

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4454697号
(P4454697)

(45) 発行日 平成22年4月21日(2010.4.21)

(24) 登録日 平成22年2月12日(2010.2.12)

(51) Int. Cl.		F I
A 6 1 K 31/557	(2006.01)	A 6 1 K 31/557
A 6 1 K 31/57	(2006.01)	A 6 1 K 31/57
A 6 1 K 31/66	(2006.01)	A 6 1 K 31/66
A 6 1 K 31/70	(2006.01)	A 6 1 K 31/70
A 6 1 K 35/12	(2006.01)	A 6 1 K 35/12

請求項の数 7 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-522871	(73) 特許権者	500429332
(86) (22) 出願日	平成8年1月5日(1996.1.5)		ケース ウェスタン リザーブ ユニバー シティ
(65) 公表番号	特表平10-512756		CASE WESTERN RESERV E UNIVERSITY
(43) 公表日	平成10年12月8日(1998.12.8)		アメリカ合衆国、44106、オハイオ州 、クリーブランド、ユークリッド アベニ ュー 10900
(86) 国際出願番号	PCT/US1996/000170	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開番号	W01996/023059		弁理士 小野 新次郎
(87) 国際公開日	平成8年8月1日(1996.8.1)	(74) 代理人	100089705
審査請求日	平成10年7月3日(1998.7.3)		弁理士 社本 一夫
審査番号	不服2004-2546(P2004-2546/J1)	(74) 代理人	100075270
審査請求日	平成16年2月9日(2004.2.9)		弁理士 小林 泰
(31) 優先権主張番号	08/377,461		
(32) 優先日	平成7年1月24日(1995.1.24)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト間葉幹細胞分化の系列指向誘導

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

分離ヒト間葉幹細胞の系列指向分化を単一特定間葉系列に誘導する一つの組成物であって、前記組成物が、ヒト間葉幹細胞と、間葉幹細胞の分化を単一特定系列に誘導する1個またはそれ以上の生物活性因子とを含み、生物活性因子が筋誘導因子を含み、筋誘導因子が5-アザシチジン、5-アザデオキシシチジンおよびそのいずれかの類似体よりなるグループから選択されることを特徴とする組成物。

【請求項2】

請求の範囲第1項記載の組成物であって、ここで前記組成物が、生物活性因子の混合物を含むことを特徴とする組成物。

【請求項3】

請求の範囲第1項記載の組成物であって、更に薬理許容担体を含むことを特徴とする組成物。

【請求項4】

請求の範囲第3項記載の組成物であって、ここで薬理許容担体が、注射可能液であることを特徴とする組成物。

【請求項5】

請求の範囲第3項記載の組成物であって、ここで薬理許容担体が、硬質多孔性容器であることを特徴とする組成物。

【請求項6】

10

20

請求の範囲第3項記載の組成物であって、ここで薬理許容担体が、ゲルであることを特徴とする組成物。

【請求項7】

請求の範囲第1項記載の組成物であって、ここで筋誘導因子が5 - アザシチシンおよび5 - アザ - 2' - デオキシシチジンよりなるグループから選択されることを特徴とする組成物。

【発明の詳細な説明】

この発明はヒトあるいは他の種の病的状態の治療に試験管で培養された間葉幹細胞を移植する前あるいは移植の時点でこれらの細胞を特異的細胞系列経路に分化するよう指向する組成物を提供する。

間葉幹細胞 (MSCs) は骨髄、血液、真皮、および骨膜で見出される形態形成多能性芽細胞あるいは胚状細胞であり、それらは脂肪結合組織、骨結合組織、軟骨結合組織、弾性結合組織、筋結合組織および繊維結合組織を含む間葉あるいは結合組織の特異な型に分化できる。これらの細胞が入り込む特異的な分化経路は機械的作用およびもしくは成長因子、サイトカインなどの内因性生物活性因子、およびもしくは宿主の組織に定着した局部微環境条件からの各種の作用に依存する。これらの細胞は通常骨髄で非常に低い頻度で存在するけれども、組織培養におけるこれらの細胞の母集団を分離し、精製し、また有糸分裂で拡張する方法がキャプラン、他、合衆国特許番号5,197,985号および5,226,914号で報告されている。

出生前生物において、特殊化結合組織細胞へのMSCs分化は十分に定着している。例えば胚ひな、マウスあるいはヒトの肢芽間葉細胞は軟骨および他の結合組織に分化する(1-5)。加えてクローンラット胎児頭蓋冠細胞系もまた筋、脂肪、軟骨、および骨に分化することが示された(6)。出生後生物におけるMSCsの存在は後胚細胞のいくつかの中胚葉表現型への分化を示す目的について広範には研究されていなかった。これまでになされた数少ない研究は骨髄細胞による骨および軟骨の形態形成に続く拡散チャンバでの入れこならびに生体内移植を含む(7、8)。最近では若いラビット(800-1,000g)から得た骨髄誘導細胞は生体内で脂肪細胞および骨形成細胞を形成することが示され(9)、また出生後マウスのクローン化骨髄ストロマ細胞は脂肪細胞および骨原細胞を形成することが示された(10)。同様にひな骨膜からの細胞は分離され、培養で拡張され、また試験管内での高密度条件の下で軟骨および骨に分化することが示された(11)。

ラット骨髄誘導間葉細胞は生体内で移植された時には骨芽細胞および軟骨細胞に分化する能力を持つことが示された(12、6)。出生後生物の各種骨髄源から得た細胞は多核性外観がた易く培養内で特徴的に認識されると共に筋形成は決して観察されなかった。最初の見地において、この発明は分離培養拡張ヒト間葉幹細胞の系列指向誘導をもたらす組成物を提供し、この組成物は間葉幹細胞を選択の系列に分化を誘導するのに有効な一つの生物活性因子あるいは因子の組合せと接触させることを含む。より詳細には、この組成物は生物活性因子が骨形成、軟骨形成、腱形成、靭帯形成、筋形成、骨髄ストロマ形成、脂肪細胞形成および皮膚形成の各間葉系列よりなるグループから選択される間葉系列にこのような細胞を誘導する組成物である。望ましくは、細胞はこの見地で1個もしくはそれ以上の生物活性因子に生体外で接触させられ、これによりいずれかの生物活性因子の生体内投与と関連する何らのリスクもない組成物を提供する。

も一つの見地において、この発明は更に分離培養拡張ヒト間葉幹細胞および選択の系列へのそのような細胞の分化を誘導するのに有効な一つの生物活性因子を含む組成物を、それを必要とする個人に投与することを提供する。望ましくは、間葉幹細胞および生物活性因子は一緒に投与され、あるいはそれらは選択肢として別個に投与される組成物であることもできる。とりわけ、この組成物の見地は分離自己ヒト間葉幹細胞よりなる組成物がこれまでに、現在、あるいはこれから投与される個人に対し生物活性因子を投与することを含む。

も一つの見地において、この発明はヒトサイトカインの生体内生産をそれを必要とする個体に誘導する組成物を提供し、それは分離培養拡張ヒト間葉幹細胞およびそのような細胞

10

20

30

40

50

を誘導するために有効な生物活性因子をそのような個体のサイトカイン生産間葉系列子孫に分化するために投与することを含む。望ましくは、間葉幹細胞および生物活性因子は組成物として一緒に投与され、あるいはそれらは選択肢として別個の組成物として投与される。

これらの見地の特異的に望ましい実施例において、生物活性因子は骨形態形成タンパク質であり、ヒトMSCsは軟骨形成系列に向けられる。生物活性因子はインターロイキン1であり、またヒトMSCsはストロマ細胞系列に向けられる(望ましくはインターロイキン1はインターロイキン1である)。生物活性因子はデキサメタゾン、アスコルビン酸-2-リン酸塩、およびグリセロホスフェートであり、ヒトMSCsは骨形成系列に向けられる。あるいは生物活性因子は5-アザシチジン、5-アザデオキシシチジンおよびそのいずれかの類似体よりなるグループから選択され、またヒト間葉幹細胞は筋形成系列に向けられる。

10

この発明のも一つの見地は、分離培養拡張ヒト間葉幹細胞の分化を選択の系列に導入するのに有効なそのような細胞および生物活性因子あるいは組合せよりなる組成物を提供する。望ましくは、この組成物は更に組織培養培地よりなる。選択肢として、組成物はそれを必要とする動物、とりわけヒトへの投与に適した適切な培地を含むことができる。この発明の見地は、前に記載したそれと関連する系列への系列誘導に関して前に確認した生物活性因子を用いて特異的な実施例を提供する。

図1は間葉幹細胞が各種の系列経路に分化することによる間葉形成過程を図形で示す。

図2は骨形成分化経路を図形で示す。

20

図3は実施例1で報告される当初の研究においてアルカリ性ホスファターゼ活性の増加を培養における時間の関数としてグラフで示す。

図4は実施例1で報告される次の研究からの成果を示す。

図5は軟骨形成分化経路を図形で示す。

図6は実施例4の実験にもとづきインターロイキン1刺激の有無でヒト間葉幹細胞サイトカイン発現の範囲を示す。

図7Aおよび7B

(A) 5-aza-CRに露出後誘導される多核細胞を示すMSCsの生体培養の位相差顕微鏡写真。この顕微鏡写真は10 μ Mの5-aza-CRで処置2週後の培養を示す。細胞内で多くの核(矢印)が観察されるが、横紋は識別できない。

30

(B) 生後17日のラット胎児の後脚から調製された正常ラット胎児筋細胞の生体培養の位相差顕微鏡写真。骨髄MSCs誘導筋管と同じく識別できる横紋は明らかでない。スケールバー50 μ m。

図8: 5-aza-CRに露出後ラット骨髄MSCsから誘導される筋管における筋特異的ミオシンの免疫蛍光染色。ミオシン抗体は横断横紋を視覚化しないが、この抗体は縦軸繊維を明らかにする。スケールバー30 μ m。

図9A-9D: 5-aza-CRに露出2週間[(A)および(B)]ならびに5週間[(C)および(D)]にラット骨髄MSCsから誘導される筋管。位相差顕微鏡写真[(A)および(C)]ならびにミオシンの免疫蛍光染色[(B)および(D)]。(A)および(B)、(C)および(D)は同じ視野である。5-aza-CR露出2週後の筋管は抗ミオシン抗体で染色されるが、5週間後のものは染色されていない。スケールバー50 μ M。

40

図10A-10B: 細胞質内に小滴を含む5-aza-CR処置MSCsの顕微鏡写真。この培養はスダンプラックで染色された。(A)脂肪細胞のクラスター(矢印)が観察された。スケールバー200 μ M。(B)小滴はブラウンからブラックに染色され(矢印)、これは小滴が脂質であることを示唆している。スケールバー100 μ M。

図11: 5-aza-CR露出後ラット骨髄MSCsから誘導された筋形成細胞の生体培養の位相差顕微鏡写真。5-aza-CRへの露出に続き、これらの細胞はbFGF、4ng/mlで10日培養された。大型筋管を見ることができる。スケールバー300 μ m。

50

図12-12Dは実施例6で報告される実験で観察されたG-CSF、GM-CSF、M-CSFおよびSCFの発現をそれぞれ図形で示す。

図13A-13Cは実施例6で報告される実験で観察されたLIF、IL-6およびIL-11の発現をそれぞれ図形で示す。

図14は実施例6で報告される実験で観察されたGM-CSF発現の用量依存IL-1誘導を図形で示す。

この発明は多くの用途および利点を有する。まず最初は、自己宿主に戻す移植に先立ちMSC分化に向けかつ加速する能力に見出される。例えば骨形成細胞になるように試験管に向けられるMSCsはまず系列内に補充され次いで主要分化段階を経て進行しなければならないMSCsよりもより急速にかつ均質に移植部位で骨基質を合成するであろう。この
 10
 10
 20
 20
 30
 30
 40
 40
 50
 50
 60
 60
 70
 70
 80
 80
 90
 90
 100
 100
 110
 110
 120
 120
 130
 130
 140
 140
 150
 150
 160
 160
 170
 170
 180
 180
 190
 190
 200
 200
 210
 210
 220
 220
 230
 230
 240
 240
 250
 250
 260
 260
 270
 270
 280
 280
 290
 290
 300
 300
 310
 310
 320
 320
 330
 330
 340
 340
 350
 350
 360
 360
 370
 370
 380
 380
 390
 390
 400
 400
 410
 410
 420
 420
 430
 430
 440
 440
 450
 450
 460
 460
 470
 470
 480
 480
 490
 490
 500
 500
 510
 510
 520
 520
 530
 530
 540
 540
 550
 550
 560
 560
 570
 570
 580
 580
 590
 590
 600
 600
 610
 610
 620
 620
 630
 630
 640
 640
 650
 650
 660
 660
 670
 670
 680
 680
 690
 690
 700
 700
 710
 710
 720
 720
 730
 730
 740
 740
 750
 750
 760
 760
 770
 770
 780
 780
 790
 790
 800
 800
 810
 810
 820
 820
 830
 830
 840
 840
 850
 850
 860
 860
 870
 870
 880
 880
 890
 890
 900
 900
 910
 910
 920
 920
 930
 930
 940
 940
 950
 950
 960
 960
 970
 970
 980
 980
 990
 990
 1000
 1000
 1010
 1010
 1020
 1020
 1030
 1030
 1040
 1040
 1050
 1050
 1060
 1060
 1070
 1070
 1080
 1080
 1090
 1090
 1100
 1100
 1110
 1110
 1120
 1120
 1130
 1130
 1140
 1140
 1150
 1150
 1160
 1160
 1170
 1170
 1180
 1180
 1190
 1190
 1200
 1200
 1210
 1210
 1220
 1220
 1230
 1230
 1240
 1240
 1250
 1250
 1260
 1260
 1270
 1270
 1280
 1280
 1290
 1290
 1300
 1300
 1310
 1310
 1320
 1320
 1330
 1330
 1340
 1340
 1350
 1350
 1360
 1360
 1370
 1370
 1380
 1380
 1390
 1390
 1400
 1400
 1410
 1410
 1420
 1420
 1430
 1430
 1440
 1440
 1450
 1450
 1460
 1460
 1470
 1470
 1480
 1480
 1490
 1490
 1500
 1500
 1510
 1510
 1520
 1520
 1530
 1530
 1540
 1540
 1550
 1550
 1560
 1560
 1570
 1570
 1580
 1580
 1590
 1590
 1600
 1600
 1610
 1610
 1620
 1620
 1630
 1630
 1640
 1640
 1650
 1650
 1660
 1660
 1670
 1670
 1680
 1680
 1690
 1690
 1700
 1700
 1710
 1710
 1720
 1720
 1730
 1730
 1740
 1740
 1750
 1750
 1760
 1760
 1770
 1770
 1780
 1780
 1790
 1790
 1800
 1800
 1810
 1810
 1820
 1820
 1830
 1830
 1840
 1840
 1850
 1850
 1860
 1860
 1870
 1870
 1880
 1880
 1890
 1890
 1900
 1900
 1910
 1910
 1920
 1920
 1930
 1930
 1940
 1940
 1950
 1950
 1960
 1960
 1970
 1970
 1980
 1980
 1990
 1990
 2000
 2000
 2010
 2010
 2020
 2020
 2030
 2030
 2040
 2040
 2050
 2050
 2060
 2060
 2070
 2070
 2080
 2080
 2090
 2090
 2100
 2100
 2110
 2110
 2120
 2120
 2130
 2130
 2140
 2140
 2150
 2150
 2160
 2160
 2170
 2170
 2180
 2180
 2190
 2190
 2200
 2200
 2210
 2210
 2220
 2220
 2230
 2230
 2240
 2240
 2250
 2250
 2260
 2260
 2270
 2270
 2280
 2280
 2290
 2290
 2300
 2300
 2310
 2310
 2320
 2320
 2330
 2330
 2340
 2340
 2350
 2350
 2360
 2360
 2370
 2370
 2380
 2380
 2390
 2390
 2400
 2400
 2410
 2410
 2420
 2420
 2430
 2430
 2440
 2440
 2450
 2450
 2460
 2460
 2470
 2470
 2480
 2480
 2490
 2490
 2500
 2500
 2510
 2510
 2520
 2520
 2530
 2530
 2540
 2540
 2550
 2550
 2560
 2560
 2570
 2570
 2580
 2580
 2590
 2590
 2600
 2600
 2610
 2610
 2620
 2620
 2630
 2630
 2640
 2640
 2650
 2650
 2660
 2660
 2670
 2670
 2680
 2680
 2690
 2690
 2700
 2700
 2710
 2710
 2720
 2720
 2730
 2730
 2740
 2740
 2750
 2750
 2760
 2760
 2770
 2770
 2780
 2780
 2790
 2790
 2800
 2800
 2810
 2810
 2820
 2820
 2830
 2830
 2840
 2840
 2850
 2850
 2860
 2860
 2870
 2870
 2880
 2880
 2890
 2890
 2900
 2900
 2910
 2910
 2920
 2920
 2930
 2930
 2940
 2940
 2950
 2950
 2960
 2960
 2970
 2970
 2980
 2980
 2990
 2990
 3000
 3000
 3010
 3010
 3020
 3020
 3030
 3030
 3040
 3040
 3050
 3050
 3060
 3060
 3070
 3070
 3080
 3080
 3090
 3090
 3100
 3100
 3110
 3110
 3120
 3120
 3130
 3130
 3140
 3140
 3150
 3150
 3160
 3160
 3170
 3170
 3180
 3180
 3190
 3190
 3200
 3200
 3210
 3210
 3220
 3220
 3230
 3230
 3240
 3240
 3250
 3250
 3260
 3260
 3270
 3270
 3280
 3280
 3290
 3290
 3300
 3300
 3310
 3310
 3320
 3320
 3330
 3330
 3340
 3340
 3350
 3350
 3360
 3360
 3370
 3370
 3380
 3380
 3390
 3390
 3400
 3400
 3410
 3410
 3420
 3420
 3430
 3430
 3440
 3440
 3450
 3450
 3460
 3460
 3470
 3470
 3480
 3480
 3490
 3490
 3500
 3500
 3510
 3510
 3520
 3520
 3530
 3530
 3540
 3540
 3550
 3550
 3560
 3560
 3570
 3570
 3580
 3580
 3590
 3590
 3600
 3600
 3610
 3610
 3620
 3620
 3630
 3630
 3640
 3640
 3650
 3650
 3660
 3660
 3670
 3670
 3680
 3680
 3690
 3690
 3700
 3700
 3710
 3710
 3720
 3720
 3730
 3730
 3740
 3740
 3750
 3750
 3760
 3760
 3770
 3770
 3780
 3780
 3790
 3790
 3800
 3800
 3810
 3810
 3820
 3820
 3830
 3830
 3840
 3840
 3850
 3850
 3860
 3860
 3870
 3870
 3880
 3880
 3890
 3890
 3900
 3900
 3910
 3910
 3920
 3920
 3930
 3930
 3940
 3940
 3950
 3950
 3960
 3960
 3970
 3970
 3980
 3980
 3990
 3990
 4000
 4000
 4010
 4010
 4020
 4020
 4030
 4030
 4040
 4040
 4050
 4050
 4060
 4060
 4070
 4070
 4080
 4080
 4090
 4090
 4100
 4100
 4110
 4110
 4120
 4120
 4130
 4130
 4140
 4140
 4150
 4150
 4160
 4160
 4170
 4170
 4180
 4180
 4190
 4190
 4200
 4200
 4210
 4210
 4220
 4220
 4230
 4230
 4240
 4240
 4250
 4250
 4260
 4260
 4270
 4270
 4280
 4280
 4290
 4290
 4300
 4300
 4310
 4310
 4320
 4320
 4330
 4330
 4340
 4340
 4350
 4350
 4360
 4360
 4370
 4370
 4380
 4380
 4390
 4390
 4400
 4400
 4410
 4410
 4420
 4420
 4430
 4430
 4440
 4440
 4450
 4450
 4460
 4460
 4470
 4470
 4480
 4480
 4490
 4490
 4500
 4500
 4510
 4510
 4520
 4520
 4530
 4530
 4540
 4540
 4550
 4550
 4560
 4560
 4570
 4570
 4580
 4580
 4590
 4590
 4600
 4600
 4610
 4610
 4620
 4620
 4630
 4630
 4640
 4640
 4650
 4650
 4660
 4660
 4670
 4670
 4680
 4680
 4690
 4690
 4700
 4700
 4710
 4710
 4720
 4720
 4730
 4730
 4740
 4740
 4750
 4750
 4760
 4760
 4770
 4770
 4780
 4780
 4790
 4790
 4800
 4800
 4810
 4810
 4820
 4820
 4830
 4830
 4840
 4840
 4850
 4850
 4860
 4860
 4870
 4870
 4880
 4880
 4890
 4890
 4900
 4900
 4910
 4910
 4920
 4920
 4930
 4930
 4940
 4940
 4950
 4950
 4960
 4960
 4970
 4970
 4980
 4980
 4990
 4990
 5000
 5000
 5010
 5010
 5020
 5020
 5030
 5030
 5040
 5040
 5050
 5050
 5060
 5060
 5070
 5070
 5080
 5080
 5090
 5090
 5100
 5100
 5110
 5110
 5120
 5120
 5130
 5130
 5140
 5140
 5150
 5150
 5160
 5160
 5170
 5170
 5180
 5180
 5190
 5190
 5200
 5200
 5210
 5210
 5220
 5220
 5230
 5230
 5240
 5240
 5250
 5250
 5260
 5260
 5270
 5270
 5280
 5280
 5290
 5290
 5300
 5300
 5310
 5310
 5320
 5320
 5330
 5330
 5340
 5340
 5350
 5350
 5360
 5360
 5370
 5370
 5380
 5380
 5390
 5390
 5400
 5400
 5410
 5410
 5420
 5420
 5430
 5430
 5440
 5440
 5450
 5450
 5460
 5460
 5470
 5470
 5480
 5480
 5490
 5490
 5500
 5500
 5510
 5510
 5520
 5520
 5530
 5530
 5540
 5540
 5550
 5550
 5560
 5560
 5570
 5570
 5580
 5580
 5590
 5590
 5600
 5600
 5610
 5610
 5620
 5620
 5630
 5630
 5640
 5640
 5650
 5650
 5660
 5660
 5670
 5670
 5680
 5680
 5690
 5690
 5700
 5700
 5710
 5710
 5720
 5720
 5730
 5730
 5740
 5740
 5750
 5750
 5760
 5760
 5770
 5770
 5780
 5780
 5790
 5790
 5800
 5800
 5810
 5810
 5820
 5820
 5830
 5830
 5840
 5840
 5850
 5850
 5860
 5860
 5870
 5870
 5880
 5880
 5890
 5890
 5900
 5900
 5910
 5910
 5920
 5920
 5930
 5930
 5940
 5940
 5950
 5950
 5960
 5960
 5970
 5970
 5980
 5980
 5990
 5990
 6000
 6000
 6010
 6010
 6020
 6020
 6030
 6030
 6040
 6040
 6050
 6050
 6060
 6060
 6070
 6070
 6080
 6080
 6090
 6090
 6100
 6100
 6110
 6110
 6120
 6120
 6130
 6130
 6140
 6140
 6150
 6150
 6160
 6160
 6170
 6170
 6180
 6180
 6190
 6190
 6200
 6200
 6210
 6210
 6220
 6220
 6230
 6230
 6240
 6240
 6250
 6250
 6260
 6260
 6270
 6270
 6280
 6280
 6290
 6290
 6300
 6300
 6310
 6310
 6320
 6320
 6330
 6330
 6340
 6340
 6350
 6350
 6360
 6360
 6370
 6370
 6380
 6380
 6390
 6390
 6400
 6400
 6410
 6410
 6420
 6420
 6430
 6430
 6440
 6440
 6450
 6450
 6460
 6460
 6470
 6470
 6480
 6480
 6490
 6490
 6500
 6500
 6510
 6510
 6520
 6520
 6530
 6530
 6540
 6540
 6550
 6550
 6560
 6560
 6570
 6570
 6580
 6580
 6590
 6590
 6600
 6600
 6610
 6610
 6620
 6620
 6630
 6630
 6640
 6640
 6650
 6650
 6660
 6660
 6670
 6670
 6680
 6680
 6690
 6690
 6700
 6700
 6710
 6710
 6720
 6720
 6730
 6730
 6740
 6740
 6750
 6750
 6760
 6760
 6770

とを示唆している（ベレスフォード、J. N. : 骨形成幹細胞および骨と骨髄のストロマシステム、臨床整形外科、240巻、270ページ、1989年）。最近の証拠は、多能性支質幹細胞あるいは間葉幹細胞と呼ばれるこれらの細胞が、数多くの生物活性因子の影響に依存して、活性化に際しいくつかの異なる種類の細胞系（すなわち骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、等）に生成する能力を持つことを示している。しかし間葉幹細胞は非常に広範な種類の他の細胞（すなわち赤血球、血小板、好中球、リンパ球、単核細胞、好酸球、好塩基球、脂肪細胞、等）で非常に少ない量で組織に存在する。

結果として、分化に先立ち組織からヒト間葉幹細胞を分離精製し次いで筋骨格治療のための貴重な用具を生産する間葉幹細胞を培養拡張する方法（プロセス）が開発された。このような処置の目的は間葉幹細胞の数を大きく増加させ、これらの細胞を身体の正常な回復能力に再指向させおおよしくはその強化のために利用することである。間葉幹細胞は大きな数に拡張され、また再生おおよしくは修復のための生体内成長を高めあるいは刺激し、続く活性化および分化を通して各種人工器官装置への移植片の接着を改善し、あるいは造血細胞生産を高める、などのために結合組織損傷の領域に適用される。

これらの線に沿って、細胞を骨格欠損の部位で注入し、細胞を人工器官で保温しその人工器官を移植するなどを含む修復、移植、等の部位で培養拡張精製間葉幹細胞を移転し、固定し、活性化するために各種の手順が考えられる。かくして分化に先立ち細胞を分離し、精製し、細胞数を大きく増加させることにより、また組織損傷部位での細胞の位置付けによるかあるいは細胞の移植の先立ち試験管内での前処理によって分化方法を活発に制御することで、培養拡張間葉幹細胞は数多くの代謝骨疾病、骨格異形成、軟骨欠損、靭帯および腱損傷ならびに他の筋骨格および結合組織疾患における細胞、分子、および遺伝子疾患を軽減するなどの各種の治療目的のために利用することができる。

望ましい選択的付着にとりわけよく適しており以下に記載される血清で補充された時には「完全培地」としてここで引用されるいくつかの培地が用意された。そのような一つの培地はよく知られており容易に商業的に利用できるダルベッコ修飾イーグル培地 - 低グルコース（DMEM - LG）の増加版である。

商業的製剤は、重炭酸ナトリウム 3700 mg / l および 0.85% 食塩水でペニシリン G（ナトリウム塩）、硫酸ストレプトマイシン、およびファンジゾン^R としてのアンホテリシン B を用いるペニシリン 10,000 単位（塩基）、ストレプトマイシン 10,000 μg（塩基）およびアンホテリシン B / ml、25 μg を含む 100 X 抗生 - 抗真菌剤 10 ml / l で補充される。

前に記載の培地は作成されすぐに使用されるまで 4℃ で 100 ml ビン当たり 90 ml あるいは 500 ml ビン当たり 450 ml で貯蔵される。使用に際しては、（選択されたロットから）胎児ウシ血清 10 ml あるいは 50 ml が最終血清量 10% になるように培地のビンに加えられる。培地は使用に先立ち 37℃ にあたためられる。

この点に関して、胎児ウシ血清 10%（カリフォルニア、ウッドランド、J. R. サイエントフィック、あるいは他の供給業者）のロットでテストされ選択された BGJ₁ 培地（ニューヨーク、グランドアイランド、ジブコ）がこの発明の用途に適していた。「完全培地」でもあったこの培地は、分化なしで間葉幹細胞を刺激しペトリ皿のプラスチック表面に間葉幹細胞のみの特異的タンパク質結合部位等の選択的付着を可能にする因子を含んでいたことが発見された。

加えて、F-12 栄養素混合物培地（ハム）（ニューヨーク、グランドアイランド、ジブコ）が選択的間葉幹細胞分離のために望ましい性質を示したことも発見された。

前に示したように、完全培地は細胞培養分離に収穫骨髄を準備するために当初の収穫過程の特異な型に依存して数多くの異なる分離過程を利用することができる。この点に関して、海綿質骨髄の栓子が利用される場合には、骨髄は完全培地に加えられ、分散を形成するために渦動され、次いで骨片等から骨髄細胞を分離するために遠心分離された。骨髄細胞（主として赤色骨髄および黄色骨髄で、一部微量の間葉幹細胞、等よりなるもの）は次いで一連の 16、18、および 20 ゲージ針を装備した注射器を通じて骨髄細胞を含む完全培地を連続的に通過させることにより単一細胞に解離された。他の酵素分離過程と対比

10

20

30

40

50

して機械的分離過程の利用を通じて生産される利点は、機械的過程が殆ど細胞の変化をもたらさなかったのに対し、一方酵素過程が培養付着および選択的分離に必要なタンパク質結合部位に対し、およびもしくは前記間葉幹細胞に特異的なモノクローナル抗体の生産に必要なタンパク質部位に対峙しとりわけ細胞損傷を産み出すこととなったと考えられる。単一細胞懸濁液（約 $50 - 100 \times 10^6$ 有核細胞で形成されたもの）は次いで引き続き懸濁液で見出される残存細胞から間葉幹細胞を選択的に分離しおよびもしくは隔離する目的で 100 mm 皿にプレートされた。

吸引された骨髄がヒト間葉幹細胞の源として利用された時、（骨破片を殆どもしくは全然含まず大量の血液を含む）骨髄細胞は完全培地に加えられ実施例 1 でより詳細に説明されるパーコル（ミズーリ、セントルイス、シグマ）勾配で分画された。パーコル勾配は骨髄誘導間葉幹細胞を含む低密度の血小板画分から大きい割合の赤血球および単核造血細胞を分離した。この点に関して約 $30 - 50 \times 10^6$ 細胞を含む血小板画分は、骨髄ドナーの年齢に依存して限定されない量の血小板、 $30 - 50 \times 10^6$ 単核細胞、および僅か約 $50 - 500$ の間葉幹細胞で構成されていた。低密度血小板画分は次いで細胞粘着にもとづく選択的分離のためにペトリ皿で平板培養された。

これに関して、海綿質あるいは腸骨吸引液（すなわち一次培養）から得られた骨髄細胞は完全培地で成長し、下記の実施例 1 で設定された条件に従って 1 乃至 7 日目ペトリ皿表面に付着が可能となった。最小細胞付着が 3 日後に観察されたために、3 日が標準時間長として選択され、その時点で非粘着細胞は元の完全培地を新鮮な完全培地で置換することにより培養から除去された。続く培地変更は通常 14 - 21 日を必要とする培養皿が密集になるまで 4 日毎に行われた。これは未分化ヒト間葉幹細胞数が $10^3 - 10^4$ 倍増加したことを示していた。

細胞は次いで EDTA（エチレンジアミンテトラ酢酸）と混和したトリプシン（トリプシン 0.25%、EDTA（1X）1 mM、ニューヨーク、グランドアイランド、ジブコ）のような剥離剤を利用して培養皿から剥離された。剥離剤は次いで不活性化され、剥離培養未分化間葉幹細胞は次の使用のために完全培地で洗浄された。

これら未分化細胞が別個の系列路に入る能力は間葉形成過程として引用され、図 1 で図形で表わされる。間葉形成過程において、MSC は特異的な多段系列路に入るように補充され、この系列路が骨、軟骨、腱、筋、真皮、骨髄ストロマ、および他の間葉結合組織などの機能分化組織を最終的に作り出す。例えば骨形成細胞の分化路についての詳細なスキームが図 2 で示される。この系列地図は、MSCs を骨形成系列に補充し、前骨芽細胞の複製を促進し、分化をどこでも最終段階骨細胞に段階的に仕向ける個々の制御要素の存在を意味している。この複合路の各段階が異なった生物活性因子により制御されるという考え方を支持するかなりの作業が報告されている。

類似の系列図表が軟骨細胞分化のために展開されており、図 5 で示されている。また各系列段階の進行状況は必ずしもそれに限定されないが骨形態形成タンパク質の発現の制御下にある。分化過程の各修飾物質は骨、軟骨、筋、あるいは他のいずれかの間葉組織においてであろうとも系列進行の割合に影響を与え、およびもしくは路に沿った個別段階に特異的に影響を与える。つまり細胞が発生期に特異的な系列を委託され、生物合成活性状態にあり、あるいは最終段階表現型に進行するかどうかは局所環境にある生物活性因子の種類およびタイミングに依存するであろう。

新鮮な拡張されたヒト間葉幹細胞の骨および軟骨系列潜在能（つまり骨軟骨潜在能）はヌードマウスの 2 個の生体内検定を用いて測定された。一つの検定は培養間葉幹細胞を負荷した多孔性リン酸カルシウムセラミックの皮下移植を含んでいた。他のものは培養間葉幹細胞で接種した拡散チャンバの腹腔内移植を含んでいた。全骨髄およびパーコル勾配分離吸引画分もこれら生体内検定で分析された。組織学的評価は大腿頭および腸骨稜から誘導された培養間葉幹細胞で移植されたセラミックで骨および軟骨形成を示していた。 5×10^6 細胞 / ml のヒト間葉幹細胞で負荷されたセラミックは空隙内で骨を形成し、一方 10×10^6 細胞 / ml のヒト間葉幹細胞で負荷されたセラミックは空隙内で軟骨を形成した。ヌードマウスの皮下部位でセラミックの複合移植片として位置する時に全骨髄が骨形

10

20

30

40

50

成することが示される一方、形成される骨の量は培養拡張骨髄誘導間葉幹細胞が使用される時に見られるほどには十分に生産されなかった。

これらの結果は、ある条件の下で培養拡張間葉幹細胞が多孔質リン酸カルシウムセラミックの移植片として接種された時に骨あるいは軟骨に分化する能力を持つことを示している。間葉幹細胞の骨あるいは軟骨細胞への分化に影響する環境因子は部分的には、多孔性リン酸カルシウムセラミックにある脈管構造により供給される成長および栄養因子への間葉幹細胞の直接接近であるようにみえる。脈管構造と培養に密接に関連する細胞は骨細胞に分化し、一方脈管構造から隔離されている細胞は軟骨細胞に分化する。濃縮ヒト間葉幹細胞で負荷されたセラミックの孔からの脈管構造の除外は骨形成分化を妨げ軟骨形成許容の条件を提供した。

10

その結果分離され培養拡張された間葉幹細胞はある特異的な条件の下でおよびもしくはある因子の影響の下で分化し結合組織修復あるいは再生およびもしくは各種人工器官装置の移植のために必要とされる望ましい細胞表現型を生産するために利用することができる。例えば培養拡張ヒト間葉幹細胞で充填された多孔性セラミック立方体を用いてセラミックの多孔内での骨形成は免疫適合宿主の皮下培養後に生成された。最近の研究(13)において、多孔セラミックを用いる複合移植のラット骨髄はラットの大腿骨の分節欠損を充填するために使用された。骨はセラミックの多孔を充填しセラミック骨髄移植片を宿主の骨に固着することを示した。

この発明に従って分離ヒト間葉幹細胞から骨形成を刺激する(すなわち骨誘導性である)因子は、以下のものを含む分子のいくつかのクラスで存在する; BMP-2(14)および BMP-3(15)などの骨形態形成タンパク質; 塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)などの増殖因子; デキサメタゾン(16)などのグルココルチコイド; およびプロスタグランジン E₁(22)などのプロスタグランジン。更にアスコルビン酸-2-リン酸塩(17)などのアスコルビン酸およびその類似体ならびに -グリセロホスフェート(18)などのリン酸グリセロールは単独では骨形成分化を誘導しないけれども有効な付随因子である。

20

ヒトMSCsに対する骨誘導活性を持つ因子は更に下記のものを含むいくつかのクラスに存在する: (i) TGF- β 1(19)、(ii) インヒピンA(20)、(iii) 骨形成刺激活性因子(CSA)(21)および(iv) BMP-4(22)などの骨形態形成タンパク質などの形質転換増殖因子-(TGF- β)上科内の化合物; タイプIコラーゲン、とりわけゲル(23)としてのそれを含むコラーゲン細胞外基質分子; およびレチノイン酸(24)などのビタミンA類似体。

30

ヒトMSCsに関するストロマ形成誘導活性を持つ因子は更に特にIL-1(25)およびIL-2(26)などのインターロイキンなどのいくつかの分子クラスに存在する。ヒトMSCsに関する筋形成誘導活性を持つ因子もまたいくつかの分子のクラス、とりわけ5-アザシチジンおよび5-アザ-2'-デオキシシチジンなどのシチジン類似体に存在する。

ヒトMSCsに関するこれらの調節因子の作用ははじめてここで開示される。これは分化を特定の系列に誘導する潜在的に有用な調節因子をすべて含む表を表すものではなくて、分離ヒト間葉幹細胞分化の段階的進行を促進する目的のための有用な生物学的活性を有する各種の化合物を例示するものである。

40

実施例 1

生体内MSCsの誘導骨形成分化

この実施例で記載される実験の目的は、間葉幹細胞(MSCs)が組織培養培地において適切な生物活性因子を提供することにより試験管内で骨形成系列路に沿って指向されたことを示すことであった。この組の実験はMSCsがどのように骨形成系列に向けて指向され得るかについてのただ一つの例を示す。

最初の研究

ヒトMSCsは前に記載の通り骨髄から収穫され分離された。これらの細胞は予備選択された10%の胎児ウシ血清(完全培地)を含むDMEM-LGで培養拡張された。新鮮完

50

全培地は培養が密集近くになるまで3 - 4日毎にとり替えられ、密集の時点で細胞はトリプシンで平板から遊離され、約40%の密集(100mm皿当たり400,000細胞)で新しい皿に再接種された。これらの再平板培養MSCsは一晩付着を許され、その後完全培地はDMEM-LG、10%の胎児ウシ血清、および100nMのデキサメタゾンのみ、あるいは100nMのデキサメタゾンと50μMのアスコルビン酸-2-リン酸塩のいずれか、および10mMのβ-グリセロホスフェート(骨形成補充剤)よりなる培地でとり替えられた。骨形成補充剤は3日毎にとり替えられた。細胞は毎日形態変化を検討された。選択された平板は次いで骨形成系列に入る細胞のマーカーである細胞表面アルカリ性ホスファターゼ(AP)活性を分析された。骨マトリックス合成に引き続き責任があったのはこれらの細胞である。標準酵素組織化学および生化学試薬がこの細胞表面タンパク質の活性を示すために使用された。追加の標本が成熟骨芽細胞母集団の連続した分化および表現型発現に相関するミネラル化細胞外基質小節の存在を評価された。骨小節内でのリン酸カルシウム結晶への硝酸銀沈殿が標準フォン・コッサ染色法を通じて達成された。この結果は、デキサメタゾンへの露出の僅か3日後に培養内でMSCsが既にその表面にアルカリ性ホスファターゼの発現を開始したことを示している。培養の6日までに、細胞の約80%はAP正であった。培養皿の全組織は1日目の繊維芽細胞状細胞の密集近い渦巻き形からお互いにトップに積重なった数多くの地域での多角形細胞に変化した。9日までに、複屈折細胞外基質の数多くの小さな小節が多層の多角形細胞のこれらフォーカス(細胞増殖巣)と関連していた。これらの地域はミネラルのためのフォン・コッサ法により正に染色された。完全培地のみ補給された対照培養はこれらのミネラル化骨小節を決して展開しなかったし、またほんの僅かAP正の細胞を含んでいた。対照的に骨形成補充剤で処理されたMSCsはAP活性を均一に獲得しまたミネラル化細胞外マトリックス小節を皿全体に合成した。それ自身骨誘導性ではなく、完全骨形成補充剤でのアスコルビン酸-2-ホスフェートおよびβ-グリセロホスフェートの存在は更に細胞外マトリックスの成熟およびミネラル沈着をそれぞれ支持する。図3は培養内での時間の関数としてアルカリ性ホスファターゼ酵素活性における増加を図で示している。8日までおよびそれ以上で骨補充剤(OS)に露出された細胞において対照培地で培養されたものよりかなり多い酵素活性が観察される。

これらをまとめてこの研究は、MSGsが試験管内骨形成系列に沿って分化するために急速かつ均一に刺激することができることを示している。更にMSCsがAP発現により立証された系列内の初期の段階に補充されるだけでなく、MSCsは骨状細胞外マトリックスを分泌しミネラル化する成熟骨芽細胞になるように系列を通じて進行する。この更なる証拠は、ひなMSCsが骨形成補充剤で処理される時それは段階特異的細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体染色により決定されるように図2で描かれる骨形成系列の段階を通じて進行するという観察から得られる。

次の研究

公開技術を使用して、MSCsは3人の異なった患者(年齢26 - 47才)から精製され、培養拡張され(27)、選択されたロットからの10%のFBSを加えたDMEM-LGで20%の密集で48ウエル培養皿に一晩接種された。比較のための基礎培地は、DMEM-LG、BGJ_b、MEMおよびDMEM/F-12(1:1)であった。各検定のための三組の培養が「骨形成補充剤」(OS)(デキサメタゾン100nM、アスコルビン酸-2-リン酸塩50μMおよびβ-グリセロホスフェート10mM(28))の存在あるいは不在下でFBS10%で成長した。培地は3日毎にとり替えられた。各組の培地は細胞数をクリスタル紫検定により、細胞表面アルカリ性ホスファターゼ(AP)を組織化学により、またミネラル化小節形成をフォン・コッサ染色により検定された。AP酵素活性は生体培養をp-ニトロフェニルホスフェート5mMでトリス50mM、NaCl150mM、pH9.0で保温培養し、サンプルを405nmでエリザ平板リーダーでスキャンングにより比色反応を定量化することで計数された。AP酵素活性は製品/分/10³細胞のナノモルで発現された。各ウエルにおけるAP正細胞の割合は染色培養から測定され、ミネラル化小節の数はウエル当りで計数された。検定は16日培養期間で4

10

20

30

40

50

日毎に行われた。対の2個サンプルt-テストが選択されたサンプルで行われた。図4のデータは1人の患者のものを表すが類似の結果はすべての標本から得られた。

平板に均一に付着されたMSCsはその特徴的な紡錐形の形態をとり、増殖して8日で密集に到達した。この期間およびそれを越えて、OS処理細胞はその密度を増すにつれ、多重層を形成し、立方体の形態を展開した。透明性については、前に記載したパラメータの選択された見地のみが図4でグラフで示されている。BGJ_b+OSで成長した標本はすべて3日以内に死滅したが、BGJ_b培養のものは試験記録の期間生存した。このためすべてのBGJ_bデータはこのグラフから除かれた。この研究のハイライトはMEMにおける増殖がDMEM/F-12あるいはDMEMのみ(すなわち16日で $P < 0.01$ および $P < 0.05$)に比べて相当大きかったことを示す。MEM培地へのOSの追加は、8日および12日($P < 0.04$ および $P < 0.03$)で増殖を阻害したが、16日までにはそうでなかった($P > 0.05$)。MEM+OSはまた、DMEMで維持されたMSCs(8日で $P < 0.02$ 、16日で $P < 0.01$)に比べるとその表面でAPを発現する細胞の大きい割合を刺激する。しかしMEM+OSとOSなしのMEM(8日で $P > 0.2$ 、16日で $P > 0.05$)との間ではAP細胞の割合に著しい差異は観察されない。注目すべきことはMEM+OSがMEMあるいはDMEM(すなわち16日で $P < 0.004$ および $P < 0.002$)を含むいずれかの他の培地よりも培養期間を通じてより大きなAP活性を誘導するという点である。しかし研究期間を通じてMEMおよびDMEM+OS(つまり16日で $P > 0.2$)の間ではAP活性に差はなかった。試験されたすべての培地について、16日でミネラル化小節の数はDMEM+OS(DMEMに比較して $P < 0.02$)において最大であった。

これらの調査は、精製され培養拡張されたヒトMSCsが試験管内で骨形成系列に誘導でき、それによりヒト骨芽細胞分化のモデルを確立するという点を示している。培養期間の初期(8日)においては、AP細胞表面染色で見られるようにMEM+OSのみがMSCsのかなりの骨芽細胞補充(>50%)を誘導した。しかし16日までにはDMEMを除くすべての培養がAP染色細胞>60%を含んでいた。研究されたすべての培地において、OSの追加は4日を越えるとより大きなAP活性を産み出した。大抵の培地で大きな割合の細胞が16日でAP染色されたが、AP活性検定における実質的な差異は細胞表面における酵素の量、および従って骨芽細胞系列への進行度合を反映しているように見える。少なくともOSはこの骨芽細胞表面マーカーの発現を上向き調節することができる。興味深いことに、AP活性が少ないのにも拘らず、DMEM+OS細胞はMEM+OSよりも多いミネラル化小節を生成した。この観察は16日の培養期間内にDMEM+OSがMEM+OS以上のMSCsの骨形成分化を支持することを示唆している。十分な時間が与えられれば、MEM+OSはDMEM+OSよりもミネラル化細胞増殖巣を培養することも可能である。MSC特異的免疫染色により立証されるMSC表現型(DMEM)の維持を容易にする培地の差異、あるいはAP正細胞およびAP活性により示される骨形成系列(MEM+OS)への最大補充および誘導はもともと興味深いものであり更なる検討を保証する。この誘導現象の間特異的細胞および基質成分に対する各種のモノクローナルおよびポリクローナル抗体の使用は現在進行中であり、試験管内分化過程の分子的性質に更なる洞察を提供するであろう。

実施例 2

ヒト骨形成細胞に対するモノクローナル抗体の生成は生体内胚骨形成および試験管内精製間葉幹細胞の分化を明らかにする

骨髄から誘導される間葉始原細胞が骨芽細胞に分化できることはこれまでに十分確立されている。加えてこれら間葉幹細胞(MSCs)は更に軟骨、腱、靭帯、筋、および他の組織を生み出す。しかしこれら各種の系列に沿ってMSCsの委託および分化に伴う各段階の知識は、骨形成あるいは他の分化路内での各段階と細胞に特異的なプローブの欠除により部分的に制約されてきた。モノクローナル抗体が分化を研究するための有用なプローブであるために、試験管内骨形成系列に誘導するヒト骨髄誘導MSCsの無傷生細胞調製物を用いて我々はマウスを免疫化した。我々は精製MSCsに対するハイブリドーマコロニ

10

20

30

40

50

一、骨形成分化を進行中のMSCs、および長骨が軟骨原基痕跡の周りに発達中である胚ヒト肢の凍結部分を検査した。この検査実験記録は試験管内分化進行中のMSCsおよび生体内ヒト骨形成細胞で反応する抗体の選択を有利にする。このアプローチを用いて、我々はヒト骨髄MSCsから誘導される骨形成細胞についての系列段階特異的表面抗原に対するモノクローナル抗体を生成した。

公開技術を用いて、MSCsは5人の異なった患者（年齢28 - 46才）から精製され、培養拡張され（29）、FBS10%および「骨形成補充剤」（デキサメタゾン100nM、アスコルビン酸-2-リン酸塩50μM、およびβ-グリセロホスフェート（28））を伴うDMEM-LGで成長した。培養3日および6日、アルカリ性ホスファターゼ発現の初期の間、およびミネラル化小節形成前（30）に、細胞はEGTA、5mMで平板から遊離された。約4百万個の3日および6日細胞はBalb/c/Jマウスに5回の週毎免疫のそれぞれでプールされた。標準技術を用いてモノクローナルハイブリドーマが生産され、培養上澄みは精製MSCsに対し半定量エリザにより検査され、またMSCsは骨形成補充剤で3日あるいは6日培養された。要約すると、MSCsは96ウエル培養皿で平板培養され、骨形成補充剤に露出され、次いで培養上澄みで続いてホースラディッシュペルオキシダーゼに接合されたヤギ抗マウスIgGにより反応された。二次抗体はすすぎ洗いされ、またO-フェニレンジアミンが平板に加えられた。一次抗体マウスモノクローナル抗体結合はウエルを490nmでエリザ平板リーダーでスキャンニングすることで定量化される比色反応により評価された。対象となるコロニーは対照MSCsおよびMSCsから誘導される骨形成細胞への差別的結合にもとづき選択された。選択されたコロニーは更にヒト胚肢の非固定凍結切片で免疫蛍光法により検査された。対象となるハイブリドーマコロニーはクローンされ更に免疫細胞化学分析がヒト、ラット、ラビット、ひな、およびウシなどの源からの各種の正常および実験誘導組織で実施された。

約10,000個のハイブリドーマコロニーが前に記載した修飾エリザ実験記録により検査された。精製MSCs、あるいは骨形成補充剤とともに3日および6日培養されたMSCsの差別的結合にもとづいて、224個のコロニーが55 - 60日胚ヒト肢に対する免疫蛍光検査のために選択された。これら224コロニーの大部分は発達中の肢に存在する多重組織型と反応するか、あるいは発達中の骨には検出されなかった。ここまでは9個のコロニーが骨形成系列の細胞に対し特異的な免疫反応を示すものとして確認された。反応性のパターンは変化する。つまりあるハイブリドーマ上澄みは骨形成環および骨始原細胞含有骨膜内の大型母集団と反応し、一方他のものは基質合成に活性的に含まれるように見えるこれらの細胞のみと反応する。2個のハイブリドーマコロニーは骨形成細胞と同じく肥厚性軟骨細胞と反応するように見える。この結果は表1で示される。

表 1

ハイブリドーマ細胞系	対照MSCs	3日OS培養	6日OS培養
20E8	0	1	8
13C9	0	1	3
5D9	0	1	2
18H4	0	3	5
18D4	0	2	4
10F1	0	0	2
13B12	0	4	2

表1は未処理MSCs、あるいは骨形成補充剤で3日あるいは6日培養されたMSCsに対する選択されたハイブリドーマコロニーの免疫活性を示す。数値は前に記載されたエリザ検定で結合された抗体の相対量を反映する。

これらの研究はトリ骨形成細胞で詳細に説明されたもの(31)と類似したヒト骨形成系列段階特異的細胞表面分化マーカーの存在を示している。発達中の肢の骨形成細胞の染色は、骨形成補充剤で培養されたMSCsが培養内で「真正」骨芽細胞になることを支持している。試験管内骨形成分化はかくしてAP発現およびミネラル化小節形成の伝統的な規準を越えて拡張する分子プローブにより確認される。抗原発現の詳細な試験管内観察および生体内分析の相関は骨形成の更なる研究に有用である。特異的な組織培養要素、すなわち骨形成系列段階を通じて細胞の進行を促進する生物活性因子の特徴付けはきわめて重大である。骨形成細胞表面およびもしくは細胞外マトリックス抗原の確認は間違いなく骨細胞生理学への更なる洞察を提供する。これらおよび現在研究中の他のモノクローナル抗体は将来MSC分化の研究に有用であることを実証するであろう。

10

実施例3

試験管内MSCsの誘導軟骨形成分化

この実施例で記載される実験の目的は、間葉幹細胞(MSCs)が組織培養培地内で適切な生物活性因子を提供することにより試験管内軟骨形成系列路に向けて指向されるということを示すことであった。この組の実験はMSCsがどのようにして軟骨形成系列に指向できるのかのただ一つの実施例を表す。ヒトMSCsが収穫され、前に記載された通り骨髓から分離された。細胞は予備選択された胎児ウシ血清10%を含むDMEM-LG培地(完全培地)で培養拡張された。培養が密集に近づくまで新鮮培地が3-4日毎にとり替えられ、密集の地点で細胞はトリプシンで平板から遊離され、約50%の密集(100mm皿当たり500,000個の細胞)で平板に再接種された。これらの再平板培養MSCsは一晩附着され、その後完全培地は胎児ウシ血清10%およびマーシャル・アール・ユースト博士により提供された部分的精製骨形態形成タンパク質(軟骨形成補充剤)5mg/mlとともにDMEM-LGでとり替えられた。この軟骨形成補充剤は3日毎にとり替えられた。細胞は毎日形態形成変化を調べられた。選択された平板は次いで軟骨系列に入った細胞のマーカーであるCSPG-Mを免疫組織化学的に分析された。次いで軟骨のタイプIIコラーゲンマトリックスを合成するため駆動されたのはこれらの細胞である。標準免疫組織化学試薬が細胞外マトリックスタンパク質の存在を示すために使用された。追加の標本が成熟軟骨細胞母集団の連続分化および表現型発現と相関付けるトルイジンブルー染色小節の存在を評価された。肥厚性軟骨細胞のミネラル化小節の存在のためのフォン・コッサ染色は負であった。

20

30

この結果は、軟骨形成補充剤に露出僅か3日後に、培養のMSCsは既にその細胞外マトリックスへのCSPG-M発現を開始したことを示していた。培養皿の全組織は1日目の繊維芽状細胞の渦巻きから軟骨膜に似た繊維芽細胞の薄層に囲まれた多層円形あるいは多角形細胞の数多くの細胞増殖巣に変化した。これら小節の細胞外マトリックスはタイプIIコラーゲンに対し強力に免疫活性であった。完全培地のみを供給された対照培地はこれらの軟骨小節を決して発達させなかった。まとめてみると、これらの研究はMSCsが試験管内軟骨形成系列に沿って分化するように刺激されたことを示している。更にMSCsがCSPG-M発現により立証された系列内の初期の段階に再補充されるだけでなく、MSCsはタイプIIコラーゲン濃縮細胞外マトリックスを分泌する成熟軟骨細胞になるように系列に沿って進行した。かくしてここまでは、石灰化基質における肥厚性細胞により立証されるMSCsから誘導された軟骨細胞の末端分化は試験管内では観察されなかった。この発見はこの末端分化段階を促進するよう特異的に意図された軟骨形成補充剤を設計する必要性を反映する。興味深いことに、パチフィチおよび共同研究者(32)は試験管内ひな軟骨細胞の末端分化を刺激するレチノイン酸を含む培地を考察した。

40

前記の実施例で軟骨形成補充剤を構成する完全培地への添加物は試験管内軟骨形成細胞分化あるいは増殖を刺激する既知の因子のただ一つのものである。

実施例4

50

試験管内MSCsの誘導骨髄ストロマ細胞分化

この実施例に記載される試験の目的はヒト骨髄誘導MSCsが培養培地に適切な生物活性因子を提供することにより試験管内支質形成系列路に沿って指向されることを示すことであった。ヒト骨髄誘導MSCsは骨髄から分離され、前に記載の通り培養で拡張された。ヒトMSCsが骨髄ストロマ細胞系列に誘導される能力を示すために、特異的サイトカイン発現が分化のマーカーとして測定された。MSCsは、予備選択された胎児ウシ血清10%を含むDMEM-LG(完全培地)よりなる培地を用いて分化なしでMSC増殖を有利にする条件、あるいは完全培地プラスインターロイキン-1(IL-1)(ストロマ形成補充剤(SS))10U/mlよりなる培地を用いて骨髄ストロマ表現型への発現および分化を有利にする条件の下で成長した。これらの組織培養母集団からの条件付き培養培地は商業的サンドイッチエリザ生物検定(アールアンドディー・システムズ)を用いてサイトカインの存在を分析された。

検定されるサイトカインはストロマ細胞により分泌されるものとして知られるものであり、また造血に影響を与えるものである。これらはインターロイキン-3(IL-3)、インターロイキン-6(IL-6)、果粒細胞コロニー刺激因子(G-CSF)、果粒細胞マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、幹細胞因子(SCF)、白血病阻害因子(LIF)および形質転換増殖因子-ベータ-2(TGF-2)を含む。それぞれの場合、第二継代MSCsは約30%の密集(35mm平板当たり30,000個の細胞)の密度で35mm培養平板に平板培養された。一晚細胞を付着させた後、培養培地は除去され、完全培地あるいは完全培地プラスストロマ形成補充剤のどちらかでとり替えられた。図6は二つの平板培養条件の下でのヒトMSCsのサイトカイン発現を図示する。IL-1不在下では、MSCsはG-CSF、GM-CSF、LIFおよびSCFを非常に低い水準で発現したがIL-6は非常に豊富に発現する。比較して、IL-1刺激の3日後、劇的に高い水準のサイトカインが前記の種のすべてで検出された。MSCsは2種の培養条件のいずれにおいてもIL-3あるいはTGF-2を発現しなかった。これらのデータは、IL-1が造血幹細胞の分化を支持するように例証されたサイトカインプロファイルのMSC発現を向上させ、またそれが分化骨髄ストロマ細胞の特徴であることを示している。

実施例5

試験管内MSCsの誘導筋形成分化

この実施例に記載される研究の目的は、5-アザシチジンが筋形成系列に沿って分化するために間葉幹細胞(MSCs)を誘導することを示すことであった。

シチジンの類似体である化合物、5-アザシチジン(5-aza-CR;ミズーリ、セントルイス、シグマ・ケミカル・カンパニー)は表現型特異的遺伝子の活性化に含まれるDNAにあるある種のシトシンの低メチル化を生じさせる。マウス胚細胞系、C3H/10T1/2Cl8およびスイス3T3は5-aza-CRに露出後3個の異なった中胚葉細胞系列、筋芽細胞、脂肪細胞および軟骨細胞に転換されることが示された(33-34)。部分的には、5-aza-CRが筋形成遺伝子を活性化する機構はMyoD1を含むように見える(35-36)。前記を心にとめながら、我々はラット骨髄誘導MSCsを5-aza-CRに露出し、我々の分析をその筋形成表現型との応答のやりとりに集中させた。

平均体重100gのオスフィッシャーラット(インディアナ、インディアナポリス、チャールズ・リバー)の大腿および脛骨が収集され、癒着性軟組織が除去された。骨髄細胞のいくつかの分離株が250gのラットから得られた。筋形成前駆体が骨髄調製物にもち込まれないことを確実にするために、軟組織を除去するための長骨の綿密な解剖が行われた。この点に関して筋形成細胞は未処理のMSC培養では決して観察されなかった。骨の両端は骨用鋏で骨幹から切り取られた。骨髄栓子は、胎児ウシ血清10%(FCS;カリフォルニア、ウッドランド、アイアール・サイエンティフィック・インコーポレイテッド)、ウマ血清5%(HS;カンサス、レネクサ、ヘイズルトン・バイオロジクス・インコーポレイテッド)および抗生物質(ジブコ・ラボラトリーズ;ペニシリンG、100U/ml

10

20

30

40

50

1 ; ストレプトマイシン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$; アンホテリチン B、 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$) の選択されたロットを含む DMEM よりなる完全培地で充填された 10 ml の注射器に固定された 18 ゲージ針の挿入により骨から流体静力学的に放出された。針は大腿の遠位端および脛骨の近位端に挿入され、骨髄栓子は反対端から放出された。骨髄栓子は 18 ゲージ、 20 ゲージ、および 22 ゲージ針を通じて連続継代により構成要素に分解され、これら分散細胞は遠心分離され完全培地で 2 度再懸濁された。細胞が血球計算器で計数された後、完全培地の $7 - 10 \text{ ml}$ の 5×10^7 細胞が 100 mm ペトリ皿に誘導された。3 日後、培地はとり替えられ非癒着性細胞は廃棄された。培地は 3 日毎に完全にとり替えられた。接種の約 10 日後、皿は殆ど密集となり癒着性細胞は EDTA ナトリウム 1 mM (ニューヨーク、グランドアイランド、ジブコ・ラボラトリーズ) 内にトリプシン 0.25% で

10

皿からとりはずされ、 $1:3$ に分割され新鮮平板に接種された。これらの一度継代した細胞が殆ど密集になった後、それは収穫され下記に記載する実験に使用された。我々はこれらの細胞をラット骨髄誘導 MSCs として引用する。全体で 8 個の異なったラット骨髄誘導 MSC 調製物がこの研究で使用された。完全培地で 37°C で CO_2 、 5% の加湿雰囲気の下で日常的に決まったやり方で培養された。

2 代継代 MSCs は 3 種の細胞密度、皿当り 500 、 $5,000$ 、および $50,000$ 細胞で 35 mm 皿に接種された。接種 24 時間後の初めに、これらの培養は各種濃度の $5 - \text{aza} - \text{CR}$ を含む完全培地よりなる筋形成培地で 24 時間処理された。培養物がタイロッド平衡塩溶液 (シグマ・ケミカル・カンパニー) で 2 度洗浄された後、培地は $5 - \text{aza} - \text{CR}$ を加えることなしに完全培地にとり替えられ続いて処理 40 日後実験が終了する

20

まで 1 週 2 回とり替えられた。結果で詳細に記載しているように、各種の培養条件は $5 - \text{aza} - \text{CR}$ 作用を最適化、とりわけ筋形成を最適化する試みで試験された。

2 代継代ラット骨髄 MSCs が $5,000$ 細胞 / 皿で 35 mm 皿に接種され、 $5 - \text{aza} - \text{CR}$ で前に記載されたのと同じ方法で $5 - \text{aza} - 2 - \text{デオキシシチジン}$ ($5 - \text{aza} - \text{dCR}$; シグマ・ケミカル・カンパニー) の 4 種の濃度 ($0.1 \mu\text{M}$ 、 $0.3 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ および $10 \mu\text{M}$) で処理された。処理の間いろいろな時期に培養の形態変化が観察された。

生体培養は毎日位相差顕微鏡 (日本、東京、オリンパス光学株式会社) で検討され、最終的には培養のいくつかは組織学あるいは免疫細胞化学のため固定された。筋細胞はまず多核筋管の存在により位相差で形態学的に確認され、続いて骨格筋特異的タンパク質ミオシンの存在により免疫組織化学的に確認された。推定上の筋細胞の収縮はタイロッドのアセチルコリン 1 mM (シグマ・ケミカル・カンパニー) の 1 滴で刺激された。免疫組織化学として、培養細胞は 10 分、 -20°C メタノール (ニュージャージー、フェアローン、フィッシャー・サイエンティフィック・カンパニー) で固定され、BSA、 0.1% (ウシ血清アルブミン ; シグマ・ケミカル・カンパニー) を含む PBS (食塩加リン酸緩衝液、 $\text{pH} 7.4$) 内のラット迅速単収縮骨格ミオシン (シグマ・ケミカル・カンパニー ; 腹水、 $1/400$ 希釈液) に対してマウスモノクローナル抗体で保温された。第 2 の抗体はピオチン接合ヒツジ抗マウス IgG (ペンシルバニア、ウェストチェスター、オーガノン・テクニカ・コーポレイション、 $1/50$ 希釈液) であり続いてテキサスレッド接合アビジン (オーガノン・テクニカ・コーポレイション、 $1/4,000$ 希釈液) により処理された。

30

40

すべての保温は 30 分室温で行われ、そのそれぞれは保温の前に 5 分、BSA 1% を含む PBS で遮断され、次いで 5 分 PBS で洗浄された。細胞はフルオロマウント G (ペンシルバニア、ピッツバーグ、フィッシャー・バイオテック) にのせられ、蛍光発光を備えたオリンパス顕微鏡 (BH - 2) で観察され、コダック TMAX 400 フィルムで撮影された。

第 2 継代ラット骨髄 MSCs が 1 細胞 / ウェルの限定希釈で 96 ウェルプレートに平板培養された。細胞は完全培地 50% および馴化培地 50% よりなる培地で平板培養され、それは 2 日間全培地で培養された密集に近いラット骨髄細胞から得られた。全体で 384 ウェルから 50 コロニーが検出された。これらは継代培養され、維持され、最終的には 4 個が生存した。これら 4 個のクローンは前に述べた通り $5 - \text{aza} - \text{CR}$ で処理され、筋形

50

成あるいは脂肪細胞形態構造として記録された。

第1継代ラット骨髄細胞は5 - a z a - C Rに24時間露出され、前の通り1細胞/ウエルの限定希釈で96ウエル平板に平板培養された。脂肪細胞(スーダン黒正)あるいは筋形成、多核細胞形態構造を示すクローンの数が測定された。

骨髄M S C sの各種中胚葉表現型への転換能力を純粹繊維芽細胞のそれと比較するために、我々はラット脳繊維芽細胞を5 - a z a - C Rあるいは5 - a z a - d C Rのいずれかに露出した。3匹のオスフィッシャーラットの脳の全大脳が頭蓋の内側から収集され、鋭いメスで小片に切断された。これらの小片は50mlの円錐形遠心分離管に移され、500 × gで10分遠心分離され、タイロード平衡塩溶液10mlに再懸濁され緩いダウンスホモジナイザーで均質化された。ホモジネートはコラーゲナーゼ0.1%(CLS2、247U/mg; ニュージャージー、フリーホールド、ワージントン・バイオケミカル・カンパニー)で37、3時間保温され、その間にこれは30分毎に30秒渦動された。処理の後、遊離細胞はナイテックスフィルター110 μmを通過され、遠心分離され、FCS10%を含む、低グルコースDMEM-LG(ジブコ・ラボラトリーズ)10mlで再懸濁され、3個の100mm培養皿で37でCO₂恒温器で培養された。培地は週2回とり替えられ、細胞は皿が密集に到達するまで培養された。

第3継代ラット脳繊維芽細胞は50,000細胞/皿の密度で35mm皿に接種され、ラット骨髄M S C sと同じ方法で5 - a z a - C R、1 μM、3 μMあるいは10 μMもしくは5 - a z a - C d R、0.1 μM、0.3 μMあるいは1 μMで処理された。24時間後培地は5 - a z a - C Rあるいは5 - a z a - C d Rの追加なしでFCS10%、HS5%およびヒドロコルチゾン50 nMを含むDMEM-LGにとり替えられ、実験が終了するまで1週2回とり替えられた。

ラット骨髄M S C sから誘導された筋形成細胞は正常な胎児ラット筋形成細胞と比較された。というのは後者の方がかなりのデータベースが存在するからである。筋細胞が生後17日のフィッシャーラット胎児の後肢筋からカルシウムおよびマグネシウムのないタイロード内でのトリプシン0.2%(シグマ・ケミカル・カンパニー)を用いて35分、37で時々攪拌しながら解離された。それを110 μmナイテックスフィルターを通した後、繊維芽細胞の濃度はフォルコンプラスチック皿で30分細胞懸濁液を保温することにより減少し、皿は繊維芽細胞の選択的付着に帰着する。被覆されていない皿に付着しなかった5 × 10⁵単一細胞の懸濁液が、DMEM79%、FCS10%、HS10%および非必須アミノ酸1%(ジブコ・ラボラトリーズ)よりなる2mlを含むコラーゲン被覆(ゼラチン0.14%の1.5ml、ニュージャージー、フィリップバーグ、J.T.ペーカー・ケミカル・カンパニー)35mmプラスチック培養皿で平板培養された。細胞は37、加湿CO₂5%で成長した。

ラット骨髄誘導M S C s(50,000細胞/35mm皿)が細胞を培養皿に接種24時間後に各種濃度の5 - a z a - C R(0、1、3、10、20、および50 μM)に露出された。5 - a z a - C Rを含む培地は24時間の露出期間後に除去され、5 - a z a - C Rを欠いている培地でとり替えられた。この露出の7日後、長多核細胞が5 - a z a - C R、3 μM以上で処理されたいくつかの皿で観察された(図7A)。これら培養における細胞は約80%の密集であった。このような多核細胞の数はコロニーあるいは群生体を分離するにつれて増加し、最初の処理の2週後に最大(10個の35mm皿の9コロニー)に達した。この細胞数は処理5週後までに減少(10個の35mm皿の6コロニー)した。7個は多分その収縮および皿からの分離によるものであり、またこの期間に4個の新しいコロニーが出現した。かなりの割合の多核細胞が最初の露出の40日後まで残っていたがこれは最長の観察期間であった。生体培養の位相差顕微鏡により観察された多核細胞の形態(図7A)は培養におけるラット筋のそれと類似していた。我々は胚ひな筋形成細胞でよく観察される識別できる横紋を観察しなかったが、もっとも正常な胎児ラット肢から得られた筋形成細胞から誘導される筋管も横紋を示さなかった(図7B)。かくしてM S C sから誘導される筋管あるいは正常ラット胚から得られるもののいずれもこれらの研究に採用される条件下では横紋を示さない。これら多核細胞のいずれかの自発の収縮あるい

10

20

30

40

50

は単収縮の波は生体培養を見る時に観察された。これらの細胞の収縮は更にこれらの細胞にアセチルコリン溶液の一滴をおくことで刺激され、それは更にこれらの細胞が筋形成性であることを示すものとなる。

これら多核細胞の同一性を更に確認するために、骨格筋特異的ミオシンに対する抗体がこれら培養の固定標本に提供された。図8は抗ミオシン抗体で正に染色された筋管を示す。再び横断横紋は観察できなかつた。我々はまた抗ミオシン抗体で5-aza-CR処理2週および5週後の筋管を染色した。処理2週後の筋管は強い正に染色(図9Aおよび9B)されたが、処理5週後のものは弱く染色された(図9Cおよび9D)。

5-aza-CRの作用はMSCsに提供された濃度に依存するよう見えた。0あるいは1 μ Mの5-aza-CRで処理された皿では筋管は発見されなかつたが、3-50 μ Mの5-aza-CRで処理されたものでは、筋管は比較できる出現率で観察された(表2)

10

表 2

異なった濃度の5-aza-CRに露出されたMSCsの培養当りで発見された筋管あるいは脂肪細胞の群生体数

[5-aza-CR]濃度	筋管	脂肪細胞	SI* (生存指数)
0 μ M	0 / 12	3 / 12	27%
1 μ M	0 / 12	19 / 12	21%
3 μ M	3 / 12	16 / 12	15%
10 μ M	4 / 9	19 / 9	12%
20 μ M	2 / 5	9 / 5	7%
50 μ M	2 / 5	8 / 5	6%

20

30

ラット骨髄細胞の第2次培養は35mm皿当り5,000細胞で平板培養され、指示された濃度の5-aza-CRで処理され、また処理14日後に観察された。筋管および脂肪細胞の出現率の数は観察される表現型確認群生体数および試験される培養皿の全数を示す。

5-aza-CRの存在下で生存指数(SI*)を測定するために、MSCsは200細胞/35mm皿で接種され、平板培養24時間後に5-aza-CRで処理された。14日後、10細胞以上を含むコロニーが計数され、この数はパーセンテージを得るため100%で乗じられ200で除された。

細胞が5-aza-CRのより高い濃度で処理された時、平板上の細胞数は、筋形成細胞および細胞生存の最大数に関して10 μ Mがもっとも有効な濃度として減少した(表2についての平板効率)。かくしてこれに続くすべての実験は5-aza-CRの10 μ Mで行われた。

40

5-aza-CRのデオキシ類似体である5-aza-2'-デオキシシチジン(5-aza-dCR)の作用を試験するために、ラット骨髄MSCsが5-aza-CRと同じ方法で5-aza-dCR、0.3 μ M、1 μ M、および10 μ Mで処理された。試験された濃度の内、5-aza-dCR、0.3 μ Mが筋形成転換の最高の出現率を与え、観察された出現率は5-aza-CRに露出した細胞よりもずっと高かつた(表3)。

表 3

異なった濃度の5 - a z a - d C Rおよび5 - a z a - C Rに露出されたM S C sの培養当りで発見された筋管の群生体数

シチジン類似体	濃 度	筋 管	S I *
5 - a z a - C d R	0 . 1 μ M	1 0 / 1 0	1 6 %
5 - a z a - C d R	0 . 3 μ M	2 4 / 1 0	1 0 %
5 - a z a - C d R	1 . 0 μ M	3 / 1 0	3 %
5 - a z a - C d R	1 0 μ M	1 / 1 0	1 %
5 - a z a - C R	1 0 μ M	7 / 1 0	1 4 %

S I * : 生存指数

ラット骨髄細胞の第2次培養は35mm皿当たり5,000細胞で平板培養され、指示された濃度の5 - a z a - d C Rあるいは5 - a z a - C Rで処理され、処理14日後に観察された。筋管の出現率の数は観察される表現型確認群生体数および試験される培養皿の全数を示す。

5 - a z a - d C Rあるいは5 - a z a - C Rの存在下で生存指数を測定するために、M S C sは200細胞/35mm皿で接種され、平板培養24時間後に5 - a z a - d C Rあるいは5 - a z a - C Rで処理された。14日後10細胞以上を含むコロニーが計数され、この数はパーセンテージを得るために100%で乗じられ200で除された。

骨髄収穫時に周囲の筋誘導筋芽細胞による汚染の可能性を除去するために、第2継代ラット骨髄M S C sはここに記載された通りクローンされた。見分けのつかない形態の4匹のクローンがこの方法で獲得され、5 - a z a - C Rに24時間露出された。強調すべきことは、これらのクローンにある細胞は5 - a z a - C Rへの露出の前は筋状特性あるいは筋特異的ミオシンに対する正の免疫染色を示さなかったことであった。5 - a z a - C Rに露出した4個のクローンの内、1個のクローンは筋管および脂肪細胞の示差的な形態を示し、これは非筋細胞が筋芽細胞あるいは脂肪細胞に転換されたかあるいはそれになるべく影響されたものと我々は解釈する。

ラット骨髄誘導M S C sは、5 - a z a - C R、10 μ Mに24時間露出されクローンされた。全体で768のウエルから136のコロニーが検出された。136コロニーの内、7個(5%)は筋形成表現型を示し、27個(20%)は脂肪細胞表現型を示し、また他のコロニーは識別できる表現型に明らかに関連する形態を欠いていた。

非M S C 標本に対する5 - a z a - C Rおよび5 - a z a - d C Rの作用を試験するために、我々は脳繊維芽細胞をこれと同じ試薬に露出した。ラット脳繊維芽細胞は35mm皿に50,000細胞/皿の密度で接種され、ラットM S C sの場合と同じ方法で5 - a z a - C R、1 μ M、3 μ M、あるいは10 μ M、もしくは5 - a z a - d C R、0.1 μ M、0.3 μ M、あるいは1 μ Mで処理された。各グループは9個の皿を持ち、細胞は露出14日後まで調査された。7日目に、5 - a z a - C R、10 μ Mで処理されたグループを除きすべての皿は密集に到達した。観察の期間中には脂肪細胞あるいは筋管はいずれの皿からも発見されなかった。

M S C sは子(生後4週、100g)および成体(生後3ヶ月、250g)のドナーラットから収集され、継代され、5 - a z a - C Rに露出後筋形成表現型のコロニー数が比較された(表4)。

10

20

30

40

表 4

5 - a z a - C R に露出された M S C s の培養当り筋管の群生体数

F C S	H S	H C	筋 管
1 0 %	5 %	+	1 1 / 5
1 0 %	5 %	-	8 / 5
1 0 %	0 %	+	2 / 5
1 0 %	0 %	-	0 / 5
5 %	0 %	+	0 / 5
5 %	0 %	-	0 / 5
0 %	5 %	+	0 / 5
0 %	5 %	-	0 / 5

10

ラット骨髄 M S C s の第 2 培養が 3 5 m m 皿当り 5 , 0 0 0 細胞で平板培養され、5 - a z a - C R μ M で処理され 2 4 時間後異なった水準の F C S、H S、あるいは H C、5 0 μ M とともに D M E M に変更され、5 - a z a - C R 露出 1 4 日後に観察され終了した。筋管の出現率の数は試験される培養皿の全数を示す。

20

若いドナーラットから得た M S C s は成体ラットから得たものよりもより多くの筋形成コロニーを得た。5 - a z a - C R に露出された若いドナー M S C s の第 2 継代培養は第 1 から第 4 継代まで試験された成体ドナーからの M S C s に比べてより多くの筋形成コロニーを生産した。

各種の培養条件が 5 - a z a - C R に露出された培養 M S C s の筋形成表現型の発現を最適化するための試みとして試験された。露出された細胞は各種の濃度の F C S、H S、基本繊維芽細胞増殖因子 (b F G F) およびヒドロコルチゾンを含む培地で培養された。表 4 は F C S、1 0 %、H S 5 %、およびヒドロコルチゾンを含む培地が筋形成性の M S C 発現には最適であるように見えることを示している。b F G F を含む培地は筋形成表現型の発現を増加させるように見えた (表 5) が、もっともこれは始原細胞からの転換の増加とは反対に、筋芽細胞分割による筋芽細胞の数の増加と関連している。

30

表 5

各継代を持つ子および成体ラット骨髄MSCsによる5-aza-CR誘導筋管の比較

	最初の細胞数		第 1	第 2	第 3	第 4
子 (100g)	50,000/dish	+bFGF	3/5	9/5	3/5	0/5
	50,000/dish	-bFGF	3/5	16/15	2/5	1/5
	5,000/dish	+bFGF	1/5	10/5	2/5	2/5
	5,000/dish	-bFGF	3/5	13/15	2/5	5/5
成体 (250g)	50,000/dish	+bFGF	1/5	0/5	2/5	0/5
	50,000/dish	-bFGF	0/5	0/5	0/5	0/5
	5,000/dish	+bFGF	1/5	0/5	1/5	3/5
	5,000/dish	-bFGF	0/5	0/5	0/5	2/5

細胞はbFGFありもしくはなしでFCS、10%、HS5%およびHC50 μ Mを持つDMEMで培養された。筋管の出現率の数は、観察される表現型確認可能コロニーあるいは群生体の全数および試験される培養皿の全数を示している。MSCは子(100g)あるいは成体(250g)ラットから得られた。

加えて、骨髄誘導MSCsは500細胞/皿、5,000細胞/皿、および50,000細胞/皿で平板培養され、次いで5-aza-CRに露出された。500細胞/皿においては、筋形成細胞はまず処理20日後に観察され、細胞は処理25日に密集になった。筋形成細胞の2個の房(クラスター)が処理29日後の5個の皿で観察された。5,000細胞/皿においては、筋形成細胞はまず7日に観察され、細胞は処理10日後に密集となった。3個の房が処理14日後4個の皿で観察された。50,000細胞/皿においては、筋形成細胞は6日に観察され、細胞は処理7日後に密集となった。10個の房が処理14日後5個の皿で観察された。

ここで提示された観察は、ラット骨髄MSCsが5-aza-CRへの短い露出に続き試験管内筋形成系列に分化する能力を持つことを示している。観察された筋形成細胞は、自発的に収縮し、アセチルコリンに露出すると収縮し、骨格筋特異的ミオシンに対するモノクローナル抗体で正に染色される筋管の特徴的な多核形態を示したが、もっともこの筋管は明らかな横紋を示さなかった。しかし胎児ラット筋から収集された正常ラット筋芽細胞は我々の手許にあるものでは培養で明らかに横紋入り筋管を形成しなかった。我々は骨髄収穫の時点で骨から付着軟組織を綿密に除去することにより指向筋形成細胞による汚染の可能性を除去するように試みた。重要なことは、我々は5-aza-CRの十分なる濃度に露出されたものを除き、数百の標本でラット骨髄のいずれの培養にも筋管を観察していないということである。加えてラット骨髄MSCsのクローンが5-aza-CRの処理後筋形成表現型および脂肪細胞表現型に転換されたが、これは我々は非筋始原細胞がこれら2個の表現型に転換されたことを意味するものと解釈する。骨格筋が骨髄内で観察されなかったため、5-aza-CRがこれらの骨髄誘導MSCsを筋形成細胞に転換するものであることを我々は確信する。

実施例 6

試験管内ヒト骨髄誘導間葉幹細胞によるサイトカイン発現：IL-1 およびデキサメタゾンの作用

この研究の目的はサイトカイン発現プロファイルの確認を通じて培養MSCsの表現型特徴を更に確立することであった。我々は各種間葉表現型の細胞分割、分化、あるいは発現

の調節に重要であるとして知られているサイトカインの発現水準を確認し測定する商業的エリザを使用した。我々はこれまでに報告した条件の下でMSCサイトカイン発現を確認し、それはMSCが分化なしで有糸分裂で拡張すること（構造的培養拡張培地）を可能にした。加えて、我々はデキサメタゾンあるいはIL-1で補充された培養培地でMSCsによるサイトカイン発現を検定した。デキサメタゾンは骨始原細胞の骨芽細胞への分化を誘導すると報告されている。対照的に、炎症応答の間に各種の細胞により骨髄微環境に分泌されるIL-1は、造血を支持する骨髄ストロマの能力を高めるものと報告されており、かくして骨髄ストロマ繊維芽細胞の分化およびもしくは発現を制御する役割を演じる。

これらの分析データは培養MSCsがユニークなサイトカインプロファイルを発現することを示す。加えて、デキサメタゾンおよびIL-1は異なった方法でMSCサイトカイン発現プロファイルを変更する。これらのデータは我々の理解にユニークなMSCsの表現型プロファイルを追加し、更にMSCsが骨形成系列あるいは骨髄ストロマ表現型に向けてその表現型を分化しあるいは調節するようにその表現が発展的に調節される巨大分子を確認する。

材料および方法

MSC分離および培養拡張

骨髄は異なった年齢の3人の男性および3人の女性の6人のヒトドナーから得られた（表6）

表 6

ドナーの特徴

ドナー #	ドナーの年齢	臨床条件	性
1	39	NHL*	女性
2	58	乳癌	女性
3	38	脊髄形成異常	女性
4	3	髄芽腫	男性
5	28	ホジキンリンパ腫	男性
6	47	AML*	男性

* NHL = 非ホジキンリンパ腫

AML = 急性骨髄性白血病

各ドナーは癌からの寛解期にあり、将来のオートログス（自己由来）骨髄移植に備え骨髄収穫を受けていた。約10mlの未分画骨髄が収穫物から得られ、この研究の検定に使用された。MSCsは精製されこれまでに報告された方法の修飾により培養された。簡単に言うと、骨髄吸引物は注射器から完全培地25mlを含む50mlの円錐形管に移され、この培地は選択されたロットから胎児ウシ血清（FBS）で補充されたダルベッコ修飾イーグル培地よりなり、最終量が10%になるようにされた。管はベックマン卓上型遠心分離機で1200rpm、GS-6旋回バケットローターで5分回転され細胞をペレットにした。サンプルの表面に形成する脂肪層および上澄みは血清ピペットを用いて吸引され廃棄された。細胞ペレットは完全培地で5mlの量になるよう再懸濁され、次いでパーコル70%の予備形成勾配のトップに移された。サンプルはソーバルGS-34型固定角ローターにのせられ、ソーバル高速遠心分離機で460 x gで15分遠心分離された。約15ml（プール密度 = 1.03 g/ml）の低密度画分が各勾配から収集され完全培地

30 ml が加えられた 50 ml の円錐形管に移された。管は細胞をペレット化するため 1200 rpm で遠心分離された。上澄みが廃棄され、細胞は完全培地 20 ml で再懸濁され赤血球を酢酸 4% で溶解させた後血球計算器で計数された。細胞は 7 ml 当り 5×10^7 細胞の濃度に調節され平板当り 7 ml で 100 mm 培養平板に接種された。

骨髄誘導 MSCs の培養および継代

骨髄誘導 MSCs は空気 95% および CO_2 5% を含む加湿雰囲気 37°C で完全培地で培養され、培地は 3 - 4 日毎にとり替えられた。第 1 次培養皿が密集近くなると、5 分 37°C で EDTA、1 mM (ジブコ) を含むトリプシン 0.25% で分離された。トリプシンの酵素活性は FBS、1/2 量の追加で停止した。細胞は計数され、1:3 に分割され、7 ml の完全培地に再平板培養された。これらの第 1 継代細胞は、それらが密集近くなるまで 4 - 6 日で分割を許された。密集近接第 1 継代細胞はトリプシン化され、下記に記載される検定形式に再平板培養された。

10

定量エリザ

MSCs によるサイトカイン発現の水準は定量エリザを用いて測定された。下記のサイトカインに対する抗体特異性を持つエリザキット (ミネソタ、ミネアポリス、アールアンドディー・システムズ) が購入された; インターロイキン 3 (IL-3)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-11 (IL-11)、果粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、果粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、幹細胞因子 (SCF)、白血病阻害因子 (LIF) および形質転換増殖因子-ベータ-2 (TGF- β 2)。密集近くになると、第 1 継代 MSCs は平板当り 50,000 細胞で 35 mm 平板に再平板培養され一晩付着することを許された。培養条件は次いで 3 個の試験条件の一つに変更された: 新鮮完全培地; 完全培地と骨形成補充剤; および完全培地と支質形成補充剤がそれである。培養は 24 時間あるいは 48 時間で試験培地で保温することを許され、その時点で上澄みが収集され、ドライアイス-エタノールで急速冷凍されすべてのサンプルと一緒に分析を準備されるまでレブコフリーザーで -70°C で貯蔵された。検定は培養上澄み 100 μ l をエリザ平板のウエル上に適用することで実施され、続いて製造業者の指示にもとづき平板を処理することがなされた。標準曲線はキットで供給される標準サイトカインを用いて生成され、適切な濃度に希釈された。ある場合 (とりわけ IL-6 検定) では、上澄みは標準曲線から正確に定量化できる十分に低い吸光測定値を生成するために大幅に希釈されねばならなかつた。

20

30

細胞数の定量化

結果

構造的培養拡張培地条件

9 個の検定されたサイトカインの 6 個の検出水準が構造的培養拡張条件に露出 24 時間後に存在した。(図 12A - 12D および 13A - 13C ならびに下記の表 7-10 を参照のこと)。

表 7

検出されたサイトカインの水準 (24時間)

ドナー		G-CSF 24 h	GM-CSF 24 h	SCF 24 h	LIF 24 h
対 照	1	15	3	56	52
	2	4	0	53	107
	3	3	0	28	134
	4	0	0	16	7
	5	0	0	30	40
	6	37	0	26	119
平 均		10	1	35	66
標準偏差		14	1	16	51
OS	1	22	0	80	11
	2	0	1	61	20
	3	6	0	34	44
	4	1	0	17	11
	5	4	0	22	11
	6	0	0	34	87
平 均		6	0	41	31
標準偏差		8	0	24	30
P値 対照:OS		0.5464	0.5761	0.1900	0.0274
P値 OS:SF		0.0358	0.0054	0.4714	0.0176
IL-1	1	322	527	66	644
	2	966	741	83	622
	3	1266	413	43	1008
	4	143	198	28	152
	5	410	307	0	191
	6	164	210	69	338
平 均		545	399	48	493
標準偏差		463	209	31	327
P値 対照:SS		0.038	0.0054	0.2434	0.0180

10

20

30

40

表 8

検出されたサイトカインの水準 (24時間)

ドナー	M-CSF 24 h	IL-11 24 h	IL-6 24 h	TGF- β 24 h
対照 1	200	830	7547	0
2	233	741	9887	0
3	303	659	6962	0
4	132	144	6987	0
5	130	509	5384	0
6	134	343	7761	0
平均	178	538	7421	0
標準偏差	70	259	1467	0
OS 1	548	0	1714	0
2	345	0	338	0
3	550	52	1842	0
4	73	0	650	0
5	162	9	1111	0
6	170	0	919	0
平均	308	9	1096	0
標準偏差	206	21	591	0
P値 対照:OS	0.1119	0.0038	0.0004	
P値 OS:SS	0.0123	0.0375	0.0065	
SS 1	1222	3583	216666	0
2	1355	4277	255555	0
3	2099	7351	340540	0
4	290	355	76033	0
5	753	1189	109473	0
6	589	1226	122666	0
平均	1051	2997	186822	0
標準偏差	648	2620	101604	0
P値 対照:SS	0.0149	0.0569	0.0074	

10

20

30

40

表 9

検出されたサイトカインの水準 (48時間)

ドナー	G-CSF 48 h	GM-CSF 48 h	SCF 48 h	LIF 48 h
対照 1	2	0	112	92
2	0	0	129	123
3	0	0	41	142
4	0	0	67	45
5	0	0	27	28
6	5	2	38	74
平均	1	0	69	84
標準偏差	2	1	42	44
OS 1	7	0	98	43
2	0	0	76	22
3	2	0	29	26
4	10	0	100	40
5	2	0	29	0
6	0	0	17	8
平均	4	0	58	23
標準偏差	4	0	38	17
P値 対照:OS	0.3053	0.3632	0.3901	0.0171
P値 OS:SS	P.0115	0.0027	0.1276	0.0040
SS 1	452	348	144	841
2	989	564	162	795
3	1214	291	53	866
4	143	198	28	152
5	410	307	0	191
6	164	210	69	338
平均	545	399	48	493
標準偏差	463	209	31	327
P値 対照:SS	0.038	0.0054	0.2434	0.0180

10

20

30

40

表 10

検出されたサイトカインの水準 (48時間)

ドナー	M-CSF 48 h	IL-11 48 h	IL-6 48 h	TGF- β 48 h
対照 1	975	1414	11707	0
2	451	905	10598	0
3	632	761	10691	0
4	337	225	4878	0
5	279	561	4814	0
6	222	467	5645	0
平均	483	722	8056	0
標準偏差	282	413	3261	0
OS 1	867	184	1230	0
2	530	0	493	0
3	655	0	1395	0
4	305	0	1090	0
5	361	0	1134	0
6	264	0	357	0
平均	497	31	950	0
標準偏差	233	75	422	0
P値 対照:OS	0.6513	0.0049	0.0029	
P値 OS:SS	0.0114	0.0167	0.0152	
SS 1	1188	4735	182352	0
2	1416	5500	36666	0
3	1847	7351	349629	0
4	290	355	76033	0
5	753	1189	109473	0
6	589	1226	122666	0
平均	1051	2997	186822	0
標準偏差	648	2620	101604	0
P値 対照:SS	0.0149	0.0569	0.0074	

最低から最高まで24時間あるいは48時間でpg/10,000細胞に関して発現されるサイトカインは:G-CSF、SCF、LIF、M-CSF、IL-11およびIL-6である。構造的培養拡張条件下で上澄みに3個のサイトカインが検出されなかったが、それはGM-CSF、IL-3およびTGF- β 2であった。他のサイトカインの発現の

10

20

30

40

50

平均水準と比較して、大きな差異が各サイトカインの平均サイトカイン発現で観察された。極端に言えば、G - C S F 発現の平均検出水準 (1 0 p g / 1 0 , 0 0 0 細胞 / 2 4 時間) は I L - 6 発現の平均検出水準 (7 4 2 1 p g / 1 0 , 0 0 0 細胞 / 2 4 時間) よりも 7 0 0 倍以上も低かった。

骨形成補充剤培養条件

骨形成補充剤の完全培地への追加は対照と関連して G - C S F、M - C S F および S C F に検出可能な変化を生み出さなかった (図 1 2 A - 1 2 D および 1 3 A - 1 3 B ; 表 7 - 1 0)。対照的に O S 培地は、24 時間構造的培養拡張培地条件の下でのこれらサイトカインの発現と関連して、L I F ($p < . 0 1$)、I L - 6 ($p < . 0 0 1$) および I L - 1 1 ($p < . 0 0 5$) の発現を著しく下向き調節した。これらの水準は構造的培養拡張培地条件で 4 8 時間のサイトカイン水準よりも統計的に低い段階に留まった (図 1 2 A - 1 2 D および 1 3 A - 1 3 C ; 表 7 - 1 0)。O S 培地媒介阻害の量は 3 個のサイトカインで変化した。24 時間の時点で構造的培養拡張培地条件に関連して O S 培地におけるサイトカイン発現の平均水準は以下のものであった ; L I F 発現、 $5 5 \% \pm 5 4 \%$ 、I L - 6、 $1 6 \% \pm 9 \%$ および I L - 1 1、 $1 \% \pm 3 \%$ 。L I F パーセント変化における大きな標準偏差は主として 1 人のドナー (ドナー # 4) からの測定に起因し、ここでは L I F 発現の水準は構造的培養拡張条件に関連して O S 培養条件下で事実上高かったためであった (表 7)。一定のドナーに対して、あるサイトカインの平均絶対阻害水準に関連してそのサイトカインの阻害パーセントは、平均絶対阻害水準に関連して他の 2 個の阻害パーセントとは無関係であった (表 7 - 1 0)。加えて、サイトカインのそれぞれに対して、母集団における 6 個の個体の間の一定のサイトカインのための阻害パーセントは、構造的培養拡張条件の下での発現の当初の水準とは無関係であった (図 1 2 A - 1 2 D および 1 3 A - 1 3 C ; 表 7 - 1 0)。

ストロマ補充剤培養条件

S S 培地は濃度依存方法で M S C s によるいくつかのサイトカインの発現を増加した。図 1 4 は G M - C F S の発現に関して I L - 1 の増加する濃度に対する第 2 継代 M S C s の 2 4 時間応答を図解する。0 . 1 - 1 0 . 0 U / m l の間での培養培地で I L - 1 の水準が増加するにつれて M S C s による G M - C S F 分泌の水準に線形に近い増加が存在する。培養培地への I L - 1 での追加のログの増加は G M - C S F 発現での追加の増加を殆どもたらさない。これらのデータは下記に記載される実験で培養培地に補充する I L - 1 の濃度を確認するために使用された。以下続くすべての検定に対し、I L - 1、1 0 U / m l が培養培地に加えられた。

I L - 1、1 0 U / m l を補充された培養培地は、構造的培養拡張培地で培養される細胞と関連し統計的に有意な上向き調節を G - C S F ($p < . 0 5$)、M - C S F ($p < 0 . 0 2$)、L I F ($p < 0 . 0 2$)、I L - 6 ($p < 0 . 0 1$) および I L - 1 1 ($p < 0 . 0 6$) の発現で誘導した。加えて I L - 1 は構造的培養拡張培地で検出されなかった G M - C S F の発現を誘導した。対照的に I L - 1 は構造的培養拡張培地条件の下での発現の水準に関連して S C F の発現には何らの統計的に有意な作用をもたらさなかった。I L - 1 に応じる倍増はサイトカインに依存して変化した。I L - 6 (2 5 . 1 + / - 1 3 . 4 倍増加) が最大の範囲で刺激され、次いで L I F (9 . 2 ± 6 . 9 倍)、M - C S F (5 . 2 ± 1 . 7 倍) および I L - 1 1 (4 . 9 ± 3 . 3 倍) の順となった。G - C S F および G M - C S F の平均倍増は計算されなかった。というのはこれらのサイトカインがあるものあるいはすべての構造的培養拡張培地で検出されなかったためであった。

検討

この研究における M S C s についての我々の継続した分析は追加の表現型特性を確認し、M S C s が分化あるいは表現型調整を生じさせる調節分子に露出された時にこの表現型がいかに変化するかを決定することを意図したものである。この研究において、我々は構造的培養拡張条件下で、また O S あるいは S S の存在下で M S C s のサイトカイン発現を特徴付けるためにエリザ検定を使用した。

M S C s は構造的培養拡張条件下で G - C S F、M - C S F、S C F、L I F、I L - 6

10

20

30

40

50

およびIL-11を含むサイトカインのユニークプロファイルを発現する。それはこれらの条件下ではGM-CSF, IL-3、およびTGF- β_2 を発現しない。OSはLIF, IL-6およびIL-11の発現を下向き調節するが、構造的培養条件下で発現された他のサイトカインの発現に影響しない。OSはこの研究で検定されたいずれかのサイトカインの発現を上向きに調節することが観察されなかった。対照的にSSはGM-CSF, M-CSF, LIF, IL-6およびIL-11の発現を上向き調節し、また構造的培養拡張条件下で検出されなかったGM-CSFの発現を誘導する。SSはSCF発現に影響を与えなかったし、またこの研究で検定されたいずれかのサイトカインを下向き調節することが観察されなかった。これらのデータを通じてMSCsを他の間葉表現型から区別するのに役立つユニークなサイトカイン発現プロファイルが生成された。サイトカインプロファイルの確認は、これらの細胞が造血を支持する誘導的かつ調節的情報を提供する骨髄の微環境で果たす役割を決定する手がかりを提供するに違いない。加えて、OSおよびSSに対応するこのサイトカインにおける変更は、MSCsが調節分子に対応して分化しその表現型を調節するようにその発現の水準が変化する特異的なサイトカインを確認する。

10

炎症応答中に各種の細胞型による骨髄微環境で放出されるIL-1は、果粒細胞(G-CSFおよびGM-CSF)、単核細胞/破骨細胞(GM-CSF, LIF, M-CSF, IL-6)および骨髄巨核球(IL-11)などの分化を支持するサイトカインの発現を上向き調節するMSCsを誘導する。IL-1は骨髄を放射性消耗あるいは血液消耗から保護することが示されている。MSCsによるサイトカイン発現のIL-1誘導上向き調節はIL-1の保護作用の機構で役割を果たすものと思われる。

20

MSCsを骨芽細胞に分化するよう誘導するデキサメタゾンは単核細胞/破骨細胞(LIF, IL-6)および骨髄巨核球(IL-11)支持サイトカインの発現を弱め、また果粒細胞始原細胞(G-CSF, GM-CSF)を支持するサイトカインの発現に何らの作用ももたらさない。デキサメタゾンにより阻害される3種のサイトカインはそのそれぞれが信号経路でgp130を使用するレセプターを通じてその信号を仲介するために重要である。

引用例

1. キャプラン, エイ. アイ. : 発生生物学協会39回年次シンポジウム, エス. サブテルニーおよびユー. アボット編, 3768ページ. ニューヨーク, アラン・アール・リス・インコーポレイテッド, 1981年.

30

2. エルマー他、奇形学、24巻、215-223ページ、1981年。

3. ハウシュカ, エス. ディー. , 発生生物学, 37巻, 345-368ページ、1974年。

4. サラーシュ他、発生生物学、83巻、9-19ページ、1981年。

5. スウォラ他、発生生物学、116巻、31-38ページ、1986年。

6. 五島他、臨床整形外科関連研究、269巻、274-283ページ、1991年。

7. アシュトン他、臨床整形外科関連研究、151巻、294-307ページ、1980年。

8. ブルーダー他、骨ミネラル、11巻、141-151ページ、1990年。

40

9. ベネット他、細胞科学ジャーナル、99巻、131-139ページ、1991年。

10. ベナヤフ他、細胞生理学ジャーナル、140巻、1-7ページ、1989年。

11. 中原他、実験細胞研究、195巻、492-503ページ、1991年。

12. デニス他、細胞移植、1巻、2332ページ、1991年。

13. 大串他、アクタ・スカンジア、60巻、334-339ページ、1989年。

14. ワン他、増殖因子、9巻、57ページ、1993年。

15. ブキセビッチ他、全米科学アカデミー紀要、86巻、8793ページ、1989年。

16. チェン他、内分泌学、134巻、277ページ、1994年。

17. テネンバウム他、石灰化組織Int., 34巻、76ページ、1982年。

50

【 図 2 B 】
FIG.2B

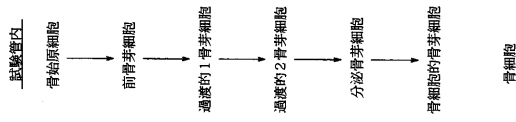
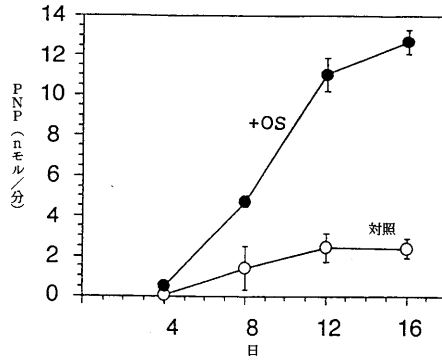


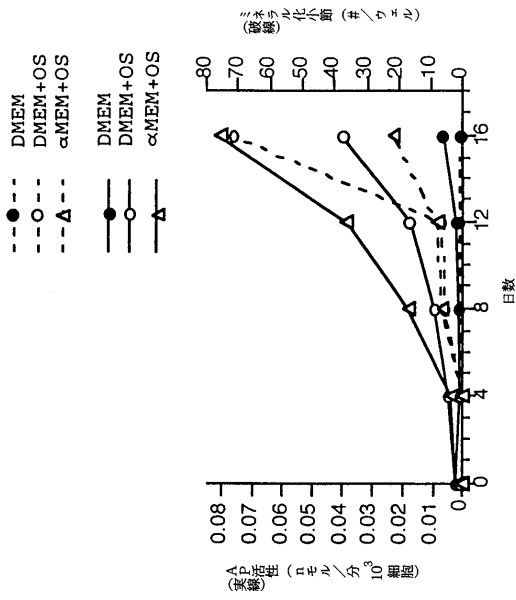
FIG. 2 A は続く

【 図 3 】
FIG. 3



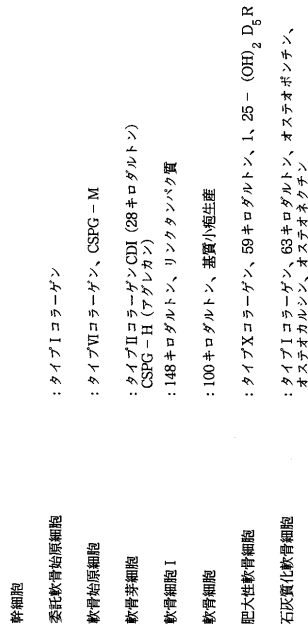
【 図 4 】

FIG. 4



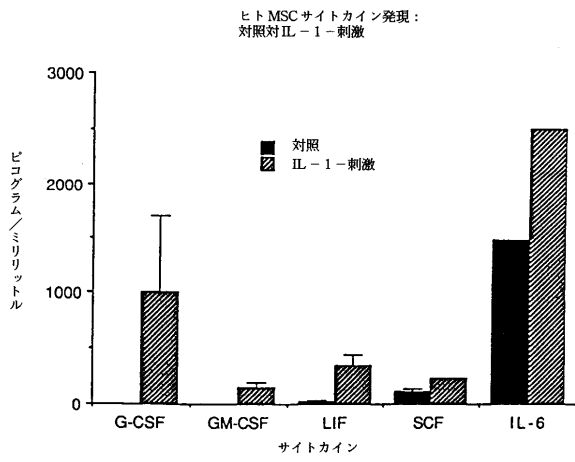
【 図 5 】
FIG.5

軟骨形成系列



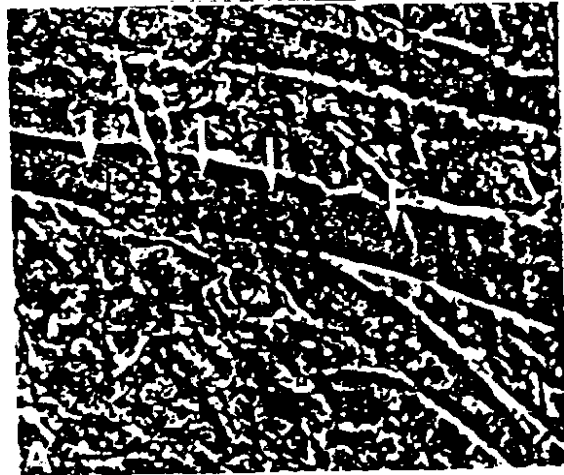
【図6】

FIG. 6



【図7A】

FIG. 7A



【図7B】

FIG. 7B



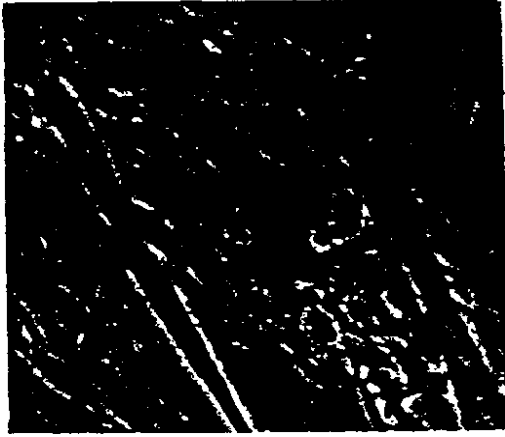
【図8】

FIG. 8



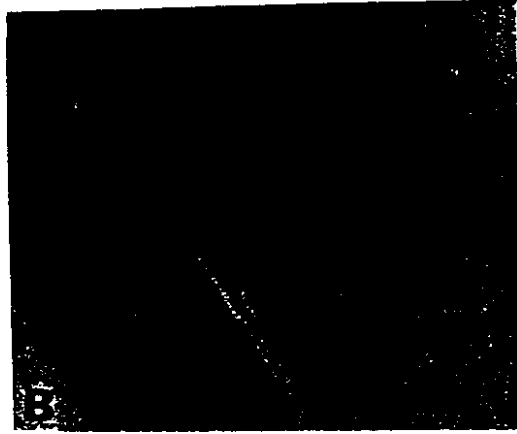
【図9A】

FIG.9A



【図9B】

FIG.9B



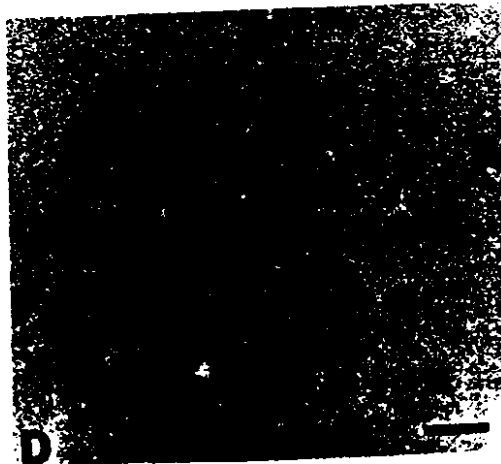
【図9C】

FIG.9C



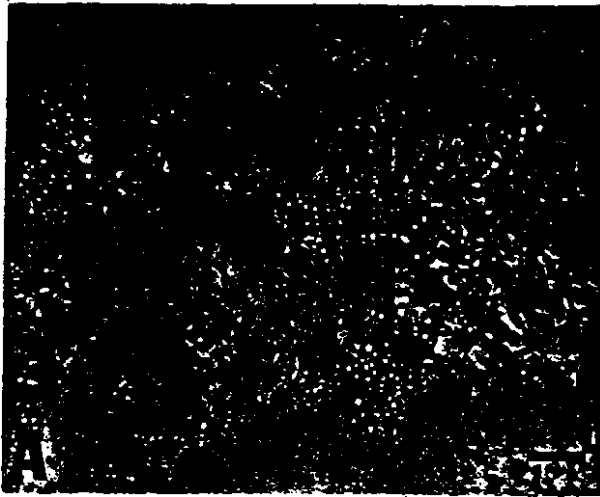
【図9D】

FIG.9D



【図10A】

FIG. 10A



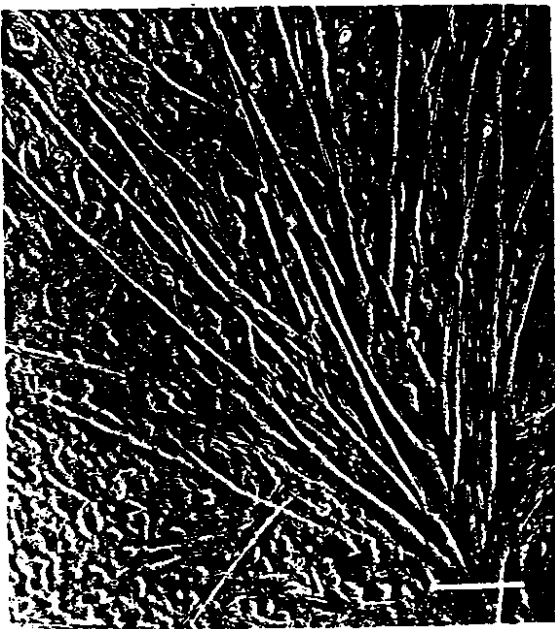
【図10B】

FIG. 10B



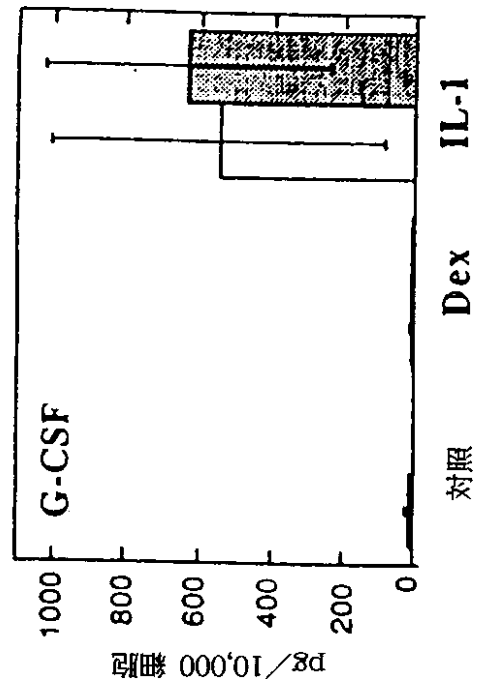
【図11】

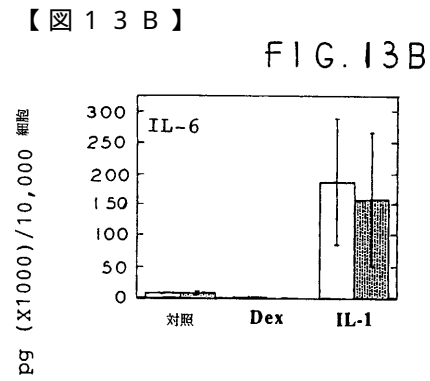
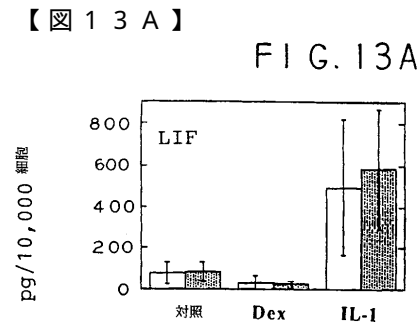
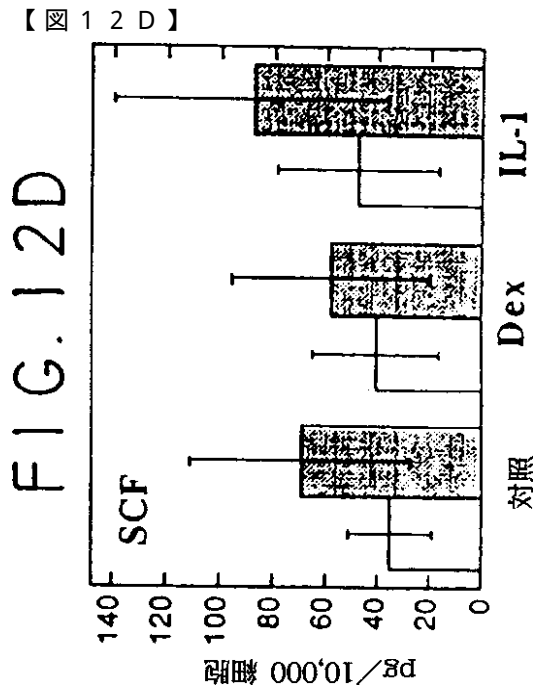
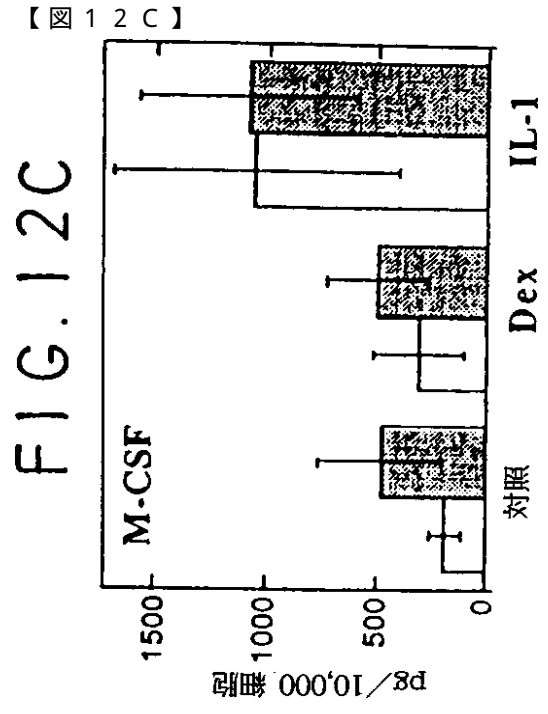
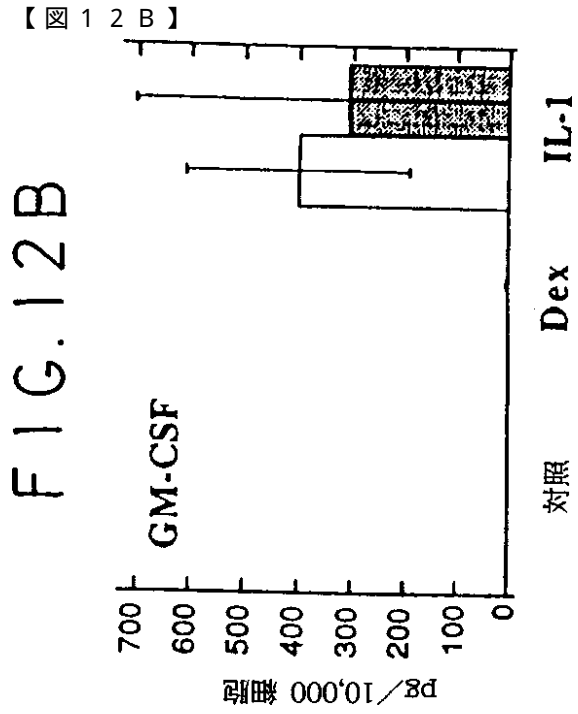
FIG. 11



【図12A】

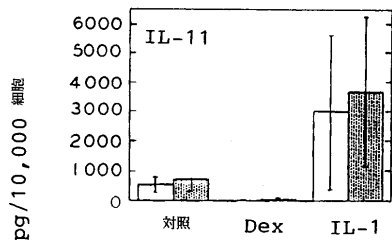
FIG. 12A





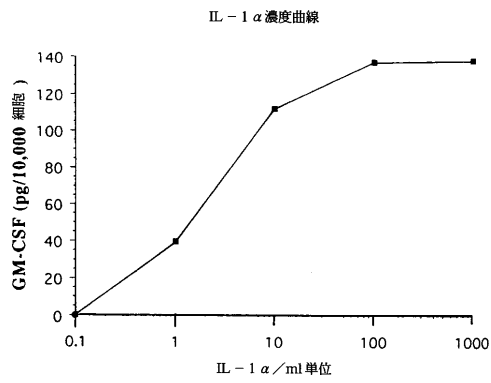
【 13 C 】

FIG. 13C



【 14 】

FIG. 14



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 38/22	(2006.01)	A 6 1 K 37/24	
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
C 1 2 N 5/07	(2010.01)	C 1 2 N 5/00	E

(74)代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100124305

弁理士 押鴨 涼子

(74)代理人 100066061

弁理士 丹羽 宏之

(72)発明者 ブルーダー, スコット, ピー.

アメリカ合衆国, 4 4 0 2 2 オハイオ, モアランド ハイッ, クウェイル ホロウ ドライブ
6 0

(72)発明者 キャブラン, アーノルド, アイ.

アメリカ合衆国, 4 4 1 2 1 オハイオ, クリーブランド ハイッ, オーク リッジ ドライブ
1 3 0 0

(72)発明者 ヘインズワース, スティーブン, イー.

アメリカ合衆国, 4 4 1 1 8 オハイオ, クリーブランド, アンティスデール ロード 3 6 4 3

合議体

審判長 平田 和男

審判官 鶴飼 健

審判官 深草 亜子

(56)参考文献 特表平7-500001(JP,A)

特開昭59-192364(JP,A)

特開平2-209811(JP,A)

Journal of Cellular Biochemistry, 56 (1994)
p.283-294

細胞工学, 13 (1994) p.803-809

Endocrinology, 134 (1994) p.277-286

Developmental Biology, 161 (1994) p.218-228

Journal of Bone and Joint Surgery, 76-A (1994)
p.579-592

Cell, 17 (1979) p.771-779

Exp Hematol, 1992, Vol.20, No.1, pp.75-79

Br J Haematol, 1991, Vol.77, No.2, pp.237-244

Differentiation, 1984, Vol.25, No.3, pp.259-263

Proc Natl Acad Sci USA, 1984, Vol.81, No.11,
pp.3429-3432

Differentiation(1994)Vol.58,p.157-164

J.Jpn.Orthop.Assoc.(1994)Vol.68,No.8,p.S160
5

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

C12N5/00