

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7154238号
(P7154238)

(45)発行日 令和4年10月17日(2022.10.17)

(24)登録日 令和4年10月6日(2022.10.6)

(51)国際特許分類

C 12 N	15/113 (2010.01)	F I	C 12 N	15/113	1 3 0 Z
C 12 N	15/09 (2006.01)		C 12 N	15/09	1 1 0
C 12 N	9/16 (2006.01)		C 12 N	9/16	Z
C 12 N	5/077 (2010.01)		C 12 N	5/077	
C 12 P	21/00 (2006.01)		C 12 P	21/00	B

請求項の数 13 (全22頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-571194(P2019-571194)

(86)(22)出願日 平成30年3月8日(2018.3.8)

(65)公表番号 特表2020-513849(P2020-513849
A)

(43)公表日 令和2年5月21日(2020.5.21)

(86)国際出願番号 PCT/KR2018/002763

(87)国際公開番号 WO2018/164507

(87)国際公開日 平成30年9月13日(2018.9.13)

審査請求日 令和3年3月5日(2021.3.5)

(31)優先権主張番号 10-2017-0029607

(32)優先日 平成29年3月8日(2017.3.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関

韓国(KR)

(31)優先権主張番号 10-2018-0027111

(32)優先日 平成30年3月7日(2018.3.7)

最終頁に続く

(73)特許権者 519325511

キム, セロン
大韓民国, ソウル 0 6 6 6 7 , ソチョ
ーク, ミョンダルーロ, 9 1 , エーピー
ティー. 9 0 1 , ザ ミシュラン

(73)特許権者 519325522

キム, イエン ウォン ジュン
大韓民国, ソウル 0 6 6 6 7 , ソチョ
ーク, ミョンダルーロ, 9 1 , エーピー
ティー. 9 0 1 , ザ ミシュラン

(73)特許権者 519325544

キム, イブセ
大韓民国, ソウル 0 6 6 6 7 , ソチョ
ーク, ミョンダルーロ, 9 1 , エーピー
ティー. 9 0 1 , ザ ミシュラン

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 M A S T 4 遺伝子を利用した細胞外基質生産用組成物及びその製造方法

(57)【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

M A S T 4 (microtubule associated serine/threonine kinase family member 4) タンパク質またはその断片をコーディングする核酸に特異的に結合することができ、
 および前記M A S T 4 タンパク質の発現または活性を阻害する化合物を含む、真核細胞で
 細胞外基質の生産を促進させるための組成物であって、
 前記化合物は前記M A S T 4 タンパク質またはその断片をコーディングする核酸に特異的な
 ガイド R N A を含む C R I S P R - C a s である、組成物。

【請求項 2】

前記M A S T 4 タンパク質をコーディングする核酸は、配列番号 8 ないし 1 4 、及び 1
 6 のうちいずれか 1 つのポリヌクレオチド配列を含むものであり、前記M A S T 4 タンパ
 ク質は、配列番号 1 ないし 7 、及び 1 5 のうちいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求
 項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記ガイド R N A は、前記M A S T 4 タンパク質またはその断片をコーディングする核
 酸に特異的な c r R N A (C R I S P R R N A) 及び t r a c r R N A (transactivatin
 g c r R N A) を含む二重 R N A 、または前述の c r R N A 及び t r a c r R N A の部分を
 含み、前記M A S T 4 タンパク質またはその断片をコーディングする核酸と混成化する一
 本鎖ガイド R N A である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記真核細胞は、線維芽細胞または軟骨細胞である、請求項 1に記載の組成物。

【請求項 5】

前記組成物は、前記真核細胞から軟骨形成を促進する、請求項 1に記載の組成物。

【請求項 6】

関節疾患の予防、治療、または症状の改善のためのものである、請求項 1に記載の組成物。

【請求項 7】

前記軟骨形成促進は、軟骨再生を誘導するためのものである、請求項 5に記載の組成物。

【請求項 8】

組織の再生または老化防止に使用するためのものである、請求項 1に記載の組成物。 10

【請求項 9】

前記組成物は、TGF - 1をさらに含む、請求項 1に記載の組成物。

【請求項 10】

請求項 1に記載の組成物を真核細胞と接触させる段階を含む、真核細胞から細胞外基質を生産するインビトロ方法であって、

前記真核細胞は、個体から分離されたものであり、

前記真核細胞と接触させる段階は、前記組成物の存在下で、前記真核細胞を培養する段階を含む、方法。

【請求項 11】

前記培養する段階は、軟骨形成を誘導する物質の存在下で培養する、請求項 10に記載の方法。 20

【請求項 12】

接触産物から細胞外基質を分離する段階をさらに含む、請求項 10に記載の方法。

【請求項 13】

前記真核細胞は、軟骨細胞である、請求項 10に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、M A S T 4 (microtubule associated serine/threonine kinase family member 4)遺伝子を利用し、真核細胞から細胞外基質を生産するための組成物、前記真核細胞から細胞外基質を生産する方法、及び前記組成物を含む軟骨再生促進用組成物に関する。 30

【背景技術】

【0002】

ほとんどの骨の形成は、軟骨板 (cartilaginous template) で開始するために、成功に至る骨格系の発達は、構造的面と分子的面とにおいて、完璧な協力が要求される。関節軟骨は、高度に組織化された組織であり、それに関与する生体内軟骨形成のメカニズムは、今のところ解明されていない。コラーゲン微小纖維と、それ以外の他の細胞外基質構成タンパク質との相互作用が、軟骨の構造的な完壁性を維持させると知られているが、それらの複雑な過程を調節する信号伝達メカニズムは、まだ明白に明らかにされていない。従って、軟骨形成を主導する中心調節子 (master regulator) 存在の究明とその機能とを明らかにすることは、学問的に意味が大きいだけではなく、国民健康に寄与することはもとより、それを利用して革新的な治療剤を開発することも可能であろう。 40

【0003】

M A S T 4 (microtubule associated serine/threonine kinase family member 4)は、軟骨で発現すると知られているが (非特許文型 B 1) 、その役割については、明確に究明されていない。特許文献 1 で、M A S T 4を利用して軟骨治療を行うことができるということを開示するが、それは、単に M A S T 4 が軟骨で発現するという確率的結果に基づくだけであり、その具体的な役割について明確に究明していない。

本発明者らは、軟骨形成に関与する新たな中心調節子として M A S T 4 を発見し、M A S

50

T 4 の活性を調節する物質開発のための源泉技術を提供する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【文献】CN 1 0 5 6 3 6 6 1 4

【非特許文献】

【0005】

【文献】BMC Genomics 2007, 8: 165

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

一様相は、MAST4 (microtubule associated serine/threonine kinase family member 4) タンパク質またはその断片に特異的に結合することができる化合物、または前記MAST4 タンパク質またはその断片をコーディングする核酸に特異的に結合することができる化合物を含む、真核細胞において、細胞外基質の生産を促進させるための組成物を提供する。

【0007】

他の様相は、MAST4 タンパク質またはその断片に特異的に結合することができる化合物、または前記MAST4 タンパク質またはその断片をコーディングする核酸に特異的に結合することができる化合物を含む、軟骨細胞から、軟骨形成 (chondrogenesis) を促進させるための組成物を提供する。

【0008】

さらに他の様相は、前記真核細胞から細胞外基質生産を促進させるための組成物を真核細胞と接触させる段階を含む真核細胞から細胞外基質を生産する方法を提供する。

【発明の効果】

【0009】

一様相による、細胞外基質の生産を促進させるための組成物を利用し、細胞外基質の供給が必要な個体に注入し、関節疾患を含む疾病を予防・治療して症状を改善させることができ、真核細胞から細胞外基質を効率的に生産する方法に適用することができる。

他の様相による、軟骨細胞から軟骨形成を促進させるための組成物を個体に注入し、関節疾患を含む疾病を予防・治療して症状を改善させることができ、個体から分離された軟骨細胞の軟骨再生を促進させ、軟骨再生現象によって生産される細胞外基質を含む多様な成分を効率的に生産する方法に適用することができる。

さらに他の様相による、真核細胞から細胞外基質を生産する方法により、真核細胞から細胞外基質を効率的に生産することができる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】CRISPR/Cas9システムを利用したMAST4 ノックアウトマウスを作製する方法を図式化した図面である。

【図2】図2Aは、MAST4 ノックアウトマウスAタイプ及びBタイプにおいて、各遺伝子の発現量変化をRT-PCRで確認した結果を示した図面である。図2Bは、MAST4 が、ノックアウトされたマウスのタンパク質発現状態を確認した図面である。

【図3】CRISPR/Cas9システムを利用し、MAST4 が、ノックアウトされたC3H10T1/2 細胞において、MAST4 ノックアウトを確認したことを示した図面である。

【図4】CRISPR/Cas9システムを利用し、MAST4 が、ノックアウトされたC3H10T1/2 細胞において、各遺伝子の発現量変化をRT-PCRで確認した結果を示した図面である。

【図5】軟骨形成確認のためのマイクロマス培養 (micromass culture) において、それぞれの遺伝子発現量の変化を、RT-PCRで確認した結果を示した図面である。

10

20

30

40

50

【図6】CRISPR/Cas9システムを利用し、MAST4が、ノックアウトされたC3H10T1/2細胞において、軟骨分化程度の差をアルシアンブルー染色で確認した結果を示した図面である。

【図7】ヒト細胞のMAST4をノックアウトするために使用された標的配列の情報に係わる図面である。

【図8】図8Aは、MAST4をsiRNAでノックダウンしたヒト軟骨細胞である。図8Bは、MAST4をCRISPR/Casシステムを利用してノックアウトしたヒト軟骨細胞において、細胞外基質因子の発現程度を示した図面である。

【図9】ヒト原性軟骨細胞にTGF-1を処理した後、MAST4の発現量変化、及びそれによる細胞外基質因子の発現量を示した図面である。

【図10】MAST4がノックアウトされたマウスの頸骨において、軟骨の形成及び再生の効果を確認した図面である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

一様相による、MAST4 (microtubule associated serine/threonine kinase family member 4) タンパク質またはその断片に特異的に結合することができる化合物、または前記MAST4タンパク質またはその断片をコーディングする核酸に特異的に結合することができる化合物を含む、真核細胞において、細胞外基質 (extracellular matrix) の生産を促進させるための組成物を提供する。

【0012】

他の様相による、MAST4タンパク質またはその断片に特異的に結合することができる化合物、または前記MAST4タンパク質またはその断片をコーディングする核酸に特異的に結合することができる化合物を含む、軟骨細胞から軟骨形成 (chondrogenesis) を促進させるための組成物を提供する。

【0013】

一具体例において、前記MAST4タンパク質またはその断片に特異的に結合することができる化合物、または前記MAST4タンパク質またはその断片をコーディングする核酸に特異的に結合することができる化合物は、前記タンパク質またはその断片、または前記核酸に少なくとも部分的に結合することができるものを含む。ここで、前記化合物は、化学的に合成された化合物、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはそれらの組み合わせでもある。それらは、MAST4タンパク質の活性または発現を阻害するものもある。一具体例において、前記真核細胞において、細胞外基質の生産を促進させるための組成物は、真核細胞から軟骨形成を促進させるためのものである組成物でもある。

【0014】

前記組成物において、前記MAST4タンパク質の活性阻害剤、またはMAST4タンパク質の発現阻害剤は、MAST4の遺伝子の発現を阻害、または前記MAST4タンパク質の活性を阻害するものであるならば、いずれも含まれる。前記活性阻害剤または発現阻害剤は、前記MAST4遺伝子の全部または一部の領域において、相補的なポリヌクレオチドでもある。前記ポリヌクレオチド配列は、RNA、DNA、またはそれらの融合体 (hybrid) でもある。

【0015】

一具体例において、前記MAST4タンパク質活性の阻害は、MAST4タンパク質のキナーゼ活性を阻害するものもある。

【0016】

MAST4は、キナーゼとして標的になる基質のSerまたはThrをリン酸化させることができるので、前記MAST4タンパク質のキナーゼ活性の阻害は、MAST4の標的になる基質のリン酸化、具体的には、SerまたはThrのリン酸化を遮断することを意味する。

【0017】

一具体例において、前記MAST4タンパク質またはその断片に特異的に結合するこ

10

20

30

40

50

できるポリペプチド、または前記 MAST 4 タンパク質またはその断片をコーディングする核酸に特異的に結合することができるポリペプチドは、抗体、またはその抗原結合断片でもある。

【0018】

用語「抗体」とは、抗原性部位に対して指示される特異的な免疫グロブリンを意味し、MAST 4 遺伝子を発現ベクターにクローニングし、前記遺伝子によってコーディングされる MAST 4 タンパク質を得て、前記タンパク質から、当該技術分野の一般的な方法によって抗体を製造することができる。前記抗体の形態は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を含み、全ての免疫グロブリン抗体が含まれる。前記抗体は、2 個の全体長の軽鎖、及び 2 個の全体長の重鎖を有する完全な形態だけではなく、2 個の軽鎖、及び 2 個の重鎖を有する完全な形態の完全な抗体構造を有さないものの、抗原性部位に対して指示される特異的な抗原結合部位（結合ドメイン）を有し、抗原結合機能を保有している抗体分子の機能的断片も含む。10

【0019】

用語「ポリヌクレオチド（nucleotide）」は、取り立てて言及されない限り、ヌクレオチドまたは核酸と同一意味で使用され、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを示し、特別に言及されていない限り、自然のヌクレオチドの類似体、及び糖部位または塩基部位が変形された類似体を含んでもよい。前記ポリヌクレオチドは、必要により、当該技術分野に公知された多様な方法を介して変形させることができる。そのような変形の例としては、メチル化、キャップ化、天然ヌクレオチド 1 以上の同族体への置換、及びヌクレオチド間の変形、例えば、荷電されていない連結体（例：メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、カルバメートなど）、または荷電された連結体（例：ホスホロチオエート、ポスホジチオエートなど）への変形がある。20

【0020】

一具体例において、前記 MAST 4 タンパク質またはその断片をコーディングする核酸に特異的に結合することができる化合物として、前記 MAST 4 タンパク質またはその断片をコーディングする核酸に特異的に結合することができるポリヌクレオチドは、前記 MAST 4 タンパク質またはその断片をコーディングする核酸に特異的な miRNA (micro RNA)、siRNA (small interfering RNA)、shRNA (short hairpin RNA)、Piwi - 相互作用 RNA (Piwi - interacting RNA (piRNA))、snRNA (small nuclear RNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、またはそれらの組み合わせでもある。30

【0021】

他の具体例において、前記 MAST 4 タンパク質またはその断片をコーディングする核酸に特異的に結合することができる化合物は、前記 MAST 4 タンパク質またはその断片をコーディングする核酸に特異的に結合することができるポリヌクレオチドを含むものであり、前記 MAST 4 タンパク質またはその断片をコーディングする核酸に特異的なガイド RNA (guide RNA) を含む CRISPR - Cas でもある。

【0022】

一具体例において、前記 Cas は、Cas 9 である。

CRISPRs (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) は、遺伝子配列が明らかにされたバクテリアまたは古細菌の遺伝体で発見されるさまざま短い直接反復を含む座位を意味し、CRISPR - Cas システムにおいて、必須なタンパク質要素として Cas 9 を含み、ガイド RNA (具体的には、ガイド RNA に含まれた CRISPR RNA (crRNA) 及び trans - activating crRNA (tracrRNA)) と命名された 2 つの RNA) と複合体を形成したとき、活性エンドヌクレアーゼ (endonuclease) として作用する。40

【0023】

一具体例において、前記 CRISPR - Cas システムが標的遺伝子である MAST 4 に特異的に作用するために、前記ガイド RNA は、前記 MAST 4 タンパク質をコーディン50

グする核酸に特異的な c r R N A (C R I S P R R N A) 及び t r a c r R N A を含む二重 R N A (dual R N A) 、または前述の c r R N A 及び t r a c r R N A の部分を含み、前記 M A S T 4 タンパク質をコーディングする核酸と混成化する一本鎖ガイド R N A (single strand guide R N A) の形態を有する。前記二重 R N A 及び一本鎖ガイド R N A は、 M A S T 4 タンパク質をコーディングするポリヌクレオチドと少なくとも部分的に混成化することができ、具体的には、 M A S T 4 タンパク質のアミノ酸配列をコーディングするポリヌクレオチド配列において、「 5 ' - T A C C C T G C C G C T G C C G C A C C - 3 ' (配列番号 17) 」に該当する部分と混成化することができる。

【 0 0 2 4 】

具体的には、前記ガイド R N A は、前記 M A S T 4 タンパク質をコーディングするヌクレオチド配列のうちから選択された標的配列に混成化する c r R N A 及び t r a c r R N A を含む二重 R N A 、または前述の c r R N A 及び t r a c r R N A の部分を含み、前記 M A S T 4 タンパク質をコーディングするヌクレオチドと混成化する一本鎖ガイド R N A であり、前記標的配列である M A S T 4 遺伝子は、少なくとも部分的に、前述の c r R N A または s g R N A と相補的な配列のポリヌクレオチド配列と、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M : protospacer-adjacent motif) を含む配列を含む。前記プロトスペーサー隣接モチーフは、当業界に周知された配列であり、ヌクレアーゼタンパク質が認識するのに適する配列を有するものもある。前記 C R I S P R - C a s システムの標的になる M A S T 4 遺伝子は、内在的 D N A (endogenous D N A) または人為的 D N A (artificial D N A) でもあり、具体的には、前記 M A S T 4 タンパク質をコーディングするヌクレオチドは、真核細胞の内在的 D N A 、さらに具体的には、軟骨細胞の内在的 D N A を意味するものもある。

10

20

30

【 0 0 2 5 】

一具体例において、前述の c r R N A または s g R N A は、前記標的 D N A と相補的な 20 個の連続的なポリヌクレオチドを含むものもあり、前記相補的な 20 個の連続的なポリヌクレオチドの標的 D N A は、 5 ' - T A C C C T G C C G C T G C C G C A C C - 3 ' (配列番号 17) でもあり、表 6 の配列番号 74 , 76 及び 77 において、ボールド体で表示された配列のうちから選択されたものを含んでもよい。前記 C a s 9 タンパク質を暗号化する核酸または C a s 9 タンパク質は、ストレプトコッカス属 (genus Streptococcus) 微生物に由来するものもある。前記ストレプトコッカス属微生物は、ストレプトコッカス・ピオゲネス (Streptococcus pyogenes) である。前記 P A M は、 5 ' - N G G - 3 ' トリヌクレオチド (trinucleotide) を意味するものもあり、前記 C a s 9 タンパク質は、効率を増進させるために、 C 末端または N 末端に、核位置信号 (N L S : nuclear localization signal)) をさらに含んでもよい。

【 0 0 2 6 】

本発明の前記真核細胞において、細胞外基質の生産を促進させるための組成物において、前記真核細胞は、酵母、かび、原生動物 (protozoa) 、植物・高等植物・昆虫及び両生類の細胞、または哺乳動物の細胞である。前記哺乳動物は、ヒトを含み、猿、牛、馬、豚など多様である。前記真核細胞は、個体から分離されて培養された細胞 (インビトロ) 、移植された細胞 (graft cell) 、インビオ細胞、または組み換えられた細胞を含むが、それらに制限されるものではない。前記個体から分離された真核細胞は、前記真核細胞から生産された細胞外基質を含む生成物を注入する個体と同一個体から分離された真核細胞でもある。その場合、異なる個体から生産された生成物が注入されることによって発生しうる移植片体宿主反応を含む不要な過剰免疫反応または拒否反応などの副作用を防止することができるという長所がある。

40

【 0 0 2 7 】

一具体例において、前記真核細胞は、線維芽細胞 (fibroblast) または軟骨細胞 (chondrocyte) である。

【 0 0 2 8 】

一具体例において、前記真核細胞において、細胞外基質の生産を促進させるための組成物

50

及び／または軟骨細胞から、軟骨形成を促進させるための組成物は、TGF-1をさらに含んでもよい。本発明者らは、TGF-1により、ヒト軟骨細胞において、MAST4の発現が低減し、それにより、細胞外基質の生産が促進されるということを確認した。従って、真核細胞（または、軟骨細胞）において、MAST4ノックアウト細胞において、細胞外基質をさらに効果的であって容易に促進させるために、TGF-1を併行処理するのが有利である。

【0029】

前記MAST4は、ヒト（*Homo sapiens*）由来またはマウス（*Mus musculus*）由来のタンパク質や、猿、牛、馬のような他の哺乳動物においても、同一タンパク質が発現される。

10

【0030】

ヒト由来のMAST4は、ヒト細胞に存在する7個のイソ型（isoform）をいずれも含むものもある。前記7個のイソ型は、NCBI reference sequence基準として、NP_055998.1（配列番号1）、NP_942123.1（配列番号2）、NP_001158136.1（配列番号3）、NP_001277155.1（配列番号4）、NP_001277156.1（配列番号5）、NP_001277157.1（配列番号6）またはNP_001284580.1（配列番号7）のアミノ酸配列を含むものもあり、前記それぞれのアミノ酸配列を有するタンパク質またはポリペプチドは、NM_015183.2、NM_198828.2、NM_001164664.1、NM_001290226.1、NM_001290227.1、NM_001290228.1またはNM_001297651.1の配列のうち、各前記配列番号1ないし7のアミノ酸配列をコーディングする配列番号8ないし14のポリヌクレオチド配列を含むmRNAからそれぞれ翻訳されたものもある。

20

【0031】

マウス由来のMAST4は、NCBI reference sequence基準として、NP_780380.2（配列番号15）のアミノ酸配列を含むものもあり、前記アミノ酸配列を有するタンパク質またはポリペプチドは、NM_175171.3の配列のうち、配列番号15のアミノ酸配列をコーディングする配列番号16のポリヌクレオチド配列を含むmRNAから翻訳されたものもある。

30

【0032】

前記配列番号1ないし7、及び15のアミノ酸配列、または配列番号8ないし14、及び16のポリヌクレオチド配列と一致しないとしても、生物学的に同等な活性を有するアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列は、MAST4タンパク質またはそのmRNAとも見なされる。

【0033】

従って、一具体例において、前記MAST4タンパク質は、配列番号1ないし7、及び15のうちいずれか一つの配列を含むものあり、前記MAST4タンパク質をコーディングするヌクレオチド配列は、配列番号8ないし14、及び16のうちいずれか一つの配列を含むものもある。

40

【0034】

前記MAST4タンパク質またはポリペプチドは、配列番号1ないし7、及び15と、60%以上、例えば、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、99%以上または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むものもある。また、前記MAST4タンパク質は、前記配列番号1ないし7、及び15のアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸、2個以上のアミノ酸、3個以上のアミノ酸、4個以上のアミノ酸、5個以上のアミノ酸、6個以上のアミノ酸、または7個以上のアミノ酸が変化された配列を有するアミノ酸配列である。

【0035】

前記MAST4それをコーディングするポリヌクレオチドは、配列番号8ないし14、及び16と、60%以上、例えば、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上

50

、99%以上または100%の配列同一性を有する配列を有することもある。また、前記MAST4をコーディングする核酸は、前記配列番号8ないし14、及び16の配列において、1個以上のヌクレオチド、2個以上のヌクレオチド、3個以上のヌクレオチド、4個以上のヌクレオチド、5個以上のヌクレオチド、6個以上のヌクレオチド、または7個以上のヌクレオチドが異なる配列を有するポリヌクレオチドである。

【0036】

本発明者らは、軟骨細胞において、MAST4遺伝子発現を阻害すれば、細胞外基質の生産が増大し、軟骨形成が促進されるということを最初に究明した。

従って、一具体例において、本発明の前記真核細胞において、細胞外基質の生産を促進させるための組成物、または軟骨細胞から軟骨形成を促進させるための組成物は、関節疾患の予防、治療、または症状の改善のためのものもある。10

また、一具体例において、本発明の前記真核細胞において、細胞外基質の生産を促進させるための組成物、または軟骨細胞から軟骨形成を促進させるための組成物は、軟骨再生を誘導するためのものもある。

また一具体例において、前記真核細胞において、細胞外基質の生産を促進させるための組成物は、組織の再生または老化防止に使用するためのものもある。

【0037】

前記組織再生は、傷、やけど、外傷、老化、慢性炎症、疾病、遺伝的要因などによって損傷されたり変形されたりする皮膚の再生を意味するものであり、医療的目的または皮膚美容目的に使用されるものをいずれも含む。前述の損傷または変形は、前記要因により、組織内の細胞外基質が損失されたり、生産量が減少したりするか、あるいは回復不可能に誘発されたものであり、本発明の組成物により、細胞外基質生産を促進させることにより、症状の改善、緩和、回復または完治が可能であるということを意味する。20

【0038】

皮膚を含む組織が老化する場合、細胞外基質の生産が低減され、組織の弾力が低下し、外部刺激によって容易に変形されたり損傷されたりし、回復速度が遅くなる。それにより、本発明の組成物は、細胞外基質の生産を増大させてるので、老化による組織の弾力低下、変形または損傷を予防したり、回復を促進させたりする。

【0039】

他の具体例において、前述の組織再生用または老化防止用の組成物は、フィラ、コラーゲン補充用化粧品の成分に利用されるものもある。さらに他の具体例において、前述の組織再生用または老化防止用の組成物は、微細ほこりまたは光物質の吸着を遮断するための機能性化粧品の成分に利用されるものもある。30

【0040】

本発明の前記真核細胞において、細胞外基質の生産を促進させるための組成物、または軟骨細胞から軟骨形成を促進させるための組成物は、薬学的に許容可能な塩または担体をさらに含んでもよい。

【0041】

用語「薬学的に許容可能な塩」とは、患者に比較的非毒性であって無害な有効作用を有する濃度で、該塩に起因した副作用が、本発明の組成物の望ましい効能を落とさない、本発明の組成物における化合物のいかなる有機または無機の付加塩を意味する。それら塩は、当業者に知られたものであるならば、いかなるものでも選択される。40

【0042】

本発明の組成物は、薬学的に許容可能な担体を追加して含んでもよい。薬学的に許容可能な担体を含む前記組成物は、経口または非経口のさまざまな剤形である。製剤化される場合には、普通使用する充填剤、增量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、界面活性剤などの希釈剤または賦形剤を使用しても調剤される。経口投与のための固形製剤には、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、トローチ剤などが含まれ、そのような固形製剤は、1以上の本発明の化合物に、少なくとも1以上の賦形剤、例えば、澱粉、炭酸カルシウム、スクロース(sucrose)またはラクトース(lactose)、あるいはゼラチンなどを混ぜても調剤50

される。また、単なる賦形剤以外に、ステアリン酸マグネシウムタルクのような潤滑剤も使用される。経口投与のための液状製剤としては、懸濁液剤、耐溶液剤、乳剤またはシリップ剤などが使用されるが、折々使用される単純希釈剤である水、リキッドパラフィン以外に、さまざまな賦形剤、例えば、湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤などが含まれる。非経口投与のための製剤には滅菌された水溶液、非水性溶剤、懸濁溶剤、乳剤、凍結乾燥製剤、坐剤などが含まれてもよい。非水性溶剤、懸濁溶剤としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブオイルのような植物性油、エチルオレートのような注射可能なエステルなどが使用される。坐剤の基剤としては、ウイテプゾール (witeps oil)、マクロゴール、ツイン (Tween) 61、カカオ脂、ラウリンジ、グリセロール、ゼラチンなどが使用される。

10

【0043】

一様相は、前記組成物を個体に投与する段階を含む、関節疾患を予防、治療または改善させる方法を提供する。

他の様相は、本発明の前記真核細胞から細胞外基質を生産するための組成物を真核細胞と接触させる段階を含む細胞外基質を生産する方法を提供する。

【0044】

一具体例において、前記真核細胞は、個体から分離されたものもある。一具体例において、前記真核細胞は、軟骨細胞もある。

一具体例において、前記真核細胞と接触させる段階は、前記組成物を真核細胞に共同形質注入 (co-transfecting) または段階的形質注入 (serial-transfected) する段階を含んでもよい。前記本発明の組成物を真核細胞内に効果的に伝達させるために、微細注入法 (microinjection)、電気穿孔法 (electroporation)、D E A E - デキストラン処理 (D E A E - dextran treatment)、リポフェクション (lipofection)、ナノパーティクル媒介形質注入、タンパク質伝達ドメイン媒介導入、ウイルス媒介遺伝子伝達、及び原生動物において、P E G 媒介形質注入のような当業界の多様な方法を使用することができるが、それらに制限されるのではない。

20

一具体例において、前記真核細胞と接触させる段階は、前記組成物の存在下、前記真核細胞を培養する段階を含む。

一具体例において、前記培養する段階は、軟骨形成を誘導する物質の存在下で培養することを含む。

30

一具体例において、本発明の細胞外基質を生産する方法は、前記接触産物から細胞外基質を分離する段階をさらに含む細胞外基質を生産する方法である。

他の具体例において、前記細胞外基質を生産する方法は、本発明の軟骨形成を促進させるための組成物を軟骨細胞と接触させる段階を含むものもある。

他の様相は、前記本発明の軟骨形成を促進させるための組成物を軟骨細胞と接触させる段階を含む軟骨を形成する方法を提供する。

一具体例において、前記軟骨細胞は、個体から分離されたものもある。

一具体例において、前記軟骨細胞は、生成された軟骨が移植される個体に由來したものもある。

40

【0045】

さらに他の様相は、本発明の上昇した細胞外基質生産能を有する真核細胞を培養し、E C Mを生産する段階と、培養物からE C Mを分離する段階と、を含むE C Mを生産する方法を提供する。

一具体例において、前記培養は、軟骨形成を誘導する物質の存在下で培養することもある。

一具体例において、前記軟骨形成を誘導する物質は、B M Pでもある。

【0046】

以下、本発明について、実施例を介してさらに詳細に説明する。しかし、それら実施例は、本発明を例示的に説明するためのものであり、本発明の範囲は、それら実施例に限定されるものではない。

50

【実施例】

【0047】

実施例1. MAST4ノックアウトマウスにおける軟骨構成成分の発現増加確認1-1. CRISPR/Cas9システムを利用したMAST4ノックアウトマウスの作製

MAST4の発現が抑制される場合、軟骨構成成分である細胞外基質が増加するか否かと
いうことを確認するために、まず、CRISPR/Cas9システムを利用し、MAST4ノックアウトマウスを作製した。

具体的には、CRISPRノックアウトマウスを作るために、Feng Zhang博士(Congら
、2013)から寄贈されたpX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hS
pCas9(Addgene、#42230)でもって、Cas9 mRNAとガイドRNA
との発現が可能なプラスミドを使用した。MAST4は、7kb以上の大きいタンパク
質であるので、エクソン1及びエクソン15の2部分を対象にし、遺伝子編集がなされる
ようにデザインし、MAST4のエクソン1を標的とするガイドRNA配列は、5'-GG
AAACTCTGTCGGAGGAAGGGG-3'、そしてエクソン15を標的とする配
列は、5'-GGCACAAAGAGTCCCCGCCAGAGG-3'である。前記ガイド
RNA配列について、作製者のプロトコル(<http://crispr.mit.edu/>, Zhang Feng Lab
)により、下記MAST4 CRISPRオリゴマー表に示されたオリゴマーを作製し、p
x330プラスミドに挿入し、それぞれエクソン1及び15を標的とする2種プラスミド
をクローニングした。

【表1】

MAST4 エクソン1 CRISPR F(配列番号18)	5' -caccGGAAACTCTGTCGGAGGAAG-3'
MAST4 エクソン1 CRISPR R(配列番号19)	5' -aaacCTTCCTCCGACAGAGTTCC-3'
MAST4 エクソン15 CRISPR F(配列番号20)	5' -caccGGCACAAAGAGTCCCCGCCAG-3'
MAST4 エクソン15 CRISPR R(配列番号21)	5' -aaacCTGGCGGGACTCTTGTCGC-3'

胚芽を得るために、C57BL/6Jめずマウスに、交配2日前、Pregnant mare serum
gonadotrophin(PMSG; Prospec, cat.no.HOR-272)5IUを
投与し、47時間後、Human chorionic gonadotrophin(hCG; Prospec,
cat.no.HOR-250)5IUを投与した。その後、C57BL/6J雄鼠と交配
させ、胚芽を卵管から得た。従来の標準的なプロトコルを参照し(Gordon and Ruddle
、1981)、前記作製されたプラスミド5ng/ul及び10ng ssDNA供与者(
ssDNA donor)を含む微細注入混合物を、1細胞段階(one-cell-stage)の胚芽の
前核(pronuclei)に注入した。注入された1細胞胚芽を仮妊娠ICRマウスに移した。
生まれた鼠に対する表現型分析は、エクソン1及びエクソン15についてなされ、最終的に、
2種MAST4ノックアウトマウスを得ることができ、前記2種MAST4ノックア
ウトマウスであるA類型及びB類型に係わる情報は、図1及び下記表2(5' 3')に表
示した通りである。

10

20

30

40

50

【表 2】

類型 AMAST4KO (エクソン 1において 71bp 欠失) (配列 番号 22)	ATGGGGGAGAAAGTTCCGAGGCCTGAGCCCCTGCCCGGGCTGCAGCGGACACGGCGCC CGGACCCTAGTCCTCGCGGCAGCCGTGCTCGGAGGGCGCTTCTCAGCGGAGTCATCC TCTGGCTCGGAAACTCTGTCGGAGGAAGGGGAGCCAGCCGCTTCTCCTGCAGGTGCGAGCCG CCCGGGCCGCCGGCGGCCCTGGAACCCGGCTACCCGCCGTGGCTCCGCGCCTG GCTCTGGAGCGTGGAGTCCTACCCGCCGTGGCACCCGGAGGAGCGGTGCTGCCGTG CCCCAGGTCAAGCAGCGCATCCCAAGAGGAGCAGGATGAAGAG
類型 BMAST4KO (エクソン 1において 90bp 欠失) (配列 番号 23)	ATGGGGGAGAAAGTTCCGAGGCCTGAGCCCCTGCCCGGGCTGCAGCGGACACGGCGCC CGGACCCTAGTCCTCGCGGCAGCCGTGCTCGGAGGGCGCTTCTCAGCGGAGTCATCC TCTGGCTCGGAAACTCTGTCGGAGGAAGGGGAGCCAGCCGCTTCTCCTGCAGGTGCGAGCCG CCCGGGCCGCCGGCGGCCCTGGAACCCGGCTACCCGCCGTGGCTCCGCGCCTG GCTCTGGAGCGTGGAGTCCTACCCGCCGTGGCACCCGGAGGAGCGGTGCTGCCGTG CCCCAGGTCAAGCAGCGCATCCCAAGAGGAGCAGGATGAAGAG
類型 AMAST4KO (エクソン 15において 3bp 欠失) (配列番 号 24)	GGCAGTCTACTTTGGCACAAGAGTCCGCCAGAGGTTGCCATGAAGAAGATCAA CAAGCAGAACCTCATCCTCGAACAGATCCAGCAGGCCCTCGTGGAGCGAGACATCCT GACTTCGCAGAGAACCCCTTGTGGTCAGCATGTATTGTCCTTGAAACGAGGCCGTCA CTTATGCATGGTCATGGAGTATGTAGAAG
類型 BMAST4KO (エクソン 15において 13bp 欠失) (配列 番号 25)	GGCAGTCTACTTTGGCACAAGAGTCCGCCAGAGGTTGCCATGAAGAAGATCAA CAAGCAGAACCTCATCCTCGAACAGATCCAGCAGGCCCTCGTGGAGCGAGACATCCT GACTTCGCAGAGAACCCCTTGTGGTCAGCATGTATTGTCCTTGAAACGAGGCCGTCA CTTATGCATGGTCATGGAGTATGTAGAAG

前記表 2において 欠失される塩基は、太字で表示した。

【0048】

1 - 2 . M A S T 4 ノックアウトマウスにおける軟骨構成成分の発現変化確認のための R N A シーケシング

前記実施例 1 - 1 で作製された M A S T 4 ノックアウトマウスにおいて、軟骨構成成分である細胞外基質の変化を確認するために、各遺伝子に対して R N A シーケシングを行った。

【0049】

具体的には、前記実施例 1 - 1 で作製された生後 1 日の M A S T 4 ノックアウトマウス、ヘテロタイプマウス及び野生型マウスを犠牲にした後、頸骨 (tibia) を切開した。氷上に D E P C - P B S が入れられたディッシュに、前記切開された頸骨を浸しておき、解剖鏡を利用し、頸骨において、軟骨と骨との部分をニードルを利用して分離する。各群から分離されたそれぞれの組織をトリゾール (Invitrogenから購入) 5 0 0 μ l に浸して各試料にし、当業界に周知された方法によって R N A を抽出し、ナノドロップ (Thermo scientific) で定量した。

【0050】

R N A シーケシングは、テラジエネテックスで行った。具体的には、各群のマウスから抽出された総 R N A 2 μ g から、oligo (d T) を利用し、m R N A を分離した。前記 m R N A を断片化 (fragmentation) させ、無作為 6 量体プライミング (random hexamer priming) を介して、一本鎖 c D N A に合成した。それをテンプレートにし、二次鎖を合成し、二本鎖 c D N A を合成した。Blunt-endを作るために、End Repairを行い、Adapterを付けるために、A - tailing 及び Adapter ligationを行った。その後、P C R (polymerase chain reaction) を利用し、c D N A ライブライアリを増幅させた。2 1 0 0 BioAnalyzerを利用し、最終生成物の濃度とサイズとを確認した。生成されたライブライアリは、K A P A library quantification kitを以下で最終定量した後、H i s e q 2 5 0 0 を利用し、配列を解読した。前記解読された配列において、低品質の配列を除去するために、配列情報において、N で示された塩基の比率が全体配列の 1 0 % 以上含まれているか、あるいは Q 2 0 未満の塩基が 4 0 % 以上であるリードが除去され、平均品質が Q 2 0 以下であるリードも除去するフィルタリングを行った。前記フィルタリング全過程は、内部で作製されたプログラムによって遂行された。フィルタリングされた配列は、S T A R v 2 . 4 . 0 b (Dobin et al、2 0 1 3) を利用し、当該種 (species) 参照遺伝子配列 (h g 1 9) に整列させた。

【 0 0 5 1 】

発現量測定は、*Cufflinks v2.1.1* (Trapnell C. et al, 2010) を利用して計算し、計算された発現値を FPKM (fragments read per kilobase of exon per million fragments mapped) で表現した。遺伝子情報データベースにおいて、ensembl 72 を使用し、non-coding 遺伝子領域は、発現マスクオプションから除外した。発現量測定の正確性を高めるために、多重判読矯正 (multi-read correction) と断片矯正 (frag-bias-correct) とのオプションを追加して使用し、他のオプションは、基本値を使用した。

MAST4 ノックアウトによって変化される遺伝子を確認するために、*Cufflinks* を介して得られた各群での試料の発現値を利用した。各発現値が、MAST4 野生型に比べて 2 倍以上、P 値 < 0.01 と、有意性ある遺伝子を選択し、選択された遺伝子の発現値及びその差を表 3 に並べた。10

【 0 0 5 2 】

その結果、下記表 3 のように、多数の軟骨構成成分として存在する細胞外基質関連遺伝子の発現が増加したということが分かる。ただし、MAST4 ノックアウトマウスの 2 タイプのいずれにおいても、細胞外基質分解酵素である mmp8 及び mmp9 は、発現が低減したと見られる。

20

30

40

50

【表 3】

		Fold induction in A KO	Fold induction in B KO
Agcan	aggrekan [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:996062]	4.65	5.79
Bgn	biginan [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88158]	2.38	2.26
Chad	chondrogranin [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1094866]	5.90	7.79
Cdk4	cartilage intermediate layer protein, nucleotide pyrophosphorylase [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1244450]	2.41	1.79
Col2a1	collagen, type II, alpha 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:38452]	4.13	17.41
Col3a1	collagen, type III, alpha 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88453]	1.47	1.18
Col4a1	collagen, type IV, alpha 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88454]	1.57	1.51
Col4a2	collagen, type IV, alpha 2 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88455]	1.57	1.27
Col4a4	collagen, type IV, alpha 4 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:104687]	1.26	7.41
Col4a5	collagen, type IV, alpha 5 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88456]	1.33	1.23
Col5a1	collagen, type IV, alpha 6 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:2152695]	2.90	3.33
Col5a2	collagen, type V, alpha 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88457]	1.11	1.44
Col6a1	collagen, type VI, alpha 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88458]	1.17	1.37
Col6a2	collagen, type VI, alpha 2 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88459]	2.04	1.96
Col6a3	collagen, type VI, alpha 3 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88460]	1.75	1.89
Col6a4	collagen, type VI, alpha 4 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88461]	2.28	2.20
Col8a2	collagen, type VIII, alpha 2 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88462]	1.44	2.35
Col9a1	collagen, type IX, alpha 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88463]	4.47	12.86
Col9a2	collagen, type IX, alpha 2 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88464]	2.38	14.16
Col9a3	collagen, type IX, alpha 3 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88465]	2.81	1.78
Col1a1	collagen, type XI, alpha 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88446]	2.44	3.10
Col1a2	collagen, type XI, alpha 2 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88447]	2.06	2.45
Col1a3	collagen, type XII, alpha 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88448]	1.93	1.72
Col1a4	collagen, type XIV, alpha 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1341221]	1.83	1.60
Col1a5	collagen, type XV, alpha 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88449]	2.16	2.54
Col1a6	collagen, type XVI, alpha 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1095336]	1.73	1.66
Col1a7	collagen, type XXIV, alpha 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:191605]	1.48	1.65
Col1a8	collagen, type XXV, alpha 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:22118]	1.83	2.37
Comt	cartilage oligomeric matrix protein [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:88466]	3.86	6.56
Fbln1	fibrillin 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1911620]	1.54	1.15
Fbln7	fibrin-modulin [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1328564]	2.90	3.16
Fmd3	fibronectin 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:569556]	4.03	4.15
Fnl1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1337006]	1.62	1.34
Hapln1	hyaluronan and proteoglycan link protein 2 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1914916]	1.71	6.49
Hapln3	hyaluronan and proteoglycan link protein 3 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1341171]	2.87	7.01
Lect1	leukocyte cell derived chemotaxin 1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1065931]	3.90	14.35
Matn1	matrin 1, cartilage matrix protein [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1305350]	11.31	19.74
Matn3	matrin 3 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1308350]	4.54	16.44
Matn4	matrin 4 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1308314]	2.61	5.29
Prelp	proline arabinine-rich end leucine-rich repeat [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:2151110]	2.32	2.66
Sdc4	syndecan 4 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:149164]	1.63	2.09
Suds3	sushi domain containing 3 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:2685972]	3.90	8.99
Ucma	upper zone of growth plate and cartilage matrix associated [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1915771]	6.85	21.57
Mmp3	matrix metallopeptidase 3 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1202395]	0.44	0.11
Mmp9	matrix metallopeptidase 9 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:97011]	0.03	0.34

10

20

30

40

【0053】

1 - 3 . M A S T 4 ノックアウトマウスにおける軟骨構成成分の発現変化確認のための R T - P C R

前記実施例 1 - 1 で作製された M A S T 4 ノックアウトマウスにおいて、軟骨構成成分である細胞外基質の変化をさらに具体的に確認するために、前記実施例 1 - 2 の R N A シケシング結果において、発現が変化すると見られる遺伝子のうち一部を選別し、R T - P C R を行った。

具体的には、下記表 4 のプライマーセット及び A c c u P o w e r P C R p r e m i x (BIONEER、韓国)を利用し、販売者の指針に従って遂行した。

50

【表4】

名称	5'→3'	配列5'→3'	産物サイズ
Acan	717ド' (配列番号26) 717ド'X (配列番号27)	GGTCACGTGTTACCGCCACTT CCAGGGAGCTGATCTCGTAG	430
Chad	717ド' (配列番号28) 717ド'X (配列番号29)	GCCAAGGACCTGGCCTGCTGCCT GCTTCTCTGGACCTCTTGGT	500
Col2a1	717ド' (配列番号30) 717ド'X (配列番号31)	GCCAAGACCTGAAACTCTGC CTTGCCCCACTAACCAAGTGT	494
Col9a1	717ド' (配列番号32) 717ド'X (配列番号33)	CGTGGATTTCAGGGCCGTGG TCGCTGTCTTGTGATCACCAAG	500
Col11a1	717ド' (配列番号34) 717ド'X (配列番号35)	GCTAGGTGTTCTGGCTGTC CCACCTTCTCAGCTGTCTC	429
Comp	717ド' (配列番号36) 717ド'X (配列番号37)	AACGGCTCAGCACTGCACCGA CCC GTTGC CGGCC CAGCCAA	400
Fmod	717ド' (配列番号38) 717ド'X (配列番号39)	CCAGCAGTCTTACCTACTAC GCCCTCAGCTTGGAGAAAGAC	350
Lect1	717ド' (配列番号40) 717ド'X (配列番号41)	GTTTGCTGGAGGAGAGAAAG CAGTGGGTGTAGCTCCCT	520
Matn1	717ド' (配列番号42) 717ド'X (配列番号43)	GGCAAGACCTGCAATGTCTG TAGTCCTGCTCCGGCCATC	400
Matn3	717ド' (配列番号44) 717ド'X (配列番号45)	CAGGACCAAGGTGAATGAGGT ATCTGCACTTCAAGCTGTAGC	550
Matn4	717ド' (配列番号46) 717ド'X (配列番号47)	AGCTCCCCCAGCGTGGCCTCC ATGCCGCGGGCGCGCGCTG	350
Susd5	717ド' (配列番号48) 717ド'X (配列番号49)	TCTCAGAAATGGCTCTCAGGG TACCACTCCCCACAGCTGT	440
Ucma	717ド' (配列番号50) 717ド'X (配列番号51)	GGTCAACAGCTCCAGGAAAG TTCTGGTGGCTAAGCAAGG	151
Mmp8	717ド' (配列番号52) 717ド'X (配列番号53)	TGATGGACCAAATGGAAATCC GGGGTACAGGCCTTGGGTTG	300
Mmp9	717ド' (配列番号54) 717ド'X (配列番号55)	GACGGGATATCCCTCGACGG GTGGTGECCGACCAAGCGGTA	422
Gapdh	717ド' (配列番号56) 717ド'X (配列番号57)	TGGCAAAGTGGAGATGTTGCC AAGATGCTGATGGGCTTCGG	156
Haplh1	717ド' (配列番号58) 717ド'X (配列番号59)	GGGCTGGACTGGTCAATGC GCAAATATCTGGCCCACTT	280
Haplh3	717ド' (配列番号60) 717ド'X (配列番号61)	TCCCTGGGGACTACCAAGG CACCCGCCCTTGAGGGCAG	460
Preip	717ド' (配列番号62) 717ド'X (配列番号63)	GCCACAAACATCTGAGAAA AAGCACATCATGGGCTTCAG	440
Fbln7	717ド' (配列番号64) 717ド'X (配列番号65)	ACTGGAAACCGCTGTCA ACATCTCACAGCTCTTCC	320
Sdc4	717ド' (配列番号66) 717ド'X (配列番号67)	AGGTCACTGACCCCCAGGAC AACTCATTTGGTGGGGCTT	520
Bgn	717ド' (配列番号68) 717ド'X (配列番号69)	AAGATCTCAAGATCCATGA GCCCTCTGAGATGGCGAGGTA	270

【0054】

その結果、実施例1-2でのRNAシーケンシング結果と一致し、軟骨構成成分として存在する細胞外基質関連遺伝子の発現が増大したということを確認した(図2)

【0055】

1-4. MAST4ノックアウトマウスの軟骨細胞マーカー発現量確認

MAST4がノックアウトされた場合、軟骨細胞に及ぼす影響を確認するために、軟骨細胞マーカーとして知られたCol2a1を、マウスの頸骨に蛍光染色して確認した。

具体的には、前記実施例1-1のマウスマodelから頸骨組織を得て、4%パラホルムアルデヒド(PFA、Wako、Osaka、日本)に、0.01Mリン酸塩緩衝食塩水(PBS、pH 7.4)、4で一晩固定した。前記組織を、10%EDTAで脱カルシウム化させ、パラフィン(Leica Biosystems、MO、米国)に入れ(embed)、6mm厚に切片化(sectionize)した。試料スライドを、ヘマトキシリント(ematoxylin)及びエオシン(eosin)で染色し、前記組織切片を4で一晩一次抗体と共にインキュベーションした。

前記一次抗体は、Col12a1(Abcam、Cambridge、英国)を標的とする。PBSで洗浄した後、前記組織切片を連續してAlexa Fluor 488(Invitrogen、CA、米国)で2時間室温でインキュベーションした。各イメージを、confocal microscope LSM700(Carl Zeiss、Oberkochen、ドイツ)を利用して得て、代表的な試料の切片を新たに準備した(freshly prepared)Russell-Movat modified pentachrome(American MasterTech、CA、米国)で染色した。

【0056】

その結果、図10は、観察された試料の特定部分を拡大したものであり、Col2a1(蛍光緑色区域/灰色背景区域)が、MAST4がノックアウトされたマウスマodelの頸骨で顕著に増大した。TOPRO-3(赤色点/灰色点で表示された区域)は、軟骨細胞の核を染色したものである。従って、MAST4ノックアウトにより、軟骨の形成及び再生が促進されるということが分かる。

【0057】

実施例2. MAST4 ノックアウト細胞における軟骨構成成分の発現増大確認

2-1. CRISPR/Cas9システムを利用したMAST4ノックアウト細胞の作製

MAST4ノックアウトマウスで示された細胞外基質増大現象が、インビトロでも同一に再現されるか否かということを確認するために、CRISPR/Cas9システムを利用し、MAST4ノックアウト細胞を作製した。

【0058】

具体的には、マウスに由来した線維芽細胞(fibroblast cell)において、軟骨細胞に分化が可能なC3H/10T1/2、Clone 8 (ATCC® CCL-226™)(¹⁰ 亞洲大学校医科大学医学遺伝学教室のチョン・ソンヨン教授研究室から贈与される(C3H10T1/2細胞))を購入した。前記細胞をノックアウトさせるために、lentiCRISPRv2(Plasmid #52961)、pVSVG(AddGene 8454)及びpSPAX2(AddGene 12260)をAddgeneから購入し、下記表5のオリゴマーを利用し、販売者の指針(lentiCRISPRv2 and lentiGuide oligo cloning protocol)により、マウスMAST4遺伝子(ENSMUSG00000034751)のエクソン1を標的とするガイドRNAを、LentiCRISPRv2プラスミドに挿入し、ガイドRNAとCas9酵素とを同時に発現するプラスミドを作製した(対照群には、ガイドRNAが挿入されず、Cas9のみ発現するプラスミドを使用した)。

【表5】

オリゴマー	配列
mMAST4 CRISPR エクソン1 sgRNA F(配列番号 70)	5' -CACCGTACCTGCCGCTGCCGACC-3'
mMAST4 CRISPR エクソン1 sgRNA R(配列番号 71)	5' -AAACGGTGCGGCAGCGGCAGGGTAC-3'
マウスMAST4 エクソン1(配列番号 72)	5'- ATGGGGAGAAAGTTCCGAGGCGCCTGAGCCGTGCCCGGGGCTGCAGC GGACACGGCGCCGGACCTAGTCCTCTGGCGAGCCGTGCTCGGAG GGCGCTTCCTCAGCGGAGTCATCCTCTGGCTCGGAAACTCTGTCGGAGGA GGGGAGCCAGCCGCTTCCTGCAGGTGCGAGCCGCCGCGGCCGGC GGGCCCTGGAACCCGGCTACCCGCCGCTGGCTCCCGCGCGTGGCT CTGGAGCGTGGAGTC CCTACCCCTGCCGCTGCCGACCCGGAGGAGCGGTG CTGCCGGTGCCCCAGGTCAAGCAGCGCATCCAAGAGGAGCAGGATGAAGAG -3'

10

20

30

【0059】

本方法はレンチウイルスを基にしたCRISPRノックアウト方法であるので、ウイルスを作製するために、293T細胞に、前述のところで作製された3種プラスミド(LentiCRISPRv2(+ガイドRNA):ガイドRNA+Cas9 expressing plasmid、pVSVG:Virus envelop plasmid、pSPAX2:Virus packaging plasmid)を、試薬PEI(polyethylenimine)を利用して形質感染(transfection)させた。

18時間後、新鮮な培地に交換し、培地だけ収穫し、0.45μmフィルタを利用し、ウイルスを得た。前記得られたウイルスを、C3H10T12が接種(seeding)された6ウェルディッシュに感染させ、ウイルス1ml+DMEM/FBS1ml+polybrene 2μlを処理した後、24時間後、新たなDMEM/FBSに交換した。24時間後、プロミシンを処理し、感染された細胞だけ選択し、10cmディッシュに、40%コンフルエントまで継代培養を進めた。CRISPRによる遺伝子編集は、細胞ごとにランダムに示されるために、単一菌集落(colony)選択を進めた。10cmディッシュに、各ディッシュ当たり50個の細胞が存在するように接種し、経時的に細胞が菌集落を形成すれば、それを1つのクローンに指定し、各クローンのゲノムDNAを抽出し、エクソン1を特異的に增幅するプライマー(F: 5' 3' CTGTGGTCCAACCTCTGTC A、R: 5' 3' ATCGGCTCAGTGACACTTCC)を利用してPCRを行った。増幅されたPCR結果物を、シーケシング業体に依頼して分析した。配列分析結果、

40

50

フレーム移動による遺伝子編集が確認された細胞を、対照群細胞と共に実験に利用した。前記作製されたガイドRNAが標的とする配列を、前記表5に太字で表示した。前記MAST4ノックアウトした結果をシーケシングした結果マウスマスト4エクソン1から、2個のヌクレオチドが欠失され、フレーム移動が誘発されたことを確認した。

【0060】

2 - 2 . M A S T 4 ノックアウト細胞における軟骨構成成分の発現変化確認のための R T - P C R

前記実施例1-1で作製されたMAST4ノックアウトマウスにおける軟骨構成成分である細胞外基質の変化を確認するために、各遺伝子に対してRT-PCRを行った。

12ウェル中央に、総 10^5 個の細胞を含む培養液 $10\mu l$ を入れ、2時間インキュベーションした後、各ウェルに、FBS10%を含むD MEMを $1m l$ ずつ添加した。24時間経過後、細胞を収穫し、easy-BLUE(TM) Total RNA Extraction Kit(Invitron、Cat17061)を利用し、販売者の指針によってRNAを分離した。その後、M-MLV Reverse Transcriptase(Promega、M1705)を利用し、販売者の指針によってcDNAを合成した。RT-PCRに使用されたプライマーは、表4に記載された通りである。

【0061】

その結果、実施例1-2及び実施例1-3での結果と一致し、MAST4ノックアウト細胞においても、軟骨構成成分として存在する細胞外基質関連遺伝子の発現が増大したことを見ることにより(図4)、インビトロにおいても、MAST4ノックアウトマウスで示された結果と同一結果を得る可能性があるということを確認した。

【0062】

実施例3 . M A S T 4 ノックアウト細胞におけるマイクロマス培養及び軟骨分化活性上昇の確認

3 - 1 . M A S T 4 ノックアウト細胞のマイクロマス培養(micromass culture)

前記実施例2-2のMAST4ノックアウト細胞の軟骨型性能を評価するために、マイクロマス培養を行った。

具体的には、MAST4ノックアウト細胞を、前記実施例2-1のように作製し、マイクロマス培養のために、従来公知の方法(Differentiation and Mineralization of Murine Mesenchymal C3H10T1/2 Cells in Micromass Culture, 2010, Rani Roy)を参照して行った。まず、12ウェルプレートの各ウェル中央に、線維芽細胞状態の総 10^5 個の細胞を含む培養液 $10\mu l$ を入れ、2時間インキュベーションした後、各ウェルに、FBS10%を含むD MEMを $1m l$ ずつ添加した。その後、各培養物には、軟骨に誘導させる目的により、 $100ng/m l$ 、 $500ng/m l$ 及び $1,000ng/m l$ のBMP2をそれぞれ添加した。その後、培養液を3日ごとに新たに交換した。

【0063】

3 - 2 . マイクロマス培養されたMAST4ノックアウト細胞の効果再現確認

前記実施例3-1によって培養されたMAST4ノックアウト細胞においても、前記実施例2-2のMAST4ノックアウト細胞のように、軟骨構成成分である細胞外基質の生産が増加する否かということ、及び最終的に軟骨型性能が上昇するか否かということを確認するために、RT-PCRを行った。

【0064】

具体的には、前記マイクロマス培養のために、プレートに接種した日を基準に、0日、3日間及び6日間培養したものをそれぞれ収穫し、同じ日にRNAを分離させ、各遺伝子について、前記実施例1-3のようにRT-PCRを行い、軟骨構成成分の生産増加いかんを確認した。

【0065】

その結果、前記実施例2-2のMAST4ノックアウト細胞で観察されたところと一致し、各細胞外基質成分の発現が増大すると共に、アグレカン(aggrekan)の発現により、BMP2を介した誘導により、3日目から軟骨細胞において、分化が始まるということが

10

20

30

40

50

分かり、結果として、軟骨型性能が上昇するということを確認した（図5）。特に、MAST4ノックアウトされた場合、3日目には、一部大きい発現差を示さない遺伝子が存在するが（haplin）、6日目には、表示された全ての細胞外基質成分関連遺伝子が過発現する一方、対照群の場合、一部タンパク質は、少なく発現するか、あるいは6日目にむしろ減少し（例えば、Matn3またはComp）、MAST4ノックアウト細胞が多様な細胞外基質をいずれも過発現させるのに有用であるように見えた。

【0066】

3-3. 大量培養されたMAST4ノックアウト細胞の軟骨形成確認

前記実施例3-2で観察された各細胞外基質成分関連遺伝子過発現現象が、遺伝子発現単位ではない、実際に単離して得られるタンパク質単位で増大するか否かということを確認するために、アルシアヌブルー染色を行った。

10

【0067】

具体的には、前述の各日付に該当する細胞のプレートを、PBSで2回ずつ洗浄し、4%パラホルムアルデヒド1mLを添加し、15分間固定させた。その後、0.1N HCl（pH 1.0）に溶かした1%アルシアヌブルー8-GX（Sigma-Aldrich、A5268）1mLを添加し、一晩染色させた。その後、500μlの0.1N HClを利用して2回洗浄し、イメージを得た。

【0068】

その結果、MAST4ノックアウト細胞の場合、3日目から軟骨形成が増大し、細胞外基質分泌が増大するということを確認することができ、その程度は、BMP2濃度が上昇するにつれて増大するように見られた（図6）。

20

【0069】

実施例4. ヒト細胞におけるMAST4発現抑制による効果確認

実施例4-1. ヒト細胞におけるMAST4発現抑制による効果確認

前記ノックアウトマウスマodel及びマウス細胞で確認されたような結果が、ヒト細胞においても、同一に誘発されるか否かということを確認した。

具体的には、ヒト原性軟骨細胞（primary chondrocyte）に、（仁荷大学校医科大学から寄贈される）MAST4 siRNA（h）（sc-106201；Santa Cruz biotechnology）を一時的（transient）に形質注入してノックダウンさせるか（図8A）、MAST4の発現を、CRISPR/Cas9システムによってノックアウトさせた。MAST4 siRNAは、ThermoFisher SCIENTIFICのLipofectamine® RNAi MAX Transfection Reagentを使用して進め、そこに使用されたプライマー情報は、下記表6に開示された通りである。CRISPR/Cas9システムの作製及び処理は、実施例1-1のように行うが、ThermoScientificのGeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit（A29377）を参照して進め、そこに使用されたプライマー情報は、下記表6に開示された通りである。

30

【0070】

siRNAの形質注入は、高い形質注入効率のために、細胞をプランティング（planting）しながら、同時に形質注入する逆順形質注入（reverse transfection）技術を利用し、形質注入試薬としては、ThermoFisher SCIENTIFICのLipofectamine® RNAi MAX Transfection Reagentを使用した。具体的には、15nMのMAST4 siRNAと、4.5μlのLipofectamine RNAi MAXとを、Gibco™ Opti-MEM I™ 40μlで混合した後、15分間インキュベーションした。その後、 1.5×10^5 細胞/ウェルのヒト原性軟骨細胞（***変更）を、6ウェルプレート（Coll I coated plate）に、ゲンタマイシン（gentamicin）が含まれていない培地2mL（FBS 10%）と共にプランティングし、前記siRNA混合物を共に添加し、72時間後に収穫し、RNAを分離した。ヒト原性軟骨細胞は、DMEM（17-205-CVR Corning）、FBS Qualified（米国origin 500mL 26140-079、Gibco）、L-グルタミン（200mM）（100×25030-081、Gibco）及びゲンタマイシン（5mμg/ml）（10mL 15700-060、Thermofisher）の条件で、コラーゲンI

40

50

にコーティングされたフラスコ(175、Col I Straight Vent 356487、Corning)で培養した。

【0071】

ノックアウトは、MAST4ゲノム上の20nt（標的のための配列を表6でボールド体で表示）を標的にして行われ、具体的には、#1、#3は、Exon5、#2は、Exon8を標的にしたものである。#1と#3は、Reverse方向に作製し、#2は、Forward方向に作製した。C R I S P R / C a s 9システムの作製に使用されたヒトMAST4遺伝子のレファレンスは、MAST4 E N S G 0 0 0 0 0 0 6 9 0 2 0 (<http://asia.ensembl.org/>)を基準にした。標的になったExon配列情報、及びC R I S P R欠失が発生するN G G P A M配列（灰色ボックス）を図7に具体的に開示した。

10

【表6】

hMAST4 CR#1 F (配列番号73)	5'-TAATACGACTCACTATAG GAGTGTGGTCGAGGCAATGC-3'
hMAST4 CR#1 R (配列番号74)	5'-TTCTAGCTCTAAAC GCATTGCCCTCGACCACACTC-3'
hMAST4 CR#2 F (配列番号75)	5'-TAATACGACTCACTATAG GTAACTCGTCTGGTGTGGT-3'
hMAST4 CR#2 R (配列番号76)	5'-TTCTAGCTCTAAAC ACCAACACCCAGACGAGTTAC-3'
hMAST4 CR#3 F (配列番号77)	5'-TAATACGACTCACTATAG AGCAACCCGAAAAGCTTAAT-3'
hMAST4 CR#3 R (配列番号78)	5'-TTCTAGCTCTAAAC ATTAAGCTTTCCGGTTGCT-3'
HumanAcanRT Forward (336) (配列番号82)	5'-gaatcaactgctgcagacca-3'
HumanAcan RT Reverse (336) (配列番号83)	5'-gtgccagatcatcaccacac-3'
HumanCol9a1RT Forward (467) (配列番号84)	5'-CGTGGATTCCAGGCCGTGG-3'
HumanCol9a1RT Reverse (467) (配列番号85)	5'-TCGCTGTCCTTGATCACCAAG-3'
HumanGapdhRT Forward (156) (配列番号86)	5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC-3'
HumanGapdhRT Reverse (156) (配列番号87)	5'-AAGATGGTGATGGGCTTCCCG-3'

20

【0072】

その結果、図8Aから分かるように、MAST4 siRNAを形質注入したとき、MAST4の発現が低減したことが確認され、このとき、Acanのような細胞外基質因子の発現が増大した。また、図8Bから分かるように、MAST4がノックアウトされることにより、Acan及びCol9a1のような細胞外基質因子の発現が増大した。そのような結果は、先に、マウスモデル及びマウス細胞を利用して立証されたところと同一である。従って、他の細胞外基質因子及び軟骨形成効果においても、ヒト細胞において、MAST4の発現を阻害することにより、マウスで立証されたところと同一結果を得ることができるのである。

30

【0073】

実施例4-2.ヒト細胞においてTGF-1のMAST4発現抑制、及びそれによる効果確認

40

実施例4-1で確認されたようなMAST4発現抑制が、TGF-1によって誘発され、それにより、細胞外基質因子の発現に及ぼす影響を確認した。

具体的には、実施例4-1のヒト原性軟骨細胞に、TGF-1を処理し、実施例1-2及び1-3のようなRT-PCR及びウェスタンプロットティングを利用し、その発現量を測定した。

【0074】

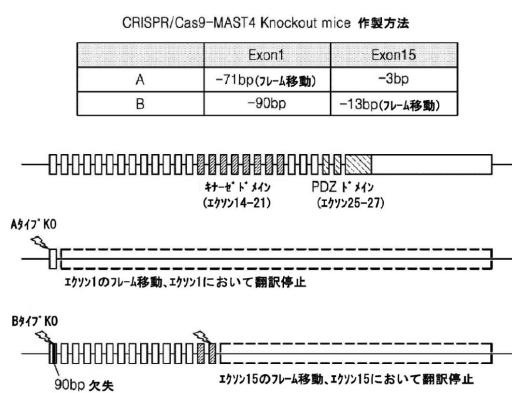
その結果、図9から分かるように、TGF-1 (5ng/ml)を、24, 48, 72時間それぞれ処理すれば、MAST4の発現が抑制され、それにより、細胞外基質因子の発現も増大するということが分かる。TGF-1 (5ng/ml)とTGF-1との阻害剤であるTEW-7197を同時に処理すれば(図9B)、TGF-1によって増

50

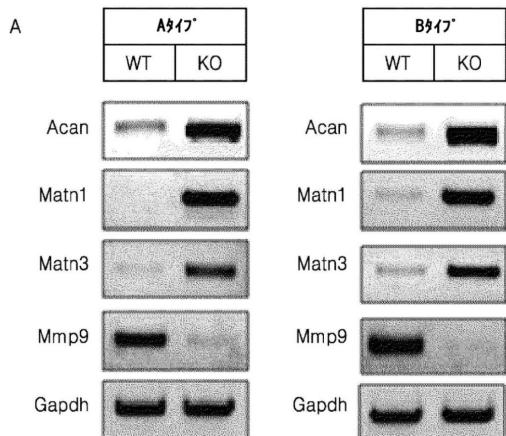
大された Acan の発現が抑制され、MAST4 発現も、TGF- β 単独処理したところに比べ、抑制効果が低減された。

【図面】

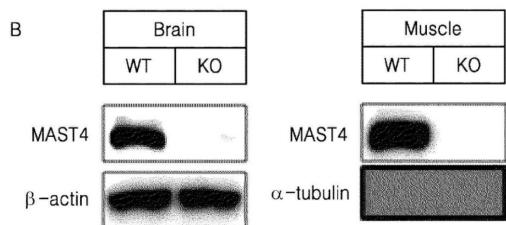
【図 1】



【図 2】

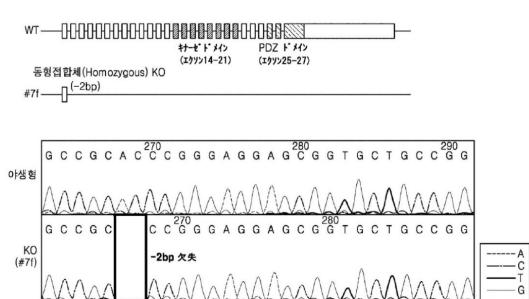


10

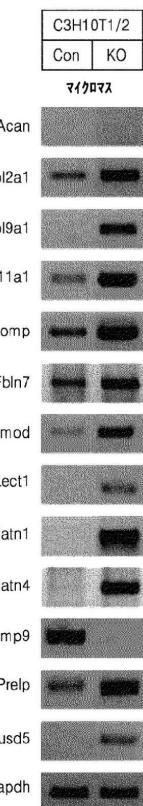


20

【図 3】



【図 4】



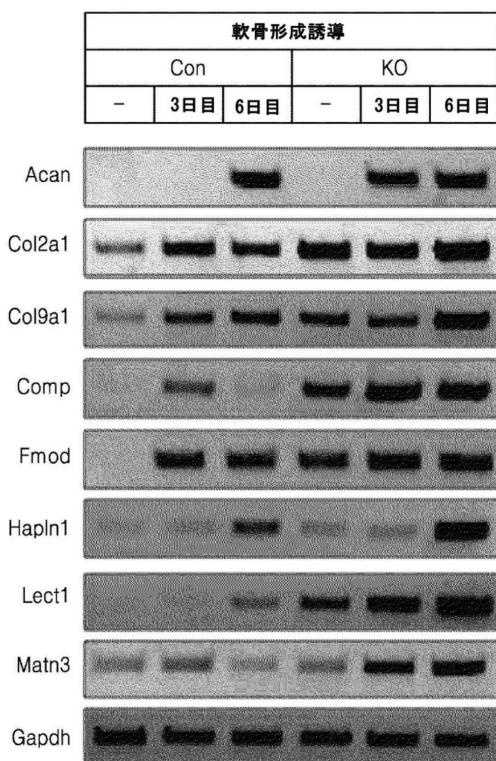
30

40

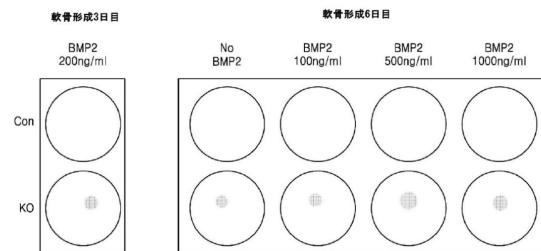
50

【図5】

マイクロマス培養 - : 非合流 (not confluent) BMP2:500ng/ml



【図6】



10

20

【圖 7】

CR#1 (配列番号79)

Human MAST4 Exon 5

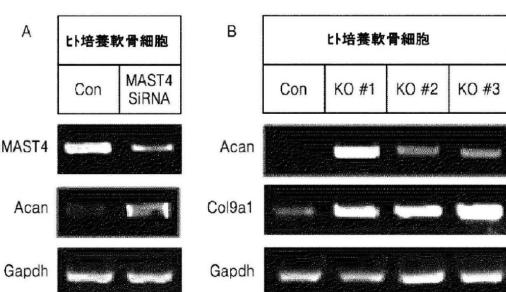
GB#3 (配列番号 82)

CR#2 (配列番号 80)
Human MAST4 Exon 8

acttccatttcaggat

C#3 (配列番号 81)

〔圖 8〕

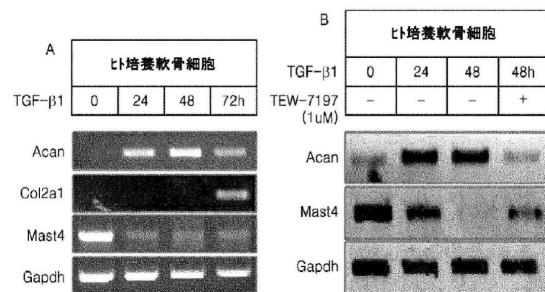


30

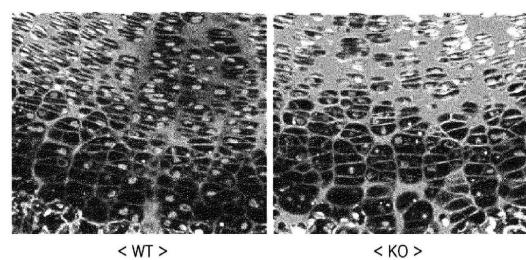
40

50

【図9】



【図10】



10

【配列表】

0007154238000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 7
A 6 1 K 31/7105(2006.01)	A 6 1 K 31/7105
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N 15/54
C 0 7 K 14/495 (2006.01)	C 0 7 K 14/495 Z N A

(33)優先権主張国・地域又は機関

韓国(KR)

(73)特許権者 519325728

キム,ソン ジン

大韓民国,ソウル 06667,ソチョーグ,ミョンダルーロ,91,エーピーティー.901,
ザミシュラン

(74)代理人 100088904

弁理士 庄司 隆

(74)代理人 100124453

弁理士 資延 由利子

(74)代理人 100135208

弁理士 大杉 卓也

(74)代理人 100163544

弁理士 平田 緑

(72)発明者 キム,ソン ジン

大韓民国,ソウル 06667,ソチョーグ,ミョンダルーロ,91,エーピーティー.901,
ザミシュラン

(72)発明者 ジヨン,ハン ソン

大韓民国,ソウル 03722,ソデムシング,ヨンセイーロ,50-1,カレッジ オブ デンティストリー,アールエム.601 オーラル バイオロジー クラス

(72)発明者 高橋,智

日本国,茨城県 305-0044,つくば市,3-19-1 並木

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特表2013-503643 (JP, A)

特表2016-531147 (JP, A)

国際公開第2017/123951 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

P u b M e d