

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6399558号  
(P6399558)

(45) 発行日 平成30年10月3日 (2018. 10. 3)

(24) 登録日 平成30年9月14日 (2018. 9. 14)

(51) Int. Cl.

F I

<b>C 1 2 N</b>	<b>5/074</b>	<b>(2010. 01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>5/074</b>
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/077</b>	<b>(2010. 01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>5/077</b>
<b>A 6 1 K</b>	<b>35/545</b>	<b>(2015. 01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>35/545</b>
<b>A 6 1 K</b>	<b>35/32</b>	<b>(2015. 01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>35/32</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>19/08</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>19/08</b>

請求項の数 13 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-539924 (P2015-539924)  
 (86) (22) 出願日 平成25年10月29日 (2013. 10. 29)  
 (65) 公表番号 特表2016-502401 (P2016-502401A)  
 (43) 公表日 平成28年1月28日 (2016. 1. 28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/067350  
 (87) 国際公開番号 W02014/070797  
 (87) 国際公開日 平成26年5月8日 (2014. 5. 8)  
 審査請求日 平成28年9月14日 (2016. 9. 14)  
 (31) 優先権主張番号 61/719, 901  
 (32) 優先日 平成24年10月29日 (2012. 10. 29)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 514005652  
 スクリップス ヘルス  
 アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォル  
 ニア州 サンディエゴ キャンパス・ポイ  
 ント・コート 4 2 7 5  
 (74) 代理人 100082072  
 弁理士 清原 義博  
 (72) 発明者 ディリーマ, ダリル, ディー.  
 アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォル  
 ニア州 サンディエゴ キャンパス・ポイ  
 ント・コート 4 2 7 5  
 (72) 発明者 オリー, ツァイウェイ  
 アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォル  
 ニア州 サンディエゴ キャンパス・ポイ  
 ント・コート 4 2 7 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟骨細胞から多能性幹細胞を製造する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

軟骨細胞の集団から多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の集団を生成する方法であって、該方法は：

a) 軟骨細胞の集団において O c t 3 / 4 ポリペプチド、S o x 2 ポリペプチド、K l f 4 ポリペプチド、及び c - M y c ポリペプチドの 1 以上の発現を導く工程；及び  
 b) 色素内皮誘導因子 ( P E D F ) の存在下であり、且つ塩基性線維芽細胞成長因子 ( b F G F ) の非存在下で、軟骨細胞を培養する工程を含む  
 ことを特徴とする方法。

【請求項 2】

発現を導く前記工程は、O c t 3 / 4 ポリペプチド、S o x 2 ポリペプチド、K l f 4 ポリペプチド、及び c - M y c ポリペプチドの発現を導くために、1 以上の発現ベクターを軟骨細胞の集団に導入する工程を含む、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞は、O c t 4、R e x - 1、S S E A 4、T r a 1 - 6 0、及び T r a 1 - 8 1 から成る群から選択された 2 以上の遺伝子を発現する、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

軟骨細胞の集団は成人のヒトに由来する、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

10

20

多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の集団から軟骨細胞の集団を生成する方法であって、該方法は：

i) 請求項 1 に記載の方法に従って多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の集団を生成する工程であって、多能性肝細胞又は分化多能性肝細胞は多能性肝細胞又は分化多能性肝細胞のコロニーを形成する、工程；

ii) 細胞集合体を製造するために多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞のコロニーを機械的に切開する工程；

iii) 集合体由来の細胞を製造するために集密度になるまで、組織培養処理した容器において細胞集合体を培養する工程；

iv) 軟骨前駆細胞を製造するために、培養において少なくとも 1 回、集合体由来の細胞を継代する工程；及び

v) 軟骨前駆細胞を三次元培養に入れる工程を含み、

ここで、前記方法は、胚様体の形成を含まないことを特徴とする方法。

#### 【請求項 6】

集合体由来の細胞は、軟骨前駆細胞を製造するために少なくとも 2 回継代される、ことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

#### 【請求項 7】

軟骨前駆細胞は、TGF- $\beta$ 3 の存在下で三次元培養に入れられる、ことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

#### 【請求項 8】

軟骨前駆細胞は、BMP-2 の存在下で三次元培養に入れられる、ことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

#### 【請求項 9】

三次元培養は、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブリン、ヒアルロン酸、ポリ-D-ラクチド、ポリ-L-ラクチド、ポリ-DL-ラクチド、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ヒドロキシアパタイト、リン酸カルシウム、アテロコラーゲン、フィブリン、アルギン酸塩、寒天、ゼラチン、及びそれらの組み合わせから選択される構成成分を含む、ことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

#### 【請求項 10】

三次元培養はコラーゲンを含む、ことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

#### 【請求項 11】

コラーゲンは架橋結合される、ことを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

#### 【請求項 12】

コラーゲンは可溶化される、ことを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

#### 【請求項 13】

三次元培養はプロテオグリカンを含む、ことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本出願は、2012 年 10 月 29 日出願の米国特許出願第 61/719,901 号の利益を主張し、その全体は引用により本明細書に組み込まれる。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

関節炎と軟骨変性は、高齢人口において、及び早い年齢で始まりだんだんと激しくなる身体活動に従事する若い年代においても同様に、身体障害の主要原因である。

#### 【発明の概要】

#### 【0003】

本明細書には、幾つかの実施形態において、軟骨細胞の集団から多能性幹細胞又は分化

10

20

30

40

50

多能性幹細胞を生成する方法が開示され、該方法は：a) 軟骨細胞の集団においてOct 3 / 4 ポリペプチド、Sox 2 ポリペプチド、Klf 4 ポリペプチド、及びc - Myc ポリペプチドの1以上の発現を導く工程；及び、b) 色素内皮誘導因子(pigment endothelium-derived factor)(PEDF)の存在下で軟骨細胞を培養する工程を含む。幾つかの実施形態において、前記方法は、Oct 3 / 4 ポリペプチド、Sox 2 ポリペプチド、Klf 4 ポリペプチド、及びc - Myc ポリペプチドの発現を導くために、1以上の発現ベクターを軟骨細胞の集団に導入する工程を更に含む。幾つかの実施形態において、1以上の発現ベクターは、レトロウイルス発現ベクター、レンチウイルス発現ベクター、アデノ随伴ウイルス(adeno-associated viral)発現ベクター、又はアデノウイルス発現ベクターである。幾つかの実施形態において、1以上の発現ベクターは、選択マーカーを含む。幾つかの実施形態において、多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞は、Oct 4、Rex - 1、SSEA 4、Tra 1 - 60、及びTra 1 - 81から成る群から選択された2以上の遺伝子を発現する。幾つかの実施形態において、軟骨細胞は、成人のヒトに由来する。

#### 【0004】

本明細書には、幾つかの実施形態において、多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の集団から軟骨細胞の集団を生成する方法が開示され、該方法は：i) 本明細書に開示される方法に従って多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の集団を生成する工程；ii) 細胞集合体を製造するために多能性幹細胞のコロニー又は分化多能性幹細胞のコロニーを機械的に切開する工程；iii) 集合体由来の細胞を製造するために、組織培養容器において、集密度になるまで細胞集合体を培養する工程；iv) 軟骨前駆細胞を製造するために、集合体由来の細胞を培養において少なくとも一回継代する工程；及び、v) 三次元培養に軟骨前駆細胞を置く工程；を含み、ここで前記方法は胚様体の形成を含まない。幾つかの実施形態において、集合体に由来する細胞は軟骨前駆細胞を製造するために少なくとも2回継代される。幾つかの実施形態において、集合体に由来する細胞は軟骨前駆細胞を製造するために少なくとも3回継代される。幾つかの実施形態において、集合体に由来する細胞は軟骨前駆細胞を製造するために少なくとも4回継代される。幾つかの実施形態において、集合体に由来する細胞は軟骨前駆細胞を製造するために少なくとも5回継代される。幾つかの実施形態において、集合体に由来する細胞は軟骨前駆細胞を製造するために少なくとも6、7、又は8回継代される。幾つかの実施形態において、軟骨前駆細胞はTGF - 3の存在下で三次元集合体培養に置かれる。幾つかの実施形態において、軟骨前駆細胞はBMP 2の存在下で三次元集合体培養に置かれる。幾つかの実施形態において、細胞集合体の生産プロセスは多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の酵素による消化を含まない。幾つかの実施形態において、三次元培養における軟骨前駆細胞の培養は、三次元マトリックスの中での細胞培養を含む。幾つかの実施形態において、三次元マトリックスは、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブリン、ヒアルロン酸、ポリ - D - ラクチド、ポリ - L - ラクチド、ポリ - DL - ラクチド、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ヒドロキシアパタイト、リン酸カルシウム、アテロコラーゲン、フィブリン、アルギン酸塩、寒天、及び/又はゼラチンを含む。幾つかの実施形態において、三次元マトリックスはコラーゲンを含む。幾つかの実施形態において、コラーゲンは架橋結合される。幾つかの実施形態において、コラーゲンは可溶化される。幾つかの実施形態において、三次元マトリックスはプロテオグリカンを含む。幾つかの実施形態において、組織培養処理した容器はプラスチックである。幾つかの実施形態において、組織培養処理した容器はポリスチレンである。

#### 【0005】

本明細書には、幾つかの実施形態において、人工多能性幹(iPS)細胞の集団が開示され、ここで幹細胞は軟骨細胞の集団に由来する。幾つかの実施形態において、iPS細胞は、生きたドナーから得た後に12回以下で継代した軟骨細胞から誘導される。幾つかの実施形態において、iPS細胞は、生きたドナーから得た後に4回以下で継代した軟骨細胞から誘導される。幾つかの実施形態において、iPS細胞の集団は、由来する軟骨細胞

胞に類似するDNA低メチル化特性及びDNA過剰メチル化特性を持つ。幾つかの実施形態において、iPS細胞は、Oct4、Rex-1、SSEA4、Tra1-60、及びTra1-81から成る群から選択された2以上の遺伝子を発現する。幾つかの実施形態において、iPS細胞は、軟骨細胞の集団においてOct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド、及びKlf4ポリペプチドの発現を導く工程を含む方法によって生成される。幾つかの実施形態において、Oct3/4、Sox2、及びKlf4の発現を導く工程は、Oct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド、及びKlf4ポリペプチドの発現のために1以上の発現ベクターを軟骨細胞に導入する工程を含む。幾つかの実施形態において、1以上の発現ベクターはレトロウイルス発現ベクター、レンチウイルス発現ベクター、アデノ随伴ウイルス発現ベクター、又はアデノウイルス発現ベクターである。幾つかの実施形態において、1以上の発現ベクターは、レンチウイルス発現ベクターである。幾つかの実施形態において、細胞は、約20%未満のアポトーシス性である。幾つかの実施形態において、細胞は、約10%未満のアポトーシス性である。幾つかの実施形態において、細胞は、約9%未満のアポトーシス性、約8%未満のアポトーシス性、約7%未満のアポトーシス性、約6%未満のアポトーシス性、約5%未満のアポトーシス性、約4%未満のアポトーシス性、約3%未満のアポトーシス性、約2%未満のアポトーシス性、又は約1%未満のアポトーシス性である。

#### 【0006】

幾つかの実施形態において、本明細書には、細胞の集団が開示され、この細胞の集団は、次の工程を含むプロセスにより作られる：(i)軟骨細胞においてポリペプチドの発現を導くことにより、軟骨細胞の集団から多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の集団を生成する工程であって、該ポリペプチドはOct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド、Klf4ポリペプチド、及びc-Mycポリペプチドを含む、工程；ii)細胞集合体を製造するために、多能性幹細胞のコロニー又は分化多能性幹細胞のコロニーを機械的に切開する工程；iii)軟骨前駆細胞を製造するために培養において少なくとも1回、細胞を継代する工程；及びiv)三次元集合体培養に軟骨前駆細胞を置く工程。幾つかの実施形態において、細胞の集団は均一である。幾つかの実施形態において、多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の集団は工程(ii)の前に色素内皮誘導因子(PEDF)の存在下において培養される。幾つかの実施形態において、細胞集合体に由来する細胞は軟骨前駆細胞を製造するために少なくとも2回継代される。幾つかの実施形態において、細胞集合体を由来する細胞は軟骨前駆細胞を製造するために少なくとも3回継代される。幾つかの実施形態において、細胞集合体を由来する細胞は軟骨前駆細胞を製造するために少なくとも4回継代される。幾つかの実施形態において、細胞集合体を由来する細胞は軟骨前駆細胞を製造するために少なくとも5回継代される。幾つかの実施形態において、細胞集合体を由来する細胞は軟骨前駆細胞を製造するために少なくとも6、7又は8回継代される。

#### 【0007】

本明細書には、幾つかの実施形態において、軟骨組織(cartilaginous tissue)を再生する方法が開示され、該方法は、本明細書に開示されるような、細胞の集団を骨又は軟骨の欠損症部位へ移植する工程を含み、ここでは新たな組織が製造される。幾つかの実施形態において、細胞の集団が、必要とする被験体の骨又は軟骨の欠損症部位に移植される。幾つかの実施形態において、新たな組織は、骨又は軟骨の欠損症の組織を統合する。幾つかの実施形態において、新たな組織は、軟骨又は骨の表面を修復する。幾つかの実施形態において、新たな組織はII型コラーゲンを含む。幾つかの実施形態において、新たな組織は、通常の関節軟骨の表面領域、中間領域、及び深い領域の特徴を含む。幾つかの実施形態において、新たな組織の表面領域はラブリシンを含む。幾つかの実施形態において、新たな組織は奇形腫、腫瘍細胞、変形の証拠、異常な構造的な特徴、又は他の不適当な細胞型を含まない。幾つかの実施形態において、前記方法はさらに、血管浸潤を遮断するための薬剤又はデバイスを、骨又は軟骨の欠損症の部位へ投与する工程を含む。

#### 【0008】

本明細書には、幾つかの実施形態において、骨又は軟骨の欠損症を処置する方法が開示され、該方法は、本明細書に開示されるような、細胞の集団を骨又は軟骨の欠損症部位へ移植する工程を含む。幾つかの実施形態において、新たな組織が生成される。幾つかの実施形態において、新たな組織は、骨又は軟骨の欠損症の組織を統合する。幾つかの実施形態において、新たな組織は、軟骨又は骨の表面を修復する。幾つかの実施形態において、新たな組織はⅡⅡ型コラーゲンを含む。幾つかの実施形態において、新たな組織は、通常の関節軟骨の表面領域、中間領域、及び深い領域の特徴を含む。幾つかの実施形態において、新たな組織の表面領域はラブリシンを含む。

#### 【0009】

本明細書には、幾つかの実施形態において、必要とする被験体における軟骨関連の障害を処置する方法が開示され、該方法は、本明細書に開示されるように、細胞の集団を軟骨の損傷部位又は欠損部位へ投与する工程を含む。幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害は、関節軟骨外傷、半月板損傷、軟骨形成 (chondrogenesis) 障害、関節炎、軟骨疾患、軟骨肉腫、軟骨軟化症、多発性軟骨炎、再発性多発性軟骨炎、大腿骨頭すべり症、離断性骨軟骨炎、軟骨異形成症、肋軟骨炎、骨軟骨腫、脊椎症、骨軟骨症 (osteochondroses)、ティーツェ症候群、フランソワの皮膚軟骨角膜ジストロフィー (dermochondrocorneal dystrophy)、骨端異形成症、手根関連性 (carpotarsal) 骨軟骨腫症、軟骨無形成症 (achondropasia)、軟骨石灰化症、遺伝性軟骨種症、軟骨腫、軟骨無発生症、内軟骨種 (enchondromata)、軟骨低形成症 (hypochondroplasia)、及び Keutel 症候群である。幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害は関節炎である。幾つかの実施形態において、関節炎は骨関節炎である。幾つかの実施形態において、骨関節炎は、被験体の膝、指、手首、殿部、脊椎、肩、肘、つま先、足首、又は頸部に生じる。

#### 【0010】

本明細書には、幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害の処置のための薬の製造における、本明細書に開示される細胞集団の使用が開示される。幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害は、関節軟骨外傷、半月板損傷、軟骨形成障害、関節炎、軟骨疾患、軟骨肉腫、軟骨軟化症、多発性軟骨炎、再発性多発性軟骨炎、大腿骨頭すべり症、離断性骨軟骨炎、軟骨異形成症、肋軟骨炎、骨軟骨腫、脊椎症、骨軟骨症、ティーツェ症候群、フランソワの皮膚軟骨角膜ジストロフィー、骨端異形成症、手根関連性骨軟骨腫症、軟骨無形成症、軟骨石灰化症、遺伝性軟骨種症、軟骨腫、軟骨無発生症、内軟骨種、軟骨低形成症、及び Keutel 症候群である。幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害は関節炎である。幾つかの実施形態において、関節炎は骨関節炎である。幾つかの実施形態において、骨関節炎は、被験体の膝、指、手首、殿部、脊椎、肩、肘、つま先、足首、又は頸部に生じる。

#### 【0011】

本明細書には、幾つかの実施形態において、軟骨修復インプラントが開示され、該インプラントは、生体材料と、本明細書に開示されるような細胞の集団を含む。幾つかの実施形態において、生体材料は、コラーゲン、ポリグリコール酸 (PGA)、ポリ乳酸、アルギン酸塩 (例えばカルシウム塩)、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸-ポリグリコール酸のコポリマー、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、ヒト真皮、又はそれらの組み合わせである。

#### 【0012】

幾つかの実施形態において、本明細書には、多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の集団から心筋細胞の集団を生成する方法が開示され、該方法は； i) 請求項1の方法に従って多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の集団を生成する工程； ii) 多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の集団が胚様体を形成するのを可能にする工程； iii) 培養培地に BMP 4 を加える工程； iv) 工程 iii 後の 1 - 3 日間、BMP 4、Activin A 及び FGF b を加える工程； v) 工程 iii 後の 3 - 8 日間に、DKK と VEGF を加える工

10

20

30

40

50

程；及びvi)工程iii後の8-14日間に、DKK、VEGF及びFGFbを加える工程を含む。幾つかの実施形態において、0日目に、約5ng/mlのBMP4が培養培地に加えられる。幾つかの実施形態において、1日目に、約10ng/mlのBMP4、約6ng/mlのActivin A、及び約5ng/mlのFGFbetaが、培養培地に加えられる。幾つかの実施形態において、3日目に、約150ng/mlのDKK及び約5ng/mlのVEGFが、培養培地に加えられる。幾つかの実施形態において、8日目に、約150ng/mlのDKK、約10ng/mlのVEGF、及び約5ng/mlのFGFbetaが、培養培地に加えられる

【図面の簡単な説明】

【0013】

本発明の新規な特徴は、特に、添付の特許請求の範囲内に明記される。本発明の特徴及び利点のより良い理解は、本発明の原理が利用される、具体例を明記する後述の詳細な説明、及び以下の添付図面を参照することによって得られる。

【図1】FGFb(10ng/ml)又はPEDF(100ng/ml)がある状態で、Lentismart OKSMによって遺伝子導入されたヒト軟骨細胞の増殖速度を示す。対照は培養培地(10%のFBSを備えたDMEM/F12)を示す。

【図2】多能性幹細胞マーカーを発現するヒト軟骨細胞由来のiPSCを示す。Oct4、Sox2、Klf4及びc-My cのためのレンチウイルス発現ベクターで、ヒト関節の軟骨細胞を形質転換させた後に、形態学的にヒト胚性幹細胞に似ている2つの細胞株(ChniPSC2とChniPSC3)を広げた。ヒト胚性幹細胞株H7とH9は陽性対照として使用された。免疫細胞化学の結果は、両方のiPSC細胞株、ChniPSC2とChniPSC3がOct4、Rex-1、SSEA4、Tra1-60及びTra1-81の発現について陽性であることを示した。マーカーの発現レベルとiPSCの形態は、H7とH9ヒト胚性幹細胞株と判別不能である。

【図3】II型コラーゲンのmRNA発現によって示されるように、iPSC細胞株(軟骨細胞由来のChIPSCとChIPSC2；ヒト真皮の繊維芽細胞由来のHDFiPSC)のペレット培養における軟骨細胞としての能力を示し、ここでH9はペレット培養において軟骨細胞様になるヒト胚性幹細胞株H9を示す。軟骨細胞に由来するiPSC細胞株は、はるかに多量にII型コラーゲンmRNAを発現した(y軸は対数目盛である)。

【図4】両方の軟骨細胞由来のiPSC細胞株から分化された軟骨前駆細胞を示し、該細胞株は、ウサギ膝ヘインビボ移植を行って8週間後において、軟骨欠損症部位を再生した組織で充填することができる。関節組織における欠損は、グリコサミノグリカンに関して(サフラニンO染色によって)陽性に染色される組織で充填されるようになった。

【発明を実施するための形態】

【0014】

軟骨は、耳、鼻、気管、関節及び椎間板において形成される。外傷(関節軟骨の損傷など)によって、又は加齢に関連する疾患(骨関節炎など)、炎症性疾患(関節リウマチなど)、腫瘍の手術の後の大型の軟骨欠損、及び先天性異常によって軟骨が損なわれる場合、歩行のような通常の日常活動が苦痛になる及び弱くなるほど、日常生活は著しく損なわれる。

【0015】

本明細書には、特定の実施形態において、多数の骨髄提供者から間葉系幹細胞を得ることなしにヒト軟骨細胞を培養する方法が開示される。この方法は、研究、医薬開発、及び、軟骨欠損症関連疾患及び障害の処置管理における使用のための軟骨細胞の供給のために使用されてもよい。さらに本明細書には、特定の実施形態において、生成された軟骨細胞を使用する軟骨治療材料が開示される。

【0016】

本明細書には、幾つかの実施形態において、軟骨細胞の集団から多能性細胞又は分化多能性細胞の集団を生成する方法が開示され、該方法は：a)軟骨細胞の集団においてOct3/4、Sox2、Klf4、及びc-My cの1以上の発現を導く工程；及びb)多

10

20

30

40

50

能性細胞又は分化多能性細胞の集団を製造するために、色素内皮誘導因子（P E D F）の存在下で軟骨細胞を培養する工程を含む。幾つかの実施形態において、前記方法は、O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、及びc - M y cの発現を導くための1以上の発現ベクターを、軟骨細胞の集団に導入する工程を更に含む。幾つかの実施形態において、1以上の発現ベクターは、レトロウイルス発現ベクター、レンチウイルス発現ベクター、アデノ随伴ウイルス発現ベクター、又はアデノウイルス発現ベクターである。幾つかの実施形態において、1以上の発現ベクターは、選択マーカーを含む。幾つかの実施形態において、多能性細胞又は分化多能性幹細胞は、O c t 4、R e x - 1、S S E A 4、T r a 1 - 6 0、及びT r a 1 - 8 1から成る群から選択された2以上の遺伝子を発現する。幾つかの実施形態において、軟骨細胞は、成人のヒトに由来する。

10

#### 【0017】

本明細書には、幾つかの実施形態において、多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の集団から軟骨細胞の集団を生成する方法が開示され、該方法は：i）本明細書に開示される方法に従って多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の集団を生成する工程；i i）細胞集合体を製造するために多能性幹細胞のコロニー又は分化多能性幹細胞のコロニーを機械的に切開する工程；i i i）集合体由来の細胞を製造するために、集密度まで、組織培養容器において細胞集合体を培養する工程；i v）軟骨前駆細胞を製造するために培養において少なくとも1回、集合体由来の細胞を継代する工程；及びv）三次元培養において軟骨前駆細胞を培養する工程を含み；前記方法は、胚様体の形成を含まない。幾つかの実施形態において、集合体由来の細胞は少なくとも2回継代される。幾つかの実施形態において、集合体由来の細胞は少なくとも3回継代される。幾つかの実施形態において、集合体由来の細胞は少なくとも4回継代される。幾つかの実施形態において、集合体由来の細胞は少なくとも5回継代される。幾つかの実施形態において、集合体由来の細胞は少なくとも6回、7回、又は8回継代される。幾つかの実施形態において、三次元培養は、T G F - 3を含む。幾つかの実施形態において、三次元培養はB M P 2を含む。幾つかの実施形態において、細胞集合体の生産プロセスは多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の酵素による消化を含まない。幾つかの実施形態において、三次元培養は、三次元マトリックスを含む。幾つかの実施形態において、三次元マトリックスは、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブリン、ヒアルロン酸、ポリ-D-ラクチド、ポリ-L-ラクチド、ポリ-DL-ラクチド、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ヒドロキシアパタイト、リン酸カルシウム、アテロコラーゲン、フィブリン、アルギン酸塩、寒天、及び/又はゼラチンを含む。幾つかの実施形態において、三次元マトリックスはコラーゲンを含む。幾つかの実施形態において、コラーゲンは架橋結合される。幾つかの実施形態において、コラーゲンは可溶化される。幾つかの実施形態において、三次元マトリックスはプロテオグリカンを含む。幾つかの実施形態において、組織培養処理した容器はプラスチックである。幾つかの実施形態において、組織培養処理した容器はポリスチレンである。

20

30

#### 【0018】

本明細書には、幾つかの実施形態において、人工多能性幹（i P S）細胞の集団が開示され、ここでi P S細胞は軟骨細胞の集団に由来する。幾つかの実施形態において、軟骨細胞の集団は、生きたドナーから得た後に12回で以下継代される。幾つかの実施形態において、軟骨細胞は、生きたドナーから得た後に4回以下で継代される。幾つかの実施形態において、i P S細胞の集団は、由来する軟骨細胞に類似するDNA低メチル化特性及びDNA過剰メチル化特性を持つ。幾つかの実施形態において、i P S細胞は、O c t 4、R e x - 1、S S E A 4、T r a 1 - 6 0、及びT r a 1 - 8 1から成る群から選択された2以上の遺伝子を発現する。幾つかの実施形態において、i P S細胞は軟骨細胞の集団においてO c t 3 / 4、S o x 2、及びK l f 4の1以上の発現を導く工程を含む方法によって生成される。幾つかの実施形態において、O c t 3 / 4、S o x 2、及びK l f 4の発現を導く工程は、O c t 3 / 4ポリペプチド、S o x 2ポリペプチド、及びK l f 4ポリペプチドの発現のために1以上の発現ベクターを軟骨細胞に導入する工程を含む。

40

50

幾つかの実施形態において、1以上の発現ベクターはレトロウイルス発現ベクター、レンチウイルス発現ベクター、アデノ随伴ウイルス発現ベクター、又はアデノウイルス発現ベクターである。幾つかの実施形態において、1以上の発現ベクターは、レンチウイルス発現ベクターである。幾つかの実施形態において、iPS細胞の集団は、約20%未満のアポトーシス性である。幾つかの実施形態において、細胞は、約10%未満のアポトーシス性である。幾つかの実施形態において、細胞は、約9%未満のアポトーシス性、約8%未満のアポトーシス性、約7%未満のアポトーシス性、約6%未満のアポトーシス性、約5%未満のアポトーシス性、約4%未満のアポトーシス性、約3%未満のアポトーシス性、約2%未満のアポトーシス性、又は約1%未満のアポトーシス性である。

#### 【0019】

幾つかの実施形態において、本明細書には、この細胞の集団は、次の工程を含むプロセスにより製造される細胞の集団が開示される：(i) Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Mycの発現を導くことにより軟骨細胞の集団から多能性細胞又は分化多能性細胞の集団を生成して、多能性細胞又は分化多能性細胞の集団を製造する工程；ii) 細胞集合体を製造するために多能性細胞又は分化多能性細胞のコロニーを機械的に切開する工程；iii) 軟骨前駆細胞を製造するために培養において少なくとも1回、細胞を継代する工程；及びiv) 三次元培養において軟骨前駆細胞を培養する工程。幾つかの実施形態において、細胞の集団は均一である。幾つかの実施形態において、多能性細胞又は分化多能性細胞の集団は工程(ii)の前に色素内皮誘導因子(PEDF)の存在下において培養される。幾つかの実施形態において、細胞集合体に由来する細胞は少なくとも2回継代される。幾つかの実施形態において、細胞集合体に由来する細胞は少なくとも3回継代される。幾つかの実施形態において、細胞集合体に由来する細胞は少なくとも4回継代される。幾つかの実施形態において、細胞集合体に由来する細胞は少なくとも5回継代される。幾つかの実施形態において、細胞集合体に由来する細胞は少なくとも6、7又は8回継代される。

#### 【0020】

本明細書には、幾つかの実施形態において、軟骨組織を再生する方法が開示され、該方法は、本明細書に開示される方法により製造されるように、細胞の集団を骨又は軟骨の欠損症部位に移植する工程を含み、ここで、新たな軟骨組織が作られる。幾つかの実施形態において、細胞の集団は、必要とする被験体の骨又は軟骨の欠損症部位に移植される。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織は、骨又は軟骨の欠損症の組織を統合する。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織は、軟骨又は骨の表面を修復する。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織はII型コラーゲンを含む。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織は、通常の関節軟骨の表面領域、中間領域、及び深い領域の特徴を含む。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織の表面領域はラブリシンを含む。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織は、奇形腫、腫瘍細胞、変形の証拠、異常な構造的特徴、又は他の不適切な細胞型を含まない。幾つかの実施形態において、前記方法はさらに、血管浸潤を遮断するための薬剤又はデバイスを、骨又は軟骨欠損症の部位に投与する工程を含む。

#### 【0021】

本明細書には、幾つかの実施形態において、骨又は軟骨の欠損症を処置する方法が開示され、該方法は、本明細書に開示される方法により作られる細胞の集団を、骨又は軟骨の欠損症部位に移植する工程を含む。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織が生成される。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織は、骨又は軟骨の欠損症の組織を統合する。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織は、軟骨又は骨の表面を修復する。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織はII型コラーゲンを含む。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織は、通常の関節軟骨の表面領域、中間領域、及び深い領域の特徴を含む。幾つかの実施形態において、新たな組織の表面領域はラブリシンを含む。

#### 【0022】

本明細書には、幾つかの実施形態において、必要とする被験体の軟骨関連の障害を処置

10

20

30

40

50



する方法が開示され、該方法は、本明細書に開示される方法により製造されるような細胞の集団を、軟骨損傷又は欠損症の部位に投与する工程を含む。幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害は、関節軟骨外傷、半月板損傷、軟骨形成障害、関節炎、軟骨疾患、軟骨肉腫、軟骨軟化症、多発性軟骨炎、再発性多発性軟骨炎、大腿骨頭すべり症、離断性軟骨炎、軟骨異形成症、肋軟骨炎、骨軟骨腫、脊椎症、骨軟骨症）、ティーツェ症候群、フランソワの皮膚軟骨角膜ジストロフィー、骨端異形成症、手根関連性骨軟骨腫症、軟骨無形成症、軟骨石灰化症、遺伝性軟骨種症、軟骨腫、軟骨無発生症、内軟骨種、軟骨低形成症、及びK e u t e l 症候群である。幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害は関節炎である。幾つかの実施形態において、関節炎は骨関節炎である。幾つかの実施形態において、骨関節炎は、被験体の膝、指、手首、殿部、脊椎、肩、肘、つま先、足首、又は頸部に生じる。

10

#### 【0023】

本明細書には、幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害の処置のために本明細書に開示される細胞集団の使用が開示される。幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害は、関節軟骨外傷、半月板損傷、軟骨形成障害、関節炎、軟骨疾患、軟骨肉腫、軟骨軟化症、多発性軟骨炎、再発性多発性軟骨炎、大腿骨頭すべり症、離断性軟骨炎、軟骨異形成症、肋軟骨炎、骨軟骨腫、脊椎症、骨軟骨症）、ティーツェ症候群、フランソワの皮膚軟骨角膜ジストロフィー、骨端異形成症、手根関連性骨軟骨腫症、軟骨無形成症、軟骨石灰化症、遺伝性軟骨種症、軟骨腫、軟骨無発生症、内軟骨種、軟骨低形成症、及びK e u t e l 症候群である。幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害は関節炎である。幾つか

20

#### 【0024】

本明細書には、幾つかの実施形態において、軟骨修復インプラントが開示され、該インプラントは、生体材料基質と、本明細書に開示されるような細胞の集団を含む。幾つかの実施形態において、生体材料基質は、コラーゲン、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ乳酸、アルギン酸塩(例えばカルシウム塩)、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸-ポリグリコール酸のコポリマー、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、ヒト真皮、又はそれらの組み合わせである。

#### 【0025】

幾つかの実施形態において、本明細書には、多能性細胞又は分化多能性細胞の集団から心筋細胞の集団を生成する方法が開示され、該方法は；i) 本明細書に開示される方法に従って多能性細胞又は分化多能性細胞の集団を生成する工程；ii) 多能性細胞又は分化多能性細胞の集団が培養培地において胚様体を形成するのを可能にする工程；iii) 培養培地にBMP4を加える工程(0日目)；iv) 工程iii後の1-3日間、BMP4、Activin A及びFGFbを加える工程；v) 工程iii後の3-8日間、DKKとVEGFを加える工程；及びvi) 工程iii後の8-14日間、DKK、VEGF及びFGFbを加える工程を含む。幾つかの実施形態において、0日目に、約5 ng/mlのBMP4が、培養培地に加えられる。幾つかの実施形態において、1日目に、約10 ng/mlのBMP4、約6 ng/mlのActivin A、及び約5 ng/mlのFGFbetaが、培養培地に加えられる。幾つかの実施形態において、3日目に、約150 ng/mlのDKK及び約5 ng/mlのVEGFが、培養培地に加えられる。幾つかの実施形態において、8日目に、約150 ng/mlのDKK、約10 ng/mlのVEGF、及び約5 ng/mlのFGFbetaが、培養培地に加えられる。

30

40

#### 【0026】

<軟骨細胞からの人工多能性幹細胞の生成>

本明細書には、軟骨細胞の集団から多能性細胞又は分化多能性細胞を生成する方法及び組成物が開示される。

#### 【0027】

本明細書には、幾つかの実施形態において、軟骨細胞の集団から多能性細胞又は分化多

50

能性細胞の集団を生成する方法が開示され、該方法は：a) 軟骨細胞の集団の中でOct 3 / 4 ポリペプチド、Sox 2 ポリペプチド、Klf 4 ポリペプチド、及びc - Myc ポリペプチドの発現を導く工程；及び、b) 色素内皮誘導因子(PEDF)の存在下で培養する工程を含む。幾つかの実施形態において、前記方法は、Oct 3 / 4 ポリペプチド、Sox 2 ポリペプチド、Klf 4 ポリペプチド、及びc - Myc ポリペプチドの発現のために、1以上の発現ベクターにより軟骨細胞の集団を変形させる工程を更に含む。幾つかの実施形態において、1以上の発現ベクターは各々、レトロウイルス発現ベクター、レンチウイルス発現ベクター、アデノ随伴ウイルス発現ベクター、及びアデノウイルス発現ベクターから独立して選択される。幾つかの実施形態において、1以上の発現ベクターの少なくとも1つは、レンチウイルス発現ベクターである。幾つかの実施形態において、1以上の発現ベクターの少なくとも1つは、選択マーカーを含む。幾つかの実施形態において、多能性細胞又は分化多能性細胞は、Oct 4、Rex - 1、SSEA 4、Tra 1 - 60、及びTra 1 - 81から成る群から選択された2以上の遺伝子を発現する。幾つかの実施形態において、軟骨細胞は、成人のヒトに由来する。幾つかの実施形態において、軟骨細胞は、子供のヒト又は若年者のヒトに由来する。

#### 【0028】

幾つかの実施形態において、本明細書には人工多能性幹細胞の集団が開示され、iPS細胞は軟骨細胞の集団に由来する。幾つかの実施形態において、iPS細胞は、生きたドナーから得た後に12回以下で継代した軟骨細胞から誘発された。幾つかの実施形態において、iPS細胞は、生きたドナーから得た後に10回以下で継代した軟骨細胞から誘発された。幾つかの実施形態において、iPS細胞は、生きたドナーから得た後に8回以下で継代した軟骨細胞から誘発された。幾つかの実施形態において、iPS細胞は、生きたドナーから得た後に6回以下で継代した軟骨細胞から誘発された。幾つかの実施形態において、iPS細胞は、生きたドナーから得た後に4回以下で継代した軟骨細胞から誘発された。幾つかの実施形態において、iPS細胞は、生きたドナーから得た後に2回以下で継代した軟骨細胞から誘発された。幾つかの実施形態において、iPS細胞は、生きたドナーから得た後に1回で継代した軟骨細胞から誘発された。幾つかの実施形態において、iPS細胞は、生きたドナーから得た後に継代されなかった軟骨細胞から誘発された。

#### 【0029】

幾つかの実施形態において、幹細胞の集団は、由来する軟骨細胞に類似するDNA低メチル化特性及びDNA過剰メチル化特性を保持する。幾つかの実施形態において、多能性細胞は、Oct 4、Rex - 1、SSEA 4、Tra 1 - 60、及びTra 1 - 81から成る群から選択された2以上の遺伝子を発現する。幾つかの実施形態において、人工多能性幹細胞の集団は、Oct 3 / 4 ポリペプチド、Sox 2 ポリペプチド、及びKlf 4 ポリペプチドの発現を導く工程を含む方法によって、生成される。幾つかの実施形態において、Oct 3 / 4、Sox 2、及びKlf 4の発現を導く工程は、Oct 3 / 4 ポリペプチド、Sox 2 ポリペプチド、及びKlf 4 ポリペプチドの発現を導くために1以上の発現ベクターを軟骨細胞に変形させる工程を含む。幾つかの実施形態において、1以上の発現ベクターは各々、レトロウイルス発現ベクター、レンチウイルス発現ベクター、アデノ随伴ウイルス発現ベクター、及びアデノウイルス発現ベクターから独立して選択される。幾つかの実施形態において、1以上の発現ベクターの少なくとも1つは、レンチウイルス発現ベクターである。

#### 【0030】

幾つかの実施形態において、軟骨細胞は、ヒト被験体に由来する。幾つかの実施形態において、軟骨細胞は、成人のヒトに由来する。幾つかの実施形態において、軟骨細胞は、子供のヒト又は若年者のヒトに由来する。幾つかの実施形態において、軟骨細胞は、非ヒト被験体(例えば非ヒト哺乳動物)に由来する。非ヒト哺乳動物の例は、限定されないが、非ヒト霊長類(例えば、類人猿、サル、ゴリラ)、げっ歯類(例えば、マウス、ラット)、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、イヌ、ネコ、又はウサギを含む。

#### 【0031】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態において、軟骨細胞の集団から多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の集団を生成する方法は、一連のポリペプチド誘導因子の発現を導く工程を更に含む。ポリペプチド誘導因子の発現を導く方法は、限定されないが、ポリペプチド誘導因子をコード化する発現ベクターを導入する工程、細胞に外因性の精製した誘導因子数ポリペプチドを導入する工程、又は、細胞を、ポリペプチド誘導因子をコード化する内因性遺伝子の発現を誘発する非自然発生の試薬と接触させる工程を含む。

【 0 0 3 2 】

幾つかの実施形態において、誘発される細胞は、誘発手順前の期間に培養される。代替的に、幾つかの実施形態において、誘発される細胞は、前培養期間無しで、誘発及び選択のプロセスにおいて直接使用される。

10

【 0 0 3 3 】

幾つかの実施形態において、異なる細胞培地が、誘発及び選択のプロセスの前、間、及びその後の異なる時点で使用される。

【 0 0 3 4 】

幾つかの実施形態において、選択プロセスは、陽性選択、陰性選択、又はその両方の 1 以上のラウンド ( r o u n d s ) を含む。

【 0 0 3 5 】

幾つかの実施形態において、一連の誘導因子ポリペプチドは、O c t 3 / 4 ポリペプチド、S o x 2 ポリペプチド、K l f 4 ポリペプチド、及び c - M y c ポリペプチドの 1 以上を含む幾つかの実施形態において、一連の誘導因子ポリペプチドは c - M y c ポリペプチドを含まない。幾つかの実施形態において、誘導因子ポリペプチドのアミノ酸配列は、本明細書に記載されるように、因子ポリペプチドの非自然発生のアミノ酸配列変異体であるが、にもかかわらず、該変異体は、誘導因子ポリペプチドのアミノ酸配列に対し機能的又は機構的に相同する。

20

【 0 0 3 6 】

幾つかの実施形態において、一連の誘導因子ポリペプチドは、O c t 3 4 ポリペプチド、S o x 2 ポリペプチド、及び K l f 4 ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態において、単一の誘導因子ポリペプチドが誘導に使用され、O c t 3 / 4 又は S o x 2 から選択される。幾つかの実施形態において、一連の誘導因子ポリペプチドは、2 つの誘導因子ポリペプチド、例えば、O c t 3 / 4 及び S o x 2 を含む。幾つかの実施形態において、一連の誘導因子ポリペプチドは、O c t 3 / 4 ポリペプチド、S o x 2 ポリペプチド、K l f 4 ポリペプチド、及び c - M y c ポリペプチドから選択される 3 つの誘導因子ポリペプチドを含む

30

【 0 0 3 7 】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示される方法は、追加の誘導因子ポリペプチドの導かれた発現を更に含む。幾つかの実施形態において、追加の誘導因子ポリペプチドは、限定されないが、N a n o g、T E R T、L I N 2 8、C Y P 2 6 A 1、G D F 3、F o x D 3、Z f p 4 2、D n m t 3 b、E c a t 1、及び T c 1 1 のポリペプチドを含む。

【 0 0 3 8 】

40

幾つかの実施形態において、本明細書に開示される方法は、少なくとも約 7 日から少なくとも約 4 0 日の期間 (例えば、8 日、9 日、1 0 日、1 1 日、1 2 日、1 3 日、1 4 日、1 5 日、1 6 日、1 7 日、1 8 日、1 9 日、2 0 日、2 1 日、2 5 日、3 0 日、3 3 日、3 7 日、4 0 日、又は 4 5 日)、誘導因子ポリペプチドの発現を導く工程を含む。

【 0 0 3 9 】

幾つかの実施形態において、軟骨細胞の集団からの細胞に多分化能を誘発する効率は、最初に培養した親の軟骨細胞の総数の少なくとも約 0 . 0 0 1 % から少なくとも約 0 . 1 % まで、例えば 0 . 0 0 2 %、0 . 0 0 3 4 %、0 . 0 0 4 %、0 . 0 0 5 %、0 . 0 0 6 5 %、0 . 0 0 7 %、0 . 0 0 8 %、0 . 0 1 %、0 . 0 4 %、0 . 0 6 %、0 . 0 8 %、又は 0 . 0 9 % である。時々、ドナーの年齢、組織の起源、又は培養条件に依存して

50

、より高い効率を達成してもよい。

#### 【0040】

幾つかの実施形態において、誘導因子ポリペプチドの導かれた発現は、誘導因子ポリペプチドをコード化する1以上の哺乳動物の発現ベクターを、軟骨細胞の集団に変形する工程を含む。幾つかの実施形態において、誘導因子ポリペプチドをコード化する遺伝子は、外来遺伝子として細胞に導入される。幾つかの実施形態において、外来遺伝子は、宿主細胞及びその後代のゲノムに統合される。幾つかの実施形態において、外来遺伝子は、宿主細胞とその後代におけるエピゾームの状態を持続する。

#### 【0041】

幾つかの実施形態において、誘導因子ポリペプチドは、輸送蛋白質アミノ酸配列（例えば、VP22ポリペプチド）を備えたフレームにおいて遺伝学的に融合される。幾つかの実施形態において、ベクトル符号化誘導因子-VP22融合ポリペプチドの使用により、本明細書に記載される誘導法で形質移入した発現ベクターの機能的な効率が増加する。

#### 【0042】

適切な哺乳動物の発現ベクターの例は、限定されないが、組み替え型ウイルス、プラスミドなどの核酸ベクター、バクテリア人工染色体、酵母人工染色体、ヒト人工染色体、トランスポゾンベクター、cDNA、cRNA、及びPCR生成物発現カセットを含む。IFの発現を促進するのに適切なプロモータの例は、限定されないが、レトロウイルスLTR要素；CMV、CAG、HSV1-TK、SV40、EF-1、 $\alpha$ -アクチン；PGK、及びTet-作動体(operator element)を含むものなどの誘導プロモータを含む。幾つかの実施形態において、哺乳動物発現ベクターの1以上は、形質移入された又は感染した細胞の同定又は選択を容易にする標識遺伝子をコード化する、核酸配列を更に含む。標識遺伝子の例は、限定されないが、蛍光タンパク質をコード化する遺伝子（例えばEGFP、DS-Red、単量体Orange、YFP、及びCFP）；及び、抗生物質(antibiotic)耐性遺伝子（例えばneo<sup>R</sup>遺伝子、及びブラストサイジン耐性遺伝子）を含む。

#### 【0043】

幾つかの実施形態において、前記方法は、多能性幹細胞を特徴づける多くの特性（例えば、形態学的特徴、誘導因子の導かれた発現中の遺伝子発現）に関して、細胞を選択する及び/又はスクリーンする工程を更に含む。幾つかの実施形態において、これらのスクリーニング基準を満たす誘導細胞が、サブクローン化され、且つ広げられる。

#### 【0044】

幾つかの実施形態において、誘導因子ポリペプチドの発現を導いた後、1以上の増殖因子（色素内皮誘導因子(PEDF)；線維芽細胞成長因子(FGF)-2；塩基性FGF(bFGF)；血小板由来増殖因子(PDGF)、上皮成長因子(EGF)；インスリン様増殖因子(IGF)；IGF II；又はインスリンなど）が、培地に含まれる。細胞培養培地を補充するために使用可能な他の増殖因子は、限定されないが、形質転換増殖因子-1(TGF-1)、アクチビンA、ノギン、脳由来神経栄養因子(BDNF)、神経成長因子(NGF)、ニュートロフィン(NT)-1、NT-2、又はNT-3の1以上を含む。幾つかの実施形態において、PEDFは培養培地中に含まれる。幾つかの実施形態において、PEDFは、誘導細胞の集団の過剰増殖を妨げる。幾つかの実施形態において、増殖因子の濃度は、約4 ng/ml乃至約50 ng/ml、例えば、約2 ng/ml、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、6 ng/ml、7 ng/ml、8 ng/ml、10 ng/ml、12 ng/ml、14 ng/ml、15 ng/ml、17 ng/ml、20 ng/ml、25 ng/ml、30 ng/ml、35 ng/ml、40 ng/ml、45 ng/ml、又は50 ng/mlである。増殖因子の濃度はまた、約4 ng/ml乃至約10 ng/ml；約20 ng/ml乃至約4 ng/ml；約10 ng/ml乃至約30 ng/ml；約5 ng/ml乃至約40 ng/ml；又は約10 ng/ml乃至約50 ng/mlでもよい。他の場合において、より高濃度の増殖因子が使用されてもよく、例えば、約50 ng/ml乃至約200 ng/ml；又は約75 ng/ml乃至

10

20

30

40

50

約  $150 \text{ ng/ml}$  である。幾つかの実施形態において、約  $50 \text{ ng/ml}$  乃至約  $200 \text{ ng/ml}$  の P E D F は、誘導後の培地に加えられる。幾つかの実施形態において、約  $100 \text{ ng/ml}$  の P E D F は、誘導後の培地に加えられる。

#### 【0045】

幾つかの実施形態において、候補である分化多能性細胞又は多能性細胞のコロニーを識別するための形態学的特徴は、周囲の細胞と比較してより丸くて小さな細胞の大きさ、及び格と細胞質の高い比率から選択される。幾つかの実施形態において、候補である誘導細胞の大きさは、約  $5 \mu\text{m}$  乃至約  $10 \mu\text{m}$  ; 約  $5 \mu\text{m}$  乃至約  $15 \mu\text{m}$  ; 約  $5 \mu\text{m}$  乃至約  $30 \mu\text{m}$  ; 約  $10 \mu\text{m}$  乃至約  $30 \mu\text{m}$  ; 又は約  $20 \mu\text{m}$  乃至約  $30 \mu\text{m}$  である。幾つかの実施形態において、核と細胞質の高い比率は、約  $1.5 : 1$  乃至約  $10 : 1$ 、例えば、約  $1.5 : 1$  ; 約  $2 : 1$  ; 約  $3 : 1$  ; 約  $4 : 1$  ; 約  $5 : 1$  ; 約  $7 : 1$  ; 約  $8 : 1$  ; 約  $9.5 : 1$  ; 又は約  $10 : 1$  である。幾つかの実施形態において、ヒト又は霊長類に由来する多能性細胞又は分化多能性細胞のクローンは、マウス胚性幹細胞に対して板状形態 ( f l a t t e n e d m o r p h o l o g y ) を表示する。幾つかの実施形態において、誘導細胞クローンを識別するための別の形態学的特徴は、親の細胞の間 (例えば、軟骨細胞間) にある空間内の小さな単分子層コロニーの形態である。

10

#### 【0046】

幾つかの実施形態において、誘導因子発現が導かれる細胞は、組織培養グレードのプラスチック上に直接播種され、培養される。代替的に、細胞は、コーティングした基体 (例えば、フィブロネクチン、ゼラチン、マトリゲル (商標) ( B D B i o s c i e n c e )、コラーゲン、又はラミニンでコーティングした基体) 上に播種され、培養される。幾つかの場合において、未処理のペトリ皿を使用してもよい。適切な細胞培養容器は、例えば、 $35 \text{ mm}$ 、 $60 \text{ mm}$ 、 $100 \text{ mm}$ 、及び  $150 \text{ mm}$  の細胞培養皿、6 - ウェルの細胞培養プレート、及び他の大きさの等しい細胞培養容器を含む。幾つかの実施形態において、細胞はフィーダー細胞で培養される。例えば、細胞は、M E F (例えば、照射された M E F 又はマイトマイシンで処理した M E F ) の層、又はカーペットの上で培養されてもよい。

20

#### 【0047】

幾つかの実施形態において、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞は、後成的な記憶 ( e p i g e n e t i c m e m o r y ) を保持する。幾つかの実施形態において、本明細書に開示される方法に従って、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞の集団が、由来する軟骨細胞に類似する D N A 低メチル化特性及び D N A 過剰メチル化特性を保持する。幾つかの実施形態において、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞の D N A メチル化特性は、繊維芽細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞の D N A メチル化特性とは異なる。幾つかの実施形態において、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞の D N A メチル化パターンは、軟骨細胞及び胚性幹細胞のものより多く重複し、繊維芽細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞のものとはあまり重複しない。

30

#### 【0048】

幾つかの実施形態において、軟骨細胞 ( c h o n d r o g e n i c ) 前駆物質及び軟骨細胞のマーカーは、他の細胞型に由来する多能性細胞の分化多能性細胞と比較して、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞においてより多く発現される。幾つかの実施形態において、軟骨細胞前駆物質と軟骨細胞のマーカーは、カプテシン B、軟骨細胞発現タンパク質 - 68 ( C E P - 68 )、X 型コラーゲン、I I 型コラーゲン、アグリカン、コラーゲン 9、Y K L - 39、Y K L - 40、オステオネクチン、S o x 9、アネキシン A 6、C D 44、C D 151、I V 型コラーゲン、C R T A C 1、D S P G 3、F o x C 1、F o x C 2、I B S P / サイアロプロテイン I I、I T M 2 A、マトリリン - 3、マトリリン - 4、M I A、O C I L、O t o r a p l i n、S o x 5、及び U R B を含む。幾つかの実施形態において、軟骨細胞由来の多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞は、本明細書に開示される方法により、F A C S 分析によって C D 73 に関して 20 % 未満の陽性である。幾つかの実施形態において、軟骨細胞由来の多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞は

40

50

、本明細書に開示される方法により、FACS分析によってCD73に関して15%未満の陽性である。幾つかの実施形態において、軟骨細胞由来の多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞は、本明細書に開示される方法により、FACS分析によってCD73に関して10%未満の陽性である。幾つかの実施形態において、軟骨細胞由来の多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞は、本明細書に開示される方法により、FACS分析によってCD73に関して5%未満の陽性である。幾つかの実施形態において、軟骨細胞由来の多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞は、本明細書に開示される方法により、内因性Oct3/4の発現に関して陽性である。幾つかの実施形態において、軟骨細胞由来の多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞は、本明細書に開示される方法により、ビメンチンに対する免疫反応力を欠いている。

10

#### 【0049】

幾つかの実施形態において、軟骨細胞由来の多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞は、本明細書に開示される方法によって、以下の多能性幹細胞のマーカーの少なくとも1つを発現する：ABCG2、cripto、CD9、FoxD3、Connexin43、Connexin45、Oct4、Sox2、Nanog、hTERT、UTF-1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、Tral-60、Tral-81。幾つかの実施形態において、多能性幹細胞のための他のマーカーは、CD133、CD24、アルカリフォスファターゼ、AFP、BMP-4、プラキウリ、CD30、TDGF-1、GATA-4、GCTM-2、Genesis、生殖細胞核因子(Germ cell nuclear factor)、HNF-4、N-CAM、Pax6、SCF、及びテロメラゼを含む。

20

#### 【0050】

幾つかの実施形態において、軟骨細胞由来の多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞は、本明細書に開示される方法により、約20%未満のアポトーシス性である。幾つかの実施形態において、細胞は、約10%未満のアポトーシス性である。幾つかの実施形態において、細胞は、約9%未満のアポトーシス性、約8%未満のアポトーシス性、約7%未満のアポトーシス性、約6%未満のアポトーシス性、約5%未満のアポトーシス性、約4%未満のアポトーシス性、約3%未満のアポトーシス性、約2%未満のアポトーシス性、又は約1%未満のアポトーシス性である。フローサイトメトリー、蛍光分光法、及びタネル染色(Tdt-Utp nick-end labeling)(TUNNEL又はTUNEL)など方法を用いて、与えられた細胞培養におけるアポトーシスの頻度を評価する。

30

#### 【0051】

<軟骨細胞由来の人工多能性幹細胞からの軟骨細胞の生成>

本明細書には、幾つかの実施形態において、多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の集団から軟骨細胞の集団を生成する方法が開示され、該方法は、i)本明細書に開示される方法に従って多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の集団を生成する工程；ii)細胞集合体を作るために多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞のコロニーを機械的に切開する工程；iii)集合体由来の細胞を作るために、培養密度まで、組織培養で処理した容器において細胞集合体を培養する工程；iv)軟骨前駆細胞を作るために培養物において少なくとも1度、集合体由来の細胞を継代する工程；及びiv)三次元培養において軟骨前駆細胞を培養する工程を含み、前記方法は、胚様体の形成を含まない。幾つかの実施形態において、集合体由来の細胞は少なくとも2回継代される。幾つかの実施形態において、集合体由来の細胞は少なくとも3回継代される。幾つかの実施形態において、集合体由来の細胞は少なくとも4回継代される。幾つかの実施形態において、集合体由来の細胞は少なくとも5回継代される。幾つかの実施形態において、集合体由来の細胞は少なくとも6回、7回、又は8回継代される。幾つかの実施形態において、三次元培養は、TGF-3を含む。幾つかの実施形態において、三次元培養はBMP2を含む。幾つかの実施形態において、細胞集合体を作るプロセスは、多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の酵素消化を含まない。幾つかの実施形態において、三次元培養は三次元マトリックスを含む。幾つかの実施形態において、三次元マトリックスは、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブリン、ヒ

40

50

アルロン酸、ポリ-D-ラクチド、ポリ-L-ラクチド、ポリ-DL-ラクチド、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ヒドロキシアパタイト、リン酸カルシウム、アテロコラーゲン、フィブリン、アルギン酸塩、寒天、及び/又はゼラチンを含む。幾つかの実施形態において、三次元マトリックスはコラーゲンを含む。幾つかの実施形態において、コラーゲンは架橋結合される。幾つかの実施形態において、コラーゲンは可溶化する。幾つかの実施形態において、三次元マトリックスはプロテオグリカンを含む。幾つかの実施形態において、組織培養で処理した容器はプラスチックである。幾つかの実施形態において、組織培養で処理した容器はポリスチレンである。

#### 【0052】

幾つかの実施形態において、軟骨細胞由来の多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞は、本明細書に開示される方法により、少なくとも1回継代される。幾つかの実施形態において、細胞は少なくとも2回継代される。幾つかの実施形態において、細胞は少なくとも3回継代される。幾つかの実施形態において、細胞は少なくとも4回継代される。幾つかの実施形態において、細胞は少なくとも5回継代される。幾つかの実施形態において、細胞は少なくとも6回継代される。幾つかの実施形態において、細胞は少なくとも7回継代される。幾つかの実施形態において、細胞は少なくとも8回継代される。幾つかの実施形態において、細胞は少なくとも9回継代される。幾つかの実施形態において、細胞は少なくとも10回継代される。幾つかの実施形態において、細胞は少なくとも12回継代される。幾つかの実施形態において、細胞は少なくとも15回継代される。幾つかの実施形態において、細胞は少なくとも20回継代される。幾つかの実施形態において、細胞は少なくとも25回継代される。幾つかの実施形態において、細胞は少なくとも30回継代される。幾つかの実施形態において、細胞は少なくとも35回継代される。

#### 【0053】

幾つかの実施形態において、本明細書には、細胞の集団が開示され、この細胞の集団は、次の工程を含むプロセスにより作られる：i) 軟骨細胞中のOct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Mycの1以上の発現を導くことにより、軟骨細胞の集団から多能性細胞又は分化多能性細胞の集団を生成する工程；ii) 多能性細胞又は分化多能性細胞のコロニーを機械的に切開する工程；iii) 軟骨前駆細胞を作るために培養物において少なくとも1回、細胞を継代する工程；及びiv) 三次元培養において軟骨前駆細胞を置く工程。幾つかの実施形態において、細胞の集団は均一である。幾つかの実施形態において、軟骨前駆細胞を作るために、細胞は少なくとも4回継代される。

#### 【0054】

##### <三次元培養>

幾つかの実施形態において、本明細書に開示される方法による軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞は、軟骨細胞の前駆体(chondrogenic precursors)を形成するために培養中に誘導される。幾つかの実施形態において、本明細書に開示される方法による軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞は、細胞ペレットなどの三次元フォーマットに関連する。幾つかの実施形態において、本明細書に開示される方法による軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞は、単層に関連する。幾つかの実施形態において、三次元フォーマットは、本明細書に開示される方法による軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞の、インビトロの軟骨形成に起因する。幾つかの実施形態において、本明細書に開示された方法による軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞は、例えば、穏やかな遠心分離の下でパックした又はペレット状にした細胞集団として、共に濃縮して培養される。

#### 【0055】

幾つかの実施形態において、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞は、マトリックスゲル材料に埋め込まれる。幾つかの実施形態において、マトリックスゲル材料は、プロテオグリカン、GAG、繊維、及び機能タンパク質の1以上を含む。幾つかの実施形態において、三次元マトリックスゲル材料は、コラーゲンとプロテオグリカンを含む。コラーゲン(例えば、II型コラーゲン、III型コラーゲン、IV型コラーゲン、V型コ

10

20

30

40

50

ラーゲン、V I 型コラーゲン、V I I I 型コラーゲン、I X 型コラーゲン、X 型コラーゲン、又はそれらの混合物)は、特に限定されない。幾つかの実施形態において、マトリックスゲルは、I 型及びI I 型のコラーゲンを含む。幾つかの実施形態において、I I 型コラーゲンが使用される。

【0056】

幾つかの実施形態において、コラーゲンはアテロコラーゲンである。幾つかの実施形態において、コラーゲンは、酵素で加水分解した低分子量コラーゲンである。幾つかの実施形態において、コラーゲンは、ヒト由来のコラーゲン、又は、ウサギ、ウシ、ウマ、又はマウスに由来するコラーゲンである。

【0057】

幾つかの実施形態において、マトリックスゲル材料は、少なくとも1つのプロテオグリカンを含む。幾つかの実施形態において、プロテオグリカンは好ましくは、未決定の ( p e n d i n g ) グリコサミノグリカン ( G A G ) 分子を備えたコア蛋白質から成る。適切な G A G は、例えば、ヒアルロン酸、コンドロイチン - 4 - スルファート、コンドロイチン - 6 - 硫酸塩、デルマタン硫酸塩、ヘパリン硫酸塩、ヘパリン硫酸塩、及びケラタン硫酸塩である。幾つかの実施形態において、G A G 分子は、三糖類リンカー (例えば、G a l G a l X y l - リンカー) を介してコア蛋白質に連結される。典型的なプロテオグリカンは、デコリン、バイグリカン、パーシカン、及びアグリカン含むが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、プロテオグリカンは、ヒアルロン酸分子によって相互に連結する。幾つかの実施形態において、多数のプロテオグリカンは、単一のヒアルロン酸骨格に付けられる。

【0058】

幾つかの実施形態において、コラーゲン対プロテオグリカンの比率は、重量比で約1のコラーゲンに対して約0.3乃至約1.1の範囲にある。幾つかの実施形態において、プロテオグリカンは、約1のコラーゲンに対して約0.5乃至約0.7の範囲にある。

【0059】

幾つかの実施形態において、マトリックスゲル材料は更に、ラミニン、エンタクチン、テネシシンフィブリリン、又はフィブロネクチンなどの糖タンパク質、オステオカルシン ( G I a タンパク質)、オステオネクチン、及び骨シアロタンパク質 ( B S P ) などのシアロタンパク質、オステオポンチン ( O P N )、象牙基質タンパク質 ( d e n t i n m a t r i x p r o t e i n ) - 1 ( D M P 1 )、象牙質シアロリン酸化タンパク質 ( d e n t i n s i a l o p h o s p h o p r o t e i n ) ( D S P P )、及びマトリックス細胞外リン糖タンパク質 ( M E P E )、又はそれらの任意の組み合わせなどの1以上の機能性を提供するタンパク質を含む。幾つかの実施形態において、タンパク質の総量は、ゲルマトリックス材料の全重量に基づいて1 - 90重量%である。

【0060】

軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞のための培地として、制限無しに軟骨細胞又は間葉細胞の通常の培養物に使用される培地と添加剤を使用することが可能である。幾つかの実施形態において、培地は、R P M I 1 6 4 7、R P M I 1 6 4 0、M E M、B M E、5 A、D M 1 2 0、R I T C 8 0 - 7、F 1 2、L - 1 5、M C D B 1 0 4、及び M C D B 1 0 7 から選択される。幾つかの実施形態において、培養培地は更に血清を含む。幾つかの実施形態において、血清の濃度は、1乃至20%の間である。幾つかの実施形態において、血清の濃度は、5乃至15%の範囲にある。幾つかの実施形態において、血清の濃度は、5乃至10%の範囲にある。幾つかの実施形態において、血清は、ウシ血清、ウシ胎仔血清、又はウマ血清である。幾つかの実施形態において、コラーゲンとプロテオグリカンは、前述の予め定めた比率で培地内で混合され、望ましくは、それらがゲル化され三次元構造を形成することが可能な濃度の範囲で使用される。幾つかの実施形態において、コラーゲンの濃度は、0.8乃至2.4重量%及び1.2乃至2.0重量%であり、プロテオグリカンの濃度は、0.4乃至1.0重量%及び0.6乃至1.0重量%である。幾つかの実施形態において、コラーゲンとプロテオグリカンの合計の濃度は、約1.



2乃至3.6重量%、好ましくは約1.8乃至3.0重量%である。

#### 【0061】

幾つかの実施形態において、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞は、軟骨細胞増殖因子の存在下で培養される。幾つかの実施形態において、軟骨細胞増殖因子は、形質転換増殖因子-3(TGF-3)、形質転換増殖因子-1(TGF-1)、インスリン様増殖因子1(IGF-1)、及び塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)から選択される。幾つかの実施形態において、軟骨細胞由来のiPS細胞は、TGF-3の存在下で培養される。幾つかの実施形態において、培養培地はまた、デキサメタゾンと高グルコースを含む。幾つかの実施形態において、軟骨に特異的な遺伝子発現は、TGF-3処置に応じて増大する。幾つかの実施形態において、軟骨に特異的な遺伝子は、2A1型コラーゲンとアグリカンの発現から選択される。

10

#### 【0062】

幾つかの実施形態において、軟骨細胞前駆物質と軟骨細胞のマーカーは、カプテシンB、軟骨細胞発現タンパク質-68(CEP-68)、X型コラーゲン、II型コラーゲン、アグリカン、コラーゲン9、YKL-39、YKL-40、オステオネクチン、Sox9、アネキシンA6、CD44、CD151、IV型コラーゲン、CRTAC1、DSPG3、FoxC1、FoxC2、IBSP/サイアロプロテインII、ITM2A、マトリリン-3、マトリリン-4、MIA、OCIL、Otoraplin、Sox5、及びURBを含む。

#### 【0063】

20

幾つかの実施形態において、本明細書には、細胞の集団が開示され、この細胞の集団は、次の特性を含む：a)細胞の集団の少なくとも75%は、FACS分析によりCD73に対して陽性である；b)細胞の集団の少なくとも75%は、FACS分析によりCD105に対して陽性である；c)ビメンチンに対して免疫陽性である；及び、d)Oct3/4発現のレベルを下げる。幾つかの実施形態において、細胞の集団は均一である。

#### 【0064】

幾つかの実施形態において、細胞は、約20%未満のアポトーシス性である。幾つかの実施形態において、細胞は、約10%未満のアポトーシス性である。幾つかの実施形態において、細胞は、約9%未満のアポトーシス性、約8%未満のアポトーシス性、約7%未満のアポトーシス性、約6%未満のアポトーシス性、約5%未満のアポトーシス性、約4%未満のアポトーシス性、約3%未満のアポトーシス性、約2%未満のアポトーシス性、又は約1%未満のアポトーシス性である。フローサイトメトリー、蛍光分光法、及びタネル染色(Tdt-Utp nick-end labeling)(TUNNEL又はTUNEL)など方法を用いて、与えられた細胞培養におけるアポトーシスの頻度を評価する。

30

#### 【0065】

<軟骨細胞由来の人工多能性幹細胞からの、心筋細胞の生成>

本明細書に開示された方法による軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞はまた、心筋細胞に分化されてもよい。幾つかの実施形態において、本明細書には、多能性細胞又は分化多能性細胞の集団から心筋細胞の集団を生成する方法が開示され、該方法は、i)本明細書に開示される方法に従って多能性細胞又は分化多能性細胞の集団を生成する工程；ii)多能性幹細胞又は分化多能性幹細胞の集団に、培養培地中で胚様体を形成させる工程；iii)培養培地にBMP4を加える工程；iv)工程iiiの後の1-3日間、BMP4、Activin A、及びFGFbを加える工程；v)工程iiiの後の3-8日間、DKKとVEGFを加える工程；及び、vi)工程iiiの後の8-14日間、DKK、VEGF、及びFGFbを加える工程を含む。幾つかの実施形態において、0日目に、約1ng/ml乃至約10ng/mlのBMP4が、培養培地に加えらる。幾つかの実施形態において、0日目に、約5ng/mlのBMP4が、培養培地に加えらる。幾つかの実施形態において、1日目に、約5ng/ml乃至約20ng/mlのBMP、約1ng/ml乃至約10ng/mlのActivin A、及び約1ng/ml乃至

40

50

至約10 ng/mlのFGFβが、培養培地に加えられる。幾つかの実施形態において、1日目に、約10 ng/mlのBMP4、約6 ng/mlのActivin A、及び約5 ng/mlのFGFβが、培養培地に加えられる。幾つかの実施形態において、3日目に、約50 ng/ml乃至約300 ng/mlのDKK、及び1 ng/ml乃至約10 ng/mlのVEGFが、培養培地に加えられる。幾つかの実施形態において、3日目に、約150 ng/mlのDKK及び約5 ng/mlのVEGFが、培養培地に加えられる。幾つかの実施形態において、8日目に、約50 ng/ml乃至約300 ng/mlのDKK、約1 ng/ml乃至約20 ng/mlのVEGF、及び約1 ng/ml乃至約10 ng/mlのFGFβが、培養培地に加えられる。幾つかの実施形態において、8日目に、約150 ng/mlのDKK、約10 ng/mlのVEGF、及び約5 ng/mlのFGFβが、培養培地に加えられる。

10

#### 【0066】

<軟骨細胞由来の人工多能性幹細胞に由来する、軟骨前駆細胞の使用>

本明細書には、特定の実施形態において、軟骨組織を再生する方法が開示される。幾つかの実施形態において、軟骨組織は、耳介軟骨、肋軟骨、関節軟骨、椎間軟骨、又は気管軟骨である。

#### 【0067】

本明細書には、幾つかの実施形態において、骨又は軟骨の欠損症を処置する方法が提供され、該方法は、本明細書に開示される方法により作られる細胞の集団（例えば、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞の集団、及び/又は、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞に由来する軟骨細胞又は軟骨前駆細胞の集団）を、骨又は軟骨の欠損症部位に移植する工程を含む。幾つかの実施形態において、新たな組織が生成される。幾つかの実施形態において、新たな組織は、骨又は軟骨の欠損症の組織を統合する。幾つかの実施形態において、新たな組織は、軟骨又は骨の表面を修復する。幾つかの実施形態において、新たな組織はII型コラーゲンを含む。幾つかの実施形態において、新たな組織は、通常関節軟骨の表面領域、中間領域、及び深い領域の特徴を含む。幾つかの実施形態において、新たな組織の表面領域はラブリシンを含む。

20

#### 【0068】

本明細書には、幾つかの実施形態において、軟骨組織を再生する方法が開示され、該方法は、本明細書に開示される方法により作られる細胞の集団（例えば、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞の集団、及び/又は、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞に由来する軟骨細胞又は軟骨前駆細胞の集団）を、骨又は軟骨の欠損症部位に移植する工程を含み、ここで、新たな軟骨組織が作られる。幾つかの実施形態において、細胞の集団は、必要とする被験体の骨又は軟骨の欠損症部位に移植される。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織は、骨又は軟骨の欠損症の組織を統合する。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織は、軟骨又は骨の表面を修復する。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織はII型コラーゲンを含む。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織は、通常関節軟骨の表面領域、中間領域、及び深い領域の特徴を含む。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織の表面領域はラブリシンを含む。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織は、奇形腫、腫瘍細胞、変形の証拠、異常な構造的特徴、又は他の不適切な細胞型を含まない。

30

40

#### 【0069】

<軟骨治療材料>

幾つかの実施形態において、本明細書に開示される方法により得られる軟骨細胞又は軟骨前駆細胞は、軟骨組織を再生する方法に使用される。幾つかの実施形態において、本明細書に開示される軟骨前駆細胞は、骨又は軟骨の欠損症の領域に直接入れられる。幾つかの実施形態において、軟骨前駆細胞は、支持生体材料と共に、骨又は軟骨の欠損症の領域に入れられる。幾つかの実施形態において、本発明により得られる軟骨細胞による、新たな軟骨組織の生成物は、骨又は軟骨の欠損症の組織を統合する。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織は、軟骨又は骨の表面を修復する。幾つかの実施形態において、新

50

たな軟骨組織はⅠⅠ型コラーゲンを含む。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織は、通常の関節軟骨の表面領域、中間領域、及び深い領域の特徴を含む。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織の表面領域はラブリシンを含む。幾つかの実施形態において、新たな軟骨組織は、奇形腫、腫瘍細胞、変形の証拠、異常な構造的特徴、又は他の不適切な細胞型を含まない。

#### 【 0 0 7 0 】

本明細書には、幾つかの実施形態において、必要とする被験体の関節の接合面における軟骨欠損症を修復又は処置する方法が開示され、該方法は、被験体の軟骨欠損症の部位に、本明細書に記載されるような細胞の集団を投与する工程を含む。幾つかの実施形態において、前記方法はまた、血管浸潤を遮断するための薬剤又はデバイスを、被験体の軟骨欠損症の部位へ投与する工程を含む。幾つかの実施形態において、無細胞のバリアが、細胞の集団を適所に保つために、軟骨欠損症部位に置かれる。

10

#### 【 0 0 7 1 】

本明細書には、幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害を処置する方法が開示され、該方法は、本明細書に記載されるような細胞の集団（例えば、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞の集団、及び／又は、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞に由来する軟骨細胞又は軟骨前駆細胞の集団）を、必要とする被験体の軟骨損傷又は欠損症の部位に投与する工程を含む。幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害は、関節軟骨外傷、半月板損傷、軟骨形成障害、関節炎、軟骨疾患、軟骨肉腫、軟骨軟化症、多発性軟骨炎、再発性多発性軟骨炎、大腿骨頭すべり症、離断性骨軟骨炎、軟骨異形成症、肋軟骨炎、骨軟骨腫、脊椎症、骨軟骨症、ティーツェ症候群、フランソワの皮膚軟骨角膜ジストロフィー、骨端異形成症、手根関連性骨軟骨腫症、軟骨無形成症、軟骨石灰化症、遺伝性軟骨種症、軟骨腫、軟骨無発生症、内軟骨種、軟骨低形成症、及びK e u t e l 症候群である。幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害は関節炎である。幾つかの実施形態において、関節炎は骨関節炎である。幾つかの実施形態において、骨関節炎は、被験体の膝、指、手首、殿部、脊椎、肩、肘、つま先、足首、又は頸部に生じる。

20

#### 【 0 0 7 2 】

本明細書には、幾つかの実施形態において、軟骨修復インプラントが開示され、該インプラントは、生体材料と、本明細書に記載されるような細胞の集団（例えば、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞の集団、及び／又は、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞に由来する軟骨細胞又は軟骨前駆細胞の集団）とを含む。幾つかの実施形態において、軟骨前駆細胞は保管のため凍結される。凍結は、変動条件下で、及び、様々な薬剤又は保護化合物の存在下で達成され得る。故に、幾つかの実施形態において、凍結はジメチルスルホキシド（「DMSO」）の存在下で実行される。DMSOは、細胞膜に挿入されてそれらを安定にし、細胞が破壊されるのを妨げる、周知の保護剤である。幾つかの実施形態において、凍結はDMSOの不在下で実行される。

30

#### 【 0 0 7 3 】

幾つかの実施形態において、軟骨細胞前駆物質は、移植前に生体材料に統合される。軟骨細胞前駆物質又はその細胞の量が統合され得る、生体材料の例は、コラーゲン、ポリグリコール酸（PGA）、ポリ乳酸、アルギン酸塩（例えばカルシウム塩）、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸-ポリグリコール酸のコポリマー、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、ヒト真皮、又はそれらの組み合わせを含む。幾つかの実施形態において、プロテオグリカンとグリコサミノグリカンは硫酸化される。幾つかの実施形態において、生体材料は、シートなどの膜、スポンジなどの多孔体、織物、布地、不織布、綿などのメッシュである。幾つかの実施形態において、生体材料は多孔質材料である。

40

#### 【 0 0 7 4 】

幾つかの実施形態において、生体材料はコラーゲンを含む。幾つかの実施形態において、コラーゲンは架橋結合される。幾つかの実施形態において、架橋コラーゲンは、ステープルなどにより、レシピエントの身体に安定して固定される。

50

## 【 0 0 7 5 】

幾つかの実施形態において、軟骨細胞を備えた混合剤のためのコラーゲン溶液、及び、必要な場合に軟骨治療材料として使用するためにゲル化される混合物を形成するために、コラーゲンが可溶化される。幾つかの実施形態において、従来のコラーゲン溶液が使用される。幾つかの実施形態において、酵素で可溶化したコラーゲン溶液が使用される。幾つかの実施形態において、軟骨治療材料は、コラーゲン溶液と軟骨細胞の混合物を、スポンジや不織布などの中に、又はそれらの上に統合する又は覆うことにより、形成される。

## 【 0 0 7 6 】

幾つかの実施形態において、軟骨治療材料は、血管新生を予防又は減少する薬剤と共に投与される。血管新生を予防又は減少する薬剤の例は、限定されないが、チロシンキナーゼ阻害剤（チロシンキナーゼ受容体 F l t - 1 ( V E G F R 1 ) 及び F l k - 1 / K D R ( V E G F R 2 ) の阻害剤、表皮由来の阻害剤など）、線維芽細胞由来又は血小板由来の増殖因子、M M P (マトリックスメタロプロテアーゼ) 阻害剤、インテグリン遮断薬、インターフェロン - 、インターロイキン - 1 2、ペントサンポリサルフェート、シクロオキシゲナーゼ阻害剤（アスピリンとイブプロフェンのような非ステロイド性の抗炎症剤 ( N S A I D )、同様に、セレコキシブとロフェコキシブのような選択的なシクロオキシゲナーゼ - 2 阻害剤を含む）、ステロイド抗炎症剤（コルチコステロイド、ミネラルコルチコイド、デキサメタゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレド ( m e t h y l p r e d )、ベタメタゾンなど）、カルボキシアミドトリアゾール、コンプレタスタチン A - 4、スクワラミン、6 - O - クロロアセチル - カルボニル） - フマギロール、サリドマイド、血液造成阻害剤、トロポニン - 1、アンジオテンシン I I 受容体拮抗薬、及び V E G F に対する抗体を含む。

## 【 0 0 7 7 】

幾つかの実施形態において、軟骨治療材料は、軟骨組織を形成し、軟骨性骨化を誘発する。ヒト真皮は、軟骨性骨化を誘発する材料の例である。幾つかの実施形態において、骨化はまた、骨形態形成蛋白 ( B M P ) などの、骨形成を促進する増殖因子によって促進される。

## 【 0 0 7 8 】

記載された軟骨治療材料の移植前に、処置される領域を調製することが望ましい。この目的のために、欠損症は、インプラントが血管新生等の危険性を減少させるために（特にその付着に関して）効果的に取る ( t a k e ) とすると確認するために調製されねばならない。一般的に、欠損症は、（領域から全ての欠陥のある軟骨を排除するために）前もって処置され、その後、清浄される。次に、様々な移植技術が、移植した材料（懸濁液、マトリックス、インビトロで再構築された軟骨）に応じて実施され得る。

## 【 0 0 7 9 】

一般的に、記載した軟骨治療材料の移植は、当業者に既知の様々な外科技術を適用することにより実行され得、このような技術はヒトの診療所で受けられ、手術中に、生物分解性の縫合糸を介して、又は生物接着剤の適用によりインプラントが取り付けられる段階を特に示唆する。生物接着剤の例は、著しくは、フィブリン及び／又はトロンビンで作られた生物学的グルー、又は他の生体適合性材料を含む。より具体的に、再吸収可能な生体適合性フィルムは、生物学的又は生体適合性のグルーによって、処置される領域に付けられる。好ましい変異体において、フィルムは、軟骨の欠損症部位に置かれ、その後、従って構築されるポケットは軟骨治療材料で満たされる。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 8 0 】

< 実施例 1 : i P S C ラインを確立するための、L e n t i - S m a r t - h O K S M を備えたヒト軟骨細胞の導入 >

< 誘導法 : I n v i v o G e n からの p L e n t i - S m a r t - h O K S M、遺伝子 O c t 4、S o x 2、K l f 4、及び c - M y c >

2 9 3 F T - P 4 細胞を解凍し、1 0 % の F B S、4 . 5 g / l のグルコース、5 0 U

10

20

30

40

50

/ml のペニシリン、50 µg/ml のストレプトマイシン、1 mM のピルビン酸ナトリウム、4 mM の L - グルタミン、及び 0.1 mM の非必須アミノ酸を含む DMEM において培養して継代した (passed)。5% の CO<sub>2</sub> インキュベーター中で、細胞を 37 で増殖させた。70 - 80% の培養密度に達した時、1 - 2 日ごとにこれらの細胞を分裂した。細胞は、90% の培養密度に達しなかった。二次培養のために、細胞をトリプシン / EDTA で分離し、1 : 3 乃至 1 : 10 の比率で分裂する。

#### 【0081】

< HEK 293T 細胞を使用するレンチウイルスベクターの産生 >

OKSM プラスミドを、水中で 1 µg / µl の濃度で提供した。188 µl の滅菌水を、pLV - OKSM の 12 µl のアリコートに加えた。12 µg の pLV - OKSM を含む、この 200 µl の溶液を使用して、LENTI - Smart (商標) を再水和した (rehydrate)。

10

#### 【0082】

LENTI - Smart (商標) を -20 から除去し、10 分間、室温で予め暖めた。200 µl の溶液を LENTI - Smart (商標) に加え、チューブの底部を優しくタップする (tapping) ことにより混合した。混合物を 15 分間、室温でインキュベートした。800 µl の滅菌水を加えることにより全容積を 1 ml までにし、チューブの底部を優しくタップすることにより混合した。

#### 【0083】

HEK 293T 細胞をトリプシン処理して、10% の FBS を含む、12 ml の予め暖めた DMEM 中の T - 75 cm<sup>2</sup> のフラスコに、 $1 \times 10^7$  HEK 293T 細胞を加えた。T - 75 cm<sup>2</sup> のフラスコを真っ直ぐに維持した。1 ml の再懸濁した LENTI - Smart (商標) を、細胞上に優しく直接加えて、上下に数回ピペットで移すことにより徹底的に均一化した。HEK 293T 細胞と LENTI - Smart (商標) を含む T - 75 cm<sup>2</sup> のフラスコを、37、5% の CO<sub>2</sub> で水平にインキュベートした。

20

#### 【0084】

12 乃至 16 時間後、培養培地を HEK 293T 細胞から切り捨て、12 ml の予め暖めた新鮮培地と取り替えて、37、5% の CO<sub>2</sub> で HEK 293T 細胞を更にインキュベートした。注意：観察すると (Assess visually control)、VSV G タンパク質の存在のため、細胞は、形質移入の 36 乃至 48 時間後に融合し、多核となった。この形態変化は予測されたが、レンチウイルスベクターの産生に影響しなかった。

30

#### 【0085】

レンチウイルスの上清を以下のように採取した：上清を貯蔵して収集し、細胞片を 2000 rpm で 5 分間、遠心分離によって除去した。ウイルスカプシド片 (viral capsid debris) を除去するために、0.45 µm のフィルターを使用して上清を濾過した。フィルターは、ニトロセルロース製に代わり、PVDf (低タンパク質結合) 製である。

#### 【0086】

0 時間：形質移入

40

#### 【0087】

12 時間：変化媒体

#### 【0088】

36 時間：第 1 の収集

#### 【0089】

48 時間：第 2 の収集

#### 【0090】

60 時間：第 3 の収集

#### 【0091】

< 形質導入手順 >

50

0日目：ヒト軟骨のP2細胞を、6ウェルのプレートにおいて適切な密度で播いた（seeded）（ $\sim 5 \times 10^4$ ）。細胞密度が形質導入時に $\sim 25 - 50\%$ 周密的であるように、細胞を播いた（plated）。

【0092】

1日目：形質導入。培地を吸引によって組織培養プレートから除去して、上述のように、追加の $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ のポリブレンを伴う、 $2 - 3 \text{ ml}$ のiPSCリプログラム因子レンチウイルス混合物と取り替えた。組織培養プレートを、室温で60分間、 $1,000 \times g$ でのデスクトップ遠心分離機（例えばSorvall RT6000）中で回転させ、形質導入効率を増加させて、前記プレートを37で一晩インキュベートした。

【0093】

2日目：形質導入培地を、 $2 - 3 \text{ ml}$ の新鮮なDMEM培地と取り替えた。

【0094】

3 - 4日目：培地を交換した。c-Mycにより誘発されたアポトーシスのため、幾つかの細胞死が観察された。

【0095】

4日目：HS27 MEFフィーダー細胞及びゼラチンでコーティングしたプレート（ $2.4 \times 10^6$ 細胞/プレート）を、不完全なES培地において調製した。

【0096】

5日目：細胞をトリプシン処理し、 $10 \text{ cm}$ のゼラチンでコーティングしたプレート（1つの6ウェルプレートから2つの $10 \text{ cm}$ のプレート）上に播いて、hESC培地中で培養した。1つはFGFbのないPEDF（Peprotech、 $100 \text{ ng}/\text{ml}$ ）を備えたセット、他方は両方とも $1 \text{ mM}$ バルプロ酸を備えたFGFbのみ（ $16 \text{ ng}/\text{ml}$ 、R&D）を備えたセット。

【0097】

培地を毎日交換し、顕微鏡でプレートを観察して、ES様のコロニーを識別した。

【0098】

不完全なヒトiPSC無血清培地（ $500 \text{ ml}$ 、 $0.22 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過される）：

【0099】

1. Knockout serum replacement  $100 \text{ ml}$ 、最終 $20\%$

【0100】

2. ペニシリン/ストレプトマイシン  $5 \text{ ml}$   $100 \text{ U}$ 、及び $1 \text{ ml}$ につき最終 $100 \mu\text{g}$

【0101】

3. L-グルタミン（ $200 \text{ mM}$ ） $5 \text{ ml}$ 、最終 $2 \text{ mM}$

【0102】

4. 非必須アミノ酸  $5 \text{ ml}$ 、最終 $100 \mu\text{M}$

【0103】

5. 2-メルカプトエタノール（ $55 \text{ mM}$ ） $0.9 \text{ ml}$ 、最終 $100 \mu\text{M}$

【0104】

6.  $500 \text{ ml}$ までDMEM/F12を充填

【0105】

コロニーを選択した後、更なる実験のために、コロニーを規則的なヒトES培地に維持して拡張した（expanded）。

【0106】

<実施例2：軟骨前駆細胞へのiPSC細胞の分化>

軟骨前駆細胞を、 $10\%$ のFBSを含むDMEM/F12中で培養することにより、iPSC又はヒト胚性幹細胞（hESC）（WAO9、Wicell）から分化させた。軟骨前駆細胞の軟骨細胞分化を、 $5 \times 10^5$ 細胞をスピンドウンすることによりペレット培

10

20

30

40

50

養物中で行い、ペレットを形成して、そして、BMP 4 を備えた、又は BMP 4 の無い TGF- $\beta$  3 を含む軟骨培地 (Lonza) 中で培養した。2 週間後、これらのペレット剤中の I 型コラーゲン発現を qPCR と共に確認した。

【0107】

部分的な厚みの欠損 (2 mm) を、ウサギの膝の滑車表面に外科的に作成した。軟骨細胞由来の iPSC 細胞株から分化した軟骨前駆細胞を、この欠損部位に移植した。8 週間後、組織を採取し、亜鉛ホルマリンで固定し、パラフィンに埋め込み、区分して、Safranin-O / Fast Green で染色した。ウサギの膝における欠損症を、陽性の細胞外マトリックスを染色するサフラニン O で満たした (図 4)。

【0108】

< 実施例 3 : 移植により成人のヒト関節炎の関節からの、外植片中の軟骨欠損症の修復 >  
骨軟骨の試料を、人工膝関節全置換術を受ける、関節炎を患う成人のヒト患者の関節から外科的に切除する。6 mm 直径の円筒状のプラグの内部を取り除いた。外科用キュレットを使用して、関節面におよそ 2 mm の大きさの部分的な厚みの欠損症を作る。欠損症を、軟骨細胞由来の iPSC 細胞から産生した製造された軟骨細胞前駆物質で満たし、それらは以下の機械的な圧力の下で凝集する :  $5 \times 10^5$  の細胞を、10 % の FBS で補足した DMEM / F12 において 5 分間 150 g で、15 ml の円錐管中で遠心分離し、TGF- $\beta$  3 の存在下、又は不在下で一晩、インキュベートした。4 週間後、外植片を固定し、パラフィンに埋め込み、区分して、免疫組織化学的な試験のためにサフラニン O で染色した。

【0109】

< 実施例 4 : 関節内注射による、成人のヒト関節炎の関節における軟骨欠損症の修復 >  
膝に変形性関節症を患う患者の関節炎の膝関節に、アルギニン酸塩中で懸濁した、本発明に係る細胞 (例えば、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞の集団、及び / 又は、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞の集団に由来する軟骨細胞又は軟骨前駆細胞の集団) を注入した。維持注射剤を必要に応じて与える。

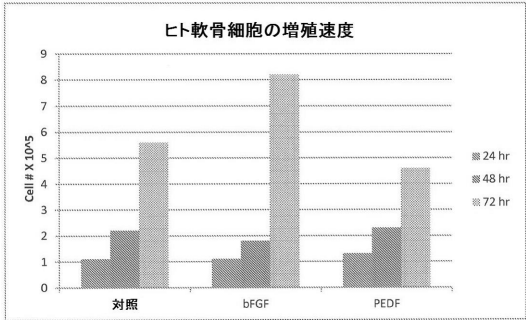
【0110】

< 実施例 5 : 外科的移植による、成人のヒト関節炎の関節における軟骨欠損症の修復 >  
膝に変形性関節症を患う、又は軟骨及び / 又は骨の欠損症を患う患者を、本発明に係る細胞 (例えば、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞の集団、及び / 又は、軟骨細胞由来の多能性細胞又は分化多能性細胞の集団に由来する軟骨細胞又は軟骨前駆細胞の集団) 及びマトリックスを外科移植することにより処置した。

【0111】

本発明の好ましい実施形態が、本明細書に示され記載されている一方で、このような実施形態が、ほんの一例として提供されることは当業者に明白であろう。多数の変形、変化、及び置換は、本発明から逸脱することなく、当業者によって現在想到される。本明細書に記載される本発明の実施形態の様々な代案が、本発明の実施において利用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義するものであり、この特許請求の範囲及びそれらの同等物の範囲内の方法及び構成がそれによって包含されることが、意図される。

【図 1】



【図 2】

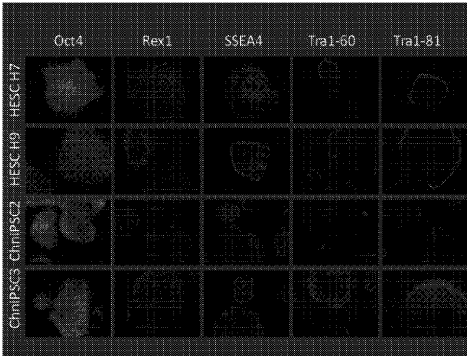
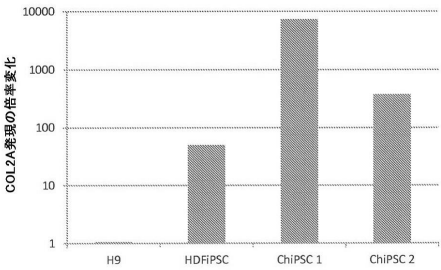
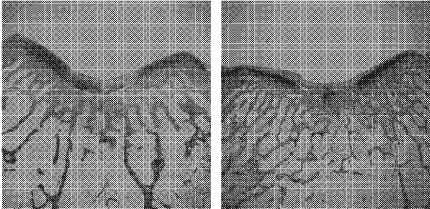


FIG. 2

【図 3】



【図 4】





## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 19/04	(2006.01)	A 6 1 P 19/04	
A 6 1 L 27/00	(2006.01)	A 6 1 L 27/00	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z

(72)発明者 コールウェル, クリフォード, ダブリュ.  
 アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州 サンディエゴ キャンパス・ポイント・コート  
 4 2 7 5

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 0 4 7 2 1 2 ( U S , A 1 )  
 European Cells and Materials , 2 0 1 2 年 1 月 , Vol. 23 , p. 1-12

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
 C 1 2 N 5 / 0 0  
 C 1 2 N 1 5 / 0 0  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 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 )  
 W P I D S ( S T N )