

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6509126号
(P6509126)

(45) 発行日 令和1年5月8日 (2019.5.8)

(24) 登録日 平成31年4月12日 (2019.4.12)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K	31/277	(2006.01)	A 6 1 K	31/277	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	

請求項の数 4 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2015-552749 (P2015-552749)
 (86) (22) 出願日 平成26年1月8日 (2014.1.8)
 (65) 公表番号 特表2016-505013 (P2016-505013A)
 (43) 公表日 平成28年2月18日 (2016.2.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/010741
 (87) 国際公開番号 W02014/110177
 (87) 国際公開日 平成26年7月17日 (2014.7.17)
 審査請求日 平成29年1月6日 (2017.1.6)
 (31) 優先権主張番号 61/750, 714
 (32) 優先日 平成25年1月9日 (2013.1.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 513205086
 インターナショナル ステム セル コー
 ポレイション
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カー
 ルズバッド プリーストリ ドライブ 5
 9 5 0
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 皮膚の再生を促進する小分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

線維芽細胞の増殖、または皮膚創傷に起因する痛みの軽減を誘導するための薬剤の調製における、S L 3 2 7 の使用。

【請求項 2】

線維芽細胞がヒト皮膚線維芽細胞 (h D F) の細胞である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

S L 3 2 7 が、少なくとも0.024 μ Mの濃度で投与される、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

S L 3 2 7 が、少なくとも0.024 μ M、0.098 μ M、0.195 μ M、0.391 μ M、0.781 μ M、または1.563 μ Mの濃度で投与される、請求項 1 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第 1 1 9 条 (e) の下、2 0 1 3 年 1 月 9 日に提出された米国特許出願第 6 1 / 7 5 0 , 7 1 4 号の優先権の利益を主張し、その全体が参照することにより本出願に援用される。

【0 0 0 2】

発明の分野

本発明は、概して皮膚再生および創傷治癒に関するものであり、より具体的には、ヒト皮膚線維芽細胞の増殖およびタンパク質産生の増加の高分子媒介性誘導に関する。

【背景技術】

【0003】

背景情報

脊椎動物の身体最大の器官である皮膚は、複雑な神経および血液供給を伴う表皮および真皮から構成される。第三層、皮下組織は、主に脂肪と疎性結合組織の層で構成されている。これらの三層は、創傷等の任意の機械的損傷から身体を保護する上で重要な役割を果たしている。

【0004】

表皮の下に直接位置する真皮は、皮膚の大部分を構成し、いくつかのエラスチンおよびグリコサミノグリカン（GAG）を伴うコラーゲンで構成されている。真皮に存在する主要な細胞タイプは、創傷治癒過程において重要な役割を果たしているプロテアーゼおよびコラゲナーゼ等のリモデリング酵素を生産することができる線維芽細胞である。

【0005】

創傷の治癒は、逐次機構であり、より具体的にはイベント駆動型のプロセスであり、一つの細胞型からの信号が他の細胞型のカスケードを始動し、創傷を治癒の段階に推進する。大人の創傷治癒は本質的に修復プロセスであり、瘢痕を通常示す。組織修復は、損傷部位でフィブリン塊沈着からすぐに開始され、損傷した血管からの出血を防ぐ。次に循環血小板が損傷部位で凝集し、PDGF、TGF- α およびTGF- β 、上皮成長因子（EGF）ならびにFGF等の種々の炎症性メディエーターが放出される。これらの分子はまた、創傷修復プロセスの下流で主な役割を果たしていると考えられている。

【0006】

創傷への成体組織の炎症反応は、好中球の初期流入を特徴とし、その数は着実に増加し、創傷後24～48時間で最大に達する。好中球数が減少し始めると、マクロファージが引き継ぎ、創傷部位を埋め直す。再上皮化も同時に起こり、ケラチノサイトが真皮および創傷縁の基底細胞内の深層から肉芽組織全体に移動する。ケラチノサイトは皮膚のバリア性を再確立するとすぐに、接触阻止で基底細胞の表現型を再開し、重層扁平角化表皮に分化する。

【0007】

炎症反応および上皮化の最終段階は、線維芽細胞および内皮細胞の移動ならびに肉芽組織の形成と一致する。これにより、血管形成および線維増殖が起こり、線維芽細胞が優勢な細胞型になり、コラーゲンおよびECMを蓄える。コラーゲンのリモデリングは、線維芽細胞およびマクロファージにより産生されるマトリックスメタロプロテアーゼを用いて起こる。

【0008】

真皮線維芽細胞は、細胞複製を行うために、はるかに高い濃度の線維芽細胞成長因子（FGF）を必要とし、ECM作成に責任を担い、表皮の重層扁平上皮細胞を統一された組織へと組織化する。さらに、真皮線維芽細胞は、身体の筋膜に皮膚を固着させる長い線維帯の結合組織を作成する。皮膚線維芽細胞がないと、創傷部位は、細胞外マトリックスを再生成することができず、表皮の皮膚細胞が創傷部位の上に増殖することができない。そのため、皮膚線維芽細胞がないと、皮膚は負傷から適切に回復することができない。

【0009】

ヒトの場合、皮膚は体重の約10分の1であり、この主要な臓器の一部への外傷、疾患、火傷または手術等の損傷は劇的な結果を有する。組織工学による皮膚代替物が、急性および慢性の皮膚創傷の防除に使用されている。組織工学は、罹患または損傷した組織または臓器を交換するための新しい生体材料を再生することを目指している。これを達成するために、細胞源だけでなく、細胞を担持することができる人工細胞外マトリックス（ECM）も必要とされている。

【0010】

10

20

30

40

50

コラーゲンおよびフィブロネクチン等の天然の生体高分子が、細胞が付着することができる生体材料の潜在的な供給源として研究されてきた。組織工学に使用される第1世代の分解性ポリマーは、他の外科的用途から適合化され、機械的および分解特性の点で欠点を有する。これは主に、インサイチュで細胞および/または分子を送達する方法、いわゆるスマートマトリックス技術として、合成分解性ゲルの開発につながった。組織または臓器の修復は通常、瘢痕の産生をもたらす線維化反応を伴う。しかしながら、特定の哺乳動物組織は、瘢痕化のない完全な再生能力を有し、好例として、胚または胎児の皮膚およびMRL/MpJマウスの耳が挙げられる。これらのモデル系の研究は、このような完全な再生を達成するために、線維化および瘢痕化の程度がなくなるように、炎症応答が改変されることを明らかにした。

10

【0011】

真皮線維芽細胞は、ECM沈着、上皮と間葉との相互作用および創傷治癒に重要な役割を有する動的な細胞集団である。線維芽細胞は、実験室で容易に培養され、組織工学による皮膚代替物への線維芽細胞の組み込みは、症状の痛みの軽減、急性および慢性創傷のより迅速な治癒、より少ない瘢痕化、より良い美容的結果を含む有望な結果を生み出している。しかしながら、現時点では、無傷の皮膚の解剖学、生理学、生物学的安定性または美的性質を完全に複製する生物学処理された皮膚のモデルはない。

【0012】

種々の組織工学皮膚製品は、特定の臨床用途のための特定の製品を識別することができるように、多施設臨床試験で比較する必要がある。これは、潜在的に、指定した製品の使用が増加した後にコストの削減につながる可能性がある。さらに、サイトカインおよび増殖因子と組織工学による皮膚代替物の組み合わせは、将来的に、創傷治癒を高めるだけでなく、デフェンシンを抗菌性の利益のために組み込む可能性を与えるために使用しうる。したがって、材料技術がインテリジェント・デザインに基づくだけでなく、再生プロセスに関与する分子にも基づく、皮膚代替物を産生するための新規のアプローチの必要性がある。

20

【発明の概要】

【0013】

本発明は、特定の小分子が、線維芽細胞の増殖を誘導し、および/またはタンパク質産生を増加させるという、将来性ある発見に基づく。

30

【0014】

対象の線維芽細胞の増殖を誘導する方法を、本明細書において提供する。この方法は、線維芽細胞の増殖を誘導する有効量の小分子を対象に投与することを含む。特定の態様では、小分子はSL 327、ABT 702、フェノバム(fenobam)、SX 011、フィゾスチグミン硫酸塩(physostigmine hemisulfate)またはNBQXである。

【0015】

また、対象のタンパク質の分泌を増加させる方法を、本明細書において提供する。この方法は、タンパク質の分泌を増加させる有効量の小分子を対象に投与することを含む。

【0016】

40

特定の態様では、成長因子はEGF、FGF7/KGF、TGFβまたはコラーゲンIである。他の態様では、小分子は、CY 208-243、CD 439、T 0156塩酸塩、CD 1530、PSB 06126、プロスタグランジンE2、LY 294002塩酸塩、KB-R7943メシル酸塩、プロキシファンシュー酸塩、m-3M3FBS、ジピリダモール、メチルリカコニチンクエン酸塩、WIN 64338、フマル酸クレマスチンまたはシロスタゾールである。

【0017】

一実施形態では、タンパク質はEGFであり、小分子はCY 208-243、CD 439、T 0156塩酸塩、CD 1530およびPSB 06126からなる群から選択される。別の実施形態では、タンパク質はFGF7/KGFであり、小分子はプロス

50

タグランジン E 2 である。さらなる実施形態では、タンパク質は T G F β であり、小分子は、L Y 2 9 4 0 0 2 塩酸塩、K B - R 7 9 4 3 メシル酸塩、プロキシファンシュウ酸塩および m - 3 M 3 F B S からなる群から選択される。さらに別の実施形態では、タンパク質はコラーゲン I であり、小分子はジピリダモール、メチルリカコニチンクエン酸塩、W I N 6 4 3 3 8、フマル酸クレマスチンおよびシロスタゾールからなる群から選択される。

【 0 0 1 8 】

皮膚の再生を促進するための方法を本明細書において提供する。この方法は、線維芽細胞の増殖を誘導するか、またはタンパク質の分泌を増加させる有効量の化合物を、対象に投与することを含む。特定の態様では、タンパク質は、E G F、F G F 7 / K G F、T G F β またはコラーゲン I である。特定の態様では、線維芽細胞の増殖を誘導する小分子は、S L 3 2 7、A B T 7 0 2、フェノバム、S X 0 1 1、フィゾスチグミン硫酸塩または N B Q X である。他の態様では、タンパク質の分泌を増加させる小分子は、C Y 2 0 8 - 2 4 3、C D 4 3 9、T 0 1 5 6 塩酸塩、C D 1 5 3 0、P S B 0 6 1 2 6、プロスタグランジン E 2、L Y 2 9 4 0 0 2 塩酸塩、K B - R 7 9 4 3 メシル酸塩、プロキシファンシュウ酸塩、m - 3 M 3 F B S、ジピリダモール、メチルリカコニチンクエン酸塩、W I N 6 4 3 3 8、フマル酸クレマスチンまたはシロスタゾールである。

【 0 0 1 9 】

特定の実施形態では、対象はヒトである。他の実施形態では、細胞はインビトロの細胞培養中にある。このような細胞は、ヒト皮膚線維芽細胞 (h D F) の細胞を含む。以下に、本発明の基本的な諸特徴および種々の態様を列挙する。

[1]

線維芽細胞の増殖を誘導する有効量の小分子を対象に投与する工程を含む、線維芽細胞の増殖をインビトロまたはインビボで対象において誘導する方法。

[2]

対象がヒトである、[1] に記載の方法。

[3]

線維芽細胞がヒト皮膚線維芽細胞 (h D F) の細胞である、[1] に記載の方法。

[4]

小分子が、S L 3 2 7、A B T 7 0 2、フェノバム、S X 0 1 1、フィゾスチグミン硫酸塩および N B Q X からなる群から選択される、[1] に記載の方法。

[5]

タンパク質分泌を増加させる有効量の小分子を対象に投与する工程を含む、対象のタンパク質の分泌を増加させる方法。

[6]

対象がヒトである、[5] に記載の方法。

[7]

線維芽細胞がヒト皮膚線維芽細胞 (h D F) の細胞である、[5] に記載の方法。

[8]

タンパク質が、E G F、F G F 7、K G F、T G F β およびコラーゲンからなる群から選択される、[5] に記載の方法。

[9]

小分子が、C Y 2 0 8 - 2 4 3、C D 4 3 9、T 0 1 5 6 塩酸塩、C D 1 5 3 0、P S B 0 6 1 2 6、プロスタグランジン E 2、L Y 2 9 4 0 0 2 塩酸塩、K B - R 7 9 4 3、メシル酸塩、プロキシファンシュウ酸塩、m - 3 M 3 F B S、ジピリダモール、メチルリカコニチンクエン酸塩、W I N 6 4 3 3 8、フマル酸クレマスチンおよびシロスタゾールからなる群から選択される、[5] に記載の方法。

[1 0]

タンパク質が E G F であり、小分子が、C Y 2 0 8 - 2 4 3、C D 4 3 9、T 0

10

20

30

40

50

1 5 6 塩酸塩、C D 1 5 3 0 および P S B 0 6 1 2 6 からなる群から選択される、[5] に記載の方法。

[1 1]

タンパク質が F G F 7 / K G F であり、小分子がプロスタグランジン E 2 である、[5] に記載の方法。

[1 2]

タンパク質が T G F β であり、小分子が、L Y 2 9 4 0 0 2 塩酸塩、K B - R 7 9 4 3 メシル酸塩、プロキシファンシュウ酸塩および m - 3 M 3 F B S からなる群から選択される、[5] に記載の方法。

[1 3]

タンパク質がコラーゲン I であり、小分子が、ジピリダモール、メチルリカコニチンクエン酸塩、W I N 6 4 3 3 8、フマル酸クレマスチンおよびシロスタゾールからなる群から選択される、[5] に記載の方法。

[1 4]

線維芽細胞の増殖を誘導する有効量の化合物を対象に投与する工程を含む、皮膚の再生を促進する方法。

[1 5]

対象がヒトである、[1 4] に記載の方法。

[1 6]

線維芽細胞が皮膚線維芽細胞 (h D F) の細胞である、[1 4] に記載の方法。

[1 7]

小分子が、S L 3 2 7、A B T 7 0 2、フェノバム、S X 0 1 1、フィゾスチグミン硫酸塩および N B Q X からなる群から選択される、[1 4] に記載の方法。

[1 8]

タンパク質分泌を増加させる有効量の化合物を対象に投与する工程を含む、皮膚の再生を促進する方法。

[1 9]

タンパク質が、E G F、F G F 7 / K G F、T G F β およびコラーゲンからなる群から選択される、[1 9] に記載の方法。

[2 0]

タンパク質が、C Y 2 0 8 - 2 4 3、C D 4 3 9、T 0 1 5 6 塩酸塩、C D 1 5 3 0、P S B 0 6 1 2 6、プロスタグランジン E 2、L Y 2 9 4 0 0 2 塩酸塩、K B - R 7 9 4 3 メシル酸塩、プロキシファンシュウ酸塩、m - 3 M 3 F B S、ジピリダモール、メチルリカコニチンクエン酸塩、W I N 6 4 3 3 8、フマル酸クレマスチンおよびシロスタゾールからなる群から選択される、[1 9] に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 0 】

【図 1】ハイスルーブット皮膚線維芽細胞アッセイスクリーニングの模式図である。

【図 2】投与量の関数として線維芽細胞の増殖を誘導する小分子を示すグラフである。

【図 3】投与量の関数として E G F 発現を誘導する小分子を示すグラフである。

【図 4】投与量の関数として F G F 7 / K G F 発現を誘導する小分子を示すグラフである。

。

【図 5】投与量の関数として T G F β 発現を誘導する小分子を示すグラフである。

【図 6】投与量の関数としてコラーゲン I 発現を誘導する小分子を示すグラフである。

【図 7】誘導されたエラスチンタンパク質の発現を図示する。

【図 8】ジメチルスルホキシドの関数として細胞毒性を示すグラフである。

【図 9】D M S O、レチノールおよび小分子 C G P 7 1 6 8 3 の関数として、相対的なエラスチンの発現を表す棒グラフである。

【図 10】D M S O、レチノールおよび小分子 C G P 7 1 6 8 3 の関数として、相対的なコラーゲン 1 a の発現を表す棒グラフである。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0021】

発明の詳細な説明

皮膚線維芽細胞は、コラーゲンの生産に責任を担う皮膚細胞であり、皮膚バリアの完全性および創傷治癒を促進する結合組織の線維および成長因子の形成に寄与する。正常な創傷治癒では、線維芽細胞が周囲の無傷の組織から肉芽組織へ補充され、創傷流体中で提示された様々な因子に反応して、新しい真皮層を増殖し再生する。正常な老化の間、真皮線維芽細胞は、増殖する能力と、正常な創傷治癒に関与する成長因子（例えば、EGF、FGF7/KGF、TGF β 、コラーゲン）を分泌する能力の両方を失う。線維芽細胞の増殖を促進し、タンパク質の分泌（例えば、EGF、FGF7/KGF、TGF β 、コラーゲン）を増加させる小分子を同定するために設計されたハイスループットスクリーニングを、本明細書に記載する。

10

【0022】

成長因子は、細胞の成長、増殖および細胞分化を刺激することができる天然に存在する物質である。成長因子は、種々の細胞プロセスを調節するために重要である。成長因子は、典型的には、細胞間のシグナル伝達分子として作用する。例は、それらの標的細胞の表面の特定の受容体に結合するサイトカインおよびホルモンである。多くの場合、それらは細胞の分化および成熟を促進し、成長因子の間で変化する。例えば、骨形成タンパク質は骨細胞の分化を刺激し、線維芽細胞成長因子および血管内皮増殖因子は血管分化（血管新生）を刺激する。成長因子および成長因子のファミリーの例として、限定されないが、アドレノメデュリン（AM）、アンジオポエチン（Ang）、自己分泌型細胞運動刺激因子、骨形成タンパク質（BMP）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、上皮成長因子（EGF）、エリスロポエチン（EPO）、線維芽細胞成長因子（FGF）、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、成長分化因子9（GDF9）、肝細胞増殖因子（HGF）、肝癌由来細胞成長因子（HDGF）、インスリン様成長因子（IGF）、移動刺激因子、ミオスタチン（GDF-8）、神経成長因子（NGF）、他のニューロトロフィン、血小板由来成長因子（PDGF）、トロポポエチン（TPO）、形質転換成長因子アルファ（TGF- α ）、転換成長因子ベータ（TGF- β ）、腫瘍壊死因子アルファ（TNF- α ）、血管内皮増殖因子（VEGF）、Wntシグナル伝達経路、胎盤成長因子（PLGF）、ウシ胎仔成長ホルモン（FBS）、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、bFGFおよびVEGFが挙げられる。

20

30

【0023】

線維芽細胞は可溶性因子を分泌し、これらの因子は、覆っている表皮まで拡散して、傍分泌様式でケラチノサイトに影響を及ぼし、自己分泌および傍分泌作用を有するサイトカインおよび成長因子を放出する。自己分泌活性は、トランスフォーミング増殖因子（TGF）- β 誘導性の合成と、コラーゲン合成および線維芽細胞増殖を促進する結合組織成長因子の分泌とを含む。傍分泌活性は、特にケラチノサイト増殖因子（KGF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターロイキン（IL）-6および線維芽細胞増殖因子（FGF）-10の線維芽細胞の分泌を介して、ケラチノサイトの増殖および分化に影響を与える。呼応して、ケラチノサイトはIL-1および副甲状腺ホルモン関連ペプチドを合成し、そしてこれらがKGFを生産するよう線維芽細胞を刺激する、つまり、二重の傍分泌ループが存在する。さらに、単独で培養されたケラチノサイトはIL-1の発現が比較的弱い、線維芽細胞と共培養した場合、IL-1およびc-Junの発現の増加を示す。したがって、皮膚基質に取り込まれた線維芽細胞は、ECMおよび刺激成長因子の生産の役割を担い、表皮形成を支持し、創傷治癒を促進するために最適な環境を提供する。

40

【0024】

線維芽細胞の密度は、正常な上皮の形態の発達およびケラチノサイト分化に関して考慮すべき重要な因子であり、依然として最適な密度を確立する必要がある。線維芽細胞は基

50

底膜の形成にも寄与し、これは部分的には、コラーゲンタイプⅠⅤおよびⅤⅠⅠ、ラミニンⅤおよびナイドジェンを生産することによるが、基底膜成分を生産するケラチノサイトを刺激するサイトカインの分泌を介して寄与している。線維芽細胞によって分泌されたTGF-βは、ケラチノサイトによるコラーゲンタイプⅠⅤおよびⅤⅠⅠの合成を誘導する。

【0025】

血管新生およびリンパ脈管新生もまた、正常な皮膚の恒常性の維持および創傷治癒のための重要なプロセスであり、線維芽細胞はこれに重要な傍分泌の役割を有する。血管内皮増殖因子(VEGF)ファミリーのメンバーとして、VEGF-A、-B、-Cおよび-Dが挙げられ、これらは、正常なヒト線維芽細胞によって生産され、特異的な受容体を介した血管およびリンパ内皮細胞増殖の調節に重要である。VEGF-Aは、脈管形成が可能な常駐内皮細胞および内皮前駆細胞の活性化に関与することが周知であり、VEGF-Bは、内皮細胞についての分裂促進性が低く、VEGF-Cおよび-Dは、同一の受容体特異性を有し、VEGF受容体2(VEGF-R2)に結合して血管新生を媒介し、また、VEGF-R3に結合してリンパ脈管新生に影響を与える。

10

【0026】

FGF-1は、身体自身の粘着組織が発達し、効果的に傷口を塞ぐように促し、それによって感染を妨害し、瘢痕形成を軽減する。線維芽細胞の活性を刺激するためにFGFを使用することは、結合組織を構成するコラーゲンの強固な性質によって、組織を塞ぐ有効な手段である。組織と一緒に塞ぐために、ヒトの身体は、優れたせん断強度を得るためにコラーゲンおよびエラスチンを使う。Ⅰ型コラーゲンは、強力な線維に束ねられたコラーゲン鎖を含み、その構造的完全性を増大させる独特の三らせん構造を有する。

20

【0027】

以下の実施例は例示であり、本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0028】

実施例1

ヒト皮膚線維芽細胞(hDF)の増殖のためのハイスループット増殖スクリーニングアッセイ

【0029】

30

増殖アッセイのために、ヒト皮膚線維芽細胞(hDF)を、96ウェルの黒色/透明底の組織培養処理プレート(Corning)に、DMEM(Gibco)、15%FBS(Hyclone)中1,000細胞/ウェルの割合で播種した。翌日、2.5μMの最終濃度で、小分子ライブラリー(Tocris 1120 Biologically Active Compounds)で細胞を処理した。処理から3日後、細胞を固定し、DAPIで染色し、Roche Cellavista High-Content Imaging System(図1参照)を用いて分析した。

【0030】

ハイスループット増殖スクリーニングアッセイから、ABT702二塩酸塩(アデノシンキナーゼアンタゴニスト)、フェノバム(mGlu₅受容体アンタゴニスト)およびSx011(p38 MAPKアンタゴニスト)が、200nMの濃度でhDFに最も高い増殖レベルを誘導したことを認めた(図2参照)。

40

【0031】

実施例2

FGF7生産のためのハイスループットスクリーニングアッセイ

【0032】

FGF7生産アッセイのために、96ウェルのクリア組織培養処理プレート(Falcon)に、DMEM(Gibco)1×N2/B27 Supplement(Invitrogen)中、19,000細胞/ウェルの割合で、hDFを播種した。翌日、2.5μMの最終濃度で、小分子ライブラリー(Tocris 1120 Biologi

50

cally Active Compounds)で細胞を処理した。処理から3日後、上清を回収し、FGF7ヒトELISAキット(Abcam)およびBioTek Synergy 2 Multi-Detection Microplate Readerを使用してFGF7含量を分析した(図1参照)。

【0033】

FGF7生産アッセイのためのハイスループットスクリーニングアッセイから、プロスタグランジンE₂が、25 μMの濃度でhDFに最も高い生産レベルのFGF7を誘導したことを認めた(図3参照)。

【0034】

実施例3

10

TGFβ1生産のためのハイスループットスクリーニングアッセイ

【0035】

TGFβ1生産アッセイのために、96ウェルのクリア組織培養処理プレート(Falcon)に、DMEM(Gibco)1×N2/B27 Supplement(Invitrogen)中、19,000細胞/ウェルの割合でhDFを播種した。翌日、2.5 μMの最終濃度で、小分子ライブラリー(Tocris 1120 Biologically Active Compounds)で細胞を処理した。処理から3日後、上清を回収し、TGFβ1ヒトELISAキット(Abcam)およびBioTek Synergy 2 Multi-Detection Microplate Readerを使用して、TGFβ1含量を分析した(図1参照)。

20

【0036】

TGFβ1生産アッセイのためのハイスループットスクリーニングアッセイから、24 nMの濃度のプロキシファンシュウ酸塩(ヒスタミンH₃受容体シグナル伝達アゴニスト)、24 nMの濃度のm-3M3FBS(ホスホリパーゼCシグナル伝達)、1.6 μMの濃度でKB-R7943メシル酸塩、および98 nMの濃度でLY294002塩酸塩が、hDFに最も高い生産レベルのTGFβ1を誘導したことを認めた(図4参照)。

【0037】

実施例4

EGF生産のためのハイスループットスクリーニングアッセイ

【0038】

30

EGF生産アッセイのために、96ウェルのクリア組織培養処理プレート(Falcon)に、DMEM(Gibco)1×N2/B27 Supplement(Invitrogen)中、19,000細胞/ウェルの割合でhDFを播種した。翌日、2.5 μMの最終濃度で、小分子ライブラリー(Tocris 1120 Biologically Active Compounds)で細胞を処理した。処理から3日後、上清を回収し、EGFヒトELISAキット(Abcam)およびBioTek Synergy 2 Multi-Detection Microplate Readerを使用してEGF含量を分析した(図1参照)。

【0039】

EGF生産アッセイのためのハイスループットスクリーニングアッセイから、25および12.5 μMの濃度でCD 437およびCD 1530(レチノイドRARシグナル伝達アゴニスト)、12.5 μMの濃度でCY 208-243(ドーパミンD1受容体アゴニスト)、および12.5 μMの濃度でPSB 06126(NTPDase 3アンタゴニスト)が、hDFに最も高い生産レベルのEGFを誘導したことを認めた(図5参照)。

40

【0040】

実施例5

1型コラーゲン生産のためのハイスループットスクリーニングアッセイ

【0041】

1型コラーゲン生産アッセイのために、96ウェルのクリア組織培養処理プレート(F

50

alcon)に、DMEM(Gibco)1×N2 Supplement(Invitrogen)中、5,000細胞/ウェルの割合でhDFを播種した。翌日、2.5 μ Mの最終濃度で、小分子ライブラリー(Tocris 1120 Biologically Active Compounds)で細胞を処理した。処理から3日後、上清を回収し、プロコラーゲンタイプ1C-ペプチドEIAキット(Takara)およびBioTek Synergy 2 Multi-Detection Microplate Readerを使用して1型コラーゲン含量について解析した(図1参照)。

【0042】

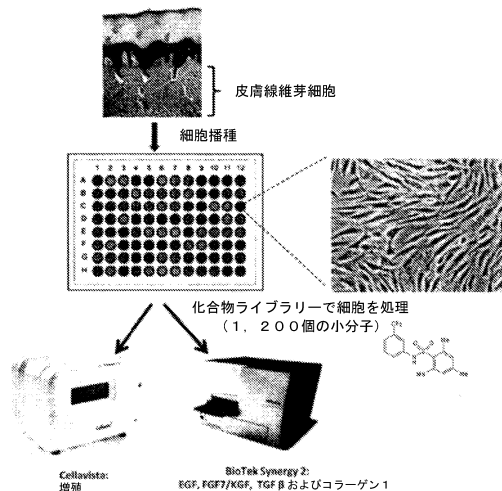
1型コラーゲンアッセイのためのハイスループットスクリーニングアッセイから、390 nMの濃度でジピリダモール(アデノシン輸送阻害剤)、390 nMの濃度でメチルリ
10
カコニチンクエン酸塩(α 7ニューロンニコチン受容体アンタゴニスト)、6.25 μ Mの濃度でシロスタゾール(PDE3Aアンタゴニスト)、780 nMの濃度でフマル酸クレマスチン(H4受容体アンタゴニスト)、97.5 nMの濃度でWIN 64338(ブラジキニンB2受容体アンタゴニスト)が、hDFに最も高い生産レベルのEGFを誘導したことを認めた(図1参照)。

【0043】

上記の実施例を参照して本発明を説明してきたが、変更および変形は本発明の精神および範囲内に包含されることが理解される。したがって、本発明は、以下の特許請求の範囲によってのみ限定される。

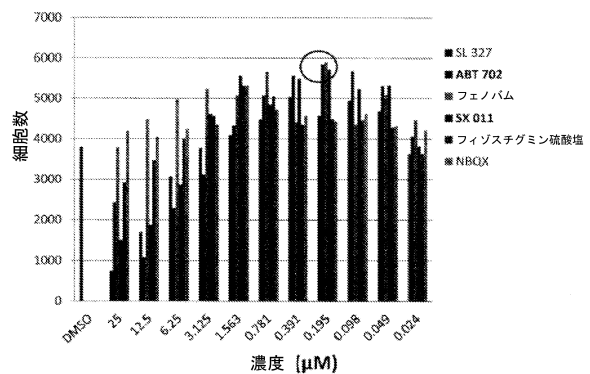
【図1】

ハイスループットヒト皮膚線維芽細胞アッセイスクリーニング

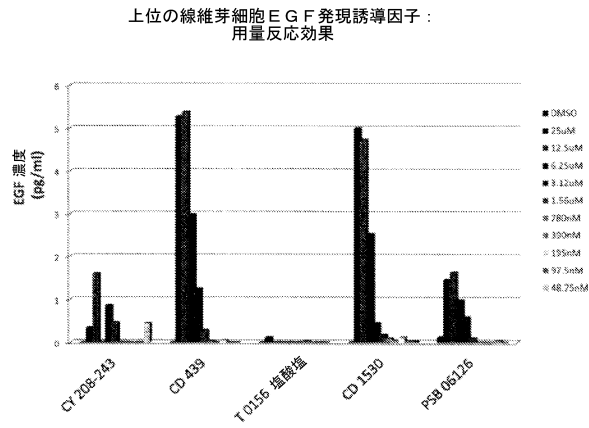


【図2】

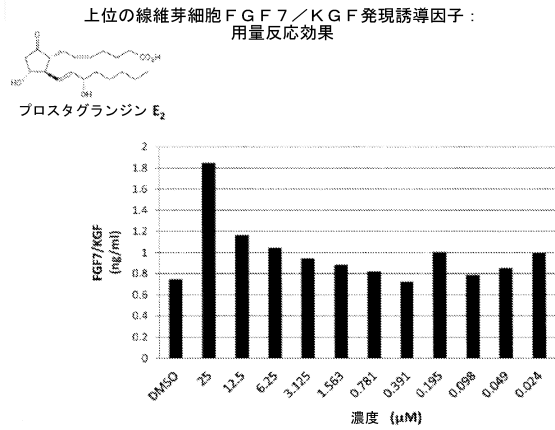
上位の線維芽細胞増殖誘導因子：
用量反応効果



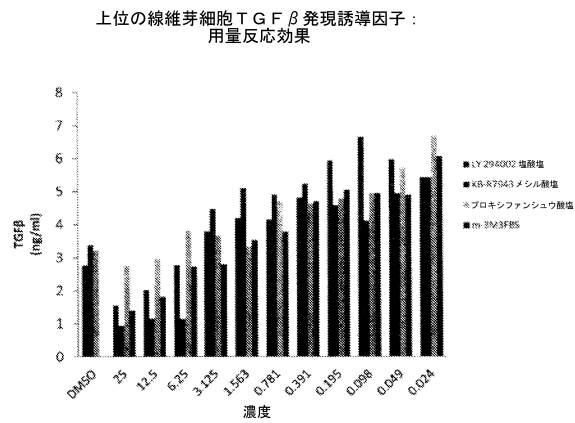
【図 3】



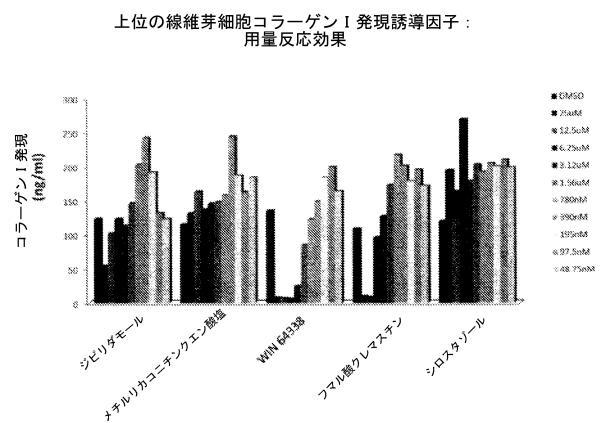
【図 4】



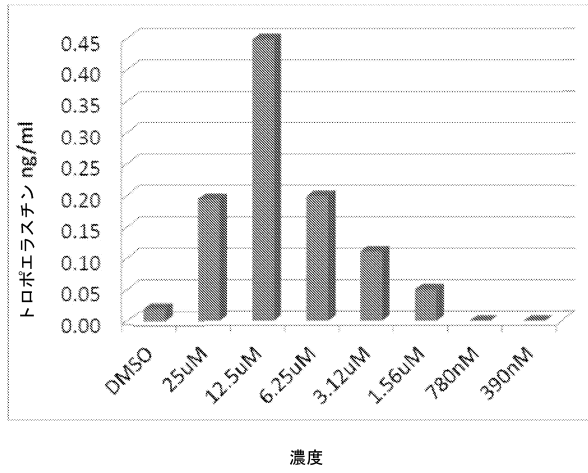
【図 5】



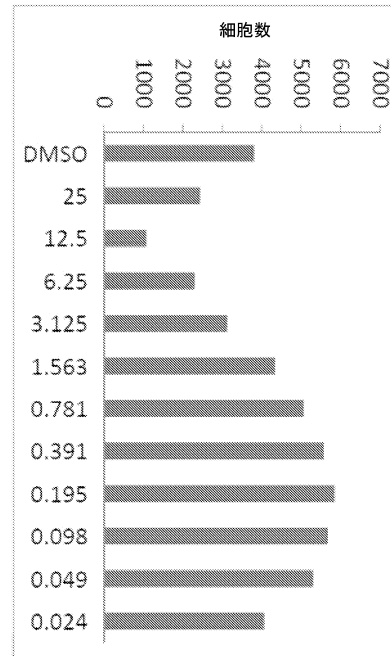
【図 6】



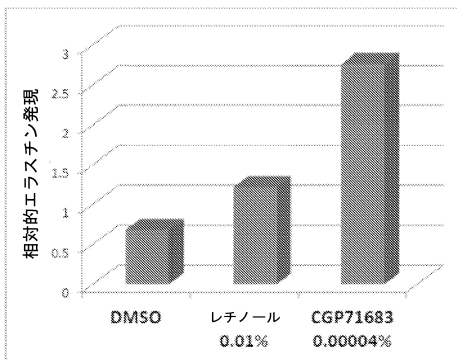
【図 7】



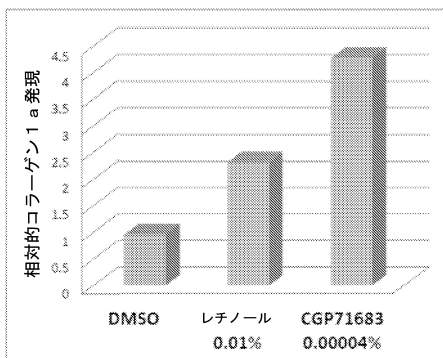
【図 8】



【図 9】



【図 10】



フロントページの続き

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ゴンザレス ロドルフォ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カールスバッド プリーストリ ドライブ 5950
- (72)発明者 ボウストボイトフ マキシム
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カールスバッド プリーストリ ドライブ 5950
- (72)発明者 セメクキン ラスラン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カールスバッド プリーストリ ドライブ 5950

審査官 参鍋 祐子

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0104125(US, A1)
米国特許出願公開第2009/0053290(US, A1)
米国特許出願公開第2007/0243158(US, A1)
Cell Transplantation, 2013年 4月12日, Vol.23, pp.1061-1073
Acta. Histochem. Cytochem., 2012年, Vol.45(4), pp.219-225
Cell Death and Differentiation, 2008年, Vol.15, pp.89-93
Functions and Modulation of MAP Kinase Pathways, Tocris Reviews, 2011年, No.35, pp.1-12

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/277
A61P 17/00
A61P 17/02
A61P 43/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)