

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-525837

(P2009-525837A)

(43) 公表日 平成21年7月16日(2009.7.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00	4 C 0 8 1
	A 6 1 L 27/00	E
	A 6 1 L 27/00	V
	A 6 1 L 27/00	Y

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁)

(21) 出願番号	特願2008-554490 (P2008-554490)	(71) 出願人	500557473 オルガノジェネシス インク. アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2021, カントン, ダン ロード 15 O
(86) (22) 出願日	平成19年2月7日 (2007.2.7)	(74) 代理人	100136630 弁理士 水野 祐啓
(85) 翻訳文提出日	平成20年9月24日 (2008.9.24)	(72) 発明者	ビルボ, パトリック, アール. アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 1776 サドベリー ウィンザー ロー ド 52
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/061800	(72) 発明者	エクランド, ダリオ, シー. アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2021 カントン コルツ クロッシン グ 15
(87) 国際公開番号	W02007/092902		
(87) 国際公開日	平成19年8月16日 (2007.8.16)		
(31) 優先権主張番号	60/771, 257		
(32) 優先日	平成18年2月7日 (2006.2.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

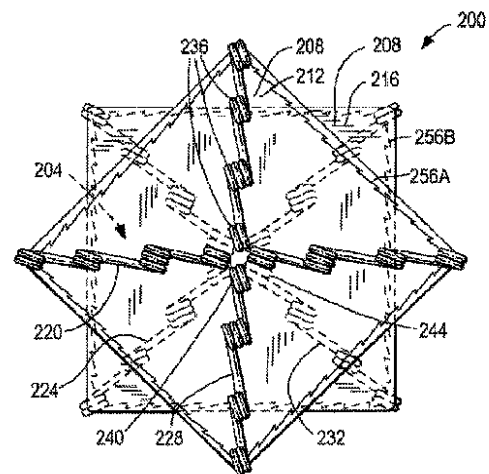
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物工学処理された組織構築物およびその心臓での使用

(57) 【要約】

培養細胞および内因的に産生された細胞外マトリックス成分を含み、外因性マ

トリックス成分またはネットワーク支持体またはスカフォード部材を必要としない、培養された組織構築物。本発明のいくつかの組織構築物は、多数の細胞層または1より多くの細胞型を含む。本発明の組織構築物は、それらの細胞が由来する組織の形態学的特徴および機能を持つ。そしてそれらの強度は容易に操作できる。本発明の培養組織構築物は、限定培地中で、すなわち、化学的に未定義の成分を含まないで調製されることが好ましい。これらの組織構築物は、心臓組織を修復するのに使用される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

経皮経腔的な処置のためのオクルダーであって、全体的な支持構造物と、前記全体的な支持構造物に接続する複数のオクルージョンシエルとを含み、前記オクルージョンシエルの少なくとも 1 つは、培養された細胞によって合成され、組み立てられた細胞外マトリックスの層を含む、オクルダー。

【請求項 2】

前記細胞外マトリックスの層はさらに細胞を含む、請求項 1 に記載のオクルダー。

【請求項 3】

前記オクルージョンシエルは、組織の成長を刺激する物質を含む、請求項 1 に記載のオクルダー。 10

【請求項 4】

前記組織の成長を刺激する物質は、成長因子を含む、請求項 3 に記載のオクルダー。

【請求項 5】

前記オクルージョンシエルは、抗血栓性の物質を含む、請求項 1 に記載のオクルダー。

【請求項 6】

前記抗血栓性の物質は、ヘパリンを含む、請求項 5 に記載のオクルダー。

【請求項 7】

前記全体的な支持構造物は、金属を含む、請求項 1 に記載のオクルダー。

【請求項 8】

前記全体的な支持構造物は、生物吸収性ポリマーを含む、請求項 1 に記載のオクルダー。 20

【請求項 9】

前記生物吸収性ポリマーは、ポリ乳酸を含む、請求項 8 に記載のオクルダー。

【請求項 10】

前記全体的な支持構造物は、近位の支持構造物および遠位の支持構造物を含む、請求項 1 に記載のオクルダー。

【請求項 11】

前記近位の支持構造物および前記遠位の支持構造物はクリップを形成している、請求項 10 に記載のオクルダー。 30

【請求項 12】

前記近位の支持構造物は、複数の外側に延びる近位の腕を含み、前記遠位の支持構造物は、複数の外側に延びる遠位の腕を含む、請求項 10 に記載のオクルダー。

【請求項 13】

前記近位の支持構造物は近位のオクルージョンシエルに結合し、前記遠位の支持構造物は遠位のオクルージョンシエルに結合する、請求項 10 に記載のオクルダー。

【請求項 14】

経皮経腔的な処置のためのオクルダーであって、全体的な支持構造物および前記全体的な支持構造物に接続する少なくとも 1 つのオクルージョンシエルを含み、細胞外マトリックスの層を生成する条件下で成長する線維芽細胞を含み、前記細胞外マトリックスの層は前記線維芽細胞によって合成され、組み立てられ、前記培養された線維芽細胞は前記合成された細胞外マトリックスの層に含有された状態である、培養された組織構築物と、組織の成長を促進する物質とを含む、オクルダー。 40

【請求項 15】

患者の心臓の開口を経皮経腔的に閉塞するための方法であって、前記方法は、患者の心臓にオクルダーを挿入することを含み、前記オクルダーは、全体的な支持構造物と、前記全体的な支持構造物に接続する少なくとも 1 つのオクルージョンシエルを含み、細胞外マトリックスの層を生成する条件下で成長する線維芽細胞を含み、前記細胞外マトリックスの層は前記線維芽細胞によって合成され、組み立てられ、前記培養された線維芽細胞は前記合成された細胞外マトリックスの層に含有された状態である、培養された組織構築物を含 50

み、また、前記方法は、前記オクルダーを少なくとも部分的に心臓の開口部に位置づけて心臓の開口部を実質的に閉塞させる、方法。

【請求項 16】

前記オクルダーの全体的な支持構造物が、近位の支持構造物と遠位の支持構造物とを含み、前記近位の支持構造物は近位のオクルージョンシェルに接続し、前記遠位の支持構造物は遠位のオクルージョンシェルに接続し、前記オクルダーを少なくとも部分的に心臓の開口内部に位置づけることは、全体的な支持構造物の一部を心臓の開口内部に位置づけ、前記近位の支持構造物と前記遠位の支持構造物とを心臓の開口の異なる側に位置づけることを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記心臓の開口が卵円孔開存である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記心臓の開口が心房性の隔壁の欠陥である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

前記心臓の開口が心室性の隔壁の欠陥である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 20】

患者の心臓の盲管を経皮経腔的に閉塞するための方法であって、前記方法は、患者の心臓にオクルダーを挿入することを含み、前記オクルダーは、全体的な支持構造物と、前記全体的な支持構造物に接続する少なくとも 1 つのオクルージョンシェルを含み、細胞外マトリックスの層を生成する条件下で成長する線維芽細胞を含み、前記細胞外マトリックスの層は前記線維芽細胞によって合成され、組み立てられ、前記培養された線維芽細胞は前記合成された細胞外マトリックスの層に含有された状態である、培養された組織構築物を含み、また、前記方法は、前記オクルダーを少なくとも部分的に心臓の盲管に位置づけて、心臓の盲管をなくす、方法。

【請求項 21】

前記心臓の盲管が左心房の付属器である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

被験体の心臓において血管新生を促進するための方法であって、前記方法は、細胞ーマトリックス構築物を被験体の心臓に付着させて、心臓内の血管数を増加させることを含み、前記細胞ーマトリックス構築物は、線維芽細胞および線維芽細胞によって天然に分泌された結合組織タンパク質を含む方法。

【請求項 23】

前記細胞ーマトリックス構築物は、天然の細胞付着によって心臓に接着される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記細胞ーマトリックス構築物は、ある付着方法によって心臓に付着される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記付着手段は、縫合糸、生物学的接着剤、合成接着剤、レーザー染料、またはヒドロゲルである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記生物学的接着剤は、フィブリン接着剤である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記細胞ーマトリックス構築物は、心臓の心外膜に付着している、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 28】

前記細胞ーマトリックス構築物は、心臓の心筋に付着している、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 29】

前記細胞ーマトリックス構築物は、心臓の心内膜に付着している、請求項 22 に記載の方

10

20

30

40

50

法。

【請求項 3 0】

哺乳動物組織のインビボでの血管新生化を促進する方法であって、前記方法は、細胞ーマトリックス構築物を前記哺乳動物組織に付着させて、前記哺乳動物組織における血管数を増やし、前記細胞ーマトリックス構築物は、線維芽細胞および線維芽細胞から天然に分泌される内因的に産生された細胞外マトリックス成分とを含む、方法。

【請求項 3 1】

前記哺乳動物組織は、心臓組織、骨格筋、平滑筋、結合組織または皮膚組織である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記細胞ーマトリックス構築物は、天然の細胞付着によって哺乳動物組織に付着される、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記細胞ーマトリックス構築物は、付着手段によって哺乳動物組織に付着される、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記付着手段は、縫合糸、生物学的接着剤、合成接着剤、レーザー染料、またはヒドロゲルである、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

被験体において吻合術の部位の治療を促進するための方法であって、細胞ーマトリックス構築物を前記部位に付着させて、内皮細胞の成長を促し、前記部位内の血管数を増やす方法であって、前記細胞ーマトリックス構築物は、線維芽細胞および線維芽細胞から天然に分泌される内因的に産生された細胞外マトリックス成分とを含む、方法。

【請求項 3 6】

前記細胞ーマトリックス構築物は、天然の細胞付着によって哺乳動物組織に付着される、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記細胞ーマトリックス構築物は、縫合糸、生物学的接着剤、合成接着剤、レーザー染料、またはヒドロゲルのいずれかによって前記部位に付着される、請求項 3 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組織工学の分野に属する。本発明は、心臓および関連する組織における内皮化および血管新生化を促進するための生物学処理された組織構築物の体内移植または付着に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

冠状動脈の心疾患は、今日の米国における 1 つの主要な死亡原因である (American Heart Association's "1999 Heart and Stroke Statistical Update")。この疾患は、他の種々の心臓脈管系の障害と同様、動脈の狭窄により、重要な組織に血液が十分に流れないことを特徴とする。

【0003】

疾患または他の損傷のある心臓における血流を改善するために現在用いられている臨床方法としては、冠状動脈のバイパス手術、血管形成術、動脈血管内膜切除術といった侵襲的な外科手術の手法がある。そのような処置は、術中および術後に固有のリスクを高いレベルで伴うのが普通であり、また、心臓の虚血に対する一時的な治療しか提供しないことが多い。

【0004】

心臓の外科手術処置の予後を改善するための努力の一環として、医師や研究者は、外科手術中の血流を助けるためのポンプを使用することを試みてきた。しかしながら、そのようなポンプは、外科手術中の一時的な援助装置として機能するだけであり、心臓の病状の治療形体として使用することはできない。

【0005】

心臓の血流を改善するための冠状動脈のバイパスまたは他の外科手術処置に代わるものとして、心臓内の組織において新血管の形成を誘発することがあげられる。

【0006】

心臓内では、先天的もしくは後天的に、異常な開口、穴、もしくはシャントが、心室間または大血管間に生じることがあり、それによって、血液が十分に流れないことが起こりうる。そのような奇形は通常、先天的なものであり、折りたたまれた管状器官から4室、2単位系が形成される胎児期に由来するものである。隔壁の奇形は、心室間の隔膜または筋壁の形成が十分でないことによって起こり、重大な問題を引き起こしている。

【0007】

1つのそのような奇形または欠陥である卵円孔開存は、心臓の右心房と左心房の間の壁の、頑固な一方通行の、通常は弁様の開口である。左心房の圧は、一般的に右心房の圧より高いので、弁は通常は閉じた状態である。しかしながら、特定の条件の下では、右心房の圧が左心房の圧を上回り、右から左へのシャンティングを来し、血塊が体循環に入ることがある。これは、強度の静脈血栓または凝血異常のような、静脈の血栓を形成しやすい患者にとっては特に問題である。心室間の血液のシャンティングは、片頭痛を合併すると考えられている。

【0008】

さらに、患者によっては心房性の不整脈（すなわち、心臓のポンプ機能を非効率的にし得る心臓の異常なリズム）になりやすい。そのような一般的な異常においては、心房性の細動、心臓上部の2つの室（左心房と右心房）が、効果的な拍動をせずに震える。心房が拍動せず、心房性の細動の間に空になってしまうので、血液は壁上に停滞し、血塊が形成され、それが、心臓を通過し、脳に至り、卒中や一過性の虚血性発作を引き起こす。これらの血塊は、典型的には、血流が遅く停滞しやすいため左心房付属器と呼ばれる心臓の盲管に形成される。

【0009】

卵円孔開存ならびに同様の心臓の開口、例えば、心房性の隔壁の欠陥または心室性の隔壁の欠陥の経皮の栓、および左心房付属器の閉塞には、種々の機械的装置を使用することができる。これらの装置は典型的には、金属製の構造的骨格とそれに付着したスカフォード材料からなる。しかしながら、現時点で使用可能な栓装置は、しばしば製造が複雑であり、性能に一貫性がなく、技術的に複雑な移植処置が要求され、解剖学的適合性を欠き、合併症（例えば、血栓形成、慢性の炎症、残留物の漏れ、穿孔、骨折および心臓伝導系の乱れ）を誘発する。

【0010】

例えば、卵円孔開存などの心臓の開口をふさぎ、心臓の盲管、例えば、左心房の付属器を閉塞させるための改善された装置および関連する方法が必要である。

【0011】

組織工学の分野は、生物工学的方法を、正常および病理学的哺乳動物組織での構造的および機能的関係を理解するライフサイエンスの概念と結びつける。組織工学の目標は、組織機能を回復、維持、または改善する生物学的置換の開発および最終適用である。したがって、組織工学を通して、実験室で生物工学的組織を設計および製造することが可能である。生物工学的組織としては、通常元来の哺乳動物またはヒト組織と関連する細胞、および合成または外因性マトリックススカフォードを挙げることができる。新たな生物工学的組織は、ホスト患者に移殖された場合、機能性があり、そしてホスト患者の体に恒久的に組込まれるか、またはレシピエントホスト患者から得られる細胞によって進行的に生物再生されるに違いない。支持体部材またはスカフォードなしに等価の組織を作製することが

、新たな生物工学的組織を作成する上での科学的課題となる。

【0012】

発明の概要

本発明は、組織および臓器における血管形成を促進するための方法に関する。特に、本発明は、心臓および関連組織の内皮化および血管新生を促進するための、細胞マトリックス構築物の移植または付着に関する。

【0013】

本発明は、多岐にわたって適用される。限定されないが、損傷した心筋の修復および再生の促進、血管新生化および心臓外科手術（例えば、バイパス外科手術または心臓弁置換術）中の癒合の促進、吻合部位の血管形成の促進、および虚血性またはその他による損傷組織、例えば、骨格筋、平滑筋、脳組織、もしくは結合組織の血管新生化および治癒の促進などに適用される。

【0014】

本発明は、細胞マトリックス構築物は、糖尿病性の足の潰瘍を持つ患者の損傷部に移植されたとき、急速に内皮化および血管新生化を誘発することができ、その結果、新たな毛細血管を形成し、損傷組織の炎症を抑えることができることの発見に部分的に基づいている。

【0015】

該細胞マトリックス構築物は、組織再生および血管新生にとって重要な種々の成長因子、最も著明なものとしては血管内皮の成長因子、すなわち、VEGFを分泌する。本発明は、該細胞マトリックス構築物を、損傷組織、例えば、損傷心筋に適用して、その部分への新たな局所的血液供給および急速な組織リモデリングを誘発させることを包含する。

【0016】

頸動脈の動脈血管内膜切除手術（これは、しばしば、処置中に除去された粒子の下流の流れによって卒中を誘発しうる）を助けたり、その必要をなくすために、細胞マトリックス構築物移植を用いて、「天然の」頸動脈のバイパスの形成を促進してもよい。

【0017】

本発明はまた、例えば、卵円孔開存、心房性の隔壁の欠陥もしくは心室性の隔壁の隔壁といった心臓の開口を経皮的に閉じるための装置および方法、ならびに心臓の盲管、例えば、心房の付属器を経皮的に閉塞させるための装置および方法をも特徴とする。本発明の装置のスcafford材料には、少なくとも、部分的に、細胞マトリックス構築物などの培養細胞から形成された細胞外マトリックスが含まれる。好ましい実施態様においては、細胞マトリックス構築物は、その上に表皮層を形成する、培養されるケラチノサイトの層と共に、培養皮膚構築物を形成する、表皮に由来するもののような線維芽細胞を含んで、培養二層皮膚構築物になる。本発明の培養皮膚構築物は、天然の皮膚の多くの物理的、形態学および生化学的特徴を発現する。さらにいっそう好ましい実施態様では、細胞マトリックス構築物は、その培養中に化学的に未定義の成分を利用しないヒト由来細胞を含む定義されたシステムで形成される、ヒト皮膚構築物である皮膚の表皮層に類似する組織構築物である。最も好ましい実施態様では、本発明の細胞マトリックス構築物は、化学的に未定義であるか、または非ヒト生物学的成分または細胞でないが、ヒト由来細胞を含む化学的に定義される系で作製される。このような構造の結果、当業で公知の装置で生じる問題点は、最低限に抑えられるか、または除去される。

【0018】

一般に、ある局面において、本発明は、経皮経腔的処置のためのオクルダーを特徴とする。該オクルダーは、全体的な支持構造物と、全体的な支持構造物に結合した複数のオクルージョンシェルからなる。少なくとも1つのオクルージョンシェルは、細胞マトリックス構築物を含む。

【0019】

全体的な支持構造物は、金属または、代替的に生物吸収性ポリマー、例えば、ポリ乳酸

10

20

30

40

50

を含む。

【0020】

さらに別の実施態様において、全体的な支持構造物は、近位の支持構造物と遠位の支持構造物の双方を含む。ある実施態様において、近位の支持構造物と遠位の支持構造物は、一緒にクリップを形成する。別の実施態様において、近位の支持構造物は、複数の、外側に延びる近位の腕を持ち、遠位の支持構造物は、複数の、外側に延びる遠位の腕を持つ。近位の支持構造物は、近位のオクルージョンシェルを結合することができ、遠位の支持構造物は、遠位のオクルージョンシェルを結合することができる。

【0021】

別の局面において、本発明は、経皮経腔的処置のためのオクルダーを特徴とする。該オクルダーは、全体的な支持構造物と、全体的な支持構造物に結合した少なくとも1つのオクルージョンシェルを含む。該少なくとも1つのオクルージョンシェルは、細胞ーマトリックス構築物を含む。特定の実施形態において、該少なくとも1つのオクルージョンシェルは、抗血栓形成性の物質を含む。

10

【0022】

さらに別の局面において、本発明は、患者における心臓の開口の経皮経腔的閉塞を特徴とする。その方法は、オクルダーを患者の心臓に挿入すること、および心臓の開口を十分に閉塞するように該オクルダーを少なくとも部分的に該心臓の開口に位置づけることを含む。該オクルダーは、全体的な支持構造物および全体的な支持構造物に結合する少なくとも1つのオクルージョンシェルを含む。少なくとも1つのオクルージョンシェルは、細胞ーマトリックス構築物を含む。

20

【0023】

本発明のこの局面のいくつかの実施態様において、心臓の開口部は、例えば、卵円孔閉塞、心房性の隔壁の欠陥、または心室性の隔壁の欠陥である。別の実施態様において、オクルダーの全体的な支持構造物は、近位の支持構造物および遠位の支持構造物を含む。該近位の支持構造物は、近位のオクルージョンシェルと結合し、遠位の支持構造物は、遠位のオクルージョンシェルと結合する。全体的な支持構造物の一部は、心臓の開口部に位置づけられ、一方、近位のオクルージョンシェルおよび遠位のオクルージョンシェルは心臓の開口部の別の側に位置づけられる。

【0024】

さらに別の局面において、本発明は、患者の心臓の盲管を経皮経腔的に閉塞する方法を特徴とする。該方法は、オクルダーを患者の心臓に挿入すること、および心臓の盲管を十分に閉塞するように該オクルダーを少なくとも部分的に該心臓の開口に位置づけることを含む。該オクルダーは、全体的な支持構造物および全体的な支持構造物に結合する少なくとも1つのオクルージョンシェルを含む。少なくとも1つのオクルージョンシェルは、細胞ーマトリックス構築物を含む。本発明のある局面のある実施態様において、該心臓の盲管は、左心房の付属器である。

30

【0025】

さらに別の局面において、本発明は、経皮経腔的処置のためのオクルダーの作製方法を特徴とする。該方法は、全体的な支持構造物を設け、複数のオクルージョンシェルを該全体的な支持構造物に結合することを含む。複数のオクルージョンシェルの少なくとも1つのは、細胞ーマトリックス構築物を含む。

40

【0026】

本発明のこの局面の種々の実施態様において、細胞ーマトリックス構築物を含む少なくとも1つのオクルージョンシェルは、例えば、縫合、積層、または接着された全体的な支持構造物を含み、コーティング剤としての非血栓形成性の物質が塗布されている。

【0027】

本発明は、外因性マトリックス成分またはネットワーク支持体またはスカフォード部材の必要なしに、培養細胞および内因的に産生された細胞外マトリックス成分の生物工学的組織構築物に向けられる。したがって、本発明は、ヒト細胞、および例えば、生物工学的

50

組織構築物が、ヒトに使用するために設計される場合、それらの細胞により産生されるヒト・マトリックス成分から全体的に有利に作製できる。

【0028】

本発明は、外因性マトリックス成分、ネットワーク支持体、またはスカフォード部材のいずれかの添加なしに、細胞外マトリックス成分を産生する、線維芽細胞のような培養物中の細胞を刺激することによって、組織構築物を産生する方法にも向けられる。

【0029】

本発明は、限定培地システム中の細胞外マトリックス成分を産生する、線維芽細胞のような培養物中の細胞の刺激によって、および／またはウシ血清または臓器抽出物のような、未定義または非ヒト由来の生物学的成分を使用することなし、組織構築物を産生する方法にも向けられる。

10

【0030】

さらに、この組織構築物は、天然の組織の細胞組成および組織構築物を模倣する培養組織構築物を産生する様々な細胞型の一連の播種によって作成できる。

【0031】

さらにまた、組織構築物は、スカフォード支持体を必要とせず、または外因性細胞外マトリックス成分の添加なしに、培養細胞によって産生および自己集合される。

【0032】

組織構築物の強度特徴は、それが、医療または試験用途での任意の支持体または担体を必要とせずに、形成および直接的に移殖される、培養装置から容易にそして剥離可能に除去されるように、処理できるようになることである。

20

【0033】

本発明の組織構築物は、皮膚腫瘍または創傷のような、組織または臓器欠陥をもつ患者に対する移植のような臨床目的のために、または医薬品、化粧品、および化学製品の安全性試験または確証のような、生体外での組織試験または動物移植のために、有用である。

【0034】

図面においては、異なる図面を通して、同じ部分には同じ参照符号をつける。また、図面は必ずしも基準尺度を持たず、本発明の原則を説明するために強調されて示されている。

【0035】

(本発明の詳細な説明)

本発明は、被験体、特に、ヒト被験体の組織および臓器における血管形成を促進する方法に関する。特に本発明は、細胞－マトリックス構築物を移植または付着して、心臓および関連する組織における内皮化および血管新生を促進することに関する。

30

【0036】

本発明は、多岐にわたって適用される。限定されないが、損傷した心筋の修復および再生の促進、血管新生化および心臓外科手術（例えば、バイパス外科手術または心臓弁置換術）中の癒合の促進、吻合部位の血管形成の促進、および損傷した骨格筋、結合組織、または他の組織の血管新生化および修復の促進に適用される。

【0037】

これまで、現在の生物工学処理された組織構築物は、完全に細胞に組み込まれることはなく、外因性マトリックス成分、または構築もしくは支持もしくはその両方のための合成部材の添加または組み込みのいずれかに頼らざるを得なかった。

40

【0038】

本明細書に記載の生物工学処理された組織構築物は、それらの細胞が由来する組織の多くの天然の特徴を示している。このように作製された組織構築物は、患者への移植またはインビトロでの試験に用いることができる。

【0039】

1つの好ましい実施態様は、第1の細胞タイプおよび内因的に産生された細胞外マトリックスを含む細胞－マトリックス構築物である。この第1の細胞タイプは、細胞外マトリ

50

ックスを合成および分泌して、細胞ーマトリックス構築物を作製することが可能である。

【0040】

別の好ましい実施態様は、第1の細胞タイプおよび内因的に産生された細胞外マトリックスおよび該第1の細胞タイプによって形成された細胞ーマトリックス構築物の上または内部に配置された第2のタイプの細胞の層とを含む二重層の構築物である。

【0041】

より好ましい実施態様は、線維芽細胞、例えば、皮膚に由来し、培養皮膚構築物を産生する線維芽細胞を含む、細胞ーマトリックス構築物である。

【0042】

別のさらに好ましい実施態様は、その上に表皮層を形成する、培養されるケラチノサイトの層と共に、培養皮膚構築物を形成する、表皮に由来するもののような線維芽細胞を含んで培養二層皮膚構築物になる、細胞ーマトリックス構築物である。本発明の培養皮膚構築物は、元来の皮膚の多くの物理的、形態学および生化学的特徴を発現する。

【0043】

さらにいっそう好ましい実施態様では、細胞ーマトリックス構築物は、その培養中に化学的に未定義の成分を利用しないヒト由来細胞を含む定義されたシステムで形成される、ヒト真皮構築物である皮膚の真皮層に類似する組織構築物である。

【0044】

最も好ましい実施態様では、本発明の組織構築物は、化学的に未定義であるか、または非ヒト生物学的成分もしくは細胞ではないヒト由来細胞を含む、化学的に定義されるシステムで作製される。

【0045】

本発明の別の実施態様において、遺伝工学的に処理され、血管新生を誘発する特徴を向上させた細胞ーマトリックス構築物を用いて、心臓または他の組織における新血管の形成を促進することができる。

【0046】

当業者は、異なるレベルの血管由来の因子を放出する細胞を組み込むことによって、細胞ーマトリックス構築物の血管由来の活性をコントロールすることができると理解されている。例えば、血管の平滑筋細胞、好ましくは、大動脈の平滑筋細胞が、ヒト真皮の線維芽細胞より、実質的に多くのVEGFを産生することが知られている。従って、線維芽細胞に代えて、またはそれに加えて、大動脈の平滑筋細胞を用いることによって、血管由来の活性が高められた細胞ーマトリックス構築物を培養することができる。

【0047】

別の実施態様において、本発明は、虚血性の損傷を受けた心臓、脳、内臓組織または周辺組織の治療方法を包含する。例えば、限定されないが、本発明の一実施態様は、心筋梗塞後の虚血性領域に細胞ーマトリックス構築物を付着して、心臓の血管新生および損傷した心筋の再生を促進することを含む。脳虚血（例えば、卒中および／または頭蓋内の血圧上昇による）の場合、当該細胞ーマトリックス構築物は、線維芽細胞、神経性のグリア細胞、神経幹細胞、星状神経膠細胞、神経成長因子によってトランスフェクトされた線維芽細胞、またはそれらの組み合わせを含んでもよい。これらの細胞のいずれかを含むそのような細胞ーマトリックス構築物は、大脳皮質に直接配置されるか、または虚血領域に外科的に移植される。

【0048】

さらに好ましい実施態様においては、可逆的な心筋の虚血を治療し、血管新生を促進する方法は、細胞ーマトリックス構築物を虚血性の損傷部位に提供することである。該細胞ーマトリックス構築物は、培養された新生児皮膚の線維芽細胞を含む。新生児皮膚の線維芽細胞の利点は、それらが思うような形になる資質を有していると考えられていることである。すなわち、それらは分化転換が可能であり；低酸素性の環境で理想的であると考えられている。また、それらは、安全であり、被験体による拒絶反応を誘発しないという免

10

20

30

40

50

疫的な利点があると考えられている。これらの細胞はまた、成長因子やサイトカインといった細胞によって産生される生成物を輸送するため、被験体自身の細胞による組織の修復を助長する。この修復の結果、小血管が形成されることになり、治療された心筋における局所的な灌流が上昇する。最も好ましい実施態様においては、この細胞－マトリックス構築物は、動物由来の成分なしに、化学的限定培地中で作製され、いかなるメッシュ支持体のような外因性マトリックス物質も合成ポリマーも含まない。種々の実施態様において、当該細胞－マトリックス構築物は、さらに、骨髓由来幹細胞、胎生幹細胞、前駆細胞（内皮の前駆細胞、心臓前駆細胞を含む）、骨格筋芽細胞、心筋細胞または内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞および脂肪組織に由来する前駆細胞からなる群から選択される細胞をさらに含む。

10

【0049】

さらに別の実施態様において、本発明は、細胞－マトリックス構築物をあらゆる組織または臓器に提供して血管新生を促進することを含む。薄壁化、心室壁の機能および駆出率の低下といったうっ血性心不全の症状を持つ患者は、細胞－マトリックス構築物を異型心臓組織に移植してこれらの症状を緩和することによって恩恵を受けるかもしれない。

【0050】

本発明の1つの好ましい実施態様は、少なくとも1つの型の細胞外マトリックス産生細胞、および、より簡単には、「マトリックス」と称される、内因的に産生される細胞外マトリックス成分の構造層を包含する。該マトリックスは、細胞を培養することによって、完全に細胞で合成され、そして組み立てられる。この層は、ここで、細胞が、それらのマトリックス内およびそれらを通して、それら自身を分泌し、含有するので、「細胞－マトリックス構築物」または「細胞－マトリックス層」と称される。培養された組織構築物は、外因性マトリックス成分を必要としないため含まない。すなわち、マトリックス成分は、培養細胞によって産生されずに、他の手段によって導入される。より好ましい実施態様では、ヒト皮膚の線維芽細胞によって産生される細胞－マトリックス構築物は、元来の皮膚に類似するコラーゲンの優勢な濃度を示すことが示される。電子顕微鏡によって立証されるとおり、マトリックスは、生来のコラーゲンに類似する原線維および原線維束の組織を包むことと同様に、4分の1差の67nm結合パターンを示すコラーゲンを含み、通常は多孔性である。遅延還元SDS-PAGEは、生来のヒト皮膚に見られる優勢なコラーゲン型であるこれらの構築物中のI型およびIII型コラーゲンの両方の存在を検出した。標準免疫組織化学（IHC）技術を用いて、皮膚の細胞－マトリックス構築物は、コラーゲン原線維に結合されることが知られ、そしてインビボで原線維の直径を調節すると思われるデルマタン硫酸プロテオグリカンである、デコリンに対して陽性に染色する。デコリンは、TEMを用いて構築物中で可視化もされうる。産生した組織は、例えば、修復中の間葉または組織で見られる細胞外マトリックス糖タンパク質であるテナスシンに対しても陽性に染色する。生体内で修復中の組織と同様に、培養基中で産生された組織は、マトリックスが形成されるときに、III型コラーゲンに対するI型コラーゲンの比を増大することが示された。理論に束縛されることを望むわけではないが、該細胞は、それらの間の開放空間に、主にIII型コラーゲンおよびフィブロネクチンから構成される顆粒組織に類似のゆるいマトリックス間を、すばやく充填し、そしてその後、このゆるいマトリックスを、主にI型コラーゲンから構成される緻密なマトリックスで再生すると思われる。産生された細胞－マトリックスは、ヒアルロン酸（HA）などのグリコサミノグリカン（GAG）；フィブロネクチン；ビグリカンおよびベルシカンのようなデコリンに加えてプロテオグリカン；およびジヒアルロン酸；ジコンドロイチン－O－硫酸；ジコンドロイチン－4－硫酸；ジコンドロイチン－6－硫酸；ジコンドロイチン－4，6－硫酸；ジコンドロイチン－4－硫酸－UA－2S；およびジコンドロイチン－6－硫酸－UA－2Sのような硫酸グリコサミノグリカンのプロファイルを含むことが示された。これらの構造および生化学的特性は、構築物が培養基中で発生するとき、それら自身を発現し、そして構築物とその最終形態に近づくときに際立って明白になる。十分に形成された培養皮膚の細胞－マトリックス構築物でのこれらの成分の存在は、当該構築物が、正常真皮のも

20

30

40

50

のに近い構造的および生化学的特性を示すものである。

【0051】

前述のリストが、皮膚の線維芽細胞から形成された培養細胞－マトリックス構築物の生化学的および構造的特性のリストであるときに、他の型の線維芽細胞から形成される培養細胞－マトリックス構築物が、これらの特性の多く、およびそれらが起源する組織型についての他の表現型を生じることが認識されるべきである。いくつかの場合には、線維芽細胞は、化学的露出または接触、物理的ストレスのいずれかにより、またはトランスジェニック手段により、非表現型成分を発現するように誘導されうる。本発明の別の好ましい実施態様は、その上に沈着した細胞の第二層を有する細胞－マトリックス層である。細胞の第二層を、細胞－マトリックス層で培養して、生物工学的に二層化した組織構築物を形成する。さらに好ましい実施態様では、第二層の細胞は、上皮起源のものである。最も好ましい実施態様では、第二層は、第一の細胞－マトリックス層と一緒に、皮膚層を形成する皮膚の線維芽細胞および内因性マトリックスから形成された細胞－マトリックス構築物が、生きた皮膚構築物を包含する培養ヒト・ケラチノサイトを包含する。十分に形成されたときに、表皮層は、基底層、超基底層、顆粒層および角質層を示すケラチノ細胞の多層化され、層状にされ、そして十分に分化された層となる。皮膚構築物は、透過型電子顕微鏡（TEM）によって示されるときに、皮膚－表皮接合部に存在する十分に発達した基底膜を有する。基底膜は、TEMによって可視化されるときにVII型コラーゲンから構成される原線維に足場をつけることにより印される、ヘミデスモソームの周囲で最も厚くみえる。足場原線維は、基底膜から出ること、および皮膚層中のコラーゲン原線維を捕捉することが見て取れる。他の基底膜成分と同様に、これらの足場原線維は、ケラチノサイトによって分泌されることも知られている。ケラチノサイトが、それら自身での基底膜成分を分泌する能力がある場合、認識可能な基底膜は、線維芽細胞の不在下で形成しないことも知られている。本発明の皮膚構築物の免疫組織化学的染色は、基底膜タンパク質であるラミニンが存在することも示された。

【0052】

細胞－マトリックス構築物を形成するための本発明の好ましい方法では、第一の細胞型である、細胞外マトリックス産生細胞型を、基質に播き、培養し、誘導して、それらの周囲に組織化細胞外マトリックスを合成および分泌させて、細胞－マトリックス構築物を形成する。本発明の別の好ましい方法では、細胞－マトリックス構築物の表面に、第二の細胞型の細胞を播き、培養して、二層組織構築物を形成する。より好ましい方法では、天然のヒト皮膚に類似の特性を示す十分な厚みの皮膚構築物が、ケラチノサイトのようなヒト上皮細胞が、播種され、そして、十分に分化した層化表皮層を形成するのに十分な条件下で培養される皮膚層である、皮膚の細胞およびマトリックスの細胞－マトリックスを形成するマトリックス合成を誘導するのに十分な条件下で、ヒト皮膚の線維芽細胞のような線維芽細胞を培養することによって形成される

【0053】

したがって、本発明の組織構築物を得る1つの方法は；

- (a) 外因性細胞外マトリックス成分または構造的支持体部材の不在下で、少なくとも1つの細胞外マトリックス産生細胞型を培養すること；および
- (b) ステップ(a)の細胞を刺激して、細胞外マトリックス成分を合成、分泌および組織化させ、それらの細胞により合成される細胞およびマトリックスから構成される組織構築物を形成し、ステップ(a)および(b)が、同時にまたは連続して行われるうることを包含する。

【0054】

細胞－マトリックス構築物およびその上の第二の層を含む二層組織構築物を形成するために、当該方法は、さらに次のステップを含む。

- (c) 形成された組織－構築物の表面で第二の型の細胞を培養して、二層組織構築物を産生する。

【0055】

本発明に使用するための細胞外マトリックス産生細胞型は、細胞外マトリックス成分を産生および分泌し、そして細胞外マトリックス成分を組織化して、細胞－マトリックス構築物を形成する能力のある任意の細胞型であればよい。1以上の細胞外マトリックス産生細胞型を、培養して、細胞－マトリックス構築物を形成しうる。異なる細胞型または組織起源の細胞を、混合物として一緒に培養して、生来の組織で見られるものと類似の相補的成分および構造を生じうる。例えば、細胞外マトリックス産生細胞型は、それと混合した他の細胞型を有して、第一の細胞型によって正常に産生されない多量の細胞外マトリックスを産生しうる。別法として、細胞外マトリックス産生細胞型は、本発明の特定の皮膚構築物でのようなマトリックス態様の細胞－マトリックス構築物の全般的形成に実質的に寄与することなしに、組織中に特殊化された組織構造を形成する他の細胞型と混合することもできる。

10

【0056】

任意の細胞外マトリックス産生細胞型が、本発明によって使用されうる場合、本発明に使用するための好ましい細胞型は、間葉に由来する。さらに好ましい細胞型は、線維芽細胞、間質細胞、および他の支持接触性組織細胞であり、最も好ましくは、ヒトの皮膚構築物の産生のためにヒト真皮で見られるヒト皮膚の線維芽細胞である。線維芽細胞は、一般に、多量の細胞外マトリックスタンパク質、種としてコラーゲンを産生する。線維芽細胞によって産生される数種の型のコラーゲンがあるが、しかし、I型コラーゲンは、インビボで最も有効である。ヒト線維芽細胞株は、制限されないが、新生男児包皮、真皮、腱、肺、臍帯、軟骨、尿道、角膜基質、口腔粘膜、および腸を含めた多数の起源から誘導されうる。ヒト細胞としては、線維芽細胞に限定されず、平滑筋細胞、軟骨細胞、および間葉起源の他の接触性組織細胞が挙げられる。組織構築物の産生に使用されるマトリックス産生細胞の起源が、本発明の培養法を使用した後に類似または模倣すべきものである組織型に由来することは、要求されないが、好ましい。例えば、皮膚構築物が産生される実施態様では、好ましいマトリックス産生細胞は、線維芽細胞、好ましくは皮膚起源のものである。別の好ましい実施態様では、毛包の皮膚乳頭からの顕微解剖によって単離される線維芽細胞は、マトリックス単独、または他の線維芽細胞に結合して産生するのに使用されうる。角膜構築物が産生される実施態様では、マトリックス産生細胞は、角膜間質に由来する。細胞供与体は、発達および年齢で変化しうる。細胞は、胚、新生児、または成人を含めたより年齢の高い個体の供与組織に由来しうる。間葉幹細胞のような胎前駆細胞は、本発明に使用でき、そして所望の組織に発達するまで分化を誘導しうる。

20

30

【0057】

ヒト細胞が、本発明に使用するのに好ましいが、その方法に使用されるべき細胞は、ヒト起源から得られる細胞に限定されない。他の哺乳動物種から得られる細胞は、限定されないが、ウマ、イヌ、ブタ、ウシ、およびヒツジ起源が挙げられる；またはマウスまたはラットのようなげっ歯類種を使用してもよい。さらに、自発的に、化学的に、またはウイルスでトランスフェクトまたは組換え細胞または遺伝子操作した細胞を本発明に使用してもよい。1つ以上の細胞型を組込む実施態様のものについては、2つまたはそれ以上の起源から得られる正常な細胞のキメラ混合物；正常で遺伝的に修飾した、またはトランスフェクトした細胞の混合物；または2つまたはそれ以上の種または組織起源の細胞の混合物が使用されうる。

40

【0058】

組換えまたは遺伝子操作された細胞は、自然の細胞産物または治療薬を用いた治療法のレベルを増大させる必要のある患者についての薬物送出移植片として作用する組織構築物を作製する細胞－マトリックス構築物の産生に使用しうる。細胞は、連続した時間、または患者に存在する症状により生物学的、化学的、または熱的に信号発生されるときに必要なとされる場合、移植片組換え細胞産物、成長因子、ホルモン、ペプチドまたはタンパク質を介して患者に生成および送出しうる。長期または短期のいずれかの遺伝子産物発現は、培養組織構築物の指示によって望みうる。長期発現は、培養組織構築物が、延長された期間、患者に治療用製品を移植して送達するときに望ましい。対照的に、短期発現は、培養

50

組織構築物が、培養組織構築物の細胞が正常なまたは正常に近い治癒を促進するか、または創傷部位の乱切を減少させる場合の、創傷を示す患者に移植される例で望ましい。いったん創傷が治癒したら、培養組織構築物から得られる遺伝子産物は、もはや必要とされないか、その部位ではもはや望ましくない。細胞は、ホルモン性でなく、高いレベルで発現または細胞外マトリックス、そして改善された創傷治癒にとって治療的に有利である生きた細胞を含ませた移植片デバイスを、新生血管形成を促進または指示するか、または瘢痕またはケロイド形成を最小限にするある種の方法で修飾されたタンパク質または異なる型の細胞外マトリックス成分を発現するように遺伝子操作されうる。これらの処置は、一般に、当業で公知であり、Sambrookら、分子クローニング、実験室マニュアル、コールド・スプリング・ハーバー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク（1989年）（Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)）に記載がある。これを引用によって本明細書に援用する。上述の型の細胞の全ては、本発明に使用される場合、「マトリックス産生細胞」の定義の範囲内に含まれる。

【0059】

線維芽細胞により産生される優勢な主要な細胞外マトリックス成分は、原線維コラーゲン、特にコラーゲンI型である。原線維コラーゲンは、細胞-マトリックス構築物での主要な成分である；しかし、本発明は、このタンパク質またはタンパク質型のみから構成されるマトリックスに限定されない。例えば、他のコラーゲンは、コラーゲン型II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XV、XVI、XVII、XVIII、XIXのようなコラーゲンファミリーから得られる原線維性および非原線維性コラーゲンの両方は、適切な細胞型の使用によって産生されうる。同様に、最近の方法を用いて産生および沈着されうる他のマトリックスタンパク質としては、それに限定されないが、エラスチン；デコリンまたはビグリカンなどのプロテオグリカン；またはテナスシンのような糖タンパク質；ビトロネクチン；フィブロネクチン；ラミニン、スロボスポリンI、およびヒアルロン酸（HA）などのグリコサミノグリカン（GAG）が挙げられる。

【0060】

マトリックス産生細胞は、三次元組織様構造の形成に対処する培養皿、フラスコ、または回転ボトルのような動物細胞または組織培養物に適切な容器中で培養される。細胞が育成されうる適切な細胞成長表面は、細胞が、付着でき、そして細胞-マトリックス構築物を形成するための足場手段を提供できる、任意の生物学的に適合性のある材料でありうる。ガラス；ステンレス鋼；ポリカルボネート、ポリスチレン、塩化ポリビニル、ポリビニリデン、ポリジメチルシロキサン、フルオロポリマー、およびフッ化エチレンプロピレンを含めた重合体；および融合シリカ、ポリシリコン、またはシリコン結晶を含めたシリコン基質などの材料が、細胞成長表面として使用しうる。細胞成長表面材料は、化学的に治療または修飾されるか、静電的に負荷されるか、またはポリ-1-リシンまたはペプチドのような生物学的製品で被覆されうる。ペプチド被覆の例は、RGDペプチドである。

【0061】

本発明の組織構築物が、固形細胞成長表面で育成されうる場合、発達組織構築物への培地の二層接触を可能にするか、または培養のみからの接触に対処する膜の頂部および底部表面の両方を連通する孔を有する細胞成長表面が、好ましい。二層接触によって、培地に、培地中に含まれる栄養に露出する最大限の表面領域についての発達中の構築物の頂部および基底の両方を接触が可能となる。培地は、形成培養組織構築物の底部のみとも接触し、その結果、頂部表面は、培養皮膚構築物の発達にあるときに、空気にさらされ得る。好ましい培養容器は、担体挿入物、培地を含む培養容器中で懸濁される多孔性膜のような培養処理透過部材を利用するものである。典型的には、膜は、蓋で覆われ得るペトリ皿または培養皿のような基底内に挿入され、そして干渉する環状部材またはフレームワークの一方の末端に確保される。多孔性膜を有する担体挿入物を組込む培養容器が、当業界で知られ、そして本発明を行うのに好ましく、そしてそのいくつかがこの分野の米国特許出願（

10

20

30

40

50

第5, 766, 937号、第5, 466, 602号、第5, 366, 893号、第5, 358, 871号、第5, 215, 920号、第5, 026, 649号、第4, 871, 674号、第4, 608, 342号など）に記述されており、そのいくつかは市販されている。この開示を引用によって本明細書に援用する。これらの型の培養容器が使用される場合、組織構築物は、膜の一方の表面で産生され、好ましくは上方に向かう表面である頂部が好ましく、そして培養物は、頂部および基底表面の両方で細胞培地によって接触される。成長表面での孔は、膜を通した望ましくない培養物に栄養を供給するための培養培地の継代に対処し、したがって、細胞が、二層にまたは、基底側から唯一供給させる。好ましい孔サイズは、膜を通した細胞の成長に対処しないだけ十分に小さく、さらに、毛管作用によるように、細胞－マトリックス構築物の基底表面まで培養培地で含有される栄養の自由な通路に対処するのみ十分大きなものである。好ましい孔サイズは、約3ミクロン未満であるが、約0.1ミクロンから約3ミクロンの間、さらに好ましくは約0.2ミクロンから約1ミクロンまでの間、そして最も好ましくは約0.4ミクロンから約0.6ミクロンサイズ孔が使用される。ヒト皮膚の線維芽細胞の場合には、最も好ましい材料は、孔サイズが、約0.4から約0.6ミクロンの間であることを示すポリカルボレートである。最大の孔サイズは、細胞のサイズの大きさのみならず、細胞がその形状を変化し、そして膜を通過する能力にも依存する。組織様構築物が、表面に付着するが、基質を組込んだり、または包んだりせず、それにより、最小限の力で剥ぎ取ることによるように、それから脱着可能であることが重要である。形成された組織構築物のサイズおよび形状は、それが成長する容器表面または膜のサイズによる。基質は、丸型、角型、または丸い角を有する形状、または不規則な形状でありうる。基質は、平坦であるか、または創傷で干渉するか、生来の組織の物理的構造を模倣する形状構築物を産生する型として輪郭を描くこともできる。成長基質の大きな表面領域を説明するために、比較的多くの細胞を表面に播き、そして多量の培地が、細胞を十分に包みそして栄養分を与えることが必要とされる。組織構築物が、最終的に形成される場合、単独層細胞－マトリックス構築物または二層構築物であろうとなかろうと、患者に移植する前に膜基質から剥ぎ取ることによって除去される。

【0062】

本発明の培養組織構築物は、組織構築物の形成のための、網目部材のような合成または生体吸収性部材に依存しない。網目部材は、織物、編物またはフェルト材料として組織化される。網目部材が使用されるシステムでは、細胞は、網目部材上で培養され、そして網目の間隙の側面および範囲内で成長して、培養組織構築物内に網目を包み、そして組込む。このような網目を組込む方法によって形成される最終構築物は、物理的支持体として、そしてバルクとしてそれに依存する。合成網目部材に依存する培養組織構築物の例は、Naughtonら (Naughton, et al) に対する米国特許出願第5, 580, 781号、第5, 443, 950号、第5, 266, 480号、第5, 032, 508号、第4, 963, 489号を参照されたい。

【0063】

細胞－マトリックス層の産生のためのシステムは、静止的手段または培養培地への灌流手段を使用しうる。静止的システムでは、培養培地は、培地が運動中である灌流システムと対照的に、なお、そして比較的運動性がない。培地の灌流は、細胞の生存性に影響し、そしてマトリックス層の発達を増大する。灌流手段としては、それに限定されないが、培地を攪拌するために、培養膜を含む基質担体のすぐ下（下に）に、または隣接する培養皿中に磁性攪拌棒または動力付き圧縮器を使用すること；培養皿またはチャンバー内、またはそれに沿って培地をポンピングすること；培養皿を振盪または回転プラットホーム上で穏やかに攪拌すること；またはローラーボトル中で作製する場合には回転させること、が挙げられる。他の灌流手段は、本発明の方法に使用するために当業者によって決定される。

【0064】

本発明に使用するのに適する培養培地形成は、培養されるべき細胞型および産生されるべき組織構造に基づいて選択される。使用される培養培地、および細胞成長を促進するの

に必要とされる特定培養条件、マトリックス合成、および生存性は、育成される細胞の型による。

【0065】

本発明の生物工学的二層皮膚構築物の作製でのようなある例では、培地組成は、様々な補足が様々な目的のための必要である場合、作製の各段階で変化する。好ましい方法では、細胞－マトリックス層は、定義された条件下で形成される、すなわち、化学的限定培地で培養される。別の好ましい方法では、組織構築物は、両方の細胞型が、定義の培養培地で培養される、そこで沈着し、培養された細胞の第二の層を具備する細胞－マトリックス層を包含する。代替的に、組織構築物は、限定培地条件下で作製された細胞－マトリックス層、および未定義の培地条件下でそこに形成される第二の層を包含する。逆に、組織構築物は、未定義の培地条件下で作製されうる細胞－マトリックス層、および限定培地条件下でその上に形成される第二の層を包含する。

10

【0066】

化学的に定義された培養培地の使用が好ましく、すなわち、未定義の動物臓器のない培地または、組織抽出物、例えば、血清、下垂体抽出物、視床下部抽出物、胎盤抽出物、または胚抽出物、および供給細胞によって分泌されるタンパク質および因子である。最も好ましい実施態様では、培地は、未定義の成分および非ヒト起源に由来する定義された生物学的成分を含まない。未定義の成分の添加は、好ましくないが、それらは、組織構築物を首尾よく作製するために、培養基中で任意の点で開示方法によって使用されうる。本発明は、非ヒト動物源に由来する化学的に定義した成分を用いてスクリーニングしたヒト細胞を利用するとき、結果物である組織構築物は、定義されたヒト組織構築物である。合成機能的当量を添加して、最も好ましい作製方法に使用するために化学的に定義された定義の全範囲内の化学的限定培地を補足しうる。一般に、細胞培養の当業者は、適切な自然のヒト、ヒト組換え体、または過度の調査または実験なしに、本発明の培養培地を補足する一般に公知の動物成分に対する合成等価物を決定できる。診療所でこのような構築物を使用する上での利点は、偶発的な動物または交雑種ウイルス混入および感染の関係が減少されることである。試験のシナリオで、化学的に定義された構築物の利点は、試験されるときに、未定義の成分の存在により、混乱されるべき結果の可能性がないことである。

20

【0067】

培養培地は、通常さらに、他の成分で補足された栄養塩基から構成される。当業者は、本発明の組織構築物を首尾よく産生することについて合理的な予測をもって、動物細胞培養の分野で適切な栄養塩基を決定できる。多くの市販で入手可能な栄養源は、本発明の実施の上で有用である。これらとしては、ダルベッコの修飾イーグル培地（DMEM）；最小必須培地（MEM）；M199；RPMI 1640；イスコフの修飾ダルベッコ培地（EDMEM）のような無機塩、エネルギー源、アミノ酸、およびB-ビタミンが供給された市販で入手可能な栄養源が挙げられる。最小必須培地（MEM）およびM199は、リン脂質前駆体および非必須アミノ酸での追加の補足を必要とする。追加のアミノ酸、核酸、酵素コファクター、リン脂質前駆体、および無機塩を供給する市販で入手可能なビタミン富化混合物としては、HamのF-12、HamのF-10、NCTC 109、およびNCTC 135が挙げられる。濃度を変化させる上であろうと、全ての基本培地は、他の基本培地成分と一緒に、グルコース、アミノ酸、ビタミンおよび無機イオンの境内で細胞についての基礎的栄養源を提供する。本発明の最も好ましい基本培地は、カルシウム不含または低カルシウムのダルベッコの修飾イーグル培地（DMEM）のいずれかの栄養塩基、または代替的に、それぞれ3対1の比から1対3の比までの間のDMEMおよびHamのF-12を包含する。

30

40

【0068】

基本培地に、アミノ酸、成長因子およびホルモンなどの成分を補足する。本発明の細胞の培養用の定義された培養培地は、Parenteauに対する米国特許出願第5,712,163号、およびPCT国際公開公報WO95/31473号に記載がある。これらの開示を引用によって本明細書中に援用する。他の培地が当業において公知であり、例え

50

ば、HamおよびMcKeehan、Methods in Enzymology、58巻：44-93頁（1979年）に開示されている。または他の適切な化学的限定培地について、Bottensteinらで、Methods in Enzymology、58巻：94-109頁（1979年）に開示されている。好ましい実施態様では、基本培地は、動物細胞培養において、当業者に公知の、インシュリン、トランスフェリン、トリヨードチロニン（T3）、エタノールアミンおよび α -ホスホリルエタノールアミンといった成分で補足される。補足についての濃度および置換は、当業者によって決定される。

【0069】

インシュリンは、多重継代と比べて長期間利点をもつ、グルコースおよびアミノ酸の摂取を促進するポリペプチドホルモンである。インシュリンまたはインシュリン様成長因子（IGF）の補足は、グルコースおよびアミノ酸を取込む細胞の能力の最終的枯渇、および細胞表現型の分解の可能性があるので、長期培養では必要である。インシュリンは、動物、例えばウシ、ヒト源または、ヒト組換えインシュリンのような組換え手段によって誘導される。したがって、ヒト・インシュリンは、非ヒト生物学的源に由来しない化学的に定義された成分の資格がある。インシュリン補足は、一連の培養に適切であり、そして広範な濃度で培地に供給される。好ましい濃度範囲は、約 $0.1 \mu\text{g/ml}$ から約 $500 \mu\text{g/ml}$ までの間、さらに好ましくは約 $5 \mu\text{g/ml}$ から約 $400 \mu\text{g/ml}$ 、そして最も好ましくは約 $375 \mu\text{g/ml}$ である。IGF-1またはIGF-2のようなインシュリン様成長因子の補足のための濃度は、培養のために選択された細胞について当業者によって容易に決定される。

【0070】

トランスフェリンは、鉄輸送調節のための培地内にある。鉄は、血清に見られる必須の微量元素である。鉄は、その遊離形態で細胞に毒性でありうるので、血清中では、好ましくは約 0.05 から約 $50 \mu\text{g/ml}$ の間、さらに好ましくは約 $5 \mu\text{g/ml}$ の濃度範囲でトランスフェリンに結合した細胞に供給される。

【0071】

トリヨードチロニン（T3）は、基本的成分であり、そして細胞代謝の速度を維持する培地中に含まれるチロイドホルモンの活性形態である。トリヨードチロニンは、約 0 pM 乃至約 400 pM 、さらに好ましくは約 2 pM から約 200 pM の濃度範囲で、そして最も好ましくは約 20 pM で培地に補足される。

【0072】

リン脂質であるエタノールアミンおよび α -ホスホリルエタノールアミンのいずれかまたは両方を、その機能が、イノシトール経路および脂肪酸代謝での重要な前駆体であるものに添加する。無血清培地では、正常血清にみとめられる脂質を補足する必要がある。エタノールアミンおよび α -ホスホリルエタノールアミンは、約 10^{-6} 乃至約 10^{-2} M までの間の濃度範囲で、さらに好ましくは約 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ で培地に供される。

【0073】

培養期間中に、基本培地に、合成または分化を誘導するか、またはヒドロコルチゾン、セレンウムおよびL-グルタミンのような細胞成長を改善する他の成分をさらに補足する。

【0074】

ヒドロコルチゾンは、ケラチノサイト表現型を促進し、したがって、被膜およびケラチノサイトトランスグルタミナーゼ含有量のような分化した特徴を増強するケラチノサイト培養物中に認められた（Rubinら、J. Cell Physiol.、138巻：208-214頁（1986年））。したがって、ヒドロコルチゾンは、例えば、ケラチノサイトシート状移植片または皮膚構築物の形成においてこれらの特徴が有益である、望ましい添加剤である。ヒドロコルチゾンは、約 $0.01 \mu\text{g/ml}$ 乃至約 $4.0 \mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で、最も好ましくは約 $0.4 \mu\text{g/ml}$ 乃至 $16 \mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で提供される。

10

20

30

40

50

【0075】

セレンウムを、無血清培地に添加して、血清によって正常に供給されるセレンウムの微量元素を再補足する。セレンウムは、約 10^{-9} 乃至約 10^{-7} M までの濃度範囲で、最も好ましくは約 5.3×10^{-8} M で培地に供されうる。

【0076】

アミノ酸 L-グルタミンは、ある種の栄養性塩基に存在する。存在しないか、または十分に存在しない場合には、添加されうる。L-グルタミンは、グルタMAX-I（登録商標）（ジブコ・ビーアールエル、ニューヨーク州グランドアイランド（Gibco BRL, Grand Island, NY））という商標名で市販されるもののような安定な形態で供給されることもある。グルタMAX-I（登録商標）は、L-アラニル-L-グルタミンの安定なジペプチド形態であり、L-グルタミンと互換可能に使用でき、L-グルタミンに対する置換基として当モル濃度で供給される。ジペプチドは、保存中および培地中のL-グルタミンの有効な濃度を不確実にしうるインキュベーション期間の、経時的な劣化に対して安定性を提供する。典型的には、塩基性培地には、好ましくは約 1 mM 乃至約 6 mM、さらに好ましくは約 2 mM 乃至約 5 mM、そして最も好ましくは 4 mM の L-グルタミンまたはグルタMAX-I（登録商標）を補足する。

【0077】

表皮成長因子（EGF）のような成長因子は、細胞規模拡大および播種を通して培養物の確立の助けになる培地にも添加されうる。生来の形態でのEGFまたは組換え形態が使用されうる。ヒト形態、天然、または組換え体のEGFは、非ヒト生物学的成分を含まない皮膚等価物を作製するとき、培地中で使用することが好ましい。EGFは、任意の成分であり、そして約 1 乃至約 15 ng/mL、さらに好ましくは約 5 乃至 10 ng/mL の間の濃度で提供すればよい。

【0078】

上に記述される培地は、一般に、下に規定されるとおり製造される。しかし、本発明の成分が、それらの物理的特性に適合する従来の方法論を用いて作製および組立てられうると解釈されるべきである。入手可能性または経済性の目的で、特定の成分を、適切な類似体または機能的に等価な作用剤に置換し、そして類似の結果を達することが当業者によく知られている。天然に存在する成長因子は、本発明の作業に使用される場合に、類似の質および結果を示す組換えまたは合成成長因子に置換されうる。

【0079】

本発明による培地は、無菌である。無菌成分は、無菌のものを購入するか、または製造後の濾過のような従来的手段によって無菌にする。適切な防腐手段は、以下の実施例を通して使用された。DMEMおよびF-12を、最初に合せ、そしてその後、個々の成分を添加して培地を完成させる。全ての成分の保存溶液は、4℃で保存されうる栄養源を除いて、-20℃で保存できる。全ての保存溶液は、上に列記される500×最終濃度で作製される。インシュリン、トランスフェリンおよびトリヨードチロニン（全てシグマから得た）の保存溶液は、以下のとおり作製される：トリホードチロニンは、2：1の比で1N塩酸（HCl）中の絶対エタノールに最初に溶解される。インシュリンは、希釈HCl（およそ0.1N）で溶解され、そしてトランスフェリンは、水に溶解される。その後、3つは、水で500×濃度まで混合および希釈される。エタノールアミンおよびオーホスホリルエタノールアミンは、水で500×濃度まで溶解され、そして濾過して無菌化する。プロゲステロンを、絶対エタノールに溶解し、そして水で希釈する。ヒドロコルチゾンを、絶対エタノールに溶解し、そしてリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で希釈する。セレンウムを、水で500×濃度まで溶解し、そして濾過して無菌化する。EGFは、無菌を購入し、そしてPBSに溶解させる。アデニンは、溶解するのが困難であるが、当業者に知られる任意の数の方法によって溶解されうる。血清アルブミンは、それらを溶液中で安定化するために、ある種の成分に添加でき、そして現在、ヒトまたは動物源のいずれから誘導される。例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）またはウシ血清アルブミン（BSA）を、長期保存のために、添加して、プロゲステロンおよびEGF保存溶液の活性を維持

しうる。培地は、作製直後に使用するか、または4℃で保存されるかのいずれかでありうる。保存の場合、EGFは、使用の時まで添加されるべきでない。

【0080】

マトリックス産生細胞の培養により細胞-マトリックス層を形成するために、培地に、細胞によるマトリックス合成および沈着を促進する追加の剤を補足する。これらの補足剤は、細胞適合性があり、高純度に限定され、かつ混入物を含まない。細胞-マトリックス層を生成するのに使用される培地は、「マトリックス産生培地」と称される。

【0081】

マトリックス産生培地を作製するために、基本培地に、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸のようなアスコルベート誘導体、またはL-アスコルビン酸ホスフェートマグネシウム塩n-ハイドレートのような、化学的にさらに安定した誘導体の内の1つを補足する。アスコルベートを添加して、沈着コラーゲン分子に対する可溶性前駆体である、プロリンの水酸化およびプロコラーゲンの分泌を促進する。アスコルベートは、I型およびIII型コラーゲン合成のアップレギュレーターと同様に、他の酵素後期翻訳過程のための重要なコファクターであることも示された。

【0082】

理論に束縛されることを望むわけではないが、タンパク質合成に関与したアミノ酸を有する培地を補足することで、細胞にアミノ酸それら自身を生成させる必要のないことにより、細胞エネルギーを保存する。プロリンおよびグリシンの添加は、プロリンの水酸化形態、ヒドロキシプロリンと同様に、それらが、コラーゲンの構造を作る基本的アミノ酸である場合好ましい。

【0083】

必要とされない場合、マトリックス産生培地に、都合により、中性高分子を補足する。本発明の細胞-マトリックス構築物は、中性高分子なしに生成され得るが、しかし、ここでも理論に束縛されることを望むわけではないが、マトリックス産生培地でのその存在は、コラーゲン過程およびサンプルの間にいっそう一定な沈着でありうる。1つの好ましい中性高分子は、マトリックス沈着コラーゲンに対して、培養細胞により産生される可溶性先駆体プロコラーゲンの生体外での過程を促進することが示されたポリエチレングリコール(PEG)である。約1000から約4000MW(分子量)の間、さらに好ましくは約3400から約3700MWの間の範囲内の組織培養グレードのPEGは、本発明の培地に好ましい。好ましいPEG濃度は、約5%w/vまたは未満の濃度で、好ましくは約0.01%w/vから約0.5%w/vまで、さらに好ましくは約0.025%w/vから約0.2%w/vまでの間、最も好ましくは約0.05%w/vでありうる方法で使用するものである。デキストランのような、好ましくはデキストランT-40、またはポリビニルピロリドン(PVP)、好ましくは30,000-40,000MWの範囲内の他の培養グレードの中性高分子も、約5%w/vまたは未満の濃度で、好ましくは約0.01%w/vから約0.5%w/vまで、さらに好ましくは約0.025%w/vから約0.2%w/vまでの間、最も好ましくは約0.05%w/vで使用することもできる。他の細胞培養グレードおよびコラーゲン過程および沈着を増強する細胞適合性剤は、哺乳動物細胞培養の分野の当業者によって確定されうる。

【0084】

細胞産生細胞がコンフルエントとなり、培養培地にマトリックス合成、分泌、または組織化で支援する成分を補足すれば、当該細胞は、それらの細胞を含む組織構築物、およびそれらの細胞によって合成されるマトリックスを形成するよう刺激される。

【0085】

したがって、好ましいマトリックス産生培地作製方法としては、ダルベッコの修飾イーグル培地(DMEM)(高グルコース処方、L-グルタミンなし)および4mMのL-グルタミンまたは等価物、5ng/mlの上皮成長因子、0.4μg/mlのヒドロコルチゾン、 1×10^{-4} Mのo-ホスホリル-エタノールアミン、5μg/mlのインシュリン、5μg/mlのトランスレリン、20pMのトリヨードチロニン、6.78ng/m

1 のセレンウム、 50 ng/ml の L-アスコルビン酸、 $0.2 \mu\text{g/ml}$ の L-プロリン、および $0.1 \mu\text{g}$ / グリシンを添加した Ham の F-12 培地の基本的 3:1 混合物を包含する。産生培地のために、他の薬理学的剤を、培養物に添加して、分泌される細胞外マトリックスの特性、量、または型を変化することができる。これらの剤としては、ポリペプチド成長因子、転写因子、またはコラーゲン転写をアップレギュレートする無機塩が挙げられる。ポリペプチド成長因子の例としては、形質転換成長因子ベータ 1 (TGF- β 1) および組織プラスミノゲンアクチベーター (TPA) が挙げられ、その両方は、コラーゲン合成をアップレギュレートすることが知られている。Raghowら、Journal of Clinical Investigation、79 巻: 1285-1288 頁 (1987 年); Pardesら、Journal

10

of Investigative Dermatology、100 巻: 549 頁 (1993 年)。コラーゲン産生を刺激する無機塩の例は、セリウムである。Shivakumarら、Journal of Molecular and Cellular Cardiology、24 巻: 775-780 頁 (1992 年)。

【0086】

培養は、インキュベーターで維持されて、細胞の培養のために調整された温度、湿度、および気体混合物の十分な環境条件を確保する。好ましい条件は、約 $5 \sim 10 \pm 1\% \text{ CO}_2$ の雰囲気および約 $80 \sim 90\%$ の間の相対湿度 (Rh) で、約 34°C から約 38°C までの間、さらに好ましくは $37 \pm 1^\circ\text{C}$ の温度である。

【0087】

好ましい実施態様において、細胞-マトリックス構築物は、皮膚線維芽細胞およびそれらの分泌マトリックスから形成される皮膚構築物である。好ましくは、ヒト皮膚線維芽細胞が使用され、真皮から得られるか、またはいっそう好ましくは、確立された細胞保存液またはウイルスおよび細菌混入に対してスクリーニングされ、そして純度について試験されたバンクから連続して継代されるか、または二次培養されるものから得られる一次細胞として誘導される。細胞を、成長培地中で十分な条件下で培養して、それらを、細胞-マトリックス構築物を形成する細胞を培養基質に播くのに適切な数まで増殖させる。別法として、凍結細胞保存液から得られる細胞を、培養基質に直接播くこともできる。

20

【0088】

いったん十分な細胞数が得られたら、細胞を回収し、適切な培養表面に播き、そして適切な成長条件下で培養して、コンフルエントな細胞シートを形成する。好ましい実施態様では、細胞を多孔性膜に播く。該多孔性膜は隠されていて、細胞を孔を通して下から、または直接上において培養物に接触させる。好ましくは、細胞を、基本または成長培地のいずれかに懸濁させ、そして細胞培養表面に、約 1×10^5 細胞/ cm^2 から約 6.6×10^5 細胞/ cm^2 までの間、さらに好ましくは約 3×10^5 細胞/ cm^2 から約 6.6×10^5 細胞/ cm^2 までの間、そして最も好ましくは約 6.6×10^5 細胞/ cm^2 (表面の平方センチメートル当たりの細胞) の密度で播く。培養物を、成長培地で培養して、培養物を樹立し、そしてそれらが、培地を、細胞外マトリックスの合成および分泌を上昇調節するために、マトリックス産生培地に交換することによって、化学的に誘導される時に、約 80% から 100% のコンフルエントな状態で培養する。別の代替的方法では、細胞を、産生培地に直接播いて、基本培地から産生培地に交換する必要をなくすが、しかし、それは、高い播種密度を必要とする方法である。

30

40

【0089】

培養中、線維芽細胞は、分泌されたマトリックス分子を組織化して、三次元組織様構造を形成するが、形成する細胞-マトリックス構築物に、培養基質からそれ自身を接触および剥ぎ取りさせる明らかな収縮力を示さない。培地交換は、新たなマトリックス産生培地で 2-3 日毎に行われ、やがて、分泌マトリックスは、厚みを増し、組織化されていく。細胞-マトリックス構築物を作製するのに必要な時間は、当初の播種濃度の能力、細胞型、細胞系列の齢、およびマトリックスを合成および分泌するセルラインの能力に依存する。十分に形成された場合、本発明の構築物は、細胞によって産生および組織化される線維性マトリックスにより塊状厚みを示す; それらは、細胞が、互いにゆるく粘着性でありう

50

る場合、通常のコンプルエントに達していなかったり、または過度にコンフルエントな細胞培養となる。線維の品質は、それらが、医療設定での日常の取扱いで亀裂またはクラッキングのような物理的損傷に耐性があるので、通常の培養と違って、構築物に粘着性組織様特性を付与する。培養真皮構築物の作製で、細胞は、細胞培養表面上でそれら自身の周囲に、膜の表面を越えて、好ましくは少なくとも厚み約30ミクロンまたはそれ以上、さらに好ましくは厚み約60から約120ミクロンの間の組織マトリックスを形成する；しかし、厚みは、120ミクロン超となる。このような厚み増大が必要とされる試験または医療用途に使用するのに適している。

【0090】

いっそう好ましい方法で、上皮細胞層を、1つの表面に、好ましくは細胞マトリックス構築物の上向きに面する表面である頂部に塗布する。細胞マトリックス構築物に、上皮細胞を、その上に播き、そして培養して、多層組織構築物を形成しうる。最も好ましい方法では、皮膚に由来するケラチノサイトは、その細胞構築物上で成長して、皮膚構築物を形成する。他の好ましい実施態様では、角膜ケラチノサイトとも称される角膜上皮細胞を、細胞マトリックス構築物上に播いて、角膜構築物を形成しうる。口腔粘膜から得られる上皮細胞を、細胞マトリックス構築物上で育成して、口腔粘膜の構築物を形成しうる。食道から得られる上皮細胞を、細胞マトリックス構築物上に播いて、食道組織の構築物を形成しうる。尿生殖器管から得られる尿管上皮細胞を、細胞マトリックス構築物上で育成して、尿管上皮の構築物を形成しうる。上皮由来の他の細胞を選択して、それらの細胞が由来する組織の構築物を形成しうる。

【0091】

表皮細胞を皮膚基質に供給する方法、および分化および角質化の誘導を含めたそれらを培養して、分化したケラチノサイト層を形成する方法は、当業で公知であり、Parenteらに対する米国特許出願第5,712,163号、Kempらに対する米国特許出願第5,536,656号に記述されている。その内容を引用によって本明細書に引用する。細胞マトリックス構築物の表皮化を行うために、ケラチノサイトを、細胞マトリックス構築物に播き、そしてその層が、厚み約1から3個の細胞層となるまで、その上で培養する。その後、ケラチノサイトを、誘導して分化し、多層真皮を形成し、その後、角質化を誘導して、角質層を形成する。

【0092】

分化表皮層を形成する方法で、二次培養ケラチノサイトを、細胞保存液から取り出し、そしてそれらの細胞数を増やす。必要数の細胞が得られたら、それらは、培養基質から放出され、懸濁され、計数され、希釈され、そしてその後、細胞マトリックス構築物の頂部表面に、約 4.5×10^3 細胞/cm²から約 5.0×10^5 細胞/cm²までの間、さらに好ましくは約 1.0×10^4 細胞/cm²から約 1.0×10^5 細胞/cm²までの間、そして最も好ましくは約 4.5×10^4 細胞/cm²の密度で、播かれる。その後、構築物を、約60分乃至約90分間、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で、10%CO₂でインキュベートして、ケラチノサイトを付着させる。インキュベーション後、構築物を、表皮化生培地に沈める。十分な長さの培養時間後、ケラチノサイトは増殖し、そして拡大して、細胞マトリックス構築物を越えてコンフルエントの単層を形成する。いったんコンフルエントに達すると、細胞培地剤を、分化培地に交換して、細胞分化を誘導する。多層上皮が形成されたときに、その後、角質化培地を使用し、培養物に空気-液体界面に付与する。ケラチノサイトの分化および角質化について、細胞を、乾燥または低湿度空気-液体界面に曝す。乾燥または低湿度界面は、皮膚の低湿度レベルを複写する試みとして特徴づけうる。やがて、ケラチノサイトは、これらの条件に曝された場合に、生来の皮膚で見られるほとんどまたは全ての角質および他の特徴を表す。

【0093】

上に記述されるとおり、細胞マトリックス構築物の産生のためのシステムは、角膜の構築物の形成に使用できる。角膜の上皮細胞は、種々の哺乳動物ソースに由来しうる。好ましい上皮細胞は、ウサギまたはヒトの角膜上皮細胞（角膜のケラチノサイト）であるが

、任意の哺乳動物角膜ケラチノサイトを使用することができる。眼の強膜または上皮に由来するもののような、他の上皮ケラチノサイトを代用してもよいが、角膜のケラチノサイトが好ましい。角膜の構築物を形成する方法では、培地を培養挿入物（細胞－マトリックス構築物を含む）およびその周囲から除去した。正常なウサギの角膜の上皮細胞を、継代培養を介して拡張し、トリプシン分解して、それらを培養基質から除去し、培養培地に懸濁し、そして約 7.2×10^4 細胞 / cm^2 乃至約 1.4×10^5 細胞 / cm^2 の密度で、膜の頂部に播種する。その後、構築物を、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で、約 4 時間、 $10\% \text{CO}_2$ で、培地なしにインキュベートして、上皮細胞を付着させる。インキュベーション後、構築物を、角膜の維持培地（CMM）（Johnson ら、1992 年）に継代培養する。細胞－マトリックス構築物が、上皮細胞で覆われるまで、上皮細胞を培養する。上皮被覆の完全性は、例えば、硫酸ナイルブルー溶液（リン酸緩衝生理食塩水中で 1 : 10, 000）で培養物を染色するなど、多様な方法によって確認できる。いったん細胞－マトリックス構築物が覆われると、約 7 日後、該構築物を、無菌で、ちょうど構築物の表面までの液体レベルに達するのに十分な角膜維持培地（CMM）を満たした新たな培養トレイに移し、上皮層を沈めることなく、界面の湿潤性を維持する。構築物を、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $10\% \text{CO}_2$ で、 60% を超える湿度で、CMM を用いて、必要に応じて、典型的には週当たり 3 回、培地交換させながら、インキュベートする。

【0094】

角膜構築物の産生に必要な場合、上皮細胞層の角質化なしに分化については、上皮細胞表面を、湿潤な空気－液体界面に曝す。湿潤な空気－液体界面を提供する方法は、Parenteau に対する米国特許出願第 5, 374, 515 号に記述されている。ここで使用される場合、用語「湿潤な界面」は、調節され、その結果構築物の表面が、高湿度であって、乾燥または浸水でない湿潤である培養環境を意味することが意図される。培養環境での湿気および湿度の正確なレベルは、重要でないが、角質化細胞の形成を避けるのに十分に湿潤でそして湿度であるべきである。湿潤な界面は、ヒトの眼の類似の湿気レベルを複写する試みとして特徴づけることができる。

【0095】

別の好ましい実施態様においては、第二のマトリックス産生細胞の播種を、第一の形成細胞－マトリックス構築物で行い、より厚みのある細胞－マトリックス構築物または二層の細胞－マトリックス構築物を得てもよい。第二の播種は、望ましい結果にしたがって、同じ細胞型または細胞株を用いて行うことができるし、または異なる細胞型または細胞株を用いて行うこともできる。第一層の産生に使用された処置およびマトリックス産生培地を用いて、同じ条件下で、第二の播種を行う。異なる細胞型で第二の播種を行った結果、構築物が、患者に移植されるときに、異なるマトリックス成分プロファイルまたはマトリックスパッケージング密度で形成されるマトリックスが創傷治癒に影響を及ぼす。第一の細胞播種は、真皮の網状層、いっそう周密に包装された I 型コラーゲンの層、および構成成分の細胞外マトリックス成分に類似のマトリックスを生じる。第二の細胞播種は、ゆるいコラーゲン原線維および細胞外マトリックスによって特徴づけられる真皮の平行層に類似のマトリックスを生じる。その結果、第二の細胞型は、改善された試験片の生着もしくは試験片の一体化または瘢痕形成の最小化または防止のような創傷治癒に影響する治療物質を産生し得る。

【0096】

別の好ましい実施態様では、使用される少なくとも 1 つの細胞型が、細胞外マトリックスを合成する能力がある場合、2 つまたはそれ以上の細胞型の混合細胞集団は、細胞－マトリックス構築物の形成の間じゅう一緒に培養されうる。第二の細胞型は、他の組織機能を行うか、または組織構築物の特定の構造的特性を発生するのに必要とされるものでありうる。例えば、皮膚構築物の産生では、付属器から得られる皮膚の乳頭細胞または上皮細胞を、マトリックス産生細胞で培養して、上皮付属器またはそれらの成分の形成を可能にしうる。汗腺または皮脂腺構造または成分または毛包構造または成分のような上皮付属器は、マトリックス産生細胞と一緒に培養したときに、形成しうる。上皮細胞は、腺の付属

器構造に由来でき、そして毛髪は、顕微解剖によるように、深部真皮に配置され、そして外分泌細胞、筋上皮細胞、腺の分泌細胞、毛包幹細胞が挙げられる。メラノサイト、ランゲルハンス細胞、およびメルケル細胞のような皮膚を構築する皮膚で見られる他の細胞型も、加えられうる。同様に、血管内皮細胞を、同時培養して、新たな脈管構造形成についての痕跡成分を生じうる。脂肪細胞を、マトリックス産生細胞と培養して、再構築手術のために使用される構築物を形成しうる。この第二の細胞型の送達の代替的態様として、細胞を、これらの構造の局在発生について、形成または完全に形成された細胞－組織マトリックス上で、または内にスポットとして、または細胞の任意の数のスポットの配列として局所に播種しうる。細胞－マトリックス構築物内に細胞を播くために、細胞－マトリックス内に、成長する細胞のために、細胞を、頂部と基底の表面の間に注入して、特定化構造を形成し、それらの特定機能を作用させうる。

10

【0097】

三層組織構築物を作製するために、マトリックス産生細胞型または非マトリックス産生細胞型を含む第一の播種を、細胞－マトリックス構築物または細胞層を作製するのに十分な時間、培養基質に播く。いったん第一の細胞－マトリックス構築物または細胞層が形成されると、マトリックス産生細胞型を含む細胞の第二の播種の細胞を、第一の細胞－マトリックス構築物または細胞層の頂部表面に播き、そして第一の構築物上に第二の細胞－マトリックス構築物を形成するのに十分な条件下で、一回、培養する。第二の細胞－マトリックス構築物上で、第三の播種の細胞を播き、そして第三の層を生じるのに十分な条件下で培養する。例として、第三の層の角膜構築物を生じるために、第一の細胞型の細胞は、角膜内皮細胞のような内皮起源から構成されうる；第二の細胞型は、角膜のケラチノサイトのような接触性組織起源の細胞から構成されうる；そして第三の細胞型は、角膜の表皮細胞のような表皮起源の細胞を包含しうる。皮膚の三層構築物の別の例として、第一の播種の細胞は、脈管構造についての成分を供する血管起源のものであり得て、第二の播種の細胞は、皮膚構築物として役割を果たす細胞－マトリックス構築物を形成する皮膚の線維芽細胞を包含でき、そして第三の播種の細胞は、表皮層を形成する表皮のケラチノサイトでありうる。

20

【0098】

本発明の組織構築物は、透化または凍結保存法が使用される場合、低温で保存されうる。組織構築物の透化のための方法は、米国特許出願第5, 518, 878号に記述され、そして凍結保存の方法は、米国特許出願第5, 689, 961号および第5, 891, 617号に、そして国際PCT出願WO96/24018号に記述され、それらの開示は、引用によって本明細書に援用する。

30

【0099】

本発明の皮膚構築物は、インビトロでの毒素学試験のための組織試験システムで使用できる。試験目的について皮膚構築物を組込む試験システムは、米国特許出願第4, 835, 102号に記述されている。その開示を引用により本明細書に援用する。細胞産生した皮膚構築物が、類似の構造を有し、そしてさらに重要なことには、皮膚に対する類似の組織化を有するので、それは、吸収、毒性および多くの場合には、製品の有効性についての、ヒト生体または動物試験に対する代替または交換として価値ある試験システムとなりうる。マトリックスの産生は、インビボでのマトリックスの修復と同様にマトリックスの産生で示される数種の過程を模倣することが示された。このことから、記載のシステムは、創傷修復および組織発生の分析において、さらに創傷修復の化学的および／または物理的刺激剤の試験および分析においての価値あるツールとなりうる。

40

【0100】

本発明の細胞－マトリックス構築物は、さまざまに応用することができる。それには、限定されないが、損傷した心筋の修復および再生の促進、心臓外科手術（例えば、バイパス術もしくは心臓弁置換術）中における血管新生化および治癒の促進、吻合術部位での血管形成の促進、虚血もしくはその他によって、損傷した平滑筋、心筋、骨格筋、結合組織もしくは脳組織の血管新生化および修復の促進が挙げられる。

50

【0101】

本発明の細胞マトリックス構築物は、心外膜、心筋および心内膜を含めた心臓の種々の位置に接着させ、接着部位における血管新生を促進することができる。接着手段としては、限定されないが、間質組織と心臓組織の間の直接的な接着、生物学的接着剤、合成接着剤、レーザー染料またはヒドロゲルがある。市販されている多くの止血剤および密封剤も用いることができる。

【0102】

直接接着を用いる本発明のある実施態様において、細胞マトリックス構築物は、心臓または近くの血管上に直接配置され、該生成物は、天然の細胞付着を介して接着する。この方法は、糖尿病性の足の潰瘍での損傷治癒の研究において実証されている。

10

【0103】

好ましい実施態様において、細胞マトリックス構築物は、手術用接着剤、好ましくは、生物学的接着剤、例えば、フィブリン接着剤を用いて、心臓や隣接する血管に接着される。手術用接着剤としてフィブリン接着剤を使用することは公知である。フィブリン接着剤組成物は公知であり（例えば、米国特許出願第4,414,971号；第4,627,879号および第5,290,552号参照）、またその由来フィブリンは、自己性であってもよい（例えば、米国特許出願第5,643,192号参照）。接着剤組成物は、1以上の作用物質もしくは薬物を含有するリポソームなどの更なる添加成分を含んでもよい（例えば、米国特許出願第4,359,049号および第5,605,541号）。また、注射によってもよい（例えば、米国特許出願第4,874,368号）し、または噴霧によってもよい（例えば、米国特許出願第5,368,563号および第5,759,171号）。フィブリン接着剤組成物を適用するためのキットも入手可能である（例えば、米国特許出願第5,318,524号）。

20

【0104】

別の実施態様において、心臓および／または血管壁、該細胞マトリックス構築物または双方にレーザー染料を塗布し、適切な波長のレーザーを用いて活性化し、組織を接着させる。

【0105】

別の実施態様において、該細胞マトリックス構築物を、ヒドロゲルを用いて心臓または血管に付着させる。多くの天然および合成ポリマー物資が、十分に公的なヒドロゲル組成物を作製することができる。例えば、ポリサッカライド、例えば、アルギン酸塩を2価のカチオンに架橋結合させてもよい。ポリホスファゼンおよびポリアクリレートはイオンの、または紫外線重合によって、架橋結合させてもよい（米国特許出願第5,709,854号）。または、合成手術用接着剤、例えば、2-オクチルシアノアクリレート（「ダーマボンド（DERMABOND）」、Ethicon, Inc., Somerville, NJ.）を用いて、細胞マトリックス構築物を付着させることができる。

30

【0106】

本発明のある別の実施態様において、該細胞マトリックス構築物は、限定されないが、5-0、6-0および7-0プロリン縫合糸（Ethicon カタログ番号8713H、8714Hおよび8701H）、ポリグレカブロン（poliglecaprone）、ポリジオキサノン（polydioxanone）、ポリグラクチン（polyglactin）、または他の好適な非生物分解性もしくは生物分解性の縫合糸材料を含む1以上の縫合糸を用いて心臓または血管に固定する。縫合には、必ずしも必要ではないが、典型的にダブルアームド針が用いられる。

40

【0107】

細胞マトリックス構築物を移植して、損傷した心筋の血管新生化、修復および再生を促進することもできる。好ましい実施態様において、当該細胞マトリックス構築物は、詰まったもしくは遮断された動脈をバイパスするために血管に適用し、新たな血管を発生させ、心臓への血流を回復させるために用いられるであろう。別の実施態様において、当該細胞マトリックス構築物は、侵襲性を最小限にした処置を用いて心臓に直接適用されるであろう。該組織を用いて血管新生化および血流を促進し、心筋梗塞後の壊死を減らし

50

、および／または心臓組織の再生を促進するために適用することができる。細胞マトリックス構築物を心臓の心外膜または心筋に付着する際、心膜（すなわち、囲心囊）を適用前に開口する必要があるだろう。しかしながら、細胞マトリックス構築物を心内膜に付着することは、カテーテルまたは類似のデバイスを心臓の心室に挿入し、細胞マトリックス構築物を心室壁に付着または接着させることによって、達成することもできる。付着部位は、小血管形成、新血管新生および血管新生を助けるのに合理的な血流を有していることが好ましい。

【0108】

細胞マトリックス構築物の血管由来の活性を用いて、吻合の処置を行うことができる。吻合術は、2つの空洞もしくは筒状構造または外科手術、2以上の別個のスペースもしくはは臓器の間の外傷や疾患によって形成された開口を作用可能に統合することであると定義される（例えば、ステッドマン医学事典第26版（Stedman's Medical Dictionary, 26th Ed, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.）。例えば、吻合部位の冠状動脈バイパス移植（CABG）処置中や、腸管または臓器移植処置中の血管グラフトの導入によって生じる。CABG処置においては、細胞マトリックス構築物を、バイパスグラフトの付着に下流に配置して、その部位の治癒促進に加えて、その部位への血流の回復後血管新生、すなわち、結合部位から生じる追加的動脈の形成を促進することができる。血管の領域の例としては、限定されないが、プレ毛細血管（細動脈間）、リョラン（中間および左痙痛動脈を結合する結腸の辺縁動脈）、門脈体循環（上方－中間／下方直腸静脈、門脈静脈－上方静脈－下方大静脈）、エルミノ（ermino）-末端（動脈から静脈）および大静脈－肺（右肺動脈から上部大静脈への吻合によるチアノーゼ性心疾患の治療）がある。

【0109】

ある実施態様において、当該細胞マトリックス構築物を、吻合部位に巻きつけて当該部位の治癒を促進する（すなわち、内皮化）。

【0110】

上記のように、限定されないが、心臓、脳周辺組織および内臓の臓器を含む組織における虚血性損傷を治療する方法も本発明に包含される。細胞マトリックス構築物移植物を、天然の接着剤、縫合糸または上記以外の他の手段を用いて虚血性の部位に接着させる。当該移植物の細胞マトリックス構築物は、損傷組織の新血管の形成および治癒を促進する。

【0111】

本発明はまた、心臓の開口、例えば、卵円孔開存を閉じるために、閉塞性心臓盲管、例えば、左心房の付属器のために細胞マトリックス構築物を組み込んだオクルダーを特徴とする。該オクルダーは、構造的枠組みおよび少なくとも1つのオクルージョンシェルを含む。ある実施態様において、細胞マトリックス構築物をオクルダーの構造的枠組みに接着させて、少なくとも1つのオクルージョンシェルをその全体に形成する。別の実施態様において、予備的に存在するオクルージョンシェルをまずオクルダーの構造的枠組みに結合させ（例えば、縫い付ける、積層させる、または接着させる）、その後その上に細胞マトリックス構築物を接着させる。

【0112】

図6は、心臓100の切り欠き図である。心臓100は、右心房108と左心房112を分ける隔膜104を含む。隔膜104は、1次中隔116と2次中隔120を有している。本発明のオクルダーによって直される例示の心臓の開口部、卵円孔開存124は、1次中隔116と2次中隔120の間に位置する。卵円孔開存124は、右心房108と左心房112の間に望ましくない液体流通をもたらす、特定の条件下では、右心房108から左心房112への血液を分流させることができる。卵円孔開存124が閉じていない場合、または何らかの状態で阻止された場合、患者は塞栓性の卒中のリスクが高くなる。

【0113】

図7は、別の心臓160の部分断面図である。心臓160は、大動脈164、左心室1

68、左心房172および卵円窩176を含む。心臓160はまた、本発明のオクルダーによって消されることになる例示の盲管、左心房の付属器180をも含む。特定の条件下では、左心房の付属器180に血塊が生じることがある。左心房の付属器180が閉じていない場合、または何らかの状態で阻止された場合、患者は、血塊が心臓160を通過し、脳に至り、卒中または一過性の虚血性発作を引き起こすリスクの高い状態に置かれる。

【0114】

図8は、経皮、経腔的に心臓の開口部を閉じるために用いられ得る、本発明の実施態様によるオクルダー200を示す。オクルダー200は、全体的な支持構造物204および、全体的な支持構造物204に結合した少なくとも1つのオクルージョンシェル208を含む。例えば、オクルダー200は、全体的な支持構造物204に結合した2つのオクルージョンシェル208を含む。近位のオクルージョンシェル212（すなわち、医師がオクルダー200を患者に移植する際、医師に最も近いオクルージョンシェル）およびその反対の遠位のオクルージョンシェル216である。以下に述べるように、少なくとも1つのオクルージョンシェル208に、細胞マトリックス構築物を塗布する。または別法として、それ自身を細胞マトリックス構築物で作製する。

10

【0115】

ある実施態様において、全体的な支持構造物204は、近位のオクルージョンシェル212を結合して、支持するための近位の支持構造物220、および遠位のオクルージョンシェル216を結合して、支持するための遠位の支持構造物224を含む。近位の支持構造物220も遠位の支持構造物224も外側に延びる任意の数のアームを含み、それぞれのオクルージョンシェル212、216を支持することができる。ある実施態様においては、図8に示すように、当該近位の支持構造物220は、外側に延びる4つの近位のアーム228を持ち、同様に、遠位の支持構造物224は、外側に延びる4つの遠位のアーム232を有している。

20

【0116】

ある実施態様において、外側に延びるのアームのそれぞれは、中心点240から放射状に延びる3以上の弾性コイル236を持つため、弾性的にバイアスしている。別法として、他の弾性的な支持構造物を用いることもできる。ある実施態様において、近位の支持構造物220および遠位の支持構造物224は、ワイヤ244によって機械的に固定されている。別法として、他の手段、例えば、レーザー溶接を用いて、近位の支持構造物220を遠位の支持構造物224に固定させてもよい。

30

【0117】

図9は、図8に示したオクルダー200の断面を示す図である。4つのアーム228、232が示されている。

【0118】

図10および11は、本発明の実施態様にかかるオクルダー200'を示す図である。近位の支持構造物220'を含む、近位のオクルージョンシェル212'を支持するための、全体的な支持構造物204'を含み、遠位の支持構造物224'を含む、遠位のオクルージョンシェル216'を支持するための、全体的な支持構造物204'を含んでおり、クリップとして形成されている。

40

【0119】

図12は、本発明の実施態様にかかるオクルダー200''を示す図である。ここでも、全体的な支持構造物204''は、クリップを形成しており、近位のオクルージョンシェル212''を支持するための近位の支持構造物220''および遠位のオクルージョンシェル216''を支持するための、遠位の支持構造物224''を含んでいる。

【0120】

図13および14は、本発明の実施態様さらに別のオクルダー200'''を示す図である。示されているように、全体的な支持構造物204'''は、オクルージョンシェル208'''を結合し、支持するための中心付着メカニズム248および複数の脚部252を含む。該脚部252は、中心付着メカニズム248に結合することができ、図13に示す半

50

球状の外側表面、または図 1 4 に示す半球状の外側表面を実質的に画定している。オクルージョンシェル 2 0 8 ' " は、脚部 2 5 2 に結合することができ、図 1 3 に示すように、半球状の外側表面のほぼ全体を実質的に覆うことができ、図 1 4 に示すように、半球状の外側表面のほぼ全体を覆うことができる。または、それらを部分的に覆うことができる。

【0 1 2 1】

図 3 乃至 7 に示されたオクルダー 2 0 0、2 0 0 '、および 2 0 0 " は、種々の実施態様をとり、例えば、卵円孔開存、心房の隔壁の欠陥、または心室隔壁の欠陥などの心臓の開口部を閉じるのに特に有用である。図 1 3 乃至 1 4 に示されたオクルダー 2 0 0 ' " は、種々の実施態様をとり、心臓の閉塞性盲管、例えば、左心房の付属器に特に有用である。

10

【0 1 2 2】

当業者には容易に理解されるように、全体的な支持構造物 2 0 4 は、あらゆる形状または構成をもつことができるとされ、上記の実施態様に限定されない。

【0 1 2 3】

ある実施態様において、全体的な支持構造物 2 0 4 は、例えば、ステンレススチール、ニッケルチタン合金（例えば、Nitinol、Nitinol Devices and Components of Freemont, Calif. 社製）、またはニッケルコバルトクロムモリブデン合金（例えば、MP35N.RTM.、SPS Technologies, Inc. of Jenkintown, Pa.）などの金属で作製される。該金属は、患者の体内で分解可能である。別法として、該金属は、腐食耐性を有していてもよい。他のいくつかの実施態様において、全体的な支持構造物 2 0 4 は、例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリジオキサン、ポリエチレングリコール、およびポリカプラクトンなどの、生溶解性または生分解性ポリマーで作製される。さらに、全体的な支持構造物 2 0 4 は、柔軟性および弾性を有することができる。したがって、それは、以下において説明するように、患者の体内の吻合部位に送達するための鞘中で崩壊し、そこに配置された後、心臓の開口部を閉じることができる。

20

【0 1 2 4】

本発明によれば、好ましい実施態様において、少なくとも 1 つのオクルージョンシェル 2 0 8 は、その全体もしくは部分的に細胞マトリックス構築物、例えば、皮膚に由来するものなどの線維芽細胞を含む細胞マトリックス構築物で作製され、培養皮膚構築物を形成され、その際、ケラチノサイトの層が培養され、表皮層が形成され、その結果、二重層の培養皮膚構築物が形成される。本発明の培養皮膚構築物は、天然の皮膚がもつ、多くの物理的、形態学的、および生化学的特徴を有している。さらに別の好ましい実施態様において、細胞マトリックス構築物は、ヒト由来の細胞を含む、培養において化学的に定義されない成分を用いない、画定された系に形成される皮膚の層、ヒト皮膚構築物に類似した組織構築物である。最も好ましい実施態様において、本発明の細胞マトリックス構築物は、ヒト由来であるが化学的に定義されない成分もしくは非ヒト生物成分を含む化学的に定義された系中で作製される。いくつかの実施態様において、当該細胞マトリックス構築物は、抗血栓物質、例えば、ヘパリンと組み合わせられている。

30

【0 1 2 5】

別法として、別の実施態様において、予備的に存在するオクルージョンシェル 2 0 8 に細胞マトリックス構築物を塗布する。1 つのそのような実施態様においては、予備的に存在するオクルージョンシェル 2 0 8 をまずオクルダー 2 0 0 の全体的な支持構造物 2 0 4 に付着させ、その後、その上に細胞マトリックスを付着させることによって強化する。別法として、予備的に存在するオクルージョンシェル 2 0 8 は、例えば、フックもしくは熱溶融によって、全体的な支持構造物 2 0 4 に積層または接着または付着される。ある実施態様において、例えば、予備的に存在するオクルージョンシェル 2 0 8 は、全体的な支持構造物 2 0 4 が全体として予備的に存在するオクルージョンシェル 2 0 8 内にカプセル化されるように、全体的な支持構造物 2 0 4 に積層することができる。予備的に存在するオクルージョンシェル 2 0 8 は、合成材料、例えば、ポリエステル繊維（例えば、ポリ

40

50

エステル織物もしくは編物繊維)、ポリビニルスポンジ (例えば、Ivalon(登録商標)、Uni

point Industries, Inc. High Point, N.C.)、拡大されたポリテトラフルオロエチレン (e P T F E)、または金属メッシュなどで作製してもよい。その代りに、予備的に存在するオクルージョンシェルを用いて、生分解性もしくは生物改造製の物質、例えば、ポリ乳酸、ポリガラクトン、およびそれによって生分解性縫合糸が作られる他の物質から形成してもよい。

【0126】

ある実施態様において、上記のように全体が細胞マトリックス構築物で形成されているか、または細胞マトリックス構築物によって強化されているオクルージョンシェル208は、非多孔性であり、オクルダー200の移植によって溜まった液体を通過させない。または、別の実施態様において、オクルージョンシェル208は、多孔性であり、組織がオクルージョンシェル208内への成長を促進し、それによって、心臓の開口部を閉塞する。ある実施態様において、当該細胞マトリックスを成長促進剤 (例えば、生理学的反応化学物質) と組み合わせる。別法として、別の実施態様において、当該細胞マトリックス自身が成長を促進する。別の実施態様において、成長促進剤は、成長因子もしくはサイトカインである。例えば、血管内皮の成長因子、塩基性フィブロ (basic fibro) 成長因子もしくは血管由来の成長因子、または成長因子およびサイトカインの組み合わせである。さらに別の実施態様において、成長促進剤は、組織の成長を促進するための薬理学的物質、例えば、細胞マトリックス構築物または遺伝子を同種または異種の細胞である。さらに別の実施態様において、ヘパリンをオクルージョンシェル208および/または細胞マトリックス構築物上にイオン結合もしくは共有結合させるか、またはオクルージョンシェルおよび、オクルージョンシェル208の全体もしくは一部を形成するための細胞マトリックス構築物の双方に塗布するか、細胞マトリックス構築物の両方に塗布して、非血栓形成性を付与する。別法として、タンパク質または細胞をオクルージョンシェル208および/または細胞マトリックス構築物に適用して、非血栓形成性を付与し、および/または治癒プロセスを促進する。

【0127】

図14A乃至14Eは、本発明の実施態様にかかる、心臓の開口部400、例えば、卵円孔開存、心房性の隔壁の欠陥、心室性の隔壁の欠陥などを閉じるために、オクルダー200を患者の体内の吻合部位に経皮的に送達するための段階を示す図である。図14Aについて、シース404をまず心臓の開口部400に、当業者によって通常行われているように挿入する。次いで、オクルダー200を、シース404のルーメン408に置き、ルーメン408中を進め、シース404の遠位端412に位置づける。図14Bにおいて、オクルダー200の遠位のオクルージョンシェル216を、シース404の遠位端412から遠位の心内腔416内に開放する。遠位のオクルージョンシェル216は、自動的かつ弾性的に開放する。次いで、図14に示すように、シース404を近位の心内腔420へ引き戻し、遠位のオクルージョンシェル216を心臓の開口部400の遠位壁面424に固定する。それによって心臓の開口部400は、遠位側から吻合される。図14Dに示すように、近位のオクルージョンシェル212がシース404の遠位端412から解放されるのに十分な距離でシース404をさらに引き出す。近位のオクルージョンシェル212は自動的かつ弾性的に、心臓の開口部400の近位面428におかれ、心臓の開口部400を近位から吻合する。次いで、開口したオクルダー200を置いたままシース404を患者の体から引き出す。図14Eに示すように、オクルージョンシェル212、216を心臓の開口部400のいずれかの端部に位置づける。またオクルダー200は、永久に患者の体内に移植される。

【0128】

別の実施態様において、例えば、左心房の付属器が発作の治療として、閉塞を必要とする場合、オクルダーを左心房の付属器に送達するための段階 (例えば、オクルダー200'を図13および14を用いて説明している) は、すぐ上で上記した段階ごとに異なる。具体的には、図14Aに関するステージを行うのは医師である。すなわち、医師は、ま

ず、通常当業者が行うように、シース４０４を左心房の付属器のルーメンに挿入する。次いで、オクルダー２００'を位置に配置し、腐敗した位置において、シース４０４のルーメン４０８に配置する。次いで、ルーメン４０８中でオクルダー２００'をシース４０４の遠位端まで進める。左心房の付属器の吻合構造は、卵円孔開存、心房性の隔壁の欠陥、心室性の隔壁のそれとは異なるため、次に、操作者は簡単にオクルダー２００'を左心房の付属器に置く。そのように配置して、オクルダー２００'は、自動的かつ弾性的に広がり、永久に左心房の付属器を閉じる。

【０１２９】

本発明の皮膚構築物の最も好ましい使用の１つは、哺乳動物の対象に対してグラフト術および移植術を行い、傷害および疾患のある皮膚を回復もしくは修復することである。皮膚構築物のグラフト術の適応症としては、限定されないが、形成もしくは再構築的外科手術、皮膚創傷、火傷、乾癬、静脈性および糖尿病性潰瘍、および基底細胞癌がある。本発明の皮膚構築物は、傷害組織の保護および、次の体内組織における内部成長のためのスカフォードとしての機能の両方において有用である。本発明において作製された組織の組織化のレベルは、創傷修復を容易にし、また、それが行われる速度を高めるものと考えられる。

【０１３０】

本発明の細胞マトリックス構築物は、粘着性を示す。ここで使用される場合、「粘着性」は、物理的単位完全性および組織様処理特性を維持できることを意味する。本発明の構築物に粘着特性を主に付与する物理的特性は、嵩高さおよび線維マトリックス構造である。線維性細胞外マトリックスは、細胞合成コラーゲンおよび他のマトリックス成分、主に、原線維および原線維束で配列される原線維コラーゲン細胞から形成され、構築物に嵩を付与している。本発明の細胞マトリックス構築物は、取扱い可能であり、すなわち、それらは、担体支持体または特殊なツールなしに、それらの培養基質から手で剥ぎ取られ、そして患者または試験装置に適用される。構造または機能に対する決定因子なしに、診療所での、通常の操作から裂傷または伸縮のような損傷に耐えられる。患者に塗布されたとき、それらは、縫合またはステープルによってその場所に確保されうる。

【０１３１】

本発明の皮膚構築物を患者に移植するために、移植領域は、標準的なプラクティスによって調製される。熱傷適応症については、移植されるべき熱傷した創傷部位は、移植片を供給され、その結果熱傷の皮膚領域が完全に切除される。切除された床は、透明で、そして移植の前に臨床的に未感染であるように見える。手術の切除による深部の部分に厚みのある創傷について、予備操作性領域を剃り、必要な場合には、抗微生物剤、無菌の皮膚洗浄剤で洗浄し、そして正常な生理食塩水で洗浄する。局所麻酔は、通常、リドカインまたはエピネフリンまたはその両方の皮膚内投与によって行う。いったん麻酔がかかると、ダーマトームを使用して、皮膚を適切な深さまで除去し、深部の部分的厚みの創傷を作る。リドカインを含むエピネフリンを用いて圧縮することにより、そして電気焼灼法により止血を達成できる。その後、皮膚構築物を、創傷床に使用し、そして必要ならば、その場所に縫合またはステープルによって固定し、その後適切な包帯で支え、そして包帯を当てる。

【０１３２】

本発明の皮膚構築物は、患者に移植する前に、網状化してもよい。網状構造は、創傷に対する皮膚構築物の形態を改善し、そして移植片の直ぐ下から創傷滲出物を排出させる手段を提供する。用語「網状化」は、それにより組織が、スリットで打ち抜かれて、ネット状配列を形成する機械的方法であると定義される。網状化は、好ましくは、従来の皮膚メッシャー（ZIMMER（登録商標）；BIOPLASTY（登録商標）の使用によって得られる。手で刻み目をつけるか、またはメスまたは針で組織を打ち抜くこともできた。網状化された皮膚は、皮膚を伸縮することによって拡張され、その結果スリットが開き、そしてその後、創傷床に使用されうる。拡張網状構造組織は、最大限の達成範囲で創傷領域を提供する。代替的には、網状化皮膚は、簡単に、非拡張スリットの配列を有するシ

ートとして拡張なしに使用されうる。網状化皮膚構築物は、単独で使用してもよいし、または体の別の領域から得られる患者自身の皮膚とともに使用してもよい。組織構築物は、穿孔もしくは窓を有してもよく、他の手段によって孔を設けてもよい。窓は、レーザー、パンチ、ステープル、針またはピンを用いて手動で実施しうる。

【0133】

本発明の皮膚構築物は、手術の創傷または熱傷の領域以外の創傷に使用してもよい。静脈腫瘍、糖尿病腫瘍、臥位腫瘍のような他の創傷は、開示の皮膚構築物を適用することによって、治癒の恩恵を受けることになる。表皮水疱症のような他の先天性皮膚疾病も同様に有益でありうる。

【0134】

以下の実施例は、本発明の実施をよりよく説明するために提供するものであり、決して本発明の範囲を制限するように解釈してはならない。当業者は、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の方法に対して様々な変更を施し得ると理解されよう。

実施例

【0135】

実施例1：ヒト新生児包皮線維芽細胞によるコラーゲンマトリックスの形成

ヒト新生児包皮線維芽細胞 (Organogenesis, Inc. Canton, MAより入手) は、 1.62×10^5 個の細胞を接種し培養液で培養した。成長培地の組成は、10% 新生子牛血清 (NBCS) (HyClone Laboratories, Inc., Logan, Utah) および 4 mM L-グルタミン (BioWhittaker, Walkersville, MD) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (高グルコース濃度、L-グルタミン無添加、BioWhittaker, Walkersville, MD) である。細胞は $10 \pm 1\%$ CO₂ 雰囲気中で $37 \pm 1^\circ\text{C}$ でインキュベーターで培養した。培地は2～3日ごとに新鮮なものと交換した。培養8日後に、細胞がコンフルエント状態、すなわち組織培養用フラスコの底面いっぱいの単層になった時に、培地をフラスコから吸引した。単層細胞を洗浄するために、無菌濾過したリン酸緩衝液生理食塩水をフラスコの底に添加してその後吸引した。トリプシン-バーゼングルタミン (BioWhittaker, Walkersville, MD) を各フラスコに 5 mL 添加し、単層細胞に完全に行き渡るようにゆっくりと回転させることで、フラスコから細胞を遊離させた。培養物をインキュベーターに戻した。細胞が遊離すると同時に、トリプシン-バーゼンの作用を停止するために、SBTI (大豆トリプシンインヒビター) 5 mL を各フラスコに添加し、細胞懸濁液と混合した。細胞懸濁液をフラスコから取り出し、無菌の円錐遠心管に等分した。細胞を約 $800 \sim 1000 \times g$ で5分間遠心して集めた。

【0136】

細胞は、新鮮な培地に 3.0×10^6 細胞/mL の濃度になるように再懸濁し、6穴トレーの 0.4 ミクロンポアサイズの 24 mm 径組織培養用インサート (TRANSWELL (登録商標)、Corning Costar) に 3.0×10^6 細胞/インサート (6.6×10^5 細胞/ cm^2) の濃度で播いた。細胞は、 $10 \pm 1\%$ の CO₂ 中で $37 \pm 1^\circ\text{C}$ のインキュベーター内に静置して、培地は2～3日ごとに新鮮なものと交換し21日間培養した。産生培地の組成は、DMEM および Ham の F-12 培地 (Quality Biologies Gaithersburg, MD) の 3:1 混合物、4 mM Glutamax-1 (登録商標) (Gibco BRL, Grand Island, NY) および最終濃度が以下の添加物を含む; 5 ng/mL のヒト組換え表皮成長因子 (Upstate Biotechnology Lake Placid, NY)、2% 新生子牛血清 (Hyclone, Logan, Utah)、 $0.4 \mu\text{g/mL}$ のヒドロコチゾン (Sigma St. Louis, MO)、 1×10^{-4} M のエタノールアミン (Fluka, Ronkonkoma, NY ACSグレード)、 1×10^{-4} M のオ-フォスフォルエタノールアミン (Sigma, St. Louis, MO)、 $5 \mu\text{g/mL}$ のインスリン (Sigma, St. Louis, MO)、 $5 \mu\text{g/mL}$ のトランスフェリン (Sigma, St. Louis, MO)、20 pM のトリヨードサイロニン (Sigma, St. Louis, MO)、 6.78 ng/mL のセレン (Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, WI)、 50 ng/mL の

10

20

30

40

50

L-アスコルビン酸 (WAKO

Chemicals USA, Inc. # 0 1 3 - 1 2 0 6 1)、0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の L-プロリン (Sigma, St. Louis, MO)、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の グリシン (Sigma, St. Louis, MO)、および 0.05% の ポリエチレングリコール (PEG) 3400-3700 MW (細胞培養グレード) (Sigma, St. Louis, MO)。

【0137】

組織学的分析を行うためのサンプルは、培養の7、14および21日目に採取し、ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋した。ホルマリン固定したサンプルはパラフィンで包埋して、5 μm 切片をヘマトキシリン-エオシン (H&E) を用いて、当業で公知の方法にしたがって染色した。H&E染色スライドを用いて、10mm/100 μm 格子のついた10x接眼レンズを用いて任意に選んだ10カ所の顕微鏡視野での厚さを測定した。

10

【0138】

ヒト皮膚線維芽細胞の2つの異なる細胞株での結果を表1に示した。この表は、細胞-マトリックス構築物の厚さが発達していることを示している。

【0139】

【表1】

表1：厚み (ミクロン)				
	0日目	7日目	14日目	21日目
B 1 1 9 平均 (n=3)	0	30.33±2.61	63.33±4.40	84.00±4.67
B 1 5 6 平均 (n=4)	0	42.00±5.14	63.85±4.50	76.25±8.84

20

【0140】

サンプルは、培養7、14および21日目に、コラーゲン濃度の分析も行った。コラーゲン含量は、既知の方法 (Woessner、1961) でのヒドロキシプロリンを比色定量する方法を用いて算出した。同じ時点において細胞数も測定した。前述の処置を用いて、2つの異なる細胞種 (B 1 5 6 および B 1 1 9) から得た細胞-マトリックス構築物からの、コラーゲン含量を表2に、細胞データを表3に示している。

30

【0141】

【表2】

表2：コラーゲン ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)				
	0日目	7日目	14日目	21日目
B 1 1 9 平均 (n=3)	0	93.69±22.73	241.66±21.08	396.30±29.38
B 1 5 6 平均 (n=4)	0	107.14±17.16	301.93±23.91	457.51±25.00

40

【0142】

【表 3】

表 3：細胞（細胞／c m ² ）				
	0 日目	7 日目	14 日目	21 日目
B 1 1 9 平均 (n = 3)	6.6×10 ⁵	11.8±4.4×10 ⁵	11.4±1.7×10 ⁵	13.9±1.2×10 ⁵
B 1 5 6 平均 (n = 4)	6.6×10 ⁵	13.1±0.5×10 ⁵	14.0±2.1×10 ⁵	17.1±1.7×10 ⁵

10

【0 1 4 3】

培養 7、14 および 21 日目でのヒト細胞由来皮膚マトリックスのサンプルを遅延還元 SDS-PAGE で解析して、サンプル中のタイプ I およびタイプ I I I コラーゲンアルファバンドに現れるコラーゲン組成を測定した。

【0 1 4 4】

皮膚マトリックスの生化学的特性について組織化学的手法を用いて検討した。フィブロネクチンの同定はパラフィン固定した切片についてザイムドヒストスタインストレパビジン-ビオチンシステム (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA) を用いて行った。テナシンの有無は、抗テナシン一次抗体染色 (Dako, Carpinteria, CA) を用い、その後、二次抗体としての抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗体 (Calbiochem) を用いて確認した。サンプルは、ジアミノベンジン (Sigma St. Louis, MO) を適用し、核ファーストレッド (Nuclear Fast red) で対比染色することにより可視化した。

20

【0 1 4 5】

グリコサミノグリカン (GAG) 定量は、以前に報告された方法 (Farndale, 1986) を用いて 21 日目のサンプルについて行った。結果は、接種後 21 日目でのヒト細胞由来皮膚マトリックスサンプル中には 1 c m² あたり 0.44 g の GAG が存在した。

【0 1 4 6】

実施例 2：十分な厚みの皮膚構築物

実施例 1 で示した方法で作成した皮膚構築物を用いて、正常ヒト新生児包皮表皮角質細胞 (Organogenesis, Inc. Canton, MA より入手) を細胞-マトリックス構築物上に播き、皮膚構築物の表皮層を形成した。

30

【0 1 4 7】

培地を無菌的に培養インサートおよびその周辺から除去した。正常ヒト表皮ケラチノサイトを、凍結副次培養細胞ストックからコンフルエント状態までに 4 経代培養して増大させた。次に細胞を、トリプシン-バーゼンを用いてフラスコ底面から遊離させ、プールし、遠心分離して細胞をペレット化し、表皮化培地中に再懸濁させ、カウントし、 4.5×10^4 細胞／c m² の密度で膜の上に播いた。該構築物を $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $10 \pm 1\%$ の CO₂ 中で 90 分間インキュベートし、ケラチノサイトを付着させた。インキュベーション後、構築物を表皮化培地に浸した。表皮化培地の組成は、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (高グルコース濃度、L-グルタミン無添加 (BioWhittaker, Walkersville, MD) および Ham の F-12 培地 (Quality Biologies Gaithersburg, MD) の 3:1 混合物で、 $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヒドロコチゾン (Sigma St. Louis, MO)、 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ のエタノールアミン (Fluka, Ronkonkoma, NY)、 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ の O-フォスフォルエタノールアミン (Sigma St. Louis, MO)、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のインスリン (Sigma St. Louis, MO)、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のトランスフェリン (Sigma St. Louis, MO)、 20 pM のトリヨードサイロニン (Sigma St. Louis, MO)、 $6.78 \text{ ng}/\text{ml}$ のセレン (Aldrich)、 $24.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアデニン

40

50

(Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI)、4 mMのL-グルタミン (BioWhittaker, Walkersville, MD)、0.3%のキレート化新生子牛血清 (HyClone Laboratories, Inc., Logan, Utah)、0.628 ng/mlのプロゲステロン (Amersham Arlington Heights, IL)、50 µg/mlのL-アスコルビン酸ナトリウム塩 (Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, WI)、10 ng/mlの表皮成長因子 (Life Technology Inc., MD)、および50 µg/mlの硫酸ゲンタマイシン (Amersham Arlington Heights, IL)を上記混合物に添加している。構築物は表皮化培地中で、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、10% CO_2 中で2日間培養した。

10

【0148】

2日後、構築物を以下の組成の培地に浸した；ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (高グルコース濃度、L-グルタミン無添加 (BioWhittaker, Walkersville, MD) およびHamのF-12培地 (Quality Biologics Gaithersburg, MD) の3:1混合物で、0.4 µg/ml ハイドロコチゾン (Sigma St. Louis, MO)、 1×10^{-4} Mのエタノールアミン (Fluka, Ronkonkoma, NY)、 1×10^{-4} MのO-フォスホリルエタノールアミン (Sigma St. Louis, MO)、5 µg/mlのインスリン (Sigma St. Louis, MO)、5 µg/mlのトランスフェリン (Sigma St. Louis, MO)、20 µMのトリヨードサイロニン (Sigma St. Louis, MO)、6.78 ng/mlのセレン (Aldrich)、24.4 µg/mlのアデニン (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI)、4 mMのL-グルタミン (BioWhittaker, Walkersville, MD)、0.3%のキレート化新生子牛血清 (HyClone Laboratories, Inc., Logan, Utah)、0.628 ng/mlのプロゲステロン (Amersham Arlington Heights, IL)、50 µg/mlのL-アスコルビン酸ナトリウム塩 (Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, WI)、265 µg/mlの塩化カルシウム (Mallinckrodt, Chesterfield, MO)、および50 µg/mlの硫酸ゲンタマイシン (Amersham Arlington Heights, IL)を上記混合物に添加している。該構築物は、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、10% CO_2 中で2日間培養した。

20

30

【0149】

2日後、構築物を含有するキャリヤを無菌的に十分な量 (9 mL) の角化培地を入れた新しい培養トレーに移し、キャリヤ膜の表面と一致する水面にとし、上皮層の層化をさせるために乾燥インターフェースを維持した。該構築物は、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、10% CO_2 中、および低湿度中でインキュベートし、培地を2~3日毎に交換しながら7日間培養した。この培地の組成は、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (高グルコース濃度、L-グルタミン無添加 (BioWhittaker, Walkersville, MD) およびHamのF-12培地 (Quality Biologics Gaithersburg, MD) の1:1混合物で、0.4 µg/ml ハイドロコチゾン (Sigma St. Louis, MO)、 1×10^{-4} Mのエタノールアミン (Fluka, Ronkonkoma, NY)、 1×10^{-4} MのO-フォスホリルエタノールアミン (Sigma St. Louis, MO)、5 µg/mlのインスリン (Sigma St. Louis, MO)、5 µg/mlのトランスフェリン (Sigma St. Louis, MO)、20 µMのトリヨードサイロニン (Sigma St. Louis, MO)、6.78 ng/mlのセレン (Aldrich)、24.4 µg/mlのアデニン (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI)、4 mMのL-グルタミン (BioWhittaker, Walkersville, MD)、2%の新生子牛血清 (BioWhittaker, Walkersville, MD)、50 µg/mlのL-アスコルビン酸ナトリウム塩 (Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, WI)、およびおよそ50 µg/mlの硫酸ゲンタマイシン (Amersham Arlington Heights, IL)を上記混合物に添加している。7日後に構築物は、培地を2~

40

50

3日毎に交換しながら、維持培地で更に10日間培養した。この維持培地の組成は；ダルベッコ改変イーグル培地（DME M）（高グルコース濃度、L-グルタミン無添加（BioWhittaker、Walkersville、MD）およびHamのF-12培地（Quality Biologics Gaithersburg、MD）の3：1混合物で、 $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヒドロコチゾン（Sigma St. Louis, MO）、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ のエタノールアミン（Fluka, Ronkonkoma, NY）、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ のO-フォスフォルルエタノールアミン（Sigma St. Louis, MO）、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のインスリン（Sigma St. Louis, MO）、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のトランスフェリン（Sigma St. Louis, MO）、 $20 \mu\text{M}$ のトリヨードサイロニン（Sigma St. Louis, MO）、 $6.78 \text{ng}/\text{ml}$ のセレン（Aldrich）、 $24.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアデニン（Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI）、 4mM のL-グルタミン（BioWhittaker、Walkersville, MD）、1%の新生子牛血清（BioWhittaker、Walkersville, MD）、および $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の硫酸ゲンタマイシン（Amersham Arlington Heights, IL）を上記混合物に添加している。

10

【0150】

最終サンプルを実施例1で述べたように、ヘマトキシリン(原語：hemotoxylin)およびエオシン染色にかけ光学顕微鏡下で肉眼的観察を行った。得られた構築物は、実施例1に記載の特徴を持つマトリックスで囲まれた線維芽細胞からなる下部（真皮）層で形成されており、多層化し、よく分化したケラチノサイトにより完全に覆われていた。このケラチノサイトは、生体内皮膚と同様に、基底層、上基底層、顆粒層、および角質層を示した。皮膚構築物は、透過型電子顕微鏡（TEM）で明らかにされるように皮膚-表皮接合部によく発達した基底膜が存在していた。TEMで観察すると、基底膜はヘミデスモゾーム周辺で最も厚く、タイプVIIコラーゲンからなる固定繊維の特徴が示されていた。予測通りこれらの固定繊維は、基底膜から容易に刺激されるようでかつコラーゲン繊維を束ねているように見える。基底膜糖蛋白であるラミニンの存在を以前に報告されたアビジン-ビオチン免疫酵素法（Guesdon、1979）を用いて確認した。

20

【0151】

実施例3：化学的限定培地中でのヒト新生児包皮線維芽細胞によるコラーゲンマトリックスのインビトロ形成

実施例1に記載の処置によってヒト新生児包皮線維芽細胞を増殖させた。細胞を 3.0×10^6 細胞/ ml 濃度になるように再懸濁し、6穴トレイの 0.4micron ポアサイズの 24mm 直径組織培養用インサートに 3.0×10^6 細胞/TW（ 6.6×10^5 細胞/ cm^2 ）の濃度で播いた。該細胞は、この後新生子牛血清を除いた培地で実施例1と全く同様に培養した。より具体的には、培地の組成は、DME MおよびHamのF-12培地（Quality Biologics Gaithersburg、MD）の3：1基本混合物、 4mM のGlutamax-1 TM（Gibco BRL、Grand Island、NY）および以下の添加物を含む； $5 \text{ng}/\text{ml}$ のヒト組み換え表皮成長因子（Upstate Biotechnology、Lake Placid、NY）、 $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヒドロコチゾン（Sigma St. Louis, MO）、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ のエタノールアミン（Fluka, Ronkonkoma, NY）、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ のO-フォスフォルルエタノールアミン（Sigma St. Louis, MO）、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のインスリン（Sigma St. Louis, MO）、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のトランスフェリン（Sigma St. Louis, MO）、 $20 \mu\text{M}$ のトリヨードサイロニン（Sigma St. Louis, MO）、 $6.78 \text{ng}/\text{ml}$ のセレン（Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, WI）、 $50 \text{ng}/\text{ml}$ L-アスコルビン酸（WAKO Chemicals USA, Inc. #013-12061）、 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ のL-プロリン（Sigma St. Louis, MO）、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のグリシン（Sigma St. Louis, MO）、および0.05%のポリエチレングリコール（PEG）（Sigma St. Louis, MO）。サンプルは、前述の方法を用いて、培養7、14および21日目にコラーゲン濃度および細胞数を確認した。結果を、表4（細胞数）および表5（コラーゲン）にまとめた。サンプルは、ホルマリ

30

40

50

ンで固定し、実施例 1 に記載した処置を用いて、ヘマトキシリンおよびエオシンで光学顕微鏡用の染色をした。組織学的な評価で、構築物は限定培地で 2 % 新生子牛血清存在下と同様に成長することが証明された。

【 0 1 5 2 】

【表 4】

表 4 : コラーゲン ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)				
	0 日目	7 日目	14 日目	21 日目
各構築物中の平均コラーゲン量 (n = 3)	0	107.63 ± 21.96	329.85 ± 27.63	465.83 ± 49.46

10

【 0 1 5 3 】

【表 5】

表 5 : 細胞 (細胞/ cm^2)				
	0 日目	7 日目	14 日目	21 日目
各構築物中の平均細胞数 (n = 3)	6.6×10^5	$7.8 \pm 2.2 \times 10^5$	$9.6 \pm 2.5 \times 10^5$	$1.19 \pm 2.1 \times 10^5$

20

【 0 1 5 4 】

また、細胞－マトリックス構築物中には内因性に産生される線維性コラーゲン、デコリン、およびグリコサミノグリカンが存在した。

【 0 1 5 5 】

実施例 4 : 化学的限定培地を用いて形成される皮膚構造の全体の厚み

実施例 3 で示した方法に類似した化学的に限定した条件下で、ヒト皮膚線維芽細胞により形成された 25 日目の皮膚構築物を用いて、正常ヒト新生児包皮表皮角質細胞を細胞－マトリックス構築物の表面上に播き、皮膚構築物の表皮層を形成した。

30

【 0 1 5 6 】

培地を無菌的に培養インサートおよびその周辺から除去した。正常ヒト表皮ケラチノサイトを、凍結副次培養細胞ストックからコンフルエント状態までに 4 経代培養して増大させた。次に細胞を、トリプシン－バーゼンを用いてフラスコ底面から遊離させ、プールし、遠心分離して細胞ペレット化し、表皮化培地中に再懸濁させ、カウントして 4.5×10^4 細胞/ cm^2 の密度で膜の上に播いた。該構築物を $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $10 \pm 1\%$ の CO_2 中で 90 分間インキュベートし、ケラチノサイトを付着させた。インキュベーション後、構築物を表皮化培地に浸した。表皮化培地の組成は、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (グルコースとカルシウムを含まない) (BioWhittaker, Walkersville, MD) および Ham の F-12 培地 (Quality Biologies Gaithersburg, MD) の 3 : 1 基本混合物で、 $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヒドロコチゾン (Sigma St. Louis, MO)、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ のエタノールアミン (Fluka, Ronkonkoma, NY)、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ のオ－フォスフォルエタノールアミン (Sigma St. Louis, MO)、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のインスリン (Sigma St. Louis, MO)、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のトランスフェリン (Sigma St. Louis, MO)、 $20 \mu\text{M}$ のトリヨードサイロニン (Sigma St. Louis, MO)、 $6.78 \text{ ng}/\text{ml}$ のセレン (Aldrich)、 $24.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアデニン (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI)、 4 mM の L－グルタミン (BioWhittaker, Walkersville, MD)、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の L－アスコルビン酸ナトリウム塩 (Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, WI)、 $16 \mu\text{M}$ のリノール酸 (Sigma, St. Louis, M

40

50

0)、 $1\text{ }\mu\text{m}$ の酢酸トコフェロール(Sigma, St. Louis, MO)、および $50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の硫酸ゲンタマイシン(Amersham Arlington Heights, IL)を上記混合物に添加している。構築物は表皮化培地中で、 $37\pm 1^\circ\text{C}$ 、 $10\%\text{CO}_2$ 中で2日間培養した。

【0157】

2日後、培地を上述の組成の新鮮なものに交換し、 $37\pm 1^\circ\text{C}$ 、 $10\pm 1\%\text{CO}_2$ 中、インキュベーターで2日間培養した。2日後、構築物を含有するキャリヤを無菌的に十分な量の培地を入れた新しい培養トレーに移し、キャリヤ膜の表面と一致する水面になり、空気-液体境界のところで構築物が発達するのを維持することが出来るようにした。形成される表皮層の表面に接触する空気は上皮細胞層の層化を促す。構築物は $37\pm 1^\circ\text{C}$ 、 $10\%\text{CO}_2$ 中で、低湿度で、培地を2~3日毎に交換しながら7日間培養した。この培地の組成は；ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(グルコースおよびカルシウムを含有しない(BioWhittaker, Walkersville, MD)およびHamのF-12培地(Quality Biologics Gaithersburg, MD)の1:1混合物で、 $0.4\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒドロコチゾン(Sigma St. Louis, MO)、 $1\times 10^{-4}\text{ M}$ のエタノールアミン(Fluka, Ronkonkoma, NY)、 $1\times 10^{-4}\text{ M}$ のオ-フォスフォルエタノールアミン(Sigma St. Louis, MO)、 $5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のインスリン(Sigma St. Louis, MO)、 $5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のトランスフェリン(Sigma St. Louis, MO)、 $20\text{ }\mu\text{M}$ のトリヨードサイロニン(Sigma St. Louis, MO)、 $6.78\text{ ng}/\text{ml}$ のセレン(Aldrich)、 $24.4\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のアデニン(Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI)、 4 mM のL-グルタミン(BioWhittaker, Walkersville, MD)、 $2.65\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の塩化カルシウム(Mallinckrodt, Chesterfield, MO)、 $16\text{ }\mu\text{M}$ のリノール酸(Sigma St. Louis, MO)、 $1\text{ }\mu\text{M}$ の酢酸トコフェロール(Sigma St. Louis, MO)、 1.25 mM のセリン(Sigma St. Louis, MO)、 0.64 mM の塩化コリン(Sigma St. Louis, MO)、および $50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の硫酸ゲンタマイシン(Amersham Arlington Heights, IL)である。培地を2~3日毎に交換しながら14日間培養した。

【0158】

サンプルは、3通りで、構築物を空気-液体境界に引き上げた後、10、12、および14日目に採取し、実施例1で述べたようにヘマトキシリン(原語: hemotoxylin)およびエオシン染色にかけ光学顕微鏡下で肉眼的に観察した。得られた構築物は、実施例3で述べた性質を持つマトリックスで囲まれた線維芽細胞からなる下部(真皮)層を形成され、多層化され、分化したケラチノサイトの層により覆われた。

【0159】

実施例5：ヒトアキレス腱線維芽細胞によるコラーゲンマトリックスのインビトロ形成

実施例1で述べたのと同じ方法を用いて、ヒト新生児包皮線維芽細胞をヒトアキレス腱線維芽細胞(HATF)に代えて細胞-マトリックスを形成させた。産生培地で21日間培養した後に、実施例1で述べた操作を用いてサンプルをH&E染色および厚さの測定に呈した。得られた構築物は、厚さ $75.00\pm 27.58\text{ }\mu\text{m}$ ($n=2$)の細胞-マトリックス組織様構造として観察された。また、この構築物中には内因性に産生される線維性コラーゲン、デコリン、およびグリコサミノグリカンも存在していた。

【0160】

実施例6：トランスフェクトしたヒト新生児包皮線維芽細胞によるコラーゲンマトリックスのインビトロ形成

トランスフェクトしたヒト皮膚線維芽細胞を以下の処置で産生させた。1バイアルのjCRIP-43血小板由来成長因子(PDGF)ウイルス産生細胞(Morgan, J, et al)を溶解し、該細胞を 2×10^6 細胞/ 162 cm^2 フラスコ(Corning Costar, Cambridge, MA)の密度で播いた。これらのフラスコには成長培地を入れ、 $10\pm 1\%\text{CO}_2$ 中で $37\pm 1^\circ\text{C}$ でインキュベーターに静置した。成長培地の組成は、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(高グルコース濃度、L-グルタミン無添加、BioWhittaker, Walkersv

ille、MD)で、10%の新生子牛血清(HyClone Laboratories、Inc.、Logan、Utah)、および4mMのL-グルタミン(BioWhittaker、Walkersville、MD)が添加されていた。同じ日に1バイアルのヒト新生児包皮線維芽細胞(HDFB156)も溶解し、 1.5×10^6 細胞/ 162 cm^2 フラスコ(Corning Costar、Cambridge、MA)の密度で播いた。3日後にjCRIP PDGF-43ウイルス産生細胞に新鮮な成長培地を与えた。HDFB156は上述の成長培地プラス $8\text{ }\mu\text{g/ml}$ のポリブレン(Sigma St. Louis、MO)で培養した。次の日にHDFB156細胞を以下のように感染させた。jCRIP PDGF-43ウイルス産生細胞からの培養液を集めて0.45ミクロンのフィルターで濾過した。 $8\text{ }\mu\text{g/ml}$ のポリブレンをこの濾過した培養液に添加した。それから培養液をHDFの上に置いた。次の2日間、HDFは新鮮な成長培地で培養した。HDFが5代から6代の経代をした日に 2.5×10^6 細胞/ 162 cm^2 フラスコ(Corning Costar、Cambridge、MA)の密度で播いた。細胞は以下のように経代培養し培養液は吸引した。フラスコをリン酸緩衝液生理食塩水で洗浄し残存する新生子牛血清を除いた。トリプシン-パーゼンを各フラスコに5ml添加し、単層細胞に完全に行き渡るようにゆっくりと回転させることで、フラスコから細胞を遊離させた。培養物をインキュベーターに戻した。細胞が遊離すると同時に、トリプシン-パーゼンの作用を停止するために、SBTI(大豆トリプシンインヒビター)5mlを各フラスコに添加し細胞懸濁液と混合した。細胞/トリプシン/SBTI懸濁液をフラスコから取り出し、無菌の円錐遠心管に等分した。細胞を約 $800-1000 \times g$ で5分間遠心して集めた。該細胞は、接種用のために成長培地に上記の濃度になるように再懸濁した。2日後に細胞に新鮮な培地を与えた。翌日上記のように細胞を集め、10%の新生子牛血清(NBCS)と10%のジメチルスルフォキシド(DMSO)(Sigma St. Louis、MO)を含む成長培地で 1.5×10^6 細胞/mlに希釈した。細胞は1ml/凍結バイアルに入れて -80°C で保存した。

【0161】

本実施例のコラーゲンマトリックス形成には、ヒト新生児包皮線維芽細胞の代わりに、上記のように高レベルの血小板由来成長因子(PDGF)を産生するように形質転換したヒト新生児包皮線維芽細胞を用いた以外は実施例1および3で述べたのと同じ処置を用いて行った。接種後18日目に、上記のようにサンプルをH&E染色に呈した。また、サンプルは実施例10に挙げたファイブロネクチンの有無を確認するためにアビジン-ビオチン法を用いて染色した。実施例1で述べたように、接種後18日目にサンプルをH&E染色に呈し、実施例1で得られたものと同様な、厚さ $123.6\text{ }\mu\text{m}$ ($N=1$)の細胞-マトリックスグロスが観察された。トランスフェクトされた細胞から細胞-マトリックス構築物中に排出されるPDGF量は、培養中を通じて(18日間)ELISAで測定して 100 ng/mL であった。一方、対照ではPDGFの排出は検出できなかった。

【0162】

実施例7：移植物質としての皮膚構造の使用

実施例1の方法に従って、新生児包皮に由来するヒト真皮線維芽細胞を用いて細胞-マトリックス構築物を形成し、無胸腺ヌードマウスに作成した全切開創に移植した。マウスは、Parenteauら(1996)の方法に従って移植した。その方法の開示をここに示す。移植は、14、28、および56日目に、切開口の接着、切開創の縮小、移植損失部分、および血管新生化(色)で観察した。移植領域は、マウスに完全に残っている間に写真を撮った。各時点で多くのマウスを屠殺して、移植部分およびその周辺部を、マウス皮膚の周辺縁に沿って少なくとも皮下脂肪肉部まで切開した。移植体とマウス皮膚との接合部は各サンプルで保存された。体外移植組織サンプルはリン酸緩衝液10%ホルマリンおよびメタノールで固定した。ホルマリン固定したサンプルを、実施例1で述べた操作に従ってH&E染色に呈した。移植体は、顕著な縮小もなくマウスの皮膚に取り込まれた。移植の14日以内にマウスの表皮は移植体を覆った。H&E染色サンプルでは、14日目の移植体には血管が明らかに認められた。そして実験全体を通じて認められた。肉眼的に観察およびH&E染色により、移植体は実験期間中を通して健全である(生存している細胞を含み、マトリックスの顕著な異常が見られない、等)であることがわかった。

【0163】

実施例8：皮膚移植としての皮膚構造全厚さの使用

実施例2の方法に従って、真皮層の新生児包皮に由来するヒト真皮線維芽細胞および別の表皮層の新生児包皮に由来するヒトケラチノサイトを用いて、2層皮膚構築物を作製した。この皮膚構築物は、膜から手で剥がし、キャリヤサポート無しで操作し、移植部位に置くことができた。本2層皮膚構築物を、Parenteauら(1966)の方法に従って無胸腺ヌードマウスに作製した全切開創に移植した。その方法の開示をここに示す。サンプル採取の時点は、移植後7、14、28、56、および184日目とした。移植領域はマウスに完全に残っている間に写真を撮った。各時点で多くのマウスを屠殺して、移植部分およびその周辺部を、マウス皮膚の周辺縁に沿って少なくとも皮下脂肪肉部まで切開した。移植物とマウス皮膚との接合部は各サンプルで保存した。体外移植組織サンプルはリン酸緩衝液10%ホルマリンおよびメタノールで固定した。ホルマリン固定したサンプルを、実施例1で述べた操作に従ってH&E染色に呈した。

10

【0164】

移植物は7日以内にマウスの皮膚に取り込まれたのが組織学的観察と同様に肉眼的観察でも確かめられた。H&E染色により、移植後7日目以内に対象組織から移植物へ血管が伸びているのが認められた。移植物は、顕著な縮小もなく実験期間中を通して健全であった。抗ヒトインボルクリン染色を用いて、ヒト表皮細胞が全移植期間中存在していることが認められた。

【0165】

20

実施例9：ヒト角膜の角膜実質細胞によるマトリックスのインビトロ作製

ヒト角膜の角質実質細胞(Organogenesis, Inc. Canton, MAより入手)を角膜の基質構造の形成に用いた。コンフルエントになったヒト角質実質細胞をトリプシンパーゼンを用いて培養基質から遊離させた。細胞が遊離した時、大豆トリプシンインヒビターを用いてトリプシンパーゼンの作用を中和し、細胞懸濁液を遠心分離し、上清を捨て、細胞を新鮮な培地に $3.0 \times 10^6 / \text{ml}$ の濃度になるように塩基性培地に再懸濁した。細胞を、6穴トレイの $0.4 \mu\text{m}$ ポアサイズの24mm直径組織培養用トランスウェルに 3×10^6 細胞/TW(6.6×10^5 細胞/ cm^2)の濃度で播いた。これらの培養物は接種培地で一晚放置した。接種培地の組成は；ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)およびHamのF-12培地(Quality Biologics Gaithersburg, MD)の3:1基礎混合物、4mM Glutamax(Gibco BRL, Grand Island, NY)および以下の添加物を含む；5ng/mlのヒト組み換え表皮成長因子(EGF)(Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)、 $0.4 \mu\text{g} / \text{ml}$ のヒドロコチゾン(Sigma St. Louis, MO)、 1×10^{-4} Mのエタノールアミン(Fluka, Ronkonkoma, NY ACSグレード)、 1×10^{-4} Mのオーフォスフォルルエタノールアミン(Sigma, St. Louis, MO)、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ のインスリン(Sigma, St. Louis, MO)、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ のトランスフェリン(Sigma, St. Louis, MO)、20pMのトリヨードサイロニン(Sigma, St. Louis, MO)、6.78ng/mlセレン(Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, WI)である。続いてこの培養物に新鮮な産生培地を与えた。産生培地の組成は；DMEM、およびHam-12培地(Quality Biologics Gaithersburg, MD)の3:1基礎混合物、4mM Glutamax(Gibco BRL, Grand Island, NY)および以下の添加物を含む；5ng/mlのヒト組換え表皮成長因子(Upstate Biotechnology Lake Placid, NY)、2%新生子牛血清(Hyclone, Logan, Utah)、 $0.4 \mu\text{g} / \text{ml}$ のヒドロコチゾン(Sigma St. Louis, MO)、 1×10^{-4} Mのエタノールアミン(Fluka, Ronkonkoma, NY ACSグレード)、 1×10^{-4} Mのオーフォスフォルルエタノールアミン(Sigma, St. Louis, MO)、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ のインスリン(Sigma, St. Louis, MO)、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ のトランスフェリン(Sigma, St. Louis, MO)、20pMのトリヨードサイロニン(Sigma, St. Louis, MO)、6.78ng/mlのセレン(Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, W

30

40

50

I)、50 ng/ml の L-アスコルビン酸 (WAKO Chemicals)、0.2 µg/ml の L-プロリン (Sigma, St. Louis, MO)、0.1 µg/ml の グリシン (Sigma, St. Louis, MO)、および 0.05% の ポリエチレングリコール (PEG) 3400-3700 MW (細胞培養グレード) (Sigma, St. Louis, MO) である。

【0166】

該細胞を、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $10 \pm 1\%$ CO_2 中で培養し、2～3日毎に新鮮な培地に交換して20日間 (合計21日間) 培養した。培養21日目に角質実質細胞を、実施例1に示した方法で測定して、厚さ約40ミクロンのマトリックス層を形成した。また、細胞-マトリックス構築物中には内因性に産生される線維性コラーゲン、デコリン、およびグリコサミノグリカンが存在した。

10

【0167】

実施例10：産生培地中でのヒト新生児包皮線維芽細胞によるコラーゲンマトリックスのインビトロ作製

ヒト新生児包皮線維芽細胞 (Organogenesis, Inc. Canton, MAより入手) を、6穴トレイの24mm直径組織培養用キャリヤ (TRANSWELL (登録商標)、Costar Corp., Cambridge, MA) に 1×10^5 細胞/0.4 µl 0.4ミクロンポアサイズの濃度で播き、成長培地で培養した。該成長培地の組成は、10%の新生子牛血清 (HyClone Laboratories, Inc., Logan, Utah) および4mMのL-グルタミン (BioWhittaker, Walkersville, MD) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (高グルコース濃度、L-グルタミン無添加、BioWhittaker, Walkersville, MD) である。細胞は $10 \pm 1\%$ CO_2 雰囲気中で $37 \pm 1^\circ\text{C}$ のインキュベーターに維持した。該培地は、2～3日毎に新鮮なものと交換し、21日間培養した。該産生培地の組成は、DMEMおよびHamのF-12培地 (Quality Biologics Gaithersburg, MD) の3:1基礎混合物、4mM Glutamax (Gibco BRL, Grand Island, NY) および以下の添加物を含む; 5 ng/ml のヒト組み換え表皮成長因子 (Upstate Biotechnology, Lake

20

Placid, NY)、2%の新生子牛血清 (HyClone Laboratories, Inc., Logan, Utah)、0.4 µg/ml のヒドロコチゾン (Sigma

St. Louis, MO)、 1×10^{-4} Mのエタノールアミン (Fluka, Ronkonkoma, NY ACSグレード)、 1×10^{-4} Mのオ-フォスフォルエタノールアミン (Sigma, St. Louis, MO)、5 µg/ml のインスリン (Sigma, St. Louis, MO)、5 µg/ml のトランスフェリン (Sigma, St. Louis, MO)、20 µMのトリヨードサイロニン (Sigma, St. Louis, MO)、6.78 ng/ml のセレン (Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, WI)、50 ng/ml の L-アスコルビン酸 (WAKO Chemicals)、0.2 µg/ml の L-プロリン (Sigma St. Louis, MO)、0.1 µg/ml の グリシン (Sigma St. Louis, MO)、および 0.05% の ポリエチレングリコール (PEG) (細胞培養グレード) (Sigma St. Louis, MO)。

30

【0168】

サンプルは、培養21日目に回収し、ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋した。ホルマリン固定したサンプルをパラフィンで包埋して、5 µm切片をヘマトキシリン-エオシン (H&E) で既知の方法に従って染色した。H&E染色スライドを用いて、10 mm/100 µm焦点鏡 (Olympus America Inc., Melville, NY) のついた10x接眼レンズ (Olympus America Inc., Melville, NY) を用いて任意に選んだ10カ所の顕微鏡視野で測定した。この方法を用いて作成した構造は実施例1で作成したものと構造や生化学的組成が類似しており、 82.00 ± 7.64 ミクロンの厚さがあった。

40

【0169】

実施例11：ブタ真皮線維芽細胞によるコラーゲンマトリックスのインビトロ作製

ブタ真皮線維芽細胞 (Organogenesis, Inc. Canton, MAより入手) を 5×10^5 細胞/162 cm² 組織培養用フラスコ (Corning Costar, Cambridge, MA、カタログ番号31

50

50) の密度で播き、以下のように成長培地中で成長させた。該成長培地の組成は、10%の新生子牛血清 (HyClone Laboratories, Inc., Logan, Utah) および 4 mM の L-グルタミン (BioWhittaker, Walkersville, MD) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (高グルコース濃度、L-グルタミン無添加、BioWhittaker, Walkersville, MD) である。細胞は $10 \pm 1\%$ CO₂ 中で $37 \pm 1^\circ\text{C}$ のインキュベーター中に維持した。該培地は、2~3日毎に新鮮なものと交換した。コンフルエントになったら、すなわち、細胞を組織培養用フラスコの底部に細胞が充填されて形成されたら、フラスコから培地を吸引した。単層細胞を洗浄するために、無菌濾過したリン酸緩衝液生理食塩水を単層細胞に添加してその後フラスコから吸引した。トリプシン-バーゼングルタミン (BioWhittaker, Walkersville, MD) を各フラスコに 5 ml 添加し、単層細胞に完全に行き渡るようにゆっくりと回転させることで、フラスコから細胞を遊離させた。培養物はインキュベーターに戻した。細胞が遊離すると同時に、トリプシン-バーゼンの作用を停止するために、SBTT (大豆トリプシンインヒビター) 5 ml を各フラスコに添加し細胞懸濁液と混合した。細胞懸濁液をフラスコから除去し、無菌の円錐遠心管に等分した。細胞を $800 - 1000 \times g$ で5分間遠心して集めた。細胞を再懸濁し、 $3.0 \times 10^6 / \text{ml}$ の濃度になるように希釈し、6穴トレイの 0.4 ミクロンポアサイズの 24 mm 直径 transwell に 3.0×10^6 細胞/TW (6.6×10^5 細胞/ cm^2) の濃度で播いた。細胞は接種培地の中で一晩放置した。接種培地の組成は; DMEM および Ham の F-12 培地 (Quality Biologics Gaithersburg, MD) の 3:1 基礎混合物、4 mM Glutamax (Gibco BRL, Grand Island, NY) および以下の添加物を含む; 5 ng/ml のヒト組み換え表皮成長因子 (EGF) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)、0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒドロコチゾン (Sigma St. Louis, MO)、 1×10^{-4} M のエタノールアミン (Fluka, Ronkonkoma, NY ACSグレード)、 1×10^{-4} M のオ-フォスフォルエタノールアミン (Sigma, St. Louis, MO)、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のインスリン (Sigma, St. Louis, MO)、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のトランスフェリン (Sigma, St. Louis, MO)、20 μM のトリヨードサイロニン (Sigma, St. Louis, MO)、6.78 ng/ml のセレン (Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, WI)、50 ng/ml のL-アスコルビン酸 (Wako Pure Chemicals)、0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のL-プロリン (Sigma, St. Louis, MO)、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のグリシン (Sigma, St. Louis, MO) である。該細胞を、 $10 \pm 1\%$ のCO₂ 中で $37 \pm 1^\circ\text{C}$ のインキュベーター内に静置して、培地を2~3日ごとに新鮮なものと交換しながら7日間培養した。該産生培地の組成は、DMEM および Ham の F-12 培地 (Quality Biologics Gaithersburg, MD) の 3:1 基礎混合物、4 mM Glutamax (Gibco BRL, Grand Island, NY) および以下の添加物を含む; 5 ng/ml ヒト組み換え表皮成長因子 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)、2% 新生子牛血清 (HyClone Laboratories, Inc., Logan, Utah)、0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒドロコチゾン (Sigma St. Louis, MO)、 1×10^{-4} M のエタノールアミン (Fluka, Ronkonkoma, NY ACSグレード)、 1×10^{-4} M のオ-フォスフォルエタノールアミン (Sigma, St. Louis, MO)、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のインスリン (Sigma, St. Louis, MO)、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のトランスフェリン (Sigma, St. Louis, MO)、20 μM のトリヨードサイロニン (Sigma, St. Louis, MO)、6.78 ng/ml のセレン (Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, WI)、50 ng/ml のL-アスコルビン酸 (Wako Chemicals)、0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のL-プロリン (Sigma St. Louis, MO)、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のグリシン (Sigma St. Louis, MO)、および 0.05% のポリエチレングリコール (PEG) (細胞培養グレード) (Sigma St. Louis, MO) である。7日後に産生培地を、新生子牛血清を含まないものに代えた。この培地は、2~3日毎に新鮮なものと交換し更に20日間、計28日間培養した。

【0170】

サンプルは、培養 21 日目に回収し、ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋した。ホルマリン固定したサンプルをパラフィンで包埋して、5 μm 切片をヘマトキシリン-エオシン (H & E) で既知の方法に従って染色した。H & E 染色スライドを用いて、10 mm / 100 μm 焦点鏡 (Olympus America Inc., Melville, NY) のついた 10x 接眼レンズ (Olympus America Inc., Melville, NY) を用いて任意に選んだ 10 カ所の顕微鏡視野で測定した。該サンプルは、細胞とマトリックスから成る構造を有し、厚さが 71.20 ± 9.57 ミクロンであった。また、細胞-マトリックス構築物中には内因性に産生される線維性コラーゲン、デコリン、およびグリコサミノグリカンが存在した。

【0171】

実施例 12：真皮乳頭細胞を含む 2 層皮膚構造のインビトロ作製

10

一次マトリックス産生細胞タイプとして正常ヒト新生児包皮線維芽細胞を用いて、実施例 1 で示した方法に従って細胞-マトリックス構築物を作製した。この細胞-マトリックスを二次産生細胞としての真皮乳頭細胞に局所的に播いた。これを次に三次産生細胞としてのケラチノサイトに播き、細胞-マトリックスおよび真皮乳頭細胞の上を覆う持続的な表皮層を形成した。

【0172】

最初に新生児包皮に由来するヒト真皮線維芽細胞 (HDF) を用いて細胞-マトリックス構築物を形成した。HDF は、成長培地中に 5×10^5 細胞 / 162 cm^2 組織培養用フラスコ (Costar Corp., Cambridge, MA) の密度で播いた。該成長培地の組成は、10 % の新生子牛血清 (NBCS) (HyClone Laboratories, Inc., Logan, Utah) および 4 mM の L-グルタミン (BioWhittaker, Walkersville, MD) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (高グルコース濃度、L-グルタミン無添加、BioWhittaker, Walkersville, MD) である。コンフルエントになったら HDF をトリプシン-バーゼンを用いてフラスコから遊離させ、新鮮な培地に 3.0×10^6 / ml の濃度になるように再懸濁し、6 穴トレイの 0.4 ミクロンポアサイズの、24 mm 直径組織培養用インサート (TRANSWELL (登録商標)、Corning Corstar) に 3×10^6 細胞 / インサート (6.6×10^5 細胞 / cm^2) の濃度で播いた。HDF 培養物は、 10 ± 1 % の CO₂ 中で 37 ± 1 °C のインキュベーター中に維持した。実施例 1 で示した方法に従って、新鮮な産生培地を 2 ~ 3 日毎に与えて 23 日間培養した。

20

【0173】

30

細胞-マトリックス構築物が形成されたら、二次産生細胞として真皮乳頭に接種した。真皮乳頭細胞は、毛髪胞の毛髪根に囲まれている特殊な線維芽細胞に個別分布として存在しており、毛髪育成の支持的な役割を果たしている。真皮乳頭は、以前に報告された Messenger, A.G. の方法 (ヒト毛髪胞からの真皮乳頭細胞の培養 (The Culture of Dermal Papilla Cells from Human Hair Follicles). Br. J. Dermatol. 110: 685-9

(1984) を用いて毛髪法の微小切開により単離できてインビトロで培養できる。この方法をここに引用する。真皮乳頭細胞はコンフルエントになったら凝集し、フラスコ上では代わって新たな凝集を作る。真皮乳頭を 4 週令のブタでの皮膚バイオプシーにより単離した。真皮乳頭からの細胞 (PDP) は、20 % NBCS を含む DMEM で 8 代まで経代培養した。培養 3 週間後、PDP 細胞は真皮乳頭様構造を呈し、あるいは凝集し、各々の直径は約 90 - 210 ミクロンであった。その後フラスコから激しくピペッティングをすることで凝集物を培養フラスコから採り、ヒトコラーゲンマトリックス上に 200 凝集物 / cm^2 の濃度で播いた。凝集物は、20 % NBCS を含む DMEM で更に 15 日間、新鮮な培地を 2 ~ 3 日毎に与えて培養した。

40

【0174】

真皮乳頭細胞を含む細胞-マトリックス構築物は、そこで直ちにケラチノサイトに播き、培養して細胞-マトリックスおよび真皮乳頭細胞の上を覆う持続的な表皮層を形成した。2 つの異なる構築物を形成した：1 つはヒトケラチノサイトとのものであり、他はブタケラチノサイトとのものである。初代培養を確立するために正常な表皮ケラチノサイトを

50

体外移植を用いてヒト新生児包皮（H E P）およびブタ角質実質細胞（P E P）から単離した。これらの細胞を培養して、ブタ細胞で経代3まで、ヒト細胞で経代4まで増殖させた。約培養5－6日後に、細胞を、トリプシン－バーゼンを用いてフラスコ底面から遊離させ、プールし、遠心分離して細胞ペレット化し、表皮化培地中に再懸濁させ、カウントして、H E P細胞で 4.5×10^4 細胞/cm²、P E P細胞で 1.6×10^5 細胞/cm²の密度で膜の上に接種した。表皮化した培養物は実施例2で述べたように12日間培養した。

【0175】

最終サンプルを光学顕微鏡でのヘマトキシリン－エオシン染色に呈した。得られた皮膚構造は皮膚に類似した基礎形態学的組織を示した。一つは真皮層で内因性に産生されたマトリックスにより取り囲まれた線維芽細胞から成っている。このマトリックスは内因性に産生される線維性コラーゲン、デコリン、およびグリコサミノグリカンを含んでいる。真皮層は真皮乳頭細胞の場所に局在している。他の一つは細胞－マトリックスおよび真皮乳頭を横切る層化したケラチノサイト層である。ヒトあるいはブタケラチノサイトに覆われた両方の組織構築物において、真皮乳頭は覆っているケラチノサイトの小さな波形を惹起する構造を維持していた。真皮乳頭細胞の付近に分化した表皮細胞が存在した。

【0176】

実施例13：サンドイッチE L I S A法によるヒアルロン酸の測定

実施例1および3の方法に従って、それぞれ、血清含有培地および化学的限定培地中で、真皮線維芽細胞により形成された細胞－マトリックス構築物中のヒアルロン酸（H A）を測定した。

【0177】

細胞－マトリックス構築物を、多孔性膜（T R A N S W E L L（登録商標）、Corning Corstar）を組み込んだ75 mm径の円形キャリヤ上に形成した。細胞－マトリックス構築物からの抽出物は、細胞－マトリックス構築物を入れた試験管に10 mLの酢酸アンモニウム緩衝液および0.5 mg/mLのプロテナーゼKを添加することで調製した。混合物を60℃で一晩インキュベートした。消化が完全に終わったら、該混合物を遠心分離し、上清をヒアルロン酸アッセイ用の別個の試験管に入れた。96穴プレートを、50 µlの0.1 MのNaHCO₃に溶かした20 µg/mLのH A結合タンパク質でコーティングし、4℃で一晩保存した。該プレートを、0.05%のTwee n 20を含有する0.85%の食塩水で3回洗浄した。その後各ウェルに250 µlのブロッキング液（3% B S Aおよび0.9%塩化ナトリウムを含有する10 mmolリン酸緩衝液、pH 7.4、P B S + 3% B S A）を添加し、プレートを室温で2時間インキュベートした。その後、プレートを、0.05% Twee n 20を含有する0.85% NaC lで3回洗浄した。該プレートに、50 µlの標準H A溶液および両方の実験条件で（これらの条件の種々の希釈を含む）の抽出サンプルを添加した。該プレートを、室温（約20℃）で2時間インキュベートした。その後、該プレートを、0.05% Twee n 20を含有する0.85% NaC lで3回洗浄して、各ウェルに50 µlのビオチン化H A（1：2000希釈）を添加し、室温で2時間インキュベートした。その後、該プレートを、0.05% Twee n 20を含有する0.85% NaC lで3回洗浄し、各ウェルを50 µlのH R P－アビジンD（1：3000希釈）を添加した。次いで該プレートを室温で45分間インキュベートし、その後該プレートを、0.05% Twee n 20を含有する0.85% NaC lで3回洗浄して、各ウェルに100 µlのオルソーフェニレンジアミン基質溶液を添加し、37℃で10分間インキュベートした。1 M塩酸を50 µl添加して反応を止めた。最終的にプレートリーダーを用いて492 nmの吸光度を読み記録した。

【0178】

吸光度の測定は、平均を取り質量測定値に変換した。血清含有培地で作製した円形の細胞－マトリックス構築物（直径75 mm）は、それぞれ約200 µgのヒアルロン酸を含有し、化学的限定培地で形成されたものにはそれぞれ約1.5 mgのヒアルロン酸が含有されていた。

【0179】

実施例14：産生された細胞マトリックス構築物の物理的試験および機械的特性

実施例1（細胞マトリックス構築物）、実施例2（ケラチノサイト層を形成している細胞マトリックス構築物）、および実施例3（限定培地で作製した細胞マトリックス構築物）の各組織構造物の機械的特性を膜膨張法で定量した。これらの試験は臨床的に用いられているアッセイ（例、Dermaflex(登録商標)、Cyberderm Inc.、Media、PAおよびCutameter(登録商標)、Courage

Khazaka、Colonge、Germany）に類似しているが、膜を破裂できる圧を含めてより高い圧を使っている。サンプルの細胞マトリックス構築物を、ノルムトニック（normotonic）生理食塩水を満たした直径10mmの円柱状ウェルの中心に置いたポリカーボネートブロックの上に水平に置いた。円柱状ウェルの直径に対応した円形の穴を持つ金属プレートをサンプルの上に置きブロックに留めた。そして、シリンジポンプで食塩水を更に注入することによりサンプルを膨張させた。圧伝導計を用いて得られた圧を測定した。加圧を続け破裂強度、実施例1の方法で得た細胞マトリックス構築物では439.02mmHg；実施例2のケラチノサイト層を形成した細胞マトリックス構築物では998.52mmHg；および実施例3の限定培地で作成した細胞マトリックス構築物では1542.26mmHgを得た。

【0180】

真皮マトリックスの熱溶解温度を求めるために、サンプル（細胞マトリックス構築物）を実施例1の処置によって作製し、21日目に採取した。サンプルの変性温度をMet t l e r T o l e d o（Highston、NJ）示差走査熱量計（DSC製品 #DSC12E）を用いて解析した。目的のために、溶解温度を、サンプルを45℃から80℃まで毎分1℃の割合で加熱することによって求めた。サンプルの平均変性温度は60.8±1.2℃（n=3）であった。

【0181】

実施例1（細胞マトリックス構築物）および実施例3（限定培地で作製した細胞マトリックス構築物）の処置を用いて作製した表皮マトリックスの縫合維持および引っ張り張力を、一定の臨床状況での縫合力を求めるために測定した。21日目のヒト真皮マトリックスの縫合維持力を、Mini-Bionex 858試験システム（MTS systems Corporation、Minneapolis、Minn.）を用いて、血管移植人工補綴のためのアメリカ国家標準刊行物（Instruments、1986）に記載されている方法により測定した。

【0182】

実施例1のサンプル（細胞マトリックス構築物）では、引っ張り張力は365N/mであり、実施例2に従って調製したサンプル（ケラチノサイト層を形成下細胞マトリックス構築物）では、引っ張り張力は2720N/mであった。

【0183】

縫合維持力は、実施例1のサンプルでは、0.14Nであり、実施例2に従って調製したサンプルでは、0.22Nであった。

【0184】

実施例1、実施例2、および実施例3に記述した構造物を24mmおよび75mmの直径の両方で作成した。3方法全ての培養操作で作成した構造物は密着性のある組織用構造であり、最小の力で膜より剥がすことが可能である。従って、“剥離可能”であり、損傷を与えることなく、使用および試験において、物理的に取り扱うことができ、また操作することができる。

【0185】

実施例15：化学的限定培地中でのヒト新生児包皮線維芽細胞による コラーゲンマトリックスのインビトロ作製

実施例1で述べた処置によってヒト新生児包皮線維芽細胞を増殖させた。細胞を 3.0×10^6 /mlの濃度となるように再懸濁し、6穴トレイの0.4ミクロンポアサイズの24mm直径組織培養用インサートに 3.0×10^6 細胞/TW（ 6.6×10^5 細胞/

10

20

30

40

50

cm^2) の濃度で播いた。この実施例では、細胞は全て化学的限定培地で培養した。

【0186】

培地の組成は、DME MおよびHamのF-12培地 (Quality Biologics Gaithersburg, MD) の3:1基礎混合物、4 mM Glutamax-1 TM (Gibco BRL, Grand Island, NY) および以下の添加物を含む; 5 ng/ml ヒト組み換え表皮成長因子 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)、 1×10^{-4} Mのエタノールアミン (Fulka, Ronkonkoma, NY, ACSクォーレート)、 1×10^{-4} Mのオーフォスフォルルエタノールアミン (Sigma St. Louis, MO)、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のトランスフェリン (Sigma St. Louis, MO)、20 μM のトリヨードサイロニン (Sigma St. Louis, MO)、6.78 ng/ml のセレン (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI)、50 ng/ml のL-アスコルビン酸 (WAKO Chemicals USA, Inc. #013-12061)、0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のL-プロリン (Sigma St. Louis, MO)、および0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のグリシン (Sigma St. Louis, MO)。

【0187】

上記基礎培地に加え、以下の条件で下記の添加物を加えた。

【0188】

1. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のインスリン (Sigma St. Louis, MO)、0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のハイドロコチゾン (Sigma St. Louis, MO)、および0.05%のポリエチレングリコール (PEG) (Sigma St. Louis, MO)。

【0189】

2. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のインスリン (Sigma St. Louis, MO) および0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のハイドロコチゾン (Sigma St. Louis, MO)。

【0190】

3. 375 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のインスリン (Sigma St. Louis, MO) および6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のハイドロコチゾン (Sigma St. Louis, MO)。

【0191】

サンプルはホルマリンで固定しヘマトキシリンおよびエオシンで光学顕微鏡用の染色をした。組織学的な観察評価で、PEGのない条件2でもPEGが存在する条件1とかなり類似したマトリックスを作製することが証明された。構造物のコラーゲン含量を生化学的に測定すると、PEGが存在する条件1では $168.7 \pm 7.98 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; PEGのない条件2では $170.88 \pm 9.07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、と両方ではほとんど同量の値を示した。高濃度のインスリンとハイドロコチゾンを含む条件3では、他の2つの条件よりも早い時点でコラーゲンを含むマトリックスの高い発現が示された。また、全ての条件下で細胞-マトリックス構築物中には内因性に産生される線維性コラーゲン、デコリン、およびグリコサミノグリカンが存在した。本実施例の条件2の方法で作成した培養真皮構築物を図2に示した。化学的限定培地で培養した21日目の培養ヒト真皮線維芽細胞から形成した細胞-マトリックス構築物の、固定、パラフィン包埋、ヘマトキシリンおよびエオシン染色した切片の写真を図2に示した。多孔性の膜は構造物の下で薄い半透明のバンドのように見える。細胞は膜の表面上で成長し膜をマトリックスの中に取り込まないことが分かる。

【0192】

図3は、本実施例の条件2の方法で作成した21日目の培養真皮構築物の透過型電子顕微鏡 (TEM) の像を示す。図3Aは、線維芽細胞間の内因性コラーゲン繊維のアライメントを示している7600倍の像である。図3Bは、完全に形成された内因性コラーゲン繊維の19000倍の像であり、繊維の配列と束を示している。

【0193】

本実施例の全ての条件下で、培養皮膚構造は構成する皮膚線維芽細胞および内因性に産生するマトリックスを形成した。全てに完全に形成されたコラーゲン繊維が細胞間で配列され束ねられた形で存在することが示された。これら繊維の質、厚さ、および結合体性は、構築物に引っ張りを与え、培養膜からの剥離を容易にし、移植や植え込みのように、

当該構築物を用いて治療される患者へ、それらを運び易くする。

【0194】

実施例16：皮膚構造の全体の厚み

上記、実施例15で述べた条件2（PEGなし）の方法で、化学的に定義された条件下でヒト真皮線維芽細胞により作成した21日目の皮膚構造を用いて、正常ヒト新生児包皮表皮ケラチノサイトを細胞マトリックス構築物の表面に播き、皮膚構造の表皮層を形成した。

【0195】

培地を無菌的に培養インサートおよびその周辺から除去した。正常ヒト表皮ケラチノサイトを、凍結副次培養細胞ストックからコンフルエント状態までに4経代培養して増大させた。次に細胞を、トリプシン-バーゼンを用いてフラスコ底面から遊離させ、プールし、遠心分離して細胞ペレット化し、表皮化培地中に再懸濁させ、カウントして 4.5×10^4 細胞/cm²の密度で膜の上に播いた。該構築物を $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $10 \pm 1\%$ のCO₂中で90分間インキュベートし、ケラチノサイトを付着させた。インキュベーション後、構築物を表皮化培地に浸した。表皮化培地の組成は、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）（グルコースとカルシウムを含有しない（BioWhittaker, Walkersville, MD）およびHamのF-12培地（Quality Biologies Gaithersburg, MD）の3：1基礎混合物で、 $0.4 \mu\text{g/ml}$ のヒドロコチゾン（Sigma St. Louis, MO）、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ のエタノールアミン（Fluka, Ronkonkoma, NY）、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ のオーフォスフォルエタノールアミン（Sigma St. Louis, MO）、 $5 \mu\text{g/ml}$ のインスリン（Sigma St. Louis, MO）、 $5 \mu\text{g/ml}$ のトランスフェリン（Sigma St. Louis, MO）、 $20 \mu\text{M}$ のトリヨードサイロニン（Sigma St. Louis, MO）、 6.78ng/ml のセレン（Aldrich）、 $24.4 \mu\text{g/ml}$ のアデニン（Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI）、 4mM のL-グルタミン（BioWhittaker, Walkersville, MD）、 $50 \mu\text{g/ml}$ のL-アスコルビン酸ナトリウム塩（Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, WI）、 $16 \mu\text{g/ml}$ のリノール酸（Sigma, St. Louis, MO）、 $1 \mu\text{M}$ の酢酸トコフェロール（Sigma, St. Louis, MO）、および $50 \mu\text{g/ml}$ の硫酸ゲンタマイシン（Amersham Arlington Heights, IL）を上記混合物に添加している。構築物は表皮化培地中で、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $10 \pm 1\%$ CO₂中で2日間培養した。

【0196】

2日後、構築物は上記組成の新鮮な培地に交換し、インキュベーターに返し $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $10 \pm 1\%$ CO₂中で2日間培養した。2日後、構築物を含有するキャリアを無菌的に十分な量の培地を入れた新しい培養トレーに移し、キャリア膜の表面と一致する水面になり、空気-液体境界のところで構築物が発達するのを維持することが出来るようにした。形成される表皮層の表面に接触する空気は上皮細胞層の層化を促す。構築物は、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 10% CO₂中、および低湿度中で、2～3日毎に培地を交換しながら7日間培養した。この培地の組成は；ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）（グルコースとカルシウムを含有しない（BioWhittaker, Walkersville, MD）およびHamのF-12培地（Quality Biologies Gaithersburg, MD）の1：1混合物で、 $0.4 \mu\text{g/ml}$ のヒドロコチゾン（Sigma St. Louis, MO）、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ のエタノールアミン（Fluka, Ronkonkoma, NY）、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ のオーフォスフォルエタノールアミン（Sigma St. Louis, MO）、 $5 \mu\text{g/ml}$ のインスリン（Sigma St. Louis, MO）、 $5 \mu\text{g/ml}$ のトランスフェリン（Sigma St. Louis, MO）、 $20 \mu\text{M}$ のトリヨードサイロニン（Sigma St. Louis, MO）、 6.78ng/ml のセレン（Aldrich）、 $24.4 \mu\text{g/ml}$ のアデニン（Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI）、 4mM のL-グルタミン（BioWhittaker, Walkersville, MD）、 $2.65 \mu\text{g/ml}$ の塩化カルシウム（Mallinckrodt, Chesterfield, MO）、 $16 \mu\text{M}$ のリノール酸（Sigma St. Louis, MO）、 $1 \mu\text{M}$ の酢酸トコフェロール（Sigma St. Louis, MO）、 1.25mM セリン（Sigma St. Louis, MO）、 0.64mM の塩化コリン（Sigma St. Louis, MO）、および $50 \mu\text{g/ml}$ の硫酸ゲンタマイシ

ン (Amersham
Arlington Heights, IL) である。2～3日毎に培地を交換しながら、14日間培養した。

【0197】

サンプルは、3通りで、構築物を空気-液体境界に引き上げた後、10、12、および14日目に採取し、実施例1で述べたようにヘマトキシリン(原語: hemotoxylin)およびエオシン染色にかけ光学顕微鏡下で肉眼的に観察した。得られた構築物は、マトリックスで囲まれた真皮線維芽細胞からなる下部層と、それを覆う多層化し分化したケラチノサイトの上側表皮層とからなる2層の皮膚構造であった。本実施例の2層皮膚構造を図4に示す。図4は、化学的に限定培地で培養したヒト真皮線維芽細胞から形成した細胞-マトリックス構築物と化学的に限定培地で培養したヒト角質実質細胞から形成した多層化した分化した表皮からなる、化学的限定培地で培養した外因性マトリックス成分なしで形成した培養皮膚構造の、固定、パラフィン包埋、ヘマトキシリンおよびエオシン染色した切片の顕微鏡写真を示す。

10

【0198】

実施例17: ヒト頬線維芽細胞によるコラーゲンマトリックスの形成

本実験の目的はヒト頬組織から単離した頬線維芽細胞から細胞-マトリックス構築物を産生することである。頬線維芽細胞を10%NBCS含有DM培地で、T-150フラスコで培養した。7日後に更に細胞数を増やすために、頬線維芽細胞を採集して、各4.0×10⁶細胞を9個のT-150フラスコに入れ10%NBCS含有DMEM培地中でコンフルエントになるまで培養し、採取した。

20

【0199】

細胞を採取するために、培地を培養フラスコから吸引した。単層細胞を洗浄するために、無菌濾過したリン酸緩衝液生理食塩水を、各培養フラスコの底部に添加し、その後吸引した。トリプシン-バーゼングルタミン(BioWhittaker, Walkersville, MD)を各フラスコに5ml添加し、単層細胞に完全に行き渡るようにゆっくりと回転させた。培養物をインキュベーターに戻した。細胞が遊離すると、トリプシン-バーゼンの作用を停止するために、SBTT(大豆トリプシンインヒビター)5mlを各フラスコに添加し、細胞懸濁液と混合した。細胞懸濁液をフラスコから取り出し、無菌の円錐遠心管に等分した。細胞を約800-1000×gで5分間遠心して集めた。

30

【0200】

細胞を再懸濁し、3.0×10⁶/mlの濃度になるように希釈し、6穴トレイの0.4ミクロンポアサイズの24mm直径TRANSWELL(登録商標)に3.0×10⁶細胞/TW(6.6×10⁵細胞/cm²)の濃度で播いた。細胞を37±1℃、10±1%CO₂雰囲気中でインキュベーターに静置し、以下の培地で培養した。培地の組成は、DMEMおよびHamのF-12培地(Quality Biologics Gaithersburg, MD)の3:1基礎混合物、4mM Glutamax(Gibco BRL, Grand Island, NY)および以下の添加物を含む; 5ng/mlのヒト組み換え表皮成長因子(EGF)(Upstate Biotechnology, Lake

40

Placid, NY)、0.4μg/mlのヒドロコチゾン(Sigma St. Louis, MO)、1×10⁻⁴Mのエタノールアミン(Fulka, Ronkonkoma, NY、カタログNo. 2400ACSグレード)、1×10⁻⁴Mのオ-フォスフォルエタノールアミン(Sigma, St. Louis, MO)、5μg/mlのインスリン(Sigma, St. Louis, MO)、5μg/mlのトランスフェリン(Sigma, St. Louis, MO)、20pMのトリヨードサイロニン(Sigma, St. Louis, MO)、6.78ng/mlのセレン(Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI)、50ng/mlのL-アスコルビン酸(WAKO Pure Chemicals)、0.2μg/mlのL-プロリン(Sigma, St. Louis, MO)、0.1μg/mlのグリシン(Sigma, St. Louis, MO)、および0.05%のポリエチレングリコール(PEG)(Sigma St. Louis, MO)である。

【0201】

50

接種後1日目に、培地を血清無添加産生培地に交換し、以後2～3日毎に新鮮なものと交換し21日間培養した。21日目にサンプルを組織学的な検討のためにホルマリンで固定した。タンパクおよびコラーゲン生成量の解析のために3個のサンプルを使用した。

【0202】

24mm直径の構造物のコラーゲン生成量は、培養21日目に構造物あたり519 μ gであった。24mm直径の構造物の総タンパク生成量は、培養21日目に構造物あたり210 μ gであった。形態学的には、ほぼ線維芽細胞の細胞マトリックス構築物は、口腔の結合組織の培養した組織構造であるが、マトリックスにより取り囲まれたほぼ線維芽細胞を示した。一方、物理的には、構築物は、物理的な嵩と完全性を有している。

【0203】

実施例18：細胞マトリックス構築物による血管新生の促進

本セクションでは、線維芽細胞ベースの細胞マトリックス構築物が、内皮化および血管新生を誘発することが可能であることを証明する。そのような生物学的活性物質を提供することで、新たな毛細血管形成を誘発し、糖尿病性の足の潰瘍を患う患者の創傷箇所の炎症を減少させることが観察された。該細胞マトリックス構築物の血管由来の特製を、ラット大動脈リングアッセイ、アポトーシスの抑制、虚血心組織での血管新生のインビボ誘発を含む広範な技術を用いて以下に記載する。集合的に、これらのアッセイは、血管新生ならびに全体のプロセスにおける広範な個別の現象をカバーしている。細胞外マトリックスに存在するフィブロネクチンもまた内皮細胞の増殖を促進することが証明されている。一方、変性コラーゲンは、ヒト内皮細胞の付着のための好ましい基質であることが証明された。マトリックス中の結合成長因子は、TGF- β およびHGFを含んでいる。これらは新たな毛細血管形成および内皮化を促進するうえで重要な物質である。該マトリックスはまた、YIGSRペプチドを介しての最初の過形成を阻害する役割を果たすことができるラミニン-1も含有している。これらのマトリックスタンパク質は、天然に分泌された成長因子とともに、血管新生のインビボでの誘発に関する組織学的解決を提供する。

【0204】

実施例19：大動脈リングアッセイ

大動脈リングアッセイにおいて、内皮血管の裏打ちが小血管を生成することができることから、血管新生が証明される。月齢1～2か月のスプレーグ・ドーリー (Sprague Dawley) 雄ラットからの胸部の大動脈を無血清MCDB131に移す。大動脈周囲の線維脂肪組織を注意深く除去し、大動脈を8～10回洗浄し、1mm長に切断した。1.5%アガロースゲル中にウェルを打ち抜き、フィブリノーゲンの凝結溶液を注入する(20 μ L、50NIHユニット/mLのフィブリノーゲン(1mL)中ウシトロンビン)。大動脈リングをウェルの中心に置く。凝結後、皿に無血清MCDB131を満たす。該培養物を、3日毎に培地を交換しながら、5%のCO₂中、37℃でインキュベートした。3、7、14日目に新しく形成された小血管を計測する。

【0205】

実施例20：マウス心外膜移植モデルにおける血管新生の促進

重症複合型免疫不全(SCID)マウス心外膜移植モデルを用いて、細胞マトリックス構築物刺激性の血管新生をインビボで調べた。

【0206】

結果：細胞マトリックス構築物は、血管由来の成長因子を分泌する。細胞マトリックス構築物は、種々の成長因子を分泌し、そのいくつかは組織再生および血管新生において重要な役割を果たすことが知られている。

【0207】

実施例21：細胞マトリックス構築物は虚血性心臓組織での血管新生を促進する

細胞マトリックス構築物で処理されたマウスおよび対照における新血管のインビボ形成を3種類(肉眼的形態学、組織学および組織化学)の解析を用いて調べた。

【0208】

肉眼的形態学および病理学的結果

移植を受ける動物において、天然の心臓組織の移植部位に細胞マトリックス構築物を埋め込む。さらに、細胞マトリックス構築物を、虚血性部に適用した結果、多くの新たな血管の形成が視覚的に観察できる。非処置の対照動物においては認められない。例えば、多くの血管が細胞マトリックス構築物の移植部位に観察される。

【0209】

肉眼的形態学的観察によって、本発明の細胞マトリックス構築物が心臓組織において血管新生を促進可能であることが証明される。

【0210】

組織学的結果

正常の未処置のSCIDマウス心臓から取得した切片の光学顕微鏡写真は、心筋およびその外側の心臓表皮の大部分である、心外膜を示す。心筋層は、細動脈、毛細血管および小静脈を含む。正常SCIDマウスと比べて、冠状動脈のオクルージョンによる心筋梗塞の誘発は、心外膜に存在する多数の検出可能な小静脈の数は激減する。

【0211】

対照的に、細胞マトリックス構築物処理した心臓から取得した切片の光学顕微鏡写真は、心外膜層および心外膜／心筋境界面近くの心筋中に位置する細動脈に形成された多くの新たな血管を示している。本発明の細胞マトリックス構築物は、新たな血管形成を促進するという肉眼的形態学的観察を、組織学的結果は確認した。

【0212】

細胞マトリックス構築物処理した心臓から取得した切片の光学顕微鏡写真から、心外膜中の内皮細胞裏打ち血管ならびに心筋中の小静脈および細動脈の存在が明らかになった。対照的に、対照動物の心外膜内皮の裏打ち血管には染色があまり認められなかった。これらの結果から、本発明の細胞マトリックスは、インビボで血管新生を刺激することが証明された。

【0213】

上述の発明について、明確さと理解を深めるために図および実施例で詳細に説明してきたが、請求項の範囲内で一定の変化や修飾を行ってもよいことが当業者には明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0214】

【図1】図1は、ヒドロキシプロリンアッセイによって測定されたコラーゲン濃度の上昇を、実施例1に記載した皮膚構築物に由来するヒト新生児の包皮細胞の細胞数と比較して、示すグラフである。

【図2】21日目に化学的限定培地中で培養ヒト皮膚の線維芽細胞から形成される細胞マトリックス構築物の、固定され、パラフィン埋没されたヘマトキシリンおよびエオシン染色された切片の光学顕微鏡写真（対物レンズ20×）である。多孔性膜は、構築物より下の薄い半透明バンドとして現れる。

【図3】図3は、21日目に化学的限定培地中の培養ヒト皮膚の線維芽細胞から形成される細胞マトリックス構築物の2つの倍率の透過型電子顕微鏡画像を示す。

【図3A】図3Aは、線維芽細胞の間のコラーゲン線維の配列を含む内因性マトリックスを示す7600×倍率である。

【図3B】図3Bは、原線維の配列および包装を表す19000×倍率の十分に形成された内因性コラーゲン線維である。

【図4】化学的限定培地中で培養ヒトケラチノサイトから形成される多層化した分化表皮を用いて、化学的限定培地中で培養ヒト皮膚の線維芽細胞から形成される細胞マトリックス構築物を含む、外因性マトリックス成分の不在下において化学的限定培地中に形成される培養皮膚構築物の、固定され、パラフィン包埋され、ヘマトキシリンおよびエオシン染色された切片の光学顕微鏡写真（対物レンズ20×）である。

【図5】図5は、卵円孔開存を説明するための、心臓の切り欠き図である。

10

20

30

40

50

【図 6】図 6 は、左心房の付属器を説明するための、心臓の部分断面図である。

【図 7】図 7 は、本発明の実施態様による、オクルダーの模式上面図である。

【図 8】図 8 は、図 7 に示すオクルダーの模式断面図である。

【図 9】図 9 は、本発明の別の実施態様による、オクルダーの模式上面図である。

【図 10】図 10 は、図 9 に示すオクルダーの模式側面図である。

【図 11】図 11 は、本発明の別の実施態様による、オクルダーの模式斜視図である。

【図 12】図 12 は、本発明の実施態様による、心臓の盲管を閉塞するためのオクルダーの模式斜視図である。

【図 13】図 13 は、本発明の別の実施態様による、心臓の盲管を閉塞するためのオクルダーの模式斜視図である。

【図 14】図 14 A 乃至 14 E は、本発明の別の実施態様による、患者の体内の解剖的部位にオクルダーを送達するための段階を示す図である。

10

【図 1】

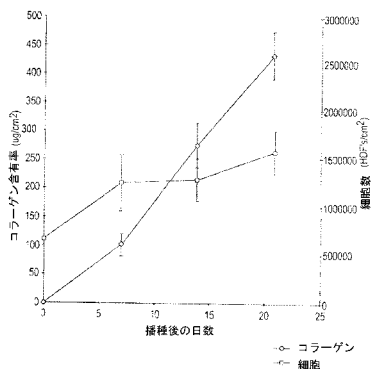


FIG. 1

【図 3 A】

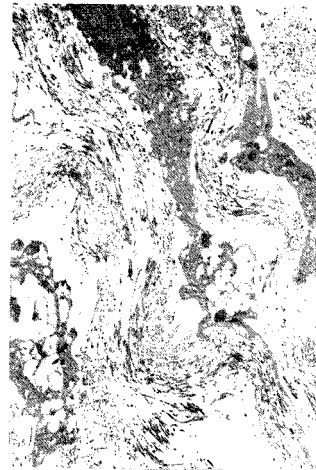


FIG. 3A

【図 2】

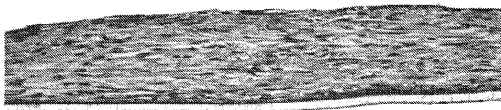


FIG. 2

【図 3 B】



FIG. 3B

【図 4】

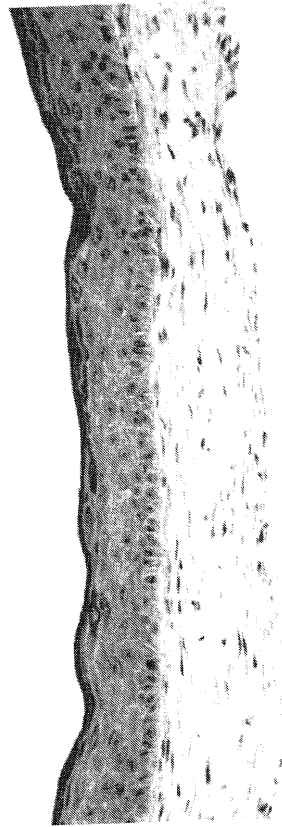


FIG. 4

【図 5】

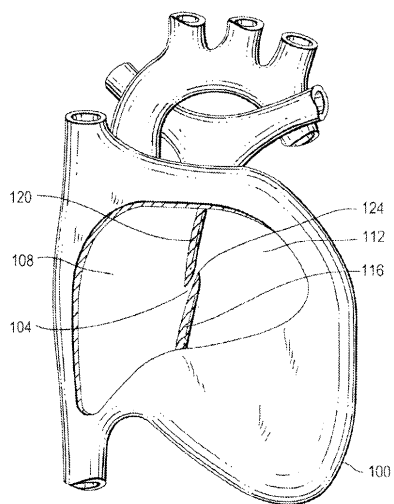


FIG. 5

【図 6】

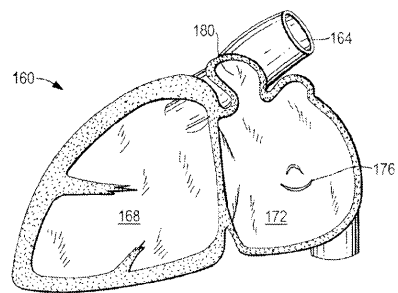


FIG. 6

【図 7】

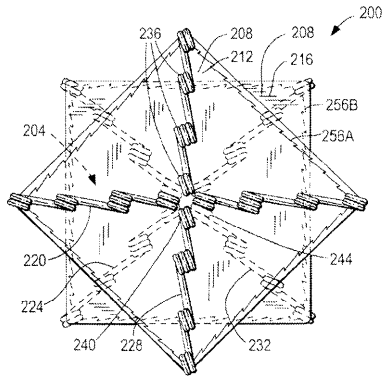


FIG. 7

【図 8】

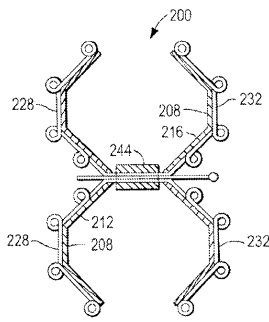


FIG. 8

【図 10】

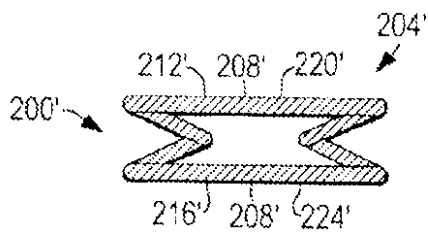


FIG. 10

【図 9】

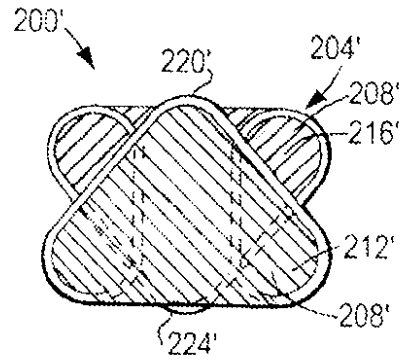


FIG. 9

【図 12】

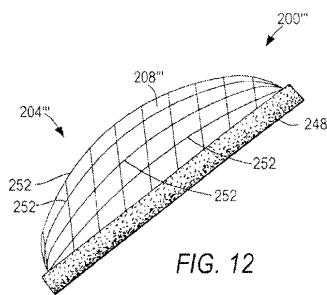


FIG. 12

【図 13】

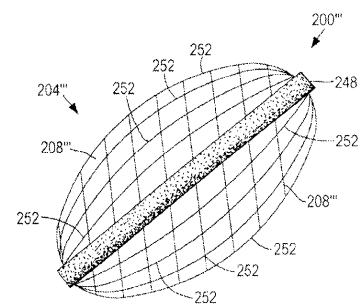


FIG. 13

【図 11】

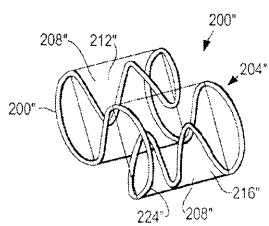
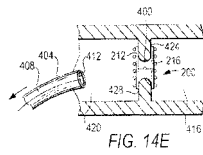
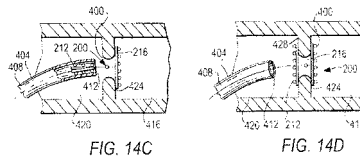
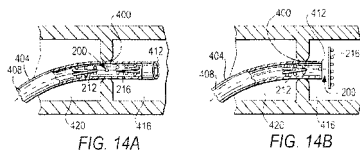


FIG. 11

【図 14】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 07/61800
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61F 2/04 (2007.10) USPC - 623/23.64, 623/904 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) IPC8 : A61F 2/04 (2007.10) USPC : 623/23.64, 623/904 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC8 : A61F 2/00, A61B 17/03, A61B 17/08 (2007.10) USPC : 823/11.11, 623/15.12, 623/23.72, 623/903, 623/1.41; 606/151, 606/157, 606/158 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB), Google Scholar Search terms: occluder, occlusion, exogenous, endothelialization, vascularization, angiogenesis, endogenous, matrix, construct, scaffold, extracellular, cell, cellular, fibroblast, cultured, synthesized, mesh, shell, patent foramen ovale, atrial septal defect		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2005/0113868 A1 (DEVILLIAN et al) 26 May 2005 (25.05.2005) see especially para [0009], [0014]-[0016], [0036]-[0037], [0045], [0052]-[0054]	1-37
Y	US 2002/0188349 A1 (McALISTER et al) 12 December 2002 (12.12.2002) see especially para [0029]-[0031]	1-37
Y	US 6,652,555 B1 (VAN TASSEL et al) 25 November 2003 (25.11.2003) see especially col 8, in 6-14 and col 19, in 1-30	23-26, 32-34, 36-37
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 17 October 2007 (17.10.2007)		Date of mailing of the international search report 17 DEC 2007
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer:  Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4C081 AB13 AB17 BA05 BA12 BA13 BA16 BB04 BB07 BB08 CA171
CD062 CD27 CD34 CE02 CG01 DA02