



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년04월25일

(11) 등록번호 10-1730216

(24) 등록일자 2017년04월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/36 (2015.01) A01K 67/027 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)

(21) 출원번호 10-2013-7007049

(22) 출원일자(국제) 2010년09월29일

심사청구일자 2015년07월17일

(85) 번역문제출일자 2013년03월20일

(65) 공개번호 10-2013-0112872

(43) 공개일자 2013년10월14일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2010/066999

(87) 국제공개번호 WO 2012/042618

국제공개일자 2012년04월05일

(56) 선행기술조사문헌

US20100197019 A1*

JP2005132813 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

가부시키가이샤 시세이도

일본 도쿄도 츠오쿠 긴자 7쵸메 5반 5고

(72) 발명자

요시다 유조

일본 224-8558 가나가와켄 요코하마시 츠즈키쿠
하야부치 2-2-1 가부시키가이샤 시세이도 리서치
센타(신요코하마) 나이

소마 츠토무

일본 224-8558 가나가와켄 요코하마시 츠즈키쿠
하야부치 2-2-1 가부시키가이샤 시세이도 리서치
센타(신요코하마) 나이

후지와라 시게요시

일본 224-8558 가나가와켄 요코하마시 츠즈키쿠
하야부치 2-2-1 가부시키가이샤 시세이도 리서치
센타(신요코하마) 나이

(74) 대리인

김진희, 김태홍

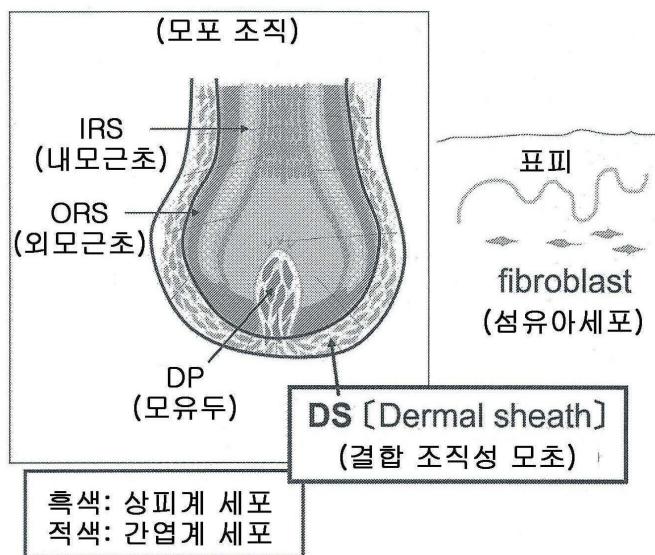
심사관 : 정의준

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 CD36 발현성 결합조직초 세포를 함유하는 모포를 재생하기 위한 조성물

(57) 요 약

본 발명은 CD36 발현성 결합조직초 세포(DSc)를 함유하는, 모포를 재생하기 위한 조성물을 제공한다.

대 표 도

명세서

청구범위

청구항 1

CD36 발현성 결합조직초 세포(DSc)를 함유하는, 모포를 재생하기 위한 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 모유두 세포(DPc)를 더 함유하는 모포를 재생하기 위한 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, CD36 발현성 DSc 대 DPc의 세포수의 비가 약 10:1 ~ 1:10인 조성물.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, CD36 발현성 DSc 및 DPc가 모두 마우스에 유래하거나, 또는 모두 래트에 유래하거나, 또는 모두 인간에 유래하는 조성물.

청구항 5

제2항 또는 제3항에 있어서, CD36 발현성 DSc 및 DPc가 이종 세포이고, 각각이 마우스, 래트 또는 인간에 유래하는 조성물.

청구항 6

인간을 제외한 동물에게 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 조성물을 이식하여, 모포를 재생하는 방법.

청구항 7

인간을 제외한 리시피언트 동물에게 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 조성물을 이식하여, 모포를 재생하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 인간을 제외한 리시피언트 동물이 면역계가 억제된 동물인 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 인간을 제외한 리시피언트 동물이 누드 마우스, 스키드 마우스, 누드 래트로 이루어지는 군에서 선택되는 면역계가 억제된 동물인 방법.

청구항 10

제2항 또는 제3항에 기재된 조성을 포함하는 피부 삼차원 모델을 제작하여, 인간을 제외한 동물에서 모포를 재생하는 방법.

청구항 11

인간을 제외한 리시피언트 동물에게 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 조성을 이식하고, 이렇게 하여 재구성 모포를 담지하게 된 키메라 동물.

청구항 12

제11항에 있어서, 인간을 제외한 리시피언트 동물이 면역계가 억제된 동물인 키메라 동물.

청구항 13

제11항에 있어서, 인간을 제외한 리시피언트 동물이 누드 마우스, 스키드 마우스, 누드 래트로 이루어지는 군에

서 선택되는 면역계가 억제된 동물인 키메라 동물.

청구항 14

제2항 또는 제3항에 기재된 조성물을 포함하는 피부 삼차원 모델을 제작하고, 이렇게 하여 재구성 모포를 담지하게 된 피부 삼차원 모델.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 모포를 재생하기 위한, CD36 항원(트롬보스폰딘 수용체)을 발현을 하는 결합조직초(「DS」: dermal sheath) 세포(이하, 「CD 발현성 DSc」라고도 함) 및 임의적으로 모유두(「DP」: dermal papilla) 세포(이하, 「DPC」라고도 함)를 함유하는 조성물, 그것을 이용하여 모포를 재생하는 방법, 또한 그와 같은 방법에 의해 재생된 모포를 담지하는 동물 또는 3차원 피부 모델을 제공한다.

배경기술

[0002] 모발은 미적 외관상 매우 중요시된다. 따라서, 선천적 또는 후천적 요인에 의한 탈모는 많은 사람들에게 있어서 심각한 고민이다. 특히 고령화 사회, 스트레스 사회라고 불리는 현대 사회에서는, 두부 모발이 여러가지 후천적인 원인에 의해, 탈모의 위기에 노출되는 기회가 점점 더 많아지고 있다. 이에 대응하여, 발모나 모발의 태모화(太毛化)의 촉진을 포함하는 육모 효과를 발휘하는 보다 우수한 육모제를 제공하기 위해, 여러가지 시도가 이루어지고 있다.

[0003] 모포는 성숙한 생체로 자기 재생을 거의 일생애를 통하여 반복하는 예외적인 기관이다. 그 자기 재생의 구조를 해명하는 것은, 조직이나 세포 이식에 의한 탈모 치료, 모포나 피지선을 함유하는 자연에 가까운 기능적으로도 우수한 피부 시트의 구축 등, 필요성이 높은 임상 응용에 연결될 것으로 기대된다. 최근, 줄기 세포 연구에의 관심의 고조와 함께 모포 상피 줄기 세포(상피 세포)의 연구가 급속하게 진전되고, 또한 모포 특이적인 간엽계 세포인 모유두 세포에 대해서도 그 성질이 조금씩 밝혀져 왔다. 모유두 세포는 모포의 자기 재생을 위해 모포 상피 줄기 세포에 활성화 시그널을 보내는 말하자면 사령탑의 역할을 담당하며, 모포 재구성 평가 시스템에 있어서는 모포 상피 줄기 세포와 함께 빠뜨릴 수 없는 세포인 것이 밝혀져 있다(Kishimoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1999), Vol.96, pp.7336-7341; 비특허문헌 1).

[0004] DP, 모포의 주위를 둘러싸는 DS는, 모두, 모포의 대부분을 구성하는 상피계 세포와는 상이하며, 간엽계 유래의 세포군으로 구성된다. DS에 대해서, 모포 형성에 대한 중요성을 시사하는 지견이, 최근, 다수 보고되어 있다. 모유두 래트 수염의 모구부 절단 모포 이식 실험에 있어서는, DS로부터 DP가 재생되는 것(1), 마우스에서, 밀 2분의 1을 절단한 모포의 DS를 이식함으로써, 모포 재생이 유도되는 것도 보고되어 있다(2). 또한, Jahoda 등 (Development. 1992 Apr; 114(4): 887-97; 비특허문헌 2)은, DS를 인간에게 이식함으로써, 모포의 재구축을 유도할 수 있는 것도 보고하고 있다(Horne KA and Jahoda CA. Development. 1992 Nov; 116(3): 563-71; 비특허문헌 3). 또한, Tobin, Paus 등의 그룹은, 마우스 모주기에 있어서, DS와 DP 사이의 세포의 이동이 일어나, 발모기에 있어서 증식을 개시하는 DPC에 앞서 결합조직초 세포(DSc)의 증식이 개시되는 것을 보고하고 있다(Tobin DJ et al., J. Invest. Dermatol., 120: 895-904, 2003; 비특허문헌 4).

[0005] 이와 같이, DS는 모포 형성에 대하여 중요한 역할을 달성하고 있을 가능성이 높지만, 그 작용 기서에 대해서는 불명한 점이 대부분이며, DSC의 성질조차 밝혀져 있지 않다. 그래서 본 발명자들은 DSC를 특징짓는 유전자 발현 프로파일을 조사하여, 모포 형성에의 작용 기서를 분명하게 하는 것을 목적으로 해석을 행하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Kishimoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1999), Vol.96, pp.7336-7341

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Jahoda CA et al., Development. 1992 Apr; 114(4): 887-97.

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Horne KA and Jahoda CA. Development. 1992 Nov; 116(3): 563-71.

(비)특허문현 0004) 비특허문현 4: Tobin DJ et al., J. Invest. Dermatol., 120: 895-904, 2003

(비)특허문현 0005) 비특허문현 5: J. Linder et al., Federation of American Societies for Experimental Biology, 14(2), 319(2000)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 과제는, 신규의 모포 재생계를 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명자는 마이크로어레이를 이용하여, DSc의 유전자 발현 프로파일을 조사한 결과, DPc나 FBc(섬유아 세포)와 비교하여 발현율이 2배 이상 높은 유전자로서 304개의 유전자를 확인하였다. 이를 유전자에 대해서 GeneSpring의 GeneOntology에서의 기능적 분류를 행한 결과, 혈관 관련 인자에 속하는 것이 많고, DS와 혈관의 관계가 시사되었다. 그리고 그 중에서의 DSc는 CD36을 고발현하는 것이 발견되고, 더구나 DSc에서의 이러한 CD36의 발현은 발모 촉진 효과를 나타내는 HGF(간세포 증식 인자)(J. Linder et al., Federation of American Societies for Experimental Biology, 14(2), 319(2000): 비특허문현 5)의 발현과 연동하고 있는 것을 알 수 있었다.

[0009] 따라서, 본원은 이하의 발명을 포함한다:

[0010] [1] CD36 발현성 결합조직초([DS]: dermal sheath) 세포를 함유하는, 모포를 재생하기 위한 조성물.

[0011] [2] 모유두(「DP」: dermal papilla) 세포를 더 함유하는, [1]의 모포를 재생하기 위한 조성물.

[0012] [3] CD36 발현성 DSc, 대, DPc의 세포수의 비가 약 10:1 ~ 1:10인, [2]의 조성물.

[0013] [4] CD36 발현성 DSc 및 DPc가 모두 마우스에 유래하는, 또는 모두 래트에 유래하는, 또는 모두 인간에 유래하는, [2] 또는 [3]의 조성물.

[0014] [5] CD36 발현성 DSc 및 DPc가 이종 세포이고, 각각이 마우스, 래트 또는 인간에 유래하는, [2] 또는 [3]의 조성물.

[0015] [6] 인간에게 [1] ~ [5] 중 어느 하나의 조성물을 이식하여, 모포를 재생하는 방법.

[0016] [7] 리시피언트 동물에게 [1] ~ [5] 중 어느 하나의 조성물을 이식하여, 모포를 재생하는 방법.

[0017] [8] 리시피언트 동물이 면역계가 억제된 동물인, [7]의 방법.

[0018] [9] 리시피언트 동물이 누드 마우스, 스키드 마우스, 누드 래트로 이루어지는 군에서 선택되는 면역계가 억제된 동물인, [7] 또는 [8]의 방법.

[0019] [10] [2] ~ [5] 중 어느 하나의 조성물을 포함하는 피부 삼차원 모델을 제작하여, 모포를 재생하는 방법.

[0020] [11] 리시피언트 동물에게 [1] ~ [5] 중 어느 하나의 조성물을 이식하고, 이렇게 하여 재구성 모포를 담지하게 된 키메라 동물.

[0021] [12] 리시피언트 동물이 면역계가 억제된 동물인, [11]의 키메라 동물.

[0022] [13] 리시피언트 동물이 누드 마우스, 스키드 마우스, 누드 래트로 이루어지는 군에서 선택되는 면역계가 억제된 동물인, [11] 또는 [12]의 키메라 동물.

[0023] [14] [2] ~ [5] 중 어느 하나의 조성물을 포함하는 피부 삼차원 모델을 제작하고, 이렇게 하여 재구성 모포를 담지하게 된 피부 삼차원 모델.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 모포 재생계 조성물은 모포 재생을 위한 이식 수술이나, 모포 재구성의 연구·개발에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 모포 조직의 구조를 나타내는 모식도이다.
- 도 2는 각종 혈관 관련 인자의 각종 세포에서의 발현이다.
- 도 3은 CD36 및 CD31 염색을 행한 조직 염색도이다.
- 도 4는 CD36 및 CD31 염색에 의한 모포의 whole-mount 염색도이다.
- 도 5는 CD36 양성 DSc와 혈관 내피 세포의 공배양 결과이다.
- 도 6은 CD36 양성 DSc의 HGF 발현 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명은, 모포를 재생하기 위한 DSc 및 임의적으로 DPc를 함유하는 조성물, 그것을 이용하여 모포를 재생하는 방법, 또한 그와 같은 재생된 모포를 담지하는 동물 또는 3차원 피부 모델을 제공한다.
- [0027] CD36 항원은 트롬보스폰딘 수용체라고도 칭해진다. CD36은 척추 동물의 대부분의 세포형의 표면에 보여지는 막 내재성 단백질이며, FAT, SCARB3, GP88, 당단백질 IV(gpIV)나 당단백질 IIIb(gpIIIb)로서도 알려져 있다. CD36은 세포 표면 단백질의 클래스 B 스캐빈저 수용체 패밀리의 멤버이다. CD36은 트롬보스폰딘 외에, 콜라겐, 열대 열 말라리아 원충이 기생하는 적혈구, 산화 저밀도 리포단백질, 천연 리포단백질, 산화 인지질, 장쇄 지방산 등의 대부분의 리간드와 결합한다. 유전자 개변 설치 동물을 이용한 최근의 연구에서는, 지방산이나 당대사, 심장 병, 미각, 및 장 내의 식물성 지방 수송에 있어서, CD36의 명확한 역할이 확인되어 왔다. CD36은, 내당뇨 장해, 죽상 동맥 경화, 동맥 고혈압증, 당뇨병, 심근증, 및 알츠하이머병에 관여할 수 있다.
- [0028] 또한, CD36 항원과 육모의 관계에 대해서는 전혀 알려져 있지 않다.
- [0029] DSc는 모포에 있어서의 DP의 주위를 둘러싸는 초 부분을 구성하는 세포이며, DPc와 마찬가지로 간엽계 세포이다. DP는 DS에 유래한다고 되어, 발모기에서의 DP 증식에 앞서 DS가 증식하는 것으로부터, DS가 DPc를 공급한다고 생각되고 있다(Tobin DJ et al., J. Invest. Dermatol., 120: 895-904, 2003; 비특허문현 4).
- [0030] CD36을 발현하는 DSc는, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예컨대 CD36에 대한 항체, 바람직하게는 모노클로널 항체를 이용한 관용의 셀 소팅 기술에 의해 DPc 등으로부터 선별할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 DSc는, 모든 포유 동물, 예컨대 인간, 침팬지, 그 밖의 영장류, 가축 동물, 예컨대 개, 고양이, 토끼, 말, 양, 염소, 소, 돼지, 그 외에 실험용 동물, 예컨대 래트, 마우스, 모르모트, 보다 바람직하게는 누드 마우스, 스키드 마우스, 누드 래트의 표피에 유래할 수 있다. 또한, 그 표피 부위는 유모 부위, 예컨대 두피여도, 무모 부위, 예컨대 포피여도 좋다.
- [0032] 「DPc(모유두 세포)」란, 간엽계 세포로서 모포 최저부에 위치하며, 모포의 자기 재생을 위해 모포 상피 줄기 세포에 활성화 시그널을 보내는, 말하자면 사령탑의 역할을 담당하고 있는 세포를 말한다. 활성화 모유두 세포만을 함유하는 모유두 세포 조제품은, 예컨대 트랜스제닉 마우스를 사용한 Kishimoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1999), Vol.96, pp.7336-7341에 기재된 방법에 따라 조제할 수 있다. 그러나, 수량 등의 점에서 바람직하게는, 예컨대 피부 조직으로부터 표피 조직을 제거함으로써 얻은 진피 조직 획분을 콜라겐 처리하여 세포 혼탁물을 조제하고, 이어서 그 세포 혼탁물을 동결 보존함으로써 모포 상피 세포를 사멸시킴으로써 조제할 수 있다.
- [0033] 상기 동결 보존에 의한 방법은, 구체적으로는, 예컨대 이하와 같이 하여 실시할 수 있다.
- [0034] 1. 포유 동물의 피부를 준비한다.
- [0035] 2. 이 피부를, 필요하다면 단백질 분해 효소 용액, 예컨대 트립신 용액 중에 적당한 시간, 예컨대 하룻밤 정치하고, 그 후 표피 부분을 핀셋 등으로 제거하며, 남은 진피를 콜라겐나체로 처리하여, 세포 혼탁액을 조제한다.
- [0036] 3. 필요하다면 셀 스트레이너에 의해 혼탁액을 여과하고, 정치에 의해 침전물을 제거한다.
- [0037] 4. 세포수를 계측하고, 적당한 세포 밀도, 바람직하게는 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8 / \text{ml}$ 정도의 세포 밀도로 동결 보호액으로 재현탁하며, 필요하다면 세분 분주하여, 통상의 세포 보존 방법에 따라, 동결 보존한다.

[0038] 5. 적당한 기간 보존 후, 용해하여, 사용한다.

[0039] 동결 방법은 특별히 한정되는 일은 없지만, -20°C 이하, 바람직하게는 -50°C 이하, 보다 바람직하게는 -80°C 이하의 초저온 냉동고 속에서, 또는 액체 질소 속에서 보존한다. 동결 보존 기간도 특별히 한정되는 일은 없지만, 상피 세포가 사멸하도록, 예컨대 1일 이상, 바람직하게는 3일 이상, 보다 바람직하게는 1주일 이상의 기간으로 한다. 또한, 액체 질소 속에서 4개월 보존하여도, 모유두 세포는 계속 생존하고 있는 것이 확인되었다. 동결 보호액으로서는 세포의 보존에 있어서 사용되고 있는 통상의 보존액, 예컨대 셀 뱅커 2 세포 동결 보존액(카타로그 No. BLC-2)(낫폰젠헤이쿠고교 제조)을 사용할 수 있다.

[0040] 세포수의 계측은 당업자 주지의 방법에 의해 실시할 수 있다. 예컨대, 세포수의 계측은 혈구 계산반(SLGC사 제조, EOSINOPHIL COUNTER)에 등량의 0.4% 트리판 블루 염색액(No.15250-061, 인비트로젠)으로 희석한 세포 혼탁액을 제공하여 혈구 계산반 부속의 취급 설명서에 기재된 방법에 따라 산출할 수 있다.

[0041] 본 발명의 DPC는 DSC와 마찬가지로, 모든 포유 동물, 예컨대 인간, 침팬지, 그 밖의 영장류, 가축 동물, 예컨대 개, 고양이, 토끼, 말, 양, 염소, 소, 돼지, 그 외에 실험용 동물, 예컨대 래트, 마우스, 모르모트, 보다 바람직하게는 누드 마우스, 스키드 마우스, 누드 래트의 피부에 유래할 수 있다.

[0042] 바람직하게는, 본 발명의 모포 재생을 위한 조성물은 추가로 「상피계 세포」를 포함하여도 좋다. 「상피계 세포」는, 피부의 표피 또는 상피의 대부분을 구성하는 세포이며, 진피에 접하는 1층의 기저 세포로부터 생긴다. 마우스를 예로 들면, 상피계 세포로서는 신생자(혹은 태아)에 유래하는 상피계 세포를 바람직하게 사용할 수 있지만, 성숙한 피부, 예컨대 휴지기 모의 상피 또는 성장기 모의 상피에 유래하는 세포여도, 케라티노사이트의 형태에 있는 세포의 배양물이어도 좋다. 이러한 세포는, 당업자 주지의 방법에 따라 원하는 도너 동물의 피부로부터 조제할 수 있다.

[0043] 적합한 양태에 있어서, 상피계 세포는 이하와 같이 하여 조제할 수 있다.

1. 포유 동물의 피부를 준비한다.

2. 이 표피를, 필요하다면 0.25% 트립신/PBS 속에서 4°C 하로 하룻밤 정치함으로써 트립신 처리한다.

3. 펀셋 등에 의해 표피 부분만 박리하고, 세절 후, 적당한 배양액(예컨대 케라티노사이트용 배양액) 속에서 4°C로 약 1시간 혼탁 처리한다.

4. 이 혼탁물을 적당한 포어 사이즈를 갖는 셀 스트레이너에 통과시키고, 이어서 원심 분리기에 걸어 상피계 세포를 회수한다.

5. 이 세포 조제품을 KGM 혹은 SFM 배지에 원하는 세포 밀도로 혼탁하여, 사용 직전까지 냉장에 정치해 둔다.

[0049] 본 발명의 상피계 세포는 DSC나 DPs와 마찬가지로, 모든 포유 동물, 예컨대 인간, 침팬지, 그 밖의 영장류, 가축 동물, 예컨대 개, 고양이, 토끼, 말, 양, 염소, 소, 돼지, 그 외에 실험용 동물, 예컨대 래트, 마우스, 모르모트, 보다 바람직하게는 누드 마우스, 스키드 마우스, 누드 래트의 표피에 유래할 수 있다. 또한, 그 표피 부위는 유모 부위, 예컨대 두피여도, 무모 부위, 예컨대 포피여도 좋다.

[0050] DSC, 대, DPC의 사용 비율은 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 본 발명의 조성물 중에 1:10 ~ 10:1, 보다 바람직하게는 1:3 ~ 3:1로 포함시킨다. 또한, DSC와 DPs의 총량에 대하여, 상피계 세포를 1:10 ~ 10:1, 더욱 바람직하게는 1:1 ~ 10:1, 더욱 보다 바람직하게는 1:1 ~ 3:1, 가장 바람직하게는 1:1로 포함시켜도 좋다.

[0051] DSC와 DPC, 또한 임의적으로 상피계 세포의 조합은 동종계여도, 이종계여도 좋다. 따라서, 본 발명의 모포를 재생하기 위한 조성물은, 예컨대, DSC, DPC, 상피계 세포의 전부가 인간에 유래하는 조합, DSC, DPC, 상피계 세포의 전부가 인간 이외의 포유 동물인 동종에 유래하는 조합(이상, 동종계), DSC 및 DPC가 인간에 유래하며, 상피계 세포가 인간 이외의 포유 동물에 유래하는 조합, DSC 및 DPC의 한쪽이 인간에 유래하며, 다른쪽 및 상피계 세포가 인간 이외의 포유 동물로서 동종 또는 이종의 것에 유래하는 조합, DSC 및 DPC의 한쪽이 인간 이외의 포유 동물에 유래하며, 다른쪽 및 상피계 세포가 인간에 유래하는 조합(이상, 이종계), 등이어도 좋다.

[0052] 본 발명에 따른 모포의 재생을 위한 조성물을 리시피언트 동물에게 이식하는 방법은, 그 자체 공지의 이식 방법에 따를 수 있다. 예컨대, Weinberg et al, J. Invest. Dermatol. Vol.100(1993), pp.229-236을 참조한 것. 예컨대 누드 마우스에게 이식을 행하는 경우, 준비된 세포를 이식 직전 ~ 1시간 전에 혼합하고, 원심(9000×g, 10 min.)에 의해 배양액을 제거하며, 50 ~ 100 μL 정도의 세포피로 한 후, 신속하게 누드 마우스 배부 피부에 매립한 실리콘제의 둠형 챔버 내에 유입시킨다. 2주간 후에 챔버를 조심스럽게 떼어내고, 추가로 3주간째 이후에

이식 부위의 모발 형성의 유무의 육안 관찰을 행할 수 있다. 인간을 포함한 동물에게 발모를 목적으로 이식을 행하는 경우도 유사하게 하여 행할 수 있으며, 적절한 방법은 의사나 수의에 의해 적절하게 결정될 것이다.

[0053] 상기 조성물을 리시피언트 동물에게 이식하는 경우, 그 이식은 동종 이식, 즉 자기 이식, 동종 동계 이식 혹은 동종 이계 이식이어도, 이종 이식이어도 좋다. 동종 이식의 경우, 모유두 세포 조제품 및 상피계 세포는 모두 리시피언트와 동종이다. 이종 이식에서는, 모유두 세포 조제품 또는 상피계 세포 중 어느 한쪽이 리시피언트와 이종이며, 다른쪽이 리시피언트와 동종인 경우와, 쌍방이 리시피언트와 이종인 경우가 있다. 리시피언트 동물로서는 모든 포유 동물, 예컨대 인간, 침팬지, 그 밖의 영장류, 가축 동물, 예컨대 개, 고양이, 토끼, 말, 양, 염소, 소, 돼지, 그 외에 실험용 동물, 예컨대 래트, 마우스, 모르모트, 보다 바람직하게는 누드 마우스, 스키드 마우스, 누드 래트를 들 수 있다.

[0054] 또한, 본 발명에 따른 상기 조성물을 적당한 리시피언트 동물에게 이식함으로써, 재생 모포를 담지하는 키메라 동물을 제공할 수 있다. 이러한 키메라 동물은, 예컨대 모포의 재생의 기구를 연구·해명하기 위해, 혹은 모포 재생 또는 발모 혹은 탈모에 유효한 약제·생약의 스크리닝을 행하기 위한 유력한 동물 모델을 담당할 수 있을 것이다. 리시피언트 동물은, 그 동물에게 이식되는 계에 포함되는 각 세포의 기원에 구애받지 않으며, 면역계가 억제된 동물인 것이 바람직하다. 또한 동물종으로서는, 실험 동물로서 사용할 수 있는 것이며, 본 발명의 목적을 따르는 것인 한, 어떠한 동물이어도 좋지만, 바람직하게는, 마우스, 래트 등을 예로 들 수 있다. 이러한 동물 중, 면역계가 억제되어 있는 것으로서는, 마우스를 예로 들면, 누드 마우스와 같이, 흉선 결손과 같은 형질을 갖는 것을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 목적을 고려하면, 특히 바람직한 리시피언트 동물로서는, 시판의 누드 마우스(예컨대, Balb-c nu/nu 계통), 스키드 마우스(예컨대, Balb/c-SCID), 누드 래트(예컨대, F344/N Jcl-rnu)를 예로 들 수 있다.

[0055] 또한, 본 발명에 따른 조성물을 삼차원 피부 모델에 포함시킴으로써, 재생 모포를 담지하는 삼차원 피부 모델을 제공할 수 있다. 단, 이 경우에는, 발모의 사령탑이 되는 모유두 세포는 필수이다. 삼차원 피부 모델은 당업자 주지의 방법(Exp. Cell Res. Amano S. et al., (2001), Vol.271, pp.249-362)에 따라, 예컨대 하기와 같이 하여 제작할 수 있다. 삼차원 피부 모델은 DSc 및 DPc를 각각 $1 \times 10^6 \sim 10^8$ 개/cm², 바람직하게는 $1.0 \sim 1.5 \times 10^7$ 개/cm², 보다 바람직하게는 약 1.27×10^7 개/cm²의 양으로 포함한다.

[0056] 삼차원 피부 모델 제작 방법

[0057] 인간 선유아세포를 0.1% 콜라겐 용액/DMEM/10% FBS에 적당량 분산시켜, 샤알레에 분주하고, 즉시 37°C의 CO₂ 인큐베이터에 정치한다. 겔화 후, 샤알레 벽면 및 바닥면으로부터 겔을 박리하여, 샤알레 안에서 부유하도록 만든다. 콜라겐 겔을 흔들면서 배양하여, 겔을 약 5분의 1로 수축시켜 진피 모델로 한다. 진피 모델을 스테인레스 그리드 위에 두고, 그 위에 유리 링을 셋트하며, KGM(표피 세포 배양용 배지)에 분산된 인간 배양 표피 세포 (1.0×10^6 세포수/ml)를 0.4 ml, 유리 링 내에 주입하여, 배양한다. 이때, DSc 및 DPc를 동시에 혼합하여 주입 한다. 인간 배양 표피 세포의 대체로서 마우스 신생아 표피 세포를 이용할 수도 있다.

[0058] 샤알레 내에 DMEM-KGM-5% FBS+Ca²⁺의 배지를, 진피 모델의 상부가 공기에 노출될 정도로 넣고, 배양하여, 약 1 주일간 후에 피부 모델을 관찰하여, 모포 원기 형성의 유무와 재현성을 판정한다.

[0059] 재구성 모포를 담지한 3차원 피부 모델은, 상기 재생 모포를 담지하는 키메라 동물과 마찬가지로, 모포의 재생의 기구를 연구·해명이나 발모·탈모에 유효한 약제·생약의 스크리닝에 이용할 수 있다.

[0060] 이하에 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0061] 실시예 1

[0062] (방법)

[0063] 세포의 단리 및 배양

[0064] 인간 두피 조직을 10% 소 태아 혈청 함유 DMEM(Gibco/invitrogen) 속에서, 진피 부분을 메스로 제거하고, 절단면으로부터 모포를 취출하였다. 정밀 펀셋을 이용하여 모포로부터, ORS(모포 상피계 세포)를 포함하는 모간을 제거하여 DP와 DS를 취출하였다. 단리한 DP는 medium-1(10% 소 태아 혈청, 10 ng/ml EGF, 20 ng/ml bFGF, 0.00075% β-мераптоэтанол, 페니실린 100 units/ml(역가), 스프레토마이신 0.1 mg/ml(역가), 암포테리신 B 0.25 ug/ml(역가) 함유 닉스이 섬유아 세포용 저혈청 배지)을 포함하는 콜라겐 코트 35 mm 접시(Iwaki) 상에서 정치

배양하고, 단리 DS는 콜라제나제 처리를 37°C, 40분 실시한 후, 마찬가지로 콜라겐 코트 35 mM 접시 상에서 정치 배양하였다. 양자 모두 1주일 경과 후, 증식을 확인한 후, DPC, DSC로서 실험 샘플로서 이용하였다. 섬유아세포(FBC)는 시판의 세포(토요보)를 사용하였다. DSC, DPC, FBC는 medium-1에 의해 7 ~ 10일, 정치 배양을 행하였다. 그 후, 트립신을 이용하여 세포의 계대를 행하였다. 배양 조건은 37°C, 5% CO₂로, 콜라겐 코트 플라스크 T-75(Iwaki)를 배양 용기로서 이용하였다. 또한 실험에 제공한 각 세포는 1회 ~ 3회 계대한 것을 이용하였다.

[0065] 혈관 내피 세포는 정상 인간 성인 피부 미소 혈관 내피 세포(이하 HMVEC)(Kurabo)를 이용하여, 저혈청 증식용 배지 Humedia-MvG(Kurabo)로 배양을 행하고, 계대수가 5회인 것을 실험에 이용하였다.

[0066] 마이크로어레이법을 이용한 DSC, DPC, FBC의 유전자 발현 프로파일의 비교

RNeasy Micro kit(Qiagen)를 이용하여 DPC, DSC, FBC로부터 mRNA를 포함하는 전체 RNA를 회수하였다. 회수한 RNA는 agilent의 프로토콜을 이용하여, 이중쇄 cDNA의 합성을 행하고, 추가로 시아닌 3, 5로 라벨한 cRNA의 합성을 계속해서 행하였다. 라벨한 cRNA는 2색법을 이용하여 애질런트사의 마이크로어레이 칩 슬라이드(Agilent, whole human genome(4×44K), G4110)에 65도 17시간 하이브리다이제이션하였다. 2개인의 DS 유래 RNA 각 2종(계 4종)과 2개인의 DP 유래 RNA 각 2종(계 4종), 1개인의 FB 유래 RNA 각 2종을 이용하여, DSC와 DPC, DPC와 FBC, FBC와 DSC, 각각 2가지 사이의 유전자 발현 레벨의 비교를 각 칩 슬라이드 상에서 행하였다. 슬라이드를 세정한 후, 칩 상의 cRNA의 형광 시그널(시아닌 3, 5)을 dual-laser Microarray scanner(Agilent)로 영상화하였다. 영상화한 데이터는 Feature Extraction Software 9.1에 의해 정량화하며, 그때, 이상한 수치나 백그라운드와 동일한 정도로 낮은 값에 표시를 하고, 해석을 행하였다. (태그를 갖는)각 발현량의 비교는 취득한 시그널의 정량값을 2가지 사이에서 비교함으로써 행하였다.

[0068] (마이크로어레이 데이터의 해석)

각 유전자 발현량은 바이오인포메틱스적 방법을 이용하였으며, 보다 상세하게 해석하기 위해, Gene Spring GX 7.3.1 소프트웨어(Agilent)를 이용하였다. Feature Extraction Software 9.1을 이용한 조작으로, 이상한 수치나 백그라운드와 동일한 정도로 낮은 값에는 표시를 하였지만, 그 표시가 된 유전자 이외를 이용하여 해석을 행하였다. 2가지 사이에서 발현량에 차가 있는 유전자를 추출하고, Gene ontology를 이용하여 그것을 기능적 분류하였다.(<http://www.geneontology.org/>) 또한 그때, 피셔 검정에 의해 통계적으로 어느 정도 우위인지를 검증하였다.

[0069] 세포 염색

[0070] CD36 항체를 이용한 세포 염색에 대해서, 산성 콜라겐 용액(Koken)을 이용하여 콜라겐 표면 처리한 4구명 챔버 슬라이드(Nalgene nunc)에 DSC를 파종한 후, 1일 ~ 2일 배양한 것을 이용하였다. PBS로 세정한 후, 4% PFA로 30분 고정, PBS로 세정, 0.1% TritonX-100 함유 PBS 용액으로 10분 처리하였다. 그리고, 3% BSA 함유 PBS로 30분 블로킹 처리를 행하고, CD36 항체(Abcam, ab17044)를 1% BSA 함유 PBS로 50배 희석한 1차 항체 용액으로 1시간 반응시켰다. PBS로 4회 세정 후, Alexa 594 표지 anti-mouse IgG 항체(Invitrogen)를 1% BSA 함유 PBS로 200배 희석한 2차 항체 용액으로 1시간 반응시켰다. 핵 염색을 위해 DAPI 용액으로 반응 후, PBS로 4회 세정하여, 퇴색 방지제 Prolong Gold Antifade Reagent(Invitrogen)와 커버 유리에 의해 봉입하였다. 형광 현미경(Olympus)을 이용하여 관찰을 행하였다.

[0071] 조직 염색

[0072] 인간 두피 조직을 동결 조직 포매제 OTC 컴파운드(Sakura Finetek)로 포매하여, 동결 절편 작성 장치 크라이오스탯(Leica)으로 동결 절편 슬라이드를 작성하였다. 4% PFA로 15분 고정한 후, PBS로 세정하고, PBS에 5% skim milk, 1% donkey serum, 0.1% triton-X100을 부가한 블로킹 용액을 이용하여 1시간 반응시켰다. 다음에, CD36 항체 용액(Abcam, ab17044), CD31 항체 용액(R&D, AF806)을 블로킹 용액으로 각각 50배, 100배 희석한 1차 항체 용액을 이용하여, 상온 1시간 혹은 4°C 오버나이트로 반응시켰다. 또한, CD31 항체는 혈관 내 세포의 마커로서 사용하는 CD31의 표지를 위해 이용하였다. PBS로 3회 세정한 후, Alexa 594 표지 anti-mouse IgG 항체(Invitrogen), Alexa 488 표지 anti-rabbit IgG 항체(Invitrogen)를 블로킹 용액으로 각각 200배 희석한 2차 항체 용액을 이용하여 상온에서 1시간 반응시켰다. DAPI 용액으로 반응 후, PBS로 3회 세정하고, 퇴색 방지제 Prolong Gold Antifade Reagent와 커버 유리에 의해 봉입하였다. 형광 현미경(Olympus)을 이용하여 관찰을 행하였다.

[0074] 모포 whole-mount 염색

인간 조직으로부터 단리한 모포를 4% PFA로 4°C에서 2시간, 진탕시키면서 고정하였다. 25%, 50%, 75% 에탄올 함유 0.1% tween PBS(이하, PBST)를 이용하여 각 5분씩, 100% 에탄올을 이용하여 5분씩 순차, 탈수 처리를 하였다. 처리한 샘플은 에탄올로 -20°C에서 보존하였다. 사용 시에는, 동일한 에탄올 계열 PBST로 재수화 처리를 행한 후, 5% tritonX-100 함유 PBS로 10분 처리하였다. 그 후, 조직 염색에 이용한 블로킹 용액, CD36 항체 (Abcam, ab17044), CD31 항체(R&D, AF806)를 포함하는 1차 항체 용액, Alexa 594 표지 anti-mouse IgG 항체, Alexa 488 표지 anti-rabbit IgG 항체를 포함하는 2차 항체를 이용하여 순차 반응시켰다. 또한 항체의 반응 조작 사이 및, 염색 후에 0.1% tritonX-100 PBS를 이용하여 각각 8회 세정을 행하였다. 반응 조건은 1차 항체 용액이 4°C 오버나이트, 2차 항체가 4°C에서 2 ~ 3시간이다. 퇴색 방지제 Prolong Gold Antifade Reagent와 커버 유리에 의해 봉입 후, 형광 현미경(Olympus)을 이용하여 관찰을 행하였다.

[0076] RT-PCR

TRIzol(Invitrogen)을 이용하여, 제공된 프로토콜을 이용하여 세포로부터 RNA를 회수하였다. 회수한 RNA는 농도를 핵산 정량 장치 Nanodrop(Thermo scientific)에 의해 측정하였다. 비교 대상군의 RNA 농도를 맞춘 뒤에, invitrogen의 프로토콜을 이용하여 역전사 효소 Superscript III(Invitrogen)에 의해 RNA로부터 oligo(dT) primers를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 주형에 반응 시약 LightCycler(등록 상표) FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green(Roche), 반응 장치 LightCycler(Roche)를 이용하여 정량적 RT-PCR을 행하였다. 조성 조건은 Roche의 프로토콜에 따라 행하였다. PCR의 조건은, 초기 변성 95°C에서 10분, 변성 95°C에서 10초, 어닐링 60°C에서 10초, 신장 72°C에서 10초이다. 이용한 프라이머 정보를 아래에 기재한다.

[0078] G3PDH:

[0079] 포워드 프라이머: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'(서열번호 1)

[0080] 리버스 프라이머: 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'(서열번호 2)

[0081] CD36:

[0082] 포워드 프라이머: 5'-GAGGAACTATATTGTGCCTATTCTTGCG-3'(서열번호 3)

[0083] 리버스 프라이머: 5'-CATAAAAGCAACAAACATCACCAACACCAAC-3'(서열번호 4)

[0084] CD31:

[0085] 포워드 프라이머: 5'-ATGCCGTGAAAGCAGATACTCTAG-3'(서열번호 5)

[0086] 리버스 프라이머: 5'-AATTGCTGTGTTCTGTGGAGCAG-3'(서열번호 6)

[0087] HGF:

[0088] 포워드 프라이머: 5'-GAGGGAAGGTGACTCTGAATGAG-3'(서열번호 7)

[0089] 리버스 프라이머: 5'-AATACCAGGACGATTGGAATGGCAC-3'(서열번호 8)

[0090] 부속의 소프트웨어를 이용하여, 각 유전자의 발현량을 측정하였다. 또한, G3PDH는 내부 표준으로서 이용하여, 각 유전자 각각의 정량 시에 있어서, 이것을 이용하여 대조군의 cDNA량을 보정하였다.

[0091] 세포의 소팅

[0092] Cell Separation Magnet(BD Bioscience)를 이용하여 세포를 분획하였다. 조작 조건은 BD Bioscience가 제시한 프로토콜에 따라 행하였다. 트립신 용액을 이용하여 세포를 박리 후, 세포 혼탁액을 공혈 70 μm 의 스트레이너(Falcon)에 통과시키고, 세포수를 카운트하였다. 500 ~ 1000만개의 세포를 500 μl 의 3% 소 태아 혈청 함유 PBS 용액으로 혼탁하고, 그 속에 CD36 항체(Abcam, ab17044)를 50배 희석이 되도록 부가하여, 15분 정도 냉장에서 반응시켰다. 1×IMag Buffer(BD Bioscience)를 이용하여 세정, 원심 조작으로 세포를 회수 후, 30 μl 의 Anti-mouse IgG1 Magnetic Particles(BD Bioscience)로 재현탁하여, 냉장에 30분 방치하였다. 500 μl 의 1×IMag Buffer(BD Bioscience)를 부가하여, Cell Separation Magnet(BD Bioscience)에 셋트하고, 8분간 정착하였다. 자석에 의해 측면에 접착한 세포를 박리하지 않도록 주의하면서 상청을 회수하고, 이것을 CD36 음성 DSC로 하였다. 계속해서 재차 500 μl 의 1×IMag Buffer(BD Bioscience)를 부가하여, 측면에 접착한 세포를 혼탁하고, Cell Separation Magnet에 셋트하여 4분간 정착한 후, 상청을 제거하였다. 이것을 1회 더 반복하여, 측면에 접

착한 세포를 CD36 양성 DSc로 하였다. 회수된 CD36 양성, 음성 DSc는, medium-1로 혼탁 후, 37°C, 5% CO₂로, 콜라겐 코트 플라스크 T-25(Iwaki)를 배양 용기로서 이용하여, 2 ~ 4일 배양한 것을 계속되는 실험에 이용하였다.

[0093] 공배양 실험

각 검체 유래 CD36 양성, 음성 DSc을 이용하여 각각 N=3, 4로 실험을 행하였다. 분획한 CD36 양성, 음성 DSc를 각각 콜라겐 코트 T-25 플라스크에 30만개 과종하였다. 그 후, medium-1로 2일간 배양 후, HMVEC를 40만개 부가하여, Humedia-MvG(Kurabo)로 1일 공배양하였다. 그 후, 혈관 내피 세포 기초 배지 Humedia-EB2(Kurabo)에 페니실린 100 units/ml(역가), 스트렙토마이신 0.1 mg/ml(역가), 암포테리신 B 0.25 ug/ml(역가) 0.1% BSA(Sigma)를 부가한 배지에 배지 교환하였다. 1일 더 공배양한 후, 세포를 트립신 용액으로 박리하고, 계속되는 FACS를 이용한 해석으로 진행하였다. CD36 양성 세포의 소팅과 동일한 방법으로, 70 μm의 스트레이너(Falcon) 처리, 3% 소 태아 혈청 함유 PBS 용액에의 혼탁, 1차 항체인 CD31 항체 용액(R&D, AF806)을 이용하여 빙상에서 20분 반응하였다. 3% 소 태아 혈청 함유 PBS 용액으로 세포를 세정 후, 2차 항체인 Alexa 488 표지 anti-rabbit IgG 항체(Invitrogen)를 빙상에서 20분 반응시키고, 0.5 ml의 PBS 용액으로 세포를 재현탁하여, Cell Lab Quanta SC(BeckmanCoulter)를 이용한 해석으로 진행하였다. BeckmanCoulter가 지정한 프로토콜과 조작 시약을 이용하여, 레이저 정밀도 관리를 포함하는 셋업을 행하였다. FL1 채널(525 nm)을 이용하여 CD31 양성 세포수의 측정을 행하였다. 또한, CD31 항체를 반응시키지 않은 내피 세포를 이용하여, 자가 형광을 없애기 위한 보정을 행하였다. 측정 후, 얻어진 전체 세포 수치, 및 CD31 양성 세포의 비율을 바탕으로, CD31 양성 세포수를 산출하였다.

[0095] (결과)

표 1에는 혈관 관련 인자의 일부에 대한 발현 결과를 나타낸다. 혈관 관련 인자는 DS에 있어서 발현성이 높은 것을 알 수 있지만, 그 중에서도 CD36이나 HGF가 DS에 있어서 특이적으로 높게 발현하고 있는 것을 알 수 있었다. 도 2에는 각종 혈관 관련 인자의 DS, DP, ORS, VEC(혈관 내피 세포)에서의 발현을 나타낸다. CD36 및 HGF가 DS에 있어서 매우 특이적으로 발현하는 것을 알 수 있다. 세포 염색 결과에서도, 단리한 DS 배양 세포에만 CD36 양성 세포가 존재하는 것이 보여지고, DP나 FB에는 CD36 양성 세포는 존재하지 않는 것을 알 수 있었다(데이터는 나타내지 않음).

표 1

DSc에서 고발현되고 있는 혈관 관련 인자

	DS/DP	DS/FB	FB/DP
CD36	40.24	10.97	3.93
	20.19	3.28	10.34
HGF	14.52	4.33	4.45
	17.85	4.14	4.47
TBX2 (T-box2 (견사 인자))	20.67	4.68	6.07
VEGFA (혈관 내피 세포 증식 인자)	3.41	5.12	0.50
	4.34	7.40	0.48
	2.22	4.16	0.52
	2.68	4.55	0.60
PDGFA (혈소판 유래 증식 인자)	5.82	3.67	1.80
COX-1 (프로스타글란дин 합성 효소)	11.73	2.24	4.88
	9.64	1.60	5.83

[0097]

CD36 및 CD31의 염색을 행한 조직 염색의 결과도, 모포의 초부, 즉 DS에 있어서 CD36의 특이적인 염색이 보여졌다(도 3). 또한, 모포의 whole-mount 염색의 결과는, DS의 일부에 혈관의 밀집부를 나타내고, CD36 양성 DSc 세포가 그 밀집부에 국재하는 것을 알 수 있었다. 따라서, CD36은 혈관과 깊게 관여하고 있는 것이 시사되었다. 또한, CD36 양성 DSc 세포는 혈관과 대부분 함께 국재하지만, 일부의 혈관 부근에서는 존재하지 않는 것도 알 수 있었다(도 4).

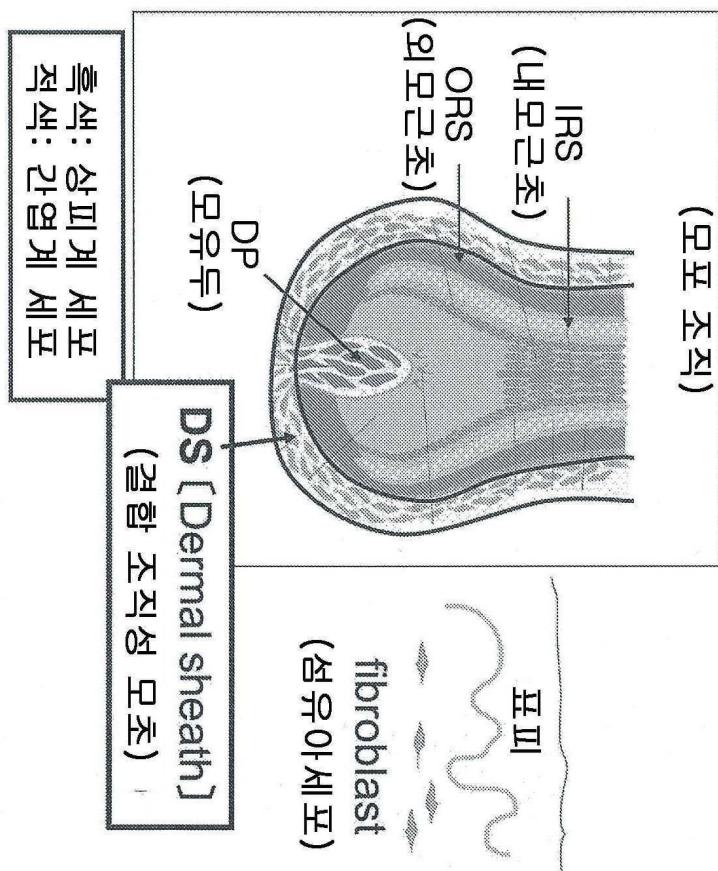
[0099] 따라서, CD36 양성 DSc 세포는, 예컨대 혈관 내피 세포의 증식을 촉진하는 등에 의해, 혈관의 형성을 촉진하는 것이 시사되었다.

[0100] 셀 소팅에 의해 단리한 CD36 양성 DSc를 혈관 내피 세포와 공배양한 실험은, CD36 양성 DSc가 CD36 음성 DSc 세

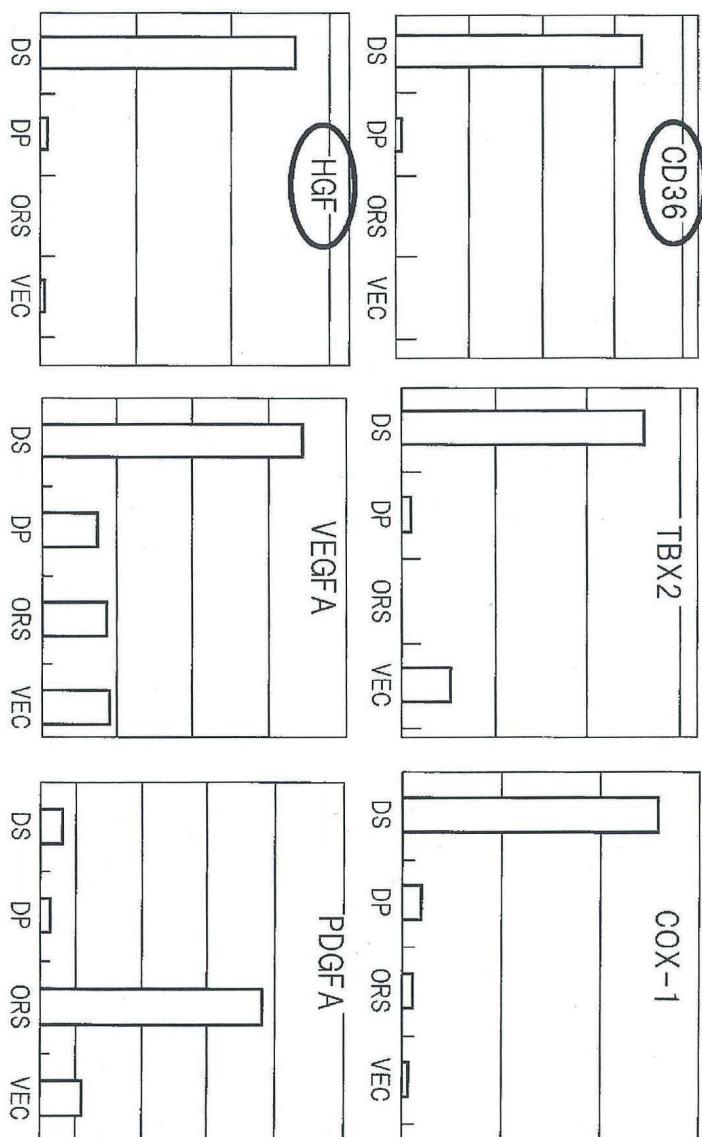
포에 비해서, 혈관 내피 세포의 증식을 현저하게 촉진하는 것을 나타내었다(도 5). 또한 단리된 CD36 양성 DSc는 CD36 음성 DSc 세포에 비해서, HGF를 고발현하는 것도 나타났다(도 6). 첫머리에서도 서술한 바와 같이, HGF는 발모나 육모를 촉진하는 인자로서 공지이다(비특허문헌 5). 따라서, CD36 양성 DSc를 모포에 이식하면, 발모·육모에 유효한 것이 분명하다.

도면

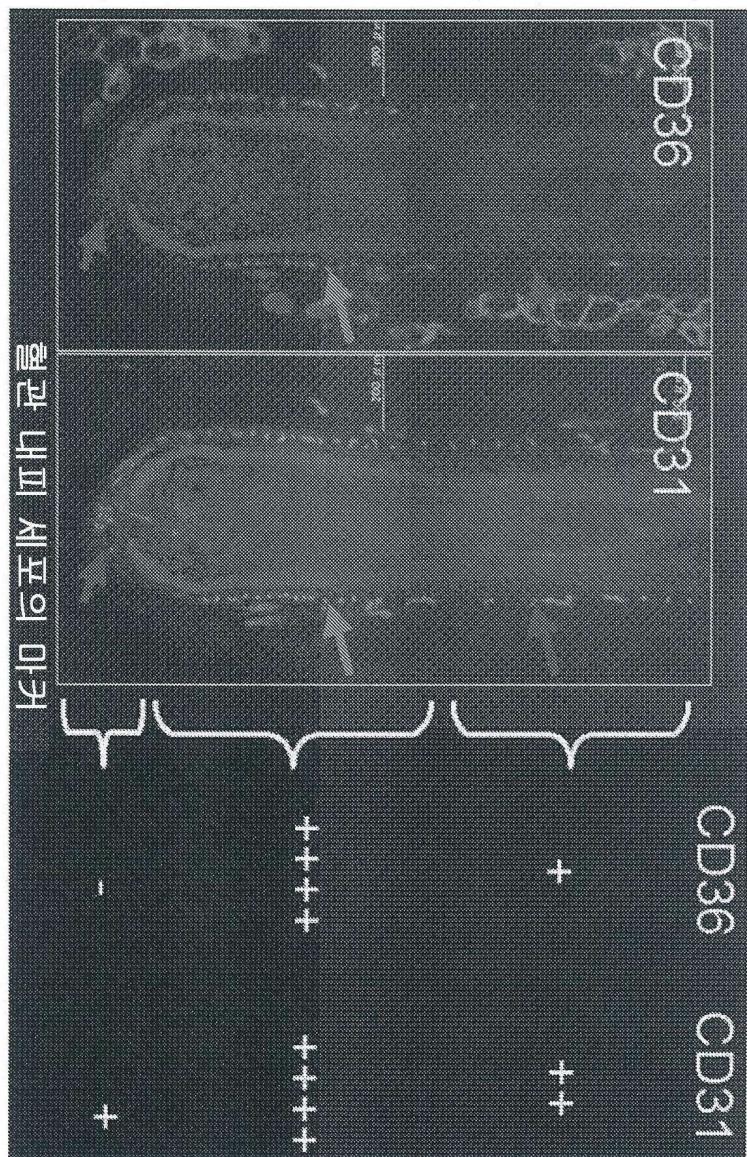
도면1



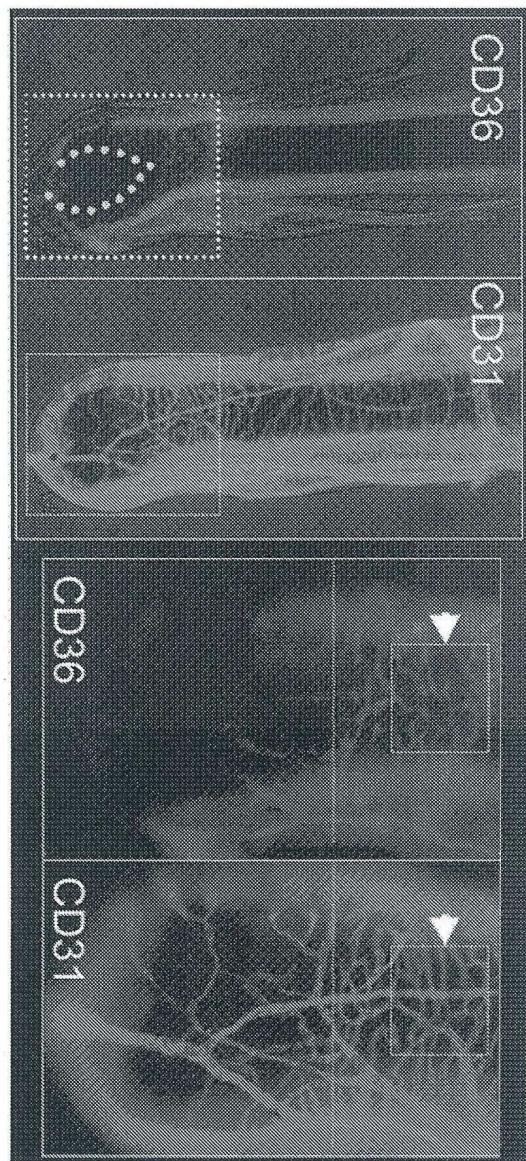
도면2



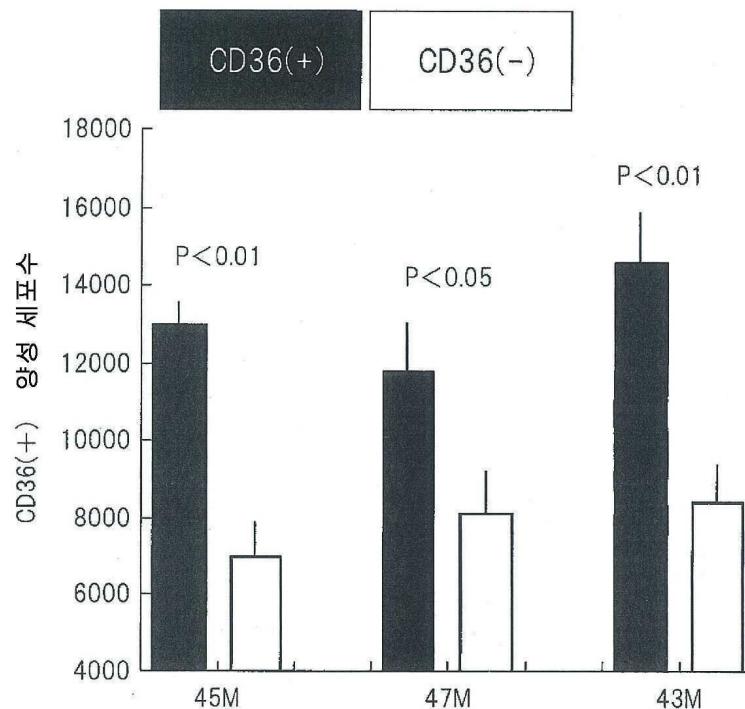
도면3



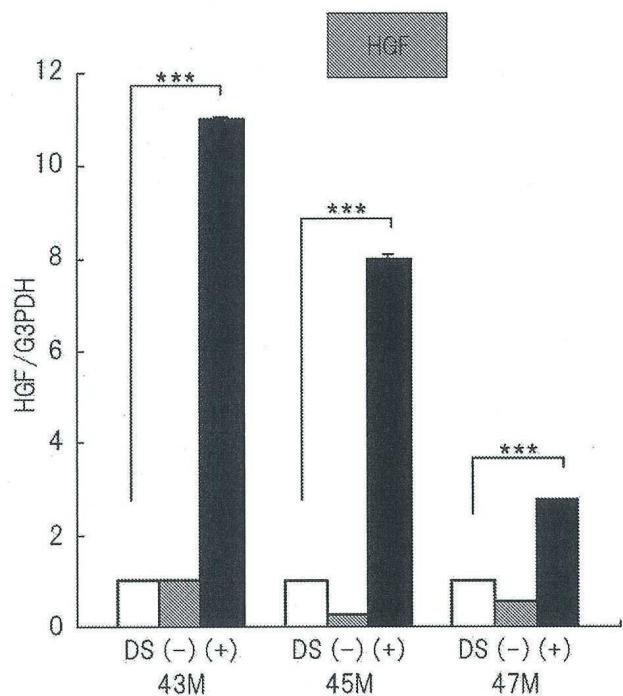
도면4



도면5



도면6



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> SHISEIDO COMPANY, LTD.

<120> Composition for Regenerating Hair Follicle Comprising CD36

Expressing-Connective Tissue Sheath Cell

<130> Y742-PCT

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G3PDH Forward Primer

<400> 1

gcaccgtcaa ggctgagaac 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> G3PDH Reverse Primer

<400> 2

atggtggtga agacgccagt 20

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD36 Forward Primer

<400> 3

gaggaactat attgtgccta ttctttggc 29

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD36 Reverse Primer

<400> 4

cataaaagca acaaacatca ccacaccaac 30

<210> 5

<211> 25

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD31 Forward Primer

<400> 5

atgccgtgga aagcagatac tctag 25

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD31 Reverse Primer

<400> 6

aattgctgtg ttctgtggaa gcag 24

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HGF Forward Primer

<400> 7

gagggaaggt gactctgaat gag 23

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HGF Reverse Primer

<400> 8

aataccagga cgatttggaa tggcac 26