



(21)申請案號：108140748

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 11 月 08 日

(51)Int. Cl.：

*C12N5/071 (2010.01)**A01K67/027 (2006.01)**C12Q1/02 (2006.01)**G01N33/15 (2006.01)**G01N33/53 (2006.01)*

(30)優先權：2018/11/19 日本

2018-216875

(71)申請人：日商資生堂股份有限公司(日本) SHISEIDO COMPANY, LTD. (JP)

日本

(72)發明人：吉田雄三 YOSHIDA, YUZO (JP)；相馬勤 SOMA, TSUTOMU (JP)；岸本治郎

KISHIMOTO, JIRO (JP)；松崎貴 MATSUZAKI, TAKASHI (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：5 共 33 頁

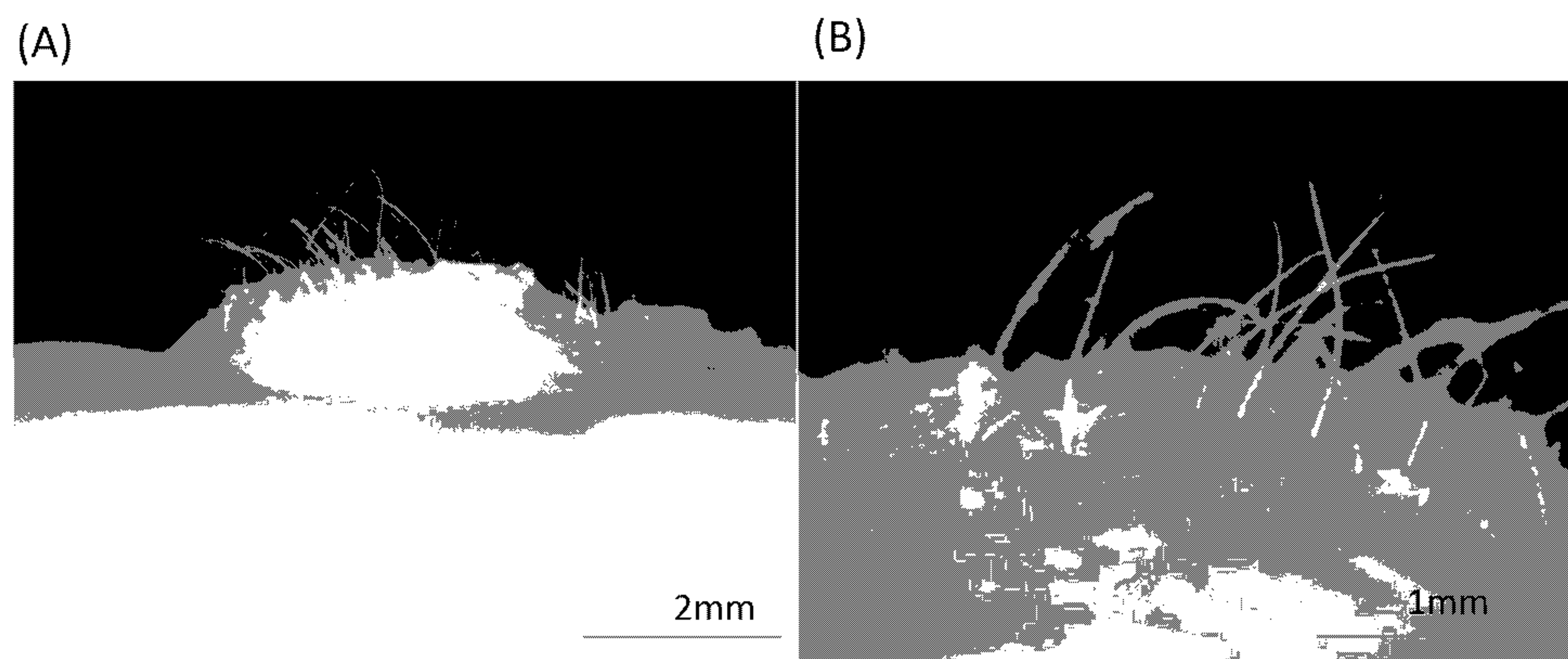
(54)名稱

用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物、人類皮膚組織模式動物及其製造方法

(57)摘要

本發明提供一種組合物、及應用其之人類皮膚組織模式動物，上述組合物之特徵在於：其係用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織者，且包含人類表皮細胞、與人類真皮細胞，此處上述人類真皮細胞包含經過球狀體形成之非源自胎兒之人類毛乳頭之細胞群。又，提供一種上述組合物及人類皮膚組織模式動物之製造方法。

指定代表圖：



【圖1】



202033763

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物、人類皮膚組織
模式動物及其製造方法

【中文】

本發明提供一種組合物、及應用其之人類皮膚組織模式動物，
上述組合物之特徵在於：其係用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織
者，且包含人類表皮細胞、與人類真皮細胞，此處上述人類真皮細胞
包含經過球狀體形成之非源自胎兒之人類毛乳頭之細胞群。又，提供
一種上述組合物及人類皮膚組織模式動物之製造方法。

【指定代表圖】

圖 1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物、人類皮膚組織模式動物及其製造方法

【技術領域】

【0001】

本發明係關於一種用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物及其製造方法。又，本發明係關於一種應用用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物的具有毛囊之人類皮膚組織模式動物及其製造方法。

【先前技術】

【0002】

毛髮由存在於皮膚之毛囊產生。所謂毛囊，係指包圍毛髮之組織層，包括源自外胚葉之毛母(毛母細胞)、內毛根鞘、外毛根鞘、或源自中胚葉之真皮毛根鞘、毛乳頭等。包圍毛乳頭之毛母細胞由自毛乳頭供給之營養或蛋白質誘導而反覆進行分裂，並進行角質化，藉此形成毛髮。

【0003】

由於毛髮之生長產生問題，故出現毛髮稀少、脫髮症。毛髮稀少、脫髮症包括壯年性脫髮症、圓形禿、休止期脫髮症等，頻率最高的是壯年性脫髮症。壯年性脫髮症於男性中主要受男性激素之影響而引起，亦稱為男性型脫髮症。毛髮一面反覆進行包括生長期、退化期及休止期之毛髮週期一面進行新陳代謝。男性型脫髮症係由於在該毛

髮週期之中生長期變短，細短毛髮之比率增多而引起之症狀。

【0004】

現在，作為壯年性脫髮症之治療，主要使用外用劑之敏樂定、或經口藥之非那雄胺。該等治療法均雖已確認有效性或安全性，但未必對所有壯年性脫髮症均有效。

【0005】

除此以外，作為壯年性脫髮症之治療，實施自體植髮手術。所謂自體植髮手術，係指將包含採自側頭部或後頭部之髮根之毛髮移植至自身之脫髮部位之術式。然而，由於該術式係將自身之毛髮重新移植至其他位置者，故並非增加毛髮之總數。

【0006】

近年來，已開發出針對各種各樣疾病之再生醫療技術，對於毛髮再生領域亦正在開發新技術。為了開發新穎之毛髮再生技術，重要的是確立用以正確評價生髮效果之評價系統，各種各樣之研究團隊正在開發具有毛囊之再構成皮膚(例如，專利文獻1及非專利文獻1、2等)。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0007】

[專利文獻1]日本專利特開2015-97524號公報

[非專利文獻]

【0008】

[非專利文獻1] Ehama R., et al., Hair follicle regeneration using

grafted rodent and human cells. J Invest Dermatol. 2007 Sep; 127(9):2106-2115. Epub 2007 Apr 12.

[非專利文獻 2] Lee LF., et al., A simplified procedure to reconstitute hair-producing skin. Tissue Eng. Part C Methods. 2011 Apr; 17(4):391-400

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0009】

毛髮再生領域中，雖正在開發使用源自毛囊之細胞之治療法，但為了正確評價所開發之治療法之效果，重要的是確立可長時間維持其結構之藉由包含人類毛囊之再構成人類皮膚所形成之評價系統。然而，至今為止，處於藉由使用能夠穩定地獲取之材料，從而再現性較好地提供包含人類毛囊之再構成人類皮膚依然較困難之情況。

【0010】

因此，本發明之目的在於藉由使用能夠穩定地獲取之材料，從而再現性較好地提供用以再構成具有人類毛囊之人類皮膚組織之組合物及其製造方法。又，本發明之目的在於提供一種應用用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物的具有毛囊之人類皮膚組織模式動物及其製造方法。

[解決問題之技術手段]

【0011】

本發明人等經過潛心研究，結果發現藉由使組合物中含有經過球狀體(spheroid)形成之非源自胎兒之人類毛乳頭之細胞群，從而可

穩定且再現性較好地再構成具有毛囊之人類皮膚組織，因而完成本發明。即，本發明包含以下發明。

【0012】

[1]一種組合物，其特徵在於：其係用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織者，且

包含

人類表皮細胞、與

人類真皮細胞，

此處上述人類真皮細胞包含經過球狀體形成之非源自胎兒之人類毛乳頭細胞之細胞群。

[2]如[1]所記載之組合物，其中上述非源自胎兒之人類毛乳頭細胞係被Wnt訊號活化劑刺激之非源自胎兒之人類毛乳頭細胞。

[3]如[2]所記載之組合物，其中上述Wnt訊號活化劑係Wnt配體家族蛋白質或Wnt促效劑。

[4]如[3]所記載之組合物，其中上述Wnt配體家族蛋白質選自由Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt16及該等之組合所組成之群。

[5]如[3]所記載之組合物，其中上述Wnt促效劑係CHIR99021或BIO。

[6]如[1]至[5]中任一項所記載之組合物，其中上述人類真皮細胞包含人類纖維芽細胞。

【0013】

[7]一種具有毛囊之人類皮膚組織模式動物，其係將如[1]至[6]中任一項所記載之組合物應用於非人類哺乳動物而得。

【0014】

[8]一種製造用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物之方法，其包括：

(1)製備包含非源自胎兒之人類毛乳頭細胞之球狀體之步驟；及

(2)使上述球狀體、人類表皮細胞、及人類真皮細胞混合並進行培養之步驟。

[9]如[8]所記載之方法，其中上述步驟(1)於Wnt訊號活化劑之存在下實施。

[10]如[9]所記載之方法，其中上述Wnt訊號活化劑係Wnt配體家族蛋白質或Wnt促效劑。

[11]如[10]所記載之方法，其中上述Wnt配體家族蛋白質選自由Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt16及該等之組合所組成之群。

[12]如[10]所記載之方法，其中上述Wnt促效劑係CHIR99021或BIO。

[13]如[8]至[12]中任一項所記載之方法，其中上述步驟(1)利用懸滴法實施。

[14]如[8]至[13]中任一項所記載之方法，其中上述非源自胎兒之人類毛乳頭細胞係源自成人之人類毛乳頭細胞。

[15]如[8]至[14]中任一項所記載之方法，其中上述人類真皮細胞

包含人類纖維芽細胞。

[16]如[8]至[15]中任一項所記載之方法，其中上述人類表皮細胞係被細胞外基質蛋白質或其衍生物刺激之上述人類表皮細胞。

[17]如[16]所記載之方法，其中上述細胞外基質蛋白質包含層黏連蛋白或其片段。

[18]如[8]至[17]中任一項所記載之方法，其中上述步驟(2)係於具備多孔膜之培養基材之上進行培養之步驟。

【0015】

[19]一種具有毛囊之人類皮膚組織模式動物之製造方法，其包括如下步驟：

將利用如[8]至[18]中任一項所記載之方法獲得之組合物應用於非人類哺乳類動物。

【0016】

[20]一種用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物，其利用如[8]至[18]中任一項所記載之方法獲得。

【0017】

[21]一種具有毛囊之人類皮膚組織模式動物，其利用如[19]之方法獲得。

[發明之效果]

【0018】

根據本發明，能夠穩定且再現性較好地提供一種能夠再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物及其製造方法。又，能夠提供一種應用該組合物之具有毛囊之人類皮膚組織模式動物及其製造方法。藉由

本發明所提供之評價系統能夠再現性較好地對開發中之藥劑、再生醫療技術、或美容技術之效果、尤其是生髮效果進行評價。

【圖式簡單說明】

【0019】

圖1係表示一實施態樣中之藉由應用本發明之組合物而獲得之SCID小鼠之皮膚之照片。(A)係再構成皮膚之外觀照片。(B)係(A)之生髮部分之放大圖。

圖2表示一實施態樣中之藉由應用本發明之組合物而獲得之SCID小鼠之皮膚之組織解析結果。(A)係經H&E染色之再構成皮膚之組織切片。(B)係(A)之虛線部分之放大圖。顯示出再構成皮膚中含有多個毛囊。

圖3表示一實施態樣中之藉由應用本發明之組合物而獲得之SCID小鼠之皮膚之組織解析結果。(A)係藉由使用人類Alu序列特異性探針之原位雜交而進行染色之再構成皮膚之組織切片之染色像。(B)係再構成皮膚與宿主組織之交界部分之藉由原位雜交之染色像。顯示出再構成皮膚由人類細胞構成，可知其係人類再構成皮膚。

圖4表示一實施態樣中之藉由應用本發明之組合物而獲得之SCID小鼠之皮膚之組織解析結果。(A)係藉由使用人類Alu序列特異性探針之原位雜交而進行染色之再構成皮膚之組織切片之染色像。(B)係藉由特異性地識別毛幹之抗體AE13進行染色之再構成皮膚之組織切片之染色像。顯示出毛髮及毛囊由人類細胞構成，可知其係人類毛囊。

圖5表示被Wnt促效劑(CHIR99021)刺激之毛乳頭(DP)球狀體。(A)係利用紅色螢光色素PKH-26標記出之毛乳頭(DP)球狀體(左：微分

干涉像，右：螢光像)。(B)係再構成皮膚之組織切片之螢光像。左列：紅色螢光像(源自DP球狀體)，右列：來自抗Pan-keratin抗體(綠)及DAPI(藍)之螢光像。上段及下段分別表示同一組織切片之像。可知形成於再構成皮膚之毛囊源自被Wnt促效劑(CHIR99021)刺激之毛乳頭(DP)球狀體。藉此，可知被Wnt促效劑(CHIR99021)刺激之毛乳頭(DP)球狀體對於形成再構成皮膚中之人類毛囊不可或缺。

【實施方式】

【0020】

以下，對實施方式進行說明，但本發明之技術範圍並非僅受下述形態限定。又，以下對於實施方式所說明之內容只要無特別限定，則可於用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物及其製造方法、以及具有毛囊之人類皮膚組織模式動物及其製造方法中相互應用。

【0021】

1.用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物

【0022】

一實施形態中，本發明之用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物之特徵在於：

包含人類表皮細胞、與

人類真皮細胞，

此處上述人類真皮細胞包含經過球狀體形成之非源自胎兒之人類毛乳頭細胞之細胞群。

【0023】

本說明書中，所謂「再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合

物」，係指於應用於皮膚之情形時，具有於該部位再構成具有毛囊之結構之人類皮膚樣之組織之能力的組合物。

【0024】

所謂「毛囊(Hair Follicle：HF)」，一般而言係指包括作為上皮系細胞之毛母(毛母細胞)、內毛根鞘、外毛根鞘、或作為間葉系細胞之真皮毛根鞘、毛乳頭等之包圍毛髮之組織層。藉由應用本發明之組合物，從而可於應用部位中再構成具有此種人類毛囊之人類皮膚樣之組織。又，自再構成之毛囊生髮。

【0025】

本發明中，所謂「表皮細胞」，係指構成表皮之細胞，包括分化階段不同之細胞(主要是角質形成細胞)。活體中，表皮由分化階段不同之表皮細胞層狀重疊而形成。表皮之最深部被稱為基底層，形成一層圓柱狀之細胞。表皮細胞隨著分化階段之進行，一面變化為扁平之形狀一面向外層移動。基底層位於與真皮之交界面，於其上層存在有棘層。自有棘層進行分化階段之表皮細胞形成具有角質層透明質顆粒、層板顆粒之顆粒層。顆粒層於活體組織中由2～3層左右構成。若自顆粒層進一步進行分化階段，則細胞核消失，形成角質層。表皮除表皮細胞以外亦包含黑色素細胞、蘭格漢氏細胞、莫克氏細胞等。本發明之組合物亦可除表皮細胞以外包含表皮中所含有之其他細胞。

【0026】

一實施態樣中，本發明之組合物中所含有之表皮細胞係源自人類之表皮細胞。人類表皮細胞可為市售之人類表皮細胞，亦可為藉由將活體組織切碎，並利用膠原酶、胰蛋白酶等蛋白質分解酶予以處理

而獲得之初代人類表皮細胞，亦可為將獲得之初代人類表皮細胞進行繼代增殖而獲得之纖維芽細胞。一實施態樣中，本發明之組合物中所含有之表皮細胞可源自人類胎兒、新生兒(例如，0歲～2歲)、未成年(例如，3歲～17歲)、或成人(例如，18歲以上、20歲以上、25歲以上、30歲以上、35歲以上、40歲以上)等。又，一實施態樣中，本發明之組合物中所含有之表皮細胞亦可為由多能性幹細胞或組織幹細胞分化而成之表皮細胞。多能性幹細胞可為iPS細胞、ES細胞或Muse細胞等，亦可使用由該等多能性幹細胞利用公知之方法進行分化誘導而獲得之表皮細胞。

【0027】

一實施態樣中，本發明之組合物中所含有之表皮細胞係被細胞外基質蛋白質或其衍生物刺激之表皮細胞。作為細胞外基質蛋白質，例如可列舉：層黏連蛋白、巢蛋白、肌腱蛋白、血小板反應素、纖維黏連蛋白、玻連蛋白、膠原蛋白、彈力蛋白等。用以刺激表皮細胞之細胞外基質蛋白質可為天然型細胞外基質蛋白質，亦可為其等之衍生物(重組體)。又，亦可為具有刺激表皮細胞之功能之細胞外基質蛋白質之片段。藉由使本發明之組合物中含有被細胞外基質蛋白質刺激之表皮細胞，從而使得該組合物之再構成具有人類毛囊之人類皮膚樣之組織之能力變得更高，故較佳。

【0028】

一實施態樣中，用以刺激表皮細胞之細胞外基質蛋白質包含層黏連蛋白或其片段。層黏連蛋白係包括 α 鏈(LAMA1、LAMA2、LAMA3、LAMA4、LAMA5)、 β 鏈(LAMB1、LAMB2、LAMB3、

LAMB4)、 γ 鏈(LAMC1、LAMC2、LAMC3)之組合之蛋白質，至今為止已知有17種(層黏連蛋白1~15以及層黏連蛋白212/222及層黏連蛋白522)之組合。例如， α 鏈、 β 鏈及 γ 鏈之組合為LAMA5、LAMB1及LAMC1之層黏連蛋白被稱為「層黏連蛋白511」。層黏連蛋白511之別名亦稱為層黏連蛋白10。一實施態樣中，用以刺激表皮細胞之細胞外基質蛋白質亦可為層黏連蛋白之片段，例如，可使用層黏連蛋白511-E8片段。

【0029】

本說明書中，所謂「真皮細胞」，係指皮膚中存在於表皮與皮下組織之間之真皮中所含有之細胞，主要包含纖維芽細胞。真皮除纖維芽細胞以外，包含膠原蛋白、彈性纖維(彈力蛋白)、細胞外基質、玻尿酸等。

【0030】

一實施態樣中，本發明之組合物中所含有之真皮細胞係源自人類之真皮細胞。人類真皮細胞可為市售之人類真皮細胞，亦可為藉由將活體組織切碎，並利用膠原酶、胰蛋白酶等蛋白質分解酶進行處理而獲得之初代人類真皮細胞，亦可為將獲得之初代人類表皮細胞進行繼代增殖而獲得之真皮細胞。一實施態樣中，本發明之組合物中所含有之真皮細胞可源自人類胎兒、新生兒(例如，0歲~2歲)、未成年(例如，3歲~17歲)、或成人(例如，18歲以上、20歲以上、25歲以上、30歲以上、35歲以上、40歲以上)等。又，一實施態樣中，本發明之組合物中所含有之真皮細胞亦可為由多能性幹細胞或組織幹細胞分化而成之表皮細胞。多能性幹細胞可為iPS細胞、ES細胞或Muse細胞

等，亦可使用由該等多能性幹細胞利用公知之方法進行分化誘導而獲得之真皮細胞。

【0031】

將毛髮之皮膚內部最深部鼓起之部分稱為毛球部(hair bulb)，將位於毛球部之中央部之包含間葉系細胞之部分稱為毛乳頭(dermal papilla：DP)。又，將構成毛乳頭之細胞稱為「毛乳頭細胞」。毛細血管或神經進入毛乳頭中，吸收來自食物之營養或氧，管控毛髮之產生或生長。於與毛乳頭接觸之部位存在毛母細胞(hair matrix cell)，毛髮於該部位產生。毛母細胞藉由自進入至毛乳頭之毛細血管吸收營養或氧，並反覆進行分裂，從而形成毛髮。

【0032】

一實施態樣中，本發明之組合物中所含有之毛乳頭細胞係源自人類之毛乳頭細胞。一實施態樣中，人類毛乳頭細胞可藉由將人類毛囊(較佳為人類頭皮毛囊)單離，自經單離之人類毛囊進而使毛乳頭區域之組織單離並進行培養，從而使細胞增殖。具體而言，例如，將頭皮切成5 mm左右之短條狀，利用磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)等洗淨後，視需要使用蛋白質分解酶等或進行外科處理，去除表皮層及真皮層，僅留下皮下脂肪層，繼而利用物理手段、例如用鑷子等將毛囊單離。可自毛囊切取毛球部，自該毛球部之下部使毛乳頭露出，而將毛乳頭(細胞)單離。

【0033】

毛乳頭細胞之培養可直接利用動物細胞之培養所使用之市售之營養培養基，或利用使該營養培養基改性而成者進行培養(初代培養

及繼代培養)。作為毛乳頭細胞之培養可使用之代表性之培養基，可列舉：含有胎牛血清之杜爾貝科改良伊格爾培養基、Chang氏培養基(Chang's medium)、MesenPRO培養基(Thermo fisher公司)等。培養基中可進而視需要添加細胞增殖因子、激素或其他微量營養素。作為該等之具體例，可列舉：運鐵蛋白、胰島素、三碘甲狀腺素、胰高血糖素、氫化可體松、睪固酮、雌二醇、黃體素、硒等。

【0034】

本發明之組合物中所含有之人類毛乳頭細胞係非源自胎兒之人類毛乳頭細胞，例如係源自未成年(例如，3歲～17歲)、或成人(例如，18歲以上)之毛乳頭細胞。根據本發明，即便使用先前較困難之非源自胎兒之人類毛乳頭細胞，亦可再構成具有毛囊之人類皮膚組織。

【0035】

另一實施態樣中，本發明之組合物中所含有之毛乳頭細胞亦可為由多能性幹細胞或組織幹細胞分化而成之毛乳頭細胞。多能性幹細胞可為iPS細胞、ES細胞或Muse細胞等，亦可使用由該等多能性幹細胞進行分化誘導而獲得之毛乳頭細胞。

【0036】

一實施態樣中，本發明之組合物含有經過球狀體形成之非源自胎兒之人類毛乳頭細胞之細胞群。本說明書中，所謂「球狀體」，係指細胞彼此集合或凝集而成之球狀細胞集合體。作為形成球狀體之方法，例如有以下方法：於使細胞懸浮於具有低細胞接著性之表面之U底之孔中之狀態下形成球狀體之方法、於使細胞接著於特定之凹凸結

構面上之狀態下形成球狀體之方法、懸滴法、藉由一面使含有培養基之細胞培養腔室旋轉一面培養大量細胞而製作球狀體之方法等。本發明之組合物中所含有之人類毛乳頭細胞之細胞群較佳為利用懸滴法而形成之球狀體。藉由使組合物中含有經過球狀體形成之非源自胎兒之人類毛乳頭細胞之細胞群，從而使得再構成具有毛囊之人類皮膚組織之效率提高。

【0037】

每1個形成了球狀體之人類毛乳頭細胞之細胞群中所含有之人類毛乳頭細胞之數量例如可為 1×10 個 $\sim 1 \times 10^5$ 個，較佳為 1×10^2 個 $\sim 1 \times 10^4$ 個，更佳為 1×10^2 個 $\sim 5 \times 10^3$ 個。又，形成了球狀體之人類毛乳頭細胞之細胞群之平均直徑為 $20 \mu\text{m} \sim 1000 \mu\text{m}$ ，較佳為 $50 \mu\text{m} \sim 300 \mu\text{m}$ ，更佳為 $70 \mu\text{m} \sim 200 \mu\text{m}$ 。

【0038】

一實施態樣中，本發明之組合物中所含有之非源自胎兒之人類毛乳頭細胞係被Wnt訊號活化劑刺激之非源自胎兒之人類毛乳頭細胞。所謂Wnt訊號，係指促進 β -連環蛋白之核轉移，發揮作為轉錄因子之功能之一連串作用。該訊號起因於細胞間相互作用，例如包括以下一連串流程：自某細胞分泌之稱為Wnt3A之蛋白質進而作用於其他細胞，細胞內之 β -連環蛋白發生核轉移，作為轉錄因子發揮作用。一連串流程引起如上皮間葉相互作用之器官構建之最初之現象。關於Wnt訊號，已知有藉由使 β -連環蛋白路徑、PCP路徑、 Ca^{2+} 路徑之三個路徑活化，從而控制細胞之增殖或分化、器官形成或初期發生時之細胞運動等各種細胞功能。藉由Wnt訊號所具有之上述未分化狀態維

持功能，而將其用於ES細胞之培養之時以抑制分化(例如，Noburo Sato et al., Nature Medicine Vol.10, No.1, Jan. 2004)。藉由使本發明之組合物中含有被Wnt訊號活化劑刺激之非源自胎兒之人類毛乳頭細胞，從而使得再構成具有毛囊之人類皮膚組織之效率提高。

【0039】

Wnt訊號活化劑亦可為Wnt配體家族蛋白質或Wnt促效劑。作為Wnt配體家族蛋白質，例如可列舉：Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt16等，亦可組合該等Wnt配體家族蛋白質使用。

【0040】

作為Wnt促效劑，例如可列舉：肝糖合成酶激酶-3(GSK-3)抑制劑、R-反應素1～4、Norrin等。作為GSK-3抑制劑，例如可列舉：CHIR99021、雙-吡啶(靛紅)化合物(BIO)((2'Z,3'E)-6-溴靛紅-3'-脲)、其丙酮脲類似物BIO-丙酮脲(2'Z,3'E)-6-溴靛玉紅-3'-丙酮脲)、噻二唑烷(TDZD)類似物(4-苄基-2-甲基-1,2,4-噻二唑烷-3,5-二酮)、氧代噻二唑烷-3-硫酮類似物(2,4-二苄基-5-氧代噻二唑烷-3-硫酮)、噻吩基 α -氯甲基酮化合物(2-氯-1-(4,4-二溴-噻吩-2-基)-乙酮)、苯基 α 溴甲基酮化合物(α -4-二溴苯乙酮)、含噻唑之脲化合物(N-(4-甲氧基苄基)-N'-(5-硝基-1,3-噻唑-2-基)脲)或GSK-3 β 肽抑制劑、例如H-KEAPPAPPQSpP-NH₂等。

【0041】

Wnt訊號活化劑之添加量無特別限制，可由本領域技術人員適當

決定。例如，於將CHIR99021作為Wnt訊號活化劑使用於毛乳頭細胞之情形時，其量例如以0.1 μM ~10 μM 左右便可進行刺激，但並非限定於此種量。

【0042】

本發明之組合物亦可除上述細胞以外，例如含有能夠適合活體之物質。所謂能夠與活體相容之物質，例如可為水、生理鹽水、磷酸緩衝液、細胞培養基、活體相容性水凝膠(聚葡萄糖胺糖凝膠、膠原蛋白凝膠、明膠、肽凝膠、層黏連蛋白凝膠及血纖維蛋白凝膠等)，但並非限定於該等。

【0043】

本發明之組合物較佳為於具備多孔膜之培養基材之上進行製備。具備多孔膜之培養基材例如可使用細胞培養插片。本發明之組合物之製造方法將於下文敘述。

【0044】

藉由將本發明之組合物應用於人類或非人類哺乳動物，從而可於被應用之部位再構建具有毛囊之人類皮膚組織。

【0045】

2.具有毛囊之人類皮膚組織模式動物

【0046】

一實施態樣中，本發明之組合物應用於非人類哺乳動物。藉此，能夠獲得具有毛囊之人類皮膚組織模式動物。作為非人類哺乳動物，例如可列舉：大鼠、小鼠、豚鼠、狨猿、兔、狗、貓、綿羊、豬、山羊、猴子、猩猩或者其等之免疫系統受到抑制之非人類哺乳類

動物等，較佳為免疫系統受到抑制之非人類哺乳類動物。本發明之具有毛囊之人類皮膚組織模式動物之製造方法將於下文敘述。

【0047】

向本發明之具有毛囊之人類皮膚組織模式動物應用期待生髮或育發效果之候補物質，例如，可藉由觀察自毛囊之生髮狀態、或毛囊組織之狀態、生髮相關之標記物等，從而對候補物質之生髮或育發效果進行評價。作為候補因子，例如可為：低分子化合物、肽、核酸、蛋白質、哺乳動物(例如，小鼠、大鼠、豬、牛、綿羊、猴子、人類等)之細胞、組織提取物或細胞培養上清液、源自植物之化合物或提取物(例如，天然藥萃取物、源自天然藥之化合物)、及源自微生物之化合物或者提取物或培養產物等。又，例如，亦可根據本發明之組合物中所含有之人類毛乳頭細胞之供體、或培養條件等之不同，評價對於所形成之毛囊及/或自毛囊之生髮所產生之影響。

【0048】

3.製造用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物之方法、及利用該方法獲得之用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物

【0049】

一實施形態中，本發明之製造用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物之方法包括：

(1)製備包含非源自胎兒之人類毛乳頭細胞之球狀體之步驟；及

(2)將上述球狀體、人類表皮細胞、及人類真皮細胞混合並進行培養之步驟。

【0050】

本發明之製造組合物之方法中，製備包含非源自胎兒之人類毛乳頭細胞之球狀體之步驟例如能夠應用以下方法：於使細胞懸浮於具有低細胞接著性之表面之U底之孔中之狀態下形成球狀體之方法、於使細胞接著於特定之凹凸結構面上之狀態下形成球狀體之方法、懸滴法、藉由一面使含有培養基之細胞培養腔室旋轉一面培養大量之細胞而製作球狀體之方法等，較佳為懸滴法。

【0051】

所謂懸滴法，係指使含有細胞之培養液之液滴點滴於培養皿之蓋之頂部側，或者利用特殊之培養器具(例如，Elplasia MPc(可樂麗公司，日本))製作液滴，藉由表面張力使培養液內之細胞以液滴之狀態進行培養之方法。藉由如此進行培養，從而可使細胞因與培養基材表面之接觸而受到之影響最小限度化。

【0052】

包含非源自胎兒之人類毛乳頭細胞之球狀體、人類表皮細胞、及人類真皮細胞可視需要調整各者之細胞數(或球狀體之數)，例如，亦可以球狀體：人類表皮細胞：人類真皮細胞為 $10 \sim 10000 : 0.1 \times 10^6 \sim 100 \times 10^6 : 0.1 \times 10^6 \sim 100 \times 10^6$ ，較佳為 $20 \sim 3000 : 1 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6 : 1 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ ，更佳為 $50 \sim 1000 : 3 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6 : 3 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ 進行混合、培養。

【0053】

一實施態樣中，上述步驟(1)於Wnt訊號活化劑之存在下實施。藉由Wnt訊號活化劑活化之人類毛乳頭細胞進一步促進毛囊之再構成。利用Wnt訊號活化劑對人類毛乳頭細胞進行處理之時間為6小時～120

小時，較佳為12小時～108小時，更佳為24小時～96小時，進而較佳為36小時～84小時。

【0054】

一實施態樣中，本發明之方法所使用之人類表皮細胞係被細胞外基質蛋白質或其衍生物刺激之人類表皮細胞。作為刺激人類表皮細胞之方法，例如可列舉以下方法：於添加有細胞外基質蛋白質或其衍生物之培養基中進行培養之方法、或於塗佈有細胞外基質蛋白質或其衍生物之培養基材之上進行培養之方法等。較佳為於塗佈有細胞外基質蛋白質或其衍生物之培養基材之上進行培養之方法。塗佈方法依據公知方法即可，無特別限定。藉由使用被細胞外基質蛋白質或其衍生物刺激之人類表皮細胞，從而進一步促進毛囊之再構成。

【0055】

一實施態樣中，本發明之方法中所包括之步驟(2)係於具備多孔膜之培養基材之上進行培養之步驟。具備多孔膜之培養基材例如可使用市售之細胞培養插片。多孔膜之平均孔徑可適當選擇，例如為約0.01 μm ～約100 μm ，較佳為0.05 μm ～50 μm ，更佳為0.1 μm ～25 μm ，最佳為1 μm ～10 μm 。

【0056】

一實施態樣中，步驟(2)中，將混合有上述球狀體、人類表皮細胞、及人類真皮細胞之懸浮液應用於具備多孔膜之培養基材之上，以特定時間(例如，將培養基等之液體成分排出之時間，例如0.5小時～3小時)進行培養。藉此，於培養基材上形成片狀之組合物。

【0057】

一實施態樣中，藉由實施上述方法，從而可獲得用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物。

【0058】

4.具有毛囊之人類皮膚組織模式動物之製造方法

本發明提供一種具有毛囊之人類皮膚組織模式動物之製造方法。一實施態樣中，具有毛囊之人類皮膚組織模式動物利用包括將上述組合物應用於非人類哺乳類動物之步驟之方法進行製造。

【0059】

一實施態樣中，將本發明之組合物應用於非人類哺乳類動物之步驟中，例如可藉由將非人類哺乳類動物之任意部位(例如背部)之皮膚切開為任意之大小，並將組合物移植至所切開之部位而實施。由於切開部位之大小根據所應用之組合物之大小及形態(懸浮液形態、或片材形態等)等適當設定，故無特別限定。又，由於切開部位之深度依賴於所應用之非人類哺乳類動物之皮膚之厚度，故無限定。可藉由將本發明之組合物應用於藉由切開而被去除皮膚之部位，並與切開部位周邊之皮膚一起縫合，從而移植組合物。應用組合物後，利用任意修整材料等對應用部位進行保護，防止組合物之物理性脫落。

[實施例]

【0060】

以下，基於實施例，更加詳細地對本發明進行說明，但本發明不受該等任何限定。

【0061】

<實施例1：再構成皮膚之製作>

(1)細胞之準備

毛乳頭細胞係使用手術刀與鑷子自人類毛囊(20～65歲、男性)將毛乳頭區域單離後，靜置於培養皿，藉由MesenPRO培養基(Thermo fisher公司)進行培養，獲得毛乳頭細胞。人類纖維芽細胞及表皮細胞係自岩井化學藥品購入市售之細胞而準備。

【0062】

(2)細胞之製備

向經單離之人類毛乳頭細胞添加3 μ M之CHIR99021(Axon Medchem公司)，進行培養後，藉由使用Elplasia MPc(可樂麗公司，日本)之懸滴法形成球狀體。

【0063】

人類表皮細胞係於塗佈有iMatrix-511(NIPPI公司)之培養燒瓶上，藉由Epilife培養基(Thermo fisher公司)進行培養。

【0064】

人類纖維芽細胞係將DMEM培養基與F12培養基以3：1混合，於含有5%FBS及40 ng/ml之bFGF(PeproTech公司)、20 ng/ml之EGF(PeproTech公司)、B27(註冊商標)補充劑(Thermo Fisher Scientific K.K.)之培養基中進行培養。

【0065】

(3)再構成皮膚之形成

將包含300萬～600萬個人類纖維芽細胞、300萬～600萬個人類表皮細胞、100～1000個人類毛乳頭球狀體之混合物靜置於市售之細胞培養插片(康寧公司)，於37℃保溫箱中進行短時間培養直至溶液排

出而僅殘存細胞，製備移植物。

【0066】

(4)移植物之移植

將麻醉下之 SCID 個體(Charles River 公司)之背部皮膚以約 1~2 cm×約 1~2 cm 之大小切開，將所製備之移植物應用於切開部位，並將其與周圍之皮膚縫合。其後，利用修整材料及繃帶對移植部位進行保護。約 10 天後，去除修整材料，約 2~3 個月後，確認有無再構成皮膚，利用附有相機之實體顯微鏡拍攝照片。其結果為，於移植片之移植部位確認到生髮(圖 1)。

【0067】

< 實施例 2：再構成皮膚之組織解析 >

摘除再構成皮膚，利用 4% 多聚甲醛溶液使其固定一晚後，製成石蠟包埋組織塊。利用切片機製成 4 μm 厚度之組織切片後，實施各種組織染色。利用一般之方法對實施過親水處理之組織切片進行 H. & E. 染色，利用 AxioScan(zeiss 公司)拍攝照片(圖 2)。

【0068】

又，為了確認再構成之含有毛囊之組織是否為由人類細胞所構成之組織，利用一般之方法實施將人類基因組特異性重複序列(Alu 序列)作為探針之原位雜交(in situ hybridization)(以下稱為 ISH)，並同樣地拍攝照片(圖 3)。

【0069】

進而實施特異性地識別毛幹之抗體 AE13(Abcam 公司)之免疫染色與 Alu-ISH 之雙重染色(圖 4)。免疫染色及 ISH 之基本方法係參考「後

基因組研究時代之免疫染色/原位雜交」(YODOSHA公司)而實施。

【0070】

其結果為，確認了含有毛囊之再構成皮膚組織源自所移植之人類細胞。又，亦可確認形成有毛幹。

【0071】

<實施例3：螢光標記之毛乳頭球狀體之追蹤實驗>

對於在CHIR99021 3uM存在下培養之毛乳頭細胞，利用紅色螢光色素PKH-26(Sigma Aldrich公司)，依據附屬之操作說明進行標記(圖5)。製作含有經標記之毛乳頭球狀體之再構成皮膚，結果於作為毛囊形成之基礎之毛乳頭部位確認到紅色螢光。據此，可得出如下結論：於再構成皮膚中確認到之毛囊係由毛乳頭球狀體誘導形成(圖5)。

【0072】

<實施例4：根據有無球狀體化之毛乳頭細胞、及有無CHIR99021刺激，確認具有毛囊之人類皮膚組織之再構成能力>

除有無球狀體化之毛乳頭細胞、及有無CHIR99021刺激之條件以外，依據實施例1所記載之方法，對SCID小鼠嘗試再構成具有毛囊之人類皮膚組織。結果如下所示。

[表1]

條件	具有含有毛囊之人類皮膚之個體
表皮細胞＋纖維芽細胞	17%(1個體(※1)/6個體)
表皮細胞＋纖維芽細胞 ＋球狀體化毛乳頭細胞	42%(3個體/7個體)
表皮細胞＋纖維芽細胞 ＋球狀體化毛乳頭細胞 ＋CHIR99021刺激	83%(10個體/12個體)

※1：確認到之毛囊數為少數，表皮細胞之一部分源自小鼠。

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種組合物，其特徵在於：其係用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織者，且

包含：

人類表皮細胞、與

人類真皮細胞，

此處上述人類真皮細胞包含經過球狀體形成之非源自胎兒之人類毛乳頭細胞之細胞群。

【第2項】

如請求項1之組合物，其中上述非源自胎兒之人類毛乳頭細胞係被Wnt訊號活化劑刺激之非源自胎兒之人類毛乳頭細胞。

【第3項】

如請求項2之組合物，其中上述Wnt訊號活化劑係Wnt配體家族蛋白質或Wnt促效劑。

【第4項】

如請求項3之組合物，其中上述Wnt配體家族蛋白質選自由Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt16及該等之組合所組成之群。

【第5項】

如請求項3之組合物，其中上述Wnt促效劑係CHIR99021或BIO。

【第6項】

如請求項1至5中任一項之組合物，其中上述人類真皮細胞包含人類纖維芽細胞。

【第7項】

一種具有毛囊之人類皮膚組織模式動物，其將如請求項1至6中任一項之組合物應用於非人類哺乳動物而得。

【第8項】

一種製造用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物之方法，其包括：

(1)製備包含非源自胎兒之人類毛乳頭細胞之球狀體之步驟；及

(2)使上述球狀體、人類表皮細胞、及人類真皮細胞混合並進行培養之步驟。

【第9項】

如請求項8之方法，其中上述步驟(1)於Wnt訊號活化劑之存在下實施。

【第10項】

如請求項9之方法，其中上述Wnt訊號活化劑係Wnt配體家族蛋白質或Wnt促效劑。

【第11項】

如請求項10之方法，其中上述Wnt配體家族蛋白質選自由Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt16及該等之組合所組成之群。

【第12項】

如請求項10之方法，其中上述Wnt促效劑係CHIR99021或BIO。

【第13項】

如請求項8至12中任一項之方法，其中上述步驟(1)利用懸滴法實施。

【第14項】

如請求項8至13中任一項之方法，其中上述非源自胎兒之人類毛乳頭細胞係源自成人之人類毛乳頭細胞。

【第15項】

如請求項8至14中任一項之方法，其中上述人類真皮細胞包含人類纖維芽細胞。

【第16項】

如請求項8至15中任一項之方法，其中上述人類表皮細胞係被細胞外基質蛋白質或其衍生物刺激之上述人類表皮細胞。

【第17項】

如請求項16之方法，其中上述細胞外基質蛋白質包含層黏連蛋白或其片段。

【第18項】

如請求項8至17中任一項之方法，其中

上述步驟(2)係於具備多孔膜之培養基材之上進行培養之步驟。

【第19項】

一種具有毛囊之人類皮膚組織模式動物之製造方法，其包括如下步驟：

將利用如請求項8至18中任一項之方法獲得之組合物應用於非人

類哺乳類動物。

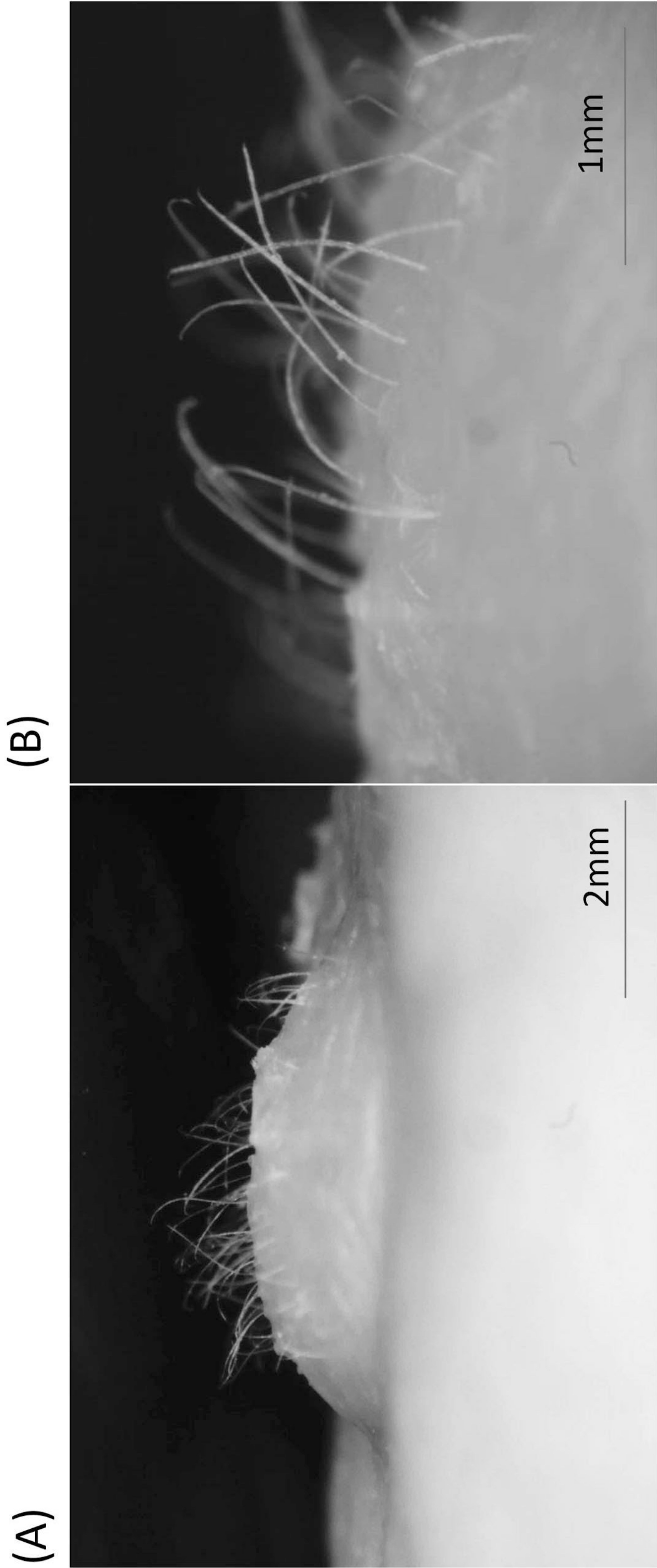
【第20項】

一種用以再構成具有毛囊之人類皮膚組織之組合物，其利用如請求項8至18中任一項之方法獲得。

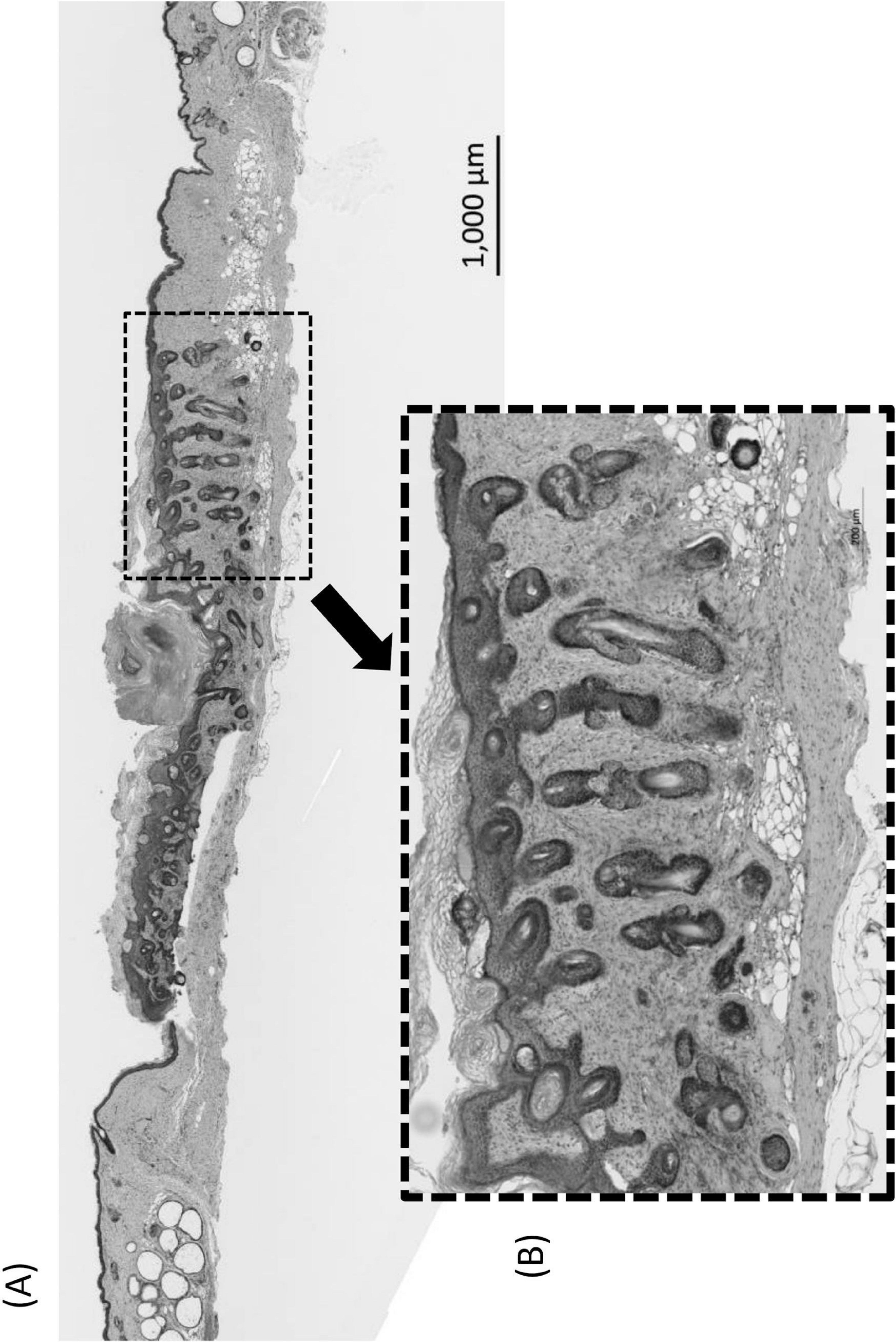
【第21項】

一種具有毛囊之人類皮膚組織模式動物，其利用如請求項19之方法獲得。

【發明圖式】



【圖1】



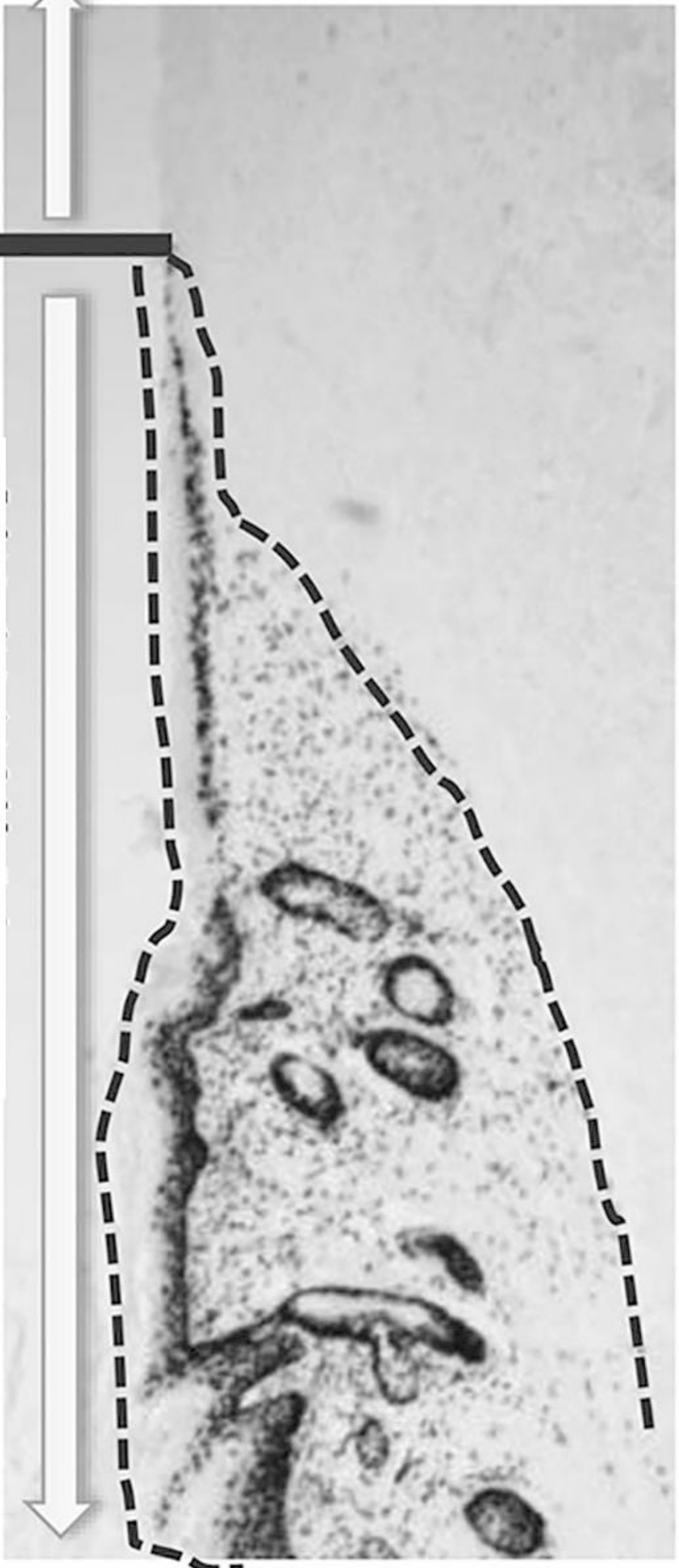
【圖2】

(A)



(B)

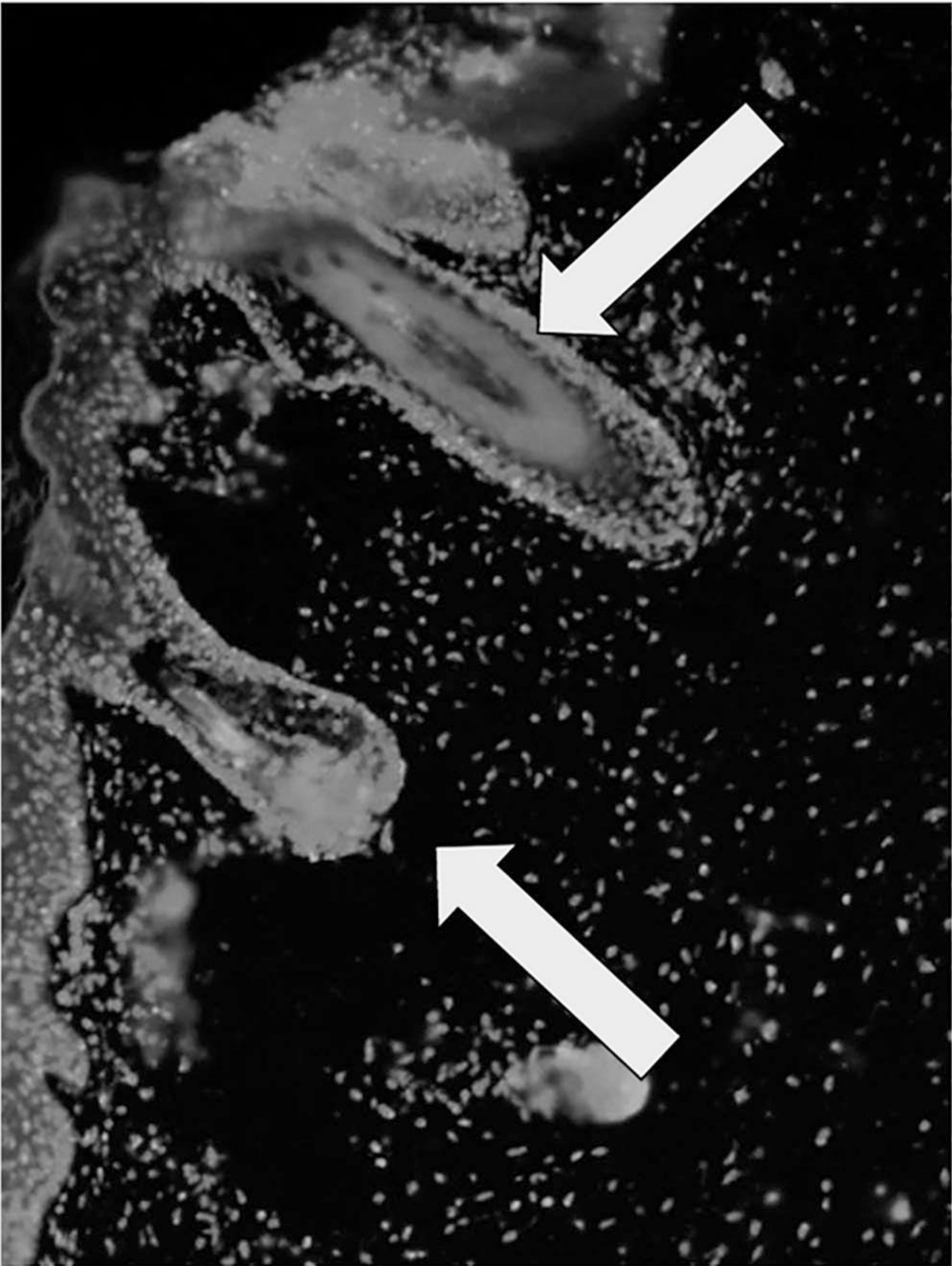
人類再構成皮膚



宿主組織

【圖3】

(B) 紅色螢光(AE13: 毛髮標記)



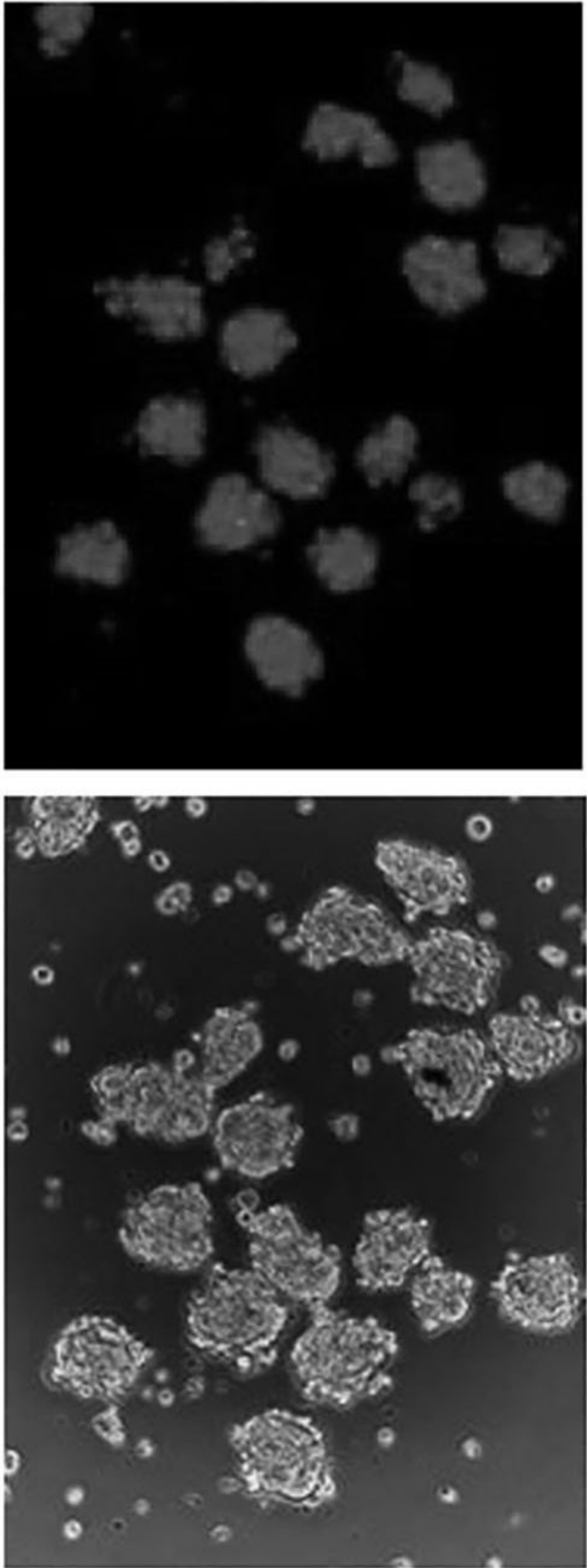
(A) 綠色螢光(人類細胞之核)



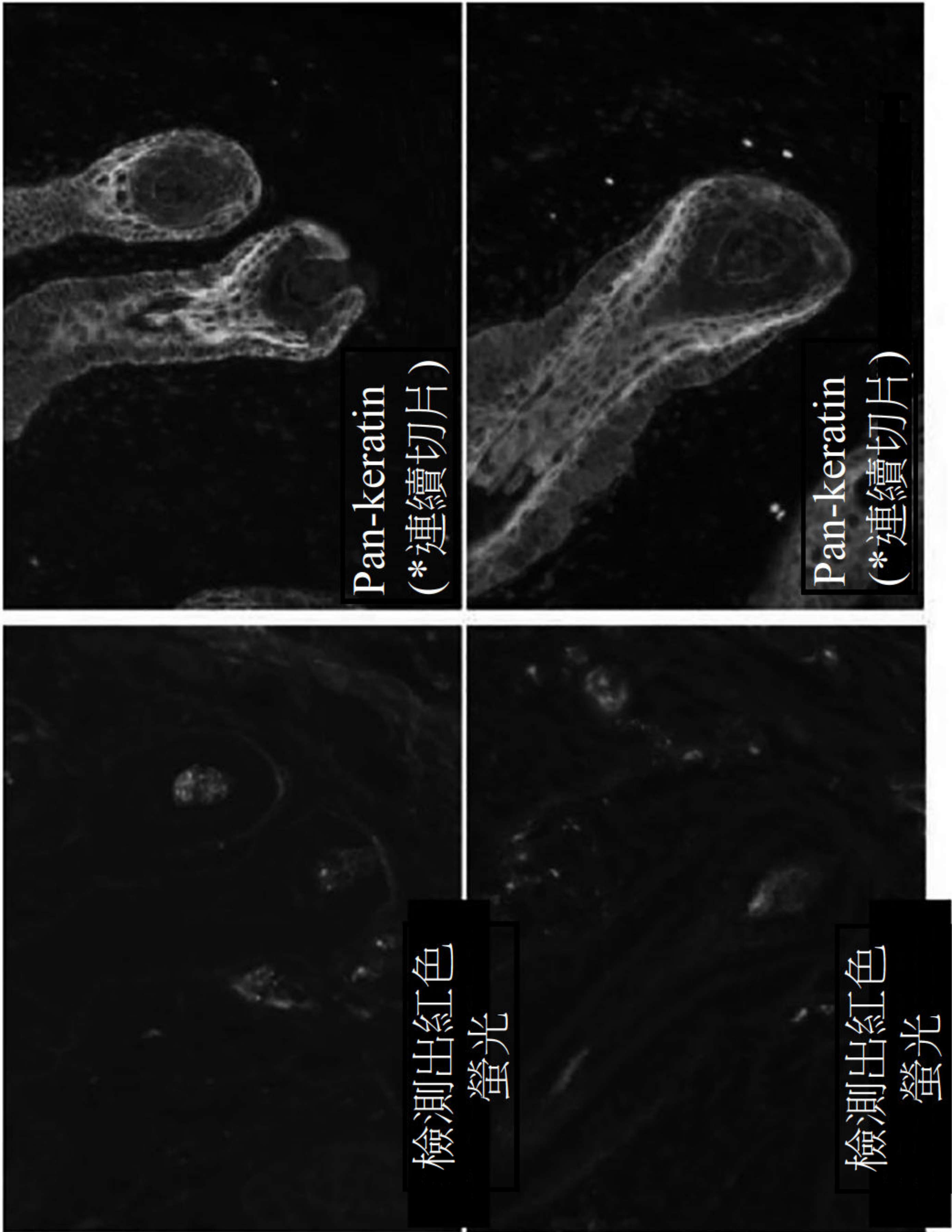
【圖4】

(A)

利用紅色螢光進行標記之DR球狀體



(B)



【圖5】