

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-88909

(P2016-88909A)

(43) 公開日 平成28年5月23日(2016.5.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	2G045
A61P 43/00 (2006.01)	A61P 43/00 111	4B063
A61P 19/08 (2006.01)	A61P 19/08	4C084
A61P 19/02 (2006.01)	A61P 19/02	4C086
A61K 31/52 (2006.01)	A61K 31/52	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-227500 (P2014-227500)
 (22) 出願日 平成26年11月7日 (2014.11.7)

特許法第30条第2項適用申請有り 電気通信回線発
 表日:平成26年10月9日 掲載アドレス: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.38912/pdf>

(71) 出願人 504132272
 国立大学法人京都大学
 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (72) 発明者 戸口田 淳也
 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
 国立大学法人京都大学内
 (72) 発明者 西小森 隆太
 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
 国立大学法人京都大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟骨過形成疾患の予防および治療剤ならびにそのスクリーニング方法

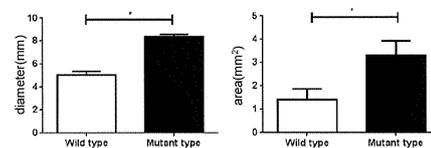
(57) 【要約】

【課題】軟骨過形成疾患の治療剤および/または予防剤をスクリーニングする方法、ならびに、軟骨過形成疾患の治療剤および/または予防剤を提供する。

【解決手段】軟骨前駆細胞を、被験物質と接触させるおよび接触させない条件下で培養し、細胞におけるSOX9のプロモーター活性、cAMP量、またはCREBのリン酸化、あるいは、培養物における細胞外マトリックス量を測定することを含む、軟骨過形成疾患の治療薬および/または予防薬をスクリーニングする方法、ならびに、有効成分としてアデニル酸シクラーゼ阻害剤を含む、軟骨過形成疾患の治療および/または予防用医薬。

【選択図】 図1C

C.



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有効成分としてアデニル酸シクラーゼ阻害剤を含む、軟骨過形成疾患の治療および／または予防用医薬。

【請求項 2】

前記アデニル酸シクラーゼ阻害剤が、SQ22536である、請求項 1 に記載の医薬。

【請求項 3】

前記軟骨過形成疾患が、慢性乳児神経皮膚関節炎症候群である、請求項 1 または 2 に記載の医薬。

【請求項 4】

下記の工程を含む、軟骨過形成疾患の治療薬および／または予防薬をスクリーニングする方法；

- (a) 軟骨前駆細胞を、被験物質と接触させるおよび接触させない条件下で培養する工程、
- (b) 工程 (a) で得られた細胞におけるSOX9のプロモーター活性を測定する工程、および
- (c) 被験物質と接触させる条件下において、接触させない条件下よりSOX9のプロモーター活性が減少した場合、当該被験物質を軟骨過形成疾患の治療薬または予防薬として選出する工程。

10

【請求項 5】

前記SOX9のプロモーター活性を測定する工程が、SOX9のmRNA量を測定する工程である、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

下記の工程を含む、軟骨過形成疾患の治療薬および／または予防薬をスクリーニングする方法；

- (a) 軟骨前駆細胞を、被験物質と接触させるおよび接触させない条件下で培養する工程、
- (b) 工程 (a) で得られた細胞におけるcAMP量を測定する工程、および
- (c) 被験物質と接触させる条件下において、接触させない条件下よりcAMP量が減少した場合、当該被験物質を軟骨過形成疾患の治療薬または予防薬として選出する工程。

30

【請求項 7】

下記の工程を含む、軟骨過形成疾患の治療薬および／または予防薬をスクリーニングする方法；

- (a) 軟骨前駆細胞を、被験物質と接触させるおよび接触させない条件下で培養する工程、
- (b) 工程 (a) で得られた細胞におけるCREBのリン酸化を測定する工程、および
- (c) 被験物質と接触させる条件下において、接触させない条件下よりCREBのリン酸化が減少した場合、当該被験物質を軟骨過形成疾患の治療薬または予防薬として選出する工程。

40

【請求項 8】

前記軟骨前駆細胞が、NLRP3に変異を有するiPS細胞から誘導された軟骨前駆細胞である、請求項 4 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

下記の工程を含む、軟骨過形成疾患の治療薬および／または予防薬をスクリーニングする方法；

- (a) NLRP3の変異を有する軟骨前駆細胞を、被験物質と接触させるおよび接触させない条件下で培養する工程、
- (b) 工程 (a) で得られた培養物における細胞外マトリックスを測定する工程、および
- (c) 被験物質と接触させる条件下において、接触させない条件下より細胞外マトリック

50

量が減少した場合、当該被験物質を軟骨過形成疾患の治療薬または予防薬として選出する工程。

【請求項 10】

前記細胞外マトリックスが、グリコサミノグリカン (GAG) である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記NLRP3の変異が、NLRP3中のTyr570CysまたはGly307Ser変異である、請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記軟骨過形成疾患が、慢性乳児神経皮膚関節炎症候群である、請求項 4 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、軟骨過形成疾患の治療剤および/または予防剤をスクリーニングする方法に関する。本発明はまた、軟骨過形成疾患の治療剤に関する。

【背景技術】

【0002】

全身性の自己免疫疾患は、自然免疫系（とりわけ、パターン認識受容体）の欠損により生じる原発性免疫不全症候群に分類される疾患であり、制御不能な免疫応答を示すことを特徴とする。新生児期発症多臓器系炎症性疾患(NOMID)は、そのような全身性の自己免疫疾患群に属する疾患であり、NLRP3遺伝子の欠陥がその原因として同定されている（非特許文献1）。NOMIDの臨床所見としては、新生児発症慢性炎症、じん麻疹様皮疹、長骨の骨端過形成により特徴づけられる関節症などの多数の病態を包含する（非特許文献2）。

【0003】

NLRP3遺伝子の生理学的な機能としては、リガンドにより活性化されると、NLRP3インフラマソームと呼ばれる複数のタンパク質複合体が形成されて、capase-1を活性化し、さらにpro IL-1 の切断の後、最終的にはIL-1 を活性化することが報告されている（非特許文献3~6）。したがって、NOMID患者に対する現在までに試みられてきた治療法としては、IL-1 を標的とした抗IL-1 療法などが存在するが、当該治療法では、全身性の炎症を抑制するには有効であるものの、長骨の骨端過形成などの病態においては十分な効果を発揮していない（非特許文献7）。したがって、NOMIDの病態に対する別の観点からの新規な治療法の開発が望まれている。

【0004】

一方、再生医療の分野等では、生体材料として利便性のある細胞から所望の細胞型へ転換する技術が望まれており、最近においては、マウスおよびヒトの人工多能性幹細胞（iPS細胞）が樹立されている。Yamanakaらは、ヒトの皮膚由来線維芽細胞にOct3/4, Sox2, Klf4およびc-Mycの4遺伝子を導入することにより、iPS細胞を樹立することに成功した（特許文献1および非特許文献8）。このようにして得られるiPS細胞は、治療対象となる患者由来の細胞を用いて作製された後、各組織の細胞へと分化させることができるため、in vitroで病態を再現することが可能であると考えられている。現在までのところ、NOMID患者からiPS細胞の作製に成功したことは報告されているが（非特許文献9）、NOMIDの病態をインビトロで再現できたという報告はなされていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開WO2007/069666

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Hoffman HM, et al., Nature Genetics. 29(3):301-305 (2001)

10

20

30

40

50

【非特許文献2】Tanaka N, et al., Arthritis and Rheumatism. 63(11):3625-3632 (2011)

【非特許文献3】Latz E, et al., Nature Reviews Immunology. 13(6):397-411 (2013)

【非特許文献4】Gattorno M, et al., Arthritis and Rheumatism. 65(5):1137-1147 (2013)

【非特許文献5】Bauernfeind FG, et al., Journal of Immunology. 183(2):787-791 (2009)

【非特許文献6】Mariathasan S, et al., Nature. 440(7081):228-32 (2006)

【非特許文献7】Arostegui JI, et al., Arthritis and Rheumatism. 62(4):1158-1166 (2010)

【非特許文献8】Takahashi, K, et al., Cell. 131:861-872 (2007)

【非特許文献9】Tanaka, T, et al., Blood. 9;120(6):1299-1308 (2012)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、軟骨過形成疾患の治療剤および/または予防剤をスクリーニングする方法を提供することにある。本発明の課題はまた、軟骨過形成疾患の治療剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、軟骨過形成疾患患者の体細胞由来のiPS細胞を軟骨細胞に分化誘導させることで、軟骨過形成疾患の病態を再現することに成功した。すなわち、軟骨過形成疾患患者の体細胞由来のiPS細胞は、正常な個体由来のiPS細胞と比較して、軟骨誘導した際に、軟骨組織が過剰に形成される傾向を見出した。また、軟骨組織の過形成の生じる原因について検討したところ、軟骨前駆細胞の増殖が亢進することが原因ではなく、軟骨細胞から細胞外マトリックスが過剰に産生されることが軟骨組織の過形成の原因であることを見出した。さらに、軟骨過形成疾患の治療剤および/または予防剤を見出すべく軟骨過形成疾患患者の体細胞由来のiPS細胞から誘導した軟骨細胞を用いて病態のメカニズムの解明を試みたところ、AMP/PKA/CREBシグナル伝達経路が軟骨組織の過形成に関与することを見出し、このAMP/PKA/CREBシグナル伝達経路を阻害する薬剤であるアデニル酸シクラーゼ阻害剤を用いると軟骨組織の過形成を抑制できることを見出された。本発明はそのような知見に基づいて完成されたものである。

【0009】

すなわち、本発明は次に記載の事項を提供するものである。

[1] 有効成分としてアデニル酸シクラーゼ阻害剤を含む、軟骨過形成疾患の治療および/または予防用医薬。

[2] 前記アデニル酸シクラーゼ阻害剤が、SQ22536である、[1]に記載の医薬。

[3] 前記軟骨過形成疾患が、慢性乳児神経皮膚関節炎症候群である、[1]または[2]に記載の医薬。

[4] 軟骨過形成疾患を治療および/または予防するための方法であって、アデニル酸シクラーゼ阻害剤を投与することを含む、方法。

[5] 前記アデニル酸シクラーゼ阻害剤が、SQ22536である、[4]に記載の方法。

[6] 前記軟骨過形成疾患が、慢性乳児神経皮膚関節炎症候群である、[4]または[5]に記載の方法。

[7] 軟骨過形成疾患の治療および/または予防用医薬の製造におけるアデニル酸シクラーゼ阻害剤の使用。

[8] 前記アデニル酸シクラーゼ阻害剤が、SQ22536である、[7]に記載の使用。

[9] 前記軟骨過形成疾患が、慢性乳児神経皮膚関節炎症候群である、[7]または[8]に記載の使用。

[10] 軟骨過形成疾患を治療および/または予防するために使用されるアデニル酸シ

10

20

30

40

50

クラーゼ阻害剤。

[11] 前記アデニル酸シクラーゼ阻害剤がSQ22536である、[10]に記載の阻害剤。

[12] 前記軟骨過形成疾患が、慢性乳児神経皮膚関節炎症候群である、[10]または[11]に記載の阻害剤。

[13] 下記の工程を含む、軟骨過形成疾患の治療薬および/または予防薬をスクリーニングする方法；

(a) 軟骨前駆細胞を、被験物質と接触させるおよび接触させない条件下で培養する工程、
(b) 工程(a)で得られた細胞におけるSOX9のプロモーター活性を測定する工程、および

(c) 被験物質と接触させる条件下において、接触させない条件下よりSOX9のプロモーター活性が減少した場合、当該被験物質を軟骨過形成疾患の治療薬または予防薬として選出する工程。

[14] 前記SOX9のプロモーター活性を測定する工程が、SOX9のmRNA量を測定する工程である、[13]に記載の方法。

[15] 下記の工程を含む、軟骨過形成疾患の治療薬および/または予防薬をスクリーニングする方法；

(a) 軟骨前駆細胞を、被験物質と接触させるおよび接触させない条件下で培養する工程、
(b) 工程(a)で得られた細胞におけるcAMP量を測定する工程、および

(c) 被験物質と接触させる条件下において、接触させない条件下よりcAMP量が減少した場合、当該被験物質を軟骨過形成疾患の治療薬または予防薬として選出する工程。

[16] 下記の工程を含む、軟骨過形成疾患の治療薬および/または予防薬をスクリーニングする方法；

(a) 軟骨前駆細胞を、被験物質と接触させるおよび接触させない条件下で培養する工程、
(b) 工程(a)で得られた細胞におけるCREBのリン酸化を測定する工程、および

(c) 被験物質と接触させる条件下において、接触させない条件下よりCREBのリン酸化が減少した場合、当該被験物質を軟骨過形成疾患の治療薬または予防薬として選出する工程。

[17] 前記軟骨前駆細胞が、NLRP3に変異を有するiPS細胞から誘導された軟骨前駆細胞である、[13]~[16]のいずれかに記載の方法。

[18] 下記の工程を含む、軟骨過形成疾患の治療薬および/または予防薬をスクリーニングする方法；

(a) NLRP3の変異を有する軟骨前駆細胞を、被験物質と接触させるおよび接触させない条件下で培養する工程、
(b) 工程(a)で得られた培養物における細胞外マトリックス量を測定する工程、および

(c) 被験物質と接触させる条件下において、接触させない条件下より細胞外マトリックス量が減少した場合、当該被験物質を軟骨過形成疾患の治療薬または予防薬として選出する工程。

[19] 前記細胞外マトリックスが、グリコサミノグリカン(GAG)である、[18]に記載の方法。

[20] 前記NLRP3の変異が、NLRP3中のTyr570CysまたはGly307Ser変異である、[17]~[19]のいずれかに記載の方法。

[21] 前記軟骨過形成疾患が、慢性乳児神経皮膚関節炎症候群である、[13]~[20]のいずれかに記載の方法。

【発明の効果】

【0010】

本発明により、新規のツールを用いた軟骨過形成疾患の治療剤および/または予防剤の

10

20

30

40

50

スクリーニングが可能となる。また、本発明により、当該スクリーニングにより得られた軟骨過形成疾患の治療剤および/または予防剤を提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1A - B】図1は、NOMID患者由来のiPS細胞から軟骨細胞への分化を示す。図1Aは、iPS細胞から軟骨細胞への分化工程における培養条件の概略を示す。図1Bは、野生型NLRP3 iPS細胞（下段）および変異型NLRP3 iPS細胞（上段）から分化誘導させた軟骨細胞についてのAlcian blue染色像およびCOL2の免疫染色像を示す。左から順に、2Dマイクロマス培養（2D）のAlcian blue染色像、3Dペレット培養（3D）のAlcian blue染色像、3DのAlcian blue染色の拡大像、3DのCOL2の免疫染色像、および3DのCOL2の免疫染色の拡大像を示す。

10

【図1C】図1Cは、2Dマイクロマス培養（左図）または3Dペレット培養（右図）により分化誘導させた野生型軟骨細胞を含むペレットと変異型軟骨細胞を含むペレットのサイズについて定量解析の結果を示す。

【図2】図2は、野生型iPS細胞および変異型iPS細胞由来の軟骨前駆細胞（Day15）および軟骨細胞（Day29）における、軟骨細胞特異的遺伝子（SOX9、COL2A1、ACANおよびCOMP）の発現の結果を示す。図2Aは、二次元マイクロマス培養（2D）における軟骨細胞特異的遺伝子の発現の結果を示す。図2Bは、三次元ペレット培養（3D）における軟骨細胞特異的遺伝子の発現の結果を示す。

【図3A】図3は、野生型iPS細胞および変異型iPS細胞由来の軟骨組織における、軟骨前駆細胞の細胞増殖率および細胞外マトリックスの産生量について調べた結果を示す。図3Aは、野生型iPS細胞および変異型iPS細胞由来の軟骨前駆細胞の増殖曲線を示す。

20

【図3B - C】図3Bは、2D培養により誘導した軟骨組織における細胞外マトリックスの量を示す。左から順に、DNA量、全グリコサミノグリカン（GAG）量およびDNAあたりの全GAG量を示す。図3Cは、3D培養により誘導した軟骨組織における細胞外マトリックスの量を示す。左から順に、DNA量、全GAG量およびDNAあたりの全GAG量を示す。

【図4】図4は、野生型iPS細胞および変異型iPS細胞からの軟骨前駆細胞誘導過程（day -9からday 15）における各軟骨細胞特異的遺伝子のmRNA量を示す。図4Aは、SOX9（左図）、COL2A1（中央図）およびACAN（右図）の各分化誘導日数後の細胞における発現量を示す。図4Bは、NLRP3の各分化誘導日数後の細胞における発現量を示す。

30

【図5】図5は、3Dペレット培養により分化誘導された軟骨性ペレットのインビボにおける成熟化の結果を示す。図5Aは、変異型iPS細胞（上段）および野生型iPS細胞（下段）由来の軟骨性ペレットを免疫不全マウスに移植した3Dペレットの像を示す。左から順に、肉眼所見、Hematoxylin-eosin (HE) 染色像、Alcian Blue染色像およびvon Kossa染色像を示す。図5Bは、移植時（38日目）および回収時（66日目）における、ペレットサイズの定量解析の結果を示す。

【図6A - D】図6は、軟骨細胞誘導時においてカスパーゼ1阻害剤（Ac-YVAD）およびIL-1 阻害剤（IL1-Ra）を添加して培養した後の軟骨組織の解析結果を示す。図6Aは、Ac-YVADの添加または無添加（DMSO）による誘導後の誘導軟骨組織のAlcian blue染色像を示す。図6Bは、Ac-YVADの添加または無添加（DMSO）による誘導後の誘導軟骨組織のペレットのサイズの測定結果を示す。図6Cは、Ac-YVADの添加または無添加（DMSO）による誘導後の誘導軟骨細胞におけるSOX9の発現量を測定した結果を示す。図6Dは、Ac-YVADの添加または無添加（DMSO）による誘導後の誘導軟骨組織のペレットのDNA量（左図）、全グリコサミノグリカン（GAG）量（中央図）およびDNAあたりの全GAG量（右図）を示す。

40

【図6E - H】図6Eは、IL1-Raの添加または無添加（PBS/BSA）による誘導後の誘導軟骨組織のAlcian blue染色像を示す。図6Fは、IL1-Raの添加または無添加（PBS/BSA）による誘導後の誘導軟骨組織のペレットのサイズの測定結果を示す。図6Gは、IL1-Raの添加または無添加（PBS/BSA）による誘導後の誘導軟骨細胞におけるSOX9の発現量を測定した結果を示す。図6Hは、IL1-Raの添加または無添加（PBS/BSA）による誘導後の誘導軟骨組織のペレットのDNA量（左図）、全グリコサミノグリカン（GAG）量（中央図）およびDNA

50

あたりの全GAG量（右図）を示す。

【図7A - D】図7は、変異型軟骨細胞におけるSOX9 過剰発現について、メカニズム解析の結果を示す。変異型軟骨細胞におけるSOX9 過剰発現は、cAMP/PKA/CREBシグナル伝達経路に依存して生じることが示された。図7Aは、Sox9近位プロモーター(-927/+84bp)を含むルシフェラーゼレポーター構築体の概略図を示す。図7Bは、野生型軟骨前駆細胞および変異型軟骨前駆細胞における、ヒトSox9プロモーター活性の解析結果を示す。図7Cは、野生型軟骨前駆細胞 および変異型軟骨前駆細胞において各転写因子結合部位を変異させた場合のヒトSox9プロモーター活性を測定した結果を示す。図7Dは、アデニル酸シクラーゼアゴニスト(forskolin)およびアンタゴニスト(SQ22536)で処理された野生型軟骨前駆細胞および変異型軟骨前駆細胞における、ヒトSox9プロモーター活性を測定した結果を示す。

10

【図7E - I】図7Eは、野生型軟骨前駆細胞および変異型軟骨前駆細胞における、forskolinおよびSQ22536を添加した場合のSOX9の発現量を測定した結果を示す。図7Fおよび図7Gは、3D培養により誘導された野生型軟骨細胞および変異型軟骨細胞における、forskolinおよびSQ22536を添加した場合の軟骨ペレットのAlcian Blue染色像、および染色面積を測定した結果を示す。図7Hは、iPS細胞(day 0)および軟骨前駆細胞(day 15)における、野生型および変異型のそれぞれの細胞内cAMPの濃度の測定結果を示す。図7Iは、変異型軟骨前駆細胞(MT1、MT2、およびMT3)および野生型軟骨前駆細胞(WT1、WT2、およびWT3)における、リン酸化CREB(P-CREB)のウエスタンブロッティング解析結果を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0012】

本明細書において、「軟骨過形成疾患」は、軟骨組織が過剰に形成されることにより生じるあらゆる骨形成疾患を意味する。軟骨過形成疾患は、例えば、新生児期発症多臓器系炎症性疾患(NOMID)、慢性乳児神経皮膚関節炎症候群(OMID/CINCA)、家族性寒冷自己炎症症候群およびマックル・ウェルズ症候群を含むクリオピリン関連周期性症候群または軟骨形成腫瘍であり、軟骨形成腫瘍として、軟骨腫(内軟骨腫または骨膜軟骨腫)、骨軟骨腫、軟骨芽細胞腫、軟骨粘液線維腫、境界性軟骨腫瘍、軟骨肉腫、骨膜性軟骨肉腫、間葉性軟骨肉腫、脱分化型軟骨肉腫、淡明細胞型軟骨肉腫または悪性軟骨芽細胞腫などの疾患を含むがこれらに限定されない。本発明が対象とする軟骨過形成疾患は、好ましくは、一部の軟骨細胞においてCREBのリン酸化が亢進している病態であり、例えば、慢性乳児神経皮膚関節炎症候群であり得る。CREBのリン酸化が亢進している軟骨過形成疾患は、その疾患の原因となる遺伝子が突然変異を生じていてもよく、例えば、突然変異を生じている遺伝子は、NLRP3であり得る。NLRP3中に生じる突然変異は、機能獲得型もしくは機能欠損型のいずれの変異であってもよいが、好ましくは、機能獲得型の突然変異であり得る。好ましくは、NLRP3中に生じる突然変異は、Tyr570CysまたはGly307Ser変異であり得る。

30

【0013】

本明細書において、「NOMID」、「CINCA」、「新生児期発症多臓器系炎症性疾患」および「慢性乳児神経皮膚関節炎症候群」は、同一の疾患に対する別々の呼称を表したものであり、特段の断りがない限り、相互に置換して使用することができる。

40

【0014】

軟骨過形成疾患の治療剤および/または予防剤

本発明は、AMP/PKA/CREBシグナル伝達経路を阻害する化合物を含む軟骨過形成疾患の治療および/または予防用医薬を提供する。AMP/PKA/CREBシグナル伝達経路を阻害する化合物には、プロテインキナーゼA(PKA)阻害剤、およびアデニル酸シクラーゼ阻害剤が含まれる。本発明において、好ましい軟骨過形成疾患の治療および/または予防用医薬は、アデニル酸シクラーゼ阻害剤である。

【0015】

本発明において、プロテインキナーゼA(PKA)阻害剤は、PKAがCREB(cAMP response element binding protein)のリン酸化を抑制する物質であれば特に限定されないが、例えば、4-Cyano-3-methylisoquinoline、Adenosine 3',5'-cyclic Monophosphorothioate

50

, 2'-O-Monobutryryl-, Rp-Isomer, Sodium Salt, Adenosine 3', 5'-cyclic Monophosphorothioate, 8-Bromo-, Rp-Isomer, Sodium Salt, Adenosine 3', 5'-cyclic Monophosphorothioate, 8-Chloro-, Rp-Isomer, Sodium Salt, Adenosine 3', 5'-cyclic Monophosphorothioate, Rp-Isomer, Triethylammonium Salt, Ellagic Acid, Dihydrate, H-7, Dihydrochloride, H-89, Dihydrochloride, H-8, Dihydrochlorideまたは、HA 1004, Dihydrochlorideが挙げられる。これらの化合物は、Merck Millipore社などより購入可能である。

【0016】

本発明においてアデニル酸シクラーゼ阻害剤は、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制する物質であれば特に限定されない。したがって、細胞内および細胞外シグナル伝達経路のいずれの段階で作用するものであっても、結果的にアデニル酸シクラーゼの活性を抑制するものであれば、本願発明のアデニル酸シクラーゼ阻害剤に包含される。本発明におけるアデニル酸シクラーゼ阻害剤は、例えば、SQ 22536 (9-(テトラヒドロ-2-フランニル)-アデニン)、2', 5'-ジデオキシアデノシン、9-シクロペンチルアデニン、2', 5'-ジデオキシアデノシン3'-ジホスフェート、2', 5'-ジデオキシアデノシン3'-モノホスフェート、MDL-12330A (シス-N-(2-フェニルシクロペンチル)アザシクロトリデセ-1-エン-2-アミン)、特願2001-153954に開示された7, 8-ジヒドロ-5(6H)-キナゾリノン誘導体(好ましくは、2-アミノ-7-(4-クロロフェニル)-7, 8-ジヒドロ-5(6H)-キナゾリノン、2-アミノ-7-(4-メトキシフェニル)-7, 8-ジヒドロ-5(6H)-キナゾリノン、2-アミノ-7-フェニル-7, 8-ジヒドロ-5(6H)-キナゾリノン4, 2-アミノ-7-(2-フランニル)-7, 8-ジヒドロ-5(6H)-キナゾリノンおよび2-アミノ-7-(2-チエニル)-7, 8-ジヒドロ-5(6H)-キナゾリノンである)などの化合物、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、脳ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、下垂体細胞アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)などのペプチドを含むがこれらに限定されない。本発明におけるアデニル酸シクラーゼ阻害剤は、好ましくは、SQ 22536であり得る。本発明において、アデニル酸シクラーゼ阻害剤は、市販で入手することが可能であり、また当業者により周知の方法によって製造することもできる。本発明におけるアデニル酸シクラーゼ阻害剤が化合物である場合、その化合物の薬理的に許容される塩(好ましくは、ナトリウム塩またはカルシウム塩など)も、本願発明のアデニル酸シクラーゼ阻害剤に包含される。

【0017】

本発明の軟骨過形成疾患の治療剤および/または予防剤として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。一方、非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。より好ましくは、関節内投与用注射剤である。これらの製剤は、賦形剤(例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトールのような糖誘導体; トウモロコシデンプン、パレイショデンプン、澱粉、デキストリンのような澱粉誘導体; 結晶セルロースのようなセルロース誘導体; アラビアゴム; デキストラン; プルランのような有機系賦形剤; および、軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体; 燐酸水素カルシウムのような燐酸塩; 炭酸カルシウムのような炭酸塩; 硫酸カルシウムのような硫酸塩等の無機系賦形剤である)、滑沢剤(例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩; タルク; コロイドシリカ; ビーズワックス、ゲイ蠟のようなワックス類; 硼酸; アジピン酸; 硫酸ナトリウムのような硫酸塩; グリコール; フマル酸; 安息香酸ナトリウム; DLロイシン; ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩; 無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類; および、上記澱

10

20

30

40

50

粉誘導体である)、結合剤(例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、および、前記賦形剤と同様の化合物である)、崩壊剤(例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体;カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルロース類である)、乳化剤(例えば、ベントナイト、ビーガムのようなコロイド性粘土;水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウムのような金属水酸化物;ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸カルシウムのような陰イオン界面活性剤;塩化ベンザルコニウムのような陽イオン界面活性剤;および、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステルのような非イオン界面活性剤である)、安定剤(メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類;クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類;塩化ベンザルコニウム;フェノール、クレゾールのようなフェノール類;チメロサル;デヒドロ酢酸;および、ソルビン酸である)、矯味矯臭剤(例えば、通常使用される、甘味料、酸味料、香料等である)、希釈剤等の添加剤を用いて周知の方法で製造される。

10

【0018】

本発明の薬剤の患者への投与量は、治療すべき病態の種類、症状および疾患の重篤度、患者年齢、性別もしくは体重、投与方法などにより異なるので一義的には言えないが、医師が前記状況を考慮して判断することにより、適宜適当な投与量を決定することができる。

20

【0019】

軟骨過形成疾患の治療薬および/または予防薬のスクリーニング方法

本発明は、軟骨前駆細胞と被験物質とを接触させ、各指標を用いて、軟骨過形成疾患の治療薬および/または予防薬の被験物質をスクリーニングする方法を提供する。すなわち、本発明は、以下の工程を含む軟骨過形成疾患の治療薬および/または予防薬の被験物質をスクリーニングする方法である;

(a)軟骨前駆細胞を、被験物質と接触させるおよび接触させない条件下で培養する工程、

(b)工程(a)で得られた細胞における指標値を測定する工程、および

(c)被験物質と接触させる条件下において、接触させない条件下より指標値が減少した場合、当該被験物質を軟骨過形成疾患の治療薬または予防薬として選出する工程。

30

【0020】

本発明のスクリーニングにおいて用いる指標は、SOX9のプロモーター活性、cAMP量、CREBのリン酸化、細胞外マトリックス量、軟骨細胞を含む組織の大きさから成る群より選択される1つ以上の指標が例示される。

【0021】

本発明において、SOX9のプロモーター活性を検出する方法は、特に限定されないが、軟骨前駆細胞が、SOX9のプロモーターによって発現が制御されるレポーター遺伝子を有している時は、そのレポーター遺伝子の発現を検出すればよい。他の態様として、内在性のSOX9の発現を検出することによって、SOX9のプロモーター活性を検出してもよい。レポーター遺伝子として、緑色蛍光タンパク質(GFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、青色蛍光タンパク質(BFP)のような蛍光タンパク質、イクオリンのような発光タンパク質またはルシフェラーゼ、ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)のような酵素をコードする遺伝子がある。

40

【0022】

SOX9のプロモーター活性を検出するために、当該軟骨細胞は、SOX9のプロモーター領域とレポーター遺伝子を結合した塩基配列を有する構築物を導入して用いることができる。ここで、SOX9のプロモーター領域を含むDNA断片は、当業者に周知の方法により、ゲノムDNAやゲノムライブラリーから単離することができる。本発明において好ましい

50

プロモーター領域は、配列番号9で表される塩基配列である。前記構築物は、プラスミドベクター、ウイルスベクター、または人工染色体ベクター (Suzuki N et al., J Biol Chem. 281(36):26615, 2006) を用いて作製される。

【0023】

他の態様として、当該軟骨前駆細胞が、多能性幹細胞から製造される場合、SOX9のプロモーターによって制御されるレポーター遺伝子を相同組換え法を用いて、SOX9のコーディング領域とレポーター遺伝子配列を置き換えるように遺伝子操作をされた多能性幹細胞から調製されてもよく、もしくはSOX9がコードするタンパク質またはその一部とレポーター遺伝子がコードするタンパク質との融合タンパク質を産生するようにレポーター遺伝子配列をSOX9遺伝子座に挿入するように遺伝子操作をされた多能性幹細胞から調製されてもよい。

10

【0024】

レポーター遺伝子または内在性のSOX9の発現を検出する場合、例えば、PCR法、LAMP法、ノザンハイブリダイゼーション法などによって、転写産物 (hnRNA、mRNAなど) を検出してもよく、RIA法、IRMA法、EIA法、ELISA法、LPIA法、CLIA法、あるいはイムノブロット法などによって、翻訳産物 (ペプチド、修飾ペプチドなど) を検出してもよい。転写産物および翻訳産物は、定量的に検出されることが望ましい。

【0025】

本発明において、cAMP量を指標として用いる場合、当分野において既知である任意の方法を用いて行うことができ、例えば、RIA法、IRMA法、EIA法、ELISA法、LPIA法、CLIA法を用いて検出しても良い。

20

【0026】

本発明において、CREBのリン酸化を指標として用いる場合、当分野において既知である任意の方法を用いて行うことができ、例えば、当該リン酸化CREBを特異的に認識する抗体を用いたウェスタンブロット法により検出しても良い。

【0027】

本発明において、指標として用いる細胞外マトリックスは、軟骨組織の細胞外マトリックスであれば、特に限定されないが、例えば、II型コラーゲン、プロテオグリカン (アグリカン)、ヒアルロン酸、グリコサミノグリカンが挙げられる。指標として特に好ましい細胞外マトリックスは、グリコサミノグリカンである。細胞外マトリックスを指標として用いる場合、当分野において既知である任意の方法を用いて行うことができ、例えば、グリコサミノグリカンを指標とする場合、Blyscan Glycosaminoglycan Assay (Biocolor) を用いて行うことができるがこれに限定されない。

30

【0028】

本発明において、軟骨細胞を含む組織の大きさを指標として用いる場合、当分野において既知である任意の方法を用いて行うことができ、例えば、Alcian blueを用いて染色した像を測定することによって行うことができる。測定には、目視によって行うこともできるが、インセルアナライザー等を用いて機械的に検出しても良い。

【0029】

本発明の軟骨過形成疾患の治療薬および/または予防薬の被験物質をスクリーニングにおいて、より顕著に指標の差異を検出するため、NLRP3に変異を有する軟骨前駆細胞を用いても良い。NLRP3に変異を有する軟骨前駆細胞は、当該変異を有する個体から直接採取して用いても良いが、NLRP3に変異を有する多能性幹細胞から軟骨前駆細胞を誘導して用いても良い。NLRP3の変異とは、慢性乳児神経皮膚関節炎症候群に関連する変異が例示され、例えば、Tyr570Cys、Gly307Serなどが挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0030】

本発明において、NLRP3に変異を有する多能性幹細胞は、当該変異を相同組換えによって多能性幹細胞へ挿入してもよく、多能性幹細胞としてiPS細胞を用いる場合、当該変異を有する体細胞からiPS細胞を製造しても良い。

【0031】

50

本発明の軟骨過形成疾患の治療薬および/または予防薬の被験物質をスクリーニングにおいて、より顕著に指標の差異を検出するため、軟骨前駆細胞を被験物質と接触させる条件下での培養において、当該軟骨前駆細胞を軟骨細胞へ誘導する培養方法を用いても良い。

【0032】

本発明のスクリーニング方法においては、任意の被験物質を用いることができ、いかなる公知化合物および新規化合物であってもよく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、微生物発酵産物、海洋生物由来の抽出物、植物抽出物、精製タンパク質または粗タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成低分子化合物、天然化合物等が挙げられる。本発明において、被験物質はまた、(1)生物学的ライブラリー法、(2)デコンヴォリューションを用いる合成ライブラリー法、(3)「1ビーズ1化合物(one-bead one-compound)」ライブラリー法、および(4)アフィニティクロマトグラフィ選別を使用する合成ライブラリー法を含む当技術分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多くのアプローチのいずれかを使用して得ることができる。アフィニティクロマトグラフィ選別を使用する生物学的ライブラリー法はペプチドライブラリーに限定されるが、その他の4つのアプローチはペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の低分子化合物ライブラリーに適用できる(Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12: 145-67)。分子ライブラリーの合成方法の例は、当技術分野において見出され得る(DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909-13; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422-6; Zuckermann et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37: 2678-85; Cho et al. (1993) *Science* 261: 1303-5; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37: 1233-51)。化合物ライブラリーは、溶液(Houghten (1992) *Bio/Techniques* 13: 412-21を参照のこと)またはビーズ(Lam (1991) *Nature* 354: 82-4)、チップ(Fodor (1993) *Nature* 364: 555-6)、細菌(米国特許第5,223,409号)、孢子(米国特許第5,571,698号、同第5,403,484号、および同第5,223,409号)、プラスミド(Cull et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-9)若しくはファージ(Scott and Smith (1990) *Science* 249: 386-90; Devlin (1990) *Science* 249: 404-6; Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378-82; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 301-10; 米国特許出願第2002103360号)として作製され得る。

10

20

30

【0033】

本発明のスクリーニング方法における対象疾患としては、好ましくは、慢性乳児神経皮膚関節炎症候群である。

【0034】

本発明のスクリーニングで用いる軟骨前駆細胞は、多能性幹細胞から分化誘導によって製造されていてもよく、分化誘導する方法としては、当分野において用いられる任意の方法を採用することができ、本願出願時において当業者に知られていた方法のみならず、本願出願後において開発された分化誘導方法を採用することも可能である。軟骨細胞を分化誘導する方法として、例えば、Koyama, N. et al. *Stem Cells and Development* 22, 102-113 (2013)、Hwang, N.S., et al. *PLoS ONE* 3, e2498 (2008)、Oldershaw, R.A. et al. *Nat. Biotechnol.* 28, 1187-1194 (2010)、Bai, H.Y., et al. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 94, 539-546 (2010)、Umeda, K. et al. *Scientific Reports* 2 (2012)、Yamashita, A. et al. *Scientific Reports* 3 (2013)などに記載の方法が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0035】

本発明において「軟骨前駆細胞」とは、コラーゲン、グリコサミノグリカン(GAG)などの軟骨または軟骨組織を構成する細胞外マトリックスを産生する「軟骨細胞」へと特異的に成長する前駆細胞を意味し、軟骨細胞より、軟骨細胞特異的遺伝子の発現が弱い細胞を指す。

【0036】

50

本発明において、軟骨細胞特異的遺伝子とは、II型コラーゲン(COL2A1)、SOX9、軟骨オリゴマー基質タンパク質(COMP)またはAGGRECAN(ACAN)が例示される。本発明において、COL2A1には、NCBIのアクセッション番号として、ヒトの場合、NM_001844またはNM_033150、マウスの場合、NM_001113515またはNM_031163に記載されたヌクレオチド配列を有する遺伝子ならびに当該遺伝子にコードされるタンパク質、ならびにこれらの機能を有する天然に存在する変異体が包含される。本発明において、SOX9には、NCBIのアクセッション番号として、ヒトの場合、NM_000346、マウスの場合、NM_011448に記載されたヌクレオチド配列を有する遺伝子ならびに当該遺伝子にコードされるタンパク質、ならびにこれらの機能を有する天然に存在する変異体が包含される。本発明において、COMPには、NCBIのアクセッション番号として、ヒトの場合、NM_000095、マウスの場合、NM_016685に記載されたヌクレオチド配列を有する遺伝子ならびに当該遺伝子にコードされるタンパク質、ならびにこれらの機能を有する天然に存在する変異体が包含される。本発明において、ACANには、NCBIのアクセッション番号として、ヒトの場合、NM_001135もしくはNM_013227、マウスの場合、NM_007424に記載されたヌクレオチド配列を有する遺伝子ならびに当該遺伝子にコードされるタンパク質、ならびにこれらの機能を有する天然に存在する変異体が包含される。

10

【0037】

本発明において用いる軟骨前駆細胞は、軟骨細胞特異的遺伝子のうち、SOX9およびCOL2A1を発現するが、COMPおよびACANは発現が弱い、または発現していない、または発現が確認できない細胞である。本発明において、COMPおよびACANの発現が弱いとは、軟骨細胞と比較して当該軟骨細胞特異的遺伝子の発現量が少ないことを言う。

20

【0038】

本発明において用いる軟骨前駆細胞は、軟骨前駆細胞のみによって集団を形成していてもよく、あるいは軟骨前駆細胞と当該細胞から産生された細胞外マトリックスからなる培養物(ペレット)の状態(軟骨組織)であってもよい。

【0039】

軟骨前駆細胞への分化誘導は、例えば、下記のプロトコール(Umeda, K. et al. Scientific Reports 2 (2012)を修正した)にしたがって行われ、このとき、任意の分化誘導因子が用いられる。本発明において使用される分化誘導因子は、例えば、Noggin、Bio、PDGF(好ましくは、PDGF-BB)、TGF- β 、BMP4などが挙げられるがこれらに限定されない。これらの因子は、軟骨前駆細胞への分化培養工程の任意の段階において任意の組み合わせで追加することができ、好ましくは、(i) iPS細胞を中胚葉細胞へ分化誘導する工程、(ii) (i)で得られた細胞を軟骨細胞へ分化誘導する工程、または、(i) iPS細胞を神経堤細胞へ分化誘導する工程、(ii) (i)で得られた細胞を軟骨前駆細胞へ分化誘導する工程を含む方法が例示される。本発明において、軟骨前駆細胞を成熟化するためには、さらに、二次元(2D)マイクロマス培養法または細胞を三次元(3D)ペレット培養法を用いても良い。本発明で用いる軟骨前駆細胞は、二次元(2D)マイクロマス培養法または細胞を三次元(3D)ペレット培養法を施行した軟骨細胞調整過程の細胞も含まれる。

30

【0040】

本発明で用いる軟骨前駆細胞を多能性幹細胞から製造する場合、多能性幹細胞を中胚葉細胞または神経堤細胞へと誘導する工程を経て行われても良い。

40

【0041】

本発明において、「中胚葉細胞」とは、動物の発生期の原腸胚期において、内胚葉と外胚葉の間に発生する細胞を意味し、例えば、BRACHYURY、KDR、FOXF1、FLK1およびBMP4が陽性である細胞を意味する。本発明における中胚葉細胞において、これらのマーカー遺伝子は、単独で発現していてもよく、複数の組み合わせで発現していてもよい。好ましくは、KDRを発現する細胞である。

【0042】

本発明において、「神経堤細胞」とは、胚内の様々な部位への遊走能を有する、神経堤から脱上皮化した細胞と同等の細胞を意味する。すなわち、本発明の神経堤細胞は、神経

50

堤由来の組織中（例えば、骨髄、脊髄後根神経節、心臓、角膜、虹彩、歯髄、および嗅粘膜）の未分化な神経堤由来細胞も含む。神経堤細胞は、好ましくは、TFAP2A、SOX10、PAX3およびp75（NGFR）のうち少なくとも一つの遺伝子が陽性である細胞であり得る。本発明において、TFAP2Aには、NCBIのアクセッション番号として、ヒトの場合、NM_001032280、NM_001042425またはNM_003220、マウスの場合、NM_001122948 またはNM_011547に記載されたヌクレオチド配列を有する遺伝子ならびに当該遺伝子にコードされるタンパク質、ならびにこれらの機能を有する天然に存在する変異体が包含される。本発明において、SOX10には、NCBIのアクセッション番号として、ヒトの場合、NM_006941、マウスの場合、NM_011437に記載されたヌクレオチド配列を有する遺伝子ならびに当該遺伝子にコードされるタンパク質、ならびにこれらの機能を有する天然に存在する変異体が包含される。本発明において、PAX3には、NCBIのアクセッション番号として、ヒトの場合、NM_000438、NM_01127366、NM_013942、NM_181457、NM_181458、NM_181459、NM_181460またはNM_181461、マウスの場合、NM_001159520またはNM_008781に記載されたヌクレオチド配列を有する遺伝子ならびに当該遺伝子にコードされるタンパク質、ならびにこれらの機能を有する天然に存在する変異体が包含される。

10

【0043】

多能性幹細胞を中胚葉細胞へ分化誘導する工程

20

本発明において、多能性幹細胞から中胚葉細胞を誘導する方法は、特に限定されないが、BMP阻害剤およびGSK-3 阻害剤を含有する培養液で培養する方法が例示される。

【0044】

多能性幹細胞から中胚葉細胞を誘導する工程(i)では、好ましくは、後述のように得られたiPS細胞を任意の方法で分離し、浮遊培養により培養され得る。ここで、分離の方法としては、力学的、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液（例えば、Accutase(TM)およびAccumax(TM)が挙げられる）またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離液を用いてもよい。ここで、用いる多能性幹細胞は、使用したディッシュに対して80%コンフルエントになるまで培養されたコロニーを用いることが好ましい。

30

【0045】

本発明において、浮遊培養とは、細胞を培養皿へ非接着の状態に培養することであり、特に限定はされないが、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理）されていないもの、もしくは、人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA）によるコーティング処理）したものを使用して行うことができる。

【0046】

多能性幹細胞から中胚葉細胞の誘導において使用される培養液は、動物細胞の培養に用いられる基礎培地へBMP阻害剤、GSK-3 阻害剤およびTGFファミリー阻害剤を添加して調製することができる。基礎培地としては、例えば、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、これらの混合培地などが挙げられる。培地には、血清（例えば、FBS）が含有されていてもよいし、または無血清でもよい。必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、KnockOut Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの血清代替物) (Invitrogen)、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、GlutaMAX (Invitrogen)、非必須アミノ酸 (NEAA)、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。多能性幹細胞から中胚葉細胞の誘導において使用される基礎培地の1つ

40

50

の実施形態において、IMDM培地とHam's F12培地を1:1で混合した培地である。

【0047】

本発明において、BMP阻害剤とは、BMP(bone morphogenetic protein)とBMP受容体(I型又はII型)との結合を介するBMPシグナル伝達(BMP signaling)の阻害に關与する物質であれば何でもよく、例えば、Dorsomorphin (すなわち、6-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine)及びその誘導体が包含される(P. B. Yu et al. (2007), *Circulation*, 116:11_60; P.B. Yu et al. (2008), *Nat. Chem. Biol.*, 4:33-41; J. Hao et al. (2008), *PLoS ONE* (www.plozone.org), 3(8):e2904)、Noggin、chordin、follistatinなどが挙げられるがこれらに限定されない。これらの阻害剤は、例えば、R&D systems社等から入手可能であり、また自ら作製してもよい。本発明で用いる好ましいBMP阻害剤としては、Nogginが挙げられる。Nogginには、ヒトおよび他の動物由来のNoggin、ならびにこれらの機能的改変体が包含され、例えば、R&D systems社等の市販されているものを使用することができる。本発明で用いるBMP阻害剤の濃度は、使用するBMP阻害剤に応じて当業者に適宜選択可能であるが、例えば、BMP阻害剤としてNogginを用いる場合、1ng/mlから500ng/mlの範囲内、好ましくは、10ng/mlから200ng/mlの範囲内にあり、例えば、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、100ng/ml、120ng/ml、140ng/ml、160ng/ml、180ng/ml、200ng/mlであるがこれらに限定されない。好ましくは、100ng/mlである。

10

【0048】

本発明において、GSK-3 阻害剤は、GSK-3 の機能、例えば、キナーゼ活性を直接または間接的に阻害できるものである限り特に限定されず、例えば、Wnt3a、インジルピン誘導体であるBIO (別名、GSK-3 阻害剤IX; 6-プロモインジルピン3'-オキシム)、マレイミド誘導体であるSB216763 (3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン)、フェニル プロモメチルケトン化合物であるGSK-3 阻害剤VII (4-ジプロモアセトフェノン)、細胞膜透過型のリン酸化ペプチドであるL803-mts (別名、GSK-3 ペプチド阻害剤; Myr-N-GKEAPPAPPQSpP-NH₂) および高い選択性を有するCHIR99021 (*Nature* (2008) 453: 519-523) などが挙げられるがこれらに限定されない。これらの化合物は、例えば、Stemgent、CalbiochemやBiomol社等から入手可能であり、また自ら作製してもよい。本発明で用いる好ましいGSK-3 阻害剤としては、BIOが挙げられる。BIOには、その機能的改変体が包含され、機能的改変体としては、例えば、Acetoxime-BIO (AceBIO) などが挙げられる。本発明で用いるGSK-3 阻害剤の濃度は、使用するGSK-3 阻害剤に応じて当業者に適宜選択可能であるが、例えば、GSK-3 阻害剤としてBioを用いる場合、0.1 μMから100 μMの範囲内、好ましくは、0.5 μMから20 μMの範囲内にあり、例えば、0.5 μM、1 μM、1.5 μM、2 μM、3 μM、4 μM、5 μM、6 μM、7 μM、8 μM、9 μM、10 μM、15 μM、20 μMであるがこれらに限定されない。好ましくは、2 μMから5 μMの範囲内である。本発明で用いるGSK-3 阻害剤は、工程の間にその濃度を変更させることが可能であり、例えば、GSK-3 阻害剤としてBioを用いる場合、0から3日は3 μM、4-8日は5 μMとして用いることができる。

20

30

【0049】

本発明において、TGF ファミリー阻害剤は、TGF ファミリーのシグナル伝達に干渉する低分子阻害剤である限り特に限定されず、例えば、SB431542、SB202190(R.K.Lindemann et al., *Mol. Cancer* 2:20 (2003)), SB505124 (Glaxo SmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208 (Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276 (Lilly Research Laboratories)、A-83-01 (WO 2009/146408) などが包含される。本発明で用いる好ましいGSK-3 阻害剤としては、SB431542が挙げられる。本発明で用いるTGF ファミリー阻害剤の濃度は、使用するTGF ファミリー阻害剤に応じて当業者に適宜選択可能であるが、例えば、TGF ファミリー阻害剤としてSB431542を用いる場合、0.1 μMから100 μMの範囲内、好ましくは、0.5 μMから20 μMの範囲内にあり、例えば、0.5 μM、1 μM、1.5 μM、2 μM、3 μM、4 μM、5 μM、6 μM、7 μM、8 μM、9 μM、10 μM、15 μM、20 μMであるがこれらに限定されない。好ましくは、2 μMから5 μMの範囲内である。本発明で用いるGSK-3 阻害剤は、工程の

40

50

間にその濃度を変更させることが可能であり、例えば、GSK-3 阻害剤としてBioを用いる場合、0-3日は3 μ M、4-8日は5 μ Mとして用いることができる。

【0050】

多能性幹細胞から中胚葉細胞の誘導において使用される工程(i)において、培養温度は特に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われる。CO₂濃度は、約2~5%、好ましくは約5%である。本工程の培養時間は、例えば15日以下の培養であり、好ましくは9日以下であり、より好ましくは、5日以下である。

【0051】

本発明において、多能性幹細胞とは、生体に存在する全ての細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞であり、それには、例えば胚性幹(ES)細胞(J.A. Thomson et al. (1998), Science 282:1145-1147; J.A. Thomson et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7844-7848; J.A. Thomson et al. (1996), Biol. Reprod., 55:254-259; J.A. Thomson and V.S. Marshall (1998), Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165)、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹(ntES)細胞(T. Wakayama et al. (2001), Science, 292:740-743; S. Wakayama et al. (2005), Biol. Reprod., 72:932-936; J. Byrne et al. (2007), Nature, 450:497-502)、精子幹細胞(「GS細胞」)(M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) Biol. Reprod., 69:612-616; K. Shinohara et al. (2004), Cell, 119:1001-1012)、胚性生殖細胞(「EG細胞」)(Y. Matsui et al. (1992), Cell, 70:841-847; J.L. Resnick et al. (1992), Nature, 359:550-551)、人工多能性幹(iPS)細胞(K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) Cell, 126:663-676; K. Takahashi et al. (2007), Cell, 131:861-872; J. Yu et al. (2007), Science, 318:1917-1920; Nakagawa, M.ら, Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008); WO 2007/069666)、培養線維芽細胞や骨髄幹細胞由来の多能性細胞(Muse細胞)(WO2011/007900)などが含まれる。より好ましくは、ヒト多能性幹細胞である。

【0052】

本発明において用いる多能性幹細胞は、NLRP3に変異を有する多能性幹細胞であることが望ましいことから、軟骨過形成疾患患者由来の体細胞より製造されたiPS細胞であることが好ましい。

【0053】

本発明の軟骨過形成疾患の治療薬および/または予防薬の被験物質をスクリーニングにおいて、より顕著に指標の差異を検出するため、軟骨前駆細胞を被験物質と接触させる条件下での培養において、当該軟骨前駆細胞を軟骨細胞へ誘導する培養方法を用いても良い。

【0054】

(i) 多能性幹細胞を神経堤細胞へ分化誘導する工程

本発明において、多能性幹細胞から神経堤細胞を誘導する方法は、特に限定されないが、TGF β ファミリー阻害剤を含有する培養液で培養する方法が例示される。

【0055】

多能性幹細胞から神経堤細胞を誘導する工程(i)では、好ましくは、前述のように得られた多能性幹細胞を、接着培養により培養した後、培養液を交換することによって行い得る。

【0056】

本発明において、接着培養では、多能性幹細胞の培養容器への接着能を高めるため、培養容器をコーティングして用いることができる。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル(BD Biosciences)、Synthemax(Corning)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン、またはフィブロネクチンおよびこれらの断片、または組み合わせが挙げられ、好ましくは、マトリゲルである。

【0057】

多能性幹細胞から神経堤細胞の誘導において使用される培養液は、動物細胞の培養に用

いられる基礎培地へTGFファミリー阻害剤を添加して調製することができる。基礎培地としては、例えば、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、これらの混合培地などが挙げられる。培地には、血清（例えば、FBS）が含有されていてもよいし、または無血清でもよい。必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、KnockOut Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの血清代替物) (Invitrogen)、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、GlutaMAX (Invitrogen) 10、非必須アミノ酸 (NEAA)、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。多能性幹細胞から神経堤細胞の誘導において使用される基礎培地の1つの実施形態において、好ましい基礎培地は、血清、GlutaMAX、インスリン、トランスフェリン、ビタミンおよび3'-チオールグリセロールを添加したIMDM培地とHam's F12培地を1:1で混合した培地である。

【0058】

多能性幹細胞から神経堤細胞の誘導において使用されるTGFファミリー阻害剤は、上述のTGFファミリー阻害剤と同条件にて用いることができる。

【0059】

多能性幹細胞から神経堤細胞の誘導において使用される工程(i)において、培養温度は特に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われる。CO₂濃度は、約2~5%、好ましくは約5%である。本工程の培養時間は、例えば15日以下の培養であり、好ましくは8日である。

【0060】

(ii) 中胚葉細胞または神経堤細胞から軟骨細胞へ分化誘導する工程

前記工程(i)で得られた中胚葉細胞または神経堤細胞から軟骨細胞を分化誘導するために、任意の方法で分離し、(ii-1)接着培養により軟骨前駆細胞を誘導する工程、および、(ii-2)二次元(2D)マイクロマス培養法、または(ii-2')三次元(3D)ペレット培養法を用いて軟骨細胞を誘導する工程を含有し得る。ここで、中胚葉細胞または神経堤細胞の分離の方法としては、力学的な方法や酵素学的な方法を用いることができるが、好ましくは、TrypLE Selectにより分離され得る。また、前記工程(i)で得られた細胞を分離後、フローサイトメトリー(FACS)にかけて、中胚葉細胞または神経堤細胞を濃縮し、本工程における出発細胞として用いることもできる。

【0061】

(ii-1) 接着培養により軟骨前駆細胞を誘導する工程

本発明において、中胚葉細胞または神経堤細胞を接着培養する方法として、細胞外基質によりコーティング処理された培養容器を用いて培養すること方法が挙げられる。コーティング処理は、細胞外基質を含有する溶液を培養容器に入れた後、当該溶液を適宜除くことによって行い得る。

【0062】

本発明において、細胞外基質とは、細胞の外に存在する超分子構造体であり、天然由来であっても、人工物(組換え体)であってもよい。例えば、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ヒアルロン酸、テネイシン、エンタクチン、エラスチン、フィブリリン、ラミニンといった物質またはこれらの断片が挙げられる。これらの細胞外基質は、組み合わせて用いられてもよく、例えば、BD Matrigel(TM)などの細胞からの調製物であってもよい。人工物としては、ラミニンの断片が例示される。本発明において、ラミニンとは、鎖、鎖、鎖をそれぞれ1本ずつ持つヘテロ三量体構造を有するタンパク質であり、特に限定されないが、例えば、鎖は、1、2、3、4または5であり、鎖は、1、2または3であり、ならびに鎖は、1、2または3が例示される。本発明において、ラミニンの断片とは、インテグリン結合活性を有しているラ

10

20

30

40

50

ミニンの断片であれば、特に限定されないが、例えば、エラスターゼにて消化して得られる断片であるE8フラグメントが例示される。本発明において軟骨前駆細胞を誘導するための接着培養には、培養容器がフィブロネクチンでコーティング処理されていることが好ましい。

【0063】

本発明の(ii-1)中胚葉細胞または神経堤細胞を接着培養により軟骨前駆細胞を誘導する工程において使用される培養液は、動物細胞の培養に用いられる基礎培地へbFGFおよびTGFファミリー阻害剤を添加して調製することができる。基礎培地としては、例えば、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、これらの混合培地などが挙げられる。培地には、血清(例えば、FBS)が含有されていてもよいし、または無血清でもよい。必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、KnockOut Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの血清代替物) (Invitrogen)、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、GlutaMAX (Invitrogen)、非必須アミノ酸 (NEAA)、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。多能性幹細胞から神経堤細胞の誘導において使用される基礎培地の1つの実施形態において、好ましい基礎培地は、血清、GlutaMAX、インスリン、トランスフェリン、ビタミンおよび3'-チオールグリセロールを添加したIMDM培地とHam's F12培地を1:1で混合した培地である。

10

20

【0064】

本発明の(ii-1)中胚葉細胞または神経堤細胞を接着培養により軟骨前駆細胞を誘導する工程において使用されるTGFファミリー阻害剤は、上述のTGFファミリー阻害剤と同条件にて用いることができる。

【0065】

本発明の(ii-1)中胚葉細胞または神経堤細胞を接着培養により軟骨前駆細胞を誘導する工程において使用されるbFGFは、WAKO社など市販のものと使用することが可能であり、bFGFの濃度は、例えば0.1-100ng/mlの範囲内、好ましくは1-50ng/mlの範囲内にあり、例えば、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/mlであるがこれらに限定されない。好ましくは、5ng/mlである。

30

【0066】

本発明の(ii-1)中胚葉細胞または神経堤細胞を接着培養により軟骨前駆細胞を誘導する工程において、培養温度は特に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われる。CO₂濃度は、約2~5%、好ましくは約5%である。本工程の培養時間は、例えば15日以下の培養であり、好ましくは9日である。

【0067】

(ii-2) 二次元(2D)マイクロマス培養法

本発明において、二次元(2D)マイクロマス培養法は、細胞外基質によりコーティング処理された培養容器を用いて培養することによって行い得る。コーティング処理は、細胞外基質を含有する溶液を培養容器に入れた後、当該溶液を適宜除くことによって行い得る。

40

【0068】

本発明において、マイクロマス培養とは、少量(例えば、1μlから50μl、好ましくは、1μlから10μl)の培養液中で、高密度で細胞(例えば、10000個から1000000個、好ましくは、10000個から500000個)を播種して培養する培養方法である。

【0069】

本発明において、細胞外基質とは、細胞の外に存在する超分子構造体であり、天然由来

50

であっても、人工物（組換え体）であってもよい。例えば、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ヒアルロン酸、テネイシン、エンタクチン、エラスチン、フィブリリン、ラミニンといった物質またはこれらの断片が挙げられる。これらの細胞外基質は、組み合わせられてもよく、例えば、BD Matrigel(TM)などの細胞からの調製物であってもよい。人工物としては、ラミニンの断片が例示される。本発明において、ラミニンとは、鎖、鎖、鎖をそれぞれ1本ずつ持つヘテロ三量体構造を有するタンパク質であり、特に限定されないが、例えば、鎖は、1、2、3、4または5であり、鎖は、1、2または3であり、ならびに鎖は、1、2または3が例示される。本発明において、ラミニンの断片とは、インテグリン結合活性を有しているラミニンの断片であれば、特に限定されないが、例えば、エラスターゼにて消化して得られる断片であるE8フラグメントが例示される。本発明において軟骨前駆細胞を誘導するための接着培養には、培養容器がフィブロネクチンでコーティング処理されていることが好ましい。

10

【0070】

本工程(ii-2)において使用される培養液は、動物細胞の培養に用いられる基礎培地へPDGF-BB、TGF₃およびBMP4、またはこれらの同等体を添加して調製することができる。これらの基礎培地へ添加される因子は、同時に添加されてもよく、また培養工程の任意の段階において別々に添加されてもよい。

【0071】

PDGF-BBの機能的同等体としては、例えば、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-CC、PDGF-DDなどが挙げられるがこれらに限定されない。TGF₃の機能的同等体としては、例えば、TGF₁、TGF₂などが挙げられるがこれらに限定されない。BMP4の機能的同等体としては、例えば、BMP2、BMP6、BMP7などが挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0072】

基礎培地としては、例えば、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、これらの混合培地などが挙げられる。培地には、血清（例えば、FCS）が含有されていてもよいし、または無血清でもよい。必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、KnockOut Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの血清代替物) (Invitrogen)、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、GlutaMAX (Invitrogen)、非必須アミノ酸 (NEAA)、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。本工程の1つの実施形態において、基礎培地は、DMEM培地とHam's F12培地を1:1で混合した無血清軟骨形成培地である。

30

【0073】

基礎培地におけるPDGF-BBの濃度は、例えば1-100ng/mlの範囲内、好ましくは20-60ng/mlの範囲内にあり、例えば、1ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、25ng/ml、30ng/ml、35ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、100ng/mlであるがこれらに限定されない。更に好ましくは、40ng/mlである。

40

【0074】

基礎培地におけるTGF₃の濃度は、例えば1-100 ng/mlの範囲内、好ましくは5-20 ng/mlの範囲内にあり、例えば、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、75ng/ml、100ng/mlであるがこれらに限定されない。更に好ましくは、10ng/mlである。

【0075】

基礎培地におけるBMP4の濃度は、例えば1-200ng/mlの範囲内、好ましくは20-40ng/mlの

50

範囲内にあり、例えば、1ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、100ng/ml、120ng/ml、140ng/ml、160ng/ml、180ng/ml、200ng/mlであるがこれらに限定されない。更に好ましくは、50ng/mlである。

【0076】

本工程(ii-2)において、培養温度は特に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われる。CO₂濃度は、約2~5%、好ましくは約5%である。本工程の培養時間は、例えば20日以下の培養であり、好ましくは14日である。

【0077】

基礎培地へのPDGF-BB、TGFβ₃およびBMP4の添加は、同時に行われてもよく、また培養工程の任意の段階において別々に添加されてもよい。好ましくは、培養工程の段階に応じて、任意の順序で任意の組み合わせで添加される。また、基礎培地へのPDGF-BB、TGFβ₃およびBMP4の添加は、培養中の培地に直接添加することもでき、また培地を交換する際に添加することもできる。

【0078】

本工程における基礎培地へのPDGF-BB、TGFβ₃およびBMP4の添加は、例えば、下記の順序および組み合わせで行われ得る。

(1) PDGF-BB、

(2) PDGF-BBおよびTGFβ₃、ならびに

(3) BMP4。

【0079】

工程(1)の培養期間は、例えば10日以下の培養であり、好ましくは6日である。工程(2)の培養期間は、例えば8日以下の培養であり、好ましくは4日である。工程(3)の培養期間は、例えば8日以下の培養であり、好ましくは4日である。

【0080】

基礎培地へのPDGF-BB、TGFβ₃およびBMP4の添加はさらに、他の分化誘導因子と組み合わせで行うこともできる。他の分化誘導因子は、例えば、Wnt3A、Activin、FGF2、Follistatin、GDF5、NT4などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0081】

(ii-2') 三次元(3D)ペレット培養法

本発明において、3Dペレット培養に先んじて、工程(i)で得られた細胞をFGF2およびTGFβ₃を添加した培地中で継代する工程を含むことができる。継代期間は、特に限定されないが、5日以下の期間であり、3日間が好ましい。培地中のFGF2の濃度は、例えば0.1-50 ng/mlの範囲内、好ましくは0.5-20 ng/mlの範囲内にあり、例えば、0.5ng/ml、0.6ng/ml、0.7ng/ml、0.8ng/ml、0.9ng/ml、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、12ng/ml、14ng/ml、16ng/ml、18ng/ml、20ng/mlであるがこれらに限定されない。更に好ましくは、1~5ng/mlの範囲内である。培地中のTGFβ₃の濃度は、例えば1-100 ng/mlの範囲内、好ましくは5-20 ng/mlの範囲内にあり、例えば、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、75ng/ml、100ng/mlであるがこれらに限定されない。更に好ましくは、10ng/mlである。

【0082】

本発明において、3Dペレット培養に先んじて、上記継代培養された細胞のアリコート遠心分離機にかけて、ペレットを形成させる工程をさらに含み得る。遠心分離機に用いられる細胞の数は特に限定されないが、例えば、 2.5×10^5 個の細胞が用いられ得る。

【0083】

本工程(ii-2')において使用される培養液は、2Dマイクロマス培養法と同様の培地を用いて行うことができる。

【0084】

10

20

30

40

50

本工程 (ii-2') において、培養温度は特に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われる。CO₂濃度は、約2~5%、好ましくは約5%である。本工程の培養時間は、例えば40日以下の培養であり、好ましくは28日である。

【0085】

本明細書において、「軟骨性ペレット」および「軟骨組織」は、前者が3Dペレット培養により誘導された軟骨細胞を含む集団を意味するのに対して、「軟骨組織」は、3Dペレット培養に限らず、任意の分化誘導法を用いて誘導された軟骨細胞を含む集団を意味する。本明細書において、「軟骨性ペレット」と「軟骨組織」は、特段の断りがない限り、相互に置換して使用することができる。

【実施例】

【0086】

本発明を以下の実施例でさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はそれら実施例に限定されないものとする。

【0087】

実施例 1

iPS細胞の作製

以下のすべての実験は、京都大学の倫理委員会の承認を得て行われた。また、患者からのサンプルの採取には、ヘルシンキ宣言に従って、事前にインフォームドコンセントを得て行われた。NLRP3体細胞モザイク(p.Tyr570Cysおよびp.Gly307Ser)を有する2人のNOMID患者からiPS細胞を作製した。各々の患者から、野生型(以下、野生型iPS細胞と言う。)および変異型NLRP3 iPS細胞(以下、変異型iPS細胞と言う。)を少なくとも3クローン確立し、この実験のために利用した。以下すべての実験は、同質遺伝子のバックグラウンドを有する野生型細胞と変異型細胞を比較することにより行われた。

【0088】

iPS細胞の製造は、次の方法によって行った。詳細には、入手したそれぞれのヒト線維芽細胞(HDF)を、10% FBS (Invitrogenおよび0.5% penicillin and streptomycin (Invitrogen)) を添加したDMEM (Nacalai Tesque) 培地で培養した。続いて、エクトロピックレトロウイルス導入法を用いて、マウスSlc7a1遺伝子を発現する線維芽細胞にOCT3/4, SOX2, KLF4, およびc-MYCを導入した(Tanaka, T., et al., Blood. 9;120(6):1299-308 (2012), and Takahashi, K., et al., Cell 131(5):861-872 (2007))。6日後に細胞を回収し、不活性化SNLフィーダー細胞上に細胞を播種した。その翌日、培地を、4 ng/mL bFGF (Wako)を添加したPrimate ES cell medium (ReproCELL)に交換した。3週間後、個々のコロニーを単離し、増殖させて、iPS細胞を得た。細胞の培養は、5% CO₂、21% O₂下、37℃で行われた。

【0089】

実施例 2

軟骨誘導

1) 神経堤細胞誘導 (day0-8)

実施例 1 で得られたiPS細胞を、フィーダーフリー培養を経て神経堤細胞へ分化誘導させた。まずフィーダー細胞をCTK(0.25% Trypsin(Life Technologies), 0.1mg/ml collagenase IV(Life Technology), 1mM CaCl₂, 20% (v/v) KSR) を用いて除去し、PBSで洗浄した後、iPS細胞をスクレーパーで回収、mTeSR培地(mTeSR Basal Medium 400ml, 5X Supplement 100ml, Penicillin/Streptomycin 2.5ml)(STEMCELL Technology)に懸濁し、一度だけピペティングした後、Matrigel-coated dish(DMEM/F12混合培地(Life Technologies)で50倍希釈したMatrigel stock solution (X50) (BD Biosciences)をdishに添加し、4℃で一晩保存した。使用の30分~60分前にMatrigelを除去し、乾燥させて作成に播種(5×10⁴/10cm dish)、mTeSR培地(10ml)で5% CO₂、37℃で培養した。2日後、培地を神経堤誘導培地(15ml/10cm dish)に交換した。詳細には10μM SB431542(Sigma-Aldrich)を添加した合成培地(CDM)(5mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin (Sigma-Aldrich)、2%(v/v)

10

20

30

40

50

chemically defined Lipid concentrate(Life Technologies), 2 mM GlutaMax (Life Technologies), 100 µg/ml human holo-transferrin(Sigma-Aldrich), 20 µg/ml bovine insulin (Sigma-Aldrich), 0.45 mM MTG(monothioglycerol)(Sigma-Aldrich), 0.17 mM A2P (ascorbic acid-2-phosphate)(Sigma-Aldrich)を添加したIscove's modified Dulbecco's medium(Sigma-Aldrich)とHam's F12(Life Technologies)を1:1で混合した培地で培養した。培養5日目に培地を交換し、培養8日目に軟骨前駆細胞誘導過程に移行した。

【0090】

2) 軟骨前駆細胞誘導 (day8-17)

培地を除去しPBSで1回洗浄したのち、Trypsin/EDTA (0.05%)(Life Technology)で剥離させ、10%FCS添加CDMで回収した。40µm Cell strainer(BD Biosciences)を用いて単一細胞にしたのち、フィブロネクチンコートdish (PBSで100倍希釈したフィブロネクチン溶液 (Millipore) をdishに添加し、30分~60分、室温で静置したもの) に播種(2×10^6 /10cm dish)した。5ng/ml bFGF(WAKO)を添加した神経堤誘導培地を用いて1回/3日程度の頻度で継代培養し、軟骨前駆細胞を増殖させた。

10

【0091】

3) 軟骨細胞誘導 (day17から)

二次元(2D)マイクロマス培養法

fibronectin-coated 24-well plate (BD)上に上述の方法で得られた軟骨前駆細胞 (1.5×10^5 cells)を40 ng/ml PDGF-BBおよび1% FCSを含む軟骨誘導培地に懸濁させ、5 mlの小滴でスポットし、培養した。このとき、培地は3日おきに交換した。6日後、10 ng/ml TGF 3をさらに添加して培養した。2Dマイクロマス培養開始10日後、PDGF-BBを50 ng/ml BMP 4 (WAKO)で置換した。2Dマイクロマス培養は、5% CO₂下、37 °Cで14日間行った。

20

【0092】

3Dペレット培養法

上述の方法で得られた軟骨前駆細胞を、5 ng/mL FGF2、10 ng/ml TGF 3を含む軟骨誘導培地中で3日間培養した。その後、 2.5×10^5 個の細胞を遠心分離してペレットを形成させ、2Dマイクロマス培養法と同様に、0.5 mlの40 ng/ml PDGF-BBおよび1% FCSを含む軟骨誘導培地中で培養した。6日後、10 ng/ml TGF 3をさらに添加して培養した。10日後、PDGF-BBを50 ng/ml BMP4 (WAKO)で置換した。3Dペレット培養は、5% CO₂下、37 °Cで28日間維持行われた。

30

以上の多能性幹細胞から軟骨細胞を誘導するプロトコールの概略は、図1Aに示す。

【0093】

上述の2Dマイクロマス培養および3Dペレット培養により誘導した軟骨細胞を調べるために、2Dマイクロマス培養後の細胞は、4% paraformaldehyde (PFA)で1時間固定し、1% Alcian Blue pH 1.0 (Sigma-Aldrich)で染色し、3Dペレット培養後の細胞は、4% paraformaldehyde (PFA)で1時間固定し、0.1% Alcian Blue pH 1.0 (Sigma-Aldrich)で染色した。さらに、抗COL2抗体 (Thermo Scientific)を用いて免疫染色も行った。ここで、Alcian blueは、軟骨細胞から分泌される細胞外マトリックスを検出する試薬であり、COL2は、軟骨細胞に特異的に発現している遺伝子である。

40

【0094】

染色の結果、野生型および変異型iPS細胞のいずれから誘導された軟骨細胞においても、Alcian blueおよびCOL2に陽性であった(図1B)。このことは、2Dマイクロマス培養および3Dペレット培養により軟骨細胞への分化誘導が成功したことを示している。また、2Dマイクロマス培養および3Dペレット培養により誘導した軟骨細胞培養物のサイズを計測したところ、野生型iPS細胞由来の軟骨細胞よりも変異型iPS細胞由来の軟骨細胞培養物の方が顕著に大きかった(図1C)。以上より、NOMID患者由来のiPS細胞を用いて、NOMID患者で観察される軟骨の過形成をインビトロで再現することに成功した。

【0095】

実施例3

軟骨細胞特異的遺伝子の発現解析

50

実施例2の方法(2Dマイクロマス培養および3Dペレット培養)により分化誘導した軟骨細胞の状態をさらに詳細に調べるために、軟骨細胞誘導前の軟骨前駆細胞と誘導後の軟骨細胞において、軟骨細胞で特異に発現している遺伝子(軟骨細胞特異的遺伝子)の発現状態について解析した。遺伝子の発現解析は、次の方法により行われた。

【0096】

mRNAの測定

mRNAは、RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて、各細胞から単離した。得られた全RNAのうち1μgを鋳型として、Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen)を用いて逆転写によりcDNAを合成した。定量リアルタイムPCRのための標準曲線を作成して解析を行った。リアルタイムPCR解析は、Power SYBR Green qPCR mastermix (Invitrogen)を用いて、StepOne real-time PCR system (ABI)により測定した。使用したプライマーの配列およびAssayIDを表1に示す。

10

【0097】

【表1】

プライマー名	配列(5'→3')	適用
hSOX9 S1177	GACTTCCGCGACGTGGAC (配列番号1)	SOX9 RT-qPCR
hSOX9 AS1275	GTTGGGCGGCAGGTAAGT (配列番号2)	
hCOL2 S4454	GGCAATAGCAGGTTACGTACA (配列番号3)	COL2A1 RT-qPCR
hCOL2 AS4532	CGATAACAGTCTTGCCCCACTT (配列番号4)	
hCOMP-F	CAACTGTCCCCAGAAGAGCAA (配列番号5)	COMP RT-qPCR
hCOMP-R	TGGTAGCCAAAGATGAAGCCC (配列番号6)	
hACAN S790	TCGAGGACAGCGAGGCC (配列番号7)	ACAN RT-qPCR
hACAN AS874	TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA (配列番号8)	

20

30

【0098】

定量PCRの結果、2Dマイクロマス培養および3Dペレット培養の両方において、野生型および変異型iPS細胞のいずれから誘導された軟骨細胞においても、軟骨細胞特異的遺伝子であるCOL2A1、ACAN、COMPおよびSOX9の発現が確認された(図2)。また、2Dマイクロマス培養および3Dペレット培養の両方の場合において、変異型iPS細胞由来の軟骨細胞の方が野生型に比べて各軟骨細胞特異的遺伝子の発現が高い傾向が見られた(図2)。

40

【0099】

実施例4

軟骨細胞増殖および細胞外マトリックス産生

変異型iPS細胞由来の軟骨細胞における過形成の原因を検証するために、軟骨細胞の増殖率および細胞外マトリックスの産生量に着目して解析を行った。

【0100】

実施例2において分化誘導した軟骨前駆細胞について、15回の継代培養時の細胞の増殖力を評価した。その結果、1回/3日程度の継代頻度で15回継代を行っても、野生型由来および変異型由来の軟骨前駆細胞の間に細胞の増殖の差異が見出されなかった(図3A)

50

。

【0101】

続いて、軟骨細胞分化後のDNA量およびグリコサミノグリカンの産生量の定量について解析を行った。DNA量の測定は、Pico Green dsDNA Quantitation kit (Invitrogen)を用いて、Nasu A, et al., PloS one. 8(1):e53771 (2013)に記載されたとおりに行われた。細胞外マトリックスの産生量については、Blyscan glycosaminoglycan Assay (Biocolor)を用いて、製造者のプロトコールに従い、測定された。その結果、軟骨細胞のDNA量は、2Dマイクロマス培養および3Dペレット培養の両方において、野生型および変異型の間で差異はなかった(図3B、C)。このことから、野生型iPS細胞および変異型iPS細胞からほぼ同数の軟骨細胞が産生されることが示された。一方、細胞外マトリックスであるグリコサミノグリカンの産生については、2Dマイクロマス培養および3Dペレット培養の両方において、野生型iPS細胞由来の軟骨細胞と比較して、変異型iPS細胞由来の軟骨細胞でより多く産生されることが観察された(図3B、C)。以上の結果より、変異型iPS細胞からは細胞増殖に伴わない、軟骨細胞外マトリックスの産生量の増加が確認された。

10

【0102】

実施例5

SOX9の発現亢進について

上述した軟骨細胞外マトリックスの過剰産生のメカニズムを調べるため、軟骨前駆細胞誘導および軟骨誘導過程における各軟骨細胞特異的遺伝子の発現量を検討した(図2および図4A)。軟骨細胞特異的遺伝子のうちSOX9およびCOL2A1は、誘導15日目および29日目の両方において、変異型iPS細胞から誘導した軟骨前駆細胞および軟骨細胞において発現が亢進していたが、ACANおよびCOMPは、29日目のみ変異型iPS細胞由来の軟骨細胞において発現が亢進していた。この結果から、SOX9の発現の軟骨細胞特異的遺伝子の誘発に寄与している可能性が示唆された。また、NLRP3のmRNA量は、変異の有無によって有意に変化しなかった(図4B)。従って、SOX9の発現は、変異NLRP3発現に依存しており、このSOX9の発現上昇によって他の軟骨細胞特異的遺伝子の発現させていることから、SOX9が軟骨細胞外マトリックスの過剰産生に寄与していることが示唆された。

20

【0103】

実施例6

インビボにおける軟骨細胞分化

NOMID患者由来iPSの細胞(変異型iPS細胞)から分化誘導された軟骨性ペレットのインビボにおける挙動を評価するために、移植実験を行った。上述した3Dペレット培養20日目(分化誘導38日目)で得られた軟骨性ペレットを0.5 cm x 1 cm Gelfoam (Phizer)に包み込み、NOD/scid/ cnull miceの背部皮膚下に移植した。4週間後、軟骨組織/骨パーティクルを回収し、パラホルムアルデヒドで24時間固定し、プラスチックに包埋し、5 μmに切片化した後、Hematoxylin and Eosin (HE)、von KossaまたはAlcian Blue染色により染色した。

30

【0104】

その結果、移植された軟骨性ペレットに対して血管新生を確認した(図5A)。また、変異型iPS細胞由来の軟骨性ペレットのサイズは、移植時および回収時の両時点において、野生型iPS細胞由来の軟骨性ペレットよりも大きく、そのサイズの差は、インビボで拡大していった(図5AおよびB)。カルシウム沈着を検出するvon Kossaにおいては、野生型iPS細胞由来の軟骨性ペレットおよび変異型iPS細胞由来の軟骨性ペレットのいずれにおいても石灰化が観察された(図5A)。Alcian blue染色の結果によると、変異型iPS細胞由来の軟骨性ペレットが野生型iPS細胞由来の軟骨性ペレットよりも多くの軟骨成分を含んでいることが明らかになった(図5A)。さらには、変異型iPS細胞由来の軟骨性ペレットにおける石灰化は不均一であり、組織化されていなかったのに対して、野生型iPS細胞由来の軟骨性ペレットは均一であった。以上より、変異型iPS細胞由来の軟骨性ペレットを移植することで、肥大化および異所性の骨化といったNOMID患者の関節における病態が再現された。

40

50

【 0 1 0 5 】

実施例 7

NLRP3インフラマソームの影響

上述した2Dマイクロマス培養によって得られた軟骨細胞では変異型iPS細胞由来においてカスパーゼ1の活性およびIL-1の分泌量に変化は見られなかったことから、軟骨細胞外マトリックスの過剰産生は、NLRP3インフラマソームには依存しないメカニズムであることが示された。さらに、10 μ M Ac-YVAD-CHOまたは1 μ g/mLを添加して2Dマイクロマス培養を行ったところ、軟骨の過形成(図7A、B、D、E、FおよびH)およびSOX9の発現(図7CおよびG)に影響はなかった。以上より、NLRP3インフラマソームを抑制に関連する薬剤では、軟骨の過形成を抑制することはできないことが示唆された。

10

【 0 1 0 6 】

実施例 8

SOX9プロモーター活性と下流因子の同定

SOX9の制御について検討を行うため、軟骨前駆細胞におけるヒトSOX9プロモーターの活性を測定した。測定には、Ushita M et al., Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society. 2009;17(8):1065-75.に従って、-927から+84bp(転写開始点を0とする)のヒトSOX9プロモーター領域をpGL3-luciferase reporter plasmid (Promega)に挿入して構築したレポーターコンストラクトを用いて行った(図7Aおよび表2)。プロモーター活性は、上述した方法で得られた軟骨前駆細胞を6-wellプレートに50000 cells/wellで播種し、FuGENE 6 transfection reagentを用いて、2 μ g DNA/wellを導入し、24時間後に、Dual-Luciferase Reporter Assay Kit (Promega)およびCentro X S³ LB 960 Microplate Luminometer (BERTHOLD)を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定することによって算出した。その結果、変異型iPS細胞由来の軟骨前駆細胞では、野生型と比較して、SOX9のプロモーター活性が高いことが示された(図7B)。続いて、変異NLRP3依存応答性の責任部位を特定するため、表3に記載されたとおり、NFAT結合配列、AP-1結合配列、NF- κ B結合配列、Sp1結合配列およびCREB/ATF結合配列にそれぞれ変異を有するレポーターコンストラクトを作成した。これらの変異レポーターを同様に軟骨前駆細胞へ導入し、プロモーター活性を測定したところ、CREB/ATF結合サイトに変異を有するレポーターでは、変異型iPS細胞由来の軟骨前駆細胞と野生型iPS細胞由来の軟骨前駆細胞においてその活性に違いが確認されなかった(図7C)。以上の結果より、CREB/ATF結合サイトがNLRP3依存型のSOX9プロモーター活性に重要な役割を果たす転写因子結合サイトであることが示唆された。

20

30

【 0 1 0 7 】

【表 2】

SOX9プロモーター領域	
CTCAAAGCCAGAGCAGTTAGCAAACCTCTCCCCAGACAGGGCGACTCGGCTGACGTTTTTG	
ACCCGGCCAGGAGGCAAAGACCAAAACGTCAGAGCAGTAGCCCTGTTACTGAGGAGCGTCCG	
GCAGGGTCGCGGGTAGAGGGGGCTGGAGAATGACTTGTGAGAGCTCAAGGTCGATGTGGC	
GCGGGGCGGCCTCGAGAGCGCCGGGCTCCTGCGTGGCCACGGCCGCGCTGCCAACCTT	
CGCGGGGACTTAGCTTTGCTTTCCATTGACTCCCTTTGCAAAGCGCAGCAGAATCCTGACC	
AGCCGCACCAGCCCCGGCGAACCCGAGCATGTTAATCTATTTATATGGATTATTACGGAGGAA	10
CAGCGGGCGTTGAGTCAACAAAACATTTGCTTCAAAGACTATTTCTAAGCACTTTTGCAGGC	
AGGCAGGCTCGCTCCAGGCGCGTAAACTCGGCTACGCATTAAGAAGCGGCTGCTTTTTCGAAT	
ACTGCAAACCTCCAGCTAAGTCCCCGGTGC CGCGGAGAGAGCAGTGAAAAGAAATGTCCGGAG	
GTGGGGGTAGATCCTAGTCTAGACACACACACTTGC GCGCACACACACACACACACACACAA	
GATTCGCGCGGAGAAGGCACTAAAATTCTGGCATTCCGAGAGTACGACAAACTTACACACTT	
<u>GGAAGTCCCCGGGTCCCCGCCTTCCCCGCAGCACCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCG</u>	
<u>CCCTTTGGCTGCGATCCCCTCCCCTCTCCTCCCCTCCCGCCTCGTCA</u> CCCAGCCCAGTGCC	
ACAATCCTCCTCCCTCCCCAAAATCGGGTCCAATCAGCTGCCTGCCAACCCCTGGGACTGCTG	20
TGCTGTGATTGGCGGGTGGCTCTAAGGTGAGGCGGAGTATTTATTAAGAGACCCTGGGCTG	
GGAGTTGGAGAGCCGAAAGCGGAGCTCGAAACTGACTGGAAACTTCAGTGGCGCGGAGAC	
TCGCCAGTTTCAACCCCGGAAACTTTTCT	
(配列番号9)	
※配列中、下線は、5'側からそれぞれNFAT結合配列、AP-1結合配列、NF-κB結合配列、Sp1結合配列およびCREB/ATF結合配列を示す	

【 0 1 0 8 】

【表 3】

転写因子結合サイト	野生型配列	変異型配列
NFAT	TTTTCCA (配列番号15)	Tagctag (配列番号10)
AP-1	TGAGTCA (配列番号16)	Gcttctc (配列番号11)
NF-κB	GGGAAGTCCC (配列番号17)	GttAAGTCaa (配列番号12)
Sp1	CCCCTCCCC (配列番号18)	aaagagaggC (配列番号13)
CREB/ATF	CCTCGTCA (配列番号19)	Agtttaggc (配列番号14)

【 0 1 0 9 】

実施例 9

アデニル酸シクラーゼ阻害剤による軟骨過形成からの回復

AMP/PKA/CREBシグナル伝達経路が軟骨過形成に関与しているかを調べるために、アデニル酸シクラーゼ活性化剤である forskolin およびアデニル酸シクラーゼ阻害剤である SQ22536 を用いて解析を行った。本試験は、ヒトSOX9プロモーターを軟骨前駆細胞に導入した直後に10 μM forskolin (CALBIOCHEM) または10 μM SQ22536 (Sigma-Aldrich) で処理し、2

10

20

30

40

50

4時間インキュベートした後のルシフェラーゼ活性を測定することによって行った。その結果、基剤（DMSO）で処理した変異型軟骨前駆細胞（コントロール）と比較して、forskolinで処理した変異型軟骨前駆細胞は、SOX9のプロモーター活性が2.3倍に増加した（図7D）。一方、SQ22536で処理した場合には、コントロールと比較して、SOX9のプロモーター活性が2倍減少した（図7D）。また、野生型軟骨前駆細胞においても、forskolinおよびSQ22536について同様の効果が観察された（図7D）。これらのデータはいずれも、SOX9のmRNA発現におけるforskolinおよびSQ22536の効果と相関していた（図7E）。

【0110】

さらに、3Dペレット培養中にforskolinおよびSQ22536を添加して、アデニル酸シクラーゼの影響を検討したところ、基剤（DMSO）で処理した変異型軟骨前駆細胞（コントロール）と比較して、forskolinで処理した変異型軟骨前駆細胞は、サイズが2.0倍増加した（図7FおよびG）。一方、SQ22536で処理した場合には、コントロールと比較して、サイズが2.1倍減少した（図7FおよびG）。また、野生型軟骨前駆細胞においても、forskolinおよびSQ22536について同様の効果が観察された（図7FおよびG）。以上の結果より、変異NLRP3は、アデニル酸シクラーゼの活性により、SOX9の発現を更新させ、軟骨過形成に参与していることが示唆され、アデニル酸シクラーゼを阻害することで、当該軟骨過形成を抑制できる可能性が示された。

【0111】

さらに、細胞内におけるcAMPの濃度をcAMP enzyme-linked immunoassay kit (Cell Signaling) を用いて測定したところ、変異型iPS細胞由来の軟骨前駆細胞が野生型iPS細胞由来の軟骨前駆細胞よりも4倍高いことが観察された（図7H）。

【0112】

続いて、AMP/PKA/CREBシグナル伝達経路の下流に位置するCREBのリン酸化状態を調べるために、ウエスタンブロッティングによる解析を次の通り行った。細胞ライセートを調製するために、M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (PIERCE)を用いてタンパク質を抽出した。等量のタンパク質をMini-PROTEAN TGX precast gels (Bio-Rad)に投与し、Immobilon PVDF membranes (Millipore)にプロットした。メンブレンをブロッキングし、各一次抗体と接触させ1時間インキュベートし、その後、HRP共役ヤギ抗マウスもしくは抗ウサギIgG (Santa Cruz)を加えて1時間インキュベートした。メンブレンを洗浄後、ECL Advance Western blotting detection kit (GE Healthcare)で検出した。CREBおよびphosphorylated CREBに対する抗体は、Cell Signaling社から購入した。

【0113】

その結果、AMP/PKA/CREBシグナル伝達経路が活性化しているときに生じるCREBのリン酸化についても、変異型iPS細胞由来の軟骨前駆細胞が野生型iPS細胞由来の軟骨前駆細胞よりも高いリン酸化状態であることが観察された（図5I）。

【0114】

以上より、AMP/PKA/CREBシグナル伝達経路がSOX9の発現増加に重要な役割を果たしており、変異型軟骨組織の過形成を生じる要因となっていることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0115】

本発明は、軟骨過形成疾患患者の体細胞由来のiPS細胞を軟骨細胞へ分化誘導を通して軟骨形成させることで、軟骨過形成疾患の病態の再現に成功したことに基づくものである。したがって、当該細胞を用いて軟骨過形成疾患の治療剤および/または予防剤のスクリーニングを行うことが可能である。また、本発明は、当該スクリーニングの結果得られた軟骨細胞への分化を抑制する物質を提供するものであり、軟骨過形成疾患の新たな治療剤および/または予防剤として利用可能である。

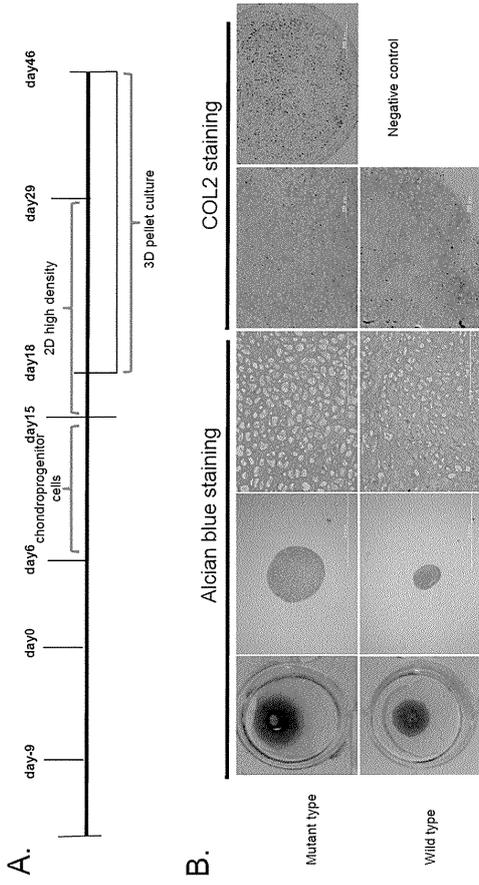
【配列表フリーテキスト】

【0116】

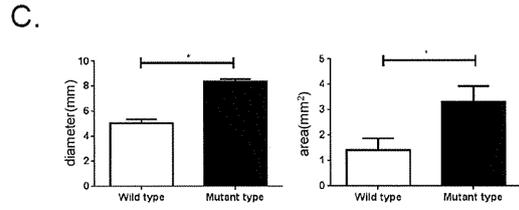
配列番号1～8：プライマー

配列番号10～14：変異型結合サイト

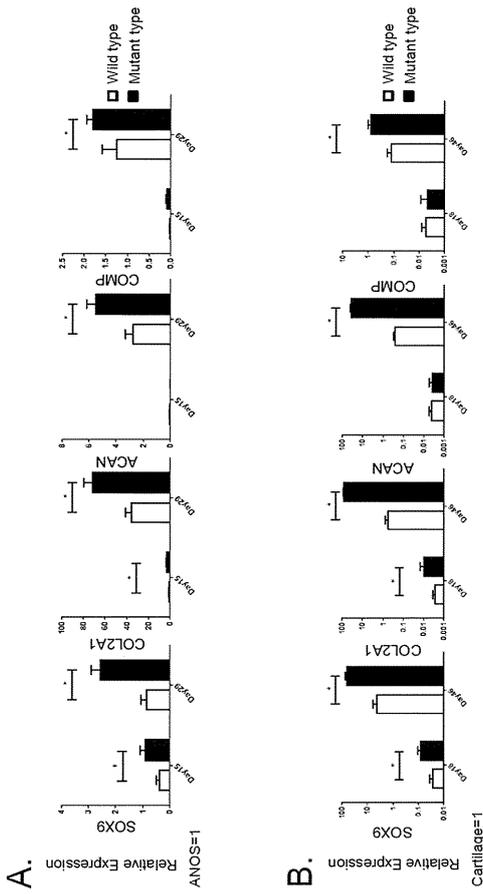
【 1 A - B 】



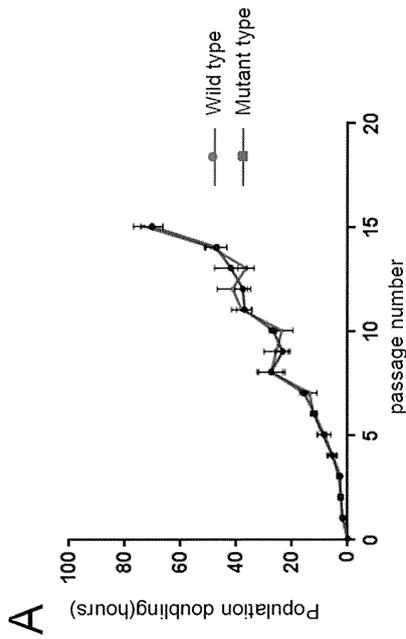
【 1 C 】



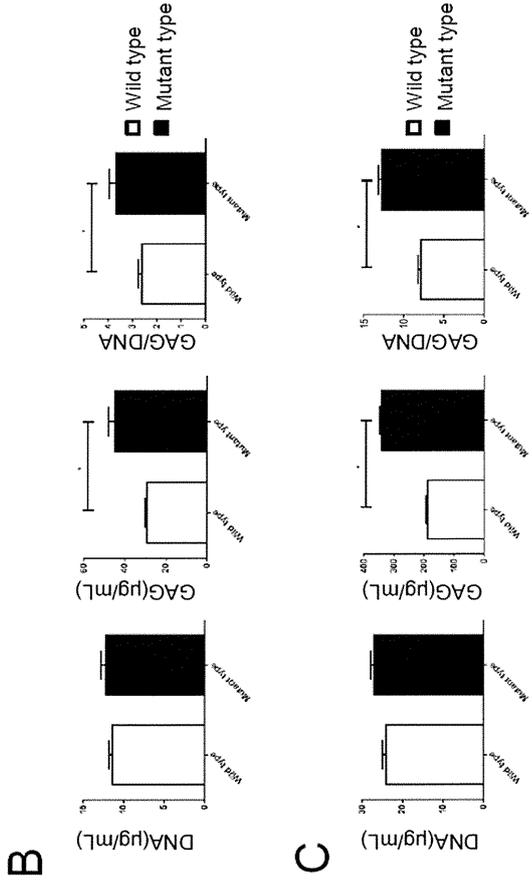
【 2 】



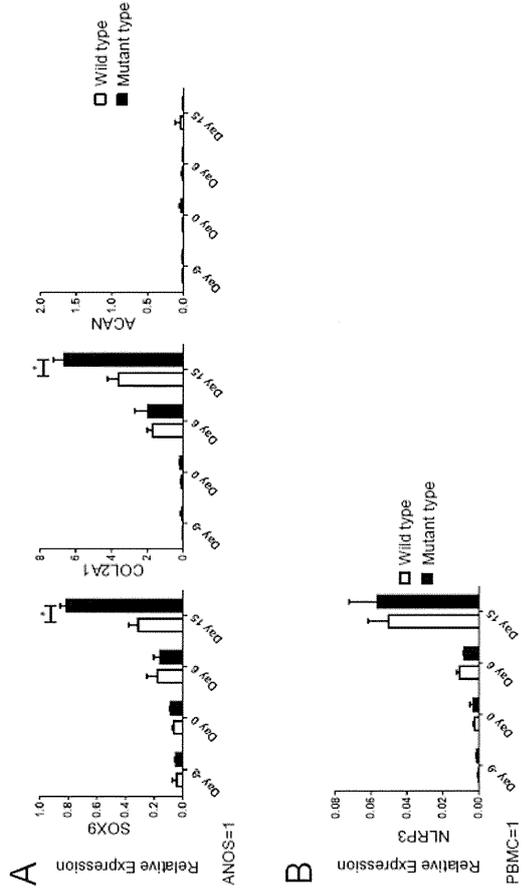
【 3 A 】



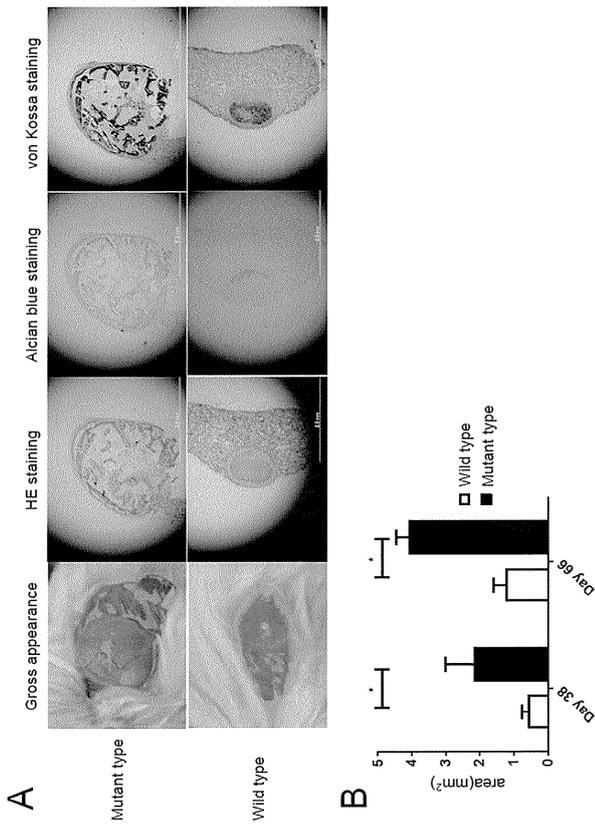
【 3 B - C 】



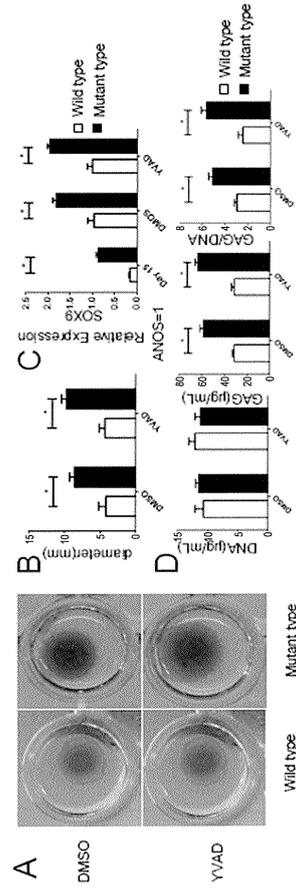
【 4 】



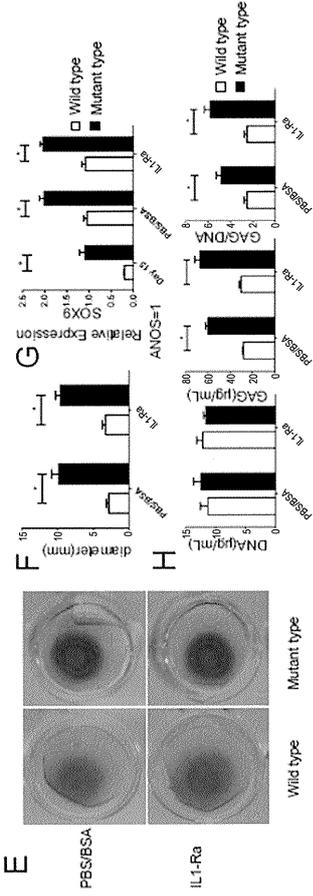
【 5 】



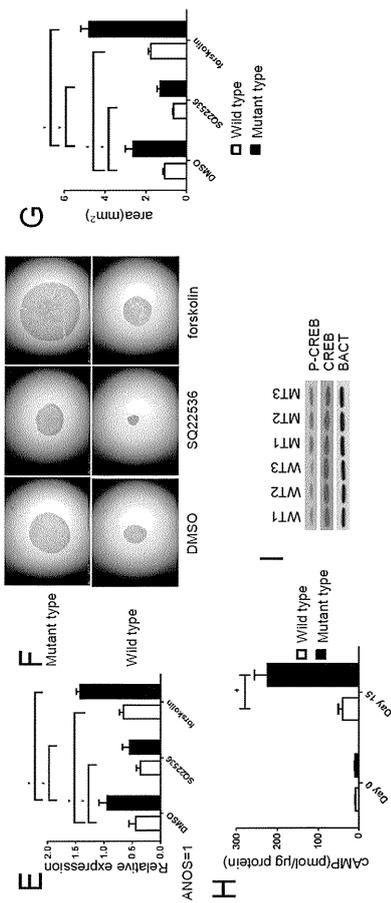
【 6 A - D 】



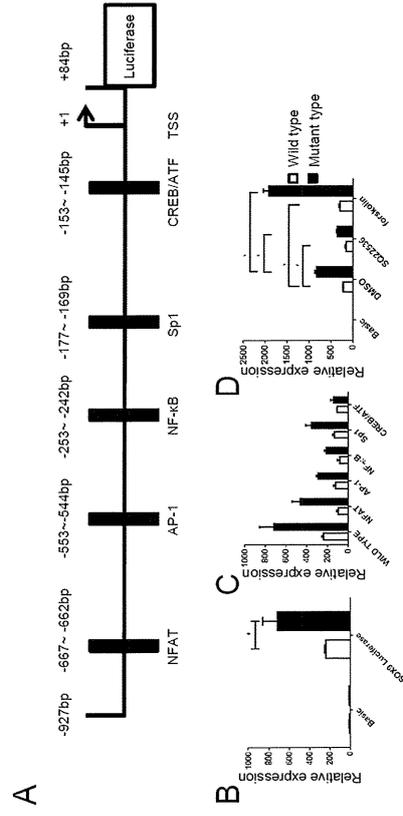
【 6 E - H 】



【 7 E - I 】



【 7 A - D 】



【配列表】

2016088909000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	P
		C 1 2 Q	1/68	Z N A A

(72)発明者 横山 宏司
 京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 池谷 真
 京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 平家 俊男
 京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地1 国立大学法人京都大学内

Fターム(参考) 2G045 AA24 DA14
 4B063 QA01 QA17 QQ53 QR32 QR62 QS25
 4C084 AA17 NA14 ZA962 ZC202
 4C086 AA01 AA02 CB07 MA01 MA04 NA14 ZA96