

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5591119号
(P5591119)

(45) 発行日 平成26年9月17日(2014.9.17)

(24) 登録日 平成26年8月8日(2014.8.8)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027 Z N A
A 6 1 K 35/32 (2006.01)	A 6 1 K 35/32
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00 G
請求項の数 19 (全 31 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2010-543020 (P2010-543020)
 (86) (22) 出願日 平成21年12月18日(2009.12.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2009/071184
 (87) 国際公開番号 W02010/071210
 (87) 国際公開日 平成22年6月24日(2010.6.24)
 審査請求日 平成24年11月9日(2012.11.9)
 (31) 優先権主張番号 特願2008-322754 (P2008-322754)
 (32) 優先日 平成20年12月18日(2008.12.18)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)
 (31) 優先権主張番号 特願2009-118790 (P2009-118790)
 (32) 優先日 平成21年5月15日(2009.5.15)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 513112212
 i P S アカデミアジャパン株式会社
 京都府京都市上京区河原町今出川下る梶井
 町448番地5
 (74) 代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所
 (72) 発明者 妻木 範行
 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法
 人大阪大学内
 審査官 太田 雄三

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟骨細胞様細胞、及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

体細胞に、(1) c-Myc、L-Myc及びN-Mycよりなる群から選択される少なくとも1種のMycファミリー遺伝子、(2) Klf4、Klf2及びKlf5よりなる群から選択される少なくとも1種のKlfファミリー遺伝子、及び(3) SOX9遺伝子を導入する工程を含む、軟骨細胞様細胞の製造方法。

【請求項2】

Mycファミリー遺伝子が、c-Myc遺伝子である、請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】

Klfファミリー遺伝子が、Klf4遺伝子である、請求項1又は2に記載の製造方法。

【請求項4】

Mycファミリー遺伝子がc-Myc遺伝子であり、且つKlfファミリー遺伝子がKlf4遺伝子である、請求項1に記載の製造方法。

【請求項5】

体細胞が、ヒト由来である、請求項1～4のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項6】

体細胞が、皮膚線維芽細胞又は脂肪組織由来間質細胞である、請求項1～5のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項7】

体細胞に、(1) c-Myc、L-Myc及びN-Mycよりなる群から選択される少なくとも1種のMyc

ファミリー遺伝子、(2) Klf4、Klf2及びKlf5よりなる群から選択される少なくとも1種のKlfファミリー遺伝子、及び(3) SOX9遺伝子を導入することにより得られる、軟骨細胞様細胞。

【請求項8】

請求項7に記載の軟骨細胞様細胞を含む、軟骨組織再生用の細胞製剤。

【請求項9】

更に、足場材料を含む、請求項8に記載の軟骨組織再生用の細胞製剤。

【請求項10】

足場材料が、コラーゲンである、請求項9に記載の軟骨組織再生用の細胞製剤。

【請求項11】

請求項7に記載の軟骨細胞様細胞を用いて構築させた軟骨組織を含む、インプラント。

【請求項12】

下記工程を含む、軟骨組織用のインプラントの製造方法：

請求項7に記載の軟骨細胞様細胞を非ヒト哺乳動物の体内に投与する工程、及び当該非ヒト哺乳動物の体内で上記軟骨細胞様細胞から形成された軟骨組織を摘出する工程。

【請求項13】

軟骨疾患患者から採取した体細胞を使用して製造された請求項7に記載の軟骨細胞様細胞を、当該軟骨疾患患者の体内に投与し、当該体内で形成された軟骨組織を含む、当該軟骨疾患患者に移植するための軟骨組織用のインプラント。

【請求項14】

軟骨疾患患者から採取した体細胞を使用して製造された請求項7に記載の軟骨細胞様細胞を、当該軟骨疾患患者の軟骨組織以外の部位に投与し、当該体内で形成された軟骨組織を含む、当該軟骨疾患患者に移植するための軟骨疾患治療用組成物。

【請求項15】

請求項7に記載の軟骨細胞様細胞を有効成分とする、軟骨疾患の治療剤。

【請求項16】

請求項8～10に記載の軟骨組織再生用の細胞製剤を有効成分とする、軟骨疾患の治療剤。

【請求項17】

請求項7に記載の軟骨細胞様細胞を非ヒト哺乳動物に投与して、当該非ヒト哺乳動物の体内で上記軟骨細胞様細胞から軟骨組織を形成させることにより製造される、軟骨組織を形成させた非ヒト哺乳動物。

【請求項18】

請求項17に記載の軟骨組織を形成させた非ヒト哺乳動物に被験物質を投与し、軟骨組織に対する被験物質の薬効を判定する工程を含む、軟骨組織に対する被験物質の薬効を判定する方法。

【請求項19】

(1) c-Myc、L-Myc及びN-Mycよりなる群から選択される少なくとも1種のMycファミリー遺伝子、(2) Klf4、Klf2及びKlf5よりなる群から選択される少なくとも1種のKlfファミリー遺伝子、及び(3) SOX9遺伝子を含む、軟骨細胞様細胞調製用組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、体細胞から誘導され、軟骨細胞と同等の特性を有する増殖可能な軟骨細胞様細胞、及び該軟骨細胞様細胞の製造方法に関する。また、本発明は、該軟骨細胞様細胞を利用した、軟骨組織再生用の細胞製剤、インプラント、インプラントの製造方法、軟骨疾患の治療方法、及び軟骨疾患に対する被験物質の薬効判定方法に関する。更に、本発明は、体細胞から該軟骨細胞様細胞に誘導するための軟骨細胞様細胞調製用組成物に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

関節軟骨は、関節運動の際に、可動関節において衝撃を吸収し、関節の潤滑剤としての役割を担っている。軟骨の機械的な機能は、II型及びXI型コラーゲン、並びにプロテオグリカン等の膠原線維で構築された軟骨細胞外基質によって付与されており、軟骨細胞外基質は軟骨に内在している軟骨細胞によって作り出されることが分かっている。

【0003】

軟骨組織の代表的な疾患として、変形性関節症がある。変形性関節症は、機械的ストレス（反復荷重、過剰な運動、外傷等）や加齢等によって、関節軟骨が変性、摩耗、損傷され、これが深刻化することによって引き起こされる。変形性関節症は、関節を作動させた際の疼痛（動作時痛）や可動域の制限（可動域制限）等の症状が現れ、日常生活の質を低下させる原因となっている。変形性関節症は、50歳以上の日本人の約20%に認められ、今後の医学の発達や生活習慣の改善により平均寿命の伸びると共に、その罹患者は益々増加すると予測されており、高年齢化社会の大きな課題となっている。

10

【0004】

従来、変形性関節症の治療には、安静により症状の悪化を防ぐ方法、或いは、消炎鎮痛剤やサプリメントの投与、関節潤滑剤の関節腔内投与等により疼痛をコントロールする方法が採用されている。しかしながら、軟骨細胞は修復について弱い能力しか有しておらず（非特許文献1参照）、軟骨組織を再生させることができないため、これらの方法では、あくまで対症療法でしかなく、根本的な治療にはならないという欠点がある。また、軟骨変性が進行した変形性関節症に対しては、金属製の人工関節に置換する施術も行われているが、人工関節では、施術時の患者に対する負担が大きい、更に人工関節の摩耗による劣化が生じる、人工関節では脱臼し易くなる、人工関節のゆるみにより再置換手術が必要となる等の欠点がある。

20

【0005】

そこで、近年、軟骨組織を再生させることにより、従来の治療では困難であった変形性軟骨症の根本治療を可能ならしめる技術が注目されている。かかる技術を実現するには、容易に得られ、且つ分化して軟骨組織を形成する能力を保持しつつ多数の細胞数を生じることができる細胞供給源を開発することが急務である（非特許文献2及び3参照）。軟骨組織の再生に使用される細胞供給源としては軟骨細胞が有力な候補として考えられるが、軟骨細胞は数が限られており、また単層拡張（monolayer expansion）によって軟骨細胞の脱分化が引き起こされるため（非特許文献4参照）、最近の研究では、骨髄由来間葉幹（MS）細胞又は胚性幹（ES）細胞を用いて軟骨組織の形成を誘導する技術の開発に注力されている（非特許文献5 - 7参照）。しかしながら、MS細胞は、限られた程度までしか増殖することができず、更に最近の研究によって、MS細胞から作製された軟骨は不安定であり十分な軟骨の特性を備えることができないことが示唆されている（非特許文献8及び9参照）。また、ES細胞由来の分化細胞では、不均一な集団であり、軟骨組織の機能が不十分になったり（非特許文献10及び11参照）、奇形腫形成を引き起こしたりすることが懸念されている（非特許文献12参照）。

30

【0006】

また、近年、Oct3/4、Klf4、c-Myc及びSox2をコードする各々の遺伝子を体細胞に導入することにより、体細胞を初期化して誘導多能性幹（iPS）細胞に誘導する技術が報告され、再生医療の分野で革新的な技術が提供されている（特許文献1、非特許文献13 - 24参照）。しかしながら、iPS細胞は、多能性幹細胞として機能するため、軟骨組織の再生に使用するには、均一な軟骨細胞集団に分化させる技術の確立が不可欠であり、軟骨組織の再生への実用化には、更なる技術的課題を解決する必要がある。

40

【0007】

このような従来技術を背景として、軟骨細胞のみに直接誘導でき、軟骨組織を再生可能且つ増殖能を有する細胞を開発し、変形性軟骨症の根本治療にも使用できる細胞供給源の提供を実現させることが切望されている。

【先行技術文献】

50

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】国際公開第2007/069666号パンフレット

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】W. Hunter, *Philos Trans Lond* 42, 514 (1743).【非特許文献2】C. Chung and J. A. Burdick, *Adv Drug Deliv Rev* 60 (2), 243 (2008).【非特許文献3】J. Gao, J. Q. Yao, and A. I. Caplan, *Proc. Inst. Mech. Eng. [H]*. 221 (5), 441 (2007). 10【非特許文献4】U. R. Goessler, P. Bugert, K. Bieback et al., *Int. J. Mol. Med.* 14 (6), 1015 (2004).【非特許文献5】J. Kramer, C. Hegert, K. Guan et al., *Mech. Dev.* 92 (2), 193 (2000).【非特許文献6】N. S. Hwang, M. S. Kim, S. Sampattavanich et al., *Stem Cells* 24 (2), 284 (2006).【非特許文献7】N. S. Hwang, S. Varghese, and J. Elisseeff, *PLoS ONE* 3 (6), e2498 (2008).【非特許文献8】V. Vacanti, E. Kong, G. Suzuki et al., *J. Cell. Physiol.* 205(2), 194 (2005). 20【非特許文献9】A. Nagai, W. K. Kim, H. J. Lee et al., *PLoS ONE* 2 (12), e1272 (2007).【非特許文献10】M. Amit and J. Itskovitz-Eldor, *Journal of anatomy* 200 (Pt3), 225 (2002).【非特許文献11】E. J. Koay, G. M. Hoben, and K. A. Athanasiou, *Stem Cells* 25 (9), 2183 (2007).【非特許文献12】S. Wakitani, K. Takaoka, T. Hattori et al., *Rheumatology (Oxford)*. 42 (1), 162 (2003).【非特許文献13】T. Aoi, K. Yae, M. Nakagawa et al., *Science* 321 (5889), 699 (2008). 30【非特許文献14】M. Nakagawa, M. Koyanagi, K. Tanabe et al., *Nat. Biotechnol.* 26 (1), 101 (2008).【非特許文献15】K. Takahashi, K. Okita, M. Nakagawa et al., *Nature protocols* 2 (12), 3081 (2007).【非特許文献16】K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki et al., *Cell* 131 (5), 861 (2007).【非特許文献17】K. Takahashi and S. Yamanaka, *Cell* 126 (4), 663 (2006).【非特許文献18】K. Okita, T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Nature* 448 (7151), 313 (2007).【非特許文献19】M. Wernig, A. Meissner, R. Foreman et al., *Nature* 448 (7151), 318 (2007). 40【非特許文献20】N. Maherali, R. Sridharan, W. Xie et al., *Cell stem cell* 1(1), 55 (2007).【非特許文献21】A. Meissner, M. Wernig, and R. Jaenisch, *Nat. Biotechnol.* 25 (10), 1177 (2007).【非特許文献22】M. Wernig, A. Meissner, J. P. Cassady et al., *Cell stem cell* 2 (1), 10 (2008).【非特許文献23】J. Yu, M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto et al., *Science* 318 (5858), 1917 (2007).【非特許文献24】I. H. Park, R. Zhao, J. A. West et al., *Nature* 451 (7175), 141 50

(2008).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

そこで、本発明は、上記従来技術の課題を解決することを目的とする。より具体的には、本発明は、軟骨組織を再生可能であり、且つ増殖能を有する細胞を開発し、変形性軟骨症の根本治療にも使用できる細胞供給源を提供するための技術を確立することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意検討したところ、多数存在する分化細胞の初期化因子と軟骨関連遺伝子の中から、Mycファミリー遺伝子及び/又はKlfファミリー遺伝子と、SOX9遺伝子との組み合わせを選択し、これらを体細胞に導入することによって、軟骨細胞と同等の特性を有する増殖可能な軟骨細胞様細胞を製造できることを見出した。実際、斯くして得られた軟骨細胞様細胞は、単層培養(monolayer culture)にて増殖可能であり、軟骨特異的のマーカを発現することを確認した。更に、上記軟骨細胞様細胞は、コラーゲンを足場として用いて培養した場合、或いは足場を使用せずに生体内に投与した場合に軟骨組織を形成できることを確認した。本発明は、これらの知見に基づいて、更に検討を重ねることにより完成したものである。

【0012】

即ち、本発明は、下記に掲げる態様の発明を提供する。

項1. 体細胞に、Mycファミリー遺伝子及びKlfファミリー遺伝子よりなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子と、SOX9遺伝子とを導入する工程を含む、軟骨細胞様細胞の製造方法。

項2. Mycファミリー遺伝子が、c-Myc遺伝子である、項1に記載の製造方法。

項3. Klfファミリー遺伝子が、Klf4遺伝子である、項1又は2に記載の製造方法。

項4. 体細胞が、ヒト由来である、項1乃至3のいずれかに記載の製造方法。

項5. 体細胞が、皮膚線維芽細胞又は脂肪組織由来間質細胞である、項1又は2に記載の製造方法。

項6. 体細胞に、Mycファミリー遺伝子及びKlfファミリー遺伝子よりなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子と、SOX9遺伝子とを導入することにより得られる、軟骨細胞様細胞。

項7. Mycファミリー遺伝子が、c-Myc遺伝子である、項6に記載の軟骨細胞様細胞。

項8. Klfファミリー遺伝子が、Klf4遺伝子である、項6又は7に記載の軟骨細胞様細胞。

項9. 体細胞が、ヒト由来である、項6乃至8のいずれかに記載の軟骨細胞様細胞。

項10. 体細胞が、皮膚線維芽細胞又は脂肪組織由来間質細胞である、項6乃至9のいずれかに記載の軟骨細胞様細胞。

項11. 項6乃至9のいずれかに記載の軟骨細胞様細胞を含む、軟骨組織再生用の細胞製剤。

項12. 更に、足場材料を含む、項11に記載の軟骨組織再生用の細胞製剤。

項13. 足場材料が、コラーゲンである、項12に記載の軟骨組織再生用の細胞製剤。

項14. 項6乃至8のいずれかに記載の軟骨細胞様細胞を用いて構築させた軟骨組織を含む、インプラント。

項15. 下記工程を含む、軟骨組織用のインプラントの製造方法：

項6乃至8のいずれかに記載の軟骨細胞様細胞を哺乳動物の体内に投与する工程、及び哺乳動物の体内で上記軟骨細胞様細胞から形成された軟骨組織を摘出する工程。

項16. 下記工程を含む、軟骨疾患の治療方法：

項6乃至8のいずれかに記載の軟骨細胞様細胞を軟骨疾患の患者の軟骨組織以外の部位に投与する工程、及び

10

20

30

40

50

上記軟骨細胞様細胞から形成された軟骨組織を摘出し、これを前記患者の軟骨疾患部位に移植する工程。

項 17 . 項 6 乃至 9 のいずれかに記載の軟骨細胞様細胞の、軟骨組織再生用の細胞製剤の製造のための使用。

項 18 . 軟骨組織再生用の細胞製剤が、軟骨疾患の治療剤である、項 17 に記載の使用。

項 19 . 項 6 乃至 9 のいずれかに記載の軟骨細胞様細胞、及び足場材料を含む組成物の、軟骨組織再生用の細胞製剤の製造のための使用。

項 20 . 足場材料が、コラーゲンである、項 19 に記載の使用。

項 21 . 項 6 乃至 9 のいずれかに記載の軟骨細胞様細胞を非ヒト哺乳動物に投与して、上記哺乳動物の体内で上記軟骨細胞様細胞から軟骨組織を形成させることにより製造される、軟骨組織を形成させた非ヒト哺乳動物。

10

項 22 . 項 21 に記載の非ヒト哺乳動物に被験物質を投与し、軟骨組織に対する被験物質の薬効を判定する工程を含む、軟骨組織に対する被験物質の薬効を判定する方法。

項 23 . Mycファミリー遺伝子及びKlfファミリー遺伝子よりなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子と、SOX9遺伝子とを含む、軟骨細胞様細胞調製用組成物。

項 24 . Mycファミリー遺伝子及びKlfファミリー遺伝子よりなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子と、SOX9遺伝子とが、体細胞に導入可能な形態で含まれる、項 23 に記載の軟骨細胞様細胞調製用組成物。

【発明の効果】

20

【0013】

本発明によれば、軟骨細胞と同等の特性を有する増殖可能な軟骨細胞様細胞を提供できるので、変形性軟骨症等の軟骨の損傷を伴う軟骨疾患の治療に有効な医療手段を提供することができる。また、本発明によれば、変形性関節症のみならず軟骨形成異常症等の成長軟骨疾患も含めた広範な軟骨疾患の患者の体細胞から軟骨細胞様細胞を作製でき、様々な解析を行うことで疾患の病態解明に寄与できる。特に、ヒトから作製した軟骨細胞様細胞は、創薬や薬品開発の材料としても適している。

【0014】

更に、本発明によれば、皮膚繊維芽細胞や皮下脂肪組織由来間質細胞等の皮膚組織由来の体細胞から軟骨細胞様細胞を得ることができるので、患者や細胞提供者の負担が軽減される点からも、临床上の有用性が高いといえる。

30

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】Col11a2-geoトランスジェニックマウス及び該マウスから単離した初代軟骨細胞、MEF、及びMDFの特性について評価した結果を示す図である。aは、トランスジェニックマウスに導入した導入遺伝子の構成を示す。bの左図はX-gal染色したCol11a2-geoトランスジェニックマウスの像を示し、bの右図はX-gal染色Col11a2-geoトランスジェニックマウスの軟骨について組織分析した結果を示す。cの左図はgeoトランスジェニックマウスから調製された初代軟骨細胞の位相差顕微鏡で観察した結果を示し、cの右図はgeoトランスジェニックマウスから調製された初代軟骨細胞をX-gal染色した結果を示す。dは、geoトランスジェニックマウスから調製した初代軟骨細胞、MEF、及びMDF、並びに野生型のF1ハイブリッドマウスから調製した初代軟骨細胞を、0~900µg/mlのG418の存在下でインキュベートした結果を示す。d中、「Tg」はgeoトランスジェニックマウス由来であることを示し、「WT」は野生型のリッターメイトマウス由来であることを示す。「Tg」及び「WT」の表記は、他図でも、同様の意味で使用する。

40

【図2】MEFに各因子を導入した細胞について分析した結果を示す図である。aは、MEFに各因子を導入して得られたコロニーについて、アルシアンブルー染色及びクリスタルバイオレット染色により計測された染色コロニー数を示す。a中、「4R」は、4つの初期化因子(Oct3/4、Sox2、c-Myc及びKlf-4)を示す。「4R」の表記は、他図でも、同様の意味で使用する。bは、MEFに4つの初期化因子(Oct3/4、Sox2、c-Myc及びKlf-4)とヒトSO

50

X9を同時に形質導入して得られた細胞をアルシアンブルー染色及びクリスタルバイオレット染色した結果を示す。cは、MEFに4つの初期化因子(Oct3/4、Sox2、c-Myc及びKlf-4)とヒトSOX9を同時に形質導入して得られたコロニーに含まれる細胞の形状を観察した結果を示す。dは、MEF形状を観察した結果を示す。eは、3つの初期化因子とSox9を導入して得られたコロニーについて、アルシアンブルー染色及びクリスタルバイオレット染色を行って計測された染色コロニー数を示す。e中、「4R - c-Myc」は、4つの初期化因子(Oct3/4、Sox2、c-Myc及びKlf-4)の内、c-Mycが含まれないこと；「4R - Klf4」は、4つの初期化因子(Oct3/4、Sox2、c-Myc及びKlf-4)の内、Klf-4が含まれないこと；「4R - Oct3/4」は、4つの初期化因子(Oct3/4、Sox2、c-Myc及びKlf-4)の内、Oct3/4が含まれないこと；並びに、「4R - Sox2」は、4つの初期化因子(Oct3/4、Sox2、c-Myc及びKlf-4)の内、Sox2が含まれないことを、それぞれ示す。これらの表記は、他図でも、同様の意味で使用する。fは、MEFにc-Myc、Klf4及びSox9をMEFに形質導入して得られたコロニーに含まれる細胞の形状を観察した結果を示す。

10

【図3】MDFに各因子を導入した細胞について分析した結果を示す図である。A~Cは、MDFに各因子を種々組み合わせて導入して得られたコロニーについて、アルシアンブルー染色及びクリスタルバイオレット染色により計測された染色コロニー数、並びに多角形状の細胞から構成されるコロニーの数を示す。Dは、MDFに各因子を導入して得られたコロニーに含まれる細胞の形態を観察した結果を示す。Eは、MDFに各因子を導入して得られたコロニーに含まれる細胞を培養し、各細胞の形状を観察した結果を示す図である。

【図4】MDFに各因子を導入して得られた細胞(クローン化細胞)の特性を評価した結果を示す図である。Aは、MDFに各因子を導入して得られた細胞及びMDFにアルシアンブルー染色した結果を示す。Bは、MDFに各因子を導入して得られた細胞、MDF、及び初代軟骨細胞について、RT-PCR分析により導入遺伝子(導入因子)の発現を分析した結果を示す。B中、「Pr chond.」は初代軟骨細胞を示す。「Pr chond.」の表記は、他図でも、同様の意味で使用する。Cは、MDFに各因子を導入して得られた細胞、MDF、及び初代軟骨細胞について、ウエスタンブロットにより導入遺伝子(導入因子)の発現を分析した結果を示す。

20

【図5】MDFに各因子を導入して得られた細胞(クローン化細胞)の特性を評価した結果を示す図である。aは、MDFに各因子を導入して得られた細胞、MDF、及び初代軟骨細胞について、軟骨細胞マーカー遺伝子の発現を分析した結果を示す。bは、MDFに各因子を導入して得られた細胞、MDF、及び初代軟骨細胞について、MDFマーカー遺伝子の発現を分析した結果を示す。cは、MDFに各因子を導入して得られた細胞(MK-4、MK0-2)の核型を分析した結果を示す。

30

【図6】MDFに各因子を導入して得られた細胞(クローン化細胞)の特性を評価した結果を示す図である。aは、初代軟骨細胞及びMDFについて、遺伝子発現パターンを比較した図である。bは、MK-3及び初代軟骨細胞について、遺伝子発現パターンを比較した図である。cは、MK-3及びMDFについて、遺伝子発現パターンを比較した図である。dは、MDFに各因子を導入して得られた細胞、MDF、及び初代軟骨細胞についてクラスター分析した結果である。eは、MK-3、MK-4及びMDFについて、ジヌクレオチドのメチル化状態を、バイスルファイトゲノム配列決定分析によって分析した結果である。e中、黒丸は各遺伝子におけるCpGジヌクレオチドの内、メチル化されているものを示し、白丸は各遺伝子におけるCpGジヌクレオチドの内、メチル化されていないものを示す。

40

【図7】MDFに各因子を導入して得られた細胞(クローン化細胞)の特性を評価した結果を示す図である。aは、MDFに各因子を導入して得られた細胞、及びMDFの増殖特性を分析した結果を示す図である。bは、MDFに各因子を導入して得られた細胞、及びMDFを培養した後に、アルシアンブルー染色を行った結果を示す図である。cは、MK-3及びMDFを用いてコラーゲンゲル培養を行い、形成されたゲル-細胞複合物を分析した結果を示す図である。

【図8】MDFに、c-Myc、Klf-4、及びSox9と共にGFPを導入して得られた細胞(MK-5)をヌードマウスの皮下に注入した結果を示す図である。Aは、ヌードマウスの全身を観察し

50

た結果を示す（右に蛍光発色の観察結果を示す）。Bは、ヌードマウスの背部の皮膚を剥ぎ取った状態を観察した結果を示す（右に蛍光発色の観察結果を示す）。Cは、細胞懸濁液を注入したマウスの皮下部位から得られた連続組織切片をサフラニンOで染色した結果を示す。Dは、Cの四角で囲んで部分の拡大図を示す。

【図9】MDFに対してc-Myc、Klf-4、及びSox9を導入して得られた細胞（軟骨細胞様細胞）をヌードマウスの皮下に注入し、注入部の組織を観察した結果を示す図である。Aには、MDFに対してc-Myc、Klf-4、及びSox9を導入して得られた細胞（MK-7）の注入後16週における注入部の組織について、サフラニンO、ファーストグリーン、及びアイアンヘマトキシリンで染色した結果を示す。Bには、MDFに対してc-Myc、Klf-4、及びSox9を導入して得られた細胞（MK-10）の注入後8週における注入部の組織について、サフラニンO、ファーストグリーン、及びアイアンヘマトキシリンで染色した結果を示す。

10

【図10】実施例1及び2で作製した各軟骨細胞様細胞のゲノムDNAに対して、Klf4 cDNAプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果を示す。

【図11】脂肪組織由来間質細胞にc-Myc、Klf-4、及びSox9を導入して得られたコロニーについて、アルシアンブルー染色及びクリスタルバイオレット染色により計測された染色コロニー数、並びに多角形状の細胞から構成されるコロニーの数を示す。

【図12】NHDFに、OCT3/4、C-MYC、KLF-4、SOX9を導入した細胞について分析した結果を示す図である。aは、OCT3/4、C-MYC、KLF-4、及びSOX9を導入したNHDFの培養ディッシュ（MKO）、並びにEGFPを導入したNHDFの培養ディッシュ（EGFP）について、アルシアンブルー染色した結果を示す図である。bは、OCT3/4、C-MYC、KLF-4、及びSOX9をNHDFに導入して得られたコロニーに含まれる細胞の形状を観察した結果を示す。cは、EGFPを導入したNHDFの培養ディッシュの細胞の形状を観察した結果を示す。dは、ヒト初代軟骨細胞の形態を示す図である。本図は、Cell Applications, INC.のホームページ（http://www.cellapplications.com/product_desc.php?id=33&category_id=51&subcategory_id=68）からコピーしたものである。

20

【発明を実施するための形態】

【0016】

1. 軟骨細胞様細胞の製造方法、及び軟骨細胞様細胞の用途

本発明において、「軟骨細胞様細胞」とは、増殖能を有し、且つ軟骨細胞と同特性を備えており、軟骨組織を形成又は再生する能力を備えている細胞（換言すれば、軟骨幹細胞）のことを意味する。ここで、「軟骨細胞と同特性」とは、軟骨細胞に対する特異的染色に対して陽性を示し、軟骨細胞マーカー遺伝子を発現していることを意味する。

30

【0017】

本発明の軟骨細胞様細胞の製造方法は、体細胞に、Mycファミリー遺伝子及びKlfファミリー遺伝子よりなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子と、SOX9遺伝子とを導入する工程を含むことを特徴とする。以下、本発明の製造方法について詳述する。

【0018】

本発明において、軟骨細胞様細胞に誘導される体細胞としては、その種類については特に制限されず、あらゆる組織又は部位由来のものが使用できる。本発明で使用される体細胞としては、例えば、皮膚、皮下脂肪、筋肉、胎盤、骨、軟骨等の組織由来のものが挙げられ、より具体的には、皮膚線維芽細胞、皮下脂肪組織由来間質細胞（皮下脂肪細胞）、胚性線維芽細胞、脂肪細胞、筋肉細胞、骨芽細胞、軟骨細胞等が例示される。これらの中でも、生体に対して侵襲が軽微であり、且つより効率的に軟骨細胞様細胞を作製するという観点から、皮膚由来細胞及び皮下脂肪由来細胞が好ましく、特に皮膚線維芽細胞及び皮下脂肪組織由来間質細胞が好ましい。このように、様々な細胞から材料を選択でき、とりわけ皮膚由来細胞や皮下脂肪由来細胞等の入手容易な細胞をも使用できることは、患者の負担を軽減し、細胞の安定な入手の点でも、臨床上の利点がある。また、上記体細胞として、市販品を使用してもよく、またES細胞や間葉系幹細胞等から分化させた体細胞を使用することもできる。

40

【0019】

50

また、上記体細胞は、軟骨細胞様細胞の使用目的に応じて、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、サル等の哺乳動物由来のものから適宜選択されるが、ヒトの治療目的で使用する場合にはヒト由来のものが好適である。また、ヒト由来の体細胞を使用する場合、胎児、幼児、小児、及び成人のいずれに由来するものであってもよい。軟骨細胞様細胞をヒトの治療目的で使用する場合には、患者から採取した体細胞を使用することが望ましい。

【0020】

本発明では、初期化因子（再プログラミング因子）としてMycファミリー遺伝子及びKlfファミリー遺伝子よりなる群から選択される少なくとも1種と、軟骨誘導性の転写因子としてSOX9遺伝子とを組み合わせ、これらを上記体細胞に導入することにより、体細胞を軟骨細胞様細胞に誘導する。

10

【0021】

Mycファミリー遺伝子としては、c-Myc、N-Myc、及びL-Myc等が挙げられる。これらのMycファミリー遺伝子は、1種単独で使用してもよく、また2種以上を組み合わせ使用してもよい。これらのMycファミリー遺伝子の中でも、本発明では、好ましくはc-Myc遺伝子及びL-Myc遺伝子、更に好ましくはc-Myc遺伝子が使用される。c-Myc遺伝子は、細胞の分化及び増殖に關与する転写制御因子として知られており（S. Adhikary, M. Elilers, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 6, pp635-645, 2005）、その塩基配列は公知（NCBI accession Number NM_010849（human）、NM_002467（Mouse））である。また、N-Myc遺伝子の塩基配列（NCBI accession Number NM_005378（human）、NM_008709（Mouse））及びL-Myc遺伝子の塩基配列（NCBI accession Number NM_005376（human）、NM_008506（Mouse））についても公知である。なお、本明細書において、NCBIとは、米国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information）の略である。

20

【0022】

また、Klfファミリー遺伝子としては、Klf1、Klf2、Klf4、及びKlf5等が挙げられる。これらのKlfファミリー遺伝子は、1種単独で使用してもよく、また2種以上を組み合わせ使用してもよい。これらのKlfファミリー遺伝子の中でも、本発明では、好ましくはKlf2遺伝子、Klf4遺伝子及びKlf5遺伝子が挙げられ、更に好ましくはKlf2遺伝子及びKlf4遺伝子が挙げられ、特に好ましくはKlf4遺伝子が挙げられる。Klf4遺伝子は、腫瘍抑制因子として知られており（A.M.Ghaleb et al., Cell Res., 15, pp92-96, 2005）、その塩基配列は公知（NCBI accession Number NM_010637（human）、NM_004235（Mouse））である。また、Klf1遺伝子の塩基配列（NCBI accession Number NM_006563（human）、NM_010635（Mouse））、Klf2遺伝子の塩基配列（NCBI accession Number NM_016270（human）、NM_008452（Mouse））、及びKlf5遺伝子の塩基配列（NCBI accession Number NM_001730（human）、NM_009769（Mouse））についても公知である。

30

【0023】

また、SOX9遺伝子は、II型コラーゲン等の発現調節をする転写因子として知られており（V. Lefebvre et al., Mol. Cell. Biol. 17, pp2336-2346, 1997）、その塩基配列は公知（NCBI accession Number NM_000346（human）、NM_011448（Mouse））である。SOX9遺伝子は、他のSOXファミリー遺伝子に置換すると、軟骨細胞様細胞への誘導ができなくなる。即ち、本発明では、Mycファミリー遺伝子及び/又はKlfファミリー遺伝子と、SOX9遺伝子を組み合わせることによって、初めて軟骨細胞様細胞への誘導になり、これらの遺伝子が一体不可分の関係で使用されることが重要である。

40

【0024】

これらの3種の遺伝子の由来は、ヒトを含む哺乳動物において共通して存在しており、任意の哺乳動物由来のものを使用できるが、導入する体細胞の由来に応じて適宜選択することが望ましい。例えば、体細胞としてヒト由来のものを使用する場合であれば、上記3種の遺伝子はヒト由来であることが望ましい。また、上記3種の遺伝子は、野生型遺伝子以外に、その遺伝子産物のアミノ酸配列における数個（例えば1～10個、好ましくは1～6個、更に好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、特に好ましくは1又は2個

50

)のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は挿入されており、且つ、野生型の遺伝子産物と同等の機能を有する変異遺伝子産物をコードしている変異遺伝子であってもよい。

【0025】

本発明において、上記3種の遺伝子は、公知の配列情報に基づいて、常法に従って調製することができる。例えば、哺乳動物由来の細胞からRNAを抽出し、常法に従ってクロニングすることにより、目的とする遺伝子のcDNAを調製することができる。

【0026】

本発明において、体細胞に導入される遺伝子は、初期化因子としてMycファミリー遺伝子及びKlf4ファミリー遺伝子のいずれか少なくとも1つの遺伝子と、SOX9遺伝子との組み合わせであればよいが、軟骨細胞様細胞への誘導効率を高めるという観点から、好ましくはMycファミリー遺伝子の少なくとも1種と、Klfファミリー遺伝子の少なくとも1種と、SOX9遺伝子の組み合わせ；更に好ましくはc-Myc遺伝子又はN-Myc遺伝子と、Klf2遺伝子又はKlf4遺伝子とSOX9遺伝子の組み合わせ；特に好ましくはc-Myc遺伝子と、Klf4遺伝子と、SOX9の3つの遺伝子の組み合わせが例示される。

10

【0027】

上記2種以上の遺伝子の体細胞への導入は、動物細胞のトランスフェクションにおいて通常使用される方法で行うことができる。具体的には、上記2種又は3種の遺伝子を体細胞へ導入する方法として、ベクターを使用する方法；リン酸カルシウム法；リポフェクション法；エレクトロポレーション法；マイクロインジェクション法等が例示される。これらの中でも、導入効率の点から、ベクターを使用する方法が好ましい。ベクターを使用して上記2以上の遺伝子を体細胞に導入する場合には、ベクターとして、ウイルスベクター、非ウイルスベクター、人工ウイルス等を用いることができるが、アデノウイルス及びレトロウイルス等のウイルスベクターが、安全性の観点から好適に使用される。なお、ベクターを使用する場合、上記2種以上の遺伝子は、各々別のベクターに組み込まれていてもよく、1つのベクターに2種以上の遺伝子が組み込まれていてもよい。

20

【0028】

斯くして上記2種以上の遺伝子が導入された体細胞は、体細胞が初期化されると同時に、軟骨細胞と同等の特性を有する増殖可能な軟骨細胞様細胞に誘導される。上記2種以上の遺伝子が導入された体細胞の中から、軟骨細胞様細胞に誘導された細胞の選択は、細胞の増殖能の有無、及び軟骨細胞と同等の特性を有するか否かを指標として行うことができる。このような軟骨細胞様細胞の選択は、具体的には、増殖能を有する細胞の中から、細胞の形状、軟骨細胞に対する特異的染色の有無、細胞の軟骨細胞マーカー遺伝子の発現の有無等を指標として行うことができる。体細胞に、予め軟骨細胞マーカー遺伝子のプロモーターに薬剤耐性遺伝子を結合して作ったレポーター遺伝子コンストラクトを導入しておいた場合には、軟骨の特性を獲得した細胞は薬剤存在下で生育可能になるので、薬剤存在下での生育を指標として、軟骨の特性を獲得した細胞を選択することもできる。また、軟骨細胞様細胞は、液体培地で単層培養すると、円形又は多角形状の形状を呈するので、かかる形状を上記指標とすることができる。更に、軟骨細胞様細胞は、軟骨細胞に特異的に発現するグルコサミノグリカンを有しているので、グルコサミノグリカンを染色できるアルシアンブルーを使用し、その染色の有無を上記指標とすることもできる。更に、軟骨細胞様細胞は、軟骨細胞マーカー遺伝子(Col2a1、Acan、SOX5等)を発現しているので、当該マーカー遺伝子の発現の有無を上記指標とすることもできる。

30

40

【0029】

斯くして得られた軟骨細胞様細胞は、液体培地中で単層培養すると増殖可能であり、通常9~21継代程度まで、軟骨細胞の特性を維持したまま安定に増殖することができる。また、軟骨細胞様細胞の培養には、動物細胞の培養に通常使用される培地を用いることができる。軟骨細胞様細胞の培養に使用される好適な培地の一例として、1~25容量%程度のFBSを含むDMEM培地が例示される。

【0030】

また、斯くして得られた軟骨細胞様細胞は、in vivoで軟骨組織に適用されると該軟骨

50

組織を足場として三次元構造の新たな軟骨組織を形成でき、またin vitroで足場材料の存在下で培養すると、三次元構造の軟骨組織を形成することができる。

【0031】

このように、本発明で得られる軟骨細胞様細胞は、増殖能を有しており、且つ生体内で軟骨組織の再生が可能であるので、変形性軟骨症、軟骨形成異常症関節炎（例えば、関節リウマチ等）、外傷、骨壊死等の軟骨疾患の治療に有効であり、軟骨組織再生用の細胞製剤（医薬組成物）として使用できる。上記軟骨細胞様細胞は、そのまま単独で軟骨疾患部位に適用してもよく、或いは足場材料と共に軟骨疾患部位に適用してもよい。また、上記軟骨細胞様細胞を足場材料と共に軟骨疾患部位に適用する場合には、上記軟骨細胞様細胞と足場材料とを個別に軟骨疾患部位に適用してもよいが、後述するように上記軟骨細胞様細胞と足場材料とを含む細胞製剤を使用することにより、これらを同時に軟骨疾患部位に適用することが望ましい。

10

【0032】

上記軟骨細胞様細胞を軟骨組織再生用の細胞製剤として調製する場合、上記軟骨細胞様細胞と共に、必要に応じて、薬学的に許容される希釈用担体を含んでいてもよい。ここで、薬学的に許容される希釈用担体としては、例えば、生理食塩水、緩衝液等が例示される。更に、当該細胞製剤は、必要に応じて、薬理活性成分や軟骨細胞様細胞の栄養源となる成分が含まれていてもよい。

【0033】

また、当該細胞製剤は、上記軟骨細胞様細胞が足場（スキャフォールド）材料を含んでいることが望ましい。当該細胞製剤が足場材料を含む場合には、上記軟骨細胞様細胞は、当該足場材料に担持されている状態で含まれていることが望ましい。このように足場材料を使用することによって、上記軟骨細胞様細胞の軟骨組織の疾患部位での生着率を高めて、軟骨組織再生を一層促進することが可能になる。

20

【0034】

使用可能な足場材料としては、薬学的に許容される限り、特に制限されず、適用する軟骨組織の部位に応じて適宜選択されるが、例えば、ゲル状体又は多孔体で、生体分解性（biodegradable）又は生体吸収性（bioresorbable）の材料が挙げられる。使用可能な足場材料として、好ましくはコラーゲン、ヒドロシキアパタイト、 β -TCP（リン酸三カルシウム）、 β -TCP（リン酸三カルシウム）、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、及びこれらの複合体等が例示される。これらの足場材料は、1種単独で使用してもよく、2種以上を組み合わせ使用してもよい。これらの足場材料の中でも、軟骨組織の再生の効率化の観点からコラーゲンが好ましい。なお、足場材料として、コラーゲンを使用する場合には、ゲル状にして三次元構造に調製しておくことが望ましい。

30

【0035】

また、上記足場材料の形状についても特に制限されず、当該細胞製剤の適用対象となる軟骨組織の損傷部位の形状に応じて適宜設計すればよい。

【0036】

足場材料に上記軟骨細胞様細胞を担持させるには、例えば、上記軟骨細胞様細胞を足場材料に播種又は混合して培養すればよい。

40

【0037】

当該細胞製剤において、足場材料に上記軟骨細胞様細胞を担持又は上記軟骨細胞様細胞により三次元構造の軟骨組織を構築させる場合、足場材料に対して使用される上記軟骨細胞様細胞の割合については、適用対象となる軟骨組織の部位、足場材料の種類等に応じて適宜設定すればよいが、一例として、足場材料1 cm³当たり、上記軟骨細胞様細胞が $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ cellsとなる割合が例示される。

【0038】

当該細胞製剤を軟骨組織の疾患部位に適用する方法については、当該細胞製剤のタイプ、適用される軟骨組織の部位等に応じて適宜設定されるが、例えば、切開して治療目的の軟骨組織の疾患部位に当該細胞製剤を直接注入する方法、或いは治療目的の軟骨組織の疾

50

患部位に関節鏡を利用して当該細胞製剤を注入する方法等が挙げられる。

【0039】

また、軟骨組織の疾患部位に適用される当該細胞製剤の投与量については、細胞製剤のタイプ、軟骨組織の部位、症状の程度、患者の年齢や性別等に基づいて、軟骨組織の再生に有効な量を適宜設定すればよい。

【0040】

更に、上記軟骨細胞様細胞を利用して三次元構造の軟骨組織を *in vitro* で構築させて、これを軟骨組織用のインプラントとして、変形性軟骨症等の軟骨欠損を伴う軟骨疾患の治療に使用することもできる。

【0041】

上記軟骨細胞様細胞により三次元構造の軟骨組織を構築させるには、例えば、上記軟骨細胞様細胞を足場材料に播種して、上記軟骨細胞様細胞が生育可能な培地中で三次元構造の軟骨組織が構築されるまで培養すればよい。より具体的には、足場材料 1 cm^3 当たり、上記軟骨細胞様細胞を $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ cells 程度播種して、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下 37°C で、1~4週間程度培養すればよい。上記三次元構造の軟骨組織の構築に使用される足場材料は、上記細胞製剤に使用可能なものと同様である。また、足場材料の形状については、目的とするインプラントの形状に応じて適宜設定すればよい。また、三次元構造の軟骨組織を構築させる際に使用される培地については、上記軟骨細胞様細胞が生育可能であるものであれば特に制限されず、一例として1~25容量%程度のFBSを含むDMEM培地が挙げられるが、臨床応用の観点からは、無血清で組成が明確である培地 (defined serum-free medium) を使用

10

20

【0042】

斯くして調製される三次元構造の軟骨組織は、足場材料を含んだ状態で、或いは足場材料を取り除いた状態で、軟骨組織用のインプラントとして使用される。

【0043】

上記インプラントの軟骨組織の疾患部位に適用する方法については、当該インプラントの形状や適用される軟骨組織の部位等に応じて適宜設定されるが、例えば、切開して治療目的の軟骨組織の疾患部位に当該インプラントを直接組み込む方法が挙げられる。

【0044】

また、上記軟骨細胞様細胞は、軟骨組織以外の生体内部位に投与しても、軟骨組織を形成することができる。従って、上記軟骨細胞様細胞を哺乳動物の生体内に投与し、哺乳動物の生体内で上記軟骨細胞様細胞から軟骨組織を形成させた後に、軟骨組織を摘出することによって、軟骨組織用のインプラントを得ることもできる。

30

【0045】

このような、軟骨組織用のインプラントの製造において、使用される哺乳動物は、ヒトであってもよく、またマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、サル等の非ヒト哺乳動物であってもよい。また、軟骨組織用のインプラントの製造において、上記軟骨細胞様細胞が投与される部位については、特に制限されないが、形成された軟骨組織の摘出容易性の観点から、皮下、特に背部の皮下が好適である。また、軟骨組織用のインプラントの製造において、上記軟骨細胞様細胞を足場 (スキャフォールド) 材料と共に投与してもよいが、足場を含むことなく上記軟骨細胞様細胞を単独で投与してもよい。このように足場を投与しなくても、上記軟骨細胞様細胞は、生体内で十分な大きさの軟骨組織を形成することができる。

40

【0046】

軟骨組織用のインプラントの製造において、哺乳動物に対する上記軟骨細胞様細胞の投与量については、特に制限されないが、通常 $10^4 \sim 10^8$ cells 程度、好ましくは $10^5 \sim 10^7$ cells 程度が挙げられる。また、上記軟骨細胞様細胞を哺乳動物に投与した後に、14~35日後、好ましくは21~28日後に、軟骨組織の形成が認められる。

【0047】

また、上記軟骨組織用のインプラントの製造を軟骨疾患の患者の生体内で行って、製造

50

された軟骨組織を当該患者の軟骨疾患部位に移植してもよい。即ち、上記軟骨細胞様細胞を、軟骨疾患の患者の軟骨組織以外の部位に投与し、患者の生体内で上記軟骨細胞様細胞から軟骨組織を形成させた後に、軟骨組織を摘出して当該患者の軟骨疾患部位に投与することによって、軟骨疾患の移植治療をすることもできる。

【0048】

また、上記軟骨細胞様細胞が投与されて、上記軟骨細胞様細胞から形成された軟骨組織を有する非ヒト哺乳動物は、軟骨組織に対する被験物質の薬効を評価するためのツールとして使用できる。即ち、上記軟骨細胞様細胞から形成された軟骨組織を有する非ヒト哺乳動物に被験物質を投与し、当該軟骨組織に対する被験物質の薬効を判定することによって、軟骨組織に対する被験物質の薬効を評価することができる。ここで、被験物質とは、軟骨組織に対する薬効の評価対象となる物質であり、具体的には、軟骨疾患の治療薬の候補物質が挙げられる。

10

【0049】

また、上記軟骨細胞様細胞は、様々な軟骨疾患の病態を解明するためのツールとして使用でき、更にはヒト体細胞から誘導した軟骨細胞様細胞は、軟骨疾患に関する創薬や薬品開発のためのツールとしても有用である。

【0050】

2. 軟骨細胞様細胞調製用組成物

前述するように、Mycファミリー遺伝子及びKlfファミリー遺伝子よりなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子と、SOX9遺伝子とを組み合わせることで体細胞に導入することにより、軟骨細胞様細胞を調製できる。従って、本発明は、更に、Mycファミリー遺伝子及びKlfファミリー遺伝子よりなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子と、SOX9遺伝子とを含む、軟骨細胞様細胞調製用組成物を提供する。当該軟骨細胞様細胞調製用組成物は、体細胞から軟骨細胞様細胞を誘導するために使用される初期化因子と軟骨誘導性の転写因子のセットを含むものであり、上記2種以上の遺伝子が体細胞に導入可能な形態で含まれていることが望ましい。上記2種以上の遺伝子が体細胞に導入可能な形態として、具体的には、上記2種以上の遺伝子が組み込まれたベクターが例示される。ここで、上記2種以上の遺伝子は、各々別のベクターに組み込まれていてもよく、1つのベクターに2種以上の遺伝子が同時に組み込まれていてもよい。

20

【0051】

当該軟骨細胞様細胞調製用組成物に使用される遺伝子、ベクターの種類等については、前述の通りである。

30

【実施例】

【0052】

以下に、実施例等に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

【0053】

実施例 1 皮膚線維芽細胞及び胚性線維芽細胞からの軟骨細胞様細胞の製造

1. Col11a2-geoトランスジェニックマウスの作製

<方法>

まず、図1aに示すCol11a2プロモーター/エンハンサー配列の制御下で -geo (-ガラクトシダーゼ遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子との融合遺伝子) を発現するトランスジェニックマウスを、以下に示す手順で作製した。

40

【0054】

2(XI) コラーゲン遺伝子ベースの発現ベクターである742LacZIntは、マウスCol11a2プロモーター (-742~+380)、SV40 RNAプライス部位、 -ガラクトシダーゼレポーター遺伝子、SV40ポリアデニル化シグナル、及びエンハンサーとしてのCol11a2の2.34-kbの第1イントロン配列を含む(参考文献1)。 geo導入遺伝子を作製するために、0.8-kbネオマイシン耐性遺伝子フラグメントを、LacZをコードする3.1-kb cDNAフラグメントの3'末端へ連結した。 geoフラグメントをLacZ遺伝子と置換して742LacZInt発現ベクターのN

50

ot 1部位に組み込み、Col11a2- geoプラスミドを作製した。

【0055】

Col11a2- geoプラスミドを、EcoRI及びPstIで消化し、当該プラスミド内の挿入物 (inserts) を放出させた。参考文献1と同様の方法で、F1ハイブリッドマウス (C57BL/6 x DBA) 由来の受精卵の前核へ前記挿入物をマイクロインジェクトすることによって、トランスジェニックマウスを作製した。尾から抽出されたゲノムDNAのPCRアッセイによって、トランスジェニックマウスを同定した。具体的には、LacZ遺伝子を認識するプライマー (CGC TAC CAT TAC CAG TTG: 配列番号1) とネオマイシン耐性遺伝子を認識するプライマー (CCA GTC ATA GCC GAA TAG: 配列番号2) を使用して、導入遺伝子特異的PCRによってゲノムDNAを増幅し、 geoトランスジェニックマウスに特異的に含まれる135-bp産物を増幅させ、トランスジェニックマウスの同定を行った。上記で同定されたトランスジェニックマウスを、少なくとも4世代の間、C57BL/6系マウスと交配させた。

【0056】

斯くして作成されたトランスジェニックマウスについて、参考文献2に記載の方法に従って、マウス身体及び切片のX-gal染色を行った。

【0057】

<結果>

2 (XI) コラーゲン鎖は、軟骨組織構造を支持する軟骨特異的基質タンパク質であり、衝撃吸収の軟骨機能において重要な役割を果たす。Col11a2プロモーター/エンハンサー配列は、特異的に軟骨で発現することが分かっている (参考文献1)。Col11a2プロモーターは、インシュレーター活性を含み、トランスジェニックマウスにおける安定な導入遺伝子発現に寄与すると考えられる。上記トランスジェニックマウスをX-gal染色したところ、軟骨細胞において特異的にLacZ活性を示したが、他の組織においては示さなかった (図1のbの左図参照)。また、組織学的分析によって、全ての軟骨細胞が geoを発現していることが確認された (図1のbの右図参照)。

【0058】

2. Col11a2- geoトランスジェニックマウスからのマウス胚性線維芽細胞、成体マウス皮膚線維芽細胞、及び初代軟骨細胞の分離及び分析

<方法>

上記で得られたトランスジェニックマウスを用いて、マウス胚性線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast) (MEF)、成体マウス皮膚線維芽細胞 (adult mouse dermal fibroblast) (MDF)、及び初代軟骨細胞を、以下の手順に従って単離した。

【0059】

MEFは、参考文献3と同様の方法で分離した。具体的には、先ず、13.5 dpc胚から頭部および内臓組織を除去した。次いで、残りの身体を細かく刻み、トリプシン処理した後に、チューブに移した。細胞を遠心分離によって回収し、これを10%FBSを含有するDMEM培地に懸濁させた。次いで、得られた細胞 1×10^6 cellsを100 mmディッシュで培養することにより、MEF (第1継代) を得た。

【0060】

MDFは、3~6月齢のトランスジェニックマウスから調製した。具体的には、トランスジェニックマウスの体毛を剃り落とした後、皮膚を細切した後に、37°Cで4時間トリプシン処理した。トリプシン処理により遊離した細胞を、ナイロンメッシュ (細孔サイズ、40 μ m; Tokyo Screen, Tokyo, Japan) で濾過し、単細胞の懸濁液を作製し、これを100 mmディッシュで培養することにより、MDF (第1継代) を得た。

【0061】

初代軟骨細胞は、参考文献4と同様の方法で分離した。具体的には、トランスジェニックマウスを解剖し、その上腕骨及び大腿骨の骨端軟骨を、2%FBS及びストレプトマイシン/ペニシリンを含むDMEM培地中で分離して採取した。骨端軟骨の付着組織及び軟骨膜を、37°Cで30分間コラーゲナーゼ (II型、Sigma) 消化 (DMEM/2%FBS中2mg/ml) 後、物理的に除去した。次いで、付着組織及び軟骨膜が除去された骨端軟骨を、コラーゲナーゼ溶液中

10

20

30

40

50

で2~4時間処理して、初代軟骨細胞を遊離させた。遊離した細胞を遠心分離(4で5分間200×g)により回収し、そして新鮮な培地に懸濁させた。細胞を60 mm又は100 mmディッシュに接種し、2% FBS含有DMEM培地で培養し、初代軟骨細胞を得た。

【0062】

なお、上記で得られた第1継代のMEF及びMDFは、トリプシン処理した後に、液体窒素中で凍結保存しておき、後述する試験に使用した。

【0063】

また、上記で得られた初代軟骨細胞については、X-gal染色を行って、LacZ活性を評価した。

【0064】

更に、上記で得られた初代軟骨細胞、MEF、及びMDFを、0~900 µg/mlのG418(ジェネティシン)を含む培地に添加して、5%CO₂条件下37でインキュベートし、各細胞の生育を評価した。なお、初代軟骨細胞の培養では2%FBS含有DMEM培地を使用し、MEF及びMDFの培養では10%FBS含有DMEM培地を用いた。また、比較のために、上記と同様の手法で、野生型のリッターメイトマウスから調製した初代軟骨細胞についても、同様にG418の存在下でインキュベートし、その生育を評価した。

【0065】

<結果>

geoトランスジェニックマウスから調製された初代軟骨細胞をX-gal染色したところ、約50%の細胞で染色が認められた(図1のc参照)。この結果は、軟骨細胞が脱分化したこと、又は調製時に軟骨に付着していた線維組織中の線維芽細胞がコンタミしていたことを示唆している。

【0066】

また、geoトランスジェニックマウスから調製した初代軟骨細胞、MEF、及びMDFをG418の存在下でインキュベートした結果を図1のdに示す。MEF及びMDFは、300 µg/mlのG418の存在下で完全に死滅したのに対して、トランスジェニックマウスから調製した初代軟骨細胞は、900 µg/mlのG418の存在下でも生育していた。また、野生型のF1ハイブリッドマウス(C57BL/6 x DBA)から調製した初代軟骨細胞では、その大部分が300 µg/mlのG418の存在下で死滅していた。

【0067】

3. MEFを軟骨細胞に誘導する因子の検討

<方法>

体細胞を軟骨細胞に誘導する因子を同定するために、4つの初期化因子(Oct3/4、Sox2、c-Myc及びKlf-4)と軟骨誘導性の転写因子(Sox9)を用いて上記で得られたMEFの形質転換を行い、軟骨細胞への誘導の有無を評価した。軟骨細胞表現型を示す細胞はG418に対する耐性を示すので、本試験において、G418耐性を指標として軟骨細胞への誘導の有無を確認した。具体的には、以下の手順に従って、試験を行った。

【0068】

本試験では、上記初期化因子と軟骨誘導性の転写因子の体細胞の導入は、参考文献3と同様の方法で、レトロウイルスpMXs/Plat-Eベクターシステムを使用して実施した。即ち、マウスc-Mycを組み込んだレトロウイルスベクター(pMXs-c-Myc)、マウスKlf4を組み込んだレトロウイルスベクター(pMXs-Klf4)、マウスSox2を組み込んだレトロウイルスベクター(pMXs-Sox2)、及びマウスOct3/4を組み込んだレトロウイルスベクター(pMXs-Oct3/4)を使用した。また、ヒトSOX9を組み込んだレトロウイルスベクターについては、ヒトSOX9 cDNAを、Gateway pENTR-1Aベクター(Invitrogen)に組み込み、得られたプラスミドをLR反応(Invitrogen)によってpMXs-gwに挿入したものを使用した。

【0069】

転写因子の体細胞への導入は、以下の手順で実施した。まず、100 mmディッシュに8×10⁶ cellsのPlat-E細胞を10mlの10%FBS含有DMEM培地(1 µg/ml puromycin、10 µg/ml brastidine、penicillin、及びstreptomycin含有)中に接種し、その1日後に、Fugene 6トラ

10

20

30

40

50

ンスフェクション試薬 (Roche) を使用して、Plat-E細胞に各pMXsベースのレトロウイルスベクターをトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、培地を交換した。培地交換の24時間後、Plat-E培養物からウイルス含有上澄みとして培地を回収した。

【0070】

凍結保存されたMEFを100 mmディッシュに接種した。形質導入の1日前に、MEF又はMDFをトリプシン処理した後に、100 mmディッシュに 5×10^5 cells入れて10% FBS含有DMEM培地に24時間静置培養した(第3継代)。

【0071】

上記で得られた各ウイルス含有上澄みを0.45 μ m酢酸セルロースフィルター (Schleicher & Schuell) で濾過し、得られたろ液に対してポリブレン (ナカライテスク株式会社) を終濃度4 mg/mlとなるように添加し、ウイルス溶液を調製した。形質導入させる遺伝子の組合せに応じて、各ウイルス溶液を混合し、混合ウイルス溶液を調製した。なお、混合ウイルス溶液の調製の際、混合させる各ウイルス溶液は、含有するレトロウイルスベクターの各々が等量となるように設定した。

【0072】

上記ウイルス液又はウイルス混合液を、上記で培養したMEFのディッシュに添加し、37°Cで16時間インキュベートし、レトロウイルスベクターを形質導入した。インキュベート後、ディッシュ中の細胞をトリプシン処理し、次いで新鮮な10% FBS含有DMEM培地を入れた3つの10 cmディッシュに細胞を分けて、2日間静置培養した。次いで、培地を500 μ g/mlのG418を含む10% FBS含有DMEM培地に交換して、1日おきに同組成の培地で培地交換を行いながら2週間静置培養した。

【0073】

斯くして培養された細胞は、アルシアンブルー染色を行った後にクリスタルバイオレット染色に供し、各ディッシュ中の染色されたコロニー数を計測した。ここで、染色されたコロニー数は、3つのディッシュの染色されたコロニー数の合計数をカウントすることにより計測した。なお、クリスタルバイオレット染色では全ての細胞が染色され、アルシアンブルー染色では、軟骨細胞に特異的に発現するグルコサミノグリカンが染色されるので、軟骨細胞に分化した細胞のみが染色される。

【0074】

また、比較のために、GFP cDNAを組み込んだレトロウイルスベクター (pMXs-EGFP) を用いて、上記と同様の手法でMEFへの形質転換、形質転換細胞の評価を行った。

【0075】

< 結果 >

MEFに各因子を導入した細胞について分析した結果を図2に示す。図2のaには、MEFに各因子を導入した細胞について、アルシアンブルー染色及びクリスタルバイオレット染色により計測された染色コロニー数を示す。また、図2のbには、MEFに4つの初期化因子 (Oct3/4、Sox2、c-Myc及びKlf-4) とヒトSOX9を同時に形質導入して得られた細胞をアルシアンブルー染色及びクリスタルバイオレット染色した際の結果を示す。MEFへのヒトSOX9のみの形質導入では、G418の存在下においてコロニー形成を誘導しなかった(図2のa)。また、MEFに4つの初期化因子 (Oct3/4、Sox2、c-Myc及びKlf-4) のみを形質導入した場合では、紡錘形状の非軟骨細胞様形態を有する細胞からなる少量のコロニーを形成させたが、これらのコロニーはアルシアンブルーで染色されなかったことから、軟骨細胞に分化していないことが分かった。他方、MEFに4つの初期化因子とSOX9を同時に形質導入した場合には、10cmディッシュ当たり約110個のG418耐性コロニーが認められ、その内の約30%のコロニーが、アルシアンブルーで染色された(図2のa及びb参照)。MEFに4つの初期化因子とSOX9を同時に形質導入した細胞の形状は、コロニー間で異なっており、あるコロニーは、多角形状の細胞(図2のc左)から構成されており、これらは初代軟骨細胞の形状(図1のc)と類似していたが、他のコロニーではMEF(図2のd)のように、紡錘形状の細胞(図2のc右)から構成されていた。

【0076】

次に、どの因子がG418耐性コロニーの形成に重要であるかを同定するために、上記4つの初期化因子の中の3つの初期化因子とSox9をMEFに形質導入し、得られた細胞について分析した。図2のeに、3つの初期化因子とSox9を導入した細胞について、アルシアンブルー染色及びクリスタルバイオレット染色を行って計測された染色コロニー数を示す。その結果、コロニーの平均数は、c-Myc又はKlf4を導入しなかった場合に減少することが明らかとなった。一方、Oct3/4又はSox2を導入しなくても、形成されるコロニーの数は減少していなかった。これらの結果は、MEFから軟骨細胞を誘導する上で、c-Myc、Klf4及びSox9の形質導入が重要であることを示している。また、c-Myc、Klf4及びSox9をMEFに形質導入した場合、約250個できたG418耐性コロニーのおよそ50%が多角形状を有する軟骨細胞様形態を有する細胞から構成されていた(図2のf参照)。

10

【0077】

4. MDFを軟骨細胞に誘導する因子の検討

<方法>

上記と同じ手法で、MDFに対して4つの初期化因子(Oct3/4、Sox2、c-Myc及びKlf-4)と軟骨誘導性の転写因子(SOX9)を種々組み合わせて形質導入し、得られた細胞の特性を分析した。

<結果>

MDFに各因子を導入した細胞について分析した結果を図3に示す。図3のA~Cには、MEFに各因子を導入した細胞について、アルシアンブルー染色又はクリスタルバイオレット染色により計測された染色コロニー数、並びに多角形の細胞から構成されるコロニー数を示す。MDFへのSOX9のみの形質導入は、G418の存在下でコロニー形成を誘導しなかった(図3のA参照)。MDFへの4種の初期化因子(Oct3/4、Sox2、c-Myc及びKlf-4)のみの形質導入でも、僅かなコロニーしか形成しなかった。一方で、MDFに、4種の初期化因子(Oct3/4、Sox2、c-Myc及びKlf-4)とSOX9を同時に形質導入した場合には、約120個のG418耐性コロニーの形成が認められ、これらのコロニーのおよそ30%が、多角形状の軟骨細胞様形態を有する細胞から構成されていた。MDFを使用することにより得られたこれらの結果は、MEFで得られたもの(図2のa参照)と同じ傾向を示している。

20

【0078】

また、SOX9の存在下で、4種の初期化因子(Oct3/4、Sox2、c-Myc及びKlf-4)からc-Myc、Klf4及びOct3/4のいずれかを欠く場合には形成されるコロニーの数は僅かに減少したが、Sox2を欠く場合には形成されるコロニーの数は増加した(図3のB参照)。形成されたコロニーの中で、円形又は多角形状の細胞から構成されるコロニーは、SOX9の存在下で上記4種の初期化因子からc-Myc及びKlf4のいずれかを欠く場合には認められず(図3のB)、SOX9の存在下で上記4種の初期化因子からOct3/4を欠く場合には、およそ5分の1のコロニーが、円形又は多角形状の細胞から構成されていた(図3のB参照)。これらの結果は、c-Myc、Klf4及びSOX9が、MDFからG418耐性でありかつ軟骨細胞様形状である細胞を含むコロニー形成において重要であったことを示している。即ち、c-Myc、Klf4及びSOX9の組み合わせは、MDFから約200個のG418耐性コロニーを作製し、そのコロニーの内のおよそ40%が、円形又は多角形状の細胞から構成されるものであることが明らかとなった(図3のC参照)。一方、c-MycとSOX9との組み合わせも、約200個のG418耐性コロニーを形成され、それらのコロニーの殆どは紡錘形の又はより平坦な形状の非軟骨細胞様形態を有する細胞から構成されているが、円形又は多角形状の軟骨細胞様形態の細胞から構成されるコロニーも僅かではあるが認められた(図3のC参照)。また、SOX9とKlf4のみを組み合わせた場合でも、約350個のG418耐性コロニーが形成され、それらのコロニーの内、僅かではあったが、円形又は多角形状の軟骨細胞様形態の細胞から構成されるものが存在していた(図3のC参照)。

30

40

【0079】

以上の結果から、c-Myc、Klf-4、及びSOX9の導入によって、 5×10^5 cellsのMDFから、G418耐性であって軟骨細胞様形態の細胞から構成されるコロニーを約50個作成できた。これらの3種の因子の組合せにOct3/4を加えても、G418耐性であって軟骨細胞様形態の細胞から

50

構成されるコロニーの数には影響しなかった。また、Sox2を加えると、コロニーの形成が妨げられた。また、c-Myc及びSOX9の組合せ、或いはKlf-4及びSOX9の組合せであっても、軟骨細胞様形態の細胞から構成されるG418耐性コロニーの形成が確認できた。更に、本結果から、Sox2の導入は、軟骨細胞様形態の細胞への誘導を阻害することも示唆された。

【0080】

一方、SOX9に代えて、SOX5及びSOX6を用いて、上記と同様の手法でc-Myc及びKlf-4と共にMDFに導入したところ、G418耐性コロニーの形成は認められなかった。SOX5及びSOX6は、SOX9をサポートする作用があるが、SOX9には存在するトランスアクティベーションドメイン(transactivation domain)を有していないことが知られている。かかる点を考慮すると、軟骨細胞様形態の細胞への誘導には、SOX9に存在するトランスアクティベーションドメインが関与していると推定される。

10

【0081】

Mycファミリー遺伝子に属する各遺伝子及びKlfファミリー遺伝子に属する各遺伝子は、基本的には、それぞれ同じ生物学的活性を有していることから、Mycファミリー遺伝子に属する遺伝子、Klfファミリー遺伝子に属する遺伝子及びSOX9を組み合わせる使用することによって、体細胞の軟骨細胞様形態の細胞への誘導が可能になることも、上記実験結果から把握される。

【0082】

5. クローンの作製

<方法>

20

MDFから誘導されたG418耐性コロニーの中から、以下の11個のコロニーを選び、クローンを作製した。

- ・ c-Myc、Klf-4、Sox2、Oct3/4及びSox9の形質導入によって作製されたコロニーから1個(以下、このクローンをMKS0-1と表記する)
- ・ c-Myc、Klf4、Sox2及びSox9の形質導入によって作製されたコロニーから2個(以下、これらのクローンをMKS-1又は-2と表記する)
- ・ c-Myc、Klf4、Oct3/4及びSox9の形質導入によって作製されたコロニーから4個(以下、これらのクローンをMK0-1~-4と表記する)
- ・ c-Myc、Klf4及びSox9の形質導入によって作製されたコロニーから4個(以下、これらのクローンをMK-1~-4と表記する)

30

標的とする各コロニーに対してトリプシン処理を行って細胞を回収した後に、96ウェルプレートにて、500 µg/mlのG418を含む10%FBS含有DMEM培地中で5%CO₂条件下37 °Cにて6~10日間培養を行った。その後、96ウェルプレートで増殖した細胞を24ウェルプレートに移して、5%CO₂条件下37 °Cで24~31日間培養を行った。次いで、24ウェルプレートで増殖した細胞を6ウェルプレートに移して、5%CO₂条件下37 °Cで18~31日間培養を行った。この細胞を10cm ディッシュに移し、この段階の細胞を第4継代と規定した。新しく増殖させた細胞を500 µg/mlのG418及び10%のFBSを含有するDMEM培地で培養し、6日毎に継代した。

【0083】

<結果>

40

上記方法で11個のコロニーに含まれる細胞を、G-418を含む培地を使用して培養を行ったところ、MK0-4のコロニー由来の細胞は、第7継代後に増殖を停止した。上記培養によって、MK0-4を除く、10個のクローン(MKS0-1、MKS-1、-2、MK0-1~-3、及びMK-1~-4)を作製することができた。作製された各クローンは、多角形状を有しており、軟骨細胞と同形態を示した(図3のE参照)。

【0084】

6. クローン化された細胞の特性の評価

上記でクローン化された細胞について、アルシアンブルー染色による分析、導入遺伝子の発現分析、軟骨細胞マーカー遺伝子の発現分析、核型分析、遺伝子発現パターンの分析、Col1a2のプロモーター領域におけるメチル化CpGジヌクレオチドの分析、増殖特性の分

50

析を行った。

【 0 0 8 5 】

6 - 1 . アルシアンブルー染色による分析

上記でクローン化された細胞（第6継代）、及びMDF（第3継代）を、60 mmディッシュにて500 µg/mlのG418を含む10%FBS含有DMEM培地中で培養し、コンフルエントになった後、さらに14日間培養を行った。斯くして培養された細胞に対してアルシアンブルー染色を行った。

【 0 0 8 6 】

得られた結果を図4のAに示す。培養後の細胞は、アルシアンブルーで強く染色され、グリコサミノグリカンが存在していることが確認された。なお、染色強度は、クローン間で異なっていた。

【 0 0 8 7 】

6 - 2 . 導入遺伝子の発現分析

レトロウイルス導入遺伝子由来の転写物を増幅するが内在性遺伝子の転写物を増幅しないプライマーを使用して、RT-PCR及びウエスタンブロット分析を行って、上記でクローン化された細胞の導入遺伝子の発現を分析した。具体的には、以下の手順に従って実施した。

【 0 0 8 8 】

上記でクローン化された細胞（第6継代）及びMDF（第3継代）を500 µg/mlのG418を含む10%FBS含有DMEM中で、また geoトランスジェニックマウスから調製した初代軟骨細胞（第1継代）を2%FBS含有DMEM培地中で、60 mmディッシュにて培養した。コンフルエントに達した後、RNeasy Mini Kits (Qiagen, Santa Clarita, CA) を使用して細胞中全RNAを抽出した。次いで、抽出した全RNAをDNアーゼで消化し、コンタミしているゲノムDNAを除去した。QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen) を使用して、得られた全RNA (1 µg) を一本鎖 (first-strand) cDNAへ逆転写した。得られたcDNA (2 µl)、をExTaq (タカラバイオ株式会社)、及び各遺伝子に対して特異的なプライマー (4 pmol) を含有する混合液 (20 µl) 中においてPCR増幅を行い、個々のRNA発現レベルを測定した。使用したプライマーを表1に列挙する。

【 0 0 8 9 】

【表1】

標的遺伝子	使用したプライマー	配列
Klf4	Klf4 Tg RT S	GACCACCTTGCCTTACACA
	Klf4 Tg RT AS	CCCTTTTTCTGGAGACTAAAT
c-Myc	c-Myc Tg RT S	TCGCTACCATTACCAGTTG
	c-Myc Tg RT AS	CCCTTTTTCTGGAGACTAAAT
Oct3/4	Oct3/4 Tg RT S	TCCCATGCATTCAAACCTG
	Oct3/4 Tg RT AS	CCCCTGTTGTGCTTTTAATC
Sox2	Sox2 Tg RT S	CCATTAACGGCACACTGC
	Sox2 Tg RT AS	CCTTACGCGAAATACGGG
hSOX9	SOX9 RT S	CCAGCGAACGCACATCAA
	SOX9 RT AS	GGAGTTCTGGTGGTCGGTGTA

【 0 0 9 0 】

また、上記でクローン化された細胞（第6継代）及びMDF（第3継代）を500 µg/mlのG418を含む10%FBS含有DMEM中で、また geoトランスジェニックマウスから調製した初代軟骨細胞（第1継代）を2%FBS含有DMEM培地中で、60 mmディッシュにて培養した。コンフルエントに達した後、細胞を溶解した。得られた細胞溶解液をドデシル硫酸ナトリウム - ポリ

アクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供し、エレクトロブロットし、次いで免疫染色を行った。抗体は、抗-Sox9抗体 (Santa-Cruz Biotechnology, Inc., 1:200希釈)、抗-c-Myc抗体 (Santa-Cruz Biotechnology, Inc., 1:200希釈)、抗-Klf4抗体 (Santa-Cruz Biotechnology, Inc., 1:200希釈)、抗-Oct3/4抗体 (Santa-Cruz Biotechnology, Inc., 1:600希釈)、抗-Sox2抗体 (Santa-Cruz Biotechnology, Inc., 1:200希釈)、抗- α -アクチン抗体 (Cell Signaling Technology, 1:5000希釈) を使用した。

【0091】

RT-PCRによる分析結果を図4のBに示し、ウエスタンブロット分析の結果を図4のCに示す。RT-PCRによる分析結果から、クローン化された細胞は、導入遺伝子を発現させていることが確認された。また、ウエスタンブロット分析から、クローン化された細胞はタンパク質レベルで導入遺伝子を発現しているが、MDFではこれらの遺伝子を発現しなかったことが確認された。

10

【0092】

6 - 3 . 軟骨細胞マーカー遺伝子の発現分析

RT-PCRを用いて、上記でクローン化された細胞の軟骨細胞マーカー遺伝子の発現を分析した。具体的には、上記と同様の手法で、クローン化された細胞 (第6継代)、MDF (第3継代)、及び geoトランスジェニックマウスから調製した初代軟骨細胞 (第1継代) から全RNAを得て、RT-PCR分析により、軟骨細胞マーカー遺伝子 (Col2a1、Acan、Hapln1、Sox5、Sox6、Col9a1、Col9a2、Col9a3、Col11a1、Col11a2) 及びMDFマーカー遺伝子 (Col1a1、Col1a2、Gapdh、RT-) の発現を分析した。使用したプライマーについては、表2に列挙する。

20

【0093】

【表 2】

標的遺伝子	使用したプライマー	配列
Gapdh	Gapdh RT S	GAGATGATGACCCTTTTGGCT
	Gapdh RT AS	TCAAGGCCGAGAATGGGAAG
Sox5	Sox5 RT S	CCCCTCAAAGCCTCTGTC
	Sox5 RT AS	CTTGCTGCTCTCGCCTGA
Sox6	Sox6 RT S	TCATCCCGGCCTAAGACA
	Sox6 RT AS	ACAGGGCAGGAGATTGAG
Col2a1	Col2a1 RT S	TTGAGACAGCACGACGTGGAG
	Col2a1 RT AS	AGCCAGGTTGCCATCGCCATA
Col11a1	Col11a1 RT S	ATGAGTATGCACCTGAGGAT
	Col11a1 RT AS	GGAGTCTCAGTCTGGTAAGGTT
Col11a2	Col11a2 RT S	GACTGTAAGAAGCGAGTTACC
	Col11a2 RT AS	GCCTTCAAAGACTTCATCG
Col9a1	Col9a1 RT S	TGTAGACTTCAGGATTCCAAC
	Col9a1 RT AS	CCAAATGTTCCAGTGCTT
Col9a2	Col9a2 RT S	TGGAAGGGAGTGCCGATT
	Col9a2 RT AS	CGACCAGGATCACCCAGAAT
Col9a3	Col9a3 RT S	TGGTGTGCCGGGACTTGAT
	Col9a3 RT AS	CACCCAGCTCGCCAGTTCTA
Col1a1	Col1a1 RT S	GCAACAGTCGCTTCACCTAC
	Col1a1 RT AS	GTGGGAGGGAACCAGATTG
Col1a2	Col1a2 RT S	TCGGGCCTGCTGGTGTTCGTG
	Col1a2 RT AS	TGGGCGCGGCTGTATGAGTTCTTC
Acan	Acan RT S	CCCTCGGGCAGAAGAAAGAT
	Acan RT AS	CGCTTCTGTAGCCTGTGCTTG

10

20

30

【 0 0 9 4 】

軟骨細胞マーカー遺伝子の発現の分析結果を図5のaに示し、MDFマーカー遺伝子の発現の分析結果を図5のbに示す。この結果から、上記でクローン化された細胞は、種々のレベルで軟骨細胞マーカー遺伝子を発現することが示された。MKS-1、MKO-2、MK-1、MK-3及びMK-4は軟骨細胞マーカー遺伝子を発現していたが、MKS-2及びMK-2は軟骨細胞マーカー遺伝子を発現していなかった。また、MKS-1は線維芽細胞特異的I型コラーゲン遺伝子（Col1a1およびCol1a2）を発現していることも確認された。

40

【 0 0 9 5 】

また、geoトランスジェニックマウスから調製した初代軟骨細胞の中にはLacZ陰性細胞が存在することが示されているように、軟骨へ付着した周囲線維性組織由来の線維芽細胞がコンタミしていた可能性がある（図1のc参照）。そのため、初代軟骨細胞由来のRNAから、線維芽細胞において発現されるが純粋な軟骨細胞においては発現されないと考えられるI型コラーゲン遺伝子（Col1a1およびCol1a2）mRNAが検出されたと推測される。

【 0 0 9 6 】

6 - 4 . 核型分析

上記でクローン化された細胞の核型を、キナクリン-ヘキスト染色で分析した。なお、

50

本分析は、財団法人実験動物中央研究所 (International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) Monitoring Center (Japan)) にて実施された。

【 0 0 9 7 】

得られた結果の一部を図 5 の c に示す。MKS-2、MKO-2及びMK-4は40XYの正常な核型を示しており、MK-3は正常な40XY及び41XY+4の混合物を示していた。

【 0 0 9 8 】

6 - 5 . 遺伝子発現パターンの分析

以下に示す手法で、DNAマイクロアレイ分析のScatterプロットによって、上記でクローン化された細胞 (MKS-1、MKO-2、MKI-1、MK-3、MK-4)、MDF、及び geoトランスジェニックマウスから調製した初代軟骨細胞における全体的な遺伝子発現パターンを分析した。

【 0 0 9 9 】

250 ngの全RNAから、MessageAmp III RNA Amplification Kit (Ambion) を用いて、ピオチン標識したcRNAを得た。次いで、10 µgのフラグメント化cRNAをAffymetrix 430 2.0 GeneChipアレイに対して、45 °Cで16時間の条件でハイブリダイズさせた。その後、DNAチップを洗浄して、更に染色した。次いで、得られたDNAチップを、Affymetrix Fluidics station 450及びスキャナーを使用してスキャンし、得られた画像をGCOSソフトウェアを使用して分析した。標準化は、MAS 5.0 アルゴリズムを用いて算出した。クラスター分析は、Cluster 3.0 (東京大学) を用いて実施した。

【 0 1 0 0 】

DNAマイクロアレイ分析のScatterプロットの結果を図 6 の a ~ c に示す。初代軟骨細胞と比較してMDFにおいて過剰発現された遺伝子の数は少なかったが、MDFと比較して初代軟骨細胞において過剰発現された遺伝子の数は多かった (図 6 の a 参照)。このことは、初代軟骨細胞は線維芽細胞でコンタミされたという推測と一致している。また、初代軟骨細胞と比較してMK-3において過剰発現された遺伝子の数 (図 6 の b 参照) は、MDFと比較してMK-3において過剰発現された遺伝子の数 (図 6 の c 参照) よりも少なかった。また、MK-3と比較して初代軟骨細胞において過剰発現された遺伝子の数 (図の b 参照) は、MK-3と比較してMDFにおいて過剰発現された遺伝子の数 (図 6 の c 参照) と同程度であった。このことは、初代軟骨細胞が線維芽細胞でコンタミされていたことに起因すると考えられる。これらの結果は、MK-3は、全体的な転写レベルで、純粋な軟骨細胞と類似していることを示している。また、MK-3及び初代軟骨細胞の双方において、Col2a1、アグリカン遺伝子 (Acan)、及びCol9a1を含む軟骨マトリックス遺伝子の発現レベルは、他の遺伝子の発現レベルに比較して極めて高かった (図 6 の b 参照)。

【 0 1 0 1 】

また、クラスター分析の結果を図 6 の d に示す。クラスター分析の結果から、MKS-1以外のクローン化された細胞は、MDF、初代軟骨細胞、及びMKS-1とは異なるクラスターに分類されることが明らかとなった。このことは、MKS-1が軟骨細胞マーカー遺伝子とMDFマーカー遺伝子の双方を発現しているというRT-PCRの知見や、初代軟骨細胞は線維芽細胞でコンタミされているという推測と一致している。

【 0 1 0 2 】

6 - 6 . 軟骨細胞マーカー遺伝子のプロモーター領域及びMDFマーカー遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化CpGジヌクレオチドの分析

上記でクローン化された細胞 (MK-3、MK-4) 及びMDFについて、軟骨細胞マーカー遺伝子 (Col2a1及びAcan) のプロモーター及びMDFマーカー遺伝子 (Col1a2) のプロモーター中のシトシングアニン (CpG) ジヌクレオチドのメチル化状態を、バイスルファイトゲノム配列決定分析 (bisulfite genomic sequencing analyses) によって評価した。バイスルファイトゲノム配列決定分析は、具体的には、次の手法に従って実施した。EpiTect Bisulfite kit (Qiagen) を用いて、該キットに添付の指示書に記載の手法に従ってバイスルファイト処理を行った。使用したPCRプライマーは表 3 に示す通りである。Mighty TA-cloning Kit (Takara) を用いて、pMD20-Tベクターに増幅産物をクローン化した。各遺伝子に対してランダムに選択した10個のクローンを、T7及びT3プライマーを用いて配列決定した

。【0103】

【表3】

標的プロモーター	使用したプライマー	配列
Col1a2 のプロモーター	Col1a2-Me-S2	GGATTGGATAGTTTTTGTTTTT
	Col1a2-Me-AS2	AAAACCCAAACCTACCTTATTT
Acan のプロモーター	Acan-Me-S2	GGTGTAGAGGGGTTTATAGAGTTGAGGA
	Acan-Me-AS2	CTCCTCCAAAACTTCAATCCTTATCCCTAC
Col2a1 のプロモーター	Col2a1-Me-S3	TAGAGGGGGTAGTGTGGTAGTT
	Col2a1-Me-AS3	CCCTCATACAAAAACCCTAAAA

10

【0104】

得られた結果を図6のeに示す。Col1a2のプロモーター中のシトシングアニン(CpG)ジヌクレオチドは、MK-3及びMK-4において高度にメチル化されていたが、MDFではメチル化されていなかった。また、Col2a1及びAcanのプロモーター中のCpGジヌクレオチドのメチル化状態は、上記でクローン化された細胞(MK-3、MK-4)及びMDFの双方において、殆どメチル化されていなかった。

【0105】

6-7. 増殖特性の分析

クローン化された細胞(第6継代)及びMDF(第6継代)を、60mmディッシュにて10%FBS含有DMEM培地中で培養し、増殖特性について評価した。

【0106】

得られた結果を図7のaに示す。MK0-2、MK-1、MK-3、及びMK-4は少なくとも48日間、指数関数的に増殖したが、培養40日以降は、紡錘形状又は平坦な形態の細胞が徐々に出現した。一方、MDFは培養開始から15日に増殖を停止した。また、MKS-1は、増殖速度の急激な上昇、及び培養24日以降に紡錘形状への形態変化を示した。これは、MKS-1が脱分化したことを示唆しており、該細胞の染色体数が異常であることと関連している可能性がある。

30

【0107】

また、細胞数が 1×10^{10} cellsを越えた時点で、各々の細胞の一部を分離し、これを10cmディッシュに接種して培養を行い、コンフルエントになった後に更に14日間培養を継続した。その後、各細胞をアルシアンブルーで染色した。アルシアンブルーで染色した結果を図7のbに示す。この結果から、MDFに比べて軟骨細胞様細胞は、アルシアンブルーで強く染色されることが明らかとなり、軟骨細胞様細胞は、ある程度の細胞数の増加の後でも、軟骨細胞としての特徴を保持していることが分かった。

【0108】

7. 軟骨組織の作製

以下に示す手法で、クローン化された細胞(MK-3)とMDFを使用して、軟骨組織の作製を行った。

40

【0109】

コラーゲンゲル培養キット(新田ゼラチン社製)を用いて、該キットに示されているプロトコールに従って、コラーゲンゲル培養を行った。まず、軟骨細胞様細胞(MK-3)及びMDFをトリプシン/EDTAで消化した。次いで、4で調製された0.25%のI型酸溶解コラーゲン液中に、細胞を 2×10^7 cells/mlになるように添加して懸濁した。細胞懸濁液(500µlの液滴)を6ウェルプレートの各ウェルの中央に添加し、37でゲル化させた。得られたゲル-細胞複合物を10%FBSを含有するDMEM培地3mlで覆って、5%CO₂条件下37で培養した。1日おきに、培地を新鮮な培地に交換した。3週間の培養後、ゲル-細胞複合物を10%ホルムアルデヒドで固定した後に、パラフィン中で包埋した。斯くして処理したゲル-

50

細胞複合物の一部をアルシアンブルー及びヌクレアファストレッドで染色した。また、ゲル - 細胞複合物の一部をII型コラーゲンに対する一次抗体（ヤギ由来ポリクローナル抗体）（Santa-Cruz Biotechnology, Inc., 1:200 dilution）で処理し、洗浄した後に、更に二次抗体Alexa Fluor 488 Rabbit Anti-goat IgG（Invitrogen）で処理した。

【0110】

結果を図7のcに示す。I型コラーゲンゲル中でMK-3の三次元培養物の組織学的分析によって、アルシアンブルーで染色された物質で囲まれた小腔構成の組織構造が確認され、上記のゲル - 細胞複合物には軟骨様組織が形成されていることが明らかとなった。また、MK-3を含むゲル - 細胞複合物には、抗II型コラーゲン抗体に対する免疫活性を示したが、MDFを含むゲル - 細胞複合物では該活性は認められなかった。

10

【0111】

8. In vivoにおける軟骨組織の作製

上記と同じ手法を用いて、MDFに、c-Myc、Klf4、及びSOX9を導入して誘導した、軟骨細胞様形態を有する細胞（MK-5；軟骨細胞様細胞）をクローン化した。なお、このMK-5には、GFP cDNAを組み込んだレトロウイルスベクターを用いて、GFPも導入されている。

【0112】

軟骨細胞様細胞（MK-5）をトリプシン/EDTAで消化した。次いで、10容量%のFBSを含有するDMEM培地に、細胞を 1×10^7 cells/mlになるように添加して懸濁して、細胞懸濁液を調製した。この細胞懸濁液0.1mLをヌードマウス（6週齢、雌、BALB/cA Jc1-nu/nu）の背部の皮下に注入した。

20

【0113】

細胞懸濁液の投与から4週間後に、マウスの背部の蛍光発色を観察したところ、MK-5の細胞懸濁液を注入した皮下にGFPを発現している塊が認められた（図8のA及びB）。次いで、細胞懸濁液を注入した部位を摘出し、4%ホルムアルデヒドで固定した後に、パラフィン中で包埋した。斯くして処理された連続組織切片をサフラニンO染色と、抗GFP抗体で免疫染色した。結果を図8のCに示す。MK-5を注入したマウスの皮下脂肪組織内では、サフラニンOで赤く染色された基質に細胞が散在する組織が確認され、ヌードマウスの皮下に軟骨組織が形成されたことが分かった。また、GFP陽性細胞は、注入した軟骨細胞様細胞を示すと考えられ、この範囲は、サフラニンOで染色される軟骨組織の領域と完全に一致していた。このことは、注入して生き残ったMK-5細胞は全てが軟骨細胞に分化し、軟骨組織を形成したことを示す。図8のDに、図8のCの四角で囲んで部分の拡大を示す。この結果から、軟骨細胞様細胞は、スキャホールドが存在しなくても、軟骨組織を形成する能力を有しており、軟骨組織の再生に実用化できることが確認された。

30

【0114】

9. 総合考察

以上の結果から、c-Myc、Klf-4、及びSox9を組み合わせて導入することによって、増殖能を有し、且つ軟骨細胞と同様の特性を備える細胞（軟骨細胞様細胞）を得ることが明らかとなった。斯くして得られた軟骨細胞様細胞は、コラーゲンゲルと共に培養することによって、或いはそのまま生体内に投与することによって、3次元構造の軟骨組織を形成できることも、実際に確認された。

40

【0115】

実施例2 軟骨細胞様細胞から軟骨組織の形成

<方法>

上記実施例1と同様の方法で、MDFにc-Myc、Klf4及びSox9の遺伝子を形質導入することによって、11個の軟骨細胞様細胞（MK-5~MK-15）を取得した。これらの軟骨細胞様細胞の内、2株（MK-7及びMK-10）をトリプシン/EDTAで消化し、次いで10容量%のFBSを懸濁するDMEM培地に懸濁して、 1×10^7 cells/mlの細胞懸濁液を用意した。この細胞懸濁液0.1mlをヌードマウス（雌、6週齢、BALB/cA Jc1-nu/nu）の背部の皮下に注射した。MK-7細胞を注射したマウスは注射後16週に、MK-10細胞を注射したマウスは注射後8週に、注射部を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定した後に、パラフィン中で包埋した。次いで

50

、組織切片を作製し、サフラニンO、ファーストグリーン、及びアイアンヘマトキシリンで染色した。

<結果>

得られた結果を図9に示す。この結果から、MK-7又はMK-10細胞をそれぞれ注入したマウスの皮下脂肪組織内に、サフラニンOで赤く染色される基質に細胞が散在する組織が確認され、ヌードマウスの皮下に軟骨組織が形成されていることが確認された。また、MK-7又はMK-10細胞の注入部位において、腫瘍の形成は認められなかった。

【0116】

以上の結果から、本発明の方法によって、少なくとも16週間は腫瘍を形成させない、軟骨細胞様細胞の取得が可能であることが確認された。

【0117】

実施例3 軟骨細胞様細胞のゲノムDNAの分析

<結果>

上記実施例1で取得した軟骨細胞様細胞(MK-1、-3及び-4)、及び上記実施例2で取得した軟骨細胞様細胞(MK-5、-7、-10及び-15)について、細胞の同一性を評価するために、以下の実験を行った。

【0118】

まず、軟骨細胞様細胞から、常法に従って、ゲノムDNAを取得し、得られたゲノムDNAをEcoRIとBamHIで消化して、断片化した。断片化されたゲノムDNAを、アガロースゲルに電気泳動にて展開して、ナイロンメンブランにトランスファーした後に、Klf4 cDNAプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。

【0119】

得られた結果を図10に示す。図10から明らかなように、実施例1-2で得られた軟骨細胞様細胞は、細胞株毎に異なるバンドのパターンを示しており、各々独立した細胞株として樹立されていることが示された。

【0120】

実施例4 脂肪組織由来間質細胞からの軟骨細胞様細胞の製造

<方法>

脂肪組織由来間質細胞(ADSC)は、参考文献5と同様の方法で皮下脂肪組織から分離した。具体的には、先ず、上記実施例1で作成したものと同様の3-6月齢のCol11a2-^{geo}トランスジェニックマウスから、皮下脂肪片を取り出し、細切した後に、37℃で2~4時間、0.2%コラーゲナーゼで処理した。コラーゲナーゼ処理により遊離した細胞を、ナイロンメッシュ(細孔サイズ、70µm; Tokyo Screen, Tokyo, Japan)で濾過した。分離された細胞は、遠心分離(200×g、4分、10分間)により回収した。次いで、細胞を新鮮な5%FBS含有DMEM培地に懸濁させ、その後再度遠心分離(200×g、4分、10分間)により細胞を回収した。次いで、得られた細胞を60mm又は100mmディッシュで培養することにより、ADSC(第1継代)を得た。

【0121】

次いで、上記実施例1と同様の手法で、皮下脂肪細胞に、c-Myc、Klf-4、及びSox9を導入して、500µg/mlのG418を含む5%FBS含有DMEM培地10ml中で培養を行った。

【0122】

斯くして処理された細胞に対して、上記実施例1と同様の方法で、アルシアンブルー染色及びクリスタルバイオレット染色を行い、また形状観察も行った。

【0123】

また、比較のために、pMXsベクターにGFP cDNAを組み込んだレトロウイルスベクターを用いて、上記と同様の手法で皮下脂肪への形質転換、形質転換細胞の評価を行った。

<結果>

結果を図11に示す。ADSCにc-Myc、Klf-4、及びSox9を導入すると、10cmディッシュ当たり約380個のG418耐性コロニーが認められた。また、これらのコロニーの約60%は、アルシアンブルーで染色された。更に、このコロニーの約20%は、円形又は多角形状の軟骨

10

20

30

40

50

細胞様の形態の細胞から構成されていた。一方、GFPを導入した脂肪組織由来間質細胞では、コロニーの形成は認められなかった。

【 0 1 2 4 】

以上の結果から、皮下脂肪由来の細胞に対してc-Myc、Klf-4、及びSox9を導入した場合でも、実施例1のMEF及びMDFの場合と同様に、増殖能を有し、且つ軟骨細胞と同様の特性を備える軟骨細胞様細胞が得られることが強く示唆された。

【 0 1 2 5 】

実施例5 ヒト由来皮膚線維芽細胞からの軟骨細胞様細胞の製造

<方法>

1. プラスミドの調製

ヒト由来皮膚線維芽細胞への遺伝子導入は、レンチウイルスベクターシステムを使用した。ヒトc-MYCを組み込んだレンチウイルスベクター (pLe6-CMVp-hc-MYC)、ヒトKLF4を組み込んだレンチウイルスベクター (pLe6-CMVp-hKLF4)、ヒトOCT3/4を組み込んだレンチウイルスベクター (pLe6-CMVp-hOCT3/4)、及びヒトSOX9を組み込んだレンチウイルスベクター (pLe6-CMVp-F(-)hSOX9) を、それぞれLRクローゼIIプラス反応 (Invitrogen) によって調製した。

【 0 1 2 6 】

2. 細胞の調製

ヒト成人由来の正常皮膚線維芽細胞 (NHDF) は、Lonza社から購入した (製品コード CC-2511)。10% FBS含有DMEM培地中で維持させたNHDFを使用した。

【 0 1 2 7 】

3. ウイルス感染

6×10^6 cellsの293FT細胞 (Invitrogen) に対して、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、3 μ gの上記各レンチウイルスベクターと9 μ gのVirapower packaging mix (Invitrogen) をトランスフェクトさせた。トランスフェクションの48時間後、transfectantの上清を回収し、0.45 μ m酢酸セルロースフィルター (Whatman) で濾過した。得られたろ液に対してポリブレン (ナカライテスク株式会社) を終濃度4 mg/mlとなるように添加し、ウイルス溶液を調製した。Le6-CMVp-hc-MYC、pLe6-CMVp-hKLF4、pLe6-CMVp-hOCT3/4、及びpLe6-CMVp-F(-)hSOX9をそれぞれ等量含むように、各ウイルス溶液を混合し、混合ウイルス溶液を調製した。

【 0 1 2 8 】

形質導入の1日前に、100 mmディッシュ中で、10% FBS含有DMEM培地に 5×10^5 cellsのNHDFを接種した。次いで、100 mmディッシュの中から培地を取り除き、上記混合ウイルス溶液を添加して、37 °Cで16時間インキュベートし、レンチウイルスベクターを形質導入した。インキュベート後、ディッシュ中の細胞をトリプシン処理し、次いで新鮮な10% FBS含有DMEM培地を入れた4つの10 cmディッシュに細胞を分けて、静置培養した。形質導入後は、1日おきに同組成の培地で培地交換しながら10日間静置培養を行った。斯くして培養された細胞に対して、アルシアンブルー染色を行った。

【 0 1 2 9 】

また、比較のために、EGFP cDNAを組み込んだレンチウイルスベクターを用いて、上記と同様の手法でNHDFへの形質転換、形質転換細胞の評価を行った。

【 0 1 3 0 】

<結果>

結果を図12に示す。3つの初期化因子 (OCT3/4、C-MYC及びKLF-4) とSOX9のNHDFへの導入において、多くのNHDFにおいて細胞死が認められた。これは、NHDFに上記初期化因子が導入されると多くの細胞で細胞死が誘導されることを示唆している。

【 0 1 3 1 】

3つの初期化因子 (OCT3/4、C-MYC及びKLF-4) とSOX9のNHDFへの導入によって、生存した細胞がコロニーを形成した。これらのコロニーの幾つかは、アルシアンブルーで強く染色された。一方、EGFPが導入されたNHDFの培養ディッシュでは、細胞は死ぬことなく増殖

10

20

30

40

50

した。EGFPが導入されたNHDFはアルシアンブルーで染色されなかった（図12のa参照）。また、また、3つの初期化因子（OCT3/4、C-MYC及びKLF-4）とSOX9を導入して培養することにより得られたコロニーに含まれる細胞の形態（図12のb参照）は、EGFPが導入された細胞（図12のc参照）に比べて、ヒト初代軟骨細胞（図12のd参照）に近似していることが確認された。

【0132】

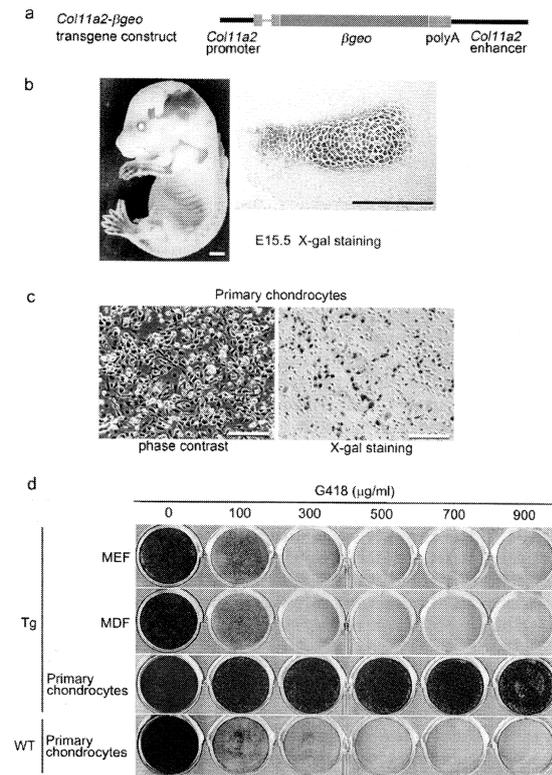
以上の結果から、本発明の技術を使用することによって、ヒトNHDFからも、増殖能を有し、且つ軟骨組織を形成できる軟骨細胞様細胞を誘導できることが強く示唆された。

【0133】

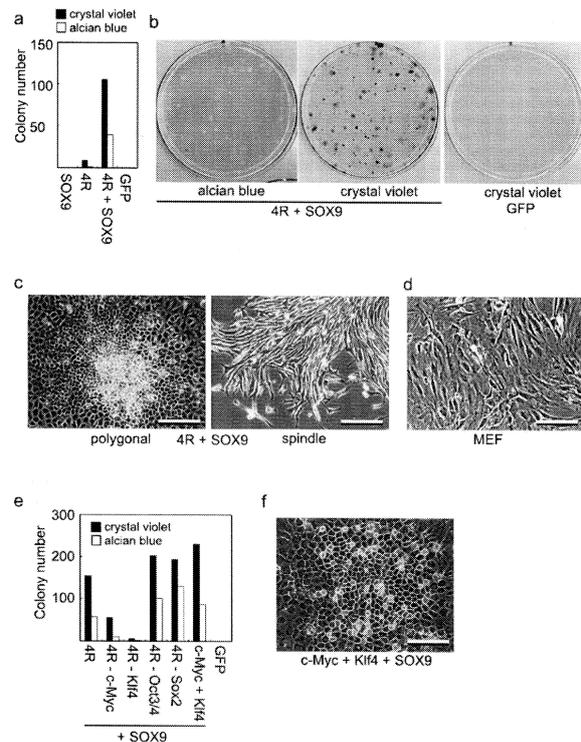
参考文献のリスト

- ・参考文献1：N. Tsumaki, T. Kimura, Y. Matsui et al., J. Cell Biol. 134 (6), 1573 (1996).
- ・参考文献2：A Nagy, M Gertsenstein, K Vintersten et al., Manipulating the Mouse Embryo., 3rd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2003).
- ・参考文献3：K. Takahashi and S. Yamanaka, Cell 126 (4), 663 (2006).
- ・参考文献4：A. Aszodi, E. B. Hunziker, C. Brakebusch et al., Genes Dev. 17 (19), 2465 (2003).
- ・参考文献5：Bjorntorp, P. et al. Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. J. Lipid Res. 19, 316-324 (1978).

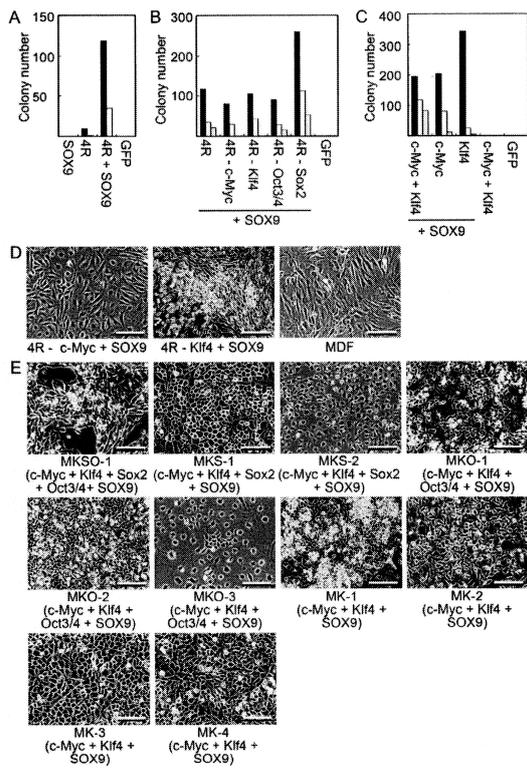
【図1】



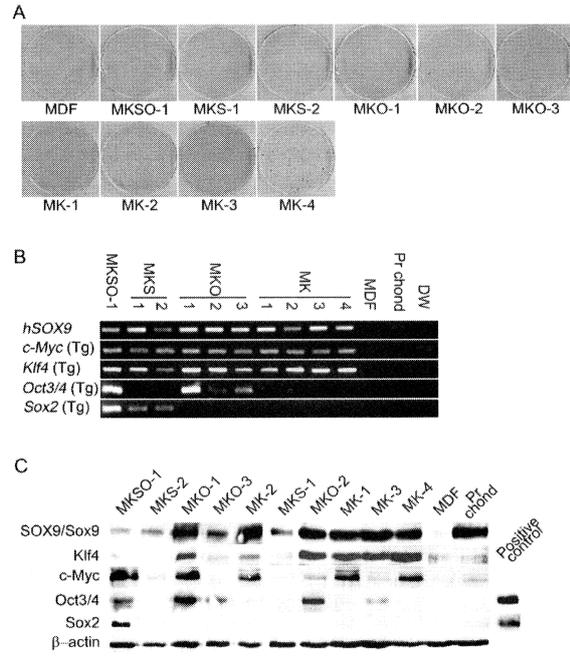
【図2】



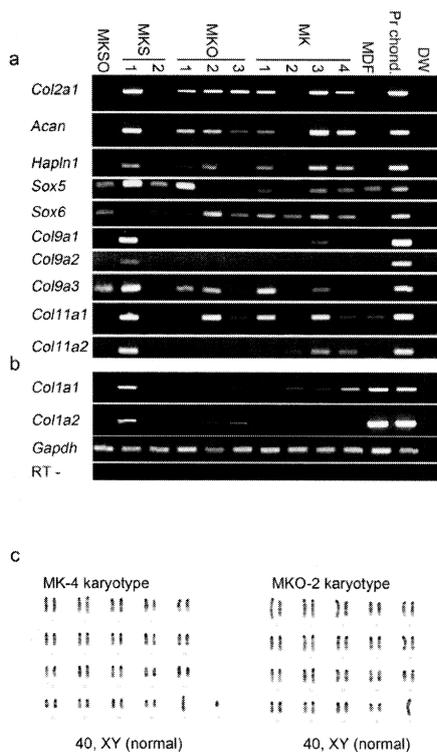
【 図 3 】



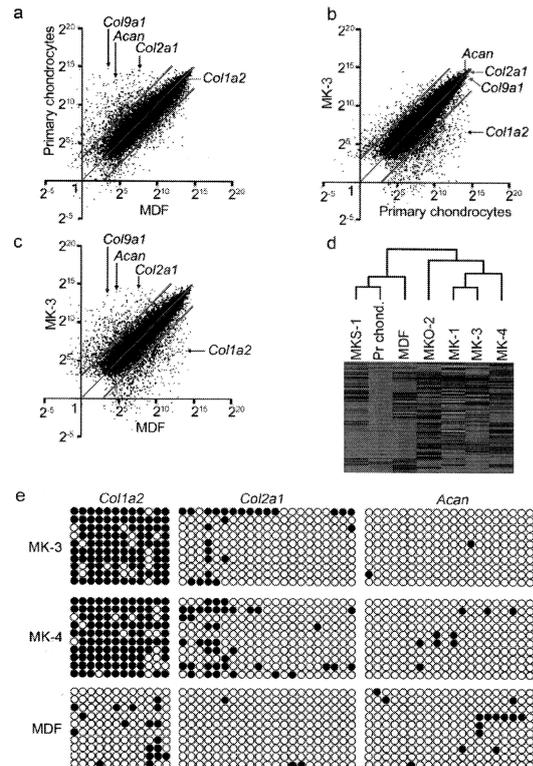
【 図 4 】



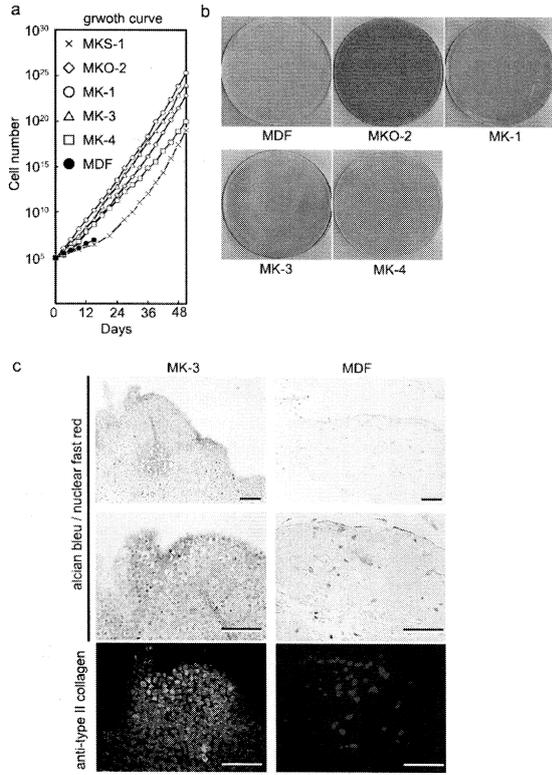
【 図 5 】



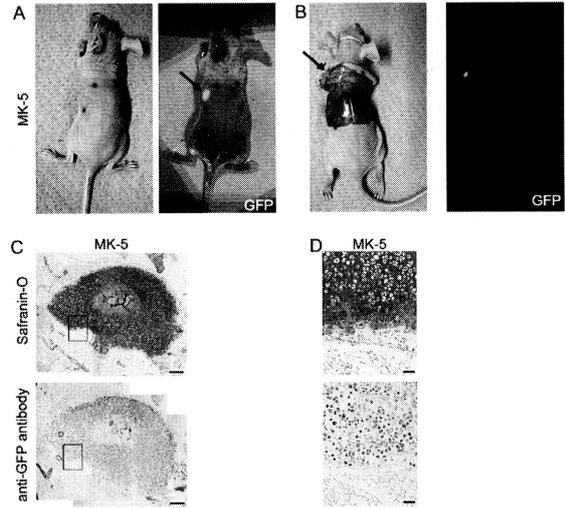
【 図 6 】



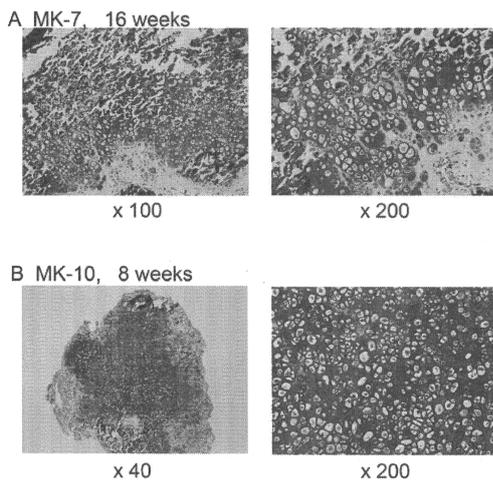
【 7 】



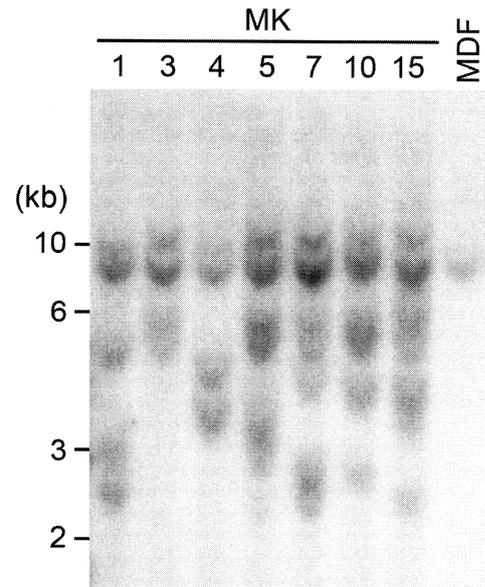
【 8 】



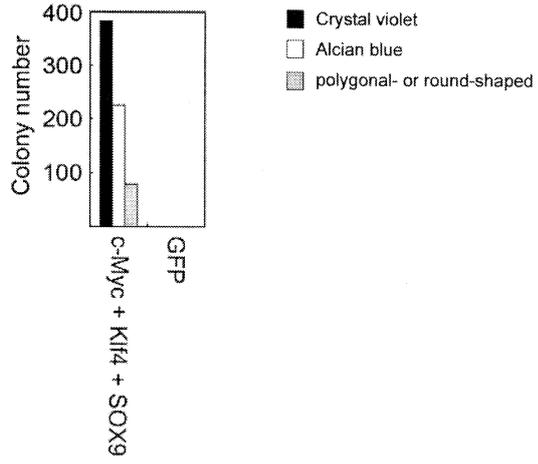
【 9 】



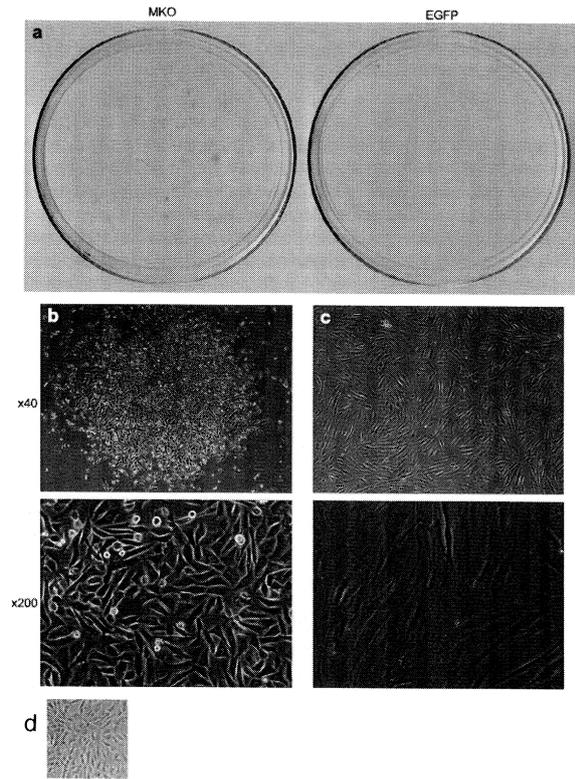
【 10 】



【 1 1 】



【 1 2 】



【 配列表 】

[0005591119000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 A

(56)参考文献 特開2004-267052(JP,A)
 特開2009-292787(JP,A)
 片山理恵ら, 骨髄細胞由来間葉系幹細胞に対するCDMP1遺伝子導入と軟骨分化誘導の促進, 第16回日本整形外科学会基礎学術集会抄録集, 2001年 8月25日, p. S850, 1-B-P1-4
 岩井貴男ら, 軟骨形成におけるSmad7の役割の解析, 第20回日本軟骨代謝学会 プログラム・抄録集, 2007年 3月 2日, p. 76
 池上大督ら, Sox9は軟骨の維持と軟骨細胞の生存に必須である, 第22回日本軟骨代謝学会 プログラム・抄録集, 2009年 3月 6日, p. 78
 妻木範行, 厚生労働科学研究補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)分担研究報告書, 関節リウマチ及び線維筋肉症の寛解導入を目的とした新規医薬品の導入・開発及び評価に関する包括的研究 平, 2007年 4月, p. 8-11

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 5 / 1 0
 A 0 1 K 6 7 / 0 2 7
 A 6 1 K 3 1 / 7 1 3
 A 6 1 K 3 5 / 3 2
 A 6 1 K 4 7 / 4 2
 A 6 1 L 2 7 / 0 0
 A 6 1 P 1 9 / 0 2
 C 1 2 N 1 5 / 0 9
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 P u b M e d
 C i N i i
 T h o m s o n I n n o v a t i o n