

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年11月26日(26.11.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/235319 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/077 (2010.01) *C12N 1/00* (2006.01) ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2020/018130
- (22) 国際出願日: 2020年4月28日(28.04.2020)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2019-094878 2019年5月20日(20.05.2019) JP
- (71) 出願人: 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 小川 晋平 (OGAWA, Shimpei); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 徳山 真由美 (TOKUYAMA, Mayumi); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: EXPANSION CULTURE METHOD FOR CARTILAGE OR BONE PRECURSOR CELLS

(54) 発明の名称: 軟骨又は骨の前駆細胞の拡大培養方法

(57) Abstract: The present invention provides: an expansion culture method for cartilage or bone precursor cells, comprising a step for culturing the cartilage or bone precursor cells in a medium containing a TGF- β signal inhibitor and an FGF; and a method for producing cartilage cells or bone cells, the method comprising a step for inducing differentiation of the cartilage or bone precursor cells obtained from the expansion culture method into cartilage or bone cells.

(57) 要約: 本発明は、軟骨又は骨の前駆細胞を、TGF- β シグナル阻害剤及びFGFを含む培地中で培養する工程を含む、軟骨又は骨の前駆細胞の拡大培養方法、並びに該方法で得られた軟骨又は骨の前駆細胞を、軟骨細胞又は骨細胞へ分化誘導させる工程を含む、軟骨細胞又は骨細胞の製造方法を提供する。



WO 2020/235319 A1

明 細 書

発明の名称：軟骨又は骨の前駆細胞の拡大培養方法

技術分野

[0001] 本発明は、軟骨又は骨の前駆細胞を拡大培養する方法、及び該拡大培養のためのキットに関する。

背景技術

[0002] ヒトの軟骨は、先天的に欠損していたり、後天的に損傷あるいは欠損すると、通常は再生されない。主として関節軟骨の老化に起因する変形性膝関節症の有病者数は、日本には約2500万人いると推測されており、高齢化に伴い今後さらに増加することが見込まれる。このようなヒト軟骨疾患に対する従来の治療としては、自己の他部位から軟骨組織を採取し欠損部位に移植する方法があるが、採取部位や量が限定されてしまう。また、軟骨細胞は増殖性が低く、再生能力に乏しいため、生体由来の軟骨細胞を増殖することも困難である。

[0003] そこで、軟骨細胞以外の細胞（例えば、多能性幹細胞）を利用して、生体外で軟骨細胞に分化させて生体内に戻す方法の開発が行われている。かかる方法としては、例えば、多能性幹細胞から軟骨細胞を分化誘導する方法が報告されている（例えば、非特許文献1、2、特許文献1など）。しかしながら、これらの方法は、多能性幹細胞から軟骨細胞へ分化させるのに少なくとも12日程度の期間が必要であるし、また軟骨疾患又は骨疾患の治療に用いるのに十分な量の軟骨細胞を得ることができない。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2016/141084号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Yamashita A., et al., Stem Cell Reports, 4(3): 404-418 (2015)

非特許文献2 : Loh K.M., et al., Cell, 166(2): 451-467 (2016)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 従って、本発明の課題は、軟骨細胞等への分化日数が従来法よりも短くてすみ、かつ疾患の治療に用いるのに十分な量の軟骨細胞等を製造できる方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために、サイトカイン又は転写因子の種類や培地に添加するタイミングなどを改良することで、多能性幹細胞などの出発細胞から軟骨細胞の分化効率を向上させる、との従来の発想を転換し、増殖能の高い軟骨細胞の前駆細胞を同定することができれば、該前駆細胞を増殖した上で軟骨細胞に分化誘導することで、誘導時間を短縮でき、しかも軟骨細胞を大量に得られるのではないかと、この着想を得た。この着想を具体化するにあたり、人工多能性幹細胞から軟骨細胞に分化する過程の中間細胞として、無限に近い増殖能を有する軟骨又は骨の前駆細胞（本発明者らは、この細胞を「iCOP (iPS-derived chondro/osteogenic progenitor)」と命名した）が存在するとの仮定を行い、実際にiCOPを同定し、かつ該細胞の拡大培養法を確立することを試みた。本発明者らは、まず、該胚葉細胞を含む細胞集団に含まれる細胞のうち、増殖能を示し、かつ軟骨細胞へ短期間に分化しうる細胞はsclerotome（硬節細胞）であると仮定した。そこで、非特許文献1に記載の方法を改良し、人工多能性幹細胞から中胚葉細胞を経てsclerotomeへ分化誘導したところ、該細胞はPDGFRAもしくはSOX9など非特許文献1に記載のマーカを高発現していることを見出した。その後、sclerotomeが増殖できる培養条件について鋭意検討を重ねた結果、TGF- β シグナル阻害剤及びFGFを含む培地中で培養することで、sclerotomeは細胞マーカ発現を維持しつつ少なくとも5継代増殖が可能である（即ち、自己複製能を有する）ことを見出した。sclerotomeが自己複製能を有することは知られていなかったため、上記知見は驚くべきものであった。しかも、このように長期間拡大

培養されたsclerotomeは、軟骨細胞への分化能を依然として有していた。したがって、sclerotomeは該iCOPであると結論づけた。本発明者らは、上記知見に基づきさらに研究を進めた結果、本発明を完成するに至った。

[0008] 即ち、本発明は以下に関する。

[1] 軟骨又は骨の前駆細胞を、TGF- β シグナル阻害剤及びFGFを含む培地中で培養する工程を含む、軟骨又は骨の前駆細胞の拡大培養方法。

[2] 前記軟骨又は骨の前駆細胞がPDGFRA、SOX9、若しくはPAX1を発現する細胞である、[1]に記載の方法。

[3] 前記培地中にL-アスコルビン酸又はその誘導体がさらに含まれる、[1]又は[2]に記載の方法。

[4] 前記TGF- β シグナル阻害剤がSB431542である、[1]～[3]のいずれかに記載の方法。

[5] 前記FGFがbFGFである、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[6] 前記TGF- β シグナル阻害剤の培地中での濃度が1 μ M～50 μ Mである、[1]～[5]のいずれかに記載の方法。

[7] 前記FGFの培地中での濃度が1 ng/mL～500ng/mLである、[1]～[6]のいずれかに記載の方法。

[8] 前記軟骨又は骨の前駆細胞が多能性幹細胞に由来する細胞である、[1]～[7]のいずれかに記載の方法。

[9] 前記軟骨又は骨の前駆細胞が多能性幹細胞を浮遊培養することで得られる細胞である、[1]～[8]のいずれかに記載の方法。

[10] 拡大培養が浮遊培養により行われる、[1]～[9]のいずれかに記載の方法。

[11] 基礎培地、TGF- β シグナル阻害剤及びFGFを含む、軟骨又は骨の前駆細胞の拡大培養用キット。

[12] L-アスコルビン酸又はその誘導体をさらに含む、[11]に記載のキット。

[13] 前記TGF- β シグナル阻害剤がSB431542である、[11]又は[1

2]に記載のキット。

[14] 前記FGFがbFGFである、[11]～[13]のいずれかに記載のキット。

[15] [1]～[10]のいずれかに記載の方法で得られた軟骨又は骨の前駆細胞を、軟骨細胞又は骨細胞へ分化誘導させる工程を含む、軟骨細胞又は骨細胞の製造方法。

[16] 前記分化誘導工程が、軟骨又は骨の前駆細胞をBMPシグナル活性化剤及び／又はTGF- β シグナル活性化剤を含む培地で培養する工程を含む、[15]に記載の方法。

[17] 前記TGF- β シグナル活性化剤がTGF- β 3である、[15]又は[16]に記載の方法。

[18] [1]～[10]のいずれかに記載の方法で得られた軟骨又は骨の前駆細胞を、靭帯節細胞へ分化誘導させる工程を含む、靭帯節細胞の製造方法。

[19] [18]に記載の方法で得られた靭帯節細胞を腱細胞又は靭帯細胞へ分化誘導させる工程を含む、腱細胞又は靭帯細胞の製造方法。

[20] [15]～[19]のいずれかに記載の方法で得られた細胞を含有してなる、細胞移植療法剤。

[21] 以下の遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子の発現を検出又は測定する工程を含む、軟骨又は骨の前駆細胞を同定する方法。

A2M, ABCA9, ACAT2, ADAMTS9, ADGRF5, AGTR2, AMER1, AMOT, ANGPT1, ARHGA
P5-AS1, ARHGEF26, ATP8A1, BCHE, BEGAIN, BOC, C3ORF52, CACNA1G, CELF2,
CLSPN, COL25A1, COL26A1, CORO1A, CRISPLD1, CTTNBP2, CYB5B, DLGAP1, D
NAJC12, DUSP9, EBF1, EBF2, EFEMP1, ESCO2, EYA1, FAM35A, FAM78A, FAR2,
FGFBP2, FGFR4, FKBP4, FRZB, GCNT4, GNG11, HAAO, HMGCS1, HS3ST5, ID4,
IGDCC3, IRF8, KCNA6, KCNB2, KITLG, LGR5, LHCGR, LHFP, LPPR5, LUM, MA
PK8IP2, MECOM, MEF2C, MEOX2, METTL7A, NAB1, NCALD, NGF, NGFR, NKAIN2,

NPR1, NR2F1, OLFML1, PCDH18, PCDH19, PCSK9, PDE4D, PDGFRA, PEG10, PLVAP, PRELP, PRRT4, RARRES2, RBMS3, RBPMS2, RSP03, RUNX1T1, SAMD5, SCARA5, SKIDA1, SLC12A2, SLC27A3, SLC39A8, SLC7A2, SLC8A3, SLC01C1, SOX8, SPRED2, STARD8, STOM, SYNPO, TBX18, TMC6, TNRC6C-AS1, TRIM2, TRIM9, TRIP13, TSPAN15, UBE2N, UHRF1, UNC5C, VIT, ZBTB46及びZNF488

[2 2] 軟骨又は骨の前駆細胞を含む細胞集団から、以下の遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を発現する細胞を単離する工程を含む、軟骨又は骨の前駆細胞の単離方法。

ABCA9, ATP8A1, BOC, KITLG, NKAIN2, ADGRF5, AGTR2, CACNA1G, C3ORF52, COL25A1, CYB5B, FAR2, FGFR4, GCNT4, HS3ST5, IGDC3, LGR5, LHFP, LHCGR, NPR1, NGFR, PLVAP, PDGFRA, KCNA6, KCNB2, PCDH18, PCDH19, SCARA5, SLC12A2, SLC27A3, SLC39A8, SLC7A2, SLC8A3, SLC01C1, STOM, TSPAN15, TMC6及びUNC5C

[2 3] 以下の遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子にコードされるタンパク質の各々に対する抗体を含んでなる、軟骨又は骨の前駆細胞の単離用試薬。

ABCA9, ATP8A1, BOC, KITLG, NKAIN2, ADGRF5, AGTR2, CACNA1G, C3ORF52, COL25A1, CYB5B, FAR2, FGFR4, GCNT4, HS3ST5, IGDC3, LGR5, LHFP, LHCGR, NPR1, NGFR, PLVAP, PDGFRA, KCNA6, KCNB2, PCDH18, PCDH19, SCARA5, SLC12A2, SLC27A3, SLC39A8, SLC7A2, SLC8A3, SLC01C1, STOM, TSPAN15, TMC6及びUNC5C

発明の効果

[0009] 本発明によれば、上記のiCOPなどの軟骨又は骨の前駆細胞の拡大培養が可能となる。軟骨又は骨の前駆細胞から軟骨細胞又は骨細胞への分化誘導期間は、従来法のiPS細胞から軟骨細胞又は骨細胞への分化誘導期間の半分以下となるため、予めiCOPを拡大培養し、ストックしておけば、軟骨細胞又は骨細胞への分化誘導期間を大幅に短縮することが可能となる。また、軟骨又は骨の前駆細胞を拡大培養することで、拡大培養前に細胞集団内に残存し得る多

能性幹細胞などの未分化細胞が占める割合は相対的に減少するし、また該多能性幹細胞は軟骨又は骨の前駆細胞などに分化してその数が減少すると考えられるため、細胞集団における腫瘍などの原因となる未分化細胞の残存リスクを顕著に低下させることができる。また、上記従来法で製造できる軟骨細胞数と比較して、軟骨細胞への分化過程の途中で軟骨又は骨の前駆細胞を拡大培養することで、軟骨細胞又は骨細胞を極めて多量に製造できるため、本発明により、軟骨疾患又は骨疾患の治療に用いるのに十分な量の軟骨細胞を迅速に製造することができる。

図面の簡単な説明

- [0010] [図1]図1は、iPS細胞からiCOPを分化誘導し、iCOPが発現するSOX9の陽性率をフローサイトメーターにより測定した結果を示す。約9割の高効率でiPS細胞がiCOPへと分化されることが示された。
- [図2]図2は、iCOPを7日ごとに5継代増殖させた際の増殖曲線を示す。増殖曲線から、一日当たりのpopulation doubling (PD)は0.46であることが示された。
- [図3]図3は、凍結保存によるiCOPの細胞増殖能への影響を検証した結果を示す。凍結保存によっても、一日当たりのPDは減少しないことが示された。
- [図4]図4は、凍結保存したiCOP又は凍結保存をしていないiCOPにおける、iCOPマーカー遺伝子の相対発現量 (mRNA量) を検証した結果を示す。凍結保存によっても、iCOPマーカー遺伝子の相対発現量は減少しないことが示された。
- [図5]図5は、iCOPから骨細胞 (Osteocyte) へ分化誘導し、骨細胞マーカー遺伝子の相対発現量 (mRNA量) を評価した結果を示す。iCOPは骨細胞への分化能を保持していることが示された。
- [図6]図6は、iCOPから靭帯節細胞 (syndetome) へ分化誘導し、靭帯節マーカー遺伝子の相対発現量 (mRNA量) を評価した結果を示す。iCOPは靭帯細胞への分化能を保持していることが示された。
- [図7]図7は、浮遊培養により、iCOPを5日ごとに3継代増殖させた際の増殖曲

線を示す。増殖曲線から、一日当たりのPDは0.38であることが示された。

発明を実施するための形態

[0011] 1. 軟骨又は骨の前駆細胞の拡大培養方法

本発明は、軟骨又は骨の前駆細胞を拡大培養する方法（以下「本発明の培養方法」と称することがある）を提供する。本発明の培養方法は、軟骨又は骨の前駆細胞を、TGF- β シグナル阻害剤及びFGFを含む培地中で培養する工程を含む。

[0012] 本明細書において、「拡大培養」とは、細胞集団に含まれる軟骨又は骨の前駆細胞を増殖し、細胞数を増加させることを目的とした培養を意味する。細胞数の増加は、細胞の増殖による増数が死滅による減数を超えることによって達成されるものであればよく、細胞集団の全ての細胞が増殖することは要さない。

[0013] 本明細書において、「軟骨又は骨の前駆細胞」とは、軟骨細胞及び／又は骨細胞への分化能を有する細胞を意味する。好ましくは、軟骨又は骨の前駆細胞はPDGFRA、SOX9、若しくはPAX1を発現し、より好ましくはPDGFRA、PAX1、及びSOX9を発現する。典型的には、「軟骨又は骨の前駆細胞」は、PDGFRA、SOX9、及びPAX1の内の少なくとも1種を発現する硬節細胞（sclerotome）である。下述する軟骨細胞及び／又は骨細胞への分化誘導方法の少なくともいずれかにより、軟骨細胞及び／又は骨細胞へ分化する場合に、細胞は軟骨細胞及び／又は骨細胞への分化能を有すると評価することができる。また、細胞のPDGFRA、PAX1及びSOX9の発現は、real-time PCRやフローサイトメトリの少なくともいずれかにより確認することができる。また、軟骨又は骨の前駆細胞は、軟骨又は骨以外の細胞、例えば靭帯節細胞（syndetome）、への分化誘導能を有していてもよい。本明細書において、「発現」とは、特にことわらない限り、少なくとも「機能的なタンパク質の産生」を含む意味で用いられるが、好ましくは、さらに「mRNAの産生」をも含む意味で用いられる。

[0014] また、「軟骨又は骨の前駆細胞」は、以下のマーカー遺伝子のうちの少な

くとも1つ、好ましくは2つ以上（例：3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10つ又はそれ以上）の遺伝子を発現するものであってもよいが、少なくともPDGFRA遺伝子を発現するものが好ましい。

[0015] A2M, ABCA9, ACAT2, ADAMTS9, ADGRF5, AGTR2, AMER1, AMOT, ANGPT1, ARHGA P5-AS1, ARHGEF26, ATP8A1, BCHE, BEGAIN, BOC, C3ORF52, CACNA1G, CELF2, CLSPN, COL25A1, COL26A1, CORO1A, CRISPLD1, CTTNBP2, CYB5B, DLGAP1, DNAJC12, DUSP9, EBF1, EBF2, EFEMP1, ESCO2, EYA1, FAM35A, FAM78A, FAR2, FGFBP2, FGFR4, FKBP4, FRZB, GCNT4, GNG11, HAAO, HMGCS1, HS3ST5, ID4, IGDC3, IRF8, KCNA6, KCNB2, KITLG, LGR5, LHCGR, LHFP, LPPR5, LUM, MAPK8IP2, MECOM, MEF2C, MEOX2, METTL7A, NAB1, NCALD, NGF, NGFR, NKAIN2, NPR1, NR2F1, OLFML1, PCDH18, PCDH19, PCSK9, PDE4D, PDGFRA, PEG10, PLVAP, PRELP, PRRT4, RARRES2, RBMS3, RBPMS2, RSP03, RUNX1T1, SAMD5, SCARA5, SKIDA1, SLC12A2, SLC27A3, SLC39A8, SLC7A2, SLC8A3, SLC01C1, SOX8, SPRED2, STARD8, STOM, SYNPO, TBX18, TMC6, TNRC6C-AS1, TRIM2, TRIM9, TRIP13, TSPAN15, UBE2N, UHRF1, UNC5C, VIT, ZBTB46及びZNF488。

[0016] 本発明に用いるTGF- β シグナル阻害剤としては、TGF- β の受容体への結合からSMADへと続くシグナル伝達を阻害する物質である限り特に限定されないが、例えば、TGF- β の受容体であるALKファミリーへの結合を阻害する物質、ALKファミリーによるSMADのリン酸化を阻害する物質などが挙げられる。本発明において、TGF- β シグナル阻害剤は、例えば、Lefty-1 (NCBI Accession Noとして、マウス：NM_010094、ヒト：NM_020997が例示される)、SB431542、SB202190(以上、R.K.Lindemann et al., Mol. Cancer, 2003, 2:20)、SB505124 (GlaxoSmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208(Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276 (Lilly Research Laboratories)、A-83-01(WO 2009146408)及びこれらの誘導体などが例示される。中でも、SB431542が好ましい。

[0017] 培地中におけるTGF- β シグナル阻害剤の濃度は、特に限定されないが、例えばSB431542を用いる場合には、1 μ M~50 μ Mが好ましく、例えば、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M、10 μ M、11 μ M、12 μ M、1

3 μ M、14 μ M、15 μ M、16 μ M、17 μ M、18 μ M、19 μ M、20 μ M、25 μ M、30 μ M、35 μ M、40 μ M、45 μ M、50 μ Mであるがこれらに限定されない。より好ましくは、2 μ M~20 μ M、特に好ましくは5~10 μ Mである。TGF- β シグナル阻害剤としてSB431542以外のものを用いる場合にも、技術常識に基づき、適宜濃度を設定することができる。

[0018] 本発明に用いるFGFとしては、細胞の増殖を促進する限り特に限定されないが、例えば、FGF-1、bFGF (FGF-2)、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FGF-8 (例：FGF-8b)、FGF-9、FGF-10、FGF-11、FGF-12、FGF-13、FGF-14、FGF-15、FGF-16、FGF-17、FGF-18、FGF-19、FGF-20、FGF-21、FGF-22、FGF-23などが挙げられる。中でも、bFGFが好ましい。また、上記FGFは任意の動物 (例：マウス、ラット、ハムスター、モルモットなどのげっ歯類、ヒト、サル、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類) 由来であってよいが、培養される細胞の種類に応じて適宜選択することができる。ヒト由来の細胞を培養する場合には、ヒト由来のFGFを用いることが好ましい。具体的なFGFとしては、例えば、ヒトbFGF (例：Endocrine Rev., 8, 95, 1987)、ウシbFGF (例：Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6963, 1984)、マウスbFGF (例：Dev. Biol., 138, 454-463, 1990)、ラットbFGF (例：Biochem. Biophys. Res. Commun., 157, 256-263, 1988) などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0019] 本発明に用いるFGFは、天然型だけでなく、その改変型であってもよい。例えば、FGFの改変体として、FGF1の特定の領域 (ヒトFGF1タンパク質のアミノ酸配列の41位~83位の部分配列、又は62~83位の部分配列) を、該領域に対応するbFGFの領域に置換したキメラタンパク質も、bFGFと同様の細胞増殖活性を有することが知られている (特開2012-143234、特開2014-100141) ため、上記bFGFの部分領域を含むFGFの改変体も、本発明に好適に用いることができる。また、本発明に用いるFGFは、自体公知の方法により作製することができるし、あるいは市販品を購入することなどにより入手することができる。さらに、FGFを含む培地は、可溶性のFGFを培地に添加して作製することもで

き、あるいは、該FGFが表面に固定されたビーズ等の担体（例：StemBeads FG F2等）を培地に添加することにより作製することもできる。

[0020] 培地中におけるFGFの濃度は、特に限定されないが、例えばbFGFを用いる場合には、1 ng/mL～500 ng/mLが好ましく、例えば、1 ng/mL、2 ng/mL、3 ng/mL、4 ng/mL、5 ng/mL、6 ng/mL、7 ng/mL、8 ng/mL、9 ng/mL、10 ng/mL、11 ng/mL、12 ng/mL、13 ng/mL、14 ng/mL、15 ng/mL、16 ng/mL、17 ng/mL、18 ng/mL、19 ng/mL、20 ng/mL、25 ng/mL、30 ng/mL、35 ng/mL、40 ng/mL、45 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mLであるがこれらに限定されない。より好ましくは、2 ng/mL～100 ng/mL、特に好ましくは10 ng/mLである。FGFとしてbFGF以外のものを用いる場合にも、技術常識に基づき、適宜濃度を設定することができる。

[0021] 本発明に用いる基礎培地としては、例えば、DMEM、EMEM、IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)、GMEM (Glasgow's MEM)、RPMI-1640、 α -MEM、Ham's Medium F-12、Ham's Medium F-10、Ham's Medium F12K、Medium 199、ATCC-CRCM30、DM-160、DM-201、BME、Fischer、McCoy's 5A、Leibovitz's L-15、RITC80-7、MCDB105、MCDB107、MCDB131、MCDB153、MCDB201、NCTC109、NCTC135、Waymouth's MB752/1、CMRL-1066、Williams' medium E、Brinster's BMOC-3 Medium、E8 medium (Nature Methods, 2011, 8, 424-429)、ReproFF2培地（リプロセル社）、及びこれらの混合培地（例：DMEM/F-12混合培地等）などが挙げられる。

[0022] 本発明に用いる培地には、自体公知の添加物が含まれていてもよい。かかる添加物としては、例えば、成長因子（例：PDGF、インスリン等）、鉄源（例：トランスフェリン等）、ヘッジホッグシグナル活性化剤、ポリアミン類（例：プトレシン等）、ミネラル（例：セレン酸ナトリウム等）、糖類（例：グルコース等）、有機酸（例：ピルビン酸、乳酸等）、血清タンパク質（例：アルブミン等）、アミノ酸（例：L-グルタミン等）、還元剤（例：2-メルカプトエタノール等）、ビタミン類（例：ビタミンC類、d-ビオチン等）、ステロイド（例： β -エストラジオール、プロゲステロン等）、抗生物質

(例：ストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等)、緩衝剤(例：HEPES等)等が挙げられる。添加物は、それぞれ自体公知の濃度範囲内で含まれることが好ましい。

[0023] 本明細書において、ビタミンC類とは、L-アスコルビン酸及びその誘導体を意味し、L-アスコルビン酸誘導体とは、生体内で酵素反応によりビタミンCとなるものを意味する。本発明に用いるL-アスコルビン酸の誘導体として、リン酸ビタミンC、アスコルビン酸グルコシド、アスコルビルエチル、ビタミンCエステル、テトラヘキシルデカン酸アスコビル、ステアリン酸アスコビル、アスコルビン酸-2-リン酸-6パルミチン酸などが例示される。好ましくは、リン酸ビタミンC(例：アスコルビン酸-2-リン酸(Ascorbic acid 2-phosphate))であり、例えば、リン酸-L-アスコルビン酸Na、リン酸-L-アスコルビン酸Mgなどのリン酸-L-アスコルビン酸塩が挙げられる。培地中におけるビタミンC類の濃度は、特に限定されないが、アスコルビン酸-2-リン酸を用いる場合の培地中の濃度は、典型的には20 μ M~2 mM(例：50 μ M、100 μ M、150 μ M、200 μ M、250 μ M、300 μ M、500 μ M、1 mM等)である。ビタミンC類としてアスコルビン酸-2-リン酸以外のものを用いる場合にも、技術常識に基づき、適宜濃度を設定することができる。

[0024] 本発明に用いるPDGFとしては、PDGF受容体へ結合するPDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC、PDGF-DDのいずれでもよいが、好ましくはPDGF-BBである。培地中におけるPDGFの濃度は、特に限定されないが、PDGF-BBを用いる場合の培地中の濃度は、典型的には10ng/mL~1 μ g/mL(例：50 ng/mL、100 ng/mL、150 ng/mL、300 ng/mL等)である。PDGFとしてPDGF-BB以外のものを用いる場合にも、技術常識に基づき、適宜濃度を設定することができる。

[0025] 本発明に用いるヘッジホッグシグナル活性化剤としては、12回膜貫通型のPatched (Ptc) と7回膜貫通型の1つSmoothened (Smo) を介するシグナルを活性化する物質である限り特に限定されないが、例えば、ヘッジホッグタンパク質(例：Hh、Shh、Ihh、Dhh等)、Smoothenedアゴニスト(例：SAG(Hh-Ag 1, 3)、SAG21k(3-chloro-4, 7-difluoro-N-(4-methoxy-3-(pyridin-4-yl)benzyl)

-N-((1r,4r)-4-(methylamino)cyclohexyl)benzo[b]thiophene-2-carboxamide)、Hh-Ag 1.1、Hh-Ag 1.5、purmorphamineなどが挙げられるが、Smoothenedアゴニストが好ましく、中でもSAGがより好ましい。培地中におけるヘッジホッグシグナル活性化剤の濃度は、特に限定されないが、SAGを用いる場合の培地中の濃度は、典型的には30 nM~3 μ M（例：100 nM、200 nM、300 nM、400 nM、500 nM、1 μ M等）である。ヘッジホッグシグナル活性化剤としてSAG以外のものを用いる場合にも、技術常識に基づき、適宜濃度を設定することができる。

[0026] 本発明に用いる培地には、血清が含まれていてもよい。血清としては、動物由来の血清であれば特に限定されないが、好ましくは哺乳動物由来の血清（例：ウシ胎仔血清、ヒト血清等）である。血清の濃度は、自体公知の濃度範囲内であればよい。本発明の培養方法により増殖させた細胞や、該細胞から分化誘導した軟骨細胞等を医療目的で使用する場合には、異種由来成分は血液媒介病原菌の感染源や異種抗原となる可能性があるため、血清を含まないことが好ましい。血清を含まない場合、血清の代替添加物（例えばKnockout Serum Replacement (KSR) (Invitrogen)、Chemically-defined Lipid concentrated (Gibco)、B-27 Supplement(Gibco)等)を用いてもよい。

[0027] 本発明に用いる培養器としては、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウエルプレート、マルチプレート、マルチウエルプレート、マイクロスライド、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、ローラーボトルなどが挙げられる。

[0028] 培養器は、接着培養に用いられる細胞接着性培養器であってもよく、浮遊培養に用いられる細胞非接着性培養器であってもよく、目的に応じて適宜選択することができる。細胞接着性の培養器は、培養器の表面の細胞との接着性を向上させる目的で、細胞外マトリックス（ECM、細胞外基質ともいう）等の任意の細胞支持用基質でコーティングされたものであってもよい。細胞支持用基質は、細胞の接着を目的とする任意の物質であり得る。本発明の培養

方法において、フィーダー細胞を使用しない場合には、細胞外基質若しくはその活性断片、又はそれらの機能をミミックする人工物を使用して培養を行うことが好ましい。細胞外基質は、培養器の表面と細胞との接着を改善する目的で細胞の培養に通常使用されるものであれば特に限定されず、例えば、ラミニン（ラミニン511、ラミニン332等）、フィブロネクチン、ビトロネクチン、コラーゲン、エラスチン、アドヘサミン等の公知のものを使用することができる。また細胞外基質の活性断片は、該細胞外基質と同等の細胞接着活性を有するその断片であればよく、これらも公知のものを使用することができる。例えば、特開2011-78370号公報に開示されている、ラミニン511のE8フラグメント（例：iMatrix-511（ニッピ）等）、ラミニン332のE8フラグメントなどが挙げられる。細胞外基質及びその活性断片は、市販品であってもよく、例えば、ライフテクノロジーズ、BDファルコン、バイオラミナ、ニッピ等から入手可能である。これらの細胞外基質及びその活性断片は、2種類以上を組み合わせ使用してもよい。また基底膜を過剰産生するマウスEHS肉腫から抽出、精製した、タンパク質や多糖類を含む複雑な基底膜成分の混合物であるマトリゲル（商品名）やGeltrex Matrix（商品名）を使用してもよい。

[0029] 細胞外基質及びその活性断片は、適当な溶液中に懸濁し、細胞を培養するのに適した容器に塗布すればよい。細胞外基質の機能をミミックする人工物も、細胞の培養に通常使用されるものであれば特に限定されず、例えば、コーニング社のシンセマックス（登録商標）やウルトラウェブ（登録商標）、シグマアルドリッチ社のHy-STEMシリーズ、ポリリジン、ポリオルニチン等の公知のものを使用することができる。本発明において使用される細胞外基質若しくはその活性断片、又はそれらの機能をミミックする人工物は、好ましくはマトリゲル、又はラミニン511若しくはラミニン511の活性断片であり、より好ましくはラミニン511の活性断片（即ち、ラミニン511のE8フラグメント）である。

[0030] 本発明の培養方法によれば、軟骨又は骨の前駆細胞を際限なく増殖させ得

る（少なくとも5週間以上は増殖が可能である）ため、培養期間は特に制限はなく、所望の細胞数となる期間を適宜選択することができる。培養温度は、特に限定されないが、30～40℃、好ましくは37℃であり、CO₂含有空気の下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは2～5%である。

[0031] 本発明に用いる軟骨又は骨の前駆細胞は、例えば、PDGFRAを指標としたセルソーティングなどにより生体試料から単離した細胞を用いてもよいし、多能性幹細胞や間葉系幹細胞などの幹細胞から分化誘導した細胞を用いてもよいが、好ましくは、多能性幹細胞由来の細胞である。

[0032] 本明細書において、「多能性幹細胞 (pluripotent stem cell)」とは、胚性幹細胞 (ES細胞) 及びこれと同様の分化多能性、即ち、生体の様々な組織 (内胚葉、中胚葉、外胚葉の全て) に分化する能力を潜在的に有する細胞を意味する。本発明に用いる多能性幹細胞としては、例えば、胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES細胞)、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS細胞)、多能性生殖幹細胞、胚性生殖幹細胞 (EG細胞) などが挙げられ、好ましくはES細胞又はiPS細胞であり、中でもiPS細胞が好ましい。上記多能性幹細胞がES細胞又はヒト胚に由来する任意の細胞である場合、その細胞は胚を破壊して作製された細胞であっても、胚を破壊することなく作製された細胞であってもよいが、好ましくは、胚を破壊することなく作製された細胞である。

[0033] 本明細書において、「ES細胞」とは、ヒトやマウスなどの哺乳動物の初期胚 (例えば胚盤胞) の内部細胞塊から樹立された、多能性幹細胞を意味する。ES細胞は、マウスで1981年に発見され (M. J. Evans and M. H. Kaufman (1981), Nature 292:154-156)、その後、ヒト、サルなどの霊長類でもES細胞株が樹立された (J. A. Thomson et al. (1998), Science 282:1145-1147; J. A. Thomson et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7844-7848; J. A. Thomson et al. (1996), Biol. Reprod., 55:254-259; J. A. Thomson and V. S. Marshall (1998), Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165)。

[0034] 本明細書において、「人工多能性幹細胞」とは、体細胞から誘導された多

能性幹細胞であり、体細胞を初期化することにより、胚性幹細胞に似た多能性を人工的に持たせた細胞を意味する。例えば、線維芽細胞等の分化した細胞をOct3/4、Sox2、Klf4、Myc等の遺伝子の発現により初期化して樹立した多分化能を有するiPS細胞 (induced pluripotent stem cell) 等を挙げることができる。2006年、山中らによりマウス線維芽細胞から人工多能性幹細胞が樹立された (Cell, 2006, 126(4), p663-676)。2007年にはヒト線維芽細胞から、胚性幹細胞と同様に多分化能を有する人工多能性幹細胞が樹立された (Cell, 2007, 131(5), p861-872; Science, 2007, 318(5858), p1917-1920; Nat Biotechnol., 2008, 26(1), p101-106)。

- [0035] 多能性幹細胞の由来としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモットなどのげっ歯類由来の細胞、及びヒト、サル、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類由来の細胞が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくはヒト由来の細胞である。
- [0036] 本発明に用いる多能性幹細胞は、あらかじめ樹立され、ストックされた細胞でもよく、又は新たに樹立された細胞でもよい。従って、本発明の培養方法に先立って、多能性幹細胞を樹立する工程を行ってもよい。多能性幹細胞を樹立する工程としては、多能性幹細胞が人工多能性幹細胞の場合には、体細胞に特定の初期化因子を導入する工程を含む限り特に限定されない。例えば、体細胞を採取し、Oct3/4、Sox2、Klf4、Myc等の初期化因子を導入して人工的に発現させた後、多能性を獲得した細胞を選択して拡大培養する工程、レトロウイルスベクター又はセンダイウイルスベクターを用いて初期化因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Myc) をヒト末梢血リンパ球に導入し培養する工程 (Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell 2013, 12, 114-126) 等を挙げることができる。
- [0037] 本発明に用いる人工多能性幹細胞の由来となる体細胞は特に限定されない。体細胞としては、例えば、末梢血中のリンパ球、皮膚等の線維芽細胞、皮膚細胞、視覚細胞、脳細胞、有毛細胞、口腔粘膜、肺細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞、腎細胞、神経幹細胞、造血幹細胞、智歯な

どに由来する間葉系幹細胞、組織幹細胞、組織前駆細胞、血液細胞（例、末梢血単核球細胞（T細胞及び非T細胞を含む）、臍帯血細胞等）、上皮細胞、内皮細胞（例、血管内皮細胞）、筋肉細胞等が挙げられるが、これに限定されるものではない。

[0038] 初期化因子に含まれる遺伝子としては、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3又はGlis1等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、W02007/069666、W02008/118820、W02009/007852、W02009/032194、W02009/058413、W02009/057831、W02009/075119、W02009/079007、W02009/091659、W02009/101084、W02009/101407、W02009/102983、W02009/114949、W02009/117439、W02009/126250、W02009/126251、W02009/126655、W02009/157593、W02010/009015、W02010/033906、W02010/033920、W02010/042800、W02010/050626、W02010/056831、W02010/068955、W02010/098419、W02010/102267、W02010/111409、W02010/111422、W02010/115050、W02010/124290、W02010/147395、W02010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat Cell Biol. 11:197-203、Judson R.L. et al., (2009), Nat. Biotech., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-22

9に記載の組み合わせが例示される。

- [0039] 本明細書において、「間葉系幹細胞」とは、骨髄や骨膜由来、末梢血由来、臍帯血、又は脂肪組織由来であり、かつ間充織組織系の組織（脂肪組織、軟骨組織、骨組織など）に分化可能な幹細胞を意味する。かかる間葉系幹細胞としては、生体組織からの細胞の採取が容易であり、採取した後の培養方法が確立されている点から、骨髄間葉系幹細胞が好ましく、また、生体から余剰組織として採取することが容易であり、採取する際の侵襲性が低いという点から、脂肪組織由来間葉系幹細胞が好ましい。
- [0040] 多能性幹細胞や間葉系幹細胞などの幹細胞から、軟骨又は骨の前駆細胞への分化誘導方法は、自体公知の方法に従い適宜行うことができる。例えば、多能性幹細胞を軟骨又は骨の前駆細胞に分化誘導する方法として、特許文献1、非特許文献1、2、特開2005-511083号公報などに記載された方法により、多能性幹細胞から軟骨細胞へ分化させる過程の途中（例えば、分化誘導後4～8日目）の細胞集団を、必要に応じてPDGFRA等を発現する細胞を選別して、用いることができる。また、間葉系幹細胞から軟骨又は骨の前駆細胞への分化誘導方法は、例えば、特開2004-254655号公報に記載の方法などを適宜参酌することができる。
- [0041] より具体的には、例えば、(i)多能性幹細胞をWntシグナル活性化剤、BMP阻害剤、FGF及び／又はTGF- β シグナル活性化剤を含む培地で細胞を1～2日間程度（好ましくは1日間）培養し、(ii)TGF- β シグナル阻害剤、Wntシグナル活性化剤、BMP阻害剤及び／又はFGFを含む培地で細胞を1～2日間程度（好ましくは1日間）培養し、(iii) TGF- β シグナル阻害剤、BMP阻害剤、Wntシグナル阻害剤及び／又はMAPK/ERKキナーゼ（MEK）阻害剤を含む培地で細胞を1～2日間程度（好ましくは1日間）培養し、(iv) Wntシグナル阻害剤及び／又はヘッジホッグシグナル活性化剤を含む培地で細胞を1～5日間程度（好ましくは3日間）培養することで、軟骨又は骨の前駆細胞へと分化誘導することができる。
- [0042] 上記Wntシグナル活性化剤としては、例えば、CHIR99021（6-[[2-[[4-(2,4-

Dichlorophenyl)-5-(5-methyl-1H-imidazol-2-yl)-2-pyrimidinyl]amino]ethyl]amino]-3-pyridinecarbonitrile)、WNTタンパク質(例：Wnt-1、Wnt-2、Wnt-2b、Wnt-3a、Wnt-4、Wnt-5a、Wnt-5b、Wnt-6、Wnt-7a、Wnt-7a/b、Wnt-7b、Wnt-8a、Wnt-8b、Wnt-9a、Wnt-9b、Wnt-10a、Wnt-10b、Wnt-11、Wnt-16b等)、RSP0タンパク質(例：RSP02)、塩化リチウム、TDZD8 (4-Benzyl-2-methyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione)、BI0-acetoxime ((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-acetoxime)、A1070722 (1-(7-Methoxyquinolin-4-yl)-3-[6-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]urea)、HLY78 (4-ethyl-5-methyl-5,6-dihydro-[1,3]dioxolo[4,5-j]phenanthridine)、CID 11210285 hydrochloride (2-Amino-4-(3,4-(methylenedioxy)benzylamino)-6-(3-methoxyphenyl)pyrimidine hydrochloride)、WAY-316606、(ヘテロ)アリールピリミジン、IQ-1、QS-11、SB-216763、DCAなどが挙げられるが、好ましくはCHIR99021である。CHIR99021を用いる場合には、培地中でのその濃度は、典型的には $0.5\mu\text{M}\sim 100\mu\text{M}$ (例： $5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 等)である。

[0043] 上記BMP阻害剤としては、例えば、NOGGIN、CHORDIN、LDN193189(4-[6-(4-Piperazin-1-yl-phenyl)-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]-quinoline hydrochloride)、DMH1(4-[6-[4-(1-methylethoxy)phenyl]pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]-quinoline)、Dorsomorphin(6-[4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]phenyl]-3-(4-pyridinyl)-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine dihydrochloride)、K02288(3-[(6-Amino-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-3-pyridinyl]phenol)、ML347(5-[6-(4-Methoxyphenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]quinoline)、DMH-1などが挙げられるが、好ましくはLDN193189である。LDN193189を用いる場合には、培地中でのその濃度は、典型的には $0.03\mu\text{M}\sim 3\mu\text{M}$ (例： $0.3\mu\text{M}$ 等)である。

[0044] 上記FGFとしては、例えば、上述の本発明の培養方法で用いられるものと同じのものが挙げられるが、好ましくはbFGFである。bFGFを用いる場合には、培地中でのその濃度は、典型的には $10\text{ ng/mL}\sim 1000\text{ ng/mL}$ (例： 100 ng/mL 等)である。

- [0045] 上記TGF- β シグナル活性化剤としては、例えば、TGF- β (例：TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3)、アクチビンA、IDE1(1-[2-[(2-Carboxyphenyl)methylene]hydrazide]heptanoic acid)、IDE2 (1-(2-cyclopentylidenehydrazide)-heptanedioic acid)、Nodalなどが挙げられるが、好ましくはアクチビンAである。アクチビンAを用いる場合には、培地中でのその濃度は、典型的には3 ng/mL～300 ng/mL (例：30 ng/mL等) である。
- [0046] 上記TGF- β シグナル阻害剤としては、例えば、上記1. で列挙したものと同一のものが挙げられるが、好ましくはSB431542である。SB431542を用いる場合には、培地中でのその濃度は、典型的には1 μ M～100 μ M (例：10 μ M等) である。
- [0047] 上記Wntシグナル阻害剤としては、例えば、C59(4-(2-methyl-4-pyridinyl)-N-[4-(3-pyridinyl)phenyl]benzeneacetamide)、DKK1、IWP-2(N-(6-methyl-2-benzothiazolyl)-2-[(3,4,6,7-tetrahydro-4-oxo-3-phenylthieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl)thio]-acetamide)、Ant1.4Br、Ant1.4CI、ニクロサミド、アピクラレン、バフィロマイシン、XAV939(3,5,7,8-tetrahydro-2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-4H-thiopyrano[4,3-d]pyrimidin-4-one)、IWR-1(4-(1,3,3a,4,7,7a-hexahydro-1,3-dioxo-4,7-methano-2H-isoindol-2-yl)-N-8-quinolinyl-benzamide)、NSC668036(N-[(1,1-Dimethylethoxy)carbonyl]-L-alanyl-(2S)-2-hydroxy-3-methylbutanoyl-L-Alanine-(1S)-1-carboxy-2-methylpropyl ester hydrate)、2,4-diamino-quinazoline、クエルセチン、ICG-001 ((6S,9aS)-hexahydro-6-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-8-(1-naphthalenylmethyl)-4,7-dioxo-N-(phenylmethyl)-2H-pyrazino[1,2-a]pyrimidine-1(6H)-carboxamide)、PKF115-584、BML-284(2-amino-4-[3,4-(methylenedioxy)benzylamino]-6-(3-methoxyphenyl)pyrimidine)、FH-535、iCRT-14、JW-55、JW-67などが挙げられるが、好ましくはIWR-1である。IWR-1を用いる場合には、培地中でのその濃度は、典型的には0.3 μ M～30 μ M (例：3 μ M等) である。
- [0048] 上記MEK阻害剤としては、例えば、PD184352(2-(2-chloro-4-iodophenylamino)-N-cyclopropylmethoxy-3,4-difluorobenzamide)、PD98059(2-(2-amino-3

-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one)、U0126、SL327、PD0325901(N-[(2R)-2,3-Dihydroxypropoxy]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-iodophenyl)amino]-benzamide)、トラメチニブ、コビメチニブ、ビニメチニブなどが挙げられるが、好ましくはPD0325901である。PD0325901を用いる場合には、培地中でのその濃度は、典型的には $0.03\mu\text{M}\sim 3\mu\text{M}$ (例： $0.3\mu\text{M}$ 等)である。

[0049] 上記ヘッジホッグシグナル活性化剤としては、例えば、ヘッジホッグタンパク質(例：Hh、Shh、Ihh、Dhh等)、Smoothenedアゴニスト(例：SAG(Hh-Ag 1.3)、SAG21k(3-chloro-4,7-difluoro-N-(4-methoxy-3-(pyridin-4-yl)benzyl)-N-((1r,4r)-4-(methylamino)cyclohexyl)benzo[b]thiophene-2-carboxamide)、Hh-Ag 1.1、Hh-Ag 1.5、purmorphamineなどが挙げられるが、Smoothenedアゴニストが好ましく、中でもSAGがより好ましい。SAGを用いる場合には、培地中でのその濃度は、典型的には $0.03\mu\text{M}\sim 3\mu\text{M}$ (例： $0.3\mu\text{M}$ 等)である。

[0050] 好ましい実施態様において、上記工程(i)で用いる培地には、CHIR99021、LDN193189、bFGF及びアクチビンAが含まれ、上記工程(ii)で用いる培地には、SB431542、CHIR99021、LDN193189及びbFGFが含まれ、上記工程(iii)で用いる場合には、SB431542、LDN193189、IWR-1及びPD0325901が含まれ、上記工程(iv)で用いる培地には、IWR-1及びSAGが含まれる。

[0051] このようにして分化誘導した軟骨又は骨の前駆細胞は、そのまま本発明の培養方法に用いてもよく、あるいは凍結保存(冷凍保存ともいう)しておき、使用前に解凍してから本発明の培養方法に用いてもよい。また、凍結保存を行う前に、分化誘導した軟骨又は骨の前駆細胞を拡大培養してもよい。従って、本発明の別の態様において、本発明の培養方法により得られた軟骨又は骨の前駆細胞を凍結保存する工程を含む、該細胞の凍結保存方法、あるいは該方法により作製された凍結ストックの製造方法が提供される。細胞の凍結操作は、細胞を浸漬させた培養液や生理緩衝液などを凍結保存液として用い、これに凍結保護剤を添加したり、培養液を、凍結保護剤を含む凍結保存液と置換するなどの処理を施したうえで行ってもよい。培養液を凍結保存液に置換する場合、培養液を実質的に全て除去してから凍結保存液を添加して

も、培養液を一部残したまま凍結保存液を添加してもよい。凍結保存液は、市販のものを用いてもよく、例えば、STEM-CELLBANKER（登録商標）（ZENOAQ）が挙げられる。細胞の解凍は、公知の任意の細胞解凍手法により行うことができ、例えば、凍結保存された細胞を、ウォーターバス、インキュベーター、恒温器などを用いて、凍結温度より高い温度の固形、液状若しくはガス状の媒体（例：水、培養液）と接触させることにより達成される。

[0052] 幹細胞から軟骨又は骨の前駆細胞への分化誘導に用いる基礎培地としては、特に制限されないが、上述した本発明の培養方法で用いる基礎培地と同一のものが挙げられる。また、培地には添加物、血清及び／又は血清代替物が含まれていてもよく、例えば、上述した本発明の培養方法で用いることができる添加物、血清、血清代替物と同一のものが挙げられる。また、上記分化誘導に用いる培養器としては、特に制限されないが、上述した本発明の培養方法で用いる培養器と同一のものが挙げられる。培養器は、細胞接着性であっても細胞非接着性であってもよく、目的に応じて適宜選ばれる。細胞接着性の培養器は、培養器の表面の細胞との接着性を向上させる目的で、細胞外マトリックス（ECM、細胞外基質ともいう）等の任意の細胞支持用基質でコーティングされたものであってもよく、かかる細胞支持用基質としては、上述した本発明の培養方法で用いることができる細胞支持用基質と同一のものが挙げられる。

[0053] 細胞の培養方法（本発明の培養方法を含む）は、接着培養であっても浮遊培養であってもよい。本明細書において、「浮遊培養」とは、目的の細胞や細胞塊を培養器の底面に接着させずに培養することを意味し、細胞や細胞塊が底面に触れていても、培養液を軽く揺らすと細胞や細胞塊が培養液中に浮かんでくるような状態で培養することも、浮遊培養に包含される。浮遊培養は、静置培養であってもよいが、機械的な制御下のもと閉鎖環境下で細胞播種、培地交換、細胞画像取得、培養細胞回収を自動で実行し、pH、温度、酸素濃度などを制御しながら、高密度での培養が可能なバイオリアクター（例：シングルユースバイオリアクター等）や自動培養装置によって行うことも

できる。これらの装置を用いて培養の途中で新しい培地を補給し、要求する物質を過不足なく細胞及び／又は組織に供給する手法として、流加培養、連続培養及び灌流培養があるが、いずれの手法も本発明に用いることができる。培養温度は、特に限定されないが、30～40℃、好ましくは37℃であり、CO₂含有空気の存在下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは2～5%である。

[0054] 2. 軟骨又は骨の前駆細胞の拡大培養用キット

本発明はまた、軟骨又は骨の前駆細胞の拡大培養用キット（以下「本発明のキット」と称することがある）を提供する。本発明のキットには、基礎培地、TGF-βシグナル阻害剤及びFGFが含まれる。かかる基礎培地、TGF-βシグナル阻害剤及びFGFとしては、例えば、上記1. で列挙したものと同一のものが挙げられるが、中でも、基礎培地としてはDMEM/F-12混合培地が好ましく、TGF-βシグナル阻害剤としてはSB431542が好ましく、FGFとしてはbFGFが好ましい。

[0055] また、本発明のキットには、軟骨又は骨の前駆細胞、培地への添加物、血清、血清代替物、培養器及び／又は細胞支持用基質が含まれていてもよく、軟骨又は骨の前駆細胞、培地への添加物、血清、血清代替物、培養器及び細胞支持用基質としては、例えば、上記1. で列挙したものと同一のものが挙げられる。本発明のキットには、さらに拡大培養の手順を記載した書面や説明書を含んでもよい。

[0056] 本発明のキットに含まれるTGF-βシグナル阻害剤及び／又はFGF、並びに必要に応じて上記の培地への添加物、血清、血清代替物等は、基礎培地に予め添加された状態で提供されてもよい。従って、一態様において、TGF-βシグナル阻害剤及び／又はFGFを含む培地を含むキット、あるいはTGF-βシグナル阻害剤及びFGFを含む軟骨又は骨の前駆細胞の拡大培養用培地が提供される。

[0057] 3. 軟骨細胞又は骨細胞の製造方法

本発明はまた、軟骨細胞又は骨細胞の製造方法（以下「本発明の製造方法」と称することがある）を提供する。本発明の製造方法は、本発明の培養方法で得られた軟骨又は骨の前駆細胞（以下「本発明の前駆細胞」と称するこ

とがある)を、軟骨細胞又は骨細胞へ分化誘導させる工程を含む。

[0058] 本発明の前駆細胞を軟骨細胞へ分化誘導させる方法としては、自体公知の方法を用いることができる。例えば、特許文献1、非特許文献1、2、特開2005-511083号公報、特開2004-254655号公報に記載の方法などを適宜参照して、本発明の前駆細胞を軟骨細胞へ分化誘導することができる。より具体的には、例えば、BMPシグナル活性化剤及び／又はTGF- β シグナル活性化剤を含む培地で本発明の前駆細胞を培養することにより、軟骨細胞へ分化誘導することができる。

[0059] 分化誘導を開始する前(例えば、凍結保存された細胞を起眠させた後)に、本発明の方法により、本発明の前駆細胞を再度拡大培養してもよく、具体的な方法や用いる基礎培地、TGF- β シグナル阻害剤、FGF、培地添加物、血清及びその代替物、培養器などは、上記1.に記載の通りである。

[0060] 上記BMPシグナル活性化剤として、例えば、骨形成タンパク質(BMP)(例:BMP-2、BMP-4、BMP-7等)、Alantolactone、FK506、イソリキリチゲニン、4'-ヒドロキシカルコンなどが挙げられるが、好ましくは骨形成タンパク質であり、中でもBMP-4がより好ましい。BMP-4を用いる場合には、培地中でのその濃度は、典型的には2 ng/mL~200 ng/mL(例:20 ng/mL等)である。上記TGF- β シグナル活性化剤としては、例えば、上記1.で列挙したものと同一のものが挙げられるが、好ましくはTGF- β であり、中でもTGF- β 3がより好ましい。TGF- β 3を用いる場合には、培地中でのその濃度は、典型的には1 ng/mL~100 ng/mL(例:10 ng/mL等)である。好ましい実施態様において、上記培養で用いる培地には、BMP-4及びTGF- β 3が含まれる。

[0061] 軟骨細胞であることの確認は、アルシアンブルー染色及び／又は1種以上の軟骨マーカーの発現を確認することにより行うことができる。前記軟骨マーカーとしては、例えば、初期軟骨マーカー(例:COL2A1等)、軟骨マーカー(例:ACAN、EPIPHYCAN等)などが挙げられる。本発明の好ましい実施態様において、軟骨又は骨の前駆細胞から分化誘導した軟骨細胞は、COL2A1、ACAN及びEPIPHYCANを、少なくともmRNAレベルで発現する。かかるマーカーの発

現は、自体公知の方法により検出することができ、マーカータンパク質の発現の検出は、抗体を用いた免疫学的アッセイ、例えば、ELISA法、免疫染色法、ウエスタンブロット法、フローサイトメトリーを利用して行うことができる。また、マーカー遺伝子の発現の検出は、例えば、real-time PCR、マイクロアレイ、バイオチップ及びRNAseq等の核酸増幅方法及び／又は核酸検出方法を利用して行うことができる。

[0062] 本発明の前駆細胞を骨細胞へ分化誘導させる方法としては、自体公知の方法を用いることができる。例えば、Mahmood A. et al., J. Bone Miner. Res., 25:1216-1233 (2010)、Lee K.W. et al., Stem Cells Dev., 19:557-568 (2010)、Hu J. et al., Tissue Eng. Part A 16:3507-3514 (2010)、Zou L. et al., Sci. Rep., 3:2243 (2013)、WO 2001/017562、WO 2006/123699に記載の方法などを適宜参照して、本発明の前駆細胞を骨細胞へ分化誘導することができる。より具体的には、例えば、デキサメタゾン、 β -グリセロリン酸及びビタミンC類、Rhoキナーゼ阻害剤及びBMPシグナル活性化剤、並びに／又はカルシウム拮抗薬を含む培地で本発明の前駆細胞を培養することにより、骨細胞へ分化誘導することができる。上記培地への添加物は、それぞれ自体公知の濃度範囲内で含まれることが好ましい。あるいは、前駆細胞を軟骨細胞へ分化誘導後、軟骨細胞から骨細胞へ分化させる方法を用いることもできる。

[0063] 上記ビタミンC類としては、例えば、上記1で列挙したものと同一のものが挙げられる。上記Rhoキナーゼ阻害剤としては、例えば、(+)-trans-4-(1-aminoethyl)-1-(4-pyridylcarbamoyl)cyclohexane、(+)-trans-N-(1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-4-yl)-4-(1-aminoethyl)cyclohexanecarboxamide、(R)-(+)-N-(4-pyridyl)-4-(1-aminoethyl)benzamide、(R)-(+)-N-(1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-4-yl)-4-(1-aminoethyl)benzamideなどが挙げられる。上記BMPシグナル活性化剤としては、例えば、上記で列挙したものと同一のものが挙げられるが、好ましくは骨形成タンパク質であり、中でもBMP-2がより好ましい。上記カルシウム拮抗薬としては、例えば、ジヒドロピリジン系カルシウム拮

抗薬（例：ベニジピン、ニフェジピン、アムロジピン、シノレニジピン等）、フェニルアルキルアミン系カルシウム拮抗薬（例：ベラパミル、ガロパミル、ベプリジル等）、ベンゾチアゼピン系カルシウム拮抗薬（例：ジルチアゼム）、ゾニサミド、ファスジル、ロメリジン、プレガバリン、シクランデレート、イデベノン、ブフロメジル、アトシバンなどが挙げられる。

[0064] 骨細胞であることの確認は、アルカリホスファターゼ活性、及び／又は1種以上の骨マーカーの発現を確認することにより行うことができる。前記骨マーカーとしては、例えば、RUNX2、COL1A1、Osteopontin (OPN)、Osterix、ALP、Osteocalcinなどが挙げられる。本発明の好ましい実施態様において、軟骨又は骨の前駆細胞から分化誘導した骨細胞は、COL2A1及びOPNを、少なくともmRNAレベルで発現する。アルカリホスファターゼ活性の確認は、自体公知の方法（例：Kind-King法、Bessey-Lowry法、GSCC法、SSCC法、JSCC法等）や、市販のキット（例：TRACP & ALP Assay Kit (Takara Bio) 等）を用いて行うことができる。骨マーカーの発現の検出は、上述の軟骨マーカーの発現の検出と同様の方法により行うことができる。

[0065] 本発明の前駆細胞から軟骨細胞又は骨細胞への分化誘導に用いる基礎培地としては、特に制限されないが、上述した本発明の培養方法で用いる基礎培地と同一のものが挙げられる。また、培地には添加物、血清及び／又は血清代替物が含まれていてもよく、例えば、上述した本発明の培養方法で用いることができる添加物、血清、血清代替物と同一のものが挙げられる。また、上記分化誘導に用いる培養器としては、特に制限されないが、上述した本発明の培養方法で用いる培養器と同一のものが挙げられる。培養器は、細胞接着性であっても細胞非接着性であってもよく、目的に応じて適宜選ばれる。細胞接着性の培養器は、培養器の表面の細胞との接着性を向上させる目的で、細胞外マトリックス（ECM、細胞外基質ともいう）等の任意の細胞支持用基質でコーティングされたものであってもよく、かかる細胞支持用基質としては、上述した本発明の培養方法で用いることができる細胞支持用基質と同一のものが挙げられる。

[0066] 本発明の前駆細胞から軟骨細胞を分化誘導させる場合には、培養期間は、軟骨細胞が分化できる限り特に制限はないが、3日間以上（例：4日、5日又はそれ以上）が好ましい。上限についても特に制限はないが、20日間以下（例：15日、10日、9日、8日、7日又はそれ以下）が好ましい。好ましい実施態様においては6日間である。本発明の前駆細胞から骨細胞を分化誘導させる場合には、培養期間は、骨細胞が分化できる限り特に制限はないが、7日間以上（例：8日、9日、10日、11日、12日、13日又はそれ以上）が好ましい。上限についても特に制限はないが、30日間以下（例：25日、20日、19日、18日、17日、16日、15日又はそれ以下）が好ましく、例えば、14日間が挙げられる。培養温度は、特に限定されないが、30～40℃、好ましくは37℃であり、CO₂含有空気の存在下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは2～5%である。

[0067] 本発明の前駆細胞の培養は、接着培養であっても浮遊培養であってもよい。浮遊培養は、静置培養であってもよいが、上述のバイオリクターや自動培養装置によって行うこともできる。これらの装置を用いて培養する場合には、流加培養、連続培養及び灌流培養のいずれの手法も本発明に用いることができる。培養温度は、特に限定されないが、30～40℃、好ましくは37℃であり、CO₂含有空気の存在下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは2～5%である。

[0068] 4. 靭帯節細胞の製造方法

さらに、本発明は、靭帯節細胞の製造方法（以下「本発明の靭帯節細胞の製造方法」と称することがある）を提供する。本発明の靭帯節細胞の製造方法は、本発明の前駆細胞を、靭帯節細胞へ分化誘導させる工程を含む。以下では、このようにして製造された靭帯節細胞を、「本発明の靭帯節細胞」と称することがある。本発明の靭帯節細胞を、腱細胞（tendon cell）又は靭帯細胞（ligament cell）に分化誘導させることで、腱細胞又は靭帯細胞を製造することもできる。本明細書において、上記のようにして製造された軟骨細胞、骨細胞、靭帯節細胞、腱細胞、靭帯細胞及び本発明の前駆細胞を包含す

るものとして、「本発明の硬節系譜細胞 (sclerotome-lineage cells)」との用語を用いることがある。

- [0069] 本発明の前駆細胞を靭帯節細胞へ分化誘導させる方法としては、自体公知の方法を用いることができる。例えば、Nakajima T. et al., *Development*, 145(16): dev165431 (2018)に記載の方法などを適宜参照して、本発明の前駆細胞を靭帯節細胞へ分化誘導することができる。より具体的には、例えば、(A)FGF及び／又はTGF- β シグナル活性化剤を含む培地で本発明の前駆細胞を培養する工程、及び(B)前記工程(A)により培養された細胞を、BMPシグナル活性化剤及び／又はTGF- β シグナル活性化剤を含む培地で培養することにより、靭帯節細胞へ分化誘導することができる。また、工程(A)及び(B)で用いる培地には、ビタミンC類が含まれることが好ましく、具体的なビタミンC類としては、例えば、上記1. で列挙したものと同一のものが挙げられる。培地におけるビタミンC類の濃度も、上記1. で記載したものと同様の濃度とすることが好ましい。
- [0070] 上記FGFとしては、上記1. で列記したものと同一のものが挙げられるが、好ましくはFGF-8 (例：FGF-8b) である。FGF-8を用いる場合には、培地中でのその濃度は、典型的には1 ng/mL~100 ng/mL (例：10 ng/mL等) である。
- [0071] 上記TGF- β シグナル活性化剤としては、例えば、上記1. で列挙したものと同一のものが挙げられるが、好ましくはTGF- β であり、中でもTGF- β 3がより好ましい。TGF- β 3を用いる場合には、培地中でのその濃度は、典型的には1 ng/mL~100 ng/mL (例：10 ng/mL等) である。
- [0072] 上記BMPシグナル活性化剤として、上記3. で列記したものと同一のものが挙げられるが、好ましくはBMP-4である。BMP-4を用いる場合には、培地中でのその濃度は、典型的には1 ng/mL~100 ng/mL (例：10 ng/mL等) である。
- [0073] 好ましい実施態様において、上記工程(A)で用いる場合には、TGF- β 3及びFGF-8が含まれ、並びに／又は上記工程(B)で用いる培地には、BMP-4及びTGF- β 3が含まれる。
- [0074] 靭帯節細胞であることの確認は、2種以上の靭帯節マーカーの発現を確認

することにより行うことができる。靭帯節マーカーの発現を確認する場合には、細胞に機械的ストレスを与えながら培養してもよい。前記靭帯節マーカーとしては、例えば、COL1A1、TNMD及びSCXから選択される2種類以上のマーカーなどが挙げられる。本発明の好ましい実施態様において、軟骨又は骨の前駆細胞から分化誘導した靭帯節細胞は、COL2A1及びTNMDを、少なくともmRNAレベルで発現する。かかるマーカーの発現は、自体公知の方法により検出することができ、マーカータンパク質の発現の検出は、抗体を用いた免疫学的アッセイ、例えば、ELISA法、免疫染色法、ウエスタンブロット法、フローサイトメトリーを利用して行うことができる。また、マーカー遺伝子の発現の検出は、例えば、real-time PCR、マイクロアレイ、バイオチップ及びRNAseq等の核酸増幅方法及び／又は核酸検出方法を利用して行うことができる。

[0075] 本発明の靭帯節細胞を腱細胞又は靭帯細胞へ分化誘導させる方法としては、自体公知の方法を用いることができる。例えば、特開2011-205964に記載の方法などを適宜参照して、本発明の靭帯節細胞を腱細胞又は靭帯細胞へ分化誘導することができる。

[0076] 靭帯節細胞、腱細胞又は靭帯細胞への分化誘導に用いる基礎培地としては、特に制限されないが、上述した本発明の培養方法で用いる基礎培地と同一のものが挙げられる。また、培地には添加物、血清及び／又は血清代替物が含まれていてもよく、例えば、上述した本発明の培養方法で用いることができる添加物、血清、血清代替物と同一のものが挙げられる。また、上記分化誘導に用いる培養器としては、特に制限されないが、上述した本発明の培養方法で用いる培養器と同一のものが挙げられる。培養器は、細胞接着性であっても細胞非接着性であってもよく、目的に応じて適宜選ばれる。細胞接着性の培養器は、培養器の表面の細胞との接着性を向上させる目的で、細胞外マトリックス（ECM、細胞外基質ともいう）等の任意の細胞支持用基質でコーティングされたものであってもよく、かかる細胞支持用基質としては、上述した本発明の培養方法で用いることができる細胞支持用基質と同一のものが挙げられる。

[0077] 本発明の前駆細胞から靭帯節細胞を分化させる場合の培養期間は、靭帯節細胞が分化できる限り特に制限はないが、3日間以上（例：4日、5日又はそれ以上）が好ましい。上限についても特に制限はないが、20日間以下（例：15日、10日、9日、8日、7日又はそれ以下）が好ましい。好ましい実施態様においては8日間である。工程(A)の培養期間は、1～3日間（例：2日間）が好ましく、工程(B)の期間は、4～8日間（例：6日間）が好ましい。靭帯節細胞から腱細胞又は靭帯細胞を分化させる場合の培養期間も、腱細胞又は靭帯細胞に分化できる限り特に制限はない。培養温度は、特に限定されないが、30～40℃、好ましくは37℃であり、CO₂含有空気の存在下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは2～5%である。また、前記培養は、接着培養であっても浮遊培養であってもよい。浮遊培養は、上記1. で記載の方法と同様に行うことができる。

[0078] 5. 細胞移植療法剤

本発明はまた、本発明の硬節系譜細胞を含有してなる、細胞移植療法剤（以下、「本発明の細胞移植療法剤」ともいう）及び該剤の製造方法を提供する。上述の通り、本発明の培養方法により、軟骨疾患又は骨疾患の治療又は予防に用いるのに十分な量の軟骨又は骨の前駆細胞を得ることができ、また、該細胞を分化誘導することにより、軟骨疾患又は骨疾患の治療又は予防に用いるのに十分な量の軟骨細胞又は骨細胞を提供することができる。同様に、本発明の前駆細胞から分化誘導した靭帯節細胞、腱細胞又は靭帯細胞は、腱又は靭帯関連疾患の治療又は予防に用いることができる。また、本発明の培養方法により、腫瘍などの原因となる未分化細胞の残存リスクが顕著に低下された細胞集団が得られる。よって、本発明の硬節系譜細胞は、細胞移植療法剤の原料として用いることに適しており、該細胞移植療法剤は、変形性関節症や関節リウマチなどの軟骨疾患又は骨疾患、あるいは靭帯損傷やエーラスダンロス症候などの腱又は靭帯関連疾患の治療又は予防に有用である。本明細書において、本発明の硬節系譜細胞には、該細胞を含む細胞集団も包含される。

[0079] 従って、本発明の一実施態様において、（１）本発明の培養方法により、軟骨又は骨の前駆細胞を提供する工程、及び（２）工程（１）によって提供された、有効量の本発明の前駆細胞を含む製剤を調製する工程を含む、本発明の細胞移植療法剤を製造する方法が提供される。また、別の態様において、（１'）本発明の製造方法により、軟骨細胞又は骨細胞を提供する工程、及び（２'）工程（１'）によって提供された、有効量の本発明の軟骨細胞等を含む製剤を調製する工程を含む、本発明の細胞移植療法剤を製造する方法が提供される。靭帯節細胞、腱細胞又は靭帯細胞を含む製剤についても、上記と同様に調製することができる。また、別の実施態様において、本発明の硬節系譜細胞又は本発明の細胞移植療法剤の有効量を治療又は予防の対象とする哺乳動物（例：ヒト、マウス、ラット、サル、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ等）に投与又は移植する、軟骨疾患又は骨疾患の治療又は予防方法が提供される。

[0080] 本発明の硬節系譜細胞を、細胞移植療法剤に用いる場合、拒絶反応が起こらないという観点から、移植先の個体のHLA遺伝子型が同一若しくは実質的に同一である体細胞から樹立したiPS細胞に由来する細胞を用いることが望ましい。ここで、「実質的に同一」とは、移植した細胞に対して免疫抑制剤により免疫反応が抑制できる程度にHLA遺伝子型が一致していることであり、例えば、HLA-A、HLA-B及びHLA-DRの3遺伝子座或いはHLA-Cを加えた4遺伝子座が一致するHLA型を有する体細胞である。本発明の硬節系譜細胞が、軟骨疾患又は骨疾患等の起因となる遺伝子変異を有する場合には、例えば、ゲノム編集（例：CRISPRシステム、TALEN、ZFN等）などの手法を用いて、該疾患の原因となる遺伝子の変異を予め修復しておくことが好ましい。年齢や体質などの理由から十分な細胞が得られない場合には、ポリエチレングリコールやシリコンのようなカプセル、多孔性の容器などに包埋して拒絶反応を回避した状態で移植することも可能である。

[0081] 本発明の硬節系譜細胞は、常套手段にしたがって医薬上許容される担体と混合するなどして、注射剤、懸濁剤、点滴剤等の非経口製剤として製造され

る。当該非経口製剤に含まれ得る医薬上許容される担体としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などの注射用の水性液を挙げることができる。本発明の細胞移植療法剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤、酸化防止剤などと配合してもよい。本発明の移植療法剤を水性懸濁液剤として製剤化する場合、上記水性液に約 1×10^6 ～約 1×10^8 細胞/mLとなるように、本発明の硬節系譜細胞を懸濁させればよい。また、本発明の硬節系譜細胞又は細胞移植療法剤の投与量又は移植量及び投与回数又は移植回数は、投与される哺乳動物の年齢、体重、症状などによって適宜決定することができる。

[0082] 本発明の細胞移植療法剤は、細胞の凍結保存に通常使用される条件で凍結保存された状態で提供され、用時融解して用いることもできる。その場合、血清若しくはその代替物、有機溶剤（例、DMSO）等をさらに含んでもよい。この場合、血清若しくはその代替物の濃度は、特に限定されるものではないが約1～約30%(v/v)、好ましくは約5～約20%(v/v)であり得る。有機溶剤の濃度は、特に限定されるものではないが0～約50%(v/v)、好ましくは約5～約20%(v/v)であり得る。

[0083] 5. その他の用途

さらに、本発明の硬節系譜細胞は、軟骨疾患若しくは骨疾患、あるいは腱若しくは靭帯関連疾患の治療又は予防用化合物のスクリーニングに有用である。例えば、試験化合物を単独で又は他の薬剤と組み合わせて、本発明の硬節系譜細胞と接触させ、自体公知の方法により、当該細胞の分化、増殖、成熟を促進する、あるいは軟骨基質又は骨基質の産生量を増加する場合には、当該試験化合物が上記疾患の治療用化合物として有用であると評価することができる。上記スクリーニングに用いる細胞は、治療対象となる疾患と同様の表現型を呈する細胞が好ましく、特に好ましくは、疾患患者由来の体細胞

から作製された人工多能性幹細胞を分化誘導することにより製造された細胞である。上記軟骨疾患又は骨疾患としては、上記4. で列挙した疾患と同一のものが挙げられる。

[0084] 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられる。ここで試験化合物は塩を形成していてもよい。該塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アルミニウム塩）などとの塩が用いられ、この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、又は有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンサルホン酸、ベンゼンサルホン酸）との塩、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩、アルミニウム塩が用いられ得る。

[0085] 本発明の硬節系譜細胞は、さらに、創薬ターゲットの検証や疾患メカニズムの解析などにも使用することができる。

[0086] 6. 軟骨又は骨の前駆細胞の同定方法

以下の実施例で示す通り、軟骨又は骨の前駆細胞であるiCOPが、以下の遺伝子を発現することが実証された。従って、以下の遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子の発現を検出又は測定することで、軟骨又は骨の前駆細胞を同定することができる。該方法では、以下の遺伝子のうちの少なくとも1つ、好ましくは2つ以上（例：3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10つ又はそれ以上）の遺伝子の発現が検出されたものを軟骨又は骨の前駆細胞として同定することができるが、少なくともPDGFRA遺伝子の発現が検出されることが好ましい。遺伝子の発現の検出又は測定は、上述の軟骨マーカーの発現の検出又は測定と同様の方法により行うことができる。

[0087] A2M, ABCA9, ACAT2, ADAMTS9, ADGRF5, AGTR2, AMER1, AMOT, ANGPT1, ARHGA

P5-AS1, ARHGEF26, ATP8A1, BCHE, BEGAIN, BOC, C3ORF52, CACNA1G, CELF2, CLSPN, COL25A1, COL26A1, CORO1A, CRISPLD1, CTTNBP2, CYB5B, DLGAP1, DNAJC12, DUSP9, EBF1, EBF2, EFEMP1, ESCO2, EYA1, FAM35A, FAM78A, FAR2, FGFBP2, FGFR4, FKBP4, FRZB, GCNT4, GNG11, HAAO, HMGCS1, HS3ST5, ID4, IGDC3, IRF8, KCNA6, KCNB2, KITLG, LGR5, LHCGR, LHFP, LPPR5, LUM, MAPK8IP2, MECOM, MEF2C, MEOX2, METTL7A, NAB1, NCALD, NGF, NGFR, NKAIN2, NPR1, NR2F1, OLFML1, PCDH18, PCDH19, PCSK9, PDE4D, PDGFRA, PEG10, PLVAP, PRELP, PRRT4, RARRES2, RBMS3, RBPMS2, RSP03, RUNX1T1, SAMD5, SCARA5, SKIDA1, SLC12A2, SLC27A3, SLC39A8, SLC7A2, SLC8A3, SLC01C1, SOX8, SPRED2, STARD8, STOM, SYNPO, TBX18, TMC6, TNRC6C-AS1, TRIM2, TRIM9, TRIP13, TSPAN15, UBE2N, UHRF1, UNC5C, VIT, ZBTB46及びZNF488。

[0088] 7. 軟骨又は骨の前駆細胞の単離方法

また、上記タンパク質のうち、下記の細胞表面抗原遺伝子（以下「本発明の細胞表面抗原遺伝子」と称することがあり、該遺伝子にコードされる抗原を「本発明の細胞表面抗原」と称することがある）から選択される少なくとも1つ、好ましくは2つ以上（例：3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10つ又はそれ以上）の遺伝子にコードされる抗原を指標として、軟骨又は骨の前駆細胞を含む細胞集団から、軟骨又は骨の前駆細胞を単離することができる。本発明の細胞表面抗原の1つとしては、PDGFRAが好ましい。細胞の単離は、自体公知の方法（例：FACS、MACS等）により行うことができる。

[0089] ABCA9, ATP8A1, BOC, KITLG, NKAIN2, ADGRF5, AGTR2, CACNA1G, C3ORF52, COL25A1, CYB5B, FAR2, FGFR4, GCNT4, HS3ST5, IGDC3, LGR5, LHFP, LHCGR, NPR1, NGFR, PLVAP, PDGFRA, KCNA6, KCNB2, PCDH18, PCDH19, SCARA5, SLC12A2, SLC27A3, SLC39A8, SLC7A2, SLC8A3, SLC01C1, STOM, TSPAN15, TMC6及びUNC5C。

[0090] 8. 軟骨又は骨の前駆細胞の単離用試薬

本発明はまた、本発明の細胞表面抗原のうちの1つ以上の抗原の各々に対

する抗体を少なくとも含んでなる、軟骨又は骨の前駆細胞の単離用試薬（以下「本発明の試薬」と称することがある）を提供する。本発明の試薬が2つ以上の抗原に対する抗体を含む場合、該試薬は、各抗体を別個の試薬中に含む試薬キットとして提供され得る。本発明の試薬に含まれる抗体は、単離手段に応じて、例えば、蛍光色素、金属同位体又はビーズ（例：磁気ビーズ）に結合した形態で提供され得る。本明細書において、該抗体には、細胞表面抗原への結合能を有する抗体断片や改変体（例：Fab断片、scFab断片、ScFv断片等）も含まれるものとする。

実施例

[0091] 以下に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

[0092] 実施例1：増殖能と軟骨分化能を有するiCOPの作製

以下の実施例では、人工多能性幹細胞（iPS細胞）からiCOP（iPS cell-induced chondro/osteogenic progenitor）を作製し、その増殖性と軟骨細胞への分化能を評価した。iPS細胞として、iPSアカデミアジャパン社より購入した1210B2株を用いた。

[0093] 5 mLシングルユースバイオリアクター（Biott）を用いて、分化開始2日前に10 μ M Y-27632（Wako）を含むStemFit（登録商標）AK03N（味の素）にiPS細胞を 2×10^5 cells/mLの細胞密度で播種し、37°C、5%CO₂のインキュベーター内で80 rpmの攪拌速度で攪拌培養した。なお、生細胞数の測定にはVi-CELLL（登録商標）XR（Beckman Coulter）を用いた。その後、RPMI1640（ナカライテスク）、2% B27（Thermo Fisher Scientific）、30 ng/mL Activin A（味の素）、10 μ M CHIR99021（Miltenyi Biotech）、100 ng/mL bFGF（PeproTech）、0.3 μ M LDN193189（Wako）を含む分化1培地5 mLに交換した。分化開始1日目にRPMI1640、2% B27、10 μ M SB431542（ReproCell）、5 μ M CHIR99021、100 ng/mL bFGF、0.3 μ M LDN193189を含む分化2培地5 mLに交換した。翌2日目にRPMI1640、2% B27、10 μ M SB431542、3 μ M IWR-1（Sigma）、0.3 μ M PD0325901（Cayman Chemical）、0.3 μ M LDN193189を含む分化3培地5 m

Lに交換した。翌3日目にRPMI1640、2% B27、3 μ M IWR-1、0.3 μ M SAG (Cayman Chemical) を含む分化4培地5 mLに交換した。翌4、5日目にシングルユースバイオリアクターの培養上清70%を分化4培地で交換し、6日目の細胞をiCOPとした。Alexa Fluor (登録商標) 647 Mouse Anti-Sox9 (BD Biosciences) を用いてiCOPが発現するSOX9を標識し、その陽性率をAttune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific) により測定した。その結果、9割前後の高効率でiCOPを誘導できることが確認された (図1)。

[0094] iCOPの増殖能を評価するため、iCOPをシングルユースバイオリアクターから回収して遠心し、Accumax cell detachment solution (Merck) 1 mLに懸濁し、10分間静置した。細胞塊が崩れるまで再び懸濁して遠心し、DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific)、2% B27、5 μ M SB431542、10 ng/mL bFGF、250 μ M L-アスコルビン酸-2-リン酸セスキマグネシウム塩 (Sigma) を含むiCOP増殖培地に懸濁し、細胞数を計測した。2 \times 10⁵ cellsのiCOPを8 mLのiCOP増殖培地を含む100 mmディッシュに播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下でインキュベーションした。播種3、5日後に新鮮培地8 mLに交換し、7日ごとに継代した。以下の図及び表では、継代をしていないものをP0、1回継代したものをP1、2回継代したものをP2、3回継代したものをP3、4回継代したものをP4、5回継代したものをP5として示す。5継代を繰り返し、iCOPの増殖曲線を求めた。その結果、一日当たりのpopulation doubling (PD)は0.46であった (図2)。また、iCOPマーカー (PAX1、SOX9、PDGFRA) の遺伝子発現を測定したところ、5継代しても発現を保持していた (表1)。

[0095] [表1]

	iCOP			
	P0	P1	P3	P5
<i>PAX1</i>	+	+	+	+
<i>SOX9</i>	+	+	+	+
<i>PDGFRA</i>	+	+	+	+

表1. iCOP マーカーの遺伝子発現

[0096] 実施例2 : iCOPの軟骨分化能の検証

iCOPの軟骨分化能を検証するため、各継代数のiCOPをPBS (-) で洗浄後、A

ccutase (ナカライテスク) に浸して37°C、5分間インキュベーションした。細胞が剥離したらチューブに回収して遠心し、DMEM/F12、2% B27、10 ng/mL TGF- β 3 (PeproTech)、20 ng/mL BMP4 (R&D systems) を含む分化5培地に懸濁し、細胞数を計測した。1 \times 10⁶cellsのiCOPを1 mLの分化5培地を含むElplasia™ Non-adherent surface 24 well plate (Kuraray) に播種し、37°C、5% CO₂条件下でインキュベーションした。培養上清を毎日半量交換し、6日目に細胞を回収した。培養後の軟骨細胞の遺伝子発現をreal-time PCR法により評価した結果、5継代したiCOPは軟骨細胞への分化能が保持していた(表2)。

[0097] [表2]

	軟骨細胞				
	P0	P1	P2	P4	P5
<i>COL2A1</i>	+	+	+	+	+
<i>ACAN</i>	+	+	+	+	+
<i>EPIPHYCAN</i>	+	+	+	+	+

表2. iCOP から誘導した軟骨細胞の遺伝子発現

[0098] 実施例3 : iCOPの凍結保存性の検証

以下の実験例では、iPS細胞から作製したiCOPを凍結保存し、その後解凍して増殖能と軟骨細胞への分化能を評価した。iPS細胞として、iPSアカデミアジャパン社より購入した1231A3株を用いた。

[0099] 分化開始1日前に、あらかじめ0.5 μ g/cm² iMatrix-511 (ニッピ) でコーティングした10 cm dish (BD FALCON) に4 \times 10⁶ cellsのiPS細胞を播種し、10 μ M Y-27632を含むStemFit (登録商標) AK03Nにて37°C、5% CO₂のインキュベーター内で培養した。翌日、RPMI1640、20% StemFit (登録商標) For Differentiation (味の素)、30 ng/mL Activin A、10 μ M CHIR99021、100 ng/mL bFGF、0.3 μ M LDN193189を含む分化1培地8 mLに交換した。翌日、RPMI1640、20% StemFit (登録商標) For Differentiation、10 μ M SB431542、5 μ M CHIR99021、100 ng/mL bFGF、0.3 μ M LDN193189を含む分化2培地8 mLに交換した。翌日、RPMI1640、20% StemFit (登録商標) For Differentiation、10 μ M SB431542、3 μ M IWR-1、0.3 μ M PD0325901、0.3 μ M LDN193189を

含む分化3培地8 mLに交換した。翌日、RPMI1640、20% StemFit (登録商標) For Differentiation、3 μ M IWR-1、0.3 μ M SAGを含む分化4培地8 mLに交換した。翌4、5日目に分化4培地で培地交換し、6日目の細胞をiCOPとした。iCOPの生細胞数を計測し、あらかじめ0.5 μ g/cm² iMatrix-511でコーティングした10 cm dishに 2×10^5 cellsのiCOPを播種し、DMEM/F12、20% StemFit (登録商標) For Differentiation、250 μ M L-Ascorbic Acid 2-phosphate、10 μ M SB431542、100 ng/mL bFGF、0.3 μ M SAGを含むiCOP増殖培地にて37°C、5% CO₂の条件でインキュベーションした。2日に1回培地交換して90~100%コンフルエントに到達したらiCOPの細胞数を計測し、そのまま継代した群と凍結ストックを作製する群に分けた。凍結ストックを作製するため、 1×10^6 cellsを1 mL STEM-CELLBANKER (登録商標) GMP grade (Zenoaq) に懸濁してセラムチューブ (IWAKI) に分注した。その後、あらかじめ4°Cに冷やしていたBIC ELL (日本フリーザー) にセラムチューブを入れて-80°Cディープフリーザー内で凍結させ、翌日-150°Cディープフリーザーに移した。一週間後、凍結させたセラムチューブを37°C湯浴内で解凍し、あらかじめ0.5 μ g/cm² iMatrix-511でコーティングした10 cm dishに 3×10^5 cellsのiCOPを播種し、iCOP増殖培地を用いて培養した。2日に1回培地交換して90~100%コンフルエントに到達したらiCOPの細胞を継代し、さらに5日間同様の条件で培養してP3 iCOPを得た。その結果、iCOPを凍結保存してもiCOPの増殖能が低下せず (図3)、またP3 iCOP におけるiCOPマーカーも低下しなかった (図4)。以上の結果から、iCOPを凍結保存することが可能であることが示された。

[0100] 実施例4 : iCOPの骨分化能の検証

以下の実験例では、iCOPから骨細胞 (Osteocyte) へ分化誘導し、骨細胞マーカーの遺伝子発現量を評価した。iPS細胞として、iPSアカデミアジャパン社より購入した1231A3株、1210B2株、及び201B7株を用いた。

[0101] 1継代目で凍結保存していたiCOPを起眠し、DMEM/F12、20% StemFit (登録商標) For Differentiation、250 μ M L-Ascorbic Acid 2-phosphate、10 μ M SB431542、100 ng/mL bFGF、0.3 μ M SAG、10 ng/mL PDGF-BB (Peprotec

h) を含むiCOP増殖培地で3継代目まで拡大培養した。iCOPが90~100%コンフルエントに到達したら生細胞数を計測し、4.5 g/L Glucose含有DMEM（ナカライテスク）、20% StemFit（登録商標） For Differentiation、250 μ M L-Ascorbic Acid 2-phosphate、100 nM dexamethasone（Sigma）、10 mM β -glycero phosphate（ナカライテスク）を含む骨分化培地に懸濁した。2 \times 10⁵ cellsのiCOPをあらかじめ0.5 μ g/cm² iMatrix-511でコーティングした24 well plate（BD FALCON）に播種し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂のインキュベーター内に静置した。隔日で培地交換を行い、18日間培養後に細胞を回収し、Osteocyteの遺伝子発現量をreal-time PCR法により評価した。その結果、いずれの細胞株においても骨細胞マーカー（COL1A1及びOPN）遺伝子を発現していたことから、iCOPは骨細胞への分化能を保持していることが示された（図5）。

[0102] 実施例5：iCOPの靭帯節細胞分化能の検証

以下の実験例では、iCOPから靭帯節細胞（syndetome）へ分化誘導し、靭帯節マーカーの遺伝子発現量を評価した。iPS細胞として、iPSアカデミアジャパン社より購入した1231A3株、1210B2株、及び201B7株を用いた。

[0103] 1継代目で凍結保存していたiCOPを起眠し、DMEM/F12、20% StemFit（登録商標） For Differentiation、250 μ M L-Ascorbic Acid 2-phosphate、10 μ M SB431542、100 ng/mL bFGF、0.3 μ M SAGを含むiCOP増殖培地で5継代目まで拡大培養した。iCOPが90~100%コンフルエントに到達したら生細胞数を計測し、DMEM/F12、20% StemFit（登録商標） For Differentiation、250 μ M L-Ascorbic Acid 2-phosphate、10 ng/mL TGF- β 3（Peprotech）、20 ng/mL FGF8b（Peprotech）を含む靭帯節細胞分化培地1に懸濁した。2.5 \times 10⁵ cellsのiCOPをあらかじめ0.5 μ g/cm² iMatrix-511でコーティングした24 well plateに播種し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂のインキュベーター内に静置した。2日後、DMEM/F12、20% StemFit（登録商標） For Differentiation、250 μ M L-Ascorbic Acid 2-phosphate、10 ng/mL TGF- β 3、10 ng/mL BMP-4（R&D）を含む靭帯節細胞分化培地2に置換し、さらに6日間培養した。培地交換は隔日で行った。培養終了後に細胞を回収し、靭帯節細胞の遺伝子発現量をreal-time PCR法に

より評価した。その結果、いずれの細胞株においても靭帯節マーカー（COL1A1及びTNMD）遺伝子を発現していたことから、iCOPは靭帯節細胞への分化能を保持していることが示された（図6）。

[0104] 実施例6：iCOPの浮遊培養による拡大培養

以下の実験例では、iCOPを浮遊培養により増殖させ、その増殖性と軟骨細胞への分化能を評価した。iPS細胞として、iPSアカデミアジャパン社より購入した1231A3株を用いた。

[0105] iPS細胞から作製したiCOPの生細胞数を計測し、DMEM/F12、20% StemFit（登録商標）For Differentiation、250 μ M L-Ascorbic Acid 2-phosphate、10 μ M SB431542、100 ng/mL bFGF、0.3 μ M SAG、10 ng/mL PDGF-BBを含むiCOP増殖培地に懸濁した。2 \times 10⁵ cells/mLの細胞密度で5 mLシングルユースバイオリアクター（Biott）に播種し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂のインキュベーター内で80 rpmの攪拌速度で攪拌培養した。1日おきに7割培地交換を行った。iCOPの増殖能を評価するため、iCOPをシングルユースバイオリアクターから回収して遠心し、Accumax cell detachment solution（Merck）1 mLに懸濁し、10分間静置した。細胞塊が崩れるまで再び懸濁して遠心し、iCOP増殖培地に懸濁し、細胞数を計測した。5日ごとに同様の操作を繰り返し、3継代目までの増殖曲線を求めた。その結果、一日当たりのPDは0.38であった（図7）。また、iCOPマーカー（PAX1、SOX9及びPDGFRA）の遺伝子発現を測定したところ、3継代しても発現を保持していた（表3）。さらに、3継代目のiCOPを軟骨細胞へ分化させたところ、いずれ軟骨細胞遺伝子も発現していた（表4）。以上より、iCOPを浮遊状態で拡大培養できることが示された。

[0106] [表3]

	iCOP			
	P0	P1	P2	P3
<i>PAX1</i>	+	+	+	+
<i>SOX9</i>	+	+	+	+
<i>PDGFRA</i>	+	+	+	+

[0107]

[表4]

	軟骨細胞
<i>COL2A1</i>	+
<i>ACAN</i>	+
<i>EPIPHYCAN</i>	+

[0108] 実施例7：iCOPの特異的マーカーの同定

以下の実験例では、iPS細胞から作製したiCOPの次世代シーケンサー（NGS）による解析を実施し、iCOP特異的マーカーの同定を行った。iPS細胞として、iPSアカデミアジャパン社より購入した1231A3株を使用した。

[0109] 分化開始1日前に、あらかじめ $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ iMatrix-511（ニッピ）でコーティングした24 well plate（BD FALCON）の4ウェルに 1.6×10^5 cellsのiPS細胞を播種し、 $10 \mu\text{M}$ Y-27632を含むStemFit（登録商標） AK03Nにて 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ のインキュベーター内で培養した。翌日、培地を除去後、RPMI1640、 $20\% \text{StemFit}$ （登録商標） For Differentiation（味の素）、 $30 \text{ ng}/\text{mL}$ Activin A、 $10 \mu\text{M}$ CHIR99021、 $100 \text{ ng}/\text{mL}$ bFGF、 $0.3 \mu\text{M}$ LDN193189を含む分化1培地を1ウェルあたり $500 \mu\text{L}$ 添加した。翌日、RPMI1640、 $20\% \text{StemFit}$ （登録商標） For Differentiation、 $10 \mu\text{M}$ SB431542、 $5 \mu\text{M}$ CHIR99021、 $100 \text{ ng}/\text{mL}$ bFGF、 $0.3 \mu\text{M}$ LDN193189を含む分化2培地 $500 \mu\text{L}$ に交換した。翌日、RPMI1640、 $20\% \text{StemFit}$ （登録商標） For Differentiation、 $10 \mu\text{M}$ SB431542、 $3 \mu\text{M}$ IWR-1、 $0.3 \mu\text{M}$ PD0325901、 $0.3 \mu\text{M}$ LDN193189を含む分化3培地 $500 \mu\text{L}$ に交換した。翌日、RPMI1640、 $20\% \text{StemFit}$ （登録商標） For Differentiation、 $3 \mu\text{M}$ IWR-1、 $0.3 \mu\text{M}$ SAGを含む分化4培地 $500 \mu\text{L}$ に交換した。翌4、5日目に分化4培地で培地交換し、6日目の細胞をiCOPとして、iCOPの生細胞数を計測した。この時点でのiCOPを0継代目のiCOPとし、取得した細胞のうち 1×10^6 cellsの細胞を含む細胞懸濁液を 1.5 mL エッペンドルフチューブに回収し、遠心後上清を除去しNGS解析用サンプルとしてペレットの状態に凍結保存した。また、あらかじめ $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ iMatrix-511でコーティングした 10 cm dishに 3×10^5 cellsのiCOPを播種し、DMEM/F12、 $20\% \text{StemFit}$ （登録商標） For Di

fferentiation、250 μ M L-Ascorbic Acid 2-phosphate、10 μ M SB431542、100 ng/mL bFGF、0.3 μ M SAGを含むiCOP増殖培地にて37°C、5% CO₂の条件でインキュベーションした。2日に1回培地交換して90~100%コンフルエントに到達したらiCOPの細胞数を計測し、この時点でのiCOPを1継代目のiCOPとして、取得した細胞の一部は継代し、 1×10^6 cellsをNGS解析用サンプルとしてペレットの状態凍結保存した。継代とNGS用細胞サンプル取得を繰り返し、0継代目、1継代目、3継代目、5継代目、8継代目、10継代目のiCOP凍結サンプルを得た。得られた凍結サンプルを解凍し、PureLink™ RNA Mini kit (Thermo Fischer Scientific) を用いてRNA抽出を行った。抽出したRNAのクオリティチェックのため、バイオアナライザ (Agilent RNA6000 Nano kit, Agilent) を用いてRIN (RNA Integrity Number) の測定を実施した。NGS解析用サンプルのライブラリー調製には、KAPA Stranded mRNA-Seq Kit (KAPA Biosystems) 及びKAPA Unique Dual-Indexed Adapter Kit (KAPA Biosystems) を使用した。調製したライブラリーのクオリティチェックにはバイオアナライザ (Agilent DNA1000 kit, Agilent) を使用し、濃度測定には、Qubit (登録商標) 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) 及びQubit (登録商標) dsDNA HS assay kit (Thermo Fisher Scientific) を使用した。調製したライブラリーを使用し、NextSeq 500 System (illumina) によるシーケンシングを実施した。BaseSpace (登録商標) Onsite (illumina) システム上からFASTQファイルを取得し、Bio-Linux上にてTrimmomaticツールによる3' 末端のトリミングを実施した。Jupyter notebook上にて、FastQCによるtrimmomaticによるクオリティ向上を確認し、ヒトゲノムへのマッピング、リード数のカウント、正規化からなるRNA-seqパイプラインを実行し、出力されたリード数カウントファイルを用いて、TCCパッケージを用いた発現変動遺伝子 (DEG) の解析を行った。解析の結果、iCOP特異的マーカー遺伝子として抽出された10遺伝子を、以下に示す。

[0110]

A2M, ABCA9, ACAT2, ADAMTS9, ADGRF5, AGTR2, AMER1, AMOT, ANGPT1, ARHGAP5-AS1, ARHGEF26, ATP8A1, BCHE, BEGAIN, BOC, C3ORF52, CACNA1G, CELF2, CLSPN, COL25A1, COL26A1, CORO1A, CRISPLD1, CTTNBP2, CYB5B, DLGAP1, DNAJC12, DUSP9, EBF1, EBF2, EFEMP1, ESCO2, EYA1, FAM35A, FAM78A, FAR2, FGFBP2, FGFR4, FKBP4, FRZB, GCNT4, GNG11, HAAO, HMGCS1, HS3ST5, ID4, IGDCC3, IRF8, KCNA6, KCNB2, KITLG, LGR5, LHCGR, LHFP, LPPR5, LUM, MAPK8IP2, MECOM, MEF2C, MEOX2, METTL7A, NAB1, NCALD, NGF, NGFR, NKAIN2, NPR1, NR2F1, OLFML1, PCDH18, PCDH19, PCSK9, PDE4D, PDGFRA, PEG10, PLVAP, PRELP, PRRT4, RARRES2, RBMS3, RBPMS2, RSPO3, RUNX1T1, SAMD5, SCARA5, SKIDA1, SLC12A2, SLC27A3, SLC39A8, SLC7A2, SLC8A3, SLCO1C1, SOX8, SPRED2, STARD8, STOM, SYNPO, TBX18, TMC6, TNRC6C-AS1, TRIM2, TRIM9, TRIP13, TSPAN15, UBE2N, UHRF1, UNC5C, VIT, ZBTB46, ZNF488

[0111] また、110遺伝子のうち、細胞表面抗原である遺伝子群を、以下に示す。

[0112] *ABCA9, ATP8A1, BOC, KITLG, NKAIN2, ADGRF5, AGTR2, CACNA1G, C3ORF52, COL25A1, CYB5B, FAR2, FGFR4, GCNT4, HS3ST5, IGDCC3, LGR5, LHFP, LHCGR, NPR1, NGFR, PLVAP, PDGFRA, KCNA6, KCNB2, PCDH18, PCDH19, SCARA5, SLC12A2, SLC27A3, SLC39A8, SLC7A2, SLC8A3, SLCO1C1, STOM, TSPAN15, TMC6, UNC5C*

産業上の利用可能性

[0113] 本発明により、軟骨又は骨の前駆細胞の拡大培養が可能となり、予め該前駆細胞を拡大培養し、ストックしておけば、軟骨細胞又は骨細胞への分化誘導期間を大幅に短縮することが可能となり、また、軟骨細胞又は骨細胞を極めて多量に製造できるため、本発明により、軟骨疾患又は骨疾患の治療に用いるのに十分な量の軟骨細胞を迅速に製造することができる。

[0114] 本出願は、日本で出願された特願2019-094878（出願日：2019年5月20日）を基礎としておりその内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

- [請求項1] 軟骨又は骨の前駆細胞を、TGF- β シグナル阻害剤及びFGFを含む培地中で培養する工程を含む、軟骨又は骨の前駆細胞の拡大培養方法。
- [請求項2] 前記軟骨又は骨の前駆細胞がPDGFRA、SOX9、若しくはPAX1を発現する細胞である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記TGF- β シグナル阻害剤がSB431542である、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 前記FGFがbFGFである、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] 前記軟骨又は骨の前駆細胞が多能性幹細胞に由来する細胞である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] 前記軟骨又は骨の前駆細胞が多能性幹細胞を浮遊培養することで得られる細胞である、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項7] 拡大培養が浮遊培養により行われる、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項8] 基礎培地、TGF- β シグナル阻害剤及びFGFを含む、軟骨又は骨の前駆細胞の拡大培養用キット。
- [請求項9] 前記TGF- β シグナル阻害剤がSB431542である、請求項8に記載のキット。
- [請求項10] 前記FGFがbFGFである、請求項8又は9に記載のキット。
- [請求項11] 請求項1～7のいずれか1項に記載の方法で得られた軟骨又は骨の前駆細胞を、軟骨細胞又は骨細胞へ分化誘導させる工程を含む、軟骨細胞又は骨細胞の製造方法。
- [請求項12] 請求項1～7のいずれか1項に記載の方法で得られた軟骨又は骨の前駆細胞を、靭帯節細胞へ分化誘導させる工程を含む、靭帯節細胞の製造方法。

[図1]

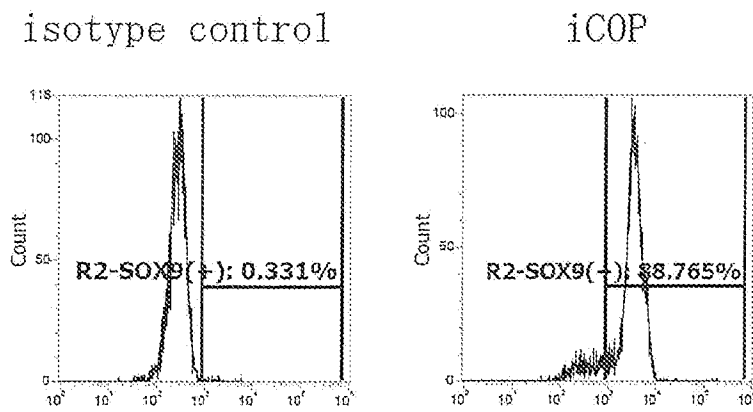


図 1. iCOP における SOX9 の発現割合

[図2]

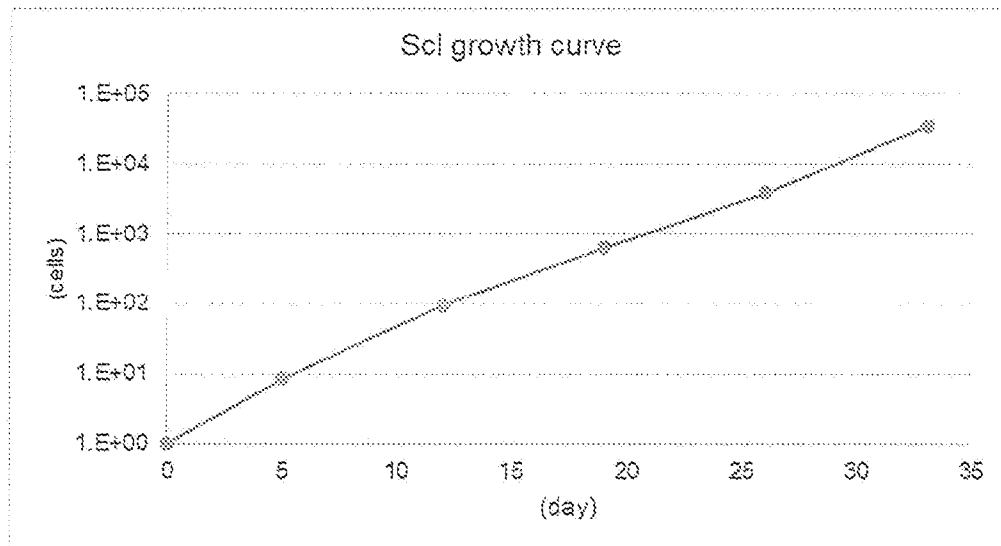


図 2. iCOP の増殖曲線

[図3]

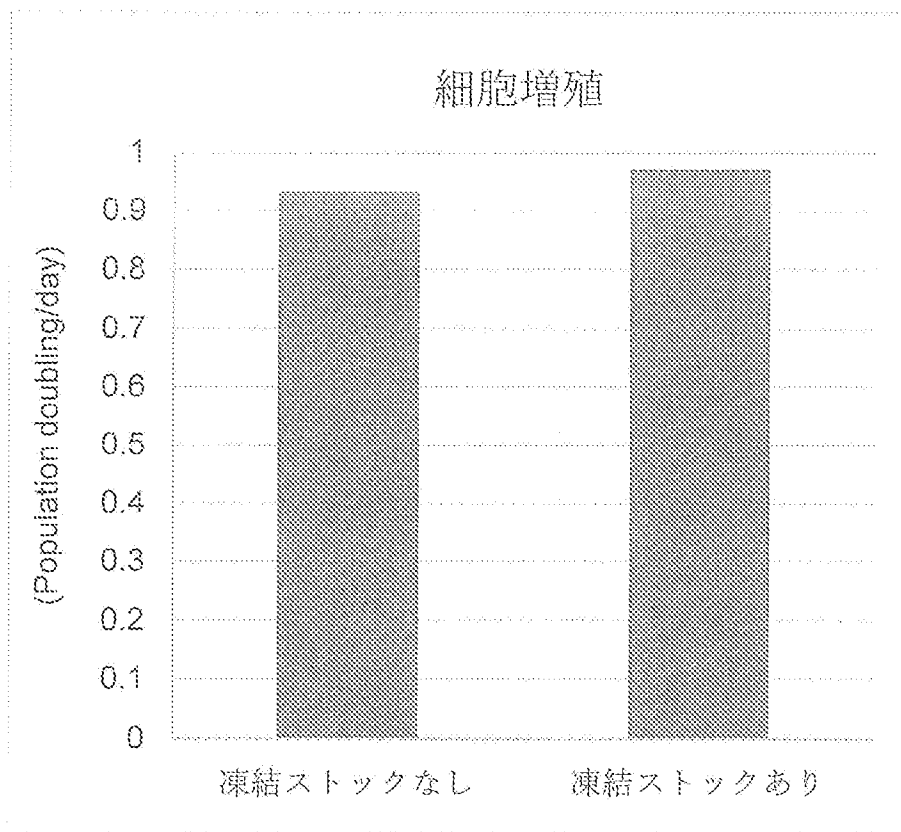


図3. 凍結保存した iCOP の増殖能

[図4]

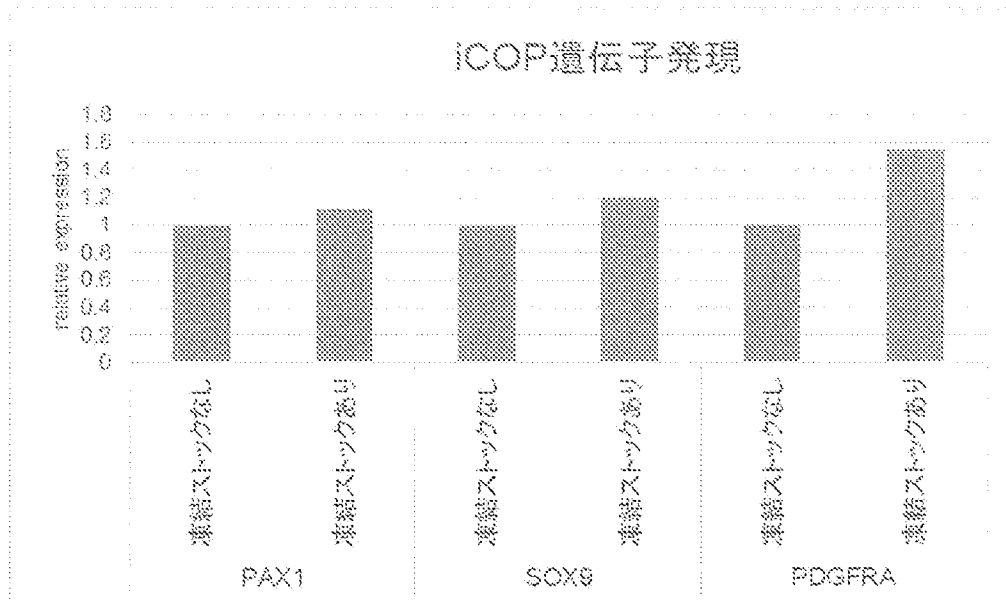


図4. 凍結保存した iCOP の遺伝子発現量

[図5]

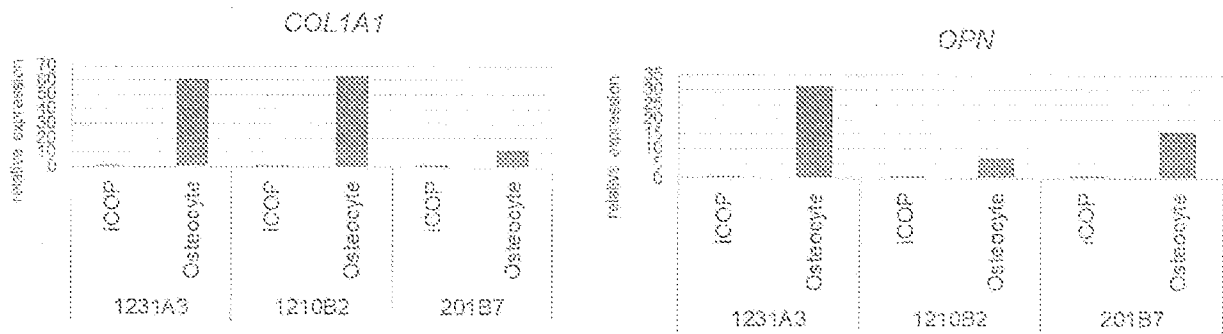


図5. iCOP から誘導した Osteocyte の遺伝子発現

[図6]

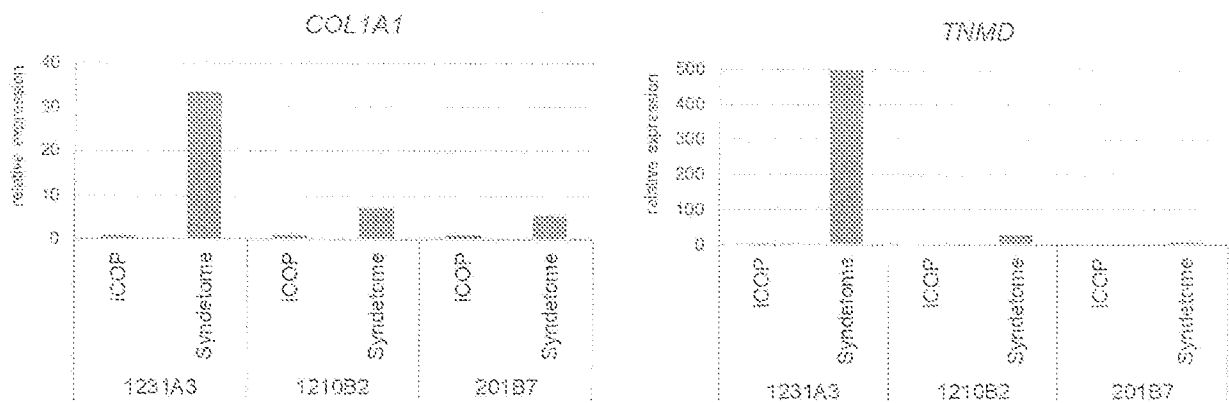


図6. iCOP から誘導した syndetome の遺伝子発現

[図7]

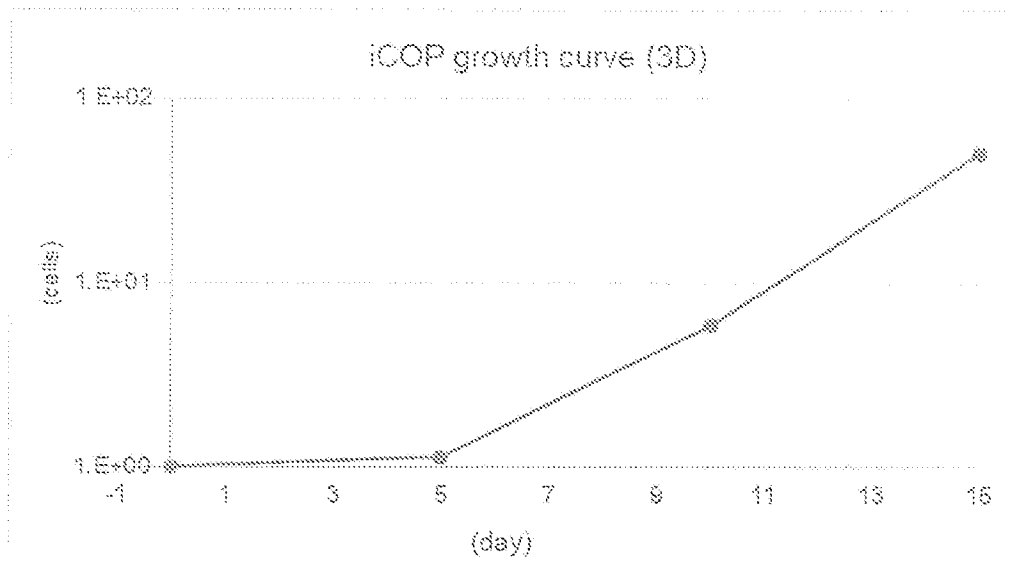


図7. 浮遊培養による iCOP の増殖曲線

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/018130

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/077(2010.01)i; C12N 1/00(2006.01)i FI: C12N5/077; C12N1/00 G According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																
<p>B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/077; C12N1/00</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <table border="0"> <tr> <td>Published examined utility model applications of Japan</td> <td align="right">1922-1996</td> </tr> <tr> <td>Published unexamined utility model applications of Japan</td> <td align="right">1971-2020</td> </tr> <tr> <td>Registered utility model specifications of Japan</td> <td align="right">1996-2020</td> </tr> <tr> <td>Published registered utility model applications of Japan</td> <td align="right">1994-2020</td> </tr> </table> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)</p>		Published examined utility model applications of Japan	1922-1996	Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020	Registered utility model specifications of Japan	1996-2020	Published registered utility model applications of Japan	1994-2020							
Published examined utility model applications of Japan	1922-1996															
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020															
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020															
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020															
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th align="center">Category*</th> <th align="center">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th align="center">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td align="center">X A</td> <td>NAKAJIMA, Taiki et al., "Modeling human somite development and fibrodysplasia ossificans progressiva with induced pluripotent stem cells", Development, 2018, vol. 145, dev165431, pp. 1-14, fig. 1, 4A</td> <td align="center">11-12 1-10</td> </tr> <tr> <td align="center">X A</td> <td>JP 2013-231082 A (ORIENTAL YEAST CO., LTD.) 14.11.2013 (2013-11-14) claims, example 2</td> <td align="center">11 1-10, 12</td> </tr> <tr> <td align="center">X A</td> <td>JP 2015-171345 A (AZUMA, Toshifumi) 01.10.2015 (2015-10-01) claims, examples</td> <td align="center">11 1-10, 12</td> </tr> <tr> <td align="center">A</td> <td>JP 2017-517259 A (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER) 29.06.2017 (2017-06-29) claims</td> <td align="center">1-12</td> </tr> </tbody> </table>		Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X A	NAKAJIMA, Taiki et al., "Modeling human somite development and fibrodysplasia ossificans progressiva with induced pluripotent stem cells", Development, 2018, vol. 145, dev165431, pp. 1-14, fig. 1, 4A	11-12 1-10	X A	JP 2013-231082 A (ORIENTAL YEAST CO., LTD.) 14.11.2013 (2013-11-14) claims, example 2	11 1-10, 12	X A	JP 2015-171345 A (AZUMA, Toshifumi) 01.10.2015 (2015-10-01) claims, examples	11 1-10, 12	A	JP 2017-517259 A (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER) 29.06.2017 (2017-06-29) claims	1-12
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.														
X A	NAKAJIMA, Taiki et al., "Modeling human somite development and fibrodysplasia ossificans progressiva with induced pluripotent stem cells", Development, 2018, vol. 145, dev165431, pp. 1-14, fig. 1, 4A	11-12 1-10														
X A	JP 2013-231082 A (ORIENTAL YEAST CO., LTD.) 14.11.2013 (2013-11-14) claims, example 2	11 1-10, 12														
X A	JP 2015-171345 A (AZUMA, Toshifumi) 01.10.2015 (2015-10-01) claims, examples	11 1-10, 12														
A	JP 2017-517259 A (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER) 29.06.2017 (2017-06-29) claims	1-12														
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</p>																
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>		"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed						
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention															
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone															
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art															
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family															
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																
Date of the actual completion of the international search 01 July 2020 (01.07.2020)	Date of mailing of the international search report 14 July 2020 (14.07.2020)															
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/018130

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-514188 A (ANGIOBLAST SYSTEMS, INC.) 08.05.2008 (2008-05-08) claims	1-12
A	JP 2018-29522 A (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 01.03.2018 (2018-03-01) claims	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application no.
PCT/JP2020/018130

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2013-231082 A	14 Nov. 2013	US 2011/0177069 A1 claims, example 2 EP 2343087 A1 WO 2010/038610 A1	
JP 2015-171345 A	01 Oct. 2015	(Family: none)	
JP 2017-517259 A	29 Jun. 2017	WO 2015/179633 A1 claims EP 3146041 A1	
JP 2008-514188 A	08 May 2008	US 2017/0260508 A1 WO 2006/032075 A1 claims US 2009/0029912 A1	
JP 2018-29522 A	01 Mar. 2018	EP 2360242 A1 (Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/077(2010.01)i; C12N 1/00(2006.01)i FI: C12N5/077; C12N1/00 G		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N5/077; C12N1/00 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2020年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2020年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2020年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN) JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	NAKAJIMA, Taiki et al., Modeling human somite development and fibrodysplasia ossificans progressiva with induced pluripotent stem cells, Development, 2018, Vol.145, dev165431, p.1-14 Fig.1, Fig.4A	11-12
A		1-10
X	JP 2013-231082 A (オリエンタル酵母工業株式会社) 14.11.2013 (2013 - 11 - 14) [特許請求の範囲]、実施例2	11
A		1-10, 12
X	JP 2015-171345 A (東 俊文) 01.10.2015 (2015 - 10 - 01) [特許請求の範囲]、[実施例]	11
A		1-10, 12
A	JP 2017-517259 A (フレッド ハッチンソン キャンサー リサーチ センター) 29.06.2017 (2017 - 06 - 29) [特許請求の範囲]	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 01.07.2020	国際調査報告の発送日 14.07.2020	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 坂井田 京 4N 1150 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2008-514188 A (アンジオプラスト システムズ, インコーポレーテッド) 08.05.2008 (2008 - 05 - 08) [特許請求の範囲]	1-12
A	JP 2018-29522 A (国立大学法人 東京大学) 01.03.2018 (2018 - 03 - 01) [特許請求の範囲]	1-12

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/018130

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2013-231082 A	14.11.2013	US 2011/0177069 A1 Claims, Example2 EP 2343087 A1 WO 2010/038610 A1	
JP 2015-171345 A	01.10.2015	(ファミリーなし)	
JP 2017-517259 A	29.06.2017	WO 2015/179633 A1 Claims EP 3146041 A1 US 2017/0260508 A1	
JP 2008-514188 A	08.05.2008	WO 2006/032075 A1 Claims US 2009/0029912 A1 EP 2360242 A1	
JP 2018-29522 A	01.03.2018	(ファミリーなし)	