

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6725806号  
(P6725806)

(45) 発行日 令和2年7月22日 (2020.7.22)

(24) 登録日 令和2年6月30日 (2020.6.30)

|                          |                |       |
|--------------------------|----------------|-------|
| (51) Int. Cl.            | F I            |       |
| A 6 1 K 35/28 (2015.01)  | A 6 1 K 35/28  |       |
| A 6 1 K 31/728 (2006.01) | A 6 1 K 31/728 |       |
| A 6 1 K 31/366 (2006.01) | A 6 1 K 31/366 |       |
| A 6 1 P 19/08 (2006.01)  | A 6 1 P 19/08  |       |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01)  | A 6 1 P 43/00  | 1 2 1 |
| 請求項の数 11 (全 17 頁) 最終頁に続く |                |       |

|               |                               |           |                                            |
|---------------|-------------------------------|-----------|--------------------------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2017-562636 (P2017-562636)  | (73) 特許権者 | 505302362                                  |
| (86) (22) 出願日 | 平成27年6月18日 (2015.6.18)        |           | 高雄醫學大學                                     |
| (65) 公表番号     | 特表2018-517703 (P2018-517703A) |           | KAOHSIUNG MEDICAL U<br>NIVERSITY           |
| (43) 公表日      | 平成30年7月5日 (2018.7.5)          |           | 台湾、高雄市三民區十全一路100号                          |
| (86) 国際出願番号   | PCT/CN2015/081835             |           | No. 100, Shih-chuan                        |
| (87) 国際公開番号   | W02016/201682                 |           | 1st Road, Sanmin Di<br>st. Kaohsiung City, |
| (87) 国際公開日    | 平成28年12月22日 (2016.12.22)      |           | Taiwan                                     |
| 審査請求日         | 平成30年1月16日 (2018.1.16)        | (74) 代理人  | 100091683                                  |
|               |                               |           | 弁理士 ▲吉▼川 俊雄                                |
|               |                               | (74) 代理人  | 100179316                                  |
|               |                               |           | 弁理士 市川 寛奈                                  |
|               |                               | 最終頁に続く    |                                            |

(54) 【発明の名称】 軟骨細胞の生成促進薬物を製造するための医薬組成物の用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

関節の軟骨欠損を治療する薬物を製造するための医薬組成物の使用であって、当該医薬組成物は3次元ヒドロゲル担体、幹細胞、ヒアルロン酸及びスタチン系化合物を含有し、当該幹細胞、ヒアルロン酸及びスタチン系化合物は当該3次元ヒドロゲル担体によって被覆され、当該医薬組成物は軟骨を形成するために、幹細胞の骨細胞ではなく軟骨細胞への分化を促進して関節の軟骨欠損を治療する、使用。

【請求項 2】

当該3次元ヒドロゲル担体はフィブリンによって形成される請求項1に記載の使用。

【請求項 3】

当該幹細胞はヒト脂肪幹細胞である請求項1に記載の使用。

【請求項 4】

当該スタチン系化合物はシンバスタチンである請求項1に記載の使用。

【請求項 5】

シンバスタチンはマイクロスフェア剤形をなす請求項4に記載の使用。

【請求項 6】

当該医薬組成物が、オステオカルシンの発現を抑えることで当該軟骨細胞の硬骨化を阻害する請求項1に記載の使用。

【請求項 7】

当該幹細胞の当該軟骨細胞への分化促進は、骨形成蛋白質 - 2 の発現増加に起因する請

10

20

求項 1 に記載の使用。

【請求項 8】

当該幹細胞の当該軟骨細胞への分化促進は、硫酸化グリコサミノグリカンの生成増加に起因する請求項 1 に記載の使用。

【請求項 9】

当該幹細胞の当該軟骨細胞への分化促進は、軟骨分化遺伝子の発現促進に起因し、当該軟骨分化遺伝子は、S o x - 9、アグリカン又は I I 型コラーゲンを含む請求項 1 に記載の使用。

【請求項 10】

前記医薬組成物において、当該ヒアルロン酸の重量パーセント濃度は 1 % である請求項 1 に記載の使用。

【請求項 11】

前記医薬組成物において、当該シンバスタチンの濃度は 1  $\mu$  M である請求項 4 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、軟骨細胞の生成促進薬物を製造するための医薬組成物の用途に関し、特に、ヒアルロン酸及びシンバスタチンを含有する医薬組成物を用いた軟骨細胞の生成促進に関する。

【背景技術】

【0002】

軟骨組織とは、血管、リンパ系及び神経を有さない結合組織であり、主なものとして硝子軟骨 (Hyaline Cartilage) がある。硝子軟骨は、主として軟骨細胞、I I 型コラーゲン (type II collagen)、プロテオグリカン (proteoglycan) からなる。軟骨組織は一度損傷すると、近傍の軟骨細胞の数が非常に限られることから損傷を十分に修復できない。更には、細胞外基質により取り囲まれているため、損傷部位への移動が困難との問題もある。現在知られているように、軟骨の自己修復によって生成される新組織の大部分は線維軟骨 (fibrocartilage) 組織であり、主として I 型コラーゲン (type I collagen) からなる。しかし、線維軟骨組織には軟骨が備えるべきバイオメカニクス特性が欠如しており、硝子軟骨の機能も備っていない。そのため徐々に分解 (degradation) されてゆき、関節を損傷前の正常な運動状態に回復させることは難しい。そこで、近年では組織工学による軟骨組織の修復が急速に成長している。これは、軟骨細胞又は間葉系幹細胞を用いて活性・機能を備えた関節軟骨組織を作製する方式であり、現在のところ、潜在力のある方式として間葉系幹細胞を細胞ソースとして用いる方式が認知されている。一方で、間葉系幹細胞は軟骨細胞への分化機能を有してはいるが、関節軟骨組織の修復に応用する場合には、誘導因子を用いて間葉系幹細胞の軟骨分化を誘導する必要がある。ところが、蛋白質系の誘導因子を用いる場合には、費用の高さや蛋白質変性、病原体の進入といった問題が存在する。また、化学系の誘導因子を用いる場合にはその他の副作用を伴う恐れがある。ここで、骨形成蛋白質 - 2 (bone morphogenetic protein - 2, BMP - 2) は、幹細胞の軟骨化や骨芽細胞の骨化を誘導することが以前より報告されており、関節軟骨や骨の組織工学に応用可能である。ただし、BMP - 2 の発現を誘導して関節軟骨を修復する場合には硬骨化の懸念があり、幹細胞で BMP - 2 を大量に発現させて軟骨欠損を治療した過去の研究では、軟骨欠損箇所の修復は可能であったものの、修復箇所に骨棘が発生するとの課題が見つかった (非特許文献 1)。しかし、幹細胞で BMP - 2 を大量に発現させて軟骨欠損箇所を修復しつつ、BMP - 2 による骨化を回避する方法についてはいまだ未解決のままである。

【0003】

シンバスタチン (simvastatin) を含むスタチン (Statins) 系臨床薬

10

20

30

40

50

物は、臨床的には主としてコレステロールの低下に応用されているが、軟骨細胞における BMP - 2 の発現や、軟骨分化遺伝子 ( Collagen type II & Aggrecan ) 及び軟骨細胞外基質の合成を誘導することも可能である。ところが、スタチン系薬物は骨芽細胞で BMP - 2 の発現を誘導し、骨化により骨折を修復することも可能である。そのため、スタチン系薬物を用いれば BMP - 2 の発現を誘導することで軟骨を修復可能ではあるが、幹細胞で BMP - 2 を大量に発現させて軟骨欠損箇所を修復しつつ、BMP - 2 による骨化を回避する方法についてはいまだ未解決のままとなっている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

10

【非特許文献1】Arthritis Rheum. Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. 2003 Feb; 48 ( 2 ) : 430 - 41 .

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、ヒアルロン酸を含有する微小環境にシンバスタチン ( simvastatin ) を組み合わせて脂肪幹細胞を処理すれば、脂肪幹細胞における骨形成蛋白質 - 2 ( BMP - 2 )、軟骨分化遺伝子 ( Sox - 9、アグリカン ( Aggrecan ) 及び II 型コラーゲン ( Col II )、関節軟骨の細胞外基質 ( sGAG ) の合成が強化されるほか、シンバスタチンにより誘発されるオステオカルシン ( osteocalcin ) の発現が低減し、細胞の硬骨化が減少するため、軟骨欠損の修復に応用可能となることを実験により証明する。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明では、シンバスタチンにヒアルロン酸を組み合わせると、幹細胞の軟骨化を誘導する効果があることが見出された。更に、フィブリンで 3 次元のヒドロゲル担体を作製してヒアルロン酸及び幹細胞を被覆し、シンバスタチン含有マイクロスフェア ( microsphere ) を当該担体に加えると、BMP - 2 の発現がより効果的に促進される結果、軟骨分化遺伝子の発現量が増加するとともに、脂肪幹細胞における硫酸化グリコサミノグリカン ( 主な関節軟骨の細胞外基質 ) の含有量が増加することが見出された。また、ミニブタの軟骨欠損を用いた動物モデルにおいても、当該組み合わせ ( 脂肪幹細胞とシンバスタチン及びヒアルロン酸の組み合わせ ) に関節軟骨欠損を修復する効果があること見出された。

30

【0007】

本稿において、「一の」或いは「一種の」との用語は本発明の構成要素や成分を述べるために用いられるが、これらの用語は記載の便宜上及び本発明の基本概念を提示するためのものにすぎない。こうした記載は、一種又は少なくとも一種を含み、別途指定がない限り、単数で示す場合にも複数を含み得ると解釈すべきである。

40

【0008】

本発明は、ヒアルロン酸混合物及びスタチン系薬物を含有する医薬組成物、試薬キット及び治療方法を提供する。

【0009】

本発明は、軟骨細胞の生成促進薬物を製造するための医薬組成物の用途を提供し、当該医薬組成物は、ヒアルロン酸 ( hyaluronan, HA ) 混合物及びスタチン ( statin ) 系化合物を含有する。

【0010】

本稿でいうところの「軟骨細胞の生成を促進する」とは、細胞の合成、代謝、発現又は軟骨の分化に関係する因子又はホルモンの分泌を促進し、細胞に軟骨細胞を形成させるこ

50

とを指すが、これらに限らない。

【0011】

具体的実施例において、当該ヒアルロン酸混合物は、ヒアルロン酸、フィブリン及び幹細胞を含む。好ましい具体的実施例において、当該フィブリンはヒドロゲルを形成する。当該フィブリンは3次元ヒドロゲルの足場構造を形成する。即ち、3次元のフィブリンヒドロゲル(3D fibrin hydrogel)を担体として形成し、当該ヒアルロン酸及び当該幹細胞を被覆する。

【0012】

本稿でいうところの「ヒドロゲル(Hydrogel)」とは水を分散媒とするゲルであり、網目状の架橋構造を有する水溶性高分子に一部の疎水基及び親水残基を取り込み、親水残基が水分子と結合して水分子を網目内に結合する一方、疎水残基が水に出会うことで膨張する架橋ポリマーとして構成されている。そのため、あらゆる水溶性或いは親水性の高分子が、一定の化学的架橋又は物理的架橋を経ることでヒドロゲルを形成可能である。ヒドロゲルは、物理ゲルと化学ゲルに分けられる。(1)物理ゲルとは、静電的相互作用、水素結合、鎖の絡み合いといった物理的作用によって形成される。この種のゲルには恒久性がなく、加熱されると溶液に変化することから、疑似ゲル又は熱可逆性ゲルとも称される。多くの天然高分子は、k2型カラギーナンや寒天のように常温下で安定的なゲル状態を示す。合成ポリマーのうち典型的な例としてはポリビニルアルコール(PVA)があり、凍結溶解処理を経ることで、60以下で安定的なヒドロゲルを得ることができる。(2)化学ゲルとは化学結合により形成される3次元ネットワークポリマーであり、その恒久性から真性ゲルと称される。ヒドロゲルは大きさや形状の違いによってマクロゲルとミクロゲル(マイクロスフェア)に分けられるほか、マクロゲルは形状の違いによって、柱状、多孔海綿状、繊維状、膜状、球状等に分けられる。また、現在製造されているマイクロスフェアはミクロレベルとナノレベルに分けられる。

【0013】

本稿でいうところの「幹細胞」とは、細胞の自己複製(self-renewal)能力及び増殖(proliferation)能力を有し、長期的に未分化(undifferentiation)の状態を維持可能な細胞のことをいう。「幹細胞」は、適切な誘導刺激を受けた場合に異なる系統の細胞群及び特定の機能組織に分化可能な分化多能性(multi-differentiation)を有する。また、「ヒト間葉系幹細胞」とは、ヒトの間質組織から取得されるあらゆる細胞であり、無限の自己複製能力を有して様々な細胞又は組織形態に分化可能である。例えば、「ヒト間葉系幹細胞」とは、脂肪間葉系幹細胞、骨髄間葉系幹細胞又は臍帯間葉系幹細胞、臍帯血間葉系幹細胞、骨膜間葉系幹細胞、滑膜間葉系幹細胞及び筋肉間葉系幹細胞からなる群の一つであるが、これらに限らない。本発明の実施例では、ヒト脂肪間葉系幹細胞(又はヒト脂肪幹細胞(human adipose-derived stem cells, hADSCs))を例示して説明するが、本発明は以下の実施例に限らない。具体的実施例において、当該幹細胞は、ヒトの皮膚繊維芽細胞(human dermal fibroblast)、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell)又は脂肪幹細胞(adipose-derived stem cell)を含む。好ましい具体的実施例において、当該幹細胞はヒト脂肪幹細胞(hADSCs)である。

【0014】

具体的実施例において、当該ヒアルロン酸の重量パーセント濃度は0.1~10%の範囲である。好ましい具体的実施例において、当該ヒアルロン酸の重量パーセント濃度は0.5~5%の範囲である。より好ましい具体的実施例において、当該ヒアルロン酸の重量パーセント濃度は1%である。

【0015】

本稿の「スタチン(statins)系化合物」は、アトルバスタチン(atorvastatin)、セリバスタチン(cerivastatin)、フルバスタチン(fluvastatin)、ロバスタチン(lovastatin)、メバスタチン(meva

10

20

30

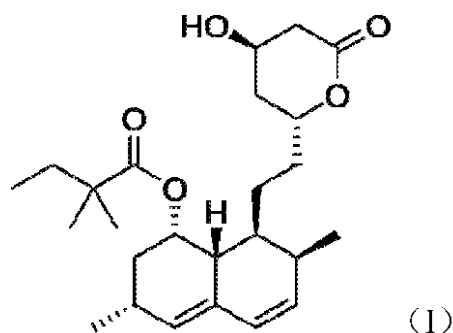
40

50

statin)、ピタバスタチン(pitavastatin)、プラバスタチン(pravastatin)、ロスバスタチン(rosuvastatin)又はシンバスタチン(simvastatin)を含むがこれらに限らない。好ましい具体的実施例において、当該スタチン系化合物はシンバスタチン(simvastatin)である。また、当該シンバスタチン(simvastatin)の構造式は式(I)である。

【0016】

【化1】



10

【0017】

具体的実施例において、当該シンバスタチンの濃度は0.1~10 $\mu$ Mの範囲である。好ましい具体的実施例において、当該シンバスタチンの濃度は0.5~5 $\mu$ Mの範囲である。更に好ましい具体的実施例において、当該シンバスタチンの濃度は1 $\mu$ Mである。他の具体的実施例において、当該シンバスタチンはマイクロスフェア(microsphere)剤形をなす。マイクロスフェア剤形によれば、シンバスタチンの濃度放出を効果的に制御可能となる。

20

【0018】

このように、本発明の医薬組成物は、ヒアルロン酸及び幹細胞を有するフィブリンヒドロゲルと、シンバスタチン含有マイクロスフェアとを含む構成を個体に投与することで、軟骨の生成又は軟骨欠損の修復を促進可能である。また、当該シンバスタチン含有マイクロスフェアは、当該ヒアルロン酸及び幹細胞を有するフィブリンヒドロゲルにそのまま加えられ、一括して当該個体に投与することが可能である。

30

【0019】

ここでいう「軟骨欠損」には、関節軟骨の変性や遺伝子の突然変異、或いは外部からの損傷により関節軟骨が欠損/摩耗する疾病が含まれるが、これらに限らない。関節軟骨は、骨の関節面、肋軟骨、気管、耳介、椎間板等に広く存在している。

【0020】

現在のところ、様々な因子やトリガによって軟骨細胞の合成や代謝を刺激可能なことが知られている。例えば、インスリン様成長因子-1(IGF-1)は滑液中の主な合成・代謝成長因子であり、プロテオグリカンとコラーゲンの合成を刺激する。このほか、骨形成蛋白質(BMP)ファミリーに属するもの(特に、BMP-2、BMP-4、BMP-6及びBMP-7)や、ヒトのトランスフォーミング成長因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )ファミリーに属するものも軟骨細胞の合成・代謝刺激を誘導可能である(Chubinskaya & Kuettnner, 2003)。また、近年では、軟骨細胞の合成・代謝刺激を誘導する化合物が識別されている(米国特許第6,500,854号、欧州特許第1391211号)。そのため、好ましい具体的実施例において、本発明の当該軟骨細胞の生成促進効果については、軟骨細胞の合成・代謝を刺激する関連因子又はホルモンを増加或いは強化し、細胞又は幹細胞の軟骨化を誘発することで得られる。更に具体的な実施例において、当該軟骨細胞の生成促進は、骨形成蛋白質-2(BMP-2)の発現増加によりなされる。

40

【0021】

50

このほか、関節軟骨における２種類の主な細胞外基質の構成成分として、プロテオグリカン (proteoglycan) とⅡ型コラーゲン (Collagen type Ⅱ, Col Ⅱ) がある。グリコサミノグリカン (glycosaminoglycan, GAG) はプロテオグリカンの糖鎖部分であり、構造的特徴として、硫酸化二糖繰り返し単位を備える。Ⅱ型コラーゲンとプロテオグリカンは、足場を形成することで軟骨に安定性と弾性強度を付与する。細胞外基質 (ECM) は組織の構造的足場となるだけでなく、細胞の情報伝達メカニズムにより軟骨細胞の調整も行う。こうした複雑な相互作用が mRNA や蛋白質の発現面で軟骨細胞の遺伝子発現に影響し、細胞の内部状態を変化させる。また、細胞外基質の分解は軟骨の病理状態に関係するのが一般的である。この場合、Ⅱ型コラーゲンの発現量が減少するとともに、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の活性が増強する。このほか、TGF- $\beta$  1 及び IGF-1 等の成長因子が関節軟骨細胞における細胞外基質の分泌と維持に関係している。そのため、好ましい具体的実施例において、本発明の当該軟骨細胞の生成促進効果については、細胞外基質の生成、発現及び細胞外基質の維持/合成を刺激する関連因子の発現を強化し、細胞又は幹細胞の軟骨化を誘発して軟骨を形成することで得られる。より好ましい具体的実施例において、当該軟骨細胞の生成促進は、硫酸化グリコサミノグリカン (sGAG) の生成増加によりなされる。

10

#### 【0022】

軟骨分化遺伝子は細胞の軟骨化を誘発可能である。一般的に、軟骨分化遺伝子は、Sox-9、アグリカン (aggrecan) 又はⅡ型コラーゲン (collagen type Ⅱ) を含むがこれらに限らない。具体的実施例において、当該軟骨細胞の生成促進は軟骨分化遺伝子の発現によりなされ、当該軟骨分化遺伝子は、Sox-9、アグリカン (aggrecan) 又はⅡ型コラーゲン (collagen type Ⅱ) を含む。

20

#### 【0023】

本稿でいうところの「発現」とは、遺伝子、RNA 又は蛋白質の発現を含むがこれらに限らない。

#### 【0024】

また、軟骨細胞の合成・代謝を刺激可能なほとんどの化合物には深刻な副作用がある。例えば、BMP-2 が過度に発現すると骨棘が生成され、硬骨化現象が発生してしまう。そのため、現在のところ、これらの副作用を伴うことなく軟骨細胞の分化を刺激可能な化合物は存在しない。また、一部の骨形成因子や硬骨化誘導因子にはオステオカルシン (osteocalcin) (ただしこれに限らない) が含まれている。そこで、本発明では、軟骨の生成に関係する各種因子を強化することで軟骨細胞の生成を促進するだけでなく、軟骨形成の過程で発生する硬骨化現象を回避可能とした。具体的実施例において、更に、当該医薬組成物は生成される軟骨細胞の硬骨化を抑制する。好ましい具体的実施例において、当該生成される軟骨細胞の硬骨化抑制は、オステオカルシン (osteocalcin) の発現を抑えることでなされる。

30

#### 【0025】

更に、本発明は、治療有効量の医薬組成物を個体の軟骨欠損部位に投与する軟骨欠損の治療方法を提供する。当該医薬組成物は、ヒアルロン酸 (hyaluronan, HA) 混合物及びスタチン (statin) 系化合物を含有する。具体的実施例において、当該ヒアルロン酸混合物は、ヒアルロン酸、フィブリン及び幹細胞を含む。好ましい具体的実施例において、当該フィブリンはヒドロゲルを形成する。当該フィブリンは３次元ヒドロゲルの足場構造を形成する。即ち、３次元のフィブリンヒドロゲル (3D fibrin hydrogel) を担体として形成し、当該ヒアルロン酸及び当該幹細胞を被覆する。

40

#### 【0026】

他の具体的実施例において、当該スタチン (statin) 系化合物はシンバスタチンである。本発明におけるシンバスタチンのようなスタチン (statin) 系化合物は、

50

例えば凝集技術や界面重合により作製されるマイクロカプセル（例えば、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル、及びポリメタクリル酸メチルマイクロカプセル）や、コロイド状ドラッグデリバリーシステム（例えば、リボソーム、マイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子又はナノカプセル）、又はマクロエマルジョン中に埋包可能である。好ましい具体的実施例において、当該シンバスタチンはマイクロスフェア（*microsphere*）剤形をなす。マイクロスフェア剤形によれば、シンバスタチンの濃度放出を効果的に制御可能となる。

【0027】

ここでいう「治療有効量」とは、化合物を個体に投与して疾病を治療するにあたり、当該疾病の治療を実現するために十分な量のことである。「治療有効量」は、化合物、疾病及びその深刻性、治療しようとする個体の年齢、体重等により変化する。具体的実施例において、当該ヒアルロン酸の治療有効量は、重量パーセント濃度で0.1～10%の範囲である。好ましい具体的実施例において、当該ヒアルロン酸の治療有効量は、重量パーセント濃度で0.5～5%の範囲である。より好ましい具体的実施例において、当該ヒアルロン酸の治療有効量は、重量パーセント濃度で1%である。他の具体的実施例において、当該シンバスタチンの治療有効量は0.1～10μMの範囲である。好ましい具体的実施例において、当該シンバスタチンの治療有効量は0.5～5μMの範囲である。更に好ましい具体的実施例において、当該シンバスタチンにおける治療有効量は1μMである。

10

【0028】

「治療」とは、何らかの疾病又は病症の改善（即ち、疾病の抑制、又は疾病における少なくとも1つの臨床症状の発現、程度又は深刻性の低減）をいう。

20

【0029】

本稿で使用する「個体（*subject*）」とは動物を指す。好ましい具体的実施例において、当該個体は哺乳動物である。更に好ましい具体的実施例において、当該個体はヒトである。

【0030】

本発明の医薬組成物は、医薬技術において熟知されている方式で製造される。一般的に、本発明の医薬組成物は医薬的に有効な量で投与される。通常、実際に投与される医薬組成物の分量については、処置すべき病状、選択された投薬経路、実際に投与される化合物、患者個々の年齢、体重及び反応、患者の症状の深刻性、及び類似の要因に鑑みて医師が決定する。

30

【0031】

本発明における医薬組成物の個体への好ましい投与経路は、関節内投与である。本発明の医薬組成物は、持続放出により投与してもよいし、持続放出型ドラッグデリバリーシステムにより投与してもよい。

【0032】

更に、本発明は、ヒアルロン酸混合物及びスタチン（*statin*）系化合物を含む試薬キットを提供する。

【0033】

具体的実施例において、当該ヒアルロン酸混合物は、ヒアルロン酸（*hyaluronan*, HA）、フィブリン及び幹細胞を含有する。好ましい具体的実施例において、当該フィブリンはヒドロゲルを形成する。当該フィブリンは3次元ヒドロゲルの足場構造を形成する。即ち、3次元のフィブリンヒドロゲル（*3D fibrin hydrogel*）を担体として形成し、当該ヒアルロン酸及び当該幹細胞を被覆する。

40

【0034】

他の具体的実施例において、当該スタチン（*statin*）系化合物はシンバスタチンである。好ましい具体的実施例において、当該シンバスタチンはマイクロスフェア（*microsphere*）剤形をなす。

【0035】

具体的実施例において、ヒアルロン酸及び幹細胞を含有するフィブリンヒドロゲルと、

50

シンバスタチンを含有するマイクロスフェアは別々の剤形とし、使用時に併用してもよい。或いは、シンバスタチンを含有するマイクロスフェアを当該フィブリンヒドロゲル中に溶解し、単一剤形として投与してもよい。

【発明の効果】

【0036】

本発明で提供する軟骨細胞の生成促進薬物を製造するための医薬組成物の用途は、その他の常用の技術と比較して以下のような利点がある。

【0037】

(1) ヒアルロン酸とスタチン (statin) 系化合物を合わせて使用すると、例えば、骨形成蛋白質 (BMP)、軟骨細胞外基質 (例えば、sGAGやCol II)、軟骨分化遺伝子 (例えば、Sox-9、アグリカン (aggrecan) 又はII型コラーゲン (collagen type II)) といった軟骨の生成又は細胞の軟骨化促進に関係する因子を顕著且つ効果的に強化可能となるため、軟骨欠損/摩耗に関する各種疾病の治療に応用できる。

【0038】

(2) 現在市販されている軟骨欠損を治療又は軟骨の成長を刺激する多くの薬物又は試薬には硬骨化発生の懸念がある。これは、軟骨化因子が過剰に発現するためと考えられる。しかし、本発明の医薬組成物によれば、軟骨の生成や細胞における軟骨化誘導に関係する因子の発現を顕著に向上させられるだけでなく、更に硬骨化因子の発現を抑制可能である。例えば、オステオカルシンの発現量が低減するため、硬骨化現象の発生が回避される。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】図1は、ヒアルロン酸塗布 (HA) ウェル又はヒアルロン酸非塗布 (Non-HA) ウェルで培養したヒト脂肪幹細胞 (hADSCs) における硫酸化グリコサミノグリカン (sGAG) の形成に対するシンバスタチン (simvastatin) の影響を表す (\*及び\*\* : ヒアルロン酸及びシンバスタチン処理無し群との比較で、\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 。# : シンバスタチン処理群 (0  $\mu$ M) との比較で、 $p < 0.01$ 。実験数 = 3)。

【図2A】図2Aは、ヒアルロン酸有り (HA) 或いはヒアルロン酸無し (Non-HA) で培養したヒト脂肪幹細胞における軟骨分化遺伝子 Sox-9 の発現に対するシンバスタチンの影響を表す (ヒアルロン酸無し群 (Non-HA) との比較で、\*\*  $p < 0.01$ 。実験数 = 4)。

【図2B】図2Bは、ヒアルロン酸有り (HA) 或いはヒアルロン酸無し (Non-HA) で培養したヒト脂肪幹細胞における軟骨分化遺伝子 Aggrecan の発現に対するシンバスタチンの影響を表す (ヒアルロン酸無し群 (Non-HA) との比較で、\*\*  $p < 0.01$ 。実験数 = 4)。

【図2C】図2Cは、ヒアルロン酸有り (HA) 或いはヒアルロン酸無し (Non-HA) で培養したヒト脂肪幹細胞における軟骨分化遺伝子 Col II の発現に対するシンバスタチンの影響を表す (ヒアルロン酸無し群 (Non-HA) との比較で、\*\*  $p < 0.01$ 。実験数 = 4)。

【図3A】図3Aは、ヒアルロン酸有り (HA) 或いはヒアルロン酸無しで培養したヒト脂肪幹細胞における骨形成蛋白質-2 (BMP-2) 遺伝子の発現に対するシンバスタチンの影響を表す (ヒアルロン酸無し群 (Non-HA) の1日目のデータとの比較で、\*  $p < 0.01$ 。実験数 = 4)。

【図3B】図3Bは、ヒアルロン酸有り (HA) 或いはヒアルロン酸無しで培養したヒト脂肪幹細胞のオステオカルシン (osteocalcin) 遺伝子の発現に対するシンバスタチンの影響を表す (ヒアルロン酸無し群 (Non-HA) の1日目のデータとの比較で、\*\*  $p < 0.01$ 。実験数 = 4)。

【図4】図4は、3次元のヒアルロン酸/フィブリンヒドロゲルで被覆したヒト脂肪幹細胞

胞をシンバスタチンで処理した場合の硫酸化グリコサミノグリカン (s G A G) の形成発現結果を分析したものである (同日のヒアルロン酸群 (H A) とヒアルロン酸 + シンバスタチン群 (H A + S i m) との比較で、 $** p < 0.01$ 。実験数 = 3)。

【図5】図5は、3次元のヒアルロン酸/フィブリンヒドロゲルで被覆したヒト脂肪幹細胞をシンバスタチンで処理した場合のI I型コラーゲン (C o l I I) の発現結果を分析したものである (同日のヒアルロン酸群 (H A) とヒアルロン酸 + シンバスタチン群 (H A + S i m) との比較で、 $** p < 0.01$ 。実験数 = 3)。

【図6A】図6Aは、3次元のヒアルロン酸/フィブリンヒドロゲルで被覆したヒト脂肪幹細胞をシンバスタチンで処理した場合の軟骨分化遺伝子S o x - 9の発現結果を分析したものである。

10

【図6B】図6Bは、3次元のヒアルロン酸/フィブリンヒドロゲルで被覆したヒト脂肪幹細胞をシンバスタチンで処理した場合の軟骨分化遺伝子アグリカン (A g g r e c a n) の発現結果を分析したものである。

【図6C】図6Cは、3次元のヒアルロン酸/フィブリンヒドロゲルで被覆したヒト脂肪幹細胞をシンバスタチンで処理した場合の軟骨分化遺伝子C o l I Iの発現結果を分析したものである。

【図7】図7は、シンバスタチン及びヒト脂肪幹細胞を含有する3次元のヒアルロン酸/フィブリンヒドロゲルでミニブタの膝関節における関節軟骨欠損箇所を処理した結果である (矢印は膝関節の修復箇所を示す)。

【発明を実施するための形態】

20

【0040】

本発明は以下で提示する実施例に限らず、別の内容で実施される場合がある。以下の実施例は、本発明の代表的な方向性及び特徴にすぎない。

【0041】

実施例1

硫酸化グリコサミノグリカン (s G A G) は関節軟骨における主要な細胞外基質である。シンバスタチン (S i m v a s t a t i n) がヒト脂肪幹細胞 (h u m a n a d i p o s e - d e r i v e d s t e m c e l l s, h A D S C s) における硫酸化グリコサミノグリカン (s G A G) の発現を促進し得るか否か、及びシンバスタチンの好ましい濃度を測定するために、本発明ではまずヒアルロン酸 (h y a l u r o n a n, H A) 塗布ウェルを作製した。即ち、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S, 1% w / w) に溶解した1 m l のヒアルロン酸を24ウェルプレートに塗布し、37℃で48時間静置してからP B Sで2度洗浄した。続いて、500  $\mu$  l の基礎培地を含有する細胞密度  $1 \times 10^5$  のウェルにヒト脂肪幹細胞を接種した。当該基礎培地はD M E M (D u l b e c c o ' s m o d i f i e d E a g l e ' s m e d i u m, ダルベッコ改変イーグル培地) を含有しており、更に、胎児ウシ血清 (F e t a l b o v i n e s e r u m, F B S) 5%、非必須アミノ酸1%及びペニシリン/ストربتマイシン (G i b c o - B R L, G r a n d I s l a n d, N Y) 100 U / m l を別途添加した。培養期間には各種濃度 (0.1 ~ 1  $\mu$  M) のシンバスタチン (s i m v a s t a t i n) をウェルプレートに添加し、当該培地を2日に1度交換した。培養7日目に細胞を収集し、B l y s c a n 硫酸化グリコサミノグリカン測定キット (B i o c o l o r, A n t r i m, U K) でジメチルメチレンブルー (d i m e t h y l m e t h y l e n e b l u e, D M M B) 分析を実施するとともに、形成された硫酸化グリコサミノグリカン (s G A G) をD N A で標準化した。図1にその結果を示す。

30

40

【0042】

本発明では、ヒアルロン酸の有無によって、ヒト脂肪幹細胞における硫酸化グリコサミノグリカン (s G A G) の形成にシンバスタチンがどう影響するかを測定した。図1に示すように、ヒアルロン酸無し (N o n - H A) の場合に0.1 ~ 1  $\mu$  M のシンバスタチンで処理すると、ヒト脂肪幹細胞におけるs G A G の発現量がいずれも促進された (0  $\mu$  M : 0.3  $\mu$  g /  $\mu$  g、0.1  $\mu$  M : 0.5  $\mu$  g /  $\mu$  g、0.5  $\mu$  M : 0.5  $\mu$  g /  $\mu$  g、

50

1  $\mu$ M : 0.7  $\mu$ g /  $\mu$ g)。また、ヒアルロン酸1%の場合に0.1 ~ 1  $\mu$ Mのシンバスタチンで処理すると、s G A Gの発現量がより強化された(0  $\mu$ M : 1.4  $\mu$ g /  $\mu$ g、0.1  $\mu$ M : 1.3  $\mu$ g /  $\mu$ g、0.5  $\mu$ M : 2.5  $\mu$ g /  $\mu$ g、1  $\mu$ M : 2.8  $\mu$ g /  $\mu$ g)。本実験では、ヒアルロン酸1%とシンバスタチン1  $\mu$ Mを共に作用させた場合、幹細胞におけるs G A Gの発現が顕著且つ良好に促進されることから、細胞の軟骨化が誘発され、軟骨の生成に有利となることが示された。

#### 【0043】

##### 実施例2

ヒト脂肪幹細胞(h A D S C s)をヒアルロン酸塗布(H A)ウェル及び非塗布(N o n - H A)ウェルでそれぞれ培養し、1  $\mu$ Mのシンバスタチン(s i m v a s t a t i n, S I M)を用いた場合又は用いない場合で1 ~ 5日間処理した。即ち、本発明では実験群を次の4つに分けた。

(1) ヒアルロン酸無し(N o n - H A)群：ヒト脂肪幹細胞をヒアルロン酸非塗布ウェルで培養し、シンバスタチン(1  $\mu$ M)による処理も実施しなかった。

(2) ヒアルロン酸無し+シンバスタチン(N o n - H A + S i m)群：ヒト脂肪幹細胞をヒアルロン酸非塗布ウェルで培養し、シンバスタチン(1  $\mu$ M)による処理を実施した。

(3) ヒアルロン酸(H A)群：ヒト脂肪幹細胞をヒアルロン酸塗布ウェルで培養したが、シンバスタチン(1  $\mu$ M)による処理は実施しなかった。

(4) ヒアルロン酸+シンバスタチン(H A + S i m)群：ヒト脂肪幹細胞をヒアルロン酸塗布ウェルで培養し、シンバスタチン(1  $\mu$ M)による処理を実施した。

#### 【0044】

所定の日数で細胞を収集し、リアルタイムPCR(real-time PCR)でBMP-2及び軟骨分化遺伝子(chondrogenic genes)の発現を分析した。また、以下に述べるメーカーのガイドラインに基づき、TRIzol試薬(Gibco BRL, Rockville, MD)を合わせて使用することでこれら細胞のトータルRNA(total RNA)を抽出した。簡単にいうと、0.5 ~ 1  $\mu$ gのトータルRNAを含む20  $\mu$ lの反応体積を取り、SuperScript First-Strand合成システム(Invitrogen)を用いてcDNAを逆転写した。続いて、iQ(登録商標) SYBR green(登録商標) supermix(Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA)と定量リアルタイムPCR検出システム(Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA)を用いてリアルタイムPCR反応を実施し、観測した。当該cDNAサンプル(2  $\mu$ lを取って毎回25  $\mu$ lの総体積で反応させた)は、参照遺伝子グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)を対照群とし、関心のある遺伝子を分析するために用いた。各標的遺伝子の発現量は、前述したように $2^{-\Delta\Delta C_t}$ で算出した。関心のある各遺伝子については、実験サンプルごとに4つの値を読んだ。また、各実験は少なくとも3回繰り返した。プライマーセット(applied primer set)としては、(1)骨形成蛋白質-2(BMP-2)のフォワード(forward) : C G A A T G A C T G G A T T G T G G C T、リバーズ(reverse) : T G A G T T C T G T C G G G A C A C A G、(2) Sox-9のフォワード : C T T C C G C G A C G T G G A C A T、リバーズ : G T T G G G C G G C A G G T A C T G、(3) II型コラーゲン(Collagen type II, Col II)のフォワード : C A A C A C T G C C A A C G T C C A G A T、リバーズ : T C T T G C A G T G G T A G G T G A T G T T C T、(4)アグリカン(Aggregan)のフォワード : A C A C G T G G G G A C A G T A T T G G、リバーズ : G T G G A A A G A T G C G G T G G T T T、(5) GAPDHのフォワード : T C T C C T C T G C A T T C A A C A G C G A C、リバーズ : C C C T G T T G T T G C A G C C A A A T T C、及び(6) オステオカルシン(osteocalcin)のフォワード : G T G C A G A G T

CCA GCA AAG GT、リバーズ：CGA TAG GCC TCC TGA  
AAG C、を添加した。図2及び図3に結果を示す。

【0045】

本発明では、まずヒアルロン酸の有無によって、ヒアルロン酸(HA)を1%、シンバスタチン(Simvastatin)を1 $\mu$ Mとする構成が、軟骨分化遺伝子(Sox-9、アグリカン(AggreCAN等)及びII型コラーゲン(Col II))の発現を刺激し得るか否か、及びこれらの好ましい濃度を測定した。図2A～図2Cに示すように、ヒアルロン酸無し(Non-HA)の場合にシンバスタチンを1 $\mu$ M加えたとしても、軟骨分化遺伝子の発現を効果的に促進することはできなかった(Non-HA+Sim)。しかし、ヒアルロン酸1%の場合にシンバスタチンを1 $\mu$ M加えたところ(HA+Sim)、良好な軟骨分化遺伝子の発現量が得られた。即ち、Sox-9、AggreCAN及びCol IIの発現量が向上した。本実験では、ヒアルロン酸1%とシンバスタチン1 $\mu$ Mを共に作用させた場合に、幹細胞における軟骨分化遺伝子の発現が顕著且つ良好に促進されることが示された。

10

【0046】

また、本発明では、ヒアルロン酸の有無によって、ヒアルロン酸を1%、シンバスタチンを1 $\mu$ Mとする構成が、BMP-2及びオステオカルシン(osteocalcin)の発現を刺激し得るか否かを測定した。図3Aに示すように、ヒアルロン酸無し(Non-HA)群における1日目のBMP-2発現量を1として比較すると、ヒアルロン酸無し(Non-HA)の場合にシンバスタチン1 $\mu$ Mを加えたときには(Non-HA+Sim)、BMP-2遺伝子の明らかな発現促進はみられなかった(1日目：Non-HA群：1倍、Non-HA+Sim群：1.2倍。3日目：Non-HA：0.5倍、Non-HA+Sim群：0.8倍。5日目：Non-HA群：0.2倍、Non-HA+Sim群：1.1倍)。一方、ヒアルロン酸1%の場合にシンバスタチン1 $\mu$ Mを加えると(HA+Sim)、BMP-2の発現量に明らかな増加がみられた(1日目：HA：0.5倍、HA+Sim：2.8倍。3日目：HA：1.9倍、HA+Sim：5倍。5日目：HA：0.4倍、Non-HA+Sim：2.1倍)。本実験では、ヒアルロン酸1%とシンバスタチン1 $\mu$ Mを共に作用させた場合に、幹細胞におけるBMP-2遺伝子の大量発現が促進されることが示された。

20

【0047】

一方、オステオカルシン(osteocalcin)遺伝子の発現量については、図3Bに示すように、ヒアルロン酸無し群における1日目のオステオカルシンの発現量を1として比較すると、ヒアルロン酸無し(Non-HA)の場合にシンバスタチンを1 $\mu$ M加えた場合、1日目から5日目までオステオカルシン遺伝子の発現が明らかに促進された。また、HA有りの場合(HA+Sim)にシンバスタチンを1 $\mu$ M加えたところ、1日目から5日目までシンバスタチン(simvastatin)により誘発されるオステオカルシン(osteocalcin)の発現が効果的に削減された。以上の結果から、ヒアルロン酸とシンバスタチンを共に作用させるとオステオカルシン(osteocalcin)の発現が低下するため、硬骨化の発生を減少させられることが示された。

30

【0048】

実施例3

1%のヒアルロン酸中に浮遊するヒト脂肪幹細胞( $5 \times 10^6$ 個)各30 $\mu$ Lと120 $\mu$ Lのフィブリン(fibrin)溶液(100mg/ml)を混合した後、テフロン(登録商標)金型(teflon mold)(深さ5.5mm、直径5.5mm)に放置した。次に、塩化カルシウム( $\text{CaCl}_2$ )40mMに溶解したウシ由来トロンビン(bovine thrombin, 300U/ml)溶液40 $\mu$ Lを金型に加え、細胞/フィブリン溶液と十分に混合した。そして、ヒドロゲル(hydrogel)が形成されるまで当該混合物を室温で15分間培養した。ヒドロゲルが形成されると、ヒト脂肪幹細胞とヒアルロン酸を含む当該3次元フィブリンヒドロゲル担体(3D fibrin hydrogel carrier)(ヒアルロン酸/フィブリンヒドロゲル)をテフロン金

40

50

型から取り出し、24ウェルプレートに移して、1 mlの基礎培地(DMEM)を用いた。当該基礎培地はDMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, ダルベッコ改変イーグル培地)を含有しており、更に、胎児ウシ血清(Fetal bovine serum, FBS) 5%、非必須アミノ酸1%及びペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco-BRL, Grand Island, NY) 100 U/mlを別途添加した。続いて、当該ヒト脂肪幹細胞(hADSCs)をヒアルロン酸/フィブリンヒドロゲル中で培養し、シンバスタチン1  $\mu$ Mを用いる場合と用いない場合とで7日間或いは14日間処理した。即ち、本発明では実験群を次の2つに分けた。

(1) ヒアルロン酸(HA)群: ヒト脂肪幹細胞をヒアルロン酸/フィブリンヒドロゲル中で培養したが、シンバスタチン(1  $\mu$ M)による処理は実施しなかった。

10

(2) ヒアルロン酸+シンバスタチン(HA+Sim)群: ヒト脂肪幹細胞をヒアルロン酸/フィブリンヒドロゲル中で培養し、シンバスタチン(1  $\mu$ M)による処理を実施した。

7日目及び14日目にヒドロゲルを収集し、60℃で18時間パパイン溶液(papain solution, 300  $\mu$ g/ml)中で培養した。続いて、各実験群から取得した50  $\mu$ lの細胞抽出物について、sGAG合成を測定するDMMB分析法、又はII型コラーゲン測定キット(Type II Collagen Detection Kit, Chondrex Inc. WA, USA)によるII型コラーゲン分析を実施した。結果を図4及び図5に示す。

#### 【0049】

20

3次元のヒアルロン酸ヒドロゲルで被覆した場合にシンバスタチン(simvastatin) 1  $\mu$ Mを加えた構成が、間葉系幹細胞における2種類の主要な細胞外基質である硫酸化グリコサミノグリカン(sGAG)及びII型コラーゲン(Collagen type II, Col II)の生成を促進し得るか否かを測定した。sGAGの発現量については、7日目にヒアルロン酸(HA)群が14  $\mu$ g/ $\mu$ g、ヒアルロン酸+シンバスタチン(HA+Sim)群が18  $\mu$ g/ $\mu$ gとなった。また、14日目には、ヒアルロン酸群が14  $\mu$ g/ $\mu$ g、ヒアルロン酸+シンバスタチン群が30  $\mu$ g/ $\mu$ gとなった(図4参照)。Col IIの発現量については、7日目にヒアルロン酸(HA)群が2 pg/ $\mu$ g、ヒアルロン酸+シンバスタチン(HA+Sim)群が6 pg/ $\mu$ gとなった。また、14日目には、ヒアルロン酸群が6.5 pg/ $\mu$ g、ヒアルロン酸+シンバスタチン群が27 pg/ $\mu$ gとなった(図5参照)。上記の結果より、3次元のヒアルロン酸/フィブリンヒドロゲルで被覆した場合にシンバスタチン(HA+Sim)を1  $\mu$ M加えると、幹細胞における2種類の主要な細胞外基質(sGAG及びCol II)の発現が効果的に促進されることが示された。

30

#### 【0050】

また、本発明では更に、ヒアルロン酸/フィブリンヒドロゲルを用いて前記ヒト脂肪幹細胞を培養し、シンバスタチン1  $\mu$ Mを用いて1~5日間処理した場合と処理しなかった場合について、軟骨分化遺伝子(Sox-9、アグリカン(Aggregan)及びII型コラーゲン(Col II))の発現状況を分析した。即ち、本発明では実験群を次の2つに分けた。

40

(1) ヒアルロン酸(HA)群: ヒト脂肪幹細胞をヒアルロン酸/フィブリンヒドロゲル中で培養したが、シンバスタチン(1  $\mu$ M)による処理は実施しなかった。

(2) ヒアルロン酸+シンバスタチン(HA+Sim)群: ヒト脂肪幹細胞をヒアルロン酸/フィブリンヒドロゲル中で培養し、シンバスタチン(1  $\mu$ M)による処理を実施した。

所定の日数で細胞を収集し、リアルタイムPCRで軟骨分化遺伝子の発現を分析した。図6にその結果を示す。

#### 【0051】

3次元のヒアルロン酸ヒドロゲルで被覆した場合にシンバスタチンを1  $\mu$ M加えたとき、間葉系幹細胞における軟骨分化遺伝子の良好な発現を促進し得るか否かを測定した。図

50

6 A ~ 図 6 C に示すように、幹細胞を 3 次元のヒアルロン酸 / フィブリンヒドロゲルで被覆してからシンバスタチンを  $1 \mu\text{M}$  加えたところ (H A + S i m)、軟骨分化遺伝子の良好な発現がみられた。即ち、S o x - 9、A g g r e c a n 及び C o l I I の発現量が向上した。本実験では、3 次元のヒアルロン酸ヒドロゲルで被覆してからシンバスタチン  $1 \mu\text{M}$  を加えると、幹細胞における軟骨分化遺伝子の発現が良好に促進されることが示された。

#### 【 0 0 5 2 】

##### 実施例 4

40 mg のシンバスタチン (M e r c k & C o m p a n y , R a h w a y , N J , U S A ) を 1 m l のエタノール (e t h a n o l ) に溶解した後、1 . 5 m l の 0 . 1 N N a O H と混合した。次に、シンバスタチンストック溶液 (s t o c k s o l u t i o n ) を 5 0 まで加熱して 2 時間保持した後、1 N の塩酸 (H C l , p H = 7 . 4 , S i g m a - A l d r i c h , S t L o u i s , M O , U S A ) で p H 値を中和して 1 0 m M のストック溶液とした。続いて、水中油中水型のダブルエマルジョン (w a t e r - i n - o i l - i n - w a t e r (w / o / w) d o u b l e e m u l s i o n ) 技術によってマイクロスフェア (m i c r o s p h e r e ) を作製した。簡単にいうと、1 6 m g のヒドロキシアパタイト (H A p ) 粉末をリン酸緩衝生理食塩水 (P B S ) に溶解して第 1 水相 (w a t e r - p h a s e ) 溶液を形成した。次に、2 5 0  $\mu\text{l}$  のシンバスタチンストック溶液と 5 0 m g の界面活性剤 S p a n 8 0 及び P L G A (乳酸 - グリコール酸共重合体) 5 0 / 5 0 (P 2 1 9 1 , 分子量 : 3 0 , 0 0 0 ~ 6 0 , 0 0 0 , S i g m a - A l d r i c h ) をジクロロメタン (d i c h l o r o m e t h a n e ) 溶液中で混合し、油相を形成した。そして、第 1 水相溶液と油相溶液を混合し、1 0 0 0 r p m で 1 5 分間攪拌することで第 1 油中水 (w / o ) エマルジョンを形成した。続いて、第 1 油中水 (w / o ) エマルジョンを 2 0 m l の第 2 水相溶液に加え、1 % (w / v ) のジクロロメタン (d i c h l o r o m e t h a n e ) 溶液と混合することで第 2 ダブルエマルジョン (w / o / w) を形成した。そして、第 2 ダブルエマルジョン (w / o / w) を室温で 3 0 分間攪拌し、当該マイクロスフェアとして硬化した。なお、攪拌過程では、ジクロロメタンを蒸発させて当該マイクロスフェアを硬化させるために抽出器が必須となる。最後に、当該マイクロスフェアを遠心方式で収集し、0 . 1 % のポリビニルアルコール (p o l y v i n y l a l c o h o l ) で 3 回洗浄してから、冷凍乾燥機で冷凍乾燥した。

#### 【 0 0 5 3 】

すべての実験動物は台東動物繁殖センター (T A P S ) から提供された。動物には、手術前にケタミン (K e t a m i n e ) 0 . 1 5 m g / k g と鎮静薬キシラジン (x y l a z i n e ) を筋肉注射 (I M i n j e c t i o n ) することで麻酔を施した。また、手術中には 5 % の吸入麻酔薬 (i n h a l a t i o n a l I s o f l u r a n e ) を投与して麻酔を維持した。こうしてミニブタに麻酔を施してから、左下肢に手術を実施した。手術では、軟骨下骨 (s u b c h o n d r a l b o n e ) を貫通することのないよう、トレフィンバー (t r e p h i n e b u r ) で左下肢の内顆 (m e d i a l c o n d y l e s ) に軟骨全層欠損 (f u l l - t h i c k n e s s c a r t i l a g e d e f e c t s ) (直径 6 m m) を形成した。術後にはシンバスタチン 1 m g のマイクロスフェアを含むヒアルロン酸 / フィブリンヒドロゲルを軟骨欠損部位に移植した。また、修復構造を縫合するために、脛骨から骨膜を採取して欠損部位の上方を覆い、最後に手術による傷口を一層ずつ縫合した。また、術後には、鎮痛薬ウルトラセト (T r a m a d o l 3 7 . 5 m g / A c e t a m i n o p h e n 3 2 5 m g ) を 1 日 1 回、1 回あたり 2 錠として 5 日間継続的に経口投与した。そして、1 2 週目に治療効果を確認すべく観察を実施した。

#### 【 0 0 5 4 】

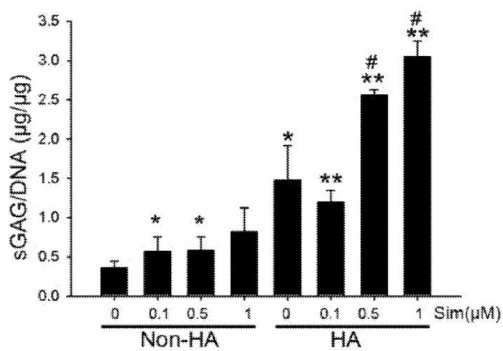
図 7 に示すように、間葉系幹細胞とシンバスタチン (S i m v a s t a t i n ) 含有マイクロスフェア (m i c r o s p h e r e ) を含む 3 次元のヒアルロン酸ヒドロゲルをミニブタの関節軟骨における欠損部位に投与したところ、1 2 週目に当該部位の関節軟骨欠

損が明らかに改善された。上記の結果は、3次元のヒアルロン酸ヒドロゲルで被覆した間葉系幹細胞及びシンバスタチン含有マイクロスフェアが関節軟骨欠損に対し修復及び改善効果を有することを示している。

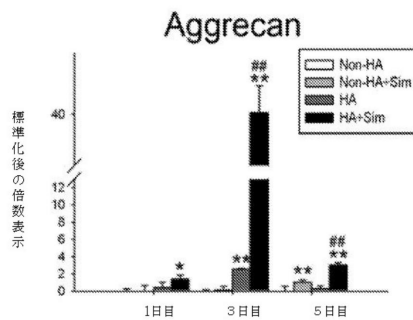
【0055】

以上は本発明の好ましい実施形態を具体的且つ詳細に説明するものにすぎず、本発明を限定するものではない。よって、当業者が本発明の主旨及び範囲を逸脱することなく行う等価の実施又は変更はいずれも本発明の請求の範囲に含まれる。

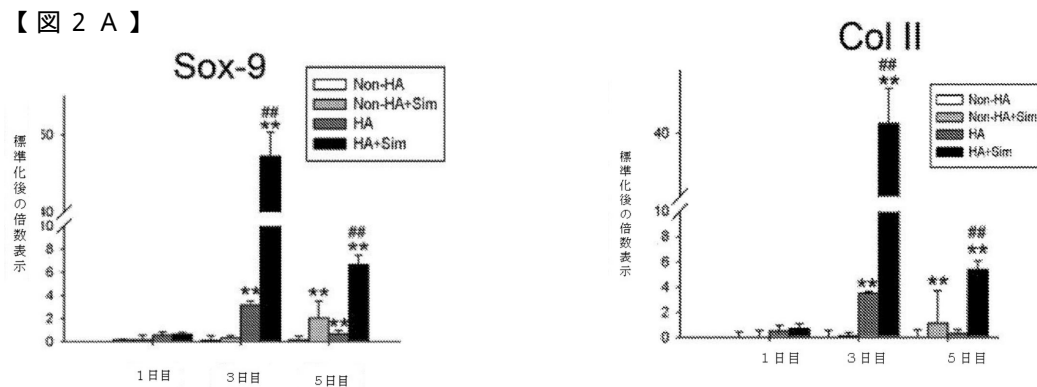
【図1】



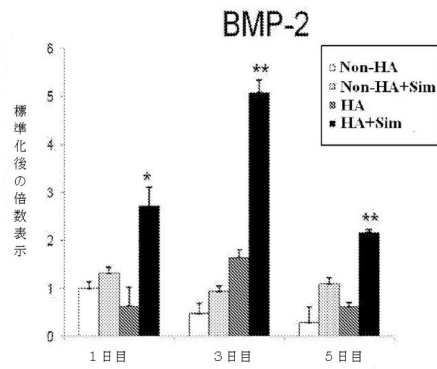
【図2B】



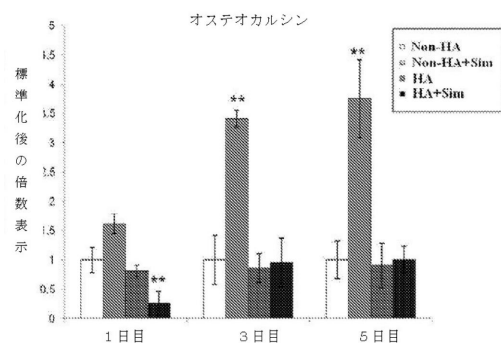
【図2C】



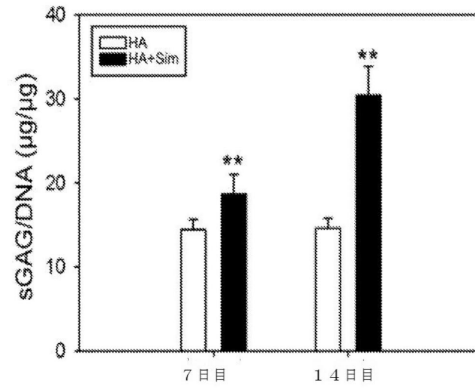
【図 3 A】



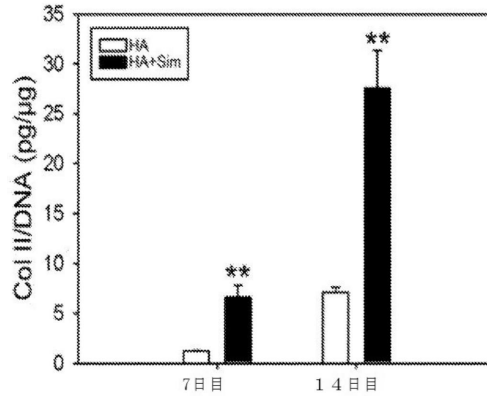
【図 3 B】



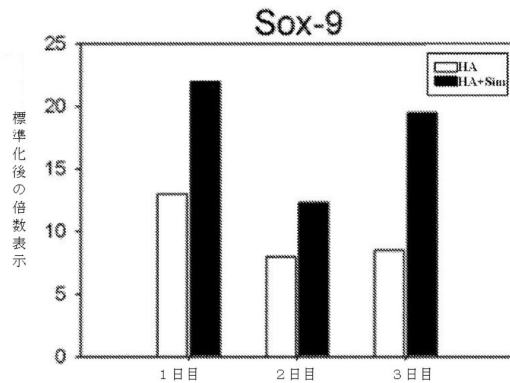
【図 4】



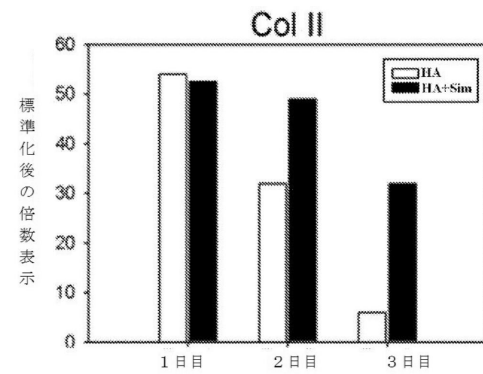
【図 5】



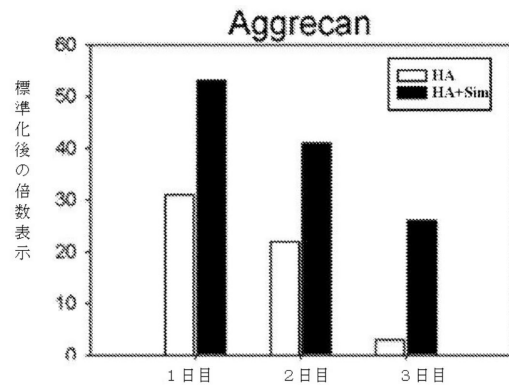
【図 6 A】



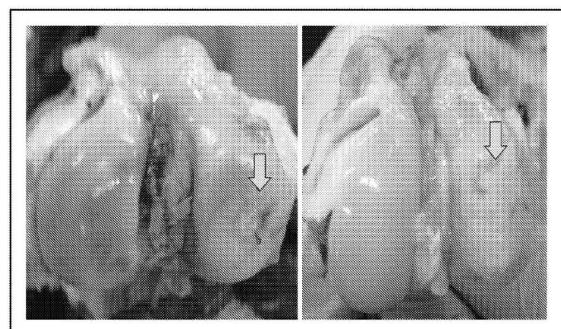
【図 6 C】



【図 6 B】



【図 7】



【配列表】

0006725806000001.app

## フロントページの続き

|               |           |         |       |       |
|---------------|-----------|---------|-------|-------|
| (51)Int.Cl.   |           | F I     |       |       |
| A 6 1 L 27/20 | (2006.01) | A 6 1 P | 43/00 | 1 0 7 |
| A 6 1 L 27/22 | (2006.01) | A 6 1 L | 27/20 |       |
| A 6 1 L 27/38 | (2006.01) | A 6 1 L | 27/22 |       |
| A 6 1 L 27/52 | (2006.01) | A 6 1 L | 27/38 | 1 0 0 |
| A 6 1 L 27/54 | (2006.01) | A 6 1 L | 27/52 |       |
|               |           | A 6 1 L | 27/54 |       |

(72)発明者 何美▲リン▼  
台湾 8 0 7 高雄市三民区十全一路1 0 0 号

(72)発明者 張瑞根  
台湾 8 0 7 高雄市三民区十全一路1 0 0 号

(72)発明者 吳順成  
台湾 8 0 7 高雄市三民区十全一路1 0 0 号

(72)発明者 張智翔  
台湾 8 0 7 高雄市三民区十全一路1 0 0 号

審査官 参鍋 祐子

(56)参考文献 特開2 0 1 2 - 0 9 7 0 6 6 ( J P , A )  
国際公開第2 0 1 5 / 0 8 3 5 8 2 ( WO , A 1 )  
J. Appl. Physiol. , 2 0 1 3 年 , Vol.114 , pp.1610-1618  
Aging , 2 0 1 0 年 , Vol.2(12) , pp.990-998  
J. UOEH. , 2 0 1 4 年 , Vol.36(2) , pp.141-146  
ARTHRITIS & RHEUMATISM , 2 0 0 9 年 , Vol.60 , No.3 , pp.801-812  
Nature , 2 0 1 4 年 , Vol.513 , pp.507-511  
移植 , 2 0 0 6 年 , Vol.41(5) , p.514  
J. Orthop. Res. , 2 0 1 0 年 , Vol.28 , Vol.110-115

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

|         |             |
|---------|-------------|
| A 6 1 K | 3 5 / 2 8   |
| A 6 1 K | 3 1 / 3 6 6 |
| A 6 1 K | 3 1 / 7 2 8 |
| A 6 1 L | 2 7 / 2 0   |
| A 6 1 L | 2 7 / 2 2   |
| A 6 1 L | 2 7 / 3 8   |
| A 6 1 L | 2 7 / 5 2   |
| A 6 1 L | 2 7 / 5 4   |
| A 6 1 P | 1 9 / 0 8   |
| A 6 1 P | 4 3 / 0 0   |

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )