

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年8月25日(25.08.2016)

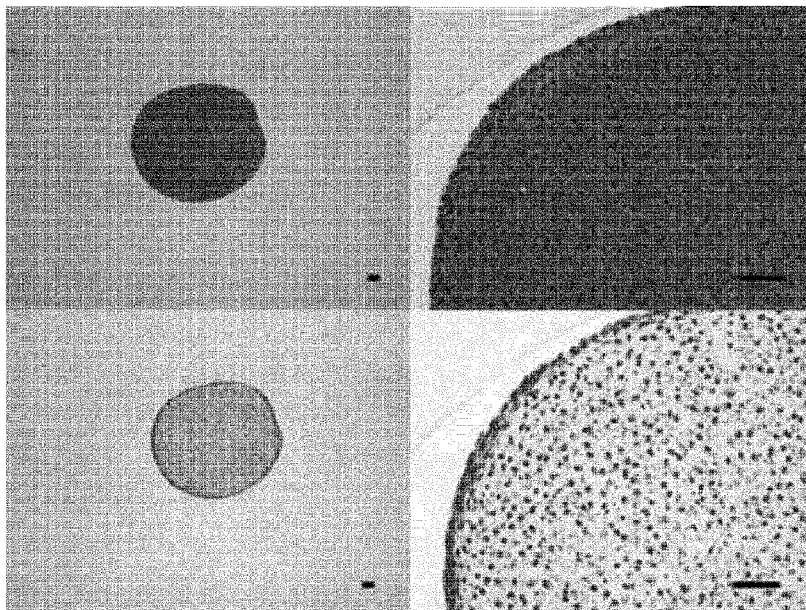


(10) 国際公開番号
WO 2016/133208 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
A61K 35/32 (2015.01) *C12N 5/077* (2010.01)
A61L 27/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/054917
- (22) 国際出願日: 2016年2月19日(19.02.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願 2015-030168 2015年2月19日(19.02.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 妻木 範行(TSUMAKI, Noriyuki); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 岩谷 龍(IWATANI, Ryo); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番31号 京阪堂島ビル3階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
 — 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: NOVEL METHOD FOR INDUCING CHONDROCYTE

(54) 発明の名称: 新規軟骨細胞誘導方法



Scale bars 50 μm

(57) Abstract: Provided is a method for producing a chondrocyte from a pluripotent stem cell, comprising the following steps: (i) culturing a pluripotent stem cell in a culture solution comprising an HMG-CoA reductase inhibitor and at least one substance selected from the group consisting of BMP2, TGFβ and GDF5 under adhesion conditions; and (ii) culturing the cell obtained from the step (i) in a culture solution comprising an HMG-CoA reductase inhibitor and at least one substance selected from the group consisting of BMP2, TGFβ and GDF5 under suspension conditions. Also provided is a pharmaceutical product comprising a chondrocyte obtained by this method.

(57) 要約: 次の工程を含む多能性幹細胞から軟骨細胞を製造する方法:

(i) 多能性幹細胞を BMP2、TGFβ および GDF5 から成る群より選択される 1 以上の物質ならびに HMG-CoA 還元酵素阻害薬を含む培養液中で接着条件で培養する工程、および (ii) 前記工程 (i) で得られた細胞を BMP2、TGFβ および GDF5 から成る群

より選択される 1 以上の物質ならびに HMG-CoA 還元酵素阻害薬を含む培養液中で浮遊条件で培養する工程。さらに、この方法で得られた軟骨細胞を含む医薬品を提供する。



WO 2016/133208 A1

明 細 書

発明の名称：新規軟骨細胞誘導方法

技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞から軟骨細胞を分化誘導する方法に関する。本発明はまた、そのようにして得られた軟骨細胞を含む治療剤に関する。

背景技術

[0002] 鼻、耳および関節は軟骨組織から形成されており、軟骨組織は、軟骨細胞と、I型コラーゲンを含まず、II型コラーゲン、IX型コラーゲン、XI型コラーゲンおよびプロテオグリカンを含む特定の細胞外マトリックスとで形成されている。関節損傷などで失われた軟骨組織は自然治癒することはないため、移植等の修復治療を行わなければ悪化してしまう。しかし、損傷部位へ移植するためには、軟骨組織の入手が必要であり、患者自身の別の部位の軟骨を用いる場合には、結局軟骨組織の欠失部位を生じてしまうため、移植治療に適応する損傷の大きさには限度がある。このため、採取した軟骨細胞を拡大培養して、移植に用いるという方法が用いられているが、*in vitro*で培養を行うと軟骨細胞が線維化してしまい、治療効果が十分ではない（非特許文献1）。この他にも、間葉系幹細胞を投与する方法が提案されているが、間葉系幹細胞は多数の種類細胞へと分化するため、所望の軟骨細胞のみならずI型コラーゲンを発現する線維組織やX型コラーゲンを発現する肥大化組織を移植することになってしまう（非特許文献2）。

[0003] そこで、近年、iPS細胞やES細胞といった多能性幹細胞から軟骨細胞へと誘導し、これを用いる方法が提案されている（非特許文献3～7）。しかし、多能性幹細胞を用いた場合、線維軟骨の形成やテラトーマの形成など問題が提起されている。従って、これら多能性幹細胞から*in vivo*で癌を形成せず、上質な軟骨組織を製造する方法が必要となる。

先行技術文献

非特許文献

- [0004] 非特許文献1: Roberts, S., et al. Knee 16, 398-404 (2009).
非特許文献2: Mithoefer, K., et al. Am. J. Sports Med. 37, 2053-2063 (2009).
非特許文献3: Koyama, N. et al. Stem cells and development 22, 102-113 (2013).
非特許文献4: Hwang, N.S., et al. PLoS ONE 3, e2498 (2008).
非特許文献5: Oldershaw, R.A. et al. Nat. Biotechnol. 28, 1187-1194 (2010).
非特許文献6: Bai, H.Y., et al. Journal of biomedical materials research. Part A 94, 539-546 (2010).
非特許文献7: Yamashita, A. et al. Scientific Reports 3 (2013).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明の課題は、多能性幹細胞から軟骨細胞を分化誘導する方法を提供することにある。より具体的には、簡素化された工程にて、安定的に軟骨細胞を分化誘導する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0006] 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、多能性幹細胞をHMG-CoA還元酵素阻害薬を含む培養液中で接着培養と浮遊培養を組み合わせることで、軟骨細胞を安定的に製造できることを見出した。本発明はそのような知見を基にして完成されたものである。

- [0007] すなわち、本発明は以下の特徴を有する：

[1] 次の工程を含む多能性幹細胞から軟骨細胞を製造する方法：

(i) 多能性幹細胞をBMP2、TGF β およびGDF5から成る群より選択される1以上の物質ならびにHMG-CoA還元酵素阻害薬を含む培養液中で接着条件で培養する工程、および

(ii) 前記工程(i)で得られた細胞をBMP2、TGF β およびGDF5から成る群より選択される1以上の物質ならびにHMG-CoA還元酵素阻害薬を含む培養液中で

浮遊条件で培養する工程。

[2] 前記工程 (i) および (ii) の工程で用いる培養液が、BMP2、TGF β 、GDF5およびHMG-CoA還元酵素阻害薬を含む培養液である、[1]に記載の方法。

[3] 前記HMG-CoA還元酵素阻害薬が、メバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチンおよびロバスタチンから成る群より選択される薬剤である、[1]または[2]に記載の方法。

[4] 前記HMG-CoA還元酵素阻害薬が、ロスバスタチンである、[3]に記載の方法。

[5] 前記工程 (i) および (ii) の工程で用いる培養液が、さらに血清を含む培養液である、[1]から[4]のいずれか1項に記載の方法。

[6] 前記工程 (ii) が、前記工程 (i) で得られた細胞を分離溶液を用いずに、浮遊培養を行う工程である、[1]から[5]のいずれか1項に記載の方法。

[7] 前記工程 (i) で用いる多能性幹細胞が、細胞塊の状態である、[1]から[6]のいずれか1項に記載の方法。

[8] 前記多能性幹細胞が、多能性幹細胞を未分化状態で培養できる培養液中で浮遊培養する工程を含む方法により製造された細胞塊である、[7]に記載の方法。

[9] 前記軟骨細胞が、軟骨細胞と細胞外マトリックスを含む塊である、[1]から[8]のいずれか1項に記載の方法。

[10] 前記工程 (i) および (ii) が、それぞれ7日以上28日以下の期間で行われる工程である、[1]から[9]のいずれか1項に記載の方法。

[11] 前記工程 (i) および (ii) が、それぞれ14日で行われる工程である、[10]に記載の方法。

[12] [1]から[11]に記載の方法で製造された軟骨細胞を含む、医薬品。

[13] 関節軟骨損傷治療用である、[12]に記載の医薬品。

発明の効果

[0008] 本発明によって多能性幹細胞（例えば、iPS細胞）から良質な軟骨細胞へ簡素化された工程にて、安定的に分化誘導することが初めて可能となった。本発明の方法で製造された軟骨細胞は、軟骨の再生医療に使用され得る。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、ヒトiPS細胞塊を軟骨分化培地で28日間分化誘導した後のパーティクルのHE染色、サフラニンO染色像を示す。

[図2]図2は、ヒトiPS細胞塊を軟骨分化培地で70日間分化誘導した後のパーティクルとマウス胎児（仔）の軟骨原基を、それぞれI型コラーゲンとII型コラーゲンの蛍光二重免疫染色にて評価した結果を示す。

[図3]図3は、ヒトiPS細胞塊を軟骨分化培地で42日間分化誘導した後のパーティクルをSCIDマウスに移植し、3か月後および12か月後に移植部位の組織を観察した結果を示す。

[図4]図4は、ヒトiPS細胞塊を軟骨分化培地で90日間分化誘導した後のパーティクルを、2個接触させた状態で60日間培養した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明を以下に詳細に説明する。

[0011] 本発明は、次の工程を含む多能性幹細胞から軟骨細胞を製造する方法を提供する；

(i) 多能性幹細胞をBMP2、TGF β およびGDF5から成る群より選択される1以上の物質ならびにHMG-CoA還元酵素阻害薬を含む培養液中で接着培養する工程、および

(ii) 前記工程(i)で得られた細胞をBMP2、TGF β およびGDF5から成る群より選択される1以上の物質ならびにHMG-CoA還元酵素阻害薬を含む培養液中で浮遊培養する工程。

[0012] 本発明で使用可能な多能性幹細胞は、生体に存在するすべ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、特に限定されないが、例えば胚性幹(ES)細胞、核移植により得られるク

ローン胚由来の胚性幹(ES)細胞、精子幹細胞(「GS細胞」)、胚性生殖細胞(「EG細胞」)、人工多能性幹(iPS)細胞、培養線維芽細胞や骨髄幹細胞由来の多能性細胞(Muse細胞)などが含まれる。好ましい多能性幹細胞は、ES細胞、ntES細胞、およびiPS細胞である。

[0013] (A) 胚性幹細胞

ES細胞は、ヒトやマウスなどの哺乳動物の初期胚(例えば胚盤胞)の内部細胞塊から樹立された、多能性と自己複製による増殖能を有する幹細胞である。

[0014] ES細胞は、受精卵の8細胞期、桑実胚後の胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚由来の幹細胞であり、成体を構成するあらゆる細胞に分化する能力、いわゆる分化多能性と、自己複製による増殖能とを有している。ES細胞は、マウスで1981年に発見され(M. J. Evans and M. H. Kaufman (1981), *Nature* 292:154-156)、その後、ヒト、サルなどの霊長類でもES細胞株が樹立された(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)。

[0015] ES細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊を線維芽細胞のフィーダー上で培養することによって樹立することができる。また、継代培養による細胞の維持は、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor (LIF))、塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor (bFGF))などの物質を添加した培養液を用いて行うことができる。ヒトおよびサルのES細胞の樹立と維持の方法については、例えばUSP5,843,780; Thomson JA, et al. (1995), *Proc Natl. Acad. Sci. U S A*. 92:7844-7848; Thomson JA, et al. (1998), *Science*. 282:1145-1147; H. Suemori et al. (2006), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345:926-932; M. Ueno et al. (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:9554-9559; H. Suemori et al. (2001), *Dev. Dyn.*, 222:273-279; H. Kawasaki et al. (2002), *Proc. Na*

tl. Acad. Sci. USA, 99:1580-1585 ; Klimanskaya I, et al. (2006), Nature, 444:481-485などに記載されている。

[0016] ES細胞作製のための培養液として、例えば0.1mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM 非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン酸、20% KSRおよび4ng/ml bFGFを補充したDMEM/F-12培養液を使用し、37°C、2% CO₂/98% 空気の湿潤雰囲気下でヒトES細胞を維持することができる(O. Fumitaka et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26:215-224)。また、ES細胞は、3~4日おきに継代する必要があり、このとき、継代は、例えば1mM CaCl₂および20% KSRを含有するPBS中の0.25% トリプシンおよび0.1mg/mlコラゲナーゼIVを用いて行うことができる。

[0017] ES細胞の選択は、一般に、アルカリホスファターゼ、Oct-3/4、Nanogなどの遺伝子マーカーの発現を指標にしてReal-Time PCR法で行うことができる。特に、ヒトES細胞の選択では、OCT-3/4、NANOG、ECADなどの遺伝子マーカーの発現を指標とすることができる(E. Kroon et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26:443-452)。

[0018] ヒトES細胞株は、例えばWA01(H1)およびWA09(H9)は、WiCell Research Instituteから、KhES-1、KhES-2およびKhES-3は、京都大学再生医科学研究所(京都、日本)から入手可能である。

[0019] (B) 精子幹細胞

精子幹細胞は、精巣由来の多能性幹細胞であり、精子形成のための起源となる細胞である。この細胞は、ES細胞と同様に、種々の系列の細胞に分化誘導可能であり、例えばマウス胚盤胞に移植するとキメラマウスを作出できるなどの性質をもつ(M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) Biol. Reprod., 69:612-616; K. Shinohara et al. (2004), Cell, 119:1001-1012)。神経膠細胞系由来神経栄養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF))を含む培養液で自己複製可能であるし、またES細胞と同様の培養条件下で継代を繰り返すことによって、精子幹細胞を得ることができる(竹林正則ら(2008), 実験医学, 26巻, 5号(増刊), 41~46頁, 羊土社(東京、日本))。

[0020] (C) 胚性生殖細胞

胚性生殖細胞は、胎生期の始原生殖細胞から樹立される、ES細胞と同様な多能性をもつ細胞であり、LIF、bFGF、幹細胞因子(stem cell factor)などの物質の存在下で始原生殖細胞を培養することによって樹立しうる(Y. Matsui et al. (1992), Cell, 70:841-847; J.L. Resnick et al. (1992), Nature, 359:550-551)。

[0021] (D) 人工多能性幹細胞

人工多能性幹(iPS)細胞は、特定の初期化因子を、DNA又はタンパク質の形態で体細胞に導入することによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能、を有する体細胞由来の人工の幹細胞である(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); 国際公開WO 2007/069666)。初期化因子は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNAまたはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA、あるいは低分子化合物によって構成されてもよい。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGlis1等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO 2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO 2010/111409、WO 2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612、Huan

gfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells . 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat Cell Biol. 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotech., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9.に記載の組み合わせが例示される。

[0022] 上記初期化因子には、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸 (VPA)、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等)等の核酸性発現阻害剤など]、MEK阻害剤 (例えば、PD184352、PD98059、U0126、SL327およびPD0325901)、Glycogen synthase kinase-3阻害剤 (例えば、BioおよびCHIR99021)、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、5-azacytidine)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、BIX-01294等の低分子阻害剤、Suv39h1、Suv39h2、SetDB1およびG9aに対するsiRNAおよびshRNA等の核酸性発現阻害剤など)、L-channel calcium agonist (例えばBayk8644)、酪酸、TGF β 阻害剤またはALK5阻害剤 (例えば、LY364947、SB431542、616453およびA-83-01)、p53阻害剤 (例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA)、ARID3A阻害剤 (例えば、ARID3Aに対するsiRNAおよびshRNA)、miR-291-3p、miR-294、miR-295およびmir-302などのmiRNA、Wnt Signaling (例えばsoluble Wnt3a)、神経ペプチドY、プロスタグランジン類 (例えば、プ

ロスタグランジンE2およびプロスタグランジンJ2)、hTERT、SV40LT、UTF1、IRX6、GLIS1、PITX2、DMRTB1等の樹立効率を高めることを目的として用いられる因子も含まれており、本明細書においては、これらの樹立効率の改善目的にて用いられた因子についても初期化因子と別段の区別をしないものとする。

[0023] 初期化因子は、タンパク質の形態の場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド（例えば、HIV由来のTATおよびポリアルギニン）との融合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよい。

[0024] 一方、DNAの形態の場合、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター（以上、Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007）、アデノウイルスベクター(Science, 322, 945-949, 2008)、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター（WO 2010/008054）などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる(Science, 322:949-953, 2008)。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができるし、さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子(例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など)、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質(GFP)、 β グルクロニダーゼ(GUS)、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞への導入後、初期化因子をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する初期化因子をコードす

る遺伝子を共に切除するために、それらの前後にLoxP配列を有してもよい。

[0025] また、RNAの形態の場合、例えばリポフェクション、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入しても良く、分解を抑制するため、5-メチルシチジンおよびpseudouridine (TriLink Biotechnologies)を取り込ませたRNAを用いても良い (Warren L, (2010) Cell Stem Cell, 7:618-630)。

[0026] iPS細胞誘導のための培養液としては、例えば、10~15%FBSを含有するDME M、DMEM/F12又はDME培養液（これらの培養液にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）またはマウスES細胞培養用培養液(TX-WES培養液、トロンボX社)、霊長類ES細胞培養用培養液（霊長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社）、無血清多能性幹細胞維持培地（例えば、mTeSR (Stemcell Technology社)、Essential 8 (Life Technologies)、StemFit AK03 (AJINOMOTO))などの市販の培養液が例示される。

[0027] 培養法の例としては、例えば、37°C、5% CO₂存在下にて、10%FBS含有DMEM又はDMEM/F12培養液上で体細胞と初期化因子とを接触させ約4~7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理ST0細胞、SNL細胞等)上に播きなおし、体細胞と初期化因子の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培養液で培養し、該接触から約30~約45日又はそれ以上ののちにiPS様コロニーを生じさせることができる。

[0028] あるいは、37°C、5% CO₂存在下にて、フィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理ST0細胞、SNL細胞等)上で10%FBS含有DMEM培養液（これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）で培養し、約25~約30日又はそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。望ましくは、フィーダー細胞の代わりに、初期化される体細胞そのものを用いる (Takahashi K, et al. (2009), PLoS One, 4:e8067 またはW02010/137746)、もしくは細胞外基質（例えば、Laminin-5 (W02009/

123349) およびマトリゲル (BD社)) を用いる方法が例示される。

[0029] この他にも、血清を含有しない培地を用いて培養する方法も例示される (Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720-15725)。さらに、樹立効率を上げるため、低酸素条件 (0.1%以上、15%以下の酸素濃度) によりiPS細胞を樹立しても良い (Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237-241またはW02010/013845)。

[0030] 上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培養液と培養液交換を行う。また、核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ100cm²あたり約5×10³~約5×10⁶細胞の範囲である。

[0031] iPS細胞は、形成したコロニーの形状により選択することが可能である。一方、体細胞が初期化された場合に発現する遺伝子 (例えば、Oct3/4、Nanog) と連動して発現する薬剤耐性遺伝子をマーカー遺伝子として導入した場合は、対応する薬剤を含む培養液 (選択培養液) で培養を行うことにより樹立したiPS細胞を選択することができる。また、マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、iPS細胞を選択することができる。

[0032] 本明細書中で使用する「体細胞」なる用語は、卵子、卵母細胞、ES細胞などの生殖系列細胞または分化全能性細胞を除くあらゆる動物細胞 (好ましくは、ヒトを含む哺乳動物細胞) をいう。体細胞には、非限定的に、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、および成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば (1) 神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞 (体性幹細胞)、 (2) 組織前駆細胞、 (3) リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞 (皮膚細胞等)、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞 (膵外分泌細胞等)、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。

[0033] また、iPS細胞を移植用細胞の材料として用いる場合、拒絶反応が起こらないという観点から、移植先の個体のHLA遺伝子型が同一もしくは実質的に同一である体細胞を用いることが望ましい。ここで、「実質的に同一」とは、移植した細胞に対して免疫抑制剤により免疫反応が抑制できる程度にHLA遺伝子型が一致していることであり、例えば、HLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座あるいはHLA-Cを加えた4遺伝子座が一致するHLA型を有する体細胞である。

[0034] (E) 核移植により得られたクローン胚由来のES細胞

ntES細胞は、核移植技術によって作製されたクローン胚由来のES細胞であり、受精卵由来のES細胞とほぼ同じ特性を有している (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)。すなわち、未受精卵の核を体細胞の核と置換することによって得られたクローン胚由来の胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたES細胞がntES(nuclear transfer ES)細胞である。ntES細胞の作製のためには、核移植技術 (J.B. Cibelli et al. (1998), *Nature Biotechnol.*, 16:642-646) とES細胞作製技術(上記)との組み合わせが利用される(若山清香ら(2008), *実験医学*, 26巻, 5号(増刊), 47~52頁)。核移植においては、哺乳動物の除核した未受精卵に、体細胞の核を注入し、数時間培養することで初期化することができる。

[0035] (F) Multilineage-differentiating Stress Enduring cells (Muse細胞)

Muse細胞は、W02011/007900に記載された方法にて製造された多能性幹細胞であり、詳細には、線維芽細胞または骨髄間質細胞を長時間トリプシン処理、好ましくは8時間または16時間トリプシン処理した後、浮遊培養することで得られる多能性を有した細胞であり、SSEA-3およびCD105が陽性である。

[0036] 本発明の軟骨細胞の製造のために用いる多能性幹細胞は、誘導工程に際して、未分化状態を失われないよう、維持しながら3次元浮遊培養することにより細胞塊の状態にすることが望ましい。本発明において、3次元浮遊培養とは、細胞を非接着条件にて、培養液中で攪拌または振とうしながら培養する方法である。

[0037] 細胞塊の直径が300 μm を超えると、細胞が分泌するサイトカイン等の影響により分化誘導や細胞塊内部に壊死が起きるため、細胞塊の直径が300 μm 以内に調整することが必要である。細胞塊の直径を調整するためには、細胞密度および攪拌速度を適宜調節することや、細胞塊をメッシュに通すなどして、大きさを調整することが例示される。ここで使用されるメッシュとしては、滅菌可能なものであれば特に限定されず、例えば、ナイロンメッシュやステンレス等の金属製メッシュなどが挙げられる。

[0038] 本発明の多能性幹細胞の3次元浮遊培養で用いる培養液は、多能性幹細胞の未分化状態を維持できる培養液であれば、特に限定されないが、このような培養液として、10~15%FBSを含有するDMEM/F12又はDMEM培養液（これらの培養液にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）、またはマウスES細胞培養用培養液(TX-WES培養液、トロンボX社)、霊長類ES細胞培養用培養液（霊長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社）、無血清多能性幹細胞維持培地（例えば、mTeSR (Stemcell Technology社)、Essential 8 (Life Technologies)、StemFit AK03 (AJINOMOTO)）などの市販の培養液が例示される。

[0039] 本発明の多能性幹細胞の3次元浮遊培養で用いる培養液には、細胞死を抑制するため、ROCK阻害剤を添加してもよい。ROCK阻害剤は、Rho-キナーゼ (ROCK) の機能を抑制できるものである限り特に限定されず、例えば、Y-27632（例、Ishizaki et al., Mol. Pharmacol. 57, 976-983 (2000); Narumiya et al., Methods Enzymol. 325, 273-284 (2000)参照）、Fasudil/HA1077（例、Uenata et al., Nature 389: 990-994 (1997)参照）、H-1152（例、Sasaki et al., Pharmacol. Ther. 93: 225-232 (2002)参照）、Wf-536（例、Nakajima et al., Cancer Chemother Pharmacol. 52(4): 319-324 (2003)参照）およびそれらの誘導體、ならびにROCKに対するアンチセンス核酸、RNA干渉誘導性核酸（例、siRNA）、ドミナントネガティブ変異体、およびそれらの発現ベクターが挙げられる。また、ROCK阻害剤としては他の公知の低分子化合物も使

用できる（例えば、米国特許出願公開第2005/0209261号、同第2005/0192304号、同第2004/0014755号、同第2004/0002508号、同第2004/0002507号、同第2003/0125344号、同第2003/0087919号、及び国際公開第2003/062227号、同第2003/059913号、同第2003/062225号、同第2002/076976号、同第2004/039796号参照）。本発明では、1種または2種以上のROCK阻害剤が使用され得る。本工程で用いる好ましいROCK阻害剤としては、Y-27632が挙げられる。本工程で用いるROCK阻害剤の濃度は、使用するROCK阻害剤に応じて当業者により適宜選択可能であるが、例えば、ROCK阻害剤としてY-27632を用いる場合、 $0.1\mu\text{M}$ から $100\mu\text{M}$ 、好ましくは、 $1\mu\text{M}$ から $50\mu\text{M}$ 、さらに好ましくは、 $5\mu\text{M}$ から $20\mu\text{M}$ である。

[0040] 本発明の多能性幹細胞の3次元浮遊培養で用いる培養液には、細胞塊同志の接着を抑制する試薬または細胞塊の浮遊状態を保持するための試薬を添加してもよく、このような試薬として、水溶性高分子、より好ましくは、水溶性多糖類（例えば、メチルセルロース、ゲランガム）が例示される。

[0041] 3次元浮遊培養に用いられる培養器は、非接着性の培養容器であれば特に制限はなく、例えば、バイオリアクター、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウエルプレート、マルチプレート、マルチウエルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、ローラーボトルが挙げられる。これらの容器には、適宜、攪拌装置、給気システムを付属させてもよい。培養器にガス透過性の素材を利用することや攪拌装置の攪拌翼の大きさ、形状を調整することで、培養槽上面にて軸流を発生させることで、給気システムを省略することができる。本発明の3次元浮遊培養に用いられる好適な培養器は、マグネティックスターラーを設置した、エイブル社製のバイオリアクターが例示される。

[0042] 3次元浮遊培養において、攪拌装置が付属された培養器を用いる場合、攪拌速度は、細胞の浮遊状態を維持できれば、特に限定されないが、例えば、30 rpmから80 rpm、好ましくは、40 rpmから70 rpm、さらに好ましくは、50 rpm

から60 rpmが例示される。

- [0043] 3次元浮遊培養は、 1.0×10^4 個/mlから 1.0×10^6 個/ml、好ましくは、 3.0×10^4 個/mlから 1.0×10^5 個/mlの細胞密度であることが例示され、培養液の容量を適宜増減することで、所望の細胞数を調整することが可能である。
- [0044] 3次元浮遊培養において、培養温度は、特に限定されないが、約30~40°C、好ましくは約37°C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。本工程の培養期間は、細胞塊の直径が300 μm以内に保つ期間であれば特に限定されないが、例えば、3日以上10日以内、好ましくは、4日以上7日以内の培養期間が例示され、好ましくは5日である。
- [0045] 本発明において、軟骨細胞とは、コラーゲンなど軟骨を構成する細胞外マトリックスを産生する細胞、または、このような細胞となる前駆細胞を意味する。また、このような軟骨細胞は、軟骨細胞マーカーを発現する細胞であってもよく、軟骨細胞マーカーとしてII型コラーゲン (COL2A1) またはSOX9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並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並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。本発明において製造される軟骨細胞は、他の細胞種が含まれる細胞集団として製造されてもよく、例えば、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上または98%以上の軟骨細胞が含まれる細胞集団である。また、本発明の方法により得られる軟骨細胞は、軟骨細胞と共に細胞外マトリックスを含む軟骨様組織（軟骨パーティクルとも言う）として得られても良い。当該軟骨様組織は、外膜および当該外膜に抱合された内容物から構成されて

おり、当該外膜は、COL1線維を含むが、COL2線維を含まず、当該外膜の厚さが、 $10\mu\text{m}$ 以上 $50\mu\text{m}$ 以下であり、当該内容物は、Col11線維、Col2線維、プロテオグリカンおよび軟骨細胞を含む。本発明において、COL1線維とは、COL1遺伝子によってコードされるタンパク質が3重らせん構造を形成している線維である。本発明において、COL2線維とは、COL2遺伝子によってコードされるタンパク質が3重らせん構造を形成している線維である。本発明において、COL11線維とは、COL11遺伝子によってコードされるタンパク質が3重らせん構造を形成している線維である。本発明において、プロテオグリカンとは、コアタンパク質のアミノ酸であるセリンと糖質（キシロース、ガラクトース、グルクロン酸）が結合し、コンドロイチン硫酸などの2糖単位で連続する多糖体が結合した化合物である。

[0046] (i) 多能性幹細胞をBMP2、TGF β およびGDF5から成る群より選択される1以上の物質ならびにHMG-CoA還元酵素阻害薬を含む培養液中で接着条件で培養する工程

本工程 (i) 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BMP2、TGF β およびGDF5から成る群から選択される1以上の物質ならびにHMG-CoA還元酵素阻害薬を添加して調製することができる。本工程 (i) で用いる好ましい培養液は、BMP2、TGF β 、GDF5およびHMG-CoA還元酵素阻害薬が添加された基礎培地である。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、 α 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、およびこれらの混合培地などが挙げられる。基礎培地には、必要に応じて、血清（例えば、FBS）、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、エタノールアミン、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、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、GlutaMAX（Invitrogen）

、非必須アミノ酸（NEAA）、ピルビン酸ナトリウム、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、無機塩類などの物質も含有しうる。本工程の1つの実施形態において、基礎培地は、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、エタノールアミン、アスコルビン酸、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、抗生物質および1%血清を含むDMEMである。

[0047] 本工程（i）において、BMP2には、ヒトおよび他の動物由来のBMP2、ならびにこれらの機能的改変体が包含され、例えば、Osteopharma社等から市販されているものを使用することができる。本工程で用いるBMP2の濃度は、0.1 ng/mlから1000 ng/ml、好ましくは、1 ng/mlから100 ng/ml、より好ましくは、5 ng/mlから50 ng/ml、10 ng/mlである。本発明において、BMP2は、BMP4に置き換えてもよい。

[0048] 本工程（i）において、TGF β には、ヒトおよび他の動物由来のTGF β 、ならびにこれらの機能的改変体が包含され、例えば、PeptoTech社等から市販されているものを使用することができる。本工程で用いるTGF β の濃度は、0.1 ng/mlから1000 ng/ml、好ましくは、1 ng/mlから100 ng/ml、より好ましくは、5 ng/mlから50 ng/ml、10 ng/mlである。

[0049] 本工程（i）において、GDF5には、ヒトおよび他の動物由来のGDF5、ならびにこれらの機能的改変体が包含され、例えば、PeptoTech社等から市販されているものを使用することができる。本工程で用いるGDF5の濃度は、0.1 ng/mlから1000 ng/ml、好ましくは、1 ng/mlから100 ng/ml、より好ましくは、5 ng/mlから50 ng/ml、10 ng/mlである。

[0050] 本発明におけるHMG-CoA還元酵素阻害薬は、例えば、メバスタチン（コンパクチン）（USP3983140参照）、プラバスタチン（特開昭57-2240号公報（USP4346227）参照）、ロバスタチン（特開昭57-163374号公報（USP4231938）参照）、シンバスタチン（特開昭56-122375号公報（USP4444784）参照）、フルバスタチン（特表昭60-500015号公報（USP4739073）参照）、アトルバスタチン（特開平3-58967号公報（USP5273995）参照）、ロスバスタチン（特開平5-17

8841号公報 (USP5260440) 参照)、ピタバスタチン (特開平1-279866号公報 (USP5854259およびUSP5856336) 参照) を含むが、これらに限定されない。本発明におけるHMG-CoA還元酵素阻害薬は、好ましくは、メバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチンおよびロバスタチンから成る群より選択される薬剤である。

[0051] 本工程 (i) において、HMG-CoA還元酵素阻害薬としてロスバスタチンを用いる場合、濃度は、 $0.01\ \mu\text{M}$ から $100\ \mu\text{M}$ 、好ましくは、 $0.1\ \mu\text{M}$ から $10\ \mu\text{M}$ 、より好ましくは、 $0.5\ \mu\text{M}$ から $5\ \mu\text{M}$ 、 $1\ \mu\text{M}$ である。

[0052] 本工程 (i) において、さらに、bFGFを基礎培地に添加してもよく、bFGFには、ヒトおよび他の動物由来のbFGF、ならびにこれらの機能的改変体が含まれ、例えば、WAKO社等の市販されているものを使用することができる。本工程で用いるbFGFの濃度は、 $0.1\ \text{ng/ml}$ から $1000\ \text{ng/ml}$ 、好ましくは、 $1\ \text{ng/ml}$ から $100\ \text{ng/ml}$ 、より好ましくは、 $5\ \text{ng/ml}$ から $50\ \text{ng/ml}$ 、 $10\ \text{ng/ml}$ である。

[0053] 本工程 (i) において、さらに、プテロシン誘導体を基礎培地に添加してもよく、プテロシン誘導体は、例えば、14/315,809に記載のプテロシン誘導体が例示され、より好ましくは、プテロシンBである。本工程で用いるプテロシンBの濃度は、 $10\ \mu\text{M}$ から $1000\ \mu\text{M}$ 、好ましくは、 $100\ \mu\text{M}$ から $1000\ \mu\text{M}$ である。

[0054] 本発明において、接着条件で培養するとは、細胞を培養皿へ接着可能な状態で培養することであり、細胞接着に適した表面加工をした培養容器を用いて培養することによって行い得る。このような表面加工をした培養容器は、市販のものを用いることができ、例えば、IWAKIの組織培養用ディッシュが例示される。他の態様として、細胞外基質を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ってもよい。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つて行い得る。

[0055] 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、ポ

リリジン、ポリオルニチン、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およびこれらの断片が挙げられる。これらの細胞外基質は、適宜組み合わせられてもよい。

[0056] 本工程 (i) において、培養温度は、特に限定されないが、約30~40°C、好ましくは約37°C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、7日以上28日以下、10日以上25日以下、10日以上20日以下、より好ましくは14日である。

[0057] (ii) 前記工程 (i) で得られた細胞をBMP2、TGF β およびGDF5から成る群より選択される1以上の物質ならびにHMG-CoA還元酵素阻害薬を含む培養液中で浮遊条件で培養する工程

本工程 (ii) では、前記工程 (i) で得られた細胞を培養容器より剥離させ、浮遊培養することで行い得る。本工程 (ii) において、細胞培養物を剥離させる方法は、力学的分離方法（例えば、ピペッティング、またはスクレーパー等を用いる方法）により行うことが好ましく、プロテアーゼ活性および/またはコラゲナーゼ活性を有する分離溶液（例えば、トリプシンとコラゲナーゼの含有溶液Accutase(TM)およびAccumax(TM) (Innovative Cell Technologies, Inc) が挙げられる）を用いない方法が好ましい。

[0058] 本発明の方法において使用される浮遊条件で培養するとは、細胞を培養皿へ非接着の状態では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）されていない培養容器（例えば、ペトリディッシュ）、または、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）した培養容器を使用して行うことが好ましい。

[0059] 本工程 (ii) において使用される培養液は、上述した工程 (i) と同一の培養液を用いることができる。

[0060] 本工程 (ii) 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、7日以上28日以下、10日以上25日以下、10日以上20日以下、より好ましくは14日である。培養期間は、所望の軟骨細胞が得られるまで培養することが望ましく、適宜軟骨細胞の製造を確認しながら培養期間を調整することができる。本発明において軟骨細胞を確認する方法として、得られた軟骨パーティクルの一部を採取し、サフラニン0にて染色されることを確認することによって行い得る。

[0061] 本発明では、上述した方法により得られた軟骨細胞を含む医薬品を提供する。患者への医薬品の投与方法としては、例えば、上述の方法により得られた軟骨細胞と産生された細胞外マトリックスから成る培養物（軟骨パーティクル）をフィブリン糊で固めて、投与部位に適した大きさの軟骨細胞と産生された細胞外マトリックスから成る培養物として、患者の軟骨欠損部位に投与する方法がある。この他にも、軟骨パーティクルをゼラチンゲルおよび/またはコラーゲンゲルおよび/またはヒアルロン酸ゲル等と混合し、患部へ投与する方法、軟骨パーティクルを患部に投与し、骨膜等で固定する方法などが例示される。

[0062] 本医薬品により治療される疾患として、鼻軟骨・耳介軟骨などの顔面軟骨および関節軟骨の欠損が例示され、好ましくは、関節軟骨損傷である。

[0063] 本発明において、本医薬品に含まれる軟骨細胞または軟骨パーティクルの数は、移植片が投与後に生着できれば特に限定されなく、患部の大きさや体躯の大きさに合わせて適宜増減して調製されてもよい。

[0064] 以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

実施例

[0065] 〔実施例1〕

ヒトiPS細胞

Nakagawa M, et al, Sci Rep. 4:3594 (2014) に記載の方法で樹立された1231A3株を京都大学iPS細胞研究所より受領し、ヒトiPS細胞として用いた。

ヒトiPS細胞は、0.5X TrypLE Selectを添加し、インキュベーションの後、セルスクレーパーを用いて細胞を剥離させた。細胞を計数し、 1.0×10^6 から 2.0×10^6 個を30 mLバイオリアクター (BWV-S03A、エイブル) へ移し、10nM Y-27632 (Wako) を添加したStemFit AK03 (Ajinomoto) を30 mLを加えて、6 cm magnetic stirrer (BWS-S03NOS-6、エイブル) により55 rpmで回転させ、37 °C、CO₂ 5%の条件下で、5日間培養した。その結果、直径50 μmから300 μmのiPS細胞塊が得られた。

[0066] 軟骨細胞誘導

上記の方法で得られたiPS細胞塊を回収し、軟骨分化培地を5 mLを入れた10 cm culture dish (イワキ) へ半量または全量のiPS細胞塊を播種した。なお、軟骨分化培地としては、1% FBS (Invitrogen) 、1% ITS-X (Invitrogen) 、50 μg/mL Ascorbic Acid (Nakalai) 、Non-Essential A.A. (Invitrogen) 、Sodium Pyruvate (Invitrogen) 、10ng/mL BMP2 (Astellas) 、10ng/mL TGF-β1 (Peprotech) 、10ng/mL GDF5 (J&J) 、1 μM Rosuvastatin (Biovision) 、Penicilline&Streptomycin (Invitrogen) およびPlasmocin (invivo gene) を添加したDMEM (SIGMA) を用いた。播種後、37 °C、CO₂ 5%条件下で培養した。2日または3日後に、新しい軟骨分化培地へ交換し、以後、2日から5日の間隔で培地交換を行い、2週間培養を継続した。すると、iPS細胞塊は次第にdishへ接着して結節 (nodule) が形成された。

[0067] 得られた結節をセルスクレーパーで剥がし、10 cmペトリディッシュへ移し、37 °C、CO₂ 5%条件下で培養した。2日または3日後に、新しい軟骨分化培地へ交換した。以後、3日から7日ごとに培地交換を行った。なお、培地交換時に、dishに貼付いた結節があればセルスクレーパーで剥がして浮遊させた。分化開始、すなわち、軟骨分化培地を用いて培養してから28日目に得られた細胞塊をサフラニン0染色にて評価した。

その結果、サフラニン0にて強く染色される細胞外マトリックスおよび軟骨

細胞から成る細胞塊（軟骨パーティクル）が得られることが確認された（図1）。

[0068] 別途、分化開始から70日目に得られた細胞塊（以下、「ヒトiPS細胞由来軟骨パーティクル」という）を、I型コラーゲンとII型コラーゲンの蛍光二重免疫染色にて評価した。比較のために、マウス胎児（仔）（14.5日胚）の上腕骨の軟骨原基の標本を作製し、同様にI型コラーゲンとII型コラーゲンの蛍光二重免疫染色を行った。その結果、図2に示したように、ヒトiPS細胞由来軟骨パーティクルとマウス胎仔軟骨原基は、ともにII型コラーゲン陽性の軟骨組織がI型コラーゲン陽性の周囲膜に囲まれていることが観察された。軟骨原基のこの周囲膜は軟骨周膜と呼ばれ、ヒトiPS細胞由来軟骨パーティクルは、軟骨+軟骨周膜からなる胎仔軟骨に形態的に似ていることが示された。

[0069] [実施例2]

ヒトiPS細胞

Nakagawa M, et al, Sci Rep. 4:3594 (2014) に記載の方法で樹立された1231A3株を京都大学iPS細胞研究所より受領し、ヒトiPS細胞として用いた。

ヒトiPS細胞は、0.5X TrypLE Selectを添加し、インキュベーションの後、セルスクレーパーを用いて細胞を剥離させた。細胞を計数し、 $0.5 - 1.0 \times 10^7$ 個を100 mLバイオリアクター（BWV-S10A、エイブル）へ移し、10nM Y-27632 (Wako) を添加したStemFit AK02N (Ajinomoto) を100 mLを加えて、magnetic stirrer (BWS-S03NOS-6、エイブル) により60 rpmで回転させ、37 °C、CO₂ 5%の条件下で、4-7日間培養した。その結果、直径50 μmから300 μmのiPS細胞塊が得られた。

[0070] 軟骨細胞誘導

上記の方法で得られたiPS細胞塊を回収し、軟骨分化培地を5 mLを入れた10 cm suspension culture dish (sumitomo) 4 - 12 dishesへiPS細胞塊を播種した。なお、軟骨分化培地としては、1% FBS (Invitrogen) 、1% ITS-X (Invitrogen) 、50 μg/mL Ascorbic Acid (Nakalai) 、Non Essential A.A. (Invitrogen) 、Sodium Pyruvate (Invitrogen) 、10ng/mL BMP2 (Peprotech) 、

10ng/mL TGF- β 1 (Peprotech)、10ng/mL GDF5 (J&J)、1 μ M Rosuvastatin (Biovision)、Penicilline&Streptomycin (Invitrogen) およびPlasmocin (invivo gene) を添加したDMEM (SIGMA) を用いた。播種後、37 °C、CO₂ 5% 条件下で培養した。1 - 5日後に、新しい軟骨分化培地へ交換し、以後、2 - 7日の間隔で培地交換を行い、2 - 3週間培養を継続した。すると、iPS細胞塊は次第にdishへ接着して結節 (nodule) が形成された。

[0071] 得られた結節をセルスクレーパーで剥がし、6 cm suspension culture dish (sumitomo) へ移し、37 °C、CO₂ 5%条件下で培養した。1 - 3日後に、新しい軟骨分化培地へ交換した。以後、2 - 7日ごとに培地交換を行った。なお、培地を交換時に、dishに貼付いた結節があればセルスクレーパーで剥がして浮遊させた。分化開始、すなわち、軟骨分化培地を用いて培養してから28日目に得られた細胞塊をサフラニン0染色にて評価した。

その結果、サフラニン0にて強く染色される細胞外マトリックスおよび軟骨細胞から成る細胞塊 (軟骨パーティクル) が得られることが確認された。

[0072] [実施例3]

ヒトiPS細胞

Nakagawa M, et al, Sci Rep. 4:3594 (2014) に記載の方法で樹立されたFf-I01株を京都大学iPS細胞研究所より受領し、ヒトiPS細胞として用いた。

ヒトiPS細胞は、0.5X TrypLE Selectを添加し、インキュベーションの後、セルスクレーパーを用いて細胞を剥離させた。細胞を計数し、0.5 - 1.0 x 10⁷個を100 mLバイオリアクター (BWV-S10A、エイブル) へ移し、10nM Y-27632 (Wako) を添加したStemFit AK03N (Ajinomoto) を100 mLを加えて、magnetic stirrer (BWS-S03NOS-6、エイブル) により60 rpmで回転させ、37 °C、CO₂ 5%の条件下で、4 - 7日間培養した。その結果、直径50 μ mから300 μ mのiPS細胞塊を得られた。

[0073] 軟骨細胞誘導

上記の方法で得られたiPS細胞塊を回収し、軟骨分化培地を5 mLを入れた10 cm suspension culture dish (sumitomo) 4 - 12dishesへ iPS細胞塊を播種

した。なお、軟骨分化培地としては、0.2% FBS (Invitrogen)、1% ITS-X (Invitrogen)、50 μ g/mL Ascorbic Acid (Nakalai)、Non Essential A.A. (Invitrogen)、Sodium Pyruvate (Invitrogen)、10ng/mL BMP2 (PeproTech)、10ng/mL TGF- β 3 (Wako)、10ng/mL GDF5 (Biovision)、1 μ M Rosuvastatin (Biovision)、を添加したDMEM (SIGMA) を用いた。播種後、37 $^{\circ}$ C、CO₂ 5%条件下で培養した。1 - 3日後に、新しい軟骨分化培地へ交換し、以後、2 - 5日の間隔で培地交換を行い、2 - 3週間培養を継続した。すると、iPS細胞塊は次第にdishへ接着して結節 (nodule) が形成された。

[0074] 得られた結節をセルスクレーパーで剥がし、6 cm suspension culture dish (sumitomo) へ移し、37 $^{\circ}$ C、CO₂ 5%条件下で培養した。1 - 5日後に、新しい軟骨分化培地へ交換した。以後、2 - 7日ごとに培地交換を行った。なお、培地を交換時に、dishに貼付いた結節があればセルスクレーパーで剥がして浮遊させた。分化開始、すなわち、軟骨分化培地を用いて培養してから56日目に得られた細胞塊をサフラニン0染色にて評価した。

その結果、サフラニン0にて強く染色される細胞外マトリックスおよび軟骨細胞から成る細胞塊 (軟骨パーティクル) が得られることが確認された。

[0075] [実施例4]

実施例1において、分化開始から42日目に得られたヒトiPS細胞由来軟骨パーティクルをSCIDマウス (C.B-17/Icr-scid/scid Jcl) の皮下に移植し、3か月後および12か月後にマウスから移植部位を切り出し定法に従い組織標本作製して組織学的分析に供した。その結果、図3に示したように、12か月後の移植部位では軟骨-骨様組織-軟骨という構造が形成された。これは、ヒトiPS細胞由来軟骨がマウスの皮下で、内軟骨性骨化を起こしたことを示すものである。拡大像では、軟骨が骨様組織に移行する部分の軟骨細胞は大きく肥大化しており、その周囲のマトリックスにはX型コラーゲンが発現していた。大きくなることとX型コラーゲンの発現は、肥大軟骨細胞の特徴であり、この部の軟骨細胞が肥大軟骨細胞であることを示す。肥大軟骨細胞が存在することから、内軟骨性骨化を起こしていると考えた。

ヒトiPS細胞由来軟骨パーティクルが内軟骨性骨化を起こすポテンシャルを持つこと、図2で示した形態的類似性、および図3で示した機能的類似性から、ヒトiPS細胞由来軟骨パーティクルが胎児（仔）の軟骨原基に相当することが示唆された。

[0076] 〔実施例5〕

実施例1において、分化開始から90日目に得られた2個のヒトiPS細胞由来軟骨パーティクルが培養液中で接触した状態で60日間培養した。その結果、図4に示したように、2個のパーティクルは融合（integration）して1個のパーティクルを形成した。もともとは、2個の独立した軟骨周膜に囲まれた軟骨組織であったが、融合部では軟骨周膜が消失し、軟骨組織同士でつながり始めていることが観察された。

軟骨の再生医療では、複数個の軟骨パーティクルを患者または動物モデルの軟骨欠損部に移植する。移植部が修復されるためには、軟骨パーティクル同士、および軟骨パーティクルと母床の軟骨が融合する必要がある。本発明により得られたヒトiPS細胞由来軟骨パーティクルはIn vitroで軟骨パーティクル同士が融合することが確認されたので、生体に移植後も融合が期待でき、良い修復が得られると考えられる。

請求の範囲

- [請求項1] 次の工程を含む多能性幹細胞から軟骨細胞を製造する方法：
(i) 多能性幹細胞をBMP2、TGF β およびGDF5から成る群より選択される1以上の物質ならびにHMG-CoA還元酵素阻害薬を含む培養液中で接着条件で培養する工程、および
(ii) 前記工程(i)で得られた細胞をBMP2、TGF β およびGDF5から成る群より選択される1以上の物質ならびにHMG-CoA還元酵素阻害薬を含む培養液中で浮遊条件で培養する工程。
- [請求項2] 前記工程(i)および(ii)の工程で用いる培養液が、BMP2、TGF β 、GDF5およびHMG-CoA還元酵素阻害薬を含む培養液である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記HMG-CoA還元酵素阻害薬が、メバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチンおよびロバスタチンから成る群より選択される薬剤である、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記HMG-CoA還元酵素阻害薬が、ロスバスタチンである、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 前記工程(i)および(ii)の工程で用いる培養液が、さらに血清を含む培養液である、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] 前記工程(ii)が、前記工程(i)で得られた細胞を分離溶液を用いずに、浮遊培養を行う工程である、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項7] 前記工程(i)で用いる多能性幹細胞が、細胞塊の状態である、請求項1から6のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項8] 前記多能性幹細胞が、多能性幹細胞を未分化状態で培養できる培養液中で浮遊培養する工程を含む方法により製造された細胞塊である、請求項7に記載の方法。
- [請求項9] 前記軟骨細胞が、軟骨細胞と細胞外マトリックスを含む塊である、

請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

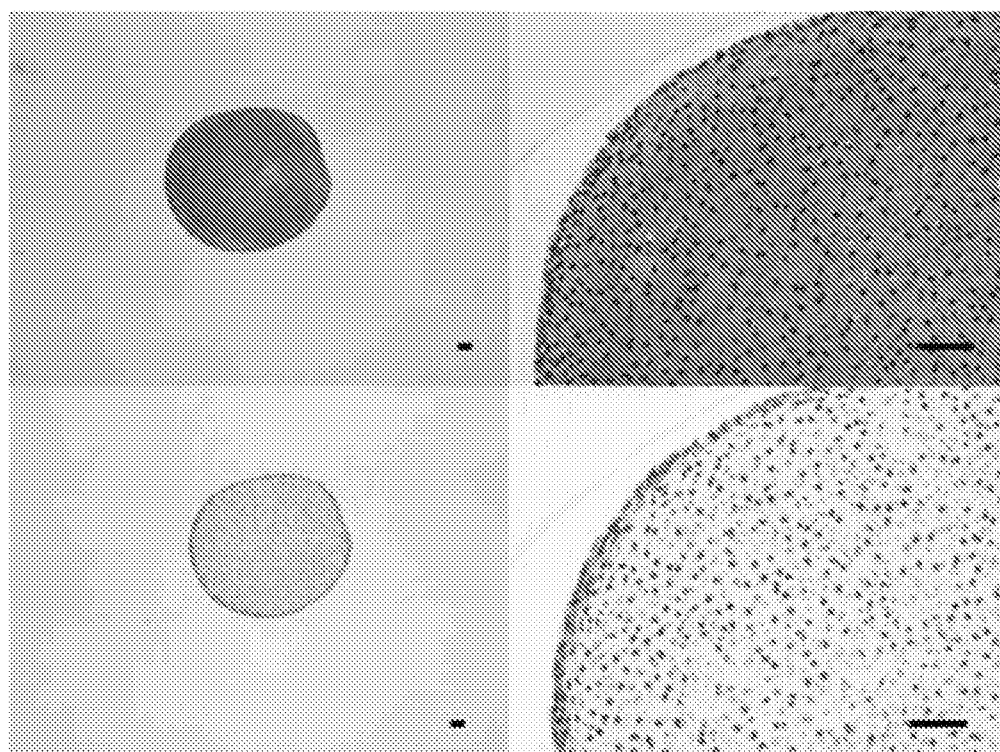
[請求項10] 前記工程 (i) および (ii) が、それぞれ 7 日以上 28 日以下の期間で行われる工程である、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項11] 前記工程 (i) および (ii) が、それぞれ 14 日で行われる工程である、請求項 10 に記載の方法。

[請求項12] 請求項 1 から 11 に記載の方法で製造された軟骨細胞を含む、医薬品。

[請求項13] 関節軟骨損傷治療用である、請求項 12 に記載の医薬品。

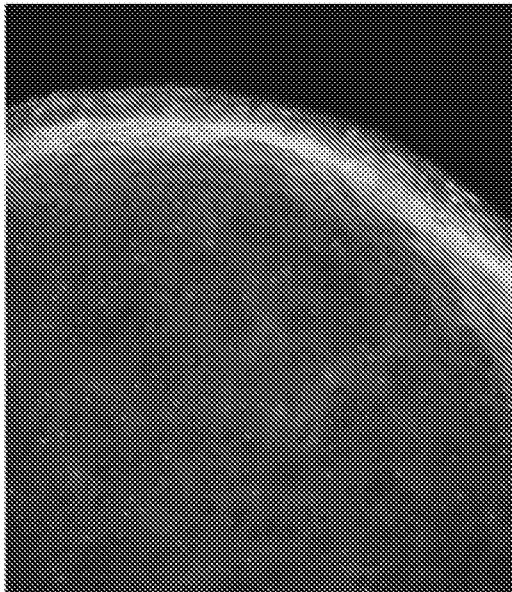
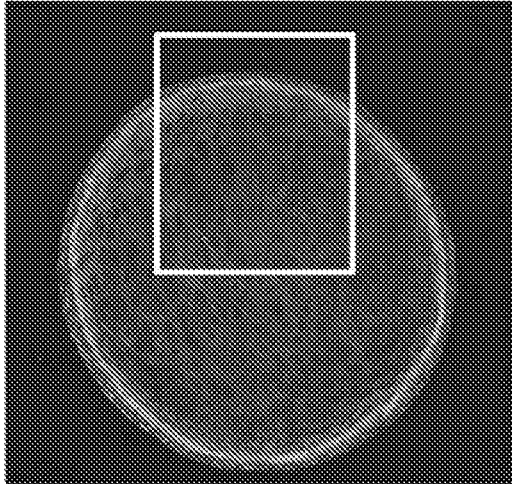
[図1]

Scale bars 50 μm

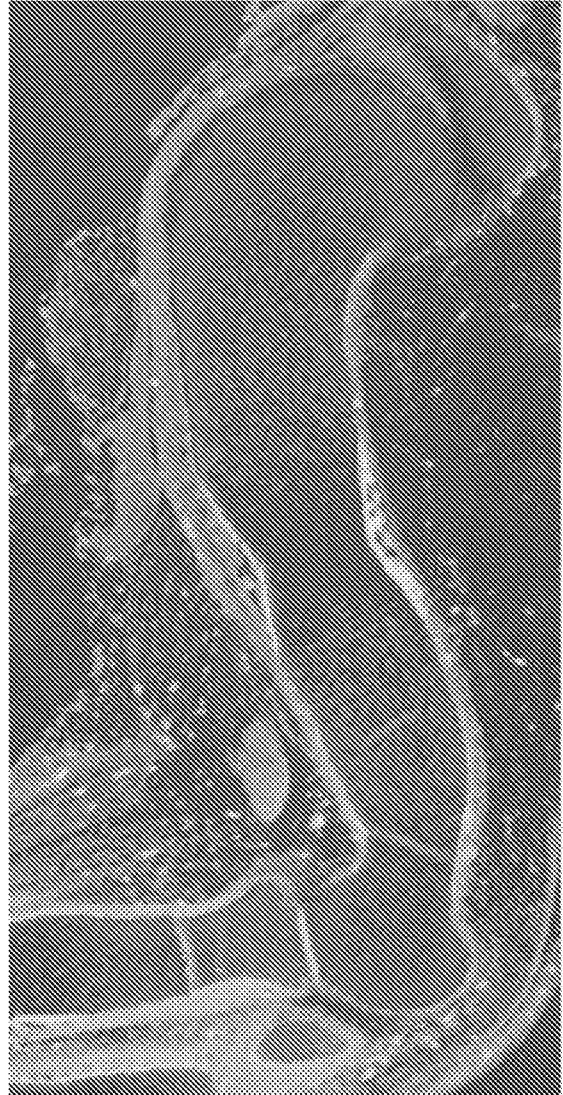
[図2]

ヒトiPS細胞由来軟骨

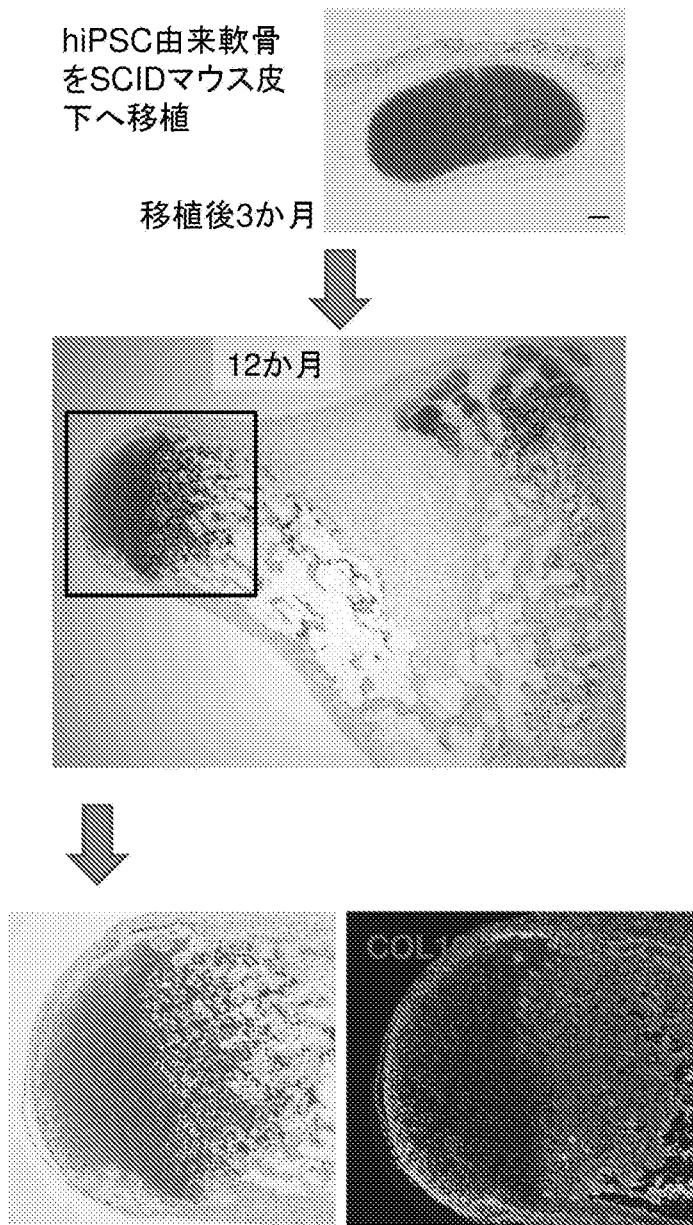
COL2 / COL1

マウス胎仔軟骨原基
(上腕骨)

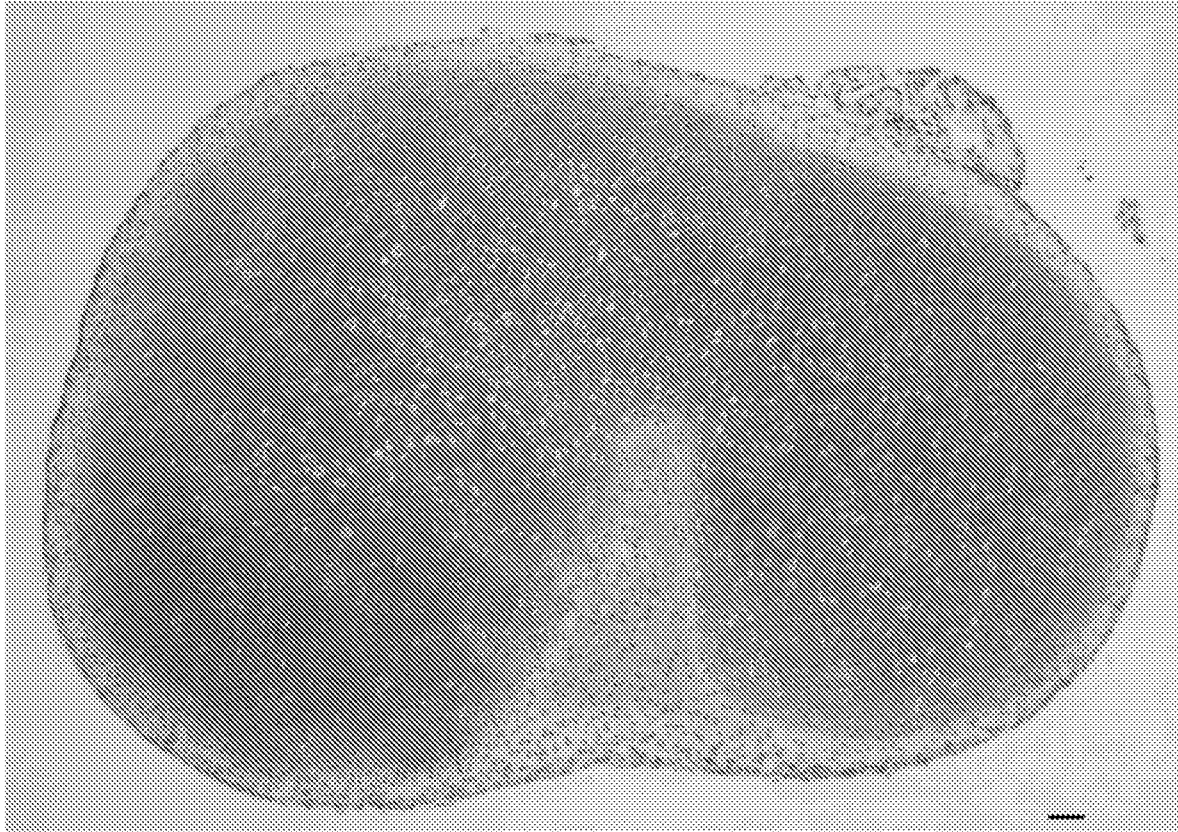
COL2 / COL1



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/054917

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/10(2006.01)i, A61K35/32(2015.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, C12N5/077(2010.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N5/10, A61K35/32, A61L27/00, A61P19/02, C12N5/077

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), WPIDS/WPIX(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YAMASHITA, A. ET AL., Statin treatment rescues FGFR3 skeletaldysplasia phenotypes., Nature, Vol.513 No.7519, 2014.09, p.507-511, Abstract, page 507, right column, line 24 to page 508, right column, line 13, page 509, right column, line 25 to page 510, left column, line 28, "METHODS", "Chondrogenic differentiation of hiPSCs", Figs. 1, 3, Extended Data Figs. 3, 5, 7, 8	1-13
A	JP 2011-041472 A (Tokai University), 03 March 2011 (03.03.2011), claims; paragraphs [0027] to [0043] (Family: none)	1-13

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 13 May 2016 (13.05.16)	Date of mailing of the international search report 24 May 2016 (24.05.16)
-------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/054917

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OLDERSHAW, R.A. ET AL., Directed differentiation of human embryonic stem cellstoward chondrocytes., Nat. Biotechnol., 2010.10, Vol.28, No.11, p.1187-1194, page 1189, left column, line 8 to page 1190, right column, line 8	1-13
P,Y	WO 2015/064754 A1 (Kyoto University), 07 May 2015 (07.05.2015), claims; paragraphs [0005] to [0095] (Family: none)	1-13
P,X	WO 2015/083582 A1 (Kyoto University), 11 June 2015 (11.06.2015), claims; paragraphs [0007] to [0123] & JP 2015-129110 A	1-13

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, A61K35/32(2015.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, C12N5/077(2010.01)i</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N5/10, A61K35/32, A61L27/00, A61P19/02, C12N5/077</p>											
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2016年										
日本国実用新案登録公報	1996-2016年										
日本国登録実用新案公報	1994-2016年										
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:70%;">引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th style="width:20%;">関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align:center;">X</td> <td> <p>YAMASHITA, A. ET AL., Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes., Nature, Vol.513 No.7519, 2014.09, p.507-511,</p> <p>Abstract、第507頁右欄第24行-第508頁右欄第13行、第509頁右欄25行-第510頁左欄第28行、"METHODS"の"Chondrogenic differentiation of hiPSCs"、Figs. 1及び3、Extended Data Figs. 3, 5, 7及び8</p> </td> <td style="text-align:center;">1-13</td> </tr> </tbody> </table>				引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	<p>YAMASHITA, A. ET AL., Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes., Nature, Vol.513 No.7519, 2014.09, p.507-511,</p> <p>Abstract、第507頁右欄第24行-第508頁右欄第13行、第509頁右欄25行-第510頁左欄第28行、"METHODS"の"Chondrogenic differentiation of hiPSCs"、Figs. 1及び3、Extended Data Figs. 3, 5, 7及び8</p>	1-13		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	<p>YAMASHITA, A. ET AL., Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes., Nature, Vol.513 No.7519, 2014.09, p.507-511,</p> <p>Abstract、第507頁右欄第24行-第508頁右欄第13行、第509頁右欄25行-第510頁左欄第28行、"METHODS"の"Chondrogenic differentiation of hiPSCs"、Figs. 1及び3、Extended Data Figs. 3, 5, 7及び8</p>	1-13									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p>		<p><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>									
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」同一パテントファミリー文献</p>									
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align:center;">13.05.2016</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align:center;">24.05.2016</p>									
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align:center;">日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2"> <p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align:center;">鶴 剛史</p> </td> <td style="width:10%; text-align:center;">4B</td> <td style="width:10%; text-align:center;">4670</td> </tr> <tr> <td colspan="4"> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p> </td> </tr> </table>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align:center;">鶴 剛史</p>		4B	4670	<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>			
<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align:center;">鶴 剛史</p>		4B	4670								
<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>											

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2011-041472 A (学校法人東海大学) 2011. 03. 03, 特許請求の範囲、段落【0027】 - 【0043】 (ファミリーなし)	1-13
A	OLDERSHAW, R. A. ET AL., Directed differentiation of human embryonic stem cellstoward chondrocytes., Nat. Biotechnol., 2010. 10, Vol. 28, No. 11, p. 1187-1194, 第 1189 頁左欄第 8 行 - 第 1190 頁右欄第 8 行	1-13
P, Y	WO 2015/064754 A1 (国立大学法人京都大学) 2015. 05. 07, 請求の範囲、[0005]-[0095] (ファミリーなし)	1-13
P, X	WO 2015/083582 A1 (国立大学法人京都大学) 2015. 06. 11, 請求の範囲、[0007]-[0123] & JP 2015-129110 A	1-13