

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02003/070291

発行日 平成17年6月9日(2005.6.9)

(43) 国際公開日 平成15年8月28日(2003.8.28)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

A61L 27/00  
// C12N 15/09

F I

A61L 27/00 G  
A61L 27/00 J  
C12N 15/00 Z N A A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁)

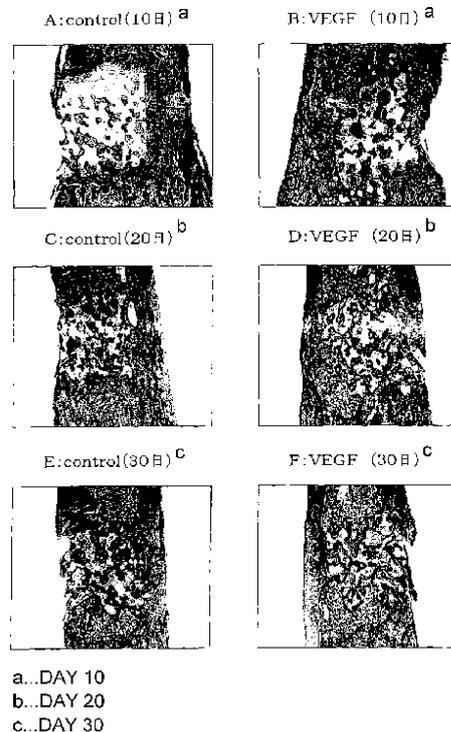
出願番号	特願2003-569244 (P2003-569244)	(71) 出願人	301021533 独立行政法人産業技術総合研究所 東京都千代田区霞が関1-3-1
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/010866	(71) 出願人	503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(22) 国際出願日	平成14年10月21日(2002.10.21)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	特願2002-41604 (P2002-41604)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成14年2月19日(2002.2.19)	(74) 代理人	100119183 弁理士 松任谷 優子
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	植村 壽公 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所内 最終頁に続く
(81) 指定国	CA, JP, US		

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年10月22日第23回大会長発行の「第23回日本バイオマテリアル学会大会予稿集」に発表

(54) 【発明の名称】 増殖因子の遺伝子を導入した細胞を含むインプラント

(57) 【要約】

本発明は生体適合性が高く、迅速な骨再生を可能とする骨代替用インプラントを提供することを目的とする。すなわち、本発明は増殖因子の遺伝子を導入した細胞を含む生体適合性材料からなるインプラントに関する。該インプラントは、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の遺伝子を導入した骨髄由来細胞を多孔性セラミックス等の生体適合性材料に播種して培養することにより製造される。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

増殖因子の遺伝子を導入した細胞を含む生体適合性材料からなる骨代替用インプラント。

## 【請求項 2】

前記増殖因子が、血管新生および/または骨形成を促す増殖因子である、請求の範囲第 1 項に記載のインプラント。

## 【請求項 3】

前記増殖因子が血管内皮細胞増殖因子 ( V E G F ) である、請求の範囲第 2 項に記載のインプラント。

## 【請求項 4】

前記細胞が胚性幹細胞または骨髄由来の間葉系幹細胞である、請求の範囲第 1 項 ~ 第 3 項のいずれか 1 項に記載のインプラント。

10

## 【請求項 5】

前記細胞が骨芽細胞である、請求の範囲第 4 項に記載のインプラント。

## 【請求項 6】

前記細胞が患者から採取された細胞である、請求の範囲第 1 項 ~ 第 5 項のいずれか 1 項に記載のインプラント。

## 【請求項 7】

前記生体適合性材料がハイドロキシアパタイト、 - T C P、 - T C P、コラーゲン、ポリ乳酸およびポリグリコール酸、ならびにこれらの 2 種以上で構成される複合体からなる群より選ばれる、請求の範囲第 1 項 ~ 第 6 項のいずれか 1 項に記載のインプラント。

20

## 【請求項 8】

以下の工程を含む、骨代替用インプラントの製造方法。

- 1) 骨髄由来細胞を *in vitro* で骨芽細胞へ分化誘導する工程
- 2) 上記細胞に、増殖因子の遺伝子をトランスフェクトする工程
- 3) 上記細胞を、生体適合性材料に播種して増殖させる工程

## 【請求項 9】

前記増殖因子が、血管内皮細胞増殖因子 ( V E G F ) である、請求の範囲第 8 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記生体適合性材料がハイドロキシアパタイト、 - T C P、 - T C P、コラーゲン、ポリ乳酸およびポリグリコール酸、ならびにこれらの 2 種以上で構成される複合体からなる群より選ばれる、請求の範囲第 8 項または第 9 項に記載の方法。

30

## 【請求項 11】

増殖因子の遺伝子がアデノウィルスベクターまたはレトロウィルスベクターを用いてトランスフェクトされることを特徴とする、請求の範囲第 8 項 ~ 第 10 項のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 12】

分化誘導がデキサメタゾン、免疫抑制剤、骨形成タンパク質、および骨形成液性因子からなる群より選ばれる 1 種または 2 種以上を用いて行われる、請求の範囲第 8 項 ~ 第 11 項のいずれか 1 項に記載の方法。

40

## 【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、増殖因子の遺伝子を導入した細胞を含むインプラントおよびその製造方法に関する。さらに詳しくは、血管内皮細胞増殖因子の過剰発現により、迅速な骨再生を可能とする骨代替用インプラントに関する。

背景技術

従来、骨のように再生能力の限られた組織の修復には、自己組織の再移植や人工インプラントによる置換・補充が行われている。しかし、自己組織の使用は患者の負担が大きく、その採取量にも限界があり、人工インプラントには自己組織に匹敵するだけの機械的・構

50

造的特性や生体適合性が期待できないという問題がある。

一方、生体から取り出した自己の細胞を *in vitro* で培養・組織化して限りなく生体に近い組織を再構築し、これを再び生体内に戻すという「再生医療」の研究が進められている。この再生医療が実現すれば、それは欠損した組織修復の最も理想的な治療方法となる。通常、再生医療における *in vitro* での組織再生は、細胞を適当な足場材料に播種、培養して行う。この細胞培養時に、細胞をより早く目的の組織に増殖・分化させること、また生体適用後に、移植組織を速やかに増殖させ、欠損部に融合・組織化させることが、再生医療においては重要な問題となる。

これを解決する方法として、細胞の分化誘導をつかさどるサイトカイン（液性因子）を直接細胞に導入するいくつかの技術が知られている。たとえば、特開 2001-316285 号には、TGF- $\beta$ 1 を含浸させたコラーゲンスポンジ上で骨髄細胞等を培養する技術が開示されている。また、特開平 8-3199 号には、bFGF を含有するコラーゲン-軟骨細胞複合体による、軟骨組織再生治療材が開示されている。しかしながら、これらの技術は増殖因子そのものを細胞に添加するため、増殖因子活性の十分な持続が望めない。特に、生体内では添加した増殖因子が速やかに拡散してしまうため、その効果は数時間から 1 日程度で急激に低下するという。

一方、肝臓等の組織再生においては、血管新生が重要な過程であることが知られているが（Ajioka, I. et al., Hepatology 29 396-402, (1999)）、骨再生における血管新生の影響については、未だ十分な検討はなされていない。

#### 発明の開示

本発明は、生体適合性が高く、迅速な骨再生を可能とする骨代替用インプラントを提供することを目的とする。

本発明者らは上記課題を解決するため鋭意研究した結果、細胞に増殖因子の遺伝子を導入して過剰発現させれば、増殖因子の効果が持続的に得られ、より迅速な組織再生が可能になると考えた。そして、血管新生を促す血管内皮細胞増殖因子（VEGF）を導入することにより、骨再生が飛躍的に向上することを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、以下の（１）～（１２）に関するものである。

（１）増殖因子の遺伝子を導入した細胞を含む生体適合性材料からなる骨代替用インプラント。

（２）前記増殖因子が、血管新生および／または骨形成を促す増殖因子である、上記（１）記載のインプラント。

（３）前記増殖因子が血管内皮細胞増殖因子（VEGF）である、上記（２）記載のインプラント。

（４）前記細胞が胚性幹細胞または骨髄由来の間葉系幹細胞である、上記（１）～（３）のいずれか 1 に記載のインプラント。

（５）前記細胞が骨芽細胞である、上記（４）記載のインプラント。

（６）前記細胞が患者から採取された細胞である、上記（１）～（５）のいずれか 1 に記載のインプラント。

（７）前記生体適合性材料がハイドロキシアパタイト、 $\beta$ -TCP、 $\alpha$ -TCP、コラーゲン、ポリ乳酸およびポリグリコール酸、ならびにこれらの 2 種以上で構成される複合体からなる群より選ばれる、上記（１）～（６）のいずれか 1 に記載のインプラント。

（８）以下の工程を含む、骨代替用インプラントの製造方法。

1) 骨髄由来細胞を *in vitro* で骨芽細胞へ分化誘導する工程

2) 上記細胞に、増殖因子の遺伝子をトランスフェクトする工程

3) 上記細胞を、生体適合性材料に播種して増殖させる工程

（９）前記増殖因子が、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）である、上記（８）記載の方法。

（１０）前記生体適合性材料がハイドロキシアパタイト、 $\beta$ -TCP、 $\alpha$ -TCP、コラーゲン、ポリ乳酸およびポリグリコール酸、ならびにこれらの 2 種以上で構成される複合

10

20

30

40

50

体からなる群より選ばれる、上記(8)または(9)に記載の方法。

(11)増殖因子の遺伝子がアデノウィルスベクターまたはレトロウィルスベクターを用いてトランスフェクトされることを特徴とする、上記(8)~(10)のいずれか1に記載の方法。

(12)分化誘導がデキサメタゾン、免疫抑制剤、骨形成タンパク質、および骨形成液性因子からなる群より選ばれる、上記(8)~(11)のいずれか1に記載の方法。

以下、本発明について詳細に説明する。

#### 1. インプラントの構成

本発明のインプラントは、増殖因子の遺伝子を導入した細胞を含む、生体適合性材料からなる骨代替用インプラントである。

10

##### 1.1 増殖因子

本発明のインプラントに用いられる増殖因子は特に限定されず、たとえば、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、血小板分化増殖因子(PDGF)、インスリン、インスリン様増殖因子(IGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、グリア誘導神経栄養因子(GDNF)、神経栄養因子(NF)、ホルモン、サイトカイン、骨形成因子(BMP)、トランスフォーミング増殖因子(TGF)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)等が挙げられる。特に、血管新生および/または骨形成を促す増殖因子が好ましい。そのような増殖因子としては、たとえば骨形成因子(BMP)、骨増殖因子(BGF)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)およびトランスフォーミング増殖因子(TGF)を挙げることができる。なかでも、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)は、*in vitro*での血管誘導を飛躍的に向上させ、迅速な骨再生を可能にする点で最も好ましい。

20

前記増殖因子の遺伝子は、通常の方法に従い、公知の配列を基に調整することができる。たとえば、骨芽細胞からRNAを抽出し、公知の配列を元にプライマーを作製し、PCR法でクローニングすることにより目的とする増殖因子遺伝子のcDNAが調整できる。また、市販のものを購入、あるいは供与してもらって用いても良い。

##### 1.2 細胞

本発明に用いられる細胞は、分化・増殖能力を有する未分化の細胞であり、たとえば、間葉系幹細胞、造血幹細胞、骨格筋幹細胞、神経幹細胞および肝臓幹細胞等を挙げることができる。特に、骨髄由来の胚幹細胞(ES細胞)および骨髄由来の間葉系幹細胞が好ましい。

30

前記細胞は、樹立された培養細胞株のほか、患者の生体から単離された細胞を好適に用いることができる。該細胞は患者から採取された後、常法に従って結合組織等を除去して調製することが好ましい。また、常法により一次培養を行い、予め増殖させてから用いてもよい。

##### 1.3 生体適合性材料

本発明に用いられる生体適合性材料は、細胞培養の足場になると同時に、細胞ごと生体内に適用され、骨代替用インプラントとして機能する。ここで、「生体適合性材料」とは、生体に対して親和性が高く、安全性の確認されている材料を意味する。そのような材料としては、SUS316L、バイタリウムおよびTi-6Al-4V等の金属材料、超高分子量ポリエチレン、MMA骨セメント、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリエチレンテレフタレートおよびポリプロピレン等の高分子材料、ハイドロキシアパタイト、-TCP、-TCPおよびバイオガラス等のセラミックス材料等を挙げることができる。ただし、細胞培養の足場として用いられるという点で、特にハイドロキシアパタイト、-TCP、-TCP等の多孔性セラミックス材料、コラーゲン、ポリ乳酸およびポリグリコール酸、ならびにこれらの複合体、あるいは吸収性合成ポリマーを用いることが好ましい。前記生体適合性材料は、細胞の均一な播種が可能となるよう、多孔性であることが好ましい。なお、本明細書中において「多孔(性)」とは、気孔率が40%以上を意味するものとする。また、孔の大きさは特に限定されないが、骨再生が起きやすいという点では直径200 $\mu$ m~500 $\mu$ mが好ましい。

40

前記生体適合性材料は、インプラントの目的や適用部位により、適宜最適なものを選ぶこ

50

とが好ましい。たとえば、強度を必要とする移植箇所（あるいは手術法）については、ハイドロキシアパタイトが好ましく、強度を必要としない移植箇所（あるいは手術法）については、生体吸収性の - T C P 等が好ましい。

前記生体適合性材料の形態および形状は、特に限定されず、スポンジ、メッシュ、不織布状成形物、ディスク状、フィルム状、棒状、粒子状、およびペースト状等、任意の形態および形状を用いることができる。こうした形態や形状は、インプラントの目的に応じて適宜選択すればよい。

## 2. インプラントの作製方法

本発明のインプラントは、次の工程によって製造される。

- 1 ヒト骨髄由来細胞を *in vitro* で骨細胞へ分化誘導する工程
- 2 上記細胞に、増殖因子の遺伝子をトランスフェクトする工程
- 3 上記細胞を、生体適合性材料に播種して増殖させる工程

10

以下、各工程の詳細について説明する。

### 2.1 細胞の分化誘導

細胞は適当な薬剤を用いて処理することにより、目的とする組織を構築する細胞に分化誘導をしておくことが必要である。たとえば、デキサメタゾン、FK-506およびシクロスポリン等の免疫抑制剤、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7およびBMP-9等の骨形成タンパク質（BMP: Bone Morphogenic Proteins）、TGF等の骨形成液性因子から選ばれる1種または2種以上を添加することにより細胞を骨系細胞に分化誘導する。

20

### 2.2 増殖因子の遺伝子の導入

増殖因子の遺伝子は、常法に従い、公知の配列を基に調整することができる。たとえば、骨芽細胞からRNAを抽出し、公知の配列を元にプライマーを作製し、PCR法でクローニングすることにより目的とする増殖因子遺伝子のcDNAが調整できる。

本発明において、増殖因子の遺伝子の細胞への導入は、動物細胞のトランスフェクションに通常用いられる方法、たとえばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、レトロウイルスやバキュロウイルスをベクターとして用いる方法等を用いることができるが、アデノウイルスまたはレトロウイルスをベクターとして用いる方法が安全性、導入効率の点から好ましく、特にアデノウイルスを用いた方法が最も好ましい。

30

前記アデノウイルスベクターの調整は、例えばMiyakeらの方法（Miyake, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 1320-1324, (1993)）に基づいて行えばよいが、市販のAdenovirus Cre/loxP Kit（宝酒造社製）を用いることもできる。このキットはP1ファージのCreリコンビナーゼとその認識配列であるloxPを用いた新たな発現制御系（Kanegae Y. et al., 1995 Nucl. Acids Res. 23, 3816）による組換えアデノウイルスベクター作製キットで、転写因子遺伝子を組み込んだ組換えアデノウイルスベクターを簡便に作製することができる。

なお、アデノウイルス感染のmoi (multiplicity of infection) は、10以上、好ましくは50~200、より好ましくは100前後（80~120程度）がよい。

40

### 2.3 細胞培養

前記増殖因子遺伝子を導入した細胞の培養は、前記した生体適合性材料からなる足場に、該細胞を播種して、通常の方法により行えばよい。

細胞の播種は、足場である生体適合性材料に単に播種するだけでもよく、あるいは、緩衝液、生理食塩水、注射用溶媒、あるいはコラーゲン溶液等の液体とともに混合して播種してもよい。また、材料によって、細胞が孔の中にスムーズに入らない場合は、引圧条件下で播種してもよい。

播種する細胞の数（播種密度）は細胞の形態を維持して組織再生をより効率よく行わせるため、用いる細胞や足場材料に応じて適宜調整することが望ましい。たとえば、骨芽細胞

50

であれば、播種密度は100万個/ml以上であることが望ましい。

細胞培養は、足場である生体適合性材料のもとで行う。培地としては、MEM培地、MEM培地、DMEM培地等、公知の培地を培養する細胞に合わせて適宜選んで用いることができる。また、該培地には、FBS (Sigma社製)、Antibiotic-Antimycotic (GIBCO BRL社製)等の抗生物質等を添加しても良い。培養は、3~10%CO<sub>2</sub>、30~40℃、特に5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で行うことが望ましい。培養期間は、特に限定されないが、少なくとも4日、好ましくは7日、より好ましくは2週間以上であるとよい。

### 3. インプラントの利用

前記方法によって再生された組織は、足場材料である生体適合性材料とともに、埋入あるいは注入することで、骨代替用インプラントとして利用することができる。 10

本発明のインプラントの形態及び形状は、特に限定されず、スポンジ、メッシュ、不織布状成形物、ディスク状、フィルム状、棒状、粒子状、及びペースト状等、任意の形態及び形状を用いることができる。こうした形態や形状は、インプラントの目的に応じて適宜選択すればよい。

本発明のインプラントは、その目的と効果を損なわない範囲において、適宜他の成分を含んでいてもよい。そのような成分としては、例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、血小板分化増殖因子(PDGF)、インスリン、インスリン様増殖因子(IGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、グリア誘導神経栄養因子(GDNF)、神経栄養因子(NF)、ホルモン、サイトカイン、骨形成因子(BMP)、トランスフォーミング増殖因子(TGF)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)等の増殖因子、骨形成タンパク質、St、Mg、Ca及びCO<sub>3</sub>等の無機塩、クエン酸及びリン脂質等の有機物、薬剤等を挙げる 20  
ことができる。

本発明のインプラントにおいて、骨細胞・組織は増殖因子の遺伝子を導入した細胞から構築される。骨細胞・組織の構築は移植前(in vitro)のみならず、移植後の骨欠損部(in vivo)においても引き続き行われてよい。本発明のインプラントは、骨親和性及び骨形成能が高く、生体適用後すみやかに生体骨と一体化し、骨欠損部の再生を可能にする。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2002-41604号の明細書に記載された内容を包含する。 30

### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明についてさらに詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

〔実施例1〕 VEGF遺伝子導入ラット骨芽細胞による血管新生促進

#### 1. 実験方法

##### 1) アデノウイルスベクターの作製

###### 1 マウスVEGFのcDNA

マウスVEGFのcDNA(配列番号1)は、東京工業大学 渡辺氏より供与を受けた。

###### 2 組換えアデノウイルスの作製

上記VEGFのcDNAを市販のAdenovirus Cre/loxP Kit(宝酒造社製)を用いてコスミドベクターpAxCawtのSwaIサイトに挿入し、キットの説明書に従い組換えアデノウイルスベクターを作製した。VEGFの挿入は制限酵素パターンとシークエンスにより確認した。このウイルスはE1領域欠失のため、標的細胞内では増殖することはできず、一過性の性質をもつ。また、目的遺伝子上流にスタッフターをもつため、Creリコンビナーゼ発現ウイルスと共感染のときのみ遺伝子を発現する。なお、作製したウイルスの力価は、約 $2.4 \times 10^9$  PFU/mlで、感染効率は非常に高かった。 40

##### 2) 骨髄細胞の採取および培養

ラット骨芽細胞(Rat Bone Marrow Osteoblast: RBMO)は、6週齢のFisherラット(オス)の大腿骨よりManiatisら 50

方法 (Maniatisopoulos, C., Sodek, J., and Melcher, A. H. (1988) Cell Tissue Res. 254, 317-330) に従って採取した。採取した細胞を、15% FBS (Sigma社製)、Antibiotic-Antimycotic (GIBCO BRL社製) 添加 MEM 培地 (nacalai tesque社製) でコンフルエントになるまで培養した。つぎに、直径 3.5 cm のディッシュに、5 nM デキサメタゾン (Sigma社製)、10 mM  $\beta$ -グリセロフォスフェート (Sigma社製)、50  $\mu$ g/ml アスコルビン酸フォスフェート (Wako社製) を添加した上述の培地を入れ、1 ディッシュあたり細胞が約 40 万個となるように培養液を加えて継代培養した。翌日、継代培養したラット骨芽細胞 (90% コンフルエント) に LacZ 遺伝子発現ウイルス (AD-LacZ) と Cre リコンビナーゼ発現ウイルス (AD-CRE) を multiplicity of infection (moi) = 100 で感染させた。

10

### 3) Xgal 染色法による LacZ 遺伝子発現細胞の観察

アデノウイルス感染 ~ 4 週間後のラット骨芽細胞における LacZ の発現を Scholer らの方法 (Scholer, H. R. et al., (1989) EMBO J., 8, 2551-2557) に従って Xgal 染色法により観察した (図 1)。なお、非感染細胞をコントロールとして用いた。染色した細胞を NIH image を用いて画像解析を行い、発現細胞数を数値化することにより遺伝子導入効率を求めた (図 2)。結果：発現効率は 4 日目が最大であり、90% 以上の発現効率が見られた。わずかであるが、4 週間目までは発現がある。

20

### 4) ノザンハイブリダイゼーション 1 < 転写確認 >

アデノウイルス感染 1 週間目のラット骨芽細胞より、市販の TRIzol 試薬 (GIBCO BRL社製, #15596-10551) を用い、説明書に従い Total RNA を抽出した。10  $\mu$ g の Total RNA を 1% アガロース / 5.5% ホルムアルデヒドゲルで分離し、20x SSC で Hybond<sup>TM</sup>-X1 メンブレン (Amersham Pharmacia Biotech社製) に転写した。その後、80 °C で 2 時間加熱し、UV 照射を 2 分間行った。VEGF の cDNA プローブは rediprime<sup>TM</sup> (Amersham Pharmacia Biotech社製) を用いて、<sup>32</sup>P dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech社製) でラベルし、取り込まれなかった <sup>32</sup>P dCTP を MicroSpin<sup>TM</sup> G-25 Column (Amersham Pharmacia Biotech社製) を用いて除いた。このメンブレンを 68 °C で 30 分間 PerfectHyb<sup>7N</sup> Plus HYBRIDIZATION BUFFER (SIGMA社製) 中でインキュベートした後、ラベルした cDNA プローブ (2 x 10<sup>6</sup> cpm/ml) を加えてさらに 68 °C で 1 時間インキュベートした。メンブレンは室温で 2x SSC / 0.1% SDS で 5 分間洗った後、さらに 68 °C で 0.5x SSC / 0.1% SDS で 2 回各 20 分間洗った。その後メンブレンを -80 °C で Kodak XAR film に一昼夜感光した (図 3)。さらに、VEGF 発現量を moi = 0 の値を 1 として 18 s rRNA の発現量との相対比で示した (図 4)。

30

結果：moi の上昇に従い VEGF の転写量が増加することが確認された。

40

### 5) ノザンハイブリダイゼーション 2 < VEGF 発現量の経時変化 >

アデノウイルス感染後 4、7、10、14 日後の Total RNA を抽出し、前項と同様の方法でノザンハイブリダイゼーションによって VEGF mRNA の発現量変化をみた。なお、VEGF 発現量は VEGF と GAPDH との相対比で示した (図 5、図 6)。

### 6) ELISA による培地中の VEGF の確認 1 < moi の効果 >

種々の moi で AD-VEGF をラット骨芽細胞に感染させ、培地中の VEGF 量を ELISA により測定した。測定は 4 日目 (図 7-A) と 7 日目 (図 7-B) の上清を用いて行った。結果：発現量は moi の上昇に伴い増えるはずであったが、moi にかかわらず約 10 ng/ml と一定であった。ウイルス感染により細胞数が減少したためと考えられる。

50

7) ELISAによる培地中のVEGFの確認 2 <VEGF量の経時変化>

AD-VEGFを $moi = 100$ で感染させ、VEGF濃度をELISAにより測定し、その経時変化をみた(図8)。なお、培地交換は3日ごとに行い、その際に上清を回収した。

結果: 10日ごろまではVEGF発現量は多く、14日目には大きく減少することから、ウイルスによるVEGF発現効果は2週間程度であることがわかった。

8) ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を利用した分泌VEGF活性の確認

VEGF活性を調べるために、96ウェルにヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を播き、種々の $moi$ でウイルスを感染させたラット骨芽細胞培地上清を $20 \mu l / well$ の割合で加えた。その後Cell Counting Kit(WAKO)で細胞の増加率を評価した(図9)。

その結果、ウイルスのVEGFにより細胞の成育に2倍の差が出ていることが確認された。

## 2. 結論

VEGF導入細胞は、 $moi$ にかかわらず、非感染細胞の約8~10倍のVEGF発現を示した。特に $moi$ は、50~200程度が望ましく、100程度が最適であると考えられた。また、VEGF感受性のヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を使った生育実験より、AD-VEGF感染ラット骨髄細胞培地を加えた細胞は、非感染細胞よりも明らかに血管細胞の成育を促進することが確かめられた。

また、増殖因子の効果も2週間程度持続しており、これは増殖因子そのものの直接導入(増殖因子の拡散が数時間から1日でおこってしまう)に比較して、非常に高いものであった。

〔実施例2〕 VEGF遺伝子導入ラット骨芽細胞による骨組織再生

### 1) 試験方法

フィッシャーラット大腿骨より骨髄液を採取したのちT75フラスコでMEM+15% FBS中37.5%炭酸ガス下で6日間培養した。その後、dexamethasone, beta-glycerophosphate, ascorbic acid等、骨芽細胞への分化誘導因子を加えて4日間培養した。T75フラスコでほぼコンフルエントになったところで( $1-3 \times 10^7$ 細胞/フラスコ)で実施例1と同様にしてAD-VEGFに感染させ( $moi = 100$ )、1日経過後トリプシンを用いて細胞をはがし、多孔性セラミックス(オスフェリオン: オリンパス光学工業株式会社、平均ポアサイズ $200 \mu m$ 、気孔率75%)に200万個/ml以上の播種密度で播種し、上記と同様の条件で培養した。

1日経過後、フィッシャーラットの大腿骨に骨欠損部位をつくり、その部分に上記セラミックス( $2 \times 2 \times 2 mm^3$ )を移植した。移植後2週間後のラットより大腿骨を取り出し、固定後、切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色により骨形成を見た。

### 2) 結果

結果を図10に示す。cont1, cont2はウイルス非感染群(コントロール)で、cont1は低倍率、cont2は高倍率像である。VEGF1, VEGF2はウイルス感染群で、VEGF1は低倍率、VEGF2は高倍率像である。図10から明らかに、非感染群では骨形成があまり起こっていないのに対し、感染群では明らかに骨形成が顕著に起こっていることが確認された。

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、細胞をより早く目的の組織に分化・増殖させ、効果的な骨再生が可能となる。これにより、再生医療における優れた骨代替用インプラントを提供することができる。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,  
Japan Science and Technology Corporation

<120> Implant made of biocompatible materials comprising cells  
transfected a gene encoding growth factor 10

<130> PH-1640-PCT

<150> JP-2002-41604

<151> 2002-02-19

<160> 2 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 980

<212> DNA 30

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (87).. (656)

<400> 1 40

caagcgcgca agagagcggg ctgcctcgca gtccgagccg gagagagga gcgacgcg 60

cgcggccccc gagccctcc gaaacc atg aac ttt ctg ctc tct tgg gtg cac 113  
 Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His  
 1 5

tgg acc cig gct ita ctg ctg tac ctc cac cat gcc aag tgg tcc cag 161  
 Trp Thr Leu Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln  
 10 15 20 25 10

gct gea ccc acg aca gaa gga gag cag aag tcc cat gaa gtg atc aag 209  
 Ala Ala Pro Thr Thr Glu Gly Glu Gln Lys Ser His Glu Val Ile Lys  
 30 35 40

ttc atg gac gtc tac cag cga agc tac tgc cgt cca att gag acc ctg 257  
 Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu  
 45 50 55 20

gtg gac atc ttc cag gag tac ccc gac gag ata gag tac atc ttc aag 305  
 Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys  
 60 65 70 30

ccg tcc tgt gtg ccg ctg atg cgc tgt gca ggc tgc tgt aac gat gaa 353  
 Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Ala Gly Cys Cys Asn Asp Glu  
 75 80 85

gcc ctg gag tgc gtg ccc acg tca gag agc aac atc acc atg cag atc 401  
 Ala Leu Glu Cys Val Pro Thr Ser Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile  
 90 95 100 105 40

atg cgg atc aaa cct cac caa agc cag cac ata gag aga atg agc ttc 449

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Ser Gln His Ile Glu Arg Met Ser Phe		
	110	115
cta cag cac agc aga tgt gaa tgc aga cca aag aaa gac aga aca aag		120
497		
Leu Gln His Ser Arg Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Thr Lys		
	125	130
		135
cca gaa aat cac tgt gag cct tgt tca gag cgg aga aag cat ttg ttt		545
10		
Pro Glu Asn His Cys Glu Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe		
	140	145
		150
gtc caa gat ccg cag acg tgt aaa tgt tcc tgc aaa aac aca gac tcg		593
20		
Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser		
	155	160
		165
cgt tgc aag gcg agg cag ctt gag tta aac gaa cgt act tgc aga tgt		641
Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys		
	170	175
		180
		185
gac aag cca agg cgg tgagccaggc tggcaggaag gagcctectc agggtttcgg		696
30		
Asp Lys Pro Arg Arg		
	190	
gaaccagacc tctcaccgga aagaccgatt aaccatgtca ccaccatgcc atcatcgica		756
ccgttgacag aacagtcctt aatccagaaa gcctgatatg aaggaagagg agatccttcg		816
40		
aggagcactt tgggtccgga gggcgagact ccggcagacg cattcccggg caggigacca		876

agcacgtgcc tcgtgggact ggattcgcca tttcttata tctgctgcta aatcgccaag 936

cccggaagai tagggttggt tctgggattc ctagagct cgtg 980

<210> 2

<211> 190

10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Thr Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

20

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Thr Thr Glu Gly

20 25 30

Glu Gln Lys Ser His Glu Val Ile Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg

35 40 45

30

Ser Tyr Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr

50 55 60

Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met

65 70 75 80

Arg Cys Ala Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ala Leu Glu Cys Val Pro Thr

85 90 95

40

Ser Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln  
 100 105 110

Ser Gln His Ile Glu Arg Met Ser Phe Leu Gln His Ser Arg Cys Glu  
 115 120 125

Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Thr Lys Pro Glu Asn His Cys Glu Pro  
 130 135 140

Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys  
 145 150 155 160

Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu  
 165 170 175

Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg  
 180 185 190

10

20

30

40

【図面の簡単な説明】

図1は、非感染細胞（control）とアデノウイルス感染細胞（AD-lacZ）の Xgal染色結果を示す画像である。

図2は、アデノウイルス感染細胞におけるLacZ遺伝子の導入効率（染色量で評価）を示すグラフである。

図3は、moiによるVEGF発現量の変化を示すノザンハイブリダイゼーションの結果である。

図4は、moiによるVEGFの発現量（18srRNA発現量との相対値）の変化を示すグラフである。

図5は、VEGF発現量の経時変化を示すノザンハイブリダイゼーションの結果である。

図6は、VEGFの発現量（18srRNA発現量との相対値）の経時変化を示すグラフである。

図7は、moiによる培地中のVEGF量変化を示すグラフ（A：4日目、B：7日目）である。

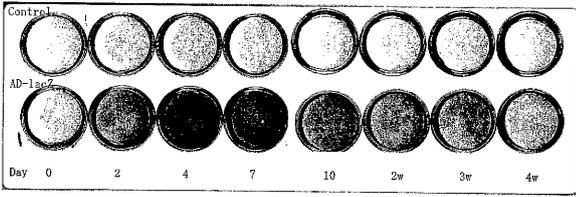
図8は、moi = 100で感染させたときのVEGF発現量の経時変化を示すグラフである。

図9は、VEGFによるヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）の増加率を示すグラフである。

図10は、ヘマトキシリン - エオジン染色により骨組織再生をみた写真である（A：control（10日）、B：control（20日）、C：VEGF（10日）、D：VEGF（20日））。

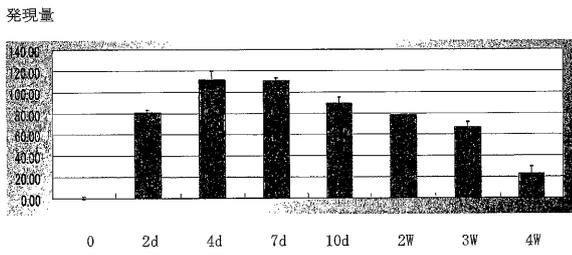
【 図 1 】

図 1



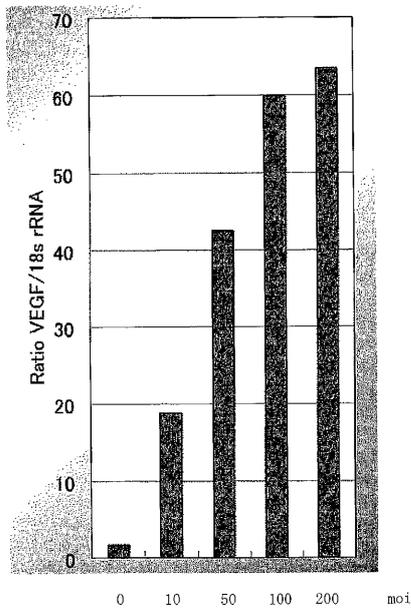
【 図 2 】

図 2



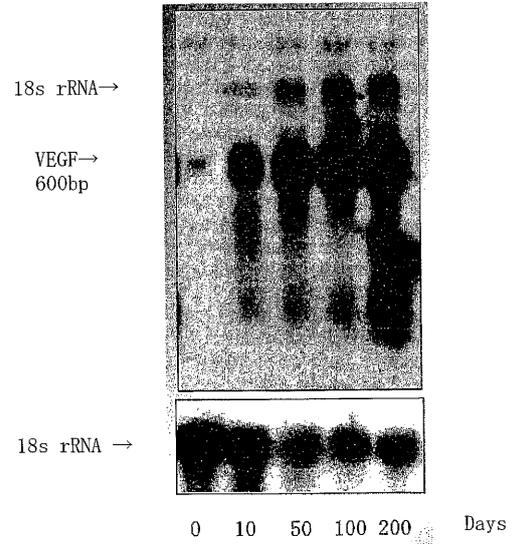
【 図 4 】

図 4



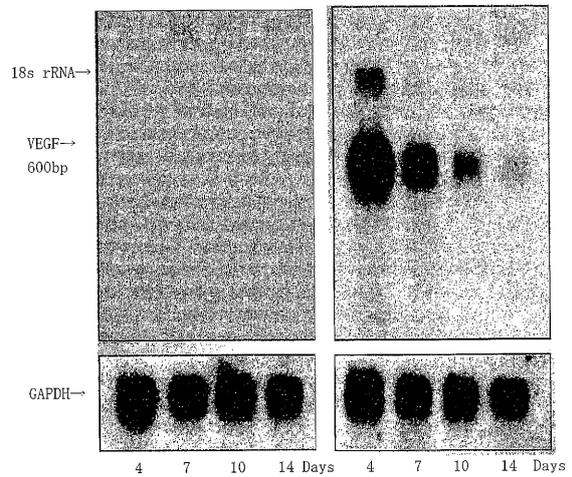
【 図 3 】

図 3



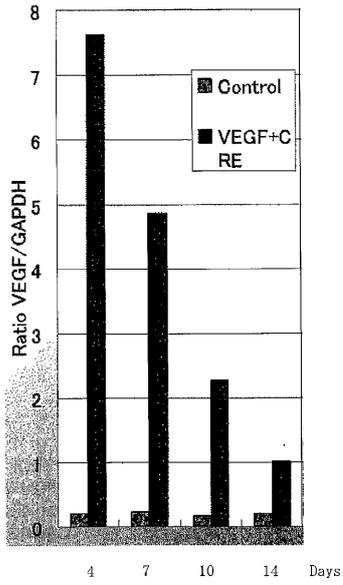
【 図 5 】

図 5



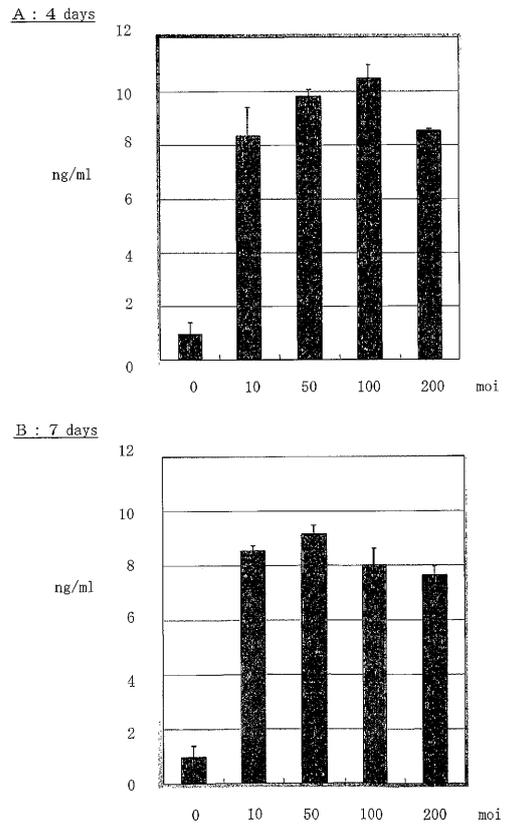
【 図 6 】

図 6



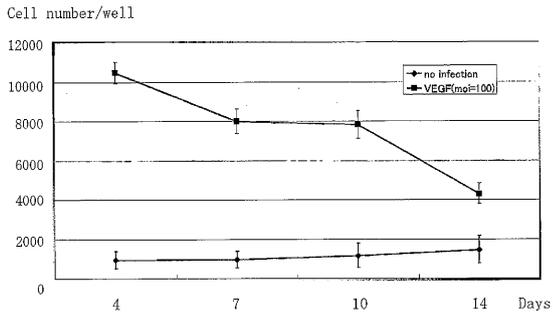
【 図 7 】

図 7



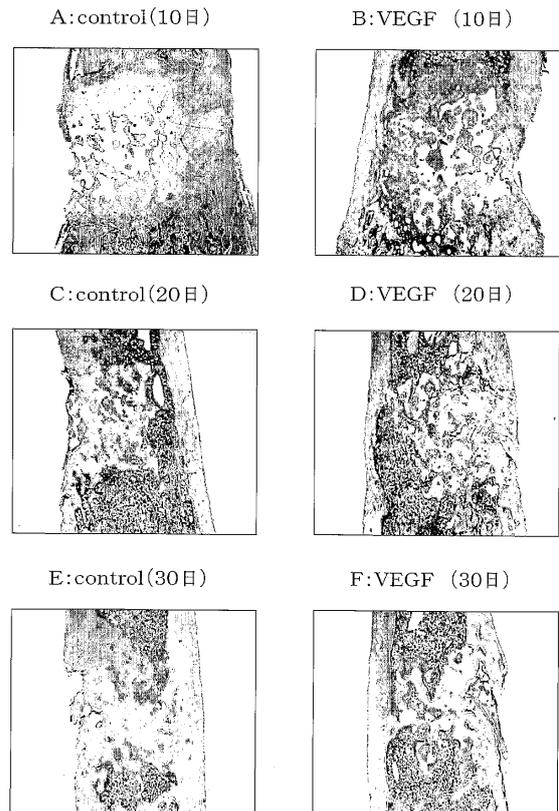
【 図 8 】

図 8



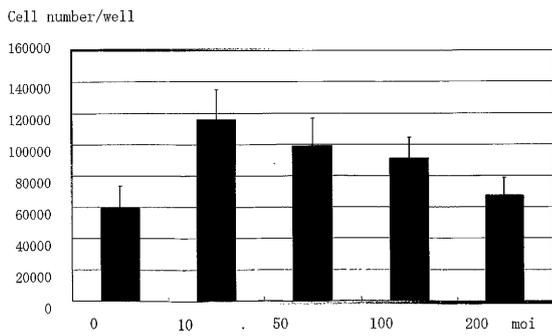
【 図 10 】

図 10



【 図 9 】

図 9



【手続補正書】

【提出日】平成15年10月2日(2003.10.2)

【手続補正001】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の遺伝子を導入した細胞を含む生体適合性材料からなる骨代替用インプラント。

【請求項2】(削除)

【請求項3】(削除)

【請求項4】前記細胞が胚性幹細胞または骨髄由来の間葉系幹細胞である、請求の範囲第1項に記載のインプラント。

【請求項5】前記細胞が骨芽細胞である、請求の範囲第4項に記載のインプラント。

【請求項6】前記細胞が患者から採取された細胞である、請求の範囲第1項、第4項、または第5項に記載のインプラント。

【請求項7】前記生体適合性材料がハイドロキシアパタイト、TCP、TCP、コラーゲン、ポリ乳酸およびポリグリコール酸、ならびにこれらの2種以上で構成される複合体からなる群より選ばれる、請求の範囲第1項、第4項、第5項、または第6項に記載のインプラント。

【請求項8】以下の工程を含む、骨代替用インプラントの製造方法。

- 1) 骨髄由来細胞を *in vitro* で骨芽細胞へ分化誘導する工程
- 2) 上記細胞に、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の遺伝子をトランスフェクトする工程
- 3) 上記細胞を、生体適合性材料に播種して増殖させる工程

【請求項9】(削除)

【請求項10】前記生体適合性材料がハイドロキシアパタイト、TCP、TCP、コラーゲン、ポリ乳酸およびポリグリコール酸、ならびにこれらの2種以上で構成される複合体からなる群より選ばれる、請求の範囲第8項に記載の方法。

【請求項11】血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の遺伝子がアデノウィルスベクターまたはレトロウィルスベクターを用いてトランスフェクトされることを特徴とする、請求の範囲第8項または第10項に記載の方法。

【請求項12】分化誘導がデキサメタゾン、免疫抑制剤、骨形成タンパク質、および骨形成液性因子からなる群より選ばれる1種または2種以上を用いて行われる、請求の範囲第8項、第10項、または第11項に記載の方法。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/10866
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>7</sup> A61L27/38, A61K48/00		
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) Int.Cl <sup>7</sup> A61L27/38, A61K48/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-17846 A (MMT Co., Ltd.), 22 January, 2002 (22.01.02), Full text & EP 1155705 A2	1-3, 6-7, 9-11 4-5, 8, 12
Y	Saisei Igaku ~Tissue Engineering no Kiso kara Saisentan Gijutsu made-, (Japan), Kabushiki Kaisha NTS, 31 January, 2002 (31.01.02), pages 680 to 686	4-5, 8, 12
X	Kazuya MATSUMOTO et al., "Hone Saiseikei ni okeru Adenovirus Vector ni yoru Idenshi Hatsugenkei no Oyo(II)-VEGF Idenshi Do'nyu ni yoru Koka-", Dai 23 Kai The Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials Yokoshu, 22 October, 2001 (22. 10.01), page 179	1-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 document 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 07 January, 2003 (07.01.03)		Date of mailing of the international search report 21 January, 2003 (21.01.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/10866
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> A61L 27/38, A61K 48/00		
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 <sup>7</sup> A61L 27/38, A61K 48/00		
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		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)		
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 請求の範囲の番号
X Y	JP 2002-17846 A (株式会社エム・エム・ティー) 2002.01.22, 全文 &EP 1155705 A2	1-3, 6-7, 9-11 4-5, 8, 12
Y	再生医学〜ティッシュエンジニアリングの基礎から最先端技術まで 〜, (日), 株式会社 エヌ・ティー・エス 2002.01.31, 第680〜686頁	4-5, 8, 12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー		
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「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
「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		「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
「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)		「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
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
国際調査を完了した日	07.01.03	国際調査報告の発送日 <b>21.01.03</b>
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) 八原 由美子	 4C 9261
	電話番号 03-3581-1101 内線 3451	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP02/10866
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 請求の範囲の番号
X	松本和也ら、骨再生系におけるアデノウイルスベクターによる遺伝子発現系の応用(II)－VEGF遺伝子導入による効果－，第23回日本バイオマテリアル学会大会 予稿集，2001. 10. 22，p. 179	1-12

---

フロントページの続き

(72)発明者 立石 哲也

茨城県つくば市下広岡670-3

(72)発明者 松本 和也

滋賀県大津市野郷原1丁目14-3 タカラバイオ瀬田寮301

(72)発明者 小島 弘子

茨城県つくば市吾妻3-18-3 ルミエール吾妻101

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。