

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5383654号  
(P5383654)

(45) 発行日 平成26年1月8日(2014.1.8)

(24) 登録日 平成25年10月11日(2013.10.11)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)  
 C 1 2 Q 1/04 (2006.01)  
 C 1 2 Q 1/68 (2006.01)  
 G O 1 N 33/53 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A  
 C 1 2 Q 1/04  
 C 1 2 Q 1/68 A  
 G O 1 N 33/53 D

請求項の数 34 (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2010-502294 (P2010-502294)  
 (86) (22) 出願日 平成20年4月3日(2008.4.3)  
 (65) 公表番号 特表2010-523124 (P2010-523124A)  
 (43) 公表日 平成22年7月15日(2010.7.15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/059275  
 (87) 国際公開番号 W02008/124508  
 (87) 国際公開日 平成20年10月16日(2008.10.16)  
 審査請求日 平成23年3月29日(2011.3.29)  
 (31) 優先権主張番号 60/910,574  
 (32) 優先日 平成19年4月6日(2007.4.6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500034653  
 ジェンザイム・コーポレーション  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2  
 1 4 2, ケンブリッジ, ケンダル ストリ  
 ート 5 0 0  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史  
 (72) 発明者 スティーブン・エム・ラプコ  
 アメリカ合衆国 O 2 O 3 8 マサチューセッ  
 ツ州フランクリン、アイランド・ロード 1  
 2 番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞および細胞培養物を評価する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞培養物の組成を評価する方法であって、該方法が、

a) 軟骨細胞の拡大のための細胞培養物を得；

b) 該細胞培養物から複数の細胞を選択し；

c) この複数の細胞におけるミクロフィブリル結合タンパク質 5 (M F A P 5) の平均発現レベルを決定し；次いで

d) M F A P 5 の平均発現レベルに基づいて該培養物の組成を決定すること

を含むものであって、ここに、所定の閾値より低い M F A P 5 の平均発現レベルが、該細胞培養物が軟骨細胞を含むことを示す、方法。

【請求項 2】

さらに、複数の細胞における軟骨細胞マーカーの平均発現レベルを決定し、工程 (d) において、軟骨細胞マーカーの平均発現レベルおよび M F A P 5 の平均発現レベルに基づいて該培養物の組成を決定することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

M F A P 5 マーカーおよび軟骨細胞マーカーが、軟骨細胞におけるそれらの (M F A P 5 マーカーに対する軟骨細胞マーカーの) 発現レベルの比率が皮膚の線維芽細胞または滑膜細胞と同等のまたは 5 倍高い比率であるものである、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

軟骨細胞マーカーが、ヒアルロン酸とプロテオグリカン連結タンパク質 1 (H A P L N

10

20

1)、マトリックスGlaタンパク質(MGP)、GF様繰返しとジスコイジンI様ドメイン3(EDIL3)、WNT1誘導性シグナル経路タンパク質3(WISP3)、アグレカン1(AGC1)、軟骨オリゴマー基質タンパク質(COMP)、II型コラーゲンアルファ1(COL2A1)、IX型コラーゲンアルファ1(COL9A1)、XI型コラーゲンアルファ1(COL11A1)、白血球細胞由来ケモタキシン1タンパク質(LECT1)、S100カルシウム結合タンパク質ベータ(S100B)、軟骨酸性タンパク質1(CRTAC1)、SRY-ボックス9タンパク質(SOX9)、およびネブレット(NEBL)からなる群から選択される、請求項2記載の方法。

【請求項5】

軟骨細胞マーカーがHAPLN1である、請求項2記載の方法。

10

【請求項6】

MFAP5および軟骨細胞マーカーの発現レベルが、RNAレベルで決定される、請求項2記載の方法。

【請求項7】

発現レベルが、PCRを用いて決定される、請求項6記載の方法。

【請求項8】

発現レベルが、比較C<sub>T</sub>PCR法を用いて決定される、請求項7記載の方法。

【請求項9】

比較C<sub>T</sub>PCR法を用いて決定される場合、0.25より高いMFAP5に対する軟骨細胞マーカーの発現レベルの比率が、細胞培養物が軟骨細胞を含むことを示す、請求項2記載の方法。

20

【請求項10】

0.55より高いMFAP5に対する軟骨細胞マーカーのモル比が、細胞培養物が軟骨細胞を含むことを示す、請求項2記載の方法。

【請求項11】

細胞培養物が、軟骨の生検から得られた細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項12】

軟骨の生検が、膝関節から取得されるものである、請求項11記載の方法。

【請求項13】

細胞培養物の評価後の細胞培養物由来の細胞が、それを必要とする患者に投与されるためのものである、請求項11記載の方法。

30

【請求項14】

培養物由来の細胞が、自家培養軟骨細胞の移植に用いられるためのものである、請求項13記載の方法。

【請求項15】

細胞培養物の組成を評価する方法であって、该方法が、

a) 軟骨細胞の拡大のための細胞培養物を得；

b) 該細胞培養物中のMFAP5の発現レベルを決定し；次いで

c) MFAP5の発現レベルに基づいて細胞培養物の組成を決定すること

を含むものである方法。

40

【請求項16】

さらに、細胞培養物中の軟骨細胞マーカーの発現レベルを決定し、工程c)において、軟骨細胞マーカーおよびMFAP5の発現レベルに基づいて細胞培養物の組成を決定することを含む、請求項15記載の方法。

【請求項17】

軟骨細胞マーカーが、ヒアルロン酸とプロテオグリカン連結タンパク質1(HAPLN1)、マトリックスGlaタンパク質(MGP)、GF様繰返しとジスコイジンI様ドメイン3(EDIL3)、WNT1誘導性シグナル経路タンパク質3(WISP3)、アグレカン1(AGC1)、軟骨オリゴマー基質タンパク質(COMP)、II型コラーゲンアルファ1(COL2A1)、IX型コラーゲンアルファ1(COL9A1)、XI

50

型コラーゲン アルファ 1 (COL11A1)、白血球細胞由来ケモタキシン 1 タンパク質 (LECT1)、S100 カルシウム結合タンパク質ベータ (S100B)、軟骨酸性タンパク質 1 (CRTAC1)、SRY - ボックス 9 タンパク質 (SOX9)、およびネブレット (NEBL) からなる群から選択されるものである、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

軟骨細胞マーカーが HAPLN1 である、請求項 16 記載の方法。

【請求項 19】

軟骨細胞マーカーおよび MFAP5 の発現レベルが、RNA レベルで決定される、請求項 16 記載の方法。

【請求項 20】

細胞培養物の組成を評価する方法であって、該方法が、

a) 哺乳動物由来の軟骨の生検から細胞を単離し；

b) 該単離された細胞を細胞培養物中で培養して軟骨細胞を生産し；

c) 前記細胞培養物から得られた複数の細胞における MFAP5 および HAPLN1 の発現レベルを決定し；次いで

d) MFAP5 および HAPLN1 の発現レベルに基づいて該培養物の組成を決定すること

を含むものである方法。

【請求項 21】

MFAP5 および HAPLN1 の発現レベルが、RNA レベルで決定される、請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

発現レベルが PCR を用いて決定される、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

発現レベルが比較 C<sub>T</sub> PCR 法を用いて決定される、請求項 22 記載の方法。

【請求項 24】

比較 C<sub>T</sub> PCR 法を用いて決定される場合、0.25 より高い MFAP5 に対する HAPLN1 の発現レベルの比率が、細胞培養物が軟骨細胞を含むことを示す、請求項 20 記載の方法。

【請求項 25】

0.55 より高い MFAP5 に対する HAPLN1 のモル比が、細胞培養物が軟骨細胞を含むことを示す、請求項 20 記載の方法。

【請求項 26】

細胞培養物の組成を評価する方法であって、該方法が、

a) 哺乳動物由来の軟骨の生検から細胞を単離し；

b) 該単離された細胞を細胞培養物中で培養して軟骨細胞を生産し；

c) 前記細胞培養物から得られた複数の細胞における MFAP5 および軟骨細胞マーカーの発現レベルを決定し；次いで

d) MFAP5 および軟骨細胞マーカーの発現レベルに基づいて該細胞培養物の軟骨細胞の存在を決定すること

を含むものである方法。

【請求項 27】

軟骨細胞マーカーが、ヒアルロン酸とプロテオグリカン連結タンパク質 1 (HAPLN1)、マトリックス GLA タンパク質 (MGPE)、GF 様繰り返しとジスコイジン I 様ドメイン 3 (EDIL3)、WNT1 誘導性シグナル経路タンパク質 3 (WISP3)、アグレカン 1 (AGC1)、軟骨オリゴマー基質タンパク質 (COMP)、II 型コラーゲン アルファ 1 (COL2A1)、IX 型コラーゲン アルファ 1 (COL9A1)、XI 型コラーゲン アルファ 1 (COL11A1)、白血球細胞由来ケモタキシン 1 タンパク質 (LECT1)、S100 カルシウム結合タンパク質ベータ (S100B)、軟骨酸性タンパク質 1 (CRTAC1)、SRY - ボックス 9 タンパク質 (SOX9)、およびネ

10

20

30

40

50

ブレット ( N E B L ) からなる群から選択されるものである、請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 2 8】

軟骨細胞マーカーが H A P L N 1 である、請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 2 9】

細胞培養物の組成を評価する方法であって、該方法が、

a ) 軟骨または滑膜由来の細胞を含む細胞培養物から複数の細胞を得；次いで

b ) この複数の細胞におけるミクロフィブリル結合タンパク質 5 ( M F A P 5 ) の平均発現レベルを決定すること

を含むものであって、ここに、所定の閾値より低い M F A P 5 の平均発現レベルが、該細胞培養物が軟骨細胞を含むことを示す、方法。

10

【請求項 3 0】

軟骨細胞培養物の組成を評価して、線維芽細胞および / または滑膜細胞の存在を同定する方法であって、該方法が、

a ) 軟骨細胞培養物から複数の細胞を得；次いで

b ) この複数の細胞におけるミクロフィブリル結合タンパク質 5 ( M F A P 5 ) の平均発現レベルを決定すること

を含むものであって、ここに、所定の閾値より高い M F A P 5 の平均発現レベルが、該細胞培養物が線維芽細胞および / または滑膜細胞を含むことを示す、方法。

【請求項 3 1】

細胞培養物の組成を評価して、線維芽細胞および / または滑膜細胞に対する軟骨細胞の比率を決定する方法であって、該方法が、

a ) 軟骨細胞培養物の細胞カウントを行い；

b ) 該細胞培養物から複数の細胞を得；次いで

c ) この複数の細胞におけるミクロフィブリル結合タンパク質 5 ( M F A P 5 ) の平均発現レベルを決定すること

を含むものであって、ここに、所定の閾値より高い M F A P 5 の平均発現レベルが、該細胞培養物が軟骨細胞より、線維芽細胞および / または滑膜細胞を多く含むことを示し、所定の閾値より低い M F A P 5 の平均発現レベルが、該細胞培養物が線維芽細胞および / または滑膜細胞より、軟骨細胞を多く含むことを示す、方法。

20

【請求項 3 2】

さらに、複数の細胞における軟骨細胞マーカーの平均発現レベルを決定し、軟骨細胞マーカーおよび M F A P 5 の発現レベルに基づいて線維芽細胞および / または滑膜細胞に対する軟骨細胞の比率を決定することを含む、請求項 3 1 記載の方法。

30

【請求項 3 3】

軟骨細胞マーカーが、ヒアルロン酸とプロテオグリカン連結タンパク質 1 ( H A P L N 1 )、マトリックス G 1 a タンパク質 ( M G P )、G F 様繰り返しとジスコイジン I 様ドメイン 3 ( E D I L 3 )、W N T 1 誘導性シグナル経路タンパク質 3 ( W I S P 3 )、アグレカン 1 ( A G C 1 )、軟骨オリゴマー基質タンパク質 ( C O M P )、I I 型コラーゲン アルファ 1 ( C O L 2 A 1 )、I X 型コラーゲン アルファ 1 ( C O L 9 A 1 )、X I 型コラーゲン アルファ 1 ( C O L 1 1 A 1 )、白血球細胞由来ケモタキシン 1 タンパク質 ( L E C T 1 )、S 1 0 0 カルシウム結合タンパク質ベータ ( S 1 0 0 B )、軟骨酸性タンパク質 1 ( C R T A C 1 )、S R Y - ボックス 9 タンパク質 ( S O X 9 )、およびネブレット ( N E B L ) からなる群から選択されるものである、請求項 3 2 記載の方法。

40

【請求項 3 4】

軟骨細胞マーカーが H A P L N 1 である、請求項 3 2 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本願は、2 0 0 7 年 4 月 6 日提出の仮出願 6 0 / 9 1 0 , 5 7 4 の優先権を主張するものである、その内容を出典明示により本明細書の一部とする。

50

## 【 0 0 0 2 】

本発明は、細胞培養物の組成物を調べる方法、より詳細には、軟骨細胞と線維芽細胞を区別する方法に関する。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 3 】

関節軟骨への損傷は、一部には軟骨における血液供給の不足により低い修復率を示す（非特許文献 1）。膝関節への外傷は、例えば、軟骨および骨軟骨の損傷を生じ得、かかる損傷は骨関節炎を進行しうる（非特許文献 2）。骨関節炎の深刻な場合には、人工膝関節置換術が必要となりうる。しかしながら、膝関節置換術で用いられる人工装具は寿命が限られており、それゆえ膝関節置換は特に高齢ではない患者にとって最善の手段ではない（Brittberg et al., 前掲）。

10

## 【 0 0 0 4 】

ある場合では、関節軟骨の損傷は、自家培養軟骨細胞の移植により修復されうる（非特許文献 3）。この手法では、軟骨細胞が患者から採取され、細胞培養で広げて軟骨細胞数を増加させ、次いで患者の損傷部位に戻される。軟骨細胞は損傷部位を塞ぐために骨膜弁で覆われる。培養された軟骨細胞は培養中に脱分化する傾向を示すが、成功した移植では、脱分化した軟骨細胞は分化能を保持しており、移植により硝子軟骨を産生する軟骨細胞に再分化する。

## 【 0 0 0 5 】

マトリックス誘導性自家培養軟骨細胞移植（M A C I（商標）移植法）として知られる改良技術において、培養された軟骨細胞は、それらが患者移植される前にコラーゲンマトリックス上に載せられる（Basad et al., 前掲）。さらに、コラーゲンマトリックスは、縫合よりむしろフィブリン糊で固定することができ、より簡単な外科的技術で行われる。

20

## 【 0 0 0 6 】

軟骨細胞を培養するために、異なる技術および培地を用いることができる。軟骨細胞の培養のための血清を含まない培地および軟骨細胞の単離と増殖のための方法の例は、例えば、出典明示により本明細書に援用される、特許文献 1 ~ 3 に記載されるもので、その内容を出典明示により本明細書の一部とする。

## 【 0 0 0 7 】

線維芽細胞または（滑膜細胞のごとき）線維芽細胞様の細胞は、軟骨細胞と一緒に共単離され、それにより軟骨細胞の移植片を調製する過程において細胞培養で共増殖されうる。軟骨細胞は、それらが培養中に脱分化する時に線維芽細胞の外見をとることが知られている（非特許文献 4）。それにもかかわらず、それらは、分化能力を維持し、すなわち、それらは、移植時に軟骨細胞の表現形を再発現することができる。結果として、外見に基づいて、培養された脱分化した軟骨細胞を、共培養した線維芽細胞または線維芽細胞様の細胞から区別することは困難でありうる。

30

## 【 0 0 0 8 】

さらに、培養され、脱分化した軟骨細胞における遺伝子発現パターンは、天然の軟骨の軟骨細胞のものとは異なる。例えば、天然の軟骨の軟骨細胞で高度に発現される多くのマーカーは、培養した軟骨細胞では減少したレベルで発現される（非特許文献 5）。したがって、かかる軟骨細胞マーカーの発現は、脱分化した軟骨細胞を細胞培養中に存在しうる他のタイプの細胞から必ずしも区別しうるわけではない。さらに、多くの公知の線維芽細胞マーカーは、レベルは異なるとしても、脱分化した軟骨細胞および天然の軟骨の軟骨細胞の両方で発現される。したがって、かかる線維芽細胞マーカーの発現レベルは、必ずしも、サンプル中に存在する細胞が脱分化した軟骨細胞、線維芽細胞、または線維芽細胞様の細胞であるかどうかを示しうるわけではない。

40

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 9 】

【 特許文献 1 】 米国特許第 6 , 1 5 0 , 1 6 3 号

50

【特許文献2】米国特許第7,169,610号

【特許文献3】米国仮出願第60/805,307号

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Basad et al., In: Hendrich et al., Cartilage Surgery and Future Perspectives, Thieme Verlag, 49-56 (2003)

【非特許文献2】Brittberg et al., New England Journal of Medicine, 331 (14): 889-895 (1994)

【非特許文献3】Brittberg et al., Clin. Orthopaed. Rel. Res., 367S: S147-S155 (1999)

【非特許文献4】Benya and Shaffer, Cell, 30: 215-224 (1982)

【非特許文献5】Binette et al., J. Orthopaed. Res., 16: 207-216 (1998)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

軟骨細胞、線維芽細胞および線維芽細胞様の細胞を同定する方法、特に細胞培養に適用可能な方法が必要である。

【課題を解決するための手段】

【0012】

一定の態様において、本発明の方法は、(例えば、線維芽細胞から軟骨細胞を区別するために)細胞培養物の組成物を評価する方法および(軟骨細胞としての)各細胞の表現形を評価する方法が開示される。本発明の方法は、例えば、軟骨欠失の処置に用いられる軟骨細胞の培養を評価するために用いられうる。いくつかの具体例において、本発明は、線維芽細胞マーカーの発現レベルに基づいた細胞培養組成物の同定または細胞の同定に関する。その他の具体例において、本発明は、細胞培養サンプルまたは各細胞における少なくとも1つの軟骨細胞マーカーおよび少なくとも1つの線維芽細胞マーカーの発現レベルを比較することに関する。実施例において、軟骨細胞マーカーは、ヒアルロン酸とプロテオグリカン連結タンパク質1(hyaluronan and proteoglycan link protein 1)(HAPLN1)であり、線維芽細胞マーカーは、ミクロフィブリル結合タンパク質5(MFAP5)である。

【0013】

本発明は、少なくとも部分的に、線維芽細胞および滑膜細胞のごとき一定の非軟骨細胞の細胞タイプで高度に発現される一方で、軟骨細胞で極めて低いレベルで発現される細胞表現形マーカーとしてのMFAP5の同定に基づく。本発明はさらに、少なくとも部分的に、MFAP5およびHAPLN1のごとき軟骨細胞マーカーの発現レベルの比率が軟骨の生検に由来する培養物における信頼性のある指標であることを見出したことに基づく。いくつかの条件下で、(細胞培養物の組成物または各細胞の表現形を確認するために)両タイプのマーカー(すなわち、線維芽細胞および軟骨細胞マーカー)を用いることが所望されうる一方で、本発明はまた、MFAP5マーカー単独の標準化された発現レベルを調べるのがこの目的に十分でありうる具体例を提供する。

【0014】

いくつかの具体例において、線維芽細胞マーカーは、MFAP5以外であり、その標準化発現レベルが線維芽細胞レベルより軟骨細胞においてより低いものである。いくつかの具体例において、線維芽細胞マーカーは、その標準化発現レベルが線維芽細胞および/または滑膜細胞より軟骨細胞(例えば、初代および/または継代軟骨細胞)においてより低いものである。いくつかの具体例において、線維芽細胞マーカーは、線維芽細胞および/または滑膜細胞より軟骨細胞において、少なくとも2、5、8、10倍低く発現される。

【0015】

それゆえ、1の態様において、本発明は、細胞培養物、例えば、暫定的に軟骨細胞を含む細胞培養物の組成物を評価する方法(方法1);ならびに各細胞の表現形を評価する方

10

20

30

40

50

法（方法２）を提供する。方法１の具体例において、各マーカーの発現レベルは、複数の細胞（培養サンプル）におけるそのマーカーの平均発現レベルとして調べられる。方法１の具体例において、細胞培養物の組成物は、それが軟骨細胞を含むかどうかを調べて全体として評価される。方法２の具体例において、マーカーの発現レベルは、評価される各細胞におけるそのマーカーの発現レベルとして調べられる。方法１が細胞培養物の組成物を同定する一方で、方法２は、各細胞の表現形、例えば、細胞が軟骨細胞であるかどうかを同定する。

#### 【００１６】

いくつかの具体例において、方法１は：

a) 複数の細胞を細胞培養物から得；  
b) 細胞培養物に由来する複数の細胞における本発明の線維芽細胞マーカーの平均発現レベルを調べ；次いで

c) 発現レベルに基づいて培養物の組成物を調べること；

を含み、ここで、所定の閾値より低い発現レベルは、細胞培養物が軟骨細胞を含むことを示す。別に、所定の閾値より高い発現レベルは、細胞培養物が軟骨細胞を含まないこと（例えば、培養物が少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％またはそれ以上の軟骨細胞を含まないこと）を示す。

#### 【００１７】

いくつかの具体例において、方法１は、線維芽細胞マーカー（M F A P 5 または別の線維芽細胞マーカー）および軟骨細胞マーカー（例えば、H A P L N 1）の発現レベルを対照と、または相互に比較することに関する。いくつかの具体例において、線維芽細胞マーカーおよび軟骨細胞マーカーは、初代および／または継代軟骨細胞における（軟骨細胞マーカーの線維芽細胞マーカーに対する）それらの発現レベルの比率が、培養された線維芽細胞における発現比率と同等であるか、または５、１０、２０、３０、５０、７５、１００倍またはそれ以上の発現レベルであるものである。

#### 【００１８】

特に、いくつかの具体例において、方法１は：

a) 複数の細胞を細胞培養物から得；

b) この複数の細胞における軟骨細胞マーカーの平均発現レベルを調べ；

c) 複数の細胞における線維芽細胞マーカーの平均発現レベルを調べ；次いで

d) 軟骨細胞マーカーの平均発現レベルおよび線維芽細胞マーカーの平均発現レベルに基づいて培養物の組成物を調べることを含む。

いくつかの具体例において、培養物は、軟骨細胞マーカーの発現レベルが所定の閾値より高い一方で、線維芽細胞マーカーの発現レベルが所定の閾値より低い場合に軟骨細胞を含むものとして同定される。別に、所定の閾値より高い線維芽細胞マーカーの発現レベルは、細胞培養物が軟骨細胞を含まないこと（例えば、培養物が少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％またはそれ以上の軟骨細胞を含まないこと）を示す。

#### 【００１９】

いくつかの具体例において、培養組成物を調べる工程は、軟骨細胞マーカーの平均発現レベルおよび線維芽細胞マーカーの平均発現レベルを比較することを含む。いくつかの具体例において、マーカーの発現は相互に相対的に比較される（それゆえ、閾値は、例えば、２つのマーカーの発現レベル間の一定の差異、またはその比率として定義される）。例えば、いくつかの具体例において、所定の閾値より高い、例えば、０．２５、０．５５、１、２、２．２、５、１０、２５、５０またはそれ以上である、軟骨細胞マーカー（例えば、H A P L N 1）の発現レベルの線維芽細胞マーカー（例えば、M F A P 5）の発現レベルに対する比率は、細胞培養物が軟骨細胞を含むことを示す。

#### 【００２０】

方法１のいくつかの具体例において、軟骨細胞および線維芽細胞マーカーの発現レベル

10

20

30

40

50

が、例えば、定量 R T - P C R の検量線法によるか、あるいは（線維芽細胞マーカーおよび軟骨細胞マーカーに必要とされる閾値サイクル数の差異を測定する）定量 R T - P C R の比較 C<sub>T</sub> 法により、R N A レベルで調べられる。

【 0 0 2 1 】

関連の態様において、本発明は、例えば、フローサイトメトリーまたは s i n g l e - c e l l R T - P C R を用いて、各細胞の表現形を評価する方法（方法 2）を提供する。前記方法は、軟骨または滑膜に由来する細胞培養物、軟骨細胞培養物、線維芽細胞培養物、滑膜細胞培養物、あるいはいずれかの他の適当な培養物を含む細胞培養物に由来する各細胞を同定するのに有用である。前記方法はまた、軟骨サンプル、滑膜サンプル、線維芽細胞サンプルなどを含む各細胞を同定することが望ましいところの、いずれかの適当な生物学的サンプルに由来する各細胞を同定するのに有用である。方法 2 における線維芽細胞および軟骨細胞マーカーは、方法 1 で記載されるごとく選択され、評価されてもよい。

10

【 0 0 2 2 】

いくつかの具体例において、方法 2 は：

a ) 細胞における本発明の線維芽細胞マーカーの発現レベルを調べ；次いで

b ) 線維芽細胞マーカーの発現レベルに基づいて細胞の表現形を調べるこ

を含み、ここで、所定の閾値より低い発現レベルは、細胞が軟骨細胞であることを示す。別に、所定の閾値より高い発現レベルは、細胞が軟骨細胞ではないこと（例えば、線維芽細胞または滑膜細胞）を示す。いくつかの具体例において、方法 2 は：

a ) 細胞における軟骨細胞マーカーの発現レベルを調べ；

b ) 細胞における線維芽細胞マーカーの発現レベルを調べ；次いで

c ) 軟骨細胞マーカーの発現レベルおよび線維芽細胞マーカーの発現レベルに基づいて細胞の表現形を評価することを含む。

20

いくつかの具体例において、軟骨細胞マーカーの発現レベルが所定の閾値レベルより高い一方で、線維芽細胞マーカーの発現レベルが所定の閾値レベルより低い場合に、細胞は、軟骨細胞として同定される。別に、軟骨細胞マーカーの発現レベルが所定の閾値より低い一方で、線維芽細胞マーカーの発現レベルが所定の閾値より高い場合に、細胞は、軟骨細胞ではない。

いくつかの具体例において、細胞の表現形を評価する工程 c ) は、軟骨細胞マーカーの発現レベルおよび線維芽細胞マーカーの発現レベルを比較することを含む。

30

【 0 0 2 3 】

本発明のさらなる態様は、以下の記載で説明される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 4 】

【図 1】図 1 は、軟骨細胞の生検から培養された軟骨細胞を産生するのに用いられる典型的な製造プロセスの段階を示すフロー図である。

【図 2】図 2 は、R T - P C R の検量線法により調べられたいくつかの細胞株における H A P L N 1 発現レベルを示す。発現レベルは、1 8 S リボソーム R N A で標準化された。初代軟骨細胞（P C）における発現レベルが 1 とされ；それに合わせて他の比率が縮尺された。

40

【図 3】図 3 は、R T - P C R の検量線法により調べられるように、図 2 で示されるものと同一の細胞株における M F A P 5 の発現レベルを示す。発現レベルは、1 8 S リボソーム R N A で標準化された。初代軟骨細胞（P C）における発現レベルが 1 とされ；それに合わせて他の比率が縮尺された。

【図 4】図 4 は、図 2 および図 3 からの H A P L N 1 および M F A P 5 発現レベルの比率を示す。初代軟骨細胞（P C）における比率が 1 とされ；それに合わせて他の比率が縮尺された。

【図 5】図 5 は、図 2 で示されるものと同一の株における H A P L N 1 および M F A P 5 発現レベルの比率を示す。発現レベルは、R T - P C R の比較 C<sub>T</sub> 法により調べられ、比

50

率が  $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$  として算出された。

【図6】図6は、多くのさらなる軟骨細胞および滑膜細胞株におけるHAPLN1発現レベルを示す。発現レベルは、RT-PCRの検量線法により調べられ、18S リボソームRNAで標準化された。初代軟骨細胞(PC)における発現レベルは1とされ；それに合わせてその他の比率が縮尺された。使用した細胞株が表3に記載される。

【図7】図7は、図6に示されるものと同一の株におけるMFAP5発現レベルを示す。発現レベルは、RT-PCRの検量線法により調べられ、18S リボソームRNAで標準化された。初代軟骨細胞(PC)における発現レベルが1とされ；それに合わせて他の比率が縮尺された。

【図8】図8は、図6および7からのHAPLN1およびMFAP5発現レベルの比率を示す。初代軟骨細胞(PC)における比率が1とされ；それに合わせてその他の比率が縮尺された。

【図9】図9は、図6に示されるものと同一の株におけるHAPLN1およびMFAP5発現レベルの比率を示す。発現レベルは、RT-PCRの比較 $C_T$ 法により調べられ、比率が  $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$  として算出された。

【図10】図10Aは、図2および6で示されるものと同一の株、ならびに表4で同定されるさらなる軟骨細胞、滑膜細胞、および皮膚の線維芽細胞株におけるHAPLN1およびMFAP5発現レベルの比率を示す。発現レベルは、実施例3に示されるごとく特注設計のプライマーとプローブを用いるRT-PCRの比較 $C_T$ 法により調べられた。HAPLN1:MFAP5比率は、  $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$  として算出された。図10Bは、表5で同定されるさらなる細胞株におけるHAPLN1およびMFAP5発現レベルの比率を示す。発現レベルは、図10Aに記載されるものと同一の方法を用いて調べられた。

【図11】図11は、単層およびコラーゲン足場(scaffold)培養におけるHAPLN1およびMFAP5に関する発現レベル比率間の比較を示す。使用した細胞株は表7に記載される。HAPLN1およびMFAP5発現レベルはRT-PCRの検量線法により調べられた。発現レベルは18S リボソームRNAで標準化された。初代軟骨細胞(PC)の単層培養における比率が1とされ；それに合わせてその他の比率が縮尺された。

【図12】図12は、図11に示されるものと同一の株を用いる単層およびコラーゲン足場培養におけるHAPLN1およびMFAP5に関する発現レベル比率間の比較を示す。HAPLN1およびMFAP5の発現レベルは、RT-PCRの比較 $C_T$ 法により調べられ、比率は  $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$  として算出された。

【図13】図13は、培養レベルに応じたHAPLN1およびMFAP5に関する発現レベル比率の変化を示す。3つの滑膜細胞株は、図に示されるように、初代培養(培養レベル1)から4回の継代(培養レベル5)を通して培養された。HAPLN1およびMFAP5の発現レベルは、RT-PCRの比較 $C_T$ 法により調べられ、比率は  $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$  として算出された。

【図14】図14Aおよび図14Bは、培養レベルによるHAPLN1およびMFAP5に関する発現レベル比率の変化を示す。図14Aおよび図14Bにおいて、軟骨細胞株は、図で示されるように、軟骨から採取され(培養レベル0)、次いで初代(培養レベル1)から第二継代(培養レベル3)を通して培養された。発現レベルは、実施例5に記載されるごとく特注設計のプライマーとプローブを用いるRT-PCRの比較 $C_T$ 法により調べられた。HAPLN1:MFAP5比率は  $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$  として算出された。

【図15】図15は、軟骨細胞および滑膜細胞の混合した集団の培養におけるHAPLN1およびMFAP5の発現レベルの比率を示す。3回の実験が実施され、各々、2つの細胞タイプの様々な割合で行われた。発現レベルは、実施例6に記載されるごとく特注設計のプライマーとプローブを用いるRT-PCRの比較 $C_T$ 法により調べられた。HAPLN1:MFAP5比率は  $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$  として算出され

10

20

30

40

50

た。

【図 1 6】図 1 6 は、絶対量測定法により調べられるマーカーの絶対的なコピー数を用いて、表 1 2 に記載される様々な細胞株における H A P L N 1 および M F A P 5 の発現レベルのモル比を示す。2  $\mu$  l の c D N A が 1 3  $\mu$  L の P C R 反応あたりに用いたことを除いて、R T - P C R は、実施例 3 に記載されるとおりに行われた。検量線は、1 0 <sup>3</sup>、1 0 <sup>4</sup>、および 1 0 <sup>5</sup> コピー / 反応における合成 H A P L N 1 および M F A P 5 R N A 転写標準物を実行することから調製された。各試験サンプルに存在する H A P L N 1 および M F A P 5 m R N A コピー量はこれらの検量線から調べられた。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 5 】

10

( 発明の詳細な説明 )

本発明は、少なくとも一部において、線維芽細胞および滑膜細胞のごとき一定の非軟骨細胞型において高度に発現される一方で、軟骨細胞では極めて低く発現される遺伝子としての M F A P 5 の同定に基づく。したがって、いくつかの具体例において、本発明は、細胞の表現形マーカーとして M F A P 5 を用いる方法を提供する。M F A P 5 は、フィブリリンに結合し、I 型プロコラーゲンの安定化に関与されることが報告されたセリン - スレオニンリッチタンパク質である (Lemaire et al., Arthritis & Rheumatism, 52(6):1812-1823 (2005))。ヒト M F A P 5 のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、G e n B a n k ( 商標 ) 受入番号 N M \_ 0 0 3 4 8 0 で見出すことができ ; そのヌクレオチド配列はまた、配列番号 1 として提供される。M F A P 5 に加えて、または代えて、その他の線維芽細胞マーカーもまた、以下に記載されるように、本発明の方法に用いることができる。

20

【 0 0 2 6 】

したがって、1 の態様において、本発明は、軟骨細胞を含む細胞培養物の組成物を評価する方法 ( 方法 1 ) および各細胞の表現形を評価する方法 ( 方法 2 ) を提供する。

【 0 0 2 7 】

方法 1 に関する具体例において、各マーカーの発現レベルは、複数の細胞におけるマーカーの平均発現レベルとして調べられる。方法 1 の具体例において、細胞培養物の組成物は、それが軟骨細胞を含むかどうかを調べるために全体として評価されてもよい。方法 2 の具体例において、マーカーの発現レベルは、評価される各細胞におけるマーカーの発現レベルとして調べられる。それゆえ、方法 1 は細胞培養物の組成物を同定する一方で、方法 2 は、各細胞の表現形、例えば、細胞が軟骨細胞であるかどうかを同定する。

30

【 0 0 2 8 】

いくつかの具体例において、線維芽細胞マーカーは、M F A P 5 以外であり、その標準化された発現レベルは線維芽細胞より軟骨細胞においてより低いものである。いくつかの具体例において、線維芽細胞マーカーは、その標準化された発現レベルが線維芽細胞 ( 例えば、皮膚の線維芽細胞 ) および / または滑膜細胞におけるより軟骨細胞 ( 例えば、初代軟骨細胞、培養した脱分化軟骨細胞 ) においてより低いものである。いくつかの具体例において、線維芽細胞マーカーは、線維芽細胞および / または滑膜細胞におけるより軟骨細胞において少なくとも 2 -、5 -、8 -、1 0 倍低いか、またはそれより低く発現される。かかるさらなるマーカーは、例えば、Leung et al., Trends in Genetics, 19(11): 64 9-659 (2003) に記載されるごとき遺伝子アレイ解析を用いて同定されうる。

40

【 0 0 2 9 】

いくつかの具体例において、方法 1 は、細胞培養物から複数の細胞における本発明の線維芽細胞マーカーの発現レベルを調べ、所定の閾値より低い発現レベルが、細胞培養物が軟骨細胞を含むことを示すことを含む。別に、所定の閾値より高い発現レベルは、細胞培養物が軟骨細胞を含まないこと ( 例えば、培養物が少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %、9 9 % またはそれ以上の軟骨細胞を含まないこと ) を示す。

【 0 0 3 0 】

実施態様において、線維芽細胞マーカーは M F A P 5 であり、細胞培養物による M F A

50

P 5 の閾値より高い発現は、培養物が相当な数の非軟骨細胞を含むことを示す。いくつかの具体例において、所定の閾値レベルは、1) 純粋な線維芽細胞の培養物における M F A P 5 発現と同等またはそれより低い (例えば、2、3、4、または 5 倍低い) か、あるいは 2) 純粋な軟骨細胞 (例えば、軟骨の生検から得られた初代軟骨細胞) の培養における M F A P 5 発現のレベルと同等またはそれより高い (例えば、2、3、4、または 5 倍より高い)。M F A P 5 以外の線維芽細胞マーカーについて、所定の閾値は、純粋な線維芽細胞および / または軟骨細胞における各マーカーの発現レベルに基づいて、類似性で選択されうる。「所定の」レベルは、マーカー発現レベルを調べる前に選択されている必要はなく、発現レベルが調べられた後に、例えば、発現結果の統計的解析に基づいて調べられてもよい。

10

**【 0 0 3 1 】**

評価中の培養物からの複数の細胞は、その培養物から得られたサンプルまたは一定分量により示されてもよい。例えば、コラーゲンマトリックス上で増殖された培養物の場合には、パンチサンプリングが実施例に記載されるごとき用いられうる。複数の細胞は、典型的に、少なくとも、一定の方法の発現解析を実施するのに十分な細胞数、またはそれ以上を含む。例えば、P C R については、通常わずか 1 0 - 1 , 0 0 0 個の細胞で十分であるが、より少ない数であっても用いることができる。

**【 0 0 3 2 】**

いくつかの具体例において、方法 1 および方法 2 は、コントロールまたはお互いに対して、線維芽細胞マーカー ( M F A P 5 または別の線維芽細胞マーカー ) および軟骨細胞マーカー ( 例えば、H A P L N 1 または別の軟骨細胞マーカー ) の発現レベルを比較することに関する。いずれのマーカーの発現レベルが調べられる順番は変更することができる。例えば、1 つは、最初に軟骨細胞マーカーの発現レベルを調べ、次に線維芽細胞マーカーの発現レベルを調べることができ、あるいはその逆もありうる。いくつかの具体例において、マーカーの両方のタイプの発現レベルは、同時に調べることができる。

20

**【 0 0 3 3 】**

本発明の方法で有用ないくつかの軟骨細胞マーカーの例は、G e n B a n k (登録商標) 受入番号および配列番号を含み、表 1 で供される。それゆえ、いくつかの具体例において、軟骨細胞マーカーは、H A P L N 1、M G P、E D I L 3、W I S P 3、A G C 1、C O M P、C O L 2 A 1、C O L 9 A 1、C O L 1 1 A 1、L E C T 1、S 1 0 0 B、C R T A C 1、S O X 9、および N E B L から選択される。

30

【表 1 - 1】

表 1：軟骨細胞マーカーの例

| マーカー名                                        | GenBank<br>(登録商標)<br>受入番号 | 配列番号    | 参考文献                                                                        |
|----------------------------------------------|---------------------------|---------|-----------------------------------------------------------------------------|
| ヒアルロン酸と<br>プロテオグリカン<br>連結タンパク質 1<br>(HAPLN1) | NM_001884                 | 配列番号 2  | Buckwalter et al., J.<br>Biol. Chem., 259(9):<br>5361-5363 (1984)           |
| マトリックス<br>Gla<br>タンパク質<br>(MGP)              | NM_000900                 | 配列番号 3  | Monroe et al., Nat<br>Genet., 21(1): 142-4<br>(1999)                        |
| GF様繰り返しと<br>ジスコイジン I 様<br>ドメイン 3<br>(EDIL3)  | NM_005711                 | 配列番号 4  | Genes Dev., 12(1): 21-<br>33 (1998)                                         |
| WNT1 誘導性<br>シグナル経路<br>タンパク質 3<br>(WISP3)     | NM_003880                 | 配列番号 5  | Kutz et al., Mol. Cell.<br>Biol., 25(1): 414-21<br>(2005)                   |
| アグレカン 1<br>(AGC1)                            | NM_001135                 | 配列番号 6  | Roughley et al., Eur.<br>Cell Mater., 11: 1-7<br>(2006)                     |
| 軟骨オリゴマー<br>基質タンパク質<br>(COMP)                 | NM_000095                 | 配列番号 7  | Song et al., J. Hum.<br>Genet., 48(5): 222-5<br>(2003)                      |
| I I 型コラーゲン<br>(COL2A1)                       | NM_001844                 | 配列番号 8  | Nishimura et al., Hum.<br>Mutat., 26(1): 36-43<br>(2005)                    |
| I X 型コラーゲン<br>(COL9A1)                       | NM_001851                 | 配列番号 9  | Czarny-Ratajczak et<br>al., Am. J. Hum.<br>Genet., 69(5): 969-80<br>(2001)) |
| X I 型コラーゲン<br>(COL11A1)                      | NM_001854                 | 配列番号 10 | Poulson et al., J. Med.<br>Genet., 41(8):e107                               |

10

20

30

40

【表 1 - 2】

|                                      |           |         |                                                                |
|--------------------------------------|-----------|---------|----------------------------------------------------------------|
|                                      |           |         | (2004)                                                         |
| 白血球細胞由来<br>ケモタキシン1<br>タンパク質 (LECT1)  | NM_007015 | 配列番号 11 | Hiraki et al., Eur. J.<br>Biochem., 260(3): 869-<br>78 (1999)  |
| S100 カルシウム<br>結合タンパク質<br>ペータ (S100B) | NM_006272 | 配列番号 12 | Steffansson et al.,<br>Nature, 295(5844): 63-<br>4 (1982)      |
| 軟骨酸性<br>タンパク質1<br>(CRTAC1)           | NM_018058 | 配列番号 13 | Steck et al., Biochem.<br>J., 353: 169-174<br>(2001)           |
| SRY-ボックス9<br>タンパク質<br>(SOX9)         | NM_000346 | 配列番号 14 | Kou and Ikegawa, J.<br>Biol. Chem., 279(49):<br>50942-8 (2004) |
| ネブレット<br>(NEBL)                      | NM_006393 | 配列番号 15 | Grogan et al., Arth. &<br>Rheum., 56(2): 586-95<br>(2007)      |

10

20

## 【 0 0 3 4 】

さらなる軟骨細胞マーカーは、例えば、Leung et al., Trends in Genetics, 19(11): 649-659 (2003)に記載されるごとく、例えば、遺伝子アレイ解析を用いて同定することができる。一般的に、軟骨細胞マーカーは、標準化された発現レベルが、線維芽細胞（例えば、皮膚の線維芽細胞）および/または滑膜細胞におけるより軟骨細胞（例えば、初代軟骨細胞、培養した脱分化軟骨細胞）においてより高い遺伝子またはタンパク質である。いくつかの具体例において、軟骨細胞マーカーは、線維芽細胞および/または滑膜細胞におけるより軟骨細胞マーカーにおいて、少なくとも2、4、5、8、10、50、75、100倍またはそれより高く発現される。

30

## 【 0 0 3 5 】

いくつかの具体例において、線維芽細胞マーカーおよび軟骨細胞マーカーは、初代軟骨細胞および/または継代軟骨細胞における発現レベルの比率が、皮膚の線維芽細胞および/または滑膜細胞における発現レベルの比率と同等、あるいは5、10、20、30、50、75、100倍またはそれ以上となるような方法で選択される。

## 【 0 0 3 6 】

特に、いくつかの具体例において、方法1は：

- 細胞培養物から複数の細胞を得；
- 複数の細胞における軟骨細胞マーカーの平均発現レベルを調べ；
- 複数の細胞における線維芽細胞マーカーの平均発現レベルを調べ；次いで
- 軟骨細胞マーカーの平均発現レベルおよび線維芽細胞マーカーの平均発現レベルに基づいて培養物の組成物を調べることを含む。

40

いくつかの具体例において、培養物は、軟骨細胞マーカーの発現レベルが所定の閾値より高く、一方で線維芽細胞マーカーの発現レベルが所定の閾値より低い場合に、軟骨細胞を含むものと同定される。代替的に、培養物は、軟骨細胞マーカーの発現レベルが所定の閾値より低く、一方で線維芽細胞マーカーの発現レベルが所定の閾値レベルより高い場合に、軟骨細胞を含まない（例えば、培養物は、少なくとも50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%またはそれ以上の軟骨細胞

50

を含まない)。

【0037】

方法1のさらなる具体例において、本発明は、細胞培養物の組成物を評価する方法を含み、前記方法が：

- a) 哺乳動物から軟骨の生検を得；
- b) 生検から細胞を単離し；
- c) 工程b)で単離された細胞を細胞培養物中で培養し；
- d) 細胞培養物のサンプルを得；
- e) サンプルから1つまたはそれ以上の細胞におけるM F A P 5およびH A P L N 1の発現レベルを調べ；次いで

f) M F A P 5およびH A P L N 1の発現レベルに基づいて培養物の組成物を調べること

を含むものである。

【0038】

いくつかの具体例において、培養物の組成物を調べる工程は、軟骨細胞マーカーの平均発現レベルおよび線維芽細胞マーカーの平均発現レベルを比較することを含む。いくつかのかかる具体例において、細胞培養物は、H A P L N 1発現のM F A P 5に対する比率が0.25より高い場合に軟骨細胞を含むことと評価される。特定の具体例において、この比率は、細胞培養物が少なくとも50%の軟骨細胞を含むことを示す。

【0039】

いくつかの具体例において、マーカーの発現レベルは、互いに相対的に比較される(それゆえ、閾値は、例えば、2つのマーカーの発現レベル間の一定の差異またはその比率として定義されてもよい)。例えば、いくつかの具体例において、所定の閾値、例えば、0.25、0.55、1、2、2.2、5、10、25、50またはそれ以上より高い、軟骨細胞マーカー(例えば、H A P L N 1)の発現レベルの線維芽細胞マーカー(例えば、M F A P 5)の発現レベルに対する比率は、細胞培養物が軟骨細胞を含むことを示す。

【0040】

方法1のいくつかの具体例において、軟骨細胞および線維芽細胞マーカーの発現レベルは、例えば、(線維芽細胞マーカーおよび軟骨細胞マーカーに必要とされる閾値サイクル数の差異を測定する)定量R T - P C Rの検量線法または定量R T - P C Rの比較C<sub>T</sub>法によりR N Aレベルで調べられる。

【0041】

関連する態様において、本発明は、例えば、フローサイトメトリーを用いて、各細胞の表現形を評価する方法(方法2)を提供する。この方法は、軟骨または滑膜に由来する細胞培養物、軟骨細胞培養物、線維芽細胞培養物、滑膜細胞培養物、あるいはいずれか他の適当な培養物を含む細胞培養物から各細胞を同定するのに有用である。この方法はまた、軟骨サンプル、滑膜サンプル、線維芽細胞サンプルなどを含む、各細胞を同定することが所望されるいずれか適当な生物学的サンプルに由来する各細胞を同定するのに有用である。いくつかの具体例において、方法2は、細胞における本発明の線維芽細胞マーカーの発現レベルを調べ、所定の閾値より低い発現レベルは、細胞が軟骨細胞であることを示すことを含む。代替的に、所定の閾値より高い発現レベルは、細胞が軟骨細胞ではないこと(例えば、細胞が線維芽細胞または滑膜細胞であること)を示す。いくつかの具体例において、方法2は：

- a) 細胞における軟骨細胞マーカーの発現レベルを調べ；
  - b) 細胞における線維芽細胞マーカーの発現レベルを調べ；次いで
  - c) 軟骨細胞マーカーの発現レベルおよび線維芽細胞マーカーの発現レベルに基づいて細胞の表現形を評価すること
- を含む。

いくつかの具体例において、細胞は、軟骨細胞の発現レベルが所定の閾値レベルより高く、一方で線維芽細胞マーカーの発現レベルが所定の閾値レベルより低い場合に、軟骨細胞

10

20

30

40

50

として同定される。方法2の具体例における線維芽細胞および軟骨細胞マーカーは、上記の方法1に関して記載されるごとく選択され、評価されてもよい。

【0042】

フローサイトメトリーは、市販されている抗体を用いて行われうるか、あるいはかかる抗体は、例えば、Linsenmeyer et al., Biochem. Biophys. Res. Com., 92(2): 440-6 (1980)に記載されるごとく調製されてもよい。

【0043】

本発明の方法により評価される細胞および培養物は、軟骨細胞を含んでいてもよく、あるいは含んでいなくてもよい、いずれの組織、細胞培養物、またはその他の物質を含む、いずれの生物学的サンプルから得られてもよい。いくつかの具体例において、評価される細胞または培養物は、哺乳動物、特に、ヒトを起源とするものである。いくつかの具体例において、細胞培養物は、軟骨の生検から解離された細胞から増殖される。例えば、自家培養軟骨細胞移植において、この方法のための軟骨細胞は、通常、移植を受ける患者の軟骨の生検から培養される。Carticel（商標）自家培養軟骨製品（マサチューセッツ州、ケンブリッジのGenzyme Corporation）は、培養した軟骨細胞製品の一例である。本発明のいくつかの具体例において、細胞培養物は、軟骨細胞を載せたコラーゲンマトリックスを含む。かかる軟骨細胞は、軟骨の生検から得られ、例えば、MACI（商標）移植製品中で用いられるごときマトリックス上に載せられる前に培養されてもよい。本発明の方法は、マトリックスを移植する前にコラーゲン支持体上に載せられた細胞を同定し、および/または同定を確認するのに有用である。

【0044】

細胞培養物の判定方法の用途の一例を示すために、図1が参照される。この図は、Carticel（商標）自家培養軟骨細胞を用いるごとく自家培養軟骨細胞移植のために培養した軟骨細胞産物を産生すること、あるいはMACI（商標）移植法のために培養した軟骨細胞産物を産生することに関する工程を示す。工程1において、自家培養軟骨細胞移植を受ける患者からの軟骨の生検は、加工（工程2）のために輸送される。生検の物質は、工程3で消化されて軟骨から軟骨細胞が解離され、採取される。解離された細胞は、組織培養フラスコに置かれ、工程4で初代培養において広げられ、必要であれば、継代培養される。細胞が適切な数に達すると、それらは、患者が移植を受ける準備ができるまで、任意選択的に、工程5で凍結保存されうる。患者が細胞を受ける準備ができると、それらは溶解され、組織培養フラスコ内に載せられ、増殖されて集合培養物が調製される（工程6）。

【0045】

自家培養軟骨細胞移植における使用について、十分な数の細胞が集合培養で得られる場合、細胞は細胞沈殿物まで遠心分離され、出荷培地中に再懸濁され、それはCarticel（商標）自家培養軟骨細胞製品のごとき「最終製品」である（工程8）。この「最終製品」は、例えば、滅菌テスト、細胞生存テスト、エンドトキシンテスト、マイコプラズマテスト、および培養組成物テストを含む、多くのQCテスト（明細書に記載されるごとき工程9「QC同一性」）にかけられることにより、培養した細胞が十分な数の軟骨細胞を含むことが確認される。培養した細胞が全てのQCテストを通過した場合、それらは移植の患者に向けて出荷される（工程11）。

【0046】

代替的に、工程6からの集合培養物がMACI（商標）移植に用いられる際、細胞は、培地中に再懸濁され、コラーゲン足場上に播種され、次いで4日間培養される（工程7）。培養期間の終結時に、細胞は、出荷用培地で洗われてMACI（商標）移植用の最終製品が産生される。この製品はまた、上記に概説したQCテストにかけられる。したがって、最終製品がCarticel（商標）自家培養軟骨細胞のごとき培養した軟骨細胞の懸濁液であろうと、あるいは最終製品がMACI（商標）移植用の足場に播種された産物であろうと、本発明は、培養物の出荷前に軟骨細胞を含むものとして細胞培養物の組成物を確認する、多くの同定アッセイまたは解離アッセイとして有用である。例えば、「QC同

一性」(工程9)は、最終製品の組立前、例えば、工程4、5、6、7、または8前のいずれかの工程で行われうる。

#### 【0047】

遺伝子またはタンパク質の発現レベルを調べる多くの方法は、Sambrook et al. (eds.) Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. (eds.) New York: John Wiley and Sons, 1998)に記載されるごとく当業者に知られている。かかる方法の例は、(PCRによる絶対量測定、リアルタイムPCR(RT-PCR)およびqRT-PCR、多重または単一PCRを含む)ポリメラーゼ鎖反応、single cell PCR、ノザンブロットアッセイ、ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、in situ ハイブリダイゼーションアッセイ、免疫組織化学アッセイ、免疫細胞化学アッセイ、ゲルまたはキャピラリーのごとき電気泳動アッセイ、ウェスタンブロットアッセイ、ELISA、免疫沈殿アッセイ、HPLCまたはゲルクロマトグラフィーのごときクロマトグラフィーに基づいたアッセイ、質量分析アッセイ、RNaseプロテクションアッセイ、フローサイトメトリーアッセイ、DNAメチル化アッセイ、およびヒストン修飾解析アッセイを含む。

#### 【0048】

本発明の全ての方法において、RNAまたはタンパク質レベルにおける発現レベルは、従来の方法のいずれか1つを含むいずれかの適当な方法を用いて調べることができる。RNAレベルは、定量RT-PCR(例えば、TaqMan(登録商標)RT-PCRまたはRT-PCR)、ノザンブロットティング、またはRNAレベルを調べるためのいずれか他の方法により、あるいは実施例に記載されるごとく調べられてもよい。タンパク質レベルは、例えば、ウェスタンブロットティング、ELISA、フローサイトメトリー、酵素活性アッセイ、またはタンパク質レベルを調べるためのいずれか他の方法を用いることにより調べられてもよい。発現レベルは、サンプルおよび/またはコントロールにおけるRNAまたはタンパク質の総量あたりに縮尺および/または標準化されてもよく、コントロールは、典型的に、ベータ-アクチンまたはグリセルアルデヒド-3-ホスホデヒドロゲナーゼ(GAPDH)、または18S リボソームRNAなどのごときハウスキーピング遺伝子であってもよい。標準化は、典型的に、タンパク質、DNA、またはRNAの投入量における変動の割合を計算することで行われる。例えば、実施例では、発現レベルは検量線を用いて18S リボソームRNAで標準化される。

#### 【0049】

実施態様において、線維芽細胞および軟骨細胞マーカーの発現レベルは、相対的な定量化のための検量線によるか、または比較C<sub>T</sub>法による、RT-PCRを用いて調べられる。いくつかの具体例において、マーカーコピー数の絶対量測定は、マーカーの公知な量を用いる検量線を作製することにより調べることができる。かかるアッセイを実施するための一般的な方法は、例えば、Real-Time PCR Systems: Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System and 7300/7500 Real-Time PCR Systems, Chemistry Guide, Applied Biosystems, 2005, Part No. 4348358 Rev. Eに記載される。

#### 【0050】

比較C<sub>T</sub>法を用いて2つのマーカーを比較する場合、線維芽細胞マーカーの発現レベルの軟骨細胞マーカーの発現レベルに対する比率量は、 $(1 + E)^{(C_{T,f} - C_{T,c})}$  [式中、C<sub>T,f</sub>は、線維芽細胞マーカーの閾値サイクル数であり、C<sub>T,c</sub>は、軟骨細胞マーカーの閾値サイクル数であり、ただし、増幅の効率(E)は、両方のマーカーで同一であり、両方のマーカーの開始量が(例えば、2つずつのサンプルにおける)内在性コントロールと同一量に標準化されるものとする]として算出することができる。E = 1の場合、実施例で示されるように、比率は $2^{(C_{T,f} - C_{T,c})}$ に近似されうる。別の方法では、計算は、リアルタイムPCRシステム: Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System and 7300/7500 Real-Time PCR Systems, Chemistry Guide, Applied Biosystems, 2005, Part No. 4348358 Rev. Eの付録Aに記載されるごとく行われう

る。

【 0 0 5 1 】

本発明のさらなる具体例は以下の実施例で示されるが、それらは例示とされ、発明の範囲が限定されるものではない。

【 実施例 1 】

【 0 0 5 2 】

実施例 1：軟骨細胞、滑膜細胞および線維芽細胞における H A P L N 1 および M F A P 5 の発現

細胞の単離および培養——ヒト軟骨細胞培養物を、C a r t i c e l (商標)自家培養軟骨細胞を産生する方法または培養した軟骨細胞を産生するプロテアーゼ法を用いて軟骨から単離した。C a r t i c e l (商標)自家培養軟骨細胞を産生する方法を用いて、軟骨組織から骨と滑膜を取り除き、第 1 の消化にかけ、組織をコラゲナーゼ溶液を用いて 37 で 18 時間酵素学的に処理した。第 1 の消化から解離された細胞を、ウシ胎児血清 (F B S) およびゲンタマイシンを含む培地 (E G H X X) の入った組織培養フラスコに置いた。次いで、細胞を第 2 の消化にかけ、第 1 の消化からの残りの組織を、コラゲナーゼ/トリプシン溶液を用いて 37 で 2.5 時間処理した。第 2 の消化により解離された細胞を、E G H X X の入った組織培養フラスコに置いた。第 2 の消化後に残っている組織片を、E G H X X の入った組織培養フラスコに置いた。プロテアーゼ単離法を用いて、軟骨組織から骨と滑膜を取り除き、プロナーゼ E (ミズーリ州、セントルイスの S i g m a - A l d r i c h 社) 溶液中で 37 において 1.5 時間第 1 の消化にかけた。次に、プロナーゼ溶液を取り除き、軟骨の第 2 の消化を、コラゲナーゼ溶液中で 37 において 18 時間行った。次いで、解離された細胞を E G H X X の入った組織培養フラスコに置いた。単離後の細胞培養方法は、いずれの単離方法から得た細胞に関して同一である。初代細胞培養物に、2 から 4 日ごとに新鮮な E G H X X を提供した。それらを単一細胞の懸濁液へとトリプシン化し、E G H X X で中和してトリプシンを不活性にし、細胞のカウントを行った。次いで、生じた細胞懸濁液をサンプリングし、さらに継代培養により広げ、あるいは長期保存用に凍結保存した。初代培養の継代培養は、二次培養または第一継代と呼ばれる。後の継代培養は、第二継代、第三継代、第四継代などと呼ばれる。継代培養を、細胞を E G H X X の入った組織培養フラスコ中に置き、新鮮な E G H X X を 2 から 4 日ごとに提供することにより行った。継代培養物が 80 % から 100 % のコンフルエンスに達した際に、それらを単一細胞の懸濁液までトリプシン処理し、E G H X X で中和してトリプシンを不活性にし、細胞のカウントを行った。生じた細胞懸濁液をサンプリングし、さらに広げ、あるいは長期保存用に凍結保存した。

【 0 0 5 3 】

ヒト滑膜細胞培養物 (滑膜線維芽細胞としても知られる、滑膜由来の細胞培養物) S 1 および S 2 を、凍結保存された初代培養細胞として C e l l A p p l i c a t i o n s I n c . (カリフォルニア州、サンディエゴ) から得た。滑膜細胞を、E G H X X 培地の入った組織培養フラスコに入れ、上述のごとく C a r t i c e l (商標) 自家培養軟骨細胞を産生する方法を用いて培養した。ヒト皮膚の線維芽細胞培養物を、凍結保存した初代培養細胞として C e l l A p p l i c a t i o n s I n c . から購入した。皮膚の線維芽細胞を、上述のごとく C a r t i c e l (商標) 自家培養軟骨細胞を産生する方法を用いて培養した。

【 0 0 5 4 】

この実施例で用いた細胞培養物を表 2 に列挙する。

## 【表 2】

表2: RT-PCR解析(実施例1)に用いた細胞培養物

| 細胞培養物 | 細胞タイプ    | 細胞培養のタイプ |
|-------|----------|----------|
| PC    | 軟骨細胞     | 初代継代     |
| C1    | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C2    | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| S1    | 滑膜細胞     | 第二継代     |
| S2    | 滑膜細胞     | 第二継代     |
| F1    | 皮膚の線維芽細胞 | 第二継代     |
| F2    | 皮膚の線維芽細胞 | 第二継代     |

10

## 【0055】

RNAとcDNA調製——RNAを、TRISピン法(Reno et al., Biotechniques 22: 1082-6 (1997))を用いて細胞培養物から単離した。単離したRNA濃度を分光測定で調べた。サンプルPC、C1、C2、S1、S2、F1、およびF2に由来するcDNAの調製においては、ランダム六量体プライマーを用いる、First Strand Synthesis Kit(インディアナ州、インディアナポリスのRoche)を、製造業者の説明書に従って実行した。生じたcDNAを解析まで-20 または-80 で保存した。

20

## 【0056】

遺伝子発現解析——遺伝子発現解析を、検量線法または比較C<sub>T</sub>法のいずれかを用いる定量リアルタイムRT-PCRを用いて行った。リアルタイムPCR法は、標的配列の配列特異的プライマー増幅を表す二重標識オリゴプローブの5'ヌクレアーゼ切断に基づいた(TaqMan(商標登録)アッセイ)。軟骨連結タンパク質(HAPLN1)およびミクロフィブリル結合タンパク質5(MFAP5)をコードする遺伝子の発現を、TaqMan(登録商標) Gene Expression Assays Hs00157103\_\_m1およびHs00185803\_\_m1(Applied Biosystems Inc.)を用いてそれぞれアッセイした。リアルタイムPCRをTaqMan(登録商標) Universal PCR Master Mixを用いて調製し、no UNG(カタログ番号4324018、Applied Biosystems Inc.)、適当なTaqMan(登録商標) Gene Expression Assay(Applied Biosystems)およびサンプルcDNAを、Universal PCR Mixのプロトコルに従って使用した。一般的なTaqMan(登録商標)サイクリングおよびこの構成に関するデータ収集プログラムを用いる、ABI7500 Real-Time PCR system(Applied Biosystems Inc.)において増幅を実行した。2つずつの25 μLの反応液を、1ウェルあたり5 ngまでのインプットcDNAで行った。0.1単位の閾値を全てのアッセイで用いた。

30

40

## 【0057】

検量線法——検量線法を、Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control assay(カタログ番号4319413E、Applied Biosystems Inc.)を用いて実施し、18S rRNAを、RT-PCR結果を標準化する内部コントロールとして用いてインプット変動を計算した。各遺伝子の発現の相対的なレベルの定量に関して、初代軟骨細胞(PC)cDNAの希釈を行い、7500システムソフトウェアを用いて検量線を作成した。各試験サンプルの発現レベルを検量線から調べ、生じた初代軟骨細胞コントロール(PC)に対するmRNA比率を、サンプルのPCに対する18S rRNA比率により分けてcDNAローディングを標準

50

化した。

【 0 0 5 8 】

比較  $C_T$  法——比較  $C_T$  解析を行うことにより、上述のごとく作成されたリアルタイム定量  $RT-PCR$  遺伝子発現解析の生データに由来する様々なサンプルにおける、 $HAPLN1$  の  $MFA P5$  に対する相対的な遺伝子発現比率を調べた。比較  $C_T$  法は、基準、検量線解析、または実際の標準物質を必要としない試験サンプル間の直接の比較を可能にする、 $HAPLN1$  の  $MFA P5$  に対する比率の相対的な測定を提供する。この方法は、以下の4つの条件に適合したため、本実施例で用いられる  $HAPLN1$  および  $MFA P5$  アッセイの場合に適用することができる：1) 分析性能が実行ごとに一貫していた；2) 同等量の  $RNA$  を  $HAPLN1$ 、 $MFA P5$ 、および内在性コントロールアッセイにおいて実行した；3) 同等量の  $RNA$  を各アッセイで実施した場合、内在性コントロール遺伝子、 $18S$   $rRNA$  に関する  $C_T$  値は、 $HAPLN1$   $C_T$  または  $MFA P5$   $C_T$  のどちらかより常に低く、それゆえ  $HAPLN1$   $C_T$  または  $MFA P5$   $C_T$  のどちらかが定量化できる場合に常に  $18S$   $C_T$  を定量化できた；ならびに4) この方法は、上述のその他の3つの条件が適合した際に  $MFA P5$   $C_T$  値と同等な  $HAPLN1$   $C_T$  値を生じさせる比率の  $HAPLN1 / MFA P5$  を含む理論上のサンプルと定義される任意選択した理論上の標準物質を用いた。この比較  $C_T$  法に用いられる微分方程式は以下のとおりである。サンプル中の標的遺伝子の量は、内在性コントロール遺伝子で標準化され、標準物質と比較され：

$$(1 + E)^{(-\Delta\Delta C_{T, \text{標的遺伝子}})}$$

[ 式中、

$E$  = 増幅効率

であり、

$\Delta\Delta C_{T, \text{標的遺伝子}} = \text{サンプル } \Delta C_{T, \text{標的遺伝子}} - \text{標準物質 } \Delta C_{T, \text{標的遺伝子}}$

であり、

$\Delta C_{T, \text{標的遺伝子}} = C_{T, \text{標的遺伝子}} - C_{T, \text{内在性コントロール遺伝子}}$

である ]

により付与される (Liu, W. and Saint, D.A., Analytical Biochemistry, 302: 52-59 (2002); Livak, K.J, ABI Prism 7700 Sequence Detection System, User Bulletin 2, ABI publication 4303859, 1997を参照)。次に、 $HAPLN1$  の  $MFA P5$  に対する比率

を：

$$(1 + E)^{(-\Delta\Delta C_{T, HAPLN1})} / (1 + E)^{(-\Delta\Delta C_{T, MFA P5})}$$

のごとく記載することができ、それは、

$$(1 + E)^{(-\{[\text{サンプル } C_{T, HAPLN1} - \text{サンプル } C_{T, \text{内在性コントロール遺伝子}}] - [\text{標準物質 } C_{T, HAPLN1} - \text{標準物質 } C_{T, \text{内在性コントロール遺伝子}}]\})} / (1 + E)^{(-\{[\text{サンプル } C_{T, MFA P5} - \text{サンプル } C_{T, \text{内在性コントロール遺伝子}}] - [\text{標準物質 } C_{T, MFA P5} - \text{標準物質 } C_{T, \text{内在性コントロール遺伝子}}]\})}$$

として表せる。同一量のサンプルを各アッセイで実施する場合、サンプル内在性コントロール遺伝子の  $C_T$  は単語  $x$  により表すことができる。同一量の標準物質を各アッセイで実施する場合、標準物質内在性コントロール遺伝子の  $C_T$  は単語  $y$  により表すことができる。これらの単語で置き換えると、該式は、

$$(1 + E)^{(-\{[\text{サンプル } C_{T, HAPLN1} - x] - [\text{標準物質 } C_{T, HAPLN1} - y]\})} / (1 + E)^{(-\{[\text{サンプル } C_{T, MFA P5} - x] - [\text{標準物質 } C_{T, MFA P5} - y]\})}$$

に誘導され、それは、

$$(1 + E)^{([x - \text{サンプル } C_{T, HAPLN1}] - [y - \text{標準物質 } C_{T, HAPLN1}])} / (1 + E)^{([x - \text{サンプル } C_{T, MFA P5}] - [y - \text{標準物質 } C_{T, MFA P5}])}$$

として表せる。標準物質が、同等量の標準物質を各アッセイで実施する際に  $C_{T, MFA$

$P_5$  値と同等の  $C_{T, HAPLN1}$  値を生じる  $HAPLN1 / MFAP5$  の比率を含む理論上のサンプルと定義される場合、次に、単語  $z$  は、標準物質  $C_{T, HAPLN1}$  および標準物質  $C_{T, MFAP5}$  に置き換えることができる。次いで、該式は、

$$(1 + E)^{([X - \text{サンプル } C_{T, HAPLN1}] - [Y - Z]) / ([X - \text{サンプル } C_{T, MFAP5}] - [Y - Z])}$$

に誘導され、それは、

$$(1 + E)^{([X - \text{サンプル } C_{T, HAPLN1}] - [Y - Z]) - [X - \text{サンプル } C_{T, MFAP5}] + [Y - Z]}$$

として表せ、

$$(1 + E)^{([X - \text{サンプル } C_{T, HAPLN1}] - [X - \text{サンプル } C_{T, MFAP5}])}$$

10

として表せ、

$$(1 + E)^{(\text{サンプル } C_{T, MFAP5} - \text{サンプル } C_{T, HAPLN1})}$$

として表せる。

そして、 $E = 1$  (100% 効率) であるならば、 $HAPLN1$  の  $MFAP5$  に対する相対的な比率は：

$$2^{(\text{サンプル } C_{T, MFAP5} - \text{サンプル } C_{T, HAPLN1})}$$

に誘導される。

上記式は、未知として2つの変数、サンプル  $HAPLN1$   $C_T$  およびサンプル  $MFAP5$   $C_T$  のみを残す最終式となる。この式を、上述の条件下でアッセイする場合に適用し、適用する理論上の標準物質を上述のごとき設定する。

20

【0059】

図2は、RT-PCRの検量線法により調べられるように、数種の細胞株における  $HAPLN1$  発現レベルを示す。図3は、RT-PCRの検量線法により調べられるように、図2に示されるものと同一の細胞サンプルにおける  $MFAP5$  の発現レベルを示す。 $HAPLN1$  は、滑膜細胞および線維芽細胞の細胞培養より軟骨細胞の細胞培養において高く発現された。 $MFAP5$  は、軟骨細胞の細胞培養より滑膜細胞および線維芽細胞の細胞培養において高く発現された。

【0060】

図4は、図2と図3からの  $HAPLN1$  および  $MFAP5$  発現レベルの比率を示す。初代軟骨細胞 (PC) における比率を1に縮尺し；それに合わせてその他の比率を縮尺した。

30

【0061】

図5は、図2で示されるものと同一の株における  $HAPLN1$  および  $MFAP5$  発現レベルの比率を示し、発現レベルをRT-PCRの比較  $C_T$  法により調べた。 $C_T$  法の結果は検量線法により得られた結果と同様であった。

【実施例2】

【0062】

実施例2：軟骨細胞、滑膜細胞および線維芽細胞のさらなる株における  $HAPLN1$  および  $MFAP5$  の発現

40

$HAPLN1$  および  $MFAP5$  の発現レベルをさらなる細胞培養物において調べて軟骨細胞と滑膜細胞培養の間を分化させる方法の信頼度を確認した。本実施例で用いられる培養物を表2に列挙する。

## 【表 3】

表3:RT-PCR解析(実施例2)に用いた細胞培養物

| 細胞培養物 | 細胞タイプ | 細胞培養のタイプ |
|-------|-------|----------|
| PC    | 軟骨細胞  | 初代培養     |
| C3    | 軟骨細胞  | 第二継代     |
| C4    | 軟骨細胞  | 第二継代     |
| C5    | 軟骨細胞  | 第二継代     |
| C6    | 軟骨細胞  | 第二継代     |
| C7    | 軟骨細胞  | 第二継代     |
| S3    | 滑膜細胞  | 第二継代     |
| S4    | 滑膜細胞  | 第二継代     |
| S5    | 滑膜細胞  | 第二継代     |
| S6    | 滑膜細胞  | 第二継代     |
| S7    | 滑膜細胞  | 第二継代     |

## 【0063】

細胞の単離および培養物——ヒト軟骨細胞の細胞培養物C3、C4、C5、C6、およびC7を、実施例1に記載されるごとくCarticel(商標)自家培養軟骨細胞を産生する方法を用いて、単離し、培養した。ヒト滑膜細胞培養物(滑膜線維芽細胞としても知られる滑膜に由来する細胞培養物)を、Genzymeで単離するか、またはCell Applications Inc.(カリフォルニア州、サンディエゴ)から取得した。株S4、S6、およびS7を、様々な方法を用いてGenzymeで単離した。S4を、刻んだ滑膜組織をコラゲナーゼ溶液中において37℃で3.5時間消化させ、次いでトリプシン溶液中において37℃で1時間2番目の消化にかけることにより単離した。株S6を、刻んだ滑膜組織をコラゲナーゼおよびDNaseを含む溶液中において37℃で2時間消化にかけることにより単離した。株S7を、刻んだ滑膜をCarticel(商標)自家培養軟骨細胞を産生する方法にかけることにより単離した。単離後、滑膜由来の細胞をEGHXX培地の入った組織培養フラスコに置き、実施例1に記載されるごとくCarticel(商標)自家培養軟骨細胞を産生する方法を用いて培養した。株S3およびS5を、冷凍保存された第一継代細胞としてCell Applications Inc.から取得した。融解後、株S3およびS5に由来する細胞をEGHXX培地の入った組織培養フラスコに置き、実施例1に記載されるごとくCarticel(商標)自家培養軟骨細胞を産生する方法を用いて培養した。

## 【0064】

RNA単離およびcDNA調製——軟骨細胞の細胞培養物C3、C4、C5、C6、C7および滑膜細胞の培養物S3、S4、S5、S6、S7に関するRNAの調製を実施例1に記載されるごとく行った。これらのサンプルに由来するRNAを、製造業者の説明書に従い、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(カリフォルニア州、フォスターシティーのApplied Biosystems, Inc.)を用いてcDNAに逆転写させた。実施例1に由来するPC cDNAを本実施例で使用した。cDNAを解析するまで-20℃または-80℃で保存した。

## 【0065】

遺伝子発現解析——遺伝子発現解析を、実施例1に記載されるごとくRT-PCRを用いて行った。

## 【0066】

図6は、多くのさらなる軟骨細胞および滑膜細胞株におけるHAPLN1発現レベルを示す。発現レベルを、RT-PCRの検量線法により調べ、18SリボソームRNAで標準化した。

【0067】

図7は、図6に示されるものと同一株におけるMFAP5発現レベルを示す。発現レベルを、RT-PCRの検量線法により調べ、18SリボソームRNAで標準化した。

【0068】

図8は、図6および7に由来するHAPLN1およびMFAP5発現レベルの比率を示す。初代軟骨細胞(PC)における比率を1に縮尺し；それに合わせてその他の比率を縮尺した。

10

【0069】

図9は、図6に示されるものと同一株におけるHAPLN1およびMFAP5発現レベルにおける比率を示す。発現レベルをRT-PCRの比較C<sub>T</sub>法により調べ、その比率を $2^{-(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$ として算出した。

【0070】

さらなる細胞株におけるRT-PCRの結果は、実施例1で得られた結果と一致した。

【実施例3】

【0071】

実施例3：特注設計のプライマーおよびプローブを用いた軟骨細胞、滑膜細胞および線維芽細胞におけるHAPLN1およびMFAP5の発現

20

様々な軟骨細胞、滑膜細胞、および皮膚の線維芽細胞培養物のテストを、公知のオリゴヌクレオチド配列のプライマーおよびプローブを用いて行った。

【0072】

細胞の単離および培養——本実施例で用いられる細胞株を以下の表4および5に列挙する。ヒト軟骨細胞の細胞培養物C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C26、C28、C30、およびC34を、実施例1に記載されるごとくCarticel（商標）自家培養軟骨細胞を産生する方法を用いて（プロテアーゼ法を用いて）単離し、培養した。ヒト滑膜細胞培養物S1、S2、S3、S4、S5、S6、およびS7に関する細胞の単離および培養方法を、実施例1および2に記載した。滑膜細胞物S9を、刻んだ滑膜組織をコラゲナーゼおよびDNaseを含む溶液中において37で2時間消化にかけることにより単離した。滑膜細胞の培養物S10を、刻んだ滑膜組織をコラゲナーゼ溶液中において37で3.5時間消化にかけ、続いてトリプシン溶液中において37で1時間2番目の消化にかけることにより単離した。滑膜細胞株S11、S12、S13、S14、S15、S16、S17、およびS18を、凍結保存された第一継代細胞としてCell Applications Inc. から取得した。皮膚の線維芽細胞株F1、F2、F3、F4、F5、F6、F8、F9、F10、およびF11を、凍結保存された初代培養細胞としてCell Applications Inc. から取得した。全ての細胞培養物を、実施例1に記載されるごとくCarticel（商標）自家培養軟骨細胞を産生する方法を用いて培養した。

30

【表 4】

表4:RT-PCR解析(実施例3)に用いた細胞培養物の1番目のセット

| 細胞培養 | 細胞タイプ    | 細胞培養のタイプ |
|------|----------|----------|
| C1   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C2   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C3   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C4   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C5   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C6   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C7   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C8   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| S1   | 滑膜細胞     | 第二継代     |
| S2   | 滑膜細胞     | 第二継代     |
| S3   | 滑膜細胞     | 第二継代     |
| S4   | 滑膜細胞     | 第二継代     |
| S5   | 滑膜細胞     | 第二継代     |
| S6   | 滑膜細胞     | 第二継代     |
| S7   | 滑膜細胞     | 第二継代     |
| S9   | 滑膜細胞     | 第一継代     |
| S10  | 滑膜細胞     | 第三継代     |
| S11  | 滑膜細胞     | 第三継代     |
| S12  | 滑膜細胞     | 第三継代     |
| S13  | 滑膜細胞     | 第三継代     |
| F1   | 皮膚の線維芽細胞 | 第二継代     |
| F2   | 皮膚の線維芽細胞 | 第二継代     |
| F3   | 皮膚の線維芽細胞 | 第二継代     |
| F4   | 皮膚の線維芽細胞 | 第二継代     |
| F5   | 皮膚の線維芽細胞 | 第二継代     |
| F6   | 皮膚の線維芽細胞 | 第二継代     |

10

20

30

【表 5】

表5:RT-PCR解析(実施例3)に用いた細胞培養物の2番目のセット

| 細胞培養物 | 細胞タイプ    | 細胞培養のタイプ |
|-------|----------|----------|
| C21   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C22   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C23   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C24   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C25   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C26   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C27   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C28   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C29   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C30   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C31   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C32   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C33   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C34   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| S14   | 滑膜細胞     | 第三継代     |
| S15   | 滑膜細胞     | 第三継代     |
| S16   | 滑膜細胞     | 第三継代     |
| S17   | 滑膜細胞     | 第二継代     |
| S18   | 滑膜細胞     | 第二継代     |
| F8    | 皮膚の線維芽細胞 | 第二継代     |
| F9    | 皮膚の線維芽細胞 | 第二継代     |
| F10   | 皮膚の線維芽細胞 | 第二継代     |
| F11   | 皮膚の線維芽細胞 | 第二継代     |

## 【 0 0 7 3 】

RNA単離およびcDNA調製——軟骨細胞株C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、滑膜細胞株S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、ならびに皮膚の線維芽細胞株F1およびF2に由来するRNAの調製を実施例1および2に記載した。軟骨細胞株C8、滑膜細胞株S9、S10、S11、S12、S13、S14、皮膚の線維芽細胞株F3、F4、F5、およびF6、ならびに表5に列挙する全ての株について、RNeasy（登録商標）Mini Kit（カリフォルニア州、バレンシアのQiagen）RNA単離法を用いた。RNeasy（登録商標）単離では、360μLの溶解溶液を100万個以下の細胞を含む細胞沈殿物に添加した。サンプルをすぐに最大速度で30秒間ボルテックスし、次いで37℃で5分間静置した。インキュベーション後、サンプルを手で10秒振り、さらに最大速度で30秒ボルテックスした。各チューブの内容物を収集し、溶解物をQiaShredder（登録商標）column（Qiagen）に通した。350μLのQiaShredderを通した溶解物を、動物細胞に由来するRNAの単離に関する製造業者のプロトコルに従ってRNeasy（登録商標）法を用いた。カラムを30μLの水からなる1回の溶出で溶出した。RNAを、製造業者の説明書に従って、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（カリフォルニア州、フォスターシティーのApplied Biosystems, Inc.）を用いてcDNAに逆転写した。生じたcDNAを解析まで-20℃または-80℃で保存した。

## 【 0 0 7 4 】

遺伝子発現解析——RT-PCRアッセイを、HAPLN1およびMFAP5 mRNAの領域に特異的な特注設計プライマーおよびプローブを用いて行った。特注プライマーおよびプローブに関する配列情報を表6に示す。略記：6FAM=6-カルボキシフルオレセイン、VIC(登録商標)は、Applied Biosystems Inc.の商標であり、蛍光色素分子である、MGBNFQ=副溝結合蛍光消光剤(Minor groove binder non-fluorescent quencher)。プライマーをInvitrogen Corp.(カリフォルニア州、カールズバッド)から取得した。プローブをApplied Biosystems Inc.から得た。HAPLN1に関しては、フォワードプライマーの標的はGenBank受入番号NM\_001884.2(配列番号2)で寄託されたHAPLN1配列のヌクレオチド543から570であり、リバースプライマーの標的はヌクレオチド603から622であり、プローブの配列は同一配列のヌクレオチド584から601である。MFAP5に関しては、フォワードプライマーの標的はGenBank受入番号NM\_003480.2(配列番号1)で寄託されたMFAP5配列のヌクレオチド301から322であり、リバースプライマーの標的はヌクレオチド353から372であり、プローブの配列は同一配列のヌクレオチド334から350である。リアルタイムPCRを、TaqMan(登録商標)

Fast Universal PCR Master Mix, no UNG(カタログ番号4352042、Applied Biosystems Inc.)、900 nM プライマー、250 nM プローブ、および5 ngのサンプルcDNAを用いてTaqMan(登録商標) Fast Universal PCR Mixプロトコルに従って行った。反応体積は13  $\mu$ Lであり、増幅を、初期設定Fast TaqMan(等速商標)サイクリングおよびこの設定に関するデータ収集プログラムを用いてABI 7500 Real-Time PCR system(Applied Biosystems Inc.)において行った。0.1単位の閾値を全てのアッセイで用いた。発現レベルを、実施例1に記載されるRT-PCRの比較C<sub>T</sub>法により調べた。

## 【表6】

表6:特注プライマーおよびプローブの配列

| マーカー   | フォワードプライマー                                         | リバースプライマー                                  | プローブ                                                      |
|--------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| HAPLN1 | 5' TGAAGGATTAGAAG<br>ATGATACTGTTGTG 3'<br>(配列番号16) | 5' GCCCCAGTCG<br>TGGAAAGTAA 3'<br>(配列番号17) | 5' VIC /<br>TACAAGGTGTGGTATTCC<br>/ MGBNFQ 3'<br>(配列番号18) |
| MFAP5  | 5' CGAGGAGACGA<br>TGTGACTCAAG 3'<br>(配列番号19)       | 5' AGCGGGATCA<br>TTCACCAGAT 3'<br>(配列番号20) | 5' 6FAM /<br>ACATTCACAGAAGATCC<br>/ MGBNFQ 3'<br>(配列番号21) |

## 【 0 0 7 5 】

表10Aは、表2および6で示されるものと同一の株、ならびに表4に由来するさらなる軟骨細胞、滑膜細胞、および皮膚の線維芽細胞株におけるHAPLN1およびMFAP5発現レベルの比率を示す。表10Bは、表5からの株におけるHAPLN1およびMFAP5発現レベルの比率を示す。特注設計のプライマーおよびプローブを用いて得られた結果は、実施例1および2に記載される結果と同様であった。

## 【実施例4】

## 【 0 0 7 6 】

実施例4：単層およびコラーゲン足場中の軟骨細胞、滑膜細胞および線維芽細胞培養物におけるHAPLN1およびMFAP5発現レベルの比較

H A P L N 1 および M F A P 5 の発現レベルを、単層およびコラーゲン足場における培養物の様々なタイプにおいて比較した。

【 0 0 7 7 】

細胞単離および培養——軟骨細胞培養物 C 9、C 1 0、C 1 1、C 1 2、C 1 3、C 1 4、C 1 5、C 1 6、C 1 7、および C 1 8 を、実施例 1 に記載されるプロテアーゼ法を用いて単離し、実施例 1 に記載されるごとく培養した。滑膜細胞培養物 S 7 を、実施例 1 および 2 に記載されるごとく単離し、培養した。皮膚の線維芽細胞培養物 F 2 および F 7 を、凍結保存された初代培養細胞として C e l l A p p l i c a t i o n s I n c , から取得し、実施例 1 に記載されるごとく培養した。第二継代培養（培養物 S 7 に関する第三継代）の完了後に、サンプルを R N A 単離し（「 0 日目」または単層サンプル）、次いで細胞を E G H X X 培地中で再懸濁し、 $20\text{ cm}^2$  の M A I X（登録商標）足場（A C I - M A I X（登録商標）コラーゲン膜、C E、ドイツ、ヘルツォーゲンラート D - 5 2 1 3 4 の M a t r i c e l G m b H）上に播種した。細胞を 3 7 で 1 時間接着させ、次いで足場にさらなる E G H X X を供し、4 日間培養した。滑膜細胞および皮膚の線維芽細胞を含む足場培養も同一の方法で調製した。足場培養の 4 日後、培養物を 8 mm 生検パンチを用いて培養をサンプリングし（「 4 日目」または足場サンプル）、R N A 単離を行った。

10

【 0 0 7 8 】

R N A 単離および c D N A 調製——R N A を R N e a s y（登録商標）M i n i K i t（カリフォルニア州、バレンシアの Q i a g e n）を用いて単離した。R N e a s y（登録商標）単離について、 $360\text{ }\mu\text{L}$  の溶解溶液を M A C I（登録商標）移植サンプル（1 回の調製あたり 2 つの 8 mm M A C I（登録商標）移植パンチまで）に添加した。サンプルを迅速に最大速度で 3 0 秒間ボルテックスし、次いで 3 7 で 5 分間静置した。インキュベーション後、サンプルを手で 1 0 秒間振って膜を広げ、続いて最大速度でさらに 3 0 秒ボルテックスした。各チューブの内容物を収集し、溶解物を Q i a s h r e d d e r c o l u m n（Q i a g e n）に通した。 $350\text{ }\mu\text{L}$  の Q i a s h r e d d e r を通した溶解物を、動物細胞に由来する R N A の単離に関する製造業者の説明書に従って R N e a s y（登録商標）法で使用した。カラムを  $30\text{ }\mu\text{L}$  の水からなる 1 つの溶出液を用いて溶出した。サンプル R N A からの c D N A の調製を、H i g h C a p a c i t y c D N A R e v e r s e T r a n s c r i p t i o n K i t（カリフォルニア州、フォスターシティーの A p p l i e d B i o s y s t e m s , I n c .）を用いて製造業者の説明書に従って行った。c D N A を - 2 0 または - 8 0 で保存した。

20

30

【 0 0 7 9 】

表 7 は、使用した細胞培養物および本実施例で使用した構成を列举する。

【表 7】

表7:RT-PCR解析(実施例4)に用いた細胞培養物

| 培養コード   | 細胞タイプ    | 培養タイプ    | 形状                        |
|---------|----------|----------|---------------------------|
| C9 0日目  | 軟骨細胞     | 第二継代     | 5 X 10 <sup>5</sup> 細胞沈殿物 |
| C10 0日目 | 軟骨細胞     | 第二継代     | 5 X 10 <sup>5</sup> 細胞沈殿物 |
| C11 0日目 | 軟骨細胞     | 第二継代     | 5 X 10 <sup>5</sup> 細胞沈殿物 |
| C12 0日目 | 軟骨細胞     | 第二継代     | 5 X 10 <sup>5</sup> 細胞沈殿物 |
| C13 0日目 | 軟骨細胞     | 第二継代     | 5 X 10 <sup>5</sup> 細胞沈殿物 |
| C14 0日目 | 軟骨細胞     | 第二継代     | 5 X 10 <sup>5</sup> 細胞沈殿物 |
| C15 0日目 | 軟骨細胞     | 第二継代     | 5 X 10 <sup>5</sup> 細胞沈殿物 |
| C16 0日目 | 軟骨細胞     | 第二継代     | 5 X 10 <sup>5</sup> 細胞沈殿物 |
| C17 0日目 | 軟骨細胞     | 第二継代     | 5 X 10 <sup>5</sup> 細胞沈殿物 |
| C18 0日目 | 軟骨細胞     | 第二継代     | 5 X 10 <sup>5</sup> 細胞沈殿物 |
| S7 0日目  | 滑膜細胞     | 第三継代     | 5 X 10 <sup>5</sup> 細胞沈殿物 |
| F7 0日目  | 皮膚の線維芽細胞 | 第二継代     | 5 X 10 <sup>5</sup> 細胞沈殿物 |
| F2 0日目  | 皮膚の線維芽細胞 | 第二継代     | 5 X 10 <sup>5</sup> 細胞沈殿物 |
| C9 4日目  | 軟骨細胞     | MACI® 移植 | 8 mm パンチ                  |
| C10 4日目 | 軟骨細胞     | MACI® 移植 | 8 mm パンチ                  |
| C11 4日目 | 軟骨細胞     | MACI® 移植 | 8 mm パンチ                  |
| C12 4日目 | 軟骨細胞     | MACI® 移植 | 8 mm パンチ                  |
| C13 4日目 | 軟骨細胞     | MACI® 移植 | 8 mm パンチ                  |
| C14 4日目 | 軟骨細胞     | MACI® 移植 | 8 mm パンチ                  |
| C15 4日目 | 軟骨細胞     | MACI® 移植 | 8 mm パンチ                  |
| C16 4日目 | 軟骨細胞     | MACI® 移植 | 8 mm パンチ                  |
| C17 4日目 | 軟骨細胞     | MACI® 移植 | 8 mm パンチ                  |
| C18 4日目 | 軟骨細胞     | MACI® 移植 | 8 mm パンチ                  |
| S7 4日目  | 滑膜細胞     | MACI® 移植 | 8 mm パンチ                  |
| F7 4日目  | 皮膚の線維芽細胞 | MACI® 移植 | 8 mm パンチ                  |
| F2 4日目  | 皮膚の線維芽細胞 | MACI® 移植 | 8 mm パンチ                  |

## 【0080】

遺伝子発現解析——単層およびMACI（商標）移植cDNAの遺伝子発現解析を、上記の実施例1で概略した方法で実施した。

## 【0081】

図11は、単層およびコラーゲン足場培養におけるHAPLN1およびMFAP5に関する発現レベル比率間の比較を示す。HAPLN1およびMFAP5発現レベルを、RT-PCRの検量線法により調べた。発現レベルを18SリボソームRNAで標準化した。初代軟骨細胞（PC）の単層培養における比率を1に縮尺し；これに合わせて他の比率を縮尺した。

## 【0082】

図12は、図11に示されるものと同じの株を用いて、単層およびコラーゲン足場培養におけるHAPLN1およびMFAP5に関する発現レベル比率間の比較を示す。HAP

L N 1 および M F A P 5 の発現レベルを、R T - P C R の比較  $C_T$  法により調べ、比率を  $2^{-(C_{T, M F A P 5} - C_{T, H A P L N 1})}$  として算出した。

【0083】

足場培養で得た結果は単層培養で得たものと同様であった。

【実施例5】

【0084】

実施例5：継代数による H A P L N 1 および M F A P 5 の発現

様々な培養レベルにおける H A P L N 1 の M F A P 5 に対する比率を調べた。

【0085】

細胞の単離および培養——軟骨細胞培養物 C 1 9、C 2 0、C 3 1、C 3 2、および C 3 3 を、実施例 1 に記載されるごとくプロテアーゼ法を用いて単離し、実施例 1 に記載されるごとく培養した。滑膜細胞培養物 S 6 および S 7 を、実施例 1 および 2 に記載されるごとく単離し、培養した。滑膜細胞培養物 S 8 を、刻んだ滑膜組織をコラゲナーゼおよび D N a s e を含む溶液中において 3 7 で 2 時間消化にかけることにより単離した。S 8 の細胞培養物を、実施例 1 に記載されるごとく行った。軟骨細胞培養物 C 1 9、C 2 0、C 3 1、C 3 2、および C 3 3 について、(図 1 4 A と 1 4 B において「1」と表示した)軟骨由来の細胞、(図 1 4 A と 1 4 B において「2」と表示した)第一継代細胞、および(図 1 4 A と 1 4 B において「3」と表示した)第二継代細胞のサンプルを取得した。滑膜細胞培養物 S 7 について、(図 1 3 において「1」と表示した)初代培養、(図 1 3 において「2」と表示した)第一継代、(図 1 3 において「3」と表示した)第二継代、(図 1 3 において「4」と表示した)第三継代、および(図 1 3 において「5」と表示した)第四継代細胞のサンプルを取得した。滑膜細胞培養物 S 6 および S 8 について、(図 1 3 において「2」と表示した)第一継代、(図 1 3 において「3」と表示した)第二継代、(図 1 3 において「4」と表示した)第三継代、および(図 1 3 において「5」と表示した)第四継代の細胞のサンプルを取得した。

【0086】

R N A 単離および c D N A 調製——R N A および c D N A を、実施例 3 に記載されるごとく R N e a s y (登録商標) M i n i K i t (Q i a g e n) および H i g h C a p a c i t y c D N A R e v e r s e T r a n s c r i p t i o n K i t (A p p l i e d B i o s y s t e m s I n c .) を用いて調製した。

【0087】

遺伝子発現解析——滑膜細胞サンプルの遺伝子発現解析を実施例 1 に記載されるごとく行った。軟骨細胞サンプルの遺伝子発現解析を実施例 3 に記載されるごとく行った。

【0088】

図 1 3、1 4 A、および 1 4 B は、継代数による H A P L N 1 および M F A P 5 に関する発現レベル比率の変化を示す。発現レベルを、R T - P C R の比較  $C_T$  法により調べた。H A P L N 1 : M F A P 5 比率を、 $2^{-(C_{T, M F A P 5} - C_{T, H A P L N 1})}$  として算出した。

【0089】

H A P L N 1 の M F A P 5 に対する比率は、軟骨細胞サンプルに対する滑膜細胞サンプルについて、全ての培養レベルで一貫して低かった。H A P L N 1 の M F A P 5 に対する比率は、滑膜細胞サンプルに対する軟骨細胞サンプルについて、全ての培養レベルで一貫して高かった。

【実施例6】

【0090】

実施例6：混合した細胞培養物における H A P L N 1 および M F A P 5 の発現

遺伝子発現解析を軟骨細胞と滑膜細胞の混合した培養の細胞に適用することにより、混合した培養物における方法の感受性レベルを評価した。ヒト軟骨細胞およびヒト滑膜細胞の細胞混合物を用いて以下の特性の 2 つの細胞タイプの混合物：

1) 0 % 軟骨細胞 / 1 0 0 % 滑膜細胞；

10

20

30

40

50

- 2) 25% 軟骨細胞 / 75% 滑膜細胞 ;
- 3) 50% 軟骨細胞 / 50% 滑膜細胞 ;
- 4) 75% 軟骨細胞 / 25% 滑膜細胞 ; および
- 5) 100% 軟骨細胞 / 0% 滑膜細胞

を調製した。

#### 【0091】

細胞の単離および培養——軟骨細胞株 C5、C6、および C8 を実施例 1 および 2 に記載されるごとく単離し、培養した。滑膜細胞の培養物 S6、S7、および S9 を、実施例 1、2、および 3 に記載されるごとく単離し、培養した。混合実験 1 においては、軟骨細胞株 6 (C6) および滑膜細胞株 6 (S6) の第二継代培養物を用いた。混合実験 2 においては、軟骨細胞株 8 (C8) および滑膜細胞株 7 (S7) の第一継代培養物を用いた。混合実験 3 においては、軟骨細胞株 5 (C5) および滑膜細胞株 9 (S9) の第一継代培養物を用いた。

10

#### 【0092】

RNA 単離および cDNA 調製——RNA および cDNA を、実施例 3 に記載されるごとく、RNeasy (登録商標) Mini Kit (Qiagen) および High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems Inc.) を用いて調製した。

#### 【0093】

遺伝子発現解析——遺伝子発現解析を、実施例 3 に記載されるごとく行った。

20

#### 【0094】

遺伝子レベルを、RT-PCR の比較  $C_T$  法により調べた。HAPLN1 : MFAP5 比率を、 $2^{-(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$  として算出した。混合実験の結果を図 15 において提供し、この図は、軟骨細胞および滑膜細胞の混合集団からなるサンプルにおける HAPLN1 および MFAP5 の発現レベルの比率を示す。75% またはそれより少ない軟骨細胞および 25% またはそれより多い滑膜細胞を含んだ培養物において、HAPLN1 : MFAP5 発現レベル比率は、約 1 またはそれより低かった。より高い比率は、テストしたサンプルにおけるより高い割合の軟骨細胞に相当する。細胞培養物の混合物を識別するアッセイの能力は、平均して、サンプルが、陽性  $C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1}$  を産生する滑膜線維芽細胞からなる平衡を有する少なくとも 67% の軟骨細胞からなることを示した。皮膚の線維芽細胞のごとき他の細胞タイプによる混入もこのアッセイで検出することができる。

30

#### 【実施例 7】

#### 【0095】

実施例 7 : アッセイ応答とマーカーの分子比間の関連解析

HAPLN1 および MFAP5 の合成 RNA 転写物を用いてテストサンプルにおけるアッセイ応答とマーカーの分子比間の関連を調べた。まず、最初の PCR (Platinum PCR Supermix、Invitrogen カタログ番号 11306-016) を、表 8 に列挙したプライマーを用いてヒト cDNA において行った。HAPLN1 について、これらのプライマーを、HAPLN1 遺伝子 (受入番号 NM\_001884.2) の位置 256 から 1171 までのヌクレオチドで増幅した。MFAP5 について、これらのプライマーを、MFAP5 遺伝子 (受入番号 NM\_003480.2) の位置 32 から 728 までのヌクレオチドで増幅した。PCR 産物を、100 塩基対の分子サイズラダー (100bp PCR Molecular Ruler、BioRad カタログ番号 170-8206) を対照に用いて 1.5% トリス - 酢酸 EDTA (TAE) アガロースゲルおよび SYBR Green I (Invitrogen カタログ番号 S-7563) ゲル染色で解析した。生じた最初の増幅産物を、4% 天然トリス - ホウ酸 EDTA (TBE) ポリアクリルアミド (PAGE) ゲルを用いてゲルで精製し、表 8 に列挙したプライマーを用いて 2 番目の PCR に鋳型として用いた。二番目の MFAP5 増幅において、ゲル精製した最初の増幅産物の鋳型を、2 番目の反応の 200  $\mu$ L あたり 0.56 ng で

40

50

ロードした。2番目のHAPLN1増幅において、ゲル精製した最初の鋳型を、2番目の反応の900  $\mu$ Lあたり2.5 ngでロードした。2番目の増幅産物を、記載のとおり、天然TBE PAGEゲルから精製し、Ambion Megascript T7 Kitを用いるインビトロ転写における鋳型として使用した。2番目の増幅産物の鋳型の1.3  $\mu$ gまでを、20  $\mu$ Lあたりの転写反応で用いた。生じた転写物を、6% TBE - 尿素(TBU)ポリアクリルアミドゲルを用いてゲルで精製し、0.1 mM EDTA中で再懸濁し、次いで40 ng/ $\mu$ L RNAの濃度に相当する1 A<sub>260</sub>単位の変換因子を用いて2回実施した読み取りで分光光度的に定量した。ゲル精製した転写物を6% TBUゲル上で解析して純度を評価した。PAGE解析による純度の決定および分光光度測定による定量後、 $\mu$ Lあたりの転写物のコピー数を表9に列挙する変換因子を用いて調べた。これらの変換因子は、343ダルトンの平均塩基分子量を想定する。アボガドロ定数を $6.02 \times 10^{23}$ /モルとした。また、転写された最初の塩基は、T7プロモーター、続いて標的配列から+1 Gであると想定した。転写物を、 $10^3$ から $10^8$ コピー/ $\mu$ Lの範囲である濃度の酵母RNAキャリア緩衝液(ヌクレアーゼフリー水中の酵母RNA(Ambionカタログ番号AM7120G)の20 ng/ $\mu$ Lの溶液)で希釈した。次に、希釈液を、2  $\mu$ LのcDNAを13  $\mu$ LのPCR反応ごとに用いることを除いて、親出願の実施例3で供されるRT-PCR法を用いてテストした。次いで、HAPLN1:MFAP5の比率を、親出願の実施例4に記載されるごとく比較Ct法を用いて各希釈液について算出した。

【0096】

コピー数の標準物質を用いるアッセイ応答を公知の分子比と比較した。これらの結果を表10に示す。決定したアッセイ応答と分子比間の関連をもって、様々なアッセイ応答における正確な分子比を算出した。表11に示すこれらの結果は、比較Ctで決めた受容境界値(acceptance boundary)が1に等しい場合(例えば、HAPLN1:MFAP5 = 1)、これがHAPLN1:MFAP5の正確な分子比の2.212に相当することを示す。

【表8】

表8:コピー数標準物質の増幅に用いたプライマー

| マーカー   | フォワードプライマー<br>(1番目のPCR)                      | フォワードプライマー<br>(2番目のPCR)                                          | リバースプライマー<br>(1番目と2番目のPCR)                   |
|--------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| HAPLN1 | 5' GCCAAGGTGTTTT<br>CACACAG 3'<br>(配列番号 22)  | 5' TAATACGACTCACTATAGGGGC<br>CAAGGTGTTTTTCACACAG 3'<br>(配列番号 23) | 5' CTCTGAAGCAGTA<br>GACACCA 3'<br>(配列番号 24)  |
| MFAP5  | 5' CCTAGCCTGGCTT<br>TCTTGCTC 3'<br>(配列番号 25) | 5' TAATACGACTCACTATAGGGCCT<br>AGCCTGGCTTTCTTGCTC 3'<br>(配列番号 26) | 5' CCATTGGGTCTCT<br>GCAAATCC 3'<br>(配列番号 27) |

【表 9】

表9:期待される転写物のサイズと変換因子

| 転写物    | 期待される<br>転写物のサイズ<br>(塩基) | 分子量<br>(ダルトン)            | コピー/ng                  |
|--------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| HAPLN1 | 917                      | $3.145 \times 10^5$ g/モル | $1.914 \times 10^9$ /ng |
| MFAP5  | 698                      | $2.394 \times 10^5$ g/モル | $2.515 \times 10^9$ /ng |

10

【表 10】

表10:マーカーのアッセイ応答対分子比

| HAPLN1<br>のコピー  | MFAP5<br>のコピー   | HAPLN1:MFAP5<br>の正確な分子比 | HAPLN1:MFAP5<br>アッセイ応答 |
|-----------------|-----------------|-------------------------|------------------------|
| $1 \times 10^8$ | $1 \times 10^8$ | 1                       | 0.470                  |
| $1 \times 10^7$ | $1 \times 10^7$ | 1                       | 0.448                  |
| $1 \times 10^6$ | $1 \times 10^6$ | 1                       | 0.423                  |
| $1 \times 10^5$ | $1 \times 10^5$ | 1                       | 0.452                  |
| $1 \times 10^4$ | $1 \times 10^4$ | 1                       | 0.443                  |
| $1 \times 10^3$ | $1 \times 10^3$ | 1                       | 0.478                  |
|                 |                 |                         | 平均 = 0.452             |

20

【表 11】

表11:様々なアッセイ応答におけるマーカーの正確な分子比

| HAPLN1:MFAP5<br>アッセイ応答 | HAPLN1:MFAP5<br>の正確な分子比 |
|------------------------|-------------------------|
| 500                    | 1106                    |
| 100                    | 221.2                   |
| 5                      | 11.06                   |
| 1                      | 2.212                   |
| 0.2                    | 0.4425                  |
| 0.01                   | 0.02212                 |
| 0.002                  | 0.004425                |

40

【実施例 8】

【0097】

実施例 8:軟骨細胞および線維芽細胞マーカーの絶対量測定解析

絶対量測定法を用いて遺伝子発現解析を行った。様々な培養物を、上記の実施例に記載されるごとく単離し、培養した。細胞培養物からの RNA を、実施例 3 に記載されるごとく RNeasy Kit を用いて単離した。RT-PCR を、 $2 \mu\text{l}$  の cDNA を 13

50

$\mu\text{L}$ のPCR反応ごとに使用したことを除いて、実施例3に記載されるごとく細胞培養物において行った。(実施例7に記載されるごとく調製した)HAPLN1およびMFAP5に関するインビトロ転写したRNA標準物質を希釈して $1\mu\text{L}$ あたり $5 \times 10^2$ 、 $5 \times 10^3$ 、および $5 \times 10^4$ コピーの最終濃度のcDNAを得た。検量線を、y軸に標準物質からのCtの結果を、x軸に1反応あたりのコピー数( $10^3$ 、 $10^4$ 、および $10^5$ )の対数をグラフで表すことにより作成した。線形のトレンドラインをデータに合わせ、各テストサンプルに存在するHAPLN1およびMFAP5 mRNAコピー数を数学的に調べた。この定量方法は、例えば、Real-Time PCR Systems: Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR Systemおよび7300/7500 Real-Time PCR Systems, Chemistry Guide, Applied Biosystems, 2005, Part No. 4348358 Rev. Eに記載されている。次に、HAPLN1:MFAP5のモル比を各サンプルについて算出した。図16は、様々な細胞培養物におけるHAPLN1:MFAP5のモル比を示す。これらの結果は、軟骨細胞におけるHAPLN1:MFAP5のモル比が滑膜細胞および皮膚の線維芽細胞と比較して高いことを示す。

10

# 【表12】

表12:絶対量測定解析(実施例8)を用いた細胞培養物

| 細胞培養物 | 細胞タイプ    | 細胞培養のタイプ |
|-------|----------|----------|
| C26   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C27   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| C28   | 軟骨細胞     | 第二継代     |
| S14   | 滑膜細胞     | 第三継代     |
| S15   | 滑膜細胞     | 第三継代     |
| S16   | 滑膜細胞     | 第三継代     |
| F1    | 皮膚の線維芽細胞 | 第二継代     |
| F2    | 皮膚の線維芽細胞 | 第二継代     |

20

# 【0098】

30

本明細書で引用される全ての刊行物および特許文献は、出典明示により全体が本明細書に援用される。出典明示により援用される物質が本明細書に矛盾するか、または不一致となる範囲まで、かかる物質のいずれのものも本明細書は優先する。

【図 1】

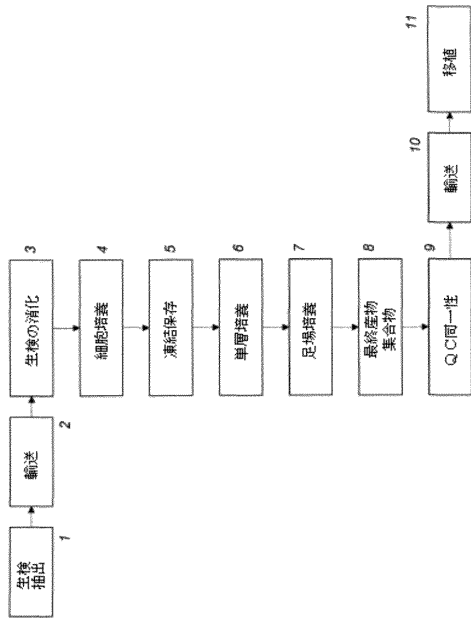


Fig. 1

【図 2】

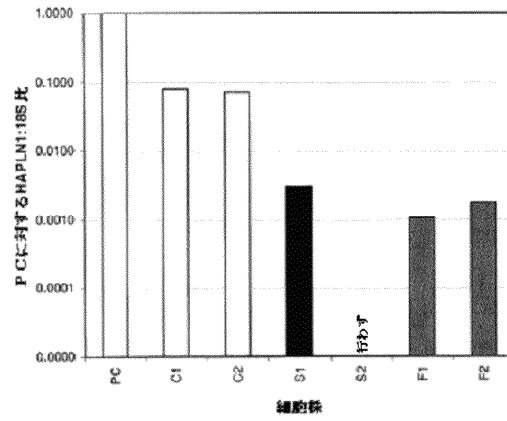


Fig. 2

【図 3】

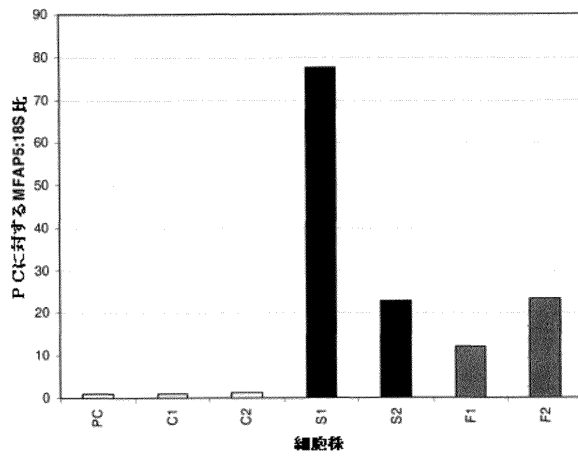


Fig. 3

【図 4】

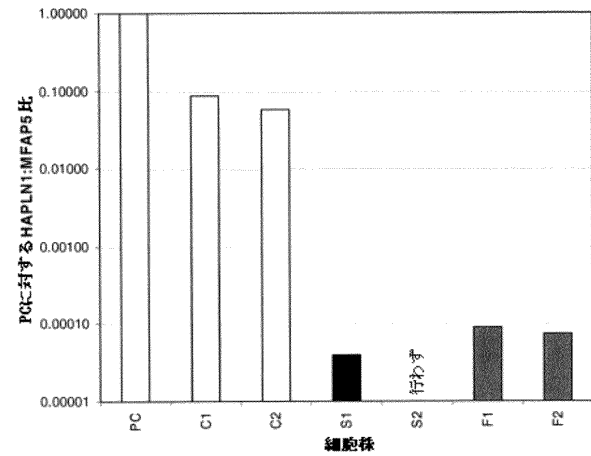


Fig. 4

【図 5】

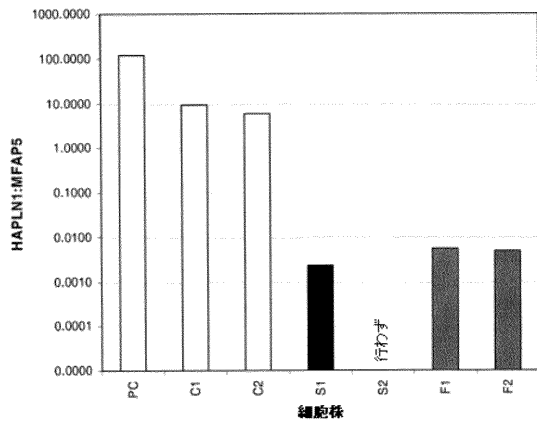


Fig. 5

【図 6】

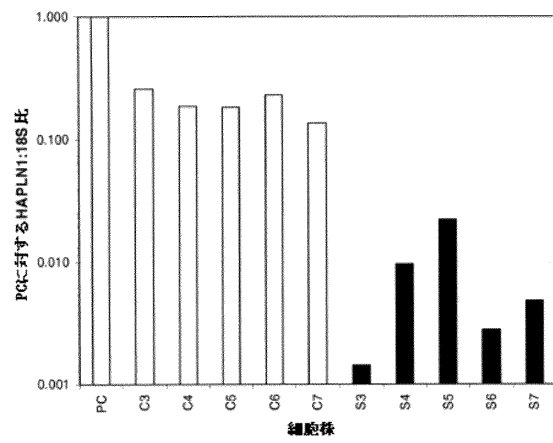


Fig. 6

【図 7】

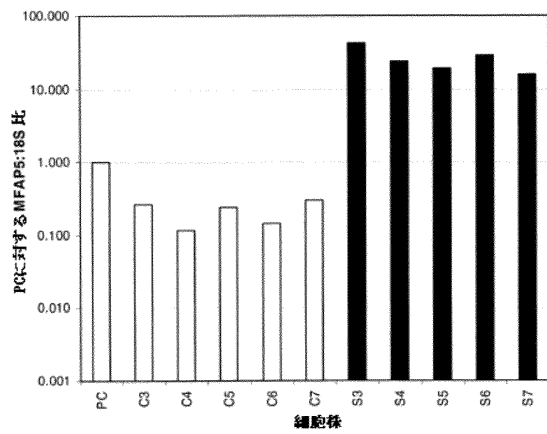


Fig. 7

【図 8】

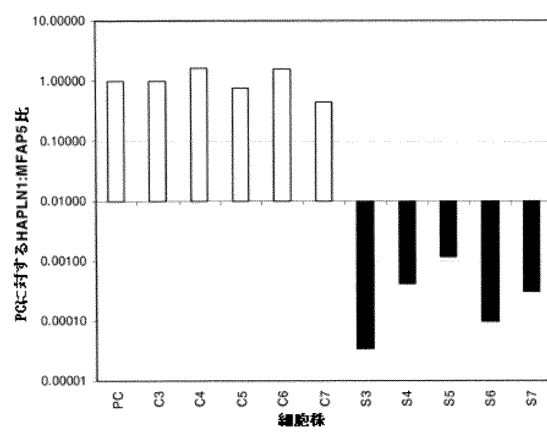


Fig. 8

【図 9】

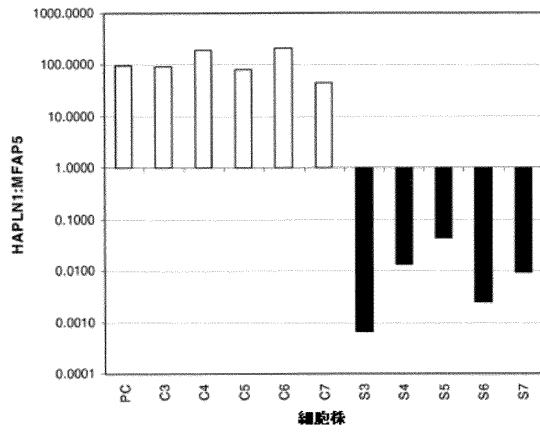


Fig. 9

【図 10 A】

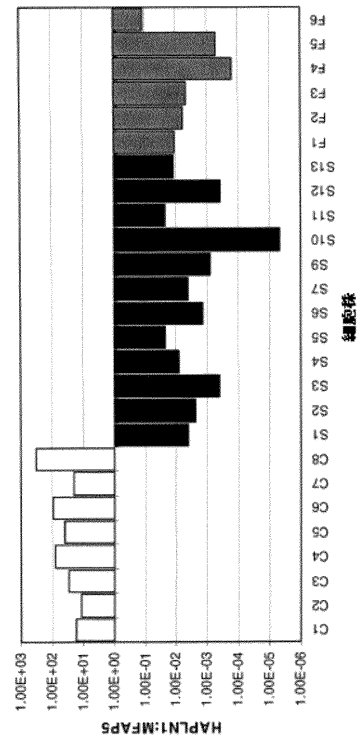


Fig. 10A

【図 10 B】

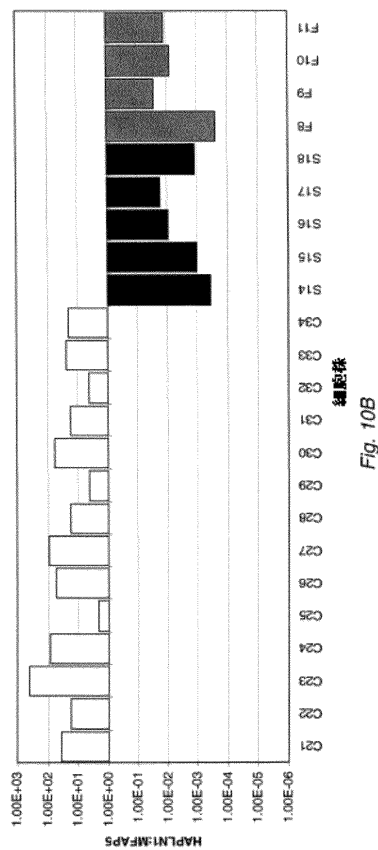


Fig. 10B

【図 11】

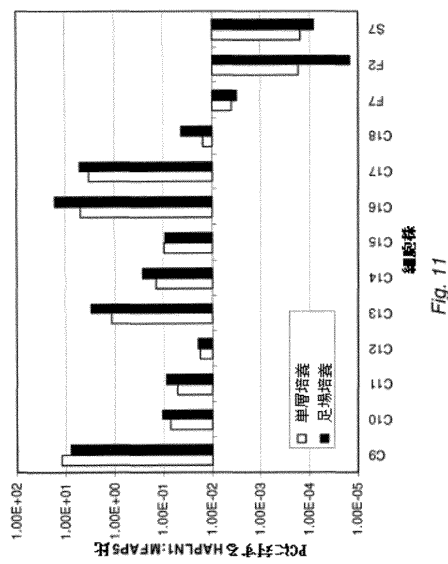
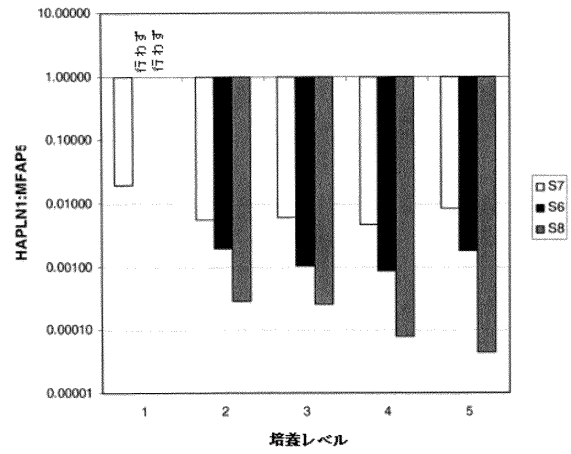
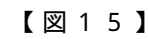


Fig. 11

【 図 1 3 】



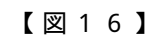
【 図 1 4 A 】



Bar chart showing the ratio of HAPLN1:MFAP5 for three experiments (混合実験 1, 混合実験 2, 混合実験 3) across different percentages of chondrocyte-containing chondroblast cells (0%, 25%, 50%, 75%, 100%). The y-axis is logarithmic, ranging from 0.0001 to 1,000,000.

| 割合 (%) | 混合実験 1   | 混合実験 2   | 混合実験 3  |
|--------|----------|----------|---------|
| 0%     | ~0.0009  | ~0.001   | ~0.001  |
| 25%    | ~0.0008  | ~0.0008  | ~0.001  |
| 50%    | ~0.0008  | ~0.0008  | ~0.0008 |
| 75%    | ~0.0009  | ~0.0015  | ~0.001  |
| 100%   | ~100,000 | ~300,000 | ~50,000 |

【 図 1 4 B 】



| Cell Line | HAPLN1: NFAPs (approx.) |
|-----------|-------------------------|
| C26       | 200                     |
| C27       | 300                     |
| C28       | 70                      |
| S14       | 0.001                   |
| S15       | 0.007                   |
| S16       | 0.003                   |
| F1        | 0.01                    |
| F2        | 0.015                   |

Fig. 16

【配列表】

0005383654000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 スティーブン・ジェイ・デュゲイ  
アメリカ合衆国01970マサチューセッツ州セイレム、フェデラル・ストリート117番

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特表2000-515761(JP, A)  
国際公開第2006/106823(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/00 - 1/70

G01N 33/48 - 33/98

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)

PubMed