

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-529315
(P2024-529315A)

(43)公表日 令和6年8月6日(2024.8.6)

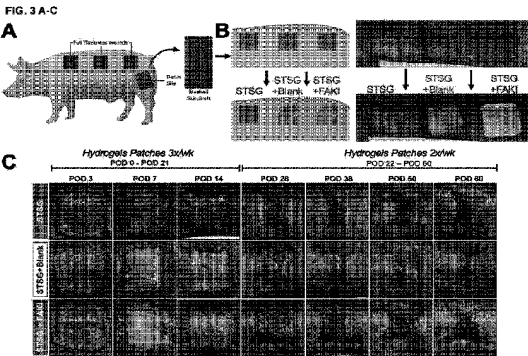
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 L	27/36 (2006.01)	A 6 1 L	27/36	1 0 0	4 C 0 8 1
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02		4 C 0 8 4
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	
A 6 1 L	27/54 (2006.01)	A 6 1 L	27/54		
A 6 1 L	27/52 (2006.01)	A 6 1 L	27/52		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全66頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-500670(P2024-500670)	(71)出願人	517293845
(86)(22)出願日	令和4年7月25日(2022.7.25)		ザ ボード オブ トラスティス オブ ザ
(85)翻訳文提出日	令和6年1月9日(2024.1.9)		リーランド スタンフォード ジュニア
(86)国際出願番号	PCT/US2022/038189		ユニヴァーシティー
(87)国際公開番号	WO2023/009439		アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 - 2 0 3 8
(87)国際公開日	令和5年2月2日(2023.2.2)		カリフォルニア, スタンフォード, ピー
(31)優先権主張番号	63/227,811		オー ボックス 2 0 3 8 6, メイン ク
(32)優先日	令和3年7月30日(2021.7.30)		アット, サード フロア, ビルディング
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		1 7 0, オフィス オブ ザ ジェネラル
	米国(US)		カウンセル
(31)優先権主張番号	63/340,145	(74)代理人	110000523
(32)優先日	令和4年5月10日(2022.5.10)		アクシス国際弁理士法人
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ジェフリー・ガートナー
	米国(US)		アメリカ合衆国 9 4 0 6 3カリフォルニ
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		ア州レッドウッド・シティ、エムシー 8
最終頁に続く			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 皮膚移植方法におけるメカノトランスダクション破壊媒介及びその実施における使用のための組成物

(57)【要約】

皮膚移植方法が提供される。方法の態様は、皮膚移植片を、メカノトランスダクション遮断剤、例えば、薬理的メカノトランスダクション遮断剤、例えば、接着斑キナーゼ阻害剤との組み合わせで、創傷に適用することを含む。また、本発明の方法を実施する使用のための組成物及びキットが提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象の創傷を治療する方法であって、前記方法が、
皮膚移植片を、メカノトランスダクション遮断剤との組み合わせで、前記創傷に適用して、前記対象の前記創傷を治療することを含む、方法。

【請求項 2】

前記皮膚移植片が、分層皮膚移植片である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記創傷が、深在性傷害創傷である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記深在性傷害創傷が、熱傷創傷である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記深在性傷害創傷が、外傷性創傷である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記皮膚移植片が、前記メカノトランスダクション遮断剤前に、前記創傷に適用される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記メカノトランスダクション遮断剤が、薬理学的メカノトランスダクション遮断剤を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記薬理学的メカノトランスダクション遮断剤が、接着斑キナーゼ阻害剤を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記メカノトランスダクション遮断剤が、前記創傷に、持続放出製剤で投与される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記持続放出製剤が、ゲル製剤を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ゲル製剤が、ヒドロゲルを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

ヒドロゲルが、生分解性プルランベースのヒドロゲルを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記方法が、前記創傷の治癒を促進する、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記方法が、線維化を低減する、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記方法が、拘縮を低減する、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記方法が、瘢痕形成を軽減する、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記方法が、コラーゲンアーキテクチャを回復させる、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記方法が、移植片生体力学的特性を改善する、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記対象が、哺乳動物である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

薬理学的メカノトランスダクション遮断剤を含む、薬学的組成物。

【請求項 22】

前記薬理学的メカノトランスダクション遮断剤が、接着斑キナーゼ阻害剤を含む、請求項 21 に記載の薬学的組成物。

【請求項 23】

前記薬学的組成物が、持続放出製剤を含む、請求項 21 又は 22 に記載の薬学的組成物。

【請求項 24】

前記持続放出製剤が、ゲル製剤を含む、請求項 23 に記載の薬学的組成物。

【請求項 25】

前記ゲル製剤が、ヒドロゲルを含む、請求項 24 に記載の薬学的組成物。

【請求項 26】

ヒドロゲルが、生分解性プルランベースのヒドロゲルを含む、請求項 25 に記載の薬学的組成物。

【請求項 27】

請求項 21 ～ 26 のいずれか一項に記載の薬学的組成物と、
皮膚移植片ハーベスタと、を含む、キット。

【請求項 28】

皮膚移植片をヒト対象の治療部位に適用した後の瘢痕形成を低減する方法であって、前記方法が、

前記皮膚移植片を前記治療部位に適用することと、

接着斑キナーゼ阻害剤を前記皮膚移植片に送達して、前記治療部位での瘢痕形成を低減することと、を含む、方法。

【請求項 29】

前記皮膚移植片が、分層皮膚移植片である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

送達ステップが、前記皮膚移植片に、前記接着斑キナーゼ阻害剤を含有する生分解性プルランベースのヒドロゲルを適用することを含む、請求項 28 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府権利の承認

本発明は、National Institute of Healthによって授与されたNIH交付番号DE026914下での政府支援でなされた。米国政府は本発明に特定の権利を有する。

【0002】

関連出願の相互参照

米国特許法第119条(e)に従って、本出願は、2021年7月30日に出願された米国特許仮出願第63/227,811号、及び2022年5月10日に出願された米国特許仮出願第63/340,145号の出願日の優先権を主張し、これらの出願の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

ヒト及び他の大型哺乳動物において、傷害は、典型的には、瘢痕形成をもたらす、瘢痕形成は、過剰な線維化及び機能の損失によって特徴付けられる(1～3)。体の最も表在性の器官として、皮膚は、通常、外部外傷性の力に対する第一防御であり、これにより、皮膚は、傷害、並びにその後の肥厚性瘢痕形成及び拘縮を特に受けやすい。皮膚傷害は、複数の病因を有し得るが、熱傷は、最も壊滅的なもののうちであり、主な世界的な公衆衛

10

20

30

40

50

生上の負担（１、４）を、特に、中所得及び低所得国において（５）表す。少なくとも年間４０，０００件の熱傷傷害に関連する入院症例があり、１２８個の米国熱傷センターのそれぞれは、熱傷及び熱傷関連皮膚疾患のための平均年間２００件の入院を受容している（６）。皮膚及び／又は皮下脂肪に制限された熱傷傷害は、通常、自家皮膚移植術を使用して、全層又は分層皮膚移植片（ＳＴＳＧ）で再構築される（７）。

【０００４】

臨床において、深在性熱傷及び他の深在性大表面積傷害は、自ら治癒することはほとんどない。代わりに、ＳＴＳＧが、低いドナー部位罹患率、有益な治癒環境の促進、及び移植片メッシュ技法を使用して比較的大きな面積を被覆する能力を有することを考慮すると、ＳＴＳＧは、重大な役割を果たす。皮膚移植片は、皮膚のバリア機能を迅速に回復させて、感染を予防し、死亡率を低減することにおいて重要な機能を果たすが、移植片治癒中の二次拘縮は、肥厚性瘢痕（ＨＴＳ）形成をもたらす（８）。治癒した皮膚移植片はまた、非創傷皮膚と比較して、脆弱性の増加、異常な色素沈着、及び乏しいテクスチャによって特徴付けられる（９）。皮膚移植後の修正率は、２０～３０％と高いことが報告されており（１０）、より若い患者は、しばしば、成長するにつれて複数回の皮膚移植を必要とし、ドナー部位可用性における追加の困難を提示する（１１、１２）。経時的に、皮膚移植片拘縮が形成され得、一般に、拘縮解放及び新しいＳＴＳＧで対処され、これは、潜在的に、拘縮の悪循環を再開する。残念ながら、衰弱させる皮膚移植後の線維化瘢痕形成、拘縮、及び他の機能的合併症を予防するために、皮膚傷害を有する患者に可用なＦＤＡ（Food and Drug Administration）承認の薬理学的療法は現

10

20

【０００５】

いくつかの最近の研究は、機械的シグナル伝達の上方調節が、マウスにおける傷害後の線維増殖性瘢痕化及び線維化の発達をどのように駆動することができるかを明らかにした（１５～２１）。本発明者らのグループは、皮膚におけるメカノトランスダクション経路の重大な重要性を特定し、その阻害が、瘢痕形成を減弱し、開放創傷治癒を改善することに成功することができることを示した（２２～２７）。しかしながら、これらの研究のいずれも、皮膚移植又は皮膚移植術後の治癒を駆動する一次シグナル経路を詳細に調査していない。加えて、マウスは、弛緩した皮膚の動物であり、主に、拘縮を介して治癒し、ヒトにおいて発生する瘢痕化の１０％未満を有する（２８、２９）。対照的に、ヒト及びブタは、数桁より大きく、緊張した皮膚の動物であり、肉芽組織の上の再上皮化を介して治癒し、はるかにより多くの瘢痕化をもたらす（２７）。残念ながら、これらの差は、発見をマウスからヒトへ技術移転する能力に影響する。

30

【０００６】

大型動物におけるＳＴＳＧ後の真皮リモデリング及び線維化の基礎となる分子及び細胞機構は、依然として不完全に理解されている（３０、３１）。単一細胞ＲＮＡ配列決定（scRNA-seq）技術は、最近、どのように細胞が転写的に分析されて、疾患の病態生理学が解明され得るかについて改革した（３２～３４）。

【発明の概要】

【０００７】

本開示は、対象の創傷を治療するための方法であって、方法が、皮膚移植片を、メカノトランスダクション遮断剤との組み合わせで、創傷に適用して、対象の創傷を治療することを含む、方法を提供する。

40

【０００８】

いくつかの場合では、本開示は、皮膚移植片をヒト対象の治療部位に適用した後の瘢痕形成を低減する方法であって、方法が、皮膚移植片を治療部位に適用することと、接着斑キナーゼ阻害剤を皮膚移植片に送達することと、治療部位での瘢痕形成を低減することとを含む、方法を提供する。

【０００９】

また、主題の方法を実施するための薬学的組成物及びキットが提供される。

50

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1-1】臨床的に関連する方法を使用する技術移転ブタモデルの開発。(A)ブタ背側上の全層切除創傷、及びドナー部位からの採取された皮膚移植片の概略図。(B)電気bovieを使用して作られた全厚創傷の段階的な写真。(C)1:1.5の比での採取されたメッシュ皮膚移植片(0.01インチ)の写真。

【図1-2】(D)本来の非創傷皮膚、全層創傷、ステープルで固定された皮膚移植片、並びに3つの層のワセリンガーゼ及びボルスタードレッシングでの被覆を示す段階的な画像。(E)手術後0、7、及び90日目での移植片の写真画像。

【図2-1】STSGからもたらされた癒痕における細胞亜集団は、メカノトランスダクション及び炎症性シグナル伝達の増加によって特徴付けられる。(A)左:非創傷皮膚(上)及び90日目でのSTSG(下)の肉眼写真。スケールバー=0.5cm。中央:トリクローム染色(スケールバー=0.5mm)及び α SMA⁺筋線維芽細胞染色(スケールバー=100 μ m)。右:コラーゲン線維のピクロシリウスレッド染色(スケールバー=5 μ m)。(B)CurveAlign(109)を使用する、真皮厚さ、 α SMA⁺筋線維芽細胞、及びコラーゲン整列の定量化。独立両側t検定を使用して行われた統計的比較(* $p < 0.05$)。全てのデータは、生物学的レプリケートの平均値 $\pm$ SEMを表す(1条件当たり $n = 6$ つのSTSG)

【図2-2】(C)STSG及び非創傷皮膚組織から単離され、scRNA-seqのために処理されたブタ細胞を示す概略図。(D)細胞型によって着色された全ての細胞のUMAP埋め込み。(E)各細胞型についての差別的に発現された遺伝子の数(0.5超の平均対数倍数変化)。骨髓系細胞についての(F)遺伝子の特徴プロット及び(G)GeneTrail3による過剰表現分析(ORA)エンリッチメント経路。(H)線維芽細胞のUMAP埋め込み。(I及びJ)線維芽細胞についての最上位の特徴及び経路プロット。

【図3-1】大型動物におけるメカノトランスダクションの破壊は、STSG治癒を加速し、線維化癒痕形成を減弱し、拘縮を低減し、生体力学的特性を改善する。(A及びB)赤Durocブタの外側背側(左及び右)上に作られた、STSGを有する大面積(25cm²)全層切除創傷を示す概略図。STSGは、標準包帯ドレッシング、ブランクヒドロゲル(STSG+ブランク; STSG+B)、又はFAKI放出ヒドロゲル(STSG+FAKI; STSG+F)のいずれかで処置された(1条件当たり $n = 6$ つのSTSG)。全ての創傷は、肉眼写真によって評価された。(C)経時的な間質性上皮化、癒痕形成、及び拘縮を追跡する代表的な画像。スケールバー=2.5cm。

【図3-2】(D)経時的な癒痕拘縮は、測定及び定量化された。(E)非創傷皮膚と比較された、手術後7日目でのSTSGの再上皮化。(F)3人の盲検化された形成外科医によってデジタル写真から評価された視覚的アナログスケール(VAS)スコア化。(G)cuto-meterによって誘導された変形によって評価されたSTSG硬度(1条件当たり $n = 6$ つのSTSG)。一元配置分散分析(ANOVA)及びテューキーの多重比較検定を使用して行われた統計的比較(* $P < 0.05$)。全てのデータは、生物学的レプリケートの平均値 $\pm$ SEMを表す。

【図4-1】大型動物のSTSGにおけるメカノトランスダクションのFAKI媒介性阻害は、コラーゲンを低減し、コラーゲン線維ネットワークの組織化を回復させる。(A)トリクローム染色は、表在性及び深在性癒痕の境界を示す。スケールバー:1mm。(B)手術後90日目での3つの癒痕群(STSG、STSG+ブランク、STSG+FAKI)のピクロシリウスレッド染色は、定量化され、整列(CurveAlign)及び線維長さ/幅メトリック(CT-Fire)(98、109、110)について非創傷皮膚と比較された(1条件当たり $n = 6$ つのSTSG)。スケールバー:10 μ m。

【図4-2】(C)手術後90日目での3つの癒痕群(STSG、STSG+ブランク、STSG+FAKI)のピクロシリウスレッド染色は、定量化され、整列(CurveAlign)及び線維長さ/幅メトリック(CT-Fire)(98、109、110)に

10

20

30

40

50

ついて非創傷皮膚と比較された（1条件当たり $n = 6$ つの STSG）。スケールバー：10 μm 。（D～F）深在性真皮における4つの群にわたる異なるコラーゲン線維ネットワーク特徴の定量化。一元配置分散分析（ANOVA）及びテューキーの多重比較検定を使用して行われた統計的比較（* $P < 0.05$ 、* $P < 0.01$ 、** $P < 0.001$ ）。全てのデータは、生物学的レプリケートの平均値 $\pm$ SEMを表す。

【図5-1】メカノトランスダクション遮断は、骨髓系細胞における抗炎症性経路の早期（手術後7日目）上方調節を引き起こす。（A）STSG及びSTSG+FAKIの概略図。（B）STSGにおける早期FAK阻害の代表的な写真。スケールバー=1 cm。（C）STSG又はSTSG+FAKIによって着色された、UMAP埋め込みにおいて示されるブタ細胞。（D）細胞型によって着色された細胞のUMAP埋め込み。破線は、目的の骨髓系細胞を示す。（E）細胞型によるSTSGとSTSG+FAKIとの間の差次的に発現された遺伝子の数。（F）線維芽細胞によって発現される線維化遺伝子のバイオリンプロット。

10

【図5-2】（G）STSG又はSTSG+FAKIによって着色された骨髓系細胞のUMAP埋め込み。（H）細胞型によって着色された骨髓系細胞のUMAP埋め込み、及びオーバーレイされたRNA速度ストリーム。（I）単球系譜細胞によって発現された線維化又は抗炎症性遺伝子のバイオリンプロット。（J）骨髓系細胞のGenetrail3によるORA経路プロット。

【図5-3】（K）ブタ組織における経時的なCXCL10タンパク質の免疫蛍光染色の代表的な画像。スケールバー=200 μm 。HM（高倍率）スケールバー=50 μm 。（L）手術後7日目（1条件当たり $n = 3$ ）、手術後14日目（1条件当たり $n = 3$ ）、及び手術後90日目（1条件当たり $n = 6$ ）での経時的なブタ組織におけるF4/80及びCXCL10タンパク質の定量化。二元配置分散分析（ANOVA）及びテューキーの多重比較検定を使用して行われた統計的比較（* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ ）。全てのデータは、生物学的レプリケートの平均値 $\pm$ SEMを表す。

20

【図6-1】メカノトランスダクションの破壊は、線維芽細胞転写運命を、後期（手術後90日目）時点で線維化促進から再生へ移行させる。（A）ブタ細胞は、FAKIヒドロゲルで処置されたSTSG（STSG+FAKI）、対照STSG、及び非創傷皮膚から単離された。処置群によって着色された線維芽細胞のUMAP埋め込み。UMAP埋め込みに射影された速度流線によって可視化された、主遺伝子平均流動として示されるRNA速度。（B）CellRank（81）によって決定された6つの線維芽細胞系譜及び終末状態。（C）細胞間の転写ダイナミクスにおける全体的な差を定量化するscVeloによって全ての遺伝子にわたって計算された潜伏時間によって着色された細胞。（D）潜伏時間ピークに従って選別された、再生（左、系譜1、2）及び線維化（右、系譜3、4）運命確率と最も高い相関を有する最上位の遺伝子の平滑化された遺伝子発現を示すヒートマップ。中央：6つの系譜にわたるAPOE及びACAN遺伝子の発現。

30

【図6-2】（E及びF）更なる深さで分析された再生（左）対線維化（右）系譜。上：UMAP埋め込みに射影された群定義遺伝子及び主要な経路の発現。下：遺伝子特異的RNA速度。紫色の点線は、スプライシングされていない：スプライシングされたmRNAの推定「定常状態」比を表す。正速度（スプライシングされていないmRNAの予想よりも高い存在量）は、遺伝子上方調節を示す。

40

【図7-1】再生及び線維化系譜にわたるSTSG治癒の時間経過。手術後7日目（1群当たり $n = 3$ ）、手術後14日目（1群当たり $n = 3$ ）、及び手術後90日目（1群当たり $n = 6$ ）での、STSG及びFAK阻害STSGブタ真皮組織切片の免疫蛍光染色を使用して実行されたタンパク質確認。（A）CXCL14、（B）THBS4、

【図7-2】（C）APOE、及び（D）CD34についての代表的な画像。スケールバー=200 μm 。HM（高倍率）スケールバー=50 μm 。二元配置分散分析（ANOVA）及びテューキーの多重比較検定を使用して行われた統計的比較（* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ ）。全てのデータは、生物学的レプリケートの平均値 $\pm$ SEMを表す。

50

【図8-1】3D器官型癒痕システムは、ヒト及びブタ細胞の両方における再生対線維化の2つの反対のトラジェクトリを再現する。(A)概略図：線維芽細胞は、ヒト患者試料から単離され、培養され、3Dコラーゲン足場内に播種された。コラーゲン足場は、歪みなし(NS、黒色)、歪み(青色)、又は歪み及びFAK I(歪み+FAK I、赤色)のいずれかに供された。(1条件当たり $n=3$)。スケールバー：1cm。(B及びC)最上位の(B)線維化及び(C)再生マーカーの免疫蛍光染色。スケールバー：100 μ m。一元配置分散分析(ANOVA)及びテューキーの多重比較検定を使用して行われた統計的比較(* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、*** $p<0.0001$)。全てのデータは、生物学的レプリケートの平均値 $\pm$ SEMを表す。

【図8-2】(D)概略図：ブタ線維芽細胞が試験された。(E)速度埋め込みストリームを有し、群によって着色された線維芽細胞のUMAP埋め込み。(*)は、分化の基礎起源を示す。(F)潜伏時間によって着色されたUMAP埋め込み。(G)群による最上位の差別的に発現された遺伝子のヒートマップ。(H及びI)本発明者らの3Dシステムにおいて観察された再生(H)対線維化(I)系譜。UMAP埋め込み(上)又はバイオリンプロット(下)に射影された群定義遺伝子の発現。

【図9-1】慢性ブタSTSG及び非創傷皮膚において観察された多様な細胞生態。(A)本発明者らの自動化細胞型アノテーションを確認するための細胞型定義遺伝子。(B)STSGと非創傷皮膚との間の各細胞型の代表的な割合。(C)細胞型による差別的に発現された遺伝子のヒートマップ。

【図9-2】(D)細胞型による差別的に発現された遺伝子のヒートマップ。(E)線維芽細胞における遺伝子及びエンリッチメント経路の追加の特徴プロット。

【図10】ヒドロゲルは、FAK Iを真皮内に経時的に放出する。(A)STSGへのFAK Iのヒドロゲル送達の概略図。(B)透析膜内のFAK Iヒドロゲルは、経時的なFAK Iの定常の放出を示す。(ブランクについて $n=2$ ；FAK Iについて $n=3$)。二元配置分散分析(ANOVA)及びテューキーの多重比較検定を使用して行われた統計的比較(* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$)。全てのデータは、生物学的レプリケートの平均値 $\pm$ SEMを表す。(C)経時的な真皮内へのFAK Iの浸透。

【図11-1】線維分析は、深在性及び表在性真皮の両方において実行された。追加の画像、及びピクロシリウスレッド染色画像の定量化が実行された(1条件当たり $n=6$)。統計的比較は、分散分析(ANOVA)及びテューキーの多重比較検定を使用して行われた(* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 、**** $P<0.0001$)。データは、生物学的レプリケートの平均値 $\pm$ SEMを表す。

【図11-2】線維分析は、深在性及び表在性真皮の両方において実行された。追加の画像、及びピクロシリウスレッド染色画像の定量化が実行された(1条件当たり $n=6$)。統計的比較は、分散分析(ANOVA)及びテューキーの多重比較検定を使用して行われた(* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 、**** $P<0.0001$)。データは、生物学的レプリケートの平均値 $\pm$ SEMを表す。

【図11-3】線維分析は、深在性及び表在性真皮の両方において実行された。追加の画像、及びピクロシリウスレッド染色画像の定量化が実行された(1条件当たり $n=6$)。統計的比較は、分散分析(ANOVA)及びテューキーの多重比較検定を使用して行われた(* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 、**** $P<0.0001$)。データは、生物学的レプリケートの平均値 $\pm$ SEMを表す。

【図12-1】多様な細胞生態が、早期(手術後7日目)STSG及びSTSG+FAK Iにおいて観察された。(A)細胞型定義遺伝子は、本発明者らの自動化細胞型アノテーションを確認する。(B)(B)線維芽細胞、並びに(C)単球及びマクロファージにおける差別的に発現されたクラスター定義遺伝子のバイオリンプロット。ボックスプロットが、中央値及び四分位範囲を示すようにオーバーレイされている。

【図12-2】(C)(B)線維芽細胞、並びに(C)単球及びマクロファージにおける差別的に発現されたクラスター定義遺伝子のバイオリンプロット。ボックスプロットが、

10

20

30

40

50

中央値及び四分位範囲を示すようにオーバーレイされている。

【図13】後期（手術後90日目）線維芽細胞のCellRank及びscVelo分析。CellRankによって特定された（A）初期及び（B）終末状態。（C）各個々のセルについて示される速度ベクトル。（D）速度長さは、全ての遺伝子にわたる転写規模の増加を示す。（E、F）（E）ENPP1及び（F）ACTA2についての遺伝子分解速度。点線は、スプライシングされていないmRNA存在量対スプライシングされたmRNA存在量の推定「定常状態」比を表す。

【図14-1】後期（手術後90日目）STSG、STSG+FAKI、及び非創傷皮膚からの線維芽細胞の追加の分析。（A）差別的に発現されたクラスター定義遺伝子のバイオリンプロット。ボックスプロットが、中央値及び四分位範囲を示すようにオーバーレイされている。

【図14-2】（B）処置群による最上位の差別的に発現された遺伝子のヒートマップ。

【図14-3】（C）遺伝子発現を示す選択特徴プロット。（D）群間を区別する主要な経路のGeneTrailを備えるUMAPプロット。

【図15】ヒト患者試料におけるscRNA-seq観察のタンパク質確認。患者試料から収集されたヒト肥厚性瘢痕（HTS）（n=6つの試料）及び非創傷皮膚（n=3つの試料）の免疫蛍光染色を使用して実行されたタンパク質確認。過剰な瘢痕形成に寄与するTHBS4、又は再生脂肪生成真皮治癒に寄与するAPOEについての染色。スケールバー：50µm。統計的比較は、独立両側t検定を使用して行われた（*P<0.05、***P<0.0001）。全てのデータは、生物学的レプリケートの平均値±SEMを表す。

【図16】ヒトコラーゲン足場におけるαSMAの免疫蛍光染色。スケールバー：100µm。一元配置分散分析（ANOVA）及びテューキーの多重比較検定を使用して行われた統計的比較（**P<0.01）。全てのデータは、生物学的レプリケートの平均値±SEMを表す。

【図17】インビトロブタscRNA-seqデータのバイオリンプロット、並びに中央値及び四分位範囲を示すようにオーバーレイされたボックスプロット。

【0011】

定義

従来の意味で本明細書で使用される場合、「線維芽細胞」という用語は、細胞外マトリックスの合成及び組織化に参与する細胞を指す。2つの線維芽細胞系譜は、Engrailed-1系譜陰性線維芽細胞（ENF）及びEngrailed-1系譜陽性線維芽細胞（EPF）を含む。EPF系譜は、Engrailed-1を発達中のいずれかの時点で発現する全ての細胞、及びこれらの細胞の全ての子孫を含む。

【0012】

従来の意味で本明細書で使用される場合、「線維化」という用語は、器官又は組織における過剰な線維性結合組織が、部位の傷害若しくは炎症、又はその血液供給との干渉の結果として形成される又は発達することを指す。線維化は、瘢痕、異常な反応性プロセス、又は未知の若しくは理解されていない原因をもたらす正常な治癒応答の結果であり得る。

【0013】

従来の意味で本明細書で使用される場合、「瘢痕」という用語は、傷害又は疾患によって破壊された正常な組織を置換する線維性組織を指す。皮膚の外層（表皮）への損傷は、組織を再構築することによって治癒し、これらの事例では、瘢痕化は、わずかであるか、又は存在しない。しかしながら、皮膚の外表面（すなわち、真皮）の下に厚い組織層が損傷されたときに、再構築はより複雑である。体は、コラーゲン線維（体によって自然に産生されるタンパク質）を、非傷害皮膚において見出されるものとは異なる組成で設け、これは、通常、顕著な瘢痕をもたらす。創傷が治癒した後に、新しいコラーゲンが形成されるにつれて、瘢痕は改変し続け、存在するコラーゲンは、酵素的にリモデリングされ、血管が正常に戻り、これは、ほとんどの瘢痕が、傷害後2年間にわたって見え外観が改善されることを可能にする。しかしながら、ある程度の可視の傷害痕跡が永久的に残り、毛包

10

20

30

40

50

、並びに汗及び脂腺は、再び成長しない。本明細書で使用される場合、「瘢痕面積」という用語は、傷害又は疾患によって破壊され、線維性組織によって置換された正常な組織の面積を指す。

【0014】

瘢痕は、(1) それらが、いずれもの真皮付属器(毛包、汗腺など)を欠くこと；(2) それらのコラーゲン構造が、基本的に異なり、正常な皮膚にその柔軟性及び強度を与える「バスケット織り」パターンではなく、高密度の平行線維を有すること；並びに(3) それらの劣性のマトリックス構造の結果として、それらが、皮膚よりも弱いことの3つの主要な様式で、正常な皮膚とは異なる。

【0015】

本明細書で使用される場合、「瘢痕関連遺伝子」という用語は、正常な創傷治癒プロセスの一部として瘢痕化に応答して活性化されるタンパク質をコードする核酸を指す。本明細書で使用される場合、「瘢痕関連遺伝子産物」という用語は、正常な創傷治癒プロセスの一部として瘢痕化に応答して発現されるタンパク質を指す。

【0016】

瘢痕組織は、主に、組織化されていないコラーゲン細胞外マトリックスからなる。これは、筋線維芽細胞によって産生され、筋線維芽細胞は、創傷に応答して真皮線維芽細胞から分化し、これは、形質転換成長因子 β の局所濃度における上昇を引き起こし、形質転換成長因子 β は、(TGF- β と総称される)TGF- β 1、TGF- β 2、及びTGF- β 3と称される少なくとも3つのアイソフォームにおいて存在する分泌型タンパク質である。TGF- β は、多くの組織型における線維化に関連する重要なサイトカインである(Beanes, S. et al, Expert Reviews in Molecular Medicine, vol. 5, no. 8, pp. 1-22 (2003))。瘢痕のタイプは、例えば、国際特許出願第2014/040074号に更に記載されており、その開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0017】

従来の意味で本明細書で使用される「皮膚」という用語は、体の全ての表面組織及びそこでの表面下構造を含み、これらは、例えば、粘膜及び眼組織、並びに通常の皮膚を含む。「皮膚」という表現は、創傷ゾーン自体を含み得る。創傷の表面の上の皮膚の再近似は、長い間、創傷治癒のかなりの部分の完了の一次徴候であった。欠陥のこの再閉鎖は、皮膚の保護機能を回復させ、その保護機能は、細菌、毒素、及び機械的力からの保護、並びに必須の体液を保持するためのバリアの提供を含む。角質層から始まるいくつかの層から構成された表皮は、皮膚の最外層である。最内皮膚層は、深在性真皮である。

【0018】

従来の意味で本明細書で使用される場合、「真皮付属器」という用語は、毛包、皮脂及び汗腺、指の爪、及び足指爪を含む。

【0019】

本明細書で使用される場合、「真皮位置」という用語は、いずれかのサイズ及び面積を有する、対象の皮膚の領域を指す。真皮位置は、対象の皮膚の一部分、例えば、頭皮を包含し得る。真皮位置は、1つ以上の皮膚層を含み得、1つ以上の皮膚層は、例えば、表皮及び真皮を含む。いくつかの場合では、真皮位置は、創傷を含む。

【0020】

従来の意味で本明細書で使用される場合、「創傷」という用語は、例えば、外科手術又は身体的傷害などの非生理学的プロセスからもたらされる、ヒト又は非ヒト動物の体の内部又は外部体表面における正常な組織連続性のいずれもの破壊及び／又は損失を含む。本明細書で使用される「創傷」又は「創傷環境」という表現は、瘢痕化を潜在的にもたらし得る治癒プロセスを誘発することが可能ないずれもの皮膚病変を指し、傷害によって作られる創傷、熱傷によって作られる創傷、疾患によって作られる創傷、及び外科的手順によって作られる創傷を含む。創傷は、いずれかの外部又は内部体表面上に存在し得、穿通又は非穿通であり得る。本明細書に記載される方法は、皮膚表面上の問題な創傷の治療にお

10

20

30

40

50

いて有益であり得る。本発明の方法により治療され得る創傷の例としては、表在性及び非表在性創傷の両方、例えば、擦過傷、裂創、温度傷害から生じる創傷（例えば、熱傷、及びいずれかのクライオベースの治療から生じるもの）、並びに外科手術からもたらされるいずれかの創傷が挙げられる。

【0021】

従来の意味で本明細書で使用される場合、「創傷治癒」という用語は、時間的及び空間的治癒プログラムの誘導を有する再生プロセスを指し、再生プロセスは、炎症、肉芽形成、新血管新生、線維芽細胞、内皮細胞、及び上皮細胞の移動、細胞外マトリックス沈着、再上皮化、並びにリモデリングのプロセスを含むが、これらに限定されない。

【0022】

ヒドロゲル。本発明の方法において有用なヒドロゲルは、捕捉された細胞の生存率を、創傷治癒を増強するのに十分な期間維持する。ヒドロゲルは既知であり、当該技術分野で創傷治癒のために使用されている。典型的には、ヒドロゲルは、重量で、最大約50%、最大約55%、最大約60%、最大約65%、最大約70%、最大約75%、最大約80%、最大約85%、最大約90%が水であり、残りの重量は、好適なポリマー、例えば、プルラン及びコラーゲン、グリコサミノグリカン、アクリレート、2-ヒドロキシメチルメタクリレート及びエチレンジメタクリレートコポリマー、カルボキシメチルセルロース、キトサン、ゼラチンなど、又は当該技術分野で既知の他の好適な親水性ポリマーを含む。ヒドロゲルは、それらのゼラチン構造を変化させることなく広範囲に膨張することができ、無定形（形状を有さない）ゲルとしての使用、並びに様々なタイプの適用システム、例えば、無定形ヒドロゲル溶液を含浸させたフラットシートヒドロゲル及び不織布ドレッシングにおける使用のために入手可能である。フラットシート（フィルム）ヒドロゲルドレッシングは、安定した架橋マクロ構造を有し、したがって、流体を吸収したときにそれらの物理的形態を保持する。

【0023】

いくつかの実施形態では、架橋ヒドロゲルフィルムは、架橋及び細孔形成を提供した条件下で、プルラン及びコラーゲンを使用して製造される。コラーゲンは、プルラン、架橋剤、及び細孔形成剤（ポロゲン）の混合物に添加され、コラーゲンは、プルランの乾燥重量に対して、少なくとも約1%及び約12.5%以下の濃度で提供される。コラーゲンは、プルランの乾燥重量に対して、約1%、約2.5%、約5%、約7.5%、約10%の濃度、通常、約2.5%～約10%の濃度で提供され得、約4%～約6%であり得る。コラーゲンは、典型的には、線維性コラーゲン、例えば、I型、II型、III型などである。目的の架橋剤は、トリメタリン酸ナトリウム（STMP）、又はトリメタリン酸ナトリウム及びトリポリリン酸ナトリウム（STMP/STPP）の組み合わせ又はの組み合わせを含む。架橋剤は、プルランに対して約5:1～約1:5の重量/重量比で含められ得、約4:1、3:1、2:1、1.75:1、1.5:1、1.25:1、1:1、1:1.25、1:1.5、1:1.75、2:1、3:1、4:1などであり得る。ゲル内結晶化のための目的のポロゲンは、いずれかの好適な塩、例えば、KClを含む。ポロゲンは、プルランに対して約5:1～約1:5の重量/重量比で含められ得、約4:1、3:1、2:1、1.75:1、1.5:1、1.25:1、1:1、1:1.25、1:1.5、1:1.75、2:1、3:1、4:1などであり得る。細胞の非存在下でのコラーゲン、プルラン、架橋剤、及びポロゲンの懸濁液が、注がれ、圧縮されてシートを形成する。好ましい厚さは、少なくとも約1mm及び約5mm以下であり、通常、約3mm以下であり、約1～2.5mm、例えば、約1.25、1.5、1.75、2mmの厚さであり得る。細孔は、相転換による膨張したヒドロゲルの迅速な乾燥を介して、ヒドロゲル内に形成される。脱水は、ポロゲンの局所的な過飽和及び結晶化をもたらす。プルラン及びコラーゲンは、相互接続されたネットワーク内の結晶の周りで強制的に組織化され、これは、KCl溶解後に網状足場形成をもたらす。

【0024】

フィルムは、乾燥状態で貯蔵され得、いずれかの好適な水性媒体中で容易に再水和する

。ヒドロゲル基質の水性は、細胞成長及び持続可能性に理想的な環境を提供する。

【0025】

ヒドロゲルの機械的特徴は、平均細孔サイズ及び足場多孔度を含む。両方の変数は、ヒドロゲル内に存在するコラーゲンの濃度とともに変動する。5%のコラーゲンを含むヒドロゲルについては、平均細孔サイズは、通常、約25 µm～約50 µm、約30 µm～約40 µmの範囲であり、約35 µmであり得る。10%のコラーゲンを含むヒドロゲルについては、平均細孔サイズは、通常、約10 µm～約25 µm、約12 µm～約18 µmの範囲であり、約15 µmであり得る。他のコラーゲン濃度での好適なヒドロゲルは、当業者には容易に決定される。足場多孔度は、通常、約50%～約85%の範囲であり、約70%～約75%の範囲であり得、コラーゲンの濃度の増加とともに減少する。コラーゲンを欠くヒドロゲルは、偏光光学顕微鏡法でいずれもの複屈折を示さないが、コラーゲンを含むヒドロゲルは、拡散複屈折を有する。

10

【0026】

プルラン。真菌 *Aureobasidium pullulans* によって産生される多糖。プルランは、アルファ（1-6）結合マルトトリオース単位からなる直鎖ホモ多糖であり、ヒドロゲル状態で水保持能力を示し、これにより、プルランは、細胞及び生体分子の両方に理想的な治療ビヒクルとなる。加えて、プルランは、複数の官能基を含有し、これらの官能基は、架橋、並びに遺伝子材料及び治療サイトカインの送達を可能にする。更に、プルランベースの足場は、インビトロでの内皮細胞及び平滑筋細胞挙動の両方を増強することが示されている。

20

【0027】

コラーゲン。本明細書で使用される場合、「コラーゲン」という用語は、存在するタンパク質の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%以上が、三重らせん構成におけるコラーゲンである、組成物を指す。コラーゲンは、脊椎動物種において広く見出され、多くの異なる種について配列決定されている。種間の高度な配列類似性に起因して、異なる種からのコラーゲンは、生物医学的目的で、例えば、哺乳類種間で使用され得る。典型的な商業的動物供給源は、ウシアキレス腱、カーフスキン、及びウシの骨を含む。いくつかの実施形態では、配向性薄フィルムの調製において使用されるコラーゲンは、I型、II型、又はIII型コラーゲンであり、いずれかの好都合な供給源、例えば、ウシ、ブタなど、通常、哺乳類供給源に由来する。

30

【0028】

コラーゲンは、三本鎖のロープ様コイル構造を有する。皮膚、腱、及び骨の主なコラーゲンは、コラーゲンIであり、コラーゲンIは、2つのアルファ1ポリペプチド鎖と、1つのアルファ2鎖と、を含有する。軟骨のコラーゲンは、1つのタイプのポリペプチド鎖であるアルファ1のみを含有する。また、胎仔は、異なる構造のコラーゲンを含有する。間質性コラーゲンであるI型、II型、及びIII型コラーゲンについての遺伝子は、普通でない特徴的な構造を示し、この構造は、多数の比較的小さいエクソン（54及び108 bp）を、進化的に保存された位置で、三重らせん gly-X-Y 部分の長さに沿って有する。

40

【0029】

コラーゲンのタイプは、I（COL1A1、COL1A2）；II（COL2A1）；III（COL3A1）；IV（COL4A1、COL4A2、COL4A3、COL4A4、COL4A5、COL4A6）；V（COL5A1、COL5A2、COL5A3）；VI（COL6A1、COL6A2、COL6A3）；VII（COL7A1）；VIII（COL8A1、COL8A2）；IX（COL9A1、COL9A2、COL9A3）；X（COL10A1）；XI（COL11A1、COL11A2）；XII（COL12A1）；XIII（COL13A1）；XIV（COL14A1）；XV（COL15A1）；XVI（COL16A1）；XVII（COL17A1）；XVIII（COL18A1）；XIX（COL19A1）；XX（COL20A1）；XXI（CO

50

L 2 1 A 1) ; X X I I (C O L 2 2 A 1) ; X X I I I (C O L 2 3 A 1) ; X X I V (C O L 2 4 A 1) ; X X V (C O L 2 5 A 1) ; X X V I I (C O L 2 7 A 1) ; X X V I I I (C O L 2 8 A 1) を含む。哺乳類コラーゲン、例えば、ウシ、ブタ、ウマなどのコラーゲンを含む他のコラーゲンが、本発明の方法に等しく好適であることが、当業者には理解されよう。

【0030】

接着斑キナーゼ (F A K) 。 F A K は、非受容体細胞質チロシンキナーゼである。 F A K は、皮膚メカノバイオロジーの主要なメディエーターのうちの1つであり、皮膚傷害後に活性化される。機械的力は、皮膚の傷害後のリン酸化を介する F A K の活性化を増強する。 F A K は、機械的ストレスのその連結を介する E C M から細胞質細胞骨格への細胞シグナル伝達に寄与し、これは、炎症性経路を活性化する。線維芽細胞は、炎症性シグナル伝達によって創傷に動員され、それらによる線維化促進サイトカインの分泌は、コラーゲン合成の増加をもたらす。不良な創傷治癒に関連する様々な病態は、非定型レベルの F A K を有することが示されている。機械的力は、炎症性 F A K - E R K - M C P 1 経路を介する病態的瘢痕化を調節し、接着斑キナーゼ (F A K) を標的とする分子戦略は、機械的力を線維化から有効に結合解除することができる。

10

【0031】

創傷ドレッシング。本発明のフィルムは、瘢痕を最小にする基質の改善を提供することによって、創傷ドレッシング又は人工皮膚としての使用が見出される。有効な生体活性創傷ドレッシングは、表皮及び真皮の両方の回復を必要とし得る創傷の修復を容易にすることができる。例えば、ヒドロゲル薄フィルムは、レシピエントの清拭された創傷上に配置され、それによって許容され、皮膚の真皮及び表皮構成要素の永久的な再確立のための手段を提供する。移植片は、瘢痕化を引き起こす肉芽組織の形成を抑制する。

20

【0032】

生物学的に活性な創傷ドレッシングについての追加の基準は、配置直後の創傷への迅速な接着；創傷からの蒸発性流体損失を制御するための、かつ創傷とドレッシング材料との間の滲出物の収集を回避するための適切な透湿性を含む。皮膚置換物は、微生物に対するバリアとして作用し、創傷において既に存在する微生物の成長を制限し、柔軟性があり、耐久性があり、破断に対する耐性があるべきである。置換物は、組織適合性を示すべきであり、すなわち、肉芽組織の形成をもたらし得る、創傷における炎症又は異物反応を誘発すべきでない。線維血管組織の内殖を可能にするヒドロゲル薄フィルムの内表面構造が提供される。外表面構造は、流体伝達を最小にし上皮化を促進するために提供され得る。

30

【0033】

多孔性創傷ドレッシング及び皮膚置換物などの製造における使用のための典型的な生体吸収性材料は、ポリ乳酸又はポリグリコール酸などの合成生体吸収性ポリマーを含み、また、構造タンパク質及び多糖などのバイオポリマーを含む。細胞播種前の完成したドレッシングは、包装され、好ましくは放射線滅菌される。そのような生物学的に活性な製品は、真皮組織の再生を必要とする多くの異なる用途において使用され得、これらの用途は、傷害皮膚及び難治性創傷、例えば、熱傷創傷、静脈うっ血潰瘍、糖尿病性潰瘍などの修復を含む。

40

【0034】

分層移植片。分層又は部分層皮膚移植片が、通常、使用され、これらの移植片については、表皮の薄層及びいくつかの真皮が、切除され、レシピエント部位上に配置される。そのような移植片は、典型的には、熱傷のために使用されるが、小さい創傷の治癒を加速するためにも使用され得る。かなりの量の真皮要素が、ドナー部位で残るため、この部位は、最終的に治癒し、再び採取され得る。

【0035】

全層移植片。全層皮膚移植片は、表皮及び真皮から構成されており、分層移植片よりも良好な外観及び機能を提供する。しかしながら、ドナー部位は、主に治癒しないため、ドナー部位が縫合閉鎖され得るような重複性皮膚の弛緩性領域（例えば、腹又は胸壁、しば

50

しば、頭皮)でなければならない。したがって、全層移植片は、通常、美容的に感受性がある領域(例えば、顔)、又はより厚くより保護的な皮膚層(例えば、手)を必要とする領域のために確保される。全層移植片は、より厚く、より血管性であるため、分層移植片と同程度のかかなり高い生存率を有さない。分層皮膚移植片は、薄(0.15~0.25 mm)、中(0.3~0.4 mm)又は厚(0.5~0.6 mm)として分類され得る。

【0036】

複合移植片。複合皮膚移植片は、2つ以上の異なるタイプの組織を含む。最も一般に、複合皮膚移植片は、皮下組織及び表面を覆う皮膚を有する又は有さない軟骨を有する。複合移植片は、支持及び構造を提供するため、しばしば、鼻翼及びヘリカルリムの全層欠陥を修復するために使用される。

【0037】

本明細書で使用される場合、「自家移植片」という用語は、移植片組織が、個体又は対象自体の体からのものである、皮膚移植片を指す。

【0038】

本明細書で使用される場合、「同種移植片」という用語は、移植片組織が、創傷の治療を受容している対象以外の異なる個体又は対象からのものである、皮膚移植片を指す。

【0039】

本明細書で使用される場合、「異種移植片」という用語は、移植片組織が、移植片組織を受容している対象に対して、異なる種である個体からのもの又は合成移植片組織である、皮膚移植片を指す。例えば、異種移植片は、ヒトが創傷をブタ皮膚移植片で治療される場合であり得る。

【発明を実施するための形態】

【0040】

皮膚移植方法が提供される。方法の態様は、皮膚移植片を、メカノトランスダクション遮断剤、例えば、薬理学的メカノトランスダクション遮断剤、例えば、接着斑キナーゼ阻害剤との組み合わせで、創傷に適用することを含む。また、本発明の方法を実施する使用のための薬学的組成物及びキットが提供される。

【0041】

本発明がより詳細に記載される前に、本発明は、記載される特定の実施形態に限定されず、したがって、もちろん、変動し得ることを理解されたい。また、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることになるため、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみを説明する対象となるためのものであり、限定することが意図されるものではないことも理解されるべきである。

【0042】

値の範囲が提供される場合、別途文脈が明確に指示されない限り、この範囲の上限と下限との間の、下限の単位の10分の1までの各介在値、及びこの記載される範囲内のいずれもの他の記載される値又は介在値が、本発明内に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限及び下限は、独立して、より小さい範囲内に含まれ得、また、記載される範囲内の具体的に除外されるいずれもの限度を条件として、本発明内に包含される。記述の範囲が、制限の一方又は両方を含む場合、それらの含まれる制限の一方又は両方を除外する範囲もまた、本発明に含まれる。

【0043】

ある範囲は、「約」という用語が数値に先行して本明細書で提示される。「約」という用語は、この用語が先行する正確な数、及びこの用語が先行する数に近い数又はほぼその数である数についての逐語的支持を提供するために本明細書で利用される。ある数が、具体的に列挙された数に近い又はほぼその数であるかを決定する際に、列挙されていない数に近い又はほぼその数は、提示される文脈において、具体的に列挙された数の実質的な同等性を提供する数であり得る。

【0044】

別途定義されない限り、本明細書で利用される全ての技術及び科学用語は、本発明が属

10

20

30

40

50

する技術分野における当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。また、本明細書に記載されるものと類似の又は均等ないずれもの方法及び材料が、本発明の実施又は試験において使用され得るが、代表的な例示的な方法及び材料が以下に記載される。

【0045】

本明細書で引用される全ての刊行物及び特許は、各個々の刊行物又は特許が、参照により組み込まれると具体的かつ個々に示されるかのように参照により本明細書に組み込まれ、方法及び／又は材料を刊行物が引用されるものに関して開示及び記載するために参照により本明細書に組み込まれる。いずれもの刊行物の引用は、出願日前のその開示についてのものであり、本発明が、従来発明のためそのような刊行物に先行する権利がないことを認めるものとして解釈されるべきでない。更に、提供される刊行物の日付は、実際の公開日とは異なり得、これらは独立して確認する必要がある。 10

【0046】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で 사용되는場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、別途文脈が明確に指示されない限り、複数の言及を含むことに留意されたい。特許請求の範囲は、いずれもの任意選択の要素を除外するように企図され得ることに更に留意されたい。したがって、この記述は、特許請求の範囲の要素の列挙に関連する「単独で」、「のみ」などのそのような排他的な用語の使用、又は「否定的」限定の使用の先行詞として機能することが意図される。

【0047】

本開示を読むことで当業者には明らかであるように、本明細書に記載及び例示される個々の実施形態のそれぞれは、異なる構成要素及び特徴を有し、これらの構成要素及び特徴は、本発明の範囲又は趣旨から逸脱することなく、他のいくつかの実施形態のうちのいずれかの特徴から容易に分離されてもよく、又はそれらと組み合わせられてもよい。記載されるいずれもの方法は、記載される事象の順序で実施されてもよく、又は論理的に可能であるいずれかの他の順序で実施されてもよい。 20

【0048】

装置及び方法は、文法的流動性のために、機能的な説明で記載されているか又は記載されるが、特許請求の範囲は、米国特許法第112条下で明確に記載されない限り、「手段」又は「ステップ」限定の構文によって必然的に限定されるとなんら解釈されるべきでなく、司法均等論下で特許請求の範囲によって提供される定義の意味及び均等物の完全な範囲を付与されるべきであり、特許請求の範囲は、米国特許法第112条下で明確に記載される場合、米国特許法第112条下で完全な法定による均等物が付与されるべきであることを明確に理解されたい。 30

【0049】

対象の創傷を治療するための方法

上記で要約されるように、対象の創傷を治療するための方法であって、方法が、皮膚移植片を、メカノトランスダクション遮断剤との組み合わせで、創傷に適用して、対象の創傷を治療することを含む、方法が提供される。創傷は、治療を必要としている対象のいずれかの創傷であり得る。本明細書に記載される方法からの利益を受容する創傷は、部分及び全層創傷；圧迫潰瘍、糖尿病性潰瘍（例えば、糖尿病性足部潰瘍）、静脈性潰瘍、下腿潰瘍などを含む潰瘍；やけど、化学的熱傷、炎熱傷及び閃光熱傷などの温度熱傷、紫外線熱傷、接触熱傷、放射線熱傷、電気熱傷などを含む熱傷（第二及び第三度熱傷）；壊疽；皮膚裂傷若しくは裂創、例えば、ナイフなどによって作られるもの；切開、例えば、ナイフ、爪、鋭いガラス、剃刀などによって作られるもの；裂離；切断；外科的創傷；失敗した若しくは損なわれた皮膚／筋肉移植片若しくはフラップ；咬傷；切創、すなわち、すなわち、長さが深さよりも大きい創傷；並びに挫傷など、又は上記のうちの1つ以上の組み合わせを含むが、これらに限定されない。 40

【0050】

本開示の対象は、創傷の治療を必要としているいずれかの対象であり得る。いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物である。本明細書に開示される方法からの利益を得る哺乳動物は、哺乳動物である。 50

乳動物の非限定的な例としては、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、マウス又はラットなどのげっ歯類、及び霊長類、例えば非ヒト霊長類、ヒトなどが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。

【0051】

本開示の方法は、皮膚移植片を創傷に適用することを含む。皮膚移植片は、対象の創傷の治療において有用であると考えられるいずれかの皮膚移植片であり得る。本開示における使用が見出される皮膚移植片は、全層移植片、部分層移植片、複合移植片などを含むが、これらに限定されない。皮膚移植片は、自家移植片、同種移植片、又は異種移植片であり得る。いくつかの実施形態では、皮膚移植片は、メカノトランスダクション遮断剤の適用前に適用される。

10

【0052】

皮膚移植片を適用することに加えて、方法はまた、メカノトランスダクション遮断剤を適用することを含む。本開示における使用が見出されるメカノトランスダクション遮断剤は、メカノトランスダクションシグナル伝達経路を損なういずれかの阻害剤である。メカノトランスダクション遮断剤の非限定的な例としては、インテグリン阻害剤、接着斑キナーゼ（FAK）阻害剤、タリン阻害剤、ピンキュリン阻害剤、パキシリン阻害剤、ザイキシン阻害剤、VASP阻害剤、p130^{cas}阻害剤などが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、メカノトランスダクション阻害剤は、接着斑キナーゼ（FAK）阻害剤である。FAK阻害剤の非限定的な例としては、PF-56227、PF-573228、TAE226（NVP-TAE226）、BI-4464、GSK2256098、PF-431396、PND-1186（VS-4718）、Y15、デファクチニブ（VS-6063）、ソラネソール（ノナイソプレノール）などが挙げられるが、これらに限定されない。上記に開示されるFAK阻害剤に加えて、他のタイプの阻害剤が使用され得る。例えば、他のタイプのFAK阻害剤は、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）を含むが、これらに限定されない。FAKのCRISPR媒介性ノックアウト又はノックダウンなど。いくつかの実施形態では、メカノトランスダクション遮断剤は、薬理学的メカノトランスダクション遮断剤である。

20

【0053】

本開示のメカノトランスダクション遮断剤は、有用と考えられるいずれかの様式で適用され得る。いくつかの実施形態では、メカノトランスダクション遮断剤は、全身的に適用される。いくつかの実施形態では、メカノトランスダクション遮断剤は、皮膚移植片の部位で局所的に適用される。メカノトランスダクション遮断剤が局所的に適用されるときに、メカノトランスダクション遮断剤は、持続放出製剤で適用され得る。いくつかの実施形態では、持続放出製剤は、ゲル製剤を含む。いくつかの実施形態では、ゲル製剤は、ヒドロゲルを含む。いくつかの実施形態では、ヒドロゲルは、炭水化物ベースのヒドロゲル、例えば、生分解性プルランベースのヒドロゲルを含む。プルランベースのヒドロゲルは、当該技術分野で既知であり、Wong et al. (Tissue Eng Part A. 2011 Mar; 17 (5-6): 631-44) 及びWong et al. (Macromol Biosci. 2011 Nov 10; 11 (11): 1458-66) に記載されており、それぞれは、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。

30

40

【0054】

本明細書に開示される方法は、他の方法、すなわち、メカノトランスダクション遮断剤の非存在下での皮膚移植片に対して、いくつかの利点を創傷治癒に提供する。例えば、方法は、創傷の治癒を促進してもよく、線維化を低減してもよく、拘縮を低減してもよく、瘢痕形成を軽減してもよく、コラーゲンアーキテクチャを回復させてもよく、又は移植片生体力学的特性を改善してもよい。

【0055】

本明細書に開示される方法の実施形態は、皮膚移植後に発生する拘縮の量を低減する。拘縮は、皮膚移植片の面積に対する瘢痕面積における変化の尺度である。拘縮は、瘢痕の周囲の皮膚の縁を引っ張る瘢痕形成の結果である歪みを引き起こす。本明細書に開示され

50

る方法は、拘縮における一連の低減をもたらす。例えば、拘縮は、メカノトランスダクション遮断剤の非存在下での皮膚移植片に対して、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、又は50%超の、拘縮における低減によって低減され得る。

【0056】

本明細書に開示される方法の実施形態は、皮膚移植後の創傷治癒を促進する。いくつかの実施形態では、創傷治癒の促進は、再上皮化における増加である。創傷治癒の促進が再上皮化における増加をもたらす実施形態では、再上皮化における一連の増加が発生し得る。例えば、再上皮化は、メカノトランスダクション遮断剤の非存在下での皮膚移植片に対して、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、又は50%超の、再上皮化における増加による増加であり得る。

【0057】

本明細書に開示される方法の実施形態は、皮膚移植片生体力学的特性を改善する。いくつかの実施形態では、皮膚移植片生体力学的特性の改善は、移植片の垂直変形によって測定される場合、皮膚移植片の硬度における減少及び弾性における増加である。皮膚移植片生体力学的特性の改善が、移植片の垂直変形によって測定される場合、皮膚移植片の硬度における減少及び弾性における増加である実施形態では、変形における一連の増加が発生し得る。例えば、変形は、メカノトランスダクション遮断剤の非存在下での皮膚移植片に対して、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、又は50%超の、皮膚移植片の変形における増加によって増加し得る。

【0058】

本明細書に開示される方法の実施形態は、コラーゲンアーキテクチャを回復させる。いくつかの実施形態では、コラーゲンアーキテクチャの回復は、メカノトランスダクション遮断剤を有さない皮膚移植片に対する、コラーゲン線維の整列及び長さにおける減少である。非創傷皮膚は、概して、短いランダムに整列したコラーゲンを有するとして特徴付けられる。コラーゲンアーキテクチャにおける回復がコラーゲン線維の整列における減少である実施形態では、コラーゲン線維の整列における一連の減少が発生し得る。例えば、コラーゲン線維の整列は、メカノトランスダクション遮断剤の非存在下での皮膚移植片に対して、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、又は50%超の、皮膚移植片のコラーゲン線維の整列における減少によって減少し得る。コラーゲンアーキテクチャにおける回復がコラーゲン線維の長さにおける減少である実施形態では、コラーゲン線維の長さにおける一連の減少が発生し得る。例えば、コラーゲン線維の長さは、メカノトランスダクション遮断剤の非存在下での皮膚移植片に対して、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、22%、24%、26%、28%、30%、32%、40%、又は40%超の、皮膚移植片のコラーゲン線維の長さにおける減少によって減少し得る。

【0059】

瘢痕形成を低減する方法

上記で要約されるように、皮膚移植片をヒト対象の治療部位に適用した後の瘢痕形成を低減するための方法であって、方法が、皮膚移植片を治療部位に適用することと、接着斑キナーゼ阻害剤を皮膚移植片に送達して、治療部位での瘢痕形成を低減することと、を含む、方法が提供される。

【0060】

皮膚移植片は、対象の創傷の治療において有用であると考えられるいずれかの皮膚移植片であり得る。本開示における使用が見出される皮膚移植片は、全層移植片、部分層移植片、複合移植片などを含むが、これらに限定されない。皮膚移植片は、自家移植片、同種

移植片、又は異種移植片であり得る。

【0061】

本開示の治療部位は、治療を必要としている皮膚上のいずれかの部位であり得る。本開示における使用が見出される治療部位は、手、手掌、腕下部、腕上部、脇の下、胸部、腹部、肩部、上背、下背、頸部、顔、頭皮、骨盤、鼠径部、脚上部、脚下部、足などを含むが、これらに限定されない。

【0062】

本明細書に開示される方法における使用が見出されるFAK阻害剤は、FAKベースのシグナル伝達を損なういずれかのFAK阻害剤である。FAK阻害剤の非限定的な例としては、PF-56227、PF-573228、TAE226 (NVP-TAE226)、BI-4464、GSK2256098、PF-431396、PND-1186 (VS-4718)、Y15、デファクチニブ (VS-6063)、ソラネソール (ノナイソプレノール) などが挙げられるが、これらに限定されない。上記に開示されるFAK阻害剤に加えて、他のタイプの阻害剤が使用され得る。例えば、他のタイプのFAK阻害剤は、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) を含むが、これらに限定されない。FAKのCRISPR媒介性ノックアウト又はノックダウンなど。

10

【0063】

本開示のFAK阻害剤は、いくつかの異なる様式で送達され得る。いくつかの実施形態では、FAK阻害剤は、全身的に送達される。いくつかの実施形態では、FAK阻害剤は、治療部位で局所的に適用される。いくつかの実施形態では、FAK阻害剤は、持続放出製剤で適用される。いくつかの実施形態では、持続放出製剤は、ゲル製剤を含む。いくつかの実施形態では、ゲル製剤は、ヒドロゲルを含む。いくつかの実施形態では、ヒドロゲルは、生分解性プルランベースのヒドロゲルを含む。

20

【0064】

瘢痕形成の低減は、いくつかの異なる様式で呈し得る。いくつかの実施形態では、瘢痕形成における低減は、瘢痕の視覚的外観における低減である。いくつかの実施形態では、瘢痕形成における低減は、瘢痕形成中にかつその後に発生する拘縮における低減である。本明細書に開示される方法は、拘縮における一連の低減をもたらす。例えば、拘縮は、メカントランスダクション遮断剤の非存在下での皮膚移植片に対して、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、又は50%超の、拘縮における低減によって低減され得る。

30

【0065】

併用療法

主題の方法における使用のために、上記のようなメカントランスダクション遮断剤は、他の薬学的に活性な薬剤との組み合わせで投与され得、他の薬学的に活性な薬剤は、基礎状態又は状態の症状、例えば、瘢痕化を治療する他の薬剤を含む。本明細書で使用される場合、「との組み合わせで」とは、例えば、第1の化合物が、第2の化合物の投与の全経過中に投与される使用；第1の化合物が、第2の化合物の投与と重複する期間投与される使用、例えば、第1の化合物の投与が、第2の化合物の投与前に始まり、第1の化合物の投与が、第2の化合物の投与の終了前に終了する使用；第2の化合物の投与が、第1の化合物の投与前に始まり、第2の化合物の投与が、第1の化合物の投与の終了前に終了する使用；第1の化合物の投与が、第2の化合物の投与の始まり前に始まり、第2の化合物の投与が、第1の化合物の投与の終了前に終了する使用；第2の化合物の投与が、第1の化合物の投与の始まり前に始まり、第1の化合物の投与が、第2の化合物の投与の終了前に終了する使用を指す。したがって、「組み合わせで」とはまた、2つ以上の化合物の投与を含むレジメンを指すことができる。本明細書で使用される場合、「との組み合わせで」とはまた、2つ以上の化合物の投与を指し、2つ以上の化合物は、同じ又は異なる製剤で投与され得、異なる経路の同じによって投与され得、同じ又は異なる剤形タイプにおいて投与され得る。

40

50

【0066】

本発明の方法の実施形態での併用療法における使用のための他の薬剤の例としては、YAP阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの事例では、YAP阻害剤は、所望の活性を示す小分子薬剤、例えば、YAP発現及び／又は活性を阻害する小分子薬剤である。目的の自然発生又は合成小分子化合物は、多数の化学クラス、例えば、有機分子、例えば、50超及び約2,500ダルトン未満の分子量を有する小有機化合物を含む。候補薬剤は、タンパク質との構造的相互作用、特に、水素結合のための官能基を含み、典型的には、少なくとも、アミン、カルボニル、ヒドロキシル、又はカルボキシル基を含み、好ましくは、官能性化学基のうちの少なくとも2つを含む。候補薬剤は、上記の官能基のうちの1つ以上で置換された環状炭素若しくは複素環式構造、及び／又は芳香族若しくは多環式芳香族構造を含み得る。候補薬剤はまた、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造類似体、又はそれらの組み合わせを含む生体分子中に見出される。そのような分子は、とりわけ、スクリーニングプロトコルを使用することによって特定され得る。

10

【0067】

いくつかの場合では、YAP阻害剤は、光感作性薬剤である。いくつかの場合では、YAP阻害剤は、ベンゾボルフィリン誘導体(BPD)である。ベンゾボルフィリン誘導体は、いずれかの好都合なベンゾボルフィリン誘導体、例えば、米国特許第5,880,145号、米国特許第6,878,253号、米国特許第10,272,261号、及び米国特許出願第2009/0304803号に記載されているものであり得、それらの開示は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの場合では、ベンゾボルフィリン誘導体は、光感作性薬剤である。いくつかの場合では、YAP阻害剤は、ベルテボルフィン(ベンゾボルフィリン誘導体一塩基酸環A、BPD-MA、商品名:Visudyne(登録商標))である。

20

【0068】

YAP阻害剤及びその使用方法に関する更なる詳細は、米国特許出願第17/626,699号に提供されており、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0069】

いくつかの事例では、方法の態様は、有効量のメカノトランスダクション遮断剤を、ピエゾ阻害剤との組み合わせで投与することを含み得る。ある実施形態では、ピエゾ阻害剤は、ピエゾ1及び／又はピエゾ2阻害剤を含む。いくつかの場合では、ピエゾ阻害剤は、ピエゾ1阻害剤である。いくつかの場合では、ピエゾ阻害剤は、ピエゾ2阻害剤である。いくつかの場合では、ピエゾ1阻害剤及びピエゾ2阻害剤の両方が、対象に投与される。いくつかの場合では、方法は、ピエゾ阻害剤を投与することから本質的になる。本明細書で使用される場合、「ピエゾ阻害剤」とは、ピエゾタンパク質機能及びシグナル伝達を阻害し得る分子を指す。いくつかの場合では、ピエゾ阻害剤は、細胞機械的シグナル伝達を阻害する。いくつかの場合では、ピエゾ阻害剤は、ピエゾタンパク質発現(DNA又はRNA発現)又は活性(例えば、核転座)を低減又は阻害する。いくつかの場合では、ピエゾ阻害剤は、ピエゾタンパク質と他のシグナル伝達分子との相互作用を低減又は阻害する。ある実施形態では、ピエゾ阻害剤を投与することは、創傷における1つ以上の細胞、例えば、脂肪細胞の機械的活性化を低減し、例えば、創傷における1つ以上の細胞、例えば、脂肪細胞の機械的活性化のレベルは、好適な対照と比較して低減される。ピエゾ阻害剤及びその使用方法に関する更なる詳細は、米国特許仮出願第63/335,843号に提供されており、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

【0070】

併用療法の文脈において、併用療法化合物は、メカノトランスダクション遮断剤が投与される同じ投与経路(例えば、肺内、経口、経腸など)によって投与され得る。代替として、メカノトランスダクション遮断剤との併用療法における使用のための化合物は、異なる投与経路によって投与され得る。

【0071】

50

薬学的組成物

上記で要約されるように、本明細書に開示される方法を実施するための薬学的組成物が提供される。薬学的組成物は、本開示のメカノトランスダクション遮断剤と、薬学的に許容される賦形剤と、を含む。

【0072】

多種多様な薬学的に許容される賦形剤が、当該技術分野で既知であり、本明細書で詳細に考察される必要はない。薬学的に許容される賦形剤は、例えば、A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel et al., eds., 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins、及び Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe et al., eds., 3rd ed. Amer. Pharmaceutical Assocを含む、多様な刊行物に十分に記載されている。

10

【0073】

ビヒクル、アジュバント、担体、又は希釈剤などの薬学的に許容される賦形剤は、容易に一般に入手可能である。更に、pH調整剤及び緩衝剤、張性調整剤、安定剤、湿潤剤などの薬学的に許容される補助物質は、公に容易に入手可能である。

20

【0074】

本開示の薬学的組成物は、メカノトランスダクション遮断剤を含む。本開示における使用が見出されるメカノトランスダクション遮断剤は、メカノトランスダクションシグナル伝達経路を損なういずれかの遮断剤である。メカノトランスダクション遮断剤の非限定的な例としては、インテグリン阻害剤、接着斑キナーゼ (FAK) 阻害剤、タリン阻害剤、ピニキュリン阻害剤、パキシリン阻害剤、サイキシン阻害剤、VASP阻害剤、p130^{cas}阻害剤などが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、メカノトランスダクション阻害剤は、接着斑キナーゼ (FAK) 阻害剤である。FAK阻害剤の非限定的な例としては、PF-56227、PF-573228、TAE226 (NV-P-TAE226)、BI-4464、GSK2256098、PF-431396、PND-1186 (VS-4718)、Y15、デファクチニブ (VS-6063)、ソラネソール (ノナイソプレノール) などが挙げられるが、これらに限定されない。上記に開示されるFAK阻害剤に加えて、他のタイプの阻害剤が使用され得る。例えば、他のタイプのFAK阻害剤は、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) を含むが、これらに限定されない。FAKのCRISPR媒介性ノックアウト又はノックダウンなど。

30

【0075】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、持続放出製剤を含む。本開示の持続放出製剤は、メカノトランスダクション遮断剤を長期間放出することが可能であるいずれかの持続放出製剤である。持続放出製剤は、メカノトランスダクション遮断剤を一連の時間にわたって放出することが可能である。例えば、持続放出製剤は、メカノトランスダクション阻害剤を、少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも36時間、少なくとも48時間、少なくとも60時間、少なくとも72時間、少なくとも84時間、少なくとも96時間、又は96時間超放出し得る。

40

【0076】

本開示の持続放出製剤は、メカノトランスダクション遮断剤を、皮膚移植片内への特定の深さ内に放出することが可能である。皮膚移植片内への深さは、角質層から角質層の下の組織内への最も遠い点までの距離の尺度である。いくつかの実施形態では、持続放出製剤が皮膚移植片内に放出する特定の深さは、少なくとも0.5mm、少なくとも0.6mm、少なくとも0.7mm、少なくとも0.8mm、少なくとも0.9mm、少なくとも

50

1 mm、少なくとも1.1 mm、少なくとも1.2 mm、少なくとも1.3 mm、少なくとも1.4 mm、少なくとも1.5 mm、少なくとも1.6 mm、少なくとも1.7 mm、少なくとも1.8 mm、少なくとも1.9 mm、少なくとも2 mm、少なくとも2.1 mm、少なくとも2.2 mm、少なくとも2.3 mm、少なくとも2.4 mm、少なくとも2.5 mm、少なくとも2.6 mm、少なくとも2.7 mm、少なくとも2.8 mm、少なくとも2.9 mm、少なくとも3 mm、又は3 mm超である。

【0077】

いくつかの実施形態では、持続放出製剤は、ゲル製剤を含有する。いくつかの実施形態では、ゲル製剤は、ヒドロゲル、例えば、炭水化物ベースのヒドロゲル、タンパク質ベースのヒドロゲルなどを含む。いくつかの実施形態では、ヒドロゲルは、生分解性プルランベースのヒドロゲルを含有する。プルランベースのヒドロゲルは、当該技術分野で既知であり、Wong et al. (Tissue Eng Part A. 2011 Mar; 17(5-6): 631-44) 及びWong et al. (Macromol Biosci. 2011 Nov 10; 11(11): 1458-66) に記載されている。

10

【0078】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、水性緩衝液中で製剤化される。好適な水性緩衝液としては、限定されないが、5 mM~100 mMの強度で変動する酢酸緩衝液、コハク酸緩衝液、クエン酸緩衝液、及びリン酸緩衝液が挙げられる。いくつかの実施形態では、水性緩衝液は、等張溶液を提供する試薬を含む。そのような試薬としては、限定されないが、塩化ナトリウム；及び糖、例えば、マンニトール、デキストロース、スクロースなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、水性緩衝液は、ポリソルベート20又は80などの非イオン性界面活性剤を更に含む。任意選択的で、薬学的組成物は、防腐剤を更に含み得る。好適な防腐剤としては、限定されないが、ベンジルアルコール、フェノール、クロロブタノール、塩化ベンザルコニウムなどが挙げられる。多くの場合では、製剤は、約4℃で貯蔵される。薬学的組成物はまた、凍結乾燥し得、その場合では、薬学的組成物は、概して、凍結保護物質、例えば、スクロース、トレハロース、ラクトース、マルトース、及びマンニトールなどを含む。凍結乾燥された製剤は、周囲温度であっても長期間にわたって保存することができる。

20

【0079】

いくつかの実施形態では、メカノトランスダクション遮断剤は、第2の薬剤、例えば、上記に開示される併用療法とともに、薬学的に許容される賦形剤中で製剤化される。

30

【0080】

主題の薬学的組成物は、経口、皮下、筋肉内、非経口、又は他の経路で投与され得、他の経路は、例えば、経口、直腸、鼻、（経皮、エアロゾル、頬側、及び舌下を含む）局所、腔、（皮下、筋肉内、静脈内、及び皮内を含む）非経口、膀胱内、又は罹患器官内への注射を含むが、これらに限定されない。

【0081】

活性剤のそれぞれは、約0.1 µg、0.5 µg、1 µg、5 µg、10 µg、50 µg、100 µg、500 µg、1 mg、5 mg、10 mg、50 mg、100 mg、250 mg、500 mg、又は750 mg以上の単位用量で提供され得る。

40

【0082】

薬学的組成物は、単位剤形で投与され得、当該技術分野で周知のいずれかの方法によって調製され得る。そのような方法は、メカノトランスダクション遮断剤を、1つ以上の副成分を構成する薬学的に許容される担体又は希釈剤と組み合わせることを含む。薬学的に許容される担体は、選択される投与経路及び標準的な薬務に基づいて選択される。各担体は、製剤の他の成分と適合性があり、対象に有害でないという意味で、「薬学的に許容される」必要がある。この担体は、固体でも液体であってもよく、種類は、一般に、使用されている投与の種類に基づいて選択される。

【0083】

50

好適な固体担体の例としては、ラクトース、スクロース、ゼラチン、寒天、及びバルク粉末が挙げられる。好適な液体担体の例としては、水、薬学的に許容される脂肪及び油、アルコール、又はエステル、エマルション、シロップ、若しくはエリキシル剤、懸濁液、溶液及び／若しくは懸濁液、並びに非発泡性顆粒から再構成される溶液及び／若しくは懸濁液、並びに発泡性顆粒から再構成される発泡性調製物を含む他の有機溶媒が挙げられる。そのような液体担体は、例えば、好適な溶媒、防腐剤、乳化剤、懸濁化剤、希釈剤、甘味料、増粘剤、及び融解剤を含有し得る。好ましい担体は、食用油、例えば、トウモロコシ油又はキャノーラ油である。ポリエチレングリコール、例えば P E G も良好な担体である。

【0084】

10

本開示の投与レジメンを提供する任意の薬物送達デバイス又はシステムが使用され得る。多種多様な送達デバイス及びシステムは、当業者に既知である。

【0085】

キット

また、本開示に記載される方法を実施するためのキット。概して、主題のキットは、上記のような上記の薬学的組成物と、皮膚移植片ハーベスタと、を含み得る。薬学的組成物は、特定の送達デバイス内に含有され得る。送達デバイスは、パッチ、ガーゼドレッシング、透明フィルムドレッシング、フォームドレッシング、ヒドロコロイドドレッシング、アルギネートドレッシング、複合ドレッシングなどを含むが、これらに限定されない。

【0086】

20

本開示の皮膚移植片ハーベスタは、分層皮膚移植片を生成することが可能ないずれかの皮膚移植片ハーベスタである。本開示における使用が見出される皮膚移植片ハーベスタは、外科手術ナイフ、振動 G o u l i a n ナイフ、気動デルマトーム、電動デルマトームなどを含むが、これらに限定されない。

【0087】

主題のキットは、本開示の方法を実行するための構成要素のいずれかの組み合わせを含むことができる。主題のキットの構成要素は、混合物として存在してもよく、又は別個の実体であってもよい。いくつかの場合では、構成要素は、凍結乾燥混合物として存在する。いくつかの場合では、構成要素は、液体混合物として存在する。いくつかの場合では、構成要素は、ヒドロゲルなどの半販売混合物として存在する。主題のキットの構成要素は、いずれかの組み合わせで、同じ容器内にあってもよく、又は別個の容器内にあってもよい。

30

【0088】

主題のキットは、（ある実施形態では）主題の方法の実施についての説明書を更に含む得る。これらの説明書は、主題のキット内に様々な形態で存在し得、それらのうちの1つ以上は、キット内に存在し得る。これらの説明書が存在し得る1つの形態は、例えば、情報が印刷される1枚又は複数枚の紙などの好適な媒体又は基板上、キットのパッケージ中、添付文書などの中印刷情報としてである。これらの説明書の更に別の形態は、情報が記録されたコンピュータ可読媒体、例えば、ディスク、コンパクトディスク（C D）、フラッシュドライブなどである。存在し得るこれらの説明書の更に別の形態は、ウェブサイトアドレスであり、ウェブサイトアドレスは、リモートサイトでの情報にアクセスするために、インターネットを介して使用され得る。

40

【0089】

以下の実施例は、例示として提供され、限定として提供されるものではない。

【実施例】

【0090】

以下の実施例は、どのように本発明を作製及び使用するかについての完全な開示及び説明を当業者に提供するために記載され、本発明者らが本発明者らの発明と考えるものの範囲を限定することは意図されておらず、以下の実験が、実行される全て又は唯一の実験であることを表すことは意図されていない。使用される数字（例えば、量、温度など）に対

50

する正確性を確保する努力がなされているが、ある程度の実験誤差及び偏差が考慮されるべきである。別様に示されない限り、部とは重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏であり、圧力は大気圧又はほぼ大気圧である。

【0091】

分子及び細胞生化学における一般的な方法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001)、Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999)、Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996)、Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999)、Viral Vectors (Kaplift & Loewy eds., Academic Press 1995)、Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press, 1997)、及びCell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998)などの標準的な教本に見出され得、それらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。本開示で言及されるか又は関連する方法の試薬、クローニングベクター、細胞、及びキットは、BioRad、Agilent Technologies、Thermo Fisher Scientific、Sigma-Aldrich、New England Biolabs (NEB)、Takara Bio USA, Incなどの商業的な供給業者、並びに例えばAddgene, Inc.、American Type Culture Collection (ATCC)などのリポジトリから入手可能である。

10

20

【0092】

I. メカノトランスダクションを破壊することは、分層皮膚移植における線維化及び拘縮を減少させる

A. 要約

熱傷及び他の外傷性傷害は、かなりの生物医学的負担を表す。深在性傷害のための現在の標準治療は、自家分層皮膚移植 (STSG) であり、STSGは、拘縮、異常な色素沈着、及び生体力学的機能の損失を頻繁にもたらす。現在、STSG後の線維化及び拘縮を予防することができる有効な療法はない。ここで、本発明者らは、STSGの臨床的に関連するブタモデルを開発し、治療に参与するブタ細胞集団を、単一細胞分解能で包括的に特徴付けた。本発明者らは、標準分層皮膚移植片における炎症促進性及びメカノトランスダクションシグナル伝達経路の上方調節を特定した。メカノトランスダクションを、小分子接着斑キナーゼ (FAK) 阻害剤を使用して遮断することによって、本発明者らは、治療を促進し、拘縮を低減し、瘢痕形成を軽減し、コラーゲンアーキテクチャを回復させ、最終的には、移植片生体力学的特性を改善した。急性メカノトランスダクション遮断は、骨髓系CXCL10媒介性抗炎症を、CXCL14媒介性骨髓系及び線維芽細胞動員の減少で上方調節した。より後期時点で、機械的シグナル伝達は、線維芽細胞を、線維化促進分化運命に向けて移行させたが、メカノトランスダクションの破壊は、間葉系線維芽細胞分化状態を調整して、これらの応答を遮断し、代わりに、線維芽細胞を、非創傷皮膚と類似の再生促進脂肪生成状態に向けて駆動した。次いで、本発明者らは、これらの2つの異なる線維芽細胞転写トラジェクトリを、ヒトの皮膚、ヒトの瘢痕、及びヒトの皮膚の三次元器官型モデルにおいて確認した。まとめると、メカノトランスダクションの薬理的遮断は、STSG後の大型動物治療を、早期抗炎症性及び後期再生転写プログラムの両方を促進することによって著しく改善し、非創傷皮膚と類似の治療した組織をもたらした。FAK阻害は、外傷性及び熱傷傷害のための現在の補足標準治療である。

30

40

【0093】

50

B. 材料及び方法

1. 研究設計

研究の全体的な目標は、大型生物における線維化の分子ドライバーを特定し治療的に標的として、STS G後の治癒転帰を改善することであった。各ブタ（ $n=5$ ）は、6つのSTS G（ $n=$ 合計30個のSTS G生物学的レプリケート）を受容した。処置条件を、各ブタ背側にわたる異なるSTS Gにランダムに割り当てた。様々な瘢痕特性（創傷拘縮、VAS、再上皮化、及び生着）の全ての評価を、観察者に盲検化された画像を使用して実行した。コラーゲンアーキテクチャの分析を、不偏の様式で、定量的コンピュータアルゴリズムCurveAlign及びCT-FIREを使用して実行した。10X genomicsのscRNA-seqデータを、処置群について盲検化されたStanford Functional Genomics Facilityによって捕捉及び配列決定した。scRNA-seqデータを、scRNA-seqデータのクラスタリング及び埋め込みのための定量的分析パッケージであるSeuratを使用して分析した。インビトロ実験については、（ $n=15$ ）ヒトコラーゲンヒドロゲル生物学的レプリケート、（ $n=6$ ）ブタヒドロゲル生物学的レプリケートを作製し、各ヒドロゲルを、異なる処置群にランダムに割り当てた。除外されたデータはなかった。これらの試料サイズは、処置の効果を一連の変数にわたって検出するのに十分な大きさであった。全ての動物作業を、Stanford APLAC及びAAALACガイドライン（APLACプロトコル31530及び32962）に従って実行した。ヒト組織試料を、IRB #54225下で、そうでなければ試料が廃棄される手順から収集した。患者識別情報を、試料のうちのいずれについても記録しなかった。

【0094】

2. STS Gのための技術移転ブタモデルの開発

本発明者らは、熱傷創傷及び他の軟部組織欠陥の臨床治療に一般に適用される外科的技法を使用する新規のブタSTS Gモデルを開発した。最初に、本発明者らは、 25 cm^2 の全層切除創傷を、成体赤Durocブタの背上に作り、下にある筋膜を無傷のままにした。同じ外科手術において、本発明者らは、臨床グレードの電気デルマトーム（Zimmer Biomet）を使用して、薄STS G（0.01インチ）を、同じブタから採取した。最初に、ドナー部位の非創傷皮膚を潤滑し（Surgilube）、デルマトームを、皮膚の上に制御された速度で通した。得られた皮膚を、Skin Graft Carrier（Dermacarrier II、Zimmer 00770800010）上に配置し、Skin Graft Mesher（Zimmer 7701）を介してゆっくり供給して、1:1.5の比のメッシュ移植片を作製した（41）。移植片を、移植片キャリア上に慎重に広げ、創傷床の露出した筋膜上に配置した。皮膚ステープル（Covidien 8886803712）を使用して、移植片を創傷床に固定した（1縁当たり約5つのステープル）。移植片を、3つの層のワセリンガーゼ（Xeroform、Covidien SH84-433605）で被覆して、移植片が乾燥するのを防止し、また、細菌感染を予防した。ボルスタードレッシングを、VAC Granufam（Small Dressing Kit、Acelity M8275065）を $5.5\text{ cm} \times 5.5\text{ cm}$ の正方形に切断することによって調製し、ガーゼ及びSTS Gの上に、追加の皮膚ステープルで堅固に固定した。最後に、Telfa非接着性ドレッシング（Covidien 1961）及びTegaderm接着性ドレッシング（3M 1624W）を使用して、ボルスターズポンジドレッシングを被覆した。刺激を予防するために、かつドレッシングに影響する動物能力を最小にするために、個々のブタに適合したカスタム設計ポリエステルジャケットを使用した（Lomir Biomedical Inc）。動物に、 10 mg/kg のアモキシシリンを、手術後に1日2回、合計5日間経口投与した。

【0095】

処置実験については、（ $n=5$ ）ブタを使用し、各ブタは、合計6つのSTS Gを受容した。手術後90日目の実験のための各ブタについて、STS Gを、FAKIヒドロゲル

、ブランクヒドロゲル、又はヒドロゲルなし（全てのSTSGのために使用される標準ドレッシング）のいずれかを等しく受容するようにランダムに割り当て、処置条件を、各ブタ背側にわたる異なるSTSGにランダムに割り当てた。手術後7日目及び手術後14日目の実験のための各ブタについて、STSGを、FAKIHドロゲル又はヒドロゲルなしのいずれかを等しく受容するようにランダムに割り当てた。全ての実験について、処置条件を、各ブタ背側にわたる異なるSTSGにランダムに割り当てて、いずれもの位置効果を最小にした。ヒドロゲルを、標準ドレッシング前に、STSGの上に適用した（ワセリンガーゼ+ボルスター スポンジ+Telfa+Tegaderm+カスタムジャケット）。滅菌ヒドロゲルを、適用前に、滅菌生理食塩水中に予め浸漬した。STSGを、最初の3日間静置した。次いで、ドレッシング及びヒドロゲルを、初期の傷害後の最初の3週間、第3週目まで1日おきに交換した。これらのドレッシング交換のそれぞれを、滅菌条件下で実行した。皮膚ステープルを、スキンステイプラーリムーバー（3M MMSR3Z）で除去し、創傷及び移植片を、滅菌生理食塩水で穏やかに洗浄した。写真を、各ドレッシング交換時に撮影し、ヒドロゲル及びボルスタードレッシングを、新しいドレッシングで置換した。動物を、各ドレッシング交換のために短期間鎮静させた。

10

【0096】

3週間後に、ドレッシング（及びヒドロゲル）を、1週間に2回、3か月目まで交換した。STSGを、もはやボルスタードレッシングせず、代わりに、従来のドレッシングを使用した（Telfa+Tegaderm）。動物内の各STSGを、組織学的及び分子的评价のために、試験の終了時に生検した。

20

【0097】

3. 統計

統計分析を、Prism8（GraphPad、San Diego, California）において実行した。2つの試料を比較するときに、t検定を使用した。3つ以上の試料を比較するときに、一元又は二元配置分散分析（ANOVA）のいずれか、及びデュエキーの多重比較検定を使用した。データを、平均値±SEMとして提示する。0.05未満のP値を、統計学的に有意であると考えた。

【0098】

C. 結果

1. 自家分層皮膚移植のブタモデル

本発明者らは、熱傷創傷及び他の軟部組織欠陥の臨床治療に適用される標準化された外科的技法を使用する臨床的に関連するブタSTSGモデルを開発した。本発明者らは、赤Durocブタが、ヒトの皮膚生理学、皮膚創傷治癒動態、及び傷害後の瘢痕形成を密接に再現すること（29、37）に起因して、それを使用することを選択した（図1）。ヒト及び赤Duroc皮膚は、類似の厚さ及び生体力学的特性を有し、小型動物モデルとは異なり、両方は、厚い線維化瘢痕組織を発達させ、これが、経時的に剛性になり拘縮することによって、深在性真皮傷害が治癒する（38）。

30

【0099】

重度の熱傷などの全層傷害を治療するために、外科医は、しばしば、STSGを適用する前に、壊死傷害組織を切除して、下にある筋膜を露出させる（39、40）。これを模倣するために、本発明者らは、25cm²の全層切除創傷を、成体赤Durocブタの背上に作り（図1、A及びB）、下にある筋膜を無傷のままにした。同じ外科手術において、本発明者らは、STSG（0.01インチ）を、臨床グレードの電気デルマトーム（Zimmer Biomet）を使用して採取し、得られた移植片を1:1.5の比でメッシュ状にした（41）（図1C）。臨床的に、STSG（約0.01インチ）は、通常、表皮及び表在性真皮を含有するように採取され、ドナー部位が再上皮化及び治癒することを可能にする（41、42）。次いで、これらのSTSGを、生着を最大にするためにワセリンガーゼ、ボルスタードレッシング、及び皮膚ステープルを使用して、背側創傷に直接適用した（図1D）。各動物はまた、研究全体にわたって、カスタムメイドの圧縮ジャケットを着用した。全てのSTSGは、完全な生着（組み込み）を経た。本発明者らは、

40

50

初期に、早期治癒期中のヒト S T S G の特徴である治癒移植片の典型的な「メッシュ」外観を観察し、続いて、かなりの移植片拘縮及び瘢痕拘縮、並びに色素沈着過剰及び粗いテクスチャを観察した（図 1 E）。これらの観察は、ヒトにおける S T S G 後の皮膚治癒及び拘縮の時間経過と一致した（43）。

【0100】

2. ブタ皮膚組織についてのカスタム単一細胞 R N A 配列決定方法は、瘢痕化に寄与する細胞亜集団を特定する

S T S G は、正常な皮膚外観を回復させず、代わりに、永久的な瘢痕拘縮、並びに過剰な線維化、色素沈着過剰、及び隆起した肥厚性瘢痕（H T S）形成を、手術後（P O D）90 日目で示した（図 2 A）。具体的には、S T S G は、厚い真皮を有し、厚い真皮は、より高度に整列したコラーゲン線維及びより少ない真皮付属器を有し、これらは全て、線維化治癒の古典的な徴候である。対照的に、正常な非創傷皮膚は、ランダムに整列した「バスケット織り」コラーゲンアーキテクチャを有した（* P < 0.05）（図 2、A 及び B）。S T S G はまた、より多くの線維化促進筋線維芽細胞を含有することが見出された（* P < 0.05）（図 2、A 及び B）。

10

【0101】

線維化 S T S G と非創傷皮膚との間の差を駆動した細胞及び分子変化を更に調査するために、本発明者らは、完全な治癒後に、s c R N A - s e q を、10 X G e n o m i c s プラットフォームを使用して実行した（図 2 C）（44、45）。以前の研究は、s c R N A - s e q を、非創傷ヒト皮膚において実行したか（46～48）、又はヒトケロイドをヒト瘢痕と比較した（49）が、いずれの研究も、以前に、線維化組織を、非創傷皮膚に対して単一細胞分解能で直接比較していない。高品質の細胞を収集するために、本発明者らは、本発明者らの以前に公開された方法を最適化し、ブタ組織を、後期段階（手術後 90 日目）S T S G 瘢痕及び正常な非創傷皮膚の両方から採取した（44）。

20

【0102】

本発明者らは、カスタムブタトランスクリプトームを、S u s S c r o f a ゲノム（E n s e m b l e, v 1 1.1）（50）を使用して、非モデル生物についての 10 X プロトコル（44）に従って生成して作製し、本発明者らは、これを、修正された 10 X C e l l R a n g e r パイプラインの一部としての実装についての説明書とともに一般に入手可能にした（Data and Materials Availability ステートメントを参照されたい）。簡潔には、全てのリード断片を、標準塩基マッピング閾値（51）、続いて、単一細胞逆多重化及び固有分子識別子（U M I）バッチ補正（52）を使用して、このトランスクリプトームにアライメントし、本発明者らが、各ブタ試料についての単一細胞 m R N A カウントマトリックスを生成することを可能にした。両方の群からの個々の細胞についてのデータを、盲検化されたルーヴァンベースのクラスタリングに供し、二次元 U M A P（均一多様体近似及び射影）空間（45）内に埋め込んだ（図 2 C）。合計 7,700 個の細胞を捕捉し、線維芽細胞、骨髄系細胞、リンパ系細胞、内皮細胞、血管平滑筋細胞（V S M C）、及び角化細胞の異なる集団を、自動化細胞型アノテーションを使用して、S i n g l e R パッケージを介して特定し（図 2 D）、細胞型特異的マーカー遺伝子で検証した（図 9 A）。

30

40

【0103】

本発明者らは、線維芽細胞が、400 個超の差別的に発現された遺伝子（D E G；S T S G と皮膚との間の 0.5 超の平均対数倍率変化）を有し、骨髄系及びリンパ系細胞が、S T S G と皮膚との間の 200 個超の D E G を有したことを観察した（図 2 E、図 9 B）。対照的に、他の細胞型（角化細胞、内皮細胞、V S M C）は、100 個以下の D E G を有し、これは、それらが、正常な皮膚と皮膚移植片との間で転写的に異ならないことを示した（図 2 E；図 9、C 及び D）。これらの知見は、この後期時点での S T S G における線維増殖性及び炎症性細胞活性の持続的な上昇を示唆し、非創傷皮膚と比較された S T S G における筋線維芽細胞の数の増加の本発明者らの観察を実証した（図 2、A 及び B）。

【0104】

50

3. STSG後の線維化は、メカノトランスダクションシグナル伝達の増加に関連する

最初に、本発明者らは、骨髓系細胞を、本発明者らのSTSG及び非創傷皮膚scRNA-seqデータセットにおいて調査した。本発明者らは、過剰提示分析(ORA)のためのパイプラインであるGenetrail3を使用して、シグナル伝達経路の差次的調節を調査した(53)。最初に、本発明者らは、STSG骨髓系細胞が、CXCL8及びCD86などの炎症性マーカーの上方調節、並びに免疫応答活性化シグナルトランスダクション(GO-BP:0002758)及び炎症性応答経路(WP453)についてのエンリッチメント(54)によって特徴付けられる炎症性表現型を実証したことを観察した(図2、F及びG)。骨髓系STSG細胞はまた、TNFなどの線維化駆動遺伝子についてエンリッチメントされ(55)、ERK1/ERK2及びEGF/EGFR経路などの一般的なメカノトランスダクション経路の上方調節(56)を実証した(図2、F及びG)。これらの経路は、FAKの下流にあり、これらの免疫細胞が、より後期の時点でもメカノ応答性であることを示唆する(57、58)。

【0105】

次に、本発明者らは、90日間にわたる完全な治癒後のSTSG及び非創傷皮膚における線維芽細胞の転写プロファイルを比較した(図2H)。これらは、筋線維芽細胞関連及びコラーゲン産生遺伝子、例えば、(平滑筋アルファアクチン α SMAをコードする)ACTA2、RUNX1(runt関連転写因子1)、TAGLN(トランスゲリン)、及びCOL11A1(コラーゲンXI型アルファ1鎖)の発現における著しい上昇を明らかにし、これは、STSGにおける線維芽細胞が、コラーゲン産生及び線維化の増加に関連するより収縮性の筋線維芽細胞表現型に分化したことを示唆し、これはまた、本発明者らの免疫蛍光染色(59)によって支持された(図2、A、B、及びI;図9E)。STSG線維芽細胞は、メカノトランスダクション、及び瘢痕形成を駆動するコラーゲン産生/組織化に関連する遺伝子セット、例えば、機械的刺激への応答(GO-BP:0009612)、接着斑(WP306)、ECM集合(GO-BP:0030198)、YAPシグナル伝達(WP3967)、TGF β シグナル伝達への応答(WP560)、及び骨化(GO-BP:0001503)に関連する遺伝子セットのエンリッチメントを示した(図2I)。STSG線維芽細胞はまた、脂質生成(WP236)、脂質輸送(GO-BP:0006869)、及び内皮細胞移動の調節(GO-BP:0010594)に関連する遺伝子の下方調節によって特徴付けられ、これらの遺伝子は、再生脂肪生成マーカー、例えば、APOE(アポリポタンパク質E)、APOD(アポリポタンパク質D)、CLEC3B(c型レクチンドメインファミリー3メンバーB)、及びAGT(アンジオテンシノーゲン)(60)によって定義された(図2J、図9E)。これらの経路及び遺伝子は、STSG線維芽細胞が、正常な皮膚において観察されるより恒常性の静止状態ベースラインから離れるように移行したことを示唆した。

【0106】

線維芽細胞は、概して、コラーゲン沈着及び瘢痕拘縮の一次媒介物質と考えられるが(26)、最近の研究は、線維化プロセスの調節(及び持続)における免疫細胞の役割を示唆している(61~64)。マクロファージが、ある状況では、機械的合図に応答するというある程度の証拠があるが、これらの研究は、矛盾する結果が得ており、文献は、機械的歪みが、炎症促進性及び抗炎症性応答の両方をもたらすことを示唆する(57、58)。全体として、本発明者らのトランスクリプトームデータは、STSG後に発達する組織が、非創傷皮膚とは異なり、主に、炎症性細胞及び線維芽細胞の両方におけるメカノトランスダクションシグナル伝達の増加によって特徴付けられることを示し、これは、STSGの文脈において、共有された共通の経路を示唆した。メカノトランスダクションの重要性は、開放創傷の治癒中に以前に特定されているが(23、25~27)、皮膚移植後のメカノトランスダクションシグナル伝達の寄与は、依然として調査される必要がある。STSG転帰を改善する治療法を開発するために、本発明者らは、メカノトランスダクションシグナル伝達を標的とすることが、治癒を改善し得、STSG後の瘢痕形成を低減し得ると仮定した。

10

20

30

40

50

【0107】

4. メカノトランスダクションを破壊することは、STS Gにおける線維化を、拘縮を低減し、生着を促進し、生体力学的特性を改善することによって軽減する

STS Gで治療されたブタ創傷におけるメカノトランスダクションを阻害するために、本発明者らは、FAKI (VS-6062) を、創傷治癒中の持続薬物放出に最適化された生分解性生体適合性軟性プルランベースのヒドロゲル (23) を使用して送達した (図3、A及びB)。FAKは、下流細胞内経路へのインテグリン-マトリックス力の重大なトランスデューサーである (26)。VS-6062 (旧Pfizer PF-00562271) は、強力なATP競合的次世代小分子FAKIであり、これは、腫瘍成長を遮断し、進行固形腫瘍に対する第I相治験を経ている (ClinicalTrials.gov 識別子: NCT00666926) (65)。VS-6062はまた、広範囲の他のキナーゼ標的に対して、FAKについての強い選択性を有し (66、67)、本発明者らは、以前に、本発明者らのヒドロゲルにおけるこの薬物の放出を特徴付けている (23、26)。ヒドロゲルは、VS-6062を含有し、ヒドロゲルを、生理食塩水中で再水和させて、それをヒドロゲルドレッシングに変換し (図10A)、ヒドロゲルドレッシングは、薬物をゆっくり放出し、薬物は、STS G真皮に経時的に浸透する (図S2、B及びC)。他のヒドロゲルと類似して、このヒドロゲルドレッシングは、創傷又はSTS Gを被覆し、乾燥を防止し、湿潤創傷治癒を容易にする (図3B)。

【0108】

本発明者らは、瘢痕の表面積を測定し、FAK阻害が、瘢痕拘縮を、早期時点で遮断したことを見出した (手術後7日目、 $P=0.09$ 、手術後21日目、 $*P<0.05$) (図3、C及びD)。対照的に、STS G及びブランクヒドロゲルで処置されたSTS Gは、即時の瘢痕拘縮を、手術後7日目までに有し、これは、経時的に増加し続けた。手術後28日目で、未処置及びブランクヒドロゲル処置STS Gは、70%超拘縮したが、FAKI処置STS Gは、30%のみの拘縮を示した (図3D)。これらの観察は、統計的に有意であり、全ての時点にわたって続いた ($*P<0.05$)。

【0109】

3人の盲検化された形成外科医のパネルは、STS G再上皮化及び瘢痕外観を、視覚的アナログスケール (VAS) を使用して定量化した。VASは、形成外科医によって、瘢痕重症度を層別化し、瘢痕外観を視覚的に評価するために一般に使用される瘢痕スコア化システムである (0~100の範囲、0=非創傷皮膚、及び100=肥厚性瘢痕) (68)。これらの盲検スコアから、本発明者らは、FAKIヒドロゲルが、手術後7日目でのSTS Gの間質性再上皮化を加速したことを見出した ($**P<0.01$) (図3E)。FAKIヒドロゲルはまた、STS G創傷の線維化外観を経時的に有意に改善し、これは、瘢痕形成の減少を実証した ($*P<0.05$) (図3F)。

【0110】

組織c u t o m e t e r (皮膚の粘弾性特性を、負圧での変形を介して測定する非侵襲性臨床機器) を使用して、本発明者らは、FAKI処置STS Gがまた、未処置STS Gよりも少ない硬度及び剛性を有し ($*P<0.05$) (図3G)、非創傷皮膚と類似の生体力学的特性を示したことを見出した。まとめると、これらのデータは、細胞メカノトランスダクション経路を破壊する早期介入が、拘縮、剛性、及び瘢痕外観を含む、STS G後に典型的に発生する一連の合併症を軽減することを実証した。

【0111】

5. STS G後のメカノトランスダクションの薬理的遮断は、非創傷皮膚と類似のコラーゲンアーキテクチャを回復させる

これらの肉眼的な解剖学的知見を確認するために、本発明者らは、組織学的分析を使用して、FAK阻害後の組織アーキテクチャにおける変化を観察した (図4A)。メカノトランスダクションの薬理的遮断は、非創傷皮膚における典型的なバスケット織り様のコラーゲン線維ネットワークと類似して、深在性真皮におけるより短いよりランダムに整理したコラーゲンを有意に促進した ($*P<0.05$) (図4、B~E; 図11、A及びB

10

20

30

40

50

）。更に、F A K 阻害は、表在性及び深在性真皮の両方にわたる全体的なコラーゲン沈着を、線維幅及び全体的なアーキテクチャ複雑性を減少させることによって減少させた（ $^{**}p < 0.01$ 、 $^{***}p < 0.001$ ）（図 4 F；図 1 1、B、及び C）。全体として、F A K I 処置 S T S G は、発達する瘢痕の厚さ全体にわたる、非創傷皮膚のものと類似の真皮リモデリングを実証した。

【0112】

6. メカノトランスダクション遮断は、骨髄系細胞における抗炎症性経路の急性上方調節を引き起こす

これらの巨視的及び顕微鏡的な組織変化を駆動する機構を理解するために、本発明者らは、どのようにメカノトランスダクションの破壊が、細胞内での治癒に影響するかを調査した（図 5 A）。未処置（対照）S T S G 及びブランクヒドロゲルで処置された S T S G は、広範囲の臨床瘢痕測定にわたって差を実証しなかったため（図 3 及び 4）、本発明者らは、未処置 S T S G 及び F A K I で処置された S T S G からの細胞における本発明者らの s c R N A - s e q 分析に着目した。最初に、本発明者らは、S T S G の 7 日後のブタ組織における S T S G 組み込みの早期段階を調査した（図 5、A 及び B）。再び、本発明者らは、処置及び未処置 S T S G の両方における多様な細胞環境を捕捉した（図 5、C 及び D；図 1 2）が、創傷治癒のこの早期炎症期中に、早期時点の単球系譜細胞（マクロファージ、単球、樹状細胞）が、最も多くの D E G（170 個超）を有し（図 5 E）、続いて、好中球及びリンパ系細胞（それぞれ約 100 個）であった（他の全ての細胞型は、75 個未満であった）。予想外に、線維芽細胞は、約 50 個の D E G のみを有し、これは、線維芽細胞遺伝子発現における実質的な差がより後期に観察されたが、これらの早期時点でのその発現における強い差がなかったことを示した。例えば、両方の条件において、線維芽細胞は、C O L 1 A 1、C O L 3 A 1、（フィブロネクチンをコードする）F N 1 などの細胞外マトリックスマーカー、及び C X C L 1 4 などの炎症性ケモカイン（69、70）の類似の発現を示した（図 5 F）。これらの知見は、線維芽細胞が、このモデルにおける治癒の早期段階中に、機械的シグナル伝達によって劇的に改変されないことを示唆した。

【0113】

代わりに、骨髄系細胞（単球系譜及び好中球）において、メカノトランスダクションを阻害することは、様々な有益な転写移行を誘発した（図 5、G 及び H）。例えば、S T S G 単球系譜細胞は、C O L 1 A 1、C O L 3 A 1、及び F N 1 の発現の増加が、F A K 阻害で抑止されたことを実証し（図 5 I）、これは、F A K 阻害が、骨髄系細胞からの早期 E C M 沈着を減少させたことを示唆した。これらの知見は、以前に調査されていない、細胞外マトリックス形成に寄与する骨髄系細胞の能力を示唆する。

【0114】

メカノトランスダクションの破壊はまた、（インターフェロングamma誘導性タンパク質 10；I P - 10 をコードする）骨髄系 C X C L 10 発現を上方調節した（図 5 I）。C X C L 10 は、線維芽細胞移動を炎症促進性マーカーに応答して阻害する分泌型ケモカインである（71）。I P - 10 療法は、線維化を低減するために臨床的に以前に使用されている（72～74）。F A K 阻害はまた、S O C S 3 発現を誘導した（図 5 I）。これは、炎症性 I L 6 発現を減弱することが既知である（75）。差次的シグナル伝達経路（53）を調査するために G e n e t r a i l 3 を使用して、本発明者らは、F A K 阻害された骨髄系細胞が、I L - 10 抗炎症性経路（W P 4495）、インターフェロナルファ／ベータシグナル伝達（W P 1835）、及び古典的な抗体媒介性補体活性化（G O - B P：0006958）に関連する遺伝子セットのエンリッチメントを示したことを観察した（図 5 J）。

【0115】

次いで、本発明者らは、ブタ S T S G 組織を経時的に（手術後 7、14、90 日目）収集し、S T S G 治癒の時間経過を、タンパク質レベルでマッピングした。免疫蛍光染色を使用して、本発明者らは、最初に、組織内の F 4 / 80 陽性マクロファージ集団の存在を

調査した（図5K）。未処置STS Gは、有意に増加した数のマクロファージを、早期（手術後7日目、*** $P < 0.001$ ）及び後期（手術後90日目、* $P < 0.05$ ）時点で含有し、これは、慢性増殖性炎症性応答を示し、本発明者らの以前の骨髄系細胞知見を支持した（図2、C～G）。FAKIで処置されたSTS Gは、浸潤性炎症性細胞の数を、早期（*** $P < 0.001$ ）及び後期（* $P < 0.05$ ）時点の両方で有意に減少させた（図5、K及びL）。残った炎症性細胞のうち、メカノトランスダクションの破壊は、手術後7日目でのIP-10（CXCL10）の分泌を有意に（* $P < 0.05$ ）上方調節し（図5、K及びL）、これは、創傷内への線維芽細胞動員の経時的減少、及び下流線維化の低減を示した。

【0116】

軟部組織傷害後の急性炎症に関与する骨髄系細胞は、最近、自己受容、触覚、バランス、及び聴覚を含む、体におけるいくつかの生理学的プロセスの文脈において、機械的感受性があることが特定されている（3、76、77）。創傷治癒の文脈内で、最近の研究は、メカノトランスダクションが、骨髄系転写ダイナミクスに影響し得、治癒潜在性を改変し得ることを示唆している（57、58、78）が、機構は、依然として完全に理解されていない（79）。ここで、本発明者らは、メカノトランスダクションの破壊が、炎症性動員を低減しCXCL10媒介性抗炎症性転写プロファイルを促進することによって、線維芽細胞よりも骨髄系細胞へのより大きい効果を早期時点で有することを観察した。ECM産生骨髄系細胞は、過剰な量でSTS Gに動員され、これは、皮膚移植片組み込み中の骨髄系細胞コラーゲン産生の以前に認められていなかった重要性を示した。これらの知見は、機械的感受性がある骨髄系細胞がまた、再生促進表現型を促進することによって、メカノトランスダクション遮断に応答することを実証した。

【0117】

7. メカノトランスダクションの破壊は、筋線維芽細胞転写状態を、再生分化に向けて移行させる

次に、早期時点でのこれらの差で、本発明者らは、後期時点でのメカノトランスダクション遮断の役割を理解することを試みた。線維芽細胞は、STS G瘢痕と正常な皮膚との間の最も多くの遺伝子変化を90日目で行ったため（図2E）、本発明者らは、線維芽細胞分化状態へのFAK阻害の効果を具体的に調査した。最初に、本発明者らは、RNA速度分析を、scVelo及びCellRankを使用して実行した（図6、A及びB）。RNA速度分析は、RNA速度情報とトランスクリプトーム類似性とを組み合わせ、細胞運命潜在性のグローバルマップを計算し、グローバルマップは、初期及び終末細胞状態を明らかにする（図13A）（80、81）。CellRankは、6つの転写的に異なる細胞系譜を特定し（図6B）、これらは、（*で標識される）初期基礎状態で起こった。FAKI処置STS Gからの線維芽細胞は、非創傷皮膚からのものとの転写類似性を、主に、系譜1及び2において示したが、正常なSTS Gからの細胞は、この[皮膚及びSTS G+FAKI]細胞状態から離れるように、UMAP-1軸に沿って、4つのより異種性の系譜（3、4、5、及び6）に移行した（図6、A及びB；図13、A～C）。線維芽細胞系譜3及び4は、より高い潜伏時間スコア及び速度ベクター長を示し（図6C、図13D）、これは、より進行した分化状態及びより高い割合のスプライシングされた成熟RNAを示した。したがって、系譜1、2、3、及び4を、更なる分析のために選択した。

【0118】

本発明者らは、運命確率推定と、潜伏時間に沿う擬似時間的順序付けとを組み合わせ、遺伝子発現を、終末状態を導くトラジェクトリに沿って視覚化した。これは、再生系譜1及び2、並びに線維化系譜3及び4についての系譜ドライバーを明らかにした（図6、D～F；図13、A及びB）。線維化状態に沿って、本発明者らは、線維化軟骨形成マーカーTHBS2（トロンプスポンジン2；状態3及び4に沿って）、THBS4（状態3）、ACAN（アグリカン；状態3）、ENPP1（エクトヌクレオチドピロホスファターゼ1）、及び筋線維芽細胞分化マーカーACTA2（状態4）の上方調節を観察し（8

2～84)、これは、機械的力が、瘢痕形成中に、線維芽細胞のサブセットを、より線維化の運命に向けて押すことを示唆した(図6、D～F;図14、E及びF)。アグリカンは、軟骨細胞マーカーであり、THBS遺伝子のファミリーは、トロンボスポンジンをコードし、ECMタンパク質は、細胞-マトリックス結合を容易にし、間葉系軟骨形成及び脂肪生成分化状態を調整することが既知である(85)。STSGにおける最上位のDEGの比較はまた、以前に特定された線維化促進遺伝子、例えば、SFRP2及びTGFB1の上方調節を明らかにした(図14、A～C)(86、87)。SFRP2は、健常ヒト皮膚scRNA-seqにおいて、高い線維形成潜在性を有する線維芽細胞亜集団として以前に特定されており(46～48)、形質転換成長因子(TGF)β1は、線維化の周知のプロモーターである(88)。これは、収縮性筋線維芽細胞表現型(アクチンフィラメント組織化;系譜3、4)、軟骨細胞分化(系譜3)、及び骨化(系譜3、4)に関する遺伝子セットについてのエンリッチメントによって支持された(図6F、図14D)。STSG線維芽細胞はまた、線維芽細胞動員ケモカインCXCL14を上方調節した(図6F;図14、A～C)。CXCL14は、再生分化を阻害しつつ、線維芽細胞移動及び増殖を刺激することが以前に見出されている(89、90)。

10

【0119】

対照的に、再生系譜1及び2に沿って、FAKI処置STSG及び非創傷皮膚は、遺伝子の類似の発現を実証し、これは、上記の線維化促進遺伝子の抑止、並びにAPOE(状態2)、CLEC3B(状態2)、CD34(状態1)、及びPPARG(ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマ;状態1)スプライシングされていないpre-mRNAの上方調節を示し、これは、再生脂肪生成転写の誘導を示した(91、92)(図6、D及びE)。APOE及びAPODなどのアポリポタンパク質は、脂質輸送及び脂質代謝の主要なマーカーであり、これらのマーカーは、脂質輸送線維芽細胞(リポ線維芽細胞)及び脂肪細胞の両方において発現される(92、93)。アポリポタンパク質は、炎症を減弱することが見出されており、リポ線維芽細胞は、線維芽細胞亜集団であり、この線維芽細胞亜集団は、脂肪組織と相互作用し、正常な組織治癒中に脂肪細胞に分化することができるが見出されている(94)。これらのリポ線維芽細胞はまた、PPARG及びCFD(アディプシンをコードする補体因子D)を発現し、これらはまた、脂質蓄積を促進し、脂質生成の重大な転写因子である(図6E)。STSG(系譜1及び2)におけるFAK阻害はまた、脂肪生成遺伝子セット(脂肪生成、血管新生、上皮細胞移動)及び幹細胞マーカー(CD34及びNT5E)を促進した(図6E;図14、B～D)。これらのマーカーの発現は、非創傷皮膚において見出される発現と一致した。加えて、トロンボスポンジンは、肥厚性瘢痕形成を、TGFB1に依存的な様式で駆動することが見出されており(95)、TGFB1は、脂肪生成を阻害することが見出されている(88)。メカノトランスダクション、トロンボスポンジン、及びTGFのこの下方調節は、デコリン(DCN)などの小型ロイシンリッチプロテオグリカン(SLRP)の上方調節によって更に支持された(図6D、図14A)。SLRPは、瘢痕形成の原線維発生を制御することを助長し、線維化組織と比較して、非創傷皮膚において高度に発現され、TGFB1を阻害して、HTS形成を低減する(87)。

20

30

【0120】

8. メカノトランスダクションは、再生運命の時間的進化を調整する

次いで、本発明者らは、ブタSTSG組織を、一連の時点(手術後7、14、90日目)にわたって収集し、治癒STSG組織内の線維芽細胞タンパク質発現の時間経過をマッピングした。免疫蛍光染色を使用して、本発明者らは、未処置STSGが、早期時点での線維芽細胞動員ケモカインCXCL14の発現の増加を実証し、続いて、後期時点でのCXCL14の有意な増加を実証したことを見出した(手術後90日目;*** $P<0.001$)(図7A)。更に、未処置細胞は、より大きい存在量の軟骨形成マトリックスタンパク質トロンボスポンジン4(THBS4のタンパク質形態)を、手術後7日目(*** $P<0.001$)、手術後14日目(*** $P<0.001$)、及び手術後90日目(* $P<0.05$)にわたって発現した(図7B)。したがって、FAK阻害は、THBS4

40

50

及び C X C L 1 4 発現を減弱し（図 7、A 及び B）、細胞動員及びその後の線維化マトリックス沈着を減少させた。メカノトランスダクションの破壊はまた、C D 3 4 の発現を、後期時点で開始し（図 7 C）、これは、線維芽細胞転写プロファイルが、より可塑的な莖様表現型に向けて移行することを実証した。その後、これらの莖様線維芽細胞は、手術後 1 4 日目（* P < 0 . 0 5）及び 9 0 日目（* P < 0 . 0 5）の両方での脂肪細胞脂質輸送アポリタンパク質 E（A P O E のタンパク質形態）の増加を実証し（図 7 D）、これは、リボ線維芽細胞再生表現型に向かう分化の増加を示した。

【 0 1 2 1 】

これらの知見の潜在的なヒト関連性を確認するために、本発明者らは、患者試料を臨床から収集した。本発明者らは、治癒したヒト S T S G 試料を収集することはできなかったが、ヒト肥厚性瘢痕を収集することができた。本発明者らは、ヒト肥厚性瘢痕が、非創傷皮膚と比較してトロンプスポンジン 4 の有意な増加（* P < 0 . 0 5）を実証し、これは、高度線維化瘢痕組織における細胞外マトリックスタンパク質沈着の上方調節を示したことを見出した。更に、健常ヒト皮膚は、アポリタンパク質 E の有意な増加（* P < 0 . 0 5）を実証し、これは、皮膚内の健常リボ線維芽細胞及び脂肪細胞の存在を示唆した。これらのリボ輸送細胞は、肥厚性瘢痕内に存在しなかった（図 1 5）。

【 0 1 2 2 】

全体として、これらのデータは、傷害後の F A K 阻害が、再生表現型を促進し、線維芽細胞を、線維化状態から離れるように移行させることを実証した。本発明者らは、F A K 阻害及び非創傷皮膚クラスターを導く「再生軸」、並びに反対方向に導き、高度な機械的ストレスを有する環境における未処置 S T S G 線維芽細胞によって特徴付けられる「線維化軸」を特定した。次に、本発明者らは、これらの 2 つのトラジェクトリの存在を、インビトロでの正確に制御された機械的環境において再現することを試みた。

【 0 1 2 3 】

9 . 機械的力の正確な操作は、線維芽細胞転写シグネチャを調整する

本発明者らのグループ及び他のグループは、ブタ創傷及びヒト皮膚の両方が、約 5 ~ 2 0 % の機械的歪みに供されること（9 6、9 7）、並びにこの機械的張力を、物理的包帯で物理的に除荷することが、線維化瘢痕形成が低減することを以前に実証している（3 8）。治癒 S T S G 内の細胞によって経験される機械的歪みの増加が、インビボで観察される同じ線維芽細胞転写状態を誘発するかを決定するために、本発明者らは、歪み（したがって、ストレス）の正確な操作を、いずれもの他の潜在的な交絡因子なしで可能にする、本発明者らの以前に公開された三次元（3 D）器官型瘢痕培養システムを使用した（2 7、9 8）。線維芽細胞を、最初に、ヒト皮膚から単離し、3 D コラーゲン足場内に播種した（図 8 A）。次いで、これらの足場を、1 0 % の歪み（歪み、S）、1 0 % の歪み及び F A K 阻害（歪み + F A K I、S + F A K I）、又は対照としての 0 % の歪み（歪みなし、N S）のいずれかに供した（図 8、A ~ C）。治癒組織が（疼痛に起因して）最大歪みに供されない可能性があると考えられたため、本発明者らは、1 0 % の歪みプロファイルを使用して、平均創傷歪み環境を表した。

【 0 1 2 4 】

ヒト細胞において、本発明者らは、機械的歪みに供された線維芽細胞が、歪みに供されていない線維芽細胞と比較して、線維芽細胞動員 C X C L 1 4 及び線維化 T H B S 4 発現（* P < 0 . 0 5）の両方を上方調節したことを観察した（図 8 B）。歪みに供された線維芽細胞のその後の F A K 阻害は、歪みに供された線維芽細胞と比較して、C X C L 1 4（* P < 0 . 0 5）、T H B S 4（* P < 0 . 0 5）、及び α S M A（** P < 0 . 0 1）発現を有意に減少させ（図 8 B、図 1 6）、また、A P O E（** P < 0 . 0 1）及び C D 3 4（**** P < 0 . 0 0 0 1）の発現を有意に増加させた（図 8 C）。これらの観察は、インビボでの S T S G への F A K I の有益な転写効果を確認した。これらの実験を、ブタ細胞及び s c R N A - s e q を使用して繰り返して、次いで、本発明者らは、歪みに供された線維芽細胞が、コラーゲン（C O L 1 A 1、C O L 3 A 1）及び他の E C M 関連遺伝子（F N 1、A D A M 1 2）、並びに線維化を駆動することが見出されている（

10

20

30

40

50

P O S T Nを含む) マーカーの発現の増加 (99) を実証したことを観察した (図8、D ~ G)。RNA速度を使用して、本発明者らは、(*で示される) 埋め込みの中心から歪み (線維化) 又はS + F A K I (再生) 系譜のいずれかへ放散する2つの分化トラジェクトリを再び特定し (図8、E、及びF)、これは、本発明者らのインビボ分析と一致した (図6、A ~ C; 図13)。また、インビボでの本発明者らの観察 (図6C) と類似して、歪みに供された線維芽細胞は、潜伏時間及び速度擬似時間の両方で進行し、これは、機械的歪みによって誘導された転写における大きい変化を実証した (図8F)。歪みに供された線維芽細胞は、C X C L 1 4、線維化トロンボスポンジン (T H B S 2)、及びコラーゲン (C O L 1 A 1) 発現を上方調節し、F A K 阻害は、これらの線維化促進応答の全てを抑止し、代わりに、A P O E 及び抗線維化遺伝子E G R 1 (初期増殖応答1) 及びP R D X 1 (ペルオキシレドキシン1) の上方調節によって特徴付けられる再生トランスクリプトームシグネチャを実証し (図8、H及びI; 図17)、これは、本発明者らのS T S G (図5及び6) 及びヒト知見 (図8、A ~ C) の両方に一致した。全体として、本発明者らは、生理学的機械的歪みが、ヒト及びブタ線維芽細胞の両方を、インビボで見出される同じ転写プロファイルに向けて押したことを観察し、これは、機械的力を操作することが、大型動物及びヒトの両方において線維化及び再生表現型を直接駆動することを確認した。

10

20

30

40

50

【0125】

まとめると、これらの知見は、大型動物及びヒト瘢痕化を特徴付け、これは、機械的力が、線維芽細胞が異なる線維化促進プログラムを呈することを促進し、線維化促進プログラムが、メカノトランスダクションを阻害することによって防がれ得、非創傷皮膚と類似の再生傾倒に向けて駆動され得ることを実証する。治癒S T S Gにおける線維芽細胞は、皮膚組織内の自然の高い機械的ストレスに供され、機械的ストレスは、その後、メカノトランスダクションシグナル伝達を活性化し、収縮性軟骨形成分化及び線維化コラーゲン形成をもたらす。対照的に、F A K 阻害は、線維芽細胞を、この高いストレス環境から薬理的に保護し、線維化表現型を防止し、より多くの再生脂肪生成表現型を促進する。

【0126】

10. 考察

皮膚移植は、重度の熱傷及び外傷性傷害の治療のための主力であり、熱傷患者の生存を改革した (8)。残念ながら、皮膚移植片は、傷害皮膚の完璧な置換物ではなく、衰弱させる線維化肥厚性瘢痕形成及び重度の拘縮をもたらし得、これらは、複数回の修正外科手術を必要とし得る (8 ~ 12)。加えて、これらの合併症を予防し、移植後の転帰を改善するためのF D A承認の薬理的療法は現在ない (7、13、14)。S T S G治癒を駆動する機構を理解するために、本発明者らは、臨床的に関連する大型動物モデルを開発して、S T S G瘢痕及び非創傷皮膚における細胞環境を特徴付け、S T S Gが、機械的に活性化された免疫細胞及び筋線維芽細胞によって駆動される線維増殖性及び炎症性転写プログラムの持続的な上昇を示したことを見出した。メカノトランスダクション経路は上方調節されることが見出されたため、本発明者らは、メカノトランスダクションが、S T S G後の過剰な線維化及び拘縮を遮断するのに好適な標的であると判断した。

【0127】

ここで、本発明者らは、メカノトランスダクションをF A K阻害を介して調整するための小分子の持続送達、ヒト様ブタモデルにおいて、瘢痕拘縮を低減し、再生真皮リモデリングを促進し、生体力学的皮膚特性を改善するために、S T S Gとともに使用され得ることを実証する。本発明者らは、標準創傷及び皮膚移植片治療において一般的に使用されるヒドロゲル内のこの持続放出形態を作製した (100)。この治療法は、ヒト移植片のための有効な療法であり、これは、現在の標準治療内に組み込まれ得、外傷性及び熱傷傷害を有する患者を助長するための技術移転機会を提供する。

【0128】

瘢痕形成及び治癒を理解するために、本発明者らのグループを含む多くのグループは、広範囲の線維化疾患状態における線維芽細胞の重要な役割を包括的に調査している (23

、25、26、32、33、101、102）。しかしながら、線維芽細胞転写状態は、大型動物線維化の文脈において、又は皮膚移植片治療の一部として、以前に調査されていない。ヒトscRNA-seqの文脈において、いくつかのグループは、以前に、非創傷ヒト皮膚を特徴付け（46～48）、ヒトケロイドと非創傷皮膚を有さないヒト瘢痕とを比較した（49）。しかしながら、線維化組織と、非創傷皮膚又は薬理学的にエンリッチメントされた再生集団とを、単一細胞分解能で直接比較することが欠如している。本発明者らの研究において、本発明者らは、後期段階瘢痕形成中の骨髄系細胞及び線維芽細胞の両方が、非創傷皮膚における細胞からの最大の転写変化を有したことを見出し、本発明者らは、STSGにおける機械的シグナル伝達が、異種性の線維化促進表現型への分化を促進することを特定した。メカノトランスダクションを破壊することによって、本発明者らは、大型動物及びヒト線維芽細胞の間葉系運命傾倒を、これらの収縮性筋線維芽細胞表現型から離れるように、脂肪生成再生分化運命に向けて転換して、非創傷皮膚において少量のランダムに組織化されたコラーゲンを産生する静止状態線維芽細胞の数を回復させる能力を実証した。

10

20

30

40

50

【0129】

本発明者らは、驚くべきことに、メカノトランスダクションシグナル伝達を調整することが、インビボで、線維芽細胞分化を、比較的線維化促進の運命と比較的再生促進の運命との間で直接移行させることができることを特定した。様々な組織内で、完全に分化していると以前に考えられた細胞型である間葉系前駆細胞（MPC）及び筋線維芽細胞の両方が、線維化、骨／軟骨形成、又は脂肪細胞に分化するための脂肪生成のいずれかに向けて押され得る可塑性細胞型であることが見出されている（33、103）。いくつかの以前のインビトロ研究はまた、どのように機械的刺激における変化が、アクチン細胞骨格組織化及びMPC分化に影響するかを調査している。例えば、McBeath et al. は、細胞機械的ストレスの増加が、接着性MPCを骨形成に向けて案内し、非接着性円形MPCが、脂肪生成に向けて案内されたことを見出した（104）。トロンボスポンジはまた、間葉系細胞において、骨／軟骨形成を促進し、脂肪生成を阻害することが見出されている（105、106）。ここで、本発明者らは、これらの線維芽細胞運命を、「線維化－再生の軸」上で、機械的シグナル伝達がこの軸に沿って細胞を押し引きすることで特徴付けた。

【0130】

予想外に、線維芽細胞は、転写活性における大きい変化を、治療の早期段階中に実証しなかった。代わりに、早期時点で、メカノトランスダクションの破壊は、主に、骨髄系系譜細胞を、CXCL10媒介性炎症性及び再生状態に向けて押した。以前の研究は、ケモカインを分泌して炎症性細胞の動員を促進する（26）線維化の「ドライバー」としての（25）メカノ応答性線維芽細胞に着目したが、本発明者らの知見は、治療の異なる段階中の免疫細胞と線維芽細胞メカノトランスダクションシグナル伝達との間のより複雑な相互作用を明らかにした。骨髄系細胞における機械的シグナル伝達を早期時点で制御することは、線維芽細胞表現型に直接影響し得る炎症性シグナルの分泌を調整した。いくつかの最近の研究は、これらの線維化プロセスの調節及び持続における免疫細胞についての役割を示唆したが（61～63）、本発明者らの知見は、骨髄系細胞が、実際に、線維芽細胞を「駆動」する可能性があることを明らかにした。他の線維化疾患状態、例えば、腎線維症、特発性肺線維症、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、又は肝硬変を調査する多くの研究は、典型的に、単離におけるこれらの細胞型のそれぞれの重要性を特徴付けている。本発明者らの知見に基づいて、将来の研究は、広範囲の線維化疾患状態についての治療的及び技術移転転帰を改善するために、両方の細胞型間の相互作用を調査するべきである。

【0131】

まとめると、本発明者らの研究は、ヒトスケールモデル及びヒト組織の両方における線維化の包括的な特徴付けを表し、大型生物及びヒトの両方における組織再生のための機械的力の調整の重要性を一緒に連結する。メカノトランスダクションの薬理学的遮断は、早

期抗炎症及び後期再生転写プログラムを促進して、線維化を軽減し、生活の質を改善することによって、臨床的転帰を改善することができる。ヒト及び他の大型生物における瘢痕形成の軽減及び組織再生の促進は、依然として生物医学研究の「聖杯」であり（107）、本発明者らの知見は、いくつかの線維化疾患のための患者治療を改善する潜在性を有し得る。

【0132】

11. 補足材料及び方法：

a. 動物飼育

全ての動物研究を、Stanford Universityによって承認されたAdministrative Panel on Laboratory Animal Careプロトコル（APLAC# 31530及び32962）に従って実施した。外科手術時に体重約16～20kgの6～8週齢の雌性赤Durocブタを、Pork Power Farms（Turlock, CA）から購入した。全ての動物を、到着後少なくとも1週間順化した。全ての動物に、実験室ブタ育成飼料の食餌及び水を自由に与えた。

【0133】

b. 外科手術のための動物の準備

動物の絶食を、外科的手順の12時間前に実行した。麻酔を、Stanford Veterinary Service Center（VSC）の担当者と共同して投与した。初期に、動物を、筋肉内telazolの投与で鎮静させた。末梢静脈ラインを、耳の静脈内に確立した。疼痛を最小にするために、EMLA（2.5%のリドカイン及び2.5%のプリロカイン）クリーム形態の局所麻酔剤を、カニユーレ挿入前に、静脈にわたって適用した。この時間中に、10（mL/kg時間）の流体を開始した。機関ガイドラインに従って、全身麻酔を、麻酔前麻酔剤としての6～8mg/kgのtelazolの1回筋肉内投与で確立し、動物に気管内チューブを挿管し、動物を、麻酔の維持のための手順にわたって、1.5～3%のイソフルランの吸入において維持した。動物を、腹臥位で配置し、それらの背を剪毛した。皮膚を、Betadine溶液で清浄化し、アルコールですすいで、皮膚病原体の混入がないことを確実にした。動物を、滅菌様式でドレープして、滅菌野を維持した。また、熱支援及び眼潤滑を使用した。各外科的手順は、動物を鎮静させた後に約2時間続いた。

【0134】

外科的部位感染を予防するために、抗生物質を予防的にかつ手術後に投与した。25mg/kgのセファゾリンを、初期傷害の60分前に静脈内投与し、外科手術の終了の12時間後に繰り返した。10mg/kgの経口アモキシシリンを、1日2回、1週間投与した。創傷を、適切なドレッシング内に覆い包んだ。疼痛の制御を、外科手術の24時間前の50mcg/時間の経皮フェンタニルの投与によって達成した。筋肉内ヒドロモルホン（0.05mg/kg）を、外科手術前に、フェンタニルパッチが外れていた場合、又はそれが配置されていなかった場合使用した。カルプロフェンを、手術後に1回使用し、続いて、24時間毎に1回、1～2日間使用し、次いで、疼痛評価に基づいて必要に応じて使用した。

【0135】

c. ブランク及びFAKI放出プルラン-コラーゲンヒドロゲル製造

本発明者らは、いくつかの修正を有する以前に記載されているもののよう（23）、空白及びFAKI放出ヒドロゲルを製造した。1gのプルラン（TCI 9057-02-7、Tokyo）を、1gのトリメタリン酸三ナトリウム（STMP）（Sigma Aldrich T5508）及び1gの塩化カリウム（KCl）（Fisher Scientific 7447-40-7）と混合した。粉末を、脱イオン水と混合して、5mLの総体積にし、完全に混合し、続いて、0.01Mの塩酸（HCl）中の5mLの10mg/mLのウシコラーゲン懸濁液を混合した。得られた混合物を、均質になるまでボルテックスし、次いで、架橋を開始するための0.65mLの1Nの水酸化ナトリ

ウムNaOHもまた、穏やかにボルテックスしながら添加した。混合物を、シリコンモールド内に注ぎ、次いで、滅菌フード内で、室温で一晩乾燥させた。乾燥したフィルムを、脱イオン水で洗浄して、非架橋ポリマー、NaOH、及びKClを除去した。洗浄溶液のpHを測定し、洗浄溶液が7.0～7.5のpHに達するまで洗浄し続けた。膨張したヒドロゲルを-80℃で凍結させ、その後、凍結乾燥させて、乾燥（ブランク）パッチを製造した。

【0136】

FAKI化合物を、Verastem Oncology (VS-6062) 及び Selleckchem (625249) から得た。本発明者らは、FAKIを、アセトン中に1mg/mLで溶解させ、1mLの溶液を、多孔性ヒドロゲル上に均一に注ぎ、次いで、溶媒を、滅菌フード内で蒸発させた。ブランク及びFAKI含有ヒドロゲルパッチを、個々のプラスチック袋内に配置し、電子ビーム照射を使用して、20kGyの照射線量で滅菌した。

【0137】

d. パッチFAKI放出研究

本発明者の現在の研究において使用されたプルラン-コラーゲンヒドロゲルにおいて、FAKI分子は、ヒドロゲル細孔内に物理的に封入されている。本発明者らは、この足場からのFAKIのインビトロ放出試験を実施し、FAKIの制御持続放出が、最大72時間まで続くことを実証した。簡潔には、本発明者らは、3つの2つのブランクヒドロゲル及び3つのFAKIヒドロゲルを取り、それらを15,000又は25,000MWCO透析膜チューブ (Thermo Fisher Scientific) 内に配置した。次いで、本発明者らは、0.5mLのPBSを添加して、透析チューブ内のヒドロゲルを膨潤させ、透析チューブを両方の側で密封し、次いで、チューブを、50mLのFalconチューブ内の10mLのPBS中に浸漬した。本発明者らは、チューブを配置して、37℃で振盪し、試料を、以下の時点、2時間、4時間、6時間、8時間、24時間、96時間時点のそれぞれで、新しいPBSを有する新しいチューブ内に移した。次いで、本発明者らは、収集された試料のFAKI含有量を、LCMS (Applied Biosystems, API 4000 Q Trap) で分析して、各パッチにおけるFAKI含有量を計算した (図10B)。ブタ皮膚上での放出を研究するために、本発明者らは、FAKIパッチ (2mgのFAKI/25cm²) を、ブタ皮膚上に12及び24時間配置して、時間依存性放出を決定した。24時間処置されたときに、FAKIを、角質層から2mmの深さで検出した (図10C)。

【0138】

e. 瘢痕拘縮分析

STSGを、各ドレッシング交換時に写真で監視した。各画像を、定規又は標準測定装置とともに撮影して、測定を標準化した。瘢痕面積を、ImageJにおいて経時的に追跡した。拘縮を、瘢痕面積における変化として測定し、第1のドレッシング交換中に、STSGの面積に正規化した。2人の独立した評価者が、瘢痕面積を測定し、得られた瘢痕面積は、2つの測定の平均であった。

【0139】

f. 視覚的瘢痕及び間質性上皮化評価

各創傷の肉眼写真を、各ドレッシング交換時に撮影した。瘢痕メトリックの定量化を、これらの肉眼写真で、3人の盲検化された瘢痕専門家のパネルによって、視覚的アナログスケール (VAS) を使用して、血管分布、色素沈着、観察者快適性 (例えば、全体的な美容術)、許容性、及び輪郭の5つの構成要素について実行した。合計スコアを、全ての5つのスコアの集成として計算した。より低いスコアは、瘢痕外観の改善を示す。盲検化された専門家はまた、経時的な移植片におけるメッシュの間質空間間の再上皮化の量によって定義された間質性上皮化の量を評価した。また、スコア化を、追加の対照として、非創傷皮膚について実行した。

【0140】

g. 皮膚生体力学的特性の粘弾性分析

cutometer (Dual MPA 580、Courage+Khazaka Electronic) を使用して、治癒組織及び非創傷皮膚の硬度及び弾性を評価した。cutometer 評価は、ヒト患者における粘弾性を測定するための最も一般的な機器のうちの1つであり (111、112)、これは、負圧 (吸引) を小さい円形直径 (8 mm のプローブ) を介して適用することによって、皮膚表面の垂直変形を測定する。2 秒間の変形 (吸引)、続いて、2 秒間の弛緩 (吸引なし) を 3 回適用し、平均した。硬度を、吸引期の終了時の振幅 (RO メトリック) として測定し、ブランクヒドロゲルで処置された STSG の値に対して正規化した (111)。一貫した負圧への変形の増加は、より少ない硬度を有する組織に対応し、非創傷皮膚により類似する。

【0141】

h. ヒト及びブタ組織試験片の収集及び凍結切片化

ブタ試験片を、研究の終了時に、各創傷の中心から採取した。ヒト肥厚性瘢痕 (HTS) 及び非創傷皮膚試料を、承認された IRB (#54225) 下で得た。そうでなければ、研究から収集された組織試料を廃棄する。患者識別情報を、試料とともに保持しなかった。これらの試料を、4 % のパラホルムアルデヒド中に即時に固定し、脱水し、最適切断温度 (OCT) 化合物中に凍結埋め込みして、ミクロトームクリオスタットにおいて凍結切片化した。

【0142】

i. コラーゲンアーキテクチャの組織学的分析

マッソンのトリクローム染色及びピクロシリウスレッド染色を実行し、画像を、Leica DM5000 B 正立顕微鏡で撮影した。ピクロシリウスレッドについては、偏光顕微鏡を使用して、40 倍の倍率画像を得、線維整列の分析を、CurveAlign (109) 及び MatFiber (98、110) を使用して実行した。整列の強度は、0 (完全にランダムな線維整列) ~ 1 (完全に整列した線維) の値の範囲である。個々のコラーゲン線維パラメータ (線維長さ、幅) の定量化を、CT-FIRE (<http://loci.wisc.edu/software/ctfire>) を使用して実行した (109、113)。

【0143】

j. 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色を、CXCL10 (Thermo Fisher Scientific、PA5-46999)、F4/80 (Thermo Fisher Scientific、MF48000)、CXCL14 (Thermo Fisher Scientific、10468-1-AP)、トロンボスポンジン4 (THBS4) (Abcam、ab263898)、アポリポタンパク質E (APOE) (Abcam、ab52607)、CD34 (Abcam、ab81289)、及びアルファ平滑筋アクチン (αSMA) (Abcam、ab5694) を標的とする一次抗体を使用して実行した。蛍光面積の量を、定量化し、著者によって記述され以前に公開されたカスタム MATLAB 画像処理コード (98) を使用して、細胞 (個々の DAPI 核) の数に正規化した。示される全ての組織像及び免疫蛍光画像は、複数の実験の代表的な画像である。

【0144】

k. 単一細胞バーコード化、ライブラリ調製、及び単一細胞 RNA 配列決定

本発明者らは、 1 cm^2 の組織を、本発明者らの STSG 群又は非創傷皮膚の中心から得た。最初に、組織を、メスを使用して、小さい 1 mm^2 片に完全に切断し、次いで、鋭いハサミで慎重に刻んだ。scRNA-seq のための細胞捕捉を最大にするために、組織を非常に慎重に切断して、精密な組織ペースト粘ちょう度にした。増加した酵素濃度、及び PBS 中の 30 mL の体積の 1 mg/mL の Liberase (Sigma-Aldrich 5401127001) を使用して、高密度の線維化ブタ細胞外マトリックスを完全に分解した。細胞消化懸濁液を、合計 2 時間、 37°C で一定に攪拌 (回転) した。組織溶液を、最大速度ボルテックスミキサー (VWR) に 30 秒間供し、その後、オーブ

10

20

30

40

50

ン内に1時間配置し、再び合計2時間後にVWRに供して、一緒に凝集したいずれもの組織を物理的に破壊し、常に酵素消化に曝露される組織表面積を最大にした。

【0145】

組織溶液を、100 μ mのナイロン細胞フィルター（Fisher-Scientific 08-771-19）に通して新しいコニカルチューブに濾過し、10%のFBSの20mLのDMEMを、フィルターに通して添加して、酵素反応をクエンチし、フィルター内に捕捉されたいずれもの細胞を解放し、下流細胞収率を最大にした。溶液を、350 $\times$ gで、5分間4 $^{\circ}$ Cで遠心分離機内でスピンさせ、上清を吸引し、次いで、細胞を、10%のFBSの20mLのDMEM中に再懸濁させ、70 μ mのナイロン細胞フィルターに通した。PBS中の10%のFBSの20mLの溶液（FACS緩衝液）を、フィルターに通して添加して、残った細胞を洗浄した。

10

【0146】

次いで、この細胞懸濁液を、濃縮溶液中に再懸濁させ、Stanford Functional Genomics Facility（SFGF）で、10x Chromium Single Cellプラットフォーム（Single Cell 3' v3、10x Genomics、USA）を使用して、液滴ベースのマイクロ流体単一細胞RNA配列決定（scRNA-seq）に供した。細胞懸濁液、逆転写マスターミックス、及び分画油を、単一細胞チップ上にロードし、Chromium Controllerにおいて処理し、逆転写を、53 $^{\circ}$ Cで45分間実行した。cDNAを、合計12サイクル（BioRad C1000 Touchサーマルサイクラー）で増幅し、cDNAサイズを、Spriselectビーズ（Beckman Coulter、USA）及び3:5の比のSpriselect試薬体積対試料体積を使用して選択した。cDNAを、Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNAチップ上で定性的制御のために分析し、5分間32 $^{\circ}$ Cで断片化し、続いて、末端修復及びAテーリングを、65 $^{\circ}$ Cで30分間行い、次いで、ダブルサイドサイズを、Spriselectで選択した。配列決定アダプターを、20 $^{\circ}$ Cで15分間、cDNAにライゲーションした。cDNAを、試料特異的インデックスオリゴをプライマーとして使用して増幅し、続いて、ダブルサイドサイズ選択を更に1回行った。最終ライブラリを、Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNAチップ上で定性的制御目的で分析した。cDNAライブラリを、HiSeq 4000 Illuminaプラットフォームにおいて、1細胞当たり50,000個のリードを目標にして配列決定した。

20

30

【0147】

し．カスタムブタトランスクリプトーム

本発明者らは、カスタムブタトランスクリプトームを、Sus Scrofaゲノム（Ensemble、v11.1）を使用して、非モデル生物についての10Xプロトコル（44）に従って生成して作製し、本発明者らは、これを、修正された10X Cell Rangerパイプラインの一部としての実装についての説明書とともに一般に入手可能にした（Data Availability and Materialsを参照されたい）。簡潔には、ブタ参照ゲノム（Sus scrofa11.1、リリース98）を、Ensemblウェブサーバ（https://uswest.ensembl.org/Sus_scrofa/Info/Index）から得た。個々の染色体についてのFastqファイルを、cshellにおけるバッチ連結を使用してマージした。GTFアノテーションを、以下の引数を使用するCell Ranger（10X Genomics）「mkgtf」関数を使用してフィルタリングした。

40

【表 1】

--attribute=gene_biotype:protein_coding \	--attribute=gene_biotype:lincRNA \	
--attribute=gene_biotype:antisense \	--	
attribute=gene_biotype:IG_LV_gene \		
--attribute=gene_biotype:IG_V_pseudogene \	--	
attribute=gene_biotype:IG_V_gene \		
--attribute=gene_biotype:IG_J_pseudogene \	--	
attribute=gene_biotype:IG_J_gene \		10
--attribute=gene_biotype:IG_C_pseudogene \	--	
attribute=gene_biotype:IG_C_gene \		
--attribute=gene_biotype:TR_V_pseudogene \	--	
attribute=gene_biotype:TR_V_gene \		
--attribute=gene_biotype:TR_J_pseudogene \	--	
attribute=gene_biotype:TR_J_gene \		
--attribute=gene_biotype:TR_D_gene \	--	
attribute=gene_biotype:TR_C_gene		20
--attribute=gene_biotype:IG_D_gene \		

【0148】

次いで、これらのGTF及びFASTQファイルを、Cell Ranger「mkref」コマンドを使用して、デフォルトパラメータ化でアセンブルした。全てのリード断片を、標準塩基マッチング閾値（51）、続いて、細胞逆多重化及びUMIバッチ補正（52）を使用して、このトランスクリプトームにアライメントし、本発明者らが、各ブタ試料についての単一細胞mRNAカウントマトリックスを生成することを可能にした。

【0149】

m. データ処理、FASTQ生成、及びリードマッピング

ベースコールを、mkfastqのCell Ranger（10X Genomics；バージョン3.1）実装を使用してリードに変換し、次いで、Cell Rangerのカウント関数及びSC3Pv3化学、並びに1試料当たり5,000個の予想される細胞を使用して、本発明者らのカスタムブタトランスクリプトームに対してアライメントした（51）。細胞バーコードを、少なくとも200個のプロファイリングされた固有転写物、10,000個未満の総転写物、及びミトコンドリア起源のそれらのトランスクリプトームの10%未満を有する最適化された閾値に基づいて、高品質のためにフィルタリングした（114）。

【0150】

n. データ正規化及び特徴的な亜集団マーカーの生成

各細胞バーコードからの固有分子識別子（UMI）を、全ての下流分析のために保持した。生UMIカウントを、1細胞当たり10,000個のUMIのスケール因子で正規化し、その後、RパッケージSeurat（バージョン3.1.1）を使用して、1の擬似カウントで自然対数変換した（52）。高度のバリアブル遺伝子を特定し、細胞を、ミトコンドリア転写産物の分数への回帰によってスケールリングした。次いで、集約されたデータを、均一多様体近似及び射影（UMAP）分析を使用して、最初の15個の主構成要素にわたって評価した（115）。自動化細胞アノテーションを、SingleRツールキット（バージョン3.11）を使用して、ENCODEブルーデータベース（116）に帰した。本発明者らは、ヒトアノテーションを使用したため、細胞型を、本発明者らのデータセット内の細胞特異的マーカーも調べることによって確認した。差次的に発現された

10

20

30

40

50

遺伝子を、SeuratのネイティブFindMarkers関数及び0.5の対数倍率変化閾値で、ROC試験を使用して特定して、予測力を各遺伝子に割り当てた。

【0151】

o. Genetrail3を使用する過剰提示分析

Genetrail3(53)を使用して、過剰表現分析(ORA)を、500個の最も発現されたタンパク質コード遺伝子、並びに遺伝子セットGene Ontology:生物学的プロセス(GO-BP)及びWikiPathways(WP)を使用して、各細胞について実行した。P値を、ベンジャミニーホッホベルグ手順を使用して調整し、遺伝子セットは、2つ~1000個の遺伝子を有することが必要とされた。

【0152】

p. scVeloを使用するRNA速度分析

RNA速度分析を、scVeloパッケージの動的モデルを使用して実行した(80)。パーティションベースのグラフ抽象化(PAGA)を、scVeloにおけるsc.tl.paga関数を使用して実行した。

【0153】

他の全てのクラスターと比較して、差次的に調節された転写ダイナミクスを有する遺伝子を見出すために、保存的であると過大評価された分散を有するウェルチのt検定を、sc.tl.rank_velocity_genes関数を使用して適用した。遺伝子を、処置によって群化された動的モデルから得られたそれらの可能性によってランク付けした。

【0154】

q. CellRank

CellRankを使用して、線維芽細胞分化の動的プロセスを、単一細胞データのマルコフ状態モデリングに基づいて明らかにした。初期及び終末細胞状態、並びに線維芽細胞運命確率を、CellRankで、scVeloによって提供された動的RNA速度情報に基づいて計算した。

【0155】

r. 線維芽細胞集合3Dコラーゲン足場実験

本発明者らは、真皮線維芽細胞を、健常ヒト及びブタ皮膚試料の両方から単離し培養した。線維芽細胞を、機械的及び酵素消化によって単離し、標準条件下で、継代3まで培養した。本発明者らの以前に公開されたプロトコル(98)に従って、本発明者らは、一次線維芽細胞を使用して、線維芽細胞集合コラーゲンヒドロゲルを、200k個の細胞/mL及び2mg/mLのコラーゲン(PureCol、Advanced Biomatrix 5005)の濃度で作製した。簡潔には、コラーゲン足場を、スポンジをアームにおいて有する十字型の形状で作製し、ペトリ皿内で、硬化ポリジメチルシロキサン(PDMS; Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit; Dow Corning)の層(約0.5cm)の上で培養した。ピンを、ヒドロゲル十字型アームにおけるスポンジに押し通して、初期前培養期間(24時間)中に足場を押さえつけた。次いで、本発明者らは、足場を、0%の歪み(歪みなし)又は10%の等二軸歪み(FAKIを有するもの又はそれを有さないもののいずれか)のいずれかに、更に48時間供した。歪みに供された未処置細胞に、10µLのDMSOを20mLの培養培地中で付与し、歪みに供された処置細胞に、DMSO中の10µLの20mMのFAKIを、20mLの培養培地中で投与して、10µMのFAKIの最終濃度を達成した。

【0156】

本発明者らは、縫合を使用して、9つの酸化チタン(IV)ドット(Sigma-Aldrich 248576)を、ゲルの中央領域の表面上に塗って、適用された歪みを追跡及び定量化した。本発明者らは、デジタルカメラを使用して、歪みの前かつその後に、マーカーを撮像した。歪みを、ピンを除去し、ヒドロゲル十字型アームを手動で伸長させ、ピンをアームに再び押し通して、足場を新しい伸長位置に保持することによって適用した。マーカー位置の写真を使用して、単一均質変形勾配テンソルFを計算し、これにより

10

20

30

40

50

、未変形位置から変形位置への9つのマーカー位置の最小二乗最適適合マッピングを、以下の優決定行列方程式を解くことによって提供した：

$$x = F X + p \quad [1]、$$

式中、 p は、画像間の移動を考慮するために含まれる任意のベクトルである。本発明者らは、以下を使用して、変形を歪みテンソル E に変換した：

【数1】

$$E = \frac{1}{2}([F^T F]^2 - I) \quad [2]$$

式中、 I は、 3×3 の単位行列であり、 3×3 の単位行列は、主対角線上に1を有し、他の場所にゼロを有し、 F^T は、線形代数原理に従って、行列の転置を表す(117)。この歪みマトリックス E を計算することによって、本発明者らは、 x 及び y 方向の両方の歪みを決定した。本発明者らは、ピンを手動で調整し、アームを反復で伸長させ、追加の写真を撮影し、その後、両方の方向に適用された全体的な歪みが約0.10(±0.01)になるまで、歪みを計算した。

【0157】

II. 参考文献：

1. Z. Zhu, J. Ding, E. E. Tredget, The molecular basis of hypertrophic scars. Burns Trauma 4, 2 (2016).
2. R. K. V. Sethi, E. D. Kozin, P. J. Fagenholz, D. J. Lee, M. G. Shrimel, S. T. Gray, Epidemiological Survey of Head and Neck Injuries and Trauma in the United States. Otolaryngology—Head and Neck Surgery 151, 776–784 (2014).
3. T. A. Wynn, T. R. Ramalingam, Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. Nat Med 18, 1028–1040 (2012).
4. B. Berman, M. H. Viera, S. Amini, R. Huo, I. S. Jones, Prevention and Management of Hypertrophic Scars and Keloids After Burns in Children. Journal of Craniofacial Surgery 19, 989–1006 (2008).
5. C. Mock, M. Peck, M. Peden, E. Krug, W. H. Organization, A WHO plan for burn prevention and care. Geneva: World Health Organization 3, (2008).
6. L. Deeter, M. Seaton, G. J. Carrougner, K. McMullen, S. P. Mandell, D. Amtmann, N. S. Gibran, Hospital-acquired complications alter quality of life in adult burn survivors: report from a burn model system. Burns : journal of the International Society for Burn Injuries 45, 42–47 (2019).
7. A. W. Chua, Y. C. Khoo, B. K. Tan, K. C. Tan, C. L. Foo, S. J. Chong, Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications. Burns Trauma 4, 3 (2016).
8. L. F. Rose, J. C. Wu, A. H. Carlsson, D. I. Tucke

10

20

30

40

50

r, K. P. Leung, R. K. Chan, Recipient wound bed characteristics affect scarring and skin graft contraction. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 23, 287–296 (2015) .

9. J. D. Villapalos, P. vol. 2019.

10. R. Kandiyali, H. Thom, A. E. Young, R. Greenwood, N. J. Welton, Cost-effectiveness and value of information analysis of a low-friction environment following skin graft in patients with burn injury. Pilot Feasibility Stud 6, 8 (2020) .

11. M. Singh, K. Nuutila, K. C. Collins, A. Huang, Evolution of skin grafting for treatment of burns: Reverdin pinch grafting to Tanner mesh grafting and beyond. Burns : journal of the International Society for Burn Injuries 43, 1149–1154 (2017) .

12. T. Nuri, K. Ueda, Y. Fujimori, Ten-year Follow-up After Treating Extended Burn Scar Contracture with an Autologous Cultured Dermal Substitute. Plast Reconstr Surg Glob Open 6, e1782 (2018) .

13. K. Meier, L. B. Nanney, Emerging new drugs for scar reduction. Expert Opin Emerg Drugs 11, 39–47 (2006) .

14. L. Block, A. Gosain, T. W. King, Emerging Therapies for Scar Prevention. Adv Wound Care (New Rochelle) 4, 607–614 (2015) .

15. D. Duscher, Z. N. Maan, V. W. Wong, R. C. Renner, M. Januszyk, M. Rodrigues, M. Hu, A. J. Whitmore, A. J. Whittam, M. T. Longaker, G. C. Gurtner, Mechanotransduction and fibrosis. J Biomech 47, 1997–2005 (2014) .

16. R. S. Gienli, M. J. Hendzel, Mechanotransduction from the ECM to the genome: are the pieces now in place? J Cell Biochem 104, 1964–1987 (2008) .

17. N. Wang, J. D. Tytell, D. E. Ingber, Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. Nat Rev Mol Cell Biol 10, 75–82 (2009) .

18. G. C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, M. T. Longaker, Wound repair and regeneration. Nature 453, 314–321 (2008) .

19. S. Aarabi, K. A. Bhatt, Y. Shi, J. Paterno, E. I. Chang, S. A. Loh, J. W. Holmes, M. T. Longaker, H. Yee, G. C. Gurtner, Mechanical load initia

10

20

30

40

50

tes hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis. *FASEB J* 21, 3250–3261 (2007).

20. A. Zehender, J. Huang, A. H. Gyorfi, A. E. Mat ei, T. Trinh–Minh, X. Xu, Y. N. Li, C. W. Chen, J. L in, C. Dees, C. Beyer, K. Gelse, Z. Y. Zhang, C. Be rgmann, A. Ramming, W. Birchmeier, O. Distler, G. Schett, J. H. W. Distler, The tyrosine phos phatase SHP2 controls TGFbeta–induced ST AT3 signaling to regulate fibroblast act 10 ivation and fibrosis. *Nat Commun* 9, 3259 (2 018).

21. D. S. Foster, C. D. Marshall, G. S. Gulati, M. S. Chinta, A. Nguyen, A. Salhotra, R. E. Jones, A . Burcham, T. Lerbs, L. Cui, M. E. King, A. L. Tita n, R. C. Ransom, A. Manjunath, M. S. Hu, C. P. Blac kshear, S. Mascharak, A. L. Moore, J. A. Norton, C. J. Kin, A. A. Shelton, M. Januszyk, G. C. Gurtner, G. Wernig, M. T. Longaker, Elucidating the 20 fundamental fibrotic processes driving a bdominal adhesion formation. *Nat Commun* 1 1, 4061 (2020).

22. V. W. Wong, K. C. Rustad, S. Akaishi, M. Sorki n, J. P. Glotzbach, M. Januszyk, E. R. Nelson, K. Levi, J. Paterno, I. N. Vial, A. A. Kuang, M. T. Lo ngaker, G. C. Gurtner, Focal adhesion kinase links mechanical force to skin fibrosis via inflammatory signaling. *Nat Med* 18, 14 8–152 (2011).

23. K. Ma, S. H. Kwon, J. Padmanabhan, D. Duscher , A. A. Trotsyuk, Y. Dong, M. Inayathullah, J. Ra jadas, G. C. Gurtner, Controlled Delivery of a Focal Adhesion Kinase Inhibitor Result s in Accelerated Wound Closure with Decr eased Scar Formation. *J Invest Dermatol* 1 38, 2452–2460 (2018).

24. Q. Ding, C. L. Gladson, H. Wu, H. Hayasaka, M. A. Olman, Focal adhesion kinase (FAK) –relat ed non–kinase inhibits myofibroblast dif ferentiation through differential MAPK a 40 ctivation in a FAK–dependent manner. *J Bi ol Chem* 283, 26839–26849 (2008).

25. S. Mascharak, H. E. desJardins–Park, M. F. D avitt, M. Griffin, M. R. Borrelli, A. L. Moore, K . Chen, B. Duoto, M. Chinta, D. S. Foster, A. H. Sh en, M. Januszyk, S. H. Kwon, G. Wernig, D. C. Wan, H. P. Lorenz, G. C. Gurtner, M. T. Longaker, Prev enting Engrailed–1 activation in fibrobl asts yields wound regeneration without s 50 carrying. *Science* 372, (2021).

26. V. W. Wong, K. C. Rustad, S. Akaiishi, M. Sorkin, J. P. Glotzbach, M. Januszyk, E. R. Nelson, K. Levi, J. Paterno, I. N. Vial, A. A. Kuang, M. T. Longaker, G. C. Gurtner, Focal adhesion kinase links mechanical force to skin fibrosis via inflammatory signaling. *Nature medicine* 18, 148–152 (2011).
27. K. Chen, S. H. Kwon, D. Henn, B. A. Kuehlmann, R. Tevlin, C. A. Bonham, M. Griffin, A. A. Trotsyuk, M. R. Borrelli, C. Noishiki, J. Padmanabhan, J. A. Barrera, Z. N. Maan, T. Dohi, C. J. Mays, A. H. Greco, D. Sivaraj, J. Q. Lin, T. Fehlmann, A. M. Mermin-Bunnell, S. Mittal, M. S. Hu, A. I. Zamaaleeva, A. Keller, J. Rajadas, M. T. Longaker, M. Januszyk, G. C. Gurtner, Disrupting biological sensors of force promotes tissue regeneration in large organisms. *Nat Commun* 12, 5256 (2021). 10
28. R. D. Galiano, J. t. Michaels, M. Dobryansky, J. P. Levine, G. C. Gurtner, Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 12, 485–492 (2004). 20
29. N. Naldaiiz-Gastesi, O. A. Bahri, A. Lopez de Munain, K. J. A. McCullagh, A. Izeta, The panniculus carnosus muscle: an evolutionary enigma at the intersection of distinct research fields. *J Anat* 233, 275–288 (2018). 30
30. C. P. Denton, P. A. Merkel, D. E. Furst, D. Khanna, P. Emery, V. M. Hsu, N. Silliman, J. Streisand, J. Powell, A. Akesson, J. Coppock, F. Hoogen, A. Herrick, M. D. Mayes, D. Veale, J. Haas, S. Ledbetter, J. H. Korn, C. M. Black, J. R. Seibold, Recombinant human anti-transforming growth factor beta1 antibody therapy in systemic sclerosis: a multicenter, randomized, placebo-controlled phase I/II trial of CAT-192. *Arthritis and rheumatism* 56, 323–333 (2007). 40
31. D. M. DeBruler, B. N. Blackstone, K. L. McFarland, M. E. Baumann, D. M. Supp, J. K. Bailey, H. M. Powell, Effect of skin graft thickness on scar development in a porcine burn model. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 44, 917–930 (2018).
32. C. F. Guerrero-Juarez, P. H. Dedhia, S. Jin, R. Ruiz-Vega, D. Ma, Y. Liu, K. Yamaga, O. Shestova, D. L. Gay, Z. Yang, K. Kessenbrock, Q. Nie, W. 50

S. Pear, G. Cotsarelis, M. V. Plikus, Single-cell analysis reveals fibroblast heterogeneity and myeloid-derived adipocyte progenitors in murine skin wounds. *Nature Communications* 10, 650 (2019).

33. M. V. Plikus, C. F. Guerrero-Juarez, M. Ito, Y. R. Li, P. H. Dedhia, Y. Zheng, M. Shao, D. L. Gay, R. Ramos, T. -C. Hsi, J. W. Oh, X. Wang, A. Ramirez, S. E. Konopelski, A. Elzein, A. Wang, R. J. Supaannachart, H. -L. Lee, C. H. Lim, A. Nace, A. Guo, E. Treffeisen, T. Andl, R. N. Ramirez, R. Murad, S. Offermanns, D. Metzger, P. Chambon, A. D. Widgerow, T. -L. Tuan, A. Mortazavi, R. K. Gupta, B. A. Hamilton, S. E. Millar, P. Seale, W. S. Pear, M. A. Lazar, G. Cotsarelis, Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science* 355, 748–752 (2017).

34. A. Butler, P. Hoffman, P. Smibert, E. Papalexi, R. Satija, Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol* 36, 411–420 (2018).

35. P. Ramos-Ibeas, F. Sang, Q. Zhu, W. W. C. Tang, S. Withey, D. Klisch, L. Wood, M. Loose, M. A. Surani, R. Alberio, Pluripotency and X chromosome dynamics revealed in pig pre-gastrulating embryos by single cell analysis. *Nat Commun* 10, 500 (2019).

36. M. S. B. Raredon, T. S. Adams, Y. Suhail, J. C. Schupp, S. Poli, N. Neumark, K. L. Leiby, A. M. Greaney, Y. Yuan, C. Horien, G. Linderman, A. J. Engler, D. J. Boffa, Y. Kluger, I. O. Rosas, A. Levchenko, N. Kaminski, L. E. Niklason, Single-cell connectomic analysis of adult mammalian lungs. *Sci Adv* 5, eaaw3851 (2019).

37. M. Januszyk, V. W. Wong, K. A. Bhatt, I. N. Vial, J. Paterno, M. T. Longaker, G. C. Gurtner, Mechanical offloading of incisional wounds is associated with transcriptional downregulation of inflammatory pathways in a large animal model. *Organogenesis* 10, 186–193 (2014).

38. G. C. Gurtner, R. H. Dauskardt, V. W. Wong, K. A. Bhatt, K. Wu, I. N. Vial, K. Padois, J. M. Korman, M. T. Longaker, Improving cutaneous scar formation by controlling the mechanical environment: large animal and phase I studies. *Annals of surgery* 254, 217–225 (2011).

39. J. L. Hunt, R. Sato, C. R. Baxter, Early tangential excision and immediate mesh autog

10

20

30

40

50

rafting of deep dermal hand burns. *Annals of surgery* 189, 147–151 (1979) .

40. D. N. Herndon, R. E. Barrow, R. L. Rutan, T. C. Rutan, M. H. Desai, S. Abston, A comparison of conservative versus early excision. *Therapies in severely burned patients. Annals of surgery* 209, 547–552; discussion 552–543 (1989) .

41. D. C. Adams, M. L. Ramsey, Grafts in dermatologic surgery: review and update on full-and split-thickness skin grafts, free cartilage grafts, and composite grafts. *Dermatol Surg* 31, 1055–1067 (2005) .

42. Y. Bian, C. Sun, X. Zhang, Y. Li, W. Li, X. Lv, J. Li, L. Jiang, J. Li, J. Feng, X. Y. Li, Wound-healing improvement by resurfacing split-thickness skin donor sites with thin split-thickness grafting. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 42, 123–130 (2016) .

43. G. Y. Hur, D. K. Seo, J. W. Lee, Contracture of skin graft in human burns: effect of artificial dermis. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 40, 1497–1503 (2014) .

44. M. Januszyk, K. Chen, D. Henn, D. S. Foster, M. R. Borrelli, C. A. Bonham, D. Sivaraj, D. Wagh, M. T. Longaker, D. C. Wan, G. C. Gurtner, Characterization of Diabetic and Non-Diabetic Foot Ulcers Using Single-Cell RNA-Sequencing. *Micromachines (Basel)* 11, (2020) .

45. A. Diaz-Papkovich, L. Anderson-Trocme, C. Ben-Eghan, S. Gravel, UMAP reveals cryptic population structure and phenotype heterogeneity in large genomic cohorts. *PLoS Genet* 15, e1008432 (2019) .

46. A. M. Ascension, S. Fuertes-Alvarez, O. Ibanez-Sole, A. Izeta, M. J. Arauzo-Bravo, Human Dermal Fibroblast Subpopulations Are Conserved across Single-Cell RNA Sequencing Studies. *The Journal of investigative dermatology* 141, 1735–1744. e1735 (2021) .

47. V. Vorstandlechner, M. Laggner, P. Kalinina, W. Haslik, C. Radtke, L. Shaw, B. M. Lichtenberger, E. Tschachler, H. J. Ankersmit, M. Mildner, Deciphering the functional heterogeneity of skin fibroblasts using single-cell RNA sequencing. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34, 36

10

20

30

40

50

77-3692 (2020) .

48. H. He, H. Suryawanshi, P. Morozov, J. Gay-Mimbrera, E. Del Duca, H. J. Kim, N. Kameyama, Y. Estrada, E. Der, J. G. Krueger, J. Ruano, T. Tuschl, E. Guttman-Yassky, Single-cell transcriptome analysis of human skin identifies novel fibroblast subpopulation and enrichment of immune subsets in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 145, 1615-1628 (2020) .

10

49. C. C. Deng, Y. F. Hu, D. H. Zhu, Q. Cheng, J. J. Gu, Q. L. Feng, L. X. Zhang, Y. P. Xu, D. Wang, Z. Rong, B. Yang, Single-cell RNA-seq reveals fibroblast heterogeneity and increased mesenchymal fibroblasts in human fibrotic skin diseases. *Nat Commun* 12, 3709 (2021) .

50. D. R. Zerbino, P. Achuthan, W. Akanni, M. R. A mode, D. Barrell, J. Bhairi, K. Billis, C. Cummins, A. Gall, C. G. Giron, Ensembl 2018. *Nucleic acids research* 46, D754-D761 (2018) .

20

51. A. Dobin, C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, T. R. Gingeras, STAR:ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15-21 (2013) .

52. T. Stuart, A. Butler, P. Hoffman, C. Hafemeister, E. Papalexi, W. M. Mauck III, Y. Hao, M. Stoeckius, P. Smibert, R. Satija, Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell*, (2019) .

30

53. N. Gerstner, T. Kehl, K. Lenhof, A. Muller, C. Mayer, L. Eckhart, N. L. Grammes, C. Diener, M. Hart, O. Hahn, J. Walter, T. Wyss-Coray, E. Meese, A. Keller, H. P. Lenhof, GeneTrail 3:advanced high-throughput enrichment analysis. *Nucleic Acids Res* 48, W515-w520 (2020) .

54. R. C. Russo, C. C. Garcia, M. M. Teixeira, F. A. Amaral, The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 10, 593-619 (2014) .

40

55. N. Oikonomou, V. Harokopos, J. Zalevsky, C. Valavanis, A. Kotanidou, D. E. Szymkowski, G. Kollias, V. Aidinis, Soluble TNF mediates the transition from pulmonary inflammation to fibrosis. *PLoS One* 1, e108 (2006) .

56. J. J. Saucerman, P. M. Tan, K. S. Buchholz, A. D. McCulloch, J. H. Omens, Mechanical regulation of gene expression in cardiac myocytes and fibroblasts. *Nature Reviews Cardio*

50

- logy 16, 361–378 (2019).
57. D. J. Tschumperlin, G. Ligresti, M. B. Hilscher, V. H. Shah, Mechanosensing and fibrosis. *J Clin Invest* 128, 74–84 (2018).
58. S. Adams, L. M. Wuescher, R. Worth, E. Yildirim-Ayan, Mechano-Immunomodulation: Mechanoresponsive Changes in Macrophage Activity and Polarization. *Ann Biomed Eng* 47, 2213–2231 (2019).
59. B. Aldeiri, U. Roostalu, A. Albertini, J. Wong, A. Morabito, G. Cossu, Transgelin-expressing myofibroblasts orchestrate ventral midline closure through TGF β signalling. *Development* 144, 3336–3348 (2017). 10
60. J. Park, J. Park, J. Jeong, K. H. Cho, I. Choi, J. Kim, Identification of tetranectin as a dipogenic serum protein. *Biochem Biophys Res Commun* 460, 583–588 (2015).
61. T. Satoh, K. Nakagawa, F. Sugihara, R. Kuwahara, M. Ashihara, F. Yamane, Y. Minowa, K. Fukushima, I. Ebina, Y. Yoshioka, A. Kumanogoh, S. Akira, Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. *Nature* 541, 96–101 (2017). 20
62. P. M. Tang, D. J. Nikolic-Paterson, H. Y. Lan, Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 15, 144–158 (2019).
63. X. M. Meng, D. J. Nikolic-Paterson, H. Y. Lan, Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 10, 493–503 (2014). 30
64. D. Henn, K. Chen, T. Fehlmann, A. A. Trotsyuk, D. Sivaraj, Z. N. Maan, C. A. Bonham, Jr., J. A. Barrera, C. J. Mays, A. H. Greco, S. E. Moortgat Ilouz, J. Q. Lin, S. R. Steele, D. S. Foster, J. Padmanabhan, A. Momeni, D. Nguyen, D. C. Wan, U. Kneser, M. Januszyk, A. Keller, M. T. Longaker, G. C. Gurtner, Xenogeneic skin transplantation promotes angiogenesis and tissue regeneration through activated Trem2(+) macrophages. *Sci Adv* 7, eabi4528 (2021). 40
65. V. M. Golubovskaya, Targeting FAK in human cancer: from finding to first clinical trials. *Front Biosci (Landmark Ed)* 19, 687–706 (2014).
66. F. J. Sulzmaier, C. Jean, D. D. Schlaepfer, FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer* 14, 598–610 (2014).
67. W. G. Roberts, E. Ung, P. Whalen, B. Cooper, C 50

- . Hulford, C. Autry, D. Richter, E. Emerson, J. Lin, J. Kath, K. Coleman, L. Yao, L. Martinez-Alsina, M. Lorenzen, M. Berliner, M. Luzzio, N. Patel, E. Schmitt, S. LaGreca, J. Jani, M. Wessel, E. Marr, M. Griffor, F. Vajdos, Antitumor activity and pharmacology of a selective focal adhesion kinase inhibitor, PF-562, 271. *Cancer Res* 68, 1935-1944 (2008).
68. R. Fearmonti, J. Bond, D. Erdmann, H. Levinson, A review of scar scales and scar measuring devices. *Eplasty* 10, e43 (2010). 10
69. P. Ortiz-Montero, A. Londono-Vallejo, J. P. Vernot, Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self-and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cell Commun Signal* 15, 17 (2017).
70. C. A. Feghali, T. M. Wright, Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 2, d12-26 (1997). 20
71. A. M. Tager, R. L. Kradin, P. LaCamera, S. D. Bercury, G. S. Campanella, C. P. Leary, V. Polosukhin, L. H. Zhao, H. Sakamoto, T. S. Blackwell, A. D. Luster, Inhibition of pulmonary fibrosis by the chemokine IP-10/CXCL10. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31, 395-404 (2004).
72. S. D. Oldroyd, G. L. Thomas, G. Gabbiani, A. M. El Nahas, Interferon-gamma inhibits experimental renal fibrosis. *Kidney Int* 56, 2116-2127 (1999). 30
73. G. Raghu, K. K. Brown, W. Z. Bradford, K. Starke, P. W. Noble, D. A. Schwartz, T. E. King, Jr., A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 350, 125-133 (2004).
74. T. Poynard, J. McHutchison, M. Manns, C. Trepo, K. Lindsay, Z. Goodman, M. H. Ling, J. Albrecht, Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 122, 1303-1313 (2002). 40
75. B. A. Croker, D. L. Krebs, J. G. Zhang, S. Wormald, T. A. Willson, E. G. Stanley, L. Robb, C. J. Greenhalgh, I. Forster, B. E. Clausen, N. A. Nicola, D. Metcalf, D. J. Hilton, A. W. Roberts, W. S. Alexander, SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol* 4, 540-545 (2003). 50

76. J. Wu, A. H. Lewis, J. Grandl, Touch, Tension, and Transduction—The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. *Trends Biochem Sci* 42, 57–71 (2017).
77. J. Padmanabhan, M. J. Augelli, B. Cheung, E. R. Kinser, B. Cleary, P. Kumar, R. Wang, A. J. Sawyer, R. Li, U. D. Schwarz, J. Schroers, T. R. Kyriakides, Regulation of cell–cell fusion by nanotopography. *Sci Rep* 6, 33277 (2016).
78. K. Chen, D. Henn, D. Sivaraj, C. A. Bonham, M. Griffin, H. Choi Kussie, J. Padmanabhan, A. A. Trotsyuk, D. C. Wan, M. Januszyk, M. T. Longaker, G. C. Gurtner, Mechanical Strain Drives Myeloid Cell Differentiation Toward Pro-Inflammatory Subpopulations. *Advances in wound care*, (2021). 10
79. R. Agha, R. Ogawa, G. Pietramaggiore, D. P. Orgill, A review of the role of mechanical forces in cutaneous wound healing. *J Surg Res* 171, 700–708 (2011). 20
80. V. Bergen, M. Lange, S. Peidli, F. A. Wolf, F. J. Theis, Generalizing RNA velocity to transient cell states through dynamical modeling. *Nat Biotechnol*, (2020).
81. M. Lange, V. Bergen, M. Klein, M. Setty, B. Reuter, M. Bakhti, H. Lickert, M. Ansari, J. Schnering, H. B. Schiller, D. Pe'er, F. J. Theis, CellRank for directed single-cell fate mapping. *bioRxiv*, 2020. 2010. 2019. 345983 (2020).
82. A. Jeschke, M. Bonitz, M. Simon, S. Peters, W. Baum, G. Schett, W. Ruether, A. Niemeier, T. Schinke, M. Amling, Deficiency of Thrombospondin-4 in Mice Does Not Affect Skeletal Growth or Bone Mass Acquisition, but Causes a Transient Reduction of Articular Cartilage Thickness. *PLoS One* 10, e0144272 (2015). 30
83. S. A. Wong, D. P. Hu, J. Slocum, C. Lam, M. Nguyen, T. Miclau, R. S. Marcucio, C. S. Bahney, Chondrocyte-to-osteoblast transformation in mandibular fracture repair. *J Orthop Res*, (2020). 40
84. P. Smeriglio, F. C. Grandi, S. E. B. Taylor, A. Zalac, N. Bhutani, TET1 Directs Chondrogenic Differentiation by Regulating SOX9 Dependent Activation of Col2a1 and Acan In Vitro. *JBMR Plus* 4, e10383 (2020).
85. B. Sid, H. Sartelet, G. Bellon, H. El Btaouri, G. Rath, N. Delorme, B. Haye, L. Martiny, Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor gro 50

wth. Crit Rev Oncol Hematol 49, 245–258 (2004) .

86. M. Mastri, Z. Shah, K. Hsieh, X. Wang, B. Woolbridge, S. Martin, G. Suzuki, T. Lee, Secreted Frizzled-related protein 2 as a target in antifibrotic therapeutic intervention. Am J Physiol Cell Physiol 306, C531–539 (2014) .

87. D. Honardoust, M. Varkey, K. Hori, J. Ding, H. A. Shankowsky, E. E. Tredget, Small leucine-rich proteoglycans, decorin and fibromodulin, are reduced in postburn hypertrophic scar. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 19, 368–378 (2011) .

88. R. A. Ignotz, J. Massague, Type beta transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82, 8530–8534 (1985) .

89. M. Augsten, C. Hagglof, E. Olsson, C. Stolz, P. Tsagozis, T. Levchenko, M. J. Frederick, A. Borg, P. Micke, L. Egevad, A. Ostman, CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 3414–3419 (2009) .

90. R. J. Waldemer-Streyer, A. Reyes-Ordonez, D. Kim, R. Zhang, N. Singh, J. Chen, Cxcl14 depletion accelerates skeletal myogenesis by promoting cell cycle withdrawal. NPJ Regen Med 2, 16017– (2017) .

91. N. J. Song, S. Kim, B. H. Jang, S. H. Chang, U. J. Yun, K. M. Park, H. Waki, D. Y. Li, P. Tontonoz, K. W. Park, Small Molecule-Induced Complement Factor D (Adipsin) Promotes Lipid Accumulation and Adipocyte Differentiation. PLoS One 11, e0162228 (2016) .

92. Z. H. Huang, C. A. Reardon, T. Mazzone, Endogenous ApoE expression modulates adipocyte triglyceride content and turnover. Diabetes 55, 3394–3402 (2006) .

93. R. W. Mahley, T. L. Innerarity, S. C. Rall, Jr., K. H. Weisgraber, Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. J Lipid Res 25, 1277–1294 (1984) .

94. B. M. Varisco, N. Ambalavanan, J. A. Whitset

10

20

30

40

50

- t, J. S. Hagood, Thy-1 signals through PPAR γ to promote lipofibroblast differentiation in the developing lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46, 765–772 (2012).
95. W. Qian, N. Li, Q. Cao, J. Fan, Thrombospondin-4 critically controls transforming growth factor β 1 induced hypertrophic scar formation. *J Cell Physiol* 234, 731–739 (2018).
96. V. W. Wong, K. Levi, S. Akaishi, G. Schultz, R. H. Dauskardt, Scar zones: region-specific differences in skin tension may determine incisional scar formation. *Plastic and reconstructive surgery* 129, 1272–1276 (2012).
97. R. Maiti, L. -C. Gerhardt, Z. S. Lee, R. A. Byers, D. Woods, J. A. Sanz-Herrera, S. E. Franklin, R. Lewis, S. J. Matcher, M. J. Carre, In vivo measurement of skin surface strain and sub-surface layer deformation induced by natural tissue stretching. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 62, 556–569 (2016).
98. K. Chen, A. Vigliotti, M. Bacca, R. M. McMeeking, V. S. Deshpande, J. W. Holmes, Role of boundary conditions in determining cell alignment in response to stretch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, 986–991 (2018).
99. J. Crawford, K. Nygard, B. S. Gan, D. B. O'Gorman, Periostin induces fibroblast proliferation and myofibroblast persistence in hypertrophic scarring. *Exp Dermatol* 24, 120–126 (2015).
100. D. Sivaraj, K. Chen, A. Chattopadhyay, D. Henn, W. Wu, C. Noishiki, N. J. Magbual, S. Mittal, A. M. Mermin-Bunnell, C. A. Bonham, A. A. Trotsyuk, J. A. Barrera, J. Padmanabhan, M. Januszyk, G. C. Gurtner, Hydrogel Scaffolds to Deliver Cell Therapies for Wound Healing. *Front Bioeng Biotechnol* 9, 660145 (2021).
101. T. Xie, Y. Wang, N. Deng, G. Huang, F. Taghavi, Y. Geng, N. Liu, V. Kulur, C. Yao, P. Chen, Z. Liu, B. Stripp, J. Tang, J. Liang, P. W. Noble, D. Jiang, Single-Cell Deconvolution of Fibroblast Heterogeneity in Mouse Pulmonary Fibrosis. *Cell Rep* 22, 3625–3640 (2018).
102. S. Mahmoudi, E. Mancini, L. Xu, A. Moore, F. Jahanbani, K. Hebestreit, R. Srinivasan, X. Li

- , K. Devarajan, L. Prelot, C. E. Ang, Y. Shibuya, B. A. Benayoun, A. L. S. Chang, M. Wernig, J. Wysocka, M. T. Longaker, M. P. Snyder, A. Brunet, Heterogeneity in old fibroblasts is linked to variability in reprogramming and wound healing. *Nature* 574, 553–558 (2019).
103. K. Sudo, M. Kanno, K. Miharada, S. Ogawa, T. Hiroshima, K. Saijo, Y. Nakamura, Mesenchymal progenitors able to differentiate into osteogenic, chondrogenic, and/or adipogenic cells in vitro are present in most primary fibroblast-like cell populations. *Stem Cells* 25, 1610–1617 (2007).
104. R. McBeath, D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju, C. S. Chen, Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 6, 483–495 (2004).
105. S. Y. Jeong, D. H. Kim, J. Ha, H. J. Jin, S. J. Kwon, J. W. Chang, S. J. Choi, W. Oh, Y. S. Yang, G. Kim, J. S. Kim, J. R. Yoon, D. H. Cho, H. B. Jeon, Thrombospondin-2 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells promotes chondrogenic differentiation. *Stem Cells* 31, 2136–2148 (2013).
106. H. S. Shitaye, S. P. Terkhorn, J. A. Combs, K. D. Hankenson, Thrombospondin-2 is an endogenous adipocyte inhibitor. *Matrix Biol* 29, 549–556 (2010).
107. P. Martin, Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75–81 (1997).
108. R. Edgar, M. Domrachev, A. E. Lash, Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30, 207–210 (2002).
109. J. S. Bredfeldt, Y. Liu, C. A. Pehlke, M. W. Conklin, J. M. Szulczewski, D. R. Inman, P. J. Kelly, R. D. Nowak, T. R. Mackie, K. W. Eliceiri, Computational segmentation of collagen fibers from second-harmonic generation images of breast cancer. *J Biomed Opt* 19, 16007–16007 (2014).
110. G. M. Fomovsky, J. W. Holmes, Evolution of scar structure, mechanics, and ventricular function after myocardial infarction in the rat. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 298, H221–228 (2010).
111. H. S. Ryu, Y. H. Joo, S. O. Kim, K. C. Park, S. W. Youn, Influence of age and regional diff

erences on skin elasticity as measured by the Cutometer. Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI) 14, 354-358 (2008) .

112. S. S. Fong, L. K. Hung, J. C. Cheng, The cutometer and ultrasonography in the assessment of postburn hypertrophic scar—a preliminary study. Burns : journal of the International Society for Burn Injuries 23 Suppl 1, S12-18 (1997) .

113. Y. Liu, A. Keikhosravi, G. S. Mehta, C. R. Drifka, K. W. Eliceiri, Methods for Quantifying Fibrillar Collagen Alignment. Methods Mol Biol 1627, 429-451 (2017) .

114. D. Osorio, J. J. Cai, Systematic determination of the mitochondrial proportion in human and mice tissues for single-cell RNA sequencing data quality control. Bioinformatics, (2020) .

115. E. Becht, L. McInnes, J. Healy, C. -A. Duterre, I. W. Kwok, L. G. Ng, F. Ginhoux, E. W. Newell, Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. Nature biotechnology 37, 38 (2019) .

116. R. K. Auerbach, B. Chen, A. J. Butte, Relating genes to function: identifying enriched transcription factors using the ENCODE ChIP-Seq significance tool. Bioinformatics 29, 1922-1924 (2013) .

117. R. A. Horn, V. V. Sergeichuk, Congruences of a square matrix and its transpose. Linear Algebra and its Applications 389, 347-353 (2004) .

【0158】

上記の実施形態のうちの少なくともいくつかでは、一実施形態で使用される1つ以上の要素は、置換えが技術的に実現可能である限り、別の実施形態で互換的に使用され得る。当業者は、特許請求される主題の範囲から逸脱することなく、上記の方法及び構造に他の様々な省略、追加、及び修正を行うことができることを理解されたい。全てのかかる修正及び変更は、添付の特許請求の範囲によって定義される主題の範囲内に入ることが意図される。

【0159】

概して、本明細書で使用される用語、及び特に、添付の特許請求の範囲（例えば、添付の特許請求の範囲の本体）で使用される用語は、概して、「オープンな」用語として意図されている（例えば、「含む (including)」という用語は、「含むが、これらに限定されない」と解釈されるべきであり、「有する」という用語は、「少なくとも有する」と解釈されるべきであり、「含む (includes)」という用語は、「含むが、

これらに限定されない」と解釈されるべきであることなど）ことが、当業者には理解されよう。特定の数の導入された特許請求の範囲の記載が意図される場合、かかる意図が特許請求の範囲内で明示的に記載され、かかる記載がない場合、かかる意図は存在しないことが当業者によって更に理解されるであろう。例えば、理解の補助として、以下の添付の特許請求の範囲は、特許請求の範囲の記載を導入するための「少なくとも1つ」及び「1つ以上」という導入語句の使用を含み得る。ただし、かかる語句の使用は、不定冠詞「a」又は「an」による特許請求の範囲の記載の導入が、かかる導入された特許請求の範囲の記載を含む特定の特許請求の範囲を、かかる記載を1つだけ含む実施形態に限定することを意味すると解釈されるべきではない。同じ主張には、「1つ以上」又は「少なくとも1つ」という導入語句と、「a」又は「an」などの不定冠詞が含まれる（例えば、「a」及び／又は「an」は「少なくとも1つ」又は「1つ以上」）；同じことが、特許請求の範囲の記載を紹介するために使用される定冠詞の使用にも当てはまる。加えて、導入された特許請求の範囲の特定の数の記載が明示的に記載されていても、当業者は、かかる記載は、少なくとも記載された数を意味すると解釈されるべきであることを認識するであろう（例えば、他の修飾語なしの「2つの記載」のありのままの記載は、少なくとも2つの記載、又は2つ以上の記載を意味する）。更に、「A、B、及びCなどのうちの少なくとも1つ」に類似する慣習が使用される場合、概して、かかる構成は、当業者が慣習を理解するという意味で意図される（例えば、「A、B、及びCのうちの少なくとも1つを有するシステム」には、Aのみ、Bのみ、Cのみ、A及びB共に、A及びC共に、B及びC共に、並びに／又はA、B、及びC共になどを有するシステムが含まれるが、これらに限定されない）。「A、B、又はCなどのうちの少なくとも1つ」に類似する慣習が使用される場合、概して、かかる構成は、当業者が慣習を理解するという意味で意図される（例えば、「A、B、又はCのうちの少なくとも1つを有するシステム」には、Aのみ、Bのみ、Cのみ、A及びB共に、A及びC共に、B及びC共に、並びに／又はA、B、及びC共になどを有するシステムが含まれるが、これらに限定されない）。明細書、特許請求の範囲、又は図面に関わらず、2つ以上の代替用語を提示する実質的に任意の離接語及び／又は語句は、用語の1つ、用語のいずれか、又は両方の用語を含む可能性を企図するように理解されるべきであることが、当業者によって更に理解されるであろう。例えば、「A又はB」という語句は、「A」又は「B」又は「A及びB」の可能性を含むと理解されるであろう。

10

20

30

【0160】

加えて、本開示の特徴又は態様が、マーカッシュ群の観点から記載される場合、したがって、本開示はまた、マーカッシュ群のいずれもの個々のメンバー又はメンバーのいずれものサブ群の観点から記載されることが、当業者には認識されよう。

【0161】

当業者には理解されるように、あらゆる目的で、例えば、書面による説明を提供する観点から、本明細書に開示される全ての範囲はまた、あらゆる可能なサブ範囲、及びそれらのサブ範囲の組み合わせを包含する。任意のリストされた範囲は、同じ範囲が、少なくとも等しい2分の1、3分の1、4分の1、5分の1、10分の1などに分解されることを十分に示し、分解されることを可能にするものとして容易に認識され得る。非限定的な例として、本明細書で考察される各範囲は、容易に、下側の3分の1、真ん中の3分の1、及び上側の3分の1などに分解され得る。当業者に同様に理解されるように、「最大」、「少なくとも」、「より大きい」、「より少ない」などの全ての用語は、記載される数を含み、上述のようにサブ範囲に後に分解され得る範囲を指す。最後に、当業者に理解されるように、範囲は各個々のメンバーを含む。したがって、例えば、1～3個の物品を有する群は、1個、2個、又は3個の物品を有する群を指す。同様に、1～5個の物品を有する群は、1個、2個、3個、4個、又は5個の物品を有する群を指す、等々。

40

【0162】

上記の本発明は、例示及び例として、理解の明確さの目的で、ある程度詳細に記載されているが、本発明の教示を鑑みて、ある変更及び修正が、添付の特許請求の範囲の趣旨又

50

は範囲から逸脱することなく本発明になされ得ることが、当業者には容易に明らかである。

【0163】

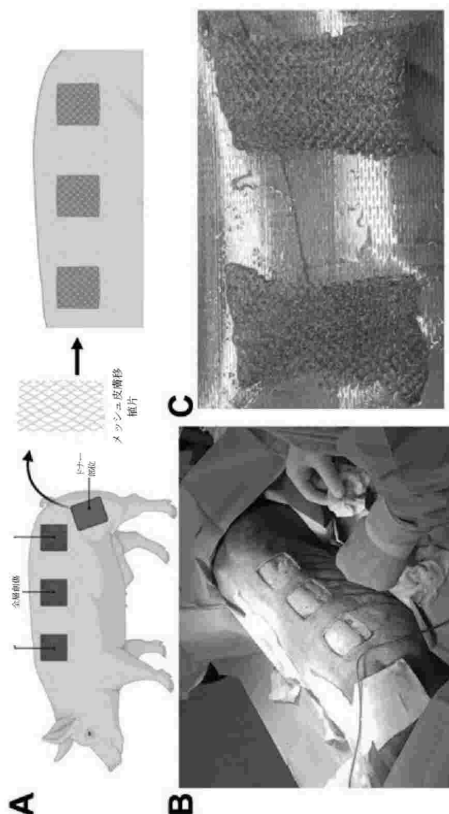
したがって、上記は、本発明の原理を単に例示するものである。当業者は、本明細書に明示的に記載又は示されていないが、本発明の原理を具現化し、その趣旨及び範囲内に含まれる様々な構成を考案することが可能であろうことが理解されるであろう。更に、本明細書に列挙される全ての例及び条件付き言語は、主に、本発明の原理及び本発明者によって当該技術分野を促進するために寄与する概念を閲読者が理解するのを支援することを意図しており、そのような具体的に列挙される例及び条件に限定されるものではないと解釈されるものである。更に、本発明の原理、態様、及び実施形態、並びにそれらの特定の実施例を列挙する本明細書の全ての記述は、それらの構造的及び機能的同等物の両方を包含することが意図される。加えて、そのような同等物は、現在知られている同等物及び将来開発される同等物の両方、すなわち、構造に関係なく、同じ機能を実施する開発される任意の要素を含むことが意図される。更に、本明細書に開示のいかなるものも、そのような開示が特許請求の範囲に明示的に列挙されているかどうかに関わらず、公共に供することを意図しない。

【0164】

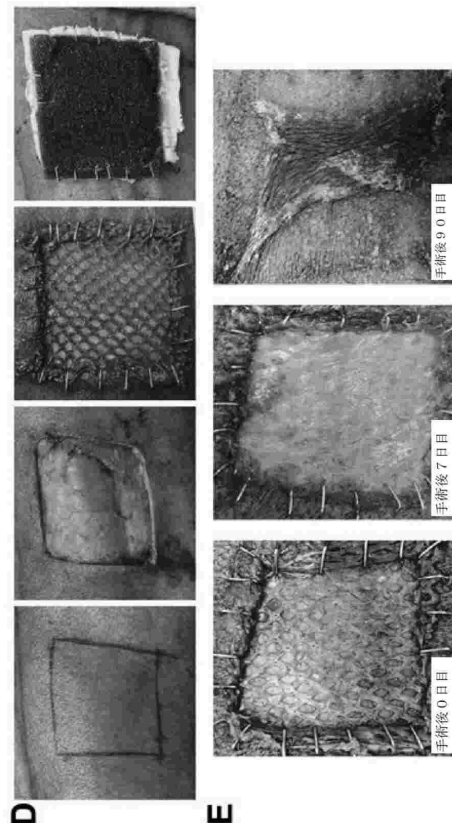
したがって、本発明の範囲が、本明細書に示され記載される例示的な実施形態に限定されることは意図されていない。むしろ、本発明の範囲及び趣旨は、添付の特許請求の範囲によって具現化される。特許請求の範囲において、米国特許法第112条(f)又は米国特許法第112条(6)は、特許請求の範囲への限定の始まりの正確な語句「のための手段」又は正確な語句「のためのステップ」が列挙されている場合にのみ、そのような特許請求の範囲に限定するために公使されると明示的に定義され、そのような正確な語句が、特許請求の範囲への限定において使用されない場合、米国特許法第112条(f)又は米国特許法第112条(6)は行使されない。

【図面】

【図1-1】



【図1-2】



10

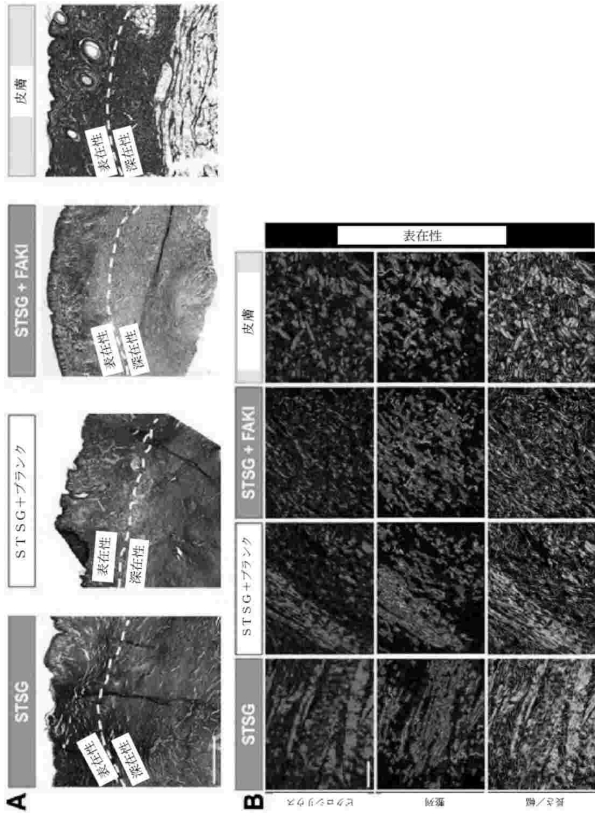
20

30

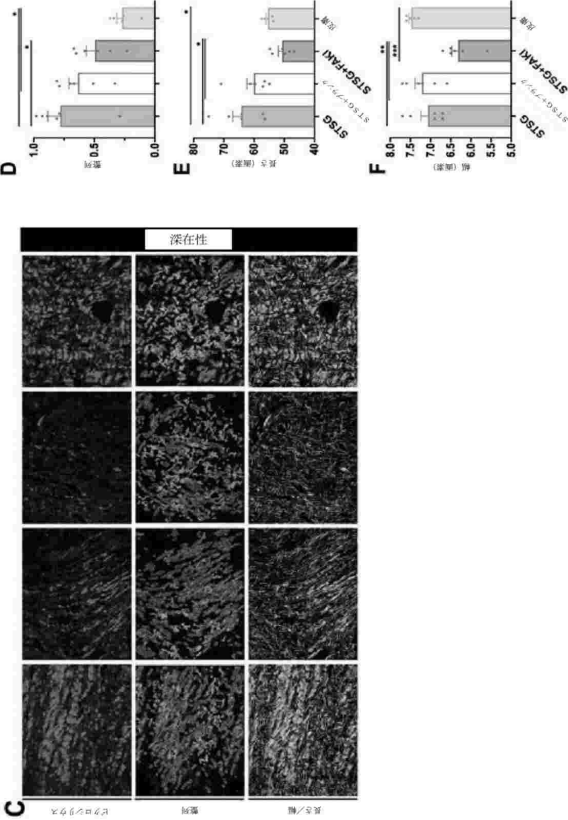
40

50

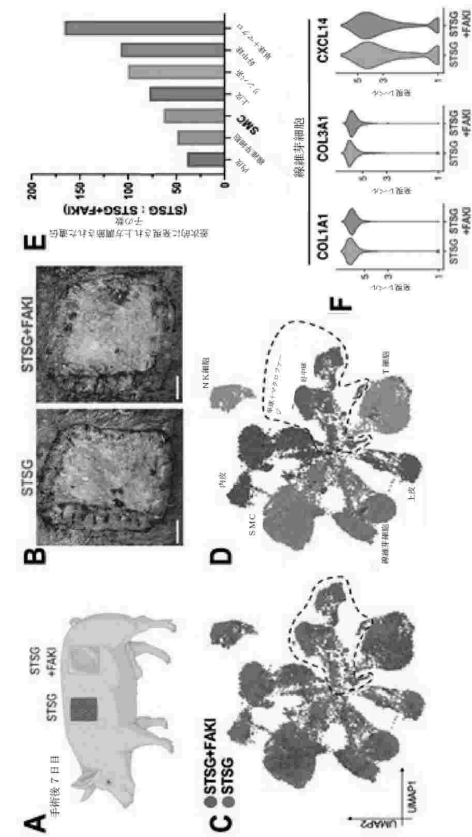
【図 4 - 1】



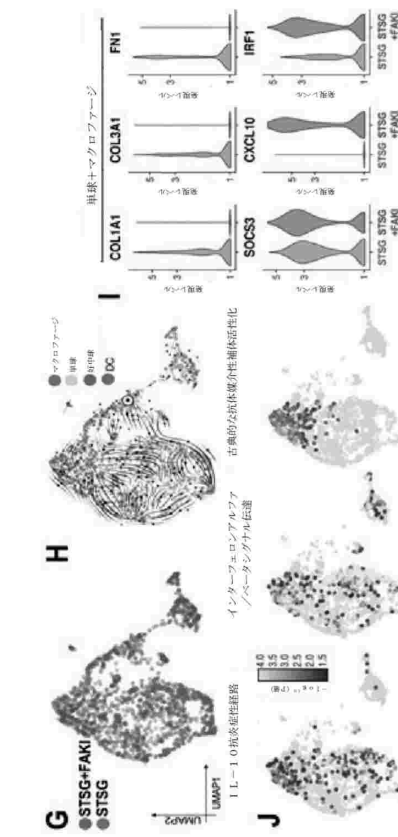
【図 4 - 2】



【図 5 - 1】



【図 5 - 2】



10

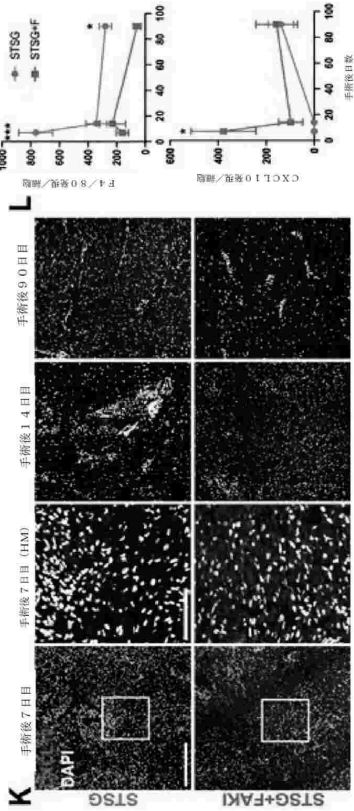
20

30

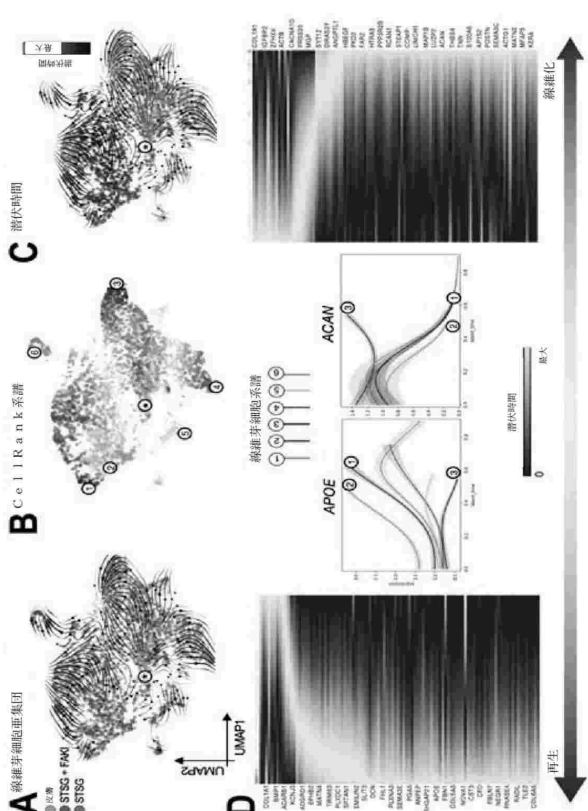
40

50

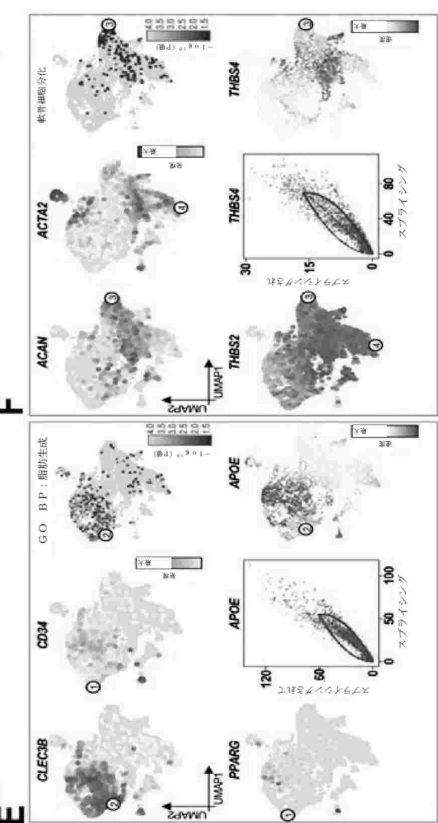
【図 5 - 3】



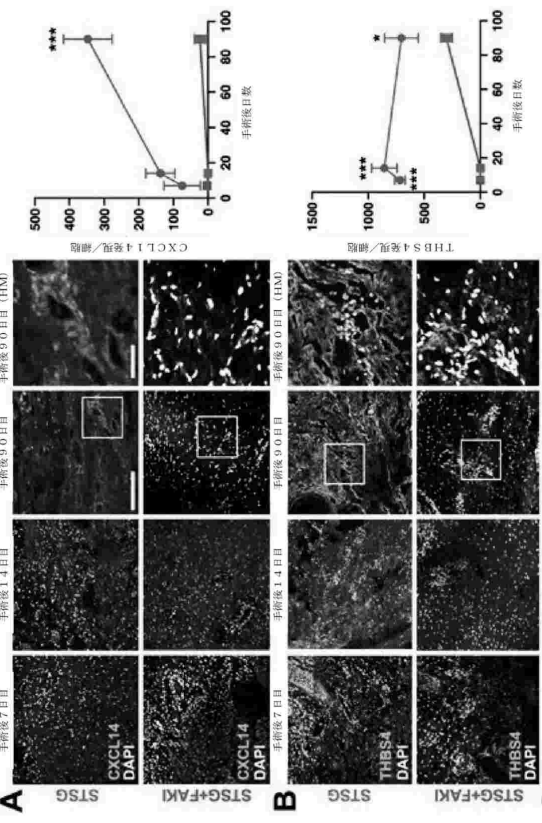
【図 6 - 1】



【図 6 - 2】



【図 7 - 1】



10

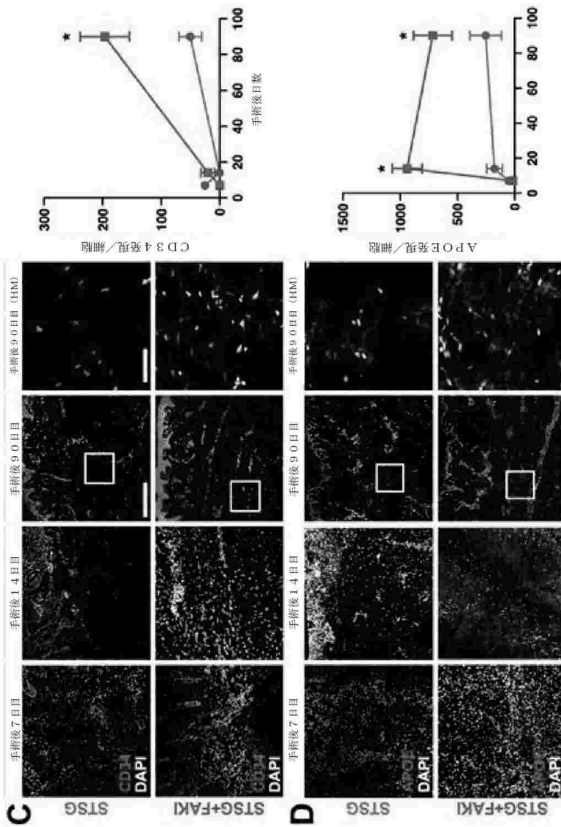
20

30

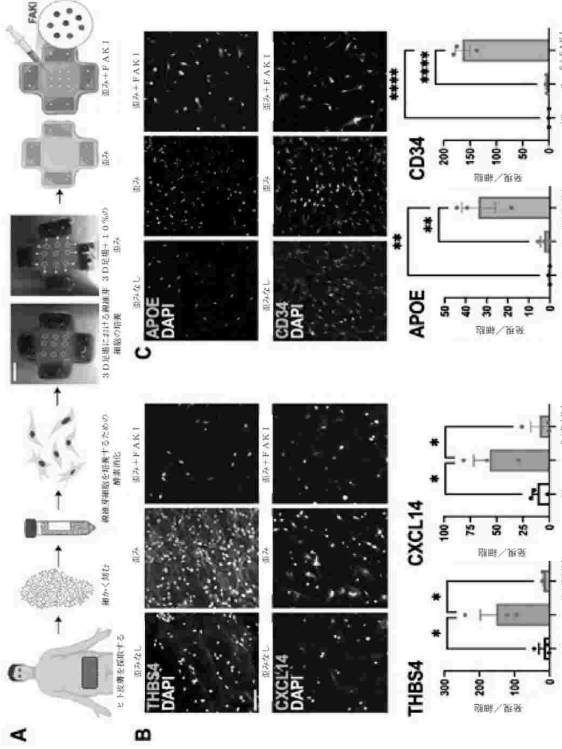
40

50

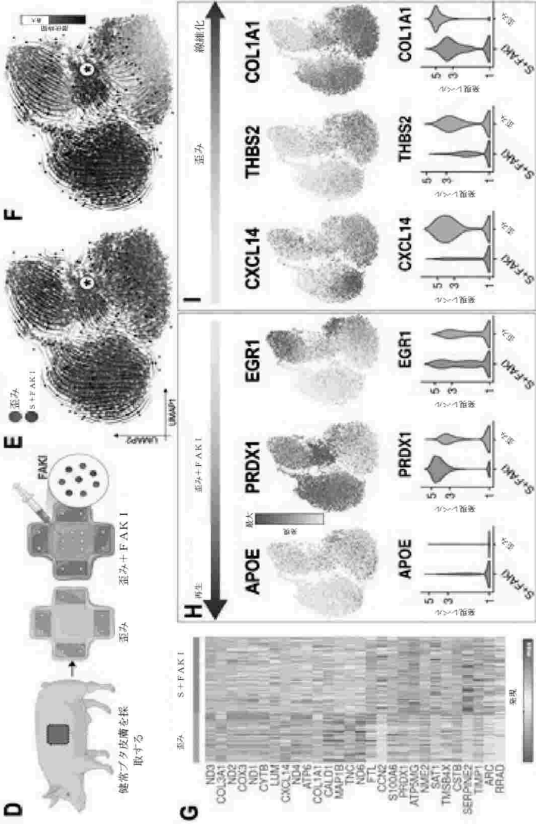
【図 7 - 2】



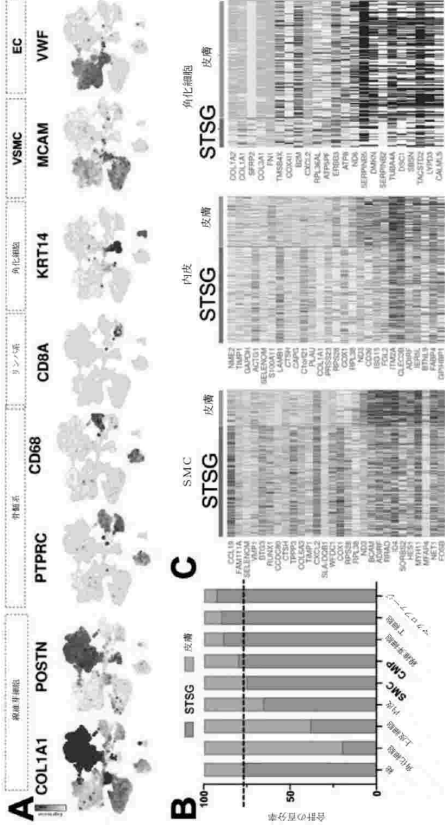
【図 8 - 1】



【図 8 - 2】



【図 9 - 1】



10

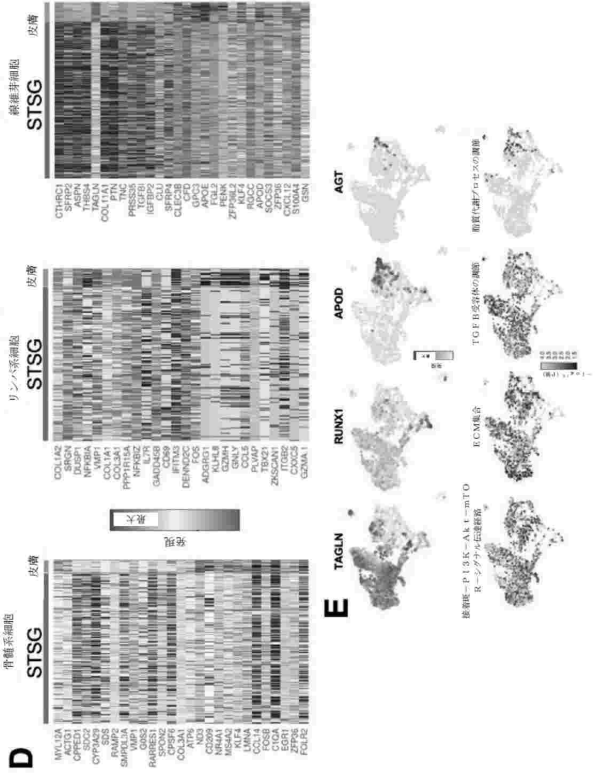
20

30

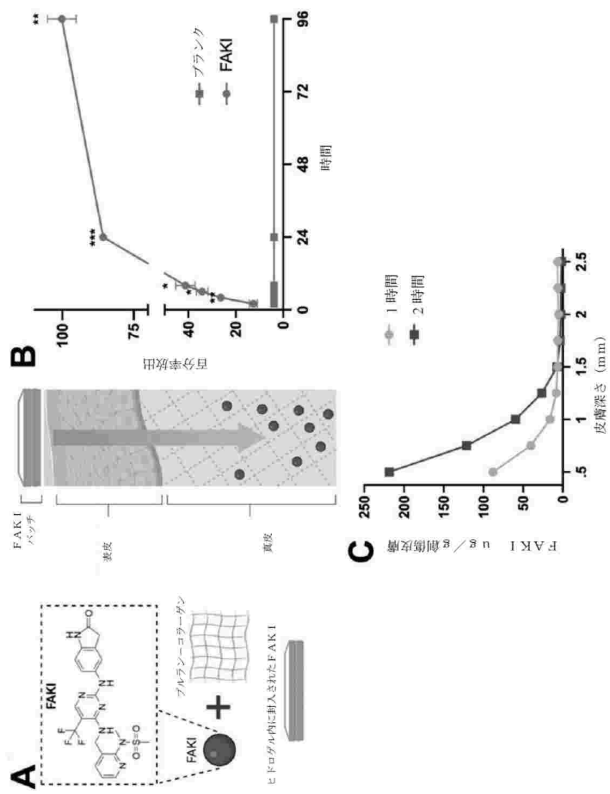
40

50

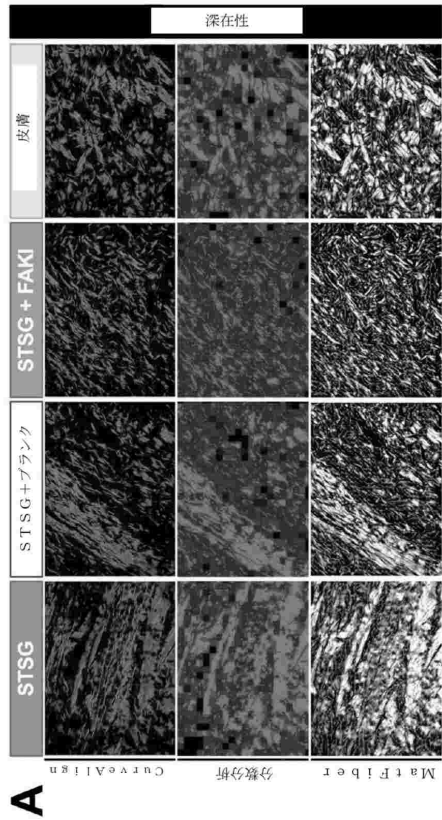
【図 9 - 2】



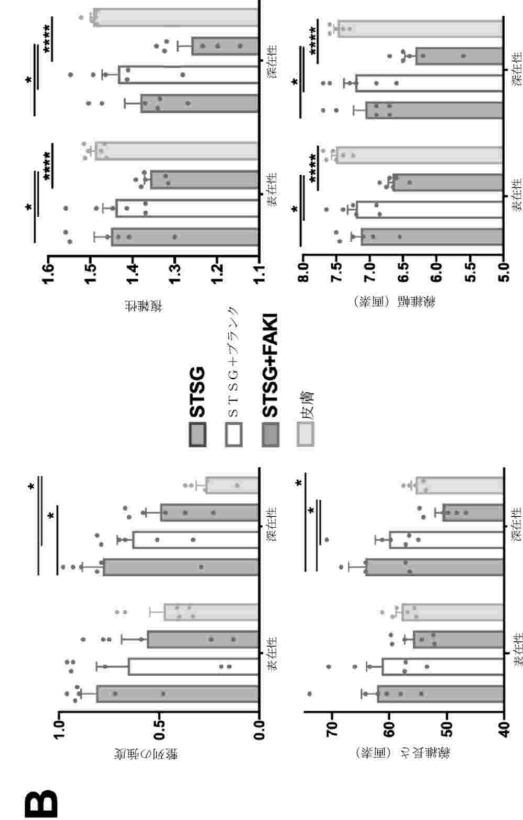
【図 10】



【図 11 - 1】



【図 11 - 2】



10

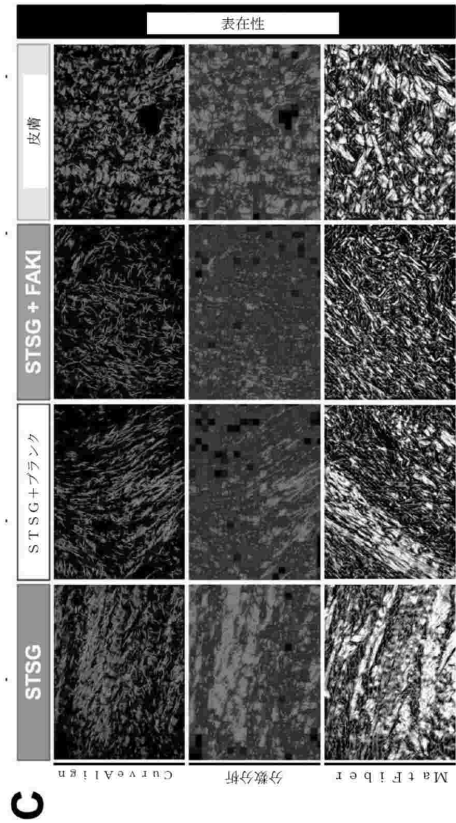
20

30

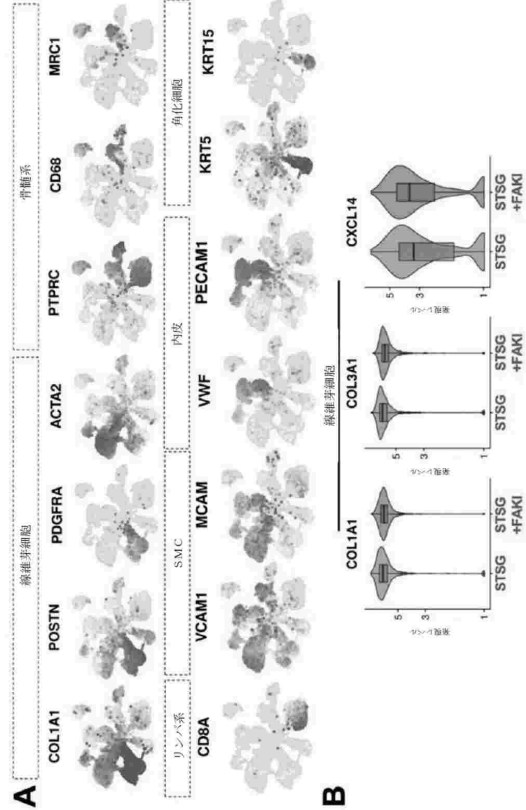
40

50

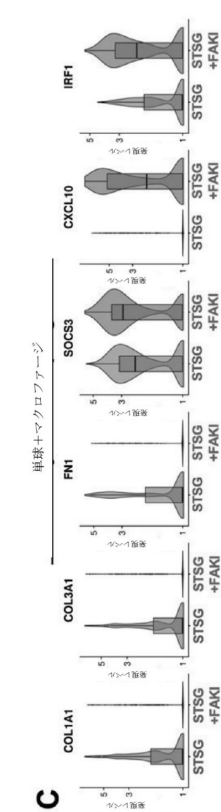
【図 1 1 - 3】



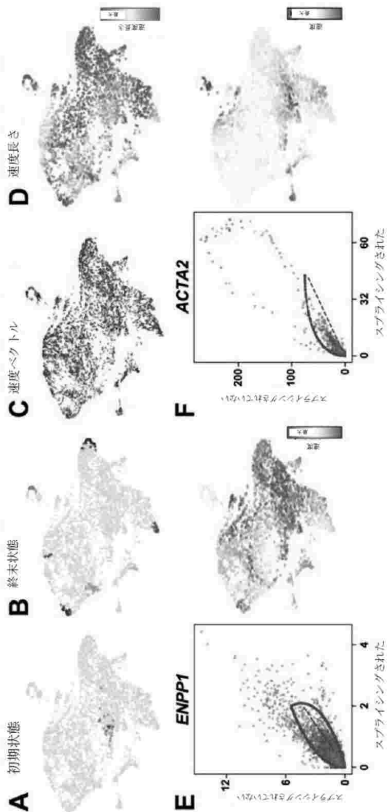
【図 1 2 - 1】



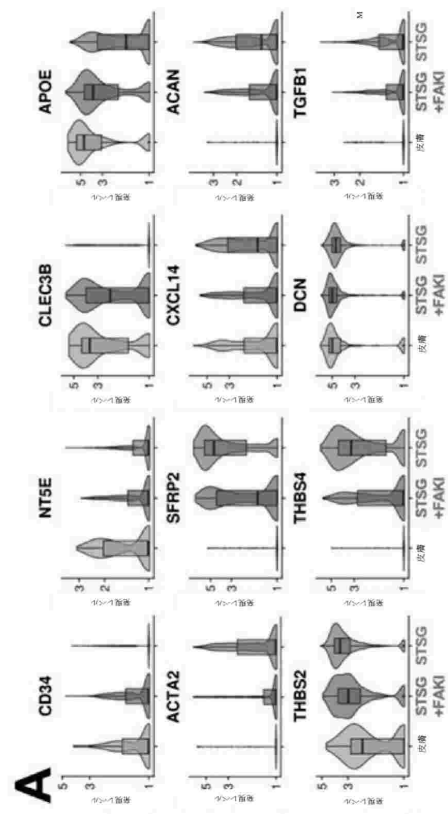
【図 1 2 - 2】



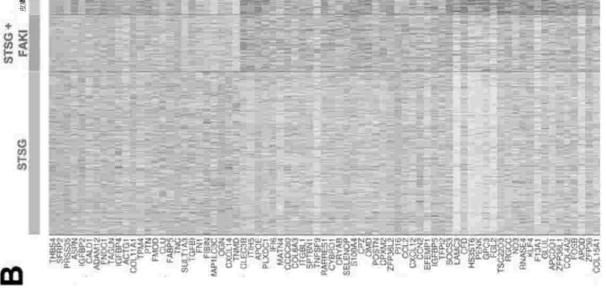
【図 1 3】



【図 1 4 - 1】



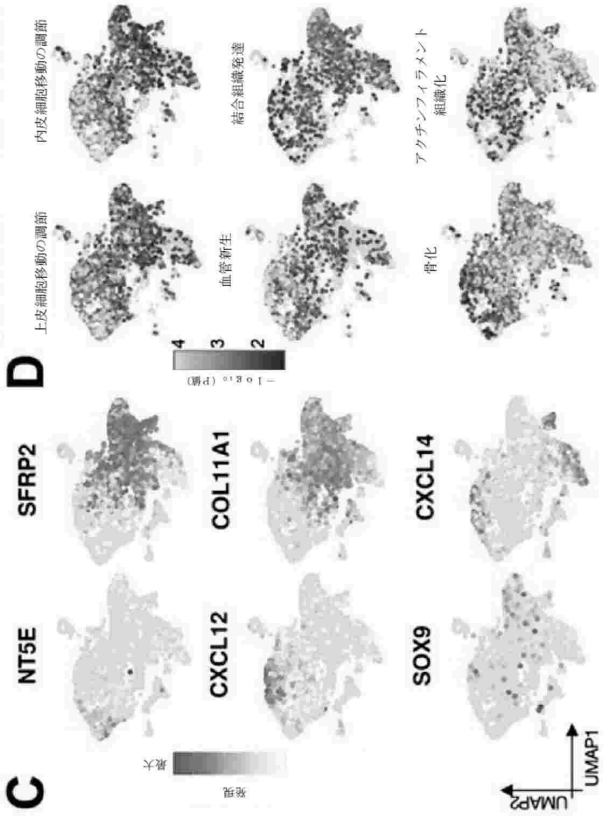
【図 1 4 - 2】



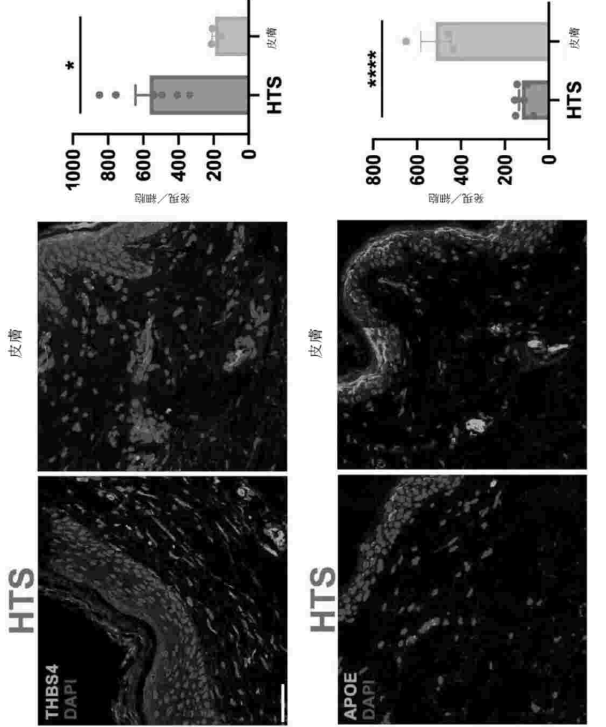
10

20

【図 1 4 - 3】



【図 1 5】



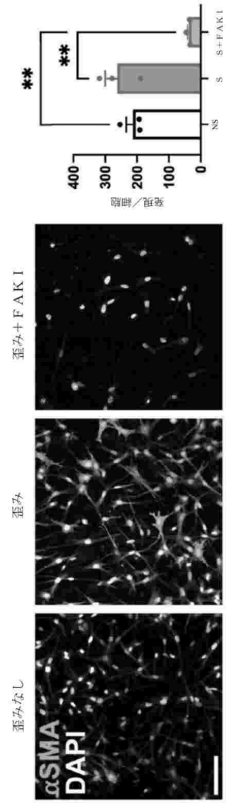
30

40

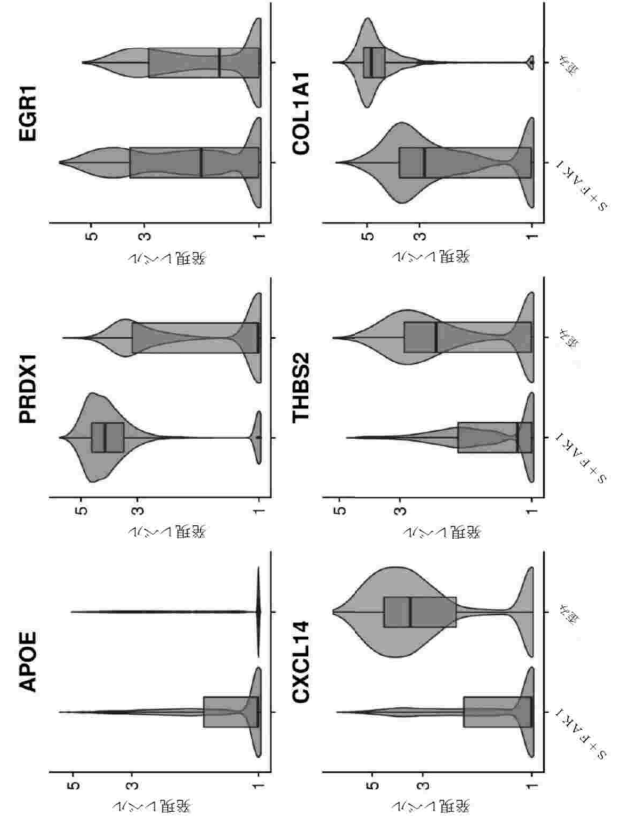
50

(63)

【図 16】



【図 17】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US22/38189
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. A61L 27/36; A61F 2/10; A61K 35/36; A61K 45/06; A61L 15/42; A61L 15/44; A61L 15/60; A61L 27/52 (2022.01) ADD. A61P 17/02 (2022.01) CPC - INV. A61L 27/362; A61F 2/105; A61K 9/0014; A61K 35/36; A61K 45/06; A61L 15/425; A61L 15/44; A61L 15/60; A61L 27/3641; A61L 27/3687; A61L 27/52; A61L 27/54; A61L 27/56; A61L 27/60; A61P 17/02 ADD. A61L 2300/602; A61L 2430/34 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/222520 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 21 November 2019; page 9, first paragraph; paragraphs [0068], [0082], [0114]	1, 3/1, 21-26, 28, 30
X	GURTNER. "Prevention of scar formation in the skin using a topical FAK inhibitor" . . Web. 08 December 2020; [Retrieved on 29 September 2022]. Retrieved from the internet: <url: https://doctrc.org/wp-content/uploads/2021/08/Gurtner.pdf>; page 1, 'Solutions' and 'Competitive Advantage' paragraphs; page 2, figure 5	1-3, 28, 29
A	US 9,655,967 B2 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 23 May 2017; entire document	1-3, 21-26, 28-30
A	US 2014/0072613 A1 (LANDER, C) 13 March 2014; entire document	1-3, 21-26, 28-30
A	WO 2021/021607 A2 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 04 February 2021; entire document	1-3, 21-26, 28-30
A	US 2017/0224874 A1 (VICUS THERAPEUTICS, LLC) 10 August 2017; entire document	1-3, 21-26, 28-30
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 September 2022 (30.09.2022)		Date of mailing of the international search report OCT 25 2022
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/38189

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-20, 27
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 L 27/60 (2006.01)	A 6 1 L 27/60	
A 6 1 L 27/20 (2006.01)	A 6 1 L 27/20	

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB
,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,
LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,
QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,W
S,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. M A T L A B

8 5 4、セカンド・フロア、ブロードウェイ・ストリート 4 1 5、スタンフォード・オフィス・オ
ブ・テクノロジー・ライセンシング

(72)発明者 ケレン・チェン

アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、エムシー 8 8 5 4、セカンド
・フロア、ブロードウェイ・ストリート 4 1 5、スタンフォード・オフィス・オブ・テクノロジー
・ライセンシング

(72)発明者 ドミニク・ヘン

アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、エムシー 8 8 5 4、セカンド
・フロア、ブロードウェイ・ストリート 4 1 5、スタンフォード・オフィス・オブ・テクノロジー
・ライセンシング

F ターム (参考) 4C081 AB19 CD011 DA12

4C084 AA19 MA02 MA63 NA05 NA14 ZA891 ZA892 ZC751