

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7661319号
(P7661319)

(45)発行日 令和7年4月14日(2025.4.14)

(24)登録日 令和7年4月4日(2025.4.4)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	5/077(2010.01)	C 1 2 N	5/077
C 1 2 N	5/0775(2010.01)	C 1 2 N	5/0775
C 1 2 N	5/02 (2006.01)	C 1 2 N	5/02
A 6 1 P	19/08 (2006.01)	A 6 1 P	19/08
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
請求項の数 31 (全37頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-520865(P2022-520865)	(73)特許権者	399047002
(86)(22)出願日	令和2年10月7日(2020.10.7)		ユニバーシティ オブ ユタ リサーチ フ
(65)公表番号	特表2022-550911(P2022-550911		ァウンダーション
	A)		アメリカ合衆国ユタ州8 4 1 0 8 , ソル
(43)公表日	令和4年12月5日(2022.12.5)		ト レイク シティ, アラピーン ドライブ
(86)国際出願番号	PCT/US2020/054477		6 1 5 , スイート 3 1 0
(87)国際公開番号	WO2021/071875	(74)代理人	110002572
(87)国際公開日	令和3年4月15日(2021.4.15)		弁理士法人平木国際特許事務所
審査請求日	令和5年9月26日(2023.9.26)	(72)発明者	岡野 光夫
(31)優先権主張番号	62/911,441		アメリカ合衆国 8 4 1 0 2 ユタ州, ソ
(32)優先日	令和1年10月7日(2019.10.7)		ルトレイクシティ, ユニット 4 1 1 ,
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		サウス テンプル 8 3 8
		(72)発明者	キム, キュンソク
			アメリカ合衆国 8 4 1 1 7 ユタ州, マ
			レー, アpartment 2 0 5 , イー.
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 軟骨形成ヒト間葉系幹細胞 (MSC) シート

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

コンフルエントな軟骨分化細胞の少なくとも2つの層を含む軟骨形成細胞シートであって、細胞シートが間葉系幹細胞(MSC)から調製され、細胞シートの基底側の軟骨分化細胞が1つ以上の接着分子を発現し、細胞シートが、I型コラーゲンの低い発現を有する、II型コラーゲン及びプロテオグリカンを含む細胞外マトリクスを含む、軟骨形成細胞シート。

【請求項2】

MSCがヒト骨髄MSC(hBM-MSC)である、請求項1に記載の軟骨形成細胞シート。

【請求項3】

細胞シートが、軟骨分化細胞から本質的になる、請求項1又は2に記載の軟骨形成細胞シート。

【請求項4】

細胞シート内の少なくとも50%の細胞が、軟骨分化細胞である、請求項1又は2に記載の軟骨形成細胞シート。

【請求項5】

軟骨分化細胞が、SOX9、アグリカン、COL2A1、ACAN、COMP及びBMP2からなる群から選択されるタンパク質を発現する、請求項1に記載の軟骨形成細胞シート。

【請求項6】

細胞シートがラクナ構造を含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の軟骨形成細胞シート。

【請求項 7】

1つ以上の接着分子が、フィブロネクチン及びラミニンから選択される、請求項1から6のいずれか一項に記載の軟骨形成細胞シート。

【請求項 8】

細胞シートが、軟骨表面への移植後に軟骨表面への物理的接着を示す、請求項1から7のいずれか一項に記載の軟骨形成細胞シート。

【請求項 9】

軟骨形成細胞シートを調製する方法であって、

a)間葉系幹細胞(MSC)を温度応答性培養器でコンフルエントになるまで培養して細胞シートを形成すること、

b)温度低下によって細胞シートを剥離させ、細胞シートを収縮させ、収縮した細胞シートを形成すること、

c)収縮した細胞シートを培養表面と接触させること、及び

d)培養表面上の収縮した細胞シートを軟骨形成培地で処理し、培養して軟骨形成細胞シートを形成すること

を含み、細胞シートが、I型コラーゲンの低い発現を有する、II型コラーゲン及びプロテオグリカンを含む細胞外マトリクスを含む、方法。

【請求項 10】

収縮した細胞シートが、培養表面上で少なくとも3週間成長される、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

軟骨形成培地が、トランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF β)及び骨形成タンパク質(BMP)からなる群から選択されるタンパク質を含む、請求項9又は10に記載の方法。

【請求項 12】

工程b)における細胞シートが、1つ以上の酵素で細胞シートを処理することなく、温度応答性培養器から剥離される、請求項9に記載の方法。

【請求項 13】

請求項9から12のいずれか一項に記載の方法によって製造された軟骨形成細胞シート。

【請求項 14】

移植を必要とする対象の組織に移植するための、請求項1から8又は13のいずれか一項に記載の軟骨形成細胞シートを含む医薬。

【請求項 15】

組織が軟骨及び骨から選択される、請求項14に記載の医薬。

【請求項 16】

軟骨が関節軟骨である、請求項15に記載の医薬。

【請求項 17】

軟骨組織の修復を必要とする対象において軟骨組織を修復するための、請求項1から8及び13のいずれか一項に記載の軟骨形成細胞シートを含む医薬。

【請求項 18】

軟骨が関節軟骨である、請求項14から17のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 19】

対象が局所軟骨欠損を有する、請求項14から18のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 20】

対象が症候性軟骨欠損を有する、請求項14から18のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 21】

症候性軟骨欠損が、急性又は反復性外傷によって引き起こされる、請求項20に記載の医薬。

【請求項 22】

対象が変性関節疾患を有する、請求項14から18及び20から21のいずれか一項に記載の医薬。

10

20

30

40

50

【請求項 2 3】

関節疾患の処置又は予防を必要とする対象において関節疾患を処置又は予防するための、請求項1から8及び13のいずれか一項に記載の軟骨形成細胞シートを含む医薬。

【請求項 2 4】

関節が、滑膜関節及び軟骨関節からなる群から選択される、請求項23に記載の医薬。

【請求項 2 5】

滑膜関節が、膝関節、手首関節、肩関節、股関節、肘関節、又は首関節である、請求項24に記載の医薬。

【請求項 2 6】

関節疾患が変性関節疾患である、請求項23に記載の医薬。

10

【請求項 2 7】

関節疾患が、関節炎、変形性関節症、関節リウマチ、及び膝蓋軟骨軟化症からなる群から選択される、請求項23に記載の医薬。

【請求項 2 8】

急性又は反復性外傷によって引き起こされる症候性軟骨欠損を有する対象において変形性関節症を予防するための、請求項1から8及び13のいずれか一項に記載の軟骨形成細胞シートを含む医薬。

【請求項 2 9】

対象がヒトである、請求項14から28のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 3 0】

細胞シート内の軟骨分化細胞が、対象に対して同種異系 (allogeneic) である、請求項14から29のいずれか一項に記載の医薬。

20

【請求項 3 1】

細胞シート内の軟骨分化細胞が、対象に対して自家 (autologous) である、請求項14から29のいずれか一項に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

この出願は、2019年10月7日に出願された米国仮特許出願第62/911,441号の優先権を主張するものであり、その内容は全体として本明細書に組み込まれる。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

変性関節疾患、例えば、変形性関節症(OA)は、世界全体において益々罹患率が増え、生活の質を損ねている。OAは、全身性で、あまり明確となっていない疾患であり、変性が始まれば処置を成功させることは困難である。膝関節に多い外傷性損傷は、関節軟骨の局所欠損を引き起こしかねず、これらの関節軟骨の局所欠損は、OAの症例の12%を超える。関節軟骨は、直接的な血液供給を欠き、自発的に修復する能力は最小限しかなく、したがって、軟骨損傷が介入なしに治癒する可能性はほとんどない。健全な関節軟骨はヒアリン構造を示し、局所欠損療法の目的は、損傷部位のヒアリン様表現型へ軟骨再生を促進することである。骨髓刺激技術、例えば、微小骨折は、臨床において最も頻繁に使用される方法である。しかしながら、得られる混合線維軟骨組織は、天然のヒアリン軟骨に比べて劣るものであり、軟骨の機能を低下させる。OAを適切に処置し、この全身性及び衰弱性疾患の発症を減少させるために、OAに進行する前に関節軟骨局所欠損部位のヒアリン軟骨を再生する改善された処置選択肢を開発する必要がある。

40

【0 0 0 3】

関節軟骨局所欠損療法の転帰を改善する試みにおいて、自家軟骨細胞移植が開発された。このアプローチは、患者がドナー及びレシピエントの両方である自家細胞調達に依拠するものであり、複数の手術、ドナー依存性の細胞の質、並びに長期の細胞増殖及び調製時間によって患者の負担を増加させる。さらに、この療法は、細胞懸濁液又は播種された足

50

場を使用して細胞を送達するものであり、標的組織部位への局在性が悪く、細胞の機能性の保持にも劣る。組織工学の進歩によってもたらされた有望な結果にもかかわらず、例えば、細胞増殖期間(大規模生産;既製品)及び細胞送達システム(低い移植効率)などの様々な制限は解決されないままである。

【0004】

取組みの増加が、自家軟骨細胞源から「既製の」同種異系細胞調達へと移行している。同種異系細胞源としての間葉系幹細胞(MSC)は、十分に実証された再生特性及び免疫調節特性並びに特定の表現型を有する細胞を調製するための標準を提供する。軟骨形成システムを含むMSCの多能性は、3D構築物、通常はペレット培養物において、*in vitro*での軟骨細胞表現型への指向された分化を可能にする。MSCの*in vitro*軟骨分化は十分に実証されているが、*in vivo*で移植される細胞は、酵素的に消化されて細胞懸濁液として送達されるか、又は足場材料に播種されるかのいずれかである。酵素的細胞収集及び足場構築物との界面相互作用(interface)の間に細胞環境が変化するため、細胞の軟骨形成潜在能力は、移植後にはほとんど現れず、したがって、軟骨局所欠損治療のためのMSC適用は臨床に達する前に失敗する。軟骨再生にMSCを用いることには多くの利点があるが、分化潜在能力を有し、構造特性又は軟骨形成特性を崩壊することなく、*in vitro*で分化したヒアリン軟骨の移植が可能な構築物を調製するための方法は存在しない。MSC細胞療法を臨床へ橋渡しするための主要な課題の1つは、投与された細胞を確実に移植し、その局在化を維持する能力である。したがって、宿主組織へ首尾よく移植可能なヒアリン様特性を有する軟骨形成細胞シートの開発が必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

ある特定の態様では、本開示は、コンフルエントな軟骨分化細胞の少なくとも2つの層を含む軟骨形成細胞シートであって、細胞シートが間葉系幹細胞(MSC)から調製され、細胞シートの基底側の軟骨分化細胞が1つ以上の接着分子を発現する、軟骨形成細胞シートに関する。ある特定の実施形態では、MSCはヒト骨髄MSC(hBM-MSC)である。ある特定の実施形態では、細胞シートは、軟骨分化細胞から本質的になる。ある特定の実施形態では、細胞シート内の少なくとも50%の細胞は、軟骨分化細胞である。ある特定の実施形態では、細胞シートは細胞外マトリクスを含む。

【0006】

ある特定の実施形態では、細胞外マトリクスは、II型コラーゲン及び硫酸化プロテオグリカンからなる群から選択されるタンパク質を含む。ある特定の実施形態では、軟骨分化細胞は、SOX9、アグリカン、COL2A1、ACAN、COMP及びBMP2からなる群から選択されるタンパク質を発現する。ある特定の実施形態では、細胞シートはラクナ構造を含む。ある特定の実施形態では、1つ以上の接着分子は、フィブロネクチン及びラミニンから選択される。ある特定の実施形態では、細胞シートは、軟骨表面への移植後に軟骨表面への物理的接着を示す。

【0007】

ある特定の態様では、本開示は、軟骨形成細胞シートを調製する方法であって、a)間葉系幹細胞(MSC)を温度応答性培養器でコンフルエントになるまで培養して細胞シートを形成すること、b)温度低下によって細胞シートを剥離させ、細胞シートを収縮させ、収縮した細胞シートを形成すること、c)収縮した細胞シートを培養表面と接触させること、及びd)培養表面上の収縮した細胞シートを軟骨形成培地で処理し、培養して軟骨形成細胞シートを形成することを含む、方法に関する。

【0008】

ある特定の実施形態では、収縮した細胞シートは、培養表面上で少なくとも3週間成長される。ある特定の実施形態では、軟骨形成培地は、トランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF β)及び骨形成タンパク質(BMP)からなる群から選択されるタンパク質を含む。ある特定の実施形態では、工程b)における細胞シートは、1つ以上の酵素で細胞シートを処理することなく、温度応答性培養器から剥離される。

【0009】

ある特定の態様では、本開示は、本明細書に記載される方法によって製造された軟骨形成細胞シートに関する。

【0010】

ある特定の態様では、本開示は、軟骨形成細胞シートを、それを必要とする対象に移植する方法であって、本明細書に記載の軟骨形成細胞シートを対象の組織に適用することを含む、方法に関する。ある特定の実施形態では、組織は軟骨及び骨から選択される。ある特定の実施形態では、軟骨は関節軟骨である。

【0011】

ある特定の態様では、本開示は、軟骨組織の修復を必要とする対象において軟骨組織を修復する方法であって、本明細書に記載の軟骨形成細胞シートを対象の軟骨に適用し、それによって対象において軟骨組織を修復することを含む、方法に関する。ある特定の実施形態では、軟骨は関節軟骨である。ある特定の実施形態では、対象は局所軟骨欠損を有する。

10

【0012】

ある特定の実施形態では、対象は症候性軟骨欠損を有する。ある特定の実施形態では、症候性軟骨欠損は、急性又は反復性外傷によって引き起こされる。ある特定の実施形態では、対象は変性関節疾患を有する。

【0013】

ある特定の態様では、本開示は、関節疾患の処置又は予防を必要とする対象において関節疾患を処置又は予防する方法であって、本明細書に記載の軟骨形成細胞シートを対象の関節に適用し、それによって対象において関節疾患を処置又は予防することを含む、方法に関する。ある特定の実施形態では、関節は、滑膜関節及び軟骨関節からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、滑膜関節は、膝関節、手首関節、肩関節、股関節、肘関節、又は首関節である。ある特定の実施形態では、関節疾患は変性関節疾患である。ある特定の実施形態では、関節疾患は、関節炎、変形性関節症、関節リウマチ、及び膝蓋軟骨軟化症からなる群から選択される。

20

【0014】

ある特定の態様では、本開示は、急性又は反復性外傷によって引き起こされる症候性軟骨欠損を有する対象において変形性関節症を予防する方法であって、本明細書に記載の軟骨形成細胞シートを、欠損を有する軟骨に適用し、それによって対象において変形性関節症を予防する、方法に関する。ある特定の実施形態では、対象はヒトである。ある特定の実施形態では、細胞シート内の軟骨分化細胞は、対象に対して同種異系 (allogeneic) である。ある特定の実施形態では、細胞シート内の軟骨分化細胞は、対象に対して自家 (autologous) である。

30

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1A～1Fは、細胞シート収縮が構造的再配列を促進することを示す図である。35mm培養皿中の、非収縮(A)及び収縮(B)全細胞シートの代表的な肉眼画像。細胞シートの縁は橙色の点線でマークされている。スケールバー=5mm。非収縮(C)及び収縮(D)細胞シートについてのH&Eの代表的な断面組織学。収縮シートと非収縮シートとを比較した場合の細胞シートの直径(E)及び厚さ(F)。エラーバーは平均±SDを表す(n=4;*p<0.05、**p<0.01)。

40

【図2A～F】3週間でのhBM-MSCの分化潜在能力を示す図である。対照培地(A～C)及び軟骨形成培地(D～F)中のペレットの組織学的切片の代表的な画像。染色は酸性ムチンについてアルシアンブルー(A、D)、硫酸化プロテオグリカンについてサフラニンO/ファストグリーン(B、E)、コラーゲンII型(擬似赤色)ではDAPI(青色)(C、F)を用いた。スケールバー:200µm。

【図2G～I】Sox9(G)、コラーゲンII型(H)、及びアグリカン(I)についてのRT-PCRを用いた軟骨形成遺伝子発現(G～I)。全ての遺伝子発現はGAPDHに対して正規化し、対照試料

50

と比較した。エラーバーは平均±SDを表す($n=4$; * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。

【図3】組織学、IHC、及びRT-PCRによって示した3週間でのhBM-MSC単層、収縮シート、及びペレットの軟骨分化を示す図である(スケールバー=200 μm 、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。

【図4】健康な関節軟骨、つまりヒアリン軟骨表現型を示す図である。軟骨の局所欠損療法の目標は、*in vivo*でヒアリン様組織に置き換えること又はそれを再生することである。Castagnola, P. et al. JCB (1986); Moore, D. et al. Ortho B. (2019);及びAkkiraju, H. et al. J Dev Biol. (2016)を参照。

【図5】細胞送達方法としての細胞シートを示す図である。細胞送達方法(懸濁液、足場、ペレット)の制限としては、細胞の保持に劣ること及び天然軟骨組織との界面相互作用に劣ることが挙げられる。軟骨分化のための現在のツールは、標的組織部位へ直接移植可能であるが、*in vitro*でヒアリン様軟骨表現型への完全な分化を達成しない。

【図6】MSC細胞シートの利点を示す図である。細胞シート技術をMSCと共に用いることによって、軟骨形成培地を用いた*in vitro*培養中にヒアリン様表現型への分化を可能にする完全に足場のない3D構築物、及び構造的特性又はヒアリン様表現型を崩壊することなく標的組織部位へ直接移植することができる軟骨形成構築物を作製することが可能である。

【図7】細胞シートの軟骨分化を示す図である。hBM-MSCは、非収縮シートとしてではなく収縮シートとして、ヒアリン様軟骨形成潜在能力を示す。

【図8】層状化を用いた細胞シートの厚さの制御を示す図である。収縮に加えて、層状化により、細胞シート構築物の厚さ及び三次元性を制御することができる。

【図9】ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hBM-MSC)シートからの移植可能な、足場のない、3Dヒアリン様軟骨組織の*in vitro*工学を示す図である。このアプローチは、細胞シート組織工学を使用して、温度応答性培養皿(TRCD)からの自発的な剥離後の細胞シート収縮を介して、足場のない3D MSC細胞構築物を調製する。この技術は、3D収縮シートを細胞培養インサートに再びプレーティングし、軟骨形成培地で3週間誘導することによって、ヒアリン様軟骨表現型への*in vitro*分化を可能にする。また、シート構築物の構造又は軟骨形成特性を損なうことなく、分化後、シートを標的組織へ直接移植することも可能である。

【図10】図10A~10Fは、細胞シート収縮が、2D細胞培養物と比較して、細胞骨格の再配列及び軟骨形成促進シグナル伝達(pro-chondrogenic signaling)を促進することを示す図である。細胞骨格のためのファロイジン/F-アクチン(緑色)染色及びDAPI(青色)核染色を用いた0日目の軟骨形成誘導前の(a)2D培養物及び(b)3D収縮シートの全皿(トップダウン)の代表的な共焦点画像。(c)細胞骨格構造マーカー β -アクチン、(d)細胞-細胞マーカー β -カテニン、並びに軟骨形成ECMマーカー(d)BMP2及び(f)COMPに関する定量的リアルタイムPCR遺伝子発現。全ての遺伝子発現はGAPDHに対して正規化し、2D細胞培養物0日目の対照試料と比較した。エラーバーは、平均±SD($n=4$)を表す(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。

【図11A-L】細胞シート収縮が、hBM-MSCの増強された軟骨分化を刺激することを示す図である。剥離後シートの収縮前(2D培養物)と収縮後(3D細胞シート)との3週間軟骨形成誘導hBM-MSCシートの比較。(a~f)対照培地及び(g~l)軟骨形成培地中で3週間のhBM-MSC構築物の組織学的断面の代表的画像。染色は、(a、b、g、h)硫酸化プロテオグリカンについてのサフラニンO/ファストグリーン、(c、d、i、j)DAPI(青色)を用いたII型コラーゲン(擬似赤色)、及び(e、f、k、l)DAPI(青色)を用いたI型コラーゲン(赤色)であった。

【図11M-T】細胞骨格についてファロイジン/F-アクチン(緑色)染色及びDAPI(青色)核染色を用いた、3週間の軟骨形成誘導(m)2D培養物及び(n)3D細胞シートの全皿(トップダウン)の代表的な共焦点画像。0日(灰色のバー)及び3週間(黒色のバー)の分化における2D培養物及び3D細胞シートについての細胞シートの(o)厚さ及び(p)線形核密度。(q)SOX9、(r)アグリカン、及び(s)II型コラーゲンについての定量的リアルタイムPCRによる軟骨形成遺伝子発現。(t)II型コラーゲンとI型コラーゲンとの比を相対遺伝子発現比として示す。全ての遺伝子発現はGAPDHに対して正規化し、2D培養物3週間の対照試料と比較した。

エラーバーは、平均±SD(n=4)を表す(ns:p≥0.05、*p<0.05、**p<0.01)。

【図12A-H】標準ペレット培養物と比較した3D hBM-MSC細胞シートについての経時的な軟骨分化の進行を示す図である。(a~h)硫酸化プロテオグリカンについてサフラニンO/ファストグリーンで染色し、(i~p)MMP13(緑色)をDAPI(青色)と共に染色した0日~3週間にわたる軟骨形成培地中の(a~d、i~l)ペレット及び(e~h、m~p)3D細胞シートの組織学的断面の代表的な画像。

【図12I-P】標準ペレット培養物と比較した3D hBM-MSC細胞シートについての経時的な軟骨分化の進行を示す図である。(a~h)硫酸化プロテオグリカンについてサフラニンO/ファストグリーンで染色し、(i~p)MMP13(緑色)をDAPI(青色)と共に染色した0日~3週間にわたる軟骨形成培地中の(a~d、i~l)ペレット及び(e~h、m~p)3D細胞シートの組織学的断面の代表的な画像。

10

【図12Q-R】(q)II型コラーゲン(擬似赤色)及び(r)I型コラーゲン(赤色)についてDAPI(青色)と共に染色した軟骨形成培地中の3週間でのペレット及び3D細胞シートの組織学的断面の代表的な画像。

【図12S-U】(s)軟骨形成遺伝子発現:SOX9、II型コラーゲン及びアグリカン、(t)肥大及び線維軟骨遺伝子発現:X型コラーゲン及びMMP13、(u)細胞-細胞相互作用発現:β-カテニンについてのペレット(青色の点線)及び3D細胞シート(黒色の実線)の定量的リアルタイムPCR。全ての遺伝子発現はGAPDHに対して正規化し、単一細胞0日対照試料と比較した。エラーバーは、平均±SD(n=4)を表す(*p<0.05、**p<0.01)。

20

【図13A-C】分化後の3D収縮hBM-MSC細胞シート及びペレット培養物のFBSコーティングされた表面への操作及び二次的接着能を示す図である。FBSコーティングされた表面への(a)移行前及び(b)移行後3日の3週間分化3DシートのサフラニンO染色組織学的断面の代表的な画像。(c)移行後0~72時間のシートの縁の代表的な位相コントラスト画像。橙色の点線でマークされた細胞シートの縁からの細胞移動。

【図13D-F】(d)二次FBSコーティング培養皿への付着の1時間後及び継続培養6時間後の3週間分化させたペレット及び3D細胞シートの付着有効性(n=6)。構築物付着=((付着した構築物の数)/(移行を試みた構築物の数))×100。DAPI核染色による接着分子ラミニンの発現及び局在化についての3週間分化(e)収縮シート及び(f)ペレット培養物の代表的なIHC断面画像。黄色の点線でマークされた接着面((e)細胞シートの基底側及び(f)ペレット培養物の周辺)。

30

【図14】図14A~14Dは、新鮮なex vivoヒト軟骨片へ分化後の3D収縮hBM-MSC細胞シートの移植特性を示す図である。(a)35mm培養皿中の3週間分化後の細胞シート、(b)新鮮なex vivoヒト関節軟骨試料に移植したもの。橙色の点線でマークされた移行された細胞シートの四分割部位。(c)サフラニンO/ファストグリーン及び(d)DAPIで対比染色した細胞接着分子ラミニンについての新鮮なex vivoヒト関節軟骨(hAC)に自然に接着した3週間軟骨形成3D hBM-MSCシート(CS)の代表的な断面組織学的及びIHC染色。

【図15】図15A~15Fは、in vivoでの軟骨分化細胞シートの移植能力を示す図である。移植された3週間軟骨分化ヒアリン様ヒトMSC由来細胞シート(B)を有する、ヌード(RNU)ラット後脚滑車溝(A)における2mm局所欠損の肉眼画像。欠損作製時に細胞シートを移植した。移植2週間後に膝関節を収集し(C)、細胞シート移植能を評価した。移植2週間後のラット局所欠損における3週間分化ヒト細胞シートのサフラニンO(D)、ヘマトキシリン&エオシン(E)、及びヒト特異的ビメンチン免疫組織化学染色(F)を用いた代表的な断面組織学的分析。陽性サフラニンO染色(赤色)は、移植領域における細胞シートの陽性ヒアリン様特性の保持を示す(D)。H&E染色は宿主組織との統合を示す(E)。細胞シート内の移植されたヒト細胞はヒト特異的ビメンチンについて陽性であり、移植領域における生着及び保持を示す(F)。スケールバー=200mm。

40

【発明を実施するための形態】

【0016】

本開示は、温度応答性培養器での細胞シートとしての間葉系幹細胞の調製を説明し、in vitroでヒアリン様軟骨表現型に分化する細胞シートの能力を示す。本開示はまた、構築物

50

の構造特性又は軟骨形成特性を損なうことなしに標的組織部位へ移植される細胞シートの能力を示す。

【0017】

次世代細胞送達方法として、細胞シート組織工学は、温度応答性培養器を使用して、足場なしの多細胞構築物を製造する。再生細胞は、再現可能な生理学的特性及びスケラブルな製造方法を有するインタクトなシートとして収集される。細胞シートは、内因性細胞マトリクス、受容体、及び接着タンパク質を保持し、細胞生存能及び細胞伝達を増強し、内因性細胞環境を保持し、縫合なしで生体材料及び生物学的表面への自発的接着を可能にする。細胞構造や機能を損なうことなく、収集後のシート操作及び層状化も可能である。

【0018】

本明細書に記載の軟骨形成細胞シートは、ヒト軟骨上に移行し、細胞シートと軟骨との間の界面に整列された細胞接着タンパク質(例えば、ラミニン)により軟骨表面上に接着することが実証された。この知見から、酵素なしで細胞を収集することができ、細胞接着タンパク質を保持するという細胞シートの利点により、分化した細胞シートを構造変化又は損傷なしに容易に標的組織に移植することができることが期待できる。

【0019】

本明細書に記載の軟骨形成細胞シートは、間葉系幹細胞(MSC)を温度応答性培養器でコンフルエントになるまで培養して単層の細胞シートを形成すること、温度低下によって細胞シートを剥離させ、複数の細胞層を有する収縮した細胞シートを形成すること、収縮した細胞シートを培養表面と接触させること、及び培養表面上の収縮した細胞シートを軟骨形成培地で処理することによって調製される。本明細書に記載される軟骨形成細胞シートは三次元であり、このことは軟骨分化にとって重要である。本明細書で使用されるとき、「三次元細胞シート」又は「3D」細胞シートという用語は、複数の細胞層を含み、単層細胞シート(例えば、細胞支持体上の単層培養でもはや張力がないためにあまり整列されていないアクチン細胞骨格)と比較して、再編成されたアクチン細胞骨格を有する、及び/又は単層細胞シートと比較してより丸みを帯び、細長さが少ない細胞/核を有する、軟骨形成細胞シートを指す。加えて、細胞シートはその安定した環境により肥大化が抑制されている。細胞シートに保持されている細胞接着タンパク質のため、標的部位(すなわち、軟骨)に、分化細胞シートを移植することが可能であった。

【0020】

3D細胞シートとしてのヒト骨髓MSC(hBM-MSC)の顕著な軟骨形成能は、例えば、関節軟骨局所欠損療法に使用され得る足場なしの3D軟骨形成構築物を開発するための強力な基盤を提供する。細胞シート収縮後の細胞骨格の再編成は、軟骨形成増加のメカニズムの一つである可能性がある。軟骨形成のための3D細胞シート構造のさらなる調製(tailoring)は、シート層状化を介して可能である。本開示は、軟骨形成特性陽性を維持しながら、*ex vivo*軟骨への分化した3D軟骨形成細胞シートの生着に成功したことを示す。加えて、本開示は、軟骨分化ヒアリン様ヒトMSC由来細胞シートが、ヒアリン様特性を維持しながら、首尾よく*in vivo*で軟骨に移植され、宿主組織と統合され得ることを実証する。

【0021】

I. 間葉系幹細胞(MSC)

間葉系幹細胞(MSC)は、主にその独自の免疫調節的役割及び再生能により、広範囲の衰弱性疾患を処置するための顕著な臨床潜在能力を有する(Caplan and Sorrell, 2015, *Immunol Lett* 168(2):136-139)。本明細書に記載の方法で使用するために好適なMSCとしては、これらに限定されないが、骨髓、臍帯、脊髄血、肢芽、歯科組織(例えば、大臼歯)、脂肪組織、筋肉及び羊水由来のMSCが挙げられる。軟骨形成潜在能力を有する任意のMSCを使用し得る。

【0022】

特定の実施形態では、間葉系幹細胞は、ヒト骨髓間葉系幹細胞(hBM-MSC)である。本明細書で使用される「ヒト骨髓間葉系幹細胞」又は「hBM-MSC」という用語は、ヒト骨髓から単離された間葉系幹細胞を指す。hBM-MSCを単離する方法は、当該技術分野で公

10

20

30

40

50

知であり、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるBaghaei et al., 2017, Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 10(3):208-213に記載されている。単離及び精製プロセスで使用されるBM-MSCの最も重要な特性は、プラスチック細胞培養プレートへの物理的接着である。MSCの単離及び濃縮には、様々な技術が用いられており、例えば、抗体ベースの細胞選別、低密度及び高密度培養技術、ポジティブネガティブ選択法、頻繁な培地交換、及び酵素消化アプローチが挙げられる。

【0023】

簡潔に述べると、ヒト骨髄は患者から取得され、無菌的に収集され得る。バフィーコートを超心分離により単離し(450×g、10分)、1.5mLのPBS中に懸濁し、培養に用いる。分離されたバフィーコートを等体積のFicoll(GE health care, USA)上に層状にし、遠心分離する(400×g、20分)。界面の細胞を除去し、滅菌PBS中で2回洗浄する。ヒト骨髄前駆細胞を、10%FBS及びペニシリン/ストレプトマイシン(それぞれ50U/mL及び50mg/mL、Gibco-Invitrogen, Carlsbad, USA)を補足したDMEM培地中で、組織処理培養プレートにおいて培養する。5%CO₂を含有する加湿雰囲気中、プレートを37℃で48時間維持する。培地の交換のため、接着していない細胞の除去のためにプレートをPBSで洗浄し、培地を置き換える。1回の培地交換で、培養物をさらに1週間維持する。接着細胞を特性決定するために、コンフルエントなヒトMSCを骨芽細胞分化培地(全てSigmaから)中で3週間培養することによって骨芽細胞分化を誘導し、3週間後にアリザリンによって細胞を染色する。脂肪細胞分化を誘導するために、コンフルエントなMSCを分化培地中で1~3週間培養し、S Red Oil(Sigma)によって脂質液滴染色を行う。フローサイトメトリーを使用して、国際細胞療法学会(ISCT)によって説明されているようなMSCの基準を用いてMSCの免疫プロファイルを評価する。細胞(P2-3)を収集し、ペレット化し、1%ウシ血清アルブミン(PBS中BSA)に再懸濁し、カウントする。フィコエリトリン(PE)並びにCD14、CD34、CD45、CD90、CD105及びCD73(ebioscience, ドイツ)に対するコンジュゲート抗体で細胞を直接染色する。全ての分析において、マウスIgG1K Iso対照と名付けられた適切なアイソタイプ適合対照抗体(ebioscience, ドイツ)を使用する。Cell Quest Software(Becton Dickinson, UK)を使用して、細胞をFACSフローサイトメトリーで分析する。上記で引用されたBaghaei et al., 2017を参照されたい。

【0024】

ヒトMSCのための別の便利な供与源は臍帯であり、それは出産後に廃棄されるので治療のための幹細胞へのアクセスが容易で、論争の的にならない供与源を提供する(El Omar et al., 2014, Tissue Eng Part B Rev 20(5): 523-544)。ヒト臍帯MSC (hUC-MSC)は、ヒト臨床試験において懸濁物として安全性及び有効性に関して検証されている(Bartolucci et al., 2017, Circ Res, 121(10), 1192-1204)。更に、hUC-MSCは、実験動物疾患モデルにおいて好結果で使用されている(Zhang et al., 2017, Cytotherapy 19(2): 194-199)。

【0025】

臍帯からMSCを単離する方法は当技術分野で公知であり、例えば、参照により完全に本明細書に組み込まれる米国特許第9,903,176号に記載される。ヒト臍帯は、臍動脈、臍静脈、ウォートンゼリー及び上皮下層を含む。一部の実施形態では、hUC-MSCはヒト臍帯の上皮下層から単離される。一部の実施形態では、hUC-MSCは、ヒト臍帯のウォートンゼリーから単離される。上皮下層から単離されるhUC-MSCを同定するために、様々な細胞マーカーを使用することができる。例えば、一部の実施形態では、上皮下層から単離されるhUC-MSCは、CD29、CD73、CD90、CD146、CD166、SSEA4、CD9、CD44、CD146及びCD105から選択される1つ以上の細胞マーカーを発現する。特定の実施形態では、hUC-MSCはCD73を発現する。一部の実施形態では、上皮下層から単離されるhUC-MSCは、CD45、CD34、CD14、CD79、CD106、CD86、CD80、CD19、CD117、Stro-1、HLA-DR、HLA-DP及びHLA-DQから選択される1つ以上の細胞マーカーを発現しない。特定の実施形態では、hUC-MSCは、HLA-DR、HLA-DP又はHLA-DQを発現しない。一部の実施形態では、本明細書に記載される細胞シートは、低いHLA発現を有する間葉

系幹細胞(MSC)で調製され、例えば、細胞シートの中のMSCの5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%又は0.1%未満が、HLA(例えばHLA-DR、HLA-DP及び/又はHLA-DQ)を発現する。

【0026】

II. MSCから生成される軟骨形成細胞シート

ある特定の態様では、本開示は、間葉系幹細胞(MSC)から調製された軟骨形成細胞シートに関する。本明細書で使用される用語「軟骨形成細胞シート」は、*in vitro*において温度応答性細胞培養支持体の上で間葉系幹細胞を増殖させ、軟骨形成を誘導する1以上の増殖因子(例えば、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF β)及び/又は骨形成タンパク質(BMP))で細胞シートを処理して軟骨分化細胞(chondrogenically differentiated cell)を含む細胞シートを生成することによって得られる細胞シートを指す。本明細書で使用する「軟骨分化細胞」という用語は、細胞外マトリックス(ECM)中のsox9、コラーゲンII型、アグリカン、及び硫酸化プロテオグリカンを発現するMSC由来の細胞を意味する。

【0027】

軟骨形成細胞シートは、少なくとも2層のコンフルエントな軟骨分化細胞、例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10層のコンフルエントな軟骨分化細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、細胞シートの基底側の軟骨分化細胞は、ラミニンを発現する。本明細書で使用される「基底側」という用語は、細胞シートの培養中に固体細胞培養支持体と接触している細胞シートの側を指す。細胞シートの基底側は、細胞シートを宿主に移植する際に、宿主の軟骨組織と接触させる。ラミニンは高分子量のヘテロ三量体タンパク質で、細胞外マトリックスに分泌される。これらのヘテロ三量体タンパク質は交差して十字架のような構造を形成し、他の細胞膜や他のラミニンを含む細胞外マトリックス分子と結合することができる。従って、ラミニンは、細胞接着において重要な役割を担っている。

【0028】

いくつかの実施形態において、軟骨形成細胞シートは、軟骨表面への移植後、軟骨表面への物理的な接着を示す。例えば、いくつかの実施形態では、軟骨形成細胞シートは、軟骨表面に移植されてから30分、1時間、2時間、3時間、6時間、12時間、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9若しくは10日後に軟骨表面に接着している。

【0029】

いくつかの実施形態では、軟骨形成細胞シートはヒアリン様軟骨の表現型を有する。ヒアリン様軟骨表現型の特徴としては、II型コラーゲン及びプロテオグリカン(せん断力、圧縮力及び引張力に対する抵抗を可能にする)を含む細胞外マトリックス(ECM)、SOX9、アグリカン及びCOL2A1の発現、I型コラーゲンの低い発現、高いCOL2A1/COL1A1比、ラクナ(lacunae)構造の核、丸い細胞構造及びECMに対する低い細胞密度があるが、それに限定されるものではない。

【0030】

一部の実施形態では、軟骨形成細胞シート中の軟骨分化細胞は凝集しているか又は物理的に連続している。一部の実施形態では、軟骨形成細胞シートを調製するために使用されるMSCは、ヒト骨髄MSCである。本明細書に記載される軟骨形成細胞シートは、温度応答性培養皿(TRCD)上でMSCを培養し、いかなる酵素処理もなしに温度シフトによってインタクトなシートとしてMSCを収集し、細胞シートを収縮させ、続いて1種以上の増殖因子(例えばTGF β 及び/又はBMP)で処理して軟骨形成を誘導することにより調製され得る。MSCシートは、組織様構造、アクチンフィラメント、細胞外マトリックス、細胞間タンパク質及び高い細胞生存能力を保持することによってそれらの完全性及び形状を維持するが、これらの全ては細胞生存及び細胞機能の向上に関係する。したがって、本明細書に記載される軟骨形成細胞シートは、天然の細胞外マトリックス、細胞接着タンパク質及び細胞接合タンパク質を含む、細胞生存及び細胞機能を向上させる構造的特色を含むことができる。したがって、本明細書に記載される方法によって調製される軟骨形成細胞シートは

、他の方法によって生成される細胞シートと比較していくつかの有益な特徴を有する。例えば、酵素処理は細胞外及び細胞内タンパク質(細胞間及び細胞とECMの間の接合)を破壊するので、化学的破壊方法は細胞の組織様構造並びに細胞間連絡(cell-cell communication)を維持することができない。したがって、酵素によるタンパク質切断は、細胞生存能力及び細胞機能を低下させる。物理的破壊(すなわち、ゴムポリスラン又は培地吸引による)は、細胞間接合の破壊及び培養された接着性シートの細胞凝集体への崩壊をもたらす。

【0031】

一部の実施形態では、細胞外マトリックスは、フィブロネクチン、ラミニン及びコラーゲンからなる群から選択される1つ以上のタンパク質を含む。一部の実施形態では、細胞接合タンパク質は、インテグリン- β 1、コネキシン43、 β -カテニン、及びN-カドヘリンからなる群から選択される。

10

【0032】

一部の実施形態では、軟骨形成細胞シートは軟骨分化細胞からなる。一部の実施形態では、軟骨形成細胞シートは軟骨分化細胞から本質的になる。一部の実施形態では、軟骨形成細胞シート中の細胞の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%は軟骨分化細胞である。一部の実施形態では、軟骨形成細胞シート中の細胞の100%が軟骨分化細胞である。

【0033】

細胞シートの形成又はその特徴を最適化するために、軟骨形成細胞シートを調製するために使用されるMSCは様々な細胞密度で細胞培養支持体中の温度応答性ポリマーの上の培養液に加えることができる。例えば、細胞培養支持体(例えばTRCD)中のMSCの初期細胞密度を制御することによって、MSC中のサイトカイン発現レベルを最適化することができる。一部の実施形態では、細胞培養支持体中のMSCの初期細胞密度を増加させることは、サイトカイン発現(例えば、HGF)を増加させる。一部の実施形態では、細胞培養支持体中のMSCの初期細胞密度を増加させることは、サイトカイン発現を減少させる。一部の実施形態では、細胞シートの調製のために使用される細胞培養支持体中のMSCの初期細胞密度は、 $1 \times 10^3/\text{cm}^2$ から $9 \times 10^5/\text{cm}^2$ である。一部の実施形態では、細胞培養支持体中のMSCの初期細胞密度は、少なくとも 1×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 又は 9×10^5 個の細胞/ cm^2 である。細胞培養支持体中のMSCの初期細胞密度の範囲を規定するために、これらの値のいずれかを使用することができる。例えば、一部の実施形態では、細胞培養支持体中の初期細胞密度は、 1×10^3 から 5×10^3 個の細胞/ cm^2 、 2×10^4 から 1×10^5 個の細胞/ cm^2 、 4×10^4 から 1×10^5 個の細胞/ cm^2 、又は 1×10^3 から 5×10^4 個の細胞/ cm^2 である。

20

30

【0034】

本明細書に記載される軟骨形成細胞シートは、宿主生物体の標的組織への移植後に細胞外マトリックスタンパク質及び細胞接合タンパク質を連続して発現することもできる。例えば、一部の実施形態では、細胞シートは、宿主生物体の組織への移植後に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25又は30日間、細胞外マトリックスタンパク質及び/又は細胞接合タンパク質を発現する。一部の実施形態では、細胞シートは、宿主生物体の組織への移植後に少なくとも1、2、3、4、5又は6カ月間、細胞外マトリックスタンパク質及び/又は細胞接合タンパク質を発現する。一部の実施形態では、移植後に細胞シートの中で発現される細胞外マトリックスタンパク質は、フィブロネクチン、ラミニン及びコラーゲンから選択される。一部の実施形態では、移植後に細胞シートの中で発現される細胞接合タンパク質は、ピンキュリン、インテグリン- β 1、コネキシン43、 β -カテニン、インテグリン連結キナーゼ及びN-カドヘリンから選択される。

40

【0035】

現行の幹細胞療法は、生検から単離される培養された幹細胞を注射用細胞懸濁物としてしばしば使用する(Bayousse et al., 2012, J Tissue Eng Regen Med, 6(10))。注射される細胞懸濁物は、病気の臓器又は組織へのより低い生着及びその中での、より低い保

50

持を一般的に示す(Devine et al., 2003, Blood, 101(8), 2999-3001)。採取時の酵素的破壊による幹細胞懸濁物中のインタクトなECM及び細胞間接合(すなわち、連絡)の喪失は、in vivoにおける幹細胞機能、生着及び生存を損なわせ、in vivoにおける治療有効性を制限する可能性がある。対照的に、本明細書に記載される軟骨形成細胞シートの調製方法は、固有の細胞機能構造を保存し、移植後の標的組織への細胞シートの付着を向上させる。例えば、一部の実施形態では、細胞シートは、宿主生物体の組織への移植後に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25又は30日間、宿主生物体の標的組織に付着したままである。一部の実施形態では、細胞シートは、宿主生物体の組織への移植後に少なくとも1、2、3、4、5又は6カ月間、宿主生物体の標的組織に付着したままである。

10

【0036】

本明細書に記載される軟骨形成細胞シートは、いくつかの点で懸濁培養物とも異なる。懸濁培養物は、それらの細胞間接合の中のそれらの細胞接着性タンパク質は、細胞懸濁培養物の調製に一般的に使用される培養表面から、細胞を採取して懸濁させるために除去しなければならないので(例えばタンパク分解性トリプシン処理によって)、ECM又は細胞間接合が欠如している単一細胞を含む。単一細胞懸濁物と対照的に、本明細書に記載される軟骨形成細胞シートは、細胞によって生成される内因性ECM及び細胞シートの形成中に生成される細胞間のインタクトな細胞間接合を含有する。細胞シートの形成、製作及び取扱いの間に保持される内因性ECM及び固有の(intrinsic)細胞間接合は、宿主生物体への移植の間のそれらの表現型の保存、細胞機能及び標的組織(例えば関節軟骨)への軟骨形成細胞シートの接着のための重要な特性の保持を容易にする。

20

【0037】

III. in vitroで軟骨形成細胞シートを生成する方法

特定の態様では、本開示は、軟骨形成細胞シートを調製する方法であって、a)間葉系幹細胞(MSC)を温度応答性培養器でコンフルエントになるまで培養して細胞シートを形成すること、b)温度低下によって細胞シートを剥離させ、細胞シートを収縮させ、収縮した細胞シートを形成すること、c)収縮した細胞シートを培養表面と接触させること、及びd)培養表面上の収縮した細胞シートを軟骨形成培地で処理し、培養して軟骨形成細胞シートを形成することを含む、方法に関する。

【0038】

一部の実施形態では、収縮した細胞シートは、培養表面上で少なくとも1、2、3又は4週間成長される。一部の実施形態では、軟骨形成培地は、トランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF β)及び骨形成タンパク質(BMP)からなる群から選択されるタンパク質を含む。一部の実施形態では、軟骨形成培地は、以下の培地成分の1つ以上を含む：インスリン-トランスフェリン-セレン(ITS-G)、デキサメタゾン、ウシ血清アルブミン(BSA)、L-アスコルビン酸2-リン酸、L-プロリン、及びリノール酸。

30

【0039】

いくつかの実施形態では、MSCは、ヒト骨髓間葉系幹細胞(hBM-MSC)である。hUC-MSCを単離する方法は、当該技術分野において既知であり、本明細書に記載されている。

【0040】

細胞シートを調製するための一般方法は当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第8,642,338号、第8,889,417号、第9,981,064号、及び第9,114,192号に記載され、各々は参照により完全に本明細書に組み込まれる。

40

【0041】

細胞培養支持体の基質をコーティングするために使用される温度応答性ポリマーは水性溶液中でより高いか又は低い臨界溶液温度を有し、それは一般的に0℃から80℃、例えば、10℃から50℃、0℃から50℃又は20℃から45℃の範囲内にある。

【0042】

温度応答性ポリマーは、ホモポリマー又はコポリマーであってよい。例示的なポリマーは、例えば、特開211865/1990号に記載される。具体的には、それらは単量体、例えば

50

(メタ)アクリルアミド化合物((メタ)アクリルアミドはアクリルアミド及びメタクリルアミドの両方を指す)、N-(又は、N,N-ジ)アルキル置換(メタ)アクリルアミド誘導体及びビニルエーテル誘導体のホモ重合又は共重合によって得ることができる。コポリマーの場合、上記の単量体などの任意の2つ以上の単量体を用いることができる。更に、それらの単量体は他の単量体と共重合させることができるか、1つのポリマーを別のものにグラフトすることができるか、2つのポリマーを共重合させることができるか、又はポリマー及びコポリマーの混合物を用いることができる。所望により、ポリマーは、それらの固有の特性を損なわない程度まで架橋させることができる。

【0043】

ポリマーでコーティングされる基質は、細胞培養で一般的に使用されるもの、例えばガラス、加工ガラス、酸化シリコン、ポリスチレン、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリエステル、ポリカーボネート及びセラミックを含む任意のタイプであってよい。

10

【0044】

支持体を温度応答性ポリマーでコーティングする方法は当技術分野で公知であり、例えば特開211865/1990号に記載される。具体的には、そのようなコーティングは、基質及び上記の単量体又はポリマーを例えば電子ビーム(EB)曝露、 γ 線による照射、紫外線による照射、プラズマ処理、コロナ処理又は有機重合反応に供することによって達成することができる。

【0045】

温度応答性ポリマーのカバレッジは、 $0.4 \sim 3.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、例えば、 $0.7 \sim 2.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 又は $0.9 \sim 2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲内であってよい。細胞培養支持体の形態は、例えば、皿、マルチプレート、フラスコ又は細胞インサートであってよい。

20

【0046】

培養された細胞は、支持材の温度を支持体基質の上のポリマーが水和し、その結果細胞を脱離することができる温度に調整することによって、細胞培養支持体から脱離(剥離)し、回収することができる。細胞シートと支持体の間のギャップに水流を加えることによって、円滑な脱離を実現することができる。細胞シートの脱離は、細胞が培養された培養液又は他の等張性液のいずれか好適であるものの中で作用させることができる。

【0047】

特定の実施形態では、温度応答性ポリマーは、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)である。ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)は、 31°C の水中でのより低い臨界溶液温度を有する。それが遊離状態である場合、それは 31°C より上の温度の水の中で脱水を起こし、ポリマー鎖は凝集して汚濁を引き起こす。反対に、 31°C 以下の温度では、ポリマー鎖は水和して水に溶解し、それによってポリマーからの細胞シートの放出を引き起こす。特定の実施形態では、このポリマーはペトリ皿などの基質の表面をカバーし、その上に固定化される。したがって、 31°C より上の温度で、基質表面のポリマーも脱水するが、ポリマー鎖は基質表面をカバーし、その上に固定化されるので、基質表面は疎水性になる。反対に、 31°C 以下の温度では、基質表面のポリマーは水和するが、ポリマー鎖は基質表面をカバーし、その上に固定化されるので、基質表面は親水性になる。疎水性の表面は、細胞の接着及び増殖のための適当な表面であるが、親水性の表面は細胞の接着を阻害し、細胞は単に培養液を冷却することによって脱離される。

30

40

【0048】

間葉系幹細胞のための培養液は当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第9,803,176号及び第9,782,439号に記載され、それぞれは参照により完全に本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、細胞培養液はヒト血小板ライセート(hPL)を含む。一部の実施形態では、培養液はウシ胎仔血清(FBS)を含む。一部の実施形態では、培養液はアスコルビン酸を含む。一部の実施形態では、培養液は、ゼノフリー培地、すなわちヒトから得られる生成物を含有することができるが、非ヒト動物から得られる生成物を含有しない培地である。一部の実施形態では、培養液は、非ヒト動物から得られる少なくとも1つの生成物(例えばFBS)を含有する。一部の実施形態では、培養液は、ヒトから得られる生成物

50

を含有しない。特定の実施形態では、培養液は、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)(Life Technologies、CA、USA)、ヒト血小板ライセート(hPL、iBiologics、Phoenix、USA)、Glutamax(Life Technologies)、MEM非必須アミノ酸溶液(NEAA)(Life Technologies)及び抗生物質、例えばペニシリン、ストレプトマイシンの1つ以上を含む。

【0049】

MSC(例えばhBM-MSC)は、細胞培養支持体の基質表面にコーティングされた温度応答性ポリマーの上の培養液で細胞を培養する前に、1回以上の継代培養(すなわち、継代)を経ることができる。一部の実施形態では、MSC(例えばhBM-MSC)は、細胞培養支持体の基質表面にコーティングされた温度応答性ポリマーの上の培養液で細胞を培養する前に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15回の継代培養を経る。継代培養の回数の範囲を規定するために、これらの値のいずれかを使用することができる。例えば、一部の実施形態では、MSC(例えばhBM-MSC)は、温度応答性ポリマーの上で細胞を培養する前に、2~10回、4~8回又は1~12回の継代培養を経る。一部の実施形態では、継代培養の回数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15回未満である。一部の実施形態では、継代培養の回数は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15回である。

【0050】

軟骨形成細胞シートは、その適用に応じてある範囲の異なるサイズで調製することができる。一部の実施形態では、軟骨形成細胞シートは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15又は20cmの直径を有する。軟骨形成細胞シートのサイズの範囲を規定するために、これらの値のいずれかを使用することができる。例えば、一部の実施形態では、軟骨形成細胞シートは、1から20cm、1から10cm又は2から10cmの直径を有する。一部の実施形態では、軟骨形成細胞シートは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250又は300cm²の面積を有する。軟骨形成細胞シートのサイズの範囲を規定するために、これらの値のいずれかを使用することができる。例えば、一部の実施形態では、軟骨形成細胞シートは、1から100cm²、3から70cm²又は1から300cm²の面積を有する。本明細書に記載される方法は、軟骨形成細胞シートの表面積がその厚さより大いに大きい軟骨形成細胞シートをもたらす。例えば、一部の実施形態では、軟骨形成細胞シートの表面積とその厚さとの比は、少なくとも10:1、100:1、1000:1又は10,000:1である。本明細書に記載される軟骨形成細胞シートは、コンフルエントな軟骨分化細胞の1つ以上の層、例えば軟骨分化細胞の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ又は10個の層を含む。一部の実施形態では、軟骨形成細胞シートは、軟骨分化細胞の2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ又は10個未満の層を含む。一部の実施形態では、軟骨形成細胞シートは、軟骨分化細胞の少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ又は10個の層を含む。

【0051】

IV. 軟骨形成細胞シートを使用する方法

一部の態様では、本開示は、軟骨形成細胞シートを、それを必要とする対象に移植する方法であって、本明細書に記載の軟骨形成細胞シートを対象の組織に適用することを含む、方法に関する。

【0052】

一部の態様では、本開示は、軟骨組織の修復を必要とする対象において軟骨組織を修復する方法であって、本明細書に記載の軟骨形成細胞シートを対象の軟骨に適用し、それによって対象において軟骨組織を修復することを含む、方法に関する。本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、軟骨は関節軟骨である。

【0053】

一部の実施形態では、対象は局所軟骨欠損、例えば局所関節軟骨欠損を有する。本明細書で使用する「局所軟骨欠損」という用語は、十分に定義された領域に限定された軟骨の損傷を意味する。一部の実施形態では、対象は症候性軟骨欠損、例えば症候性関節軟骨欠

損を有する。一部の実施形態では、症候性軟骨欠損は、急性又は反復性外傷によって引き起こされる。一部の実施形態では、対象は変性関節疾患（例えば変形性関節症（osteoarthritis））を有する、又は変性関節疾患（例えば変形性関節症（osteoarthritis））を発症するリスクがある。

【0054】

一部の態様では、本開示は、関節疾患の処置又は予防を必要とする対象において関節疾患を処置又は予防する方法であって、本明細書に記載の軟骨形成細胞シートを対象の関節に適用し、それによって対象において関節疾患を処置又は予防することを含む、方法に関する。本明細書で使用される場合、用語「処置する（treat）」、「処置する（treating）」、及び「処置（treatment）」はすべて、関節疾患に関連する少なくとも1つの測定可能な物理パラメータの改善又は逆転を指すことが意図されている。用語「処置する」、「処置する」、「及び「処置」はまた、関節疾患の進行を防止すること、又は少なくとも進行を遅らせることを指すことができる。一実施形態では、「処置する」、「処置する」、及び「処置」は、関節疾患、障害、又は状態に関連する痛みの低減又は完全な軽減を指す。別の実施形態では、「処置する」、「処置する」、及び「処置」は、関節の炎症の軽減を指す。さらに別の実施形態では、「処置する」、「処置する」、及び「処置」は、滑膜関節の関節軟骨などの関節の軟骨の分解を抑制又は低減することを指す。また、さらに別の実施形態では、「処置する」、「処置する」、及び「処置」は、関節痛、関節腫脹、関節硬直、炎症、関節運動困難、及び可動域減少などの、関節疾患に関連する1以上の症状の緩和を指す。ある実施形態では、本明細書に記載の軟骨形成細胞シートが対象に最初に適用される時点で、対象が関節疾患を有している。いくつかの実施形態では、軟骨形成細胞シートは、関節疾患（例えば、変形性関節症）が発生する前に、例えば、関節疾患の発生を予防するために、対象に適用される。

【0055】

いくつかの実施形態では、関節は、滑膜関節及び軟骨関節から選択される。「滑膜関節」という用語は、哺乳動物の体内で最も一般的で可動性のあるタイプの関節を指す。滑膜関節には、ヒンジ関節（例えば、肘及び膝）、ピボット関節（例えば、首の上部にあるアトラス及び軸骨）、ボール及びソケット関節（例えば、股関節）、鞍関節（例えば、親指の手根骨関節）、顆状関節（例えば、手首、中手指関節、中足指関節）、及び滑関節（例えば、手首の手根間結合部）などがある。滑膜関節の非限定的な例としては、膝関節、手首関節、肩関節、股関節、肘関節、小手指関節、手根中手骨関節、及び足根中足骨関節などがあるが、これらに限定されるものではない。「軟骨関節」は、軟骨によって完全に接続された関節であり、例えば、胸骨関節（sternum）及び椎間板などのアンフィアース関節である。特定の実施形態では、関節疾患は滑膜関節に影響を及ぼす。他の実施形態では、関節疾患は、軟骨関節に影響を及ぼす。

【0056】

いくつかの実施形態では、関節疾患は、変性関節疾患、例えば、変形性関節症である。本明細書で使用される場合、「変形性関節症」は、滑膜関節に発生する関節炎の一形態を指す。これは、通常、慢性的な状態であり、関節を形成するために一緒になる骨の端にある、関節軟骨として知られる保護軟骨が摩耗し、及び／又は劣化したときに発生する。「関節軟骨」とは、関節の骨の端にある組織で、関節を動かす際に骨同士を摩擦なく接触させる役割を担う。関節軟骨は、コラーゲンとプロテオグリカンという2つの主成分から構成される。滑膜関節の軟骨が破壊される原因としては、プロテアーゼ、加齢、肥満、及び軟骨形成における遺伝的欠陥などが挙げらるが、これらに限定されるものではない。一部の実施形態では、関節疾患は、関節炎、変形性関節症、関節リウマチ、及び膝蓋軟骨軟化症からなる群から選択される。

対象はヒトである。

【0057】

ある特定の態様では、本開示は、急性又は反復性外傷によって引き起こされる症候性軟骨欠損を有する対象において変形性関節症を予防する方法であって、本明細書に記載の軟

骨形成細胞シートを、欠損を有する軟骨に適用し、それによって対象において変形性関節症を予防する、方法に関する。

【0058】

一部の実施形態では、軟骨形成細胞シートが適用される組織は、軟骨、例えば、関節軟骨である。いくつかの実施形態では、軟骨形成細胞シートが適用される組織は、骨、例えば軟骨下骨である。

【0059】

本明細書に記載される軟骨形成細胞シートの1つの利点は、適用される細胞シートの細胞外マトリックスが対象の軟骨組織に細胞シートを結合する天然の接着剤として作用し、そのため組織に細胞シートを接着するのに縫合(suture)も縫い合わせる(stitch)ことも必要とされないことである。軟骨形成細胞シートを対象の軟骨組織に移動するために、支持膜又は他の器具を使用して、その後シート移動の後に取り出すことができる。支持体は、例えば、ポリ(ビニリデンジフルオリド)(PVDF)、酢酸セルロース、セルロースエステル、プラスチック及び金属であってよい。軟骨形成細胞シートは標的組織に容易に接着し、標的組織の上に短時間直接置かれた後に縫合なしに自己安定化する。例えば、一部の実施形態では、軟骨形成細胞シートは、組織との接触から5、10、15、20、25又は30分以内に標的組織に接着する。軟骨形成細胞シートが子宮組織に接着した後、支持膜を除去することができる。

【0060】

ある特定の実施形態では、細胞シート中の軟骨分化細胞は対象に対して同種異系(allogeneic)である、すなわち対象と同じ種の異なる個体から単離され、そのため1つ以上の遺伝子座の遺伝子は同一でない。ある特定の報告された症例では、MSCに由来する細胞シートはヒト及び動物モデルにおいて同種異系拒絶を回避するようである(Jiang et al., 2005, Blood, 105(10), 4120-4126)。したがって、本明細書に記載される軟骨形成細胞シートは、既製の製品として同種異系細胞療法で 사용할 ことができる。他の実施形態では、細胞シート内の軟骨分化細胞は、軟骨形成細胞シートが適用される対象に対して同種異系(allogeneic)である。一部の実施形態では、対象はヒトである。

【0061】

同種異系細胞供与源は、宿主患者同種異系組織において標準の免疫適格性の下で意味のある治療を導き出すことが可能でなければならない。これには治療目的の組織部位への信頼できる細胞指向性、及びそこでの十分な期間の分割量(fractional dose)の生着又は保持が含まれる(Leor et al., 2000, Circulation, 102(19 Suppl 3), III 56-61)。現在の予想は、幹細胞懸濁物が対象に投与される場合、虚血性傷害に続く注射の3日後に、注射された幹細胞の3%未満が傷害を受けた心筋で保持されるというものである(Devine et al., 2003, Blood, 101(8), 2999-3001)。更に、標的組織に生着される細胞懸濁物からのほとんどの投与された細胞は、最初の数週間以内に死ぬ(Reinecke & Murry, 2002, J Mol Cell Cardiol, 34(3), 251-253)。対照的に、本明細書に記載される軟骨形成細胞シートは、移植の3日後に宿主組織に高い分割保持で安定して生着される。したがって、本明細書に記載される軟骨形成細胞シートは、注射又は投与される間葉系幹細胞懸濁物と比較して異なる利点を提供する。

【0062】

本明細書に記載される方法では、1を超える軟骨形成細胞シートを対象の軟骨組織に適用することができる。一部の実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれより多くの軟骨形成細胞シートを対象の軟骨組織(例えば関節軟骨組織)に適用することができる。対象の軟骨組織に適用される軟骨形成細胞シートの数の範囲を規定するために、これらの値のいずれかを使用することができる。例えば、一部の実施形態では、2~4、3~5又は1~10個の軟骨形成細胞シートが対象の軟骨組織(例えば関節軟骨組織)に適用される。

例えば、本発明は以下の実施形態を包含する：

「実施形態1」コンフルエントな軟骨分化細胞の少なくとも2つの層を含む軟骨形成細胞

シートであって、細胞シートが間葉系幹細胞(MSC)から調製され、細胞シートの基底側の軟骨分化細胞が1つ以上の接着分子を発現する、軟骨形成細胞シート。

〔実施形態2〕MSCがヒト骨髄MSC(hBM-MSC)である、実施形態1に記載の軟骨形成細胞シート。

〔実施形態3〕細胞シートが、軟骨分化細胞から本質的になる、実施形態1又は2に記載の軟骨形成細胞シート。

〔実施形態4〕細胞シート内の少なくとも50%の細胞が、軟骨分化細胞である、実施形態1又は2に記載の軟骨形成細胞シート。

〔実施形態5〕細胞シートが細胞外マトリクスを含む、実施形態1から4のいずれかに記載の軟骨形成細胞シート。

〔実施形態6〕細胞外マトリクスが、II型コラーゲン及び硫酸化プロテオグリカンからなる群から選択されるタンパク質を含む、実施形態5に記載の軟骨形成細胞シート。

〔実施形態7〕軟骨分化細胞が、SOX9、アグリカン、COL2A1、ACAN、COMP及びBMP2からなる群から選択されるタンパク質を発現する、実施形態5又は6に記載の軟骨形成細胞シート。

〔実施形態8〕細胞シートがラクナ構造を含む、実施形態1から7のいずれかに記載の軟骨形成細胞シート。

〔実施形態9〕1つ以上の接着分子が、フィブロネクチン及びラミニンから選択される、実施形態1から8のいずれかに記載の軟骨形成細胞シート。

〔実施形態10〕細胞シートが、軟骨表面への移植後に軟骨表面への物理的接着を示す、実施形態1から9のいずれかに記載の軟骨形成細胞シート。

〔実施形態11〕軟骨形成細胞シートを調製する方法であって、

a)間葉系幹細胞(MSC)を温度応答性培養器でコンフルエントになるまで培養して細胞シートを形成すること、

b)温度低下によって細胞シートを剥離させ、細胞シートを収縮させ、収縮した細胞シートを形成すること、

c)収縮した細胞シートを培養表面と接触させること、及び

d)培養表面上の収縮した細胞シートを軟骨形成培地で処理し、培養して軟骨形成細胞シートを形成すること

を含む、方法。

〔実施形態12〕収縮した細胞シートが、培養表面上で少なくとも3週間成長される、実施形態11に記載の方法。

〔実施形態13〕軟骨形成培地が、トランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF β)及び骨形成タンパク質(BMP)からなる群から選択されるタンパク質を含む、実施形態11又は12に記載の方法。

〔実施形態14〕工程b)における細胞シートが、1つ以上の酵素で細胞シートを処理することなく、温度応答性培養器から剥離される、実施形態11に記載の方法。

〔実施形態15〕実施形態11から14のいずれかに記載の方法によって製造された軟骨形成細胞シート。

〔実施形態16〕軟骨形成細胞シートを、それを必要とする対象に移植する方法であって、実施形態1から10又は15のいずれかに記載の軟骨形成細胞シートを対象の組織に適用することを含む、方法。

〔実施形態17〕組織が軟骨及び骨から選択される、実施形態16に記載の方法。

〔実施形態18〕軟骨が関節軟骨である、実施形態17に記載の方法。

〔実施形態19〕軟骨組織の修復を必要とする対象において軟骨組織を修復する方法であって、実施形態1から10及び15のいずれかに記載の軟骨形成細胞シートを対象の軟骨に適用し、それによって対象において軟骨組織を修復することを含む、方法。

〔実施形態20〕軟骨が関節軟骨である、実施形態16から19のいずれかに記載の方法。

〔実施形態21〕対象が局所軟骨欠損を有する、実施形態16から20のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

〔実施形態22〕対象が症候性軟骨欠損を有する、実施形態16から20のいずれかに記載の方法。

〔実施形態23〕症候性軟骨欠損が、急性又は反復性外傷によって引き起こされる、実施形態22に記載の方法。

〔実施形態24〕対象が変性関節疾患を有する、実施形態16から20及び22から23のいずれかに記載の方法。

〔実施形態25〕関節疾患の処置又は予防を必要とする対象において関節疾患を処置又は予防する方法であって、実施形態1から10及び15のいずれかに記載の軟骨形成細胞シートを対象の関節に適用し、それによって対象において関節疾患を処置又は予防することを含む、方法。

10

〔実施形態26〕関節が、滑膜関節及び軟骨関節からなる群から選択される、実施形態25に記載の方法。

〔実施形態27〕滑膜関節が、膝関節、手首関節、肩関節、股関節、肘関節、又は首関節である、実施形態26に記載の方法。

〔実施形態28〕関節疾患が変性関節疾患である、実施形態25に記載の方法。

〔実施形態29〕関節疾患が、関節炎、変形性関節症、関節リウマチ、及び膝蓋軟骨軟化症からなる群から選択される、実施形態25に記載の方法。

〔実施形態30〕急性又は反復性外傷によって引き起こされる症候性軟骨欠損を有する対象において変形性関節症を予防する方法であって、実施形態1から10及び15のいずれかに記載の軟骨形成細胞シートを、欠損を有する軟骨に適用し、それによって対象において変形性関節症を予防する、方法。

20

〔実施形態31〕対象がヒトである、実施形態16から30のいずれかに記載の方法。

〔実施形態32〕細胞シート内の軟骨分化細胞が、対象に対して同種異系 (allogeneic) である、実施形態16から31のいずれかに記載の方法。

〔実施形態33〕細胞シート内の軟骨分化細胞が、対象に対して自家 (autologous) である、実施形態16から31のいずれかに記載の方法。

【0063】

〔実施例〕

〔実施例1〕

材料及び方法

細胞培養

2回継代でLonzaから購入した4回継代ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hBM-MSC)を、10%ウシ胎児血清(FBS、Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、1%ペニシリン・ストレプトマイシン(PS、Life Technologies)、及び5ng/mL塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF、PeproTech, NJ, USA)を補足したダルベッコ変性イーグル培地(DMEM、Life Technologies, CA, USA)を含有する増殖培地に細胞3,000個/cm²でプレーティングし、37℃、5%CO₂で、加湿環境下でインキュベートした。培地を1日目及び5日目に交換し、細胞を90%コンフルエントになるまで約7日間培養した。0.05%トリプシン-EDTA(Gibco, NY, USA)を用いて細胞を継代し、血球測定器を用いて細胞懸濁液をカウントした。

30

【0064】

細胞シート及びペレットの作製及び軟骨分化

5回継代hBM-MSCを、ペレット培養のために15mLのエッペンドルフチューブ中の20%FBS増殖培地中に細胞 2.5×10^5 個でアリコートし、単層培養のために1μm径の細孔の6ウェル細胞培養インサートに細胞 6.7×10^4 個/cm²で播種し、細胞シート培養のために35mmのUpCell皿(Nunc, Thermo Fisher Scientific、デンマーク)に細胞 6.7×10^4 個/cm²で播種した。ペレット作製のため、チューブを500×gで10分間回転させた。蓋を緩め、細胞を37℃、5%CO₂で3日間インキュベートし、ペレットを形成させた。細胞シート作製のために細胞を5日間培養した。5日目に細胞シートを20℃で1時間放置した後、鉗子で剥離した。細胞シートの再播種のため、1μmの細孔の細胞培養インサート(Falcon, NE, USA)をFBSで一晩馴化した後に細胞シートを再播種した。インサートを1×PBS(Gibco)で

40

50

2回洗浄し、標準インキュベータ内に保管した。剥離した細胞シートを、OHPフィルム(Ap-
ollo, NY, USA)を使用して、訓化細胞培養インサートに移し、インサートウェルとの基底
接触を確実にした。細胞シートを、20 μ Lの増殖培地中、37°C、5%CO₂で1時間インキュ
ベートした。1時間後、新鮮な細胞増殖培地をシートに加え、細胞付着のために37°C、5%
CO₂で3日間インキュベートした。3日間のインキュベーション工程後、軟骨形成培地で軟
骨形成試料を誘導し、対照試料を細胞増殖培地中で維持し、全ての試料を低酸素インキュ
ベータに移した(37°C、5%CO₂、5%O₂)。軟骨形成培地は、10ng/mLのトランスフォー
ミング増殖因子 β -3(TGF β 3、Thermo Fisher Scientific)、200ng/mLの骨形成タンパ
ク質-6(BMP6、PeproTech)、1%のインスリン-トランスフェリン-セレン(ITS-G、Ther-
mo Fisher Scientific)、1%のPS(Life Technologies)、1%の非必須アミノ酸(NEAA、
Thermo Fisher Scientific)、100nMのデキサメタゾン(MP Biomedicals, OH, USA)
、1.25 mg/mlのウシ血清アルブミン(BSA、Sigma-Aldrich, MO, USA)、50 μ g/mLの
L-アスコルビン酸2-リン酸(Sigma-Aldrich)、40 μ g/mLのL-プロリン(Sigma-Aldrich)
、及び5.35 μ g/mLのリノール酸(Sigma-Aldrich)を補足したダルベッコ変性イーグル培
地(DMEM、Life Technologies)を含有した。軟骨形成試料及び対照試料について、分化
期間(0日~4週間)にわたって、培地を週に2回交換した。

【0065】

組織学的分析

4%パラホルムアルデヒド(PFA、Thermo Scientific)で15分間固定後、パラフィン包
埋した。包埋した試料を4 μ mで切片化し、アルシアンブルー及びサフラニンOで染色した
。アルシアンブルーは、軟骨中の酸性多糖類、例えば、グリコサミノグリカンを染色する
ために使用される多価塩基性染料である。サフラニンOは、様々な色合いの赤色で関節軟
骨の成分(例えば、プロテオグリカン、軟骨細胞、及びII型コラーゲン)を染色する塩基性
染料である。早期の軟骨形成を検出するために、試料をアルシアンブルー(EMD Millipor-
e, MA, USA)で10分間染色した。成熟軟骨形成を検出するために、標準的な方法に従って
サフラニンO染色を行った。簡潔に述べると、試料を、Wiegertの鉄ヘマトキシリン(Sig-
ma-Aldrich)で4分間、0.5g/Lのファストグリーン(Sigma-Aldrich)で5分間、0.1%のサ
フラニンO(Sigma-Aldrich)で8分間染色した。全ての試料を一晩乾燥させた後、AmScop-
e Softwareを使用してBX41広視野顕微鏡で画像化した。サフラニンO染色スライドを使
用して、細胞シートの厚さ及び核密度を計算した。各細胞シートスライドについて、細胞
シートの長さに沿って3枚の写真を撮影した。AmScopeソフトウェアに組み込まれた測定
ツールを使用して、シートの頂端から基底端までの5回の測定を写真ごとに行い、これら
の測定はシートに沿って均等に間隔を空けた。核のカウントは同じ3枚の写真/シートを用
いて行った。AmScopeソフトウェアに組み込まれた測定ツールを使用して長さ500 μ mの
細胞シートを画像内にマークした。ImageJソフトウェアを使用して、マークされたセク
ション内で核の数をカウントした。細胞シートの直径と体積の計算のために、ImageJソフト
ウェアを使用してシートの肉眼画像を分析した。1群当たり4枚の細胞シートについて5回
の直径測定を行った。厚さの測定値は上述のサフラニンO試料から用いた。全ての測定値
は各試料群について平均化した。

【0066】

免疫組織化学分析

断面IHC分析のため、試料をインサート膜上に4%PFAで15分間固定し、パラフィン包埋
した。包埋した試料を4 μ mで切片化し、成熟軟骨形成を検出するためにコラーゲンII型に
ついて、肥大を検出するためにMMP13について、並びに接着分子を検出するためにフィ
ブロネクチン及びラミニンについて染色した。簡潔に述べると、コラーゲンII型試料につ
いては50 $\times$ 低pH標的回収溶液(Dako, Agilent Technologies, CA, USA)の1:50希釈液
を用いて圧力鍋中で低圧にて106~110°Cで15分間インキュベートし、MMP13試料、フ
ィブロネクチン試料、及びラミニン試料についてはプロテインナーゼK(Dako, Agilent Tec-
hnologies)を用いて室温で6分間インキュベートすることによって抗原回収を行った。フ
ィブロネクチン試料及びラミニン試料を0.1%Triton X-100(Sigma-Aldrich)を用いて室

温で10分間透過処理した。全ての試料について、非特異的結合を10%正常ヤギ血清(Vector Laboratories, CA, USA)を用いて室温で30分間ブロッキングした。次にコラーゲンII型試料、MMP13試料、フィブロネクチン試料、及びラミニン試料を、抗コラーゲンII型一次抗体(Thermo Fisher Scientific)の1:200希釈液、抗MMP13一次抗体(Abcam, Cambridge, UK)の1:200希釈液、抗フィブロネクチン一次抗体(Abcam)の1:100希釈液、又は抗ラミニン一次抗体(Abcam)の1:100希釈液中で、それぞれ4°Cで一晩インキュベートした。試料を1×PBSで洗浄し、ヤギ抗ウサギ488二次抗体(Thermo Fisher Scientific)の1:200希釈液中、室温で被覆して2時間インキュベートした。2時間後、試料を1×PBSで洗浄し、DAPI含有マウンティング培地(Invitrogen, MA, USA)を用いてマウンティングした。Zeiss Axio広視野顕微鏡及びZENソフトウェアで試料を可視化した。細胞骨格の配置を決定するために、ファロイジン(F-アクチン)染色を行った。簡潔に述べると、試料を0.1%Triton X-100(Sigma-Aldrich)で15分間透過処理し、1×PBSで洗浄した。次いで、試料をファロイジンアレキサフルオル488(Life Technologies)の1:100希釈液と共に室温で被覆して30分間インキュベートした。次いで、試料を1×PBSで洗浄し、DAPI溶液(2滴/mL、Life Technologies)を用いて室温で5分間インキュベートした。試料を1×PBSで洗浄した後、マウンティングのために調製した。試料を共焦点顕微鏡(Nikon A1-NIS Elements AR Software)で撮像した。画像を分析し、ImageJを使用して調製した。

【0067】

RT-PCR分析

試料からのRNAを、1mL TRIzol/試料(Ambion, Life Technologies, CA, USA)を用いてペストルモーターミキサーで抽出した。総RNAを、PureLink RNAミニキット(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)を用いて、製造業者の説明書に従って単離した。cDNA合成のために、全ての試料を同時に合成した。cDNAを合成する前に、RNAをNanodropで定量し、全てのcDNA試料を1µgのRNA/試料から調製した。1.8を超える純度(A_{260}/A_{280})を有する全ての試料を、継続するのに十分な純度があると見なした。cDNA合成は、高容量cDNA逆転写酵素キット(Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を用いて、製造業者の説明書に従って実施した。RT-PCR分析は、Applied Biosystems Step One機器を使用して、TaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。以下の遺伝子について遺伝子発現レベルを分析した:1)ハウスキーピング遺伝子としてのグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH、Hs99999905_m1)、2)SRX-box 9(Sox9、Hs01001343_g1)、3)コラーゲンII型アルファ1鎖(Col II、Hs00264051_m1)、4)アグリカン(ACAN、Hs00153936_m1)、5)コラーゲンX型アルファ1鎖(ColX、Hs00166657_m1)、6)アルカリホスファターゼ(ALPL、Hs01029144_m1)、7)マトリクスメタロペプチダーゼ13(MMP13、Hs00942584_m1)、11)β-カテニン(Hs00355049_m1)、12)骨形成タンパク質2(BMP2、Hs00154192_m1)、13)軟骨オリゴマーマトリクスタンパク質(COMP、Hs00164359_m1)。全てのプライマーはApplied Biosystems製であった。相対遺伝子発現は定量比較CT法により算出した。遺伝子発現はGAPDH発現レベルに対して正規化した。軟骨分化について、発現レベルは単層3週間対照群に対するものであり、時間比較分化発現レベルは時間0単層対照群に対するものである。

【0068】

分化後の操作及び再付着

移植潜在能力評価の構造的変化のために、3週間軟骨分化収縮シートを、メスを使用して半分に切断した。各シートの半分の直ちに4%PFA中に15分間固定し、パラフィン包埋した。各シートの残りの半分の、新しいFBSコーティングした35mm組織培養プラスチック皿に再播種した。細胞シートを移行させるために、細胞シートをそっと突いて細胞培養インサート膜から動かし、鉗子を用いて手動で新たな皿に移した。二次表面に配置した後、少量の軟骨形成培地中で1時間インキュベートしてシートを付着させた。1時間後、新鮮な軟骨形成培地を加え、細胞シートを低酸素インキュベータに移動させた。3日間の培養期間中、細胞の明視野画像をシートの縁で毎日撮影した。3日後、細胞シートの半分の4%

PFA中に15分間固定し、パラフィン包埋した。

【0069】

標的組織部位への移植潜在能力について、3週間軟骨分化収縮シートを、メスを使用して4分の1に切断した。各シートの4分の1を直ちに4%PFA中に15分間固定し、パラフィン包埋した。各シートの他の4分の1を、新鮮なex vivoヒト関節軟骨片(約2cm²)の頂端側に移植した。ヒト関節軟骨試料は、処置中にヒト股関節軟骨から収集した。3日間の共培養後、軟骨試料上の細胞シートを4%PFA中に3日間固定し、パラフィン包埋した。

【0070】

統計分析

全ての統計分析は、n=4のデータセットで完了させた。全ての定量値は、平均及び標準偏差として表す。統計学的有意性は、対応のある両側スチューデントT検定を用いて算出した。有意性は、*p < 0.05及び**p < 0.01と定義した。

10

【0071】

結果

hBM-MSCの軟骨形成潜在能力

軟骨形成培地及び低酸素状態で3週間後、ペレット培養物としてのhBM-MSCは、予想される軟骨形成特性陽性を示す(図2)。3週間分化ペレットは、全ての軟骨形成染色(アルシアンブルー(図2D)、サフラニンO(図2E)、コラーゲンII型(図2F))に対して陽性である。3週間の対照ペレットは、全ての軟骨形成染色に対して陰性であった(図2A~C)。RT-PCRを用いた遺伝子分析では、3週間分化ペレットにおいて、軟骨形成マーカー(Sox9(図2G)、コラーゲンII型(図2H)、アグリカン(図2I))の発現が3週間対照ペレットと比較して有意に増加したことが示される。このデータは、hBM-MSCの軟骨形成潜在能力を支持する。

20

【0072】

hBM-MSC細胞シートの内因性剥離後収縮

細胞シートは、温度応答性培養皿から剥離後、自発的な収縮を経る。内因性剥離後収縮は、非収縮条件(図1A、1C)と比較して、収縮した細胞シートのサイズ及び構造を有意に変化させる(図1B、1D)。収縮した細胞シートは、非収縮シートと比較して、構築物の直径の29.2%減少(図1E)、厚さの883%増加(図1F)を示す。

【0073】

収縮シートとしてのhBM-MSCの軟骨形成潜在能力の増加

3週間にわたる軟骨分化は、細胞シートで軟骨形成陽性に至った(図11)。非収縮細胞シートは、非収縮3週間対照シート(図11)と比較して、アルシアンブルー(図11)、サフラニンO(図11)、及びコラーゲンII型(図11)によるわずかな軟骨形成染色陽性を示した。アルシアンブルー染色陽性は、試料の酸性ムチン含有量と相関する濃い青色によってマークされる。サフラニンOは、GAG含有量と比較して陽性硫酸化プロテオグリカンを暗赤色に染色し、他の全てのECM青色と対比染色する。コラーゲンII型は、赤色蛍光(擬似)によって示され、核はDAPI(青色)で対比染色される。全ての軟骨形成マーカー(アルシアンブルー(図11)、サフラニンO(図11)、コラーゲンII型(図11))について、収縮シートは、3週間収縮対照(図11)及び軟骨形成非収縮シートの両方と比較して、強く染色された。また分化した収縮シートは、成熟したヒアリン軟骨に関連するラクナ形態を示した。全ての軟骨形成マーカー(Sox9(図11Q)、Col II(図11S)、アグリカン(図11R))の遺伝子発現は、3週間分化後の非収縮シートと比較して、収縮シートにおいて有意に増加した。また、収縮シートは、3週間分化後の厚さで、非収縮シートの23倍に対して30倍増加を示した(図11)。分化後のこの厚さの増大は、収縮シート内又は非収縮シート内のいずれの細胞の数も有意に変化させるものではなく(図11)、軟骨形成性収縮細胞シートの厚さの増大は、軟骨形成に関連するECMの堆積によって引き起こされると示唆される。

30

40

【0074】

軟骨分化のための細胞骨格構造の変化

細胞骨格配置をファロイジン(f-アクチン)蛍光染色で観察し、核をDAPIによって同定した(図10及び11)。0日目で、非収縮シートはMSCの標準的な単層培養に関連する細長く整

50

列した細胞骨格構造を示す(図10及び11)。逆に、剥離後に収縮した細胞シートは、0日目よりランダムで交差した線維構造を示した(図10及び11)。3週間の分化後、3週間分化収縮シート細胞における細胞の大部分は、成熟軟骨細胞に関連する縮小した丸みを帯びた細胞骨格構造を示す(図10及び11)。非収縮シートの一部の細胞はこの丸みを帯びた細胞骨格構造を示しているが、3週間分化非収縮シートにおける細胞の大部分はより多様なMSC様構造を有する(図10及び11)。これらの細胞骨格変化に加えて、収縮シートは、非収縮シート(図10及び11)と比較して、細胞-細胞相互作用(β -カテニン(図10及び11))並びに軟骨形成の誘導及び開始に関連するECM成分(BMP2(図10及び11)、COMP(図10及び11))の有意な増加を示した。

【0075】

経時的な細胞シートの軟骨分化

収縮細胞シート及びペレットの経時的な軟骨分化は非常に類似した軟骨形成進行を示し、収縮細胞シートで見られる硫酸化GAG蓄積のわずかに早い開始を示す(図12)。ペレット培養物及び収縮シートの両方とも0日目でサフラニンO染色は陰性である(図12)。1週間の分化により、収縮細胞シート(図12)はペレット培養物(図12)よりも試料全体にわたってより大きなサフラニンO染色を示すが、両方の試料について染色は非常に微かである。このサフラニンO染色と併せて、収縮シートは、ペレット培養物と比較して、軟骨形成の誘導及び開始に関連するECM成分(BMP2(図12)、COMP(図12))の有意な増加を示した。3週間の分化により、収縮細胞シート(図12)及びペレット(図12)の両方がサフラニンOについて強く染色し、ラクナ(lacuna)形態を示す。遺伝子分析は、収縮シート及びペレットの4週間分化にわたる軟骨形成マーカー(Sox9(図12)及びコラーゲンII型(図12))発現の同様の傾向を示す。収縮シート及びペレットの両方について、Sox9発現は、初期の軟骨形成の間に増加し、次いで、試料が分化を続けるにつれて減少する。軟骨形成マーカーの発現は、分化の間の任意の時点で、収縮シートとペレットとの間で有意差はない。

【0076】

収縮細胞シートの遅延した肥大発生

収縮シートは、標準的なペレット培養物と比較して、肥大特性の発生が遅延していることを示す(図12)。肥大マーカーMMP13の免疫組織化学的染色は、0日目のペレット及び収縮シートにおいて陰性である(図12)。ペレット培養物中のMMP13染色は、2週間にわたって陰性であるか又は低いままであるが(図12)、3週間及び4週間の試料では両方で高度に発現されている(図12)。収縮シート試料では、MMP13染色は3週間まで陰性であるか又は低く(図12)、4週間の試料においてのみ陽性である(図12)。コラーゲンX型遺伝子の発現は、収縮シート及びペレットの両方について、軟骨分化を通じて増加する(図12)。コラーゲンX型の発現は、3週間及び4週間の分化の両方で収縮シートよりもペレット培養物において有意に高い。全ての試料において、MMP13遺伝子発現は、初期の軟骨形成中は低く、分化の後期段階で増加し始める(図12)。MMP13発現の増加は、収縮シート培養物(3~4週間)よりもペレット培養物で早く(2~3週間)生じる。3週間の分化におけるMMP13の発現は、収縮細胞シートと比較して、ペレットにおいて有意に高い。

【0077】

分化後の収縮細胞シートは、その構造的特性を失うことなく、二次生物学的表面へ操作及び移行することができる。

3週間分化させた収縮細胞シートを操作し、新たな培養皿に移し、3日間強く接着させることができた(図13)。FBSコーティングされた皿での3日間の二次培養後、細胞シートを収集し、固定し、サフラニンOで染色した。この染色は、移行後の細胞シートの構造及び内容物に識別し得るものは示さなかった(図13)。逆に、二次培養皿に移したペレット培養物は、サフラニンO染色の減少及びペレット形状のいくつかの変化を示した(図13)。3日間の二次培養後、収縮シートは、細胞シートの基底側に局在したラミニン細胞接着染色を維持していた(図13)。ペレットのラミニン染色では、染色はペレットの周辺に局在し、細胞シート培養物と比較して、界面表面で弱い(図13)。二次培養中、分化した収縮シートの移行から早くも24時間後には、細胞シートの縁で細胞の移動を見ることができ(図13)、これ

10

20

30

40

50

に対してペレット培養物では細胞の移動は最小限であり、遅れて進行した(図13)。このことは、ペレット培養物よりも収縮シートにおいて表面への接着性及び細胞の生存能が高いことを示す。

【0078】

分化後の細胞シートは、3日間、新鮮なex vivo軟骨表面に強く接着する(図14)。ラミニン細胞接着染色は、シートと軟骨表面との間の界面で最も強く(図14)、細胞シートと標的組織との間の強い接着及び界面相互作用を示す。

【0079】

[実施例2]

関節軟骨局所欠損治療法に使用される多くの幹細胞は、in vitroペレット培養を使用して軟骨形成潜在能力を示すが、この潜在能力は、細胞が生体材料足場に播種された場合、ほとんど保持されない。細胞シート組織工学は、足場要件を取り除き、培養から直接、細胞を移植することを可能にする。軟骨療法のためのヒトMSCシートを開発するためには、細胞の軟骨形成能をシート形態において維持することが重要である。

【0080】

本研究は、細胞シート技術を使用して、in vitroでMSCから即時に使用可能なヒアリン様軟骨構築物を作製することを目的としている。本研究はさらに、細胞シートがヒアリン様表現型への軟骨分化後に移植能力を保持し、構築物の構造特性又は軟骨形成特性を損なうことなく、標的組織部位との自発的な接着及び界面相互作用を可能にすることを実証する(図9)。本研究は、再生療法のためにin vivoでヒアリン軟骨を確立するために移植細胞にかかる時間を短縮することができる、予め分化したヒアリン様細胞シート構築物の開発を記載する。

【0081】

1. 材料及び方法

1.1 細胞培養

2回継代でLonzaから購入したhBM-MSCを、10%ウシ胎児血清(FBS)(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン(PS)(Gibco, NY, USA)及び5 ng/mL塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)(PeproTech, NJ, USA)を補足した高グルコース(4.5g/L)ダルベッコ変性イーグル培地(HG-DMEM)(Life Technologies, CA, USA)を含有する増殖培地に細胞3,000個/cm²でプレーティングし、加湿環境下(37°C、5%CO₂)でインキュベートした。培地を1日目及び5日目に交換し、細胞を90%コンフルエントになるまで約7日間培養した。細胞を0.05%トリプシン-EDTA(Gibco)を用いて継代し、血球測定器を用いて細胞懸濁液をカウントした。細胞を拡張し、3回継代及び4回継代を預け、5回継代を実験に使用した。

【0082】

1.2 細胞シート及びペレットの作製並びに軟骨分化

5回継代hBM-MSCを、ペレット培養のために15mLのコニカルチューブ中の20%FBS増殖培地中に細胞2.5×10⁵個でアリコートし、単層培養のために1.0µm径の細孔の6ウェル細胞培養インサートに細胞6.7×10⁴個/cm²で播種し、細胞シート培養のために35mm径のUpCell皿(株式会社セルシード、東京、日本)に播種した。ペレット作製のため、コニカルチューブを500×gで10分間遠心分離した。蓋を緩め、細胞を標準インキュベータ(37°C、5%CO₂)に移して3日間ペレット形成させた。細胞シート作製のために、細胞を5日間培養した。5日目に、細胞シートを20°Cで1時間移動させた後、鉗子で剥離した。細胞シートを再播種するために、1.0µm径の細孔の6ウェル細胞培養インサートをFBSで一晩調整してから細胞シートを再播種した。インサートは、シートを移す前に1×リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(Gibco)で2回洗浄した。剥離した細胞シートを、オーバーヘッドプロジェクトポリエステルフィルム(Apollo, NY, USA)を使用して訓化細胞培養インサートに移行させ、インサートウェル培養表面との基底接触を確実にし、標準インキュベータ内で20µLの増殖培地中で1時間インキュベートした。1時間後、新鮮な細胞増殖培地をシートに加え、さらに3日間インキュベートして、シート付着を確実にし、ペレット培養インキ

ュベーション期間を反映させた。3日間のインキュベーション工程後、軟骨形成培地で軟骨形成試料を誘導した。対照試料は10%FBS細胞増殖培地中で維持した。全ての試料を低酸素インキュベータ(37°C、5%CO₂、5%O₂)に移した。軟骨形成培地は、10ng/mLのトランスフォーミング増殖因子β-3(TGFβ3)(Thermo Fisher Scientific)、200ng/mLの骨形成タンパク質-6(BMP6、PeproTech)、1%のインスリン-トランスフェリン-セレン(ITS-G)(Thermo Fisher Scientific)、1%のPS(Life Technologies)、1%の非必須アミノ酸(NEAA)(Thermo Fisher Scientific)、100nMのデキサメタゾン(MP Biomedicals、OH、USA)、1.25mg/mlのウシ血清アルブミン(BSA)(Sigma-Aldrich、MO、USA)、50 μg/mLのL-アスコルビン酸2-リン酸(Sigma-Aldrich)、40 μg/mLのL-プロリン(Sigma-Aldrich)及び5.35 μg/mLのリノール酸(Sigma-Aldrich)を補足したHG-DMEMを含有した。軟骨形成試料及び対照試料について、培地を分化期間(0日～3週間)にわたって週に2回交換した。

【0083】

1.3 組織学的分析

4%パラホルムアルデヒド(PFA)(Thermo Scientific)で15分間固定した後、試料をパラフィン包埋した。包埋試料を4 μmで切片化した。細胞形態を同定するために、ヘマトキシリン及びエオシン(H&E)染色を標準的な方法に従って行った。簡潔に述べると、試料を、Mayerのヘマトキシリン(Sigma-Aldrich)で4分間、及びエオシン(Thermo Scientific)で4分間染色した。成熟軟骨形成を検出するために、標準的な方法に従ってサフラニンO染色を行った。簡潔に述べると、試料を、Wiegertの鉄ヘマトキシリン(Sigma-Aldrich)で4分間、0.5g/Lのファストグリーン(Sigma-Aldrich)で5分間、0.1%のサフラニンO(Sigma-Aldrich)で8分間染色した。全ての試料を一晩乾燥させた後、AmScope Software(USA)を使用してBX41広視野顕微鏡(オリンパス株式会社、日本)で画像化した。サフラニンO染色スライド断面を使用して、細胞シートの厚さ及び核密度を計算した。各細胞シートスライドについて、細胞シートの長さに沿って3枚の写真を撮影した。AmScopeソフトウェアに組み込まれた測定ツールを使用して、シートの頂端から基底端までの5回の測定を写真ごとに行い、これらの測定はシートに沿って均等に間隔を空けた。核のカウントは同じ3枚の写真/シートを用いて行った。AmScopeソフトウェアに組み込まれた測定ツールを使用して、細胞シートの長さ500 μmをマークした。ImageJソフトウェア(NIH、USA)を使用して、マークされた切片内の核の数をカウントした。細胞シート直径の計算のために、ImageJソフトウェアを使用してシートの肉眼画像を分析した。1群当たり4枚の細胞シートについて5回の直径測定を行った。全ての測定値は各試料群について平均化した。

【0084】

1.4 免疫組織化学分析

断面IHC分析のため、試料を4%PFAで15分間、インサート膜上に固定し、パラフィン包埋した。包埋試料を4 μmで切片化し、II型及びI型コラーゲンを染色して成熟軟骨形成を検出し、MMP13を染色して肥大を検出し、ラミニンを染色して接着分子を検出した。簡潔に述べると、II型コラーゲン試料については、50×低pH標的回収溶液(Dako, Agilent Technologies, CA, USA)の1:50希釈液を用いて圧力鍋中で低圧にて106～110°Cで15分間インキュベートし、I型コラーゲン試料、MMP13試料、及びラミニン試料についてはプロテイナーゼK(Dako, Agilent Technologies)を用いて室温(RT)で6分間インキュベートすることによって抗原回収を行った。ラミニン試料を0.1%Triton X-100(Sigma-Aldrich)を用いて室温で10分間透過処理した。非特異的結合を、II型コラーゲン試料、MMP13試料、及びラミニン試料について10%正常ヤギ血清(Vector Laboratories, CA, USA)を用いて、及びI型コラーゲン試料について5%正常ロバ血清(Abcam)を用いて、室温で30分間ブロッキングした。次に、II型コラーゲン試料、I型コラーゲン試料、MMP13試料及びラミニン試料を、抗コラーゲンII型一次抗体(Thermo Fisher Scientific)の1:200希釈液、抗コラーゲンI型一次抗体(Thermo Fisher Scientific)の1:200希釈液、抗MMP13一次抗体(Abcam)の1:200希釈液、又は抗ラミニン一次抗体(Abcam)の1:100希釈液中で、それぞれ4°Cで一晩インキュベートした。試料を1×PBSで洗浄し、II型コラーゲン試

料、MMP13試料及びラミニン試料についてのヤギ抗ウサギ488二次抗体(Thermo Fisher Scientific)の1:200希釈液、又はI型コラーゲン試料についてのヤギ抗ロバ594二次抗体(Thermo Fisher Scientific)の1:200希釈のいずれかを用いて、室温で被覆して2時間インキュベートした。2時間後、試料を1×PBSで洗浄し、DAPI含有マウンティング培地(In vitrogen、MA, USA)を用いてマウンティングした。試料をZeiss Axio広視野顕微鏡及びZENソフトウェアで可視化した。試料をAmScope Softwareを使用してBX41広視野顕微鏡で可視化した。細胞骨格の配置を決定するためにファロイジン(F-アクチン)染色を行った。簡潔に述べると、試料を0.1%Triton X-100(Sigma-Aldrich)で15分間透過処理し、1×PBSで洗浄した。次いで、試料をファロイジンAlexaFluor488(Life Technologies)の1:100希釈液と共に、室温で被覆して30分間インキュベートした。次いで試料を1×PBSで洗浄し、DAPI溶液(2滴/mL、Life Technologies)を用いて室温で5分間インキュベートした。次いで、試料を1×PBSで洗浄し、マウンティングのために調製した。試料を共焦点顕微鏡(Nikon A1-NIS Elements AR Software)で撮像した。ImageJソフトウェアを使用して画像を調製した。

【0085】

1.5. リアルタイム定量PCR分析

試料からのRNAを、1mLのTRIzol/試料(Ambion, Life Technologies, CA, USA)を用いてペストルモーターミキサーで抽出した。総RNAを、PureLink RNAミニキット(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)を用いて製造業者の説明書に従って単離した。cDNA合成のために、全ての比較試料を同時に合成した。cDNAを合成する前に、RNAをNano Drop分光光度計(Thermo Scientific, USA)を用いて定量し、全てのcDNA試料を1µgのRNA/試料から調製した。1.8を超える純度(A_{260}/A_{280})を有する全ての試料を、使用するのに十分な純度があると見なした。cDNA合成は、高容量cDNA逆転写酵素キット(Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を用いて製造業者の説明書に従って実施した。リアルタイムqPCR分析は、Applied Biosystems Step OnePlus機器を使用してTaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。以下の遺伝子について遺伝子発現レベルを分析した。1)ハウスキーピング遺伝子としてのグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH、Hs99999905_m1)、2)β-アクチン(Hs99999903_m1)、3)β-カテニン(Hs00355049_m1)、4)骨形成タンパク質2(BMP2、Hs00154192_m1)、5)軟骨オリゴマーマトリクスタンパク質(COMP、Hs00164359_m1)、6)SRY-box9(SOX9、Hs01001343_g1)、7)アグリカン(ACAN、Hs00153936_m1)、8)コラーゲンII型アルファ1鎖(COL2A1、Hs00264051_m1)、9)コラーゲンI型アルファ1鎖(COL1A1、Hs00164004_m1)、10)コラーゲンX型アルファ1鎖(COL1、Hs0016665_m1)、11)マトリクスメタロペプチダーゼ13(MMP13、Hs00942584_m1)。全てのプライマーは、Applied Biosystems製であった。相対遺伝子発現は定量比較CT法により算出した。遺伝子発現をGAPDH発現レベルに対して正規化した。細胞骨格分析及び時間比較分化について、発現レベルは0日の2D単層対照群に対するものであり、軟骨分化について、発現レベルは2D単層3週間対照群に対するものである。

【0086】

1.6 分化後の操作及び再付着

分化後操作中の構造変化及び接着能を評価するために、3週間軟骨分化収縮hBM-MSCシートを、メスを用いて半分に切断した。各シートの半分を直ちに4%PFA中に15分間固定し、パラフィン包埋した。各シートの残りの半分を、FBSコーティングされた35mm組織培養プラスチック皿に再播種した。細胞シートを移行させるために、細胞シートの半分をそっと突いて細胞培養インサート膜から動かし、鉗子を用いて手動で新たなFBSコーティングされた培養皿に移した。二次表面に配置した後、シートを軟骨形成培地中で1時間インキュベートして付着させた。1時間後、新鮮な軟骨形成培地を加え、細胞シートを低酸素インキュベータに移動させ、さらなる培養を行った。3日間の培養期間中の0~72時間に、Zeiss Axio広視野顕微鏡及びZENソフトウェアを用いて、細胞の明視野画像をシート

の縁で撮影した。3日後、細胞シートの半分を4%PFA中に15分間固定し、パラフィン包埋した。比較のために、3週間軟骨分化ペレットも、FBSコーティングされた35mm組織培養プラスチック皿に再播種した。ペレットを、穏やかなピペッティングによって新しい培養表面に手で移した。二次表面に配置した後、ペレットを少量の軟骨形成培地中で1時間インキュベートして付着させた。1時間後、新鮮な軟骨形成培地を加え、ペレットを低酸素インキュベータに移動させ、さらに6時間培養した。構築物の付着有効性を、この追加の6時間の培養後に付着したシート又はペレットと、移行したシート又はペレットの総数との比率として定量化した(n=6)。

【0087】

1.7 分化後移植潜在能力

軟骨組織を標的とする移植潜在能力を決定するために、3週間軟骨分化した収縮シートを、メスを使用して4分の1に切断した。各シートの4分の1を直ちに4%PFA中で15分間固定し、パラフィン包埋した。各シートの他の4分の1を、ルーチンの股関節鏡検査処置でヒト股関節軟骨から匿名化組織廃棄物として収集した新鮮な(収集と同日の)ex vivoヒト関節軟骨片(約2cm²)の頂端側に移植した。低酸素インキュベータ内で3日間共培養した後、細胞シート上軟骨試料を4%PFA中で3日間固定し、パラフィン包埋した。

【0088】

1.8 統計分析

全ての統計分析はn≥4の生物学的複製物のデータセットで完了させた。全ての定量値は平均±標準偏差として表す。統計学的有意性は、データの正規分布を仮定して、対応のある両側スチューデントT検定を用いて評価した。この統計分析のための十分な正規分布は、データの歪度 ≥ -0.8 及び $\leq +0.8$ と定義した。統計学的有意性は、有意性なし(ns)p ≥ 0.05 、*p < 0.05 及び**p < 0.01 と定義した。

【0089】

2 結果

2.1 hBM-MSCシートの自発的な剥離後収縮

培養ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hBM-MSC)シートは、温度応答性培養皿から剥離後に自発的に収縮した(図15)。自発的な剥離後収縮は、2D単層細胞培養条件と比較して、得られた3D収縮細胞シートのサイズ及び構造を著しく変化させた(図15)。hBM-MSCシートは、2D単層細胞培養条件と比較して、剥離後細胞シートの収縮後の直径の有意な減少(3.5分の1に減少、p=1.77E-5)(図15)及び厚さの増加(7倍増加、p=3.63E-6)(図15)を示した。

【0090】

2.2 軟骨形成潜在能力のためのシート細胞骨格変化

培養hBM-MSCシートの細胞骨格配置をファロイジン(F-アクチン)蛍光染色で観察し、核をDAPIにより同定した(図21a、b)。0日目に、2D培養物内の細胞は、MSCの標準的な接着培養物と関連する細長く整列した細胞骨格構造を示した(図10A)。逆に、剥離後に収縮させた収集hBM-MSC細胞シートは、より丸みを帯びた核を有する、よりランダムな交差した線維構造を示した(図10B)。これらの細胞骨格変化は、収縮3Dシートと2D単層培養物との間の相対的な β -アクチン遺伝子発現(図10C)に基づいて有意であることが確認された(p=0.0194)。これらの細胞骨格変化に加えて、収縮3Dシートは、軟骨形成誘導前の2D単層培養物と比較して、細胞-細胞相互作用、 β -カテニン(p=.00865)、並びに軟骨形成促進シグナル伝達分子BMP2(p=.0000457)及びCOMP(p=.000947)の有意な増加を示した(図10D~F)。

【0091】

2.3 3D収縮シートとしてのhBM-MSCの軟骨形成潜在能力の増加

hBM-MSCを、標準的な3Dペレット培養物において確認されている、実証された軟骨形成潜在能力を有するMSC供給源として選択した(図2を参照)。3D収縮細胞シートとして収集したhBM-MSCの3週間軟骨分化はヒアリン様軟骨形成陽性に至った(図11)。対照試料と比較して、3週間分化試料ではサフラニンO及びII型コラーゲン染色陽性が同定された(図11a~d、g~j)。サフラニンO染色は硫酸化プロテオグリカンに赤色に染色し(赤色の濃

10

20

30

40

50

さは、GAG含有量に対して相対的である)、ファストグリーンは他のECMタンパク質を青色に対比染色する。II型コラーゲンは赤色蛍光(擬似赤色免疫染色)によって示され、核はDAPI(青色)で対比染色される。単層2D hBM-MSC培養物は、3週間の分化後に、サフラニンO(図11G)及びII型コラーゲン(図11I)で、わずかに軟骨形成染色陽性を示した。3週間分化後の3D収縮シートは、軟骨形成2D培養物(図11G、I)と比較して、全ての軟骨形成マーカー(サフラニンO(図11H)及びII型コラーゲン(図11J))についてより強く染色された。分化3D収縮シートはまた、成熟ヒアリン軟骨に関連するラクナ構造を発達させた(図11H)。3週間の分化後、3週間の分化収縮シートのほとんどの細胞は、成熟軟骨細胞に関連する、縮小して丸みを帯びた細胞骨格構造を示した(図11N)。2D単層培養におけるいくつかの細胞はこの丸みを帯びた細胞骨格構造を示したが、3週間分化させた単層における細胞の大部分は、より多様な紡錘様又は線維芽細胞形状を有した(図11M)。全ての軟骨形成マーカーの遺伝子発現は、3週間の分化後に、2D細胞培養と比較して、3D収縮細胞シートにおいて有意に増加した(SOX9(図11Q)($p=0.0044$)、ACAN(図11R)($p=0.0242$)、及びCOL2A1(図11S)($p=0.0126$))。3D収縮細胞シートはまた、3週間分化後に、2D培養物(図11K)と比較してII型コラーゲンとI型コラーゲンとの比(図11T)($p=.0107$)を有意に高く発現させ、I型コラーゲンに対する染色は最小限であった(図11L)。さらに、3D収縮シートは、3週間分化後に30倍の厚さ増加を示し、2D細胞培養物の23倍の厚さ増加よりも有意に大きかった(図11O)($p=4.26E-6$)。分化後のこの厚さの増加は、3D収縮細胞シート内又は2D細胞培養物内のいずれにおいても細胞数を有意に変化させなかったことから(図11P)($p=0.422(3D);0.997(2D)$)、軟骨形成細胞シートの厚さの増加は、軟骨形成誘導性ECMの堆積から生じることが示唆された。

【0092】

2.4 経時的な細胞シートの軟骨分化

3D収縮した収集細胞シート及びペレットの経時的な軟骨分化は、軟骨形成において非常に類似した進行を示し、3D収縮hBM-MSCシートで硫酸化GAG蓄積のわずかに早い発生並びに肥大及び線維軟骨表現型の遅延した発生が見られた(図12)。ペレット培養物及び3Dシートの両方とも、0日目でサフラニンO染色について陰性であった(図12A、E)。1週間の分化後、3D収縮した細胞シート(図12F)は、ペレット培養物(図12B)よりも試料全体にわたってより大きなサフラニンO染色を示したが、染色は両方の試料で微かであった。3週間の分化により、3D細胞シート(図12H)及びペレット培養物(図12D)の両方が、サフラニンO(図12H、D)及びII型コラーゲン(図12Q)について強く染色された一方で、ラクナ構造を示した。遺伝子分析は、収縮シート及びペレットについて、3週間の分化にわたって軟骨形成マーカー発現(SOX9、COL2A1、ACAN)の同様の傾向を示した(図12S)。軟骨形成マーカー発現は、分化中の任意の時点で3Dシートとペレット培養物との間で有意差はなかった(SOX9: $p=0.435(0日)$ 、 $0.754(1週間)$ 、 $0.189(2週間)$ 、 $0.222(3週間)$; COL2A1: $p=0.169(0日)$ 、 $0.158(1週間)$ 、 $0.265(2週間)$ 、 $0.131(3週間)$; ACAN: $p=0.773(0日)$ 、 $0.681(1週間)$ 、 $0.213(2週間)$ 、 $0.724(3週間)$)。

【0093】

軟骨形成発現は類似していたが、3D収縮シートは、標準のペレット培養物と比較して、肥大及び線維軟骨特性の遅延した発生を示した。肥大マーカーのMMP13^{44,45}についての免疫組織化学的染色は0日目のペレット培養物及び3Dシートにおいて陰性であった(図12I、M)。hBM-MSCペレット培養物のMMP13染色は2週間にわたって陰性又は最小限のままであった(図12I~K)、3週間の試料において強く表れた(図12L)。3Dシート試料におけるMMP13染色は3週間にわたって陰性又は最小限のままであった(図12M~P)。3週間の分化により、ペレット培養物は線維軟骨マーカーI型コラーゲンについて強く染色されたが、3D収縮シートは最小限のI型コラーゲン染色陽性を示した(図12R)。肥大に関するX型コラーゲン遺伝子発現は3Dシート及びペレットの両方で軟骨分化を通じて増加したが(図12T)、3週間分化後のX型コラーゲンの発現は、3Dシートよりもペレット培養物において有意に高かった($p=0.00596$)。MMP13遺伝子の発現は、初期の軟骨形成の間は両方の

構築物で低かったが、3週間では3D収縮細胞シートと比較してペレットで有意に高かった(図12T)($p=0.0114$)。細胞-細胞接着マーカー β -カテニンは、軟骨形成の初期段階で軟骨形成コミットメントに関連するが、軟骨分化の後期段階で過剰発現された場合、軟骨細胞肥大にも関連する。この β -カテニンの発現は、3D細胞シートにおいて、hBM-MSCペレット培養物と比較して、誘導時に有意に高かったが、その後、分化を通じて有意に低かった(図12U)($p=0.00248(0日);0.0374(1週間);0.00591(2週間);0.0464(3週間)$)。

【0094】

2.5 シート特性に影響を及ぼさないヒアリン様細胞シート操作

3週間分化させた3D収縮hBM-MSCシートを操作し、インタクトなシートとして新たな培養表面に移すことができた(図13)。FBSコーティング表面で3日間二次培養した後、細胞シートを収集し、固定し、サフラニンOで染色した。この染色は、移行後の細胞シートの構造又はGAG組成に識別可能な変化を示さなかった(図13A、B)。二次培養中、細胞の移動/増殖は、収集した分化3D収縮シートでは移行後に早ければ6時間で細胞シートの縁で観察され(図13C)、急速で自発的な表面接着及び細胞生存能を示した。3週間分化細胞シートの付着成功率100%(6/6シートで完全接着)であったのに対して、再播種3週間分化ペレットはいずれも接着できず、新鮮培地を添加して構築物をさらに6時間培養した後、二次培養皿に付着したままであった(0/6ペレットで接着)(図13D)。3週間分化3D収縮シート及びペレットの免疫組織化学的分析は、接着分子ラミニン染色が細胞シート基底側に沿って強く現れたことを示した(図13E)が、ペレット培養物のラミニン染色は、ペレットの周辺(界面)辺りに最小限の陽性染色を示した(図13F)。

【0095】

2.6 ヒアリン様細胞シート移植潜在能力

3週間分化させた3D収縮hBM-MSCシートは、新鮮なex vivoのヒト関節軟骨片に自発的かつ強力に接着することができた(図14)。分化後の3D hBM-MSCシート(図14A)は、1時間以内に新鮮なex vivoのヒト関節軟骨表面に強く接着し(図14B)、継続培養中に少なくとも3日間接着したままであった。3日間の共培養後のサフラニンO染色は、シートと軟骨表面との間に密接な物理的接着を示し、界面に沿った隙間はほとんど又は全く見られなかった(図14C)。3日間の共培養後のラミニン染色は、シートと軟骨表面との間の界面で最も強く(図13E)、細胞シートと標的軟骨組織との間の連続した接着及び生物学的結合の可能性を支持した。

【0096】

3. 考察

多くの研究は、MSCが、2D構造と比較して、3D構造において増加した軟骨形成潜在能力を示すことを実証している。2D細胞培養物とは異なり、3D培養物は、細胞が、軟骨細胞の細胞骨格組織に関連する丸みを帯びた細胞形態をとることを可能にする。収縮した細胞シートは、細胞がより丸みを帯び、細長さの少ない細胞骨格構造をとるこの3D環境を自発的に生成する。このことは、細胞の軟骨形成潜在能力に直接関係する。温度媒介性の剥離時に収縮細胞シートで見られる細胞骨格再編成及び2Dから3Dへの移行(図1及び10)は、間質細胞テンセグリティの変化により引き起こされる可能性が最も高い。この変化において、固定/接着培養物からの細胞放出はアクチンフィラメントの自発的収縮を可能にし、細胞シート内の細胞の収縮を促す。

【0097】

細胞シート技術は、酵素を収集したり、内因性細胞-細胞相互作用及び細胞-ECM間相互作用を損ねたりすることなく、コンフルエントなシートとして細胞を自発的に剥離し、アクチンフィラメントに沿った集成的相互作用による内因性の細胞収縮力を維持し、このことは連続単位としてのシート収縮を刺激する。この剥離後の細胞シート収縮は、多核で厚く、足場なしの3D細胞シート構造を自発的に作製し(図1)、細胞骨格の再編成を誘導する(図10)。細胞骨格構造のこれらの変化はまた、メカノトランスダクションを刺激し、細胞形状及びECM構造の両方を変化させることによって初期の軟骨形成凝縮を模倣し、軟骨形成誘導の前に、 β -カテニンを介した細胞-細胞相互作用の増加、並びに軟骨形成促進シグ

ナル伝達分子BMP2(細胞凝縮の調節因子)及びCOMP(コラーゲン蓄積及びECMアセンブリの調節因子)の上方調節をもたらし得る。

【0098】

軟骨形成誘導前の構造的移行及び軟骨形成促進シグナル伝達の上方調節は、軟骨形成培地による誘導後に軟骨形成表現型を達成する3D収縮細胞シートをもたらす(図11)。健康な関節軟骨は、特に、II型コラーゲン及びプロテオグリカンに富むECM(剪断力、圧縮力、及び引張力に対する耐性を可能にする)、SOX9及びアグリカンの発現、I型コラーゲンの低発現、ラクナ構造中の核、並びにECMと比べて低い細胞密度を含むヒアリン軟骨形成表現型を有する。収集3D収縮シートは、それらのヒアリン様表現型の標準的かつ認められたベンチマーク、つまりECM内の顕著なII型コラーゲン及びプロテオグリカン含有量、共通のヒアリン軟骨マーカー(SOX9、COL2A1、ACAN)の高発現、高COL2A1/COL1A1比となるI型コラーゲンの低発現、並びに比較的低い細胞密度でのラクナ構造内に核を有する丸みを帯びた細胞構造を分化後に首尾よく達成している。ECM組成(つまり、プロテオグリカン、アグリカン、及びII型コラーゲン含有量)に加えて、ECM堆積(分化中の3D収縮シートに見られる)もヒアリン軟骨分化に関連する。軟骨形成誘導前の3D収縮細胞シート内の細胞骨格再編成は、ECMアセンブリ及びコラーゲン蓄積に直接関連するCOMP及びBMP2を上方調節し、軟骨形成誘導後の2D培養物よりも3D細胞シートにおいて有意に多くECM堆積をもたらす。培養物表面からの温度媒介性剥離に際して自発的収縮から生成される3D細胞シートは、初期には細胞密度の高い構造である。しかし、軟骨形成中に3D細胞シートの厚さを著しく増大させるECM堆積は、構築物の全体的な細胞密度を低下させる。ECM堆積からのこの全体的な細胞密度の低下は、天然のヒアリン軟骨構造及び細胞分布とより密接に一致するヒアリン様組織構築物をもたらす。

【0099】

ヒアリン様表現型へのMSC軟骨分化の主な制限は、*in vitro*及び*in vivo*の両方で、MSC由来軟骨細胞が肥大化及び線維軟骨に向かって必然的に進行することである。適切なヒアリン様軟骨分化のために3D構造が必要であることは明らかであるが、構築物の厚さ及び細胞密度が培地拡散に影響を及ぼし、低酸素圧力領域の生成及び厚い組織における栄養拡散勾配の増加が軟骨分化及び肥大に影響を及ぼすことが示されているため、特定の閾値が決定されなければならない。本試験において、3D細胞シートは、対照3Dペレット培養物と比較して、*in vitro*で同様の軟骨形成発達進行を示したが、肥大特性の発生は遅延した(図12)。*in vitro*でのMSC由来軟骨細胞の肥大の駆動機序はまだほとんど明らかにされていないが、本研究で観察されたMSCシートの肥大特性の発生遅延は、シートの構造特性に起因する可能性が最も高い。詳細には、この研究で用いた3D細胞シートは、対照3Dペレット培養物と比較して薄く、細胞密度が低下しており、それにより構築物全体にわたるより実質的かつ均一な培地拡散が促進され、軟骨形成を、細胞シグナル伝達ではなく、培地補充によって主に駆動することが可能である。軟骨分化中の細胞シグナル伝達、例えば、 β -カテニンの継続的な過剰発現は、古典的Wnt経路の活性化を介した*in vitro*での軟骨細胞肥大誘導と結びついている。3Dペレット培養物がより厚いことは、細胞密度がより高いことと組み合わせると、十分な栄養拡散に対する障壁となり、この障壁は、遊離培地に不十分に曝露されたペレットのコアの細胞に軟骨形成の合図を伝播させるために、細胞-細胞相互作用への依存を増加させ得る(つまり、 β -カテニンを上方調節させ得る(図12))。これらのデータを合わせると、3D細胞シートの構築物の厚さ及び細胞密度を調整することにより、軟骨形成中の細胞相互作用を調節し、*in vitro*でMSC由来軟骨細胞肥大の発生を遅延させ得ることが示唆される。それらの表現型は、安定したヒアリン様組織を必要とする将来的*in vivo*研究において長期的な治療的利益を確立するためには有害であるため、*in vitro*分化中に肥大表現型又は線維軟骨表現型への任意の移行を評価及び監視することが重要である。最適な構築物の厚さ、及びこの肥大化への移行を駆動する特定の機構を明らかにし、MSC由来軟骨細胞の肥大を予防しながら、*in vitro*でヒアリン軟骨を生成するための最も効果的なシート調製パラメータを特定するために、さらなる*in vitro*研究が必要である。

10

20

30

40

50

【0100】

様々な分化プラットフォームがin vitroでMSCのヒアリン様表現型への軟骨分化を促進することに成功しているが、これらの分化産物はいずれも、ヒト適用への転換には成功していない。例えば、ペレット培養物は、接着能の制限及び再生組織の均質性の制限により、in vivo治療用途ではなく、分化潜在能力のin vitro検証のために主に使用されている。ペレット培養物のクラスターは、in vivoで軟骨欠損を埋めるために使用されており、ペレットの球状の形状の制約によって残される負の空間へのいくつかの集合能が示されている。しかしながら、これらのペレットクラスターは、均質な組織を生成せず、追加の接着剤なしに生物学的表面に強く接着しないか、又は欠損部位にそれらを含する膜を支持しない。

10

【0101】

細胞シート技術の1つの独自の利点は、内因性ECMの保持、細胞相互作用、及びインタクトな接着タンパク質を介して、足場又は支持材料なしで細胞を標的組織部位に直接的かつ自発的に移植し、天然組織と相互作用するための安定な細胞培養環境も提供する能力である。本発明者らのデータは、細胞シートを分化後に移行させ、生物学的表面に接着させることができること、及びこの移行が、構造特性又は軟骨形成特性に影響を与えないことを示している(図13)。操作及び移行後にシートの軟骨形成特性及び構造特性が維持されていることは、損傷又は欠損したヒアリン軟骨の迅速な置き換えにとって有望である。これらの分化した細胞シートはまた、新鮮なex vivoヒト軟骨に強く接着することができ、3日以内に天然軟骨細胞との界面相互作用を潜在的に開始できた(図13)。これらの内因性接着能は、ペレット培養物の周辺に沿っては豊富に存在しない接着分子を、分化後のシートの基底表面に沿って保持することに起因し、移植潜在能力の格差の要因となっている可能性が高い。表面接着分子の保持は、軟骨欠損部位での細胞シートの生着及び局在化を補助することが予測される。ヒアリン様細胞シートと天然軟骨との間の密接な物理的及び生化学的界面相互作用は、宿主軟骨からの直接の軟骨形成シグナル伝達を介して、in vivoでシートのヒアリン特性を維持するために役立つと予想される。このex vivo実験は、他の全ての欠損微小環境因子の非存在下での細胞シートと健康な関節軟骨との間の理想的な相互作用を表す。関節軟骨局所欠損における軟骨分化細胞シートのシート移植能及び治療効果を完全に検証するためには、長期的なフォローアップ並びに再生及び免疫応答への詳細な着目に伴うin vivo試験が必要となる。

20

30

【0102】

本研究では、以下のことが実証される:1)MSCシートは、構造的変換及び細胞骨格再編成を介した、剥離後細胞シートの自発的な収縮後に、足場材料なしでin vitroでヒアリン軟骨に軟骨分化することが可能である。2)これらの3D MSCシートは、in vitroでヒアリン様軟骨形成表現型を維持しながら、肥大を遅延させる好適な初期厚さ及び細胞密度を提供する。3)分化後、これらの3D細胞シートは、軟骨表面に自発的に直接接着することができ、構造特性及び軟骨形成特性を維持し、保持された接着タンパク質を介して天然組織と潜在的に界面相互作用し得る。これらの知見に基づいて、3D MSCシートは、関節軟骨再生療法のための、同種異系の、移植可能な、足場なしのヒアリン軟骨構築物を発達させるための特有のプラットフォームを表す。

40

【0103】

4. 結論

本研究において提示される細胞シートに基づく技術は、ヒアリン様特性を有する足場なしの軟骨構築物をin vitroで作製するための改善された戦略を示す。さらにヒアリン様軟骨分化3D MSCシートは、構造特性又は軟骨形成特性を損なうことなく、軟骨組織との自発的接着及び界面相互作用を開始する。MSCを使用した細胞シートに基づく本技術は、移植可能なヒアリン様構築物をin vitroで生成し、損傷したヒアリン関節軟骨を迅速かつ直接的に置き換えるための適合性のあるプラットフォームを提供するはずである。

【0104】

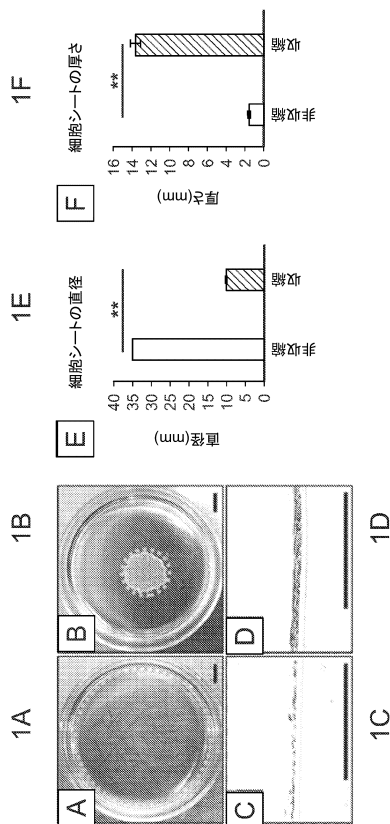
[実施例3]

50

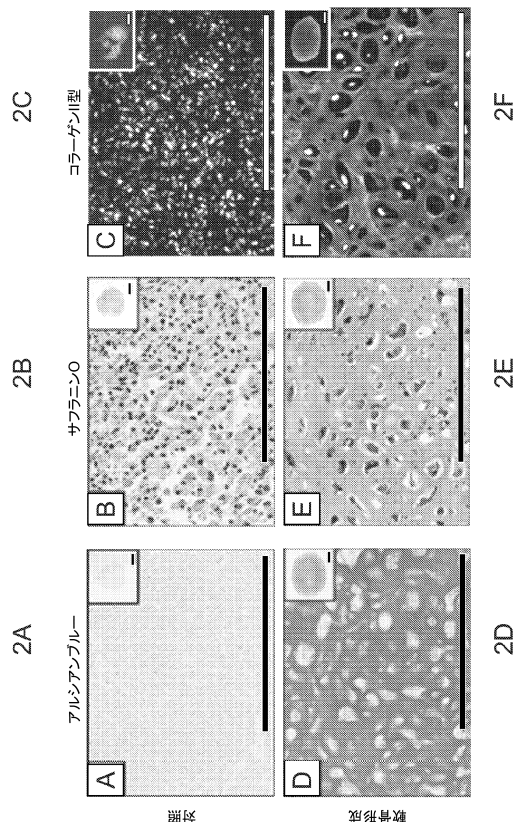
実施例1及び2に記載の軟骨分化細胞シートの移植能力を、局所軟骨欠損のラットモデルにおいてin vivoで評価した。ヌード(RNU)ラット後脚滑車溝に2mmの局所欠損を作製した(図15A参照)。欠損作製の成功により、軟骨下骨を破壊することなく、軟骨の全厚が取り除かれる(軟骨下骨から出血はほとんど又は全く見られない)。3週間の軟骨分化ヒアリン様ヒトMSC由来細胞シートを、欠損作製時に欠損に移植した(図15B参照)。関節を閉じる前に、わずかに加湿した環境で約30分間シートを接着させた。移植2週間後、膝関節を収集し(図15C)、細胞シート移植能を評価した。移植2週間後のラット局所欠損における3週間分化ヒト細胞シートの断面組織学的分析を、サフラニンO(図15D)、ヘマトキシリン&エオシン(図26E)、及びヒト特異的ビメンチン免疫組織化学染色(図15F)を用いて行った。サフラニンO染色陽性は、移植領域における細胞シートのヒアリン様特性陽性の保持を示した(図15D)。H&E染色は、宿主組織との統合を示した(図15E)。ビメンチンは、間葉由来細胞において発現されるIII型中間フィラメントタンパク質であり、したがって、ヒト特異的ビメンチンを使用して、異種宿主内のヒト細胞を特異的に識別することができる。細胞シート内に移植されたヒト細胞は、ヒト特異的ビメンチンについて陽性であり、移植領域における生着及び保持を示した(図15F)。スケールバー=200 μ m。全体的に、これらの結果は、軟骨分化ヒアリン様ヒトMSC由来細胞シートが軟骨への移植に成功し、ヒアリン様特性を維持しながら宿主組織と統合され得ることを示す。

【図面】

【図1】



【図2 A-F】



10

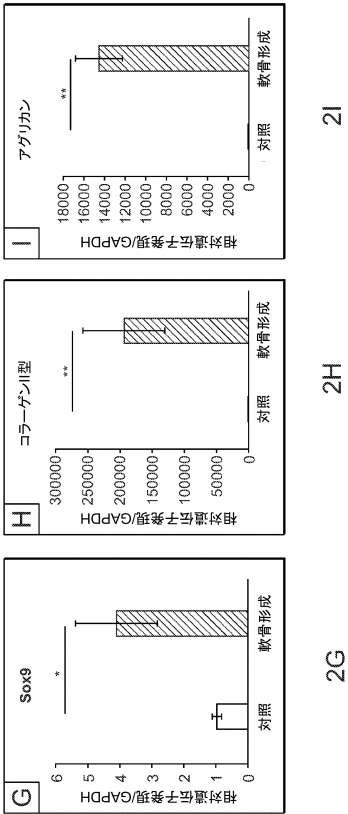
20

30

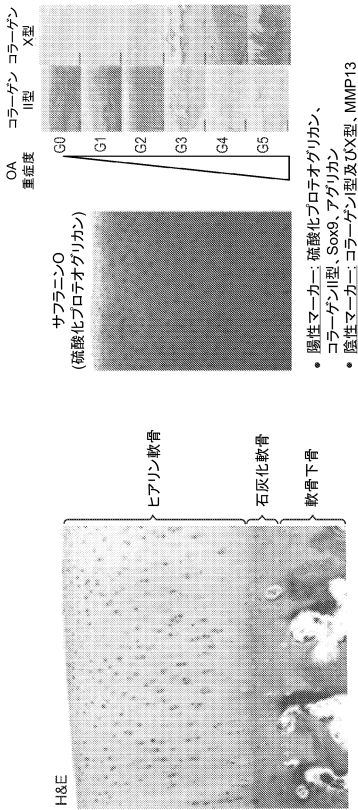
40

50

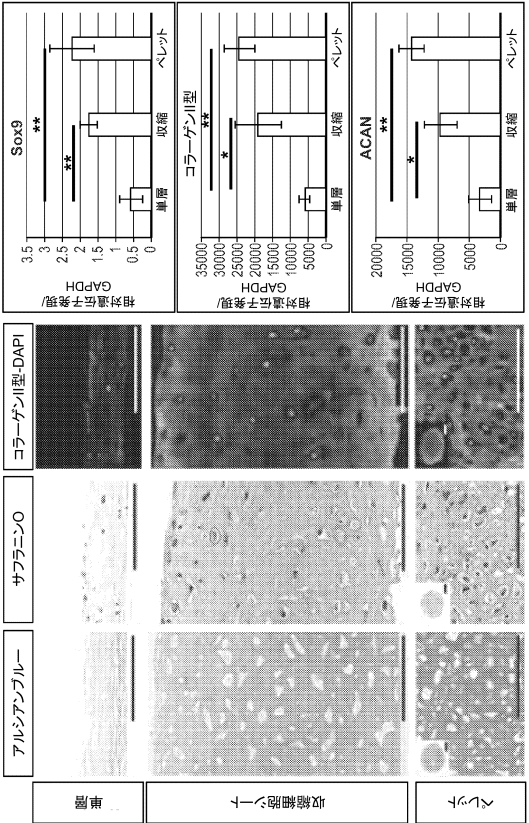
【図 2 G - I】



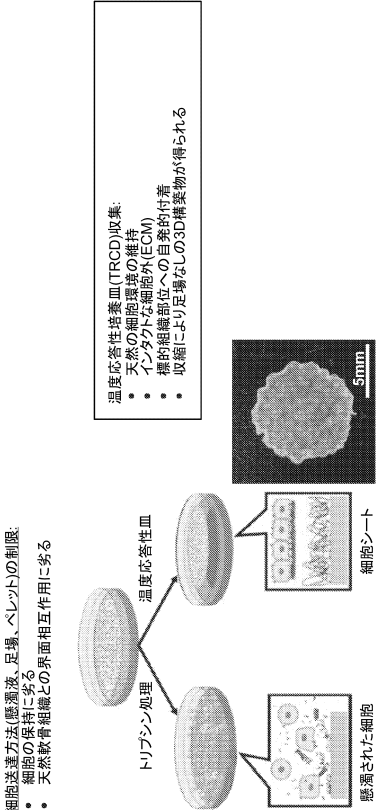
【図 4】



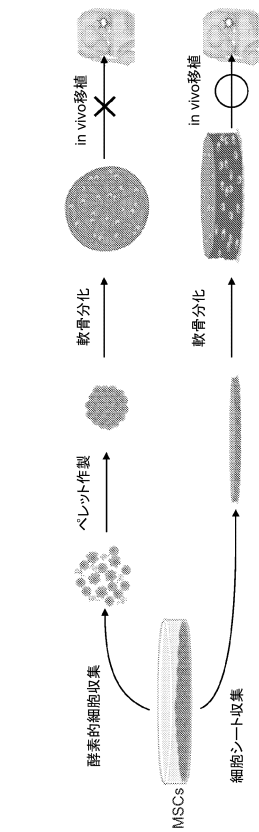
【図 3】



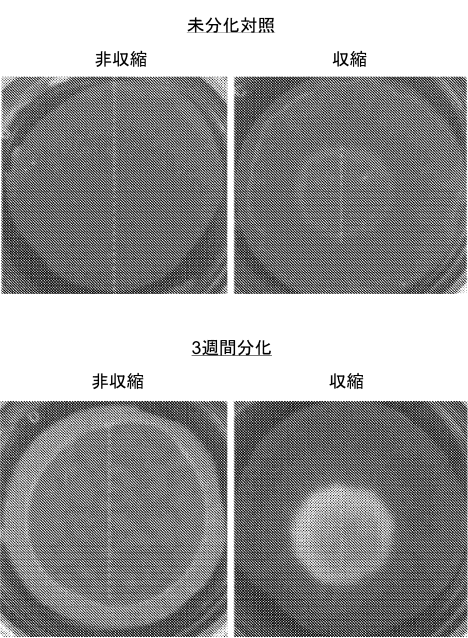
【図 5】



【図 6】



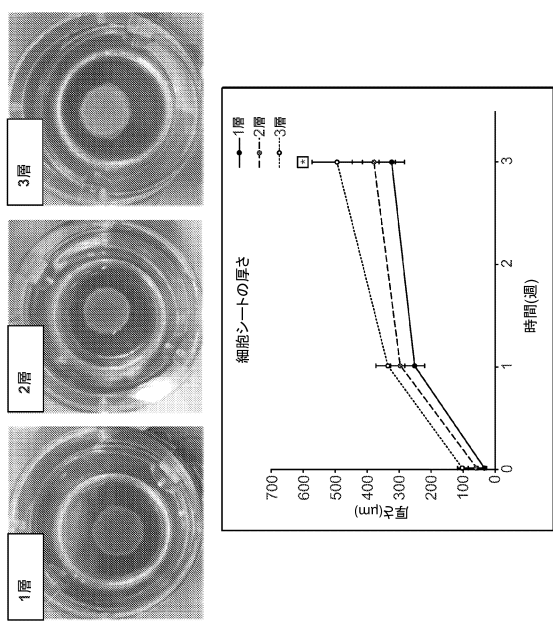
【図 7】



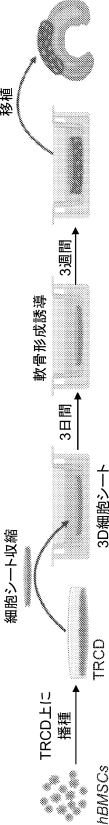
10

20

【図 8】



【図 9】

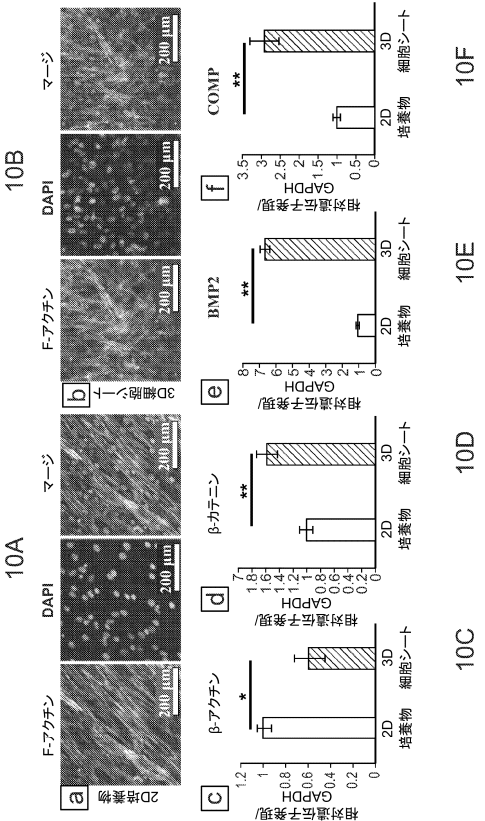


30

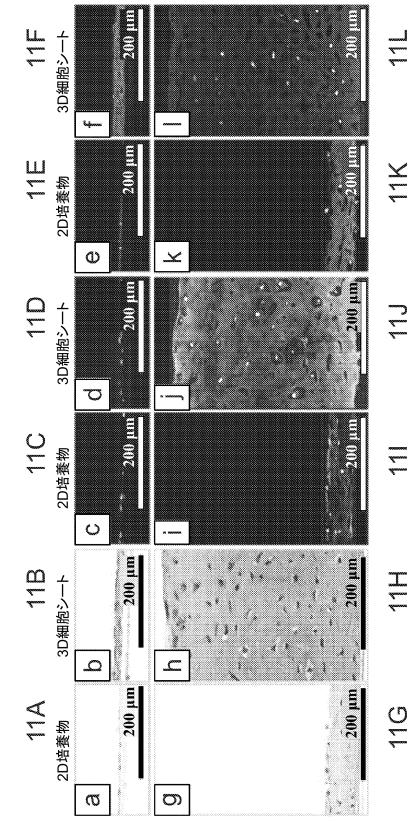
40

50

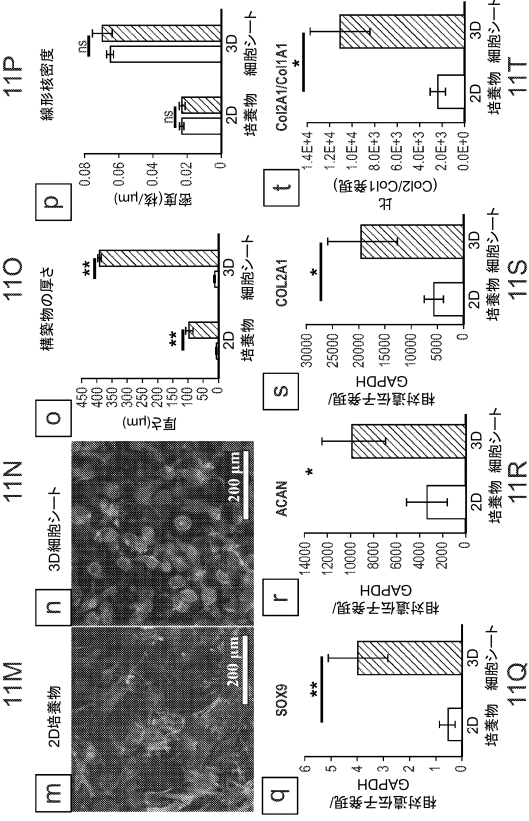
【図 10】



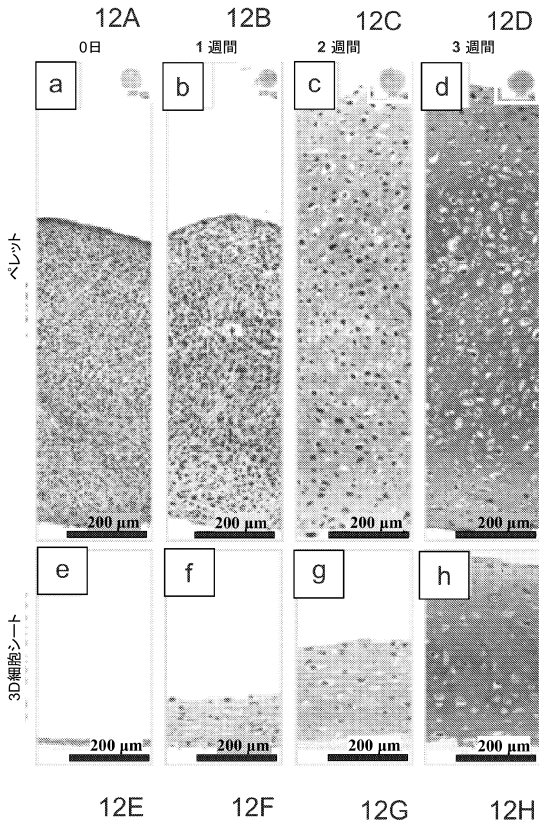
【図 11 A - L】



【図 11 M - T】



【図 12 A - H】



10

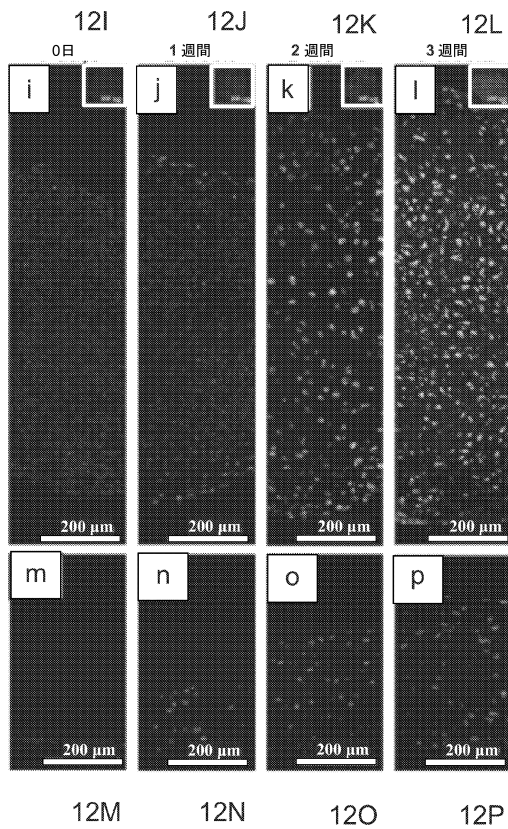
20

30

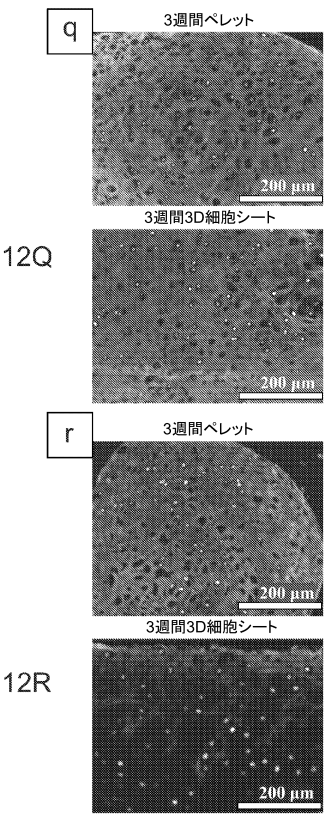
40

50

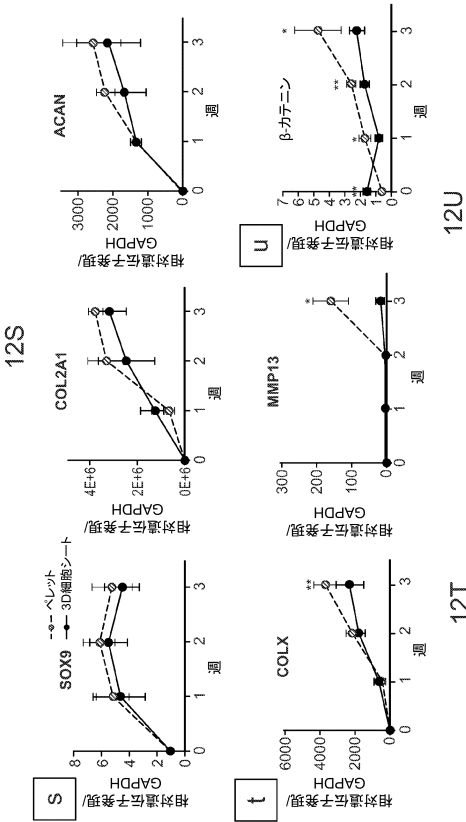
【図 1 2 I - P】



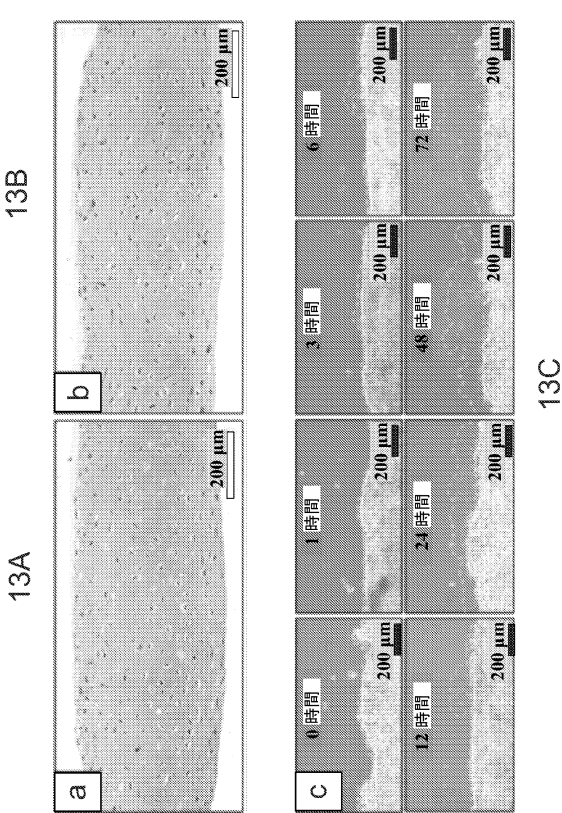
【図 1 2 Q - R】



【図 1 2 S - U】



【図 1 3 A - C】



10

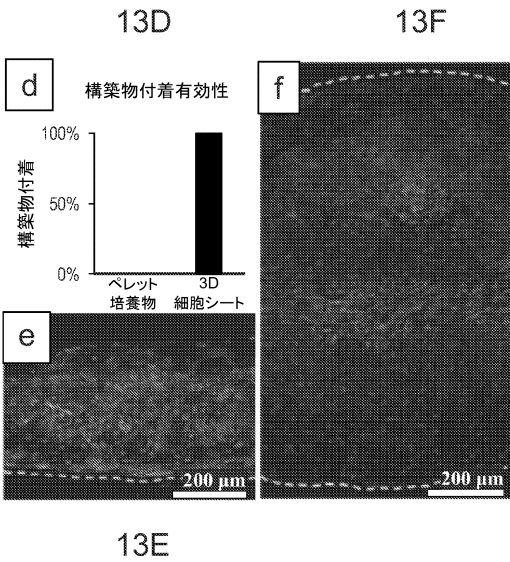
20

30

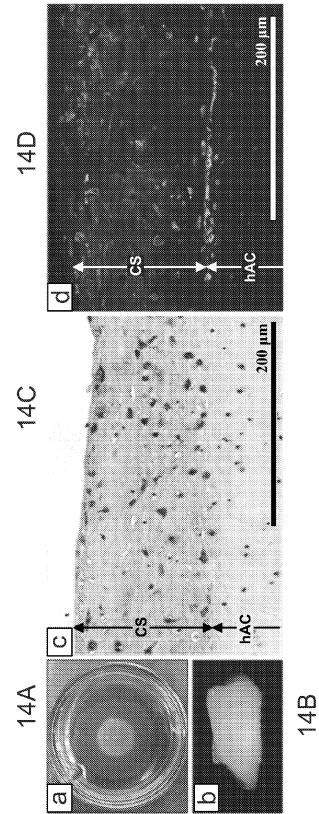
40

50

【図 1 3 D - F】



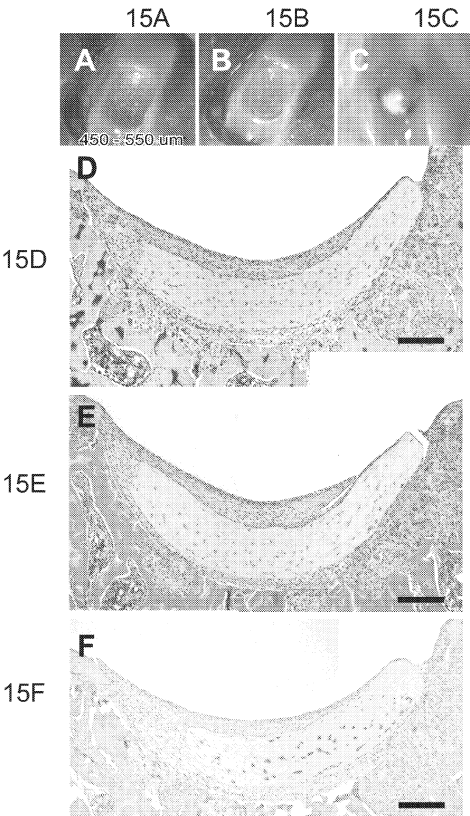
【図 1 4】



10

20

【図 1 5】



30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 29/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/32 (2015.01)
 A 6 1 L 27/38 (2006.01)
 A 6 1 L 27/40 (2006.01)
 A 6 1 L 27/50 (2006.01)
 A 6 1 L 27/36 (2006.01)
 A 6 1 L 27/22 (2006.01)
 A 6 1 L 27/24 (2006.01)

F I

A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 29/00 1 0 1
 A 6 1 K 35/32
 A 6 1 L 27/38 1 1 1
 A 6 1 L 27/38 1 1 2
 A 6 1 L 27/38 3 0 0
 A 6 1 L 27/40
 A 6 1 L 27/50
 A 6 1 L 27/36 1 3 0
 A 6 1 L 27/22
 A 6 1 L 27/24

コップル クリーク ロード 1 3 4 9

(72)発明者

ソープ, ハリー

アメリカ合衆国 8 4 1 0 2 ユタ州, ソルトレイクシティ, アパートメント 1, イー. 2エヌデ
 ィー アベニュー 3 7 6

(72)発明者

グレイガー, デイビッド ダブリュ.

アメリカ合衆国 8 4 1 0 3 ユタ州, ソルトレイクシティ, 8ティーエイチ アベニュー 5 3 5

(72)発明者

マーク, トラヴィス

アメリカ合衆国 8 4 0 9 8 ユタ州, パーク シティ, パインブルック ロード 7 4 5 8

審査官

斉藤 貴子

(56)参考文献

特表2007-528756 (JP, A)

特開2016-140308 (JP, A)

特表2007-528706 (JP, A)

国際公開第2018/067175 (WO, A1)

SEKINE, W. et al., Chondrocyte Differentiation of Human Endometrial Gland-Derived MSCs in Layered Cell Sheets, Scientific World Journal, 米国, Hindawi Publishing Corporation, 2013年11月18日, 2013 (359109), 1-7

ITOKAZU, M. et al., Transplantation of Scaffold-Free Cartilage-Like Cell-Sheets Made from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair: A Preclinical Study, Cartilage, 米国, SAGE Publications, 2016年10月, 7 (4), 361-372

SATO, Y. et al, Xeno-free and shrinkage-free preparation of scaffold-free cartilage-like disc-shaped cell sheet using human bone marrow mesenchymal stem cells, J Biosci Bioeng, NL, Elsevier, 2013年12月, 116 (6), 734-739

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 2 8

A 6 1 L 2 7 / 0 0 - 2 7 / 6 0

A 6 1 K 3 5 / 3 2

A 6 1 P 1 9 / 0 0

A 6 1 P 2 9 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)