

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6434014号
(P6434014)

(45) 発行日 平成30年12月5日(2018.12.5)

(24) 登録日 平成30年11月16日(2018.11.16)

(51) Int.Cl.	F I	
A 6 1 K 35/32 (2015.01)	A 6 1 K 35/32	
A 6 1 L 27/38 (2006.01)	A 6 1 L 27/38	3 0 0
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 7
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00	Z
請求項の数 10 (全 26 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-529708 (P2016-529708)	(73) 特許権者	515195543
(86) (22) 出願日	平成26年7月23日 (2014.7.23)		バイオ・ソリューション・カンパニー・リミテッド
(65) 公表番号	特表2016-525541 (P2016-525541A)		Bio Solution Co., Ltd.
(43) 公表日	平成28年8月25日 (2016.8.25)		大韓民国01811ソウル、ノウォング、コンヌンロ232、フィフス・フロア、ナンバー519 (コンヌンドン、ソウル・テクノパーク)
(86) 国際出願番号	PCT/KR2014/006680		MCTT BIO INC.
(87) 国際公開番号	W02015/012582	(74) 代理人	100101454
(87) 国際公開日	平成27年1月29日 (2015.1.29)		弁理士 山田 卓二
審査請求日	平成29年7月10日 (2017.7.10)	(74) 代理人	100062144
(31) 優先権主張番号	10-2013-0087533		弁理士 青山 葆
(32) 優先日	平成25年7月24日 (2013.7.24)		
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 球状軟骨細胞治療剤の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 軟骨細胞及び/又は軟骨分化能を有する細胞をV字状の底部を有するウェル容量が $500 \mu\text{L}$ 以上である96ウェル ディープウェルプレートに $0.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ 細胞 / $400 \sim 600 \mu\text{L}$ / ウェルで分注し、

b) 上記プレートを遠心分離し、

c) 上記プレートをインキュベーター内で三次元培養し、そして

d) 各ウェルからペレットを回収する、

工程を含む、球状軟骨細胞治療剤の製造方法。

【請求項2】

工程a)で、軟骨分化能を有する細胞が間葉系幹細胞、胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞からなる群より選択される、請求項1に記載の球状軟骨細胞治療剤の製造方法。

【請求項3】

間葉系幹細胞が、脂肪由来、骨髄由来、臍帯由来、臍帯血由来、胎盤由来、滑膜由来、骨膜由来又は軟骨膜由来の細胞である、請求項2に記載の球状軟骨細胞治療剤の製造方法。

【請求項4】

工程a)で、軟骨細胞又は軟骨分化能を有する細胞を $0.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ 細胞 / $400 \mu\text{L}$ / ウェルで分注する、請求項1に記載の球状軟骨細胞治療剤の製造方法。

【請求項 5】

工程 a) で、マルチ - チャネルピペット、マルチ - ピペット、マイクロプレートウォッシャー及びマイクロプレートディスペンサーからなる群より選択される装置を用いて軟骨細胞又は軟骨分化能を有する細胞を分注する、請求項 1 に記載の球状軟骨細胞治療剤の製造方法。

【請求項 6】

工程 b) で、500 ~ 2000 rpm で 5 分 ~ 10 分間遠心分離する、請求項 1 に記載の球状軟骨細胞治療剤の製造方法。

【請求項 7】

工程 c) で、無血清培地で三次元培養する、請求項 1 に記載の球状軟骨細胞治療剤の製造方法。

10

【請求項 8】

工程 c) で、3 日 ~ 30 日間三次元培養する、請求項 1 に記載の球状軟骨細胞治療剤の製造方法。

【請求項 9】

工程 c) で、培地を交換する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の球状軟骨細胞治療剤の製造方法。

【請求項 10】

マルチ - チャネルピペット、マルチ - ピペット、マイクロプレートウォッシャー及びマイクロプレートディスペンサーからなる群より選択される装置を用いて培地を交換する、請求項 9 に記載の球状軟骨細胞治療剤の製造方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、球状軟骨細胞治療剤の製造方法に関する。さらに詳しくは、a) 軟骨細胞及び/又は軟骨分化能を有する細胞をV字状の底部を有する96ウェルディープウェルプレート (deep well plate) に分注し、b) 上記プレートを遠心分離し、c) 上記プレートをインキュベーター内で三次元培養し、そしてd) 各ウェルからペレットを回収する工程を含むことによって、繰り返して再現可能であり、均一な良質の軟骨組織を容易かつ安定的に大量に製造できる、支持体(scaffold)のない球状軟骨細胞治療剤の製造方法、及び上記方法で製造された軟骨損傷に注入式で簡単に移植し、損傷を修復する効果を有する支持体のない球状軟骨細胞治療剤に関するものである。

30

【背景技術】

【0002】

軟骨組織は、無血管組織であり、組織内の細胞密度が顕著に低いため、自然的再生は非常に限定的である。1994年Brittbergら(非特許文献1)が患者自身の関節軟骨細胞を分離、増殖させ、軟骨損傷部に移植する自己軟骨細胞移植術(ACI; autologous articular chondrocyte implantation)方法を報告して以来、ACI法は、関節軟骨損傷治療に使用され、臓器観察においても成功裏の結果が報告されている。しかしながら、高齢の患者および大きなサイズの損傷では、正常な関節軟骨の構造的特徴又は構成を再現することはできなかった。伝統的なACI(第1世代のACI)の制限は、骨膜をカバーとして懸濁液状態の細胞を損傷部位に固定する相当に浸潤的な移植方法、移植後細胞の生存率減少及び軟骨細胞の表現型(phenotype)が保持されない点、物理的な強度脆弱などがその原因として指摘されている。このような制限を克服するために、ゲル、膜、三次元支持体を細胞運搬システムとして利用する第2世代のACI技術である組織工学的軟骨が開発されている(Hutmacher et al., 2000; Adkisson et al., 2001; Ochi et al., 2001; 及びCancedda et al., 2003)(非特許文献2、3、4、5)。

40

【0003】

組織工学的軟骨製造において、支持体は、軟骨細胞に三次元システムを提供して軟骨細胞の表現型を保持し、硝子軟骨の細胞外基質(ECM)生産を促進させる。さらに、細胞

50

を軟骨損傷部位に運搬し、移植部位に物理的支持を提供して負荷される力から細胞を保護する。現在、多くの合成又は天然成分の材料を利用して組織工学のための支持体が開発されてきた。しかしながら、臨床に適用する側面から見れば、異種及び同種由来の天然材料は免疫反応を誘発することがあり、合成材料の場合、害になる分解産物が生じることもあるため、安全性側面から問題がある。また、軟骨細胞を支持体に接種すれば、ほとんどが支持体の外郭に分布するようになり、軟骨細胞が合成、分泌した細胞外基質が支持体の外郭でシェルを形成し、栄養分、老廃物及びガスの拡散及び交換を阻害し、結果的に内部細胞の死滅などを引き起こす。幾つかの研究で支持体を用いて成功裏に組織工学的軟骨を製造したが、細胞と生体材料との相互作用、生体材料の不規則な分解性、生体適合性、均一ではない細胞分布、移植後組織工学的軟骨と周辺軟骨の連結（結合）不足などが未だに解決しなければならない課題として残っている（Hutmacher et al., 2000; Ochi et al., 2001; Sitterling et al., 1996; Grande et al., 1997; Nehrer et al., 1998; Sims et al., 1998; Naumann et al., 2004; Park et al., 2006; 及びWolf et al., 2008）（非特許文献2、4、6、7、8、9、10、11、12）。

10

【0004】

支持体を用いず、三次元的軟骨組織を製造する方法に対する研究は、継続して行われてきたが、このような方法は、細胞と細胞のECM合成能力にのみ依存して組織を形成するため、移植が必要な損傷サイズに合う組織作りが難しく、直接臨床適用することは非常に制限的と報告されてきた（Adkisson et al., 2001; Grogan et al., 2003; 及びMarlovits et al., 2003）（非特許文献3、13、14）。軟骨は、無血管組織であるので、低酸素及び低栄養状態でよく耐える。しかしながら、Jainら（2005）及びRouwkemaら（2008）（非特許文献15及び16）は、体内のあらゆる細胞は、血管から100～200µm以上離れていないため、実験室で移植のための組織を作る際にも、制限された栄養成分、老廃物及びガスの拡散を考慮し、その大きさを決定しなければならないとした。その上、軟骨損傷の形状と深さは均一ではない（図1A）ため、実験室で製造した三次元的軟骨が損傷部位より大きい場合、損傷の形状に合わせて移植体（implant）を整えなければならず、また、軟骨移植体が損傷部位より小さいときには、損傷形状に合わせてモザイクのように嵌め込む方法で移植しなければならなかった。現在までに開発された組織工学的軟骨製品はこのような方式で移植されているが、損傷の厚さは合わせるのが難しく、関節軟骨で移植体が周辺の軟骨より高くはみ出すか、陥没されれば、異常な体重負荷により移植体又は周辺正常軟骨に追加的損傷を誘発する虞がある（図1B）。

20

30

【0005】

従って、小さな球状の軟骨組織が作られれば、培養過程中的灌流（perfusion）の問題による内部細胞の死滅が生じず、損傷部位に幾つかの小さな球状組織を詰め込むことで、軟骨損傷部位の形状及び厚さに関係なく、欠損部位を修復することができる。さらに、大きく切開することなく、小さな切開又は関節鏡を通して損傷部位に注入式で移植が可能である（図1C）。しかし、治療剤として開発するためには、繰り返して再現可能で、均一化された軟骨性組織を作ることができる技術が必要であり、広い部位損傷に使用するためには、相当多数の軟骨性組織を製造することができる大量培養システムが求められる。

【0006】

支持体を使用することなく、硝子軟骨性組織を製造する方法は、軟骨細胞又は軟骨分化能を有する細胞の高密度三次元培養に基づいている。高密度で三次元状態を維持することは、軟骨細胞の表現型発現において最も重要な要素である。発生過程で見れば、軟骨前駆細胞の凝集（aggregation）以後、初期細胞-細胞及び細胞-基質付着分子の増加により軟骨分化は促進される（Tavella et al., 1997; Stewart et al., 2000; Anderer et al., 2002; 及びZhang et al., 2004）（非特許文献17、18、19、20）。

40

【0007】

支持体のない小さな軟骨構造物を製造する方法のうち、まず、ペレット培養は、比較的少ない数の細胞を遠心分離し、細胞凝集（condensation）をなして、三次元培養開始工程から人為的に細胞の超高密度培養システムを製造する方法である。ペレット形成過程は、

50

簡単に容易に再現可能であり、軟骨形成能力を有する細胞は、このシステム下で軟骨性基質を合成、分泌して、軟骨性組織を作るようになる (Zhang et al., 2004) (非特許文献 20)。ペレット培養法は、幹細胞の軟骨分化能力を評価する時に最も多く使用される方法であり (Pittenger et al., 1999) (非特許文献 21)、軟骨細胞に及ぼす外来因子等の影響を評価する用途にも利用されている (Stewart et al., 2000; Croucher et al., 2000; Graff et al., 2000; 及び Larson et al., 2002) (非特許文献 18、22、23、24)。しかしながら、ペレット培養で作る軟骨構造体の細胞治療剤への利用可能性に対する評価は行われていない。なぜなら、ペレットシステムは良質の軟骨性組織を作るのに有用な方法であるが、十分な大きさのペレットを作ることが難しいという問題から軟骨損傷再生に適用には難しいと考えられていたからである。また、一般的なペレット培養は、蓋付きチューブ (円錐チューブ、貯蔵チューブ、マイクロ遠心分離チューブ等) に、細胞懸濁液を入れ、遠心分離後、三次元培養して、チューブ 1 個当たり一個のペレットを作ることができる方法を利用するため、大量培養への適用は難しい (図 2 A)。

【0008】

支持体のない小さな軟骨構造物を製造する方法としては、自然的に細胞の凝集を誘導する方法がある。Mosconaら (1961) (非特許文献 25) は、回転技術を利用して “aggregation pattern (凝集パターン)” と命名した細胞集合体を作製した。彼らは、細胞を培養液に浮遊した状態で動的培養 (dynamic culture) するとき、細胞間の作用により自然的に細胞集合体 (aggregate) が形成されたことを報告した (図 2 B)。Landryら (1985; 1984) (非特許文献 26、27) は、非付着性プラスチック表面上で細胞を操作して三次元細胞集合体を作製し、これを “スフェロイド (spheroid)” と名前付けた。Reginatoら (1994); Stewartら (2000); Andererら (2000); 及び、Wolfら (2008) (非特許文献 12、18、19、28) は、軟骨細胞をアガロースやヒドロゲルでコーティングした非付着性培養皿で培養し、自然的な細胞集合体形成を誘導した (図 2 C)。このような自然的なスフェロイドシステムにおいて、細胞は、三次元的な細胞集合体を形成し、硝子軟骨の自然的な基質と類似な自己の細胞外基質 (ECM) を生産する。しかし、この培養方法は、一個の細胞集合体を作る細胞数を調節することができず、形成された軟骨性組織間の融合 (fusion) が引き起こされる虞があるため、それぞれ軟骨性組織の大きさ及び軟骨化の変動が存在するので、組織工学的 / 細胞治療剤として規格化することができないという短所がある。

【0009】

さらに別の自然的に細胞凝集を誘導する方法には、付着性培養皿を使用する方法がある。Imabayashiら (2003) (非特許文献 29) は、軟骨分化能を有する細胞の高濃度懸濁液を付着性培養皿に滴下し、37 インキュベーター中に静置すれば、数時間 ~ 数日以内に細胞が凝集し、これを培養培地で浮遊させた後、非付着性培養皿又は動的培養条件で三次元培養した方法を記載している (図 2 D)。マイクロマス / コンドロスフィア (chondrosphere) 培養と呼ばれるこの方法は、軟骨性組織を形成する細胞数を調節することができるという長所がある。しかしながら、自然的に細胞集合体を形成し得る能力は細胞の状態によって差があるため、均一化された軟骨性組織を安定的に得ることができる保障はない。また、ECM が硬くなる前に、細胞集合体を一度に培養する場合、形成された軟骨性組織間の融合が生じる虞があった。

【0010】

自然的な細胞集合体を形成する細胞数を同じにするために、マイクロウェルを使用する研究も行われている。肝細胞の三次元培養で、ヘパトスフィア (Hepatosphere) が大きい場合、内部コアの壊死が生じ得る。その結果、所望の大きさで多量の均一化されたヘパトスフィアを作ることができる三次元培養システムの開発が必要とされていた。Fukutaら (2006) (非特許文献 30) は、そのような方法の一つとして、微小成形技術 (micromolding techniques) のような方法を開発した。Wongら (2011) 及び Choiら (2010) (非特許文献 31 及び 32) も、薄いポリ - ジメチルシロキサン (PDMS) 膜に基づいた直径 300 ~ 500 μm の凹状のマイクロモールドを作製し、肝細胞を平たな PDMS、シリンダー

10

20

30

40

50

形又は凹状のマイクロウェルで培養し、スフェロイドを形成させたとき、凹状のマイクロウェルで形成された球体の大きさと形状は均一にされ、大きさは凹状のマイクロウェルの直径により完璧に調節され、凹状のマイクロウェルで培養した細胞は、シリンダー状マイクロウェルや平たな表面でより速く球体を形成しており、細胞を回収しやすいため、安定した球体を得るのに大きい長所となると報告した(図2E)。マイクロモールドを用いたマイクロ-組織製造方法は、モールドが商品化され、様々な細胞で評価されてはいるが、これもまた、自然的な細胞凝集を誘導する方法であるため、均一化された軟骨性組織を安定的に得ることができる保障はなく、作られた細胞集合体の大きさが小さすぎるため、物理的強度が脆く、取扱い難く、三次元軟骨細胞治療剤として使用するには限界があった。

【0011】

このように、支持体を用いずに三次元的軟骨組織を製造する方法として、現在までに公知の方法は、十分なペレットの大きさを形成することができないか、大量生産に適しないか、繰り返して再現可能な均一な軟骨組織を形成することができないか、形成された細胞集合体の大きさが小さすぎて、強度が低いという問題点がある。故に、これらの方法は支持体のない球状軟骨細胞治療剤を生産するには適しない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994 Oct 6 ; 331(14):889 - 95.

【非特許文献2】Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000 ; 21:2529 - 43.

【非特許文献3】Adkisson HD, Gillis MP, Davis EC, Maloney W, Hruska KA. In vitro generation of scaffold independent neocartilage. *Clin Orthop* 2001 ; 391S:S280 - 94.

【非特許文献4】Ochi M, Uchio Y, Tobita M, Kuriwaka M. Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artif Organs* 2001 ; 25:172 - 9.

【非特許文献5】Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology.* 2003 ; 22:81 - 91.

【非特許文献6】Sittinger M, Reitzel D, Dauner M, et al. Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 1996 ; 33:57 - 63.

【非特許文献7】Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R, Manji R. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biomed Mater Res* 1997 ; 34:211 - 20.

【非特許文献8】Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Hsu HP, Minas T, Shortkroff S, Sledge CB, Yannas IV, Spector M. Chondrocyte seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials* 1998 ; 19:2313 - 28.

【非特許文献9】Sims CD, Butler PE, Cao YL, Casanova R, Randolph MA, Black A, Vacanti CA, Yaremchuk MJ. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. *Plast Reconstr Surg* 1998 ; 101:1580 - 5.

【0013】

【非特許文献10】Naumann A, Dennis JE, Aigner J, Coticchia J, Arnold J, Berghaus A, Kastenbauer ER, Caplan AL. Tissue engineering of autologous cartilage grafts in three-dimensional in vitro macroaggregate culture system. *Tissue Eng* 2004 ; 10(11 - 12):1695 - 706.

【非特許文献11】Park K, Huang J, Azar F, Jin RL, Min BH, Han DK, Hasty K. Scaffold-free, engineered porcine cartilage construct for cartilage defect repair -

10

20

30

40

50

in vitro and in vivo study. *Artif Organs* 2006 ; 30(8): 586 - 96.

【非特許文献 1 2】Wolf F, Candrian D, Wendts D, Farhadi J, Heberer M, Martin I, Barbero A. Cartilage tissue engineering using pre - aggregated human articular chondrocytes. *European Cells and Materials* 2008 ; 16:92 - 99.

【非特許文献 1 3】Grogan SP, Rieser B, Winkelmann HFP, Berardi S, Mainil - Varlet P. A static, closed and scaffold - free bioreactor system that permits chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2003 ; 11:403 - 11.

【非特許文献 1 4】Marlovits S, Tichy B, Truppe M, Gruber D, Vecsei V. Chondrogenesis of aged human articular cartilage in a scaffold - free bioreactor. *Tissue Eng* 2003 ; 9:1215 - 26.

10

【非特許文献 1 5】Jain RK, Au P, Tam J, Duda DG, Fukumura D. Engineering vascularized tissue. *Nat Biotechnol* 2005 ; 23:821 - 3.

【非特許文献 1 6】Rouwkema J. Rivron NC. van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2008 ; 26:434.

【非特許文献 1 7】Tavella S, Bellese G, Castagnola P, Martin I, Piccini D, Doliana R, Colombatti A, Cancedda R, Tacchetti C. Regulated expression of fibronectin, laminin and related integrin receptors during the early chondrocyte differentiation. *J Cell Sci* 1997 ; 110:2261 - 70.

【非特許文献 1 8】Stewart MC, Saunders KM, Burton - Wurster N, Macleod JN. Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro: the effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation. *J Bone Miner Res* 2000 Jan ; 15(1):166 - 74.

20

【非特許文献 1 9】Anderer U, Libera J. In vitro engineering of human autologous cartilage. *J Bone Miner Res* 2002 ; 17: 1420 - 29.

【 0 0 1 4 】

【非特許文献 2 0】Zhang Z, McCaffery M, Spencer RG, Francomano CA. Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *J Anat* 2004 ; 205:229 - 37.

【非特許文献 2 1】Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 ; 284(5411):143 - 7.

30

【非特許文献 2 2】Croucher LJ, Crawford A, Hatton PV, Russell RG, Buttle DJ. Extracellular ATP and UTP stimulate cartilage proteoglycan and collagen accumulation in bovine articular chondrocyte pellet cultures. *Biochim Biophys Acta* 2000 ; 1502:297 - 306.

【非特許文献 2 3】Graff RD, Lazarowski ER, Banes AJ, Lee GM. ATP release by mechanically loaded porcine chondrons in pellet culture. *Arthritis Rheum* 2000 ; 43:1571 - 9.

【非特許文献 2 4】Larson CM, Kelley SS, Blackwood AD, Banes AJ, Lee GM. Retention of the native chondrocyte pericellular matrix results in significantly improved matrix production. *Matrix Biol* 2000 ; 21:349 - 59.

40

【非特許文献 2 5】Moscona A. Rotation - mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. A quantifiable approach to cell interactions in vitro. *Exp Cell Res* 1961 ; 22: 455 - 475.

【非特許文献 2 6】Landry J, Bernier D, Ouellet C, Goyette R, Marceau N. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *J Cell Biol* 1985 ; 101: 914 - 23.

【非特許文献 2 7】Landry J, Freyer JP. Regulatory mechanisms in spheroidal aggregate

50

gates of normal and cancerous cells. Recent Results Cancer Res 1984 ; 95: 50 - 66

【非特許文献 2 8】Reginato AM, Iozzo RV, Jimenez SA. Formation of nodular structures resembling mature articular cartilage in long-term primary cultures of human fetal epiphyseal chondrocytes on a hydrogel substrate. Arthritis Rheum 1994 ; 7:1338 - 49.

【非特許文献 2 9】Imabayashi H, Mori T, Gojo S, Kiyono T, Sugiyama T, Irie R, Isogai T, Hata J, Toyama Y, Umezawa A. Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. Exp Cell Res 2003 ; 288(1):35 - 50. 10

【非特許文献 3 0】Fukuda J, Nakazawa K. Orderly arrangement of hepatocyte spheroids on a microfabricated chip. Tissue Eng 2005 ; 11:1254 - 62.

【非特許文献 3 1】Wong SF, No da Y, Choi YY, Kim DS, Chung BG, Lee SH. Concave microwell based size-controllable hepatosphere as a three-dimensional liver tissue model. Biomaterials. 2011 Nov ; 32(32):8087 - 96.

【非特許文献 3 2】Choi YY, Chung BG, Lee DH, Khademhosseini A, Kim JH, Lee SH. Controlled size embryoid body formation in concave microwell arrays. Biomaterials 2010 ; 31:4296 - 303. 20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

そこで、本発明は、支持体を用いず、三次元的軟骨組織を製造する方法として、特に球状軟骨組織を生産するのに適した新しい方法を提供しようとするものであり、容易に購入可能なV字状の底部を有する96ウェル ディープウェルプレートを利用する簡単な方法により、繰り返して再現可能であり、均一な良質の軟骨組織を容易に安定的に大量に作ることができる球状軟骨細胞治療剤の製造方法を提供することを技術的課題とする。また、本発明者らは、上記方法で製造した支持体のない球状軟骨細胞治療剤が実際軟骨損傷に注入式で簡単に移植され、損傷を修復する効果を有することを確認しており、本発明は、上記製造方法で製造された支持体のない球状軟骨細胞治療剤を提供することをさらに別の技術的課題とする。 30

【課題を解決するための手段】

【0016】

上記の技術的課題を解決するために、本発明は、a)軟骨細胞及び/又は軟骨分化能を有する細胞をV字状の底部を有する96ウェル ディープウェルプレートに分注し、b)上記プレートを遠心分離し、c)上記プレートをインキュベーター内で三次元培養し、そしてd)各ウェルからペレットを回収する、工程を含む球状軟骨細胞治療剤の製造方法を提供する。

【0017】

また、本発明は、上記方法で製造された軟骨損傷に注入式で簡単に移植し、損傷を修復する効果を有する支持体のない球状軟骨細胞治療剤を提供する。 40

【0018】

さらに、本発明は、上記球状軟骨細胞治療剤と、骨及び/又は骨移植材料と、を含む骨軟骨損傷治療用軟骨-骨二層構造物を提供する。

【発明の効果】

【0019】

本発明は、支持体を用いず、三次元的軟骨組織を製造する際に、V字状の底部を有する96ウェル ディープウェルプレートを使用することによって、従来の培養方法と比較して、繰り返して再現可能であり、均一な良質の球状軟骨組織を容易に安定的に大量に作ることができ、自動化が可能であり、実際患者の軟骨損傷に注入式で簡単に移植され、損傷 50

を修復する効果を有する球状軟骨細胞治療剤を製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】球状軟骨組織移植物の必要性を概略的に示した図であり、Aは軟骨損傷の不規則な形状及び様々な膝軟骨厚さを示し、Bは単一規格（厚さ）の移植物の場合、軟骨厚さに応じて軟骨面からはみ出されるか、陥没される形態で移植され、移植物又は周辺正常軟骨に異常な体重負荷がかかる現象を示し、Cは小さな球状の移植物の場合、注入式で軟骨損傷の形状／厚さに関係なく、移植可能であることを示している。

【図2】軟骨細胞又は幹細胞から支持体のない三次元軟骨組織を作る様々な製造方法を概略的に示した図である。

【図3a】96ウェル ディープウェルプレートと一般的な96ウェル プレートのウェルの深さ（高さ）の差を示す写真である。

【図3b】様々な形態のV字状の底部を有する96ウェル ディープウェルプレートとそれぞれのウェルで球状軟骨組織（ペレット）の形成模式図である。

【図4a】V字状の底部を有する96ウェル プレート（300μLウェル容量）で、三次元ペレット培養した軟骨細胞の組織学的染色（GAG染色）結果を示す写真である。

【図4b】平坦な底部を有する96ウェル プレート（300μLウェル容量）で、三次元ペレット培養した軟骨細胞の写真である。

【図4c】凹状の底部を有する96ウェル ディープウェルプレートで、三次元ペレット培養した軟骨細胞の写真である。

【図4d】V字状の底部を有する96ウェル ディープウェルプレートで、三次元ペレット培養した軟骨細胞の写真である。

【図5a-h】ウサギの軟骨細胞をV字状の底部を有する96ウェル ディープウェルプレートで、三次元ペレット培養して製造した球状軟骨組織（ペレット）の初期接種細胞数及び培養時間による特性を評価した結果である。

【図6a-f】ウサギの軟骨細胞をV字状の底部を有する96ウェル ディープウェルプレートで、1ウェル当たり 1.0×10^5 細胞で、10日間、三次元ペレット培養して製造した球状軟骨組織（ペレット）の特性を分析した結果である。

【図7a-f】ヒトの軟骨細胞をV字状の底部を有する96ウェル ディープウェルプレートで、1ウェル当たり 1.0×10^5 細胞で、10日間、三次元ペレット培養して製造した球状軟骨組織（ペレット）の特性を分析した結果である。

【図8a-b】96ウェル ディープウェルプレートの各ウェルに、同時に細胞を接種し、培地を交換し得る装置及び適用可能な自動化システムを示した写真である。

【図8c】持ち運び可能なペレット収集装置の模式図である。

【図9a-d】図7のヒトの軟骨細胞から製造したペレットをヌードマウスの皮下に移植し、4週、8週、16週及び20週後に観察した結果の写真である。

【図10a-c】図6のウサギの軟骨細胞から作ったペレットをウサギの膝軟骨損傷部に移植し、6週、12週、24週後に移植部位再生組織を観察した結果である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

以下、本発明を詳しく説明する。

本発明の球状軟骨細胞治療剤の製造方法は、下記工程を含むことを特徴とする。

a) 軟骨細胞及び／又は軟骨分化能を有する細胞をV字状の底部を有する96ウェル ディープウェルプレートに分注し、

b) 上記プレートを遠心分離し、

c) 上記プレートをインキュベーター内で三次元培養し、そして

d) 各ウェルからペレットを回収する工程。

【0022】

一側面で、本発明の球状軟骨細胞治療剤の製造方法は下記工程を含んでいてもよい。

a) 軟骨細胞及び／又は軟骨分化能を有する細胞をV字状の底部を有する96ウェル

10

20

30

40

50

ディープウェルプレートに分注し、

- b) 上記プレートを通心分離し、
- c) 上記プレートをインキュベーター内で三次元培養し、
- c - 1) 培地を交換し、そして
- d) 各ウェルからペレットを回収する工程。

【0023】

驚くべきことに、本発明者らは、商業的に利用可能なV字状の底部を有する96ウェルディープウェルプレートを利用する簡単な方法により、繰り返して再現可能であり、均一な良質の球状軟骨組織を容易に安定的に大量に製造できることを見出した。

【0024】

本発明の製造方法の第一の工程は、軟骨細胞及び/又は軟骨分化能を有する細胞をV字状の底部を有する96ウェルディープウェルプレートに分注することである。本発明の製造方法に使われるV字状の底部を有する96ウェルディープウェルプレートは、商業的に利用可能であるものであれば、いずれであってもよく、400 μ L以上の培地を添加するのに適するようにウェル容量が500 μ L以上であることが好ましい。下記実施例では、Axygen社製(Corning Life Science, USA)のV字状の底部を有するウェル容量が600 μ Lである96ウェルディープウェルプレートを使用した、これに限定されない。

【0025】

本発明の製造方法において、V字状の底部を有する96ウェルディープウェルプレートの各ウェルに、同時に細胞を接種し得る装置は、既に商業的に利用可能である。その一例に、図8a及び図8bに、96ウェルディープウェルプレートの各ウェルに、同時に細胞を接種し、培地を交換し得る装置及び適用可能な自動化システムが示されている。好ましくは、マルチ-チャンネルピペット、マルチ-ピペット、マイクロプレートウォッシャー及びマイクロプレートディスペンサーからなる群より選択される装置を用いて遂行することができる。

【0026】

本発明において、軟骨細胞又は軟骨分化能を有する細胞は、哺乳動物由来のものを用いる。例えば、ヒト、ウシ、ブタ、ウマ、イヌ、ヤギ、ウサギ、マウスなどを含むが、これに限定されない。好ましくは、ヒト、ウサギ又はヤギから単離した軟骨細胞及び/又は軟骨分化能を有する細胞を使用する。

【0027】

本発明において、用語「軟骨細胞(chondrocyte)」とは、既に軟骨細胞に分化方向が決定された細胞である軟骨前駆細胞(chondroblast)までも含む概念である。用語「軟骨分化能を有する細胞」とは、適切な培養条件で軟骨細胞に分化する能力を有する細胞を意味する。好ましくは、軟骨分化能を有する細胞は、間葉系幹細胞、胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞よりなる群から選ばれ、上記間葉系幹細胞は、脂肪由来、骨髄由来、臍帯由来、臍帯血由来、胎盤由来、滑膜由来、骨膜由来又は軟骨膜由来細胞であることを特徴とする。

【0028】

V字状の底部を有する96ウェルディープウェルプレートに分注される軟骨細胞又は軟骨分化能を有する細胞の量は、0.1 \times 10⁵細胞/ウェル~5.0 \times 10⁵細胞/ウェルの範囲であり、好ましくは、0.5 \times 10⁵細胞/ウェル~2.0 \times 10⁵細胞/ウェルの範囲である。このとき、培養培地の量は、300 μ L/ウェル~2,000 μ L/ウェルの範囲であり、好ましくは、400 μ L/ウェル~600 μ L/ウェルの範囲である。下記実施例では、細胞をそれぞれ0.5 \times 10⁵細胞/400 μ L/ウェル、1.0 \times 10⁵細胞/400 μ L/ウェル又は2.0 \times 10⁵細胞/400 μ L/ウェルで分注した後、ペレット培養し、28日間評価した。その結果、球状ペレットの形成において、いずれも満足できる結果が得られた。ただし、ペレットの大きさが接種された細胞数に正比例して連続的に増加するのではなく、特に2.0 \times 10⁵細胞/400 μ L/ウェルは

10

20

30

40

50

1.0 × 10⁵ 細胞 / 400 μL / ウェルと比較して、接種細胞数は2倍であるが、形成されたペレットの大きさは、ある時点（例えば、28日目）に達すれば、それほど差がないか、二次元的な面積も約1.1～1.3倍程度に止まった。

【0029】

本発明の製造方法の第二の工程は、細胞を分注した上記96ウェル ディープウェルプレート を遠心分離することである。遠心分離は、200～3000 rpmで5～15分間、好ましくは、500～2000 rpmで5分～10分間行う。遠心分離条件の具体的な例示には、500 rpmで15分間、1000 rpmで10分間、1000 rpmで5分間、1500 rpmで5分間、2000 rpmで5分間、遠心分離する方法などが挙げられるが、必ずこれらに限定されるものではない。最も好ましくは、1200 rpmで5分間、遠心分離すればよい。

10

【0030】

本発明の製造方法の第三の工程は、遠心分離した96ウェル ディープウェルプレートをインキュベーター内で三次元培養することである。インキュベーターでの三次元培養条件は、この技術分野における通常的に使用する条件をそのまま使用することができる。一態様で、37℃、5% CO₂ インキュベーターで細胞を三次元培養してもよい。培地の種類には限定がないが、無血清培地を使用するのが好ましい。一態様で、上記培地は軟骨分化用培地である。

【0031】

本発明において、三次元培養は、少なくとも3日以上行うことを特徴とする。好ましくは、3日～30日間、最も好ましくは、3日～20日間行ってもよい。3日未満培養する場合、十分な大きさのペレットが得られないだけでなく、ペレットが硬く凝集されず、解けてしまう特性を示す。また、30日を超えて培養する場合、死滅細胞及び肥大軟骨細胞が過多出現し、良質の軟骨組織を収得するのに望ましくない。

20

【0032】

一側面で、本発明の製造方法は、この工程で培地を交換する工程をさらに含むことを特徴とする。好ましくは、3～4日間隔で培地を交換しながら細胞を三次元培養することができる。このような培地交換には、上記の第一の工程で、96ウェル ディープウェルプレートの各ウェルに、同時に細胞を接種するのに使用した装置をそのまま使用することができる。これらの装置は、既に商業的に利用可能である。培地を交換し得る装置及び適用可能な自動化システムの例が、図8a及び図8bに示されている。好ましくは、マルチチャンネルピペット、マルチピペット、マイクロプレートウォッシャー及びマイクロプレートディスペンサーからなる群より選択される装置を用いて遂行することができる。

30

【0033】

培養が完了すれば、本発明の製造方法の最後の工程により、各ウェルからペレットを回収する。ペレットを回収する方法には、特に限定がなく、この技術分野における通常的に使用する真空吸入ポンプを用いた方法を使用することができる。例えば、図8cに示されるような持ち運び可能なペレット収集装置を使用することができる。

【0034】

下記実施例で確認されるように、本発明の製造方法により作られた構造体は、三次元培養3日目から硝子軟骨のように表面が滑らかで、白く半透明の特性を示した。

40

【0035】

大きさに関して、0.5 × 10⁵ 細胞 / ウェルの場合、3日目には直径が約0.5 mmであり、培養期間の増加に伴ってその大きさがゆっくり増加し、28日目には、直径が約1 mmであった。1.0 × 10⁵ 細胞 / ウェルの場合、3日目には直径約1 mmの球体を形成し、培養期間の増加に伴い、その大きさがゆっくり増加し、28日目には直径が約1.5 mmで、三次元培養全般に亘って、0.5 × 10⁵ 細胞 / ウェルと比較して、約2倍大きさの球体を形成した。しかし、2.0 × 10⁵ 細胞 / ウェルで作られた三次元構造体の場合、3日目には直径約1 mmの球体を形成し、培養期間の増加に伴い、その大きさがゆっくり増加し、28日目には直径が約1.5 mmであったが、1.0 × 10⁵ 細胞 / ウ

50

エルで作られた三次元構造体と大きさの差は観察されなかった。

【0036】

顕微鏡写真で測定した二次元的面積において、 0.5×10^5 細胞/ウェルでは、三次元培養3日目に、約 0.28 mm^2 であり、7日、14日、21日及び28日目には、それぞれ 0.71 、 0.92 、 1.25 、及び 1.12 mm^2 であり、培養期間の増加に伴い、ゆっくり増加したが、21日目と比較し、28日目には約10%面積が減少した。 1.0×10^5 細胞/ウェルでは、三次元培養3日目に、約 1.06 mm^2 で、7日、14日、21日及び28日目には、それぞれ 1.43 、 1.66 、 1.91 及び 1.74 mm^2 と培養期間の増加に伴い、ゆっくり増加したが、21日目と比較し、28日目には約10%面積が減少した。 1.0×10^5 細胞/ウェルでは、 0.5×10^5 細胞/ウェルで作られた三次元組織と比較し、培養14日目までは約2~3.8倍大きさの構造体を形成し、その以降には約1.5倍大きさであった。 2.0×10^5 細胞/ウェルでは、三次元培養3日、7日、14日、21日及び28日目に、それぞれ 1.25 、 1.68 、 2.01 、 2.13 及び 2.33 mm^2 と培養期間の増加に伴い、その大きさがゆっくり増加したが、 1.0×10^5 細胞/ウェルと比較し、接種細胞数は2倍であったが、構造体の大きさは $1.1 \sim 1.3$ 倍であった。

10

【0037】

また、ウサギの肋軟骨細胞を 1.0×10^5 細胞/ $400 \mu\text{L}$ /ウェルで分注し、10日間ペレット培養した結果、肉眼で、白く滑らかな表面の半透明な直径 $1.0 \sim 1.5 \text{ mm}$ の球状の三次元的組織が観察され、その平面大きさは、 $1.6 \text{ mm}^2 \pm 20\%$ 範囲と細胞供給対象に関係なく、96ウェル ディープウェルプレートの各ウェルで均一なペレット形成が観察された。

20

【0038】

また、ヒトの肋軟骨細胞を 1.0×10^5 細胞/ $400 \mu\text{L}$ /ウェルで分注し、10日間ペレット培養した結果、直径 $1.0 \sim 1.5 \text{ mm}$ の表面が滑らかで、白い、半透明の小さな球状の構造物を得ることができ、ロット当たり30個の球の大きさを測定した結果、均一な大きさを有していることが分かった。

【0039】

一方、本発明は、上記の製造方法で製造された支持体のない球状軟骨細胞治療剤に関するものである。本発明の球状軟骨細胞治療剤は、上記の製造方法で製造されたペレットを有効成分として含み、必要に応じて、当技術分野で公知の1種またはそれ以上の薬学的に許容される担体をさらに含んでもよい。本発明の球状軟骨細胞治療剤を損傷部位に挿入することによって、軟骨損傷部位の形状及び厚さに関係なく、欠損部位を修復することができ、大きな切開のない、小さな切開又は関節鏡を通して損傷部位に注入式で移植が可能である。従って、本発明の球状軟骨細胞治療剤は、軟骨損傷に注入式で簡単に移植され、損傷を修復する効果を示す。

30

【0040】

一態様で、本発明の球状軟骨細胞治療剤を軟骨損傷部位に注入する前、これらのペレット間の接着のために、フィブリン接着剤又は血液で遠心分離して得た自己多血小板血漿(PRP)などを使用することができる。

40

【0041】

また、本発明は、上記球状軟骨細胞治療剤；及び骨及び/又は骨移植材料を含む骨軟骨損傷治療用軟骨-骨二層構造物に関するものである。ヒドロキシアパタイトは、歯牙や骨等の生体内で石灰化された組織を構成する無機物質であり、リン酸カルシウム化合物の中で最も高い結晶性を有している。従って、分解される速度もそれだけ遅いが、生体内に存在する物質であるので、生体親和性が高く、いろいろな骨移植材料中でも、最も優れた骨再生効果を示すものと知られている。従って、好ましい骨移植材料は、HA-TCP(ヒドロキシアパタイト-トリカルシウムホスフェート)であるが、これに限定されるものではない。一態様で、複数個のペレットとフィブリン接着剤を混合して軟骨部分を作製し、その下に、HA-TCP(ヒドロキシアパタイト-トリカルシウムホスフェート)と骨髄

50

由来間葉系幹細胞 (BMSC) を混合して作製した骨部分を位置させ、骨と再生軟骨と間の連結を評価できるようにサンドウィッチ形態の軟骨 - 骨二層構造物を作製することができる。このような軟骨 - 骨二層構造物は、特に骨軟骨損傷の修復に適している。

【0042】

以下、実施例を通して本発明を更に詳しく説明する。しかし、下記実施例は本発明の理解を助けるためのものであり、本発明の範囲がこれらにより限定されるものではない。

【実施例】

【0043】

実施例 1

軟骨細胞の単離及び増殖

肋軟骨組織を抗生剤が含まれたリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 ~ 5 回洗浄し、血液と汚染物を除去した。軟骨を 1 ~ 2 mm³ 程度の大きさに細かく切断した後、0.5% プロナーゼ (pronase) 及び 0.2% タイプ I コラゲナーゼ処理で細胞外基質を消化し、細胞を単離した。単離した細胞は、2 ~ 4 × 10⁴ 個 / cm² の密度で培養皿に接種し、細胞増殖用培地 (1 ng / mL の FGF-2 が含まれた間葉系幹細胞培養培地 (MSCGM)) を添加し、37、5% CO₂ インキュベーターで細胞が過密になるまで培養した。トリプシン - EDTA 溶液で、培養皿で脱着させた細胞を 1 ~ 2 × 10⁴ 個 / cm² の密度で培養皿に接種し、6 ~ 8 継代まで継代培養した。

【0044】

様々な種類の 96 ウェル プレート又は 96 ウェル ディープウェルプレートで軟骨細胞の三次元ペレット培養

増殖が完了された 6 ~ 8 継代目の細胞は、軟骨分化用培地 (DMEM、50 µg / mL ゲンタマイシン、10 ng / mL TGF-β3、1% ITS+3、100 nM デキサメタゾン、50 µg / mL アスコルビン酸、40 µg / mL L-プロリン) に懸濁し、(1) V 字状の底部を有する 96 ウェル プレート (300 µL ウェル容量) に、ウェル当たり 1.0 × 10⁵ 細胞 / 200 µL になるように分注し、(2) 平坦な底部を有する 96 ウェル プレート (300 µL ウェル容量) に、ウェル当たり 1.0 × 10⁵ 細胞 / 200 µL になるように分注し、(3) 凹状の底部を有する 96 ウェル ディープウェルプレート (600 µL ウェル容量) に、ウェル当たり 1.0 × 10⁵ 細胞 / 400 µL になるように分注し、(4) V 字状の底部を有する 96 ウェル ディープウェルプレート (600 µL ウェル容量) に、ウェル当たり 1.0 × 10⁵ 細胞 / 400 µL になるように分注した後、プレートを 1200 rpm で 5 分間、遠心分離し、その後、37、5% CO₂ インキュベーター内で 3 ~ 4 日間隔で培地を交換しながら 28 日間三次元培養した。

【0045】

結果

V 字状の底部を有する 96 ウェル プレート (300 µL ウェル容量) では、球体形成はうまくいったが、後述する実施例 2 の (4) 組織学的特性及び免疫染色のサフラン O (Safranin O) GAG 染色方法によって評価した結果、細胞形状と軟骨性基質発現可否に基づいて軟骨分化が進んでいないことを確認することができた (図 4 a)。平坦な底部を有する 96 ウェル プレート (300 µL ウェル容量) を用いた三次元培養では、安定的に正常な形状の球体が形成されなかった (図 4 b)。96 ウェル ディープウェルプレート (600 µL ウェル容量) を用いた三次元培養でウェルの底形状が凹状の場合には、遠心分離過程にもかかわらず安定的に正常な形状の球体が形成されなかったが (図 4 c)、ウェルの底形状が V 字状の場合には、安定的に均一な大きさを有する球体がウェル当たり 1 つずつ観察され、三次元培養 3 日目にはある程度硬い構造を形成した (図 4 d)。

【0046】

実施例 2

球状三次元軟骨組織の製造

細胞増殖用培地で継代 6 ~ 8 代目まで培養したウサギの軟骨細胞を V 字状の底部を有す

10

20

30

40

50

る96ウェルディープウェルプレートに 0.5×10^5 細胞/400 μ L/ウェル、 1.0×10^5 細胞/400 μ L/ウェル又は 2.0×10^5 細胞/400 μ L/ウェルでペレット培養し、28日間評価した。

【0047】

球状三次元軟骨組織の特性評価方法

(1) 外観及び大きさ

三次元培養過程中、それぞれのウェルでペレットを収集し、その特性を評価した。まず、肉眼観察を通して外観を評価し、スライドガラス上にペレットをマウントし、40倍の倍率で顕微鏡に取り付けられたデジタルカメラで写真を撮った後、その面積を測定した。

【0048】

(2) DNA量

ペレット中のDNA量は、ペレットに125 μ g/mLのパパインを添加して均質化(homogenization)し、65 $^{\circ}$ Cで、一晚処理後、試料を用意して、DNA Quantitationキット(Bio-Rad Laboratories)のHoechst 33258 dyeと混合し、吸光度を測定した。仔牛胸腺(Calf thymus)DNAをスタンダード(20ng \sim 10 μ g)にして定量的に計算した。

【0049】

(3) グリコサミノグリカン(GAG)量

ペレット中のGAG量を測定するために、ペレットをパパイン溶液(125 μ g/mL)で、65 $^{\circ}$ Cで、一晚処理して、GAG成分を抽出し、遠心分離後上清を採取し、試験試料を用意した。ここに、Blyscan染料(dye reagent)(Biocolor社製、英国)を添加し、硫酸(sulfated)GAG成分と染料が結合するよう反応させた後、遠心分離して、上清を除去した。残ったGAG-染料の塊を染料分離試薬(dye dissociation reagent)で溶かした後、656nmで吸光度を測定した。このように測定した吸光度はス、タンダード(コンドロイチン硫酸、1.0 \sim 5.0 μ g)を基準に定量化した。

【0050】

(4) 組織学的特性及び免疫染色

組織学的評価のために、ペレットをホルマリンで固定し、脱水、パラフィン包埋過程を経て、ミクロトームで4 \sim 6 μ m厚さに薄切し、ヘマトキシリンで核染色実施後、サフラニンOを染色薬でGAGを染色した。対照染色としては、ファーストグリーン(Fast green)を用いてGAG発現及び細胞の形態学的評価を実施した。

【0051】

三次元培養過程中的軟骨の特性を評価するために、ペレット超薄切片(ultrathin-section)を0.2%トリトンX-100で透過化し、ヒアルロニダーゼ(hyaluronidase)で処理した後、抗-タイプIコラーゲン抗体、抗-タイプIIコラーゲン抗体又は抗-タイプXコラーゲン抗体を適用し、その後2次抗体及びストレプトアビジン-ペルオキシダーゼを処理した。DABで発色を誘導し、核染色のためにファーストレッド(fast red)を使用した。

【0052】

蛍光染色には、ペレットを丸ごと又はペレット超薄切片を0.2%トリトンX-100で透過化し、20%正常ヤギ血清を処理し、非特異的反応を遮断し、抗-アグリカン抗体又は抗-タイプIIコラーゲン抗体を1次抗体として使用し、FITC標識2次抗体を使用した後、超薄切片の場合、DAPIで核染色し、蛍光顕微鏡(Olympus Optical Co.; 日本)下で観察した。

【0053】

(5) アポトーシス(apoptosis)

三次元培養過程で、ペレット中の細胞の死滅を評価するために、4 μ m厚さの切片でTUNELアッセイ(Roche社製、ドイツ)を実施した。DAPIで核を染色し、蛍光顕微鏡下で死滅細胞の存在を評価した。

【0054】

10

20

30

40

50

(6) コラーゲン量

ペレット中のコラーゲン量は、ペレットをペプシン溶液で処理して、コラーゲン成分を抽出した。この試料溶液にS i r c o l K i t (Biocolor社製)の染料溶液を添加し、室温で振とうして反応し、遠心分離して、色素と結合したコラーゲンを沈殿させた。上清を完全に除去し、沈澱物を1 N N a O H溶液に溶解し、540 nmでの吸光度を測定した。標準曲線(0 ~ 50 μg)を得た後、上記の方法で測定した吸光度を基準に定量化した。

【0055】

ペレット中に新しく合成されたコラーゲンプロ-C-ペプチドの定量的測定のためにプロ-CコラーゲンタイプI C-ペプチド(PIP)EIAキット(TakaraBio, Inc., 日本)を使用した。ペレットをペプシン溶液で処理して、コラーゲン成分を抽出した。残りの工程は製造者の指示に従って行った。測定されたペプチド量を0 ~ 640 ng PIP/mL範囲で標準曲線を基準に定量化した。

【0056】

(7) 遺伝学的特性

細胞の遺伝学的特性を評価するために、ペレットからRNAを抽出し、逆転写し、cDNAを合成した。合成されたcDNAに対して下記表1に示された遺伝子のプライマーを使用してPCRを行った。PCR産物を臭化エチジウム(EtBr)が含まれたアガロースゲルで電気泳動した後、UV下で各増幅産物の大きさに該当するバンドを確認し、評価した。

【0057】

【表1】

遺伝子		産物大きさ(bp)	プライマー(正方向及び逆方向)
ヒト	タイプIIコラーゲン (NM_001844)	257	GAC AAT CTG GCT CCC AAC ACA GTC TTG CCC CAC TTA C
	タイプIXコラーゲン (NM_001851)	175	CAG GAA GAG GTC CCA AC GCT GGC TCA CAG AAA CC
	アグリカン (NM_013227)	157	GTC TCA CTG CCC AAC TAC GGA ACA CGA TGC CTT TCA C
	SOX 9 (NM_000346)	118	GAG CAG ACG CAC ATC TC CCT GGG ATT GCC CCG A
	タイプIコラーゲン (NM_000088)	251	GAG AGC ATG ACC GAT GG GTG ACG CTG TAG GTG AA
	タイプXコラーゲン (NM_000493)	139	CCA GCA CGC AGA ATC C GTG TTG GGT AGT GGG C
	GAPDH (NM_002046)	123	TGG TAT CGT GGA AGG ACT CA GCA GGG ATG ATG TTC TGG A
	ウサギ	タイプIIコラーゲン (S83370)	193
GAPDH (L23961)		202	AGG TCA TCC ACG ACC ACT TC GTG AGT TTC CCG TTC AGC TC

【0058】

結果

(1) 外観及び大きさ

作製された構造体は、三次元培養3日目から硝子軟骨のように表面が滑らかで、白い、半透明の性状を示した。その大きさは 0.5×10^5 細胞/ウェルの場合、3日目には直

径が約 0.5 mm であり、培養期間の増加に伴いその大きさがゆっくり増加し、28 日目には直径が約 1 mm であった。1.0 × 10⁵ 細胞/ウェルの場合、3 日目には直径約 1 mm の球体を形成しており、培養期間の増加に伴いその大きさがゆっくり増加し、28 日目には直径が約 1.5 mm と三次元培養全般にかけて、0.5 × 10⁵ 細胞/ウェルと比較して、約 2 倍大きさの球体を形成した。しかし、2.0 × 10⁵ 細胞/ウェルで作製された三次元構造体の場合、3 日目には直径約 1 mm の球体を形成しており、培養期間の増加に伴いその大きさがゆっくり増加し、28 日目には直径が約 1.5 mm であったが、1.0 × 10⁵ 細胞/ウェルで作製された三次元構造体と大きさの差は観察されなかった(図 5 a 及び 5 b)。

【0059】

28 日間の三次元培養期間の軟骨細胞から形成した支持体のない三次元構造体の顕微鏡上の写真で測定した二次元的面積は、0.5 × 10⁵ 細胞/ウェルでは三次元培養3 日目に、約 0.28 mm² であり、7 日、14 日、21 日及び 28 日目には、それぞれ 0.71、0.92、1.25、及び 1.12 mm² と培養期間の増加に伴いゆっくり増加したが、21 日目と比較して、28 日目には約 10% 面積が減少した。1.0 × 10⁵ 細胞/ウェルでは三次元培養3 日目に、約 1.06 mm² であり、7 日、14 日、21 日及び 28 日目には、それぞれ 1.43、1.66、1.91 及び 1.74 mm² と培養期間の増加に伴いゆっくり増加したが、21 日目と比較して 28 日目には、約 10% 面積が減少した。1.0 × 10⁵ 細胞/ウェルでは 0.5 × 10⁵ 細胞/ウェルで作製された三次元組織と比較し、培養 14 日目までは約 2 ~ 3.8 倍大きさの構造体を形成し、その以降には約 1.5 倍大きさであった。2.0 × 10⁵ 細胞/ウェルでは三次元培養 3 日、7 日、14 日、21 日及び 28 日目に、それぞれ 1.25、1.68、2.01、2.13 及び 2.33 mm² と培養期間の増加に伴いその大きさがゆっくりしたが、1.0 × 10⁵ 細胞/ウェルと比較して、接種細胞数は 2 倍であったが、構造体の大きさは 1.1 ~ 1.3 倍であった(図 5 c)。

【0060】

(2) DNA 量

三次元培養期間中のペレット中の細胞数を DNA 含量で評価した結果、培養期間中、0.5 × 10⁵ 細胞/ウェルでは約 80 ng、1.0 × 10⁵ 細胞/ウェルでは約 170 ng、2.0 × 10⁵ 細胞/ウェルでは約 200 ng と一定であった。接種細胞数は 2 倍であったが、DNA 含量はそれぞれ 2 倍及び 1.2 倍であった(図 5 d)。

【0061】

(3) GAG 量

硝子軟骨特異的細胞外基質である GAG 成分は、培養期間の増加に伴い増加した。1.0 × 10⁵ 細胞/ウェルでは 0.5 × 10⁵ 細胞/ウェルと比較して、約 2 倍の量であったが、2.0 × 10⁵ 細胞/ウェルでは 1.0 × 10⁵ 細胞/ウェルと同様の GAG 含量を示した(図 5 e)。

【0062】

(4) 組織学的特性

三次元培養中の硝子軟骨性組織の形成の有無を、サフラニン O 染色で GAG の発現を評価した結果、V 字状の底部のウェルで 0.5 × 10⁵ 細胞/ウェル及び 1.0 × 10⁵ 細胞/ウェル細胞が形成された三次元構造体は、培養 3 日目から構造体全般に亘って強いサフラニン O 染色が観察された。2.0 × 10⁵ 細胞/ウェルでは 3 日及び 7 日目にサフラニン O 染色に陰性の部分が構造体中心部から観察されており、その後には構造体全般に亘って強いサフラニン O 染色が観察された。三次元培養 3 日目に、ペレットで細胞はぎっしり密集され、丸い形状であったが、小腔 (lacunae) の形態は観察されなかった。7 日目に、1.0 × 10⁵ 細胞/ウェルのペレットで細胞は明確な小腔内に存在した。14 日目以降には全ての細胞数のペレットで小腔に包まれている細胞が観察され、経時間によって成熟した硝子軟骨の形態を示した(図 5 f)。

【0063】

(5) アポトーシス

三次元培養中の細胞の死滅有無をTUNELアッセイで評価した結果、 2.0×10^5 細胞/ウェルでは3日目から培養終了時までペレットの中心部及び外郭でアポトーシス細胞が多数観察された。 0.5×10^5 細胞/ウェル及び 1.0×10^5 細胞/ウェルでは28日目にのみアポトーシス細胞が観察された(図5g)。

【0064】

(6) 免疫染色

1.0×10^5 細胞/ウェルのペレットで三次元培養中、タイプIコラーゲン、タイプIIコラーゲン及びタイプXコラーゲンの発現を免疫染色で評価した結果、タイプIコラーゲンは培養28日目に表面の外郭でのみ発現しており、タイプIIコラーゲンは28日目に外郭を除いたペレット全体で強く染色された。肥大軟骨細胞(hypertrophic chondrocyte)のマーカであるタイプXコラーゲンは14日目に発現細胞が観察され、経時的に発現割合が増加した(図5h)。

【0065】

実施例3

細胞増殖用培地で継代6~8代目まで培養したウサギの肋軟骨細胞を分化用培地に懸濁し、V字状の底部を有する96ウェルディープウェルプレートにウェル当たり 1.0×10^5 個/400 μ Lずつ分注した。以降、プレートを1200rpmで、5分間遠心分離した後、ペレットを37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベーターで3~4日間隔で培地を交換しながら10日間培養して、関節軟骨損傷に移植するための支持体のない球状軟骨組織を製造した。培養が終わった球状軟骨組織を、持ち運び可能なペレット収集装置を利用して収集し(図8c)、実施例2に記載された方法によりその特性を評価した。

【0066】

その結果、肉眼的に白くて、滑らかな表面の半透明な直径1.0~1.5mmの球状の三次元的組織が観察された(図6a)。その平面の大きさは $1.6 \text{ mm}^2 \pm 20\%$ 範囲と細胞供給対象に関係なく、96ウェルディープウェルプレートそれぞれのウェルで均一なペレット形成が観察された(図6b)。細胞は、小腔内に存在し、ペレット全体的に強いGAG発現が観察された(図6c)。免疫蛍光染色結果、アグリカンはペレット全体的に強く染色されたが、タイプIIコラーゲンはペレット全般に亘って弱く染色され、タイプXコラーゲンの発現はほとんど観察されなかった(図6d)。RT-PCRでタイプIIコラーゲンに対する遺伝子発現を評価した結果、3ロット全てで発現することが観察された(図6e)。ペレット中の細胞生存率は95%以上であったし、GAG含量は15~30 μ g/ペレットであった(図6f)。

【0067】

実施例4

細胞増殖用培地で継代6~8代目まで培養したヒトの肋軟骨細胞を分化用培地に懸濁し、V字状の底部を有する96ウェルディープウェルプレートにウェル当たり 1.0×10^5 個/400 μ Lずつ分注した。以降、プレートを1200rpmで、5分間遠心分離した後、ペレットを37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベーターで3~4日間隔で培地を交換しながら10日間培養して、関節軟骨損傷に移植するための支持体のない球状軟骨組織を製造した。培養が終わった球状軟骨組織を、持ち運び可能なペレット収集装置を利用して収集し(図8c)、実施例2に記載された方法によりその特性を評価した。

【0068】

その結果、直径1.0~1.5mmの表面が滑らかで、白い、半透明の小さな球状の構造物を得ることができた。ロット当たり30個の球の大きさを測定した結果、均一な大きさを有していることが分かった(図7a)。組織学的には、細胞は、GAGを強く発現する基質に包まれており、細胞は高い密度で存在し、未成熟軟骨細胞の形状を示した(図7b)。三次元培養を追加的に17日まで進めた結果、GAG及びコラーゲン含量は継続増加したが、プロ-コラーゲンタイプI C-ペプチド(P1P)の量は10日目以降減少した(図7c)。蛍光染色で硝子軟骨細胞特異マーカであるタイプIIコラーゲンとアグ

10

20

30

40

50

リカンの発現を評価した結果、弱い発現であったが、ペレット全体に亘ってタイプIIコラーゲンの発現が観察され、アグリカンはペレット全体的に強く発現された(図7d)。ペレットの薄切片(thin-section)で硝子軟骨細胞特異マーカであるタイプIIコラーゲンとアグリカン、未成熟軟骨細胞のマーカであるタイプIコラーゲン、肥大軟骨細胞の特異マーカであるタイプXコラーゲンの発現を評価した結果、それぞれ約54%、99%、81%及び0%の発現割合を示した(図7e)。RT-PCRで遺伝子発現を評価した結果、軟骨細胞特異マーカであるタイプIIコラーゲン、タイプIXコラーゲン及びアグリカンの強い発現が観察され、軟骨細胞転写因子であるsox-9の発現も観察された。さらに、未成熟軟骨細胞のマーカであるタイプIコラーゲンの発現と肥大軟骨細胞の特異マーカであるタイプXコラーゲンの弱い発現度観察された(図7f)。

10

【0069】

実施例5

球状軟骨組織の動物移植評価：ヌードマウス皮下移植

ヒト肋軟骨細胞を継代6~8代目まで増殖後、V字状の底部を有する96ウェルディープウェルプレートにウェル当たり細胞 1.0×10^5 個/400 μ Lずつ分注した後、遠心分離し、軟骨分化用培地で10日間ペレット培養した。ペレット40個とペレット固定のためのフィブリン接着剤(Greenplast(登録商標)、緑十字製)を混合して、軟骨部分を作製した。その下にHA-TCP(ヒドロキシアパタイト-トリカルシウムホスフェート;PURUGO社製、韓国)と骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC)を混合して作製した骨部分を位置させ、骨と再生軟骨間の連結を評価できるようにサンドウィッチ形態の軟骨-骨二層構造物を製作した(図9a)。

20

【0070】

動物の麻酔は、キシラジン及びケタミンで誘導し、手術部位はアルコールとポビドン-ヨードで用意した。用意されたヌードマウス肩甲骨下の皮膚中央部を約1cm切開し、左、右側に鈍性分離して、移植空間を作った後、左右の皮下に二層構造物をそれぞれ移植した。移植後、4週、8週、16週及び20週目に動物を安楽死させ、背中及び肩部位皮膚を切開した後、移植物を肉眼で観察した。また、鉗子で骨部分と軟骨部分を引っ張り、これらの連結程度を評価した。移植物を10%中性緩衝ホルマリン溶液に固定し、脱灰後、パラフィンに包埋して6 μ mの厚さで切開した。スライドに付着した切片は、ヘマトキシリン/エオシン染色を行い、組織学的な評価及びタイプIIコラーゲン及びアグリカンに対する免疫染色を行った。また、組織の終末分化を評価するために、肥大軟骨細胞マーカであるタイプXコラーゲンに対する免疫染色を実施した。

30

【0071】

その結果、移植構造物は、二つの層が強く連結されており、軟骨層は肉眼的に硝子軟骨のように表面が滑らかで白い、半透明であった。血管の浸透は確認されなかった。反面、骨層には血管の流入が観察された(図9b)。組織学的にペレットは互いによく連結され、骨基質との連結も観察された(図9c)。硝子軟骨の特異マーカであるタイプIIコラーゲンは、移植後4週から20週まで強く発現され、アグリカン発現は減少した後、再び増加する傾向を示した。肥大軟骨細胞のマーカであるタイプXコラーゲンの発現は移植後、20週まで観察されなかった(図9d)。

40

【0072】

実施例6

球状軟骨組織の動物移植評価：ウサギ膝軟骨損傷部移植

ウサギ肋軟骨細胞を継代6~8代目まで増殖後、V字状の底部を有する96ウェルディープウェルプレートにウェル当たり細胞 1.0×10^5 個/400 μ Lずつ分注した後、遠心分離して、軟骨分化用培地で10日間ペレット培養した。ウサギ膝の膝蓋骨内側を切開して膝蓋窩を露出し、直径5mm、深さ約2mmの軟骨損傷を、歯科用マイクロドリルを使用して作製した。損傷部を冷たい生理食塩水で強く洗浄し、落ちた断片を除去した後、ペレット18~20個をフィブリンノーゲンと希釈したトロンピン(約10IU)と均一に混合した後、直ちに膝損傷溝部位に詰め込んだ。その上を高濃度のトロンピンを含む

50

フィブリン接着剤で塗布した。対照欠陥には、フィブリン接着剤 (Greenplast (登録商標)、緑十字社製、大韓民国) のみを使用した。十分に固化した後、膝蓋骨を再び元位置させ、関節カプセルと皮膚を縫合した。移植6週、12週及び24週後、手術した膝を切開し、関節嚢と膝軟骨を肉眼で観察した後、大腿骨の遠位骨端を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液に固定した後、脱灰後、パラフィンに包埋して6µmの厚さに切断し、サフラニンO染色及びタイプIコラーゲン又はタイプIIコラーゲンに対する免疫染色を実施した。その結果、損傷部位を硝子軟骨性軟骨層で修復されるのを肉眼、組織学的及び免疫化学的に確認することができた(図10)。

【0073】

実施例7

球状軟骨組織の動物移植評価：ヤギ膝軟骨損傷部移植

ヤギ肋軟骨細胞を継代6~8代目まで増殖後、V字状の底部を有する96ウェルディープウェルプレートにウェル当たり細胞 1.0×10^5 個/400µLずつ分注した後、遠心分離して、軟骨分化用培地で10日間ペレット培養した。ヤギ膝の膝蓋骨内側を切開し、膝蓋窩(patellar groove)と大腿骨の内側顆(medial femoral condyle)は露出させ、それぞれ直径8mm、深さ約2mmの軟骨損傷を、歯科用マイクロドリルを使用して作製した。損傷部を冷たい生理食塩水で強く洗浄し、落ちた断片を除去した後、ペレット約48個をフィブリン接着剤(トロンビン約10IU)又は血液で遠心分離して得た自己多血小板血漿(PRP)とトロンビン(約10IU)で損傷部に固定した。そして、その表面を高濃度のトロンビンを含むフィブリン接着剤又は自己PRPを塗布した。十分に固化後、膝蓋骨を再び元置させ、関節カプセルと皮膚を縫合した。細胞移植後、欠損部位での細胞固定を確認するために、手術後2週目、ヤギのヤギ両側膝に対してMRI(Magnus 2.1 for Magnum 3.0T MRI system; Medinus, Korea)評価を実施した。移植直後と移植12週及び24週後、再生組織の物理学的特性を評価するために、万能物性計測機JTM(H5K-T, H.T.E., Salfords, UK)を利用して押し込み試験(indentation test)を実施した。再生組織を含む膝部位を鋸で切断した後、再生組織の中心部を5Nロード細胞(load cell)と直径3mmの圧子プローブ(indenter probe)を使用して、0.1S-1速度で400µm深さまで押し込みながら剛性度(stiffness)及び弾性係数(elastic modulus)を測定した。その結果を下記表2に示した。

【0074】

【表2】

物理的特性		強度(kN/M)	弾性(kPa)
正常軟骨		5.93 ± 1.05	838.68 ± 148.49
ペレット移植	移植直後	0.66 ± 0.05	110.25 ± 8.17
	12週	2.52 ± 0.72	356.32 ± 101.81
	24週	4.93 ± 1.15	697.37 ± 162.22
フィブリン接着剤単独	24週	1.997	282.60

【0075】

上記表2に示されるように、移植直後にも正常軟骨の約1/8程度の強度を示し、移植後12週及び24週目に再生組織の剛性度及び弾性係数はそれぞれ正常軟骨の約1/2及び同じ水準であった。

【0076】

参考文献

Adkisson HD, Gillis MP, Davis EC, Maloney W, Hruska KA. In vitro generation of scaffold independent neocartilage. Clin Orthop 2001; 391S:S280 - 94.

Anderer U, Libera J. In vitro engineering of human autologous cartilage. J Bone Miner Res 2002; 17: 1420 - 29.

10

20

30

40

50

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994 Oct 6 ; 331(14):889 - 95.

Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology*. 2003 ; 22:81 - 91.

Choi YY, Chung BG, Lee DH, Khademhosseini A, Kim JH, Lee SH. Controlled size embryoid body formation in concave microwell arrays. *Biomaterials* 2010 ; 31:4296 - 303.

Croucher LJ, Crawford A, Hatton PV, Russell RG, Buttle DJ. Extracellular ATP and UTP stimulate cartilage proteoglycan and collagen accumulation in bovine articular chondrocyte pellet cultures. *Biochim Biophys Acta* 2000 ; 1502:297 - 306.

Fukuda J, Nakazawa K. Orderly arrangement of hepatocyte spheroids on a microfabricated chip. *Tissue Eng* 2005 ; 11:1254 - 62.

Graff RD, Lazarowski ER, Banes AJ, Lee GM. ATP release by mechanically loaded porcine chondrons in pellet culture. *Arthritis Rheum* 2000 ; 43:1571 - 9.

Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R, Manji R. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biomed Mater Res* 1997 ; 34:211 - 20.

Grogan SP, Rieser B, Winkelmann HFP, Berardi S, Mainil - Varlet P. A static, closed and scaffold - free bioreactor system that permits chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2003 ; 11:403 - 11.

Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000 ; 21:2529 - 43.

Imabayashi H, Mori T, Gojo S, Kiyono T, Sugiyama T, Irie R, Isogai T, Hata J, Toyama Y, Umezawa A. Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large - scale cDNA analysis. *Exp Cell Res* 2003 ; 288(1):35 - 50.

Jain RK, Au P, Tam J, Duda DG, Fukumura D. Engineering vascularized tissue. *Nat Biotechnol* 2005 ; 23:821 - 3.

Landry J, Freyer JP. Regulatory mechanisms in spheroidal aggregates of normal and cancerous cells. *Recent Results Cancer Res* 1984 ; 95: 50 - 66.

Landry J, Bernier D, Ouellet C, Goyette R, Marceau N. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *J Cell Biol* 1985 ; 101: 914 - 23.

Larson CM, Kelley SS, Blackwood AD, Banes AJ, Lee GM. Retention of the native chondrocyte pericellular matrix results in significantly improved matrix production. *Matrix Biol* 2000 ; 21:349 - 59.

Marlovits S, Tichy B, Truppe M, Gruber D, Vecsei V. Chondrogenesis of aged human articular cartilage in a scaffold - free bioreactor. *Tissue Eng* 2003 ; 9:1215 - 26.

Moscona A. Rotation - mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. A quantifiable approach to cell interactions in vitro. *Exp Cell Res* 1961 ; 22: 455 - 475.

Naumann A, Dennis JE, Aigner J, Coticchia J, Arnold J, Berghaus A, Kastenbauer ER, Caplan AL. Tissue engineering of autologous cartilage grafts in three - dimensional in vitro macroaggregate culture system. *Tissue Eng* 2004 ; 10(11 - 12):1695 - 706.

Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Hsu HP, Minas T, Shortkroff S, Sledge CB, Yanas IV, Spector M. Chondrocyte seeded collagen matrices implanted in a chondral

10

20

30

40

50

defect in a canine model. *Biomaterials* 1998 ; 19:2313 - 28.

Ochi M, Uchio Y, Tobita M, Kuriwaka M. Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artif Organs* 2001 ; 25:172 - 9.

Park K, Huang J, Azar F, Jin RL, Min BH, Han DK, Hasty K. Scaffold - free, engineered porcine cartilage construct for cartilage defect repair - in vitro and in vivo study. *Artif Organs* 2006 ; 30(8): 586 - 96.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 ; 284(5411):143 - 7.

Reginato AM, Iozzo RV, Jimenez SA. Formation of nodular structures resembling mature articular cartilage in long - term primary cultures of human fetal epiphyseal chondrocytes on a hydrogel substrate. *Arthritis Rheum* 1994 ; 7:1338 - 49.

Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2008 ; 26:434.

Sims CD, Butler PE, Cao YL, Casanova R, Randolph MA, Black A, Vacanti CA, Yaremchuk MJ. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. *Plast Reconstr Surg* 1998 ; 101:1580 - 5.

Sittinger M, Reitzel D, Dauner M, et al. Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 1996 ; 33:57 - 63.

Stewart MC, Saunders KM, Burton - Wurster N, Macleod JN. Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro: the effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation. *J Bone Miner Res* 2000 Jan ; 15(1):166 - 74.

Tavella S, Bellese G, Castagnola P, Martin I, Piccini D, Doliana R, Colombatti A, Cancedda R, Tacchetti C. Regulated expression of fibronectin, laminin and related integrin receptors during the early chondrocyte differentiation. *J Cell Sci* 1997 ; 110:2261 - 70.

Wolf F, Candrian D, Wendts D, Farhadi J, Heberer M, Martin I, Barbero A. Cartilage tissue engineering using pre - aggregated human articular chondrocytes. *European Cells and Materials* 2008 ; 16:92 - 99.

Wong SF, No da Y, Choi YY, Kim DS, Chung BG, Lee SH. Concave microwell based size - controllable hepatosphere as a three - dimensional liver tissue model. *Biomaterials*. 2011 Nov ; 32(32):8087 - 96.

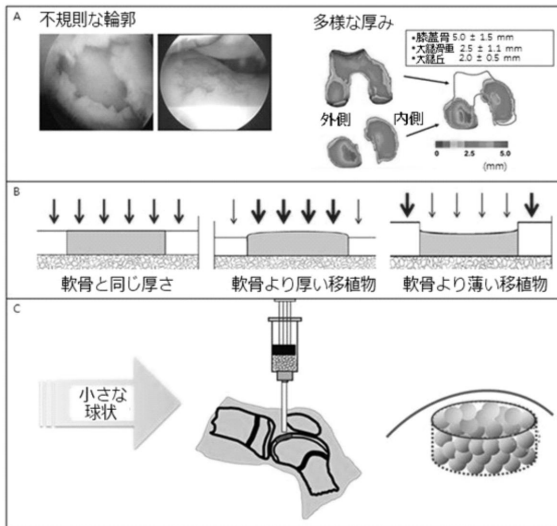
Zhang Z, McCaffery M, Spencer RG, Francomano CA. Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *J Anat* 2004 ; 205:229 - 37.

10

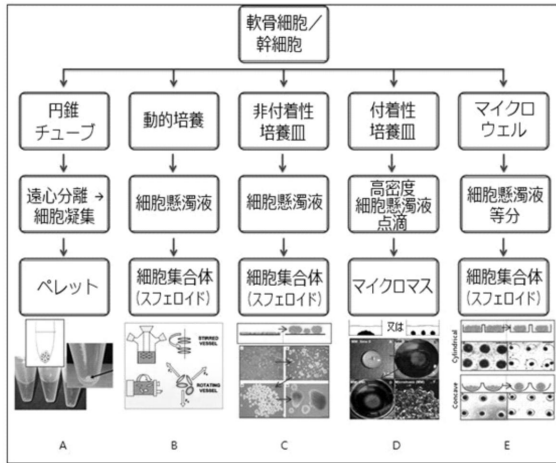
20

30

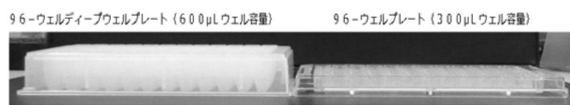
【図1】



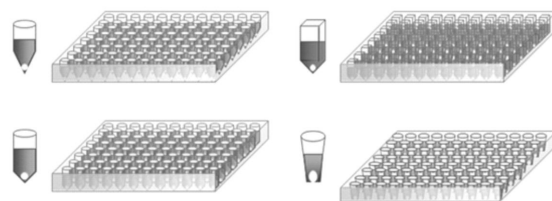
【図2】



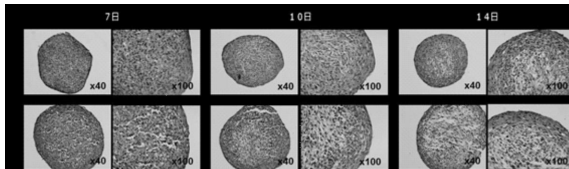
【図3a】



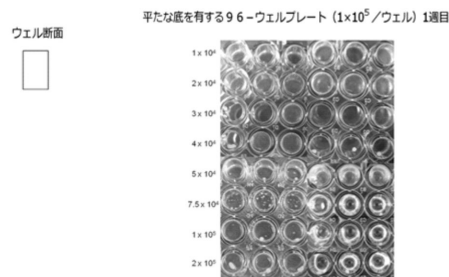
【図3b】



【図4a】



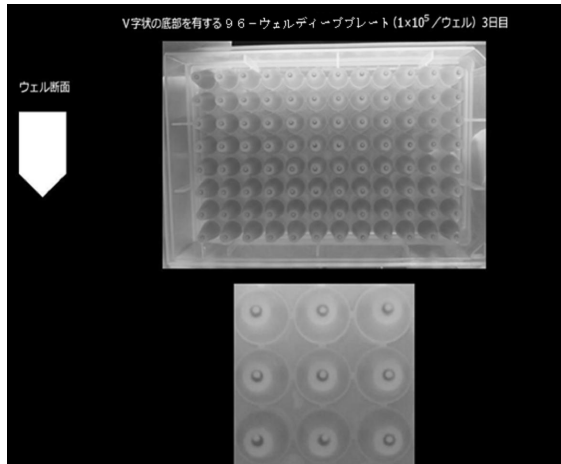
【図4b】



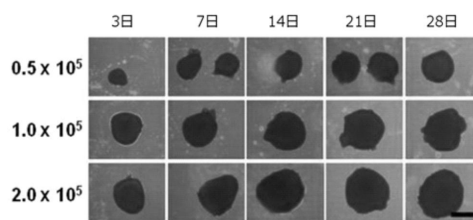
【図4c】



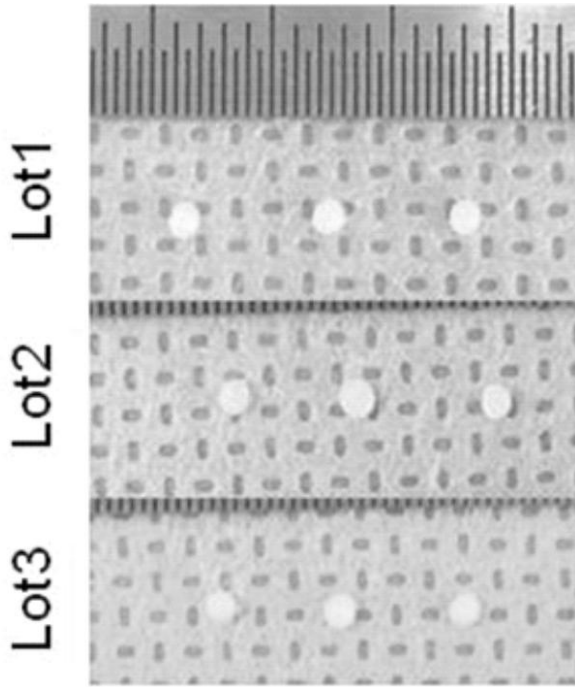
【図4d】



【図5a】



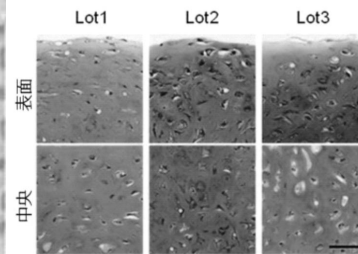
【図 6 a】



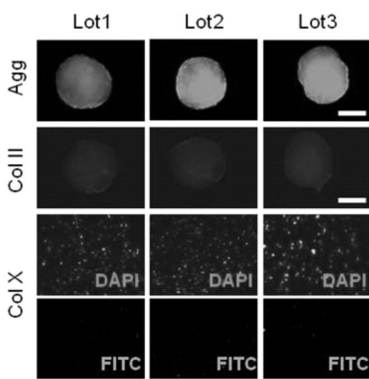
【図 6 b】



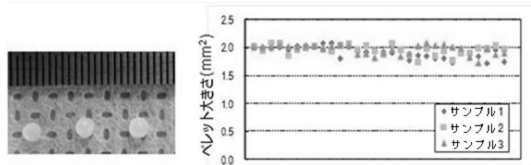
【図 6 c】



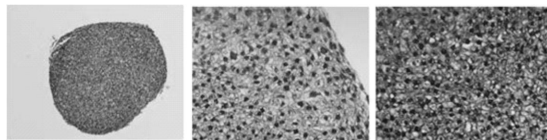
【図 6 d】



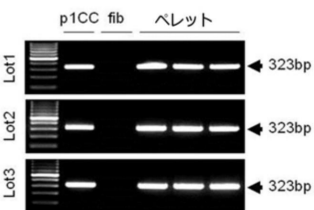
【図 7 a】



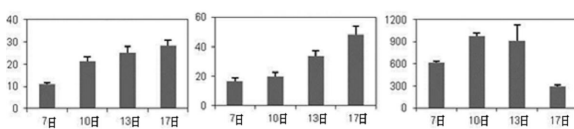
【図 7 b】



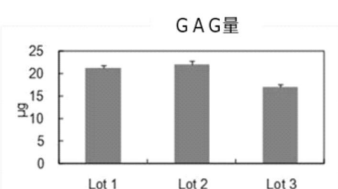
【図 6 e】



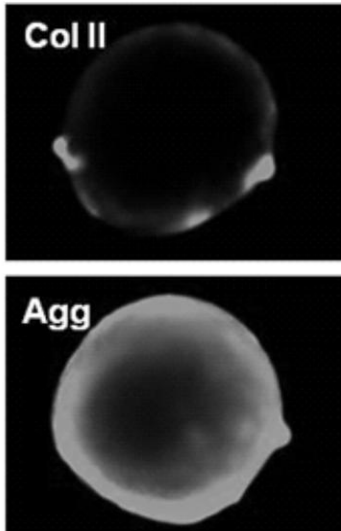
【図 7 c】



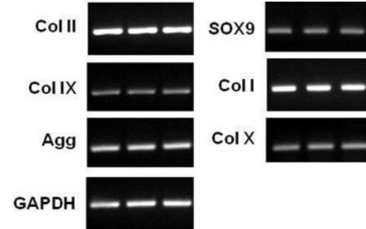
【図 6 f】



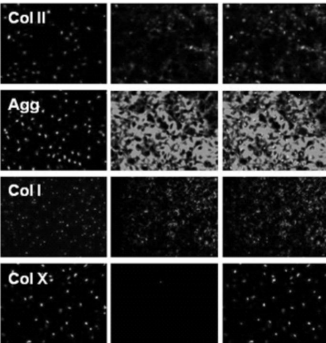
【 図 7 d 】



【 図 7 f 】



【 図 7 e 】



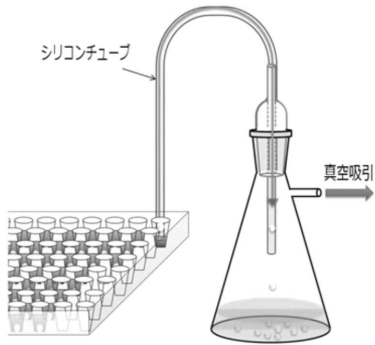
【 図 8 a 】



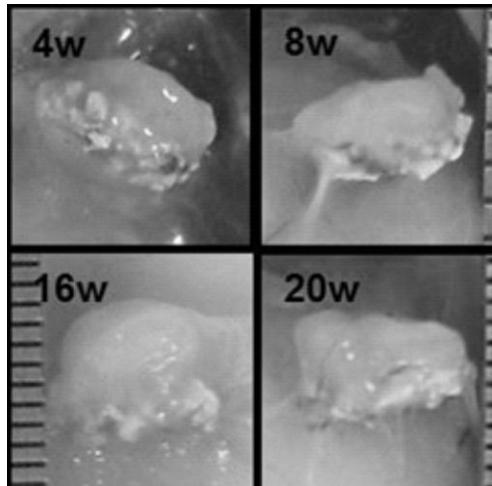
【 図 8 b 】



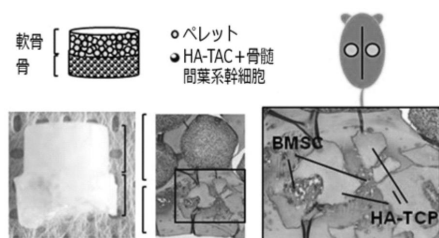
【 図 8 c 】



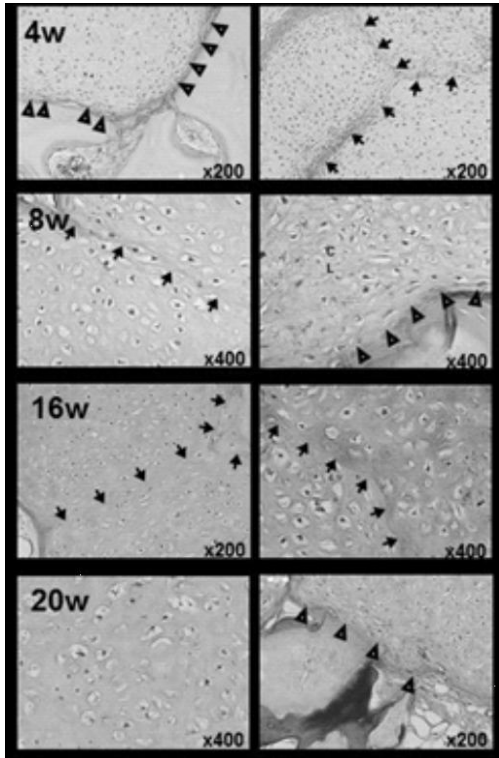
【 図 9 b 】



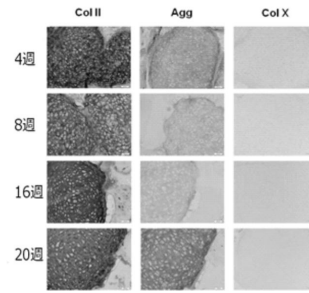
【 図 9 a 】



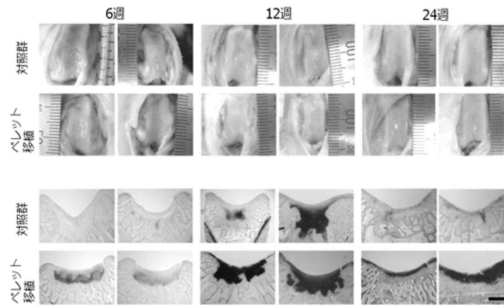
【図 9 c】



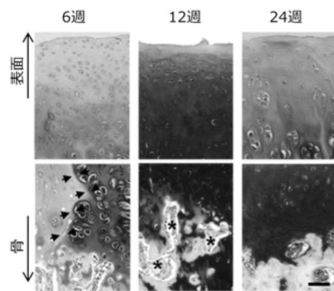
【図 9 d】



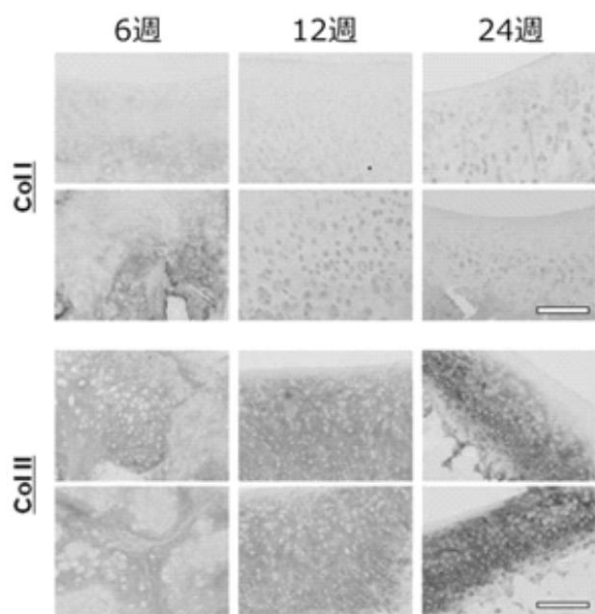
【図 10 a】



【図 10 b】



【図 10 c】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	5/077 (2010.01)	C 1 2 N 5/077
C 1 2 N	5/22 (2006.01)	C 1 2 N 5/22
C 1 2 N	5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735
C 1 2 N	5/0775 (2010.01)	C 1 2 N 5/0775

(74)代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(72)発明者 イ・ジョンソン

大韓民国133-751ソウル、ソンドング、ドンホロ100番、ナンバー111-1003

(72)発明者 イ・ジンヨン

大韓民国472-728キョンギド、ナミヤンジュシ、ワブウプ、ドクソロ97ボンギル12番、ナンバー201-1506

(72)発明者 チェ・ピョンチョル

大韓民国139-802ソウル、ノウォング、コンヌンロ126番、ナンバー108-904

(72)発明者 ソン・ヨンスク

大韓民国135-808ソウル、カンナムグ、オンジュロ105番、ナンバー205-703

(72)発明者 チャン・ソンスン

大韓民国137-880ソウル、ソチョグ、サイムダンロ19ギル10番、ナンバー101-1101

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 特表2001-512304(JP,A)

特表2004-502401(JP,A)

PENICK K. J., et al., High-throughput aggregate culture system to assess the chondrogenic potential of mesenchymal stem cells, NIH Public Access Author Manuscript(Biotechniques, 2005, vol.39, no.5, p.687-691), 2006年, p.1-8

SCHON B. S., et al., Validation of a high-throughput microtissue fabrication process for 3D assembly of tissue engineered cartilage constructs, Cell and Tissue Research, 2012年, vol.347, p.629-642

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 5 / 3 2

A 6 1 L 2 7 / 3 8

A 6 1 P 1 9 / 0 2

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C 1 2 M 3 / 0 0

C 1 2 N 5 / 0 7 3 5

C 1 2 N 5 / 0 7 7

C 1 2 N 5 / 0 7 7 5

C 1 2 N 5 / 2 2

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)

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)