

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7303612号
(P7303612)

(45)発行日 令和5年7月5日(2023.7.5)

(24)登録日 令和5年6月27日(2023.6.27)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	35/35 (2015.01)	A 6 1 K	35/35
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28
A 6 1 K	35/34 (2015.01)	A 6 1 K	35/34
A 6 1 K	35/36 (2015.01)	A 6 1 K	35/36
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02

F I

請求項の数 14 (全67頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2017-517678(P2017-517678)
 (86)(22)出願日 平成27年10月2日(2015.10.2)
 (65)公表番号 特表2017-530151(P2017-530151
 A)
 (43)公表日 平成29年10月12日(2017.10.12)
 (86)国際出願番号 PCT/US2015/053856
 (87)国際公開番号 WO2016/054592
 (87)国際公開日 平成28年4月7日(2016.4.7)
 審査請求日 平成30年10月1日(2018.10.1)
 審判番号 不服2021-4429(P2021-4429/J1)
 審判請求日 令和3年4月6日(2021.4.6)
 (31)優先権主張番号 62/059,773
 (32)優先日 平成26年10月3日(2014.10.3)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73)特許権者 319008281
 サイトリ・セラピューティクス株式会社
 東京都千代田区大手町一丁目1番1号
 大手町パークビルディング
 (74)代理人 100114890
 弁理士 アインゼル・フェリックス=ラ
 インハルト
 (74)代理人 100098501
 弁理士 森田 拓
 (74)代理人 100182545
 弁理士 神谷 雪恵
 (72)発明者 フレイザー ジヨン ケイ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92
 121 サン デイエゴ カラン ロード
 3020

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 熱傷の進行の緩和ならびに皮膚移植片の取り込みおよび治癒の改善における再生細胞の使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象におけるレシピエントの創傷部位内への皮膚移植片の取り込みを増強させるための、あるいは対象におけるレシピエントの、皮膚移植片による創傷部位の治癒を加速させるための、脂肪由来再生細胞を含む組成物であって、前記脂肪由来再生細胞が、CD45陽性細胞を含み、かつ、脂肪由来幹細胞、内皮細胞（血液およびリンパ内皮細胞を含む）、内皮前駆体および前駆細胞、マクロファージ、線維芽細胞、周皮細胞、平滑筋細胞、前脂肪細胞、ケラチノサイト、単能性および多分化能性の前駆体および前駆細胞（およびその子孫）、ならびにリンパ球からなる群から選択される、1つまたは複数の種類の脂肪由来再生細胞を含有する任意の異種または同種の細胞集団であり、組成物が静脈内投与用製剤である、組成物。

【請求項2】

対象におけるレシピエントの創傷部位内への皮膚移植片の取り込みを増強させるための、あるいは対象におけるレシピエントの、皮膚移植片による創傷部位の治癒を加速させるための、脂肪由来再生細胞を含む組成物であって、前記脂肪由来再生細胞が、CD45陽性細胞を含み、かつ、脂肪由来幹細胞、内皮細胞（血液およびリンパ内皮細胞を含む）、内皮前駆体および前駆細胞、マクロファージ、線維芽細胞、周皮細胞、平滑筋細胞、前脂肪細胞、ケラチノサイト、単能性および多分化能性の前駆体および前駆細胞（およびその子孫）、ならびにリンパ球からなる群から選択される、1つまたは複数の種類の脂肪由来再生細胞を含有する任意の異種または同種の細胞集団であり、組成物がレシピエントの創傷

部位、皮膚移植片、またはその両方に投与するための製剤であり、かつ、請求項 1 に記載の組成物と組みあわせて用いられるための組成物。

【請求項 3】

レシピエントの創傷部位が熱傷部位である、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

レシピエントの創傷部位が非治癒性潰瘍である、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

熱傷が全層熱傷である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 6】

熱傷が中間層熱傷である、請求項 3 に記載の組成物。

10

【請求項 7】

対象がヒトである、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 8】

組成物が、細胞、組織、および組織断片からなる群から選択される添加剤を含む、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

皮膚移植片が分層皮膚移植片である、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】

皮膚移植片が網目にかけた自家移植片である、請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 11】

熱傷が熱による熱傷である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 12】

熱傷が化学薬品による熱傷である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 13】

脂肪由来幹細胞が、脂肪由来再生細胞の細胞成分の少なくとも 0.1 % を構成する、請求項 1 から 12 までのいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 14】

脂肪由来再生細胞が、培養されていない細胞である、請求項 1 から 13 までのいずれか 1 項に記載の組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦政府支援の研究開発に関する陳述

本発明は、保健社会福祉省によって授与された契約 HHS0100201200008 C 号下の政府の支援で行われた。米国政府が本発明において特定の権利を有する。

【背景技術】

【0002】

皮膚 (skin または cutis) とは、外側の表皮層および内側の真皮層が含まれる二重層の器官である。表皮層自体は、死細胞およびケラチンの外層、ならびに増殖するケラチノサイトの基底層を含む。表皮層は、毒素 (たとえば細菌性および環境性) に対する物理的障壁を提供し、水分損失を防止し、体温を維持する。内側の真皮層は、表皮層と皮下組織の間に位置している。真皮層は、コラーゲン線維から構成される真皮乳頭層、ならびにコラーゲン線維と線維芽細胞、マクロファージ、肥満細胞、および脂肪細胞を含めた細胞とから構成される真皮網状層に分けられる。また、真皮層は、細動脈、細静脈、および毛細の複雑な血管叢である微小循環も含有する。真皮は、表皮層に支えを提供し、身体への圧力や歪みを和らげ、また表皮層および真皮層に栄養素を提供して廃棄物を除去するように機能する。

40

皮膚熱傷は、皮膚への最も破壊的な侵襲のうちの 1 つであり、皮膚 (および場合によっ

50

ては皮下)組織の損傷、瘢痕、さらには死滅を引き起こす。熱傷は米国において毎年2百万件を超える医療手順を計上している。これらのうち、150,000人の対象が入院しており、10,000人の対象が死亡している(Bronzino, 1995, The Biomedical Engineering Handbook (CRC Press: Florida))。

【0003】

熱傷は、病変の重篤度に応じて4つのカテゴリー、すなわち、(1)表在性または第1度(2)中間層または第2度の熱傷、(3)全層または第3度の熱傷(病変は、皮下層を含み、感応性がないことおよび白色になることに関連する)、ならびに(4)真皮下または第4度の熱傷に分類される。中間層熱傷は、(a)表在性中間層熱傷(b)中部中間層熱傷(mid partial thickness burn)、および(c)深部中間層熱傷にさらに細分類される。表在性/第1度熱傷は表皮のみに影響を与え、介入なしで、3~5日間以内に瘢痕を伴わずに回復する。表在性中間層熱傷は、表皮を通じて真皮乳頭層内にまで及ぶ。表在性中間層熱傷は、最初は赤く見えて水疱を形成し、過敏性および疼痛によって特徴づけられている。典型的には、表在性中間層熱傷は瘢痕と関連づけられていない。深部中間層熱傷は、真皮の網状層内にまで及ぶ。深部中間層熱傷は、黄色または白色に見え、水疱形成を示す場合がある。表在性中間層熱傷とは対照的に、深部中間層熱傷は、瘢痕および拘縮と関連づけられており、多くの場合切除術および移植術を必要とする。全層熱傷は真皮層全体に及ぶ。全層熱傷は瘢痕および拘縮によって特徴づけられている。熱傷切除術(一部の事例では切断術)は、全層熱傷において標準である。真皮下または第4度熱傷は、表皮および真皮層を通じて、根底にある脂肪、筋肉および骨内にまで及ぶ。

10

【0004】

熱傷傷害における一次組織欠損は、熱、化学薬品、電気、摩擦、または放射線によって誘導された熱傷に続くタンパク質の変性から生じる。熱傷後、中間層および全層熱傷においては、熱傷源の中心部で壊死が起こり、周辺では重篤度が徐々に下がる。熱傷領域は、凝血区域、鬱血区域、および充血区域の3つの区域に分類される。凝血/壊死区域とは、熱傷源に最も近い、生育不能な熱傷焼痂をいう。鬱血区域は、凝血区域を取り囲み、組織灌流の減少、生細胞と非生細胞の混合物、毛細血管狭窄、および虚血によって特徴づけられている。鬱血区域を取り囲む充血区域は、熱傷に対する代償反応としての増加した血流によって特徴づけられている、損傷していない組織を含む。充血区域内の組織は常に回復する。鬱血区域内の組織は、適切に介入すれば救出可能である可能性がある。しかし、炎症伝達物質の放出、組織浮腫、および/または感染症は、既に決定的に損傷した/虚血性となった組織への血流をさらに損なうため、適切に処置されない場合は、鬱血区域内の組織は死滅する(たとえば壊死および/またはアポトーシスの結果として)。

20

【0005】

熱傷の3つの区域は三次元であり、鬱血区域において組織が欠損することにより、創傷は深く広がる。この現象は、「熱傷の進行」または「熱傷の転換」と呼ばれる。したがって、当初は中間層性として評価された熱傷は、時間と共に全層性に進行し得る。アポトーシス(タンパク質合成を要する能動的なプロセス、すなわちエネルギー依存性のプロセス)および壊死(細胞死をもたらすエネルギー非依存性の「受動的な」プロセス)はどちらも虚血区域内の組織から生育不能な組織への転換において観察される。Singer, et al (2008) Academic Emergency Medicine 15:549-554を参照されたい。

30

【0006】

熱傷創傷の接線切除、焼痂切開術、または創傷清拭は、3週間以内に治癒することが予測されない熱傷のための標準治療とみなされている。そのような熱傷には、深部中間層熱傷および全層熱傷が含まれる。Choi, et al. (2008) J Craniofac. Surg. 19:1056-60。生育不能な灌流されない組織は細菌および真菌の病巣であるため、感染症の可能性を下げるために、既に生育不能である組織または生育不能となることが予想される組織は切除される。また、死滅、損傷、または感染した組織などが存在する場合、残存している健康な組織の治癒の潜在性を改善するために、創傷の清拭も熱傷の状況外で幅広く使用され

40

50

ている。通常、個体を細菌、真菌、および環境毒素への曝露から遮蔽するように機能する表皮層が欠損するときには、熱傷対象における感染症の危険性が非常に高い。また、非生細胞および細胞細片も毒性産物の源であり、炎症反応を引き起こす。熱傷の創傷清拭は、死亡率を低下させることが実証されており、入院を短縮させ、創傷治癒の速度の改善および続く瘢痕の縮小に関連づけられている。

【 0 0 0 7 】

創傷清拭を単独で使用した場合、感染症の危険性は依然として非常に高い。したがって、多くの場合、創傷清拭した領域の治癒を促進し、その拘縮および瘢痕を防止するために皮膚移植片が使用される。理想的には、皮膚移植片は患者自身の皮膚（ドナー部位）から採取する。しかし、大きなサイズの移植片が必要な場合、または患者が安定していない場合、自家移植片は実現可能でない場合がある。さらに、ドナー皮膚の取得は有痛性であり、感染症や、最初の熱傷傷害が原因で全体的な健康が既に損なわれている対象の不安定化などの危険性を伴う。そのような事例では、同種移植片（すなわち、同じ種の他の対象から取得したもの）、異種移植片（すなわち、異なる種から取得したもの）、および人工血管移植片が代替物として使用される。皮膚移植片に伴う他の潜在的な合併症には、移植片不全、皮膚移植片の拒絶、ドナーもしくはレシピエント部位での感染症、または自家移植片のドナー部位が治癒に伴って体液および血液を漏出することが含まれる。これらの合併症のうちの特定のもの（たとえば、移植片不全および皮膚移植片の拒絶）は、同種移植片または異種移植片の代わりに自家移植片を使用することによって幾分か緩和され得る。

【 0 0 0 8 】

創傷／熱傷の深度および重篤度に応じて、全層皮膚移植片または分層皮膚移植片のどちらかが推奨される。分層皮膚移植片、すなわち「S T S G」は、表皮と、根底にある真皮の一部のみを含有する。全層皮膚移植片は、表皮と、真皮の全層を含有する。分層皮弁は、外科的「取り込み」の度合が低いことから妨げられている。典型的には、移植した皮膚の約 20% ~ 40%のみが、その新しい位置に自身を再建することに成功する。全層皮弁は、新しい部位において再建することがさらに困難である。米国特許第 4 8 1 0 6 9 3 号を参照されたい。移植片不全は、皮膚移植片の下に生育不能な組織が存在することをもたらす、創傷床の不十分な切除、創傷床への不十分な血管供給、血腫および漿液腫が床と皮膚移植片との間に障壁を形成すること、移植片の血管再生を防止する、移植片の剪断または位置ずれ、および、移植片が床に接着することを防止する、移植片の分解または過剰な浸出液を生じる可能性がある感染症を含めて、1つまたはいくつかの理由の結果として生じる場合がある。放射線に対して二次的に発生する創傷は、分層皮膚移植片（S T S G）を支持する可能性が低く、多くの場合、生存を最適化するための付加的手段を必要とする。同様に、糖尿病および血管系を損なう他の状態（たとえば末梢血管疾患など）に罹患している対象も、血管系を損なう状態を患っていない対象と比較して、皮膚移植片の「取り込み」がより低い可能性がある。皮膚移植に関連する先天的な危険性に加えて、皮膚移植片は効果であり、多くの場合供給が限定されている。したがって、組織の切除を最小限にし（またはさらには排除する）、手順において使用する移植組織の量を最小限にすることが非常に望ましい。熱傷創傷の進行は、切除および移植を必要とする壞死組織の全体表面積（「T B S A」）が、熱的外傷後の最初の数日間に進行的に増加する、「移動標的」状況をもたらす。さらに、切除および縫合を必要とする熱傷の程度の境界を定めた後、様々な皮膚移植片の供給が限定されていることが原因で、移植片が必要な領域が拡大することにより、最終的な創縫合を完了するまでの時間がさらに延びる。転換／進行の低下は、組織切除自体の必要性を最小限にしおよび／または防止し、創縫合の成功率を増強して回復を加速し、熱傷患者の罹患率および死亡率を減少させるであろうため、熱傷創傷の進行／転換を最小限にする、ならびに／または皮膚移植片の取り込みおよび治癒を増強する治療の必要性は明白である。さらに、熱傷創傷の進行の低下または排除は、必要な皮膚移植材料の量を最小限にする。最後に、改善された移植片の取り込みは対象の転帰を改善し、失敗した移植片に関連する危険性およびさらなる費用、ならびに二次的な繰り返しの移植片の採取および施用の必要性を最小限にするため、熱傷または移植を必要とする他の創傷

10

20

30

40

50

の状況における、移植片の「取り込み」を改善することの望ましさは明白である。

【0009】

創傷治癒（たとえば、熱傷および他の種類の創傷の治癒）ならびに皮膚移植片の治癒における別の大きな懸念事項は、肥厚性瘢痕などの病理学的瘢痕の発生である。肥厚性瘢痕とは、盛り上がった瘢痕をもたらす、過剰な量のコラーゲンの堆積によって特徴づけられた皮膚状態である。肥厚性瘢痕は、一般に、真皮の深層に関与する熱的または外傷的傷害の後に発生する。関節の上に存在する場合、肥厚性瘢痕は重篤な関節拘縮を引き起こし、最終的には、廃用に対して二次的に、根底にある骨の侵食をもたらす場合がある。Aarabi, et al. PLOS Medicine (2007) 4(9):1464-1470を参照されたい。たとえば、熱傷患者において瘢痕形成を制限する努力は、皮膚を、ヒト分層自家移植片もしくは同種移植片、またはIntegra（登録商標）などの合成真皮類似物ですぐに置き換えることに大きく依存してきた。しかし、皮膚移植を用いても、臨床家らは、肥厚性瘢痕が依然として酷い臨床問題であることを理解している。たとえば、Sheridan, et al. (2004) J. Am. Col. Surg. 198:243-263を参照されたい。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

臨床経験により、肥厚性瘢痕は、創傷治癒の正常プロセスの異常な形態であることが示唆されている。Singer, et al. (1999) N Engl J Med. 341:738-746。しかし、過剰に豊富な線維症の病因は知られていない。肥厚性瘢痕形成の病態生理には、創傷治癒の構成的に活性な増殖期、ならびにコラーゲンの障害性の產生（たとえば、コラーゲンの過剰な產生および乱れた配向性）が関与している。瘢痕組織は血管の多いユニークな構造的構成を有しており、炎症細胞および線維芽細胞を伴い、豊富かつ乱れたマトリックス構造に寄与している。病因はよく理解されていないが、TIMP-1の高い発現および MMP-1活性の阻害が創傷修復中のコラーゲンの分解の減少を引き起こすことに関連づけられており、肥厚性瘢痕の形成に寄与すると考えられている。元の皮膚の欠陥が機能不全な組織の塊によって置き換えられることが最終結果である。たとえば、瘢痕は、正常な皮膚の障壁機能を十分な程度にまで維持し得るが、根底および隣接の構造の正常な運動を許容するために必要な屈曲性および柔軟性は維持していない。関節の限定された範囲の運動を衰弱させることなどの続発症、ならびに顔面不動、およびそれに関連する表情を達成できないことをもたらす場合がある。また、III型コラーゲン対I型コラーゲンの比も、非病理学的瘢痕と比較して肥厚性瘢痕中で変更／上昇していると報告されている。Oliviera, et al. (2009) Int. Wound J. 6(6):445-452。肥厚性瘢痕の別の特徴は、アルファ-平滑筋アクトин（アルファ-SMA）のレベルの上昇である。非病理学的瘢痕およびケロイド瘢痕とは対照的に、肥厚性瘢痕には、瘢痕組織中に特徴的な突出した垂直方向の血管が存在する。機能の喪失、動作の制限、美観を損なうことなどを含めた、肥厚性瘢痕から生じる有害な結果を考慮すると、防止および治療する選択肢が望ましい。

20

【課題を解決するための手段】

【0011】

本明細書中には、創傷の処置に有用な組成物および方法を開示する。一態様では、本明細書中に開示する実施形態は熱傷の処置に関連する。したがって、一部の実施形態は、創傷の進行を防止または緩和するための組成物および方法に関する。そのような実施形態では、熱傷を有しており、熱傷の進行を発生する危険性にある対象を同定することができる。熱傷の進行を緩和させるために十分な治療有効量の再生細胞を含む組成物を、対象に投与することができる。また、この方法には、熱傷に対して創傷清拭もしくは焼痂切開術を行う、および／または熱傷の進行を測定もしくは計算するステップも含めることができる。

30

【0012】

第2の態様では、本明細書中に開示する実施形態は、レシピエントの創傷部位内への皮膚移植片の取り込みを増強させるための組成物および方法に関する。そのような実施形態には、皮膚移植片を提供するステップと、皮膚移植片に再生細胞を含む組成物を投与して

40

50

強化された皮膚移植片を作製するステップと、強化された皮膚移植片をレシピエントの創傷部位に施用するステップとを含めることができる。代替実施形態では、この方法には、皮膚移植片を提供するステップと、再生細胞を含む組成物を対象に全身的および/または創傷部位に局所的に投与するステップとを含めることができる。皮膚移植片は、再生細胞を施用する前または後のどちらかに、レシピエントの創傷部位に施用することができる。

本明細書中に開示する実施形態の第3の態様は、深部中間層または全層創傷における肥厚性瘢痕の形成を防止または最小限にするための組成物および方法に関する。そのような実施形態には、深部中間層または全層創傷を有する対象を同定するステップと、対象に、たとえば、全身的または深部中間層もしくは全層創傷へ局所的に、再生細胞を含む組成物を投与するステップとを含めることができる。

10

【0013】

第4の態様では、本明細書中に開示する実施形態は、肥厚性瘢痕を縮小または排除する組成物および方法を提供する。この方法には、肥厚性瘢痕を有する対象を同定するステップと、再生細胞を含む組成物を、対象に、たとえば、全身的および/または肥厚性瘢痕へ局所的に投与するステップとを含めることができる。この方法には、再生細胞を含む組成物を投与する前に瘢痕組織を創傷清拭するさらなるステップを含めることができる。

第5の態様では、本明細書中に開示する実施形態は、必要とする対象において、拘縮を処置する組成物および方法に関する。関節または筋肉の拘縮を有する対象を同定し、再生細胞を含む組成物を対象に投与し、それによって拘縮を処置することができる。この方法には、運動の範囲、瘢痕などを評価するステップを含めることができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】下記例1に記載の放射線および熱損傷組合せ実験の実験処理フローを示すチャートである。

【図2】下記例1の実験で実施した、火傷組織内への局所注射部位を示す図である。

【図3】例1で分析した例示的火傷創の、(a)収縮区域(無創傷皮膚で覆われていない全区域)および(b)上皮化区域(新生上皮化の根拠が示されている創傷内区域)を示す画像である。太い実線は、生検区域を示す。内側の点線は、再上皮化の境界を示す。外側の点線は、収縮の評価のための創傷の境界を示す。

【図4】例1の実験で実施した、創傷生検(2または4つの生検回収構成)についてスケジュールおよび火傷創の処理(免疫組織化学[IHC]または分子分析のための瞬間凍結)の概略を示す図である。

30

【図5A】例1に記載の、対照動物(群1a)、脂肪由来再生細胞の局所投与を受けた動物(群1b)および脂肪由来再生細胞の静脈内投与を受けた動物(群1c)における経時的な血液学的パラメータの測定を示すグラフである。図5Aは、絶対白血球数を示す。

【図5B】例1に記載の、対照動物(群1a)、脂肪由来再生細胞の局所投与を受けた動物(群1b)および脂肪由来再生細胞の静脈内投与を受けた動物(群1c)における経時的な血液学的パラメータの測定を示すグラフである。図5Bは、絶対好中球数を示す。

【図5C】例1に記載の、対照動物(群1a)、脂肪由来再生細胞の局所投与を受けた動物(群1b)および脂肪由来再生細胞の静脈内投与を受けた動物(群1c)における経時的な血液学的パラメータの測定を示すグラフである。図5Cは、絶対血小板数を示す。

40

【図5D】例1に記載の、対照動物(群1a)、脂肪由来再生細胞の局所投与を受けた動物(群1b)および脂肪由来再生細胞の静脈内投与を受けた動物(群1c)における経時的な血液学的パラメータの測定を示すグラフである。図5Dは、絶対リンパ球数を示す。

【図6】図6A～6Bは、例1に記載の血管新生条件下で播種したブタ脂肪由来再生細胞の位相差顕微鏡写真(拡大率1000×)を示す図である。試験動物#5341010からの細胞の顕微鏡写真(図6A)。動物#5344302からの細胞の顕微鏡写真(図6B)。矢印は、管様構造を指している。

【図7】図7Aおよび7Bは、例1に記載の脂肪生成アッセイにおけるオイルレッドO染色の前(図7A)および後(図7B)の動物#5341010からの細胞を示す代表的な

50

位相差顕微鏡写真（拡大率 100×）である。

【図 8】例 1 に記載の群 1 a（対照）、群 1 b（局所送達された脂肪由来再生細胞）および群 1 c（静脈内送達された脂肪由来再生細胞）における動物に対する様々な時点の創傷収縮パーセントを示すグラフである。

【図 9 A】例 1 に記載の、群 1 a（LR 対照）、群 1 b（脂肪由来再生細胞局所送達）および群 1 c（脂肪由来再生細胞静脈内送達）の動物における、損傷後 7 日間の再上皮化パーセント（図 9 A）を示す棒グラフである。

【図 9 B】例 1 に記載の、群 1 a（LR 対照）、群 1 b（脂肪由来再生細胞局所送達）および群 1 c（脂肪由来再生細胞静脈内送達）の動物における、損傷後 7 日間の上皮被覆パーセント（図 9 B）を示す棒グラフである。

【図 9 C】例 1 に記載の、群 1 a（LR 対照）、群 1 b（脂肪由来再生細胞局所送達）および群 1 c（脂肪由来再生細胞静脈内送達）の動物における、活性化上皮区域（ μm^2 ）（図 9 C）を示す棒グラフである。

【図 9 D】例 1 に記載の、群 1 a（LR 対照）、群 1 b（脂肪由来再生細胞局所送達）および群 1 c（脂肪由来再生細胞静脈内送達）の動物における、増殖上皮パーセント（図 9 D）を示す棒グラフである。

【図 10】図 10 A は、例 2 に記載の焼痂試料の生検に対するマッソントリクローム染色の写真である。図 10 B および 10 C は、図 10 A の詳細図である。黒の矢印は、脂肪組織における出血を示す。

【図 11】例 2 に記載の脂肪生成アッセイを行った焼痂組織由来の脂肪由来再生細胞に対するオイルレッド O 染色の写真（拡大率 200×）である。

【図 12】図 12 A ~ 12 C は、例 2 に記載の例示的な焼痂試料から単離した脂肪由来再生細胞の血管新生培養物で形成された免疫染色血管様構造の写真である。

【図 13】下記例 3 に記載の放射線および熱損傷組合せ実験についての実験処理フローを示すチャートである。

【図 14】下記例 3 に記載の、群 D 対照（LR）および試験（ADR C）処置創傷における火傷誘導後 14 日での個々の創傷の開放創傷面積のパーセンテージを示すグラフである。

【図 15】下記例 3 に記載の試験 14 日目における、群 D の LR および ADR C 処置動物における全ての創傷についての創傷上皮化のパーセンテージを示す散布図である。対照および試験コホートあたり $N = 16$ の創傷。

【図 16】図 16 A および 16 D は、それぞれ 14 および 21 日目の、ビヒクルのみを受けた群 D の動物における深部肉芽組織の新血管形成を示す代表的な画像である。図 16 B および 16 D は、それぞれ 14 および 21 日目の、ADR C を受けた群 D の動物における深部肉芽組織の新血管形成を示す代表的な画像である。ビヒクルのみまたは局所 ADR C を受けた動物から回収した創傷生検を、CD 31（内皮マーカー）で染色した。矢印は、CD 31 陽性血管を示す。スケールバー = $300 \mu\text{m}$ 。下部パネル：LR および ADR C 処置動物における 14 および 21 日目の微小血管密度の定量。1 群あたり $n = 4$ の動物、下記例 3 に記載の各処置条件について全 6 つの創傷。

【図 17】下記例 3 に記載の、群 D 動物の LR および ADR C 処置創傷における上皮厚さを示すグラフである。

【図 18 A】肉芽組織成熟化の組織学的評価を示す図である。図 18 A は、下記例 3 に記載の実験で生検組織診断に使用した尺度を示す。

【図 18 B】肉芽組織成熟化の組織学的評価を示す図である。図 18 B は、INTEGR A（登録商標）または ADR C を補足した INTEGR A（登録商標）で処置した創傷における組織の経時的な器質化のグラフである。

【図 18 C】肉芽組織成熟化の組織学的評価を示す図である。図 18 C は、INTEGR A（登録商標）または ADR C を補足した INTEGR A（登録商標）で処置した創傷における、経時的な肉芽組織厚さを示すグラフである。肉芽組織厚さの平均は、21 日目まで、Integra 対照よりも、ADR C + Integra で処置した創傷の方が大きかった。

10

20

30

40

50

【図19A - 19B】図19Aおよび19Bは、INTEGRA（登録商標）またはADRCを補足したINTEGRA（登録商標）で処置した創傷における14日目および21日目の微小血管密度を示すグラフである。

【図19C - 19D】図19Cおよび19Dは、INTEGRA（登録商標）またはADRCを補足したINTEGRA（登録商標）で処置した創傷における14日目および21日目の全CD312染色を示すグラフである。

【図19E - 19F】図19Eおよび19Fは、INTEGRA（登録商標）またはADRCを補足したINTEGRA（登録商標）で処置した創傷における14日目および21日目の全ルーメン面積を示すグラフである。

【図20A】INTEGRA（登録商標）またはADRCを補足したINTEGRA（登録商標）で処置した創傷におけるINTEGRA（登録商標）マトリックス充填パーセントを示すグラフである。

【図20B】INTEGRA（登録商標）またはADRCを補足したINTEGRA（登録商標）で処置した創傷における1mm²あたりの細胞数を示すグラフである。

【図20C】INTEGRA（登録商標）またはADRCを補足したINTEGRA（登録商標）で処置した創傷における1mm²あたりの血管数を示すグラフである。

【図21】下記例3に記載される、群Cの21日目で回収した生検の上皮被覆を示すグラフである（1群あたりn=4の動物、1群あたり6つの創傷）。

【図22】下記例3に記載の、TISSUEL（登録商標）+ビヒクルまたはTISSUE L（登録商標）+ADRCを受けた動物の表層肉芽組織内における7日目、14日目および21日目の微小血管密度（MVD）の定量を示すグラフである（1群あたりn=4の動物、6創傷/群）。

【図23】例2に記載のCD34対CD90染色に関して細胞の散乱分布を示す、試料#E5由来の散布図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本明細書中に開示する実施形態は、部分的に、再生細胞が含まれる組成物が、熱傷の進行/転換、ならびに/または熱傷から生じる二次的な傷害および瘢痕を緩和、縮小、および防止するために機能できるという発見に基づいている。また、本実施形態は、部分的に、再生細胞は、焼痂組織からの脂肪を含めた、熱による熱傷傷害を患っている対象由来の脂肪組織から容易に得ることができるという発見に基づいている。本実施形態は、部分的に、再生細胞は、放射線傷害を患っている対象由来の脂肪組織から容易に得ができるという発見にさらにに基づいている。最後に、本明細書中に開示する実施形態は、部分的に、再生細胞が含まれる組成物は、深部中間層または全層創傷（熱傷など）後の病理学的瘢痕、たとえば肥厚性瘢痕の防止および/または処置に有用であるという発見にもに基づいている。

【0016】

定義

記述した数値に言及する際に本明細書中で使用する用語「約」とは、記述した数値のプラスまたはマイナス方向に10%の範囲以内の値を示す。

【0017】

本明細書中で使用する用語「由来する」とは、それから単離した、または他の様式で精製もしくは分離したことを行う。たとえば、脂肪由来の幹細胞および他の再生細胞は脂肪組織から単離される。同様に、用語「由来する」とは、組織、たとえば脂肪組織から直接単離した細胞から大規模に培養した細胞（たとえば、分裂細胞の大多数が3、4、5、もしくはそれ未満の細胞倍加を受ける培養条件下に置いたもの）、または一次単離物から培養もしくは拡大した細胞を含しない。したがって、脂肪由来の幹細胞および他の再生細胞ならびにその組合せを含めた「脂肪由来細胞」とは、脂肪組織から得られた細胞をいい、細胞は、大規模に培養したものではない、たとえば、脂肪組織マトリックスから分離されたままのその「ネイティブ」形態にある。

10

20

30

40

50

本明細書中で使用するように、細胞は、特定のマーカーが検出可能な場合に、そのマーカーについて「陽性」である。たとえば、CD73は、脂肪由来の幹細胞または再生細胞において、バックグラウンドよりも検出可能に高い量で検出可能であるため（たとえば、任意の所定のアッセイにおいてアイソタイプ対照または実験的陰性対照と比較して）、脂肪由来再生細胞は、たとえばCD73について陽性である。また、あるマーカーが、細胞を少なくとも1つの他の細胞種から区別するために使用することができる、または、存在するもしくは細胞によって発現された場合に、細胞を選択もしくは単離するために使用することができる場合にも、細胞はそのマーカーについて陽性である。

【0018】

本明細書中で使用する「再生細胞」とは、完全または部分再生、修復、あるいは器官、組織、または生理的単位もしくは系の構造または機能の置換を引き起こす、またはそれに寄与して、それによって、治療的、構造的、または美容上の利益をもたらす、本明細書中に開示した実施形態の系および方法を使用して得られた任意の異種または同種の細胞集団をいう。再生細胞の例には、成体幹細胞、内皮細胞、内皮前駆細胞、内皮前駆細胞、マクロファージ、線維芽細胞、周皮細胞、平滑筋細胞、前脂肪細胞、分化または脱分化脂肪細胞、ケラチノサイト、単能性および多分化能性の前駆体および前駆細胞（およびその子孫）、ならびにリンパ球が含まれる。

【0019】

したがって、本明細書中で使用する脂肪由来再生細胞（「ADRC」）とは、脂肪由来幹細胞、内皮細胞（血液およびリンパ内皮細胞が含まれる）、内皮前駆細胞、内皮前駆細胞、マクロファージ、線維芽細胞、周皮細胞、平滑筋細胞、前脂肪細胞、ケラチノサイト（keratinocyte）、単能性および多分化能性の前駆体および前駆細胞（およびその子孫）、ならびにリンパ球を含めた、1つまたは複数の種類の脂肪由来再生細胞を含有する任意の異種または同種の細胞集団をいう。脂肪由来幹細胞は、脂肪由来再生細胞の細胞成分の少なくとも0.1%を構成する。

同様に、「骨髄由来再生細胞」（「BMR」）とは骨髄由来幹細胞、内皮細胞（血液およびリンパ内皮細胞が含まれる）、内皮前駆細胞、内皮前駆細胞、マクロファージ、線維芽細胞、周皮細胞、平滑筋細胞、前脂肪細胞、ケラチノサイト、単能性および多分化能性の前駆体および前駆細胞（およびその子孫）、ならびにリンパ球を含めた1つまたは複数の種類の骨髄由来再生細胞を含有する任意の異種または同種の細胞集団をいう。

【0020】

一部の文脈では、用語「前駆細胞」とは、1つまたは複数の細胞種に分化する能力を有し、1つまたは複数の特定の機能を行い、自己複製する能力が制限されているまたは有さない、単能性、二分化能性、または多分化能性である細胞をいう。本明細書中に開示する前駆細胞の一部は多能性であり得る。

本明細書中で使用する語句「接着性細胞」とは、足場依存性である、すなわちin vitroで成長するために表面への付着を必要とする、同種または異種の細胞集団をいう。

【0021】

一部の文脈では、用語「脂肪組織由来細胞」とは、成熟脂肪細胞および結合組織から活性細胞成分（たとえば、脂肪細胞および/または赤血球が含まれない細胞成分）を分離するように処理した脂肪細胞から抽出した細胞をいう。分離は部分的または完全であり得る。すなわち、「脂肪組織由来細胞」は、一部の脂肪細胞および結合組織を含有していても、していないくともよく、また、凝集体または部分的に脱凝集した形態で存在する一部の細胞を含有していても、していないくともよい（たとえば、細胞外基質によって連結された2つ以上の細胞を含む血管またはリンパ管の断片）。この画分は、本明細書中で「脂肪組織由来細胞」、「脂肪由来細胞」、「脂肪由来再生細胞」または「ADC」と呼ぶ。典型的には、ADCとは、脂肪組織から細胞を洗浄および分離することによって得られる細胞のペレットをいう。ペレットは、典型的には、結合組織および脂肪組織マトリックスから遊離された細胞の懸濁液を濃縮することによって得られる。例として、ペレットは、細胞が遠心分離容器の底に凝集するように脂肪由来細胞の懸濁液を遠心分離することによって得

10

20

30

40

50

ることができ、たとえば間質血管画分である。一部の実施形態では、本明細書中に記載の脂肪由来細胞集団には、他の細胞種の中でとりわけ白血球が含まれる。一部の実施形態では、本明細書中に記載脂肪由来細胞集団には、他の再生細胞種の中でとりわけ内皮細胞が含まれる。

一部の文脈では、用語「脂肪組織」とは、脂肪細胞および血管細胞を含めた複数の細胞種を含有する組織をいう。脂肪組織には、成体幹細胞（A S C）、内皮前駆体および前駆細胞、周皮細胞などを含めた複数の再生細胞種が含まれる。したがって、脂肪組織とは、脂肪を保存する結合組織を含めた脂肪をいう。

【0022】

一部の文脈では、用語「脂肪組織の単位」とは、別個または測定可能な量の脂肪組織をいう。脂肪組織の単位は、単位の質量および／または体積を決定することによって測定し得る。本明細書中の開示を参照して、脂肪組織の単位とは、対象から取り出した脂肪組織の全量、または対象から取り出した脂肪組織の全量より少ない量をいい得る。したがって、脂肪組織の単位は、別の単位の脂肪組織と組み合わせて、個々の単位の合計である質量または体積を有する脂肪組織の単位を形成し得る。

10

一部の文脈では、用語「一部分」とは、全体より少ない、材料の量をいう。副部分とは50%未満の量をいい、主要部分とは50%を超える量をいう。したがって、対象から取り出した脂肪組織の全量より少ない、脂肪組織の単位は、取り出した脂肪組織の一部分である。

【0023】

本明細書中で使用する用語「R O S」および「R N S」とは、それぞれ反応性酸素種および反応性窒素種をいう。R O SおよびR N Sには、過酸化水素、ペルオキシ硝酸塩、ヒドロキシルラジカル（·O H）、二酸化窒素ラジカル（·N O₂）および炭酸ラジカル（·C O₃）などの化合物が含まれる。本明細書中で使用する用語「脂質過酸化」、または「脂質過酸化産物」すなわち「L P P」には、それだけには限定されないが、マロンジアルデヒド（M D A）および4-ヒドロキシノネナール（H N E）、アクロレインなどを含めることができる。

20

【0024】

本明細書中で使用する用語「皮膚代替物」または「皮膚移植片」とは、傷害または創傷の発生の前にその部位のネイティブ皮膚によって提供されていた皮膚機能のうちの任意のものを置き換える任意のものをいう。皮膚代替物または皮膚移植片は、同種移植片（たとえば死体移植片など）、または異種移植片であることができる。また、皮膚移植片は自家移植片であることもできる（すなわち、移植を受ける患者から得られた移植片）。ある特定の実施形態では、移植片は分散形態であることができる（たとえば、網目にかけたまたは酵素処理して、完全または部分的に分散した、ケラチノサイトを含めた皮膚細胞の懸濁液を作製し、その後、被覆が必要な領域に施用する、皮膚移植片）。ある特定の実施形態では、移植片は培養細胞を含むことができる（たとえば、支持足場を有するまたは有さない培養ケラチノサイトおよび／または真皮細胞）。好ましくは、皮膚代替物は、何らかの様式で治癒中の創傷内に取り込まれるべきである。したがって、培養または人工の包帯は、表皮層、真皮層、または同時に両層の代替物として使用し得る。一部の移植片は、限定期間の間、皮膚機能を提供するために使用する（一時的な被覆）。たとえば、同種移植片および異種移植片は、最終的な創傷処置または皮膚移植の前に通常は取り除かれる。

30

40

【0025】

本明細書中に開示した組成物および実施形態は、熱傷傷害を有する対象、および／または皮膚移植片（たとえば、皮膚移植片、皮膚代替物など）を必要とする対象を処置するために有用である。したがって、用語「対象」とは、それだけには限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、サル、チンパンジー、および類人猿などの霊長類、ならびにヒトを含めた、任意の哺乳動物をいうことができる。一部の実施形態では、対象はヒトである。用語「対象」は、本明細書中において用語「個体」および「患者」と互換性があるように使用することができる。以下

50

にさらに詳細に記載するように、一部の実施形態では、対象は、放射線傷害（たとえば急性放射線傷害）、および熱傷などの深部中間層または全層創傷を有する。

【 0 0 2 6 】

熱傷の進行

熱傷創傷は、最初の侵襲に続く数日間、成熟し続け、熱傷の分類および処置プロトコールを混乱させる。鬱血区域内の組織が壊死および／またはアポトーシスを受けるため、皮膚への損傷は侵襲後の数日間続く。アポトーシスおよび壊死がどちらも熱傷の虚血性区域で起こる。アポトーシス性真皮細胞は、表在性中間層熱傷と比較して深部中間層熱傷においてはるかに高い頻度で見つかり、20日間以上持続する。たとえばGravante, et al. (2006) *Surgery* 139:854-855を参照されたい。

熱傷の進行は、酸化的ストレス、持続性の炎症、および損なわれた灌流を含めた、複雑な協調した事象に関与している。たとえばShupp, et al. (2010) *J. Burn Care & Res.* 31:849-873を参照されたい。以下にさらに詳細に記述するように、本明細書中に開示する方法および組成物は、これらの経路のうちの1つまたは複数を寛解させるように機能し、したがって、熱傷の進行を最小限にするおよび／または防止する。したがって、本明細書中に開示する方法および組成物は、皮膚移植のレシピエント部位の領域を有利に縮小または最小限にすることができる、一部の例では、熱傷後の皮膚移植の必要性を完全に排除する。

【 0 0 2 7 】

酸化的ストレスは、反応性酸素種の全身発生と、生物系の、反応中間体を容易に解毒する能力および／またはその結果生じる損傷を修復する能力との不均衡の結果として起こる。様々な異なる経路が一点に集中して、熱傷において酸化的ストレスおよびフリーラジカルの過剰を生じる。まず、熱による熱傷は、熱によって引き起こされる溶血性（hemolytic）結合分裂によってフリーラジカルを直接発生することができる。また、熱傷は、たとえば、増殖中のケラチノサイト、毛細内皮細胞、および動脈平滑筋細胞において、キサンチンオキシダーゼおよびNADPHオキシダーゼの活性の増加、ならびに一酸化窒素（「NO」）の産生の増加も引き起こす。たとえばShupp, et al. (2010) *J. Burn Care & Res.* 31:849-873を参照されたい。キサンチンオキシダーゼおよびNADPHオキシダーゼは、損害を与えるROS過酸化水素およびスーパーオキシドを発生する。一方、NOは、スーパーオキシドラジカルと相互作用して、反応性が高い過酸化亜硝酸化合物である反応性窒素種を生じる。反応性酸素種（「ROS」）および反応性窒素種（「RNS」）の増加は、スーパーオキシドジスムターゼ（「SOD」）、グルタチオン、アスコルビン酸、および熱傷に関連するアルファ-トコフェロールの低下を含めた、酸化防御の低下によって強められている。

【 0 0 2 8 】

過剰なROSおよびRNSは、たとえば、DNA、タンパク質、脂質（脂質過酸化産物すなわち「LPP」を生じる）、および他の構造的細胞成分への細胞損傷を含めた複数の有害効果をもたらし、最終的にはアポトーシスをもたらす場合があり、それによって熱傷の進行が引き起こされるおよび／または悪化する。したがって、ROSおよびRNSが熱傷の進行において主要な役割を果たす。また、LLPは、巨視的間空壊死、好中球浸潤、および血栓症においても役割を果たし、それによって熱傷の進行を促進することが示されている。たとえばTaira, et al. (2009) *J. Burn Care Res.* 30:499-504を参照されたい。

【 0 0 2 9 】

細胞損傷と協調して、酸化的ストレスは悪化して持続性の炎症に寄与し、これも熱傷の進行に関係づけられている。ROSは、NF- κ Bの作用を通じて炎症誘発性サイトカインの発現を誘導する。たとえば、細胞膜への損傷（たとえば、最初の熱傷侵襲ならびに／または続くROSおよび／もしくはRNS損傷が原因の、アポトーシスまたは壊死から生じるもの）は、炎症伝達物質の動的なカスケードをもたらす。一方、長期または持続性の炎症はコラーゲン分解およびケラチノサイトのアポトーシスをもたらし、それによって熱傷の進行がさらに進む。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

酸化的ストレスおよび損傷から生じる炎症誘発効果に加えて、たとえば最初の熱傷侵襲から生じる失活組織 (devitalized tissue) も炎症誘発性である。失活組織は露出したC3b結合部位および自己抗原を有しており、代替補体系の強力な活性化因子として役割を果たす。さらに、壞死組織にコロニー形成する細菌も補体系の強力な活性化因子である。補体力スケードの活性化は熱傷創傷の進行に関連していることが知られている。たとえば Henze, et al. (1997) Burns 23:473-477を参照されたい。補体力スケードの活性化は、血流を取り囲む化学走性因子の拡散をもたらす。一方、補体分解因子は好中球を活性化させ、領域性の内皮細胞の接着および遊走をもたらす。同時に、元は組織中に保存されている、または侵襲細胞によって次いで産生されるリンホカインが、創傷自体の中に放出される。これは単球侵襲を刺激し、貪食プロセスによって失活組織、細菌、および大量の自己抗原の創傷清掃を司っている中心的な細胞である、組織マクロファージへのその成熟を増強する。このプロセスは、補体因子のオブソニン化特性によってさらに増強される。酸素フリーラジカル、リソソーム、および炎症性サイトカインはすべて、貪食の結果上昇する。補体の活性化および好中球の血管内刺激が、細胞毒性フリーラジカルの産生をもたらす。

10

【 0 0 3 1 】

TNFアルファ、IL-1、IL-6、IL-8、およびIL-10などの炎症誘発性サイトカインの細胞性放出が熱傷傷害に続いている。たとえば、Dorst, et al. (1993) J. Trauma 35(3): 335-339、Molloy, et al. (1993) J. Immunol. 151: 2142-2149を参照されたい。異常なレベルの、腫瘍壞死因子アルファ (TNFアルファ)、インターロイキン-1b (IL-1b)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-8 (IL-8)、およびインターロイキン-10 (IL-10)などの炎症誘発伝達物質が、熱傷患者において全身的および局所的の両方で報告されている。熱傷の進行 / 転換における壞死の拡大は、上昇したレベルの炎症誘発伝達物質および炎症誘発性サイトカインの低下によって特徴づけられた微小環境によって駆動される。炎症誘発分子の遮断が、熱傷の進行を低下または緩和するために有利であることが実証されている。Sun, et al. (2012) Wound Repair Regen. 20(4):563-72。また、白血球の浸潤も熱傷の進行に関連づけられている。たとえば遮断抗体を全身投与することによって、好中球と内皮との接着を遮断することは、動物モデルにおいて創傷転換を低下させることができ。Choi, et al. (1995) Plastic Reconst. Surg. 96(5): 1007-1250。本明細書中に開示する実施形態は、部分的に、本明細書中に開示した再生細胞が、中間層および全層熱傷の微小環境を改変するために有利に機能することができ、それによって、壞死および / またはアポトーシスの拡大が防止されるおよび / または最小限になるという発見に基づいている。

20

【 0 0 3 2 】

本明細書中に開示する組成物は、熱傷の凝血区域もしくは壞死組織の拡大を止めるもしくは阻害する、または熱傷の凝血区域もしくは壞死組織の拡大を最小限にするために、有利に機能することができる。したがって、一部の実施形態では、必要とする対象において、創傷の進行を最小限にするおよび / または防止する方法を本明細書中に提供する。この方法には、再生細胞を含む組成物を、熱傷が進行する危険性にある対象、たとえば熱傷などの深部中間層創傷または全層創傷を有する対象に投与することを含めることができる。したがって、一部の実施形態では、本明細書中に開示する方法は皮膚移植の必要性を排除する。特定の理論に限定されずに、本明細書中に開示した再生細胞 (たとえば間葉間質細胞) は、それだけには限定されないが、熱傷傷害後の酸化的ストレスおよび / または損傷を最小限にするまたは低下させること、熱傷傷害後の炎症反応を変調すること (たとえば、炎症誘発性サイトカインを弱めるまたは低下させることによって)、鬱血区域内への白血球の浸潤を変調することに、ならびに鬱血区域内の血流を増強、増加、または修復することを含めた、1つまたはいくつの機構によって、熱傷の進行を防止することができる。

30

したがって、本明細書中に記載の再生細胞が含まれる組成物の投与が含まれる、必要と

40

50

する対象において、たとえば鬱血区域内の、熱傷傷害後の酸化的ストレスおよび／または損傷を低下または最小限にする方法を、本明細書中に提供する。他の方法は、本明細書中に記載の再生細胞を投与することが含まれる、必要とする対象における、熱傷傷害後の炎症の変調（たとえば、鬱血区域内の炎症性サイトカインの局所濃度を弱めるまたは低下させること、鬱血区域内の炎症性白血球の浸潤および／または血管外遊走を弱めるまたは低下させること、免疫細胞の抗炎症性表現型への極性化を変調することなど）に関する。本明細書中に記載の再生細胞を対象に投与することが含まれる、熱傷傷害後にたとえば鬱血区域内の血流を増加または増強させる方法を、本明細書中に提供する。

【0033】

熱傷の進行／転換の緩和方法

一部の実施形態では、必要とする対象において熱傷の進行を低下させる方法を提供する。ある特定の実施形態では、対象は、哺乳動物、たとえば、好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ミニブタ、イヌ、ネコ、ウマ、サル、類人猿、ヒトなどであり得る。一部の実施形態では、対象は、随伴性の放射線傷害を有し得る。一部の実施形態は、深部中間層または全層熱傷傷害を有する放射線傷害を有する対象において、熱傷の進行を低下または防止する方法を提供する。一部の実施形態では、放射線傷害は急性放射線傷害である。一部の実施形態では、熱傷傷害は、対象の全体表面積の5%より多く、10%より多く、15%より多く、20%より多く、25%より多く、30%より多く、またはそれ以上を占める。

【0034】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は熱傷の進行を完全に防止することができる。すなわち、熱傷の凝血区域は、熱傷傷害後の最初の領域を超えて拡大しない。一部の実施形態では、熱傷の凝血区域は、本明細書中に開示する組成物を用いた処置の前ににおけるその領域を超えて拡大しない。一部の実施形態では、凝血区域は、本明細書中に開示する組成物を用いた処置後、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、またはそれ以上を超えて拡大しない。一部の実施形態では、鬱血区域は、本明細書中に開示する組成物を投与した後に変化しないまま保たれる。一部の実施形態では、鬱血区域は、5%未満、10%未満、15%未満、20%未満、25%未満、30%未満、35%未満、40%未満、45%未満、50%未満程度の、失活組織への転換を示す。したがって、一部の実施形態では、本明細書中に開示する組成物の投与は、熱傷の鬱血区域内の組織の100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%程度を保存することができる。

【0035】

一部の実施形態では、本明細書中に開示するように、熱傷の進行を緩和または低下させる、すなわち患者を「処置する」ことで、再生細胞の投与が存在しない場合に予想される組織壊死の量と比較して、組織壊死および／またはアポトーシスの量を低下させることができる。たとえば、患者が熱による熱傷を受けた場合、投与した再生細胞は、虚血区域において熱傷傷害の進行を低下させ、中間層傷害の全層壊死への転換を阻害することができる。一部の実施形態では、本明細書中に開示する方法は、熱傷の進行または転換を排除することができる。

【0036】

中間層および全層熱傷の様々な区域（すなわち、凝血区域、鬱血区域、および充血区域）は、1953年に最初に記載されている。Jackson, et al. (1953) Br. J. Surg. 40:588。したがって、熱傷の凝血区域、鬱血区域、および充血区域の同定は広く知られている。熱傷の様々な区域の同定に有用な方法の非限定的な例には、それだけには限定されないが、米国特許出願第2007/0197895号、米国特許第8435750号、ならびに国際特許出願WO2013/110021号およびWO2007/130,423号に記載されているものなどが含まれる。

【0037】

一部の実施形態では、本明細書中に開示する組成物の投与は、表在性中間層熱傷の、中

10

20

30

40

50

部中間層熱傷、深部中間層熱傷、全層熱傷、または第4度熱傷への転換を防止または最小限にする。表在性第2度熱傷は、表皮全層から基底膜および真皮の上3分の1以下を含む。中部真皮熱傷は、表皮から真皮の真ん中の3分の1までの破壊を含む。深部第2度熱傷は、表皮全層および真皮の少なくとも3分の2を含む。第4度熱傷は、皮膚の表皮および真皮層、ならびに根底にある組織（たとえば、筋肉、腱、靭帯、骨など）にまで及ぶ。一部の実施形態では、本明細書中に開示する組成物の投与は、中部中間層熱傷の、深部中間層熱傷、全層熱傷、または第4度熱傷への転換もしくは進行（または転換した組織の量）を防止または最小限にする。一部の実施形態では、本明細書中に開示する組成物の投与は、深部中間層熱傷の、全層熱傷または第4度熱傷への転換または進行を防止または最小限にする。一部の実施形態では、本明細書中に開示する組成物は、全層創傷の第4度熱傷への転換または進行を防止または最小限にする。

【0038】

一部の実施形態では、熱傷の転換または熱傷の進行の危険性にある対象は、たとえば、自己同定または別の人による同定によって同定する。したがって、一部の実施形態では、第2度または中間層熱傷を有する個体を同定する。多くの患者は、傷害のある特定の領域がたとえば全層傷害からなり、他の領域が深部中間層および／もしくは中間層創傷、ならびに／または第4度創傷からなる、異種の熱傷深度を示すことが理解されよう。一部の実施形態では、対象は表在性第2度熱傷を有する。一部の実施形態では、対象は中部第2度熱傷または中部真皮熱傷を有する。中部真皮創傷は、表在性第2度熱傷よりも広い区域の鬱血を示す。中部真皮熱傷を有する対象は、熱傷の進行／熱傷の転換の危険性が高い。一部の実施形態では、対象は深部第2度または深部真皮熱傷を有する。一部の実施形態では、対象は、真皮層全体にまで及ぶ全層または第3度熱傷を有する。一部の実施形態では、対象は第4度または真皮下熱傷を有する。一部の実施形態では、対象は、放射線傷害、たとえば皮膚または急性放射線傷害を有する。たとえば、一部の実施形態では、熱傷の進行の危険性にある対象は2グレイ以上に曝露されている。一部の実施形態では、対象は放射線傷害を有しており、熱、電気、または化学薬品による熱傷を患っている。

【0039】

当業者には、熱傷深度を分類するための、当分野で許容されている任意の技法が本明細書中に開示する実施形態において有用であることが理解されよう。たとえば、一部の実施形態では、熱傷深度を視覚的に評価する。一部の実施形態では、熱傷深度は、1つまたは複数の生検、次いで組織学的な検査によって分類する。たとえばChvapil et al, 1984, Plast. Reconstr. Surg. 73:438-441を参照されたい。本明細書中に開示する実施形態において有用な、熱傷深度分類する他の方法には、それだけには限定されないが、そのそれぞれが本明細書中に参照により組み込まれている米国特許第7860554号、第5701902号、第4170987号、カナダ特許出願第2,287,687号、Mason et al. (1981), Burns 7:197-202、Park et al. (1998) Plast. Reconstr. Surg. 101:1516-1523、Brink et al. (1986) Invest. Radiol. 21:645-651、およびAfromowitz et al. (1987) IEEE Trans Biomed Eng BME34:114-127に記載されているものが含まれる。

【0040】

同定した後、対象に、本明細書中の開示による再生細胞を含む組成物を投与することができる。一部の実施形態では、創傷の進行または転換は、本明細書中に開示する再生細胞の投与の前および／または後に分析または測定することができる。たとえば、一部の実施形態では、鬱血区域内の組織の生存度を測定することができる。当業者には、組織生存度を決定する当分野で許容されている任意の方法（既知のものまたは将来発見されるもののいずれか）が、本明細書中に開示する実施形態において有用であることが容易に理解されよう。たとえば、失活組織の領域は、視覚的に、組織学的に（たとえば生検を使用して）、または、それだけには限定されないが、国際特許出願WO2001/078587号、WO2001/054580号、WO2005/002425号、WO1991/012766号、米国特許第8221989号に記載されているものなどを含めた他の方法を使用して、評価することができる。

【0041】

一部の実施形態では、酸化的ストレスまたは酸化損傷または脂質過酸化のレベルは、本明細書中に記載の再生細胞の投与の前および／または後に測定することができる。酸化損傷および脂質過酸化は、当分野で認識されている方法または将来発見される方法を使用して測定することができる。例として、Bosken, et al., "Assessments of Oxidative Damage and Lipid Peroxidation After Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury" in Animal Models of Acute Neurological Injuries II, Chen, et al. Ed., (c) 2012, Humana Press, New York, NY, pp. 347-375、Pratico, et al. (2002) J. Neuro. 80(5): 894-898に記載の方法を使用して脂質過酸化を測定することができる。

【0042】

一部の実施形態では、虚血区域内の血流のレベルは、本明細書中に記載の再生細胞の投与の前および／または後に測定することができる。一部の実施形態では、免疫応答の変調（たとえば、局所的または全身的のどちらか）は、たとえば、現在知られている、または将来発見される任意の方法を使用して、本明細書中に記載の再生細胞の投与の前および／または後に測定することができる。したがって、一部の実施形態では、血流のレベルは、レーザードップラーアイメージング、または任意の他の既知もしくは将来発見される技法を使用して評価する。一部の実施形態では、この方法には、血管構造、たとえば虚血区域内のものの分析が含まれる。たとえば、一部の実施形態では、CD31陽性構造の量または数を決定することができる。

【0043】

一部の実施形態では、免疫応答の変調は、本明細書中に記載の再生細胞の投与の前および／または後に測定することができる。たとえば、一部の実施形態では、炎症誘発性モジュレーター（たとえば、TNFアルファ、IFNガンマ、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-12、IL-18など）のレベル（たとえば、組織試料中、全血中、血漿中など）は、当分野で許容されている任意の方法、または将来発見される任意の方法を使用して決定することができる。一部の実施形態では、鬱血区域内の白血球の数および／または種類は、本明細書中に記載の再生細胞の投与の前および／または後に測定または分析することができる。熱傷領域内の浸潤マクロファージおよびT細胞の数は、たとえば、それぞれ抗F4/80および抗CD3抗体を使用した分析によって、容易に決定することができる。一部の実施形態では、様々な免疫細胞の比を、本明細書中に記載の再生細胞の投与の前および／または後に測定することができる。例のみとして、一部の実施形態では、この方法には、本明細書中に記載の再生細胞の投与の前および／または後にM2:M1マクロファージの比を決定するステップが含まれる。M2:M1細胞の比は、たとえば、CD206/CD11細胞表面マーカーの比（たとえば血液中）をFujisaka (2009) Diabetes 58(11): 2574-2582に記載のように測定することを含めた、当分野で許容されている手段を使用して容易に決定することができる。

【0044】

皮膚移植および皮膚移植片の治癒の改善方法

また、皮膚移植、根底にある組織内への移植片の取り込み、または皮膚移植片の「取り込み」を改善する方法も、本明細書中に提供する。当業者には、本明細書中に開示する実施形態は、たとえば、皮膚欠損の領域が、局所的な皮膚および縫合の単独使用で閉じるには大きすぎる事例において、創傷の治癒を助けるための移植片の配置を含む様々な種類の創傷の処置に有用であることが容易に理解されよう。たとえば、本明細書中に開示する実施形態は、たとえば熱傷した組織を切除するものを含めた熱傷の処置において有用である。本明細書中に開示する方法および組成物を使用する他の例示的な種類の創傷には、それだけには限定されないが、たとえば、慢性創傷および潰瘍を含めた非治癒性創傷（たとえば、圧傷、糖尿病に関連する創傷および潰瘍、末梢血管疾患、外傷など）、たとえば機械、化学薬品、昆虫、または他の動物源などによって引き起こされた様々な外傷が含まれる。たとえば、本明細書中に記載の方法は、がん組織、失活組織、または感染組織の外科的除去後、および曝露が産業事故、戦争、テロ攻撃、または他の手段の経路で起こる可能性

10

20

30

40

50

がある、化学兵器（たとえば、糜爛性毒ガスおよびアルキル化剤）を含めた化学薬品への曝露からの傷害後の、移植片の取り込みにおいて有用である。

【 0 0 4 5 】

皮膚移植片またはその「取り込み」の最終的な成功は、3相で起こる、栄養素の取り込みおよびレシピエント床からの血管の内方成長（ingrowth）に依存する。第1相は、最初の24～48時間中に起こる。移植片はフィブリン層の形成を通じて最初にレシピエント部位と結合し、血漿浸染と呼ばれるプロセスによってレシピエント床からの毛細作用による栄養素の拡散が起こる。第2相は、ドナーおよびレシピエントの末端毛細血管が整列して血管網を確立する、吻合のプロセスを含む。移植片の血管再生は、これらの毛細血管を介して、および第3であるかつ最終相において血管新生を介した新しい血管の内方成長によって達成され、これは一般に4～7日間以内に完了する。皮膚移植片の神経再支配は移植の約2～4週間後から始まり、レシピエント床および周辺組織からの神経線維の内方成長によって起こる。全層移植片における神経鞘の含有量が高いため、知覚の回復は全層移植片の方が高い。同様に、移植片がドナー部位の発毛を実証することを可能にする、毛嚢を移植片と共に移植し得る。

10

【 0 0 4 6 】

一部の実施形態では、本明細書中に開示する方法は、熱傷（たとえば焼痂切開術などの後）、慢性非治癒性創傷などの創傷の根底にある組織内への移植片の取り込みの改善に関する。一部の実施形態は、創傷の清拭と皮膚移植片、皮膚代替物、または他の足場の施用との間の時間を短縮することに関する。本明細書中に記載の再生細胞は、強化された創傷床を作製するために創傷清拭した創傷床に投与することができ、続いて皮膚移植片を強化された創傷床に施用することができる。例のみとして、本明細書中に記載の再生細胞を含む組成物は、創傷清拭した創傷床内に（たとえば1つまたは複数の部位で）注射することができる。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物は、創傷清拭した創傷床上に噴霧することができる。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物は、創傷清拭した創傷床上に垂らすまたは塗布することができる。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物は、全身的に、または本明細書中で以下に記述する投与方法のうちの任意のものに従って投与する。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物は、局所的（たとえば、外用または局所注射によって）および全身的（たとえば、血管内、リンパ内など）の両方で投与する。一部の実施形態では、再生細胞は、生理食塩水または緩衝溶液などの単純なビヒクル中で送達する。他の実施形態では、これらはフィブリン糊などの生物学的ビヒクル中で送達する。さらなる実施形態では、再生細胞は、移植片内で送達する。ある特定の実施形態では、再生細胞は、ケラチノサイトおよび/または真皮細胞などの他の細胞種と混合して、または一時的に会合させて送達する。

20

【 0 0 4 7 】

一部の実施形態は、創傷の清拭と創傷への自家移植片の施用との間の時間を短縮する方法を提供する。たとえば、一部の実施形態では、この方法には、本明細書中に開示する再生細胞を含む組成物を、創傷清拭した創傷に施用する一時的な移植片に施用することを含めることができる。続いて、永久移植片（たとえば、自家移植片または他の種類の永久移植片）を創傷清拭した創傷に施用することができる。一部の実施形態では、この方法には、自家移植片を施用する前に、移植片のすべてまたは一部を除去するステップが含まれる。例のみとして、一部の実施形態では、本明細書中に開示する再生細胞を含む組成物をINTEGA（商標）皮膚代替物などの移植片に施用して、一時的な、強化された移植片を作製することができる。一定期間（たとえば、12時間、1日間、2日、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、20日間、21日間、22日間、23日間、24日間、25日間、26日間、27日間、28日間、29日間、30日間、またはそれ以上）の後、INTEGA（商標）移植片のすべて（または一部）を除去する（たとえばシリコーン製の裏当て）。続いて、自家移植片を創傷に施用する。本明細書中に記載の再生細胞を用いたINTEGA（商標）皮膚代替物の強化は

30

40

50

、INTEGRA（商標）皮膚代替物内およびその下の創傷組織の血管化を加速し、創傷（たとえば創傷清拭した熱傷）が自家移植片を受け入れる準備が整うまでの時間を短縮する。一部の実施形態では、自家移植片の施用までに必要な時間は、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、またはそれより多く短縮される。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物を皮膚代替物（たとえば、INTEGRA（商標）など）に施用することで、自家移植片の施用までに必要な時間が12時間、1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、またはそれより多く短縮される。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物の施用は、自家移植片の再構築を改善させる。

【0048】

一部の実施形態は、自家移植片の治癒を改善させる方法に関する。たとえば、本明細書中に開示する一部の実施形態は、分散させたまたは網目にかけた自家移植片の上皮化を改善させる方法に関する。この方法には、本明細書中に開示する再生細胞を含む組成物（たとえば脂肪由来再生細胞を含む組成物など）を、網目にかけた自家移植片または完全もしくは部分的に脱凝集した皮膚細胞の懸濁液に施用するステップを含めることができる。一部の実施形態では、組成物を、網目にかけた自家移植片または細胞懸濁液に施用して、強化された移植片を作製し、その後、これをレシピエント創傷床（たとえば創傷清拭した熱傷創傷など）上に置く。一部の実施形態では、レシピエント創傷床（たとえば創傷清拭した創傷など）上において、網目にかけた自家移植片または細胞懸濁液、および再生細胞を含む組成物を、既にレシピエント部位に配置された、網目にかけた自家移植片または細胞懸濁液に施用する。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物を、網目にかけた自家移植片または細胞懸濁液に施用することで、上皮化が改善される。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物の施用は、網目にかけた自家移植片および/または治癒中の創傷床の血管化を改善させる。上皮化および血管化は、それだけには限定されないが、Pomahac, et al. (2007) *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 32(5): 377-381、Greenwood, et al. (2009) *J. Plastic Surg.* 9: 309-318に記載されているものなどを含めた、当分野で許容されている任意の方法を使用して容易に評価することができる。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物の施用は、網目にかけた自家移植片の再構築を改善させる。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物の施用は、移植片の「ゴースト化」を防止する。本明細書で使用する用語「ゴースト化」とは、組み込まれた移植片が、多くの場合は感染症の結果として、続いて経時に「溶解する」現象をいう。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物の施用は、移植片内への血管の取り込みの成熟を促進する。

【0049】

したがって、(1)有効量の本明細書中に開示する再生細胞が含まれる組成物を施用するステップと（たとえば「強化された移植片」を作製するため）、(2)創傷の根底にある組織を強化された移植片と接触させるステップと、(3)移植片を根底にある組織に固定し、それによって、前記根底にある組織内への移植片の取り込みが促進されるステップとが含まれる実施形態を提供する。したがって、一部の実施形態では、再生細胞を皮膚移植片または皮膚代替物に施用して「強化された移植片」を作製することができ、続いて、必要とする対象において、これをレシピエント部位に投与する。一部の実施形態では、本明細書中に開示する方法は、熱傷を創傷清拭するステップと、強化された移植片を対象に投与するステップとを提供する。また、この方法には、レシピエント部位内への強化された移植片の取り込みを測定、分析、または評価するステップも含めることができる。一部の実施形態では、強化された移植片は、強化されていない移植片よりも急速に治癒する。一部の実施形態では、対象は、放射線傷害、たとえば、皮膚放射線傷害または急性放射線傷害を有する。一部の実施形態では、対象は、放射線傷害および移植片を必要とする熱、化学薬品、または電気による熱傷を有する。一部の実施形態では、対象は、熱傷以外の原因から生じ、その処置には移植片の施用が含まれる、急性または慢性創傷を有する。

【0050】

また、(1)レシピエント創傷床に再生細胞を含む組成物を施用して、強化されたレシ

10

20

30

40

50

ピエント部位を作製するステップと、(2)レシピエント部位を移植片と接触させ、それによって、レシピエントの創傷部位内への移植片の取り込みが改善されるステップとが含まれる実施形態も提供する。一部の実施形態では、対象は、放射線傷害、たとえば、皮膚放射線傷害または急性放射線傷害を有する。一部の実施形態では、対象は、放射線傷害および移植片を必要とする熱、化学薬品、または電気による熱傷を有する。

【0051】

一部の実施形態では、本明細書中に開示する方法には、本明細書中に開示する再生細胞が含まれる組成物を、創傷(たとえば、創傷清拭した熱傷または創傷)の根底にある組織に、外用でまたは注射によって、移植片をレシピエント部位、すなわち、創傷の根底にある組織上に投与する前に施用するステップが含まれる。したがって、(1)レシピエントの創傷部位(たとえば、創傷清拭した熱傷創傷、創傷清拭した潰瘍などの創傷清拭した創傷)に、有効量の本明細書中に開示する再生細胞を施用するステップと、(2)移植片を創傷の根底にある組織と接触させるステップと、(3)移植片をレシピエントの創傷部位に固定し、それによって、レシピエントの創傷部位内への移植片の取り込みが促進されるステップとが含まれる実施形態を提供する。一部の実施形態では、対象は、放射線傷害、たとえば、皮膚放射線傷害または急性放射線傷害を有する。一部の実施形態では、対象は、放射線傷害および移植片を必要とする熱、化学薬品、または電気による熱傷を有する。

当業者には、移植片の固定は、それだけには限定されないが、縫合、ステーブル、糊付け(たとえば、フィブリンなどの生物学的に適合性のある糊を用いる)、または包帯を含めた、任意の許容される方法を使用して達成できることが容易に理解されよう。

【0052】

この方法には、移植片のレシピエント部位内への取り込みを分析するステップを含めることができる。移植片の取り込みを評価するための非限定的な方法には、それだけには限定されないが、Dong, et al. (1993) Ann. Biomed. Eng. 21(1):51-55(移植片の皮膚表面への接着の測定)、Greenhalgh, et al. (1992) J. Burn Care Rehab. 13(3) 334-339(経皮的な酸素および二酸化炭素の測定)に記載されているもの、ならびに、それだけには限定されないが、血管化および/または壊死の分析、肉芽形成の度合の分析、創傷の大きさの評価(たとえば、上皮化の評価、新生真皮形成の評価、または両方)などを含めた他の方法が含まれる。一部の実施形態では、面積測定を使用して、レシピエント部位の上皮化および/または収縮を分析する。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物の投与は、移植片の血管化を増加させることによって、移植片内の血管の平均管腔径を増加させることによって、血管の成熟を増加または加速させることによってなどで、移植片の取り込みおよび治癒を改善させる。血管化および管腔径は、組織学などを含めた当分野で許容されている方法を使用して容易に評価することができる。

【0053】

一部の実施形態では、本明細書中に提供する方法は、創傷、たとえば、本明細書中に記載の強化された移植片(再生細胞および皮膚移植片もしくは皮膚代替物)を受けている創傷、または再生細胞を単独で受けている創傷において、収縮を防止または低下させる。したがって、拘縮を発生する危険性にある創傷を有する対象を同定する。一部の実施形態では、拘縮を発生する危険性にある創傷は深部中間層創傷である。一部の実施形態では、拘縮を発生する危険性にある創傷は全層創傷である。深部中間層および全層創傷は、本明細書中の他の箇所に記載されている、当分野で許容されている方法を使用して評価することができる。一部の実施形態では、対象に再生細胞を含む組成物を投与する。組成物は、全身的、局所的、または両方で投与することができる。一部の実施形態では、拘縮を発生する危険性にある創傷を、本明細書中の他の箇所に記載されている再生細胞を含む組成物と接触させる。一部の実施形態では、組成物には足場、たとえば組織足場(脂肪組織など)が含まれる。一部の実施形態では、組成物には真皮代替物が含まれる。一部の実施形態では、組成物には皮膚移植片が含まれる。したがって、再生細胞は、足場と混合するか、またはその表面に施用することができる。一部の実施形態では、組成物をレシピエントの創傷部位に施用し、続いて、足場、たとえば真皮代替物または皮膚移植片を創傷部位に施用

10

20

30

40

50

する。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物の投与は、全身的もしくは局所的に投与したか、または足場と組み合わせて施用したかどうかにかかわらず、レシピエント創傷の収縮の速度を遅くする。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物の投与は、拘縮の発生が防止されるまたは最小限となるように、収縮の速度を遅くする。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物の投与は、肥厚性瘢痕の発生が防止されるまたは最小限となるように、収縮の速度を遅くする。

【0054】

肥厚性瘢痕を防止する、最小限にする、または処置する方法

深部中間層または全層創傷部位での肥厚性瘢痕の防止および/または縮小のための方法を、本明細書中に提供する。当業者には、本明細書中に開示する実施形態は、たとえば、皮膚欠損の領域が、局所的な皮膚および縫合の単独使用で閉じるには大きすぎる事例において、創傷の治癒を助けるための移植片の配置を含む様々な種類の創傷の処置に有用であることが容易に理解されよう。たとえば、本明細書中に開示する実施形態は、たとえば熱傷した組織を切除するものを含めた熱傷の処置において有用である。本明細書中に開示する方法および組成物を使用する他の例示的な種類の創傷には、それだけには限定されないが、たとえば虚血性の創傷および潰瘍（たとえば、圧傷、糖尿病に関連する創傷および潰瘍、末梢血管疾患に関連する創傷および潰瘍など）を含めた非治癒性創傷、たとえば機械、化学薬品、昆虫、または他の動物源などによって引き起こされた様々な外傷が含まれる。たとえば、本明細書中に記載の方法は、がん組織、失活組織、または感染組織の外科的除去の後の移植片の取り込みにおいて有用である。

【0055】

肥厚性瘢痕を防止または最小限にする方法には、（1）深部中間層または全層創傷を有する対象を同定するステップと、（2）深部中間層または全層創傷に再生細胞を含む組成物を投与するステップとを含めることができる。一部の実施形態では、対象は、放射線傷害、たとえば、皮膚放射線傷害または急性放射線傷害を有する。一部の実施形態では、対象は、放射線傷害および熱、化学薬品、もしくは電気による熱傷または他の深部中間層もしくは全層創傷を有する。

【0056】

一部の実施形態では、再生細胞を創傷部位に直接施用する。一部の実施形態では、再生細胞は、「強化された移植片」中で、たとえば、それだけには限定されないが、脂肪移植片、皮膚移植片、あるいは他の生物学的（自己もしくは非自己）または合成皮膚代替物を含めた、本明細書中の他の箇所に記載されている足場と組み合わせて施用する。一部の実施形態では、足場を深部中間層または全層創傷部位に施用し、続いて再生細胞を創傷部位に施用する。一部の実施形態では、再生細胞を本明細書中に記載の足場（たとえば未処理の脂肪組織など）と一緒に混合し、混合物を創傷部位に施用する。一部の実施形態では、再生細胞を本明細書中に記載の足場と一緒に混合して強化された足場を生成し、これをレシピエント部位に投与し、続いて、皮膚移植片または皮膚代替物を、既に強化された足場を受けたレシピエント部位に施用する。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物は、レシピエント部位に外用で施用する。本明細書中の他の箇所で記載されているように、外用投与には、再生（regenerative）細胞を含む液体ビヒクルをレシピエントの創傷部位上に垂らすこと、再生細胞を含むビヒクルをレシピエントの創傷部位上に噴霧することなどを含めることができる。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物は、創傷部位の周りに（たとえば単一または複数回の注射で）注射する。

創傷が熱傷である一部の実施形態では、この方法には、熱傷を創傷清拭して創傷清拭したレシピエント部位を作製するステップと、再生細胞を含む組成物、または再生細胞および足場（強化された足場）を含む組成物を、深部中間層または全層創傷の創傷清拭したレシピエント部位に投与するステップとをさらに含めることができる。一部の実施形態では、続いて、皮膚移植片または真皮代替物を、強化された足場を受けたレシピエント部位に施用し、それによって肥厚性瘢痕形成が防止または阻害される。

【0057】

10

20

30

40

50

また、この方法には、創傷部位での肥厚性瘢痕の形成の形成を測定、分析、または評価するステップも含めることができる。

一部の実施形態では、本明細書中に開示する方法には、本明細書中に開示する再生細胞が含まれる組成物を、創傷（たとえば、創傷清拭した熱傷または創傷）の根底にある組織に、外用でまたは注射によって、移植片をレシピエント部位、すなわち、創傷の根底にある組織上に投与する前に施用するステップが含まれる。したがって、（1）レシピエントの創傷部位（たとえば、創傷清拭した熱傷創傷、創傷清拭した糖尿病性および／または末梢血管疾患関連の潰瘍創傷、創傷清拭した褥瘡などの、創傷清拭した創傷）に、有効な肥厚性瘢痕阻害量の本明細書中に開示する再生細胞を含む組成物を施用するステップと、（2）移植片をレシピエントの創傷部位に固定し、それによって、肥厚性瘢痕形成が防止または阻害されるステップとが含まれる実施形態を提供する。

【0058】

一部の実施形態は、創傷の収縮を防止または遅くする方法に関する。一部の実施形態では、肥厚性瘢痕の防止は、創傷の収縮を防止または遅くすることを含む。したがって、一部の実施形態では、深部中間層または全層創傷（たとえば、創傷の収縮が素早く進行しそぎると肥厚性瘢痕を発生する危険性にある創傷）を有する対象を同定する。再生細胞を含む組成物（たとえば脂肪由来再生細胞の濃縮集団など）を対象に投与することができる。一部の実施形態では、組成物は、創傷部位に直接、たとえば、外用投与または局所注射によって投与する。一部の実施形態では、組成物は、全身的に、たとえば、血管内またはリンパ内で投与する。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物を、対象に、局所的および全身的の両方で投与する。一部の実施形態では、この方法には、創傷の収縮を測定するステップが含まれる。創傷の収縮は、たとえばRogers, et al. (2010) *J. Diabetes Sci. Tech.*, 4(4):799-802に記載の面積測定を含めた、当業者に知られている任意の方法を使用して容易に評価することができる。一部の実施形態では、たとえば再生細胞を含む組成物と局所投与する場合、組成物には、組織足場（たとえば、脂肪組織、PRPなど）、または生物学的もしくは生体適合性の足場（皮膚移植片、皮膚代替物などが含まれる）などの足場が含まれる。一部の実施形態では、創傷の収縮は、傷害後の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上の日数までに、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、またはそれ以上よりも多く縮小されている。

【0059】

本明細書中に提供する他の実施形態は、既に発生している、または発生の過程にある肥厚性瘢痕を処置する方法に関する。たとえば、肥厚性瘢痕を処置することとは、既存の瘢痕組織を最小限にするおよび／または排除すること、肥厚性瘢痕の拘縮を最小限にするおよび／または排除すること、瘢痕領域にわたる運動の範囲を改善させること、そう痒症を排除または最小限にすること、肥厚性瘢痕組織の柔軟性を改善させること、肥厚性瘢痕組織の硬度を改善させること、1つまたは複数の当分野で許容されている瘢痕スケールにおけるスコアを改善させること（たとえばFearnonti, et al. (2010) *J. Plastic Surg.* 10:354-364を参照）、肥厚性瘢痕組織中の肥満細胞の数および／または筋繊維芽細胞の数を減少させることなどをいうことができる。

【0060】

肥厚性瘢痕を有する対象、すなわち、14日間より長く、30日間より長く、45日間より長く、60日間より長く、90日間より長く、120日間より長く、1年間より長く、5年間より長く、またはそれ以上長く存在していた肥厚性瘢痕を同定する。一部の実施形態では、対象は、放射線傷害、たとえば、皮膚放射線傷害または急性放射線傷害を有する。一部の実施形態では、対象は放射線傷害および肥厚性瘢痕を有する。一部の実施形態では、この方法には、再生細胞を含む組成物を、肥厚性瘢痕に、たとえば、局所的もしくは全身的注射、または本明細書中に記載の任意の他の投与経路によって投与することができる。一部の実施形態では、再生細胞は、本明細書中以下に記載の足場（たとえば、自己脂肪移植片、自己皮膚移植片、同種移植片、真皮代替物、もしくはその任意の組合せ、

10

20

30

40

50

または任意の他の生物学的もしくは合成足場)などの足場と共に投与する。一部の実施形態では、組成物には足場が含まれる。一部の実施形態では、この方法には、当分野で許容されている任意の方法を使用して肥厚性瘢痕組織を除去して、レシピエント部位を作製するステップと、再生細胞を含む組成物をレシピエント部位に投与するステップとが含まれる。一部の実施形態では、肥厚性瘢痕組織は、再生細胞を含む組成物を投与する前に除去しない。

【0061】

肥厚性瘢痕を最小限にするまたは処置することに関する一部の実施形態では、この方法には、再生細胞を含む組成物の投与と組み合わせて、肥厚性瘢痕を寛解するために補助処置または治療を行うステップが含まれる。たとえば、一部の実施形態では、この方法には、たとえば、たとえば米国特許出願第2008/0119781号に記載のように、機械力を使用して瘢痕組織を穿孔するステップ(たとえばCosta, et al.: (1999) Mechanical Force Induce Scar Remodeling: Am J Pathol. 155: 1671-1679を参照)、瘢痕組織を外科的除去するステップ(たとえばSuzuki, S. (1996): Operation: Operation of keloid and/or hypertrophic scar. 50: 1557-1561を参照)、シリコーンシートを病変に施用するステップ(たとえばPerkins, et al., (1983) Silicone gel: a new treatment for burn scars and contractures. Burns 9; 201-204を参照)、病変にレーザーおよびパルス光処置を行うステップ(たとえばVrijman, et al. (2011) Laser and Intense pulsed Light Therapy for the Treatment of Hypertrophic Scars, British J. Derm. 165(5):934-942を参照)などを含めることができる。当業者には、行う任意の補助治療は、再生細胞を含む組成物の投与の前、実質的に同時に、またはその後に行うことができる事が容易に理解されよう。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物は、本明細書中の他の箇所に記載されている足場または移植片と組み合わせた再生細胞が含まれる、本明細書中の他の箇所に記載されている強化された足場および/または強化された移植片である。

【0062】

一部の実施形態では、この方法には、肥厚性瘢痕の処置を評価するステップが含まれる。たとえば、一部の実施形態では、肥厚性瘢痕の大きさを評価する。一部の実施形態では、本明細書中に記載の再生細胞を含む組成物を用いた処置は、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれより多くの、瘢痕領域の減少をもたらす。瘢痕領域の減少とは、当分野で許容されている技法を使用して評価した瘢痕の幅、高さ、または深度の減少をいう場合がある。瘢痕領域を評価する方法の非限定的な例は、たとえばOliviera, et al. (2005) Dermatol. Surg. 31(1): 48-58に記載されている。一部の実施形態では、本明細書中に記載の再生細胞を含む組成物を用いた処置は、瘢痕の拘縮の低下をもたらす。したがって、一部の方法には、瘢痕の拘縮の度合または量を評価するステップが含まれる。たとえば、一部の実施形態では、拘縮は、Parry, et al. (2010) J. Burn Care, 31(6): 888-903に記載の方法のうちの1つもしくは複数によって、または任意の数の他の当分野で許容されている技法を使用して、測定することができる。一部の実施形態では、本明細書中に記載の再生細胞を含む組成物を用いた処置は、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれより多くの、瘢痕の拘縮の減少をもたらす。一部の実施形態では、当分野で許容されている方法を使用して、瘢痕領域にわたる運動の範囲を評価する。一部の実施形態では、本明細書中に記載の再生細胞を含む組成物を用いた処置は、運動の範囲を、少なくとも2度、5度、10度、15度、20度、25度、30度、35度、40度、45度、50度、55度、60度、65度、70度、75度、80度、85度、90度、95度、100度、110度、120度、またはそれより多く改善させる。運動の範囲は、それだけには限定されないがPalmieri, et al. (2003) J. Burn Care Rehabil. 24:104-108に記載されているものを含めた当分野で許容されている任意の技法を使用して評価することができる。

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、そう痒症を評価する。一部の実施形態では、再生細胞を含む組成物を用いた処置は、それだけには限定されないがPhan, et al. (2011) *Acta Derm. Venereol.* 92: 502-507に記載のツールを含めた1つまたは複数の当分野で許容されている技法によって測定された、そう痒症の改善をもたらす。一部の実施形態では、瘢痕組織の柔軟性を評価する。一部の実施形態では、本明細書中に記載の再生細胞を含む組成物を用いた肥厚性瘢痕の処置は、瘢痕組織の柔軟性の改善をもたらす。柔軟性は、それだけには限定されないが、Oliviera, et al. (2005) *Dermatol. Surg.* 31(1): 48-58、Lye et al. (2006) 27(6):82-85に記載されているものなどを含めた当分野で許容されている任意の技法を使用して評価することができる。一部の実施形態では、肥厚性瘢痕内の血流は、たとえば、レーザードップラーイメージング、または任意の他の当分野で許容されている技法を使用して評価する。一部の実施形態では、瘢痕の弾性を評価する。一部の実施形態では、本明細書中に記載の再生細胞を含む組成物を用いた肥厚性瘢痕の処置は、瘢痕組織の弾性の改善をもたらす。弾性は、それだけには限定されないがBartell, et al. (1988) *J. Burn Care Rehabil.* 9(6): 657-660に記載されているものなどを含めた当分野で許容されている任意の技法を使用して評価することができる。一部の実施形態では、瘢痕組織の剛性を評価する。一部の実施形態では、本明細書中に記載の再生細胞を含む組成物を用いた肥厚性瘢痕の処置は、瘢痕組織の剛性の改善をもたらす。剛性は、それだけには限定されないがMcHugh, et al. (1997) *J. Burn Care Rehabil.* 18(2): 104-108に記載されているものを含めた当分野で許容されている任意の技法を使用して評価することができる。

【0063】

投与方法

一部の実施形態では、本明細書中に開示する方法には、治療有効量の再生細胞を含む組成物を対象に投与することが含まれる。本明細書で使用する用語「治療有効量」とは、熱傷の転換を緩和させるため、ならびに／または移植片の生存および取り込みを改善させるために十分な量をいう。本明細書中に開示する実施形態のための再生細胞の正確な用量の決定は、当分野の通常技術の範囲内に十分ある。

【0064】

組成物の投与の量および頻度は、たとえば、何を投与するか、患者の状態、および投与の様式に応じて変動する場合がある。治療的応用においては、組成物を、熱傷を患っている患者（たとえば、中間層熱傷および／もしくは全層熱傷を有すると同定された対象、または移植片を必要とする対象）に、熱傷の進行を軽減させるまたは少なくとも部分的に緩和させるために十分な量で投与することができる。また、組成物は、移植片を受ける患者（たとえば、創傷清拭した創傷または熱傷を有する対象）に、患者に投与した後に移植片の生存を改善させるために十分な量で投与することもできる。用量は、熱傷移植片の種類および程度、具体的な対象の年齢、質量、および全体的な状態、ならびに投与経路などの変数に依存する可能性が高い。有効用量は、*in vitro* または動物モデルの試験系から導かれる用量応答曲線から外挿することができる。

【0065】

一部の実施形態では、少なくとも 1×10^2 個の再生細胞が治療有効量である。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^3 個の再生細胞が治療有効量である。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^4 個の細胞が治療有効量である。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^5 個の再生細胞が治療有効量である。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^6 個の再生細胞が治療有効量である。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^7 個の再生細胞が治療有効量である。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^8 個の再生細胞が治療有効量である。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^9 個の再生細胞が治療有効量である。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^{10} 個の再生細胞が治療有効量である。一部の実施形態では、より大きな表面積を有する熱傷を処置するためには、より小さな表面積を有する熱傷を処置するよりも多数の再生細胞が治療上有効である。一部の実施形態では、より深い熱傷を処置するためには、それほど深くない熱傷を処置するよりも多数の再生細胞が治療上有効である（たとえば、深部中間層創傷を処置するためには表在性中間層創傷を

10

20

30

40

50

処置するよりも多数の再生細胞が治療上有効であり得る)。一部の実施形態では、より大きな表面積を有する移植片の生存または取り込みを改善させるためには、より小さな移植片と比較してより多数の再生細胞が治療上有効である。一部の実施形態では、治療上有効である再生細胞の数は、移植片が全層または分層皮膚移植片であるか、あるいは移植片が皮膚代替物または他の合成もしくは生物学的足場であるかに依存する。

【0066】

一部の実施形態では、再生細胞は少なくとも0.05%の幹細胞を含む。たとえば、一部の実施形態では、再生細胞は、少なくとも0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、50%、またはそれより多くの幹細胞を含む。すなわち、一部の実施形態では、再生細胞集団内の有核細胞のうちの少なくとも0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、50%、またはそれより多くが幹細胞である。

10

【0067】

再生細胞

本明細書中に開示する実施形態では、再生細胞は、熱傷の進行／転換を緩和および／または防止するために使用する。様々な実施形態では、再生細胞は、移植片の取り込みもしくは生存度を改善させるため、および／または移植片の治癒を促進するために使用する。上述のように、本明細書中に開示する「再生細胞」の集団は、完全または部分再生、修復、あるいは器官、組織、または生理的単位もしくは系の構造または機能の置換を引き起こす、またはそれに寄与して、それによって、治療的、構造的、または美容上の利益をもたらす、同種または異種の細胞集団であることができる。再生細胞の例には、それだけには限定されないが、成体幹細胞、内皮細胞、内皮前駆細胞、内皮前駆細胞、マクロファージ、線維芽細胞、周皮細胞、平滑筋細胞、前脂肪細胞、分化または脱分化脂肪細胞、ケラチノサイト、単能性および多分化能性の前駆体および前駆細胞（およびその子孫）、ならびにリンパ球が含まれる。

20

【0068】

本明細書中に開示した再生細胞は、それだけには限定されないが、骨髄、胎盤、脂肪組織、皮膚、焼痂組織、子宮内膜組織、成体筋肉、角膜間質、歯髄、ウォートンジェリー、羊水、および臍帯を含めた様々な組織から単離することができる。本明細書中に開示した再生細胞は、当業者に知られている、または将来発見される任意の手段を使用して、上記組織から単離することができる。

30

【0069】

例のみとして、再生細胞は、組織を切除または吸引するプロセスによって、脂肪組織から単離することができる。切除または吸引した組織を洗浄し、その後、酵素的または機械的に脱凝集させて、脂肪組織マトリックス中に結合された細胞を放出させることができる。放出された後、細胞を懸濁させることができる。例のみとして、本明細書中に開示する実施形態において有用な再生細胞は、そのそれが本明細書中に参照により組み込まれている、米国特許第7390484号、第7585670号、第7687059号、第8309342号、第8440440号、米国特許出願第2013/0164731号、第2013/0012921号、第2012/0164113号、US2008/0014181号、国際特許出願WO2009/073724号、WO/2013030761号などに記載の方法および／または装置を使用して単離することができる。

40

本明細書中に開示する実施形態において有用な、骨髄から再生細胞を単離するための例示的な非限定的方法は、そのそれが本明細書中に参照により組み込まれている、米国特許第5879940号、米国特許出願第2013/0101561号、第2013/0266541号、欧州特許出願EP2488632号、EP0241578号、EP2624845号、国際特許出願WO2011047289号、WO1996038482号に記載されている。

50

【 0 0 7 0 】

本明細書中に開示する実施形態において有用な、胎盤組織から再生細胞を単離するための例示的な非限定的方法は、そのそれぞれが本明細書中に参照により組み込まれている、米国特許第8580563号、米国特許出願第20130040281号、国際特許出願WO2003089619号、Klein, et al. (2011) *Methods Mol Biol.* 698:75-88、Vellasamy, et al. (2012) *World J Stem Cells* 4(6): 53-61、Timmins, et al. (2012) *Biotechnol Bioeng.* 109(7):1817-26、Semenov, et al. (2010) *Am J Obstet Gynecol* 202:193-e.13などに記載されている。

本明細書中に開示する実施形態において有用な、皮膚から再生細胞を単離するための例示的な非限定的方法は、そのそれぞれが本明細書中に参照により組み込まれている、Tom a, et al. (2001), *Nat Cell Biol.* 3(9):778-84、Nowak, et al. (2009), *Methods Mol Biol.* 482:215-32、米国特許出願第2007/0248574号などに記載されている。

【 0 0 7 1 】

本明細書中に開示する実施形態において有用な、焼痂組織から再生細胞を単離するための例示的な非限定的方法は、Van der Veen, et al. (2012), *Cell Transplant.* 21(5):93 3-42、および本明細書中以下の他の箇所に記載されている。

本明細書中に開示する実施形態において有用な、子宮内膜組織から再生細胞を単離するための例示的な非限定的方法は、そのそれぞれがその全体で本明細書中に参照により組み込まれている、米国特許出願第2013/0156726号、第2008/0241113号などに記載されている。

【 0 0 7 2 】

本明細書中に開示する実施形態において有用な、筋組織から再生細胞を単離するための例示的な非限定的方法は、そのそれぞれが本明細書中に参照により組み込まれている、米国特許第6337384号、米国特許出願第2001/019966号、第2011/0033428号、第2005/0220775号などに記載されている。

本明細書中に開示する実施形態において有用な、角膜組織から再生細胞を単離するための例示的な非限定的方法は、そのそれぞれが本明細書中に参照により組み込まれている、米国特許出願第2005084119号、Sharifi, et al. (2010) *Biocell.* 34(1):53-5などに記載されている。

【 0 0 7 3 】

本明細書中に開示する実施形態において有用な、歯髄から再生細胞を単離するための例示的な非限定的方法は、そのそれぞれが本明細書中に参照により組み込まれている、米国特許出願第2012/0251504号、Gronthos, et al. (2011) *Methods Mol Biol.* 698:107-21、Suchanek, et al. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2007;50(3):195-201、Yildirm, Sibel, "Isolation Methods of Dental Pulp Stem Cells," in *Dental Pulp Stem Cells: Springer Briefs in Stem Cells*, pp. 41-51, (著作権) 2013, Springer New York, New York, NYなどに記載されている。

本明細書中に開示する実施形態において有用な、ウォートンジェリーから再生細胞を単離するための例示的な非限定的方法は、そのそれぞれが本明細書中に参照により組み込まれている、米国特許出願第2013/0183273号、第2011/0151556号、国際特許出願WO04/072273号、Sheshareddy, et al. (2008) *Methods Cell Biol.* 86:101-19、Mennan, et al. (2013) *BioMed Research International*, Article ID 916136、Corotchi, et al. (2013) *Stem Cell Research & Therapy* 4:81などに記載されている。

【 0 0 7 4 】

本明細書中に記載の実施形態において有用な、羊水から再生細胞を単離するための例示的な非限定的方法は、そのそれぞれが本明細書中に参照により組み込まれている、米国特許第8021876号、国際特許出願WO2010/033969号、WO2012/014247号、WO2009/052132号、米国特許出願第2013/0230924号、第2005/0054093号などに記載されている。

10

20

30

40

50

本明細書中に記載の実施形態において有用な、臍帯から再生細胞を単離するための例示的な非限定的方法は、そのそれぞれが本明細書中に参照により組み込まれている、米国特許出願第20130065302号、Reddy, et al. (2007), *Methods Mol Biol.* 407: 149-63、Hussain, et al. (2012) *Cell Biol Int.* 36(7):595-600、Pham, et al. (2014) *Journal of Translational Medicine* 2014, 12:56、Lee, et al. (2004) *Blood* 103(5):1669-1675などに記載されている。

【0075】

本明細書中に記載した方法および組成物中の再生細胞は、幹細胞および他の再生細胞が含まれる異種の細胞集団であり得る。一部の実施形態では、本明細書中に記載した方法および組成物中の再生細胞には、幹細胞および内皮前駆細胞が含まれることができる。一部の実施形態では、再生細胞には幹細胞および周皮細胞が含まれることができる。一部の実施形態では、再生細胞には幹細胞および白血球が含まれることができる。たとえば、一部の実施形態では、再生細胞には幹細胞およびマクロファージが含まれることができる。一部の実施形態では、再生細胞には幹細胞およびM2マクロファージが含まれることができる。一部の実施形態では、再生細胞には周皮細胞および内皮前駆細胞が含まれることができる。一部の実施形態では、再生細胞には血小板が含まれることができる。好ましくは、再生細胞は幹細胞および内皮前駆細胞を含む。一部の実施形態では、再生細胞にはTreg細胞などの制御細胞が含まれることができる。

【0076】

一部の実施形態では、再生細胞は脂肪由来である。したがって、一部の実施形態は、たとえば脂肪由来の幹細胞および内皮前駆細胞が含まれる脂肪由来再生細胞を用いて熱傷の進行を緩和または低下させる方法および組成物を提供する。

一部の実施形態では、再生細胞を使用前に培養しない。例として、一部の実施形態では、再生細胞は、由来の組織、たとえば、骨髄、胎盤、脂肪組織、皮膚、焼痂組織、子宮内膜組織、成体筋肉、角膜間質、歯髄、ウォートンジェリー、羊水、臍帯などからの単離の後に使用するための細胞である。

【0077】

一部の実施形態では、再生細胞を使用前に培養する。たとえば、一部の実施形態では、再生細胞は「限定培養」、すなわち、プラスチックに接着する細胞をプラスチックに接着しない細胞から分離するための培養に供する。したがって、一部の実施形態では、再生細胞は「接着性の」再生細胞である。接着性の再生細胞を脂肪組織から単離する例示的な非限定的方法は、たとえばZuk, et al. (2001)に記載されている。接着性の再生細胞を骨髄から単離する例示的な非限定的方法は、たとえば、Pereira (1995) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92:4857-4861、Castro-Malaspina et al. (1980), *Blood* 56:289-30125、Piersma et al. (1985) *Exp. Hematol.* 13:237-243、Simmons et al., 1991, *Blood* 78:55-62、Beresford et al., 1992, *J. Cell. Sci.* 102:341-351、Liesveld et al. (1989) *Blood* 73:1794-1800、Liesveld et al., *Exp. Hematol* 19:63-70、Bennett et al. (1991) *J. Cell. Sci.* 99:131-139)、米国特許第7056738号などに記載されている。

一部の実施形態では、再生細胞は、3継代より多く *in vitro* で培養する。たとえば、一部の実施形態では、再生細胞は、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、またはそれより多くの継代数を *in vitro* で培養する。

【0078】

本明細書中に記載の再生細胞は、当分野で知られている手法に従って培養することができ、培養した細胞は、例示した方法のうちのいくつかにおいて使用することができる。たとえば、再生細胞は、本明細書中に参照により組み込まれているNg, et al., (2004), *Microvasc. Res.* 68(3):258-64に記載のように、コラーゲンでコーティングした皿または3Dコラーゲンゲル培養上、内皮細胞基本培地中で、低もしくは高ウシ胎児血清または同様

10

20

30

40

50

の製品の存在下で培養することができる。あるいは、再生細胞を、他の細胞外基質タンパク質でコーティングした皿上で培養することができる。使用し得る細胞外基質タンパク質の例には、それだけには限定されないが、フィプロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、およびⅠⅤ型コラーゲンが含まれる。また、培養容器内への内皮細胞の接着を同様に促進する、ゼラチンまたは任意の他の化合物もしくは担体も、再生細胞を培養するために使用し得る。

【 0 0 7 9 】

再生細胞を *in vitro* で培養するために使用することができる基本培養培地の例には、それだけには限定されないが、EGM、RPMI、M199、MCDB131、DMEM、EMEM、マッコイ5A、イスコフ培地、イスコフ改変培地、または血液内皮細胞の成長を支持する、当分野で知られている任意の他の培地が含まれる。一部の実施形態では、再生細胞を EGM-2MV 培地中で培養する。再生細胞を培養するために使用することができる、基本培養培地に加えることができる補助因子または化合物の例には、それだけには限定されないが、アスコルビン酸、ヘパリン、内皮細胞増殖因子、内皮成長補助剤、グルタミン、HEPES、Nu血清、ウシ胎児血清、ヒト血清、ウマ血清、血漿由来ウマ血清、鉄添加仔ウシ血清、ペニシリン、ストレプトマイシン、アムホテリシンB、塩基性および酸性纖維芽細胞増殖因子、インスリン増殖因子、星細胞馴化培地、線維芽細胞もしくは線維芽細胞様細胞馴化培地、炭酸水素ナトリウム、表皮増殖因子、ウシ下垂体抽出物、硫酸マグネシウム、イソブチルメチルキサンチン、ヒドロコルチゾン、デキサメタゾン、ジブチリル (dibutyryl) 環状AMP、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、エストラジオール、プロゲステロン、成長ホルモン、アンジオゲニン、アンジオポエチン-1、D e 1 - 1、フォリスタチン、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、エリスロポエチン、肝細胞増殖因子 (HGF) / スキャッター因子 (SF)、レブチン、ミッドカイン、胎盤増殖因子、血小板由来内皮細胞増殖因子 (PD-ECGF)、血小板由来増殖因子-BB (PDGF-BB)、ブレイオトロフィン (PTN)、プログラニュリン、プロリフェリン、トランスフォーミング増殖因子 - アルファ (TGF-アルファ)、トランスフォーミング増殖因子 - ベータ (TGF-ベータ)、腫瘍壞死因子 - アルファ (TNF-アルファ)、血管内皮増殖因子 (VEGF) / 血管透過性因子 (VPF)、インターロイキン-3 (IL-3)、インターロイキン7 (IL-7)、インターロイキン-8 (IL-8)、エフリン、マトリックスマタロプロテイナー (MM P 2 および MMP 9 など)、または内皮細胞の生存、増殖、もしくは分化を促進するための、当分野で知られている任意の他の化合物が含まれる。

【 0 0 8 0 】

細胞のさらなる処理には、細胞の拡大 (1つまたは複数の再生細胞種) および細胞の維持 (細胞シートのすすぎおよび培地の交換が含まれる)、継代培養、細胞の播種、一過性の形質移入 (バルク供給源から形質移入細胞を播種することが含まれる)、採取 (酵素的、非酵素的採取、および機械的搔爬による採取が含まれる)、細胞生存度の測定、細胞のプレーティング (たとえばマイクロタイタープレート上で、拡大のために細胞を個々のウェルから拾うこと、細胞を新鮮なウェル内で拡大することが含まれる)、高スループットスクリーニング、細胞治療への応用、遺伝子治療への応用、組織工学への応用、治療的タンパク質への応用、ウイルスワクチンへの応用、バンキングまたはスクリーニングのための再生細胞または上清の採取、細胞の成長、溶解、摂取、感染、または誘導の測定、細胞系の作製 (ハイブリドーマ細胞が含まれる)、透過性研究のための細胞、RNAi およびウイルス耐性の研究のための細胞、ノックアウトおよびトランスジェニック動物研究のための細胞の培養、親和性精製研究、構造的生物学への応用、アッセイ開発およびタンパク質工学への応用が含まれる。

【 0 0 8 1 】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の実施形態において有用な再生剤を単離する方法には、陽性選択 (標的細胞の選択)、陰性選択 (望ましくない細胞の選択的除去)、またはその組合せを含めることができる。本明細書中および文献中に記載のフローサイトメ

10

20

30

40

50

トリーによる分離に加えて、細胞は、それだけには限定されないが、電荷または大きさ（たとえば、誘導電気泳動または様々な遠心分離方法などによる）を含めたいいくつかの異なるパラメータに基づいて分離することができる。

【0082】

例として、本明細書中に開示する処置方法において有用な再生細胞は、細胞マーカーおよび遺伝子マーカーの様々な組合せによって同定し得る。たとえば、一部の実施形態では、再生細胞は CD90 を発現する。一部の実施形態では、再生細胞は有意なレベルの Lin を発現しない。一部の実施形態では、再生細胞は有意なレベルの ckit を発現しない。一部の実施形態では、再生細胞は CD90+ / Lin- / ckit- / CD45- である。

一部の実施形態では、再生細胞は STRO-1 を発現する。一部の実施形態では、再生細胞は STRO-1 および CD49d を発現する。一部の実施形態では、再生細胞は、 STRO-1、CD49d、ならびに CD29、CD44、CD71、CD90、CD105 / SH2 および SH3 のうちの 1 つまたは複数を発現する。一部の実施形態では、再生細胞は、 STRO-1、CD49d、ならびに CD29、CD44、CD71、CD90、CD105 / SH2 および SH3 のうちの 1 つまたは複数を発現するが、低いまたは検出不可能なレベルの CD106 を発現する。

【0083】

一部の実施形態では、再生細胞は、 STRO-1、CD49d、CD13、CD29、SH3、CD44、CD71、CD90、および CD105 のうちの 1 つもしくは複数、またはその任意の組合せを発現する。例のみとして、一部の実施形態では、再生細胞は、 CD31、CD34、CD45、および CD104 のそれぞれを発現し、検出可能なレベルの CD4、CD8、CD11、CD14、CD16、CD19、CD33、CD56、CD62E、CD106、および CD58 を発現しない。

一部の手法では、再生細胞は CD14 陽性および / または CD11b 陽性である。

一部の実施形態では、細胞は、マーカー CD45 (+) を発現する細胞が枯渇している。一部の実施形態では、細胞は、グリコホリン - A (GlyA) を発現する細胞が枯渇している。一部の実施形態では、細胞は、 CD45 (+) および GlyA (+) 細胞が枯渇している。

【0084】

細胞の陰性選択、たとえば、異種の細胞集団からの特定の細胞種の枯渇は、当分野で許容されている技法を使用して、たとえばマイクロ磁気ビーズなどを利用して行うことができる。一部の実施形態では、再生細胞は CD34+ である。

一部の実施形態では、再生細胞を凍結保存しない。一部の実施形態では、再生細胞を凍結保存する。たとえば、一部の実施形態では、再生細胞には、たとえば、Liu, et al. (2010) Biotechnol Prog. 26(6):1635-43、Carvalho, et al. (2008) Transplant Proc. ;40(3):839-41、国際特許出願 WO 97 / 039104 号、WO 03 / 024215 号、WO 2011 / 064733 号、WO 2013 / 020492 号、WO 2008 / 09063 号、WO 2001 / 011011 号、欧州特許 EP 0343217 号などに記載のように、凍結保存した細胞が含まれる。

一部の実施形態では、再生細胞は、放射線傷害、たとえば、皮膚または急性放射線傷害を有する対象から単離する。本明細書中に記載の実施形態の一部は、放射線傷害を有する対象の脂肪組織から単離した再生細胞の集団が、放射線傷害を有さない対象の脂肪組織から単離した再生細胞と類似の特性を有する（たとえば、細胞種、細胞生存度、細胞頻度、および細胞機能）という驚くべき発見に部分的に基づいている。

【0085】

一部の実施形態では、再生細胞は、焼痂から得られた脂肪組織から単離する。たとえば、一部の実施形態では、再生細胞は、接線または一括焼痂切開術から得られた脂肪組織から単離する。本明細書中に開示する実施形態は、焼痂から得られた脂肪組織から単離した再生細胞集団が、非焼痂脂肪組織から単離した再生細胞と類似の特性を有する（たとえば

10

20

30

40

50

、細胞種、細胞生存度、細胞頻度、および細胞機能)という発見に部分的に基づいている。

【0086】

足場

一部の実施形態では、本明細書中に開示した再生細胞を、足場と共に対象に投与することができる。一部の実施形態では、足場は、皮膚代替物、たとえば、生物学的または合成皮膚代替物であることができる。本明細書中に開示する実施形態において有用な例示的な皮膚代替物には、それだけには限定されないが、EPICEL (商標) 皮膚移植片 (Genzyme Biosurgery、米国マサチューセッツ州)、CELLSPRAY (商標) 皮膚移植片 (Avita Medical、オーストラリア、Perth)、MYSKIN (登録商標) 皮膚移植片 (CellTran Ltd.、英国Sheffield)、LASERSKIN (商標) 皮膚移植片 (Fidia Advanced Biopolymers、イタリア、Abano Terme)、RECELL (商標) 皮膚移植片 (Avita Medical、オーストラリア、Perth)、ORCEL (商標) 皮膚移植片 (Ortec Int'l、米国ジョージア州)、APLIGRAFT (商標) 皮膚移植片 (Organogenesis、米国マサチューセッツ州)、POLYACTIVE (商標) 皮膚移植片 (HC Implants BV、オランダ、Leiden) などの細胞含有皮膚代替物が含まれる。本明細書中に開示する実施形態において有用な、例示的な非細胞性の皮膚代替物には、それだけには限定されないが、INTEGRA (商標) (Integra NeuroSciences、米国ニュージャージー州) 足場、ALLODERM (商標) 足場 (LifeCell Corp.、米国ニュージャージー州)、HYALOMATRIX PA (商標) 足場 (Fidia Advanced Biopolymers、イタリア、Abano Terme)、DERMAGRAFT (商標) 足場 (Advanced BioHealing、米国コネティカット州)、TRANSCYTE (商標) (Advanced BioHealing、米国コネティカット州)、HYALOGRAFT 3D (登録商標) 足場 (Fidia Advanced Biopolymers、イタリア、Abano Terme)、DERMAMATRIX (商標) 足場 (Synthes、CMF、米国ペンシルベニア州) などが含まれる。当業者には、将来開発される皮膚代替物 (細胞性または無細胞性にかかわらない) が本明細書中に開示する実施形態において有用であることが容易に理解されよう。本明細書中に開示する実施形態において有用な様々な皮膚代替物が、米国特許出願公開番号 U.S. 2011/0245929 号に記載されている。

【0087】

本明細書中に開示する実施形態において有用な足場およびマトリックスの他の非限定的な例には、PURAPLY (商標) コラーゲン包帯 (Organogenesis, Inc.、米国マサチューセッツ州)、ALLEVYN (商標) マトリックス (Smith & Nephew、英国 Hull)、ACTICOAT (商標) マトリックス (Smith & Nephew、英国 Hull)、CICA-CARE (商標) マトリックス (Smith & Nephew、英国 Hull)、DURA-FIBER (商標) マトリックス (Smith & Nephew、英国 Hull)、INTRASITE (商標) マトリックス (Smith & Nephew、英国 Hull)、IODOSORB (商標) マトリックス (Smith & Nephew、英国 Hull)、OPSITE (商標) マトリックス (Smith & Nephew、英国 Hull)、PROFORE (商標) マトリックス (Smith & Nephew、英国 Hull)、CUTINOVA (商標) マトリックス (Smith & Nephew、英国 Hull)、JELONET (商標) マトリックス (Smith & Nephew、英国 Hull)、BIOBRANE (商標) マトリックス (Smith & Nephew、英国 Hull)、FORTAFLEX (商標) 生物工学コラーゲンマトリックス (Organogenesis、米国マサチューセッツ州)、FORTAGEN (商標) コラーゲン構築体 (Organogenesis、米国マサチューセッツ州) などが含まれる。

【0088】

10

20

30

40

50

したがって、一部の実施形態では、再生細胞は、メッシュ、ガーゼ、スポンジ、一相性の栓、二相性の栓、ペースト、パテ、ラップ、帶具、パッチ、メッシュ、またはパッドなどの生体適合性マトリックスと組み合わせる。一部の実施形態では、生体適合性マトリックスは、再吸収性、多孔性、または再吸収性および多孔性の両方であることができる。本明細書中に開示する実施形態において有用な生体適合性マトリックスには、以下のうちの1つまたは複数を含めることができる：タンパク質、多糖、核酸、炭水化物、無機成分もしくは鉱物、および合成ポリマー、またはその混合物もしくは組合せ。たとえば、一部の実施形態では、生体適合性マトリックスには、ポリウレタン、たとえば、NOVOSORB（登録商標）生体適合性ポリウレタンマトリックス、シロキサン、ポリシロキサン、コラーゲン、グリコサミノグリカン、酸化再生セルロース（ORC）、ORC：コラーゲン複合体、アルギネート、アルギネートコラーゲン（alginate x collagen）複合体、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ポリ（乳酸-コ-グリコール酸（glycolitic acid））（PLGA）、カルボキシメチルセルロース、粒状コラーゲン-グリコサミノグリカン複合体、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースアルギン酸、ポリ（a-ヒドロキシ酸）、ポリ（ラクトン）、ポリ（アミノ酸）、ポリ（酸無水物）、ポリ（オルトエステル）、ポリ（酸無水物-コ-イミド）、ポリ（オルト炭酸）、ポリ（a-ヒドロキシアルカノエート）、ポリ（ジオキサンノン）、ポリ（ホスホエステル）、ポリ（L-ラクチド）（PLLA）、ポリ（D,L-ラクチド）（PDLA）、ポリグリコリド（PGA）、ポリ（ラクチド-コ-グリコリド（PLGA）、ポリ（L-ラクチド-コ-D,L-ラクチド）、ポリ（D,L-ラクチド-コ-トリメチレンカーボネート）、ポリヒドロキシブチレート（PUB）、ポリ（e-カプロラクトン）、ポリ（5-バレロラクトン）、ポリ（y-ブチロラクトン）、ポリ（カプロラクトン）、ポリアクリル酸、ポリカルボン酸、ポリ（塩酸アリルアミン）、ポリ（塩化ジアリルジメチルアンモニウム）、ポリ（エチレンイミン）、ポリプロピレンフマレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリエチレン、ポリメチルメタクリレート、カーボンファイバー、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（酸化エチレン）、ポリビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（エチルオキサゾリン）、ポリ（酸化エチレン）-コ-ポリ（酸化プロピレン）ブロックコポリマー、ポリ（エチレンテレフタレート）ポリアミド、アラビアガム、グアルガム、キサンタン（xantham）ガム、ゼラチン、キチン、キトサン、酢酸キトサン、乳酸キトサン、コンドロイチン硫酸、N,O-カルボキシメチルキトサン、デキストラン、フィブリン糊、グリセロール、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸ナトリウム、セルロース、グルコサミン、プロテオグリカン、デンプン、乳酸、フルロニック、グリセロリン酸ナトリウム、グリコーゲン、ケラチン、絹のうちの1つまたは複数、1つもしくは複数のその複合体、1つもしくは複数のその混合物、または1つもしくは複数のその組合せを含めることができる。一部の実施形態では、リン酸カルシウムを含む。

【0089】

一部の実施形態では、生体適合性マトリックスはコラーゲンを含み得る。特定の実施形態では、生体適合性マトリックスは、I型コラーゲン、II型コラーゲン、III型コラーゲン、IV型コラーゲン、V型コラーゲン、VI型コラーゲン、VII型コラーゲン、VIII型コラーゲン、またはその組合せを含む。さらに、コラーゲンは、ウシコラーゲン、ヒトコラーゲン、ブタコラーゲン、ウマコラーゲン、トリコラーゲン、またはその組合せを含むことができる。特定の実施形態では、コラーゲンは、ウシI型コラーゲンまたはヒトI型コラーゲンを含む。一部の実施形態では、コラーゲンは、他の材料と組み合わせる（たとえば、コンドロイチン6硫酸）および/または障壁機能を提供する材料を添加する（たとえばシリコーン裏当ての防湿層）。複合コラーゲン含有移植片の一例は、INTEGRATEGRA（商標）（Integra NeuroSciences、米国ニュージャージー州）足場である。

【0090】

一部の実施形態では、再生細胞を、HELISTAT（商標）吸収性コラーゲン止血ス

10

20

30

40

50

ポンジ (Integra Life Sciences、米国ニュージャージー州)、HE LITENE 吸収性コラーゲン止血剤 (Integra Life Sciences、米国ニュージャージー州)、Matrix Collagen Particles (登録商標) 創傷被覆材 (Collagen Matrix, Inc.、米国ニュージャージー州)、Matrix Collagen Sponge (登録商標) 創傷被覆材 (Collagen Matrix, Inc.、米国ニュージャージー州)、OASIS (商標) 創傷マトリックス (Smith & Nephew、英国 Hull)、BIOBLANKET (登録商標) 外科用メッシュ (Kensey Nash, Corp.)、ZIMMER (登録商標) コラーゲン修復パッチ (Zimmer, Inc.、英国 Swindon)、PRO MOGRAN (登録商標) マトリックス創傷被覆材 (Systagenix、米国マサチューセッツ州)、FIBROCOL PLUS (商標) コラーゲン包帯 (Systagenix、米国マサチューセッツ州) などと組み合わせることができる。本明細書中に開示する実施形態において有用なさらに他の足場および移植片は、米国特許第 6,979,670 号、第 7,972,631 号、第 7,824,711 号、および第 7,358,284 号、米国特許出願第 2011/0091515 号などに記載されている。10

一部の実施形態では、再生細胞を、組織足場、たとえば、未処理の脂肪組織、多血小板血漿、または他の組織と組み合わせる。本明細書中に記載の実施形態において有用な、強化された足場を形成するための再生細胞と組織との混合物 (たとえば細胞が濃縮された脂肪移植片) は、たとえば、米国特許第 7,651,684 号および Kakudo, et al. (2013) *Journal of Translational Medicine* 11:254 などに開示されている。20

【0091】

組合せ療法

以下にさらに詳細に記載するように、一部の実施形態は、組合せ療法、すなわち、本明細書中に記載の再生細胞に加えて 1 つまたは複数の追加の添加剤 (たとえば、医薬薬剤、生物剤、または他の治療剤) を用いた、対象の処置を提供する。

【0092】

一部の実施形態では、上述の 1 つまたは複数の追加の「薬剤」は、単一の組成物中で再生剤と共に投与することができる。一部の実施形態では、1 つまたは複数の追加の「薬剤」は、再生細胞とは別に投与することができる。たとえば、一部の実施形態では、1 つまたは複数の追加の薬剤は、再生細胞の投与の直前または直後に投与することができる。本明細書中で使用する用語「直前」とは、15 分間、30 分間、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間以内などをいうことができる。同様に、語句「投与の直後」とは、15 分間、30 分間、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間以内などをいうことができる。30

【0093】

本明細書中に記載の方法における組合せ療法において有用な追加の薬剤には、たとえば、増殖因子、サイトカイン、多血小板血漿、ステロイド、非ステロイド性抗炎症剤、抗細菌剤および抗真菌剤、ならびに熱傷の処置において有益な効果を有することが当分野で知られている他の薬剤が含まれる。

1) 増殖因子、サイトカイン、およびホルモン

様々な増殖因子、サイトカイン、およびホルモンが、たとえば、熱傷傷害における再上皮化および回復において有益な効果を有することが示されている。たとえば Wenczak, et al. (1992) *J. Clin. Invest.* 90:2392-2401 を参照されたい。40

【0094】

一部の実施形態では、対象に、本明細書中に開示した再生細胞に加えて、1 つまたは複数の増殖因子、サイトカイン、またはホルモンを、その組合せを含めて投与することができる。たとえば、一部の実施形態では、増殖因子は、再生細胞の投与と同時に、その前に、またはその後に投与する。本明細書中に開示する実施形態において有用な増殖因子の非限定的な例には、それだけには限定されないが、アンジオゲニン、アンジオポエチン - 1 (Ang - 1)、アンジオポエチン - 2 (Ang - 2)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、カルジオトロフィン - 1 (CT - 1)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、Dcl -50

1、酸性纖維芽細胞増殖因子 (a F G F)、塩基性纖維芽細胞増殖因子 (b F G F)、フォリスタチン、顆粒球 (g a n u l o c y t e) コロニー刺激因子 (G - C S F)、グリア細胞系由来神経栄養因子 (G D N F)、肝細胞増殖因子 (H G F)、スキヤッター因子 (S F)、インターロイキン - 8 (I L - 8)、レブチン、ミッドカイン、神経増殖因子 (N G F)、ニューロトロフィン - 3 (N T - 3)、ニューロトロフィン - 4 / 5 、ニューチュリン (N T N)、胎盤増殖因子、血小板由来内皮細胞増殖因子 (P D - E C G F)、血小板由来増殖因子 - B B (P D G F - B B)、ブレイオトロフィン (P T N)、プログラニュリン、プロリフェリン、P B S F / S D F - 1 、トランスフォーミング増殖因子 - アルファ (T G F - アルファ)、トランスフォーミング増殖因子 - ベータ (T G F - ベータ)、腫瘍壞死因子 - アルファ (T N F - アルファ)、血管内皮増殖因子 (V E G F)、血管透過性因子 (V P F)、エリスロポエチン (たとえばTobalem, et al. (2012) Br. J. Surg. 99(9):1295-1303を参照) などが含まれる。

【0095】

2) 抗炎症剤

一部の実施形態では、対象に、本明細書中に開示する再生細胞に加えて1つまたは複数の抗炎症剤を投与する。本明細書中で使用する用語「抗炎症剤」とは、炎症を低下させる任意の化合物をいい、それだけには限定されないが、ステロイド、非ステロイド性抗炎症薬、および抗炎症効果を有することが実証されている他の生物製剤をいう。

したがって、一部の実施形態では、ステロイドは、再生細胞の投与と同時に、その前に、またはその後に投与する。本明細書中に開示する実施形態において有用なステロイドの非限定的な例には、それだけには限定されないが、プロゲストーゲン (p r o g e s t e g e n)、たとえばプロゲステロンなど、コルチコステロイド、たとえば、プレドニゾン、アルドステロン、コルチゾールなど、アンドロゲン、たとえばテストステロンなど、およびエストロゲンが含まれる。

【0096】

本明細書中に開示する実施形態において有用な他の抗炎症剤には、たとえば、T N F - アルファ、I L - 6 (たとえばSun, et al. (2012) Repair and Regeneration, 20(4): 563-572を参照)、抗T N F コンジュゲート、Sun, et al. (2012) Wound Repair Regen. 20(4): 563-572などの作用を阻害する抗体が含まれる。これらの抗炎症剤は、熱傷の回復において有益な効果を示すことが実証されている。

本明細書中に開示する実施形態において有用な非ステロイド性抗炎症薬には、プロピオニ酸誘導体、酢酸誘導体、ビフェニルカルボン酸誘導体、フェナム酸誘導体、およびオキシカムが含まれる。抗炎症性活性剤の例には、それだけには限定されないが、アセトアミノフェン、ジクロフェナク、ジクロフェナクナトリウムおよび他の塩、イブプロフェンおよびその塩、アセトアミノフェン、インドメタシン、オキサプロジン、プラノプロフェン、ベノキサプロフェン、ブクロキシン酸、エロコン、ならびにその混合物が含まれる。

【0097】

3) 抗酸化剤

抗酸化剤は、熱傷傷害からの回復に有用であることが示されている。たとえばF.H. Al-Jawad, et al. (2008) Ann Burns Fire Disasters 21(4): 186-191を参照されたい。したがって、一部の実施形態では、本明細書中に開示する方法および組成物には、再生細胞に加えて1つまたは複数の抗酸化剤の投与が含まれる。本明細書中に開示する実施形態において有用な抗酸化剤には、それだけには限定されないが、N - アセチルシステイン、クルクマリン、ガラクトマンナン、ピルベートおよび他のアルファ - ケト酸、チオグリコート、レチノイン酸、レチニルアルデヒド、レチンA、パルミチン酸レチニル、アダパレン、ベータ - カロテンを含めたビタミンAおよび誘導体、ビタミンB (パンテノール、ブロビタミンB 5 、パントテン酸 (p a n t h e n i c a c i d)、ビタミンB 複合体因子)、ビタミンC (アスコルビン酸やその塩) およびパルミチン酸アスコルビルなどの誘導体、カルシポトリエン (ビタミンD 3 類似体) を含めたビタミンD、その個々の構成物であるアルファ - 、ベータ - 、ガンマ - 、デルタ - トコフェロール、コトリエノールを含

10

20

30

40

50

めたビタミン E およびその混合物およびビタミン E パルミチン酸エステル、ビタミン E リノール酸 (l i n o l a t e) エステル、ビタミン E 酢酸エステルを含めたビタミン E 誘導体、ビタミン K および誘導体、ビタミン Q (ユビキノン)、ならびにその任意の組合せが含まれる。

【 0 0 9 8 】

4) 血小板含有液

多血小板血漿 (「 P R P 」) は、熱傷傷害後に有益な効果を有することが実証されている。たとえば Pallua, et al. (2010) Burns, 36(1):4-8 を参照されたい。したがって、一部の実施形態では、対象に、本明細書中に開示した再生細胞に加えて多血小板血漿を投与する。たとえば、一部の実施形態では、血小板含有液は、再生細胞の投与と同時に、その前に、またはその後に投与する。一部の実施形態では、本明細書中に開示する再生細胞を、相乗的に有効な量の血小板含有液と組み合わせる。

10

【 0 0 9 9 】

本明細書中で使用する用語「血小板含有液」とは、血小板を含有する、生物学的または人工のどちらかの任意の液体をいう。そのような液体の非限定的な例には、ヒトおよび非ヒト源由来の様々な形態の全血、血漿、多血小板血漿、任意の培地中の濃縮血小板などが含まれる。たとえば、一部の実施形態では、血小板含有液とは、血液、血小板、血清、血小板濃縮物、多血小板血漿 (P R P) 、乏血小板血漿 (P P P) 、血漿、新鮮凍結血漿 (F F P) などをいう。

【 0 1 0 0 】

本明細書中で使用する用語「 P R P 」とは、血漿の溶液中に懸濁させた、末梢血濃度よりも高い血小板の濃度をいう。本明細書中に開示する実施形態において有用な P R P を単離する方法は当分野で知られている。たとえば、米国特許第 8 5 5 7 5 3 5 号、国際特許出願 WO 0 9 / 1 5 5 0 6 9 号、米国特許出願 U S 2 0 1 0 0 1 8 3 5 6 1 号、U S 2 0 0 3 0 0 6 0 3 5 2 号、U S 2 0 0 3 0 2 3 2 7 1 2 号、U S 2 0 1 3 0 2 1 6 6 2 6 号、U S 2 0 1 3 0 2 7 3 0 0 8 号、U S 2 0 1 3 0 2 3 3 8 0 3 号、U S 2 0 1 0 0 0 2 5 3 4 2 号、欧州特許 E P 1 8 4 8 4 7 4 号などを参照されたい。血小板または P R P は、血漿以外の賦形剤中に懸濁させることができる。一部の実施形態では、血小板組成物には、それだけには限定されないが、等張塩化ナトリウム溶液、生理食塩水、規定生理食塩水 (normal saline) 、水中の 5 % デキストロース、水中の 3 0 % デキストロース、乳酸加リンゲル液などを含めた、ヒトまたは非ヒト動物への投与に適した他の賦形剤を含めることができる。典型的には、本明細書中に定義する P R P 中の血小板数の範囲は、1 立方ミリメートルあたり 5 0 0 , 0 0 0 ~ 1 , 2 0 0 , 0 0 0 個、またはそれより多い。 P R P は、自己、同種、またはプールした血小板および / または血漿の供給源を使用して得られ得る。 P R P は、ヒト源を含めた様々な動物源から得られ得る。好ましい実施形態では、本発明による P R P は生理的 pH まで緩衝する。

20

【 0 1 0 1 】

投与方法

本明細書中に記載の方法によって投与する組成物は、たとえば、静脈内、動脈内、皮内、筋肉内、リンパ内、節内、乳房内、腹腔内、くも膜下腔内、球後、肺内 (たとえば期間放出) によって、経口、舌下、経鼻、肛門、経膣、もしくは経皮の送達によって、または特定の部位での外科的移植によって、対象内に導入することができる。導入は、一定期間にわたる単一用量または複数の用量からなり得る。そのような場合、複数の導入は同じ機構によるものである必要はない。たとえば、一部の実施形態では、一時点での導入は再生細胞の外用噴霧の形態であってよく、別の時点では、導入は自己脂肪移植片と組み合せた再生細胞であってよい。細胞治療剤のためのビヒクルは当分野で知られており、文献中に記載されている。たとえば本明細書中に参照により組み込まれている Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publ. Co, Easton Pa. 18042) pp 1 435-1712 を参照されたい。無菌的溶液は、所要量の再生細胞を、適切な緩衝液中に、本明細書中に記載の他の成分の様々なものを用いてまたは用いずに取り込ませることによつ

30

40

50

て調製する。

【0102】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の再生細胞は、熱傷に直接投与することができる。たとえば、一部の実施形態では、本明細書中に開示した再生細胞は、注射用に製剤化する。したがって、一部の実施形態では、本明細書中に開示する組成物は、静脈内、動脈内、皮内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下、節内、およびリンパ内の注射、輸液、および配置用に製剤化する。一部の実施形態では、本明細書中に開示する組成物は、リンパ内送達用に製剤化する。したがって、一部の実施形態では、再生細胞は、熱傷部位内、たとえば、熱傷の凝血区域、鬱血区域、または充血区域内（皮下、筋肉内など）に注射することができる。

10

【0103】

一部の実施形態では、本明細書中に開示した再生細胞は、皮下または筋肉内注射によって、凝血区域に隣接して注射する。一部の実施形態では、本明細書中に開示した再生細胞は、鬱血区域に隣接して注射する。一部の実施形態では、本明細書中に開示した再生細胞は、凝血区域内およびそれに隣接して注射する。一部の実施形態では、本明細書中に開示した再生細胞は、鬱血区域内およびそれに隣接して注射する。したがって、一部の実施形態では、再生細胞は、複数の用量、たとえば、熱傷内および／またはその周りに複数回の注射で投与するために製剤化する。一部の実施形態では、注射の回数は熱傷の大きさに依存する。たとえば、一部の実施形態では、熱傷の面積（および／または重篤度）が増加するにつれて、より多い回数の再生細胞の注射を提供する。一部の実施形態では、たとえば、本明細書中に開示する再生細胞は、0.1 mm²、0.2 mm²、0.3 mm²、0.4 mm²、0.5 mm²、0.6 mm²、0.7 mm²、0.8 mm²、0.9 mm²、1.0 mm²、2 mm²、3 mm²、4 mm²、5 mm²、6 mm²、7 mm²、8 mm²、9 mm²、10 mm²、20 mm²、30 mm²、40 mm²、50 mm²、60 mm²、70 mm²、80 mm²、90 mm²、1 cm²、5 cm²、10 cm²、20 cm²、30 cm²、40 cm²、50 cm²、60 cm²、70 cm²、80 cm²、90 cm²、100 cm²の熱傷面積、またはその間の任意の値ごとに、熱傷内およびその周りに注射する。当業者には、様々な装置、たとえば、複数用量の再生細胞の注射に適したJUVAPEN（登録商標）注射装置（Juvaplus, SA、スイス）などを、本明細書中に開示する実施形態による再生細胞の投与に使用できることが容易に理解されよう。一部の実施形態では、再生細胞は、単一注射、たとえば単一の皮下注射での送達用に製剤化される。

20

【0104】

一部の実施形態では、本明細書中に開示した再生細胞は、1回または複数回の静脈内注射によって投与することができる。たとえば、一部の実施形態では、再生細胞は、1分間、2分間、3分間、4分間、5分間、10分間、30分間、45分間、1時間、2時間、またはそれより長い期間にわたる単一の静脈輸液によって投与することができる。

30

一部の実施形態では、本明細書中に開示した再生細胞は、細胞を本明細書中の他の箇所に記載されている足場（たとえば、それだけには限定されないが、皮膚代替物などの生体適合性の合成および非合成マトリックスが含まれる）に施用し、再生細胞を播種した足場を熱傷に施用することによって、投与することができる。一部の実施形態では、足場（たとえば、それだけには限定されないが、皮膚代替物などの生体適合性の合成および非合成マトリックスが含まれる）を熱傷に施用し、本明細書中に開示した再生細胞を足場に施用する。

40

【0105】

本明細書中に開示する再生細胞を投与する他の方法には、それだけには限定されないが、Gerlach, et al. (2011) Burns 37, e19-e23に記載されているものが含まれる。この方法では、再生細胞を、はめ込み式ノズルを備えた無菌的シリンジ内に入れ、ノズルから熱傷内に直接噴霧する。コンピュータ支援送達を使用して、銃が細胞を均一の速度で創傷全体にわたって分布させる。また、そのような方法は、再生細胞を含む組成物を本明細書中に記載の足場に施用するために容易に使用することもできる。当業者には、それだけに

50

は限定されないが、FIBRINET（商標）生体材料塗布器（Nordson Micromedics、ミネソタ州St. Paul）、EASY SPRAY（商標）塗布器（Baxter、イリノイ州Deerfield）、SMARTJET（商標）塗布器（Harvest Technologies、マサチューセッツ州Plymouth）などを含めた、組成物を噴霧することによって再生細胞を含む組成物を投与することに適した他の装置を、本明細書中に記載の方法において使用できることが理解されよう。

【0106】

一部の実施形態では、本明細書中に開示した再生細胞が含まれる組成物は、熱傷傷害後の5分間、10分間、15分間、20分間、30分間、40分間、50分間、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、24時間、36時間、48時間、60時間、1週間、2週間、またはそれより短い時間以内に投与する。一部の実施形態では、再生細胞は、一定期間にわたって連続的に投与する（たとえば、対象に毎回単一または複数の用量で再生細胞を投与することができる）。たとえば、一部の実施形態では、本明細書中に記載の再生細胞は、12時間ごと、毎日、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日ごと、毎月、またはそれ以上ごとに投与することができる。処置の頻度も変動し得る。対象は、1日に1回もしくは複数回（たとえば、1回、2回、3回、4回、もしくはそれより多く）、またはある時間ごと（たとえば、約2、4、6、8、12、もしくは24時間ごと）処置することができる。処置の時間経過は様々な持続時間、たとえば、2、3、4、5、6、7、8、9、10日間、またそれより長いものであります。たとえば、処置は、1日2回を3日間、1日2回を7日間、1日2回を10日間であることができる。患者の組織が治癒および/または再構築プロセスの経過とともに処置が続くことを本発明者らは予想しているが、処置サイクルは一定間隔で繰り返すことができる。たとえば、処置は、週に1回、月に2回、または月に1回繰り返すことができ、処置の期間は、処置を与えない期間によって隔てることができる。処置は、単一処置であることができるか、または対象の寿命がある限り続けることができる（たとえば長年）。

【0107】

一部の実施形態では、本明細書中に開示する方法には、本明細書中に開示する組成物の投与の前に熱傷領域を創傷清拭することができる。たとえば、一部の実施形態では、この方法には、本明細書中に開示する組成物の投与の前に、熱傷の結果として存在する壊死組織の一部またはすべてを除去するステップが含まれる。一部の実施形態では、熱傷領域は、外科的または機械的手段を使用して創傷清拭する。一部の実施形態では、熱傷領域は超音波手段を使用して、たとえば、米国特許第80705503号などに記載のように創傷清拭する。一部の実施形態では、熱傷領域は、たとえば欧州特許EP0933096号に記載のように、壊死組織を切除することによって熱傷創傷を創傷清拭するために使用するパルスCO₂レーザーを使用して創傷清拭する。本明細書中に開示する実施形態において有用な、熱傷領域の創傷清拭に有用な様々な他の方法および機器には、それだけには限定されないが、米国特許出願第20130261534号、第20130245386号、第20130079800号、第20130045196号、第20100292689号、第20100094265号、第20090010869号、第20070239078号、第20040120989号、第20040092920号、第20030125783号に記載されているものなどが含まれる。

【0108】

一部の実施形態では、たとえば凝血区域内の、熱傷組織または生育不能な組織の一部またはすべてを、本明細書中に開示した再生細胞の投与の前に創傷清拭する。一部の実施形態では、本明細書中に開示した再生細胞は、熱傷組織または生育不能な組織の一部またはすべての創傷清拭の前および後の両方で投与することができる。

したがって、一部の実施形態では、本明細書中に開示する再生細胞は、熱傷組織または生育不能な組織の一部またはすべての創傷清拭の直後に投与することができる。一部の方法では、本明細書中に開示した再生細胞は、熱傷傷害の30分間、40分間、50分間、

10

20

30

40

50

1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、24時間、36時間、48時間、60時間、1週間、2週間、またはそれより長い時間の後に投与することができる。

したがって、一部の実施形態では、本明細書中に開示する再生細胞は、熱傷組織または生育不能な組織の一部またはすべての創傷清拭の直前に投与することができる。一部の方法では、本明細書中に開示した再生細胞は、熱傷組織または生育不能な組織の一部またはすべてを創傷清拭する30分、40分、50分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、24時間、36時間、48時間、60時間、1週間、2週間、またはそれより長い時間前に投与することができる。

本明細書中に開示するように、再生細胞は、さらなる加工なしに、または由来の組織から単離した後にさらに精製、改変、刺激、もしくは他の様式で細胞を変化させるための追加の手順に従わずに、対象に提供するか、または損傷組織に直接もしくは損傷組織の近くに施用することができる。たとえば、患者から得られた細胞は、投与前に細胞を培養せずに、前記患者に戻して提供し得る。いくつかの実施形態では、脂肪組織の採取および加工、ならびに再生細胞の投与は、患者のベッドサイドで行う。好ましい実施形態では、再生細胞は、それを移植する人の組織から抽出し、それによって、移植片に対する抗原性および/または免疫原性応答に関連する潜在的な合併症を低下させる。しかし、別の個体から抽出したまたはそれに由来する細胞の使用も企図される。

【実施例】

【0109】

以下の例は、本技術が適用されるる詳細な状況および設定を示すために提供され、本発明の範囲および本開示に含まれる特許請求の範囲を制限することを意図するものではない。

【0110】

(例1)

放射線損傷を有する対象から単離した脂肪由来再生細胞の生存率および治療活性

この例に記載される実験は、随伴性放射線損傷および熱傷のための治療法の試験に有用な新規モデル系を評価および検証するために実施した。またこの実験は、照射対象における熱傷の処置において、皮下または静脈内に送達される、新たに単離された脂肪由来再生細胞の安全性および有効性を評価するために実施した。

【0111】

放射線損傷および随伴性熱傷のモデル系

ブタの生理および皮膚は、小型哺乳動物よりもヒトに非常によく類似していることが分かっている。Vardaxis et al., (1997) J Anat 190: 601-11。この試験のためにゲッチングンミニブタ系統を特に選択したが、その理由は、この系統が成体でおよそ10~20 kgであり、成体で>100 kgとなるヨークシャー種家畜ブタよりも非常に取扱いが容易で、動物を使用する作業に都合が良いためである。

非致死性骨髄抑制全身照射の状況における創傷治癒を評価する十分に確立されたモデルは存在していない。したがって本明細書に記載の実験は、随伴性放射線損傷および熱傷に対する治療を評価するために有用な新規モデル系の開発を記載する。本明細書で開発されたモデル系を使用して、脂肪由来再生細胞が、致死量以下の随伴性骨髄抑制全身照射を伴った全層熱傷損傷を受けた動物における治癒を改善する能力について、皮膚移植有りまたは無しで評価した。

【0112】

治癒を評価するために、2つの主要な有効性組織学的エンドポイント（収縮および上皮化）を、創傷床における一連の生検を補足した面積測定を損傷後の特定の時点で実施することによって、試験過程の間に評価した。生検試料を回収する処理は、新たな損傷を誘導するため、1度試料採取した創傷は、その後の分析から除いた。そのように、動物を2つの主要群に分けた。群1は、皮膚移植なしで、早期、中期、後期の時点に生検した創傷であり、群2は、皮膚移植の適用後のみに生検した創傷である。脂肪由来再生細胞を含む組

10

20

30

40

50

成物を使用した処置の効果を、各群（1および2）内または対照群と個々の細胞処置群との間のデータ比較により評価した。

【0113】

皮膚への損傷に加えて、熱傷損傷は、致死性多臓器不全につながる可能性がある全身性炎症応答とも関連しうる。したがって本明細書に記載の実験は、脂肪由来再生細胞を含む組成物の局所投与による処置と脂肪由来再生細胞を含む組成物の静脈内注入とを含む（後者は、より包括的な全身性効果を提供しうる有望な投与経路を代表する）。さらに、脂肪由来再生細胞は、全身性炎症マーカーに対する潜在的な効果に加えて、放射線誘導好中球減少および血小板減少の過程に積極的に影響する能力を有しうる可能性もある。本明細書に記載の試験で、全身性送達経路（静脈内）の安全性および有効性を評価した。

10

【0114】

18匹の動物を下記表1に示す群の1つにランダムに割り当てた：

【表1】

表1:実験の群および部分群

群	部分群	処置 (焼痂切開後3日間)	送達経路	動物の数	創傷生検 (損傷後の日数)
1 (STSG なし)	1a	ビヒクルのみ	真皮下	3	10、17、23および3 3
	1b	ADRCs	真皮下	3	10、17、23および3 3
	1c	ADRCs	静脈内	6	10、17、23および3 3
2 (STSG あり)	2a	ビヒクルのみ	真皮下	3	17および27
	2b	ADRCs	真皮下	3	17および27

20

【0115】

方法

a. 照射 *V a r i a n 6 0 0 c L I N A C*を、動物照射のために使用した。機器は、投与用量を100MU（機械単位）に設定し、投与速度を100MU/分に調節した。特定の放射線量（1.2Gy）を送達するために、LINAC機器の設定が必要であった。計算は、各動物個体の寸法を使用し、製造業者の指示にしたがって、各動物について実施した。

30

全身照射について、動物を1.1mg/kgのアセプロマジン（IM）で鎮静化し、LINAC施設内の照射室に移した。照射室で、動物を、腕および脚を体のできるだけ近くに押し込めて、拘束装置内に配置した（V字形フォーム楔またはスリング）。ボーラス組織等価材（「*S u p e r F l a b*」）を動物の体全体に巻き付けた。動物に、照射の間、フェイスマスクを介したイソフルラン（1～5%）による麻酔を維持させた。動物は、右および左外側面の両方に、標的放射線量の半量を受けた。ダイオード検出器を動物の各側面に配置し、動物曝露についての入射線量と射出線量の合計を測定するために使用した。照射後、イソフルランを除去し、動物を保持ケージに戻して回復させてから、収容室に戻した。

40

【0116】

b. 热傷 プリントした創傷鑄型シートを使用して、各動物の背に6つの創傷部位を確保し、脊椎のそれぞれの側に沿って3つの創傷を各動物に正しく配置した。各創傷は、3cm離し、ミニブタの脊椎から4cmの箇所に位置させた。鑄型を、ブタの皮膚上に直接置き、創傷部位を、頭側から尾側へ、左側の創傷についてはL1、L2、L3と標識し、右側の創傷についてはR1、R2、R3と標識した。

50

火傷が生じる間に動物の皮膚に適用される圧力を制御するように設計されたカスタマイズされた火傷装置（米国仮特許出願第61/979461号）を使用して、全層火傷を誘導した。損傷の日に、動物を清浄にし、各ミニブタの背側表面を電気シェーバーで刈り込んだ。皮膚をクロルヘキシジンで清浄にし、損傷前にDuraPrep（ベタジン／アルコール）で調製した。火傷誘導の前に、動物を、フェイスマスクを介した3～5%イソフルラン下に、10～15mg/kgケタミンおよび2mg/kgキシラジンを筋肉内注射して麻酔した。

【0117】

火傷誘導のために、真鍮ブロックを、およそ180～200に、レーザー温度計で温度を検証しながら加熱した。この試験で、火傷装置は動物の体に0.4kg/cm²の圧力がかかるように較正した。6つの熱傷を、皮膚表面が平坦で、火傷装置と完全な接触を確保するために十分な大きさである胸部脊椎傍領域に位置づけ、創傷錆型シートを使用して作製した（脊椎のそれぞれの側に沿って3つの創傷）。火傷の誘導後、創傷区域全体を、承認された試験プロトコールに記載されるように包帯し、何らかのさらなる自傷損傷および環境から火傷を保護した。

フェンタニルパッチ（25μg）を、痛みの制御のために1日目に耳の後ろに置いた。パッチは、試験獣医がパッチをプロトコールから安全に取り出しうると決定した11日目まで、1日ごとに交換した。

【0118】

創傷を外部の汚染および感染から保護するために、以下のように、多層の包帯を使用した。

- ・ 層1（火傷部位上に直接配置） - 三重抗生物質軟膏（バシトラシン、ネオマイシン、およびポリミキシンB硫酸塩）
- ・ 層2 - Tegaderm
- ・ 層3 - Ioban 2、ヨードホール含接着剤を有する抗菌ドレープ
- ・ 層4 - 動物をストッキングホース型シャツで覆った。
- ・ 層5 - 動物に、全ての包帯を固定するためのLomirジャケットを着せた。

【0119】

c. 脂肪由来再生細胞の単離 処置のための脂肪組織を採取するために、動物を麻酔し、小切開（約3インチ）を、鼠径部入口近くに作製した。およそ10～25gの脂肪組織を回収し、Cytori（登録商標）Cellution（登録商標）細胞処理装置を使用して製造業者（Cytori Therapeutics、San Diego、CA）の指示にしたがって処置し、脂肪由来再生細胞を含む組成物を得た。全細胞収率（有核細胞）および生存率パーセントを、下記に記載するように決定した。

d. 焼痂切開 焼痂切開は、3日目に、脂肪組織回収のおよそ2時間後に実施した。動物に麻酔をし、創傷部位を、筋肉層に至るまで、外科的に切開した。得られた創傷の全体的大きさの平均は、およそ14cm²であった。

創傷を外部の汚染および感染から保護するために、多層包帯を使用した。各包帯は、感染の発生を最小にするために、試験にわたって7日ごとに交換した。

創傷部位上に配置する第1の包帯層は、銀含接着剤シリコーンフォーム包帯材（Mepilex-Ag；Molnlycke health Care AB、Goteborg、Sweden）で構成した。第2の包帯層のIoban（商標）（ヨードホール含接着剤を有する抗菌切開ドレープ）を、Mepilex上に適用して、創傷部位を密封した。第3の被覆層は、綿弹性包帯ラップで構成した。最後に、Lomirジャケットを、全ての包帯を保持するように置いた。

【0120】

e. 処置 熱創傷誘導後3日目および焼痂切開後に、乳酸リンゲル液に懸濁させた新たに単離した脂肪由来再生細胞を含む組成物を、創傷周囲の真皮組織内に放射状および全周的に（範囲：0.2mLを10～16注射／創傷周囲領域）ならびに浅筋膜内に直接（範囲：0.2mLを5～9注射）、注射した。局所送達について、脂肪由来再生細胞を、0

10

20

30

40

50

. 2 3 ~ 0 . 3 2 × 1 0 ⁶ 再生細胞 / cm² の用量で、図 2 に示すように、切開した創傷内に局所投与した。

静脈内送達は、新たに単離した脂肪由来再生細胞の乳酸リソゲル液懸濁物を、全体積 5 mL で静脈内送達した。細胞注射は、耳介静脈を通して、0 . 7 8 ~ 3 . 3 × 1 0 ⁶ 再生細胞 / kg 体重の標的生細胞用量で、1 mL / 分の速度で、実施した。

【 0 1 2 1 】

f . 創傷の評価 損傷後 3 、 1 0 、 1 7 、 2 3 、 2 7 または 3 3 日目に、様々な試験動物から創傷について標準化デジタル写真を取った。創傷を、a) 収縮 (無創傷皮膚で覆われていない全区域) および b) 上皮化 (新生上皮化の根拠が示されている創傷内区域) の 2 つのパラメータについて評価した。図 3 は、この試験で評価される創傷の様々な区域を示す。緑色の線は、収縮の評価のための創傷境界を示し、白色の線は、再上皮化の境界を示し、黄色の円は、生検の位置を示す。

g . 創傷生検 1 創傷あたり 6 mm のパンチ生検を、損傷後 1 0 、 1 7 、 2 3 および 3 3 日目 (群 1) または損傷後 1 7 および 2 7 日目 (部分群 2 a および 2 b) に包帯交換と同時に回収した。動物の血小板数が 5 0 , 0 0 0 / μ L 未満になった場合には、その日に回収する創傷部位あたりの生検は 2 つのみとした。試験過程の間に、7 匹の動物は、予定された創傷生検の直前に血小板数が低くなり、したがって 2 つの生検のみを回収した。最後の時点で、創傷全体を回収した。回収したら、生検をすぐに 1 0 % 中性緩衝ホルマリン内に入れるか、またはすぐに急速凍結した。創傷内に半剛性の足場が存在しない場合には、創傷収縮の速度が予測よりも高くなかった。結果的に、1 7 日目以降は、計画した創傷内で 4 つの生検全てを得ることは実際的でなかった。これらの状況下、1 つは創傷の中央、もう 1 つは創傷の周囲部として、2 つの生検のみを回収した。図 4 は、創傷生検 (2 または 4 つの生検回収構成) についての、スケジュールおよび処理 (IHC または分子分析のための瞬間凍結) を示す。各生検は、2 ~ 3 人の調査者により盲検的に評価した。

【 0 1 2 2 】

h . 組織学的解析 ホルマリン固定生検を脱水し、パラフィンで包埋し、5 μ m の厚さに切り、試験施設でヘマトキシリンおよびエオシン (H & E) を使用して染色した。染色されていない 7 つのスライドが、創傷治癒プロセス (マッソントリクローム、CD 3 1 および Ki 6 7 染色) に関する選択マーカーの発現の差異を評価するために、Cytori 社員からさらに提供された。染色後、スライドを、Aperio Scan Scope AT 2 Turbo を使用してデジタル的にスキャンし、ImageScope ソフトウェアを使用して画像化した。

【 0 1 2 3 】

i . 骨髄抑制 骨髄抑制は、通常の血球数により観測した。血液回収の前に、全ての動物を、アセプロマジン (0 . 5 ~ 1 . 1 mg / Kg 、 IM) で鎮静化した。血液は、伏在静脈を介して回収し、抗凝固剤として K 3 E D T A を含むバキュテナー内に入れた。

採血は、照射損傷前 5 日間、および照射後 0 、 3 、 5 、 8 、 1 0 、 1 2 、 1 5 、 2 0 、 2 3 、 2 5 、 3 0 および 3 3 日目に実施した。血液学のために回収される血液は、ADVIA Hematology System (Bayer Corporation) を使用した。凝血の何らかの根拠を示した試料は、分析から除外した。

【 0 1 2 4 】

結果

A . モデル系は、一貫した再現性のある量で放射線を送達する この試験の全ての動物は、両側スキームを使用して全身照射を受けた。照射の間のダイオード測定に基づくと、実際の吸収線量は、標的線量 (1 . 2 Gy) の 9 8 . 7 ~ 1 1 0 . 7 % の範囲に相当する 1 . 1 8 4 ~ 1 . 3 2 8 Gy の範囲であった。各動物に送達した実際の放射線量の詳細を表 2 に示す。これらのデータは、一貫した全身照射が送達されたことを示している。

【 0 1 2 5 】

10

20

30

40

50

【表2】

表2.個別の放射線吸収線量

動物ID	ダイオードA 右肩	ダイオードB 右臀部	ダイオードC 左肩	ダイオードD 左臀部	平均線量 (cGy)	標的に対する%
5341010	121.6	120.3	128.8	122.9	123.4	102.80%
5344302	130.8	130.9	135.6	133.9	132.8	110.70%
5348057	126.5	118.7	122.9	117.5	121.4	101.20%
5342130	126.8	124.9	128.4	125.4	126.4	105.30%
5345473	127.9	126.3	129.2	127	127.6	106.30%
5343136	122	118.5	120.1	119.5	120.0	100.00%
5344655	135.6	127.1	134.2	128.1	131.3	109.40%
5341265	132.1	123.1	122.6	120.6	124.6	103.80%
5340536	118.7	118	119.5	117.5	118.4	98.70%
5343063	124.5	121.3	125.7	120.3	123.0	102.50%
5348073	124.8	120.4	122.6	119.5	121.8	101.50%
5346500	122.2	117.3	119.6	117.5	119.2	99.30%
5343195	125.2	120.1	122.4	118.7	121.6	101.30%
5346593	124.7	119.3	122.3	120.7	121.8	101.50%
	126.2	118.4	121.5	119.4	121.4	101.10%
5343471	120.6	119.8	118.9	117.6	119.2	99.40%
5349592	125	119	120.2	118.7	120.7	100.60%
5346534	120.1	118.4	120.8	119.1	119.6	99.70%

線量は、センチグレイ(cGy)で示す;100cGy=1Gy

【0126】

b. モデル系で投与された放射線量は、骨髓抑制および好中球減少をもたらすために十分であった。図5 A ~ 5 D は、群1、つまり群1a(対照)、群1b(局所ADRc処置)および群1c(静脈内ADRc処置)を含む「皮膚移植なし」の群の動物についての血液学的データ(絶対白血球、絶対好中球、絶対血小板および絶対リンパ球)を示す。図5 A ~ 5 D に示されるように、対照群といずれかの処置群との間の血球数に差異はなかった。全ての対照動物における血小板数は、照射後5日間を通して全体的に安定していた。動物は、放射線曝露後10~15日目の間におよそ100,000/ μ L以下の血小板数最下点を示した(図5 C)。動物は、概して15日後に正常な血小板レベルへゆっくりと回復した。動物は、1,000/ μ Lを下回る好中球数の低下を示し、放射線曝露後15~23日目に最下点を示した(図5 B)。平均好中球数は、照射後およそ12日間を通して全体的に安定であった。全ての動物は、概して25日後に正常な好中球数へゆっくりと回復した。放射線3日後までに、循環リンパ球の数の実質的な低下が、全ての動物で観察された。ベースラインレベルへの穏やかな回復が、10日目以降に観察された(図5 D)。同様の結果が、皮膚移植を受けた群2の動物、つまり群2a(対照)および群2b(局所再生細胞処置)の動物で観察された。図6 A ~ 6 D に示されるように、対照群と処置群との間の血球数に差異はなかった。さらに動物は、群1の動物と同じ骨髓抑制(myelosuppression)パターンを示した。まとめると、これらのデータは、一過性骨髓抑制およびリンパ抑制が、選択された標的放射線量で一貫して達成されたことを示す。

【0127】

c. 脂肪由来再生細胞は、放射線損傷を有する対象から得ることができる。致死量以下の放射線への曝露が脂肪由来再生細胞の生存率および/または治療有効性に影響を与えるかを評価するために、コロニー形成単位(CFU)、細胞組成および細胞分化アッセイを

10

20

30

40

50

動物対象に対して実施した。1 . 2 G y の全身照射を受けた動物から単離した脂肪由来再生細胞の生存率および機能を評価した。

【 0 1 2 8 】

部分群 1 b 、 1 c および 2 b における動物由来再生細胞の収率および生存率を評価した。全体として、処理された脂肪組織 1 グラムあたり平均で $1 . 5 \pm 0 . 4$ の脂肪由来再生細胞（範囲： $0 . 9 7 \sim 2 . 1 6 \times 1 0 ^ 6$ 細胞 / g 組織）が取得され、平均生存率は $9 0 . 2 \pm 4 . 3$ % (範囲： $7 9 . 1 \sim 9 4 . 4$ %) であった。この数は、非照射対象から得られた組織から取得した有核細胞の範囲内である（比較データ示さず）。

【 0 1 2 9 】

C D 4 5 、 C D 3 1 、 C D 9 0 および C D 1 4 6 についての蛍光細胞分取分析を実施して、対照および照射動物における脂肪組織から単離した細胞集団の構成を決定した。表 3 は、脂肪組織から単離した細胞集団内の様々な細胞部分集団を定義するために使用した発現プロファイルを示す。

【表 3】

表3

抗原	CD45	CD31	CD90	CD146
細胞部分集団				
白血球	+	+/-	+/-	+/-
内皮細胞	-	+	+/-	+/-
間質細胞	-	-	+	+/-
平滑筋関連	-	-	+/-	+

10

20

F A C s 分析からの例示的データを、下記表 4 に示す。

【表 4】

表4. 放射線損傷を受けた動物の脂肪組織から誘導した脂肪由来細胞における主要な細胞部分集団の相対的出現頻度

動物ID#	CD45	間質細胞	内皮細胞	平滑筋関連細胞
群1a	23.2	44.6	3.3	17.6
群1a	22.3	24.3	10.2	29.4
群2a	14.0	47.6	2.4	9.1
群2a	7.0	35.4	2.2	20.3
平均±STD	16.6±7.6	38±10.5	4.5±3.8	19.1±8.4

30

上記データは、照射動物から単離した脂肪由来再生細胞が、同様に非照射家畜およびヒト検体から単離した脂肪由来再生細胞と同じ主要集団から構成されていたことを示す（比較データ示さず）。

【 0 1 3 0 】

コロニー形成単位 - 線維芽細胞 (C F U - F) アッセイは、機能性間葉系幹細胞を定量するために使用される十分に確立されたアッセイである。Hicok, et al. (2011) Methods Mol Biol. 702: 87 参照。試料採取された動物における C F U - F 頻度は、およそ $4 . 6 2 \pm 1 . 3 8$ % であることが示された。これらのデータは、照射動物から単離された脂肪由来再生細胞が、 in vitro で過剰増殖することができる接着細胞集団を、ヒト由来細胞について報告されている頻度 (1 ~ 6 %) と同じ頻度で含むことを示す。照射対象対非照射対象で単離される細胞の機能的能力をさらに分析するために、照射対象から単離された脂肪由来再生細胞を、従前に記載された in - vitro 内皮管形成アッセイで評価した。例えば、Donovan et al. (2001) Angiogenesis 4: 113-121 参照。このアッセイは、内皮細胞が、適切な時間および細胞外マトリックス支持体を与えられて、 in vitro で移動し、毛細管様構造（略して管）を形成する能力を測定する。脂肪由来再

40

50

生細胞を、125600細胞/cm²の密度で、標準細胞培養プレートの、内皮細胞培地（EGM-2、Lonza、Basel、Switzerland）中に播種した。培養培地は、2週間に1回、培地交換した。14日後、細胞を空気乾燥させ、50:50のアセトン：メタノール溶液を使用して固定した。次いで、固定した培養物を、標準的免疫組織化学技術および試薬を使用して染色した。免疫組織化学実験の代表的写真を図6A～6Bに示す。細胞培養物中で観察される管様構造の内皮関連起源を検証するために、細胞を固定し、CD146およびCD31に対する抗体を使用して染色した。下記図6Cおよび6D、図6Aおよび6Bに示す管様構造は、コンフルエントな線維芽細胞単層の上面に増殖し、内皮細胞の指標であるCD146およびCD31の両方を発現していることが分かった。

10

【0131】

細胞機能の別の試験として、Zuk, et al. (2002) Mol. Biol. Cell 13: 4279-4295に記載された方法を使用して、動物対象から単離した脂肪由来再生細胞集団の脂肪細胞への分化能力を評価した。図7Aおよび7Bは、照射対象から単離した脂肪由来再生細胞が、脂肪細胞に分化可能であることを示す。

【0132】

前記データは、脂肪由来再生細胞が、致死量以下の照射を受けた対象の脂肪組織から、非照射対象と同様の量で単離されうることを示している。さらにデータは、照射対象の脂肪組織から単離した再生細胞集団の構成が、非照射対象の脂肪組織から単離した再生細胞集団の構成とよく似ていることを示している。最後に、データは、照射対象から単離した脂肪由来再生細胞が、非照射対象から単離した細胞の機能的能力、例えばCFU-F、毛細管様形成、および脂肪細胞への分化を示している。

20

【0133】

e. 脂肪由来再生細胞は治癒過程を促進する

創傷収縮は、創傷を閉じるための創傷の端から中心への動きを指す。この過程は、治癒の成熟化段階に先行し、一般に、元の損傷の維持後5～15日の間で生じる。創傷収縮に伴う1つの問題点は、拘縮が発生するリスクである。理想的には、創傷は締め過ぎてはならず、さもないと動きの範囲を制限する重度の瘢痕が生じうる。このことは、身体の広範囲にわたる全層火傷創の場合に特に問題となりうる。これらの損傷は非常に広いために、損傷が閉じるとき、領域内の皮膚に対抗して引っ張る可能性がある。患者は、屈曲性を保持するためおよび締まり過ぎない皮膚の柔軟性を維持するために、治癒の間に理学療法を使用することが必要となりうる。

30

脂肪由来再生細胞を含む組成物の局所および静脈内送達の創傷収縮に対する効果を決定するために、創傷を、焼痂切開時（損傷後の日数）ならびに損傷後120、17、23および33日目の面積測定によって評価した。創傷を、1) 収縮 - 無創傷皮膚で覆われていない全区域および2) 上皮化 - 新生上皮化の根拠が示されている創傷内区域の2つのパラメータについて評価した。

【0134】

創傷収縮は、創傷切開直後の区域に対するパーセンテージとしての全創傷区域の変化として定義した。全層熱傷創傷の3つの対が各動物に適用された。創傷収縮の生データを、階層混合効果モデルを使用して、線形対数相関（時間を対数変換した後、各創傷データに線形回帰を適合させた）でモデル化した。群1についてのデータを図8に示す。重要なことに、脂肪由来再生細胞を含む組成物の局所注射または静脈内注射のいずれかで処置された動物の創傷収縮の速度は、対照群で観察される速度よりも顕著に低かった。群2の動物については、対照群と、脂肪由来再生細胞を含む組成物で処置された群とに収縮速度の差異は観察されなかった（データ示さず）。瘢痕拘縮は、収縮の過程の最終的な結果と認識されている（Goel and Shrivastava, Ind J Plast Surg 2010; 43(Suppl): S63-S71. "Post-burn scars and scar contractures"）。したがって、この試験で再生細胞が収縮を減少させる能力は、肥厚性瘢痕および/または拘縮の処置、予防および/または減少における有用性と一致する。

40

50

【0135】

創傷の中央で回収した生検の組織学的分析により、群1の局所および静脈内処置動物における上皮被覆の増加が示された。図9 Aおよび9 Bを参照。さらに、組織学的検査により、脂肪由来再生細胞を含む組成物の局所送達による、処置後7日目（損傷後10日目）における上皮増殖の増強が示された。図9 Cおよび9 Dを参照。これらのデータは、脂肪由来再生細胞が創傷治癒を改善することを実証し、さらに再生細胞の局所および静脈内送達が創傷治癒を改善し、異なる作用メカニズムによる上皮活性化を促進するように機能しうること、例えば、再生細胞の局所送達が上皮増殖を増強し、再生細胞の静脈内送達が上皮遊走を加速しうることを示唆する。

【0136】

創傷治癒過程の後期におけるコラーゲン沈着は、創傷の引張り強さの増大を促進し、治癒過程を評価するための良好なパラメータである。したがって、損傷後33日目に回収した創傷生検のコラーゲン沈着を、ImageScope（商標）分析ソフトウェアを使用して、トリクロームマッソン染料で染色した組織検体を使用して決定した。ソフトウェアアルゴリズムは、異なる色を分離するために逆重畠法を利用しており、相互汚染なしに個々の染色を定量することができる。このアルゴリズムは、パーセンテージを、弱（1+）、中等度（2+）、および強（3+）コラーゲン陽性染色で計算する。下記表5に示すように、脂肪由来再生細胞を含む組成物の局所投与により、対照と比較してコラーゲン沈着が促進された。

【表5】

表5:

	強陽性(++)平均 パーセント	中等度陽性(++) 平均パーセント	弱陽性(+)平均 パーセント	平均スコア(0 ～300)
群1a-対照	3.25±2.05	9.32±2.91	32.77±2.14	61.15±13.3
群1b-局所再生 細胞送達	8.34±4.63	11.89±1.35	31.57±3.77	80.38±12.7
群1c-静脈内再 生細胞送達	5.56±4.09	10.50±3.2	28.12±4.56	65.81±20.13

10

20

30

【0137】

簡潔に述べれば、これらのデータは、放射線損傷の状況における創傷、例えば熱傷の処置について、一部の有効性パラメータの統計学的に有意な効果を説明する。詳細には、脂肪由来再生細胞を含む組成物を使用した処置は、ビヒクルのみを受けた動物と比較して、創傷収縮の顕著な低下および創傷再上皮化の増加を示す。

【0138】

(例2)

脂肪由来再生細胞は、焼痂組織から取得することができる

全層火傷損傷のための標準的処置には、焼痂切開として参照される処理における非生組織の切開（焼痂）が含まれる。実際には、この切開には、点状出血を示す組織への切開が含まれる。点状出血は、切開が生組織床に達したことを示す明らかな視覚的証拠である。そのように、焼痂切開における切開の性質により、実質的に罹患率がゼロの全層熱傷を有する患者から脂肪組織を得る追加的機会が生じる。患者の大半について、焼痂切開は、直下の生組織を慎重に保存する層状接線手法を使用して実施する。この切開が、下にある脂肪組織を曝す場合は、脂肪組織はこの切開を単に継続し、処理のための生脂肪組織を切開して取得されうる可能性もある。出血または手術時間が懸念される患者については、一般に、より侵襲性の焼痂切開処理で焼痂が筋膜に至るまで一縷めにして切開され、この処理では、真皮下脂肪組織が変性された火傷組織に沿ってしばしば切開される。

【0139】

実験はまた、再生細胞が、焼痂切開中に取り出された組織（「焼痂切開組織」）から得

40

50

られる脂肪から単離しうること、さらにこれらの再生細胞集団が、健常者から得られる脂肪吸引された脂肪組織から単離した再生細胞集団と同じ特徴（生存率、構成 [例えは、様々な細胞型の種類および頻度] ならびに有効性）を有することも示している。下記に記載の実験は、焼痂切開から得られた脂肪組織の酵素処理により得られた新たに単離した間質血管性細胞の詳細を調べ、非火傷個体由来の脂肪組織の処理により得られた集団と比較するために実施した。脂肪由来再生細胞収率、生存率、C F U - F 頻度、細胞組成および分化機能を分析した。

California大学、San DiegoのBurn Centerからの焼痂試料を、患者へのインフォームドコンセント後に、Cytori Therapeuticsに移した。各試料は、火傷組織を取り出すために一纏めの切開手術手法が使用された組織を含んだ。

【 0 1 4 0 】

未処置の焼痂の中央から得た組織生検試料を切除し、パラフィンに包埋して調製し、組織学的に評価した後、検体から脂肪を解離した。組織切片を、ヘマトキシリン - エオシンおよび / またはマッソントリクロームで染色し、その後、これらの染料を使用した組織学的評価のために、標準的組織学的手順で処置した。焼痂組織関連脂肪を、クラス II 生物学的安全キャビネット中でハサミおよびメスを使用して火傷皮膚から切除した。単離に際し、脂肪組織を秤量し、吸引された脂肪の小片と同等のおよそ 1 ~ 3 mm の小片に、無菌の鋭利なハサミおよび / またはナイフを使用して刻んだ。刻んだ組織検体を、Cytori (登録商標) Celution (登録商標) 細胞処理装置中で製造業者の指示にしたがって処置して、脂肪由来再生細胞を調製した。脂肪由来再生細胞の有核細胞濃度および生存率を、NUCLEOCOUNTER (登録商標) 細胞計数装置 (Chemometec A / S, Allerød, Denmark) を製造業者の指示にしたがって使用して、評価した。

【 0 1 4 1 】

CD31、CD34、CD45、CD90 および CD146 細胞膜タンパク質に対する蛍光標識抗体を使用した蛍光活性化細胞分取を実施して、新たに単離した脂肪由来再生細胞の不均質な集団内の様々な細胞集団を特定した。

焼痂脂肪組織から単離した脂肪由来再生細胞集団における脂肪由来幹細胞の発生頻度を評価するために、C F U - F アッセイを上記のように実施した。簡潔には、細胞を、標準 6 ウェル培養プレートにウェルあたり 1,000 細胞の濃度で、10% ウシ胎仔血清および抗菌 / 抗真菌溶液を補足した D M E / F 1 2 培養培地中に播種した。プレートを 37 °C 、5% CO₂ 、加湿チャンバー中でインキュベートし、培地を 1 週間に 1 回交換した。培養の 12 ~ 14 日後、細胞を固定し、標準血液学的染料 (May - Grunwald) キットを使用して染色した。コロニーおよびクラスターを、ステレオスコープを使用してスコア化した。評価した各試料について 6 つの複製ウェルに播種し、中間の 4 つの計数の平均を使用して、平均 C F U - F 頻度を決定した。

【 0 1 4 2 】

焼痂脂肪組織から単離した脂肪由来再生細胞の機能を評価するために、細胞の脂肪細胞に分化する能力を評価した。脂肪由来再生細胞 (25,000 細胞 / cm²) を、最初に、10% ウシ胎仔血清および抗菌 - 抗真菌溶液を補足した標準 D M E / F 1 2 培地中、37 °C 、5% CO₂ で培養した。最初の培地交換時に、非接着細胞を除去し、残った接着細胞を増やして 70 ~ 90% のコンフルエンスに到達させた後、標準増殖培地を、脂肪細胞分化培地 (Zenbio, Research Triangle Park, NC) に取り換えた。細胞を分化培地中に 3 日間維持し、次いで培地を脂肪細胞維持培地に置き換えた。脂肪細胞維持培地は、成熟脂肪細胞 (脂質含有細胞) が観察されるまで (およそ 7 ~ 12 日間) 、3 日ごとに交換した。およそ 12 日間培養した後、細胞を 10% ホルマリン中で固定し、標準的手法にしたがってオイルレッド O で染色した。脂肪細胞分化を経た細胞は、明るい赤色の染色で視覚化された細胞内脂質の蓄積により証拠づけられた。

【 0 1 4 3 】

10

20

30

40

50

焼痂脂肪から単離した脂肪由来再生細胞の別の機能性試験として、細胞を、血管新生アッセイにおいて、毛細管様構造に分化する能力について評価した。血管新生アッセイについて、脂肪由来再生細胞を、25,000細胞/cm²の濃度で、内皮細胞培地（EGM-2、Lonza、Basel、Switzerland）中に播種し、37、5%CO₂中で7~21日間インキュベートした。培地を1週間に2回交換し、培養物を毎週、管形成について調べた。血管新生培地の中で21日間培養した後、細胞を固定し、管構造を内皮タンパク質（CD31、CD34、CD146、von Willebrand因子）に対する抗体および白血球（CD45）マーカーを使用して免疫細胞化学により染色した。

【0144】

結果

焼痂組織の組織学的分析は、検体の中央または周囲部から回収された試料における血管出血の明らかな存在から証拠づけられる、真皮および真皮下脂肪組織における損傷血管を示した。図10参照。

【0145】

脂肪由来再生細胞の収率および生存率を、各焼痂試料について決定した。データを、下記表6に示す。

【表6】

表6:焼痂試料におけるADRCの収率および生存率

試料	検体表面積(cm ²)	脂肪質量(g)	全脂肪	グラム脂肪/cm ²	処理方法	ADRC収率(細胞/グラム)(×10 ⁵)	生存率
E1O	508	192.5	485.4	0.96	手動	2.09	92%
E1Y		157.9			手動	1.65	90%
E2S	185	58	126	0.68	手動	1.77	90%
E2D		68			手動	5.20	92%
E3	1050	42.9	42.9	0.04	手動	2.93	79%
E5	480	155.1	155.1	0.32	手動	0.90	91%
E6	114	74.3	74.3	0.65	手動	1.82	92%
E7M	260	327.1	427.1	1.64	手動	3.00	94%
E7C		100			CT-X2	1.90	86%
E8	196	216.8	216.8	1.11	手動	2.49	93%
E9	260	100	100	0.38	手動	5.00	93%
		平均	0.72±0.51		2.61±1.37		90±4%

処理された焼痂脂肪組織から取得された1グラムあたりの脂肪由来再生細胞の平均収率および生存率は、正常ドナー組織の場合と同様であった（比較データ示さず）。

【0146】

脂肪由来再生細胞組成物は、フローサイトメトリーにより評価した。正常な健常ドナー由来の脂肪組織から単離した脂肪由来再生細胞における主要な集団（間質、内皮細胞、平滑筋関連細胞および白血球）は、一団の4つの抗体：CD45、CD31、CD146およびCD34により定義した。内皮細胞は、CD34およびCD31の両方を発現しているがCD45を発現していない細胞と定義し、間質細胞は、CD34を発現しているがCD31またはCD45を発現していない細胞と定義し、白血球は、抗原CD45を発現している細胞と定義し、および平滑筋関連細胞は、抗原CD146を発現しているが、CD31またはCD45を発現していない細胞と定義した。焼痂組織から得た脂肪から単離した脂肪由来再生細胞調製物における細胞部分集団を、下記表7に列挙する。重要なことに、正常組織由来の脂肪から取得された再生細胞集団において観察されるものと同じ主要な

10

20

30

40

50

細胞集団および頻度が、焼痂組織から単離された脂肪由来再生細胞で観察された。さらに、非損傷組織由来の脂肪由来再生細胞で見られるものと同じ集団内変動性 (variability) が、焼痂組織から単離された細胞で観察された。例えば、CD34+細胞の全てではないがほとんどで、マーカーCD90の発現が示され、集団CD34+/CD90は、再生細胞の平均29.70±15.33% (10.10%~53.40%の範囲) を占めた。図23参照。

【0147】

【表7】

表7: 焼痂脂肪組織由来のADRC中の主要な細胞集団

試料	白血球(%)	内皮(%)	間質(%)	平滑筋(%)
E1Y	15.70	15.70	59.20	4.20
E1O	17.35	14.30	58.00	5.20
E2S	39.60	7.60	28.00	4.25
E2D	27.00	6.35	43.75	12.90
E3	48.30	12.60	27.15	3.45
E5	26.80	23.55	33.30	5.30
E6	29.75	15.40	34.55	11.45
E7M	46.90	13.10	22.70	5.10
E7C	41.20	13.20	21.60	11.80
E8	44.70	18.70	19.60	5.20
E9	43.00	14.00	27.90	5.80
平均±STD	34.57±11.73	14.05±4.70	34.16±13.84	6.79±3.46

10

20

30

40

50

【0148】

CFU-Fアッセイは、2つの機能を実施する；両方とも集団内の推定幹細胞数を定量し、それらの増殖能力を確認する。このアッセイにおいて、コロニーは、50の細胞を含有するものと定義し、細胞クラスターは、4を超えるが50未満の細胞を有するものと定義した。焼痂切開由来の脂肪組織から単離した脂肪由来再生細胞集団における観察されたクラスターの平均頻度はおよそ1.71%であり、コロニーの平均数はおよそ1%であった。焼痂試料由来のコロニーの平均頻度は、正常ドナーから単離した脂肪由来再生細胞について報告されている範囲内であった。

【0149】

脂肪生成能力を評価して、焼痂組織から単離した脂肪由来再生細胞集団の機能的能力を分析した。図11は、上記のように処置され、試験された例示的焼痂試料のオイルレッドO染色を示す。図11に示されるように、多胞性脂肪細胞の豊富な高頻度の形成が、焼痂試料由来の脂肪から単離した再生細胞集団で観察された。これは、焼痂組織由来の脂肪から単離した再生細胞が、脂肪細胞に分化する能力を保持していたことを示す。

【0150】

血管新生能力を、焼痂組織から単離した脂肪由来再生細胞集団の機能的能力の尺度としても評価した。Donovanらは、血管新生のためのアッセイを記載しており、このアッセイにおいては、線維芽細胞様細胞のフィーダー層上で増殖する内皮細胞が、新生毛細管床を示唆するCD31陽性管の複雑なネットワークを発生する。以前に、Cytoriは、外部フィーダー層の不在下の同様の条件で、正常ドナー組織由来脂肪由来再生細胞を播種することにより、同様の構造が導かれることを見出している。そのように、焼痂試料からのヒト脂肪由来再生細胞を、増殖因子またはマトリゲルを添加していない組織培養プレート中で培養して、焼痂組織の脂肪から取得した脂肪由来再生細胞の血管新生能力を評価した。例示的な一連のデータを図12A~12Cに示す。これらのデータは、無火傷対象由来の脂肪組織から単離した再生細胞集団を使用する場合と同様に、焼痂組織由来の脂

肪から得た再生細胞集団が、*in vitro* 血管新生アッセイで遊走し、管構造を形成することができる細胞を含有したことを示している。

【0151】

前記実験は、脂肪由来再生細胞の集団が、焼痂組織由来の脂肪から取得しうることを示す。焼痂から得た脂肪から単離した脂肪由来再生細胞の細胞組成および生存率は、健常(つまり、無火傷)組織から単離した脂肪由来再生細胞において観察された細胞組成および生存率と類似していた。最後に、焼痂組織から単離した脂肪由来再生細胞は、健常組織から単離した脂肪由来再生細胞で観察される機能的能力と同様の機能的能力を保持していた。これらのデータは、再生細胞が、熱傷損傷を有する患者の皮下脂肪組織から取得しうることを示している。この特定の試験において、組織は、切除手段により取得した。皮下脂肪組織は、吸引(脂肪吸引)および当該分野で認識されている他の手段によっても取得されうる。

【0152】

(例3)

足場とともに適用される脂肪由来再生細胞は、治癒を改善する

この例は、足場とともに適用されるときの、創傷治癒の改善における脂肪由来再生細胞の有用性を示す。INTEGA(登録商標)およびTISSEEL(登録商標)足場は、創傷治癒、例えば、深部中間層火傷および全層火傷の治癒を容易にするために使用されている。本明細書に記載の実験は、再生細胞(特に脂肪由来再生細胞)が、全層熱傷におけるINTEGA(登録商標)コラーゲン系真皮再生錠型創傷マトリックスおよびTISSEEL(登録商標)フィブリン系創傷シーラントの治癒パラメータを改善する能力を評価する。

【0153】

24匹の動物を下記表1に示す群の1つにランダムに割り当てた：

【表8】

表8:実験の群および部分群

群	試験物質	対照物質
A, *D	乳酸リンゲル液に懸濁させた脂肪由来再生細胞(ADRC)	乳酸リンゲル液
B	Integra上に負荷されたADRC	Integra創傷包帯
C	TISSEEL中に混合されたADRC	TISSEEL/フィブリン糊

【0154】

実験処理フローの概略を図13に示す。全層火傷を、各動物に対して誘導し、脂肪由来再生細胞を、上記例2の「熱傷」および「脂肪由来再生細胞の単離」の項に記載されるように、各動物から回収した。ADRC注射を受けた群Aの動物(n=4)から、処理脂肪組織1グラムあたり平均 $1.88 \times 10^6 \pm 0.66 \times 10^6$ 個のADRC(範囲: 0.95 $\times 10^6$ ~ 2.4 $\times 10^6$ 細胞/g組織)を得た。群A ADRC調製物から回復した細胞の平均生存率は90.8 ± 3.0% (範囲: 87.9% ~ 94.8%)であった。各創傷部位は、火傷部位をおよそ2mmのマージンで全層深さへ切開することにより、外科的に郭清した。

焼痂切開後すぐに、群AおよびDの動物の創傷床を、対照物質1(LRBヒクル)または試験物質1(LRBに懸濁した脂肪由来再生細胞)を使用した真皮下/筋膜内注射で処置した。対照/試験物質は、図2に示すパターンで創傷を囲む組織内に放射状および周的に(創傷床あたりそれぞれ0.2mLを10~16注射)ならびに浅筋膜内に直接(創傷床あたりそれぞれ0.2mLを5~9注射)送達して、複数回の注射として投与した。

10

20

30

40

50

【0155】

群Bの動物については、細胞単離から1/2時間以内に、ADRCを、INTEGRATECH（登録商標）マトリックスの10cm²あたり500μl中およそ3×10⁶個のADRCの濃度で、Integraマトリックス上に直接負荷した。次いで、ADRCを負荷したマトリックスを、切開した創傷床の上に配置し、ADRCを負荷した側が、創傷床と直接接觸するようにした。

ADRCを負荷したINTEGRATECH（登録商標）マトリックスを、切開した創傷床の上に配置し、ADRCで負荷した表面が、創傷床と直接接觸するようにした。マトリックス適用後、ポリエチレンシートを取り出した。次いで各創傷に対してINTEGRATECH（登録商標）マトリックスを成形し、創傷の上に止め金でしっかりと付けた。シリコーン層を、試験の全過程にわたって、創傷内の位置に維持した。詳細には、群Bの動物に、0.25×10⁶細胞/cm²±25%（つまり、0.19×10⁶細胞/cm²～0.31×10⁶細胞/cm²）の範囲内の用量のADRCを与えた。20×25cmのIntegraシートを、10×8.3cm（83cm²）の6片に切断した。1000μlのピベットを使用し、ADRCを、INTEGRATECH（登録商標）マトリックス上に均一に負荷した（INTEGRATECH（登録商標）1cm²あたり2.5×10⁵±25%のADRC（つまり、Integraの83cm²あたり1mL中20.8×10⁶±25%のADRC）。次いで細胞を、創傷部位に適用する前に5～10分間、マトリックス内に浸漬し、付着させた。

【0156】

群Cの動物については、新たに単離したADRCを、TISSUEEL/フィブリン糊中に、10cm²の創傷あたり2.5～3×10⁶個のADRCの濃度で負荷した。全ての動物に、0.25×10⁶細胞/cm²±25%（つまり、0.19×10⁶細胞/cm²～0.31×10⁶細胞/cm²）の範囲内の用量のADRCを与えた。TISSUEEL中に負荷した新たに単離したADRCは、1cm²あたり0.24×10⁶±0.04×10⁶個のADRCの平均用量（範囲：0.17×10⁶～0.37×10⁶/cm²）で適用した。TISSUEELにおけるADRCの平均用量は、創傷面積1cm²あたり0.24×10⁶±0.04×10⁶個のADRCであった。対照創傷には、細胞を添加していない等体積のTISSUEELを与えた。

【0157】

試験および対照物質を各動物に投与した後、処置された部位を以下の層で覆った：Mepilex、Ioban、綿ラッピングおよびLomirジャケット。追跡測定、生検回収、および血液回収を、次の4週間にわたる動物の回復時に行った。包帯は、1週間に1回交換し（ADRCの再適用または足場送達はなし）、局所または全身性の抗生物質を必要に応じて適用した。

生検については、創傷あたり複数の6mmパンチ生検を、7、14、21日目の包帯交換ならびに生存試験相終了（28日目）と同時に回収した。創傷は、いずれかの特定の時点で生検に使用したら、以後の試験では生検は行わなかった。生検は、図3に示されるように各創傷の中央および周囲部から7、14および21日目に取った。生検を回収し、10%中性緩衝ホルマリン中に固定した。

【0158】

28日目の剖検に際し、4つの生検を適切な創傷から回収した（表6および図7参照）。11、1および5時位の3つの生検を、10%NBF中に固定し、1つの生検（7時位の位置）は回収し、将来的試験のために瞬間凍結した。

創傷収縮および再上皮化測定のために、創傷を、SILHOUETTE CONNECT（商標）デジタル画像ソフトウェア（ARANZ Medical、Christchurch、NZ）を使用して、面積測定により評価した。創傷は、2つのパラメータについて評価した：1）収縮 - 無創傷皮膚で覆われていない全区域、および2）上皮化 - 新生上皮化の根拠が示されている創傷内区域。

【0159】

組織学的分析のために、生検組織を、10%中性緩衝ホルマリン（NBF）中に固定し

10

20

30

40

50

、脱水し、パラフィン中に包埋し、3～5 μmの厚さに切り、ヘマトキシリンおよびエオシン（H & E）ならびにマッソントリクローム染料で染色した。スライド（生検または末端試料あたり2つの切片）を、委員会認定獣医学病理学者により、組織構造、細胞充実性およびコラーゲン沈着の診断によって、光学顕微鏡を介して定性的に評価した。H & E、マッソントリクローム、および免疫組織化学染色による追加の組織学的分析を実施した。スライド（生検または末端試料あたり1つの切片）を、2人の委員会認定獣医学病理学者により、組織構造、細胞充実性およびコラーゲン沈着の診断によって、光学顕微鏡を介して定性的に評価した。

【0160】

免疫組織化学分析について、生検した組織のパラフィン切片を脱パラフィンし、アルコールに通して水に再水和させた。各切片を、クエン酸ナトリウム溶液（pH 6、Vect o r）を使用して抗原回収工程にかけた後、ブロッキングおよび抗体インキュベーションを行った。

損傷後28日目に回収した創傷生検のコラーゲン沈着を、トリクロームマッソンで染色した組織検体を使用して、ImageScope分析ソフトウェアを使用して決定した。ソフトウェアアルゴリズムは、異なる色を分離するために逆重畠法を利用してあり、相互汚染なしに個々の染色を定量することができる。このアルゴリズムは、パーセンテージを、弱（1+）、中等度（2+）、および強（3+）コラーゲン陽性染色で計算する。このように、コラーゲン沈着スコアを、陽性パーセンテージを含む簡単な式（スコア = 1 × [弱%] + 2 × [中等度%] + 3 × [強%]）により計算した。各生検について、肉芽組織の表層および中部／深部領域を特定するため、アノテーションを作成した。上皮厚さは、ヘマトキシリンおよびエオシンスライドで、基底層から角質層までの上皮層の長さを測定することにより評価した。合計で3～5回の測定を、創傷瘢痕組織の左側から右側組織にかけて実施した。

【0161】

結果

a. A D R C は、創傷閉鎖を改善する：群D対照（LR）および試験（A D R Cのみ）処置創傷の面積測定評価により、創傷閉鎖の速度が、A D R C の真皮下および筋膜注射を受けた動物において、火傷誘導後14日目までに平均32%増加していることが分かった。このことは、対照および試験動物の個々の開放創傷面積をプロットしている図14で示される。A D R C 処置動物の開放創傷面積の平均パーセンテージは、14日目に、対照動物と比較して有意に減少していた（対応のない片側t検定により $p = 0.0004$ ）。図14参照。群D A D R C 処置創傷で観察された創傷閉鎖速度の増加は、収縮速度の増加によるものではなく、なぜなら、試験過程にわたって対照群（局所LR注射）とA D R C 処置群との間で（面積測定により測定される）平均創傷収縮に有意な差異はなかったためである（データ示さず）。群Dの動物における再上皮化が生じた創傷区域の面積測定による定量により、LR処置動物と比較して、A D R C 処置創傷における上皮化の速度が増加していることが示される。上皮化の平均パーセンテージは、それぞれ、A D R C 処置創傷において $30.3\% \pm 14.9\%$ （範囲：7.9%～53.6%）対LR処置創傷において $14.4\% \pm 9.5\%$ （範囲：0%～32.7%）であった。図15参照。この差異は統計学的に有意であった（ $p = 0.0004$ 、対応のない片側t検定）。

創傷肉芽組織における新血管形成の動態を決定するために、組織切片の免疫組織化学分析を、損傷後7、14および21日目に回収した生検に対して実施した。LRおよびA D R C 処置動物由来の組織試料に、CD31（内皮血管マーカー）免疫染色を行い、新生毛細管を局在化した。染色した各スライドを、デジタル的にスキャンし、次いでImageScope分析ソフトウェアを適用して微小血管密度（1 mm²あたりの血管数）を定量した。各生検について、肉芽組織の表層および深部領域を特定するため、アノテーションを作成した。

【0162】

7日目に回収された生検における創傷組織は、顕著に不均質であった。CD31染色を

10

20

30

40

50

実施したが、採取した生検における肉芽組織の不均一な厚さおよび全面積により、定量は実行できなかった。微小血管密度 (MVD) は、14日目に、局所ADRC処置を受けた動物の深部肉芽組織において、LR処置動物と比較して、顕著に増加していた (1.47倍) (それぞれ 1 mm^2 あたり 179.6 ± 21.7 血管対 121.8 ± 13.3 血管; $p = 0.031$)。図16A～16D参照。有意な差異は、表層肉芽組織では観察されなかった。

上皮厚さを、28日目に、群Dのビヒクル (乳酸リソゲル液「LR」) およびADRC処置動物において調べた。28日目に、創傷の中心での平均上皮厚さは、ADRC処置創傷の方が、LR処置創傷と比較して高かった。図17参照。

【0163】

b. 再生細胞はINTEGRATE (登録商標) 治癒を改善する

INTEGRATE (登録商標) 真皮マトリックスに関してみると、処置を知らされていない病理学者による組織学的スコアリングから、ADRCを負荷して送達された場合にIntegraの下の肉芽組織の成熟化の加速が示された (図18A、B)。したがって、この肉芽組織の厚さも評価した。組織形成は、新しい血管が進入するマトリックスの基部で始まる。基部からシリコーンまで層ごとに、進行性血管新生により、その過程がマトリックスのより高いレベルで生じる (Gottlieb ME, Arimedica, 2005)。興味深いことに、21日目に、マトリックス下の肉芽組織の厚さは、ADRCで処置した動物において増加していた。図18C。14日目に回収した生検の大半は、細胞内にINTEGRATE (登録商標) のコアを捕捉しておらず、したがって肉芽組織の厚さの決定はこの時点で行わなかった。

【0164】

H&Eおよびマッソントリクロームで染色したスライドは、外部の獣医学病理学者 (ANTECH Diagnostics) により評価した。この病理学者は、適用した処置を知らされなかった。外部評価により、損傷後10日目において、ADRCで処置した創傷の中央から回収した生検の全てが、局所注射によるか静脈内送達によるかにかかわらず、主に表層および中部真皮において中等度の化膿性および纖維素性混合炎症を示していた (スコア = 2.5)。逆に、対照動物は、主に表層および中部真皮において中等度の化膿性および単核性混合炎症を示していた (スコア = 2.5)。定量分析により、LR処置創傷 (対照) から回収した生検の100%が、10日目に単核性炎症を示したことが示された。対照的に、処置された創傷の100% (局所およびiv注射の両方) で纖維素性が示された。興味深いことに、17日目に、LR処置創傷の67%が纖維素性炎症を示したが、一方で、処置された創傷は依然として纖維素性炎症を示した。これらのデータは、脂肪由来再生細胞が炎症応答を調節していることを示している。

【0165】

血管形成の免疫組織学的解析を行って、観察された肉芽組織の厚さの増加が、組織血管形成の加速に関与しているかを調べた。この目的のために、平均血管密度、平均血管ルーメン面積および全CD31染色面積を決定して、肉芽組織血管分布の相対的成熟度を評価した。血管密度は、損傷後14および21日目の中央創傷生検の実験において、Integraシートの下の肉芽組織内のCD31陽性血管の数をImageScope (商標) (ARANZ Medical, Christchurch, NZ) を使用して定量することにより測定した。INTEGRATE (登録商標) マトリックス下の肉芽組織における血管密度は、ADRCを補足したINTEGRATE (登録商標) マトリックスを受けた創傷の方が、INTEGRATE (登録商標) マトリックスのみにより覆われた創傷と比較して、大きかった。この増加は、14日目で統計学的有意に近く ($p = 0.06$)、21日目に統計学的に有意であった ($p = 0.024$)。図19A～Bを参照。中部および深部真皮における21日目の平均血管ルーメン面積は、ADRCを負荷したINTEGRATE (登録商標) マトリックスで処置した創傷の方が、LRを負荷したIntegraよりも、大きかった。図19E～F。この差異は統計学的有意に近かった ($p = 0.063$)。中部および深部真皮における全CD31染色面積は、ADRCを負荷したIntegraを使用し

10

20

30

40

50

て処置した創傷の方が、INTEGR A (登録商標)マトリックスのみよりも、大きかった。図19C～D。この差異は統計学的有意に近かった($p = 0.069$)。

【0166】

マッソントリクローム、ヘマトキシリン&エオシン、およびCD31 (血管マーカー)で染色した生検のデジタル画像分析は、それぞれ色逆重畠、核、および血管密度アルゴリズム (Aperio) を使用して、マトリックス充填に対する各生物学的過程の相対的寄与を評価した。デジタル定量により、INTEGR A (登録商標)マトリックスへのADR Cの負荷により、損傷後21日目に、INTEGR A (登録商標)マトリックス細胞充実性が増加していることが明らかになった。図20A～B。試験21日目のINTEGR A (登録商標)マトリックス充填および細胞充実性 (1群あたり $n = 3 \sim 4$ の動物、処置あたり6つの創傷)。ADR C負荷Integraにおいて、INTEGR A (登録商標)のみと比較して、定性的に大きな細胞充実性が観察された。観察された充填効果 (図20A) は統計学的に有意であり (片側T検定により $p = 0.026$)、同様にマトリックス体積間内の細胞の量 (図20B) は、ADR C負荷INTEGR A (登録商標) で見られる細胞核のレベルの方が高かった (片側T検定により $p = 0.09$)。細胞を受けていないINTEGR A (登録商標)マトリックスに対して、CD31陽性血管密度が増加する傾向が、21日目に、ADR C負荷INTEGR A (登録商標)マトリックスで観察された (1群あたり $n = 3 \sim 4$ の動物；処置された6つの創傷)。図20Cを参照。

10

【0167】

全体的に見て、INTEGR A (登録商標)マトリックス足場を使用したデータから、脂肪由来再生細胞を含む組成物が、移植片の治癒を改善することが示される。詳細には、再生細胞は、INTEGR A (登録商標)マトリックスの血管新生、ルーメンサイズ、および血管密度を改善する。さらに、ADR C処置足場は、細胞充実性の増加を示す。このデータは、ADR C処置創傷において、平均ルーメンサイズの増加に基づいて、血管の成熟化が加速されていることを示し、ADR Cが、血管の安定性および新組織への血液流入を好適に調節しうることを示唆している。実際に、血管のルーメンは、損傷部位に血液を提供するために必須である (Axnick J and Lammert E, Curr Opin. Hematol., 2012)。内皮細胞および壁細胞 (例えば、周皮細胞) との間に重要な力学的相互作用が生じて、血管再構築、直径、および血管基底膜マトリックス集合、ならびに血管成熟化および安定化に必要な根本的な過程に影響を与える。これらの過程は、機能的微小循環の発生を制御するために重要である。本発明者らの知見は、INTEGR A (登録商標)マトリックスへのADR Cの負荷が、血管新生だけでなく血管成熟化の促進によって、新血管形成の複雑なプロセスを編成しうることを示唆する。

20

30

【0168】

c. TISSUE Lは、脂肪由来再生細胞送達のための適切な足場である

次の連の実験は、再生細胞を含む組成物が、他の足場、例えばTISSUE L (登録商標)の状況における治癒を有益に増強することを示す。

【0169】

7日目に回収した生検の組織学的評価により、増殖する肉芽組織上のTISSUE L / フィブリンの存在が明らかになった (データ示さず)。さらに、ADR C処置動物において、遊走性細胞の存在が、界面肉芽組織 / TISSUE Lで観察された (データ示さず)。

40

図21に示されるように、TISSUE L (登録商標)を脂肪由来再生細胞で補足することにより、損傷後21日目のレシピエント部位の上皮被覆が顕著に増強した。図22に示されるように、微小血管密度は、14日目に、局所ADR C処置を受けた動物の表層肉芽組織内で、LR処置動物と比較して顕著に増加していた (1.72倍) (それぞれ 1 mm^2 あたり 103.7 ± 15.2 血管対 60.3 ± 9.9 血管; $p = 0.0325$)。21日目に、血管新生の増加傾向が、ADR C処置動物対LR処置 (それぞれ 1 mm^2 あたり 85.8 ± 13.7 血管対 62.5 ± 12.9 血管) (図22) で観察された。

これらのデータは、TISSUE L (登録商標)などのフィブリン糊足場が、創傷部位、例えば全層火傷部位への脂肪由来再生細胞の投与のための適切な送達ビヒクルであるこ

50

とを示す。

【0170】

(例4)

脂肪由来再生細胞は、ブタにおける火傷進行を軽減する

この例は、動物モデルにおける火傷進行の予防または軽減のための、本明細書に開示される脂肪由来再生細胞の使用を説明する。

動物を、損傷のおよそ1時間後に凝固部近くに皮下注射を介して脂肪由来再生細胞（およそ $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 個の有核細胞）またはP B Sのみ（バッファー対照）の投与を受ける処置にランダム化する。

【0171】

10

簡単に述べると、オープン内で100に5分間予熱された真鍮コームを使用して、4つのコーム火傷を、各動物の背中に作製する。この真鍮コームにより、3つの無火傷皮膚の「間隙」により分離される明確な4つの火傷部位が生じ、それらは進行性の損傷を生じる（例えば、Singer, et al (2007) Acad. Emergency Med. 14: 1125-1129を参照）。1匹のブタあたり2つの全層切開創傷を、コーム火傷と同じ大きさで、対照として含めた。

損傷後7日間、間隙から全層生検を実施し、H & E 染色後、壊死の根拠について評価する。壊死に進行する間隙のパーセンテージを、カイ2乗（ χ^2 ）検定を使用して比較する。

2、5および7日目の組織学的解析および巨視的評価により決定される全層壊死に移行した間隙の数は、7日目に、脂肪由来再生細胞で処置した火傷の方が、対照群と比較して有意に低い。

20

脂肪由来再生細胞（例えば、本明細書に開示される幹細胞および前駆細胞を含む脂肪由来細胞の濃縮集団）を含む組成物を使用した処置は、豚コーム火傷モデルにおける火傷損傷の進行を顕著に減少させる。

【0172】

(例5)

脂肪由来再生細胞はヒトにおける火傷進行を軽減する

対象には、対象の全身表面積（T B S A）の15%を超える中部中間層熱傷がある。一単位の脂肪組織を対象から取得し、米国特許第7390484号に開示された方法にしたがって処理し、これにより脂肪由来再生細胞の集団を得る。

30

火傷侵襲から24時間以内に、対象に、およそ $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 個の脂肪由来再生細胞を含む組成物を、静脈内注射を介して投与する。

中部中間層火傷は、全層火傷に進行せず、凝固部の表面積は減少し、長期的に増加しない。

【0173】

(例6)

焼痂組織由来再生細胞は、ヒトにおける火傷進行を軽減する

対象には、対象の全身表面積（T B S A）の10%を超える全層熱傷がある。火傷の失活（壊死および/またはアポトーシス）組織を特定し、焼痂切開を介して失活組織を除去する。

40

焼痂切開された組織を、組織を刻むことによって、機械的に脱凝集させる。次いで刻んだ組織に酵素消化を施し、細胞懸濁液を作製する。細胞懸濁液を遠心分離し、得られた細胞ペレットを、生理学的溶液（例えば、乳酸リソゲル液）に再懸濁し、 $100 \mu\text{m}$ のフィルターに通し、それにより再生細胞の濃縮集団を得る。焼痂切開組織から誘導されたおよそ $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 個の再生細胞を、最初の火傷侵襲から48時間以内に、焼痂切開部位の周囲に、皮下注射を介して対象に投与する。

全層火傷の表面積および凝固部の表面積は減少し、長期的に増加しない。

【0174】

(例7)

脂肪由来再生細胞は、自家移植片の生着および治癒を増強させる

50

以下の例は、脂肪由来再生細胞が、移植片の生着を増強させることを示す。

ブタを、制御された温度、湿度および12~12時間日夜光サイクルの標準条件下で個別に収容し、水およびマウス標準餌を自由に摂取できるようにする。

10 日目に、ブタを「対照」群および「処置」群にランダムに分ける。ブタは、イソフルラン吸入麻酔を使用して麻酔される。ブタの背側の毛を剃り、背側の正中線に直径20mmの円形区域の輪郭を描く。切開を、メスを使用してマーキングに沿って行い、輪郭を描いた皮膚を、深部背側筋膜層から分離することにより全層移植片として採取する。臨床条件において採取される全層皮膚移植片の表面下の過剰脂肪の除去をシミュレートするために、皮筋層を、皮膚移植片の皮下から取り除く。対照群について、移植片は、0.5mlの生理食塩水で処置する。処置群については、本明細書に開示された方法により取得される $1 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ 個の再生細胞を、5ml体積の移植片に適用する。移植片を、断続非吸収性縫合により端を固定することによりドナー部位に戻す。その後、外科的部位への外傷を最小にするための補足的手法として、ブタを個別にケージに入れる。

【0175】

手術後14日目に、皮膚移植区域を、面積測定により、巨視的に評価する。健常移植組織を使用した区域および移植失敗後に二次的に治癒した区域を特定する。毛および/または濾胞を有する領域は、健常移植組織であるとみなしそう、毛または濾胞はなく、平滑な白っぽい外観を有する区域は、全層喪失により二次的に治癒した区域とみなす。健常領域および二次的に治癒した領域の大きさを計算するために、皮膚移植背側に載せた透明な紙にこれらの区域の輪郭を描く。透明紙をデジタル的にスキャンし、皮膚移植区域全体に対する健常区域の比率をコンピュータソフトウェア(Image Pro Plus, Silver Spring, MD)を使用して各移植片について計算した。

皮膚移植の巨視的評価後14日目に、ブタを安樂死させる。皮膚移植区域を、レシピエント床を含めて一縦めで除去し、メタノール-カルノア溶液(メタノール:クロロホルム:氷酢酸、6:3:1)中に固定する。この後、健常移植片区域および二次的治癒から構成される典型的部分を主検体から切除し、4μmの切片を病理組織学的評価のために各検体から取得した。

【0176】

上皮化および肉芽組織形成の病理組織学的評価のために、代表的切片に、標準ヘマトキシリン・エオシン染色を実施する。それぞれの典型的スライドについて、検体の由来を知らされていない病理学者(C.Y.F.)により、4点評価システム(0: 無し、1: 軽度、2: 中等度、3: 大量)で、弱拡大(100×)光学顕微鏡下、これらの各パラメータを半定量的に評価した。健常移植片区域に対するパーセンテージについて面積測定により得られたデータならびに上皮化および肉芽組織について半定量的スコアにより得られたデータを、対照ブタおよび処置ブタ間で比較する。

データは、脂肪由来再生細胞を使用した(例えば、強化された移植片を生成するための)皮膚移植の処置が、移植片の生着を増強させることを示す。強化された移植片を使用したブタは、対照移植片と比較して、肉芽組織形成の増強および上皮化スコアの増強を示す。

【0177】

(例8)

再生細胞は肥厚性瘢痕形成を予防する

対象には、対象の全身表面積(TBSA)の5~30%の深部中間層熱傷がある。火傷の失活(壊死および/またはアポトーシス)組織を特定し、焼痂切開を介して失活組織を除去して、レシピエント部位にひだをつける。

【0178】

焼痂切開された組織を、組織を刻むことによって、機械的に脱凝集させる。刻んだ組織に、次いで酵素消化を施し、細胞懸濁液を作製する。細胞懸濁液を遠心分離し、得られた細胞ペレットを、生理学的溶液(例えば、乳酸リングル液)に再懸濁し、100μmのフィルターに通し、それにより再生細胞の濃縮集団を得る。焼痂切開組織から誘導されたおよそ $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 個の再生細胞を、焼痂切開後50日以内にレシピエント部位に

10

20

30

40

50

投与する。

【 0 1 7 9 】

再生細胞で処置された領域の肥厚性瘢痕のバンクーバー瘢痕スケール (Vancouver Scar Scale, VSS) で評価される程度および重症度は、再生細胞で処置されなかった同等の損傷の領域の場合より低い。リスクのある領域全体が再生細胞で処置された対象に関して、対象は、バンクーバー瘢痕スケール (Vancouver Scar Scale, VSS) によって評価される肥厚性瘢痕を、再生細胞で処置されていない同様の患者で予測されるものと同じ程度および重症度で発生させない。

次に、本発明の好ましい態様を示す。

1. 热傷を有しており、热傷の進行を発生する危険性にある対象を同定するステップと、
対象に、热傷の進行を緩和させるために十分な治療有効量の再生細胞を含む組成物を投
与するステップと

を含む、必要とする対象において热傷の進行を緩和する方法。

2. 再生細胞が間葉間質細胞である、上記1に記載の方法。

3. 間葉間質細胞が、骨髄、胎盤、脂肪組織、皮膚、焼痂組織、子宮内膜組織、成体筋
肉、角膜間質、歯髄、ウォートンジェリー、羊水、および臍帯からなる群から選択される
組織に由来する、上記2に記載の方法。

4. 間葉間質細胞が脂肪組織に由来する、上記3に記載の方法。

5. 間葉間質細胞を培養しない、上記3に記載の方法。

6. 热傷が表在性热傷である、上記1から5までのいずれかに記載の方法。

7. 热傷が中間層热傷である、上記1から5のいずれかに記載の方法。

8. 热傷が深部中間層热傷である、上記6に記載の方法。

9. 热傷が全層热傷である、上記1から5のいずれかに記載の方法。

10. 対象がヒトである、上記1から9でのいずれかに記載の方法。

11. 組成物が、細胞、組織、および組織断片からなる群から選択される添加剤を含む
上記1から10までのいずれかに記載の方法。

12. 添加剤が多血小板血漿を含む、上記11に記載の方法。

13. 組成物を足場に投与する、上記1から12までのいずれかに記載の方法。

14. 足場が生体適合性マトリックスまたは未処理の脂肪組織である、上記13に記載
の方法。

15. 生体適合性マトリックスが皮膚移植片または皮膚代替物である、上記14に記載
の方法。

16. 組成物を热傷に直接投与する、上記1から15のいずれかに記載の方法。

17. 組成物を血管内に投与する、上記1から15のいずれかに記載の方法。

18. 組成物を热傷部位内への注射によって投与する、上記16に記載の方法。

19. 組成物を、热傷部位を取り囲む皮膚内への注射によって投与する、上記16に記
載の方法。

20. 組成物を、热傷部位内および热傷部位を取り囲む皮膚内の両方への注射によつて
投与する、上記16に記載の方法。

21. 注射が複数回の注射を含む、上記18から20のいずれかに記載の方法。

22. 再生細胞を投与ステップの前にさらに培養する、上記1から21のいずれかに記
載の
方法。

23. 再生細胞が接着性細胞である、上記1から22のいずれかに記載の方法。

24. 再生細胞を組織培養中で少なくとも5継代培養する、上記22に記載の方法。

25. 再生細胞を投与ステップの前に培養しない、上記1から22のいずれかに記載の
方法

—

26. 再生細胞を組織から閉じた系で単離する、上記1から25までのいずれかに記載
の方

10

20

30

40

50

法。

27. 再生細胞を凍結保存する、上記1から26までのいずれかに記載の方法。
28. 再生細胞が幹細胞を含む、上記1から27までのいずれかに記載の方法。
29. 再生細胞が異種の細胞集団を含む、上記1から28までのいずれかに記載の方法。
30. 再生細胞が脂肪由来再生細胞を含む、上記1から29までのいずれかに記載の方法。
31. 組成物を対象に投与する前に、熱傷を完全または部分的に創傷清拭することをさらに含む、上記1から30までのいずれかに記載の方法。
32. 再生細胞が自己である、上記1から31までのいずれかに記載の方法。
33. 再生細胞が自己ではない、上記1から29のいずれかに記載の方法。
34. 前記再生細胞のうちの5%より多くがCD34を発現する、上記1から33までのいずれかに記載の方法。
35. 前記再生細胞のうちの5%より多くがCD45を発現する、上記1から34までのいずれかに記載の方法。
36. 前記再生細胞のうちの1%より多くがCD146を発現する、上記1から35までのいずれかに記載の方法。
37. 前記再生細胞のうちの1%より多くがCD31を発現する、上記1から36までのいずれかに記載の方法。
38. 前記再生細胞のうちの5%より多くがCD90を発現する、上記1から37までのいずれかに記載の方法。
39. 前記再生細胞の9/5%よりも多くが である、上記1から38までのいずれかに記載の方法。
40. 熱傷の転換を緩和させるための治療有効量の再生細胞を含む組成物の使用。
41. 再生細胞が間葉間質細胞である、上記40に記載の使用。
42. 間葉間質細胞が、骨髄、胎盤、脂肪組織、皮膚、焼痂組織、および臍帯からなる群から選択される組織に由来する、上記41に記載の使用。
43. 間葉間質細胞が脂肪組織に由来する、上記42に記載の使用。
44. 熱傷が表在性熱傷である、上記40から43のいずれかに記載の使用。
45. 熱傷が中間層熱傷である、上記40から43のいずれかに記載の使用。
46. 熱傷が深部中間層熱傷である、上記45に記載の使用。
47. 熱傷が全層熱傷である、上記40から43のいずれかに記載の使用。
48. 対象がヒトである、上記40から47のいずれかに記載の使用。
49. 組成物が、細胞、組織、および組織断片からなる群から選択される添加剤を含む、上記40から48のいずれかに記載の使用。
50. 添加剤が多血小板血漿を含む、上記49に記載の使用。
51. 皮膚移植片を提供するステップと、
皮膚移植片に再生細胞を含む組成物を投与して強化された皮膚移植片を作製するステップと、
強化された皮膚移植片をレシピエントの創傷部位に施用するステップと
を含む、レシピエントの創傷部位内への皮膚移植片の取り込みを増強させる方法。
52. 再生細胞が間葉間質細胞である、上記51に記載の方法。
53. 間葉間質細胞が、骨髄、胎盤、脂肪組織、皮膚、焼痂組織、子宮内膜組織、成体筋肉、角膜間質、歯髄、ウォートンジェリー、羊水、および臍帯からなる群から選択される組織に由来する、上記52に記載の方法。

10

20

30

40

50

5 4 . 間葉間質細胞が脂肪組織に由来する、上記 5 3 に記載の方法。

5 5 . 再生細胞が、幹細胞を含み、皮膚、焼痂、および脂肪組織から選択される組織に由来する、上記 5 3 に記載の方法。

5 6 . レシピエントの創傷部位が熱傷部位である、上記 5 1 から 5 5 のいずれかに記載の方法。

5 7 . レシピエントの創傷部位が非治癒性潰瘍である、上記 5 1 から 5 5 のいずれかに記載の方法。

5 8 . 热傷が中間層熱傷である、上記 5 6 に記載の方法。

5 9 . 热傷が深部中間層熱傷である、上記 5 6 に記載の方法。

6 0 . 热傷が全層熱傷である、上記 5 6 に記載の方法。

6 1 . 対象がヒトである、上記 5 1 から 6 0 のいずれかに記載の方法。

6 2 . 組成物が、細胞、組織、および組織断片からなる群から選択される添加剤を含む請求

項 5 1 から 6 1 のいずれかに記載の方法。

6 3 . 添加剤が多血小板血漿を含む、上記 6 2 に記載の方法。

6 4 . 皮膚移植片が分層皮膚移植片である、上記 5 1 から 6 3 のいずれかに記載の方法。

6 5 . 皮膚移植片が全層皮膚移植片である、上記 5 1 から 6 3 のいずれかに記載の方法。

6 6 . 皮膚移植片が皮膚代替物である、上記 5 1 から 6 3 のいずれかに記載の方法。

6 7 . 皮膚移植片を提供するステップと、

レシピエントの創傷部位に再生細胞を含む組成物を投与するステップと、

皮膚移植片をレシピエントの創傷部位に施用するステップと

を含む、レシピエントの創傷部位内への皮膚移植片の取り込みを増強させる方法。

6 8 . 再生細胞が間葉間質細胞である、上記 6 7 に記載の方法。

6 9 . 間葉間質細胞が、骨髄、胎盤、脂肪組織、皮膚、焼痂組織、子宮内膜組織、成体筋肉、

角膜間質、歯髄、ウォートンジェリー、羊水、および臍帯からなる群から選択される組織に由来する、上記 6 8 に記載の方法。

7 0 . 間葉間質細胞が脂肪組織に由来する、上記 6 9 に記載の方法。

7 1 . 再生細胞が、幹細胞を含み、皮膚、焼痂、および脂肪組織から選択される組織に由来する、上記 6 9 に記載の方法。

7 2 . レシピエントの創傷部位が熱傷部位である、上記 6 7 から 7 1 のいずれかに記載の方法。

7 3 . レシピエントの創傷部位が非治癒性潰瘍である、上記 6 7 から 7 1 のいずれかに記載の方法。

7 4 . 热傷が中間層熱傷である、上記 7 2 に記載の方法。

7 5 . 热傷が深部中間層熱傷である、上記 7 4 に記載の方法。

7 6 . 热傷が全層熱傷である、上記 7 2 に記載の方法。

7 7 . 対象がヒトである、上記 6 7 から 7 6 のいずれかに記載の方法。

7 8 . 組成物が、細胞、組織、および組織断片からなる群から選択される添加剤を含む請求

項 6 7 から 7 6 のいずれかに記載の方法。

7 9 . 添加剤が多血小板血漿を含む、上記 7 8 に記載の方法。

8 0 . 皮膚移植片が分層皮膚移植片である、上記 6 7 から 7 9 のいずれかに記載の方法。

8 1 . 皮膚移植片が全層皮膚移植片である、上記 6 7 から 7 9 のいずれかに記載の方法。

8 2 . 皮膚移植片が皮膚代替物である、上記 6 7 から 7 9 のいずれかに記載の方法。

8 3 . 深部中間層または全層創傷を有する対象を同定するステップと、

深部中間層または全層創傷に再生細胞を含む組成物を投与するステップと

10

20

30

40

50

を含む、深部中間層または全層創傷における肥厚性瘢痕の形成を防止または最小限にする方法。

8 4 . 深部中間層または全層創傷が熱による熱傷である、上記 8 3 に記載の方法。

8 5 . 間葉間質細胞が、骨髄、胎盤、脂肪組織、皮膚、焼痂組織、子宮内膜組織、成体筋肉、角膜間質、歯髄、ウォートンジェリー、羊水、および臍帯からなる群から選択される組織に由来する、上記 8 3 に記載の方法。

8 6 . 間葉間質細胞が脂肪組織に由来する、上記 8 5 に記載の方法。

8 7 . 投与ステップが、

皮膚移植片を提供するステップと、

皮膚移植片と再生細胞を含む組成物とを接触させて、強化された移植片を生じるステップと、

強化された移植片を深部中間層または全層創傷に施用するステップとを含む、上記 8 3 に記載の方法。

8 8 . 肥厚性瘢痕を有する対象を同定するステップと、

再生細胞を含む組成物を、肥厚性瘢痕に投与するステップとを含む、肥厚性瘢痕を縮小または排除する方法。

8 9 . 投与が、

肥厚性瘢痕のすべてまたは一部分を外科的に除去してレシピエント部位を作製するステップと、

再生細胞を含む組成物を、レシピエント部位に施用するステップとを含む、上記 8 8 に記載の方法。

9 0 . 再生細胞を含む組成物が足場を含む、上記 8 8 に記載の方法。

9 1 . 足場がコラーゲンマトリックスである、上記 9 0 に記載の方法。

9 2 . 組成物をレシピエント部位に投与した後に、分層皮膚移植片をレシピエント部位に投与することをさらに含む、上記 9 1 に記載の方法。

9 3 . 再生細胞を含む組成物をレシピエント部位に投与した 1 週間後よりも後に分層皮膚移植片を施用する、上記 9 2 に記載の方法。

9 4 . 関節または筋肉の拘縮を有する対象を同定するステップと、

再生細胞を含む組成物を対象に投与するステップとを含む、必要とする対象において拘縮を処置する方法。

9 5 . 再生細胞を含む組成物を、関節または筋肉の拘縮の部位に投与する、上記 9 4 に記載の方法。

9 6 . 再生細胞を含む組成物が足場を含む、上記 9 5 に記載の方法。

9 7 . 関節または筋肉の拘縮が瘢痕に対して二次的である、上記 9 4 に記載の方法。

9 8 . 瘢痕が肥厚性瘢痕である、上記 9 4 に記載の方法。

9 9 . 瘢痕が創傷に対して二次的である、上記 9 4 に記載の方法。

1 0 0 . 創傷が熱傷である、上記 9 4 に記載の方法。

1 0 1 . 組成物が組織移植片をさらに含む、上記 9 4 に記載の方法。

1 0 2 . 拘縮が関節拘縮であり、拘縮によって影響を受けた関節の運動の範囲を測定することをさらに含む、上記 9 4 に記載の方法。

1 0 3 . 肥厚性瘢痕形成を防止するための治療有効量の再生細胞を含む組成物の使用。

1 0 4 . 深部中間層または全層創傷において肥厚性瘢痕を縮小するための治療有効量の再生細胞を含む治療有効量の組成物を含む組成物の使用。

10

20

30

40

50

【図面】

【図1】

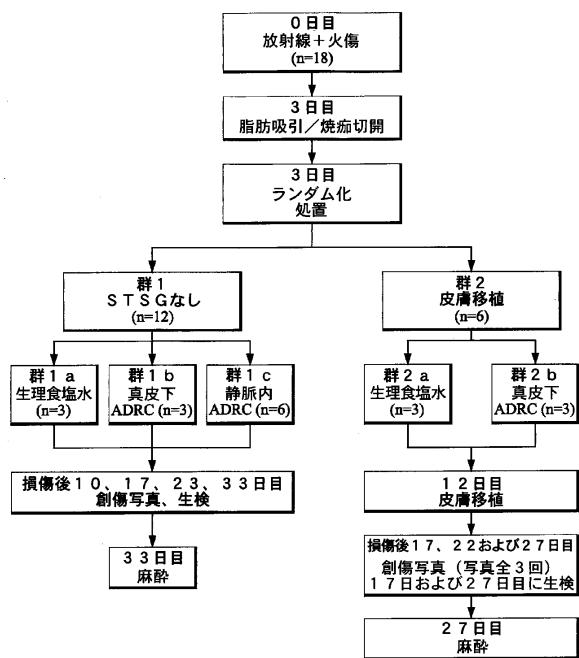
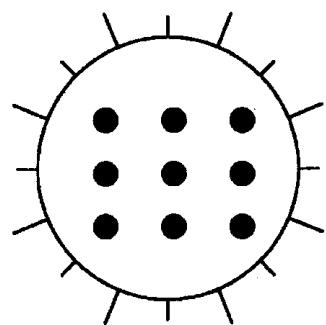


FIG.1

【図2】



10
— 真皮下への放射状注射
(0.2 mlを10~16注射)

● 浅筋膜内への注射
(0.2 mlを5~9注射)

FIG.2

20

【図3】

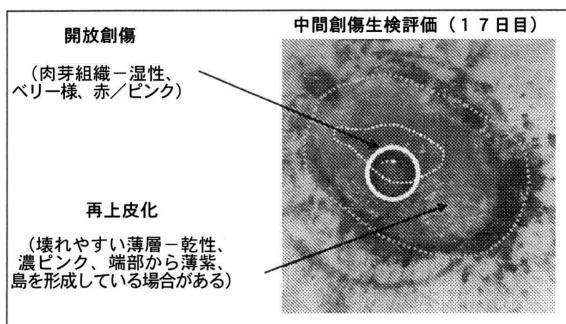


FIG.3

【図4】

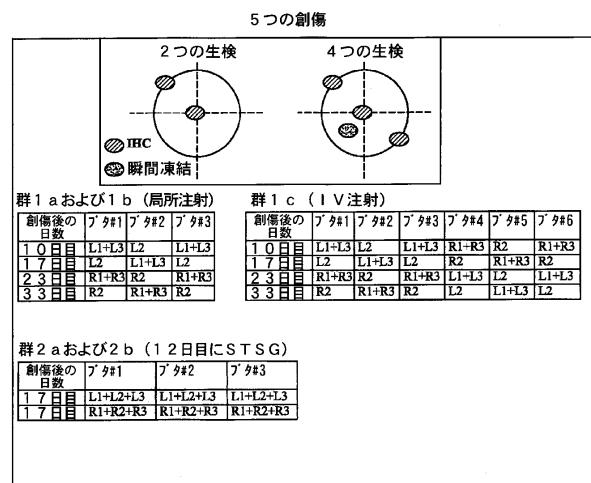


FIG.4

30

40

50

【図 5 A】

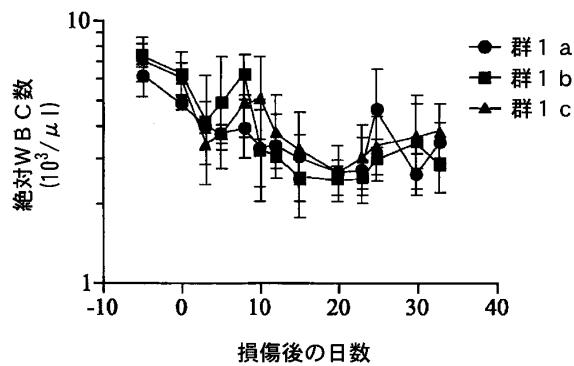


FIG.5A

【図 5 B】

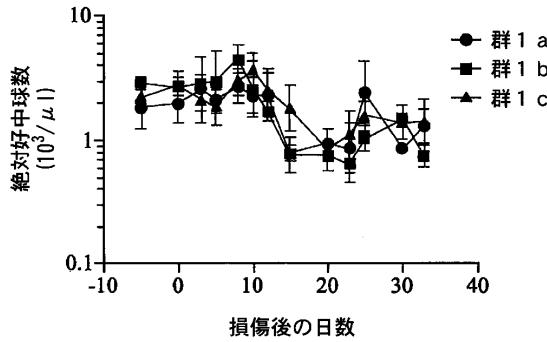


FIG.5B

【図 5 C】

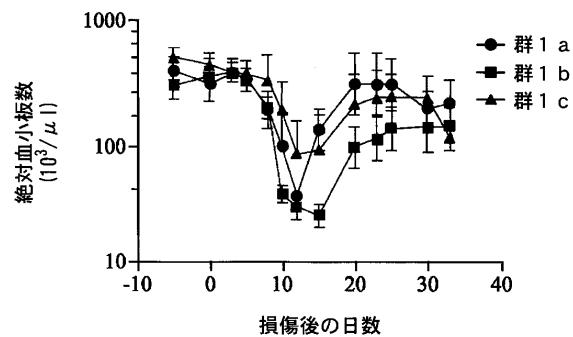


FIG.5C

【図 5 D】

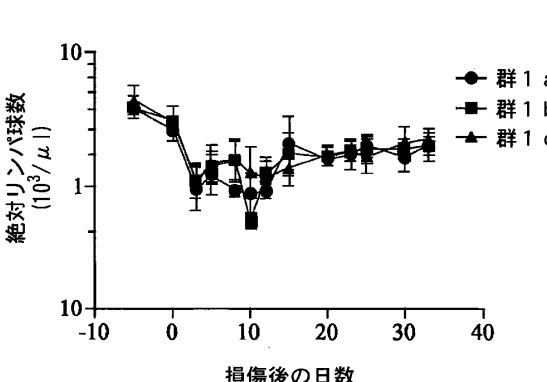


FIG.5D

30

40

50

10

【図 6 A】

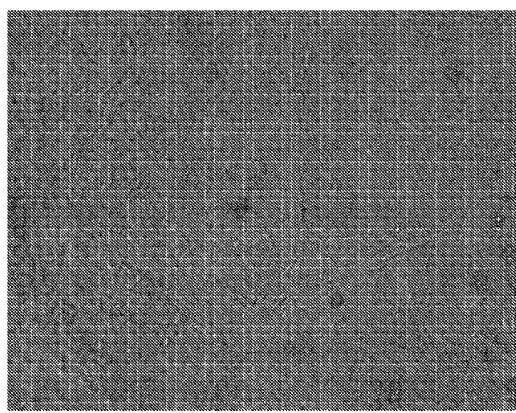


FIG. 6A

【図 6 B】

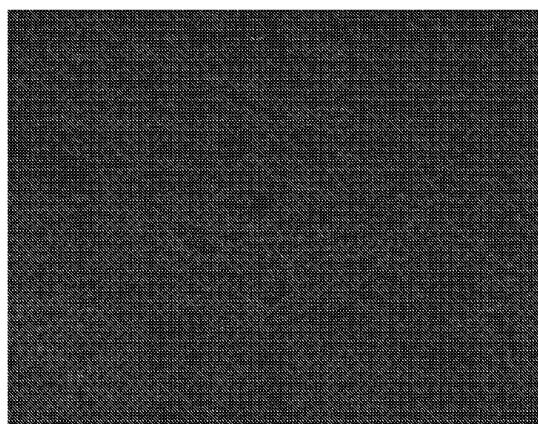


FIG. 6B

10

【図 7 A】

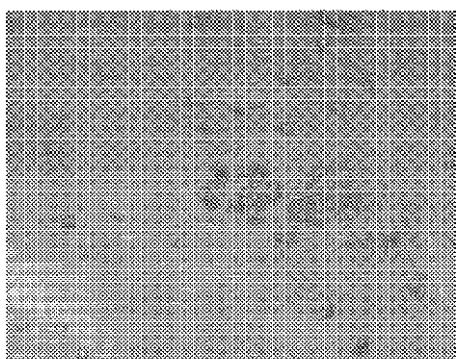


FIG. 7A

【図 7 B】

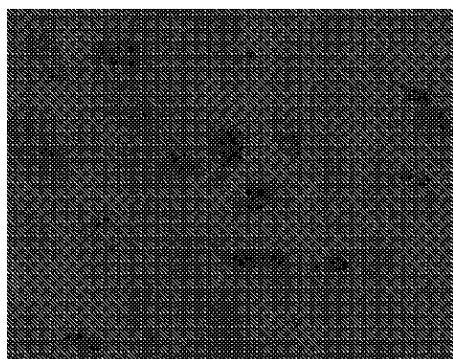


FIG. 7B

20

30

40

50

【図 8】

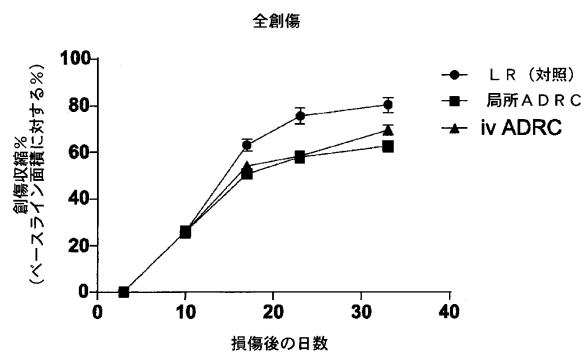
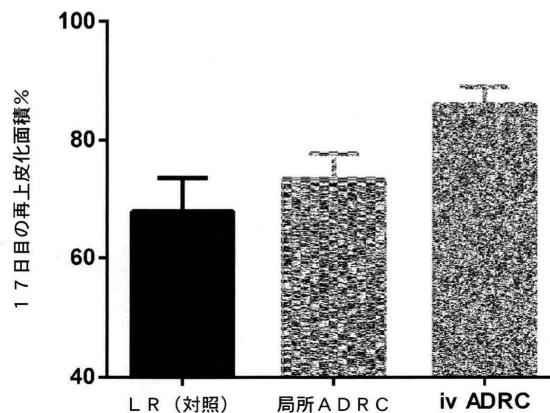


FIG.8

【図 9 A】

FIGURES 9A

9A



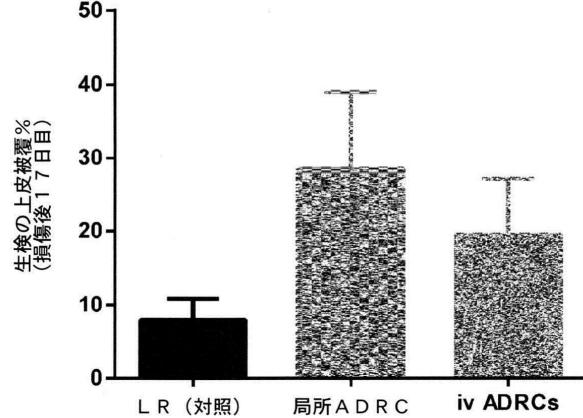
10

20

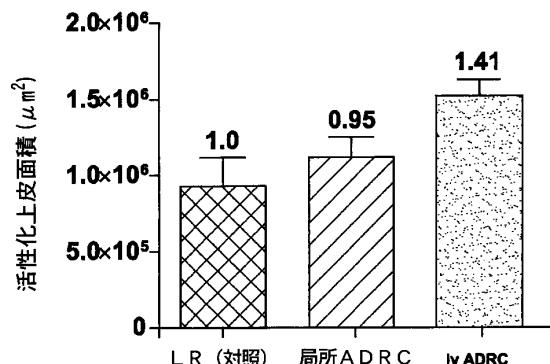
【図 9 B】

FIGURES 9B

9B



【図 9 C】



30

40

FIG.9C

50

【図 9 D】

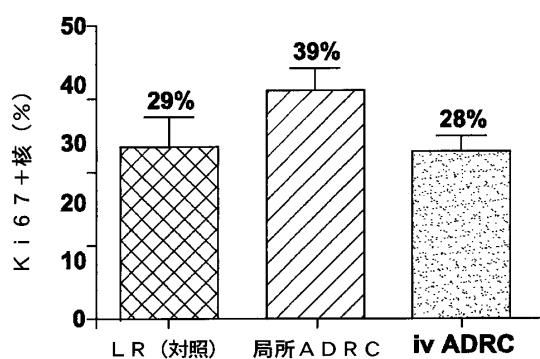
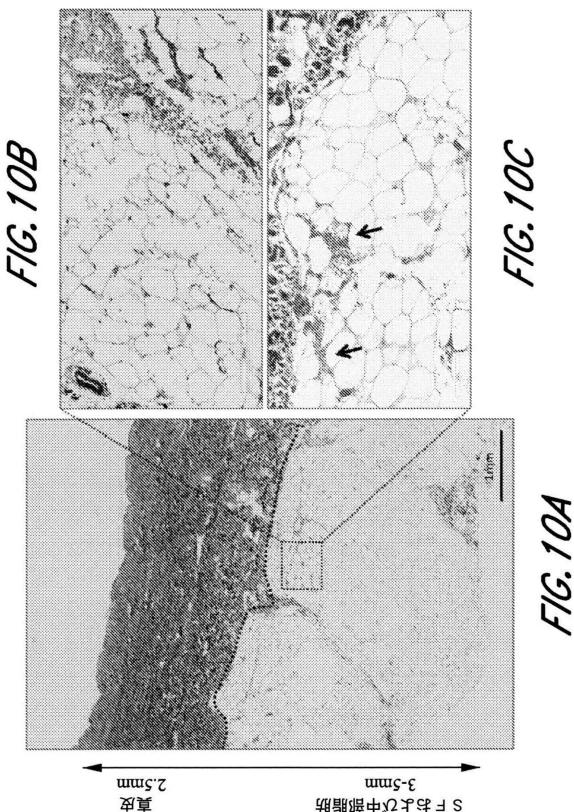


FIG. 9D

【図 10】



10

20

30

40

【図 11】

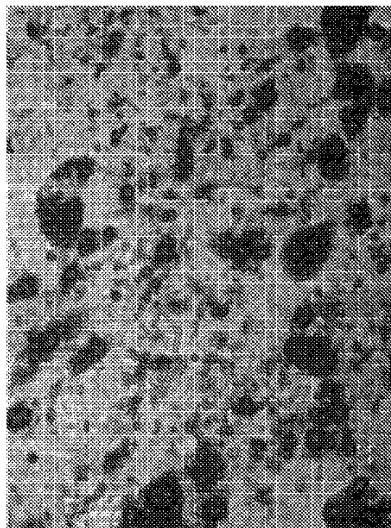


FIG. 11

【図 12】

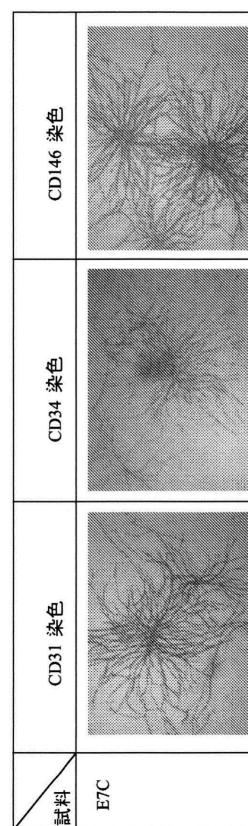


FIG. 12A FIG. 12B FIG. 12C

50

【図 1 3】

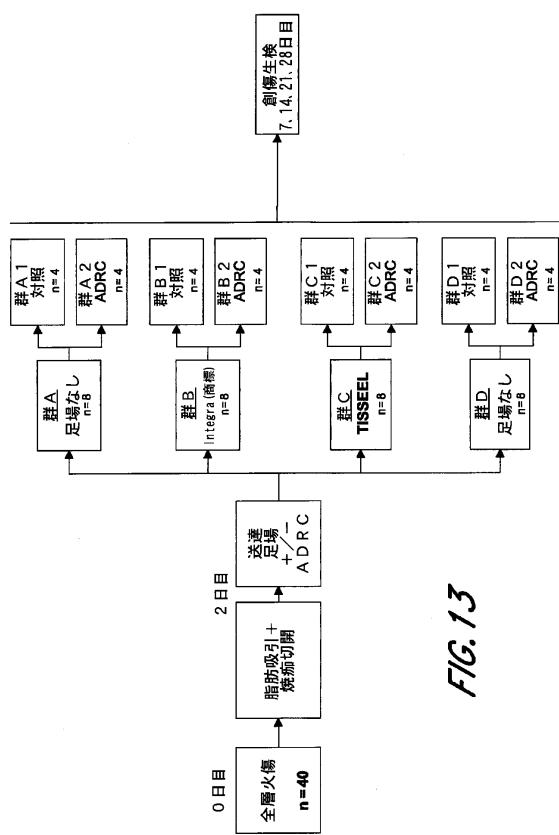


FIG. 13

【図 1 4】

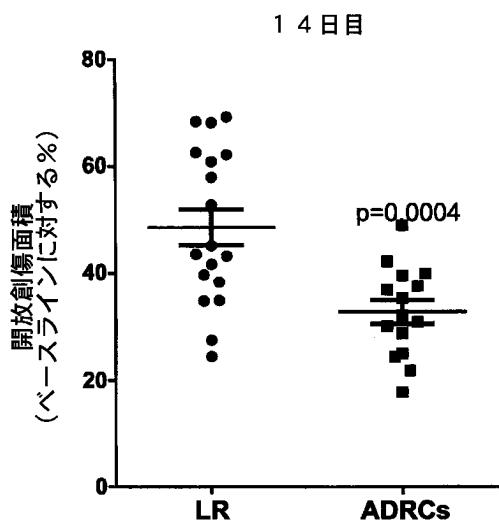


FIG. 14

【図 1 5】

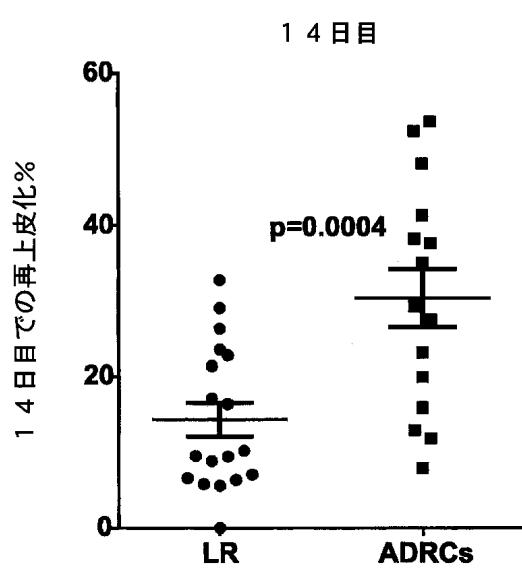
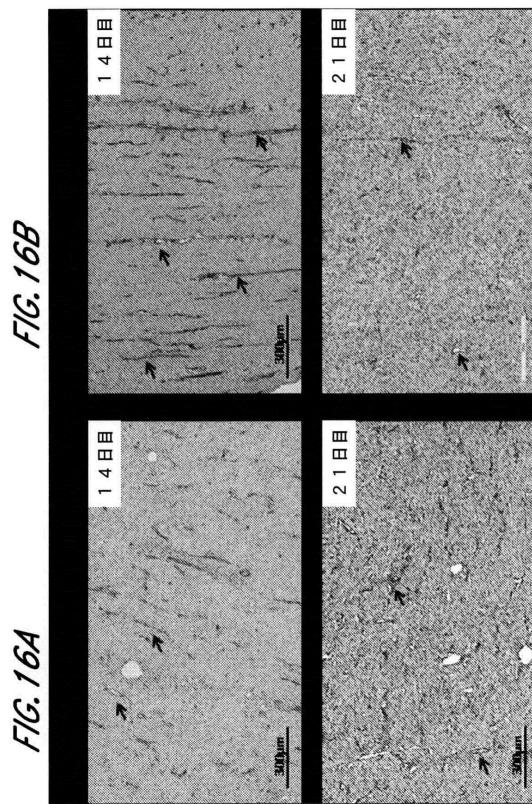


FIG. 15

【図 1 6】



【図 17】

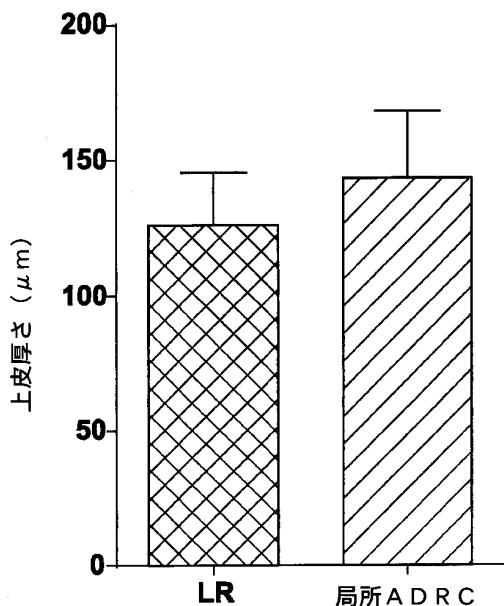


FIG. 17

10

【図 18 B】

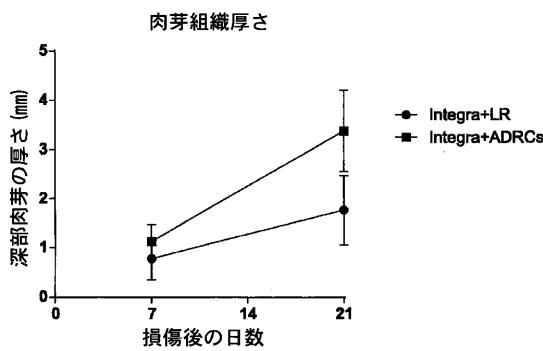


FIG. 18B

30

【図 18 C】

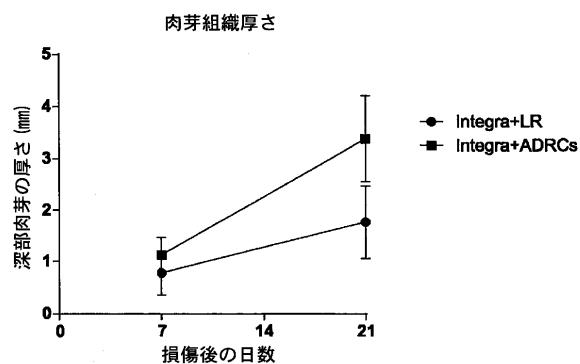


FIG. 18C

40

50

【図 19 A - 19 B】

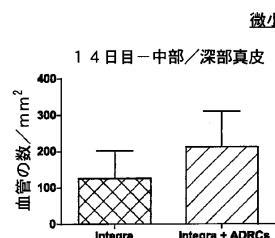


FIG. 19A

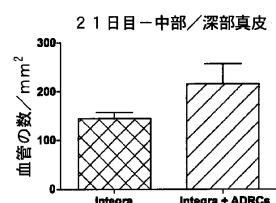


FIG. 19B

【図 19 C - 19 D】

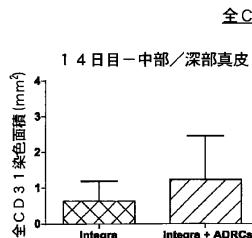


FIG. 19C

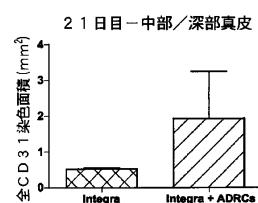


FIG. 19D

【図 19 E - 19 F】

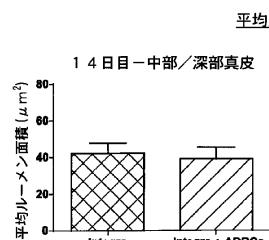


FIG. 19E

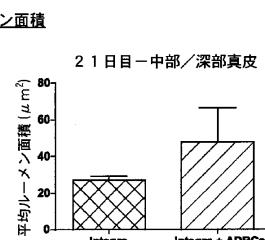


FIG. 19F

【図 20 A】

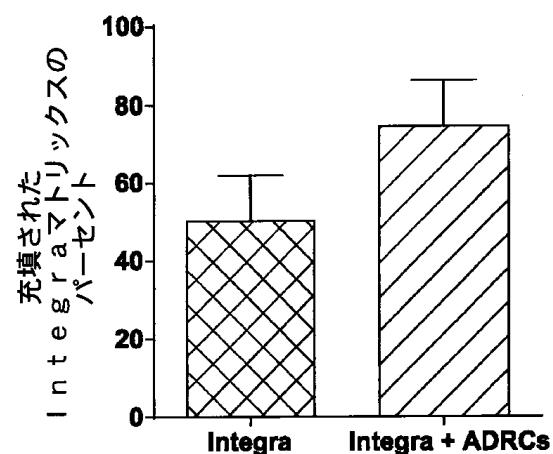


FIG. 20A

【図 20B】

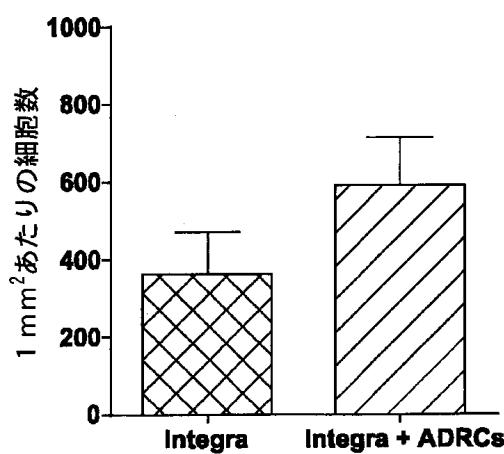


FIG.20B

【図 20C】

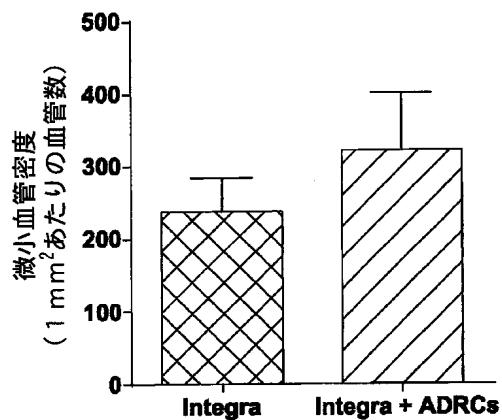


FIG.20C

【図 21】

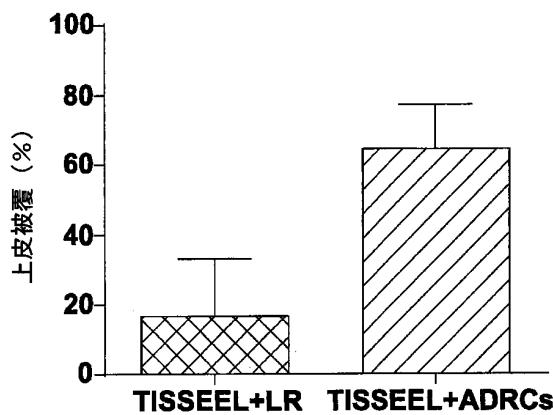


FIG.21

【図 22】

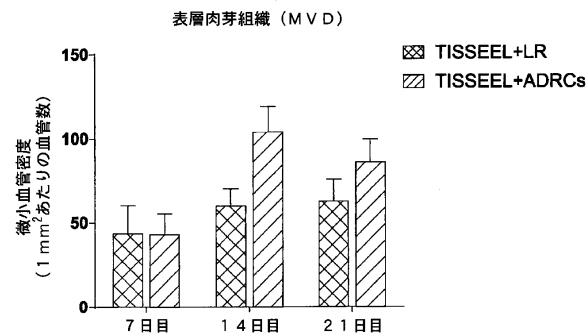


FIG.22

20

30

40

50

10

【図 2 3】

CD34対CD90染色に関して細胞の散乱分布を示す、
試料#E5由来のADC散布図

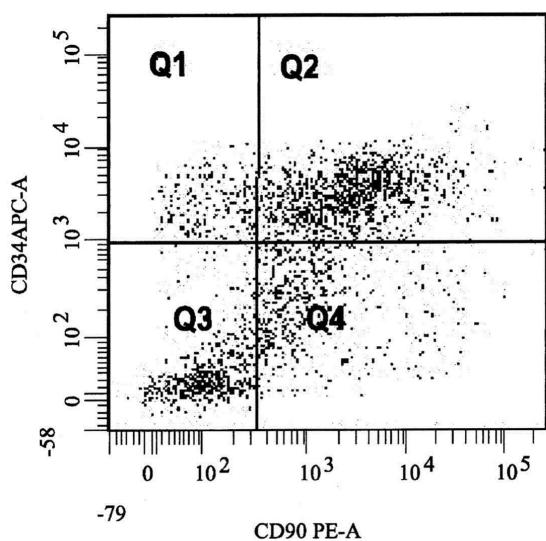


FIG.23

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 61 P 43/00 (2006.01)

F I

A 61 P 43/00 105

(72)発明者 フォーベルト フィリップ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121 サン デイエゴ カラン ロード 3020

(72)発明者 アルフォンソ ゼニ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121 サン デイエゴ カラン ロード 3020

合議体

審判長 森井 隆信

審判官 岡崎 美穂

審判官 斎藤 恵

(56)参考文献 特表2008-526762 (JP, A)

Radiation Protection Dosimetry, 2012, pp1-5
(doi:10.1093/rpd/ncs176)

Cytotherapy, 2008, Vol. 10, No. 4, pp 417-426 (doi:10.1080/14653240801982979)

Advances In Wound Care, 2014.01.01, Vol. 3, No. 1, p 38-45 (doi:10.1089/wound.2012.0408)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K 35

MEDLINE / CAPLUS / BIOSIS / EMBASE (STN)