



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103237554 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 12

(21) 申请号 201080069392. 7

(22) 申请日 2010. 09. 29

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2013. 03. 29

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2010/066999 2010. 09. 29

(87) PCT国际申请的公布数据
W02012/042618 JA 2012. 04. 05

(73) 专利权人 株式会社资生堂
地址 日本东京都中央区银座7丁目5番5号

(72) 发明人 吉田雄三 相马勤 藤原重良

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 熊玉兰 孟慧岚

(51) Int. Cl.

A61K 35/36(2015. 01)

A01K 67/027(2006. 01)

A61P 17/14(2006. 01)

A61P 43/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2010197019 A1, 2010. 08. 05,

US 2010197019 A1, 2010. 08. 05,

Takashi Matsuzaki, et al.. "The upper dermal sheath has a potential to regenerate the hair in the rat follicular epidermis". 《Differentiation》. 1996, 287-297.

Takashi Matsuzaki, et al.. "The upper dermal sheath has a potential to regenerate the hair in the rat follicular epidermis". 《Differentiation》. 1996, 287-297.

审查员 关巍

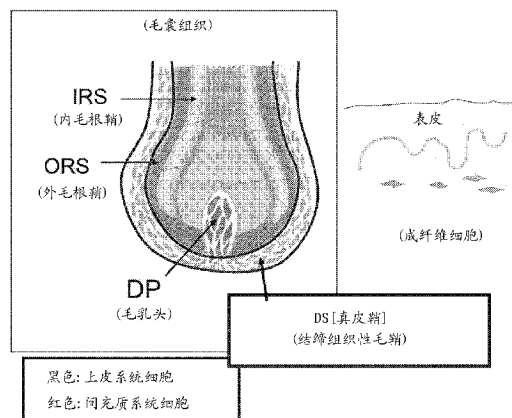
权利要求书1页 说明书10页
序列表3页 附图6页

(54) 发明名称

含有 CD36 表达性结缔组织鞘细胞的用于再生毛囊的组合物

(57) 摘要

公开了含有 CD36 表达性结缔组织鞘细胞(DSc) 的用于再生毛囊的组合物。



1. 用于再生毛囊的组合物,其含有真皮鞘细胞(DSc),所述真皮鞘细胞(DSc)都是CD36表达性的。

2. 权利要求1所述的用于再生毛囊的组合物,其还含有毛乳头细胞(DPc)。

3. 权利要求2所述的组合物,其中CD36表达性DSc与DPc的细胞数的比是10:1~1:10。

4. 权利要求2或3所述的组合物,其中CD36表达性DSc以及DPc共同来自小鼠、或共同来自大鼠、或共同来自人。

5. 权利要求2或3所述的组合物,其中CD36表达性DSc以及DPc是异种细胞,分别来自小鼠、大鼠或人。

6. 权利要求1~5中任一项所述的组合物在制备用于在人中再生毛囊的药物中的用途。

7. 权利要求1~5中任一项所述的组合物在制备用于在受体动物中再生毛囊的药物中的用途。

8. 权利要求7所述的用途,其中受体动物是免疫系统受抑制的动物。

9. 权利要求7或8所述的用途,其中受体动物是选自裸鼠、严重联合免疫缺陷小鼠、裸大鼠的免疫系统受抑制的动物。

10. 含有权利要求2~5中任一项所述的组合物的皮肤三维模型在制备用于再生毛囊的装置中的用途。

11. 产生嵌合动物的方法,其包括:对受体动物移植权利要求1~5中任一项所述的组合物,并负载如此重建的毛囊。

12. 权利要求11所述的方法,其中受体动物是免疫系统受抑制的动物。

13. 权利要求11或12所述的方法,其中受体动物是选自裸鼠、严重联合免疫缺陷小鼠、裸大鼠的免疫系统受抑制的动物。

14. 皮肤三维模型,其如下形成:制备含有权利要求2~5中任一项所述的组合物的皮肤三维模型,并负载如此重建的毛囊。

含有 CD36 表达性结缔组织鞘细胞的用于再生毛囊的组合物

技术领域

[0001] 本发明提供用于再生毛囊的、含有表达 CD36 抗原（血小板反应蛋白受体）的结缔组织鞘（“DS”：真皮鞘）细胞（下文也称为“CD 表达性 DSc”）以及任选地毛乳头（“DP”：真皮乳头）细胞（下文也称为“DPc”）的组合物，应用所述组合物再生毛囊的方法，进一步地提供负载通过该方法再生的毛囊的动物或 3 维皮肤模型。

背景技术

[0002] 毛发在美学外貌上被看做是极为重要的。因此，由于先天或后天原因而脱毛对于许多人是深刻的烦恼。尤其是在高龄化社会、压力社会这样的现代社会，由于各种后天的原因，头部毛发遭受脱毛危机的机会越来越多。与此对应，对于提供发挥包括促进毛发长出、毛发的粗化（太毛化）的毛发生长效果的更优异的毛发生长剂，进行了各种尝试。

[0003] 毛囊是成熟的生物体中几乎一生反复自我再生的例外的器官。期望阐明其自我再生的机制与需求高的临床应用关联，所述应用如利用组织、细胞移植进行脱毛治疗，构建含有毛囊、皮脂腺的近似天然的机能也优异的皮肤片等。近年来，随着对干细胞研究的关心的增加，毛囊上皮干细胞（上皮细胞）的研究急速进展，另外，作为毛囊特异性间充质系统细胞的毛乳头细胞的性质也逐渐被知晓。毛乳头细胞行使为用于毛囊的自我再生的毛囊上皮干细胞输送活化信号的称为指挥塔台的功能，在毛囊重建评价系统中判定为与毛囊上皮干细胞共同为不可缺少的细胞（Kishimoto 等人，Proc. Natl. AcadSci. USA (1999), Vol. 96, pp. 7336-7341；非专利文献 1）。

[0004] 与构成毛囊的大部分的上皮系统细胞不同，DP、环绕毛囊周围的 DS 共同地由间充质系统来源的细胞群构成。关于 DS，近年来报告了许多表明其对毛囊形成的重要性的发现。也报告了在毛乳头大鼠胡须的毛球部切断毛囊移植实验中，DP 由 DS 再生（1），在鼠中对切断了下部二分之一的毛囊进行 DS 移植诱导毛囊再生（2）。另外，Jahoda 等人也报告（Development. 1992 Apr;114(4):887-97；非专利文献 2），通过对人移植 DS，能够诱导毛囊的再构建（Horne KA and Jahoda CA. Development. 1992 Nov;116(3):563-71；非专利文献 3）。进一步地，Tobin, Paus 等人的小组报告，在鼠毛周期中，DS 与 DP 间产生细胞移动，在毛发长出期开始增殖的 DPc 之前结缔组织鞘细胞（DSc）开始增殖（Tobin DJ 等人，J. Invest. Dermatol., 120:895-904, 2003；非专利文献 4）。

[0005] 这样，DS 对毛囊形成发挥重要作用的可能性高，但其作用机制几乎不明，DSC 的性质尚且不知。因此我们研究了表征 DSC 的基因表达谱，为了阐明对毛囊形成的作用机制而进行分析。

[0006] 现有技术文献

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献 1: Kishimoto 等人，Proc. Natl. AcadSci. USA (1999), Vol. 96, pp. 7336-7341

- [0009] 非专利文献 2 :Jahoda CA 等人, Development. 1992 Apr;114(4):887-97.
- [0010] 非专利文献 3 :Horne KA and Jahoda CA. Development. 1992 Nov;116(3):563-71.
- [0011] 非专利文献 4 :Tobin DJ 等人, J. Invest. Dermatol., 120:895-904, 2003
- [0012] 非专利文献 5 :J. Linder 等人, Federation of American Societies for Experimental Biology, 14(2), 319(2000)。

发明内容

[0013] 发明要解决的课题

[0014] 本发明的课题是提供新的毛囊再生系统。

[0015] 解决课题的手段

[0016] 本发明人利用微阵列研究 DSc 的基因表达谱,结果鉴定了作为 DPc 与 FBc(成纤维细胞)相比表达率为 2 倍以上高的基因的 304 个基因。对这些基因利用 GeneSpring 的 GeneOntology 进行功能分类,结果其大多属于血管相关因子,表明了 DS 与血管的关系。接着发现其中 DSc 高表达 CD36,并且得知 DSc 中的有关 CD36 的表达与显示毛发长出促进效果的 HGF(肝细胞增殖因子)(J. Linder 等人., Federation of American Societies for Experimental Biology, 14(2), 319 (2000): 非专利文献 5) 的表达是联锁的。

[0017] 因此,本申请包含以下发明:

[0018] [1]用于再生毛囊的组合物,其含有 CD36 表达性结缔组织鞘([DS]:真皮鞘)细胞。

[0019] [2][1]所述的用于再生毛囊的组合物,其还含有毛乳头(“DP”:真皮乳头)细胞。

[0020] [3][2]所述的组合物,其中 CD36 表达性 DSc 与 DPc 的细胞数的比是约 10:1 ~ 1:10。

[0021] [4][2]或[3]所述的组合物,其中 CD36 表达性 DSc 以及 DPc 共同来自小鼠、或共同来自大鼠、或共同来自人。

[0022] [5][2]或[3]所述的组合物,其中 CD36 表达性 DSc 以及 DPc 是异种细胞,分别来自小鼠、大鼠或人。

[0023] [6]再生毛囊的方法,其中对人移植[1]~[5]中任一项所述的组合物。

[0024] [7]再生毛囊的方法,其中对受体动物移植[1]~[5]中任一项所述的组合物。

[0025] [8][7]所述的方法,其中受体动物是免疫系统受抑制的动物。

[0026] [9][7]或[8]所述的方法,其中受体动物是选自裸鼠、严重联合免疫缺陷小鼠(スキッドマウス)、裸大鼠的免疫系统受抑制的动物。

[0027] [10]再生毛囊的方法,其中制备含有[2]~[5]中任一项所述的组合物的皮肤三维模型。

[0028] [11]嵌合动物,其如下形成:对受体动物移植[1]~[5]中任一项所述的组合物,并使其负载如此重建的毛囊。

[0029] [12][11]所述的嵌合动物,其中受体动物是免疫系统受抑制的动物。

[0030] [13][11]或[12]所述的嵌合动物,其中受体动物是选自裸鼠、严重联合免疫缺陷小鼠(スキッドマウス)、裸大鼠的免疫系统受抑制的动物。

[0031] [14] 皮肤三维模型,其如下形成:制备含有[2]~[5]中任一项所述的组合物的皮肤三维模型,并使其负载如此重建的毛囊。

[0032] 发明效果

[0033] 本发明的用于毛囊再生的组合物可以在用于毛囊再生的移植手术、毛囊再构成的研究和开发中利用。

附图说明

[0034] 【图 1】显示毛囊组织的构造的模式图。

[0035] 【图 2】各种血管相关因子在各种细胞中的表达。

[0036] 【图 3】进行了 CD36 以及 CD31 染色的组织染色图。

[0037] 【图 4】利用 CD36 以及 CD31 染色的毛囊的整铺片(whole-mount)染色图。

[0038] 【图 5】CD36 阳性 DSc 与血管内皮细胞的共培养结果。

[0039] 【图 6】CD36 阳性 DSc 的 HGF 表达结果。

具体实施方式

[0040] 本发明提供用于再生毛囊的含有 DSc 以及任选地 DPc 的组合物,应用所述组合物再生毛囊的方法,进一步地提供负载如此再生的毛囊的动物或 3 维皮肤模型。

[0041] CD36 抗原也称为血小板反应蛋白受体。CD36 是脊椎动物的许多细胞类型表面所见的膜内在蛋白质,也称为 FAT、SCARB3、GP88、糖蛋白 IV(gpIV)、糖蛋白 III b(gpIII b)。CD36 是细胞表面蛋白 B 类清除受体家族的成员。CD36 除血小板反应蛋白外,与胶原、寄生了恶性疟原虫的红细胞、氧化低密度脂蛋白、天然脂蛋白、氧化磷脂、长链脂肪酸等多种配体结合。在应用基因改变啮齿动物的最近的研究中,在脂肪酸和糖代谢、心脏病、味觉、以及肠内的食物性脂肪输送中,确认了 CD36 的明确功能。CD36 可与耐糖量异常、动脉粥样硬化、动脉高压、糖尿病、心肌病、以及阿尔兹海默病有关。

[0042] CD36 抗原与毛发生长的关系是完全未知的。

[0043] DSc 是构成环绕毛囊中 DP 周围的鞘部分的细胞,与 DPc 同样为间充质系统细胞。DP 来源于 DS,在毛发长出期 DP 增殖之前,DS 增殖,因此考虑 DS 供给 DPc(Tobin DJ 等人., J. Invest. Dermatol., 120:895-904, 2003;非专利文献 4)。

[0044] 表达 CD36 的 DSc 没有特别限定,例如,可以利用针对 CD36 的抗体,优选单克隆抗体,通过常用的细胞分选技术从 DPc 等中选择。

[0045] 本发明的 DSc 可以得自所有哺乳动物的表皮,所述哺乳动物例如人,黑猩猩,其他灵长类,家畜动物例如犬、猫、兔、马、绵羊、山羊、牛、猪,其它实验用动物例如大鼠、小鼠、豚鼠,更优选裸鼠、严重联合免疫缺陷小鼠(スキッドマウス)、裸大鼠。另外,该表皮部位可以是有毛部位例如头皮,也可以是无毛部位例如包皮。

[0046] “DPc(毛乳头细胞)”作为间充质系统细胞位于毛囊最底部,为了毛囊的自我再生而向毛囊上皮干细胞递送活化信号,行使称为指挥塔台的功能。仅含有活化毛乳头细胞的毛乳头细胞制备物可以例如通过使用转基因小鼠的 Kishimoto 等人., Proc. Natl. AcadSci. USA (1999), Vol. 96, pp. 7336-7341 记载的方法制备。但是,从产量等来看,可以优选这样制备,对例如从皮肤组织去除表皮组织而得到的真皮组织级分进行胶原处理并

制备细胞悬浮物,随后冷冻保存该细胞悬浮物使毛囊上皮细胞杀灭。

[0047] 具体地,利用上述冷冻保存的方法可以例如如下实施。

[0048] 1. 准备哺乳动物的皮肤。

[0049] 2. 将该皮肤按需要在蛋白分解酶溶液、例如胰蛋白酶溶液中静置适当的时间例如一晚,其后用镊子等除去表皮部分,用胶原酶处理残留的真皮,制备细胞悬浮液。

[0050] 3. 按需要通过 Cell Straine 过滤悬浮液,静置除去沉淀物。

[0051] 4. 测量细胞数,以适当的细胞密度、优选 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8/\text{ml}$ 左右的细胞密度在冷冻保护液中再悬浮,按需要小量分装,按通常的细胞保存方法冷冻保存。

[0052] 5. 保存适当时期后融解并使用。

[0053] 冷冻方法没有特别限制,在 -20°C 以下、优选 -50°C 以下、更优选 -80°C 以下的超低温冷库中或液氮中保存。冷冻保存时期也没有特别限制,能够杀灭上皮细胞即可,例如 1 天以上、优选 3 天以上、更优选 1 周以上时期。即使在液氮中保存 4 个月,也确认到毛乳头细胞继续生存。冷冻保护液可以使用细胞保存中使用的通常的保存液,例如 Cell Banker 2 细胞冷冻保存液(目录号 BLC-2)(日本全药工业制)。

[0054] 细胞数的测量可以通过技术人员公知的方法实施。例如,对于细胞数的测量,可以在血球计(SLGC 社制、EOSINOPHIL COUNTER)中提供用等量的 0.4% 台盼蓝染色液(No. 15250-061, invitrogen)稀释的细胞悬浮液,按血球计所附的使用说明书记载的方法算出。

[0055] 本发明的 DPc 与 DSc 同样,可以来自所有哺乳动物的皮肤,所述哺乳动物例如人,黑猩猩,其他灵长类,家畜动物例如犬、猫、兔、马、绵羊、山羊、牛、猪,其它实验用动物例如大鼠、小鼠、豚鼠,更优选裸鼠、严重联合免疫缺陷小鼠(スキッドマウス)、裸大鼠。

[0056] 优选地,本发明的用于毛囊再生的组合物可以进一步地含有“上皮系统细胞”。“上皮系统细胞”是构成皮肤的表皮或上皮的大部分的细胞,由与真皮连接的 1 层基底细胞产生。以小鼠为例,上皮系统细胞可以优选使用新生儿(或胎儿)来源的上皮系统细胞,也可以是成熟的皮肤、例如休眠期毛的上皮或成长期毛的上皮来源的细胞,也可以是角化细胞形态的细胞的培养物。这样的细胞可以通过技术人员公知的方法从期望的供体动物的皮肤制备。

[0057] 在适当的方案中,上皮系统细胞可以如下制备。

[0058] 1. 准备哺乳动物的皮肤。

[0059] 2. 将该表皮按需要在 0.25% 胰蛋白酶 /PBS 中在 4°C 下静置一晚进行胰蛋白酶处理。

[0060] 3. 利用镊子等仅剥离表皮部分,切碎后在适当的培养液(例如角化细胞用培养液)中在 4°C 悬浮处理约 1 小时。

[0061] 4. 将该悬浮物通过具有适当孔径的 Cell Strainer,随后经离心分离器回收上皮系统细胞。

[0062] 5. 将该细胞制备物用 KGM 或 SFM 培养基以期望的细胞密度悬浮,在冰上静置直至使用之前。

[0063] 本发明的上皮系统细胞与 DSc 和 DPc 同样地,可以来自所有哺乳动物的表皮,所述哺乳动物例如人,黑猩猩,其他灵长类,家畜动物例如犬、猫、兔、马、绵羊、山羊、牛、猪,其

它实验用动物例如大鼠、小鼠、豚鼠,更优选裸鼠、严重联合免疫缺陷小鼠(スキッドマウス)、裸大鼠。另外,该表皮部位可以是有毛部位例如头皮,也可以是无毛部位例如包皮。

[0064] DSc 与 DPc 的使用比率没有特别限定,优选在本发明组合物中的含有比率为 1:10~10:1、更优选 1:3~3:1。进一步地,对于 DSc 与 DPc 的总量,上皮系统细胞可以以 1:10~10:1、更优选 1:1~10:1、再优选 1:1~3:1、最优选 1:1 含有。

[0065] DSc 与 DPc、进一步地任选地上皮系统细胞的组合可以是同种系,也可以是异种系。因此,本发明的用于再生毛囊的组合物可以是,例如,DSc、DPc、上皮系统细胞全部是人来源的组合,DSc、DPc、上皮系统细胞的全部是人以外的哺乳动物的同种来源的组合(以上称为同种系),DSc 以及 DPc 是人来源、上皮系统细胞是人以外的哺乳动物来源的组合,DSc 以及 DPc 的一个是人来源、另一个以及上皮系统细胞是人以外的哺乳动物的同种或异种来源的组合,DSc 以及 DPc 的一个是人以外的哺乳动物来源、另一个以及上皮系统细胞是人来源的组合(以上称为异种系)等。

[0066] 向受体动物移植本发明涉及的用于毛囊再生的组合物可以是其自身公知的移植方法。例如,参考 Weinberg 等人, J. Invest. Dermatol. Vol.100(1993), pp. 229-236。例如在向裸鼠移植时,准备的细胞在移植前约 1 小时前混合,通过离心(9000×g,10min.)除去培养液,制成 50~100 μL 左右的细胞团后,快速地流入埋入裸鼠背部皮肤的硅树脂制圆顶式室内。2 周后非常小心地摘取该室,再 3 周以后可以对移植部位的毛发形成的有无进行肉眼观察。在包含人的动物中以毛发长出为目的进行移植时也可以类似地操作,适当的方法由医师、兽医适当决定。

[0067] 上述组合物向受体动物移植时,该移植可以为同种移植即自体移植、同种同基因移植或同种异基因移植,也可以为异种移植。在同种移植时,毛乳头细胞制备物以及上皮系统细胞均与接受者同种。在异种移植中,存在毛乳头细胞制备物或上皮系统细胞中的任一与接受者为异种、另一个与接受者为同种的情况,以及这二者与接受者均为异种的情况。受体动物可列举所有哺乳动物、例如人,黑猩猩,其他灵长类,家畜动物例如犬、猫、兔、马、绵羊、山羊、牛、猪,其它实验用动物例如大鼠、小鼠、豚鼠,更优选裸鼠、严重联合免疫缺陷小鼠(スキッドマウス)、裸大鼠。

[0068] 另外,通过向适当的受体动物移植本发明涉及的上述组合物,可以提供负载再生毛囊的嵌合动物。所述嵌合动物可以作为有力的动物模型,例如用于研究和阐明毛囊再生的机制,或用于对毛囊再生或毛发长出或脱毛有效的药剂、原料药进行筛选。受体动物不限于向该动物移植的系统中含有的各细胞的来源,优选免疫系统受抑制的动物。另外动物种类为能够作为实验动物使用的动物,只要按本发明目的,可为任何动物,优选可列举小鼠、大鼠等。这些动物中,免疫系统受抑制的动物若以小鼠为例,可列举裸鼠这样的如具有胸腺缺乏的性质的动物。考虑到本发明的目的,特别优选的受体动物可列举市售的裸鼠(例如 Balb-cnu/nu 系统)、严重联合免疫缺陷小鼠(スキッドマウス)(例如 Balb/c-SCID)、裸大鼠(例如 F344/NJcl-rnu)。

[0069] 进一步地,通过将本发明涉及的组合物包含在三维皮肤模型中,可以提供负载再生毛囊的三维皮肤模型。但是,在此情况下,作为毛发长出的指挥塔台的毛乳头细胞是必须的。三维皮肤模型可以通过技术人员公知方法(Exp. Cell Res. Amano S. 等人., (2001), Vol. 271, pp. 249 - 362),例如下述方法进行制备。三维皮肤模型以各自 $1 \times 10^6 \sim 10^8$ 个 /

cm^2 、优选 $1.0 \sim 1.5 \times 10^7$ 个 / cm^2 、更优选约 1.27×10^7 个 / cm^2 的量含有 DSc 以及 DPc。

[0070] 三维皮肤模型制备方法

[0071] 将人成纤维细胞适当量分散在 0.1% 胶原溶液 / DMEM / 10% FBS 中, 在培养皿中分配, 迅速地在 37℃ 的 CO_2 培养箱中静置。凝胶化后, 从培养皿侧面及底面剥离凝胶, 使其在培养皿中漂浮。边摇动胶原凝胶边培养, 使凝胶收缩为约 5 分之一制成真皮模型。将真皮模型置于不锈钢栅格上, 其上设置玻璃环, 将 KGM (表皮细胞培养用培养基) 中分散的人培养表皮细胞 (1.0×10^6 细胞数 / ml) 0.4ml 注入玻璃环内进行培养。此时同时混合并注入 DSc 以及 DPc。也可以替代人培养表皮细胞使用小鼠新生儿表皮细胞。

[0072] 在培养皿内放入 DMEM - KGM - 5% FBS + Ca^{2+} 培养基, 直至真皮模型上部暴露于空气, 培养, 约一周后观察皮肤模型, 判断毛囊原基形成的有无和再现性。

[0073] 负载了重建毛囊的 3 维皮肤模型与上述负载再生毛囊的嵌合动物同样地, 能够用于研究、阐明毛囊的再生的机制, 以及筛选对毛发长出、脱毛有效的药剂、原料药。

[0074] 下面列举实施例对本发明进一步地详细说明。

[0075] 实施例 1

[0076] (方法)

[0077] 细胞的分离以及培养

[0078] 在含有 10% 胎牛血清的 DMEM (Gibco/invitrogen) 中, 将人头皮组织的真皮部分用刀除去, 从断面取出毛囊。应用精密镊子从毛囊除去含有 ORS (毛囊上皮系统细胞) 的毛干, 取出 DP 和 DS。在含有培养基 -1 (含有 10% 胎牛血清、10 ng/ml EGF、20 ng/ml bFGF、0.00075% β 巯基乙醇、青霉素 100 单位 / ml (效价)、链霉素 0.1mg/ml (效价)、两性霉素 B 0.25ug/ml (效价) 的 ニ ッ ス イ 成纤维细胞用低血清培养基) 的胶原包被 35mm 皿 (Iwaki) 上静置培养分离的 DP, 分离的 DS 在 37℃、40 分实施胶原酶处理后同样地在胶原包被 35mm 皿上静置培养。二者均在经过 1 周后确认增殖, 之后作为 DPc、DSc 用作实验样品。成纤维细胞 (FBc) 使用市售细胞 (东洋纺)。DSc、DPc、FBc 利用培养基 -1 进行 7 ~ 10 天的静置培养。其后, 利用胰蛋白酶进行细胞的传代。培养条件是 37℃、5% CO_2 , 将胶原包被摇瓶 T-75 (Iwaki) 用作培养容器。另外, 供给实验的各细胞应用传代 1 次 ~ 3 次的细胞。

[0079] 血管内皮细胞应用正常成人皮肤微血管内皮细胞 (下文称为 HMVEC) (Kurabo), 用低血清增殖用培养基 Humedia-MvG (Kurabo) 进行培养, 传代数为 5 次的细胞用于实验中。

[0080] 应用微阵列法的 DSc、DPc、FBc 的基因表达谱的比较

[0081] 应用 RNeasy Micro 试剂盒 (Qiagen) 从 DPc、DSc、FBc 回收含 mRNA 的总 RNA。应用 agilent 的方案将回收的 RNA 合成双链 cDNA, 进一步地, 继续进行利用花青苷 3、5 标记的 cRNA 的合成。将标记的 cRNA 利用二色法在 Agilent 公司的微阵列芯片玻片 (Agilent, 全人基因组 (4 × 44K), G4110) 中在 65 度杂交 17 小时。应用 2 个人的 DS 来源 RNA 各 2 种 (共计 4 种) 和 2 个人的 DP 来源 RNA 各 2 种 (共计 4 种)、1 个人的 FB 来源 RNA 各 2 种, 在各芯片玻片上进行 DSc 与 DPc、DPc 与 FBc、FBc 与 DSc 各自 2 者间的基因表达水平的比较。洗涤玻片后, 用双激光微阵列扫描仪 (Agilent) 对芯片上的 cRNA 的荧光信号 (花青苷 3、5) 成像。成像的数据利用 Feature Extraction Software 9.1 定量, 此时将异常数值和与背景大致相同低的值标出, 进行分析。对于 (加标签的) 各表达量的比较, 在 2 者间比较取得的信号的定量值。

[0082] (微阵列数据的分析)

[0083] 应用生物信息学方法分析各基因表达量,为了更详细地分析,应用 Gene Spring GX 7.3.1 软件 (Agilent)。应用 Feature Extraction Software 9.1 进行操作,将异常数值和与背景大致相同低的值标出,应用标出基因之外的基因进行分析。提取 2 者间的表达量有差异的基因,应用 Gene ontology 对其进行功能分类。(http://www.geneontology.org/) 另外在此时,通过 Fisher 检验验证在统计学上占多少优势。

[0084] 细胞染色

[0085] 对于应用 CD36 抗体的细胞染色,在利用酸性胶原溶液 (Koken) 进行胶原表面处理的 4 孔室玻片 (Nalgene nunc) 中播种 DSc 后,培养 1 日~2 日,应用得到的培养物。将培养物用 PBS 洗涤后,用 4%PFA 固定 30 分钟,用 PBS 洗涤,在含 0.1% TritonX-100 的 PBS 溶液中处理 10 分钟。随后,用含 3%BSA 的 PBS 进行 30 分钟封闭处理,用 CD36 抗体 (Abcam, ab17044) 在含 1%BSA 的 PBS 中 50 倍稀释而成的初次抗体溶液反应 1 小时。用 PBS 洗涤 4 次后,用 Alexa 594 标记的抗小鼠 IgG 抗体 (Invitrogen) 在含 1%BSA 的 PBS 中 200 倍稀释而成的二次抗体溶液反应 1 小时。在用于核染色的 DAPI 溶液中反应后,用 PBS 洗涤 4 次,通过防褪色剂 Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen) 和盖玻片封入。应用荧光显微镜 (Olympus) 进行观察。

[0086] 组织染色

[0087] 将人头皮组织用冷冻组织包埋剂 OTC 化合物 (Sakura Finetek) 包埋,用冷冻切片制备装置恒冷切片机 (Leica) 制成冷冻切片。将切片用 4%PFA 固定 15 分钟后,用 PBS 洗涤,用 PBS 中加入 5% 脱脂乳、1% 猴血清、0.1% triton-X100 的封闭溶液反应 1 小时。随后,应用 CD36 抗体溶液 (Abcam, ab17044)、CD31 抗体溶液 (R&D, AF806) 用封闭溶液各自 50 倍、100 倍稀释而成的初次抗体溶液,在常温反应 1 小时或在 4℃ 反应过夜。CD31 抗体用于标记作为血管内细胞的标志物使用的 CD31。用 PBS 洗涤 3 次后,应用 Alexa 594 标记抗小鼠 IgG 抗体 (Invitrogen)、Alexa 488 标记抗兔 IgG 抗体 (Invitrogen) 用封闭溶液各自 200 倍稀释而成的二次抗体溶液,在常温反应 1 小时。用 DAPI 溶液反应后,用 PBS 洗涤 3 次,通过防褪色剂 Prolong Gold Antifade Reagent 和盖玻片封入。应用荧光显微镜 (Olympus) 进行观察。

[0088] 毛囊整铺片染色

[0089] 将从人组织分离的毛囊在 4%PFA 中在 4℃ 边振荡边固定 2 小时。依次应用含 25%、50%、75% 乙醇的 0.1% tween PBS (下文称为 PBST) 各 5 分钟、应用 100% 乙醇 5 分钟,进行脱水处理。处理的样品在乙醇中于 -20℃ 保存。使用时,在相同乙醇系列 PBST 中进行再水化处理后,在含有 5% tritonX-100 的 PBS 中处理 10 分钟。其后,应用组织染色中应用的封闭溶液,含有 CD36 抗体 (Abcam, ab17044)、CD31 抗体 (R&D, AF806) 的初次抗体溶液,含有 Alexa 594 标记的抗小鼠 IgG 抗体、Alexa 488 标记的抗兔 IgG 抗体的二次抗体溶液,DAPI 溶液按顺序反应。抗体的反应操作期间以及染色后,应用 0.1% tritonX-100 PBS 各洗涤 8 次。反应条件是初次抗体溶液 4℃ 过夜、二次抗体 4℃ 下 2~3 小时。利用防褪色剂 Prolong Gold Antifade Reagent 与盖玻片封入后,应用荧光显微镜 (Olympus) 进行观察。

[0090] RT-PCR

[0091] 应用 TRIzol (Invitrogen),利用提供的方案从细胞回收 RNA。通过核酸定量装置

Nanodrop(Thermo scientific) 测定回收的 RNA 的浓度。使比较对象群的 RNA 浓度一致,并且应用 invitrogen 的方案通过逆转录酶 Superscript III(Invitrogen) 利用 oligo(dT) 引物从 RNA 合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板,利用反应试剂 LightCycler(注册商标) FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green (Roche)、反应装置 LightCycler(Roche) 进行定量 RT-PCR。组成条件根据 Roche 的方案进行。PCR 的条件是,初期变性 95℃ 10 分钟、变性 95℃ 10 秒、退火 60℃ 10 秒、延伸 72℃ 10 秒。应用的引物信息在下文中记述。

[0092] G3PDH :

[0093] 正向引物 :5 ‘-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3 ‘(序列编号 1)

[0094] 反向引物 :5 ‘-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3 ‘(序列编号 2)

[0095] CD36 :

[0096] 正向引物 :5 ‘-GAGGAACTATATTGTGCCTATTCTTTGGC-3 ‘(序列编号 3)

[0097] 反向引物 :5 ‘-CATAAAAGCAACAAACATCACCACACCAAC-3 ‘(序列编号 4)

[0098] CD31 :

[0099] 正向引物 :5 ‘-ATGCCGTGGAAAGCAGATACTCTAG-3 ‘(序列编号 5)

[0100] 反向引物 :5 ‘-AATTGCTGTGTTCTGTGGGAGCAG-3 ‘(序列编号 6)

[0101] HGF :

[0102] 正向引物 :5 ‘-GAGGGAAGGTGACTCTGAATGAG-3 ‘(序列编号 7)

[0103] 反向引物 :5 ‘-AATACCAGGACGATTTGGAATGGCAC-3 ‘(序列编号 8)。

[0104] 应用所附的软件,测定各基因的表达量。G3PDH 用作内部标准,在各基因分别定量时应用其校正对照组的 cDNA 量。

[0105] 细胞的分选

[0106] 应用 Cell Separation Magnet(BD Bioscience) 对细胞分级分离。操作条件按照 BD Bioscience 提示的方案进行。应用胰蛋白酶溶液剥离细胞后,将细胞悬浮液通过孔穴 70um 的 Strainer (Falcon),计数细胞数。用 500ml 的含 3% 胎牛血清的 PBS 溶液悬浮 500 ~ 1000 万个细胞,其中加入 CD36 抗体 (Abcam, ab17044) 使其稀释 50 倍,在冰上反应大致 15 分钟。应用 1×IMag Buffer(BD Bioscience) 洗涤,用离心操作回收细胞后,用 30ul 的抗小鼠 IgG1 Magnetic Particles(BD Bioscience) 再悬浮,在冰上放置 30 分钟。加入 500ul 的 1×IMag Buffer(BD Bioscience),置于 Cell Separation Magnet(BD Bioscience) 中,静置 8 分钟。边注意不剥离通过磁体侧面粘附的细胞边回收上清,将其作为 CD36 阴性 DSc。接着再次加入 500ul 的 1×IMag Buffer(BD Bioscience),使侧面粘附的细胞悬浮,置于 Cell Separation Magnet 中静置 4 分钟后,除去上清。再重复该步骤 1 次,将侧面粘附的细胞作为 CD36 阳性 DSc。用培养基 -1 悬浮回收的 CD36 阳性、阴性 DSc 后,在 37℃、5%CO₂,应用胶原包被摇瓶 T-25(Iwaki) 为培养容器培养 2 ~ 4 日,将得到的培养物用于随后的实验。

[0107] 共培养实验

[0108] 应用各样品来源的 CD36 阳性、阴性 DSc,以各自 N=3, 4 进行实验。将分级分离的 CD36 阳性、阴性 DSc 各自在胶原包被的 T-25 摇瓶中种植 30 万个。其后,用培养基 -1 培养 2 天后,加入 40 万个 HMVEC,用 Humedia-MvG(Kurabo) 共培养 1 天。其后,将培养基替换为在血管内皮细胞基础培养基 Humedia-EB2(Kurabo) 中加入青霉素 100 单位 /ml(效价)、链霉素 0.1mg/ml(效价)、两性霉素 B 0.25ug/ml(效价) 0.1%BSA(Sigma) 的培养基。再共培养 1

天后,用胰蛋白酶溶液剥离细胞,继续应用 FACS 进行分析。用与 CD36 阳性细胞的分选同样的方法,用 70um 的 strainer (Falcon) 处理,在含 3% 胎牛血清的 PBS 溶液中悬浮,应用作为初次抗体的 CD31 抗体溶液 (R&D, AF806) 在冰上反应 20 分钟。用含有 3% 胎牛血清的 PBS 溶液洗涤细胞后,使作为二次抗体的 Alexa 488 标记抗兔 IgG 抗体 (Invitrogen) 在冰上反应 20 分钟,将细胞在 0.5ml 的 PBS 溶液中再悬浮,应用 Cell Lab Quanta SC (BeckmanCoulter) 分析。应用 BeckmanCoulter 指定的方案和操作试剂,进行包含激光精度管理的设置。应用 FL1 通道 (525nm) 进行 CD31 阳性细胞数的测定。应用不与 CD31 抗体反应的内皮细胞,进行用于省略自身荧光的校正。测定后,基于得到的全细胞数值以及 CD31 阳性细胞的比例,算出 CD31 阳性细胞数。

[0109] (结果)

[0110] 表 1 中示出血管相关因子的一部分的表达结果。得知血管相关因子在 DS 中表达性高,并得知其中 CD36 和 HGF 在 DS 中特异性地高表达。图 2 中示出各种血管相关因子在 DS、DP、ORS、VEC (血管内皮细胞) 中的表达。得知 CD36 以及 HGF 在 DS 中极度特异性地表达。细胞染色结果中也确认到仅分离的 DS 培养细胞中存在 CD36 阳性细胞,得知 DP 和 FB 中不存在 CD36 阳性细胞 (数据未显示)。

[0111] 【表 1】

[0112]

在 DSc 中高表达的血管相关因子

	DS/DP	DS/FB	FB/DP
CD36	40.24	10.97	3.93
HGF	20.19	3.28	10.34
	14.52	4.33	4.45
	17.85	4.14	4.47
TBX2 (T-box2 (转录因子))	20.67	4.68	6.07
VEGFA (血管内皮细胞增殖因子)	3.41	5.12	0.50
	4.34	7.40	0.48
	2.22	4.16	0.52
	2.68	4.55	0.60
PDGFA (血小板衍生增殖因子)	5.82	3.67	1.80
COX-1 (前列腺素合成酶)	11.73	2.24	4.88
	9.64	1.60	5.83

[0113] 进行 CD36 以及 CD31 的染色的组织染色的结果也确认到毛囊的鞘部、即 DS 中 CD36 的特异性染色 (图 3)。进一步地,毛囊的整铺片染色的结果为,DS 显示一部分血管的密集部,得知 CD36 阳性 DSc 细胞局限于该密集部。因此,表明 CD36 与血管密切相关。另外也知晓,虽然 CD36 阳性 DSc 细胞与血管几乎共同局限化,但其在一部分血管附近不存在 (图 4)。

[0114] 因此表明,CD36 阳性 DSc 细胞促进血管的形成,例如促进血管内皮细胞的增殖等。

[0115] 在通过细胞分选分离的 CD36 阳性 DSc 与血管内皮细胞共培养的实验中,CD36 阳性 DSc 与 CD36 阴性 DSc 细胞相比,显示出显著促进血管内皮细胞的增殖 (图 5)。进一步地,分离的 CD36 阳性 DSc 与 CD36 阴性 DSc 细胞相比,也显示出高表达 HGF (图 6)。如本申

请开始所述的, HGF 作为促进毛发长出和毛发生长的因子是公知的(非专利文献 5)。因此明显的是, 如果将 CD36 阳性 DSc 移植在毛囊中, 则对毛发长出、毛发生长是有效的。

序列表

<110> SHISEIDO COMPANY, LTD.

<120> 含有 CD36 表达性结缔组织鞘细胞的用于再生毛囊的组合物

<130> Y742-PCT

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> G3PDH 正向引物

<400> 1

gcaccgtcaa ggctgagaac

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> G3PDH 反向引物

<400> 2

atggtggtga agacgccagt

20

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD36 正向引物

<400> 3

gaggaactat attgtgccta ttctttggc

29

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD36 反向引物

<400> 4

cataaaagca acaaacatca ccacaccaac

30

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD31 正向引物

<400> 5

atgccgtgga aagcagatac tctag

25

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD31 反向引物

<400> 6

aattgctgtg ttctgtggga gcag

24

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HGF 正向引物

<400> 7

gagggaaggt gactctgaat gag

23

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HGF 反向引物

<400> 8

aataccagga cgatttgga tggcac

26

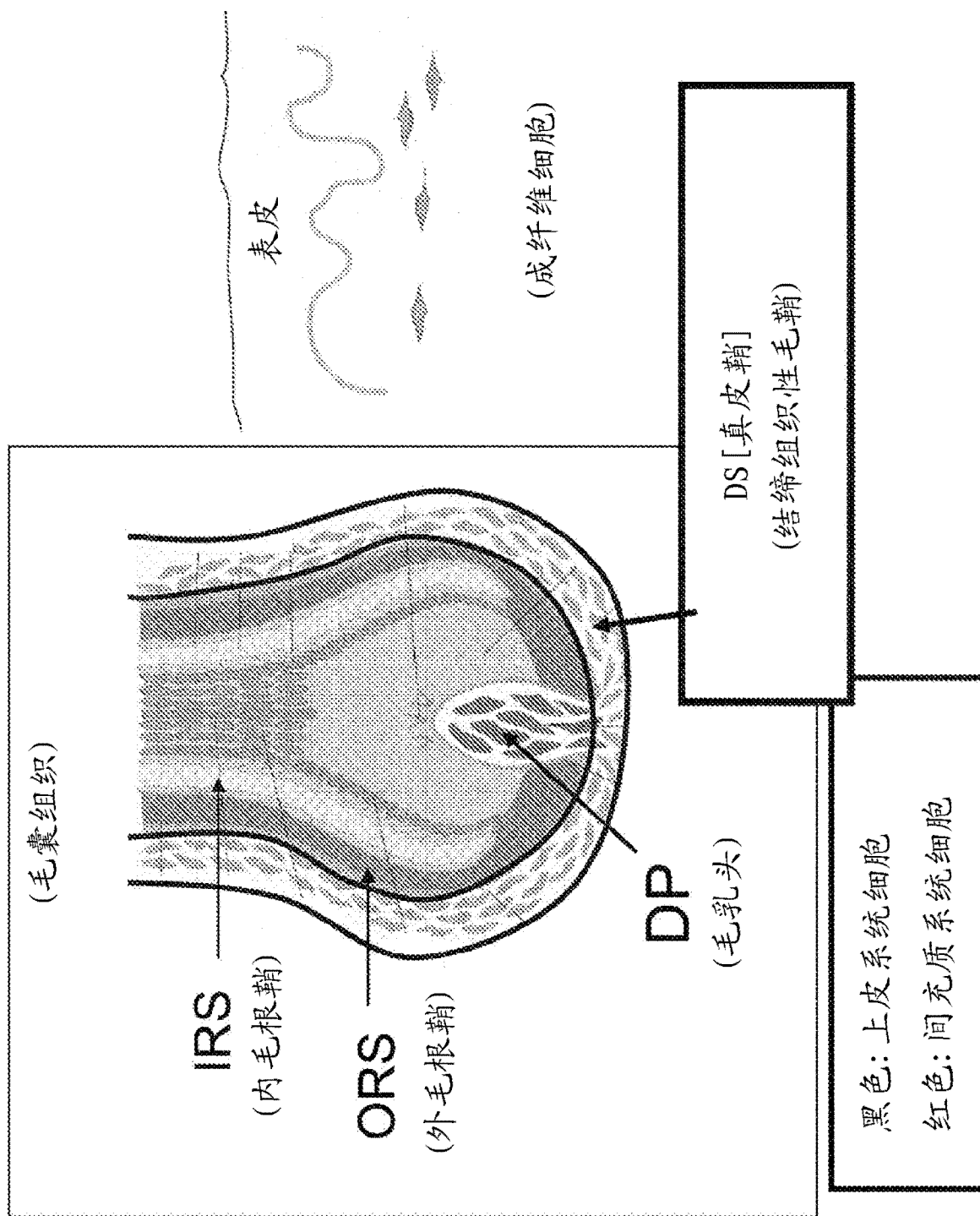


图 1

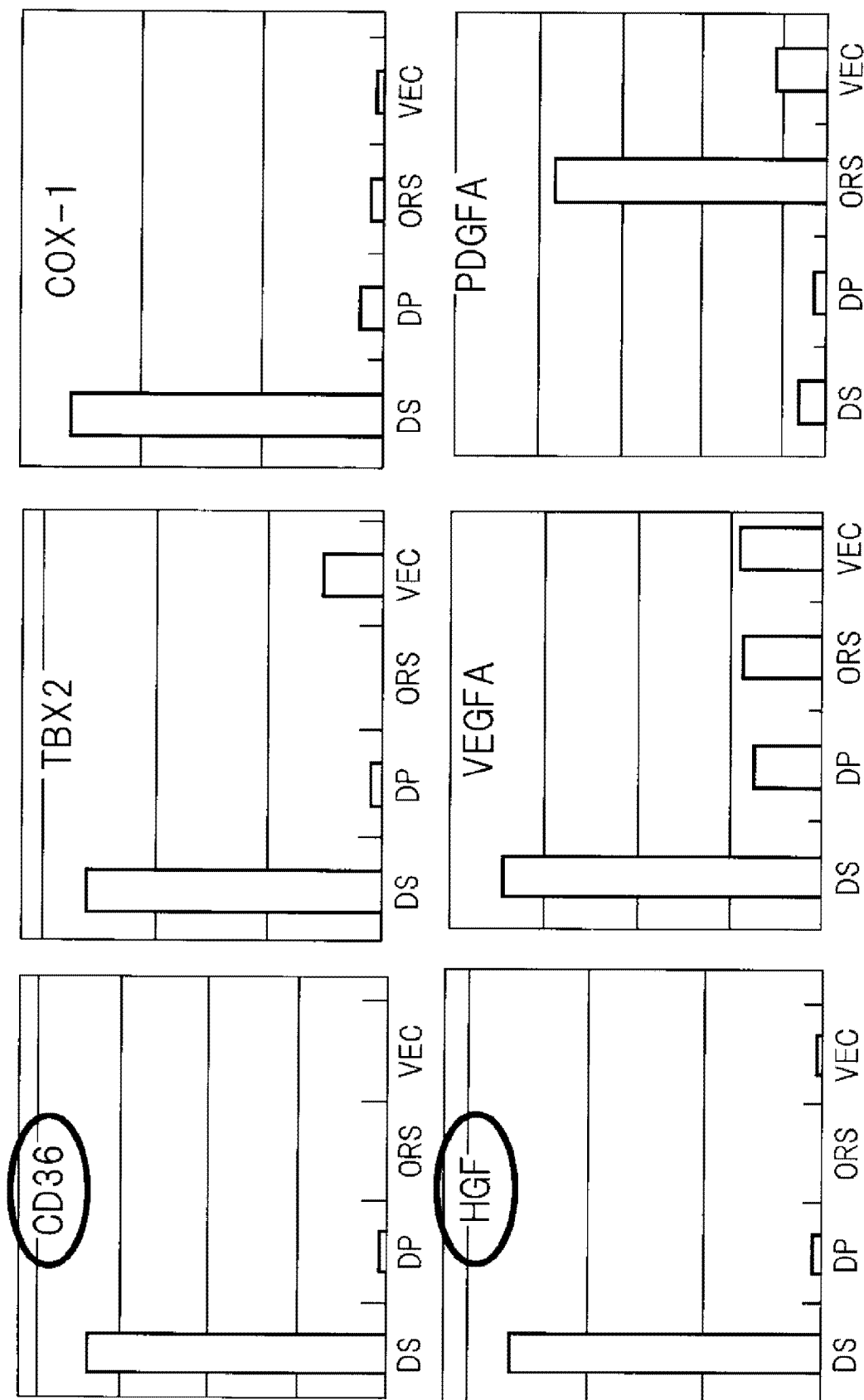


图 2

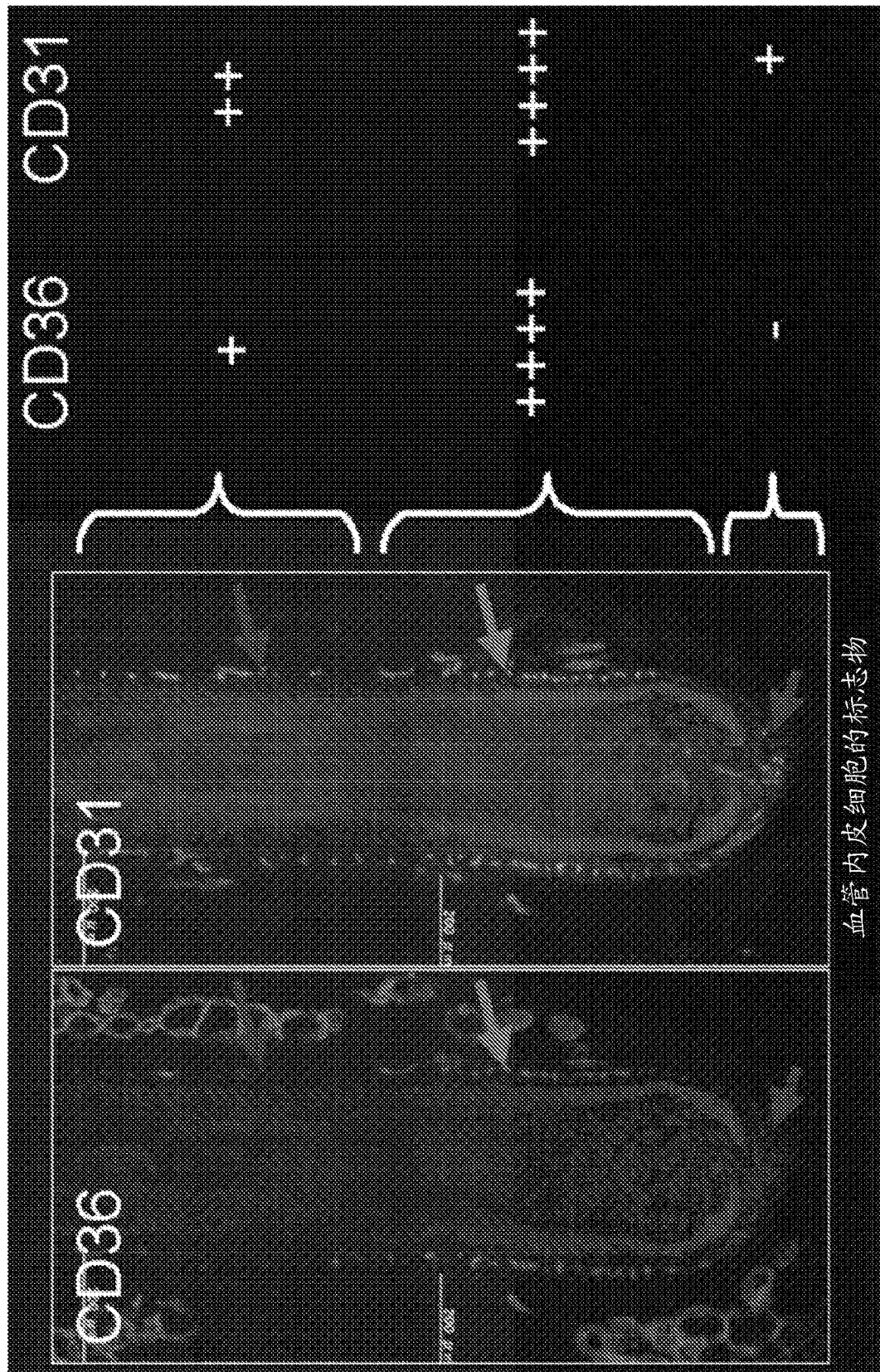


图 3

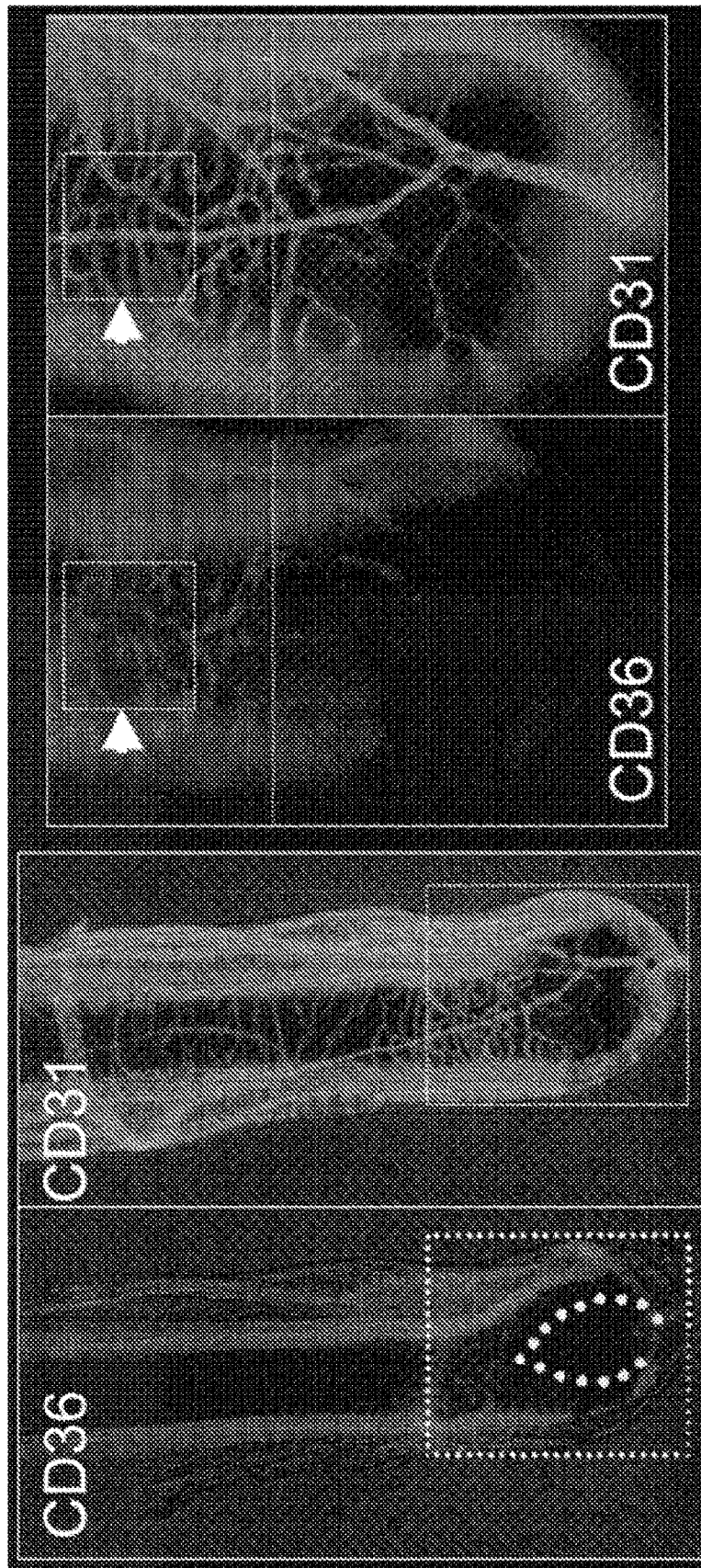


图 4

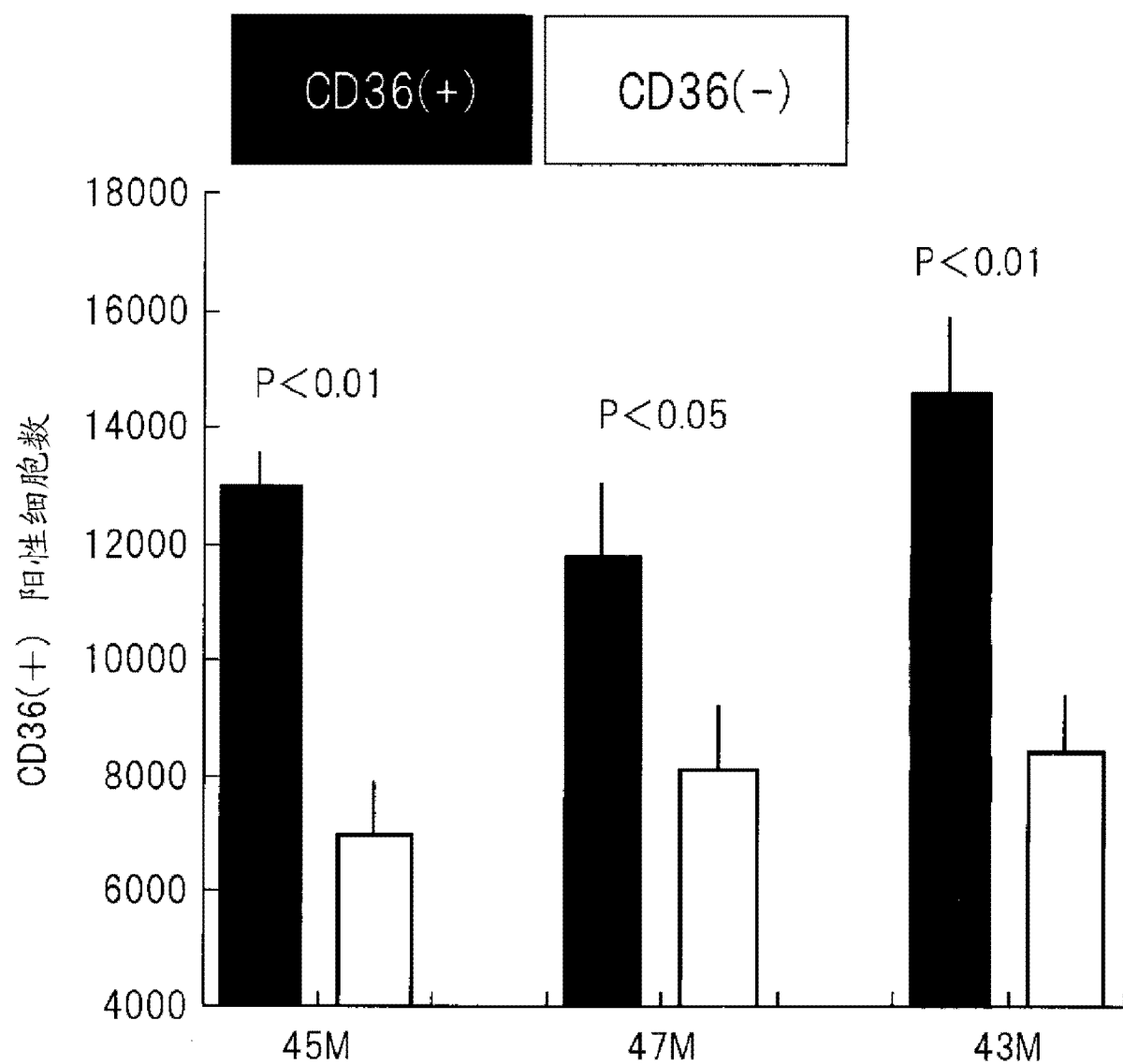


图 5

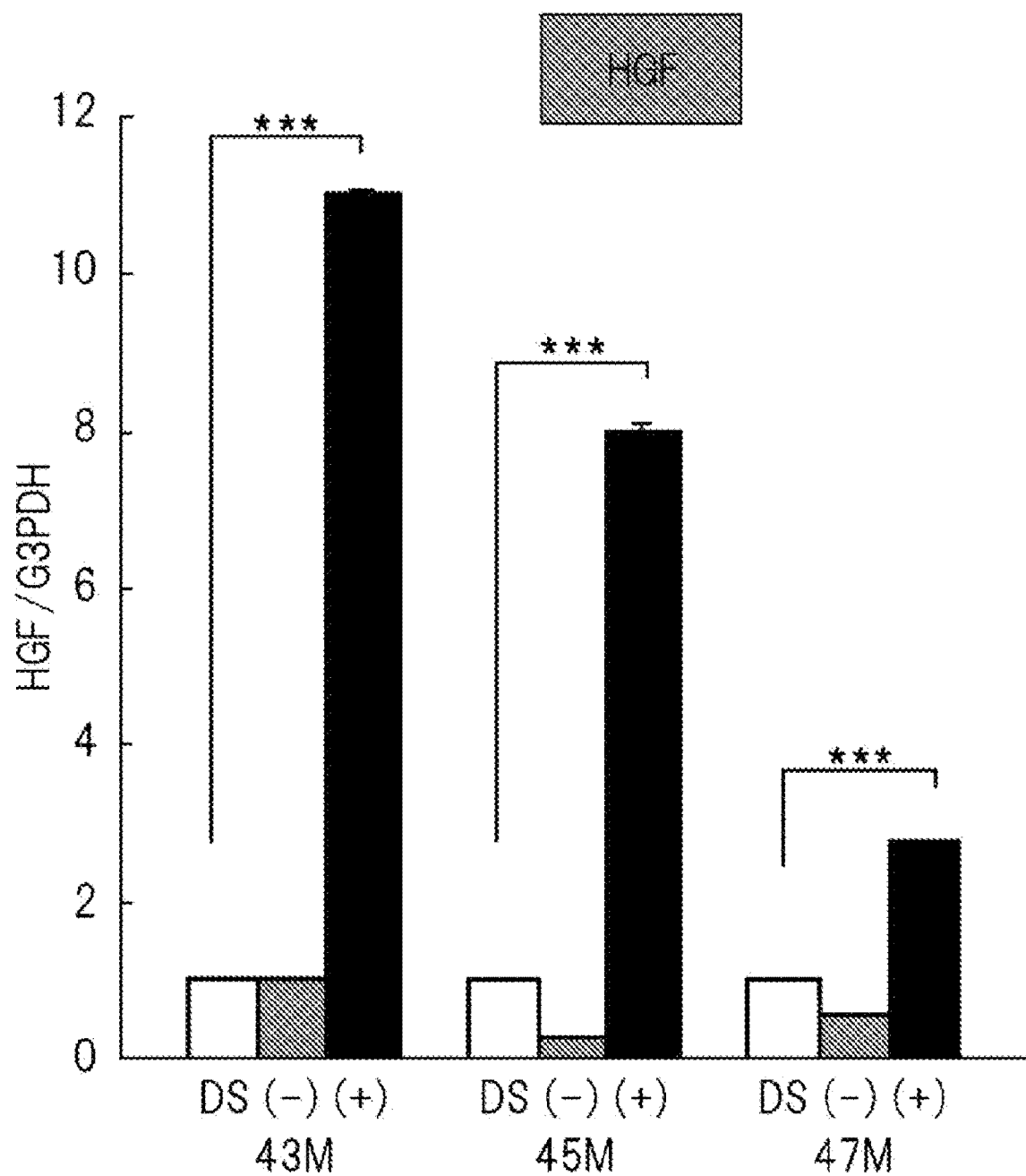


图 6