

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007年1月4日 (04.01.2007)

PCT

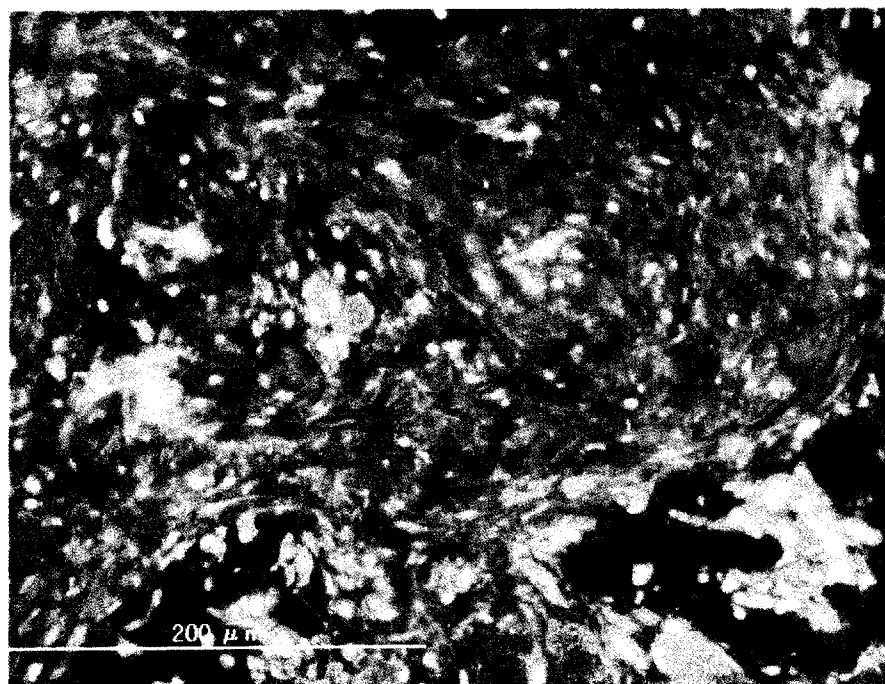
(10) 国際公開番号
WO 2007/001016 A1

- (51) 国際特許分類:
A61L 27/00 (2006.01) C12N 5/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/312871
- (22) 国際出願日: 2006年6月28日 (28.06.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2005-190374 2005年6月29日 (29.06.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人名古屋大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4648603 愛知県名古屋市千種区不老町1番 Aichi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 蛭沢 克己 (EBI-SAWA, Katsumi) [JP/JP]; 〒4648603 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 安部 誠 (ABE, Makoto); 〒4600003 愛知県名古屋市中区錦2丁目1番5号白川第六ビル7階 手島特許事務所名古屋オフィス Aichi (JP).

[続葉有]

(54) Title: DERMAL TISSUE IMPROVING MATERIAL AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 皮膚組織改善材及びその利用



(57) Abstract: A material for improving a dermal tissue which mainly comprises a fibroblast derived from an oral tissue of human or other mammal. Preferably, the fibroblast is a human gingival fibroblast and/or a human periodontal fibroblast, which is excellent in capability of producing a vascular endothelial growth factor (VEGF) and/or a keratinocyte growth factor (KGF).

(57) 要約: 本発明によって提供される皮膚組織改善材は、ヒト又は他の哺乳動物の口腔内組織由来の線維芽細胞を主体として構成される。好ましくは、上記線維芽細胞はヒトの歯肉線維芽細胞及び/又は歯根膜線維芽細胞であり、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)

[続葉有]

WO 2007/001016 A1



(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, 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, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,

SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

皮膚組織改善材及びその利用

技術分野

[0001] 本発明は、口腔内組織由来の細胞の利用に関し、詳しくは当該細胞を主体とする皮膚組織改善材(皮膚組織改善用組成物)に関する。また、本発明は口腔内組織由来の細胞を用いた皮膚組織の改善方法に関する。

なお、本国際出願は2005年6月29日に出願された日本国特許出願第2005-190374号に基づく優先権を主張しており、その出願の全内容は本明細書中に参照として組み入れられている。

背景技術

[0002] 傷病等による皮膚組織の異常や欠損或いは先天的若しくは後天的な(加齢性の)皺、陥没等の変形を修復するために、皮膚組織修復材として種々の生体材料が使用されている。例えば、国際公開第WO1997/004720号(特表平11-510069号公報に対応)には、患者自身の皮膚組織より単離した真皮線維芽細胞を体外で培養後、その培養物を皮膚組織(患部)に注入する方法が記載されている。また、デラストロ(DeLustro F)らの文献(J Biomed Mater Res.、1986年、第20巻(1)、p. 109~120)にはC末端及びN末端ペプチド部分を除去して抗原性を低下させたウシコラーゲン(アテロコラーゲン)を患部に注入する方法が記載されている。また、デュランチ(Duranti F)らの文献(Dermatol Surg.、1998年、第24巻(12)、p. 1317~1325)にはヒアルロン酸ゲルを患部に注入する方法が記載されている。

[0003] しかしながら、上記の各ジャーナルに記載されるような生化学的材料(非生体組織)は、生体内において加水分解され易く、早期に投与部位から消滅するために効果が持続しないという欠点がある。また、この種の材料を使用する場合、免疫学的影響を完全に排除することは困難である。

[0004] 他方、上記国際公開公報に記載されるような患者自身の真皮線維芽細胞を体外で培養後に患部(皮下組織)に注入する方法では、免疫学的影響は生じないものの患部に注入された培養細胞は修復すべき皮膚組織(患部)において充填物として機能

するにすぎず、患部とその周辺領域の皮膚組織の生理学的状態(皮膚組織の物理的状态及び/又は栄養状態)を積極的に改善するのに十分な機能を有するものではない。

発明の開示

[0005] そこで、本発明は、従来の皮膚組織修復材料(即ち患部充填材料)とは異なる内容の生体適合材料を創出するものであり、その目的は、異常や欠損の生じた皮膚組織(患部)の修復(充填)とともに当該患部及びその周辺の皮膚組織の生理学的状態をより健全なものに改善し得る機能を備えた皮膚組織改善用材料(生きた細胞を含む組成物)を提供することである。また、他の目的は、そのような皮膚組織改善用材料を利用し即ち患部(皮膚組織)に適用して、当該患部の生理学的状態を改善する方法を提供することである。

[0006] 本発明によって提供される皮膚改善材(即ち皮膚組織改善のための組成物)は、ヒト又は他の哺乳動物の口腔内組織由来の線維芽細胞を主体として構成されることを特徴とする。典型的には、ここで開示される皮膚改善材(皮膚組織改善のための組成物)は、薬学的に許容され得る媒質(担体を包含する。)を含む。

本明細書において「皮膚組織」は、特に言及される場合を除いて広義に解釈されるべき用語であり、表皮、真皮及び皮下組織を包含する用語である。

また、本明細書において「口腔内組織」は、特に言及される場合を除いて広義に解釈されるべき用語であり、歯周組織(歯肉、歯根膜、歯槽骨及びセメント質を包含する。)及び頬粘膜を包含する用語である。

[0007] 本発明者らは、修復すべき皮膚組織とは全く異なる口腔内粘膜(例えば歯肉或いは頬粘膜)から採取した線維芽細胞を当該修復すべき皮膚組織に投与したところ、当該皮膚組織においての充填効果のみならず、当該投与部位とその周辺部位の生理学的状態を改善(例えば表皮における細胞分裂の促進やそのことに基づく肌の色つや、はり、きめ等の物理的状态の改善及び/又は皮膚の栄養状態の改善)し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、ここで開示される皮膚組織改善材(皮膚組織改善のための組成物)によると、その主構成要素たる口腔内組織由来線維芽細胞が高効率に種々の細胞増殖因子(

VEGF、KGF等)を当該投与部位において継続的に産生(即ち患部に供給)する結果、従来の皮膚組織修復材と同様の皮膚組織(典型的には皮下組織)変形部位若しくは欠損部位における充填効果を奏することに加え、当該部位とその周辺皮膚組織の生理学的状態を改善することができる。

[0008] ここで開示される皮膚組織改善材の好ましい一態様は、前記線維芽細胞として、ヒト又は他の哺乳動物の口腔内組織由来の線維芽細胞を生体外で増殖させて得た培養細胞を主体として構成されることを特徴とする。

口腔内組織(好ましくは歯周組織或いは頬粘膜)由来の線維芽細胞は、インビトロ培養での増殖速度が比較的(例えば皮膚真皮細胞と比較して)高く、所望する量の口腔内組織由来線維芽細胞を短期間に効率よく生産することができる。このため、本態様の皮膚組織改善材によると、線維芽細胞生産に係るコストを低下させ得るとともに迅速に皮膚組織(患部)の修復処置及び改善処置を実行することができる。

[0009] また、ここで開示される皮膚組織改善材の好ましい一態様は、前記線維芽細胞がヒトの歯肉線維芽細胞及び/又は歯根膜線維芽細胞であることを特徴とする。これら線維芽細胞は、特に細胞増殖因子群の産生が活発であり、皮膚組織修復(充填)効果に加えて高い皮膚組織改善効果を得ることができる。

[0010] 好ましい皮膚組織改善材は、前記線維芽細胞を生体外で増殖させて得た培養細胞を含む懸濁液の形態に調製されており、特に好ましい皮膚組織改善材(生きた細胞を含む組成物)は、前記細胞を含む懸濁液であって、該懸濁液の上清中のタンパク質1mgあたりの血管内皮細胞増殖因子(VEGF)含有量が少なくとも30pgである懸濁液により実質的に構成される皮膚組織改善材である。或いはまた、前記細胞を含む懸濁液であって、該懸濁液の上清中のタンパク質1mgあたりの角化細胞増殖因子(KGF)含有量が少なくとも0.5ngである懸濁液により実質的に構成される皮膚組織改善材である。このような増殖因子を高濃度に含む細胞懸濁液の投与(患部への注入)により、皮膚組織の迅速な改善を図ることができる。

従って本発明は他の側面として、歯肉線維芽細胞及び/又は歯根膜線維芽細胞を(好ましくは細胞懸濁液の形態で)患部に投与することを特徴とする、皮膚組織(患部)にVEGF及び/又はKGFを供給する方法を提供する。また、歯肉線維芽細胞

及び／又は歯根膜線維芽細胞を生体外で培養することを特徴とする、VEGF及び／又はKGFの生産方法を提供する。

[0011] また、本発明は、ここで開示される皮膚組織改善材(皮膚組織改善のための組成物)を製造する好適な方法を提供する。即ち、本発明の製造方法は、ヒト又は他の哺乳動物の口腔内組織(好ましくは歯周組織)由来の線維芽細胞を用意すること、前記線維芽細胞を生体外において培養すること、および、前記培養した培養細胞を回収すること、を包含する方法である。典型的には、培養細胞は適当な液体媒質中に懸濁される。好ましくは、皮膚組織改善材を適用する被験者(患者)に対して免疫原となり得る物質が含まれないように前記培養細胞を含む懸濁液を調製する。また、好ましくは、培養のために用意される口腔内組織(好ましくは歯周組織)由来の線維芽細胞は、適用対象たる被験者(患者)或いはその者と血縁関係にある者から採取される。

ここで開示される方法によると、調達した口腔内組織(好ましくは歯周組織)由来の線維芽細胞を培養(増殖)し、上述した効果を奏する皮膚組織改善材を効率よく製造することができる。

[0012] ここで開示される皮膚組織改善材製造方法の好ましい一態様は、前記用意した線維芽細胞がヒトの歯肉線維芽細胞及び／又は歯根膜線維芽細胞であることを特徴とする。また、前記細胞がVEGF及び／又はKGFを産生可能な条件で培養することが特に好ましい。

[0013] また、本発明は、他の側面として、ここで開示される皮膚組織改善材を被験者の患部に注入して当該患部の皮膚組織を修復(又は改善)する方法を提供する。

この方法は、典型的には、ここで開示される何れかの皮膚組織改善材(例えばヒト又は他の哺乳動物の口腔内組織(好ましくは歯周組織)由来の線維芽細胞を含む懸濁液)を用意すること、及び、該用意した皮膚組織改善材(例えば上記線維芽細胞懸濁液)を被験者の患部(皮膚組織、例えば皮下組織)に投与(細胞の移植)すること、を包含する。従って、本発明は、ヒト又は他の哺乳動物の口腔内組織由来の線維芽細胞を患部に投与(移植)することを特徴とする、皮膚組織改善のための当該線維芽細胞の利用方法を提供する。

[0014] 好ましくは、ヒトの歯肉線維芽細胞及び／又は歯根膜線維芽細胞を患部に投与(

移植)する。また、好ましくは、予め被験者から採取した歯肉線維芽細胞及び／又は歯根膜線維芽細胞を生体外において培養し、得られた自己培養細胞(典型的には該培養細胞と薬学的に許容され得る媒質(適当な溶媒)を含む細胞懸濁液)を当該被験者の患部(皮膚組織、例えば皮下組織)に投与(注入)する。VEGF及び／又はKGFを産生可能な条件で培養した細胞を投与することが特に好ましい。また、免疫原となり得る物質が含まれないように調製された皮膚組織改善材(典型的には免疫原性物質を含まない細胞懸濁液)を使用することが好ましい。従って、本発明は、ヒトの歯肉線維芽細胞及び／又は歯根膜線維芽細胞(好ましくは患者自身から得た細胞)を患部に投与(移植)することを特徴とする、皮膚組織改善のための当該線維芽細胞の利用方法を提供する。

ここで開示される何れかの方法によって、患部である皮膚組織の迅速な修復及び改善を実現することができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図1は、実施例に係るヒト歯肉線維芽細胞(培養細胞)及び比較例に係るヒト皮膚線維芽細胞(培養細胞)がそれぞれ培養液中に産生するVEGF量を示すグラフであり、横軸は培養時間(h)、縦軸はVEGF濃度(pg/mgタンパク質)である。図中の左側がヒト歯肉線維芽細胞(GF)の結果であり、図中の右側がヒト皮膚線維芽細胞(DF)の結果である。

[図2]図2は、実施例に係るヒト歯肉線維芽細胞(培養細胞)及び比較例に係るヒト皮膚線維芽細胞(培養細胞)がそれぞれ培養液中に産生するKGF量を示すグラフであり、横軸は培養時間(h)、縦軸はKGF濃度(ng/mgタンパク質)である。図中の左側がヒト歯肉線維芽細胞(GF)の結果であり、図中の右側がヒト皮膚線維芽細胞(DF)の結果である。

[図3]図3は、実施例に係るヒト歯肉線維芽細胞をヌードマウス背部真皮内に注入後、2ヶ月が経過した注入部位の状態を示す蛍光免疫染色後の組織の顕微鏡写真(拡大率40倍)である。

[図4]図4は、実施例に係るヒト歯肉線維芽細胞をヌードマウス背部真皮内に注入後、2ヶ月が経過した注入部位の状態を示す蛍光免疫染色後の組織の顕微鏡写真(拡

大率400倍)である。

発明を実施するための最良の形態

[0016] 以下、本発明の好適な実施形態を説明する。なお、本明細書において特に言及している事項(例えば、採用する線維芽細胞の種類)以外の事柄であつて本発明の実施に必要な事柄(例えば細胞培養・精製方法、細胞を含む生物学的薬剤組成物の調製に関する一般的な事項)は、医学、薬学、生化学、有機化学、タンパク質工学、分子生物学、獣医学、衛生学等の分野における従来技術に基づく当業者の設計事項として把握され得る。本発明は、本明細書に開示されている内容と当該分野における技術常識とに基づいて実施することができる。

また、本明細書中で引用されている全ての文献の全ての内容は本明細書中に参照として組み入れられている。

[0017] ここで開示される皮膚組織改善材は、ヒトその他の哺乳動物のための皮膚組織改善材(医薬組成物)であり得、ヒトその他の哺乳動物の口腔内組織(好ましくは歯周組織或いは頬粘膜)由来の線維芽細胞を主体として構成される皮膚組織改善材である。通常、免疫学上の問題から、投与対象(被験者)と同種の哺乳類の口腔内組織由来の線維芽細胞を成分とするのが好ましく、予め投与対象(被験者)から採取した線維芽細胞又はその培養細胞(自己細胞)を採用することが好ましい。

[0018] 口腔内組織(好ましくは歯周組織或いは頬粘膜)由来の線維芽細胞であつて本発明の目的に適う種々の細胞増殖因子を産生し得るものであれば、特に細胞の種類を限定するものではないが、ヒトを対象とする場合、ヒト(好ましくは被験者本人)の歯肉線維芽細胞、及び/又は、歯根膜線維芽細胞を主体とする皮膚組織改善材が好ましい。これら線維芽細胞は生体外(インビトロ)での培養における増殖速度が速く、種々の細胞増殖因子(典型的にはVEGF或いはKGF)を高効率に産生する能力を有するために細胞材料として好ましい。

なお、培養細胞を皮膚組織改善材の主体として使用する場合、実際に使用する段階の当該培養細胞が上記線維芽細胞由来のものであつて且つ本発明の目的(即ち皮膚組織の修復と改善)を達成するために必要な細胞増殖因子(VEGF、KGF等)を産生する能力を有しておればよく、度重なる継代培養によって細胞の外見その他

の性状が採取した初代の線維芽細胞と異なる場合であってもよい。本発明に係る「口腔内組織由来の線維芽細胞」には、そのような継代培養後の細胞を包含する。

[0019] 口腔内組織由来の線維芽細胞の採取方法は、従来のこの種の細胞の採取方法と同様でよく、特別な処理を必要としない。例えば、歯周組織(典型的には歯肉又は歯根膜)由来の線維芽細胞は、抜歯した歯(例えば乳歯や第三大臼歯)若しくは抜歯痕から採取した歯肉組織や歯根膜から得ることができる。

また、本発明の実施にあたっては、使用する細胞を口腔内の粘膜下(例えば頬粘膜)から採取すればよいため、採取痕が外部から視認されないことが被験者(又は採取対象者)にとっての一つの利点である。

[0020] 採取した線維芽細胞は、従来この種の細胞の培養法と同様の方法で培養・増殖させ、細胞系(継代培養系)を確立することができる。例えば、培地としては、適当な血清材料、抗生物質等を添加した一般的な α -MEM培地、イーグル培地、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM培地)等を好適に使用することができる。培養細胞は、適当な培養容器中、37°C程度(好ましくはCO₂インキュベーター内)でコンフルエント状態になるまで培養し、必要に応じて継代を繰り返す。継代数に特に制限はないが、典型的には10以下(例えば3~6)である。

[0021] そして、上記のような培養によって所望量の培養細胞が生産された後、培養容器から目的の細胞を回収する。回収方法は、従来の線維芽細胞と同様でよく、本発明の実施にあたって特別な操作・処理を必要としない。例えば、培養容器の内壁面に付着した細胞は、適当な酵素(例えばトリプシン)処理を施して遊離させ、培養液と共に回収する。そして、好ましくは、回収した細胞を適当な無血清培地中で12時間以上、好ましくは24時間以上培養する。これにより、培地中に含まれる免疫原性物質(典型的には血清成分)を実質的に除去することができる。また、培養した細胞は従来公知の方法で凍結保存することができる。

このように免疫原性物質を実質的に除去した細胞懸濁液(即ち、培養細胞及び適当な無血清培地、緩衝液その他適当な溶媒を主成分とする組成物)は、好適な皮膚組織改善材であり得る。

なお、皮膚組織改善材には、主成分たる線維芽細胞、薬学的に許容され得る媒質

(典型的には無血清培地等の培地或いは緩衝液等の溶媒)の他に、種々の副成分を含み得る。例えば、(1).抗生物質、(2).各種ビタミン、アミノ酸、ブドウ糖その他の栄養成分、(3).酵素類、(4).補酵素類、(5).防腐剤、(6).KGF、VEGF等の増殖因子その他サイトカイン類、(7).各種の薬剤(例えば抗炎症剤)、(8).色素、等が好適な副成分として挙げられる。

[0022] 調製された皮膚組織改善材は、従来の皮膚組織修復材(例えば上記特許文献(国際公開第WO97/04720号)又はジャーナル(DeLustro Fらの文献、Duranti Fらの文献)参照)と同様に患部に投与することができる。これら引用文献の全ての内容は本明細書中に参照として組み入れられている。

典型的には、細胞懸濁液の形態の皮膚組織改善材を適当な注射器等を用いて皮下組織に注入することができる。また、懸濁液の形態に限られず、例えば目的の線維芽細胞から成る細胞集塊物を皮膚組織改善材として使用してもよい。この場合、典型的には、線維芽細胞とマトリクスとの複合体として投与され得る。マトリクスとしては、種々の好適な生体適合性材料(多糖類、タンパク質その他の高分子有機材料、無機材料等)を利用することができる。ヒト由来(好ましくは被験者自身)の血液、又は種々の内容の血漿材料、例えば多血小板血漿(platelet-rich plasma:PRP)は、好適なマトリクスの一典型例である。

投与量及び投与回数(及び投与の間隔)は、症状に応じて異なり得るため特に制限はなく、一般には医師その他の施用者の決定事項であるため本発明を制限する事項ではない。

また、ここで開示される皮膚組織改善材は、歯肉組織の改善にも適用できる。即ち、本発明は、他の側面として、ヒト又は他の哺乳動物の口腔内組織由来の線維芽細胞(典型的にはヒト又は他の哺乳動物の口腔内組織由来の線維芽細胞を生体外で増殖させて得た培養細胞)を主体として構成される歯肉組織改善材を提供する。

[0023] 以下、本発明に関するいくつかの実施例を説明するが、本発明をかかるとは実施例に示すものに限定することを意図したものではない。

[0024] <試験例1:歯肉線維芽細胞の培養>

ヒト歯肉組織から線維芽細胞を採取した。即ち、名古屋大学病院・口腔外科におい

て成人患者から抜歯した歯より歯肉組織を採取した(事前に名古屋大学医学部倫理委員会により承認され、患者の同意を得ている。)。得られた歯肉組織に37°C、2時間のコラゲナーゼ処理(和光純薬(株)製品:濃度5mg/mL)を施した。かかる処理後の歯肉組織を直径3.5cmのDMEM培地を含む培養用ディッシュに移植し、37°C、5%CO₂条件下で培養し、当該ディッシュに付着した線維芽細胞(実施例)を得た。

また、対象細胞(比較例)として、正常ヒト成人皮膚線維芽細胞(米国Cascade Biologics,inc.製品)を入手した。

[0025] 次いで、10%のウシ胎児血清(Invitrogen社製品;No.10099-141)及び1%の抗生物質-抗真菌剤(Invitrogen社製品;No.15240-062)を含むDMEM培地(Sigma-Aldrich社製品;No.D6429)を含むT75フラスコを用意し、該フラスコ中に上記得られたヒト成人歯肉線維芽細胞又はヒト成人皮膚(真皮)線維芽細胞を凡そ4×10⁴個播種し、37°C、5%CO₂条件下で7日間培養した(試験数n=4)。その後、市販の細胞解離剤(Invitrogen社製品;TrypLE Select(商品名))で処理して培養フラスコに付着した線維芽細胞を遊離・回収した。回収した細胞数は、市販の細胞計数分析装置(Scharfe system社製品;CASY(登録商標))を用いて計測した。結果を表1に示す。

表1に示す値から明らかなように、対象の皮膚線維芽細胞の比較して本実施例に係る歯肉線維芽細胞の増殖率は高く、皮膚線維芽細胞の2倍弱であることが確認された。

[0026] [表1]

表 1

培養細胞種	播種細胞数	培養日数	培養後細胞数	増加率
(実施例)				
ヒト歯肉線維芽細胞	4.0 × 10 ⁴	7	7.34 × 10 ⁵	18.4
(比較例)				
ヒト皮膚線維芽細胞	4.0 × 10 ⁴	7	4.02 × 10 ⁵	10.1

T-75フラスコでの培養結果 (n=4)

[0027] <試験例2:培養歯肉線維芽細胞によるVEGF及びKGFの産生>

10%のウシ胎児血清(Invitrogen社製品;No.10099-141)及び1%の抗生物質-抗

真菌剤 (Invitrogen社製品; No.15240-062) を含むDMEM培地を添加した6ウェルプレート各ウェルに上記歯肉線維芽細胞又は皮膚線維芽細胞を播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。培養を開始した後、100%コンフルエントとなった状態で培養液を吸引し、PBSで2回洗浄後、血清を添加しないDMEM培地を加えてさらに培養を継続した。そして、24時間、48時間、72時間経過後にそれぞれ1mLずつ培養液を採取し、ウェルには新鮮なDMEM培地を1mL添加した。各時間で採取した培養液は4°C、10000rpmで5分間遠心沈降させ、その上清を採取した。採取した上清は、必要に応じて-70°Cにて保存した。

而して、全サンプルを採取後、市販のキットを用いてELISA法に基づいて培養液中のVEGF及びKGFの定量を行った(試験数n=3)。なお、VEGFの定量にはBiosource社製の「Immunoassay kit VEGF」を使用した。また、KGFの定量にはR&Dsystem社製の「Quantikine (登録商標) Human KGF Immunoassay kit」を使用した。

[0028] 結果をVEGFについては図1に示し、KGFについては図2に示す。いずれの図(グラフ)についても左側の柱状グラフがGF(gingival fibroblast)、即ち歯肉線維芽細胞についての結果を示しており、右側の柱状グラフがDF(dermal fibroblast)、即ち皮膚線維芽細胞についての結果を示している。

これらグラフから明らかなように、歯肉線維芽細胞のほうがVEGF及びKGFの何れについても産生(分泌)能が有意に高かった。歯肉線維芽細胞のVEGF産生量は無血清DMEM培地で培養24時間後で上清タンパク質1mg当たり30pg以上であった。また、培養48時間後及び72時間後では、それぞれ、上清タンパク質1mg当たり約45pg及び約60pg又はそれ以上のVEGFが産生(分泌)されることが確認された。

他方、歯肉線維芽細胞のKGF産生量は無血清DMEM培地で培養24時間後で上清タンパク質1mg当たり0.5ng以上(より詳細には0.8ng以上)であった。また、培養48時間後及び72時間後では、それぞれ、上清タンパク質1mg当たり約1.5ng及び約2ng又はそれ以上のKGFが産生(分泌)されることが確認された。

[0029] <試験例3: 歯肉線維芽細胞から成る皮膚組織改善材の投与>

上記試験例1と同様の条件で培養した歯肉線維芽細胞を上記細胞解離剤で処理して培養フラスコから回収した。回収した細胞数は、上記細胞計数分析装置を用い

て計測した。

そして、約 2×10^7 個の同細胞を市販の蛍光染色キット(Sigma-Aldrich社製品;PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit)を用いて染色(蛍光ラベル)した。

而して、当該蛍光ラベルされた細胞をPBSを用いて懸濁し、細胞濃度を約 1×10^7 細胞/mLに調整後、ヌードマウス背部の真皮内に注入した。

2ヶ月後、注入部組織を採取し、固定液として4%パラホルムアルデヒド液(Sigma-Aldrich

社製品)を使用して組織を固定した。次いで、「Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetechnical社製品)」に包埋し、約 $6 \mu\text{m}$ の切片を作製した。

[0030] そして、この切片と抗ヒトコラーゲンタイプIモノクローナル抗体(Chemicon社製品)を使用し、免疫蛍光抗体法によって免疫染色を行った。その後、市販の免疫組織染色用封入剤「Vectashield(登録商標) Mounting Medium for Fluorescence with DAPI(Vector Laboratories社製品)」を用いて標本を作製し、顕微鏡(オリンパス(株)製品;BX51)及び顕微鏡デジタルカメラ(オリンパス(株)製品;DP70)を用いて撮影した。その写真を図3及び図4に示す。

図3(拡大率40倍)及び図4(拡大率400倍)に示す写真の青い蛍光部位は蛍光色素「DAPI」で染色された核であり、赤い蛍光部位は蛍光色素「PKH26」で染色された移植細胞(歯肉線維芽細胞)である。また、緑の蛍光部位は、蛍光ラベルされた抗ヒトコラーゲンタイプIモノクローナル抗体である。

これら写真から明らかなように、ヌードマウスに移植した本実施例に係る歯肉線維芽細胞(皮膚組織改善材)は、2ヶ月経過後も移植時と同様に真皮内に留まっていること(即ち生存していること)が確認された(図3)。また、移植した歯肉線維芽細胞の細胞質及びその周囲にヒトタイプIコラーゲンが存在することが認められる。このことは、歯肉線維芽細胞が移植後もタイプIコラーゲンを産生していることを裏付けるものである。

産業上の利用可能性

[0031] ここで開示される皮膚組織改善材は、皮膚組織の修復及び生理学的状態の改善

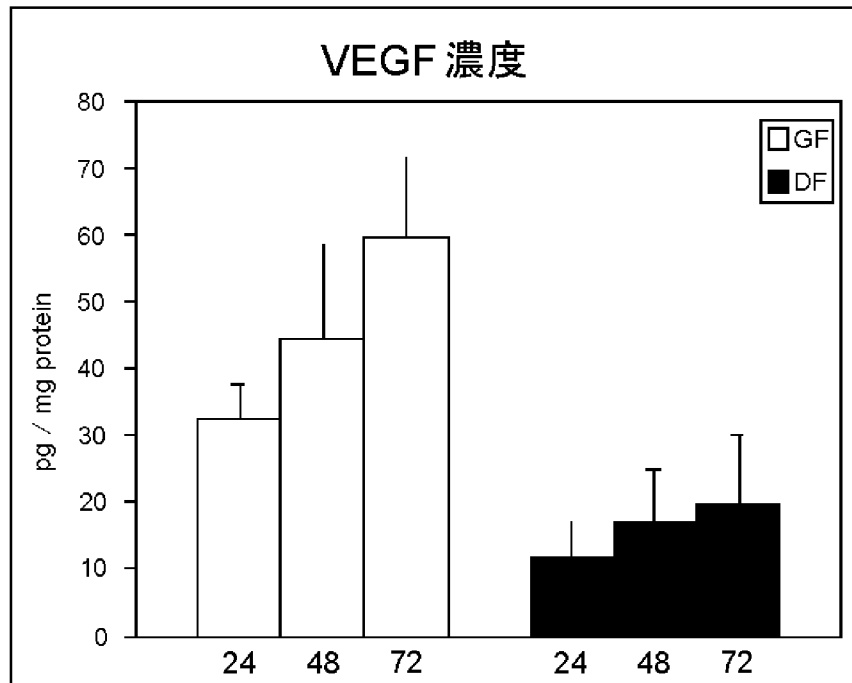
を行うことができる。このため、皮膚外科(形成外科、美容外科を含む)的治療に利用
する材料として有用である。

請求の範囲

- [1] ヒト又は他の哺乳動物の口腔内組織由来の線維芽細胞と、薬学的に許容され得る媒質とを含む、皮膚組織改善材。
- [2] 前記線維芽細胞として、ヒト又は他の哺乳動物の口腔内組織由来の線維芽細胞を生体外で増殖させて得た培養細胞を含む、請求項1に記載の皮膚組織改善材。
- [3] 前記線維芽細胞がヒトの歯肉線維芽細胞及び／又は歯根膜線維芽細胞である、請求項2に記載の皮膚組織改善材。
- [4] 前記線維芽細胞を生体外で増殖させて得た培養細胞を含む懸濁液の形態に調製された、請求項3に記載の皮膚組織改善材。
- [5] 前記細胞を含む懸濁液であって、該懸濁液の上清中のタンパク質1mgあたりの血管内皮細胞増殖因子(VEGF)含有量が少なくとも30pgである懸濁液により実質的に構成される、請求項4に記載の皮膚組織改善材。
- [6] 前記細胞を含む懸濁液であって、該懸濁液の上清中のタンパク質1mgあたりの角化細胞増殖因子(KGF)含有量が少なくとも0.5ngである懸濁液により実質的に構成される、請求項5に記載の皮膚組織改善材。
- [7] 皮膚組織改善材を製造する方法であって：
ヒト又は他の哺乳動物の口腔内組織由来の線維芽細胞を用意すること；
前記線維芽細胞を生体外において培養すること；および
前記培養した培養細胞を回収すること；
を包含する、方法。
- [8] 前記用意した線維芽細胞がヒトの歯肉線維芽細胞及び／又は歯根膜線維芽細胞である、請求項7に記載の方法。
- [9] 前記細胞が血管内皮細胞増殖因子(VEGF)及び／又は角化細胞増殖因子(KGF)を産生可能な条件で培養する、請求項7又は8に記載の方法。

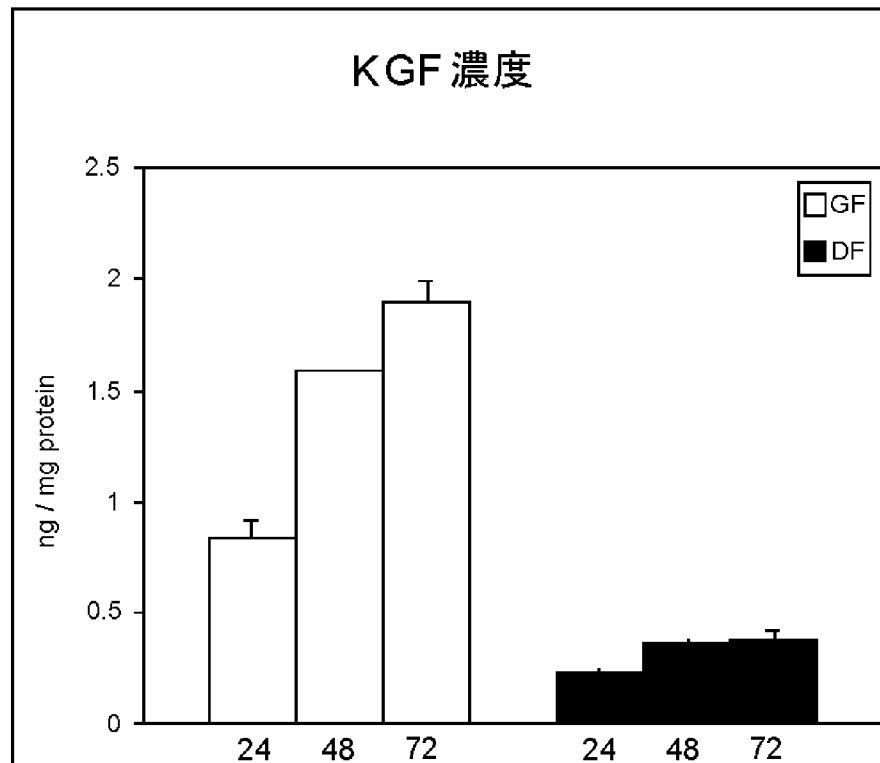
[図1]

FIG.1



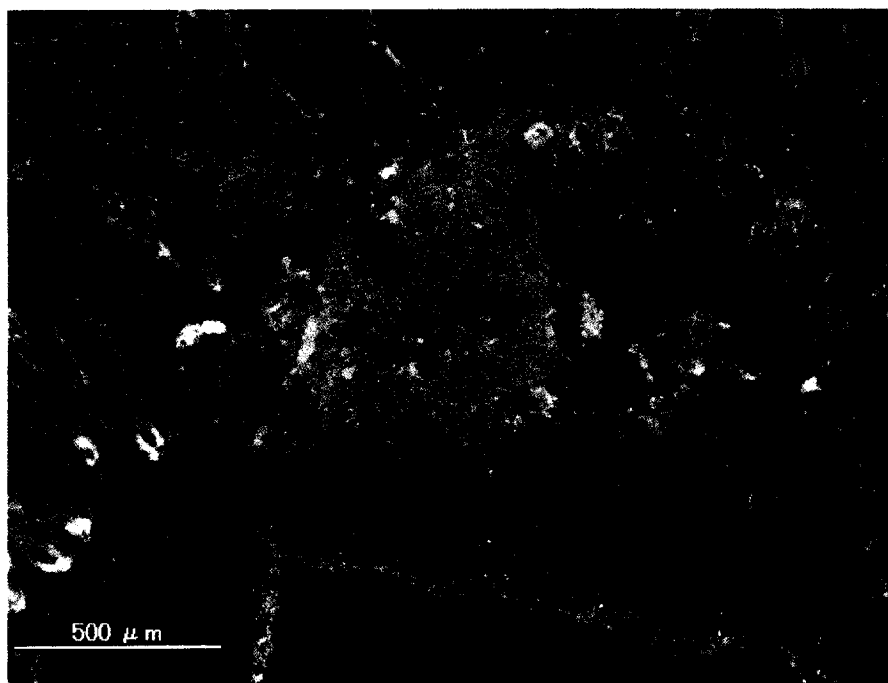
[図2]

FIG.2



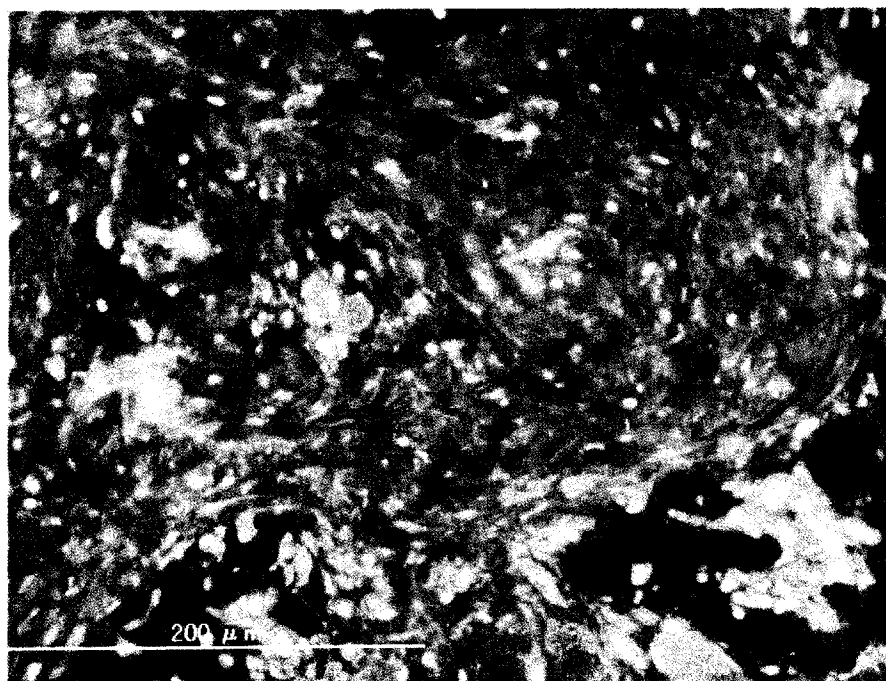
[図3]

FIG.3



[図4]

FIG.4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/312871

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L27/00(2006.01) i, C12N5/06(2006.01) i

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)

A61L27/00, C12N5/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Buurma B. et al., Transplantation of human pulpal and gingival fibroblasts attached to synthetic scaffolds, European Journal of Oral Sciences, 1999, Vol.107, No.4, pages 282 to 289, ISSN: 0909-8836	<u>1-3, 7, 8</u> 1-9
Y	Ortiz-Urda S. et al., Injection of genetically engineered fibroblasts corrects regenerated human epidermolysis bullosa skin tissue, Journal of Clinical Investigation, 2003, Vol.111, No.2, pages 251 to 255, ISSN: 0021-9738	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* 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
22 August, 2006 (22.08.06)

Date of mailing of the international search report
29 August, 2006 (29.08.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/312871

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 11-510069 A (ISOLAGEN TECHNOLOGIES INC.), 07 September, 1999 (07.09.99), Full text; particularly, page 11, line 13 to page 13, line 7 & WO 1997/004720 A1 & US 5591444 A	1-9
Y	Suthin K. et al., Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts, Journal of Periodontal Research, 2003, Vol.38, No.1, pages 90 to 96, ISSN: 0022-3484	5,6,9
Y	Mackenzie I.C. et al., Keratinocyte growth factor expression in human gingival fibroblasts and stimulation of in vitro gene expression by retinoic acid, Journal of Periodontology, 2001, Vol.72, No.4, pages 445 to 453, ISSN: 0022-3492	6,9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61L27/00(2006.01)i, C12N5/06(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61L27/00, C12N5/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2006年
日本国実用新案登録公報	1996-2006年
日本国登録実用新案公報	1994-2006年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(STN), CAplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X -----	Buurma B. et al. Transplantation of human pulpal and gingival fibroblasts attached to synthetic scaffolds,	1-3, 7, 8 -----
Y	European Journal of Oral Sciences, 1999, Vol.107, No.4, pages 282 to 289, ISSN: 0909-8836	1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.08.2006

国際調査報告の発送日

29.08.2006

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 のぶよ

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

4C

3762

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Ortiz-Urda S. et al. Injection of genetically engineered fibroblasts corrects regenerated human epidermolysis bullosa skin tissue, Journal of Clinical Investigation, 2003, Vol.111, No.2, pages 251 to 255, ISSN: 0021-9738	1-9
Y	JP 11-510069 A (ISOLAGEN TECHNOLOGIES INC.) 1999.09.07, 文献全体、特に 11 ページ 13 行目～13 ページ 7 行目 & WO 1997/004720 A1 & US 5591444 A	1-9
Y	Suthin K. et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts, Journal of Periodontal Research, 2003, Vol.38, No.1, pages 90 to 96, ISSN: 0022-3484	5,6,9
Y	Mackenzie I.C. et al. Keratinocyte growth factor expression in human gingival fibroblasts and stimulation of in vitro gene expression by retinoic acid, Journal of Periodontology, 2001, Vol.72, No.4, pages 445 to 453, ISSN: 0022-3492	6,9