

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-230493

(P2014-230493A)

(43) 公開日 平成26年12月11日(2014.12.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	4 B 0 2 9
G O 1 N 33/50 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/50 P	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-111813 (P2013-111813)
 (22) 出願日 平成25年5月28日 (2013.5.28)

(71) 出願人 000006035
 三菱レイヨン株式会社
 東京都千代田区丸の内一丁目1番1号
 (72) 発明者 外川 直之
 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号
 三菱レイヨン株式会社横浜研究所内
 Fターム(参考) 2G045 AA40 DA13
 4B024 AA11 BA80 CA09 HA12
 4B029 AA27 BB20 CC03 CC08 FA15
 GA08
 4B063 QA01 QA05 QA19 QQ43 QQ53
 QR32 QR55 QR56 QS34 QX02

(54) 【発明の名称】 間葉系幹細胞からの分化状態を識別する遺伝子群及び分化状態の評価方法

(57) 【要約】

【課題】骨代謝、骨免疫関連遺伝子変動を簡便に分類、評価することにより、間葉系幹細胞からの細胞の分化状態を評価できる手法を提供する。

【解決手段】細胞分化の品質管理に関連する遺伝子群と、それらの発現量の変化を検出するためのオリゴヌクレオチドプローブ。また、当該オリゴヌクレオチドプローブを搭載したDNAマイクロアレイ。さらには、間葉系幹細胞を分化させ、その遺伝子発現パターンの変化を把握することにより、特に、破骨細胞、骨芽細胞または軟骨細胞へ分化した細胞の品質を簡便に評価すること。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

間葉系幹細胞から破骨細胞、骨芽細胞又は軟骨細胞のいずれかへの分化状態を識別するための、以下の遺伝子群から選択される2種以上の遺伝子を含む分化識別用遺伝子群。

aggrecan、acid phosphatase 5 tartrate resistant、activin A receptor type 1、activin A receptor type 1B、activin A receptor type 1C、activin receptor IIA、activin receptor IIB、a disintegrin and metalloproteinase domain 17、a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif 5 (aggrecanase-2)、adiponectin C1Q and collagen domain containing、adiponectin receptor 1、alkaline phosphatase (liver/bone/kidney)、androgen receptor、activating transcription factor 4、ATPase H⁺ transporting lysosomal V0 subunit A1、bone gamma carboxyglutamate protein、bone gamma-carboxyglutamate protein related sequence 1、biglycan、bone morphogenetic protein 2、bone morphogenetic protein 4、bone morphogenetic protein 6、bone morphogenetic protein 7、bone morphogenetic protein receptor type 1A、calcitonin/calcitonin-related polypeptide alpha、calcitonin receptor、calcium-sensing receptor、core binding factor beta、CD44 antigen、cadherin 1、chordin、chloride channel 7、collagen type X alpha 1、collagen type I alpha 1、collagen type II alpha 1、collagen type III alpha 1、collagen type VI alpha 1、collagen type IX alpha 1、cartilage oligomeric matrix protein、colony stimulating factor 1 (macrophage)、colony stimulating factor 1 receptor、chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1、chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2、connective tissue growth factor、catenin (cadherin associated protein) beta 1、cathepsin K、cathepsin L、chemokine (C-X-C motif) receptor 4、cytochrome P450 family 19 subfamily a polypeptide 1、cytochrome P450 family 24 subfamily a polypeptide 1、cytochrome P450 family 27 subfamily b polypeptide 1、dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)、dentin matrix protein 1、ephrin B2、epidermal growth factor、Eph receptor A4、Eph receptor B4、estrogen receptor 1 (alpha)、estrogen receptor 2 (beta)、fibroblast growth factor 2

10

20

30

40

50

3、fibroblast growth factor 10、fibroblast growth factor 17、fibroblast growth factor 18、fibroblast growth factor 2、fibroblast growth factor 4、fibroblast growth factor 8、fibroblast growth factor receptor 1、fibroblast growth factor receptor 2、fibroblast growth factor receptor 3、FMS-like tyrosine kinase 1、fibronectin 1、FBJ osteosarcoma oncogene、FBJ osteosarcoma oncogene B、fos-like antigen 1、fos-like antigen 2、follistatin、frizzled homolog 1 (Drosophila)、gap junction protein alpha 1、GLI-Kruppel family member GLI1、GLI-Kruppel family member GLI2、GLI-Kruppel family member GLI3、gremlin 1、gremlin 2 homolog cysteine knot superfamily (Xenopus laevis)、human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 3、perlecan (heparan sulfate proteoglycan 2)、hyaluronoglucosaminidase 1、hyaluronoglucosaminidase 2、integrin binding sialoprotein、inhibitor of DNA binding 1、inhibitor of DNA binding 2、interferon alpha 1、interferon (alpha and beta) receptor 1、interferon beta 1 fibroblast、interferon gamma、interferon gamma receptor 1、interferon gamma receptor 2、insulin-like growth factor 1、insulin-like growth factor 2、insulin-like growth factor I receptor、insulin-like growth factor 2 receptor、Indian hedgehog、interleukin 17A、interleukin 1 alpha、interleukin 1 beta、interleukin 1 receptor type I、interleukin 6、inhibin beta-A、inhibin beta-B、inhibin beta-C、inhibin beta E、interferon regulatory factor 8、integrin alpha V、integrin beta 3、kinase insert domain protein receptor、60S ribosomal protein L10E、klotho、lymphoid enhancer binding factor 1、leptin、low density lipoprotein receptor-related protein 5、v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family protein B (avian)、matrix Gla protein、melanoma inhibitory activity 1、microphthalmia-associated transcription factor、matrix metallopeptidase 13、matrix metallopeptidase 14 (membrane-inserted)、matrix metallopeptidase 1a (interstitial collagenase)、matrix metallopeptidase 1b (interstitial collagenase)、matrix metallopeptidase 2、matrix metallopeptidase 3、matrix met

allopeptidase 8、matrix metallopeptidase
9、homeobox msh-like 1、homeobox msh-like
2、myogenic differentiation 1、nuclear fac
tor of activated T cells cytoplasmic cal
cineurin dependent 1、nuclear factor of a
ctivated T cells cytoplasmic calcineurin
dependent 2、nuclear factor of activated
T cells cytoplasmic calcineurin depende
nt 3、nuclear factor of kappa light polyp
peptide gene enhancer in B cells 1 p105、n 10
uclear factor of kappa light polypeptide
gene enhancer in B cells 2 p49/p100、nog
gin、osteoclast associated receptor、plate
let derived growth factor alpha、platelet
derived growth factor B polypeptide、pho
sphatase orphan 1、periostin osteoblast s
pecific factor、peroxisome proliferator a
ctivated receptor gamma、PR domain contai
ning 1 with ZNF domain、patched homolog 1
、patched domain containing 1、prostagland 20
in-endoperoxide synthase 2、parathyroid h
ormone、parathyroid hormone 1 receptor、pa
rathyroid hormone-like peptide、v-rel ret
iculoendotheliosis viral oncogene homolo
g A (avian)、ras homolog gene family memb
er A、runt related transcription factor 1
、runt related transcription factor 2、run
t related transcription factor 3、syndeca
n 3、SFFV proviral integration 1、sonic he
dghog、MAD homolog 1 (Drosophila)、MAD ho 30
molog 2 (Drosophila)、MAD homolog 3 (Dros
ophila)、MAD homolog 4 (Drosophila)、MAD h
o
molog 5 (Drosophila)、MAD homolog 6 (Dros
ophila)、MAD homolog 7 (Drosophila)、MAD h
omolog 9 (Drosophila)、sclerostin、SRY-box
containing gene 5、SRY-box containing ge
ne 6、SRY-box containing gene 9、trans-act
ing transcription factor 3、Sp7 transcrip
tion factor 7、secreted acidic cysteine r 40
ich glycoprotein、secreted phosphoprotein
1、Rous sarcoma oncogene、transforming gr
owth factor beta 1、transforming growth f
actor beta 2、transforming growth factor
beta 3、transforming growth factor beta r
eceptor I、transforming growth factor bet
a receptor II、transmembrane 7 superfamil
y member 4、tumor necrosis factor、tumor n
ecrosis factor receptor superfamily memb
er 11a、tumor necrosis factor receptor su 50

per family member 1a、tumor necrosis factor receptor superfamily member 1b、tumor necrosis factor (ligand) superfamily member 11、tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b (osteoprotegerin)、TNF receptor-associated factor 6、versican、vitamin D receptor、vascular endothelial growth factor A、wingless-related MMTV integration site 3A、wingless-related MMTV integration site 4、wingless-related MMTV integration site 5A、wingless-related MMTV integration site 5B、wingless-related MMTV integration site 6、wingless-related MMTV integration site 7A、wingless-related MMTV integration site 7B、sema domain immunoglobulin domain (Ig) transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain (semaphorin) 4D

【請求項 2】

遺伝子、前記遺伝子が転写するRNA、前記遺伝子もしくはRNAの核酸配列のうち少なくとも連続した30塩基以上の部分配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、のいずれかを含み、間葉系幹細胞からの、破骨細胞、骨芽細胞又は軟骨細胞へのいずれかの分化状態を、識別可能にする分別マーカーであって、

前記遺伝子が、請求項1記載の遺伝子群から選択される2種以上の遺伝子であることを特徴とする分別マーカー群。

【請求項 3】

請求項2記載の分別マーカー群を用い、分別マーカーの発現の差を検出することにより、間葉系幹細胞からの、破骨細胞、骨芽細胞又は軟骨細胞へのいずれかの分化状態を識別する、分化識別方法。

【請求項 4】

以下の(a)~(d)のうち1種のDNAの塩基配列及び/又は該DNAの塩基配列と相補的な塩基配列を含む細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプローブ。

(a) 配列番号1~202に示される塩基配列から選択されるDNA

(b) (a)のDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

(c) (a)の塩基配列と同一性が80%以上の塩基配列からなるDNA

(d) (a)~(c)のいずれかの塩基配列に1から数個の付加、挿入、欠損又は置換を含む塩基配列からなるDNA

【請求項 5】

請求項4記載のオリゴヌクレオチドプローブが搭載された細胞分化状態評価用DNAマイクロアレイ。

【請求項 6】

請求項4記載のオリゴヌクレオチドプローブを用いて、遺伝子発現量を測定する工程を含む細胞の分化状態を評価する、評価方法。

【請求項 7】

請求項5記載のDNAマイクロアレイを用いて、遺伝子発現量を測定する工程を含む細胞の分化状態を評価する、評価方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、間葉系幹細胞からの、破骨細胞、骨芽細胞又は軟骨細胞へのいずれかの分化状態を、識別可能にする遺伝子群及びその遺伝子の発現を検出することによる細胞の分化状態の評価方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年のバイオテクノロジー技術の発展に伴い、再生医療の進展が期待されている。その中でも再生医療のための移植材料として間葉系幹細胞が注目されている。間葉系幹細胞は哺乳類の骨髄等に存在し、脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞に分化する多能性の幹細胞として知られている（非特許文献1）。また、間葉系幹細胞の採取や培養に関する報告もされている（非特許文献2）。

10

【0003】

間葉系幹細胞から分化する細胞として、骨関連の細胞群がある。骨は、骨の構造的、機械的及び生化学的な完全性の持続、並びにヒト身体ミネラルの恒常性を必要とする機能的に異なる細胞群からなる動的結合組織である。

【0004】

関連する主な細胞として、例えば、骨新生、骨形成及び骨質量の維持を担う軟骨細胞や骨芽細胞、骨吸収を担う破骨細胞があげられる。

【0005】

これらの細胞の間葉系幹細胞からの発生及び増殖は完全には解明されていないが、骨のミクロ環境中で産生される増殖因子及びサイトカイン、並びに全身性ホルモン及びマトリクス再構築遺伝子の複雑な相互作用によって支配されており、成長ホルモン、インスリン様増殖因子-1、性ステロイド、甲状腺ホルモン、PTH及びプロスタグランジンE2等のカルシウム要求性ホルモン、インターロイキン-1、インターロイキン-6、及び腫瘍壊死因子等の種々のサイトカイン、さらには1,25-ジヒドロキシビタミンD（カルシトリオール）等が調和的に作用していると考えられている。

20

【0006】

間葉系幹細胞を、組織の再生医療に利用するためには、この幹細胞を生体組織から採取し、増殖し、更にそれを分化増殖して、組織の調製を行うことが必要となる。間葉系幹細胞は骨髄や骨膜に存在するが、組織再生医療への実用化のためには、間葉系幹細胞の分化状態を厳密に評価する技術を開発することが必要である。

30

【0007】

これまでに間葉系幹細胞の分化状態を評価する手段として、破骨細胞の分化に関わる遺伝子を調べたもの（特許文献1）、軟骨形成に影響を及ぼし得る特定の因子を調べたもの（特許文献2）、骨芽細胞へと分化させる培養工程中での遺伝子発現変化を調べたもの（特許文献3）などがある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特表2008-522632号公報

【特許文献2】特表2010-509927号公報

【特許文献3】特開2008-178403号公報

40

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】遺伝子医学、Vol.4、No.2（2000）p58-61

【非特許文献2】実験医学、Vol.19、No.3（2月号）2001、p350-356

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

しかしながら、上述の手段（特許文献1～3）はある特定の細胞のみへの分化に關与す

50

る遺伝子をモニターするものであり、さまざまな細胞への分化の可能性をもつ間葉系幹細胞を評価するには不十分であった。すなわち、本発明の目的は、間葉系幹細胞の分化状態を評価するのに有用な遺伝子を提供することにある。さらには、その遺伝子の発現を検出するのに適した基材の提供をすることにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者は、上記課題を解決するべく鋭意検討を行った結果、間葉系幹細胞が破骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞等に分化する過程において、それらの過程を同時に評価する遺伝子群を見出すことによって、本発明を完成させた。

【0012】

すなわち、本発明は、以下の通りである。

(1) 間葉系幹細胞から破骨細胞、骨芽細胞又は軟骨細胞のいずれかへの分化状態を識別するための、以下の遺伝子群から選択される2種以上の遺伝子を含む分化識別用遺伝子群。

【0013】

aggrecan、acid phosphatase 5 tartrate resistant、activin A receptor type 1、activin A receptor type 1B、activin A receptor type 1C、activin receptor IIA、activin receptor IIB、a disintegrin and metallopeptidase domain 17、a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif 5 (aggrecanase-2)、adiponectin C1Q and collagen domain containing、adiponectin receptor 1、alkaline phosphatase (liver/bone/kidney)、androgen receptor、activating transcription factor 4、ATPase H⁺ transporting lysosomal V0 subunit A1、bone gamma carboxyglutamate protein、bone gamma-carboxyglutamate protein related sequence 1、biglycan、bone morphogenetic protein 2、bone morphogenetic protein 4、bone morphogenetic protein 6、bone morphogenetic protein 7、bone morphogenetic protein receptor type 1A、calcitonin/calcitonin-related polypeptide alpha、calcitonin receptor、calcium-sensing receptor、core binding factor beta、CD44 antigen、cadherin 1、chordin、chloride channel 7、collagen type X alpha 1、collagen type I alpha 1、collagen type II alpha 1、collagen type III alpha 1、collagen type VI alpha 1、collagen type IX alpha 1、cartilage oligomeric matrix protein、colony stimulating factor 1 (macrophage)、colony stimulating factor 1 receptor、chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1、chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2、connective tissue growth factor、catenin (cadherin associated p

10

20

30

40

50

rotein) beta 1, cathepsin K, cathepsin L,
 chemokine (C-X-C motif) receptor 4, cytochrome P450 family 19 subfamily a polypeptide 1, cytochrome P450 family 24 subfamily a polypeptide 1, cytochrome P450 family 27 subfamily b polypeptide 1, dickkopf homolog 1 (*Xenopus laevis*), dentin matrix protein 1, ephrin B2, epidermal growth factor, Eph receptor A4, Eph receptor B4, estrogen receptor 1 (alpha), estrogen receptor 2 (beta), fibroblast growth factor 23, fibroblast growth factor 10, fibroblast growth factor 17, fibroblast growth factor 18, fibroblast growth factor 2, fibroblast growth factor 4, fibroblast growth factor 8, fibroblast growth factor receptor 1, fibroblast growth factor receptor 2, fibroblast growth factor receptor 3, FMS-like tyrosine kinase 1, fibronectin 1, FBJ osteosarcoma oncogene, FBJ osteosarcoma oncogene B, fos-like antigen 1, fos-like antigen 2, follistatin, frizzled homolog 1 (*Drosophila*), gap junction protein alpha 1, GLI-Kruppel family member GLI1, GLI-Kruppel family member GLI2, GLI-Kruppel family member GLI3, gremlin 1, gremlin 2 homolog cysteine knot superfamily (*Xenopus laevis*), human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 3, perlecan (heparan sulfate proteoglycan 2), hyaluronoglucosaminidase 1, hyaluronoglucosaminidase 2, integrin binding sialoprotein, inhibitor of DNA binding 1, inhibitor of DNA binding 2, interferon alpha 1, interferon (alpha and beta) receptor 1, interferon beta 1 fibroblast, interferon gamma, interferon gamma receptor 1, interferon gamma receptor 2, insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor 2, insulin-like growth factor I receptor, insulin-like growth factor 2 receptor, Indian hedgehog, interleukin 17A, interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 1 receptor type I, interleukin 6, inhibin beta-A, inhibin beta-B, inhibin beta-C, inhibin beta-E, interferon regulatory factor 8, integrin alpha V, integrin beta 3, kinase insert domain protein receptor, 60S ribosomal protein L10E, klotho, lymphoid enhancer binding factor 1, leptin, low density lipoprotein

10

20

30

40

50

receptor-related protein 5, v-maf musculo
 aponeurotic fibrosarcoma oncogene family
 protein B (avian), matrix Gla protein, me
 lanoma inhibitory activity 1, microphthal
 mia-associated transcription factor, matr
 ix metalloproteinase 13, matrix metallopep
 tidase 14 (membrane-inserted), matrix met
 alloproteinase 1a (interstitial collagena
 se), matrix metalloproteinase 1b (intersti
 tial collagenase), matrix metalloproteinas
 e 2, matrix metalloproteinase 3, matrix met
 alloproteinase 8, matrix metalloproteinase
 9, homeobox msh-like 1, homeobox msh-like
 2, myogenic differentiation 1, nuclear fac
 tor of activated T cells cytoplasmic cal
 cineurin dependent 1, nuclear factor of a
 ctivated T cells cytoplasmic calcineurin
 dependent 2, nuclear factor of activated
 T cells cytoplasmic calcineurin depende
 nt 3, nuclear factor of kappa light polyp
 eptide gene enhancer in B cells 1 p105, n
 uclear factor of kappa light polypeptide
 gene enhancer in B cells 2 p49/p100, nog
 gin, osteoclast associated receptor, plate
 let derived growth factor alpha, platelet
 derived growth factor B polypeptide, pho
 sphatase orphan 1, periostin osteoblast s
 pecific factor, peroxisome proliferator a
 ctivated receptor gamma, PR domain contain
 ing 1 with ZNF domain, patched homolog 1
 , patched domain containing 1, prostagland
 in-endoperoxide synthase 2, parathyroid h
 ormone, parathyroid hormone 1 receptor, pa
 rathyroid hormone-like peptide, v-rel ret
 iculoendotheliosis viral oncogene homolo
 g A (avian), ras homolog gene family memb
 er A, runt related transcription factor 1
 , runt related transcription factor 2, run
 t related transcription factor 3, syndeca
 n 3, SFFV proviral integration 1, sonic he
 dgehog, MAD homolog 1 (Drosophila), MAD ho
 molog 2 (Drosophila), MAD homolog 3 (Dros
 ophila), MAD homolog 4 (Drosophila), MAD h
 o
 molog 5 (Drosophila), MAD homolog 6 (Dros
 ophila), MAD homolog 7 (Drosophila), MAD h
 omolog 9 (Drosophila), sclerostin, SRY-box
 containing gene 5, SRY-box containing ge
 ne 6, SRY-box containing gene 9, trans-act

10

20

30

40

50

ing transcription factor 3、Sp7 transcription factor 7、secreted acidic cysteine rich glycoprotein、secreted phosphoprotein 1、Rous sarcoma oncogene、transforming growth factor beta 1、transforming growth factor beta 2、transforming growth factor beta 3、transforming growth factor beta receptor I、transforming growth factor beta receptor II、transmembrane 7 superfamily member 4、tumor necrosis factor、tumor necrosis factor receptor superfamily member 11a、tumor necrosis factor receptor superfamily member 1a、tumor necrosis factor receptor superfamily member 1b、tumor necrosis factor (ligand) superfamily member 11、tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b (osteoprotegerin)、TNF receptor-associated factor 6、versican、vitamin D receptor、vascular endothelial growth factor A、wingless-related MMTV integration site 3A、wingless-related MMTV integration site 4、wingless-related MMTV integration site 5A、wingless-related MMTV integration site 5B、wingless-related MMTV integration site 6、wingless-related MMTV integration site 7A、wingless-related MMTV integration site 7B、sema domain immunoglobulin domain (Ig) transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain (semaphorin) 4D

(2) 遺伝子、前記遺伝子が転写するRNA、前記遺伝子もしくはRNAの核酸配列のうち少なくとも連続した30塩基以上の部分配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、のいずれかを含み、間葉系幹細胞からの、破骨細胞、骨芽細胞又は軟骨細胞へのいずれかの分化状態を、識別可能にする分別マーカーであって、

前記遺伝子が、(1)の遺伝子群から選択される2種以上の遺伝子であることを特徴とする分別マーカー群。

(3) (2)の分別マーカー群を用い、分別マーカーの発現の差を検出することにより、間葉系幹細胞からの、破骨細胞、骨芽細胞又は軟骨細胞へのいずれかの分化状態を識別する、分化識別方法。

(4) 以下の(a)~(d)のうち1種のDNAの塩基配列及び/又は該DNAの塩基配列と相補的な塩基配列を含む細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプローブ。

(a) 配列番号1~202に示される塩基配列から選択されるDNA

(b) (a)のDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

(c) (a)の塩基配列と同一性が80%以上の塩基配列からなるDNA

(d) (a)~(c)のいずれかの塩基配列に1から数個の付加、挿入、欠損又は置換を含む塩基配列からなるDNA

(5) (4)のオリゴヌクレオチドプローブが搭載された細胞分化状態評価用DNAマイクロアレイ。

(6) (4)のオリゴヌクレオチドプローブを用いて、遺伝子発現量を測定する工程を含

む細胞の分化状態を評価する、評価方法。

(7)(5)のDNAマイクロアレイを用いて、遺伝子発現量を測定する工程を含む細胞の分化状態を評価する、評価方法。

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、細胞分化を識別する遺伝子群と、それらの発現量の変化を検出するためのオリゴヌクレオチドプローブを提供することができる。

【0015】

また、本発明によれば、当該オリゴヌクレオチドプローブを搭載したDNAマイクロアレイを提供することができる。さらには、間葉系幹細胞を分化させ、その遺伝子発現パターンの変化を把握することにより、特に、破骨細胞、骨芽細胞または軟骨細胞へ分化した細胞の分化状態を細胞の種類ごとではなく、一括して簡便に評価することができる。

10

【発明を実施するための形態】

【0016】

以下、本発明を詳細に説明する。

< 1. 破骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への分化識別用遺伝子群 >

本発明における分化識別用遺伝子として関連性が深い遺伝子は、破骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞へ分化過程で変動が明確な遺伝子である。また、分化後分子マーカーとして発現量が維持される遺伝子である。例えば細胞種に特異的な細胞外マトリクス、基質分解酵素、分化誘導・調節転写因子、サイトカインとその受容体を機能としてコードする遺伝子、またはこれらに関連する遺伝子が挙げられる。

20

【0017】

(分化識別用遺伝子群)

aggrecan、acid phosphatase 5 tartrate resistant、activin A receptor type 1、activin A receptor type 1B、activin A receptor type 1C、activin receptor IIA、activin receptor IIB、a disintegrin and metalloproteinase domain 17、a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif 5 (aggrecanase-2)、adiponectin C1Q and collagen domain containing、adiponectin receptor 1、alkaline phosphatase (liver/bone/kidney)、androgen receptor、activating transcription factor 4、ATPase H⁺ transporting lysosomal V0 subunit A1、bone gamma carboxyglutamate protein、bone gamma-carboxyglutamate protein related sequence 1、biglycan、bone morphogenetic protein 2、bone morphogenetic protein 4、bone morphogenetic protein 6、bone morphogenetic protein 7、bone morphogenetic protein receptor type 1A、calcitonin/calcitonin-related polypeptide alpha、calcitonin receptor、calcium-sensing receptor、core binding factor beta、CD44 antigen、cadherin 1、chordin、chloride channel 7、collagen type X alpha 1、collagen type I alpha 1、collagen type II alpha 1、collagen type III alpha 1、collagen type VI alp

30

40

50

ha 1, collagen type IX alpha 1, cartilage oligomeric matrix protein, colony stimulating factor 1 (macrophage), colony stimulating factor 1 receptor, chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1, chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2, connective tissue growth factor, catenin (cadherin associated protein) beta 1, cathepsin K, cathepsin L, chemokine (C-X-C motif) receptor 4, cytochrome P450 family 19 subfamily a polypeptide 1, cytochrome P450 family 24 subfamily a polypeptide 1, cytochrome P450 family 27 subfamily b polypeptide 1, dickkopf homolog 1 (*Xenopus laevis*), dentin matrix protein 1, ephrin B2, epidermal growth factor, Eph receptor A4, Eph receptor B4, estrogen receptor 1 (alpha), estrogen receptor 2 (beta), fibroblast growth factor 23, fibroblast growth factor 10, fibroblast growth factor 17, fibroblast growth factor 18, fibroblast growth factor 2, fibroblast growth factor 4, fibroblast growth factor 8, fibroblast growth factor receptor 1, fibroblast growth factor receptor 2, fibroblast growth factor receptor 3, FMS-like tyrosine kinase 1, fibronectin 1, FBJ osteosarcoma oncogene, FBJ osteosarcoma oncogene B, fos-like antigen 1, fos-like antigen 2, follistatin, frizzled homolog 1 (*Drosophila*), gap junction protein alpha 1, GLI-Kruppel family member GLI1, GLI-Kruppel family member GLI2, GLI-Kruppel family member GLI3, gremlin 1, gremlin 2 homolog cysteine knot superfamily (*Xenopus laevis*), human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 3, perlecan (heparan sulfate proteoglycan 2), hyaluronoglucosaminidase 1, hyaluronoglucosaminidase 2, integrin binding sialoprotein, inhibitor of DNA binding 1, inhibitor of DNA binding 2, interferon alpha 1, interferon (alpha and beta) receptor 1, interferon beta 1 fibroblast, interferon gamma, interferon gamma receptor 1, interferon gamma receptor 2, insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor 2, insulin-like growth factor I receptor, insulin-like growth factor 2 receptor, Indian hedgehog, interleukin 17A, interleukin 1 alpha, interl

10

20

30

40

50

eukin 1 beta, interleukin 1 receptor type
 I, interleukin 6, inhibin beta-A, inhibin
 beta-B, inhibin beta-C, inhibin beta E, int
 erferon regulatory factor 8, integrin alp
 ha V, integrin beta 3, kinase insert domai
 n protein receptor, 60S ribosomal protein
 L10E, klotho, lymphoid enhancer binding f
 actor 1, leptin, low density lipoprotein r
 eceptor-related protein 5, v-maf musculoa
 poneurotic fibrosarcoma oncogene family 10
 protein B (avian), matrix Gla protein, mel
 anoma inhibitory activity 1, microphthalm
 ia-associated transcription factor, matri
 x metalloproteinase 13, matrix metallopept
 idase 14 (membrane-inserted), matrix meta
 lloproteinase 1a (interstitial collagenase)
 e), matrix metalloproteinase 1b (interstit
 ial collagenase), matrix metalloproteinase
 2, matrix metalloproteinase 3, matrix meta
 lloproteinase 8, matrix metalloproteinase 9 20
 , homeobox msh-like 1, homeobox msh-like 2
 , myogenic differentiation 1, nuclear fact
 or of activated T cells cytoplasmic calc
 ineurin dependent 1, nuclear factor of ac
 tivated T cells cytoplasmic calcineurin
 dependent 2, nuclear factor of activated
 T cells cytoplasmic calcineurin dependen
 t 3, nuclear factor of kappa light polype
 ptide gene enhancer in B cells 1 p105, nu
 clear factor of kappa light polypeptide 30
 gene enhancer in B cells 2 p49/p100, nogg
 in, osteoclast associated receptor, platelet
 derived growth factor alpha, platelet
 derived growth factor B polypeptide, phos
 phatase orphan 1, periostin osteoblast sp
 ecific factor, peroxisome proliferator ac
 tivated receptor gamma, PR domain contain
 ing 1 with ZNF domain, patched homolog 1,
 patched domain containing 1, prostaglandi
 n-endoperoxide synthase 2, parathyroid ho
 rmone, parathyroid hormone 1 receptor, par
 athyroid hormone-like peptide, v-rel reti
 culoendotheliosis viral oncogene homolog
 A (avian), ras homolog gene family membe
 r A, runt related transcription factor 1,
 runt related transcription factor 2, runt
 related transcription factor 3, syndecan
 3, SFFV proviral integration 1, sonic hed
 gehog, MAD homolog 1 (Drosophila), MAD hom
 olog 2 (Drosophila), MAD homolog 3 (Droso 50

phila)、MAD homolog 4 (Drosophila)、MAD ho
m

olog 5 (Drosophila)、MAD homolog 6 (Droso
phila)、MAD homolog 7 (Drosophila)、MAD ho
molog 9 (Drosophila)、sclerostin、SRY-box
containing gene 5、SRY-box containing gene
6、SRY-box containing gene 9、trans-acti
ng transcription factor 3、Sp7 transcript
ion factor 7、secreted acidic cysteine ri
ch glycoprotein、secreted phosphoprotein
1、Rous sarcoma oncogene、transforming gro
wth factor beta 1、transforming growth fa
ctor beta 2、transforming growth factor b
eta 3、transforming growth factor beta re
ceptor I、transforming growth factor beta
receptor II、transmembrane 7 superfamily
member 4、tumor necrosis factor、tumor ne
crosis factor receptor superfamily membe
r 11a、tumor necrosis factor receptor sup
erfamily member 1a、tumor necrosis factor
receptor superfamily member 1b、tumor ne
crosis factor (ligand) superfamily membe
r 11、tumor necrosis factor receptor supe
rfamily member 11b (osteoprotegerin)、TNF
receptor-associated factor 6、versican、v
itamin D receptor、vascular endothelial g
rowth factor A、wingless-related MMTV int
egration site 3A、wingless-related MMTV i
ntegration site 4、wingless-related MMTV
integration site 5A、wingless-related MMT
V integration site 5B、wingless-related M
MTV integration site 6、wingless-related
MMTV integration site 7A、wingless-relate
d MMTV integration site 7B、sema domain i
mmunoglobulin domain (Ig) transmembrane
domain (TM) and short cytoplasmic domain
(semaphorin) 4D

【0018】

遺伝子の具体的な遺伝子名、及びGenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> から取得可能)のAccession number (アクセ
ッション番号)は表1~表6に示される。

【0019】

10

20

30

40

【表 1】

ProbeNo.	GeneSymbol	RefSeq_ID	Sequence
1	Acan	NM_007424	AGTAGGGCGGTACAGAGCTTGGAGGACTCAGAAAGGCCAAAGTACAGCTTAGTGTGTTGGACAA
2	Acp5	NM_001102405	GAAATGACCATCATATATGTGGAAGCCTCTGAAAATCACTCTTAAAGACCAGCCTCCCAAGGAG
3	Acvr1	NM_001110204	CTGTAACCTTTCTTTTCAGTTGATGAGAACATATTTAGCCATTACCCATGCAACACCACCCGGA
4	Acvr1b	NM_007395	AAACACAAAAATTCCTCCAGACTCAAACGCACATAGTTCAGTCACTGGAAAAGCTTGTCTTTGCAC
5	Acvr1c	NM_001111030	GCTTTTAATAACAATTGCATAACTTCTGCGGCTCCAGGTGTACATTCTCTCTGCCTAAATGT
6	Acvr2a	NM_007396	AGCTTTACTCTGTATTTCTTGTCAAGTGTGTTGGGCACAGGTTGTACTACTGTCAATTTGTAC
7	Acvr2b	NM_007397	TAGAAGAGCGGTATCCCTGATCAGGAGTCCGTCACCGGCACTACCTCGACTGTCTCTCTCT
8	Adam17	NM_009615	GCTGTGCATTGATGATACCTGCCTCAGTCAATAAATACTGAATATCAAAGCAGTGGATTGGTA
9	Adams5	NM_011782	GCCATACTGTGCTAATACCACCTCATCTATTACACTGAAACATGGACCGTACAAATGCATTACA
10	Adipoa	NM_009605	GACGCGCACTGGCAAGTCTACTGCAACATTCGGGACTCTACTACTTCTTTACCACATCAC
11	Adipor1	NM_028320	CCCTTACCOCCTCCTTACTTTGTAACCTGGCTGATAACGGGCCATCCATTTTGTAGCACACT
12	Alpl	NM_007431	CCACCAAATGCAGAGACTCGCCAACCCCTTCACTGAAGTGGCTCTCTGTTTGAATAGCGGGT
13	Ar	NM_013476	CTGCTCAAGGCGCTTCTACCAGCTCACCAGCTCCTCGATTCTGTGAGCCTATTGCAAGAGAGC
14	Atf4	NM_009716	AAAAAGAATGAGGCTCTGAAAGAGAAGGCGAGTTCTTGGCCAAAGGAGATCCAGTATCTGAAAGA
15	Atp8v0a1	NM_016920	TCTTTGTGGGACCCGTGCAAGGCTTCTGTCCAGACATCTTATCCGGAATAAGTGTGTTTGA
16	Bclap	NM_007541	GACTCTGACAAAGCCTTCATGTCCAAGCAGGAGGGCAATAAGTGTGAAACAGACTCCGGCGCTA
17	Bglap-rs1	NM_031368	TGAGAAGAACAATAGTGTGCTGTTCTTCTGCTGGTCAAGTCAAGGCAACAGGAGGGTGCAG
18	Bgn	NM_007542	CCCAGCAAGAGGGAGTGCCTTATGAGTCAAGTGTCTCTCAATTAAGAAACACTGTGCAATA
19	Bmp2	NM_007553	GCCTGACACGCAGCAAAATGAGCATAATGTTTCTGCTGCACCCTGTTCTCTGACTGTCAAGT
20	Bmp4	NM_007554	TTATCAGGAGATGGTGGTAGAGGGGTGTGATGCGCTGAGATCAGGCAGTCCAGAGGGGGACA
21	Bmp6	NM_007556	ATTCTAACAAACAACATCTGCCTTAAACCACGAAACAACAGCACAGGCAAGGGGATGGTACACA
22	Bmp7	NM_007557	CGCCCTTCTCTGCAAGTGAAGGACAAGTCTACCAGCTACCACAGCAAAACGCTAAGAGC
23	Bmpr1a	NM_009758	GCAGGGACAGTCTCCACCTCTGGCTGTAAGGAGTGGAACTAGGCAAGCAGTGTATCAGTCC
24	Calca	NM_007587	ATTACTGGTTGCTTCTCTGAGGCAAGAATGTTATCTGAAATCCCCAGTGGGTGAGGAGAAAGTC
25	Calcr	NM_007588	GGTGTGTCCTATGTTTTGTTTACACACATCGAAATCAGTGTATTTTCAGGCAGCTCTAGTACAA
26	Casr	NM_013803	GGACTGACTCAACCCACGAGCTGTCTCTGTAACATAATCAATGTACATAGCGTAACTCTTAAG
27	Cbfb	NM_022309	GAGCTTCCAGTCCGGCAGTCAAGATCACATGGTGTAAATGTGGCCGCTCCCTCTGTAATAGC
28	Cd44	NM_009851	TTGATTGACTAATAATAATGAGSAAAACCTGATGTGTACATTACCCGATTGAAAGTGTGATTGG
29	Cdh1	NM_009864	GTGCTGATAATTTTGTATTTTGTGGGGGGTGGAAAAGTAAAGCCATTGAAACCGTTCTCTAAGAT
30	Chrd	NM_009893	TTATTGGGATCTTAAATTTATCCTCACTCAGCACCAGGTTCCCTCACACCATTCCTGCTACC
31	Cln7	NM_011930	AGGCACTCAGCATGGTGATAAACAAGTGCAGATGGCACITTTAAACAGTAGTTGCTGTCTGTGTCG
32	Col10a1	NM_009925	ATCCTATTCTCCGCTTAGAAAGGCTTCCACCCAATCCATGCGCCCTCCCTGGAGATGCATTT
33	Col11a1	NM_007742	AGGAATTCGGACTAGACATTGGCCCTGCCTGCTTGTGTAACCTCCCTCCACCCCAATCTGGTTC
34	Col12a1	NM_031163	CAAAATAAAATCTCGTGTCTATTTATTTATTGTCTTCTGTAAGACCTCTGGGTCCAGGCGGA
35	Col3a1	NM_009930	CTGTTGCTGGTGAACCTTGAAGTATCTGGAAGGCTTTAAAGACACATGTTAAGGTGCTAATGTA
36	Col6a1	NM_009933	CTTAGTGGCTAGTCTTCCACTCTGAAAGCAAGGTGCTATCTATCTGTAAGGGCTCTCTCTACA

10

20

【 0 0 2 0 】

【表 2】

ProbeNo.	GeneSymbol	RefSeq_ID	Sequence
37	Col19a1	NM_007740	GGCTGTGTCCAAAAGTGGTCTCTATACATCGCATGGTGGTTTTGATATTTACTATGAATTTGTG
38	Comp	NM_018685	AACATCATCTGGGCTAACCTGGGTACCGTTGCAATGATACAATCCCTGAGGACTACGAGAGTCA
39	Csf1	NM_007778	ATTGCAAGAAGCTCTTTGTGGTGCCTGGTTACATCGGAGCAGGGGAGCCTCAAATCCACCTTTG
40	Csf1r	NM_001837859	TATAGTCCCGCTCATCCTGGATCTTGTACTGAGCGGAGCTAAAAGTGTCTACCCAGTGCCT
41	Csgalnact1	NM_172753	GCCTTCTGTCTGCCCACAGTGAACATGTTGTAATGCTTCAAGAACACTCAAGCTGTGTGTTA
42	Csgalnact2	NM_030165	GTGAATCCGATTCAATAAATAACTAGTTGCTGAGGGTCTACCCGGCATATCGTTGAGTATTTT
43	Ctcf	NM_010217	GTGGGGGCGAGTTTATTTGTTGAGAGTGTGACCAAAAGTTACATGTTTTGCACCTTCTAGTTGAA
44	Ctnnb1	NM_007614	TGGACAGTATACCAGTTGCCTTTTATCCCAAAGTTGTTGAACCTGCTGTGATACAAATGCTTCAA
45	Ctsk	NM_007802	ATGCTAACTAAGATTGTTTCATTTCTCCTCGTGGTGTCCAGTGACAACCTACTTCCTT
46	Ctsl	NM_009984	CGGATTTACCTCAGTGTCCCATCAGATTAGGTATGTTAGTGAATCTAGCTTGGGATAATTTG
47	Cxcr4	NM_009911	GCAGGACTGTGGCCAAAGTCTTAGTAGCTGTTATCTGTGTAGGACTGTAGAATGTAGAGG
48	Cyp19a1	NM_007810	CCAGGAGTGTAGTTAGACTGTAGTAGGTATAGATTCAGGTAAAACATGCCTAAGTAGTATTAGCC
49	Cyp24a1	NM_009996	GAGCCCCCTGGTAAGCACAATTTCAAAAACGAAAACACAGTTATGACCTACTGACAACGTTTT
50	Cyp27b1	NM_010009	GTGGATCCACTTCTTATCATCCATCTTTGGCTGCCCTCCTCCAGCTGTCTTTTTATATTA
51	Dkk1	NM_010051	CCAGATGATGGCAGAAATTCAGAAAGAGATTATGCAGAAGGAAGCTGCCAACTTAAGCCAAATAA
52	Dmp1	NM_016779	GGCTCAATGATGAGGAGGAGGAAAGAAATTTGGTGTGGAGTGGGAGAAAACATAATTAAGG
53	Efnb2	NM_010111	ATCTGAATTTTGCATGTTTATTTAGCTACAGCTTGTTTAACGGCAGTGCATCCCTTTGCACTGT
54	Eef	NM_010113	AACCAGCTGATGATGGTAGAATGCTACAGACTTGGTACTCCAGTTTCCAGGGCTAATCACTGCT
55	Epha4	NM_007936	GTGTTCAACAATGATTACTGTGTGTGTTCTGAGACCTCTGTATTATCTGTGAAGGGACGCTG
56	Ephb4	NM_001159571	TCGATATGTTCTAGAACAGTGCCTTGGAAATGCCACAGCCTTAGACAGTTCTTCTTCTTCTCT
57	Esr1	NM_007956	AATGACCAGAATGGGTCATGAGAGTCCCTTTGAACAAGGGGATAAAAAAGGAACTACTCTATC
58	Esr2	NM_010157	ACTTCCCTCCAATAAGGCCATACCTATTCTAACAAGGCCATACCTCTTAAGAGTGCCACTTCCAT
59	Fgf23	NM_022657	GCAGCTTCTAGTTACTATTCTGGGATTCACGGGTGTTTGGTTTGGACACCTTGACCTTAATGTC
60	Fgf10	NM_008002	TTAATGTTTTACATGTGTGAGCGGGCTATCCTTACCCTAAACAACCAAAATGCTTTCGGTTCF
61	Fgf17	NM_008004	ACAACGTGTCTCAAATCTTGCCTCCCTGAACCTCTCTGAATCTGAACCAAAATAGCCAAACTCTGG
62	Fgf18	NM_008005	GAGGAACTGCGAGAAACCAAGTCCCTTTCCCCCAAGGTTCTGAAAGCAAAACAAAACAAAAC
63	Fgf2	NM_008006	GTGTCTATCAAGGGAGTGTGTGCCAACCGGTACCTTGCATGAAAGGAAGATGGACGGCTGTGGC
64	Fgf4	NM_010202	TGGGAGTCTCCCAAACCTTCTTCTGTCTGGTGGCTCACAGGACAATAAGATTTTGTGTTTTT
65	Fgf8	NM_010205	TCGGCGCACAGCAAAGGGAGGGGCTGGGAGCTGCCTTCTAGTTGTGCATATTGTTGCTGTT
66	Fgfr1	NM_010206	AACTTGGCAACTCAATTTCTGCCACCTGCTGGTTGCTTTGGTACCTTGGTCTCTTATTCAAACCCA
67	Fgfr2	NM_010207	TCCATCTTCTTAAGGGTTTGGCTTCTGGCTTCTACCCACTTCTGACAAGACCTCACCTCACAAAAA
68	Fgfr3	NM_008010	ACTTTCTTGGGGCTAGCACATGGTTTGTCAAGCCACACTGGCAGATGTGGTTTTGTTAACACAA
69	Flt1	NM_010228	CATCTTTGTCCATTCGCAAAAGCTCTTGTGGCTGCAGTGTGTAAGTCAGGCGATGAGACAGAGG
70	Fn1	NM_010233	GAACAACACTAACGTAAATGCCCCATTGAGTGTCTCATGCCCTAGATGTGCAAGCTGACAGA
71	Fos	NM_010234	AAACACGCTTCCCTCGAAGGTTCCCGTCGACCTAGGGAGGACCTTACCTGTTCTGTGAAACACAC
72	Fosb	NM_008036	ACTCTGATCTCCGGTCTGTCTGTTAATTTCTGGATTGTGCGGGACATGCAATTTACTTCTGTAA

10

20

【 0 0 2 1 】

【表 3】

ProbeNo.	GeneSymbol	RefSeq_ID	Sequence
73	Fos11	NM_010235	TTTCATGTTATCCAGCCTACTCTACACCTAGACAGAAAGGTGCCCTTTGACTAGCCTAGAACACTAA
74	Fos12	NM_008037	GGAGGGTCGCTCTAGTTGAACTCTCCAGGCAGGACCTTATGCTCAGAAATCTTTGTATAGTTTAA
75	Fst	NM_008046	ATGTCTGCTCCGTCGCCCTCGTTCTGGTGAACGTTGGGAGAGAGGATGAGAGAGACATTAAAATT
76	Fzd1	NM_021457	TGGTTGACTTCCGAAGACAGAGGGGTGGACTCACGGATGGGTGAGAGAGACAACACGACCTA
77	Gja1	NM_010288	GTTTCCTCTTCCGGCCAGCTACACAAGGAGTTTTTGGACAATGAGAACTAATTTGTTTGACAT
78	Gli1	NM_010296	ATTCTCAACTCTAGTGCTAAAAGGGTAAGGAACCCCAAGCAGATGGTATTTCCTAAATGGCTA
79	Gli2	NM_001081125	ACATAGACCCTAGCTTCCATTCTGTCTGTATCTATTTTGTGTAGACATCGCTTGGCTGAATAG
80	Gli3	NM_008130	ACAATGTAATACATTTCAAGTATTGTAGACGTAGAGTTGGGATGTGTAGGCTCGGGCCTTCCTT
81	Grem1	NM_011824	GTCTGTAGCCATGTTCTAAATTAATTCACCTTGACCGGGGTGAAGTCTTTGTCTTGTGAAGA
82	Grem2	NM_011825	ATCAACAAGAAGAAATTTGGTGGATGGCTCTCACCTCCAGTCTATGGGAACCTCAAGCCTTTATT
83	Hivep3	NM_010657	GTCCCTGAGGACAACATGTCACATTTCTTCATGGCTGGATTAACGATGTGTGTGTATATA
84	Hspg2	NM_008305	AAGGGAGACCAACTCTTTCCAGAATCGCTAGGCAGAGCCAGCAATGAGTCCACCACACCAG
85	Hyal1	NM_008317	CAAGCACTAGAAGTGGGCTAACTCATTCACTTTCGCAATGGACATGCAGGGAAGCTGAGCCTTT
86	Hyal2	NM_010489	ACCTGCCAATACCTCAAGAATTAACCTAATCAGCTGCTGGTTCCTACATAGTCAAGGTGCTCTG
87	Ibse	NM_008318	AACTCAGAGGATCTGGAAGCATTCTTCTTCAATACATCTGAATGGCTAAGGTTTACTAAGGAG
88	Id1	NM_010495	CCCTTCAGGAGGCAAGAGGAAAAAGTGTCTCCGGTCCCCAGGGATCTCTGGGAAAGACACTA
89	Id2	NM_010496	TTTCACAAGGTGGAGCGTGAATACCAGAAGGACCCAGTATTCGGTTACTTAAATGAAGTCTTG
90	Ifna1	NM_010502	CCAGGAGATGCCCTGCTGGCTGTGAGGAAACTTCCACAGGATCACTGTGTACCTGAGAGAGA
91	Ifnar1	NM_010508	AAGTGTACTGTCTCTCATTCTCTGTCTCTGAGATCCCTTCTGCTACCTCAAGAGACTAAGA
92	Ifnb1	NM_010510	ACAGCCCTCTCCATCAACTATAAGCAGCTCCAGCTCCAAGAAAGGACCAACATTCGGAATGTCA
93	Ifng	NM_008337	CAGCAAGGCGAAAAGGATGCATTTCATGATTTGCCAAGTTTGAGGTCAACAACCCACAGGTCC
94	Ifngr1	NM_010511	TTTCAACTGAAAGCTACTCAAAGCCAGCCGTAAGTCTATGGTAGAATGTGATGGAACATGTTGGT
95	Ifngr2	NM_008338	TTTCTCTTTCTTGTCCCTTACCACGTCCGCTTCTTTGCCTGTTTTCCGTAAGTATTGACTTG
96	Igf1	NM_010512	GGCTCCATCCATATCTCCTATCCGTTGCTCTGTATCCTTAAACCTTGCAACATCATACAGTGTA
97	Igf2	NM_010514	CAGGTGTTTGCCTCAACTCAGTCCCTCTAACATGCATTTTCTGGCAAAATCCAAAGCTTGGGTTT
98	Igf1r	NM_010513	TCTGCTCCTATGCCAGTGAGGTTGAAGTAAGAGTTTTGCCAGAGTTCATCTACCTCTGGGATTT
99	Igf2r	NM_010515	GGCTGTGGATCTTTTCTTGATGTGTTCAGTGACTTGTCAATATAGAGTTGTATATAGGTGGC
100	Ihh	NM_010544	TTTGTGTCAATGGGCGGAGTCTCTGATCCGGGCAATGTSACCTACTACCTGGGACTGGGGAAG
101	I117a	NM_010552	GGCAGCCTAAACAGAGACCCGGCTGACCCCTAAGAAACCCCAAGGTTTCTCAGCAAACTTACT
102	I11a	NM_010554	GGAACTCCCTTAAATCCTCTGAGCTTGACGGCACCCCTCGCAGCAGGGTTTTCTAGGTGGTCAGT
103	I11b	NM_008361	CATTAGGCAGCACTCTCTAGAACAACCTAGCTGTCAACGTGTGGGGATGAATTTGGTCATAGC
104	I11r1	NM_008362	AGAGTCTTAGAAACTTGGCCAGAGAGGATAAAGGGGAGAGCAGTGACAGAGAAACCCGCGATCTT
105	I16	NM_031168	ATCTACTCGGCAACCTAGTCCGTTATGCCTAAGCATATCAGTTTTGTGGACATTCCTCACTGTGG
106	Inhba	NM_008380	AACAGTCATTAAACACTACCGCATGAGGGTACAGCCCTTTGCCAACCTTAAGTCATGCTGTG
107	Inhbb	NM_008381	AGCGAATGATTGCTTTCAATGTTTGCAGTGTCTAGTTGCATGGTTAGTCAGAAACTGCCATTTG
108	Inhbc	NM_010565	ACATACCAAGTCTATTGGTTGACATTCCTCTAGTTTCCAGCTGAATTTGACCAAAAAGGAGACT

10

20

【 0 0 2 2 】

【表 4】

ProbeNo.	GeneSymbol	RefSeq_ID	Sequence
109	Inhbe	NM_008382	CCCCAGCGGGTTTCTGAGACTTTCTCAGGGGTTTTCAAGACTATTTTCATAATCACACTGAGATG
110	Irf8	NM_008320	CCCTACCGCACCATTTCGGCCCCAATCTGGCTGTCCAACCTAGTTTGAAGTAATCTAAATCAG
111	Itsav	NM_008402	CTTCTCTCGTGATCACCCACATTGGGTGAGACATAAGATGAGTCTCTCTGAAATCTGTCAATTTG
112	Itgb3	NM_018780	ACAGCAACATCAGAGTCTTTGTCCATTTTGGTTGAAATGCTTACGGCCCTTCCTGACACCCTC
113	Kdr	NM_010612	TGGTTGGTTTGCCTCCAGATAATCACTAGCCAGATTCGAAATACTTTTTAGCCGAGGTATG
114	Rplp0	NM_007475	ATCAGATGAGSATATGGATTCGGTCTCTTCCACTAATCCCGCCAAAGCAACCAAGTCAGCTGC
115	Kl	NM_013823	TACACCTGAGTGGTCTTATTGATAACCCCTGATACCAGATCAGGCAAGATAAATCCGTCATAGCAG
116	Lef1	NM_010703	CTTCTGTCTACTGCAAGGCGGACTTCCAAAAGAAAGCCGAAACGGTTTTCGGAAAAA
117	Lep	NM_008493	GACTGAAGAGACCGGGAAAGAGTGACAGGAAGTGTGAGAGACTTTATGGGCCACAAAAGTGGC
118	Lrp5	NM_008513	TGAACCCACCCCGTCCCGGCCACAGACCCCTCTCTCTACAACGTGGACGTGTTTTATTCTTCA
119	Mafb	NM_010658	ATTCGTCTGCATCGAAACGAGCTTTGGTTTTACTGATTCAACTGTGTGAAATCAAACCTGC
120	Mgp	NM_008597	TATACAGACACGSCATGTGTGCTTGCCTTACATGATCTCCTAGCTGGCTGGCCCACTCCTTCC
121	Mia1	NM_019394	TGATTGCCCTTCTTGACTATATAGGGCCCAAGTGGTATGTCTTCTCCAAGTTGAAGGGCC
122	Mitf	NM_008601	GTGCTGTCCGTTTTCATTCAGGGGAAACTTGGTGTGAGCTTTGTCTGTGTGACCTCCTTTG
123	Mmp13	NM_008607	GCAAGCCAGAAATAAGACTGTGCCAGCTGGTCAGTCGCCCTTTTGAGACCACCTCTTTGTGCTCC
124	Mmp14	NM_008608	CCTAGTTGGCTGCCCTCCCGCACTCTGACTAAAAGGAATCTTAAGAGTGTADGTTTGGAGTGGGA
125	Mmp1a	NM_032006	GGAGAGTCAACAGAAAGGCTTTCCAAAGTAAAAATGGCTCTGAAAACAGGAACAGGTACATGA
126	Mmp1b	NM_032007	GGAAAGAAAGTATTTGTACAGTGGATAACTCTCACTGTGGTCTATGTATCTCCTTTCAAGAGAG
127	Mmp2	NM_008610	CCTCCTGTAGTTAACCAGCCTTCTCCTCACCTGGTGACTTCAGATTTAAGAGGGTGGCTTCT
128	Mmp3	NM_010809	GTGCTTTGTTCCAGCATGTGCTATGGCAGAACCAACAGGAGCTATGGATGACACCAGTCAACGTC
129	Mmp8	NM_008611	CTGCATATTCGTCCTGGTTCGTGAATGCATCACAAGAGAGCAAGCCGTTTACTACCTTACTC
130	Mmp9	NM_013599	GGGCGCGGCTCCAACCGCTGCATAAATATTAAGGTATTCAGTTGCCCTACTGGAAGGTATTATG
131	Msx1	NM_010835	ACTTGCACAGAGAAATGCTAATCGGTGCTTCAAGAGATGAGCCAGCCCTATAGAAAGCAAGGA
132	Msx2	NM_013601	GTCTCACCTCCTGTCCATCTCTCCCCAGTATATTTTATCCCGTTGAATGGGTATCTGTAT
133	Myod1	NM_010866	TATTTATCTCCAGGCATGCTGTGTAGTCAACAAAAAATTTGTATGTTTATTCCTCAAGCGGGC
134	Nfatc1	NM_016791	GCTGTGAAGTCCGAGCCTCCCTTGAGCCTTCTGTATTATTAAGTGAAGTTTCATGTATACTAG
135	Nfatc2	NM_010899	AATGAAGTCTGGGAAGTGGAGTCAAAAGTGTAAATGCTTTCAGATGGGAATAAAGTCCCTGCC
136	Nfatc3	NM_010901	TTGGCTTGAGGAAGGAATGAAGGAGCAGCCTCTGTTTACTAGAAAAATGTTTGGGTTACACAGT
137	Nfkb1	NM_008689	CGAATTTGGCGTCTTCTTTGGTCTGAAATGAAATGAGTGTGCCACGCACAGACGGTGTCTAGC
138	Nfkb2	NM_019408	ATACCCAAAGAAACTTCGAGGCCATACCCCTCTTGACCTCACTTGCAGTACCAAGGTGAAGACT
139	Nog	NM_008711	ACCTCATCGAATCCAGACCCTATCTTTGACCCTAAGGAGAAGGATCTGAACGAGAGCGTCTGT
140	Oscar	NM_175632	TTTAGTGAATTTTTTAGTATTGAACCCAGGTCCTCTCAGTGTAGGCAAGTACTTTACCCGTG
141	Pdafa	NM_008808	CAAAGCAAGTACTGTAGCACTCAGAGAGCAGTGAGAAAGCTTCCCTTGTACAGAGAGCGGAAAAAC
142	Pdafb	NM_011057	GGGAGAACAGCCCTCGCTGCACAGGTGCCCTCTGATCTTTTGGGTTCTACCCGATGGCTCCT
143	Phospho1	NM_153104	TTGCATTCCTTTTGGCCTTATGGAACAGAAAGCCATGTTTTTAAGCAGAGCCAGGGAACCCAA
144	Postn	NM_015784	CAAAACAACCTACCAAAATAGAACAGTGGTGTACATATTTCTCATGCAATGGGTTTCTCTGC

10

20

【 0 0 2 3 】

【表 5】

ProbeNo.	GeneSymbol	RefSeq_ID	Sequence
145	Pearg	NM_011146	GTCATTATTCTCAGTGGAGACCGCCAGGCTTCTGTAACGTGAAGCCATCGAGGACATCCAAGA
146	Prdm1	NM_007548	ATACAAATACGATTTCTTTGCAGTGAACCTGGGTGTGTTTCTCCTGTGCTTTTCTGTGTGGG
147	Ptch1	NM_008957	TATGAGAGCTACCCCTGAGACTGATCAGGGGATTTAGAGATCCTCATGTGCCCTTTTCATGTCCAG
148	Ptchd1	NM_001093750	TAAATAACCACTCCCAATTTGCTGTGGCATTCTAAGACTATGACACTACCTTCCCAADCCCA
149	Ptgs2	NM_011198	GGCTGTTGGAATTTACGCATAAAGCAGACTGCATAGATCCAATATTGACTGACCCCAAGCATGTTA
150	Pth	NM_020623	CCTGGGCAACACCTGGCTCCATGGAGAGATGCAATGGCTGAGAGGAAGCTGCAAGATATGC
151	Pth1r	NM_011189	ATTGAGAACGAACCATACCAGTTACTATGACAGTTCCCAAGGACGACGGCTTCCCTAATGGCTC
152	Pthlh	NM_008970	CGGTTTGGTTCAGACGATGAGGGCAGATACCTAACTCAGGAAACCAACAGGTGGAGAGGTACAA
153	Rela	NM_009045	CCTTAGGCCATATAGCCTTACTATCAAGTGTCTTCCCTCCACGGGATTCCTGTACACCTTGTATCC
154	Rhoa	NM_016802	ATATATCATTCTAGTACCCCTTCCAGACTGGACTAAGTAGGAATTTGGTTTCCCGCTGAGGCA
155	Runx1	NM_001111022	GGCAGGGCAGCCCTAAGCTACTGATGTTTTCTTCCCTTGTACTATGTCTTTTCTGTAACCTCCA
156	Runx2	NM_009820	CCAAATTTGCCTAACCAAGATGATGGTGTGACGCTGACGGAAGCCACAGCAGTTCCTCAACTGT
157	Runx3	NM_019732	AACTTGTGTACAGGTCAACTGTCCATCTTGGGTACTATTTAACTGTCAAACAGAGGAATCTGT
158	Sdc3	NM_011520	ATCAGGGTTACCTCCCTTCCCGACAGCTTCCCTACCGGTTCTCCCTATAAACCCTGTTTATTA
159	Sfp1	NM_011355	GCCACGGTCTCCTTGGGAGTCTGGCGCTGGCACCTTTTTGTATATTGAATGCTTTTTAAAAAG
160	Shh	NM_009170	CGAGCCCAAGAGGATGGAGCTGTAGTTTGTACAGAGAAAAACAAGGATGTTTTGCAATTAATA
161	Smad1	NM_008539	AGAAATTTGGAGTTAAGAATAGTCTAAATGGCTAGTGGTTTACAGAGTATCTGAGGGGGGG
162	Smad2	NM_010754	GTAGTAGTGTGTACAGGTAATGTGTCCAGACCCAGTATTGCAGTACTATGCTGTGTGTATACAT
163	Smad3	NM_016789	GGTCTTGTCACTCCTTAGCCAGCCAGGCTTGTAGTCTTTGTAATAAAGCATGTATTTATAGTG
164	Smad4	NM_008540	GAGATTCACACCAACGACCCCTAACCATTTCCAGGATGGTGGACTATGAAATATACTCGTGT
165	Smad5	NM_008541	CCCTTTTGGGTTTGGTTTTAGATDCAATTAGCTTTGTCTGAACCCATCTTTGTCGGCCGAGTA
166	Smad6	NM_008542	TCCTGCCCTGTTGGCTGGAGATCCTACTCAACAACCCAGATAGCAATGGGCTGCCACTGTGC
167	Smad7	NM_001042660	TGAACAAGAGAAGCATTCTCATTGGAATTTAGCATTGTAGTCTTTGAGAGAGGAAAGGACTCC
168	Smad9	NM_019483	CTGTCGTTTGGAGCATCCTACCTTAGCAACTCAACGCCACCTCCATCAAGGAACATGTCTATAGG
169	Sost	NM_024449	TAAAAATGGGACCGAACTCTGCTGAGATCCAAAGGATGGGGTACCCCGTGTAGACTGGTGGAGA
170	Sox5	NM_011444	ATGCGACAGTACTTCAACGTTGGGCAACAAGCAGACAGATCCCATCGGACGGCCGGAGTTGTATA
171	Sox6	NM_011445	GCAGGATTTCTCTTGGCAATCATGTTGTTTCTAATGCTGCACATGATCGTGCATCTGCACAGCA
172	Sox9	NM_011448	CTGCTCAGACTATCACCTGTACCTCCCTGAATACCAGGTTTAACTTCAAGACATCCCATGTGC
173	Sp3	NM_001018042	GTCTTGTAAAGAGCTCTACACTTTTCCCTACATGTACCTACAACACAGCAGTTCATCTATTTCCAGG
174	Sp7	NM_130458	CTATTTATCTAAGTTATGATGAGCGGTCAGGTACAGTGAAGTGGAGAGGAAAAGGGATTCTCCCC
175	Sparc	NM_009242	CACCTCTCCCAACCCCTGCCACTTGAACCTTCTACTAATCAAGAGAACTTCCAAAGCCAAACGG
176	Sppl	NM_009263	CAACAACGGAAAGGGCAGCCATGAGTCAAGTCAAGTGAACCAAGTCTGGAAACACACAGAC
177	Src	NM_009271	TTTAAATGTGAAGAATCCCTACTCTATCCAGACACGACCATTTCAACCCATTGCCCATCACA
178	Tgfb1	NM_011577	CCCGTGCAGAGCTGCCCTTGCAGAGATTAATAAAGTGTGGAGCAACATGTGGAACCTTACCAG
179	Tgfb2	NM_009367	TTTGGTCTCATGGGTGATTAATAAAGACACAGCTTTGGTTGAGTTTTTCAAGGGGGAAAAAG
180	Tgfb3	NM_009368	GCACCTGCCTGGAATTAAGCAATCCGTTCTTCTGCAACTGTCTTTTCAACCTCGATCAGCATCA

10

20

【 0 0 2 4 】

【表 6】

ProbeNo.	GeneSymbol	RefSeq_ID	Sequence
181	Tgfb1	NM_009370	TCCTATTGTATTGTGCAGTCCCTTAACCCCTGTTGGTGTGATTGCTGCCCTTTCAGATATGTGCA
182	Tgfb2	NM_009371	AGGAATAGCATCGCTGTCACTTCCCAAAGTGTGACTCTTGTTCACTACTACATAAAGGGAAA
183	Tnfrsf4	NM_029422	AAAGGCTTAGATATTTGAAAACTTGGTCCCAAGTGTAGTGCATCTTGGGGGAGGCTTATAAGGTG
184	Tnf	NM_013693	AATGGCTTTCCGAATTCACCTGGAGCCTCGAATGTCCATTCCTGAGTTCGCAAAAGGGAGAGTGG
185	Tnfrsf11a	NM_009399	CCATCTCCCTGGTTTCCCTCCTGACTGAAGTTCCTCTGGTGTAGCAGTGTGATCTGATTTT
186	Tnfrsf1a	NM_011609	TTCAAGCCATTCTGTAGATGCCCTACTCCCTGTGGTGAAAAGTGGGCAAGGCTCTAAGG
187	Tnfrsf1b	NM_011610	ATCTGCCCTCCTCCTCTGAAATGCTGGGATTAATGTGTGTGCCAACATGCCAGTGCAGTG
188	Tnfrsf11	NM_011613	TGCTTATGAAAACCTTACAGTGTAGCTATGGAAAGGGGTCACAGTCTCTGGTCTAACCCCTGGA
189	Tnfrsf11b	NM_008764	CCCAACAGTTTATCCAGCTGTATGCTGTTTCCAGTATCTACAGACTGTGTCTCCTCATTACC
190	Traf6	NM_009424	TGGATGGATGCTTCCCAATCCAGAAATCCAGAAAAATGAAACCAAGATGTGATCAACCTGAACCT
191	Vcan	NM_001081249	TTGAAATGACACAATGAAAGCAAGCATTGAAGCATCGTGGGTTGCCATTAAGTATGGTCAGACT
192	Vdr	NM_009504	TGGATATCAGCATAAACCTATGTCTGGGACTACGATCCCTTTTCCCTGGGTAATAAACTCAGCCA
193	Vegfa	NM_001025250	GCACAGAGCAATGGGGCAGGACCCGCAAGCCCTCACCAGGAGCAGAGAAAAGAGAAAGTGTTTA
194	Wnt3a	NM_009522	ATGACAGCCCTGATGATAGCCCTGCATCCGCTCTGACACTTAATACTCAGATCTCCCGGAAACC
195	Wnt4	NM_009523	TAAAGACGTTGCTGGGCTGTACCGCCCTTCCGCCAGGTGGCCACGGCTAAAGGAGAAAGTTT
196	Wnt5a	NM_009524	GTATCCATTTCATGGGCTTGGTAGCCCTTCTGGTCACTCAGTCCCTGTGGCTCTTAACTTATTGCC
197	Wnt5b	NM_009525	AGAGGCCCTGTGGAAGACCTGATAACCCGGATGGTAGCCTAGTCTTCCCTGAAAATGGAGCCAG
198	Wnt6	NM_009526	AAGAAAGTTGGTCTGGTAGAGTTAGCAATTCAGTCTGAGTCTATCATCCACCTGTTACCAAGG
199	Wnt7a	NM_009527	AGACTCTAAGCTGGTCCAGATCTGGAATGTTTTCTCCAGGACGCTCCTATCCTTTTGGCCCT
200	Wnt7b	NM_009528	GTCTGGGATACCCAGTCCGTCGCCACGTTGCCCTGTGAGGAGCCTGGTTAACTTATATTGTT
201	Sema4d	NM_013660	TTGCTTCCATCTCATCACTGCCCTTGGACTTCCGCTTGGACTGCTCCATGAAAGACAGAAATGG
202	Actb	NM_007393	CCATCGTGCACCCCAAGTGTCTTAGGCGGACTGTTACTGAGCTGCSTTTTACACCCCTTCTTTG
203	OmpA	OmpA	GTGTCGGCATAAGCCGAAGATATCGGTAGAGTTATATTGACAGATCCCCCGGTGAAGGATTTAA

30

40

例えば、破骨細胞であれば破骨細胞特異的インテグリン(111番: integrin alpha V、112番: integrin beta 3)、分化誘導・転写因子(71番: c-Fos、72番: FosB、73番: Fra-1、135番: NFAT2、146番: Prdm1、159番: Sfp1、188番: Tnfrsf11、190番

50

: T R A F 6)、骨吸収、酸分泌等酵素、細胞骨格シグナル (2 番 : A c p 5、1 5 番 : V - A T P a s e、3 1 番 : C L C N 7、1 2 4 番 : M M P - 1 4、1 5 4 番 : R h o A) が挙げられる。

【 0 0 2 5 】

特徴的な発現パターンとしては、例えば、破骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞の分化後分子マーカーのすべての発現量を合計し、この合計値でそれぞれの細胞種の分化後分子マーカーの合計値の比率を算出したとき、破骨細胞の分化後分子マーカーの比率が 9 0 % 以上、その他の細胞の分化後分子マーカーの比率が 5 % 以下という発現パターンが好ましい。

【 0 0 2 6 】

また軟骨細胞であれば、軟骨の分化後の細胞外マトリクス、軟骨特異的コラーゲンやプロテオグリカン (1 番 : A c a n、3 2 番 : C o l 1 0 a 1、3 4 番 : C o l 2 a 1、3 7 番 : C o l 9 a 1、3 8 番 : C o m p、8 4 番 : H s p g 2、1 5 8 番 : S d c 3、1 9 1 番 : V c a n) 軟骨形成関連酵素 (4 1 番 : C s g a l n a c t 1、4 2 番 : C s g a l n a c t 2)、アグリカン分解酵素 (9 番 : A d a m t s 5)、軟骨基質分解酵素 (8 5 番 : H y a l u r o n i d a s e 1、8 6 番 : H y a l u r o n i d a s e 2)、分化誘導・転写因子・サイトカイン関連 (6 2 番 : F G F 1 8、7 6 番 : F r i z z l e d (F z d 1)、1 5 5 番 : R u n x 1、1 7 0 番 : S o x 5、1 7 1 番 : S o x 6) が挙げられる。

【 0 0 2 7 】

特徴的な発現パターンとしては、例えば、破骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞の分化後分子マーカーのすべての発現量を合計し、この合計値でそれぞれの細胞種の分化後分子マーカーの合計値の比率を算出したとき、軟骨細胞の分化後分子マーカーの比率が 7 0 % 以上、その他の細胞の分化後分子マーカーの比率が 2 5 % 以下という発現パターンが好ましい。

【 0 0 2 8 】

最後に骨芽細胞であれば、細胞外マトリクス・骨基質タンパク (1 6 番 : B g l a p、1 7 番 : B g l a p - r s 1、1 8 番 : B g n、3 3 番 : C o l 1 a 1、3 5 番 : C o l 3 a 1、3 6 番 : C o l 6 a 1、7 0 番 : F i b r o n e c t i n、8 7 番 : I b s p、1 2 0 番 : M g p、1 7 5 番 : S p a r c、1 7 6 番 : S p p 1)、骨芽細胞分化促進 (1 0 番 : A d i p o n e c t i n、1 1 番 : A d i p o n e c t i n r e c e p t o r 1、1 4 番 : A t f 4、7 8 番 : G l i 1、7 9 番 : G l i 2)、骨芽細胞分化調節・誘導に関わる分子 (2 7 番 : C b f b、4 4 番 : C t n n b 1、5 1 番 : D k k 1、7 7 番 : G j a 1、8 8 番 : I d 1、8 9 番 : I d 2、1 3 3 番 : M y o d 1、1 4 3 番 : P h o s p h o 1、1 4 7 番 : P t c h 1、1 5 3 番 : R u n x 3、1 5 6 番 : R u n x 2、1 7 3 番 : S p 3、1 7 4 番 : S p 7 (O s t e r i x)) などを挙げることができる。

【 0 0 2 9 】

特徴的な発現パターンとしては、例えば、破骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞の分化後分子マーカーのすべての発現量を合計し、この合計値でそれぞれの細胞種の分化後分子マーカーの合計値の比率を算出したとき、骨芽細胞の分化後分子マーカーの比率が 8 5 % 以上、その他の細胞の分化後分子マーカーの比率が 1 0 % 以下という発現パターンが好ましい。

【 0 0 3 0 】

これらの遺伝子は分化後の細胞において特徴的な発現パターンを示すと推定されるが、識別方法の選び方によっては、ここで挙げた遺伝子群のみに限定されるものではない。

【 0 0 3 1 】

< 2 . マーカー >

マーカーとは、特定の細胞集団を特徴づける目印であって、その細胞集団が持つ機能に由来するタンパク質やタンパク質を発現するために転写されている m R N A (遺伝子マーカー) である。

ここで、遺伝子、前記遺伝子が転写する R N A、前記遺伝子もしくは R N A の核酸配列

10

20

30

40

50

のうち少なくとも連続した30塩基以上の部分配列を含むオリゴヌクレオチド、前記遺伝子、前記遺伝子が転写するRNA、前記遺伝子もしくはRNAの核酸配列のうち少なくとも連続した30塩基以上の部分配列を含むポリヌクレオチド、のいずれかを含むものを分別マーカーという。

分別マーカーとは細胞集団間でマーカーの差異を比較した際、特に差異が大きい遺伝子マーカーである。

分別マーカーは、間葉系幹細胞からの、破骨細胞、骨芽細胞又は軟骨細胞のいずれかへの分化状態を、識別するものである。

【0032】

分別マーカーの測定は、これにハイブリダイズダイゼーションできるプローブを用いて遺伝子発現量を測定することで可能である。特に多数の分別マーカーをまとめて検出するためには、複数のプローブを固定化して遺伝子発現量を測定できるDNAマイクロアレイを用いることが有効である。

10

【0033】

2種以上の遺伝子である分別マーカー群とは、前述の「分化識別用遺伝子群」から選択される少なくとも2種以上の遺伝子である分別マーカー群のことである。実験や検査が成功したか否かを判断できるようにするため、分類する種類に加えてポジティブコントロール、ネガティブコントロールを含めた種類を揃えておくことが好ましい。

【0034】

<3.細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプローブ>

20

これら遺伝子の発現を特異的に検出することのできるプローブを設計する。DNA断片としては、30~70個の塩基が好ましく、65個の塩基が特に好ましい。ポジティブコントロール及びネガティブコントロールを含めた全ての遺伝子に対するキャプチャープローブは、鎖長65塩基の合成オリゴヌクレオチドで、融解温度(T_m)はほぼ同一であり、標的遺伝子のmRNAの3'末端側より1、500塩基以内の領域に特異的に結合するように、専用ソフトウェアを用いて設計したものである。設計したオリゴヌクレオチドプローブの配列を表1~表6に示す。表1~表6に記載の遺伝子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつこれらの遺伝子のmRNAを検出し得る機能を有するDNA断片も、本発明の細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプローブとして用いることができる。

30

【0035】

ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))等を適宜参照することができる。

「ストリンジェントな条件」とは、ハイブリダイゼーション時の条件であって、バッファの塩濃度が97.5~390mM、温度が37~80、好ましくは塩濃度が97.5~200mM、温度が50~70の条件を意味する。具体的には、例えば195mMで65等の条件を挙げることができる。さらに、このような塩濃度や温度等の条件に加えて、プローブ濃度、プローブの長さ、反応時間等の諸条件も考慮し、条件を適宜設定することができる。

40

上記条件を満たすDNA断片としては、表1~表6に記載の遺伝子をコードする塩基配列に対して少なくとも80%以上の同一性を有する塩基配列であることが好ましく、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有するものである。

上記の同一性の数値は、配列解析ソフトウェアであるDNASIS(株式会社日立ソリューションズ)を用いて、例えば、マキシマムマッチング法のコマンドを実行することにより求められる。その際のパラメータは、デフォルトの設定(初期設定)とする。

【0036】

また、細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプローブとしてのDNA断片は、数個の塩基

50

に付加、挿入、欠損又は置換等の変異が生じた塩基配列も、それが本発明のプロープとしての機能を有する限り、本発明のプロープに含まれる。なお、付加、挿入、欠損又は置換される塩基の個数は、DNA断片の全塩基数が30～70の場合は、5個以下、好ましくは3個以下、特に好ましくは2個以下である。

なお、上記のDNA断片は、細胞の識別に関わる遺伝子のmRNAを検出し得る機能を有するDNA断片であることが重要である。

【0037】

本発明の細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプロープは、細胞の識別の評価に特に関連性が深い遺伝子群と、特異的に結合する（ハイブリダイズする）ものである。このように特異的に結合することにより、細胞の識別の評価関連遺伝子のmRNAの検出ができ、細胞の分化状態を簡便に評価することができる。

10

【0038】

細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプロープの作製方法は、特に限定はされないが、公知の各種DNA合成機を用いて得る方法等が挙げられる。これら細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプロープを用いて特定の遺伝子発現を検出する方法としてリアルタイムPCR、シーケンス法、マイクロアレイ法等用いることができるが、以下にマイクロアレイ法を一例に挙げてより詳細を説明する。

<4. 細胞分化状態評価用DNAマイクロアレイ>

DNAマイクロアレイについて、その支持体の形態は、限定はされず、平板、棒状、ビーズ等のいずれの形態も使用できる。支持体として、平板を使用する場合は、その平板上に、所定の間隔をもって、所定のプロープを種類毎に固定することができる（スポットティング法等；Science 270、467-470（1995）等参照）。また、平板上の特定の位置で、所定のプロープを種類毎に逐次合成していくこともできる（フォトリソグラフィ法等；Science 251、767-773（1991）等参照）。他の好ましい支持体の形態としては、中空繊維を使用するものが挙げられる。支持体として中空繊維を使用する場合は、所定のプロープを種類毎に各中空繊維に固定し、すべての中空繊維を集束させ固定した後、繊維の長手方向で切断を繰り返すことにより得られるDNAマイクロアレイが好ましく例示できる。このDNAマイクロアレイは、貫通孔基板に核酸を固定化したタイプのもので説明することができ、いわゆる「貫通孔型マイクロアレイ」とも言われる（特許第3510882号公報等を参照）。

20

30

【0039】

支持体へのプロープの固定方法は、限定はされず、どのような結合様式でもよい。支持体に直接固定することに限定はされず、例えば、予め支持体をポリリジン等のポリマーでコーティング処理し、処理後の支持体にプロープを固定することもできる。さらに、支持体として中空繊維等の管状体を使用する場合は、管状体にゲル状物を保持させ、そのゲル状物にプロープを固定することもできる。当該貫通孔型マイクロアレイとしては、例えば、三菱レイヨン社製のDNAマイクロアレイ（Genopal（登録商標））等が好ましく挙げられる。

【0040】

<5. 評価方法>

本発明の細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプロープ又は細胞分化状態評価用DNAマイクロアレイを用いた細胞の分化状態の評価方法は、一例としては次の（1）～（3）の工程を含む評価方法である。（1）評価対象となる間葉系幹細胞を分化誘導させる工程、（2）誘導後、核酸を抽出する工程、（3）（2）で抽出した評価対象核酸について発現データを収集する工程、工程（4）工程（3）におけるデータを用いて識別評価を行う工程。

40

【0041】

工程（1）評価対象となる間葉系幹細胞を分化誘導させる工程

ここで、評価対象とは生体そのものであってもよいが、より好ましくは細胞由来のものである。例えば、破骨細胞に分化可能なRAW264.7細胞株、軟骨細胞に分化可能な

50

A T D C 5 細胞株、骨芽細胞に分化可能な M C 3 T 3 - E 1 細胞株等を挙げるができる。

【 0 0 4 2 】

分化誘導させる方法は、M C S F、T G F、B M P - 2 等を含有する培地で培養細胞を培養する方法などが考えられるが、特にこれに限定されるものではない。

工程 (2) 誘導後、核酸を抽出する工程

核酸 (核酸増幅産物) の抽出方法は特に限定はされないが、例えば、実験動物由来の臓器・組織、もしくは培養細胞から、カラム等を用いて転写産物を含む核酸を分離、場合により分離後増幅することにより得ることが出来る。

工程 (3) (2) で抽出した評価対象核酸について発現データを収集する工程

評価対象から調製した核酸 (核酸増幅産物) を細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプローブ等に接触させ、ハイブリダイズした転写産物を検出する。

【 0 0 4 3 】

なお、接触とは、具体的には、上記の核酸 (核酸増幅産物) をハイブリダイゼーション用の溶液と混合させ、この溶液 (ハイブリダイゼーション溶液) を細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプローブに結合 (ハイブリダイズ) させることを言う。

【 0 0 4 4 】

ハイブリダイゼーション溶液と細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプローブとの接触、すなわちハイブリダイゼーション反応は、当該溶液中の核酸が当該オリゴヌクレオチドプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るよう、反応条件 (緩衝液の種類、p H、温度など) を適宜設定して行うことができる。なお、ここで言う「ストリンジェントな条件」とは、ハイブリダイゼーション時の条件であって、バッファの塩濃度が 9 7 . 5 ~ 3 9 0 m M、温度が 3 7 ~ 8 0、好ましくは塩濃度が 9 7 . 5 ~ 2 0 0 m M、温度が 5 0 ~ 7 0 の条件を意味する。具体的には、例えば 1 9 5 m M で 6 5 等の条件を挙げるができる。

【 0 0 4 5 】

洗浄後、オリゴヌクレオチドプローブに結合した核酸の標識を検出できる装置により、スポットごとに検出強度を測定する。蛍光標識化された核酸を結合させた場合、又は核酸を結合後に蛍光標識化した場合は、各種蛍光検出装置 (例えば、三菱レイヨン社製の冷却 C C D 式蛍光検出装置など) を使用して蛍光強度を測定することができる。得られた検出結果 (蛍光強度) は、公知の処理方法により、ターゲットとなる各種遺伝子の発現量を数値化することが出来る。その後、この数値を発現データとして収集する。

【 0 0 4 6 】

工程 (4) 工程 (3) におけるデータをもとに識別評価を行う工程

工程 (3) で得られたデータをもとにあらかじめ設定しておいた手法を用いて細胞の分化状態を判定することができる。例えば、表 1 ~ 表 6 記載の細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプローブを搭載した細胞分化状態評価用 D N A マイクロアレイを作製し、破骨細胞に分化可能な R A W 2 6 4 . 7 細胞株、軟骨細胞に分化可能な A T D C 5 細胞株、骨芽細胞に分化可能な M C 3 T 3 - E 1 細胞株の遺伝子発現データを比較し、有意に変動した遺伝子を変動の大きいものから順位付けして遺伝子群を選抜し、細胞の識別に有用な遺伝子群、またはプローブを見出す。その後、識別のための指標数値をそれらの遺伝子群やプローブに割り当て判定基準を設定しておく。その後、未知のサンプルについて取得した遺伝子の発現の情報をそれらと比較することにより細胞を識別することができる。

【 0 0 4 7 】

また、別の例としては、2 種以上の分別マーカーの発現量に基づいて、相関係数、クラスター分析、多次元尺度法、主成分分析、因子分析、数量化 I I I 類、数量化 I V 類、自己組織化マップ、ネットワークの推定 (プーリアンネットワーク、ベイジアンネットワーク) などを用いることができる。

【 0 0 4 8 】

例えば、スピアマン相関係数を使用した識別方法では、あらかじめ設定しておいた各種

10

20

30

40

50

分化後の細胞の基準値に対して、相関係数値が、0.6以上、好ましくは0.8以上、さらに好ましくは0.9以上であった時に、被検細胞が特定の分化段階の細胞であったと識別される等、必要に応じて適切な方法を設定することができる。

【0049】

以下に、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例】

【0050】

1. 細胞分化状態評価用DNAマイクロアレイの製造

間葉系幹細胞から破骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞へ分化に特に関連性が深い遺伝子、202遺伝子を選択し、これらの遺伝子の発現を特異的に検出するキャプチャープローブ(細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプローブ)を搭載した細胞分化状態評価用DNAマイクロアレイ(貫通孔型オリゴヌクレオチドマイクロアレイ(Genopalm™)、三菱レイヨン社製)を作製した。

ポジティブコントロール及びネガティブコントロールを含めた全ての遺伝子に対する細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプローブは、鎖長65塩基の合成オリゴヌクレオチドで、融解温度(T_m)はほぼ同一であり、標的遺伝子のmRNAの3'末端側より1,500塩基以内の領域に特異的に結合するように、専用ソフトウェアを用いて設計したものである。設計した細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプローブの配列を表1~表6に示した。

【0051】

2. サンプルの調製

2-1. 細胞の培養と分化

間葉系幹細胞として、破骨細胞に分化可能なRAW264.7細胞株、軟骨細胞に分化可能なATDC5細胞株、骨芽細胞に分化可能なMC3T3-E1細胞株をもちいた。以下のi~viの細胞を当業者により知られる方法によって培養し、ii、iv、viに関しては分化誘導を行った。

【0052】

i) RAW264.7: 4日培養(MEM培地)

ii) RAW264.7: RANKL (100 ng/ml) 4日培養(MEM培地)

iii) MC3T3-E1細胞株: 7日培養(MEM培地)

iv) MC3T3-E1細胞株: BMP-2 (200 ng/ml) 7日培養(MEM培地)

v) 培養マウス前軟骨細胞ATDC5細胞株(MEM培地)

vi) 培養マウス前軟骨細胞ATDC5細胞株をITS(インスリン・トランスフェリン・セレナイト)存在下で2週間培養(MEM培地)

【0053】

2-2. サンプル細胞からのtotal RNAの回収

培地を取り除き、細胞をPBSで洗浄した。その後、1ウェルあたり1mLのQIAzol(キアゲン社)を加え、セルスクレイパーで細胞を回収した。全量を滅菌済みの1.5mLチューブに加えてヴォルテックスミキサーでよく混合した。次いで、200μLのクロロホルムを加えてヴォルテックスミキサーでよく混合した。その後、室温で5分間静置した。次に、13000rpm、4で15分間遠心分離し、水層を新しい1.5mLチューブに回収した。回収した液に同量のイソプロパノールを加えてよく混合した後、室温で5分間静置した。さらに、13000rpm、4で15分間遠心分離し、上清を取り除いた。その後、1mLの70%エタノールを加えてよく混合した後、13000rpm、4で5分間遠心分離し、上清を取り除いた。得られた沈殿を室温で5分間風乾させた。風乾後、沈殿にヌクレアーゼフリー水30μLを加えてピペティングでよく混合した。吸光度計を用いて、260nmにおける吸光度を測定し、total RNA濃度を

10

20

30

40

50

定量した。また2100 Bioanalyzer (Agilent社)で電気泳動を行い、total RNAが分解していないかどうかを確かめた。<結果>

RIN値はi) 9.8、ii) 9.8、iii) 9.8、iv) 9.9、v) 9.8、vi) 9.1

濃度はi) 1606 ng/μL、ii) 967 ng/μL、iii) 439 ng/μL、iv) 511 ng/μL、v) 301 ng/μL、vi) 1312 ng/μLであった。

【0054】

2-3. total RNAからのaRNA合成

i~viのTotal RNAを用いてBiotin標識aRNAを調製し、これを1 . で製造した細胞分化状態評価用DNAマイクロアレイにハイブリダイゼーションさせる被験試料とした。Biotin標識aRNAの調製はMessage Amp II Biotin Enhanced Kit (Ambion社製)を用いて、所定の方法に従って実施した。aRNAの取得量はi) 116 μg、ii) 121.2 μg、iii) 126 μg、iv) 134.4 μg、v) 105.2 μg、vi) 95.6 μgであった。

10

【0055】

3. 細胞分化状態評価用DNAマイクロアレイによるアッセイ

前述のビオチン標識済みaRNA 5 μgを、キットに付属の5×Fragmentation Bufferを用いて94にて7分30秒加熱し、断片化した。断片化したビオチン標識aRNA溶液を、最終的な組成が0.12 M Tris-HCl/0.12 M NaCl/0.05% Tween 20となるように各種試薬を添加した。これを150 μlのハイブリダイゼーションサンプルとした。ハイブリダイゼーション反応は、65で16時間行った。反応後のDNAマイクロアレイは、洗浄バッファー溶液(0.12 M TNT溶液)を用いて65で20分間の洗浄を2回を行い、最後に0.12 M TN溶液で65、10分間洗浄した。

20

0.12 M TNT溶液は以下のように調製した。

1 M Tris-HCl 120 ml

1 M NaCl 120 ml

0.5% Tween 20 100 ml

蒸留水で 1000 mlにメスアップ。

30

0.12 M TN溶液は以下のように調製した。

1 M Tris-HCl 120 ml

1 M NaCl 120 ml

蒸留水で1000 mlにメスアップ。

【0056】

次に、細胞分化評価用オリゴヌクレオチドプローブに結合した核酸の蛍光標識を行った。蛍光標識は、あらかじめ蒸留水によって1 mg/mlに溶解したCy5-Streptavidin (GE Healthcare社製)を1/500に蒸留水で希釈した溶液5 mlに、細胞分化状態評価用DNAマイクロアレイを室温で30分間浸漬させることで行った。浸漬後のDNAマイクロアレイは5 mlの0.12 M TNT溶液によって5分間、4回洗浄に供した。

40

Cy5標識後の細胞分化状態評価用DNAマイクロアレイは、検出器(型番MB-V1 横河電機社製)を用い、0秒から40秒の複数の露光時間で蛍光を検出し、スポットそれぞれにおいて、当該スポット中に飽和画素を含まない画像のうち、最長の露光時間の画像を用い、単位時間あたりに換算した蛍光シグナル強度として数値化した。数値化したデータを収集し、引き続きデータ解析を実施した。

【0057】

4. 発現解析データの取得とチップ間データの補正

以下のようにして解析を実施した。

【0058】

50

(1) 検出した蛍光強度の生データからブランクスポット(プローブを搭載していないスポット)の中央値を差し引き、シグナル強度とした。またブランクスポットの標準偏差を算出した。

(2) 内部コントロール遺伝子を表4記載の114番の遺伝子: Rp1p0とした。比較するチップ間でRp1p0のシグナル強度が最大のチップを選択し、チップ間でのRp1p0のシグナル強度比を算出してチップ間の補正係数とした。各チップのスポットのシグナル強度に補正係数を乗算しシグナル強度の補正を行った。

5. 分化識別遺伝子群の選択

補正後のデータを用いて、コントロール遺伝子(Rp1p0)を除いた遺伝子について、遺伝子ごとにi)~v)のサンプルの発現量を比較し、破骨細胞の遺伝子マーカーとしてii)のサンプルで最も発現量が多い遺伝子、骨芽細胞の遺伝子マーカーとしてiv)のサンプルで最も発現量が多い遺伝子、軟骨細胞のマーカーとしてvi)のサンプルで最も発現量が多い遺伝子をリストアップした。

さらにリストアップした遺伝子を発現量の大きい順番に並べなおした。これを表7~表9に示した。

破骨細胞マーカー候補

【0059】

【表7】

備考	破骨細胞へ分化					
遺伝子名	① 発現量	② 発現量	③ 発現量	④ 発現量	⑤ 発現量	⑥ 発現量
Acp5	449	50083	43	47	37	55
Actb	25681	40160	14468	19220	19489	8938
Ctek	362	25845	690	975	105	173
Csfr1r	6126	8262	57	69	60	71
Itgav	513	7126	732	1274	476	511
Mmp9	97	5213	56	40	51	78
Sfp1	1858	4778	49	46	52	73
Fosl2	314	4461	640	560	616	648
Tgfb1	173	4321	168	338	123	255
Tm7sf4	122	2876	39	39	46	62
Fos	372	1937	139	236	51	104
Pdgfb	337	1935	48	45	47	65
Acvr1	296	1452	470	676	171	304
Cd44	600	1384	326	461	290	339
Tgfb2	845	1316	613	477	232	334
Igf2r	502	1166	218	271	125	376
Ifng2	542	1112	298	355	246	509
Hyal1	420	1090	137	127	66	159
Cln7	212	1084	121	168	125	215
Oscar	69	885	46	37	44	62
Il1b	125	800	155	136	144	172
Sema4d	267	749	1	22	24	54
Bmp1a	498	678	544	546	492	551
Tnfrsf1a	246	660	46	49	39	60
Tgfb1	414	544	220	412	165	315
Src	116	537	102	123	136	231
Nfk2	274	467	165	157	262	216
Traf6	144	417	91	85	99	164
Acvr1b	103	374	100	97	71	110
Ptchd1	182	316	47	42	58	82
Prdm1	67	302	56	85	55	87
Hyal2	156	297	164	169	170	218
Itat6	110	289	177	170	98	159
Acvr2b	142	281	99	105	108	213
Acvr1c	96	246	97	69	68	97
Csgainact1	184	244	105	199	76	135
Nfatc3	213	220	151	219	195	211
Mx2	153	202	119	199	123	176
Acvr2a	107	185	131	109	92	151
Nfatc1	54	181	19	19	44	77
Mitf	99	146	59	66	55	87
Cdh1	84	145	75	62	65	91
Fgf18	133	144	73	89	73	88
Kdr	91	128	85	100	75	108
Bmp7	87	118	61	72	59	95
Calca	80	106	89	87	55	84
Bglap-rs1	87	104	63	87	43	60
Ifnb1	81	100	66	75	61	98
Fosb	75	97	73	64	57	79
Epha4	70	97	64	74	53	78
Calcr	70	95	89	55	53	78
Pth	84	95	56	55	60	77
Shh	83	94	37	33	31	56
Bmp6	58	89	36	60	44	82
Fgf17	73	87	45	61	47	77
Fgf2	85	87	59	71	52	72
Inhbc	34	70	54	37	54	64
Acan	40	65	21	27	10	48
Ifna1	50	60	47	31	50	55
Adipoq	44	55	39	42	36	49
Wnt7b	26	46	21	31	31	37

備考	破骨細胞へ分					
遺伝子名	① 発現量	② 発現量	③ 発現量	④ 発現量	⑤ 発現量	⑥ 発現量
Acp5	2	1	5	4	6	3
Actb	2	1	5	4	3	6
Ctek	4	1	3	2	6	5
Csfr1r	2	1	6	4	5	3
Itgav	4	1	3	2	6	5
Mmp9	2	1	4	6	5	3
Sfp1	2	1	6	5	4	3
Fosl2	6	1	3	5	4	2
Tgfb1	4	1	5	2	6	3
Tm7sf4	2	1	5	6	4	3
Fos	2	1	4	3	6	5
Pdgfb	2	1	4	6	5	3
Acvr1	5	1	3	2	6	4
Cd44	2	1	5	3	6	4
Tgfb2	2	1	3	4	6	5
Igf2r	2	1	5	4	6	3
Ifng2	2	1	5	4	6	3
Hyal1	2	1	4	5	6	3
Cln7	3	1	6	4	5	2
Oscar	2	1	4	6	5	3
Il1b	6	1	3	5	4	2
Sema4d	2	1	6	5	4	3
Bmp1a	5	1	4	3	6	2
Tnfrsf1a	2	1	4	5	6	3
Tgfb1	2	1	5	3	6	4
Src	5	1	6	4	3	2
Nfk2	2	1	5	6	3	4
Traf6	3	1	5	6	4	2
Acvr1b	3	1	4	5	6	2
Ptchd1	2	1	5	6	4	3
Prdm1	4	1	5	3	6	2
Hyal2	6	1	4	5	3	2
Itat6	5	1	2	3	6	4
Acvr2b	3	1	6	5	4	2
Acvr1c	4	1	2	5	6	3
Csgainact1	3	1	5	2	6	4
Nfatc3	3	1	6	2	5	4
Mx2	4	1	6	2	5	3
Acvr2a	5	1	3	4	6	2
Nfatc1	3	1	5	6	4	2
Mitf	2	1	5	4	6	3
Cdh1	3	1	4	6	5	2
Fgf18	2	1	5	3	6	4
Kdr	4	1	5	3	6	2
Bmp7	3	1	5	4	6	2
Calca	4	1	2	5	6	3
Bglap-rs1	2	1	4	3	6	5
Ifnb1	3	1	5	4	6	2
Fosb	3	1	4	5	6	2
Epha4	4	1	5	3	6	2
Calcr	4	1	2	5	6	3
Pth	2	1	5	6	4	3
Shh	2	1	4	5	6	3
Bmp6	4	1	6	3	5	2
Fgf17	3	1	6	4	5	2
Fgf2	2	1	5	4	6	3
Inhbc	6	1	4	5	3	2
Acan	3	1	5	4	6	2
Ifna1	4	1	5	6	3	2
Adipoq	3	1	5	4	6	2
Wnt7b	5	1	6	4	3	2

10

20

30

40

50

【 0 0 6 0 】
 骨芽細胞マーカー候補
 【 0 0 6 1 】
 【 表 8 】

備考	骨芽細胞 へ分化					
	サンプル ① 発現量	サンプル ② 発現量	サンプル ③ 発現量	サンプル ④ 発現量	サンプル ⑤ 発現量	サンプル ⑥ 発現量
遺伝子名						
Sparc	1134	1106	30091	75050	7688	28948
Bgn	58	68	21251	34514	8932	16878
Colla1	167	245	14820	26684	1955	6066
Postn	51	71	15611	21368	84	4485
Ibsp	58	74	4620	17794	51	2651
Alpl	43	55	2169	13873	326	1845
Mmp14	192	539	8875	10603	1232	5054
Bgap	126	93	236	7871	31	99
Col1a1	92	133	2705	7301	1630	4025
Gli1	84	74	1749	5436	1162	817
Ctnnb1	2455	2483	2857	4095	1572	3093
Col3a1	85	106	893	2064	61	248
Smad6	124	101	228	2063	692	416
Fgf3	111	109	147	2030	172	446
Csf1	55	46	857	1876	956	264
Ctgf	104	121	250	1824	100	169
Fgf2	91	71	559	1515	135	347
Id2	120	534	234	1295	505	354
Tnfrsf1a	527	359	640	1081	643	683
Sp7	77	49	154	1063	186	308
Ifng1	377	327	597	1070	428	550
Igf1r	66	57	474	883	365	722
Fosf1	269	140	304	708	280	80
Tgfb3	63	51	235	695	106	169
Pdgfra	289	355	519	597	461	473
Fzd1	55	113	330	515	148	169
Smad7	86	165	100	509	160	160
Tnfrsf1b	359	365	314	389	208	330
Pparg	77	64	281	390	47	134
Runx3	105	75	179	361	78	115
Grem2	71	85	77	307	41	58
Dmpl	68	114	127	256	53	65
Vcan	2	6	76	255	25	47
Mx1	62	110	132	252	40	64
Inhbb	59	68	65	169	50	61
Efnb2	72	70	114	143	80	82
Smad9	64	60	52	141	126	107
Runx1	96	87	70	110	85	109
Gli2	77	79	64	97	62	85
Egf	75	77	80	87	53	71
Adamts5	72	54	77	85	60	76
Ar	46	58	59	61	44	54
Wnt5a	1	2	18	59	8	28
Wnt4	3	2	1	43	1	8

備考	骨芽細胞 へ分化					
	サンプル ①	サンプル ②	サンプル ③	サンプル ④	サンプル ⑤	サンプル ⑥
順位						
Sparc	5	6	2	1	4	3
Bgn	6	5	2	1	4	3
Colla1	6	5	2	1	4	3
Postn	6	5	2	1	4	3
Ibsp	5	4	2	1	6	3
Alpl	6	5	2	1	4	3
Mmp14	6	5	2	1	4	3
Bgap	3	5	2	1	6	4
Col1a1	6	5	3	1	4	2
Gli1	5	6	2	1	3	4
Ctnnb1	5	4	3	1	6	2
Col3a1	5	4	2	1	6	3
Smad6	5	6	4	1	2	3
Fgf3	5	6	4	1	3	2
Csf1	5	6	3	1	2	4
Ctgf	5	4	2	1	6	3
Fgf2	5	6	2	1	4	3
Id2	6	2	5	1	3	4
Tnfrsf1a	5	6	4	1	3	2
Sp7	5	6	4	1	3	2
Ifng1	5	6	2	1	4	3
Igf1r	5	6	3	1	4	2
Fosf1	4	5	2	1	3	6
Tgfb3	5	6	2	1	4	3
Pdgfra	6	5	2	1	4	3
Fzd1	6	5	2	1	4	3
Smad7	6	2	5	1	4	3
Tnfrsf1b	3	2	5	1	6	4
Pparg	4	5	2	1	6	3
Runx3	4	6	2	1	5	3
Grem2	4	2	3	1	6	5
Dmpl	4	3	2	1	6	5
Vcan	6	5	2	1	4	3
Mx1	5	3	2	1	6	4
Inhbb	5	2	3	1	6	4
Efnb2	5	6	2	1	4	3
Smad9	4	5	6	1	2	3
Runx1	3	4	6	1	5	2
Gli2	4	3	5	1	6	2
Egf	3	2	5	1	6	4
Adamts5	4	6	2	1	5	3
Ar	5	3	2	1	6	4
Wnt5a	6	5	3	1	4	2
Wnt4	3	4	6	1	5	2

10

20

【 0 0 6 2 】
 軟骨細胞マーカー候補
 【 0 0 6 3 】

30

【表 9】

備考	軟骨細胞へ分化					
遺伝子名	サンプル①発現量	サンプル②発現量	サンプル③発現量	サンプル④発現量	サンプル⑤発現量	サンプル⑥発現量
Fnl1	40	68	8149	8139	2461	13722
Col10a1	318	361	191	153	141	4351
Rhoa	2624	2136	1671	2197	2720	3349
Bmp4	36	69	858	151	1247	3323
Cbfb	1287	1020	1119	1425	1941	2630
Sdc3	887	283	351	2113	2349	2540
Pth1r	70	98	302	1270	50	1885
Adipo1	702	1534	887	1105	1017	1503
Vegfa	346	200	282	708	315	1413
Col2a1	86	84	135	169	110	1373
Cyp27b1	1021	1310	1037	1000	1031	1364
Tnfrsf11b	63	99	149	251	61	1256
Phospho1	188	900	120	233	139	1050
Smad4	475	423	450	567	543	852
Itgb2	81	71	192	342	134	725
Hsp2	67	76	228	220	244	513
Sg3	429	279	353	456	444	503
Eph4	72	98	141	156	244	481
Rela	331	364	288	416	386	437
Grem1	69	71	106	118	57	434
Col6a1	86	99	81	92	56	360
Sox9	38	28	73	109	127	314
Esr2	240	186	78	96	166	312
Igf1	113	56	74	22	27	289
Smad1	137	149	136	189	170	294
Smad3	102	123	229	228	137	270
Smad5	81	136	99	112	127	182
Fgf9	106	98	111	82	87	143
Sox5	56	80	68	60	122	136
Comp	59	88	81	80	38	122
Runc2	70	39	50	65	58	89
Sost	75	70	51	58	68	89
Var	2	1	31	36	33	69
Iti	84	64	85	54	53	89
Ifng	72	78	53	60	44	81
Mia1	70	70	38	46	39	78
Mmp1b	54	59	67	46	58	76
Bmp2	70	71	73	61	18	75
Igf2	65	82	67	31	39	74
Ptch1	38	70	36	31	56	74
Dkk1	43	65	51	41	46	74
Mmp8	60	65	64	55	49	74
Inhbe	42	65	52	41	56	73
Left1	64	52	43	44	37	73
Tnfrsf11	63	81	45	60	41	71
Cyp24a1	53	64	54	47	46	66
Esr1	41	53	80	48	29	63
Lep	55	58	34	39	41	63
Sox6	46	45	49	33	40	61
Pthlh	30	39	43	31	40	58
Gli1	56	53	31	35	40	57
Kl	35	29	11	14	32	43
OmpA	3	9	1	1	1	24
Wnt5b	2	2	1	1	1	20
Wnt3a	2	2	1	1	1	2
Wnt7a	2	2	1	1	1	2

備考	軟骨細胞へ分化					
遺伝子名	サンプル①発現量	サンプル②発現量	サンプル③発現量	サンプル④発現量	サンプル⑤発現量	サンプル⑥発現量
Fnl1	6	5	2	3	4	1
Col10a1	3	2	4	5	6	1
Rhoa	3	5	6	4	2	1
Bmp4	6	5	3	4	2	1
Cbfb	4	6	5	3	2	1
Sdc3	4	6	5	3	2	1
Pth1r	4	5	3	2	6	1
Adipo1	6	2	5	3	4	1
Vegfa	3	6	5	2	4	1
Col2a1	5	6	3	2	4	1
Cyp27b1	5	2	3	6	4	1
Tnfrsf11b	5	4	3	2	6	1
Phospho1	4	2	6	3	5	1
Smad4	4	6	5	2	3	1
Itgb2	5	6	3	2	4	1
Hsp2	6	5	3	4	2	1
Sg3	4	6	5	2	3	1
Eph4	6	5	4	3	2	1
Rela	5	4	6	2	3	1
Grem1	5	4	3	2	6	1
Col6a1	4	2	5	3	6	1
Sox9	5	6	4	3	2	1
Esr2	2	3	6	5	4	1
Igf1	2	4	3	6	5	1
Smad1	5	4	6	2	3	1
Smad3	6	5	2	3	4	1
Smad5	6	2	5	4	3	1
Fgf9	3	4	2	6	5	1
Sox5	6	5	3	4	2	1
Comp	5	2	3	4	6	1
Runc2	2	6	5	3	4	1
Sost	2	3	6	5	4	1
Var	5	9	4	2	3	1
Iti	3	4	2	5	6	1
Ifng	3	2	5	4	6	1
Mia1	2	3	6	4	5	1
Mmp1b	5	3	2	6	4	1
Bmp2	4	3	2	5	6	1
Igf2	3	4	2	6	5	1
Ptch1	4	2	5	6	3	1
Dkk1	5	2	3	6	4	1
Mmp8	4	2	3	5	6	1
Inhbe	5	2	4	6	3	1
Left1	2	3	5	4	6	1
Tnfrsf11	2	3	5	4	6	1
Cyp24a1	4	2	3	5	6	1
Esr1	5	3	2	4	6	1
Lep	3	2	6	5	4	1
Sox6	3	4	2	6	5	1
Pthlh	6	4	2	5	3	1
Gli1	2	3	6	5	4	1
Kl	2	4	6	5	3	1
OmpA	3	2	5	6	4	1
Wnt5b	2	3	5	6	4	1
Wnt3a	2	3	5	6	4	1
Wnt7a	2	3	5	6	4	1

10

20

表 7 ~ 表 9 中の各グループの中で発現量の高いものから上位 1 2 遺伝子を、各細胞の分化識別用分別マーカーとして設定した。

30

【0064】

< 破骨細胞の分別マーカー >

Acp5、Actb、Ctsk、Csfr1、Itgav、Mmp9、Sfpi1、Fosl2、Tgfbr1、Tm7sf4、Fos、Pdgfb

< 骨芽細胞の分別マーカー >

Sparc、Bgn、Col1a1、Postn、Ibsp、Alpl、Mmp14、Bglap、Col6a1、Gja1、Ctnnb1、Col3a1

< 軟骨細胞の分別マーカー >

Fnl1、Col10a1、Rhoa、Bmp4、Cbfb、Sdc3、Pth1r、Adipo1、Vegfa、Col2a1、Cyp27b1、Tnfrsf11b

40

【0065】

6. 細胞での識別評価

上述の分別マーカーを用いて識別評価を行った。

< モデルサンプル >

・ 骨芽細胞に分化しているモデルサンプル

マウス初代培養骨芽細胞を 7 日間、BMP-2 (200 ng/ml) 存在下で培養した細胞

・ 破骨細胞に分化しているモデルサンプル

マウス骨髄細胞を M-CSF (50 ng/ml)、TGF-β (1 ng/ml)

50

、 RANKL (50 ng/ml) 存在下で4日間培養した細胞
 ・軟骨細胞に分化しているモデルサンプル

摘出したマウス肋軟骨細胞を摘出し、そのまま維持培養した細胞

2 - 2 記載の方法と同様に Total RNA を抽出し、細胞分化状態評価用 DNA マイクロアレイにハイブリダイズして検出し、バックグラウンドを減算した後、チップ間補正し、各サンプルの発現量を取得した。その後、この発現量の値をもとに各遺伝子の発現量の合計値を算出した(表10)。

その結果、骨芽細胞モデルサンプルは骨芽細胞に識別され、破骨細胞モデルサンプルは破骨細胞に識別され、軟骨細胞モデルサンプルは軟骨細胞に識別された。

従来技術では、例えば3種類(骨芽細胞識別用、破骨細胞識別用及び軟骨細胞識別用)の識別を行う実験を行わなければならなかったが、本発明では一度の実験により、3種類共に簡便に分化を識別できることが示された。

【0066】

マーカー合計値からの識別結果

【0067】

【表10】

	マウス初代培養骨芽細胞を7日間BMP-2 (200 ng/ml) 存在下で培養 → 骨芽細胞に分化	マウス骨髄細胞をM-CSF (50 ng/ml), TGF-β(1 ng/ml), RANKL (50 ng/ml) 存在下で4日間培養 → 破骨細胞に分化	摘出したマウス肋軟骨細胞そのもの
破骨細胞マーカー	Actb	10782	13900
	Ctsk	1043	1327
	Csf1r	65	75
	Itgav	605	590
	Mmp9	41	64
	Sfp1	43	65
	Fosl2	408	410
	Tgfb1	91	266
	Tm7sf4	36	56
	Fos	91	86
	Pdgfrb	25	51
	Sparc	109409	71349
	Bgn	9527	14481
	Col1a1	65000	289
Postn	2789	114	
骨芽細胞マーカー	Itbp	639	94
	Alpl	2815	99
	Mmpl4	3460	645
	Bglap	12739	196
	Col6a1	2593	8052
	Gja1	1293	2211
	Ctnnb1	1287	3629
	Col3a1	727	128
	Fn1	7221	25568
	Col10a1	355	1372
	Rhoa	2384	3217
	Bmp4	225	92
	Cbfb	1516	2686
	Sdc3	1850	687
軟骨細胞マーカー	Pth1r	1977	571
	Adipo1	1197	1861
	Vegfa	1573	896
	Col2a1	395	279475
	Cyp27b1	1514	1437
	Tnfrsf11b	196	872
	Actb	362260	362260
	Ctsk	199473	199473
	Csf1r	29886	29886
	Itgav	11540	11540
	Mmp9	269390	269390
	Sfp1	8959	8959
	Fosl2	9376	9376
	Tgfb1	10055	10055
Tm7sf4	10847	10847	
Fos	4716	4716	
Pdgfrb	10017	10017	
Sparc	8542	8542	
Bgn	2431	2431	
Col1a1	3124	3124	
Postn	945	945	
Itbp	222	222	
Alpl	242	242	
Mmpl4	21556	21556	
Bglap	119	119	
Col6a1	619	619	
Gja1	687	687	
Ctnnb1	4496	4496	
Col3a1	295	295	
Fn1	1134	1134	
Col10a1	690	690	
Rhoa	8943	8943	
Bmp4	56	56	
Cbfb	2294	2294	
Sdc3	5008	5008	
Pth1r	177	177	
Adipo1	5555	5555	
Vegfa	1022	1022	
Col2a1	240	240	
Cyp27b1	3466	3466	
Tnfrsf11b	350	350	

【配列表フリーテキスト】

【0068】

配列番号1 ~ 203 : 合成DNA

【配列表】

2014230493000001.app

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

G 0 1 N 37/00 (2006.01)

F I

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 37/00 1 0 2

テーマコード(参考)

