

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 507035

(P2003 - 507035A)

(43)公表日 平成15年2月25日(2003.2.25)

| (51) Int.Cl ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マ-コ-ド* (参考) |
|--------------------------|------|---------------|---------------|
| C 1 2 N 15/09 | | A 6 1 K 35/28 | 2 G 0 4 5 |
| A 6 1 K 35/28 | | A 6 1 P 3/14 | 4 B 0 2 4 |
| A 6 1 P 3/14 | | 7/00 | 4 B 0 6 3 |
| 7/00 | | 19/00 | 4 B 0 6 5 |
| 19/00 | | 19/10 | 4 C 0 8 7 |

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 47数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 517670(P2001 - 517670)

(86)(22)出願日 平成12年8月11日(2000.8.11)

(85)翻訳文提出日 平成14年2月13日(2002.2.13)

(86)国際出願番号 PCT/US00/22040

(87)国際公開番号 W001/012785

(87)国際公開日 平成13年2月22日(2001.2.22)

(31)優先権主張番号 60/148,814

(32)優先日 平成11年8月13日(1999.8.13)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ユニバーシティー オブ ロチェスター
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ロチェ
スター ハイラン ビルディング 518 オ
フィス オブ テクノロジー トランスフ
アー

(72)発明者 ウー ジェイ . エイチ . デイビッド
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ピッツ
フォード フラミンガム レーン 21

(72)発明者 マンタラリス アサナスロス
イギリス国 ミドルセックス ハロー ケ
ントン リーガル ウェイ 4

(74)代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 三次元バイオリクターにおいて、骨髄から機能的な破骨細胞をエキスビオで産生する方法

(57)【要約】

本発明は、骨を吸収するよう機能する培養破骨細胞、およびそのような破骨細胞を生成させる方法を提供する。本発明は、造血細胞又は補助細胞を単離する段階、培養培地に覆われているか囲まれている足場を有するチャンパー内で造血細胞または補助細胞を培養し、該足場により、培養造血細胞または補助細胞の三次元での細胞間接触が可能となる段階、を含む。本発明の破骨細胞は、破骨細胞形成および/または破骨細胞機能を阻害または刺激する薬物をスクリーニングするために有用である。本発明の破骨細胞は、ある種の骨疾患の治療において、そして骨のリモデリングおよび再生において使用するためにも有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 造血細胞または補助細胞から破骨細胞を培養する方法であって、

造血細胞または補助細胞を単離する段階、および

培養培地に覆われているか囲まれている足場を有するチャンバー内で造血細胞または補助細胞を培養し、該足場により、培養造血細胞または補助細胞の三次元での細胞間接触が可能となる段階、を含む方法。

【請求項2】 造血細胞または補助細胞が、哺乳動物の造血細胞または補助細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項3】 哺乳動物の造血細胞または補助細胞が、ヒトの造血細胞または補助細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項4】 造血細胞または補助細胞が単核細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項5】 造血細胞または補助細胞が、骨髄細胞、間質細胞、末梢血細胞、幹細胞、臍帯細胞、胚幹細胞、末梢幹細胞、および、これらの細胞のいずれかの組み合わせからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項6】 足場が、絡み合った繊維、多孔性粒子、スポンジ、またはスポンジ様材料からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項7】 足場が、金属、ガラス、セラミック、プラスチック、ヒドロキシアパタイト、処理済みまたは未処理の骨、合成ポリマー、天然物質、および半合成物質からなる群より選択された材料から形成される、請求項1記載の方法。

【請求項8】 材料が分解性である、請求項7記載の方法。

【請求項9】 材料が非分解性である、請求項7記載の方法。

【請求項10】 培養培地が、1,25ジヒドロキシビタミンD3、1,25ジヒドロキシビタミンD3の生物活性型誘導体、破骨細胞分化因子、副甲状腺ホルモン、レチノイド、甲状腺ホルモン、ロイコトリエン、インターロイキン-1、インターロイキン-6、リンフォトキシン、腫瘍壊死因子、およびコロニー刺激因子-1を含む、請求項1記載の方法。

【請求項11】 骨を吸収する細胞を同定する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項12】 造血細胞または補助細胞をチャンバーに再接種する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項13】 請求項1記載の骨髄細胞から培養された破骨細胞。

【請求項14】 請求項1記載の方法によって培養された細胞。

【請求項15】 請求項1記載の方法によって培養された細胞を増殖させる段階、および該細胞を移植する段階を含む、骨を合成または改変する方法。

【請求項16】 造骨細胞および破骨細胞を一緒に移植する、請求項15記載の方法。

【請求項17】 造骨細胞および破骨細胞を連続して培養する、請求項15記載の方法。

【請求項18】 細胞を支持体上で増殖させる、請求項15記載の方法。

【請求項19】 細胞を支持体なしで増殖させる、請求項15記載の方法。

【請求項20】 破骨細胞の骨吸収能に影響を与える薬物をスクリーニングする方法であって、

造血細胞または補助細胞を単離する段階、

培養培地に覆われているか囲まれている足場を有する容器内で造血細胞または補助細胞を培養し、該足場により、培養造血細胞または補助細胞の三次元での細胞間接触が可能となる段階、

培養細胞を除去する段階、および

試験化合物存在下における破骨細胞の骨吸収能を測定する段階、を含む方法。

【請求項21】 培養細胞が単離された破骨細胞である、請求項20記載の方法。

【請求項22】 培養細胞が、培養液から得られた細胞混合物である、請求項20記載の方法。

【請求項23】 培養細胞が、培養液から分画された細胞である、請求項20記載の方法。

【請求項24】 ヒト破骨細胞の骨吸収能が強化される、請求項20記載の方

法。

【請求項25】 ヒト破骨細胞の骨吸収能が低下する、請求項20記載の方法

。

【請求項26】 造血細胞または補助細胞が、哺乳動物の造血細胞または補助細胞である、請求項20記載の方法。

【請求項27】 哺乳動物の造血細胞または補助細胞が、ヒトの造血細胞または補助細胞である、請求項26記載の方法。

【請求項28】 造血細胞または補助細胞が単核細胞である、請求項20記載の方法。

【請求項29】 造血細胞または補助細胞が、骨髄細胞、間質細胞、末梢血細胞、および、これらの細胞のいずれかの組み合わせからなる群より選択される、請求項20記載の方法。

【請求項30】 足場が、絡み合った繊維、多孔性粒子、スポンジ、またはスポンジ様材料からなる群より選択される、請求項20記載の方法。

【請求項31】 足場が、合成ポリマー、天然物質、および半合成物質からなる群より選択された材料から形成される、請求項20記載の方法。

【請求項32】 材料が分解性である、請求項31記載の方法。

【請求項33】 材料が非分解性である、請求項31記載の方法。

【請求項34】 培養培地が、1,25ジヒドロキシビタミンD₃、またはその生物活性型誘導体を含む、請求項20記載の方法。

【請求項35】 骨を吸収する細胞を同定することによって、破骨細胞を同定する段階をさらに含む、請求項20記載の方法。

【請求項36】 造血細胞または補助細胞をチャンバーに再接種する段階をさらに含む、請求項20記載の方法。

【請求項37】 骨を吸収する単離破骨細胞。

【請求項38】 破骨細胞がカルシトニン受容体をもつ、請求項37記載の破骨細胞。

【請求項39】 破骨細胞が酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを発現する、請求項37記載の破骨細胞。

【請求項40】 破骨細胞が遺伝子の塩基配列によって形質転換されている、請求項37記載の単離破骨細胞。

【請求項41】 遺伝子の塩基配列が、破骨細胞の由来する生物種とは異種のものである、請求項40記載の単離破骨細胞。

【請求項42】 遺伝子の塩基配列が、破骨細胞の由来する本来の生物種のものである、請求項37記載の単離破骨細胞。

【請求項43】 塩基配列が破骨細胞分化因子をコードしている、請求項41または42記載の単離破骨細胞。

【請求項44】 破骨細胞の形成または機能に関連する遺伝子を同定する方法であって、

(a) 造血細胞または補助細胞を単離する段階、

(b) 培養培地に覆われているか囲まれている足場を有するチャンバー内で造血細胞または補助細胞を培養し、該足場により、培養造血細胞または補助細胞の三次元での細胞間接触が可能となる段階、

(c) 試験培養物の培養条件を一つ以上変更する段階、

(d) 試験試料における破骨細胞の数および機能を測定する段階、ならびに

(e) 試験試料における破骨細胞の数および機能の変化に関連する遺伝子(単数または複数)をスクリーニングする段階、を含む方法。

【請求項45】 TRAP陽性細胞を数えることによって破骨細胞数を測定する、請求項44記載の方法。

【請求項46】 骨吸収測定法(bone resorption assay)によって破骨細胞機能を測定する、請求項44記載の方法。

【請求項47】 破骨細胞の数および機能の変化に関連する遺伝子(単数または複数)のスクリーニング法が、遺伝子のディファレンシャルディスプレイ法、RNA任意プライミング(arbitrarily primed)(RAP)-PCR法、または遺伝子マイクロアレイ分析のうち少なくとも一つ以上の方法である、請求項44記載の方法。

【請求項48】 破骨細胞形成に作用する薬物をスクリーニングする方法であって、

(a) 造血細胞または補助細胞を単離する段階、

(b) 培養培地に覆われているか囲まれている足場を有する容器またはチャンパー内で造血細胞または補助細胞を培養し、該足場により、培養造血細胞または補助細胞の三次元での細胞間接触が可能となる段階、

(c) 試験化合物をバイオリクターに添加する段階、

(d) 培養細胞を除去する段階、および、

試験化合物の破骨細胞形成に対する影響力を測定する段階、を含む方法。

【請求項49】 破骨細胞数の計数、TRAP染色、骨吸収測定、またはこれらを併用した方法によって、試験化合物の破骨細胞形成に対する影響力を測定する、請求項48記載の方法。

【請求項50】 培養細胞が単離された破骨細胞である、請求項48記載の方法。

【請求項51】 培養細胞が、培養液から得られた細胞混合物である、請求項48記載の方法。

【請求項52】 培養細胞が培養液から分画される、請求項48記載の方法。

【請求項53】 試験化合物の効果が、破骨細胞形成を刺激するものである、請求項48記載の方法。

【請求項54】 試験化合物の効果が、破骨細胞形成を阻害するものである、請求項48記載の方法。

【請求項55】 造血細胞または補助細胞が、哺乳動物の造血細胞または補助細胞である、請求項48記載の方法。

【請求項56】 哺乳動物の造血細胞または補助細胞が、ヒトの造血細胞または補助細胞である、請求項48記載の方法。

【請求項57】 造血細胞または補助細胞が単核細胞である、請求項48記載の方法。

【請求項58】 造血細胞または補助細胞が、骨髄細胞、間質細胞、末梢血細胞、および、これらの細胞のいずれかの組み合わせからなる群より選択された、請求項48記載の方法。

【請求項59】 足場が、絡み合った繊維、多孔性粒子、スポンジ、またはスポンジ様材料からなる群より選択される、請求項48記載の方法。

【請求項60】 足場が、合成ポリマー、天然物質、および半合成物質からなる群より選択された材料から形成される、請求項48記載の方法。

【請求項61】 材料が分解性である、請求項60記載の方法。

【請求項62】 材料が非分解性である、請求項60記載の方法。

【請求項63】 培養培地が、1,25ジヒドロキシビタミンD₃、またはその生物活性型誘導体を含む、請求項48記載の方法。

【請求項64】 造血細胞または補助細胞をチャンバーに再接種する段階をさらに含む、請求項48記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本出願は、原初、1999年8月13日に米国仮出願第60/148,814号として出願されたものである。

【0002】

本明細書に記載された発明は、国立科学財団の契約番号BES-963160による支援の下、米国政府と共同してなされたものである。従って、本発明は、米国政府の権利にも属する。

【0003】

本発明の属する技術分野

本発明は、細胞培養の技術分野に関するものであり、特に、培養破骨細胞に関連した方法および組成物に関する。

【0004】

本発明の背景

骨は、カルシウム塩の沈着によって強化される有機基質からなる。この有機基質の95%はI型コラーゲンから構成され、残りの5%は、プロテオグリカンおよび数多くの非コラーゲンタンパク質から構成されている。細胞の制御下にある骨有機基質内に沈着する結晶塩は、主に、ヒドロキシアパタイトの形になったカルシウムとリン酸である[2]。

【0005】

骨は、また、少なくとも4種類の異なった細胞型をもつ。造骨細胞、破骨細胞、および骨管壁細胞 (bone lining cells) が骨の表面に存在するのに対し、骨細胞は鉱化した内部に浸透して行く。破骨細胞は、骨基質を発生させる完全に分化した細胞である。破骨細胞は、典型的なタンパク質産生細胞であり、I型コラーゲン、および骨基質の非コラーゲンタンパク質を分泌する。また、破骨細胞は、また、その機構は完全に分かってはいないが、骨基質の鉱質化を調節している[2]。骨細胞は、骨基質内に存在する成熟した造骨細胞であり、骨基質の維持を担っている。これらの細胞は、基質を合成することができるばかりでなく、一定の限度で基質を吸収することもできる[3]。骨の管壁細胞は、平坦で長く伸びた

不活性型細胞で、骨形成も骨吸収も起こらない骨表面を覆っている。これらの細胞の機能についてはほとんど解っていないが、骨管壁細胞が造骨細胞の前駆細胞であるかもしれないと推測されている[2]。

【0006】

破骨細胞は、骨吸収を行なう巨大な多核細胞である。骨吸収および骨形成は、生体において、正常な骨形態形成およびカルシウム恒常性にとって必須の過程である。その生理学的な役割以外にも、骨吸収は、骨粗鬆症、代謝性骨疾患、骨折、および悪性高カルシウム血症などの病理障害において重要な役割を果たしている。

【0007】

骨吸収を行なうとき、破骨細胞は、骨に直接接触する広範に嵌合した絨毛突起からなる波状縁によって規定される極性を示す。破骨細胞は、直径が40~100 μm で、細胞当たり10~20個もの核をもつことがある[5]。活性型破骨細胞は、大量のミトコンドリア、リソソーム、および十分に発達したゴルジ装置をもつ。また、これらの細胞は移動性細胞で、骨吸収の過程で骨性表面を頻繁に移動する[6]。

【0008】

破骨細胞はマクロファージ系譜から派生する。そのため、造血幹細胞ファミリーの一員である。破骨細胞形成を調節する経路では、あらゆるマクロファージ細胞の分化で見られる初期段階の多くが利用される。最近の報告では、骨髄およびBリンパ球の転写因子であるPU.1が、破骨細胞形成に重要な役割を果たしていることが示されている[7]。転写因子であるc-fosおよびc-srcも、破骨細胞形成に関与している[8]。この他の動物およびヒトにおける変異も、破骨細胞経路を明らかにしてきた。特に、破骨細胞微小環境下内で間質細胞によるコロニー刺激因子1(CFS-1)の産生が障害されると、破骨細胞とマクロファージがなくなる[9]。

【0009】

補助細胞形成は、骨吸収過程における最初の段階ではない。特定の部位への細胞補充、骨への細胞付着、鉍質除去と基質分解、運動性およびアポトーシスが、

吸収過程の一部として生じる過程のすべてである。原型となる骨吸収刺激因子（副甲状腺ホルモン、ビタミンD₃、多くのインターロイキン、甲状腺ホルモン、腫瘍壊死因子など）が骨吸収を間接的に刺激することが現在では知られている。このことは、破骨細胞上にはこれらの分子に対する受容体がないことを意味している。むしろ、通常、破骨細胞や間質細胞の管壁細胞である補助細胞が、吸収シグナルを受容して、次に、前破骨細胞の分化の最終段階を促進刺激する可溶性因子を産生する[10]。

【0010】

破骨細胞に吸収する場所を教えるシグナルは間違っ規定されている。しかし、インテグリン受容体の役割は十分に規定されてからなり、オステオポンチンやコラーゲンのような骨基質分子に対して高い特異性を示す。インテグリンファミリーで広く発現されているサブユニット対である $\alpha_v\beta_3$ は、破骨細胞上に存在する。直接観察したところ、 $\alpha_v\beta_3$ による干渉を受けると、骨への破骨細胞の付着が抑止され、骨吸収が阻害されることが分かった[6]。破骨細胞は、裸出した骨表面上に確立されると、その方向に極性化するようになる。波状縁や透明帯などの特別なオルガネラ構造体が出現する。波状縁は、広い表面積を提供し、そこを通して破骨細胞が骨と相互作用できるようになっている、高度に嵌合した絨毛突起構造である。骨の無機基質が溶解すると、骨吸収の経路において除去される必要がある有機基質のコラーゲンと非コラーゲン性タンパク質が露出する。酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）は、骨基質分解に関与すると考えられている、破骨細胞の重要な酵素である。TRAPは、オステオポンチン蛋白質を脱リン酸化することができる[11]。

【0011】

破骨細胞を単離することは、かなり難しい。[15]この難しさは、他の骨細胞の種類より破骨細胞の数が低く、破骨細胞が骨基質へ付着する傾向、および他の骨細胞との比較による破骨細胞の脆弱性のために生じる。破骨細胞は、ネズミ造血性細胞の従来のフラスコ培養でうまく生成される。破骨細胞の超微細構造的特徴を持つ多核性細胞（MNC）を説明した最初の報告は、MNCをネコの骨髄細胞の長期間培養で生成した[3]。その後、多くの研究者がこの骨髄培養系を他の動物種、

並びにヒトに対して広げ、応用した。これらの培養物中で形成されるMNCは、多核性、TRAP活性、およびホルモン応答性のような破骨細胞の特徴を有する。しかし、いくつかの場合において、特にヒトの骨髄培養物において、形成されたMNCは、骨を吸収する能力を持たなかった。

【0012】

これらの障害にうち勝つために、研究者らは、骨巨細胞腫のような骨の巨大細胞腫瘍を、別の方法では硬い骨基質から抽出できない成熟ヒト破骨細胞の供給源として用いている[16]。これらの細胞は、新生物細胞型ではなく、正常な表現型および機能を有している。にもかかわらず、骨巨細胞腫のような骨の巨大細胞腫瘍は、破骨細胞の発生の研究と臨床応用における破骨細胞の使用に關しての本来の限界のある癌細胞系である。

【0013】

最近、マウスの可溶性破骨細胞分化因子 (sODF) が、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) 培養からの機能的な破骨細胞を生成するために使用されている[17]。ODFは、通常破骨細胞/間質細胞の生体膜において発現しており、破骨細胞発生抑制因子 (OCIF) のリガンドである。M-CSFのPBMC培養物への添加はまた、破骨細胞発生などのために必須であった。さらに、デキサメタゾンもまた、付着性細胞群の培養では必要ではないが、ヒトPBMC培養で破骨細胞の形成に必要とされていた。

【0014】

本発明は、骨髄で見出されるような造血性または補助細胞から機能的な破骨細胞を生成するための方法と手段を提供する。機能的な破骨細胞は、骨髄の微小な環境を模倣する三次元バイオリアクターで、インビボの条件から逸脱する添加物の必要がなく生成される。

【0015】

本発明の概要

本発明は、造血細胞または補助細胞から機能的な破骨細胞を産生する方法を提供するものである。便利なことに、造血細胞または補助細胞は、骨髄細胞、間質細胞、末梢性細胞、幹細胞、臍帯細胞、胚幹細胞、末梢幹細胞、またはこれらの細胞を組み合わせたものから単離したり、派生させることができる。本方法は、

造血細胞または補助細胞を単離し、培養培地に覆われているか囲まれている足場を有するチャンバー内で造血細胞または補助細胞を培養することを含む。この足場により、造血細胞または補助細胞の三次元での細胞間接触が可能となる。

【0016】

造血細胞または補助細胞は、好ましくは、哺乳動物の造血細胞または補助細胞である。より好ましい実施態様では、哺乳動物の造血細胞または補助細胞は、ヒトの造血細胞または補助細胞である。

【0017】

本発明によれば、造血細胞または補助細胞は、細胞試料から成熟赤血球を取り除いた後に残る細胞である単核細胞でもよい。また、本発明によれば、造血細胞または補助細胞は、骨髄細胞、間質細胞、末梢血細胞、幹細胞、臍帯細胞、胚幹細胞、末梢幹細胞、および、これらの細胞のいずれかを組み合わせたものから選択される。

【0018】

チャンバーまたは容器で使用される足場は、絡み合った繊維、多孔性粒子、スポンジ、またはスポンジ様材料からできていよう。この足場は、合成ポリマー、天然物質、および半合成物質からなる群より選択された材料から形成されていて、分解性でも非分解性でもよい。

【0019】

本発明によれば、生体内での骨髄環境に存在しない添加物を加えることなしに、破骨細胞が産生される。しかしながら、望ましい場合には、例えば、1,25ジヒドロキシビタミンD₃、その生物活性型誘導体、および/または、IL-1、TNF、CSF-1、IL-6、リンフォトキシン、破骨細胞分化因子、副甲状腺ホルモン、レチノイド、甲状腺ホルモン、およびロイコトリエンなどの他のコロニー刺激因子を培養培地に添加することもできる。

【0020】

また、本発明は、造血細胞または補助細胞を単離し、培養培地に覆われているか囲まれている足場を有するチャンバー内で造血細胞または補助細胞を培養し、さらに、骨を吸収する細胞を同定することによって、造血細胞または補助細胞が

ら機能的な破骨細胞を産生する方法を提供する。

【0021】

さらに、造血細胞または補助細胞を単離し、培養培地に覆われているか囲まれている足場を有するチャンバー内で造血細胞または補助細胞を培養し、さらに、造血細胞または補助細胞をチャンバーに再接種することによって、造血細胞または補助細胞から機能的な破骨細胞を産生する方法が提供される。

【0022】

本発明に係る方法に従って作製された、造血細胞および/または補助細胞から培養された補助細胞も提供されている。このような破骨細胞は、骨再生、骨合成、骨改変、および骨改造などの骨工学において使用することができる。このように、本発明によって、造血細胞または補助細胞を単離する段階、培養培地に覆われているか囲まれている足場を有するチャンバー内で造血細胞または補助細胞を培養し、該足場により、造血細胞または補助細胞の三次元での細胞間接触を可能にする段階、そして、支持体によって、または支持体なしで細胞を移植する段階からなる骨工学法が提供される。破骨細胞は、造血細胞などの他の骨細胞とともに、またはそれに連続して移植することができる。

【0023】

本発明は、また、破骨細胞の骨吸収能に影響を与える薬物をスクリーニングする方法も提供する。この方法は、造血細胞または補助細胞を単離する段階、培養培地に覆われているか囲まれている足場を有するチャンバーまたは容器内で造血細胞または補助細胞を培養し、該足場により、造血細胞または補助細胞の三次元での細胞間接触が可能となる段階、培養細胞を除去する段階、および、被検化合物存在下で破骨細胞の骨吸収能を測定する段階を含む。本方法によれば、ヒト破骨細胞の骨吸収能を強化または低下させる薬物を同定できる。造血細胞または補助細胞は、哺乳動物の造血細胞または補助細胞でもよい。

【0024】

好ましい実施態様において、哺乳動物の造血細胞または補助細胞は、ヒトの造血細胞または補助細胞であろう。

【0025】

破骨細胞による骨吸収能に影響を与える薬物をスクリーニングする方法において使用する培養培地は、所望の場合には、1,25ジヒドロキシビタミンD₃、またはその生物活性型誘導体を含有する。さらに、破骨細胞による骨吸収能に影響を与える薬物をスクリーニングする方法において使用するためのチャンバーまたは容器には、造血細胞または補助細胞を再接種することもできる。

【0026】

また、本発明では、骨を吸収する、単離された破骨細胞が提供されている。好ましい実施態様において、単離された破骨細胞はカルシトニン受容体を有する。別の好ましい実施態様において、破骨細胞は、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを発現する。培養破骨細胞は、反応中の破骨細胞に関係するさまざまな条件を扱う上で有用である。遺伝子の塩基配列によって、対象となる破骨細胞を形質転換することができる。

【0027】

破骨細胞の形成または機能に関連する遺伝子を同定する方法も提供される。この方法は、造血細胞または補助細胞を単離する段階、培養培地に覆われているか囲まれている足場を有するチャンバー内で造血細胞または補助細胞を培養し、該足場によって、造血細胞または補助細胞の三次元での細胞間接触を可能にする段階、被検培養物の培養条件を一つ以上変更する段階、被検試料における破骨細胞の数と機能を測定する段階、および、被検試料における破骨細胞の数と機能の変化に関連する遺伝子をスクリーニングする段階を含む。遺伝子は、例えば、ディファレンシャル遺伝子ディスプレイ法、RNA任意プライミング (arbitrarily primed) (RAP)-PCR法、または遺伝子マイクロアレイ分析など、さまざまな公知の方法を用いてスクリーニングすることができる。

【0028】

また、本発明は、破骨細胞形成に影響する薬物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、造血細胞または補助細胞を単離する段階、培養培地に覆われているか囲まれている足場を有する容器またはチャンバー内で造血細胞または補助細胞を培養し、該足場によって、造血細胞または補助細胞の三次元での細胞間接触を可能にする段階、被検化合物をバイオリクターに添加する段階、培養

細胞を除去する段階、および、被検化合物の破骨細胞形成に対する影響力を測定する段階を含む。

【0029】

発明の詳細な説明

本発明は、造血性細胞または補助細胞由来の破骨細胞の培養法を提供する。方法は、造血性細胞および/または補助細胞を単離すること、並びに造血性細胞および/または補助細胞が三次元空間において細胞から細胞へ接触することを考慮した、培養培地で覆われたまたは取り囲まれた足場を持つチャンバーまたは容器においてこのような細胞を培養することを含む。本発明の方法によって生成される破骨細胞が骨を吸収するために機能することは驚くべき発見である。

【0030】

本明細書で使用される「造血性細胞」という用語は、血液細胞および造血細胞を意味し、例えば、幹細胞、骨髄細胞、リンパ球、赤血球細胞、始原細胞、前駆細胞、並びに赤血球、好中球、単球、マクロファージ、好酸球、好塩基球、巨核球、血小板、ナチュラルキラー細胞、T細胞、B細胞、および形質細胞のような成熟血液細胞を含んでもよい。本明細書で使用される「補助細胞」は、間質細胞のような本質的には非造血性である任意の細胞を含む。本明細書で使用される「間質細胞」は、また、内皮細胞、網様細胞、脂肪細胞、および樹状細胞のような専門の抗原提示細胞などの細胞を含む。造血性細胞または補助細胞は、例えば骨髄細胞、間質細胞、末梢血細胞、幹細胞、臍帯細胞、胚性幹細胞、末梢幹細胞、もしくはこれらの細胞の任意の組み合わせのような多くの様々な供給源から単離されてもよい。

【0031】

本発明により、バイオリクターシステムと機能的な破骨細胞を生成する方法が提供される。本明細書で使用される「機能的な破骨細胞」とは、骨を吸収するために機能する破骨細胞を意味する。本発明のバイオリクターは、天然の細胞外マトリックスと表面積が広い骨髄を模倣する三次元構造を提供し、組織のような細胞密度で細胞から細胞への相互作用を可能にする。本発明のバイオリクターが、三次元構造を提供する限り多くの異なる配置をとってもよいことが理解さ

れる。バイオリクターに関して、「三次元構造」という用語は、「足場」という用語と相互互換的に使用される。

【0032】

機能的な破骨細胞を生成する際に使用するバイオリクターは、少なくとも1つのチャンバーまたはセクションと、そこに位置する足場とを持つ容器または器(vessel)を含む。足場は、多孔性または繊維性基質から作成される。培地は多孔性もしくは繊維性基質の上または周囲に配置される。

【0033】

図1aは、機能的な破骨細胞を生成するために使用されるバイオリクターの1つの可能な配置を図示している。図1において、多孔性または繊維性の足場がより低い培養チャンバーに置かれている。本発明のバイオリクターが、三次元構造(足場)を提供する限り多数の配置を有することができる。

【0034】

容器または器の壁はガラス、セラミック、プラスチック、ポリカーボネート、ビニル、塩化ビニル(PVC)、金属等のような任意の多数の物質を含んでもよい。造血性および/または補助細胞の機能的な破骨細胞への成長および分化を支持すると考えられる培養培地を多孔性または繊維性物質の上および/または周囲に置く。

【0035】

多くの異なる多孔性または繊維性物質を、例えば絡み合った繊維、多孔性粒子、スポンジ、またはスポンジ様物質を、バイオリクターの足場として使用してもよい。多孔性または繊維性足場は、造血性および/または補助細胞を増殖させ、かつ分化へと移行させる。限定するものではなく、例を挙げるためのものであるが、適当な足場の基質は、多糖類および繊維タンパク質のような天然ポリマー、ポリアミド(ナイロン)、ポリエステル、ポリウレタンのような合成ポリマー、セラミック、および金属、サンゴ、ゼラチン、ポリアクリルアミド、綿、ガラス繊維、カラゲナン(carrageenans)、およびデキストランを含む無機物を含む幅広く様々な材料を用いて調製することができる。絡み合った繊維の例としては、ガラスウール、スチールウール、および針金もしくはメッシュを含む。

【0036】

多孔性粒子の例には、例えば、ビーズ（ガラス、プラスチック等）、セルロース、寒天、ヒドロキシアパタイト、処理済みもしくは未処理の骨、コラーゲン、セファクリル、セファデックス、セファロース、アガロース、またはポリアクリルアミドのようなゲルを含む。「処理済み」の骨は、例えば酸性またはアルカリ性の溶液のような異なる化学薬品にさらされてもよい。このような処理は、骨の多孔性を変える。所望であれば、基質を、例えば、コラーゲン、マトリゲル（matrigel）、フィブロネクチン、ヘパリン硫酸、ヒアルロンおよびコンドロイチン硫酸、ラミニン、ヘモネクチン（hemonectin）、もしくは、プロテオグリカンなどの細胞外マトリックスまたは細胞外マトリックス群で覆ってもよい。

【0037】

バイオリアクターの足場として用いられる繊維性または多孔性物質は、造血性および/または補助細胞が進入する開口部または孔を形成する。一旦進入すると、細胞は繊維性もしくは多孔性物質の孔に入るか、もしくはこれらの物質に付着し、その上に定着、および/または凝集する。細胞の吸着と定着は、多孔性もしくは繊維性基質の上に重層する、および/または取り囲む培養培地に、単に細胞を播種することによって起こる。細胞の付着と定着は、多孔性もしくは繊維性基質の上へ直接細胞を播種することによっても起こる。

【0038】

本発明により、造血性および/または補助細胞は繊維性もしくは多孔性物質の開口部（孔）に入ることができなければならない。当業者は、異なる大きさの造血性および補助細胞を認識しており、それによってこのような細胞を収容することが必要とされる孔の大きさを認識している。一般的には、約15ミクロンから約1000ミクロンまでの大きさの孔を用いることができる。好ましくは、約100ミクロンから約300ミクロンまでの大きさの孔を用いる。

【0039】

好ましい態様では、メンブレンはガス交換を容易にするためにバイオリアクターに配置される。メンブレンはガス透過性であり、約10から約100 μm までの厚さを有してもよい。より好ましい態様では、メンブレンは約50 μm の厚さを有する

。メンブレンは、チャンバーまたは容器の底または側面の開口部の上に置かれる。バイオリアクターからの培地およびの細胞の過剰な漏出を防ぐために、ガスケットは、開口部、および/または開口部および固定されたアセンブリーの下もしくは横側に置かれた固体プレートの周囲に配置される。

【0040】

バイオリアクターに用いられる細胞培地は、骨髄細胞の成長と分化、特に、造血性および/または補助細胞の機能的な破骨細胞への成長と分化を支持するために用いられる幅広く知られている培地のいずれかであってよい。例えば、以下の典型的な培地は、使用され、所望であれば、ビタミンおよびアミノ酸溶液、血清、ならびに/または抗生物質を補充される：フィッシャー培地 (Fisher's medium) (Gibco)、イーグル基本培地 (Basal Media Eagle) (BME)、ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Media) (D-MEM)、イスカブス改変ダルベッコ培地 (Iscoves's Modified Dulbecco's Media)、最小必須培地 (MEM)、マッコイ5A培地 (McCoy's 5A Media)、およびRPMI培地。

【0041】

特殊化された培地、例えば、MyeloCult(商標) (Stem Cell Technologies)、およびOpti-Cell(商標) (ICN Biomedicals) のような培地を用いてもよい。所望であれば、血清を含まない培地、例えば、StemSpan SFEM (商標) (StemCell Technologies)、StemPro 34 SFM (Life Technologies) およびMarrow-Gro (Quality Biological Inc.) のような培地を用いてもよい。

【0042】

好ましい態様では、マッコイ5A培地 (Gibco) をビタミンとアミノ酸溶液を補充し、約70% v/vで用いる。さらにより好ましい態様では、培養培地は、約70% (v/v) マッコイ5A培地 (Gibco)、約 1×10^{-6} M ヒドロコルチゾン、約50ug/ml ペニシリン、約50mg/ml ストレプトマイシン、約0.2mM L-グルタミン、約0.45% 炭酸水素ナトリウム、約1x MEM ピルビン酸ナトリウム、約1x MEM ビタミン溶液、約0.4x MEM アミノ酸溶液、約12.5% (v/v) 熱失活ウマ血清、および約12.5% 熱失活FBSを含む。所望であれば、培地用チャンバーを連続して灌流してもよい。

【0043】

バイオリアクターは、造血性および/または補助細胞で、バイオリアクターの三次元の足場部分へ穏やかに添加すること、例えば、ピペティングによって播種される。または、造血性および/または補助細胞が三次元の足場を覆うおよび/または取り囲む培地に添加してもよい。細胞は、足場を構成する多孔性または繊維性物質に定着または移動すると思われる。バイオリアクターに添加された細胞の数は、三次元の足場の総面積および培養培地の総体積に依存する。好ましくは、造血性および/または補助細胞は、本明細書において包括的に述べられている供給源のいずれかから単離され、フィコール/ブラークのような勾配によって遠心分離し、成熟した赤血球細胞を除去し、単核細胞を得る。

【0044】

高さ約3/16''、幅約5/16''、長さ約5/16''の培養チャンバーを備え、約0.01gの多孔性または繊維性基質で充填されたバイオリアクターについて、バイオリアクターに添加された単核細胞の数は、約 10^4 個から 10^9 個あたりの単核細胞であってよい。好ましくは、 $4 \sim 6 \times 10^6$ 細胞をバイオリアクターに播種するために用いてもよい。これらの指針を用いて、当業者は、三次元の足場の総面積、培地の総体積、三次元の足場の種類、並びに造血性および/または補助細胞の供給源に依存してバイオリアクターに播種するために、用いる細胞数を調整することができる。

【0045】

好ましくは、培養培養は、2日毎に培地を与える。様々な他の成分を、破骨細胞の成長と分化をさらに刺激するために、培地に添加してもよい。従って、例えば、ビタミンD3 (1,25 ジヒドロキシビタミン D3)、1,25 ジヒドロキシビタミン D3の生物活性型誘導体、破骨細胞分化因子、副甲状腺ホルモン (PTH)、レチノイド、甲状腺ホルモン、ロイコトリエン、インターロイキン-1、インターロイキン-6、リンフォトキシン、腫瘍壊死因子、およびコロニー刺激因子-1を培地に添加してもよい。

【0046】

好ましい態様において、ビタミンD3は、破骨細胞の増殖、分化、および機能を刺激するために使用される。細胞培養物を、数日から数週間、任意の時間で増殖

させる。好ましくは、約3週間後に培養物を採集する。破骨細胞形成の阻害の可能性を回避するため、ヒドロコルチゾンも、好ましくは、約1~3週間、培養培地から除去される。

【0047】

細胞は、多数の周知の方法で採集されうる。接着細胞を放出するためには、チャンバーを、コラゲナーゼのような任意の適当な薬剤で処理することができる。非接着細胞を培地中へ放出することによって、収集することができる。振とう、攪拌等のような物理的手段によって、細胞を基質から除去することもできる。その後、例えばピペティング又は遠心分離のような当技術分野において既知の任意の手法を使用して、細胞を収集する。好ましくは、非接着性細胞を、穏和な攪拌、および多孔質又は繊維性の材料の層との混合により放出させ、次いで遠心分離又は沈降により収集する。

【0048】

所望であれば、周知のポジティブ選択法を使用して、バイオリアクターから収集された細胞試料を、破骨細胞に関して、さらに濃縮することができる。従って、例えば、破骨細胞と結合する抗体が接合している（ビーズのような）固体支持体を、細胞試料と混合することができる。次いで、破骨細胞が結合した抗体接合ビーズを、重力、又は磁性ビーズの場合であれば磁石のようなその他の手段により収集する。

【0049】

バイオリアクターから取り出された細胞試料中の破骨細胞集団を濃縮する手段として、ネガティブ選択を使用することもできる。ネガティブ選択スキームでは、破骨細胞以外の細胞と反応する1個以上の抗体が接合している（ビーズのような）固体支持体を、細胞試料と混合することができる。次いで、破骨細胞以外の細胞が結合した抗体接合ビーズを、重力、又は磁性ビーズの場合であれば磁石のようなその他の手段により収集する。

【0050】

ポジティブ選択においてもネガティブ選択においても、破骨細胞は、大きさに基づく濾過によりさらに単離されうる。しかしながら、本発明によると、バイオ

リアクターから取り出された細胞試料は、さらに濃縮することなく、多くの異なる臨床および薬物スクリーニングの現場で使用されうる機能性破骨細胞を含む。

【0051】

破骨細胞は、例えば多核性、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 活性、カルシトニン (CT) 受容体の存在、並びに1,25-ジヒドロキシビタミンD₃ [1,25(OH)₂D₃]、副甲状腺ホルモン (PTH) を含むホルモン、およびある種のサイトカインに対する応答性のような、周知の特徴を使用して同定されうる。

【0052】

本発明の方法により作製された破骨細胞は、骨を吸収するように機能する。本発明の方法により作製された破骨細胞の骨吸収能は、象牙質を使用した、Jones et al.1986 Scanning Electron.Micros.4:1571-1580およびBoyde et al.Scanning Electron.Micros.3:1259-1271に記載されたアッセイ法、又は骨を使用した、Chambers et al.1985 Endocrinology 116:234-239およびChambers et al.1984 J. Cell Sci.66:383-399に記載された方法のような周知の骨吸収アッセイ法を使用して、アッセイされうる。本発明の培養破骨細胞に関して使用するのに特に適した骨吸収アッセイ法は、本明細書の実施例7に記載されている。

【0053】

本発明の培養破骨細胞は、治療および医薬産業における無数の用途を有する。例えば、本発明の破骨細胞は、破骨細胞形成又は破骨細胞機能、例えば骨吸収活性を阻害又は刺激する薬物をスクリーニングするために使用されうる。本明細書において使用される、「破骨細胞形成」とは、造血幹細胞ファミリーからの破骨細胞の派生を意味する。「骨吸収」又は「骨吸収活性」とは、細胞動員、細胞の骨への付着、鉱質除去およびマトリックス分解、運動、およびアポトーシスのような骨吸収における任意の段階を意味する。

【0054】

現在、様々な疾患が、過小反応性又は過剰反応性の破骨細胞と関連していることが知られている。例えば、骨粗鬆症は、過剰量の骨が吸収され、破骨細胞が過剰反応性である状態である。従って、本発明のアッセイ法により同定された破骨細胞形成又は骨吸収の阻害剤は、骨粗鬆症のような過剰反応性破骨細胞と関連し

た疾患の治療に有用である。

【0055】

ある種の型の転移性癌、例えば乳癌および前立腺癌において、癌細胞は、原発腫瘍から移動し、骨内に滞留する。破骨細胞による骨吸収を阻害することにより、骨病巣を減少させ、そのような病巣から骨に侵入する癌細胞の発生率を減少させることが可能である。

【0056】

大理石骨病のような様々な疾患状態が、過小反応性破骨細胞により引き起こされると考えられている。そのような疾患は、本発明のアッセイ法により、破骨細胞形成又は骨吸収の刺激因子として同定された薬物により治療されうる。

【0057】

従って、本発明により、破骨細胞形成又は破骨細胞の骨吸収能に影響を与える薬物をスクリーニングする方法が提供される。本明細書において使用される、「薬物」又は「試験化合物」には、破骨細胞形成又は破骨細胞機能を阻害又は刺激する能力を有する任意の因子、分子、化学化合物、ホルモン、増殖因子、ヌクレオチド配列（オリゴヌクレオチドを含む）、タンパク質（ペプチドを含む）、および試薬が含まれる。

【0058】

破骨細胞の機能、例えば骨吸収に影響を与える薬物の典型的なスクリーニングアッセイ法においては、培養破骨細胞を、バイオリアクターから取り出し、破骨細胞の生存を維持するための十分な培養培地又は緩衝溶液を有するペトリ皿、フラスコ、顕微鏡スライド、マイクロタイター皿等に置く。最終的には、破骨細胞の機能を阻害又は刺激する薬物が作用するであろう場所であるため、液体培地は、好ましくは、生体の骨環境を模倣すべきである。好ましくは、pHは約7.2に、温度は約37℃に維持される。所望であれば、スクリーニングアッセイ中、本発明の培養破骨細胞を、ヒト生体を模倣する環境で、骨又は象牙質試料の上に置くこともできる。スクリーニングアッセイ法において使用されうる破骨細胞の数は、経験に基づく。典型的には、細胞試料中の破骨細胞の数に応じて、全部で 1×10^6 個の細胞を含有する試料が使用されうる。

【0059】

細胞試料中の破骨細胞の他の細胞に対する相対数は、顕微鏡下で多核の巨細胞を計数することにより決定されうる。TRAP染色法、骨吸収アッセイ法、又はそれらの組み合わせを、実施することもできる。細胞計数の方法は、当技術分野において周知であり、また実施例4にも記載されている。試験化合物、即ち破骨細胞活性の可能性のある阻害剤又は刺激剤としてスクリーニングされる薬物の濃度は、経験に基づく。当業者であれば、スクリーニングアッセイ法において試験化合物の効果を最も良好に同定するため、異なる組成物の濃度を調整する方法に精通している。典型的には、ある濃度範囲が使用され、その範囲のうち、破骨細胞の生存率に対する重度の有害効果を示す部分が、さらなる研究から排除される。その範囲のうち、破骨細胞の生存率に対する有害効果が比較的少ない部分が同定され、破骨細胞形成、破骨細胞活性、又は破骨細胞機能性に対する阻害又は刺激効果のさらなる研究のために使用される。

【0060】

破骨細胞と試験化合物との混合物を、骨吸収活性の阻害又は刺激が起こるために十分な時間と条件の下でインキュベートする。本明細書において定義される、十分な時間とは、約5分から数時間、又はそれ以上の任意の時間でありうる。破骨細胞をペトリ皿、フラスコ、顕微鏡スライド、マイクロタイター皿等で試験する場合、十分な時間は、数分から数時間でありうる。当然、細胞に対する効果を観察するため、必要に応じて試験時間を延長することもできる。当業者は、試料を取り出し、細胞の生存率を顕微鏡で検査することにより、スクリーニングアッセイ法を実施するための最適な時間を決定することができる。次いで、骨吸収に対する薬物の効果を決定するための骨吸収アッセイ法が実施されうる。破骨細胞を骨又は象牙質上で直接試験する場合、骨吸収活性の阻害又は刺激のための十分な時間は、延長されうる。例えば、試験時間は、数日から約10日、又はそれ以上でありうる。

【0061】

反応において使用するための好ましい緩衝液は、1×非必須アミノ酸、1×L-グルタミン、10%FBS、50U/mlペニシリン、および50µg/mlストレプトマイシンが

補充された非フェノールレッド含有MEMである。好ましい態様において、試験反応容量は、約0.5mlから約2mlの間である。より好ましい態様において、反応容量は、約1mLである。好ましい態様において、インキュベーション温度は、およそ37である。

【0062】

本発明によると、好ましくは、試験化合物が破骨細胞に添加されないことを除き、試験アッセイ法と同様に培養破骨細胞が処理される対照アッセイ法が、実施される。試験化合物が骨吸収を阻害又は刺激するために十分な時間の後、骨吸収アッセイ法が実施される。骨吸収アッセイ法は、試験化合物の存在下でも実施されうる。破骨細胞による骨吸収をアッセイするための方法は、当技術分野において周知であり、本明細書に記載されている。対照試料中の破骨細胞と試験試料中の破骨細胞との間で骨吸収を比較することにより、骨吸収を阻害又は刺激する試験化合物が同定される。

【0063】

別の態様において、破骨細胞形成を阻害又は刺激する薬物をスクリーニングするための方法が提供される。この態様においては、試験化合物をバイオリアクターに直接添加する。培養培地又は三次元足場へ、試験化合物を添加することもできる。試験化合物が添加される時点は、経験に基づくが、比較的初期である。典型的には、試験化合物がバイオリアクターに添加されない対照ランが実施される。

【0064】

試験化合物が破骨細胞形成を阻害又は刺激する能力は、破骨細胞計数、TRAP染色法、骨吸収アッセイ法、又はそれらの組み合わせにより決定されうる。細胞計数法は、当分野において周知であり、実施例4にも記載されている。細胞数を、実験アッセイと対照アッセイとの間で比較する。対照ランと比較した破骨細胞数の増加は、破骨細胞形成の刺激剤の同定と関連している。対照ランと比較した破骨細胞数の減少は、破骨細胞形成の阻害剤の同定と関連している。

【0065】

本発明のアッセイ法においてスクリーニングしてもよい阻害試験化合物の例に

は、例えば、カルシトニンの機能的類似体、IFN-、およびTGF-、破骨細胞形成阻害因子(OCIF)と共にグルココルチコイド、ならびにエストロゲンおよびアンドロゲンの類似体が含まれる。本発明のアッセイ法においてスクリーニングしてもよい刺激試験化合物の例には、例えば、IL-1、TNF、CSF-1、およびIL-6の機能的類似体、ならびに破骨細胞分化因子(ODF)が含まれる。しかし、上記のように、利用可能ないかなる試験化合物を用いて、破骨細胞形成および/または破骨細胞活性または機能性の有効な阻害剤をスクリーニングしてもよい。

【0066】

場合によっては、試験化合物が、破骨細胞形成または骨吸収について可能性がある阻害剤または可能性がある刺激剤として分類されるか否かは不明であり、まずはアッセイ法によって決定される。

【0067】

同様に、本発明に従って、骨吸収能を有する破骨細胞を提供する。このように、本発明の破骨細胞は、反応の弱い破骨細胞に関連した骨疾患を治療するために用いてもよい。そのような病態の例には大理石骨病が含まれる。一方、パジェット病は、当初破骨細胞による骨吸収の増加から始まり、その後新しい骨形成の代償的な増加が起こる。

【0068】

破骨細胞によって行われる骨吸収は骨形成と骨再形成過程の双方の一部であることが知られているため、本発明の破骨細胞はまた、骨および歯の人工器官の調製を含む骨合成、骨改変、および骨工学に用いてもよい。

【0069】

本発明のいずれかの局面において、バイオリクターにおいて形成された機能的破骨細胞は、バイオリクターから除去して移植される。本明細書において用いられるように、「移植する」または「移植」という用語は、エクスピボ骨再生、合成、改変、または再形成の目的のために他に培養することを含む、さらなる加工のためにバイオリクターから破骨細胞を除去することを意味する。本明細書において用いられるように、「移植」はまた、インビボで骨に直接移植する場合のように、ヒトの体内に破骨細胞を移植する段階を含む。

【0070】

本発明の破骨細胞は、例えば、骨芽細胞のような他の骨細胞と共に、または伴わずに移植してもよい。破骨細胞のみを用いる骨工学（再生、合成、改変、または再形成を含む）では、通常骨に存在する層状の骨ではなくて、編まれた構造の骨が形成される。このように、破骨細胞を用いる現在の骨工学の特性は、本発明の培養破骨細胞をそれらを組み合わせて用いると改善される。破骨細胞と本発明の破骨細胞は同時に、または連続して移植してもよい。移植はインビボまたはエクスピボであってもよい。本発明の破骨細胞以外の骨細胞を培養してもよく、体内から単離してもよい。

【0071】

本発明の破骨細胞は、支持体（足場構造）と共に、または支持体なしで移植してもよい。当技術分野において既知であるように、骨工学に用いられる足場構造には多くの異なるタイプがある。実施例には、本明細書において十分に考察するように、バイオリアクターにおける足場構造において用いられる多孔性または繊維様材料が含まれる。他の実施例には、チタンコーティングポリマーおよびCell Foam（商標）が含まれ、後者はタンタルの高温沈殿物によって非常に規則正しい網状の炭素骨格上の薄膜として形成される。

【0072】

このように、本発明の破骨細胞はまた、骨再形成または骨形成において役立つために移植してもよい。骨再形成の欠損に関連した様々な病態が存在し、そのような病態を修正するために、本発明の破骨細胞をインビボまたはエクスピボで移植してもよい。移植のために用いられる本発明の破骨細胞に、遺伝子のヌクレオチド配列をトランスフェクトしてもよい。遺伝子は破骨細胞が形成される種に対して異種であってもよく、または破骨細胞が形成される種に対して本来の種であってもよい。例えば、本発明の破骨細胞は、破骨細胞分化因子（ODF）をコードするヌクレオチド配列によって形質転換してもよい。破骨細胞分化因子のヌクレオチド配列は既知であり、容易に入手できる。

【0073】

上記のように、本発明の破骨細胞は、他のタイプの骨細胞、例えば骨芽細胞と

共に、または伴わずに移植してもよい。同様に、本発明の破骨細胞は骨再生において用いてもよい。このように、例えば、チタンまたはプラスチック製の骨置換体の代用として本発明の破骨細胞を、骨を再生する方法において欠損した、例えば折れたもしくは粉碎された骨に、または他の支持体に移植してもよい。この場合も、本発明の破骨細胞は、他のタイプの骨細胞、例えば骨芽細胞と共に、もしくは連続して、または伴わずに移植してもよい。

【0074】

本発明はまた、破骨細胞形成または機能に関連する遺伝子を同定する方法を提供する。本発明のこの局面において、例えば、破骨細胞分化因子のような骨破壊物質を含む栄養成分、温度、酸素濃度、CO₂濃度、および栄養組成のような培養条件の様々なパラメータを変更してもよい。一つまたはそれ以上のパラメータを変更した後、破骨細胞の数と機能を測定する。破骨細胞数は、TRAP陽性細胞を計数することによって決定してもよい。破骨細胞機能は、骨吸収アッセイ法によって測定してもよい。対照試料と比較して、破骨細胞数および機能の変化が試験試料に起これば、その系を用いて、その変化の原因となる遺伝子または複数の遺伝子に関してさらにスクリーニングしてもよい。遺伝子ディファレンシャルディスプレイ法、RNA任意プライミング(RAP)-PCR技術のようなその改変型、または遺伝子マイクロアレイ分析を用いて、関係する遺伝子をさらに同定して特徴を調べることができる。これらの方法は当技術分野で周知である。さらに、試験試料の破骨細胞に関連した遺伝子は、精製または濃縮した本発明の破骨細胞によって発現される遺伝子をクローニングすることによって同定してもよい。

【0075】

本発明はさらに、以下の特定の実施例によって説明するが、これらは本発明の範囲をいかなるようにも制限すると解釈されない。

【0076】

実施例 1

バイオリアクターの調製

バイオリアクターは、ポリカーボネート製のプレートを用いて作製した(図1A)。
培養チャンバー(3/16"H×5/16"W×5/16"L)に非常に多孔性の微小担体0.01

gを充填した。充填した微小担体床に培養培地を上層した。培地チャンバーは(1/2"H×5/16"W×12/16"L)は、培地0.6 mlを含んだ。ガス交換を容易にするためにTeflon(商標)メンブレン(厚み50 μm)を用いた。

【0077】

Cellsnow(商標)-EXタイプL(低イオン荷電)、多孔性セルロース微小担体(キリン、日本:直径1~2mm;孔径100~200 μm;95%多孔性)を、ヒト骨髄細胞のための人工的足場構造としてこれらの実験の全体を通して用いた(図1B)。

【0078】

実施例2

ヒト骨髄調製物

ロチェスター大学研究被験者倫理委員会の指示に従って同意を得たドナーの腸骨稜から吸引した骨髄を、マッコイ5A培地(ギブコ社、グランドアイランド、ニューヨーク州)によって1:1に希釈して、フィコール/パック(ファルマシア社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州、密度1.027 g/ml)上に重ね、200 gで30分間遠心した。単核球層を回収して、3回洗浄し、これを用いてバイオリアクターに接種した。細胞の一部を採取して、必要に応じて様々なアッセイ法において用いた。

【0079】

実施例3

三次元ヒト長期骨髄細胞培養

培養物に、適当数の単核球($4 \sim 6 \times 10^6$ 個/培養チャンバー)を、バイオリアクターの多孔性の微小担体部分にピペティングすることによって接種した。培養物を湿潤CO₂インキュベータ(5%CO₂を含む)内で37 °Cでインキュベートした。LTBMC培地(毎日交換)は、70%(v/v)マッコイ5A培地(ギブコ社)、 1×10^{-6} Mヒドロコルチゾン(シグマ社、セントルイス、ミズーリ州)、50 μg/mlペニシリン(シグマ社)、50 mg/mlストレプトマイシン(シグマ社)、0.2 mM L-グルタミン(ギブコ社)、0.045%重炭酸ナトリウム(シグマ社)、1×MEMビルビン酸ナトリウム(ギブコ社)、1×MEMビタミン溶液(ギブコ社)、0.4×MEMアミノ酸溶液(ギブコ社)、12.5%(v/v)熱不活化ウマ血清(ギブコ社)、お

よび12.5%熱不活化FBS（ギブコ社）で構成された。最初の二週間、培養物には完全な培養培地を2日ごとに与えた。2週間目に、培養物を、多孔性のマイクロスフェアの床を軽く攪拌して混合することによって浮遊させ、非接着細胞を放出させた（50 μ l/ウェル）。非接着細胞の生存細胞数は、トリパンブルー色素（シグマ社）と血球計算盤を用いる色素排除法によって決定した。2週目から、培養物に1,25-D-ジヒドロキシビタミンD₃（ICNバイオメディカルズ社、オーロラ、オハイオ州）の異なる濃度（10⁻⁷、5 × 10⁻⁸、10⁻⁸、および10⁻⁹ M）を含むヒドロコルチゾン不含培地を2日ごとに加えた。培養物を3週目に回収して、緩くピペティングして、4週目に様々なアッセイ法を行った。

【0080】

実施例4

ディファレンシャル細胞分析

ヒトLTBMCから得られた非接着細胞のサイトスピンスライドガラスを、サイトスピン遠心装置（シャンドン社、セウィックレー、ペンシルバニア州）を用いて、サイトスピンの漏斗状装置の中で20,000個/スライドガラスを500 rpmで5分間遠心することによって調製した。細胞を風乾させてから、ライト染色液（ジオメトリックデータ社、ウェイン、ペンシルバニア州）によって15分間染色後、蒸留水で1分間洗浄した。ディファレンシャル細胞算定は、1試料あたり細胞100個以上を計数することによって盲検的に実施した。それぞれの培養条件に関して、同一の培養物6～9個を確立した[19]。形態学的に識別可能な「破骨細胞様」細胞は、ビタミンD₃添加および非添加培養の双方からの細胞液に認めた（図2）。これらの巨大な多核細胞は、骨髓塗抹標本において認められる典型的な破骨細胞の細胞形態学を示し、マクロファージおよび巨核球と容易に区別可能であった。

【0081】

実施例5

細胞形態学の特徴付け

バイオリアクターから採取した足場構造と細胞を2%バクトアガー（ギブコ社）に抱埋した後、10%中性緩衝ホルマリン（フィッシャー社、ピッツバーグ、ペンシルバニア州）において少なくとも1時間固定した。次に、それらにパラフィ

ンを浸透させた[20]。三次元LTBMCのパラフィン薄切片を、連続的に4～5 μmの厚みに切断して、化学物質をコーティングしたスライドガラスに載せた。パラフィン薄切片をキシレン、100%アルコール、95%アルコール、および70%アルコールの後に水道水ですすぐことによってパラフィンを除去した。次に切片をメイヤーズ、ヘマトキシリン-エオジンによって染色して、細胞形態学の特徴を調べるために顕微鏡下で調べたところ、「破骨細胞様」細胞の存在を確認した[20]。図3Aおよび3Bに示すように、細胞は、波状の境界によって示される極性を示し、これは、マトリクス表面と直接接しているように思われた。このように、三次元足場構造は骨髄の空間的構築を模倣し、それによって細胞外マトリクスとの細胞相互作用が可能となり、その結果、骨において認められる破骨細胞と類似の形態を示す破骨細胞様細胞が得られる。

【0082】

実施例6

TRAPのサイトスピン調製

三次元培養物から採取した細胞のサイトスピンスライドガラスを実施例4に記載のように調製した。スライドガラスを風乾して、TRAP染色を行うまで冷蔵庫で保存した。TRAP染色の前に、スライドガラスを室温にした。酸フォスファターゼ、白血球キット（シグマ社、セントルイス、ミズーリ州）の製造元の指示に従って、スライドガラスを固定溶液（ホルマリン、アセトン、およびクエン酸塩を含む）中で30秒間固定した後、蒸留水で洗浄した。次に、スライドガラスを以下の予め加温した混合液：ジアゾ化ファストガーネットGBC溶液、ナフトールAS-BIホスフェート溶液、酢酸塩溶液と共に酒石酸塩溶液において、37℃で少なくとも一時間遮光して染色した。スライドガラスを蒸留水中ですすぎ、ギルヘマトキシリン中で2分間染色した後、0.3%アンモニア水に8回浸して青色を発色させた[20、21]。塗抹標本を風乾させて、ツァイスアキシオスコープ顕微鏡（ツァイス社、ソーンウッド、ニューヨーク州）を用いて観察した。

【0083】

ライト染色したサイトスピンスライドにおいて同定された大きい、多核の「破骨細胞様」細胞は、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ（TRAP）に関して強い要請

反応を示した(図4)。これらの多核細胞(3個またはそれ以上の核を含む)の大多数は、TRAP染色陽性であった。類似の結果が2つの独立した実験において得られた。

【0084】

実施例7

骨吸収アッセイ法

破骨細胞の機能性は、骨吸収アッセイ法を行うことによって決定した。簡単に説明すると、三次元バイオリアクターから採取した細胞を、ウシ大腿表層骨からの骨ウェーハ(4mm×4mm)上で培養した。細胞をウェーハ上に30分間沈降させた。次に、ウェーハを96ウェルプレートのウェルに移して、培地を加えた。培地は、フェノールレッド不含MEM(ギブコ社)、1×非必須アミノ酸(ギブコ社)、1×L-グルタミン(ギブコ社)、10%熱不活化FBS(ギブコ社)、50 U/mlペニシリン、および50 mg/mlストレプトマイシンで構成された。培地に適当な濃度のビタミンD₃を副甲状腺ホルモン(PTH、10⁻⁸ M;シグマ社)と共に、または伴わずに加えた。骨ウェーハを37 °Cのインキュベータ(5%CO₂含有)に入れて、さらに10日間培養した。ウェーハをトルエンブルーによって染色して、反射光顕微鏡(オリンパス社、メルビル、ニューヨーク州)を用いて吸収点を採点した。破骨細胞の吸収点の数および表面積は、デジタル画像化ソフトウェアを用いて定量し、これは細胞活性の指標であった[7]。1試料あたり3本を採点した。

【0085】

異なる実験において、バイオリアクターにおいて4週間培養後、培養物を回収して、骨吸収アッセイ法をウシ大腿表層骨からの骨ウェーハ上で実施した。無数の吸収点が形成された(図5)。陰性対照には、吸収点は形成されなかった。骨ウェーハを吸収点に関して採点した。破骨細胞点の数および表面積を定量し、これは細胞活性の指標であった。ビタミンD₃の用量依存性を認めた(図6)。高濃度のビタミンD₃(10⁻⁷ M)によって、最高レベルの吸収活性が得られた。その上、PTHを添加すると、吸収活性をさらに刺激した。この結果は、PTHの刺激的な役割[23]と一致し、三次元模倣体において形成された「破骨細胞状」細胞が、真の破骨細胞としての挙動を示すことを確認する。

【0086】

実施例8

吸収後の骨ウェーハ表面の走査型電子顕微鏡（SEM）試験

骨吸収アッセイ法（実施例7）において用いた骨ウェーハを試料ステージに載せて、デスクIIバキューム（ランド社、ワイコッフ、ニュージャージー州）において金をコーティングした[22]。レオ982デジタルSEM（レオ電子顕微鏡、イギリス）を用いた。骨ウェーハの走査型電子顕微鏡によって、破骨細胞によって穴を掘られた吸収小腔(lacunae)が認められた（図7aおよび7b）。顕微鏡写真は、有機マトリクス、すなわちコラーゲン繊維が分解する前に、無機質の溶解が起こることを示している。

【0087】

参考文献

- [1] Baron, R.E. (1996) Anatomy and Ultrastructure of Bone. In: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism (Favus, M.J., ed.) pp. 3-10, Lippincott-Raven, Philadelphia.
- [2] Marks, S.C. and Hermey, D.C. (1996) The Structure and Development of Bone. In: Principles of Bone Biology (Bilezikian, J.P. et al., eds.), pp. 3-14, Academic Press, San Diego.
- [3] Buckwalter, J.A., Glimcher, M.J., Cooper, R.R. and Pecker, R. (1995) Bone Biology. Part I. Structure, blood supply, matrix, and mineralization. *Journal of Bone Joint Surgery* 77-A, 1256-1289.
- [4] Marks, S.C. and Popoff, S.N. (1988) Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton. *American Journal of Anatomy* 183, 1-44.
- [5] Jandl, J.H. (1987) *Blood: Textbook of Hematology* Little Brown and Co., Boston, MA.
- [6] Mundy, G.R. (1996) Bone Resorbing Cells. In: Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorders of Mineral Metabolism (Favus, M.J., ed.) pp. 16-23, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA.
- [7] Tondravi, M.M., McKercher, S., Anderson, K., Erdmann, J.J., Quiroz, M., Maki, R. and Teitelbaum, S.L. (1997) Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* 386, 81-84.
- [8] Grigoriadis, A.E., Wang, Z., Cecchini, M.G., Hofstetter, W., Felix, T., Fleisch, H.A. and Wagner, E.F. (1994) c-Fos: A key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 266, 443-448.
- [9] Kodama, H., Yamasaki, A., Nose, M., Niida, S., Ohgama, Y., Abe, M., Kumegawa, M. and Suda, T. (1991) Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (op/op) mice is cured by injections of macrophage colony stimulating factor. *Journal of Experimental Medicine* 173, 269-272.
- [10] McSheehy, P.M.J. and Chambers, T.J. (1986) Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* 118, 824-828.

- [11] Ek-Rylander, B., Flores, M., Wendel, M., Heinegard, D. and Anderson, G. (1994) Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 269, 14853-14856.
- [12] Kurihara, N., Chenu, C., Miller, M., Civin, C. and Roodman, G.D. (1990) Identification of committed mononuclear precursors for osteoclast-like cells formed in long term human marrow cultures. *Endocrinology* 126, 2733-2741.
- [13] Thavarajah, M., Evans, D.B., Binderup, L. and Kanis, J.A. (1990) 1,25(OH)₂D₃ and calcipotriol (MC903) have similar effects on the induction of osteoclast-like cell formation in human bone marrow cultures. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 171, 1056-1063.
- [14] Flanagan, A.M., Horton, M.A., Dorey, E.L., Collins, D.A., Evely, R.S., Moseley, J.M., Firkin, F.C., Chambers, T.J., Helfrich, M.H. and Martin, T.J. (1992) An assessment of the ability of human bone marrow cultures to generate osteoclasts. *International Journal of Experimental Pathology* 73, 387-401.
- [15] Hakeda, Y. and Kumegawa, M. (1996) The Growth and Culture of Bone Cells: Osteoclastic. In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian, J.P. et al., eds.), pp. 1217-1228, Academic Press, San Diego.
- [16] Nesbitt, S.A. and Horton, M.A. (1997) Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science* 276, 266-269.
- [17] Matsuzaki, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Yamaguchi, K., Yasuda, H., Shima, N., Morinaga, T., Toyama, Y., Yabe, Y., Higashio, K. and Suda, T. (1998) Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 246, 199-204.
- [18] Suda, T., Jimi, E., Nakamura, I. and Takahashi, N. (1997) Role of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in osteoclast differentiation and function. *Enzymology* 282, 223-235.
- [19] Lefkovits, I., ed. (1997) *Immunology Methods Manual: The comprehensive Sourcebook of Techniques* Academic Press, San Diego.

- [20] Humason, G.L. (1967) *Animal Tissue techniques* W. H. Freeman and Company, San Fransisco.
- [21] Johnstone, A. and Thorpe, R. (1996) *Immunohistochemistry in Practice* Blackwell Science, Oxford, UK.
- [22] Deldar, A., Lewis, H. and Bloom, J. (1989) Electron microscopic study of the unique features and structural-morphologic relationship of canine bone marrow. *American Journal of Veterinary Research* 50, 136-144.
- [23] Fitzpatrick, L.A. and Bilezikian, J.P. (1996) Actions of Parathyroid Hormone. In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian, J.P. et al., eds.), pp. 339-346, Academic Press, San Diego.
- [24] Zucker-Franklin, D., Greaves, M.F., Grossi, C.E. and Marmont, A.M., eds. (1988) *Atlas of Blood Cells: Function and Pathology* Lea & Febiger, Philadelphia.
- [25] Quinn, J.M., Neale, S., Fujikawa, Y., McGee, J.O. and Athanasou, N.A. (1998) Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells. *Calcified Tissue International* 62, 527-531.
- [26] Takahashi, S., Reddy, S.V., Dallas, M., Devlin, R., Chou, J.Y. and Roodman, G.D. (1995) Development and characterization of a human marrow stromal cell line that enhances osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 136, 1441-1449.

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1aは、バイオリアクターの1つの可能な配置の図面である。本明細書に図示されている配置において、多孔性または繊維性の足場は、培養チャンバーに置かれる。図1bは、バイオリアクターの人工的足場として用いられるマクロ孔質セルロース微粒子の走査型電子顕微鏡写真である。

【図2】 ビタミンD₃補充三次元培養物からのライト染色された (Wright's stained) サイトスピンスライドの「破骨細胞様」細胞の顕微鏡写真である。「破骨細胞様」細胞は、巨大な多核性細胞の特徴を有し、骨髓塗抹標本で観察されるものと似ている。

【図3】 図3aは、三次元バイオリアクター培養後の薄いパラフィン切片の

「破骨細胞様」細胞の顕微鏡写真である。図3bは、基質(M)の表面と直接接触したままであるように見える、波打った輪郭によって定められる多孔性を示す破骨細胞様細胞の同倍率の顕微鏡写真である。培養物にビタミンD₃を補充した。

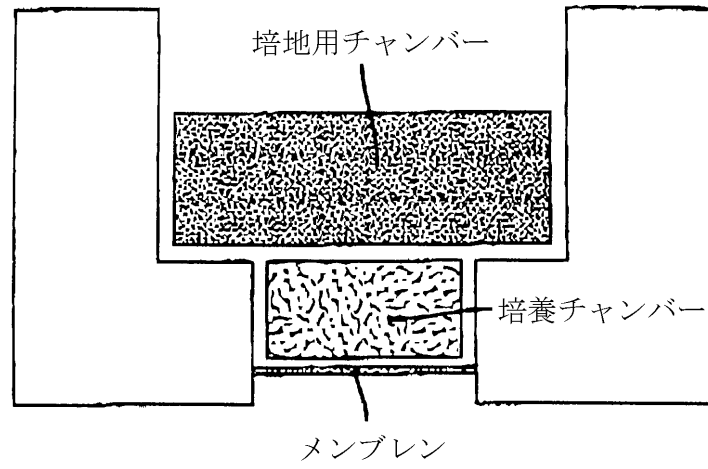
【図4】 三次元擬態におけるTRAP陽性多核性(3つまたはそれ以上の核)「破骨細胞様」細胞の顕微鏡写真である。培養物にビタミンD₃を補充した。

【図5】 図5aは、3-Dバイオリアクターから集めた細胞について骨吸収アッセイ法の結果の顕微鏡写真である。吸収点は、破骨細胞によって形成され、はっきり見ることができる。実線は、吸収小腔(lacunae)を縁どったものである。図5bは、図5aに図示されている(ビタミンD₃およびPTH非存在下の)同じ骨吸収アッセイ法の陰性対象からの骨ウェーハの顕微鏡写真である。

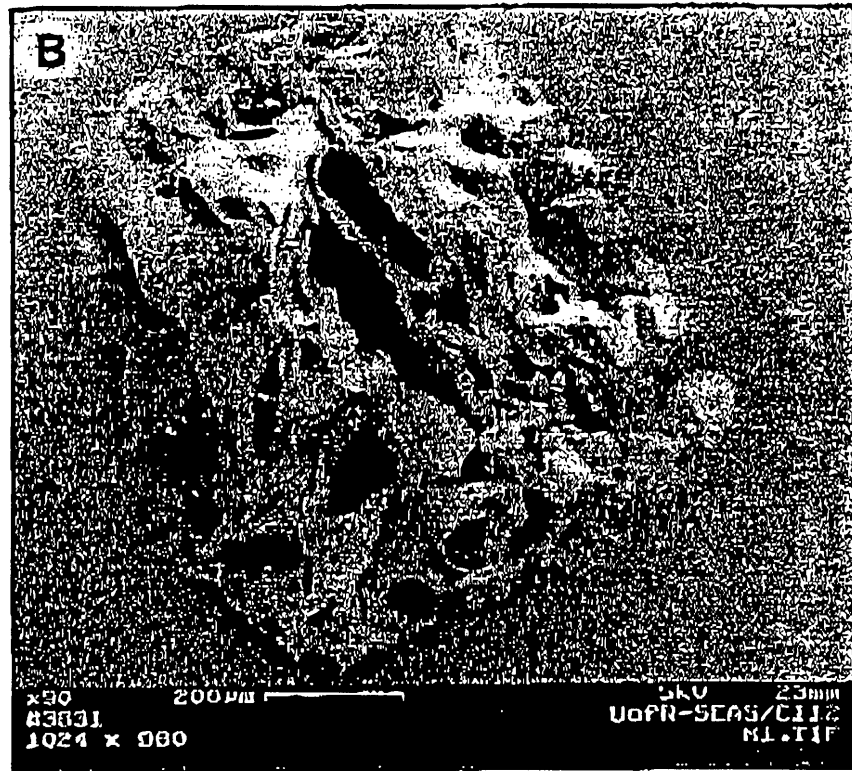
【図6】 骨吸収活性に対するビタミンD₃濃度とPTHの影響を図示したものである。用いたPTH濃度は、10⁻³Mであった。データは、3つの骨ウェーハからの平均を示す。アスタリスクは、3つのデータの代わりに2つのデータのもので、骨ウェーハを数えた実験群を示す。

【図7】 バイオリアクターで生成された破骨細胞による吸収後の骨ウェーハの表面の走査型電子顕微鏡写真である。矢印は、破骨細胞の残異物を示す。

【図1】



a

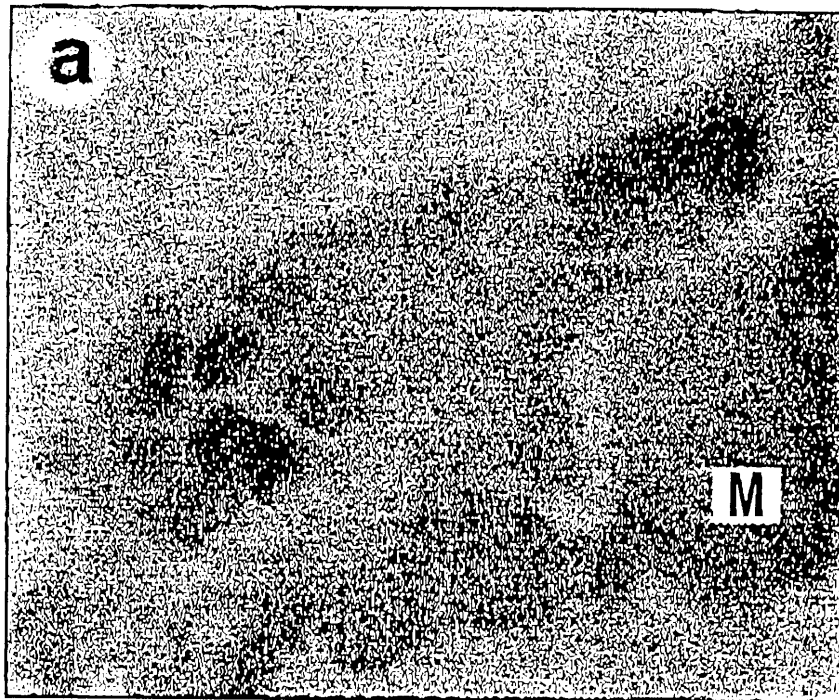


b

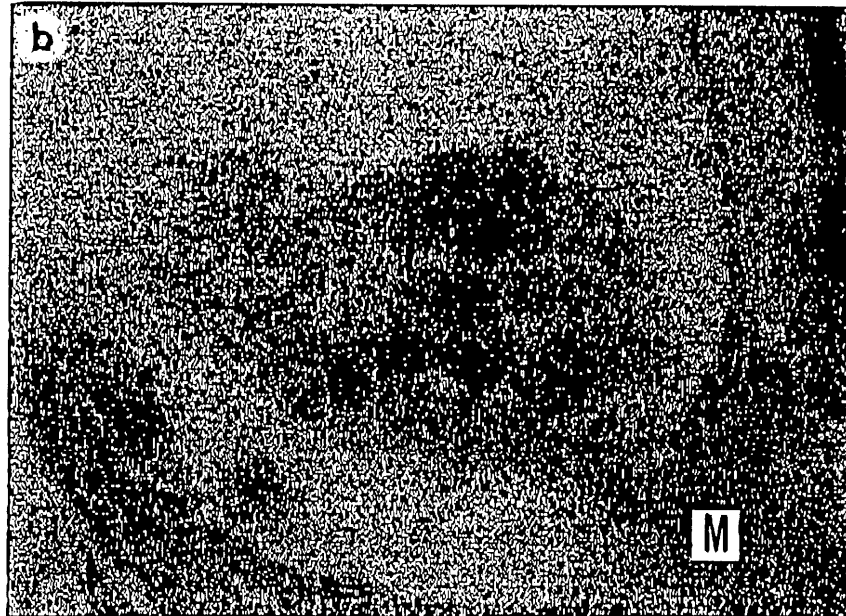
【図2】



【図3】

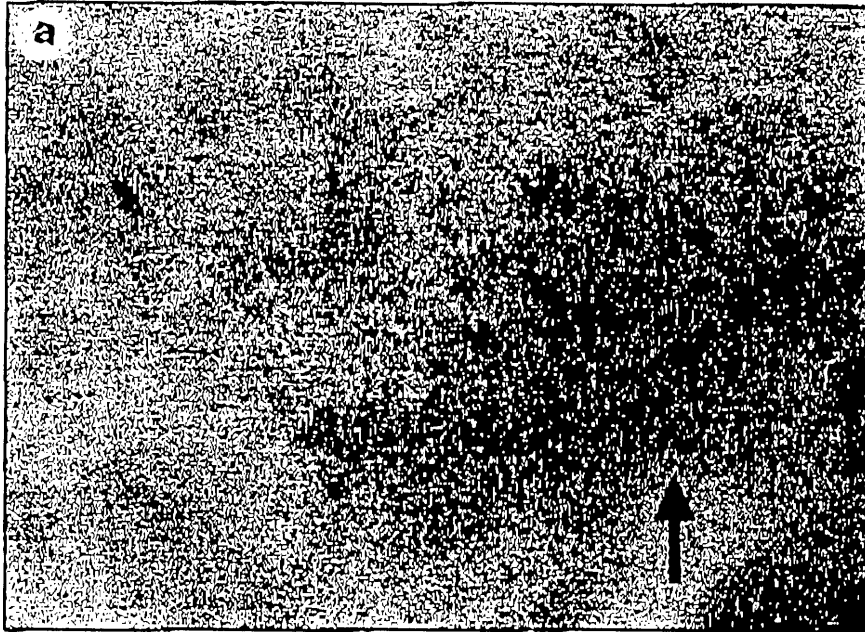


a

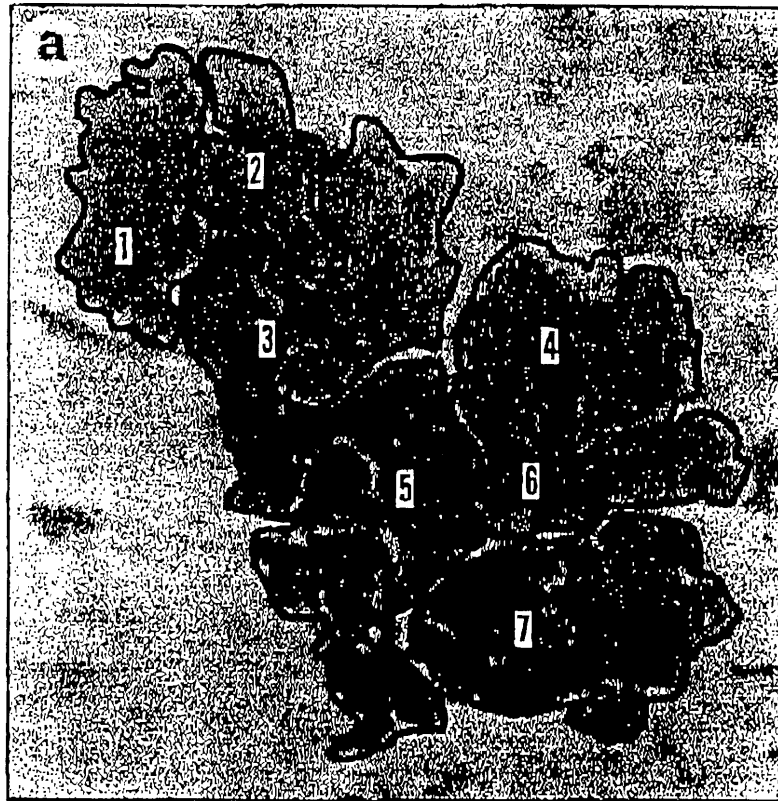


b

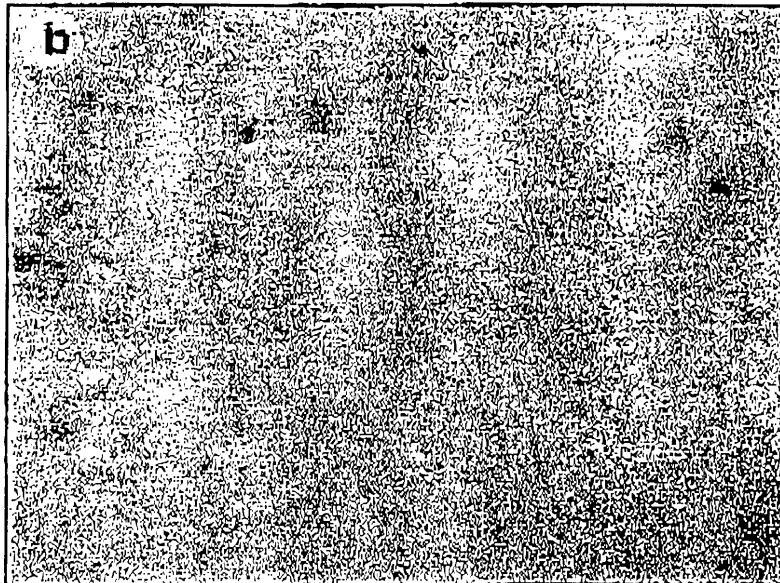
【図4】



【図5】

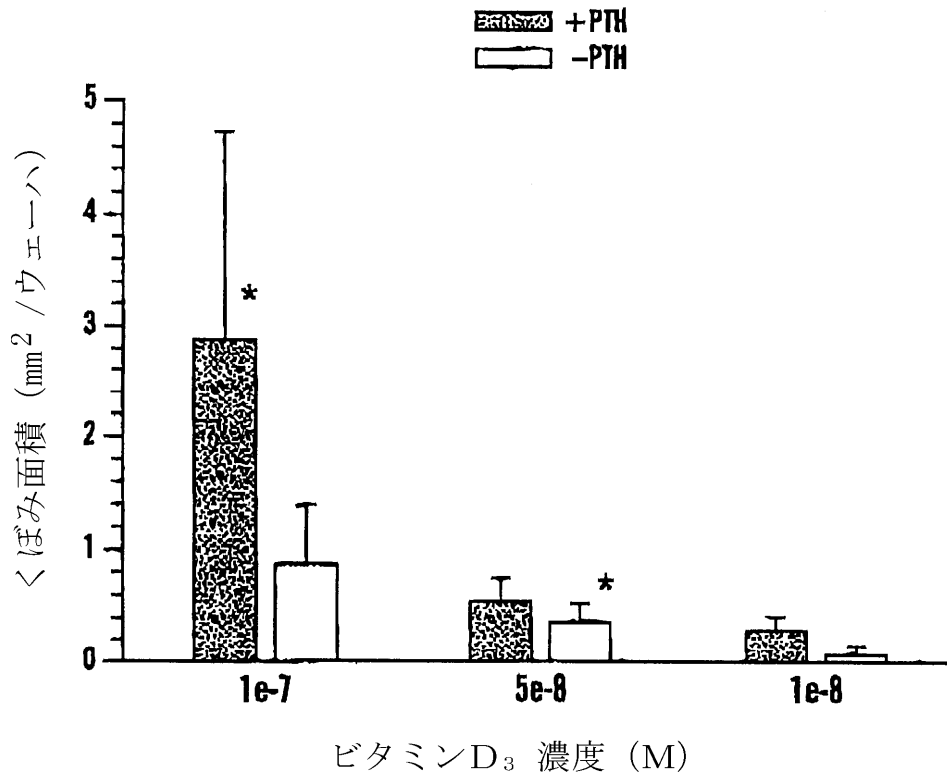


a



b

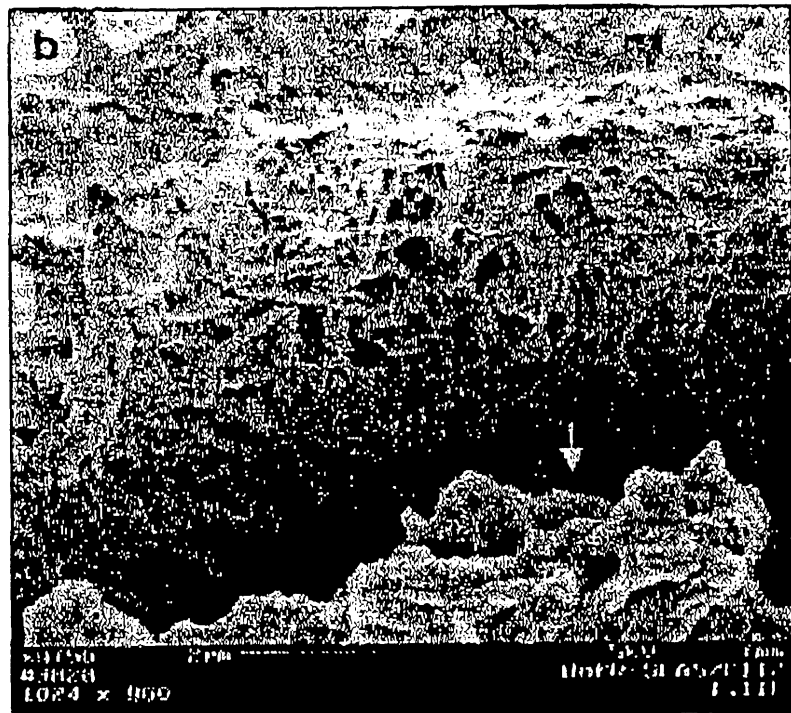
【図6】



【図7】



a



b

【國際調查報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US00/22040 |
|---|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC(7) : C12N 5/08; C12Q 1/00 US CL : 435/372, 4 | | |
| 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) U.S. : 435/372, 4, 40.5, 40.52, 325, 347, 366, 373, 375, 378, 383, 384 | | |
| 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) Please See Continuation Sheet | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | US 5,719,058 A (RODAN et al) 17 February 1998 (17.02.1998), entire document. | 1-64 |
| A | US 5,856,186 A (RODAN et al) 05 January 1999 (05.01.1999), entire document. | 1-64 |
| A, E | US 6,093,533 A (RODAN et al) 25 July 2000 (25.07.2000), entire document. | 20-43, 48-64 |
| A | ISHAUG et al. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. Journal of Biomed. Mat. Research. 1997, Vol. 36, pages 17-28. | 1-19, 20, 26-34, 44, 48, 59-64 |
| A | HAKEDA H. et al. The Growth and Culture of bone Cells: Osteoclastic. Principles of Bone Biology. 1996, pages 1217-1228. | 1-64 |
| <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 | "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 | |
| "B" earlier application or patent published on or after the international filing date | "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 | |
| "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) | "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 | |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" document member of the same patent family | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| Date of the actual completion of the international search 20 October 2000 (20.10.2000) | Date of mailing of the international search report 14 NOV 2000 | |
| Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230 | Authorized officer <i>Carolina Lawrence Fox</i> George Elliott Telephone No. (703) 308-0196 | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US00/22040

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos. :
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos. :
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claim Nos. :
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US00/22040

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

Group I, claims 1-14, drawn to a method of culturing osteoclasts from hemopoietic cells.

Group II, claims 15-19, drawn to a method of bone synthesis or modification.

Group III, claims 20-43, drawn to a method of screening for drugs which affect bone resorption.

Group IV, claims 44-47, drawn to a method of identifying genes related to osteoclasts.

Group V, claims 48-64, drawn to a method for screening for drugs which affect osteoclastogenesis.

1. This International Searching Authority considers that the international application does not comply with the requirements of unity of invention (Rules 13.1, 13.2 and 13.3) for the reasons indicated below:

The inventions listed as Groups I, II, III, IV and V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features. The unifying concept among the five groups is isolated and cultured osteoclasts. In themselves, cultured osteoclasts are not an inventive concept. They are well known and documented in the art which is evident in Hakeda et al (Principles of Bone Biology, 1996, pages 1217-1228). Hakeda teaches various ways to isolate and culture osteoclasts. In addition to the concept being well known in the art, examples applying these concepts are numerous. For example, U.S. Patent 5,766,669 amongst others applies these concepts to the practice of their inventions. Thus, Groups I-V lack a single unifying inventive concept that justifies keeping them together.

Furthermore, pursuant to 37 C.F.R. §1.475(d), the ISA/US considers that where multiple products and processes are claimed, the main invention shall consist of the first invention of the category first mentioned in the claims and the first recited invention of the other categories related thereto. Accordingly, the main invention, Group I, comprises the product, cultured osteoclast cells which are cultured according to the method set forth in claims 1-14. Thus, pursuant to 37 C.F.R. §1.475(d), the ISA/US does not consider any feature which the subsequently recited products and methods share with the main invention as a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 and that each of such products and methods accordingly defines a separate invention.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3: EAST, BIOSIS, MEDLINE, SCISEARCH, EMBASE, DIALOG
search terms: osteoclast, osteoblast, culture, scaffold, growth, proliferation, hematopoietic, bone synthesis, resorption

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マ-ト' (参考) |
|--------------------------|-------|---------------|-------------|
| A 6 1 P 19/10 | | A 6 1 P 43/00 | 1 0 5 |
| | 43/00 | | |
| C 1 2 N 5/06 | 1 0 5 | C 1 2 Q 1/02 | |
| | | | A |
| | | | Z |
| C 1 2 Q 1/02 | | G 0 1 N 33/15 | Z |
| | | | M |
| | | | 1 0 2 |
| G 0 1 N 33/15 | | C 1 2 N 15/00 | A |
| | | | E |
| | | | B |
| | | | F |
| | 33/53 | | |
| | 37/00 | | |
| | 1 0 2 | | |
| | | 15/00 | |

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
 T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J
 , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,
 M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K
 E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G
 , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D ,
 R U , T J , T M) , A E , A L , A M , A T , A U ,
 A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C
 N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , E E , E S
 , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U ,
 I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K
 R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V
 , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O ,
 N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S
 I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A
 , U G , U Z , V N , Y U , Z A , Z W

Fターム(参考) 2G045 AA40 BA13 BB20 CB01 DA12
 DA13 DA14 FA16 FA20 FB02
 HA16
 4B024 AA01 AA11 BA11 BA63 CA02
 CA09 DA02 GA11 GA18 HA17
 4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ42 QQ52
 QR55 QR69 QR77 QR80 QR82
 QS24 QS28 QS34
 4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14
 BA24 BB20 BC41 BC50 CA24
 CA31 CA44
 4C087 AA03 BB44 BB64 CA04 ZA96
 ZA97 ZB21 ZC41

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 在三维生物反应器中从骨髓离体生产功能性破骨细胞的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2003507035A | 公开(公告)日 | 2003-02-25 |
| 申请号 | JP2001517670 | 申请日 | 2000-08-11 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 罗彻斯特大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 罗切斯特大学 | | |
| [标]发明人 | ウーージェイエイチデイビッド マンタラリスアサナスロス | | |
| 发明人 | ウーージェイ.エイチ.デイビッド マンタラリスアサナスロス | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 A61K35/12 A61K35/28 A61P3/14 A61P7/00 A61P19/00 A61P19/10 A61P43/00 C12N5/078 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N37/00 C12N5/06 | | |
| CPC分类号 | A61K35/12 A61P19/00 A61P19/10 C12N5/0643 C12N2500/32 C12N2500/38 C12N2501/37 C12N2501 /39 C12N2503/02 C12N2531/00 C12N2533/76 C12N2533/78 G01N2500/10 | | |
| FI分类号 | A61K35/28 A61P3/14 A61P7/00 A61P19/00 A61P19/10 A61P43/00.105 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N5/00.E C12N5/00.B C12N15/00.F | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045 /FA16 2G045/FA20 2G045/FB02 2G045/HA16 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA11 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063 /QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR55 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS24 4B063/QS28 4B063/QS34 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065 /AC14 4B065/BA24 4B065/BB20 4B065/BC41 4B065/BC50 4B065/CA24 4B065/CA31 4B065/CA44 4C087/AA03 4C087/BB44 4C087/BB64 4C087/CA04 4C087/ZA96 4C087/ZA97 4C087/ZB21 4C087 /ZC41 | | |
| 优先权 | 60/148814 1999-08-13 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明提供了具有吸收骨功能的培养破骨细胞和产生这种破骨细胞的方法。本发明提供了分离造血细胞或辅助细胞的步骤，在具有被培养基覆盖或包围的支架的腔室中培养造血细胞或辅助细胞，该支架允许培养培养的造血细胞或辅助细胞。包括允许电池单元在三个维度上接触的步骤。本发明的破骨细胞可用于筛选抑制或刺激破骨细胞形成和/或破骨细胞功能的药物。本发明的破骨细胞也可用于治疗某些骨疾病以及骨重塑和再生。

