

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3673281号
(P3673281)

(45) 発行日 平成17年7月20日(2005.7.20)

(24) 登録日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(51) Int. Cl.⁷

F I

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/53

Y

A 6 1 K 35/32

A 6 1 K 35/32

A 6 1 K 38/22

A 6 1 K 39/395

D

A 6 1 K 39/395

A 6 1 L 27/00

G

A 6 1 L 27/00

G O 1 N 33/566

請求項の数 20 (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-502869
 (86) (22) 出願日 平成8年6月12日(1996.6.12)
 (65) 公表番号 特表平11-508358
 (43) 公表日 平成11年7月21日(1999.7.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/IL1996/000010
 (87) 国際公開番号 W01996/041620
 (87) 国際公開日 平成8年12月27日(1996.12.27)
 審査請求日 平成15年6月12日(2003.6.12)
 (31) 優先権主張番号 60/000,137
 (32) 優先日 平成7年6月12日(1995.6.12)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者

イエーダ リサーチ アンド ディベロッ
 プメント カンパニー, リミテッド
 イスラエル国 レホボット 76100,
 ピー. オー. ボックス 95, ザ
 ウェイズマン インスティテュート オ
 ブ サイエンス

(73) 特許権者

ラモット ユニバーシティ オソリティ
 フォー アプライド リサーチ アンド
 インダストリアル ディベロップメント
 リミテッド
 イスラエル国 ラマット アビブ 699
 75, ハイム レバノン ストリート
 32

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 間葉性骨格前駆細胞についてのマーカーとしてのFGFR3

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

間葉性骨格前駆細胞の実質的に純粋な培養物を得るための方法であって：

(a) FGFR3結合因子を、間葉性骨格前駆細胞を含む細胞供給源に、生体外で適用する工程；および

(b) FGFR3結合因子が結合する細胞を該供給源から分離する工程を包含し、該細胞は間葉性骨格前駆細胞の実質的に純粋な培養物を提供する、方法。

【請求項2】

前記細胞供給源が、増殖していない軟骨細胞、脱分化した線維芽細胞様の細胞、軟骨膜、滑膜、骨膜から得られる細胞であるか、または該細胞供給源が胚性である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

表面にFGFR3を特徴として有する骨格前駆細胞の実質的に純粋な培養物。

【請求項4】

軟骨膜および／または滑膜および骨膜に接する領域由来の骨格前駆細胞の実質的に純粋な培養物。

【請求項5】

前軟骨幹細胞の実質的に純粋な培養物。

【請求項6】

請求項 1 に記載の方法により得られる、請求項 3 に記載の骨格前駆細胞。

【請求項 7】

軟骨細胞の生存能を維持するに適した培地、および請求項 2 から 5 のいずれかに記載の実質的に純粋な培養物を含む、骨および軟骨の修復のための薬学的組成物。

【請求項 8】

FGFR3 に結合する FGF ファミリーのメンバーをさらに含有する、請求項 7 に記載の薬学的組成物。

【請求項 9】

FGF9 を含有する、請求項 8 に記載の薬学的組成物。

【請求項 10】

増殖を許容する接着性の環境、および請求項 3 から 5 のいずれかに記載の実質的に純粋な培養物を含有する、骨または軟骨移植に適した移植物。

【請求項 11】

FGFR3 に結合する FGF ファミリーのメンバーをさらに含有する、請求項 10 に記載の移植物。

【請求項 12】

FGF9 を含有する、請求項 11 に記載の移植物。

【請求項 13】

軟骨および骨の成長が貧弱であると予測される、他の発育不全および骨端軟骨の損傷を罹患した軟骨形成不全の患者を処置するための、請求項 8 または 9 に記載の薬学的組成物。

【請求項 14】

軟骨および骨の成長が貧弱であると予測される、他の発育不全および骨端軟骨の損傷を罹患した軟骨形成不全の患者を処置するための、請求項 11 または 12 に記載の移植物。

【請求項 15】

前記細胞が内生的である、請求項 13 に記載の薬学的組成物。

【請求項 16】

前記細胞が内生的である、請求項 14 に記載の移植物。

【請求項 17】

前記細胞が同種異系である、請求項 13 に記載の薬学的組成物。

【請求項 18】

前記細胞が同種異系である、請求項 14 に記載の移植物。

【請求項 19】

間葉性骨格前駆細胞を含む細胞供給源から間葉性骨格前駆細胞の実質的に純粋な培養物を得るのに使用する組成物であって、FGFR3 結合因子を含有する、組成物。

【請求項 20】

前記細胞供給源が、内生的であり、増殖していない軟骨細胞、脱分化した線維芽細胞様の細胞、軟骨膜、滑膜、骨膜から得られる細胞であるか、または該細胞供給源が胚性である、請求項 19 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、表面上に線維芽細胞増殖因子レセプター 3 (FGFR3) を特徴として有する細胞の同定により間葉性骨格前駆細胞を同定するための方法に関する。

本発明はさらに、FGFR3 結合因子を利用することにより、間葉性骨格前駆細胞を得るための方法に関する。本発明はなおさらに、間葉性骨格前駆細胞の実質的に純粋な培養物、並びにこの間葉性骨格前駆細胞を含む薬学的組成物および移植物に関する。

別の局面によると、本発明は、軟骨—骨腫瘍の同定方法および軟骨—骨腫瘍の処置のための薬学的組成物に関する。

発明の背景

骨格の成長は、組織細胞エレメント（軟骨細胞）、および長骨の軟骨成長中心におけるその細胞膜レセプターの適切な機能、並びに循環しているホルモンおよび局所のホルモンお

10

20

30

40

50

よび増殖因子の、正常性およびレベルの両方に依存する。そのため、発育不全は2つの異なるカテゴリー、(a)循環因子における不全、および(b)標的軟骨組織における不全に分類される。

正常な分化過程は、間葉性幹細胞から始まり、間葉性幹細胞は、骨前駆細胞に分化し、これは前軟骨幹細胞に分化して最終的に軟骨を形成し得るか、または前骨形成性幹細胞に分化して最終的に骨を形成し得る。

成長を支持する間葉性幹細胞、並びに正常および発育不全のファミリーにおける移動経路を追跡しようとする試みにおいて、これらの特定の間葉性幹細胞用の適切なマーカーの欠如を含む困難が存在する。例えば、長手方向および横方向の成長を支持する増殖板幹細胞の本来の位置および移動の経路に関して、部分的で不完全な情報は入手可能である。「Ranvier対La Croix」と呼ばれ得る、100年以上もの間に亘って長く続いている議論は今も続いている。1889年に、Ranvierは、「骨膜骨を形成する細胞は、増殖板の細胞から派生する。」と述べ、1951年にLa Croixは、「並列的成長は、軟骨膜周縁の細胞から起こる。」と述べた。Ranvierの理論は、70年代初頭にRigal, Hert, J. (Acta Anat (Basel) 82:420-436(1972))らによって支持を得、そして90年代には、Langenskiöldら (Acta Orthop. Scand., 64:683-687(1993))によって支持を得た。このことは、胚層からの細胞が骨溝の境界線に移動して、長手方向と横方向の両方の骨成長の両方の供給源として作用することを示唆している。

しかし、軟骨細胞および間葉の分化をもたらす因子の様々なタイプの完全な理解は、これらの細胞の主要な貯蔵部の本来の位置を位置付けることができないこと、およびそのことによるインビトロでの細胞培養の限界によって妨害されてきた。1つの困難なことは、連続する分化現象に続く特定の表現型マーカーの欠如である。II型コラーゲン分泌は、軟骨細胞分化の主要な初期のマーカーであると考えられる一方で、アルカリ性ホスファターゼの合成は、骨芽細胞分化の初期のマーカーである。成熟した骨芽細胞はまた、オステオポンチン、オステオネクチン、およびオステオカルシンを産生し、これら3つの細胞外基質タンパク質はI型コラーゲンと共に沈着して無機化した骨基質になる。不運にも、わずかの分化マーカーしか同定されておらず、そしてこれらのうちのいくつか(例えば、アルカリ性ホスファターゼ、オステオポンチン、およびオステオネクチン)は、骨形成性分化に対して特異的ではない。他方、オステオカルシンのような他のものは、インビトロでは稀にしか発現しない。さらに、間葉細胞株、並びに分化している軟骨細胞および骨芽細胞の初代培養物は、可変表現型を示し、そしてしばしば異なる分化段階での細胞型の混合物である(Eriebacher, A.ら, Cell 80:371-378(1995); Yamaguchi, T.P. および Rossant, J., Current Opinion in Genetics and Development 5:485-491(1995))。

従って、長手方向および横方向の両方の成長を支持しそしてこれに貢献する幹細胞の部位および供給源を正確に位置付け得るマーカーであって、正常な状態および病的状態における間葉発達のメカニズムをよりよく理解するため、および治療目的のために間葉性骨格前駆細胞の実質的に純粋な培養物を得る目的の両方のための、骨修復に対するマーカーを開発することが非常に望まれてきた。

発明の要旨

本発明は、線維芽細胞増殖因子レセプター3 (FGFR3)が間葉性骨格前駆細胞についてのマーカーとして作用するという驚くべき発見に基づく。本発明はさらに、間葉性骨格前駆細胞の解剖学的位置がLa Croix溝内の軟骨膜内にあるという驚くべき発見に基づく。

用語「間葉性骨格前駆細胞」は、以下の型の細胞を示すために以下に用いられる。(a)骨格前駆細胞に分化し得る間葉性幹細胞、(b)骨格前駆細胞、(c)前軟骨幹細胞、および(d)前骨形成性幹細胞、または上記の細胞型の2つ以上の組み合わせ。間葉性骨格前駆細胞はすべて、骨および/または軟骨の成長に寄与するという特性を共有し、他のタイプの軟骨および骨由来の細胞に比べて向上した増殖性、並びに線維芽増殖因子9のような適切な走化性因子の存在下で移動する傾向も示す。

これらの間葉性骨格前駆細胞は、胚および新生個体の生命の初期段階において、関節および骨端軟骨成長(板軟骨)の両方の成長を支持する。しかし、生命の非常に初期の段階(生

10

20

30

40

50

後2～3ヶ月)で、関節領域へのこれらの幹細胞の連結は破壊され、このことが関節軟骨の貧弱な自己創傷治癒につながる。このような間葉性骨格前駆細胞は、骨端軟骨の閉塞まで(18～22歳での)、長骨の長手方向および横断方向(横方向)の成長のための細胞供給源を維持し続け、そして一生を通じて骨折の仮骨に関連する骨膜の幹細胞貯蔵部を供給し続ける。成体の生命において、特に老年の場合、増殖する軟骨細胞を確立する可能性を有する未分化の細胞供給源を追跡する技術は、このような細胞供給源の不足のため、およびこの

ような未分化細胞についてのマーカーが不適切であるために、これまで失敗している。本発明が基づく発見、すなわち、FGFR3は間葉性骨格前駆細胞についてのマーカーであることを用いることにより、表面上にFGFR3を特徴として有するこれらの細胞を同定することにより間葉性骨格前駆細胞を同定する方法を開発することが可能であった。このような方法は、例えばFGFR3レセプターが関連する成長の停止の病的状態をよりよく理解するために、間葉性骨格前駆細胞を追跡するために重要であり得る。これらは、例えば、遺伝的軟骨無形成性小人症、または複数の遺伝性外骨症における持続的発現、および主要な変形性関節炎の骨増殖体における再発現を導く。

従って、本発明は、間葉性骨格前駆細胞を同定するための方法であって、

(a)リガンドーレセプター結合を可能にする条件下で、線維芽細胞増殖因子レセプター3 (FGFR3)結合因子を、アッセイされる細胞または組織に適用する工程；

(b)どの細胞がこのFGFR3結合因子に結合しているかを決定する工程を包含し、ここで、この細胞は、間葉性骨格前駆細胞である、方法を提供する。

抗体または線維芽細胞増殖因子9 (FGF9)であり得るFGFR3結合因子は、標識されて、そしてアッセイされる組織(例えば関節の組織)に適用されるべきである。標識されたこれらの領域は、間葉性骨格前駆細胞の供給源として作用する。

好ましくは、間葉性骨格前駆細胞の供給源は、La Croixの領域での軟骨膜であり、そして滑膜および骨膜に接する領域である。

様々な目的のため(例えば、間葉性骨格前駆細胞の培養物を得、これらをインビトロで増殖させ、次いで軟骨および骨の成長を促進するためにこれらを体内に再導入するという目的のために)、本発明の方法を使用して関節のような様々な組織内の間葉性骨格前駆細胞を同定しそして位置付け得る。あるいは、これらの細胞を同定することにより、未分化の間葉性骨格前駆細胞の過度の活性を特徴とする様々な疾患および異常におけるこのような幹細胞の過剰な活性を排除するために、組織部位からこれらの細胞を除去することが可能になる。さらに、FGFR3を有する細胞の領域を位置づけることにより、様々な調節因子をこれらの細胞の正確な位置に投与することによって、インサイチュでこのような細胞を操作することが可能である。このような因子は、FGFR3を安定化し、それにより、これらの細胞の未分化に増殖する状態をより長期間維持する能力を有する因子であり得る。その一例がFGF9である。あるいは、因子は、FGFR3を有する細胞の未熟な分化を引き起こし得、その一例がFGF9アンタゴニストである。

FGFR3が間葉性骨格前駆細胞のマーカーであるという事実を用いることにより、胚でない供給源からのこのような細胞の実質的に純粋な培養物を得ることが初めて可能になった。本発明の方法によると、FGFR3をマーカーとして用いることにより、間葉性骨格前駆細胞が、成長板の周縁に存在する軟骨膜リング(La Croix領域)内に位置付けられた。老年期における関節軟骨の自己創傷治癒が貧弱であることは、軟骨膜La Croix領域での潜在的幹細胞の供給源から関節領域が切断されることに基づいて説明され得る。このことは、成長の休止で起こる。

従って、本発明は、間葉性骨格前駆細胞の局在化のみならず、大量のこのような細胞の実質的に純粋な培養物を初めて得ることも可能にする。用語「実質的に純粋な培養物」は、本質的に、上記で定義した用語「間葉性骨格前駆細胞」にカバーされる4つの細胞型のうちの1つ以上を含む培養物を意味する。

従って、本発明は、以下に説明するように、様々な供給源から大量の間葉性骨格前駆細胞を得るための方法に関する。間葉性骨格前駆細胞は、FGFR3に対する特異的な抗体か、またはFGF9リガンドのようなこのレセプターに対する特異的リガンドのいずれかを用いるこ

10

20

30

40

50

とにより、同定され、そして供給源中の他の細胞から分離され得る。

間葉性骨格前駆細胞の実質的に純粋な培養物を得る方法は、

(c)FGFR3結合因子を、間葉性骨格前駆細胞を含む細胞供給源に適用する工程、

(d)FGFR3を結合する細胞のみを、この供給源から分離する工程を包含し、ここで、この細胞は間葉性骨格前駆細胞の実質的に純粋な培養物を提供する。

分離は、外科的に、例えば、FGFR3標識した結合因子に結合された領域のみをメスで取り上げることににより行われ得るか、または、特定の標識(FGFR3結合因子)を有する個々の細胞を、供給源内の標識されていない細胞の集団から分離し得る様々な細胞分離システムを利用することにより行われ得る。

このような間葉性骨格前駆細胞を得るための適切な供給源は、関節鏡検査または骨髄バイオプシーから入手可能な自己供給源である。バイオプシー供給源は、増殖していない軟骨細胞または脱分化した線維芽細胞様の細胞であり得る。細胞供給源はまた、軟骨膜、滑膜、もしくは骨膜の領域、またはこれらの領域が接する位置から得られ得る。これらの細胞は組織内においてまれであるので、特定のマーカーを利用するだけで、間葉性骨格前駆細胞をこれらの供給源から単離することが可能である。あるいは、細胞供給源はまた、胚性であり得る。

これらの供給源から得られた間葉性骨格前駆細胞は、適切な増殖因子およびヘパリンの存在下でエキソビボで増殖するように誘導され得る。次いで、軟骨細胞の生存能力を維持するに適した培地中の薬学的組成物という形態で体内に再導入される得るか、あるいは、移植物の形態で所望の部位に導入され得る。後者の場合、間葉性骨格前駆細胞は増殖を許容する接着性の環境(growth permissive gluey milieu)内に存在する。薬学的組成物および移植物の両方がまた、これらの間葉性骨格前駆細胞上に存在するFGFR3の活性を刺激するために、適切な線維芽細胞増殖因子、好ましくは線維芽細胞増殖因子9を含むことが好ましい。

本発明の薬学的組成物または移植物は、欠陥関節軟骨の修復および再生の目的のため、軟骨形成不全患者の処置のため、他の発育不全に罹患している患者の処置のため、および軟骨および骨の成長速度が貧弱であると予測される物理的障害の処置のために用いられ得る。本発明の薬学的組成物または移植物は、成長速度を向上させるため、および／または未熟な分化を防止するために成長板内の成長の速度を操作するための介入として用いられ得るか、あるいは、脊柱障害の治癒を促進するために微細な(fine)椎骨の髄核に直接注入するために用いられ得る。所望であれば、自己の間葉性骨格前駆細胞は、分子工学により、所望の部位に導入する前に所望の形質を発現するようにエキソビボで改変され得る。遺伝子操作の例は、変異欠損レセプターを置換するための野生型FGFR3の過剰発現、または、例えば様々なタイプの腫瘍などの場合に野生型レセプターの活性を抑制するためのドミナントネガティブ変異FGFR3の発現を指向する遺伝子操作である。

実際、本発明の方法は、通常、ヒアルロン酸ベースの粘性の増殖を許容する環境内に間葉性骨格前駆細胞を包埋する工程、混成の半固体移植物を形成する工程を包含する。移植物は、開放性の関節手術下かまたは関節鏡検査デバイスによるかのいずれかによって、成長の標的部位、例えば関節病変部位に移され、関節表面までの損傷の管腔を充填する。スプレーデバイスにより薄い浸透膜が形成されて、欠損を閉鎖しそして移植物の本来の位置における定着および維持を保証する。

別の局面によると、本発明は、FGFR3がまた例えば、良性腫瘍(例えば、外骨症および骨増殖体など)軟骨一骨腫瘍上に存在し、従って、このような腫瘍の存在のインジケーターならびにこのような腫瘍の正確な位置付けのためのマーカーの両方として作用し得るという発現に基づく。そのため、本発明はさらに、組織またはサンプル中の軟骨一骨腫瘍を検出するための方法であって、

(i)アッセイされる組織またはサンプルをFGFR3結合因子と接触させる工程；

(ii)FGFR3結合因子が結合する細胞の存在を検出する工程であって、陽性の検出が、そのアッセイされた組織またはサンプル中の軟骨一骨腫瘍の存在を示す工程を包含する、方法を包含する。

10

20

30

40

50

検出はFGFR3に対する適切な標識抗体を用いることにより、またはFGF9のようなFGFR3に対する特異的な標識リガンドの使用により、行われ得る。この標識したFGFR3結合因子をインビボで組織に適用することにより、腫瘍が組織内に存在するか否かを決定するだけでなく、腫瘍を正確に位置付けすることが可能になる。このことは、腫瘍の外科的除去を補助し得る。

FGFR3が軟骨—骨腫瘍細胞上に存在するという事実はまた、適切な細胞傷害性部分を、FGF9のようなFGFR3に特異的なリガンド、またはFGF9に対して特異的な抗体に結合させることにより、特に腫瘍部位に特異的に細胞傷害性の因子を標的化するために作用し得る。従って、本発明はさらに、細胞傷害性部分に結合したFGFR3結合因子を含む軟骨—骨腫瘍の処置のための薬学的組成物、および、細胞傷害性部分に結合した治療有効量のFGFR3を被験

10

体に投与することによりこのような腫瘍を処置する方法に関する。
細胞傷害性因子は、当該分野で周知であり、この用語は、本発明の文脈において、軟骨および骨由来腫瘍細胞を破壊し得る全ての因子を示す。上記因子の例は、例えば、メトトレキセート、ドキシソムビシン(doxombicin)、シクロホスファミドなどである。

癌の処置はまた、FGFR3を有する細胞の分化を誘導することによっても行われ得る。これは、例えば、FGFR3分化誘導性因子を、FGFR3結合因子によって標識された領域に導入することによって行われ得る。分化誘導性因子の例は、FGF9アンタゴニストまたはFGF9に対する抗体である。

処置はまた、野生型FGFR3の活性を減弱するドミナントネガティブの検出用の(detetive)FGFR3の腫瘍への導入(例えば、遺伝子工学により)により行われ得る。

20

以下に、いくつかの限定しない図面および実施例に照らして本発明を説明する。

【図面の詳細な説明】

図1—FGFR3に対する抗体によるモルモットの骨端部の組織学的染色。顕微鏡写真1～5は、若齢の成体モルモットの骨端断面を示す。

1. コラーゲンおよびプロトグリカン(protoglycan)などの結合組織エレメントについて特異的な染色である、マッソン三色染色(倍率:×6)の組織学的色素で染色された矢状断面。

2. FGFR3に対する抗体での免疫組織化学的染色により染色された矢状断面(×400)。3、4および5. 軸方向断面。

3. FGFR3抗体因子についての免疫組織化学的染色(×100)。

30

4. マッソン三色染色(×25)、および

5. FGFR3抗体因子についての免疫組織化学的染色(×400)。

図2は、17日齢のひな胚の長骨の骨端の矢状断面を示す顕微鏡写真6～11からなる。

顕微鏡写真6、10および11は、FGFR3に対する抗体での免疫組織化学的染色により染色されており、そして8は、プロトグリカンに特異的なアルシアンブルー(pH2.5)により染色されている。(特定の領域で染色が欠如していることに留意されたい。)

顕微鏡写真の倍率は以下の通りである:6(×25);7(×40);9(×100);10(×400);および11(×100)。

7および9は、マッソン三色染色により染色されている。

図3は、骨端軟骨を取り囲む前軟骨リングが除去された青年期ラット(STRIIP);上記の除去なしに軟骨膜を曝露したラット(SHAM);およびいずれの操作にも供されなかったラット(CNTL)体内の大腿骨成長を示す。

40

図4は、インビトロで増殖させ、関節軟骨、骨端、骨端軟骨、および軟骨膜から得られた細胞のコロニー形成までの日数を示す。

発明の詳細な説明

材料および方法

(a)初代軟骨細胞培養:

長骨(大腿骨および脛骨)の骨端を、11日齢のひな胚から得た。切除後、組織セグメントを、Tyrod溶液中のトリプシンで処理し、遊離細胞の懸濁液が得られるまで機械的に粉碎した。次いで細胞を高濃度(5×10^6)でプレーティングした。

50

(b)初代軟骨細胞培養物のPCRスクリーニング：

コンフルエントに達すると、細胞を収集してRNA精製キット(3試薬)(Molecular Research Center,Cincinnati,Ohio)により溶解した。細胞由来のRNAをフェノール抽出し、イソプロパノール沈殿させ、水中で再懸濁し、そしてその光学密度を測定することによりアッセイした。クリーンなRNA(0.D.260/280 nm>1.5)を得た後、逆転写酵素反応を用いてcDNAを生成し、そして線維芽細胞増殖因子(FGF)についてスクリーニングした。FGFR3とFGF9との両方についてオリゴヌクレオチドペアを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を用いた。変性を94℃で行い、52-65℃でアニーリングし、72℃で伸長させ、これを35サイクル繰り返した。

(c)FGF9の放射標識：

組換えマウスFGF9を、上述したように(Hecht,Dら、Growth factors 12、223-233(1995))調製し、クロラミン-T法を用いてNa¹²⁵I(0.5mCi)で標識し、ヘパリンセファロースカラム上の遊離ヨウ素から分離した。比活性の範囲は、0.5~2×10⁵cpm/ngであった。

(d)免疫組織化学：

脱灰した骨を、ホルマリンおよびピクリン酸により固定した後、液体パラフィン中に包埋した。パラフィンブロックを切断し、標準的なプロトコルを用いて免疫組織化学のために調製した。抗FGFR3抗体の力価を上昇させながらスライドを染色した。

(e)インサイチュハイブリダイゼーション：

T7(アンチセンスプローブ)およびT3(センスプローブ)を、S-35標識したウリジン残基を用いて、プラスミド(Bluescript-Stratagen)を含む組換えFGF9およびFGFR3から作製した。受胎後10.5~18.5日齢のマウス胚をパラホルムアルデヒド中で固定し、エタノールの濃度を上昇させながら脱水し、液体パラフィン中に包埋した。切片を切断し、そして標準的な方法を用いて調製し、そして適切なRNAプローブとハイブリダイズした。

実施例 1

FGFR3に対する抗体による組織化学的染色

図1に見られるように、FGFR3に対する抗体で染色された領域は、受け入れた軟骨染色であるマッソンの三色染色で染色された領域に一致しなかった。これらの発見は、FGFR3を有する細胞は軟骨内自体には一致しないが、むしろLa Croix溝として知られている領域内の軟骨膜内に位置することを示している。

実施例 2

青年期ラットのLa Croixのリングのストリッピング

3つのグループの各グループには10匹のラットが含まれていた。グループ1は、対照群(CNTL)として供した。ラットには麻酔をかけたが、手術は行わなかった。グループ2 (SHAM)は、見かけの手術グループとして供し、麻酔をかけて軟組織を切除して軟骨膜を曝露した。グループ3 (STRIP)は、ループ拡大下で骨端軟骨を取り囲む軟骨膜リングをストリップした。ループ拡大は、骨端軟骨自体にいかなる損傷も与えることなく軟組織のみを切除することを可能にした。4週間後、ラットの平均の大腿骨の長さを測定した。結果を図3に示す。反対側の足(contra-lateral)は、手術における長さにおいて、対照の足と同様であった(データは示さない)。見かけの手術を行った足は、統計学的に有意なレベルに達しない程度に足の長さが増加する傾向を示した。これらのストリップされた足は、足の成長の停止を示した。これらの結果は、FGFR3抗体で染色された領域を除去することにより足の長さが停止することを示し、このことは、このような領域が正常な成長に関与することを示す。

実施例 3

La Croixのリングから得られた細胞のインビトロでの増殖

上記のラットから取り出した、La Croix領域由来の軟骨膜組織を、培養ディッシュ内の適切な成長培地中に置き、そしてコロニー形成までの期間を決定した。比較として、遠位大腿骨(関節軟骨、骨端(骨)、骨端軟骨(軟骨))の様々な位置から得た組織を同一条件下で培養し、そしてまたコロニー形成までの期間を決定した。

図4に見られるように、軟骨膜から取り出した組織は、培養約3日後に細胞コロニーを急

10

20

30

40

50

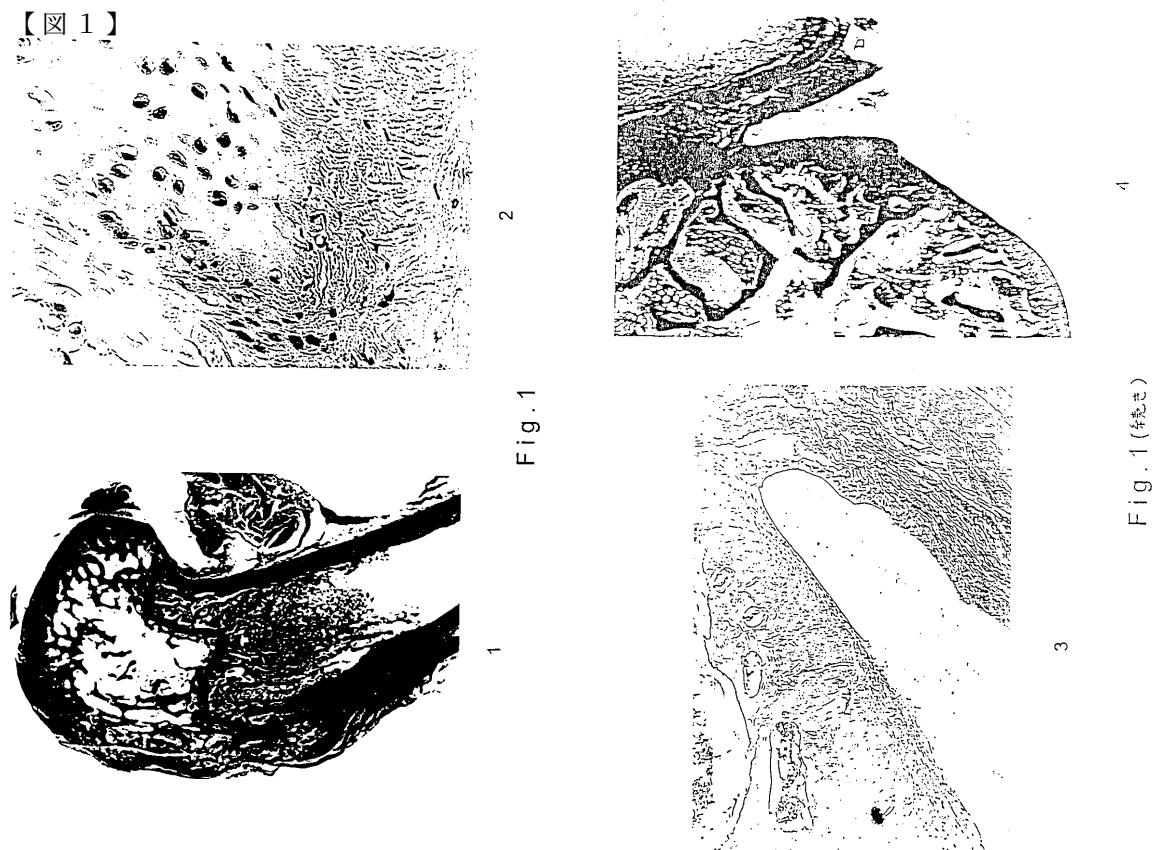
速に形成する能力を示したが、一方、他の領域から取り出した組織は、移植から10日以上後になって初めて培養物を生成した。これらの結果は再び、FGFR3抗体で染色した領域から得られた細胞は、FGFR3を特徴として有しない、骨の他の領域から得られた細胞よりもより急速に成長するということを示す。

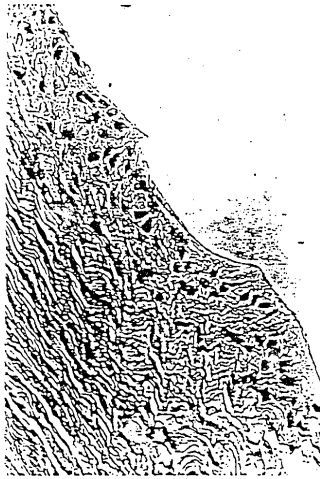
実施例 4

外骨症におけるFGFR3の存在

FGFR3に対する抗体を、外骨症良性腫瘍から得た組織に適用した。抗体は線維性の組織中の細胞を染色し、そして本質的に軟骨の細胞を染色しなかった(データは示さない)。これらの発見は、FGFR3が、軟骨—骨由来の良性腫瘍(外骨症)内に存在し、その結果、FGFR3結合因子(抗体のような)をこのような腫瘍を同定しかつそれに結合した細胞傷害性因子を標的化するために使用し得ることを示す。この発見はまた、FGFR3の消滅を引き起こし、従って分化を導く因子(例えばFGF9のアンタゴニスト)による、このような腫瘍の処置を導く。

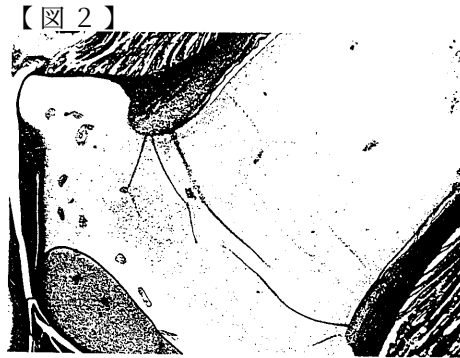
10





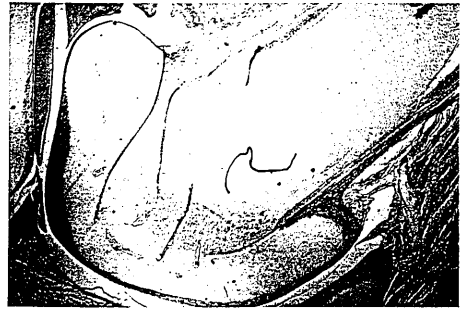
5

Fig.1(続き)

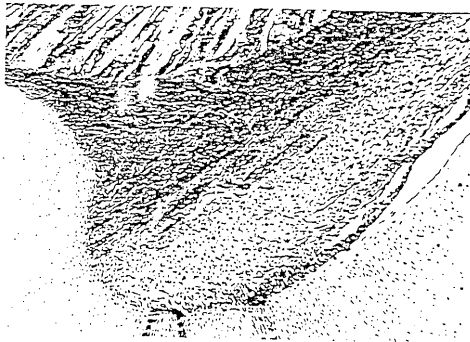


7

Fig.2



6



9

Fig.2(続き)

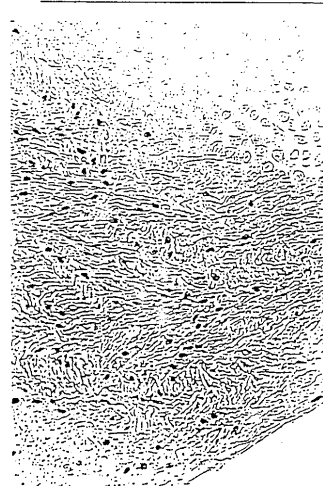


8



11

Fig.2(続き)



10

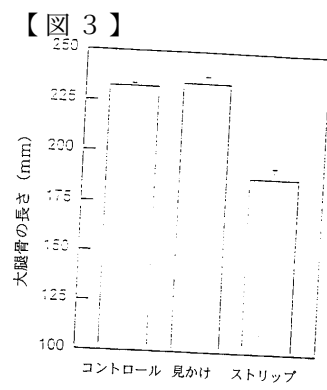


Fig.3

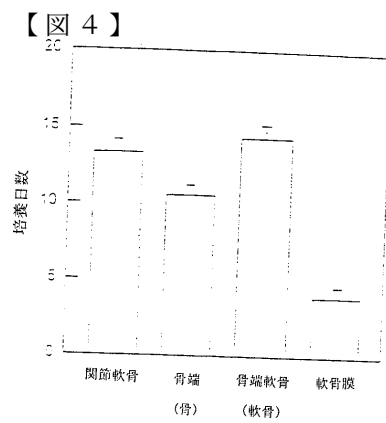


Fig.4

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I
C 1 2 N 5/06 A 6 1 K 37/24 A B J
G 0 1 N 33/566 C 1 2 N 5/00 E

(74)代理人

弁理士 山本 秀策

(72)発明者 ヤヨン, アブネール

イスラエル国 モシャブ シチリア 7 6 8 3 4, 1 0 4

(72)発明者 ネボ, ズビ

イスラエル国 ヘルズリア 4 6 4 2 5, ニーブ アミリム, ヤイル スターン ストリート
1 1

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 特表平07-500001 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

G01N 33/53
A61K 35/32
A61K 38/22 ABJ
A61K 39/395
A61L 27/00
C12N 5/06
G01N 33/566