

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6600299号
(P6600299)

(45) 発行日 令和1年10月30日 (2019. 10. 30)

(24) 登録日 令和1年10月11日 (2019. 10. 11)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 35/28 (2015. 01)	A 6 1 K 35/28
A 6 1 L 27/00 (2006. 01)	A 6 1 L 27/00
A 6 1 K 47/42 (2017. 01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 K 47/36 (2006. 01)	A 6 1 K 47/36
A 6 1 K 47/34 (2017. 01)	A 6 1 K 47/34

請求項の数 15 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-513108 (P2016-513108)
(86) (22) 出願日	平成26年5月9日 (2014. 5. 9)
(65) 公表番号	特表2016-520068 (P2016-520068A)
(43) 公表日	平成28年7月11日 (2016. 7. 11)
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/037435
(87) 国際公開番号	W02014/182994
(87) 国際公開日	平成26年11月13日 (2014. 11. 13)
審査請求日	平成29年5月9日 (2017. 5. 9)
(31) 優先権主張番号	61/822, 134
(32) 優先日	平成25年5月10日 (2013. 5. 10)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)

(73) 特許権者	596115687
	ザ チルドレンズ メディカル センター
	コーポレーション
	アメリカ合衆国マサチューセッツ州〇2 1
	1 5, ボストン, シャタック・ストリート
	5 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 創傷治癒および組織工学

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ABCB5 + 真皮間葉系幹細胞を含む幹細胞の集団と共移植されたコラーゲングリコサミノグリカンスカフォールドからなる、創傷治癒スカフォールドであって、前記幹細胞の集団が、

- a) 幹細胞の集団の少なくとも 8 0 % が ABCB5 + 幹細胞である、
- b) 組成物の細胞の 5 0 % 未満が ABCB5 (-) 細胞である、
- c) 集団が、5 % 未満のケラチノサイトおよび / または上皮細胞を含む、
- d) 幹細胞の集団の少なくとも 8 5 % が、ABCB5 + 幹細胞である、または
- e) 幹細胞の集団の少なくとも 9 0 % が、ABCB5 + 幹細胞である、

10

ことを特徴とする、
前記スカフォールド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の創傷治癒スカフォールドであって、ABCB5 + 幹細胞が、対象の組織から単離され、ABCB5 + 幹細胞が前記対象における他の細胞から ABCB5 に対して特異的な抗体を用いて分離されたものである、前記創傷治癒スカフォールド。

【請求項 3】

スカフォールドが、架橋されたコラーゲンおよびグリコサミノグリカンの多孔質マトリックスであり、且つコラーゲンがウシ腱コラーゲンである、請求項 1 または 2 に記載のス

20

カフォールド。

【請求項 4】

スカフォールドが、任意にポリシロキサン（シリコーン）である半透性層を含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のスカフォールド。

【請求項 5】

スカフォールドがメッシュスカフォールドである、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のスカフォールド。

【請求項 6】

スカフォールドが、約 10～500 マイクロメートル、50～350 マイクロメートルまたは 70～200 マイクロメートルの孔サイズを有する、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のスカフォールド。

10

【請求項 7】

創傷治癒を増強するために有効な少なくとも 1 の生理活性分子をさらに含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のスカフォールド。

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれか一項に記載の創傷治癒スカフォールドを含む、創傷治癒を促進するための組成物。

【請求項 9】

創傷が熱傷または糖尿病性潰瘍である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

20

スカフォールドと共に陰圧創傷治療に用いるための、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 11】

創傷治癒生物学的組織スカフォールドに ABCB5 + 真皮間葉系幹細胞を含む幹細胞の集団を播種すること、および組織が形成されるような条件下においてスカフォールドを維持することを含む、組織工学の方法。

【請求項 12】

生物学的組織スカフォールドが、同種移植片または自家移植片、異種組織あるいは脱細胞組織である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

創傷治癒を促進する用途のための創傷治癒スカフォールドであって、創傷を創傷治癒スカフォールドと接触させ、スカフォールドが ABCB5 + 真皮間葉系幹細胞を含む幹細胞の集団と共移植されたスカフォールドを含む、前記創傷治癒スカフォールド。

30

【請求項 14】

創傷が眼の創傷である、請求項 13 に記載の用途のための創傷治癒スカフォールド。

【請求項 15】

細胞の集団が 眼細胞を含む、請求項 13 に記載の用途のための創傷治癒スカフォールド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

関連出願

本願は、2013年5月10日に出願された米国仮出願第61/822134号、表題「WOUND HEALING AND TISSUE ENGINEERING」に対する35 U.S.C. § 119(e)下の優先権を主張し、これは、本明細書においてその全体において参考として援用される。

【0002】

政府の後援

本発明は、NIH/NCIに付与された助成金番号5R01CA113796下における政府の支援により行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

発明の分野

50

本発明は、コラーゲングリコサミノグリカンスカフォールド (scaffold) における ABCB5 陽性幹細胞を含む、創傷治癒および組織工学のための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

再生医学は、スカフォールドなどの外来性の材料を用いる、組織および器官の修復、再生、維持および置換を含む。スカフォールドに、初代細胞または幹細胞などの細胞、および組織の増殖を励ますための多様な因子を播種することもできる。しかし、再生医学および組織工学のための適切な材料の設計においては、多くの課題が残されている。

【0005】

米国においては毎年100万を超える新たな慢性創傷が発生し、概算される処置費用は、数十億ドルに達する。創傷は、個々の器官または器官系の保護的な被覆の欠損として概念化することができる。この生理学的障壁を失うと、通常では被覆により保護されている組織は、生物学的区画化の喪失にさらされる。組織がもはや生理学的に区画化されなくなると、それは、体液の喪失、微生物による侵入、電解質の不均衡、および幾つかの場合においては代謝不全にさらされる。非区画化された組織により失われる体液として、限定されないが、血液、血漿、リンパ、腸内容物、胆汁、脳脊髄液、粘液が挙げられる。これらの液体の喪失は、下にある組織の乾燥をもたらす、微生物の侵入を可能にし、潜在的な感染、および多くの場合において進行性の組織の喪失をもたらす。例えば、下肢における慢性皮膚創傷の治癒の不能は、病肢の一部または全ての切断をもたらす場合がある。かかる慢性の下肢の皮膚創傷についての幾つかの病因が存在し、それらは、機械的外傷、熱傷、放射線照射、動脈不全、静脈鬱血、慢性感染、ニューロパシー、および糖尿病などの全身性疾患を含む。創傷治癒を改善するための現在の方法は、効果的なドレナージ、感染の予防、炎症の軽減、ならびに組織および体液の喪失の最小化に力を置いている。

【0006】

慢性皮膚創傷は、糖尿病、熱傷、外傷（戦時の持続性の外傷など）、脊髄損傷、および血管不全などの多様な医学的状态を有する患者にとって、著しい健康問題を提起する。これらの患者の一部は、不動および褥瘡、ならびに糖尿病または末梢血管疾患に起因する慢性非治癒性潰瘍の帰結として、慢性創傷を発症する危険性がある。出生後のヒトの皮膚における損傷に対する初期状態の応答は、迅速な創傷閉鎖の必要性により駆動され、瘢痕の形成をもたらすことが運命づけられている。瘢痕は、皮膚の障壁の機能の回復のために十分である一方で、それらはしばしば、必須の皮膚構造を結合組織で置き換えることにより、他の正常な機能を損なう。発生中の皮膚が無菌の羊水中に浸漬している、より保護された環境である胎生期の生活においては、ヒトの外皮は、完全に、瘢痕なしの再生、すなわち再生的な創傷治癒を行うことができる。成人の幹細胞の固有の可塑性の現在の理解は、この現象は、生後において再現することができることを示唆する。

【発明の概要】

【0007】

発明の要旨

本発明は、ABCB5を発現する幹細胞が分化の可塑性を示し、さらに、単独で、または生分解性スカフォールドに関して使用される場合に、創傷治癒および/または組織再生を増強するという発見を組み込み、少なくとも部分的にこれに基づく。

【0008】

幾つかの側面において、本発明は、幹細胞の集団と共移植 (cograft) されたコラーゲングリコサミノグリカンスカフォールドからなる、創傷治癒スカフォールドであって、ここで、前記幹細胞の集団の少なくとも80%が、ABCB5+幹細胞である。

【0009】

他の側面において、本発明は、幹細胞の集団と共移植されたコラーゲングリコサミノグリカンスカフォールドからなる、創傷治癒スカフォールドであって、ここで、組成物の細胞の50%未満が、ABCB5(-)細胞である。

さらに他の側面において、本発明は、ABCB5 + 幹細胞の集団と共移植されたコラーゲングリコサミノグリカンスカフォールドからなる、創傷治癒スカフォールドであって、ここで、前記細胞集団が、5 %未満のケラチノサイトおよび/または上皮細胞を含む。

【0010】

ABCB5 + 眼幹細胞の集団と共移植されたコラーゲングリコサミノグリカンスカフォールドからなる、創傷治癒スカフォールドであって、ここで、前記細胞集団が非眼細胞を含まないものは、本発明の他の側面において提供される。

対象の組織から単離されたABCB5 + 幹細胞の集団と共移植されたコラーゲングリコサミノグリカンスカフォールドからなる、創傷治癒スカフォールドであって、ここで、前記ABCB5 + 幹細胞が、前記対象における他の細胞からABCB5に対して特異的な抗体を用いて分離されたものであるものは、他の側面において提供される。

10

ABCB5 + 幹細胞は、ABCB5 + 真皮間葉系幹細胞であってもよい。幾つかの態様において、前記幹細胞の集団の少なくとも85 %または90 %は、ABCB5 + 幹細胞である。

【0011】

幾つかの態様において、スカフォールドは、架橋されたコラーゲンおよびグリコサミノグリカンの多孔質マトリックスである。コラーゲンは、例えば、ウシ腱コラーゲンであってよい。幾つかの態様において、グリコサミノグリカンは、コンドロイチン6硫酸、コンドロイチン4硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ケラチン硫酸、デルマタン硫酸、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。

スカフォールドは、ポリシロキサン（シリコン）などの半透性層を含んでもよい。他の態様において、スカフォールドは、メッシュスカフォールドである。任意に、スカフォールドは、組織への挿入のために成形されていてもよい。

20

【0012】

幾つかの態様において、スカフォールドは、INTEGRA（登録商標）Meshed Bilayer Wound Matrixである。

スカフォールドは、多様な孔サイズを有していてもよい。例えば、スカフォールドは、約10 ~ 500または約50 ~ 350または約70 ~ 200マイクロメートルの孔サイズを有していてもよい。

スカフォールドは、創傷治癒を増強するために有効な少なくとも1の生理活性分子を含んでもよい。例えば、生理活性分子は、増殖因子、抗炎症剤、創傷治癒剤、抗瘢痕剤、抗菌剤、細胞接着ペプチド、組織生成調節細胞、核酸、核酸アナログ、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、セラミック、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメンバーであってよい。

30

【0013】

幾つかの態様において、スカフォールドのサイズは、2インチ（in）× 2インチ（25平方cm）、4インチ× 5インチ（125平方cm）、4インチ× 10インチ（250平方cm）、または8インチ× 10インチ（500平方cm）とされる。

治癒を促進するために、創傷を、本明細書において記載される創傷治癒スカフォールドと接触させることによる、創傷治癒を促進するための方法は、本発明の他の側面において提供される。幾つかの態様において、接触させることは、出血を制御するために、組成物を出血部位に適用することを含む。

40

幾つかの態様において、創傷は、熱傷または糖尿病性潰瘍である。

幾つかの態様において、陰圧創傷治療を、スカフォールドと共に用いる。

【0014】

他の態様において、方法は、その後、創傷を処置するために医学的に受容可能な被覆で創傷を保全することを含んでもよい。

創傷は、一部の層または全層の創傷、褥瘡、静脈性潰瘍、糖尿病性潰瘍、慢性血管性潰瘍、トンネル状（tunneled）/穿掘性（undermined）創傷、外科的創傷、外傷性創傷、および滲出性（draining）創傷からなる群より選択され得る。

本発明は、他の側面において、コラーゲングリコサミノグリカンスカフォールドにABCB

50

5+ 幹細胞を播種すること、および組織が形成されるような条件下においてスカフォールドを維持することによる、組織工学の方法である。幾つかの態様において、組織工学の方法は、組織再生のための方法であり、スカフォールドは、組織が再生されるような条件下において維持される。さらに他の態様において、組織再生の方法は、加齢した皮膚を処置するための方法である。

【0015】

生物学的組織スカフォールドにABCB5+ 幹細胞を播種すること、および組織が形成されるような条件下においてスカフォールドを維持することによる組織工学の方法は、本発明の他の側面において提供される。

生物学的組織スカフォールドは、例えば同種移植片または自家移植片、異種組織および/または脱細胞 (decellularize) 組織であってもよい。

本発明の他の利点および新規の特徴は、添付の図面と合わせて考慮した場合、本発明の多様な非限定的な態様の以下の詳細な記載から明らかとなるであろう。本明細書と、参照により組み込まれる文書とが、矛盾する開示および/または一致しない開示を含む場合、本明細書が支配すべきである。

【0016】

特定の状態の処置のために対象に組成物を投与する幾つかの方法が、本明細書において開示される。本発明の各々のかかる側面において、本発明は特にまた、特定の状態の処置における使用のための組成物、ならびにその特定の状態の処置のための医薬の製造のための当該組成物の使用を含むことが、理解されるべきである。

【0017】

本発明は、その適用において、以下の説明において記載される、または図面において説明される成分の構造および配置の詳細に、限定されない。本発明は、他の態様、および多様な方法において実施されるかまたは実行されることが可能である。また、本明細書において用いられる表現および専門用語は、説明を目的とするものであり、限定的なものとしてみなされるべきではない。本明細書における「含む (including)」、「含む (comprising)」、または「有する (having)」、「含む (containing)」、「含む (involving)」およびそれらのバリエーションの使用は、その後に列記される項目およびその均等物、ならびにさらなる項目を包含することを意図される。

【0018】

図面の簡単な説明

添付の図面は、原寸で描画されることを意図されない。図面において、多様な図面において描かれている各々の同一またはほぼ同一の成分は、同様な数値により表される。明確であることを目的として、全ての成分が全ての図面においてラベルされているわけではない。図面においては：

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1 . ABCB5+ 細胞の複分化能。ABCB5+ (左パネル) またはABCB5- (右パネル) ヒト皮膚細胞の、分化の前後におけるスペクトリン (筋形成アッセイ)、CD31 (血管新生アッセイ)、およびTUJ1 (神経発生アッセイ) の発現についての免疫蛍光染色 (上3列)。DAPIで核を可視化する。下2列: ABCB5+ (左パネル) またはABCB5- (右パネル) ヒト皮膚細胞の、分化の前後における、オイルレッド (脂肪生成アッセイ) およびアリザリンレッド (骨形成アッセイ) 染色。複製標本 (n = 3) における、各々のマーカー (筋形成、血管新生および神経発生アッセイにおいて) についてのピクセル強度の凝集分析、または陽性に染色された細胞のパーセント (脂肪生成および骨形成アッセイにおいて) を、右側の棒グラフにおいて示す。*、P < 0.05。

【0020】

【図2】図2 . マウスABCB5の遺伝子座およびタンパク質トポロジーの模式図。マウスAbcb5遺伝子は、28のエクソンを含み、12qF2座においてゲノムDNAの102kbにわたっている。それは、11の膜貫通型ヘリックスおよび5つの細胞外ループを有する12

10

20

30

40

50

5 5 A Aのタンパク質をコードする。エクソン23は、A A 9 1 1 ~ 9 5 7をコードし、これは、3C2-1D12抗ABCB5抗体結合エピトープを含む細胞外ループを形成する。

【0021】

【図3】図3. Abcb5 WT (上のパネル) およびAbcb5 KO (下のパネル) マウスの分析。H & E染色は、KO動物において、皮下脂肪の減少および平滑筋系の解体を伴う真皮の菲薄化を示す(倍率はWTおよびKO標本について同じである)。IHCおよびフローサイトメトリーは、Abcb5ヌル/ヌルマウスにおけるAbcb5タンパク質発現の完全な喪失を示す。ローダミン-123排出研究は、Abcb5ヌル/ヌルマウスにおいて、新規の色素保持細胞集団を同定し(R1ゲート、右下のパネル)、これは、特徴的なAbcb5の機能であるローダミン-123の排出1の喪失と一致する。

10

【0022】

【図4】図4 A - 4 C. ABCB5による幹細胞の静止状態の制御。in vivoでBrdUで標識されたAbcb5 WT (B) およびAbcb5 KO (C) マウスから、および未標識のAbcb5 WT対照(A)からのマウス皮膚細胞の、代表的な二色フローサイトメトリー分析。細胞を抗BrdU FITC抗体および7-AADで共染色した。細胞周期のG0期におけるBrdU陽性細胞を、R1ゲートにおいて示す。細胞周期のS/G2/M期におけるBrdU陰性細胞は、R2ゲートにおいて表される。

【0023】

【図5】図5 A - 5 B. Abcb5 KOマウスとAbcb5 WTマウスとの間における細胞周期の制御に關与する遺伝子の発現差異。(A)リアルタイムPCR分析により決定される、Abcb5 KOにおいてAbcb5 WTマウスに対して下方調節される遺伝子のリスト。(B)ここで表される遺伝子は、Abcb5 KOマウスにおいて下方調節される。矢印を伴う線は、既知の遺伝子の相互作用を示す。p53シグナル伝達、G1/Sチェックポイント制御、サイクリンおよび細胞周期の制御、ならびにカルシウムシグナル伝達経路などの古典的経路に対する遺伝子の関係は、矢印なしの線により注解される。遺伝子の関係および相互作用は、Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity, CA) に基づく。

20

【0024】

【図6】図6 A - 6 C. Abcb5 KOおよびAbcb5 WTマウスの比較創傷治癒分析。(A) Abcb5 WT (上のパネル) およびAbcb5 KO (下のパネル) マウスにおいて作成した全層皮膚創傷の、代表的な第0日および第7日のデジタル写真。(B) Abcb5 WT (上のパネル) およびAbcb5 KO (下のパネル) マウスから実験第7日において採取された、中央の創傷の断面、周囲の皮膚および下にある筋肉組織の代表的なH&E染色。(C) Abcb5 KOおよびAbcb5 WT創傷の創傷閉鎖(上のパネル) および炎症間質厚(下のパネル) の定量的分析。

30

【0025】

【図7】図7 A - 7 C. Abcb5 KOおよびAbcb5 WTマウスにおける比較CD31発現分析。(A) および(B)、Abcb5 WT (上のパネル) およびAbcb5 KO (下のパネル) マウスから実験第7日において採取された、中央の創傷の断面、周囲の皮膚および下にある筋肉組織の代表的なH&EおよびCD31染色。(C) Abcb5 KOおよびAbcb5 WTの創傷における、血管性のCD31+の層の厚み(上のパネル) および無血管性のCD31-層の厚み(下のパネル) 定量的分析。

【0026】

40

【図8】図8. Abcb5 KOおよびAbcb5 WTマウスにおける血管形成の比較分析。Abcb5 WT (左パネル) およびAbcb5 KO (右パネル) マウスから実験第7日において採取された組織からの、中央の創傷の断面の血管層の代表的なCD31染色。

【0027】

【図9】図9 A - 9 B. Abcb5 KOにおける、WTマウスの創傷に対する、血管新生に關与する遺伝子の発現差異。(A)リアルタイムPCR分析により決定される遺伝子発現レベル。(B) Abcb5 KO創傷において下方調節される血管新生促進性サイトカインを示し、ラベルする。矢印は、血管新生促進効果を示す。抗血管新生性膜貫通型受容体、Bai1は、Abcb5 KO創傷において過剰発現される。下部におけるバーは、抗血管新生効果を示す。遺伝子の関係は、Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity, CA) に基づく。

50

【0028】

【図10】図10A - 10D . NSGマウスにおける創傷治癒に対するABCB5 + 細胞の効果。
(A) 4つの実験群において与えられた創傷の炎症間質厚の定量的分析。(B) 実験第14日において採取された創傷断面の代表的なH&E染色。(C) INTEGRA (登録商標) マトリックス中に注入されたヒト細胞の、移植の14日後における、ヒト特異的 2 Mによる検出。黒矢印は、2 M + ヒト細胞クラスターおよび個々の 2 M + ヒト細胞を指す。(D) ヒト特異的GAPDH、2 - ミクログロブリン、およびローディング対照として用いられたマウス - アクチンの発現についての、マウス創傷断面のRT-PCR分析。

【0029】

【図11】図11A - 11C . マウスの背側において移植の8週間後において確立されたヒト皮膚移植片を示す、ヒトからマウスへの異種移植モデル。(A) ヒト - マウスの皮膚吻合を示す対応する病理組織学を、(B) において示す。ヒト異種移植片の創傷形成(C) は、創傷形成の0、2、4および7日後の時点(上から下へ)における、特異的な真皮細胞および細胞外マトリックスエレメントの免疫組織化学的検出を可能にする。

10

【0030】

【図12】図12 . ヒトの再生的創傷治癒におけるABCB5の役割。瘢痕形成およびINTEGRA (登録商標) スカフォールドにより誘導される再生(scar対scaf)の結果としての治癒応答の免疫組織化学的プロファイルを調べる比較研究を確認することができる(スカフォールドを有する創傷における、アクチンを発現する筋線維芽細胞の顕著な再整列、および著しく増強されたABCB5 + 真皮細胞の発現に注意する)。

20

【発明を実施するための形態】

【0031】

詳細な説明

本発明は、部分的に、ABCB5陽性幹細胞を播種されたコラーゲングリコサミノグリカンスカフォールドが、増強された創傷治癒および組織工学特性を示すという発見に基づく。本発明のコンストラクトは、組織合成をもたらす独自の再生活性を有することを示した。増強された組織合成は、組織の修復および生成、ならびに創傷の修復および治癒において有用である。

【0032】

本発明により有用である細胞は、ABCB5陽性幹細胞である。ABCB5は、正常なヒト組織からの複能性幹細胞集団の単離のための、新規かつ重要なマーカーである。「ABCB5 (+) 幹細胞」とは、本明細書において用いられる場合、自己再生する能力、および複数の成人の細胞系列の成熟細胞へと分化する能力を有する細胞を指す。これらの細胞は、細胞表面におけるABCB5の発現により特徴づけられる。本発明の幾つかの態様において、ABCB5 (+) 幹細胞は、真皮または眼の幹細胞である。

30

【0033】

「ABCB5陽性真皮間葉系幹細胞」とは、本明細書において用いられる場合、自己再生する能力、ならびに、骨、脂肪および軟骨などの複数の成人の細胞系列の成熟細胞へと分化する能力を有する、皮膚の細胞を指す。これらの細胞は、細胞表面におけるABCB5の発現により特徴づけられる。培養においては、間葉系幹細胞は、特異的な培地を用いて、骨、脂肪、軟骨および筋細胞へと分化するように誘導することができる(Hirschi KK and, Goodell MA. Gene Ther. 2002; 9: 648-652. Pittenger MF, et al., Science. 1999; 284: 143-147. Schwartz RE, et al., J Clin Invest. 2002; 109: 1291-1302. Hirschi K and Goodell M. Differentiation. 2001; 68: 186-192.)。

40

【0034】

ABCB5陽性真皮間葉系幹細胞は、皮膚から得ることができる。皮膚は、皮膚を有する任意の対象に由来してよいが、幾つかの態様においては、好ましくはヒト皮膚である。皮膚は、任意の年齢の対象に由来してよいが、幾つかの態様においては、好ましくは、青年期または幼児期の皮膚よりも、成人の皮膚である。

【0035】

50

本発明の他の態様において、ABCB5 (+) 幹細胞は、網膜幹細胞である。ABCB5 (+) 幹細胞は、眼の基底角膜縁上皮 (basal limbal epithelium) から、または網膜色素上皮 (RPE) から得ることができる (例えば、これらから単離するか、またはこれらから誘導する)。幾つかの態様において、ABCB5 (+) 幹細胞は、ヒトの眼から得る。他のABCB5 (+) 幹細胞の型 (例えば角膜中心部から得られるものなど) を、本発明の多様な側面および態様において用いてもよい。

【0036】

ABCB5 (+) 幹細胞は、単離してもよい。「単離されたABCB5 (+) 幹細胞」とは、本明細書において用いられる場合、それがもともと見出された生体から取り除かれた細胞、またはかかる細胞の子孫を指す。単離された細胞はまた、天然の環境以外における条件中に置かれる細胞を指す。かかる細胞は、後で、第2の生体中に導入するか、それ (またはそれが由来する細胞または細胞の集団) を単離した生体に再導入することができる。かかる細胞は、本発明の方法により操作された後で、なお単離された細胞であるものとみなされる。用語「単離された」は、当該細胞の、他の細胞との組み合わせもしくは混合物における、またはin vivoの環境における、後の使用を妨げない。

【0037】

ABCB5 (+) 幹細胞は、組織 (真皮細胞などの皮膚細胞、および基底角膜縁上皮またはRPEの眼細胞を含む) の試料を単離することにより、対象から得ることができ、次いでABCB5 (+) 幹細胞を精製することができる。試料をABCB5 + 幹細胞について多数の方法において濃縮することができることは、当業者には明らかであろう。例えば、細胞上のABCB5細胞表面分子に結合する抗体または他の結合分子を用いて、幹細胞を選択することができる。幹細胞は、ドナーから直接的に得ても、凍結保存による貯蔵から回収してもよい。幹細胞を、例えばABCB5に対する抗体を用いて単離して、後の使用のために、標準的な方法を用いて培養中に維持するか、例えば液体窒素中で凍結してもよい。

【0038】

間葉系幹細胞の分子的表現型を有する特異的に純粋なABCB5 + 真皮細胞集団を、健康なヒト皮膚の外科標本から、例えば確立された高感度かつ特異的なABCB5モノクローナル抗体 (mAb) を用いて、単離することができる。単離されたABCB5 + 真皮幹細胞は、それらが三胚葉全て、すなわち、外胚葉、中胚葉および内胚葉の細胞系列へと分化するような、複分化能を有する。

【0039】

本発明は、混合された細胞の集団からABCB5 (+) 幹細胞を分離するために、例えばモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、F (ab')₂、Fab、Fd、Fvまたは単鎖FvフラグメントなどのABCB5結合分子を使用する、任意の公的な方法を企図する。したがって、方法は、ABCB5 (+) 幹細胞の集団を産生する方法を含み、該方法は、細胞の細胞懸濁液を提供するステップ；細胞懸濁液を、ABCB5 (+) 細胞上のABCB5を含むエピトープを認識するモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体の組み合わせと接触させるステップ；ならびに細胞懸濁液から、モノクローナル抗体により結合された細胞を分離して回収するステップを含む。モノクローナル抗体は、固相に結合していてもよく、ABCB5 + 幹細胞を捕捉するために利用される。結合した細胞を、次いで、抗体および固相の性質に依存して、公知の方法により固相から分離してもよい。

【0040】

「モノクローナル抗体」とは、本明細書において用いられる場合、抗原の同じエピトープに結合する、単クローンの免疫グロブリンの集団から得られる抗体を指す。本発明の細胞集団を調製するために適切なモノクローナルベースの系として、陽性または陰性選択のいずれかのための、抗体を利用する磁気ビーズ / 常磁性粒子カラム；ビオチンまたはストレプトアビジンのアフィニティーに基づく分離；および他の細胞の懸濁液中に混合された免疫蛍光染色されたLSCの高速フローサイトメトリーソーティングが挙げられる。したがって、本発明の方法は、表面抗原ABCB5に対して産生させたモノクローナル抗体 (例えば

、ABCB5に選択的に結合するモノクローナル抗体)を用いる、細胞の集団の単離および増強を含む。幾つかの例において、本明細書において開示される方法において、ABCB5に選択的に結合する市販の抗体または抗体フラグメントを用いてもよい。かかる抗体は、それらが、当該モノクローナル抗体が他の抗原(すなわち、ABCB5以外の抗原)に結合することができるアフィニティーよりも高いアフィニティーでABCB5に結合するか、またはこれに結合することができる場合、ABCB5に選択的に結合するものとみなされる。かかる結合は、標準的なタンパク質-タンパク質相互作用アッセイ(例えば、抗体-抗原またはリガンド-受容体アッセイ)、例えば、競合アッセイ、飽和アッセイ、または限定することなく、酵素結合免疫吸着アッセイ、ラジオイムノアッセイおよびラジオイムノフィルター結合アッセイを含む標準的なイムノアッセイなどにより、測定または決定することができる。

10

【0041】

ABCB5(+)幹細胞は、実質的に純粋な調製物として調製することができる。用語「実質的に純粋」とは、本明細書において用いられる場合、ABCB5(+)幹細胞以外の細胞を実質的に含まない調製物を指す。例えば、ABCB5(+)幹細胞の実質的に純粋な調製物は、調製物中に存在する全細胞のうちの少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%がABCB5(+)幹細胞である、調製物を構成してもよい。

20

【0042】

本発明の組成物は、例えば、生分解性スcaffoldを含む、創傷治癒を促進する生体適合性材料などの基質を含む。ABCB5(+)幹細胞を、例えば、移植のための組織または組織移植片を形成する基質またはスcaffoldに添加してもよい。スcaffoldは、コラーゲンおよびグリコサミノグリカンからなる高度に多孔質の格子、すなわちコラーゲングリコサミノグリカンのマトリックスまたはスcaffoldである。コラーゲングリコサミノグリカンスcaffoldの例として、米国特許第4,060,081号、同第4,280,954号および同第4,505,266号において列記されるものが挙げられる。コラーゲングリコサミノグリカンスcaffoldにおいて有用な他の材料として、限定されないが、コンドロイチン6硫酸、コンドロイチン4硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ケラタン硫酸、デルマトン硫酸、キチンおよびキトサンが挙げられる。コラーゲングリコサミノグリカンスcaffoldは、血管および周辺組織の細胞が組織腔中からその中に遊走する(「浸潤」として知られるプロセス)、支持体または足場構造として役立つ。浸潤は、新たな組織を作成する原因となり、これが、スcaffoldが生分解するにつれてこれを置き換える。

30

【0043】

幾つかの態様において、スcaffoldは、INTEGRA(登録商標)である。INTEGRA(登録商標)は、FDAに承認された無細胞性の真皮性皮膚置換物であって、細胞外マトリックス(コラーゲンおよびGAG)からなる。それは、広汎な組織欠損または静脈性下腿潰瘍のような非治癒性の創傷の処置において使用されてきた。

【0044】

「組成物」とは、本明細書において、単離された細胞調製物またはスcaffoldを指し、組織スcaffoldおよび人工スcaffoldを含む。本発明の組成物は、幾つかの例において、単離されたABCB5(+)幹細胞が濃縮されている。組成物は、ABCB5(+)幹細胞が、調製物中に存在する主な細胞サブタイプである場合に、単離されたABCB5(+)幹細胞が濃縮されているとみなされる。例えば、ABCB5(+)幹細胞が濃縮された組成物は、組成物の細胞のうちの少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%がABCB5(+)幹細胞である、組成物である。幾つかの態様において、単離されたABCB5(+)幹細胞が濃縮された組成物は、組成物の細胞のうちの50%未満、4

40

50

5 %未満、40 %未満、35 %未満、30 %未満、25 %未満、20 %未満、15 %未満、10 %未満、9 %未満、8 %未満、7 %未満、6 %未満、5 %未満、4 %未満、3 %未満、2 %未満または1 %未満がABCB5 (-) 細胞であるものである。幾つかの態様において、組成物の細胞は、真皮細胞のみである。例えば、スカフォールドに、全ての細胞がABCB5 + 真皮細胞となるように、細胞を播種する。すなわち、幾つかの態様においては、組成物は、非真皮細胞を含まなくともよい。幾つかの態様において、細胞は、ケラチノサイトおよび/または上皮細胞を含まない。幾つかの態様において、組成物の細胞は、眼細胞のみである。すなわち、幾つかの態様において、組成物は、非眼細胞を含まない。幾つかの態様において、組成物は、ABCB5 (-) 眼細胞を含まなくともよい。

【0045】

10

本発明のスカフォールドは、多単シートとして、または複数のコラーゲンの層もしくはシートを含む積層シートとして、多様な様式においてフォーマットすることができる。ある態様において、スカフォールドは、2 ~ 15 枚のシートを含む。かかるシートは、ステッチまたは縫合によりまとめられていてもよい。

【0046】

特定の態様において、ポリマーはさらに、幹細胞に加えて、生理活性分子、例えば低分子またはペプチドをさらに含む。生理活性分子は、非共有結合的に、例えば、懸濁液として、粒子、微粒子、もしくはコロイドとしてカプセル化されて、またはこれらの混合物として、ポリマー中に組み込まれていてもよい。生理活性分子はまた、生理活性分子のポリマーへの結合のための任意の好適な化学を用いて、ポリマー中に共有結合的に組み込まれていてもよい。生理活性分子は、増殖因子、抗菌剤、鎮痛剤、止血剤、血管新生促進剤、または抗血管新生剤などの、任意の治療上望ましい分子であってよい。例示的な態様において、ポリマーは、FGF2、NGF、ドキシサイクリン、アモキシシリンおよびポリ-L-リジンのうちの1または2以上を含む。

20

【0047】

別の特定の態様において、スカフォールドは、少なくとも10 cmの幅を有する。例えば、スカフォールドは、少なくとも10 cmの幅および少なくとも10 cmの長さを有していてもよい。したがって、あるスカフォールドは、 100 cm^2 を超える表面積、例えば4002を有していてもよい。本発明のスカフォールドは、少なくとも80 Nまたはそれより高い二軸強度 (biaxial strength) を有していてもよい。

30

【0048】

本発明の組織スカフォールドは、限定されないが、組織の欠損または創傷を被覆すること、軟部組織などの組織を補強すること、および器官/組織の生成または再生を含む、複数の適用において用いることができる。したがって、別の側面において、本発明は、損傷を受けた組織の修復のための方法の特徴とし、該方法は、損傷を受けた組織を本発明のスカフォールドと接触させることを含む。本発明はさらに、軟部組織の再生を刺激するための方法の特徴とし、該方法は、軟部組織を本発明のスカフォールドと接触させることを含む。スカフォールドが組織と接触させられると、スカフォールドは、スカフォールドの近傍に位置する組織の増殖を増大させることができる。さらに、スカフォールドは、それが接着する組織中での血管新生を促進することができる。したがって、別の側面において、本発明は、組織中の細胞の増殖を刺激するための方法を提供し、該方法は、細胞増殖が刺激されるように、組織をスカフォールドと接触させることを含む。本発明はさらに、組織の血管新生を誘導する方法を提供し、該方法は、組織中で血管新生が起こるように、組織をスカフォールドと接触させることを含む。

40

【0049】

スカフォールドを、皮膚の欠損を充填するために成形してもよい。殆どの場合、これは、ポリマー繊維をハサミまたはナイフでトリミングすることにより達成することができる；あるいは、スカフォールドを、加熱または揮発性溶媒中で溶解することにより形成されるポリマー溶液から鑄造することもできる。

【0050】

50

間葉系幹細胞は、スカフォールドへの細胞懸濁液の適用により、スカフォールド上に播種する。これは、スカフォールドを細胞培養容器中に浸漬するか、またはスカフォールドへの細胞の注射もしくは他の直接適用により、達成することができる。

【0051】

細胞を播種されたスカフォールドは、標準的な外科的技術を用いて、欠損の部位において移植する。スカフォールドは、*in vitro*で移植の前に播種しても、播種して速やかに移植しても、または移植して、次いで細胞を播種してもよい。一態様において、細胞は、スカフォールド上またはスカフォールド中に播種し、*in vitro*で、約16時間～20週間にわたり培養するが、それはより長くともよい。播種または移植の時点における細胞密度は、状況下において変化するであろう。例えば、細胞密度は、約25,000細胞/mm³であってよい。当業者は、適切な細胞密度を知っているであろう。

10

【0052】

本明細書において用いられる場合、対象は、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコおよびげっ歯類などの哺乳動物であってよい。ヒトABCB5(+)幹細胞およびヒト対象は、特に重要な態様である。

【0053】

幾つかの態様において、単離されたABCB5(+)幹細胞(例えば、ABCB5(+)幹細胞移植片の形態における組成物として、または移植された移植片に送達される細胞の調製物として)を、1回以上対象に投与してもよい。したがって、幾つかの態様において、対象に、単離されたABCB5(+)幹細胞の複数の用量または移植片(例えば、2、3、4またはそれより多く)を、数週間、数か月間または数年間の経過にわたり、投与してもよい。幾つかの態様において、幹細胞を、最初の投与の後、3か月、6か月、9か月、12か月、18か月、21か月または24か月後に、再び投与する。適用の回数および適用の頻度は、例えば、最初の幹細胞投与/移植の後で達成された細胞の再生の程度に依存し得る。幹細胞適用の回数および頻度は、医学の専門家(例えば外科医、医師)により決定され得る。

20

【0054】

本発明の組成物(ABCB5+幹細胞を播種したスカフォールド)は、創傷治癒において用いられる。皮膚および他の器官系におけるほとんどの創傷は、保護的な外層ならびにその下の層および組織からの細胞および結合組織マトリックスの喪失により特徴づけられる。皮膚創傷の場合、上皮が、失われる外層である。上皮は、真皮、ならびに脂肪、筋肉および骨などのより深い構造を覆っている。皮膚および他の器官系における大きな創傷の閉鎖は、典型的には何十億もの細胞の産生、血管ネットワークを通しての栄養、ならびに新生細胞外マトリックス(ECM)中に存在するタンパク質およびグリコサミノグリカンからの機械的強度を必要とする。

30

【0055】

用語「創傷」とは、本明細書における目的において、器官および器官系に対する傷害を広範に指す。皮膚の場合、傷害は、上皮、真皮および/または皮下組織に対するものであり得る。皮膚創傷は、創傷の深度に依存して、4つのグレードの内の1つに分類することができる：i)グレードI：上皮に限定された創傷；ii)グレードII：真皮中に及ぶ創傷；iii)グレードIII：皮下組織中に及ぶ創傷；ならびにiv)グレードIV(または全層創傷)：骨が露出される創傷(例えば大転子または仙骨などの骨による圧力点)。用語「一部の層の創傷」とは、グレードI～IIIを包含する創傷を指す；一部の層の創傷の例として、熱傷性創傷、褥瘡、静脈鬱血性潰瘍および糖尿病性潰瘍が挙げられる。用語「深い創傷」は、グレードIIIおよびグレードIVの両方の創傷を含む。本発明の方法は、慢性および急性創傷を含む全グレードの創傷を処置するために用いられる。用語「慢性創傷」とは、30日以内に治癒しなかった創傷を指す。

40

【0056】

用語「創傷治癒を促進すること」とは、本明細書における目的において、器官または器官系の正常な生理学的障壁の再構成を可能にすることを指す。皮膚創傷の場合、創傷治癒

50

を促進することは、肉芽組織の形成の誘導、および／または創傷の収縮の誘導、および／または再血管新生の誘導、および／または上皮化（すなわち、上皮中の新たな細胞の生成）の誘導を含み得る。幾つかの態様において、ABCB5+細胞は、少なくとも部分的に、例えばVEGFなどのメディエーターの分泌により機能する場合がある。

【0057】

本発明の方法により処置されるべき創傷の型として、限定されないが、以下の多様な種類の創傷が挙げられる：外科的創傷；外傷性創傷；放射線損傷性創傷；毒物による上皮壊死性創傷；感染性創傷；腫瘍性創傷；全層創傷；一部の層の創傷；および熱傷性創傷、ならびに、多様な型の潰瘍から生じる創傷、例えば、皮膚潰瘍、角膜潰瘍、動脈閉塞性潰瘍、連続的な圧力により誘導される褥瘡および糖尿病性潰瘍、熱傷性潰瘍、傷害性潰瘍、放射線性潰瘍、薬物により誘導される潰瘍、手術後潰瘍、炎症性潰瘍、胃腸管の潰瘍、単純潰瘍および他の型の血管障害性潰瘍、ならびに慢性（難治性）潰瘍。

10

【0058】

本発明の多様な態様の方法は、複雑な創傷または治癒が困難な創傷を処置することにおいて、特に有用である。感染、放射線照射された組織、全身性疾病、薬物療法、患者の年齢、患者の健康、および対象の栄養状態を含む多くの要因が、創傷治癒プロセスに悪影響を及ぼし得る。さらに、動脈硬化、長時間の圧力、静脈瘤疾患、および静脈鬱血などの、末梢の血液循環を妨害する任意のプロセスが、酸素、栄養、化学シグナル、および傷害を受けた対象における治癒を媒介するために適切な細胞型の送達に悪影響を及ぼし得、これは創傷治癒の障害となるであろう。創傷治癒を阻害する要因として、創傷の乾燥、化学療法またはステロイドなどの薬物療法、および患者の健康および／または栄養状態が悪いことが挙げられる。熱傷、皮膚移植片および多様な型の潰瘍などの、特定の一部の層のおよび全層の傷害は、修復に抵抗して、対象にとって著しい疼痛および不快を引き起こす。

20

【0059】

患者の全身健康状態もまた、創傷治癒において重要である。年齢が高くなるにつれ、傷害を受けた組織を修復する能力は低下する。なぜならば、皮膚がより薄くなり、線維芽細胞の数および総皮膚コラーゲンの量が減少するからである。アルコール依存症、貧血、糖尿病、栄養障害、ショックおよび尿毒症などの疾患状態は、創傷部位への酸素および栄養の送達の妨害をもたらし、それにより治癒プロセスを阻害する。また、単球減少症をもたらす疾患も、創傷治癒を著しく損ない得る。

30

【0060】

障害を処置するために用いられる薬物療法は、障害された創傷治癒を生じ得る。癌患者において分裂している細胞を取り除くために用いられる化学療法もまた、かかる患者が創傷を治癒する能力（これもまた、新たな細胞増殖に依存する）を抑制する。ステロイドは、3つ全ての相の創傷修復に負の影響を及ぼす：初期の炎症応答を阻害し、新たな上皮および血管組織の産生を遅らせ、瘢痕組織におけるコラーゲンマトリックスを弱化させる。

【0061】

細菌による創傷感染は、創傷治癒の延長についての一般的な局所的原因である。ヒト皮膚は、典型的には、*Candida albicans*、*Staphylococcus epidermidis*、*Staphylococcus aureus*および幾つかの*Streptococcus*属の株を含む多数の微生物によりコロニー形成されている。したがって、下にある組織を環境に対して露出する任意の創傷は、常在菌叢に感染する。よく看護され、高度に血管新生される組織中の創傷は、感染に抵抗するが、一方、虚血組織中のものは、感染に対してはるかに感受性である。

40

【0062】

幾つかの態様において、対象は、皮膚創傷を有していてもよい。他の態様において、対象は、例えば角膜上皮において、眼の創傷（例えば、死んでいるか、損傷を受けたか、または感染した眼細胞）などの眼の状態を有していてもよい。したがって、角膜上皮は、本発明により、眼の状態を有する対象において、創傷を有していてもよい。

【0063】

幾つかの態様において、本発明のスcaffoldは、創傷に対して圧力を及ぼすデバイ

50

スと組み合わせてもよい。創傷内の細胞を、必要に応じて定常的にまたは時間依存的な様式において機械的に張力または圧迫を誘導するデバイスを用いて、制御された緊張に供してもよい。制御された、限局的な力を創傷表面に適用するために、例えば創傷表面上に位置することができるマトリックス中のマイクロチャンバーなどの微細構造と流体的に連通する、多数のマイクロチャネルを有するデバイスを用いてもよい。各マイクロチャンバーに適用される真空圧力（または陽圧）は、マイクロチャネルを介して制御される。用語「真空圧力」とは、本明細書における目的において、チャンバーまたは対象となる材料中の圧力であって、参照チャンバー、材料、組織または大気のものよりも規模が低いものを指す。用語「陽圧」とは、本明細書における目的において、チャンバーまたは対象となる材料中の圧力であって、参照チャンバー、材料、組織または大気のものよりも規模が高いものを指す。用語「圧力」とは、本明細書における目的において、真空圧力または陽圧の両方を包含することを意図される。本発明のスcaffoldsは、圧力を適用するためのデバイスより前、後、またはこれと断続的に、創傷に適用することができる。

【0064】

創傷治癒は、フィブリン血栓形成、炎症細胞の動員、再上皮化、ならびにマトリックスの形成およびリモデリングを含む。組織傷害の直後に、血管の破壊が、血液の血管外漏出、ならびに、フィブリン血栓形成をもたらす、同時の血小板凝集および血液凝固をもたらす。フィブリン血栓内に捕捉された活性化された血小板は、脱顆粒し、多様なサイトカインおよび増殖ホルモンを放出する。これらのサイトカインおよび増殖ホルモンは、傷害の部位へ炎症細胞を動員し、血管新生を刺激し、再上皮化および結合組織収縮に伴う組織の運動を開始させるために役立つ。

【0065】

好中球および単球は、脱顆粒している血小板から放出される増殖因子およびサイトカイン、細菌タンパク質から切断されるホルミルメチオニルペプチド、ならびにフィブリンおよび他のマトリックスタンパク質のタンパク質分解の副生成物を含む多数の走化性シグナルにより、傷害の部位に動員される。好中球浸潤は数日後に終わるが、創傷部位への単球の持続的動員により、マクロファージは集合を続ける。活性化されたマクロファージは、増殖因子およびサイトカインを放出し、それにより、脱顆粒している血小板からのより早期のシグナルを増幅する。これらのプロセスを補助するために、外因性の因子を創傷に適用してもよい。

【0066】

したがって、本発明の態様はまた、ABCB5+細胞による可溶性因子の内包を含む方法を含む。デバイスの創傷上での配置の後で、デバイスに添加された可溶性因子（例えば、上皮増殖因子などの増殖因子、サイトカイン、PGDF、インスリン様増殖因子、TGF- β 、ケラチノサイト増殖因子サイトカイン、TNF、ケモカイン、走化性ペプチド、組織メタロプロテイナーゼ阻害物質など）は、組織中へと通過する。

【0067】

急性および慢性の両方の創傷において、動物モデルにおいて、多数の組み換え増殖因子が創傷治癒プロセスを加速させ得ることが注目されてきた。これらの組み換え由来の因子として、血小板由来増殖因子（PDGF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、上皮増殖因子（EGF）、ならびにトランスフォーミング増殖因子 および （TGF- α およびTGF- β ）が挙げられる。さらに、インスリン、インスリン様増殖因子 I および II（それぞれIGF-I およびIGF-II）、インターフェロン（IFN）、インターロイキン（IL）、KGF（ケラチノサイト増殖因子）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、血小板由来内皮細胞増殖因子（PD-ECGF）、ならびに幹細胞因子（SCF）を含む他の組み換え増殖因子は、創傷治癒プロセスに関与する細胞型の活性化、増殖および/または刺激を促進し得る。

【0068】

可溶性因子は、タンパク質であってもよく、または細胞において発現させてもよい。タンパク質、ペプチドまたはポリペプチドとは、アミノ酸のポリマーを指し、これらの用語は、交換可能に用いられる。ポリマーは、天然または非天然のアミノ酸を含んでよい。タ

10

20

30

40

50

ンパク質またはポリペプチドは、in vitroまたはin vivoで、天然、組み換え、合成または他の手段を介して生成することができる。タンパク質またはポリペプチドは、翻訳語修飾を有していてもよく、または、リン酸化、グリコシル化、ファルネシル化、アセチル化、メチル化、チオール酸化などを含むように、化学的に修飾されていてもよい。

【0069】

本発明の組成物についての別の使用は、組織再生におけるものである。創傷治癒は、組織修復または組織再生のいずれかを通して達成することができる。通常癒痕の形成をもたらす修復と比較して、組織再生は、正常な構造の完全な形態学的および機能的回復を提供する。自発的な組織再生は、生後の生命においては起こらない；しかし、それは、少なくとも部分的に、スcaffoldsなどの外因性の生物学的マトリックスにより補助することができる。スcaffoldsは、臨床的にはINTEGRA（登録商標）（Integra LifeSciences, Plainsboro, N.J.）として知られ、これは、大規模な熱傷を受けた患者における使用について、ならびに再建の欠陥および慢性創傷の処置について、米国食品医薬品局により承認されている。再生される皮膚は、器質的に適格であり、完全に血管が形成されており、接触および熱または低温に対して感受性であるが⁶、重要な皮膚付属物、例えば、毛包および汗腺を欠いている⁵。

10

【0070】

ABCB5陽性幹細胞を含む移植片の移植は、INTEGRA（登録商標）により誘導される再生的な創傷治癒をさらに増強し、再生応答に関連する複能性幹細胞集団の局所アベイラビリティの増大のおかげで、皮膚付属物の形成を潜在的に増強するが、ABCB5欠損真皮移植片はそうではない。創傷治癒応答の著しい改善は、本明細書により、真皮および上皮の同時再生、ならびに癒痕形成の減少を伴うことが予測される。

20

【0071】

本発明のこの側面において、ABCB5陽性細胞を播種されたスcaffoldsは、分化の誘導により組織を生成するために用いられる。単離されて精製された間葉系幹細胞は、特異的培地中での有糸分裂による増殖を通して、未分化状態において増殖させることができる。これらの細胞を、次いで収集し、機械的刺激、細胞性刺激および生化学的刺激を含む多数の因子により活性化させて、骨、軟骨および多様な他の型の結合組織へと分化させることができる。ヒト間葉系幹細胞は、腱、靱帯および真皮などの多様な間葉系組織細胞を生じる骨芽細胞および軟骨細胞などの細胞へと分化する能力を有し、この能力は、単離の後で、培養における数集団の増殖にわたり、保持される。したがって、間葉系幹細胞を単離し、精製し、大量に増殖させ、次いで、骨格および結合組織など（骨、軟骨、腱、靱帯、筋肉および脂肪など）の特定の型の所望の間葉系細胞へと分化するように活性化することにより、骨格および他の結合組織の障害を処置するためのプロセスが存在する。用語、結合組織は、本明細書において、特殊化したエレメントを支持する身体組織を含むように用いられ、骨、軟骨、腱、靱帯、間質、筋肉および脂肪組織を含む。

30

【0072】

別の側面において、本発明は、結合組織の損傷を修復するための方法に関する。方法は、修復が必要である結合組織の型に幹細胞が分化するために好適な条件下において、スcaffoldsを結合組織損傷の領域に適用するステップを含む。

40

【0073】

用語「結合組織欠損」とは、外傷、疾患、年齢、先天性欠損、外科的介入などに起因して起こり得る、正常な結合組織と比較した任意の損傷または変則性を含む欠損を指す。結合組織欠損はまた、例えば美容増強（cosmetic augmentation）のために、骨形成が単独で望ましい非損傷領域を指す。

【0074】

スcaffoldsはまた、肝臓疾患の処置においても有用である。肝臓疾患は、肝臓組織に対する損傷をもたらす肝炎などの疾患を含む。より一般的には、本発明のスcaffoldsは、限定されないが、以下を含む肝臓の疾患、障害または状態の処置のために用いることができる：アルコール性肝臓疾患、肝炎（A、B、C、Dなど）、限局的肝病変、原発

50

性肝細胞癌、肝臓の大嚢胞性病変、限局的な結節性過形成性肉芽腫性の肝臓疾患、肝肉芽腫、遺伝性ヘモクロマトーシスなどのヘモクロマトーシス、鉄過剰症候群、急性脂肪肝、妊娠悪阻、妊娠期の介入性肝臓疾患、肝内胆汁鬱滞、肝不全、劇症肝不全、黄疸または無症候性の高ビリルビン血症、肝細胞に対する傷害、クリグラー・ナジャー症候群、ウィルソン病、アルファ 1 アンチトリプシン欠損、ジルベール症候群、高ビリルビン血症、非アルコール性脂肪性肝炎、ポルフィリン症、非肝硬変性門脈圧亢進症、非肝硬変性門脈圧亢進症、限局性線維症、住血吸虫症、原発性胆汁性肝硬変、パッド・キアリ症候群、骨髄移植の後の肝静脈閉塞症など。

【 0 0 7 5 】

幾つかの態様において、本発明は、本発明のスcaffoldsにより神経変性疾患を処置することに関する。幾つかの場合において、本発明は、神経変性疾患、または神経変性をもたらし得る神経細胞に対する損傷を有する対象の処置を企図する。神経細胞は、主に、それらの局所的／領域的なシナプス結合（例えば、局所回路の介在ニューロン、対、長距離に投射するニューロン）および受容体のセット、ならびに関連する二次メッセンジャー系に基づいて、分類される。神経細胞は、中枢神経系（CNS）ニューロンおよび末梢神経系（PNS）ニューロンの両方を含む。多くの異なる神経細胞の型が存在する。例として、限定されないが、感覚および交感神経系のニューロン、コリン作動性ニューロン、後根神経節ニューロン、固有受容性ニューロン（三叉神経中脳路核におけるもの）、毛様体神経節ニューロン（副交感神経系におけるもの）などが挙げられる。当業者は、典型的には細胞形態学的特徴、細胞特異的マーカーの発現、特定の分子の分泌などを利用して、容易に神経細胞を同定し、それらをグリア細胞などの非神経細胞と区別することができるであろう。「神経変性障害」または「神経変性疾患」とは、本明細書において、末梢神経系における、または中枢神経系における、進行性のニューロンの喪失が起こる障害として定義される。これらの障害は、脊髄損傷および頭部外傷などのニューロンの損傷に関連する傷害を含む。

【 0 0 7 6 】

慢性神経変性疾患の殆どは、中年期の間の発症により典型的に表され、神経系内の特定のニューロンのサブセットの急速な変性をもたらす、最終的には、早期の死亡に至る。真皮間葉系幹細胞を含む組成物は、神経変性疾患を処置するために、単独で、または、これらの障害または疾患の処置または予防のために他の治療用化合物の投与と組み合わせて、対象に投与してもよい。

【 0 0 7 7 】

神経変性疾患の処置における成人幹細胞の有用性は、記載されてきた。間葉系幹細胞が、脳卒中を経験したマウスにおいてニューロン様細胞に変化し得ることは、実証されている（Journal of Cell Transplantation Vol. 12, pp. 201-213, 2003）。さらに、骨髄に由来する幹細胞は、神経細胞に発達し、これは、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）および脊髄損傷を有する患者を処置するために有望である。

【 0 0 7 8 】

本発明の方法はまた、腎臓疾患に関連する障害の処置において有用である。先に腎臓に移植された間葉系幹細胞は、腎臓の機能および細胞の再生において、殆ど即座の改善をもたらすことが実証されている（Resnick, Mayer, Stem Cells Brings Fast Direct Improvement, Without Differentiation, in Acute Renal Failure, EurekAlert!, August 15, 2005）。したがって、本発明のスcaffoldsは、腎臓疾患を有する対象に、単独で、または、腎臓の機能および細胞の再生を改善するために他の治療剤または分析などの手順と組み合わせて投与してもよい。

【 0 0 7 9 】

本発明の方法により処置することができる他の疾患は、角膜および肺の疾患を含む。これらの組織における間葉系幹細胞の投与に基づく治療は、正の結果が実証されている。例えば、ヒト間葉系幹細胞は、損傷を受けた角膜を還元するために用いられてきた（Ma Y et al, Stem Cells, August 18, 2005）。さらに、骨髄に由来する幹細胞は、肺の修復お

10

20

30

40

50

よび肺損傷に対する保護のために重要であることが見出された (Rojas, Mauricio, et al., American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, Vol. 33, pp. 145-152, May 12, 2005)。したがって、本発明の真皮間葉系幹細胞はまた、角膜組織または肺組織の修復において用いることができる。

【0080】

ABCB5 (+) 幹細胞は、対象に対して自家性 (同じ対象から得られるもの) であっても、対象に対して同種または同系である細胞などの非自家性のものであってもよい。あるいは、ABCB5 (+) 幹細胞は、対象に対して異種性のものであるソースから得てもよい。

【0081】

同種性とは、対象と遺伝的に異なるが、対象と同じ種に属するか、またはこれから得られる細胞を指す。したがって、同種性ヒトABCB5 (+) 幹細胞は、意図される幹細胞のレシピエント以外のヒトから得られる幹細胞である。同系とは、遺伝的に同一または緊密に関係しており、対象にとって免疫学的に適合性である (すなわち、同一の遺伝子型を有する個体または組織からの) 細胞を指す。異種性とは、対象と異なる種の生物に由来するか、またはこれから得られる細胞を指す。

【0082】

本発明によるABCB5 (+) 幹細胞は、ex-vivoで、またはin vitroで、スカフォールドへの適用の前に、またはin vivoで投与の後に、増殖させることができる。したがって、幾つかの例において、ABCB5発現は、ABCB5 (+) 幹細胞を同定し、単離し、クローニングし、増殖 (propagate) させ、in vitroで増殖 (expand) させるための基礎を提供する。ABCB5 (+) 幹細胞を他の細胞から分離するための剤、例えば単離されたペプチド、例えばABCB5に結合する抗体を使用する、任意の好適な方法を用いることができる。単離されたABCB5 (+) 幹細胞は、例えば組み合わせ培地、栄養補助剤および試薬を用いて、適切な培養環境において維持することができる。随意に、フィーダー細胞集団、またはフィーダー細胞集団から得られる条件培地を用いて、ABCB5 (+) 幹細胞集団を増殖させてもよい。

【0083】

本発明による幹細胞増殖のために用いることができる接着因子、付着因子およびマトリックス因子として、限定することなく、E-カドヘリン、コラーゲン、フィブロネクチン、スーパーフィブロネクチン (superfibronectin)、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、ICAM-1、ラミニン、オステオポンチン、プロテオグリカン、E-セレクトイン、L-セレクトイン、VCAMおよびビトロネクチンが挙げられる。

【0084】

本発明による幹細胞増殖のために用いることができる生理活性剤および栄養補助剤として、限定することなく、酵素 (例えば、カテプシンG、Flt-3/Fc)、タンパク質およびペプチド (例えば、アクチピンA、アルブミン、アンジオゲニン、アンジオポイエチン、BAX阻害ペプチド、ヘレグリンベータ-1、SMAC/Diablo)、ビタミン、ホルモン、ならびに多様な他の物質 (例えば、L-アスコルビン酸、デキサメタゾン、EGF、EGF受容体、胚液 (embryonic fluid) (ウシ)、flt3リガンド、プロゲステロン、レチノイン酸、酢酸レチニル、トロンボポイエチンおよびTPO)、抗体、ケモカイン、サイトカイン、増殖因子、ならびに受容体が挙げられる。

【0085】

本発明による幹細胞増殖のために用いることができる培養試薬として、限定することなく、抗生物質 (例えば、シクロヘキサミド、エトボシド、ゲンタマイシン、マイトマイシン、ペニシリン-ストレプトマイシン)、古典的培地 (例えば、Claycomb培地、ダルベッコ改変イーグル培地、イスコフ改変ダルベッコ培地、最小必須培地)、細胞凍結培地 - DM SO、L-グルタミンを含まないClaycomb培地、Stemline (登録商標) 培地 (Sigma-Aldrich, USA) が挙げられる。

【0086】

本発明の組成物は、幹細胞、または幹細胞の単離された調製物を含んでよく、該幹細胞は、グリコサミノグリカンスカフォールドと共移植されたそれらの細胞表面上におけるAB

10

20

30

40

50

CB5の発現により特徴づけられる。組成物は、単離されたABCB5(+)幹細胞が濃縮された調製物を含んでも、または実質的に純粋なABCB5(+)幹細胞の集団を含んでもよい。組成物は、本明細書において議論されるスカフォールドを包含することを意図される。

【0087】

組成物は、幾つかの態様において、細胞の再生および分化を促進するために、さらなる生理活性剤および栄養補助剤を含んでもよい。本発明により用いることができるかかる生理活性剤および栄養補助剤は、上に記載されており、限定することなく、多様な酵素、タンパク質およびペプチド、ビタミン、抗体、ケモカイン、サイトカイン、増殖因子ならびに受容体を含む。幾つかの態様において、組成物は、免疫抑制剤および/または抗脈管形成剤を含んでもよい。例えば、幾つかの態様において、組成物は、移植片拒絶を予防および/または処置するために用いられ得るシクロスポリン(例えばCyA)を含んでもよい。幾つかの態様において、組成物は、ペバシズマブ(例えば、AVASTIN(登録商標))を含んでもよい。抗脈管形成剤の使用は、幾つかの例において、移植後にしばしば生じて移植片拒絶をもたらす血管形成を予防するために用いることができる。幾つかの態様において、免疫抑制剤および/または抗脈管形成剤は、組成物またはスカフォールドの成分として投与されるのではなく、寧ろ、ABCB5(+)幹細胞の投与の前または後に、独立して投与される。

【0088】

ABCB5+細胞は、遺伝子的にまたは組み換え的に操作されていてもよい。組み換えとは、生物、細胞、核酸およびタンパク質を指し得る。組み換え細胞および生物とは、組み換えDNAを含む細胞および生物である。組み換えDNAとは、天然においては通常は見出されない核酸配列を指す。通常、この用語は、一緒にスプライシングされて非天然の生成物を形成する、2または3以上のDNAのピースを指す。組み換えタンパク質とは、組み換えDNA(すなわち、天然において生じるものとは異なる核酸)から産生されるタンパク質である。組み換えタンパク質を産生することにおいて、タンパク質をコードする遺伝子の調節配列は、通常、天然の遺伝子において起こるものとは異なる。望ましい生物においてそのタンパク質を産生させるために、遺伝子はまた、通常では当該遺伝子を所有しない生物において配置されていてもよい。

【0089】

スカフォールド上に播種される細胞への所望される遺伝子または他の核酸コンストラクトの挿入は、例えばAusubelら編、1989年、Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York)において記載されるような、慣用的な遺伝子および組み換え工学の技術を用いて達成することができる。

【0090】

真皮間葉系幹細胞を、本明細書においてより詳細に記載されるような、治療的指標においても有用であるタンパク質を発現するように改変してもよい。例えば、細胞は、分化した系統への間葉系幹細胞の分化をさらに誘導または促進する少なくとも1の生理活性因子を産生する核酸を含んでもよく、および/または、細胞は、分泌型メディエーターを産生する核酸を含んでもよい。骨が形成されている例において、生理活性因子は、多様な組織増殖因子、特に、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-6およびBMP-7からなる群より選択される少なくとも1つなどの、骨の形態タンパク質を含むTGF-ベータスーパーファミリーのメンバーであってもよい。他の例において、分泌型メディエーターは、VEGFであってもよい。

【0091】

核酸を細胞中に導入するために、多様な技術を使用することができる。かかる技術は、核酸CaPO₄沈殿物のトランスフェクション、DEAEと結合した核酸のトランスフェクション、目的の核酸を含むレトロウイルスによるトランスフェクション、リボソーム媒介トランスフェクションなどを含む。特定の用途のために、核酸を特定の細胞にターゲティングすることが好ましい。かかる例においては、本発明による核酸を細胞中に送達するために用いられるビヒクル(例えば、レトロウイルスまたは他のウイルス; リボソーム)は、

10

20

30

40

50

それに付着したターゲティング分子を有する。例えば、標的細胞上の表面膜タンパク質に対して特異的な抗体、または標的細胞上の受容体に対するリガンドなどの分子を、核酸送達ビヒクルに結合させるか、または核酸送達ビヒクル中に組み込んでよい。例えば、リポソームが本発明の核酸を送達するために使用される場合、エンドサイトーシスに関連する表面膜タンパク質に結合するタンパク質を、ターゲティングのために、および/または取り込みを容易にするために、リポソーム形成に組み込んでよい。

【0092】

外来遺伝子材料を真皮間葉系幹細胞中に導入する一方法は、複性欠損レトロウイルスを用いて細胞に形質導入することによる。複性欠損レトロウイルスは、全てのビリオンタンパク質の合成を指揮することができるが、感染性粒子を作ることにはできない。したがって、これらの遺伝子改変されたレトロウイルスベクターは、培養細胞における高効率な遺伝子の形質導入のための一般的な有用性を有する。レトロウイルスは、遺伝子材料を細胞中に輸送するために後半に用いられてきた。複性欠損レトロウイルスを生成するための標準的なプロトコル（外来遺伝子材料のプラスミドへの組み込み、プラスミドによるパッケージング細胞株のトランスフェクション、パッケージング細胞株による組み換えレトロウイルスの産生、組織培養培地からのウイルス粒子の回収、およびウイルス粒子による標的細胞の感染のステップを含む）は、当該分野において提供される。

【0093】

レトロウイルスを用いることの主な利点は、ウイルスが、宿主細胞のゲノム中に、治療剤をコードする単コピーの遺伝子を効率的に挿入し、それにより、当該細胞が分裂する際に、その子孫に外来遺伝子材料を伝えることを可能にすることである。さらに、LTR領域中の遺伝子のプロモーター配列は、多様な細胞型において、挿入されたコード配列の発現を増強することが報告されている。レトロウイルス発現ベクターを用いることの主な不都合は、（１）挿入変異、すなわち、標的細胞のゲノム中の望ましくない位置への治療剤遺伝子の挿入（例えば制御されない細胞増殖をもたらすもの）、ならびに（２）ベクターにより運搬される治療剤遺伝子が標的ゲノム中に組み込まれるための、標的細胞の増殖のための要求である。これらの見かけ上の限定要因にも関わらず、レトロウイルスを介する治療上有効な量の治療剤の送達は、形質導入の効率が高く、および/または形質導入のために利用可能な標的細胞の数が多い場合、有効である。

【0094】

真皮間葉系幹細胞の形質転換のための発現ベクターとして有用なさらに別のウイルス候補は、二本鎖DNAウイルスであるアデノウイルスである。レトロウイルスと同様に、アデノウイルスゲノムは、すなわち、ウイルス自体の産生を制御する遺伝子情報を除去することにより、遺伝子伝達のための発現ベクターとしての使用のために適応可能である。アデノウイルスは、通常、染色体外の様式において機能するので、組み換えアデノウイルスは、理論上の挿入変異の問題は有さない。一方で、標的真皮間葉系幹細胞のアデノウイルスによる形質転換は、安定な形質導入をもたらさない場合がある。しかし、より最近になり、特定のアデノウイルス配列が、キャリア配列に対して染色体内組み込み特異性を与え、したがって、外来遺伝子材料の安定な伝達をもたらすことが報告されている。

【0095】

したがって、当業者には明らかであるように、外来遺伝子材料を真皮間葉系幹細胞中に輸送するために、多様な好適なベクターが利用可能である。遺伝子置換治療を受け入れられる特定の状態のための治療剤を送達するために適切なベクターの選択、および選択された発現ベクターの細胞中への挿入のための条件の最適化は、当該分野における通常の技術の範囲内であり、過度の実験を必要としない。

【0096】

したがって、本発明は、真皮間葉系幹細胞を、それらが、ヒト幹細胞において通常は産生されないか、または少量においてであるが、過剰産生が治療上の利益をもたらすであろう状況において産生されるポリペプチド、ホルモンおよびタンパク質を、生物学的に重要な量において産生するような様式において、遺伝子操作することを可能にする。これらの

生成物は、次いで、血流または中枢神経系などの身体の他の領域中に分泌される。この方法において形成され、スcaffolds中に包埋されたヒト幹細胞は、持続的な薬物送達系として、必要とされる物質の周期的投与（経口摂取、注射、デポ注入などにより）を必要とする現在のレジメンを置き換えるために役立ち得る。本発明は、ホルモン、酵素および薬物を、かかる物質を必要とするヒトに提供することにおける適用性を有する。それは、持続的な用量において長期間にわたり必要とされ、修復される組織に関連する、ホルモン（例えば、副甲状腺ホルモン、インスリン）などの物質を提供することにおいて、特に価値がある。

【0097】

ABCB5（+）幹細胞は、それらから他の細胞、組織および/または全動物を生じることができ、全能性、複能性（multipotent）および多能性（pluripotent）幹細胞（例えば、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell：iPSC））を産生させるために、単離してもよい。したがって、ABCB5（+）幹細胞を、細胞がスcaffolds中に播種される前または後に、全能性、複能性および多能性幹細胞になるように直接的に再プログラミングするか、または誘導するための方法が、本発明の幾つかの側面において提供される。用語「再プログラミング」とは、本明細書において用いられる場合、細胞または細胞の集団（例えば、ABCB5（+）幹細胞）の発達能力を逆転させるプロセスを指す。したがって、再プログラミングすることとは、細胞を、より高い発達能力を有する状態に、すなわち、より未分化な状態へと後ろ向きに駆動するプロセスを指す。再プログラミングされるべき細胞は、再プログラミングの前に、部分的に分化していても、高度に分化していてもよい。幾つかの態様において、再プログラミングは、完全なまたは部分的な分化状態の逆転、すなわち、細胞の発達能力の、全能性、複能性および多能性状態を有する細胞のものへの増大を包含する。幾つかの態様において、再プログラミングは、ABCB5（+）幹細胞を、当該細胞が胚性幹細胞の発達能力、すなわち胚性幹細胞の表現型を有するように、全能性、複能性および多能性状態へと駆動することを包含する。再プログラミングはまた、細胞を、さらなる操作に供された場合に全能性、複能性および多能性状態への再プログラミングを完了するように、より高い感受性にする状態への、細胞の分化状態の部分的な逆転を包含する。

【0098】

全能性、複能性および多能性幹細胞は、幾つかの再プログラミング因子を用いて、ABCB5（+）幹細胞から作製することができる（本明細書において「再プログラミングされたABCB5（+）細胞」として言及される）。生じる細胞は、ABCB5（+）幹細胞よりも高い発達能力を有し、これは次いで、さらなる操作のための幹細胞のソースとなり得る。「再プログラミング因子」とは、本明細書において用いられる場合、その発現が細胞（例えばABCB5（+）幹細胞）の、より未分化なまたは未分化な状態への、例えば多能性状態または部分的に多能性状態の細胞への再プログラミングに寄与する、発達能力改変因子を指す。再プログラミング因子として、OCT4、SOX2、KLF4およびc-MYC（別名「山中因子」として知られる）が挙げられる。他の再プログラミング因子として、限定することなく、SOX 1、SOX 3、SOX15、SOX 18、NANOG、KLF1、KLF2、KLF5、NR5A2、LIN28、1-MYC、n-MYC、REM 2、TBX3、TERTおよびLIN28が挙げられる。上記の転写因子のうちの2または3以上の任意の組み合わせを、単離されたABCB5（+）幹細胞を再プログラミングするために用いることができる。細胞を全能性、複能性および多能性状態へと再プログラミングする方法は、StadtfieldおよびHochedlinger [33] により記載され、これは本明細書において参考としてその全体において援用される。

【0099】

分化した細胞もまた、再プログラミングされたABCB5（+）細胞から作製して、スcaffolds中に組み込むことができる。方法は、再プログラミングされたABCB5（+）細胞において、より成熟した、分化した細胞型（例えば血液細胞、血小板、間質細胞、骨細胞、筋細胞、皮膚細胞、脂肪細胞、または神経細胞など）への分化を促進するために必要な、任意の1または2以上の分化因子を発現させることを含んでもよい。本明細書において

用いられる場合、用語「分化因子」とは、細胞を所望の細胞型に分化するように誘導するタンパク質または低分子などの、発達能力改変因子を指す。例えば、分化因子は、細胞の発達能力を低下させる。特定の細胞型への分化は、1つより多くの分化因子の同時および/または逐次発現を含んでもよい。方法はさらに、再プログラミングされたABCB5(+)細胞を、分化した細胞を形成するように分化を促進するための条件下において増殖させることを含んでもよい。

【0100】

「幹細胞」とは、本明細書において用いられる場合、未分化の細胞または部分的に分化した細胞であって、自己再生する能力を有し、複数の細胞型へと分化する発達能力を有するものである。「多能性細胞」とは、様々な条件下において、三胚葉(すなわち、内胚葉(例えば腸組織)、中胚葉(血液、筋肉および血管を含む)、ならびに外胚葉(皮膚および神経など))全ての特徴的な細胞型に分化する発達能力を有する細胞である。「複能性」細胞とは、1または2以上の胚葉の細胞へと分化する発達能力を有するが、三胚葉すべての細胞へは分化しない細胞である。これらの細胞は、例えば、例えば造血幹細胞および神経幹細胞などの成人幹細胞を含む。「全能性」細胞は、胚外組織を含む生体における全ての分化した細胞へと分化する発達能力を有する細胞である。幹細胞は、分化した表現型に対する傾向を有していてもよい;しかし、これらの細胞は、逆転して幹細胞の表現型を再表現するように誘導することができる。このプロセスは、「脱分化」または「再プログラミング」として言及される。

【0101】

本発明のACB5(+)幹細胞、再プログラミングされたABCB5(+)細胞、および分化した細胞は、これらの細胞型のための標準的な条件下において操作することができる。細胞の処置は、細胞がスカフォールド中に組み込まれる前または後に、*in vitro*、*ex vivo*または*in vivo*で行うことができる。例えば、細胞は、体内において、または培養培地中に存在することができる。操作は、高酸素または低酸素条件下において行うことができる。

【0102】

「培養培地」は、細胞のバイアビリティを維持し、増殖を支援する栄養を含む。典型的な培養培地は、塩、緩衝化剤、アミノ酸、ブドウ糖または他の糖、抗生物質、血清または血清置換物、および/またはペプチド増殖因子などの他の成分を含む。全能性、複能性および多能性の誘導および維持における使用のための細胞培養培地、ならびに細胞は、当該分野において公知である。培養培地はまた、以下のような細胞特異的増殖因子を含んでもよい:アンジオゲニン、骨形態形成タンパク質-1、骨形態形成タンパク質-2、骨形態形成タンパク質-3、骨形態形成タンパク質-4、骨形態形成タンパク質-5、骨形態形成タンパク質-6、骨形態形成タンパク質-7、骨形態形成タンパク質-8、骨形態形成タンパク質-9、骨形態形成タンパク質-10、骨形態形成タンパク質-11、骨形態形成タンパク質-12、骨形態形成タンパク質-13、骨形態形成タンパク質-14、骨形態形成タンパク質-15、骨形態形成タンパク質受容体IA、骨形態形成タンパク質受容体IB、脳由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、毛様体神経栄養因子受容体-アルファ、サイトカイン誘導性好中球走化性因子1、サイトカイン誘導性好中球走化性因子2-アルファ、サイトカイン誘導性好中球走化性因子2-ベータ、ベータ-内皮細胞増殖因子、endothelia 1、上皮増殖因子、上皮誘導性好中球誘引剤、線維芽細胞増殖因子4、線維芽細胞増殖因子5、線維芽細胞増殖因子6、線維芽細胞増殖因子7、線維芽細胞増殖因子8、線維芽細胞増殖因子b、線維芽細胞増殖因子c、線維芽細胞増殖因子9、線維芽細胞増殖因子10、酸性線維芽細胞増殖因子、塩基性線維芽細胞増殖因子、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体-アルファ-1、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体-アルファ-2、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質-アルファ、増殖関連タンパク質-ベータ、増殖関連タンパク質-ガンマ、ヘパリン結合性上皮増殖因子、肝細胞増殖因子、肝細胞増殖因子受容体、インスリン様増殖因子I、インスリン様増殖因子受容体、インスリン様増殖因子II、インスリン様増殖因子結合タンパク質、ケラチノサイト増殖因子、白血病阻害因子、白血病阻害因子受容体-アルファ、神経増殖因子、神経増殖因子受容体、二

ユーロトロフィン - 3、ニューロトロフィン - 4、胎盤増殖因子、胎盤増殖因子 2、血小板由来内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、血小板由来増殖因子 A 鎖、血小板由来増殖因子 A A、血小板由来増殖因子 A B、血小板由来増殖因子 B 鎖、血小板由来増殖因子 B B、血小板由来増殖因子受容体 - アルファ、血小板由来増殖因子受容体 - ベータ、プレ B 細胞増殖刺激因子、幹細胞因子、幹細胞因子受容体、トランスフォーミング増殖因子 - アルファ、トランスフォーミング増殖因子 - ベータ、トランスフォーミング増殖因子 - ベータ - 1、トランスフォーミング増殖因子 - ベータ - 1 ~ 2、トランスフォーミング増殖因子 - ベータ - 2、トランスフォーミング増殖因子 - ベータ - 3、トランスフォーミング増殖因子 - ベータ - 5、潜在型トランスフォーミング増殖因子 - ベータ - 1、トランスフォーミング増殖因子 - ベータ - 結合タンパク質 I、トランスフォーミング増殖因子 - ベータ - 結合タンパク質 I I、トランスフォーミング増殖因子 - ベータ - 結合タンパク質 I I I、I 型腫瘍壊死因子受容体、I I 型腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター受容体、血管内皮増殖因子、ならびにこれらのキメラタンパク質および生物学的または免疫学的に活性なフラグメント。

【0103】

細胞の分化状態は、当該分野において公知のかかる評価を行うための任意の方法を用いて評価することができる。例えば、本明細書において記載される方法により処置された細胞の分化状態を、未処置の細胞、または同じ再プログラミングまたは分化因子の発現をもたらす DNA を送達するためにウイルスベクターを用いて DNA で処置された細胞と比較することができる。

【0104】

幹細胞の用量は、スカフォールド中に含まれる細胞の数により定義することができ、広い限度内において変化し得、そして無論、各々の特定の場合における個々の要件に適合させる。用いられる細胞の数は、レシピエントの体重および状態、ならびに当業者に公知の他の変数に依存するであろう。

【0105】

本発明はまた、上述の組成物のいずれかをキットにおいて提供し、キットは、任意に、本明細書において記載される状態の処置のための組成物の使用のための説明書を含む。すなわち、キットは、本明細書において開示される任意の生物学的または化学的機構における関与のための、組成物の使用の説明を含んでもよい。キットはさらに、状態の症状ではなく、病態を処置することにおける状態の活性度の説明を含んでもよい。すなわち、キットは、本明細書において議論される組成物の使用の説明を含んでもよい。キットはまた、細胞とスカフォールドとの組み合わせの、疾患の処置のための使用のための説明書を含んでもよい。説明書はまた、任意の好適な技術により組成物を投与するために提供されてもよい。キットはまた、真皮間葉系幹細胞の単離および精製に関連する 1 または 2 以上の試薬、すなわち ABCB5 抗体、および細胞を単離および / または精製するための説明であってもよい。

【0106】

本明細書において記載されるキットはまた、1 または 2 以上の容器を含んでもよく、これは、組成物および先に記載されるような他の材料を含んでもよい。キットはまた、幾つかの場合において、本発明の組成物を混合、希釈、および / または投与するための説明書を含んでもよい。キットはまた、1 または 2 以上の溶媒、界面活性剤、保存剤および / または希釈剤（例えば、生理食塩水（0.9% NaCl）、または 5% デキストロース）を含む他の容器、ならびに、試料中の成分を混合、希釈、またはかかる処置を必要とする対象に投与するための容器を含んでもよい。

【0107】

キットの組成物は、任意の好適な形態において、例えば容器としてまたは乾燥粉末として提供することができる。組成物が乾燥粉末として提供される場合、好適な溶媒（これもまた提供することができる）の添加により組成物を再構成することができる。液体形態の組成物が用いられる態様においては、液体形態は、濃縮されていても、すぐに使える状態

10

20

30

40

50

であってもよい。

【0108】

本発明を下の例によりさらに説明する。例は、決してさらなる限定として解釈されるべきではない。本願を通して引用される参考文献（学術文献、発行された特許、公開された特許出願および同時継続中の特許出願を含む）のすべての全内容は、本明細書により明示的に参考として援用される。

【0109】

例

例1：in vitroおよびin vivoにおけるABCB5+真皮幹細胞の複能分化可塑性

本発明者らは、先に、ABCB5がヒト真皮中の間葉系幹細胞集団を同定し、ここでそれは、膜の過分極をもたらし、膜電位の調節因子として、皮膚前駆体が分化を起こす傾向を決定することを示した。さらなる研究は、ABCB5が、ヒトメラノーマにおける特異的な分化可塑性を有する癌幹細胞（CSC）のサブセットに対して、薬物耐性を付与し、およびこれを標識し、ここでそれはまた、臨床疾患の進行と関連することを明らかにした。

【0110】

本発明者らは、ABCB5+皮膚細胞が、網状真皮において存在し、付近の成熟線維芽細胞、CD31+内皮細胞およびCD34+バルジ細胞とは区別し得ることを示した。ABCB5は、ヒト皮膚標本中の全細胞の内の2.5~5%により発現される。ABCB5+細胞は、間葉系幹細胞マーカーCD29（細胞の99.48±0.5%において）、CD44（99.09±0.9%）、CD49e（92.61±4.0%）、CD90（100%）、およびCD166（58.29±19.7%）、ならびに幹細胞マーカーCD133（6.29±5.1%）を共発現するが、内皮系マーカーCD31、造血系マーカーCD45、および静止状態の線維芽細胞のマーカーCD34などの分化マーカーについては陰性である。重要なことに、報告されたMSCマーカー（CD29、CD44、CD49e、CD90およびCD166）について陽性に染色される細胞の区別し得る部分集団のみが、ABCB5について陽性に染色され、一方、これらの抗原を発現する細胞のうちの大部分は、ABCB5について陰性であることが見出された。このことは、ABCB5+細胞が、間葉系幹細胞の中のユニークな新規の部分集団を表すことを実証している。

【0111】

本発明者らは、ABCB5が、複能性間葉系幹細胞についての、現在利用可能なMSC抗原よりも特異的なマーカーを表すか否かを調べるために、ABCB5+真皮幹細胞の複能分化可塑性を、ABCB5-細胞に対して、in vitroおよびin vivoで評価した。

【0112】

本発明者らは、健康なヒト志願者に由来する解離した皮膚細胞懸濁液からの陽性選択により単離されたABCB5+細胞の分化能を調べ、ABCB5-真皮線維芽細胞の分化能と比較した（図1）。ABCB5+またはABCB5-細胞を、神経原性、血管原性、筋原性、骨原性または脂肪生成の系列を誘導する培地において培養し、それらの分化可塑性を、系列特異的マーカー（すなわち、スペクトリン-筋形成、CD31-血管新生、TUJ1-神経発生、オイルレッド-脂肪生成、およびアリザリンレッド-骨形成）のRNAおよびタンパク質発現の誘導を測定すること、ならびに系列に特徴的な形態学的変化により評価した（図1）。ABCB5+真皮細胞のみが、3つ全ての胚性系列（すなわち、外胚葉性（神経発生）、中胚葉性（筋形成）および内胚葉性（血管新生）の系列）を生じることができ、ABCB5-真皮細胞はこれができなかった（図1）。

【0113】

ヒトABCB5+真皮MSCの分化可塑性をさらに精査し、in vivoでのそれらのニッチ非依存的な複能分化についての能力を決定するために、本発明者らは、急性筋損傷モデルにおける、ヒトABCB5+皮膚由来細胞の、ABCB5-皮膚由来細胞に対する、in vivoでの筋再生能力を調べた。ABCB5+およびABCB5-皮膚細胞を、重篤に易感染性状態であるNOD/SCID/IL2R^{-/-}（NSG）マウスの心臓毒を注射した前脛骨（TA）筋に注射した。ヒトABCB5+およびABCB5-細胞をヒト特異的2-ミクログロブリン、-サルコグリカンおよびスペクトリンと共に注射したマウス筋肉の代表的な免疫蛍光染色を得た。DAPIで核を可視化

10

20

30

40

50

する。注射された筋肉、および注射されていない対照筋肉を、移植の2週間後に採取し、ヒト由来の全細胞を同定するヒト特異的 2 ミクログロブリン (2 M)、ならびに、分化したヒト筋細胞により特異的に発現されるがマウス筋細胞によっては発現されないヒト特異的スベクトリン (SPTBN1) およびデルタ - サルコグリカン (SGCD) の発現について調べた。免疫染色により、 2 M + ヒト細胞 in both ABCB5 + 細胞およびABCB5 - 細胞を注射された筋肉の存在が明らかとなり、このことは、移植および生着の成功の指標であるが、一方で、ABCB5 + を注射されたTA筋肉のみが、SPTBN1 + およびSGCD + の分化した筋細胞を含んだ。注射された筋肉および注射されていない対照筋肉のリアルタイムPCR分析は、ABCB5 + 細胞およびABCB5 - 細胞を注射した筋肉における、ヒト特異的 2 M 転写物の発現を示し、ヒト特異的SPTBN1およびSGCD転写物の発現は、ABCB5 + 細胞を注射された筋肉においてのみ示された。したがって、ABCB5は、現在利用可能なMSC抗原に対して実質的に増強された差別的マーカー機能を有する、複能性ヒト真皮間葉系幹細胞についての高度に特異的なマーカーを表す。これらの知見は、幹細胞に基づく組織再生のための新規の細胞ソースとしてのABCB5 + 真皮MSCの能力を強調する。

【 0 1 1 4 】

例 2 : Abcb5ノックアウトマウスの幹細胞欠損表現型

発生および幹細胞の機能におけるABCB5の役割をさらに精査するために、本発明者らは、第1のコンディショナルAbcb5ノックアウト (KO) マウスを作製した。近年までに、ABCB5タンパク質の機能は、ホモ・サピエンスにおいて広汎に研究された。ヒトABCB5遺伝子は、細胞外および細胞内の両方のATP結合ドメインに挟まれた5つの膜貫通ヘリックスを有する、812アミノ酸 (AA) のタンパク質をコードする¹。本発明者らの先の研究は、本発明者らのモノクローナル抗ABCB5抗体のクローンのうちの1つである、ヒトABCB5タンパク質のアミノ酸残基493~508を含む細胞外ループを標的とする3D2-1D12が、ABCB5により媒介されるローダミン-123色素の排出、膜の分極、およびドキシソルピシン輸送を阻害することを明らかにし^{1, 2, 5}、このことは、当該分子のこの細胞外ループ領域の決定的な機能的な重要性を実証している。本発明者らはまた、先に、対応するABCB5のマウス相同体であるマウスAbcb5をクローニングした^{2, 3}。マウスにおけるAbcb5機能を妨害するために、マウス分子の相同部分を標的とした。UCSC Blat検索エンジンを用いて、本発明者らは、3C2-1D12 ABCB5 mAb結合エピトープと相同なAbcb5タンパク質ドメインをコードするマウスゲノム領域が、エクソン23によりコードされることを同定した。この知見に基づいて、2つのloxP部位がマウスエクソン23を挟むように挿入されたコンディショナルKOコンストラクトを設計した (図2)。

【 0 1 1 5 】

機能の完全な喪失の結果を決定するために、接合体期のマウス胚においてCreリコンビナーゼを発現するElla-Cre導入遺伝子を用いてAbcb5遺伝子のエクソン23を削除した^{4, 8, 9}。loxP部位の間のゲノム領域の欠失は、ゲノムDNAのPCRにより確認した。ヘテロ接合性Abcb5ヌル/WTマウスを交雑し、ホモ接合Abcb5ヌル/ヌル変異体を作製し、Abcb5ヌル/ヌル変異体におけるAbcb5の発現および機能の喪失を、フローサイトメトリー分析およびローダミン-123排出アッセイにより確認した¹ (図3)。

【 0 1 1 6 】

相対的な静止状態は、多様な哺乳動物の幹細胞集団に起因する顕著な特徴の1つである^{5, 10}。皮膚幹細胞は、Bickenbach^{5, 1}、Morris^{5, 2} およびCotsarelis^{5, 0} により開発されたいわゆる「パルスチェイス (pulse and chase) 」DNA標識実験的アプローチを用いて、周期が遅い細胞として初めに同定された。これらのアプローチは、細胞周期の複製期 (S期) の間の、標識されたチミジンアナログ、ウリジンの、核DNA中への組み込みに依存する。第1に、DNA標識または「パルス」期の間に、細胞または動物を、放射活性により、または化学的に標識されたウリジン (例えばプロモデオキシウリジン、BrdU) に暴露する。該ウリジンは次いで、各細胞分裂の間に核DNA中に組み込まれる。標識されたウリジン (例えばBrdU) 暴露を、次いで「チェイス」期の間に取り除き、その後、頻繁に分裂する細胞により、約48~72時間の経過にわたり、標識が失われる。周期の遅い細胞は、し

かし、長期間にわたりDNA標識を保持することができる；例えば、マウス毛包のバルジ領域幹細胞は、少なくとも4週間にわたり放射活性標識されたウリジンを保持することができ⁵⁰、したがって、「標識保持細胞」と名付けられる。

【0117】

ABCB5が、哺乳動物の皮膚における、示された幹細胞表現型と一致する休止状態の標識保持細胞集団を同定するか否か、および幹細胞の休止状態の維持のために完全なABCB5の機能が必要であるか否かを決定するために、本発明者らは、Abcb5 WTおよびAbcb5 KOマウスにおいて、*in vivo*でBrdU標識実験を行った。BrdUは、非放射活性ウリジン誘導体であって、蛍光標識された抗BrdU抗体を用いて検出することができる。マウスは、分裂が遅い細胞を標識するように設計された、9日間の毎日の全身(*i.v.*) BrdU投与の「パルス」に供され、その後、BrdU処置の停止の後、4週間の無BrdUの「チェイス」期に供される。解離した全層皮膚細胞懸濁液中のBrdU保持細胞のパーセンテージを、次いで、抗BrdU抗体染色およびフローサイトメトリーを用いて、Abcb5 WTマウスとAbcb5 KOマウスとの間で比較した。細胞を、これにより、細胞周期の位置に関する細胞の一覧および特徴づけのために、全DNAに結合する7-アミノ-アクチノマイシンD(7-AAD)色素で共染色した(図4)。フローサイトメトリー分析は、4週間の「チェイス」の後で、Abcb5 WTマウス中の全BrdU陽性(すなわち標識保持細胞)がG0期において見出されたこと(図4B、ゲートR1)、およびこの集団は、Abcb5 KOマウスにおいて74%減少したこと(図4C、ゲートR1)を明らかにした。さらに、Abcb5 KOマウスに由来する全層皮膚細胞懸濁液は、Abcb5 WTマウスに由来するものと比較して67%多いS/G2/M期における増殖中のBrdU陰性細胞を示し(図4Bおよび4C、ゲートR2)た。このことは、正常なABCB5機能の抑止が、正常では休止状態にあるABCB5+細胞の細胞増殖を誘導することを示している。

【0118】

この観察と一致して、細胞周期制御に関与する84細胞の遺伝子(SABiosciences、カタログ番号PAMM-020)のリアルタイムPCR分析は、p53シグナル伝達、G1/Sチェックポイント制御、サイクリンおよび細胞周期制御、ならびにカルシウムシグナル伝達経路を含む、幾つかの古典的な細胞周期経路に関与する22の分子(G0/G1細胞周期チェックポイントおよび細胞の休止状態を制御するp53ファミリー(p53およびp63)ならびにcKipファミリー(p21およびp27)のメンバーを含む)の、Abcb5 KOマウスにおける著しい下方調節を明らかにした(図5)。

【0119】

これらの結果は、ABCB5が細胞周期の進行を調節し、幹細胞の休止状態の維持のために必要とされることを示す。ABCB5機能の抑止は、G0/G1細胞周期の進行の重要な負の制御の抑制、および細胞増殖の増大をもたらす。細胞周期からの離脱は、正常な分化のための必須要件であり、それができないことが、以下の記載されるAbcb5 KOマウスにおける正常な創傷治癒の障害を説明し得る。データはさらに、哺乳動物の皮膚からの幹細胞の単離のための機能的に適切なマーカーとしてのABCB5の好適性を支持する。

【0120】

例3: Abcb5ノックアウトマウスにおける創傷治癒の障害

創傷治癒は、4つの連続する期: 止血、炎症、増殖および瘢痕形成によるリモデリングを通して進行する、複雑な現象である⁵³。本発明者らは、Abcb5 WTおよびAbcb5 KOマウスを用いて、正常な創傷治癒のために完全なABCB5の機能が必要とされるか否かを調べた。1 cm²の皮膚および脂肪層を取り除くことにより全層皮膚創傷を作製し、その後、創傷治癒の初期の増殖期の間、7日にわたり、マウスを観察した。外科的手順の直後、および組織の採取の時点(第7日)に創傷を撮影した。実験の終了時に保存したデジタル写真を、対応する最初の写真と比較して、マウスの遺伝的状態について知らされていない2人の独立した観察者により、定量的に分析した。

【0121】

これにより、創傷閉鎖は、先に記載されるように⁵⁴、Image Jソフトウェアパッケージ(NIH, Bethesda, MD)を用いて、面積測定分析により得られた測定値に基づいて、元

10

20

30

40

50

の創傷のパーセンテージとして計算した。データは、不均等な分散を説明するウェルチ補正を用いる対応のない (unpaired) t 検定を用いて比較した。Abcb5 KOマウス ($n = 15$) は、Abcb5 WTマウス ($n = 19$) と比較して、著しく遅延した創傷閉鎖を示した ($63.64 \pm 7.6\%$ 対 $87.33 \pm 3.4\%$ 、平均値 \pm SEM、 $P = 0.01$) (図6)。さらに、両群において、スキャンしたH&E染色された第7日の創傷の断面において、Aperio Image Scope software (Vista, CA) を用いて、炎症間質厚を測定し、Abcb5 KO創傷は、Abcb5 WT創傷と比較して著しく増大した炎症間質厚を示した ($820.2 \pm 65.6 \mu\text{m}$ 対 $590.0 \pm 38.8 \mu\text{m}$ 、平均値 \pm SEM、 $P = 0.003$) (図6)。

【0122】

新血管新生は、創傷再生の初期ステージの特徴の1つであり、低酸素により誘導される過剰な筋線維芽細胞増殖の制御 (これはケロイド瘢痕形成に寄与すると考えられる) のために重要である (55において概説される)。先の研究は、創傷血管新生は、主に、既存の血管からの新たな血管の出芽を通して達成され、新たに形成された血管のうちの一部は、骨髓前駆体細胞に起源し得ることを示した^{5,6}。他の常在幹細胞集団の創傷血管新生への寄与は不明である。本発明者らの、ヒトメラノーマ脈管形成^{2,8}におけるABCB5+細胞の決定的役割の先の観察に基づいて、本発明者らは、完全なABCB5の機能がまた、創傷を受けた皮膚における効率的な血管形成のために必須であり得るという仮説を立てた。この提案の最終版以来生じたさらなる予備研究においてこの仮説を試験するために、上記のように作製されたマウス皮膚創傷における血管形成を、Abcb5 KOマウスとAbcb5 WTマウスにおいて、創傷作成の7日後において、内皮マーカーCD31の発現を、創傷床内の血管形成された層 (strata / layer) の厚みに関して、血管形成されていない層に対して比較することにより分析した。血管性のCD31陽性および無血管性のCD31陰性の層の厚みを、両群において、スキャンされたCD31染色された第7日の創傷断面において、Aperio Image Scopeソフトウェア (Vista, CA) を用いて測定し、Abcb5 KO創傷は、Abcb5 WT創傷と比較して、有意に減少した血管層の厚み ($278.5 \pm 51.45 \mu\text{m}$ 対 $469.2 \pm 40.30 \mu\text{m}$ 、平均値 \pm SEM、 $P = 0.0069$)、および有意に増大した無血管層の厚み ($626.2 \pm 41.18 \mu\text{m}$ 対 $324.5 \pm 28.55 \mu\text{m}$ 、平均値 \pm SEM、 $P < 0.0001$) を示した (図7)。

【0123】

増殖中のCD31陽性血管が、多様な長さに伸びた、よく形成された管腔を備えた分枝チャネルを形成した野生型の動物と比較して、ABCB5 KOの動物からの類似の領域は、局所的に、CD31陽性の構造を相対的に欠くか、または時々単発のCD31陽性細胞またはCD31陽性細胞の小さなクラスターと混じった小血管プロフィールからなった。これらの後者のCD31陽性細胞は、効率的かつ生産的な治癒応答のために必要とされる成熟血管の分枝ネットワークの形成のために必要な、血管原性の出芽が可能な細管へと分化することができないことを反映すると考えられる (図8)。

【0124】

この観察と一致して、血管新生に関与する84の遺伝子 (SABiosciences、カタログ番号PAMM-024Z) のリアルタイムPCR分析は、Abcb5 KO創傷における血管新生促進性サイトカイン、すなわち、Csf3、Cxcl2、Il1b、Ifng、LepおよびMdkの下方調節、ならびに既知の抗血管新生分子であるホスファチジルセリン受容体Bai1の上方調節を明らかにし (図9)、Abcb5 KO創傷において観察された高度に阻害された異常な血管新生パターンについての最初の説明を提供した。

【0125】

これらの結果は、Abcb5 KOマウスにおける、創傷閉鎖の遅延、増大した炎症間質厚および異常な血管新生により特徴づけられる障害された創傷治癒を実証し、さらに、ABCB5の、したがって正常な皮膚創傷治癒におけるABCB5+間葉系幹細胞の、重要な機能的役割を支持する。

【0126】

例4：NSGマウスにおける再生的創傷治癒に対するヒトABCB5+真皮MSCの効果

10

20

30

40

50

本発明者らは、以下の4つの処置ステップを用いて、INTEGRA（登録商標）処置されたNSGマウスにおける創傷治癒に対するヒトABCB5 + 真皮MSCの効果を調べた：（1）処置なし；（2）INTEGRA（登録商標）；（3）INTEGRA（登録商標）を 1×10^6 のABCB5 + 真皮MSCと共に注射したもの；ならびに（4）INTEGRA（登録商標）を 1×10^6 のABCB5陽性真皮細胞と共に注射したもの（図10B）。すべての動物において、図6において記載されるように 1 cm^2 の皮膚および脂肪層を取り除くことにより、全層皮膚創傷を作製した。群2、3および4における各創傷に、ただちに 1 cm^2 のINTEGRA（登録商標）移植片を移植し、その後、 1×10^6 のABCB5 + 細胞（群3）または 1×10^6 のABCB5 - 細胞（群4）のいずれかのINTEGRA（登録商標）内注射を行った。実験群2においては、細胞は注射されなかった。群1は、未処置の実験の対照として用いた。手順の14日後において、INTEGRA（登録商標）、周囲の皮膚およびその下の筋肉組織からなる創傷組織を採取した。すべての群において、スキャンされたH&E染色された第14日の創傷断面において、Aperio Image Scope software（Vista, CA）を用いて炎症間質厚を測定した。定量的分析は、INTEGRA（登録商標）およびABCB5 + ヒト真皮MSCで処置されたマウスが、INTEGRA（登録商標）およびABCB5 - 真皮細胞で処置されたマウス（ $608.0 \pm 46.7 \mu\text{m}$ 対 $855.4 \pm 69.8 \mu\text{m}$ 、平均値 \pm SEM、 $P = 0.009$ ）、INTEGRA（登録商標）単独で処置されたマウス（ $874.7 \pm 43.3 \mu\text{m}$ 、 $P = 0.0001$ ）、または未処置のマウス（ $1014.4 \pm 49.4 \mu\text{m}$ 、 $P < 0.0001$ ）と比較して、著しく減少した炎症間質厚を示すことを明らかにした。INTEGRA（登録商標）単独で処置されたマウスと、INTEGRA（登録商標）およびABCB5 - 真皮細胞で処置されたマウスとの間に、差異は観察されなかった。INTEGRA（登録商標）のみによる処置は、炎症間質厚を、未処置の創傷と比較して中程度に減少した（図10A）。注射されたヒト細胞集団の生存を保証するために、移植片、ヒト起源の全細胞の識別因子であるヒト特異的 α 2ミクログロブリン（ $\alpha 2\text{M}$ ）の発現について、さらに調べた。免疫染色により、細胞を注射したINTEGRA（登録商標）移植片中の $\alpha 2\text{M}$ + ヒト細胞クラスターならびに個々の $\alpha 2\text{M}$ + ヒト細胞の存在が明らかとなった。（図10C）。ABCB5 + またはABCB5 - のいずれかのヒト真皮細胞を注射されたINTEGRA（登録商標）移植片のリアルタイムPCR分析はまた、ヒト特異的GAPDHおよび $\alpha 2\text{M}$ の転写物の発現を示した。これらは、予測されたとおり、注射されていないINTEGRA（登録商標）のみで処置された対照（図10D）においては検出可能ではなかった。したがって、移植可能なINTEGRA（登録商標）マトリックス中への注射の後の、生ABCB5 + 真皮MSCまたは生ABCB5 - 真皮細胞の生着および維持の成功にもかかわらず、ABCB5 + 真皮MSCの移植のみが、創傷を受けたNSGマウスにおいて、炎症間質厚をさらに減少させ、ABCB5 - ヒト真皮細胞はこれを減少させなかった。このことは、この新規のMSC集団の、再生的創傷治癒をさらに増強するための治療上の特異的な有用性についての、初めの原理証明を提供した。

【0127】

例5：ヒト化マウスモデル

マウスモデルは、ヒト疾患の研究のために広く用いられているが、一方で、ヒトと非ヒト種との間では創傷治癒プロセスにおいて実質的な差異が存在する³¹。この理由から、全層ヒト皮膚移植片を免疫不全マウス³²に移植する代替的モデルを用いた。このモデルにおいては、皮膚移植片は、ヒト皮膚に組織学的に近似し、それらのヒト表現型を少なくとも3か月間維持する。形成手術の間に取り除かれた廃棄された正常な成人皮膚試料を、8週齢の免疫不全NSGマウスへのヒト皮膚移植のために用いた（図11A、B）。ヒト皮膚異種移植片の創傷形成は図11Cにおいて示すように、正常なヒト創傷治癒パターンをもたらした。

【0128】

さらに、本発明者らは、ヒト患者における再生的な創傷治癒に対するINTEGRA（登録商標）スカフォールド移植の効果を、移植を受けていない創傷から（図12、上のパネル）、またはINTEGRA（登録商標）スカフォールド移植片を移植されたヒト患者の創傷から（図12、下のパネル）得た生検において試験した。比較分析により、瘢痕形成（INTEGRA

(登録商標)なし、図12、上のパネル)またはスカフォールドにより誘導される再生の結果としての、治癒応答の免疫組織化学的プロファイルが明らかとなった。これは、創傷を有するスカフォールド(INTEGRA(登録商標)、図12、下のパネル)におけるアクチンを発現する筋線維芽細胞の再整列、および著しく増強されたABCB5+真皮細胞の発現により特徴づけられる。

【0129】

これらの結果は、INTEGRA(登録商標)スカフォールドの移植およびその結果としてのABCB5+真皮MSCの動態化が、瘢痕形成を介する創傷治癒とは対照的に、再生的な創傷治癒を優先的に誘導することを示す。したがって、ヒトABCB5+真皮MSCは、INTEGRA(登録商標)により媒介される再生的な創傷治癒を、著しくかつ選択的にさらに増強し(図10)、翻訳的に最も適切なヒト皮膚創傷治癒実験において、ヒトABCB5+真皮MSC/INTEGRA(登録商標)スカフォールド共移植の治療的効力を実証する。

10

【0130】

真皮間葉系幹細胞は、正常な治癒応答が、漸進的な創傷閉鎖および生理学的な瘢痕形成をもたらす整然たる様式において起こるためのバランスを提供するために必要とされる。本発明者らは、Abcb5 KOマウスにおいて損なわれた真皮幹細胞機能は、不十分な治癒または過剰な治癒のいずれかとなり得る異常な創傷治癒応答をもたらすことを予想した。治癒の欠損は、褥瘡において観察されるような皮下組織の喪失として、または静脈性潰瘍において観察されるような再上皮化の不全として、または糖尿病性潰瘍において観察されるような壊死 感染の併発として、顕れ得る。組織学的には、創傷治癒の欠損は、過剰な好中球浸潤、およびコラーゲン破壊をもたらすMMP-9コラゲナーゼ分泌の増加³により特徴づけられ得る。対照的に、肥厚性瘢痕は、増幅された炎症応答と、その結果であるTGF- β 8を含む増殖因子の過剰産生とに起因するコラーゲン沈着の増加により特徴づけられる。

20

【0131】

参考文献

【表1-1】

1. Frank, N.Y. et al. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem* 278, 47156-65 (2003).
2. Ko, S.H. et al. The role of stem cells in cutaneous wound healing: what do we really know? *Plast Reconstr Surg* 127 Suppl 1, 10S-20S.
3. Diegelmann, R.F. & Evans, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 9, 283-9 (2004).
4. Sarkar, A., Tatlidede, S., Scherer, S.S., Orgill, D.P. & Berthiaume, F. Combination of stromal cell-derived factor-1 and collagen-glycosaminoglycan

30

【表 1 - 2】

- scaffold delays contraction and accelerates reepithelialization of dermal wounds in wild-type mice. *Wound Repair Regen* 19, 71-9.
5. Yannas, I.V., Lee, E., Orgill, D.P., Skrabut, E.M. & Murphy, G.F. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 933-7 (1989).
 6. Yannas, I.V., Orgill, D.P. & Burke, J.F. Template for skin regeneration. *Plast Reconstr Surg* 127 Suppl 1, 60S-70S.
 7. Badiavas, E.V. & Falanga, V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Arch Dermatol* 139, 510-6 (2003).
 8. Falanga, V. et al. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng* 13, 1299-312 (2007). 10
 9. Navsaria, H.A., Ojeh, N.O., Moiemen, N., Griffiths, M.A. & Frame, J.D. Reepithelialization of a full-thickness burn from stem cells of hair follicles micrografted into a tissue-engineered dermal template (Integra). *Plast Reconstr Surg* 113, 978-81 (2004).
 10. Schurr, M.J. et al. Phase I/II clinical evaluation of StrataGraft: a consistent, pathogen-free human skin substitute. *J Trauma* 66, 866-73; discussion 873-4 (2009).
 11. Toma, J.G. et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3, 778-84 (2001). 20
 12. Toma, J.G., McKenzie, I.A., Bagli, D. & Miller, F.D. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* 23, 727-37 (2005).
 13. Fernandes, K.J. et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol* 6, 1082-93 (2004).
 14. Bartsch, G. et al. Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells Dev* 14, 337-48 (2005).
 15. Biernaskie, J.A., McKenzie, I.A., Toma, J.G. & Miller, F.D. Isolation of skin-derived precursors (SKPs) and differentiation and enrichment of their Schwann cell progeny. *Nat Protoc* 1, 2803-12 (2006).
 16. Chen, F.G. et al. Clonal analysis of nestin(-) vimentin(+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *J Cell Sci* 120, 2875-83 (2007). 30
 17. Lavoie, J.F. et al. Skin-derived precursors differentiate into skeletogenic cell types and contribute to bone repair. *Stem Cells Dev* 18, 893-906 (2009).
 18. Kuroda, Y. et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 8639-43.
 19. Wilson, B.J. et al. ABCB5 identifies a therapy-refractory tumor cell population in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 71, 5307-16 (2011).
 20. Frank, N.Y. et al. VEGFR-1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth. *Cancer Res* 71, 1474-85 (2011).
 21. Ma, J. et al. Isolation of tumorigenic circulating melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 402, 711-7. 40
 22. Schatton, T. et al. Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells. *Cancer Res* 70, 697-708.
 23. Frank, N.Y. & Frank, M.H. ABCB5 gene amplification in human leukemia cells. *Leuk Res* 33, 1303-5 (2009).
 24. Schatton, T. et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451, 345-9 (2008).
 25. Frank, N.Y. et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res* 65, 4320-33 (2005).

【表 1 - 3】

26. Kim, S. et al. Identification of human ABCB5+ dermal progenitor cells with multipotent differentiation plasticity. in *Society of Investigative Dermatology, 2010 Annual Meeting* Vol. 130 (Supplement 1S) S107 (Abstract 642). (Journal of Investigative Dermatology Atlanta, 2010).
27. Cheung, S.T., Cheung, P.F., Cheng, C.K., Wong, N.C. & Fan, S.T. Granulin-epithelin precursor and ATP-dependent binding cassette (ABC)B5 regulate liver cancer cell chemoresistance. *Gastroenterology* 140, 344-55.
28. Frank, N.Y., Schatton, T. & Frank, M.H. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* 120, 41-50.
29. Gazzaniga, P. et al. CD133 and ABCB5 as stem cell markers on sentinel lymph node from melanoma patients. *Eur J Surg Oncol* 36, 1211-4. 10
30. Sharma, B.K., Manglik, V. & Elias, E.G. Immuno-expression of human melanoma stem cell markers in tissues at different stages of the disease. *J Surg Res* 163, e11-5.
31. Cohen, I.K. & Mast, B.A. Models of wound healing. *J Trauma* 30, S149-55 (1990).
32. Yan, H.C. et al. Human/severe combined immunodeficient mouse chimeras. An experimental in vivo model system to study the regulation of human endothelial cell-leukocyte adhesion molecules. *J Clin Invest* 91, 986-96 (1993).
33. Gottesman, M.M. How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res* 53, 747-54 (1993). 20
34. Bosch, I., Dunussi-Joannopoulos, K., Wu, R.L., Furlong, S.T. & Croop, J. Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine behave as substrates of the human MDR1 P-glycoprotein. *Biochemistry* 36, 5685-94 (1997).
35. Frank, M.H. et al. Specific MDR1 P-glycoprotein blockade inhibits human alloimmune T cell activation in vitro. *J Immunol* 166, 2451-9 (2001).
36. van Helvoort, A. et al. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 87, 507-17 (1996).
37. Bunting, K.D., Galipeau, J., Topham, D., Benaim, E. & Sorrentino, B.P. Effects of retroviral-mediated MDR1 expression on hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation in culture. *Ann N Y Acad Sci* 872, 125-40; discussion 140-1 (1999). 30
38. Randolph, G.J. et al. A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6924-9 (1998).
39. Gollapudi, S. & Gupta, S. Anti-P-glycoprotein antibody-induced apoptosis of activated peripheral blood lymphocytes: a possible role of P-glycoprotein in lymphocyte survival. *J Clin Immunol* 21, 420-30 (2001).
40. Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Tainton, K.M. & Smyth, M.J. A role for P-glycoprotein in regulating cell death. *Leuk Lymphoma* 38, 1-11 (2000).
41. Chaudhary, P.M. & Roninson, I.B. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 66, 85-94 (1991).
42. Zhou, S. et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7, 1028-34 (2001). 40
43. Spangrude, G.J., Brooks, D.M. & Tumas, D.B. Long-term repopulation of irradiated mice with limiting numbers of purified hematopoietic stem cells: in vivo expansion of stem cell phenotype but not function. *Blood* 85, 1006-16 (1995).
44. Zijlmans, J.M. et al. Modification of rhodamine staining allows identification of hematopoietic stem cells with preferential short-term or long-term bone marrow-repopulating ability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8901-5 (1995).

【表 1 - 4】

45. Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S. & Mulligan, R.C. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183, 1797-806 (1996).
46. Goodell, M.A. et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 3, 1337-45 (1997).
47. Leemhuis, T. et al. Isolation of primitive human bone marrow hematopoietic progenitor cells using Hoechst 33342 and Rhodamine 123. *Exp Hematol* 24, 1215-24 (1996).
48. Hutcheson, D.A. & Kardon, G. Genetic manipulations reveal dynamic cell and gene functions: Cre-ating a new view of myogenesis. *Cell Cycle* 8, 3675-8 (2009). 10
49. Lakso, M. et al. Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5860-5 (1996).
50. Cotsarelis, G., Sun, T.T. & Lavker, R.M. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61, 1329-37 (1990).
51. Bickenbach, J.R. Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J Dent Res* 60 Spec No C, 1611-20 (1981).
52. Morris, R.J., Fischer, S.M. & Slaga, T.J. Evidence that the centrally and peripherally located cells in the murine epidermal proliferative unit are two distinct cell populations. *J Invest Dermatol* 84, 277-81 (1985). 20
53. Erba, P., Ogawa, R., Vyas, R. & Orgill, D.P. The reconstructive matrix: a new paradigm in reconstructive plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 126, 492-8.
54. Peng, C. et al. Lack of FGF-7 Further Delays Cutaneous Wound Healing in Diabetic Mice. *Plast Reconstr Surg* 128, 673e-84e.
55. Schafer, M. & Werner, S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 628-38 (2008).
56. Tepper, O.M. et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood* 105, 1068-77 (2005).
57. Lau, K., Paus, R., Tiede, S., Day, P. & Bayat, A. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Exp Dermatol* 18, 921-33 (2009). 30
58. Colwell, A.S., Phan, T.T., Kong, W., Longaker, M.T. & Lorenz, P.H. Hypertrophic scar fibroblasts have increased connective tissue growth factor expression after transforming growth factor-beta stimulation. *Plast Reconstr Surg* 116, 1387-90; discussion 1391-2 (2005).

【0 1 3 2】

本明細書において引用されるすべての参考文献は、参照により完全に組み込まれる。本発明の少なくとも 1 の態様の幾つかの側面をこのように記載してきたことにより、当業者は、多様な改変、修飾および改善を容易に想起するであろうことが理解されるべきである。かかる改変、修飾および改善は、本開示の一部であることが意図され、本発明の精神および範囲のうちであることが意図される。したがって、上記の説明および図面は、単なる例である。

【図 1】

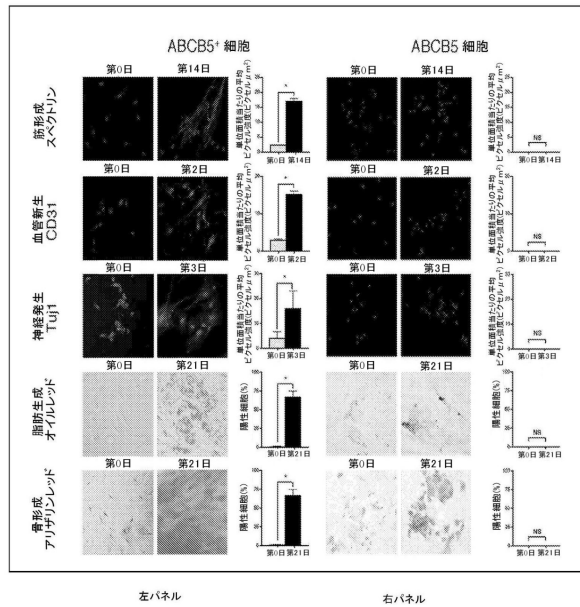


図 1

【図 2】

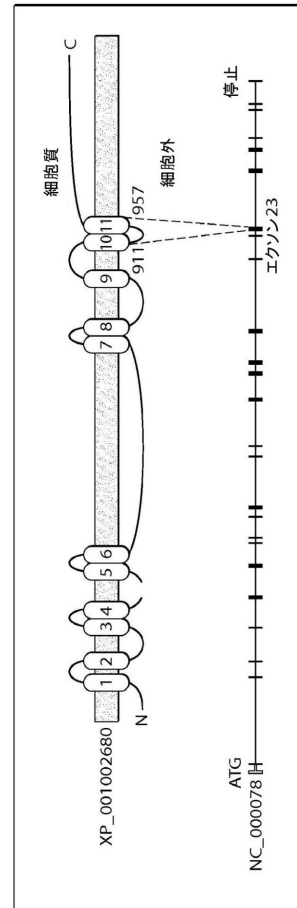


図 2

【図 3】

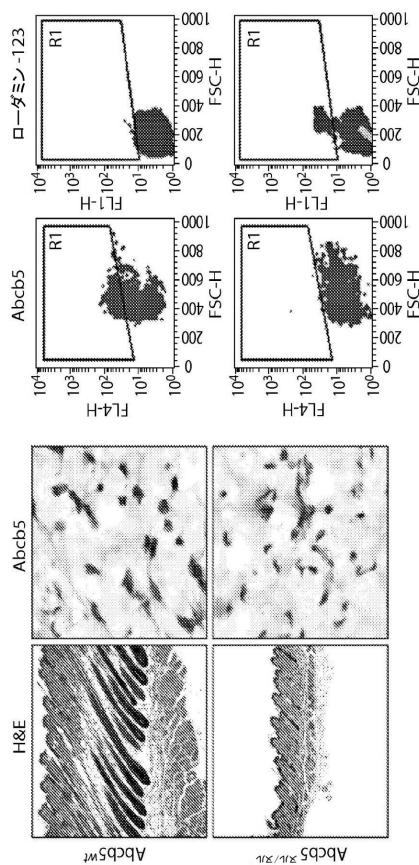


図 3

【図 4】

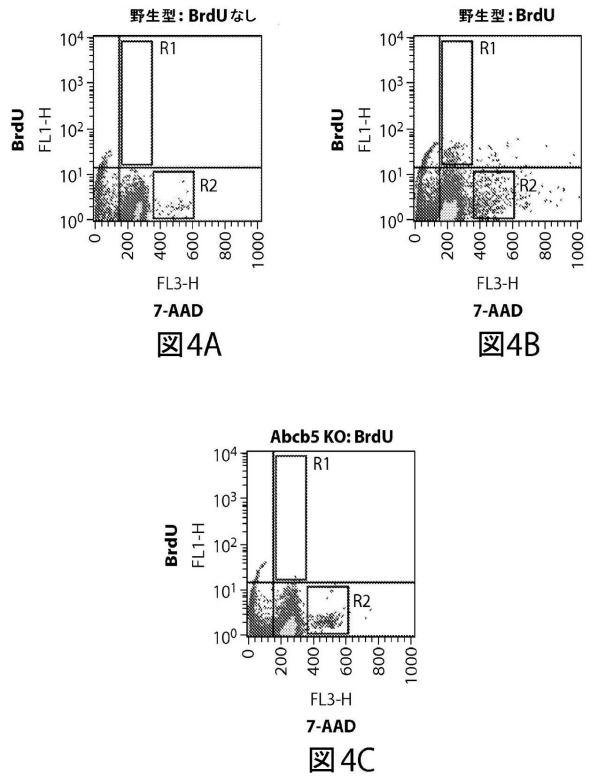


図 4C

【図 5 A】

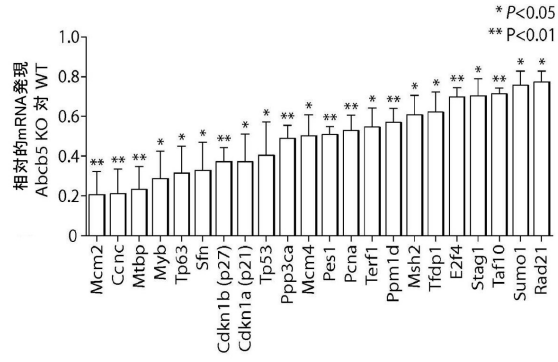


図5A

【図 5 B】

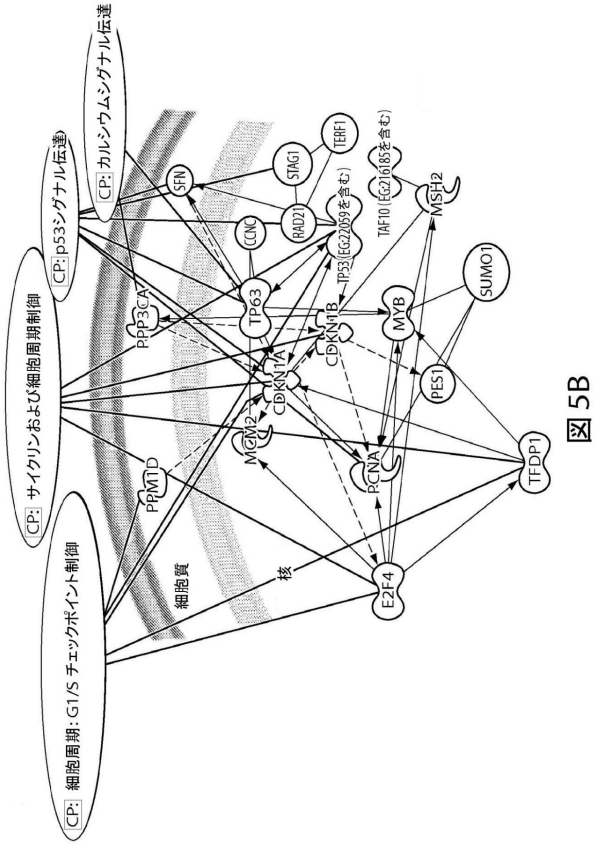


図 5B

【図 6】

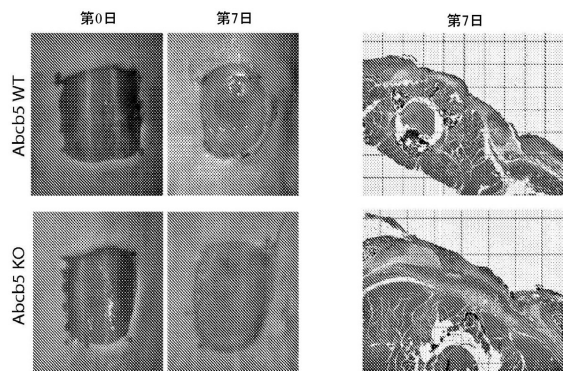


図 6A

図 6B

【図 7 A B】

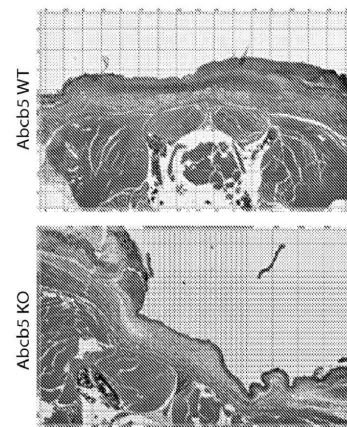


図 7A

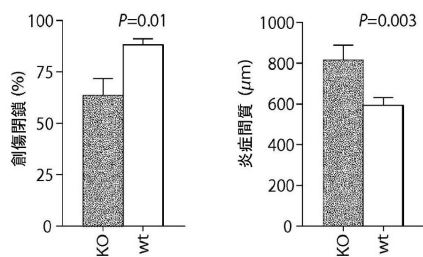


図6C

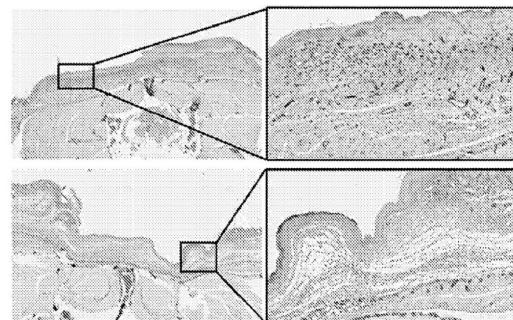


図 7B

【図 7 C】

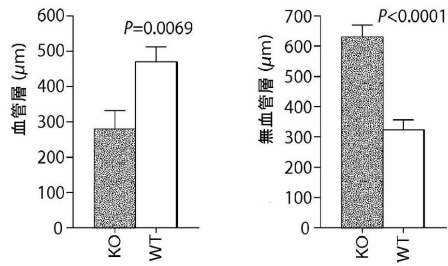


図 7C

【図 8】

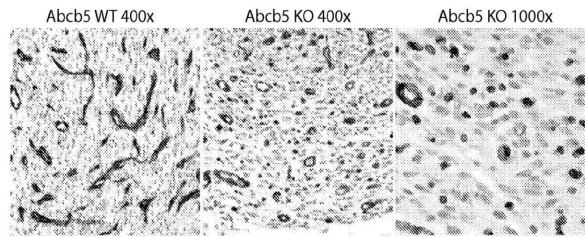


図 8

【図 9】

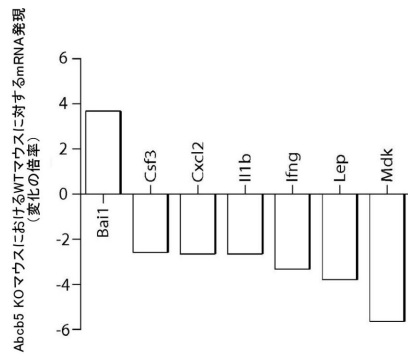


図 9A

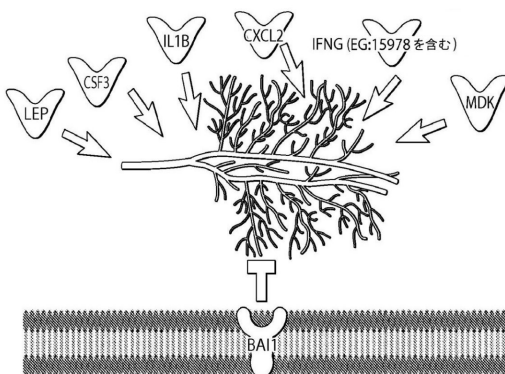


図 9B

【図 10 A】

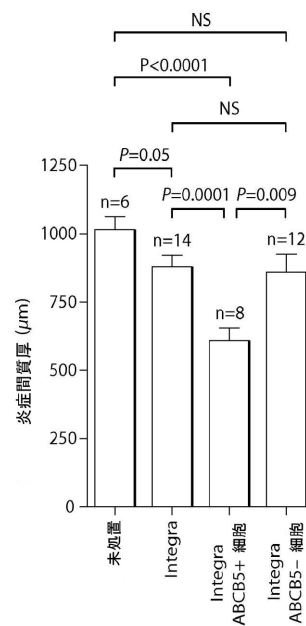


図 10A

【図 10 B - D】

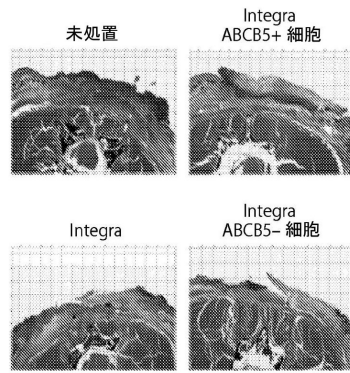


図10B

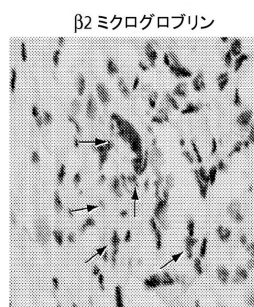


図10C

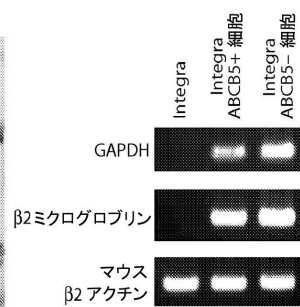


図10D

【図 11 A B】

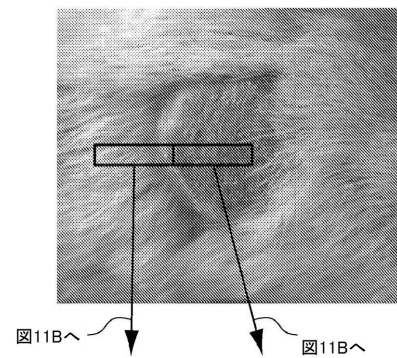


図11A

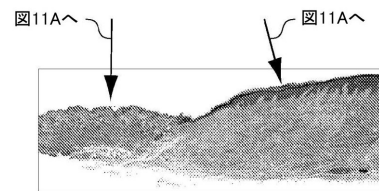


図11B

【図 11 C】

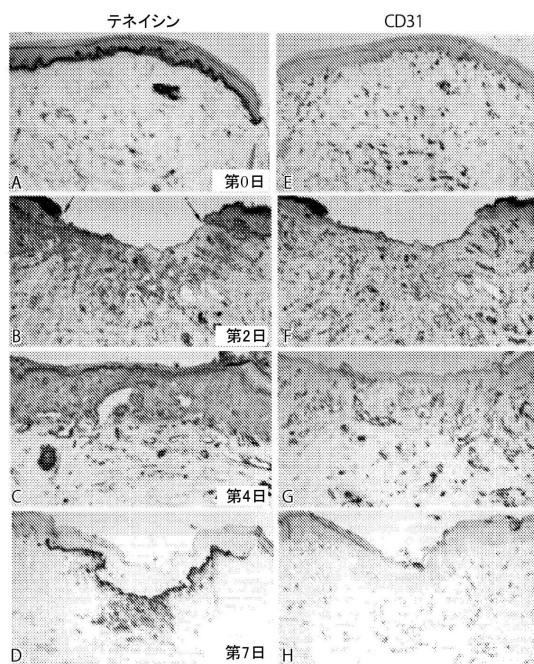


図11C

【図 12】

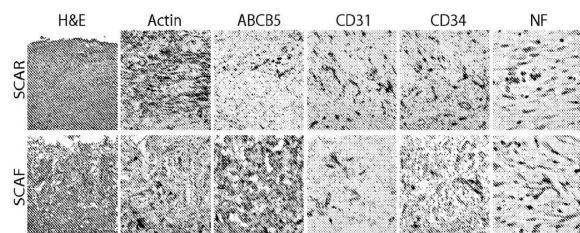


図12

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/02
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1
C 1 2 N	5/0775	(2010.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5
C 1 2 N	5/074	(2010.01)	C 1 2 N 5/0775
A 6 1 K	35/36	(2015.01)	C 1 2 N 5/074
A 6 1 K	35/30	(2015.01)	A 6 1 K 35/36
			A 6 1 K 35/30

(73)特許権者 515311268

ザ ブリガム アンド ウーメンズ ホスピタル インコーポレーテッド
 THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02115、ボストン、ハンティントン アベニュー 1
 01、フォース フロアー、リサーチ ベンチャーズ アンド ライセンシング
 101 Huntington Avenue, 4th Floor, Research Ven-
 tures & Licensing, Boston, MA 02115 U.S.A.

(73)特許権者 515227512

ブイエー ボストン ヘルスケア システム
 VA BOSTON HEALTHCARE SYSTEM
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02130、ボストン、サウス ハンティントン アベニ
 ュー 150
 150 South Huntington Avenue, Boston, MA 02130
 U.S.A.

(74)代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

(72)発明者 フランク, マルクス, エイチ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02138、ケンブリッジ、ブルーワー ストリート 9

(72)発明者 フランク, ナターシャ, ワイ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02138、ケンブリッジ、ブルーワー ストリート 9

(72)発明者 オージル, デニス, ピー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02478、ベルモント、クラフリン ストリート 217

(72)発明者 マーフィー, ジョージ, エフ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02115、ボストン、フランシス ストリート 75、
 パトロジュー デパートメント

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 国際公開第2007/143139(WO, A1)

特表2006-519681(JP, A)

国際公開第2014/130518(WO, A1)

Mol. Cell. Biomech., 2009年, Vol. 6, No. 4, pp. 217-227

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2008年, Vol. 49, No. 12, pp. 5325-5331

Artif. Organs, 2008年, Vol. 32, No. 12, pp. 925-931

J. Tissue Eng. Regen. Med., 2012年, Vol. 6, pp. 125-134

バイオリジカルスキャホールド, 人工臓器, 2011年, Vol. 40, No. 3, pp. 231-235

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8

A 6 1 K 3 6 / 0 6 - 3 6 / 0 6 8

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