(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
2016 年 5 月 19 日(19.05.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/076102 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/077 (2010.01) *C12N 1/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/080139

(22) 国際出願日: 2015 年 10 月 26 日(26.10.2015)

(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 2014-231489 2014 年 11 月 14 日(14.11.2014) JP

(71) 出願人: 株式会社リジェネシスサイエンス(RE-GENESIS SCIENCE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒8100074 福岡県福岡市中央区大手門三丁目１番３０－１２０６号 Fukuoka (JP).

(72) 発明者: 矢永　博子(YANAGA Hiroko); 〒8100001 福岡県福岡市中央区天神一丁目２番１２号 Fukuoka (JP). 矢永　克(YANAGA Katsu); 〒8100001 福岡県福岡市中央区天神一丁目２番１２号 Fukuoka (JP).

(74) 代理人: 廣瀬　隆行(HIROSE Takayuki); 〒1040042 東京都中央区入船３－８－７　ザ・ロワイヤルビル３階　廣瀬国際特許事務所内 Tokyo (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(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),

[続葉有]

(54) **Title**: METHOD FOR SERUM-FREE CULTURE OF CARTILAGE CELLS AND SERUM-FREE CULTURE MEDIUM

(54) 発明の名称 : 軟骨細胞の無血清培養方法，及び無血清培地

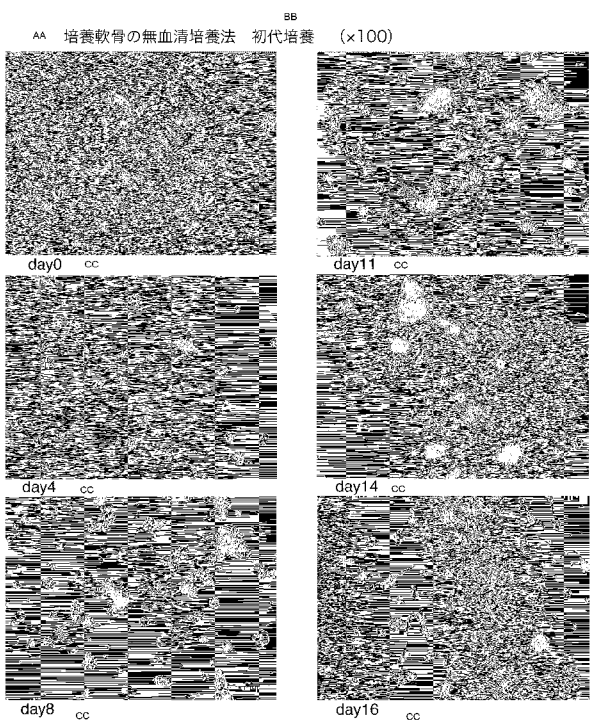


FIG. 1:
AA Method for serum-free culture of cartilage cells
BB Primary culture
CC day

(57) **Abstract**: [Problem] To provide a method for serum-free culture of human cartilage cells and a serum-free culture medium. [Solution] A method for serum-free culture of cartilage cells, said method comprising: an enzymatic treatment step for treating a human cartilage cell-containing tissue with a protease; an inhibitor-treatment step for, after the enzymatic treatment step, treating the tissue with an inhibitor for the aforesaid protease; and a culture step for, after the inhibitor-treatment step, culturing the tissue in a serum-free culture medium that contains kartogenin and/or SAG, ITS, FGF2 and hydrocortisone. A serum-free culture medium for culturing cartilage cells, said serum-free culture medium containing kartogenin and/or SAG, ITS, FGF2 and hydrocortisone.

(57) 要約: 【解決課題】　ヒト軟骨細胞の無血清培養方法や無血清培地を提供する。【解決手段】　ヒト軟骨細胞を含む組織を，タンパク質分解酵素で処理する酵素処理工程と，酵素処理工程の後に，前記組織を前記タンパク質分解酵素の阻害剤で処理する阻害剤処理工程と，阻害剤処理工程の後に，前記組織をカルトゲニン又はＳＡＧのいずれか又は両方と，ＩＴＳ，ＦＧＦ２，及びヒドロコルチゾンを含む無血清培地で培養する培養工程と，を含む軟骨細胞の無血清培養方法。カルトゲニン又はＳＡＧのいずれか又は両方と，ＩＴＳ，ＦＧＦ２，及びヒドロコルチゾンを含む軟骨細胞培養用の無血清培地。

WO 2016/076102 A1

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： 軟骨細胞の無血清培養方法，及び無血清培地

技術分野

[0001] 本発明は，無血清培養を行う前に細胞をタンパク質分解酵素で処理した軟骨細胞の培養方法や，その方法に適した無血清培地に関する。

背景技術

[0002] 特開２００３－１２５７８７号公報には，軟骨細胞分化培養に用いられる無血清培地や，その無血清培地を用いた軟骨細胞の培養方法が開示されている。

[0003] 特許第３６３８６１４号公報には，軟骨細胞培地及びその培地を用いた軟骨細胞の培養方法が開示されている。また，この文献には，ＩＴＳが開示されている。

[0004] 特表２００２－５２９０７１号公報には，軟骨細胞様細胞のための無血清培地が開示されている。

[0005] 特表２００９－５４０８２６号公報には，初代ヒト軟骨細胞を関節軟骨生検から単離し，プロテアーゼ（ストレプトマイセス・グリセウス）を用いて１時間酵素的消化を行い，その後，コラゲナーゼで酵素的消化を行なう軟骨細胞の培養方法が開示されている。この文献では，コラゲナーゼが軟骨から軟骨細胞を剥離するために用いられている。コラゲナーゼが過度に作用すると細胞を障害する。このため，細胞にコラゲナーゼが付着した状態で無血清培養を行うと，軟骨細胞がうまく培養できない他，得られた軟骨細胞が移植等に適さない場合がある。

[0006] 特表２０１５－５２２５９０公報の段落［０１４５］には，カルトゲニンが変形性関節症の処置を助ける小分子であることが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開２００３－１２５７８７号公報

特許文献2：特許第３６３８６１４号公報

特許文献3：特表２００２－５２９０７１号公報

特許文献4：特表２００９－５４０８２６号公報

特許文献5：特表２０１５－５２２５９０公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 上記の培養方法では，軟骨が培養されるものの，実際に培養した軟骨を移植等しようとした場合に，良好な結果が得られない場合があった。

[0009] そこで，本発明は，効果的に培養でき，しかも良好な移植結果を得ることができる，軟骨細胞の無血清培養方法や，その方法に用いることができる無血清培地を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明の第１の側面は，軟骨細胞培養用の無血清培地に関する。この培地は，カルトゲニン又はスムーズンドアゴニストであるＳＡＧのいずれか又は両方と，ＩＴＳ，ＦＧＦ２，及びヒドロコルチゾンを含む。

[0011] この培地は，カルトゲニン及びＳＡＧの両方を含むものが好ましい。

[0012] この培地は，ＩＧＦ（インスリン様増殖因子）を更に含むものが好ましい。

[0013] この培地は，培養対象である軟骨細胞を更に含むものが好ましい。

[0014] この培地の好ましい利用態様は，この培地と，アスコルビン酸剤及び脂肪酸剤を含む培地キットであって，アスコルビン酸剤は，アスコルビン酸，アスコルビン酸の塩又はアスコルビン酸の溶媒和物を含み，脂肪酸剤は，脂肪酸，脂肪酸の塩，又は脂肪酸の溶媒和物を含むものが好ましい。

[0015] 本発明の第２の側面は，軟骨細胞の無血清培養方法に関する。この方法は，

ヒト軟骨細胞を含む組織を，コラゲナーゼで処理する酵素処理工程と，

組織を無血清培地で培養する培養工程と，

を，この順で含み，

無血清培地は，カルトゲニン又はＳＡＧのいずれか又は両方と，

ＩＴＳ，ＦＧＦ２，及びヒドロコルチゾンを含む，

軟骨細胞の無血清培養方法であって，

培養工程は，

培養開始から３日目から２８日目の期間にアスコルビン酸，アスコルビン酸の塩又はアスコルビン酸の溶媒和物を無血清培地に添加し，

培養開始から３日目から２８日目の期間に脂肪酸，脂肪酸の塩，又は脂肪酸の溶媒和物を無血清に添加する工程を含む，

方法である。

[0016] この方法は，好ましくは，酵素処理工程の後に，組織をコラゲナーゼ阻害剤で処理する阻害剤処理工程を更に含む。

発明の効果

[0017] 効果的に培養でき，しかも良好な移植結果を得ることができる，軟骨細胞の無血清培養方法や，その方法に用いることができる無血清培地を提供する。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]図１は，実施例１における培養０日目から１６日目までの培養軟骨細胞を示す図面に替わる写真である。

[図2]図２は，実施例１における培養１９日目から４１日目までの培養軟骨細胞を示す図面に替わる写真である。

[図3]図３は，比較例１における培養１日目から５日目までの培養軟骨細胞を示す図面に替わる写真である。

[図4]図４は，実施例２（継代培養）における培養１日目から１３日目までの培養軟骨細胞を示す図面に替わる写真である。

[図5]図５は，実施例２における培養１８日目から２８日目までの培養軟骨細胞を示す図面に替わる写真である。

[図6]図６は，培養２９日目から５２日目までの培養軟骨細胞を示す図面に替わる写真である。

[図7]図７は，比較例２における培養１日目から１３日目までの培養軟骨細胞を示す図面に替わる写真である。この例では，ＳＡＧを含まないＤＭＥＭ培地を用いた以外は実施例２と同様にして軟骨を培養した。

[図8]図８は，無血清培地で培養したヒト耳介軟骨をヌードマウスの背部に移植し，6ヶ月後に軟骨が形成された様子を示す図面に替わる写真である。

[図9]図９は，ヌードマウスの背部に形成された軟骨を摘出した標本を示す図面に替わる写真である。

[図10]図１０は，無血清培地（ＳＡＧ＋ＩＴＳ）で培養したヒト耳介軟骨をヌードマウス背部に移植し，形成された軟骨の切片をトルイジンブルー，アリシアンブルーまたはＥＶＧ（Ｅｌａｓｔｉｃａ　Ｖａｎｇｅｓｏｎ）にて染色した結果を示す図面に替わる写真である。

[図11]図１１は，無血清培地（Ｋａｒｔｏｇｅｎｉｎ＋ＩＴＳ）で培養したヒト耳介軟骨をヌードマウス背部に移植し，形成された軟骨の切片をトルイジンブルー，アリシアンブルーまたはＥＶＧを用いて染色した結果を示す図面に替わる写真である。

[図12]図１２は，ＳＡＧ濃度と培養軟骨細胞の増殖との関係を示すグラフである。

[図13]図１３は，ＩＴＳとＳＡＧを培地に添加した場合における，ＳＡＧ濃度と培養軟骨細胞の増殖との関係を示すグラフである。

[図14]図１４は，ＩＴＳとＳＡＧを培地に添加した場合における，ＳＡＧ濃度と培養軟骨細胞の増殖との関係を示す別のグラフである。

発明を実施するための形態

[0019] 以下，図面を用いて本発明を実施するための形態について説明する。本発明は，以下に説明する形態に限定されるものではなく，以下の形態から当業者が自明な範囲で適宜修正したものも含む。

[0020] 本発明は，軟骨細胞の無血清培養方法に関する。この方法は，酵素処理工程と，培養工程とを含む。この方法は，阻害剤処理工程を含んでも良い。

[0021] 酵素処理工程は，ヒト軟骨細胞を含む組織を，タンパク質分解酵素で処理

する工程である。具体的に説明すると，ヒト軟骨細胞を含む組織とタンパク質分解酵素とを接触させ，ヒト軟骨細胞を含む組織に含まれるタンパク質をタンパク質分解酵素により分解させる工程である。タンパク質分解酵素で処理すること自体は既に知られているため，既に知られている方法に基づいてこの工程を行えばよい。

[0022] ヒト軟骨細胞の例は，耳介軟骨，鼻中隔軟骨，肋軟骨，関節軟骨，脊間軟骨，気管軟骨，喉頭蓋から採取される軟骨細胞や，ヒト遺伝子から培養されたヒト軟骨細胞である。ヒト軟骨細胞を採取する方法は，公知である。すなわち外科的に患者からヒト軟骨細胞を採取すればよい。また，本発明は，軟骨細胞に分化しうる細胞を適宜用いて，ヒト軟骨細胞を得てもよい。ヒトや温血動物の骨髄由来の細胞，関節軟骨由来の細胞，皮膚由来の細胞，胚細胞，胎児由来細胞を用いてもよい，軟骨細胞に分化しうる細胞の例は，ヒト間葉系幹細胞，脱分化した軟骨細胞（例，脱分化したヒト正常軟骨細胞）である。

[0023] そして，本発明は，ヒト軟骨組織と集合軟骨細胞を単細胞(ｓｉｎｇｌｅｃｅｌｌ)にするためにタンパク質分解酵素で処理する。この工程は，ヒト軟骨組織や集合細胞に含まれるタンパク質の一部をタンパク質分解酵素で分解する消化工程である。タンパク質分解酵素の例は，トリプシン又はコラゲナーゼである。コラゲナーゼは，例えば，特許第４７６４００６号公報や，特許第５３２２６３７号，及び特表２００９－５４０８２６号公報に開示される通り，公知の化合物である。コラゲナーゼは，動物由来の成分を含まないコラゲナーゼが好ましい。そのようなコラゲナーゼは市販されているため，動物由来の成分を含まないコラゲナーゼを購入すればよい。この溶液には，たとえば，ペニシリンやストレプトマイシンといった公知の抗生物質を適宜含んでもよい。酵素処理工程は，たとえば，タンパク質分解酵素を含む溶液を用意し，この溶液にヒト軟骨細胞を浸漬すればよい。このようにして，ヒト軟骨細胞に含まれるタンパク質の一部をタンパク質分解酵素で分解することができる。もっとも，コラゲナーゼなどのタンパク質分解酵素は，ヒト軟

骨細胞を完全には分解しない程度にヒト軟骨細胞と作用させることが好ましい。このため，タンパク質分解酵素は，溶液中に，０．０１重量％以上１重量％以下（又は０．１重量％以上０．５重量％以下）含まれるものが好ましい。そして，浸漬時間は，例えば，３時間以上２４時間以下のように調整することが好ましい。

[0024] 阻害剤処理工程は，酵素処理工程の後に，組織をタンパク質分解酵素の阻害剤で処理する工程である。この工程は，タンパク質分解酵素で処理された組織にタンパク質分解酵素の阻害剤を接触させ，タンパク質分解酵素の機能を阻害する処理を行う工程である。阻害剤の例は，トリプシン阻害剤又はコラゲナーゼ阻害剤である。トリプシン阻害剤及びコラゲナーゼ阻害剤の例は，大豆由来タンパク分解酵素阻害剤である。コラゲナーゼ阻害剤の他の例は，特許第５０４４０７１号公報に開示されるレチノール酸や，特開平５－９７６７４号公報に開示される８－ヒドロキシキノリン誘導体である。レチノール酸は，塩や溶媒和物の形で用意されてもよい。塩や溶媒和物については，後述する通りである。この阻害剤処理工程も先の酵素処理工程と同様にして行うことができる。阻害剤処理工程は，たとえば，タンパク質分解酵素の阻害剤を含む溶液を用意し，この溶液にヒト軟骨細胞を浸漬すればよい。このようにして，ヒト軟骨細胞に含まれるタンパク質分解酵素の機能を阻害することができる。このように阻害剤処理工程を含むことで，本発明は効果的に良好な軟骨細胞を培養できる。

[0025] つまり，軟骨細胞を培養するとコラーゲンが発現する。このため通常であれば，採取した軟骨細胞をコラゲナーゼで処理しようとは思わない。軟骨細胞は，軟骨組織中ではコラーゲンなどの細胞外マトリクス（ｍａｔｒｉｘ）に取り囲まれている。従って軟骨細胞をマトリクス（ｍａｔｒｉｘ）から取り出すために，本発明ではあえて，採取した軟骨細胞をコラゲナーゼやトリプシンで処理し，軟骨細胞の培養や移植後にふさわしくない成分を分解する。一方，トリプシンが機能を発揮し続けると，軟細胞が傷害されて，軟骨細胞の培養が進まない。そのため，本発明は，阻害剤処理工程で，トリプシン

などのタンパク質分解酵素の機能を阻害する。血清中にはタンパク分解酵素阻害剤様成分が存在するので，血清を用いた培地にはタンパク分解酵素阻害剤の添加は必要ない。一方，無血清培地には酵素阻害剤様成分がないので，タンパク質分解酵素の機能を阻害するために酵素阻害剤様成分を添加する。なお，コラゲナーゼを用いた場合もコラゲナーゼ阻害剤を用いてもよいが，コラゲナーゼの作用は強くないので，コラゲナーゼ阻害剤を用いなくてもよい。

[0026] 培養工程は，阻害剤処理工程の後に，組織を無血清培地で培養する工程である。軟骨細胞の無血清培養は上記のとおりすでに知られている。したがって，本発明においても公知の培養方法を適宜採用すればよい。一方，本発明は，無血清培地がスムーズンドアゴニストを含むことが好ましい。スムーズンド又はスムーズンド受容体は，例えば，特許第５２７０３６２号公報や，特許第５４２４９２３号公報において紹介されている通り，ソニックヘッジホッグ（Ｓｈｈ）を活性化させるタンパク質である。そして，スムーズンド（ｓｍｏｏｔｈｅｎｅｄ）アゴニストは，ＳＡＧ又はＳＡＧ１．１であることが好ましい。ＳＡＧは，ＣＡＳ番号３６４５９０－６３－６で知られ，化学物質名がＮ－メチル－Ｎ’－（３－ピリジニルベンジル）－Ｎ’－（３－クロロベンゾ［ｂ］チオフェン－２－カルボニル）－１，４－ジアミノシクロヘキサン（Ｎ－Ｍｅｔｈｙｌ－Ｎ’－（３－ｐｙｒｉｄｉｎｙｌｂｅｎｚｙｌ）－Ｎ’－（３－ｃｈｌｏｒｏｂｅｎｚｏ［ｂ］ｔｈｉｏｐｈｅｎｅ－２－ｃａｒｂｏｎｙｌ）－１,４－ｄｉａｍｉｎｏｃｙｃｌｏｈｅｘａｎｅ）である化合物である。ＳＡＧは，国際公開ＷＯ２０１４－０８４０８５号パンフレットに開示される通り，ソニックヘッジホッグ（Ｓｈｈ）を活性化させるタンパク質である。ＳＡＧ１．１は，化学物質名がＮ－メチル－Ｎ’－（３－（４－ベンゾニトリル）－４－メトキシベンジル）－Ｎ－（３－クロロベンゾ［ｂ］チオフェン－２－カルボニル）－１，４－ジアミノシクロヘキサン（Ｎ－Ｍｅｔｈｙｌ－Ｎ－（３－（４－ｂｅｎｚｏｎｉｔｒｉｌｅ）－４－ｍｅｔｈｏｘｙｂｅｎｚｙｌ）－Ｎ’－（３－ｃｈｌｏｒｏｂｅｎｚ

ｏ［ｂ］ｔｈｉｏｐｈｅｎｅ－2－ｃａｒｂｏｎｙｌ）－1,4－ｄｉａｍｉｎｏｃｙｃｌｏｈｅｘａｎｅ））である。ＳＡＧについては文献Ｓｉｎｈａ Ｓ，Ｃｈｅｎ ＪＫ．Ｎａｔ Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ．２００６ Ｊａｎ;2（1）：２９－３０.及びＣｈｅｎ ＪＫ，Ｔａｉｐａｌｅ Ｊ，Ｙｏｕｎｇ ＫＥ，Ｍａｉｔｉ Ｔ，Ｂｅａｃｈｙ ＰＡ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００２ Ｏｃｔ ２９；９９（２２）：１４０７１－６.に詳しい。同様に，ＳＡＧ1.1については文献Ｃｈｅｎ，Ｗ.，Ｒｅｎ，Ｘ．Ｒ.，Ｎｅｌｓｏｎ，Ｃ．Ｄ.，Ｂａｒａｋ，Ｌ．Ｓ.，Ｃｈｅｎ，Ｊ．Ｋ.，Ｂｅａｃｈｙ，Ｐ．Ａ.,ｄｅ Ｓａｕｖａｇｅ，Ｆ．＆Ｌｅｆｋｏｗｉｔｚ，Ｒ．Ｊ.（２００４）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３０６,（５７０５） ２２５７－２２６０に詳しい。

[0027] 軟骨細胞を培養する方法は，通常の経験や知見に基づいて適宜行えばよい。無血清培地として，基本培地に適宜試薬を添加したものを用いればよい。試薬の量は，公知の量を適宜修正して用いればよい。

[0028] 本発明は，無血清培地をも提供する。この無血清培地は，スムーズンドアゴニスト（たとえば，ＳＡＧ）を含むことが好ましい。そして，この培地は，軟骨細胞の培養に好ましく用いられる。このため，この無血清培地は，培養時において，軟骨細胞を含む無血清培地である。

[0029] 本発明の培地は，好ましくは，カルトゲニン（Ｋａｒｔｏｇｅｎｉｎ）を含む。カルトゲニンは，物質名が，２－［（ビフェニル－４－イル）カルバモイル］ベンゼン酸（２－［（Ｂｉｐｈｅｎｙｌ－４－ｙｌ）ｃａｒｂａｍｏｙｌ］ｂｅｎｚｏｉｃ ａｃｉｄ）であり，市販されている。本発明の培地は，カルトゲニン及びＳＡＧのいずれか又は両方を含むことが好ましく，カルトゲニンのみを含むものであっても，ＳＡＧのみを含むものであってもよいし，カルトゲニンとＳＡＧを両方含むものであっても良い。

[0030] 本発明の無血清培地は，基本培地に適宜必要な要素を添加すればよい。基本培地の例は，イーグル基礎培地，及びＤＭＥＭである。試薬は，培地に用いる公知のものを適宜添加すればよい。試薬の例は，上記したＳＡＧ（又は

ＳＡＧ１．１），ＦＧＦ２（ビーズ），ＩＧＦ（インスリン様増殖因子），インスリン，ＨＣ（ヒドロコルチゾン）などのステロイド，ＰＤＧＦ（ｐｌａｔｅｌｅｔ ｄｅｒｉｖｅｄ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ），ＡＣＴＨ（副腎皮質刺激ホルモン），ＬＩＦ（白血病阻害因子），ＴＧＦβ，ＢＭＰ，ステロイド，脂肪酸，大豆トリプシン阻害剤，アスコルビン酸，ヒアルロン酸，プロリン，デキサメタゾン，インスリン，トランスフェリン，亜セレン酸である。アスコルビン酸などを培地に添加する場合，２－リン酸塩など塩の形のものを添加してもよい。

[0031] 例えば，特許５２２８１８７号には，グルクロン酸を含むことを特徴とする軟骨細胞培養用培地組成物が開示されている。本発明においても，例えば，この公報に記載されている培地の添加物を適宜用いればよい。

[0032] インスリンは，ＩＴＳとして添加されるものが好ましい。ＩＴＳは，インスリン，トランスフェリン，及び亜セレン酸ナトリウムを含む試薬であり，その組成例は，インスリン５μｇ／ｍｌ，トランスフェリン５μｇ／ｍｌ，及び亜セレン酸ナトリウム５ｎｇ／ｍｌである。ＩＴＳは，市販されているので，市販されているものを適宜用いればよい。ＩＴＳは，動物由来の成分を含まないアニマルフリーのものが好ましい。なお，本発明においては，基本的に動物由来の成分を含まない原料を用いることが好ましい。

[0033] ＳＡＧ，カルトゲニン，ＦＧＦ２，ＩＧＦ（インスリン様増殖因子），インスリン，ヒドロコルチゾンなどのステロイド，ＰＤＧＦ，ＡＣＴＨ（副腎皮質刺激ホルモン），ＬＩＦ（白血病阻害因子），ＴＧＦβ，ＢＭＰ，ステロイド，及びＩＴＳは，たとえば，それぞれ培地に０．１ｎｇ／ｍＬ以上２０μｇ／ｍＬ以下（又は０．２ｎｇ／ｍＬ以上１０μｇ／ｍＬ以下）となるように添加すればよい。これらは精製の程度や必要量に応じて適宜調整して添加すればよい。試行錯誤の結果，無血清培地は，基本培地に，ＳＡＧ（たとえば，０．０５以上５μＭ以下，好ましくは０．１μＭ以上２μＭ以下，好ましくは０．２μＭ以上１μＭ以下），ＦＧＦ２（たとえば，１ｎｇ／ｍＬ以上１μｇ／ｍＬ以下），ＩＧＦ（たとえば，１ｎｇ／ｍＬ以上５０μｇ

／ｍＬ以下），及びＨＣ（たとえば，１ｎｇ／ＭＬ以上μｇ／ｍＬ以下）を添加したものをベースとしたものが好ましいことが分かった。

[0034] 上記の細胞を通常の培養条件（例えば３７℃，５％CO_2）で培養・増殖させる。細胞量は１０％前後から１００％コンフルエントな状態まで可能であり，また，１００％コンフルエントを超えるような高密度，重層状態での培養も可能である。移植後すぐに，あるいはしばらく静置した後，低酸素状態に移行させてもよい。低酸素培養は，例えば市販の窒素ガスなどを混合し，酸素分圧を低下させるタイプの低酸素インキュベーターを用いることもできるし，適当な空間に窒素ガスなどを吹き込んで酸素分圧を下げるなどして培養してもよい。

[0035] 実施例において行った培養工程は，以下のとおりである。すなわち，上記のＳＡＧを培地に添加した。培地にアスコルビン酸や脂肪酸を適宜添加する。実験を繰り返した結果，アスコルビン酸や脂肪酸を培養開始から含めた場合，軟骨細胞がうまく増殖しなかった。一方，アスコルビン酸や脂肪酸を，培養開始後所定期間が経た後に添加すると軟骨細胞が顕著に増加した。よって，培養開始後３日から２８日目の期間にアスコルビン酸，アスコルビン酸の塩又はアスコルビン酸の溶媒和物を無血清培地に添加することが好ましい。アスコルビン酸の添加時期は，培養開始から５日目から２５日目までの期間であってもよいし，１０日目から２２日目の期間であってもよいし，１４日から２１日目の期間であってもよい。また，これらの期間を適宜短縮又は延長した期間であってもよい。また，培養開始から３日目から２８日目の期間に脂肪酸，脂肪酸の塩，又は脂肪酸の溶媒和物を無血清培地に添加することが好ましい。脂肪酸等の添加時期は，培養開始から５日目～２ヶ月目までの期間からであってもよいし，１０日目から４０日目までの期間からであってもよいし，１９日目から２５日目であってもよい。このような培養を行うことで，対照に比べて圧倒的に効果的に軟骨細胞を培養できた。

[0036] 本発明の方法で製造された軟骨細胞または軟骨は，例えば，関節疾患（例，整形外科領域における骨折，再骨折，骨変形・変形脊椎症，骨肉腫，骨髄

腫，骨形成不全，側弯症等の非代謝性骨疾患；骨欠損，骨粗鬆症，骨軟化症，くる病，線維性骨炎，腎性骨異栄養症，骨ペーチェット病，硬直性脊髄炎等の代謝性骨疾患；変形性関節炎，慢性関節リウマチなどの軟骨疾患）などにおいて，軟骨を修復するための外科的手法として行われる軟骨移植に使用することが可能である。軟骨移植方法は常套手段を用いて行うことができる。したがって，本発明の方法で製造された軟骨細胞または軟骨は，上記関節疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤として使用することができる。また，本培養系を用いて軟骨分化に関わる遺伝子の探索や，医薬品の探索も可能である。

[0037] 培養細胞の回収

上記のようにして培養された軟骨細胞は，細胞が積み重なってできた集合体を形成している。そのため，例えば，培養後，培地に横方向から棒を挿入し，その棒を上方へ引き上げると，軟骨組織の培養物を効果的に回収することができる。通常であれば，培養細胞を回収するために，容器から軟骨組織をはがす必要がある。このため，通常の方法では，コラゲナーゼやトリプシンといったタンパク質分解酵素を作用させて容器から軟骨細胞を剥離していた。このため，培養して得られる軟骨組織は，ばらばらのものしか得られなかった。本発明の培養方法では，軟骨細胞が積み重なってできた集合体が，容器から剥がれやすい状態となっているため，上記の回収方法を用いるだけで，例えばシート状や塊状の軟骨組織を容易に回収できる。

実施例 1

[0038] 組織の消化－培養準備－

初代ヒト軟骨細胞を関節軟骨生検から単離し，その試料を細分した。その後，０．１％から０．３％コラゲナーゼ溶液に浸漬し，３７℃にて４から５時間酵素的消化を行なった。得られた細胞を５分間，１，２００ｒｐｍで遠心分離して回収した。

[0039] ＤＭＥＭ培地に，ＦＧＦ１００ｎｇ／ｍＬ，ＳＡＧ０．５μＭ，ＨＣ４００ｎｇ／ｍＬ，ＩＧＦ５ｎｇ／ｍＬ及びインスリン５μｇ／ｍＬを添加した

ものを培地として用いた。先に得られた培養細胞を，１０００細胞／ｃｍ^{2}の密度で播種した。培養は，３７℃，５％CO_2の環境において行った。

[0040] 図１は，実施例１における培養０日目から１６日目までの培養軟骨細胞を示す図面に替わる写真である。軟骨組織が徐々に増加したことがわかる。

[0041] 図２は，実施例１における培養１９日目から４１日目までの培養軟骨細胞を示す図面に替わる写真である。培養１８日目に培地に５０μｇ／ｍＬのアスコルビン酸を添加した。試行錯誤の結果，この程度の期間においてアスコルビン酸を添加することが，無血清培地において軟骨細胞を培養するうえで非常に有効であることが分かった。培養３週間日目に脂肪酸を１：１０００から１：５００で添加した。脂肪酸を加えたところ細胞数が増え，培地の粘度が上がった。

[0042] 培養中に添加した脂肪酸及びコレステロールは，以下のとおりである。

[0043] 培養中に添加している脂肪酸及びコレステロール

	濃度　ｍｇ／ｍＬ
アラキドン酸	２．０
リノール酸	１０．０
リノレン酸	１０．０
ミリスチン酸	１０．０
オレイン酸	１０．０
パルミチン酸	１０．０
パルミトオレイン酸	１０．０
ステアリン酸	１０．０
コレステロール	２２０．０
ＤＬα酢酸トコフェロール（ビタミンＥ）	７０．０

[0044] 上記の添加量は±２００％，好ましくは±１００％の範囲で増減しても構わない。なお，脂肪酸の範囲は１：５０から１：２０００の範囲であってもよい。

[0045] 継代培養の際は，コラゲナーゼに替えてトリプシンを用い，回収した細胞

をトリプシン阻害剤である大豆由来タンパク分解酵素阻害剤に浸漬した。

[0046] ［比較例１］

図３は，比較例１における培養１日目から５日目までの培養軟骨細胞を示す図面に替わる写真である。この例では，ＳＡＧを含まないＤＭＥＭ培地を用いた以外は実施例１と同様にして軟骨を培養した。図３に示されるとおり，ＳＡＧを含まない状態では，軟骨細胞を効果的に培養できないことが示された。

[0047] アスコルビン酸及び脂肪酸の添加時期の調整

アスコルビン酸の添加を培養開始時，培養開始１時間後，３時間後，１２時間後，１日後，２日後，３日後，５日後，１週間後，１０日後，２週間後，２０日後，３週間後，２５日後，４週間後，３０日後，５週間後，４０日後，６週間後，４５日後，７週間後，５０日後，８週間後，６０日後，９週間後，７０日後のそれぞれから開始した。アスコルビン酸の添加は，定期的（例えば，１２時間毎，１日毎，２日毎）とした。

脂肪酸の添加も，アスコルビン酸の添加と同様に調整した。

その結果，培養開始からすぐにアスコルビン酸を添加するよりも，３日程度経過した後からアスコルビン酸を添加することが望ましいことがわかった。

脂肪酸の添加も，アスコルビン酸の添加と同様であったが，アスコルビン酸の添加を行った後に，脂肪酸を添加したケースの方が望ましいことがわかった。

実施例 2

[0048] ＤＭＥＭ培地に，ＦＧＦ２を１００ｎｇ／ｍＬ，ＳＡＧ０．５μＭ，ＨＣ４００ｎｇ／ｍＬ，ＩＧＦ５ｎｇ／ｍＬ及びインスリン５μｇ／ｍＬを添加したものを継代培養用の培地として用いた。実施例１で培養細胞を，１００００細胞／ｃｍ^{2}の密度で播種した。培養は，３７℃，５％CO_2の環境において行った。

[0049] 図４は，実施例２（継代培養）における培養１日目から１３日目までの培

養軟骨細胞を示す図面に替わる写真である。培養開始から１０日程度で，培地に粘性が見られ，吸引器で培地を除去すると細い糸を引くことが観測された。１３日目から培地の粘度が上がっていた。

[0050] 図５は，実施例２における培養１８日目から２８日目までの培養軟骨細胞を示す図面に替わる写真である。培養１８日目に培地に５０μｇ／ｍＬのアスコルビン酸を添加した。試行錯誤の結果，この程度の期間においてアスコルビン酸を添加することが，無血清培地において軟骨細胞を培養するうえで非常に有効であることが分かった。培養３週間日目に脂肪酸を１：１０００から１：５００で添加した。脂肪酸を加えたところ細胞数が増え，培地の粘度が上がった。

[0051] 図６は，培養２９日目から５２日目までの培養軟骨細胞を示す図面に替わる写真である。吸引器で培地を除去すると太い糸を引いた。図に示される通り，無血清培地を用いた軟骨細胞の培養により，効果的に軟骨細胞を培養できることが示された。

[0052] 培養中に添加した脂肪酸及びコレステロールは，以下のとおりである。

[0053] 培養中に添加している脂肪酸及びコレステロール

	濃度　ｍｇ／ＭＬ
アラキドン酸	２．０
リノール酸	１０．０
リノレン酸	１０．０
ミリスチン酸	１０．０
オレイン酸	１０．０
パルミチン酸	１０．０
パルミトオレイン酸	１０．０
ステアリン酸	１０．０
コレステロール	２２０．０
ＤＬα酢酸トコフェロール（ビタミンＥ）	７０．０

[0054] 上記の添加量は±２００％，好ましくは±１００％の範囲で増減しても

構わない。なお，脂肪酸の範囲は１：５０から１：２０００の範囲であってもよい。

[0055] ［比較例２］

図７は，比較例２における培養１日目から１３日目までの培養軟骨細胞を示す図面に替わる写真である。この例では，ＳＡＧを含まないＤＭＥＭ培地を用いた以外は実施例２と同様にして軟骨を培養した。図７に示されるとおり，ＳＡＧを含まない状態では，軟骨細胞を効果的に培養できないことが示された。

実施例 3

[0056] 本発明の無血清培地で培養した軟骨細胞が，移植に適した細胞であることを確認するため，ヌードマウスに移植し，生体内で軟骨が形成されるかを調査した。

まず，ヒト耳介軟骨由来の軟骨細胞を，実施例１で述べた手順に従って準備し，本発明の無血清培地で培養した。培養後の軟骨細胞をコラーゲンの綿に浸漬させ，次いで，この綿と共にヌードマウスの背部の２か所に移植した。移植手術およびヌードマウスの管理は，公知の方法に従って行った。移植の６ヶ月後，ヌードマウスの背部を切開し，移植部位に細胞が定着し，軟骨が形成されているか否かを確認した。

[0057] 図８は，移植の６ヶ月後に，ヌードマウスの背部を切開した様子を示した写真である。培養した軟骨細胞を移植した部位（左右の背部）に，大きな白い軟骨（Ａ－２，Ｂ－２）が確認できた。よって，培養細胞が移植部位に定着して増殖し，軟骨を形成したこと考えられた。

[0058] 図９は，ヌードマウスの背部に形成された軟骨を摘出した様子を示している。Ａ１は，下記の培養条件（Ａ）（ＳＡＧ＋ＩＴＳ）で培養した軟骨細胞を移植したヌードマウスに形成された軟骨を示している。ＩＴＳは，アニマルフリーのものを用いた。

[0059] 培養条件（Ａ）

ＤＭＥ（Ｈ）：Ｆ－１２＝１：１

ＳＡＧ　０．１ｕＭ

ＦＧＦ　５０ｎｇ／ｍＬ

ＨＣ　４００ｎｇ／ｍＬ

ＩＴＳ　×１

培養８日目からアスコルビン酸　５０ｕｇ／ｍＬ，脂肪酸　１：５００を添加

[0060] 一方，Ｃ１は，下記の培養条件（Ｃ）（Ｋａｒｔｏｇｅｎｉｎ＋ＩＴＧ）で培養した，培地が分離しがちで一番粘度が低かった軟骨細胞を移植したヌードマウスに形成された軟骨を示している。

[0061] 培養条件（Ｃ）

ＤＭＥ（Ｈ）：Ｆ－１２＝１：１

Ｋａｒｔｏｇｅｎｉｎ　１ｕＭ

ＦＧＦ　５０ｎｇ／ｍＬ

ＨＣ　４００ｎｇ／ｍＬ

ＩＴＳ　×１

培養８日目からアスコルビン酸　５０ｕｇ／ｍＬ，脂肪酸　１：５００を添加

[0062] 培養条件（Ａ）で培養した軟骨細胞は，培養条件（Ｃ）で培養した軟骨細胞よりも，大きな軟骨を形成していた。また，コラーゲンの綿のみを移植したヌードマウス（ネガティブコントロール）では，軟骨が形成されなかった（Ｄ２およびＤ３）。

[0063] 次に，培養細胞の移植部位に形成された軟骨が，軟骨であることを組織学的に調査した。具体的には，摘出した軟骨（Ａ１，Ｃ１）の切片を作成し，軟骨を特異的に染色するトルイジンブルーやアルシアンブルーを用いて染色した。また，弾性軟骨を特異的に染色するＥＶＧ（Ｅｌａｓｔｉｃａ　Ｖａｎｇｅｓｏｎ）を用いて染色を行った。結果を図１０および図１１に示した。

[0064] 図１０は，Ａ１の軟骨の染色結果を示している。図１０（Ａ）は，トルイ

ジンブルー染色の結果であり，軟骨は紫色に染色された。図１０（Ｂ）は，アリシアンブルー染色の結果であり，軟骨は青色に染色された。従って，Ａ１の軟骨は両染色について陽性であり，軟骨としての特性を有していることが確認された。

また，図１０（Ｃ）は，ＥＶＧ染色の結果を示しており，軟骨は褐色に染色された。従って，弾性軟骨であることが証明され，耳介軟骨であることが同定された。

[0065] 図１１は，Ｃ１の軟骨の染色結果を示している。図１１（Ａ）は，トルイジンブルー染色の結果であり，軟骨は紫色に染色された。図１１（Ｂ）は，アリシアンブルー染色の結果であり，軟骨は青色に染色された。従って，Ｃ１の軟骨は両染色について陽性であり，軟骨としての特性を有していることが確認された。

また，図１１（Ｃ）は，ＥＶＧ染色の結果を示しており，軟骨は褐色に染色された。従って，弾性軟骨であることが証明され，耳介軟骨であることが同定された。

[0066] よって，本発明の無血清培地で培養した軟骨細胞は移植に適した細胞であり，ヌードマウスに移植した場合には，移植部位に軟骨を形成できることが証明された。

実施例 ４

[0067] 培地に添加するＳＡＧの至適濃度を調査するために，無血清培地中のＳＡＧ濃度を０．０５ｕＭ，０．０１ｕＭまたは，０．５ｕＭと変え，培養軟骨細胞の増殖に対する影響を調べた。具体的には，実施例１と同様の手順で準備した軟骨細胞を，１００００個／Ｗｅｌｌの密度で播種し，播種後４，７，１４，２１目の細胞数を計測した。結果を図１２に示した。

いずれのＳＡＧ濃度においても，培養１４日目まで細胞の増殖にほとんど差は見られず，培養２１日目においても，想定したほどの顕著な差は見られなかった。

[0068] ＳＡＧは非常に高価な試薬であるため，できるだけ低い濃度で使用できる

ことが好ましい。発明者らは，ＳＡＧとともにＩＴＳ（Ｉｎｓｕｌｉｎ－Ｔｒａｎｓｆｅｒｒｉｎ－Ｓｅｌｅｎｉｕｍ）を添加することで，低濃度のＳＡＧでも十分に軟骨細胞の増殖を促すことができるという知見を得たため，これを確認した。具体的には，ＩＴＳを添加した無血清培地のＳＡＧ濃度を０．０１ｕＭ，０．０５ｕＭ，０．１ｕＭまたは，０．５ｕＭと変えて，培養軟骨細胞を培養し，播種後４，７，１４，２１目の細胞数を計測した。結果を図１３に示した。

[0069] ＩＴＳもＳＡＧも添加しない場合には，軟骨細胞の増殖に対する顕著な効果は見られなかった。一方，ＩＴＳともにＳＡＧを添加した場合には，０．０１ｕＭ～０．５ｕＭのいずれのＳＡＧ濃度においても，ほぼ同程度の軟骨細胞の増加が見られた。したがって，ＩＴＳと共に添加する場合には，０．０１ｕＭのＳＡＧでも充分な効果が得られることが明らかとなった。

また，ＳＡＧではなく，カルトゲニン（Ｋａｒｔｏｇｅｎｉｎ）を添加した場合にも，軟骨細胞の増殖に効果的であることが明らかとなった。

[0070] 軟骨細胞の増加に対するＩＴＳとＳＡＧの効果をさらに調べるため，ＩＴＳとＳＡＧの両者を添加した処理区（ＩＴＳ＋ ＳＡＧ ０．０１ｕＭ，ＩＴＳ＋ ＳＡＧ ０．１ｕＭ），ＩＴＳを単独で添加した処理区（ＩＴＳ＋ ＳＡＧ－），ＩＴＳもＳＡＧも添加しない処理区（ＩＴＳ－ ＳＡＧ－）における，軟骨細胞の増加を調べた。結果を図１４に示した。

[0071] 軟骨細胞の増殖に対する効果は，ＩＴＳもＳＡＧも添加しない処理区（ＩＴＳ－ ＳＡＧ－）においてもっとも低かった。ＩＴＳを単独で添加した処理区（ＩＴＳ＋ ＳＡＧ－）では，わずかに増殖効果が見られた。しかし，ＩＴＳとＳＡＧの両者を添加した処理区に比べるとその効果は小さかった。よって，軟骨細胞の増殖に対するＩＴＳの効果はあまり強くなく，ＳＡＧと組み合わせることによって顕著な効果が得られるといえる。

また，ＩＴＳとＫａｒｔｏｇｅｎｉｎを組み合わせた処理区（ＩＴＳ＋ Ｋａｒｔｏｇｅｎｉｎ １ｕＭ）でも，軟骨細胞の増殖効果が見られることが分かった。ただし，ＩＴＧとＳＡＧの組み合わせた場合に比べると，その

効果は小さかった。

[0072] これらの結果より，軟骨細胞の増殖には，ＩＴＳと共にＳＡＧを添加することが有効であることが確認できた。また，ＩＴＳと共にＫａｒｔｏｇｅｎｉｎを添加することも有効であることが確認できた。

産業上の利用可能性

[0073] 本発明の無血清培地や軟骨細胞の培養方法は，培養軟骨を製造するために用いることができる。このため，本発明や医薬産業の分野で利用されうる。

請求の範囲

[請求項1] カルトゲニン又はＳＡＧのいずれか又は両方と，

ＩＴＳ，ＦＧＦ２，及びヒドロコルチゾンを含む軟骨細胞培養用の無血清培地。

[請求項2] 請求項１に記載の培地であって，カルトゲニン及びＳＡＧの両方を含む培地。

[請求項3] 請求項１に記載の培地であって，ＩＧＦ（インスリン様増殖因子）を更に含む培地。

[請求項4] 請求項１に記載の培地であって，培養対象である軟骨細胞を更に含む培地。

[請求項5] 請求項１に記載の培地と，アスコルビン酸剤及び脂肪酸剤を含む培地キットであって，

前記アスコルビン酸剤は，アスコルビン酸，アスコルビン酸の塩又はアスコルビン酸の溶媒和物を含み，

前記脂肪酸剤は，脂肪酸，脂肪酸の塩，又は脂肪酸の溶媒和物を含む，

培地キット。

[請求項6] ヒト軟骨細胞を含む組織を，コラゲナーゼで処理する酵素処理工程と，

前記組織を無血清培地で培養する培養工程と，

を，この順で含み，

前記無血清培地は，カルトゲニン又はＳＡＧのいずれか又は両方と，

ＩＴＳ，ＦＧＦ２，及びヒドロコルチゾンを含む，

軟骨細胞の無血清培養方法であって，

前記培養工程は，

培養開始から３日目から２８日目の期間にアスコルビン酸，アスコルビン酸の塩又はアスコルビン酸の溶媒和物を前記無血清培地に添加

し，

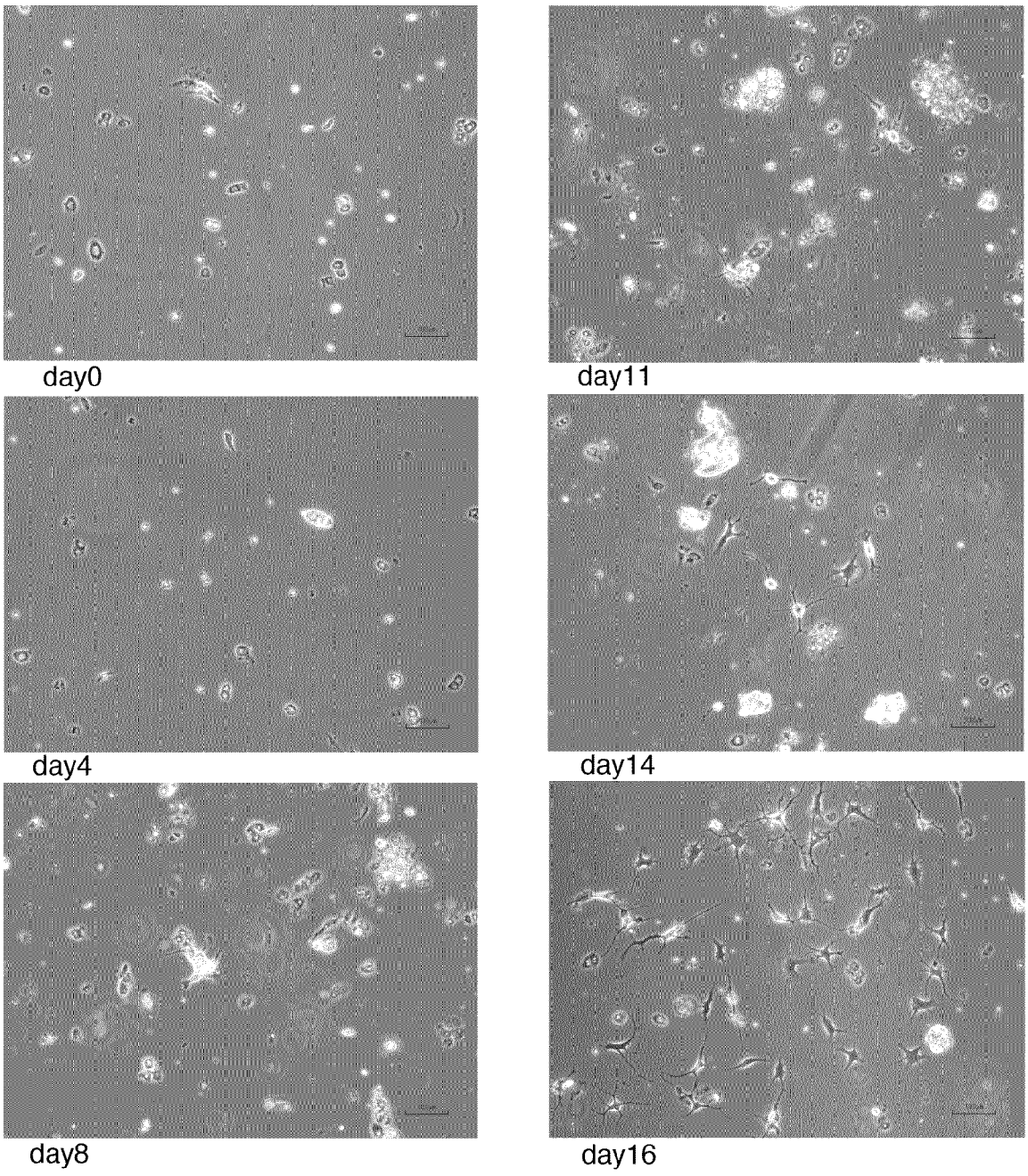
培養開始から３日目から２８日目の期間に脂肪酸，脂肪酸の塩，又は脂肪酸の溶媒和物を前記無血清に添加する工程を含む，

方法。

[請求項7] 請求項６の方法であって，前記酵素処理工程の後に，前記組織をコラゲナーゼ阻害剤で処理する阻害剤処理工程を更に含む，方法。

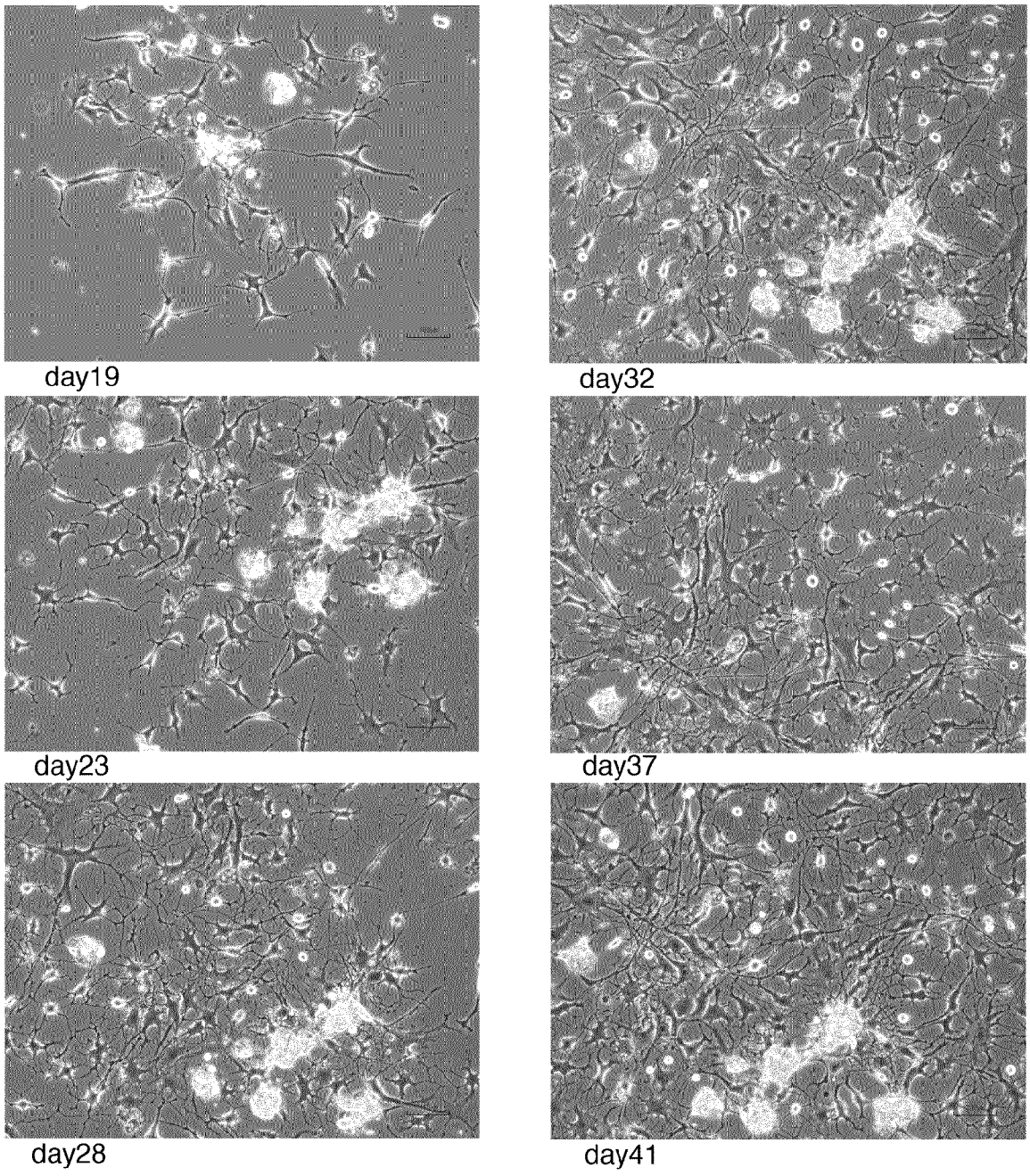
[図1]

培養軟骨の無血清培養法　初代培養　（×100）



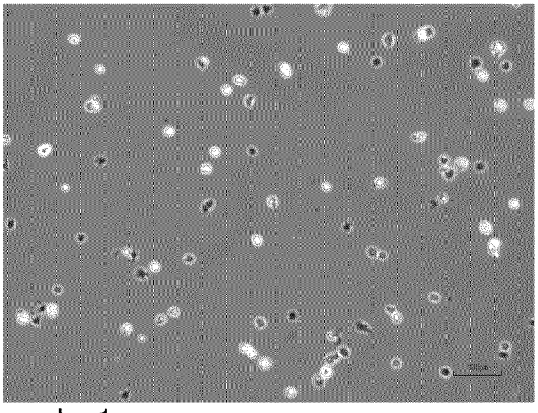
[図2]

培養軟骨の無血清培養法　初代培養　（×100）

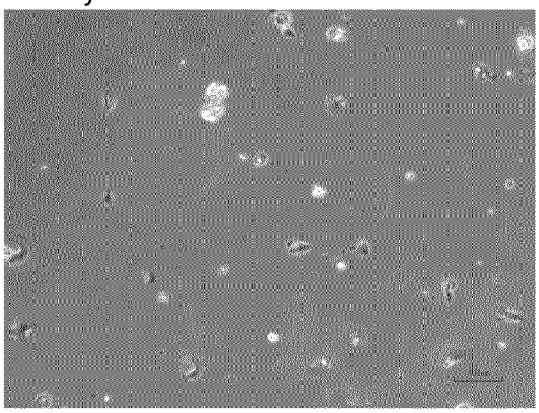


[図3]

培養軟骨の無血清培養法　初代培養　Control　(×100)



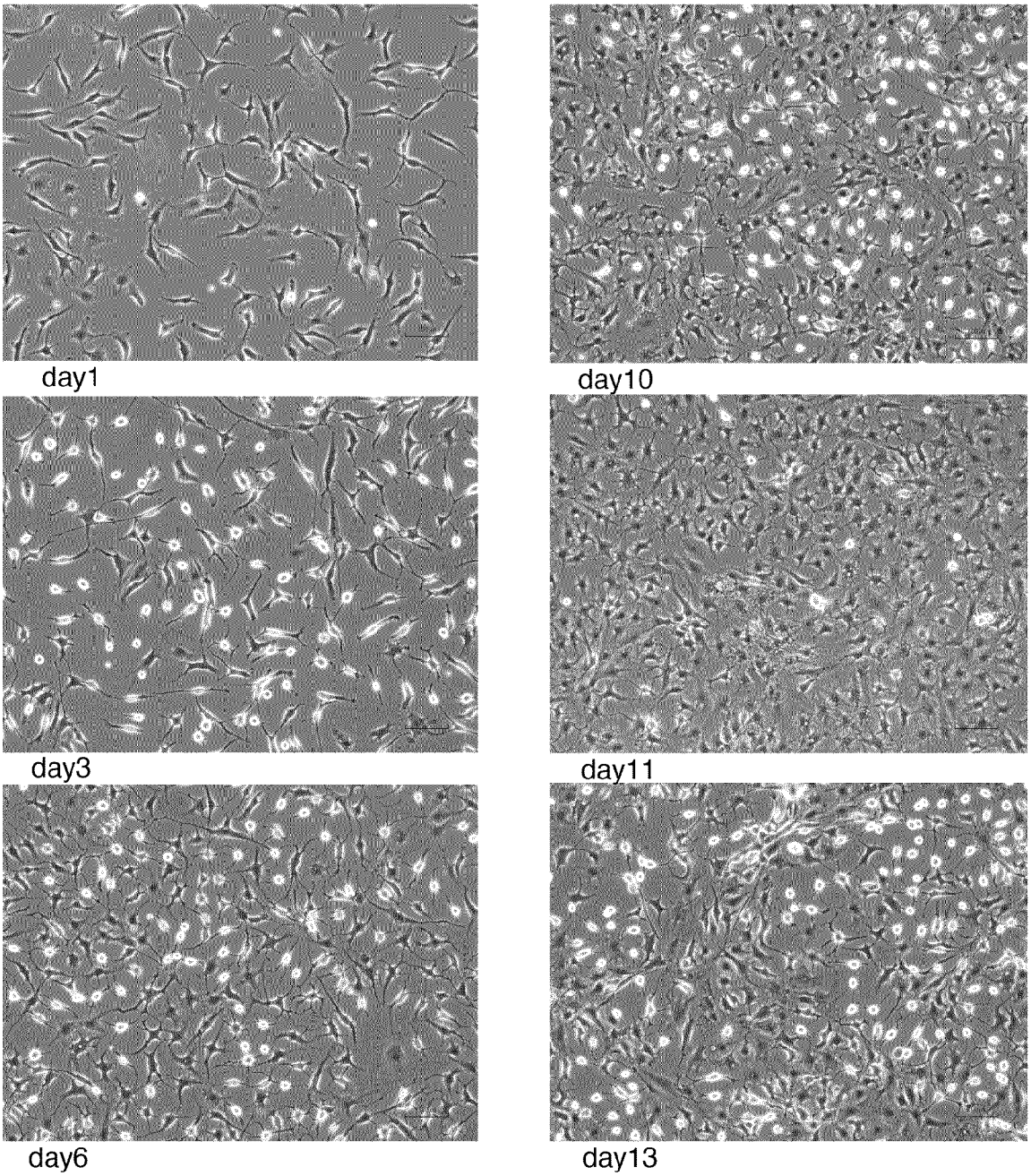
day1



day5

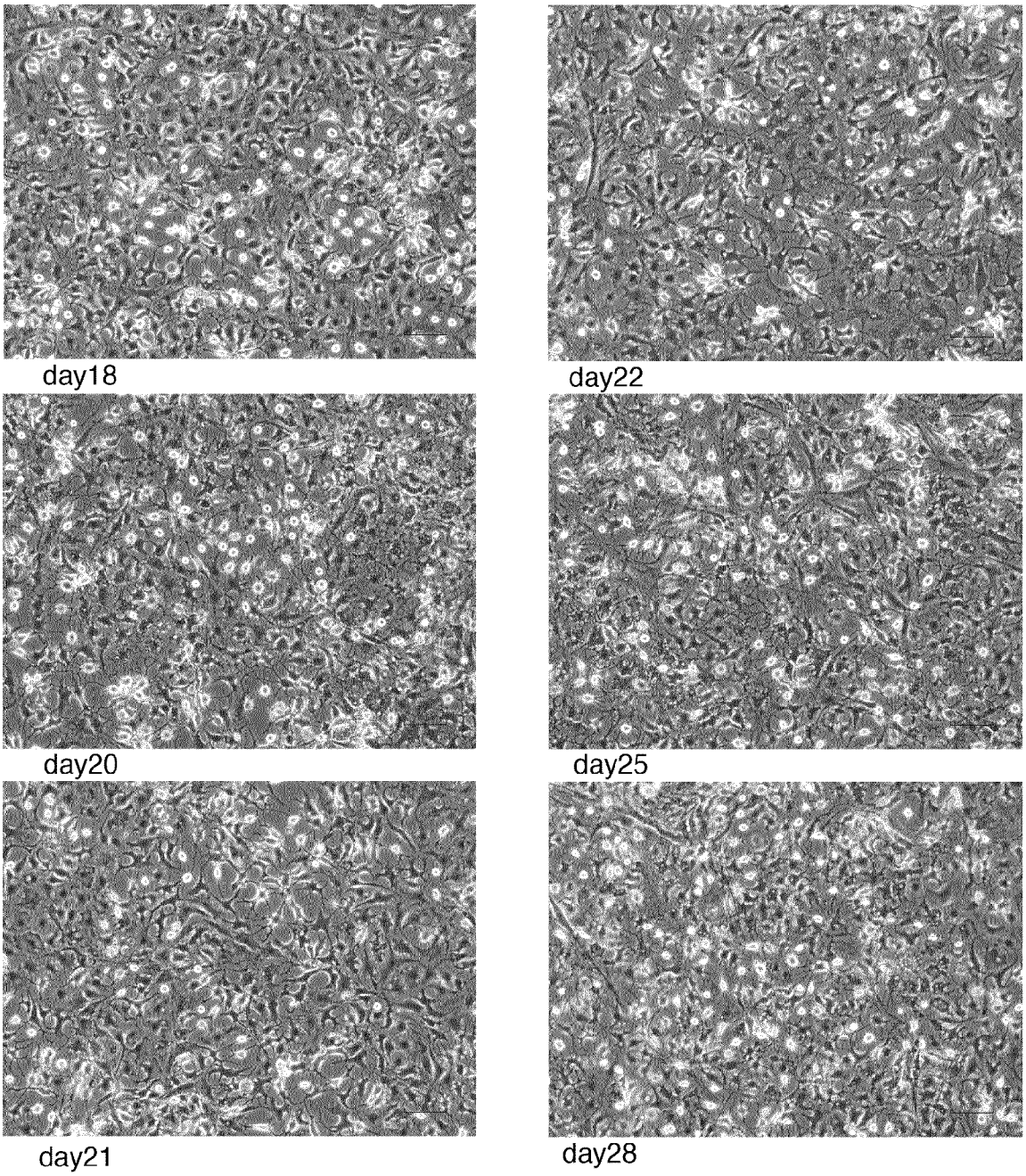
[図4]

培養軟骨の無血清培養法　継代培養　（×100）



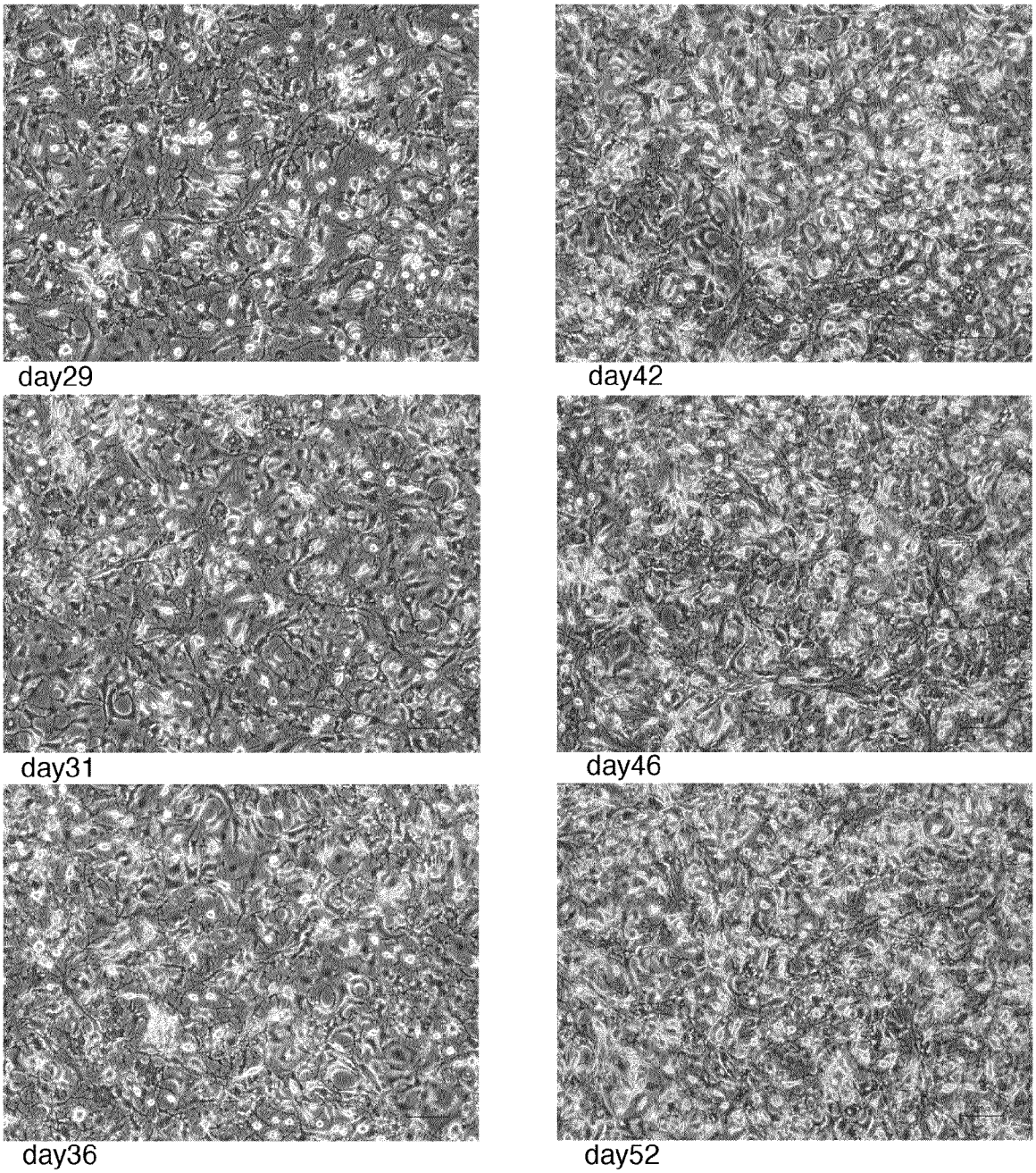
[図5]

培養軟骨の無血清培養法　継代培養　（×100）

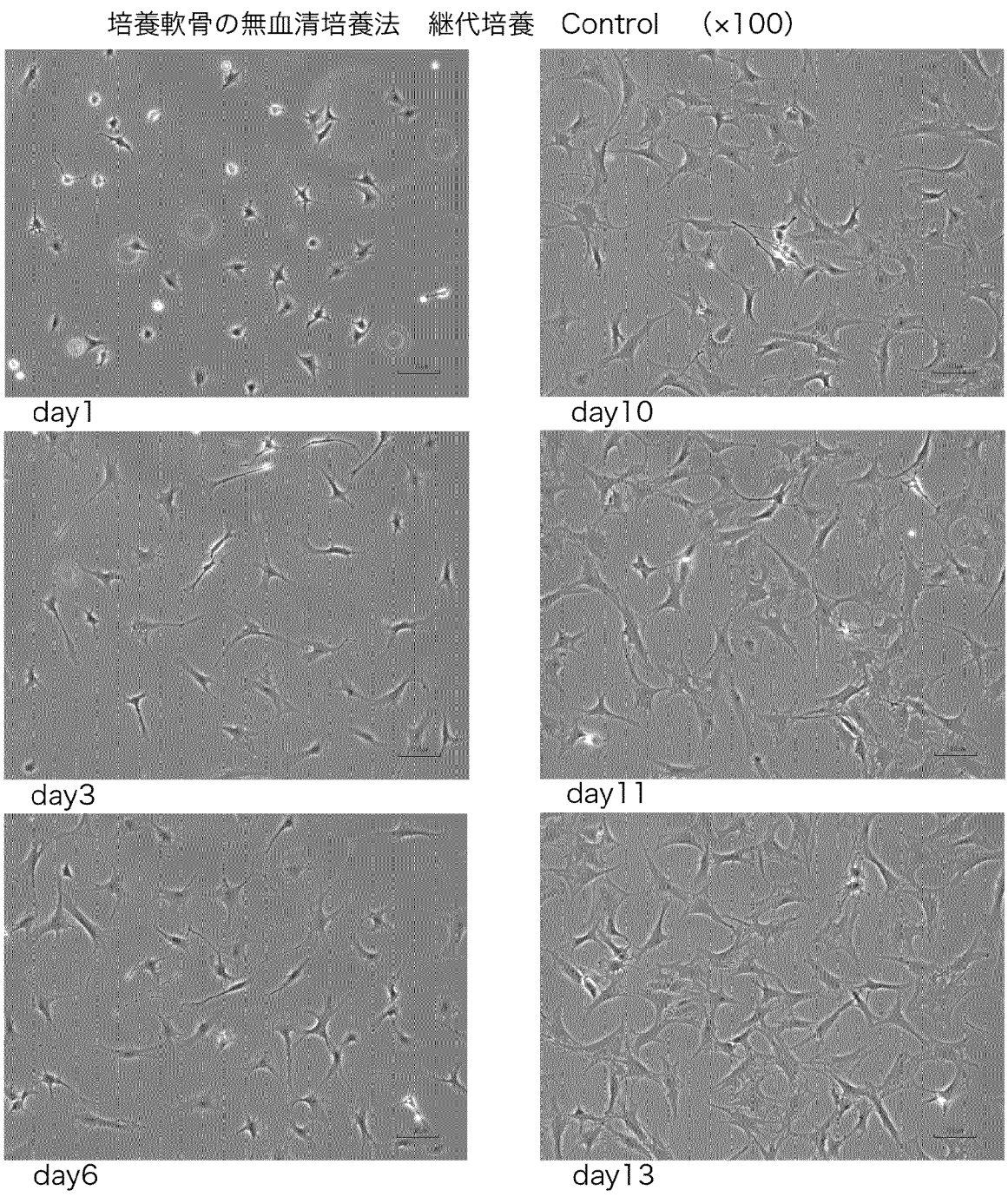


[図6]

培養軟骨の無血清培養法　継代培養　(×100)

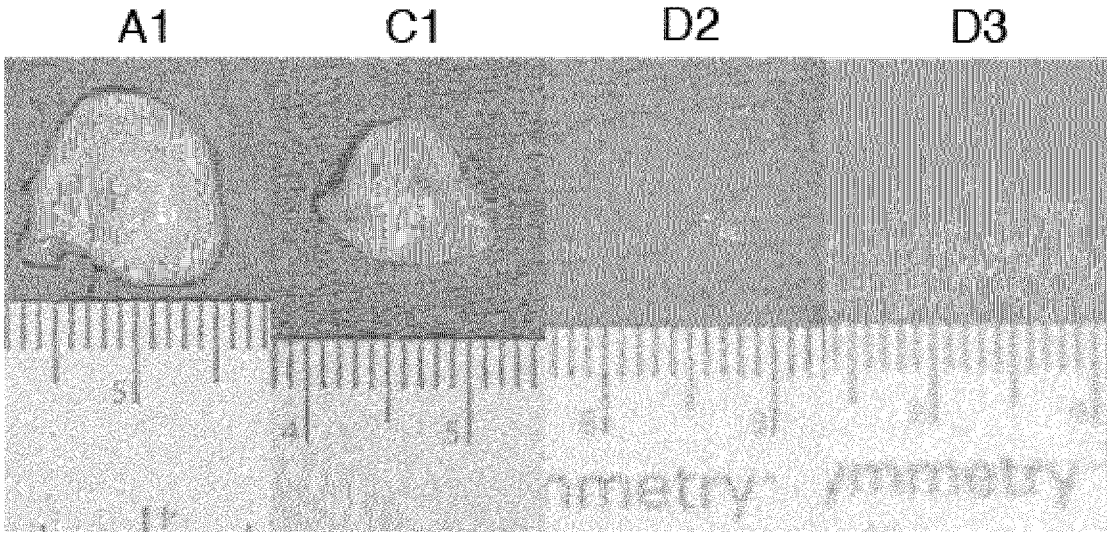


[図7]


培養軟骨の無血清培養法　継代培養　Control　(×100)
day1
day10
day3
day11
day6
day13

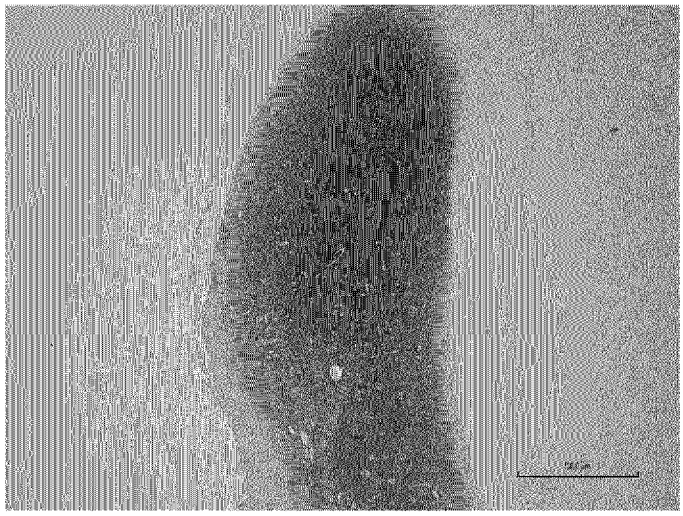
[図8]

[図9]

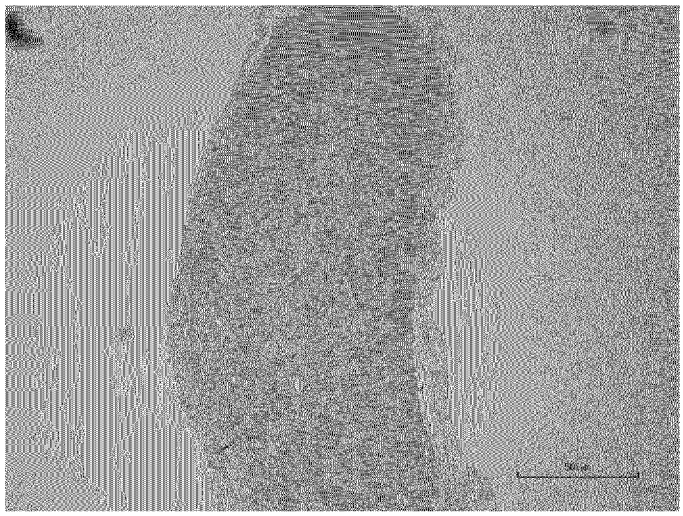


[図10]

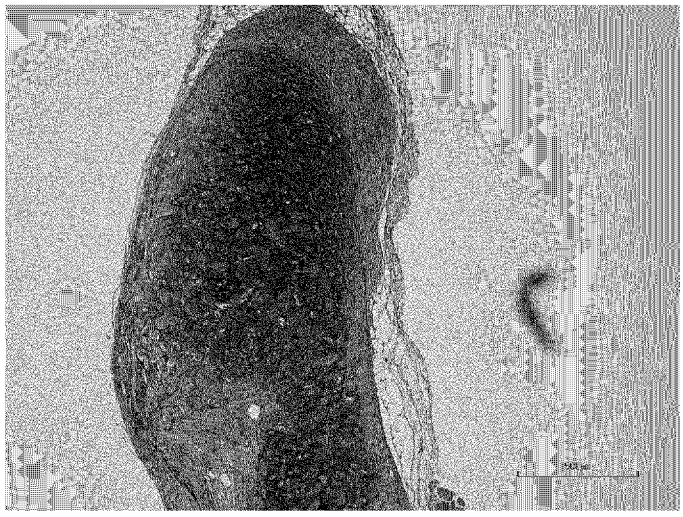
(A)



(B)

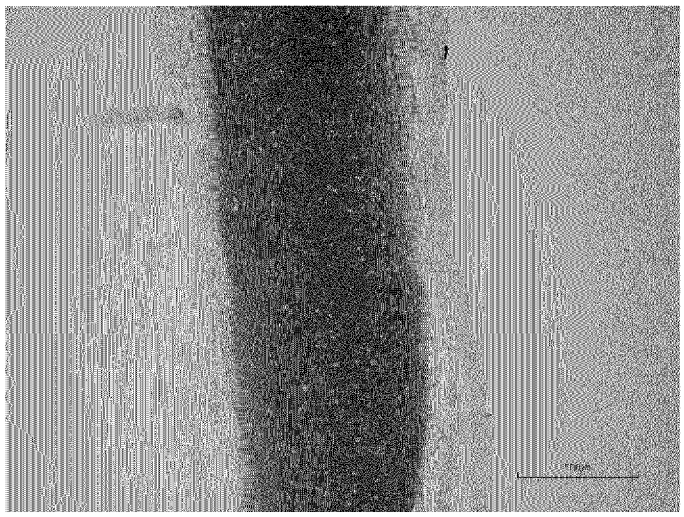


(C)

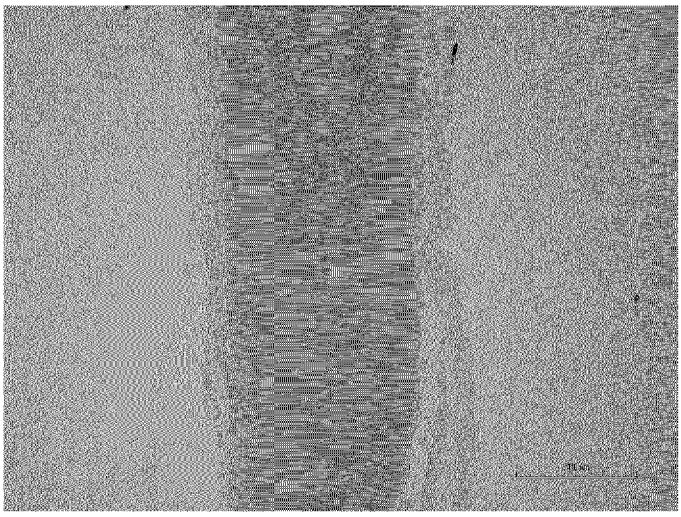


[図11]

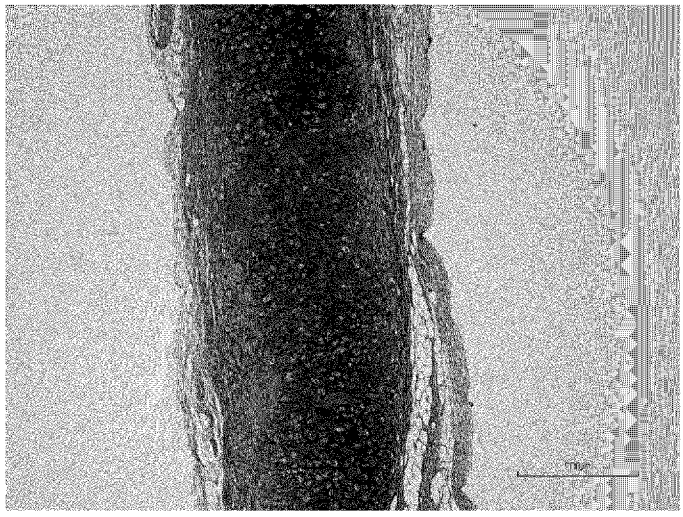
(A)



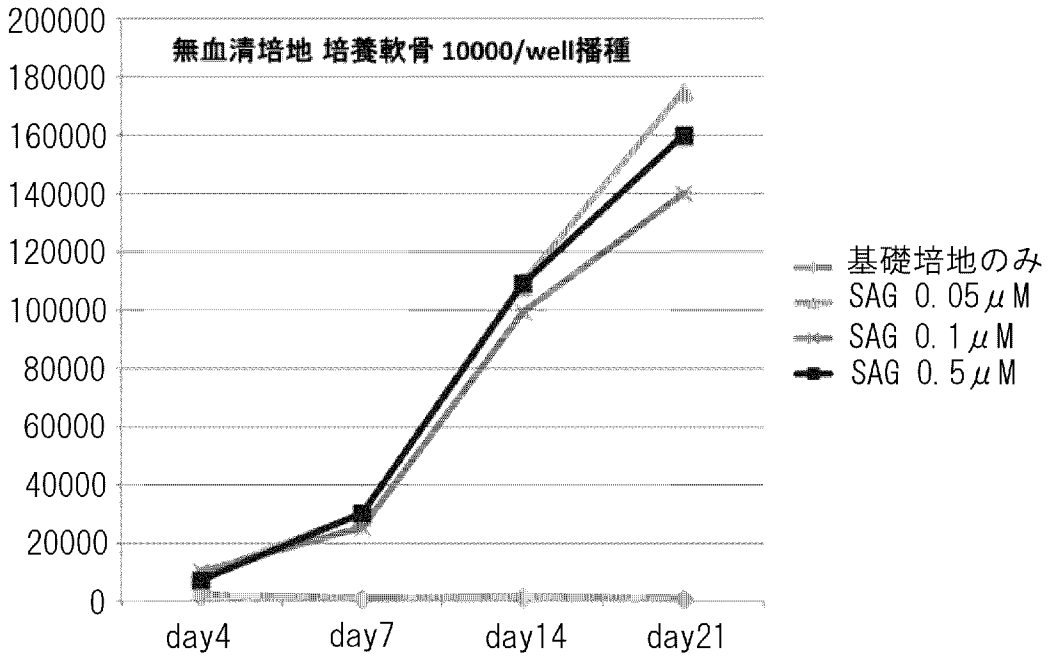
(B)



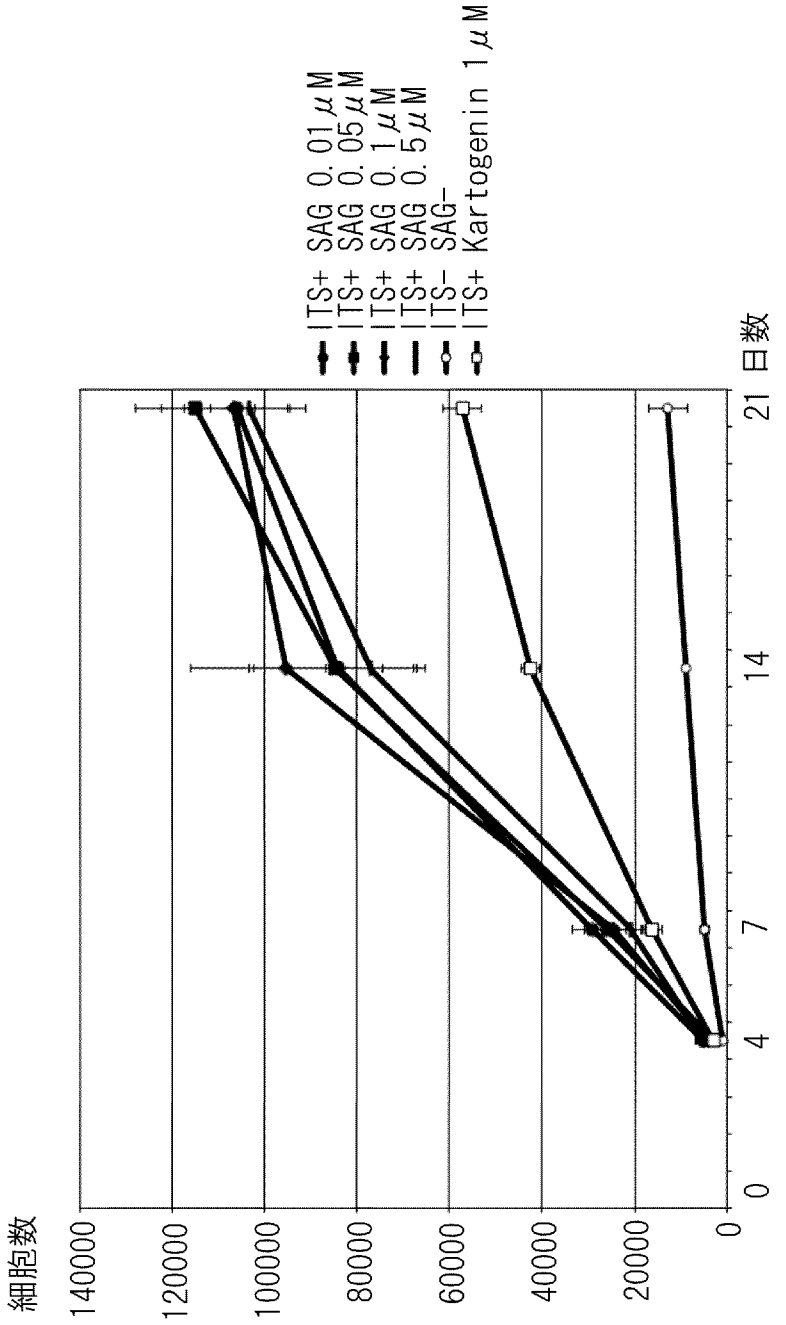
(C)



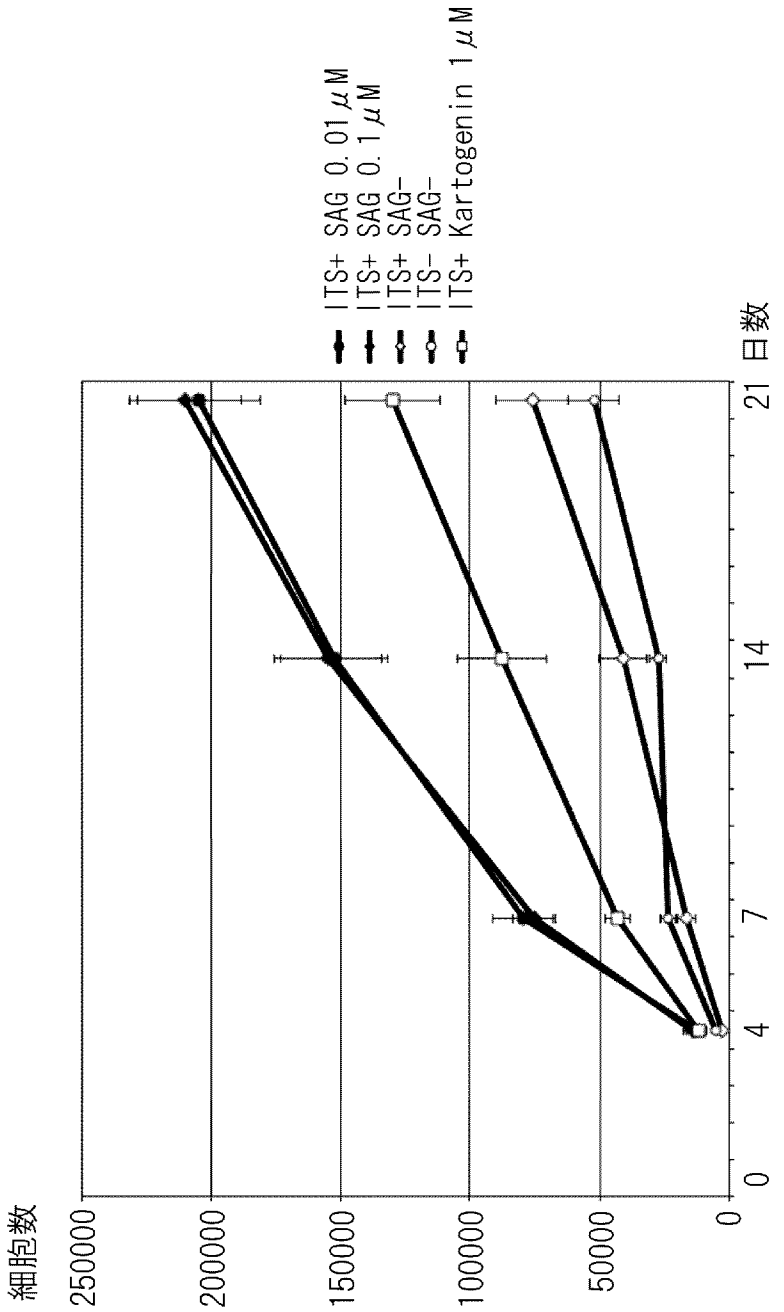
[図12]


無血清培地 培養軟骨 10000/well播種
200000
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
day4
day7
day14
day21
基礎培地のみ
SAG 0.05μM
SAG 0.1μM
SAG 0.5μM

[図13]


ITS+ SAG 0.01μM
ITS+ SAG 0.05μM
ITS+ SAG 0.1μM
ITS+ SAG 0.5μM
ITS- SAG-
ITS+ Kartogenin 1μM
細胞数
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0
4
7
14
21
日数

[図14]


ITS+ SAG 0.01μM
ITS+ SAG 0.1μM
ITS+ SAG-
ITS- SAG-
ITS+ Kartogenin 1μM
細胞数
250000
200000
150000
100000
50000
0
0
4
7
14
21
日数

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/080139

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/077(2010.01)i, *C12N1/00*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N5/077, C12N1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN), DWPI(Thomson Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LONG, F. et al., Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation, Development, 2001.12.15, 128(24), pp. 5099-5108	1-7
A	CHEN, J. K. et al., Small molecule modulation of Smoothened activity, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002.10.21, 99(22), pp. 14071-14076	1-7
A	WO 2014/084085 A1 (Nagoya University), 05 June 2014 (05.06.2014), (Family: none)	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"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
"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
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 January 2016 (08.01.16)	19 January 2016 (19.01.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/080139

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOHNSON, K. et al., A stem cell-based approach to cartilage repair, Science, 2012.04.05, 336(6082), pp. 717-721	1-7
A	JP 2000-515023 A (Genzyme Corp.), 14 November 2000 (14.11.2000), & US 6150163 A & WO 1998/004681 A2 & EP 920490 A2 & AU 3740197 A & CA 2261292 A & AU 730749 B2	1-7
A	JP 2002-529071 A (Consorzio per la Gestione del Centro di Biotecnologie Avanzate), 10 September 2002 (10.09.2002), & US 2005/0090002 A1 & US 6617159 B1 & WO 2000/027996 A1 & EP 1131407 A1 & DE 69933579 D & AU 1380400 A & CA 2348687 A1 & IL 142914 A & AU 758073 B2 & AT 342348 T & RU 2272839 C2	1-7
A	JP 2008-136396 A (Yokohama City University), 19 June 2008 (19.06.2008), (Family: none)	1-7
A	JP 2009-540826 A (Genzyme Corp.), 26 November 2009 (26.11.2009), & US 2007/0292949 A1 & WO 2007/149328 A1 & EP 2032689 A1 & CN 101490245 A & AU 2007261530 A1 & MX 2008016429 A & IL 196025 A & BR PI0713572 A2	1-7

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０８０１３９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/077(2010.01)i, C12N1/00(2006.01)i

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））

Int.Cl.　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	１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１６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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/BIOSIS (STN), DWPI (Thomson Innovation)

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
A	LONG, F. et al., Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation, Development, 2001.12.15, 128(24), pp. 5099-5108	1-7
A	CHEN, J. K. et al., Small molecule modulation of Smoothened activity, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002.10.21, 99(22), pp. 14071-14076	1-7

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　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矛盾するものではなく、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	国際調査報告の発送日
０８．０１．２０１６	１９．０１．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　５３７４
渡邉　潤也
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　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
A	WO 2014/084085 A1 (国立大学法人名古屋大学) 2014.06.05, (ファミリーなし)	1-7
A	JOHNSON, K. et al., A stem cell-based approach to cartilage repair, Science, 2012.04.05, 336(6082), pp. 717-721	1-7
A	JP 2000-515023 A (ジェンザイム・コーポレーション) 2000.11.14, & US 6150163 A & WO 1998/004681 A2 & EP 920490 A2 & AU 3740197 A & CA 2261292 A & AU 730749 B2	1-7
A	JP 2002-529071 A (コンソルツィオ・ペール・ラ・ジェスティオーネ・デル・チェントロ・ディ・ビオテクノロジー・アヴァンツァテ) 2002.09.10, & US 2005/0090002 A1 & US 6617159 B1 & WO 2000/027996 A1 & EP 1131407 A1 & DE 69933579 D & AU 1380400 A & CA 2348687 A1 & IL 142914 A & AU 758073 B2 & AT 342348 T & RU 2272839 C2	1-7
A	JP 2008-136396 A (公立大学法人横浜市立大学) 2008.06.19, (ファミリーなし)	1-7
A	JP 2009-540826 A (ジェンザイム・コーポレーション) 2009.11.26, & US 2007/0292949 A1 & WO 2007/149328 A1 & EP 2032689 A1 & CN 101490245 A & AU 2007261530 A1 & MX 2008016429 A & IL 196025 A & BR PI0713572 A2	1-7