(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4246994号
(P4246994)

(45)発行日　平成21年4月2日(2009.4.2)　(24)登録日　平成21年1月16日(2009.1.16)

(51)Int.Cl.　F I
A61L 27/00 (2006.01)　A61L 27/00 G
A61F 2/28 (2006.01)　A61F 2/28

請求項の数 44　(全 26 頁)

(21)出願番号　特願2002-560515(P2002-560515)
(86)(22)出願日　平成14年1月30日(2002.1.30)
(65)公表番号　特表2005-500085(P2005-500085A)
(43)公表日　平成17年1月6日(2005.1.6)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/002640
(87)国際公開番号　WO2002/060315
(87)国際公開日　平成14年8月8日(2002.8.8)
審査請求日　平成17年1月27日(2005.1.27)
(31)優先権主張番号　60/265,053
(32)優先日　平成13年1月30日(2001.1.30)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/265,064
(32)優先日　平成13年1月30日(2001.1.30)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　503270179
オーソジーン，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４９０４，　グリンブレー，　ボン　エア　センター　３３６，　スイート　４０７
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　ハンツィカー，　アーンスト　ビー.
スイス国　ツェーハー－４５３３　リードホルツ，　ソネンライン　３２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】滑膜由来の組織または細胞を使用する関節軟骨における欠陥または病変の処置および修復のための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下：
生分解性のマトリックスまたはマトリックス形成材料；
有効量の、ＢＭＰ－２である形質転換因子；および
滑膜組織の片の調製物；
を含有する、ヒトを含む動物において関節軟骨欠損を処置するための組成物。
【請求項２】
前記マトリックスが、フィブリン、コラーゲン、ゼラチン、アガロース、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記形質転換因子が、制御放出送達系に付随している、請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
前記制御放出送達系が、リポソーム、ミクロスフィア、生体侵食性ポリマー、硫酸ヘパリンプロテオグリカンに化学結合したコラーゲン繊維、および炭水化物に基づく小体からなる群より選択される、請求項３に記載の組成物。
【請求項５】
有効量の増殖因子をさらに含有する、請求項１～２のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項６】
有効量の抗脈管形成因子をさらに含有する、請求項１～２のいずれか１項に記載の組成

物。
【請求項７】
有効量のビスホスホネートをさらに含有する、請求項１～２のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項８】
フィブリン接着剤、トランスグルタミナーゼまたはフィブロネクチンをさらに含有する、請求項１～７のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項９】
滑膜、および有効量の、ＢＭＰ－２である形質転換因子を含む、ヒトを含む動物における、軟骨の欠損の処置のための、組成物。
【請求項１０】
前記滑膜が、部分的に誘導体化されている、請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
前記欠損の表面のプロテオグリカンを分解するための薬剤をさらに含有する、請求項９～１０のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１２】
プロテオグリカンを分解するための前記薬剤が、コンドロイチナーゼＡＣである、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１３】
滑膜細胞含有組成物、および有効量の、ＢＭＰ－２である形質転換因子を含む、ヒトを含む動物において関節軟骨欠損を処置するための組成物。
【請求項１４】
前記滑膜細胞が自己由来である、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１５】
前記滑膜細胞が、培養物中で増殖されている、請求項１３または１４に記載の組成物。
【請求項１６】
前記組成物が、生分解性マトリックスをさらに含有する、請求項１３～１５のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１７】
有効量の抗脈管形成因子をさらに含有する、請求項１３または１６に記載の組成物。
【請求項１８】
滑膜由来の自己由来の軟骨マトリックス、および有効量の、ＢＭＰ－２である形質転換因子を含む、ヒトを含む動物において関節軟骨欠損を処置するための、組成物。
【請求項１９】
前記組成物が、前記欠損の表面のプロテオグリカンを分解するための薬剤をさらに含有する、請求項１３または１８のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項２０】
プロテオグリカンを分解するための前記薬剤が、コンドロイチナーゼＡＣである、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２１】
前記マトリックスが、フィブリン、コラーゲン、ゼラチン、アガロース、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１６に記載の組成物。
【請求項２２】
前記抗脈管形成因子が、スラミン、アンギオスタチン、メタロプロテアーゼインヒビター、抗ｂＦＧＦ抗体、抗ＥＳＡＦ抗体、フマギリン、およびＡＧＭ－１４７０からなる群より選択される、請求項１７に記載の組成物。
【請求項２３】
有効量の増殖因子をさらに含有する、請求項１３または１８に記載の組成物。
【請求項２４】
有効量のビスホスホネートをさらに含有する、請求項１３または１８のいずれか１項に

記載の組成物。
【請求項２５】
フィブリン接着剤、トランスグルタミナーゼ、フィブロネクチンおよびこれらの組み合わせからなる群より選択される薬剤をさらに含有する、請求項１３または１８のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項２６】
前記形質転換因子が、制御放出送達系に付随している、請求項１３または１８に記載の組成物。
【請求項２７】
滑膜細胞含有組成物と有効量の、ＢＭＰ－２である形質転換因子とを併せることによって処方される、ヒトを含む動物における、軟骨の欠損の処置するための医薬。
【請求項２８】
前記滑膜が、部分的に誘導体化されている、請求項２７に記載の医薬。
【請求項２９】
前記欠損の表面のプロテオグリカンを分解するための薬剤をさらに含有する、請求項２７～２８のいずれか１項に記載の医薬。
【請求項３０】
プロテオグリカンを分解するための前記薬剤が、コンドロイチナーゼＡＣである、請求項２９に記載の医薬。
【請求項３１】
滑膜細胞含有組成物、と有効量の、ＢＭＰ－２である形質転換因子とを併せることによって処方される、ヒトを含む動物において関節軟骨欠損を処置するための医薬。
【請求項３２】
前記滑膜細胞が自己由来である、請求項３１に記載の医薬。
【請求項３３】
前記滑膜細胞が、培養物中で増殖されている、請求項３１または３２に記載の医薬。
【請求項３４】
前記医薬が、生分解性マトリックスをさらに含有する、請求項３１～３３のいずれか１項に記載の医薬。
【請求項３５】
有効量の抗脈管形成因子をさらに含有する、請求項３１または３４に記載の医薬。
【請求項３６】
滑膜細胞含有組成物と、有効量の、ＢＭＰ－２である形質転換因子とを併せることによって処方される、ヒトを含む動物において関節軟骨欠損を処置するため、医薬。
【請求項３７】
前記医薬が、前記欠損の表面のプロテオグリカンを分解するための薬剤をさらに含有する、請求項３１または３６のいずれか１項に記載の医薬。
【請求項３８】
プロテオグリカンを分解するための前記薬剤が、コンドロイチナーゼＡＣである、請求項３７に記載の医薬。
【請求項３９】
前記マトリックスが、フィブリン、コラーゲン、ゼラチン、アガロース、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項３４に記載の医薬。
【請求項４０】
前記抗脈管形成因子が、スラミン、アンギオスタチン、メタロプロテアーゼインヒビター、抗ｂＦＧＦ抗体、抗ＥＳＡＦ抗体、フマギリン、およびＡＧＭ－１４７０からなる群より選択される、請求項３５に記載の医薬。
【請求項４１】
有効量の増殖因子をさらに含有する、請求項３１または３６に記載の医薬。
【請求項４２】

有効量のビスホスホネートをさらに含有する、請求項３１または３６のいずれか１項に記載の医薬。
【請求項４３】
フィブリン接着剤、トランスグルタミナーゼ、フィブロネクチンおよびこれらの組み合わせからなる群より選択される薬剤をさらに含有する、請求項３１または３６のいずれか１項に記載の医薬。
【請求項４４】
前記形質転換因子が、制御放出送達系に付随している、請求項３１または３６に記載の医薬。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本願は、米国特許仮出願番号６０／２６５，０５３および同６０／２６５，０６４（両方とも２００１年１月３０日に出願された）の米国特許法第１１９条（ｅ）項に基づく利益を主張する。
【０００２】
（発明の技術分野）
本発明は、軟骨における欠陥または病変（本明細書中で交換可能に使用される）の処置および修復に関する。本発明の組成物は、軟骨欠陥の充填に使用するためのマトリクスおよび滑膜（ｓｙｎｏｖｉａｌ）の組織および細胞を含む。形成層細胞もまた使用され得る。マトリクスおよび滑膜の組織および細胞の調製物はまた、滑膜細胞の拡大および軟骨細胞への滑膜細胞の分化をそれぞれ促進し、軟骨組織の形成を導くための、増殖因子および／またはトランスフォーミング因子を含み得る。本発明の組成物はまた、軟骨形成遺伝子をトランスフェクトされた滑膜細胞または形成層細胞を含み、その結果、これらの細胞は、軟骨形成を促進する軟骨形成因子を発現する。本発明の方法は、関節包の滑膜の最小侵襲性の生検から滑膜の組織または細胞を得る工程、この滑膜の組織または細胞に適切な増殖因子および／またはトランスフォーミング因子を添加する工程、および構造マトリクス有りまたは無しで組織（膜シートまたはミンスされた膜として）または細胞を欠陥に配置する工程を包含する。あるいは、欠陥は、層化された滑膜シートで充填され得る。滑膜組織は、その欠陥を充填する前に、部分的に失活され得る。あるいは、欠陥は、軟骨細胞を含むマトリクスで充填され得、この軟骨細胞は、インビトロまたはインサイチュで滑膜細胞または形成層細胞から調製される。あるいは、インビトロまたはインサイチュで形成された部分的に形質転換された滑膜由来の組織を使用して、欠陥を充填し得る。次いで、充填された欠陥は、被覆膜（好ましくは、部分的に失活された滑膜シートを含む）でカバーされ得る。本発明の方法は、変形性関節症に見出される関節軟骨欠陥の処置において、そして軟骨損傷を生じる他の疾患および外傷の処置において、特に有用である。
【０００３】
米国特許第５，２０６，０２３号、同第５，２７０，３００号および同第５，８５３，７４６号は、参考として本明細書によって援用される。
【背景技術】
【０００４】
（背景技術）
関節は、骨格中の骨が連結される共通様式の１つである。正常な関節をなした骨の末端は、関節軟骨組織によって覆われ、これは、実質的に摩擦のない、互いの骨の動きを可能にする［Ｌ．Ｗｅｉｓｓ編、Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｍｕｎｃｈｅｎ：Ｕｒｂａｎ ａｎｄ Ｓｃｈｗａｒｚｅｎｂｕｒｇ、１９８８）２４７頁］。
【０００５】
関節軟骨は、特定の構造組織によって特徴付けられる。これは、細胞間物質（しばしば、文献では「軟骨マトリクス」と呼ばれる）中に包埋された特殊化された細胞（軟骨細胞）からなり、この物質は、プロテオグリカン、主にＩＩ型のコラーゲン原線維、他のタン

パク質および水に富んでいる［Ｂｕｃｋｗａｌｔｅｒら、「Ａｒｔｉｃｕｌａｒ Ｃａｒｔｉｌａｇｅ：Ｉｎｊｕｒｙ ａｎｄ Ｒｅｐａｉｒ」、Ｉｎｊｕｒｙ ａｎｄ Ｒｅｐａｉｒ ｏｆ ｔｈｅ Ｍｕｓｃｕｌｏｓｋｅｌｅｔａｌ Ｓｏｆｔ Ｔｉｓｓｕｅｓ（Ｐａｒｋ Ｒｉｄｇｅ、ＩＩＩ：Ａｍｅｒｉｃａｎ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｏｒｔｈｏｐａｅｄｉｃ Ｓｕｒｇｅｏｎｓ Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ、１９８７）４６５頁］。軟骨マトリクスは、その中に包埋された軟骨細胞によって産生および維持される。軟骨組織は、神経支配されないし、血管系またはリンパ系のいずれによっても侵入されない。しかし、成体の成熟関節において、その土台となる軟骨下骨組織は、その骨組織と軟骨との間に薄い連続的なプレートを形成する。この軟骨下の骨組織または骨板は、神経支配され、そして血管化される。この骨板の下で、骨組織は、骨髄を含む、小柱を形成する。未成熟関節において、関節軟骨は、初代の骨小柱によってのみ裏打ちされる。関節中の半月組織の一部もまた、その構成が軟骨関節に類似する軟骨からなる［Ｂｅａｕｐｒｅ，Ａ．ら、Ｃｌｉｎ．Ｏｒｔｈｏｐ．Ｒｅｌ．Ｒｅｓ．７２－７６頁（１９８６）］。

【０００６】

２つの型の欠陥が、関節表面において認識されている。これらは、全層性（ｆｕｌｌ－ｔｈｉｃｋｎｅｓｓ）欠陥および表層性（ｓｕｐｅｒｆｉｃｉａｌ）欠陥である。全層性欠陥は、軟骨下の骨板内へまたは軟骨下の骨板を通って浸透する欠陥であり；表層性欠陥は、軟骨下の骨板へ浸透しない欠陥である。これらの欠陥は、軟骨に対する物理的損傷の程度においてのみならず、各型の病変が誘発し得る修復応答の性質においても異なる。

【０００７】

関節表面の全層性欠陥は、硝子軟骨、石灰化軟骨層ならびにその血管および骨髄を有する軟骨下骨組織に対する損傷を含む。全層性血管は、重篤な痛みを引き起こし得る。なぜなら、骨板は、感覚神経終末を含むからである。このような欠陥は、一般に、重篤な外傷から生じるか、または変性性の関節疾患（例えば、変形性関節症）の後期の間に生じる。全層性欠陥は、時折、出血および軟骨下の骨からの修復反応の誘導を導き得る［Ｂｕｃｋｗａｌｔｅｒら、「Ａｒｔｉｃｕｌａｒ Ｃａｒｔｉｌａｇｅ：Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｒｅｓｐｏｎｓｅ ｔｏ Ｉｎｊｕｒｙ，ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｆａｃｉｌｉｔａｔｉｎｇ Ｒｅｐａｉｒ」、Ａｒｔｉｃｕｌａｒ Ｃａｒｔｉｌａｇｅ ａｎｄ Ｋｎｅｅ Ｊｏｉｎｔ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ：Ｂａｓｉｃ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ａｒｔｈｒｏｓｃｏｐｙ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ、１９９０）１９～５６頁」。形成された修復組織は、乏しい生体力学特性を有し、そして長期間持続しない、血管化された繊維性型の軟骨である［Ｂｕｃｋｗａｌｔｅｒら（１９９０）前出］。

【０００８】

関節軟骨組織中の表層性欠陥は、軟骨組織自体に限定される。このような欠陥は、悪い意味で有名である。なぜなら、これらは、一般に、治癒せず、そして修復反応に対する性向を示さないからである。

【０００９】

表層性欠陥は、軟骨の表面中に裂溝、窪み（ｄｉｖｏｔ）または中裂として現れ得るか、またはこれらは、その罹患組織において「蟹肉様（ｃｒａｂ－ｍｅａｔ）」の外観を有し得る。これらは、全層性欠陥において見られるような、出血性の血管（血斑）を含まない。表層性欠陥は、公知の原因を有さないかもしれないが、しばしば、これらは、軟骨組織の擦過を導く、機械的擦過の結果である。機械的障害は、関節に対する外傷（例えば、関節への裂かれた半月組織の位置ずれ、半月切除術、裂かれた靱帯による関節の緩み、関節の転位（ｍａｌａｌｉｇｎｍｅｎｔ）、骨折）によってか、または遺伝的疾患によって引き起こされ得る。表層性欠陥はまた、変性性関節疾患（例えば、変形性関節症）の初期段階に特徴的である。軟骨組織は、神経支配されず［Ｈａｍ’ｓ Ｈｉｓｔｏｌｏｇｙ（第９版）（Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ：Ｊ．Ｂ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｃｏ．１９８７）２６６－２７２頁］、血管化もされないので、表層性欠陥は、代表的には、疼痛性ではない。しかし、痛みはないが、表層性欠陥は、一般に、治癒せず、そしてしばしば、全層

性欠陥への変性する。

【００１０】

一般に、関節軟骨は血管系を欠いているので、損傷した軟骨組織は、修復応答を誘発するのに十分または適切な刺激を受けないと考えられている［Ｗｅｂｂｅｒら、「Ｉｎｔｒｉｎｓｉｃ Ｒｅｐａｉｒ Ｃａｐａｂｉｌｉｔｉｅｓ ｏｆ Ｒａｂｂｉｔ Ｍｅｎｉｓｃａｌ Ｆｉｂｒｏｃａｒｔｉｌａｇｅ：Ａ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｍｏｄｅｌ」（３０ｔｈ Ａｎｎ．Ｏｒｔｈｏｐ．Ｒｅｓ．Ｓｏｃ．，Ａｔｌａｎｔａ，Ｆｅｂ．１９８４）；Ｗｅｂｂｅｒら、Ｊ．Ｏｒｔｈｏｐ．Ｒｅｓ．３、３６－４２頁（１９８５）］。軟骨組織中の軟骨細胞は、通常、十分な量の修復刺激因子（例えば、増殖因子）に曝されず、そしてフィブリン凝塊が、代表的に、損傷された血管化された組織中に存在するということが理論付けられている。

【００１１】

損傷された軟骨組織を修復刺激に曝すために使用されている１つのアプローチは、軟骨を通して軟骨下の骨へドリルするかまたは削り取り、出血を生じさせることを含む［Ｂｕｃｋｗａｌｔｅｒら（１９９０）前出］。不幸にも、このような外科的外傷に対する組織の修復応答は、通常、出血を引き起こす全層性欠陥において自然に生じることが観察される修復応答（つまり、不十分な生体力学特性を示し、そして長期間持続しない、繊維性型の軟骨の形成）に匹敵する［Ｂｕｃｋｗａｌｔｅｒら（１９９０）前出］。

【００１２】

種々の増殖因子が単離されており、そして現在、研究および生体医学適用に利用可能である［例えば、Ｒｉｚｚｉｎｏ，Ａ．，Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．，１３０，４１１－４２２頁（１９９８）を参照のこと］。これらの増殖因子のいくつか（例えば、トランスフォーミング増殖因子β（ＴＧＦ－β））は、インビトロの胚性ラット間葉細胞において、軟骨特異的分子（例えば、ＩＩ型コラーゲンおよび軟骨特異的プロテオグリカン）の形成を促進することが報告されている［例えば、Ｓｅｙｅｄｉｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８２，２２６７－７１頁（１９８５）；Ｓｅｙｅｄｉｎら、Ｊ．Ｂｉｏ．Ｃｈｅｍ．，２６１，５６９３－９５頁（１９８６）；Ｓｅｙｅｄｉｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６２，１９４６－１９４９頁（１９８７）］。

【００１３】

何百万人もの患者が、変形性関節症を有する（すなわち、その患者らの関節軟骨において変性性の欠陥または病変を有する）として診断されている。にもかかわらず、損傷された軟骨において修復応答を誘発する種々の方法が主張されているが、これらの処置のいずれもが、実質的に適用されていない［Ｂｕｃｋｗａｌｔｅｒら（１９９０）前出；Ｋｎｕｔｓｏｎら、Ｊ．Ｂｏｎｅ ａｎｄ Ｊｏｉｎｔ Ｓｕｒｇ．，６８－Ｂ，７９５頁（１９８６）；Ｋｎｕｔｓｏｎら、Ｊ．Ｂｏｎｅ ａｎｄ Ｊｏｉｎｔ Ｓｕｒｇ．，６７－Ｂ，４７頁（１９８５）；Ｋｎｕｔｓｏｎら、Ｃｌｉｎ．Ｏｒｔｈｏｐ．，１９１，２０２頁（１９８４）；Ｍａｒｑｕｅｔ，Ｃｌｉｎ．Ｏｒｔｈｏｐ．，１４６，１０２頁（１９８０）］。そして、このような処置は、一般に、一次的な軽減を提供するに過ぎなかった。「軟骨保護（ｃｈｏｎｄｒｏｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ）因子」の全身的使用もまた、変形性関節炎の進行を阻止し、そして痛みの軽減を誘導すると述べられている［Ｌｏｈｍａｎｄｅｒ，Ｌ．Ｓ．ら、Ａｎｎ．Ｒｈｅｕｍ．Ｄｉｓ．．５５（７），４２４－３１頁（１９９６）］。しかし、このような因子は、軟骨組織における病変または欠陥の修復を促進することが示されなかった。

【００１４】

考慮されている１つのアプローチは、米国特許第４，８４６，８３５号に例示される。ここでは、軟骨細胞が、生検によって取り出された成熟軟骨組織から回収され、その後、組織培養物において数の上で増殖または拡大され、次いで、インサイチュで軟骨細胞を固定するために使用されるコラーゲンゲルマトリクス中で、欠陥部位に移植される。骨膜シートが、その欠陥に移植された細胞（すなわち、移植片）を固定するために使用される。このアプローチは、本発明よりもより侵襲性であり、そして成熟軟骨を取り出すことによ

ってさらなる軟骨欠陥を生じるという欠点を被る。欠陥を修復するための関節軟骨の使用はまた、関節軟骨が滑膜細胞と比較してより限定された増殖能力を有するので、不利である。

【００１５】

別のアプローチは、軟骨欠陥への移植のために、骨髄由来の間葉幹細胞を形質転換し、軟骨細胞をインビトロで作製することであった［ＣａｐｌａｎおよびＨａｙｎｅｓｗｏｒｔｈ、米国特許第５，８１１，０９４号］。これらの細胞は、骨髄生検を介してしか得ることができず、これは、患者のドナー部位（通常、骨盤の腸骨稜）で長期の局所的病理に関連し得る。次いで、生検された骨髄細胞は、精巧な技術を使用して精製され、インビトロで拡大され、そして欠陥部位に播種されなければならない［Ｃａｐｌａｎら、Ｃｌｉｎ．Ｏｒｔｈｏｐ．，３４２，２５４－２６９頁（１９９７）を参照のこと］。

【００１６】

文献に見られるさらなるアプローチは、新しい組織の増殖を刺激するために、欠陥を取り囲む組織を介して電位を印加することである［米国特許第４，５０６，６７３号］。

【００１７】

このような欠陥を修復する別のアプローチは、米国特許第５，２７０，３００号、同第５，２０６，０２３号および同第５，３６８，８５８号に見出され、ここでは、本発明者らが、その発明を記載し、ここで、修復細胞が滑膜区画から欠陥部位へ誘引され、これらが、増殖されそして軟骨細胞に分化されるように誘導され、この軟骨細胞が、新しい軟骨マトリクスを合成する。

【００１８】

細胞を関節軟骨内で懸濁液中またはマトリクス中に維持するための１つの手段は、その欠陥空間の上部に適切な薄い被覆膜を縫合することであることが報告されている。現在までに使用されている被覆膜材料は、骨膜由来、軟骨膜由来または筋膜である。これらの被覆膜または他の関節被覆膜は、その被覆膜自体が軟骨組織へ変換しないか、または限られた程度にしか変換しないという、重大な欠点を有する。従って、欠陥空間は、修復軟骨で完全に満たされない。さらに、繊維性型の被覆膜の分解は、非常に低い。さらに、これらの被覆膜は、欠陥病変の境界に沿ってネイティブ組織と一体化しない。このような被覆膜組織は、線維芽細胞を含み得、これらは、軟骨細胞に変換せず、その代わり、所望でない瘢痕様組織を生じる。従って、特定の先行技術の被覆膜において、線維芽細胞は、修復空間内外に移動し、修復空間を汚染し、そして所望でない瘢痕組織形成を導き得る。

【００１９】

従って、表層性および全層性の軟骨欠陥（例えば、重篤な機械的損傷および変形性関節症の場合に見出されるような）の単純で、迅速で、かつ信頼性の高い処置に対する必要性が存在する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【００２０】

（発明の要旨）

本発明は、ヒトおよび他の動物の軟骨における病変の修復を誘導するための効果的な治療組成物および方法を提供する。本発明の組成物および方法の使用はまた、さもなければ効果的な関節機構の損失を導き、これが、可能性のある関節の切除ならびに金属および／またはプラスチックの人工関節での関節の置換を導く、外傷性の病変および変形性関節症の形成の治癒を促進する。

【００２１】

本発明において、関節における軟骨欠陥に罹患している患者は、関節領域に局所麻酔を投与されるか、または全身麻酔が投与され得る。適切な外科ツールを使用して、滑膜組織の一部を抽出する。その欠陥と同じ関節から滑膜組織を取り出すことが有利であり得る。なぜなら、軟骨細胞および滑膜細胞は、それらが由来する特定の関節に代表的な力学的特性および構造的特性を満たす形態に成熟することが示されているからである［Ｋｕｅｔｔ

ｎｅｒ，Ｋ．Ｅ．，Ｃｌｉｎ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２５，１５５－６３頁（１９９２）（ｃａｒｔｉｌａｇｅ ｏｆ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ ｊｏｉｎｔｓ ｄｉｆｆｅｒ ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ）；Ａｒｃｈｅｒ，Ｃ．Ｗ．，Ａｎｎ．Ｒｈｅｕｍ．Ｄｉｓ．，５３，６２４－３０頁（１９９４）（ｆｅｔａｌ ｃａｒｔｉｌａｇｅ ｄｉｆｆｅｒｓ ｊｏｉｎｔ ｔｏ ｊｏｉｎｔ）］。しかし、いくつかの場合、不十分な量のドナー滑膜組織を含む小さい関節の修復における使用のために、大きい関節から滑膜組織を取り出すことが有利であり得る。このようにして得られた滑膜の組織または細胞は、以下に記載の修復手順において使用される。あるいは、骨膜または軟骨膜由来の形質層を、細胞または修復組織の供給源として使用し得る。

【００２２】

修復材料を欠陥に満たす前に、欠陥部位の軟骨関節の縁部を、プロテオグリカン分解酵素で処理し、表在性のプロテオグリカンを除去することが好ましい。この処置は、その下にあるコラーゲン網を露出し、より大きな組織統合および修復材料の接着を可能にする。

【００２３】

本発明の１つの実施形態において、滑膜組織は、即時の移植手順において使用される。滑膜またはミンスされた滑膜を、軟骨細胞への滑膜細胞の分化を誘導するトランスフォーミング因子の存在下で移植することが好ましくは、次いで、この軟骨細胞が、新しい軟骨を形成し、それによって欠陥を修復する。好ましくは、滑膜またはミンスされた滑膜は、生分解性マトリクス中に分散され、次いで、このマトリクスが、欠陥部位に移植される。トランスフォーミング因子は、制御放出送達系を介して投与され得る。

【００２４】

本発明の別の実施形態において、ミンスされた滑膜は、手短なコラゲナーゼ消化およびトリプシン消化（３０～４５分）に供され、その後、手術室において迅速に精製される。次いで、これらの滑膜小片を、欠陥部位への即時の移植に使用し、これは、トランスフォーミング因子を含む生分解性マトリクス中に懸濁され、移植後に、このトランスフォーミング因子が、これらの小片を軟骨細胞に分化させる。あるいは、スタック中に配列された滑膜シートを使用して、欠陥を満たし得る。適切なトランスフォーミング因子の添加は、インサイチュでの軟骨細胞への滑膜細胞の変換を促進する。
このような因子は、好ましくは、滑膜シートの間に配置される。適切な抗血管形成因子はまた、新たな軟骨組織の血管新生を防止するために使用され得、そして適切な鉱化／石灰化インヒビターが、新たな軟骨組織の骨化を防止するために使用され得る。

【００２５】

あるいは、全骨膜、軟骨膜、または好ましくは、骨膜もしくは軟骨膜の形成層のシートは、欠損を満たすために使用される。組織のいくつかの構成：小片、シート、小片と共に分散されたシート、生分解性マトリクス中に懸濁された組織、またはそれらの要素の組み合わせの任意のものが可能である。さらに、異なる組織を、組み合わせて使用し得る。例えば、骨膜形成層シートは、欠損床に配置され得、滑膜小片または骨膜小片を含む生分解性マトリクスは、この欠損を満たすために使用され得、そして滑膜シートは、この欠損を被覆するために使用され得る。あるいは、滑膜シートおよび骨膜シートまたは軟骨膜シートの混合層が、欠損を満たすために使用され得る。

【００２６】

滑膜細胞はまた、移植手順において使用され得る。滑膜細胞は、滑膜または滑液から得られ、また一方で、形成層細胞は、骨膜または軟骨膜の形成層から得られる。次いで、この細胞が、充分な数（以下に記載されるような）存在しない場合、この細胞は、インビトロで培養され、そして増殖される。この培養された細胞が、充分な数まで増殖される場合、この細胞は、軟骨欠損部位に移植される。好ましくは、この細胞は、欠損部位に移植される生分解性マトリクス中に移植される。この細胞は、滑膜細胞の分化を引き起こす形質転換因子の存在下で、軟骨細胞に移植され、これは次いで、新たな軟骨を形成し、それによりこの欠損を修復する。この形質転換因子は、徐放送達系を介して投与され得る。

【００２７】

あるいは、軟骨細胞は、形質転換された滑膜シートから単離され、次いで、上記のように、これらをマトリクスまたは懸濁液に挿入することによって、欠損空間に移植され得る。この様式で誘導される軟骨細胞はまた、その数を増加して、軟骨形成亜集団について選択するために、軟骨移植の前にインビトロで増殖され得る。

【００２８】

本発明の別の実施形態において、滑膜細胞は、形質転換因子の存在下で、インビトロで軟骨細胞に分化するように誘導され、この軟骨細胞は、軟骨組織を形成し始める。細胞周囲マトリクスの部分的酵素消化は、個々の軟骨細胞を放出するように実施され得、次いで、この軟骨細胞は、塊として欠損部位に移植される。あるいは、インビトロで形成される軟骨組織は、生分解性マトリクス中に移植され得、このマトリクスが、次いで、欠損部位に移植され得る。

【００２９】

本発明の別の実施形態において、滑膜細胞は、インサイチュで軟骨細胞中に形質転換され得る。本発明のこの局面において、滑膜細胞は、滑膜凹部の１つまたは脂肪パッドに対して近位で、滑膜に縫合された分化因子浸漬マトリクスパッドの使用によってインサイチュで分化するように誘導される。あるいは、これは、この分化因子浸漬マトリクスパッドを、関節空間のすぐ外側の滑膜組織に取り付けることによって、達成され得、関節を開く必要性を排除する。この形質転換組織は、切除され、そして細胞は、約３０～４５分間のコラゲナーゼ消化およびトリプシン消化を使用して、迅速に分離される。新たに形質転換された軟骨細胞は、インサイチュの移植の前に、インビトロでさらに増殖および／または分化され得る。次いで、軟骨細胞は、細胞を欠損空間に維持するために、懸濁液（関節腔への細胞の損失を防止するために、被覆膜により被覆される）またはマトリクスのいずれかで欠損部位に移植され得る。この被覆膜は、損傷の上側周囲の付近の欠損縁部に縫合され得る。

【００３０】

上記の実施形態の各々において、組織は、欠損部位からの組織または細胞の損失を防止するために、生分解性マトリクス内に移植されて、欠損を処置するために用いられる任意の薬剤または因子のためのキャリアとして欠損空間を効果的に満たすことが好ましい。あるいは、またはさらに、移植後の欠損部位の表面は、欠損部位からの組織または細胞の損失を防止するために、生分解性薄膜（「被覆膜」）により被覆されることが好ましい。

【００３１】

本発明の好ましい実施形態において、滑膜被覆膜（好ましくは、部分的に失活されている（すなわち、マクロファージ中で部分的に枯渇されている）かまたは完全にネイティブである）は、満たされた欠損を被覆するために使用され得る。あるいは、筋膜組織シート（これは３回の凍結解凍サイクルによって完全に失活され得る（内在する修復マトリクス中の増殖因子に曝露された後の混入細胞の増殖を防止するため））は、欠損を被覆するために使用され得る。あるいは、生分解性膜は、人工的（例えば、ポリ乳酸シート、ヒアルロン酸シートおよび薄い（微細な）コラーゲンメッシュ）、または天然（例えば、骨膜、軟骨膜）であり得る。天然の骨膜または軟骨膜の被覆膜は、本発明に従って増殖因子が使用される場合には好ましくない。なぜなら、このような因子は、欠損領域に混入するこれらの被覆膜中の細胞を刺激し得るからである。しかし、このことは一般に、形成層のみが使用される場合には考慮されない。

【００３２】

関節軟骨欠損を被覆するための被覆膜としての滑膜組織膜の使用は、骨膜組織または筋膜を含む従来技術の被覆膜を越える利点を有する。滑膜組織は、軟骨細胞および軟骨に、より完全に形質転換され得、そして隣接する軟骨組織に、より良好に組み込まれ得る。骨膜組織および筋膜の両方は、代表的に、多くの線維芽細胞を含み得、この線維芽細胞は、軟骨細胞および軟骨に形質転換され得ず、瘢痕組織として存続する。滑膜組織膜の下の欠損にさらなる治療因子を使用することなく、滑膜組織膜を軟骨細胞および軟骨に形質転換することは、浅い欠損を修復するのに適切であり得る。

【００３３】
滑膜組織を被覆膜として使用する場合、この組織を、形質転換因子で処理することが好ましい。この形質転換因子を、徐放送達系と共に使用することがまた好ましい。この形質転換因子は、徐放送達系と共にかまたはなしで、滑膜被覆膜に加えられ得るか、あるいは、滑膜被覆膜は、徐放送達系と共にかまたはなしで、形質転換因子の溶液に浸漬され得る。

【００３４】
本発明は、従来技術の手順よりも簡単でありより迅速な手順である。例えば、本発明は、欠損部位への修復細胞の移動を引き起こすために誘引因子の存在を必要とせず、骨髄由来間葉細胞を使用するために必要な複雑な抽出手順および精製手順を必要としない。

【００３５】
膝において、滑膜組織は、膝蓋骨後方脂肪パッドの付近または滑膜組織の大きな貯蔵ひだが存在する膝蓋上凹部中の凹部から、切除され得る。滑膜組織のこのような除去は、関節機能の障害に実質的に関与しない。滑膜パッドの除去は、いずれの関節症状にも関連せず、そしてこれらの組織における任意の損傷は、自然に治癒する傾向がある。

【００３６】
満たされた欠損を被覆するために本発明の滑膜組織被覆膜を使用することはまた、全被覆膜自体が、軟骨組織に形質転換し得、かつ新たに形成する修復軟骨に組み込まれ得るという点で、従来技術の方法を越える有意な利点を有する。さらに、これは、隣接しているネイティブの組織（例えば、骨）によく組み込まれ得る。さらに、これは、形質転換増殖因子が使用される場合に、有利である。なぜなら、滑膜組織被覆膜は、軟骨形成前駆細胞を主に含むからである。

【００３７】
本発明に従う部分的に失活された組織被覆膜の使用もまた、有利である。あるいは、筋膜被覆膜が、使用され得る。好ましくは、このような筋膜被覆膜は、線維芽細胞、マクロファージおよび他の細胞型が、新たに形成された軟骨組織に混入し、続いて所望でない瘢痕組織を形成することを防止するために、使用前に充分に失活される（すなわち、使用前に３回凍結および解凍される）。

【００３８】
滑膜組織被覆膜について、部分的な失活は、他の細胞型ではなく、マクロファージを選択的に除去するために、好ましい。これは、単一の凍結－解凍サイクル、またはマクロファージおよび他の炎症性細胞の選択的除去のための当該分野で公知の他の方法によって、達成される（例えば、マクロファージは、マクロファージを選択的に中和する抗マクロファージ抗体または他の物質を使用することによって、滑膜組織または他の組織から除去され得る）。

【００３９】
上記の実施形態の各々において、抗炎症剤が、マクロファージの移動、活性化および増殖、ならびにパンヌス形成を防止するために、局所的に使用され得る。抗炎症剤としては、ステロイド性薬（例えば、プレドニゾン）、および非ステロイド性抗炎症薬（「ＮＳＡＩＤ」）（例えば、イブプロフェン、ケトプロフェン、ピロキシカム、ナプロキセン、スリンダク、アスピリン、コリンサブサリチレート、ジフルニサル、フェノプロフェン、インドメタシン、メクロフェナメート、サルサレート、トルメチンおよびサリチル酸マグネシウム）が挙げられる。このような抗炎症剤は、滑膜組織または滑膜細胞を含むマトリクス中の徐放送達システムにおいて、欠損に投与され得るか、または層状の滑膜シートの間に配置され得る。送達系の例としては、ポリ（乳）酸（ＰＬＡ）、ポリ（Ｄ，Ｌ－乳酸－ｃｏ－グリコール）酸（ＰＬＧＡ）またはポリ（ε－カプロラクトン）（ＰＣＬ）のミクロスフェア、リポソーム、生体腐食性ポリマー、硫酸ヘパリンプロテオグリカンに化学的に結合されたコラーゲン繊維、ならびに炭水化物ベースの微粒子が挙げられる。

【００４０】
上記の実施形態の各々において、軟骨の修復は、滑膜組織または滑膜細胞の自己移植（

すなわち、同じ個体由来）により行われ得るか、あるいは、滑膜組織または滑膜細胞の異種移植が行われ得る。異種移植は、当該分野で公知の免疫抑制治療剤の同時投与を必要とし得る。

【００４１】

本発明の滑膜組織被覆膜はまた、当該分野で公知の他の軟骨修復技術（例えば、米国特許第５，２０６，０２３号、同第５，２７０，３００号および同第５，８５３，７４６号に記載される技術が挙げられるが、これらに限定されない）と共に使用され得る。

【００４２】

（発明の詳細な説明）

本発明をより完全に理解し得るために、以下の詳細な説明が示される。この説明において、以下の用語が使用される。

【００４３】

（抗血管形成剤）－本明細書中で使用する場合、抗血管形成剤とは、内在する骨組織から軟骨組織への血管の内殖を防止する生物学的活性を有する任意の化合物または組成物（例えば、抗浸潤因子、軟骨由来血管形成インヒビター、アンギオスタチン、メタロプロテアーゼインヒビター、血管形成誘導因子に対する抗体（ｂＦＧＦおよび内皮細胞刺激性血管形成因子（ＥＳＡＦ）を含む）、スラミン（Ｇｅｒｍａｎｉｎ（登録商標）、Ｂａｙｅｒ　ＡＧ、Ｇｅｒｍａｎｙ）、フマギリン、フマギリンアナログ、およびＡＧＭ－１４７０［Ｐｅａｃｏｃｋ，Ｄ．Ｊ．ら、Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１６０，１７８－８４頁（１９９５）］）をいう。抗血管形成剤を決定するためのインビボおよびインビトロのアッセイは、当該分野で周知である［例えば、Ｍｏｓｅｓ，Ｍ．Ａ，Ｃｌｉｎｉｃａｌ　＆　Ｅｘｐｔｌ．Ｒｈｅｕｍａｔｏｌｏｇｙ，１１（Ｓｕｐｐｌ．８），５６７－６９頁（１９９３）；Ｍｏｓｅｓ，Ｍ．Ａ．ら、Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏ．，１１９（２），４７５－８２頁（１９９２）；Ｍｏｓｅｓ，Ｍ．Ａ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４８，１４０８－１０頁（１９９０）；Ｉｎｇｂｅｒ，Ｄ．ら、Ｎａｔｕｒｅ，２４８（６），５５５－５７頁（１９９０）］。

【００４４】

（関節鏡検査）－本明細書中で使用する場合、関節鏡検査とは、関節を検査または関節の手術を実施するための関節鏡の使用をいう。

【００４５】

（形成層細胞）－本明細書中で使用する場合、形成層細胞とは、関節および骨の軟骨膜または骨膜の形成層において見出される細胞をいう。

【００４６】

（軟骨）－本明細書中で使用する場合、軟骨とは、コラーゲンの原線維（主に、ＩＩ型コラーゲンおよび他の少数型（例えば、ＩＸ型およびＸＩ型））、種々のプロテオグリカン（例えば、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ケラタン硫酸プロテオグリカンおよびデルマタン硫酸プロテオグリカン）、他のタンパク質および水を含む細胞内物質（しばしば、「軟骨マトリクス」と呼ばれる）中に埋包された軟骨細胞を含む型の結合組織をいう。本明細書中で使用される場合、軟骨は、関節軟骨および半月軟骨を含む。関節軟骨は、関節中の骨の一部の表面を覆い、そして骨と骨とが直接接触することなく、関節中で移動することを可能にし、それにより、磨耗および隣接する骨表面に対する損傷を防ぐ。最も正常な健康な関節軟骨はまた、「ヒアリン」（すなわち、特徴的なすりガラスの外観を有する）と記載される。半月軟骨は、通常、衝撃および運動に曝露される関節中に見出される。半月軟骨のこのような位置としては、側頭下顎関節、胸鎖関節、肩鎖関節、橈骨手根関節および膝関節が挙げられる［Ｇｒａｙ’ｓ　Ａｎａｔｏｍｙ（Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ：Ｂｏｕｎｔｙ　Ｂｏｏｋｓ，１９７７）］。

【００４７】

（細胞接着促進因子）－本明細書中で使用する場合、細胞接着促進因子とは、フィブロネクチンおよびテトラペプチドほど小さな他のペプチド（これは、トリペプチドである、Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐを含む）を含む、細胞外物質への細胞の接着を媒介する任意の化

合物または組成物をいう［Ｒｕｏｓｌａｔｈｉら、Ｃｅｌｌ，４４，５１７－５１８頁（１９８６）］。

【００４８】

（軟骨細胞）－本明細書中で使用する場合、軟骨細胞とは、軟骨組織の成分（例えば、ＩＩ型軟骨性原線維および繊維、ならびにプロテオグリカン）を生成し得る細胞をいう。

【００４９】

（被覆膜）－本明細書中で使用する場合、被覆膜とは、隣接空間への細胞の損失を防止するために、移植後に満たされた欠損部位を被覆するために使用され得る任意の材料、ならびに骨欠損部分と全厚欠損の軟骨欠損部分との間に配置され得る任意の材料であって、骨欠損部分からこの全厚欠損の軟骨欠損部分への細胞移動および血管浸潤を防止する、材料をいう。本発明の方法および組成物において使用される膜は、好ましくは、生分解性であり、滑膜、ポリ乳酸シート、ヒアルロン酸シート、薄い（微細な）コラーゲンメッシュ、骨膜、軟骨膜または筋膜が挙げられ得る。滑膜は、代表的に、軟骨組織に形質転換されて、修復軟骨組織に組み込まれる。非生分解性膜としては、テフロン（登録商標）（Ｇｏｒｅｔｅｘ（登録商標））、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ（登録商標）膜、またはＶｅｒｉｇｅｎ（登録商標）膜が挙げられ得る。

【００５０】

（線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ））－天然、合成または組換えの供給源から得られる、ＦＧＦポリペプチドのファミリーの任意のメンバー［Ｇｉｍｅｎｅｚ－Ｇａｌｌｅｇｏら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，１３５，５４１－５４８頁（１９８６）；Ｔｈｏｍａｓら、Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｃｉ．，１１，８１－８４頁（１９８６）］またはその誘導体。これは種々の細胞のＤＮＡ合成および細胞分裂をインビトロで刺激する能力を示し［アッセイについては、例えば、Ｇｉｍｅｎｅｚ－Ｇａｌｌｅｇｏら、１９８６（前出）；Ｃａｎａｌｉｓら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，８１，１５７２－１５７７頁（１９８８）を参照のこと）］、一次線維芽細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞および角膜内皮細胞、骨芽細胞、筋芽細胞、平滑筋細胞ならびにグリア細胞が挙げられる［Ｔｈｏｍａｓら、１９８６、前出］。ＦＧＦは、それらの等電点（ｐＩ）に依存して、酸性ＦＧＦ（ａＦＧＦ）または塩基性ＦＧＦ（ｂＧＦＧ）として分類され得る。

【００５１】

（マトリクス）－本明細書中で使用する場合、マトリクスとは、多孔性複合体、細胞がその物質に収容され得るのに充分大きな細孔または空間を有する固体もしくは半固体の物質をいう。用語、マトリクスは、マトリクス形成材料（すなわち、軟骨または骨における欠損部位内でマトリクスを形成し得る材料）を含む。マトリクス形成材料は、マトリクスを形成するために重合剤の添加（例えば、フィブリンマトリクスを形成するための、フィブリノーゲンを含有する溶液へのトロンビンの添加）を必要とし得る。他のマトリクス材料としては、コラーゲン、コラーゲンとフィブリンの組み合わせ、アガロース（例えば、Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標））、ゼラチン、ヒアルロン酸（ヒアルロナン（ｈｙａｌｕｒｏｎａｎ））、コラーゲンと組み合わせたヒアルロン酸、光重合材料、アルブミンベースのマトリクス、ポリ酪酸ベースのマトリクス、ポリグリコール酸ベースのマトリクスおよびフィブリンベースのマトリクスが挙げられるが、これらに限定されない。固体マトリクスを形成するリン酸カルシウム（例えば、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイトまたは他のカルシウム塩）が、骨における欠損の処置において、単独でか、または他のマトリクス材料と組み合わせて使用され得る。

【００５２】

「増殖（マイトジェン）因子」とは、本明細書中で使用される場合、インビトロで細胞の増殖を刺激することができる、任意の化合物または組成物（ペプチド、タンパク質、および糖タンパク質を含む）を指す。ペプチド、ポリペプチド、および他の化合物の増殖（マイトジェン）活性を決定するためのインビトロアッセイは、当該分野で周知である［例えば、Ｃａｎａｌｉｓら、１９８８（上記）；Ｇｉｍｅｎｅｚ－Ｇａｌｌｅｇｏら、Ｂｉ

ochem. Biophys. Res. Commun. 135, pp. 541～548（1986）；Methods Enzymol. 146A（New York：Academic Press, 1987）, pp. 341－52中のRizzino「Soft Agar Growth Assays for Transforming Growth Factors and Mitogenic Peptides」；Methods Enzymol. 146A（New York：Academic Press, 1987）中のDicksonら「Assays of Mitogen－Induced Effects on Cellular Incorporation of Precursors for Scavengers, de novo, and Net DNA Synthesis」pp. 329－40を参照のこと］。化合物または組成物の増殖（マイトジェン）活性を決定するための1つの標準的方法は、軟寒天における非形質転換細胞の足場非依存性増殖を誘導する能力についてインビトロでその化合物または組成物をアッセイすることである［例えば、Rizzino, 1987（上記）］。他のマイトジェン活性アッセイ系もまた、公知である［例えば、Gimenez－Gallegoら、1986（上記）；Canalisら、1988（上記）；Dicksonら、1987（上記）］。因子のマイトジェン効果は、しばしば、非所に濃度依存性であり、そしてその効果は、マイトジェン有効性について最適な濃度範囲よりも低い濃度または高い濃度にて、反転し得る。

【0053】

「滑膜細胞」とは、本明細書中で使用される場合、滑膜と生理学的に関連する細胞、または滑膜下空間に存在する細胞；関節の滑膜または滑液から得られた細胞を指す。適切な刺激に曝された場合、この滑膜細胞は、分化し、そして軟骨細胞へと転換される。滑膜由来修復細胞とは、間葉細胞、線維芽細胞、線維芽細胞様細胞、マクロファージ、脱分化軟骨細胞、滑膜管壁細胞、および滑膜線維芽細胞様細胞を包含する。

【0054】

「トランスフォーミング因子」とは、本明細書中で使用される場合、例えば、滑膜由来細胞から軟骨細胞への分化を誘導する、任意のペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または他の任意の化合物もしくは組成物を指す。この語はまた、欠損を修復するために使用される細胞中に（例えば、トランスフェクションによって）導入される遺伝子産物を包含する。その化合物または組成物が、細胞による軟骨特異的プロテオグリカンおよびII型コラーゲンの産生を誘導または刺激する能力は、当該分野で公知のインビトロアッセイにより決定され得る［Seyedinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, pp. 2267～71（1985）；Seyedinら、Path. Immunol. Res. 7. pp. 38－41（1987）］。

【0055】

「トランスフォーミング増殖因子β（TGF－β）」とは、天然供給源、合成供給源、または組換え供給源から得られる、TGFβポリペプチドのファミリー［Derynck, R.ら、Nature, 316, pp. 701－705（1985）；Peptide growth factors and their receptors I（Berlin：Springer Verlag, 1990）p419中のRobertsら「The transforming growth factor－β's」］の任意のメンバーまたはその誘導体であって、軟寒天アッセイにおいて正常ラット腎臓（NRK）細胞が増殖およびコロニー形成するように刺激する特徴的なTGFβ活性を示し［Methods for Preparation of Media, Supplements, and Substrata for Serum－Free Animal Cell Culture（New York：Alan R. Liss, Inc., 1984）中のRobertsら「Purification of Type β Transforming Growth Factors From Non－neoplastic Tissues」］、かつインビトロで細胞による軟骨特異的プロテオグリカンおよびII型コラーゲンの産生を誘導または刺激する能力により示されるような、滑膜

由来修復細胞から軟骨細胞への転換を誘導することができる［Ｓｅｙｅｄｉｎら、１９８５（上記）］。

【００５６】

（欠損の修復および滑膜組織の取得）

本発明に従って軟骨における欠損または損傷を処置する方法を実行するために、修復されるべき関節軟骨欠損が、まず同定される。動物における軟骨欠損は、関節の関節鏡検査または開放性手術の間の損傷または欠損の簡単な検査の間に、視覚的に容易に同定可能である。軟骨欠損はまた、コンピュータ補助連動断層撮影（ＣＡＴスキャニング）、Ｘ線検査、磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）、滑液マーカーまたは血清マーカーの分析によってか、あるいは当該分野で公知の他の任意の手順によって、推論的にも同定され得る。

【００５７】

一旦欠損が同定されると、修復の前または修復時に、外科医は、その欠損を外科的に改変して、本明細書中に記載される処置方法にて付加される滑膜組織、細胞、および／またはマトリクス材料をその欠損が物理的に保持する能力を増強させ得る。好ましくは、平坦な形状または浅い凹面の形状を有する代わりに、その欠損は、垂直方向の縁を有するかもしくは垂直方向の縁を有するような形状であるか、または本明細書中に記載される処置方法にて付加される滑膜組織、細胞、および／もしくはマトリクス材料をより良好の保持するように受け口がある。十分な厚さの欠損および浅い欠損の両方が、「微小骨折（ｍｉｃｒｏｆｒａｃｔｕｒｅ）」と呼ばれるプロセスにおいて出血する別個の領域を生じるように処置され得、このプロセスは、肋軟骨下骨板において測定した穿孔を作製する工程を包含する。遊離した骨髄要素は、外科的に誘導された凝固を形成し、この凝固は、新規な組織形成のための富化した環境を提供する［Ｓｔｅａｄｍａｎら、Ｃｌｉｎ．Ｏｒｔｈｏｐ．３９１　Ｓｕｐｐｌ．ｐｐ．Ｓ３６２－６９（Ｏｃｔ．２００１）］。

【００５８】

１つの実施形態において、局部麻酔下で、小さい関節鏡介入または外科的介入が、実施される。欠損部位は、必要に応じて、移植前に、再移植された滑膜組織、細胞、またはマトリクスの接着を改善し得るようにプロテオグリカン分解酵素または他の物質で処置され得る。欠損の表面は、滅菌した吸収組織を使用してその領域にブロットすることにより乾燥され、そして欠損容積が、滅菌酵素溶液で２～１０分間充填され、軟骨表面上とその欠損の表面から約１～２μｍ以内の深さに局所的に存在するプロテオグリカンが分解される。種々に酵素が、プロテオグリカンを分解するために、滅菌した緩衝化水溶液中において、単独でかまたは組み合わせて使用され得る。その溶液のｐＨは、酵素活性を最適化するように調整されるべきである。

【００５９】

本発明の方法においてプロテオグリカンを分解するために有用な酵素としては、コンドロイチナーゼＡＢＣ、コンドロイチナーゼＡＣ、ヒアルロニダーゼ、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、プロナーゼ、ストロメリシンおよびＳｔａｐｈ　Ｖ８プロテアーゼが挙げられる［Ｊｕｒｇｅｎｓｅｎ，Ｋ．ら、Ｊ．Ｂｏｎｅ　Ｊｏｉｎｔ　Ｓｕｒｇ．Ａｍ．７９（２），ｐｐ．１８５－９３（１９９７）；Ｈｕｎｚｉｋｅｒ，Ｅ．Ｂ．ら、Ｊ．Ｂｏｎｅ　Ｊｏｉｎｔ　Ｓｕｒｇ．Ｂｒ．８０（１），ｐｐ．１４４－５０（１９９８）］。特定の酵素または酵素の組み合わせの適切な濃度は、その酵素溶液の活性に依存する。

【００６０】

本発明の好ましい実施形態において、その欠損は、濃度１Ｕ／ｍｌのコンドロイチナーゼＡＣの滅菌溶液で充填され、そして消化が、４分間進行される。コンドロイチナーゼＡＣの好ましい濃度は、実施例１に記載される手順に従って決定される。使用される他のどの酵素も、深さ約１～２μｍまでの表面のプロテオグリカンのみが分解されるような、濃度および期間使用されるべきである。

【００６１】

その酵素溶液が適用される時間は、修復領域において優先的にプロテオグリカンの分解

をもたらすための最小値に維持されるべきである。濃度１Ｕ／ｍｌのコンドロイチナーゼＡＢＣまたはコンドロイチナーゼＡＣについて、１０分間よりも長い消化期間は、欠損領域の外側のプロテオグリカンの不必要かつ有害な可能性のある分解を生じ得る。さらに、１０分間よりも長い消化時間は、この手順の全体の時間に過剰に寄与する。この手順の全体の時間は、特に開放性関節切開の間は最小値に維持されるべきである。なぜなら、軟骨は、空気に曝されることにより分解され得るからである［Ｍｉｔｃｈｅｌｌら（１９８９）（上記）］。これらの理由のため、酵素消化によるプロテオグリカンの分解工程を包含する本発明の方法の実施形態において、１０分間未満の消化時間が好ましく、５分間未満の消化時間が最も好ましい。

【００６２】

本発明の方法に従って、欠損の表面から酵素がプロテオグリカンを分解した後、その酵素溶液は、欠損領域から除去されるべきである。この酵素溶液の除去は、微細な吸引を備えたアスピレーターを使用し、その後ｃｏｔｔｏｎｏｉｄで拭うことによって行われ得る。あるいは、その酵素溶液は、ｃｏｔｔｏｎｏｉｄのみで拭い去ることによって除去され得る。

【００６３】

その酵素溶液の除去後、その欠損は、徹底的に、好ましくは３回、滅菌生理食塩水（例えば、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ）でリンスされるべきである。リンスされた欠損部位は、その後乾燥されるべきである。滅菌ガーゼまたは滅菌ｃｏｔｔｏｎｏｉｄが、この欠損部位を乾燥させるために使用され得る。

【００６４】

手術内滑膜再移植または手術内滑膜移植のために、プロテオグリカン分解酵素は、いかなるプロテアーゼも除去し、添加された増殖因子の不活化をそれにより妨げるために、徹底的に洗浄されなければならない。

【００６５】

あるいは、またはこの酵素処理工程に加えて、この欠損部位は、化合物（例えば、フィブリン接着剤またはトランスグルタミナーゼ）を用いて施されて、その欠損部位へのマトリクスの接着が増強され得る。好ましい実施形態において、フィブリン接着剤またはトランスグルタミナーゼは、その欠損部位が酵素処置後にリンスされ乾燥された後に、その欠損部位に適用される。フィブリン接着剤は、欠損表面上の軟骨コラーゲン原線維とマトリクスの原線維との化学的結合（架橋）を促進する［Ｇｉｂｂｌｅら、Ｔｒａｎｓｆｕｓｉｏｎ、３０（８），ｐｐ．７４１－４７（１９９０）を参照のこと］。酵素トランスグルタミナーゼは、同じ効果のために使用され得る［例えば、Ｉｃｈｉｎｏｓｅら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６３（２３），ｐｐ．１３４１１－１４（１９９０）；「Ｔｒａｎｓｇｌｕｔａｍｉｎａｓｅ］Ｖ．Ａ．ＮａｊｊａｒおよびＬ．Ｌｏｒａｎｄ編，Ｍａｒｔｉｎｕｓ　Ｎｉｊｈｏｆｆ　Ｐｕｂｉｓｈｅｒｓ（Ｂｏｓｔｏｎ，１９８４）］。縫合、焼灼、または細胞外マトリクスの接着を促進し得るフィブリン接着剤もしくはトランスグルタミナーゼ以外の化合物もまた、使用され得る。

【００６６】

この欠損に罹患している患者は、その欠損を含む関節にて局部麻酔されるか、または全身麻酔を投与され、そして適切な手術用の道具（例えば、生検セット、メスまたは関節鏡）が、その関節から適切な量の滑膜および／または滑液を抽出するために使用される。膝関節において、滑膜物質が、好ましくは、膝関節付近の遠位陥凹からまたは膝関節の脂肪パッドからまたは膝蓋上陥凹において除去される。滑膜組織（脂肪パッドを含む）もまた、その欠損を完全に充填するためにさらなる組織塊が有用である場合に使用され得る。一般に、滑膜は、貯蔵層に存在する領域から取り出されるべきであり、反対の関節軟骨表面からは直接取り出されるべきではない。

【００６７】

（滑膜組織の使用）

得られる滑膜組織は、迅速な手術内滑膜移植手順において使用され得る。滑膜組織は、

必要に応じて、一回の凍結融解サイクルにより部分的に失活され得、その後、その欠損内に配置され得る。増殖因子および／またはトランスフォーミング因子を含むマトリクスが、必要に応じて、その欠損を充填するために滑膜組織とともに使用され得る。

【００６８】

本発明の１つの実施形態において、滑膜組織が、欠損部位中に直接移植される。関節空間中に移植される滑膜組織の損失を防ぐために、その欠損部位の表面が、薄い生分解性被覆膜で被覆され得る。この被覆膜は、人工物であっても、天然物（例えば、下記のような、滑膜）であってもよい。この被覆膜は、縫合糸、フィブリン接着剤、組織トランスグルタミナーゼ、焼灼などにより、その欠損部位の縁にシールされる。滑膜と組み合わせて縫合糸が使用される場合、その縫合糸は、その滑膜中の滑膜細胞が軟骨細胞へと分化するのを促進する適切な濃度のトランスフォーミング因子（例えば、ＢＭＰ－２）を染み込まされ得る。

【００６９】

本発明の別の実施形態において、滑膜は、陥凹から取り出され、そして移植のために非常に小さい片へと切断される（すなわち、小片へと刻まれる）。刻まれた滑膜は、手術室において短いコラゲナーゼ消化およびトリプシン消化（３０～４５分間）に供され得、その後、迅速に精製され得る。あるいは、骨膜組織または軟骨膜組織の物理的な剥離および／または穏やかなタンパク質分解消化によって、形成層組織が得られ、そして刻まれる。刻まれた滑膜組織または形成層組織は、マトリクス中に混合され、そして欠損空間中にそのマトリクス内で移植される。マトリクス全体が細胞に存在するためにそのマトリクスが走化性因子／増殖因子を含み、そしてこのマトリクス内での軟骨組織変換を誘導するためにそのマトリクスが徐放系とともにトランスフォーミング因子を含むことが、好ましい。マトリクス全体は、その欠損空間内にそのマトリクスを保持するために、滑膜組織被覆膜または他の膜で被覆され得る。

【００７０】

本発明の別の実施形態において、切り出された滑膜シートの１つ以上の層が、その欠損空間が充填されるまで、重ねられる。最上層の縁、および必要に応じてその下層部の角が、インサイチュでその堆積物を保持するためにその欠損の縁に縫合または接着され得る。好ましくは上記のような徐放性送達系を使用して、滑膜シートの軟骨変換を誘導するために、それらのシートの間にトランスフォーミング因子が堆積される。組織が軟骨へと変換するのを誘導するためにトランスフォーミング因子を染み込ませた薄いマトリクス層（例えば、フィブリンまたはコラーゲン）をそれらのシートの間に堆積させることによって、これは行われる。あるいは、ミクロソーム、ミクロスフェア、ナノスフェアまたはリポソーム中に含まれたトランスフォーミング因子が、マトリクスを伴わずに、滑膜シートの間に添加され得る。別の実施形態は、これらのシートの間にそのような因子を含むエマルジョンを配置することである。あるいは、これらの滑膜シートが、再移植の前に、トランスフォーミング増殖因子含有溶液中に浸漬され得る。

【００７１】

上記の実施形態の刻まれた滑膜、刻まれた形成層組織、および滑膜シートはまた、細胞密度を減らしかつ望ましくない細胞の存在を減らすために、一回の凍結融解サイクルを介して部分的に失活され得る。あるいは、抗マクロファージ抗体または他の物質が、マクロファージ集団を除去するために使用され得る。

【００７２】

部分的に変換された滑膜組織もまた、欠損空間を充填するために使用され得る。第１の外科的介入において、徐放のためにトランスフォーミング増殖因子を染み込ませたマトリクスパッドが、関節中の滑膜の陥凹に縫合され付着されるか、あるいは、滑膜被覆膜のすぐ外側の滑膜組織に付着される。この介入の８～１４日間後、このようなマトリクスパッドの下の組織が、軟骨様組織へと変換される。その後、これは除去され、そして部分的に変換された滑膜組織でその欠損空間を充填するために、その欠損部位にて重ねられる。さらなるトランスフォーミング因子ならびに当該分野で公知の維持因子（例えば、ＩＧＦ

Ｉ、ＩＧＦ　ＩＩおよびＩＧＦ－ＢＰ）が、このような組織堆積物の層の間に添加され得る。

【００７３】

欠損が血管化組織（例えば、肋軟骨下骨および肋軟骨下骨髄空間または激しく血管化している滑膜付近）まで広がる領域において、内殖する血管がその欠損中の修復組織に混入し得る可能性が存在する。このような望ましくない血管内殖を防ぐために、抗血管形成因子が、そのマトリクスに添加され得るか、あるいは滑膜組織層の間、滑膜片の間、または滑膜由来移植軟骨細胞もしくは滑膜細胞の間に、堆積され得る。

【００７４】

（滑膜細胞の使用）

上記のように得られた滑膜は、個々の滑膜管壁細胞および滑膜線維芽細胞様細胞がその膜組織から遊離されるように、部分消化される。標準的トリプシン消化が使用され得るか、または周囲の組織からそれらの細胞を解離するための他の手段が使用され得る。個々の細胞が、（例えば、フィコール密度勾配を介する差次的沈降を介して）収集され、そしてその迅速な増殖および拡大を保証する標準的細胞培養条件下でインビトロで培養される（増殖因子が、この工程をより迅速に行うために添加され得る）。滑膜細胞培養技術は、当該分野で公知である［Ｔａｇｕｃｈｉ，Ｋ．ら、Ｃｅｌｌ　Ｓｔｒｕｃｔ．Ｆｕｎｃｔ．２２，ｐｐ．４４３－５３（１９９７），Ｒｏｄｅｌ，Ｊ．ら、Ｅｘｐ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．Ｐａｔｈｏｌ．４８，ｐｐ．２４３－７（１９９６）］。２～３週間以内に、滑膜細胞は、その欠損の大きさに依存して、その欠損部位への移植可能な状態に十分な数（例えば、溶液またはマトリクス１ｍｌあたり、１０，０００～３００，０００細胞）にまで拡大する。

【００７５】

本発明の別の実施形態では、培養された滑膜細胞は、インビトロで分化するように誘導される。間葉幹細胞は、インビトロで分化するように誘導され得ることが示されている［ＣａｐｌａｎおよびＨａｙｎｅｓｗｏｒｔｈ、米国特許第５，４８６，３５９号］。インビトロでＢＭＰ（骨形態形成タンパク質）を用いて刺激された滑膜誘導間葉型細胞は、軟骨へと分化することもまた示されている［Ｉｗａｔａら、Ｃｌｉｎ．Ｏｒｔｈｏｐ．，２９６，２９５－３００頁（１９９３）］。

【００７６】

この実施形態において、患者から取り出された滑膜細胞は、軟骨細胞への分化を誘導するために、ＴＧＦ－βおよび／またはＢＭＰ（好ましい濃度を以下に提供する）の存在下で培養される。次いで、得られた軟骨細胞は、以前に記載された実施形態のように（すなわち、懸濁物としてか、またはマトリクスシステムの一部として）、欠損部位へと移植される。

【００７７】

さらなる実施形態では、ＴＧＦ－βおよび／またはＢＭＰにより軟骨細胞へと分化するように誘導された滑膜細胞は、インビトロで軟骨組織を産生する。従って、軟骨組織は、欠損部にぴったりと適合するようにこの軟骨組織のサイズと形状を成形した後に、欠損部位へと移植される。あるいは、軟骨マトリクスは、軟骨産生軟骨細胞（これは、次いで、懸濁物または塊として移植される）を収集するために、部分的な酵素消化に供され得る。

【００７８】

（滑膜組織被覆膜の使用）

被覆膜として滑膜を使用する場合、部分的失活工程を実行することが好ましい。なぜならば、この組織はマクロファージを含むからである。このマクロファージは、軟骨組織形成に理想的ではない。なぜならば、マクロファージは、炎症細胞の増殖を導くか、または血管を誘引し得るシグナル物質を産生して、その結果、不必要な骨形成を導き得るからである。マクロファージは、一回の急速凍結および解凍プロセスにより取り出され得る。このプロセスは、滑膜被覆膜中の細胞の数を減少させる。これは、主に、マクロファージを取り出す一方で、間葉細胞の数は、減少はするが、軟骨細胞形成（従って、最終的な軟骨

形成）のために十分である。さらに、細胞密度を減少させることによる、部分的な失活は、修復組織における軟骨形成のために、より適切な生理学的細胞密度を作る。マクロファージを取り出すために当該分野で公知の他の方法（例えば、抗マクロファージ抗体）は、追加でまたは代替として用いられ得る。

【００７９】

上記のような、欠損部を被覆するための即時型の滑膜組織自己移植工程の代わりに、事前に形質転換された滑膜が用いられ得る。このアプローチでは、２工程の外科的方法が用いられる。第１の工程は、関節鏡検査介入であり、ここで、形質転換因子（例えば、ＢＭＰ－２、ＴＧＦ－β）を含浸するマトリクスパットは、（１）陥凹部内の滑膜か、（２）脂肪パッドを含む、滑液空間の直ぐ外側の滑膜組織か、または（３）滑膜裏打ち細胞に近接する滑膜下（ｓｕｂｓｙｎｏｖｉａｌ）結合組織に縫合される。選択肢（２）および（３）は、関節が開放される必要がないという利点を有する。このマトリクスパッドを並置した３～４週間後、滑膜は、軟骨様組織へと形質転換する。第２の工程は、外科的介入であり、ここで、この軟骨様組織領域は切り取られ、そして欠損部を補充および／または被覆するために、欠損部位へと移植される。非常に薄い関節軟骨層を有する小さな関節（例えば、指の関節）において、このような部分的に形質転換された滑膜は、欠損空間全体を補充するのに十分であり得る。膝関節において誘導され、そして小さな指の関節（または他の関節）へと自己移植されるこのような部分的に形質転換された滑膜は、再構築目的のために有用であり得る。

【００８０】

組織および／またはマトリクス材料を保持するための被覆物として本発明に従って用いられる滑膜被覆膜は、上下逆に方向付けられるか、または生理学的な方向で方向付けられる（どちらの方法も効果的である）。それは、完全に活性な材料、または結果を最適化するために特定の細胞型を排除するように部分的に失活した材料として適用され得る。

【００８１】

本発明に従う滑膜被覆膜の使用に関する１つの実施形態では、滑膜被覆膜は、全層性欠損部の床、または粉砕骨折した（ｍｉｃｒｏｆｒａｃｔｕｒｅｄ）全層性欠損部または表在性（ｓｈａｌｌｏｗ）欠損部（これは肋軟骨下の骨板にのみ達している）を覆うために用いられ得る。このような被覆膜は、これらの欠損部における構造的かつ機能的な障壁として機能し得る。１つ以上の出血点を含む、全層性欠損または表在性欠損において、骨形成因子（必要に応じて、制御放出システム（例えば、ミクロスフェア、リポソーム、またはマトリクスに含まれる）を伴う）は、欠損部の骨部分の基部に配置され得、次いで、第１の滑膜被覆膜で覆われ得る。必要に応じて、脈管形成因子が、第１の滑膜被覆膜の下に配置されて、骨形成をさらに促進し得るが、血液中の因子もまた、骨形成を促進する。第１の滑膜被覆膜は、縫合糸を用いて、焼灼を用いて、接着剤を用いて、他の手段を用いて、または何も用いずに、適所に保持され得る。抗脈管形成因子は、第１の滑膜被覆膜の周辺部で用いられて、上の関節修復空間の、血管による浸潤を阻止し得る。

【００８２】

第１の滑膜被覆膜の上（すなわち、欠損の骨部に隣接しない）で、軟骨形成因子は、マトリクス有りまたはマトリクス無しで用いられ、軟骨形成を促進し得る。軟骨形成因子と交互配置された、滑膜の積重ねが、欠損部を補充するために用いられることが好ましい。細胞ベースの治療もまた、マトリクス有りまたはマトリクス無しで、滑膜の積重ねの代わりに用いられて、軟骨形成を促進し得る。このような細胞ベースの治療は、滑膜細胞、軟骨細胞、骨髄間質細胞、軟骨形成遺伝子を用いて形質移入された細胞、または任意の軟骨形成細胞／マトリクスシステムの使用を含む。

【００８３】

軟骨形成細胞／マトリクスシステムで補充された後の欠損空隙の上部は、好ましくは、第２の滑膜被覆膜により被覆される。この第２の滑膜被覆膜は、軟骨組織への完全な形質転換を促進するため、および欠損空隙を補充する軟骨形成細胞／マトリクスシステムのための保持デバイスとして同時に機能するために、軟骨形成因子に直接かぶせられ得る。

【００８４】
上記の実施形態に従う第１の滑膜被覆膜（ｓｙｎｏｖｉａｌ　ｃｏｖｅｒｉｎｇ　ｍｅｍｂｒａｎｅ）は、係留デバイスとして機能し得、これは、全層性欠損部において、以下の３つの修復機能を行う：（１）全層性欠損部の骨部分、または表在性欠損部の出血点に向かい合う、滑液被服膜の面が、骨の形成に関与し、そして約１週間～約４週間の期間にわたって、新規に形成された骨と最終的に融合する；（２）欠損の骨部分から離れて向かい合う、滑液被服膜の面が、軟骨の形成に関与し、そして新規に形成された軟骨と最終的に融合する；そして（３）第１の滑膜被覆膜自体が、欠損部の骨部分または欠損の脂肪組織から上方の血管に対する一時的な障壁として機能し、そして骨および脂肪組織由来の様々な起源の幹細胞による、欠損部の軟骨修復空間への不必要な移動および汚染に対する障壁としてもまた機能する。
【００８５】
（マトリクスおよび他の修復材料）
軟骨欠損部を補充するか、さもなければ、整えるための本発明の方法に有用なマトリクス材料としては、フィブリノーゲン（トロンビンで活性化されて、欠損部または病巣内でフィブリンを形成する）、コラーゲン、アガロース、ゼラチン、ならびに任意の他の生分解性材料（これらは、滑膜細胞または軟骨細胞が、マトリクス内に場所を占め、そして増殖することを可能にするために、十分に大きい孔を有するマトリクスを形成し、そして修復プロセスの間に、分解され得、そして軟骨と交換され得る）が挙げられる。
【００８６】
本発明の方法において有用なマトリクスは、例えば、フィブリノーゲンのような化合物および組成物を重合して、フィブリンマトリクスを形成することによって、インサイチュで実行され得るか、または形成され得る。実行され得るマトリクスとしては、コラーゲン（例えば、コラーゲンスポンジおよびコラーゲンフリース）、化学修飾されたコラーゲン、ゼラチンビーズまたはゼラチンスポンジ、アガロースのようなゲル形成物質、および任意の他のゲル形成物質または複合材料（これらは、欠損部を補充し、そして、培養された滑膜細胞もしくは軟骨細胞またはネイティブの滑膜細胞もしくは軟骨細胞が、マトリクス内に場所を占めることを可能にするマトリクス材料から構成される）、または上記の混合物が挙げられる。
【００８７】
本発明の１つの実施形態では、マトリクスは、フィブリノーゲンおよび細かく切った滑膜組織を用いて形成され、使用の直前に、このマトリクスにトロンビンを添加して重合を開始させる。水性緩衝溶液の０．５～５ｍｇ／ｍｌのフィブリノーゲン濃度が使用され得る。好ましくは、水性緩衝溶液の１ｍｇ／ｍｌのフィブリノーゲン溶液が用いられる。欠損領域中のこのフィブリノーゲン溶液の重合は、滑膜細胞または軟骨細胞が自由にマトリクス内に場所を占め、そして増殖してマトリクスが占める欠損部の容積を満たすように、十分に大きい孔径（例えば、約５０～２００μＭ）を有するマトリクスを生じる。好ましくは、重合の完了の前に欠損領域内に材料を置けるように、外科医に十分な時間を許すために、十分な量のトロンビンが、適用の直前にフィブリノーゲン溶液に添加される。代表的には、トロンビン濃度は、重合が、数分（２～４分）以内に達成されるような濃度であるべきである。なぜならば、軟骨の長時間の空気への曝露は、損傷を引き起こすことが示されているからである［Ｍｉｔｃｈｅｌｌら、Ｊ．Ｂｏｎｅ　Ｊｏｉｎｔ　Ｓｕｒｇ．，７１Ａ，８９－９５頁（１９８９）］。過剰量のトロンビンは、用いられるべきではない。なぜならば、トロンビンは、増殖因子分子を切断し、そして増殖因子分子を不活化する能力を有するからである。水性緩衝溶液の１０～５００単位／ｍｌ、および、好ましくは、１００単位／ｍｌのトロンビン溶液が、フィブリノーゲン溶液に添加するために調製され得る。
【００８８】
本発明の好ましい実施形態では、フィブリノーゲン溶液（１ｍｇ／ｍｌ）の１ｍｌにつき、約２０μｌのトロンビン（１００Ｕ／ｍｌ）が、欠損部を補充する約２００秒前に混

合される。重合は、より低濃度のトロンビンが添加される場合に、よりゆっくりと生じる。２～４分以内にフィブリン重合を達成するために必要とされるトロンビン溶液の量は、おおよそでのみ与えられ得ることが理解される。なぜならば、これは、環境温度、トロンビン溶液の温度、フィブリノーゲン溶液の温度などに依存するからである。あるいは、好都合な場合、溶液が欠損部位に配置された後に、トロンビンをマトリクス溶液の上部に配置し、そしてこのトロンビンを溶液を通じて拡散させることにより、トロンビンが添加され得る。欠損部を補充するトロンビン活性型マトリクス溶液の重合は、フィブリノーゲン溶液の外部サンプルのトロンビン誘導型重合を観察することにより、容易にモニターされる。好ましくは、本発明の組成物および方法において、フィブリンマトリクスは、処置される種と同じ哺乳動物種の血液由来のフィブリノーゲン分子から形成される。他の種由来の非免疫源性フィブリノーゲンもまた、用いられ得る。

【００８９】

フィブリンおよびコラーゲンを含むマトリクス、または、より好ましくは、フィブリンおよびゼラチンもまた、本発明の組成物および方法において用いられ得る。コラーゲンマトリクスはまた、全層性欠損部を含む、軟骨欠損部を修復する際に用いられ得る。深い全層性欠損部の骨部分の修復については、米国特許第５，２７０，３００号および同第５，８５３，７４６号に開示される手順が用いられ得ることを特に言及する。

【００９０】

コラーゲンが、マトリクス材料として用いられる場合、十分な粘稠性の溶液が、例えば、Ｃｏｌｌａｇｅｎ－Ｖｌｉｅｓｓ（登録商標）（「フリース」）、Ｓｐｏｎｇｏｓｔａｎ（登録商標）、またはゼラチン－血液－混合物を用いて作成され得、そして重合剤を必要としない。コラーゲンマトリクスはまた、重合剤を用いて活性化されたフィブリノーゲン溶液と共に用いられ得、その結果、混合型マトリクスが生じる。

【００９１】

重合剤はまた、他の生分解性化合物がマトリクスを形成するために用いられる場合、必須でなくてもよい。例えば、Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）溶液が、選択され得る。このＳｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）溶液は、３９～４２℃で液体マトリクス溶液であり、そして３５～３８℃で固体（すなわち、ゲル様）になる。Ｓｅｐｈａｒｏｓｅはまた、欠損部を補充するゲルが、滑膜由来の修復細胞または軟骨細胞がマトリクスおよび欠損領域で自由に場所を占めることを可能にするようなメッシュサイズを有するような、濃度であるべきである。

【００９２】

（形質転換因子およびマトリクスの使用）

再移植した滑膜組織または滑膜細胞懸濁物は、一旦、欠損部位において、成熟軟骨組織を最終的に産生する軟骨細胞（これは、初めに、プロテオグリカン分解酵素を用いて処理した表面に付着する）へと一部自発的に形質転換し得る。［Ｈｕｎｚｉｋｅｒ，Ｅ．Ｂ．ら、Ｊ．Ｂｏｎｅ　Ｊｏｉｎｔ　Ｓｕｒｇ．Ｂｒ．，８０（１），１４４－５０頁（１９９８）］。好ましくは、適切な濃度の形質転換因子（例えば、トランスフォーミング成長因子β（ＴＧＦβ）、骨形態形成タンパク質（ＢＭＰ）［Ｍａｊｕｍｄａｒ，Ｍ．Ｋ．Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．，１８９（３），２７５－８４頁（２００１）］、軟骨由来形態形成タンパク質（ＣＤＭＰ）［Ｌｕｙｔｅｎ，Ｆ．Ｐ．Ａｃｔａ　Ｏｒｔｈｏｐ．Ｓｃａｎｄ．Ｓｕｐｐｌ．２６６，５１－４（１９９５）］、インディアンヘッジホッグタンパク質（Ｉｎｄｉａｎ　ｈｅｄｇｅｈｏｇ　ｐｒｏｔｅｉｎ）（ＩＨＨタンパク質）［Ｓｔ－Ｊａｃｑｕｅｓ，Ｂ．ら、Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．，１３（１６），２０７２－８６頁（１９９９）］、ソニックヘッジホッグ（ｓｏｎｉｃ　ｈｅｄｇｅｈｏｇ　ｐｒｏｔｅｉｎ）（ＳＨＨタンパク質）［Ｉｗａｍｏｔｏ，Ｍら、Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｏｒａｌ　Ｂｉｏｌ．Ｍｅｄ．，１０（４），４７７－８６頁（１９９９）］またはＳＯＸ－９［Ｋｏｌｅｔｔａｓ，Ｅ．ら、Ｒｈｅｕｍａｔｏｌｏｇｙ，４０（１０），１１４６－５６頁（２００１）］）が、移植された滑膜組織に添加されて、軟骨細胞への同種分化を誘導し得る。形質転換因子は、好ましくは、制御放出送達システム中で投与される。連続した増

殖および軟骨産生は、欠損部位を補充し、それによりこの欠損部を修復する。新規の軟骨が、形成されそして密度が高まると、この新規の軟骨は、生分解性マトリクスに取って代わり、そして薄い被覆膜が溶解するか、または修復組織に組み込まれて、修復病巣に残る。当該分野で公知の維持因子（例えば、ＩＧＦ　Ｉ、ＩＧＦ　ＩＩおよびＩＧＦ－ＢＰ）はまた、欠損部内の修復細胞集団を安定化するために用いられ得る。

【００９３】

軟骨修復を促進するための本発明の組成物および方法に有用な形質転換因子はとしては、任意のペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または任意の他の化合物または組成物（これらは、滑膜由来修復細胞の、軟骨特異的プロテオグリカンおよびＩＩ型コラーゲンを産生する軟骨細胞への分化を誘導する）が挙げられる。形質転換因子はまた、骨または他の細胞型を形成する細胞を誘導し得る。細胞において軟骨特異的プロテオグリカンおよびＩＩ型コラーゲンの産生を誘導または刺激する化合物または組成物の能力は、当該分野で公知のアッセイ［例えば、Ｓｅｙｅｄｉｎら、１９８５、前出；Ｓｅｙｅｄｉｎら、１９８７、前出］を用いて決定され得る。本発明の組成物および方法に有用な形質転換因子としては、例えば、ＴＧＦ－β、ＴＧＦ－α、ＦＧＦ（酸性または塩基性）およびＢＭＰ（ＢＭＰ－２を含む）が挙げられる。これらの形質転換因子は、単独または組み合わせで用いられ得る。これらの因子の二量体または多量体もまた用いられ得る。さらに、ＴＧＦ－βは、ＥＧＦと組合わせて用いられ得る。

【００９４】

特に、ＴＧＦ－βＩもしくはＴＧＦ－βＩＩまたはＭＢＰ－２が、形質転換因子として用いられ得る。他のＴＧＦ－β形態（例えば、ＴＧＦ-βＩＩＩ、ＴＧＦ－βＩＶ、ＴＧＦ－βＶ、またはＴＧＦ－βスーパーファミリーの任意のメンバー）またはＴＧＦ－β活性を有するポリペプチド（Ｒｏｂｅｒｔｓ，１９９０、前出、を参照のこと）、および将来検出されるこの物質の他の形態、および他の成長因子もまた、この目的に有用であり得る。

【００９５】

好ましい実施形態では、ＴＧＦ－β濃度は、好ましくは、マトリクスの２００ｎｇ／ｍｌより多く、そして最も好ましくは、溶液またはマトリクスの５００ｎｇ／ｍｌ以上である。あるいは、ＢＭＰは、１００～２０００ｎｇ／ｍｌの好ましい濃度で、形質転換因子として用いられ得る。滑膜細胞の分化を誘導するためのＴＧＦ－βまたはＢＭＰの好ましい濃度は、処置される特定の種または個体により変化し得ることが理解される。

【００９６】

本発明の組成物における形質転換因子は、マトリクス内で、欠損部位に適用される。従って、これらの存在は、非常に局在した部位に制限される。これは、関節空間へのこれらの自由注射または自由注入を避けるために行われる。このような自由注入は、周囲の滑膜の細胞を刺激して関節浸出を生じるという有害な効果を生じ得る。

【００９７】

本発明の好ましい実施形態では、移植される組織またはマトリクスは、形質転換因子として、ＴＧＦ－βまたはＢＭＰに加えて抗脈管形成剤を含む。

【００９８】

本発明の別の実施形態では、欠損部位は、上記のような、プロテオグリカン分解酵素および／または別の接着増強化合物を用いて処置される。滑膜組織または培養した滑膜細胞は、初めに生分解性マトリクスシステムに添加される。次いで、適切な濃度の滑膜組織または細胞を含むマトリクスシステム（例えば、１０，０００～３００，０００細胞／（１ｍｌの組織、溶液、またはマトリクス））は、欠損部位へ移植される。上記のように、薄い被覆膜（人工または天然）は、関節空間への組織の損失を防ぐために欠損部表面を覆って密封され得る；しかし、特により小さな欠損部では、被覆膜は必須でなくてもよい。なぜならば、欠損部を補充するために用いられる滑膜組織または細胞を含むマトリクスは、欠損部に留まる傾向があるからである。欠損部を補充するために用いられる滑膜組織内の細胞は、マトリクスシステム内で増殖する傾向がある。

【００９９】
上記のようにマトリクスシステムを用いる実施形態では、形質転換因子（好ましくは、ＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバー）は、移植の際にマトリクスシステム内に提供され、その結果、移植された滑膜細胞は、軟骨産生軟骨細胞への分化を誘導する。移植された細胞を形質転換因子に連続して長期間曝露させることを可能にするために、送達システムが形質転換因子と共に用いられる。適切な送達システムの例としては、ポリ乳酸ミクロスフェアおよびリポソームが挙げられる。症例の特定のパラメーター（例えば、欠損部位のサイズおよび密度、所定の時間での標的細胞の濃度、および用いられる形質転換因子）に依存して、送達スケジュールが立てられ得る。このようなシステムは、米国特許第５，２０６，０２３号に開示される。

【０１００】
さらに、欠損が、この欠損を満たすために使用される滑膜サンプルまたは細胞懸濁液内の細胞の濃度に対して大きい場合、増殖剤は、この欠損を満たす滑膜細胞の数を増加させる手段として、滑膜サンプルまたはマトリクスに添加され得る。増殖剤は、この欠損内の滑膜細胞に対する増殖効果を有するのに適切な濃度範囲で存在するべきである。好ましくは、この薬剤はまた、（例えば、ＴＧＦ－βの場合）細胞に対して走化性効果を有するべきである；しかし、排他的な増殖効果を有する因子は、特に、被覆する膜が、欠損空間において、組織および細胞を保持するために存在する場合、使用され得る。あるいは、欠損内に配置される細胞に対する走化性効果を作り出し、続いて、細胞増殖を誘導するために、２つの異なる薬剤（それぞれ、それらの特定の効果（走化性または増殖性のいずれか）のうちの１つのみを有する）が使用され得る。このような薬剤は、米国特許第５，２０６，０２３号に記載される。フィブロネクチンまたは他の細胞接着促進因子もまた、米国特許第５，２０６，０２３号に記載されるように、マトリクス内に含まれ得る。上で考察されるような形質転換因子の引き続く投与は、滑膜サンプルまたは細胞懸濁液中の細胞を、軟骨産生軟骨細胞に分化するように誘導する。上で考察されるような制御放出送達系は、増殖剤および形質転換因子のうちのいずれかまたはその両方を投与するために使用され得る。

【０１０１】
本発明の別の実施形態において、特に軟骨欠損が全厚みである場合、１つ以上の抗脈管形成剤は、軟骨組織内への血管増殖を妨げるのに適切な濃度範囲で、滑膜組織、細胞溶液またはマトリクスに添加され得る。使用され得る抗脈管形成剤としては、下にある骨組織または隣接する滑膜から軟骨組織に血管を内方増殖することを妨げる生物学的活性を有する任意の薬剤が挙げられる。このような抗脈管形成剤は、米国特許第５，８５３，７４６号に記載される。本発明に有用であり得る抗脈管形成剤のいくつかの例が、上記される。この抗脈管形成剤は、迅速な活性を提供するために自由に入手可能であるはずであり、そしてまた例えば、長期の活性に対する送達系と関連して、徐放形態で存在し得る。このような系はまた、米国特許第５，８５３，７４６号に記載される。

【０１０２】
あるいは、膜は、滑膜組織、細胞またはマトリクスの移植の前に、骨組織に向かって配置されて、下にある骨髄空間または他の周りの組織からの血管および脈管周囲細胞の内方増殖を妨げ、それによって、欠損部位における骨組織の形成を妨げる。米国特許第５，２７０，３００号および同第５，８５３，７４６号を参照のこと。抗炎症剤もまた、炎症細胞の混入を防ぐために、制御放出送達系に添加され得る。

【０１０３】
インビトロ細胞培養または滑膜組織もしくは滑膜細胞のインサイチュ形質転換のいずれかを含む上記実施形態において、滑膜細胞は、１つ以上の色素形成遺伝子を安定にまたは一過性でトランスフェクトされ得る。インビトロ細胞培養の場合、これは、欠損への移植の前、インビトロ細胞培養プロセスの間に、行われる。インサイチュ形質転換の場合、トランスフェクションはまた、当該分野で公知の手段（例えば、リポソームまたはアデノウ

イルスベクター）によって、インサイチュで達成され得る。
【０１０４】
トランスフェクトされた色素形成性遺伝子に関わる１つの実施形態は、インサイチュでトランスフェクションをもたらすために、欠損内に選択されたトランスフェクションビヒクルをインターリーブされた（ｉｎｔｅｒｌｅａｖｅｄ）滑膜組織の重なり（ｓｔａｃｋ）の使用である。色素形成遺伝子の例としては、限定しないが、ＢＭＰ、ＢＭＰ－２、ＢＭＰ－９、ＴＧＦ－β、ＣＤＭＰ、ＩＨＨ、ＳＨＨおよびＳＯＸ－９が挙げられ、これらは、その環境に適するような、当該分野で公知の方法（例えば、エレクトロポレーション、リポソーム送達およびウイルスベクター）に従って、トランスフェクトされ得る。当該分野で公知の色素形成遺伝子をコードするＤＮＡは、トランスフェクトされる色素形成遺伝子の公開されたＤＮＡ配列から得られるプライマー配列を使用する、市販のＤＮＡライブラリーのＰＣＲ増幅によって得られ得る。
【０１０５】
上記実施形態のそれぞれにおいて、組織またはマトリクスは、修復組織領域において、非特異的に、鉱化され得るかまたは石灰化され得る。従って、石灰化阻害剤または鉱化阻害剤（例えば、ビスホスホネート）が、このような望まない鉱化または石灰化を妨げ、そして修復組織のヒアリン様特性を保存するために組織またはマトリクスに添加され得る。組織修復領域を鉱化するように作用する肥大性軟骨細胞への軟骨細胞の分化を阻害することが望ましい。これは、副甲状腺ホルモンレセプタータンパク質または他の公知な活性な薬剤の使用によって達成され得る。
【０１０６】
上記実施形態のそれぞれにおいて、滑膜組織または滑膜細胞の移植に続き、そして生分解性被覆膜で満たされた欠損を必要に応じて覆って、関節空間は、外科的に層で閉じられる。
【０１０７】
本発明の方法は、動物（ヒトを含む）における軟骨欠損の処置を可能にし、これは、投与が容易であり、そして冒された関節領域の適所に制限される。処置全体は、関節鏡手順、開存的外科手術手順または経皮手順によって実行され得る。
【０１０８】
本明細書中に記載される本発明がより完全に理解され得るために、以下の例が記載される。これらの例が例示の目的であり、本発明をいかなるようにも制限するとは解釈されないことが理解されるべきである。
【実施例】
【０１０９】
（実施例Ｉ．インビボでの関節軟骨欠損を被覆するための滑膜の使用）
関節軟骨欠損を被覆するために滑膜を使用することの有用性を試験するために、５ｍｍの幅、１０ｍｍの長さおよび０．７ｍｍの深さの欠損を、成熟ヤギにおいて、平削り（ｐｌａｎｉｎｇ）機器を用いて作製した。新たな欠損を、４０ｎｇ／ｍｌの濃度の自由増殖剤（ＩＧＦ－１）および１．０μｇ／ｍｌの濃度のリポソームカプセル化形質転換増殖因子（ＢＭＰ－２）を含むフィブリンマトリクスを用いて満たした。次いで、欠損を、関節壁から切り出された同じサイズの滑膜で覆い、そして単回断続縫合を使用することによって、ｖｙｃｒｉｌ　７．０縫合材料によって欠損境界に縫合された。関節の閉鎖の後、動物を、４週間にわたって、軟らかいギプス包帯中で関節を固定して維持した（ｎ＝６匹の動物）。安楽死および組織学的分析に続いて、滑膜が周りの軟骨組織境界に良好に組み込まれ、そしてそれがまた軟骨様組織に形質転換されたことが見出された。３匹の動物において、滑膜組織を、関節孔に向かう滑膜管壁細胞を用いて配向させ、そして３匹の動物において、管壁細胞を欠損空間に向かって配向させた。両方のグループにおいて、同様な結果が得られた（すなわち、被覆膜配向は、本発明の方法において有意な役割を果たさないようである）。
【０１１０】

（実施例ＩＩ．Ａ．インビボで関節軟骨欠損を修復するための滑膜ビット（ｂｉｔ）の使用）

大きな関節軟骨欠損において、軟骨細胞に形質転換されて軟骨を修復し得る細胞を欠損に集める（ｐｏｐｕｌａｔｅ）ために、滑膜から関節軟骨欠損に滑膜細胞を移動させるプロセスは、手術に続く最初の数週間以内での細胞増殖および組織分化による完全な充填を達成するには、非常に遅くあり得るかまたは不十分な数の細胞を提供し得る。修復のための非常に多数の細胞の供給源を提供するために、滑膜材料は、小さな組織ビットに切り取られ、そしてフィブリンマトリクスに混合され、そして欠損内で、形質転換因子と一緒に堆積された。次いで、欠損は、上記実施例Ｉに記載されるように、滑膜被覆膜によって覆われた。実験のすべての局面は、滑膜ビットのフィブリンマトリクスへの添加を除いて、上記の通りであって。動物の屠殺において、組織形質転換の多くの領域が存在し、そして修復細胞の数は、新たな軟骨組織の形成に十分であった。

【０１１１】

（実施例ＩＩ．Ｂ．移植前の滑膜組織の部分的な失活）

ＩＩ．Ａ．（上記）における実験を、移植された滑膜被覆膜を１回凍結させ、そしてすぐに解凍するように、改変した。これはまた、滑膜組織内に存在するマクロファージの数を減少させるために、滑膜組織ビットを用いて行った。この工程を加えることによって、軟骨組織のより均一な形質転換が達成された。

【０１１２】

（実施例ＩＩＩ．関節軟骨欠損をインビボで修復するための滑膜の重なりの使用）

実施例Ｉ．（上記）に記載の実験を、欠損がほぼ欠損自体の寸法の滑膜の重なりを用いて満たされるように、改変した。欠損での配置の前に、滑膜のそれぞれを、４．４ｍｇ／ｍｌの濃度でＢＭＰ－２溶液中に浸して、軟骨組織への形質転換を誘導した。さらに、滑膜の層間に、形質転換因子（ＢＭＰ－２、４．４ｍｇ／ｍｌ）を含む少量のフィブリンマトリクスまたはミクロスフェアを堆積させて、形質転換因子の制御放出を可能にした。肉眼の結果は、滑膜組織の軟骨様組織への形質転換を示した。

【０１１３】

（実施例ＩＶ．インビボで関節軟骨欠損を修復するための培養滑膜細胞の使用）

実施例Ｉ（上記）に記載される処理と同様の欠損の処理を、適切な量の滑膜および／または滑液が好ましくは修復される関節から抽出される外科的介入に続いて、得られる滑膜細胞が、１０，０００～３００，０００細胞／１ｍｌ溶液の濃度に到達するまでインビトロで培養されるように、実行され得る。増殖剤を使用して、培養された滑膜細胞集団の増殖を早めることができる。

【０１１４】

次いで、培養された滑膜細胞集団を、懸濁液中の欠損部位に直接移植する。局所麻酔下で、小さな関節鏡または外科的介入が実行される。欠損の表面を、滅菌吸収組織を使用してその領域をブロッティングすることによって乾燥させ、そしてこの欠損容積を、軟骨の表面上に存在するプロテオグリカンを分解するために２～１０分間、滅菌プロテオグリカン分解酵素溶液を用いて、局所的に、欠損の表面から約１～２μｍの深さまで満たす。次いで、プロテオグリカン分解酵素を除去し、そして欠損をリンスする。

【０１１５】

次いで、懸濁液またはマトリクス（好ましい濃度は、１０，０００～３００，０００細胞／１ｍｌ溶液またはマトリクスである）において、培養された滑膜細胞を、欠損部位に、好ましくは、形質転換因子（例えば、ＴＧＦ－β）とともに、移植して、軟骨産生軟骨細胞への滑膜細胞の分化を促進する。関節空間への移植された細胞の損失を防ぐために、欠損部位の表面を、薄い生分解性被覆膜（好ましくは、滑膜）で被覆する。被覆膜を、縫合糸、フィブリン接着剤、組織トランスグルタミナーゼなどを用いて欠損部位の端に封着する。縫合が滑膜被覆膜とともに使用される場合、縫合糸は、適切な濃度でＢＭＰ－２のような形質転換因子に浸されて、軟骨細胞への被覆膜内の滑膜細胞の分化を促進し得る。

【０１１６】

培養された滑膜細胞の移植および生分解性被覆膜での被覆に続いて、関節空間は、層で外科的に閉鎖される。

【０１１７】

（実施例Ｖ．滑膜組織のインサイチュでの形質転換）

インサイチュでのＢＭＰ－２による滑膜組織形質転換の時間経過を、成体ウサギにおいて実験した。この研究は、各群において５匹のウサギの５つの群からなった。１００ｎｇ／ｍｌの濃度でＢＭＰ－２装填リポソームを含むコラーゲン性マトリクスを、各動物の膝関節における滑膜に縫合した。コラーゲン性マトリクスの移植に続いて、関節空間を層で外科的に閉鎖した。

【０１１８】

関節の組織を、０日目、６日目、８日目、１２日目および１４日目に試験した。関節全体を固定し、そしてプラスチックに埋め込み、その後、１．５ｍｍの一連の切片を作製した。このように、経時的に、組織組成における変化を観察することが可能であった。組織の４つの分類が、識別可能であった：（１）正常な滑膜組織；（２）新規な結合組織；（３）新規な軟骨；および（４）新規な骨（骨髄を伴う）。

【０１１９】

６日目に、正常な滑膜組織および新規な結合組織のみを観察した。８日目に、軟骨性の中心（ｆｏｃｉ）が見られた。１０日目に、新規な軟骨が、より大きな塊で得られた。１２日目に、骨中心が見られ、そして１４日目に、実質的な量の骨が、軟骨に加えて見られた。これらの結果は、膝関節における滑膜組織が、適切な条件下において、軟骨および骨への形質転換を可能にする成体幹細胞を含むことを示す。

フロントページの続き

審査官　松波　由美子

(56)参考文献　国際公開第００／０４８５５０（WO，Ａ１）
Ernst B. Hunziker et al., The Journal of Bone and Joint Surgery, １９９８年, Vol.80-B, No.1, p.144-150

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
A61L 27/00
CA(STN)
MEDLINE(STN)