

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5366353号
(P5366353)

(45) 発行日 平成25年12月11日(2013.12.11)

(24) 登録日 平成25年9月20日(2013.9.20)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 1/38 (2006.01)	C 1 2 N 1/38
A 6 1 K 35/36 (2006.01)	A 6 1 K 35/36
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00 C
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02

請求項の数 16 外国語出願 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-153373 (P2005-153373)	(73) 特許権者	391023932 ロレアル
(22) 出願日	平成17年5月26日(2005.5.26)		フランス国パリ, リュ ロワイヤル 14
(65) 公開番号	特開2005-341967 (P2005-341967A)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(43) 公開日	平成17年12月15日(2005.12.15)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
審査請求日	平成17年5月26日(2005.5.26)	(72) 発明者	ニコラ フォーチュネル フランス国 91650 ブルイエ, シ ュマン デ グラヴィエール 2
審判番号	不服2011-4806 (P2011-4806/J1)	(72) 発明者	ドミニク ベルナル フランス国 75015 パリ, リュ デュ ソメ デ ザルプ 5
審判請求日	平成23年3月2日(2011.3.2)		
(31) 優先権主張番号	0451037		
(32) 優先日	平成16年5月26日(2004.5.26)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞及び組織工学における L I F の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトの皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の集合体の、(i)インビトロにおける増殖を促進させると同時に、それらを未分化状態で維持させ、及び(ii)多重層上皮を生成するそれらの能力を維持し及び/又は増大させるための、

L I F ;

皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体に対して L I F 活性を有する L I F ポリペプチドであって、L I F ポリペプチドは L I F のアミノ酸配列に少なくとも 95% のアミノ酸配列同一性を有するもの ;

及びそれらの混合物から選択される化合物の培養培地中 0 . 0 1 p g / m l ~ 1 m g / m l の使用。

10

【請求項 2】

ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体のライブラリ又は培養体を得るための方法における請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

多重層の再構成された表皮及び/又は再構成された皮膚を得るための方法における、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

L I F が、精製された L I F、組換え L I F、L I F を含む粉碎細胞材料又は細胞抽出物、L I F を含有する細胞培養上清、又はそれらの混合物の形態で提供されることを特徴

20

とする、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 5】

L I F ;

皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体に対して L I F 活性を有する L I F ポリペプチドであって、L I F ポリペプチドは L I F のアミノ酸配列に少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性を有するもの；

及びそれらの混合物から選択される化合物を 0 . 0 1 p g / m l ~ 1 m g / m l で含有する培養培地において、ヒトのケラチノサイト調製物を増殖させる少なくとも一の工程を含んでなり、

前記 L I F 又は L I F ポリペプチドはヒトの皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の集合体の、(i)インビトロにおける増殖を促進させると同時に、それらを未分化状態で維持させ、及び (i i)多重層上皮を生成するそれらの能力を維持し及び/又は増大させるものである、ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体のライブラリ又は培養体を得て、多重層の再構成された表皮及び/又は再構成された皮膚の調製するための方法であって、ヒトのケラチノサイト調製物が、ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体にて、I 型コラーゲン基質への急速な付着、及び付着した細胞の回収によりプレ濃縮されることを特徴とする方法。

10

【請求項 6】

前記細胞の回収が、0 . 0 5 % のトリプシン及び 0 . 0 2 % の E D T A の存在下、剥離によって実施されることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

L I F ;

皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体に対して L I F 活性を有する L I F ポリペプチドであって、L I F ポリペプチドは L I F のアミノ酸配列に少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性を有するもの；

及びそれらの混合物から選択される化合物の存在下、前記増殖した細胞を低温保存する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 8】

(i)ヒトのケラチノサイト調製物、及び

(i i) L I F ; 皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体に対して L I F 活性を有する L I F ポリペプチドであって、L I F ポリペプチドは L I F のアミノ酸配列に少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性を有するもの；及びそれらの混合物から選択された化合物を培養培地中 0 . 0 1 p g / m l ~ 1 m g / m l で補足されたヒトのケラチノサイト細胞用の培養培地

30

を含む、ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体のライブラリ又は培養体を生成して、多重層の再構成された表皮及び/又は再構成された皮膚を生成するためのキットであって、

前記 L I F 又は L I F ポリペプチドはヒトの皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の集合体の、(i)インビトロにおける増殖を促進させると同時に、それらを未分化状態で維持させ、及び (i i)多重層上皮を生成するそれらの能力を維持し及び/又は増大させるものである、キット。

40

【請求項 9】

多重層の再構成された表皮及び/又は再構成された皮膚の調製方法であって、

該方法は、真皮支持体又は真皮等価物上に、L I F ; 皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体に対して L I F 活性を有する L I F ポリペプチドであって、L I F ポリペプチドは L I F のアミノ酸配列に少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性を有するもの；及びそれらの混合物から選択される化合物の培養培地中 0 . 0 1 p g / m l ~ 1 m g / m l 存在下で増幅された、ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の集合体を播種することからなる工程を含んでなり、

前記 L I F 又は L I F ポリペプチドはヒトの皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の集合体

50

の、(i)インビトロにおける増殖を促進させると同時に、それらを未分化状態で維持させ、及び(ii)多重層上皮を生成するそれらの能力を維持し及び/又は増大させるものである、方法。

【請求項10】

多重層の再構成された表皮及び/又は再構成された皮膚を生成するためのキットであって、該キットは

(i)真皮支持体と

(ii)ヒトのケラチノサイト調製物と

(iii) L I F ; 皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体に対して L I F 活性を有する L I F ポリペプチドであって、L I F ポリペプチドは L I F のアミノ酸配列に少なくとも 95% のアミノ酸配列同一性を有するもの；及びそれらの混合物から選択された化合物を、培養培地中 0.01 pg/ml ~ 1 mg/ml で含む培養培地とを含有してなり、

10

前記 L I F 又は L I F ポリペプチドはヒトの皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の集合体の、(i)インビトロにおける増殖を促進させると同時に、それらを未分化状態で維持させ、及び(ii)多重層上皮を生成するそれらの能力を維持し及び/又は増大させるものである、キット。

【請求項11】

再構成された表皮及び/又は再構成された皮膚が皮膚の損傷を処理することを意図した、請求項9に記載の方法。

20

【請求項12】

再構成された表皮及び/又は再構成された皮膚が、火傷の処理を意図したものであることを特徴とする、請求項9に記載の方法。

【請求項13】

再構成された表皮及び/又は再構成された皮膚が、皮膚切除による、皮膚の損傷の処理を意図したものであることを特徴とする、請求項9に記載の方法。

【請求項14】

再構成された表皮及び/又は再構成された皮膚が、遺伝病に関連した皮膚の損傷の処理を意図したものであることを特徴とする、請求項9に記載の方法。

【請求項15】

30

ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体が、皮膚に影響を及ぼす遺伝病を被った個人から得られることを特徴とする、請求項9に記載の方法。

【請求項16】

皮膚に影響を及ぼす遺伝病が、表皮水疱症、色素性乾皮症、層状魚鱗癬又は X-染色体関連魚鱗癬から選択されることを特徴とする、請求項15に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

本発明の技術分野は、ヒトの皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の培養方法、及び多重層上皮、特に表皮等価物及び/又は皮膚等価物の調製におけるそれらの使用にある。

40

【0002】

本発明は、(i)ヒトの皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の集合体の、インビトロにおける増殖を促進させると同時に、それらを未分化状態で維持させ；及び/又は(ii)多重層上皮、特に多重層表皮、及び/又は全て又はいくつかの皮膚付属物を生成するそれらの能力を維持し及び/又は増大させるための、L I F、L I F 類似体、L I F 模倣剤、及び内因性 L I F の発現を刺激可能な生成物、及びそれらの混合物から選択される化合物の有効量の使用に関する。

また、L I F の存在下で、ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体のライブラリ又は培養体を得るための方法、再構成された表皮及び/又は再構成された皮膚を得るための方法、再構成された表皮又は細胞のライブラリを作製するためのキット、ダメージを

50

受けた皮膚を示す個人(第3度火傷を有する個人、及び皮膚に影響を及ぼす遺伝病を被った個人)の処置を意図した幹細胞又は再構成された表皮を調製するための、LIFの使用に関する。

【0003】

本発明において、「ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の集合体」なる表現は、多重層上皮、特に多重層表皮、及び/又は全て又はいくつかの皮膚付属物(皮脂腺、毛髪の小胞、爪等)を生成し、自己再生及び/又は増殖可能な表皮の基底層に天然に存在する成人体細胞の幹細胞の集合体を意味する。ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体のこの集合体は、例えば、成人の皮膚及び/又は新生児の皮膚のサンプルから得られたものであってもよい。

10

「細胞の自己再生能」なる表現は、少なくとも一方が母細胞と同一である、2つの娘細胞を付与するように分割可能な細胞を意味することを意図している。複雑型細胞の集合体の規模では、自己再生という概念は、連続的な細胞分割の間一定である表現型及び機能的特徴を有する細胞区画の維持を意味している。本発明において、このことは、強い増殖能と、多重層上皮、特に多重層表皮の生成能で特徴付けられる、未分化の皮膚の幹細胞及び/又は表皮前駆体を構成する区画の維持に関与している。

「細胞の増殖能」なる表現は、増殖して2つの娘細胞を付与可能な細胞を意味することを意図しており、母細胞の特徴及び能力は、必ずしも2つの娘細胞の少なくとも一方に伝達されるものではない。

自己再生現象を伴ってもそうでなくてもよい増殖は、増殖する細胞集合体において興味ある細胞区画の漸次的減少又は消失に帰する傾向がある。

20

本発明において、細胞増殖は、強い増殖能と、多重層上皮、特に多重層表皮の生成能で特徴付けられる、未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の区画の漸次的減少及び/又は消失を伴う可能性がある。

この集合体は、特に未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体を含む。

【0004】

組織ヒエラルキーの最も上流に位置する幹細胞区画は、強い自己再生能(長期間にわたる増殖能)とまた多能性(特に、多重層上皮、特にケラチノサイト、及び/又は皮膚付属物の種々の細胞型、例えば毛髪の小胞、皮脂腺、爪等)により特徴付けられる。

前記幹細胞から派生した表皮前駆体は、かなりではあるが一般的に幹細胞の増殖能よりは低い増殖能を示し、また多重層上皮、特に多重層表皮を生成する能力によって特徴付けられる。

30

【0005】

胚由来の幹細胞(ES細胞)は、先天的無制限に拡大する可能性を有する(Amitら, Dev Biol. 227:271-278, 2000; Odoricoら, Stem Cells. 19:193-204, 2001)。事実、それらは、未分化状態を保持しつつ、加齢の兆候なしに増殖することができる。

特にW002/097068には、マウス胚の幹細胞のマウスケラチノサイトへの分化を誘発させる方法が記載されている。

【0006】

他方、成人体細胞の幹細胞が拡大する可能性は、有糸分裂時計により制限される(Vaziriら, Proc Natl Acad Sci USA. 91:9857-9860, 1994; Changら, Proc Natl Acad Sci USA. 92:11190-11194, 1995)。この制限された拡大能力は、特に表皮の幹細胞及び前駆体に関係している(Ramirezら, Genes Dev. 15:398-403, 2001; Counterら, Lancet. 361:1345-1346, 2003; Fortunelら, J. Cell Sci. 116:4043-4052, 2003)。

40

制限された数、分割した後、成人組織から派生した幹細胞及び前駆体は分化を指向し、老化の兆候を示し、そして死亡する。これらの特徴は、細胞ライブラリの作製、及び細胞及び組織工学(例えば:皮膚等価物の調製)における制限因子を表す。

【0007】

以前、本出願人は、W003/038073(ロレアル/CNRS)において、細胞外マトリックス成分に、調製物を付着させることによって、ケラチノサイト調製物から、ケラチノサイト

50

幹細胞の集合体を濃縮する方法を提案している。

よって、細胞培養法、特に細胞を増殖及び／又は分化させる方法は、成人体細胞の幹細胞と胚の幹細胞とに特異的な特徴を考慮すべきであり、それは、(i)胚の幹細胞に対しては制限されず、成人の幹細胞に対しては制限されると認知されている、それらの拡大可能性、及び(ii)「全能性」の胚の幹細胞(個人の全ての組織及び器官型を生成可能)と比較して、皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体(皮膚組織を生成可能)にとってより進んだそれらの分化段階によって異なる。

【0008】

よって、ヒトの皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の増殖を促進可能であると同時に、それらを未分化の状態に維持可能で、それらの器官形成能、すなわち多重層上皮、特に多重層表皮、及び／又は全て又はいくつかの皮膚付属物(毛髪の小胞、皮脂腺、爪等)を生成する能力を維持、さらには増大可能とさせる薬剤を見出す必要がある。

【0009】

今日、本出願人は、予期しないことに、白血病阻害因子(LIF)を使用することにより

：

(i)ヒトの皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の集合体の、インビトロにおける増殖を促進可能であると同時に、それらを未分化の状態に維持可能であり；

(ii)天然の表皮(角質層、顆粒層、超基底層、及び基底層を有する)に匹敵する組織学的特徴を示す品質の、多重層の再構成された表皮を得るために必要なものを明らかにすることができる；

ことを見出した。事実、LIFの不在下で再構成された表皮は、LIFの存在下で再構成された表皮と比較して、構造的異常が見出されることが示されている。

【0010】

LIFは骨髄性白血病細胞、例えばマウスM1細胞の増殖を抑制し、マクロファージの分化を促進させることが可能な因子として、US6261548に記載されており、それには、感染に対する反応性に関与するマクロファージの機能を変化させ、ある種の形態の骨髄性白血病を抑制させるための非増殖性の治療剤としての使用が示唆されている。

皮膚において、LIFは、インビボ及びインビトロで、ケラチノサイトにより自然に生成されるサイトカインであり(Pagliaら, Br J Dermatol. 134: 817-823, 1996)、特にこの因子は、乾癬(Bonifatiら, Arch Dermatol Res. 290: 9-13, 1998; Szepietowskiら, J Dermatol. 28: 115-122, 2001)、又はある種のアレルギー(Szepietowskiら, Contact Dermatitis. 36: 21-25, 1997)等の、種々の皮膚病に関連した炎症プロセスの制御に関与していることが知られている。

しかしながら、インビトロにおいて、胚の幹細胞と比較して制限された拡大可能性を有することが知られており、胚の幹細胞よりもより進んだ分化段階である、成人体細胞の幹細胞の増殖を促進させるために、LIF、LIF類似体、LIF模倣剤、又は内因性LIFの発現を刺激可能な生成物を使用すること、さらにインビトロにおいて、ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の増殖を促進させるためにLIFを使用することについては、記載も示唆もされておらず、皮膚(再構成された表皮及び再構成された皮膚)の器官型培養モデルを改善することについてもしかりである。

【0011】

ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体のライブラリ又は培養体を得るため、及び病変のある皮膚を有する個人(第3度火傷を被った個人、皮膚に影響を及ぼす遺伝病を被った個人)を処置することを意図した皮膚等価物を調製するための、この発見が重要であることが理解される。

【0012】

皮膚は、生物体とその環境との間に物理的障壁を構成する。それは、2つの組織：表皮と真皮とからなる。

真皮は表皮に堅牢な支持部を付与している。真皮はまた表皮の栄養成分でもある。真皮は主として線維芽細胞と細胞外マトリックスとからなり、細胞外マトリックスは、特にコ

10

20

30

40

50

ラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、及び基底物質として公知の物質から構成され、これらの成分は本質的に線維芽細胞によって合成される。さらに、白血球、肥満細胞又は組織マクロファージ (tissue macrophage) もそこに見出される。また、真皮には血管と神経線維も含まれる。

【 0 0 1 3 】

表皮は、平均して100 μm厚の落屑する多重層上皮であり、皮膚幹細胞、未分化の表皮前駆体、さらに成熟/分化プロセスに関与する細胞を含む基底層、基底細胞上に配された数層の多面細胞からなる「有棘」層、細胞質封入体、ケラトヒアリン顆粒を含む扁平細胞からなるいわゆる「顆粒」層、そして最後に、角質細胞と称される分化の最終段階のケラチノサイトからなる角質層(horny layer)(又は角質層:stratum corneum)と称される上層に一般的に分割される。角質細胞は、ケラチノサイトから派生するミイラ化した無核の角質化細胞である。角質細胞の積層により、とりわけ、表皮の障壁機能として機能する角質層が構成される。

10

表皮分化は、基底ケラチノサイトが移動しながら変形し、完全に角質化した死亡細胞である角質細胞の形成を生じる、連続した指向性の成熟プロセスに続く。この分化は、完全に協調した現象の結果であり、結果として一定の厚みが維持され、よって表皮のホメオスタシスが確保される。このことは、分化プロセスに入る細胞の数と、落屑する細胞の数との厳密な調節が存在していることを意味する。正常な落屑プロセスの課程において、最も表面にある角質細胞のみが表皮表面から剥離する。

【 0 0 1 4 】

20

その暴露のために、皮膚は、様々なタイプの環境攻撃を受けるおそれがあり、その最も深刻なものは、結果的に死に至る場合もある。重度の火傷を被った患者は、体表面の80%以上に皮膚組織の破壊がみられ、破壊された全ての領域上の皮膚を、十分再生可能とする程の量の皮膚等価物が成功裏に生成されることによつてのみ、助けることができるであろう。

よつて、皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の拡大可能性を制御すること、及びエキソピボで増幅された細胞から器官型の皮膚培養物を発育させることは、自己生成(Ronfardら, Burns. 17: 181-184, 1991、及びTransplantation. 70: 1588-1598, 2000)及び/又は異種生成(Heftonら, Lancet. 2: 428-430, 1983; Brayeら, Med Biol Eng Comput. 38: 248-252, 2002)、第3度火傷を被った個人の処置を意図した皮膚組織グラフトにとってまさに重要な問題である。

30

【 0 0 1 5 】

皮膚移植片から派生し、エキソピボで増幅された細胞から生成された皮膚等価物は、母斑(Kumagaiら, Ann Plast Surg. 39: 483-488, 1997)又は入れ墨(Kumagaiら, An Plast Surg. 33: 385-391, 1994)の外科的切除の後に、皮膚組織を再生させるための自己グラフトを生成させるためにも使用される。

また皮膚は、その整合性を危うくさせる遺伝的原因のある種々の病気によつても影響を受けるおそれがある。これらは、例えば、真皮と表皮の間の結合性における永続的欠陥により特徴付けられる表皮水疱症(Eadyら, J. Dermatol. 28: 638-640, 2001); 表皮の角質層の病的厚化を伴う魚鱗癬(DiGiovanna & Robinson-Bostom, Am J Clin Dermatol. 4: 81-95, 2003)である。

40

【 0 0 1 6 】

皮膚に影響を及ぼす、他の種類の遺伝的病気、例えば色素性乾皮症により、結果として、環境からの「攻撃」に対するこの組織の反応性に機能障害が生じる。これらの病気は紫外線(UV)により誘発されるDNAダメージを切除するメカニズムの欠陥により特徴付けられ、その臨床的結果、皮膚癌の発現頻度が増加する(Sarasin, Mutat Res. 428: 5-10, 1999)。

よつて、それらは重症の病変であり、現在までに、有効で便宜的な薬学的処置はなされていない。しかしながら、これらの病気のいくつかであると同定されている一遺伝子の起源のものは、遺伝子治療による処置の展望が開けている(Spiritoら, J Gen Med. 3: 21-3

50

1, 2001 : Magnaldo & Sarasin, Mutat Res, 509 : 211-220, 2002)。

【 0 0 1 7 】

事実、機能不全の回復は、影響を受けた個人から取り出された皮膚サンプルから派生したケラチノサイトにおいて得られ、それはエクスピボで培養され、いくつかの皮膚の遺伝病のケースにおいては、レトロウィルスベクターを使用する遺伝子移入により訂正されるものである。この種のアプローチを通して、特に層状魚鱗癬(Choateら, Hum Gene Ther. 7 : 2247-2253, 1996)、X-染色体関連魚鱗癬(Freibergら, Hum Mol Genet. 6 : 927-933, 1997)、及び種々のグループの色素性乾皮症(Carreauら, Hum Gene Ther. 6 : 1307-1315, 1995 ; Arnaudeau-Begardら, Hum Gene Ther. 14 : 983-996, 2003)の影響を受けたケラチノサイトの遺伝的訂正を得ることができる。

10

よって、皮膚に影響を及ぼす遺伝病を被った患者、及び/又は正常な個人から派生した皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体を、エクスピボで「マニピュレートする」ための培養システムを有するようになることは、これらの細胞から、できる限り生理的な表皮等価物及び/又は皮膚等価物を得るために重要であると理解される。

【 0 0 1 8 】

よって、本発明の第1の主題は、(i)ヒトの皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の集合体の、インビトロにおける増殖を促進させると同時に、それらを未分化状態で維持させ；及び/又は(ii)多重層上皮を生成するそれらの能力を維持し及び/又は増大させるための、白血病阻害因子(LIF)、LIF類似体、LIF模倣剤、及び内因性LIFの発現を刺激可能な生成物、及びそれらの混合物から選択される化合物の有効量の使用にある。

20

特に本発明は、ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体のライブラリ又は培養体を得ることを意図した方法における、LIF、LIF類似体、LIF模倣剤、及び内因性LIFの発現を刺激可能な生成物、及びそれらの混合物から選択される化合物の有効量の使用に関する。

また本発明は、多重層上皮、特に再構成された表皮及び/又は再構成された皮膚を得ることを意図した方法における、LIF、LIF類似体、LIF模倣剤、及び内因性LIFの発現を刺激可能な生成物、及びそれらの混合物から選択される化合物の有効量の使用に関する。

【 0 0 1 9 】

本発明においては、表皮等価物又は再構成された皮膚、及び皮膚等価物又は再構成された皮膚が参照される。

30

【 0 0 2 0 】

インビトロでの増殖における、ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の増殖、及び/又は多重層表皮の分化及び/又は発育における、LIF、LIF類似体又はLIF模倣剤の作用は、直接又は間接的であってよい。

それらは、皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の増殖、拡大及び/又は器官形成能を刺激することにより、直接的でありうる。また、特に、この因子に対して反応するLIF-反応性細胞により発せられ、これらと同様の細胞及び/又は隣接する細胞を有益に刺激することも可能な因子及び/又はシグナルを介して間接的になされてもよい。例えば、それらは細胞間の直接接触により伝達されるシグナル、及び/又はパラクリン調節経路に關与する因子である。皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の発現可能性の制御は、特に真皮の線維芽細胞と幹細胞及び/又は表皮前駆体との間の、この種の「ダイアログ」に關与している。従って、前記細胞は、外的刺激、及び/又は細胞環境から派生したシグナルに対し、より感受性がある。

40

【 0 0 2 1 】

表皮のホメオスタシスは、細胞分割を促進する分裂促進シグナルと、抗増殖シグナルとの間の微細なバランスの調節から生じる。これらのシグナルは、特にケラチノサイト及び/又はそれらの環境に存在する他の細胞型によって自然に生成される因子、特に真皮の線維芽細胞により分泌される因子の作用から生じる。

【 0 0 2 2 】

50

「表皮のホメオスタシスに關与することが知られている刺激剤及び／又はシグナル」の例としては、特に以下のものを挙げることができる：

- 成長因子、例えば、分裂促進成長因子、表皮成長因子(E G F)及びケラチノサイト成長因子(K G F)(Cookら, J Cell Physiol. 146 : 277-289, 1991 ; Andreadisら, FASEB J. 15 : 898-906, 2001 ; Gamadyら, J Cell Biochem. 89 : 440-449, 2003)、又はトランスフォーミング成長因子- 1 (T G F- 1)、特にインビボ及びインビトロでのケラチノサイトに対する抗増殖効果が同定されている多機能成長因子(Glickら, Proc Natl Acad Sci U SA. 90 : 6076-6080, 1993 ; Van Ruissenら, J Cell Sci. 107 : 2219-2228, 1994 ; Cuiら, Genes Dev. 9 : 945-955, 1995)。これらの因子は高度な相互作用的で相互に關連したオートクリン及びパラクリン調節ループに關与しており、増殖の制御及び分化の制御の双方を確実にし(Reiss & Sartorelli, Cancer Res. 47 : 6705-6709, 1987 ; Hertleら, J Invest Dermatol. 104 : 260-265, 1995 ; Edmonsonら, J Cell Physiol. 179 : 201-207, 1999 ; Yamasakiら, J Invest Dermatol. 120 : 1030-1037, 2003 ; Pasonen-Seppanenら, J Invest Dermatol. 120 : 1038-1044, 2003)、よって、ケラチノサイトの再生及び／又は成熟化の正確な調節が可能になる；及び／又は

- 特にE G F及びT G F- 1の作用に対する細胞の感作メカニズムにより(Tongら, J Invest Dermatol. 94 : 126-131, 1990)、成長因子の作用を完了、調節及び／又は阻害可能な分子、例えばK F Gの分裂促進作用に対するケラチノサイト感受性を増加させる能力について、ビタミンD及びその誘導體(Gamadyら, J Cell Biochem. 89 : 440-449, 2003)；ケラチノサイトの増殖及び／又は分化を調節する能力についてレチノイン酸(Choi & Fuchs, Cell Regul. 1 : 791-809, 1990 ; Gibbsら, Arch Dermatol Res. 288 : 729-738 ; 1996 ; Chapellierら, EMBO J. 21 : 3402-3413, 2002)。

【 0 0 2 3 】

本発明で使用される「L I F」は、特に精製されたL I F、組換えL I F、L I Fを含有する粉碎細胞材料又は細胞抽出物、L I Fを含有する細胞培養上清、又はそれらの混合物の形態で提供することができる。

ヒト由来のL I Fが好ましく使用される。

【 0 0 2 4 】

特に：

- 臓器、組織及び／又はL I Fを天然に発現する細胞から精製されたL I F [例えば：脳下垂体細胞(Ferraraら, Proc Natl Acad Sci USA. 89 : 698-702, 1992)、真皮線維芽細胞(Lorenzoら, Clin Immunol Immunopathol. 70 : 260-265, 1994)、肺線維芽細胞(Eliasら, Am J Physiol. 266 : L426-435, 1994)、胎盤及び子宮粘膜(Kojimaら, Biol. Reprod. 50 : 882-887, 1994)、骨髄間質細胞(Lorgeotら, Cytokine. 9 : 754-758, 1997)、腎細胞(Morelら, Cytokine. 12 : 265-271, 2000)、心筋細胞(Anceyら, Cytokine. 18 : 199-205, 2001)]；

- 原核生物微生物(例えば：細菌、E. coli)又は真核生物微生物(例えば：酵母、Pichia pastoris、Saccharomyces)培養で得られる組換えL I F、場合によっては融合タンパク質の形態のもの(例えば：Chemicon International Inc.から販売されているヒト組換えL I F)；

- L I Fを発現する細胞の粉碎材料又は抽出物、特に粉碎材料、又はL I Fを発現する滋養細胞(例えば：3 T 3系のマウス線維芽細胞)、L I Fが発現するように遺伝的に修飾された細胞、又はL I Fが発現するように刺激された細胞の抽出物；

- L I Fを含有する細胞培養上清、例えばL I Fを発現する3 T 3細胞の培養上清；又はそれらの混合物を使用してよい。

【 0 0 2 5 】

「内因性L I Fの発現を刺激可能な生成物」としては、例えばヒト肺の平滑筋細胞、上皮細胞、線維芽細胞による、L I Fの分泌及び合成を誘発する能力が記載されたサイトカイン、I L - 1 を挙げることができる(Knightら, Am J Respir Cell Mol Biol. 20 : 934-841, 1999)。さらに、延髄ストロマから誘導されたマウス細胞系において、L I Fプロ

モータを誘発するそれらの能力が研究されている、環状AMP類似体、8-プロモアデノシン3':5'モノホスファート(8Br cAMP)、及びTNF- α を挙げることのできる(Gollnerら, Cytokine. 11:656-663, 1999)。

【0026】

別法として、逆に、特にStat5タンパク質を含み、LIFの抗-分化効果のアンタゴニストである、シグナル伝達経路の活性を抑制可能な任意の活性成分を使用してもよい。これらは、特にStat分子の活性化に関与した、キナーゼ及びホスファターゼ活性のモジュレータ、又は小RNAs(s iRNA)を介した干渉方法及び/又はアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0027】

本発明において、「LIF類似体」なる用語は、皮膚幹細胞、及び/又は表皮前駆体に対してLIF活性を有する、すなわち(i)未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の自己再生能、及び/又はそれらの増殖能を促進させ、及び(ii)多重層表皮を生成するそれらの能力を維持し及び/又は増大させることのできる、任意の修飾されたLIFポリペプチド、又は任意のLIFポリペプチド断片を意味することを意図している。

【0028】

「LIF活性を有する修飾されたLIFポリペプチド」なる表現は、例えばその安定性を増大させるために、一又は複数の修飾を受けたLIFポリペプチドを特に意味することを意図している。「修飾」なる用語は、一のアミノ酸、又は少数のアミノ酸の、特に天然のアミノ酸が非天然のアミノ酸又は疑似アミノ酸で、修飾がLIFの生物学的活性に実質的に影響を及ぼさないような位置で置換されることによる、任意の置換、欠失及び/又は挿入を意味することを意図している。

【0029】

修飾されたLIFペプチドは、Genbank AAA59217配列(195aa)、GenBank AAA51699配列(202aa)、及び相同配列から選択される、ヒトLIFペプチド配列から得られてもよい。

「相同配列」なる用語は、同じ種又は異なる種において、定義されたペプチド配列と、少なくとも70%、好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも95%同一である配列を意味することを意図しており；これは、オルソロガスペプチド配列と称される。

また、この修飾されたLIFポリペプチドは、一般的なクローニング及び発現技術に従い、ヒトLIF遺伝子又はcDNAの配列(GenBank M63420、J05436、J03261、X13967)、又はマウスLIF遺伝子又はcDNAの配列(GenBank M63419、J05435、X06381、X12810、S73374)から得られてもよい。

【0030】

「LIF活性を有するLIFポリペプチド断片」なる表現は、特にGenbank AAA59217配列(195aa)、GenBank AAA51699配列(202aa)、及び相同配列から選択される配列の断片を意味することを意図している。

前記断片は、LIF-R-結合及びgp130-結合部位を示すLIFの3次構造が再構成される程、十分大きい。

また、このポリペプチド断片は、一般的なクローニング及び発現技術に従い、ヒトLIF遺伝子又はcDNAの配列(GenBank M63420、J05436、X13967、J03261)、又はマウスLIF遺伝子又はcDNAの配列(GenBank X06381、M63419、J05435、X12810、S73374)、特にコード化配列から得られてもよい。

【0031】

例えば、本発明の実施に適したこのようなLIF類似体は、次の：

- a) ケラチノサイト、又は未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の調製を、(i)テスト用生成物の存在下、又は(ii)不在下で培養し；
- b) (i)及び(ii)に従い培養された細胞を、顕微鏡下で観察し；
- c) 未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の、インビトロにおける増殖を促進させる生成物の能力を、(i)テスト用生成物の存在下、又は(ii)不在下で得られた未分化状態

10

20

30

40

50

の細胞クローンの数と比較することにより測定し；

d) 該生成物の不在下における未分化状態の細胞クローンの数と比較して、該生成物の存在下で得られた未分化状態の細胞クローンの数を増加させる生成物を選択し；

e) ついで、多重層表皮を再生させる該生成物の能力を、次の：

a. ケラチノサイトの調製を、(i)テスト用生成物の存在下、又は(i i)不在下にある真皮支持体に播種し；

b. (i)及び(i i)において再構成された表皮の構造体を、顕微鏡下で観察し；

c. 該生成物の不在下における表皮の構造体と比較して、該生成物の存在下で得られる再構成された表皮の構造を改善する生成物を選択する；

工程に従いテストする；

工程を含む方法に従い選択され得る。

10

【0032】

本発明において、「L I F 模倣剤」なる用語は、特に、g p 1 3 0 及び / 又は J a k / S t a t₃、及び R a s / M a p キナーゼシグナル伝達経路、特に S t a t₃ の発現及び / 又は活性を活性化可能な細胞抽出物又は細胞抽出物のフラクシオン、又は任意の活性剤、又は L I F レセプター (L I F - R) の任意のアゴニストを意味することを意図している。

例えば、L I F レセプターアゴニスト、L I F レセプターと相互作用及びそれらを活性可能な合成ペプチド、又は L I F に対する反応性に関与するシグナル伝達経路の活性化、特に S t a t₃ の発現及び / 又は活性化、又はヤヌス関連 (Janus-associated) チロシンキナーゼ (J A K) の活性化を誘発可能な任意の活性剤である抗体を使用してもよい。

20

特に、L I F と類似した強い 3 次構造を有する、カルジオトロフィン-1 (C T - 1)、毛様体神経栄養因子 (C N T F)、サイトカインオンコスタチン M (O S M) 等の、L I F R - g p 1 3 0 ヘテロダイマーの形成を誘発可能な薬剤を使用してもよい。

本発明の実施に適したこのような L I F 模倣剤は、従来からの L I F - R - 結合及び g p 1 3 0 活性化アッセイにより選択され得る。

【0033】

これらの L I F 類似体又は L I F 模倣剤は、天然又は合成由来であってよい。

「天然由来」なる用語は、天然由来の組織 (皮膚等)、特にヒトの表皮、又は植物由来の抽出物から、種々の抽出方法で得られる、純粋な状態の化合物、又は種々の濃度の溶液を意味することを意図している。

30

「合成由来」なる用語は、化学的に、又はこの生成に必要な要素を生物体に挿入した後、該生物体内に生成されることにより得られる、純粋な状態の化合物、又は種々の濃度の溶液を意味することを意図している。

【0034】

実際、L I F に対する細胞反応性には、低親和性レセプター (190 k D、g p 190 の糖タンパク質) 及び高親和性レセプター (130 k D、g p 130 の糖タンパク質) (Taupinら, J Biol Chem. 276: 47975-47981, 2001)、及びこれらのレセプターの下流、J a k / S t a t₃ 及び R a s / M a p キナーゼシグナル伝達経路 (Ernstら, J Biol Chem. 274: 9729-9737, 1999; Burdonら, Trends Cell Biol. 12: 432-438, 2002) が関与していることが知られている。S t a t₃ シグナル伝達タンパク質は、L I F に対する反応において、マウス E S 細胞を未分化状態に維持するといった主たる役割を担っており (Niwaら, Genes Dev. 12: 2048-2060, 1998; Matsudaら, EMBO J. 18: 4261-4269, 1999)、これに対し、S t a t₅ タンパク質の発現は、逆にこれらの細胞の分化への挿入に関連している (Nemetzら, Differentiation. 62: 213-220, 1998)。

40

【0035】

別法として、L I F レセプター (L I F - R) 又は内因性 L I F - R の発現を刺激可能な生成物が、L I F、L I F 類似体、L I F 模倣剤、又は L I F の発現を刺激可能な生成物と組合せて使用され得る。

【0036】

また本発明は、L I F、L I F 類似体、L I F 模倣剤、及び内因性 L I F の発現を刺激

50

可能な生成物、及びそれらの混合物から選択される化合物の有効量を含有する培養培地において、ヒトのケラチノサイト調製物を増殖させる少なくとも一の工程を含む、未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体のライブラリ又は培養体を得るための方法に関する。

【0037】

本発明において「細胞の培養」なる用語は、特に、インビトロで培養された天然組織から派生し、人工的条件下(エクスピゴ、インビトロ)で生存している細胞の調製を意味することを意図している。

本発明において、「細胞のライブラリ」なる用語は、特に二次使用を目的として保存するために処理された細胞の調製物を意味することを意図している。例えば、細胞は凍結されていてもよく、アリコートで保存されてもよい。細胞は天然組織から生じたものであってよく、例えば凍結した形態で直接保管するか、又は保管する前にインビトロで増幅されていてもよい。

10

本発明において、「ヒトのケラチノサイト調製物」なる表現は、皮膚サンプル、及び/又は表皮及び/又は全て又はいくつかの皮膚付属物を生成可能な、皮膚幹細胞及び/又は前駆体の任意の他の可能な源から得られる一組のケラチノサイトを、特に意味することを意図している。

前記幹細胞及び/又は前駆体の他の源として、特に毛髪の小胞を挙げることができる。

【0038】

ケラチノサイト調製物は、従来からの細胞培養法に従い得ることができる。

特に、個人から取り出された皮膚移植片を使用する、次の：

20

- 外科用メスを使用し、皮下組織を取り除き；
- 皮膚サンプルを抗生物質処理(例えばゲンタマイシン処理)により除染し；
- 真皮をタンパク質分解処理(例えば：トリプシン及びディスパース(disperse))により表皮から分離させ、ついで切開し；
- ついで、細胞の切開を、0.05%のトリプシン及び0.02%のEDTAの溶液の存在下で促進させ；トリプシンの効果を10%の漿液を含有するDMEM培養培地を添加することにより中和させ；
- 細胞懸濁液をホモジナイズし、ついで、ケラチノサイト用の培養培地(KGM, Bullet kit, Clonetics Corp.)で洗浄する；

手順が使用され得る。

30

【0039】

ケラチノサイト調製物の増殖工程は、LIF、LIF類似体、LIF模倣剤、又は内因性LIFの発現を刺激可能な生成物を含有し、該細胞の増殖及びそれらを未分化状態で維持するのに適した培養培地において実施されてよい。

【0040】

フィーダー線維芽細胞の不在下、及び低密度で(例えば2400細胞/cm²で播種)、半定義された培養培地(KGM Bullet Kit, Clonetics, Cambrex Bio Science Inc.)を使用してもよい。

また、照射された線維芽細胞の存在下、及び低密度で(例えば2400細胞/cm²で播種)、RheinwaldとGreen(Cell, 6: 317-330, 1975)により記載された培地を使用してもよい。

40

【0041】

さらに一般的には、LIFを含有し、皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の増殖を促進させ、及び/又は重層表皮を生成させることを意図した任意の培養培地は、本発明の一部でもあるであろう。

特に、このような培養培地は、ケラチノサイトの少なくとも一の分裂促進成長因子[例えば：表皮成長因子(EGF)及び/又はケラチノサイト成長因子(KGF)]、インシュリン、ヒドロコルチゾン及び抗生物質(例えば：ゲンタマイシン、アンホテリシンB)を含有していてもよい。

有利には、前記培地は、下垂体抽出物、例えばウシ属由来のもの、エピネフリン、トラ

50

ンスフェリン及び/又は非必須アミノ酸をさらに含有していてもよい

前記培地は、漿液を含有していてもいなくてもよく、トランスフォーミング成長因子-(TGF-)が補足されていてもよい。

【0042】

前記細胞用の培養培地に存在する、LIF、LIF類似体、LIF模倣剤、又は内因性LIFの発現を刺激可能な生成物、又はそれらの混合物の有効濃度は、培養培地の0.01pg/ml~1mg/ml、好ましくは培養培地の0.1ng/ml~100ng/ml、さらに好ましくは100pg/ml~1ng/mlであってよい。

LIFを含む粉碎細胞材料又細胞抽出物が使用される場合、該細胞の増殖工程用の培養培地に存在する該粉碎細胞材料又は抽出物の有効濃度は、培養培地の0.01pg/ml~10mg/ml、好ましくは培養培地の10pg/ml~100µg/ml、有利には培養培地の100mg/ml~1µg/lであってよい。

10

【0043】

好ましい実施態様において、ヒトのケラチノサイト調製物は、未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体で、特に細胞外マトリックス成分への急速な付着、及び付着した細胞の回収によりプレ濃縮される(Adh+++と称される高い付着能力を有する細胞)。

「細胞外マトリックス成分」なる用語は、特にコラーゲン類、ラミニン類、フィブロネクチン又はプロテオグリカン類等の分子を示す。

WO03/038073(ロレアル/CNRS)に記載されたプレ濃縮工程を、特に使用することができる。

20

【0044】

好ましくは、付着工程は、I型コラーゲンが吸着するプラスチック支持体上で実施され：この工程は37で約10分~約20分、特に12~15分実施される。

さらに、剥離工程は、例えば0.05%のトリプシン及び0.02%のEDTAの存在下、短時間、好ましくは10分未満、特に1~2分間、穏和にトリプシン処理することによって実施することができる。

【0045】

特定の実施態様において、細胞懸濁液を、200000細胞/cm²の密度で、I型コラーゲンで「被覆」された培養フラスコに配す(PBSで2倍に希釈されたコラーゲンIの溶液(Sigma Chemical Co Ltd, Irvine, UK)を45分間フラスコ内に付着させ、ついで余剰物を除去した後に乾燥させる)。12分後、付着していないケラチノサイトをPBSバッファーで洗浄することにより除去する。このようにして選択された付着細胞を、穏和にトリプシン処理(0.05%のトリプシン-0.02%のEDTA(Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel)を用い、37で3~5分)することにより、支持体から剥離させる。トリプシンの中和を行った後(DMEM+10%のSVF)、細胞を回収し、洗浄し、ついでKGM培地に再懸濁させる。

30

この方法により選択された付着細胞フラクションは、表皮の全ケラチノサイトの約10%である。

付着細胞のパーセンテージは、一般的に、ケラチノサイト調製物に含まれる細胞の5~20%、特に、ケラチノサイト調製物に含まれる細胞の10%である。

40

【0046】

このようにして選択された「Adh+++」集合体は、付着能力が低い(Adh-/+)ことで特徴付けられるより成熟したケラチノサイトの集合体よりも約10倍の付着能力を有する、未分化の表皮前駆体及び/又はクローン原性の皮膚幹細胞の頻度を示す。

このような濃縮プロセスにより、主として成熟したケラチノサイトからなる非付着細胞と比較して、高い拡大可能性を有する付着細胞の集合体を選択することができる。

前記Adh+++付着細胞の集合体は、特に長期間にわたる拡大可能性、及び多重層上皮、特に多重層表皮、及び/又は皮膚等価物、及び/又は全て又はいくつかの皮膚付属物を生成する可能性によって特徴付けられる、未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体を含む。

50

【 0 0 4 7 】

特定の実施態様においては、L I F - 反応性細胞、すなわちそれらの表面でL I F レセプター(類)の発現を示す細胞(L I F - R ⁺ 表現型の細胞)、及び/又はL I F の存在下、未分化状態で増殖可能な細胞において、ケラチノサイト調製物、及び/又は皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の集合体を濃縮してもよい。L I F - 反応性のL I F - R ⁺ 細胞の選択は、例えば免疫磁気ビーズを使用したフローサイトメトリーにより局在化した生存細胞及び免疫表現型標識により、及び/又は抗-L I F - R 抗体が吸着した支持体上における免疫選択により実施される。

【 0 0 4 8 】

有利には、本発明の方法は、分化状態での維持を促進させる条件下で、前記増殖した細胞を低温保存する工程をさらに含む。

10

特に、細胞ライブラリを得るために使用されるこの低温保存工程は、二次使用の目的で、前記細胞を保管及び/又は保存可能とするために、L I F の存在下で拡大させた後に、液体窒素中で細胞を凍結させることからなる。

よって、L I F の存在下、インビトロで増殖させる本発明の方法により、未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体のライブラリ又は培養体を得ることができる。

未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体のこのライブラリ又は培養体は、特に、細胞がL I F - R ⁺ と呼称される、L I F レセプター(L I F - R)をその表面で発現し、及び/又はL I F の作用に反応可能な細胞内で濃縮されることにより特徴付けられる。

それは液状形態、有利には凍結形態であってよい。

20

【 0 0 4 9 】

また、少なくとも、(i)ヒトのケラチノサイト調製物、及び(ii)有効量のL I F、L I F 類似体又はL I F 模倣剤が補足されたヒトのケラチノサイト細胞用の培養培地を含む、ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体のライブラリ又は培養体を生成するための任意のキットは、本発明の一部でもあるであろう。

特に前記キットは、L I F の有効量が、培養培地の0.01 pg/ml ~ 1 mg/ml、好ましくは培養培地の0.1 ~ 100 ng/mlである培地を含むであろう。

L I F を含む粉碎細胞材料又は細胞抽出物が使用される場合、培養培地に存在する該粉碎材料又は抽出物の有効濃度は、培養培地の0.01 pg/ml ~ 10 mg/ml、好ましくは培養培地の10 pg/ml ~ 100 µg/ml、有利には培養培地の100 ng/ml ~ 1 µg/mlであってよい。

30

【 0 0 5 0 】

また本発明は：

a) 真皮支持体又は真皮等価物を調製することからなる工程；及び
b) 該支持体上に、ヒトのケラチノサイトの集合体を播種することからなる工程；
を含み、L I F、L I F 類似体、L I F 模倣剤、及び内因性L I F の発現を刺激可能な生成物から選択される化合物の有効量を、工程a)及びb)のいずれか、もしくは双方において、培地に添加する、再構成された表皮及び/又は再構成された皮膚の調製方法に関する。

【 0 0 5 1 】

40

別法として、再構成された表皮及び/又は再構成された皮膚の調製方法は：

a) 真皮支持体又は真皮等価物を調製することからなる工程；及び
b) 該支持体上に、L I F、L I F 類似体、L I F 模倣剤、及び内因性L I F の発現を刺激可能な生成物、及びそれらの混合物から選択される化合物の存在下で培養された未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の集合体を播種することからなる工程；
を含む。

特に、前記真皮支持体又は真皮等価物は、コラーゲン/線維芽細胞の格子、予め脱-表皮化された真皮、及び人工膜から選択されるであろう。

【 0 0 5 2 】

真皮等価物の調製例としては、特許出願(EP-A-285471、EP-A-285474、EP-A-789074、EP

50

-A-502172、EP-A-418035、WO-A-9116010、EP-A-197090、EP-A-20753、FR-A-2665175、FR-A-2689904)に記載されているプロトコル、又は好ましくは、Asselineauら、1987、(Models in dermatol., Vol. III, Ed. Lower & Maibach, 1-7)に記載されているプロトコルを挙げることができる。

表皮等価物及び/又は皮膚等価物を調製するためのプロトコルの例としては、特許又は特許出願EP285471、EP285474、EP418035、WO-A-9002796、WO-A-9116010、EP197090、EP20753、FR2665175、FR2689904に記載されているものを挙げることができる。

【0053】

最も一般的には、再構成された皮膚モデルは、支持体上に、多くの場合は真皮等価物上に配され、表皮等価物の形成に帰する分化プログラムに入るような条件下で培養されてなる、ヒトのケラチノサイトからなる。

10

また、天然組織に類似した表皮及び/又は皮膚を再構成させるために、他の細胞種、例えばランゲルハンス細胞(EP0789074)又はメラノサイトを一体化させることもできる。

【0054】

L I F、L I F類似体、L I F模倣剤、及び内因性L I Fの発現を刺激可能な生成物、及びそれらの混合物から選択される少なくとも一の化合物を有効量含有する、表皮等価物及び/又は皮膚等価物を調製するための任意のキットは、本発明の一部でもあるであろう。

特にこのキットは、(i)真皮支持体又は真皮等価物、(ii)ケラチノサイト調製物、及び(iii)L I F、L I F類似体、L I F模倣剤、及び内因性L I Fの発現を刺激可能な生成物、及びそれらの混合物から選択される化合物の有効量を含んでいてもよい。

20

【0055】

L I F、L I F類似体、L I F模倣剤、又は内因性L I Fの発現を刺激可能な生成物、及びそれらの混合物は、単独で又は混合物として培養培地に導入されてよく、該培養培地はケラチノサイトの増殖及び/又は分化に適したものである。

【0056】

上述したように、このような培地は、特にケラチノサイトの少なくとも一の分裂促進成長因子[例えば：表皮成長因子(E G F)及び/又はケラチノサイト成長因子(K G F)]、インシュリン、ヒドロコルチゾン及び抗生物質(例えば：ゲンタマイシン、アンホテリシンB)を含有していてもよい。

30

有利には、前記培地は、下垂体抽出物、例えばウシ属由来のもの、エピネフリン、トランスフェリン及び/又は非必須アミノ酸をさらに含有していてもよい

前記培地は、漿液を含有していてもいなくてもよく、トランスフォーミング成長因子-(T G F-)が補足されていてもよい。

【0057】

本発明の他の側面は、本発明で定義されたL I F、及びL I Fの存在下で増幅された未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の多様な用途に関する。

特に本発明は、未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の、成熟したケラチノサイト、又は皮膚付属物の構造の一部である任意の他の細胞型への分化及び/又は増殖を調節可能な活性剤をスクリーニング及び/又は評価するための方法における、L I F、L I F類似体、L I F模倣剤、及び内因性L I Fの発現を刺激可能な生成物、及びそれらの混合物から選択される化合物の存在下で増幅された、未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体の使用に関する。

40

【0058】

特にこのスクリーニング方法は：

- テストされる活性剤の存在下、及び成熟したケラチノサイト、又は皮膚付属物の構造の一部である任意の他の細胞型への分化及び/又は増殖が可能な条件で、L I F、L I F類似体、L I F模倣剤、及び内因性L I Fの発現を刺激可能な生成物、及びそれらの混合物から選択される化合物の存在下、未分化の皮膚幹細胞及び/又は表皮前駆体を培養し；
- 該活性剤の不在下における細胞の分化及び/又は増殖度合いと、活性剤の存在下にお

50

ける細胞の分化及び／又は増殖度合いとを比較する；
ことを含む。

【 0 0 5 9 】

また本発明は、皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の、多重層上皮、特に多重層表皮及び／又は皮膚等価物を生成する能力を調節可能な活性剤をスクリーニング及び／又は評価するための方法における、L I F、L I F類似体、L I F模倣剤、及び内因性L I Fの発現を刺激可能な生成物、及びそれらの混合物から選択される化合物の存在下で増幅された未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の使用に関する。

特にこの方法は：

- テストされる活性剤の存在下、多重層表皮及び／又は全て又はいくつかの皮膚付属物を生成可能な条件で、L I F、L I F類似体、L I F模倣剤、及び内因性L I Fの発現を刺激可能な生成物、及びそれらの混合物から選択される化合物の存在下で増幅された、未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体を培養し；

- 該活性剤の不在下における多重層表皮及び／又は全て又はいくつかの皮膚付属物を生成する細胞の能力と、該活性剤の存在下における多重層表皮及び／又は全て又はいくつかの皮膚付属物を生成する細胞の能力とを比較する；

ことを含む。

【 0 0 6 0 】

本発明の他の部分は、皮膚の損傷を処置することを意図した、未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体、又は再構成された表皮及び／又は再構成された皮膚を調製するための、L I F、L I F類似体、L I F模倣剤、及び内因性L I Fの発現を刺激可能な生成物から選択される化合物の使用にある。

特に、未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体、又は再構成された表皮及び／又は再構成された皮膚は、インビボにおいて、ダメージを受けた皮膚又はダメージを受けた皮膚領域上に正常な皮膚を生成させることを意図している。

【 0 0 6 1 】

皮膚の損傷には多くの原因があり、それは以下のようなものである：

- 偶発的原因、例えば顔又は体の広い表面上に火傷を被った皮膚(例えば：第3度火傷を被った個人)；

- 外科的原因、例えば母斑(Kumagaiら, Ann Plast Surg. 39 : 483-488, 1997)、又は入れ墨(Kumagaiら, An Plast Surg. 33 : 385-391, 1994)の処置のために切除を受けた皮膚；

- 遺伝的原因、例えば遺伝病に関連した変化を示す皮膚；特に真皮と表皮の間の結合性における永続的欠陥により特徴付けられる表皮水疱症(Eadyら, J. Dermatol. 28 : 638-640, 2001)；表皮の角質層の病的厚化を伴う魚鱗癬、例えば層状魚鱗癬(Choateら, Hum Gen e Ther. 7 : 2247-2253, 1996)；X-染色体関連魚鱗癬(Freibergら, Hum Mol Genet. 6 : 927-933, 1997)；紫外線(UV)により誘発されるDNAダメージを切除するメカニズムの欠陥により特徴付けられ、その臨床的結果、皮膚癌の発現頻度が増加するとされている色素性乾皮症(Sarasin, Mutat Res. 428 : 5-10, 1999)を挙げることができる。

【 0 0 6 2 】

皮膚が偶発的、又は外科的施術に続いてダメージを受けた場合、ダメージを受けた皮膚の処置は：

- 正常な個人(異種細胞)又はダメージを受けた皮膚のある個人の正常な領域(自己細胞)からの皮膚移植片を用い、ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の集合体を調製し；

- L I Fの存在下で、該ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の集合体を増殖させ；

- インビボで天然の表皮及び／又は全て又はいくつかの皮膚付属物を生成可能なヒトの未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の形態、又は再構成された表皮及び／又は再構成された皮膚の形態で、ダメージを受けた皮膚領域に該細胞を再移植する；

10

20

30

40

50

ことからなる。特に、細胞は、処理される領域に注射及び／又は適用されてよく、これに対し、再構成された表皮又は再構成された皮膚は処理領域にグラフトされるであろう。

【0063】

例えば、本発明のLIFの存在下で調製された再構成された表皮及び／又は再構成された皮膚、又はLIFの存在下で増幅された未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の使用は、特に火傷の処置を意図している。

例えば、本発明のLIFの存在下で調製された再構成された表皮及び／又は再構成された皮膚、又はLIFの存在下で増幅された未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の使用は、皮膚切除、さらには外科由来のものに関連した皮膚の損傷(例えば：母斑、入れ墨)の処置を意図している。

10

【0064】

遺伝病に関連した皮膚の損傷の処置は、特に、次の第1の方式：

- 皮膚に影響を及ぼす遺伝病を被った個人からの皮膚移植片を用い、未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の集合体を調製し；
 - 特にレトロウィルスベクターを使用して、変異していない遺伝子移入により、遺伝病に関連した機能不全が回復するように、エクスピボで該細胞を処理し；
 - インピボで天然の表皮及び／又は全て又はいくつかの皮膚付属物を生成可能なヒトの未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の形態、又は再構成された表皮及び／又は再構成された皮膚の形態で、ダメージを受けた皮膚領域に該処理された細胞を再移植する；
- ことからなる。特に、これらの細胞は、処理される領域に注射及び／又は適用されてよく、これに対し、再構成された表皮又は再構成された皮膚は処理領域にグラフトされるであろう。

20

【0065】

別法として、遺伝病に関連した皮膚の損傷の処置は：

- 正常な個人(異種細胞)からの皮膚移植片を用い、ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の集合体を調製し；
 - LIFの存在下で、該ヒトの未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の集合体を増殖させ；
 - インピボで天然の表皮及び／又は全て又はいくつかの皮膚付属物を生成可能なヒトの未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の形態、又は再構成された表皮及び／又は再構成された皮膚の形態で、ダメージを受けた皮膚領域に該細胞を移植する；
- ことからなる。特に、細胞は、処理される領域に注射及び／又は適用されてよく、これに対し、再構成された表皮又は再構成された皮膚は処理領域にグラフトされるであろう。

30

【0066】

例えば、LIFの存在下で再構成された表皮及び／又はLIFの存在下で再構成された皮膚、又はLIFの存在下で増幅された未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の使用は、表皮水疱症、色素性乾皮症、層状魚鱗癬及びX-染色体関連魚鱗癬等の、遺伝病に関連した皮膚の損傷の処置を意図している。

例えば、遺伝病を被った個人からの皮膚移植片を用いて調製され、LIFの存在下で培養された未分化の皮膚幹細胞及び／又は表皮前駆体の使用は、遺伝子移入プロトコルの有効性を研究するためのインピトロモデルの構築に使用され得る。

40

このことは、遺伝的訂正の頻度を評価(導入遺伝子の挿入を示す細胞のパーセンテージ)、及び／又は機能的訂正の有効性を評価及び定量化(例えば、単層培養物及び／又は再構成された表皮及び／又は再構成された皮膚において、当初欠損のあった機能の訂正度合いを研究)するために、該細胞を使用することを含む。

【実施例】

【0067】

本発明を、以下の非限定的実施例により例証する。

(実施例)

実施例1：LIFの存在下で最適化された未分化の幹細胞及び／又は表皮前駆体の成長性

50

ケラチノサイトを成人の皮膚サンプルから単離した(胸部形成外科)。

外科用メスを使用し、皮下組織を除去した後、皮膚サンプルを約5 mm × 5 mmの断片に切断し、ついで、抗菌処理によって除染した[ゲンタマイシン(Life Technologies)、DMEM培養培地(Life Technologies)において10分間、3回連続浴]。ついで、表皮から真皮を分離させるために、サンプルをタンパク質分解処理にかける[ディスパース(Boehringer, Roche Diagnostics) + トリプシン(Gibco, Invitrogen)、4 で一晚]。ついで、切開により、表皮を真皮から分離させる。真皮組織から分離された表皮断片を0.05%のトリプシン-0.02%のEDTA溶液に配する(Gibco, Invitrogen)(37 で15分間)。細胞の解離を促進させるため、調製物を定期的に攪拌する。ついで、トリプシンの効果を10%の漿液を含有する培養培地(DMEM + 10%の漿液)を添加することにより中和する。トリプシン(DMEM + 10%の漿液)の中和後、細胞調製物を機械的にホモジナイズし(分注)、ついで濾過する。細胞懸濁液を洗浄し、ついでKGM培地(Clonetics)に再懸濁させる。懸濁液中の細胞を、マラセズ(Malassez)細胞を使用し、顕微鏡下で計測する。サンプルの生存度を、トリパンブルー(Life Technologies)排除法で評価する。

10

【0068】

未分化の幹細胞及び/又は表皮前駆体における濃縮工程を、I型コラーゲン基質への急速な付着工程により実施した(高い付着能力を有する集合体、Adh⁺⁺⁺を選択)。

実際、未分化の幹細胞及び/又は表皮前駆体は、それらの急速な付着特性に基づき、より成熟したケラチノサイトから分離することができる。この工程により、未分化の幹細胞及び/又は表皮前駆体にて、調製物をプレ濃縮することができる。

20

コラーゲンへの付着による濃縮方法は、WO03/038073及び科学文献(Fortuneら, J Cell Sci, 116: 4043-4052, 2003)に記載されている。

【0069】

細胞懸濁液を150000 ~ 200000細胞/cm²の密度で、I型コラーゲンで「コーティング」された[コラーゲンは、少なくとも45分、PBSに2倍希釈されたコラーゲンI(Sigma Chemical)溶液の蒸着により、付着支持体上に吸着させる]培養フラスコに配する。12 ~ 15分後、付着しなかったケラチノサイトを、PBSバッファで洗浄することにより除去する。このようにして選択されたAdh⁺⁺⁺と称される付着細胞を、穏和なトリプシン処理(0.05%のトリプシン-0.02%のEDTA(Gibco, Invitrogen)、37 で3 ~ 5分)により、支持体から剥離させる。トリプシンの中和後(DMEM + 10%の漿液)、細胞を回収し、洗浄し、ついで培養培地(本ケースにおいては、KGM培地)に再懸濁させる。付着細胞から構成され、この方法により選択されたフラクシオンは、表皮の全ケラチノサイトの約5 ~ 10%である。

30

【0070】

定量化可能な単離された細胞クローンを得るために、フィーダー線維芽細胞の不在下、及び低密度(2400細胞/cm²で播種)で、Adh⁺⁺⁺細胞から開始した培養体を、半定義された培養培地(KGM Bullet Kit, Clonetics, Cambrex Bio Science Inc.)において調製した。第1の二次培養(経過1)において、培養体を、1) 上述したものと同一の条件; 2) 1 ng/mlの濃度でLIF(Chemicon International Inc.から販売されているヒト組換えLIF)を添加した上述したものの2つのバッチに分割した。8日間培養した後、これら2つの培養条件下で得られた細胞クローンの特徴を分析するために、培養体を固定し(70%のエタノール)、染色した(エオシン及びギムザ染色)(図1)。

40

【0071】

LIFの不在下又は存在下で実施された培養体の比較分析により、この因子により、Adh⁺⁺⁺細胞の培養から誘導された、未分化の幹細胞及び/又は表皮前駆体の成長を、最適化可能であることが示された。

肉眼での観察により、かなり濃く染色された細胞クローンの数が増加していることが示された(図1A、B)。顕微鏡での観察により、その発育が促進されるこれらのクローンは、本質的に、未分化の状態の幹細胞及び/又は表皮前駆体に関連した形態的特徴を示す小細胞からなり、その基準は、LIFで処理された培養体が「より若い」という事実を表し

50

ている。L I Fに反応してかなりの高密度クローンの数が増加していることが、図1 Cに示されたヒストグラムに表されたように、コンピュータ画像分析により確認される。

よって、培養系においてL I Fを使用すると、ヒトの未分化の表皮の幹細胞及び/又は表皮前駆体の集合体の増殖を促進させることができる。

【0072】

実施例2：表皮の再構成におけるL I Fの正の効果

我々は、3 T 3線維芽細胞からの粉碎材料が、インビトロで培養され、凍結された幹細胞及び/又は表皮前駆体から、表皮の再構成を促進させることを観察した。再構成された表皮は良質のものであり：それは天然の表皮と類似した、細胞組織及び層形成を示す(図2 A)。

10

L I Fがこの特性に関与しているという仮説をテストするために、L I Fを免疫沈降により枯渇させ、ついで、L I F-フリーの粉碎材料の活性を、枯渇していない粉碎材料と比較した。

粉碎3 T 3材料のL I F-枯渇は、ウサギ内で生成されたポリクローナル抗体を使用することにより実施する(抗-L I F A b, Santa Cruz, ref. SC-20087)。L I FをA bに正しく確実に結合させるために、数時間、4 超で、粉碎3 T 3材料を抗-L I F A bと共にインキュベートする。ついで、フリー及びL I F-結合A bを、タンパク質Gが吸着した(タンパク質GはA b sのF cドメインに対し高い親和性を有する)セファロースビーズを添加することにより「捕捉」する。遠心分離により、L I Fが枯渇した粉碎材料から、L I Fが保持されたビーズを分離することができる。

20

【0073】

凍結ライブラリから得られた表皮の幹細胞(乳房の皮膚サンプルから単離)の、再構成された皮膚を作製する能力を、L I Fが枯渇していない3 T 3線維芽細胞からの粉碎材料の存在下(正の対照)、粉碎3 T 3材料の不在下(負の対照)、及びL I Fが枯渇した粉碎3 T 3材料の存在下(実験条件)で評価した。各条件下で得られた再構成された表皮の組織学的特徴を、固定し、染色された断面で比較した(図2)。

3 T 3線維芽細胞からの粉碎材料が補足された器官型培養(L I Fは枯渇していない)により、良質(図2 A)、すなわち細胞組織及び層形成が天然の表皮と類似した、再構成された表皮を得ることができ、粉碎材料の不在下で調製された培養体では、必要な組織学的特徴を有さない表皮しか得ることができない(図2 B)。

30

【0074】

粉碎3 T 3材料の不在下で得られた表皮は、次の異常：

- かなりの細胞間空胞及び間隙；
- 乏しい層形成；
- 少数の細胞を有する基底層；
- 非常に伸長した超基底細胞(superbasal cell)；
- 基底細胞の不正確な配向(マトリックスに並行)；
- ほとんど又は全く顆粒層が存在しない；
- 薄い角質層；

を示す。

40

【0075】

L I Fが枯渇した粉碎3 T 3材料の存在下で培養するという実験条件での細胞は、粉碎材料の不在下で培養されたものと類似したように機能し(図2 C)、これはL I Fの枯渇により、表皮再構成における粉碎材料の有益な特性が損なわれているという結果を示している。

よって、L I Fを使用すると、実施例1で示したように、未分化状態の前記細胞の増殖を促進させる能力に加えて、該細胞の器官形成における潜在能力、すなわち天然の表皮に類似した特徴を示す、質の良い再構成された表皮を生成する能力を維持することができる。

【0076】

50

実施例 3 : 表皮等価物及び / 又は皮膚等価物の調製

特に示さない限りは、実施例で使用される全ての培地及びバッファーは、Bellら, 1979 (Proc Natl Acad Sci USA. 76 : 1274-1278, 1979)、Asselineau及びPrunieras, 1984 (Br J Dermatol. 111 : 219-222, 1984)、又はAsselineauら, 1987 (Models in dermatol., Vol. III, Ed. Lowe & Maibach, 1-7, 1987)に記載されている。

真皮支持体又は真皮等価物は、次の割合 :

M E M 培地 (1 . 7 6 X)	4 5 %
子ウシ胎児血清 :	9 %
N a O H (0 . 1 N) :	5 %
酢酸 (1 / 1 0 0 0) :	4 %
コラーゲン :	2 6 %
線維芽細胞 :	1 1 %

10

で、Asselineauら, 1985及び1987 (Exp. Cell. Res. 159 : 536-539, 1985 ; Models in dermatology, Vol 3, pp 1-7, 1987)に記載されているようにして調製する。

【 0 0 7 7 】

使用したコラーゲンはI型コラーゲン(市販溶液)であるが、III型又はIV型コラーゲンを使用することもできる。酸加水分解によりラットの尾部又は子ウシの皮膚から抽出し、+4 で酸性培地において保管し ; 37 °C まで再加熱し、酸性度を低下させる (pH は増加) ことにより自然に重合させる。予め、水 + 酢酸の連続浴に対して、コラーゲンを透析する。

20

プロトコルは次の通りである : 添加剤 (1 % のグルタミン、1 % の非必須アミノ酸、1 % のピルビン酸ナトリウム、1 % のフンギゾン (fungizone)、及び1 % のペニシリン / ストレプトマイシン) の存在下、1 . 7 6 X の M E M 培地、子ウシ胎児血清、及び0 . 1 N の N a O H を、無菌ファルコンチューブに入れる。ついで、ヒトの皮膚の移植片から単離された線維芽細胞を、培養培地 1 m l 当たり $1 . 4 \times 10^5$ 細胞の濃度で添加する。

ついで、1 / 1 0 0 0 に希釈された酢酸に同容量のコラーゲンが入った混合物を、白みがかって曇った外観が観察されるように、チューブの壁面に対してゆっくりと添加する。

次に、全組合せを注意深く混合し、 1 cm^2 当たり 0 . 5 m l の割合で混合物が入った 1 2 - ウェル培養プレート (Costar型、参照番号3512) のウェルに分配する。ついで、培養プレートを、5 % の CO_2 にて、37 °C のインキュベータに配する。

30

【 0 0 7 8 】

第2工程は、L I F を含有する培地において増幅された未分化の皮膚幹細胞及び / 又は表皮前駆体、又はL I F の存在下でケラチノサイト調製物を、前記支持体に播種することからなる。

特定の実施態様において、真皮等価物を含有する培地は、播種工程の前に、L I F を補足する。

ついで、培養体は、Rheinwald及びGreen、(Cell, 6 : 317-330, 1975)により記載された培地、ケラチノサイトの増殖が可能な培地であってよい、3 F 栄養培地に浸漬して保持しておくことができる。

3 ~ 15 日、好ましくは7 ~ 9 日のインキュベート時間の後、皮膚等価物を、例えば金属スクリーンに堆積させて、空気 / 液体の界面に保持しておく。液体は、好ましくは上述したものと同様の栄養培地からなる。

40

【 0 0 7 9 】

次に、皮膚の特徴を示す皮膚等価物、すなわち支持体上に、4つの通常の細胞層の種類、つまり基底、超基底、顆粒及び角質層を有する表皮等価物が得られるまで、インキュベートをし続ける。

例えば、5 ~ 30 日、好ましくは7 ~ 10 日、インキュベートをし続ける。

このようにして生成された再構成された皮膚は、2つの実体であり、物理的に互いに分離可能な支持体と表皮等価物を含む。

【 図面の簡単な説明 】

50

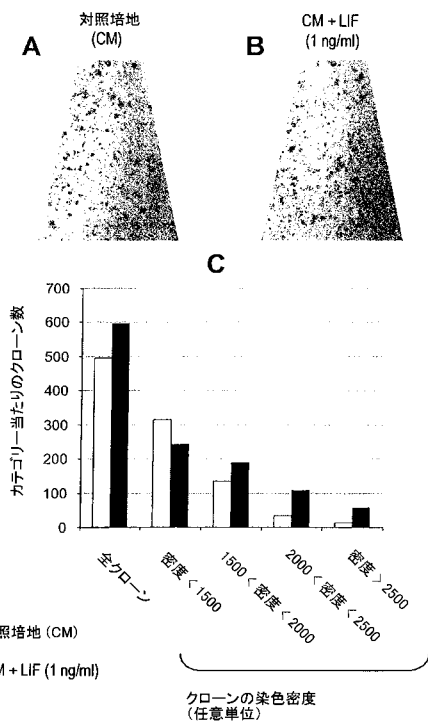
【 0 0 8 0 】

【図1】図1は、幹細胞及び/又は表皮前駆体のクローン性増殖におけるLIFの効果の分析を示す。経過1において細胞から得られた細胞クローンを、内因性LIFの不在下で8日培養し、ついで固定して、染色し(A)；経過1においてケラチノサイトから得られた細胞クローンを、1ng/mlの内因性LIFの存在下で8日培養し、ついで固定して、染色した(B)；対照条件及び内因性LIFの存在下で得られたクローン密度の半定量分析(C)。

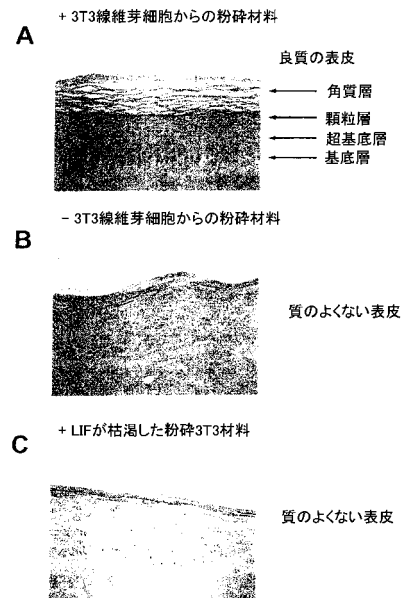
【図2】図2は、LIFが枯渇した又は枯渇していない3T3線維芽細胞からの粉碎材料の存在又は不在下において得られた再構成された表皮の組織学的分析を示す。LIFが枯渇していない粉碎3T3材料の存在下で得られた再構成された表皮の組織学的断面(正の対照)(A)；粉碎3T3材料の不在下で得られた再構成された表皮の組織学的断面(負の対照)(B)；LIFが枯渇した粉碎3T3材料の存在下で得られた再構成された表皮の組織学的断面(実験条件)(C)。

10

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/071 (2010.01) C 1 2 N 5/00 2 0 2 A
C 1 2 Q 1/02 (2006.01) C 1 2 Q 1/02

(72)発明者 コリーヌ フェラーリ
フランス国 7 5 0 1 7 パリ, リュ ブルソー 4 4
(72)発明者 マルセル レニエ
フランス国 7 5 0 1 8 パリ, リュ シャンピオネ 2 3 4

合議体

審判長 田村 明照
審判官 齊藤 真由美
審判官 安藤 倫世

(56)参考文献 国際公開第2003/038073(WO, A2)
国際公開第2002/097068(WO, A2)
特表2003-525034(JP, A)
国際公開第97/041208(WO, A1)
Connective Tissue, Vol. 33, (2001), p. 301-308
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 97, No. 21, (2000),
p. 11307-11312
STEM CELLS, Vol. 21, (2003), p. 5-14
J. Cell Sci., Vol. 116, (2003), p. 4043-4052
細胞工学, Vol. 21, No. 8, (2002), p. 827-830

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 1/00-7/08, C12Q 1/00-3/00