織および複合体はまた、自己組織化しており、内部において生物学的結合が行われているという点で、従来の細胞治療とも一線を画すことができる。
- [0236] 本発明の人工組織および複合体はまた、三次元形態を容易に形成することができ、所望の形態に容易に設計することができることから、その汎用性に留意されるべきである。
- [0237] 本発明の人工組織および複合体は、周囲の組織、細胞などの移植後環境との生物学的結合を有することから、術後の定着がよい、細胞が確実に供給されるなどの優れた効果が奏される。本発明の効果としては、このような生物学的結合性の良好さから、他の人工組織などと複合組織を形成することによって複雑な治療を行うことができる点にもある。
- [0238] 本発明の別の効果は、人工組織および複合体として提供した後、分化誘導をかけることができるという点にある。あるいは、人工組織および／または複合体として提供する前に、分化誘導をかけて、そのような人工組織および／または複合体を形成することができる点にもある。
- [0239] 本発明の他の効果は、細胞移植という観点から、従来の細胞のみの移植、シートを用いた移植などと比べて、置換性がよい、被覆することによる総合的な細胞供給などの効果が奏される点にある。
- [0240] 本発明によって、生物学的結合能を有し、移植可能な人工組織が提供される。この

ような組織は、上記特徴および効果を有することによって、従来人工物での移植処置が考えられなかった部位の処置が可能になった。本発明の人工組織は、組織内および環境との間で生物学的結合を有しており、実際に移植治療において機能する。このような人工組織は、従来技術では提供されるものではなく、初めて提供されるものである。本発明の人工組織は、移植後の周囲の組織、細胞などと生物学的に結合する能力を有し(好ましくは細胞外マトリクスによる)、従って、術後の経過に優れる。このような生物学的結合能を有する人工組織は、従来存在しておらず、従って、本発明は、従来の人工組織では達成できなかった治療効果を奏することになる。

[0241] さらに、本発明により、疾患部分を充填し、置換させること、および/または疾患部位を被覆することによって治療効果をもたらす医療処置が可能となった。

[0242] また、本発明は、他の人工組織(例えば、ハイドロキシアパタイトでできた人工骨、微線維性コラーゲン医療材料など)とともに用いることにより、他の人工組織と生物学的に結合することによって、従来では達成できなかった人工組織の定着の向上が得られた。このような組織は、複合組織という。

[0243] 本発明の人工組織または複合体は、組織全体にフィブロネクチン、ビトロネクチンなどの細胞外マトリクスまたは細胞接着因子が分布、一方細胞シート工学では培養細胞のシャーレへの接着面に細胞接着因子は局在している。そして最たる違いは細胞シート工学ではシートの主体は細胞であり、シートは接着因子のノリを底面に付けた細胞の塊といえるが、本発明者らの人工組織は文字通り細胞外マトリクスが細胞を包んだ「組織」であるという点が従来のものとは顕著に異なるといえる。

[0244] スキャフォールド(基盤)材料を用いない細胞移植方法としては、非特許文献3による温度感受性培養皿を利用した細胞シート工学技術が代表的であり、独創的技術として国際的評価を得ている。しかし、この細胞シート技術を使用する場合、単独のシートでは脆弱であることが多く、移植等の外科的操作に耐えうる強度を得るためにはシートを重ね合わせる操作等の工夫が必要であった。本発明はこのような問題を解決した。

[0245] 本研究で開発する細胞・マトリクス複合体は細胞シート技術とは異なり、温度感受性培養皿を必要とせず、また細胞・マトリクスを重層化させることが容易であることが

特徴である。げっ歯類のストローマ細胞などのいわゆるFeeder細胞の使用無しに10層以上に重層した複合体を3週間程度で作成できる技術は世界的に見当たらない。また、細胞のマトリックス産生条件を調節させることにより、特殊な器具を必要とすることなく複合体の把持、移動といった外科的操作が可能となる強度を保持する複合体の作成も可能であり、本発明は、世界的に見ても、細胞移植を確実にかつ安全に行うための独創的で画期的な手法となるという点でも効果を有するといえる。

[0246] 別の実施形態において、本発明の人工組織または複合体は、可撓性である。可撓性であることによって、特に、運動性の臓器の補強に適切となる。そのような臓器としては、例えば、心臓、血管、筋肉などが挙げられるがそれらに限定されない。

[0247] 別の実施形態において、本発明の人工組織または複合体は、伸縮性を有する。伸縮性を有することによって、伸び縮みする臓器、例えば、心臓、筋肉などにおける適用が可能となる。このような伸縮性は、従来の方法で調製された細胞シートなどでは達成されなかった性質である。好ましくは、本発明の人工組織または複合体は、心臓の拍動運動に耐え得る強度を有する。そのような拍動運動に耐え得る強度とは、例えば、少なくとも天然の心筋が有する強度の少なくとも約50%以上、好ましくは少なくとも約75%以上、より好ましくは少なくとも約100%以上であることが挙げられるがそれらに限定されない。

[0248] 好ましい実施形態において、本発明の人工組織または複合体は、三次元方向すべてに生物学的結合がある。従来の方法で調製された人工組織は、二次元方向には生物学的結合がある程度見られるものがあつたが、三次元方向にあつた組織は調製されていない。従って、本発明の人工組織は、このように三次元方向すべての生物学的結合を有することによって、どのような用途においても実質的に移植可能という性質がもたらされる。

[0249] 本発明の人工組織または複合体において指標となる生物学的結合としては、細胞外マトリックスの相互結合、電気的結合、細胞間情報伝達の存在が挙げられるがそれらに限定されない。細胞外マトリックスの相互作用は細胞間の接着を顕微鏡で適宜染色して観察することができる。電気的結合は、電位を測定することによって観察することができる。

- [0250] 好ましい実施形態において、本発明の人工組織は、臨床適用することができる組織強度を有する。臨床適用することができる組織強度は、適用が意図される部位に応じて変動する。そのような強度は、当業者が本明細書の開示を参照して、当該分野における周知技術を参酌することによって決定することができる。
- [0251] 本発明の人工組織は、引っ張り強度は弱くてもいい。そのような引っ張り強度は、細胞・細胞外マトリクス比率におけるマトリクス濃度をあげると強くなり、細胞比率を上げると弱くなる。本発明は、必要に応じて強度も自由に調整できることが特徴の一つである。移植される組織に対して相対的に近似して強くも弱くもできることが特徴である。従って、そのような任意の場所に応じて目的と設定することができることが理解される。
- [0252] 別の実施形態において、本発明の人工組織または複合体の強度は、自己支持性を有するに十分であることが好ましい。従来の人工組織は、作製後、自己支持性を有していなかった。従って、従来の人工組織を移動させると、少なくとも一部が損傷していた。しかし、本発明の技術を用いた場合、自己支持性を有する人工組織が提供された。従って、本発明は、従来技術では提供できなかった人工組織を提供する。そのような自己支持性は、0.5～3mmの先端(好ましくは、1～2mmの太さの先端、さらに好ましくは1mmの太さの先端)を有するピンセットで組織をつまみあげたときに、実質的に破壊されないことが好ましい。ここで、実質的に破壊されないとは、目視によって確認することができるが、上記条件にてつまみ上げた後に、例えば、水漏れ試験を行ったときに、水が漏れないことなどによって確認することができる。あるいは、上述のような自己支持性は、ピンセットではなく、手でつまみあげたときに破壊されないことによっても確認することができる。
- [0253] 特定の実施形態において、上記臨床適用が意図される部分としては、骨、関節、軟骨、半月、腱、靭帯、腎臓、肝臓、滑膜、心臓などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明の人工組織に含まれる細胞の由来は、臨床適用される用途に影響されないことが特徴である。
- [0254] また、組織が軟骨である場合、人工組織が該関節内組織の欠損部に移植された後人工的に固定することなく(例えば、2、3分後)、該人工組織が残存していることによ



って、接着性を検定することができる。

[0255] 別の局面において、本発明は、細胞から人工組織を生産するための細胞培養組成物を提供する。この細胞培養組成物は、細胞を維持または増殖させるための成分（例えば、市販される培地など）；および細胞外マトリクス産生促進因子を含む。このような細胞外マトリクス産生促進因子に関する説明は、上述の人工組織生産法において詳述した。従って、この細胞外マトリクス産生促進因子は、アスコルビン酸またはその誘導体（例えば、 $TGF-\beta 1$ 、 $TGF-\beta 3$ 、アスコルビン酸1リン酸またはその塩、アスコルビン酸2リン酸またはその塩、L-アスコルビン酸またはその塩など）を含む。ここで、本発明の培養組成物において含まれるアスコルビン酸2リン酸またはその塩は、少なくとも0.1mMで存在するか、あるいは濃縮培養組成物の場合は、調製時に少なくとも0.1mMとなるように含まれている。あるいは、アスコルビン酸類は、0.1mM以上であれば、ほとんど効果は変わらないようである。0.1mMであれば十分であるといえる。 $TGF-\beta 1$ 、 $TGF-\beta 3$ であれば、1ng/ml以上、代表的には、10ng/mlの量が十分であり得る。好ましくは、本発明では、軟骨への移植は、その軟骨（例えば、関節軟骨）に対してコンドロイチナーゼ（コンドロイチナーゼABC）での処置なしで行われる。本発明により、コンドロイチナーゼ処置しない方が、軟骨、特に、関節軟骨を効果的に処置することができるからである。

[0256] あるいは、本発明は、このような細胞外マトリクス産生促進因子を備える、人工組織生産のための組成物を提供し得る。

[0257] 本発明の人工組織生産法に用いられる細胞外マトリクス産生促進因子は、アスコルビン酸2リン酸を含む（Hata R, Senoo H. J Cell Physiol. 1989; 138(1):8-16参照）。本発明では、アスコルビン酸2リン酸を一定量以上加えることによって、細胞外マトリクスの生産が促進され、その結果、得られる人工組織または複合体が硬化され、剥離しやすくなる。この後、剥離の刺激を与えることによって自己収縮が行われる。しかも、このようなアスコルビン酸を加えて培養した後、組織が硬化し、剥離しやすくなる性質を獲得することは、Hataらの報告には記載されていない。理論に束縛されないが、一つの顕著な相違点として、Hataらは、使用した細胞密度が顕著に異なるという点にある。また、Hataらは、硬化効果を示唆すらしておらず、このような硬化および収縮

効果、および剥離しやすくなるという効果は、本発明によって初めて見出されたものであり、本発明の人工組織は、従来製造されてきたものとは硬化、収縮、剥離などの手順を経て生産されている点で、少なくとも全く異なるものであるということが出来る。

[0258] 好ましい実施形態では、本発明において使用されるアスコルビン酸2リン酸は、通常少なくとも0.01mMで存在し、好ましくは少なくとも0.05mMで存在し、さらに好ましくは少なくとも0.1mMで存在する。より好ましくは少なくとも0.2mMの濃度で、さらに好ましくは少なくとも0.5mMの濃度で存在することが好ましい。さらに好ましくは最低限度の濃度は、1.0mMであり得る。

[0259] 細胞密度については、特に限定されないが、1つの実施形態において、細胞は、1cm<sup>2</sup>あたり、 $5 \times 10^4$ 細胞～ $5 \times 10^6$ 細胞で配置される。この条件は、例えば、筋芽細胞に適用され得る。この場合、細胞外マトリクス産生促進因子は、アスコルビン酸類として、少なくとも0.1mM提供されることが好ましい。厚い人工組織が作成可能であるからである。この場合、濃度を増やすと、細胞外マトリクスで密な人工組織が形成される。少ない場合は、細胞外マトリクス量が減少するが、自己支持性は保たれる。

[0260] (置換および被覆のための人工組織)

別の局面において、本発明は、動物の生体の部分を補強するための人工組織または複合体を提供する。このような補強を行うことができる人工組織または複合体は、本発明の人工組織生産法によって初めて達成された技術である。本発明の人工組織または複合体は、自己支持性を有することから、従来提供されなかったような用途(例えば、充填(置換)補強、全体の補強、漏れのない補強、被覆など)にも使用可能である。特に、充填、置換補強(すなわち、細胞供給)が顕著に改善されたという点では、本発明は顕著な効果を奏する。また、分化誘導をかけることができるという点でもその適用範囲は拡大する。好ましくは、本発明では、軟骨への移植は、その軟骨(例えば、関節軟骨)に対してコンドロイチナーゼ(コンドロイチナーゼABC)での処置なしで行われる。本発明により、コンドロイチナーゼ処置しない方が、軟骨、特に、関節軟骨を効果的に処置することができるからである。

[0261] 本発明の特定の実施形態において、上記補強は、上記部分を被覆するように本発明の人工組織を配置することによって達成され得る。従来の方法で提供される人工

組織は、このような、置換および／または被覆による処置が不可能であったことから、本発明の人工組織または複合体は、従来技術で達成不可能であった用途を提供することになる。

[0262] 従って、そのような特定の実施形態において、本発明の人工組織または複合体は、上記部分の伸縮に対して抵抗性を有する。

[0263] 好ましい実施形態において、本発明の人工組織または複合体は、生物学的結合を有することが有利である。

[0264] 別の好ましい実施形態において、生物学的結合は、細胞外マトリクスの相互結合、電氣的結合、細胞間の情報伝達のうち少なくとも1つを含む。

[0265] 別の好ましい実施形態において、本発明の補強用人工組織は、細胞外マトリクス産生促進因子の存在下で細胞を培養することによって形成される。

[0266] 別の実施形態において、本発明の補強用人工組織または複合体は、処置該当される動物(例えば、ヒト)に由来する細胞(自己細胞)を含む。より好ましくは、本発明の補強用人工組織は、処置該当される動物(例えば、ヒト)に由来する細胞(自己細胞)のみを細胞として含む。

[0267] 本発明の補強または置換方法が対象とするものは、例えば、軟骨全層損傷;軟骨部分損傷;骨軟骨損傷;骨壊死;変形性関節症;半月損傷;靭帯修復(陳旧性、変性断裂、再建手術の際の生物学的補強など)腱(アキレス腱を含む)修復(陳旧性、変性断裂、再建手術の際の生物学的補強など);腱板修復(特に、陳旧性、変性断裂など);骨折遷延治癒;偽関節;骨格筋修復・再生;心筋再生(変性部または壊死部などの修復促進)などを行うことができる。

[0268] (置換および被覆を用いた治療法)

別の局面において、本発明は、動物の生体の部分を補強するための方法を提供する。この方法は、A)人工組織または複合体を、該部分を置換するようにおよび／または被覆するように配置する工程;およびB)該人工組織または複合体と該部分とが生物学的に結合するに十分な時間保持する工程、を包含する。ここで、ある部分を置換するように配置するとは、代表的には、罹患部を必要に応じて搔爬(debridement、curetage)し、罹患部に本発明の人工組織または複合体を配置して、置換が促進

されるように静置することをいう。このような置換は、細胞の充填を目的としており、当該分野において公知の技術を組み合わせて用いることができる。ここで、ある部分を被覆するように配置することは、当該分野において周知技術を用いて行うことができる。ここで、十分な時間は、その部分と人工組織との組み合わせによって変動するが、当業者であれば、その組み合わせに応じて適宜容易に決定することができる。このような時間としては、例えば、術後1週間、2週間、1カ月、2カ月、3カ月、6カ月、1年などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明では、人工組織は、好ましくは実質的に細胞およびそれに由来する物質のみを含むことから、特に術後に摘出する物質が必要であるというわけではないので、この十分な時間の下限は特に重要ではない。従って、この場合、長ければ長いほど好ましいといえるが、実質的には極端に長い場合は、実質的に補強が完了したといえ、特に限定する必要はない。本発明の人工組織はまた、自己支持性を有することから、ハンドリングが楽で、実際の処置時に破壊されず、手術も容易であるという特徴も有する。好ましくは、本発明では、軟骨への移植は、その軟骨(例えば、関節軟骨)に対してコンドロイチナーゼ(コンドロイチナーゼABC)での処置なしで行われる。本発明により、コンドロイチナーゼ処置しない方が、軟骨、特に、関節軟骨を効果的に処置することができるからである。

[0269] 別の実施形態において、本発明の補強方法では、上記部分は、袋状臓器(例えば、心臓、肝臓、腎臓など)を含むことが好ましい。そのような袋状組織の補強には、置換または被覆が必要である。置換または被覆のための用途で抵抗可能な人工組織は、本発明によって初めて提供された。従って、本発明の補強方法は、従来達成されなかった画期的な方法を提供することになる。

[0270] あるいは、上記部分は、骨または軟骨を含み得る。そのような例としては、半月、靭帯、腱などを挙げるができるがそれに限定されない。本発明の方法は、心臓、骨、軟骨、靭帯、腱または半月の疾患、障害または状態を処置、予防または強化するために利用され得る。

[0271] 特に、本発明の補強方法では、本発明の人工組織または複合体は、上記部分の伸縮に対して抵抗性を有する。このような伸縮の例としては、心臓の拍動運動、筋肉の収縮などが挙げられるがそれらに限定されない。

- [0272] 別の好ましい実施形態では、本発明の補強方法では、本発明の人工組織または複合体は、生物学的結合(例えば、細胞外マトリクスの相互結合、電気的結合、細胞間の情報伝達など)を含む。この生物学的結合は、三次元方向すべてにおいて有されていることが好ましい。
- [0273] 別の好ましい実施形態において、本発明の補強方法は、細胞外マトリクス産生促進因子の存在下で細胞を培養して本発明の人工組織または複合体を形成する工程をさらに包含する。このような細胞外マトリクス産生促進因子の存在下での培養を包含する方法の移植・再生技術は、従来提供されていなかった方法であり、このような方法によって、従来治療が不可能とされていた疾患(例えば、軟骨損傷、難治性骨折など)を治療することができるようになった。
- [0274] 好ましい実施形態において、本発明の補強方法において、本発明の人工組織または複合体において使用される細胞は、移植が意図される動物に由来する細胞(すなわち、自己細胞)である。自己細胞の使用により、免疫拒絶反応などの有害な副作用を回避することができる。
- [0275] 別の好ましい実施形態では、本発明の補強方法が対象とする部分は心臓である。
- [0276] 本発明の治療方法が対象とするものは、例えば、軟骨全層損傷;軟骨部分損傷;骨軟骨損傷;骨壊死;変形性関節症;半月損傷;靭帯修復(陳旧性、変性断裂、再建手術の際の生物学的補強など)腱(アキレス腱を含む)修復(陳旧性、変性断裂、再建手術の際の生物学的補強など);腱板修復(特に、陳旧性、変性断裂など);骨折遷延治癒;偽関節;骨格筋修復・再生;心筋再生(虚血性疾患による壊死部の修復促進)などを行うことができる。
- [0277] 一部の臓器について、特定の疾患、障害および状態は、その治療について根本的な治療が困難といわれるものがある(例えば、難治性心疾患など)。しかし、本発明の上述のような効果によって、従来では不可能とされていた処置が可能となり、根本的な治療にも応用することができることが明らかとなった。したがって、本発明は、従来の医薬で達成不可能であった有用性を有するといえる。
- [0278] このように、本発明は、動物の生体の部分を処置するための方法であって、A)人工組織または複合体を、該部分を被覆するように配置する工程;およびB)該生体の部

分の状態が改善するに十分な時間該人工組織を保持する工程、を包含する、方法を提供する。このような状態の改善は、処置されるべき部分の機能に応じて判定することができる。例えば、心臓であれば、心機能(心拍、血流など)を見ることによって状態の改善を判定することができる。骨であれば、レントゲン、CTスキャンなどによって骨形成を観察することによって状態の改善を判定することができる。骨の場合、その強度を測定したり、MRIにより骨髄および/または骨質の評価を行うことによって状態の改善を判定することができる。軟骨・半月であれば、関節鏡検査により関節表面を観察することができる。さらに、関節鏡視下にて生体力学検査を行うことによって状態の改善を判定することができる。また、MRIによって修復状態を確認することによって状態の改善を判定することも可能である。靭帯に関しては、関節制動性検査により動揺性が存在するかどうかを確認することによって判定することができる。また、MRIによって組織の連続性を確認することによって状態の改善を判定することができる。いずれの組織の場合も、組織生検を行い組織学的評価を行うことによって状態が改善したかどうかを確認することができる。

[0279] 好ましい実施形態において、この処置は、心臓、骨、軟骨、靭帯、腱または半月の疾患、障害または状態を処置、予防または強化するものである。好ましくは、この人工組織は、自己支持性を有する。これらの人工組織または複合体としては、当業者は、本明細書において、上述した任意の形態およびその改変体を用いることができる。

[0280] (併用療法)

別の局面において、本発明は、BMP(例えば、BMP-2、BMP-4、BMP-7など)、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 3、HGF、FGF、IGFなどのようなサイトカインと人工組織とを併用することによる再生療法を提供する。

[0281] 本発明で使用されるサイトカインは、いくつかすでに市販されているが(例えば、BMP(山之内製薬)、bFGF2(科研製薬)、TGF- $\beta$ 1(研究用としてR&D)、IGF(藤沢薬品)、HGF-101(東洋紡(株))等)、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば、種々の方法で調製されたものを用いることができる。あるサイトカインを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養上清等から分離、精製して該あるサイトカインを得ることもできる。或いは、遺伝子工学的手法によりそのサイトカイ

ンをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主に挿入して挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組み換えサイトカインを得ることができる(例えば、Nature、342、440(1989)、特開平5-111383号公報、Biochem-Biophys. Res. Commun.、, 163;967(1989)等を参照)。上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、酵母または動物細胞などを用いることができる。このようにして得られたサイトカインは、天然型サイトカインと実質的に同じ作用を有する限り、そのアミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失および/または付加されていてもよい。患者への導入方法としては、例えば、本発明においてサイトカインの導入方法として、安全かつ効率の良い遺伝子導入法であるセンダイ・ウイルス(HVJ)リポソーム法(Molecular Medicine、30、1440-1448(1993)、実験医学、12、1822-1826(1994))、電気的遺伝子導入法、ショットガン方式遺伝子導入法、超音波を用いる遺伝子導入法等があげられる。別の好ましい実施形態では、上記サイトカインは、タンパク質形態として投与されることできる。

[0282] (所望の厚さを有する人工組織の生産方法)

別の局面において、本発明は、所望の厚さを有する人工組織または複合体を生産するための方法を提供する。この方法は、A)細胞を提供する工程;B)該細胞を、細胞外マトリクス産生促進因子(例えば、アスコルビン酸類、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 3など)を含む細胞培養液を収容する、所望の人工組織または複合体のサイズを収容するに十分な底面積を有する容器に配置する工程;C)該容器中の該細胞を、細胞外マトリクス産生促進因子を含む細胞培養液とともに、該所望の大きさのサイズを有する人工組織または複合体を形成するに十分な時間培養して、細胞を人工組織とする工程;およびD)物理的刺激または化学的刺激により、該人工組織の厚さを調節して所望の厚さにする工程、を包含する。ここで、細胞の提供、細胞の配置、刺激および人工組織または複合体とする工程は、本発明の人工組織または複合体を生産する方法において詳細に説明されており、任意の実施形態を採ることができることが理解される。好ましくは、本発明では、軟骨への移植は、その軟骨(例えば、関節軟骨)に対してコンドロイチナーゼ(コンドロイチナーゼABC)での処置なしで行われる。本発

明により、コンドロイチナーゼ処置しない方が、軟骨、特に、関節軟骨を効果的に処置することができるからである。

[0283] 次に、使用される物理的または化学的な刺激としては、例えば、ピペッティング、アクチン調節物質の使用などを挙げることができるがそれらに限定されない。好ましくは、ピペッティングであり得る。ピペッティングは、操作が容易であり、有害物質を使用しないからである。あるいは、使用される化学的的刺激としては、アクチン脱重合促進因子およびアクチン重合促進因子などを挙げることができる。そのようなアクチン脱重合促進因子は、ADF (actin depolymerizing factor)、デストリン、デパクチン、アクトフォリン、サイトカラシンおよびNGF (nerve growth factor)などを挙げることができる。あるいは、アクチン重合促進因子としては、LPA (lysophosphatidic acid)、インスリン、PDGFa、PDGFb、chemokineおよびTGFbなどを挙げることができる。そのようなアクチンの重合または脱重合は、アクチンへの作用を見ることによって、観察することができ、任意の物質について、そのような作用を検定することが可能である。本発明の人工組織を生産する際に、所望の厚さを達成するために、そのように検定されて同定された物質を用いてもよいことが理解される。例えば、本発明において、所望の厚さの調整は、アクチン脱重合促進因子とアクチン重合促進因子との比率を調節することによって達成される。

[0284] (複合組織)

別の局面において、本発明はまた、移植可能な人工組織と、他の人工組織とを含む、複合組織を提供する。ここで、他の人工組織としては、本発明の範囲に入る人工組織またはそれに入らない人工組織(すなわち従来の人工組織)のいずれであってもよい。従来の人工組織(例えば、人工骨、微線維性コラーゲン医療材料など)は、生物学的結合能を有していないかまたは有してもほとんど実用に耐えなかったことから、このような複合組織を形成することは不可能であった。従って、本発明を使用すれば、例えば、骨に軟骨を組み合わせて治療することができることが理解される。あるいは、骨などの欠損には、特に、骨軟骨複合体の治療において、人工骨(例えば、ネオボーンなどのハイドロキシアパタイト構成物、微線維性コラーゲン医療材料など)と本発明の人工組織または複合体との複合組織を用いることによって、骨の部分は、



人工骨によって、その表層にある軟骨については人工組織によって同時に治療され得ることから、本発明の人工組織または複合体を人工骨と結合させて治療することができるが理解される。ここで、本発明の移植可能な人工組織または複合体は、例えば、実質的に細胞および該細胞に由来する物質から構成され、より好ましくは、実質的に細胞および該細胞に由来する細胞外マトリクスから構成される。ここで使用される細胞外マトリクスは、コラーゲンI, コラーゲンIII, ビトロネクチンおよびフィブロネクチンからなる群より選択される。好ましくは、本発明では、軟骨への移植は、その軟骨(例えば、関節軟骨)に対してコンドロイチナーゼ(コンドロイチナーゼABC)での処置なしで行われる。本発明により、コンドロイチナーゼ処置しない方が、軟骨、特に、関節軟骨を効果的に処置することができるからである。

[0285] 本明細書において「複合組織」とは、本発明の人工組織または複合体と、他の人工組織(本発明の人工組織または複合体を含む)との複合体化した組織をいう。従って、そのような複合組織は、複数の組織治療に用いることが可能である。たとえば、そのような複合組織は、軟骨および骨の両方の治療に使用することが可能である。

[0286] 巨大な軟部組織の欠損(例えば、半月など)があった場合に、他の人工組織(微線維性コラーゲン医療材料(例えば、CMI (Amgen, USA)、インテグラン(日本臓器)、ヒアルロン酸ゲル、コラーゲンゲル、アガロースゲル、アルギネートゲル、ビーズ)に本発明の人工組織を結合させることによって、他の人工組織と移植組織との生物学的結合を促進させることができる。

[0287]

好ましくは、本発明の複合体において、移植可能な人工組織と、他の人工組織とは、生物学的に結合される。このような結合は、2つの組織を接触させて培養することによって作製することができる。このような生物学的結合は、細胞外マトリクスを介する。

[0288] 以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、実施例のみに限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

### 実施例

[0289] 本実施例において、動物の取り扱い、大阪大学において規定される基準を遵守

し、動物愛護精神に則って実験を行った。

[0290] (製造例1)

本実施例では、種々の滑膜細胞を用いて、人工組織を作製した。以下に説明する。

[0291] <細胞の準備>

ブタ(LWD三元交配種、細胞採取時には2~3月齢のものを使用)膝関節より滑膜細胞を採取し、コラゲナーゼ処理後、10%FBS-DMEM培地(HyCloneから入手可能、DMEMはGIBCOから入手したものを使用)にて培養および継代を行った。継代数について、滑膜細胞においては10継代にても多分化能を有するという報告もあることから、本実施例においては最大10継代まで使用したが、用途に応じてそれ以上の継代細胞も用いることが理解される。実際に人体に移植する場合には自家移植であるが、十分な細胞数の確保しつつ、感染等の危険性を軽減するために培養期間の短縮する必要がある。

[0292] これらを考慮して、種々の継代細胞を用いた。実際に行った細胞は、初代培養細胞、1継代、2継代、3継代、4継代、5継代、6継代、8継代、10継代のものを実験した。これらを用いて、人工組織を用いた。

[0293] <人工組織の作製>

35mm皿、60mm皿または100mm皿(BD Biosciences、セルカルチャー皿・マルチウェルセルカルチャープレート)の上に $4.0 \times 10^6$ 個の滑膜細胞を2mlの10%FBS-DMEM培地にまきこんで培養した。その際にアスコルビン酸を添加した。皿、アスコルビン酸および細胞の濃度は、以下のとおりである。

皿:BD Biosciences、細胞培養皿・マルチウェル細胞培養プレート

アスコルビン酸2リン酸:0mM、0.1mM、0.5mM、1mM、2mM、および5mM

細胞数: $5 \times 10^4$ 細胞/cm<sup>2</sup>、 $1 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>、 $2.5 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>、 $4.0 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>、 $5 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>、 $7.5 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>、 $1 \times 10^6$ 細胞/cm<sup>2</sup>、 $5 \times 10^6$ 細胞/cm<sup>2</sup>、および $1 \times 10^7$ 細胞/cm<sup>2</sup>

予定培養期間まで、2回/週で培地交換を行った。培養期間に達したら、皿周囲を全周性に100 μlのピペットマンでピペッティングを行いながら、細胞シートと皿を分離

した。分離できたら皿を軽く揺ることにより細胞シートを可能な限り平坦にした。その後培地を1ml追加し、細胞シートを完全に浮遊させ、2時間放置することにより細胞シートが収縮をおこし、3次元化することにより人工組織を作製した。

[0294] (ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色)

細胞における支持体の定着・消長を観察するために、HE染色を行った。その手順は以下のとおりである。必要に応じて脱パラフィン(例えば、純エタノールにて)、水洗を行い、オムニのヘマトキシリンでサンプルを10分浸した。その後流水水洗し、アンモニア水で色出しを30秒間行った。その後、流水水洗を5分間行い、塩酸エオジン10倍希釈液で2分間染色し、脱水し、透徹し、封入する。

[0295] (各種細胞外マトリクス)

1)凍結ストックから、5  $\mu$  m厚の切片を作製する。

[0296] 2) -20°Cで5-10分間にわたり、アセトン中でこの切片を固定する(パラフィンブロックは、パラフィン除去し再水和する必要がある)

3)内因性ペルオキシド活性は、メタノール中0.3%  $H_2O_2$  中で20分間室温でブロックする(1ml 30%  $H_2O_2$  + 99mlメタノール)

4)PBSで洗浄する(3×5分)。

[0297] 5)モノクローナル一次抗体(各種細胞外マトリクスに対するマウスまたはウサギ抗体)(1  $\mu$  l抗体+200  $\mu$  lPBS/スライド)と4°Cで湿式チャンバー内で一晚インキュベートする。

[0298] 6)翌日PBSで洗浄する(3×5分)。

[0299] 7)抗マウスおよび抗ウサギのno. 1ビオチン化結合を、30分-1時間室温で適用する(3滴を直接スライドにたらす)。

[0300] 8)PBSで洗浄する(3×5分)。

[0301] 9)ストレプトアビジンHRP no. 2を、LSABについてたらし1015分間浸す。

[0302] 10)PBSで洗浄する(3×5分)。

[0303] 11)DABをたらす(5ml DAB+5  $\mu$  l  $H_2O_2$ )

12)茶っぽい色を顕微鏡で観察する。

[0304] 13)水中に5分ほど浸す。

- [0305] 14) HEを30秒－1分間浸す。
- [0306] 15) 数回洗浄する。
- [0307] 16) イオン交換水で1回洗浄する。
- [0308] 17) 80%エタノールで1分洗浄する。
- [0309] 18) 90%エタノールで1分洗浄する。
- [0310] 19) 100%エタノールで1分洗浄する。(3回)
- 20) キシレンで3回×1分間洗浄する。その後カバースリップをかける。
- [0311] 21) 発色を見る。
- [0312] (結果)

細胞外マトリックス産生促進因子としてアスコルビン酸2リン酸を添加した場合、細胞の重層化はわずかに認められるのみである。他方、シート状のこの細胞を培養底面より剥離させ自己収縮させることにより、左に示されるように、重層化が進展し三次元化が促進されることが観察された。滑膜細胞を用いた場合でも、孔のない大きな組織が作製された。この組織は、厚みがあり、細胞外マトリックスに富む組織であった。0.1mM以上添加した場合、細胞外マトリックスの形成が促進したことが分かる。培養日数が、3日、7日、14日および21日の人工組織を調べると、培養3日ですでに、剥離が可能になる程度に組織が強固になることが分かる。培養日数が増すと、細胞外マトリックス密度は変動し、増加していく。

- [0313] これらが、培養皿底面より剥離し自己収縮をさせた人工組織であった。人工組織はシート状で作製され、皿から剥離した後に放置すると、自己収縮を起こし、三次元化が進む。組織所見により、細胞が幾層にもわたり点在して重層化しているのがわかる。

- [0314] 次に細胞外マトリックスを含む種々のマーカーを染色した。

種々の細胞外マトリックス(コラーゲンI型、II型、III型、IV型、フィブロネクチン、ビトロネクチンなど)が存在したことがわかる。免疫染色で、コラーゲンIおよびIIIは強く染色されたが、コラーゲンIIの染色は一部に限局していた。強拡大みると、コラーゲンは、核から少し離れた部位で染色されており、細胞外マトリックスであることが確認できる。一方、細胞接着因子として重要とされているフィブロネクチン、ビトロネクチンは、強拡大

でみると、コラーゲンとは異なり、核に密接する領域にも染色されており、細胞周囲にも存在することが確認できる。

[0315] また、人工組織の作製には、3～8継代が好ましいようであるが、どのような継代でも使用可能なようである。

[0316] 従来の人工組織は、フィブロネクチンおよびビトロネクチンでは染色されない。このことから、本発明の人工組織は、従来の人工組織とは異なり、また、既存のコラーゲンスキャフォールドでは、フィブロネクチンおよびビトロネクチンの接着因子は含まれておらず、その意味でも、本発明の組織の独創性が明らかになる。どの細胞外マトリクスでも染色されない。正常組織と本実施例の人工組織とを比べると、人工組織の癒合の様子が自然に近いことが確認される。

[0317] なお、本発明の人工組織は、水分除去のための濾紙に接触させたところ、濾紙に接着し、手で剥離することが困難であった。

[0318] コラーゲン含有量測定を行った。ヒドロキシプロリンの量から、0.1mM以上のアスコルビン酸2リン酸を加えたときに、コラーゲンの生産が有意に促進されることが明らかになった。産生量は、培養期間にほぼ比例していた。

[0319]

(製造例2:脂肪由来組織)

次に、脂肪組織由来の細胞を用いて人工組織を作製した。

[0320] A)細胞は、以下のようにして採取した。

[0321] 1)膝関節の脂肪パッド(fat-pad)より検体を採取した。

[0322] 2)この検体をPBSを用いて洗浄した。

[0323] 3)この検体をできるだけ細かく鋏で切り刻んだ。

[0324] 4)コラゲナーゼ(0.1%)10mlを加え、37°C水浴にて1時間振盪した。

[0325] 5)DMEM(10%FBS補充)を同量加えて、70 $\mu$ lのフィルター(Milliporeなどから入手可能)に通した。

[0326] 6)フィルターを通った細胞およびフィルターに残った残渣を10% FBSを補充したDMEM5mlに入れて25cm<sup>2</sup>フラスコ(Falconなどから入手可能)において培養した

。

[0327] 7) フラスコの底面に張り付いた細胞(間葉系幹細胞を含む)を取り出して以下の人工組織作製に供した。

[0328] B) 人工組織の作製法

次に、この脂肪由来の細胞を用いて人工組織を作製した。アスコルビン酸2リン酸は、0mM(なし)、0.1mM、0.5mM、1.0mM、5.0mMの条件を用いた。作製は、上記滑膜細胞を作製した方法(実施例1に記載される)に準じて行った。初期の播種条件としては、 $5 \times 10^4$ 細胞/cm<sup>2</sup>を用いた。培養日数は14日間を採用した。脂肪組織由来の細胞からも人工組織は作成され、滑膜細胞由来人工組織と同様にフィブロネクチンおよびビトロネクチンが豊富に存在していた。またコラーゲンI, IIIについても同様豊富に発現していた。

[0329] アスコルビン酸2リン酸 0mM: 接線係数(ヤング率)0.28

アスコルビン酸2リン酸 1.0mM: 接線係数(ヤング率)1.33

C) 移植実験

次に、この人工組織を実施例8(軟骨修復)、実施例9(半月修復)に記載されるように、移植実験に供する。その結果、脂肪細胞が、滑膜細胞由来の人工組織と同様に、修復機能を有することがわかる。

[0330] D) 脂肪からの人工組織の骨軟骨への分化誘導

本実施例で作製した骨または軟骨の人工組織を、軟骨または骨に分化誘導させた。左の実験は骨分化実験の結果を示す。上段は人工組織、下段は単層培養である。人工組織は骨分化誘導培地にてアルザリンレッド陽性反応を呈し、骨分化が確認できた。右の実験は軟骨分化誘導実験で人工組織は軟骨分化誘導培地+BMP-2の刺激によりアルシアンブルー陽性の軟骨様組織へと分化した。つまり、脂肪由来人工組織も滑膜細胞由来人工組織と同様に骨・軟骨への分化能を保持していることが判明した。

[0331]

(コラーゲン産生の測定)

次に、本発明の人工組織の移植により、細胞外マトリクスであるコラーゲンが十分産生されているかどうかを確認した。以下のプロトコールを使用した。

## [0332] &lt;方法&gt;

培養期間:3日、7日、14日、21日、28日

アスコルビン酸2リン酸の濃度:0mM、0.1mM、1mM、5mMで

の条件を用いて、滑膜由来人工組織を作製した。

[0333] この人工組織の培養液に、6N HClを加え、105°Cで18時間加水分解し、クロラミンTにて酸化後、Ehrlich's Reagent Solution (p-ジメチルアミノ-ベンズアルデヒド2g+60%過塩素酸3ml; イソプロパノールを3:13になるように希釈して作製)にて発色させ吸光度を測定した。

## [0334] &lt;結果&gt;

1) コラーゲン産生量について、アスコルビン酸については、0mM << 5mM < 1mM ≤ 0.1mMであった。コラーゲン産生という観点においては、至適濃度は0.1~1mMであった。

[0335] 2) 培養期間についてみると、コラーゲン産生という観点においては、時間依存的にコラーゲン産生量が増加していることが明らかになった。

[0336] (皿の大きさ、細胞数および継代数の影響)

次に、皿の大きさおよび継代数の影響を調べた。

[0337] 細胞数および継代数の相違による人工組織の形成の様子を示す。いずれの場合でも、試験したすべての濃度において人工組織が形成されたことが示される。

[0338] 上記の条件を用いて、皿の大きさ(35mm、65mm、100mm)および継代数(5~7)の細胞を用いて、同様の実験を行った。

[0339] どのような皿であっても、継代数であっても、同様に人工組織が形成されることが明らかになった。

[0340] 細胞数については、マトリックス産生という観点からみると、基本的には多い方が良く考えられるが、多すぎると細胞の収縮力が強くなりすぎて培養開始翌日には自然に剥がれることがわかる。したがって、より大型の人工組織を作製する場合は、比較的薄い濃度で播種することが好ましいようであることが明らかになった。特に、人工組織の強度などをコントロールする場合は、比較的薄い濃度であることが好ましいようである。示されるように、5継代であれば $5.0 \times 10^5 / \text{cm}^2$ では剥がれてしまい、 $2.5 \times 10^5 / \text{cm}^2$

では自然に剥が

れない。6継代以上でも $7.5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ では剥がれてしまうが、 $5.0 \times 10^5 / \text{cm}^2$ でははがれなかった。従って、本発明の好ましい人工組織を作製するためには十分数の細胞を確保する必要があり、ある程度の細胞継代が必要であるようである。4継代のものも試作したが、 $40 \times 10^5 / \text{cm}^2$ では剥がれた。このように、継代数と密接な関係がありそうであり、用途に応じて種々の人工組織を作製することができる。これらの結果から、移植に耐える好ましい細胞としては、5継代の細胞を $4.0 \times 10^5 / \text{cm}^2$ で培養する条件を採用すればよいようであるが、それには限定されないようである。

[0341] 同様に他の細胞でも、細胞濃度により強度を調整することができることが実証される。滑膜細胞、筋芽細胞、脂肪由来細胞は、種々の本明細書に記載の条件に基づき、人工組織を作製し、細胞密度による強度への影響を観察することができる。

[0342] (力学的特性の測定)

次に、 $4 \times 10^6$ 細胞/cm<sup>2</sup>の細胞を3週間アスコルビン酸2リン酸を添加して培養して、剥離後48時間たったものを使用して、力学的特性を調べた。本発明の人工組織の力学的特性を測定した。そのプロトコールを以下に示す。

[0343] まず、力学的特性を、引っ張り試験により試験した。

[0344] 装置において、人工組織の両端を試験片把持部に保持させる。人工組織には、測定が簡単なようにマーカを付す。

[0345] 人工組織をはさみ、マーカを置いて引張試験を行う。最大荷重が1.89N、ヤング率19.2MPaであった。参考として、最大張力は、通常、皮膚が最大荷重は軟骨で0.7から1.2MPaであり、皮膚で1.1MPaであった。ヤング率は軟骨が10MPa、皮膚が35MPaであった。このように、本発明の人工組織は、皮膚および軟骨などと同様の力学強度を有し、外科的にハンドリングに耐えうるものであることが明らかになった。

[0346] 実験結果から、最大荷重は、それぞれ、1.89N、1.9Nであることが明らかになった。ヤング率(接線係数)は、19.2MPaであることが明らかになった。

[0347] (自己支持性の判定)

次に、自己支持性の判定実験を行った。ピンセットとして、先曲がり先細無鉤ピンセ



ットA-11(ステンレス製、全長120mm、先曲がり20mm、先端は0.1mmのもの；夏目製作所)を用いて人工組織を挟み、試験した。自己支持性を有するか否かは、目視により判断した。片が複数になったものは自己支持性を有しないと判断した。この判定は、他のピンセット、例えば、別の種類のピンセットとして先曲がり先細無鉤ピンセットA-12-2(ステンレス製・ボッチ付、全長100mm、先端は0.05mmのもの；夏目製作所)を用いて別の実験者が行った場合でも、同様の結果が見出された。

[0348] 自己支持性の判断は、人工組織の剥離時および剥離後に保存した後のものを試験することができる。

[0349] 上記実施例などに記載されるように、心筋細胞、筋芽細胞、滑膜細胞について、アスコルビン酸を含む細胞外マトリクス産生促進因子の存在下で作製した人工組織はいずれも、自己支持性を有していた。これに対して、このような因子の非存在下で作製した人工組織は、剥離時にすでにピンセットでつまみあげることが困難であり、自己支持性が全くないことが確認された。

[0350] 従って、1)周囲のピペッティングの際に簡単に剥がれるかどうか；および2)はがれたシートの辺縁を軽くさわるだけで、さらにシートが簡単にはれるかどうかというこの2点さえクリアできれば、あとは自然に拘縮するので十分な強度になるようであることが判明した。

[0351] 従って、自己支持性は、本発明の方法によって初めて獲得された性質であるといえる。

[0352] (骨分化誘導)

骨分化誘導を行った場合でも本発明の人工組織が機能するかどうかを確認する。

[0353] まず、はじめから骨分化誘導培地(10% FBS-DMEM+0.1  $\mu$ M デキサメタゾン、10 mM  $\beta$  グリセロホスフェート、0.2mMアスコルビン酸2リン酸)にて培養し、骨分化誘導させた滑膜細胞から人工組織を作製した。

[0354] また、骨分化誘導をかけずに三次元の人工組織を作製し、その後、培地を骨分化誘導培地に換えてさらに培養することにより、人工組織に石灰沈着骨が生じることを確認した。

[0355] 外見上も分化誘導を掛けない人工組織は、透明なのにくらべ、骨形成した人工組

織は白色である。アリザリンレッド (Alizarin Red) には強く染色され、アルカリホスファターゼ (ALP) 染色もコントロールに比べ強く染色されている。このように、滑膜細胞による人工組織が骨分化能を有することが確認できる。

[0356] (軟骨分化誘導)

次に、本発明の人工組織の製造方法において、軟骨分化誘導が使用可能かどうか確認した。

[0357] (培養条件)

細胞密度:  $4 \times 10^4 / \text{cm}^2$

条件: CO<sub>2</sub> 5%, air 95%, 37°C

この培地を用いて、以下の軟骨分化誘導培地を用いて、培養を行い、人工組織を作製した。

[0358] 軟骨分化誘導培地: DMEM (GIBCO)、FBS (HyClone) 10%、ITS + Premix (インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸) (BD Biosciences) 6.25 μg/ml、デキサメサゾン (Sigma)  $10^{-7}$  M、アスコルビン酸 (WAKO) 50 μg/ml、ピルビン酸 (SIGMA) 100 μg/ml。

[0359] 通常の培地、軟骨分化誘導培地、軟骨分化誘導培地 + BMP-2、軟骨分化誘導培地 + TGF-β1 で人工組織を培養したもので実験した。いずれにおいてもアルシアンブルー染色にて青く染まり軟骨様マトリックス産生の亢進が確認できるが、その効果は BMP-2 添加群にて著明である。

[0360] 人工組織における軟骨関連遺伝子の発現 (アグリカン、Col II、Sox9) を見たところ、人工組織を通常の培地 (一番左の列) から軟骨分化誘導培地 (中央列) に換えると軟骨分化マーカーである Sox9 遺伝子の発現が亢進し、さらに軟骨分化誘導培地 + BMP-2 で培養すると Collagen II 遺伝子発現も亢進し、より強力な軟骨分化が確認できた。同じ分化誘導刺激を加えた際の軟骨分化反応を単層培養滑膜細胞と三次元人工組織化した滑膜細胞とで比較したところ、単層培養、三次元人工組織を、同じ培養条件でペアで比較したところ、軟骨分化誘導培地、あるいは軟骨分化誘導培地 + BMP-2 の刺激を加えた場合、軟骨分化マーカー遺伝子の発現は人工組織においてより著明に発現していることが確認され、三次元化された人工組織は強い軟骨分化

能を持つことが確認された。

[0361]

(比較例1:コンドロイチナーゼABCを使用して生産した人工組織での軟骨修復)  
次に、軟骨修復が可能であるかどうかを確認した。ここでは、同種異系の人工組織を使用した。

[0362] 人工組織の接着能の有無を確認するため、豚軟骨片上に同種の人工組織を移植した。人工組織は、細胞数 $4.0 \times 10^6$ 個/35mm 皿、アスコルビン酸1mM、培養期間7～14日間という条件で作製した。軟骨片に径6mmの創を作成し、上層帯をメスにて切除し、コンドロイチナーゼABC(1U/1ml)を添加し、5分間処理した。人工組織を径6mmとなるように採型・移植し、7日間器官培養した。人工組織は、軟骨片接着面と密に接着し、接着面にフィブロネクチンが集結していた(図1)。

[0363] 次に、豚軟骨移植を施行した。上記同様、生体の大腿骨内果部に径6mmの創を作成し、上層帯をメスにて切除し、コンドロイチナーゼABC(1U/1ml)を添加し、5分間処理した後に同種人工組織を径6mmとなるように採型・移植し、10日間飼育した。その結果を、図2に示す。図3は、図2で示した人工組織と軟骨接着メントの培養部の強拡大図である。図3左には、HE染色の様子を示し、中には抗フィブロネクチン抗体で染色した写真を示し、図3右には、抗ビトロネクチン抗体で染色した写真を示す。人工組織と軟骨組織との接着面は、矢印で示すように、細胞を介した接着ではなく、人工組織のマトリクスと軟骨のマトリクスとが直接接着していることが明らかになった。接着面にはフィブロネクチンおよびビトロネクチンが集積していることがわかる。つまりこれら接着因子が人工組織と被移植組織の接着に関与していることが示唆される。従って、本発明は、従来の人工組織、あるいは細胞よりも、天然での癒合が顕著であるという点でも特徴的であることがわかる。

[0364] さらに、1ヶ月後の組織所見では、図4に示されるように、人工組織は、軟骨損傷部は生物学的に結合しており、炎症を起こさずに定着していたことが確認された。周囲の組織との癒合を観察したところ、生物学的結合がなされていたことが明らかになった。人工組織の表層部は、図5に示されるように、繊維芽細胞様の細胞主体であった

が、深層部では、図6に示されるように、軟骨様細胞が主体であった。このことから、移植された人工組織は深層部において経時的に軟骨様組織へと分化していくことが示される。いずれの時期においても顕著な拒絶反応は認められず、同種移植の際に危惧された拒絶反応は認められなかった。

[0365] 従って、同種異系の人工組織を用いた移植処置により、副作用なく処置可能であることが分かった。

[0366] (実施例1)

本実施例では、以下の事項について言及する：

1. 成体ミニブタの全層関節軟骨欠損の自然治癒；
2. 幼若ブタを使用して半層軟骨損傷モデルを確立すること；
3. 幼若ブタの半層関節軟骨欠損に対するコンドロイチナーゼABCの効果；
4. ブタの半層関節軟骨欠損に対する3DST移植モデルの確立；
5. 幼若ブタを使用して全層関節損傷モデルを確立すること；

(材料および方法)

(細胞および細胞培養物)

ブタ滑膜(SM)を、外科手術によって膝関節から得るか、または死亡したブタから死亡から12時間以内に膝関節を得た。SM標本を、カルシウムおよびマグネシウムを含まないPBSですすぎ、可能な限り細かくして、0.1%のコラゲナーゼIV(Sigma, St. Louis, MO, USA)を用いて37°Cにて消化し、1.5時間に亘って振とうした。ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM; Gibco BRL, Life Technologies Inc, Rockville, USA)中で10%胎仔血清(FBS; HyClone, Logan, Utah, USA)を用いてコラゲナーゼを中和した後に、細胞を、遠心分離によって回収し、PBSで2回洗浄し、FBSおよび抗生物質を添加した高グルコースDMEM増殖培地中に再懸濁し、70mmメンブレンで濾過し、そして、T25フラスコにプレーティングした。

[0367] 増殖させるために、5%CO<sub>2</sub>の加湿雰囲気下(37°C)で、増殖培地中単層にて細胞を培養した。その培地は、1週間に1回取り替えた。一次培養の15~28日後に、これらの細胞がコンフルエントに達すると、細胞を、PBSで2回洗浄して、トリプシン-EDTA(0.25%トリプシンおよび1mM EDTA; Gibco BRL, Life Technologies

Inc) 処理によって回収して、最初の部分培養物について1:3の希釈にて再プレーティングした。細胞継代は、細胞がコンフルエントに達したときに1:3希釈して、同様に継続した。

[0368] (3DST調製)

3次元人工組織(3DST)を、以下のように調製した:ブタ滑膜細胞を、0.2mMアスコルビン酸2リン酸を加えた増殖培地中でプレーティング( $4.0 \sim 5.0 \times 10^5 / \text{cm}^2$ )して、10日間に亘って単層で培養した。次いで、細胞およびネイティブマトリックスの単層培養複合体を、外周に沿って穏やかにピペッティングすることによってせん断応力を与えることによってその基底部から分離させた。この分離させた複合体を、3次元組織を発生させるために1時間に亘って能動的に萎縮させた。本実施例において、3DSTを同種(異系)移植片として調製した。

[0369] (移植手順)

幼若ブタと成体ミニブタを、塩酸ケタミン(50mg/mlで、0.6ml/体重kg)とキシラジン(20mg/mlで、0.3ml/体重kg)の混合物を筋内注射しすること、およびプロポフォルの連続的な静脈注射(10mg/mlで、8mg/kg/時間)を行うことによって麻酔をかけた。内側側成熟膝蓋の切開(medial parapatellar incision)の後に、内側大腿部関節丘を、膝を完全に曲げた位置で露出させた。欠損の位置および深さは、Acufex(登録商標)mosaoplasty<sup>TM</sup>DP(Smith and Nephew)によってマークして、その欠損部の周りを歯科用探針で掘り出した。その損傷部の基底部から、さらなる液を洗浄・除去した後に、3DSTを、その損傷部に移植した。このコントロール群においては、その損傷部内には、何も満たさなかった。手術後1ヶ月で、麻酔をかけてそれらの動物を屠殺した。

[0370] (結果)

(1. 成体ミニブタの全層関節軟骨部欠損の自然治癒)

成体ブタは、外科手術に利用するには大きすぎる(通常は、200kgを超える)ので、発明者らは小型種のブタ(ミニブタ;1歳にして約50~60kg)を使用するようにした。逆に言えば、ミニブタ大腿部関節丘における関節軟骨は薄く(約1mm)、したがって、一貫した半層欠損を作製するのは困難であった。したがって、全層欠損のみを作

製し得ると判断し、したがって、成体ミニブタにおける全層関節軟骨欠損の自然治癒を調べた。この全層関節軟骨欠損の直径は、3.5mm、4.5mm、および6.5mmとした(各々サイズについてn=3)。

[0371] 驚くべきことに、どのサイズの欠損も、1ヶ月で完全に治癒した。それらの軟骨の層厚は、間充織細胞がその欠損を完全に覆うのに十分であるほど小さかったと考えられる。発明者らは、ミニブタモデルが、軟骨修復研究のにとって適切でないと結論づけた。

図7は、損傷1ヶ月後の成体ミニブタの全層関節軟骨損傷の自然治癒を示す。

[0372] (2. 幼若ブタを使用して半層軟骨損傷モデルを確立すること)

(3. 幼若ブタの半層関節軟骨欠損に対するコンドロイチナーゼABCの効果)

3月齢ブタの関節軟骨の層厚は、大腿部関節丘で約4~5mmであり、したがって、発明者らは、2mm厚であってかつ直径6.5mmの損傷を作製した。図8(左)に示されるように、この欠損は、治癒していない(n=3)。発明者らは、この損傷モデルは、3DST移植研究のモデルであり得る。なぜならば、この損傷は、自然に治癒しないからである。

[0373] 関節軟骨は、デルマタン硫酸、および表面欠損部上に抗接着特性を与える他のプロテオグリカンを含む。Hunzikerらによると、コンドロイチナーゼABCで処理された関節軟骨欠損は、フィブリン塊で満たされて修復を促進する(J Bone Joint and Surg[Am]. 78-A:721-33:1996)。発明者らは、半層軟骨の治癒反応に対するコンドロイチナーゼABCの効果調べた。コンドロイチンABCで処理した場合、Hunzikerらが報告したように、酵素処理をしなかった場合よりも、半層欠損は、ずっと一様に塊で被覆された。しかし、活性である細胞の治癒反応は観察されなかった(n=3)。(図8;右)。これらの結果によって、フィブリン塊のみの適用は、半層軟骨欠損部に対する治癒を誘導(し、修復にかかわる細胞を補充)するのには十分ではないことが示唆される。

[0374] 図8は、損傷後1ヶ月における3月齢のブタの半層関節損傷の治癒を示す。左は、コンドロイチナーゼABC処理なしの場合、右は、コンドロイチナーゼありの場合を示す。

[0375] (4. 幼若ブタの半層関節軟骨欠損部に対する3DST移植)

3DSTは、フィブロネクチンおよびビトロネクチンを含む接着分子を豊富に含んでいる。したがって、3DSTは、非常に接着性が高いと考えられる。インビゴでのその接着特性を改善するために、発明者らは、発明者らが上述したように、幼若ブタにおける半層関節軟骨欠損部に、直径6.5mmであり2mm厚である3DSTを移植する研究を行った。

[0376] 移植手術後1ヶ月で、3DSTは、その損傷の基底部に接着して、コンドロイチナーゼABCの処理をすることなくその損傷部を被覆した(各処理についてn=3である;図9)。興味深いことに、コンドロイチナーゼABC処理は、損傷部の基底の表面に対する凝塊の競合的な接着によって、その損傷部の基底部に対する3DSTの接着に対して悪影響を与えた(図9、右)。

[0377] 図9は、3月齢ブタの半層関節軟骨損傷部の表面に対する3DSTの移植を示す。この図の左は、3DSTの移植のみを示す。右は、損傷部の基底の表面でコンドロイチナーゼABC処理の後の3DSTの移植を示す。

[0378] これらの結果に基づくと、発明者らは、3DSTを移植して半層軟骨損傷部を修復するために、上記のような酵素処理は必要ないと結論付けた。

[0379] (5. 幼若ブタの全層関節軟骨欠損部の自然治癒)

全層欠損モデルとして、発明者らは、直径にして6.5mmである欠損を作製し、幼若ブタ全層関節軟骨欠損部の自然の時間経過を確認した(n=3)。

[0380] 巨視的な観察では、その全層欠損は、1ヶ月目にしてまだ治癒していなかった。この欠損は、いくつかの組織では部分的にのみ満たされている(組織学的な結果によっても確かめられた)。その組織学的研究結果は現在の段階では手元にないが、その巨視的な観察結果によって、この損傷モデルが、自発的に(自然に)治癒することがないことを明確に示している。したがって、発明者らは、このモデルが、全層関節軟骨に関する3DST移植研究のために使用され得ると結論付けた。

[0381] 図10は、損傷の1ヶ月後で、幼若ブタの全層関節損傷の自然治癒について示したものである。

[0382] (結論)

(1)ミニブタは、全層軟骨損傷の研究のための適切な動物ではない。なぜならば、軟骨の層が小さすぎ、その損傷が一様に作製し得ないからである。

(2)ミニブタは、その自発的な治癒応答のために、全層関節軟骨損傷の3DST移植の研究にとって適切な動物ではない。

(3)幼若ブタの半層関節軟骨の部分的欠損は、4週間目において治癒しなかった。コンドロイチンABC処理は、3DST移植にとって必要なかった。

(4)幼若関節軟骨の全層欠損は、4週間で治癒しなかった。

[0383] (軟骨欠損の作製および3DSTの移植における示唆)

上述の欠損部の隅は、長方形であるべきである。なぜならば、ボウル形状の欠損部は、関節内の液圧によるせん断応力に曝されやすいからである。これらの実験の後に、発明者らは、全層欠損部／半層欠損部の作製においていくつかの改善点をあたえた。欠損部の位置および深さは、Acufex (登録商標) misaicplasty<sup>TM</sup> DP(Smith and Nephew)を用いてマークし(A);ダイヤモンドディスクグラインダー(Shofu INC; 日本 京都)を使用して電気ルーター(13000rpm, Proxxon:Niersbach:Germany)で大まかに穿孔し(B);歯科用探針でその欠損部の周りを掘り起こし(C);そして、イヤモンドディスクグラインダーを手動で用いて底面を滑らかにした(D)。欠損部を作製して(E)、そして、3DSTを移植した(F)。その被膜をとじた。

[0384] 図11は、軟骨欠損の作製および3DSTの移植の一例を示す。上述の欠損部の隅は、長方形であるべきである。なぜならば、ボウル形状の欠損部は、関節内の液圧によるせん断応力に曝されやすいからである。これらの実験の後に、発明者らは、全層欠損部／半層欠損部の作製においていくつかの改善点をあたえた。欠損部の位置および深さは、Acufex (登録商標) misaicplasty<sup>TM</sup> DP(Smith and Nephew)を用いてマークし(A);ダイヤモンドディスクグラインダー(Shofu INC; 日本 京都)を使用して電気ルーター(13000rpm, Proxxon:Niersbach:Germany)で大まかに穿孔し(B);歯科用探針でその欠損部の周りを掘り起こし(C);そして、イヤモンドディスクグラインダーを手動で用いて底面を滑らかにした(D)。欠損部を作製して(E)、そして、3DSTを移植した(F)。その被膜をとじた。

[0385] (比較例および実施例)



以上を比較すると、軟骨(特に関節軟骨)の処置のためには、対象となる軟骨をコンドロイチナーゼ処置せずに移植する方コンドロイチナーゼの処置をするよりも適切であることが予想外に明らかになった。

- [0386] 以上のように、本発明の好ましい実施形態および実施例を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

#### 産業上の利用可能性

- [0387] 本発明は、従来治療が困難であった疾患の根本的な治療方法、技術、医薬、医療デバイスを提供するという有用性を有する。特に、天然に近い状態への回復を促進するという意味において、画期的な治療および予防を提供し、そのために使用される医薬、細胞、組織、組成物、システム、キットなどの提供において本発明は有用であることが理解される。
- [0388] 本発明がターゲットとする骨・軟骨を中心とした関節組織修復・再生のニーズであるが、骨再生のターゲットとなる骨折患者数は年間数十万人にのぼり、また軟骨再生治療の主要なターゲットとなる変形性関節症の潜在患者数は3000万人とも言われており、潜在するマーケットは巨大であり、周辺産業における有用性は高い。骨・軟骨を中心とした関節組織を対象とした再生医療研究は世界で激しい競争が開始されているが、本発明の人工組織は、患者などの生体より採取した細胞から作成される、安全かつ独創的なマテリアルであり、副作用などの点からも有用性は高い。

## 請求の範囲

- [1] コンドロイチナーゼ非処理での移植に使用するための、人工組織。
- [2] 第三次元方向に生物学的に結合されている (integrated)、請求項1に記載の人工組織。
- [3] 周囲との生物学的結合能 (integration capability) を有する、請求項1に記載の人工組織。
- [4] 前記細胞外マトリクスは、コラーゲンI、コラーゲンIII、ビトロネクチンおよびフィブロネクチンからなる群より選択される少なくとも1つを含む、請求項7に記載の人工組織。
- [5] 細胞外マトリクスが分散して配置され、該細胞外マトリクスは、任意の2つの1cm<sup>2</sup>のセクションにおける分布密度を比較したときに、約1:3~3:1の範囲内の比率に収まる、請求項1に記載の人工組織。
- [6] スキャフォールドフリーである、請求項1に記載の人工組織。
- [7] 前記移植は、関節であり、該関節が前記コンドロイチナーゼで処理されていないことを特徴とする、請求項1に記載の人工組織。
- [8] 前記関節は、関節軟骨を含む、請求項7に記載の人工組織。
- [9] コンドロイチナーゼの非存在下で関節軟骨を処置するための人工組織を生産するための方法であって、
- A) 細胞を提供する工程；
- B) 該細胞を、細胞外マトリクス産生促進因子を含む細胞培養液を収容する、所望の人工組織のサイズを収容するに十分な底面積を有する容器に配置する工程；
- C) 該容器中の該細胞を、細胞外マトリクス産生促進因子を含む細胞培養液とともに、該所望の大きさのサイズを有する人工組織を形成するに十分な時間培養する工程；および
- D) 前記細胞を該容器から分離する工程、
- を包含する、方法。
- [10] 細胞から、コンドロイチナーゼの非存在下で関節軟骨を処置するための人工組織を生産するための細胞培養組成物であって、
- A) 該細胞を維持するための成分；および

B) 細胞外マトリクス産生促進因子、  
を含む、組成物。

[11] コンドロイチナーゼの非存在下で関節軟骨を補強するための方法であって、

A) 細胞と該細胞に由来する成分とを含む複合体を、該部分を置換することまたは該部分を被覆するように配置するかあるいはその両方を行う工程; および

B) 該複合体と該部分とが生物学的に結合するに十分な時間該複合体を保持する工程、

を包含する、方法。

[12] コンドロイチナーゼの非存在下で関節軟骨を処置するための方法であって、

A) 細胞と該細胞に由来する成分とを含む複合体を、該部分を置換することまたは該部分を被覆するように配置するかあるいはその両方を行う工程; および

B) 該生体の部分の状態が改善するに十分な時間保持する工程、

を包含する、方法。

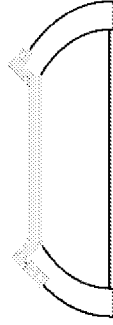
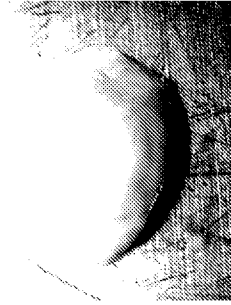
[図1]

FIG. 1

表在性帯の除去  
コンドロイチンナーゼ ABC での消化

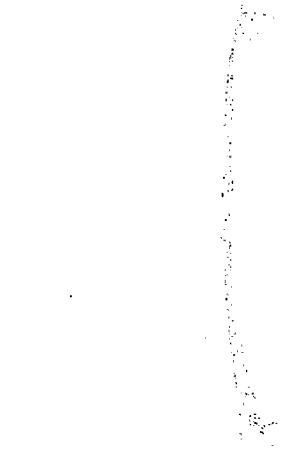
7 日間培養

(Hunziker EB. JBJS 1996)



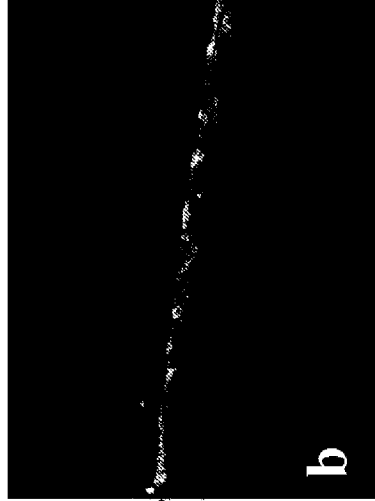
HE 染色

フィブロネクチン



x40

a



x200

b

[図2]

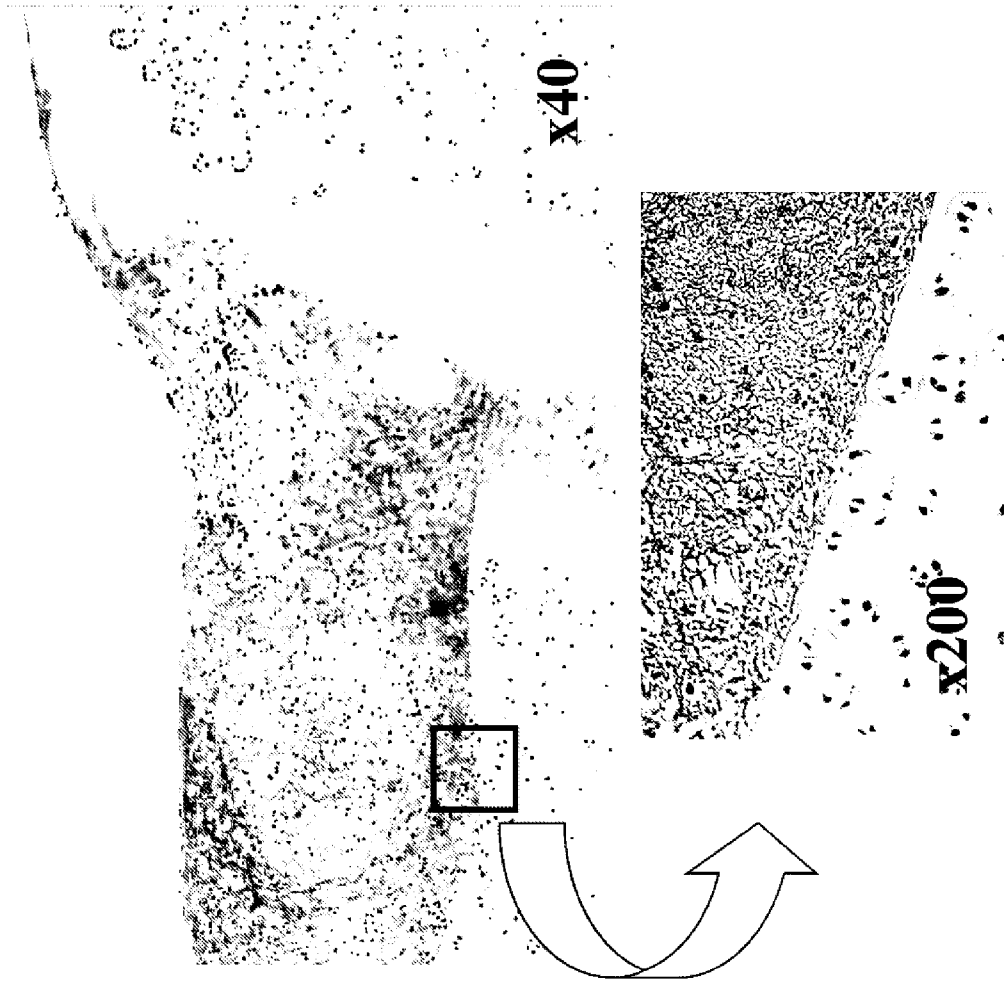


FIG.2

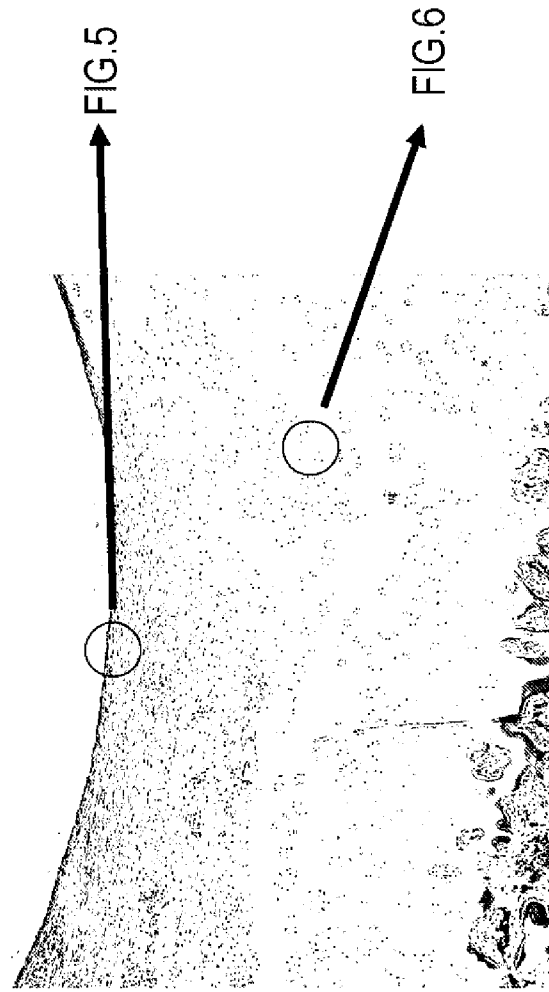
[図3]

FIG.3



[図4]

FIG.4



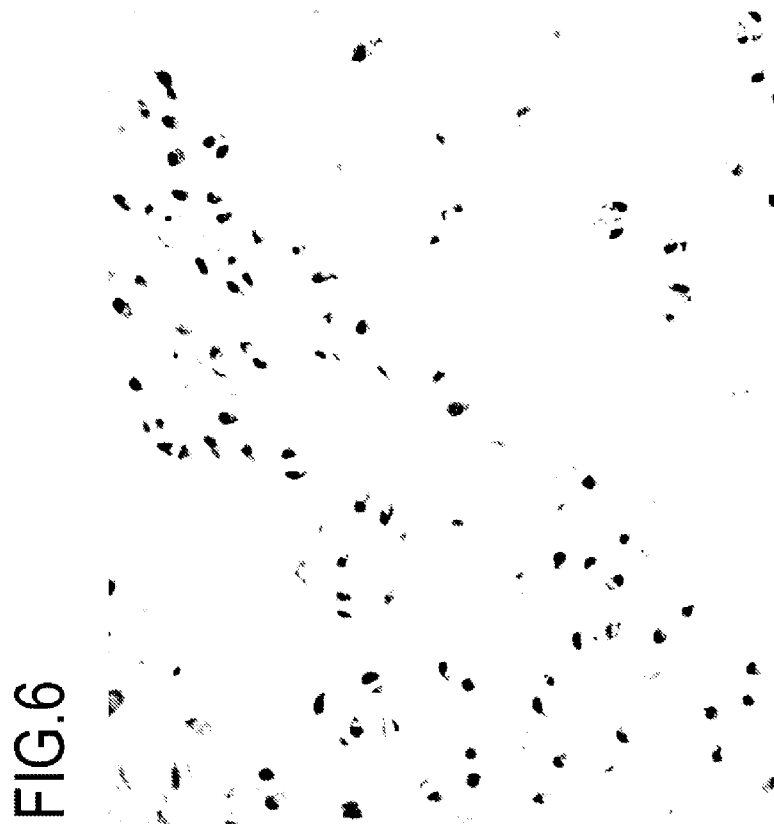
[図5]

FIG.5



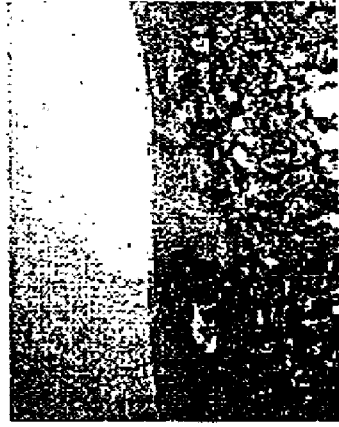


[図6]

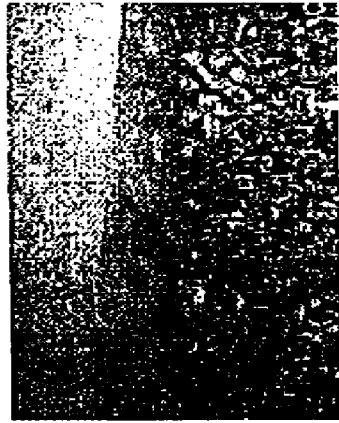


[図7]

FIG.7



$\phi 6.5\text{mm}$



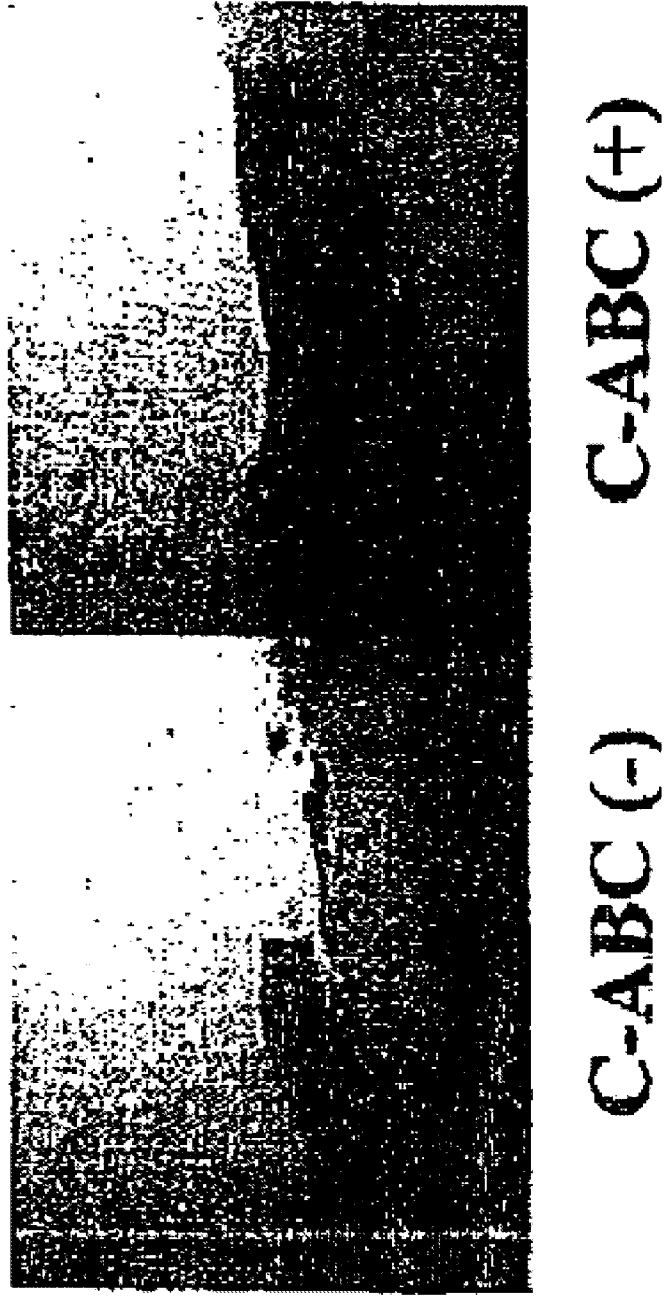
$\phi 4.5\text{mm}$



$\phi 3.5\text{mm}$

[図8]

FIG.8



[図9]

FIG.9



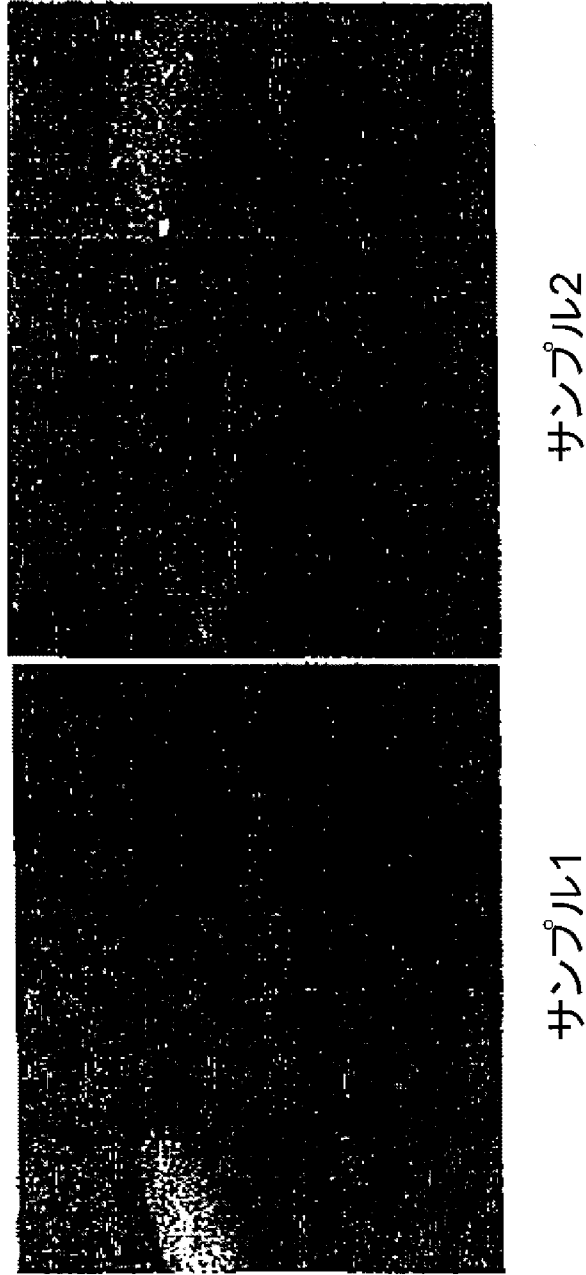
C-ABC (+)



C-ABC (-)

[図10]

FIG.10



[図11]



FIG.11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2006/326152

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61L27/00(2006.01) i, A61L31/00(2006.01) i

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L27/00, A61L31/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

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

WPI, BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), JMEDPLUS (JDream2), JSTPLUS (JDream2), Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Data Base

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Hikomichi FUJIE et al., "Katsumaku Yurai Kansaibo ga Jiko Seisei shita Scaffold Free 3 Jigen Jinko Soshiki no Rikigaku Tokusei", Bio Engineering Gakujutsu Koenkai Koen Ronbunshu, 12 January, 2006 (12.01.06), Vol.18th, pages 93 to 94, page 93, left column 2. Jikken Hoho 2-1 Shiryo	1, 2
X	WO 2005/012512 A1 (NAKAMURA Norimasa), 10 February, 2005 (10.02.05), Abstracts; Claims; examples 9, 10, 17 to 20	1, 2
X	WO 2000/051527 A1 (RUSH PRESBYTERIAN-ST. LUKE'S MEDICAL CENTER), 08 September, 2000 (08.09.00), Abstracts; Claims; page 2, line 25 to page 3, line 6	1, 2

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
06 March, 2007 (06.03.07)

Date of mailing of the international search report  
13 March, 2007 (13.03.07)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/326152

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2003/024463 A1 (RUSH PRESBYTERIAN-ST. LUKE'S MEDICAL CENTER), 27 March, 2003 (27.03.03), Abstracts; Claims	1,2
X	WO 1995/030742 A1 (BIOSURFACE TECHNOLOGY, INC.), 16 November, 1995 (16.11.95), Abstracts; Claims; page 24, right column, lines 1 to 14	1,2
X	WO 1995/033821 A1 (ADVANCED TISSUE SCIENCE, INC.), 14 December, 1995 (14.12.95), Abstracts; Claims	1,2
X	US 6143501 A (Sittinger, Michael), 07 November, 2000 (07.11.00), Abstracts; Claims	1,2



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2006/326152

WO 2005/012512 A1	2005.02.10	EP 1651756 A1	2006.05.03
		AU 2004261899 A1	2005.02.10
WO 2000/051527 A1	2000.09.08	JP 2002-537896 A	2002.11.12
		US 6197061 B1	2001.03.06
		US 2001/012965 A1	2001.08.09
		US 6451060 B2	2002.09.17
		EP 1158938 A1	2001.12.05
		EP 1158938 B1	2006.07.26
		AU 200033839 A	2000.09.21
		AU 771467 B2	2004.03.25
		DE 60029566 E	2006.09.07
WO 2003/024463 A1	2003.03.27	JP 2005-506860 A	2005.03.10
		US 2003/077821 A1	2003.04.24
		EP 1435980 A1	2004.07.14
		AU 2002335747 A1	2003.04.01
		KR 2004074054 A	2004.08.21
WO 1995/030742 A1	1995.11.16	US 5723331 A	1998.03.03
		US 5786217 A	1998.07.28
		AU 9524354 A	1995.11.29
WO 1995/033821 A1	1995.12.14	JP 2002-502226 A	2002.01.22
		JP 3599341 B2	2004.12.08
		US 5902741 A	1999.05.11
		US 5962325 A	1999.10.05
		EP 812351 A1	1997.12.17
		AU 9527696 A	1996.01.04
		AU 689605 B	1998.04.02
		KR 97703416 A	1997.07.03
		NZ 288467 A	1998.10.28
US 6143501 A	2000.11.07	JP 10-511884 A	1998.11.17
		JP 3452366 B2	2003.09.29
		US 5932459 A	1999.08.03
		WO 1997/015655 A2	1997.05.01
		WO 1997/015655 A3	1997.06.12
		EP 801676 A1	1997.10.22
		DE 19632404 A1	1998.04.02

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2006/326152

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
- 3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
A part of claim 1 and claim 2.

**Remark on Protest**  
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No. III of continuation of first sheet (2)

An artificial tissue to be used in transplantation without treating with chondroitinase that is the technical feature common to claims 1 to 12 is not novel because of having been disclosed in WO 00/51527 A1 and WO 03/024463 A1. Therefore, the inventions according to claims 1 to 12 are not so linked as to form a single general inventive concept but have nine invention groups as follows.

1. Part of claim 1 and claim 2  
An artificial tissue to be used in transplantation without treating with chondroitinase which is biologically integrated in the three-dimensional direction.
2. Part of claim 1 and claim 3  
An artificial tissue to be used in transplantation without treating with chondroitinase which has a biological integration capability with the surroundings.
3. Part of claim 1 and claims 4 and 5  
An artificial tissue to be used in transplantation without treating with chondroitinase which has extracellular matrix distributed therein and in which the density ratio of the extracellular matrix in two arbitrary sections (1 cm<sup>2</sup>) falls within the range of from about 1:3 to about 3:1.
4. Part of claim 1 and claim 6  
An artificial tissue to be used in transplantation without treating with chondroitinase which is scaffold-free.
5. Part of claim 1 and claims 7 and 8  
An artificial tissue to be used in transplantation without treating with chondroitinase wherein the transplantation is characterized in that it is to be performed on a joint and the joint has never been treated with chondroitinase.
6. Claim 9  
A method of producing an artificial tissue to be used in treating a joint cartilage in the absence of chondroitinase which comprises:  
A) the step of providing cells;  
B) the step of supplying the cells in a container which has a liquid cell incubation medium containing an extracellular matrix production promoter and has a bottom area sufficient for storing the artificial tissue in a desired size therein;  
C) the step of incubating the cells in the container together with the liquid cell incubation medium containing the extracellular matrix production promoter for a period of time sufficient for forming the artificial tissue in the desired size; and  
D) the step of stripping off the cells from the container.
7. Claim 10  
A cell incubation composition for producing an artificial tissue to be used in treating a joint cartilage in the absence of chondroitinase which contains:  
A) a component for maintaining the cells; and  
B) an extracellular matrix production promoter.

(Continued to the next sheet.)

## 8. Claim 11

A method of reinforcing a joint cartilage in the absence of chondroitinase which comprises:

- A) the step of providing a complex containing cells and a component originating in the cells to thereby replace the part to be treated, coat the part or to replace and coat the same; and
- B) the step of maintaining the complex for a period of time sufficient for achieving biological integration between the complex and the part.

## 9. Claim 12

A method of treating a joint cartilage in the absence of chondroitinase which comprises:

- A) the step of providing a complex containing cells and a component originating in the cells to thereby replace the part to be treated, coat the part or to replace and coat the same; and
- B) the step of maintaining for a period of time sufficient for improving the part *in vivo*.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61L27/00(2006.01)i, A61L31/00(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61L27/00, A61L31/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2007年 日本国実用新案登録公報 1996-2007年 日本国登録実用新案公報 1994-2007年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPI, BIOSIS(STN), CAplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN), JMEDPlus(JDream2), JSTPlus(JDream2), 医学・薬学予稿集全文データベース			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	藤江 裕道 等、滑膜由来幹細胞が自己生成したスキャフォールドフリー3次元人工組織の力学特性、 バイオエンジニアリング学術講演会講演論文集、2006年1月12日、 Vol.18th, pp.93-94 p.93左欄2.実験方法2-1 試料	1, 2	
X	WO 2005/012512 A1 (NAKAMURA Norimasa) 2005.02.10, Abstract, CLAIMS, Example 9,10,17-20	1, 2	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 06.03.2007		国際調査報告の発送日 13.03.2007	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 瀬下 浩一	4C   9284 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2000/051527 A1 (RUSH PRESBYTERIAN-ST. LUKE' S MEDICAL CENTER) 2000.09.08, Abstract, CLAIMS, 第 2 ページ 第 25 行-第 3 ページ 第 6 行	1, 2
X	WO 2003/024463 A1 (RUSH PRESBYTERIAN-ST. LUKE' S MEDICAL CENTER) 2003.03.27 Abstract, CLAIMS	1, 2
X	WO 1995/030742 A1 (BIOSURFACE TECHNOLOGY, INC.) 1995.11.16, Abstract, CLAIMS, 第 24 ページ 右欄第 1-14 行	1, 2
X	WO 1995/033821 A1 (ADVANCED TISSUE SCIENCE, INC.) 1995.12.14, Abstract, Claims	1, 2
X	US 6143501 A (Sittinger, Michael) 2000.11.07 ABSTRACT, Claims	1, 2

WO 2005/012512 A1	2005. 02. 10	EP 1651756 A1 AU 2004261899 A1	2006. 05. 03 2005. 02. 10
WO 2000/051527 A1	2000. 09. 08	JP 2002-537896 A US 6197061 B1 US 2001/012965 A1 US 6451060 B2 EP 1158938 A1 EP 1158938 B1 AU 200033839 A AU 771467 B2 DE 60029566 E	2002. 11. 12 2001. 03. 06 2001. 08. 09 2002. 09. 17 2001. 12. 05 2006. 07. 26 2000. 09. 21 2004. 03. 25 2006. 09. 07
WO 2003/024463 A1	2003. 03. 27	JP 2005-506860 A US 2003/077821 A1 EP 1435980 A1 AU 2002335747 A1 KR 2004074054 A	2005. 03. 10 2003. 04. 24 2004. 07. 14 2003. 04. 01 2004. 08. 21
WO 1995/030742 A1	1995. 11. 16	US 5723331 A US 5786217 A AU 9524354 A	1998. 03. 03 1998. 07. 28 1995. 11. 29
WO 1995/033821 A1	1995. 12. 14	JP 2002-502226 A JP 3599341 B2 US 5902741 A US 5962325 A EP 812351 A1 AU 9527696 A AU 689605 B KR 97703416 A NZ 288467 A	2002. 01. 22 2004. 12. 08 1999. 05. 11 1999. 10. 05 1997. 12. 17 1996. 01. 04 1998. 04. 02 1997. 07. 03 1998. 10. 28
US 6143501 A	2000. 11. 07	JP 10-511884 A JP 3452366 B2 US 5932459 A WO 1997/015655 A2 WO 1997/015655 A3 EP 801676 A1 DE 19632404 A1	1998. 11. 17 2003. 09. 29 1999. 08. 03 1997. 05. 01 1997. 06. 12 1997. 10. 22 1998. 04. 02

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
  
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
  
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。  
別紙参照。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1の一部及び2

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。



## 第Ⅲ欄の続き

請求の範囲1-12の共通する技術的特徴であるコンドロイチナーゼ非処理での移植に使用するための人工組織は、WO 00/51527 A1及びWO 03/024463 A1に記載されていることから、新規なものではないから、請求の範囲1-12の一群の発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関しておらず、下記のとおり9つの発明を含む。

## 1. 請求の範囲1の一部及び2

第三次元方向に生物学的に結合されている (integrated)、コンドロイチナーゼ非処理での移植に使用するための、人工組織。

## 2. 請求の範囲1の一部及び3

周囲との生物学的結合能 (integration capability) を有する、コンドロイチナーゼ非処理での移植に使用するための、人工組織。

## 3. 請求の範囲1の一部、4及び5

細胞外マトリクスが分散して配置され、該細胞外マトリクスは、任意の2つの1 cm<sup>2</sup>のセクションにおける分布密度を比較したときに、約1:3~3:1の範囲内の比率に収まる、コンドロイチナーゼ非処理での移植に使用するための、人工組織。

## 4. 請求の範囲1の一部及び6

スキャフォールドフリーである、コンドロイチナーゼ非処理での移植に使用するための、人工組織。

## 5. 請求の範囲1の一部、7及び8

移植は、関節であり、該関節が前記コンドロイチナーゼで処理されていないことを特徴とする、コンドロイチナーゼ非処理での移植に使用するための、人工組織。

## 6. 請求の範囲9

コンドロイチナーゼの非存在下で関節軟骨を処置するための人工組織を生産するための方法であって、

A) 細胞を提供する工程；

B) 該細胞を、細胞外マトリクス産生促進因子を含む細胞培養液を収容する、所望の人工組織のサイズを収容するに十分な底面積を有する容器に配置する工程；

C) 該容器中の該細胞を、細胞外マトリクス産生促進因子を含む細胞培養液とともに、該所望の大きさのサイズを有する人工組織を形成するに十分な時間培養する工程；および

D) 前記細胞を該容器から分離する工程、  
を包含する、方法。

## 7. 請求の範囲10

細胞から、コンドロイチナーゼの非存在下で関節軟骨を処置するための人工組織を生産するための細胞培養組成物であって、

A) 該細胞を維持するための成分；および

B) 細胞外マトリクス産生促進因子、  
を含む、組成物。

## 8. 請求の範囲11

コンドロイチナーゼの非存在下で関節軟骨を補強するための方法であって、

A) 細胞と該細胞に由来する成分とを含む複合体を、該部分を置換することまたは該部分を被覆するように配置するかあるいはその両方を行う工程；および

B) 該複合体と該部分が生物学的に結合するに十分な時間該複合体を保持する工程、  
を包含する、方法。

## 9. 請求の範囲12

コンドロイチナーゼの非存在下で関節軟骨を処置するための方法であって、

A) 細胞と該細胞に由来する成分とを含む複合体を、該部分を置換することまたは該部分を被覆するように配置するかあるいはその両方を行う工程；および

B) 該生体の部分の状態が改善するに十分な時間保持する工程、  
を包含する、方法。