



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202246491 A

(43)公開日：中華民國 111 (2022) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：111104138

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 01 月 28 日

(51)Int. Cl. : C12N5/077 (2010.01)

A61K31/734 (2006.01)

A61P19/00 (2006.01)

(30)優先權：2021/01/29 日本

2021-013667

2021/10/13 日本

2021-167913

(71)申請人：國立大學法人北海道大學 (日本) NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION
HOKKAIDO UNIVERSITY (JP)

日本

日商 P u R E C 股份有限公司 (日本) PUREC CO., LTD. (JP)

日本

日商持田製藥股份有限公司 (日本) MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

(JP)

日本

(72)發明人：須藤英毅 SUDO, HIDEKI (JP)；筈場大介 UKEBA, DAISUKE (JP)；山田勝久
YAMADA, KATSUHISA (JP)；浦勝郎 URA, KATSURO (JP)；鈴木久崇 SUZUKI,
HISATAKA (JP)；伊谷有未 IYOKU, YUMI (JP)；陶山史 SUYAMA, TAKASHI
(JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：27 項 圖式數：20 共 153 頁

(54)名稱

椎間盤再生用組成物

(57)摘要

本發明提供一種椎間盤之髓核再生促進用組成物，其含有低內毒素海藻酸之 1 價金屬鹽與間葉系幹細胞。特別是，本發明之組成物透過源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞所致之髓核細胞之活化及/或源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞之向髓核細胞之分化，促進椎間盤之髓核再生。



【發明摘要】

【中文發明名稱】

椎間盤再生用組成物

【中文】

本發明提供一種椎間盤之髓核再生促進用組成物，其含有低內毒素海藻酸之1價金屬鹽與間葉系幹細胞。特別是，本發明之組成物透過源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞所致之髓核細胞之活化及/或源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞之向髓核細胞之分化，促進椎間盤之髓核再生。

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

椎間盤再生用組成物

【技術領域】

【0001】本發明係關於含有低內毒素海藻酸之1價金屬鹽與間葉系幹細胞之椎間盤再生用組成物。本發明係關於含有源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞的椎間盤再生用組成物。

【先前技術】

【0002】人類之背骨(脊椎)由24塊骨(椎骨)所構成，發揮該椎骨與椎骨之間的緩衝作用之組織稱為椎間盤。椎間盤，因年老、外傷、疾病等而產生變性、損傷。椎間盤之變性，為椎間盤之細胞數、水分含量、細胞外基質(第二型膠原蛋白、聚集蛋白聚醣(*aggrecan*)等)等降低的狀態，若發生變性則變得不能發揮椎間盤之作為衝擊吸收體的機能。椎間盤變性及椎間盤損傷，具體而言，為椎間盤突出、椎間盤疾病、脊椎退化性滑脫症、化膿性椎間盤炎、變形性脊椎疾病、脊椎狹窄症、外傷等所致之椎間盤損傷等。例如，在椎間盤突出中，因包覆髓核之纖維環產生變形或龜裂而形成突出向椎間盤外突出，自變形或產生之龜裂處脫出的髓核，壓迫脊髓神經，引起疼痛、麻痺等。

【0003】對椎間盤突出的治療之一有椎間盤髓核摘除(切除)術，確認了有一定之效果。然而，已知在椎間盤髓核摘除(切除)術中，由於椎間盤髓核摘除術後之手術部位未施以處置，故有時進行椎間盤之變性變化。若藉由椎間盤髓核摘除術去除髓核之一部分，則於髓核部位產生空洞(本說明書中亦稱為「缺損部」)。由於髓核之自我修復能力及再生能力很低，故髓核之空洞在物理上亦容易變弱。又，有時於空洞部分中，纖維母細胞樣細胞聚積形成與本來之髓核不同力學特性的組織。因此，椎間盤髓核摘除術後，突出之復發率高。雖據說椎間盤髓核摘除後之5年以內的復發率為4~15%左右，但最近之長期數據中可知10年後過半數會復發。雖然若突出復發則需要再手術，但脊髓神經埋沒於在第1次手術後形成之瘢痕組織之中，確認脊髓神經之位置變得困難。

【0004】至今，開發以海藻酸為基底之高純度硬化性凝膠，實證即使單獨投予凝膠(無細胞)椎間盤組織亦自然修復(日本專利6487110號，Tsujiimoto et al., EBioMedicine 37(2018)521-534)，實施對20~49歲之腰椎椎間盤突出病患在突出摘除術後植入凝膠之臨床試驗。

【0005】另外，間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells: MSC)，由於在細胞採取所伴隨之倫理性問題少，具有分化成骨、軟骨、脂肪等之多樣的分化能力，故為繼造血幹細胞後之盛行於臨床應用的體性幹細胞(somatic stem cells)之一。由於MSC可藉由相對簡單的手法技術來

分離，主要在試驗管內誘導分化成軟骨或骨等後移置至局部等，廣為使用作為用於再生醫療之材料。然後，向臨床應用發展時，可製造必要量之維持一定機能的細胞之事，成為製品化之必要條件。

【0006】然後，本發明者們，確立了自骨髓藉由流式細胞儀分離 LNGFR、Thy-1 共陽性細胞，獲得快速增殖株 (Rapidly Expanding Clone: REC)，可排除源自供體之 MSC 的增殖性之差的純化分離方法 (日本專利第 6463029 號、WO2016/017795、Mabuchi Y. et al., Stem Cell Reports 1(2): 152-165, 2013)

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0007】

[專利文獻 1] 日本專利第 6487110 號

[專利文獻 2] 日本專利第 6463029 號

[專利文獻 3] 國際公開 2016/017795 號小冊子

[非專利文獻]

【0008】

[非專利文獻 1] Tsujimoto T et al., An acellular bioresorbable ultra-purified alginate gel promotes intervertebral disc repair: A preclinical proof-of-concept study, EBioMedicine 37(2018)521-534

[非專利文獻 2] Mabuchi Y et al., LNGFR+Thy-1+Vcam-1hi+cells reveal functionally distinct subpopulations in

mesenchymal stem cells.

Stem Cell Reports 1(2) : 152-165, 2013

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

【0009】如前述，至今，開發以海藻酸為基底之高純度硬化性凝膠，實施有對腰椎椎間盤突出病患於突出摘除術後埋入凝膠之探索性之醫師主導臨床試驗。然而，據說幾乎沒有自我修復能力及再生能力的髓核，在中老年期更加缺乏自我修復能力，對如此之病患以凝膠單獨治療有著明顯的極限。

因此，必須開發可修復、再生椎間盤組織之進一步的組成物。

[解決課題之手段]

【0010】本發明者，為了藉決上述課題進行研究的結果，發現含有低內毒素海藻酸之1價金屬鹽與間葉系幹細胞的組成物，可解決上述課題，終至完成本發明。又，本發明之其他態樣中，發現含有源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞的組成物，可解決上述課題。

即，本發明如下述。

[1] 一種椎間盤再生用組成物，其含有低內毒素海藻酸之1價金屬鹽與間葉系幹細胞。

[1-1] 一種椎間盤再生用組成物，其含有海藻酸之1

價金屬鹽與間葉系幹細胞。

[2] 如[1]或[1-1]中記載之組成物，其透過間葉系幹細胞所致之髓核細胞之活化及/或間葉系幹細胞之向髓核細胞之分化，促進椎間盤之髓核再生。

[3] 如[1]～[2]之任一項中記載之組成物，其中前述間葉系幹細胞為源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞。

[4] 如[3]中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之高速增殖性間葉系幹細胞株的細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

(a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為35%以下，

(b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

[4-1] 如[3]中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係以LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性為指標進行分離之高速增殖性間葉系幹細胞株的細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

(a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為35%以下，

(b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

[4-2] 如[3]中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係源自LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之細胞的高速增殖性間葉系幹細胞株之細胞集團，且為滿足以下(a)及

(b)之至少1個特徵之細胞集團：

- (a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為35%以下，
- (b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

[4-3] 如[3]中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之高速增殖性間葉系幹細胞株的細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

- (a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下，
- (b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

[4-4] 如[3]中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係以LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性為指標進行分離之高速增殖性間葉系幹細胞株的細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

- (a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下，
- (b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

[4-5] 如[3]中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係源自LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之細胞的高速增殖性間葉系幹細胞株之細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

- (a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下，
- (b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

[5] 如[1]～[4-5]之任一項中記載之組成物，其中施用於對象之椎間盤，該施用時具有流動性。

[5-1] 如[1]～[4]之任一項中記載之組成物，其中施用於對象之椎間盤髓核部位，以於施用後使交聯劑接觸組成物之表面的至少一部分之方式使用，對髓核部位施用時具有流動性。

[5-2] 如[1]～[4]之任一項中記載之組成物，其中施用於對象之椎間盤髓核部位，以於施用後將一部分硬化之方式使用，對髓核部位施用時具有流動性。

[6] 如[5]～[5-2]之任一項中記載之組成物，其中對前述髓核部位之施用，為對髓核缺損部之前述組成物的填充。

[7] 如[5-2]或[6]中記載之組成物，其中前述一部分之硬化，係以使交聯劑接觸組成物之表面的至少一部分來進行。

[8] 如[5-1]或[7]中記載之組成物，其中前述交聯劑為2價以上之金屬離子化合物。

[8-1] 如[1]～[8]之任一項中記載之組成物，其中前述海藻酸之1價金屬鹽，為低內毒素海藻酸1價金屬鹽。

[9] 如[1]～[8-1]之任一項中記載之組成物，其中前述低內毒素海藻酸之1價金屬鹽，藉由GPC-MALS法測定之重量平均分子量(絕對分子量)為8萬以上。

[10] 如[1]～[9]之任一項中記載之組成物，其中低內毒素海藻酸之1價金屬鹽的濃度為0.5w/w%～5.0w/w%。

[11] 如[1]～[10]之任一項中記載之組成物，其係使用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防或抑制復發。

[12] 如[11]中記載之組成物，其中前述椎間盤變性及/或椎間盤損傷，為選自由椎間盤突出、椎間盤疾病、脊椎退化性滑脫症、化膿性椎間盤炎、變形性脊椎疾病、脊椎狹窄症、腰部脊椎狹窄症、腰部脊椎狹窄症所伴隨之椎間盤突出及椎間盤損傷所成群組中之至少1種。

[12-1] 如[11]或[12]中記載之組成物，其中前述椎間盤變性及/或椎間盤損傷，伴隨慢性腰痛。

【0011】[13] 一種椎間盤再生用組成物，其係含有源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞之施用於對象之椎間盤髓核部位者。

[14] 如[13]中記載之組成物，其透過源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞所致之髓核細胞之活化及/或源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞之向髓核細胞之分化，促進椎間盤之髓核再生。

[15] 如[13]或[14]中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，於施用時為未分化狀態及/或無誘導分化之處置下來施用。

[16] 如[13]～[15]之任一項中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之高速增殖性間葉系幹細胞株的細胞集團，且為

滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團。

(a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為35%以下

(b)平均細胞尺寸為20 μ m以下

[16-1] 如[13]～[15]之任一項中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係以LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性為指標進行分離之高速增殖性間葉系幹細胞株的細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

(a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為35%以下，

(b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

[16-2] 如[13]～[15]之任一項中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係源自LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之細胞的高速增殖性間葉系幹細胞株之細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

(a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為35%以下，

(b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

[16-3] 如[13]～[15]之任一項中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之高速增殖性間葉系幹細胞株的細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

(a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下，

(b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

[16-4] 如[13]～[15]之任一項中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係以LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性為指標進行分離之高速增殖性間葉系幹細胞株的細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

(a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下，

(b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

[16-5] 如[13]～[15]之任一項中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係源自LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之細胞的高速增殖性間葉系幹細胞株之細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

(a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下，

(b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

[17] 如[13]～[16-5]之任一項中記載之組成物，其中前述組成物進而包含用以包埋細胞之載體。

[18] 如[17]中記載之組成物，其中前述載體為選自由海藻酸、玻尿酸、硫酸軟骨素、硫酸皮膚素、硫酸角質素、肝素、硫酸乙醯肝素，及硫酸半乳糖胺葡萄糖醛酸聚糖(galactosaminoglycuronglycan sulfate)，以及此等之藥學上可容許之鹽所成群組中。

[19] 如[17]中記載之組成物，其中前述載體為海藻

酸之1價金屬鹽。

[20] 如[13]～[19]之任一項中記載之組成物，其施用於對象之椎間盤髓核部位，以於施用後使交聯劑接觸組成物之表面的至少一部分之方式使用，對髓核部位施用時具有流動性。

[21] 如[13]～[19]之任一項中記載之組成物，其係施用於對象之椎間盤髓核部位，以於施用後將一部分硬化之方式使用，對髓核部位施用時具有流動性。

[22] 如[20]或[21]中記載之組成物，其係對前述髓核部位之施用，為對髓核缺損部之前述組成物的填充。

[23] 如[20]～[22]之任一項中記載之組成物，其中前述交聯劑為2價以上之金屬離子化合物。

[24] 如[19]～[23]之任一項中記載之組成物，其中前述海藻酸之1價金屬鹽，藉由GPC-MALS法測定之重量平均分子量(絕對分子量)為8萬以上。

[25] 如[19]～[24]之任一項中記載之組成物，其中前述海藻酸之1價金屬鹽的濃度為0.5w/w%～5.0w/w%。

[26] 如[19]～[25]之任一項中記載之組成，其中前述海藻酸之1價金屬鹽，為低內毒素海藻酸1價金屬鹽物。

[27] 如[13]～[26]之任一項中記載之組成物，其係使用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防或抑制復發。

[28] 如[27]中記載之組成物，其中前述椎間盤變性及/或椎間盤損傷，為選自由椎間盤突出、椎間盤疾病、

脊椎退化性滑脫症、化膿性椎間盤炎、變形性脊椎疾病、脊椎狹窄症、腰部脊椎狹窄症、腰部脊椎狹窄症所伴隨之椎間盤突出(混合性腰部脊椎狹窄症)及椎間盤損傷所成群組中之至少1種。

[28-1] 如[27]或[28]中記載之組成物，其中前述椎間盤變性及/或椎間盤損傷，伴隨著慢性腰痛。

[29] 如[1]～[28-1]之任一項中記載之組成物，其用於抑制椎間盤性疼痛。

[30] 如[29]中記載之組成物，其中前述椎間盤性疼痛為慢性腰痛。

【0012】[31] 一種用以以具有流動性之狀態施用於對象之椎間盤髓核部位的椎間盤再生用組成物，其包含海藻酸之1價金屬鹽與源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞。

[31-1] 如上述[31]中記載之椎間盤再生用組成物，其係用於在以具有流動性之狀態施用於對象之椎間盤髓核部位後，不需要使組成物硬化之處置的用途。

[31-2] 如上述[31]或[31-1]中記載之椎間盤再生用組成物，其係在以具有流動性之狀態施用於對象之椎間盤髓核部位後，不使交聯劑與該組成物接觸來使用。

[32] 如[31]～[31-2]之任一項中記載之組成物，其係透過源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞所致之髓核細胞之活化及/或源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞之向髓核細胞之分化，促進椎間盤之髓核再生。

[33] 如[31]～[32]之任一項中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，於施用時為未分化狀態及/或無誘導分化之處置下來施用。

[34] 如[31]～[33]之任一項中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之高速增殖性間葉系幹細胞株的細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

- (a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下，
- (b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

[34-1] 如[31]～[33]之任一項中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係以LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性為指標進行分離之高速增殖性間葉系幹細胞株的細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

- (a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下，
- (b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

[34-2] 如[31]～[33]之任一項中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係源自LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之細胞的高速增殖性間葉系幹細胞株之細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

- (a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下，

(b)平均細胞尺寸為 $20\mu\text{m}$ 以下。

[34-3] 如[34]～[34-2]之任一項中記載之組成物，其中前述變異係數為35%以下。

[35] 如[31]～[34]之任一項中記載之組成物，其中對前述髓核部位之施用，為對髓核缺損部之前述組成物的填充。

[36] 如[31]～[35]之任一項中記載之組成物，其中前述海藻酸之1價金屬鹽，藉由GPC-MALS法測定之重量平均分子量(絕對分子量)為8萬以上。

[37] 如[31]～[36]之任一項中記載之組成物，其中前述海藻酸之1價金屬鹽的濃度為 $0.5\text{w/w}\%$ ～ $5.0\text{w/w}\%$ 。

[38] 如[31]～[37]之任一項中記載之組成物，其中前述海藻酸之1價金屬鹽，為低內毒素海藻酸1價金屬鹽。

[39] 如[31]～[38]之任一項中記載之組成物，其係使用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防或抑制復發。

[40] 如[39]中記載之組成物，其中前述椎間盤變性及/或椎間盤損傷，為選自由椎間盤突出、椎間盤疾病、脊椎退化性滑脫症、化膿性椎間盤炎、慢性腰痛、變形性脊椎疾病、脊椎狹窄症、腰部脊椎狹窄症、腰部脊椎狹窄症所伴隨之椎間盤突出(混合性腰部脊椎狹窄症)及椎間盤損傷所成群組中之至少1種。

[41] 如[39]或[40]中記載之組，其中前述椎間盤變性及/或椎間盤損傷，伴隨著慢性腰痛成物。

[42] 如 [31]～[41]之任一項中記載之組成物，其用於抑制椎間盤性疼痛。

[43] 如 [42]中記載之組成物，其中前述椎間盤性疼痛為慢性腰痛。

【0013】[44] 一種用以以具有流動性之狀態施用於對象之髓核部位的組成物，其係包含海藻酸之1價金屬鹽與源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞之椎間盤性疼痛抑制用組成物。

[44-1] 如上述[44]中記載之椎間盤性疼痛抑制用組成物，其係用於在以具有流動性之狀態施用於對象之椎間盤髓核部位後，不需要使組成物硬化之處置的用途。

[44-2] 如上述[44]或[44-1]中記載之椎間盤性疼痛抑制用組成物，其係在以具有流動性之狀態施用於對象之椎間盤髓核部位後，不使交聯劑與該組成物接觸來使用。

[45] 如 [44]～[44-2]之任一項中記載之組成物，其中前述疼痛為伴隨著選自由椎間盤突出、椎間盤疾病、脊椎退化性滑脫症、化膿性椎間盤炎、變形性脊椎疾病、脊椎狹窄症、腰部脊椎狹窄症、腰部脊椎狹窄症所伴隨之椎間盤突出(混合性腰部脊椎狹窄症)及椎間盤損傷所成群組中之至少1種的疼痛。

[46] 如 [44]～[45]中記載之組成物，其中前述疼痛為慢性腰痛。

[47] 如 [44]～[46]之任一項中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，於施用時為未

分化狀態及/或無誘導分化之處置下來施用。

[48] 如[44]～[47]之任一項中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之高速增殖性間葉系幹細胞株的細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

- (a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下，
- (b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

[48-1] 如[44]～[47]之任一項中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係以LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性為指標進行分離之高速增殖性間葉系幹細胞株的細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

- (a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下，
- (b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

[48-2] 如[44]～[47]之任一項中記載之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係源自LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之細胞的高速增殖性間葉系幹細胞株之細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團、[44]～[47]之任一項中記載之組成物：

- (a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下，
- (b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

[48-3] 如[48]～[48-2]之任一項中記載之組成物，其中前述變異係數為35%以下。

[48-4] 如[44]～[48-3]之任一項中記載之組成，其中對前述髓核部位之施用，為對髓核缺損部之前述組成物的填充物。

[49] 如[44]～[48-4]之任一項中記載之組成物，其中前述海藻酸之1價金屬鹽，藉由GPC-MALS法測定之重量平均分子量(絕對分子量)為8萬以上。

[50] 如[44]～[49]之任一項中記載之組成物，其中前述海藻酸之1價金屬鹽的濃度為0.5w/w%～5.0w/w%。

[51] 如[44]～[50]之任一項中記載之組成物，其中前述海藻酸之1價金屬鹽，為低內毒素海藻酸1價金屬鹽。

[52] 如[31]～[51]之任一項中記載之組成物，其係在X射線透視下施用於對象之椎間盤髓核部位，對髓核部位施用時具有流動性，且不使交聯劑與該組成物接觸來使用。

[53] 如[52]中記載之組成物，其係在X射線透視下使用壓力計注射器施用於對象之椎間盤髓核部位，對髓核部位施用時具有流動性，且不使交聯劑與該組成物接觸來使用。

【0014】[54] 一種評估椎間盤之再生能力的方法，其係使用綿羊重度椎間盤變性模式，評估施用於該模式之椎間盤的組成物中之椎間盤之再生能力的方法，其包含對藉由以下(a1)或(a2)之步驟及(b1)或(b2)之步驟的方法而製

作之重度椎間盤變性模式的椎間盤，投予含有細胞之組成物的步驟，

(a1)自綿羊椎間盤去除相當於綿羊體重之0.00004%~0.00005%之量的髓核組織，製作變性椎間盤之步驟；

(a2)自綿羊椎間盤去除20mg之髓核組織，製作變性椎間盤之步驟；

(b1)於前述步驟(a1)或(a2)之4週後，進一步去除相當於綿羊體重之0.00014%~0.000175%之量的髓核組織之步驟；

(b2)於前述步驟(a1)或(a2)之4週後，進一步去除70mg之髓核組織的步驟。

[55] 如[54]中記載之方法，其中投予組成物之步驟，在步驟(b1)或(b2)之後進行。

[56] 如[54]或[55]中記載之方法，其中評估係在組成物投予後，對自變性模式採取之椎體及椎間盤，藉由選自由MRI、組織染色、免疫組織化學染色(IHC)所成群組中之至少1種評估方法來進行。

【0015】又，本發明包含以下之態樣。

[57] 一種用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防及/或抑制復發之方法，

其包含：將含有海藻酸之1價金屬鹽與間葉系幹細胞之組成物，施用於需要前述治療、預防或抑制復發之對象的椎間盤之髓核部位。

[58] 一種用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、

預防及/或抑制復發之方法，

其包含：將源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，施用於需要前述治療、預防或抑制復發之對象的椎間盤之髓核部位。

[59] 一種用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防及/或抑制復發之方法，

其包含：將包含源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞及海藻酸之1價金屬鹽之組成物，施用於需要前述治療、預防或抑制復發之對象的椎間盤之髓核部位，且前述組成物對該髓核部位施用時具有流動性。

[60] 一種用於椎間盤性疼痛之治療、預防及/或抑制復發之方法，

其包含：將包含源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞及海藻酸之1價金屬鹽之組成物，施用於需要前述治療、預防或抑制復發之對象的椎間盤之髓核部位，且前述組成物對該髓核部位施用時具有流動性。

[61] 一種使用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防或抑制復發之海藻酸之1價金屬鹽及間葉系幹細胞，其係將含有海藻酸之1價金屬鹽與間葉系幹細胞之組成物，施用於需要椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防或抑制復發之對象的椎間盤之髓核部位。

[62] 一種組成物，其含有海藻酸之1價金屬鹽與間葉系幹細胞，其係使用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防或抑制復發者。

[63] 一種源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，其係使用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防或抑制復發者。

[64] 一種包含源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞及海藻酸之1價金屬鹽的組成物，其係使用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防或抑制復發者，該組成物包含：施用於需要前述治療、預防或抑制復發之對象的椎間盤之髓核部位，且前述組成物對該髓核部位施用時具有流動性。

[65] 一種包含源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞及海藻酸之1價金屬鹽之組成物，其係使用於椎間盤性疼痛之治療、預防或抑制復發者，該組成物包含：施用於需要前述治療、預防或抑制復發之對象的椎間盤之髓核部位，且前述組成物對該髓核部位施用時具有流動性。

[發明效果]

【0016】依據本發明，提供一種可促進椎間盤之髓核的再生之髓核填補用組成物。若依據本發明之組成物，不僅是椎間盤髓核還可抑制包含纖維環之椎間盤組織全體的變性變化。又，本發明之組成物，具有使髓核中之第二型膠原蛋白陽性之透明軟骨樣細胞的比例增加之效果。然後，即使對中老年期之自我修復作用弱的症例，例如50歲以上之中老年期常見的混合性之腰部脊椎狹窄症(合併脊椎狹窄症與椎間盤突出)，亦可獲得再生促進效果。

又，本發明之一態樣中，考慮組成物投予時的簡便性、對身體侵襲的減低，不進行用來將用以包埋細胞之載體硬化之處置來使用，可抑制椎間盤性疾病所伴隨之疼痛，特別是腰痛，更佳為慢性腰痛。

【圖式簡單說明】

【0017】

[圖 1]顯示使用海藻酸鈉溶液(以下，有時稱為「UPAL」(低內毒素高純度海藻酸凝膠(Ultra-purified alginate gel))之7日共培養後之用以分離以羧基螢光素二乙酸酯琥珀醯亞胺酯(CFDA-SE)標記之源自骨髓之間葉系幹細胞(BMSC)及無標記髓核細胞(NPC)的細胞分選數據之圖。

(a)：共培養細胞之二維(2D)散點圖。P1圈門(Gate)配置於單一活細胞之周圍。

(b)：經分類之P2圈門中之無標記NPC及P3圈門中之CFDA-SE標記BMSC的2D散點圖。

FSC-A：前向散射區域；FSC-W：前向散射寬；SSC-A：側向散射區域；CFDA-SE-A：CFDA-SE-區域。

將各細胞之基因表現以持家基因GAPDH為基準，以對數標尺(y軸)作圖。數據為4隻不同兔子NPC系統之平均值。

(c)：HIF-1 α 、(d)：GLUT-1、(e)：Brachyury、(f)：CDMP-1、(g)：TGF- β 、(h)：IGF-1、(i)：第二型膠原蛋白

白，及(j)：聚集蛋白聚醣。

數據以平均值 $\pm$ 標準誤差表示，p值藉由使用Tukey-Kramer之事後檢定之單因子變異數分析求得。

[圖2]顯示源自骨髓之間葉系幹細胞(BMSC)在椎間盤(IVD)存活之圖。

以羧基螢光素二乙酸酯琥珀醯亞胺酯(CFDA-SE)標記之移植後之源自骨之間葉系幹細胞(BMSC)，在術後第4週及第12週之椎間盤(IVD)存活。將IVD之冷凍切片以4',6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)染色。圖像為4次重複試驗(完整對照(intact control)及BMSC+凝膠，n=4；4週及12週)之代表。比例尺=50 μ m。

[圖3]顯示與源自骨髓之間葉系幹細胞(BMSC)組合之凝膠保存椎間盤切除後之變性椎間盤(IVD)之水分含量之圖。

(a)：術後第4週與第12週之變性IVD之T2加權成像(T2WI)、正中矢狀面像。圖像為8次成像之代表圖像。

(b)：IVD變性之Pfarrmann分類。數據為平均值 $\pm$ 標準誤差(完整之對照、穿刺，椎間盤切除，凝膠，及BMSC+凝膠，n=8；4週及12週)。

(c)對NP之變性變化之磁共振造影(MRI)index(髓核(NP)面積 $\times$ 平均信號強度)。數值係以與完整之對照IVD比較之比例(%)表示。數據為平均值 $\pm$ 標準誤差，使用Tukey-Kramer檢定藉由伴隨事後解析之單因子變異數分析求得p值。

[圖 4]與源自骨髓之間葉系幹細胞(BMSC)組合之凝膠，顯示預防椎間盤切除後之椎間盤(IVD)變性的圖。

(a, b)：以蘇木精及曙紅(H&E)或番紅O染色之IVD的正中矢狀面切片圖像(8次實驗圖像之代表例)(完整對照(Intact control)、穿刺(Puncture)、椎間盤切除(Discectomy)、凝膠、BMSC+凝膠、n=8；4及12週)。

AF：纖維環、NP：髓核。比例尺=(A)：500 μ m(由上數之第1個及第3個區段)、50mm(由上數之第2個及第4個區段)，及(B)：500 μ m。

(c)：顯示第4週與第12週之組織學的變性度。

數據為平均值 $\pm$ 標準誤差，p值為藉由使用Tukey-Kramer之事後檢定之單因子變異數分析求得。

[圖 5]顯示兔子髓核(NP)中之第二型膠原蛋白陽性細胞的圖。

(a)：將兔子椎間盤(IVD)之正中矢狀面切片對第二型膠原蛋白進行染色。圖像為8次重複實驗結果(完整對照、穿刺、椎間盤切除、凝膠、BMSC+凝膠、n=8；4及12週)的代表圖像。箭頭表示對第二型膠原蛋白陽性之細胞。比例尺=500 μ m(由上數之第1個及第3個區段)及20 μ m(由上數之第2個及第4個區段)。

(b)：第二型膠原蛋白陽性細胞之比例。數據為平均值 $\pm$ 標準誤差，p值為藉由使用Tukey-Kramer之事後檢定之單因子變異數分析求得。

[圖 6]顯示兔子NP中之髓核(NP)標記陽性細胞的圖。

(a-c)：於第1、7、28日進行HIF-1 α 、GLUT-1、Brachyury染色之兔子椎間盤(IVD)的水平切片。圖像為4次重複實驗(完整對照、椎間盤切除，及BMSC+凝膠、n=4；day 1、7、28)之代表圖像。比例尺=50 μ m。

(d-f)：相對於全細胞之NP標記陽性細胞的比例。

(g-i)：相對於CFDA-SE陽性細胞(代表經移植之BMSC)之NP標記陽性細胞的比例。數據為平均 $\pm$ 標準誤差，p值使用配對t檢定來決定。

[圖7]顯示椎間盤(IVD)再生之機制的圖。

經移植之源自骨髓之間葉系幹細胞(BMSC)，產生導致現有之髓核細胞(NPC)活化的成長因子與細胞外基質(ECM)。現有之NPC活化，又使增殖因子及ECM的產生增加。經移植之BMSC分化成NPC。UPAL：超純化海藻酸鹽(亦稱為低內毒素高純度海藻酸鹽)。

[圖8]顯示REC株之全面解析結果的圖。

[圖9]顯示人類之健康椎間盤髓核細胞(NPC)及高純度間葉系細胞(REC)中之各種基因之表現量的圖。

[圖10]顯示移植後第4週之綿羊模式中之椎間盤之MRI之結果的圖。

[圖11]顯示移植後第4週之綿羊模式中之椎間盤之組織學檢查結果的圖。

[圖12]顯示移植後第4週之綿羊模式中之椎間盤之組織學檢查結果的圖。

[圖13]顯示3D共培養7日後之人類NPC及REC之表現譜

的圖。

(A) 顯示REC單離的概略圖。針對CD271(LNGFR)及CD90(THY-1)染色之人類骨髓細胞的流式細胞儀輪廓圖(profile)。將自1孔收集之細胞播種至35mm培養皿，使其增殖至14日，獲得具有高分化能力及增殖能力之均勻的細胞集團。

(B及C) 使用細胞分選數據，區別CFDA-SE標記REC與無標記NPC。

(B) P1圈門排除死細胞及殘屑活細胞。

(C) 顯示P2圈門中之無標記之NPC與P3圈門中之CFDA-SE標記REC的2D散點圖。

(D～K) 將各細胞之基因表現水平相對於持家基因GAPDH之表現水平進行標準化，以對數標尺(y軸)作圖。將自4個不同之人類NPC株所得之數據平均化。

(D)HIF-1 α ，(E)GLUT-1，(F)brachyury，(G)CDMP-1，(H)TGF- β ，(I)IGF-1，(J)第二型膠原蛋白，(K)聚集蛋白聚醣

數據以平均 $\pm$ SD值(n=4)表示。顯著差異係以藉由post hoc Tukey-Kramer檢定之單因子變異數分析來評估。

NPC：髓核細胞

REC：急速增殖之細胞株

CFDA-SE：5,6-羧基螢光素二乙酸酯琥珀醯亞胺酯

ANOVA：變異數分析

FSC-A：前向散射面積

FSC-W：前向散射寬

SSC-A：側向散射面積

CFDA-SE-A：CFDA-SE面積

[圖 14]表示2種凝膠之彈性比。

(A) 以 CaCl_2 誘導之凝膠化(直徑，4.5mm；厚度，2mm)後之圓盤狀UPAL及REC+UPAL凝膠之形成。

(B及C) 拉伸壓縮機械試驗裝置。將樣本以0.5mm/分鐘之一定速度進行壓縮。

(D) 應力應變曲線。楊氏模數係依循壓縮值10~20%之間之切線的斜率來計算。進行4次重複試驗，顯示代表的圖像。

(E) 2種凝膠之楊氏模數。數據顯示平均 $\pm$ SD值(n=4)。顯著差異係Welch之檢定後，藉由Student's t-test來評估。

N.S：無顯著差異

UPAL：超純化海藻酸鹽(亦稱為低內毒素高純度海藻酸鹽)

REC：迅速增殖之細胞株

SD：標準偏差

[圖 15]顯示各組之實驗排程表及治療之詳細的圖。

(A及B)於最初之手術自處置IVD去除20mg之新鮮NP組織，建立重度之變性IVD模式。

(C)最初之手術4週後，進而自變性IVD去除70mg之變性NP組織。

(D)去除變性NP後，將UPAL或REC+UPAL溶液移植至椎間盤內之空隙。

NP：髓核

UPAL：超純化海藻酸(亦稱為低內毒素高純度海藻酸)

IVD：椎間盤

[圖 16]顯示埋植後第4週及第24週之經治療之IVD之MRI評估的圖。

(A)綿羊中之術後第4週及第24週之IVD之T2加權成像、正中矢狀面圖像。圖像為6或8次重複結果之代表。

(B)Pfarrmann等級之IVD變性。

(C)相對於NP之變性變化的MRI指數(NP面積×平均信號強度)值。數值以相對於無處置之對照IVD之值的比例(%)表示。

(D)用於IVD治療之椎間盤高度指數。數值係以相對於無處置之對照IVD之數值的比例(%)表示。數據以平均±SD值表示(無處置對照，n=6；椎間盤切除，n=6；凝膠，n=8；REC+凝膠，n=8)。顯著差異係藉由以使用Tukey-Kramer檢定之post hoc解析之一元配置ANOVA來評估。

NP：髓核

MRI：磁振圖像法

IVD：椎間盤

ANOVA：變異數分析

SD：標準偏差

[圖 17]顯示埋植 4 週後及 24 週後之經治療之 IVD 之進行組織學評估之結果的圖。

(A 及 B)藉由 H&E 或 番紅 -O 染色經染色之處理 IVD 的代表性正中矢狀切片 (無處置對照, $n=6$; 椎間盤切除術, $n=6$; 凝膠, $n=8$; REC+凝膠, $n=8$)。比例尺 (A); $50\mu\text{m}$ (由上數之第 2 個及第 4 個部分) 或 1mm (由上數之第 1 個及第 3 個部分) (B); 1mm 。

(C)組織學分級係透過修改的 Boos 分類來決定。數據以平均值 $\pm$ 標準偏差表示。顯著差異係以藉由 post hoc Tukey-Kramer 檢定之單因子變異數分析來評估。

IVD：椎間盤

H&E：蘇木精 & 曙紅

SD：標準偏差

AF：纖維環

NP：髓核

[圖 18]顯示埋植 4 週後及 24 週後之處置 IVD 中之第二型或第一型膠原蛋白陽性細胞的圖。

(A 及 B)針對第二型膠原蛋白或第一型膠原蛋白染色之處置 IVD 之代表性正中矢狀切片 (無處置對照, $n=6$; 椎間盤切除術, $n=6$; 凝膠, $n=8$; REC+凝膠, $n=8$)。比例尺, 1mm (第 1 及第 3 之線) 或 $50\mu\text{m}$ (第 2 及第 4 之線)。

(C 及 D)經處置之 IVD 中之相對於總細胞之第二型或第一型膠原蛋白陽性細胞的比例。數據以平均值 $\pm$ 標準偏差表示。顯著差異係以藉由 post hoc Tukey-Kramer 檢定之單

因子變異數分析來評估。

IVD：椎間盤

REC：急速增殖株

SD：標準偏差

ANOVA：變異數分析

[圖 19]顯示NP組織去除後第4週之組織學評估的圖。

(A)自 IVD 去除之 NP 組織(無處置對照，或去除 20、50、100、200 mg)之中矢狀部(以 H&E 或番紅-O 染色)。綿羊模式中，於 4 週後因去除 20mg 以上之 NP 組織而產生 IVD 變性。比例尺：1mm(全部)。

(B)組織學分級係透過修改的 Boos 分類來決定。數據為平均值±標準偏差。

NP：髓核

IVD：椎間盤

H&E：蘇木精及曙紅

SD：標準偏差

[圖 20]顯示使用 T2 加權成像中間矢狀圖像之相對於鄰接椎骨之椎間盤高度之椎間盤高度之測定結果的圖。

BC 與 EF 分別為前方及後方椎間盤高，AB 與 DE 為頭側之鄰接椎體高。以椎間盤高度 (BC+EF) 與椎體高度 (AB+DE) 之比來計算 DHI 值，以處置 IVD 之 DHI 相對於無處置對照 IVD 之 DHI 的比來計算相對 DHI 值。

DHI：椎間盤高度指數

IVD：椎間盤

【實施方式】

1.概要

【0018】本發明係關於含有海藻酸之1價金屬鹽與間葉系幹細胞(例如源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞)之椎間盤再生用組成物。本發明之一態樣中，本發明係關於含有低內毒素海藻酸之1價金屬鹽與間葉系幹細胞(例如源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞)之椎間盤再生用組成物。本發明之組成物透過間葉系幹細胞所致之髓核細胞之活化及/或間葉系幹細胞之向髓核細胞之分化，促進椎間盤之髓核再生。本發明之組成物，係施用於對象之髓核部位，於施用後以將一部分硬化之方式使用。在數個本發明之態樣中，本發明之組成物施用於對象之髓核部位，以使交聯劑與表面之至少一部分接觸的方式使用。

【0019】本發明中，以使用源自兔子之間葉系幹細胞的in vivo試驗實証藉由源自骨髓之間葉系幹細胞(BMSCs)與凝膠之併用，較凝膠單獨更顯著地促進組織修復效果，而作為其機制，明白藉由凝膠包埋之BMSCs與髓核細胞之共培養，1)成長因子產生所致之兩細胞的相互活化、2)BMSCs之向髓核細胞之分化、3)自兩細胞之細胞外基質產生能力的提升。

【0020】本發明之組成物所含之海藻酸，為自腔昆布(Ecklonia cava)、荒布(Eisenia bicyclis)、昆布等之褐藻類萃取之多醣類，具有加入鈣等之2價金屬離子則交聯硬化

的性質。利用此性質，藉由使其於患部與金屬離子接觸，使其表面硬化，可留在患部。本發明中，發現將包含低內毒素海藻酸鈉之組成物以溶膠狀態注入椎間盤髓核部位，於注入口接觸交聯劑使組成物之一部分硬化，則抑制髓核之變性，使對髓核再生較佳的第二型膠原蛋白陽性細胞之比例增加，促進椎間盤髓核的再生。

【0021】本發明中，藉由將間葉系幹細胞以海藻酸(例如低內毒素海藻酸)之1價金屬鹽包埋，經埋植之間葉系幹細胞留在患部發揮長期的效果。即，經埋植之高純度間葉系幹細胞產生成長因子或細胞外基質，活化髓核細胞。然後，經活化之髓核細胞產生成長因子或細胞外基質。其結果，經埋植之間葉系幹細胞分化成髓核細胞，透過髓核細胞與間葉系幹細胞之相互作用促進障礙部的再生。本發明之其他態樣中，可將細胞包埋於玻尿酸等之生物相容性材料。

【0022】又，本發明之組成物所含之間葉系幹細胞中，其一態樣之源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞(REC)，為藉由以2種抗體與細胞分選儀自骨髓直接分離的技術來製作的超高純度人類間葉系幹細胞。由於藉由使用細胞分選儀之分離可獲得均勻的細胞集團故品質管理為容易，且由於增殖性極高故藉由大量培養之製劑化為可能。

【0023】本發明亦係關於含有源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞之椎間盤再生用組成物。本發明之一態樣中，本發明之組成物，未分化狀態下及/或無分化誘導之

處置下施用於椎間盤髓核。本發明之組成物，透過源自人類骨髓之高純度透過間葉系幹細胞所致之髓核細胞之活化及/或間葉系幹細胞之向髓核細胞之分化，促進椎間盤之髓核再生。本發明之組成物，可施用於對象之髓核部位，以使交聯劑接觸表面之至少一部分之方式使用。本發明之一態樣中，本發明之組成物，可施用於對象之髓核部位，以於施用後使一部分硬化之方式使用。

【0024】

2.定義

「低內毒素」、「海藻酸之1價金屬鹽」記述於後。

「椎間盤」為連接於脊椎之位於椎骨與椎骨之間的圓柱狀之組織。椎間盤為圓板狀之無血管組織，其具有以髓核為中心而周圍被纖維環圍繞，進而上下配置有終板之結構。

「髓核」為存在於椎間盤中心的凝膠狀組織，主要含有髓核細胞、主要以蛋白多醣與第二型膠原蛋白構成之細胞外基質，及水。認為髓核中自我修復能力、再生能力為顯著低。

【0025】所謂「髓核填補」，係指填補因年老、外傷、感染及對於該等之外科手術(例如，椎間盤髓核摘除(切除)術)等而變性、縮小或去除之髓核的變性部分、縮小部分，或去除部分。此外，本說明書中「髓核填充」之用語，以與「髓核填補」相同意思來使用，本發明之「髓核填補用組成物」與「髓核填充用組成物」為同義。

所謂「髓核部位」，係指髓核存在的部位、產生髓核之變性或縮小的部位，或因去除髓核之至少一部分而形成之髓核的缺損部，亦包含髓核存在的部位之周邊部。

【0026】「對象」為人類，或人類以外之生物，例如，鳥及非人類哺乳動物(例如，牛、猴、貓、小鼠、大鼠、天竺鼠、倉鼠、豬、狗、兔子、綿羊及馬)。

所謂「施用」，意指以對於埋入椎間盤之髓核部位之變性部分、縮小部分、除去部分、缺損部等為充分的量將本發明之組成物填充於髓核部位的意思。

所謂「包埋」，係指將細胞懸濁或混合於生物相容性材料，較佳為海藻酸之1價金屬鹽的溶液。

所謂「將一部分硬化」，係如後述。

【0027】所謂「含有低內毒素海藻酸之1價金屬鹽」，意指經施用本發明之組成物之髓核部位中，含有對於髓核再生為充分的量之低內毒素海藻酸之1價金屬鹽的意思。

所謂「具有流動性」，係如後述。

所謂「椎間盤變性及/或椎間盤損傷」、「治療、預防或抑制復發」，係如後述。

所謂「椎間盤性疼痛」，意指起因於椎間盤而產生之疼痛的意思。

所謂「腰痛」，為產生於椎間盤之周圍之疼痛，包含背部痛、臀部痛。

所謂「慢性腰痛」，意指自腰痛發病12週以上連續腰

痛的意思。

【0028】本發明之組成物，可使用溶劑以溶液狀態提供，亦可以冷凍乾燥物(特別是冷凍乾燥粉體)等之乾燥狀態提供。作為乾燥狀態提供時，本發明之組成物，於施用時使用溶劑，以溶液狀等之具有流動性的狀態來使用。溶劑雖只要是可施用於活體之溶劑便無特別限定，但可舉例例如注射用水、純化水、蒸餾水、離子交換水(或去離子水)、Milli-Q水、生理食鹽水、磷酸緩衝生理食鹽水(PBS)等。較佳為可使用於人類及動物之治療的注射用水、蒸餾水、生理食鹽水等。

【0029】

3.海藻酸之1價金屬鹽

本發明中，作為載體使用之「海藻酸之1價金屬鹽」，為藉由將海藻酸之6位的羧酸之氫原子，與 Na^+ 或 K^+ 等之1價金屬離子進行離子交換而製作之溶性之鹽。作為海藻酸之1價金屬鹽，具體而言，雖可舉例海藻酸鈉、海藻酸鉀等，但特別以藉由市售品可取得之海藻酸鈉較佳。海藻酸之1價金屬鹽的溶液，與交聯劑混合時形成凝膠。

【0030】使用於本發明之「海藻酸」，為生物分解性之高分子多醣類，為名為D-甘露糖醛酸(D-mannuronic acid)(M)與L-古洛糖醛酸(L-guluronic acid)(G)之2種尿羧基酸聚合成直鏈狀之聚合物。更具體而言，為D-甘露糖醛酸之均聚物部分(MM部分)、L-古洛糖醛酸之均聚物部分(GG部分)，及D-甘露糖醛酸與L-古洛糖醛酸無規排列之部分

(MG部分)經任意鍵結而成之嵌段共聚物。海藻酸之D-甘露糖醛酸與L-古洛糖醛酸之構成比(M/G比)，主要依據海藻等之來源生物的種類而不同，又，受到該生物之生育場所或季節所致之影響，遍及M/G比為約0.4之高G型至M/G比為約5之高M型的高範圍。

【0031】海藻酸之1價金屬鹽為高分子多醣類，雖正確確定分子量為困難，但分子量若太低則黏度變低，對施用部位的周邊組織之密著性有變弱之虞，又，分子量過高者製造為困難，且產生溶解性降低、做成溶液狀時黏度過高而操作變差、長期間保存下難以維持物性等之問題，一般而言重量平均分子量計為1萬～1000萬，較佳為2萬～800萬，更佳為5萬～500萬之範圍。本說明書中，使用「～」表示之數值範圍，表示包含「～」前後記載之數值分別作為最小值及最大值的範圍。

【0032】另一方面，已知源自天然物之高分子物質的分子量測定中，依據測定方法而值可能產生差異。例如，藉由凝膠滲透色層分析(GPC)或凝膠過濾色層分析(此等亦合稱粒徑排阻層析法)所測定之重量平均分子量，依據本發明之實施例所示之效果，較佳為10萬以上，更佳為50萬以上，又較佳為500萬以下，更佳為300萬以下。其較佳的範圍為10萬～500萬，更佳為50萬～350萬。

【0033】又，例如，依據組合凝膠滲透色層分析(GPC)與多角度光散射檢測器(Multi Angle Light Scattering：MALS)之GPC-MALS法，可測定絕對重量平均

分子量。藉由 GPC-MALS 法所測定之重量平均分子量(絕對分子量)，依據本發明之實施例所示之效果，較佳為 1 萬以上，更佳為 8 萬以上，進而佳為 9 萬以上，又較佳為 100 萬以下，更佳為 80 萬以下，進而佳為 70 萬以下，特佳為 50 萬以下。其較佳的範圍為 1 萬～100 萬，更佳為 8 萬～80 萬，再更佳為 9 萬～70 萬，特佳為 9 萬～50 萬。

【0034】通常，以如上述之手法算出高分子多醣類之分子量時，可能產生 10～20% 以上之測定誤差。例如，若為 40 萬則可能在 32～48 萬，若為 50 萬則可能在 40～60 萬，若為 100 萬則可能在 80～120 萬左右的範圍產生值之變動。

【0035】海藻酸之 1 價金屬鹽之分子量之測定，可依循常規方法進行測定。

於分子量測定使用凝膠滲透色層分析時之代表條件，如本說明書之實施例所記載。管柱可使用例如 GMPW-XL×2+G2500PW-XL(7.8mm I.D.×300mm)，溶析液可定為例如 200mM 硝酸鈉水溶液，作為分子量標準可使用聚三葡萄糖。

【0036】於分子量測定使用 GPC-MALS 時之代表條件，如本說明書之實施例所記載。作為檢測器，可使用例如 RI 檢測器與光散射檢測器(MALS)。

【0037】海藻酸之 1 價金屬鹽，雖然在自褐藻類萃取最初，分子量大、黏度高，但以藉由熱之乾燥、純化等之過程，分子量變小、黏度變低。藉由製造步驟之溫度等之條件管理、作為原料之褐藻類的選擇、製造步驟中之分子

量之劃分等之手法可製造分子量不同之海藻酸之1價的金屬鹽。進而，亦可藉由與具有不同分子量或黏度之另一批次的海藻酸之1價金屬鹽混合，做成具有目標分子量之海藻酸之1價金屬鹽。

【0038】本發明中使用之海藻酸之1價金屬鹽，較佳為將海藻酸之1價金屬鹽溶解於MilliQ水做成1w/w%濃度之溶液，使用錐板型黏度計，在20℃之條件下進行黏度測定時之表觀黏度，以40mPa·s~800mPa·s較佳，更佳為50mPa·s~600mPa·s為宜。表觀黏度之測定條件，依循後述之條件為宜。此外，本說明書中有時將「表觀黏度」簡稱為「黏度」。

【0039】本發明中使用之海藻酸，雖可為源自天然亦可為合成物，但以源自天然者較佳。作為源自天然之海藻酸，可舉例例如自褐藻類萃取者。含有海藻酸之褐藻類雖在世界中沿岸區域繁茂，但實際上作為海藻酸原料可使用之海藻有限，以南美之巨藻、北美之大海帶、歐州之昆布或囊葉藻、澳洲之叢梗藻等為代表者。作為海藻酸之原料的褐藻類，可舉例例如巨藻(Lessonia)屬、大海帶(Macrocytis)屬、昆布(Laminaria)屬(海帶屬)、囊葉藻(Ascophyllum)屬、叢梗藻(Durvillea)屬、荒布(Eisenia)屬、腔昆布(Ecklonia)屬等。

【0040】本發明之其他態樣中，作為用以包埋細胞之載體，亦可使用其他生物相容性材料。例如，可使用包含其藥學上可容許之鹽(生理鹽)之玻尿酸(HA)、硫酸軟骨

素、硫酸皮膚素、角蛋白硫酸、肝素、硫酸乙醯肝素、硫酸半乳糖胺葡萄糖醛酸聚糖(galactosaminoglycuronglycan)(GGGS)等之1種或複數種之天然或合成醣胺聚醣(GAG)或黏多醣類作為用以包埋細胞之載體。本發明之其他態樣中，作為用以包埋細胞之載體雖無特別限定，但可使用由纖維素、纖維素衍生物、瓊脂糖凝膠、幾丁質、幾丁聚醣、澱粉、果膠等之多醣類，明膠、膠原蛋白、多肽等之蛋白質、胺基酸衍生物及此等之共聚物以及此等之衍生物中所選擇者，可使用任一種或複數種。本發明之其他態樣中，作為載體亦可使用膠原蛋白或明膠樣組成物之水凝膠。

【0041】

4.低內毒素處理

本發明所使用之海藻酸之1價金屬鹽無特別限定，例如為低內毒素之海藻酸之1價金屬鹽。本發明之一態樣中，用以包埋細胞之載體，以低內毒素較佳。即，本發明所使用之海藻酸之1價金屬鹽，以低內毒素之海藻酸之1價金屬鹽較佳。所謂低內毒素，係指內毒素水平低至實質上不引起炎症或發燒之程度。更佳為經低內毒素處理之海藻酸之1價金屬鹽為宜。

【0042】低內毒素處理，可依據公知的方法或以其為基準之方法來進行。例如，可藉由純化玻尿酸鈉之菅等人的方法(例如，參照日本特開平9-324001號公報等)、純化 β 1,3-葡聚醣之吉田等人的方法(例如，參照日本特開平8-

269102號公報等)、純化藻酸鹽、結蘭膠等之生物高分子鹽之威廉等人的方法(例如,參照日本特表2002-530440號公報等)、純化多醣之詹姆斯等人的方法(例如,參照國際公開第93/13136號小冊子等)、路易斯等人的方法(例如,參照美國專利第5589591號說明書等)、純化藻酸鹽之赫耳曼法蘭克等人的方法(例如,參照Appl Microbiol Biotechnol(1994)40:638-643等)等或基於此等之方法來實施。本發明之低內毒素處理不限於此等,可藉由洗淨、利用過濾器(內毒素去除過濾器或帶電之過濾器等)之過濾、超過濾、使用管柱(利用內毒素吸附親合性管柱、凝膠過濾管柱、離子交換樹脂之管柱等)之純化、疏水性物質、樹脂或活性碳等上之吸附、有機溶劑處理(利用有機溶劑之萃取、利用添加有機溶劑之析出、沉降等)、界面活性劑處理(例如,參照日本特開2005-036036號公報等)等公知的方法,或是適當組合此等來實施。此等處理之步驟中,亦可適當組合離心分離等公知的方法。配合海藻酸之種類等適當地選擇為宜。

【0043】內毒素水平可藉由公知的方法進行確認,例如,可藉由利用鰲試劑(LAL)之方法、使用Endospecy(註冊商標)ES-24S套組(生化學工業股份有限公司)之方法等來測定。

【0044】本發明之組成物中含有之海藻酸之1價金屬鹽的內毒素之處理方法雖無特別限定,但利用鰲試劑(LAL)測定海藻酸之1價金屬鹽之內毒素含量時,其結果以

500內毒素單位(EU)/g以下較佳，進而佳為100EU/g以下，特佳為50EU/g以下，特別是30EU/g以下。經低內毒素處理之海藻酸鈉，可藉由例如Sea Matrix(註冊商標)(持田製藥股份有限公司)、PRONOVA™UP LVG(FMC BioPolymer)等市售品取得。

如此之經低內毒素處理之海藻酸鈉，於本說明書中亦稱為「高純度海藻酸鈉」(UPAL)。

【0045】

5.海藻酸之1價金屬鹽之溶液的調製

本發明之組成物，亦可使用海藻酸之1價金屬鹽之溶液來調製。海藻酸之1價金屬鹽之溶液，可藉由公知的方法或以其為基準的方法來調製。即，本發明中使用之海藻酸之1價金屬鹽，可使用前述之褐藻類，藉由酸法、鈣法等公知的方法來製造。具體而言，例如，自此等之褐藻類，使用碳酸鈉水溶液等之鹼水溶液進行萃取後，添加酸(例如鹽酸、硫酸等)，藉此可獲得海藻酸，藉由海藻酸之離子交換可獲得海藻酸之鹽。如前述，進行低內毒素處理。海藻酸之1價金屬鹽的溶劑，雖只要是可施用於活體之溶劑便無特別限定，但可舉例例如純化水、蒸餾水、離子交換水、Milli-Q水、生理食鹽水、磷酸緩衝生理食鹽水(PBS)等。此等以經菌者較佳，經低內毒素處理者較佳。例如，可將Milli-Q水過濾滅菌來使用。

【0046】本發明之組成物以冷凍乾燥物等之乾燥狀態提供時，可使用上述溶劑調製成有流動性之溶液。

又，用以獲得本發明之組成物之操作全部在內毒素水平及細菌水平低的環境下進行為宜。例如，操作於潔淨工作台，使用滅菌器具進行較佳，亦可以市售之內毒素去除劑處理使用之器具。

【0047】

6.本發明之組成物之表觀黏度

本發明之數個態樣的組成物為有流動性之液體狀，即溶液狀。本發明之組成物對髓核部位施用時具有流動性。本發明之態樣之一中，較佳為本發明之組成物，具有將組成物於20℃靜置1小時後能以21G之注射針注入的流動性。此態樣之本發明之組成物的表觀黏度，雖只要可獲得本發明效果便無特別限定，但黏度過低則有對施用之部位的周邊組織之密著性變弱之虞，故較佳為10mPa·s以上，更佳為100mPa·s以上，進而佳為200mPa·s以上，特佳為500mPa·s以上。表觀黏度若過高則有操作性變差之虞，故較佳為50000mPa·s以下，更佳為20000mPa·s以下，進而佳為10000mPa·s以下。表觀黏度為20000mPa·s以下時以注射器等之施用可較容易進行。然而，即使表觀黏度為20000mPa·s以上亦能使用加壓型或電動型之填充器具或其他手段來施用。本發明之組成物之較佳的範圍為10mPa·s~50000mPa·s，更佳為100mPa·s~30000mPa·s，進而佳為200mPa·s~20000mPa·s，又進而佳為500mPa·s~20000mPa·s，特佳為700mPa·s~20000mPa·s。其他較佳態樣中，可為500mPa·s~10000mPa·s或是

2000mPa · s ~ 10000mPa · s。本發明之數個態樣的組成物，為亦能以注射器等施用於對象之黏度。

【0048】海藻酸類之水溶液等含有海藻酸之1價金屬鹽之組成物的表觀黏度之測定，可依循常規方法進行測定。例如，可使用旋轉黏度計法之共軸雙重圓筒形旋轉黏度計、單一圓筒形旋轉黏度計(布氏黏度計)、圓錐-平板形旋轉黏度計(錐板型黏度計)等來測定。較佳為依循日本藥典(第16版)之黏度測定法為宜。本發明中黏度測定在20℃之條件下進行為宜。如後述本發明之組成物含有細胞等不溶於溶劑者時，為了正確地進行黏度測定，組成物的表觀黏度設為不含有細胞等之狀態的表觀黏度較佳。

【0049】本發明中，含有海藻酸之1價金屬鹽之組成物的表觀黏度之測定，特別是以使用錐板型黏度計測定較宜。例如，以如下述之測定條件測定為宜。試料溶液之調製，使用MilliQ水進行。測定溫度定為20℃。錐板型黏度計之旋轉數，在海藻酸1價金屬鹽之1%溶液測定時定為1rpm，2%溶液測定時定為0.5rpm，以此為標準來決定。讀取時間，在海藻酸1價金屬鹽之1%溶液測定時測定2分鐘，定為開始1分鐘至2分鐘之平均值。2%溶液測定時測定2.5分鐘，定為開始0.5分鐘至2.5分鐘之平均值。試驗值定為3次測定之平均值。

【0050】本發明之組成物的表觀黏度，例如，可藉由控制海藻酸之1價金屬鹽之濃度、分子量或M/G比等來調整。

海藻酸之1價金屬鹽之溶液的表觀黏度，溶液中之海藻酸1價金屬鹽濃度高時黏度變高，濃度低時黏度變低。又，海藻酸1價金屬鹽之分子量大時黏度變高，分子量小時黏度變低。

【0051】海藻酸之1價金屬鹽之溶液的表觀黏度，由於受到M/G比影響，故例如可依據溶液之黏度等適當地選擇具有較佳M/G比之海藻酸。本發明中使用之海藻酸的M/G比為約0.1～5.0，較佳為約0.1～4.0，更佳為約0.2～3.5。

如前述，M/G比主要依據海藻之種類而決定，因此作為原料使用之褐藻類的種類對海藻酸之1價金屬鹽之溶液的黏度造成影響。作為本發明中使用之海藻酸，較佳為源自巨藻屬、大海帶屬、昆布屬、囊葉藻屬、叢梗藻屬之褐藻，更佳為源自巨藻屬之褐藻，特佳為源自淡黑巨藻(*Lessonia nigrescens*)。

【0052】

7.間葉系幹細胞

本發明中使用之間葉系幹細胞，為源自中胚葉性組織(間葉)之體性幹細胞，期待於骨或血管、心肌之再構築等之再生醫療的應用。

間葉系幹細胞，可自骨髓、脂肪組織、胎盤組織、齒髓或臍帶組織等之各種組織取得。其純化流程，例如如下述。

將自人類或非人類哺乳動物(例如，牛、猴、貓、小

鼠、大鼠、天竺鼠、倉鼠、豬、狗、兔子、綿羊，及馬山羊、兔子等)採取之少量的脂肪片進行酵素處理獲得細胞型的混合集團，藉由離心分離自該混合集團分離游離性之脂肪細胞集團，藉由繼代培養使在接觸裝滿培養液之培養器的頂面之狀態下靜置時沉降至底面進行增殖的纖維母細胞樣細胞增殖。

又，本發明中，亦可使用源自iPS細胞之間葉系幹細胞，或市售之間葉系幹細胞。本發明中，間葉系幹細胞，較佳為未分化狀態及/或無誘導分化之處置下施用於髓核。所謂未分化狀態，係指具有分化能力之幹細胞維持未分化之狀態。所謂「無分化誘導之處置下」，係指未進行例如使用分化誘導培養基使具有分化能力之幹細胞分化成特定之細胞等之處置。

【0053】

8.源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞

(1)REC株

本發明者，依據以前之研究，自LNGFR(CD271)為陽性之間葉系幹細胞(CD271+細胞)，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之間葉系幹細胞(CD271+CD90+細胞)之中，成功地單離出增殖快速的高速增殖性之細胞株(Rapidly Expanding Clone：REC)。

【0054】此REC，為於96孔盤將細胞1個個播種進行培養時，2週達到細胞匯合之細胞，與以往方法所得之間葉系幹細胞相比較，具有增殖能力、分化能力及移行

(migration)能力全部為1000倍以上之能力。然後，特別是保持移行能力，故可經靜脈內投予，可期待於骨、軟骨形成不全症等之嚴重的全身性疾病之應用。

本發明中，可使用上述REC株之中，分化能力或增殖能力偏差少的細胞株。

【0055】包含本發明之細胞株的細胞集團，LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性，且為增殖快速之間葉系幹細胞株的集團，滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵。

(a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下。

(b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

【0056】

(2)人類間葉系幹細胞濃縮方法

本發明中，為獲得LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之間葉系幹細胞，可依循例如WO2009/31678號中記載之方法。

該方法之概要如下述。

【0057】首先，自包含人類間葉系幹細胞之細胞集團，藉由分選LNGFR(CD271)為陽性(CD271+)，或CD271及CD90為共陽性(CD271+CD90+)之細胞劃分，高度地濃縮間葉系幹細胞。此外，包含人類間葉系幹細胞之細胞集團中包含血球系細胞時，為了分選非血球系之細胞，亦可加上分選CD45及CD235a為共陰性(CD45-CD235a-)之細胞的步驟。

【0058】包含間葉系幹細胞之細胞集團，可藉由流式細胞儀或親和層析來調製。

用以獲得此細胞集團之材料雖無特別限定，但可舉例例如骨髓、脂肪組織、臍帶血、末梢血(包含G-CSF投予後之末梢血)等。此外，骨髓可使用脊椎、胸骨、腸骨等之骨髓。又，作為細胞，亦可舉例ES細胞及iPS細胞。

【0059】細胞調製時，成為材料捲入間葉系幹細胞之細胞塊時，依需要，可對材料進行利用吸移等之物理性處理，或利用胰蛋白酶、膠原酶等之酵素處理。又，材料中混入紅血球時，預先將紅血球進行溶血較佳。

使用如上述調製之細胞集團，分選CD271+細胞或CD271+CD90+細胞。

【0060】作為分選CD271+細胞或CD271+CD90+細胞之方法，可舉例例如使用抗體之方法。

抗體為可分選CD271+細胞或CD271+CD90+細胞之抗CD271抗體及/或抗CD90抗體。於分選使用流式細胞儀時，藉由適當組合FITC、PE、APC等之不同螢光色素所標記之抗CD271抗體，或抗CD271抗體與抗CD90抗體來使用，能以短時間分選活細胞。又，流式細胞儀以外，亦能藉由使用磁氣珠之方法或使用親合層析之方法，分選CD271+CD90+細胞。

此外，使用此等之方法前，亦可預先使將死細胞染色之螢光色素(例如，PI)與細胞集團反應，去除經螢光染色之細胞，藉此去除死細胞。

【 0061】**(3)REC細胞濃縮**

接著，將經分選之 LNGFR 陽性細胞，或 LNGFR 及 Thy1 共陽性細胞進行單一細胞(株)培養，選擇增殖快速的批次，藉此獲得增殖能力、分化能力、移行能力優異之高純度人類間葉系幹細胞(REC：Rapidly Expanding Clone)。

【 0062】由人類骨髓或脂肪、胎盤絨毛膜調製單核細胞，將骨髓單核細胞以抗 LNGFR 單獨，或抗 LNGFR 及抗 Thy1 染色。接著，使用流式細胞儀(細胞分選儀)，將 LNGFR 陽性細胞，或 LNGFR 陽性及 Thy1 陽性細胞植株分選於 96 孔培養盤中。即，每 1 孔播種 1 個細胞。單一細胞培養 2 週後將培養盤於顯微鏡下攝影，分選出達到細胞匯合或半細胞匯合之孔，將該孔所含之細胞定為 REC。

【 0063】此處，所謂「增殖快速」、「高速增殖性」，意指於 96 孔培養盤之每 1 孔播種 1 個細胞進行培養時，具有培養開始 2 週後或在那之前培養盤達到細胞匯合或半細胞匯合程度之增殖速度(倍增時間(doubling time)為 26 ± 1 小時)。

【 0064】所謂細胞匯合，為培養細胞覆蓋培養容器表面(培養面)之 90% 以上的狀態。又，所謂半細胞匯合，為培養細胞覆蓋培養容器表面(培養面)之 70~90% 的狀態。使用之培養器具的尺寸及種類，可視細胞之增殖速度適當地變更。將緩慢增殖之細胞(Moderately/Slowly Expanding Cells)，亦即即使單一細胞培養 2 週後未達到半細胞匯合或

細胞匯合之細胞丟棄。將由分選作為 REC 之各孔回收的 REC 依每一孔各自移入培養燒瓶，進而培養至達到細胞匯合(擴大培養)。之後，各別回收經擴大培養之細胞。源自 1 孔的 REC 定為 1 批次。

【0065】由於本發明中使用之 REC 為藉由每 1 孔播種 1 個細胞的殖株分選而得者，故經增殖之細胞彼此的遺傳特徵全部相同。因此，本發明中可將細胞集團全體稱為「株」，亦可將構成細胞集團的各個細胞稱為「株」。

【0066】又，本發明中，用以使用於分選之 REC，亦可預先藉由 REC 標記(抗 Ror2)進行評估。例如，前述擴大培養後，自全批次回收附著增殖之細胞，分出各批次的一部分($1 \sim 3 \times 10^5$ 個左右)的細胞，以對抗 Ror2 之單株抗體進行單一染色。對抗 Ror2 之單株抗體進行單一染色的手法為公知(WO2016/17795)。總結來說，藉由使用 REC 標記之流式細胞儀解析，求出回收細胞中之 REC 標記陽性細胞的比率。比率可使用定量 PCR 定量 Ror2 之 mRNA 表現，亦可藉由顯微鏡手動求得該比率。上述陽性比率為一定值(例如 65%)以上之批次(細胞集團)定為合格，亦可將此使用於後述之分選。

【0067】

(4)幹細胞集團之分選

本發明中，對於各個批次之 REC 株，調查細胞之增殖能力、脂肪分化能力、REC 特異性標記表現量、細胞尺寸的均勻性，解析各自的相關，藉此能以高純度分選出細胞

性能更高之REC。

本發明中，將前向散射光之變異係數(Coefficient of Variation：CV值)及細胞的平均尺寸設為分選的指標。

所謂前向散射光(Forward Scatter)，為相對於雷射光之軸前方向之以小角度散射的光。前向散射光，由細胞表面產生之雷射光的散射光、繞射光及折射光而成，可獲得關於樣本之大小的情報。

【0068】變異係數(Coefficient of Variation：CV)，為將標準偏差除以平均值而得之值，係相對性評估單位不同之數據的偏差，或相對於平均值之數據與偏差的關係時使用的數值。

本發明中，分選上述CV值為40%以下，較佳為35%以下者。CV值為40%以下之細胞集團，更佳為35%以下之細胞集團，為由大小均勻的細胞所構成之細胞集團。較佳為CV值為30%以下，25%以下，或20%以下。又，依據本發明分選之細胞集團中之細胞的平均尺寸，為20 μm 以下。較佳為18 μm 以下，14 μm ～18 μm 之範圍的大小。

【0069】本發明，亦提供評估LNGFR陽性細胞，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之高速增殖性間葉系幹細胞株之細胞集團的品質之方法。本發明中，將滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵，較佳為滿足兩方之特徵的細胞集團，判定為高品質。

(a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下。

(b)平均細胞尺寸為20 μm 以下。

如此進行而評估及分選出之細胞集團，構成該集團之細胞株的數未限定，例如 1ml 之溶液中具有 $0.8 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^7$ 個左右之細胞。

【0070】又，本發明之較佳的態樣中，將滿足以下 (a) 及 (b) 之至少 1 個特徵，較佳為滿足兩方之特徵的細胞集團，判定為高品質。

(a) 流式細胞儀之前向散射光的變異係數為 35% 以下。

(b) 平均細胞尺寸為 $20 \mu\text{m}$ 以下。

如此進行而評估及分選出之細胞集團，構成該集團之細胞株的數未限定，例如 1ml 之溶液中具有 $0.8 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^7$ 個左右之細胞。

【0071】

9. 本發明之組成物的調製

本發明之組成物，以含有例如低內毒素海藻酸之 1 價金屬鹽及上述間葉系幹細胞作為有效成分為特徵。本發明者們，將本發明之組成物填充至活體之髓核部位時，初次發現海藻酸之 1 價金屬鹽本身發揮髓核組織之再生或治療效果。含有作為有效成分，係將低內毒素海藻酸之 1 價金屬鹽施用於患部時，以可發揮髓核組織之再生或治療效果之量含有即可，以至少為組成物全體之 0.1w/v% 以上較佳，更佳為 0.5w/v% 以上，進而佳為 1w/v%。本發明之組成物中較佳的海藻酸之 1 價金屬鹽濃度，較佳為 0.5w/v% $\sim$ 5w/v%，更佳為 1w/v% $\sim$ 5w/v%，進而佳為 1w/v% $\sim$ 3w/v%，特佳為 1.5w/v% $\sim$ 2.5w/v%。又，其他態樣中，本

發明之組成物中海藻酸之1價金屬鹽濃度，較佳為0.5w/w%～5w/w%，更佳為1w/w%～5w/w%，進而佳為1w/w%～3w/w%，特佳可為1.5w/w%～2.5w/w%。

【0072】使用純化至顯示較佳的內毒素水平之海藻酸之1價金屬鹽，如上述製作組成物時，組成物之內毒素含量，通常為500EU/g以下，更佳為300EU/g以下，進而佳為150EU/g以下，特佳為100EU/g以下。

【0073】本發明之組成物中含有之細胞數(細胞濃度)，例如為 1×10^4 個/ml以上，或 1×10^5 個/ml以上，較佳為 1×10^4 個/ml～ 1×10^7 個/ml的細胞。

【0074】本發明之組成物，亦可使其含有促進細胞成長之因子。作為如此之因子，可舉例例如BMP、FGF、VEGF、HGF、TGF- β 、IGF-1、PDGF、CDMP(cartilage-derived-morphogenetic protein)、CSF、EPO、IL、PRP(Platelet Rich Plasma)、SOX及IF等。此等之因子，可藉由重組法製造，或是可由蛋白組成物純化。此外，本發明之數個態樣的組成物不包含此等之成長因子。即使不包含成長因子之情形，髓核的再生十分良好，且與積極地促進細胞成長之情形相比安全性亦較高。

【0075】本發明之組成物，亦可使其包含抑制細胞死之因子。作為引起細胞死之因子，可舉例例如Caspase、TNF α 等，作為抑制此等之因子，可舉例抗體或siRNA等。此等之抑制細胞死之因子，可藉由重組法製造，或是可由蛋白組成物純化。此外，本發明之數個態樣的組成物不包

含抑制細胞死之因子。即使不包含抑制細胞死之因子之情形，髓核的再生十分良好，且與積極地抑制細胞死之情形相比安全性亦較高。

【0076】此外，本發明之1個態樣中，本發明之組成物，除低內毒素海藻酸之1價金屬鹽之外，不包含對椎間盤之髓核組織發揮藥理作用之成分。即使僅含有低內毒素海藻酸之1價金屬鹽作為有效成分之組成物中，亦可充分地發揮髓核的再生或治療效果。

本發明之數個態樣中，視需要亦可使本發明之組成物含有其他醫藥活性成分，或慣用之安定化劑、乳化劑、滲透壓調整劑、緩衝劑、等張化劑、保存劑、舒緩劑、著色劑等一般醫藥使用之成分。

【0077】

10.本發明之組成物的硬化

本發明之組成物，可以於對髓核部位施用後將一部分硬化之方式使用。

所謂「將一部分硬化」，係指使交聯劑與具有流動性之本發明之組成物的一部分接觸，並非與交聯劑接觸之組成物的全體而是一部分凝膠化、固化。較佳為藉由使交聯劑與具有流動性之本發明之組成物之表面的至少一部分接觸而將本發明之組成物之一部分硬化。本發明中，可選擇適合使用之載體之交聯劑或硬化手段。

【0078】本發明之數個態樣中，所謂「將組成物對髓核部位施用後使一部分硬化」，亦可藉由以下表示：使用

與對髓核部位之填充同樣的交聯劑之使用方法及使用比率，於in vitro，在直徑6mm之試驗管填充低內毒素海藻酸鈉500 μ L及交聯劑靜置1小時後，試驗管內之組成物的容量之至少5成未凝膠化，未凝膠化之部分，試驗管內之組成物的容量之至少5成能以裝有21G之注射針的注射器吸起。

【0079】認為藉由組成物對髓核部位之填充後亦顯示如此之性狀，而在填充後即使自椎間盤之頭尾側施加壓縮力之情形組成物亦不會脫出。「組成物之表面的至少一部分」，例如為連接髓核之椎間盤之表面的開口部，較佳為為了將組成物施用於髓核部位而使用之椎間盤之表面的開口部，亦即組成物之填充口。藉由將組成物之表面的至少一部分凝膠化固化，可有效地防止組成物自椎間盤漏出。椎間盤表面之組成物的填充口，例如為於椎間盤之表面以注射器之針或手術刀製作之填充組成物所使用之開口部，或是於椎間盤突出摘除時利用手術刀等製作之椎間盤表面的開口部較佳。此態樣中之椎間盤較佳為纖維環。

【0080】本發明之組成物，較佳為施用於對象之髓核部位之前，不含使組成物硬化之量的交聯劑。因此，本發明之組成物中，可含有經過一定時間後亦不使組成物硬化之量的交聯劑。此處所謂一定時間雖無特別限定，但較佳為30分鐘～12小時左右。「不含使組成物之量的交聯劑」，例如亦可藉由以下表示：將組成物於20℃靜置1小時後，能以裝有21G之注射針的注射器注入。本發明之數個態樣的組成物中，不含交聯劑。

【0081】作為交聯劑，只要可以藉由將海藻酸之1價金屬鹽之溶液交聯而將其表面固定化者，則無特別限定。作為交聯劑，可舉例例如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 等之2價以上之金屬離子化合物、分子內具有2~4個胺基之交聯性試藥等。更具體而言，作為2價以上之金屬離子化合物，可舉例 CaCl_2 、 MgCl_2 、 CaSO_4 、 BaCl_2 等，作為分子內具有2~4個胺基之交聯性試藥，可舉例氮原子上可具有離胺醯基(lysyl)基($-\text{COCH}(\text{NH}_2)-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$)之二胺基烷烴，即包括二胺基烷烴及其胺基經離胺醯基基取代之形成有離胺醯基胺基的衍生物，具體而言，雖可舉例二胺基乙烷、二胺基丙烷、N-(離胺醯基)-二胺基乙烷等，但由取得容易度、凝膠之強度等之理由來看，特別是定為 CaCl_2 溶液較佳。

【0082】本發明之數個態樣之1個中，使交聯劑與本發明之組成物之表面接觸的時間點，較佳為對髓核部位施用本發明之組成物後。做為使交聯劑(例如，2價以上之金屬離子)與本發明之組成物之一部分接觸的方法，雖無特別限定，但可舉例例如以注射器、噴射器(噴霧器)等，將2價以上之金屬離子之溶液施加於組成物表面的方法等。例如，交聯劑可緩慢地向形成於椎間盤之組成物的填充口持續施加數秒~10數秒。之後視需要，亦可加以去除填充口附近殘存之交聯劑的處理。交聯劑之去除，可為例如利用生理食鹽水等之施用部位的洗淨。

【0083】交聯劑之使用量，以考慮本發明之組成物的施用量、椎間盤表面之組成物的填充口大小、椎間盤之髓

核的施用部位尺寸等適當地調節為宜。為了不使交聯劑強烈影響組成物之填充口的周圍組織，以交聯劑之使用量不會過剩之方式來調節。作為2價以上之金屬離子的使用量，只要是可將含有海藻酸之1價金屬鹽之組成物的表面固化的量便無特別限定。然而，例如使用100mM之 CaCl_2 溶液時，椎間盤之表面的填充口為直徑1mm左右之情形， CaCl_2 溶液之使用量以0.3ml～5.0ml左右較佳，更佳為0.5ml～3.0ml左右。椎間盤表面之填充口於椎間盤突出摘除時藉由手術刀等製作，邊緣為5mm×10mm左右之情形，100mM之 CaCl_2 溶液的使用量，以0.3ml～10ml左右較佳，更佳為0.5ml～6.0ml左右。可觀察施用部位中之本發明之組成物的狀態來適當地增減。

【0084】交聯劑含鈣時，已知鈣的濃度為高者凝膠化快，又，可形成更硬之凝膠。然而，由於鈣有細胞毒性，故濃度若過高，則對本發明之組成物的椎間盤之髓核再生作用有壞影響之虞。因此，於含有海藻酸之1價金屬鹽的組成物之表面固化，例如使用 CaCl_2 溶液時，較佳為定為25mM～200mM，更佳為定為50mM～150mM之濃度為宜。

【0085】本發明中，較佳為於組成物中添加交聯劑後，靜置一定時間後，藉由將殘存於添加部位之交聯劑洗淨等去除為宜。靜置的一定時間雖無特別限定，但較佳為靜置約1分鐘以上，更佳為靜置約4分鐘以上使組成物之表面凝膠化為宜。或是靜置約1分鐘～約10分鐘，更佳為靜置約4分鐘～約10分鐘、約4分鐘～約7分鐘，進而佳為靜

置約5分鐘較佳。此一定時間之間，以成為使組成物與交聯劑接觸之狀態為宜，可適當追加交聯劑以使組成物之液面不會變乾。

【0086】例如，將海藻酸鈉溶液滴至 CaCl_2 溶液中，凝膠化製作而成者有海藻酸珠。然而，海藻酸珠必須擠壓至施用部位來施用，必須製作與施用部位大小相應者，在實際臨床使用上，有技術上的困難。又，將 CaCl_2 溶液作為交聯劑使用時，由於珠表面之 Ca 離子與周圍組織接觸，故亦有鈣之細胞毒性的問題。相對於此，由於本發明之組成物為溶液狀，故對任意形狀之施用部位亦可容易地施用，且能以本組成物覆蓋施用部位之全體，對周圍組織之密著性亦良好。本發明之組成物之與周圍組織接觸的部分，能保持低的鈣濃度，鈣之細胞毒性的問題亦少。本發明之組成物之與周圍組織接觸的部分，由於交聯劑之影響少，故本發明之組成物，能容易地與施用部位之細胞或組織接觸。較佳為本發明之組成物在施用於髓核部位後，經過約4週，在施用之部位以無法辨識的程度與活體組織融合，對活體之親和性亦高。

【0087】將本發明之組成物施用於髓核部位時，若藉由交聯劑使一部分凝膠化，則本發明之組成物於患部一部分硬化，在與周圍組織密著之狀態下局部存在，可防止自髓核部位之漏出。除此之外，藉由本發明之組成物與周圍組織密著，更強力地發揮本發明之組成物之髓核再生效果。

【0088】發現使對髓核部位填充之填補材全體凝膠化進行硬化時，若對椎間盤自頭尾側施加壓縮力則硬化凝膠自椎間盤表面之組成物填充口脫出的現象，相對於此，本發明之溶液狀的組成物填充於髓核部位時，自頭尾側施加壓縮力時不會自椎間盤表面之填充口脫出。即，實際上藉由本發明之組成物進行髓核填補時，即使是對於椎間盤之來自上下的壓力，經填補之組成物漏出的風險亦可說是低。

【0089】又，將經硬化之凝膠對髓核部位填充時，硬化之凝膠向脊柱管內突出，有引起重大神經障礙之危險性。另一方面，本發明之溶液狀的組成物，這樣的危險性低，併發症發病之危險低。

【0090】本發明之一態樣中，亦可不使包埋細胞之載體硬化來使用。配合臨床症狀或損傷部之大小、形狀，亦可不使用交聯劑來施用。

【0091】

11.本發明之組成物之施用

本發明之組成物施用於人類，或人類以外之生物，例如，鳥及非人類哺乳動物(例如，牛、猴、貓、小鼠、大鼠、天竺鼠、倉鼠、豬、狗、兔子、綿羊及馬)之椎間盤之髓核部位，用於促進髓核的再生。

【0092】本發明之組成物的形態，較佳為有流動性之液體狀，即溶液狀。本發明中所謂「具有流動性」，意指具有其形態不定形地變化的性質，不需要具有例如如溶液

般一直流動的性質。較佳為，以例如具有可將組成物封入注射器等，並注入椎間盤之髓核部位的流動性為宜。又，本發明之數個態樣之1個中，以具有將組成物於20℃靜置1小時後，能以裝有14G～26G之注射針的注射器注入椎間盤之髓核部位的流動性為宜，進而佳為能以21G之注射針注入為宜。本發明之組成物以冷凍乾燥物等之乾燥狀態提供時，可於施用時使用溶劑等做成如上述之有流動性的組成物。

【0093】溶液狀之本發明之組成物，可容易地以注射器、凝膠用移液器、專用注射器、專用注入器、填充器具等施用於椎間盤之髓核部位。

本發明之組成物的黏度高時，由於以注射器施用為困難，故亦可使用加壓型或電動型等之注射器。亦可不使用注射器等，例如以刮刀、棒等對髓核部位之缺損部施用。以注射器注入時，例如使用14G～27G或14G～26G之針較佳。

【0094】本發明之組成物的對髓核部位施用之方法雖無特別限定，但較佳為可藉由公知的外科手法於直視下使患部露出後，或是於顯微鏡下或內視鏡下，使用注射器、填充器具等，將本發明之組成物施用於髓核部位。較佳的態樣之一中，亦可例如自纖維環表面向髓核部位插入填充器具之針等，施用本發明之組成物。

【0095】由於本發明之組成物為溶液狀，故亦可是適合於髓核之縮小、髓核部位之空洞或缺損部等任何形狀之

髓核部位，亦可填充髓核之縮小、空洞或缺損部的全體。髓核之縮小、髓核部位之空洞或缺損部，可為因椎間盤之變性或損傷所生者，或是可為藉由以外科手術去除或吸除髓核之至少一部分所生者。較佳為於藉由去除髓核之至少一部而形成之髓核缺損部施用本發明之組成物為宜。

【0096】髓核之至少一部分的去除無特別限定，例如，可在直視下、經皮的、顯微鏡觀察下，或內視鏡下進行之椎間盤髓核摘除術等。又例如，可為於背上切開2cm～10cm之開口，將肌肉從稱為椎弓之脊椎的後方要素後面剝離，切除椎弓間之韌帶，確認神經與椎間盤突出，摘除壓迫神經之突出的方法(LOVE法)。又，可為對髓核照射雷射，使髓核之容量減少的方法。

【0097】本發明之組成物對髓核部位施用後，如前述，可藉由交聯劑使組成物之一部分硬化。

本發明之組成物的施用量，試施用之對象的髓核之施用部位的容積來決定即可，雖無特別限定，但例如為0.01ml～10ml，更佳為0.1ml～5ml，進而佳為0.2ml～3ml。於髓核缺損部施用本發明之組成物時，以充分填滿髓核部位之缺損部容積之方式注入為宜。

【0098】本發明之組成物之施用次數、頻率，可視症狀與效果增減。例如，可僅施用1次，亦可持續進行1月～1年1次的施用。

由於海藻酸為動物體內原本不存在之物質，故動物不保有將海藻酸特異性分解的酵素。海藻酸在動物體內，藉

由通常的水解而緩慢地分解，但與玻尿酸等之聚合物相比體內的分解更緩慢，又由於在髓核內不存在血管，填充於髓核內之情形，可期待長期的效果持續。

【0099】即使本發明之組成物未與如前述之細胞或成長因子一同提供時，本發明之組成物對髓核部位施用時，以可與前述之細胞或成長因子、細胞死抑制因子、後述其他藥劑等併用來使用。

本發明之組成物，藉由對髓核部位施用，而發揮抑制椎間盤組織全體及髓核之變性變化，促進再生之效果。因此，本發明之組成物，較佳使用作為椎間盤之髓核填補用組成物。

【0100】本發明之組成物之較佳的態樣之一，為用以抑制椎間盤之變性的組成物，更佳為用以抑制椎間盤髓核之變性的組成物。所謂「椎間盤或髓核之變性」，係指因年老等而椎間盤之細胞數、水分含量、細胞外基質(第二型膠原蛋白、聚集蛋白聚醣等)等降低產生形態的變化，造成功能降低的狀態，若繼續進行則變得無法發揮作為椎間盤之衝擊吸收體的功能。本說明書中「抑制變性」，係指與未處置時相比抑制變性變化即可，並不是指一定要達到未變性的狀態。

【0101】本發明之組成物的態樣之一，為用以抑制髓核再生的組成物。所謂髓核再生，係指防止纖維母細胞樣細胞的聚集、髓核細胞比率高地使髓核再生為目的，意圖使富含第二型膠原蛋白或蛋白多醣的髓核組織再生。此髓

核再生之用語中，亦包括抑制髓核之變性。本發明之較佳的態樣之一，以施用本發明之組成物而再生之髓核的組成，接近天然正常之髓核的組成為宜。

【0102】又，本發明之較佳的態樣的組成物，使用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防或抑制復發。本說明書中「治療、預防或抑制復發」，包括治療、預防、抑制復發、減低、抑制、改善、去除、發病率之減少、發病時期之延遲、進程抑制、重症度之輕減、復發率之降低、復發時期之延遲、臨床症狀之緩和等。本說明書中「治療、預防或抑制復發」，包含(慢性)疼痛的緩和。本發明之組成物之較佳的態樣，特別是不使包埋細胞之載體硬化來使用之情形，係為了抑制椎間盤變性及/或椎間盤損傷所伴隨之(慢性)疼痛(特別是腰痛)而使用。

【0103】此等之本發明之組成物之較佳的態樣、組成物之使用方法等，依循如前述之記載。

椎間盤變性及/或椎間盤損傷，為例如選自由椎間盤突出、椎間盤疾病、脊椎退化性滑脫症、化膿性椎間盤炎、變形性脊椎疾病、脊椎狹窄症、腰部脊椎狹窄症、椎間盤損傷、腰部脊椎狹窄症所伴隨之椎間盤突出(亦稱為混合性腰部脊椎狹窄症)所成群組中之至少1種的狀態或疾病。椎間盤變性及/或椎間盤損傷，可為伴隨腰痛者。

本發明之組成物，配合臨床症狀或損傷部之大小、形狀，亦可不使包埋細胞之載體硬化來使用，如此之態樣中，係為了抑制椎間盤變性及/或椎間盤損傷所伴隨之疼

痛，特別是慢性腰痛而使用。

【0104】

12.治療方法

本發明提供一種使用前述本發明之組成物之用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷的治療、預防或抑制復發的方法。較佳為本發明之治療方法為一種用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防及/或抑制復發之方法，其包含：將含有低內毒素海藻酸之1價金屬鹽，且具有流動性之組成物，施用於需要前述治療、預防或抑制復發之對象的椎間盤之髓核部位，將施用之前述組成物的一部分硬化。

【0105】 本發明之治療方法，在對髓核部位施用本發明之組成物之前，亦可包含去除髓核之至少一部分的步驟。

前述椎間盤變性及/或椎間盤損傷，為例如選自由椎間盤突出、椎間盤疾病、脊椎退化性滑脫症、化膿性椎間盤炎、變形性脊椎疾病、脊椎狹窄症、椎間盤損傷所成群組中之至少1種的狀態或疾病。本發明之數個態樣的治療方法中，前述椎間盤變性及/或椎間盤損傷為椎間盤突出，特別是腰椎椎間盤突出。本發明之數個態樣的治療方法中，前述椎間盤變性及/或椎間盤損傷為腰部脊椎狹窄症所伴隨之椎間盤突出(亦稱為混合性腰部脊椎狹窄症)。椎間盤變性及/或椎間盤損傷可為慢性腰痛。椎間盤變性及/或椎間盤損傷亦可為此等之狀態或疾病的組合。

【0106】又，本發明之數個態樣之1個中，提供一種使用前述本發明之組成物之抑制椎間盤之變性變化的方法。又，本發明之較佳的態樣之1個中，提供一種使用前述本發明之組成物之使椎間盤之髓核再生的方法。

此等之方法，包含：將含有間葉系幹細胞及低內毒素海藻酸之1價金屬鹽，且具有流動性之組成物，施用於需要椎間盤變性抑制或髓核再生之對象的椎間盤之髓核部位，將施用之組成物的一部分硬化。前述之方法，在對髓核部位施用本發明之組成物之前，亦包含去除髓核之至少一部分的步驟。

【0107】本發明之組成物之較佳的態樣、具體的對椎間盤之髓核部位的施用方法、組成物的硬化方法、用語的意義等如前述。亦可適當的組合其他椎間盤之治療方法或治療藥進行本發明之治療方法。

【0108】又，在將本發明之組成物施用於髓核部位之前、或是同時、或是之後，可以填充鏈黴素、青黴素、妥布黴素(Tobramycin)、愛康黴素(Amikacin)、健大黴素(Gentamicin)、新黴素及雙性黴素B等之抗生素、阿斯匹靈、非類固醇性解熱鎮痛劑(NSAIDs)、乙醯胺酚等之抗炎症藥、蛋白分解酵素、副腎皮質類固醇藥、辛伐他汀(Simvastatin)、洛伐他汀(Lovastatin)等之HMG-CoA還原酵素抑制劑等之併用藥。此等藥劑可混入本發明之組成物中使用。或亦可以口服或是非口服併用投予。除此之外，亦可視需要以口服或是非口服併用投予肌肉鬆弛藥、類鴉片

(Opioid)止痛藥、神經性疼痛緩和藥等。

【0109】本發明亦關於用以製造本發明之組成物之低內毒素海藻酸之1價金屬鹽的用途。

本發明之用途為一種低內毒素海藻酸之1價金屬鹽之用途，其係用以製造用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防或抑制復發之組成物，前述組成物施用於對象之髓核部位，以於施用後將一部分硬化之方式使用，對髓核部位施用時具有流動性。

【0110】本發明進而提供一種用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防或抑制復發的低內毒素海藻酸之1價金屬鹽，其係將含有間葉系幹細胞及低內毒素海藻酸之1價金屬鹽，將具有流動性之組成物施用於需要椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防或抑制復發之對象的椎間盤之髓核部位，將施用之組成物的一部分硬化。

【0111】

13.本發明之組成物的評估

本發明之組成物，可使用發明者們新確立之綿羊重度椎間盤變性模式來評估。重度椎間盤變性模式，可藉由下述(a)及(b)製作重度椎間盤變性綿羊模式：(a)第1次之手術中，自綿羊椎間盤去除相當於綿羊體重之0.00004%~0.00005%之量的髓核組織，製作變性椎間盤，及(b)於第1次之手術4週後，自以(a)製作之變性椎間盤進一步去除相當於綿羊體重之0.00014%~0.000175%之量的髓核組織。

【0112】較佳的態樣中，可對於體重40~50kg之綿

羊，藉由下述(a)及(b)製作重度椎間盤變性綿羊模式：(a)第1次之手術中，自綿羊椎間盤去除20mg之髓核組織，製作變性椎間盤，及(b)於第1次之手術4週後，自以(a)製作之變性椎間盤進一步去除70mg之髓核組織。

本發明之組成物可藉由下述(a)～(d)之程序進行評估。(a)第1次之手術中，自綿羊椎間盤去除20mg之髓核組織，製作變性椎間盤；(b)作為第2次之手術，於第1次之手術4週後，藉由自以(a)製作之變性椎間盤進而去除70mg之髓核組織製作重度椎間盤變性綿羊模式；(c)於第2次之手術之後，於產生之空隙投予對象之組成物；及(d)於組成物投予後，對於自變性模式採取之椎體及椎間盤以選自由MRI、組織染色、免疫組織染色(IHC)所成群組中之至少1種評估方法，評估椎間盤之再生。

【0113】以前的大型動物模式中，由於藉由部分摘除正常椎間盤製作椎間盤變性模式，故椎間盤有自然治癒的可能性。然而，藉由部分摘除已經變性之椎間盤的本動物模式，可更正確地評估本實施例對於人類之變性椎間盤的效果。

【0114】

實施例

以下，藉由實施例進一步具體說明本發明。惟，本發明之範圍不因此等之實施例受限定。

[實施例1]

【0115】 兔子椎間盤障礙模式中之椎間盤障礙治療試驗

本實施例中，使用包含源自骨髓之間葉系幹細胞(BMSC)與活體吸收性超純化海藻酸鹽(低內毒素高純度海藻酸鹽，亦稱為UPAL)凝膠之組成物，試驗對切除椎間盤(IVD)後之變性IVD移植BMSC之再生效果。

1. 材料及方法

1.1. 動物實驗

對於所有動物之處置，係依循由北海道大學之動物管理使用委員會(承認編號：13-0051)所承認，承認的指南來實施。雄性之日本白色兔子(20週齡、3.2~3.5kg)係由三共實驗室服務股份有限公司(東京，日本)取得。

【0116】

1.2. 兔子髓核細胞(NPC)之調製

髓核(NP)試料，係將4隻兔子透過靜脈內過剩投予戊巴比妥使其安樂死後，自腰部IVD(自L1/2至L5/6；全部為20個IVD)獲得。將NPC自髓核(NP)組織單離，以過去報導的方法培養[2,5,7,8]。具體而言，無菌條件下，使用微鉗子自纖維環(AF)分離明膠狀NP組織。組織標本放入含有10%胎牛血清(Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan)、1%青黴素/鏈黴素，及1.25mg/ml Fungizone(Life Technologies, Waltham, MA, USA)之Dulbecco改良Eagle培養基(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)之培養培養基中。未使用外

因性成長因子。將試料再懸濁於補充0.25%膠原酶之培養基(和光純藥工業，大阪，日本)中，於振盪培養箱中，以37℃、20% O₂及5% CO₂培養4小時，藉由酵素消化來單離。使自NP組織分離之細胞在培養皿中增殖，加濕大氣中，包含20% O₂及5% CO₂之37℃下以上述培養基培養。培養基一週交換2次，以繼代2使用NPC。

【0117】

1.3. 兔子同種BMSC之調製

作為兔子同種BMSC，使用自Cyagen(Santa Clara, CA, USA；型號：RBXMX-01,001，批次編號：151114I31)購入之OriCell™兔子間葉系幹細胞。此等之細胞，對於特徵、解凍後之存活性、細胞週期、未分化狀態之驗證，以及沿著骨形成、軟骨形成及脂肪形成系統之多能性分化能力進行試驗。BMSC係依循製造業者之說明書進行培養，培養基一週交換2次，以繼代2使用BMSC。

【0118】

1.4. UPAL凝膠及三維(3D)培養物之調製

本實施例中，將UPAL凝膠(Mochida Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan)作為用來3D培養之海藻酸鹽支架來使用[2]。UPAL凝膠之純化流程，如之前之報導[2]。具體而言，將海藻中之海藻酸鹽，藉由澄清化程序[2]轉變成水溶性海藻酸鈉藉以進行萃取。此海藻酸鹽溶液，由於為高黏性故以大量之水稀釋[2]。接著，過濾萃取物，自纖維狀殘渣分離海藻酸鈉溶液[2]。為了單離高品質之海藻

酸，於此溶液中添加酸[2]。

【0119】將溶解於磷酸緩衝生理食鹽水(和光純藥工業)及102mM CaCl_2 中之2%(w/v)UPAL液調製成凝膠化用。於3D培養前，使用最終濃度20mM之5,6羧基螢光素二乙酸酯琥珀醯亞胺酯(CFDA-SE；CFDA-SE Cell Proliferation Assay Kit；BIO RAD, Hercules, CA, USA)，依循製造業者之說明書將BMSC螢光標記[9]。接著，將標記BMSC及無標記NPC，以1：1(分別 1×10^6 細胞/ml)[1,10]之比率包埋於UPAL液中，得到 2×10^6 細胞/ml之最終細胞濃度[9,10]。UPAL/細胞混合物，為了凝膠化，通過22規格針放入102mM CaCl_2 中。凝膠珠在低氧條件(5% O_2 及5% CO_2)下以上述培養基培養7日[10]。進而，將NPC及BMSC以 1×10^6 細胞/ml之細胞濃度分別包埋於UPAL液中。細胞濃度，係基於在各組中使用不同總細胞數比較效果的過去報導之例[11]來設定。凝膠化後，將凝膠珠在與前述同樣的低氧條件下進行培養。實驗組如下：(a)NPC單培養；(b)BMSC單培養；及(c)NPC+BMSC共培養。

【0120】於培養0日及7日後，依循過去報導之方法[8]將全部的凝膠珠溶解於55mM檸檬酸鈉中直至凝膠及細胞分離。NPC+BMSC共培養組中，將回收之細胞使用具有Diva軟體version7.0(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)之BD FACSAria III 高速細胞分選儀(High speed cell sorter)進行分選[1,12]。去除死細胞及殘渣，將發出530nm螢光之細胞鑑定為BMSC，非螢光細胞鑑定為NPC。

【 0121】

1.5. RNA 萃取及即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (qRT-PCR)

將回收之 NPC 及 BMSC 溶解於 1ml 之 TRIzolTM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，使用 RNeasy Mini套組 (Qiagen, Valencia, CA, USA)自樣本萃取總 RNA。使用 TaqManTM基因表現測定與定製 TaqManTM基因表現測定(表 1)(Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)，進行即時 qRT-PCR解析。關於各試料得到循環閾值 (Ct)，使用 $2^{-\Delta Ct}$ 方法，計算以持家基因 GAPDH之 Ct值為基準之各標的基因之相對 mRNA表現 [1]。

【 0122】

表1. qRT-PCR用之Applied Biosystems預先設計的引子及探針混合物

基因	基因符號	檢測ID
HIF-1α	HIF1A	Oc03398626_m1
GLUT-1	SLC2A1	Oc03399482_m1
Brachyury	T	Oc03395780_m1
CDMP-1	GDF5	Oc00433564_m1
TGF-β	TGFB1	Oc04176122_u1
IGF-1	IGF1	Oc04096599_m1
第二型膠原蛋白	COL2A1	Oc03396134_m1
聚集蛋白聚醣*	ACAN	-

* 定製TaqMan[®] 基因表達測定

【 0123】

1.6. 使用兔子變性IVD模式之 in vivo試驗

In vivo試驗中合計使用48隻兔子。樣本大小，係對於採用之2個時間點各別基於以前之報告 [2,7,8]來決定。48

隻兔子之中隨機選擇32隻，進行IVD變性之定性分析(磁共振圖像(MRI)、組織學、免疫組織化學(IHC))，將合計80個IVD隨機分配成完整對照(Intact control)組、穿刺(Puncture)組(僅進行用以製作變性之穿刺)、椎間盤切除(Discectomy)組(對於變性IVD進行用以製作空洞之部分椎間盤切除)、凝膠組(對於變性IVD之部分椎間盤切除及UPAL凝膠埋植)、BMSC+凝膠組(對於變性IVD之部分椎間盤切除及BMSC與UPAL凝膠之埋植)(各組8個IVD)。

【0124】使用4隻兔子NP組織之冷凍切片，進行經移植之BMSC的存活評估，將合計8隻的IVD，隨機分配成完整對照組及BMSC+凝膠組(每組4隻的IVD)。使用剩餘的12隻兔子，進行HIF-1a、GLUT-1、Brachyury之表現評估。此等之標記，被提倡做為表現於健康之人類NPC的主要標記[13](使用兔子NP組織之石蠟切片之IHC)。將合計36個IVD隨機分配成完整對照組、椎間盤切除組、BMSC+凝膠組(各組4個IVD)。

【0125】

1.7.UPAL溶液中之BMSC標記及包埋

In vivo實驗中，作為移植細胞以繼代2使用與in vitro實驗同樣的OriCell™兔子間葉系幹細胞。BMSC在移植前以CFDA-SE標記，包埋於2% UPAL液中，調製成 1×10^6 細胞/ml之最終細胞濃度[14]。

【0126】

1.8. IVD變性之製作及細胞移植

20週齡兔子對於模仿高齡之人類集團的狀態係未充分老化，獲得具有均勻老化之高齡兔子為困難。因此本實施例中，為了獲得變性IVD使用兔子椎間盤之纖維環(AF)穿刺模式[8,15,16]。藉由K他命(10mg/kg)及鹽酸賽拉嗪(Xylazine)(3mg/kg)之靜脈內注射進行全身麻醉，以自主換氣利用與七氟烷(2~3%)混合之O₂及空氣(3.0l/分鐘)維持麻醉。IVD變性，係藉由在L2/3及L4/5 IVD使用18號針之AF穿刺來製作。L3/4 IVD係作為對照為無處置。

【0127】IVD穿刺4週後，將含有BMSC之UPAL溶液，移植至L2/3及L4/5之變性IVD的部位[8]。於全身麻醉下，以前外側後腹膜進入法(approach)使脊椎露出。椎間盤切除組、凝膠組及BMSC+凝膠組中，將18號針穿刺做成刺入口後，使用10ml注射器吸出變性NP組織，將剩餘的NP組織使用微鉗子(Nagashima Medical Instruments Co., Ltd., Tokyo, Japan)於L2/3及L4/5 IVD(每IVD為約10~12mg濕重量)去除，製作IVD空洞。L3/4 IVD係作為對照為無處置。

【0128】凝膠組中使用裝著27號針之微注射器(Hamilton Medical, Bonaduz, Switzerland)，以20μl之2%UPAL溶液填滿IVD缺損，BMSC+凝膠組中以含有BMSC之UPAL溶液填滿IVD缺損。特別是，由於26號針顯示對於細胞存活率或組織變性沒有影響，故使用27號針[2,7,8,17]。接著，將1mL之102mM CaCl₂散佈於UPAL液之上誘導凝膠化。5分鐘後，將手術創以生理食鹽水洗淨並閉合。穿刺

組中進行假手術。為了IVD變性之分析於手術4週後與12週後，或為了NPC標記之表現評估於手術1日後、7日後及28日後，藉由靜脈內戊巴比妥過量投予殺死兔子。為了評估人類BMSC對兔子IVD影像的效果，亦使用源自骨髓之人類間葉系幹細胞(hMSC-BM；PromoCell, Heidelberg, Germany；型號：C-12974，批次編號：412Z022.4)進行同樣的埋植實驗。

【0129】

1.9. 經移植之BMSC存活的評估

於埋植後第4週與第12週，基於CFDA-SE螢光標記[18,19]確認埋植BMSC之存活。將IVD(完整對照組及BMSC+凝膠組)對半水平切斷，於液態氮中冷凍，切片成5mm切片，接著作為對比染色以4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI；Invitrogen；P36935)染色。特別是，由於DAPI陽性細胞無法界定存活對死滅之NPC及BMSC，故不能定量移植BMSC之存活率。

【0130】

1.10. MRI解析

於術後第4週與第12週，使用7.0-T MR掃描器(Varian Unity Inova；Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA)得到IVD之T2加權成像正中矢狀面像[2,8,16]。使用Pfarrmann分類(等級5分類為重度變性)，將IVD變性等級化[20]。為了算出MRIindex，亦使用分析軟體版本12.0(AnalyzeDirect, Overland Park, KS, USA)進行定量分析。

將MRIindex(NP面積與平均信號強度之積)應用於NP之變性的定量化，定量數據，係以相對於未處置對照IVD所得之MRIindex(相對MRIindex)的百分比表示[2,8,16]。

【0131】

1.11. 組織學的分析

MRI分析後，為了進行組織學的染色而將各IVD進行處理。為了評估蛋白多醣表現，將正中矢狀面切片(5mm厚)藉由蘇木精與曙紅(H&E)以及番紅O-固綠(fast green)進行染色[8]。進行IVD之半定量分析，等級分成0(正常)至5(高度變性)[21,22]。具體而言，此組織學的尺度著重於AF結構之形態學的變化。

【0132】

1.12. IHC分析

於術後第4週及第12週為了檢測第一型及第二型膠原蛋白進行免疫組織化學(IHC)染色[8]，於術後第1日、第7日、第28日檢測HIF-1 α 、GLUT-1及Brachyury。第一型及第二型膠原蛋白染色中，運用針對第一型膠原蛋白(Sigma-Aldrich；C2456, RRID：AB_476836)及第二型膠原蛋白(Kyowa Pharma Chemical, Toyama, Japan；F-57)之小鼠單株抗體。作為對比染色使用3,3'-二胺基聯苯胺鹽酸鹽(Dako)及Mayer's蘇木精(Merck, Darmstadt, Germany)展開染色。關於HIF-1 α 、GLUT-1及Brachyury染色，運用針對HIF-1 α 之DyLight 550結合兔子多株抗體(Novus Biologicals, Centennial, CO, USA；NB100-479R, RRID：

AB_1642267)、針對 GLUT-1 之 PE 結合兔子多株抗體 (LS Bio, Seattle, WA, USA ; LS-A109342-100) , 及針對 Brachyury 之無結合兔子多株抗體 (LS Bio ; LS-C31179-100, RRID : AB_911118)。進而, 使用 Alexa Fluor 594 結合山羊抗兔子多株抗體 (Invitrogen ; A32740) 作為 Brachyury 之二次抗體。作為對比染色使用 DAPI 展開染色。

【0133】第一型及第二型膠原蛋白、HIF-1 α 、GLUT-1 及 Brachyury 之陽性細胞, 係分別以獨立隨機地選擇之 5 視野來計測[2,8]。視野延伸至包含深的區域及表面區域兩者之 NP 的寬度。數值, 係以陽性細胞相對於所有評估項目中之總細胞數的比例, 又, 相對於用於 NPC 標記評估之 CFDA-SE 陽性細胞的比例表示。所有的實驗, 關於用於第一型及第二型膠原蛋白評估之 8 個 IVD, 及自各處置組之用於 NPC 標記評估之 4 個 IVD, 在各別的時間點進行。

【0134】

1.13. 統計解析

全部的數據, 以平均 $\pm$ 標準誤差 (SE) 表示。對於多組比較進行 One-way 變異數分析 (ANOVA) 及 Tukey-Kramer 事後檢定。對於 2 組比較進行配對 t 檢定 (paired t-test)。所有的統計計算, 以顯著性閾值 $p < 0.05$, 使用 JMP Pro-version 14.0 統計軟體 (SAS Institute, Cary, NC, USA) 進行。

【0135】

2. 結果

2.1. NPC 及 BMSC 共培養, 促進 BMSC 之向 NPC 的分化

以及成長因子及ECM的產生

為了調查對於各細胞型之NPC及BMSC共培養的效果，將無標記NPC及CFDA-SE標記BMSC，為了進行3D培養而包埋於UPAL凝膠中。本發明者，在共培養組中，使用細胞分選儀收集兩者的細胞型。磷酸緩衝食鹽水/細胞懸濁液分析，係使用前向散射及側向散射進行。P1圈門以2D散點圖(圖1a)繪圖，將死細胞及殘渣除外。將無標記NPC及CFDA-SE標記BMSC，在螢光對側向散射散點圖中使用不同的圈門進行分選(圖1b)。因此，將P2圈門設定於無標記細胞之上，將P3圈門設定於CFDA-SE標記細胞之上，為了迴避交叉污染於2個圈門之間設置間隙[1]。凝膠溶解及細胞分選之後，得到(a)NPC對照(day0)、(b)NPC單培養、(c)NPC共培養、(d)BMSC對照(day0)、(e)BMSC單培養，及(f)BMSC共培養之6種類型之細胞。關於BMSC分化之解析，6種類之細胞中，使用qRT-PCR，作為NPC標記評估HIF-1 α 、GLUT-1及Brachyury之基因表現，作為成長因子評估CDMP-1、TGF- β 及IGF-1之基因表現，然後作為細胞外基質(ECM)評估第二型膠原蛋白及聚集蛋白聚醣之基因表現。

【0136】NPC共培養中之HIF-1 α 之基因表現，與NPC對照相比顯著地增加($p=0.0218$ 、Tukey-Kramer檢定)、BMSC共培養中與BMSC對照($p=0.0041$ 、Tukey-Kramer檢定)及單培養($p=0.0041$ 、 0.0116 、Tukey-Kramer檢定)相比顯著地增加(圖1c)。

NPC 共培養中之 GLUT - 1 之表現，與 NPC 對照 ($p < 0.0001$, Tukey-Kramer 試驗) 及單培養 ($p < 0.0001$, Tukey-Kramer 試驗) 相比顯示顯著的增加，NPC 單培養中，與 NPC 對照 ($p < 0.0001$, Tukey-Kramer 試驗) 相比顯示顯著的增加。BMSC 共培養中，與 BMSC 對照 ($p = 0.0189$ 、Tukey-Kramer 檢定) 相比顯示 GLUT-1 表現之顯著的增加 (圖 1d)。相對於此，Brachyury 之基因表現，於 3 種 NPC 間未顯示統計學之顯著差異。進而，Brachyury 之基因表現，僅在 BMSC 共培養中觀察到，在 BMSC 對照及單培養之任一者之中皆未觀察到 (圖 1e)。

【0137】NPC 共培養中之 CDMP-1、TGF- β 及 IGF-1 之基因表現，與 NPC 對照 ($p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p = 0.0002$ 、Tukey-Kramer 試驗) 及單培養 ($p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p = 0.0082$ 、Tukey-Kramer 試驗) 相比顯著地增加，NPC 單培養中之表現，與 NPC 對照 ($p = 0.0179$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p = 0.0079$ 、Tukey-Kramer 試驗) 相比顯著地增加。BMSC 共培養中之表現，與 BMSC 對照 ($p = 0.0011$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ ，Tukey-Kramer 試驗) 及單培養 ($p = 0.0015$ 、 $p = 0.0386$ 、 $p < 0.0001$ ，Tukey-Kramer 試驗) 相比顯著地增加 (圖 1f-h)。

【0138】NPC 共培養及單培養中之第二型膠原蛋白之表現，與 NPC 對照 ($p = 0.0036$ 、 $p = 0.0035$ 、Tukey-Kramer 試驗) 相比顯著地增加，BMSC 共培養中之表現，與 BMSC 對照 ($p = 0.004$ 、Tukey-Kramer 試驗) 及單培養 ($p = 0.0226$ 、

Tukey-Kramer試驗)相比顯著地增加(圖 1i)。關於聚集蛋白聚醣，NPC共培養中之基因表現，與NPC對照($p=0.0047$ 、Tukey-Kramer試驗)及單培養($p=0.0392$ 、Tukey-Kramer試驗)相比顯著地增加，單培養中之表現與NPC對照($p=0.0274$ 、Tukey-Kramer試驗)相比顯著地增加。特別是，聚集蛋白聚醣雖僅在BMSC共培養中表現，但在BMSC對照或單一培養中未表現(圖 1j)。

【 0139】

2.2. 移植BMSC之存活

In vivo試驗中，BMSC+凝膠組中，觀察到CFDA-SE標記BMSC，但於術後第4週與第12週完整對照組中未觀察到(圖 2)。人類BMSC組亦與BMSC+凝膠組(兔子BMSC)顯示相同的觀察結果，確認經移植之BMSC於移植後第12週於IVD中存活。若切開，未觀察到凝膠之擠出。

【 0140】

2.3. BMSC與UPAL凝膠之併用，促進變性IVD中之椎間盤切除後的IVD再生

將經治療之IVD中之變性變化藉由MRI定性分析，捕捉T2加權成像正中矢狀面圖像(圖 3a)。BMSC+凝膠組中之Pfarrmann等級，於第4週顯著地於椎間盤切除組($p=0.003$ 、Tukey-Kramer檢定)，於第12週顯著地低於穿刺組與椎間盤切除組($p=0.0009$, $p<0.0001$, Tukey-Kramer檢定)。進而，凝膠組之變性度於第12週亦顯著地低於椎間盤切除組($p=0.0028$ 、Tukey-Kramer檢定)(圖 3b)。凝膠組

與 BMSC+凝膠組之間未觀察到顯著差異。BMSC+凝膠組之 MRIindex，於 4 週顯著地高於椎間盤切除組 ($p=0.0085$ 、Tukey-Kramer 試驗)，及於 12 週亦顯著地高於穿刺、椎間盤切除及凝膠組 ($p=0.0002$ ， $p<0.0001$ ， $p=0\sim 0248$ ，Tukey-Kramer 試驗)。又，12 週後凝膠組之 index 亦顯著地高於椎間盤切除組 ($p=0.0092$ 、Tukey-Kramer 檢定)(圖 3c)。特別是，兔子 BMSC 組與人類 BMSC 組之間，Pfirrmann 等級或 MRIindex 之任一者中皆未觀察到顯著差異。

【0141】在組織學的變性度分類之前，評估包含 NP 及 AF 之 IVD 的全體結構，觀察組間肉眼的差異。IVD 之組織學評估的結果，完整之對照標本，無內部 AF 之結構的崩壞，NP 組織顯示典型的橢圓形(圖 4a 及 b)。椎間盤切除組中，內側 AF 崩壞，於第 4 週與第 12 週皆觀察到 NP 組織之纖維性變化。然而，BMSC_+凝膠組中之內側 AF，NP 組織之纖維性變化停在最小，於第 4 週與第 12 週兩時間點看起來良好地保存，凝膠組中之內側 AF，亦看起來相對良好地保存(圖 4a 及 b)。BMSC+凝膠組之組織學的變性分數，於第 4 週及第 12 週，皆顯著地低於穿刺組 ($p=0.0006$ 、 $p<0.0001$ ，Tukey-Kramer 檢定)、椎間盤切除組 ($p<0.0001$ 、 $p<0.0001$ ，Tukey-Kramer 檢定)、凝膠組 ($p=0.00,134$ 、 $p<0.0001$ ，Tukey-Kramer 檢定)，於第 12 週凝膠組之變性的分數亦顯著地低於椎間盤切除組 ($p=0.0006$ 、Tukey-Kramer)。又，兔子 BMSC 組與人類 BMSC 組之間未觀察到顯著差異。在任一組中皆未觀察到骨刺形成。

【 0142】

2.4. BMSC與UPAL凝膠之併用，促進變性之IVD中之ECM產生

接著，本發明者評估IVD中之ECM產生。特別是，第二型膠原蛋白對IVD機能為必要的必須成分，但IVD變性過程中觀察到第一型膠原蛋白合成之增加[23]。第二型膠原蛋白陽性細胞的比例，BMSC+凝膠組中於第4週顯著地高於穿刺組及椎間盤切除組($p=0.0001$, $p<0.0001$, Tukey-Kramer檢定)，於第12週顯著地高於穿刺組、椎間盤切除組及凝膠組($p<0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, Tukey-Kramer檢定)。又，凝膠組，於第4週顯示顯著高於椎間盤切除組的比例($p<0.0001$, Tukey-Kramer檢定)，於第12週顯著高於穿刺組及椎間盤切除組($p=0.0231$, $p<0.0001$, Tukey-Kramer檢定)(圖5)。

【 0143】另一方面，第一型膠原蛋白陽性細胞的比例，於第4週及第12週，BMSC+凝膠組皆顯著地低於穿刺組($p<0.0001$, $p<0.0001$, Tukey-Kramer檢定)、椎間盤切除組($p<0.0001$, $p<0.0001$, Tukey-Kramer檢定)、凝膠組($p<0.0001$, $p<0.0001$, Tukey-Kramer檢定)。又該比例，於4週凝膠組亦顯著地低於椎間盤切除組($p<0.0001$, Tukey-Kramer檢定)，於12週顯著地低於穿刺組及椎間盤切除組($p=0.0007$ 、 $p<0.0001$, Tukey-Kramer檢定)。藉由IHC分析之兩評估中，兔子BMSC組與人類BMSC組之間未觀察到顯著差異。

【 0144】

2.5. 變性IVD中之移植BMSC之向NPC的分化

最後，隨著時間觀察 HIF-1 α 、GLUT-1及 Brachyury陽性細胞，探討 *in vivo*中移植 BMSC分化成 NPC之機制(圖 6a-c)。完整對照組中，幾乎全部細胞在所有時間點 3個 NPC標記皆為陽性。BMSC+凝膠組中 HIF-1 α 、GLUT-1及 Brachyury陽性細胞於第1日雖以低水平被觀察到，但陽性細胞數隨時間增加。3種 NPC標記陽性細胞相對於全細胞數的比例，與第1日及第7日相比於第28日顯著地高($p<0.0001$, $p<0.0001$, Student之 *t*檢定)。相對於此，椎間盤切除組中，約 20%之細胞在全部的時間點為陽性(圖 6d-f)。同樣地，3種 NPC標記陽性細胞相對於 CFDA-SE陽性細胞數(表示移植 BMSC)的比例，與第1日及第7日相比於第28日顯著地高($p<0.0001$ 、 $p<0.0001$, Student's *t*-test)(圖 6g-i)。

【 0145】

3. 考察

由於IVD之再生能力顯著低，故藉由椎間盤切除所生之缺損組織修復不充分，有進而導致IVD變性的可能性[2]。本實施例中，即使UPAL凝膠單獨亦較椎間盤切除後更抑制IVD變性，但若併用BMSC與UPAL凝膠，藉由誘導IVD再生而發揮強力的效果。進而，人類BMSC與兔子BMSC中，IVD再生在兩組組間觀察到為同等。數個以前的研究中，亦實證了變性IVD中之各種BMSC之再生能力

[18、24、25]。進而，UPAL凝膠，由於顯示高的生物相容性及充分的活體力學特性而支持內源性修復治療策略[2]，故提供用於於變性IVD部位移植BMSC後之IVD再生及進一步變性預防的最適環境。

【0146】本實施例中，NPC標記、成長因子及ECM之基因表現，與in vitro之各3D單培養相比較，NPC與BMSC之3D共培養中顯著地增加。此等之結果，顯示NPC與BMSC之共培養引導向NPC之BMSC分化，其結果，引導NPC與BMSC之間的相互活性，帶來兩細胞型中之ECM產生的增強。此事，亦與顯示NPC與BMSC之共培養刺激BMSC分化成NPC樣表現型的其他數個in vitro研究的見解為一致[1,12,26]，支持透過成長因子之產生[1,11,27]及ECM合成之調升(up-regulation)之NPC與BMSC之間的相互活化[1,5,10,26]。

【0147】進而，in vivo試驗中觀察到經埋植之BMSC中之NPC標記之表現的隨時間增加，及與單獨椎間盤切除後之結果相比顯示ECM產生的增強之同樣的結果。具我們所知，未有探討海藻酸鹽及BMSC於in vivo移植時之BMSC分化成NPC時之機制的報告，但某研究中，實證了埋入去端膠原蛋白(atelocollagen)中之移植的MSC可分化成NPC[28]。具體而言，以綠色螢光蛋白質標記之自體BMSC移植至成熟兔子IVD，藉由IHC分析測定移植細胞之分化。於移植後第48週，移植BMSC顯示HIF-1 α 、GLUT-1及MMP-2為陽性，此意指BMSC分化成表現數個NPC代表性

表現型特徵的細胞[28]。

【0148】In vivo試驗中，藉由組織學解析，進一步顯示凝膠單獨之移植比椎間盤切除後更預防IVD變性，及BMSC+凝膠之併用於變性之預防發揮更強力的效果。此與MRI結果一致，MRI結果教示凝膠單獨比椎間盤切除術更保存IVD之含水量，但BMSC+凝膠之組合中帶來對含水量保存更強力的效果。IHC之結果進而教示BMSC+凝膠之組合促進變性NP組織中之ECM合成，此對於適當的IVD機能為重要，導致預防透過降低第一型膠原蛋白產生的變性進行。進而，與穿刺組(無椎間盤切除之變性IVD)相比較之BMSC+凝膠之組織學結果，教示BMSC移植導致IVD再生。總結此等之結果，顯示經移植之BMSC隨時間分化成NPC，產生in vivo之IVD再生。

【0149】關於AF再生，凝膠組及BMSC+凝膠組，雖使NP中之膠原蛋白I產生顯著地減少，但於凝膠及BMSC+凝膠之填充中藉由穿刺之AF缺損被修復。由於IVD變性之特徵為NP細胞外基質的分解[2]，故本實施例中主要著重於NP之保存/再生。

【0150】報導有在椎間盤細胞治療中，移植細胞不能在椎間盤內附著，移植細胞自注入部位漏出的風險，其結果，亦有形成骨刺之報告[5,29,30]。因此，椎間盤切除後之BMSC移植之情形，為了防止細胞漏出而需要載體材料。本發明中，BMSC+凝膠組中未觀察到骨刺形成。若組合使用UPAL凝膠與BMSC則具有即時硬化性之重要特徵，

其結果，對於防止細胞漏出之點在臨床上為有用。

【0151】基於本發明之結果與以前之報告[1,11,12,26-28]，本發明者認為IVD再生之機制如下。

1)經埋植之BMSC，透過向UPAL凝膠中包埋，可向椎間盤外無漏出而局部存在於IVD之空洞內。

2)經埋植之BMSC，產生成長因子及ECM，導致現有NPC之活化。

3)活化之NPC，又使成長因子及ECM之產生增加。

4)其結果，經埋植之BMSC分化成NPC。

5)進而，BMSC及現有NPC相互活化，產生IVD再生(圖7)。

【0152】此次in vitro實驗中，認為若BMSC與NPC進行細胞融合，則細胞之分離為不可能，故認為細胞結合作用構成IVD變性之主要作用機制的可能性低。又，BMSC與NPC於in vivo未確認到直接接觸。因此，成為作用基礎之機制，可能是起因於成長因子及/或調節BMSC與NPC之間的相互作用之數個重要之體液性因子。

【0153】

References

- [1] Strassburg S, Richardson SM, Freemont AJ, Hoyland JA. Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype. Regen Med 2010;5(5):701-11.
- [2] Tsujimoto T, Sudo H, Todoh M, et al. An acellular bioresorbable ultra-purified alginate gel promotes intervertebral disc repair: a preclinical proof-of-concept study. EBioMedicine 2018;37:521-34.

- [3] Oehme D, Ghosh P, Shimmon S, et al. Mesenchymal progenitor cells combined with pentosan polysulfate mediating disc regeneration at the time of microdiscectomy: a preliminary study in an ovine model. *J Neurosurg Spine* 2014;20(6):657-69.
- [4] Noriega DC, Ardura F, Hernandez-Ramajo R, et al. Intervertebral disc repair by allogeneic mesenchymal bone marrow cells: a randomized controlled trial. *Transplantation* 2017;101(8):1945-51.
- [5] Naqvi SM, Buckley CT. Differential response of encapsulated nucleus pulposus and bone marrow stem cells in isolation and coculture in alginate and chitosan hydrogels. *Tissue Eng Part A* 2015;21(1-2):288-99.
- [6] Sudo H. Exploratory clinical trial on the safety and capability of dMD-001 in lumbar disc herniation. https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/icdr_e/ctr_view.cgi?recptno=R000039018. Accessed December 10, 2019.
- [7] Yamada K, Sudo H, Iwasaki K, et al. Caspase 3 silencing inhibits biomechanical overload-induced intervertebral disk degeneration. *Am J Pathol* 2014;184 (3):753-64.
- [8] Sudo H, Minami A. Caspase 3 as a therapeutic target for regulation of intervertebral disc degeneration in rabbits. *Arthritis Rheum* 2011;63(6):1648-57.
- [9] Sato M, Uchida K, Nakajima H, et al. Direct transplantation of mesenchymal stem cells into the knee joints of Hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2012;14(1):R31.
- [10] Ouyang A, Cerchiari AE, Tang X, et al. Effects of cell type and configuration on anabolic and catabolic activity in 3D co-culture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells. *J Orthop Res* 2017;35(1):61-73.
- [11] Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, et al. Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow-derived stromal cells: significance of direct cell-to-cell contact in coculture system. *Spine (Phila Pa 1976)* 2004;29(14):1508-14.

- [12] Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells* 2006;24(3):707-16.
- [13] Risbud MV, Schoepfiin ZR, Mwale F, et al. Defining the phenotype of young healthy nucleus pulposus cells: recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 annual ORS meeting. *J Orthop Res* 2015;33(3):283-93.
- [14] Hiyama A, Mochida J, Iwashina T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J Orthop Res* 2008;26(5):589-600.
- [15] Lei T, Zhang Y, Zhou Q, et al. A novel approach for the annulus needle puncture model of intervertebral disc degeneration in rabbits. *Am J Transl Res* 2017;9 (3):900-9.
- [16] Ura K, Sudo H, Iwasaki K, Tsujimoto T, Ukeba D, Iwasaki N. Effects of intradiscal injection of local anesthetics on intervertebral disc degeneration in rabbit degenerated intervertebral disc. *J Orthop Res* 2019;37(9):1963-71.
- [17] Qian J, Ge J, Yan Q, Wu C, Yang H, Zou J. Selection of the optimal puncture needle for induction of a rat intervertebral disc degeneration model. *Pain Physician* 2019;22(4):353-60.
- [18] Wang H, Zhou Y, Huang B, et al. Utilization of stem cells in alginate for nucleus pulposus tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2014;20(5 6):908-20.
- [19] Polzer H, Volkmer E, Saller MM, et al. Long-term detection of fluorescently labeled human mesenchymal stem cell in vitro and in vivo by semi-automated microscopy. *Tissue Eng Part C Methods* 2012;18(2):156-65.
- [20] Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 2001;26(17):1873-8.

- [21] Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials* 2006;27(3):335-45.
- [22] Nishimura K, Mochida J. Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus: an experimental study. *Spine (Phila Pa 1976)* 1998;23(14):1531-8.
- [23] Le Maitre CL, Pockert A, Buttle DJ, Freemont AJ, Hoyland JA. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration. *Biochem Soc Trans* 2007;35(Pt 4):652-5.
- [24] Wang F, Nan LP, Zhou SF, et al. Injectable hydrogel combined with nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells for the treatment of degenerative intervertebral disc in rats. *Stem Cells Int* 2019:8496025.
- [25] Omlor GW, Lorenz S, Nerlich AG, Guehring T, Richter W. Disc cell therapy with bone-marrow-derived autologous mesenchymal stromal cells in a large porcine disc degeneration model. *Eur Spine J* 2018;27(10):2639-49.
- [26] Risbud MV, Albert TJ, Guttapalli A, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: implications for cell-based transplantation therapy. *Spine (Phila Pa 1976)* 2004;29(23): 2627-32.
- [27] Yang SH, Wu CC, Shih TT, Sun YH, Lin FH. In vitro study on interaction between human nucleus pulposus cells and mesenchymal stem cells through paracrine stimulation. *Spine (Phila Pa 1976)* 2008;33(18):1951-7.
- [28] Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 2005;30(21):2379-87.
- [29] Li YY, Diao HJ, Chik TK, et al. Delivering mesenchymal stem cells in collagen microsphere carriers to rabbit degenerative disc: reduced risk of osteophyte formation. *Tissue Eng Part A* 2014;20(9 10):1379-91.

- [30] Vadala G, Sowa G, Hubert M, Gilbertson LG, Denaro V, Kang JD. Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: cell leakage may induce osteophyte formation. J Tissue Eng Regen Med 2012; 6(5):348-55.
- [31] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006;8(4):315-7.
- [32] Raynaud CM, Maleki M, Lis R, et al. Comprehensive characterization of mesenchymal stem cells from human placenta and fetal membrane and their response to osteoactivin stimulation. Stem Cells Int 2012;2012:658356.
- [33] Serigano K, Sakai D, Hiyama A, Tamura F, Tanaka M, Mochida J. Effect of cell number on mesenchymal stem cell transplantation in a canine disc degeneration model. J Orthop Res 2010;28:1267-75.

[實施例 2]

【 0154 】 由髓核細胞 (NPC) 與高純度間葉系幹細胞 (REC) 之共培養 (in vitro) 所致之基因表現的變化

1. 材料與方法

1.1. 人類之健康椎間盤髓核細胞 (NPC)

人類之健康椎間盤髓核細胞 (NPC)，使用北海道大學醫院中之青春期特發性脊椎側彎症之年輕病患 (15.3 ± 3.3 歲) 之於脊椎前方固定術時所得之細胞。

【 0155 】

1.2. 具有高度均勻性之高純度間葉系幹細胞之調製

(1)藉由流式細胞儀之前向散射光(FSC)的CV值測定

將藉由公知方法(WO2016/17795)預先調製之複數REC株，使用於藉由流式細胞儀之前向散射光的CV值測定。

流式細胞儀中之FSC與細胞之表面積或大小成正比。本實施例中，將FSC之CV值作為指標評估細胞尺寸之偏差。

(a)對各個REC株進行PI染色，於PI陰性之活細胞集團設定圈門，將死細胞自解析對象除外。

(b)將PI陰性之活細胞集團以FSC/SSC之細胞直方圖(cytogram)展開，於主要細胞集團設定圈門(P1)，將垃圾或雜訊自解析對象除外。

(c)將P1圈門內之細胞集團以FSC之直方圖(histogram)展開，設定標記(M1)，計測CV值。

【0156】

(2)細胞增殖能力及脂肪分化能力的評估

為了評估細胞增殖能力，將 1×10^5 個REC細胞播種於100mm培養皿，於 37°C 、5% CO_2 環境下培養5日，之後，使用細胞計數器計測細胞數及平均細胞尺寸。

培養液，使用添加了FBS、basic FGF、Hepes、青黴素-鏈黴素之DMEM培養基(富士軟片和光純藥公司)。

又，為了評估脂肪分化能力，將 5×10^4 個REC細胞播種於24孔盤，於 37°C 、5% CO_2 環境下培養2日，之後，取代成脂肪分化誘導培養基，進而培養14日。培養14日後進行油紅O染色，藉由圖像解析算出脂肪滴面積。此外，脂

肪分化誘導培養基，使用於上述培養培養基中添加地塞米松、吲哚美辛、IBMX之培養基。

【0157】

(3)全面分析

對於複數之REC株，調查FSC之CV值、細胞增殖率(增殖能力)、平均細胞尺寸、脂肪分化能力後，得知FSC之CV值低的REC株(CV=35%以下)，增殖能力、分化能力皆高，平均細胞尺寸小(平均細胞尺寸：20 μ m以下)(圖8)。

【0158】另一方面，得知FSC之CV值高的REC株(CV=35%以上)，增殖能力、分化能力皆低，平均細胞尺寸大。

CV值30%~35%之株的平均增殖率為6.4，CV值25%~30%之株的平均增殖率為9.2，CV值25%以下之株的平均增殖率為15.1。又平均細胞尺寸為18 μ m~20 μ m之株的平均增殖率為7.0，平均細胞尺寸為16 μ m~18 μ m之株的平均增殖率為12.7，平均細胞尺寸為16 μ m以下之株的平均增殖率為21.3。

以下，本實施例中使用FSC之CV值低的REC株(CV=25%以下)。

【0159】

1.3. 包含REC之UPAL組成物之調製

將NPC與經螢光標記之高純度間葉系細胞(REC)分組成各單獨組與混合組，在超高純度海藻酸(UPAL：持田製

藥提供)之3維凝膠中共培養或單獨培養，於培養前(day0)與培養7日後，將3維凝膠溶解後，以細胞分選儀分離成下述細胞。

(a)NPC 對照組(day0)

(b)NPC 單獨培養組

(c)NPC 共培養組

(d)REC 對照組(day0)

(e)REC 單獨培養組

(f)REC 共培養組

【0160】對於上述6組之細胞藉由定量PCR解析(qRT-PCR)測定下述之基因表現。

髓核細胞之標記

HIF-1 α

GLUT-1

Brachyury

成長因子

CDMP-1

TGF- β

IGF-1

細胞外基質

第二型膠原蛋白

聚集蛋白聚醣

基因表現量之測定法，依據實施例1進行。

【0161】

2. 結果

若將REC與髓核細胞共培養，則與單獨培養之情形相比，分化指標(HIF-1 α 、GLUT-1、Brachrury)在髓核細胞、間葉系幹細胞兩者中皆上升(圖9)。

關於成長因子(CDMP-1、TGF β 、IGF-1)及細胞外基質(第二型膠原蛋白、聚集蛋白聚醣)亦相同。

教示髓核細胞與高純度間葉系幹細胞相互作用而活化，間葉系幹細胞向髓核細胞分化。

[實施例3]

【0162】

綿羊椎間盤變性模式中之再生促進效果(MRI解析)與組織學解析

1. 材料與方法

7隻綿羊(40-50kg)依據GLP施術。

將椎間盤L1/L2(第1腰椎與第2腰椎之間的椎間盤)、椎間盤L2/L3(第2腰椎與第3腰椎之間的椎間盤)、椎間盤L3/L4(第3腰椎與第4腰椎之間的椎間盤)及椎間盤L4/L5(第4腰椎與第5腰椎之間的椎間盤)分成以下4組。

對照組(n=6)：無處置組

椎間盤切除手術組(n=6)：僅摘除髓核組織

凝膠組(n=8)：摘除髓核組織後，埋植海藻酸凝膠

REC+凝膠組(n=8)：摘除髓核組織後，埋植REC與海藻酸凝膠

【0163】除了無處置組，自各組之椎間盤於麻醉下摘除20mg之髓核組織，使其產生重度之椎間盤變性。

自最初之髓核組織摘除4週後，進而於麻醉下摘除70mg之髓核組織，於椎間盤內之空隙，以最終細胞濃度 $1 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ (100 μl)注入懸浮於UPAL之REC(實施例2，1.2項中調製之REC)。

埋植手術4週後，使綿羊安樂死。

為了評估處置椎間盤之變性定量之目的下使用3特斯拉之磁共振圖像法(MRI)進行分析，之後，椎間盤進行利用H&E染色及番紅-O染色之組織學評估，及利用免疫組織化學評估之第二型膠原蛋白表現的評估。

所有數據以平均 $\pm$ 標準誤差表示，各組間之差以單因子變異數分析(ANOVA)與Tukey-Kramer事後檢定來檢定。

【0164】

2. 結果

於綿羊椎間盤之患部埋植凝膠及REC+凝膠後，於4週後以MRI評估椎間盤變性之結果，Pfarrmann分類中凝膠及REC+凝膠組顯著地低於無治療組(椎間盤切除手術組)，又MRI index中REC+凝膠組顯著地高於無治療組(椎間盤切除手術組)(圖10)。利用組織染色之組織學變性分數(Boos分類)，凝膠及REC+凝膠組顯著地低於無治療組(椎間盤切除手術組)，又凝膠組與REC+凝膠組之比較中REC+凝膠組顯著地低(圖11)。免疫組織化學分析中，第二型膠原蛋白陽性細胞的比例REC+凝膠組顯著地高於無治療組(椎間盤切

除手術組)及凝膠組(圖12)。

【0165】若埋植包含REC之UPAL凝膠，則在高度變性之IVD中抑制椎間盤切除後之IVD變性，第二型膠原蛋白陽性細胞在REC+凝膠組顯著地高。因此，顯示併用UPAL凝膠之REC，促進自發性IVD再生。進而，本發明者實證，REC與UPAL凝膠之併用促進成長因子及ECM產生及內因性NPC活化，促進向NPC之分化，增強IVD再生。

[實施例4]

【0166】本實施例中實證，在顯示重度之IVD變性的綿羊模式中，源自骨髓之高純度間葉系幹細胞(REC)與UPAL凝膠之組合，增強椎間盤切除後(至24週)原位(in situ)的IVD再生。進而，本實施例中，將健康之人類NPC及REC在UPAL凝膠中之3D系統中共培養，評估成為IVD再生基礎之機制。又，進行NPC及市售之BMSC之共培養及NPC與REC細胞之共培養，比較REC及市售之BMSC對於NPC之效果。本發明者們之研究結果，教示了用於治療變性人類IVD之突出的REC與原位硬化性凝膠之組合的臨床應用性。

【0167】

1. 材料及方法

1.1. 試驗設計

本實施例中之試驗設計係以下述內容進行。

(i)透過於in vitro之人類NPC與REC之3D共培養的IVD

再生之機制的探討

(ii) 透過 REC 及市售人類 BMSC 與 NPC 之 3D 共培養的 REC 與市售人類 BMSC 對於 NPC 之效果的比較

(iii) UPAL 與 REC+UPAL 凝膠之力學特性的測定

(iv) 於 *in vivo* 之椎間盤切除後之重度變性 IVD 之再生能力的評估

(v) 移植 IVD 中之腫瘤形成的評估

【0168】本發明者們假設在椎間盤切除後藉由移植包埋於 UPAL 凝膠中之 REC，促進自發性 IVD 再生。

由北海道大學大學院醫學研究科之倫理委員會，承認健康之人類 IVD 之使用。動物實驗程序，係依循北海道大學及 Hamri 股份有限公司(茨城縣)之動物實驗委員會 (Institutional Animal Care and Use Committee) 所承認，且此等之委員會所推薦的指南來實施。

【0169】將健康之人類 NPC 及 REC，在 UPAL 凝膠之 3D 系統中共培養，評估成為 IVD 再生基礎之機制。於培養 0 日後及 7 日後，使用 qRT-PCR (n=4) 在全細胞類型中分析 NPC 標記 (包含 HIF-1 α 、GLUT-1 及 brachyury)、成長因子 (包含 CDMP-1、TGF- β 及 IGF-1) 以及 ECM 成分 (包含第二型膠原蛋白及聚集蛋白聚醣) 之表現 (2,9,30,31)。進而，將 NPC 及市售之 BMSC 共培養，比較 REC 及市售之 BMSC 對於 NPC 的效果。

【0170】接著，使用無拘束壓縮試驗，評估 UPAL 及 REC+UPAL 凝膠之力學特性。將圓板狀凝膠以 0.5mm/分鐘

之一定速度進行壓縮，計算楊氏模數($n=4$)(3、15、32、33)。動物實驗中，綿羊14隻(計56次的IVD)分類成以下4群。4週之結果亦記載於實施例3。

無處置對照組(4週， $n=6$ ；24週， $n=6$)：無處置組

椎間盤切除手術組(4週， $n=6$ ；24週， $n=6$)：僅摘除髓核組織，亦稱為椎間盤切除組

凝膠組(4週， $n=8$ ；24週， $n=8$)：摘除髓核組織後，埋植海藻酸凝膠

REC+凝膠組(4週， $n=8$ ；24週， $n=8$)：摘除髓核組織後，埋植REC與海藻酸凝膠

【0171】為了製作重度變性之IVD，本發明者們自經處置之IVD去除20mg之NP組織。本發明者們進而在最初之手術4週後，自變性IVD去除70mg之NP組織。由於在預備實驗中，綿羊模式中若去除20mg以上之NP組織在4週後產生IVD變性，故將去除之組織的初期量設定為20mg(圖19)。第2次之去除量，基於以前之兔子模式中之實驗(2、3)所得之正常及變性IVD之去除量的比，設定為70mg。第2次之椎間盤切除後，將含有UPAL或REC與UPAL之組合的溶液移植至椎間盤內的空隙中。綿羊在移植4週後(實施例3)及24週後使其安樂死。為了評估IVD變性，使用3.0-T MRI(2,3,15,37,38)定性地分析IVD。之後，為了組織學分析將IVD以H&E及番紅-O染色，為了ECM成分之分析，藉由IHC評估第二型及第一型膠原蛋白之水平。最後，使用組織標本(2,3,15)進行腫瘤形成解析。

【 0172】

1.2. 統計解析

使用 Tukey-Kramer 檢定，以 α 水平 0.05 及 0.8 之檢定力 (power) 藉由檢定力分析來決定用於定量數據之樣本大小。統計解析使用 JMP Pro version 14.0 軟體 (SAS Institute, Cary, NC, USA) 進行，值為 $p < 0.05$ 時視為顯著。全部的數據以平均 $\pm$ SD 值顯示。為了多組比較進行單因子變異數分析 (ANOVA) 與 Tukey-Kramer 事後檢定。於 2 組間比較使用學生 t 檢定或曼-惠特尼 U 檢定及 Welch 檢定。本發明者們進行試料之隨機化，對於試驗之試料進行盲測化。

【 0173】

1.3. 於 in vitro 之 REC 及市售人類 BMSC 與人類 NPC 之 3D 共培養

REC 之調製

本試驗中，使用由股份有限公司 Japan Tissue Engineering 提供之符合冷凍 GMP 之 REC。REC 及市售之人類 BMSC 的比較分析中，以繼代 6 調製 REC 之 3 株，亦即 REC-02 原型 #003-P6-191220、REC-02 HLWF-1-P6-210114 及 REC-02 QRKF-1-P6-210210。細胞於 3D 培養前在 37℃ 之溫浴中解凍。

【 0174】

市售之人類 BMSC 之調製

市售之人類 BMSC (hMSC-BM; PromoCell, Heidelberg, Germany; C-12974，批次編號：412Z022.4) 依循過去報導

取得(2)。試驗屬於骨形成、軟骨形成及脂肪生成系統之此等細胞的特性、解凍後之存活性、細胞週期、未分化狀態、多分化能力。BMSC，使用完全培養培養基，即補充20% HyClone胎牛血清(FBS；Cytiva, Tokyo, Japan)、1%青黴素/鏈黴素、1.25mg/mL Fungizone(Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、1% HEPES(Life Technologies, Thermo Fisher Scientific)及0.1% bFGF(Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan)之含有L-麩醯胺及酚紅(DMEM；FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)的Dulbecco改良Eagle培養基(低葡萄糖水平；2mg/mL)，依循製造業者之指示書進行培養。培養基一週交換2次，使用第4繼代流程後之BMSC(合計6繼代與REC相同)。

【0175】

UPAL凝膠及3D培養物之調製

UPAL凝膠(Mochida Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan)，使用作為用於3D培養之海藻酸鹽支架(2, 3)。

調製溶解於磷酸緩衝食鹽水(PBS；FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries)之2%(w/v)UPAL溶液，使用CaCl₂溶液(102mM)進行凝膠化。將REC或市售之BMSC，以1×10⁶細胞/mL(2、31、49)之最終細胞濃度與UPAL溶液混合。為了凝膠化使用22號針，以移液器將細胞-UPAL混合溶液放入102mM CaCl₂溶液中。將珠狀得到之2種凝膠與培養基一起在加濕環境(20% O₂、5% CO₂、37℃)中培養7日。培

養基每3日交換。3D培養之7日後為了回收細胞，如過去報導(2、3、35)，使用55mM檸檬酸鈉溶解，離心分離(4℃下10分鐘110×g)後，自凝膠珠回收細胞。進而，如前述，在正常條件下平面培養(2D培養)7日將調製之REC及市售之BMSC作為對照組使用(即，設定以下4組作為實驗組：1)2D培養REC、2)3D培養REC、3)2D培養BMSC，及4)3D培養BMSC)。

【0176】

細胞增殖能力之解析

2D或3D培養7日後，為了二次培養所得之4種細胞而再度播種。成為密集狀態之階段下回收細胞，基於以細胞數加倍所需時間定義之倍增時間(Td)評估細胞增殖能力。Td使用下述式計算。

$$Td = (t_2 - t_1) \times \ln(2) / \ln(N_2 / N_1)$$

(此處，N2及N1為時間t2及t1中之細胞數)。

【0177】

流式細胞儀解析

於4個類型之細胞中分別添加PBS(包含2%之FBS)，以 1×10^6 細胞/mL之最終密度調製細胞懸浮液。接著，將細胞以抗CD90抗體(PE抗人類CD90(Thy1)、BioLegend、San Diego、CA、USA)及抗CD45抗體(FITC抗人類CD45、Beckman Coulter、Brea、CA、USA)染色。又，作為陰性對照使用小鼠IgG1抗體(小鼠IgG1-PE, BioLegend；mouse IgG1-FITC, Beckman Coulter)進行染色。使用碘化丙啶(PI)

檢測死細胞。流式細胞儀分析係使用 CytoFLEX System (Beckman Coulter)進行，評估細胞存活率以及各細胞表面抗原之均勻性及陽性。數據分析中使用 FlowJo 軟體 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)。

【 0178】

健康之人類NPC之調製

自於北海道大學醫院接受用於青春期特發性脊椎側彎症之脊椎前方固定術的9名病患(平均年齡 $\pm$ SD， 15.3 ± 3.3 歲)得到人類NP樣本。由參加本研究之參加者取得知情同意，製作同意書並保存。樣本於外科手術時取得。全部的IVD透過MRI於介手術前分析，使用Pfirrmann分類(36)評估關於變性變化。全部的IVD分類為等級1，教示全部的樣本為非變性IVD。

【 0179】自人類NP樣本單離細胞，如過去報導進行培養(2、3)。首先，在解剖顯微鏡下自AF分離各凝膠樣NP，將組織標本置於培養基中。藉由離心分離(1,000rpm、3分鐘)洗淨調製物2次，再懸浮於補充0.25%膠原酶之培養基中。為了細胞單離，將調製物在振盪培養箱中進行培養(37℃、4小時)，接著進行2次離心分離(1,000rpm、3分鐘)。將自基質分離之細胞放入10cm之組織培養皿，與上述同樣地培養。培養基一週交換2次，使用第4繼代後之NPC。

【 0180】

REC及市售人類BMSC之調製

上述 REC(REC-02_原型 #003-P6-191220)及市售之人類 BMSC，亦使用於 3D 共培養中。將 2 個類型之細胞，藉由與上述 2D 培養相同的方法依循製造業者之指示進行培養。培養基一週交換 2 次。使用源自第 2 繼代之細胞(REC，合計 8 繼代；BMSC，合計 4 繼代)之兩者。

【0181】

3D 共培養與單培養

本發明者們調製 2% UPAL 溶液，如過去報導(2、3)，為了凝膠化使用 CaCl_2 溶液(102mM)。於 3D 培養之前，參照製造業者之手冊(2、15、29)，以 20mM CFDA-SE(CFDA-SE 細胞增殖測定套組；BIO RAD, Hercules, CA, USA)將 REC 及 BMSC 進行螢光標記。之後，將標記細胞及無標記 NPC 以與 UPAL 溶液相同之比率(各細胞 1×10^6 細胞/mL)(2、31、49)混合，最終細胞濃度定為 2×10^6 細胞/mL。細胞-UPAL 混合溶液，使用 22 號針放入 102mM 之 CaCl_2 溶液使其凝膠化。所得之凝膠，在低氧條件(5% O_2 及 5% CO_2)(2、49)下培養 7 日。進而，將 3 個類型之細胞以 1×10^6 細胞/mL 之濃度分別混合於 UPAL 溶液中。細胞濃度，基於過去報導之結果(2)來選擇。凝膠化後，將凝膠珠在低氧條件下以與上述相同的方法培養，使用於以下之實驗組(每 1 組 $n=4$)。

(a)單培養 NPC

(b)單培養 BMSC

(c)單培養 REC

(d)共培養NPC+BMSC

(e)共培養NPC+REC。

【0182】於培養初日及7日後，將全部的凝膠珠溶解於55mM檸檬酸鈉，使凝膠自細胞分離。共培養組中，使用(High speed cell sorter)分選回收之細胞，該高速細胞分選儀使用Diva軟體版本7.0(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)之BD FACSAria III(2, 31)。去除殘渣及死細胞後，選擇530nm之螢光細胞作為REC及BMSC，選擇非螢光細胞作為NPC。

【0183】

RNA萃取與qRT-PCR

將經回收之10種細胞類型(對照NPC、單培養NPC、與市售之BMSC共培養之NPC、與REC共培養之NPC、對照BMSC、單培養BMSC、共培養BMSC、對照REC、單培養REC，及共培養REC)，溶解於1mL之TRIzol(註冊商標)(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)，使用RNeasy Mini套組(Qiagen, Valencia, CA, USA)自試料萃取總RNA。即時qRT-PCR，係使用TaqMan(註冊商標)基因表現測定(Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific)(表3)進行。關於各樣本得到循環閾值(Ct)值。進而，透過 $2^{-\Delta Ct}$ 法(2)計算各標的基因、NPC標記、增殖因子及ECM成分之相對mRNA表現水平。表現水平藉由持家基因GAPDH(2,31)之表現量進行標準化。

【0184】

1.4. 使用無拘束壓縮試驗之凝膠的彈性分析

使用無拘束壓縮試驗評估UPAL及REC-UPAL凝膠之力學特性。製作直徑4.5mm、厚度2mm之2種圓盤狀凝膠(圖14(a))。將樣本放入拉伸-壓縮機械試驗機(Autograph AG-X; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)至凝膠破碎,使用100 N測力器以0.5mm/分鐘之一定速度壓縮(圖14、B及C)(3、15)。楊氏模數,係基於所得之應力-歪曲線(圖14D),使用壓縮值10~20%(n=4凝膠/組)之間之近似直線來計算(圖14E)(3、15、32、33)。

【0185】

1.5. 變性IVD之綿羊模式中之in Vivo試驗

本實施例中,包含綿羊模式之全部的程序,於符合醫藥品GLP之實驗室(Hamri Co., Ltd.)進行(3)。使用14隻雄薩福克綿羊(2歲,體重40~60kg)進行IVD變性之定性分析(3)。全部56個IVD隨機分配成無處置對照(4週, n=6; 24週, n=6)、椎間盤切除(4週, n=6; 24週, n=6)、凝膠(4週, n=8; 24週, n=8),及REC+凝膠(4週, n=8; 24週, n=8)組。首先,進行NP組織去除手術,製作重度變性之IVD模式。以0.5mL/kg之速度肌肉內注射K他命(0.2mg/kg)及鹽酸賽拉嗪(Xylazine)(20mg/kg)之4:1混合物藉此進行麻醉誘導,並藉由吸入麻醉(異氟烷)達成麻醉的維持。手術以右側方後腹膜進入法(approach)進行,露出L1至L5的椎體與IVD。將固形海綿質螺釘(ZIMMER BIOMET, Warsaw, IN, USA)插入L2椎體作為椎骨標記。椎間盤切除

組、凝膠組、REC+凝膠組中於AF切開(5×3mm)後摘除NP組織20mg，引起IVD變性(圖15, A,B)(3,8)。

【0186】

經變性之NP組織的去除與移植

自初次手術4週後，使用相同進入法(approach)露出椎體與IVD。本發明者們進而如上述，為了於AF切開後製作IVD空洞，自3個處置組所得之變性IVD抽出70mg之NP組織(圖15C)。椎間盤切除後，凝膠組中於椎間盤內之空隙中移植2% UPAL溶液110～120μL，REC+凝膠組中移植REC與UPAL溶液之混合物(最終濃度， 1×10^6 細胞/mL)110～120μL(圖15D)(2)。立即將102mM之CaCl₂溶液注入混合物之表面，5分鐘後確認了凝膠化。於埋植4週及24週後，使用戊巴比妥使綿羊安樂死，將腰部脊柱以一塊摘除(3)。

【0187】

MRI

使用3.0-T MR掃描器(MAGNETOM Prisma; Siemens, Munich, Germany)，得到T2加權成像正中矢狀切片圖像。為了評估經處置之IVD的信號變化，本發明者們使用包含5個等級(1：正常～5：高度變性)之Pfarrmann分類(36)，將IVD變性程度分數化。進而，使用Analyze 14.0軟體(AnalyzeDirect, Overland Park, KS, USA)，測定MRI指數值(NP之平均信號強度與NP面積之積)，將NP組織之亮度定量化。進而，3個處置組(2、3、15、37、38)的全部中，

評估無處置對照組中之MRI指數的比率即相對MRI指數。亦測定椎間盤高度相對於鄰接頭蓋側之椎體高度的比即DHI(4、39)。決定無處置對照組之DHI的百分比值即相對DHI。

【0188】

組織學的分析

MRI攝影後，將樣本於10%甲醛中固定，以10% EDTA(pH 7.5)脫鹽，包埋於石蠟中。將矢狀5微米厚之石蠟切片以二甲苯脫蠟，以醇處理，以水清洗，以H&E及番紅-O染色。將IVD變性之程度，使用修改之Boos'分類(3、40、41)，以0(正常)至36(高度變性)進行分數化。

【0189】

IHC

IVD中之第二型及第一型膠原蛋白之表現，藉由IHC決定。切片在二甲苯中脫蠟化，為了抗原活化而以0.1%胰蛋白酶處理30分鐘。接著，將切片以甲醇中之3% H₂O₂處理10分鐘，接著，使用蛋白質封閉無血清溶液(DAKO, Agilent, Santa Clara, CA, USA)進行蛋白質之封閉30分鐘。將山羊抗第一型膠原蛋白(1：40；Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)與抗第一型膠原蛋白抗體一同使用，抗hCL(II)及純化IgG(1：400；Kyowa Pharma Chemical Co., Ltd., Toyama, Japan)與抗第二型膠原蛋白抗體一同使用作為一次抗體。將細胞以PBS洗淨後，使用為了第二型膠原蛋白之EnVision+ System-HRP標記聚合物抗小鼠

(DAKO)，及為了第一型膠原蛋白之 Histofine(註冊商標)Simple Stain Max PO(G)(Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan)作為二次抗體。最後，將切片以 DAB(DAKO)及蘇木精染色。以5個隨機選擇之視野決定第二型及第一型膠原蛋白陽性細胞的數，計算全細胞中之陽性細胞率(2、3、15)。

【0190】

腫瘤形成分析

為了評估移植 IVD 中之移植細胞及現有細胞的腫瘤形成，進行(i)浸潤性增殖、(ii)核分裂、(iii)二核細胞，及(iv)核仁的評估。

24週之評估期間中，使用無處置對照及 REC+凝膠組中之 H&E 染色標本，陽性細胞之總數，在15個隨機選擇之視覺化視野(400倍之倍率下15個視覺化視野；26.5個視覺化視野，總計5mm²)中決定，計算每平方毫米之數。

【0191】

2. 結果

2.1. 於 in vitro 之 REC 及市售人類 BMSC 與人類 NPC 之 3D 共培養的結果

REC 與市售之人類 BMSC 之比較

將關於組入凝膠前後之 REC 及市售之人類 BMSC 的穩定性確認之結果的細節表示於表2及3。

【0192】將 PI-未染色細胞相對於細胞總數的比率定義為細胞存活率。REC 與 BMSC 之間的比沒有顯著差異

($p=0.6087$ ，表2)。計算與細胞徑成正比之前向散射光的變異係數(CV)，評估細胞尺寸之均勻性。 $\%CV$ 值，REC中顯著地低於BMSC($p=0.0366$ ，表2)。細胞增殖能力，藉由計算Td來評估。Td，REC中顯著地短於BMSC($p=0.0074$ ，表2)。細胞表面抗原確認試驗，顯示CD90陽性細胞的比例於REC中顯著地高於BMSC($p=0.0004$)。各組間於CD45陽性細胞未觀察到顯著差異($p=0.0907$ ，表2)。

【0193】本發明者們進而於培養1週後比較REC及市售之BMSC(表3)。關於2D及3D培養後之Td，REC與BMSC之間無顯著差異(分別為 $p=0.3339$ 、 $p=0.6996$)。然而，CD90陽性細胞率，2D及3D培養皆為REC中顯著地高於BMSC(分別為 $p=0.0039$ 、 $p=0.0007$)。關於CD45陽性細胞，其比例為2D培養後之REC中顯著地低於BMSC($p=0.0038$)。3D培養後之REC與BMSC之間無顯著差異($p=0.3221$)。在於in vitro模仿椎間盤內移植後之細胞環境之狀態即與海藻酸鹽之3D培養環境下，由於REC與BMSC相比更維持間葉系幹細胞之特徵性細胞表面標記的表現，故顯示REC在海藻酸鹽環境下亦穩定地維持間葉系幹細胞之形質。

【0194】

表2 REC與市售之人類BMSC的比較

	REC	BMSC	P 值
細胞存活率確認試驗(%)	94.7 ± 1.1	94.0 ± 1.8	0.6087
細胞尺寸確認試驗(%)	34.9 ± 1.0	40.5 ± 3.0	0.0366
細胞倍增時間(hr)	34.5 ± 5.4	51.9 ± 2.6	0.0074
細胞表面抗原確認試驗(%)	99.6 ± 0.1	98.3 ± 0.2	0.0004
CD90(上)、CD45(下)	0.0 ± 0.0	0.03 ± 0.02	0.0907

數據為平均±SD(n=3)。P值藉由學生t檢定來決定。

【 0195】

表3 培養1週後之REC與市售之BMSC的比較

		REC	BMSC	P 值
細胞倍增時間 (hr)	2D盤培養	54.2 ± 14.9	44.7 ± 1.5	0.3339
	UPAL凝膠內之3D培養	57.9 ± 14.5	54.2 ± 5.0	0.6996
CD90(%)	2D盤培養	99.6 ± 0.1	99.0 ± 0.1	0.0039
	UPAL凝膠內之3D培養	92.8 ± 6.6	49.0 ± 4.6	0.0007
CD45(%)	2D盤培養	0.0 ± 0.0	0.05 ± 0.02	0.0038
	UPAL凝膠內之3D培養	0.07 ± 0.06	0.03 ± 0.02	0.3221

數據為平均±SD(n=3)。P價值藉由學生t檢定來決定。

【 0196】

REC與人類NP細胞(NPC)之共培養

本發明者們，探討REC與人類NPC之共培養的效果，及不同細胞型即市售之人類BMSC與人類NPC之共培養的效果，並比較兩者。將以5,6-羧基螢光素二乙酸酯琥珀醯亞胺酯(CFDA-SE)標記之REC或BMSC，及無標記NPC包埋於UPAL凝膠，進行3維(3D)培養(2,15,27)。培養7日後，將凝膠溶解，使用細胞分選機去除殘渣及死細胞。接著，將細胞分類成CFDA-SE陽性細胞、REC、BMSC、無標記細胞及NPC。細胞分選後，得到以下10種細胞。

(a)對照NPC(非培養)

(b)單培養NPC

- (c)與市售之BMSC共培養之NPC
- (d)與REC共培養之NPC
- (e)對照BMSC(非培養)
- (f)單培養BMSC
- (g)共培養BMSC
- (h)對照REC(非培養)
- (i)單培養REC
- (j)共培養REC

【0197】為了分析BMSC及REC之分化、細胞間相互作用以及ECM產生，藉由即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應(qRT-PCR)測定NPC標記(包含HIF-1 α 、GLUT-1、brachyury)、增殖因子(包含CDMP-1、TGF- β 、IGF-1)及ECM成分(包含第二型膠原蛋白及聚集蛋白聚醣)表現(表4)(2、9、30、31)。

【0198】

表4 引子及探針混合物

基因	基因記號	檢測ID
HIF-1 α	HIF1A	Hs00153153_m1
GLUT-1	SLC2A1	Hs00892681_m1
Brachyury	T	Hs00610080_m1
CDMP-1	GDF5	Hs00167060_m1
TGF- β 1	TGFB1	Hs00998133_m1
IGF-1	IGF1	Hs01547656_m1
第二型膠原蛋白	COL2A1	Hs00264051_m1
聚集蛋白聚醣	ACAN	Hs00153936_m1
GAPDH	GAPDH	Hs02786624_g1

【0199】在與REC共培養之NPC中，3個NPC標記即HIF-1 α 、GLUT-1及brachyury的表現水平，顯著地高於對照NPC、單一培養NPC及與市售BMSC共培養之NPC中之表現水平。GLUT-1表現水平，在與市售BMSC共培養之NPC中，顯著地高於對照NPC(圖13、D~F)。CDMP-1及IGF-1之表現水平，在與REC共培養之NPC中，與對照NPC、單一培養NPC及與市售BMSC共培養之NPC相比顯著地增加。TGF- β 表現水平，在與REC共培養之NPC中，與對照及單一培養NPC中之表現水平相比顯著地增加。與市售之BMSC共培養之NPC，與對照NPC及單培養NPC相比，顯示CDMP-1及IGF-1表現之顯著的增加(圖13、G~I)。第二型膠原蛋白及聚集蛋白聚醣之表現水平，在與REC共培養之NPC中，顯著地高於對照及單培養NPC，與市售之BMSC共培養之NPC中之表現水平，亦顯著地高於對照及單培養NPC中之表現水平(圖13、J及K)。

【0200】共培養REC中之3個NPC標記全部的表現量，皆顯著地高於對照及單培養REC(圖13、D~F)。CDMP-1、TGF- β 、IGF-1之表現量，共培養REC中與對照及單培養REC相比亦顯著地增加(圖13、G~I)。同樣地，第二型膠原蛋白及聚集蛋白聚醣之表現水平，在共培養REC中顯著地高於對照及單培養REC(圖13、J及K)。

【0201】

2.2. 使用無拘束壓縮試驗之凝膠之彈性分析的結果
埋入UPAL凝膠之REC的效果

為了評估及比較REC-UPAL及UPAL凝膠之力學特性，進行無拘束壓縮試驗(3、15、32、33)。調製2種圓筒狀凝膠樣本(直徑4.5mm、厚度2mm)，計算軸壓縮應力對應變之比(圖14，A～C)。壓縮水平10～20%，UPAL及REC-UPAL凝膠中楊氏模數分別為 $18.0 \pm 3.5 \text{ kPa}$ 及 $18.8 \pm 2.1 \text{ kPa}$ ，2組間力學特性無顯著差異($p=0.6942$)(圖14，D及E)。進而，此等之2個值與正常人類NP組織之值(3、32)同等。

【0202】

2.3. 變性IVD之綿羊模式中之in Vivo試驗的結果

REC與UPAL凝膠之併用提高IVD再生

IVD之再生能力，以凝膠或REC+凝膠之移植後之綿羊模式進行評估(圖15)。綿羊廣為使用於包含活體材料之椎間盤切除後之IVD研究(3、34、35)。將源自14隻綿羊隻56個IVD分成以下之組。

無處置對照組($n=6$ IVD)

椎間盤切除手術組(椎間盤切除組)($n=6$ IVD)

凝膠組($n=8$ IVD)

REC+凝膠組($n=8$ IVD)

【0203】為了製作IVD變性模式，在最初之手術中去除20mg之NP組織(圖15，A及B)、基於預備實驗之結果，設定應去除量為20mg(圖19)。最初之手術4週後(觀察變性變化後)，再度去除NP組織(圖15C)。接著，將UPAL或REC+UPAL溶液移植至IVD缺損，切除第2椎間盤後暴露於102mM之 CaCl_2 使其凝膠化(圖15D)。於移植4週後及24週

後，為了各種分析而採取經移植之腰椎。

【0204】經治療之IVD中之變性變化，使用透過MRI得到之T2加權成像中央矢狀剖面圖像進行評估(圖16A)。為了IVD之形態學分析，為了評估埋入IVD(2、3、15、36～38)及椎間盤高指數(DHI)中之信號的變化，評估Pfirrmann分數及MRI指數。基於Pfirrmann分數，凝膠組之變性分數於第24週顯著地低椎間盤切除手術組，REC+凝膠組之變性分數，第4週及第24週皆顯著地低於椎間盤切除手術組、凝膠組(圖16B)。

【0205】MRI index，於第4週REC+凝膠組較椎間盤切除手術組為顯著高值。於第24週，凝膠組之MRI index顯著地高於椎間盤切除手術組，REC+凝膠組顯著地高於椎間盤切除手術組、凝膠組(圖16C)。

進而，使用MRI圖像測定經治療之IVD之椎間盤高度。於IVD之前方及後方測定椎間盤之高度相對於上部鄰接椎體之高度的比，即DHI。接著，決定相對DHI，即無3個處置組之DHI值相對於處置對照組之DHI值的比(圖20)(4、39)。3個處置組之DHI值，於第4週及第24週兩者，皆顯著地低於無處置對照組之DHI值。埋植4週後3組間雖無顯著差異，但埋植24週後凝膠組之DHI顯著地高於椎間盤切除手術組，REC+凝膠組顯著地高於椎間盤切除手術組、凝膠組(圖16D)。

【0206】組織學分析，使用蘇木精&曙紅(H&E)及番紅-O染色進行。於無處置對照組中之4週及24週兩者，

IVD顯示紡錘形，無NP組織中之纖維性變化，纖維環(AF)為同心結構，以番紅-O均勻地染色。椎間盤切除手術組中，看到顯著的瘢痕組織、纖維性變化、組織缺損、終板之崩壞、破壞(圖17，A、B)，凝膠組之基於修改之Boos'分類(3, 40, 41)判定之組織學變性度，於4週、24週皆顯著地低於椎間盤切除手術組，於4週、24週REC+凝膠組顯著地低於椎間盤切除手術組、凝膠組(圖17C)。

【0207】藉由免疫組織化學法(IHC)評估經治療之IVD中之第二型及第一型膠原蛋白之表現水平(圖18，A及B)。在NP組織中評估隨機選擇之5個視覺化視野中之細胞總數中之第二型及第一型膠原蛋白陽性細胞率(2、3、15)。第二型膠原蛋白為NP組織中之必須的ECM成分，隨著變性之進行，被第一型膠原蛋白取代。第二型膠原蛋白之分析中，NP組織在無處置對照組中雖均勻地被染色，但REC+凝膠組中略有減少。凝膠組中觀察到非染色區域分散存在，椎間盤切除手術組中觀察到廣範圍的非染色區域。第二型膠原蛋白陽性細胞的比例，於4週、24週REC+凝膠組皆顯著地高凝膠組、椎間盤切除手術組，於24週凝膠組顯著地高椎間盤切除手術組(圖18C)。相反地，第一型膠原蛋白陽性細胞的比例，在4週之評估期間REC+凝膠組顯著地低於椎間盤切除手術組，在24週之評估期間顯著地低於椎間盤切除手術組、凝膠組。又，此等細胞的比例，於24週凝膠組顯著地低於椎間盤切除手術組(圖18D)。

【0208】

REC+凝膠注入之對IVD的影響

24週之評估期間中，以無處置對照與 REC+凝膠組之組織學標本分析腫瘤形成。兩組的全標本中，與核分裂一起評估浸潤性增殖，測定二核細胞數與每平方毫米之核仁數。兩組皆未看到浸潤性增殖、核分裂像、核仁。無處置對照組及 REC+凝膠組之二核細胞數分別為 0.03 ± 0.07 及 0.23 ± 0.25 。即，值為 $<1/mm^2$ ，各組間未觀察到顯著差異 ($p=0.3311$)(表 5)。

【 0209】

表5 每平方毫米之2核細胞數		
無處置對照	REC +凝膠	P值
0.03 ± 0.07	0.23 ± 0.25	0.3311

數據為平均值±標準偏差，Welch檢定後，藉由曼-惠特尼U檢定求出P值。

【 0210】

3. 考察

本實施例中，關於細胞增殖能力、細胞尺寸均勻性及細胞表面抗原之表現，與可作為市售品取得之人類 BMSC 相比，顯示 REC 之優異特性。進而，本實施例實證了關於 NPC 標記、成長因子及 ECM 成分之表現水平，與在與市售之 BMSC 之 NPC 之 3D 共培養中所觀察之表現水平相比，在人類 NPC 及 REC 之 3D 共培養中顯著地增加。REC 與 UPAL 凝膠之併用的有效性，以綿羊腰椎模式之 IVD 變性部位觀察。UPAL 凝膠單獨中，雖較椎間盤切除組更抑制 IVD 變性，但 REC 與凝膠之併用更有效地增強 IVD 再生。

【 0211】本實施例中教示，藉由 REC 之與 NPC 之共培

養帶來 REC 之向 NPC 的分化，藉此改善兩者細胞型中之 ECM 成分產生。於兔子中之結果(實施例 1)亦觀察到同樣的結果。即，得知實施例 1 中包埋於 UPAL 凝膠中之 BMSC 的移植後 NPC 標記之表現增加，及與椎間盤切除組相比，BMSC+UPAL 凝膠組中 ECM 之產生增加(2)。

【0212】基於上述結果及以前之研究(2、31、47、48、50~52)的結果，作為藉由包埋於 UPAL 凝膠中之 REC 的移植之成為 IVD 再生基礎的機制，教示以下的可能性。

- 1) REC 包埋於凝膠可移植至 IVD 缺損。
- 2) REC 產生成長因子及 ECM 成分，藉此，活化現有之 NPC(旁泌機制)。
- 3) NPC 產生更多 ECM 及成長因子。
- 4) 作為結果，REC 直接分化成 NPC。
- 5) 最後，REC 及 NPC 具有導致 IVD 再生之正的細胞間反饋環路。

【0213】IVD 修復中使用之活體材料/水凝膠，必須為生物學性及機械性適合者。

本實施例中，由於腰部 IVD 之活體力學與幾何學的配置與人類同等(3,4,34)，故選擇用以將候補水凝膠移植至前臨床動物模式的綿羊腰椎模式。本發明者們，至今，埋入椎間盤切除後之綿羊腰部 IVD 的 UPAL 凝膠顯示適當的活體力學特性，顯示不發生材料之突出，不需要椎間盤切除後之 AF 之縫合(3)。本實施例中，無拘束壓縮試驗表明 UPAL 組與 REC-UPAL 組之間的楊氏模數無顯著差異，且顯

示埋入 UPAL 凝膠之 REC 未改變凝膠之力學特性。由於提供迅速治癒的決定性能力，UPAL 凝膠與 REC 之組合，在不縫合 AF 而防止細胞漏出之點上提供臨床性優點。

【0214】經移植 UPAL 凝膠之(及未移植之)動物中之 MRI 及組織學評估，顯示 UPAL 凝膠單獨之移植後抑制 IVD 變性。進而，REC 與 UPAL 凝膠之組合，與 UPAL 凝膠單獨相比，進一步有效地防止變性。又，無處置組與 REC+凝膠組之間二核細胞數無顯著差異，教示 REC 與凝膠之組合不會誘導腫瘤形成。進而，IHC 之結果，教示 REC 與凝膠之併用增強正常 IVD 之機能所需的 ECM 合成，藉由抑制第一型膠原蛋白的產生抑制 IVD 變性之進行。此等之結果，與使用 IVD 變性之兔子模式所得之結果(實施例 1)一致，實證了包埋於 UPAL 凝膠中之 BMSC 更有效地抑制變性(2)。實施例 1 中顯示，與受到透過 AF 針穿刺製作變性 IVD 之椎間盤切除的動物相比，BMSC+UPAL 凝膠移植後之變性之組織學惡性度分數較低。這教示 BMSC 移植招致 IVD 再生(2)。總結來說，本發明者們之研究結果，顯示包埋於 UPAL 凝膠中之 REC 的移植增強在 *in vivo* 之 IVD 再生(2)。

【0215】

實施例 4 中之參照文獻

1. J. N. Katz, Lumbar disc disorders and low-back pain: Socioeconomic factors and consequences. J. Bone Joint Surg. Am. 88, 21-24 (2006).
2. D. Ukeba, H. Sudo, T. Tsujimoto, K. Ura, K. Yamada, N. Iwasaki, Bone marrow mesenchymal stem cells combined with ultra-purified alginate gel as a regenerative therapeutic strategy after discectomy for deg

- enerated intervertebral discs. EBioMedicine 53, 102698 (2020).
3. T. Tsujimoto, H. Sudo, M. Todoh, K. Yamada, K. Iwasaki, T. Ohnishi, N. Hirohama, T. Nonoyama, D. Ukeba, K. Ura, Y. M. Ito, N. Iwasaki, An acellular bioresorbable ultra-purified alginate gel promotes intervertebral disc repair: A preclinical proof-of-concept study. EBioMedicine 37, 521-534 (2018).
 4. S. R. Sloan Jr, C. Wipplinger, S. Kirnaz, R. Navarro-Ramirez, F. Schmidt, D. McCloskey, T. Pannellini, A. Schiavinato, R. Hartl, I. J. Bonassar, Combined nucleus pulposus augmentation and annulus fibrosus repair prevents acute intervertebral disc degeneration after discectomy. Sci. Transl. Med. 12, eaay2380 (2020).
 5. P. Heindel, A. Tuchman, P. C. Hsieh, M. H. Pham, A. D'Oro, N. N. Patel, A. M. Jakoi, R. Hah, J. C. Liu, Z. Buser, J. C. Wang, Reoperation rates after single-level lumbar discectomy. Spine 42, E496-E501 (2017).
 6. J. Sherman, J. Cauthen, D. Schoenberg, M. Burns, N. L. Reaven, S. L. Griffith, Economic impact of improving outcomes of lumbar discectomy. Spine J. 10, 108-116 (2010).
 7. P. Kambin, L. F. Cohen, M. Brooks, J. L. Schaffer, Development of degenerative spondylosis of the lumbar spine after partial discectomy. Comparison of laminotomy, discectomy, and posterolateral discectomy. Spine 20, 599-607 (1995).
 8. D. Oehme, P. Ghosh, S. Shimmon, J. Wu, C. McDonald, J. M. Troupis, T. Goldschlager, J. V. Rosenfeld, G. Jenkin, Mesenchymal progenitor cells combined with pentosan polysulfate mediating disc regeneration at the time of microdiscectomy: a preliminary study in an ovine model. J. Neurosurg. Spine 20, 657-669 (2014).
 9. S. M. Naqvi, C. T. Buckley, Differential response of encapsulated nucleus pulposus and bone marrow stem cells in isolation and coculture in alginate and chitosan hydrogels. Tissue Eng. Part A 21, 288-99 (2015).
 10. D. C. Noriega, F. Ardura, R. Hernandez-Ramajo, M.A. Martin-Ferrer

- o, I. Sanchez-Lite, B. Toribio, M. Alberca, V. Garcia, J. M. Moraleda, A. Sanchez, J. Garcia-Sancho, Intervertebral disc repair by allogeneic mesenchymal bone marrow cells: A randomized controlled trial. *Transplantation* 101, 1945-1951 (2017).
11. R. D. Bowles, H. H. Gebhard, R. Hartl, L. J. Bonassar, Tissue-engineered intervertebral discs produce new matrix, maintain disc height, and restore biomechanical function to the rodent spine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 13106-13111 (2011).
12. P. A. Revell, E. Damien, L. Di Silvio, N. Gaurav, C. Longinotti, L. Ambrosio, Tissue engineered intervertebral disc repair in the pig using injectable polymers. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18, 303-308 (2007).
13. I. Hussain, S. R. Sloan, C. Wipplinger, R. Navarro-Ramirez, M. Zubkov, E. Kim, S. Kirnaz, L. J. Bonassar, R. Hartl, Mesenchymal stem cell-seeded high-density collagen gel for annular repair: 6-week results from in vivo sheep models. *Neurosurgery* 85, E350-E359 (2018).
14. B. Pennicooke, I. Hussain, C. Berlin, S. R. Sloan, B. Borde, Y. Moriguchi, G. Lang, R. Navarro-Ramirez, J. Cheetham, L. J. Bonassar, R. Hartl, Annulus fibrosus repair using high-density collagen gel: An in vivo ovine model. *Spine* 43, E208-E215 (2018).
15. D. Ukeba, K. Yamada, T. Tsujimoto, K. Ura, T. Nonoyama, N. Iwasaki, H. Sudo, Bone marrow aspirate concentrate combined with in situ forming bioresorbable gel enhances intervertebral disc regeneration in rabbits. *J. Bone Joint Surg. Am.* 103, e31 (2021).
16. K. Ura, K. Yamada, T. Tsujimoto, D. Ukeba, N. Iwasaki, H. Sudo, Ultra-purified alginate gel implantation decreases inflammatory cytokine levels, prevents intervertebral disc degeneration, and reduces acute pain after discectomy. *Sci. Rep.* 11, 638 (2021).
17. A. J. Friedenstein, U. F. Deriglasova, N. N. Kulagina, A. F. Panasuk, S. F. Rudakowa, E. A. Luria, I. A. Ruadkow, Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* 2, 83-92 (1974).

18. Y. Mabuchi, S. Morikawa, S. Harada, K. Niibe, S. Suzuki, F. Renault-Mihara, D. D. Houlihan, C. Akazawa, H. Okano, Y. Matsuzaki, *LNDR(+)*THY-1(+)*VCAM-1*(hi+) cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rep.* 1, 152-165 (2013).
19. M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, D. R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 14-147 (1999).
20. J. Kim, J. W. Kang, J. H. Park, Y. Choi, K. S. Choi, K. D. Park, D. H. Baek, S. K. Seong, H.K. Min, H. S. Kim, Biological characterization of long-term cultured human mesenchymal stem cells. *Arch. Pharm. Res.* 32, 117-126 (2009).
21. W. J. C. Rombouts, R. E. Ploemacher, Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 17, 160-170 (2003).
22. C. 棕, C. McKee, S. Bakshi, K. Walker, E. Hakman, S. Halassy, D. Svinarich, R. Dodds, C. K. Govind, G. R. Chaudhry, Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 13, 1738-1755 (2019).
23. T. Squillaro, G. Peluso, U. Galderisi, Clinical trials with mesenchymal stem cells: An update. *Cell Transplant.* 25, 829-848 (2016).
24. S. Morikawa, Y. Mabuchi, Y. Kubota, Y. Nagai, K. Niibe, E. Hiratsu, S. Suzuki, C. M.-Hara, N. Nagoshi, T. Sunabori, S. Shimmura, A. Miyawaki, T. Nakagawa, T. Suda, H. Okano, Y. Matsuzaki, Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J. Exp. Med.* 11, 2483-2496 (2009).
25. D. D. Houlihan, Y. Mabuchi, S. Morikawa, K. Niibe, D. Araki, S. Suzuki, H. Okano, Y. Matsuzaki, Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of *Sca-1* and *PDGFR- α* . *Nat. Protoc.* 7, 2103-2111 (2012).
26. Y. Mabuchi, Y. Matsuzaki, Prospective isolation of resident adult

- human mesenchymal stem cell population from multiple organs. *Int. J. Hematol.* 103, 138-144 (2016).
27. S. Harada, Y. Mabuchi, J. Kohyama, D. Shimojo, S. Suzuki, Y. Kawamura, D. Araki, T. Suyama, M. Kajikawa, C. Akazawa, H. Okano, Y. Matsuzaki, FZD5 regulates cellular senescence in human mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells* 39, 318-330 (2021).
28. K. Yamada, K. Maeda, Y. M. Ito, F. Inage, T. Isoe, N. Yokota, O. Sugita, N. Sato, K.K. Tha, N. Iwasaki, H. Sudo, Exploratory clinical trial on the safety and capability of dMD-001 in lumbar disc herniation: Study protocol for a first-in-human pilot study. *Contemp Clin Trials Commun.* 23, 100805 (2021).
29. M. Sato, K. Uchida, H. Nakajima, T. Miyazaki, A. R. Guerrero, S. Watanabe, S. Roberts, H. Baba, Direct transplantation of mesenchymal stem cells into the knee joints of Hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 14, R31 (2012).
30. M. V. Risbud, Z. R. Schoepflin, F. Mwale, R. A. Kandel, S. Grad, J. C. Iatridis, D. Sakai, J. A. Hoyland, Defining the phenotype of young healthy nucleus pulposus cells: recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 annual ORS meeting. *J Orthop. Res.* 33, 283-293 (2015).
31. S. Strassburg, S. M. Richardson, A. J. Freemont, J. A. Hoyland. Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype. *Regen. Med.* 5, 701-711 (2010).
32. J. C. Iatridis, M. Weidenbaum, L. A. Setton, V. C. Mow, Is the nucleus pulposus a solid or a fluid? Mechanical behaviors of the nucleus pulposus of the human intervertebral disc. *Spine* 21, 1174-1184 (1996).
33. Y. Zeng, C. Chen, W. Liu, Q. Fu, Z. Han, Y. Li, S. Feng, X. Li, C. Qi, J. Wu, D. Wang, C. Corbett, B. P. Chan, D. Ruan, Y. Du, Injectable microcryogels reinforced alginate encapsulation of mesenchymal stromal cells for leak-proof delivery and alleviation of canine disc de

- generation. *Biomaterials* 59, 53-65 (2015).
34. S. Reitmaier, H. Schmidt, R. Ihler, T. Kocak, N. Graf, A. Ignatius, H.-J. Wilke, Preliminary investigations on intradiscal pressures during daily activities: an in vivo study using the merino sheep. *PLoS One* 8, e69610 (2013).
35. A. A. Hegewald, F. Medved, D. Feng, C. Tsagogiorgas, A. Beierfuß, G. A. Schindler, M. Trunk, C. Kaps, D. S. Mern, C. Thome, Enhancing tissue repair in annulus fibrosus defects of the intervertebral disc : Analysis of a bio-integrative annulus implant in an in-vivo ovine model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 9, 405-414 (2015).
36. C. W. Pfirrmann, A. Metzdorf, M. Zanetti, J. Hodler, N. Boos, Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine* 26, 1873-1878 (2001).
37. H. Sudo, A. Minami, Caspase 3 as a therapeutic target for regulation of intervertebral disc degeneration in rabbits. *Arthritis Rheum.* 63, 1648-1657 (2011).
38. K. Ura, H. Sudo H, K. Iwasaki, T. Tsujimoto T, D. Ukeba, N. Iwasaki N, Effects of intradiscal injection of local anesthetics on intervertebral disc degeneration in rabbit degenerated intervertebral disc. *J. Orthop. Res.* 37, 1963-1971 (2019).
39. D.S. Lu, Y. Shono, I. Oda, K. Abumi, K. Kaneda, Effects of chondroitinase ABC and chymopapain on spinal motion segment biomechanics. A n in vivo biomechanical, radiologic, and histologic canine study. *Spine* 22, 1828-1834 (1997).
40. N. Boos, S. Weissbach, H. Rohrbach, C. Weiler, K. F. Spratt, A. G. Nerlich, Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science. *Spine* 27, 2631-2644 (2002).
41. S. Reitmaier, L. Kreja, K. Gruchenberg, B. Kanter, J. Silva-Correia, J. M. Oliveira, R. L. Reis, V. Perugini, M. Santin, A. Ignatius, H. J. Wilke, In vivo biofunctional evaluation of hydrogels for disc regeneration. *Eur. Spine J.* 23, 19-26 (2014).

42. H. Wang, Y. Zhou, B. Huang, L.-T. Liu, M.-H. Liu, J. Wang, C.-Q. Li, Z.-F. Zhang, T.-W. Chu, C.-J. Xiong, Utilization of stem cells in alginate for nucleus pulposus tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* 20, 908-920 (2014).
43. F. Wang, L.-P. Nan, S.-F. Zhou, Y. Liu, Z.-Y. Wang, J.-C. Wang, X.-M. Feng, L. Zhang, Injectable hydrogel combined with nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells for the treatment of degenerative intervertebral disc in rats. *Stem Cells Int.* 2019, 8496025 (2019).
44. G. W. Omlor, S. Lorenz, A. G. Nerlich, T. Guehring, W. Richter, Disc cell therapy with bone marrow-derived autologous mesenchymal stromal cells in a large porcine disc degeneration model. *Eur. Spine J.* 27, 2639-2649 (2018).
45. M. Dominici, K. L. Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy* 8, 315-317 (2006).
46. C. M. Raynaud, M. Maleki, R. Lis, B. Ahmed, I. Al-Azwani, J. Malek, F. F. Safadi, A. Rafii, Comprehensive characterization of mesenchymal stem cells from human placenta and fetal membrane and their response to osteoactivin stimulation. *Stem Cells Int.* 2012, 658356 (2012).
47. Y. Yamamoto, J. Mochida, D. Sakai, T. Nakai, K. Nishimura, H. Kawada, T. Hotta, Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow-derived stromal cells: significance of direct cell-to-cell contact in coculture system. *Spine* 29, 1508-1514 (2004).
48. S.-H. Yang, C.-C. Wu, T. T.-F. Shih, Y.-H. Sun, F.-H. Lin, In vitro study on interaction between human nucleus pulposus cells and mesenchymal stem cells through paracrine stimulation. *Spine* 33, 1951-1957 (2008).
49. A. Ouyang, A. E. Cerchiari, X. Tang, E. Liebenberg, T. Alliston, Z. J. Gartner, J. C. Lotz, Effects of cell type and configuration on anabolic and catabolic activity in 3D co-culture of mesenchymal stem

- cells and nucleus pulposus cells. *J. Orthop. Res.* 35, 61-73 (2017).
50. M. V. Risbud, T. J. Albert, A. Guttapalli, E. J. Vresilovic, A. S. Hillibrand, A. R. Vaccaro, I. M. Shapiro, Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: implications for cell-based transplantation therapy. *Spine* 29, 2627-2632 (2004).
51. S. M. Richardson, R. V. Walker, S. Parker, N. P. Rhodes, J. A. Hunt, A. J. Freemont, J. A. Hoyland, Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells* 24, 707-716 (2006).
52. D. Sakai, J. Mochida, T. Iwashina, T. Watanabe, T. Nakai, K. Ando, T. Hotta, Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: Potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration. *Spine* 30, 2379-2387 (2005).
53. T. J. DiStefano, J. O. Shmukler, G. Danias, J. C. Iatridis, The functional role of interface tissue engineering in annulus fibrosus repair: bridging mechanisms of hydrogel integration with regenerative outcomes. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6, 6556-6586 (2020).
54. T. C. Schmitz, E. Salzer, J. F. Crispim, G. T. Fabra, C. LeVisage, A. Pandit, M. Tryfonidou, C. L. Maitre, K. Ito, Characterization of biomaterials intended for use in the nucleus pulposus of degenerated intervertebral discs. *Acta Biomater.* 114, 1-15 (2020). 573

[實施例 5]

【 0216 】

大鼠椎間盤髓核缺損模式中之海藻酸鈉及間葉系幹細胞的填補所致之炎症抑制及疼痛抑制效果

1. 大鼠椎間盤穿刺變性模式之製作

大鼠椎間盤穿刺變性模式 (Mohd Isa et al. *Sci Adv* 2018) 使用於被驗物質投予的實驗 (IHC 分析、組織學分

析、疼痛關連行動分析)。將合計60隻的12週齡雌SD大鼠(260~300 g)，隨機分配成僅皮膚切開之組(sham組)、僅椎間盤穿刺之組(punch組)、椎間盤穿刺後埋植UPAL之組(UPAL組)、椎間盤穿刺後埋植UPAL與REC之組(REC組)(n=3，各時間點、各組)。藉由吸入5%異氟醚(isoflurane)導入麻醉後，藉由K他命與米托咪啉(medetomidine)之混合物(K他命：米托咪啉=75 mg/kg：0.5 mg/kg)的腹腔內注射維持麻醉。以使用鉗子之尾部捏掐試驗確認麻醉深度後，切開Co4/5~5/6之背側皮膚。剝離結締組織露出Co4/5~5/6，使用19G針將Co4/5~5/6之椎間盤損傷(徑1 mm、深度2 mm)。

【0217】Gel組、REC組中，將經乾燥之纖維狀之UPAL(400~600mPa/s, Mochida Pharma Co. Ltd., Tokyo, Japan)溶解於生理食鹽水(0.9%, Otsuka)調製成2%(w/v)，使用附有26G針之微注射器(Hamilton)將4 µl之UPAL溶液以與穿刺部不同之路徑注入椎間盤內中心部。REC組將濃度設定為 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。以生理食鹽水洗淨手術部位，將筋膜、結締組織、皮膚縫合關閉。

【0218】

2. 免疫組織學評估

實施大鼠椎間盤之免疫組織學評估，檢測術後1、4、7及28日後之TNF- α 、IL-6及TrkA陽性細胞。藉由異氟醚吸入使大鼠(各時間點、各組n=3)深度麻醉，以頸椎脫臼使其安樂死。

【0219】外科性摘除尾巴全體(Co4/5～5/6)，無菌條件下去除軟組織僅採取尾椎與椎間盤。採取之椎間盤係以4%(w/v)聚甲醛固定(室溫下48小時)，包埋於石蠟。於椎間盤中央將檢體橫切，得到冠狀面中央之橫剖面切片(厚度5 μ m)。以二甲苯將切片脫蠟化後，於蛋白酶K(Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)中培養(37℃、15分鐘)。接著，以1%過氧化氫甲醇(w/v)阻斷(37℃、30分鐘)，於2%(w/v)牛血清白蛋白中培養(室溫、30分鐘)後，於4℃與一次抗體培養一晚。使用抗TNF- α 小鼠單株抗體(ab220210, Abcam)、抗IL-6小鼠單株抗體(ab9324, Abcam)、抗TrkA兔子單株抗體(ab86474, Abcam)。

【0220】關於顯色，TNF- α 分析中使用Histofine(註冊商標)固紅(Fast Red)II(Nichirei Bioscience)，IL-6分析中使用HistoGreen Substrate kit for Peroxidase(Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan)，TrkA分析中使用Histofine(註冊商標)DAB(Nichirei Bioscience)。在提升視認性之目的下進行細胞核之對比染色，分別於TNF- α 或TrkA染色中使用蘇木精，IL-6染色中使用固紅。使用光學顯微鏡(Olympus, Tokyo, Japan)，各別以隨機選擇之5視野計算TNF- α 、IL-6或TrkA陽性細胞的數，將各染色中之陽性髓核或纖維環細胞數，以視野中之相對於全髓核或纖維環細胞數之百分率計算。全評估，藉由盲測化之2人獨立的觀察者進行。各觀察者，對於1檢體實施3次的評估算出每檢體之平均值，進行各組間之比較。

【 0221】

3. 組織學評估

評估術後28日之椎間盤組織變性。將大鼠(n=3)以與免疫組織學評估相同的方法使其安樂死，採取椎間盤。採取之椎間盤以4%(w/v)聚甲醛(paraformaldehyde)固定48小時，以Kristensen脫鈣液脫鈣2週後，以自來水洗淨24小時，進行石蠟包埋(Mohd Isa et al. Sci Adv 2018)。為了使用大鼠椎間盤之矢狀面正中標本(厚度5 μ m)評估組織學分數(Rutges et al. Osteoarth Carti 2013)，以蘇木精 & 伊紅、番紅O，或亞里西安藍(Arcian blue)(AB)染色。AB染色雖與分數無直接關係，但由於為適於細胞外基質評估之染色故作為輔助目的來實施。全部的評估，藉由盲測化之2人獨立的觀察者進行。各觀察者，對於1檢體實施3次的評估算出個體之平均值後，比較各組間。

【 0222】

4. 疼痛關連行動分析

將免疫組織學評估中至術後第28日存活之大鼠12隻(各組n=3)，及組織學分析中使用之大鼠12隻(各組n=3)之合計24隻大鼠(各組n=6)使用於疼痛關連行動分析。對全大鼠實施Hargreaves、von Frey、閃尾疼痛(tail flick)試驗。各試驗之24小時前及試驗開始前，使各大鼠個別在試驗環境度過20分鐘使其習慣環境。全部的試驗，藉由盲測化之同一檢者進行。各大鼠進行複數次測定算出平均值，各組間比較所得結果。

【 0223 】

4.1 Hargreaves 試驗

Hargreaves 試驗，係使用 Hargreaves 試驗裝置 (Ugo Basile Biological Instruments、Gemonio、Italy)，於術前第 2 日 (Day-2) 與術後第 2、7、14、27 日實施 (Mohd Isa et al. Sci Adv 2018)。將大鼠放入在玻璃板 (Ugo Basile Biological Instruments) 上四方及上方圍起來的個別小房間 (上方有空氣孔)。作為熱刺激於皮膚切開部之腹側照射紅外線光束。記錄至顯示對熱刺激之逃避行動的潛時 (latency)。光束強度設定為最大輸出之 50%。在防止組織損傷之目的下，將截止時間設定為 20 秒。同一大鼠中雖於各時間點實施 4 次測定，但各測定間至少隔著 1 分鐘的休息。

【 0224 】

4.2 von Frey 試驗

von Frey 試驗，係使用動態腳底刺痛測定儀 (dynamic plantar aesthesiometer) (Ugo Basile Biological Instruments)，於術前第 2 日 (Day-2) 與術後第 2、7、14、27 日實施。於金屬網上設置與 Hargreaves 試驗中所使用的相同的小房間中放入大鼠。將直徑 0.5 mm 之纖維接觸皮膚切開部之腹側，耗費 10 秒施加自 0 g 開始至 5 g 為止之線性增加的力，之後以恆定的力施加 5 g 之力直至試驗開始 30 秒後。紀錄至大鼠顯示任何的逃避行動的潛時。同一大鼠中雖於各時間點實施 5 次測定，但各測定間至少隔著 10 秒鐘的休息。

【 0225】

4.3 閃尾疼痛試驗

閃尾疼痛試驗使用熱通量輻射計(heat flux radiometer)(Ugo Basile Biological Instruments公司製)進行。為了避免因與Hargreaves試驗同一日程施行而過度熱刺激導致的組織損傷，於術前第1日(Day-1)與術後第3、8、15、28日實施(Mohd Isa et al. Sci Adv 2018)。將各大鼠以毛巾包裹之狀態使其平靜10分鐘後，身體以毛巾覆下將僅尾巴放置於裝置上，對自尾巴遠端靠近5cm之腹側照射紅外線光束。紀錄至對於熱刺激之甩尾反應的潛時。在防止組織損傷的目的下，將截止時間設定為20秒。同一大鼠中雖於各時間點實施4次測定，但各測定間至少隔著15秒鐘的休息。

【 0226】

5. 統計分析

全部的數據以平均 $\pm$ 標準誤差(SE)標記。多組間比較中使用one-way ANOVA。2組比較中使用未配對學生t檢定。所有ANOVA之結果，使用Tukey-Kramer事後檢定或Kruskal-Wallis檢定進一步評估。關於差，5%之顯著性水準視為具有統計學的顯著性($P < 0.05$)。

【 0227】

6. 結果

埋植UPAL與REC之組(REC組)中，可確認到疼痛抑制效果。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種椎間盤再生用組成物，其含有海藻酸之1價金屬鹽與間葉系幹細胞。

【請求項2】如請求項1之組成物，其透過間葉系幹細胞所致之髓核細胞之活化及/或間葉系幹細胞之向髓核細胞之分化，促進椎間盤之髓核再生。

【請求項3】如請求項1或2之組成物，其中前述間葉系幹細胞為源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞。

【請求項4】如請求項3之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之高速增殖性間葉系幹細胞株的細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

(a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下、

(b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

【請求項5】如請求項3或4之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係以LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性為指標進行分離之高速增殖性間葉系幹細胞株的細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

(a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下、

(b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

【請求項6】如請求項1～5中任一項之組成物，其施用於對象之椎間盤，以於施用後使交聯劑接觸組成物之表

面的至少一部分之方式使用，且該施用時具有流動性。

【請求項7】如請求項6之組成物，其係用來施用於椎間盤之髓核部位。

【請求項8】如請求項7之組成物，其中對前述髓核部位之施用，為對髓核缺損部之前述組成物的填充。

【請求項9】如請求項6～8中任一項之組成物，其中前述交聯劑為2價以上之金屬離子化合物。

【請求項10】如請求項1～9中任一項之組成物，其中前述海藻酸之1價金屬鹽為低內毒素海藻酸1價金屬鹽。

【請求項11】如請求項1～10中任一項之組成物，其中前述海藻酸之1價金屬鹽，藉由GPC-MALS法測定之重量平均分子量(絕對分子量)為8萬以上。

【請求項12】如請求項1～11中任一項之組成物，其中海藻酸之1價金屬鹽的濃度為0.5w/w%～5.0w/w%。

【請求項13】如請求項1～12中任一項之組成物，其係使用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防或抑制復發。

【請求項14】如請求項13之組成物，其中前述椎間盤變性及/或椎間盤損傷，為選自由椎間盤突出、椎間盤疾病、脊椎退化性滑脫症、化膿性椎間盤炎、變形性脊椎疾病、脊椎狹窄症，及椎間盤損傷所成群組中之至少1種。

【請求項15】一種用以以具有流動性之狀態施用於對象之椎間盤髓核部位的椎間盤再生用組成物，其係包含海藻酸之1價金屬鹽與源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞

之椎間盤再生用組成物。

【請求項16】如請求項15之椎間盤再生用組成物，其係在以具有流動性之狀態施用於對象之椎間盤髓核部位後，不使交聯劑接觸該組成物來使用。

【請求項17】如請求項15或16之組成物，其透過前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞所致之髓核細胞之活化及/或前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞之向髓核細胞之分化，促進椎間盤之髓核再生。

【請求項18】如請求項15～17中任一項之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，於施用時為未分化狀態及/或無誘導分化之處置下來施用。

【請求項19】如請求項15～18中任一項之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性之高速增殖性間葉系幹細胞株的細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

(a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下、

(b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

【請求項20】如請求項15～19中任一項之組成物，其中前述源自人類骨髓之高純度間葉系幹細胞，係以LNGFR(CD271)為陽性，或LNGFR(CD271)及Thy-1(CD90)為共陽性為指標進行分離之高速增殖性間葉系幹細胞株的細胞集團，且為滿足以下(a)及(b)之至少1個特徵之細胞集團：

(a)流式細胞儀之前向散射光的變異係數為40%以下、

(b)平均細胞尺寸為20 μ m以下。

【請求項21】如請求項15～20中任一項之組成物，其中前述海藻酸之1價金屬鹽為低內毒素海藻酸1價金屬鹽。

【請求項22】如請求項15～21中任一項之組成物，其中前述海藻酸之1價金屬鹽，藉由GPC-MALS法測定之重量平均分子量(絕對分子量)為8萬以上。

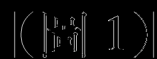
【請求項23】如請求項15～22中任一項之組成物，其中前述海藻酸之1價金屬鹽的濃度為0.5w/w%～5.0w/w%。

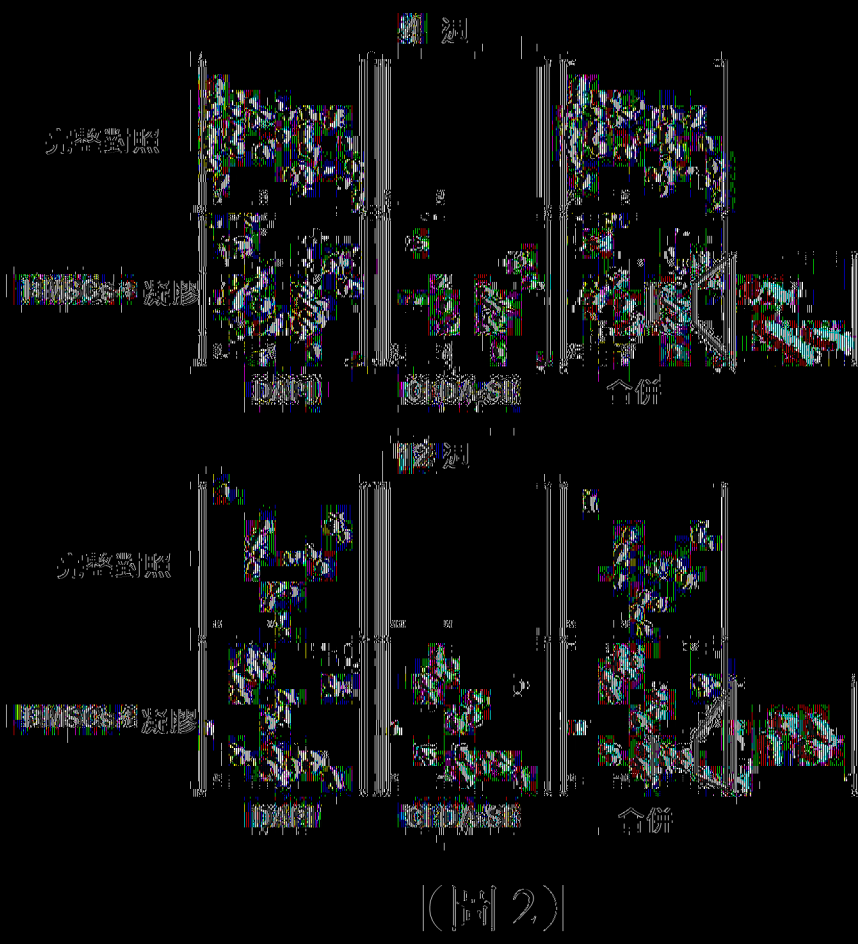
【請求項24】如請求項15～23中任一項之組成物，其係使用於椎間盤變性及/或椎間盤損傷之治療、預防或抑制復發。

【請求項25】如請求項24之組成物，其中前述椎間盤變性及/或椎間盤損傷，為選自由椎間盤突出、椎間盤疾病、脊椎退化性滑脫症、化膿性椎間盤炎、慢性腰痛、變形性脊椎疾病、脊椎狹窄症、腰部脊椎狹窄症、腰部脊椎狹窄症所伴隨之椎間盤突出(混合性腰部脊椎狹窄症)及椎間盤損傷所成群組中之至少1種。

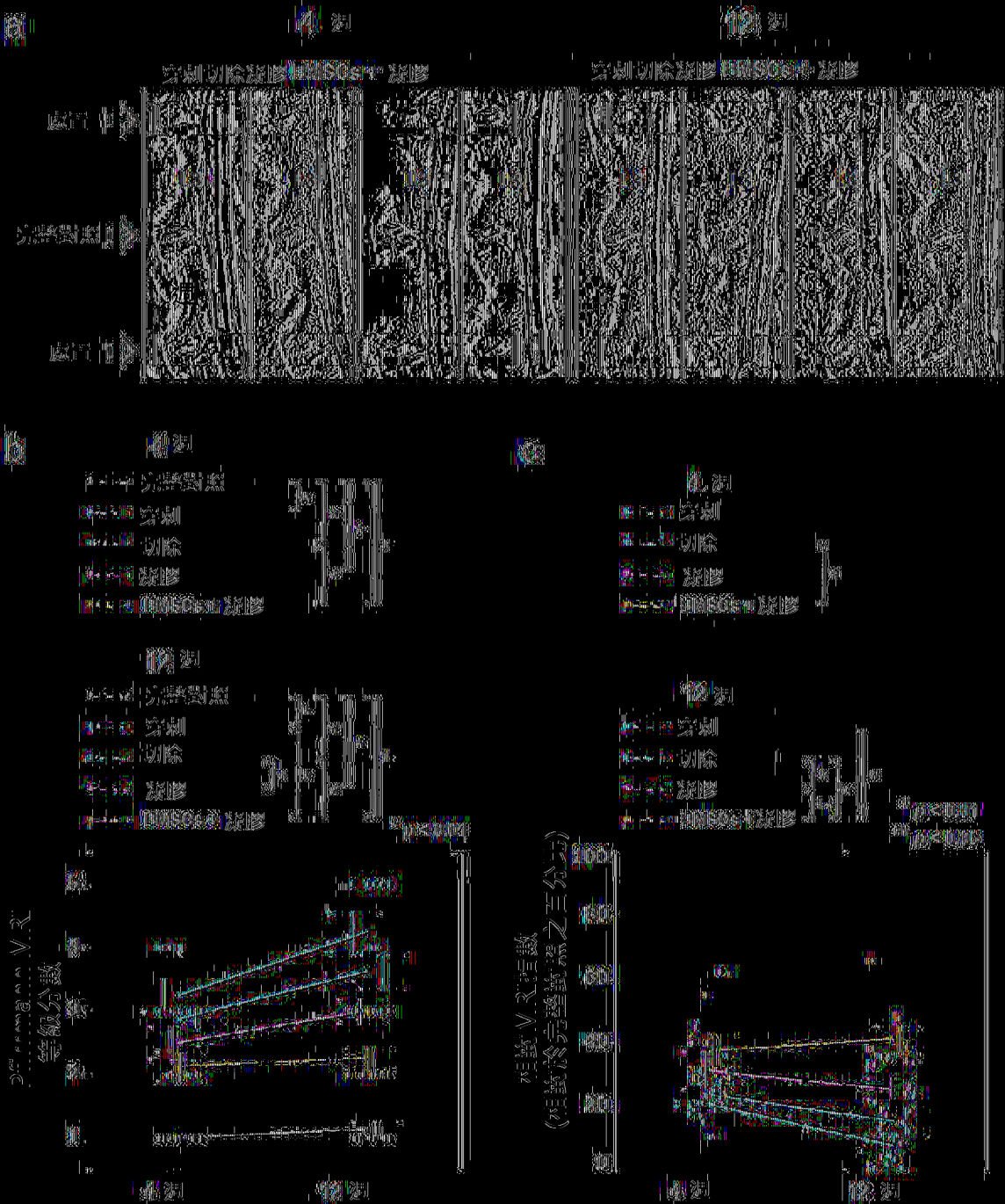
【請求項26】如請求項24或25之組成物，其中前述椎間盤變性及/或椎間盤損傷伴隨著慢性腰痛。

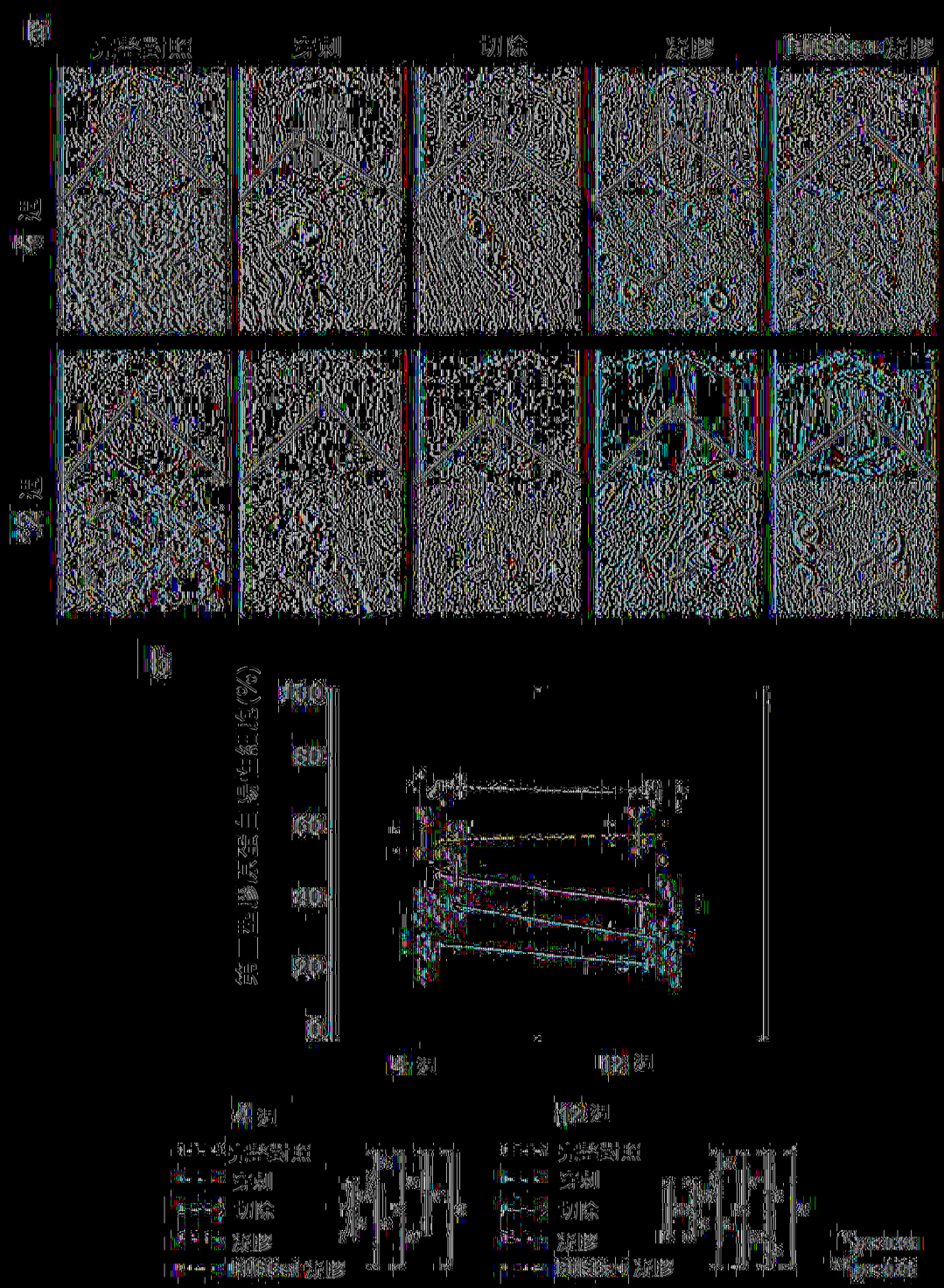
【請求項27】如請求項15～23中任一項之組成物，其使用於抑制椎間盤性疼痛。



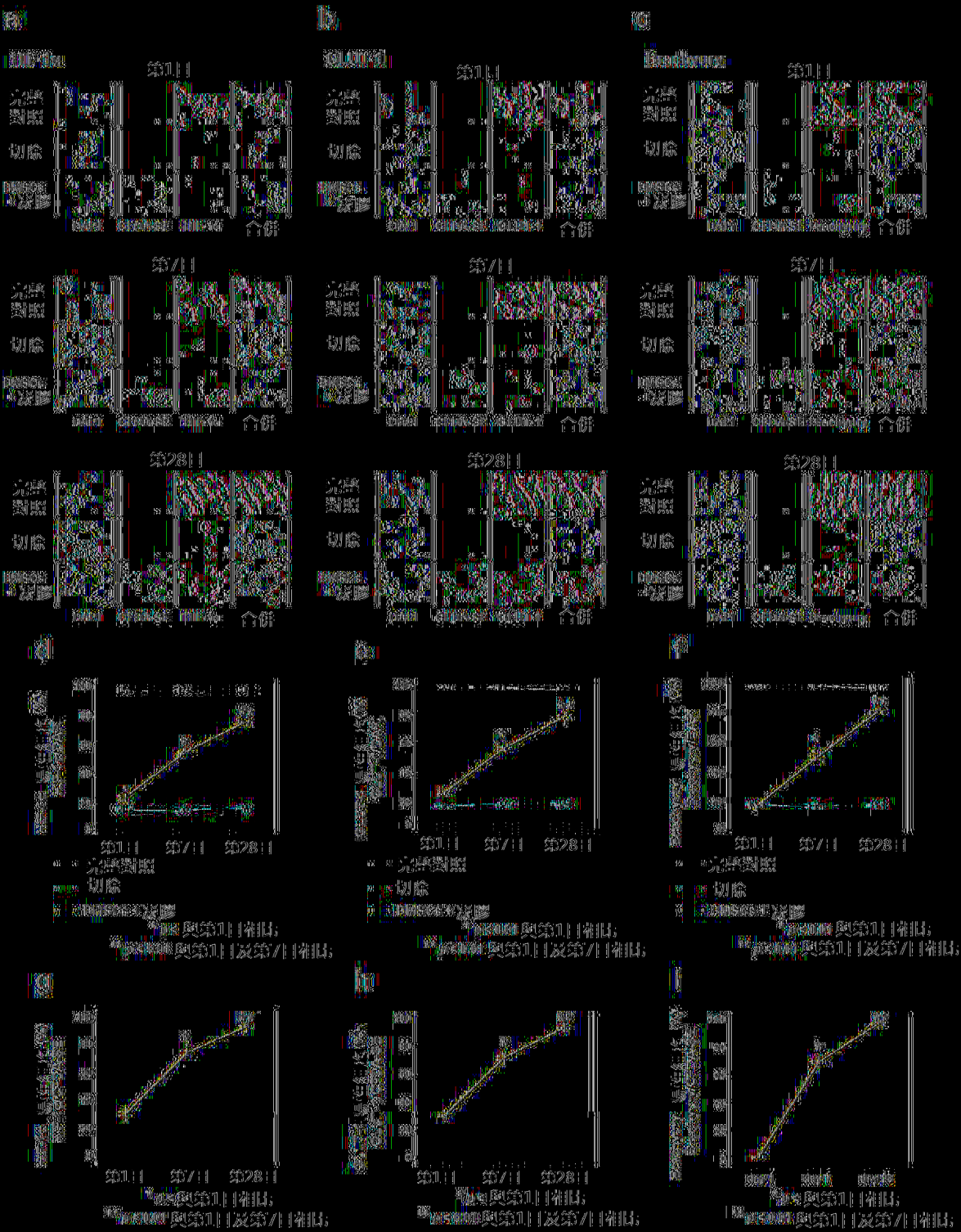


(Figure 2)

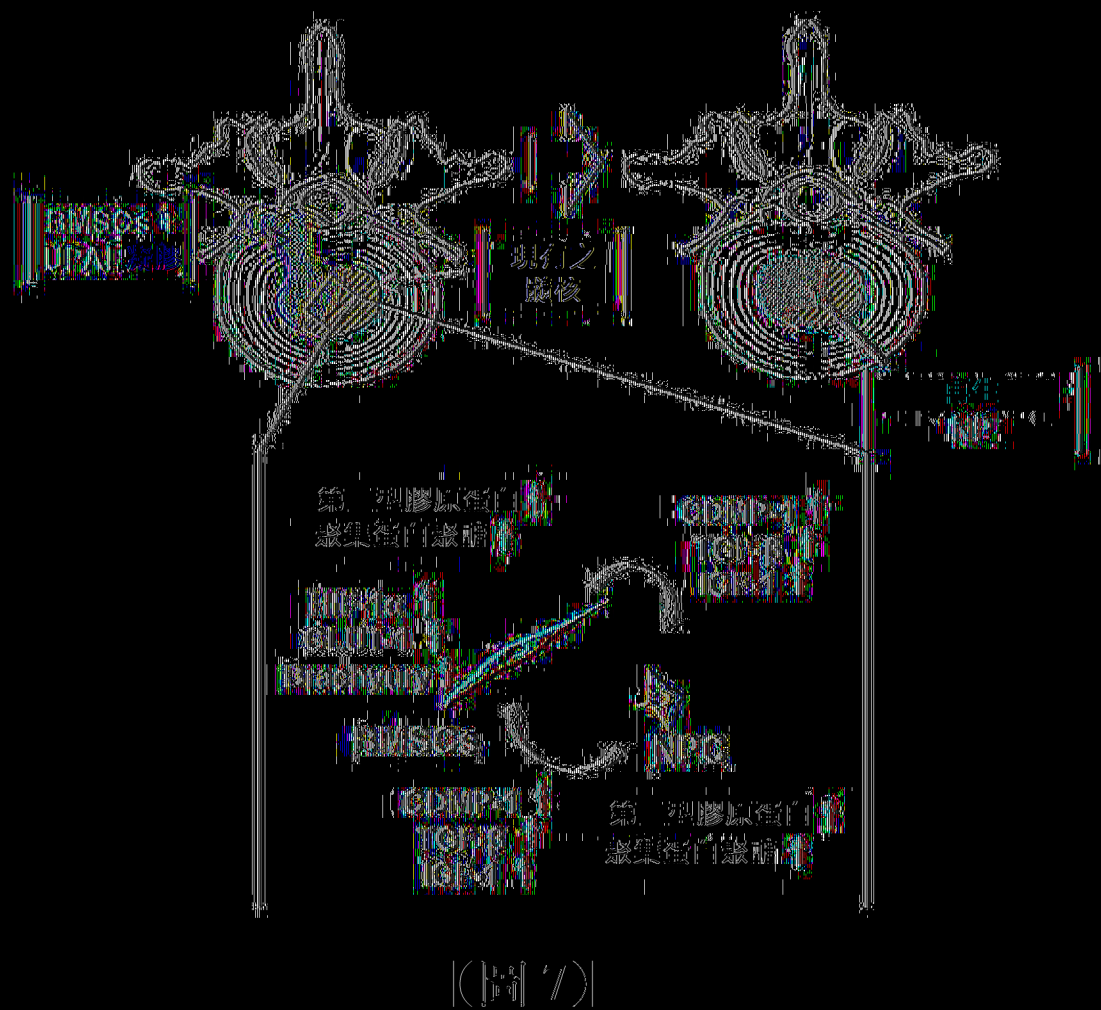

$$\left| \left(\begin{array}{c} \mathbb{F}_q \\ \mathbb{F}_q \end{array} \right) \right| 3$$



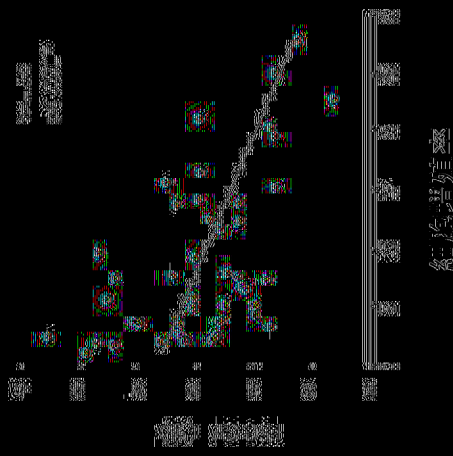
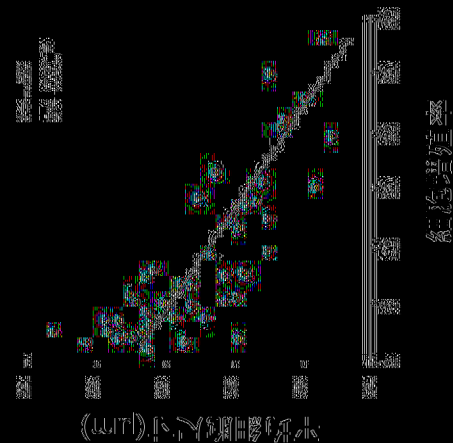
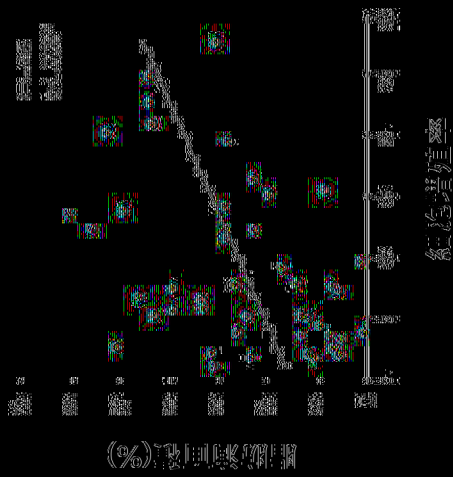
|(圖 5)|



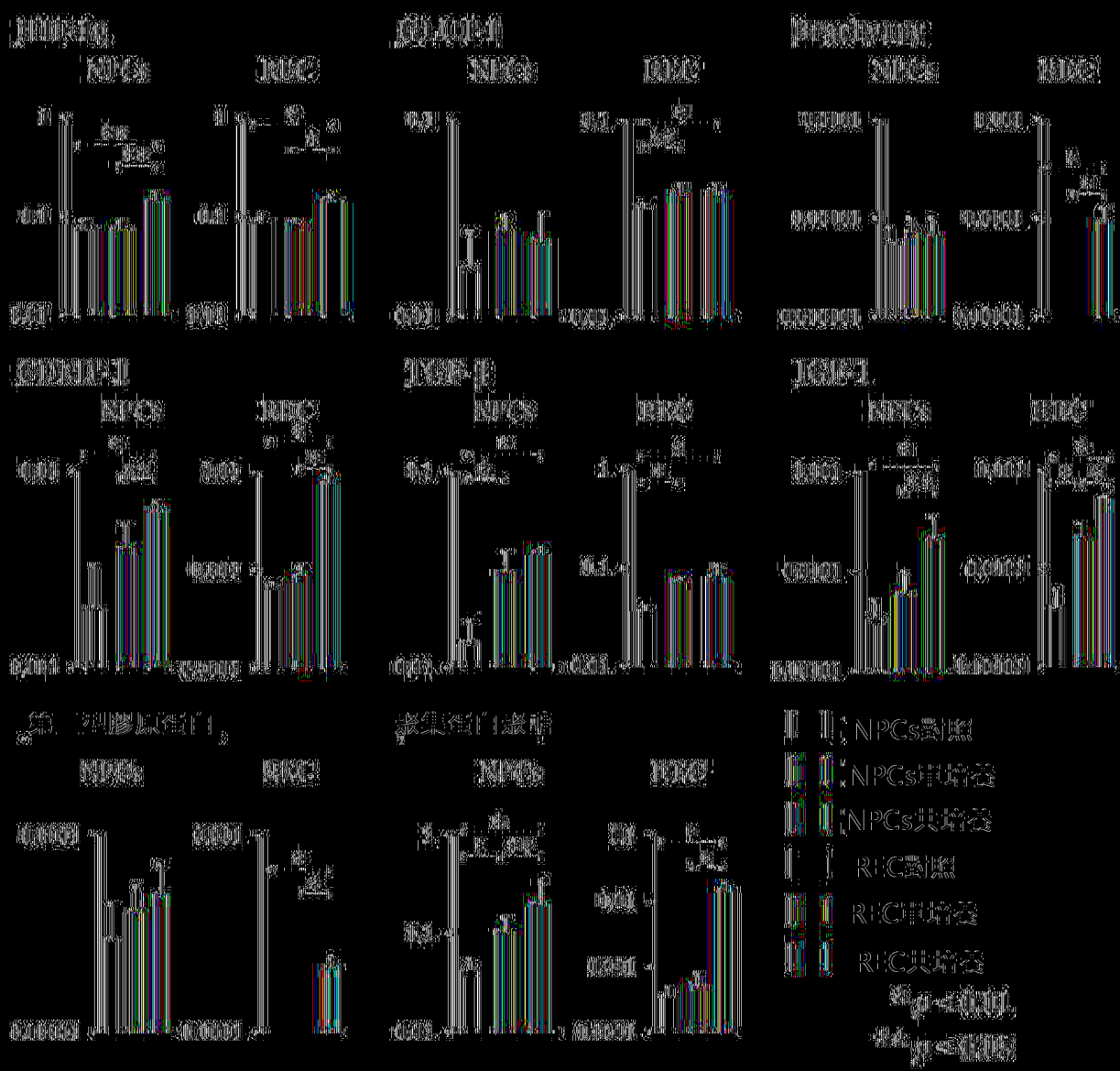
(图 6)



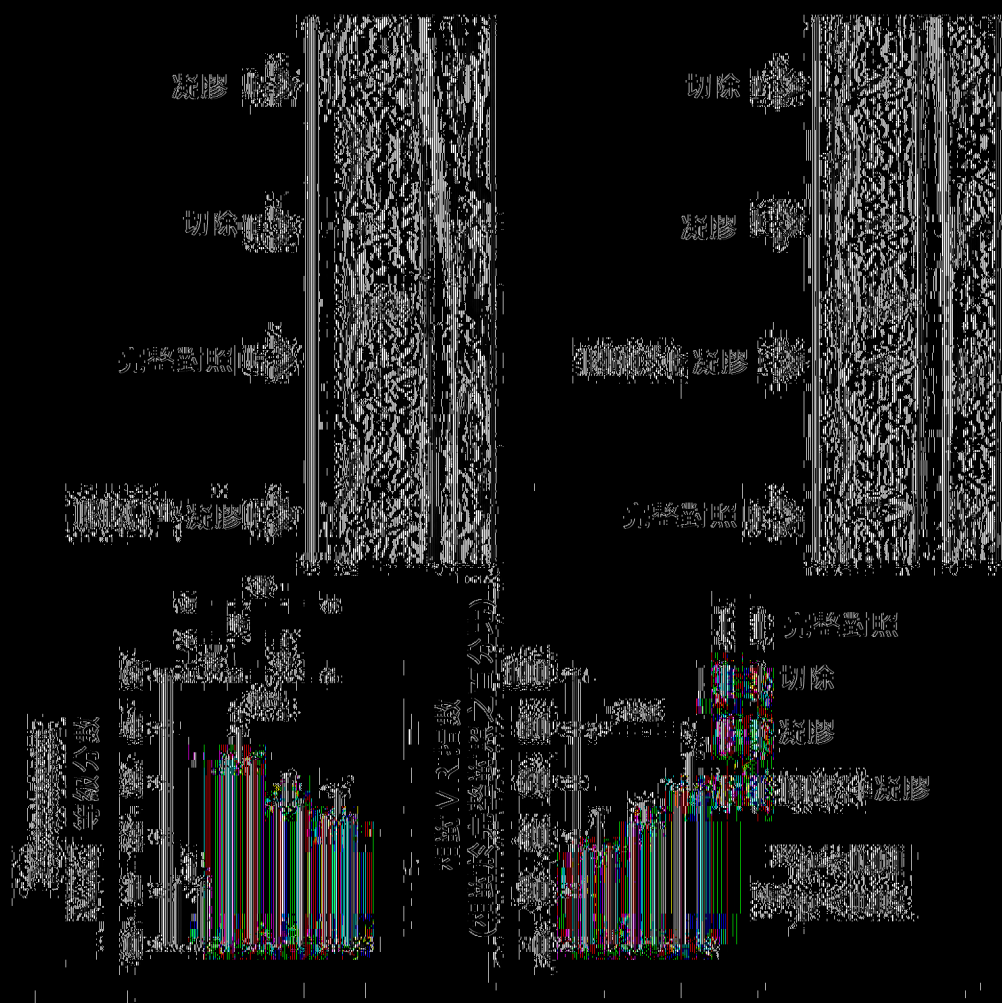
[(B)']

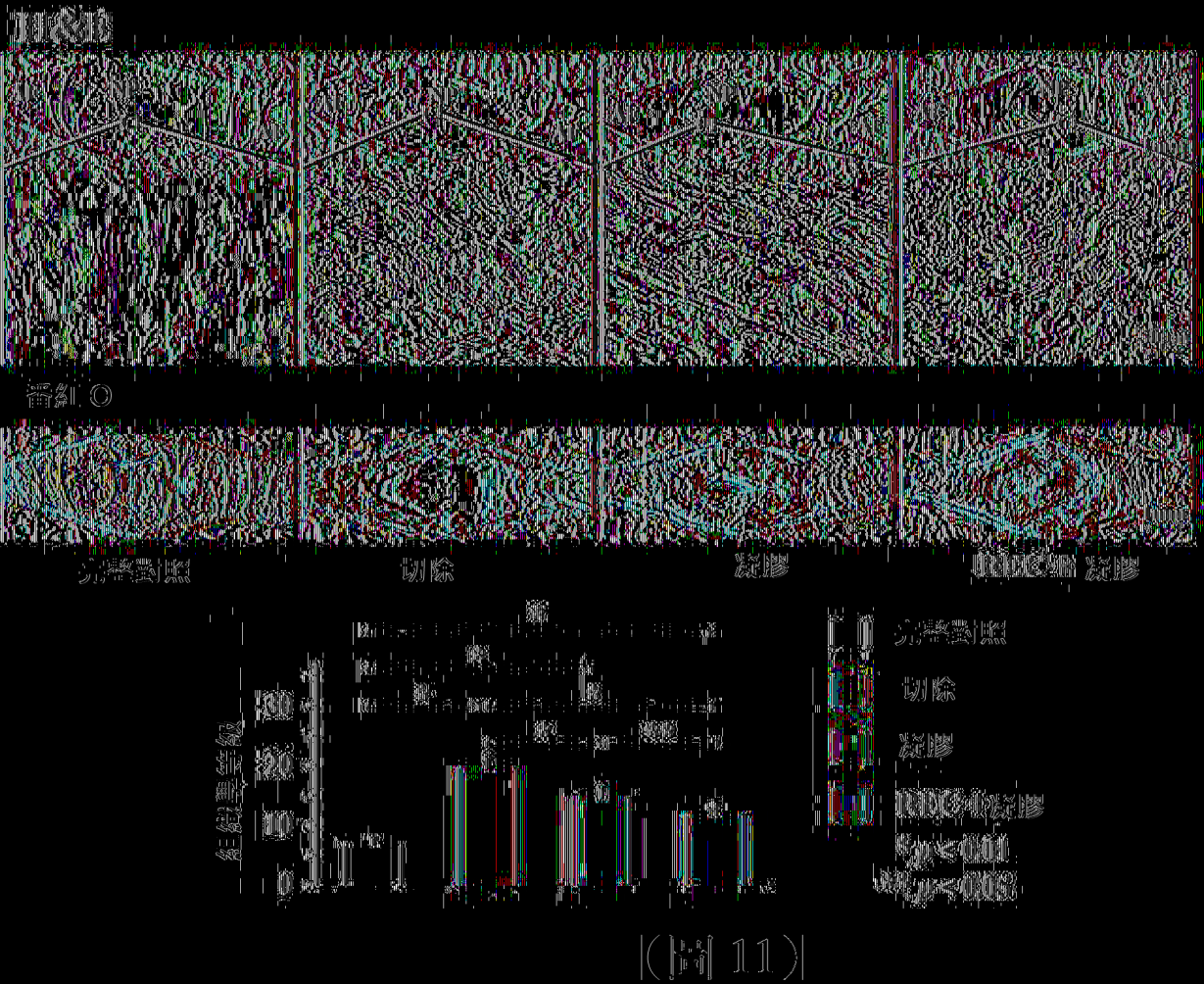


(8)



(圖 9)


$$|(\begin{smallmatrix} \text{H} & R \\ \text{E} & \text{E} \end{smallmatrix} \quad 10)|$$



(圖 11)

圖 7 膠原蛋白

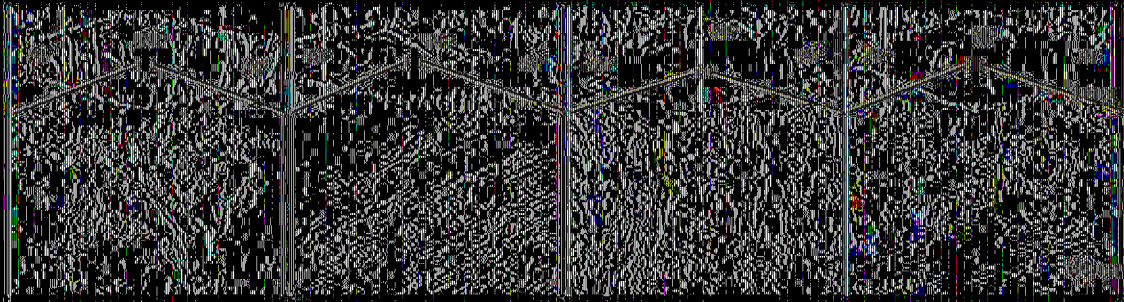


圖 8 凝膠生成性組織

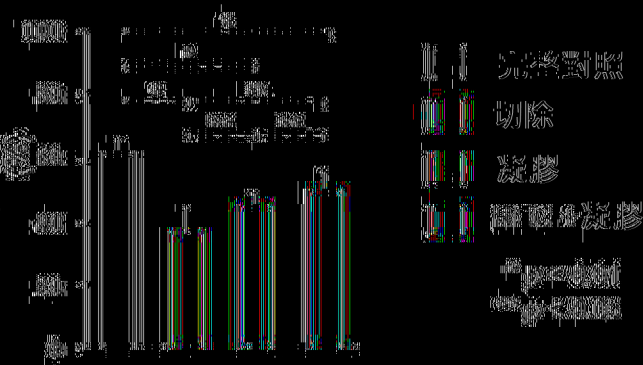
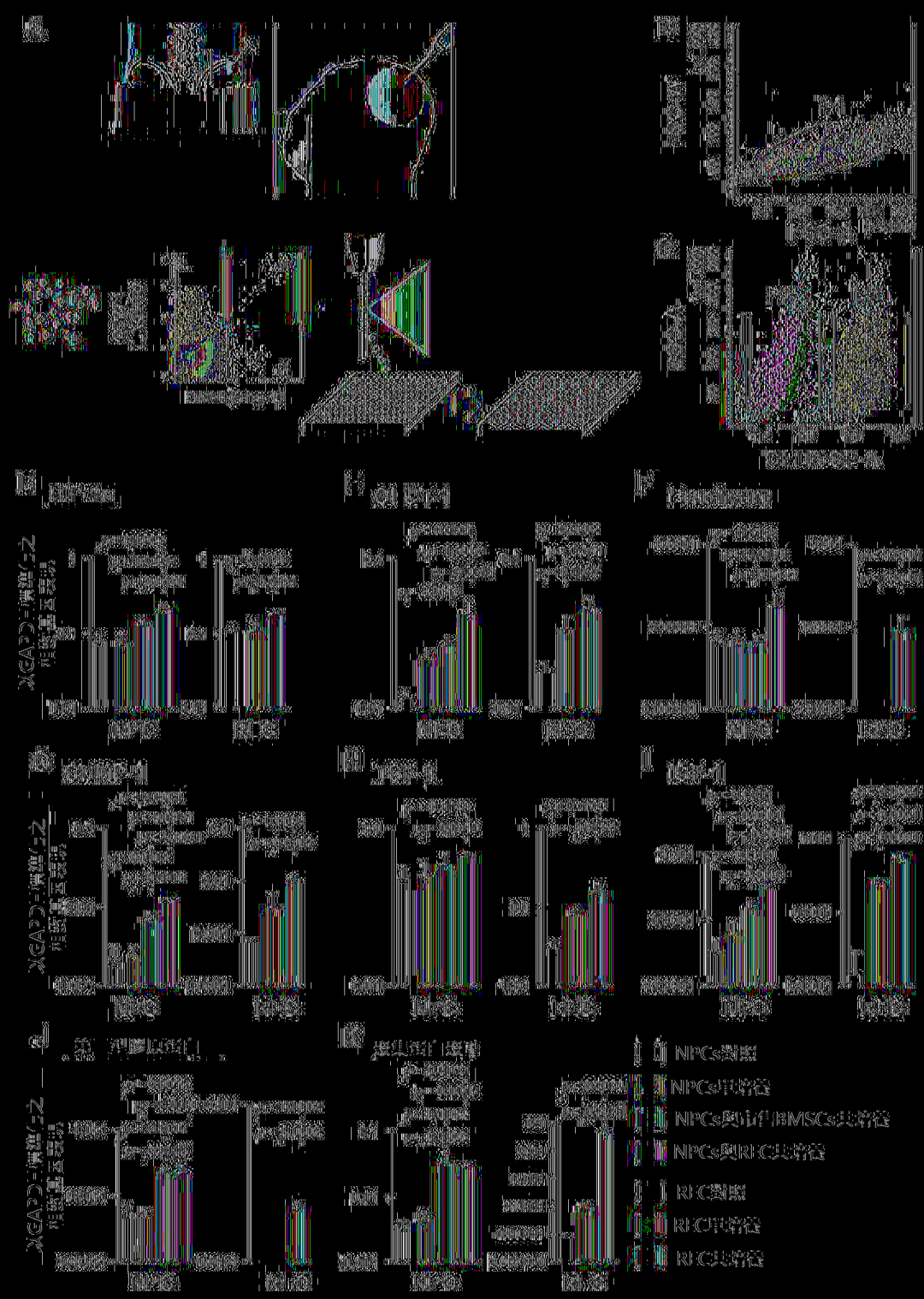
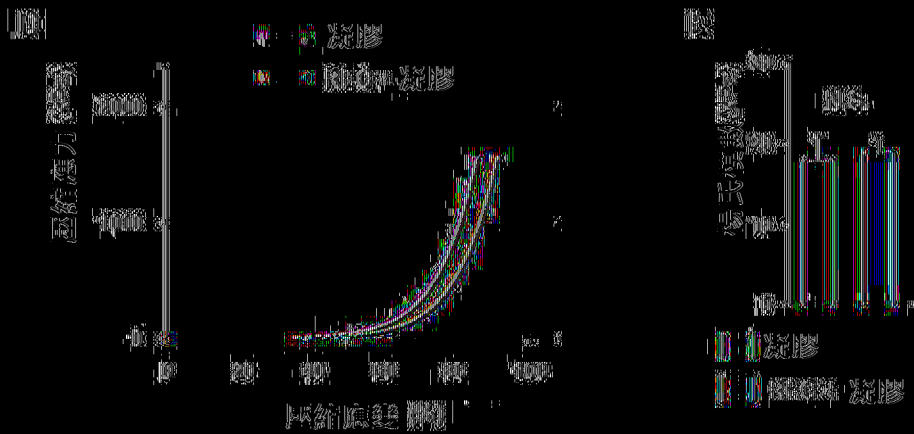
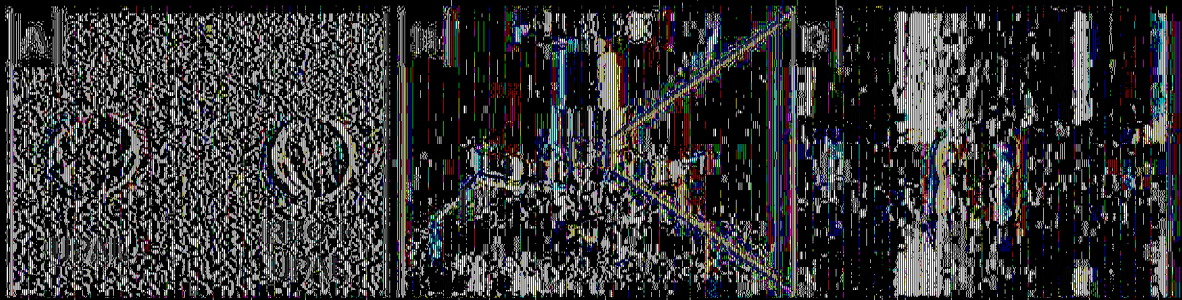


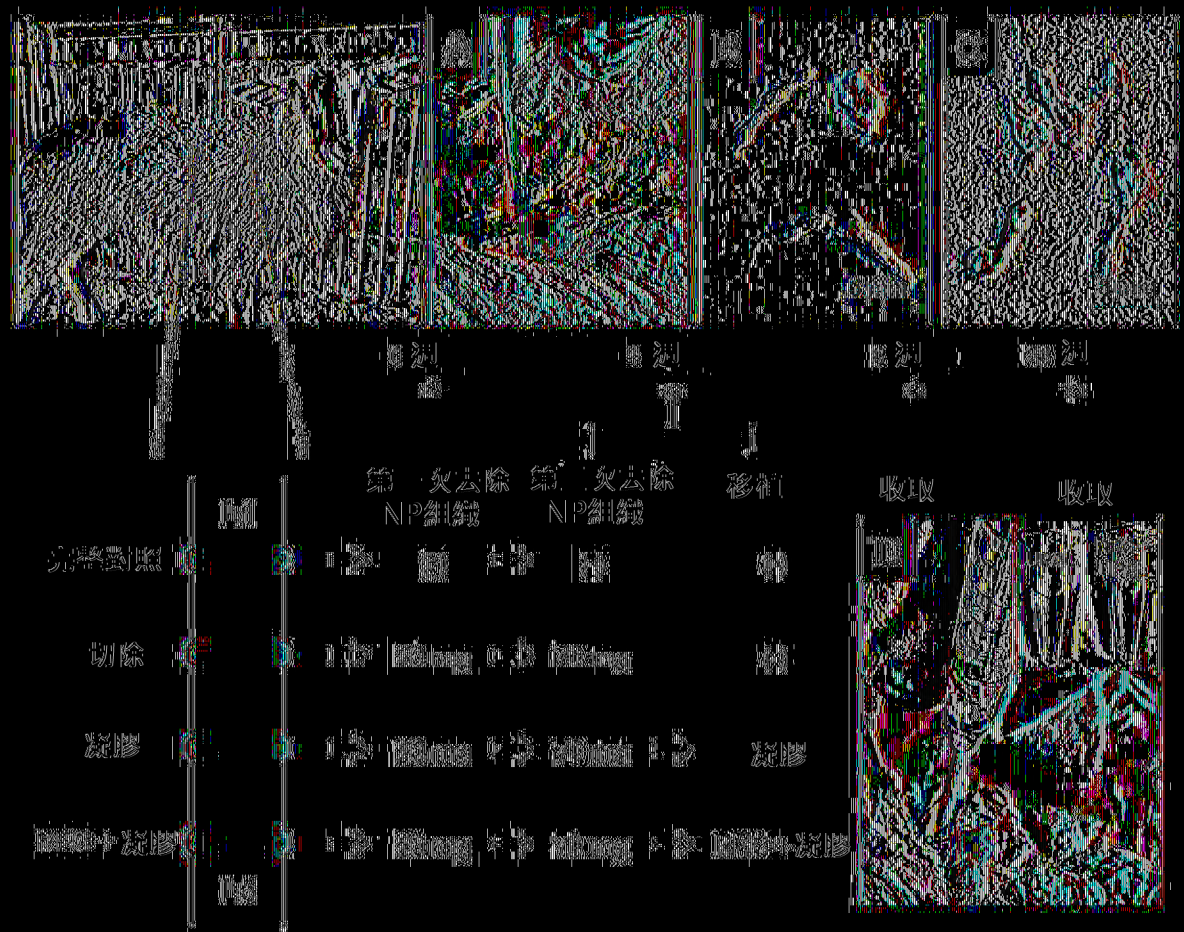
圖 12



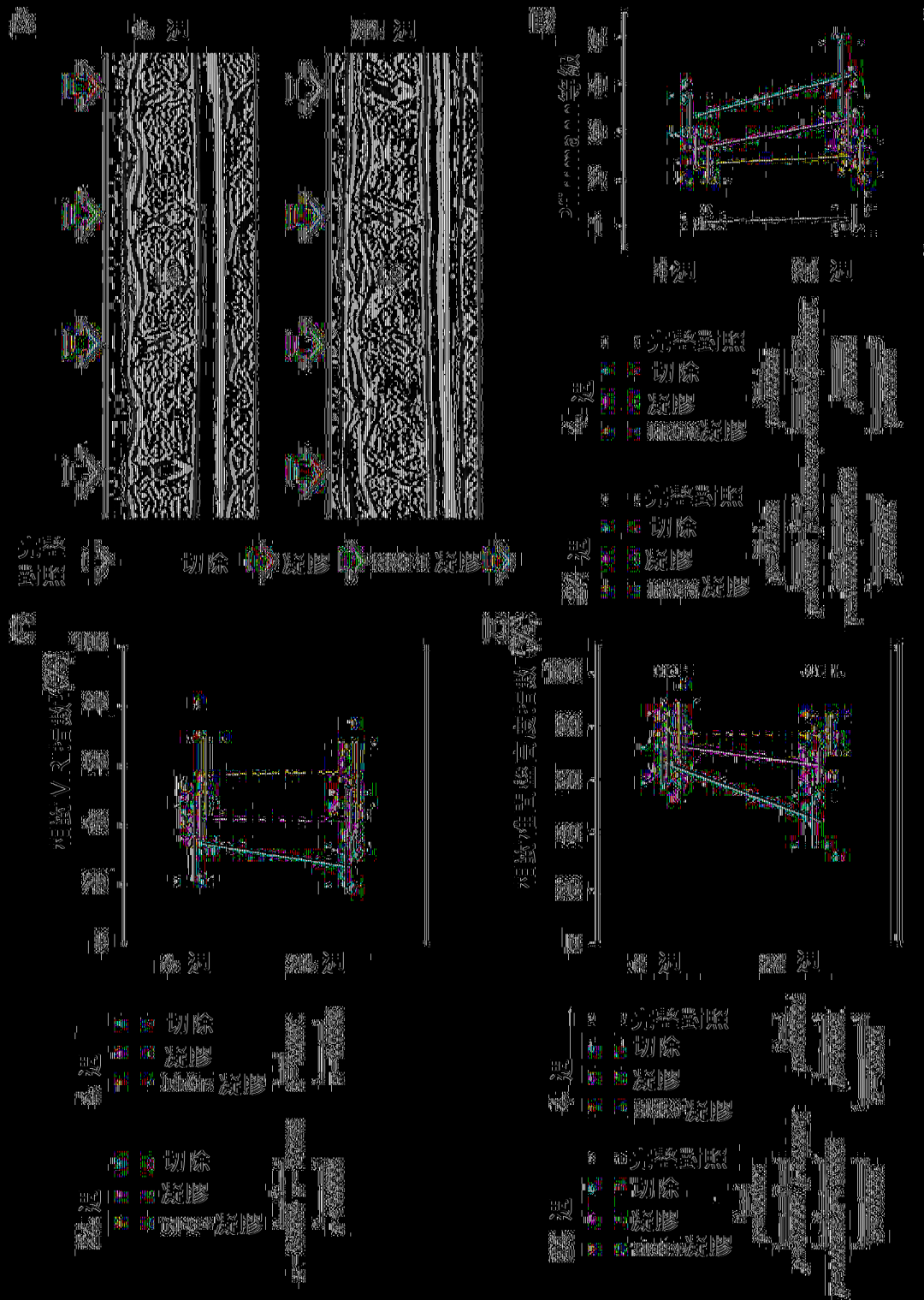
|(圖 13)|

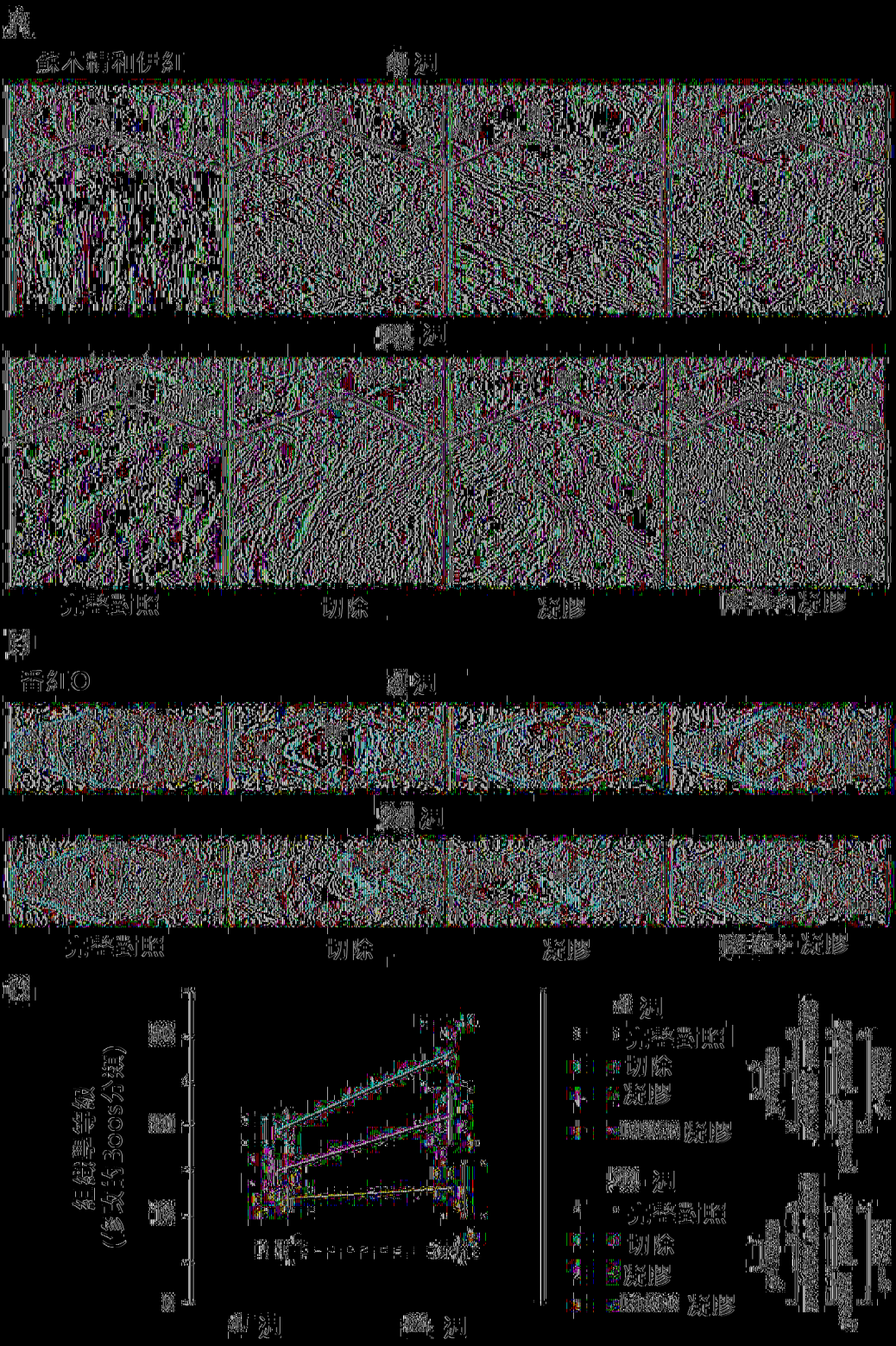


(圖 14)

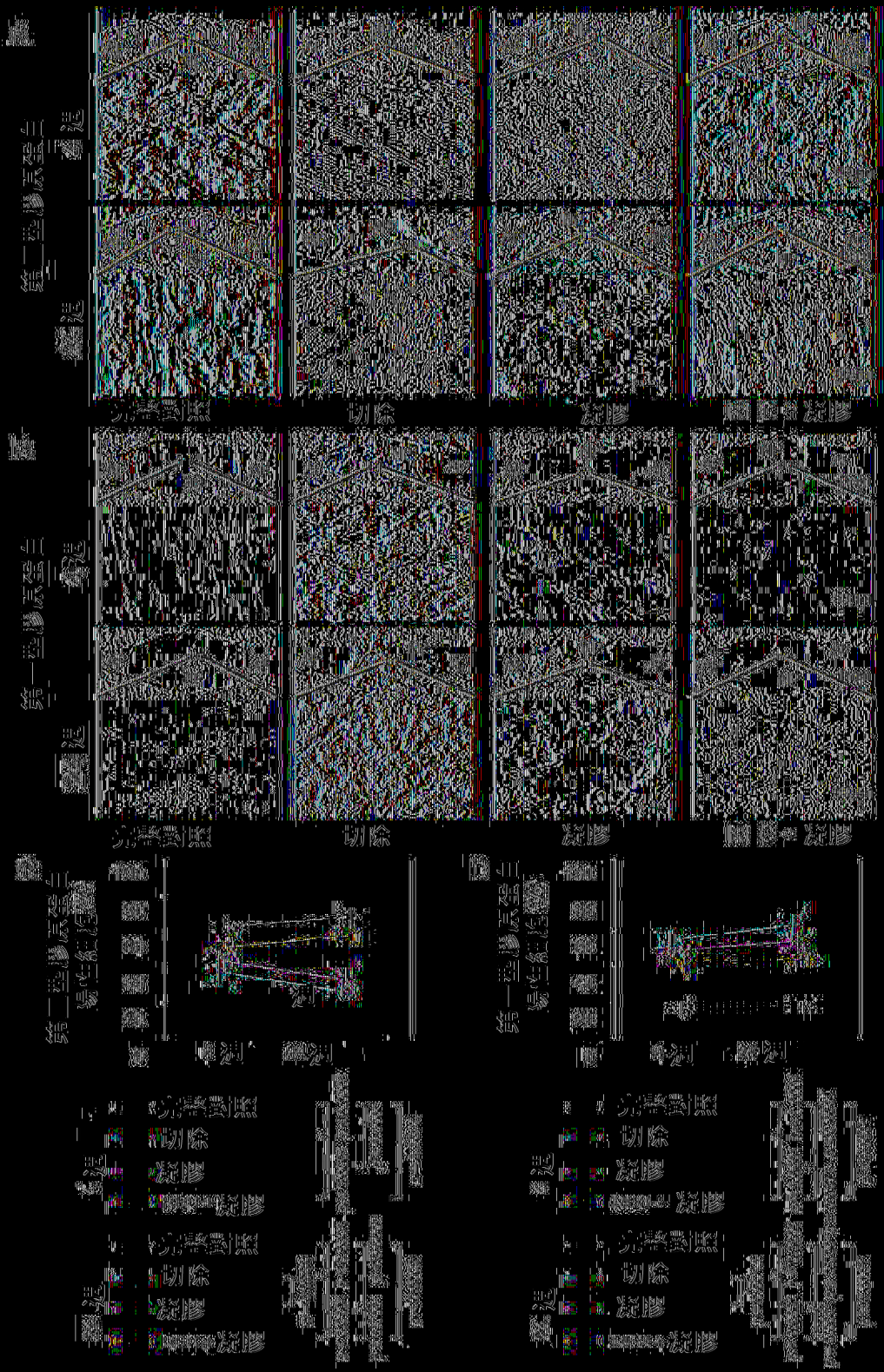


|(圖 15)|

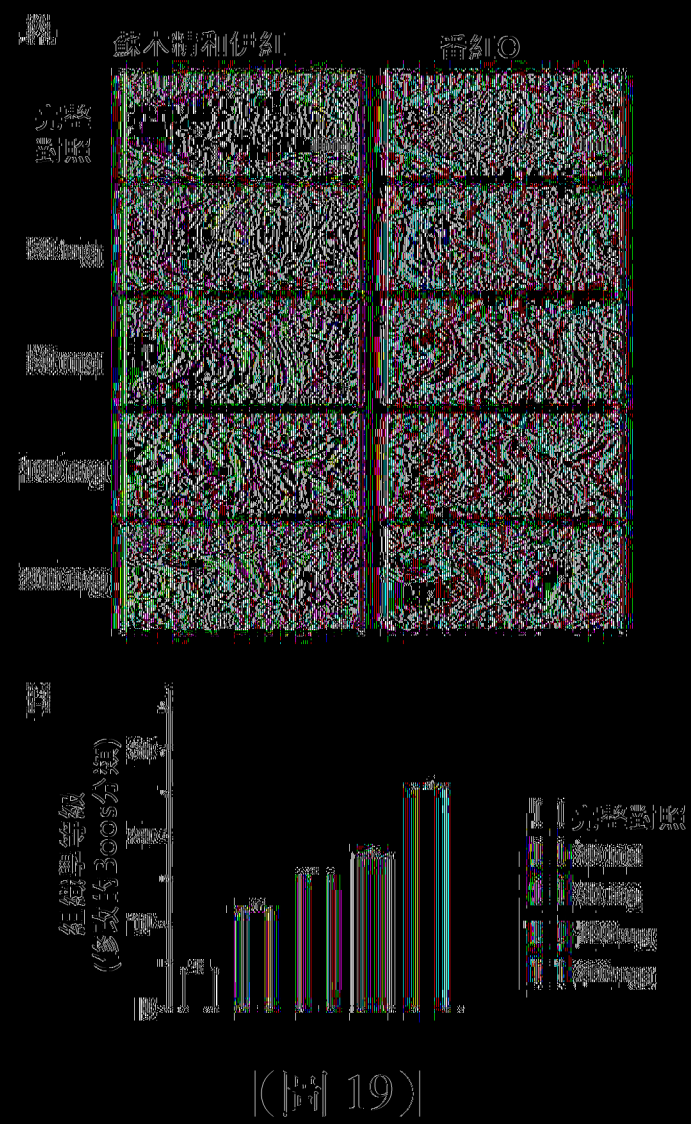


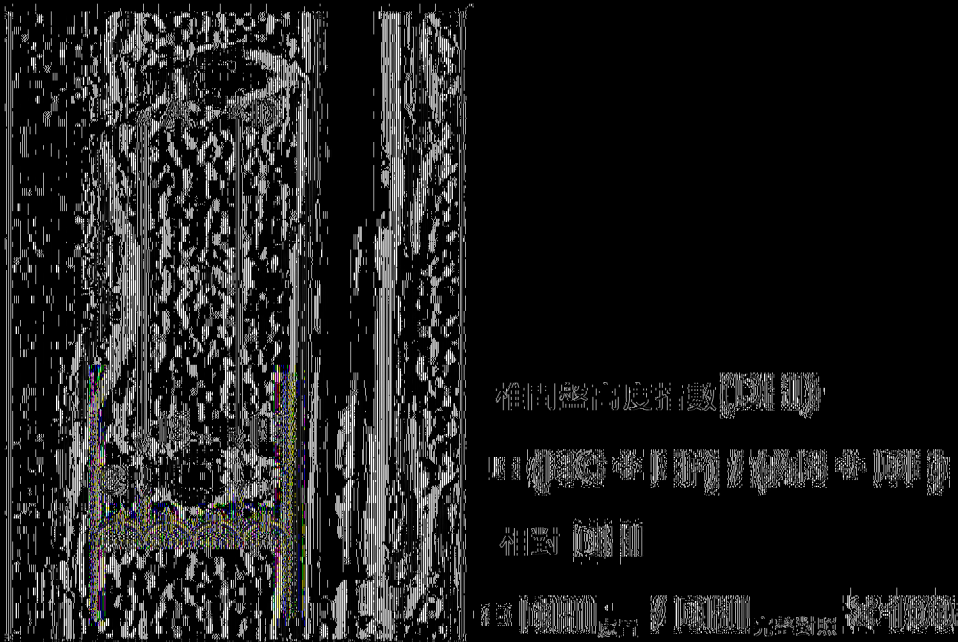


(圖 11)



|(FIG. 18)|





|(圖 20)|