

(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
2022年5月5日(05.05.2022)

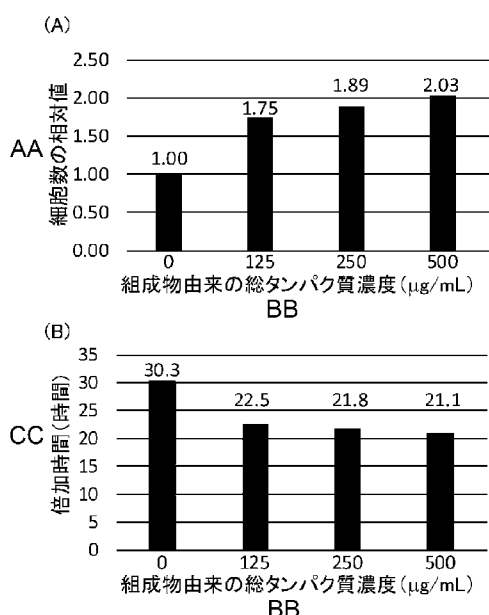


(10) 国際公開番号
WO 2022/092169 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 35/19 (2015.01) C12N 5/078 (2010.01)
A61K 38/17 (2006.01) C12N 5/16 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/039716
- (22) 国際出願日: 2021年10月27日(27.10.2021)
- (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 2020-180042 2020年10月27日(27.10.2020) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 長崎大学(NAGASAKI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8528521 長崎県長崎市文教町1-1-4 Nagasaki (JP). 株式会社メガカリオン(MEGAKARYON CORPORATION) [JP/JP]; 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町1-3-4 番地 京都市サーチパーク Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 岩竹 真弓 (IWATAKE Mayumi); 〒8528521 長崎県長崎市文教町1-1-4 国立大学法人 長崎大学 知的財産室内 Nagasaki (JP). 住田 吉慶(SUMITA Yoshinori); 〒8528521 長崎県長崎市文教町1-1-4 国立大学法人 長崎大学 知的財産室内 Nagasaki (JP). 朝比奈 泉(ASAHINA Izumi); 〒8528521 長崎県長崎市文教町1-1-4 国立大学法人 長崎大学 知的財産室内 Nagasaki (JP). 佐竹 真(SATAKE Makoto); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町1-3-4 番地 京都市サーチパーク 株式会社メガカリオン内 Kyoto (JP). 間 靖子(HAZAMA Yasuko); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町1-3-4 番地 京都市サーチパーク 株式会社メガカリオン内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 辻丸 光一郎, 外(TSUJIMARU Koichiro et al.); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町1-3-4 京都市サーチパーク 1号館301号室 Kyoto (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,

(54) Title: OSTEOGENIC COMPOSITION AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 骨形成組成物およびその用途



AA Relative cell count
BB Total concentration of composition-derived proteins (μg/mL)
CC Doubling time (hours)

(57) Abstract: Provided is a composition having a cell-derived physiological activity. The osteogenic composition according to the present invention contains a processed product of megakaryocytes or a culture thereof.

(57) 要約: 細胞由来の生理活性を有する組成物を提供する 本発明の骨形成組成物は、巨核球またはその培養物の処理物を含む。

WO 2022/092169 A1

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：骨形成組成物およびその用途

技術分野

[0001] 本発明は、骨形成組成物およびその用途に関する。

背景技術

[0002] 再生医療用の治療薬として、間葉系幹細胞等の組織再生を促す細胞を細胞製剤として開発することが試みられている。また、前記組織再生を促す細胞は、成長因子等の生理活性を有するタンパク質を放出することにより、組織再生を促進していると考えられている。

[0003] また、歯科領域の再生医療では、骨増生（造成）治療等において、多血小板血漿が用いられている。しかしながら、多血小板血漿は、単離されたヒトの血液から分離および遠心濃縮で調製するため、血小板数が統一されておらず、その効能が不明である。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] そこで、本発明は、細胞由来の骨形成活性を有する組成物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0005] 前記目的を達成するために、本発明の骨形成組成物（以下、「組成物」ともいう）は、巨核球またはその培養物の処理物を含む。

[0006] 本発明の骨形成キット（以下、「キット」ともいう）は、骨形成組成物と、骨形成の足場材料とを含み、前記骨形成組成物は、本発明の骨形成組成物である。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、細胞由来の骨形成活性を有する組成物を提供できる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1は、実施例1における濃縮システムの構成を示す模式図である。

[図2]図2は、実施例1における細胞の増殖活性を示すグラフであり、(A)は、増殖活性の相対値を示し、(B)は、倍加時間を示す。

[図3]図3は、実施例1におけるアルカリフォスファターゼの染色像を示す写真である。

[図4]図4は、実施例1におけるカルシウムの染色像を示す写真である。

[図5]図5は、実施例1における培地中のカルシウムイオン濃度を示すグラフである。

[図6]図6は、実施例2における細胞の増殖活性を示すグラフであり、(A)は、増殖活性の相対値を示し、(B)は、倍加時間を示す。

[図7]図7は、実施例2におけるカルシウムの染色像を示す写真である。

[図8]図8は、実施例2におけるカルシウムの染色像を示す写真である。

[図9]図9は、実施例2における培地中のカルシウムイオン濃度を示すグラフである。

[図10]図10は、実施例3における細胞数を示すグラフである。

[図11]図11は、実施例3におけるALP活性を示すグラフである。

[図12]図12は、実施例3における細胞数を示すグラフである。

[図13]図13は、実施例3におけるALP活性を示すグラフである。

[図14]図14は、実施例4における骨形成を示す写真である。

[図15]図15は、実施例4における骨形成量または骨増生量を示すグラフである。

[図16]図16は、実施例5における実験の概要およびサイトカイン遺伝子の発現量を示す模式図およびグラフである。

[図17]図17は、実施例5における実験の概要およびサイトカイン遺伝子の発現量を示す模式図およびグラフである。

[図18]図18は、実施例6における移植後4週目における、骨形成を示す写真である。

[図19]図19は、実施例6における移植後4週目における、骨量、骨塩量、欠損骨量と新生骨量との比、および骨密度を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0009] <骨形成組成物>

本発明の骨形成組成物は、前述のように、巨核球またはその培養物の処理物を含む。本発明の組成物は、巨核球またはその培養物の処理物を含むことが特徴であり、その他の構成および条件は、特に制限されない。本発明の組成物によれば、例えば、細胞由来の生理活性を有する組成物を提供できる。本発明の組成物によれば、例えば、骨芽細胞への分化を促進することにより、骨形成を誘導できる。

[0010] 本発明において、「骨形成」は、既にある骨が増えること、すなわち、「骨増生」（骨造成）でもよいし、新たに骨が形成されること、すなわち、「骨新生」でもよいし、喪失（欠損）された骨またはその部分が回復すること、すなわち、「骨再生」のいずれの意味で用いてもよい。このため、本発明の骨形成組成物は、骨増生（骨造成）組成物、骨新生組成物、および／または骨再生組成物ということもできる。

[0011] 本発明の組成物は、後述するように、骨芽細胞の分化誘導を促進、加速（誘導促進）、亢進、増強、および／または強化することにより、骨形成を誘導すると推定される。このため、本発明の組成物は、骨芽細胞の分化誘導を促進、加速（誘導促進）、亢進、増強、および／または強化組成物ということもでき、また、骨形成の誘導、促進、加速（誘導促進）、亢進、増強、および／または強化組成物ということもできる。

[0012] 本発明において、「巨核球」は、生体内においては骨髄中に存在する最大の細胞であり、血小板を放出する細胞および同等の機能を有する細胞を意味する。前記同等の機能を有する細胞は、血小板の産生能を有する細胞を意味する。本発明において、巨核球は、多核化（多倍体化）前の巨核球、すなわち、未成熟な巨核球または増殖期の巨核球でもよいし、多核化後の巨核球（多核化巨核球）でもよい。具体例として、前記巨核球は、例えば、前巨核芽球、巨核芽球、前巨核球、および成熟巨核球のいずれでもよい。前記多核化後の巨核球が有する染色体のセット数は、2セットを超えればよく、具体例

として、16～32セットである。

- [0013] 前記巨核球の由来は、特に制限されないが、例えば、ヒトおよび非ヒト動物があげられる。前記非ヒト動物は、例えば、サル、ゴリラ、チンパンジー、マーモセット等の霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウサギ、ヒツジ、ウマ、モルモット等があげられる。前記巨核球の由来は、例えば、本発明の組成物の投与対象と同じでもよいし、異なってもよい。
- [0014] 本発明において、前記巨核球は、細胞表面マーカーにより特定できる。前記巨核球がヒト由来の場合、前記細胞表面マーカーは、CD41a、CD42aおよびCD42bがあげられる。すなわち、前記巨核球は、CD41a、CD42aおよびCD42bが陽性の細胞である。前記巨核球がヒト由来の場合、前記細胞表面マーカーは、例えば、CD9、CD61、CD62p、CD42c、CD42d、CD49f、CD51、CD110、CD123、CD131、およびCD203cからなる群から選択された少なくとも1つであってもよい。
- [0015] 前記巨核球は、生体から単離した巨核球でもよいし、多能性細胞等の巨核球より未分化な細胞（以下、「前駆細胞」ともいう）から誘導された巨核球でもよい。前記「巨核球より未分化な細胞」は、前記巨核球への分化能を有する細胞を意味する。
- [0016] 前記巨核球が生体から単離した巨核球である場合、前記巨核球は、例えば、骨髓中に存在するため、骨髓から単離できる。この場合、前記巨核球は、生体由来の他の細胞を含んでもよい。
- [0017] 前記巨核球が前駆細胞から誘導された巨核球である場合、前記巨核球は、後述のように、in vitroで誘導できる。この場合、前記巨核球は、前記前駆細胞を含んでもよい。前記前駆細胞は、例えば、造血幹細胞、造血前駆細胞、CD34陽性細胞、巨核球・赤芽球前駆細胞（megakaryocyte-erythroid progenitor：MEP）、巨核球前駆細胞等があげられる。前記前駆細胞は、例えば、骨髓、臍帯血、末梢血等から単離してもよいし、ES細胞（胚性幹細胞、embryonic stem cells）、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells、iPS細胞）、核移植ES細胞（ntES細胞）、生殖性幹細胞、

体性幹細胞、胚性腫瘍細胞等の多能性細胞から誘導してもよい。

[0018] 前記巨核球が前駆細胞から誘導された巨核球である場合、前記巨核球は、不死化巨核球が好ましい。前記不死化巨核球は、例えば、他の巨核球の誘導方法により誘導された巨核球と比較して、細胞の分化段階の均質性が高いため、得られた処理物における成分組成の変動を抑制できる。前記不死化巨核球は、例えば、後述のように、前記前駆細胞に、癌遺伝子およびポリコム遺伝子、または、癌遺伝子、ポリコム遺伝子、およびアポトーシス抑制遺伝子を導入することにより誘導される巨核球である。

[0019] 前記「癌遺伝子」は、生体内で細胞の癌化を誘導可能な遺伝子を意味し、例えば、c-MYC、N-MYC、L-MYC等のMYCファミリー遺伝子、SRCファミリー遺伝子、RASファミリー遺伝子、RAFファミリー遺伝子、c-kit (CD117)、PDGFR (血小板成長因子受容体)、Ab1 (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog) 等のプロテインキナーゼファミリー遺伝子等があげられる。

[0020] 前記「ポリコム遺伝子」は、CDKN2a (サイクリン依存性キナーゼ阻害2A、INK4a/ARF) を負に制御し、細胞老化を回避するために機能すると知られている遺伝子を意味する (下記参考文献1~3)。具体例として、前記ポリコム遺伝子は、例えば、BMI1 (Polycomb complex protein BMI-1、polycomb group RING finger protein 4 (PCGF4)、RING finger protein 51 (RNF51))、Mel18 (Polycomb group RING finger protein 2)、Ring (Ring Finger Protein) 1a/b、Phc (Polyhomeotic Homolog) 1/2/3、Cbx (Chromobox) 2/4/6/7/8、Ezh2 (Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit)、Eed (Embryonic Ectoderm Development)、Suz12 (SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit)、HADC (Histone deacetylases)、Dnmt (DNA (cytosine-5)-methyltransferase) 1/3a/3b等があげられる。

参考文献1：小黒秀行ら、「ポリコム群蛋白複合体による幹細胞の老化制御」、再生医療、2007年、第6巻、第4号、26-32頁

参考文献2 : Jesus Gil et.al, “ Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all” , Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, vol.7, pages 667-677

参考文献3 : Soo-Hyun Kim et.al., “ Absence of p16^{INK4a} and truncation of ARF tumor suppressors in chickens” , PNAS, 2003, vol.100, No.1, pages 211-216

[0021] 前記「アポトーシス抑制遺伝子」は、細胞のアポトーシスを抑制可能な機能を有する遺伝子を意味し、例えば、BCL2 (B-cell Lymphoma 2) 、 Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) 、 Survivin (Baculoviral IAP Repeat Containing 5) 、 MCL1 (BCL2 Family Apoptosis Regulator) 等があげられる。

[0022] 前記不死化巨核球は、外来性の B M I 1 遺伝子、 M Y C 遺伝子、および B c l - x L 遺伝子を含む巨核球であることが好ましい。前記「外来性」は、細胞外から細胞内に導入されたことを意味する。前記外来性の遺伝子は、前記細胞の染色体上に存在してもよいし、核または細胞質内に存在してもよい。前記外来性の遺伝子は、例えば、当該遺伝子の数を測定することにより検出できる。前記遺伝子が常染色体上の遺伝子の場合、前記遺伝子は、各常染色体上に1つ存在するため、1つの細胞には、2つの遺伝子が存在する。このため、前記外来性の遺伝子が存在しないと、前記遺伝子は、1つの細胞において2つ検出される。他方、前記外来性の遺伝子が存在する場合、前記遺伝子は、1つの細胞において3つ以上検出される。この場合、前記外来性の遺伝子は、例えば、プライマーを用いた P C R、プローブ、またはこれらの組合せ等を用いて検出できる。前記外来性の遺伝子がタグ配列や選択マーカーを有する場合、前記外来性の遺伝子の検出は、前記タグ配列の検出または選択マーカーの検出により実施してもよい。また、前記外来性の遺伝子は、例えば、前記遺伝子から翻訳されるタンパク質に対して、抗体等を用いて検出できる。

[0023] 前記巨核球の培養物は、例えば、前記巨核球を培養することにより生産される培養物である。前記巨核球の培養は、例えば、後述のように、培地の存

在下、前記巨核球を培養することにより実施できる。

[0024] 前記巨核球の培養物は、前記巨核球を培養して得られる物であるため、例えば、細胞成分として、前記巨核球および巨核球から産生される血小板を含む混合物である。前記細胞成分は、細胞および血小板を意味する。前述のように、前記巨核球は、前記巨核球より未分化な細胞より誘導できる。このため、前記巨核球の培養物を生産するための巨核球として、前記巨核球より未分化な細胞より誘導された巨核球を含む場合、前記巨核球の培養物は、前記巨核球より未分化な細胞を含んでもよい。

[0025] 本発明において、前記巨核球の培養物は、前記巨核球を培養して得られた培養物そのものでもよいし、前記培養物を加工したものでもよい。前記培養物の加工は、例えば、液体画分の除去、細胞成分画分の抽出、血小板を含む細胞成分の組成の変更等があげられる。前記細胞成分の組成の変更は、例えば、前記混合物における細胞および／または血小板の除去、前記混合物における細胞および／または血小板の抽出、前記混合物への細胞および／または血小板の追加等があげられる。

[0026] 前記「血小板」は、血液中の細胞成分の一つであり、CD41aおよびCD42bが陽性である細胞成分を意味する。前記血小板は、例えば、細胞核を有さず、また、前記巨核球と比較して、大きさが小さい。このため、前記血小板と前記巨核球とは、例えば、細胞核の有無および／または大きさにより区別できる。前記血小板は、血栓形成と止血において重要な役割を果たすとともに、損傷後の組織再生や炎症の病態生理にも関与することが知られている。また、前記血小板は、出血等により血小板が活性化されると、その膜上にIntegrin α IIb β 3 (glycoprotein IIb/IIIa; CD41aとCD61の複合体) 等の細胞接着因子の受容体が発現することが知られている。また、前記血小板が活性化されると、血小板同士が凝集し、血小板から放出される各種の血液凝固因子によってフィブリンが凝固することにより、血栓が形成され、止血が進む。本発明において、前記血小板の由来は、前記巨核球の由来と同じである。

[0027] 本発明において、前記処理物は、前記巨核球から調製してもよいし、前記

巨核球の培養物から調製してもよい。また、前記巨核球の培養物から調製する場合、前記巨核球の培養物は加工されてもよい。具体例として、前記処理物は、例えば、前記巨核球またはその培養物の細胞画分の処理物でもよいし、前記巨核球またはその培養物を加工した加工物の処理物でもよい。前記処理物の調製における処理は、特に制限されず、例えば、濃縮処理等の細胞成分の密度を変更する処理；乾燥処理、凍結処理、凍結乾燥処理、溶媒処理、界面活性剤処理、酵素処理、タンパク質画分抽出処理等の細胞の成分を抽出する抽出処理；磨砕処理、粉砕処理等の破砕処理；等があげられる。前記処理物の具体例としては、例えば、前記巨核球またはその培養物の濃縮物、乾燥物、凍結物、凍結乾燥物、溶媒処理物、界面活性剤処理物、酵素処理物、タンパク質分画物、超音波処理物等の抽出物；磨砕処理物、粉砕処理物等の破砕処理物；前記巨核球またはその培養物の細胞画分の濃縮物、乾燥物、凍結物、凍結乾燥物、溶媒処理物、界面活性剤処理物、酵素処理物、タンパク質分画物、超音波処理物の抽出物；磨砕処理物、粉砕処理物等の破砕処理物；等があげられる。前記処理物は、1種類の処理物から構成されてもよいし、2種類以上の処理物の混合物でもよい。前記混合物は、特に制限されず、任意の処理物の組み合わせおよび比率で混合した混合物とすることができる。

[0028] 前記処理物は、例えば、1以上の成長因子および成長因子受容体の少なくとも一方を含む。また、前記処理物は、例えば、細胞の増殖促進活性、骨芽細胞の分化促進活性等の生理活性を有する。さらに、前記処理物は、例えば、前述のように、前記巨核球またはその培養物を処理することにより製造できる。このため、本発明において、前記処理物は、例えば、下記条件（1）～（3）を用いて規定できる。前記処理物は、例えば、下記条件（1）～（3）のいずれかにより規定されてもよいし、複数の条件により規定されてもよいし、全ての条件により規定されてもよい。具体例として、前記処理物は、例えば、条件の組合せにより規定できる。

（条件）

(1) 成長因子および／または成長因子受容体の含有量；

(2) 処理物の生理活性；

(3) 処理物の製造方法

(条件の組合わせ)

条件(1)、(2)、または(3)；

条件(1)および(2)、条件(1)および(3)、または条件(2)および(3)；

条件(1)、(2)、および(3)

[0029] (1) 条件(1)

条件(1)は、前述のように、成長因子および／または成長因子受容体の含有量に関する条件である。前記条件(1)は、前記成長因子の含有量または前記成長因子受容体の含有量を規定してもよいし、前記成長因子の含有量および前記成長因子受容体の含有量を規定してもよい。また、前記条件(1)の規定に用いる成長因子は、1種類でもよいし、2種類以上でもよい。前記条件(1)の規定に用いる成長因子受容体は、1種類でもよいし、2種類以上でもよい。

[0030] 前記条件(1)において、前記成長因子は、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、インスリン様増殖因子結合タンパク質-1(IGFBP-1)、インスリン様増殖因子結合タンパク質-2(IGFBP-2)、インスリン様増殖因子結合タンパク質-3(IGFBP-3)、インスリン様増殖因子結合タンパク質-6(IGFBP-6)、胎盤増殖因子(PIGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、内分泌腺由来血管内皮増殖因子(EG-VEGF)、分化増殖因子-15(GDF-15)、アンフィレグリン(AR)、骨形成タンパク質-5(BMP-5)、骨形成タンパク質-7(BMP-7)、肝臓増殖因子(HGF)、TGF β 1(トランスフォーミング成長因子 β 1)等があげられる。

[0031] 前記条件(1)において、前記成長因子受容体は、幹細胞因子受容体(SCFR)、上皮成長因子受容体(EGFR)、血管内皮増殖因子受容体2(

VEGFR2)等があげられる。

[0032] 前記含有量は、例えば、前記処理物における各成長因子および各成長因子受容体の重量でもよいし、前記処理物の総タンパク質の重量に対する各成長因子および各成長因子受容体の重量（総タンパク質あたりの含有量）でもよいが、後者が好ましい。

[0033] 前記総タンパク質の重量は、例えば、BCAタンパク質定量法により決定できる。前記BCAタンパク質定量法は、1価の銅イオンと、2分子のピシニコニン酸との配位結合を利用したタンパク質の定量方法である。前記BCAタンパク質定量法に供するサンプルは、例えば、還元剤および／または銅イオンのキレート剤を含まないことが好ましい。前記BCAタンパク質定量法は、下記参考文献4に準じて実施でき、例えば、市販のキット等を用いてもよい。前記BCAタンパク質定量法のキットとしては、Pierce（商標）BCA Protein Assay Kit（Thermo Fisher Scientific社製）等が利用できる。
参考文献4：長谷 俊治ら、「やさしい原理からはいえるタンパク質科学実験法1 タンパク質をつくる 抽出・精製と合成」、化学同人、2008年12月13日

[0034] 前記処理物における総タンパク質濃度は、例えば、処理に供する細胞数と、処理物における溶媒の体積により適宜設定できる。前記処理物における総タンパク質濃度は、例えば、前記処理に供する細胞数を増加させる、前記処理物における溶媒の体積を低減する、または前記巨核球から抽出することにより、前記処理物における総タンパク質濃度を相対的に高くできる。また、前記処理物における総タンパク質濃度は、例えば、前記処理に供する細胞数を低減する、前記処理物における溶媒の体積を増加させる、または前記巨核球の培養物から抽出することにより、前記処理物における総タンパク質濃度を相対的に低くできる。具体例として、前記処理に供する細胞数が 1×10^8 細胞であり、前記処理物における溶媒の体積が $100 \mu\text{l}$ の場合、前記処理物における総タンパク質濃度は、例えば、 $0.1 \sim 200 \text{ mg/ml}$ である。前記溶媒は、例えば、後述の水性溶媒である。

[0035] 前記成長因子および成長因子受容体の重量は、例えば、サンドイッチEL

ISA法により決定できる。前記サンドイッチELISA法は、下記参考文献5に準じて実施でき、例えば、市販のキット等を用いてもよい。前記サンドイッチELISA法のキットとしては、Quantibody（登録商標） Human Growth Factor Array 1（RayBiotech社製）等が利用できる。

参考文献5：生物化学的測定研究会編集、「免疫測定法 基礎から先端まで」、講談社、2014年12月20日

- [0036] 前記処理物における前記成長因子の含有量および成長因子受容体の含有量としては、例えば、以下の例が挙げられる。
- [0037] 前記成長因子がbFGFの場合、前記処理物は、例えば、総タンパク質1mgあたり、2000~20000pg、5000~20000pg、または10000~20000pgのbFGFを含む。前記処理物は、例えば、bFGFを含有することにより、後述のように、細胞増殖の促進活性および骨芽細胞への分化促進活性を示す。
- [0038] 前記成長因子がIGFBP-1の場合、前記処理物は、例えば、総タンパク質1mgあたり、0~200pg、0.01~200pg、0.01~100pg、または0.01~50pgのIGFBP-1を含む。
- [0039] 前記成長因子がIGFBP-2の場合、前記処理物は、例えば、総タンパク質1mgあたり、8000~80000pg、10000~80000pg、または20000~80000pgのIGFBP-2を含む。
- [0040] 前記成長因子がPIGFの場合、前記処理物は、例えば、総タンパク質1mgあたり、1~60pg、1~30pg、または1~20pgのPIGFを含む。
- [0041] 前記成長因子がVEGFの場合、前記処理物は、例えば、総タンパク質1mgあたり、20~800pg、20~600pg、または20~400pgのVEGFを含む。
- [0042] 前記成長因子がGDF-15の場合、前記処理物は、例えば、総タンパク質1mgあたり、1000~10000pg、1000~5000pg、または2000~5000pgのGDF-15を含む。

- [0043] 前記成長因子がARの場合、前記処理物は、例えば、総タンパク質1mgあたり、0~16pg、0.01~16pg、0.1~16pg、または1~16pgのARを含む。
- [0044] 前記成長因子がHGFの場合、前記処理物は、例えば、総タンパク質1mgあたり、0~100pg、0.01~100pg、0.01~50pg、または0.01~30pgのHGFを含む。
- [0045] 前記成長因子がBMP-7の場合、前記処理物は、例えば、総タンパク質1mgあたり、0~1000pg、0.01~1000pgのBMP-7を含む。
- [0046] 前記成長因子受容体がSCFRの場合、前記処理物は、例えば、総タンパク質1mgあたり、200~2000pg、300~1500pg、または400~1000pgのSCFRを含む。
- [0047] 前記成長因子受容体がEGFRの場合、前記処理物は、例えば、総タンパク質1mgあたり、0~60pg、0.01~60pg、1~50pg、1~45pg、または10~40pgのEGFRを含む。
- [0048] 前記成長因子受容体がVEGFR2の場合、前記処理物は、例えば、総タンパク質1mgあたり、20~400pg、50~350pg、または100~300pgのVEGFR2を含む。
- [0049] 前記条件(1)は、前述のように、1または2種類以上の成長因子の含有量で規定してもよいし、1または2種類以上の成長因子受容体の含有量で規定してもよいし、これらの含有量を任意に組合わせて規定してもよい。この場合、前記条件(1)は、例えば、下記条件(A1)~(A9)および(B1)~(B3)からなる群から選択された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個の条件で規定される。具体例として、前記成長因子の含有量および/または成長因子受容体の含有量の組合せとしては、下記の組合せが例示できる。

(成長因子の含有量および/または成長因子受容体の含有量の組合せ)

(A1)~(A9)および(B1)~(B3)のいずれか1つの条件:

(A1) bFGFの含有量、(A2) IGFBP-1の含有量、(A3) IGFBP-2の含有量、(A4) PIGFの含有量、(A6) VEGFの含有量、(A6) GDF-15の含有量、(A7) ARの含有量、(A8) HGFの含有量、(A9) BMP-7の含有量、(B1) SCFRの含有量、(B2) EGFRの含有量、または(B3) VEGFR2の含有量；

(A1) ~ (A9) および (B1) ~ (B3) のいずれか2つの条件：

(A1) および (A2)、(A1) および (A3)、(A1) および (A4)、(A1) および (A5)、(A1) および (A6)、(A1) および (A7)、(A1) および (A8)、(A1) および (A9)、(A1) および (B1)、(A1) および (B2)、(A1) および (B3)、

(A2) および (A3)、(A2) および (A4)、(A2) および (A5)、(A2) および (A6)、(A2) および (A7)、(A2) および (A8)、(A2) および (A9)、(A2) および (B1)、(A2) および (B2)、(A2) および (B3)、

(A3) および (A4)、(A3) および (A5)、(A3) および (A6)、(A3) および (A7)、(A3) および (A8)、(A3) および (A9)、(A3) および (B1)、(A3) および (B2)、(A3) および (B3)、

(A4) および (A5)、(A4) および (A6)、(A4) および (A7)、(A4) および (A8)、(A4) および (A9)、(A4) および (B1)、(A4) および (B2)、(A4) および (B3)、

(A5) および (A6)、(A5) および (A7)、(A5) および (A8)、(A5) および (A9)、(A5) および (B1)、(A5) および (B2)、(A5) および (B3)、

(A6) および (A7)、(A6) および (A8)、(A6) および (A9)、(A6) および (B1)、(A6) および (B2)、(A6) および (B3)、

(A7) および (A8)、(A7) および (A9)、(A7) および (B1)

)、(A7)および(B2)、(A7)および(B3)、
(A8)および(A9)、(A8)および(B1)、(A8)および(B2)
)、(A8)および(B3)、
(A9)および(B1)、(A9)および(B2)、(A9)および(B3)
)、
(B1)および(B2)、(B1)および(B3)、または
(B2)および(B3)。

[0050] 前記総タンパク質あたりの含有量は、例えば、本発明の組成物の用途に応じて、前記成長因子および成長因子受容体以外の他のタンパク質を追加または除去することにより、調整してもよい。前記他のタンパク質は、例えば、前記成長因子および成長因子受容体の活性に影響を与えないタンパク質があげられ、具体例として、ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン、ヒトガンマグロブリン等のガンマグロブリン等があげられる。前記タンパク質の除去は、例えば、カラムを用いた除去、抗体を用いた除去等があげられる。

[0051] (2) 条件(2)

条件(2)は、前述のように、処理物の生理活性に関する条件である。前記条件(2)において、前記処理物の生理活性は、例えば、細胞、組織、または臓器の機能を調節する活性を意味する。前記細胞の機能は、例えば、増殖、分化等があげられる。

[0052] 前記処理物の生理活性は、例えば、細胞の増殖促進活性、骨芽細胞への分化促進活性、骨前駆細胞から骨芽細胞への分化促進活性があげられる。前記細胞の増殖促進活性において、前記細胞は、特に制限されず、例えば、間葉系幹細胞等があげられる。前記骨芽細胞への分化促進活性において、前記骨前駆細胞は、例えば、間葉系幹細胞、骨芽細胞等があげられる。前記処理物は、例えば、1つの活性を有してもよいし、複数の活性を有してもよい。

[0053] 前記間葉系幹細胞は、自己複製能を有し、骨、軟骨、および脂肪細胞への分化能を有する細胞である。前記間葉系幹細胞は、細胞表面マーカーにより特定できる。前記間葉系幹細胞は、例えば、CD73、CD90、およびCD105陽性、

ならびにCD14、CD34およびCD45陰性である。

[0054] 前記骨芽細胞は、骨基質を合成および分泌可能な細胞である。前記骨芽細胞は、例えば、アルカリフォスファターゼ陽性およびオステオカルシン陽性の細胞として特定できる。

[0055] 前記細胞の増殖促進活性は、例えば、本発明の組成物を添加しない以外は同様の対照群と比較して、細胞の増殖能が向上していればよく、例えば、開始時より、細胞の増殖能が低下していてもよい。この場合、前記「増殖促進活性」は、例えば、増殖活性の低下の抑制ということもできる。具体例として、前記間葉系幹細胞は、継代を行なう毎に増殖活性が低下する。本発明の組成物によれば、前記間葉系幹細胞の増殖活性の低下を抑制できるため、例えば、本発明の組成物は、増殖促進活性を示すといえる。前記細胞の増殖促進活性は、例えば、対象の細胞が増殖する培養条件下で測定できる。前記培養条件は、例えば、前記細胞の種類に応じて、適宜設定できる。

[0056] 前記骨芽細胞への分化促進活性は、例えば、本発明の組成物を添加しない以外は同様の対照群と比較して、骨芽細胞への分化能が向上していればよい。前記分化能の向上は、例えば、前記骨芽細胞への分化速度が早くなること、および前記骨芽細胞に分化する細胞の割合が向上することのいずれの意味でもよい。前記骨芽細胞への分化は、例えば、特開2012-120529号公報を参照できる。具体例として、間葉系幹細胞から骨芽細胞の誘導方法は、例えば、後述の実施例2に基づき実施できる。

[0057] (3) 条件(3)

条件(3)は、前述のように、処理物の製造方法に関する条件である。本発明の組成物における処理物の製造方法については、後述の本発明の組成物の製造方法の説明を援用できる。

[0058] 本発明の組成物は、in vitroで使用してもよいし、in vivoで使用してもよい。

[0059] 本発明の組成物をin vitroで使用する場合、前記投与対象は、例えば、細胞、組織、器官等があげられ、前記細胞は、例えば、生体から採取

した細胞、培養細胞等があげられる。

[0060] 本発明の組成物を in vivo で使用する場合、前記投与対象は、例えば、ヒト、またはヒトを除く非ヒト動物があげられる。前記非ヒト動物としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ウマ、ネコ、ヤギ、サル、モルモット等があげられる。

[0061] 本発明の組成物の使用条件（投与条件）は、特に制限されず、例えば、投与対象の種類等に応じて、投与形態、投与時期、投与量等を適宜設定できる。

[0062] 本発明の組成物を in vitro で使用する場合、本発明の組成物は、例えば、対象とする前駆細胞の培地に添加することで使用できる。本発明の組成物は、例えば、前記前駆細胞を維持する際に使用する維持培地に添加してもよいし、前記前駆細胞を前記骨芽細胞に分化する際に使用する添加してもよいし、前記維持培地および前記分化培地の両者に添加してもよい。本発明の組成物によれば、例えば、前記組成物を含む維持培地で、前記前駆細胞を維持することにより、その後、前記前駆細胞を骨芽細胞に分化させる際にも分化を促進できる。前記維持培地における本発明の組成物由来の総タンパク質の終濃度は、例えば、 $10\sim 1000\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\sim 500\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、または $10\sim 300\ \mu\text{g}/\text{ml}$ である。前記分化培地における本発明の組成物由来の総タンパク質の終濃度は、例えば、 $10\sim 1000\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\sim 500\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、または $10\sim 300\ \mu\text{g}/\text{ml}$ である。

[0063] 本発明の組成物を in vivo で使用する場合、例えば、投与対象の種類、症状、年齢、投与方法等により適宜決定できる。具体例として、マウスに投与する場合、1日にあたりの組成物の投与量は、前記組成物由来の総タンパク質量の合計は、特に制限されず、例えば、その用途に応じて適宜設定できるが、具体例として、 $10\ \text{ng}\sim 100\ \text{mg}$ があげられる。ヒトに投与する場合、1日あたりの組成物の投与量は、前記組成物由来の総タンパク質量の合計は、特に制限されず、例えば、その用途に応じて適宜設定できるが、具体例として、 $10\ \text{ng}\sim 100\ \text{g}$ があげられる。1日あたりの投与回数

は、例えば、1～5回、1～3回、1回または2回である。

[0064] 本発明の組成物の投与形態は、特に制限されない。本発明の組成物を i n v i v o で投与する場合、経口投与でもよいし、非経口投与でもよい。前記非経口投与は、例えば、静脈注射（静脈内投与）、筋肉注射（筋肉内投与）、経皮投与、皮下投与、皮内投与、経腸投与、直腸投与、経膈投与、経鼻投与、経肺投与、腹腔内投与、局所投与等があげられる。

[0065] 本発明の組成物の剤型は、特に制限されず、例えば、前記投与形態に応じて適宜決定できる。前記剤型は、例えば、液体状または固体状があげられる。

[0066] 本発明の組成物は、例えば、必要に応じて、添加剤を含んでもよい。前記添加剤は、薬学的に許容可能な添加剤または薬学的に許容可能な担体であることが好ましい。

[0067] 本発明の組成物の製造方法（以下、「製造方法」ともいう）は、巨核球またはその培養物を処理する処理工程を含む。本発明の製造方法において、前記処理工程における処理対象は、巨核球またはその培養物である。このため、本発明の製造方法は、前記処理工程に先立ち、巨核球より未分化な細胞から前記巨核球を誘導する巨核球誘導工程および／または前記巨核球の培養物を生産する生産工程を含んでもよい。

[0068] 前記巨核球誘導工程において、前記巨核球の誘導方法は、特に制限されず、公知の誘導方法により実施できる。具体例として、前記巨核球の誘導方法は、例えば、国際公開第2011/034073号（米国特許出願公開2012/0238023号公報）、国際公開2012/157586号（米国特許出願公開2014/0127815号公報）、国際公開第2014/123242号（米国特許出願公開2016/0002599号公報）等の不死化巨核球の誘導方法；下記参考文献6に記載された巨核球の誘導方法；等を参照でき、ここに本明細書の一部を構成するものとして援用する。具体例として、前記巨核球誘導工程では、例えば、前記巨核球より未分化な細胞に、前記癌遺伝子および前記ポリコーム遺伝子を強制発現させてもよい。これにより、前記巨核球誘導工程では、例えば

、無限に増殖する不死化巨核球を得ることができる。さらに、例えば、前記不死化巨核球の前記強制発現を解除することにより、前記不死化巨核球を多核化巨核球に誘導し、血小板を産生させることができる。また、前記巨核球誘導工程では、例えば、前記巨核球前駆細胞に前記アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させてもよい。これにより、前記巨核球誘導工程では、前記不死化巨核球を得ることができる。さらに、例えば、前記不死化巨核球の前記強制発現を解除することにより、前記不死化巨核球から多核化巨核球を誘導し、血小板を産生させることができる。

参考文献6 : Ann-Kathrin Borger et.al., “Generation of HLA-Universal iPSC-Derived Megakaryocytes and Platelets for Survival Under Refractoriness Conditions” , Mol. Med., 2016, vol. 22, pages 274-288

[0069] 前記巨核球誘導工程では、例えば、前記癌遺伝子、前記ポリコム遺伝子、および前記アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させてもよい。この場合、前記癌遺伝子、前記ポリコム遺伝子、および前記アポトーシス抑制遺伝子の強制発現は、同時に行なってもよいし、別個に行なってもよい。具体例として、前記巨核球誘導工程では、前記癌遺伝子および前記ポリコム遺伝子を強制発現後、前記強制発現を解除し、つぎに、前記アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させてもよいし、前記癌遺伝子、前記ポリコム遺伝子、および前記アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させてもよいし、前記癌遺伝子および前記ポリコム遺伝子を強制発現させ、さらに、前記アポトーシス抑制遺伝子を発現させてもよい。これにより、前記巨核球誘導工程では、前記不死化巨核球を得ることができる。さらに、例えば、前記不死化巨核球の前記強制発現を解除することにより、前記不死化巨核球から多核化巨核球を誘導し、血小板を産生させることができる。

[0070] 前記巨核球誘導工程は、例えば、各遺伝子の導入効率を向上できることから、前記巨核球より未分化な細胞に、癌遺伝子およびポリコム遺伝子を強制発現させる第1の発現工程と、前記未分化な細胞において、Bcl-xL遺伝子等のアポトーシス抑制遺伝子を強制発現させる第2の発現工程と、前

記強制発現を全て解除する解除工程とを含むことが好ましい。

[0071] 各遺伝子の強制発現および強制発現の解除は、例えば、国際公開第2011/034073号、国際公開第2012/157586号、国際公開第2014/123242号または下記参考文献7に記載された方法等の公知の方法、またはそれに準ずる方法で実施でき、ここに本明細書の一部を構成するものとして援用する。具体例として、各遺伝子の強制発現および強制発現の解除は、例えば、薬剤応答性の遺伝子発現誘導システムを用いて実施できる。前記遺伝子発現誘導システムは、例えば、Tet-on（登録商標）システム、Tet-off（登録商標）システム等があげられる。前記Tet-onシステムを用いる場合、例えば、前記強制発現する工程では、テトラサイクリン、ドキシサイクリン等の遺伝子発現を誘導する薬剤の存在下、培養を実施し、前記強制発現を解除する工程では、前記薬剤の非存在下で、前記培養を実施する。

参考文献7：Nakamura S et al, “Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells.”, Cell Stem Cell, 2014, vol.14, No.4, pages 535-548

[0072] つぎに、前記生産工程では、前記巨核球の培養物を生産する。前記生産工程は、例えば、培地の存在下、前記巨核球を培養することにより実施できる。前記巨核球の培養は、例えば、フィーダ細胞上で実施してもよいし、フィーダ細胞なしで実施してもよい。前記巨核球は、例えば、浮遊培養できるため、前記フィーダ細胞なしで培養できる。前記巨核球の培養物は、例えば、前記血小板を含む。

[0073] 前記巨核球の培養条件は、特に制限されず、前記巨核球の通常の培養条件を採用できる。具体例として、培養温度は、例えば、約35～約42℃、約36～約40℃、約37～約39℃である。CO₂濃度は、例えば、約5～約15%である。O₂濃度は、例えば、約15～約25%、約20%である。培養期間は、特に制限されず、例えば、約1日～約2週間、約4～約8日であ

る。

[0074] 前記培地は、特に制限されず、例えば、前記巨核球から血小板が産生するのに好適な公知の培地およびそれに準ずる培地があげられる。具体例として、前記培地は、例えば、動物細胞の培養に用いる培地を基礎培地として調製することができる。前記基礎培地は、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)、Ham's F12培地、RPMI1640培地、Fischer's培地、Neurobasal (登録商標) Medium (Thermo Fisher Scientific社製) 等の単独培地またはこれらの混合培地があげられる。前記培地は、例えば、血清または血漿を含んでもよいし、これらを含まない無血清培地でもよい。前記血清および血漿の由来は、前記巨核球の由来と同じ由来であることが好ましい。具体例として、前記巨核球がヒト由来である場合、前記血清および血漿は、それぞれ、ヒト由来であることが好ましい。

[0075] 前記培地は、例えば、他の成分を含んでもよい。前記他の成分は、特に制限されず、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、モノチオールグリセロール (MTG)、脂質、アミノ酸 (例えば、L-グルタミン)、アスコルビン酸、ヘパリン、非必須アミノ酸、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、サイトカイン等があげられる。前記他の成分は、例えば、1種類でもよいし、2種類以上でもよい。前記サイトカインは、例えば、血球系細胞の分化を促進する物質であり、具体例として、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、トロンボポエチン (TPO)、各種TPO様作用物質、Stem Cell Factor (SCF)、ITS (インスリン-トランスフェリン-セレナイト) サプリメント、ADAM阻害剤、FLT阻害剤、WNT阻害剤、ROCK阻害剤、芳香族炭化水素受容体 (AhR) 阻害剤等があげられる。前記培地は、例えば、血清、インスリン、トランスフェリン、セリン、チオールグリセロール、アスコルビン酸、TPOを含むIMDM培地が好ましい。前記培地は、例えば、さらにSCFを含んでもよく、さらに

へパリンを含んでいてもよい。前記他の成分の濃度は、特に制限されない。前記TP0の濃度は、例えば、約10ng/ml～約200ng/ml、約50ng/ml～約100ng/mlである。前記SCFの濃度は、例えば、約10ng/ml～約200ng/ml、約50ng/mlである。前記へパリンの濃度は、例えば、約10U/ml～約100U/ml、約25U/mlである。前記培地は、例えば、さらに、ホルボールエステル（例えば、ホルボール-12-ミリスタート-13-アセタート；PMA）を含んでもよい。

[0076] つぎに、前記処理工程では、前記巨核球またはその培養物を処理する。前記処理工程では、例えば、前記巨核球またはその培養物が含有する細胞の細胞膜を破壊することにより、タンパク質等の生体高分子を抽出する。具体例として、前記処理工程における処理は、特に制限されず、例えば、濃縮処理等の細胞成分の密度を変更する処理；乾燥処理、凍結処理、凍結乾燥処理、溶媒処理、界面活性剤処理、酵素処理、タンパク質画分抽出処理、超音波処理等の細胞の成分を抽出する抽出処理；磨砕処理、粉砕処理等の破砕処理；等があげられる。前記処理工程において実施する処理は、1種類でもよいし、2種類以上でもよい。また、前記処理工程では、前記処理を1回実施してもよいし、2回以上実施してもよい。

[0077] 前記濃縮処理は、例えば、前記巨核球またはその培養物を、遠心等することにより実施できる。前記遠心の条件は、例えば、細胞または血小板を沈殿させる条件を採用できる。前記乾燥処理は、例えば、前記巨核球またはその培養物に対してドライスプレー、ドラムドライヤー等で乾燥させることにより実施できる。前記凍結乾燥処理は、例えば、凍結乾燥機を用いて実施できる。前記溶媒処理において、前記溶媒は、例えば、フェノール、クロロホルム等の有機溶媒；水、生理的食塩水、緩衝液等の水性溶媒；である。前記溶媒として水性溶媒を用いる場合、前記溶媒処理は、例えば、後述の界面活性剤処理、酵素処理、および／または超音波処理と併用することが好ましい。前記溶媒処理は、例えば、前記巨核球またはその培養物を、前記溶媒と混合することにより実施できる。前記界面活性剤処理において、前記界面活性剤は、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム等のイオン系界面活性剤；NP-40、Trit

on X-100、Tween 20、n-Dodecyl- β -D-maltopyranoside等の非イオン系界面活性剤；CHAPS等の両性イオン界面活性剤；等があげられる。前記界面活性剤の濃度は、例えば、前記巨核球またはその培養物における細胞成分の細胞膜を破壊可能な濃度である。前記界面活性剤処理は、例えば、水性溶媒の存在下、前記巨核球またはその培養物を、前記界面活性剤と接触させることにより実施できる。前記界面活性剤との接触は、例えば、約0～約10℃で実施する。前記水性溶媒は、例えば、水、生理的食塩水、緩衝液等があげられる。前記酵素処理における酵素は、例えば、ペプチダーゼ、プロテアーゼ等があげられる。前記酵素処理は、例えば、前記水性溶媒の存在下、前記巨核球またはその培養物を、前記酵素と接触させることにより実施できる。前記酵素処理の条件は、例えば、前記酵素が活性を示す条件である。前記タンパク質画分抽出処理は、例えば、前記巨核球またはその培養物に対して、浸透圧ショック、凍結融解等を行なうことにより実施できる。前記超音波処理は、例えば、超音波発生装置を用いて実施できる。前記超音波処理の条件は、例えば、細胞を破砕する条件を使用できる。

[0078] 各種処理における処理条件および処理時間は、例えば、前記処理の種類に応じて適宜決定できる。また、前記処理工程では、例えば、前記水性溶媒の量を調整することにより、前記処理物における総タンパク質の濃度を調整できる。

[0079] 前記巨核球またはその培養物は、前記処理に先立ち、加工（前処理）を実施してもよい。この場合、前記巨核球の培養物としては、前記巨核球を培養して得られた培養物そのものを用いてもよいし、前記混合物を加工したものでものを用いてもよい。前記培養物の加工は、例えば、液体画分の除去、細胞成分画分の抽出、血小板を含む細胞成分の組成の変更等があげられる。前記細胞成分の組成の変更は、例えば、前記混合物における細胞および／または血小板の除去、前記混合物における細胞および／または血小板の抽出、前記混合物への細胞および／または血小板の追加等があげられる。

[0080] 本発明の製造方法が前記前処理を含む場合、本発明の製造方法は、前記巨

核球またはその培養物から血小板を除去する除去工程を含んでもよい。この場合、前記処理工程では、前記巨核球またはその培養物として、前記血小板が除去された巨核球もしくはその培養物、または除去された血小板を用いて処理を実施する。前記血小板放出後の巨核球は、例えば、bFGFの含有量が高い。このため、本発明の製造方法は、例えば、前記血小板を除去することにより、bFGFの含有量が高い組成物を製造できる。前記血小板の除去により、前記血小板と、その他の細胞成分とを分離することができる。このため、前記除去工程は、例えば、血小板の分離工程または血小板と他の細胞成分との分離工程ということもできる。前記除去工程において、前記巨核球の培養物からの血小板の分離方法は、例えば、国際公開第2017/065280号公報（米国特許出願公開2018/282697号公報）に記載された方法等の公知の方法、またはそれに準ずる方法で実施でき、ここに本明細書の一部を構成するものとして援用する。

[0081] 前記除去工程における血小板の除去率（分離率）は、例えば、60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上である。前記血小板の除去率は、例えば、60～90%である。

[0082] 本発明の製造方法は、前記巨核球もしくはその培養物、前記血小板が除去された巨核球もしくはその培養物、または除去された血小板を保存する保存工程を有してもよい。前記保存工程における保存は、例えば、冷蔵保存（約1～約10℃）、冷凍保存（約-200～約-4℃）があげられる。前記保存工程における保存期間は、特に制限されない。前記保存工程は、例えば、前記処理工程における凍結処理を兼ねられることから、冷凍保存が好ましい。

[0083] 本発明の製造方法は、一例として、下記のように実施できる。ただし、本発明は、以下の例示に何ら制限されない。まず、前記巨核球またはその培養物を含む培地について、遠心により濃縮処理を行ない、細胞成分を濃縮する。前記遠心処理は、例えば、前記細胞成分が沈殿する条件である。具体例と

して、前記遠心処理は、例えば、 $1000\sim3000\times g$ で、 $5\sim20$ 分遠心することに実施できる。つぎに、遠心後に沈殿物を回収し、得られた沈殿物を急速凍結することで凍結処理する。前記凍結処理は、例えば、前記沈殿物を液体窒素等の液化ガスと接触させることにより実施できる。さらに、凍結後の沈殿物を、前記界面活性剤を含む水性溶媒で溶解させることにより、界面活性剤処理する。得られた溶液について、遠心し、夾雑物を沈殿させる。前記遠心処理は、例えば、細胞膜等の夾雑物が沈殿する条件である。具体例として、前記遠心処理は、例えば、 $10000\sim20000\times g$ で、 $3\sim10$ 分間遠心することにより実施できる。前記遠心後、タンパク質は上清に存在するため、上清をタンパク質分画として回収することにより、前記処理物を得ることができる。

[0084] 本発明の組成物は、例えば、後述するように、骨芽細胞の分化促進組成物として使用できる。本発明の使用方法については、後述の細胞の増殖促進組成物および骨芽細胞の分化促進組成物の説明を援用できる。また、本発明の組成物は、例えば、顎骨腫瘍、嚢胞、骨壊死、外傷、骨系統疾患（外胚葉異形成症、唇顎口蓋裂等）による顎骨欠損；歯周病またはそれに伴う歯槽骨欠損、う蝕または外傷による歯槽骨欠損等の歯槽骨欠損；原発性骨粗鬆症（閉経後骨粗鬆症、老人性骨粗鬆症等）、続発性骨粗鬆症（骨形成不全症等）等の骨粗鬆症；甲状腺機能亢進症、Cushing症候群、性腺機能低下症）、外傷等による難治性骨折；開胸手術による肋骨接合；開頭手術による骨欠損；腫瘍切除または嚢胞摘出による全身の骨欠損；等に好適に使用できると推定される。

[0085] <骨芽細胞の分化促進組成物>

本発明の骨芽細胞の分化促進組成物は、前述のように、前記本発明の組成物を含む。本発明の分化促進組成物は、前記本発明の組成物を含むことが特徴であり、その他の構成および条件は、特に制限されない。本発明の分化促進組成物によれば、骨芽細胞への分化、特に、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を促進できる。本発明の分化促進組成物は、前記本発明の組成物の説

明を援用できる。

[0086] 本発明の分化促進組成物は、in vitroで使用してもよいし、in vivoで使用してもよい。

[0087] 本発明の分化促進組成物をin vitroで使用する場合、前記投与対象は、例えば、細胞、組織、器官等があげられ、前記細胞は、例えば、生体から採取した細胞、培養細胞等があげられる。

[0088] 本発明の分化促進組成物をin vivoで使用する場合、前記投与対象は、例えば、ヒト、またはヒトを除く非ヒト動物があげられる。前記非ヒト動物としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ウマ、ネコ、ヤギ、サル、モルモット等があげられる。

[0089] 本発明の分化促進組成物の使用条件（投与条件）は、特に制限されず、例えば、投与対象の種類等に応じて、投与形態、投与時期、投与量等を適宜設定できる。本発明の分化促進組成物の投与条件は、前記本発明の組成物の説明を援用できる。

[0090] 本発明の分化促進組成物をin vitroで使用する場合、本発明の分化促進組成物は、例えば、対象とする前駆細胞の培地に添加することで使用できる。本発明の分化促進組成物は、例えば、前記前駆細胞を維持する際に使用する維持培地に添加してもよいし、前記前駆細胞を前記骨芽細胞に分化する際に使用する添加してもよいし、前記維持培地および前記分化培地の両者に添加してもよい。本発明の分化促進組成物によれば、例えば、前記分化促進組成物を含む維持培地で、前記前駆細胞を維持することにより、その後、前記前駆細胞を骨芽細胞に分化させる際にも分化を促進できる。前記維持培地における本発明の分化促進組成物由来の総タンパク質の終濃度は、例えば、 $10\sim 1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\sim 500\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または $10\sim 300\mu\text{g}/\text{ml}$ である。前記分化培地における本発明の分化促進組成物由来の総タンパク質の終濃度は、例えば、 $10\sim 1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\sim 500\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または $10\sim 300\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

[0091] 前駆細胞の骨芽細胞への分化促進作用は、例えば、間葉系幹細胞と被検物

とを共存させた際に、前記被検物の非存在下（対照群）と比較して、前記間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進できるかにより評価できる。具体的には、前記骨芽細胞への分化促進作用は、前記間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化誘導した後の細胞群の培地におけるカルシウムイオンの濃度を指標に、評価できる。前記間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導方法およびカルシウムイオンの濃度の測定方法は、後述の実施例1（6）に準じて、実施できる。そして、前記評価では、例えば、前記被検物との共存群におけるカルシウムの濃度が、前記被検物非存在下の群におけるカルシウム濃度と比較して、90%以下、85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下である場合、前記被検物は、骨芽細胞への分化促進作用があると評価できる。

[0092] 本発明の分化促進組成物は、例えば、前記間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導アッセイにおいて、カルシウム濃度を、90%以下、85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下に抑制する骨芽細胞の分化促進活性を有する。前記間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導アッセイは、後述の実施例1（6）に準じて実施できる。

[0093] 本発明の分化促進組成物を in vivo で使用する場合、例えば、投与対象の種類、症状、年齢、投与方法等により適宜決定できる。具体例として、ヒトに投与する場合、1日あたりの分化促進組成物の投与量は、前記分化促進組成物由来の総タンパク質量の合計は、特に制限されず、例えば、その用途に応じて適宜設定できる。1日あたりの投与回数は、例えば、1～5回、1～3回、1回または2回である。

[0094] 本発明の分化促進組成物の投与形態は、特に制限されない。本発明の分化促進組成物を in vivo で投与する場合、経口投与でもよいし、非経口

投与でもよい。前記非経口投与は、例えば、静脈注射（静脈内投与）、筋肉注射（筋肉内投与）、経皮投与、皮下投与、皮内投与、経腸投与、直腸投与、経膈投与、経鼻投与、経肺投与、腹腔内投与、局所投与等があげられる。

[0095] 本発明の分化促進組成物の剤型は、特に制限されず、例えば、前記投与形態に応じて適宜決定できる。前記剤型は、例えば、液体状または固体状があげられる。

[0096] 本発明の分化促進組成物は、例えば、必要に応じて、添加剤を含んでもよい。前記添加剤は、薬学的に許容可能な添加剤または薬学的に許容可能な担体であることが好ましい。

[0097] <骨形成キット>

本発明の骨形成キットは、骨形成組成物と、骨形成の足場材料とを含み、前記骨形成組成物は、前記本発明の骨形成組成物である。本発明のキットは、前記本発明の骨形成組成物を含むことが特徴であり、その他の工程および条件は、特に制限されない。本発明のキットは、前記本発明の組成物と前記足場材料とを組み合わせることにより、簡便に骨形成を誘導できる。本発明のキットは、前記本発明の組成物および分化促進組成物の説明を援用できる。

[0098] 本発明のキットにおいて、前記足場材料は、例えば、骨または軟骨再生に用いられる足場材料を用いることができる。前記足場材料は、例えば、骨細胞もしくは骨芽細胞、またはこれらの前駆細胞が付着、増殖、および／または分化可能な材料ということもできる。前記足場材料は、例えば、三次元の中空構造または多孔質構造を有する構造体（構造物）であり、具体例として、多孔質体、多孔性支持体、多孔性立体構造体（構造物）、ゲル（ハイドロゲル）、スポンジ構造物等があげられる。

[0099] 前記足場材料は、例えば、前記本発明の組成物とあわせて生体内に留置されることから、生体適合性および／または生分解性を示すことが好ましい。前記「生体適合性」は、例えば、生体における組織および／または器官と親和性があり、異物反応や拒絶反応などを生じないことを意味する。前記「生

分解性」とは、例えば、生体内において、その構成成分が分解可能であることを意味する。

[0100] 前記足場材料の構成成分は、例えば、コラーゲン、ゼラチン、アルブミン、ケラチン、フィブリン、フィブロイン等のタンパク質；アガロース、デキストラン、カルボキシメチルセルロース、キサンタンガム、キトサン、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヒアルロン酸、アルギン酸等の多糖類；ポリグリコール酸（PGA）、ポリ乳酸（PLA）、ポリグリコール酸とポリ乳酸の共重合体、ポリヒドロキシ酪酸、ポリジオキサノン、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリカプロラクトン、ポリブチレンサクシネート、リン酸カルシウム（例えば、 β -リン酸三カルシウム）、炭酸カルシウム、ハイドロキシアパタイト、ポリエーテルケトン、およびポリエーテルエーテルケトン等があげられる。前記構成成分は、1種類を単独で用いてもいいし、複数種類を併用してもよい。

[0101] 前記足場材料は、例えば、前記足場材料の構成成分を架橋または複合化することにより、調製できる。

[0102] 前記足場材料としては、例えば、ネオボーン（ハイドロキシアパタイト製、Aimdic MMT社製）、APACERAM（登録商標、ハイドロキシアパタイト製、HOYA A株式会社社製）、ボナーク（コラーゲン／オクタリン酸カルシウム製、東洋紡株式会社社製）、オスフェリオン（ β TCP製、オリンパステルモバイオマテリアル株式会社社製）、サイトランスグラニュール（炭酸アパタイト製、株式会社ジーシー社製）、リフィット（コラーゲン／アパタイト製、HOYA株式会社社製）等があげられる。

[0103] 本発明のキットにおいて、前記組成物と、前記足場材料とは、独立して存在してもよいし、一体で存在してもよい。後者の場合、本発明のキットは、例えば、骨形成足場材料ということもできる。前記組成物と、前記足場材料とが一体の場合、前記組成物は、例えば、前記足場材料の表面に吸着されてもよいし、前記足場材料内に包含されてもよい。

[0104] 本発明のキットは、例えば、前記組成物に加えて、生理活性物質を含んで

もよい。前記生理活性物質は、例えば、骨形成または骨芽細胞もしくは骨細胞の分化を促進する物質である。前記生理活性物質は、例えば、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、表皮増殖因子（EGF）、線維芽増殖因子（FGF）、肝細胞増殖因子（HGF）、インスリン様成長因子（IGF）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、増殖分化因子-5（GDF5）、赤血球生成促進因子（EPO）、形質転換増殖因子（TGF）および骨形成タンパク質（BMP）等があげられる。前記生理活性物質は、1種類を単独で用いてもよいし、複数種類を併用してもよい。

[0105] 本発明のキットは、例えば、前記投与対象において、骨形成を誘導したい所望の場所に、前記組成物および足場材料を移植（埋設、包埋）することにより使用できる。具体的に、本発明のキットにおいて、前記組成物と、前記足場材料とが独立している場合、前記足場材料に前記組成物を含浸させ、ついで、前記足場材料を移植することにより使用できる。また、本発明のキットにおいて、前記組成物と、前記足場材料とが独立している場合、前記足場材料を移植後、前記移植部位に、前記本発明の組成物を導入することにより使用してもよい。また、本発明のキットにおいて、前記組成物と前記足場材料とが一体の場合、前記足場材料を移植することにより使用できる。

[0106] 本発明のキットにおいて、前記組成物の含有量は、例えば、前記本発明の組成物における投与量に準じて設定できる。

[0107] <免疫細胞の活性化抑制組成物>

本発明は、別の態様において、細胞由来の免疫細胞の活性化抑制活性を有する組成物を提供する。この場合、本発明の免疫細胞の活性化抑制組成物（以下、「活性化抑制組成物」ともいう。）は、巨核球またはその培養物の処理物を含む。本発明の活性化抑制組成物は、巨核球またはその培養物の処理物を含むことが特徴であり、その他の構成および条件は、特に制限されない。本発明の活性化抑制組成物によれば、例えば、細胞由来の免疫細胞の活性化抑制活性を有する組成物を提供できる。本発明の活性化抑制組成物は、前記本発明の組成物、分化促進組成物、および骨形成キットの説明を援用でき

る。

[0108] 本発明の活性化抑制組成物は、例えば、免疫細胞における炎症性サイトカインの産生を抑制できる。このため、本発明の活性化抑制組成物は、例えば、免疫細胞における炎症性サイトカインの産生抑制組成物ということもできる。

[0109] 本発明において、「免疫細胞の活性化」は、例えば、免疫細胞において、活性化マーカーの発現が誘導されること、炎症性サイトカイン等のサイトカインの発現が誘導されることのいずれの意味で用いてもよい。前記炎症性サイトカインは、例えば、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $IFN-\gamma$ 等があげられる。

[0110] 前記免疫細胞の活性化抑制作用は、例えば、前記免疫細胞を活性化させる条件下において、前記免疫細胞と被検物とを共存させた際に、前記被検物の非存在下と比較して（対照群）、前記免疫細胞の培養後の培地における炎症性サイトカインの濃度を抑制できるかにより評価できる。具体的には、前記免疫細胞の活性化抑制作用は、炎症性サイトカインの産生量の抑制率に基づき、評価できる。前記免疫細胞の種類、活性化の条件、および炎症性サイトカインの産生量は、後述の実施例5に準じて、測定できる。そして、前記評価では、例えば、いずれか1つ以上のサイトカインの産生量の抑制率が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、または99%以上の場合、前記被検物は、免疫細胞の活性化抑制作用があると評価できる。

[0111] 本発明の活性化抑制組成は、例えば、前記免疫細胞の活性化アッセイにおいて、少なくとも1種類の炎症性サイトカインの濃度を、対照群と比較して、90%以下、85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下に抑制する免疫細胞の活性化抑制作用を有する。前記免疫

細胞の活性化アッセイは、後述の実施例5に準じて実施できる。

[0112] 本発明において、前記免疫細胞は、例えば、T細胞等のリンパ球；炎症性マクロファージ等のマクロファージ；等があげられる。

[0113] 本発明の活性化抑制組成物は、in vitroで使用してもよいし、in vivoで使用してもよい。

[0114] 本発明の活性化抑制組成物をin vitroで使用する場合、前記投与対象は、例えば、細胞、組織、器官等があげられ、前記細胞は、例えば、生体から採取した細胞、培養細胞等があげられる。

[0115] 本発明の活性化抑制組成物をin vivoで使用する場合、前記投与対象は、例えば、ヒト、またはヒトを除く非ヒト動物があげられる。前記非ヒト動物としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ウマ、ネコ、ヤギ、サル、モルモット等があげられる。

[0116] 本発明の活性化抑制組成物の使用条件（投与条件）は、特に制限されず、例えば、投与対象の種類等に応じて、投与形態、投与時期、投与量等を適宜設定できる。

[0117] 本発明の活性化抑制組成物をin vitroで使用する場合、本発明の活性化抑制組成物は、例えば、対象とする細胞の培地に添加することで使用できる。本発明の活性化抑制組成物をin vitroで使用する場合、前記培地における本発明の活性化抑制組成物由来の総タンパク質の終濃度は、例えば、 $10\sim 1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\sim 500\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または $10\sim 300\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

[0118] 本発明の活性化抑制組成物をin vivoで使用する場合、例えば、投与対象の種類、症状、年齢、投与方法等により適宜決定できる。具体例として、ヒトに投与する場合、1日あたりの活性化抑制組成物の投与量は、前記活性化抑制組成物由来の総タンパク質量の合計は、特に制限されず、例えば、その用途に応じて適宜設定できる。1日あたりの投与回数は、例えば、1～5回、1～3回、1回または2回である。

[0119] 本発明の活性化抑制組成物の投与条件および剤型は、前記本発明の組成物

の説明を援用できる。

[0120] <抗炎症組成物>

本発明は、別の態様において、細胞由来の抗炎症活性を有する組成物を提供する。この場合、本発明の抗炎症組成物は、巨核球またはその培養物の処理物を含む。本発明の抗炎症組成物は、巨核球またはその培養物の処理物を含むことが特徴であり、その他の構成および条件は、特に制限されない。本発明の抗炎症組成物によれば、例えば、炎症を抑制可能な組成物を提供できる。本発明の抗炎症組成物は、前記本発明の組成物、分化促進組成物、骨形成キット、および活性化抑制組成物の説明を援用できる。

[0121] 本発明において、「抗炎症」は、炎症を抑制することを意味し、例えば、炎症性サイトカインの発現誘導の抑制または炎症性サイトカインの産生抑制等を指標に検討できる。

[0122] 本発明の抗炎症組成物は、in vitroで使用してもよいし、in vivoで使用してもよい。

[0123] 本発明の抗炎症組成物の投与対象、投与条件、および剤型は、前記本発明の組成物および免疫細胞の活性化抑制組成物の説明を援用できる。

[0124] <骨形成方法>

本発明の骨形成方法は、前記本発明の骨形成組成物を使用する。本発明の骨形成方法は、前記本発明の組成物を使用することが特徴であり、その他の工程および条件は、特に制限されない。本発明の骨形成方法によれば、例えば、骨芽細胞への分化、特に、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を促進することにより、骨形成を誘導できる。本発明の骨形成方法は、前記本発明の組成物、分化促進組成物、および骨形成キットの説明を援用できる。

[0125] 本発明の骨形成方法は、例えば、投与対象に、本発明の骨形成組成物を投与する投与工程を含む。本発明の骨形成方法により、in vivoで骨形成を行なう場合、前記本発明の組成物の投与位置は、骨形成を行なう所望の位置とできる。本発明の骨形成方法において、前記投与対象および投与条件は、前記本発明の組成物の投与対象および投与条件の説明を援用できる。

[0126] 本発明の骨形成方法において、前記本発明の骨形成組成物として、前記本発明の骨形成キットを用いてもよい。

[0127] <骨芽細胞の分化促進方法>

本発明の骨芽細胞の分化促進方法（以下、「分化促進方法」ともいう）は、前記本発明の細胞の分化促進組成物を使用する。本発明の分化促進方法は、前記本発明の分化促進組成物を使用することが特徴であり、その他の工程および条件は、特に制限されない。本発明の分化促進方法によれば、骨芽細胞への分化、特に、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を促進できる。本発明の分化促進方法は、前記本発明の組成物、分化促進組成物、骨形成キット、および骨形成方法の説明を援用できる。

[0128] 本発明の分化促進方法は、例えば、in vitroで実施してもよいし、in vivoで実施してもよい。本発明の分化促進方法は、例えば、投与対象に、本発明の分化促進組成物を投与する投与工程を含む。

[0129] 本発明の分化促進方法をin vitroで実施する場合、本発明の分化促進方法は、例えば、前記分化促進組成物の存在下、前駆細胞を骨芽細胞に分化させる分化工程を含む。本発明の分化促進方法は、前記分化工程に先立ち、前記分化促進組成物の存在下、前駆細胞を維持培養する維持工程を含んでもよい。前記本発明の分化促進組成物の投与対象および投与条件は、例えば、本発明の分化促進組成物における投与対象および投与条件の説明を援用できる。

[0130] <免疫細胞の活性化抑制方法>

本発明は、別の態様において、免疫細胞の活性化を抑制する方法を提供する。本発明の免疫細胞の活性化抑制方法（以下、「活性化抑制方法」ともいう）は、前記本発明の免疫細胞の活性化抑制組成物を使用する。本発明の活性化抑制方法は、前記本発明の活性化抑制組成物を使用することが特徴であり、その他の工程および条件は、特に制限されない。本発明の活性化抑制方法によれば、免疫細胞の活性化を抑制できる。本発明の活性化抑制方法は、前記本発明の組成物、分化促進組成物、骨形成キット、活性化抑制組成物、

抗炎症組成物、骨形成方法、および分化促進方法の説明を援用できる。

[0131] 本発明の活性化抑制方法は、例えば、in vitroで実施してもよいし、in vivoで実施してもよい。本発明の活性化抑制方法は、例えば、投与対象に、本発明の活性化抑制組成物を投与する投与工程を含む。

[0132] 本発明の活性化抑制方法をin vitroで実施する場合、本発明の活性化抑制方法は、例えば、前記活性化抑制組成物の存在下、免疫細胞を培養する培養工程を含む。前記本発明の活性化抑制組成物の投与対象、投与条件、および剤型は、例えば、本発明の活性化抑制組成物における投与対象、投与条件、および剤型の説明を援用できる。

[0133] <炎症の抑制方法>

本発明は、別の態様において、炎症を抑制する方法を提供する。本発明の炎症の抑制方法（以下、「抑制方法」ともいう）は、前記本発明の抗炎症組成物を使用する。本発明の炎症の抑制方法は、前記本発明の抗炎症組成物を使用することが特徴であり、その他の工程および条件は、特に制限されない。本発明の炎症の抑制方法によれば、炎症を抑制できる。本発明の炎症の抑制方法は、前記本発明の組成物、分化促進組成物、骨形成キット、活性化抑制組成物、抗炎症組成物、骨形成方法、分化促進方法、および活性化抑制方法の説明を援用できる。

[0134] 本発明の炎症の抑制方法は、例えば、in vitroで実施してもよいし、in vivoで実施してもよい。本発明の炎症の抑制方法は、例えば、投与対象に、本発明の抗炎症組成物を投与する投与工程を含む。

[0135] 本発明の炎症の抑制方法をin vitroで実施する場合、本発明の炎症の抑制方法は、例えば、前記抗炎症組成物の存在下、投与対象を培養する培養工程を含む。前記本発明の抗炎症組成物の投与対象、投与条件、および剤型は、例えば、本発明の抗炎症組成物における与対象、投与条件、および剤型の説明を援用できる。

[0136] <組成物の使用>

本発明は、骨形成のために使用するための、巨核球またはその培養物の処

理物を有効成分として含む、組成物またはその使用である。本発明は、骨芽細胞の分化促進のために使用するための、巨核球またはその培養物の処理物を有効成分として含む、組成物またはその使用である。本発明は、免疫細胞の活性化抑制のために使用するための、巨核球またはその培養物の処理物を有効成分として含む、組成物またはその使用である。本発明は、炎症の抑制のために使用するための、巨核球またはその培養物の処理物を有効成分として含む、組成物またはその使用である。本発明は、骨形成組成物を製造するための、巨核球またはその培養物の処理物を有効成分として含む、組成物の使用である。また、本発明は、骨芽細胞の分化促進組成物を製造するための、巨核球またはその培養物の処理物を有効成分として含む、組成物の使用である。本発明は、免疫細胞の活性化抑制組成物を製造するための、巨核球またはその培養物の処理物を有効成分として含む、組成物の使用である。本発明は、抗炎症組成物を製造するための、巨核球またはその培養物の処理物を有効成分として含む、組成物の使用である。本発明は、前記本発明の組成物、分化促進組成物、骨形成キット、活性化抑制組成物、抗炎症組成物、骨形成方法、分化促進方法、活性化抑制方法、および炎症の抑制方法の説明を援用できる。

実施例

[0137] 以下、実施例を用いて本発明を詳細に説明するが、本発明は実施例に記載された態様に限定されるものではない。

[0138] [実施例 1]

本発明の組成物を製造し、成長因子および成長因子受容体を含むこと、細胞の増殖促進活性および骨芽細胞への分化促進活性を有することを確認した。

[0139] (1) 不死化巨核球細胞の作製

不死化巨核球は、以下の手順で作製した。

[0140] (1-1) iPS細胞からの造血前駆細胞の調製

ヒト iPS細胞 (TKDN SeV2 および NIH5 : センダイウイルスを用いて樹立され

たヒト胎児皮膚繊維芽細胞由来iPS細胞)から、下記参考文献8に記載の方法に従って、血球細胞への分化培養を実施した。具体的には、ヒトES/iPS細胞コロニーを20ng/ml VEGF (R&D SYSTEMS社製)存在下でC3H10T1/2フィーダ細胞と14日間共培養して造血前駆細胞 (Hematopoietic Progenitor Cells ; HPC) を作製した。培養条件は、37℃、20%O₂、5%CO₂で実施した(特に記載がない限り、以下同条件)。

参考文献8 : Takayama N. et al., “Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells” , J. Exp. Med., 2010, vo.13, pages 2817-2830

[0141] (1-2) 遺伝子導入システム

遺伝子導入システムは、レンチウイルスベクターシステムを利用した。レンチウイルスベクターは、Tetracycline制御性のTet-on (登録商標) 遺伝子発現誘導システムベクターである。LV-TRE-mOKS-Ubc-tTA-I2G (下記参考文献9) のmOKSカセットをc-MYC、BMI1、またはBCL-xLに組み替えることで作製した。c-MYC、BMI1、またはBCL-xLが導入されたベクターを、それぞれ、LV-TRE-c-Myc-Ubc-tTA-I2G、LV-TRE-BMI1-Ubc-tTA-I2G、およびLV-TRE-BCL-xL-Ubc-tTA-I2Gとした。c-MYC、BMI1、およびBCL-xLウイルスは、293T細胞へ前記レンチウイルスベクターで遺伝子導入することにより作製した。得られたウイルスを目的の細胞に感染させることによって、c-MYC、BMI1、およびBCL-xL遺伝子が目的の細胞のゲノム配列に導入される。安定的にゲノム配列に導入されたこれらの遺伝子は、培地にドキシサイクリン (clontech#631311) を加えることによって強制発現させることができる。

参考文献9 : Kobayashi, T. et al., “Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells.” , Cell, 2010, vol.142, No.5, pages 787-799

[0142] (1-3) 造血前駆細胞へのc-MYCおよびBMI1ウイルスの感染

予めC3H10T1/2フィーダ細胞を播種した6 well plate上に、前記(1-1)

の方法で得られたHPCを 5×10^4 cells/wellとなるように播種し、BMI1ウイルスおよびc-MYCウイルスを用いたレンチウイルス法にてc-MYCおよびBMI1を強制発現させた。このとき、細胞株1種類につき6 wellずつ使用した。具体的には、それぞれMOI (multiplicity of infection) 20となるように培地中にウイルス粒子を添加し、スピニンフェクション (32°C、900rpm、60分間遠心) で感染させた。前記スピニンフェクションは、12時間おきに2回実施した。培地は、基本培地 (15% Fetal Bovine Serum (GIBCO)、1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine (GIBCO)、1% Insulin, Transferrin, Selenium Solution (ITS-G) (GIBCO)、0.45 mmol/l 1-Thioglycerol (Sigma-Aldrich)、50 µg/ml L-Ascorbic Acid (Sigma-Aldrich)を含有するIMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (Sigma-Aldrich)) に、50 ng/ml Human thrombopoietin (TPO)(R&D SYSTEMS)、50 ng/ml Human Stem Cell Factor (SCF) (R&D SYSTEMS)および2 µg/ml Doxycycline (Dox, clontech #631311)となるようにそれぞれを添加した培地 (以下、分化培地) に、さらに、Protamineを最終濃度が10 µg/mlとなるように添加した培地を用いた。

[0143] (1-4) 巨核球自己増殖株の作製および維持培養

前記(1-3)の方法でc-MYCおよびBMI1ウイルスの感染を実施した日を感染0日目として、以下の通り、c-MYC遺伝子およびBMI1遺伝子が導入されたHPCを培養することで、巨核球自己増殖株をそれぞれ作製した。c-MYC遺伝子およびBMI1遺伝子の強制発現は、培地に1 µg/ml DOXとなるようにDOXを添加することにより実施した。

[0144] ・感染2日目～感染11日目

感染2日目に、ピペティングにて上記の方法で得られたウイルス感染済み血球細胞を回収し、1200rpm、5分間遠心操作を行って上清を除去した後、新しい分化培地で懸濁して新しいC3H10T1/2フィーダ細胞上に播種した(6well plate)。感染9日目に同様の操作をすることによって継代を実施した。前記再播種時は、細胞数を計測後、 1×10^5 cells/2ml/wellとなるようにC3H10T1/2フィーダ細胞上に播種した(6well plate)。

[0145] ・感染12日目～感染13日目

感染2日目と同様の操作を実施した。細胞数を計測後 3×10^5 cells/10ml/100mm dishとなるように、C3H10T1/2フィーダ細胞上に播種した(100mm dish)。

[0146] ・感染14日目

ウイルス感染済み血球細胞を回収し、細胞 1.0×10^5 個あたり、抗ヒトCD41a-APC抗体(BioLegend)、抗ヒトCD42b-PE抗体(eBioscience)、および抗ヒトCD235ab-pacific blue (BioLegend) 抗体を、それぞれ $2 \mu\text{l}$ 、 $1 \mu\text{l}$ 、および $1 \mu\text{l}$ を用いて、前記血球細胞と抗体とを反応させた。前記反応後、FACS Verse (商標) (BD Biosciences) を用いて解析した。感染14日目において、CD41a陽性率が50%以上である細胞を、巨核球自己増殖株とした。

[0147] (1-5) 巨核球自己増殖株へのBCL-xLウイルス感染

前記感染14日目の巨核球自己増殖株に、BCL-xLウイルスを用いたレンチウイルス法にてBCL-xLを遺伝子導入した。MOI 10になるように培地中にウイルス粒子を添加し、スピニンフェクション(32°C、900rpm、60分間遠心)で感染させた。BCL-xL遺伝子の強制発現は、培地に $1 \mu\text{g/ml}$ DOXとなるようにDOXを添加することにより実施した。

[0148] (1-6) 巨核球不死化株の作成および維持培養

・感染14日目～感染18日目

前記(1-5)の方法で得られたBCL-xL遺伝子を導入した巨核球自己増殖株を回収し、1200rpm、5分間遠心操作を行った。前記遠心後、沈殿した細胞を新しい分化培地で懸濁した後、新しいC3H10T1/2フィーダ細胞上に 2×10^5 cells/2ml/wellとなるように播種した(6well plate)。

[0149] ・感染18日目：継代

BCL-xL遺伝子を導入後の巨核球自己増殖株を回収し、細胞数を計測後、 3×10^5 cells/10ml/100mm dishとなるように播種した。

[0150] ・感染24日目：継代

BCL-xL遺伝子を導入後の巨核球自己増殖株を回収し、細胞数を計測後、 1×10^5 cells/10ml/100mm dishとなるように播種した。以後、4-7日毎に同様

にして継代を行い、維持培養を行った。なお、継代時には、新たな分化培地に懸濁の上、播種した。

[0151] 感染24日目にBCL-xLを遺伝子導入した巨核球自己増殖株を回収し、細胞 1.0×10^5 個あたり、抗ヒトCD41a-APC抗体(BioLegend)、抗ヒトCD42b-PE抗体(eBioscience)、および抗ヒトCD235ab-Pacific Blue (Anti-CD235ab-PB; BioLegend) 抗体を、それぞれ、 $2 \mu\text{l}$ 、 $1 \mu\text{l}$ 、および $1 \mu\text{l}$ を用いて、免疫染色した後にFACS Verse (商標) を用いて解析した。そして、感染24日目において、CD41a陽性率が50%以上である株を不死化巨核球細胞株とした。感染後24日以上増殖することができたこれらの細胞を、不死化巨核球細胞株SeV2-MKCLおよびNIH5-MKCLとした。

[0152] 得られたSeV2-MKCLおよびNIH5-MKCLを、10cmディッシュ (10ml/ディッシュ) で静置培養した。培地は、IMDMを基本培地として、以下の成分を加えた (濃度は終濃度)。培養条件は、 37°C 、5% CO_2 とした。

FBS (シグマ#172012 lot.12E261) 15%

L-Glutamin (Gibco #25030-081) 2mmol/l

ITS (Gibco #41400-045) 100倍希釈

MTG (monothioglycerol, sigma #M6145-25ML) $450 \mu\text{mol/l}$

アスコルビン酸(sigma #A4544) $50 \mu\text{g/ml}$

Puromycin (sigma #P8833-100MG) $2 \mu\text{g/ml}$

SCF (和光純薬#193-15513) 50ng/ml

TPO様作用物質 200ng/ml

[0153] (2) 巨核球の培養物の生産

DOXを含まない培地で培養することで強制発現を解除した。具体的には、前記(1)の方法で得た不死化巨核球細胞株 (SeV2-MKCLおよびNIH5-MKCL) を、PBS(-)で2度洗浄し、下記血小板生産培地に懸濁した。細胞の播種密度は、 1.0×10^5 cells/mlとした。

[0154] 前記血小板生産培地は、IMDMを基本培地として、以下の成分を加えた (濃度は、終濃度)。

human plasma 6%

L-Glutamin (Gibco #25030-081) 4mmol/l

ITS (Gibco #41400-045) 100倍希釈

MTG (monothioglycerol, sigma #M6145-25ML) 450 μ mol/l

アスコルビン酸 (sigma #A4544) 50 μ g/ml

SCF (和光純薬#193-15513) 50ng/ml

TPO様作用物質200ng/ml

ADAM阻害剤15 μ mol/l

GNF351 (Calbiochem #182707) 500nmol/LY39983 (Chemscene LLC #CS-0096)

500nmol/l

Urokinase 5U/ml

低分子heparin (SANOFI、クレキサン) 1U/ml

[0155] そして、前記血小板生産培地存在下で6日間培養して、血小板を産生させることにより、巨核球の培養物を生産させた。

[0156] (3) 精製血小板の製造

前記(2)で得られた巨核球の培養物について、以下の手順で、血小板を製造(精製)した。なお、同様の精製を2回実施した。

[0157] (3-1) 巨核球の培養物の濃縮

前記(2)で得られた巨核球の培養物について、培養物バッグに導入した。そして、前記培養物バッグについて、図1のように、濃縮システムに接続した。図1において、洗浄保存液バッグ1および2は、洗浄保存液を含む。前記洗浄保存液は、ピカネイト輸液(ピカーボン輸液、大塚製薬社製)に20%ACDおよび2.5%ヒト血清アルブミンを添加し、NaOHでpH7.2に調整したものを使用した。そして、下記表1にしたがって、中空糸膜(プラズマフローOP、旭化成メディカル社製)を用いて、前記巨核球の培養物を濃縮し、得られた巨核球の培養物の濃縮液を貯蔵バッグに回収した。

[0158]

[表1]

手順	開放バルブ	ポンプ 1 (rpm)	ポンプ 2 (rpm)	内容
1	2, 3, 4	-	-	洗浄保存液バッグ 1 から洗浄保存液 50mL を導入
2	1, 3, 4	-	-	洗浄保存液バッグ 1 から洗浄保存液 50mL を導入
3	5, 6	-	100	洗浄保存液バッグ 2 から洗浄保存液 500mL を導入 ポンプ 2 を 1 分間作動
4	4, 7	50	-	洗浄保存液バッグ 1 から洗浄保存液 500mL を導入 ポンプ 1 を 1 分間作動
5	1, 3, 6, 8	100	100	培養物を中空糸膜に導入
6	2, 3, 6, 8	100	100	濃縮物を貯蔵バックに導入
7	2, 3, 4	-	-	洗浄保存液バッグ 1 から洗浄保存液 50mL を導入
8	4, 8	50	-	洗浄保存液バッグ 1 から洗浄保存液 500mL を導入

[0159] (3-2) 血小板の遠心分離

まず、無菌接合装置を用いて、ACP215ディスポーザブルセットの廃液バッグを回収用バッグに置換した。前記回収用バッグは、ハイカリックIVHバック（テルモ HC-B3006A）を用いた。つぎに、前記巨核球の培養物の濃縮液に対して10%量のACD-A液（テルモ社製）を添加した。前記添加後、ACD-A液を添加した濃縮液を、細胞バッグに注入した。前記細胞バッグは、ハイカリックIVHバック（テルモ HC-B3006A）を用いた。

[0160] つぎに、無菌接合装置を用いて、ACD-A液を添加した培養物を含む細胞バッグをACP215ディスポーザブルセットに接合した。そして、ACP215をサービスマードで立ち上げ、回転数を2500rpm (350×g) にセットした。ACP215をスタートさせ、前記細胞バッグ中の培養物を約100ml/minで分離ボウルに導入した。前記分離ボウルより流出する液体成分は、回収バッグに回収した。前記細胞バッグ中の培養物の全量を分離ボウルに導入後、さらに500mlの洗浄保存液を前記分離ボウルに導入した。前記分離ボウルに前記洗浄保存液を導入後、

遠心を止めてチューブシーラーを用いて回収液（血小板を含む回収された液体成分）を含む回収バッグを切り離した。

[0161] 新しいACP215ディスポーザブルセットに、前記無菌接合装置を用いて回収液（血小板を含む）を含んだ回収バッグを接合した。ACP215を通常モードで立ち上げた。プログラム設定はWPCを選択し、機器の指示に従い、前記回収バッグを接合したACP215ディスポーザブルセットをセットした。なお、回収液を含んだ回収バッグはスタンドに設置した。

[0162] つぎに、ACP215の遠心速度を5000rpm (1398.8×g) に変更し、遠心をスタートさせた。前記分離ボウルへ前記回収液が導入され始めたとき、自動注入から手動注入に変更した。具体的には、前記回収液を約100ml/minの導入速度で前記分離ボウルに導入した。前記回収液全量を分離ボウルに添加後、さらに500mlの洗浄保存液を追加した。

[0163] (3-3) 血小板の洗浄

洗浄は、ACP215のプログラムに従って、2000mlの前記洗浄保存液で洗浄した。

[0164] (3-4) 血小板の回収

ACP215のプログラムに従って、200mlの洗浄済み血小板を血小板製剤バッグに回収した。

[0165] (3-5) 血小板の分離

前記血小板製剤バッグについて、前記中空糸膜を用いて、常法により血小板を分離し、回収用バッグに回収した。

[0166] (4) 抽出物の製造

前記巨核球またはその培養物としては、前記(1)の方法で得た不死化巨核球細胞株、前記(3-5)で得られた血小板製剤バッグに回収した血小板、および排液バッグに回収された血小板が除去された巨核球の培養物（以下、まとめて「原材料」ともいう）を用いた。血小板が除去された巨核球の培養物については、別個に調製した4サンプルを用いた（血小板除去巨核球培養物1~4）。

- [0167] 各原材料について、洗浄液で2回洗浄した。前記洗浄液は、ピカネイト輸液に約20 (v/v) %になるようにACD-A液を添加後、NaOHを添加して、pHを7.0~7.4の範囲に調整したものをを用いた。前記洗浄後、各原材料を、2000×g、10分、室温(約25℃)の条件で遠心した。前記遠心後、沈殿物を回収し、液体窒素を用いて、前記沈殿物を凍結した。つぎに、凍結した沈殿物に、細胞溶解バッファーを添加し、50rpm、4℃で30分間振盪することにより溶解した。前記細胞溶解バッファーは、市販の細胞溶解バッファー(2× Cell Lysis Buffer、RayBiotech社製、Cat.No.: AA-LYS)に、プロテアーゼインヒビターカクテル(Protease Inhibitor Cocktail、RayBiotech社製、Cat.No.: AA-PI)を添加したものをを用いた。
- [0168] 得られた溶解液について、14000×g、5分間、4℃の条件で遠心した。前記遠心後、上清を、実施例の処理物として回収した。各原材料から得られた処理物について、Pierce(商標) BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific社製)を用いて、総タンパク質濃度を測定した。この結果、不死化巨核球細胞株を用いた場合、 2.2×10^7 細胞から、2.604mgの総タンパク質が抽出された。また、血小板を用いた場合、 2.5×10^8 細胞から、1.187mgの総タンパク質が抽出された。さらに、血小板除去巨核球培養物1~4を用いた場合、 1.97×10^8 細胞、 5.25×10^8 細胞、 3.64×10^8 細胞、 6.22×10^8 細胞から、それぞれ、2.8、5.944、3.6、および4.496mgの総タンパク質が抽出された。そして、総タンパク質濃度を、5mg/mlに調整した後、各処理物について、Quantibody(登録商標) Human Growth Factor Array 1(RayBiotech社製)を用いて、成長因子(bFGF、IGFBP-1、IGFBP-2、PIGF、VEGF、GDF-15、AR、BMP-7、HGF)および成長因子受容体(SCFR、EGFR、VEGFR2)の濃度(pg/総タンパク質5mg)を測定した。これらの結果を下記表2に示す。なお、下記表2は、総タンパク質5mgあたりの濃度ということもできる。

[0169]

[表2]

	不死化 巨核球	血小板	血小板除去巨 核球培養物 1	血小板除去巨 核球培養物 2	血小板除去巨 核球培養物 3	血小板除去巨 核球培養物 4
AR	1.22	3.68	5.92	54.30	15.63	49.93
bFGF	12095.43	8204.79	71688.60	64295.53	67623.46	58957.22
BMP-7	7990.20	5963.72	4411.27	325.58	71.43	157.92
GDF-15	7301.68	9028.55	13392.39	22623.63	19756.97	17166.80
IGFBP-1	12.09	4.87	31.32	38.13	194.83	18.03
IGFBP-2	49374.40	435632.49	341979.83	168537.40	194034.44	26793.87
PIGF	26.58	6.60	71.01	44.90	23.52	66.87
SCF	2898.13	35.37	61.19	71.34	187.32	281.21
VEGF	228.55	472.63	1434.18	1218.30	1321.43	1299.05
SCF R	9440.46	953.60	2277.34	3784.83	4437.62	3593.33
EGF R	10.44	164.37	202.28	169.70	109.56	5.04
VEGF R2	134.11	343.16	522.28	1185.16	1057.00	987.55

単位：pg/mL

[0170] (5) 細胞の増殖促進活性の確認

ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を、10cmディッシュに、 $2.4 \sim 4.8 \times 10^5$ 細胞/10ml 培地/ディッシュとなるように播種した。なお、前記間葉系幹細胞としては、市販のヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (Takara Bio社製、Cat. No.: C-12977) を2回継代培養した後に、回収した細胞を用いた。前記培地は、間葉系幹細胞増殖培地2 (Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2、Takara Bio社製、Cat. No.: C-28009) に、血小板除去巨核球培養物2から調製した組成物を凍結後、溶解したものを添加した。前記組成物は、培地における前記組成物由来の総タンパク質濃度が、所定濃度 (0、125、250、または500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) となるように添加した。なお、前記培地は、維持培地である。

[0171] 前記播種後、前記間葉系幹細胞を3日間、37℃、5%CO₂の湿潤下で培養した。前記培養後、前記間葉系幹細胞を回収し、同様の条件で播種し、再度3日間、37℃、5%CO₂の湿潤下で培養した。つぎに、前記培養後の間葉系細胞を回収し、細胞数をカウントした。そして、前記播種時の細胞数を基準(1)とした際の回収時の細胞数の相対値を算出し、これを増殖活性の

相対値とした。また、前記播種時の細胞数と、前記回収時の細胞数に基づき、細胞が一回増殖するために必要な時間（倍加時間）を算出した。これらの結果を図2に示す。

[0172] 図2は、細胞の増殖活性を示すグラフである。図2において、(A)は、増殖活性を示し、(B)は、倍加時間を示す。図2(A)において、横軸は、前記組成物由来の総タンパク質濃度を示し、縦軸は、増殖活性の相対値を示す。図2(B)において、横軸は、前記組成物由来の総タンパク質濃度を示し、縦軸は、倍加時間を示し、図中の数値は、倍加時間を示す。図2(A)に示すように、本発明の組成物を添加した場合、前記組成物由来の総タンパク質濃度依存的に、間葉系幹細胞の増殖活性が増加した。また、図示していないが、前記組成物を添加していない間葉系幹細胞において、3回目の継代後の倍加時間は、21時間であった。図2(B)に示すように、本発明の組成物を添加しない場合、間葉系幹細胞の倍加時間は、約1.5倍に延伸した。これに対して、図2(B)に示すように、本発明の組成物を添加した場合、前記組成物由来の総タンパク質濃度依存的に、間葉系幹細胞が一回増殖するために必要な時間が短縮した。また、本発明の組成物が未添加の培地で培養した場合、間葉系幹細胞は、継代回数を得ると倍加時間が伸びた。これに対して、本発明の組成物を添加した場合、前記倍加時間の伸びがほぼ抑制された。このため、本発明の組成物は、細胞の増殖促進活性を示すこと、および増殖活性の低下を抑制できることがわかった。

[0173] (6) 分化促進活性の確認

前記(5)と同様にして、前記間葉系幹細胞を維持培養した。つぎに、各ウェルの培地を、等量の分化培地に交換した(分化開始0日目)。前記分化培地は、間葉系幹細胞骨芽細胞分化培地(Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium、Takara Bio社製、Cat. No.: C-28013)に血小板除去巨核球培養物2から調製した組成物を凍結後、溶解したものを添加した。前記組成物は、分化培地における前記組成物由来の総タンパク質濃度が、所定濃度(0、125、または250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)となり、かつ維持培地に

における前記組成物由来の総タンパク質濃度との組合せが、下記表3の組合せとなるように添加した。

[0174] [表3]

		分化培地における組成物由来の総タンパク質濃度 ($\mu\text{g/mL}$)		
		0	125	250
維持培地における組成物由来の総タンパク質濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	0	○	○	○
	125	NT	○	○
	250	NT	○	○
	500	○	○	○

○：実施

NT：未試験

[0175] 前記播種後、前記間葉系幹細胞を14日間、37℃、5%CO₂の湿潤下で培養した。前記培養中、3または4日毎に培地交換を行なった。分化開始後、7日目に、各サンプルについて、アルカリフォスファターゼの発現を、染色キット (TRACP & ALP double-stain Kit、Takara Bio社製、Cat. No.: MK300) を用いて染色することにより確認した。ネガティブコントロールは、前記分化培地に代えて前記維持培地のみを添加した以外は同様にして実施した。この結果を図3に示す。

[0176] 図3は、ALPの染色像を示す。図3に示すように、いずれのサンプルにおいても、ALP陽性であり、骨芽細胞への分化が誘導されていることが確認できた。また、本発明の組成物を維持培地または分化培地に添加した場合、本発明の組成物を維持培地および分化培地に添加しなかった場合およびネガティブコントロールと比較して、培養後の間葉系幹細胞では、ALPが強く染色されており、骨芽細胞への分化が促進されていることが示唆された。

[0177] また、分化開始後、14日目に、各サンプルについて、アリザリンレッドSを用いてカルシウムを染色することにより、骨基質の形成を確認した。ネ

ガティブコントロールは、前記分化培地に代えて前記維持培地のみを添加した以外は同様にして実施した。この結果を図4に示す。

[0178] 図4は、カルシウムの染色像を示す。図4に示すように、維持培地および分化培地のいずれに対しても本発明の組成物を添加していないサンプルおよびネガティブコントロールでは、カルシウムがほとんど染色されなかった。これに対して、維持培地および分化培地の少なくとも一方に本発明の組成物を添加したサンプルでは、カルシウムが染色され、骨基質の形成が生じていることが確認できた。すなわち、本発明の組成物により、骨芽細胞への分化が促進されていることがわかった。

[0179] さらに、分化開始後、10、14および18日目に、培地中のカルシウムイオン濃度を測定した。前記培地中のカルシウムイオン濃度は、イオン選択型電極（BIOPROFILE（登録商標）FLEX、NOVA BIOMEDICAL社製）を用いて測定した。なお、培養開始時の培地中のカルシウムイオン濃度は、 0.88 mmol/l であった。また、前記間葉系幹細胞が骨芽細胞および骨芽細胞に分化した場合、培地中のカルシウムを利用して、骨基質を形成する。このため、カルシウムイオン濃度の低下を指標に、骨芽細胞および骨細胞への分化を評価できる。これらの結果を図5に示す。

[0180] 図5は、培地中のカルシウムイオン濃度を示すグラフである。図5において、横軸は、維持培地および分化培地における組成物由来の総タンパク質濃度と、各測定日におけるカルシウムイオン濃度の実測値を示し、縦軸は、カルシウムイオン濃度を示す。図5に示すように、分化開始10日目において、本発明の組成物を添加したサンプルは、本発明の組成物を添加していないサンプルと同等以下のカルシウムイオン濃度であった。また、分化開始14日目において、本発明の組成物を添加したサンプルは、本発明の組成物を添加していないサンプルと比較して、顕著にカルシウムイオン濃度が低下した。そして、分化開始18日目において、本発明の組成物を添加したサンプルは、本発明の組成物を添加していないサンプルと同等以下のカルシウムイオン濃度であった。これらの結果から、本発明の組成物を添加すると、骨芽細

胞および骨細胞への分化が早期に進み、培地中のカルシウムの取り込みがより早期に開始されることがわかった。これらの結果から、本発明の組成物は、骨芽細胞への分化促進活性を有することがわかった。

[0181] [実施例 2]

本発明の組成物が、細胞の増殖促進活性および骨芽細胞への分化促進活性を有することを確認した。

[0182] (1) 細胞の増殖促進活性の確認

前記間葉系幹細胞として、2回継代培養した後、回収して凍結保存した。前記凍結保存した細胞を解凍後、1回継代培養した細胞を用い、前記維持培地における前記組成物由来の総タンパク質濃度を、所定濃度(0、0.2、1.3、31.3、62.5、または125 $\mu\text{g}/\text{ml}$)となるように添加した以外は、前記実施例1(5)と同様にして、増殖活性および倍加時間を算出した。これらの結果を図6に示す。

[0183] 図6は、細胞の増殖活性を示すグラフである。図6において、(A)は、増殖活性を示し、(B)は、倍加時間を示す。図6(A)において、横軸は、前記組成物由来の総タンパク質濃度を示し、縦軸は、増殖活性の相対値を示す。図6(B)において、横軸は前記組成物由来の総タンパク質濃度を示し、縦軸は、倍加時間を示す。図6(A)に示すように、本発明の組成物を添加した場合、前記組成物由来の総タンパク質濃度依存的に、間葉系幹細胞の増殖活性が増加し、特に、総タンパク質濃度が31.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である場合、顕著に、間葉系幹細胞の増殖活性が増加した。また、図示していないが、前記組成物を添加していない間葉系幹細胞において、3回目の継代後の倍加時間は、17時間であった。図6(B)に示すように、本発明の組成物を添加しない場合、間葉系幹細胞の倍加時間は、約1.5倍に延伸した。これに対して、図6(B)に示すように、本発明の組成物を添加した場合、前記組成物由来の総タンパク質濃度依存的に、間葉系幹細胞が一回増殖するために必要な時間が短縮し、特に、総タンパク質濃度が31.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である場合、顕著に、間葉系幹細胞が一回増殖するために必要な時間

が短縮した。また、本発明の組成物が未添加の培地で培養した場合、間葉系幹細胞は、継代回数を得ると倍加時間が延びた。これに対して、本発明の組成物を添加した場合、前記倍加時間の伸びがほぼ抑制され、この効果は、前記組成物由来の総タンパク質濃度を $31.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上とした場合、顕著であった。このため、本発明の組成物は、細胞の増殖促進活性を示すこと、および増殖活性の低下を抑制できることがわかった。

[0184] (2) 分化促進活性の確認

前記実施例 2 (1) と同様にして、前記間葉系幹細胞を維持培養した。つぎに、各ウェルの培地を、等量の分化培地に交換した (分化開始 0 日目)。前記分化培地は、間葉系幹細胞骨芽細胞分化培地に血小板除去巨核球培養物 2 から調製した組成物を凍結後、溶解したものを添加した。前記組成物は、分化培地における前記組成物由来の総タンパク質濃度が、所定濃度 (0、0.2、1.3、31.3、62.5、または $125 \mu\text{g}/\text{ml}$) となり、かつ維持培地における前記組成物由来の総タンパク質濃度との組合せが、下記表 4 の組合せとなるように添加した。

[0185]

[表4]

		分化培地における組成物由来の総タンパク質濃度 ($\mu\text{g/mL}$)					
		0	0.2	1.3	31.3	62.5	125
維持培地における組成物由来の総タンパク質濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	0	○	NT	○	○	○	○
	0.2	NT	○	○	○	○	○
	1.3	NT	NT	○	NT	○	NT
	31.3	NT	NT	NT	○	○	NT
	62.5	NT	NT	NT	NT	○	○
	125	NT	NT	NT	NT	NT	○

○ : 実施

NT : 未試験

[0186] 前記播種後、前記実施例 1 (6) と同様にして培養した。つぎに、分化開始後、14 および 18 日目に、各サンプルについて、前記実施例 1 (6) と同様にしてカルシウムを染色することにより、骨基質の形成を確認した。この結果を図 7 および 8 に示す。

[0187] 図 7 および 8 は、カルシウムの染色像を示す。図 7 および 8 に示すように、維持培地および分化培地のいずれに対しても本発明の組成物を添加していないサンプルおよびネガティブコントロールでは、カルシウムがほとんど染色されなかった。これに対して、維持培地および分化培地の少なくとも一方に本発明の組成物を添加したサンプルでは、カルシウムが染色され、骨基質の形成が生じていることが確認できた。すなわち、本発明の組成物により、骨芽細胞への分化が促進されていることがわかった。

[0188] さらに、分化開始後、6、10、14 および 18 日目に、前記実施例 1 (6) と同様にして、培地中のカルシウムイオン濃度を測定した。これらの結果を図 9 に示す。

[0189] 図9は、培地中のカルシウムイオン濃度を示すグラフである。図9において、横軸は、維持培地および分化培地における組成物由来の総タンパク質濃度と、各測定日におけるカルシウムイオン濃度の実測値を示し、縦軸は、カルシウムイオン濃度を示す。図9に示すように、分化開始6および10日目において、本発明の組成物を添加したサンプルは、本発明の組成物を添加していないサンプルと同等以下のカルシウムイオン濃度であった。また、分化開始14日目において、本発明の組成物を添加したサンプルは、本発明の組成物を添加していないサンプルと比較して、顕著にカルシウムイオン濃度が低下し、特に、前記分化培地における組成物由来の総タンパク質濃度が $1.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ のサンプルにおいて顕著であった。そして、分化開始18日目において、本発明の組成物を添加したサンプルは、本発明の組成物を添加していないサンプルと同等以下のカルシウムイオン濃度であった。これらの結果から、本発明の組成物を添加すると、骨芽細胞および骨細胞への分化が早期に進み、培地中のカルシウムの取り込みがより早期に開始されることがわかった。また、本発明の組成物による骨芽細胞への分化促進活性は、組成物由来の総タンパク質濃度が $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ と低い条件でも得られることがわかった。これらの結果から、本発明の組成物は、骨芽細胞への分化促進活性を有することがわかった。

[0190] [実施例3]

本発明の組成物が、細胞の増殖促進活性および骨芽細胞への分化促進活性を有することを確認した。

[0191] (1) 細胞の増殖促進活性の確認

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC、PromoCell社製、Cat No. C-12974) を 5×10^4 cells/wellとなるように24ウェルプレートに播種し、7日間培養した。培地交換は、3日毎に、培地の2/3の量を新たな培地に交換することにより実施した。なお、前記播種密度で培養を開始した場合、約7日程度で80%コンフルエントに達する細胞密度である。BMSCの基本培地は、10% FBSおよび1% 抗菌薬 (Ab) を含有するDMEM培地 (low-g

lucose) とした。

[0192] 前記培養開始後 24 時間において、前記実施例 1 (4) で調製した血小板除去巨核球培養物由来の組成物を、前記基本培地における前記組成物由来の総タンパク質濃度が、所定濃度 (0、125、250、または 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) となるように添加した。そして、前記組成物の添加後、3、5、または 7 日目に細胞数を、細胞数カウントキット (WST8、Cell Counting Kit-8、Dojindo 社製、Cat No. 347-07621) を用い、添付のプロトコルにして算出した。また、ALP 活性は、p-ニトロフェニルホスファート (SIGMAFAST (商標) p-ニトロフェニルホスファートタブレット、SIGMA 社製、Cat No. N1891) を用いて、405 nm における吸光度を測定することにより、検討した。そして、細胞 1 個あたりの ALP 活性値を算出した。これらの結果を、図 10 および図 11 に示す。

[0193] 図 10 は、細胞数を示すグラフである。図 10 において、横軸は、組成物添加後の日数を示し、縦軸は、細胞数を示す。また、図中の濃度は、総タンパク質濃度を示す (以下、同様。) 図 10 に示すように、本発明の組成物を含む培地で培養した場合、濃度依存的に細胞の増殖が促進された。なお、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加した群では、7 日目において、細胞数が減少しているが、これは、5 日目にコンフルエントになったためである。

[0194] つぎに、図 11 は、ALP 活性を示すグラフである。図 11 (A) において、横軸は、組成物添加後の日数を示し、縦軸は、ALP 活性 (吸光度 OD 405) を示す。図 11 (B) において、横軸は、組成物添加後の日数を示し、縦軸は、ALP 活性 (細胞数あたりの ALP 活性値) を示す。図 11 (B) に示すように、ウェル単位の場合、ALP 活性は 5 日目に最大となり、7 日目に低下した。他方、図 11 (A) に示すように、細胞単位の場合、いずれの培養条件においても、ALP 活性は、経時的に低下した。一般的に、MSC では、増殖とともに、分化が進むため、経時的に ALP 活性が上昇する。しかしながら、本発明の組成物の存在下では、強い増殖が誘導される一方、ALP 活性が抑制されることから、分化誘導は抑制されていると推定さ

れた。これらのことから、本発明の組成物は、本発明の組成物は、細胞の増殖促進活性を示すことがわかった。

[0195] (2) 分化促進活性の確認

前記実施例3(1)と同様にして、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞について、7日間培養した。

[0196] 前記培養後、各ウェルの培地を、前記基本培地、または骨芽細胞分化因子として、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のアスコルビン酸と、前記組成物とを含有する基本培地(分化培地)に交換し、2週間培養することで、骨芽細胞を誘導した。培地交換は、3日毎に、培地の $2/3$ の量を新たな培地に交換することにより実施した。前記組成物は、前記基本培地における前記組成物由来の総タンパク質濃度が、所定濃度(0、125、250、または $500\mu\text{g}/\text{ml}$)となるように添加した。前記組成物は、前記実施例1(4)で調製した血小板除去巨核球培養物由来の組成物を用いた。

[0197] 前記誘導開始日を基準として、7、10または14日に、細胞数とALP活性とを測定した。前記細胞数は、前記細胞数カウントキットを用い、添付のプロトコルにして算出した。ALP活性は、p-ニトロフェニルホスファート(SIGMAFAST(商標)p-ニトロフェニルホスファートタブレット、SIGMA社製、Cat No. N1891)を用いて、 405nm における吸光度を測定することにより、検討した。そして、細胞1個あたりのALP活性値を算出した。これらの結果を、図12および13に示す。

[0198] 図12は、細胞数を示すグラフである。図12において、横軸は、骨芽細胞の分化誘導開始後の日数を示し、縦軸は、細胞数を示す。図12(A)に示すように、骨芽細胞分化因子を含まない場合、本発明の組成物を含む培地で培養すると、経時的な細胞数の増加が観察された。他方、図12(B)に示すように、骨芽細胞分化因子を含むと、本発明の組成物を含む培地で培養した場合、経時的な細胞数の減少が濃度依存的に抑制された。

[0199] つぎに、図13は、ALP活性を示すグラフである。図13(A)および(C)において、横軸は、骨芽細胞の分化誘導開始後の日数を示し、縦軸は

、ALP活性（吸光度OD405）を示す。図13（B）および（D）において、横軸は、組成物添加後の日数を示し、縦軸は、ALP活性（細胞数あたりのALP活性値）を示す。図13（A）および（B）に示すように、骨芽細胞分化因子を含まない場合、本発明の組成物を含む培地で培養すると、経時的にALPの活性は増加するものの、本発明の組成物を含まない比較例の培地（ $0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ）との間でALP活性の差は、観察されなかった。他方、図13（C）および（D）に示すように、骨芽細胞分化因子を含む場合、本発明の組成物を含む培地で培養すると、分化誘導開始後14日目において、本発明の組成物を含まない比較例の培地（ $0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ）で培養した場合と比較して、ALP活性が有意に上昇した。なお、比較例の培地（ $0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ）について、分化誘導開始後10日目において、吸光度の上昇が見られるのは、細胞増殖による細胞数の増加に起因するものと推定される。これらの結果から、本発明の組成物は、アスコルビン酸による骨芽細胞の分化誘導系においても、骨芽細胞の分化誘導を促進できることがわかった。また、本発明の組成物は、骨芽細胞分化因子により誘導される骨芽細胞への分化誘導を促進することがわかった。したがって、本発明の組成物が、骨芽細胞への分化促進活性を有するといえる。

[0200] [実施例4]

本発明の組成物が、*in vivo*で骨形成および骨造成を促進することを確認した。

[0201] 骨形成モデルとしては、ヌードマウス頭蓋骨上で骨形成を行なうモデルを使用した。具体的には、ヌードマウス（8週齢BALB/cAJCL-nu/nu）の頭蓋骨上（骨膜下）に、全身麻酔（3種混合）下にて、本発明の組成物を人工骨材料とともに、移植試料とし、移植した。具体的には、下記4群を設定した。

・ネガティブコントロール群（ $n = 5$ ）

25mgの β -TCP（ β -リン酸三カルシウム）顆粒（ β -TCP granules、OSferion G1、Olympus Terumo社製）のみから調製した移植試料を移植した。

・ポジティブコントロール群（ $n = 9$ ）

25 mg の β -TCP 顆粒および多血小板血漿 (PRP) を移植した。多血小板血漿は、マウスの末梢血から、末梢血における血小板濃度の6倍の濃度となるように血小板を濃縮した物を用いて、移植試料を調製し、移植した。

・実施例4A (n=5)

25 mg の β -TCP 顆粒と、ポジティブコントロールと同数の細胞 (1.65×10^8 個) を含む血小板除去巨核球培養物から調製した組成物 (総タンパク質約 2 mg) を用いて、移植試料を調製し、移植した。

・実施例4B (n=16)

25 mg の β -TCP 顆粒と、ポジティブコントロールの5倍の細胞 (8.25×10^8 個) を含む血小板除去巨核球培養物から調製した組成物を用いて、移植試料を調製し、移植した。

[0202] 各人工骨材料は以下のようにして、調製した。

・ネガティブコントロール群

ダッペングラス上で、滅菌済みTCP 25mg を $50 \mu\text{l}$ bovine fibrinogen (10 mg/ml) (Sigma, F8630) と混和し、 $5 \mu\text{l}$ bovine thrombin (100U/ml) (Sigma, T9549) を添加してゲル化させた。ゲル化後は速やかに移植するため、これらの工程は、動物センター内で実施した。

・ポジティブコントロール群

低蛋白吸着性チューブにて、 $100 \mu\text{l}$ の前記多血小板血漿 (PRP) を 25 mg の β -TCP 顆粒に含浸させた。前記含浸後、 $10 \mu\text{l}$ の自己血清 (10 mg/ml) と混和し、 $5 \mu\text{l}$ thrombin (100 U/ml) を添加してゲル化させた。ゲル化後は速やかに移植するため、これらの工程は、動物センター内で実施した。

・実施例4A

低蛋白吸着性チューブにて、 $8 \mu\text{l}$ の本発明の組成物と、 $32 \mu\text{l}$ の滅菌水 (DW) を混和し、ついで、25mg TCPに含浸させた。前記含浸後、 $10 \mu\text{l}$ fibrinogen (10mg/ml) と混和し、 $5 \mu\text{l}$ thrombin (100U/ml) を添加してゲル化させた

。ゲル化後は速やかに移植するため、これらの工程は、動物センター内で実施した。

・実施例 4 B

低蛋白吸着性チューブにて、40 μ lの本発明の組成物に、25mg TCP を含浸させた。前記含浸後、10 μ l fibrinogen (10mg/ml)と混和し、5 μ l thrombin (100U/ml) を添加してゲル化させる。ゲル化後は速やかに移植するため、これらの工程は、動物センター内で実施した。

[0203] 前記移植後、4または8週目に、周囲頭蓋骨含む移植試料を摘出後、HE染色による組織学的な観察を行った。また、あわせて、骨形成または骨増生が生じている領域について、ソフトウェア (Image J) を用いてピクセル単位でカウントすることにより、骨形成量および骨造成量を検討した。なお、骨形成量は、移植試料内に新たに形成された新生骨部であり、骨造成量は、新生骨、骨髄およびその周囲の人工骨を対象領域とした。なお、骨形成量および骨増生量は、ネガティブコントロール群における骨形成量および骨増生量により補正した。これらの結果を、図14および15に示す。

[0204] 図14は、骨形成を示す写真である。図14において、各写真は、左から、実施例4A、実施例4B、ポジティブコントロール群およびネガティブコントロール群の結果を示す写真である。また、各群の写真において、上段は、倍率20倍の対物レンズで撮像した写真であり、下段は、倍率100倍の対物レンズで撮像した写真であり、上段の破線部で示した領域の拡大写真である。図14(A)～(C)に示すように、実施例4(A)および(B)と、ポジティブコントロールでは、薄いグレーの人工骨の残存部の周囲に、濃いグレーで示される領域に骨が新たに形成されていた。

[0205] つぎに、図15は、骨形成量および骨増生量を示すグラフである。図15において、(A)は、骨形成量を示し、(B)は、骨増生量を示す。図15(A)において、横軸は、移植材の移植後の期間を示し、縦軸は、骨形成量を示す。また、図15(B)において、横軸は、移植材の移植後の期間を示し、縦軸は、骨増生量を示す。図14および図15に示すように、実施例4

Aは、移植後4～8週目にかけて、ポジティブコントロール群と、同程度の新生骨形成、および新生骨周囲の骨髄や人工骨を含む骨増生を認めた。さらに、実施例4Bでは、移植後4週目において、ポジティブコントロール群を超える骨形成量および骨増生量を認めたが、移植後8週目においては、ポジティブコントロール群と、同程度骨形成量および骨増生量であった。これは、実施例4Bでは、移植後4週目において、既に、ポジティブコントロール群および実施例4Aと同程度の骨形成量および骨増生量のプラトーに達しているためと推定された。

[0206] [実施例5]

本発明の組成物が、抗炎症活性を有することを確認した。

[0207] (1) 免疫細胞の活性化

免疫細胞の活性化は、図16(A)および図17(A)に示すように実施した。具体的には、まず、24ウェルプレートに、15 ng/mlの抗ヒトCD3抗体 (eBioscience社製、Cat No. : 2045756) および5 ng/mlの抗ヒトCD28抗体 (eBioscience社製、Cat No. : 1928813) を含むリン酸緩衝液を播種し、オーバーナイト (約12時間) でインキュベートすることにより、これらの抗体をプレートに固相化した。ついで、ボランティアより採取した末梢血から末梢血単核球を、フィコール (Histopaque (登録商標) 1077、SigmaAldrich) を用いて単離した。前記末梢血単核球を、前記24ウェルプレートに、 2.5×10^6 cells/welとなるように播種し、培養を開始した。前記末梢血単核球の培地は、10% FBSおよび1% Ab含有RPMI培地 (gibco社製、Cat No. : 20621736) を用いた。

[0208] 前記培養開始後1時間に、各ウェルに、前記培地における組成物由来の総タンパク質濃度が、所定濃度 (0、125、250、または500 μ g/ml) となるように、組成物 (iMDF) を添加した。前記組成物は、前記実施例1(4)で調製した血小板除去巨核球培養物由来の組成物を用いた。前記組成物の添加後、さらに1時間または3時間培養した。前記培養後、前記末梢血単核球を回収し、ついで、mRNA抽出試薬 (Trizol (登録商標)、T

hermo Fisher Scientific社製) を用いて、前記末梢血単核球から Total RNA を抽出した。得られた RNA と、逆転写酵素 (SuperScript (商標) III First-Strand Synthesis System、Thermo Fisher Scientific社製) とを用いて、cDNA を合成した。

[0209] (2) サイトカイン発現量の測定

得られた cDNA、下記プライマーセット、および DNA ポリメラーゼ (Takara-Taq、タカラバイオ社製) を用い、qPCR 装置 (Mx3000P QPCR System、アジレント・テクノロジー株式会社製) により、各遺伝子の mRNA の発現量を測定した。前記測定後、内部標準遺伝子 (GAPDH 遺伝子) の発現量に基づき、各遺伝子の相対的な発現量を算出した。ネガティブコントロールは、抗 CD 3 抗体および抗 CD 28 抗体を固相化しなかった以外 (Unstimulated) は、同様にして実施した。これらの結果を図 16 および図 17 に示す。

[0210] ・ TNF- α 用プライマーセット

フォワードプライマー (配列番号 1)

5'-AATGGCGTGGAGCTGAGA-3'

リバースプライマー (配列番号 2)

5'-TAGACCTGCCCAGACTCGG-3'

・ IFN- γ 用プライマーセット

フォワードプライマー (配列番号 3)

5'-CTGTTACTGCCAGGACCCAT-3'

リバースプライマー (配列番号 4)

5'-ACACTCTTTTGGATGCTCTGGT-3'

・ IL-1 β 用プライマーセット

フォワードプライマー (配列番号 5)

5'-CACAGACCTTCCAGGAGAAT-3'

リバースプライマー (配列番号 6)

5'-TTCAACACGCAGGACAGGTA-3'

- ・ I L - 6 用 プライマー セット
フォワードプライマー（配列番号 7）
5' -GTACATCCTCGACGGCATC-3'
リバープライマー（配列番号 8）
5' -AGCCACTGGTTCTGTGCCT-3'
- ・ G A P D H 用 プライマー セット
フォワードプライマー（配列番号 9）
5' -GGAGTCCACTGGCGTCTTCAC-3'
リバープライマー（配列番号 10）
5' -GCTGATGATCTTGAGGCTGTTGTC-3'

[0211] 図 16 および図 17 は、実験の概要およびサイトカイン遺伝子の発現量を示す模式図およびグラフである。図 16 (B) ~ (E) および図 17 (B) ~ (E) において、横軸は、サンプルの種類を示し、縦軸は、各遺伝子の相対的発現量を示す。図 17 (B) ~ (E) に示すように、本発明の組成物は、刺激後 3 時間において、濃度依存的に、末梢血単核球による TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β および IL-6 の発現誘導を抑制した。他方、図 16 (B) ~ (E) に示すように、本発明の組成物は、刺激後 1 時間において、濃度依存的に、末梢血単核球による TNF- α 、IL-1 β および IL-6 の発現誘導を抑制した。なお、刺激後 1 時間においては、IFN- γ の発現誘導が抑制されていないが、刺激後 3 時間においては、IFN- γ の発現誘導が抑制されていることから、本発明の組成物による IFN- γ の発現誘導の抑制は、他の炎症性サイトカインと比較して、遅いタイミングで効果が表れることがわかった。本実施例において使用した抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体は、T 細胞を活性化することから、本発明の組成物は、T 細胞等の免疫細胞の活性化を、そのサイトカイン遺伝子の発現誘導を抑制することにより、抑制すると推定された。

[0212] [実施例 6]

本発明の組成物が、in vivo で頭蓋骨欠損部位の骨形成および骨造成を促進

することを確認した。

[0213] 骨形成モデルとしては、ヌードラット頭蓋骨欠損部で骨形成を行なうモデルを使用した。具体的には、ヌードラット（8週齢、F344/NJcl-rnu/nu）の頭蓋骨に、全身麻酔（3種混合）下にて、4 mmの欠損部位を作成し、本発明の組成物を人工骨材料とともに、移植試料とし、移植した。具体的には、下記2群を設定した。

・ネガティブコントロール群（n = 17）

径4 mmのリン酸オクタカルシウム（Octacalcium phosphate : OCP）/Collagen（Col）担体にPBSを含浸させ、調製した移植試料を移植した。

・実施例6（n = 8）

8. 2.5×10^8 個の多血小板血漿に相当する血小板除去巨核球培養物から調製した組成物（総タンパク質約25 mg）をOCP/Col担体に含浸・吸着させ、移植試料を調製し、移植した。

[0214] 各人工骨材料は以下のようにして、調製した。

・ネガティブコントロール群

OCP顆粒（径300～500 μ m）と、3%ブタ由来テロコラーゼンを混合し、前記混合後、凍結乾燥を行った。前記凍結乾燥後、熱架橋を行い、OCP/Col担体（OCP担体、重量比77%OCP含有；直径5 mm、厚さ1 mm）を作製した。

・実施例6

20 μ lの本発明の組成物（8. 2.5×10^8 個の多血小板血漿に相当）をOCP担体に含浸させ、本発明の組成物を含んだOCP担体を得た。

[0215] ネガティブコントロール群および実施例6について、前記欠損部位に移植時を基準として、4または8週目に、周囲頭蓋骨含む移植試料を摘出後、得られた摘出部について、 μ CT撮影を行った。前記撮影後、前記摘出部から標本作製し、HE染色またはマッソントリクローム（Masson trichrome）染色による組織学的な観察、および免疫染色を行った。また、移植材料から新生された骨（新生骨）の骨量および骨塩量と、欠損部位の作成時に摘出した

骨の骨量 (B_S) に対する移植材料から新生された骨の骨量 (B_R) との比 (B_R/B_S) と、骨密度とを評価した。前記評価では、3D骨解析ソフト (TRI/3D-BON; Ratoc System Engineering社製) を用い、骨形態 (骨量: BV (cm^3)、骨塩量: BMC (mg)、骨密度: BMD (mg/cm^3)) の計測を行った。前記欠損部位の作成時に摘出した骨の骨量 (B_S) に対する移植材料から新生された骨の骨量 (B_R) との比 (B_R/B_S) は、欠損骨量を100%とした場合の比として、算出した。これらの結果を、図18および図19に示す。

[0216] 図18は、移植後4週目における、骨形成を示す写真である。図18において、各写真は、上段は、ネガティブコントロール群を示し、下段は、実施例6の群の結果を示す写真である。また、各群の写真において、左から、前記摘出部全体、前記欠損部位のうち左側、前記欠損部位のうち右側、および前記摘出部のうち欠損部位を含む断面の写真である。図18に示すように、実施例6の群では、頭蓋骨の欠損部位に、骨が新たに形成されていたことがわかった。

[0217] つぎに、図19は、移植後4週目における、骨量、骨塩量、欠損骨量と新生骨量との比、および骨密度を示すグラフである。図19において、(A) は、骨量を示し、(B) は、骨塩量を示し、(C) は、欠損骨量と新生骨量との比 (B_R/B_S) を示し、(D) は、骨密度を示す。図19(A)において、横軸は、実験群の種類を示し、縦軸は、骨量 (BV) (cm^3) を示す。図19(B)において、横軸は、実験群の種類を示し、縦軸は、骨塩量 (BMC) (mg) を示す。図19(C)において、横軸は、実験群の種類を示し、縦軸は、欠損骨量と新生骨量との比 (%) を示す。図19(D)において、横軸は、実験群の種類を示し、縦軸は、骨密度 BMD (mg/cm^3) を示す。図19に示すように、ネガティブコントロール群と比べて、実施例6は、欠損部の左右共に、骨量、骨塩量、欠損骨量と新生骨量との比、および骨密度が増加した。以上のことから、本発明の組成物は、頭蓋骨の欠損部位に、骨を新たに形成できることがわかった。

[0218] 以上のことから、本発明の組成物は、骨形成および骨増生を誘導できること、およびその成分含有量を増加させることにより、骨形成および骨増生を促進できることがわかった。

[0219] 以上、実施形態および実施例を参照して本発明を説明したが、本発明は、上記実施形態および実施例に限定されるものではない。本発明の構成や詳細には、本発明の範囲内で当業者が理解し得る様々な変更をすることができる。

[0220] この出願は、2020年10月27日に提出された日本出願特願2020-180042を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

[0221] <付記>

上記の実施形態および実施例の一部または全部は、以下の付記のように記載されうるが、以下には限られない。

(付記1)

巨核球またはその培養物の処理物を含む、骨形成組成物。

(付記2)

前記処理物は、巨核球またはその培養物の細胞画分の抽出物である、付記1記載の骨形成組成物。

(付記3)

前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、2000~20000pgの塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)を含む、付記1または2記載の骨形成組成物。

(付記4)

前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、8000~80000pgのインスリン様増殖因子結合タンパク質-2(IGFBP-2)を含む、付記1から3のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記5)

前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、1~60pgの胎盤増殖因子(

P I G F) を含む、付記 1 から 4 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 6)

前記処理物は、総タンパク質 1 m g あたり、2 0 0 ~ 2 0 0 0 p g の幹細胞因子受容体 (S C F R) を含む、付記 1 から 5 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 7)

前記処理物は、総タンパク質 1 m g あたり、2 0 ~ 8 0 0 p g の血管内皮増殖因子 (V E G F) を含む、付記 1 から 6 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 8)

前記処理物は、総タンパク質 1 m g あたり、2 0 ~ 4 0 0 p g の血管内皮増殖因子受容体 2 (V E G F R 2) を含む、付記 1 から 7 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 9)

前記処理物は、総タンパク質 1 m g あたり、1 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 p g の分化増殖因子 - 1 5 (G D F - 1 5) を含む、付記 1 から 8 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 1 0)

前記処理物は、総タンパク質 1 m g あたり、0 ~ 1 0 0 0 p g の骨形成タンパク質 - 7 (B M P - 7) を含む、付記 1 から 9 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 1 1)

前記処理物は、総タンパク質 1 m g あたり、0 ~ 1 6 p g のアンフィレグリン (A R) を含む、付記 1 から 1 0 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 1 2)

前記処理物は、総タンパク質 1 m g あたり、0 ~ 6 0 p g の上皮成長因子受容体 (E G F R) を含む、付記 1 から 1 1 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 1 3)

前記処理物は、総タンパク質 1 m g あたり、0 ~ 1 0 0 p g の肝臓増殖因子 (H G F) を含む、付記 1 から 1 2 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 1 4)

前記処理物は、総タンパク質 1 m g あたり、0 ~ 2 0 0 p g のインスリン様増殖因子結合タンパク質-1 (I G F B P - 1) を含む、付記 1 から 1 3 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 1 5)

細胞の増殖促進活性を有する、付記 1 から 1 4 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 1 6)

前記細胞は、間葉系幹細胞である、付記 1 5 記載の骨形成組成物。

(付記 1 7)

骨芽細胞の前駆細胞から骨芽細胞への分化促進能を有する、付記 1 から 1 6 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 1 8)

前記骨芽細胞の前駆細胞は、間葉系幹細胞である、付記 1 7 記載の骨形成組成物。

(付記 1 9)

前記巨核球の培養物は、血小板が除去された培養物である、付記 1 から 1 8 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 2 0)

前記巨核球は、不死化巨核球である、付記 1 から 1 9 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 2 1)

前記不死化巨核球は、外来性の B M I 1 遺伝子、M Y C 遺伝子、および B c l - x L 遺伝子を含む巨核球である、付記 2 0 記載の骨形成組成物。

(付記 2 2)

前記巨核球は、in vitroで誘導された巨核球である、付記 1 から 2 1 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 2 3)

前記巨核球は、多能性細胞由来である、付記 1 から 2 2 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 2 4)

前記多能性細胞は、人工多能性幹 (iPS) 細胞である、付記 2 3 記載の骨形成組成物。

(付記 2 5)

前記処理物は、

巨核球またはその培養物を処理し、

前記処理は、濃縮処理、乾燥処理、凍結処理、凍結乾燥処理、溶媒処理、界面活性剤処理、酵素処理、タンパク質分画抽出処理、超音波処理、および／または破碎処理である、付記 1 から 2 4 のいずれかに記載の骨形成組成物。

(付記 2 6)

前記処理物は、

前記巨核球またはその培養物から血小板を除去し、

前記血小板が除去された巨核球またはその培養物を処理する、付記 2 5 記載の骨形成組成物。

(付記 2 7)

前記処理物は、

前記血小板が除去された巨核球またはその培養物を保存し、

前記保存された巨核球またはその培養物を処理する、付記 2 6 記載の骨形成組成物。

(付記 2 8)

前記処理物は、

前記巨核球またはその培養物を保存し、

前記保存された巨核球またはその培養物を破砕処理する、付記 27 記載の骨形成組成物。

(付記 29)

骨形成組成物と、骨形成の足場材料とを含み、前記骨形成組成物は、付記 1 から 28 のいずれかに記載の骨形成組成物である、骨形成キット。

(付記 30)

前記足場材料は、生体適合性および／または生分解性を示す、付記 29 記載のキット。

(付記 31)

前記足場材料は、コラーゲン、ゼラチン、アルブミン、ケラチン、デキストラン、カルボキシメチルセルロース、キサンタンガム、キトサン、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヒアルロン酸、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸とポリ乳酸の共重合体、ポリヒドロキシ酪酸、ポリジオキサノン、ポリカプロラクトン、ポリブチレンサクシネート、リン酸カルシウム、ハイドロキシアパタイト、ポリエーテルケトン、およびポリエーテルエーテルケトンからなる群から選択される少なくとも 1 つから構成される、付記 29 または 30 記載のキット。

(付記 32)

前記足場材料は、多孔質構造を有する、付記 29 から 31 のいずれかに記載のキット。

(付記 33)

生理活性物質を含む、付記 29 から 32 のいずれかに記載のキット。

(付記 34)

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、表皮増殖因子 (EGF)、線維芽増殖因子 (FGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、インスリン様成長因子 (IGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、増殖分化因子-5 (GDF5)、赤血球生成促進因子 (EPO)、形質転

換増殖因子（TGF）および骨形成タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つを含む、付記29から33のいずれかに記載のキット。

（付記35）

付記1から28のいずれかに記載の骨形成組成物を含む、骨芽細胞の分化促進組成物。

（付記36）

巨核球またはその培養物の処理物を含む、免疫細胞の活性化抑制組成物。

（付記37）

前記処理物は、巨核球またはその培養物の細胞画分の抽出物である、付記36記載の免疫細胞の活性化抑制組成物。

（付記38）

前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、2000～20000pgの塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）を含む、付記36または37記載の免疫細胞の活性化抑制組成物。

（付記39）

前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、8000～80000pgのインスリン様増殖因子結合タンパク質-2（IGFBP-2）を含む、付記36から38のいずれか一項に記載の免疫細胞の活性化抑制組成物。

（付記40）

前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、1～60pgの胎盤増殖因子（PIGF）を含む、付記36から39のいずれか一項に記載の免疫細胞の活性化抑制組成物。

（付記41）

前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、200～2000pgの幹細胞因子受容体（SCFR）を含む、付記36から40のいずれか一項に記載の免疫細胞の活性化抑制組成物。

（付記42）

前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、20～800pgの血管内皮増

殖因子（VEGF）を含む、付記36から41のいずれか一項に記載の免疫細胞の活性化抑制組成物。

（付記43）

前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、20～400pgの血管内皮増殖因子受容体2（VEGFR2）を含む、付記36から42のいずれか一項に記載の免疫細胞の活性化抑制組成物。

（付記44）

前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、1000～10000pgの分化増殖因子-15（GDF-15）を含む、付記36から43のいずれか一項に記載の免疫細胞の活性化抑制組成物。

（付記45）

前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、0～16pgのアンフィレグリン（AR）を含む、付記36から44のいずれか一項に記載の免疫細胞の活性化抑制組成物。

（付記46）

前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、0～60pgの上皮成長因子受容体（EGFR）を含む、付記36から45のいずれか一項に記載の免疫細胞の活性化抑制組成物。

（付記47）

前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、0～100pgの肝臓増殖因子（HGF）を含む、付記36から46のいずれか一項に記載の免疫細胞の活性化抑制組成物。

（付記48）

前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、0～200pgのインスリン様増殖因子結合タンパク質-1（IGFBP-1）を含む、付記36から47のいずれか一項に記載の免疫細胞の活性化抑制組成物。

（付記49）

前記免疫細胞は、T細胞である、付記36から48のいずれか一項に記載の

免疫細胞の活性化抑制組成物。

(付記 5 0)

前記巨核球は、不死化巨核球である、付記 3 6 から 4 9 のいずれか一項に記載の免疫細胞の活性化抑制組成物。

(付記 5 1)

前記巨核球は、in vitroで誘導された巨核球である、付記 3 6 から 5 0 のいずれか一項に記載の免疫細胞の活性化抑制組成物。

(付記 5 2)

付記 3 6 から 5 1 のいずれか一項に記載の免疫細胞の活性化抑制組成物を含む、抗炎症組成物。

(付記 5 3)

付記 1 から 2 8 のいずれかに記載の骨形成組成物を使用する、骨芽細胞の分化促進方法。

(付記 5 4)

前記骨形成組成物を、in vitroまたはin vivoで使用する、付記 5 3 記載の骨芽細胞の分化促進方法。

(付記 5 5)

付記 3 5 記載の骨芽細胞の分化促進組成物を使用する、骨芽細胞の分化促進方法。

(付記 5 6)

前記骨芽細胞の分化促進組成物を、in vitroまたはin vivoで使用する、付記 5 5 記載の骨芽細胞の分化促進方法。

(付記 5 7)

付記 3 6 から 5 1 のいずれかに記載の免疫細胞の活性化抑制組成物を使用する、免疫細胞の活性化抑制方法。

(付記 5 8)

前記免疫細胞の活性化抑制組成物を、in vitroまたはin vivoで使用する、付記 5 7 記載の骨芽細胞の分化促進方法。

(付記59)

付記52記載の抗炎症組成物を使用する、炎症の抑制方法。

(付記60)

前記抗炎症組成物を、in vitroまたはin vivoで使用する、付記59記載の炎症の抑制方法。

(付記61)

骨形成のために使用するための、巨核球またはその培養物の処理物を有効成分として含む、組成物。

(付記62)

骨芽細胞の分化促進のために使用するための、巨核球またはその培養物の処理物を有効成分として含む、組成物。

(付記63)

免疫細胞の活性化抑制のために使用するための、巨核球またはその培養物の処理物を有効成分として含む、組成物。

(付記64)

炎症の抑制のために使用するための、巨核球またはその培養物の処理物を有効成分として含む、組成物。

産業上の利用可能性

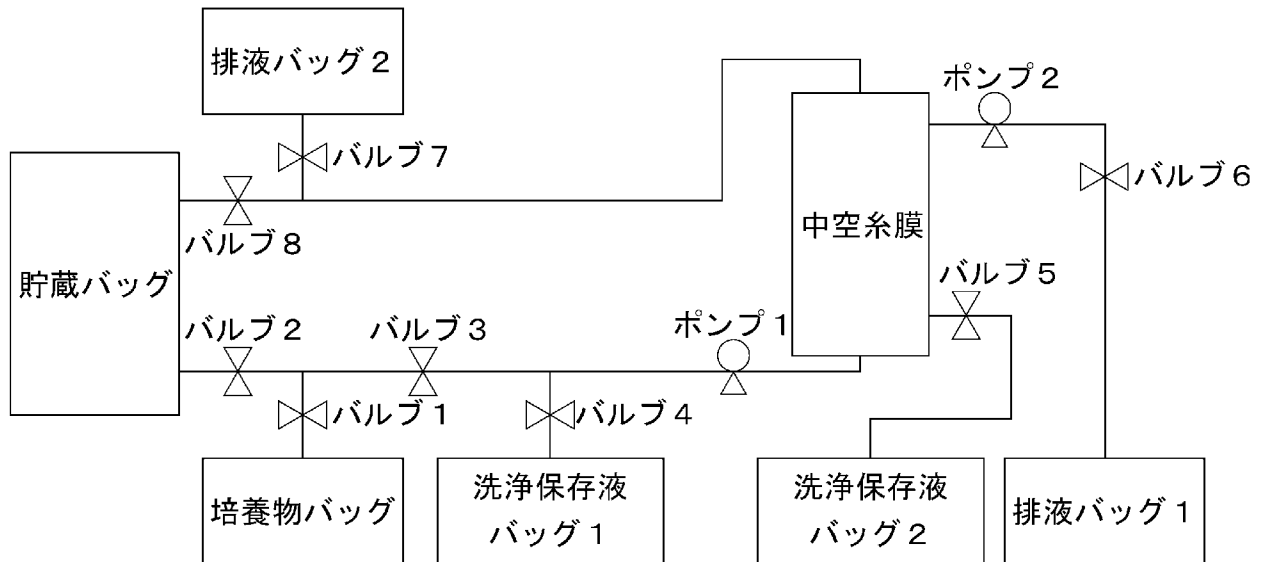
[0222] 以上のように、本発明によれば、細細胞由来の骨形成活性を有する組成物を提供できる。また、本発明の組成物は、例えば、細胞の増殖促進活性および骨芽細胞への分化促進活性を有する。このため、本発明は、医薬分野、再生医療分野等において極めて有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 巨核球またはその培養物の処理物を含む、骨形成組成物。
- [請求項2] 前記処理物は、巨核球またはその培養物の細胞画分の抽出物である、請求項1記載の骨形成組成物。
- [請求項3] 前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、2000～20000pgの塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）を含む、請求項1または2記載の骨形成組成物。
- [請求項4] 前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、8000～80000pgのインスリン様増殖因子結合タンパク質-2（IGFBP-2）を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の骨形成組成物。
- [請求項5] 前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、1～60pgの胎盤増殖因子（PIGF）を含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の骨形成組成物。
- [請求項6] 前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、200～2000pgの幹細胞因子受容体（SCFR）を含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の骨形成組成物。
- [請求項7] 前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、20～800pgの血管内皮増殖因子（VEGF）を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の骨形成組成物。
- [請求項8] 前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、20～400pgの血管内皮増殖因子受容体2（VEGFR2）を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の骨形成組成物。
- [請求項9] 前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、1000～10000pgの分化増殖因子-15（GDF-15）を含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の骨形成組成物。
- [請求項10] 前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、0～16pgのアンフィレグリン（AR）を含む、請求項1から9のいずれか一項に記載の骨形成組成物。

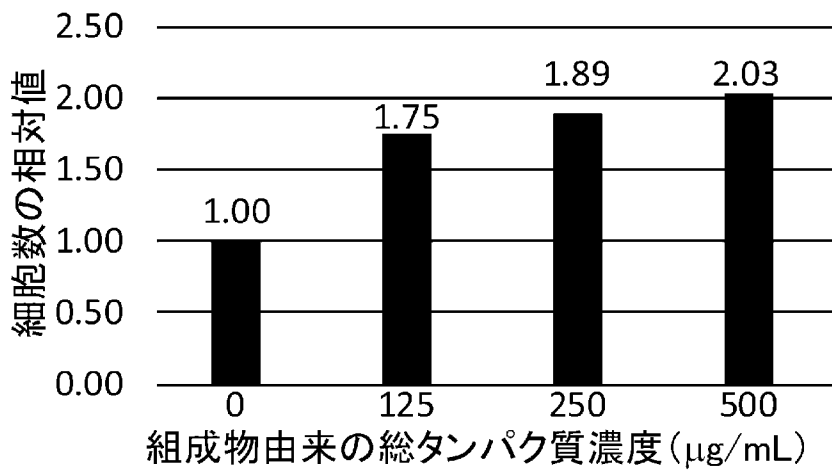
- [請求項11] 前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、0～60pgの上皮成長因子受容体（EGFR）を含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の骨形成組成物。
- [請求項12] 前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、0～100pgの肝臓増殖因子（HGF）を含む、請求項1から11のいずれか一項に記載の骨形成組成物。
- [請求項13] 前記処理物は、総タンパク質1mgあたり、0～200pgのインスリン様増殖因子結合タンパク質-1（IGFBP-1）を含む、請求項1から12のいずれか一項に記載の骨形成組成物。
- [請求項14] 細胞の増殖促進活性を有する、請求項1から13のいずれか一項に記載の骨形成組成物。
- [請求項15] 前記細胞は、間葉系幹細胞である、請求項14に記載の骨形成組成物。
- [請求項16] 骨芽細胞の前駆細胞から骨芽細胞への分化促進能を有する、請求項1から15のいずれか一項に記載の骨形成組成物。
- [請求項17] 前記骨芽細胞の前駆細胞は、間葉系幹細胞である、請求項16に記載の骨形成組成物。
- [請求項18] 前記巨核球は、不死化巨核球である、請求項1から17のいずれか一項に記載の骨形成組成物。
- [請求項19] 前記巨核球は、in vitroで誘導された巨核球である、請求項1から18のいずれか一項に記載の骨形成組成物。
- [請求項20] 骨形成組成物と、骨形成の足場材料とを含み、前記骨形成組成物は、請求項1から19のいずれか一項に記載の骨形成組成物である、骨形成キット。

[図1]

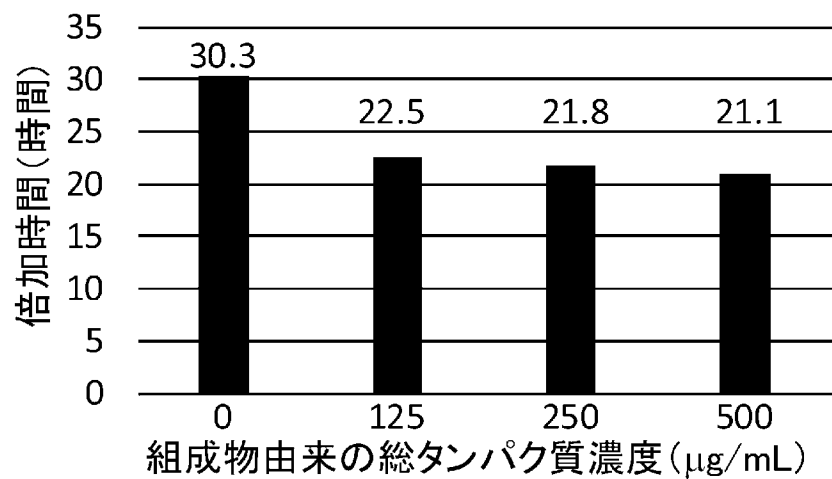


[図2]

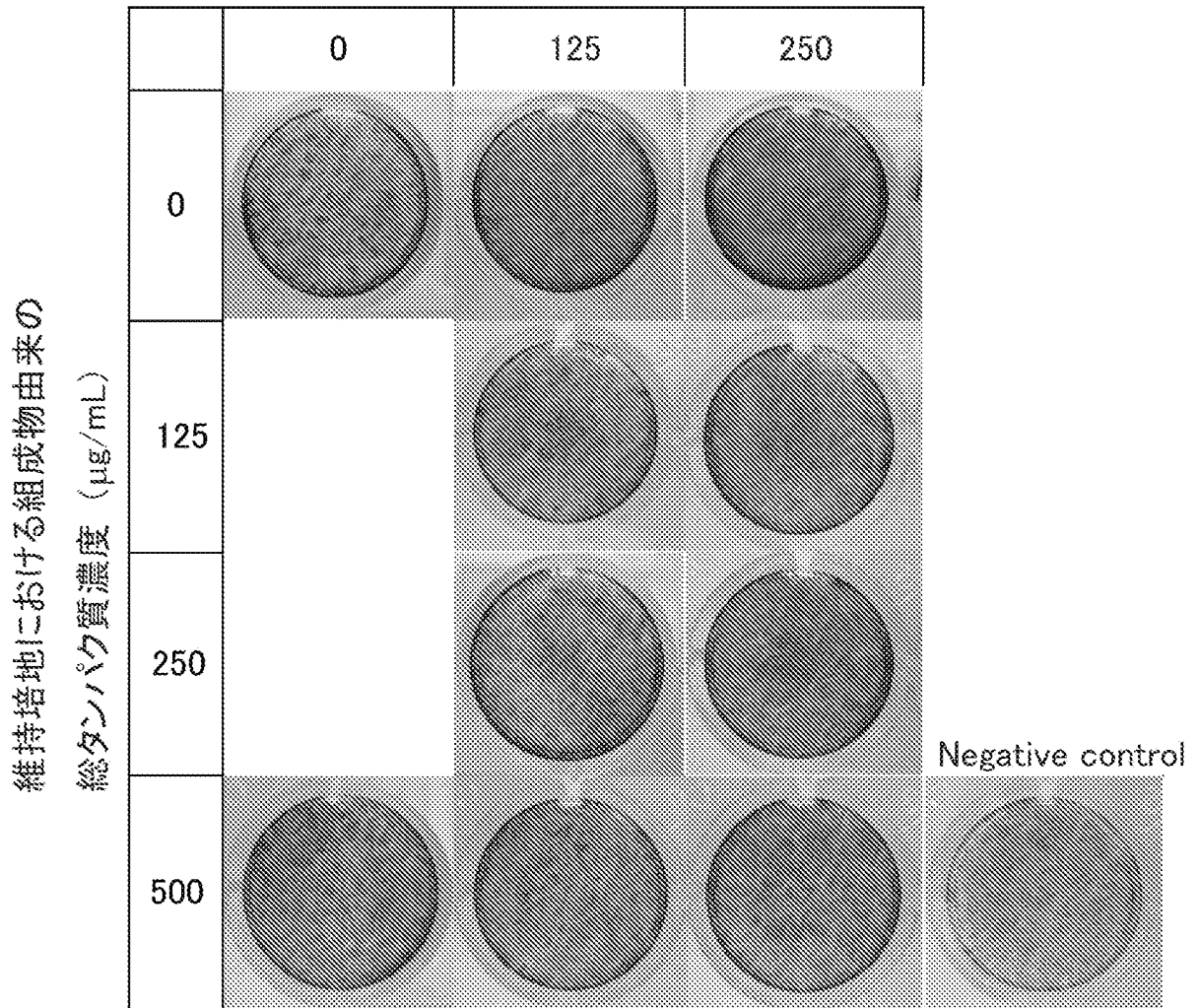
(A)



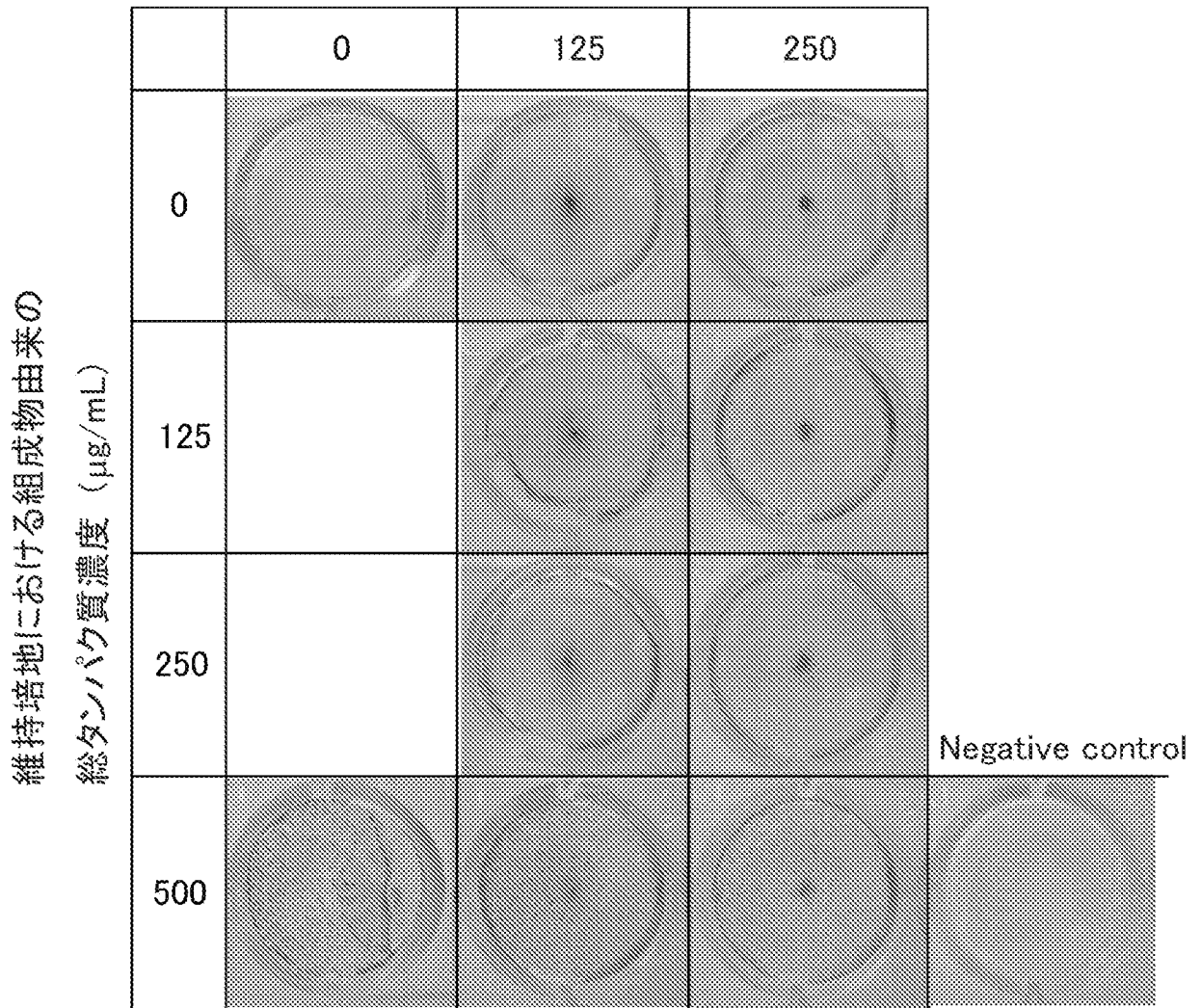
(B)



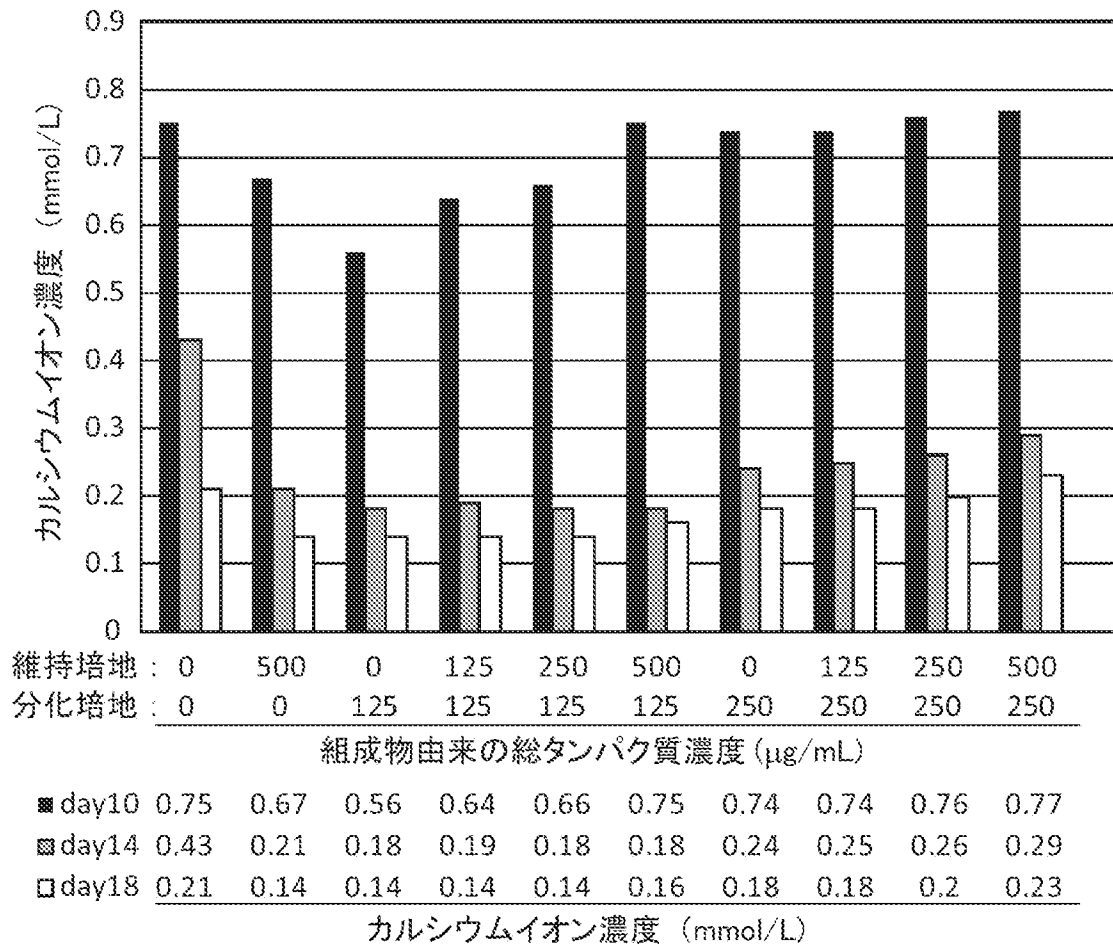
[図3]

分化培地における組成物由来の
総タンパク質濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

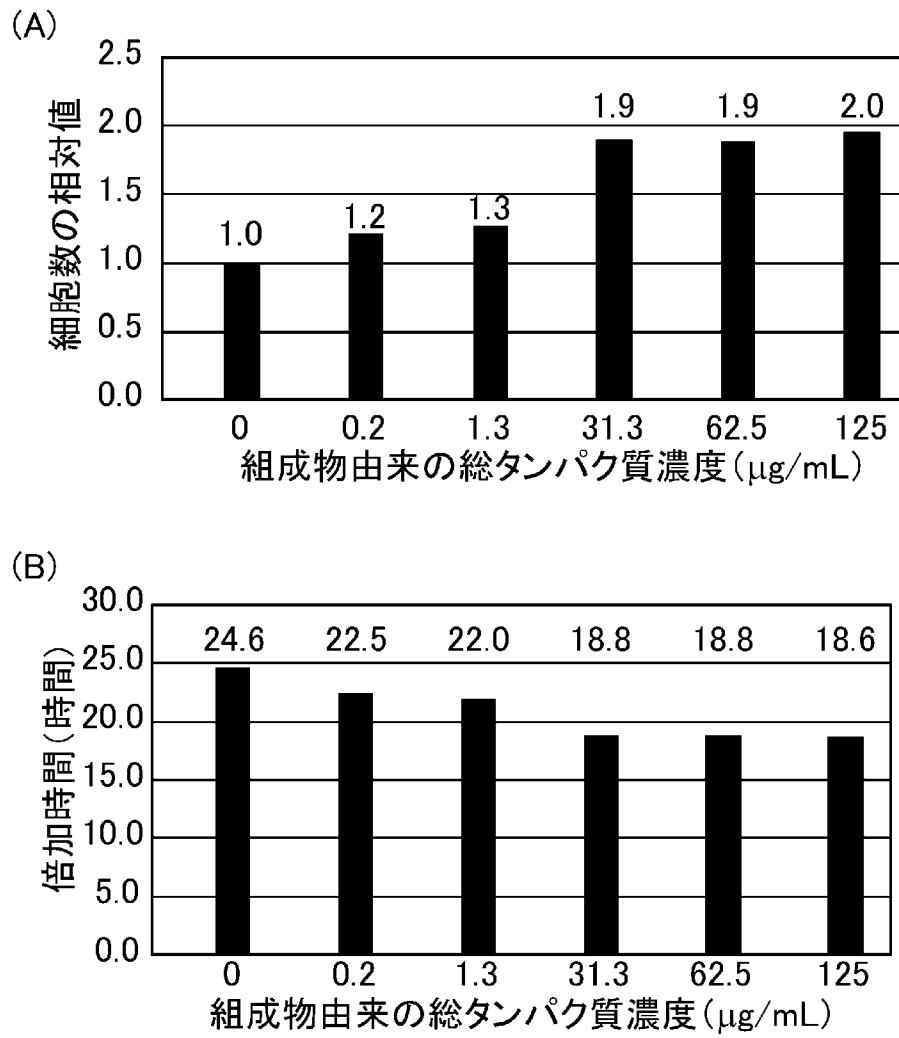
[図4]

分化培地における組成物由来の
総タンパク質濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

[図5]

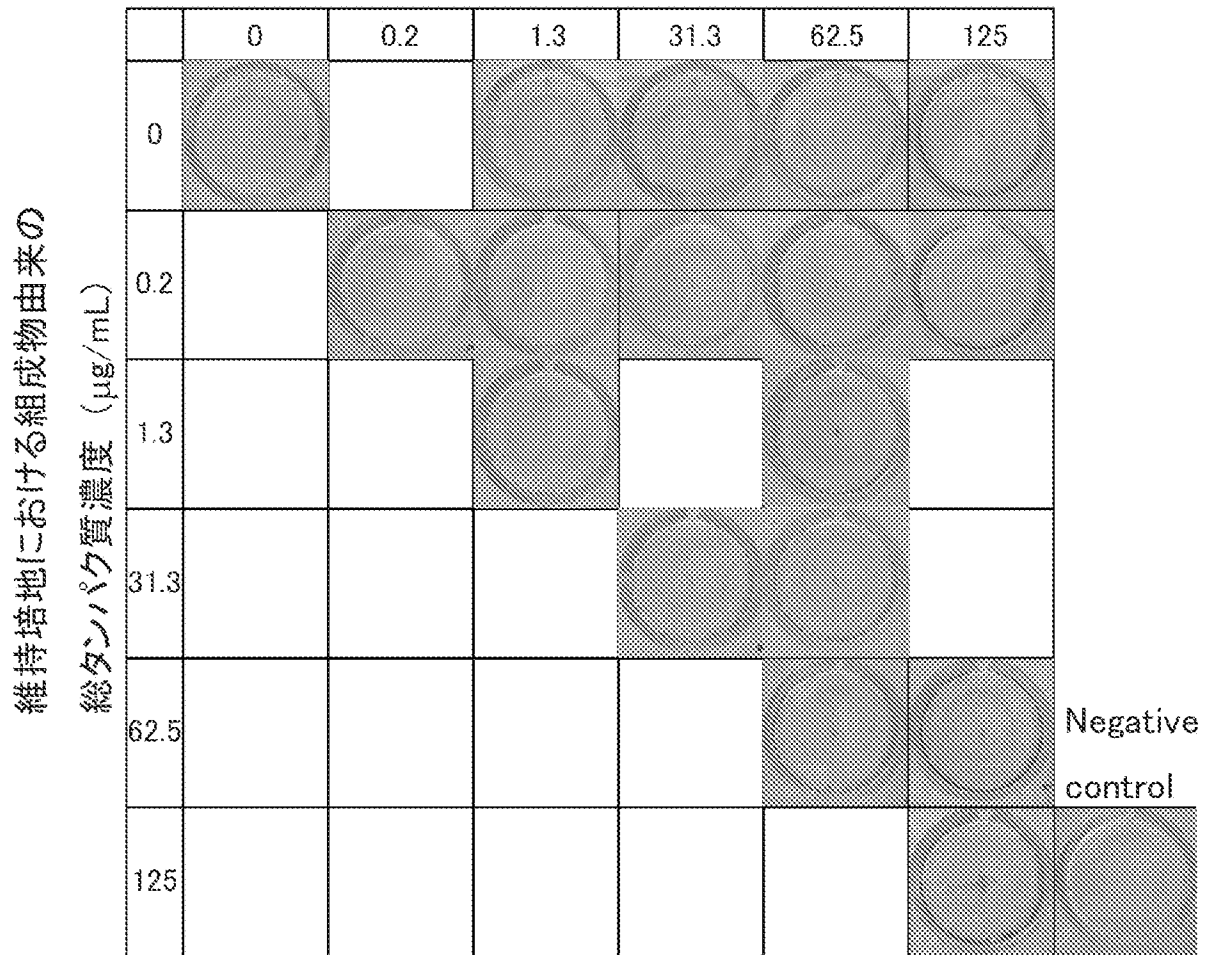


[図6]



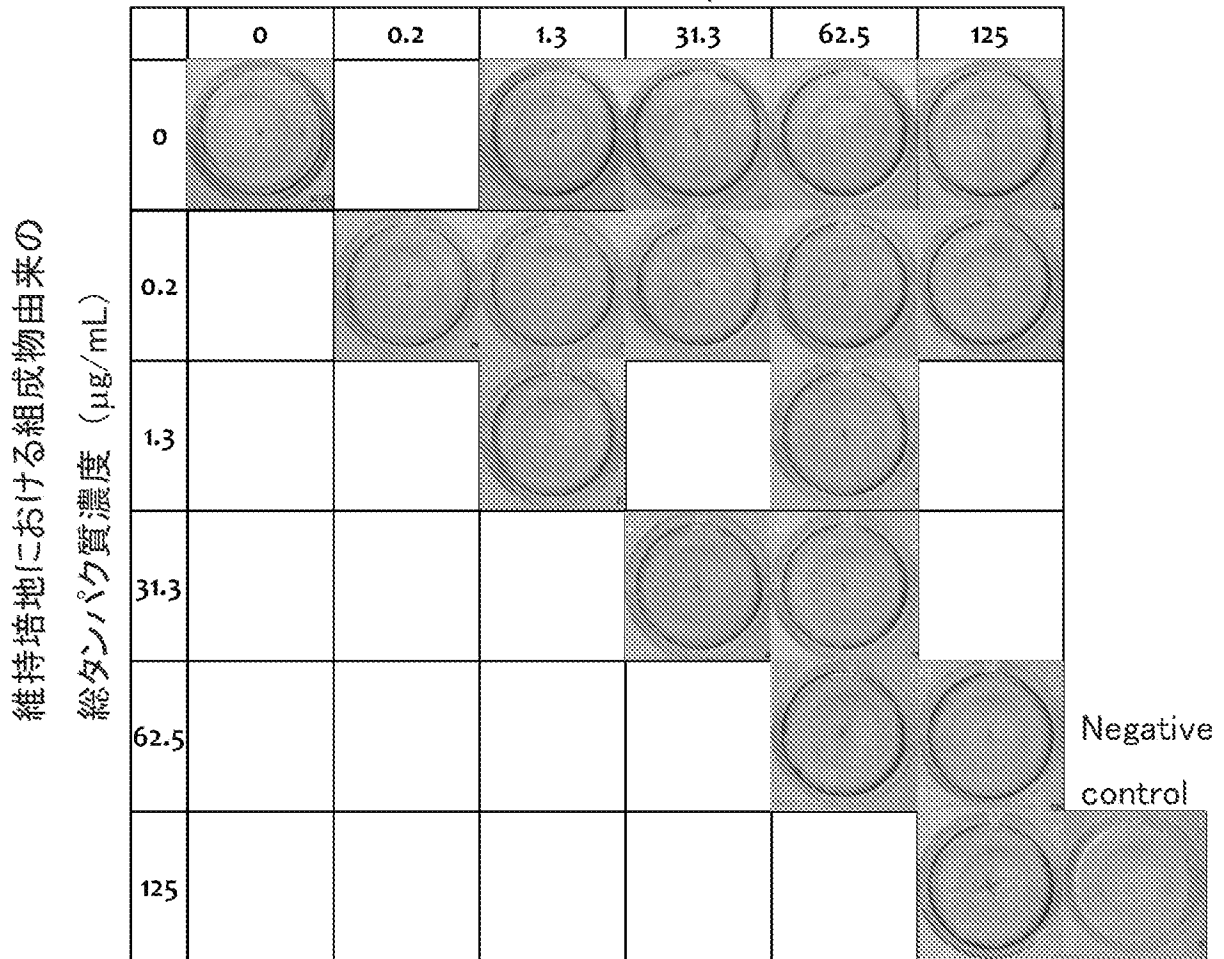
[図7]

分化培地における組成物由来の
総タンパク質濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

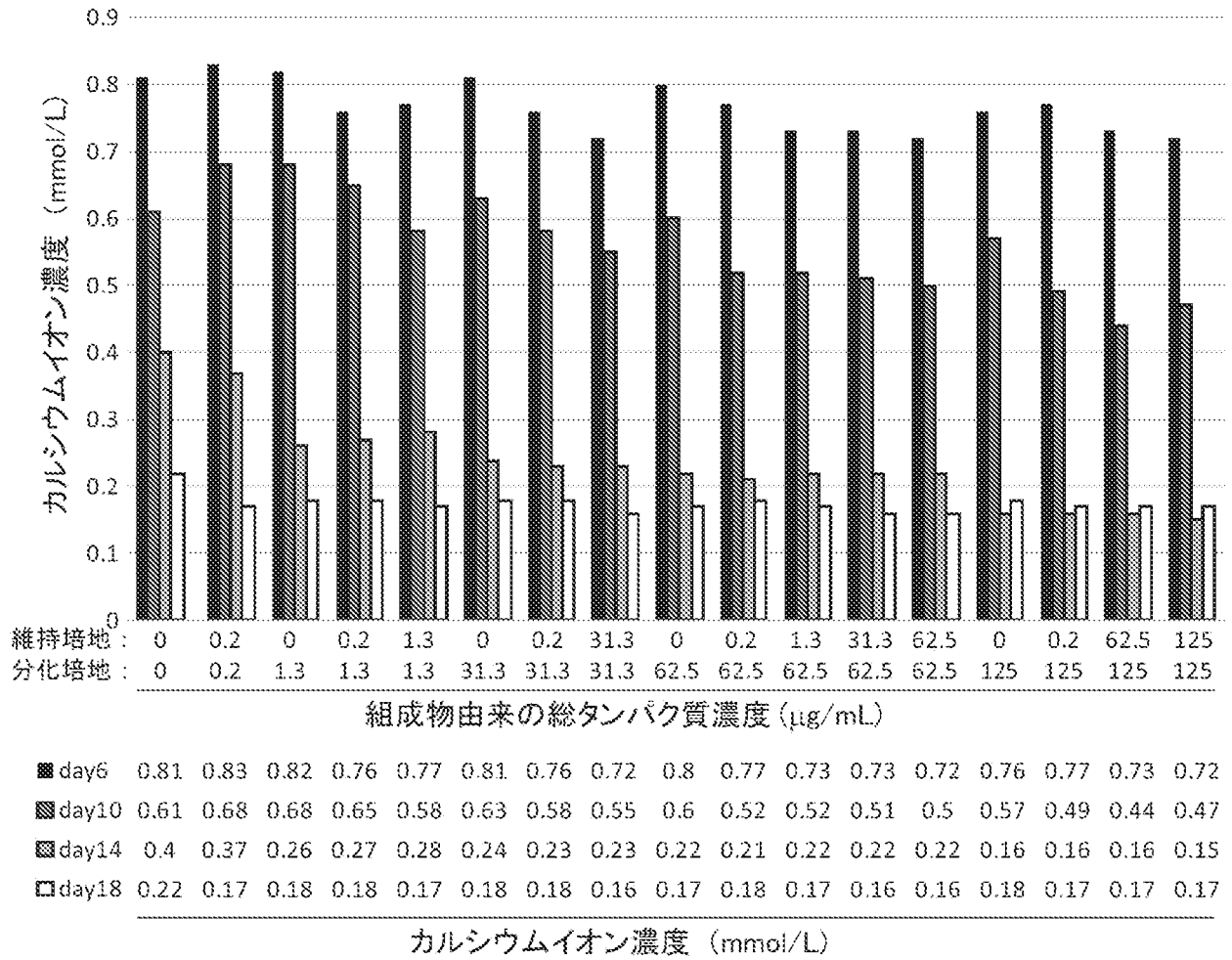


[図8]

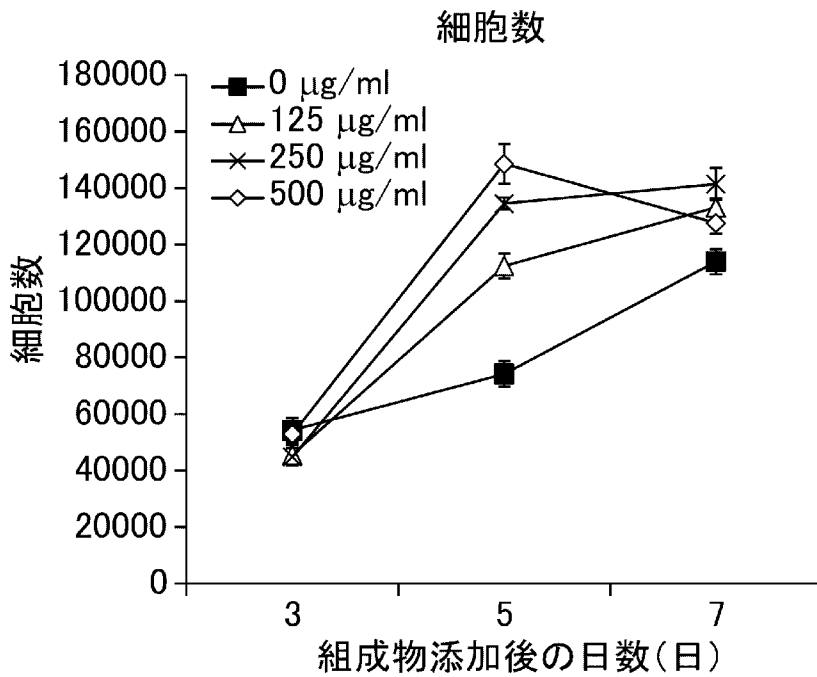
分化培地における組成物由来の
総タンパク質濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)



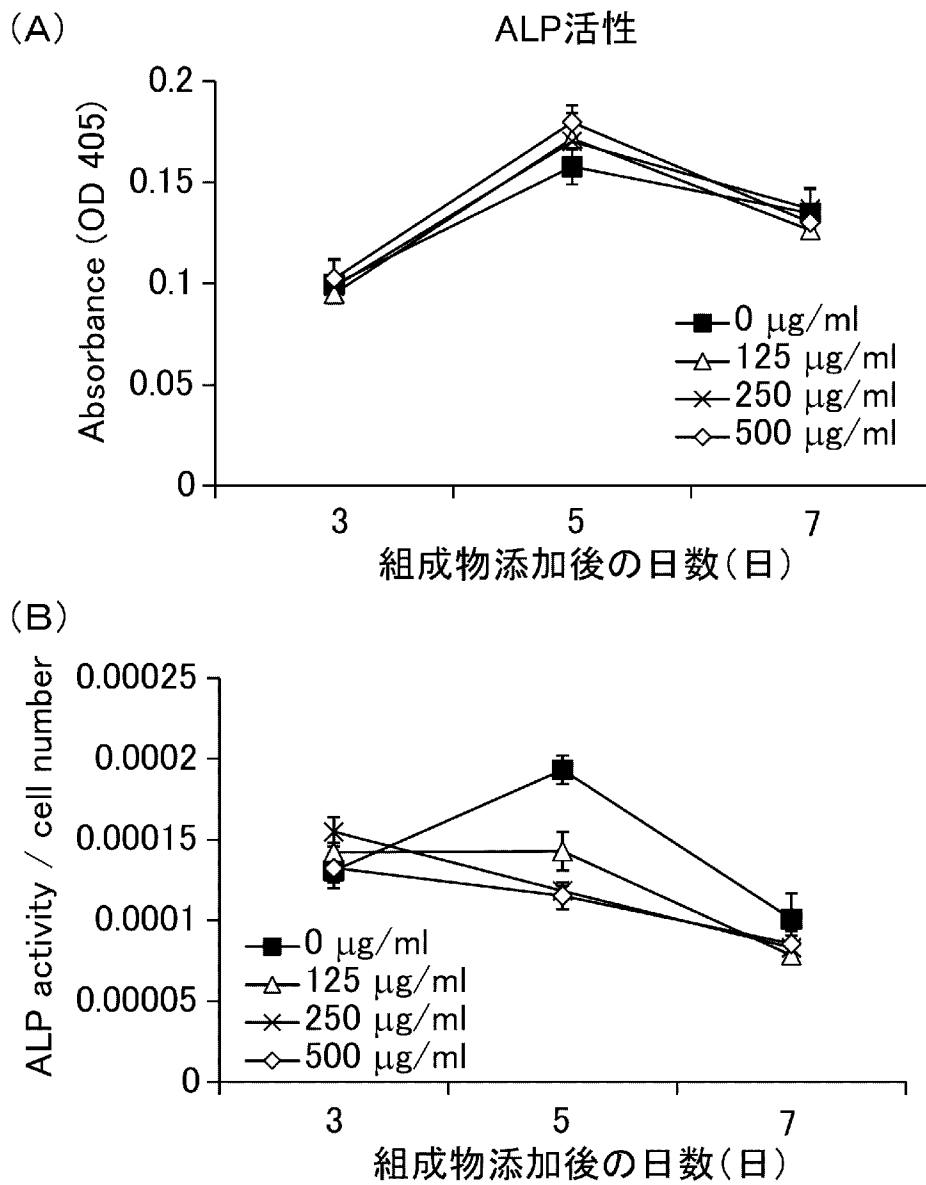
[図9]



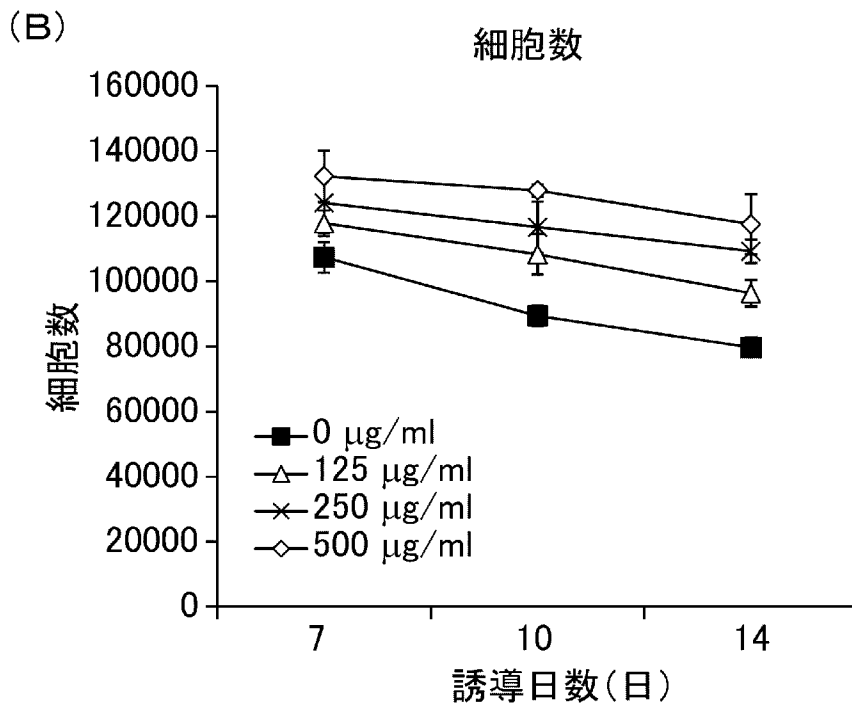
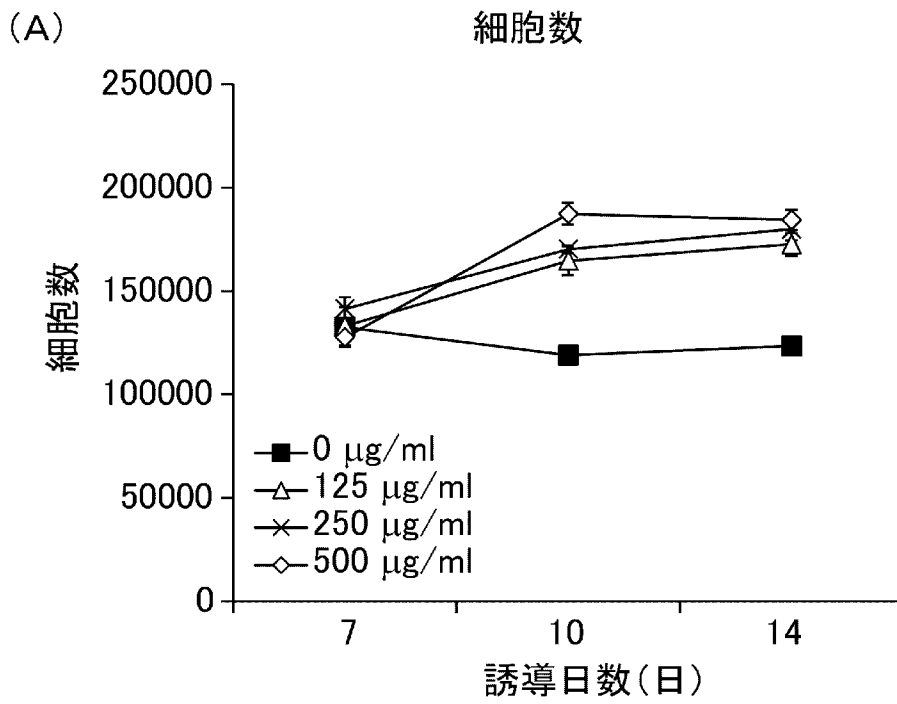
[図10]



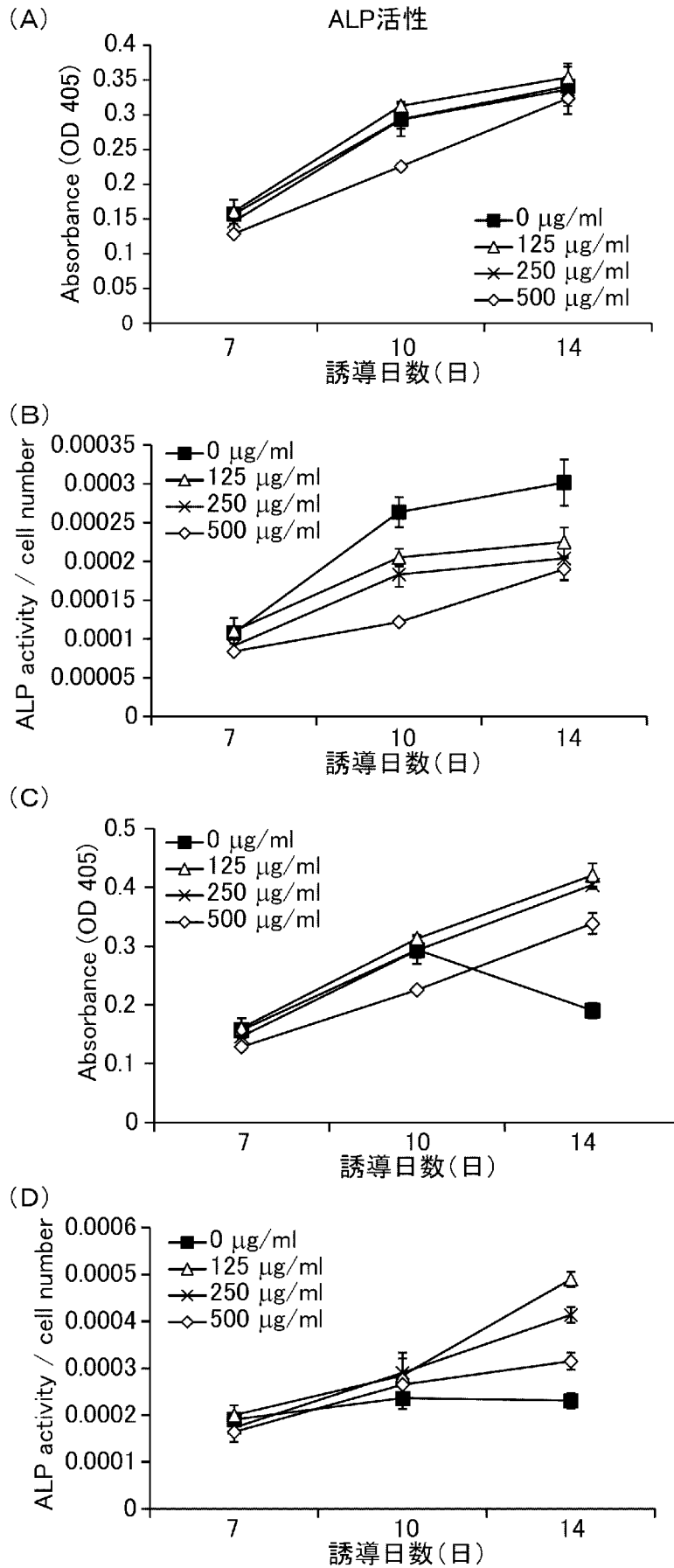
[図11]



[図12]

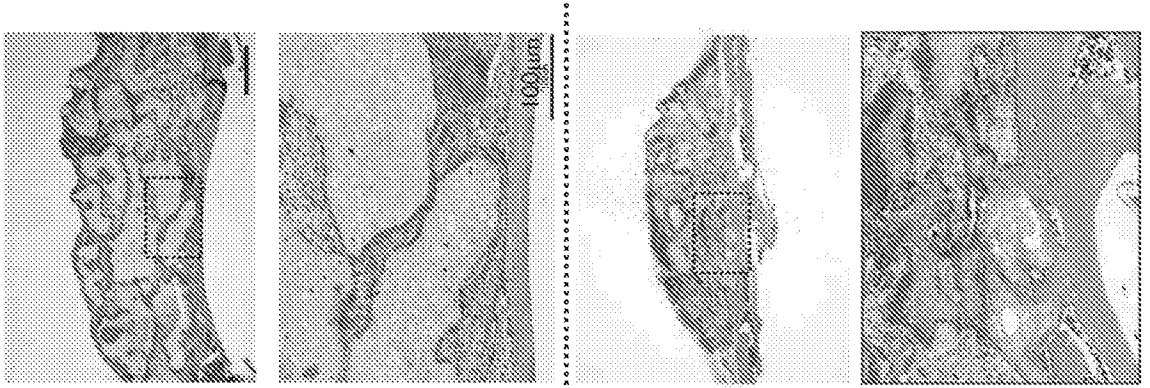


[図13]

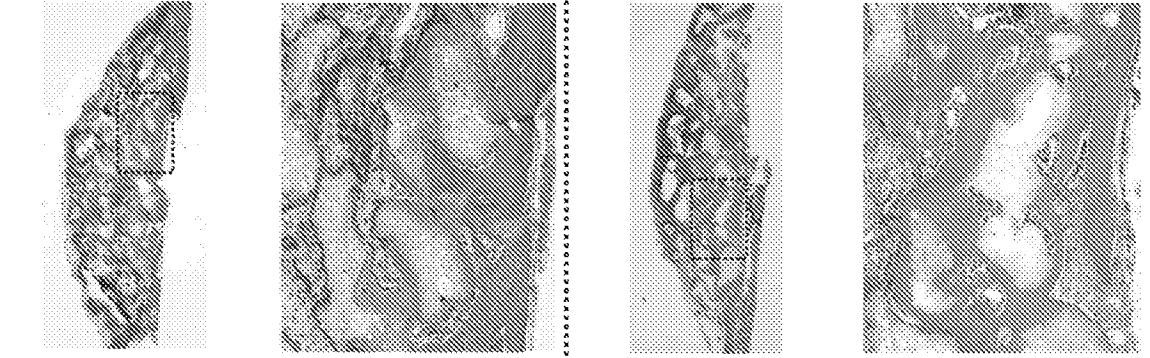


[図14]

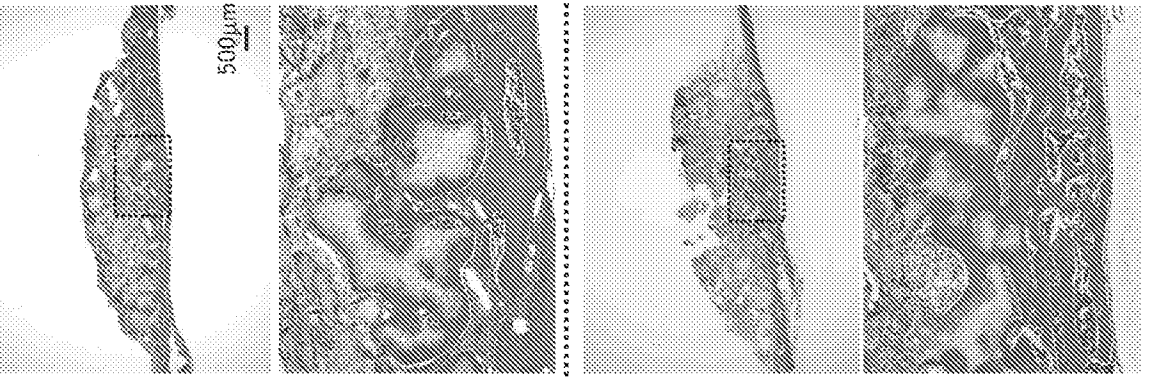
ネガティブコントロール群



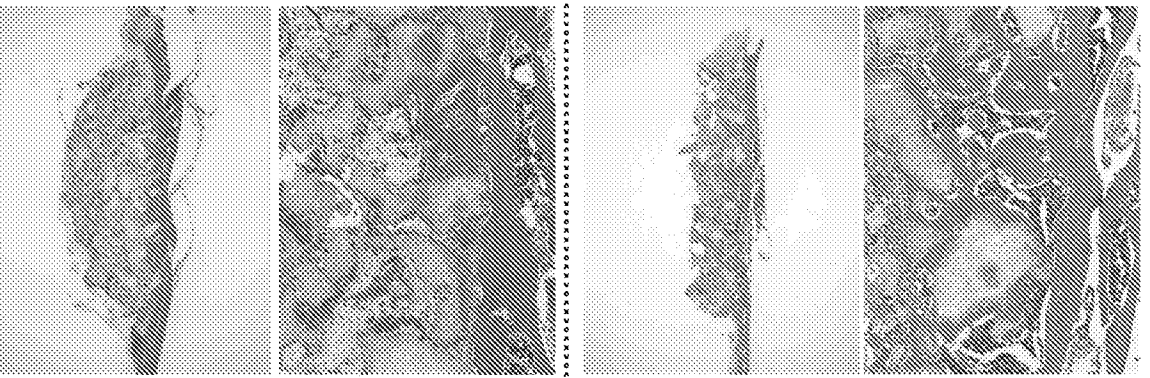
ポジティブコントロール群



実施例4B



実施例4A



【4週後】

(×20)

(×100)

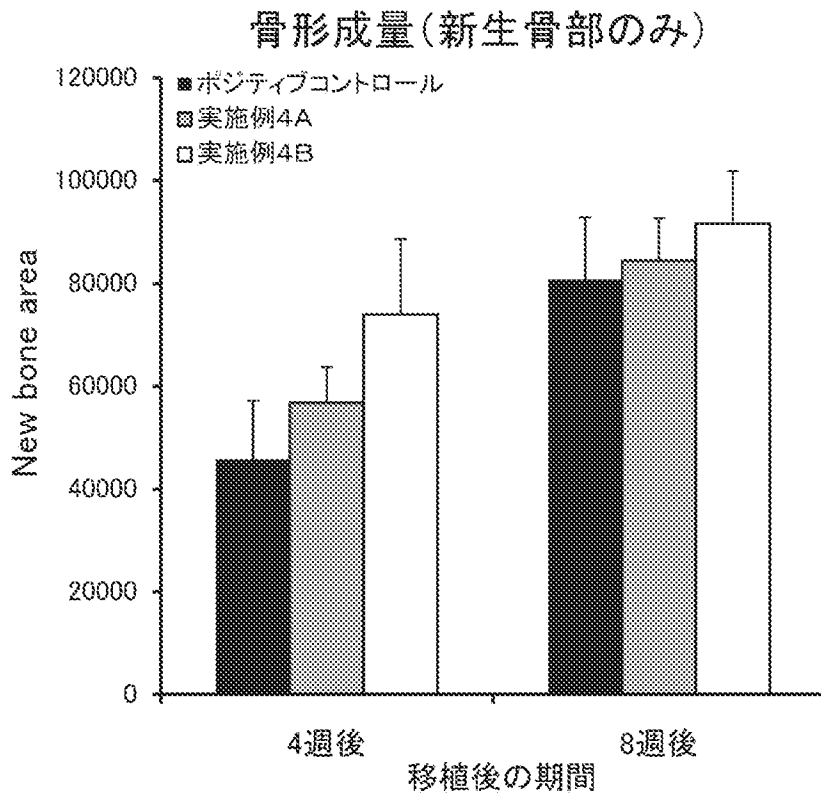
【8週後】

(×20)

(×100)

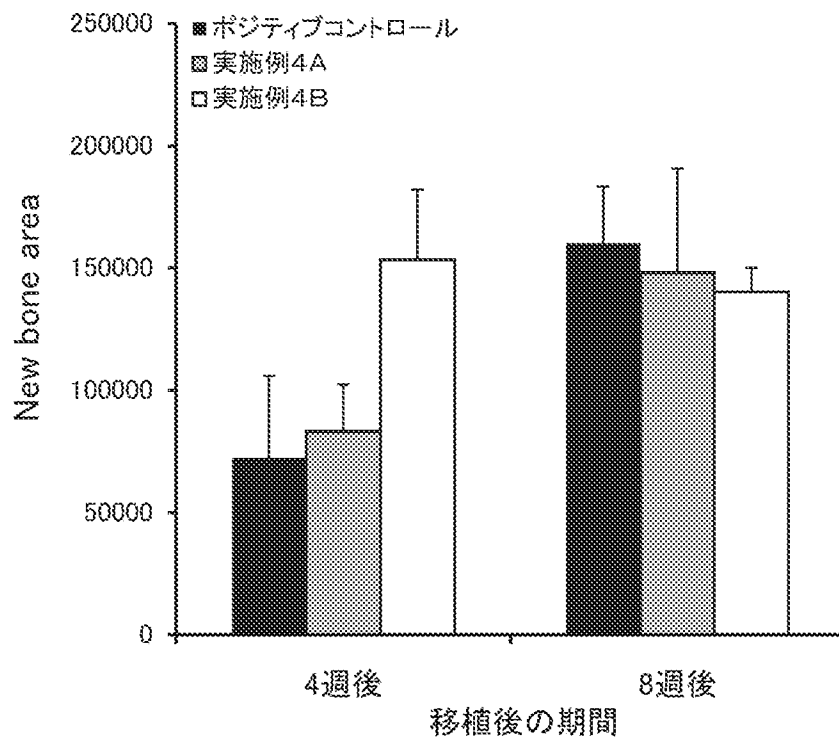
[図15]

(A)



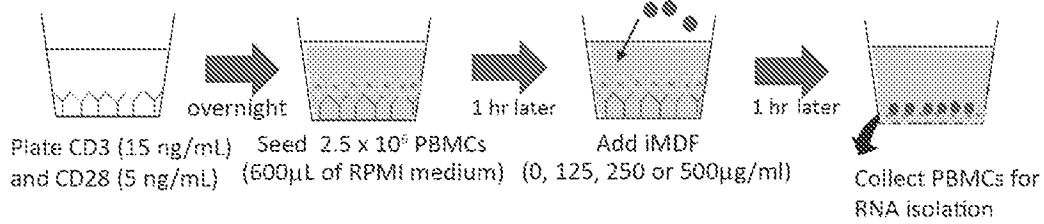
(B)

骨増生量(新生骨と骨髄、その周囲人工骨含む)

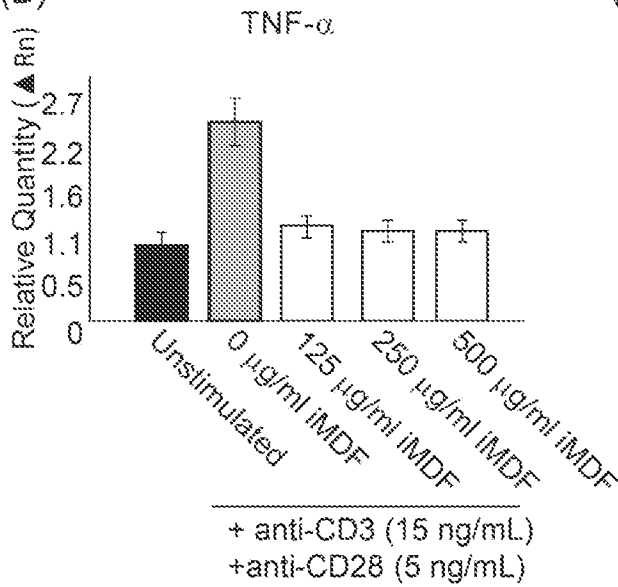


[16]

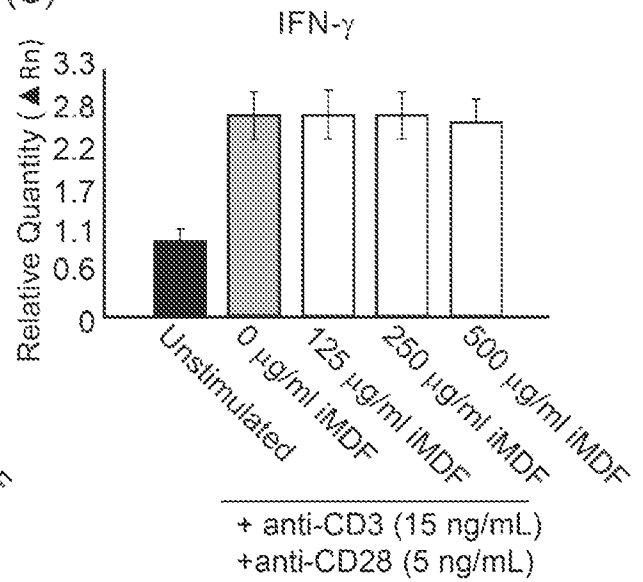
(A)



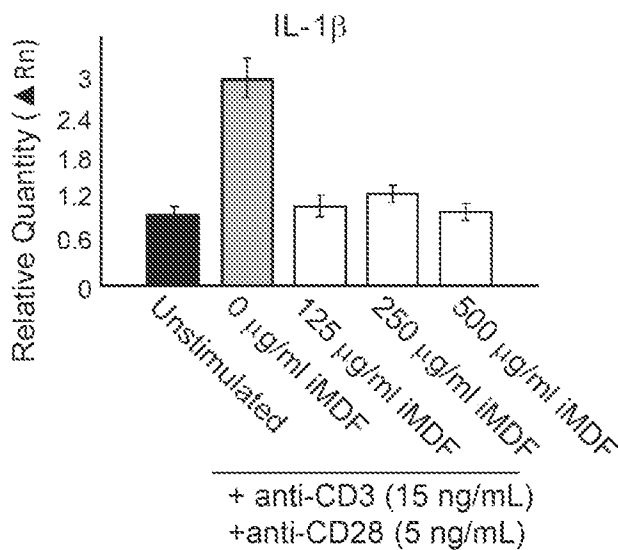
(B)



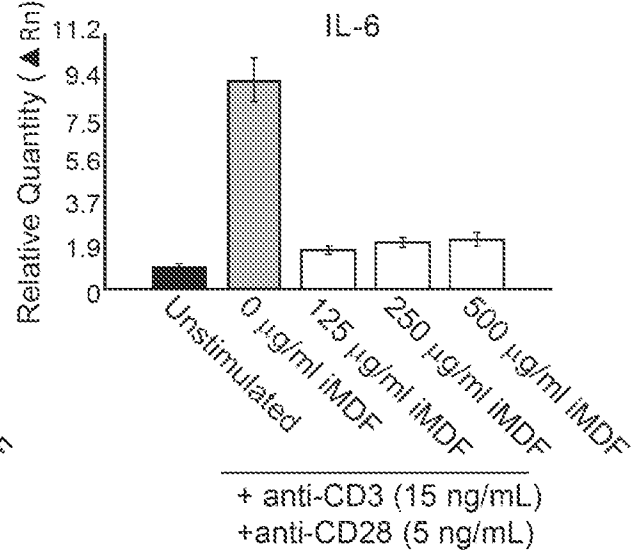
(C)



(D)

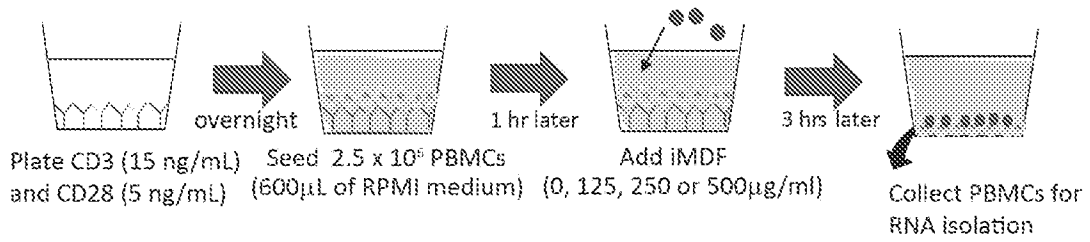


(E)

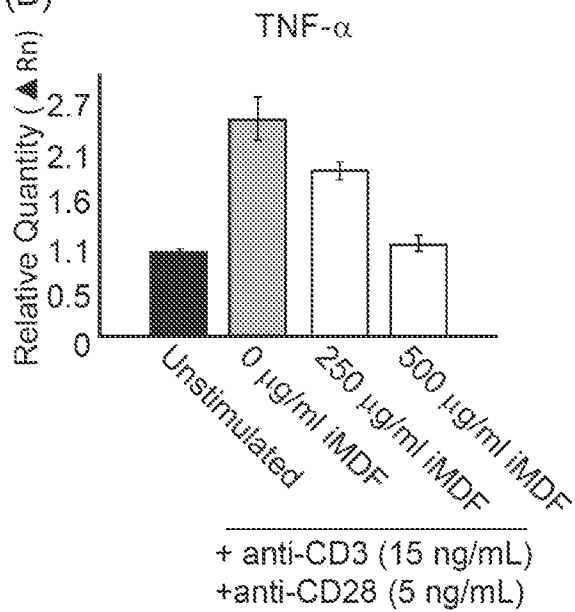


[17]

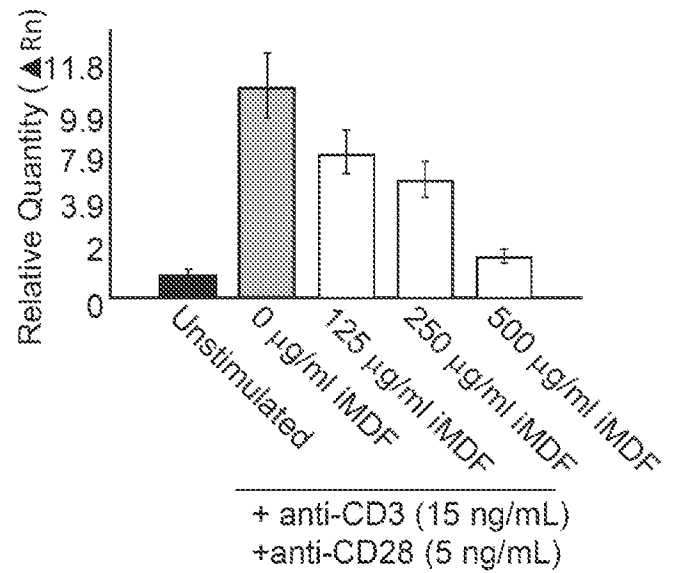
(A)



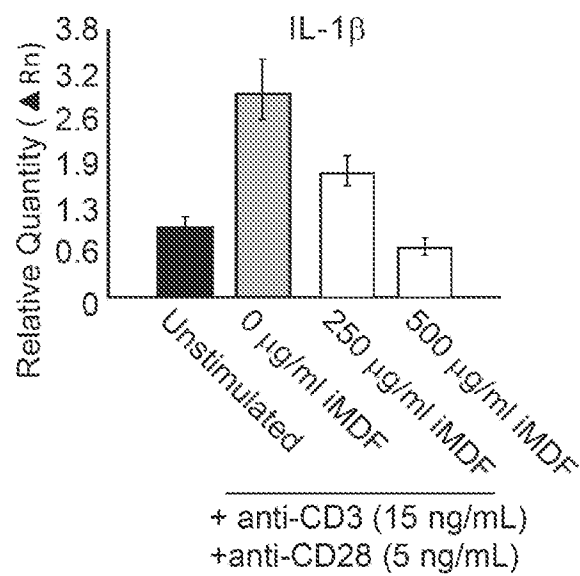
(B)



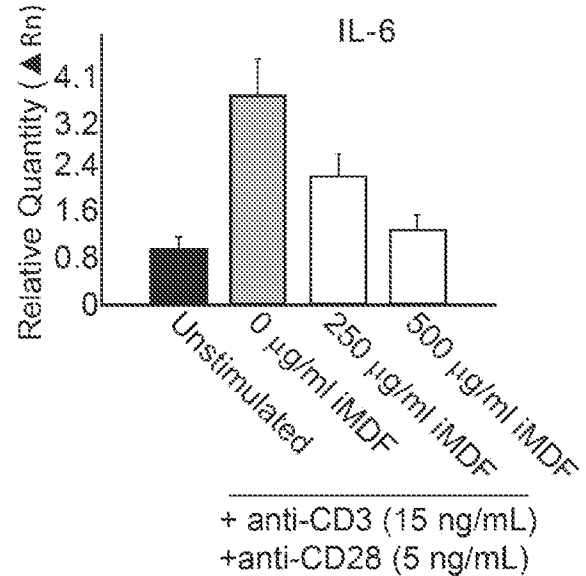
(C)



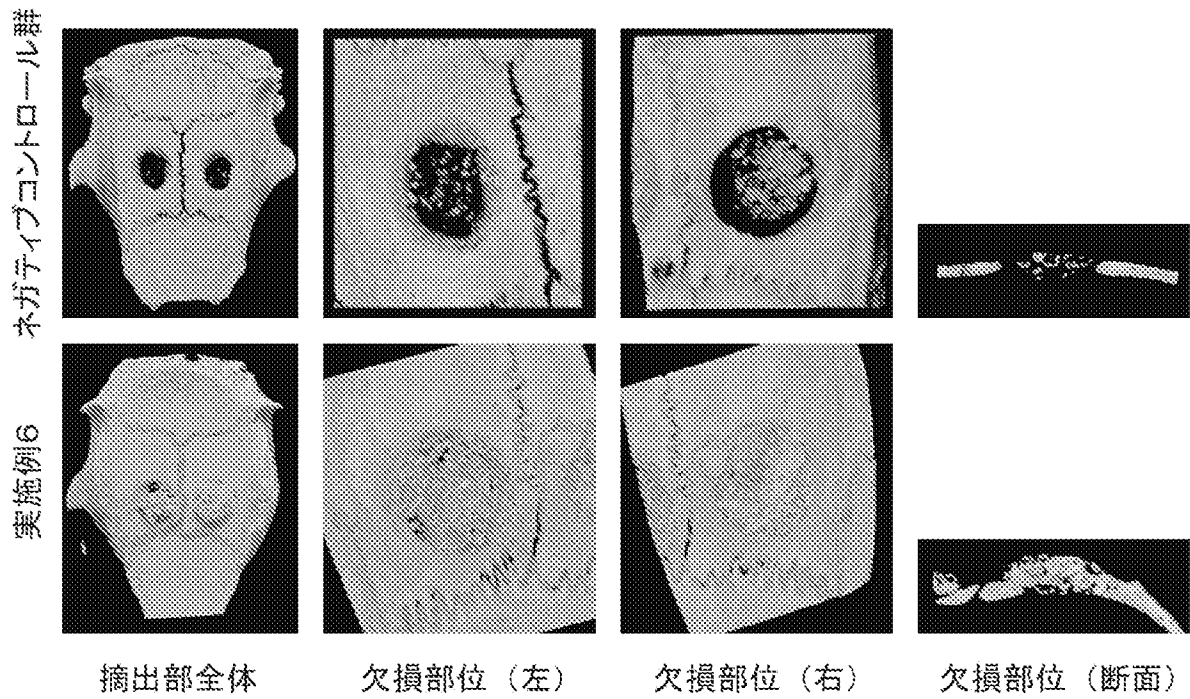
(D)



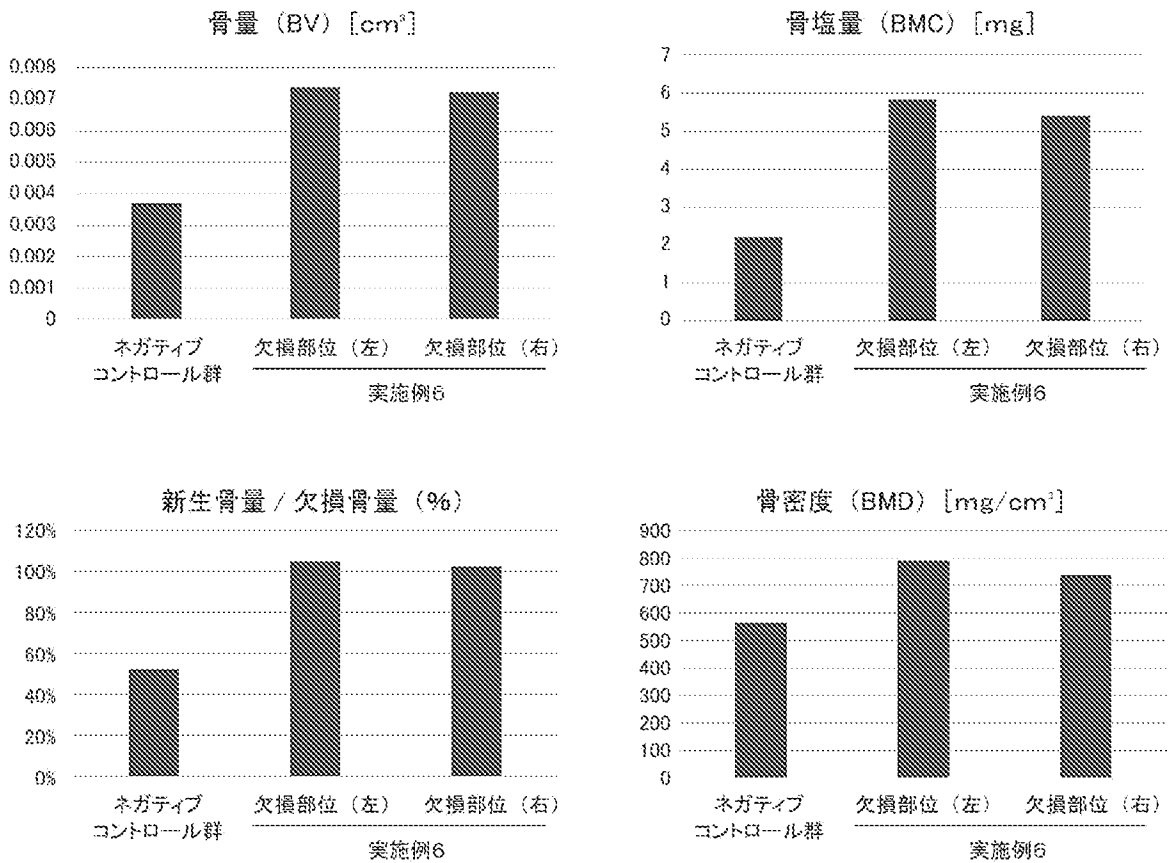
(E)



[図18]



[図19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/039716

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>A61K 35/19</i>(2015.01)i; <i>A61K 38/17</i>(2006.01)i; <i>A61L 27/38</i>(2006.01)i; <i>A61P 19/00</i>(2006.01)i; <i>C12N 5/0775</i>(2010.01)i; <i>C12N 5/078</i>(2010.01)i; <i>C12N 5/16</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/12</i>(2006.01)i; <i>C07K 14/47</i>(2006.01)n FI: A61K35/19 Z ZNA; A61K38/17; A61L27/38 100; A61P19/00; C12N5/0775; C12N5/078; C12N5/16; C12N15/12; C07K14/47</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K35/19; A61K38/17; A61L27/38; A61P19/00; C12N5/0775; C12N5/078; C12N5/16; C12N15/12; C07K14/47		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021		
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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEVALLIER, N. et al. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. <i>Biomaterials</i> . 2010, 31(2), p. 270-8 in particular, abstract	1-20
Y	WO 2017/065280 A1 (MEGAKARYON CORP) 20 April 2017 (2017-04-20) in particular, claims, examples	1-20
Y	WO 2019/059235 A1 (MEGAKARYON CORP) 28 March 2019 (2019-03-28) in particular, claims, examples	1-20
A	WO 2019/189947 A1 (UNIV NAGASAKI) 03 October 2019 (2019-10-03) in particular, claims, examples	1-20
P, A	WO 2021/117900 A1 (MEGAKARYON CORP) 17 June 2021 (2021-06-17) in particular, claims, examples	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 25 November 2021		Date of mailing of the international search report 07 December 2021
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/039716

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	SATO, M. et al. The Effect of Megakaryocytes and Platelets Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells on Bone Formation. Spine Surg Relat Res. 22 February 2021, 5(3), pp. 196-204 in particular, abstract	1-20
.....		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2021/039716

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2017/065280 A1	20 April 2017	US 2018/0282697 A1 in particular, claims, examples EP 3363443 A1 CN 108135940 A KR 10-2018-0063307 A	
WO 2019/059235 A1	28 March 2019	US 2020/0216809 A1 in particular, claims, examples EP 3679938 A1	
WO 2019/189947 A1	03 October 2019	(Family: none)	
WO 2021/117900 A1	17 June 2021	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 35/19(2015.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61L 27/38(2006.01)i; A61P 19/00(2006.01)i; C12N 5/0775(2010.01)i; C12N 5/078(2010.01)i; C12N 5/16(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)n</p> <p>FI: A61K35/19 Z ZNA; A61K38/17; A61L27/38 100; A61P19/00; C12N5/0775; C12N5/078; C12N5/16; C12N15/12; C07K14/47</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>A61K35/19; A61K38/17; A61L27/38; A61P19/00; C12N5/0775; C12N5/078; C12N5/16; C12N15/12; C07K14/47</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 border="0"> <tr> <td>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>1971-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2021年</td> </tr> </table> <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)</p>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2021年	日本国実用新案登録公報	1996-2021年	日本国登録実用新案公報	1994-2021年																						
日本国実用新案公報	1922-1996年																															
日本国公開実用新案公報	1971-2021年																															
日本国実用新案登録公報	1996-2021年																															
日本国登録実用新案公報	1994-2021年																															
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CHEVALLIER N. et al., Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate, Biomaterials, 2010, 31(2), p.270-8 特に、要約</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2017/065280 A1 (株式会社メガカリオン) 20.04.2017 (2017-04-20) 特に、請求の範囲, 実施例</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2019/059235 A1 (株式会社メガカリオン) 28.03.2019 (2019-03-28) 特に、請求の範囲, 実施例</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2019/189947 A1 (国立大学法人 長崎大学) 03.10.2019 (2019-10-03) 特に、請求の範囲, 実施例</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>P, A</td> <td>WO 2021/117900 A1 (株式会社メガカリオン) 17.06.2021 (2021-06-17) 特に、請求の範囲, 実施例</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> <table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </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	Y	CHEVALLIER N. et al., Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate, Biomaterials, 2010, 31(2), p.270-8 特に、要約	1-20	Y	WO 2017/065280 A1 (株式会社メガカリオン) 20.04.2017 (2017-04-20) 特に、請求の範囲, 実施例	1-20	Y	WO 2019/059235 A1 (株式会社メガカリオン) 28.03.2019 (2019-03-28) 特に、請求の範囲, 実施例	1-20	A	WO 2019/189947 A1 (国立大学法人 長崎大学) 03.10.2019 (2019-10-03) 特に、請求の範囲, 実施例	1-20	P, A	WO 2021/117900 A1 (株式会社メガカリオン) 17.06.2021 (2021-06-17) 特に、請求の範囲, 実施例	1-20	* 引用文献のカテゴリー	“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	“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	“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	“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）	“&” 同一パテントファミリー文献	“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	
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																														
Y	CHEVALLIER N. et al., Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate, Biomaterials, 2010, 31(2), p.270-8 特に、要約	1-20																														
Y	WO 2017/065280 A1 (株式会社メガカリオン) 20.04.2017 (2017-04-20) 特に、請求の範囲, 実施例	1-20																														
Y	WO 2019/059235 A1 (株式会社メガカリオン) 28.03.2019 (2019-03-28) 特に、請求の範囲, 実施例	1-20																														
A	WO 2019/189947 A1 (国立大学法人 長崎大学) 03.10.2019 (2019-10-03) 特に、請求の範囲, 実施例	1-20																														
P, A	WO 2021/117900 A1 (株式会社メガカリオン) 17.06.2021 (2021-06-17) 特に、請求の範囲, 実施例	1-20																														
* 引用文献のカテゴリー	“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの																															
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの																															
“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	“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																															
“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）	“&” 同一パテントファミリー文献																															
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献																																
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献																																
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日																															
25.11.2021	07.12.2021																															
名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）																															
日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	渡邊 潤也 4U 3131																															
	電話番号 03-3581-1101 内線 3452																															

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2021/039716

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2017/065280	A1	20.04.2017	US	2018/0282697	A1	
				特に, Claims, Examples			
				EP	3363443	A1	
				CN	108135940	A	
				KR	10-2018-0063307	A	

WO	2019/059235	A1	28.03.2019	US	2020/0216809	A1	
				特に, Claims, Examples			
				EP	3679938	A1	

WO	2019/189947	A1	03.10.2019	(ファミリーなし)			

WO	2021/117900	A1	17.06.2021	(ファミリーなし)			
