

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4921692号

(P4921692)

(45) 発行日 平成24年4月25日(2012.4.25)

(24) 登録日 平成24年2月10日(2012.2.10)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 L	27/00	(2006.01)	A 6 1 L 27/00
A 6 1 F	2/28	(2006.01)	A 6 1 F 2/28
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/00
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00

請求項の数 6 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2003-516573 (P2003-516573)	(73) 特許権者	301021533
(86) (22) 出願日	平成14年7月3日(2002.7.3)		独立行政法人産業技術総合研究所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2002/006727		東京都千代田区霞が関1-3-1
(87) 国際公開番号	W02003/011343	(73) 特許権者	503360115
(87) 国際公開日	平成15年2月13日(2003.2.13)		独立行政法人科学技術振興機構
審査請求日	平成17年5月10日(2005.5.10)		埼玉県川口市本町四丁目1番8号
審査番号	不服2009-17346 (P2009-17346/J1)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成21年9月16日(2009.9.16)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	特願2001-227979 (P2001-227979)	(74) 代理人	100118773
(32) 優先日	平成13年7月27日(2001.7.27)		弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	植村 壽公
			茨城県つくば市並木3-674-101
		(72) 発明者	立石 哲也
			茨城県つくば市下広岡670-3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 転写因子の遺伝子導入による骨・軟骨組織再生方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下のステップ：

(1) 単離された骨髄由来骨芽細胞を多孔性足場材料に減圧下で吸着させることにより播種するステップ；および

(2) 該細胞にCbfa1遺伝子をアデノウイルスベクターを用いて導入するステップを含む、骨再生用インプラントの作製方法。

【請求項2】

前記遺伝子がType II/III Cbfa1(til-1)遺伝子である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記多孔性足場材料が多孔性セラミックス、コラーゲン、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、ならびにこれらの複合体からなる群より選ばれる、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記細胞が移植対象の患者から採取された細胞である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記細胞を播種した後、ただちに遺伝子導入を行う、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記細胞を播種した後、一定期間培養してから遺伝子導入を行う、請求項1～4のい

10

20

れか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子導入による骨・軟骨組織の再生方法に関する。さらに詳しくは、骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を導入することによって、目的とする組織への細胞の分化誘導を促し、効率的な骨・軟骨組織の構築を可能にする方法、及び該方法によって作製される骨・軟骨代替用インプラントに関する。

背景技術

近年、再生医療の現場では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研究が進められてきている。こうした組織再生においては、細胞の確保はもちろんのこと、細胞増殖のための足場の提供、分化誘導の促進が不可欠となる。通常生体内では、細胞は細胞外マトリックスに接着して存在し、これを足場として分化・増殖する。したがって、生体外における培養、完全な三次元組織化のためには、細胞に加えて、細胞の増殖・分化のための適切な足場が必要である。従来、骨・軟骨等の硬組織の再生においては、多孔性セラミックス等の多孔質生体吸収性素材を足場として用いることで良好な結果が得られている。

一方、組織再生のための組織工学的アプローチにおいては、生体外での細胞培養時にいかに早く目的の組織に分化させるかということが重要な問題となる。これに対し、従来の多くの試みでは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が、又は目的のサイトカインの cDNA を組み込んだ発現ベクターをリポフェクション法等によって細胞内に導入し、発現させることによりある程度の成功を収めてきた。

しかし、細胞増殖因子の導入は、目的のサイトカインが 100% その組織に特異的に効果を及ぼすとは限らないことや、リポフェクション法による遺伝子導入は樹立細胞株ではある程度の成功をおさめても、初代培養細胞に対しては、殆ど 0 に近い導入効率しか得られないこと、などの問題があり、十分満足のいく結果が得られていなかった。

最近、骨芽細胞の分化には転写因子、特に runt 型及び Helix-Loop-Helix (HLH) 型の転写因子が重要な意味を持つことが、多くの研究者により明らかにされてきた。例えば runt 型転写因子としては、Pebp2alpha A (Pebp2 A) / Cbfa1、HLH 型転写因子としては、Scleraxis、Id-1、I-mfa 等が骨芽細胞分化に重要な意味を持つことが報告されている（辻 邦他：「骨芽細胞の分化に關与する Runt 型転写因子 Cbfa1 / Pebp2 A ならびに骨・軟骨形成における Sox9 の機能と骨形成異常」実験医学、16(11), 25-32, 1998 など）。しかしながら、これらの転写因子の機能を生かした組織再生の具体的な試みは未だ報告されていない。

そこで、本発明者らは鋭意検討した結果、骨・軟骨誘導性転写因子を骨髄由来細胞に導入し、発現させることにより、該細胞を効率よく骨・軟骨組織に分化誘導しうることを見出した。さらに、転写因子の導入にアデノウイルス又はレトロウイルスベクターを用いれば、骨・軟骨細胞等の接着細胞の初代培養系細胞に効率よく感染し、99% 程度の極めて効率のよい分化誘導が期待できることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は以下の(1)～(13)を提供するものである。

(1) 骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を単離された細胞に導入し、該細胞を分化増殖させる工程を含む、骨・軟骨組織の作製方法。

(2) 前記細胞が骨髄由来細胞である、上記(1)の方法。

(3) 前記骨髄由来細胞が間葉系幹細胞である、上記(2)記載の方法。

(4) 前記骨髄由来細胞が骨芽細胞である、上記(2)記載の方法。

(5) 前記細胞が初代培養細胞である、上記(1)～(4)のいずれか1項に記載の方法。

(6) 前記細胞が患者から単離された細胞である、上記(5)記載の方法。

(7) 前記骨・軟骨誘導性転写因子が、Cbfa1、Dlx-5、Bapx1、Msx2、Scleraxis 及び Sox-9 からなる群より選ばれる1種又は2種以上である

10

20

30

40

50

、上記(1)～(6)のいずれか1項に記載の方法。

(8) 骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子の細胞への導入がアデノウィルスベクター又はレトロウィルスベクターを用いて行われる、上記(1)～(7)のいずれか1項に記載の方法。

(9) 骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を導入した細胞の増殖が、多孔性セラミックス、コラーゲン、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、ならびにこれらの複合体からなる群より選ばれる1種又は2種以上を足場として行われる、上記(1)～(8)のいずれか1項に記載の方法。

(10) 以下の工程を含む、骨・軟骨組織の作製方法。

1) 生体から単離した骨髄由来細胞をデキサメタゾン、免疫抑制剤、骨形成タンパク質及び骨形成液性因子からなる群より選ばれる1種又は2種以上によって分化誘導する工程。

2) 上記細胞に骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子をアデノウィルスベクター又はレトロウィルスベクターを用いてトランスフェクトする工程。

3) 上記細胞を多孔性セラミックス、コラーゲン、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、ならびにこれらの複合体からなる群より選ばれる1種又は2種以上を足場として増殖させる工程。

(11) 上記(1)～(10)のいずれか1項に記載の方法によって作製された骨・軟骨組織を含む、インプラント。

(12) さらに、多孔性セラミックス、コラーゲン、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、ならびにこれらの複合体からなる群より選ばれる1種又は2種以上からなる足場材料を含む、上記(11)記載のインプラント。

(13) 骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を導入した細胞を含む、多孔性セラミックス、コラーゲン、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、ならびにこれらの複合体からなる群より選ばれる1種又は2種以上を含む、インプラント。

#### 発明の開示

以下、本発明について詳細に説明する。

##### 1. 骨・軟骨組織の作製

本発明は、骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を単離された細胞に導入し、該細胞を分化増殖させることにより、骨・軟骨組織を生体外で作製する方法に関する。

##### 1.1 転写因子

本発明に用いられる転写因子は、未分化の細胞を骨及び/又は軟骨に分化誘導する、骨・軟骨誘導性の転写因子であり、例えばC b f a 1, D l x - 5、B a p x 1、M s x 2、S c l e r a x i s、S o x - 9が挙げられる。C b f a 1は1993年京都大学の小川らによってクローニングされ、大阪大学の小守らにより間葉系幹細胞から骨芽細胞に分化誘導するのに必要不可欠であることが確認された転写因子である(Komori, T. et al., (1997) Cell 89, 755 - 764)。このC b f a 1には2つのアイソフォーム、t i l - 1とp e b p 2 Aが存在する。D l x - 5は、D r o s o p h i l a d i s t a l l e s s (D 1 1) 遺伝子の相同遺伝子で、軟骨骨膜や内膜の骨化に関わる転写因子である(Acampora, D. et al., (1999) Development 126, 3795 - 3809)。B a p x 1は、D r o s o p h i l a b a g p i p e h o m e o b o x 遺伝子の相同遺伝子で、特に脊髄での間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化に関わっており、C b f a 1 遺伝子の調節遺伝子の1つと考えられている(Tribioli, C. et al., (1999) Development 126, 5699 - 5711)。M s x 2は、D r o s o p h i l a m u s c l e s e g m e n t h o m e o b o x (M s h) 遺伝子の相同遺伝子で頭蓋骨の骨化に関わっており、C b f a 1 遺伝子の調節遺伝子の1つと考えられている(Satokata, I. et al., (2000) Nature Genet. 24, 391 - 395)。S c l e r a x i s は、間葉系幹細胞から軟骨細胞や結合組織への分化誘導に関わる転写因子である(Cserjesi, P. et al., (1995) Development 121, 1099 - 1110)。S o x - 9は、軟骨で発現しており、t y p e

10

20

30

40

50

II Collagen等の軟骨分化に関わる遺伝子の発現調節をしている(Ng, L. J. et al., (1997) Dev. Biol. 183, 108-121)。

本発明において、前記骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子は、常法に従い公知の配列を基に調整することができる。例えば、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転写因子のcDNAを調整することができる。

#### 1.2 細胞の分化誘導

本発明に用いられる細胞は、生体から単離された分化・増殖能力を有する未分化の細胞であり、例えば、ES細胞、間葉系幹細胞、又は間葉系細胞から分化した骨芽細胞等が挙げられる。なかでも骨髄由来の間葉系幹細胞が好ましく、骨芽細胞がより好ましい。特に、10

本発明を再生医療の現場で利用する場合には、前記細胞は患者の体内から単離された細胞である。該細胞は、常法に従い結合組織などを除去して調製することが望ましい。また、細胞は一次培養を行い、予め増殖させてから用いてもよい。前記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。例えば、骨組織再生の場合には、デキサメタゾン、FK-506やシクロスポリン等の免疫抑制剤、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7及びBMP-9等の骨形成タンパク質(BMP: Bone Morphogenetic Proteins)、TGF等の骨形成液性因子から選ばれる1種又は2種以上を添加して細胞を骨系細胞に分化誘導することが好ましい。

#### 1.3 転写因子遺伝子の導入

本発明において、骨・軟骨誘導性転写因子遺伝子の標的細胞への導入は、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、例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、アデノウイルスやレトロウイルス、バキュロウイルス等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、アデノウイルス又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。20

前記アデノウイルス又はレトロウイルスベクターは、周知の方法に基づいて調製することができる。例えばアデノウイルスベクターの調整は、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、市販のキット、例えばAdenovirus Cre/loxP Kit(宝酒造社製)等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。30

#### 1.4 細胞の増殖

トランスフェクトした細胞は完全な三次元構造を構築するために、適当な足場を用いて増殖させることが必要である。足場材料としては、例えばハイドロキシアパタイトやTCP(リン酸三カルシウム)、TCP等の多孔性セラミックス、コラーゲン、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、ならびにこれらの複合体(例えば、ポリ乳酸/ポリグリコール酸樹脂/コラーゲン複合体等)等が挙げられる。これらの足場材料は1種類であってもよいし、あるいは2種以上を組み合わせ用いてもよい。特に、多孔性のセラミックスは力学的強度が高いという点で、組織再生の足場として好ましい。40

前記足場材料は、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、骨再生がおきやすいという点では直径200µm~500µmが好ましい。50

細胞の増殖は、前記足場材料に、該細胞を播種して、通常の方法により培養すればよい。細胞の播種は、足場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。

細胞培養に用いられる培地としては、MEM培地、 $\alpha$ -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。

## 2. 骨・軟骨組織を含むインプラント

前記方法によって作製された骨・軟骨組織は、足場材料とともに、あるいは足場材料とは別個に、生体内に埋入あるいは注入することで、骨・軟骨代替用インプラントとして利用できる。すなわち、本発明は生体外で構築された骨・軟骨組織を含むインプラントを提供する。

本発明のインプラントにおいて、骨・軟骨組織は足場材料と別個に移植してもよいが、足場材料とともに移植されることが好ましい。該足場材料は、インプラントの目的や適用部位により、前記した足場材料の中から適宜最適なものを選べばよい。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TCP等が好ましい。

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、骨・軟骨組織及び足場材料のほか、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、薬剤等を挙げることができる。

本発明のインプラントにおいて、骨・軟骨組織は転写因子の遺伝子を導入した細胞から構築される。骨・軟骨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2001-227979号の明細書に記載された内容を包含する。

### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の具体的な実施例について記載するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1： アデノウイルスベクターによるラット骨芽細胞へのCbfa1遺伝子導入による骨組織再生

10

20

30

40

50

## 1. 実験方法

### 1) アデノウイルスベクターの作製

#### 1 C b f a 1 の c D N A の 調 整

C b f a 1 の c D N A は、住友製薬株式会社より提供を受けた 2 種のプラスミド\* 1 ; p S G 5 / I T ( m P E B P 2 a A ) 及び p S G 5 / K S ( m t i l - 1 ) から、m P E B P 2 a A の O R F は制限酵素 B a m H I を、m t i l - 1 の O R F は制限酵素 B g l I I を用いて切り出し、Type I : p e b p 2 A / C b f a 1 ( 配列番号 1 )、Type I I / I I I : t i l - 1 / C b f a 1 ( 配列番号 2 ) の 2 種を調整した ( 図 1 )。

\* 1 C b f a 1 は、T 細胞特異的に発現している Type I ( p e b p 2 A / C b f a 1 ) と骨芽細胞特異的に発現している Type I I / I I I ( t i l - 1 / C b f a 1 ) があり、Type I I / I I I は Type I よりも長い。

10

#### 2 組換えアデノウイルスの作製

2 種の C b f a 1 の c D N A を市販の A d e n o v i r u s C r e / l o x P K i t ( 宝酒造社製 ) を用いてコスミドベクター p A x C A L N L w の S w a I 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 ( 図 2 )。作製したウイルスの力価は、約  $10^{11}$  P F U / m l で、感染効率は非常に高かった。

### 2) 骨髄細胞の採取及び培養

ラット骨芽細胞 ( R a t B o n e M a r r o w O s t e o b r a s t : R B M O ) は、6 週齢の F i s h e r ラット ( オス ) の大腿骨より M a n i a t o p o u l o s らの方法 ( M a n i a t o p o u l o s , C . , S o d e k . J . , a n d M e l c h e r , A . H . ( 1 9 8 8 ) C e l l T i s s u e R e s . 2 5 4 , 3 1 7 - 3 3 0 ) に従って採取した。

20

採取した細胞を、15% F B S ( S i g m a 社製 )、A n t i b i o t i c - A n t i m y c o t i c ( G I B C O B R L 社製 ) 添加 MEM 培地 ( n a c a l a i t e s q u e 社製 ) でコンフルエントになるまで培養した。次に、直径 3.5 cm のディッシュに、5 n M デキサメタゾン ( S i g m a 社製 )、10 m M - グリセロフォスフェート ( S i g m a 社製 )、50  $\mu$  g / m l アスコルビン酸フォスフェート ( W a k o 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に前項で調整した組換えアデノウイルスベクターを m u l t i p l i c i t y o f i n f e c t i o n ( m o i ) = 5 0 0 で感染させた。なお、コントロールとして、C b f a 1 非導入アデノウイルスを感染させた細胞を作製した。

30

### 3) X g a l 染色法による L a c Z 遺伝子発現細胞の観察

アデノウイルス感染 3 日後 ~ 2 週間後のラット骨芽細胞における L a c Z の発現を S c h o l e r らの方法 ( S c h o l e r , H . R . e t a l . , ( 1 9 8 9 ) E M B O J . , 8 , 2 5 5 1 - 2 5 5 7 ) に従って X g a l 染色法により観察した ( 図 3 )。さらに、染色した細胞を N I H i m a g e 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 4 )。

### 4) アルカリフォスファターゼ活性の測定

アデノウイルス感染 3 日後 ~ 2 週間後のラット骨芽細胞を 100 m M T r i s ( p H 7 . 5 ) , 5 m M M g C l <sub>2</sub> で洗浄後、スクレイパーで集め、500  $\mu$  l の 100 m M T r i s ( p H 7 . 5 ) , 5 m M M g C l <sub>2</sub> , 1% T r i t o n X - 100 に懸濁して超音波破碎した。破碎後 6 , 000 g で 5 分間遠心分離して上清を回収した。各上清 5  $\mu$  l を 0 . 0 5 6 M 2 - a m i n o - 2 - m e t h y l - 1 , 3 - p r o p a n d i o l ( p H 9 . 9 ) , 10 m M p - n i t r o p h e n y l p h o s p h a t e , 2 m M M g C l <sub>2</sub> に加え、37  $^{\circ}$  C で 30 分間インキュベートした後、すぐにマイクロプレートリーダーで吸収波長 405 nm における吸光度を測定した。酵素活性は、得られた吸光度から p - ニトロフェノールを用いて作製した検量線に基づいて求めた ( 図 5 )。

40

### 5) カルシウム量の測定

アデノウイルス感染後 1 ~ 3 週間後のラット骨芽細胞を 3 . 7% ホルマリン緩衝液で固定

50

し、一昼夜 0.6 M HCl で脱灰した。脱灰液を希釈し、市販の o-クレゾールフタレインコンプレキソン含有カルシウム分析試薬 (Sigma 社製, #587, 360-11) を用い、説明書に従いカルシウム量を測定した (図 6)。

#### 6) ノーザンハイブリダイゼーション

アデノウイルス感染後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 µg 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、20 × 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。GAPDH と Cbfa1 の cDNA プロブは rediprime<sup>TM</sup> (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて、<sup>-3</sup> <sup>2</sup> PdCTP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech 社製) でラベルし、取り込まれなかった <sup>-3</sup> <sup>2</sup> PdCTP 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>TM</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 プロブ (2 × 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 2 × SSC / 0.1% SDS で 5 分間洗った後、さらに 68 °C で 0.5 × 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 7)。

#### 7) 細胞数の計測

アデノウイルス感染後 3 日 ~ 2 週間後の骨芽細胞を 1% グルタルアルデヒド添加 PBS で 5 分間固定した後、蒸留水で 2 回洗浄し、1% クリスタルバイオレットを用いて 30 分間室温で染色した。蒸留水で 3 回洗って余分な染料を除いた後、10% 酢酸, 1% Triton X-100 で脱色した。脱色液を希釈し、波長 595 nm における吸光度を測定した。細胞数は、得られた吸光度から検量線<sup>\*2</sup>に基づき決定した (図 8)。

\*2 検量線は細胞を適当な濃度で播種し (duplicate)、上述の染色法とトリプシン処理して剥がした細胞をカウントすることにより作製した。

#### 8) 石灰化の観察

骨芽細胞が分泌するミネラル成分による石灰化の様子を von kossa 染色法及びアリザリンレッド染色を用いて観察した。

##### 1 von kossa 染色

アデノウイルス感染 1 ~ 3 週間後の骨芽細胞を 3.7% ホルマリン緩衝液で 5 分間固定し、蒸留水で軽く洗い、5% 硝酸銀水溶液を加えて 20 分間暗所でインキュベートした。その後明所でさらに 15 分間インキュベートし、蒸留水で何度も洗浄した。結果をスキャナーで取り込んで比較した (図 9)。

##### 2 アリザリンレッド染色

継代培養後、骨芽細胞に Cbfa1 と Cre リコンビナーゼ遺伝子の組換えアデノウイルスを multiplicity of infection (moi) = 500 で感染させた。感染 1 ~ 3 週間後の骨芽細胞を 3.7% ホルマリン緩衝液で 5 分間固定し、蒸留水で軽く洗い 1% アリザリンレッド水溶液を加えて 2 分間インキュベートした。その後蒸留水で何度も洗浄し、結果をスキャナーで取り込んで比較した (図 10)。

## 2. 実験結果

### 1) LacZ 遺伝子の発現

図 3 及び図 4 から明らかなように、LacZ 遺伝子の発現は、感染後 3 日目でピークに達し、約 90% の細胞が LacZ 遺伝子を発現していた。その後徐々に発現細胞数は減少するが、感染後 2 週間を経過しても一部の細胞 (約 20%) では発現が維持されていた。

### 2) アルカリフォスファターゼ活性

図 5 から明らかなように、Cbfa1 (pebp2 A, til-1) を過剰発現させた

10

20

30

40

50

細胞のアルカリフォスファターゼ活性はコントロールに比較して高く、特に感染後10日目の酵素活性はコントロールの約6倍に達した。

### 3) カルシウム量

図6から明らかなように、C b f a 1 ( p e b p 2 A , t i l - 1 ) 過剰発現細胞の方が圧倒的にカルシウムの沈着量が多いことが確認された。

### 4) C b f a 1 遺伝子の発現

図7から明らかなように、C b f a 1 ( p e b p 2 A , t i l - 1 ) 組換えアデノウィルス感染細胞では、感染後3日目の細胞で非常に高いC b f a 1 遺伝子発現が認められた。またt i l - 1 に関しては内在性のC b f a 1 遺伝子の発現も観察することができた。

### 5) 細胞の増殖

図8から明らかなように、非感染細胞(コントロール)に比べてC b f a 1 + C r e 遺伝子を導入した細胞はウィルス価は倍であるが、細胞の増殖はほとんど差がなかった。

### 6) 石灰化

v o n k o s s a 染色(図9)とアリザリンレッド染色(図10)の結果から明らかなように、C b f a 1 ( p e b p 2 A , t i l - 1 ) 過剰発現細胞の方が石灰化が進んでいることが確認された。

## 3. 結論

以上の結果より、C b f a 1 のc D N A はアデノウィルスベクターにより極めて効率良く骨芽細胞に導入され、導入されたC b f a 1 遺伝子は骨芽細胞の骨組織への分化を顕著に促すことが確認された。また、この培養系は多孔性セラミックス等の適当な足場材料を用いることで、生体外での効率よい組織再生手段を提供しうることが示された。

### 実施例2: C b f a 1 遺伝子導入骨芽細胞のラット背上皮皮下移植実験

#### 1. 実験方法

##### 1) ラット背上皮皮下移植

市販の - T C P (リン酸三カルシウム)多孔性ブロック(O l y m p u s 社製, 平均ポアサイズ=直径200 $\mu$ m, 5mm $\times$ 5mm $\times$ 5mm)を足場として、以下の方法でC b f a 1 遺伝子導入ラット骨芽細胞を培養し、ラット背上皮に皮下移植した。すなわち、コンフルエントになったラット骨芽細胞をトリプシン処理して剥がした後、 - T C P ブロックに細胞濃度100万個/mlで減圧下(100mmHg)で吸着させた。さらに2週間培養した後、実施例1で作製したC b f a 1 ( t i l - 1 ) 導入アデノウィルスベクターをm o i = 500で感染させ、翌日ラットの背上皮皮下に移植した。コントロールとして、C b f a 1 非導入アデノウィルスベクターを感染させた細胞を含むブロックを同様に移植した。ブロックは移植2週間後、4週間後及び8週間後に摘出し、各種測定及び観察を行った。

##### 2) 組織切片観察(ヘマトキシリン/エオジン染色)

摘出したブロックを4%パラホルムアルデヒド, 0.05%グルタルアルデヒドでマイクロウェーブ固定した後、翌日10%EDTA, 100mM T r i s (pH7.4)中で約1週間脱灰した。脱灰後、エタノールで脱水し、パラフィンに包埋した。5 $\mu$ mの厚さで切片を作製し、脱パラフィン後、ヘマトキシリン続いてエオジンで染色した(図11, 12)。

##### 3) アルカリフォスファターゼ活性の測定

摘出したブロックを、実施例1と同様の方法でアルカリフォスファターゼ活性を測定した(図13)。

##### 4) オステオカルシン量の測定

アルカリフォスファターゼ活性測定後のブロックの残渣を20%ギ酸存在下で超音波破砕し、4日間4 でインキュベートして脱灰した。PD-10カラム(A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 社製)で脱塩した後、10%EDTA, 100mM T r i s (pH7.4)で抽出し、R A T O S T E O C A L C I N E I A K I T (B i o m e d i c a l T e c h n o l o g i e s I n c . 製)でオステオカルシン量を測定した(図14)。



## 2. 実験結果

### 1) ヘマトキシリン/エオジン染色

移植ブロックのヘマトキシリン/エオジン染色の結果(図11、12)から、Cbfa1(til-1)を過剰発現させた細胞の方がブロックのポアに存在する細胞数が多く、骨化した部位が大きく広がっていることが確認された。

### 2) アルカリフォスファターゼ活性

図13から明らかのように、Cbfa1(til-1)を過剰発現させた細胞のアルカリフォスファターゼ活性の方がコントロールよりも高く、特に移植後4週間目の酵素活性はコントロールの約3倍に達した。

### 3) オステオカルシン量

図14から明らかのように、Cbfa1(til-1)を過剰発現させた細胞のオステオカルシン量の方がコントロールよりも高く、特に移植後4週間目のオステオカルシン量はコントロールの約2.5倍に達した。

## 実施例3: Cbfa1遺伝子導入骨芽細胞の皮下及び骨欠損部移植実験

### 1. 実験方法

#### 1) ラット背上皮及び大腿骨内への移植

実施例2と同様に、ラット骨芽細胞を市販のTCPブロック(Olympus社製, 平均ポアサイズ: 直径200 $\mu$ m, 5mm $\times$ 5mm $\times$ 5mm(皮下移植用)、2mm $\times$ 2mm $\times$ 2mm(骨欠損部移植用))に細胞濃度200万個/mlで吸着させた。24時間後、Cbfa1(til-1)導入アデノウイルスベクターをmoi=500で感染させ、翌日ラットの背上皮皮下及び骨欠損部に移植した。骨欠損部への移植は、左右大腿骨末端前頭部に直径2mm、深さ3-4mmの穴を開け、この穴(骨欠損部)にブロックを埋入した。コントロールとして、Cbfa1非導入アデノウイルスベクターを感染させた細胞を含むブロックを同様に移植した。

皮下移植したブロックは移植3週間後又は5週間後に摘出し、アルカリフォスファターゼ活性及びオステオカルシン量の測定及び組織切片の観察を行った。また、大腿骨内に移植したブロックは移植3週間後又は8週間後に摘出し、組織切片の観察を行った。

### 2. 実験結果

#### 1) ヘマトキシリン/エオジン染色

皮下移植:

移植3週間目及び5週間目のいずれにおいても、Cbfa1(til-1)を過剰発現させた細胞の方がブロックのポアに存在する細胞数が多く、骨化がより進行していることが確認された(図15A)。

骨欠損部移植:

移植3週間目では、Cbfa1(til-1)を過剰発現させた細胞では骨形成が進み、大腿骨切開部分はほぼ完全に新しい骨組織に置換されていたが、コントロールではほとんど骨形成がみられなかった。また、移植8週間目では、Cbfa1(til-1)を過剰発現させた細胞では、さらに骨形成が進み、ブロックを移植した穴はほぼ完全に骨髄組織に置換されていたが、コントロールでは移植ブロックがまだ残っていた(図15B)。

#### 2) アルカリフォスファターゼ活性及びオステオカルシン量

Cbfa1(til-1)を過剰発現させた細胞のアルカリフォスファターゼ活性は、移植後3週間目でコントロールの約2.0倍、5週間目で約4.7倍であった(図16)。

また、Cbfa1(til-1)を過剰発現させた細胞のオステオカルシン量は、移植後3週間目でコントロールの約2.0倍、5週間目で約1.5倍であった(図17)。

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、骨髄細胞を利用した骨・軟骨組織再生において、効率のよい生体外組織培養を行うことができる。かかる方法は、生体内では再生不可能な損傷組織に対し、生体

10

20

30

40

50

から取り出した自己の細胞を *in vitro* で培養・組織化し、限りなく生体に近い組織を再構築して生体内に戻すという、究極的治療を可能にする。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Japan Science and Technology Corporation	10
<120> Method for regeneration of bone/cartilage tissue by using gene transmission of transcription factors	
<130> PH-1480-PCT	20
<150> JP2001-227979	
<151> 2001-07-27	
<160> 2	
<170> PatentIn Ver. 2.1	30
<210> 1	
<211> 1557	
<212> DNA	
<213> Mus musculus	40
<220>	
<221> CDS	

&lt;400&gt; 1

ggatccacca tgcgtattcc tgtagatccg agcaccagcc ggcgccttcag cccccctcc 60  
 agcagcctgc agcccgga gatgagcgac gtgagcccg tggtagctgc gcagcagcag 120  
 caacagcagc agcagcaaca gcagcagcaa caacagcaac agcaacaaca gcagcagcag 180  
 cagcagcagc agcaggaggc ggccgcagca gcagcggcgg cagcggcggc ggcagcagcg 240  
 gcggcggccg cagtgcctccg attgaggccg ccgcacgaca accgcacat ggtaggagatc 300  
 atcgcggacc acccgccga actggctccg accgacagtc ccaacttct gtgtccctg 360  
 ctgcccctgc actggcgggtg caacaagacc ctgcccgtgg cctcaaggt ttagccctc 420  
 ggagaggtag cagatgggac tgtggttacc gtcattggccg ggaatgatga gaactactcc 480  
 gccgagctcc gaaatgccct cgcgttatg aaaaaccaag tagccagggt caacgatctg 540  
 agatttgigg gccggagcgg acgaggcaag agttcacct tgaccataac agcttcaca 600  
 aatctcccc aagtggccac ttaccacaga gctattaaag tgacagtga cggccccgg 660  
 gaaccaagaa ggcacagaca gaagcttgat gactetaaac ctagtttgtt ctctgategc 720  
 ctcagtgatt tagggcgcct tctctatccc agtatgagag taggtgtccc gcctcagaac 780  
 ccacggccct cctgaactc tgcaccaagt ccttttaac cacaaggaca gagtcagatt 840  
 acagatccca ggcaggcaca gtcttcccc cggggctct atgaccagtc ttaccctcc 900  
 tatctgagcc agatgacatc cccatccatc cactccacca cgcctgtgc ttccacacgg 960  
 ggcaccgggc tacttgccat cactgacgtg ccaggcgta tttcagatga tgacactgcc 1020  
 accctgact tetgctctg gccctccct ctctagtaaga agagccaggc aggtgcttca 1080  
 gaacigggcc cttttcaga cccaggcag ttccaagca tttcctct cactgagagc 1140  
 cgtcttcca acccaggaat gcactacca gccacctta cctacacccc gccagtcag 1200  
 tcaggcatgt cctctggcat gtcggccacc actcactacc acagctacct gccaccacc 1260  
 taccctggct ctcccaaaag ccagagtga ccttccaga ccagcagcac tccatatctc 1320

10

20

30

40

tactatggta ctctgcagc atcciatcag ticcacatgg taccggggg agaccggct 1380  
 cctccagga tggteccacc atgcaccacc acctegaatg gcagcagct attaaalcca 1440  
 aatttgccta accagaatga tgggttgac gctgacggaa gccacagcag tcccccaact 1500  
 gtttgaatt ctageggcag aatggatgag tcigtitggc ggccatattg aggatcc 1557

10

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1804

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;400&gt; 2

agatctccat getteattcg cctcacaac aaccacagaa ccacaagtgc ggtgcaaact 60  
 ttctccagga agactgcaag aaggctctgg cgtttaaatg gttaatctct gcaggctact 120  
 accagccacc gagaccaacc gagtcattta aggctgcaag cagtatttac aacagagggc 180  
 acaagticta tctggaaaaa aaaggaggga ctatggcgtc aaacagcctc ttcagcgcag 240  
 tgacaccgtg tcagcaaagc ttcttttggg atccgagcac cagccggcgc ttcagcccc 300  
 cctccagcag cctgcagccc ggcaagatga gcgacgtgag cccggtggtg gctgcgcagc 360  
 agcagcaaca gcagcagcag cagcagcaac agcagcagca acaacagcaa cagcaacaac 420  
 agcagcagca gcagcagcag caggaggcgg ccgcagcagc agcggcggca gcggcggcgg 480  
 cagcagcggc ggcgcccgca gtgccccgat tgaggccgcc gcacgacaac cgcaccatgg 540

30

40

tggagatcat cgcggaccac ccggccgaac tggiccgcac cgacagtcce aacttccgtg 600  
 gciccggtgci gccctcgcac tggcgggtgca acaagaccet gcccggtggcc tccaagggtg 660  
 tagccctcgg agaggtacca gatgggactg tggttaccgt catggccggg aatgatgaga 720  
 actactccgc cgagctccga aatgcctcgc ctgittatgaa aaaccaagta gccaggttca 780  
 acgatctgag atttgtgggc cggagcggac gaggcaagag ttccacctg accataacag 840  
 tcttcacaaa tctctcccaa gtggccactt accacagagc tattaaagtg acagtggacg 900  
 gtccccggga accaagaagg cacagacaga agcttgatga ctctaaacct agtllgttct 960  
 ctgategcct cagtgattta gggcgcattc ctcatcccag tatgagagta ggtgtcccgc 1020  
 ctcagaacct acggccctcc ctgaaactctg caccaagtcc ttttaateca caaggacaga 1080  
 gtcagattac agatcccagg caggcacagt ctccccacc gtggtectat gaccagctct 1140  
 accctctca tetgagccag atgacatccc catccatcca ctccaccag ccgctgtctt 1200  
 ccacacgggg caccgggcta cctgccatea ctgacgtgcc caggcgtatt tcagatgatg 1260  
 aactgccac ctctgacttc tgccctctggc ctctctctct cagtaagaag agccaggcag 1320  
 gtgcttcaga actgggacct ttttcagacc ccaggcagtt cccaagcatt tcatccctca 1380  
 ctgagagccg ctctcccaac ccacgaatgc actaccage cactttace tacaceccgc 1440  
 cagtcacgtc aggcattgct ctggcatgt ccgccaccac tcactaccac acgtacctgc 1500  
 caccacccta ccccggtct tcccaaagcc agagtggacc ctccagacc agcagcactc 1560  
 catatctcta ctatggtact tegtacgat cctatcagtt cccaatggta cccgggggag 1620  
 accggtctcc ttccaggatg gtcaccat gcaccaccac ctgcaatggc agcagctat 1680  
 taaatccaaa ttgacctaac cagaatgatg gtgttgacgc tgacggaagc cacagcagtt 1740  
 cccaactgt ttgaaattct agcggcagaa tggatgagtc tgtttggcgg ccatattgag 1800  
 atct 1804

【図面の簡単な説明】

図1は、Type I C b f a 1 ( p e b p 2 A ) 及び Type II / III C b f a 1 ( t i l - 1 ) の構造を示す図である。

図2は、C b f a 1 遺伝子導入のための p A x C A L N L w コスミドの構造を示す図である。

図3は、ラット骨芽細胞における L a c Z の発現量を X g a l 染色した結果を示す写真である。

図4は、ラット骨芽細胞におけるL a c Zの発現量を定量化した結果を示すグラフである。  
 図5は、組換えアデノウイルス感染後のラット骨芽細胞におけるアルカリフォスファターゼ活性の変化を示すグラフである。

図6は、組換えアデノウイルス感染後のラット骨芽細胞におけるカルシウム量の変化を示すグラフである。

図7は、C b f a 1 遺伝子発現量をノーザンハイブリダイゼーションにより検出した結果を示す画像である。

図8は、組換えアデノウイルス感染後のラット骨芽細胞の増殖を示すグラフである。

図9は、組換えアデノウイルス感染後のラット骨芽細胞における石灰化の様子をv o n k o s s a 染色で観察した結果を示す写真である。

10

図10は、組換えアデノウイルス感染後のラット骨芽細胞における石灰化の様子をアリザリンレッド染色で観察した結果を示す写真である。

図11は、ラット背上皮内移植後4週間目のブロックから得た組織片をヘマトキシリン/エオジン染色した結果を示す写真である。

図12は、ラット背上皮内移植後8週間目のブロックから得た組織片をヘマトキシリン/エオジン染色した結果を示す写真である。

図13は、ラット背上皮内移植後のブロックにおけるアルカリフォスファターゼ活性の変化を示すグラフである。

図14は、ラット背上皮内移植後のブロックにおけるオステオカルシン量の変化を示すグラフである。

20

図15は、ラット背上皮及び大腿骨内移植後のブロックから得た組織片をヘマトキシリン/エオジン染色した結果を示す写真である。

A - a : コントロール背上皮内移植3週間後

A - b : コントロール背上皮内移植5週間後

A - c : C b f a 1 ( t i l - 1 ) 感染細胞背上皮内移植3週間後

A - d : C b f a 1 ( t i l - 1 ) 感染細胞背上皮内移植5週間後

B - a : コントロール大腿骨内移植3週間後

B - b : コントロール大腿骨内移植8週間後

B - c : C b f a 1 ( t i l - 1 ) 感染細胞大腿骨内移植3週間後

B - d : C b f a 1 ( t i l - 1 ) 感染細胞大腿骨内移植8週間後

30

図16は、ラット背上皮移植後のブロックにおけるアルカリフォスファターゼ活性の変化を示すグラフである。

図17は、ラット背上皮移植後のブロックにおけるオステオカルシン量の変化を示すグラフである。

【 図 1 】

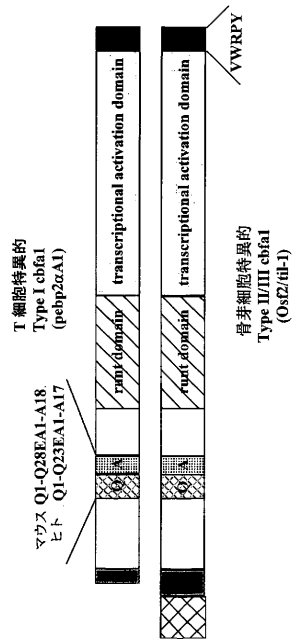


図 1

【 図 2 】

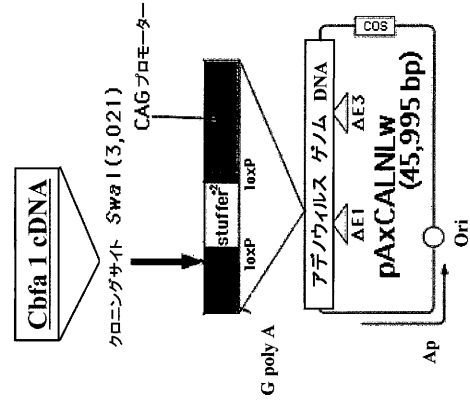


図 2

【 図 3 】

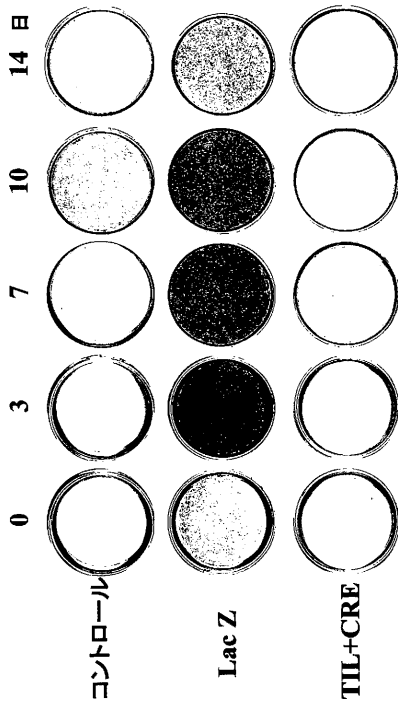


図 3

【 図 4 】

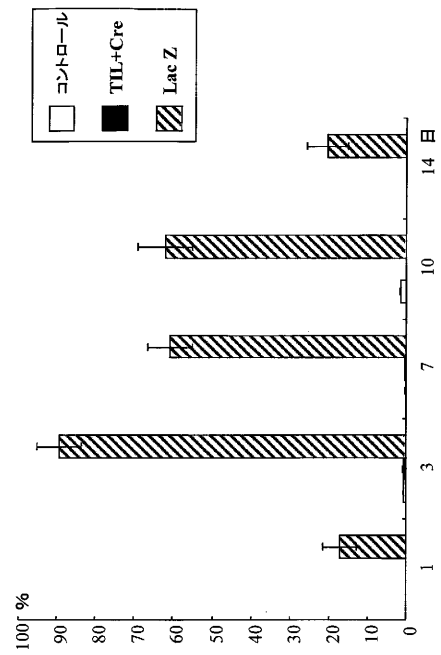
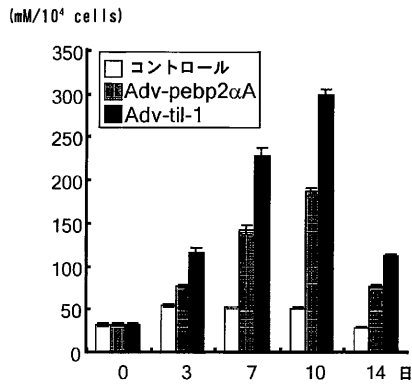


図 4

【 図 5 】

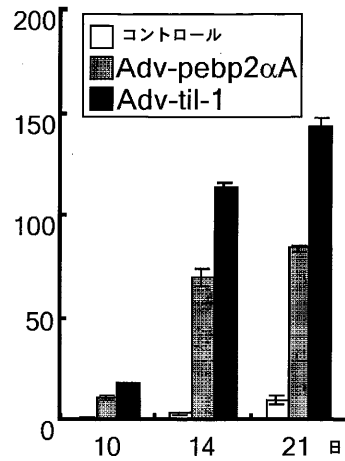
図 5



【 図 6 】

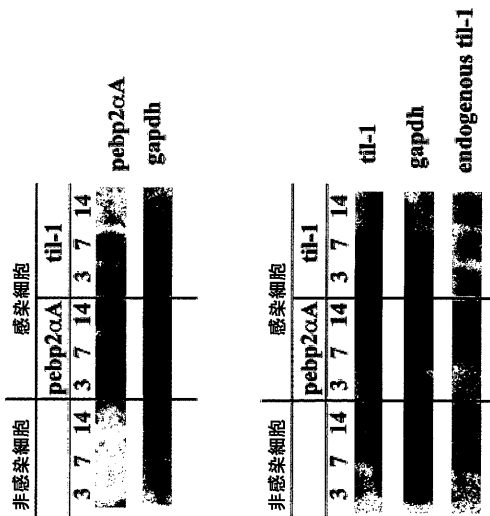
図 6

(mg / φ 3.5cm dish)



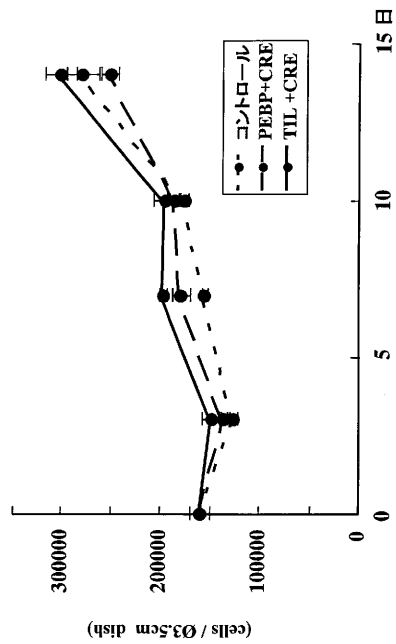
【 図 7 】

図 7



【 図 8 】

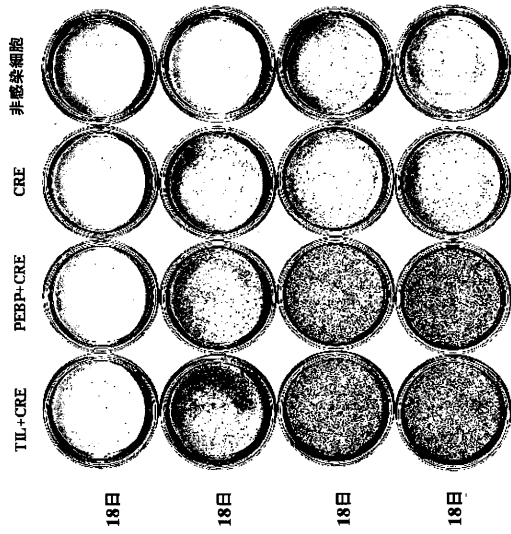
図 8





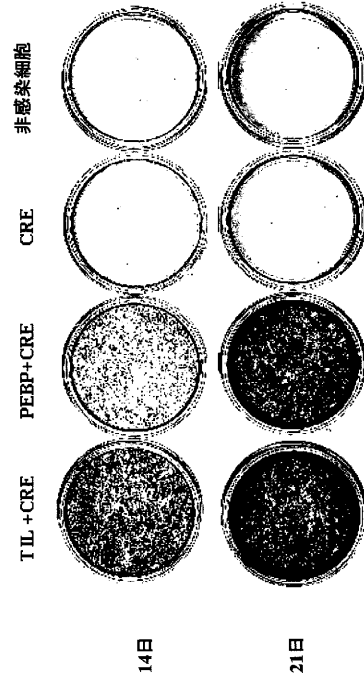
【 図 9 】

図 9



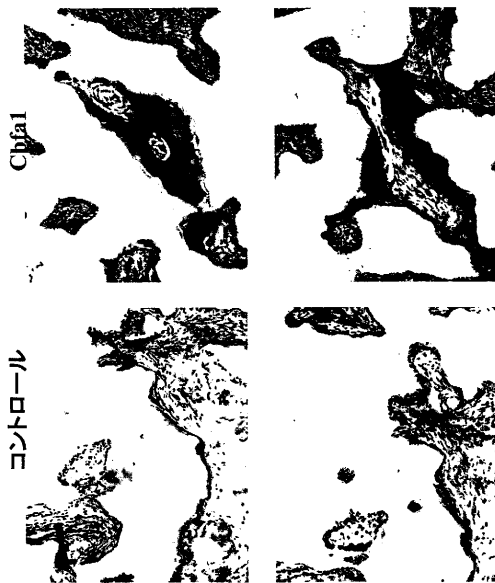
【 図 10 】

図 10



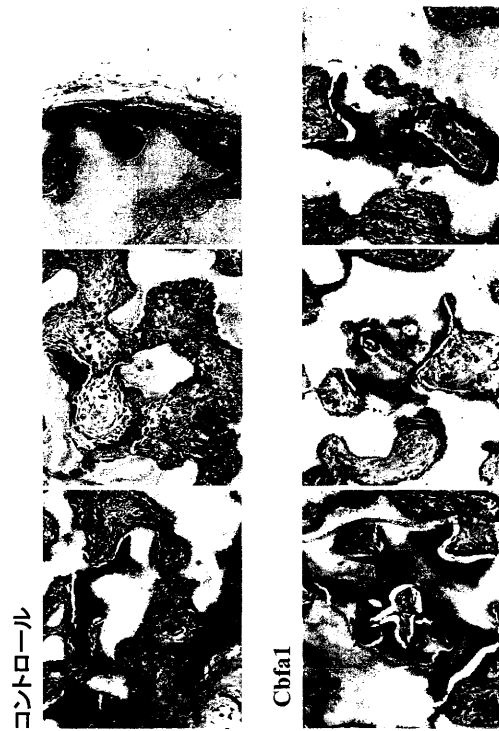
【 図 11 】

図 11



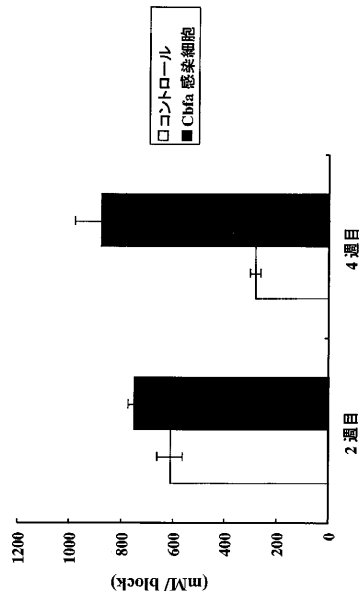
【 図 12 】

図 12



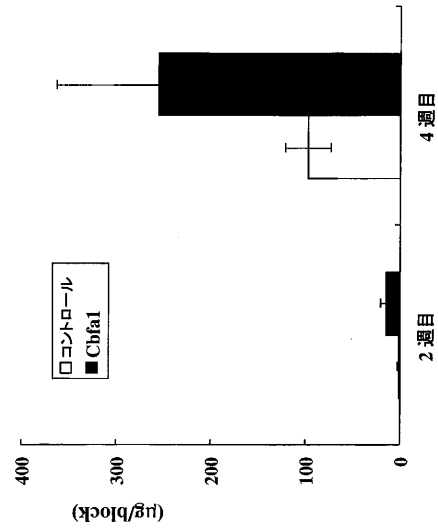
【図13】

図13



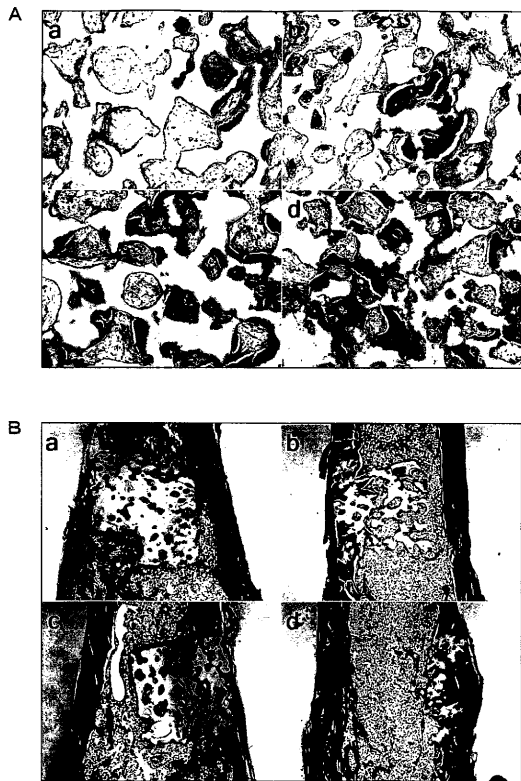
【図14】

図14



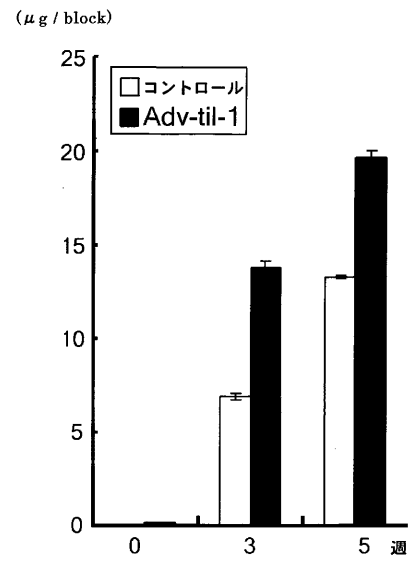
【図15】

図15



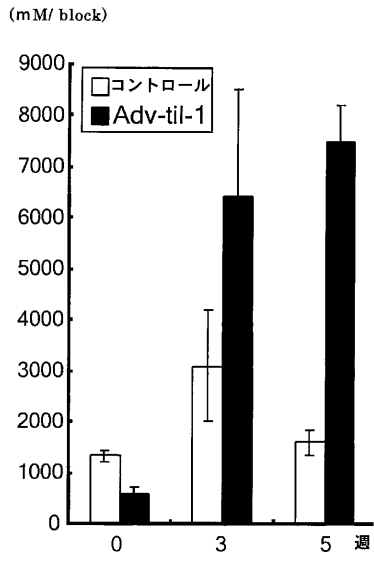
【図16】

図16



【 図 17 】

図 17



## フロントページの続き

(72)発明者 小島 弘子  
茨城県つくば市吾妻3-18-1-101

合議体

審判長 横尾 俊一

審判官 田名部 拓也

審判官 前田 佳与子

(56)参考文献 米国特許第6077987(US,A)  
特開平10-194987(JP,A)  
国際公開第98/40111(WO,A1)  
国際公開第00/74741(WO,A2)  
国際公開第99/67363(WO,A1)  
UETA, CHISATO et al., Journal of Cell Biology, April 2011, Vol.153, No.1, p.87-99  
Enomoto, Hirayuki et al., Journal of Biological Chemistry, 2000, Vol.275, No.12, p.8695-8702  
小守壽文, 蛋白質核酸酵素, 2000, Vol.45, No.1, p.13-17  
Lee, K.S. et al., Mol.Cell.Biol., 2000, Vol.20, No.23, p.8783-92  
Xiao, Z.S. et al., J.Cell.Biochem., 1999, Vol.74, No.4, p.596-605  
吉川隆章, 蛋白質核酸酵素, 2000, Vol.145, No.13, p.2289-2296

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00- 38/58

A61K 48/00

A61P 1/00- 43/00

CA(STN)

REGISTRY(STN)

MEDLINE(STN)

BIOSIS(STN)

EMBASE(STN)