(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 6 月 26 日(26.06.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/098211 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 35/407 (2006.01) *A61K 38/43* (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/084228

(22) 国際出願日: 2013 年 12 月 20 日(20.12.2013)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2012-280261 2012 年 12 月 21 日(21.12.2012) JP

(71) 出願人: 日東電工株式会社(NITTO DENKO CORPORATION) [JP/JP]; 〒5678680 大阪府茨木市下穂積１丁目１番２号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 新津洋司郎(NIITSU, Yoshiro); 〒0640823 北海道札幌市中央区北３条西３０丁目２－１－９０１ Hokkaido (JP). 米田明弘(YONEDA, Akihiro); 〒0600008 北海道札幌市中央区北８条西１９丁目１－２ Ｎ８ ＦＵＪＩＩ ＭＳ ３０１号 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 三橋 規樹, 外(MITUHASHI, Motoki et al.); 〒1600023 東京都新宿区西新宿６丁目２４番１号西新宿三井ビルディング１７階葛和国際特許事務所 Tokyo (JP).

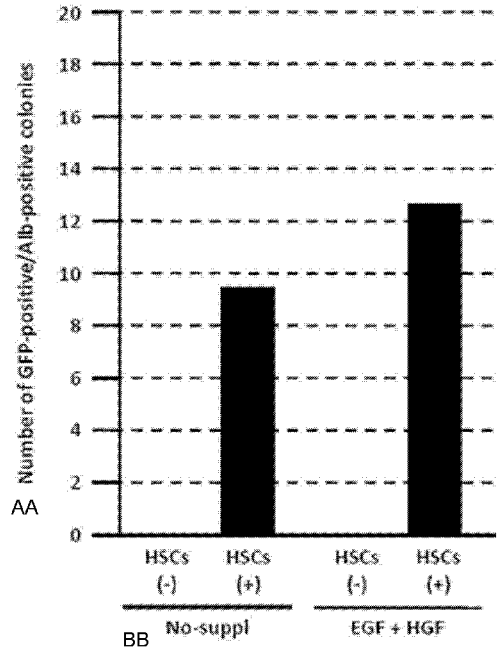
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) **Title**: TISSUE REGENERATION ACCELERATOR

(54) 発明の名称 : 組織再生促進剤

[図17]



AA Number of GFP-positive/Alb-positive colonies
BB No-supplemented

(57) **Abstract**: The purpose of the present invention is to provide a novel tissue regeneration accelerator and tissue regeneration method. The present invention relates to: a composition for accelerating tissue regeneration, accelerating cell differentiation and/or accelerating cell multiplication comprising a component selected from the group consisting of activated stellate cells, the decomposition product of activated stellate cells, MMP14, collagen that has been treated with MMP14, and the secretion product of activated stellate cells; a composition for suppressing cell multiplication comprising MMP14 suppressing material; and a cell cultivation substrate comprising collagen that has been treated with MMP14.

(57) 要約: 本発明は、新規な組織再生促進剤および組織再生促進方法の提供を目的とする。 本発明は、活性化星細胞、活性化星細胞分解物、ＭＭＰ１４、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンおよび活性化星細胞分泌物からなる群から選択される成分を含む、組織再生促進、細胞分化促進および／または細胞増殖促進のための組成物、ＭＭＰ１４抑制物質を含む細胞増殖抑制のための組成物、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンを含む細胞培養基材等に関する。

WO 2014/098211 A1

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ： 組織再生促進剤

技術分野

[0001] 本発明は活性化星細胞、活性化星細胞分解物、ＭＭＰ１４、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンおよび活性化星細胞分泌物からなる群から選択される成分を含む、組織再生促進、細胞分化促進および／または細胞増殖促進のための組成物、ＭＭＰ１４抑制物質を含む細胞増殖抑制のための組成物、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンを含む細胞培養基材等に関する。

背景技術

[0002] 生体の組織は、損傷を受けると、損傷部分を補うように再生し、その機能を回復しようとする。例えば肝臓は、その半分以上を切除しても、短期間で再生して、ほぼ元の大きさおよび機能を回復することが知られている。組織再生に関する研究は、肝臓を中心に古くから行われており、種々の知見が報告されているが、組織再生の詳細なメカニズムについては依然不明なところが多い。組織の再生には複数の種類の細胞が複雑に関わり合っていると考えられているが、これらの細胞のいずれが主要な役割を担っているのかについてさえ、決定的な見解は得られていない。

[0003] 組織再生メカニズムの解明は、組織染色や細胞染色などによる損傷組織の経時変化や、種々の生理活性物質の組織再生に及ぼす影響などを解析することによって進められている。例えば、非特許文献１には、マウス肝部分切除モデルにおいて、特定のフェノタイプの肝類洞内皮細胞が、VEGFR2（vascular endothelial growth factor-A receptor-2）を介した内皮細胞特異的転写因子であるId1の上方調節により肝細胞の増殖を引き起し、次いで内皮細胞自身が増殖することで、肝臓の再生が行われるという仮説が示されている。

しかしながら、精力的な研究にも拘らず、組織再生に係る機構は未だそのごく一部が明らかにされているにすぎず、さらなる研究努力が求められている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Ding et al., Nature. 2010 Nov 11;468(7321):310-5

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、新規な組織再生促進剤および組織再生促進方法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を進める中で、活性化星細胞が組織の再生に重要な役割を果していること、活性化星細胞の分泌物が組織再生の核となる幹細胞の増殖および分化を誘導すること、活性化星細胞が発現するＭＭＰ１４の作用を受けたコラーゲンが組織実質細胞の増殖を誘導すること、および、この増殖の誘導にコラーゲンに存在するＲＧＤ配列が関与することをそれぞれ見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は以下に関する。

（１）活性化星細胞、活性化星細胞分解物、ＭＭＰ１４、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンおよび活性化星細胞分泌物からなる群から選択される成分を含む、組織再生を促進するための組成物。

（２）組織再生が、障害組織または移植組織において生じる、（１）に記載の組成物。

（３）障害または移植を受けた日から４日以内に投与される、（２）に記載の組成物。

（４）障害または移植を受けた日から１日以内に投与される、（２）に記載の組成物。

（５）障害が、組織破壊、炎症、壊死、線維化、手術的侵襲、臓器不全からなる群から選択される、（２）～（４）のいずれかに記載の組成物。

[0007] （６）組織再生が組織幹細胞の分化および／または増殖を伴う、（１）～（

５）のいずれかに記載の組成物。

（７）組織再生が組織実質細胞の増殖を伴う、（１）～（６）のいずれかに記載の組成物。

（８）活性化星細胞が、ＨＧＦ、ＥＧＦ、ＭＭＰ１４からなる群から選択されるタンパク質の発現を増大させる処置を施されたものである、（１）～（７）のいずれかに記載の組成物。

（９）組織再生が抑制された状態を有する対象に対して用いる、（１）～（８）のいずれかに記載の組成物。

（１０）組織再生が抑制された状態が、炎症、壊死、線維化、臓器不全、血小板数の減少、遺伝子異常、ノルアドレナリンの減少からなる群から選択される、（９）に記載の組成物。

[0008] （１１）対象において組織再生を促進する方法であって、（１）～（１０）のいずれかに記載の組成物を、これを必要とする対象に投与する工程を含む、前記方法。

（１２）活性化星細胞、活性化星細胞分解物、ＭＭＰ１４、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンおよび活性化星細胞分泌物からなる群から選択される成分を含む、幹細胞の分化および／または増殖のための組成物。

（１３）活性化星細胞、活性化星細胞分解物、ＭＭＰ１４、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンおよび活性化星細胞分泌物からなる群から選択される成分と、幹細胞とを接触させる工程を含む、組織幹細胞を分化および／または増殖させる方法。

（１４）活性化星細胞、活性化星細胞分解物、ＭＭＰ１４、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンおよび活性化星細胞分泌物からなる群から選択される成分を含む、細胞増殖を促進するための組成物。

[0009] （１５）活性化星細胞、活性化星細胞分解物、ＭＭＰ１４、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンおよび活性化星細胞分泌物からなる群から選択される成分と、細胞とを接触させる工程を含む、細胞増殖を促進させる方法。

（１６）ＭＭＰ１４を阻害する物質を含む、細胞増殖を抑制するための組成

物。

（１７）ＭＭＰ１４を阻害する物質が作用する細胞が、ＣＡＦおよび／または腫瘍細胞である、（１６）に記載の組成物。

（１８）ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンを含む、細胞培養基材。

（１９）ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンで被覆された細胞培養容器。

発明の効果

[0010] 本発明により、生体内での組織再生のみならず、生体外での組織形成をも促進させることができるため、生物学的、医学的に多大な貢献が期待できる。

また、本発明による組織再生の促進は、組織再生が抑制されている状況、例えば、線維症などの疾患を伴う状況などにおいて特に有用である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]肝部分切除ラットに対する処置の流れを示した図である。

[図2]肝部分切除後５日目および１０日目に採取した各群の肝臓の外観を、肝部分切除前および切除直後の肝臓との比較で示した図である。

[図3]採取した各群の肝重量の推移を示したグラフである。

[図4]肝部分切除後５日目に採取した肝組織をＦＩＴＣ－ＴＵＮＥＬ、α－ＳＭＡおよびＤＡＰＩで共染色した蛍光顕微鏡像を示した図である。

[図5]肝部分切除後５日目に採取した肝組織をＦＩＴＣ－ＴＵＮＥＬ、α－ＳＭＡおよびＤＡＰＩで共染色した蛍光顕微鏡像における、α－ＳＭＡ陽性ＴＵＮＥＬ陽性細胞の数を示した図である。

[0012] [図6]肝部分切除後５日目に採取した肝組織をＫｉ６７およびＤＡＰＩで共染色した蛍光顕微鏡像を示した図である。

[図7]肝部分切除後５日目に採取した肝組織をＫｉ６７およびＤＡＰＩで共染色した蛍光顕微鏡像におけるＫｉ６７陽性細胞数を示した図である。

[図8]肝部分切除後５日目に採取した肝組織をＣＤ１３３およびＤＡＰＩで共染色した蛍光顕微鏡像を示した図である。

[図9]例３の各群に施した処置の概要を示した図である。

[図10]採取した各群の肝臓の外観を、肝部分切除直後（０日目）の肝臓との比較で示した図である。

[0013] [図11]採取した各群の肝臓の重量を、肝部分切除直後（０日目）の肝臓との比較で示したグラフである。

[図12]肝部分切除後の肝組織におけるα－ＳＭＡ陽性細胞の経時変化を示した図である。

[図13]肝部分切除後の肝組織におけるα－ＳＭＡ陽性細胞数の経時変化を示したグラフである。

[図14]静止型肝星細胞（上図）および活性型肝星細胞（下図）の顕微鏡像を示した図である。

[図15]幹細胞と星細胞との接触共培養における、ＧＦＰ／アルブミン両陽性コロニーの顕微鏡像を示した図である。

[0014] [図16]幹細胞と星細胞との接触共培養において、ＥＧＦおよびＨＧＦを添加したときの、ＧＦＰ／アルブミン両陽性コロニーの顕微鏡像を示した図である。

[図17]幹細胞と星細胞との接触共培養におけるＧＦＰ／アルブミン両陽性コロニー数を示したグラフである。

[図18]幹細胞と星細胞との接触共培養におけるＧＦＰ／アルブミン両陽性コロニーの面積を示したグラフである。

[図19]幹細胞と星細胞との非接触共培養におけるＧＦＰ／アルブミン両陽性コロニーの面積を示したグラフである。

[図20]幹細胞と星細胞との非接触共培養におけるＧＦＰ／アルブミン両陽性細胞数の増殖を吸光度で示したグラフである。

[0015] [図21]肝部分切除後の肝組織におけるＤＮＡ合成の経時変化を示した顕微鏡像である。

[図22]肝部分切除後の肝組織におけるＢｒｄＵ陽性細胞の割合の経時変化を示したグラフである。

[図23]肝部分切除後の肝組織におけるＤＮＡ合成の経時変化を示した顕微鏡

像である。

[図24]肝部分切除後の肝組織におけるＢｒｄＵ陽性細胞の割合の経時変化を示したグラフである。

[図25]肝細胞と星細胞とを共培養したときのＢｒｄＵ陽性肝細胞を示した顕微鏡像である。

[0016] [図26]肝細胞と星細胞とを共培養したときのＢｒｄＵ陽性肝細胞の割合を示したグラフである。

[図27]種々の処理を施したコラーゲン上で肝細胞を培養したときのＢｒｄＵ陽性細胞を示した顕微鏡像である。

[図28]種々の処理を施したコラーゲン上で肝細胞を培養したときのＢｒｄＵ陽性細胞の割合を示したグラフである。

[図29]肝細胞と、ＭＭＰ１４および／またはＨＧＦをノックダウンした星細胞とを共培養したときのＢｒｄＵ陽性肝細胞を示した顕微鏡像である。

[0017] [図30]肝細胞と、ＭＭＰ１４および／またはＨＧＦをノックダウンした星細胞とを共培養したときのＢｒｄＵ陽性肝細胞の割合を示したグラフである。

[図31]ＭＭＰ１４処理コラーゲン上で肝細胞をＲＧＤペプチドの存在下で培養したときのＢｒｄＵ陽性細胞を示した顕微鏡像である。

[図32]ＭＭＰ１４処理コラーゲン上で肝細胞をＲＧＤペプチドの存在下で培養したときのＢｒｄＵ陽性細胞の割合を示したグラフである。

発明を実施するための形態

[0018] 本発明の一側面は、活性化星細胞、活性化星細胞分解物、ＭＭＰ１４、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンおよび活性化星細胞分泌物からなる群から選択される成分を含む、組織再生を促進するための組成物に関する。

[0019] 活性化星細胞は、生体から単離した星細胞を継代培養して得ることができる。星細胞は、肝臓、膵臓、腎臓、腸管、肺などの種々の組織に存在することが知られており（Zhao and Burt, J Mol Histol. 2007 Mar;38(1):53-64）、これらのいずれをも利用することができる。星細胞の単離は既知の任意の方法を用いて行うことができる。肝星細胞の単離方法の具体例は後述の例５

（１）に例示されている。活性化星細胞はαＳＭＡの発現を特徴としており、これをマーカーとして選別することができる。

[0020] 活性化星細胞は、ＨＧＦ、ＥＧＦ、ＭＭＰ１４からなる群から選択されるタンパク質の発現を増大させる処置を施されたものであってもよい。かかる処置としては、限定されずに、例えば、前記タンパク質をコードする遺伝子の活性化星細胞への導入が挙げられる。ＨＧＦ、ＥＧＦおよびＭＭＰ１４をコードする遺伝子は既知であり、また、遺伝子の導入法も当該技術分野においてよく知られている。

[0021] 活性化星細胞分解物は、活性化星細胞を、物理的および／または化学的手法を含む種々の手法で分解して得ることができる。分解には、細胞を分解する既知の任意の手法、例えば、浸透圧ショック法、凍結融解法、界面活性剤の使用、酵素消化法、超音波処理、フレンチプレス、乳鉢による粉砕、ホモジナイザーによる破砕、ガラスビーズによる破砕などを用いることができる。分解手法は、タンパク質を変性させないか、変性が軽度のものが好ましい。かかる手法を用いることで、細胞膜上に発現しているＭＭＰ１４を、その機能を損なうことなく得ることができる。また、活性化星細胞分解物は、細胞膜成分を含んでいることが好ましい。

[0022] ＭＭＰ１４（ＭＴ１－ＭＭＰとも呼ばれる）は、細胞膜上に発現するＭＭＰである。ＭＭＰ１４はコラーゲンＩに作用することができる。本発明者により、ＭＭＰ１４のコラーゲンＩに対する作用が、細胞の増殖に深く関与することが明らかとなった。

本発明におけるＭＭＰ１４は、細胞膜上に発現しているもののみならず、細胞膜から遊離したものも含む。ＭＭＰ１４は天然に存在するものであっても、人工的に作製したものであってもよい。したがって、ＭＭＰ１４は組換えＭＭＰ１４を含む。遊離型のＭＭＰ１４は既知であり（例えば、Jo et al., Biochem J. 2000 Feb 1;345 Pt 3:511-9など）、市販もされている（例えば、R&D Systems, Cat No.918-MP-010、918-MPN-010など）。ＭＭＰ１４のアミノ酸およびこれをコードする塩基配列は既知である（例えば、ヒトＭＭＰ

１４の塩基配列はGenBankアクセッション番号NM_004995、アミノ酸配列はGenBankアクセッション番号NP_004986として登録されている）。

[0023] 本発明におけるＭＭＰ１４は、その機能的変異体も含む。ＭＭＰ１４の機能的変異体は、限定されることなく、例えば、（ｉ）当該タンパク質のアミノ酸配列に１個または２個以上、典型的には１個または数個の変異を有するが、なお当該タンパク質と同等の機能を有する変異体、（ｉｉ）当該タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を有する核酸もしくは同核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸の塩基配列に１個または２個以上、典型的には１個または数個の変異を有する核酸によりコードされ、かつ当該タンパク質と同等の機能を有する変異体、（ｉｉｉ）当該タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を有する核酸、同核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸もしくは（ｉｉ）の変異体をコードする核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズする核酸によりコードされ、かつ、当該タンパク質と同等の機能を有する変異体、（ｉｖ）当該タンパク質のアミノ酸配列と６０％以上、好ましくは７０％以上、より好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上、特に好ましくは９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつ、当該タンパク質と同等の機能を有する変異体、（ｖ）当該タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列と６０％以上、好ましくは７０％以上、より好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上、特に好ましくは９５％以上の相同性を有する核酸によりコードされ、かつ、当該タンパク質と同等の機能を有する変異体等が挙げられる。

[0024] 当業者はＭＭＰ１４の配列情報をもとに、上記機能的変異体を、既知の任意の手法、例えば、化学合成、制限酵素による核酸の切断または挿入、部位特異的変異導入、放射線もしくは紫外線の照射などにより適宜作製することができる。

ある変異体がＭＭＰ１４と同等の機能を有するか否かは、当該変異体を、ＭＭＰ１４の既知の機能、限定されずに、例えば、コラーゲン分解能などについて、既知の任意の方法により解析し、適切な陰性対照や、陽性対照とし

てのＭＭＰ１４と比較することによって評価することができる。例えば、ある変異体において、上記機能が陰性対照より優れている場合、例えば、１０％以上、２５％以上、５０％以上、７５％以上、さらには１００％以上優れている場合、および／または、同機能がＣＳＡＢＰの１／１００以上、１／５０以上、１／２５以上、１／１０以上、１／５以上、さらには１／２以上である場合、この変異体をＭＭＰ１４の機能的変異体に含める。

[0025] 本明細書で用いる「ストリンジェントな条件」という用語は、当該技術分野において周知のパラメータであり、標準的なプロトコル集、例えばSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Press (2001)や、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992)等に記載されている。

[0026] 本発明におけるストリンジェントな条件は、例えば、６５℃での、３．５×ＳＳＣ（０．１５Ｍ塩化ナトリウム／０．１５Ｍクエン酸ナトリウム、ｐＨ７）、フィコール０．０２％、ポリビニルピロリドン０．０２％、ウシ血清アルブミン０．０２％、ＮａＨ２ＰＯ４２５ｍＭ（ｐＨ７）、ＳＤＳ０．０５％、ＥＤＴＡ２ｍＭからなるハイブリダイゼーションバッファーによるハイブリダイゼーションを指す。ハイブリダイゼーション後、ＤＮＡが移された膜は、２×ＳＳＣにて室温において、次いで０．１～０．５×ＳＳＣ／０．１×ＳＤＳにて６８℃までの温度において洗浄する。あるいは、ストリンジェントなハイブリダイゼーションは、ExpressHyb(R)Hybridization Solution（Clontech社）等の市販のハイブリダイゼーションバッファーを用いて、製造者によって記載されたハイブリダイゼーションおよび洗浄条件で行ってもよい。

[0027] 同程度のストリンジェンシーを生じる結果となる使用可能な他の条件、試薬等が存在するが、当業者はかかる条件に通じていると思われるため、これらについては、本明細書中に特段記載はしていない。しかしながら、タンパク質の変異体をコードしている核酸の明確な同定ができるよう、条件を操作することが可能である。

本発明におけるＭＭＰ１４および／またはその機能的変異体は、当該タンパク質自体やその機能的変異体のほか、当該タンパク質やその機能的変異体をコードする核酸をも含む。

[0028] ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンは、コラーゲンをＭＭＰ１４で処理して得ることができる。コラーゲンとしては、例えば、コラーゲンＩを用いることができる。処理に用いるＭＭＰ１４は、上述のＭＭＰ１４（ＭＭＰ１４の機能的変異体を含む）のほか、ＭＭＰ１４を発現する細胞自体、または、ＭＭＰ１４を含む前記細胞の分解物であってもよい。ＭＭＰ１４による処理時間としては、例えば、ＭＭＰ１４が作用し得る温度で、１～１２０時間、３～６０時間、６～４８時間、１２～３６時間などであってもよい。ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンは、ＲＧＤ配列が、細胞と相互作用できる状態になっていることが好ましい。

[0029] 活性化星細胞分泌物は、活性化星細胞の培養上清などから得ることができる。培養上清はそのまま用いても、透析や凍結乾燥などにより濃縮して用いてもよい。活性化星細胞分泌物には種々のタンパク質が含まれているため、タンパク質が変性しないように扱うことが好ましい。

[0030] 本発明の組成物により再生を促進する組織は特に限定されず、全身の種々の組織を含む。かかる組織としては、限定されずに、例えば、星細胞が存在する組織、線維化が生じる組織、幹細胞が存在する組織などが挙げられる。具体的には、限定されずに、例えば、肝臓、膵臓、腎臓、腸管、肺、脾臓、心臓、骨髄、声帯、皮膚、腹膜、眼、脈管などが挙げられる。

[0031] 本発明の組成物は、障害組織または移植組織において生じる組織再生に有用である。障害組織は、組織破壊、炎症、壊死、線維化、手術的侵襲、臓器不全等を受けた組織を含む。本発明の組成物の投与時期は特に限定されないが、障害または移植を受けた日から４日以内、または、障害または移植を受けた日から１日以内に投与することが好ましい。

[0032] 本発明の組成物による組織再生は、幹細胞の分化および／または増殖を伴うものであってもよい。また、本発明の組成物による組織再生は、組織実質

細胞の増殖を伴うものであってもよい。幹細胞の分化は、例えば、分化細胞に特異的な細胞マーカーの検出、分化細胞が示す機能の検出などにより評価することができる。細胞の増殖は、種々の既知の手法、例えば、経時的な生細胞数の計数、組織のサイズ、体積または重量の測定、ＤＮＡ合成量の測定、ＷＳＴ－１法、ＢｒｄＵ（ブロモデオキシウリジン）法、^{3}Ｈチミジン取込み法などにより評価することができる。

[0033] 本発明の組成物は、組織再生が抑制された状態を有する対象に対して用いることができる。組織再生が抑制された状態としては、限定されずに、例えば、炎症、壊死、線維化、臓器不全、血小板数の減少、遺伝子異常、ノルアドレナリンの減少などを含む。

[0034] 本発明の組成物における有効成分の配合量は、組成物が投与された場合に、組織再生が促進される量であってもよい。また、投与による利益を超える悪影響が生じない量が好ましい。かかる量は公知であるか、培養細胞などを用いたin vitro試験や、マウス、ラット、イヌまたはブタなどのモデル動物における試験により適宜決定することができ、このような試験法は当業者によく知られている。組織再生の促進は、組織の機能、重量、大きさなどの回復を、生化学検査、レントゲン、超音波、ＭＲＩ、ＣＴ、内視鏡などを用いた画像診断などにより評価することができる。有効成分の配合量は、組成物の投薬態様によって変化し得る。例えば、１回の投与に複数の単位の組成物を用いる場合、組成物１単位に配合する有効成分の量は、１回の投与に必要な有効成分の量の複数分の１とすることができる。かかる配合量の調整は当業者が適宜行うことができる。

[0035] 本発明はまた、活性化星細胞、活性化星細胞分解物、ＭＭＰ１４、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンおよび活性化星細胞分泌物からなる群から選択される成分を配合することを含む、組織再生を促進するための組成物を製造する方法、前記成分の、組織再生を促進するための組成物の製造への使用、ならびに、組織再生の促進に用いる前記成分に関する。

上記製造方法または使用における各成分やその配合量については、既に上

述したとおりである。各成分の配合は、既知の任意の手法に従って行うことができる。

[0036] 本発明はまた、上記の組成物を、これを必要とする対象に投与する工程を含む、対象において組織再生を促進する方法に関する。本方法における対象は、組織に障害を受けているか、組織移植を受けていてもよい。障害は、限定されずに、例えば、組織破壊、炎症、壊死、線維化、手術的侵襲、臓器不全等を含む。組成物の投与は、例えば、障害もしくは移植を受けた日から４日以内、障害もしくは移植を受けた日から１日以内であってもよい。

[0037] 本発明はまた、活性化星細胞、活性化星細胞分解物、ＭＭＰ１４、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンおよび活性化星細胞分泌物からなる群から選択される成分を含む、幹細胞の分化および／または増殖のための組成物、前記成分を配合することを含む、幹細胞の分化および／または増殖のための組成物を製造する方法、前記成分の、幹細胞の分化および／または増殖のための組成物の製造への使用、幹細胞の分化および／または増殖に用いる前記成分、ならびに、前記成分と、幹細胞とを接触させる工程を含む、幹細胞を分化および／または増殖させる方法に関する。

[0038] 幹細胞は、特に限定されず、例えば、組織幹細胞（体性幹細胞、成体幹細胞）、胚性幹細胞、ｉＰＳ細胞等を含む。幹細胞は、全能性、万能性、多能性または単能性であってもよい。組織幹細胞としては、限定されずに、例えば、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、皮膚幹細胞、筋幹細胞、生殖幹細胞等が挙げられる。幹細胞は自己由来のものであっても、同種の他の個体または異種の個体のものであってもよい。分化および／または増殖させた幹細胞は、それを必要とする対象に移植することができる。

[0039] 上記方法はin vitro、in vivoまたはex vivoで行われてもよい。上記組成物、方法または使用における各成分やその配合量については、既に上述したとおりである。各成分の配合は、既知の任意の手法に従って行うことができる。上記組成物、方法または使用における有効成分としてＭＭＰ１４を用い

る場合、増殖促進の対象となる細胞の周囲にコラーゲン（特にコラーゲンＩ）が存在することが好ましい。

[0040] 本発明はまた、活性化星細胞、活性化星細胞分解物、ＭＭＰ１４、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンおよび活性化星細胞分泌物からなる群から選択される成分を含む、細胞増殖を促進するための組成物、前記成分を配合することを含む、細胞増殖を促進するための組成物を製造する方法、前記成分の、細胞増殖を促進するための組成物の製造への使用、細胞増殖の促進に用いる前記成分、ならびに、前記成分と、細胞とを接触させる工程を含む、細胞増殖を促進させる方法に関する。

増殖を促進する細胞は、限定されずに、例えば、肝臓、膵臓、腎臓、腸管、肺、脾臓、心臓、骨髄、声帯、皮膚、腹膜、眼、脈管などの細胞が挙げられる。細胞は自己由来のものであっても、同種の他の個体または異種の個体のものであってもよい。分化および／または増殖させた細胞は、それを必要とする対象に移植することができる。

[0041] 上記方法はin vitro、in vivoまたはex vivoで行われてもよい。上記組成物、方法または使用における各成分やその配合量については、既に上述したとおりである。各成分の配合は、既知の任意の手法に従って行うことができる。上記組成物、方法または使用における有効成分としてＭＭＰ１４を用いる場合、増殖促進の対象となる細胞の周囲にコラーゲン（特にコラーゲンＩ）が存在することが好ましい。

[0042] 本発明はまた、ＭＭＰ１４を抑制する物質を含む、細胞増殖を抑制するための組成物、前記物質を配合することを含む、細胞増殖を抑制するための組成物を製造する方法、前記物質の、細胞増殖を抑制するための組成物の製造への使用、細胞増殖の抑制に用いる前記物質、ならびに、前記物質と、細胞とを接触させる工程を含む細胞増殖を抑制する方法に関する。

本発明はまた、ＭＭＰ１４を抑制する物質を含む、細胞増殖性疾患を処置するための組成物、前記物質を配合することを含む、細胞増殖性疾患を処置するための組成物を製造する方法、前記物質の、細胞増殖性疾患を処置する

ための組成物の製造への使用、細胞増殖性疾患の処置に用いる前記物質、ならびに、前記物質の治療有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む、細胞増殖性疾患を処置するための方法に関する。

[0043] ＭＭＰ１４を阻害する物質としては、限定されずに、例えば、ＭＭＰ１４の産生および／または活性を阻害する薬物や、ＭＭＰ１４の分解および／または不活性化を促進する薬物などが含まれる。ＭＭＰ１４の産生を阻害する薬物としては、限定されずに、例えばＭＭＰ１４をコードするＤＮＡに対するＲＮＡｉ分子、リボザイム、アンチセンス核酸、ＤＮＡ／ＲＮＡキメラポリヌクレオチドおよびこれらを発現するベクター等が挙げられる。

[0044] ＭＭＰ１４の阻害は、ＭＭＰ１４阻害物質を作用させなかった場合に比べ、細胞においてＭＭＰ１４の発現や活性が阻害されていることにより決定することができる。ＭＭＰ１４の発現は、既知の任意の手法、限定されずに、例えば、抗ＭＭＰ１４抗体を利用した免疫沈降法、ＥＩＡ、ＥＬＩＳＡ、ＩＲＡ、ＩＲＭＡ、ウェスタンブロッティング法、免疫組織化学法、免疫細胞化学法、フローサイトメトリー法、ＭＭＰ１４をコードする核酸もしくはそのユニークな断片または該核酸の転写産物（例えば、ｍＲＮＡ）もしくはスプライシング産物に特異的にハイブリダイズする核酸を利用した、種々のハイブリダイゼーション法、ノーザンブロット法、サザンブロット法、種々のＰＣＲ法などにより評価することができる。

[0045] 本明細書で用いる場合、ＲＮＡｉ分子は、ＲＮＡ干渉をもたらす任意の分子を指し、限定されずに、ｓｉＲＮＡ（small interfering RNA）、ｍｉＲＮＡ（micro RNA)、ｓｈＲＮＡ（short hairpin RNA）、ｄｄＲＮＡ（DNA-directed RNA）、ｐｉＲＮＡ（Piwi-interacting RNA）、ｒａｓｉＲＮＡ（repeat associated siRNA）などの二重鎖ＲＮＡおよびこれらの改変体などを含む。これらのＲＮＡｉ分子は市販されているか、既知の配列情報などに基づいて設計、作製することが可能である。

また、本明細書で用いる場合アンチセンス核酸は、ＲＮＡ、ＤＮＡ、ＰＮＡ、またはこれらの複合物を含む。

本明細書で用いる場合、ＤＮＡ／ＲＮＡキメラポリヌクレオチドは、限定されずに、例えば、特開2003-219893に記載の、標的遺伝子の発現を阻害するＤＮＡとＲＮＡとからなる２本鎖ポリヌクレオチドを含む。

[0046] 増殖を抑制する細胞としては、限定されずに、例えば、その増殖が悪影響を及ぼす細胞、その増殖が疾患に関与する細胞などが挙げられる。具体的には、例えば、腫瘍細胞、がん細胞、活性化星細胞等が挙げられる。ＭＭＰ１４を抑制する物質は、これらの細胞に投与してもよいが、これらの細胞の増殖を補助するＭＭＰ１４発現細胞、例えば、ＣＡＦ（がん随伴線維芽細胞）等に投与してもよい。

細胞増殖性疾患としては、限定されずに、例えば、良性または悪性腫瘍、過形成症、ケロイド、クッシング症候群、原発性アルドステロン症、紅板症、真性多血症、白板症、過形成瘢痕、扁平苔癬および黒子症などが挙げられる。

[0047] 本明細書に記載される本発明の各種の組成物、方法等における有効成分が核酸、例えば、ＲＮＡｉ分子、リボザイム、アンチセンス核酸、ＤＮＡ／ＲＮＡキメラポリヌクレオチドなどである場合、これらは、裸の核酸としてそのまま利用することもできるが、種々のベクターに担持させることもできる。ベクターとしては、プラスミドベクター、ファージベクター、ファージミドベクター、コスミドベクター、ウイルスベクター等の公知の任意のものを利用することができる。ベクターは、担持する核酸の発現を増強するプロモーターを少なくとも含んでいることが好ましく、この場合、該核酸は、かかるプロモーターと作動可能に連結されていることが好ましい。核酸がプロモーターに作動可能に連結されているとは、プロモーターの作用により、該核酸のコードするタンパク質が適切に産生されるように、該核酸とプロモーターとが配置されていることを意味する。ベクターは、宿主細胞内で複製可能であってもなくてもよく、また、遺伝子の転写は宿主細胞の核外で行われても、核内で行われてもよい。後者の場合、核酸は宿主細胞のゲノムに組み込まれてもよい。

[0048] また、有効成分は、種々の非ウイルス性脂質またはタンパク質担体に担持させることもできる。かかる担体としては、限定されずに、例えば、コレステロール、リポソーム、抗体プロトマー、シクロデキストリンナノ粒子、融合ペプチド、アプタマー、生分解性ポリ乳酸コポリマー、ポリマーなどが挙げられ、細胞内への取込み効率を高めることができる（例えば、Pirollo and Chang, Cancer Res. 2008;68(5):1247-50などを参照）。特に、カチオン性リポソームやポリマー（例えば、ポリエチレンイミンなど）が有用である。かかる担体として有用なポリマーのさらなる例としては、例えば、US 2008/0207553、US 2008/0312174等に記載のものなどが挙げられる。

[0049] 本明細書に記載される本発明の各種組成物は、生体内の組織の再生、疾患の処置などの医療用途に用いることができる。したがって、本発明の各種組成物は医薬組成物とすることができる。医薬組成物においては、有効成分の効果を妨げない限り、有効成分を他の任意成分と組み合わせてもよい。そのような任意成分としては、例えば、他の化学治療剤、薬理学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤等が挙げられる。また、投与経路や薬物放出様式などに応じて、上記組成物を、適切な材料、例えば、腸溶性のコーティングや、時限崩壊性の材料で被覆してもよく、また、適切な薬物放出システムに組み込んでもよい。

[0050] 本明細書に記載される本発明の各種組成物（各種医薬組成物を含む）は、経口および非経口の両方を包含する種々の経路、例えば、限定することなく、経口、静脈内、筋肉内、皮下、局所、腫瘍内、直腸、動脈内、門脈内、心室内、経粘膜、経皮、鼻内、腹腔内、肺内および子宮内等の経路で投与してもよく、各投与経路に適した剤形に製剤してもよい。かかる剤形および製剤方法は任意の公知のものを適宜採用することができる（例えば、標準薬剤学、渡辺喜照ら編、南江堂、２００３年などを参照）。

[0051] 例えば、経口投与に適した剤形としては、限定することなく、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、液剤、懸濁剤、乳剤、ゲル剤、シロップ剤などが挙げられ、また非経口投与に適した剤形としては、溶液性注射剤、懸濁性注射

剤、乳濁性注射剤、用時調製型注射剤などの注射剤が挙げられる。非経口投与用製剤は、移植片、水性または非水性の等張性無菌溶液または懸濁液の形態であることができる。

[0052] 本明細書に記載される本発明の各種組成物（各種医薬組成物を含む）は、特定の組織や細胞に標的化されていてもよい。標的化は、既知の任意の手法により達成することができる。がんへの送達を企図する場合は、限定されずに、例えば、製剤をＥＰＲ（enhanced permeability and retention）効果の発現に好適な直径５０～２００μm、特に７５～１５０μmなどのサイズにすることによるパッシブターゲティングや、ＣＤ１９、ＨＥＲ２、トランスフェリン受容体、葉酸受容体、ＶＩＰ受容体、ＥＧＦＲ（Torchilin, AAPS J. 2007;9(2):E128-47）、ＲＡＡＧ１０（特表２００５－５３２０５０）、ＰＩＰＡ（特表２００６－５０６０７１）、ＫＩＤ３（特表２００７－５２９１９７）などのリガンドや、ＲＧＤモチーフやＮＧＲモチーフを有するペプチド、Ｆ３、ＬｙＰ－１（Ruoslahti et al., J Cell Biol. 2010;188(6):759-68）などを標的化剤として利用するアクティブターゲティングなどの手法を用いることができる。また、レチノイドまたはその誘導体ががん細胞やＣＡＦへの標的化剤として有用であることも知られているため（WO 2008/120815）、レチノイドを標的化剤として含む担体を利用することもできる。かかる担体は、上記文献のほか、WO 2009/036368、WO 2010/014117、WO 2012/170952などに記載されている。

[0053] 本明細書に記載される本発明の各種組成物（各種医薬組成物を含む）はいずれの形態で供給されてもよいが、保存安定性の観点から、用時調製可能な形態、例えば、医療の現場あるいはその近傍において、医師および／または薬剤師、看護士、もしくはその他のパラメディカルなどによって調製され得る形態で提供してもよい。かかる形態は、本発明の組成物が、脂質やタンパク質、核酸などの安定した保存が難しい成分を含むときに特に有用である。この場合、本発明の組成物は、これらに必須の構成要素の少なくとも１つを含む１個または２個以上の容器として提供され、使用の前、例えば、２４時

間前以内、好ましくは３時間前以内、そしてより好ましくは使用の直前に調製される。調製に際しては、調製する場所において通常入手可能な試薬、溶媒、調剤器具などを適宜使用することができる。

[0054] したがって、本発明は、本発明の各種組成物に含まれ得る有効成分を、単独でもしくは組み合わせて含む１個または２個以上の容器を含む組成物の調製キット、ならびに、そのようなキットの形で提供される各種組成物の必要構成要素にも関する。本発明のキットは、上記のほか、本発明の各種組成物の調製方法や投与方法などが記載された指示、例えば説明書や、ＣＤ、ＤＶＤ等の電子記録媒体等を含んでいてもよい。また、本発明のキットは、本発明の各種組成物を完成するための構成要素の全てを含んでいてもよいが、必ずしも全ての構成要素を含んでいなくてもよい。したがって、本発明のキットは、医療現場や、実験施設などで通常入手可能な試薬や溶媒、例えば、無菌水や、生理食塩水、ブドウ糖溶液などを含んでいなくてもよい。

[0055] 本明細書に記載される本発明の各種方法における有効量とは、例えば、組織の再生に関しては、組織の再生を促進し、または、組織再生の遅延を解消する量であってもよく、疾患の処置に関しては、疾患の症状を低減し、または疾患の進行を遅延もしくは停止する量であってもよく、好ましくは、疾患を抑制し、または治癒する量である。また、投与による利益を超える悪影響が生じない量が好ましい。かかる量は、培養細胞などを用いたin vitro試験や、マウス、ラット、イヌまたはブタなどのモデル動物における試験により適宜決定することができ、このような試験法は当業者によく知られている。また、本発明の処置方法に用いる薬物の用量は当業者に公知であるか、または、上記の試験等により適宜決定することができる。

[0056] 本明細書に記載される本発明の処置方法において投与する有効成分の具体的な用量は、処置を要する対象に関する種々の条件、例えば、再生を阻害する状態の有無、症状の重篤度、対象の一般健康状態、年齢、体重、対象の性別、食事、投与の時期および頻度、併用している医薬、治療への反応性、剤形、および治療に対するコンプライアンスなどを考慮して決定され得る。

[0057] 投与経路としては、経口および非経口の両方を包含する種々の経路、例えば、経口、静脈内、筋肉内、皮下、局所、腫瘍内、直腸、動脈内、門脈内、心室内、経粘膜、経皮、鼻内、腹腔内、肺内および子宮内等の経路が含まれる。

投与頻度は、用いる剤や組成物の性状や、上記のものを含む対象の条件によって異なるが、例えば、１日多数回（すなわち１日２、３、４回または５回以上）、１日１回、数日毎（すなわち２、３、４、５、６、７日毎など）、１週間毎、数週間毎（すなわち２、３、４週間毎など）であってもよい。

[0058] 本明細書で用いる場合、用語「対象」は、任意の生物個体を意味し、好ましくは動物、さらに好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトの個体である。本発明において、対象は健常であっても、何らかの疾患に罹患していてもよいものとするが、特定の疾患の処置が企図される場合には、典型的にはかかる疾患に罹患しているか、罹患するリスクを有する対象を意味する。

また、用語「処置」は、本明細書で用いる場合、疾患の治癒、一時的寛解または予防などを目的とする医学的に許容される全ての種類の予防的および／または治療的介入を包含するものとする。例えば、「処置」の用語は、疾患の進行の遅延または停止、病変の退縮または消失、発症の予防または再発の防止などを含む、種々の目的の医学的に許容される介入を包含する。

[0059] 本発明はまた、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンを含む、細胞培養基材に関する。ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンについては、各種組成物などに関して上述したとおりである。

本発明の細胞培養基材は、細胞生育の足場となるものであり、膜状、ゲル状など種々の形態をとってもよい。細胞培養基材は無菌であることが好ましいが、非無菌状態で提供され、使用時に滅菌してもよい。本発明の細胞培養基材は、細胞培養容器を被覆するために用いてもよい。被覆濃度は、限定されずに、例えば、コラーゲンの濃度として０．０１～１０００μｇ／ｃｍ^2、０．１～１００μｇ／ｃｍ^2、１～５０μｇ／ｃｍ^2、５～２５μｇ／ｃｍ^{2}であってもよい。

[0060] また、本発明は、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲン、または、ＭＭＰ１４およびコラーゲンを含む細胞培養基材作製キットにも関する。該キットは、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンを細胞培養基材として使用するための情報や、コラーゲンをＭＭＰ１４で処理するための情報などを含む指示、例えば、説明書や、ＣＤ、ＤＶＤ等の電子記録媒体等を含んでいてもよい。

[0061] 本発明はまた、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンで被覆された細胞培養容器に関する。細胞培養容器は既知の任意のものを用いることができる。本発明の細胞培養容器は、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンを細胞培養容器に被覆して製造しても、細胞培養容器に予め被覆したコラーゲンをＭＭＰ１４で処理して製造してもよい。処理に用いるＭＭＰ１４は、細胞膜に付着していても、細胞膜から遊離していてもよい。したがって、コラーゲンの処理は、コラーゲンが被覆された細胞培養容器中で活性化星細胞などの、ＭＭＰ１４を発現する細胞を培養することを含み得る。コラーゲンの処理に使用したＭＭＰ１４を発現する細胞は、処理後に除去しても、そのまま細胞培養容器に残し、これに増殖させる細胞を加えてもよい。この細胞培養容器は、細胞増殖能に優れており、細胞培養を促進するために用いることができる。また、星細胞は、幹細胞の分化を誘導することができるため、星細胞をさらに含む細胞培養容器は、幹細胞の分化誘導にも用いることができる。コラーゲンの被覆濃度は、限定されずに、例えば、０．０１～１０００μｇ／ｃｍ^2、０．１～１００μｇ／ｃｍ^2、１～５０μｇ／ｃｍ^2、５～２５μｇ／ｃｍ^{2}であってもよい。

[0062] また、本発明は、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲン、または、ＭＭＰ１４およびコラーゲンを含む、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンで被覆された細胞培養容器の作製キットにも関する。該キットは、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンで細胞培養容器を被覆するための情報や、細胞培養容器に被覆されたコラーゲンをＭＭＰ１４で処理するための情報などを含む指示、例えば、説明書や、ＣＤ、ＤＶＤ等の電子記録媒体等を含んでいてもよい。本発明のキットは細胞培養容器を含んでもよいが、市販の細胞培養容器を別途用意し

て使用することもできる。

[0063] 本発明はさらに、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンで細胞培養容器を被覆する工程、または、細胞培養容器に被覆されたコラーゲンをＭＭＰ１４で処理する工程を含む、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンが被覆された細胞培養容器の製造方法に関する。処理に用いるＭＭＰ１４は、細胞膜に付着していても、細胞膜から遊離していてもよい。したがって、細胞培養容器に被覆されたコラーゲンをＭＭＰ１４で処理する工程は、コラーゲンが被覆された細胞培養容器中で活性化星細胞などの、ＭＭＰ１４を発現する細胞を培養することや、細胞培養容器に被覆されたコラーゲンと、ＭＭＰ１４を発現する細胞の分解物とを接触させることを含む。

実施例

[0064] 本発明を以下の例でさらに詳細に説明するが、これらは例示に過ぎず、本発明を決して限定するものではない。

[0065] 例１　ＶＡ－ｌｉｐ　ｓｉＲＮＡの調製

（１）ｓｉＲＮＡの調製

コラーゲン（Ｉ～ＩＶ型）の共通分子シャペロンであるヒトＨＳＰ４７のラットホモログ、ｇｐ４６（GenBank Accession No. M69246、配列番号１）の塩基配列を標的とするｓｉＲＮＡ（北海道システム・サイエンス, Sapporo, Japan）のセンス鎖およびアンチセンス鎖は以下のものを用いた。

Ａ：ＧＵＵＣＣＡＣＣＡＵＡＡＧＡＵＧＧＵＡＧＡＣＡＡＣＡＧ（ｇｐ４６の塩基配列上の第７５７塩基から始まるセンス鎖ｓｉＲＮＡ、配列番号２）

Ｂ：ＧＵＵＧＵＣＵＡＣＣＡＵＣＵＵＡＵＧＧＵＧＧＡＡＣＡＵ（アンチセンス鎖ｓｉＲＮＡ、配列番号３）

[0066] ｓｉＲＮＡｒａｎｄｏｍ（ｓｉＲＮＡｓｃｒａｍｂｌｅと称することもある）として以下のものを用いた。

Ｃ：ＣＧＡＵＵＣＧＣＵＡＧＡＣＣＧＧＣＵＵＣＡＵＵＧＣＡＧ（センス鎖ｓｉＲＮＡ、配列番号４）

Ｄ：ＧＣＡＡＵＧＡＡＧＣＣＧＧＵＣＵＡＧＣＧＡＡＵＣＧＡＵ（アンチセ

ンス鎖ｓｉＲＮＡ、配列番号５）

[0067] いくつかの実験において、６’－カルボキシフルオレセイン（６－ＦＡＭ）またはフルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）が５’末端に結合したセンス鎖を用いた。これらの配列はＢＬＡＳＴ検索において、既知の他のラットｍＲＮＡと相同性を有さないことを確認した。

[0068] （２）ＶＡ－ｌｉｐ ｓｉＲＮＡの調製

カチオン性脂質として、Ｏ，Ｏ’－ジテトラデカノイル－Ｎ－（α－トリメチルアンモニオアセチル）ジエタノールアミンクロライド（ＤＣ－６－１４）、コレステロールおよびジオレイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）を４：３：３のモル比で含むカチオン性リポソーム（Lipotrust）を北海道システム・サイエンス(Sapporo, Japan)から購入した。リポソームは、使用前に、凍結乾燥した脂質混合物に攪拌条件下で再蒸留水（ＤＤＷ）を添加することによって、１ｍＭ（ＤＣ－６－１４）の濃度で調製した。ＶＡ結合リポソームを調製するため、ＤＭＳＯに溶解した２００ｎｍｏｌのビタミンＡ（レチノール、Sigma, USA）をリポソーム懸濁液（ＤＣ－６－１４として１００ｎｍｏｌ）と、１．５ｍｌチューブ中で攪拌しながら２５℃で混合した。ｓｉＲＮＡｇｐ４６を担持するＶＡ結合リポソーム（ＶＡ－ｌｉｐ－ｓｉＲＮＡｇｐ４６）を調製するため、ｓｉＲＮＡｇｐ４６溶液（ＤＤＷ中に５８０ｐｍｏｌ／μｌ）を、レチノール結合リポソーム溶液に攪拌しながら室温下で添加した。ｓｉＲＮＡとＤＣ－６－１４とのモル比は１：１１．５、また、ビタミンＡ、ＤＣ－６－１４およびｓｉＲＮＡのモル比は１１．５：１１．５：１であった。in vitroでの使用に望ましい用量を得るため、ＶＡ－ｌｉｐ ｓｉＲＮＡをリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で再構成した。

[0069] 例２ 肝部分切除ラットへのＶＡ－ｌｉｐ ｓｉＲＮＡｇｐ４６投与による肝再生への影響

（１）肝部分切除ラットの作製および処置

肝部分切除ラットは、雄ＳＤラット（１５０～２００ｇ）（Slc Japan, Sh

izuoka, Japan）の肝臓全体の約７０％にあたる肝左葉および中葉を切除することにより作製した。この肝部分切除ラットに、例１で作製したＶＡ－ｌｉｐ ｓｉＲＮＡｇｐ４６（群ｌ）、ＶＡ－ｌｉｐ ｓｉＲＮＡｓｃｒａｍｂｌｅ（ｍｏｃｋコントロール、群ｌｌ）、または５％グルコース（ｓｉＲＮＡ非含有コントロール、群ｌｌｌ）を、３００μｌ／回の容量で、１日おきに合計５回（すなわち肝部分切除後１、３、５、７および９日目に）尾静脈投与した（図１、ｎ＝６）。なお、各ｓｉＲＮＡは、ラット体重に対して０．７５ｍｇ／ｋｇで使用した。

[0070] （２）採取組織の評価

３回目および５回目の投与が終了した２４時間後（すなわち肝部分切除後５日目および１０日目）に、肝部分切除ラットの肝臓を採取した。採取した肝臓は、外観を観察し、重量を測定した後、ＯＣＴコンパウンドを用いて封埋し、凍結切片を作製した。得られた切片を４％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）で固定し、次いで５％ヤギ血清含有ＰＢＳでブロッキングを施し、ＰＢＳで洗浄した後、Ｃｙ３標識抗α平滑筋アクチン（α－ＳＭＡ）抗体（Sigma）、抗Ｋｉ－６７抗体（Dako）または抗ＣＤ１３３抗体を用いて、４℃で一晩反応させた。ＰＢＳで洗浄した後、Ａｌｅｘａ４８８標識ヤギ抗マウス抗体（Invitrogen）を用いて室温で６０分間反応させた。ＰＢＳで洗浄した後、ProLong(R) Gold with DAPI (Invitrogen) で封入し、蛍光顕微鏡で観察を行った。また、採取した肝凍結切片のTunel染色は、In situ Apoptosis Detection Kit (Takara Bio, Japan)を用い、製造者の指示に従って行った。α－ＳＭＡとＴｕｎｅｌとの共染色には、ＦＩＴＣ－ＴＵＮＥＬ抗体およびＣｙ３標識抗α－ＳＭＡ抗体を用いた。陽性細胞数は、５視野（倍率２００倍）の平均値を算出した。

[0071] （３）結果

図２に肝部分切除後５日目および１０日目に採取した各群の肝臓の外観を、肝部分切除前および切除直後の肝臓との比較で示す。また、図３に、採取した各群の肝重量の推移を示す。両図から分るとおり、肝臓は、群ｌｌおよ

びＩＩＩでは５日目にすでに切除前の大きさおよび重量を回復したが、ＶＡ－ｌｉｐ　ｓｉＲＮＡｇｐ４６を投与した群Ｉでは、切除後１０日経っても肝臓の大きさおよび重量は回復しなかった。

[0072] 次に、切除後５日目に採取した肝組織をＦＩＴＣ－ＴＵＮＥＬ、α－ＳＭＡおよびＤＡＰＩで共染色したところ、群Ｉにおいて、α－ＳＭＡ陽性細胞におけるＴＵＮＥＬ陽性細胞の数が、他の群に比べて顕著に多くなっていることが明らかになった（図４および５）。これは、活性化肝星細胞などのα－ＳＭＡ陽性細胞が、ＶＡ－ｌｉｐ　ｓｉＲＮＡｇｐ４６によるｇｐ４６の抑制により大量にアポトーシスを起したことを示している。

[0073] さらに、切除後５日目に採取した肝組織をＫｉ６７およびＤＡＰＩで共染色したところ、群Ｉにおけるｋｉ６７陽性細胞が、同じく肝部分切除を行った他の群（群ＩＩおよび群ＩＩＩ）に比べ顕著に少なくなっていることが明らかになった（図６および７）。なお、群ＩＩおよび群ＩＩＩにおけるＫｉ６７陽性細胞の数は、肝部分切除を行っていない正常肝組織のものよりも顕著に多く、Ｋｉ６７が細胞増殖のマーカーであることから、肝部分切除後に肝組織において旺盛な細胞増殖が生じていることを物語っている。

[0074] また、切除後５日目に採取した肝組織をＣＤ１３３およびＤＡＰＩで共染色したところ、群ＩにおけるＣＤ１３３陽性細胞が、同じく肝部分切除を行った他の群（群ＩＩおよび群ＩＩＩ）に比べ顕著に少なくなっていることが明らかになった（図８）。ＣＤ１３３は幹細胞マーカーであることから、この結果は、ＶＡ－ｌｉｐ　ｓｉＲＮＡｇｐ４６により、幹細胞の増殖が顕著に抑制されたことを示すものである。

上記の各染色結果は、合わせ考慮すると、α－ＳＭＡ陽性細胞のアポトーシスにより、肝組織における幹細胞を含む細胞の増殖が抑制されたこと、逆に言えば、α－ＳＭＡ陽性細胞が、肝部分切除後の組織再生に向けた肝組織における細胞増殖、特に幹細胞の増殖に不可欠であることを示すものである。

[0075] 例３　肝部分切除ラットへのＶＡ－ｌｉｐ　ｓｉＲＮＡｇｐ４６投与時期に

よる肝再生への影響

（１）肝部分切除ラットの作製および処置

例２と同様にして肝部分切除ラットを作製した。この肝部分切除ラットに、以下の処置を施した（図９）。

Ａ群：無処置（無処置コントロール群）

Ｂ群：５％グルコース（溶媒コントロール群）

Ｃ群：ＶＡ－ｌｉｐ　ｓｉＲＮＡｓｃｒａｍｂｌｅ（ｍｏｃｋコントロール群）

Ｄ群：ＶＡ－ｌｉｐ　ｓｉＲＮＡｇｐ４６（試験群）

Ｅ群：ＶＡ－ｌｉｐ　ｓｉＲＮＡｇｐ４６（遅延投与群）

（各群ともｎ＝４）

[0076] ＶＡ－ｌｉｐ　ｓｉＲＮＡｇｐ４６およびＶＡ－ｌｉｐ　ｓｉＲＮＡｓｃｒａｍｂｌｅは例１で作製したものを使用した。Ｂ～Ｄ群は、それぞれの投与物を３００μｌ／回の容量で、１日おきに合計６回（すなわち肝部分切除後０、２、４、６、８および１０日目に）、Ｅ群は、合計４回（すなわち肝部分切除後４、６、８および１０日目に）尾静脈投与した。なお、各ｓｉＲＮＡは、ラット体重に対して０．７５ｍｇ／ｋｇで使用した。

[0077] （２）採取組織の評価

６回目（Ｅ群については４回目）の投与が終了した２４時間後（すなわち肝部分切除後１１日目）に、肝部分切除ラットの肝臓を採取した。採取した肝臓は、外観を観察し、重量を測定した後、ＯＣＴコンパウンドを用いて封埋し、凍結切片を作製した。得られた切片を４％パラホルムアルデヒドで固定し、次いで５％ヤギ血清含有ＰＢＳでブロッキングを施し、ＰＢＳで洗浄した後、Ｃｙ３標識α平滑筋アクチン（α－ＳＭＡ）抗体（Sigma）を用いて４℃で一晩反応させた。ＰＢＳで洗浄した後、ProLong(R) Gold with DAPI (Invitrogen) で封入し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

[0078] （３）結果

図１０および１１に（２）で採取した各群の肝臓の外観および重量を、肝

部分切除直後（０日目）の肝臓との比較でそれぞれ示す。両図から分るとおり、肝臓は、Ａ～ＣおよびＥ群で切除前の大きさおよび重量を回復したが、ＶＡ－ｌｉｐ　ｓｉＲＮＡｇｐ４６を第０日目から投与したＤ群では、切除後１１日経っても肝臓の大きさおよび重量は回復しなかった。また、同じ用量のＶＡ－ｌｉｐ　ｓｉＲＮＡｇｐ４６を第４日目から投与したＥ群で肝臓の大きさおよび重量の回復が認められたことから、ＶＡ－ｌｉｐ　ｓｉＲＮＡｇｐ４６は、組織再生の早期の段階で投与すべきことが明らかとなった。

[0079] 例４　肝部分切除後の肝組織におけるα－ＳＭＡ陽性細胞数の経時変化

（１）肝部分切除ラットの作製および採取組織の評価

例２と同様にして肝部分切除ラットを作製した。肝部分切除ラットから、肝部分切除後０、１、２、３、４、５または６日目に肝臓を採取した。採取した肝組織をＯＣＴコンパウンドを用いて封埋し、凍結切片を作製した。得られた切片を４％パラホルムアルデヒドで固定し、次いで５％ヤギ血清含有ＰＢＳでブロッキングを施し、ＰＢＳで洗浄した後、Ｃｙ３標識α平滑筋アクチン（α－ＳＭＡ）抗体（Sigma）を用いて４℃で一晩反応させた。ＰＢＳで洗浄した後、ProLong(R) Gold with DAPI (Invitrogen) で封入し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

[0080] （２）結果

図１２および１３に示す結果から、α－ＳＭＡ陽性細胞の数が肝部分切除後３日目に急激に増加し、その後なだらかに減少することが分る。この結果は、例２～３の結果および星細胞は活性化するとα－ＳＭＡを発現するようになることを考慮すると、組織再生の早期の段階で組織に存在する星細胞が活性化し、組織再生に向けた細胞増殖を引き起すことを示唆しするものである。

[0081] 例５　幹細胞の分化に対する星細胞の関与

（１）細胞の調製

星細胞としては、ＳＤラット肝臓から採取した肝星細胞を用いた。すなわち、まず、ＳＤラットにＥＧＴＡ溶液およびコラゲナーゼ溶液を灌流した後

、肝臓を採取し、採取した肝臓を細切後、セルストレーナー（孔径１００μｍ）で濾過した。得られた細胞懸濁液にＨＢＳＳ＋０．２５％ＢＳＡ（Bovine Serum Albumin）溶液を加えて、４℃、５００ｒｐｍで２分間遠心した。上清を採取して、４℃、１３００ｒｐｍで５分間遠心を行った。上清を除去した後、ＨＢＳＳ＋０．２５％ＢＳＡ溶液を加え、Nycodenzの濃度が１３．２％になるように２８．７％ Nycodenz溶液（Axis Shield, Oslo, Norway）を加えて混合した。ＨＢＳＳ＋０．２５％ＢＳＡ溶液を重層した後、４℃、１４００×ｇで２０分間遠心した。遠心終了後、中間層を採取して、ＤＭＥＭ（Dulbecco's Modified Eagle's medium）＋１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）培地を用いて、培養を行った。培養１日目の細胞を静止型肝星細胞（ｑＨＳＣ）とし、また、培養５日目に継代を行い、さらに２日間培養したものを活性型肝星細胞（ａＨＳＣ）とした（図１４）。

[0082] 幹細胞としては、４週齢のＧＦＰ遺伝子導入ラット（Slc Japan）の肝臓より採取した肝幹細胞を用いた。まず、ＧＦＰ遺伝子導入ラットにＥＧＴＡ溶液およびコラゲナーゼ溶液を灌流した後、肝臓を採取し、採取した肝臓を細切後、セルストレーナー（孔径１００μｍ）で濾過した。得られた細胞懸濁液にハンクス平衡塩液（ＨＢＳＳ）＋０．２５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）溶液を加えて、４℃、５００ｒｐｍで２分間遠心した。上清を採取して、４℃、１３００ｒｐｍで５分間遠心を行った。上清を除去した後、沈殿に対してＭＡＣＳ(R)（Magnetic Activating Cell Sorting）バッファー（Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA）を加えて混合した。細胞数をカウント後、ＦＩＴＣ結合マウス抗ＣＤ４５抗体（BD Pharmingen）、ウサギポリクローナル抗ＣＤ１３３抗体（Abcam）およびマウスモノクローナル抗ＥｐＣＡＭ抗体（Santa Cruz）を用いてＭＡＣＳ(R)を行い、ＣＤ１３３陽性、ＥｐＣＡＭ陽性、ＣＤ４５陰性細胞を採取し、ラット肝幹細胞として本実験に用いた。

[0083] （２）幹細胞と星細胞との接触共培養

Ｉ型コラーゲンでコートされたカバーガラス（IWAKI, Tokyo, Japan）を入れた６穴プレートに、上記（１）で得たａＨＳＣを５×１０^{4}個／ウェルの密

度で播種し、インキュベーター内で３７℃、５％CO_2にて４８時間培養した。ａＨＳＣ播種の２日後に、上記（１）で得た肝幹細胞を３×１０^{4}個／ウェルの密度でウェル内のａＨＳＣ上に播種し、インキュベーター内で３７℃、５％CO_2にて９日間共培養した（培地として、ＤＭＥ／Ｆ１２（Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham）＋１０％ＦＢＳ＋ＩＴＳ（１０ｍｇ／ｌインスリン、５．５ｍｇ／ｌトランスフェリン、０．６７μｇ／ｌセレン）＋０．１μＭデキサメサゾン＋１０ｍＭニコチンアミド＋５０μｇ／ｍｌβ－メルカプトエタノール＋２ｍＭ　Ｌ－グルタミン＋５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓを使用）。条件によっては、２０ｎｇ／ｍｌのＥＧＦおよび／または５０ｎｇ／ｍｌのＨＧＦを共培養開始時に添加した。また、コントロールとして、肝幹細胞のみをａＨＳＣが存在しない状態で同様に培養した。

共培養９日目に、肝細胞マーカーであるアルブミンに対する抗体（ウサギポリクローナル、MP Biomedicals）で免疫染色を行い、倒立顕微鏡（Nikon）を用いて１００倍の倍率でＧＦＰ／アルブミン両陽性コロニーを撮影し、得られた画像をもとにＧＦＰ／アルブミン両陽性コロニーの数をカウントするとともに、面積をNIS-Elements software（Nikon）を用いて算出した（図１５～１８）。

[0084] （３）幹細胞と星細胞との非接触共培養

セルカルチャーインサート（孔径０．４μｍ、BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA）上に上記（１）で得たａＨＳＣを５×１０^{4}個／ウェルの密度で播種し、インキュベーター内で３７℃、５％CO_2にて、ＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳを用いて４８時間培養した。ａＨＳＣ播種の２日後に、上記（１）で得た肝幹細胞をＩ型コラーゲンでコートされたカバーガラス（IWAKI, Tokyo, Japan）を入れた２４穴プレート（BD Falcon）に１×１０^{4}個／ウェルの密度で播種した。次いで、ａＨＳＣを含む上記セルカルチャーインサートを２４穴プレートのウェルに挿入し、インキュベーター内で３７℃、５％CO_2にて１０日間共培養した（培地として、ＤＭＥ／Ｆ１２（Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham）＋１０％ＦＢＳ＋ＩＴＳ（１０ｍｇ／ｌ

インスリン、５．５ｍｇ／ｌトランスフェリン、０．６７μｇ／ｌセレン）＋０．１μＭデキサメサゾン＋１０ｍＭニコチンアミド＋５０μｇ／ｍｌβ－メルカプトエタノール＋２ｍＭ　Ｌ－グルタミン＋５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓを使用）。また、コントロールとして、肝幹細胞のみをａＨＳＣが存在しない状態で同様に培養した。

[0085] 共培養１０日目に、抗アルブミン抗体（ウサギポリクローナル、MP Biomedicals）で免疫染色を行い、倒立顕微鏡（Nikon）を用いて１００倍の倍率でアルブミン陽性コロニーを撮影し、得られた画像をもとにアルブミン陽性コロニーの面積をNIS-Elements software（Nikon）を用いて算出した（図１９）。

別な実験では、共培養１０日目に、Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (Takara, Tokyo, Japan)を使用して、マイクロプレートリーダー(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いて細胞増殖の測定を行った（図２０）。

[0086] （４）結果

図１５～１８に示す接触共培養実験の結果から、肝幹細胞を活性型肝星細胞と共培養することで、肝幹細胞の肝細胞への分化および増殖が生じることが明らかとなった。また、肝幹細胞の肝細胞への分化・増殖は、ＥＧＦおよびＨＧＦの添加により顕著に促進されることが明らかとなった。

図１９および２０に示す非接触共培養実験の結果からは、活性型肝星細胞が、肝幹細胞と接触しない状態であっても肝幹細胞の肝細胞への分化・増殖を誘導し得ることが明らかとなった。

これらの結果は、活性型肝星細胞から分泌される液性因子が肝幹細胞の肝細胞への分化・増殖を誘導することを示すものである。

[0087] 例６　肝部分切除後の肝組織におけるＤＮＡ合成の経時変化

（１）ＢｒｄＵ陽性細胞の経時変化

例２と同様にして肝部分切除ラットを作製した。肝部分切除後の肝臓内のＤＮＡ合成の経時変化を調べるために、ラットに対して、ＢｒｄＵを１００

μｇ／ｇ体重の濃度で腹腔内注射した。ＢｒｄＵ投与後３時間目に肝臓組織を採取した。採取した肝臓組織は、１０％ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した。パラフィン包埋した肝臓組織は５μｍ厚の切片にし、１０ｍＭクエン酸バッファーを用いて、１２０℃で２０分間賦活化を行った後、５％ヤギ血清を用いてブロッキングした。ブロッキング後、マウスモノクローナル抗ＢｒｄＵ抗体（MBL）を３７℃で６０分間反応させた。切片をＰＢＳで洗浄後、Ａｌｅｘａ４８８標識ヤギ抗マウスＩｇＧ（Invitrogen）を３７℃で６０分間反応させた。ＰＢＳで洗浄後、ＤＡＰＩを含む封入剤を用いて封入し、肝臓組織内でのＢｒｄＵの取り込みを観察した。結果を図２１に示す。

[0088] ラット肝部分切除後の肝組織内でＤＮＡ合成が行われている細胞の割合を測定するために、肝部分切除を施したラットに対して、ＢｒｄＵを１００μｇ／ｇ体重の濃度で腹腔内注射した。ＢｒｄＵ投与後３時間目に、門脈より０．０３％コラゲナーゼ溶液で灌流した後、肝臓組織を採取して細切し、細胞懸濁液を得た。この細胞懸濁液を、０．２５％ＢＳＡを含むハンクス溶液（Invitrogen）で、細胞濃度が１×１０^{7}個／１００μｌとなるように調整し、ＡＰＣ標識マウスモノクローナル抗ＢｒｄＵ抗体（BioLegends）を加え、３７℃で６０分間反応させた。反応終了後、フローサイトメトリーを用いて、ＢｒｄＵ陽性細胞数を計測した。結果を図２２に示す。図中、ラット肝部分切除後の肝臓内でのＢｒｄＵ陽性細胞の割合は、ＢｒｄＵ陽性細胞数をフローサイトメトリーで解析した全細胞数で割ったもので示した。

図２１および２２に示す結果から、肝部分切除後、肝組織内でのＤＮＡ合成が二峰性に増加することがわかる。すなわち、切除の１日後に最初のピークがあり、２日後にはやや沈静化するが、３日後に再び増加し、４日後以降は徐々に低下していく。

[0089] （２）ＢｒｄＵ陽性肝細胞の経時変化

例２と同様にして肝部分切除ラットを作製した。肝部分切除後の肝臓内の肝細胞におけるＤＮＡ合成の経時変化を調べるために、ラットに対して、ＢｒｄＵを１００μｇ／ｇ体重の濃度で腹腔内注射した。ＢｒｄＵ投与後３時

間目に肝臓組織を採取した。採取した肝臓組織は、１０％ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した。パラフィン包埋した肝臓組織は５μｍ厚の切片にし、１０ｍＭクエン酸バッファーを用いて、１２０℃で２０分間賦活化を行った後、５％ヤギ血清を用いてブロッキングした。ブロッキング後、ＡＰＣ標識マウスモノクローナル抗ＢｒｄＵ抗体（BioLegends）およびヤギ抗ＨＮＦ４α抗体（Santa Cruz）を３７℃で６０分間反応させた。切片をＰＢＳで洗浄後、Ａｌｅｘａ４８８標識ヒツジ抗ヤギＩｇＧ（Invitrogen）を３７℃で６０分間反応させた。ＰＢＳで洗浄後、ＤＡＰＩを含む封入剤を用いて封入し、肝臓組織内での肝細胞によるＢｒｄＵの取り込みを観察した。結果を図２３に示す。

[0090] ラット肝部分切除後の肝組織内でＤＮＡ合成が行われている肝細胞の割合を測定するために、肝部分切除を施したラットに対して、ＢｒｄＵを１００μｇ／ｇ体重の濃度で腹腔内注射した。ＢｒｄＵ投与後３時間目に、門脈より０．０３％コラゲナーゼ溶液で灌流した後、肝臓組織を採取して細切し、細胞懸濁液を得た。この細胞懸濁液を、０．２５％ＢＳＡを含むハンクス溶液（Invitrogen）で、細胞濃度が１×１０^{7}個／１００μｌとなるように調整し、ＡＰＣ標識マウスモノクローナル抗ＢｒｄＵ抗体（BioLegends）およびヤギ抗ＨＮＦ４α抗体（Santa Cruz）を加え、３７℃で６０分間反応させた。ＰＢＳで洗浄後、Ａｌｅｘａ４８８標識ヒツジ抗ヤギＩｇＧ（Invitrogen）を３７℃で６０分間反応させた。反応終了後、フローサイトメトリーを用いて、ＢｒｄＵ陽性ＨＮＦ４α陽性細胞数を計測した。結果を図２４に示す。図中、ラット肝部分切除後の肝臓内でのＢｒｄＵ陽性肝細胞の割合は、ＢｒｄＵ陽性肝細胞数をフローサイトメトリーで解析した全肝細胞数で割ったもので示した。

[0091] 図２３および２４に示す結果から、肝細胞の増殖は肝部分切除の１日後にピークをつけた後、徐々に減少することがわかる。肝細胞を含む肝臓に存在する全細胞の増殖は、図２１および２２に示すとおり、肝部分切除の１日後と３日後に２つのピークを有するところ、１日後の最初のピークは肝細胞の

増殖が主体であり、３日後の２番目のピークは、肝細胞以外の細胞、例えば、幹細胞などの増殖によるものと考えられる。

[0092] 例７　肝細胞の増殖に対する星細胞の関与

（１）肝細胞と星細胞との共培養

星細胞が肝細胞の増殖に与える影響を評価するために、肝細胞と星細胞との共培養を行った。例５で得たａＨＳＣを６０ｍｍディッシュに１×１０^{5}個の濃度で播種し、１０％ＦＢＳ加ＤＭＥＭを用いて、３７℃、５％CO_2で２４時間培養した。培養２４時間目に培地を除去し、Opti-MEM I reducing medium (Invitrogen) を加えて、ｓｉＲＮＡのトランスフェクションの準備ができるまで前培養した。ｓｉＲＮＡを最終濃度が１０ｎＭとなるようにRNAiMAX (Invitrogen)と混合し、室温で１５分間静置してｓｉＲＮＡ複合体を得た。使用したｓｉＲＮＡは以下のとおりである。

ＧＦＰ　ｓｉＲＮＡ (Ambion、Silencer GFP siRNA、Cat. No.AM4626)

Ｓｃｒａｍｂｌｅ　ｓｉＲＮＡ：例１に記載のもの

ｇｐ４６　ｓｉＲＮＡ：例１に記載のもの

[0093] ｓｉＲＮＡ複合体を前培養したａＨＳＣに添加し、３７℃、５％CO_2で５時間培養した。培養５時間目に、培地を１０％ＦＢＳ加ＤＭＥＭに置換し、３７℃、５％CO_2で４８時間培養した。培養４８時間目に、培地を除去して、Opti-MEM I reducing mediumを加え、ｓｉＲＮＡのトランスフェクションの準備ができるまで、前培養した。最終濃度が１０ｎＭとなるようにｓｉＲＮＡ（ＧＦＰ　ｓｉＲＮＡ、Ｓｃｒａｍｂｌｅ　ｓｉＲＮＡ、ｇｐ４６　ｓｉＲＮＡ）をＲＮＡｉＭＡＸと混合し、室温で１５分間静置した。ｓｉＲＮＡ複合体を前培養したａＨＳＣに添加し、３７℃、５％CO_2で５時間培養した。培養５時間目に培地を除去し、ＰＢＳで洗浄した後、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液を用いてＨＳＣを回収した。

[0094] 回収したＨＳＣは、事前にＧＦＰ遺伝子導入ラット肝臓から採取し、コラーゲンＩでコートした３５ｍｍディッシュに５×１０^{4}個の濃度で播種した肝細胞に対して、５×１０^{4}個／ディッシュの濃度で加え、３７℃、５％CO_2

で４８時間培養した。培養４８時間目に、培地を１０ｍＭ　ＢｒｄＵおよび１０％ＦＢＳを含むＤＭＥ／Ｆ１２培地に置換し、３７℃、５％CO_2でさらに２４時間培養した。培養２４時間目に、培地を除去し、ＰＢＳで洗浄後、４％ＰＦＡを加え、室温で３０分間固定した。固定後、ＰＢＳで洗浄し、０．２Ｎ　ＨＣｌおよび０．１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を含むＰＢＳを加えて透過処理を行った。

[0095] （２）蛍光顕微鏡での観察

上記（１）で透過処理を行った細胞をＰＢＳで洗浄後、５％ヤギ血清でブロッキングを行い、マウスモノクローナル抗ＢｒｄＵ抗体（MBL）およびウサギポリクローナル抗ＧＦＰ抗体（Invitrogen）を加えて一次抗体反応を３７℃で６０分間行った。一次抗体反応後、ＰＢＳで洗浄し、Ａｌｅｘａ４８８標識ヤギ抗ウサギＩｇＧ（Invitrogen）およびＡｌｅｘａ５５５標識ヤギ抗マウスＩｇＧ（Invitrogen）を加えて二次抗体反応を３７℃で６０分間行った。二次抗体反応後、ＰＢＳで洗浄し、ＤＡＰＩを含む封入剤を用いて細胞を封入した。蛍光顕微鏡像を図２５に示す。

[0096] （３）ＦＡＣＳ解析

ＢｒｄＵ陽性ＧＦＰ陽性肝細胞の割合を測定するために、上記（１）で透過処理を行った細胞をＰＢＳで洗浄した後、ＡＰＣ標識マウスモノクローナル抗ＢｒｄＵ抗体およびＦＩＴＣ標識ウサギポリクローナル抗ＧＦＰ抗体を加えて抗体反応を３７℃で６０分間行った。抗体反応終了後、ＰＢＳで細胞を洗浄して、ＦＡＣＳ解析によりＢｒｄＵ陽性ＧＦＰ陽性肝細胞の割合を測定した。結果を図２６に示す。ＢｒｄＵ陽性細胞の割合は、ＢｒｄＵ陽性細胞数をフローサイトメトリーで解析した全細胞数で割ったもので示した。

[0097] 図２５および２６に示した結果から、肝細胞をａＨＳＣと共培養すると、肝細胞を単独で培養したときよりも肝細胞の増殖が高まるが、ａＨＳＣにｇｐ４６　ｓｉＲＮＡを作用させるとこの効果が抑制されることがわかる。これらの結果は、ａＨＳＣが肝細胞の増殖に関与していることを示すものである。

[0098] 例８　種々の処理を施したコラーゲンが肝細胞の増殖に与える影響

（１）種々の処理を施したコラーゲン上での肝細胞の培養

ラット尾由来コラーゲンＩ（Ｓｉｇｍａ）を１０μｇ／ｃｍ^{2}の濃度で６０ｍｍディッシュにコートした。変性コラーゲンＩは、ラット尾由来コラーゲンＩを６０℃で３０分間処理し、１０μｇ／ｃｍ^{2}の濃度で６０ｍｍディッシュにコートした。ＭＭＰ１４処理コラーゲンＩは、ラット尾由来コラーゲンＩを活性型ＭＭＰ１４（R&D System）を含む反応液（０．１μｇ／ｍｌトリプシン３（Recombinant Human Active Trypsin3、R&D systems、Cat. No. 3714-SE）、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　ＣａＣｌ$_2$、５μＭ　ＺｎＣｌ$_2$、０．０５％（ｖ／ｖ）Ｂｒｉｊ３５、ｐＨ７．５）を用いて、室温で２０時間反応させた。反応終了後、ＭＭＰ１４処理コラーゲンＩを１０μｇ／ｃｍ^{2}の濃度で６０ｍｍディッシュにコートした。肝細胞はラット肝臓から採取し、２×１０^{5}個／ディッシュの濃度で播種し、３７℃、５％ＣＯ$_2$で４８時間培養した。培養４８時間目に、培地を１０μＭ　ＢｒｄＵおよび１０％ＦＢＳを含むＤＭＥ／Ｆ１２培地に置換して、３７℃、５％ＣＯ$_2$でさらに２４時間培養した。培養２４時間目に、培地を除去し、ＰＢＳで洗浄した後、４％ＰＦＡを加え、室温で３０分間固定した。固定後、ＰＢＳで洗浄し、０．２Ｎ　ＨＣｌおよび０．１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を含むＰＢＳを加えて透過処理を行った。

[0099] （２）蛍光顕微鏡での観察

上記（１）で透過処理を行った細胞をＰＢＳで洗浄後、５％ヤギ血清でブロッキングを行い、マウスモノクローナル抗ＢｒｄＵ抗体（MBL）およびウサギポリクローナル抗ＧＦＰ抗体(Invitrogen)を加えて一次抗体反応を３７℃で６０分間行った。一次抗体反応後、ＰＢＳで洗浄し、Ａｌｅｘａ４８８標識ヤギ抗ウサギＩｇＧ（Invitrogen）およびＡｌｅｘａ５５５標識ヤギ抗マウスＩｇＧ（Invitrogen）を加えて二次抗体反応を３７℃で６０分間行った。二次抗体反応後、ＰＢＳで洗浄し、ＤＡＰＩを含む封入剤を用いて細胞を封入した。蛍光顕微鏡像を図２７に示す。

[0100] （３）ＦＡＣＳ解析

ＢｒｄＵ陽性肝細胞の割合を測定するために、上記（１）で透過処理を行った細胞をＰＢＳで洗浄した後、ＡＰＣ標識マウスモノクローナル抗ＢｒｄＵ抗体を加えて抗体反応を４℃で３０分間行った。抗体反応終了後、ＰＢＳで細胞を洗浄して、ＦＡＣＳ解析によりＢｒｄＵ陽性肝細胞の割合を測定した。結果を図２８に示す。ＢｒｄＵ陽性細胞の割合は、ＢｒｄＵ陽性細胞数をフローサイトメトリーで解析した全細胞数（３×１０^{4}個）で割ったもので示した。

[0101] 図２７および２８に示した結果から、変性コラーゲンＩおよびＭＭＰ１４処理コラーゲンＩでコートしたディッシュにおいて、未処理のコラーゲンＩでコートしたディッシュに比べて、肝細胞の増殖が促進されることが分かる。ＨＳＣには、コラゲナーゼ活性を有するＭＭＰ１４が発現していることから、上記結果は、ＨＳＣによる肝細胞の増殖促進の一因として、ＨＳＣが発現するＭＭＰ１４によるコラーゲンへの作用が関与していることを示唆するものである。

例９　ａＨＳＣにおけるＭＭＰ１４の発現が肝細胞の増殖に与える影響

（１）肝細胞と星細胞との共培養

星細胞が肝細胞の増殖に与える影響を評価するために、肝細胞と星細胞との共培養を行った。例５で得たａＨＳＣを６０ｍｍディッシュに１×１０^{5}個の濃度で播種し、１０％ＦＢＳ加ＤＭＥＭを用いて、３７℃、５％CO_2で２４時間培養した。培養２４時間目に培地を除去し、Opti-MEM I reducing medium (Invitrogen) を加えて、ｓｉＲＮＡのトランスフェクションの準備ができるまで前培養した。ｓｉＲＮＡを最終濃度が１０ｎＭとなるようにＲＮＡｉＭＡＸ(Invitrogen)と混合し、室温で１５分間静置してｓｉＲＮＡ複合体を得た。使用したｓｉＲＮＡは以下のとおりである。

ＧＦＰ　ｓｉＲＮＡ (Ambion、Silencer GFP siRNA、Cat. No.AM4626)

ＭＭＰ１４　ｓｉＲＮＡ：

センス鎖：５’－ＧＣＵＣＡＵＵＣＡＵＧＧＧＵＡＧＣＧＡＴＴ－３’（配

列番号６）

アンチセンス鎖：５’－ＵＣＧＣＵＡＣＣＣＡＵＧＡＡＵＧＡＧＣＣＴ－３’（配列番号７）

ＨＧＦ　ｓｉＲＮＡ：

センス鎖：５’－ＡＵＡＵＣＵＵＵＣＣＧＧＣＡＡＧＡＡＵＵＵＧＵＧＣ－３’（配列番号８）

アンチセンス鎖：５’－ＧＣＡＣＡＡＡＵＵＣＵＵＧＣＣＧＧＡＡＡＧＡＵＡＵ－３’（配列番号９）

[0102] ｓｉＲＮＡ複合体を前培養したａＨＳＣに添加し、３７℃、５％CO_2で５時間培養した。培養５時間目に、培地を１０％ＦＢＳ加ＤＭＥＭに置換し、３７℃、５％CO_2で４８時間培養した。培養４８時間目に、培地を除去して、Opti-MEM I reducing mediumを加え、ｓｉＲＮＡのトランスフェクションの準備ができるまで、前培養した。最終濃度が１０ｎＭとなるようにｓｉＲＮＡ（ＧＦＰ　ｓｉＲＮＡ、ＭＭＰ１４　ｓｉＲＮＡ、ＨＧＦ　ｓｉＲＮＡ）をＲＮＡｉＭＡＸと混合し、室温で１５分間静置した。ｓｉＲＮＡ複合体を前培養したａＨＳＣに添加し、３７℃、５％CO_2で５時間培養した。培養５時間目に培地を除去し、ＰＢＳで洗浄した後、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液を用いてＨＳＣを回収した。

[0103] 回収したＨＳＣは、事前にＧＦＰ遺伝子導入ラット肝臓から採取し、コラーゲンＩでコートした３５ｍｍディッシュに５×10^4個の濃度で播種した肝細胞に対して、５×10^4個／ディッシュの濃度で加え、３７℃、５％CO_2で４８時間培養した。培養４８時間目に、培地を１０ｍＭ　ＢｒｄＵおよび１０％ＦＢＳを含むＤＭＥ／Ｆ１２培地に置換し、３７℃、５％CO_2でさらに２４時間培養した。培養２４時間目に、培地を除去し、ＰＢＳで洗浄後、４％ＰＦＡを加え、室温で３０分間固定した。固定後、ＰＢＳで洗浄し、０．２Ｎ　ＨＣｌおよび０．１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を含むＰＢＳを加えて透過処理を行った。

[0104] （２）蛍光顕微鏡での観察

上記（１）で透過処理を行った細胞をＰＢＳで洗浄後、５％ヤギ血清でブロッキングを行い、マウスモノクローナル抗ＢｒｄＵ抗体（MBL）およびウサギポリクローナル抗ＧＦＰ抗体（Invitrogen）を加えて一次抗体反応を３７℃で６０分間行った。一次抗体反応後、ＰＢＳで洗浄し、Ａｌｅｘａ４８８標識ヤギ抗ウサギＩｇＧ（Invitrogen）およびＡｌｅｘａ５５５標識ヤギ抗マウスＩｇＧ（Invitrogen）を加えて二次抗体反応を３７℃で６０分間行った。二次抗体反応後、ＰＢＳで洗浄し、ＤＡＰＩを含む封入剤を用いて細胞を封入した。蛍光顕微鏡像を図２９に示す。

[0105] （３）ＦＡＣＳ解析

ＢｒｄＵ陽性ＧＦＰ陽性肝細胞の割合を測定するために、上記（１）で透過処理を行った細胞をＰＢＳで洗浄した後、ＡＰＣ標識マウスモノクローナル抗ＢｒｄＵ抗体およびＦＩＴＣ標識ウサギポリクローナル抗ＧＦＰ抗体を加えて抗体反応を４℃で３０分間行った。抗体反応終了後、ＰＢＳで細胞を洗浄して、ＦＡＣＳ解析によりＢｒｄＵ陽性ＧＦＰ陽性肝細胞の割合を測定した。結果を図３０に示す。ＢｒｄＵ陽性細胞の割合は、ＢｒｄＵ陽性細胞数をフローサイトメトリーで解析した全細胞数で割ったもので示した。

[0106] 図２９および３０に示した結果から、ａＨＳＣによる肝細胞の増殖促進にａＨＳＣが発現するＭＭＰ１４が関与しており、その寄与度が、肝細胞の増殖促進のキーファクターとして知られるＨＧＦを上回ることがわかる。

[0107] 例１０　ＭＭＰ１４処理コラーゲン上のＲＧＤ配列が肝細胞の増殖に与える影響

ＧＦＰ遺伝子導入ラット肝臓から採取したラット肝細胞を２×１０^{5}個／ｍｌの濃度でＤＭＥ／Ｆ１２培地に播種し、異なる濃度のペプチド（コントロールペプチド（Ｈ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ｓｅｒ－ＯＨ、Peptides International、Cat. No. PFA-3907-PI）：５００μｇ／ｍｌ、ＧＲＧＤＳペプチド（ペプチド研究所、Cat. No. 4189-v）：１００μｇ／ｍｌ、２００μｇ／ｍｌ、５００μｇ／ｍｌ）を加え、３７℃で３０分間反応させた。反応終了後のラット肝細胞を、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲン

Ｉをコートした３５ｍｍディッシュに５×１０^{4}個／ディッシュの濃度で播種し、１０ｍＭ　ＢｒｄＵおよび１０％ウシ胎児血清を含むＤＭＥ／Ｆ１２培地中、３７℃、５％CO_2で７２時間培養した。培養終了後、培地を除去し、ＰＢＳで洗浄した後、４％ＰＦＡを加えて室温で３０分間固定した。固定後、ＰＢＳで洗浄し、０．２Ｎ　ＨＣｌおよび０．１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を含むＰＢＳを加えて透過処理を行った。

[0108] ＰＢＳで洗浄後、５％ヤギ血清でブロッキングを行い、マウスモノクローナル抗ＢｒｄＵ抗体（MBL）およびウサギポリクローナル抗ＧＦＰ抗体（Invitrogen）を加えて一次抗体反応を３７℃で６０分間行った。一次抗体反応後、ＰＢＳで洗浄して、Ａｌｅｘａ４８８標識ヤギ抗ウサギＩｇＧ（Invitrogen）およびＡｌｅｘａ５５５標識ヤギ抗マウスＩｇＧ（Invitrogen）を加えて二次抗体反応を３７℃で６０分間行った。二次抗体反応後、ＰＢＳで洗浄して、ＤＡＰＩを含む封入剤を用いて、細胞を封入した。蛍光顕微鏡像を図３１に示す。増殖細胞の割合は、ＢｒｄＵ陽性細胞数をカウントした全細胞数で割ったもので示した（図３２）。

[0109] 図３１および３２に示した結果から、ａＨＳＣによる肝細胞の増殖促進に、ＲＧＤ配列が関与していることが分かる。このことから、ａＨＳＣが発現するＭＭＰ１４の作用により露出したコラーゲンＩのＲＧＤ配列が、肝細胞の増殖促進に関与していることが示唆される。

請求の範囲

[請求項1] 活性化星細胞、活性化星細胞分解物、ＭＭＰ１４、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンおよび活性化星細胞分泌物からなる群から選択される成分を含む、組織再生を促進するための組成物。

[請求項2] 組織再生が、障害組織または移植組織において生じる、請求項１に記載の組成物。

[請求項3] 障害または移植を受けた日から４日以内に投与される、請求項２に記載の組成物。

[請求項4] 障害または移植を受けた日から１日以内に投与される、請求項２に記載の組成物。

[請求項5] 障害が、組織破壊、炎症、壊死、線維化、手術的侵襲、臓器不全からなる群から選択される、請求項２～４のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項6] 組織再生が組織幹細胞の分化および／または増殖を伴う、請求項１～５のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項7] 組織再生が組織実質細胞の増殖を伴う、請求項１～６のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項8] 活性化星細胞が、ＨＧＦ、ＥＧＦ、ＭＭＰ１４からなる群から選択されるタンパク質の発現を増大させる処置を施されたものである、請求項１～７のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項9] 組織再生が抑制された状態を有する対象に対して用いる、請求項１～８のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項10] 組織再生が抑制された状態が、炎症、壊死、線維化、臓器不全、血小板数の減少、遺伝子異常、ノルアドレナリンの減少からなる群から選択される、請求項９に記載の組成物。

[請求項11] 対象において組織再生を促進する方法であって、請求項１～１０のいずれか一項に記載の組成物を、これを必要とする対象に投与する工程を含む、前記方法。

[請求項12] 活性化星細胞、活性化星細胞分解物、ＭＭＰ１４、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンおよび活性化星細胞分泌物からなる群から選択される成分を含む、幹細胞の分化および／または増殖のための組成物。

[請求項13] 活性化星細胞、活性化星細胞分解物、ＭＭＰ１４、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンおよび活性化星細胞分泌物からなる群から選択される成分と、幹細胞とを接触させる工程を含む、組織幹細胞を分化および／または増殖させる方法。

[請求項14] 活性化星細胞、活性化星細胞分解物、ＭＭＰ１４、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンおよび活性化星細胞分泌物からなる群から選択される成分を含む、細胞増殖を促進するための組成物。

[請求項15] 活性化星細胞、活性化星細胞分解物、ＭＭＰ１４、ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンおよび活性化星細胞分泌物からなる群から選択される成分と、細胞とを接触させる工程を含む、細胞増殖を促進させる方法。

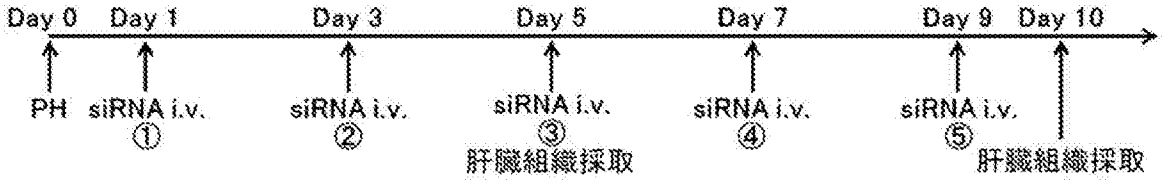
[請求項16] ＭＭＰ１４を阻害する物質を含む、細胞増殖を抑制するための組成物。

[請求項17] ＭＭＰ１４を阻害する物質が作用する細胞が、ＣＡＦおよび／または腫瘍細胞である、請求項１６に記載の組成物。

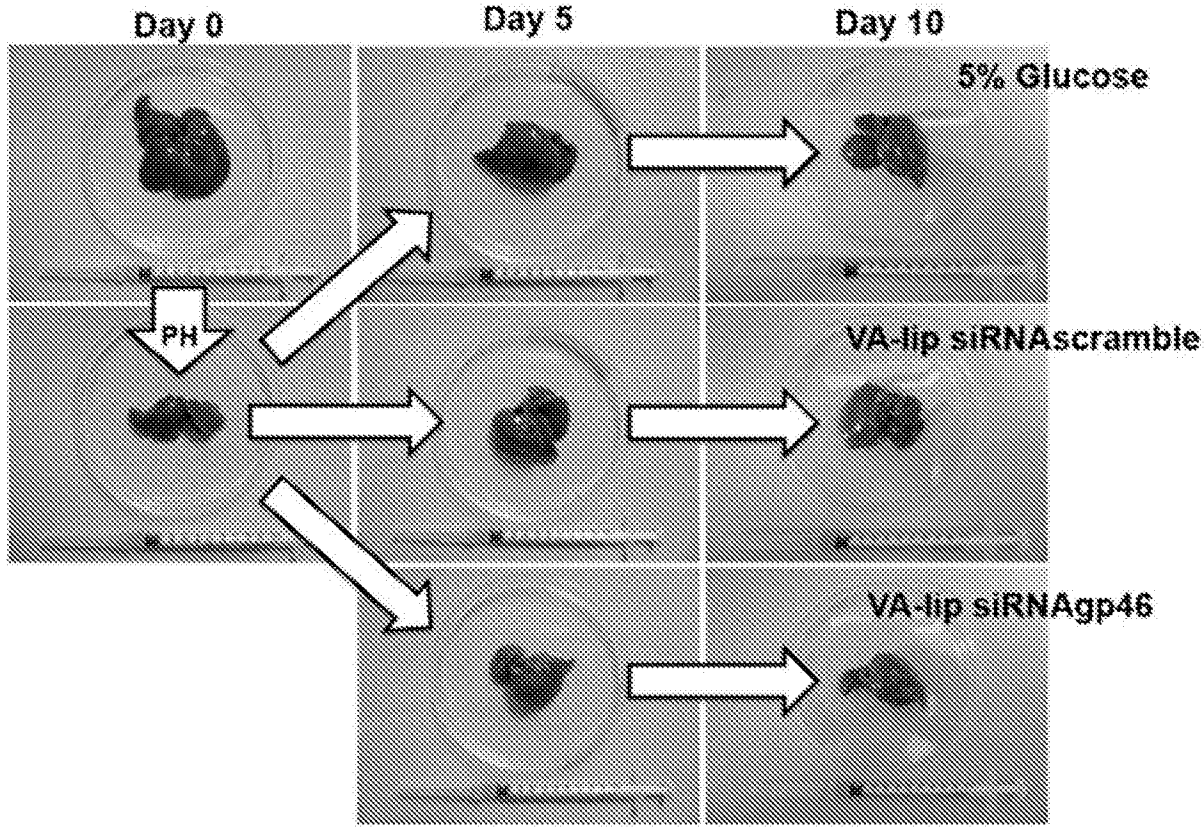
[請求項18] ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンを含む、細胞培養基材。

[請求項19] ＭＭＰ１４で処理したコラーゲンで被覆された細胞培養容器。

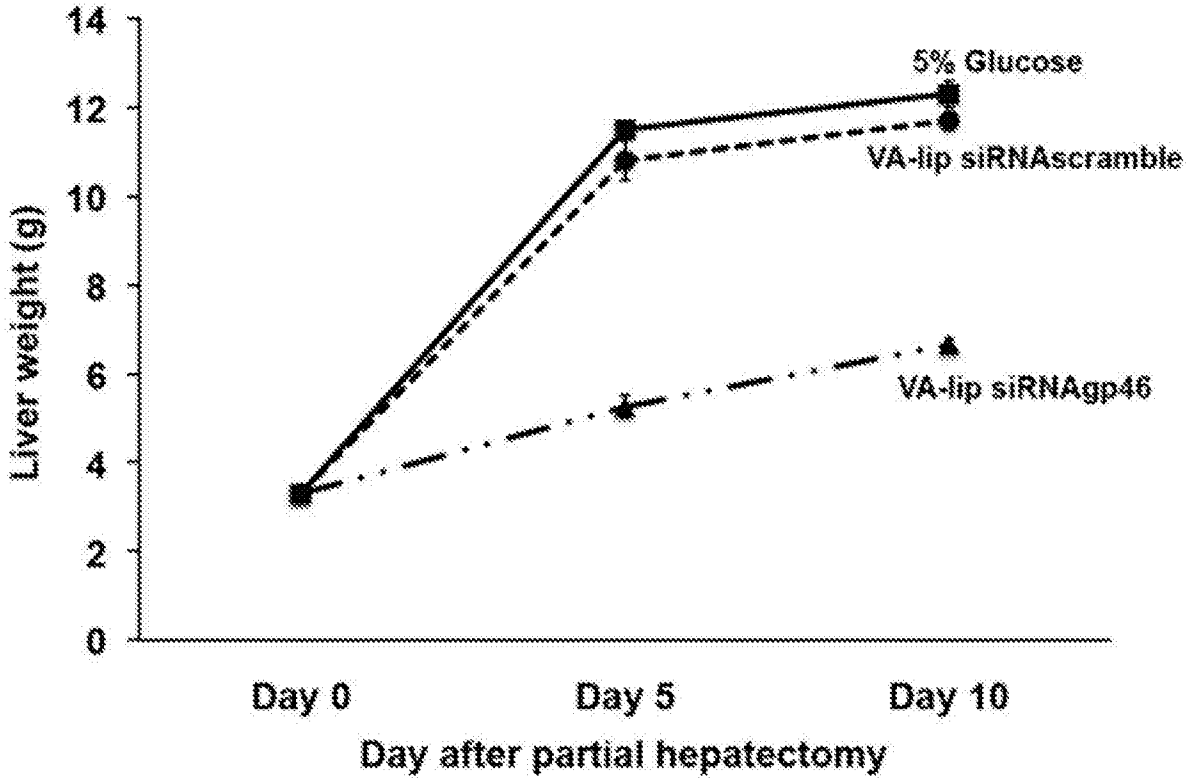
[図1]


Day 0
Day 1
Day 3
Day 5
Day 7
Day 9
Day 10
PH
siRNA i.v.
①
siRNA i.v.
②
siRNA i.v.
③
肝臓組織採取
siRNA i.v.
④
siRNA i.v.
⑤
肝臓組織採取

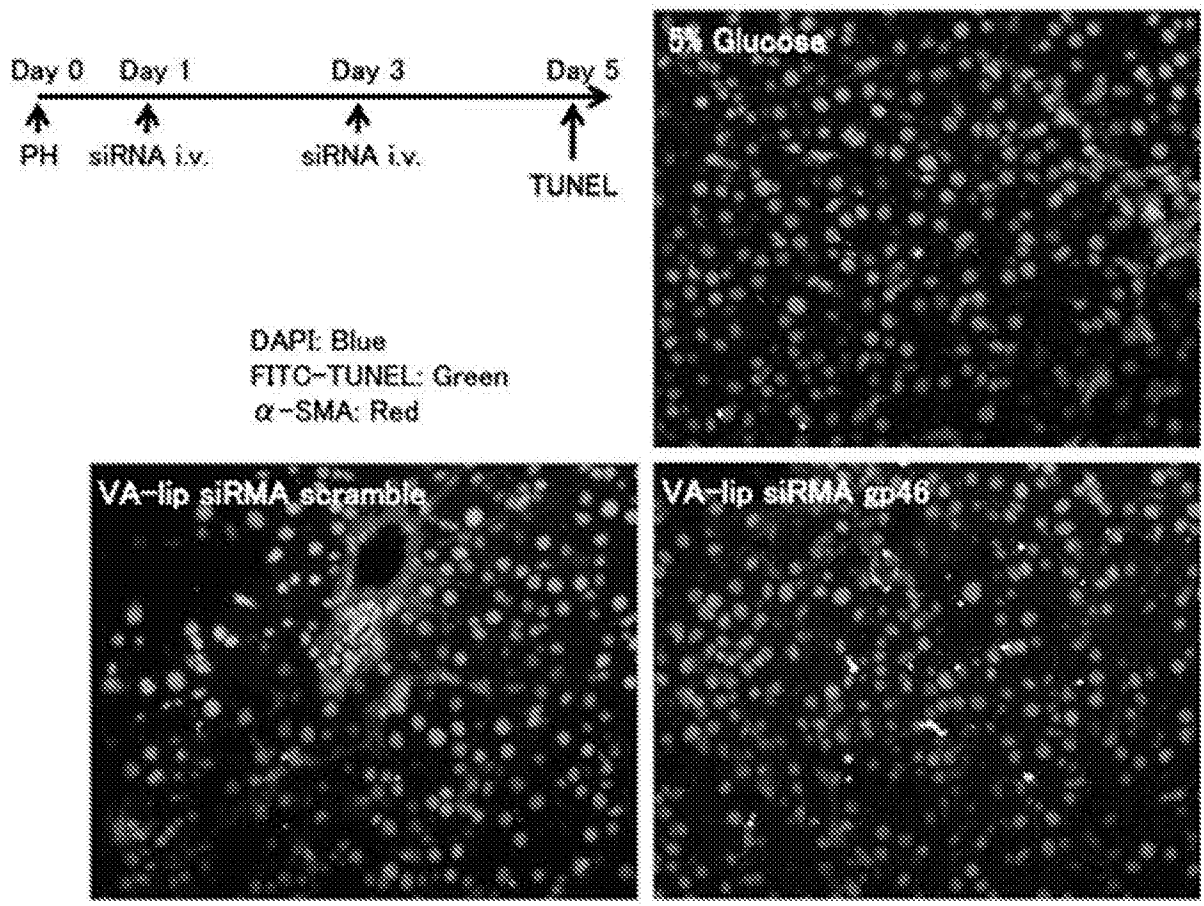
[図2]


Day 0
Day 5
Day 10
5% Glucose
PH
VA-lip siRNAscramble
VA-lip siRNAgp46

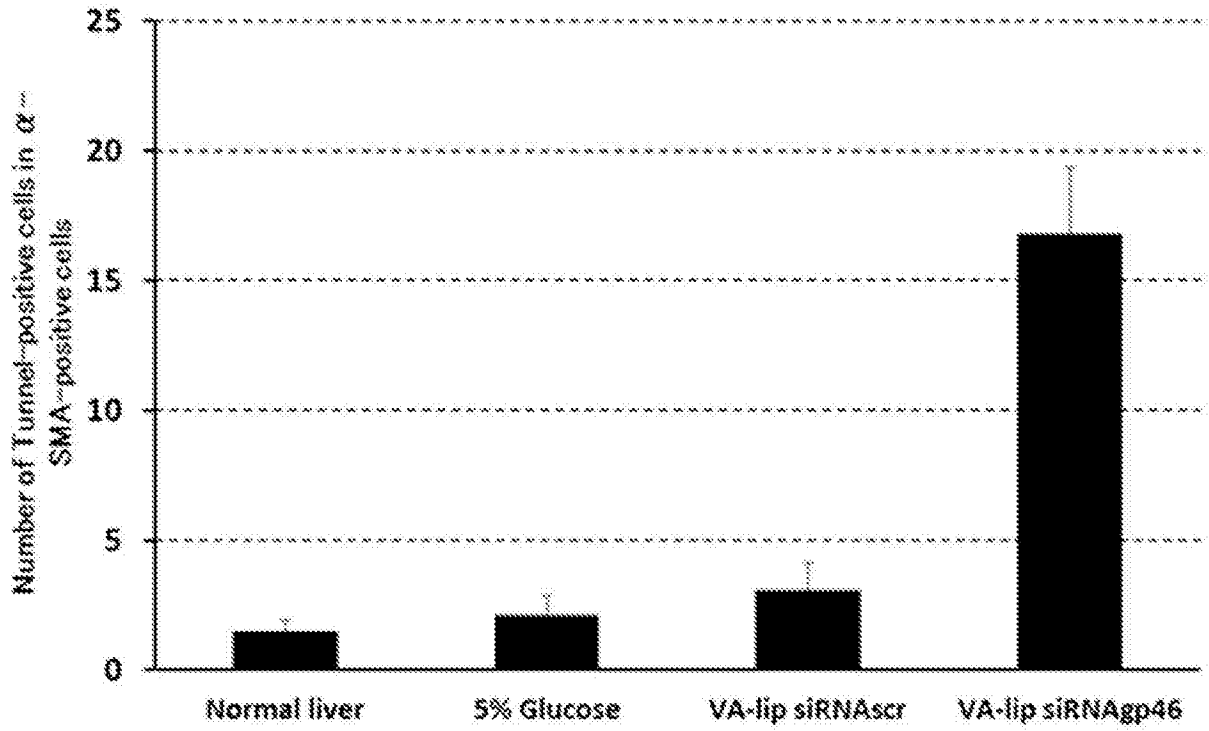
[図3]


14
12
10
8
6
4
2
0
Liver weight (g)
5% Glucose
VA-lip siRNAscramble
VA-lip siRNAgp46
Day 0
Day 5
Day 10
Day after partial hepatectomy

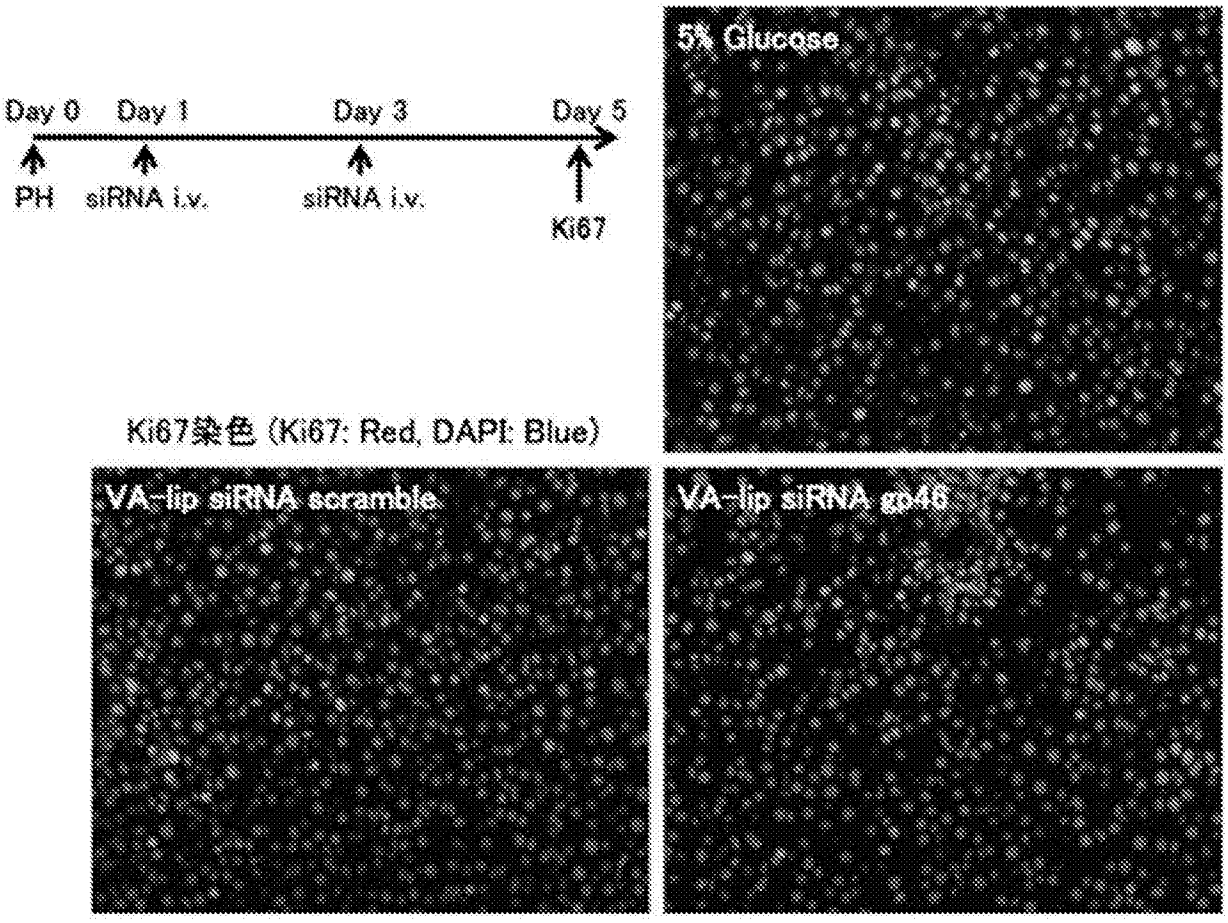
[図4]


Day 0
Day 1
Day 3
Day 5
PH
siRNA i.v.
siRNA i.v.
TUNEL
DAPI: Blue
FITC-TUNEL: Green
α-SMA: Red
5% Glucose
VA-lip siRMA scramble
VA-lip siRMA gp46

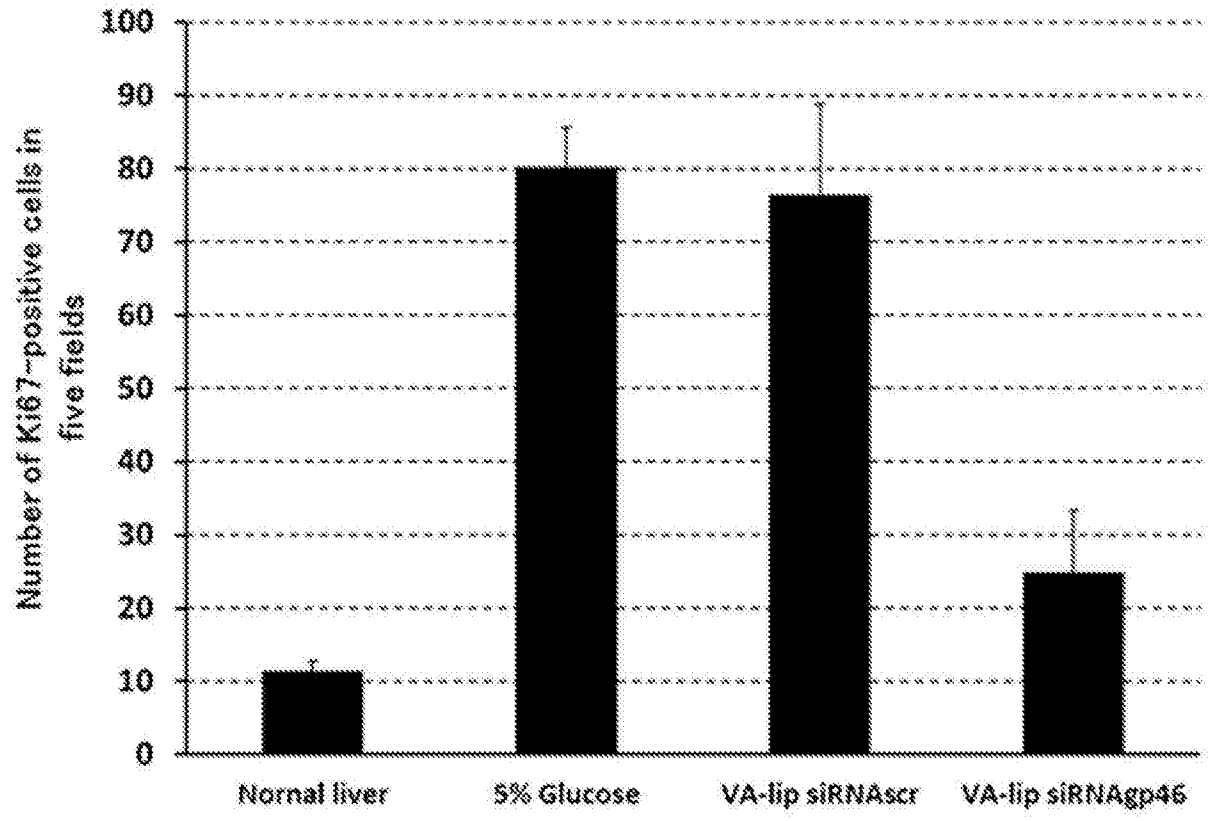
[図5]


Number of Tunnel-positive cells in α-SMA-positive cells
25
20
15
10
5
0
Normal liver
5% Glucose
VA-lip siRNAscr
VA-lip siRNAgp46

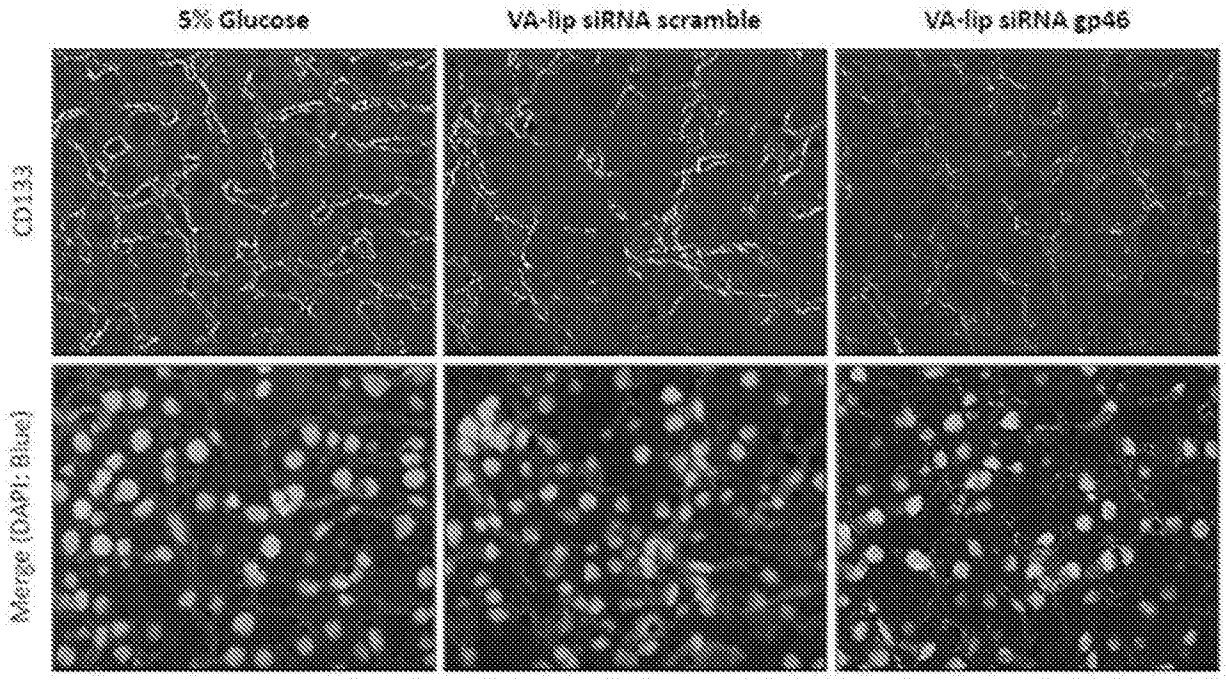
[図6]


Day 0
Day 1
Day 3
Day 5
PH
siRNA i.v.
siRNA i.v.
Ki67
5% Glucose
Ki67染色 (Ki67: Red, DAPI: Blue)
VA-lip siRNA scramble
VA-lip siRNA gp46

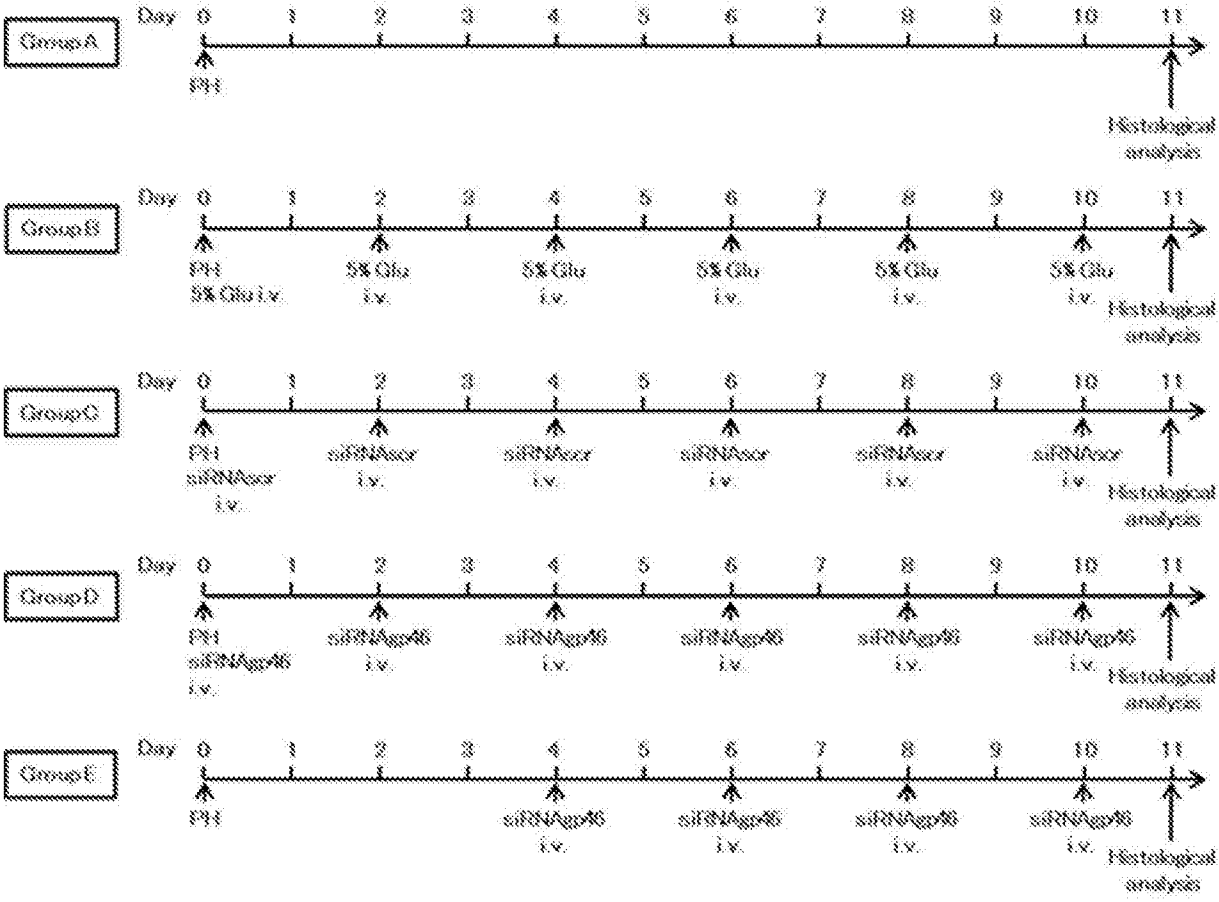
[図7]


Number of Ki67-positive cells in five fields
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Normal liver
5% Glucose
VA-lip siRNAscr
VA-lip siRNAgp46

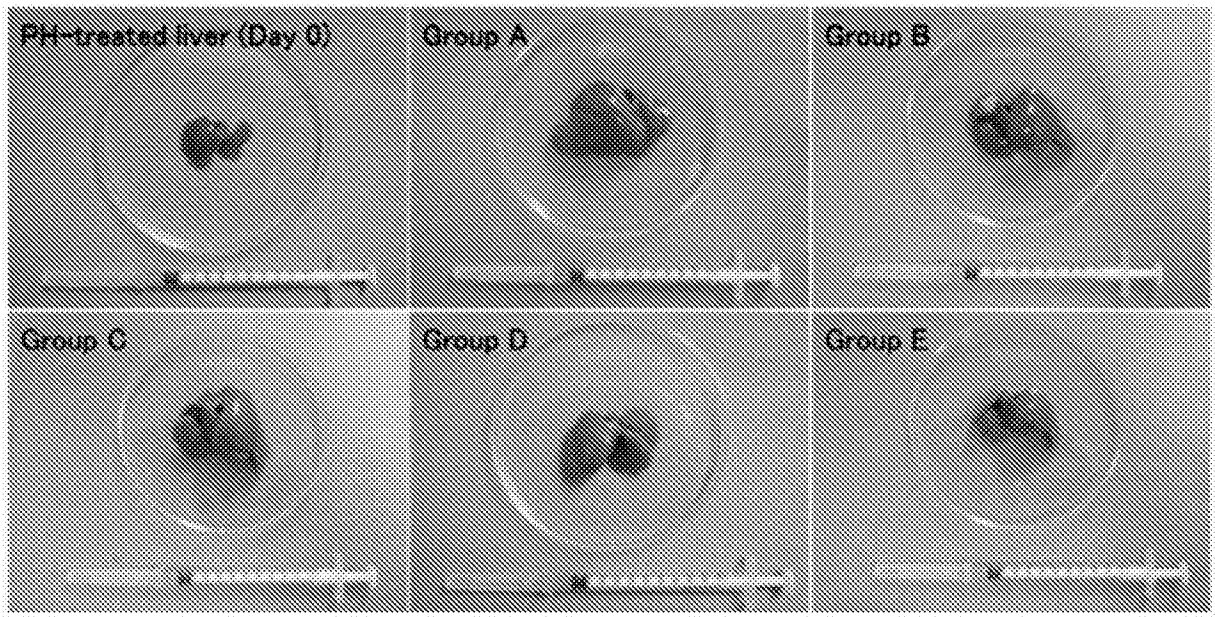
[図8]


5% Glucose
VA-lip siRNA scramble
VA-lip siRNA gp46
CD133
Merge (DAPI: Blue)

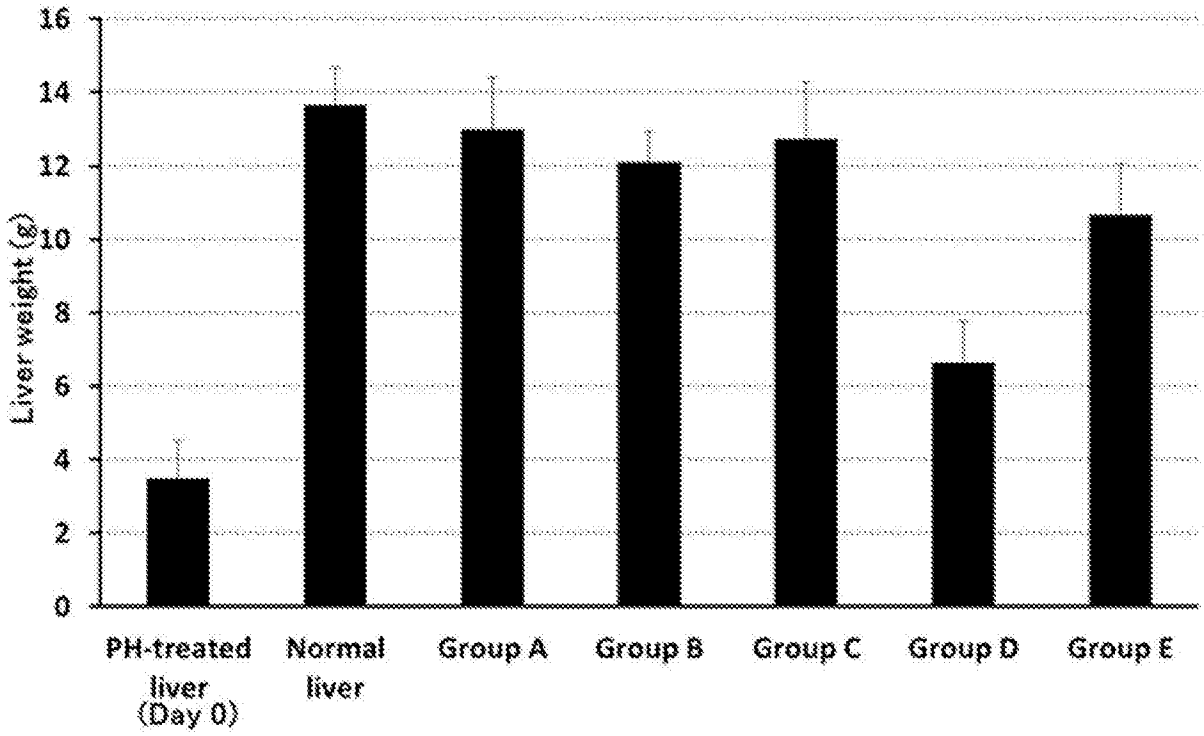
[図9]


Group A
Day 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
PH
Histological analysis
Group B
PH
5% Glu i.v.
5% Glu i.v.
Group C
PH
siRNAscr i.v.
siRNAscr i.v.
Group D
PH
siRNAgp46 i.v.
siRNAgp46 i.v.
Group E

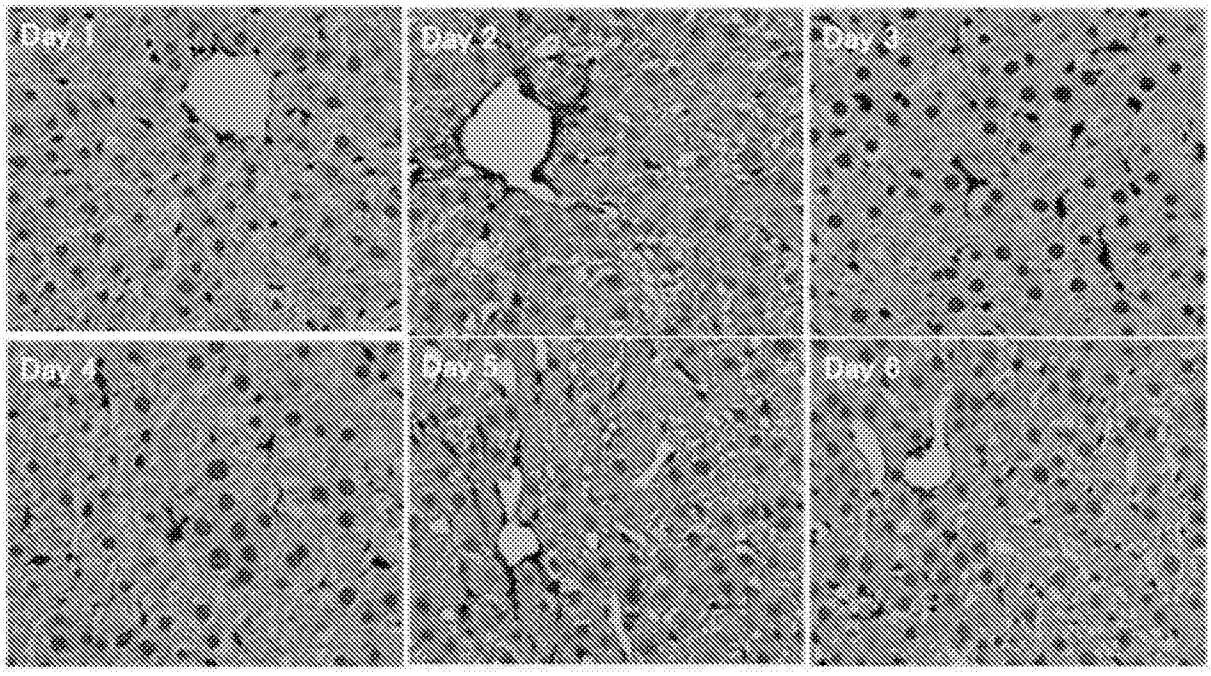
[図10]


PH-treated liver (Day 0)
Group A
Group B
Group C
Group D
Group E

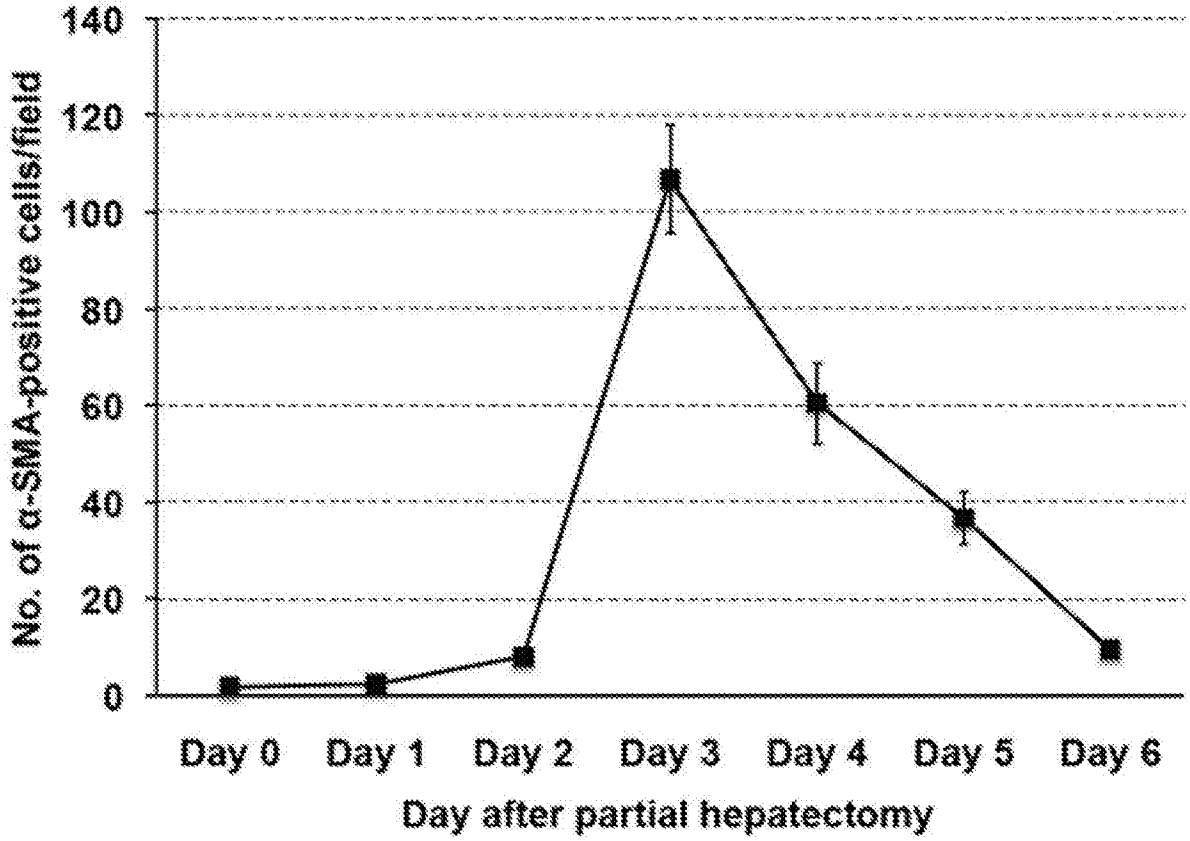
[図11]


16
14
12
10
8
6
4
2
0
Liver weight (g)
PH-treated liver (Day 0)
Normal liver
Group A
Group B
Group C
Group D
Group E

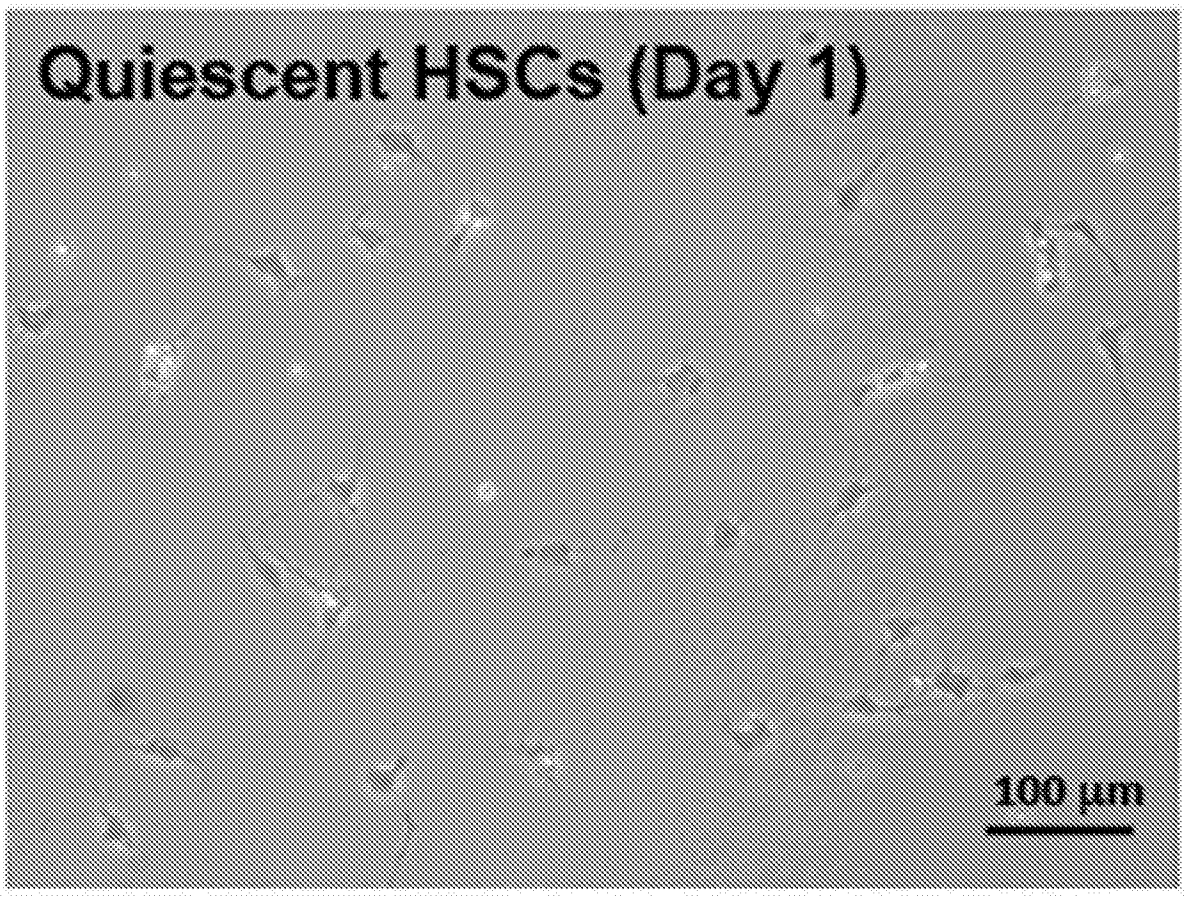
[図12]

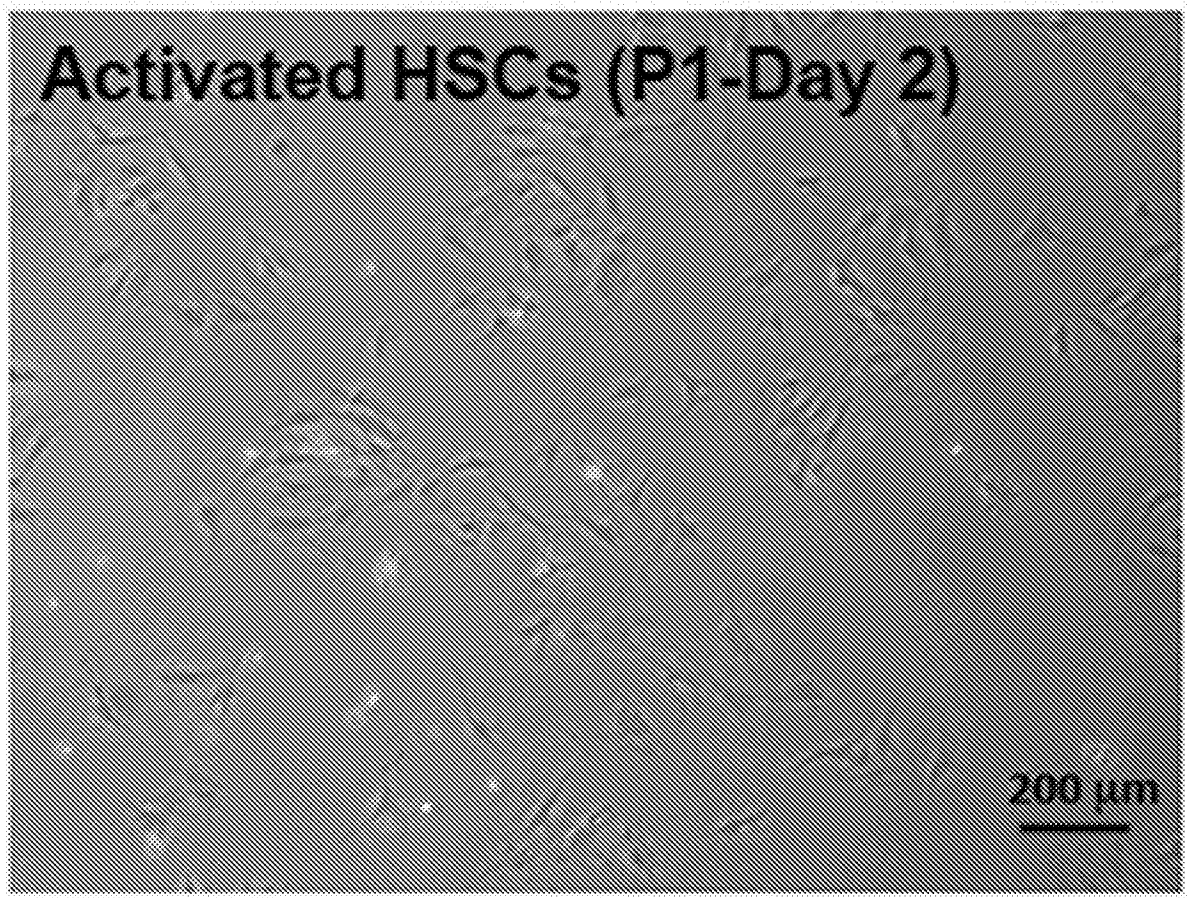

Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6

[図13]

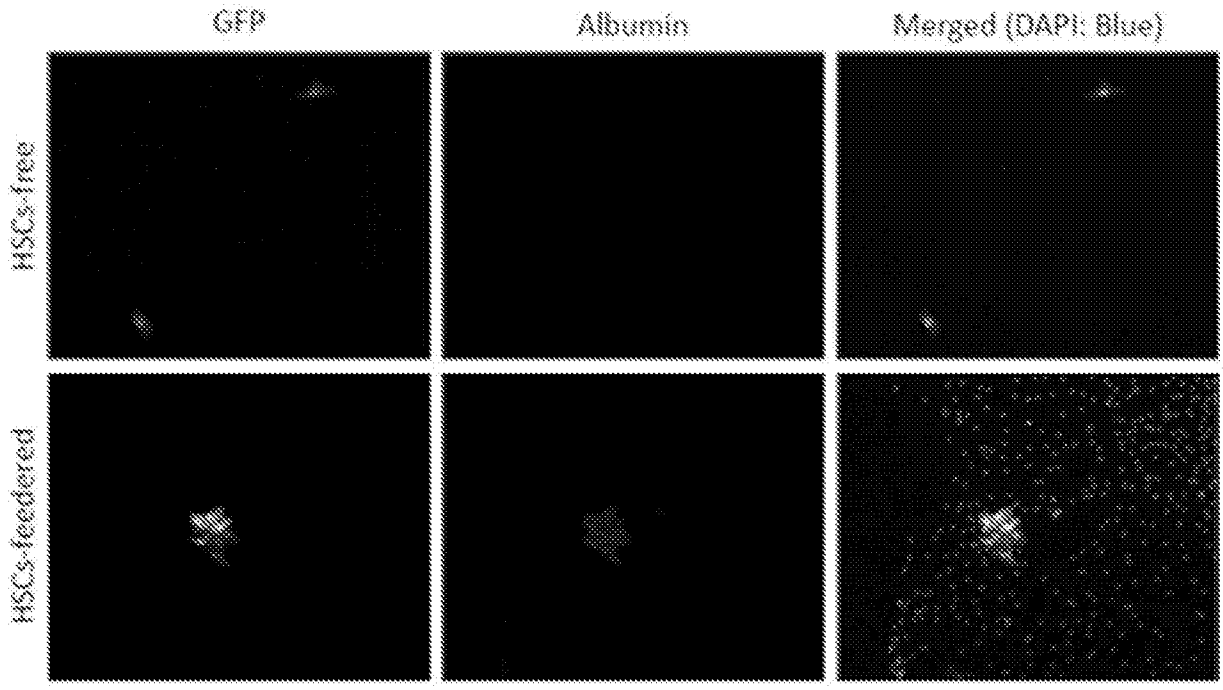

140
120
100
80
60
40
20
0
No. of α-SMA-positive cells/field
Day 0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6
Day after partial hepatectomy

[図14]

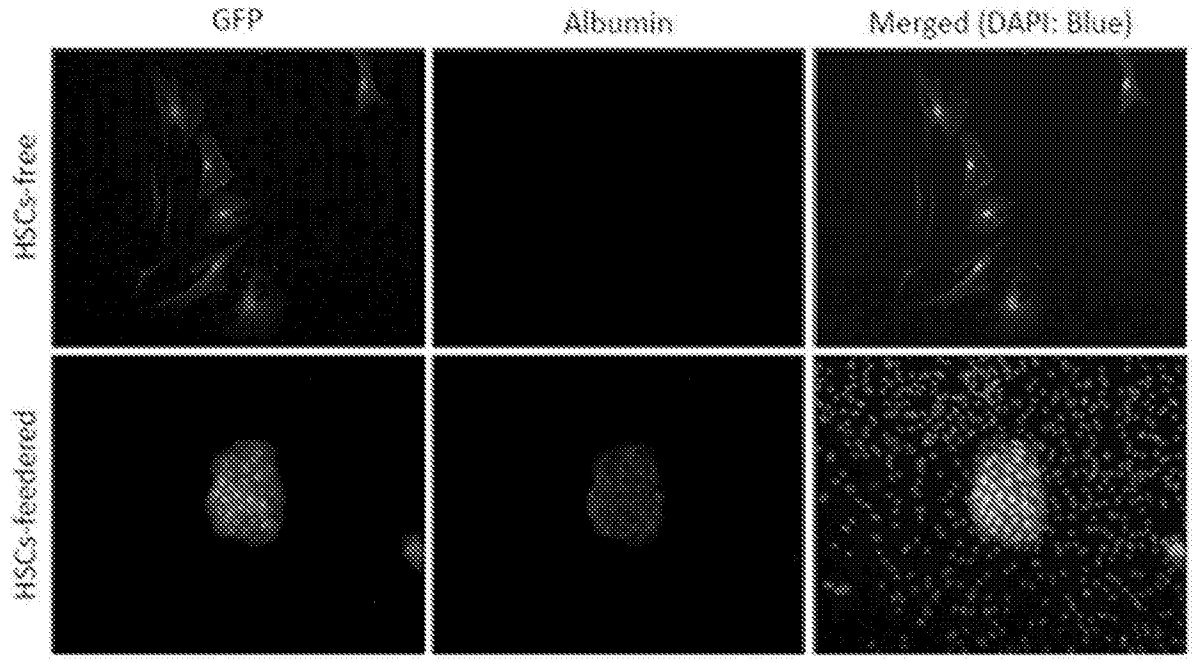




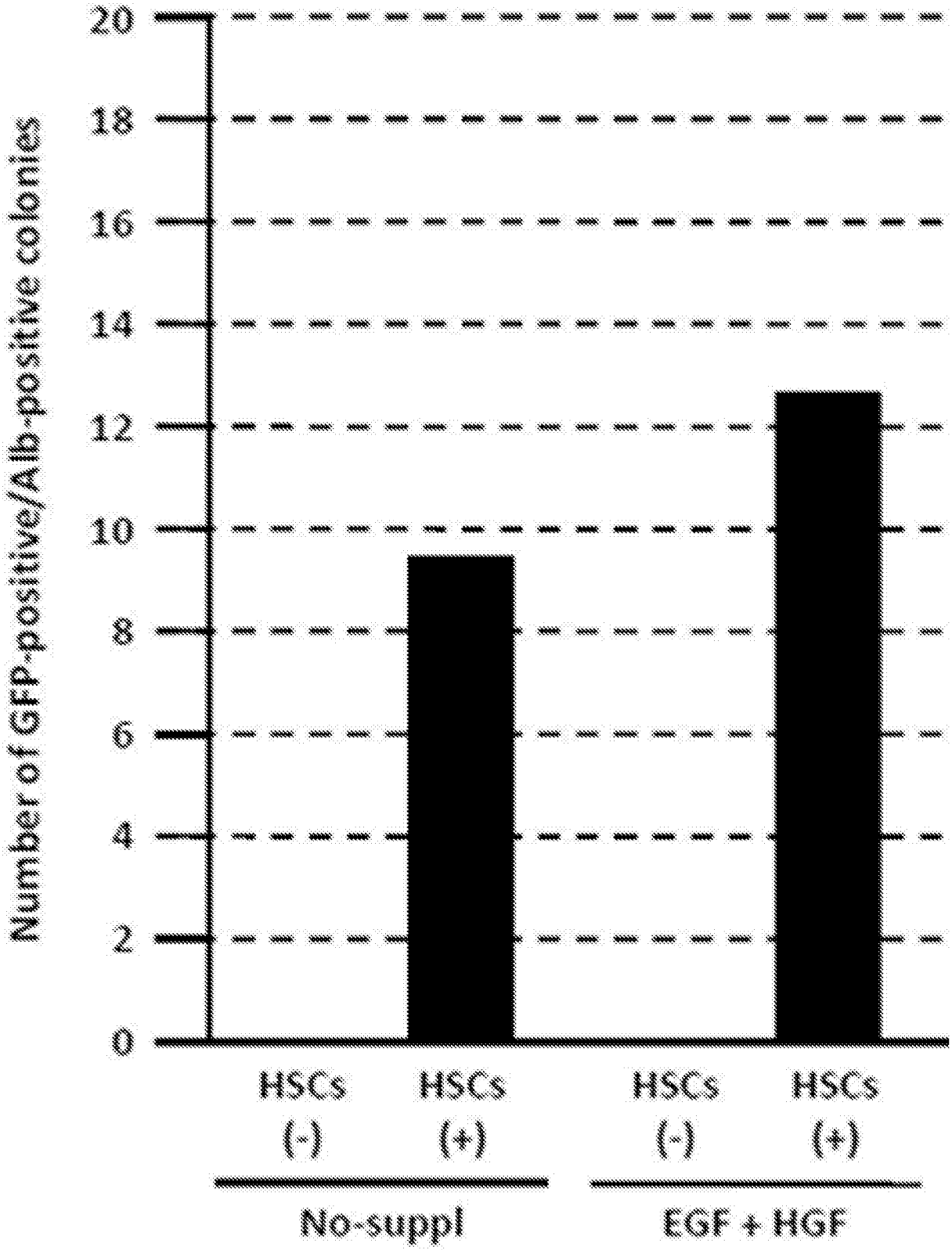
[図15]


GFP
Albumin
Merged (DAPI: Blue)
HSCs-free
HSCs-feedered

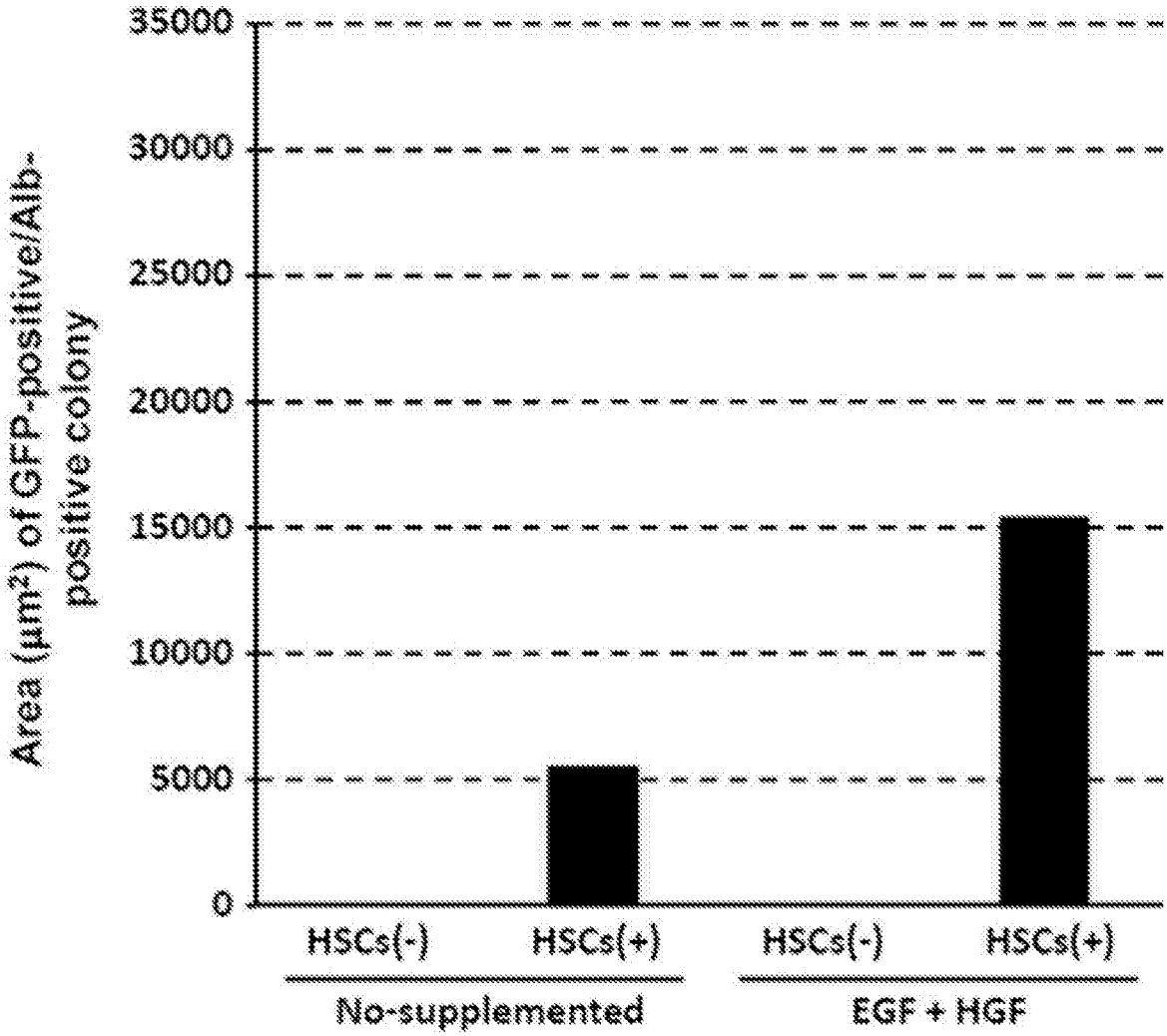
[図16]


GFP
Albumin
Merged (DAPI: Blue)
HSCs-free
HSCs-feedered

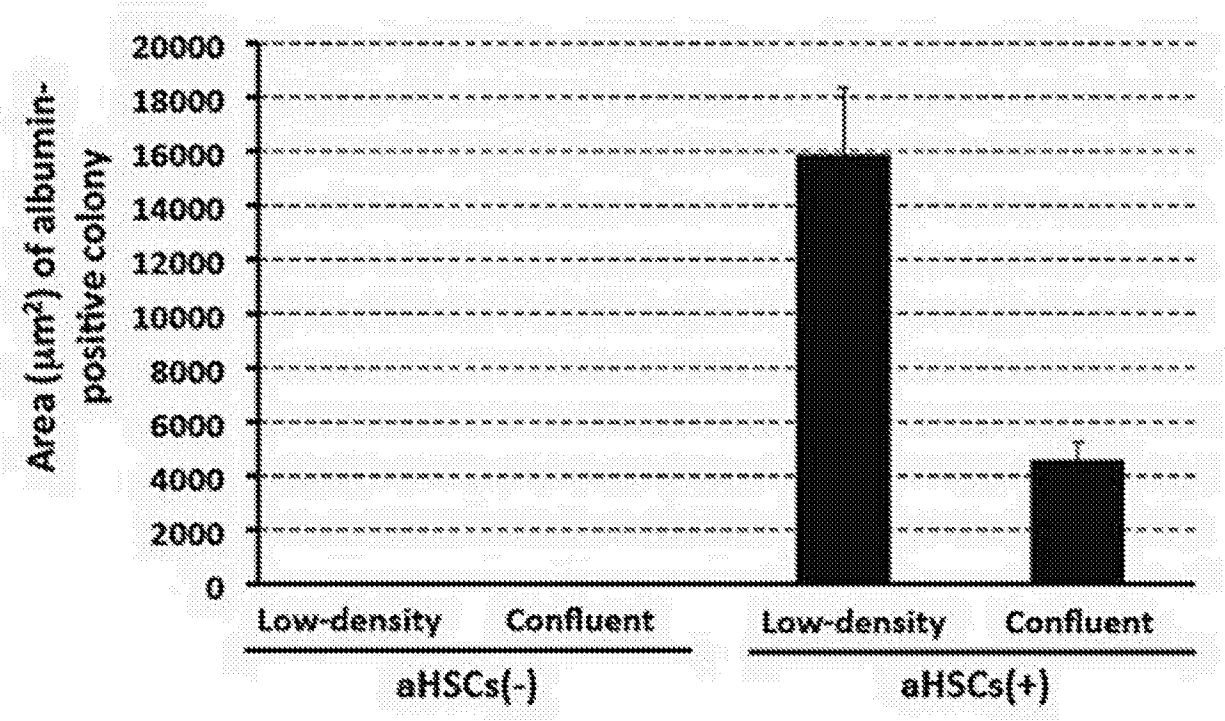
[図17]


Number of GFP-positive/Alb-positive colonies
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
HSCs (-)
HSCs (+)
HSCs (-)
HSCs (+)
No-suppl
EGF + HGF

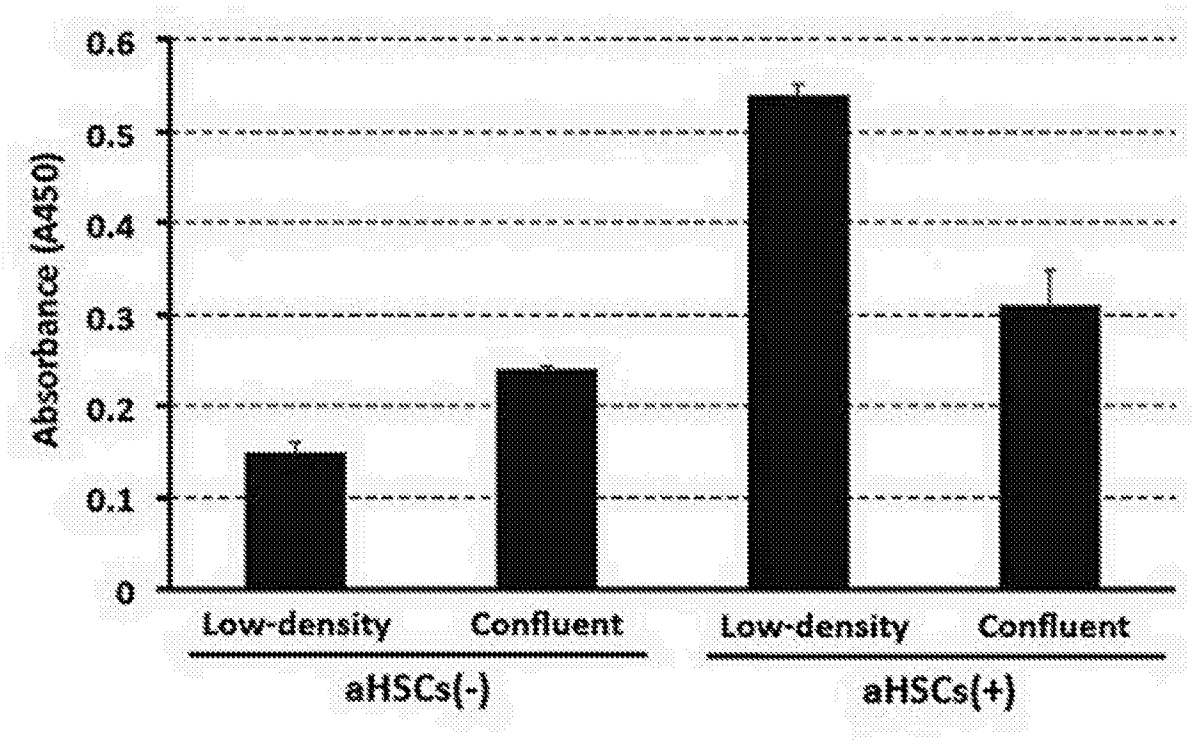
[図18]


35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Area (μm²) of GFP-positive/Alb-positive colony
HSCs(-)
HSCs(+)
HSCs(-)
HSCs(+)
No-supplemented
EGF + HGF

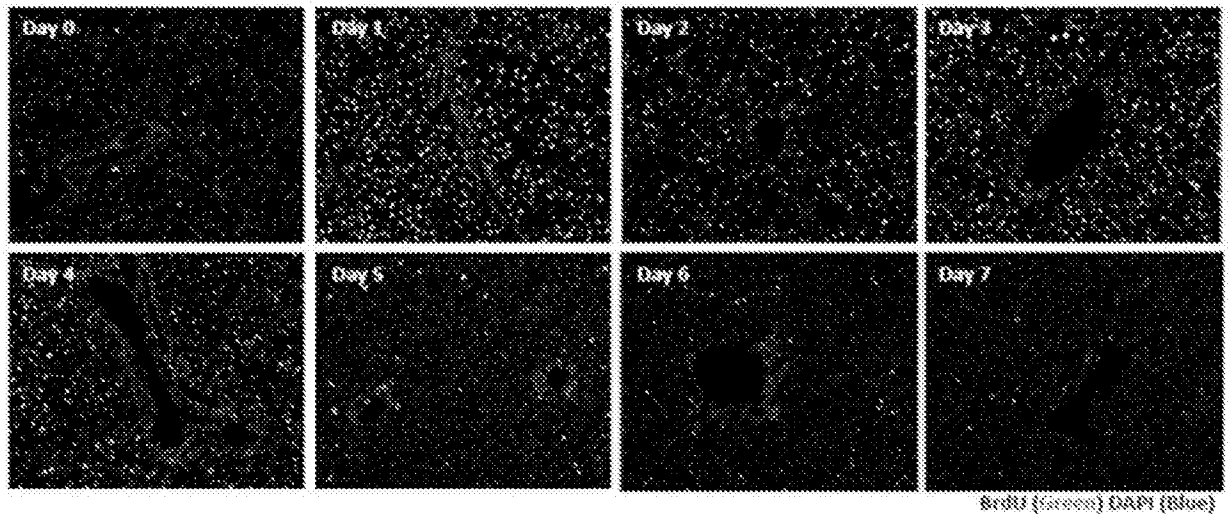
[図19]


20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Area (μm²) of albumin-positive colony
Low-density
Confluent
Low-density
Confluent
aHSCs(-)
aHSCs(+)

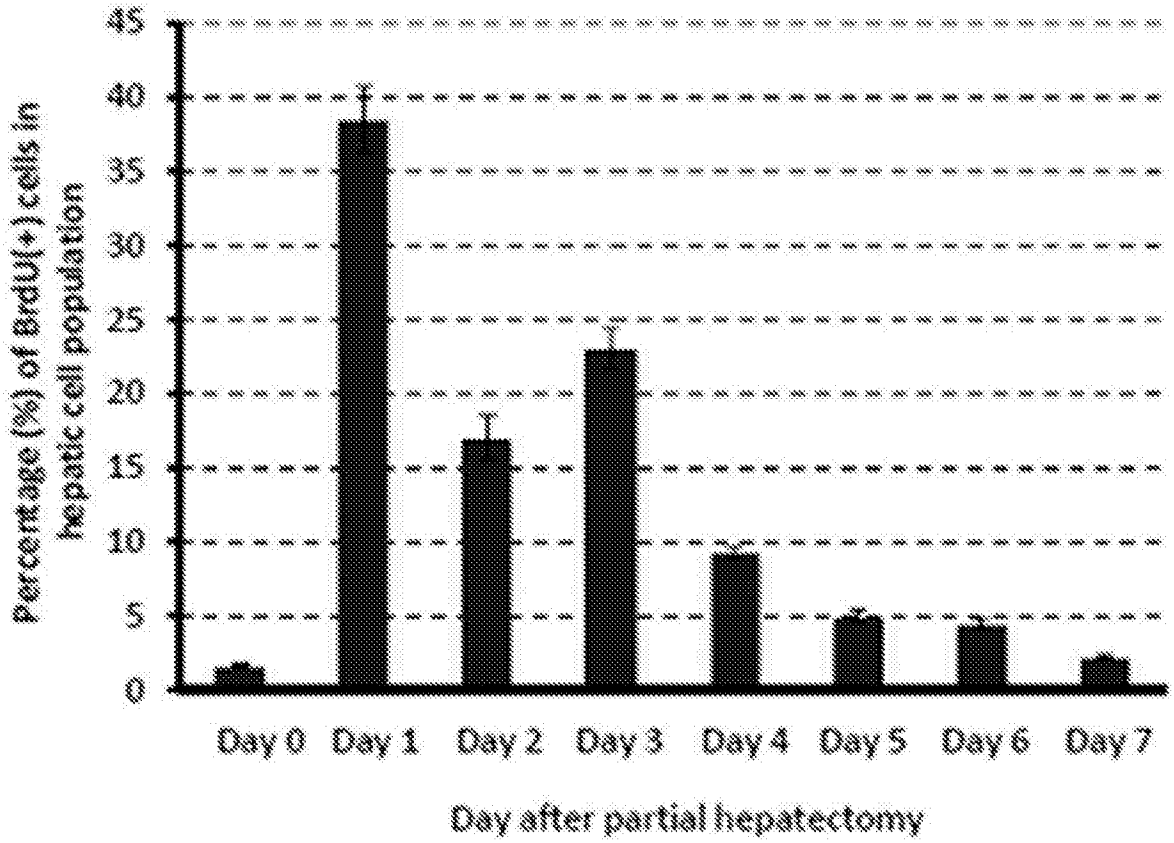
[図20]


Absorbance (A450)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Low-density
Confluent
Low-density
Confluent
aHSCs(-)
aHSCs(+)

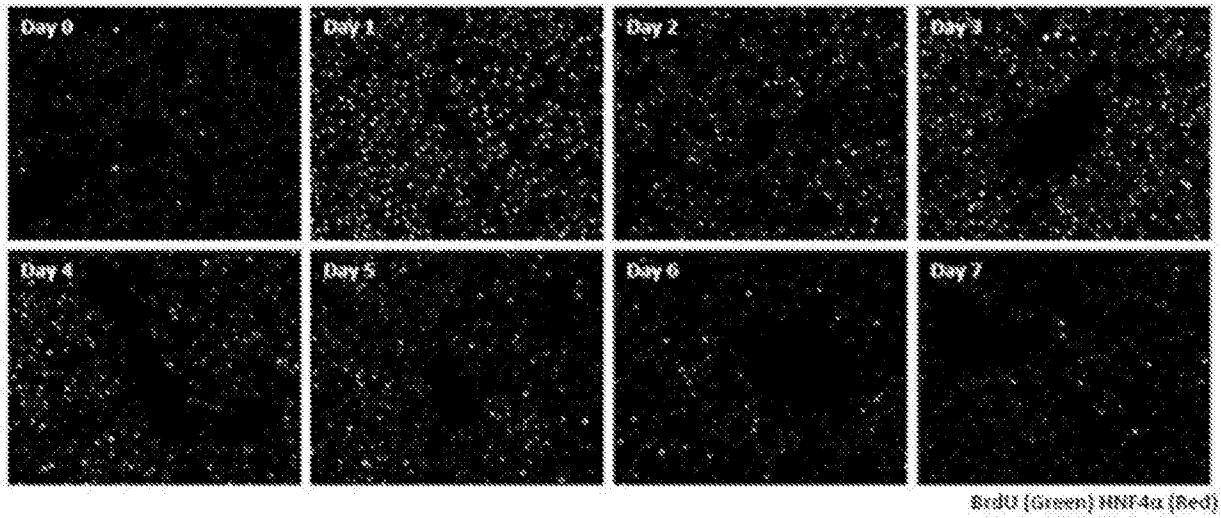
[図21]


Day 0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6
Day 7
BrdU (Green) DAPI (Blue)

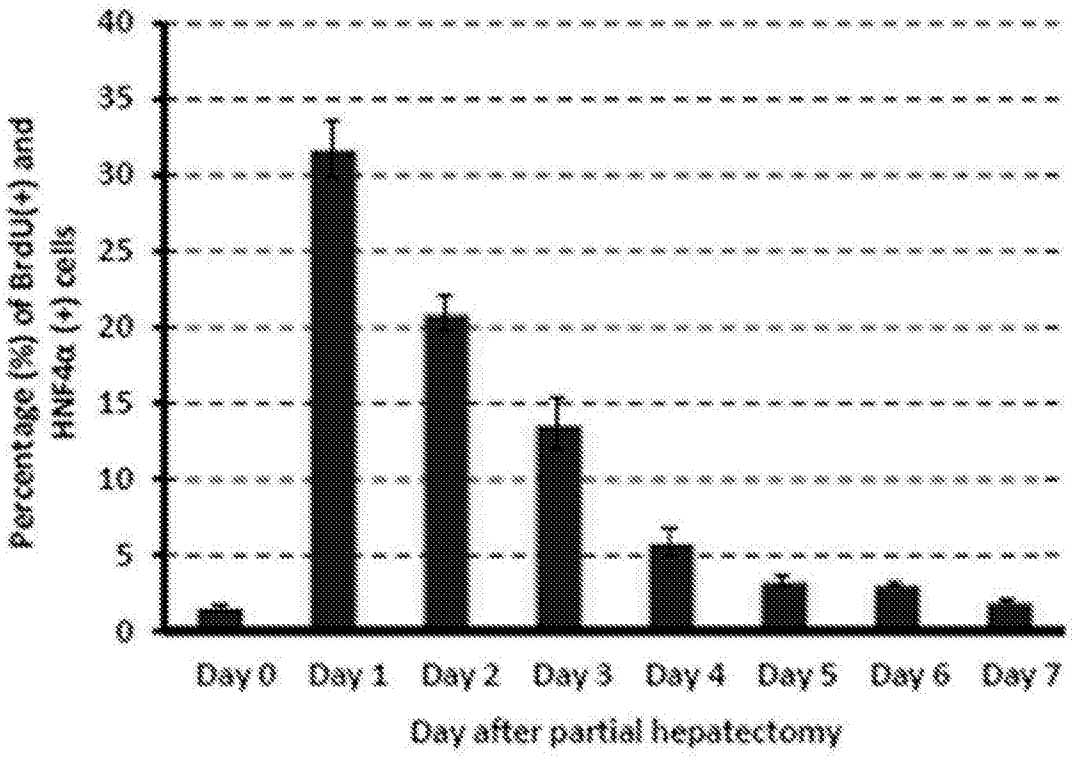
[図22]


Percentage (%) of BrdU(+) cells in hepatic cell population
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Day 0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6
Day 7
Day after partial hepatectomy

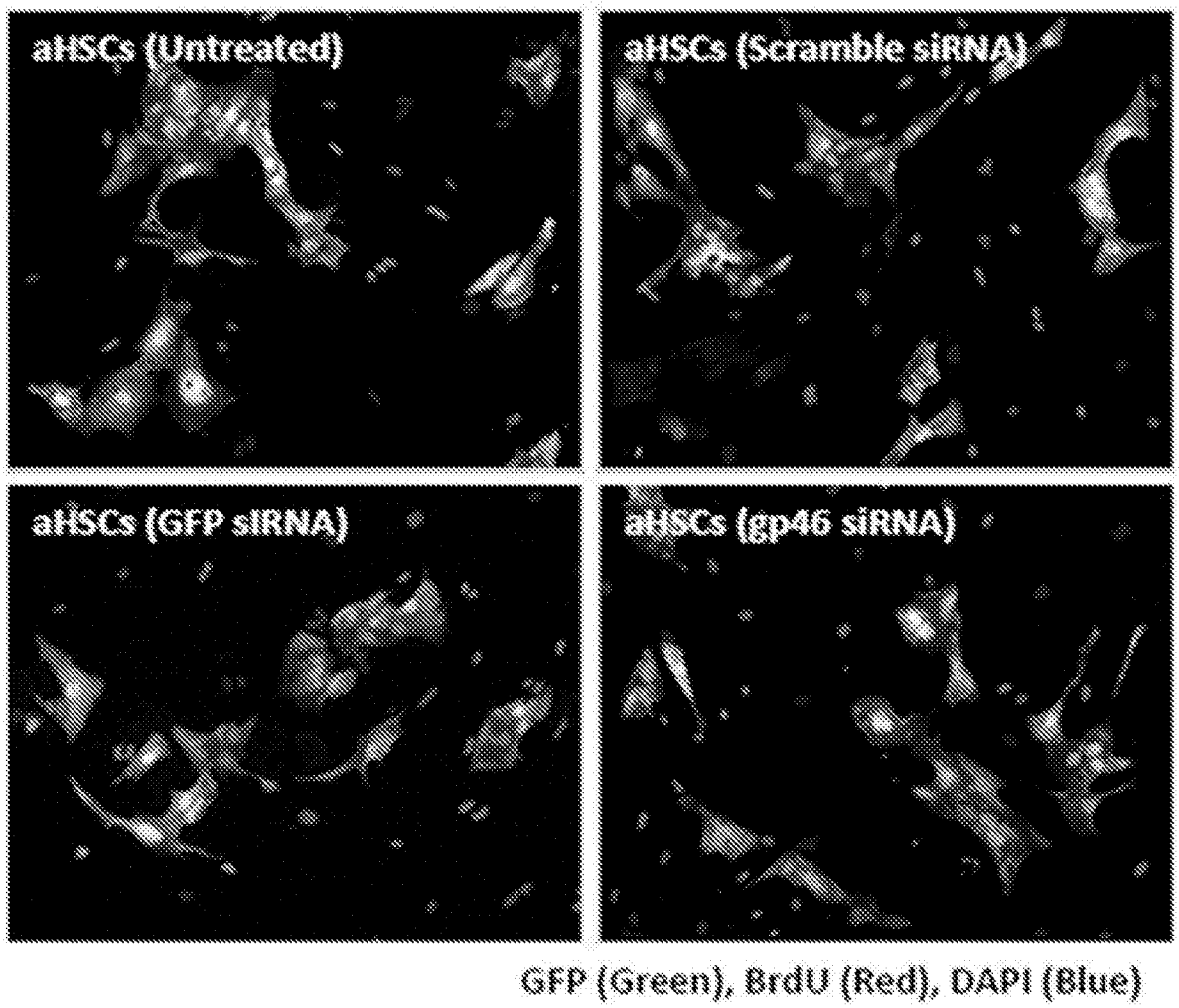
[図23]


Day 0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6
Day 7
BrdU (Green) HNF4α (Red)

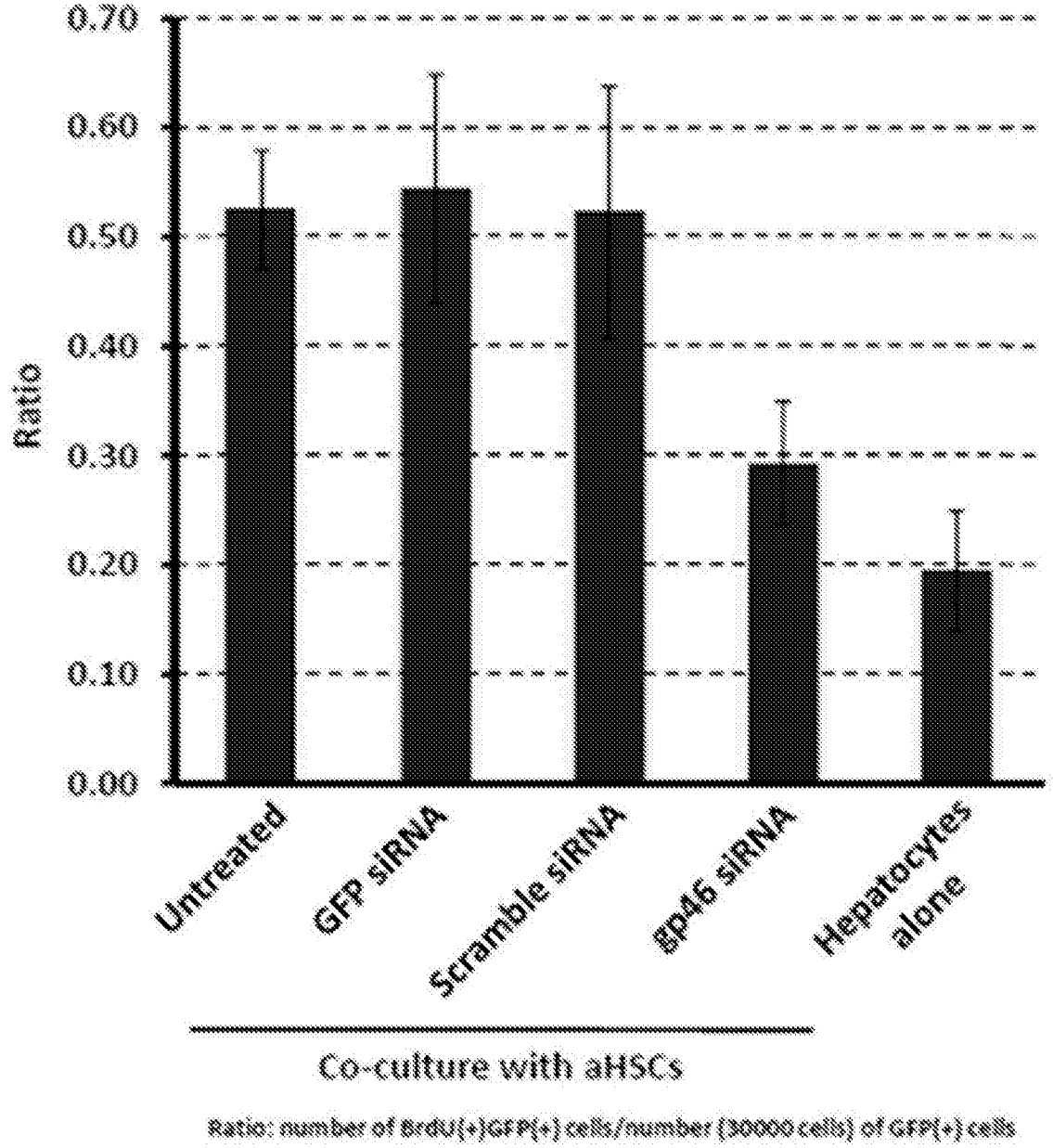
[図24]


Percentage (%) of BrdU(+) and HNF4α (+) cells
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Day 0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6
Day 7
Day after partial hepatectomy

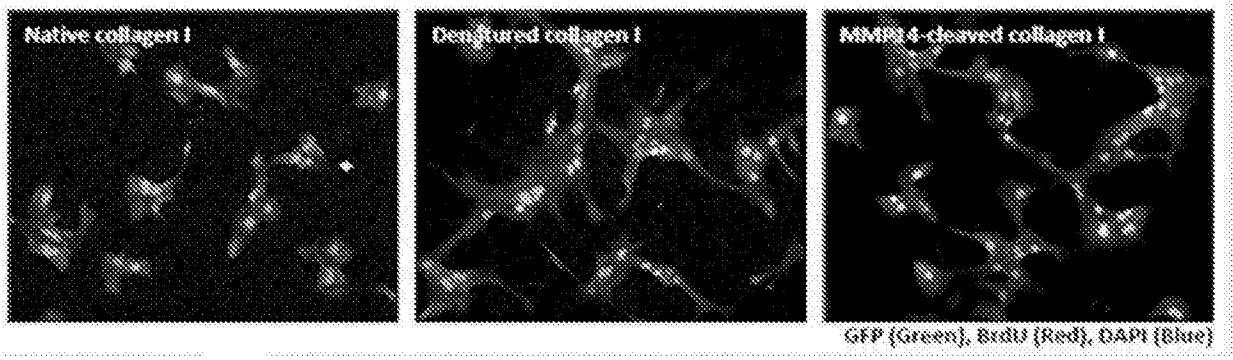
[図25]


aHSCs (Untreated)
aHSCs (Scramble siRNA)
aHSCs (GFP siRNA)
aHSCs (gp46 siRNA)
GFP (Green), BrdU (Red), DAPI (Blue)

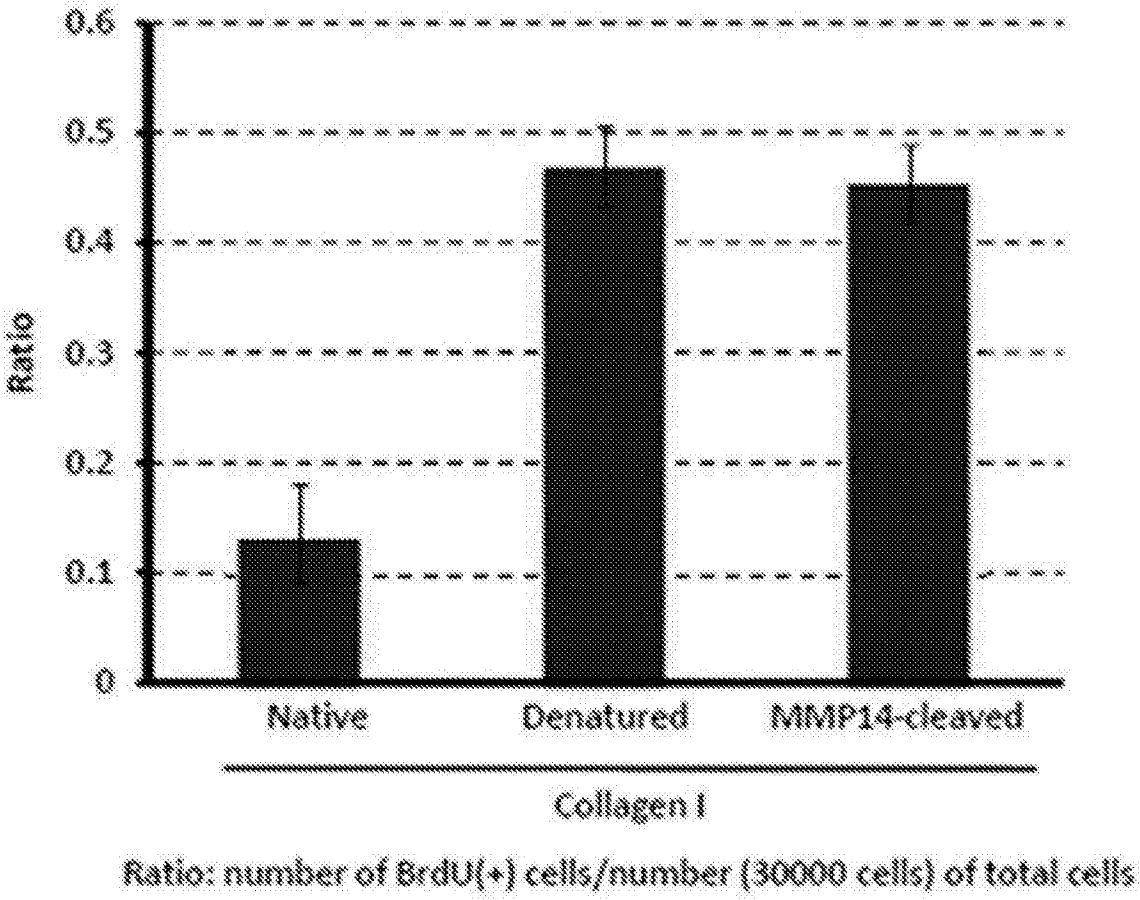
[図26]


0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
Ratio
Untreated
GFP siRNA
Scramble siRNA
gp46 siRNA
Hepatocytes alone
Co-culture with aHSCs
Ratio: number of BrdU(+)GFP(+) cells/number (30000 cells) of GFP(+) cells

[図27]

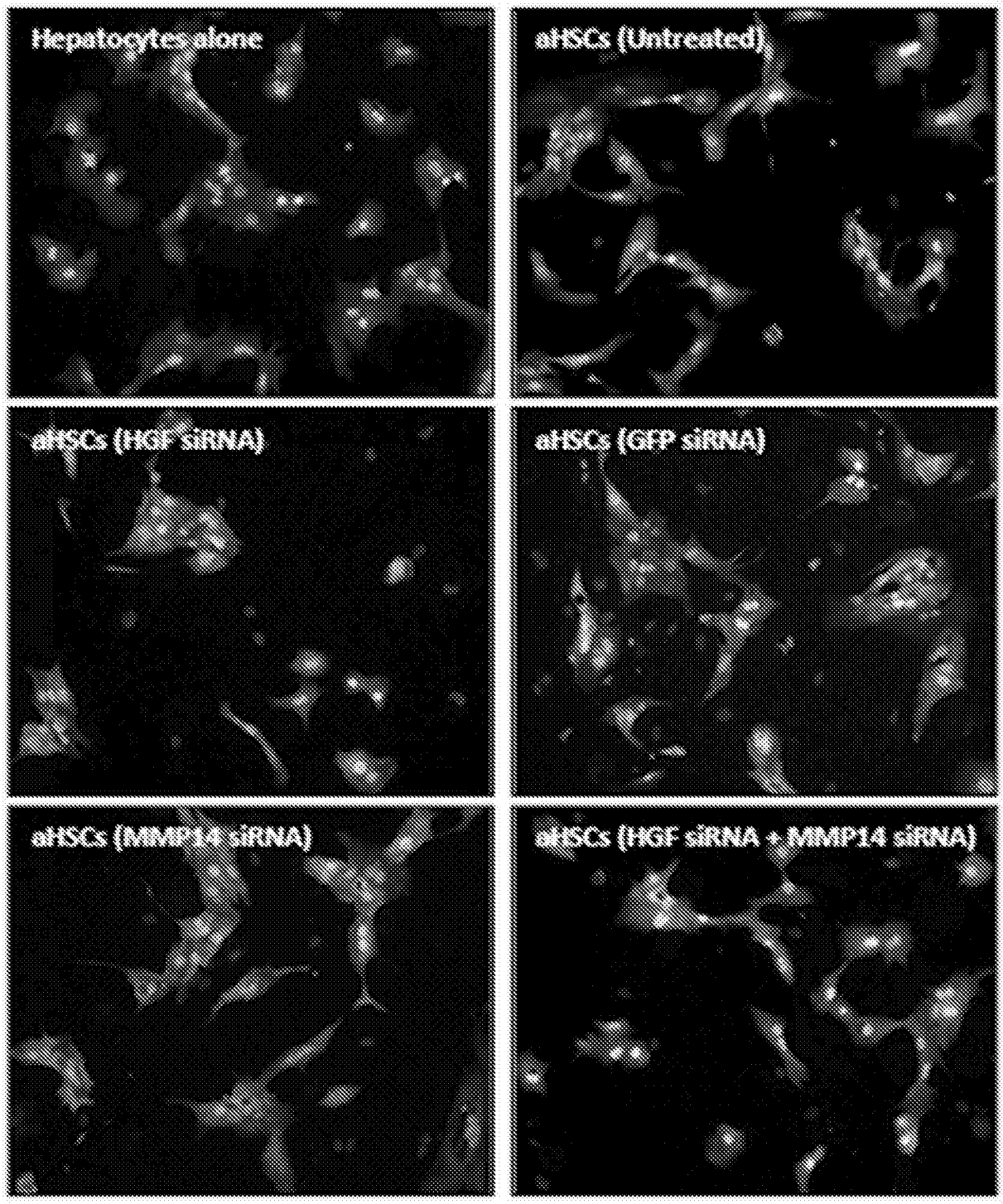

Native collagen I
Denatured collagen I
MMP-1-cleaved collagen I
GFP (Green), BrdU (Red), DAPI (Blue)

[図28]

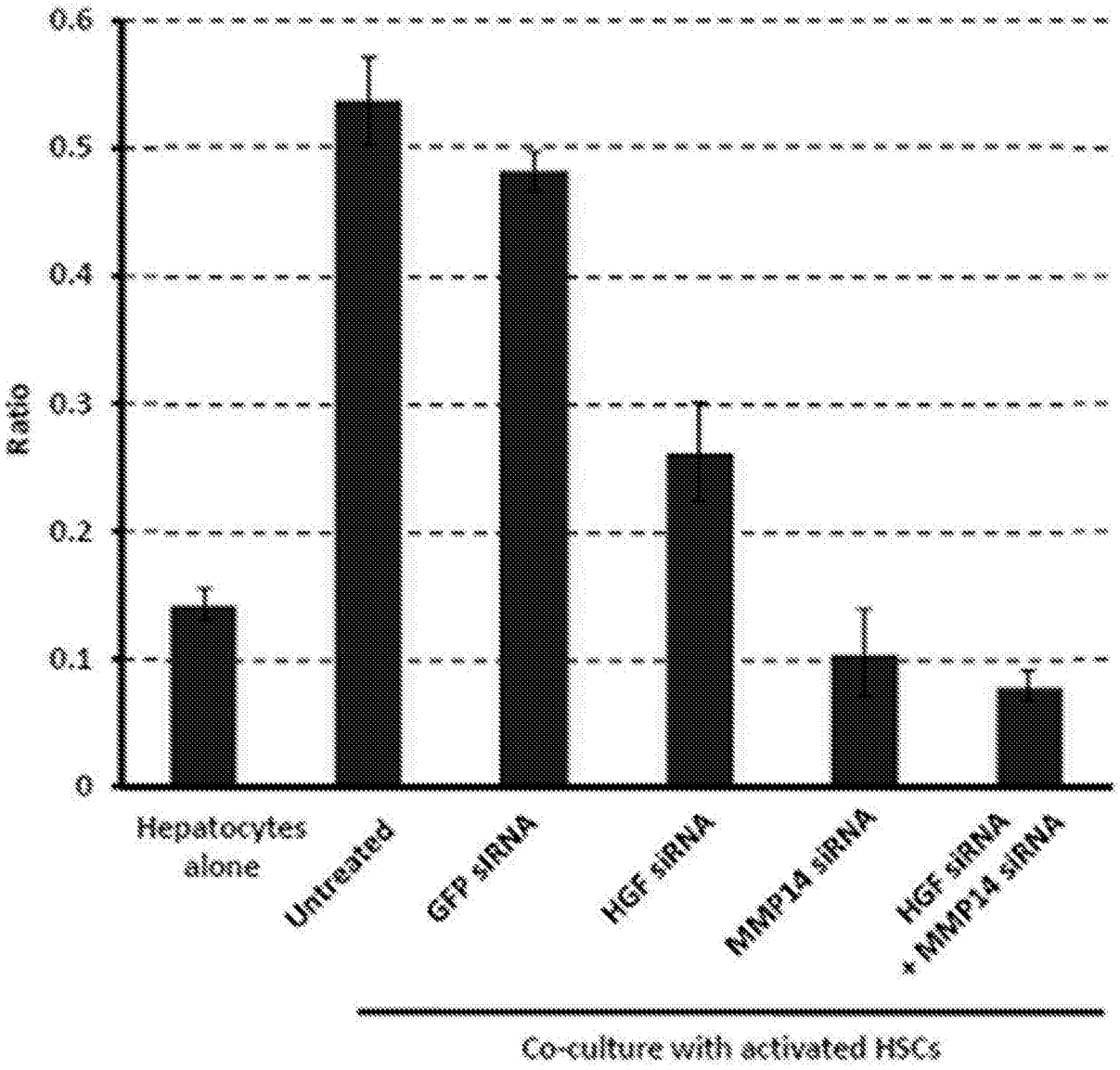


Ratio: number of BrdU(+) cells/number (30000 cells) of total cells

[図29]

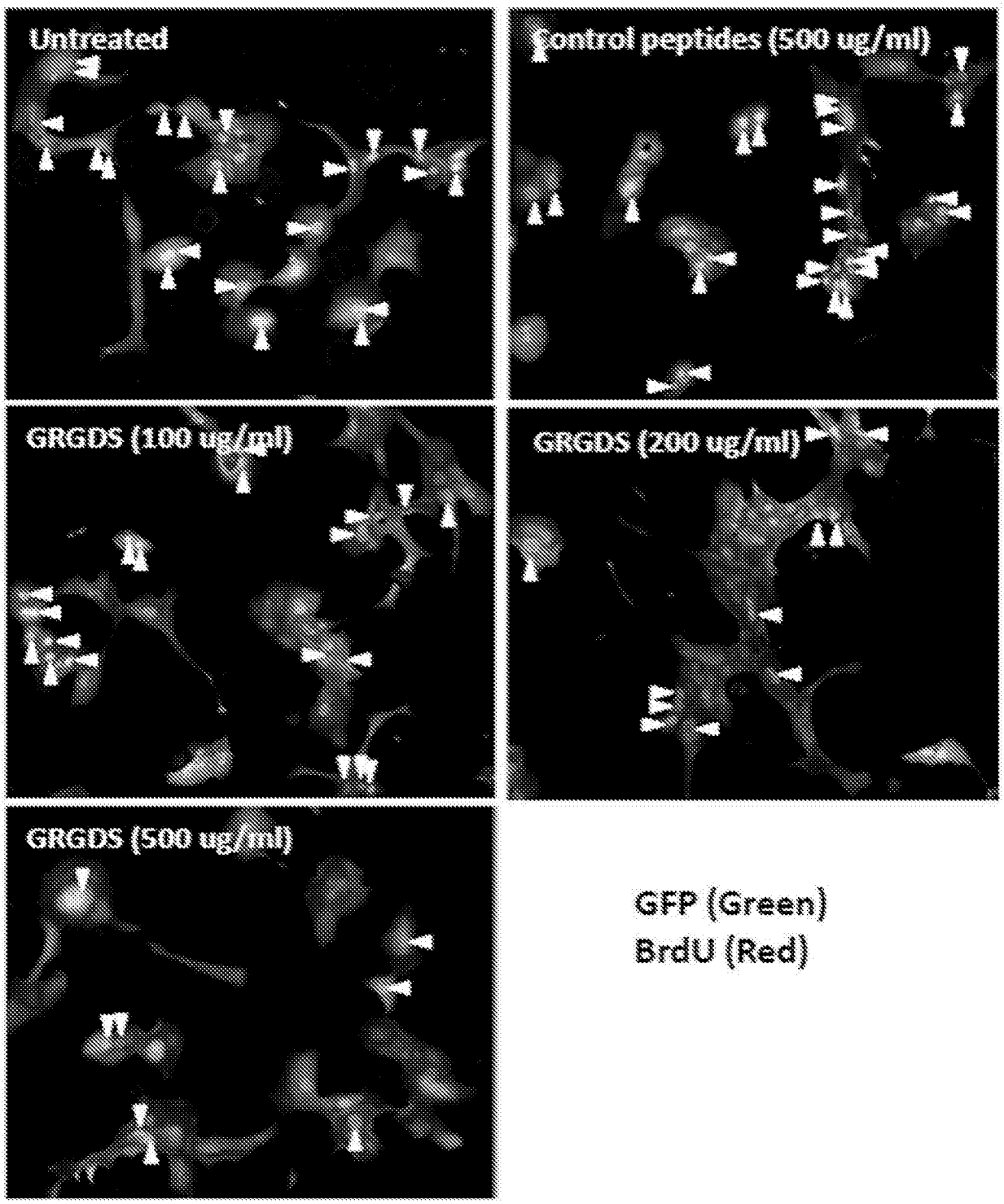

Hepatocytes alone
aHSCs (Untreated)
aHSCs (HGF siRNA)
aHSCs (GFP siRNA)
aHSCs (MMP14 siRNA)
aHSCs (HGF siRNA + MMP14 siRNA)

[図30]

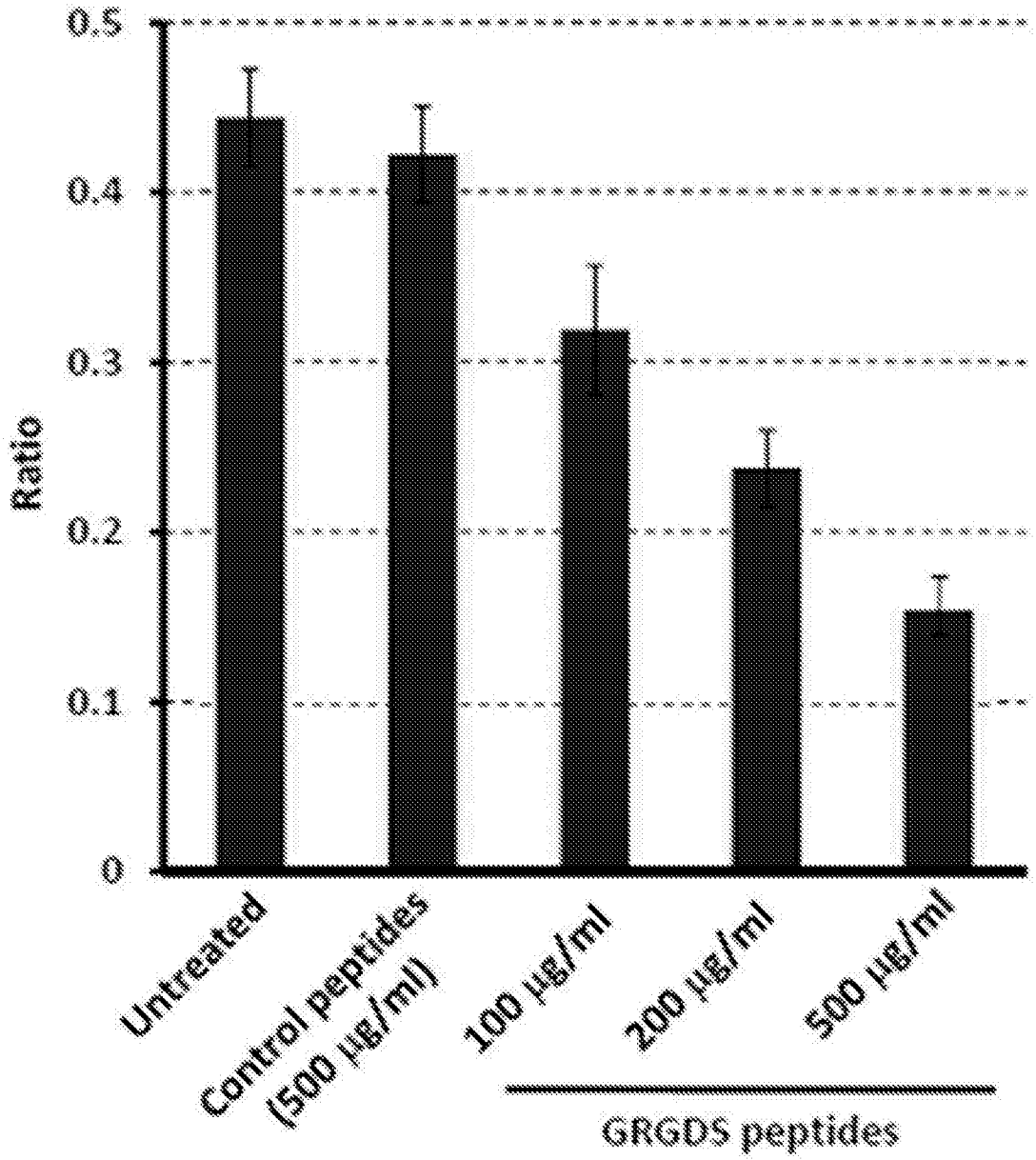


Ratio: number of GFP(+)BrdU(+) cells/number (30000 cells) of GFP(+) cells

[図31]


Untreated
Control peptides (500 ug/ml)
GRGDS (100 ug/ml)
GRGDS (200 ug/ml)
GRGDS (500 ug/ml)
GFP (Green)
BrdU (Red)

[図32]



Ratio: number of BrdU-positive hepatocytes/number of GFP-hepatocytes

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/084228

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K35/407(2006.01)i, *A61K35/12*(2006.01)i, *A61K38/00*(2006.01)i, *A61K38/17*(2006.01)i, *A61K38/43*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i, *C12M1/00*(2006.01)i

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)
A61K35/407, A61K35/12, A61K38/00, A61K38/17, A61K38/43, A61P43/00, C12M1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	WO 2012/064834 A2 (CORNELL UNIVERSITY), 18 May 2012 (18.05.2012), examples & US 2013/0224161 A1 & JP 2013-543760 A & CA 2816593 A & SG 190206 A	1-7,9,10,12,14 1-10,12,14,16,17 18,19
X Y A	JP 2008-543276 A (Minerva Biotechnologies Corp.), 04 December 2008 (04.12.2008), claims; examples & US 2006/0222637 A1 & EP 1875244 A2 & WO 2006/105448 A2 & CA 2610292 A & AU 2005336092 A	1-7,9,10,12,14 1-10,12,14,16,17 18,19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"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
"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
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 March, 2014 (18.03.14)	01 April, 2014 (01.04.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/084228

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	Yoshiro NIITSU et al., "Bunshi Saibo kara Kaimei suru Kanzo Biology Kansei Saibo o Hyoteki to shita Kankohen no Chiryo Senryaku", Experimental Medicine, 2011, 29(13), 2114 to 2122, fig. 1	1-10,12,14, 16,17 18,19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/084228

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. [x] Claims Nos.: 11,13,15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 11, 13, and 15 pertain to "methods for treatment of the human body by surgery or therapy" and thus relate to a subject matter on which it is not required to carry out an international search under the provision of PCT Rule 39.1(iv).

2. [ ] Claims 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. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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 and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０８４２２８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K35/407(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K38/17(2006.01)i, A61K38/43(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K35/407, A61K35/12, A61K38/00, A61K38/17, A61K38/43, A61P43/00, C12M1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2012/064834 A2 (CORNELL UNIVERSITY) 2012.05.18, 実施例等 & US 2013/0224161 A1 & JP 2013-543760 A & CA 2816593 A	1-7,9,10,12,14
Y	& SG 190206 A	1-10,12,14,16,17
A		18,19

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１８．０３．２０１４	０１．０４．２０１４

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｕ　４４９６
安藤　公祐
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４３９

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2008-543276 A（ミネルバ　バイオテクノロジーズ　コーポレーション）2008.12.04，請求項、実施例等	1-7,9,10,12,14
Y	& US 2006/0222637 A1 & EP 1875244 A2 & WO 2006/105448 A2 & CA 2610292 A & AU 2005336092 A	1-10,12,14,16,17
A		18,19
Y	新津洋司郎ら，分子・細胞から解明する肝臓のバイオロジー 肝星細胞を標的とした肝硬変の治療戦略，実験医学，2011，29(13)，2114-22 図１等参照	1-10,12,14,16,17
A		18,19

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０８４２２８

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☑ 請求項　11,13,15　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項11,13,15は、「手術又は治療による人体を処置する方法」であって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。

２．☐ 請求項　　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。