(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117337185 A
(43)申请公布日 2024.01.02

(21)申请号 202280035360.8
(22)申请日 2022.06.14
(30)优先权数据
2021-099538 2021.06.15 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.11.15
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/023853 2022.06.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/265021 JA 2022.12.22
(71)申请人 株式会社资生堂
地址 日本东京都
(72)发明人 小坂纱香 松本哲典
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 曾祯 段承恩
(51)Int.Cl.
A61K 35/36(2015.01)

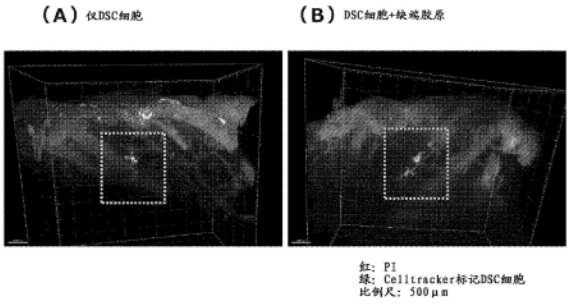
权利要求书2页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

包含缺端胶原和真皮鞘杯(DSC)细胞的组合物、用于将毛发再生的试剂盒、制造用于将毛发再生的组合物的方法和将毛发再生的方法

(57)摘要

本发明提供:一种组合物,包含缺端胶原和真皮鞘杯(DSC)细胞;一种用于将毛发再生的试剂盒,包含:包含缺端胶原的第1剂、和包含真皮鞘杯(DSC)细胞的第2剂;一种制造用于将毛发再生的组合物的方法,包括:将缺端胶原与真皮鞘杯(DSC)细胞进行混合的工序;一种在有需要的对象中将毛发再生的方法,包括:将包含缺端胶原和真皮鞘杯(DSC)细胞的组合物应用于上述对象的皮肤的工序。



CN 117337185 A

1.一种组合物,包含缺端胶原和真皮鞘杯细胞即DSC细胞。

2.根据权利要求1所述的组合物,包含所述缺端胶原0.05(v/v)%~1.25(v/v)%。

3.根据权利要求1或2所述的组合物,所述真皮鞘杯细胞即DSC细胞与所述缺端胶原通过在即将被应用于皮肤前进行混合而被调制。

4.根据权利要求1~3中任一项所述的组合物,为了将毛发再生而使用。

5.根据权利要求1~4中任一项所述的组合物,被用于毛发稀疏和/或脱毛症的治疗。

6.一种用于将毛发再生的试剂盒,包含:包含缺端胶原的第1剂、和包含真皮鞘杯细胞即DSC细胞的第2剂。

7.根据权利要求6所述的试剂盒,在混合所述第1剂与所述第2剂时,以包含所述缺端胶原0.05(v/v)%~1.25(v/v)%的方式调整。

8.根据权利要求6或7所述的试剂盒,所述第1剂与所述第2剂在即将被应用于皮肤前进行混合而被调制。

9.根据权利要求6~8中任一项所述的试剂盒,被用于毛发稀疏和/或脱毛症的治疗。

10.一种制造用于将毛发再生的组合物的方法,包括:将缺端胶原与真皮鞘杯细胞即DSC细胞进行混合的工序。

11.根据权利要求10所述的方法,将所述缺端胶原以包含0.05(v/v)%~1.25(v/v)%的方式混合。

12.根据权利要求10或11所述的方法,将所述缺端胶原与所述真皮鞘杯细胞即DSC细胞在即将应用于皮肤前进行混合而调制。

13.根据权利要求10~12中任一项所述的方法,被用于毛发稀疏和/或脱毛症的治疗。

14.在有需要的对象中将毛发再生的方法,该方法包括:

将包含缺端胶原和真皮鞘杯细胞即DSC细胞的组合物应用于所述对象的皮肤的工序。

15.根据权利要求14所述的方法,在所述组合物中,包含缺端胶原0.05(v/v)%~1.25(v/v)%。

16.根据权利要求14或15所述的方法,所述组合物在即将应用于皮肤前被调制。

17.根据权利要求14~16中任一项所述的方法,被用于毛发稀疏和/或脱毛症的治疗。

18.在有需要的对象中将毛发再生的方法,该方法包括:

(1-1)对所述对象的皮肤应用包含缺端胶原的第1剂的工序;和

(1-2)在应用了所述第1剂的所述皮肤的部位,应用包含真皮鞘杯细胞即DSC细胞的第2剂的工序;

以及/或者

(2-1)对所述对象的皮肤应用所述第2剂的工序;和

(2-2)在应用了所述第2剂的所述皮肤的部位,应用所述第1剂的工序。

19.根据权利要求18所述的方法,所述第1剂包含缺端胶原0.05(v/v)%~1.25(v/v)%。

20.根据权利要求18或19所述的方法,被用于毛发稀疏和/或脱毛症的治疗。

21.缺端胶原和真皮鞘杯细胞即DSC细胞的用途,用于制造用于将毛发再生的药物。

22.根据权利要求21所述的用途,在所述药物中包含所述缺端胶原0.05(v/v)%~1.25(v/v)%。

23.根据权利要求21或22所述的用途,所述缺端胶原与所述真皮鞘杯细胞即DSC细胞通过在即将被应用于皮肤前进行混合而被调制。

24.根据权利要求21～23中任一项所述的用途,被用于毛发稀疏和/或脱毛症的治疗。

25.真皮鞘杯细胞即DSC细胞的用途,用于通过与缺端胶原联合使用从而制造将毛发再生的组合物。

26.根据权利要求25所述的用途,所述缺端胶原以0.05(v/v)％～1.25(v/v)％的浓度被联合使用。

27.一种用于将毛发再生的组合物,其特征在于,包含真皮鞘杯细胞即DSC细胞作为有效成分,在有需要的对象的皮肤的应用了缺端胶原的部位被应用。

28.根据权利要求27所述的组合物,所述缺端胶原以0.05(v/v)％～1.25(v/v)％的浓度被应用。

29.一种包含缺端胶原的组合物,为了促进真皮鞘杯细胞即DSC细胞在皮肤应用部位的植入而使用。

30.根据权利要求27所述的组合物,包含所述缺端胶原0.05(v/v)％～1.25(v/v)％。

包含缺端胶原和真皮鞘杯(DSC)细胞的组合物、用于将毛发再生的试剂盒、制造用于将毛发再生的组合物的方法和将毛发再生的方法

技术领域

[0001] 本发明提供包含缺端胶原和真皮鞘杯(DSC)细胞的组合物、用于将毛发再生的试剂盒、制造用于将毛发再生的组合物的方法以及将毛发再生的方法。

背景技术

[0002] 毛发通过存在于皮肤的毛囊而产生。所谓毛囊,为包围毛发的组织层,由来源于外胚层的毛母(毛母细胞)、内毛根鞘、外毛根鞘、来源于中胚层的真皮毛根鞘、毛乳头等构成。包围毛乳头的毛母细胞通过从毛乳头被供给的营养、蛋白质被诱导而反复进行分裂,角质化从而形成毛发。

[0003] 由于毛发的发育发生问题从而发生毛发稀疏/脱毛症。毛发稀疏/脱毛症中有早秃、斑秃、休止期脱毛症等,频率最多的是早秃。早秃在男性中,主要是通过男性激素的影响而引起的,也被称为雄激素性秃发。毛发一边反复进行由生长期、退行期和休止期构成的毛发周期一边新生。雄激素性秃发是在该毛发周期中生长期变短,细而短的毛发的比例增加从而引起的症状。

[0004] 现在,作为早秃的治疗,主要使用了外用剂米诺地尔、经口药非那雄胺。这些治疗法虽然都确认了有效性、安全性,但不一定对全部早秃有效。

[0005] 此外,作为早秃的治疗,实施了自身植发术。所谓自身植发术,是将从侧头部、后头部采取了的包含发根的毛发移植到自己的脱发部的技术。然而,该技术由于为将自己的毛发向其它位置移植的技术,因此未增加毛发的总数。

[0006] 近年来,开发了对各种疾病的再生医疗技术,在毛发再生领域中也研究开发了新的技术。报导了例如,在毛囊中,提示位于毛囊的再外层的真皮毛根鞘、特别是位于毛球部的底部的真皮鞘杯(dermal sheath cup cell:DSC)细胞具有高的毛囊诱导能力,在移植了DSC细胞的实验中确认到毛发产生(非专利文献1～3)。此外,也显示出DSC细胞为在毛发产生中具有重要的作用的毛乳头(Dermal papilla:DP)细胞的前体细胞,关注集中于DSC细胞(非专利文献4)。

[0007] 现有技术文献

[0008] 非专利文献

[0009] 非专利文献1:Jahoda CA.,et al.,Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells.Nature 1984;311:560-562.

[0010] 非专利文献2:McElwee KJ.,et al.,Cultured peribulbar dermal sheath cells can induce hair follicledevelopment and contribute to the dermal sheath and dermal papilla.J.Invest.Dermatol.2003;121:1267-1275.

[0011] 非专利文献3:Tsuboi R.,et al.,Autologous cell-based therapy for male and female pattern hair loss using dermal sheath cup cells:Arandomized

placebo-controlled double-blinded dose-finding clinical study.J.Am.Acad.Dermatol.2020Jul;83(1):109-116

[0012] 非专利文献4:Rahmani W.,et al.,Hair follicledermal stem cells regenerate the dermal sheath,repopulate the dermal papilla,and modulate hair type.Dev.Cell.2014Dec.8;31(5):543-58.

发明内容

[0013] 发明所要解决的课题

[0014] 本发明的目的是提供有助于毛发的再生的、包含真皮鞘杯(DSC)细胞的新的组合物、试剂盒和制造它们的方法。此外,本发明的目的是提供使用了它们的毛发的再生方法。

[0015] 用于解决课题的手段

[0016] 本发明者们进行了深入研究,结果提示,通过缺端胶原与真皮鞘杯(DSC)细胞进行混合,从而即使在被移植到皮肤的情况下DSC细胞的生存率的维持和向移植组织的植入率也提高,从而完成了本发明。即,本发明包含以下发明。

[0017] [1]一种组合物,包含缺端胶原和真皮鞘杯(DSC)细胞。

[0018] [2]根据项目1所述的组合物,包含上述缺端胶原0.05(v/v)%~1.25(v/v)%。

[0019] [3]根据项目1或2所述的组合物,上述真皮鞘杯(DSC)细胞与上述缺端胶原通过在即将被应用于皮肤前进行混合而被调制。

[0020] [4]根据项目1~3中任一项所述的组合物,为了将毛发再生而使用。

[0021] [5]根据项目1~4中任一项所述的组合物,被用于毛发稀疏和/或脱毛症的治疗。

[0022] [6]一种用于将毛发再生的试剂盒,包含:包含缺端胶原的第1剂、和包含真皮鞘杯(DSC)细胞的第2剂。

[0023] [7]根据项目6所述的试剂盒,在混合上述第1剂与上述第2剂时,以包含上述缺端胶原0.05(v/v)%~1.25(v/v)%的方式调整。

[0024] [8]根据项目6或7所述的试剂盒,上述第1剂与上述第2剂在即将被应用于皮肤前进行混合而被调制。

[0025] [9]根据项目6~8中任一项所述的试剂盒,被用于毛发稀疏和/或脱毛症的治疗。

[0026] [10]一种制造用于将毛发再生的组合物的方法,包括:将缺端胶原与真皮鞘杯(DSC)细胞进行混合的工序。

[0027] [11]根据项目10所述的方法,将上述缺端胶原以包含0.05(v/v)%~1.25(v/v)%的方式混合。

[0028] [12]根据项目10或11所述的方法,将上述缺端胶原与上述真皮鞘杯(DSC)细胞在即将应用于皮肤前进行混合而调制。

[0029] [13]根据项目10~12中任一项所述的方法,被用于毛发稀疏和/或脱毛症的治疗。

[0030] [14]一种方法,是在有需要的对象中将毛发再生的方法,包括:

[0031] 将包含缺端胶原和真皮鞘杯(DSC)细胞的组合物应用于上述对象的皮肤的工序。

[0032] [15]根据项目14所述的方法,在上述组合物中,包含缺端胶原0.05(v/v)%~1.25(v/v)%。

[0033] [16]根据项目14或15所述的方法,上述组合物在即将应用于皮肤前被调制。

[0034] [17]根据项目14～16中任一项所述的方法,被用于毛发稀疏和/或脱毛症的治疗。

[0035] [18]在有需要的对象中将毛发再生的方法,包括:

[0036] (1-1)对上述对象的皮肤应用包含缺端胶原的第1剂的工序;和

[0037] (1-2)在应用了上述第1剂的上述皮肤的部位,应用包含真皮鞘杯(DSC)细胞的第2剂的工序,

[0038] 以及/或者

[0039] (2-1)对上述对象的皮肤应用上述第2剂的工序;和

[0040] (2-2)在应用了上述第2剂的上述皮肤的部位,应用上述第1剂的工序。

[0041] [19]根据项目18所述的方法,上述第1剂包含缺端胶原0.05(v/v)％～1.25(v/v)％。

[0042] [20]根据项目18或19所述的方法,被用于毛发稀疏和/或脱毛症的治疗。

[0043] [21]缺端胶原和真皮鞘杯(DSC)的用途,用于制造用于将毛发再生的药物。

[0044] [22]根据项目21所述的用途,在上述药物中包含上述缺端胶原0.05(v/v)％～1.25(v/v)％。

[0045] [23]根据项目21或22所述的用途,上述缺端胶原与上述真皮鞘杯(DSC)细胞通过在即将被应用于皮肤前进行混合而被调制。

[0046] [24]根据项目21～23中任一项所述的用途,被用于毛发稀疏和/或脱毛症的治疗。

[0047] [25]真皮鞘杯(DSC)细胞的用途,用于通过与缺端胶原联合使用从而制造将毛发再生的组合物。

[0048] [26]根据项目25所述的用途,上述缺端胶原以0.05(v/v)％～1.25(v/v)％的浓度被联合使用。

[0049] [27]一种用于将毛发再生的组合物,其特征在于,包含真皮鞘杯(DSC)细胞作为有效成分,在有需要的对象的皮肤的应用了缺端胶原的部位被应用。

[0050] [28]根据项目27所述的组合物,上述缺端胶原以0.05(v/v)％～1.25(v/v)％的浓度被应用。

[0051] [29]一种包含缺端胶原的组合物,为了促进皮肤应用部位中的真皮鞘杯(DSC)细胞的植入而使用。

[0052] [30]根据项目27所述的组合物,包含上述缺端胶原0.05(v/v)％～1.25(v/v)％。

[0053] 发明的效果

[0054] 根据本发明,可以期待皮肤移植后的DSC细胞的生存率和植入率提高,由DSC细胞带来的将毛发再生的能力提高。

附图说明

[0055] 图1显示与缺端胶原混合了的DSC细胞的生存率。

[0056] 图2显示与各浓度的缺端胶原混合而培养了的DSC细胞的形态。

[0057] 图3显示对在离体(ex vivo)移植到猪皮肤组织的仅DSC细胞(A)或与缺端胶原混合了的DSC细胞(B)的局部存在进行了观察的结果。

具体实施方式

[0058] 以下,对本发明的具体实施方式进行说明,但本发明的技术范围不仅仅限定于下述方式。另外,在本说明书中被引用的文献可以通过参照而被并入到本发明中。

[0059] 在一实施方式中,本发明提供包含缺端胶原和真皮鞘杯(DSC)细胞的组合物。

[0060] 将毛发的皮肤内部最深部的鼓起了的部分称为毛球部(hair bulb),将位于毛球部的中央部的由间充质细胞构成的部分称为毛乳头(dermal papilla:DP)。在毛乳头中毛细血管、神经进入,吸收来自食物的营养、氧,掌管毛发的产生、生长。在与毛乳头相接的地方具有毛母细胞(hair matrix cell),毛发在该部位被产生。即毛母细胞从进入到毛乳头的毛细血管摄取营养、氧,反复进行分裂从而形成毛发。

[0061] 在本说明书中,所谓“毛囊(Hair Follicle:HF)”,是指包含作为上皮细胞的毛母(毛母细胞)、内毛根鞘、外毛根鞘、作为间充质细胞的真皮毛根鞘、毛乳头、和黑素细胞等的包围毛的组织层。

[0062] 在本说明书中,所谓“真皮毛根鞘(Dermal Sheath:DS)”,是由包裹毛囊的最外层的一层或多层真皮性细胞层(波形蛋白阳性)构成的组织,并且包含平滑肌型α肌动蛋白(α-SMA)阳性细胞。真皮毛根鞘在毛球部的最下端与毛乳头连续。在本说明书中,在真皮毛根鞘中,包含真皮鞘杯和上部真皮毛根层。

[0063] 在本说明书中,所谓“真皮鞘杯(dermal sheath cup:DSC)”,是指作为真皮毛根鞘的一部分,位于毛球部的底部的组织。“真皮鞘杯细胞(DSC细胞)”为构成真皮鞘杯的细胞。已知DSC细胞为毛乳头细胞的前体细胞,并已知通过将DSC细胞移植于皮肤,从而在移植部位毛囊被诱导。

[0064] 在本说明书中,所谓“上部真皮毛根鞘(Upper Dermal Sheath:UDS)”,是指真皮毛根鞘之中的除上述真皮鞘杯的部分以外的组织。

[0065] 在本发明中使用的DSC细胞可以来源于任意动物,但优选来源于脊椎动物,更优选来源于哺乳动物,最优选来源于人。此外,本发明中能够使用的DSC细胞可以为从移植对象采取了的自身的DSC细胞,也可以为异体的DSC细胞。

[0066] 本发明中能够使用的DSC细胞只要通过公知的方法调制即可,没有特别限定。

[0067] 在一实施方案中,本发明所使用的DSC细胞可以使用将人毛囊(优选为人头皮毛囊)分离,从被分离了的人毛囊将毛乳头区域的组织进一步分离使其反转后,将毛乳头除去,将包含DSC细胞的真皮鞘杯区域进行培养使其增殖而得的细胞。具体而言,例如,在将头皮切为5mm左右的长条状,用磷酸缓冲生理盐水(PBS)等进行了洗涤后,根据需要使用蛋白质分解酶等或进行外科处理,将表皮层和真皮层除去,仅形成皮下脂肪层,接着将毛囊用物理手段例如镊子等进行分离。可以从毛囊切取毛球部,从该毛球部下部使毛乳头露出而将毛乳头除去,从真皮鞘杯区域将DSC细胞分离(非专利文献3)。

[0068] DSC细胞的培养可以直接使用动物细胞的培养所使用的市售的营养培养基,或者用进行了改性的培养基进行培养(原代培养和传代培养)。作为DSC细胞的培养可以使用的代表性的培养基,可举出包含胎牛血清的达尔伯克氏改性伊格尔培养基、Chang培养基(Chang's medium)、MesenPRO培养基(Thermo fisher社)等。在培养基中,可以进一步根据需要加入细胞生长因子、激素、其它微量营养素。作为这些具体的物质,可举出转铁蛋白、胰岛素、三碘甲状腺原氨酸、胰高血糖素、氢化可的松、睾酮、雌二醇、黄体酮、硒等。

[0069] 本发明中能够使用的DSC细胞可以为从多能干细胞或组织干细胞分化而成的DSC细胞。多能干细胞可以为iPS细胞、ES细胞或Muse细胞等,可以使用从这些多能干细胞通过分化诱导而获得的DSC细胞。

[0070] 所谓“缺端胶原”,是指将存在于胶原分子的两端的、抗原性高的端肽通过蛋白酶进行了切割除去的胶原,是可溶于水的胶原。本发明中能够使用的缺端胶原可以是以构成各种动物(例如,哺乳动物(人、牛、猪、兔、绵羊等)、鸟类、爬虫类、两栖类、鱼类(鲨鱼、鲑鱼等))的真皮、韧带、腱、骨、软骨等的胶原作为原材料的,优选为来源于哺乳动物(例如,牛或猪)的缺端胶原。此外,本发明中能够使用的缺端胶原可以使用市售的,例如,可以利用由株式会社高研(日本)制造销售的以牛真皮作为原料的缺端胶原,但不限定于此。

[0071] 在本发明中,缺端胶原在组合物中、或在移植部位中可以包含0.05(v/v)%~1.25(v/v)%,例如0.1(v/v)%~1.0(v/v)%。通过上述浓度的缺端胶原作为支架而存在,从而DSC细胞3维地伸展,在移植了的情况下,也发挥植入率提高这样的优异的效果。

[0072] 在一实施方案中,本发明的组合物可以通过在即将被应用于皮肤前进行混合而调制,例如,可以作为包含包含缺端胶原的第1剂、和包含真皮鞘杯(DSC)细胞的第2剂的、用于将毛发再生的试剂盒而提供。在本发明作为试剂盒而提供的情况下,可以提供在将包含缺端胶原的第1剂、和包含真皮鞘杯(DSC)细胞的第2剂混合时,以包含缺端胶原0.05(v/v)%~1.25(v/v)%,例如0.1(v/v)%~1.0(v/v)%的方式调整的试剂盒。

[0073] 本发明的组合物、或试剂盒中的第1剂或第2剂除了上述DSC细胞、缺端胶原以外,还可以包含药学上能够容许的载体。在本说明书中所谓“药学上能够容许的载体”,是指被各国政府的管制机关批准,可以在动物、特别是人中使用的稀释液、佐剂、赋形剂、或媒介物等。在一实施方式中,作为本发明可以包含的载体,可举出生理学缓冲溶液、生理盐水、细胞培养培养基、和水等,但不限定于这些。本发明中可以使用的生理学缓冲溶液包含例如缓冲生理盐水、磷酸缓冲液、汉克平衡盐溶液、Tris缓冲生理盐水、和HEPES缓冲生理盐水,但不限定于这些。

[0074] 通过将本发明应用于皮肤,从而能够将毛发再生。因此,本发明能够被用于毛发稀疏和/或脱毛症的治疗。

[0075] 在一实施方案中,本发明提供包含将缺端胶原与真皮鞘杯(DSC)细胞进行混合的工序的、制造用于将毛发再生的组合物的方法。在本发明的制造方法中,优选将缺端胶原以包含0.05(v/v)%~1.25(v/v)%,例如0.1(v/v)%~1.0(v/v)%的方式混合。此外,本制造方法优选将缺端胶原与真皮鞘杯(DSC)细胞在即将应用皮肤前进行混合而调制。

[0076] 在一实施方案中,本发明提供在有需要的对象中将毛发再生的方法,包括:

[0077] 将包含缺端胶原和真皮鞘杯(DSC)细胞的组合物应用于上述对象的皮肤的工序。

[0078] 将本发明的组合物应用于皮肤,例如,希望毛发产生的部位(例如,头皮、眉部等)的方法可以使用公知的应用方法,例如,可以通过将被填充于注射器的本发明所使用的组合物注射到皮肤中的希望毛发产生的部位来施与。缺端胶原、与真皮鞘杯(DSC)细胞如上述那样,可以在即将应用前进行混合而被填充于注射器,缺端胶原与真皮鞘杯(DSC)细胞可以被填充于分开的注射器。在后者的情况下,通过在皮肤中的希望毛发产生的相同部位注射而被施与。因此,在其它方案中,本发明能够提供以下方案。

[0079] 一种方法,是在有需要的对象中将毛发再生的方法,包括:

[0080] (1-1)对上述对象的皮肤应用包含缺端胶原的第1剂的工序;和

[0081] (1-2)在应用了上述第1剂的上述皮肤的部位,应用包含真皮鞘杯(DSC)细胞的第2剂的工序,

[0082] 以及/或者

[0083] (2-1)对上述对象的皮肤应用上述第2剂的工序;和

[0084] (2-2)在应用了上述第2剂的上述皮肤的部位,应用上述第1剂的工序。

[0085] 在一实施方案中,本发明提供缺端胶原和真皮鞘杯(DSC)细胞用于制造将毛发再生的药物的用途。

[0086] 此外,在其它方案中,本发明提供用于真皮鞘杯(DSC)细胞通过与缺端胶原的联合使用从而制造将毛发再生的组合物的用途。

[0087] 此外,本发明提供用于将毛发再生的组合物,其特征在于,包含真皮鞘杯(DSC)细胞作为有效成分,在有需要的对象的皮肤的应用了缺端胶原的部位被应用。即,在对象中,通过在应用了缺端胶原的皮肤的部位,应用包含真皮鞘杯(DSC)细胞作为有效成分的用于将毛发再生的组合物,从而能够实现DSC细胞植入,再生毛发。

[0088] 进而另外,本发明提供为了促进皮肤应用部位中的真皮鞘杯(DSC)细胞的植入而使用的、包含缺端胶原的组合物。在一实施方案中的该组合物中,包含缺端胶原0.05(v/v)%～1.25(v/v)%,例如0.1(v/v)%～1.0(v/v)%,在将真皮鞘杯(DSC)细胞与该组合物联合使用,应用于希望毛发产生的皮肤的部位的情况下,真皮鞘杯(DSC)细胞的植入被促进,毛发产生被促进。

[0089] 实施例

[0090] 以下,基于实施例进一步详细地说明本发明,但它们完全不限定本发明。

[0091] ＜实施例1:与细胞悬浮液的混合性＞

[0092] 将DSC细胞用细胞冷冻液稀释了。将缺端胶原(制品名:缺端胶原植入物1%(v/v)(株式会社高研,日本))、透明质酸(制品名:アルツディスポ関節注(生化学工业株式会社,日本))、或交联透明质酸(制品名:サイビスクディスポ関節注(サノフィ社,法国);ジュビダームビスタ(注册商标)ウルトラ(アラガン社,美国))以1:1进行混合,进行冲吸,通过目视而确认了混合性。

[0093] 其结果,确认了DSC细胞与0.5%(v/v)的缺端胶原或透明质酸均匀地混合。另一方面,DSC细胞不与交联透明质酸均匀地混合。

[0094] ＜实施例2:细胞生存率的确认＞

[0095] 调查了与缺端胶原混合了的情况下的DSC细胞的生存率。

[0096] 将用细胞冷冻液进行了冷冻的DSC细胞利用温浴进行融化,与缺端胶原(制品名:缺端胶原植入物1%(株式会社高研,日本))以1:1进行了混合。对照用细胞冷冻液以细胞数相同的方式进行了稀释。将各个样品在6孔的低粘接板(Corning)中以100μL进行分注,在4℃、室温(21～24℃)、37℃下培育了0小时(刚与材料混合后)、1小时或3小时。然后,通过LIVE/DEAD(注册商标)fixable viability assay kit(Thermo Fisher Scientific)所包含的钙黄绿素和EtDh-1将各样品进行了染色。活细胞通过钙黄绿素而发出绿色荧光。死细胞通过EtDh-1而发出红色荧光。通过用荧光显微镜观察各样品,计数绿色细胞或红色细胞的数,从而算出了生存率。

[0097] 如图1所示那样,与缺端胶原混合了的DSC细胞即使在作为保存温度的4℃和室温、37℃下培育了3小时后,也维持生存率(图1)。

[0098] ＜实施例3:排出实验＞

[0099] 在将与支架材料混合了的DSC细胞从注射器排出后,也确认了细胞是否生存。

[0100] 将用细胞冷冻液进行了冷冻的DSC细胞利用温浴进行融化,与缺端胶原(制品名:缺端胶原植入物1％(株式会社高研,日本))以1:1进行混合,取样了排出前的样品。对照用细胞冷冻液以细胞数成为相同的方式稀释,同样地在排出前取样了。

[0101] 在注射器中填充了样品后,安装31针号的针,回收了从针排出了的样品。针的堵塞利用目视而确认了。将回收了的样品分别通过与实施例2同样的方法而算出了生存率。

[0102] 在31G针排出的前后,细胞生存率几乎没有变化。此外,通过目视,未确认到针的堵塞(表1)。

[0103] 表1:排出前后的DSC细胞的生存率

[0104]

	排出前	排出后
对照	98.7％	98.8％
缺端胶原	98.1％	98.0％

[0105] ＜实施例4:缺端胶原内的细胞形态的观察＞

[0106] 观察了与缺端胶原混合了的DSC细胞的、缺端胶原凝胶化后的细胞形态。

[0107] 将用细胞冷冻液进行了冷冻的DSC细胞利用温浴进行融化,以缺端胶原(制品名:缺端胶原植入物1％或3％(株式会社高研,日本))的终浓度成为0.1(v/v)％、0.25(v/v)％、0.5(v/v)％或1.0(v/v)％的方式混合,将各个样品在玻璃底培养皿中以100μL/孔进行了接种。对照仅使用未与缺端胶原混合的DSC细胞,同样地在玻璃底培养皿中以100μL/孔进行了接种。以3天、37℃、5％CO_2进行培育,使用4(w/v)％低聚甲醛在4℃下固定了一晚后,用PBS洗涤了。用Alexa Fluor(商标)488Phalloidin(Thermo Fisher Scientific)染色了。各样品利用共聚焦激光显微镜(Zeiss)进行观察/拍摄,使用高精细3D/4D图像分析软件Imaris(Zeiss)进行了分析。

[0108] 其结果,0.1(v/v)％的缺端胶原中的DSC细胞显示了与未与缺端胶原混合的对照的DSC细胞类似的形态(图2)。另一方面,在0.25(v/v)％以上的缺端胶原中培养了的DSC细胞观察到了以胶原纤维作为支架而3维地伸展的状况(图2)。

[0109] ＜实施例5:离体(ex vivo)下的DSC细胞的组织内滞留实验＞

[0110] 确认了在将与缺端胶原混合了的DSC细胞移植到离体(ex vivo)的猪皮肤组织的情况下,是否能够保持。

[0111] DSC细胞标记使用CellTracker(商标)Green CMFDA Dye(Invitrogen),按照添附的规程进行了染色。猪皮肤组织由东京芝浦脏器(株)购入,在未冷冻下使用了剪裁为1cm见方的2片。对于2片之中的一者,将仅在培养基中悬浮了的标记DSC细胞使用安装了31G注射针(株式会社ユニシス)的注射器而注入到皮内。对于另一者,将悬浮于终浓度0.5(v/v)％缺端胶原的标记DSC细胞同样地注入到皮内。静置于37℃使其凝胶化后用4％PFA固定,供于透明化。组织透明化使用CUBIC-L(TCI)和CUBIC R+(TCI),以K.Tanaka et al.(K.Tanaka et al.,Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents.Cell Reports,24(2018)2196-2210)作为参考进行了实验。在脱脂后通过

Propidium Iodide(同仁化学研究所)实施了组织的核染色。样品使用LightSheet显微镜(Zeiss)进行观察/拍摄,使用高精细3D/4D图像分析软件Imaris(Zeiss)进行了分析。

[0112] 如果观察图3的虚线内的部分,则来源于被注入到皮肤内的DSC细胞的荧光可以观察。与缺端胶原混合了的DSC细胞即使在注入到离体(ex vivo)的皮肤组织后,也可以观察到保持更多的细胞的倾向(图3)。

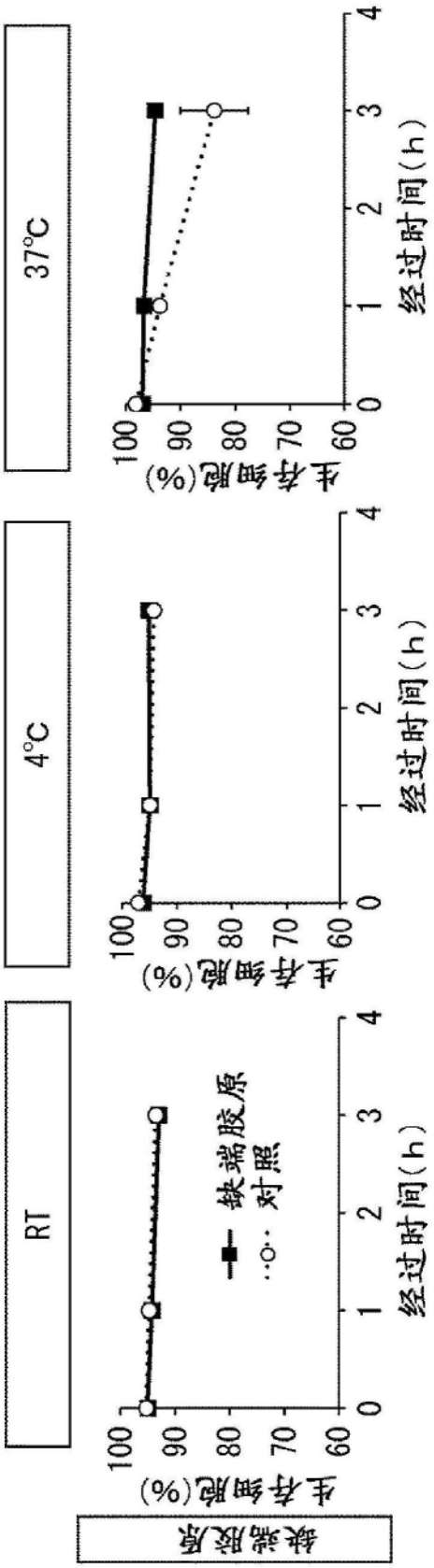


图1

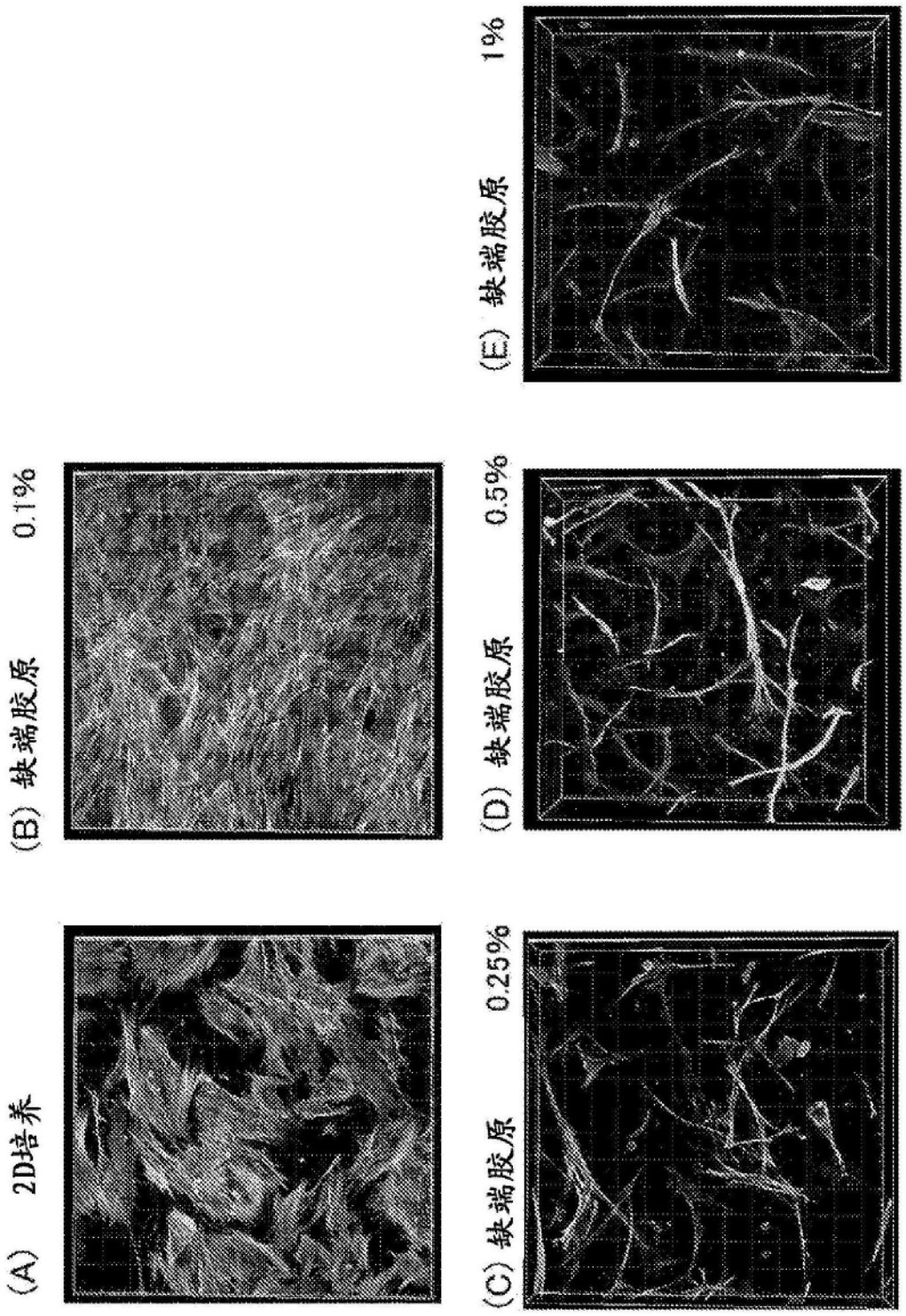


图2

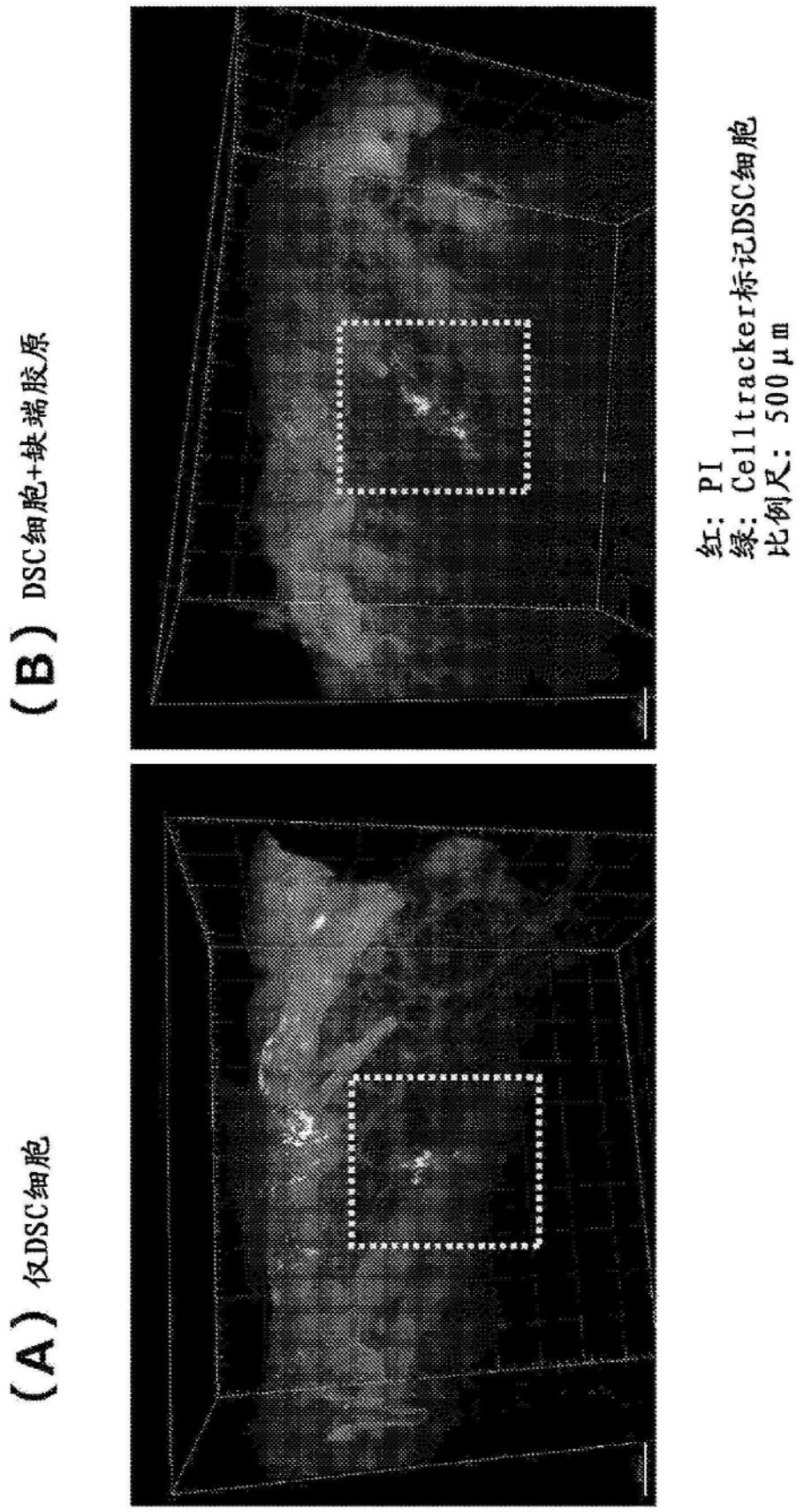


图3