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

特許第5228187号
(P5228187)

(45)発行日　平成25年7月3日(2013.7.3)　(24)登録日　平成25年3月29日(2013.3.29)

(51)Int.Cl.　　F I
C12N 5/071 (2010.01)　　C12N 5/00 202A
C12R 1/91 (2006.01)　　C12N 5/00 202A
C12R 1:91

請求項の数 11　(全 9 頁)

(21)出願番号　特願2006-144698 (P2006-144698)
(22)出願日　平成18年5月24日 (2006.5.24)
(65)公開番号　特開2007-312657 (P2007-312657A)
(43)公開日　平成19年12月6日 (2007.12.6)
審査請求日　平成21年4月16日 (2009.4.16)

特許法第３０条第１項適用　平成１８年２月１７日　北海道大学主催の「北海道大学大学院工学研究科　分子化学専攻修士論文発表会」において文書（平成１７年度修士論文要旨、第６１頁）をもって発表

特許法第３０条第１項適用　平成１８年３月５日　社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会２００６年度（平成１８年度）大会講演要旨集」第２９１頁、３Ｃ２６ａ１１に発表

(73)特許権者　504173471
国立大学法人北海道大学
北海道札幌市北区北８条西５丁目
(74)代理人　100093230
弁理士　西澤　利夫
(72)発明者　高木　睦
北海道札幌市北区北１３条西８丁目　国立大学法人北海道大学大学院工学研究科内
(72)発明者　鍵田　恵梨奈
北海道札幌市北区北１３条西８丁目　国立大学法人北海道大学大学院工学研究科内

審査官　名和　大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】軟骨細胞培養用の培地組成物と培養組成物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
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。
【請求項２】
グルクロン酸の濃度が０．１～１０００ｍｇ／Ｌであることを特徴とする請求項１に記載の軟骨細胞培養用培地組成物。
【請求項３】
グルクロン酸が脱硫化されていることを特徴とする請求項１または２に記載の軟骨細胞培養用培地組成物。
【請求項４】
Ｎ－アセチルガラクトサミンを含むことを特徴とする軟骨細胞培養用培地組成物。
【請求項５】
Ｎ－アセチルガラクトサミンの濃度が０．１～１０００ｍｇ／Ｌであることを特徴とする請求項３に記載の軟骨細胞培養用培地組成物。
【請求項６】
Ｎ－アセチルガラクトサミンが脱硫化されていることを特徴とする請求項４または５に記載の軟骨細胞培養用培地組成物。
【請求項７】
請求項１から６のいずれかに記載の培地組成物に軟骨細胞を含むことを特徴とする軟骨細胞培養組成物。

【請求項８】
軟骨細胞は、間葉系幹細胞または胚性幹細胞から分化したものであることを特徴とする請求項７の軟骨細胞培養組成物。
【請求項９】
請求項１から６のいずれかに記載の培地組成物に、間葉系幹細胞または胚性幹細胞を含むことを特徴とする軟骨細胞培養組成物。
【請求項１０】
請求項７または８の組成物により軟骨細胞を培養し、細胞外マトリックスであるII型コラーゲンを生成、蓄積させることを特徴とする軟骨細胞の培養方法。
【請求項１１】
請求項９の組成物により間葉系幹細胞または胚性幹細胞を培養して、細胞外マトリックスであるII型コラーゲンが生成、蓄積した軟骨細胞に分化させることを特徴とする軟骨細胞の培養方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、軟骨細胞の培地組成物とこれを用いた培養組成物に関するものである。
【背景技術】
【０００２】
近年ヒト細胞などの動物細胞を用いた組織再生に関する基礎的知見が多々発見されその臨床応用に期待が寄せられている。それに用いる細胞としては、分化がほぼ終了した細胞と未分化で多分化能を有した細胞とがある。前者の分化がほぼ終了した細胞を応用する例としては、皮膚表皮細胞を用いた培養皮膚形成、患者の関節軟骨を正常部位から採取し増殖させた後、疾患部位へ移植する軟骨移植などがある。また、後者の未分化で多分化能を有した細胞を応用する例として、骨髄中にある造血幹細胞を用いた血液系、免疫系細胞の増殖、移植、同じく骨髄中にある間葉系幹細胞から骨、軟骨、筋肉の再生などが考えられる。さらに受精卵中の細胞に由来する胚由来幹細胞（ＥＳ細胞）はすべての組織のすべての細胞に分化する能力を保持していると考えられており、組織再生に利用できる可能性がある。
【０００３】
ここで、軟骨組織に注目すると、少数の軟骨細胞の他に多量の細胞外マトリックス（アグリカン、II型コラーゲンなど）が蓄積されており、それらマトリックスが緩衝材の働きをするために軟骨が骨自体の損傷、磨耗を防ぐことができる。軟骨組織の再生方法を考えると、（１）患者の正常部位から採取し増殖させた関節軟骨細胞、（２）間葉系幹細胞やＥＳ細胞を分化させて得られた軟骨細胞のいずれかを疾患部位へ移植し、移植された細胞が患部で細胞外マトリックスを蓄積することが期待される。
【０００４】
しかしながら、移植された細胞が患部で細胞外マトリックスを多量に生成し蓄積するには長時間を要する。このため、細胞培養時間の短縮、タイプIIコラーゲンなどの有用な細胞外マトリックスの早期形成などの改善が望まれている。したがって、上記のいずれかの軟骨細胞を体外で培養し、細胞外マトリックスを蓄積させて、軟骨細胞以外に細胞外マトリックスを多量に含有する軟骨組織を体外で予め作成した後に患部に移植するほうが治療効果がよいことが期待できる。
【０００５】
だが、現状においては、軟骨細胞を体外で培養して細胞外マトリックスを多量に生成、蓄積させる技術が十分に確立されていない。
【０００６】
その理由としては、軟骨細胞の培養系になんらかの操作を加えることによりその分裂、増殖能を高め、結果として細胞外マトリックスの産生能を高めようとする研究が行われているが、細胞外マトリックスの産生能力には限界があると認識されてきた（特許文献１、

段落０００６）からである。
【０００７】
このため、細胞外マトリックスの不足状態を補い、強度を高めるための方策として、天然あるいは合成高分子を培養担体とすることや、細胞外マトリックスとして、アルギン酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、グルクロン酸等の酸性生体高分子とキトサン、ポリアミン等の塩基性生体高分子の複合体の成形物を培養担体として用いること（特許文献１）や、生体吸収性の多孔質に脂質結合性グリコサミノグリカンを結合して軟骨培養用基材とすること（特許文献２）が提案されている。
【０００８】
しかしながら、これらの試みにおいても、軟骨細胞の体外での培養において、細胞外マトリックス、とりわけII型コラーゲンを効率的に多量に生成、蓄積させることのできる技術としては確立されていないのである。
【特許文献１】特開２００２－２９１４６１号公報
【特許文献２】特開２００２－３４５４５５号公報
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
本発明は、上記のとおりの背景から、従来の問題点を解消し、本発明は、軟骨細胞を体外で培養する際に、細胞外マトリックス、特にII型コラーゲンを効率的に多量に生成、蓄積させることができる培養手段を提供することを課題としている。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
本発明は、上記の課題を解決するものとして、グリコサミノグリカンを構成する単糖の少くとも１種、あるいはそれらを脱硫した構造の単糖の少くとも１種、もしくはコンドロイチン硫酸を含むことを特徴とする軟骨細胞培養用培地を提供し、また、これらの培地組成物に軟骨細胞を含むことを特徴とする軟骨細胞培養組成物と、これを用いて軟骨細胞を培養することで細胞外マトリックス、特にII型コラーゲンを効率的に多量に生成、蓄積させることを特徴とする軟骨細胞の培養方法を提供する。
【００１１】
以上のとおりの本発明は、従来より培養担体や培養基材の成分として知られているグリコサアミノグリカンそのものではなく、これを構成する単糖を培地成分として用いることが、細胞マトリックス、特にII型コラーゲンの生成、蓄積に顕著な効果をもたらすという、全く新しい、これまでに知られていない知見に基づいて完成されたものである。コンドロイチン硫酸についても同様である。
【発明の効果】
【００１２】
上記のとおりの本発明によれば、軟骨細胞を体外で培養する際に、細胞外マトリックス、特にII型コラーゲンを多量に生成、蓄積させることが可能とされる。そしてこれを可能にするために、II型コラーゲンのｍＲＮＡの発現量を顕著に増大させる。
【００１３】
本発明によれば、移植治療の効率は顕著に向上することになる。
【発明を実施するための最良の形態】
【００１４】
本発明は上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下に、その実施の形態について説明する。
【００１５】
本発明で用いる軟骨細胞は、動物由来の細胞であり、動物の種類としては鳥類、爬虫類、両生類、魚類、哺乳類などを挙げることができる。哺乳類動物としては、たとえばヒト、サル、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、ネズミなどを例としてあげることができる。また、動物から採取してから一般的に５０回程度までの限られた回数のみ分裂、増殖できる初代

細胞、あるいは動物から採取された後一般に５０回以上の多数回分裂、増殖できる細胞株の両方とも用いることができる。初代細胞とそれを採取する部位に関しては、たとえば、軟骨組織から採取した軟骨細胞、骨髄液や臍帯血に含まれる間葉系幹細胞およびそれらから体外で分化させて得られる軟骨細胞、ある時期の受精卵から分離される胚性幹細胞（ＥＳ細胞）や、それらから体外で分化させて得られる軟骨細胞などを例として挙げることができる。また、以上にあげた細胞に対して、プラスミドの導入、ウイルス感染などの手段により遺伝子操作を施して得られた細胞も本発明で用いることができる。

【００１６】

本発明における「培地組成物」としては、上記のとおりのグリコサミノグリカンを構成する単糖やコンドロイチン硫酸のほかに、細胞の増殖及び維持を支援すべく使用される成長因子及び栄養素を含む標準培地、すなわち、炭素源、エネルギー源、アミノ酸、ビタミン、微量金属等や、標準培地に動物血清をはじめとする種々の添加物を加えた培地を例として挙げることができる。用いる標準培地は培養を所望する細胞種によって異なり、通常動物細胞の培養で用いられるイスコフ培地、ＲＰＭＩ１培地、ダルベッコＭＥＭ培地など培地を用いうるが、公知文献等により、細胞の増殖及び維持に有効であることが知られている血清以外の因子、たとえば血清アルブミン、トランスフェリン、脂質及び脂肪酸源、コレステロール、ピルビン酸塩、グルココルチロイド、ＤＮＡ及びＲＮＡ合成用ヌクレオチド、増殖因子（例えば表皮成長因子、線維芽細胞成長因子、血小板由来成長因子及びインシュリン）、並びに細胞外マトリックス細胞（例えばコラーゲン、フィブロネクチン及びラミニン）等を添加してもよい。また、細胞を用いて組織を再生するということは、通常の細胞培養のように培養器（ディッシュ）底面に平面的に細胞を培養するだけでは不十分であり、立体的な形状を持った三次元的な培養が必要となることがある。そのために細胞の足場となるために種々の材料が研究開発されている。天然物質からなる足場としてコラーゲンやアガロースなどのゲルに細胞を包埋して培養する方法がある。また、人工的な高分子材料を用いた三次元的な足場材料が種々考案されている。人工的な足場材料のうち、ポリエステル、ポリエチレン、セラミックスなどは優れた機械的強度があるが、生体中に移植したあとほとんど分解されないという特徴を持つ。これに対して、移植後、足場材料が消失したほうが臨床上好ましい場合が多く、このような理由から、移植後に生体内で消失される生体吸収性高分子が研究されている。生体吸収性高分子の生体内における分解のメカニズムには、酵素的なものや非酵素的なものがある。このような生体吸収性高分子の代表例として、ポリＬ乳酸（ＰＬＬＡ）、ポリグリコール酸（ＰＧＡ）、乳酸ポリグリコール酸共重合体（ＰＬＧＡ）などがある。本発明の培養組成物には以上のようなゲルや高分子材料を含んでもよい。

【００１７】

本発明におけるグリコサミノグリカンの例としては、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリンなどを例として挙げる事ができる。これらを構成する単糖としては、Ｄ－グルクロン酸、Ｌ－イズロン酸、Ｎ－アセチルガラクトサミン、Ｄ－ガラクトース、Ｄ－グルコサミン、Ｄ－ガラクトサミンなどを例として挙げることができる。これらの単糖のあるもの、たとえばＮ－アセチルガラクトサミン、Ｄ－グルコサミン、Ｄ－ガラクトサミン、Ｌ－イズロン酸はグリコサミノグリカン中で硫酸化されている場合もあるが、本発明の軟骨細胞培養組成物には脱硫化された構造のものも用いることができる。

【００１８】

本発明で使用されるグルクロン酸はフリーの酸であってもよいが、ナトリウム塩などの塩であっても、さらに細胞によりグルクロン酸を生成できるグルクロン酸前駆体でもよい。グルクロン酸前駆体としてはグルクロノラクトン、グルクロン酸アミドなどを例として挙げることができる。グルクロン酸の濃度は０．１～１０００ｍｇ／Ｌのいずれでもよいが、１～１００ｍｇ／Ｌが好ましい。

【００１９】

本発明で使用されるＮ－アセチルガラクトサミンは塩でもよい。塩の例としては、塩酸

塩、硫酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、リンゴ酸塩などを挙げることができる。Ｎ－アセチルガラクトサミンの濃度は０．１～１０００ｍｇ／Ｌのいずれでもよいが、１～１００ｍｇ／Ｌが好ましい。

【００２０】

本発明で使用するコンドロイチン硫酸としては、コンドロイチン硫酸Ａでもコンドロイチン硫酸Ｃでもよいがコンドロイチン硫酸Ｃが好ましく、塩でもよいが塩の例としてナトリウム塩を挙げることができる。コンドロイチン硫酸の濃度は０．１～１０００ｍｇ／Ｌのいずれでもよいが、１～１００ｍｇ／Ｌが好ましい。

【００２１】

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

【実施例】

【００２２】

〈実施例１〉

ブタの大腿骨ヒザ関節軟骨をメスで採取し、０．２５％コラゲナーゼ溶液（ＤＭＥＭ＋１０％ＦＣＳに溶かす。）に懸濁し、３７℃で４時間インキュベートして、軟骨細胞懸濁液を得た。

【００２３】

氷浴中の１５ｍｌ容遠心管の中でゲル化培地（表１）３６０μＬに上記の軟骨細胞（１０×10_6cells）を加えよくピペッティングした。さらに、コラーゲン（高研、KOKENCE LLGEN I-PC)を９２０μｌ加え十分混合した。そして、９６穴ウェルプレート（SUMILON、Cat.No.MS-8096）に、本混合液を９６μＬ注入した。プレートを３７℃、５％CO_2インキュベーター内に移し、３０分間コラーゲンをゲル化させた。その後、ゲルの上に培養用培地（表２）を２６０μｌずつ加え、３７℃、５％CO_2下で１Ｈ培養した。ゲルをスパチュラで２４穴プレート（SUMILON 、MS-8024R）に移し、１．８ｍｌの培養用培地を加え、３７℃、５％CO_2下で３週間培養した。１週間ごとに培養用培地を全量交換した。この培養用培地には、表２の成分以外に、Ｄ－グルクロン酸Ｎａ塩（シグマ　Ｇ７９０６、５又は５０ｍｇ／Ｌ）、Ｎ－アセチルガラクトサミン（シグマ　Ａ２７９５、５又は５０ｍｇ／Ｌ）、コンドロイチン硫酸ＣＮａ塩（シグマ　Ｃ４３８４、１０又は１００ｍｇ／Ｌ）のうち１つを添加した。また、表２の成分以外に何も添加しないものも用いた。

【００２４】

【表１】

ゲル化培地

成分	量
MEM (95g/L) （Gibco、61100-061）	0.9ml
重曹（１Ｍ）（Wako、191-01305）	0.09ml
HEPES（１Ｍ）（Wako、346-01373）	0.09ml
L-アスコルビン酸リン酸(5g/L)（Wako、013-12061）	0.09ml
ペニシリン、ストレプトマイシン（SIGMA、P-7539）	0.09ml
純水（SIGMA、W-3500）	0.54ml
ウシ胎児血清（LIFE TECHNOLOGIES、26140-079）	1ml

【００２５】

【表２】

培養用培地 (500ml)

成分	量
MEM （Gibco、61100-061）	4.28g
重曹 （Wako、191-01305）	0.99g
L-アスコルビン酸リン酸 （Wako、013-12061）	22.5mg
ペニシリン、ストレプトマイシン （SIGMA、P-7539）	4.5ml
純水 （SIGMA、W-3500）	445 ml
ウシ胎児血清 （LIFE TECHNOLOGIES、26140-079）	50ml

培養後、以下の操作により、ゲル中のアグリカンおよびII型コラーゲンの含量をそれぞれ定量した。

【００２６】

培養液上清を除いた後、２４穴プレート中にてゲルをＰＢＳ　１．８ｍｌで３回洗浄した。ゲルをスパチュラですり潰し、４℃以下に冷却したアグリカン抽出用試液（表３）１ｍｌを加え、４℃で４８ｈｒ振とう抽出した。４℃で３０００ｇ、５ｍｉｎ遠心分離し、沈殿を除去した。回収した上清に３倍量の１．３％酢酸カリウム（Wako、１６０－０３１７５）／無水エタノール（Wako、３２１－０００２５）を加え、沈殿を回収した。沈殿除去した上清に再度、３倍量の１．３％酢酸カリウム（Wako、１６０－０３１７５）／無水エタノール（Wako、３２１－０００２５）を加え、沈殿を回収した。回収した沈殿を２ｍｌ純水に溶解させた。これをサンプルとして以下のＤＭＭＢ法によりアグリカン含量を定量した。すなわち、９６穴プレート（greiner bio-one 、６５５１０１）にサンプル３０μｌずつ添加し、ＤＭＭＢ溶液（表４）１５０μｌを加えた。直ちに吸光度（５９０ｎｍ、５４０ｎｍ）を測定し、５４０ｎｍ／５９０ｎｍの吸光度の比により、アグリカン量を算出した。

【００２７】

【表３】

アグリカン抽出用試液

成分	量
グアニジン塩酸塩(Wako、070-01825)	4 M
Na_2EDTA(DO JINDO、345-01865)	10 mM
e-アミノカプロン酸(キシダ化学、000-03012)	0.1 M
ベンズアミジン塩酸(Wako、028-09481)	0.005 M
酢酸でpH=5.8に調整	

【００２８】

【表４】

ＤＭＭＢ溶液

調製方法
１．A液：2 mlギ酸にギ酸ナトリウム(キシダ化学、000-71542) 2 mgを加えて900 mlミリQに溶解させた溶液
２．B液：DMMB(Sigma、341088-1G)16 mgを5 ml無水エタノール(Wako、321-00025)に溶解させた溶液
３．A液とB液を混合し、ミリQで1000 mlにメスアップする。

一方、培養液上清を除いた後、２４穴プレート中にてゲルをＰＢＳ　１．８ｍｌで洗浄した。３Ｍグアニジン塩酸塩（Wako、０７０－０１８２５）／０．０５Ｍ　Ｔｒｉｓ（Wako、２０４－０７８８５）－ＨＣｌ buffer 、ｐＨ＝７．５の溶液０．５ｍｌにゲルを浮遊させ、４℃で１晩、往復振とうした（LAB-THERMO SHAKER TS-20 、SHAKER CONTROL＝１０に設定）。１００００ｒｐｍ、３ｍｉｎで遠心分離し、沈殿物を冷却したミリＱで洗浄

した。０．５Ｍ　ＮａＣｌ（JUNSET、１９０１５－０３０１）を含んだ０．０５M酢酸（Wako、０１７－００２５１）（ｐＨ＝２．９－３．０、ｐＨはギ酸（関東化学、１６０６４－００）で調整）０．８ｍｌ中に、沈殿物をもう一度浮遊させた。１０ｍｇ／ｍｌペプシン（Wako、１６８－１８７２３）／０．０５M酢酸０．１ｍｌを加え、４℃で４８ｈｒ往復振とうした（LAB-THERMO SHAKER TS-20 、SHAKER CONTROL＝１０に設定）。１０ＸＴＳＢ（１．０Ｍ　Ｔｒｉｓ－２．０Ｍ　ＮａＣｌ－５０mM　$CaCl_2$、ｐＨ＝７．８－８．０）０．１ｍｌを加え、１Ｎ　ＮａＯＨ（JUNSET、３９１５５－１２０１）を用いてｐＨ＝８．０に調整した。１ｍｇ／ｍｌエラスターゼ（Wako、０５８－０５３６１）／１Ｘ　ＴＳＢ（ｐＨ＝７．８－８．０）０．１ｍｌを加え、４℃で１晩往復振とうした。サンプルを１００００ｒｐｍ、５ｍｉｎ遠心分離し、上清を回収し、２０℃で保存した。これをサンプルとして、ＥＬＩＳＡキット（Native Type II collagen Detection Kit、Chondrex社、６００９）により、II型コラーゲン含量を定量した。

【００２９】

その結果、表５に示すように、グルクロン酸、Ｎ－アセチルガラクトサミン、コンドロイチン硫酸を添加したものは無添加のものに比べて、アグリカンの蓄積量に有意な差はないものの、II型コラーゲンの蓄積量が顕著に多量になっていた。

【００３０】

【表５】

培地添加物とマトリックス蓄積量の関係

	添加物						
	無添加	D-グルクロン酸		N-アセチルガラクトサミン		コンドロイチン硫酸	
	-	5 mg/L	50 mg/L	5 mg/L	50 mg/L	5 mg/L	50 mg/L
アグリカン蓄積量（μg/ゲル）	146	133	139	122	160	150	158
Ⅱ型コラーゲン蓄積量（μg/ゲル）	0.34	2.84	2.65	2.92	2.71	2.44	2.31

＜実施例２＞

II型コラーゲンの蓄積量増加に効果のあるＧｌｃＡ（Ｄ－グルクロン酸）とＧａｌＮＡｃ（Ｎ－アセチル－Ｄ－ガラクトサミン）を組合わせて添加した。すなわち、ＧｌｃＡとＧａｌＮＡｃの濃度が各々培地中で０、２．５、２５、１２５ｍｇ／ｌになるよう両方同時に添加し、ブタの大腿骨から分離した初代軟骨細胞を３週間培養した。細胞密度、アグリカン蓄積量、II型コラーゲン蓄積量の測定結果は、それぞれ図１のようになった。

【００３１】

ＧｌｃＡとＧａｌＮＡｃを同時に添加すると、三次元培養後の細胞密度は最大で約１．３倍と少し増加したが、アグリカン蓄積量にはほとんど影響をおよぼさなかった。一方、これらの単糖を同時に添加するとII型コラーゲン蓄積量を顕著に増大し、ＧｌｃＡ（２．５ｍｇ／ｌ）とＧａｌＮＡｃ（２．５ｍｇ／ｌ）とを同時に添加した場合に、無添加の約４倍となった。

＜実施例３＞

ＧｌｃＡ、ＧａｌＮＡｃ、ＣＳＣ（コンドロイチン硫酸）の各々の添加により、II型コラーゲンの蓄積量が増加したが、これらの添加物がII型コラーゲンのｍＲＮＡ発現をも増大させているのかを確認した。

【００３２】

II型コラーゲンの蓄積量が６倍になった条件を選び、ＧｌｃＡ、ＧａｌＮＡｃの濃度が培地中で５０ｍｇ／ｌ、ＣＳＣの濃度が培地中で１００ｍｇ／ｌになるよう添加し、ブタ

の大腿骨から分離した初代軟骨細胞を３週間培養した。その後、細胞からＲＮＡを抽出し、II型コラーゲンのｍＲＮＡ発現量を定量した。

【００３３】

図２はその結果を示したものである。

【００３４】

II型コラーゲンのｍＲＮＡ発現量についてはＧｌｃＡ添加で約４倍、ＧａｌＮＡｃ添加で約３倍、ＣＳＣ添加で約２倍と増加した。サンプル間の偏差は小さかったので、ＧｌｃＡ、ＧａｌＮＡｃ、ＣＳＣ添加によりII型コラーゲンのｍＲＮＡ発現量は明確に増大したと言える。また、ＧｌｃＡを添加した場合のII型コラーゲンのｍＲＮＡ発現量はＣＳＣの添加の約２倍であった。II型コラーゲンのｍＲＮＡ発現量を上げる効果の点で、ＧｌｃＡ添加はより有用であると示唆された。

【００３５】

従って、これらの糖を添加すると、細胞内シグナル伝達によってII型コラーゲンのｍＲＮＡ発現量が増加し、II型コラーゲンの蓄積量を増大させると考えられる。

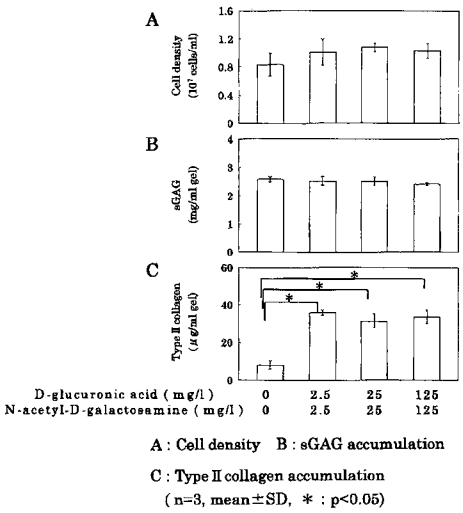
【図面の簡単な説明】

【００３６】

【図１】実施例２においてＧｌｃＡとＧａｌＮＡｃとの併用の結果について例示した図である。

【図２】実施例３においてII型コラーゲンのｍＲＮＡ発現量について例示した図である。

【図１】

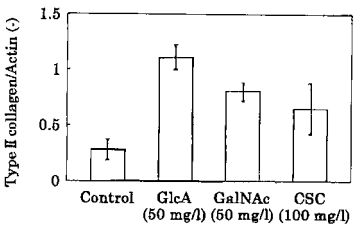


A : Cell density　B : sGAG accumulation

C : Type II collagen accumulation

(n=3, mean±SD, ＊ : p<0.05)

【図２】



(n=2)

フロントページの続き

(56)参考文献 Biochim.Biophys.Acta,2006-APR,1762(4),p.453-9
J.Biosci.Bioeng.,2005,100(1),p.123-6

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　　５／００－５／２８
ＣＡｐｌｕｓ／ＢＩＯＳＩＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩ）
ＰｕｂＭｅｄ
ＷＰＩ