

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5764807号
(P5764807)

(45) 発行日 平成27年8月19日 (2015. 8. 19)

(24) 登録日 平成27年6月26日 (2015. 6. 26)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 L 27/00 (2006. 01)	A 6 1 L 27/00 G
A 6 1 F 2/28 (2006. 01)	A 6 1 F 2/28

請求項の数 10 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2011-15143 (P2011-15143)	(73) 特許権者	515137381
(22) 出願日	平成23年1月27日 (2011. 1. 27)		ファウエル・メディシン・カンパニー
(65) 公開番号	特開2011-161225 (P2011-161225A)		FaWell Medicine Co.
(43) 公開日	平成23年8月25日 (2011. 8. 25)		台湾 11690 タイペイ・シティ、シンロン・ロード、セクション2、ナンバー25
審査請求日	平成25年11月18日 (2013. 11. 18)		2、5フロアー2
(31) 優先権主張番号	12/700, 469	(74) 代理人	100100158
(32) 優先日	平成22年2月4日 (2010. 2. 4)		弁理士 鮫島 睦
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100068526
早期審査対象出願			弁理士 田村 恭生
前置審査		(74) 代理人	100138900
			弁理士 新田 昌宏
		(74) 代理人	100162684
			弁理士 呉 英燦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟骨欠損の修復に用いる外科用グラフト

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

軟骨欠損の修復のためのインプラントであって、軟骨細胞様細胞が包埋されたコラーゲンマトリックスを含んでなり、該インプラントには小腔が存在せず、トランスフォーミング増殖因子 1 (T G F - 1) を添加したコラーゲン含有培地で、間葉系幹細胞の軟骨細胞様細胞への分化と前記インプラントの形成が可能な条件下、間葉系幹細胞を 7 ~ 20 日間培養することによって作製され、該コラーゲン含有培地が約 1 % から約 10 % w / v の濃度でコラーゲンを含有し、該軟骨細胞様細胞がグリコサミノグリカンを分泌する、インプラント。

【請求項 2】

前記間葉系幹細胞が、骨髓、脂肪組織、筋肉組織、乳歯の歯髄、臍帯血、臍帯、胎盤、臍帯内膜から単離される、請求項 1 記載のインプラント。

【請求項 3】

前記コラーゲンマトリックスが I 型または II 型コラーゲンを含んでなる、請求項 1 記載のインプラント。

【請求項 4】

請求項 1 のインプラントを作製する方法であって、
間葉系幹細胞を用意する工程と、

トランスフォーミング増殖因子 1 (T G F - 1) を添加したコラーゲン含有培地で、間葉系幹細胞の軟骨細胞様細胞への分化とインプラントの形成が可能な条件下、間葉系

幹細胞を7～20日間培養する工程、
を含んでなる、方法。

【請求項5】

前記間葉系幹細胞が、骨髄、脂肪組織、筋肉組織、乳歯の歯髄、臍帯血、臍帯、胎盤、臍帯内膜から単離される、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記コラーゲン含有培地が約1%から約10%w/vの濃度でコラーゲンを含有する、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

前記コラーゲン含有培地が約3%w/vの濃度でコラーゲンを含有する、請求項6記載の方法。

10

【請求項8】

前記コラーゲンがI型またはII型コラーゲンである、請求項4に記載の方法。

【請求項9】

前記培養工程の後に、軟骨細胞様細胞がグリコサミノグリカンを分泌しており、かつインプラントに小腔が存在しないことを確認することをさらに含んでなる、請求項4に記載の方法。

【請求項10】

前記培養工程がカプセル内で実行される、請求項4に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は軟骨欠損の修復に用いる外科用グラフトに関する。

【背景技術】

【0002】

1994年以来、自己軟骨細胞移植術が軟骨欠損の治療に用いられており、これは、正常な軟骨組織から軟骨細胞を収集し、それら細胞をインビトロの培地でできる限り増殖してから、増殖した細胞を人工足場に植え込み、軟骨欠損を埋めるというものである。しかしながら、そこにはまだ多くの問題がある。例えば、自己軟骨細胞のソースが限られる、軟骨細胞の増殖能が低い、そして増殖中にそれら固有の表現型が失われることがある（非特許文献1）、などである。

30

【0003】

間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell、MSC）は、軟骨を含む結合組織系の細胞に分化する能力を有し、このため軟骨組織再生において魅力的な細胞ソースとなっている。MSCの軟骨形成誘導においては多くの技法が用いられている。Kavalkovichらは、胚性軟骨形成の環境を模倣したパレット培養法を提供しており、それによると細胞密度の高い細胞が得られたが、大量の細胞の緊密な細胞凝集塊で少量の軟骨組織しか形成されなかった。このため、欠損軟骨の修復にはかなりの数の細胞パレットが必要とされ、大型のパレットは辺縁に生存細胞がみられたがパレットの中央部は壊死した（非特許文献2）。さらに、パレットは取り扱いが難しく、欠損修復に必要な多様な形状に成型することが困難である。上述を受けて、パレット培養は外科的用途には実用的でない。さらに、ヒトMSC（hMSC）をアガロースまたはアルギン酸ゲルに包埋することで多様な形状に成型でき、かつ実質的な軟骨形成を引き起こすことが分かった（非特許文献3、非特許文献4）。しかしながら、軟骨組織再生用アルギン酸またはアガロース足場には、細胞接着の弱さ、周囲の培地への二価カチオン拡散後のアルギン酸の制御不能な分解などの欠点がある。加えて、アルギン酸マトリックスは、インビボでの適用に用いられているが、実験動物の軟骨における全層欠損の治療に移植した場合に、重度の異物巨細胞反応や免疫応答を生じることが報告されている（非特許文献5）。このため、アルギン酸マトリックスはヒトの患者の関節軟骨修復には用いられていない。

40

【0004】

50

従って、患者の軟骨欠損修復のための外科用グラフトの開発がなおも必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Saadeh et al., Human cartilage engineering: chondrocyte extraction, proliferation, and characterization for construct development. Ann Plast Surg 1999; 42: 509-13

【非特許文献2】Kavalkovich et al., Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells within an alginate layer culture system. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2002; 38: 457-66

【非特許文献3】Huang et al., Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in agarose culture. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2004; 278: 428-36

【非特許文献4】Ma et al., Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. J Biomed Mater Res A 2003; 64: 273-81

【非特許文献5】Hunziker, Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. Osteoarthritis Cartilage 2001; 9: 432-63

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、軟骨欠損の修復のための新規なインプラント、該インプラントの作製方法、並びに該インプラントを用いる軟骨欠損の修復方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、(1)軟骨細胞様細胞が包埋されたコラーゲンマトリックスを含んでなるインプラントは、軟骨欠損部位に移植したときに軟骨欠損を修復する、そして(2)移植部位でインプラントと組織間に隙間が形成されない、という2つの予期せぬ発見に基づいている。

【0008】

本発明の一つの態様は、軟骨細胞様細胞が包埋され、かつトランスフォーミング増殖因子1(TGF- β 1)が添加されたコラーゲンマトリックスを含んでなる、軟骨欠損修復用インプラントを提供する。このインプラントには小腔が存在せず、TGF- β 1を添加した、コラーゲン(例: I型またはII型コラーゲン)含有培地で、間葉系幹細胞(MSC)をMSCの軟骨細胞様細胞への分化及びインプラントの形成が可能な条件下で培養することによって作製される。軟骨細胞様細胞はグリコサミノグリカンを分泌する。MSCは骨髄、脂肪組織、筋肉組織、乳歯の歯髄、臍帯血、臍帯、胎盤、臍帯内膜から得ることができる。

【0009】

一例として、上述の培養工程は、TGF- β 1を添加したコラーゲン含有培地で、コラーゲンマトリックスの形成と、該コラーゲンマトリックスに包埋される、MSCの軟骨細胞様細胞への分化が可能な条件下で、7~21日間MSCを培養することにより行なわれる。コラーゲン含有培地のコラーゲン濃度は、約1~約10%w/v(例: 約3%w/v)が望ましい。この培養工程はカプセル内で実施することができる。

【0010】

本発明の別の態様は、上述のインプラントを、軟骨欠損部位の治療が必要な患者に移植することで軟骨欠損を修復する方法を提供する。一例として、インプラントは注射器様のピストンで欠損部位に送達される。別の例では、インプラントはカプセルに取り込まれ、カプセルからそれを押し出して該当部位に適用することにより、欠損部位に送達される。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 1 】

本発明の多様な実施形態を以下に詳細に説明する。本発明のその他の特徴は、この多様な実施形態とクレームに関する以下の詳細な説明と図面により明らかにされる。

【 0 0 1 2 】

本発明を説明するために、以下に本発明の好ましい実施形態を図面に示す。しかしながら、本発明がそれら好ましい実施形態に限定されないことは理解されなければならない。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 3 】

【 図 1 】 本発明の方法で治療を受けた 9 名の患者の I K D C 採点結果のグラフである。術後 6 ヶ月及び 1 2 ヶ月目でスチューデントの t 検定により有意の改善が見られた。

10

【 図 2 】 本発明の方法で治療を受けた患者の移植後 1 2 ヶ月目の関節鏡検査画像である。病変部位と細胞マトリックス複合体により作製された外科用グラフト間には間隙がない。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 4 】

本発明は、軟骨細胞様細胞が包埋されたコラーゲンマトリックスとトランスフォーミング増殖因子 1 (T G F - 1) を含んでなるインプラントであって、該軟骨細胞様細胞が間葉系幹細胞 (M S C) から分化したものでありかつグリコサミノグリカンを分泌し、それによってグラフトとの間に間隙を生じることなく該軟骨欠損が修復する、インプラントで患者の軟骨欠損を修復する方法を提供する。

20

【 0 0 1 5 】

特に記載しない限り、本明細書において用いられる用語はすべて、本発明が属する技術分野における当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書において用いられる以下の用語は、特に記載しない限り、以下に記載する意味を有する。

【 0 0 1 6 】

数の記載がない名詞は、1 以上 (少なくとも 1 つ) のものを表す。例えば、「構成要素」は 1 つまたは 2 つ以上の構成要素を意味する。

【 0 0 1 7 】

「間葉系幹細胞」または「 M S C 」なる語は、骨髓、脂肪組織、筋肉組織、乳歯の歯髄、臍帯血または臍帯が挙げられるがこれらに限定されない成人の組織から得られた、多能性幹細胞を指す。

30

【 0 0 1 8 】

「軟骨細胞」なる語は、マトリックス内の小腔 (小さい空洞) 内に包埋された成熟した軟骨細胞を意味する。軟骨細胞は、間葉軟骨形成細胞の軟骨芽細胞 (軟骨マトリックスを生成する最も初期の細胞) への分化により生じる。成熟した軟骨細胞は球形の核と明瞭な核小体を持つ大型の分泌細胞である。軟骨細胞における小腔の形成は、成熟した軟骨細胞の特質とみなされる。

【 0 0 1 9 】

「軟骨細胞様細胞」なる語は、グリコサミノグリカン (G A G) の分泌など、軟骨細胞の分泌細胞の性質を有するが成熟した軟骨細胞に一般的な性質である小腔を形成しない細胞を意味する。

40

【 0 0 2 0 】

「コラーゲンマトリックス」なる語は、グリコサミノグリカン (G A G) を分泌する能力を有するが小腔が存在しない軟骨細胞様細胞が包埋された、コラーゲン含有培地で M S C を培養することにより形成される組織再生材料を意味する。

【 0 0 2 1 】

本発明は、患者における軟骨欠損を修復する方法であって、
間葉系幹細胞 (M S C) から分化されかつグリコサミノグリカンを分泌する軟骨細胞様細胞が包埋されたコラーゲンマトリックスとトランスフォーミング増殖因子 1 (T G F - 1) を含んでなるインプラントを提供する工程と、
該インプラントを患者の軟骨欠損部位に配置する工程を含み、

50

前記インプラントには小腔が存在しない、
方法を提供する。

【0022】

本発明において、軟骨細胞様細胞が包埋されたコラーゲンマトリックスとトランスフォーミング増殖因子 1 (TGF- β 1) を含んでなるインプラントは、トランスフォーミング増殖因子 1 (TGF- β 1) を添加したコラーゲン含有培地で、MSCの軟骨細胞様細胞への分化とインプラントの形成が可能な条件下で、MSCを培養することにより得られる。

【0023】

本発明の一実施例では、MSCを、TGF- β 1を添加したコラーゲン(例：I型またはII型コラーゲン)含有培地で培養した。MSCから軟骨細胞様細胞への分化は、MSCが軟骨様組織に誘導されたことを確認するため、グリコサミノグリカン(GAG)含量を評価し、かつ小腔が形成されたか否かを検出することにより特徴付けられた。インプラントとして使用される組織再生材料である軟骨細胞様細胞が包埋されたコラーゲンマトリックスを回収した。

【0024】

本発明の一実施例では、MSCを増殖させ培養した後、これを軟骨細胞様細胞への軟骨形成誘導が可能な条件下でコラーゲンを含む培地に包埋させて培養し、さらにトランスフォーミング増殖因子 1 (TGF- β 1) を添加した。グリコサミノグリカン(GAG)を分泌する前記軟骨細胞様細胞が包埋されたコラーゲンマトリックスを回収する。コラーゲンマトリックスは、常法に従い、小腔の形成が存在せず、かつ包埋された軟骨細胞様細胞がGAGを分泌するかを確認する検査を行うことができる。

【0025】

本発明において、MSCの軟骨細胞様細胞への分化とインプラントとしてのコラーゲンマトリックスの形成が可能なあらゆる標準の方法、条件、技術を用いることができる。

【0026】

本発明の一実施例において、コラーゲンはI型またはII型コラーゲン、あるいはその組み合わせでもよい。コラーゲンの濃度は、約1%～約10%であってよいが、約3%が好ましい。

【0027】

本発明によれば、インプラントは注射器様のピストンによって容易に軟骨欠損部位に送達することができる。本発明の一実施形態では、インプラントをカプセル内に入れ、カプセルからインプラントを押し出してそれを軟骨欠損部位に適用することにより配置してもよい。

【0028】

よって、本発明はまた、間葉系幹細胞(MSC)から分化されかつグリコサミノグリカンを分泌する軟骨細胞様細胞が包埋された、トランスフォーミング増殖因子 1 (TGF- β 1) が添加された、コラーゲンマトリックスを含んでなるインプラントであって、該インプラントに小腔が存在しないことを特徴とする、軟骨欠損の修復に用いるインプラントを提供する。

【0029】

本発明によれば、インプラントは、
間葉系幹細胞(MSC)を用意する工程と、
トランスフォーミング増殖因子 1 (TGF- β 1) を添加したコラーゲン含有培地で、MSCの軟骨細胞様細胞への分化とインプラントの形成が可能な条件下で、MSCを培養する工程
を含んでなる方法により作製することができる。

【0030】

限定ではなく例示を目的として示す以下の実施例を参照して、本発明をより具体的に説明する。

10

20

30

40

50

【実施例 1】

【0031】

ヒトMSCの単離と培養

骨盤の腸骨からヘパリン添加骨髓血液 10 ml を採取し、骨髓MSCを単離した。MSCを、ウシ胎児血清 10 % を含む低グルコースのダルベッコ改変イーグル培地にて、37℃、二酸化炭素 5 %、湿度 95 % で培養した。培地は週に 2 回交換した。細胞をトリプシン処理し、1 : 3 の比率で毎週継代培養した後、回収して無血清DMEM-LGのみを含むPorcogen (登録商標) コラーゲン溶液 (3 % I 型 / III 型 コラーゲン、SunMax Biotech., TW) に包埋した。細胞を、24 ウェルプレートにて、ゲルに対して 2.6×10^6 細胞 / cm^2 の最終細胞密度の 0.5 mL のアリコートで 37℃にて 1 時間培養した後、ITS + Premix、50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ の L - アスコルビン酸 - 2 - リン酸、 10^{-7} M のデキサメタゾンを含む無血清DMEM-LGを含む培地を 1 ウェルにつき 2.0 mL 加え、10 ng / mL の TGF- β 1 (Pepro Tech, Rocky Hill, NJ) を添加した。細胞を上述の培地で 7 ~ 21 日間培養し、3 日毎に培地を交換し、コラーゲン含有培地に包埋された細胞を分散させて軟骨細胞様細胞が包埋されたコラーゲンマトリックスを得た。細胞播種後 7 日、14 日、21 日目に細胞 / コラーゲン混合物を分析し、GAG が分泌されており小腔が形成されていないことを確認して、細胞マトリックス複合体を得た。

10

【実施例 2】

【0032】

細胞マトリックス複合体の特徴づけ

細胞マトリックス複合体を回収し、パラフィンに包埋し、5 μm のスライスにカットした。このスライスを脱パラフィン化した後、100 % キシレン、100 % エタノール、70 % エタノールおよび水の順に浸漬して再水和した。サンプルの切片をヘマトキシリン - エオシン染色 (Muto, Tokyo, Japan) して細胞形態を評価した。さらに、アルシアンブルー染色 (Sigma) を用いてグリコサミノグリカン (GAG) 量を評価した。

20

【実施例 3】

【0033】

ヒトの患者での調査

1. 患者集団

離断性骨軟骨症または大腿骨内側顆の骨壊死による軟骨欠損または骨軟骨欠損の患者、あるいは加重部位に変形性関節症の限局性軟骨欠損を有する患者を選択した。但し、幼若骨、関節全置換術が必要な重度の変形性関節炎、十字靭帯断裂や半月板損傷などの他の欠損、関節リウマチや痛風性関節炎などの関節炎、及び AIDS や B 型肝炎などの感染症の患者、3 ヶ月以上にわたり完全に寝たきりの患者、2 週間以上にわたりコルチコステロイド剤を服用している患者、アルコール依存症の患者は除外した。合計 10 名の患者を採用した。そのうち 6 名が女性で 4 名が男性であった。患者の平均年齢は 66 歳 (47 歳から 83 歳まで) であった。

30

【0034】

2. 手術

膝を前部正中切開し、内側傍膝蓋アプローチを用いて大腿骨内側顆の関節面を露出させた。膝を大きく屈曲させて骨軟骨欠損に容易にアクセスできるようにした。骨欠損部を創傷清拭し、脛骨上部から採取した海綿骨を充填した。次いで、実施例 1 で得た細胞マトリックス複合体を外科用グラフトとして欠損部に移植した。最後に、脛骨近位端から採取した骨膜を用いてこの外科用グラフトを被覆した。手術後、全患者が膝の可動域を改善するため通常の大腿四頭筋トレーニングとエクササイズを受けた。

40

【0035】

3. 臨床的評価

全 10 名の患者の膝機能について、術前と術後 1.5、3、6、12 ヶ月目に、IKDC (International Knee Documentation Committee) の Subjective Knee Form によるスコアリングおよび X 線検査を行った。MRI を術後 6 ヶ月目と 12 ヶ月目に実施した。患者

50

が提案を受け入れた場合、術後 12 ヶ月目に関節鏡検査と生検を実施した。スチューデントの t 検定を用いて統計的分析を行った。

【0036】

4. 結果

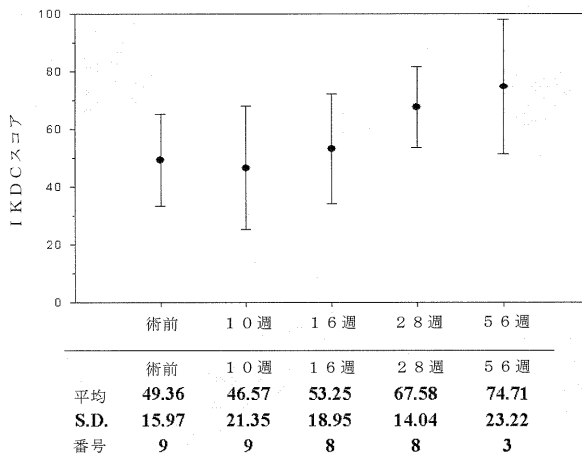
術後 6 ヶ月目の評価を受けないことを希望した 1 名の患者を除き、残り 9 名の患者は 12 ヶ月目まで定期的にフォローアップした。図 1 に示すように、本発明の方法に従い治療を受けた患者の IKDC スコアリングでは、術後 6 ヶ月目と 12 ヶ月目にスチューデントの t 検定により有意の改善が見られた。9 名の患者全員が術後 6 ヶ月目で以前よりはるかに良好であると感じていた。4 名の患者は 12 ヶ月目を超えてフォローアップを行い、そのうち 3 名が関節鏡検査を受けた。軟骨欠損部には病変部位とグラフトの間で間隙なく融合した適度な硬さの硝子軟骨が認められた（図 2 参照）。

10

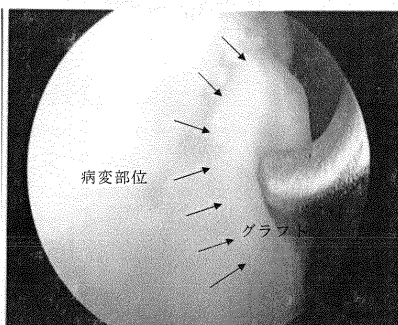
【0037】

上述のとおり、GAG を分泌するが小腔が存在しない軟骨細胞様細胞および本発明に基づきそれから作製されたマトリックスを含んでなる細胞マトリックス複合体は、患者における軟骨欠損の修復に優れた有効性を示し、病変部位への移植後、その病変部位では、病変部位と細胞マトリックス複合体により作製された外科用グラフトとの間にいかなる間隙もなく硝子軟骨が形成した。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(72)発明者 劉 華昌

台湾タイペイ、チャウ・チョウ・ストリート、レイン４８、ナンバー８、６フロアー

(72)発明者 林 峯輝

台湾タイペイ、ジェン・アイ・ロード、セクション１、１

(72)発明者 李 幸懋

台湾タイペイ・カウンティ２５１、ダンシュエイ・タウンシップ、ジョンジェン・イー・ロード、セクション２、ナンバー２９－１、８フロアー

(72)発明者 顔 君哲

台湾タイチュン、ダ・イエー・ロード１８０番、３フロアー－３

審査官 吉田 佳代子

(56)参考文献 特表２００７－５３８０５５（ＪＰ，Ａ）

JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A，２００７年，VOL.83，NO.3，P.626-635

BIOMATERIALS，２００８年，VOL.29，P.3201-3212

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)

A61L 27/00 - 27/60

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

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)