

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6130588号
(P6130588)

(45) 発行日 平成29年5月17日 (2017.5.17)

(24) 登録日 平成29年4月21日 (2017.4.21)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 L	27/38 (2006.01)	A 6 1 L	27/38 3 0 0
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28
A 6 1 K	35/35 (2015.01)	A 6 1 K	35/35
A 6 1 K	9/70 (2006.01)	A 6 1 K	9/70
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02

請求項の数 17 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-508913 (P2016-508913)
 (86) (22) 出願日 平成26年7月7日 (2014.7.7)
 (65) 公表番号 特表2016-518912 (P2016-518912A)
 (43) 公表日 平成28年6月30日 (2016.6.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2014/006068
 (87) 国際公開番号 W02015/105249
 (87) 国際公開日 平成27年7月16日 (2015.7.16)
 審査請求日 平成27年10月20日 (2015.10.20)
 (31) 優先権主張番号 10-2014-0003499
 (32) 優先日 平成26年1月10日 (2014.1.10)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2014-0065816
 (32) 優先日 平成26年5月30日 (2014.5.30)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 515291188
 アンテロジェン シーオー. , エルティー
 ディー.
 ANTEROGEN CO. , LTD.
 大韓民国、ソウル、クムチョング、デジ
 タルーロ、130、ナムソンプラザ 40
 5ホ (カサンードン)
 405, Namsung Plaza (Ga
 san-dong) 130, Digit
 al-ro Geumcheon-gu
 Seoul 153-782 (KR)
 (74) 代理人 110001139
 SK特許業務法人
 (74) 代理人 100130328
 弁理士 奥野 彰彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 皮膚再生または傷治療のための間葉系幹細胞-ヒドロゲル-生分解性または間葉系幹細胞-ヒドロゲル-非分解性支持体造成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 脂肪組織から間葉系幹細胞を分離して増殖培地で2継代以上培養するステップと、
 (b) 培養した脂肪由来の間葉系幹細胞をヒドロゲルを利用して生分解性支持体及び非分解性支持体で形成されるグループから選択される1種以上の支持体、または1種以上の生分解性支持体及び1種以上の非分解性支持体の複合体に付着して脂肪由来の間葉系幹細胞-ヒドロゲル-支持体を得るステップと、(c) ステップ(b) から得た脂肪由来の間葉系幹細胞-ヒドロゲル-支持体を増殖培地で培養するステップと、を含むが、ここでステップ(a) またはステップ(c) の増殖培地はFBS (fetal bovine serum) 及びbFGF (basic fibroblast growth factor)、EGF (epidermal growth factor)、TGF- β 1 (transforming growth factor beta-1)、PDGF (platelet-derived growth factor)、VEGF (vascular endothelial growth factor)、HGF (hepatocyte growth factor) 及びIFG-1 (insulin-like growth factor) で形成されるグループから選択される1種以上の因子を含む培地である皮膚再生または傷治療用シートの製造方法。

【請求項2】

ヒドロゲルはフィブリン糊、ヒアルロン酸、ゼラチン、コラーゲン、アルギン酸、セルロースまたはペクチンで形成されるグループから選択されるいずれか一つ以上であることを

特徴とする請求項 1 に記載の皮膚再生または傷治療用シートの製造方法。

【請求項 3】

フィブリン糊は 0.5 乃至 30 mg/mL 濃度のフィブリノゲンを含むことを特徴とする請求項 2 に記載の皮膚再生または傷治療用シートの製造方法。

【請求項 4】

フィブリン糊は 0.5 乃至 10 mg/mL 濃度のフィブリノゲンを含むことを特徴とする請求項 2 に記載の皮膚再生または傷治療用シートの製造方法。

【請求項 5】

フィブリン糊は 1 乃至 50 I.U./mL 濃度のトロンピンを含むことを特徴とする請求項 2 に記載の皮膚再生または傷治療用シートの製造方法。

10

【請求項 6】

生分解性支持体は PGA (poly-gamma-glutamic acid)、PLA (poly lactic acid)、ビクリルメッシュ、人の羊膜、牛の羊膜及び豚のコラーゲン、キチン、キトサン、フィブロネクチン及びデキストランで形成されるグループから選択される 1 種または 2 種以上の組み合わせであり、非分解性支持体は滅菌された不織布繊維、PET (polyethylene terephthalate) フィルム、PE (polyethylene) フィルム及び PP (polypropylene) フィルムで形成されるグループから選択される 1 種または 2 種以上の組み合わせであることを特徴とする請求項 1 に記載の皮膚再生または傷治療用シートの製造方法。

【請求項 7】

1 種以上の生分解性支持体及び非分解性支持体の複合体は PGA / 不織布繊維、PLA / 不織布繊維または PGA / PLA / 不織布繊維であることを特徴とする請求項 1 に記載の皮膚再生または傷治療用シートの製造方法。

20

【請求項 8】

前記ステップ (c) において、物理的刺激、低酸素刺激、ミトジェン刺激及び炎症因子刺激で形成されるグループから選択される一つ以上の刺激を追加的に行って細胞を活性化するステップ (d) をさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載の皮膚再生または傷治療用シートの製造方法。

【請求項 9】

傷は糖尿病性創傷であることを特徴とする請求項 1 に記載の皮膚再生または傷治療用シートの製造方法。

30

【請求項 10】

前記ステップ (c) において、脂肪由来の間葉系幹細胞 - ヒドロゲル - 支持体を 1 乃至 20 w/v % DMSO (dimethyl sulfoxide) 及び 1 乃至 50 w/v % 人血清アルブミンを含有する凍結保管剤に入れて冷凍保管するステップ (e) をさらに含み、ここで、冷凍保管してから解凍した際の脂肪由来の間葉系幹細胞の生存率が 90 % 以上である請求項 1 に記載の皮膚再生または傷治療用シートの製造方法。

【請求項 11】

脂肪由来の間葉系幹細胞及びヒドロゲルを含み、生分解性支持体及び非分解性支持体で形成されるグループから選択される 1 種以上の支持体、または 1 種以上の生分解性支持体及び非分解性支持体の複合体を含有し、

40

前記ヒドロゲルはフィブリン糊、ヒアルロン酸、ゼラチン、コラーゲン、アルギン酸、セルロースまたはペクチンで形成されるグループから選択されるいずれか一つ以上であり、前記生分解性支持体は PGA (poly-gamma-glutamic acid)、PLA (poly lactic acid)、ビクリルメッシュ、人の羊膜、牛の羊膜及び豚のコラーゲン、キチン、キトサン、フィブロネクチン及びデキストランで形成されるグループから選択される 1 種または 2 種以上の組み合わせであり、非分解性支持体は滅菌された不織布繊維、PET (polyethylene terephthalate) フィルム、PE (polyethylene) フィルム及び PP (polypropylene) フィルムで形成されるグループから選択される 1 種または 2 種以上の組

50

み合わせであり、

脂肪由来の間葉系幹細胞がヒドロゲルを利用して生分解性支持体及び非分解性支持体で形成されるグループから選択される1種以上の支持体、または1種以上の生分解性支持体及び1種以上の非分解性支持体の複合体に付着されている形態である、皮膚再生または傷治療用造成物。

【請求項12】

フィブリン糊は0.5乃至30mg/mL濃度のフィブリノゲンを含むことを特徴とする請求項11に記載の皮膚再生または傷治療用造成物。

【請求項13】

フィブリン糊は0.5乃至10mg/mL濃度のフィブリノゲンを含むことを特徴とする請求項11に記載の皮膚再生または傷治療用造成物。

10

【請求項14】

フィブリン糊は1乃至50IU/mL濃度のトロンピンを含むことを特徴とする請求項11に記載の皮膚再生または傷治療用造成物。

【請求項15】

1種以上の生分解性支持体及び非分解性支持体の複合体はPGA/不織布繊維、PLA/不織布繊維またはPGA/PLA/不織布繊維であることを特徴とする請求項11に記載の皮膚再生または傷治療用造成物。

【請求項16】

傷は糖尿病性創傷であることを特徴とする請求項11に記載の皮膚再生または傷治療用造成物。

20

【請求項17】

請求項11、請求項12、請求項14、請求項16のうちいずれか一項による造成物を有効成分に含有する皮膚再生または傷治療用シート。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 非分解性支持体を含む皮膚再生または傷治療用造成物、シート(sheet)及びその製造方法に関するものであり、特に本発明の幹細胞を含むシート状の造成物は皮膚の再生または傷(wound)治癒用被覆材として使用される。

30

【背景技術】

【0002】

糖尿病とは、身体が摂取した飲食物を適切に使用できずに血液内の葡萄糖(血糖)数値が正常人より非常に高い状態を言い、糖尿病性創傷は糖尿病足病変ともいう糖尿患者に現れる主な合併症であって、糖尿病による血液循環障害と血管中の高い糖数値が神経細胞を殺して感覚を鈍くするため発生する。

【0003】

一般的な創傷の治癒は、損傷した組織及び侵入した病原菌の除去と損傷した組織の再形成が必要な連続過程であって、第一に、白血球などの炎症細胞が集まって外部から侵入した菌と死んだ組織などを除去する炎症過程、第二に、白血球が分泌した成長因子の刺激によって傷周囲の上皮細胞が移動し増殖して、損傷した部分を覆って真皮層の繊維細胞がコラーゲンを蓄積して新しい毛細血管を生成し傷を埋めて上皮化が行われる増殖過程、第三に、炎症細胞が消えて臨時に生成された肉芽組織が元の皮膚組織に近いように成熟する成熟過程を経る。このような復旧過程は、多様な成長因子及びサイトカイン - インシュリン様成長因子(Insulin-like Growth Factor; IGF)、形質転換増殖因子(Transforming Growth Factor beta; TGF-β)、血管内皮細胞増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)、塩基性繊維芽細胞増殖因子(basic Fibroblast Growth Factor; bFGF)、血小板由来成長因子(Pla

40

50

telet-derived Growth Factor; PDGF)、神経成長因子(Nerve Growth Factor; NGF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor; GM-CSF)、上皮成長因子(Epidermal Growth Factor; EGF)、肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor; HGF)の作用を介して行われ、炎症性細胞、繊維芽細胞、ケラチノサイト及び内皮細胞のような互いに異なる形態の細胞の相互作用を介して行われる。

【0004】

一般的な傷は前記創傷治癒過程を順次に行うことで容易に治癒されるが、皮膚の再生または創傷の治療は炎症反応(inflammation)、再上皮化(re-epithelialization)、肉芽組織の形成(granulation)、繊維組織の形成(fibroplasia)、創傷組織の収縮(contraction)など様々な過程を経て行われる(Freedberg et al., J. Clin. Psychol., 57: 433-455, 2001)。皮膚再生の一連の過程は、角質細胞(keratinocytes)、繊維芽細胞(fibroblasts)、内被細胞(endothelial cells)、大食細胞(macrophage)、血小板(platelets)などのような様々な細胞の協力によって行われ、このような細胞の移動、浸潤、増殖、分化のような複合的な進行は多様な成長因子(growth factor)、サイトカイン、ケモカインによって調節されるため、生物学的因子や化学物質の有効性が知られている。

【0005】

しかし、前記成長因子、サイトカインを利用した創傷治癒技術はこれらのたんぱく質を生産、分離するのに多くのコストがかかり、創傷を治癒する過程にはこれらのたんぱく質が複合的に作用するため一つの種類のたんぱく質のみを使用する場合には創傷治療剤として部分的な創傷の緩和を提供するが、治癒期間が長く治療に対する反応が最適に及ばないなど効果的ではないため実際の実用化に問題点がある。

【0006】

また、特に糖尿病患者における慢性の傷の場合、成長因子の生成減少、血管新生の減少及びケラチノサイトと繊維芽細胞の移動及び増殖の悪化など様々な要因のため創傷の治癒過程が続けられずに炎症期に留まる場合がよくあり、容易に再生されない(Eur J Cell Biol 81: 153-60, 2002; Br J Surg 90: 133-46, 2003)。

【0007】

このような背景のため、皮膚を構成する繊維芽細胞または表皮細胞またはその両方で形成される人工皮膚及び培養皮膚を利用して糖尿病性創傷に移植する技術が開発されている。

【0008】

最近、幹細胞の研究が活発になるにつれ、幹細胞が皮膚細胞に分化可能で皮膚細胞より活性がよいため大量の成長因子を分泌し、免疫反応まで調節可能であることが明らかになったことから、幹細胞を糖尿を誘発したマウスの創傷部位に移植して糖尿性創傷を治療する方法が試みられている(J Diabetes Res. 2013; 2013: 647107, Diabetes. 2013 Jul; 62(7): 2588-94, Plast Reconstr Surg. 2011 Oct; 128(4): 872-80.)。Maharlooeei MKなど(Diabetes Res Clin Pract. 2011 Aug; 93(2): 228-34)は脂肪組織から分離した成体幹細胞によって糖尿マウスにおける創傷治癒力が増加したことを示した。また、糖尿病足病変の潰瘍患者を対象に各患者の腹部から脂肪組織を吸引した後、脂肪由来の幹細胞を抽出して培養していないままの状態で作傷部位に塗布した結果、8週以内に全ての患者の創傷部位が完全に治癒されたことが報告された。

【0009】

しかし、培養していない細胞には免疫細胞が含まれているため必ず患者自身の組織を採取

10

20

30

40

50

しなければならない欠点がある。これは非常に煩わしいだけでなく、糖尿病患者は一度発生した傷がよく治癒されないため脂肪吸引手術の過程が他の慢性的な創傷を誘発する恐れがある。脂肪組織から細胞を分離してから継代培養すると、免疫細胞などが消えて免疫源がないながらも逆に過度な免疫反応を抑制することができ、各種成長因子を分泌する自家及び同種移植が可能な中間葉幹細胞が残るようになる。このような状態の培養した細胞を単離して疾患に適用する技術が開発されているが、これを1世代の幹細胞治療剤という。

【0010】

しかし、従来1世代の幹細胞治療剤はトリプシンまたはディスパーゼなどのたんぱく質分解酵素を処理して得た単離された細胞でたんぱく質分解酵素を処理する間、細胞膜に露出されている全てのたんぱく質を非選択的に分解するため、細胞間の結合と基底膜のたんぱく質などが殆ど維持されない。また、中間葉の幹細胞は付着性の強い細胞であり、単一の細胞に分離すると6~24時間内に死滅するため生着率が非常に低いという欠点がある。

10

【0011】

一方、傷を治癒するためのヒドロゲル形態の細胞伝達用ビヒクルに関する特許文献6がある。ここでは生理食塩水、リン酸緩衝溶液(PBS)及び細胞培養培地で形成された群から選択される水性媒質にゲラント(gellant)なしに非イオン性界面活性剤であるポリプロピレングリコールポリエチレングリコール蓄合物が15~50%の重量比で混合、分散されて構成されたヒドロゲルの形態を有する細胞伝達(delivery)用ビヒクル造成物が開示されている。しかし、湿潤効果及び傷収縮抑制効果に起因して傷の治癒をより促進する効果が開示されているだけであって、成長因子の分泌及び促進または細胞間物質のレベル上昇などのメカニズムによる治癒効果については具体的に開示されておらず、生分解性支持体または非分解性支持体シートの使用について開示されておらず、ヒドロゲルの場合には製造濃度に応じて網目構造の大きさ、硬度及び分解速度が異なるため、細胞の形態及び増殖速度に影響を及ぼすようになるが、特に中間葉幹細胞に適用されるための最適濃度条件についても示されていない。

20

【0012】

本発明は、前記のような従来技術の問題点を解決しようとするものであり、培養した中間葉幹細胞をヒドロゲルに懸濁して生分解性または非分解性支持体に付着した後、培養する高活性の生きている中間葉幹細胞を含む皮膚再生または傷治癒用造成物及びシート、そしてその製造方法を提供することを目的とする。このような方法で製造されたシートに含まれている中間葉幹細胞の大部分はCD73及びCD90を発現し、70%以下の細胞でCD105を発現する。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】韓国登録特許第1,293,762号

【特許文献2】韓国登録特許第1,106,015号

【特許文献3】韓国公開特許第2010-0114729号

40

【特許文献4】韓国登録特許第1,328,604号

【特許文献5】国際特許WO2013/022447号

【特許文献6】韓国登録特許第1,101,321号

【特許文献7】国際特許WO2008/060374号

【特許文献8】韓国登録特許第1,335,176号

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】J Diabetes Res. 2013; 2013: 647107

【非特許文献2】Diabetes. 2013 Jul; 62(7): 2588-94

【非特許文献3】Plast Reconstr Surg. 2011 Oct; 128

50

(4) : 872 - 80 .

【非特許文献4】Maharlooeei MKなど、Diabetes Res Clin Pract . 2011 Aug ; 93 (2) : 228 - 34 .

【非特許文献5】Tissue eng 4 (4) : 1403 ~ 414 , 1988

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明は人間の脂肪組織から分離した中間葉幹細胞を皮膚再生及び傷治癒に利用するためのものであり、臨床的に有効な治療効果を得るための高活性の中間葉幹細胞を含む皮膚再生または傷治療用造成物及び造成物シート、及びその製造方法を提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0016】

前記目的を達成するために、本発明では脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性支持体または非分解性支持体を含む造成物、シート及びその製造方法を提供する。

【0017】

本発明による皮膚再生または傷治療用造成物において、中間葉幹細胞はCD29、CD44、CD73、CD90及びCD105に対して陽性で、CD34及びCD45に対して陰性である自家または同種由来細胞である。

【0018】

本発明による一様態において、支持体としてはPGA (Poly - gamma - glutamic acid)、PLA (poly lactic acid)、PGA/PLA、ピクリルメッシュ、人の羊膜、牛の羊膜及び豚のコラーゲン、キチン、キトサン、フィブロネクチン及びデキストランで形成されるグループから選択される生分解性高分子支持体を使用するか、滅菌された不織布繊維、PET (Polyethylene terephthalate) フィルム、PE (Polyethylene) フィルム、PP (Polypropylene) フィルムのような非分解性支持体、またはそれらの複合体、例えばPGA/不織布繊維、PLA/不織布繊維、PGA/PLA/不織布繊維を使用してもよい。

20

【0019】

本発明による一様態において、ヒドロゲルはフィブリン糊、ヒアルロン酸またはその誘導体、ゼラチン、コラーゲン、アルギン酸、セルロース及びペクチンで形成されるグループから選択されるが、この際、フィブリン糊を形成するフィブリノゲンの濃度は0.5乃至30mg/mLであってもよく、より詳しくは0.5乃至20mg/mLであってもよく、更に詳しくは0.5乃至10mg/mLであってもよい。

30

【0020】

本発明による一様態において、皮膚再生及び傷治療用シートを製造するために幹細胞をヒドロゲルと混合して支持体1cm²当たり4,000乃至6,000に均一に塗布し、FBS及びbFGFまたはEGFを含有する培地で培養して支持体1cm²当たり幹細胞20,000個以上、より詳しくは20,000乃至200,000個になるように増殖するステップを含む。

40

【発明の効果】

【0021】

本発明による高活性の中間葉幹細胞を含む造成物またはシートは、たんぱく質分解酵素を利用した単離 (選別) 過程なしに高活性の幹細胞がそのまま傷部位に塗布されることができ、培養ステップで中間葉幹細胞から分泌されるコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、エラスチンのような細胞外基質が完全にヒドロゲルに貼布されて存在するため、従来の治療剤に比べ皮膚再生及び傷の治癒能力が著しく優秀で治療期間を短縮することができる有利な効果を示す。より詳しくは、本発明による脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 支持体は、無血清培地でも繊維芽細胞の形態を維持し、1週が経過した後にも90%以

50

上生存することが示されて従来の幹細胞治療剤に比べて生存期間が著しく増加しており、凍結保管後解凍した際にシートに形態及び強度がそのまま維持され、シート内の細胞も95%以上生存している主な有効成分である細胞の損傷なしに-80℃で長期間冷凍保管が可能であり、細胞成長及び血管形成を促進する多様な成長因子とサイトカインが持続的に分泌され、多様な種類の細胞外基質を多量に分泌するだけでなく分泌された細胞外基質がヒドロゲル内に留まるため体内に移植した際に多様な基質を提供することで傷の治癒を容易にし、免疫反応を誘発せずにかえって傷部位から炎症が発生しても免疫細胞によって多量分泌されて免疫反応性を増加する役割をするTNF- α の分泌量を著しく減少し炎症を緩和することで傷の治癒を助ける長所がある。

【図面の簡単な説明】

10

【0022】

【図1a】フィブリノゲン原液及びステップ別に希釈された溶液で製造されたフィブリンゲルと混合して培養した人脂肪由来の中間葉幹細胞の形態をAO/EtBrに染色して観察した蛍光顕微鏡の写真である(400倍率)。フィブリノゲンの希釈倍数及びトロンピンが含まれた細胞懸濁液と1:1に混合されて最終フィブリン糊を形成した際の濃度は括弧で表記した。

【図1b】フィブリノゲン原液及びステップ別に希釈された溶液で製造されたフィブリンゲルと混合して培養した人脂肪由来の中間葉幹細胞にWST-1を添加して測定した吸光度グラフである。

【図2a】人脂肪由来の中間葉幹細胞-ヒドロゲル-生分解性または非分解性支持体シートの写真である。

20

【図2b】図2aのシート内の細胞の写真であって、aはシート形成直後(Day 0)、bは5日間培養した後の光学顕微鏡の観察写真であり、cは5日間培養した後、細胞をAO/EtBrに染色して蛍光顕微鏡で観察した写真である。

【図2c】図2aのシート内の細胞の時間による生存率を示すグラフである。

【図3a】人脂肪由来の中間葉幹細胞-ヒドロゲル-生分解性または非分解性支持体シートを-80℃で凍結保管してから解凍した写真である。

【図3b】図3aのシート内の細胞をAO/EtBrに染色して蛍光顕微鏡で観察した写真であって、aは生分解性支持体または非分解性繊維支持体に付着された中間葉幹細胞を、bは非分解性フィルム支持体に付着された中間葉幹細胞を示す写真である。

30

【図4】人脂肪由来の中間葉幹細胞-ヒドロゲル-生分解性または非分解性支持体シートを溶かして単一の細胞に分離した後、細胞表面たんぱく質で染色してからフローサイトメトリで分析した結果である。従来技術によって2次培養した脂肪由来の中間葉幹細胞に比べCD29、CD44、CD73、CD90の発現は類似していたが、CD105は発現が減少して70%以下であった。

【図5a】人脂肪由来の中間葉幹細胞-ヒドロゲル-生分解性支持体シートまたは非分解性支持体シートから分泌されるVEGFとHGFの量をELISAで定量して示したグラフである。

【図5b】人脂肪由来の中間葉幹細胞-ヒドロゲル-生分解性支持体シートまたは非分解性支持体シートから分泌される血管形成促進因子をサイトカインアレイキットを利用して分析した結果である。

40

【図6】人脂肪由来の中間葉幹細胞-ヒドロゲル-生分解性支持体シートまたは非分解性支持体シートを細胞外マトリックスで蛍光染色して観察した写真である。

【図7a】人脂肪由来の中間葉幹細胞-ヒドロゲル-生分解性支持体シートまたは非分解性支持体シートを同種の末梢血液単核細胞と共同培養した後、末梢血液単核細胞から分泌されるTNF- α の量をELISAで定量して示したグラフである。

【図7b】人脂肪由来の中間葉幹細胞-ヒドロゲル-生分解性支持体シートまたは非分解性支持体シートを同種の活性化された末梢血液単核細胞に添加して共同培養した後、末梢血液単核細胞から分泌されるTNF- α の量をELISAで定量してからTNF- α の分泌抑制率(%)に換算して示したグラフである。

50

【図 8 a】糖尿病性創傷モデルに人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性支持体シートまたは非分解性支持体シート、ビヒクル対照群、ヒドロゲル対照群、単一幹細胞対象群を処置しその試験結果を示したグラフである。y 軸は元の創傷面積に対する百分率 (%) を示し、x 軸は処置後の日数を示す。

【図 8 b】糖尿病性創傷モデルに人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性支持体シートまたは非分解性支持体シート、ビヒクル対照群、ヒドロゲル対照群、単一幹細胞対象群を処置した後、日付別に観察した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

前記目的を達成するために、本発明では脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体を含む皮膚再生または傷治療用造成物、シート及びその製造方法を提供する。

10

【0024】

本発明は (a) 脂肪組織から中間葉幹細胞を分離して増殖培地で2継代以上培養するステップと、(b) 培養した脂肪由来の中間葉幹細胞をヒドロゲルを利用して生分解性支持体及び非分解性支持体で形成されるグループから選択される1種以上の支持体、または1種以上の生分解性支持体及び1種以上の非分解性支持体の複合体に付着して脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 支持体を得るステップと、(c) ステップ (b) から得た脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 支持体を増殖培地で培養するステップと、を含むが、ここでステップ (a) またはステップ (c) の増殖培地は FBS (fetal bovine serum) 及び bFGF (basic fibroblast growth factor)、EGF (epidermal growth factor)、TGF- β 1 (transforming growth factor β -1)、PDGF (platelet-derived growth factor)、VEGF (vascular endothelial growth factor)、HGF (hepatocyte growth factor) 及び IGF-1 (insulin-like growth factor) で形成されるグループから選択される1種以上の因子を含む培地である、皮膚再生または傷治療用シートの製造方法に関するものである。

20

本発明による一様態において、前記増殖培地に含まれる因子は、より詳しくは bFGF、EGF またはそれらの組み合わせである。

30

【0025】

本発明による一様態において、中間葉幹細胞は CD29、CD44、CD73、CD90 及び CD105 に対して陽性で、CD34 及び CD45 に対して陰性である自家または同種由来細胞である。

【0026】

本発明の一様態において、創傷治療用シートを製造するために幹細胞をヒドロゲルと混合して支持体 1 cm^2 当たり 4,000 乃至 6,000 に均一に塗布し、FBS、bFGF 及び EGF で形成される群から選択される一つ以上が含まれる培地で培養して、支持体 1 cm^2 当たり幹細胞 20,000 個以上、より詳しくは 20,000 乃至 200,000 個になるように増殖するステップを含む。

40

【0027】

本発明による一様態において、前記ステップ (c) において、物理的刺激、低酸素刺激、マイトジェン刺激及び IFN- γ のような炎症因子刺激で形成されるグループから選択される一つ以上の刺激を追加的に行って細胞を活性化するステップ (d) をさらに含んでもよい。特に、糖尿性創傷で損傷された組織の場合、血管が破壊されるか機能が低下されて酸素供給が円滑ではなく慢性炎症が存在するため、損傷された組織に投与された幹細胞は低酸素ストレス及び炎症因子によって活性化されて成長因子及びサイトカインの分泌が急激に増加する。よって、支持体シートの製造ステップで低酸素ストレス、マイトジェンまたは炎症因子を処理して高濃度の成長因子とサイトカインを分泌する高活性の幹細胞を含

50

む造成物、シートを製造することができる。

【0028】

本発明による一様態において、ヒドロゲルとしてはフィブリン糊、ヒアルロン酸、ゼラチン、コラーゲン、アルギン酸、セルロースまたはペクチンを使用するが、それに限ることではない。ヒドロゲルとしてフィブリン糊を使用する場合、フィブリン糊は0.5乃至30mg/mL濃度、詳しくは0.5乃至20mg/mLの濃度、より詳しくは0.5乃至10mg/mL濃度、更に詳しくは0.5乃至5mg/mL濃度のフィブリノゲンを含むことを特徴とし、1乃至50I.U./mL濃度、詳しくは1乃至30I.U./mL濃度、より詳しくは1乃至20I.U./mL濃度のトロンピンを含む。

【0029】

本発明の一様態において、ヒドロゲル自体だけでも幹細胞 - ヒドロゲルシートを製造することができるが、ヒドロゲルは強度が低く機械的/物理的力によって容易に破れるためシートの大きさが制限され、使用の際に細心の注意が要求される短所があるが、生分解性支持体または非分解性支持体に中間葉幹細胞 - ヒドロゲルを付着する場合、支持体が中間葉幹細胞 - ヒドロゲルの強度を上げて操作がより容易になる。

【0030】

本発明の一様態において、生分解性支持体としてはPGA、PLA、ビクリルメッシュ、人の羊膜、牛の羊膜及び豚のコラーゲン、キチン、キトサン、フィブロネクチン及びデキストランで形成されるグループから選択される1種または2種以上の組み合わせを使用してもよく、非分解性支持体としては滅菌された不織布繊維、PETフィルム、PEフィルム及びPPフィルムで形成されるグループから選択される1種または2種以上の組み合わせを使用してもよいが、それに限ることではない。

【0031】

本発明による一様態において、1種以上の生分解性支持体及び非分解性支持体の複合体を支持体として使用してもよく、例えばPGA/不織布繊維、PLA/不織布繊維またはPGA/PLA/不織布繊維の形態で使用してもよいが、それに制限されることはない。本発明の一様態において、傷は特に糖尿病性創傷である。

【0032】

本発明の一様態において、前記ステップ(c)において、脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 支持体を1乃至20w/v%DMSO及び1乃至50w/v%人血清アルブミンを含有する凍結保管剤に入れて冷凍保管するステップ(e)をさらに含んでもよいが、ここで、冷凍保管してから解凍した際の脂肪由来の中間葉幹細胞の生存率が90%以上であることを特徴とする。

【0033】

本発明の他の様態において、脂肪由来の中間葉幹細胞及びヒドロゲルを含み、生分解性支持体及び非分解性支持体で形成されるグループから選択される1種以上の支持体、または1種以上の生分解性支持体及び非分解性支持体の複合体を含有する皮膚再生または傷治療用造成物が提供される。

【0034】

本発明による一様態において、ヒドロゲルはフィブリン糊、ヒアルロン酸、ゼラチン、コラーゲン、アルギン酸、セルロースまたはペクチンで形成されるグループから選択されるいずれか一つであってもよいが、それに限ることではない。ヒドロゲルとしてフィブリン糊を使用する場合、フィブリン糊は0.5乃至30mg/mL濃度、詳しくは0.5乃至20mg/mLの濃度、より詳しくは0.5乃至10mg/mL濃度、更に詳しくは0.5乃至5mg/mL濃度のフィブリノゲンを含むことを特徴とし、1乃至50I.U./mL濃度、詳しくは1乃至30I.U./mL濃度、より詳しくは1乃至20I.U./mL濃度のトロンピンを含む。

【0035】

本発明の一様態において、生分解性支持体としてはPGA、PLA、ビクリルメッシュ、人の羊膜、牛の羊膜及び豚のコラーゲン、キチン、キトサン、フィブロネクチン及びデキ

10

20

30

40

50

ストランで形成されるグループから選択される1種または2種以上の組み合わせを使用してもよく、非分解性支持体としては滅菌された不織布繊維、PETフィルム、PEフィルム及びPPフィルムで形成されるグループから選択される1種または2種以上の組み合わせを使用してもよいが、それに限ることではない。

【0036】

本発明による一様態において、1種以上の生分解性支持体及び非分解性支持体の複合体を支持体として使用してもよく、例えばPGA/不織布繊維、PLA/不織布繊維またはPGA/PLA/不織布繊維の形態で使用してもよいが、それに限ることではない。

本発明の一様態において、傷は特に糖尿病性創傷である。

本発明の他の様態において、前記造成物を有効成分に含有する皮膚再生または傷治療用シートが提供される。

10

【0037】

本発明による一様態において、より具体的に前記方法は、

【0038】

(a) 脂肪組織から中間葉幹細胞を分離してFBS、成長因子であるbFGFまたはEGFを含む増殖培地で2継代以上培養するステップと、(b) 培養した脂肪由来の中間葉幹細胞をヒドロゲルを利用して生分解性または非分解性支持体、またはそれらの複合体に付着するステップと、(c) 前記ステップ(b)の脂肪由来の中間葉幹細胞-ヒドロゲル-生分解性または非分解性支持体をFBS、成長因子であるbFGFまたはEGFを含む培地で約5日間培養してシートを製造するステップと、(d) 前記ステップ(c)の培養の際に物理的刺激、低酸素刺激、ミトジェン刺激、炎症因子刺激を追加的に行って細胞を活性化するステップと、(e) 前記ステップ(c)またはステップ(d)の脂肪由来の中間葉幹細胞-ヒドロゲル-生分解性または非分解性支持体シートにFBSと成長因子であるbFGFまたはEGFが除去された培地で洗浄するステップと、(f) ステップ(c)の中間葉幹細胞-ヒドロゲル-生分解性または非分解性支持体シートを10% DMSO及び5% 人血清アルブミンで構成された凍結保管剤に入れて冷凍保管するステップと、(g) 凍結保管された中間葉幹細胞-ヒドロゲル-生分解性または非分解性支持体シートを解凍して生理食塩水で洗浄して凍結保管剤を除去するステップと、(h) 糖尿病性創傷に創傷の大きさに合わせて切り取って傷部位に付着するステップと、(i) 前記シートを被覆材で覆うステップと、を含む。前記方法をより具体的にみると以下のようなものである。

20

30

【0039】

ステップ(a)において、人脂肪組織から中間葉幹細胞を分離し、2継代以上培養する方法は従来技術(特許文献4)によるものであって、増殖培地を使用して細胞を培養することで多量の中間葉幹細胞を短時間内に効果的に得ることができる。従来技術によって2継代以上培養した人脂肪由来の中間葉幹細胞はプラスチック培養容器に付着して繊維芽細胞の形態を維持し、CD10、CD13、CD29、CD44、CD59、CD71、CD90、CD105及びOct4に対して陽性で、CD34、CD45、CD104、CD106及びStro-1には陰性を示す。また、幹細胞として体外で脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、筋肉細胞、神経細胞に分化する能力を有する。また、VEGF、HGF、TGF- α 、NGF、IGFのような多様な成長因子を分泌し、免疫調節能力を保有しているため多様な疾患の治療に適用する技術が開発されている。

40

【0040】

前記ステップ(b)においては、ステップ(a)で2継代以上培養した脂肪由来の中間葉幹細胞をトリプシンまたはディスパーゼ処理して単一の細胞にし、ヒドロゲルに懸濁してから生分解性または非分解性繊維に約5,000個/cm²の濃度で均一に噴射して付着した。次に、10% FBS及びEGFまたはbFGFが含まれた増殖培地を利用して3~5日間培養した。本発明の実施例で使用したヒドロゲルはフィブリンゲルであるがそれに限ることではなく、それ以外にもコラーゲン、ヒアルロン酸、ゼラチン、アルギン酸、セルロース、ペクチンを含んでもよい。

【0041】

50

また、本発明の実施例で使用した生分解性支持体はビクリルメッシュまたは牛の羊膜を、非分解性支持体としては滅菌されたガーゼ、PETフィルムであるがそれに限ることはなく、PGA/不織布繊維、PGA/PLA/不織布繊維、人の羊膜、コラーゲン膜などを使用してもよい。

【0042】

本発明において、ヒドロゲルは1次的には生分解性または非分解性支持体繊維またはPETフィルム、PEフィルム、PPフィルムに中間葉幹細胞を付着する機能を行い、2次的には付着性細胞である中間葉幹細胞に基質を提供して、細胞が基質に付着して安定的に生存し得る環境を提供する。また、ヒドロゲルは無数に多い3次元の網目構造(pore)を含んでいえるため、培養液に含まれたFBS、bFGFまたはEGFが網目構造を通過して細胞に作用して増殖し得る環境を提供する。ヒドロゲルは製造する濃度に応じて網目構造の大きさ、硬度、分解速度が異なるため、細胞の形態及び増殖速度に主要な影響を及ぼす。本発明の実施例では最終0.5~10mg/mLのフィブリンゲルを使用することで中間葉幹細胞の増殖速度を上げる一方、適切なゲルの硬度が維持されるようにしている。

10

【0043】

前記ステップ(c)において、中間葉幹細胞-ヒドロゲル-生分解性または非分解性支持体シートで中間葉幹細胞が速く増殖して3~5日間4倍以上増加し、 cm^2 当たり20,000個以上の細胞を含む。

【0044】

本発明において、ヒドロゲル内で増殖した細胞は脂肪由来の中間葉幹細胞の特性であるCD29、CD44、CD73、CD90、CD105を発現し、VEGF、HGFを含む多様な成長因子を分泌する。また、免疫細胞から分泌される代表的な炎症性因子であるTNF- α とIFN- γ の抑制能力も保有している。即ち、ヒドロゲル内で培養された細胞は中間葉幹細胞の特性を維持することを特徴とする。

20

【0045】

また、前記ステップ(c)では低酸素ストレス、マイトジェン(mitogen)処理、炎症因子(IFN- γ)処理を混用してもよい。糖尿病性創傷で損傷された組織は血管が破壊されるか機能が低下されて酸素の供給が円滑ではなく慢性的な炎症が存在するため、損傷された組織に投与された幹細胞は低酸素ストレス及び炎症因子によって活性化され、成長因子及びサイトカインの分泌が急激に増加する。

30

【0046】

上述したように、本発明は脂肪由来の中間葉幹細胞-ヒドロゲル-生分解性または非分解性支持体シートの製造ステップで低酸素ストレス、マイトジェンまたは炎症因子を処理し、高濃度の成長因子とサイトカインを分泌する高活性の幹細胞を含むシートの製造方法を提供する。

【0047】

また、本発明によって製造した脂肪由来の中間葉幹細胞-ヒドロゲル-生分解性または非分解性支持体シートは高活性の幹細胞がたんぱく質分解酵素を利用した単離過程なしにそのまま創傷に塗布されるため、治療能力に優れる。また、たんぱく質分解酵素を利用した単離過程がないため、培養ステップで中間葉幹細胞から分泌されるコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、エラスチンのような細胞外基質が完全にヒドロゲルに貼布されて存在して創傷の治療を促進する。

40

【0048】

上述したように、本発明の前記ステップ(b)でヒドロゲル自体でも幹細胞-ヒドロゲルシートを製造することができる。しかし、ヒドロゲルは強度が低くて機械的/物理的力によって容易に破れるため、シートの大きさが制限的で使用の際に細心の注意を要する。一方、本発明によって幹細胞-ヒドロゲルを生分解性または非分解性支持体に付着すると、支持体が幹細胞-ヒドロゲルの強度を上げて操作を容易にする。また、シートの厚さは0.1~2mmに製造して傷に適用する際にシートが破れることを防止し、シート内に十分

50

な細胞数が含まれるようにして治療効果を高めた。

【0049】

本発明のステップ(e)は、脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートは生理食塩水で2~3回洗浄して動物由来成分であるFBSを除去し、より完全に除去するために無血清DMEM培地で洗浄する。前記過程でFBSが除去され、シートを人体に塗布する際に動物由来成分によって発生し得る副作用を最小化する。

【0050】

本発明は、また脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートを凍結保管する方法を含む。クライオバックにシートが十分に沈むように10% DMSOと5%人血清アルブミン溶液で構成された凍結保管剤を入れてシーリングした後、
10
-80で保管する。一般にたんぱく質酵素処理して単離された細胞、人口皮膚(表皮細胞または真皮細胞または両方の細胞で構成された人口皮膚)は-80で凍結保管すると細胞が損傷して傷に適用する際に治療効果が減少すると知られている(非特許文献5)。しかし、本発明によって製造した脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートはヒドロゲルが幹細胞を包んでいるため、外部衝撃及びストレスから細胞を保護して-80でも細胞を損傷せずに長期間保管することができるようにしている。

【0051】

本発明による一様態において、傷の治療を増進するのに有用な有効量の1種以上の成長因子、サイトカイン、ホルモンまたは細胞外マトリックス化合物またはたんぱく質を本発明
20
による造成物と一緒に投与してもよく、詳しくはGCSF、IL6、IL8、IL10、MCP1、MCP2、組織因子、bFGF、KGF、VEGF、PLGF、MMP1、MMP9、TIMP1、TIMP2、TGF-beta1、HGFなどが例として挙げられるが、それに限ることではない。

以下、実施例を介して本発明をより詳細に説明する。但し、これらの実施例は本発明の例示に過ぎないものであって、本発明の範囲はこれらに限ることではない。

実施例1：人脂肪由来の中間葉幹細胞の培養方法

脂肪組織は普通脂肪吸引術で得られるが、それに限ることではない。

【0052】

脂肪吸引によって得られた脂肪組織から以下のように脂肪由来の中間葉幹細胞を分離した
30
：血液を除去するために脂肪組織を同じ容積のPBSで3~4回洗浄した。脂肪組織と同じ容積のコラゲナーゼ溶液を入れて37の水浴で反応させた。これを遠心分離機用チューブに移して20、1,500rpmで10分間遠心分離した。上層液である脂肪層を除去し、下層であるコラゲナーゼ溶液を揺れないように注意して分離した。基質培地を入れて懸濁させた後、20、1,200rpmで5分間遠心分離した。この際、下に沈むものがストローマ - 血管分画であり、上層液を除去した。ストローマ - 血管分画を基質培地に懸濁させて培養容器に接種し、37、5%CO₂インキュベータで24時間培養した。培養液を除去した後、リン酸塩緩衝溶液で洗浄し、基質培地または基質培地に塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)が1ng/mlの濃度で含まれた増殖培地、または基質培地に上皮成長因子(EGF)が5ng/mlの濃度で含まれた培地を利用して増殖させ
40
た。脂肪由来の中間葉幹細胞が培養容器の80~90%程度に育ったら、トリプシン処理し単一の細胞に分離して収得した。

実施例2：ヒドロゲルとしてのフィブリン糊の濃度決定

【0053】

凍結乾燥されたトロンピンは塩化カルシウム溶液1mLを添加して400~600IUになるようにした。または、凍結されたトロンピンを解凍して同じ濃度になるように調節してから使用した。凍結乾燥されたフィブリノゲンにアプロニチン溶液1mLを添加するか、凍結されたフィブリノゲンを解凍して71.5~126.5mg/mL(原液)を準備し1:5、1:10、1:20、1:40になるように段階別に希釈した。前記実施例1で2継代以上培養した細胞を収集して懸濁した後、トロンピンを40~50:1の割
50

合 (v/v) に混ぜてから段階別に希釈したフィブリノゲンと 1 : 1 混合してフィブリンゲルが形成されるようにした。30 分後、ゲルが完全に固まると 10 % FBS、1 ng/mL bFGF が含まれた培養培地を添加してから 37 °C、5 % CO₂ のインキュベータで 5 日間培養した。培養 2 日目と 5 日目に細胞 - フィブリンゲル混合物を取って薄く切片を製造した後、10 µg/mL アクリンジンオレンジ / 臭化エチジウム (AO/EtBr) で染色し、蛍光顕微鏡を利用して細胞形態と生存率を測定した。また、培養 5 日目に WST - 1 を添加して細胞の増殖程度を測定した。

【0054】

図 1 a は、原液または希釈されたフィブリノゲン溶液で製造したフィブリンゲル内の幹細胞の形態と数を示す顕微鏡写真である。フィブリノゲン原液で製造されたフィブリンゲル内では 5 日目まで大部分の細胞の球状の細胞の形態をそのまま維持し、殆ど増殖していなかった。一方、希釈倍数が増加するほど細胞は速く繊維芽細胞の形態を形成し、より多く増殖していた。原液フィブリノゲンで製造したフィブリンゲル (36 ~ 64 mg) 内では一部の死んだ細胞が観察されたが、希釈されたフィブリノゲンで製造したフィブリンゲル内では死んだ細胞が観察されなかった。即ち、36 ~ 64 mg の高濃度フィブリンゲルは脂肪由来の中間葉幹細胞に対する細胞毒性が弱く存在するが、18 ~ 32 mg 以下の濃度のフィブリンゲルは細胞毒性がないことを示している。

【0055】

図 1 b は、フィブリノゲンゲルによる幹細胞の増殖能力を WST - 1 を利用して定量的に測定して示したグラフであって、希釈倍数が増加するほど吸光度が増加した。即ち、フィブリノゲンを 20 倍 (3.6 ~ 6.3 mg/mL) または 40 倍 (1.8 ~ 3.2 mg/mL) 希釈して製造したフィブリンゲルで幹細胞が最もよく増殖すること分かる。

実施例 3 : 人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートの製造

【0056】

前記実施例 1 で 2 継代以上培養した中間葉幹細胞を収集し、増殖培地で懸濁した。前記実施例 2 の結果に基づいて、トロンピンを最終 8 ~ 1.5 IU になるように細胞懸濁液に添加した。支持体として、約 10 × 10 cm の大きさの四角形の生分解性支持体であるピクリルメッシュ、牛の羊膜または非分解性支持体であるガーゼ及び PET フィルムに約 3 ~ 6.5 mg/mL 濃度のフィブリノゲンを塗布し均一に塗布した。次に、トロンピンが含まれた細胞懸濁液を支持体に cm² 当たり約 5,000 個になるように塗布した後、上下に丁寧に揺らして細胞 - フィブリンゲルが支持体に均一に形成されて付着されるようにした。30 分後、フィブリンゲルが完全に固まると増殖培地を添加し、37 °C、5 % CO₂ のインキュベータで 3 ~ 5 日間培養した。

【0057】

図 2 a は、人脂肪由来の中間葉幹細胞をフィブリンヒドロゲルと混合して生分解性支持体であるピクリルメッシュ、牛の羊膜、非分解性支持体であるガーゼまたは PET フィルムに付着してから培養して製造されたシートの写真である。即ち、本発明によって細胞 - ヒドロゲルを生分解性または非分解性支持体に付着してシートを製造することでシートの強度を上げて取り扱いやすくした。また、細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートの厚さは 0.1 ~ 2 mm で、臨床的適用の際にシートが容易に破れるか破損することを防止し、幹細胞の含量を上げることで治療効果を増大するようにした。

【0058】

図 2 b は、シートを顕微鏡または AO/EtBr で染色して蛍光顕微鏡で観察した写真である。図 2 b に示したように、0 日には球状の脂肪由来の中間葉幹細胞が支持体に低い濃度で分布されていたが、5 日間培養した後には繊維芽細胞形態の細胞がヒドロゲルによって支持体に付着されて増殖されたことが観察された。シート cm² 当たり約 20,000 ~ 60,000 個の細胞が均質に分布され、100 % 生存していた。

【0059】

他の実施例として、5 日間培養した前記シートを生理食塩水で洗浄して FBS を除去し、

10

20

30

40

50

無血清DMEMを添加して37℃で10日間放置した。3日、5日、7日、10日目にEtBr/AOで染色して生存率を測定した。その結果、図2cに示したように前記発明によって製造したシート内で脂肪由来の中間葉幹細胞は無血清培地でも繊維芽細胞の形態を維持しており、3日目に98%以上、7日目に90%以上、10日目には80%以上生存していた。

実施例4：人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートの凍結保管

【0060】

前記実施例3で製造した人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートを洗浄して細胞培養液を除去した後、凍結保管剤（10% DMSO及び人血清アルブミン溶液）が入っているクライオバックに入れて-80℃で凍結保管した。約1ヵ月後、前記クライオバックを取り出して37℃の恒温水槽に入れて揺らし、凍結保管剤を溶かして流した。生理食塩水を添加し上下に揺らして流した。1~3回更に追加洗浄して凍結保管剤を完全に除去した後、AO/EtBrで染色して生存率を測定した。

10

【0061】

その結果、図3に示したように、-80℃で凍結保管してから解凍した人脂肪由来中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体はシートの形態及び強度がそのまま維持されており、シート内の細胞も95%以上生存していることに示された。即ち、本発明によって製造された人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートは主な有効成分である細胞を損傷せずに-80℃で長期間冷凍保管が可能であることが分かる。

20

実験例1：人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体の生物学的特性

【0062】

前記実施例1で分離及び培養した脂肪由来の中間葉幹細胞は従来技術（特許文献4）によるものであって、CD10、CD13、CD29、CD44、CD59、CD71、CD90、CD105及びOct4に対して陽性で、CD34、CD45、CD104、CD106及びStro-1には陰性であった。前記実施例1から得た細胞を利用して製造した実施例3のシートを酵素処理してフィブリン糊を溶かした後、単一細胞に分離した。収集された細胞を1.5mlの遠心分離用チューブに移し、FACS染色溶液（1%ウシ胎児血清が含まれたリン酸塩緩衝溶液）1mlを入れてよく混ぜた後、10,000rpmで5秒間遠心分離した。上層液を除去し、FACS染色溶液1mlに再浮遊して10,000rpmで5秒間遠心分離した後、上層液を除去しFACS染色溶液300μlに再浮遊した。サンプルの数に応じて遠心分離用チューブ当たり約0.5~1.0×10⁶個の細胞が含まれるように新しいチューブに分柱し、抗体を添加し氷で30分間反応させた。FACS染色溶液1mlに再浮遊して10,000rpmで5秒間遠心分離してから上層液を除去した。FACS固定液400~500μlを添加し再浮遊してフローサイトメトリを利用して分析した。

30

【0063】

その結果、図4に示したように、本発明によってヒドロゲル内で培養した脂肪由来の中間葉幹細胞は依然としてCD29、CD44、CD73、CD90、CD105に陽性反応を示し、CD34、CD45に陰性である免疫学的特性を維持していた。但し、CD105の発現は70%以下で、従来技術（特許文献4）によって培養した際に比べて20%以上減少していた。

40

実験例2：人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体の成長因子の分泌

【0064】

実施例3の人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートまたは実施例4の凍結保管されたシートを解凍してPBSで洗浄した後、0.8×0.8cmに切り取って25-wellのプレートに2枚ずつ入れてDMEM 1mlを添加

50

した。37、5%CO₂インキュベータで72時間培養した後、上層液を収集して中間葉幹細胞から分泌される代表的な成長因子であるVEGF、HGFの量をELISA法を利用して測定した。その結果、図5aに示したように前記シートはHGF及びVEGFを分泌していた。

【0065】

他の実施例として、前記収集した上層液を血管形成に関するサイトカインアレイキットを利用して分析した。その結果、図5bに示したように前記シートは血管形成を促進するHGF、VEGFをはじめとする成長因子とサープリン(Serpin)E1(PAI-1)とF1(PDEF)、TIMP-1、CXCL8(IL-8)、FGF-2、DPP-IV(CD26)のような多様なサイトカインを多量に分泌していた。即ち、本発明によ

10

実験例3：人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体のECM分泌能

【0066】

前記実施例3で製造した人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体の凍結切片を製造した後、3.7%ホルムアルデヒドを含むPBSで30分間固定した。PBSで3回洗浄し、5%の正常ヤギ血清(normal goat serum)と0.1%トリトン(triton)-X100を含むPBSで30分間浸透(permeabilization)及びブロッキング(blocking)を行った。1次抗体を含むPBSを添加した後、37で1時間反応させてからPBSで3回洗浄し、2次抗体を添加し常温で30分間反応させた。PBSで3回洗浄してからマウンティングし、蛍光顕微鏡で観察した。

20

【0067】

図6はシート内の脂肪由来の中間葉幹細胞の細胞外マトリックス(Extracellular matrix: ECM)の分泌能を示す写真であり(x400)、ここに示したように本発明によって製造した脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体は全体的にコラーゲンタイプI、フィブロネクチン及びラミニンに陽性反応を示した。即ち、本発明によって製造した脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体を構成する細胞は多様な種類の細胞外基質を多量に分泌するだけでなく、分泌された細胞外基質のヒドロゲル内に留まるため、体内に移植した際に多様な基質を提供することで創傷の治癒を容易にする。

30

実験例4：同種の人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体の免疫調節機能

【0068】

実施例3の人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートまたは実施例4の凍結保管されたシートを回答してPBSで洗浄した後、それぞれ0.8x0.8cmに切り取って24-wellのプレートに1枚ずつ入れた。そして、組織適合性抗原(Human Leukocyte Antigen: HLA)が他の供与者から得た抹消血液単核細胞(Peripheral Blood Mononuclear Cell: PBMC)5x10⁵個を24-wellのプレートに添加した。陽性対照群としては抹消血液単核細胞にマイトジェンであるPHA(phyto-hemagglutinin)を添加して抹消血液単核細胞の免疫反応を誘発した。反応開始後3日目に上澄液を収集し、分泌されたTNF- α の量をELISA法を利用して測定した。

40

【0069】

図7aは同種の人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体の免疫反応の誘導能を示す図であり、ここに示したように陽性対照群である抹消血液単核細胞はPHAによって活性化される一方、前記実施例3または4によって製造した同種の

50

人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体との反応では TNF - が殆ど分泌されていなかった。即ち、同種の人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体は免疫反応を誘発しないことが確認された。

【 0 0 7 0 】

他の実験例として、抹消血液単核細胞 5×10^5 個を 24 - well のプレートに入れ、PHA で活性化させて免疫反応を誘発し、前記実施例 3 または 4 によって製造した同種の人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートを 0.8×0.8 cm に切り取ってプレートに 1 枚ずつ入れた。反応 3 日目に上澄液を収集し、TNF - の分泌量を測定した。

【 0 0 7 1 】

その結果、図 7 b に示したように PHA で活性化された抹消血液単核細胞で同種の人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートは TNF - の分泌量を 60 % 以上減少させた。即ち、同種の人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体は免疫反応を誘発せず、また過度な免疫反応が発生したら免疫細胞によって多量分泌されて免疫反応性を増加する役割をする TNF - の分泌量を著しく減少する役割をする。よって、脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートを糖尿病性創傷に覆うと、持続される創傷の炎症を緩和して創傷が治癒されるように助ける。

実験例 5 : 脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体の傷治癒効果

【 0 0 7 2 】

雄の db / db 糖尿病マウスを日本エスエルシー株式会社から購入し、血糖が 250 mg / dL 以上になるまで純化した。手術のためにマウスにロンピンとゾレチル 50 を 1 : 1 に混合して腹腔に投与した。麻酔されたマウスの胸部位を除毛器で除毛した後、イソプロパノールで消毒した。マウスごとに胸の両側に直径 8 mm の円形の生検創傷を製造し、円形の創傷が維持され創傷が収縮することを防止するためにシリコンスプリントを付着した。創傷をデジタルカメラで撮影した。実施例 3 人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートを創傷と同じ大きさに切り取って創傷を覆った。創傷が十分に覆われるようにテガダーム (登録商標) で被覆し、その上に弾力保護帯で更に被覆した。5 日後、テガダーム (登録商標) を丁寧に取り出して写真を撮影した後、更にテガダーム (登録商標) で覆った。その後約 2 週にわたって 3 日に一度ずつ連続写真を撮影し、NIH 画像プロセッシングプログラムである Image J を利用して創傷の面積を計算して、初期創傷面積に対する百分率 (%) で示して定量した。

【 0 0 7 3 】

その結果、図 8 a に示したように創傷形成後 8 日までは人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートを処置した群がビヒクル対照群またはヒドロゲル対照群の創傷の大きさに比べ減少する様相を示したが、統計的な差は観察されなかった。しかし、11 日から人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートを処置した群がビヒクル対照群またはヒドロゲル対照群の創傷の大きさより有意に更に小さくなり、14 日目には人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートを処置した群の大部分の創傷が完全に閉ざされた一方、ビヒクル対照群、ヒドロゲル対照群、単一細胞処置群は一部の固体を除いては殆どのマウスにまだ創傷が残っていた。従来技術で培養した単一細胞処置群は対照群に比べて創傷の大きさが減少していたが、有意な差は示さなかった。即ち、従来技術で培養した単一人脂肪由来の中間葉幹細胞は糖尿病性創傷に対する治癒効果が殆どないのに対し、本発明によって製造した人脂肪由来の中間葉幹細胞 - ヒドロゲル - 生分解性または非分解性支持体シートは糖尿病性創傷の治癒効果が高かった。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 7 4 】

本発明による高活性の中間葉幹細胞を含む造成物またはシートは、たんぱく質分解酵素を

10

20

30

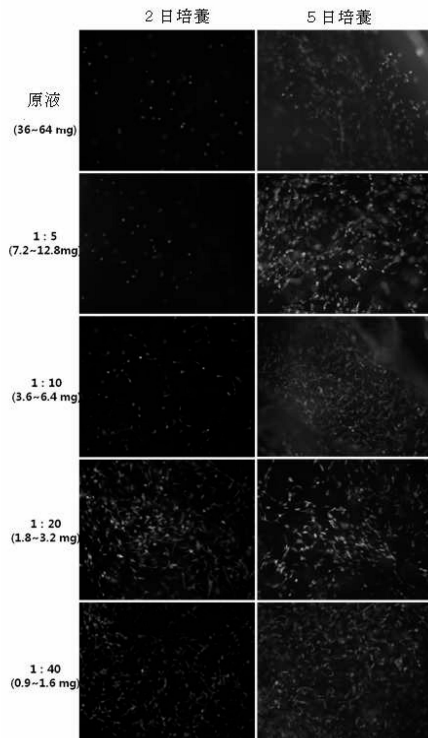
40

50

利用した単離（選別）過程なしに高活性の幹細胞がそのまま傷部位に塗布されることができ、培養ステップで中間葉幹細胞から分泌されるコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、エラスチンのような細胞外基質が完全にヒドロゲルに貼布されて存在することで従来の治療剤に比べて皮膚再生及び傷の治癒能力が著しく優秀で治療期間を短縮することができる有利な効果を示すため、皮膚再生及び傷治癒用造成物またはシートとして有用に使用可能であるため産業上の利用可能性がある。

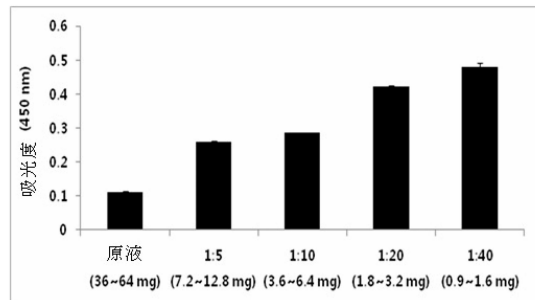
【図1 a】

【図1 a】



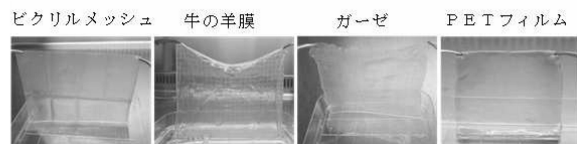
【図1 b】

【図1 b】



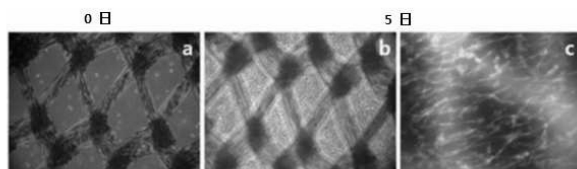
【図2 a】

【図2 a】



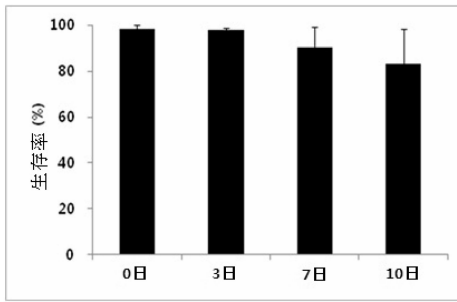
【図2 b】

【図2b】



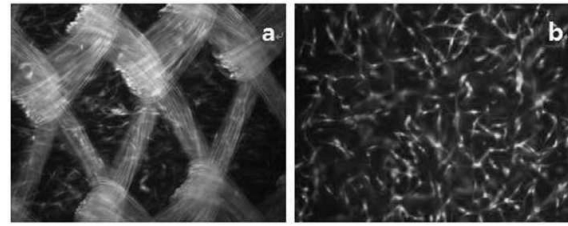
【図2c】

【図2c】



【図3b】

【図3b】



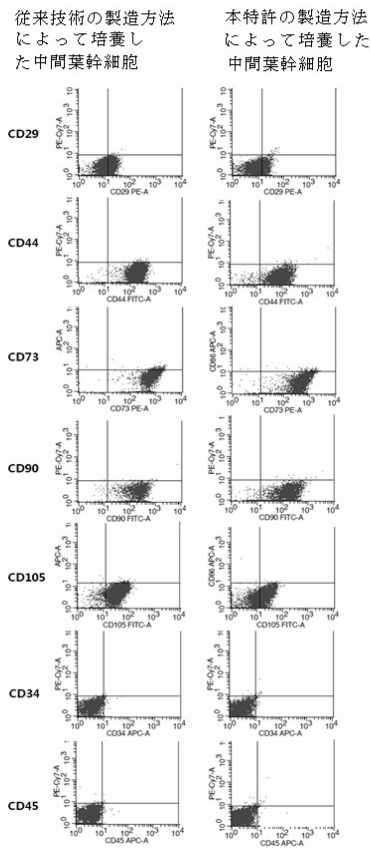
【図3a】

【図3a】



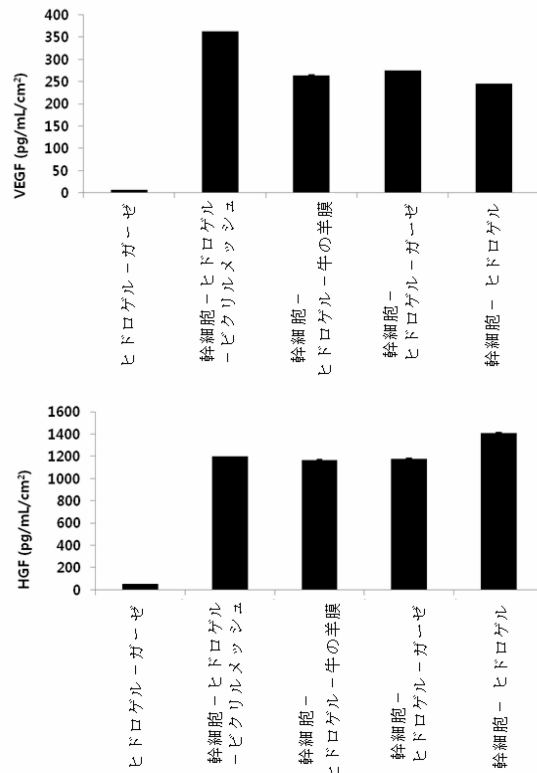
【図4】

【図4】



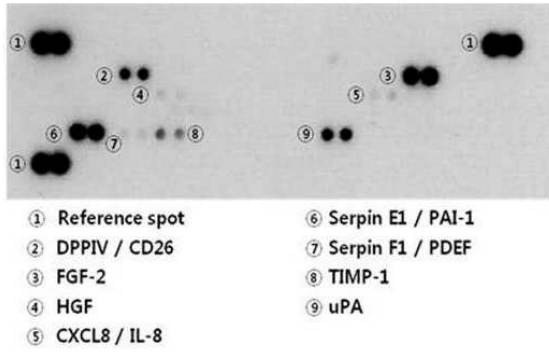
【図5a】

【図5a】



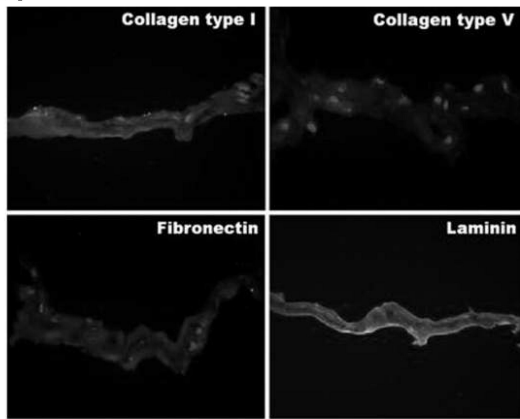
【 図 5 b 】

【図5b】



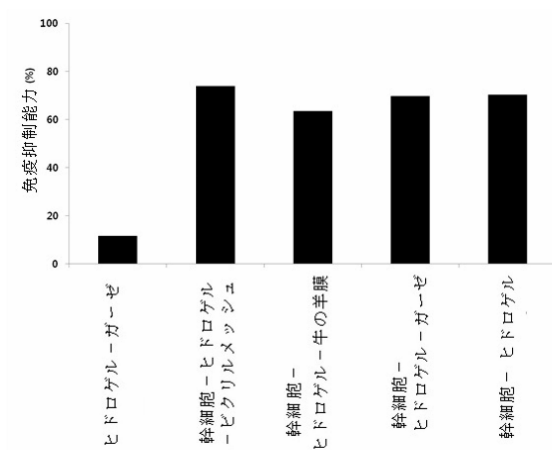
【 図 6 】

【図6】



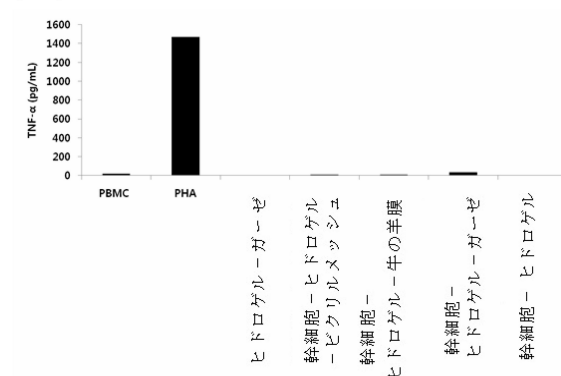
【 図 7 b 】

【図7b】



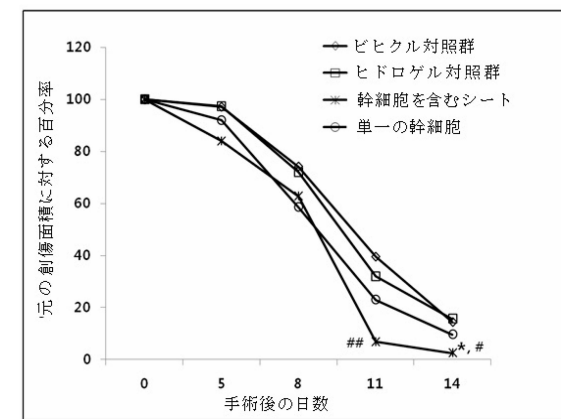
【 図 7 a 】

【図7a】



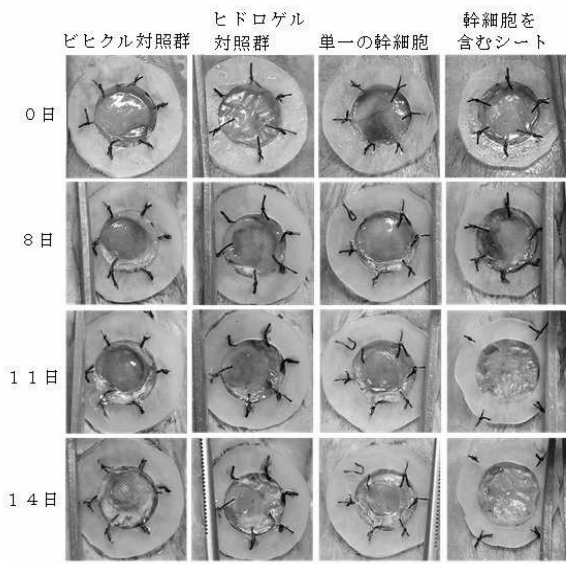
【 図 8 a 】

【図8a】



【図 8 b】

【図8b】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 47/42	(2017.01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 K 47/36	(2006.01)	A 6 1 K 47/36
A 6 1 K 47/38	(2006.01)	A 6 1 K 47/38
A 6 1 K 47/34	(2017.01)	A 6 1 K 47/34
A 6 1 K 47/32	(2006.01)	A 6 1 K 47/32

(74)代理人 100130672

弁理士 伊藤 寛之

(72)発明者 イ、ソング

大韓民国、ソウル、クムチョング、デジタルー口、130、ナムソンプラザ 405ホ(カサードン)

(72)発明者 キム、ミヒョン

大韓民国、ソウル、クムチョング、デジタルー口、130、ナムソンプラザ 405ホ(カサードン)

(72)発明者 キム、インオク

大韓民国、ソウル、クムチョング、デジタルー口、130、ナムソンプラザ 405ホ(カサードン)

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 特表2013-542777(JP,A)

特表2013-510577(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 L 15 / 00 - 33 / 18

A 6 1 K 9 / 00

A 6 1 K 35 / 00

A 6 1 K 47 / 00

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)