

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-528252  
(P2007-528252A)

(43) 公表日 平成19年10月11日(2007.10.11)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 L 27/00</b> (2006.01)	A 6 1 L 27/00	Z 4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 5/10</b> (2006.01)	A 6 1 L 27/00	E 4 C 0 8 1
	A 6 1 L 27/00	G
	A 6 1 L 27/00	Q
	C 1 2 N 5/00	B

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁)

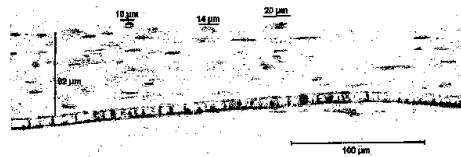
(21) 出願番号	特願2007-502444 (P2007-502444)	(71) 出願人	506305012 アルフォース, ジャン-エリック ダブ リュー.
(86) (22) 出願日	平成17年3月9日 (2005.3.9)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成18年11月6日 (2006.11.6)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 國際出願番号	PCT/IB2005/004091	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02006/048783		
(87) 國際公開日	平成18年5月11日 (2006.5.11)		
(31) 優先権主張番号	60/551,431		
(32) 優先日	平成16年3月9日 (2004.3.9)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】オートジェネシス生体足場および生体組織マトリックス；方法およびその使用

## (57) 【要約】

細胞の分化、脱分化、および/または分化転換ならびに/またはインビトロおよびインビボでの組織の形成を促進すると同時に、細胞の成長、増殖、移動、インビボ様形態の獲得、またはその組み合わせを促進し、1.「オートジェネシス生体足場」(ALS)と呼ばれる細胞、組織、器官、またはその組み合わせを構造的支持および/または栄養的支持を提供するか；2.「生体組織マトリックス」(LTM)と呼ばれるより複雑な組織(またはマトリックス)または完全に異なる組織(またはマトリックス)に形質転換することができる、適切な細胞(または実体)およびこれらの細胞(または実体)によって完全に產生および配置されたECM(またはマトリックス)を含む三次元構造。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

適切な細胞および細胞外マトリックスを含むオートジェネシス生体細胞産生三次元構築物。  
。

**【請求項 2】**

適切な細胞、  
細胞外マトリックス  
を含む、インビトロオートジェネシス生体構築物。

**【請求項 3】**

少なくとも約 200 kPa の最大抗張力を有する、請求項 1 または請求項 2 に記載の構築物。  
10

**【請求項 4】**

少なくとも約 100 μm の厚さを有する、請求項 1 または請求項 2 に記載の構築物。

**【請求項 5】**

少なくとも約 0.2 の破断歪を有する、請求項 1 または請求項 2 に記載の構築物。

**【請求項 6】**

前記細胞外マトリックスが、適切な細胞を超密集で播種し、そして該細胞を過剰密集条件下で維持することによって產生される、請求項 1 または請求項 2 に記載の構築物。

**【請求項 7】**

前記適切な細胞が、無血清培地または血清補充培地を与えられる、請求項 1 または請求項 2 に記載の構築物。  
20

**【請求項 8】**

前記適切な細胞が、線維芽細胞を含み、そして f ALS 培地を与えられる、請求項 6 に記載の構築物。

**【請求項 9】**

前記適切な細胞が、結合組織由来の細胞を含む接着依存性細胞であり、足場がインビボ 3D 結合組織に類似する、請求項 1 または請求項 2 に記載の構築物。

**【請求項 10】**

前記適切な細胞が、線維芽細胞、筋線維芽細胞、間質細胞、内皮細胞、またはインビトロで細胞外マトリックスを產生する任意の他の細胞型のうちのいずれかであり得る、請求項 1 または請求項 2 に記載の構築物。  
30

**【請求項 11】**

前記細胞が、約 1,000 細胞 / mm<sup>3</sup> から約 200,000 細胞 / mm<sup>3</sup> を超える密度で維持される、請求項 1 または請求項 2 に記載の構築物。

**【請求項 12】**

前記足場が、さらなる細胞、組織、またはこれらの組み合わせをさらに含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の構築物。

**【請求項 13】**

前記さらなる細胞または組織が、前記適切な細胞以外の型のものである、請求項 12 に記載の構築物。  
40

**【請求項 14】**

オートジェネシス生体足場である、請求項 1 または請求項 2 に記載の構築物。

**【請求項 15】**

生体組織マトリックスである、請求項 1 または請求項 2 に記載の構築物。

**【請求項 16】**

細胞または組織の分化、脱分化、分化転換、またはこれらの任意の組み合わせのいずれかを促進する、請求項 1 ~ 請求項 15 のいずれか 1 項に記載の構築物。

**【請求項 17】**

前記分化、脱分化、分化転換、またはこれらの任意の組み合わせのいずれかが、インビボまたはインビトロで起こり得る、請求項 16 に記載の足場。  
50

**【請求項 18】**

細胞の成長、増殖、移動、および／もしくはインビボ様形態の獲得、またはその任意の組み合わせのいずれかを促進する、請求項1～請求項15のいずれか1項に記載の構築物。

**【請求項 19】**

前記細胞の成長、増殖、移動、および／もしくはインビボ様形態の獲得、またはその任意の組み合わせが、インビボまたはインビトロで起こり得る、請求項18に記載の足場。

**【請求項 20】**

さらなる細胞、組織、またはこれらの組み合わせをさらに含む、請求項1または請求項2に記載の構築物。

**【請求項 21】**

前記構築物が、オートジェネシス生体足場である、請求項1または請求項2に記載の構築物。

**【請求項 22】**

前記構築物が、生体組織マトリックスである、請求項1または請求項2に記載の構築物。

**【請求項 23】**

前記LTM内の線維芽細胞が、サイトカラシンBが補充された神経培地にLTMを数時間から数日間置配置し、その後に該LTMを新鮮な神経培地に配置することによって、ニューロンに分化転換される、請求項22に記載の生体組織マトリックス。

**【請求項 24】**

前記構築物が、エキソビボ細胞産生組織である、請求項1、請求項2、請求項15、または請求項22に記載の構築物。

**【請求項 25】**

前記さらなる細胞、組織、またはこれらの組み合わせが、幹細胞、先祖細胞、前駆細胞；結合組織、上皮、筋肉、神経、または腺起源の細胞または組織；ならびに神経芽細胞腫細胞、筋芽細胞、星状細胞、心筋細胞、骨格筋の筋芽細胞、肝細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、ケラチノサイト、シュワン細胞、神経細胞、グリア細胞、上皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、間質細胞、メサンギウム細胞、間葉細胞、造血細胞、樹状細胞、免疫系細胞、神経組織、肝臓組織、大動脈組織、静脈組織、毛細管組織、軟骨、骨、筋肉、腺、および毛包を含む、脈管器官および／または非脈管器官起源の細胞を含み得る、請求項12に記載の構築物。

**【請求項 26】**

前記構築物が、細胞、組織、器官、またはこれらの組み合わせの成長を支持する、請求項25に記載の構築物。

**【請求項 27】**

前記さらなる細胞、組織、またはこれらの組み合わせが、幹細胞、先祖細胞、前駆細胞；結合組織、上皮、筋肉、神経、または腺起源の細胞または組織；ならびに神経芽細胞腫細胞、筋芽細胞、星状細胞、心筋細胞、骨格筋の筋芽細胞、肝細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、ケラチノサイト、シュワン細胞、神経細胞、グリア細胞、上皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、間質細胞、メサンギウム細胞、間葉細胞、造血細胞、樹状細胞、免疫系細胞、神経組織、肝臓組織、大動脈組織、静脈組織、毛細管組織、軟骨、骨、筋肉、腺、および毛包を含む、脈管器官および／または非脈管器官起源の細胞を含む、請求項12に記載の構築物。

**【請求項 28】**

前記構築物が、細胞、組織、器官、またはこれらの組み合わせの成長を支持する、請求項27に記載の足場。

**【請求項 29】**

前記構築物が、栄養支持、発生支持、またはこれらの組み合わせを提供する、請求項12に記載の構築物。

**【請求項 30】**

前記構築物が、機械的支持および構造的支持を提供する、請求項12に記載の構築物。

10

20

30

40

50

**【請求項 3 1】**

前記構築物が、該構築物中の細胞に対する支持を提供する、請求項 3 0 に記載の構築物。

**【請求項 3 2】**

前記足場が、移植部位に対する支持を提供する、請求項 3 0 に記載の構築物。

**【請求項 3 3】**

前記構築物が、再生する細胞、組織、または器官に対する支持を提供する、請求項 3 0 に記載の構築物。

**【請求項 3 4】**

前記構築物が、創傷治癒に対する支持を提供する、請求項 3 0 に記載の構築物。

**【請求項 3 5】**

前記構築物が、移植部位および該移植部位の免疫系活性の程度に依存して、接触から約 3 6 時間以内に該移植部位に結合し始め、数日間、数週間、または数ヶ月間結合し続ける、請求項 1 2 に記載の構築物。

**【請求項 3 6】**

前記移植部位が、インビボ部位である、請求項 3 5 に記載の構築物。

**【請求項 3 7】**

前記移植部位が、インビトロ部位である、請求項 3 5 に記載の構築物。

**【請求項 3 8】**

前記移植部位が、組織、器官、またはこれらの組み合わせにおける部位である、請求項 3 6 に記載の構築物。

**【請求項 3 9】**

前記移植部位が、結合組織、上皮組織、筋肉組織、もしくは神経組織のうちの 1 つ、または脈管器官もしくは非脈管器官のうちの 1 つ、あるいはこれらの組み合わせである、請求項 3 7 に記載の構築物。

**【請求項 4 0】**

前記適切な細胞が、線維芽細胞を含み、前記さらなる細胞が、結合組織、上皮、筋肉、神経、腺、脈管器官、非脈管器官の細胞、またはこれらの組み合わせを含む、請求項 1 2 に記載の構築物。

**【請求項 4 1】**

前記構築物がニューロン細胞を含む、請求項 1 2 に記載の構築物。

**【請求項 4 2】**

前記神経細胞の寿命が、前記構築物の非存在下の神経細胞と比較して少なくとも約 2 倍延長される、請求項 4 1 に記載の構築物。

**【請求項 4 3】**

前記ニューロン細胞の脆弱性が、前記構築物の非存在下の神経細胞と比較して少なくとも約 1 / 5 に減少する、請求項 4 1 に記載の構築物。

**【請求項 4 4】**

ヒトの生物学的細胞系、もしくは組織系、またはこれらの組み合わせをインビトロでモデリングする工程を包含する、請求項 1 または請求項 2 のいずれか 1 項に記載の構築物を使用するための方法。

**【請求項 4 5】**

前記適切な細胞が、無血清培地を与えられる、請求項 4 4 に記載の方法。

**【請求項 4 6】**

前記無血清培地が、線維芽細胞の成長を維持するのに適切な濃度で、

基本培地、

塩基性線維芽細胞成長因子 ( bFGF ) または等価な成長因子、

インスリン、

糖質コルチコイド、および

セレン

を含む、請求項 4 5 に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 4 7】**

前記無血清培地が、

過剰な L - グルタミン（好ましくは、G l u t a m a x の形態）；  
さらなる成長因子（上皮成長因子（E G F）、血小板由来成長因子（P D G F）など）  
；  
L - 3 , 3 ' , 5 - トリヨードサイロニン；  
エタノールアミンまたは等価物（すなわち、o - ホスホリルエタノールアミン）を含む  
、脂質前駆体；  
アスコルビン酸（好ましくは、安定な L - アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩 n - 水  
和物形態）；  
抗酸化剤（グルタチオン（還元）またはT r o l o x など）；  
過剰な特異的アミノ酸；  
細胞成長に適合する任意の他の栄養素または因子；ならびに  
細胞外マトリックスの産生に適合する任意の他の栄養素または因子  
のうちの 1 つ以上をさらに含む、請求項 4 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 4 8】**

前記無血清培地が、細胞成長および成長因子の分泌に適合する任意の他の栄養素もしくは  
因子ならびに / または目的の播種された細胞もしくは組織の成長および発達を促進する他の  
化合物をさらに含む、請求項 4 7 に記載の方法。

**【請求項 4 9】**

前記適切な細胞が線維芽細胞を含む、請求項 4 5 に記載の方法。

**【請求項 5 0】**

前記培地が f A L S 培地を含む、請求項 4 9 に記載の方法。

**【請求項 5 1】**

前記構築物が、さらなる細胞、組織、またはこれらの組み合わせと共に播種される、請求  
項 4 4 に記載の方法。

**【請求項 5 2】**

前記さらなる細胞、組織、またはこれらの組み合わせが、幹細胞、先祖細胞、前駆細胞；  
結合組織、上皮、筋肉、神経、および / または腺起源の細胞または組織；ならびに神経芽  
細胞腫細胞、筋芽細胞、星状細胞、心筋細胞、骨格筋の筋芽細胞、肝細胞、軟骨細胞、骨  
芽細胞、線維芽細胞、ケラチノサイト、シュワン細胞、神経細胞、グリア細胞、上皮細胞  
、内皮細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、間質細胞、メサンギウム細胞、間葉細  
胞、造血細胞、樹状細胞、免疫系細胞、神経組織、肝臓組織、大動脈組織、静脈組織、毛  
細管組織、軟骨、骨、筋肉、腺、および毛包などの脈管器官および / または非脈管器官起  
源の細胞を含む、請求項 5 1 に記載の方法。

**【請求項 5 3】**

前記さらなる細胞、組織、またはこれらの組み合わせが、1 つを超えるさらなる細胞型を  
含む、請求項 5 1 に記載の方法。

**【請求項 5 4】**

前記さらなる細胞、組織、またはこれらの組み合わせが、神経芽細胞腫細胞および筋芽細  
胞を含む、請求項 5 3 に記載の方法。

**【請求項 5 5】**

前記さらなる細胞または組織が、特定の個体に由来し、モデリングされる生体系が該特定  
の個体に特有である、請求項 5 1 に記載の方法。

**【請求項 5 6】**

前記さらなる細胞または組織またはこれらの組み合わせが、特定の生物学的供給源に由来  
し、モデリングされる生体系が、該特定の生物学的供給源に特有である、請求項 5 1 に記  
載の方法。

**【請求項 5 7】**

前記特定の生物学的供給源が、結合組織、上皮、筋肉、神経、循環（ホルモンを含む）、

50

免疫、脈管、または非脈管器官起源の供給源を含む、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記特定の生物学的供給源が、ウイルス、プリオン、細菌、真菌、および寄生因子からなる群から選択される微生物因子をさらに含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記特定の生物学的供給源が、肝細胞または肝臓組織であり、前記微生物因子が肝炎ウイルスである、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記モデリングされる生体系に対する 1 以上のさらなる因子の影響を評価する工程をさらに包含し、該 1 以上の因子は、医薬品、酵素、ホルモン、小分子、ペプチド、ポリペプチド、天然産物、天然産物の抽出物、無機塩、他の細胞、成長因子、凝固因子、毒素、毒物、核酸、機械的ストレスインデューサー、電流発生器、電磁場およびパルス発生器、および音波インデューサーを含む、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の構築物を組織を成長させるために使用する方法であって、該方法は、

前記構築物をさらなる細胞および / または組織と共に播種する工程；

播種された細胞および / または組織の成長および発達に好ましい培地を与える工程；

該播種された細胞を前記構築物内に組織成長に十分な期間維持する工程、  
を包含する、方法。

【請求項 6 2】

前記播種された細胞および / または組織を前記構築物内に三次元組織成長を促進する条件下で維持する工程をさらに包含する、請求項 6 1 に記載の構築物の使用する方法。

【請求項 6 3】

前記播種された細胞および / または組織が、結合組織、上皮組織、筋肉組織、神経組織、もしくは腺組織の細胞および / または組織、あるいは脈管器官または非脈管器官の細胞および / または組織、またはこれらの組み合わせを含む、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記構築物ならびに細胞および / または組織を所望の移植部位に配置する工程をさらに包含する、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記組織成長がニューロン組織成長であり、前記移植部位が脊髄である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記組織成長が心筋組織または平滑筋組織の成長であり、前記移植部位が心臓である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記組織成長が脈管組織の成長であり、前記移植部位が動脈または静脈である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記組織成長が脈管組織の成長であり、前記移植部位が心臓、肺、腎臓、肝臓、四肢のうちの任意の 1 以上、または脈管組織を必要とする任意の他の器官である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記組織成長が毛細管組織の成長であり、前記移植部位が任意の 1 以上の毛細管組織を必要とする組織（筋肉組織、神経組織、肺組織、胃組織、腸組織、子宮組織、腎臓組織、肝臓組織、脾臓組織、骨格組織、結合組織、リンパ組織、脈管組織、および皮膚組織を含む）である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記組織成長が結合組織の成長であり、前記移植部位が、関節、骨、腱、靭帯、および軟

10

20

30

40

50

骨を含む、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記結合組織成長が軟骨であり、前記移植部位が、脊柱中の椎骨の間である、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

請求項 6 1 に記載の方法から得られる、細胞または組織。

【請求項 7 3】

線維芽細胞オートジェネシス生体足場 ( f A L S ) 培地であって、該培地は、  
3 : 1 の比の D M E M ( L - グルタミンおよびビルビン酸ナトリウムを含む高グルコース ) : F 1 2 または 2 : 1 の比の I M E M : F 1 2 、

4 m M G l u t a m a x 、

2 . 5 n g / m L ヒト血清アルブミン中の E G F 、

5 . 0 n g / m L b F G F 、

9 0  $\mu$  M インスリン、

1 0 0 n M デキサメタゾン、

2 0 0 p M L - 3 , 3 ' , 5 - トリヨードサイロニン、

1 0 0  $\mu$  M エタノールアミン、

4 0 n M 亜セレン酸、

3 2 0  $\mu$  M L - アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩 n - 水和物

1  $\mu$  g / m L 還元グルタチオン、

1 % p e n / s t r e p / a m p B

10

20

20

30

40

50

を含む、培地。

【請求項 7 4】

請求項 1 または請求項 2 いずれかに記載の構築物から分化される細胞および / または組織を產生する方法であって、該方法は、

該構築物を細胞および / または組織と共に播種する工程；  
そして以下：

該播種された構築物を、塩基性線維芽細胞成長因子 ( b F G F ) 、上皮成長因子 ( E G F ) 、脳由来神経成長因子 ( B D N F ) などの少なくとも 1 つの成長因子と接触させる工程；

該播種された構築物を分化した細胞と接触させる工程；

該播種された構築物を組織と接触させる工程；

該播種された構築物に胎児ヒト血清 ( F H S ) などの血清を含むか含まない成長培地を添加する工程；

該播種された構築物を方向性電磁場に配置する工程、

該播種された構築物をバルーン形状またはディスク形状の鑄型などの特定の孔形状を有する予備成形鑄型に配置する工程；

該播種された構築物を H A R V または S T L V システムなどの擬似的なほぼ無重力の状態の培養環境に配置する工程；

該播種された構築物をエキソビオもしくはインビオ移植部位に移植または配置する工程；

該構築物を分化細胞サンプルと接触させる工程；

該播種された構築物を宿主組織に配置する工程；

該播種された構築物に、分化および組織の再生を促進するのに適切な成長条件 ( ストレスまたは歪などの機械的条件、補助栄養素または成長因子などの化学的条件、ならびに温度、p H 、または大気圧の変化などの環境条件を含む ) を提供する工程；ならびに

該播種された構築物を組織が再生されるような生存条件で維持する工程、  
の工程のうちのいずれか 1 つ  
を包含する、方法。

【請求項 7 5】

損傷しているか失われた組織または器官をインビポで再生する工程をさらに包含する、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の足場を使用して被験体における組織もしくは器官の損傷、または組織もしくは器官の変性を処置するための方法であって、該方法は、

請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の構築物を產生する工程；

そして以下：

a ) 前記構築物と、損傷されたかもしくは変性された組織または器官の型またはクラスの細胞あるいは組織とを使用して、インビトロで組織の新規の器官または組織を再生し、その後、被験体中の組織または器官の損傷または変性部位にこのような構築物を再生された組織または器官の組織と共に移植する工程；あるいは

b ) 該被験体中の組織または器官の損傷または変性部位に、該構築物と該損傷されたかもしくは変性された組織または器官の型またはクラスの細胞あるいは組織を移植し、その後、該損傷されたかもしくは変性された組織または器官の型またはクラスの細胞あるいは組織を有する足場を使用して、新規の器官または該器官の組織をインビポで再生する工程；あるいは

c ) 該構築物のみを使用して、a ) または b ) にあるように新規の器官または該器官の組織を再生する工程、

の工程のうちのいずれか 1 つ

を包含する、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7 7】

前記被験体が、クローン病、癌（肺癌、結腸癌、胃癌、肝臓癌、腎臓癌、脾臓癌、骨の癌、脳の癌を含む）、筋ジストロフィー、眼の変性、糖尿病、心虚血、心臓弁の損傷、または心臓弁の先天的欠損症を罹患している、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

組織もしくは器官の損傷または組織もしくは器官の変性のインビポでの処置において構築物生成組織を使用する方法であって、該方法は、

請求項 7 7 に記載の方法にしたがって組織を產生する工程；

有効量の該組織を組織および／もしくは器官が再生するように宿主細胞の組織損傷部位または組織変性部位に配置する工程

30

を包含する、方法。

【請求項 7 9】

生存可能な脊椎動物ニューロン細胞をインビトロで再生するための方法であって、該方法は、

請求項 1 または請求項 2 に記載の構築物を、脊椎動物の初代神経細胞またはニューロン組織と共に播種する工程；

生存可能な脊椎動物ニューロン組織が生成される条件下で、該播種された構築物を培養物中で維持する工程

を包含する、方法。

【請求項 8 0】

前記構築物が、脊椎動物の神経前駆細胞、神経幹細胞、または神経芽細胞腫細胞と共に播種される、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記構築物が、脊椎動物のグリア細胞と共に播種される、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記脊椎動物のニューロン組織が、哺乳動物神経組織である、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記哺乳動物神経組織が、ヒト神経組織である、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

被験体の麻痺の処置において請求項 1 または請求項 2 に記載の足場を使用するための方法

であって、該方法は、

生存可能な神経組織を使用して構築物を產生する工程；

該被験体中の少なくとも1つの脊髄部位を生存可能な神経組織と共に有効量の該構築物と接觸させて該麻痺を処置する工程  
を包含する、方法。

【請求項85】

被験体における神経変性疾患の処置において請求項15に記載の構築物を使用するための  
方法であって、該方法は、

適切な細胞をLTM内でニューロンに分化転換させる工程；

該被験体中の少なくとも1つの部位を、分化転換したニューロンと共に有効量の構築物  
と接觸させて神経変性疾患を処置する工程であって、ここで該神経変性疾患が、パーキン  
ソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病、統合失調症、痴呆、多発性硬化症、脳性麻  
痺、筋ジストロフィー、ティ・サックス病、狂牛病、またはクロイツフェルト・ヤコブ病  
のうちのいずれか1つである、工程；

を包含する、方法。

【請求項86】

被験体における神経変性疾患の処置において請求項14に記載の構築物を使用するための  
方法であって、該方法は、

ALSを神経前駆細胞または神経幹細胞と共に播種する工程；

該被験体中の少なくとも1つの部位を播種された神経前駆細胞または神経幹細胞と共に  
有効量の該ALSと接觸させて神経変性疾患を処置する工程であって、ここで該神経変性  
疾患が、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病、統合失調症、痴呆、多発  
性硬化症、脳性麻痺、筋ジストロフィー、ティ・サックス病、狂牛病、またはクロイツフ  
ェルト・ヤコブ病のうちのいずれか1つである、工程

を包含する、方法。

【請求項87】

毛包を生成するための方法であって、該方法は、

適切な上皮細胞、表皮組織、および/または皮膚組織から請求項15に記載の構築物を  
產生する工程；

該適切な細胞を前記LTM内で毛包に分化転換させる工程  
を包含する、方法。

【請求項88】

毛包を生成するための方法であって、該方法は、

適切な上皮細胞、表皮組織、および/または皮膚組織から請求項14に記載のLTMを  
產生する工程；

前記ALSを毛包細胞と共に播種する工程  
を包含する、方法。

【請求項89】

前記毛包を、被験体の適切な部位にインピボで配置する、請求項87または請求項88に  
記載の毛包の再生方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

本出願は、米国仮特許出願第60/551,431号(2004年3月9日出願)からの正規の特許出願であり、その全体の内容は、本明細書において参考として援用される。本出願はまた、米国仮特許出願第60/499,142号(2003年8月29日出願)の優先権を主張する米国特許出願第10/930,673号(2004年8月30日出願)(両方の全体の内容は、本明細書において参考として援用される)の一部継続出願である。

10

20

30

40

50

## 【0002】

## (技術分野)

本発明は、適切な生体細胞およびこれらの生体細胞が產生する細胞外マトリックスを含む「生体足場」、特に、「オートジェネシス生体足場（A L S）」に関する。本発明はまた、テンプレートとしてのこのようなオートジェネシス生体足場の使用、ならびに同じ細胞および組織の成長または異なる細胞および異なる組織の成長のための支持構造の使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0003】

米国では、何百万という人々が毎年組織を失っている。最新の処置には、同一個体または別の個体中の健康な部位からの組織移植、喪失組織の機能を支持するための医療デバイスの使用、または喪失組織の代謝産物の薬理学的補充が含まれる。これらの最新の処置における問題には、免疫抑制剤に対する依存の可能性、機械的デバイスの耐久力の限度、ならびに薬理学的補充の不便さおよび複雑さを含む、組織の合併症および不適合の可能性が含まれる。生体組織代替物開発のための現在のアプローチは、細胞の付着および組織発達のための物理的支持体およびテンプレートとしての機能を果たす「足場」を利用する。これらの足場は、理想的には、インビオ状態を真似るために、細胞がインビオで暴露される細胞外マトリックスの構造および組成の両方に類似するように設計される。初期に広く使用された天然の足場は、細胞外マトリックスタンパク質であるコラーゲンでできていたが、より最近では、ポリグリコール酸（P G A）およびポリ乳酸（P L A）などの物質でできている機械的により強度の高い人工足場が使用されている。

10

20

30

40

50

## 【0004】

いくつかの細胞 - 足場組成物は、生体適合材料（コラーゲン、原線維形成コラーゲン、マトリックスG1aタンパク質、オステオカルシン、または他の生体適合材料（海洋サンゴ、サンゴハイドロキシアパタイトセラミック、およびこれらの混合物を含む）のような細胞外マトリックス物質を含む）の多層を有し、そしていくつかのこの足場が、細胞と共に播種され、次いで、異なる頻度で細胞を機械的に刺激するための手段を有するバイオリアクター内に配置される（2002年7月8日に出願され、2004年1月8日に公開されたP. R. Connellらの米国特許出願第0040005297号を参照のこと）。

## 【0005】

さらに、生体組織等価物（L T E）、特に、細胞播種コラーゲンおよびフィブリングルは、インビトロ創傷治癒モデルおよび組織リモデリングの研究のための系として広く使用されている。より最近では、L T Eは、喪失または損傷した結合組織の代替物（例えば、Organogenesis, Inc. のA p l i g r a f<sup>TM</sup>）として非常に注目され始めている。L T Eは、合成代替物を超えるいくつかの利点があり、その利点としては、天然の細胞基質であること、細胞性が直接達成されること、ならびに細胞の拡大および細胞外マトリックス（E C M）の形成が促されることが挙げられる。L T Eは、細胞と可溶性生体ポリマー溶液（例えば、コラーゲン、フィブリン、および/またはプロテオグリカン）との混合によって作製される。細胞は、数日間にわたって生体ポリマー足場に侵入し、再編成し、部分的に分解し、培養期間を通して新規のタンパク質を合成する。しかし、L T Eは、一般に、インビオでの機械的な力に耐えるのに必要な物理的性質を欠き、眞の「生体組織」ではない。

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

ここ20年間にわたり、完全に細胞に由来するL T Eが開発されている。しかし、今日まで、これらは非常に薄く、成長に長期間（一般に、約数ヶ月）を要するのに対して、コラーゲンゲルおよびフィブリングルは、たった数日間で成長することができる。完全に生物学的に細胞に由来するL T E、ならびにインビトロおよびインビオでの創傷治癒および

組織再生で使用するための生体足場についての必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要旨)

特許請求される本発明の実施形態は、強力で完全に生物学的な軟結合組織の代替物を作製するために使用するため、そしてインビトロの創傷治癒および組織発達を試験するための、わずか3週間で発達され得る細胞およびこれらの細胞によって産生されるECM(このECMは、細胞産生マトリックスまたは細胞由来マトリックス(CDM)と呼ばれる)を含む強力で厚みのある細胞産生生体組織等価物(LTE)を提供する。細胞産生マトリックスおよび細胞リモデリングマトリックスの生体力学および対応する生化学的組成物がまた、細胞による細胞外マトリックス(ECM)の自己産生を許容する化学的に規定された培地として提供される。

10

【0008】

他の実施形態は、外因性足場を使用しないで細胞外マトリックスの迅速な産生を促す条件に線維芽細胞を配置し、それにより、線維芽細胞含有(populated)コラーゲンおよびフィブリングルなどの細胞リモデリングマトリックスを使用して得られ得るものよりも有意に強力で厚みのある3-D構造が得られることを開示する。

【0009】

したがって、特許請求される本発明の実施形態は、細胞の分化、脱分化、および/または分化転換ならびに/または組織の形成をインビトロおよびインビボで促進すると同時に、細胞の成長、増殖、移動、および/またはインビボ様形態の獲得(いずれも今まで報告されていない)を促進するために、生体細胞および生体細胞がインビトロで産生する細胞外マトリックスから完全にでできたオートジェネシス生体足場、細胞産生マトリックス(細胞由来マトリックス(CDM)および生体組織マトリックス(LTM)とも呼ばれる)の使用を提供する。

20

【0010】

特許請求される本発明の実施形態は、細胞、組織、器官、またはこれらの組み合わせに對して機械的支持、栄養的支持、および/または発達の支持を提供する細胞産生足場であるオートジェネシス生体足場(ALS)または生体組織マトリックス(LTM)を提供する。本明細書中に開示される細胞産生オートジェネシス生体足場は、その環境に適応することができるよう活発であり、生きており、それにより、生物学的に活性であり、そして播種された細胞および組織以外の全成分は、足場系自体によって天然に形成され、足場がオートジェネシスであるか、または自己産生されるようになる。

30

【0011】

本明細書中に開示のオートジェネシス生体足場は、生体細胞および生体細胞が産生する細胞外マトリックス(ECM)によって作製され、これらを含む。生体細胞は、遺伝子操作され得るか、そうでなければ改変され得る。ALSは、同一または他の細胞株または型のためのブループリント(blue print)、支持構造、骨格、または足場としての機能を果たす。ALSはまた、他の細胞、ALSを産生する細胞、移植部位周囲の組織、損傷に対して、あるいは細胞、組織、および器官をインビトロで生成および再生するために、適切であるかもしくはこれらを支持する機械的環境および化学的環境、シグナル、または刺激を与え得る。ALSはまた、栄養素、成長因子、および他の必要または有用な成分を他の細胞に提供し得、環境における特定の物質のための緩衝液に取り込まれ得るか、または緩衝液としての機能を果たし得、そして新規の環境に適合する可能性を有し得る。

40

【0012】

オートジェネシス生体足場細胞を使用して、目的の細胞または組織と共に播種した場合に心筋などの組織および/または器官を産生することもできる。例えば、肝臓組織を、肝細胞と共に播種したALSから産生することができ、腎臓、脾臓、脊髄、ならびに身体の他の器官および組織を、所望の細胞型または組織型とALSと共に播種することによって

50

產生することもできる。したがって、適切な細胞型と共に播種したオートジェネシス生体足場を使用して、その後のインビボ部位への移植のために、組織および器官をインビトロで移植可能にすることができる。

#### 【0013】

多数の異なる細胞型は、異なる生体足場部分に播種されてもよいし、または、これらを、互いの上部に交互に重ねてもよい。例えば、線維芽細胞オートジェネシス生体足場を、線維芽細胞の組織またはオートジェネシス生体足場への成長に好ましい無血清条件において最初に成長させることができる。次いで、この生体足場を、星状細胞と共に播種し、無血清成長条件（培地、pH、浸透圧、温度、酸素圧、およびその他の必要なものが挙げられる）を、星状細胞の成長に好ましいように調整する。必要な場合、生体足場の生存および健康状態を保持するための他の成分を添加する。また、所望の場合、既に播種された神経によって刺激される骨格筋組織を形成し得る骨格筋細胞などのさらなる層を添加し続けることができる。

#### 【0014】

別の実施形態では、オートジェネシス生体足場を、鋳型によって特定の形状に成長させることもでき、いくらか再成形することもできる。例えば、最初に星状細胞を播種し、その後神経細胞を播種した線維芽細胞オートジェネシス生体足場の上記例のシートを、円柱に巻くことができる。次いで、この円柱を、インビボで脊髄に移植することができる。オートジェネシス生体足場はまた、播種された細胞に機械的支持を提供する。例えば、特定の実施形態では、ニューロンと共に播種した線維芽細胞オートジェネシス生体足場を、ニューロンに主な損傷を与えることなく機械的にストレスを与え、圧縮することができ、このような機械的ストレスおよび圧縮の程度は、ALSの非存在下で成長させた場合にほとんどのニューロンが死滅するものでさえ可能である。他の実施形態のオートジェネシス生体足場を、生体足場および生体足場上で成長する任意の細胞または組織の性質を変化させ得る機械的ストレスまたは張力に導入することもできる。

#### 【0015】

1つの特定の実施形態では、線維芽細胞オートジェネシス生体足場の線維を、播種した神経細胞もこれらの線維に沿って並行して成長するように補助し、特にシュワン細胞を足場に予め播種した場合に、これらの線維にそって並行して最初に成長し始めるような並行した成長を作製することもできる。これは、脊髄に移植した場合になおさらに有用であり得る。なぜならば、移植された神経細胞は、その後に脊髄中の天然の神経細胞と同一方向に整列され得るからである。さらに別の実施形態では、播種したニューロンを含むオートジェネシス生体足場のシートを移植前に円柱に巻いて、脊髄中の天然のニューロンと同一の一般的方向に整列したニューロン層を有する構造を得ることもできる。他の組織および器官への移植のために、同様のことが行われ得る。

#### 【0016】

他の特定の実施形態では、細胞-細胞、組織-組織、および組織-細胞相互作用を、オートジェネシス生体足場を使用して（異なる細胞のサンドイッチが含まれる）インビトロおよびインビボで研究することもできる。さらに別の実施形態では、オートジェネシス生体足場を、生物中の細胞、組織、器官、系、疾患、および器官の成長および発達、ならびに異なる応答を研究するためのインビトロ生体モデルとして使用することができる。例えば、異なる細胞型および組織型に対する創傷応答（線維芽細胞が積極的役割を果たす）を、このテクノロジーの使用によってインビトロで研究することができる。

#### 【0017】

線維芽細胞（特に包皮線維芽細胞）は、多数の成長因子（神経成長因子（NGF）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、およびニューロトロphins-3（NT-3）、ならびに線維芽細胞成長因子（FGF）、および血小板由来成長因子（PDGF）（全てニューロンの再生および生存を促進する）が含まれる）を分泌する。本明細書中に記載のALSの実施形態は、神経細胞が任意の他の現在利用可能な足場よりもインビボで通常暴露される細胞外環境をより密接に模倣し、損傷した脊髄ニューロンをインビボで機能的に交換する

10

20

30

40

50

ために使用され得るので、初代神経細胞がニューロン再生のための潜在的な治療薬についてのインビトロ 3 - D モデルとしての機能し得る活性な 3 - D 神経網をインビトロで形成することが可能である。

【 0 0 1 8 】

本出願の f A L S の特定の実施形態の場合、 A L S の不溶性 E C M タンパク質であるコラーゲンおよびフィブロネクチンに沿った高密度の線維芽細胞が、慢性的に損傷した脊髄に移植された場合に軸索の伸長および機能回復を促進するように協力して作用する。さらに、インビトロでの機能的神経網の発達により、移植した場合に神経移植片をより有用にすることが可能であり、本明細書中に開示されたインビトロ 3 - D 神経ネットワークモデルに対する異なる医薬品および方法の影響を研究するために重要である。

10

【 0 0 1 9 】

他の実施形態では、 A L S における機能的神経網の発達に及ぼす異なる栄養補助剤および成長因子の影響も研究することができる。したがって、本発明の実施形態では、一旦ニューロンが A L S に播種されると、成長培地を A L S の成長を支持する培地からニューロンの成長および分化を促進する培地に交換すると同時に、線維芽細胞の成長を遅延させる。これにより、線維芽細胞がニューロンを過剰産生 ( o v e r - r u n n i n g ) するのを回避され、ニューロンの発達が有効に回避される。他の実施形態では、ニューロンの生存および発達をなおさらには強化するために N G F 、 B D N F 、 F G F - 2 、および b F G F などの成長因子をより多く分泌するように、線維芽細胞が遺伝子操作され得る。

20

【 0 0 2 0 】

さらに他の実施形態では、 A L S 神経移植片は、ほとんど任意の非剛性 ( n o n - r i g i d ) 形状を取る可撓性を有し、球状または円柱に巻かれ得る。いくつかの薄い神経移植片は、互いの上部に重層されて神経網の異なる並行層を形成し得、再度円柱に巻かれてもよいし、いくつかの他の形状に形成されてもよい。

20

【 0 0 2 1 】

別の実施形態は、細胞、組織、またはその組み合わせ（幹細胞、先祖細胞、前駆細胞、結合組織、上皮、筋肉、神経、および / または腺起源の細胞または組織；ならびに脈管器官および / または非脈管器官起源の細胞（神経芽細胞腫細胞、筋芽細胞、星状細胞、心筋細胞（ c a r d i o m y o c y t e ）、骨格筋の筋芽細胞、肝細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、ケラチノサイト、シュワン細胞、神経細胞、グリア細胞、上皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、心筋細胞（ c a r d i a c m u s c l e c e l l ）、間質細胞、メサンギウム細胞、間葉細胞、造血細胞、樹状細胞、免疫系細胞、神経組織、肝臓組織、大動脈組織、静脈組織、毛細管組織、軟骨、骨、筋肉、腺、および毛包などのいずれかが含まれる）と共に播種されたオートジェネシス生体足場を提供する。

30

【 0 0 2 2 】

別の実施形態は、細胞が細胞のみによって完全な 3 D マトリックスを产生するので、インビトロでの生成 / 再生結合組織を厳密に模倣する生体組織マトリックス ( L T M ) を提供する。実際、 L T M は、瘢痕を伴って治癒する新生児または成体の哺乳動物の創傷と対照的に瘢痕を伴わないで再生する胚の創傷治癒（および他の非瘢痕形成組織創傷の治癒）における創傷床に最初に満たされる線維芽細胞含有結合組織型の組成と類似している。さらに、この方法により、コラーゲンまたはフィブリングルなどの成体ポリマーを用いて得られるも有意に厚くかつ強い 3 - D 構築物 ( L T M ) が产生される。全生体組織マトリックス（細胞および E C M ）を、完全に自系にし、それにより、宿主の拒絶反応を防止し、完全に免疫適合性にすることも可能である。

40

【 0 0 2 3 】

別の実施形態では、 L T M 系で产生された E C M により、再生環境および実質上の芽腫を得るために L T M 内で脱分化または分化転換された自系成体細胞についての最適環境が提供される。言い換えると、 L T M 内の何百万もの線維芽細胞（最初に L T M を产生した細胞）が脱分化または分化転換される場合、 L T M は、有効に、多組織型再生のための構造的に健全な移植可能な線維芽細胞様構造になることができる。

50

## 【0024】

別の実施形態は、D M E M (高グルコース - 4 . 5 g / L - L - グルタミンおよびピルビン酸ナトリウムを含む) および H a m F 1 2 倍地を 3 : 1 の比率で含み (または I M E M と H a m F 1 2 倍地とを 2 : 1 で含む) 、 4 . 2 × 1 0 <sup>- 1 0</sup> M 上皮成長因子 (ヒト血清アルブミン) 、 2 . 8 × 1 0 <sup>- 1 0</sup> M 塩基性線維芽細胞成長因子、 8 . 6 × 1 0 <sup>- 5</sup> M インスリン、 1 . 0 × 1 0 <sup>- 7</sup> M デキサメタゾン、 3 . 2 × 1 0 <sup>- 4</sup> M L - アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩 n - 水和物、 2 × 1 0 <sup>- 1 0</sup> M L - 3 , 3 ' , 5 - トリヨードサイロニン、 1 0 <sup>- 4</sup> M エタノールアミンまたは他の脂質前駆体、 3 . 9 × 1 0 <sup>- 8</sup> M 亜セレン酸、 4 × 1 0 <sup>- 3</sup> M G l u t a m a x <sup>TM</sup> 、 3 . 3 × 1 0 <sup>- 6</sup> M グルタチオン (還元) 、 および 1 % ペニシリン / ストレプトマイシン / アンフォテリシン B を補充した A L S または L T M の成長のための化学的に規定された培地処方物 ( 「 f A L S 培地 」 または 「 マトリックス培地 」 と呼ばれる) を提供する。さらに、上に列挙した培地の他の実施形態およびバリエーションは、さらなる成分 ( 例えば、血小板由来成長因子 ( P D G F ) 、 1 0 0 : 6 8 の比のグリシン : L - プロリン、 L - システィン、 および T r o l o x のうちの任意の 1 以上のもの ) を含み得る。培地中の総浸透圧が A L S の成長に許容可能なレベルで維持される限りは、必要な場合に、濃度を変化させることができる。

## 【0025】

他の実施形態は、 A L S または L T M を使用した組織および / または器官の成長方法、ヒト生物学的細胞系またはその組み合わせの組織系をモデリングするための A L S または L T M を使用するための方法を提供する。さらに、モデリングされる生体系に及ぼす 1 つまたは複数の因子の影響を評価するために A L S または L T M を使用する方法が提供され、ここで 1 つまたは複数の因子としては、医薬品、酵素、ホルモン、小分子、ペプチド、ポリペプチド、天然産物、天然産物の抽出物、無機塩、他の細胞、成長因子、凝固因子、毒素、毒物、核酸、機械的ストレスインデューサー、電流発生器、電磁場およびパルス発生器、および音波インデューサーが挙げられる。

## 【0026】

さらに他の実施形態は、 A L S または L T M を產生する工程と、以下の工程 : a ) 前記足場と、損傷しているか再生した組織または器官の型もしくはクラスの細胞または組織を使用してインビトロで組織の新規の器官または組織を再生し、その後、被験体中の組織または器官の損傷または変性部位にこのような足場を再生した組織または器官の組織と共に移植する工程 ; あるいは b ) 被験体中の組織または器官の損傷または変性部位に、足場と、損傷しているか変性した組織または器官の型もしくはクラスの細胞または組織とを移植し、その後、前記損傷しているか変性した組織または器官の型もしくはクラスの細胞または組織を有する足場を使用して、新規の器官または器官の組織をインビトロで再生する工程 ; あるいは c ) 足場のみを使用して、 a ) または b ) にあるように新規の器官または器官の組織を再生する工程、のうちのいずれか 1 つとを包含する、クローン病、癌 ( 肺癌、結腸癌、胃癌、肝臓癌、腎臓癌、脾臓癌、骨肉腫、脳腫瘍が含まれる ) 、筋ジストロフィー、眼の変性、糖尿病、心虚血、心臓弁の損傷、または心臓弁の先天的欠損症を罹患した被験体において、組織もしくは器官の損傷または組織もしくは器官の変性を処置するための A L S または L T M の使用方法を提供する。

## 【0027】

他の実施形態は、 A L S を、脊椎動物の初代神経細胞またはニューロン組織と共に播種する工程と、生存可能な脊椎動物ニューロン組織が生成する条件下で播種した足場を培養物中に維持する工程とを包含する、 A L S を使用したインビトロでの生存可能な脊椎動物ニューロン組織の產生する方法を提供する。次いで、被験体中の少なくとも 1 つの脊髄部位を生存可能な神経組織と共に有効量の A L S と接触させて麻痺を処置することにより、このような生存可能な脊椎動物ニューロン組織が、別の実施形態で使用されて、被験体の麻痺を処置する。

## 【0028】

同様に、他の実施形態は、神経変性疾患が、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツ

10

20

30

40

50

ハイマー病、統合失調症、痴呆、多発性硬化症、脳性麻痺、筋ジストロフィー、ティ・サックス病、狂牛病、またはクロイツフェルト・ヤコブ病のいずれか1つである、被験体中の少なくとも1つの部位を生存可能なニューロン組織と共に有効量のALSまたはLTMと接触させて神経変性疾患を処置することによる、被験体の神経変性疾患を処置するための方法を提供する。

#### 【0029】

本発明の上記特徴は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照して、より深く理解される。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0030】

##### (特定の実施形態の詳細な説明)

定義。本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、以下の用語は文脈上他の意味が必要でない限り、表示の意味を有する。

#### 【0031】

本明細書中で使用される、「オートジェネシス生体足場」または「ALS」は、細胞、組織、器官、またはその組み合わせの成長を支持する細胞（または実体）およびこれらの細胞（または実体）によって完全に產生および配置されたECM（またはマトリックス）を含む三次元構造を意味する。「オートジェネシス」は、細胞、組織、器官、またはその組み合わせに対する機械的支持、栄養的支持、および発達の支持を提供する、自己產生された足場を意味する。「生体」は、足場が活発であり、その環境に適応することを意味する。「生体」はまた、生物学的に活性であり、播種された細胞および組織を除く全成分が、足場系自体によって天然に形成、產生、および合成される（すなわち、足場はオートジェネシスである）ことを意味する。「足場」は、組織などの単位内の全細胞の適切な機能に必要である細胞の成長方向を誘導し、細胞に正確に間隔をあけさせることができ、過剰密集（over crowding）を防止し、細胞を相互伝達させることができ、わずかな生体信号を伝達し、その環境からシグナルを受け取り、結合および接触を形成する細胞のための構造フレームワークを提供することを意味する。

#### 【0032】

本明細書中で使用される、「類似する」は、比較される材料または系の間に物理的、機能的、組成、構造的、表現型、または他の類似性が存在し、その結果、対象物が実質的に等価であることを意味する。「実質的に等価な」は、視覚的、顕微鏡的、物理的、機能的、ならびに他の観察およびアッセイにより、材料または系が容易または有意に区別されないことを意味する。容易または有意な区別は、例えば、染色、顕微鏡、抗体などの標準的なアッセイおよび観察技術を使用して速やかに明らかとなるか容易に検出可能な機能的相違、物理的相違、組成の相違、構造の相違である。

#### 【0033】

本明細書中で相互に交換して使用される、「細胞外マトリックス」（ECM）または「細胞由来マトリックス」（CDM）または細胞產生マトリックスは、細胞から細胞外空間に產生されるか、または細胞から分泌される細胞由来の分泌構造物質を意味する。ECM/CDMにより、組織の成長、分化、および產生のための任意の細胞型の成長テンプレートが提供される。本明細書中で使用される場合、「任意の細胞型」には、幹細胞、前駆細胞、分化細胞、および任意の他の細胞または実体が含まれる。この用語はまた、2003年8月29日に出願された米国特許出願第60/499,142号の優先権を主張した2004年8月30日に出願された米国特許出願10/930,673号（その両方の全ての内容が本明細書中で参考として援用される）に記載のRadicali実体およびRadicali前細胞（pre-cell）および細胞によって產生される細胞外成長マトリックス（ECGM）をいうマトリックス材料を含むことが意図される。ECMは、細胞を付着させ、細胞を移動させ、細胞分化を促進させる。ECMはまた、所望の細胞型または既存の細胞型の新規の組織の形成を補助する。本明細書中で使用される、「細胞由来マトリックス（CDM）とも呼ばれる細胞產生マトリックス」は、細胞（または実体）に

10

20

30

40

50

よってインピトロで完全に產生されたか整列された三次元E C M（またはマトリックス）構造も意味する。

【0034】

本明細書中で使用される、「構築物」は、足場のマトリックスなどの機械的性質を有する物理的構造を意味する。構築物は、オートジェネシス生体足場、生体組織マトリックス、エキソビオ細胞產生組織および細胞由来マトリックスを包含する。

【0035】

本明細書中で使用される、「細胞由来」は、材料、物体（body）、または成分の供給源が、細胞または細胞集団であることを意味する。

【0036】

本明細書中で使用される、「エキソビオ細胞產生組織（ECT）」は、1つまたは複数の細胞型（または実体）を含む機能的組織、およびいくつかのこれらの細胞（または実体）によって完全に產生および配置されたE C M（またはマトリックス）を意味する。例えば、A L S 中で分化されて神經組織を形成した神經前駆細胞と共に播種されたA L S からなるエキソビオ細胞產生神經移植片。

【0037】

本明細書中で使用される、「生体組織マトリックス（LT M）」は、細胞（または実体）およびこれらの細胞（または実体）によって完全に產生および配置されたE C M（またはマトリックス）からなるより複雑な組織（またはマトリックス）または完全に異なる組織（またはマトリックス）に変換され得る三次元組織（またはマトリックス）を意味する。

【0038】

本明細書中で使用される、「生体組織等価物（LTE）」は、特定の天然の組織型を模倣することを意図する生体細胞を含む構築物を意味する。この構築物を、任意のインピトロ手段（人工足場の使用が含まれる）によって產生することができる。

【0039】

「超密集（superconfluence）条件」または「超密集（superconfluence）」は、本出願の文脈の範囲内で、細胞が互いにほとんど直接隣および上に密集するような高密度成長条件で細胞が成長および維持されることを意味する。

【0040】

本明細書中で使用される、「過剰密集（hyperconfluence）条件」は、細胞およびその関連E C Mが培養皿の底の全ての空間を占め、三次元的に（互いの上部に）成長し始めるようなインピトロ細胞培養／成長の条件を意味する。

【0041】

本明細書中で使用される、「基本培地」は、真核細胞のインピトロ培養を支持する任意の細胞培養培地を意味し、これらとしては、D u l b e c c o 改変イーグル培地（D M E M）、H a m ' s F - 1 2 (F 1 2)、H a m ' s F - 1 0 (F 1 0)、I s c o v e 改変D M E M (I D M E M)、培地199、A l p h a M E M、E a r l e のB S S を含む基本イーグル培地、凍結防止培地（凍結培地）、D M E M : F 1 2 1 : 1、L - グルタミンをふくむもの；L - グルタミンを含むG l a s g o w ' s M E M (G M E M)、H E P E Sを含み、L - グルタミンを含むか含まないI M D M、L - グルタミンを含まないL - 1 5 (L e i b o v i t z)、M c C o y ' s 5 A 改変培地、培地199、M E M E a g l e 、L - グルタミンを含むか含まないM E M E a g l e - E a r l e ' s B S S 、M E M E a g l e - H a n k s B S S 、N C T C - 1 0 9 、R i c h t e r ' s C M 培地、H E P E Sを含むR P M I 1 6 4 0 、R P M I 1 6 4 0 、またはこれらのいずれかの組み合わせが挙げられる。

【0042】

本明細書中で使用される、「糖質コルチコイド」は、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、コルチコステロン、コルチゾール、コルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾン、ブデゾニド、ベクロメタゾン、または糖質コルチコイドに分類される

10

20

30

40

50

か、一般に糖質コルチコイドと呼ばれるか、糖質コルチコイドレセプターと相互作用する任意の他の化合物を意味する。

【0043】

本明細書中で使用される、「多数の線維芽細胞の成長」は、少なくとも約1,000細胞/mm<sup>3</sup> ~ 200,000細胞/mm<sup>3</sup>超を得るための複数の線維芽細胞培養物の成長、または少なくとも約1,000細胞/mm<sup>3</sup> ~ 200,000細胞/mm<sup>3</sup>超を得るための単一の培養物の成長を意味する。

【0044】

本明細書中で使用される、「成長および発達」は、産生能力および生存能力を意味し、増殖および分化および/または組織の発達が含まれる。

10

【0045】

本明細書中で使用される、「脆弱性」は、細胞が容易に破壊されるか損傷する傾向を意味し、物理的ストレスに供される場合の細胞の物理的脆弱性および弱さ、構造の頑丈さの欠如、およびインタクトなままであることが不可能なことをいう。

【0046】

本明細書中で使用される、「三次元組織成長を促進する条件」は、三次元組織成長を促進するか、補助するか、さらにまたは任意の方法で発達させる、インビトロまたはインビボの条件を意味する。条件には、特定の培地、成長因子、無機質、インキュベーション温度、細胞密度、曝気、震盪の使用、所望の組織の成長を成形して含めるためのALS「鑄型」の使用、所望の組織の成長のためのSynthecon<sup>TM</sup>のほぼ無重力状態のインキュベーターシステム(HARVおよびSTLVなど)などの減圧チャンバーの使用、マイクロキャリアビーズの使用、天然または生分解性足場の使用、結合組織、上皮組織、筋肉組織、および/もしくは神経組織などの器官または組織などのインビボ部位への非線維芽細胞播種オートジェネシス生体足場の移植が含まれ得る。

20

【0047】

本明細書中で使用される、「等価な成長因子」は、線維芽細胞を非生存性にすることなく線維芽細胞の細胞培養において特定の成長因子に置換し得る任意の成長因子を意味する。上皮成長因子(EGF)について、この等価な成長因子には、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、線維芽細胞成長因子2(FGF-2)、および形質転換成長因子(TGF-)が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0048】

本明細書中で使用される、「線維芽細胞成長および細胞外マトリックスの產生を支持する濃度」は、線維芽細胞の成長、再生、増殖、分化を可能にするモル濃度、重量/体積%、重量/重量%、体積/体積%、もしくは濃度測定のための任意の他の標準的な手段、または細胞外マトリックス材料を生存可能なままにして產生する任意の他の方法によって決定された成長培地成分の濃度を意味する。

40

【0049】

本明細書中で使用される、「再生組織」は、播種した細胞および/組織を含むか含まないオートジェネシス生体足場が、以前に存在しなかつたか、以前に組織が部分的または完全に機能しない場合、再度組織を形成するか、作製するか、構築するか、そうでなければ生成することを意味する。

【0050】

本明細書中で使用される、「成長を支持する」は、成長が、目的の系と適合し、そして/または目的の系によって促進されることを意味する。例えば、語句「足場が細胞成長を支持する」または「組織成長を支持する」、または「器官成長を支持する」は、ALSが、足場内、足場上もしくは足場全体での細胞、組織、または器官の成長と適合し、そして/あるいはその成長を促進することを意味する。

【0051】

本明細書中で使用される、「遺伝子操作された」は、細胞または実体が、化学的、物理的、ストレス誘導性、もしくは他の手段などの人による操作によって変異および選択を受

50

けるか、または外因性核酸がトランスフェクションなどの任意の標準的手段によって実際に細胞または実態に導入され、その結果、その細胞または実体が、新規の特徴、表現型、遺伝子型、および／または遺伝子発現産物（遺伝子マーカー、遺伝子産物、および／またはmRNAが含まれるが、これらの限定されない）を獲得し、元の細胞または実体に遺伝子レベルで遺伝的に操作されていない非選択対応の細胞または実体に存在しない機能、特徴、または遺伝子エレメントが付与されることを意味する。

【0052】

オートジェネシス生体足場に関して本明細書中で使用される、「活発な（smart）」は、生体足場が、その環境に適合し、その状況および周囲の状況（surroundings）に対して変化し、反応性様式および活性様式の両方で、物理的手段、生化学的手段、細胞シグナル伝達、酵素手段および／または遺伝的手段によって、周囲の因子、細胞、実体、および構造物と相互作用し反応することを意味する。活発であることには、より複雑な、生化学的、物理的、および／または遺伝的に進化した材料、系、足場、またはマトリックスへの変形；機能的、物理的、生化学的、および／または遺伝的な進化；ならびに周囲の細胞、実体、および材料への機能的、物理的、生化学的、および／または遺伝的な組み込みも含まれ得る。

【0053】

本明細書中で使用される、「細胞外成長マトリックスの產生に適切な細胞または細胞型」または「任意の適切な細胞型によって產生された」は、インピトロで細胞外マトリックスを產生するために操作され得る任意の細胞、細胞型、または細胞実体（Radicali実体、およびRadicali前細胞、およびこれらが由来するRadicali細胞が含まれる）を意味する。「インピトロで細胞外マトリックスを產生するように操作した」は、条件、培地、因子、および刺激が存在せず、且つ細胞外マトリックス材料の產生を刺激するために適用され得る不適切な細胞型および細胞実体と対照的に、成長条件、成長培地、補充因子、および適切な刺激が存在し、且つ細胞外マトリックス材料の產生を刺激するためにこれらの細胞および実体に適用され得ることを意味する。

【0054】

本明細書中で使用される、「脂質前駆体」は、脂肪酸鎖の連結のための構造骨格を形成する脂質の合成または生合成の小分子前駆体を意味する。例には、エタノールアミンまたはo-ホスホリルエタノールアミンなどの等価物が含まれ、本明細書中に開示のALSの成長のための無血清培地でエタノールアミンに交換可能な任意の他の物質も含まれる。

【0055】

本明細書中で開示される、「オートジェネシス生体足場（ALS）」は、生体細胞およびこれらの生体細胞が產生する細胞外マトリックス（ECM）から作製され、これらから構成される。これらのオートジェネシス生体足場が含む生体細胞は、遺伝子操作され得るか、そうでなければ改変され得る。これらは、同一または他の細胞株または細胞型のためのブループリント、支持構造、骨格、または足場としての機能を果たす。ALSはまた、他の細胞、ALSを產生する細胞、移植部位周囲の細胞、創傷に対して、あるいは、細胞、組織、および器官をインピトロで生成および再生するために、適切であるかまたは支持する機械的および化学的環境、シグナル、または刺激を提供する。これらはまた、他の細胞に、栄養、成長因子、および他の必要または有用な成分を提供し得る。これらはまた、環境における特定の物質のための緩衝液に取り込まれるか、緩衝液としての機能を果たすこともでき、新規の環境に適合する可能性もいくら有し得る。

【0056】

ALSの線維芽細胞產生マトリックス、すなわち「細胞由来マトリックス」（CDM）は、多数の不溶性細胞外マトリックス（ECM）分子（おそらくインピボでの比率に近い比率のフィブロネクチン、コラーゲン-1、およびコラーゲン-3が含まれる）から構成される。したがって、ALSは、インピトロでALS上に播種された線維芽細胞および他の細胞の両方に、人工足場およびコラーゲンゲルなどの再構成された細胞外マトリックスが提供するよりも「天然の」環境、またはインピボでの天然の組織の環境により厳密に類似する。

10

20

30

40

50

似する環境を提供することができる。したがって、A L Sにより、インビオ条件のより正確なインビトロ刺激を医学的処置およびインビトロモデル系のより良好な設計に役立てることが潜在的に可能である。

#### 【0057】

1つの実施形態では、A L Sは、線維芽細胞によって產生された緻密な細胞外マトリックスに囲まれたゆっくり増殖する多層化線維芽細胞から構成され、その大部分が超分子的に組織化されたコラーゲンからなる。この自己產生される機械的にストレスを受けた環境下での線維芽細胞は、合成表現型(*synthetic phenotype*)が推測される。線維芽細胞の合成表現型は、インビオで結合組織において最も一般的に見出される表現型であり、低細胞増殖、高コラーゲン蓄積、線維性フィプロネクチンの組織化、ならびにアクチントレス線維および局所性接着の形成によって特徴付けられる活性化細胞表現型である(Kesslerら, 2001)。これにより、A L Sをマトリックス上に播種された他の細胞型に対する構造支持を提供するのに十分な強度にする(それにより、足場としての機能を果たす)ことが可能である。A L S中での線維芽細胞のゆっくりとした増殖速度により、線維芽細胞が他の細胞型を過剰成長させることが回避される。線維芽細胞の成長を促進する培養培地からその後の播種細胞の成長および発達を促進する(それと同時におそらく線維芽細胞の成長を遅らせる)培養培地への培養培地の交換はまた、線維芽細胞が播種した細胞および/または組織を確実に過剰成長させないように役立つ。

#### 【0058】

化学的に規定された培地により、A L S成長パラメーターがより制御され(それにより、その機械的性質および化学的性質が制御される)、細胞分化のためのインビトロ生物モデルおよび足場中の非ヒト成分が排除される。いくつかの化学的に規定された線維芽細胞用培地は、長い年月をかけて処方されている(Bettgerら, 1981; ShiplerおよびHam, 1983; Parenteau, 1994; Vaccarielloら, 1999)。強度、密度が高く、迅速に成長するECMを有効に產生させないと同時に、線維芽細胞自体の成長を十分にゆっくり維持し、それにより、線維芽細胞が系に播種された他の細胞を過剰產生しない。A L S培地により、インビトロでの目的の細胞および組織の產生、その後のインビオでの移植のためのオートジェネシス「生体」足場(A L S)系が適切に產生され(ここでこの系の全成分は、完全に定義され、非ヒト成分を含まない)、このようにして形成されたA L Sは、有効且つ経済的な様式で目的の細胞および組織の成長を容易にするのに十分な強度、順応性、および厚さである。

#### 【0059】

特に無血清条件で成長し、その成長速度および他の特徴が制御され得る線維芽細胞(これらは厚さがたった数個の細胞分であり得る(すなわち、厚さ1mm超))および間質細胞などの他の類似の細胞クラス(ほとんどの足場依存性クラスの細胞)から作製されるオートジェネシス生体足場はまた、インビオで移植された場合、別の重要な役割を果たし得る。例えば、線維芽細胞オートジェネシス生体足場(f A L S)は、成長し得、数時間~数日以内にこれら自体が移植部位に付着し得、それにより、移植細胞を移植部位に対して固定し続けるのを補助し得る。これは、例えば、わずかな程度の成長軸方向の変化によって神経が移植部位に隣接する既存の神経と有効に連結するのを回避し得る神経移植片において非常に重要である。線維芽細胞A L Sはまた、その環境に適応する能力を有し、それらを「活発に」する。例えば、心臓の損傷部分を切り出し、心筋細胞(cardiomyocyte)および/または骨格筋の筋細胞と共に播種した線維芽細胞A L Sまたは筋線維芽細胞A L Sをこの部位に移植した場合、線維芽細胞または筋線維芽細胞は成長し、比較的の短期間でこれら自体が切開部位周囲の心筋の残存部位に付着し、足場を心筋周囲にほとんど完全に固定し続ける。次いで、心筋細胞(cardiomyocyte)または骨格筋の筋細胞(または他の播種細胞)が成長し、新規の心筋または類似の心筋代替物に発達し、既存の心筋に付着および連結する。コラーゲンIよりもコラーゲンIIが高い線維芽細胞A L Sまたは筋線維芽細胞A L S(ほとんどの包皮線維芽細胞から分泌されたECMと同様に)を使用した場合、切開部位および移植部位の瘢痕が縮小され得る。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 0 】

オートジェネシス生体足場細胞はまた、細胞がインビボに暴露される天然の環境をより厳密に模倣するか類似する比率で、他の有用且つ有利な成分を產生し得る。これは、播種された細胞が、天然の組織および器官により厳密に類似した組織および器官に成長ならびに発達するのを補助する。インビボで移植された場合、特に、オートジェネシス生体足場を含む細胞が異なる宿主に由来する場合、少なくとも部分的にオートジェネシス生体足場は時間と共に消滅すると予想される。しかし、オートジェネシス生体足場上に播種された細胞から発達する組織または器官は、残存すると予想される。心筋および心臓だけでなく、目的の細胞または組織と共に播種される A L S を使用して、他の器官または組織が產生され得る。例えば、肝細胞と共に播種される A L S から肝臓組織を產生することができ、所望の細胞型または組織型と A L S を播種することにより、腎臓、臍臓、脊髄、ならびに身体の他の器官および組織を產生することもできる。したがって、適切な細胞型と共に播種されるオートジェネシス生体足場を使用して、移植可能な組織および器官をインビトロで成長させ、その後インビボ部位に移植することができる。一般に、本発明の実施形態が細胞および細胞が產生する足場を含む場合、この材料を、生体足場または「オートジェネシス生体足場（ A L S ）」という。組織または器官を產生するために足場を細胞と共に播種する場合、この材料を、「エキソビオ細胞產生組織（ E C T ）または器官（ E C O ）」という。本発明の実施形態は、ヒト皮膚線維芽細胞などの特定の細胞は、新規の細胞成長および組織の形成を容易にし、補助する役割を果たす格子様基質またはメッシュ様基質を形成する、本明細書中で細胞產生マトリックスまたは細胞由来マトリックス（ C D M ）と呼ばれる広範な 3 - D 構造の纖維状材料を產生するように誘導され得ることを実証する。得られた生体組織マトリックス（ C D M + C D M を產生した線維芽細胞）は、特定の細胞から構成される組織および器官を形成するための他の細胞の移動および集合の前に形成される、初期結合組織に類似する。例えば、両生類の胚形成時に、心臓の形成は、この線維芽細胞含有結合組織型の形成から始まり、その後に、これらの線維芽細胞が心臓細胞に分化転換され、最終的に両生類の心臓を形成する。胚創傷治癒（および非瘢痕形成組織創傷治癒）では、創傷床は、最初に生体組織マトリックスに類似する線維芽細胞含有結合組織型で満たされ、その後に移動して損傷組織の細胞と共に損傷部位に再集合（ r e p o p u l a t i o n ）する。予備実験では、 L T M により、任意の細胞型の新規の細胞成長のための足場および / またはテンプレートが提供され（したがって、「生体足場」としての機能を果たす）、そして組織損傷部位での細胞の付着、移動、増殖、および分化（特に、組織の生成および再生）を補助するように機能することが示された。さらに、 L T M は、 L T M 内での線維芽細胞の分化転換および脱分化によって、インビボでの多組織再生のための「移植可能な芽体」に形質転換され得る。

## 【 0 0 6 1 】

生体組織マトリックスは、有意に増殖することなく合成期に入らせるマトリックス培地などの化学的に完全に定義された培地（血清添加せず）中に過剰密集密度で皮膚線維芽細胞などの適切な細胞を培養することにより產生される（これらの特殊な条件下に置く前に、線維芽細胞を迅速に増殖するように誘導し、密集に到達せることなく継代する）。この相において、分泌された細胞外マトリックス（ E C M ）は、典型的な線維芽細胞培養物の E C M と顕著に異なり、インビボでの生成 / 再生環境で見出される細胞外マトリックスにより厳密に類似する。高濃度のヒアルロン酸およびデコリンを含む I 型と比較して I I 型コラーゲンの比率が高い。

## 【 0 0 6 2 】

細胞が細胞自体によって完全な 3 D マトリックスを產生するため、 L T M は、現在存在する任意の他のマトリックス、足場、または構造よりもインビボ生成 / 再生性結合組織と厳密に類似するようである。実際、 L T M は、瘢痕を伴って治癒する新生児または成体の哺乳動物における創傷と対照的に、瘢痕を伴わないで再生する胚の創傷治癒（および他の非瘢痕形成組織創傷の治癒）において創傷床に最初に満たされる線維芽細胞含有結合組織型の組成と類似している。さらに、この方法により、コラーゲンまたはフィブリングルな

10

20

30

40

50

どの成体ポリマーゲルを使用して得られるものよりも有意に厚く且つ強い3D構築物（LTM）が產生される。全生体組織マトリックス（細胞およびECM）を、完全に自系にし、それにより、宿主の拒絶反応を防止し、完全に免疫適合性にすることも可能である。

#### 【0063】

この系において產生されたECMにより、再生環境および実質上の芽株を作製するためのLTM内で脱分化または分化転換された自系成体細胞についての最適環境が提供される。言い換えると、LTM内の何百万もの線維芽細胞（最初にLTMを產生した細胞）が脱分化または分化転換された場合、LTMが、有効に、多組織型再生のための構造的に健全な移植可能な線維芽細胞になる。

#### 【0064】

生体組織マトリックス（LTM）は、動物成分を含まない化学的に規定された培地をえた細胞のみから產生されるため、軟組織代替物として使用される可能性がある。急速に成長し、高価で遺伝的にばらつきのある血清を欠くことにより、商業的に実現可能な軟組織代替物としてLTMが開発される。化学的に規定された培地が比較的単純であるため、これらの細胞産生成体組織マトリックスは、軟組織の成長および発達に及ぼす栄養成分および薬学的生成物の栄養についてのインビトロ生体モデルとしての機能も果たし得る。これらはまた、創傷治癒、軟結合組織の形成、線維形成、ならびに生成／再生組織環境下での異なる細胞の発達および相互作用などの多数のインビボ条件およびプロセスの研究にも有用であり得る。コラーゲンおよびフィブリングルの両方を超えるLTMの高い安定性および機械的完全性により、LTMのその構造完全性が再構成されたECMよりもインビボ条件下でより長く保持される。化学的に規定された条件下において比較的短期間で厚く且つ強力なLTMを成長させる能力により、フィブリングル、コラーゲンゲル、およびさらに組織置換のための天然の組織の魅力的な代替物を開発することができる。

#### 【0065】

多数の異なる細胞型を異なる生体足場部分に播種するか、またはこれらの細胞を互いの上部に交互に重ね、種々のex-vivo細胞產生組織（ECT）またはex-vivo細胞產生器官（ECO）を產生し得る。例えば、線維芽細胞は、線維芽細胞ALSの促進に好ましい無血清条件で最初に成長させられ得る。次いで、線維芽細胞ALSは、星状細胞と共に播種され、無血清成長条件（培地、pH、浸透圧、温度、酸素圧、およびその他の必要なものが含まれる）が、星状細胞の成長に好ましいように調整される。必要に応じて、そのALSの生存および健康を保持するための他の成分が添加される。この完全な構造または系は、多孔質膜（例えば、TransWells<sup>TM</sup>またはBD Falcon<sup>TM</sup>/BioCoat<sup>TM</sup> Cell Culture Inserts）上でも成長させられ得る。この多孔質膜は、ECT複合体の基底外側および先端側の両方に培地を添加するのを可能にする。したがって、ALSの起源細胞（例えば、線維芽細胞）の成長および生存により好ましい培地成分が、全ECT系または複合体の基底外側に添加され得る一方で、ALS上に播種された細胞および組織の成長により好ましい培地成分が全系の先端側に添加され得る。別の選択肢は、OptiCell<sup>TM</sup>などの細胞培養系を使用することである。この細胞培養系は、細胞が付着および成長することができる細胞培養容器の壁を横切ってガス交換が起こるのを可能にし、それにより、ALSまたはLTMがインビトロで厚さ約2mmにまで発達することを可能にする。一旦好ましい星状細胞層が線維芽細胞層上に成長すると、これら両方が「一緒にECTを構成している」といわれてもよいし、線維芽細胞のみがLTMといわれてもよい。次いで、神経細胞が星状細胞層上に播種され、無血清成長条件が、神経細胞の成長および発達に好ましいように再度調整される。上記のように、必要に応じて、ALSおよび星状細胞の生存および健康を維持するための他の成分が再度添加され、全系またはECT複合体の先端側および基底外側に異なる培地成分を添加するための多孔質膜上で、その全系が成長させられ得る。所望されるとおりに、既に播種した神経によって神経支配される骨格筋組織を形成し得る骨格筋の筋細胞のようなさらなる層を、この様式または類似の様式で添加し続けることができる。

#### 【0066】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、ALSまたはLTMを、鋳型によって特定の形状に成長させられ得、いくらか再成形もされ得る。例えば、最初に星状細胞と共に播種し、その後神経細胞を播種したALSの上記例のシートは、円柱に巻くことができる。この円柱は、インビボで脊髄に移植することができる。ALSはまた、播種された細胞に機械的な支持を提供する。例えば、特定の実施形態では、ニューロンと共に播種したALSを、ニューロンに大きな損傷を与えることなく機械的にストレスを与え、圧縮することができる。これは、ALSの非存在下またはECTの非形成下で成長させた場合にはこのような機械的ストレスおよび圧縮がほとんどのニューロンを死滅させる場合でさえ可能である。他の実施形態のALSを、ALSおよびALS上で成長する任意の細胞または組織の性質を変化させ得る機械的ストレスまたは張力に導入することもできる。

10

## 【0067】

1つの特定の実施形態では、線維芽細胞オートジェネシス生体足場の線維は、特にシュワン細胞が足場に予め播種され、これらの線維にそって並行に成長し始める場合に、平行に成長するように作製され、このことは、播種した神経細胞もこれらの線維に沿って並行して成長することを補助する。これは、脊髄に移植した場合になおさらに有用であり得るが、これは、移植された神経細胞をその後に脊髄中の天然の神経細胞と同一方向に整列させることができるからである。さらに別の実施形態では、播種したニューロンを含むALSのシートを移植前に円柱に巻いて、脊髄中の天然のニューロンと同一の一般的方向に整列したニューロン層を有する構造を得ることもできる。他の組織および器官への移植のために同じことを行うことができる。

20

## 【0068】

他の特定の実施形態では、細胞-細胞、組織-組織、および組織-細胞相互作用を、オートジェネシス生体足場およびLTMを使用して（例えば、異なる細胞のサンドイッチすることにより）インビトロおよびインビボで研究することもできる。さらに別の実施形態では、オートジェネシス生体足場およびLTMを、細胞、組織、器官、系、疾患の成長および発達、ならびに器官の異なる応答を研究するためのインビトロ生体モデルとして使用することができる。例えば、異なる細胞型および組織型に対する創傷応答（線維芽細胞が積極的役割を果たす）を、このテクノロジーを使用してインビトロで研究することができる。

30

## 【0069】

現在の耐負荷組織の欠点により、インビボ機構に耐えることができる人工組織に対する需要が作り出されている。結合組織の強度のほとんどは、組織の単位質量あたりのコラーゲン含有量に起因する。コラーゲンの抗張力の高さは、主に、コラーゲン原線維間の細胞間共有結合性架橋の存在に起因する。強度は、コラーゲン原線維の直径の増加に伴って高くなり（典型的には、天然の組織の直径は約100nmまでのオーダーであり、発達中の天然の結合組織の直径は40~60nmである）、同様にコラーゲン原線維の密度および架橋の増加に伴って高くなる。線維芽細胞ベースALS(fALS)およびLTM中のコラーゲンについて、100コラーゲン原線維/ $\mu\text{m}^2$ を超える密度が、高度の原線維間の架橋度で達成され得る。線維芽細胞がヒト新生児包皮の真皮に由来するALS中のコラーゲン原線維の直径は、これまででは、約40~50nmのオーダーであり、このことは、成熟結合組織よりも大きな再生能力を有するインビボでの幼若結合組織との類似性を示している。コラーゲンの機械的強度はまた、コラーゲン原線維の磁性配置を通して、そしてコラーゲン原線維間にさらなる架橋を誘導するリシリオキシダーゼの添加によっても増加され得る。強度はまた、フィブロネクチンの添加に伴っても増加し、このフィブロネクチンは、アクチン組織化を増加させ、ECMの組成を調節する。例えば、フィブロネクチンは、線維芽細胞集合コラーゲン格子の最大抗張力における5倍の増加を誘導する。特定の実施形態では、フィブロネクチンは、一般に、マトリックス培地を与えたALS中のコラーゲンの次に最も豊富なECMタンパク質である。

40

## 【0070】

線維芽細胞（特に包皮線維芽細胞）は、多数の成長因子（神経成長因子（NGF）、脳

50

由来神経栄養因子（BDNF）、およびニューロトロphins（NT-3）、ならびに線維芽細胞成長因子（FGF）、および血小板由来成長因子（PDGF）（これらは全て、ニューロンの再生および生存を促進する）が挙げられる）を分泌する。本明細書中に記載されるALSおよびLTMの実施形態は、任意の他の現在許容可能な足場よりも、神経細胞がインビポで暴露される環境をより厳密に模倣し、活性な三次元神経回路網をインビトロで形成することさえも可能にする。この活性な三次元神経回路網は、初代神経細胞がニューロン再生のための潜在的な治療薬についてのインビトロ三次元モデルとしての機能を果たし得、そして同様に損傷した脊髄ニューロンをインビポで機能的に交換するためにも使用され得る。

## 【0071】

10

以前の実験により、ラットおよびサルの慢性的に損傷した脊髄に移植した場合、インビポ部位から得た線維芽細胞移植片が軸索を約28軸索/ $\mu\text{m}^2$ の密度で約0.5mm/月で伸長することが示されており、BBBスケール（Basso, Beattie, and Bresnahanの運動機能評価スケール（スケール範囲：0～21、動物において、0は機能なしを示し、21は完全な運動機能を示す（Luria, (2002) Brain 125 (Pt 1) : 14-21））によって3ヶ月以内に約10まで機能的に回復させたことが示された。10倍を超えるBDNFおよびNGFを発現するように線維芽細胞を遺伝子操作した場合、これらの数値は、約70軸索/ $\mu\text{m}^2$ の密度で約2.1mm/月に移行し、機能回復がさらに僅かに改良される。線維芽細胞は高密度で移植された後に増殖を停止し、損傷部位および移植部位の移植片も線維形成を妨害した。さらに、線維芽細胞移植は末梢神経系からのシュワン細胞の移植片への迅速且つ広範な移動を促進し、機能的脊髄の再生のための主要且つ必要な因子であると考えられる。

20

## 【0072】

他の研究により、ラットの損傷脊髄に移植した場合に、コラーゲンゲルおよびコラーゲンフィラメント移植片が1ヶ月以内に軸索を5mm伸長させ、BBBスケールを3ヶ月以内に約12まで機能的に回復させたことが示された。さらに他の研究では、ラットの損傷脊髄に移植した場合に、フィブロネクチンマットにより1ヶ月以内に軸索が4～5mmまで伸長し、直径が3.5 $\mu\text{m}$ に達し、BBBスケールを3ヶ月以内に約10まで機能的に回復させたことが示された。移植されたフィブロネクチンは、損傷脊髄中の移植部位でのニューロン軸索の適切な方向への伸長および末梢神経系由来のシュワン細胞の付着を補助することも見出された。

30

## 【0073】

本出願のfALSの特定の実施形態の場合、ALSの不溶性ECMタンパク質であるコラーゲンおよびフィブロネクチンに沿った高密度の線維芽細胞は、慢性的に損傷した脊髄に移植した場合に軸索の伸長および機能回復を促進するように協力して作用する。分化した神経細胞および/または組織を産生する初代ニューロン細胞と共に播種した特定のALSにより、1ヶ月以内に軸索が約10mm/月も伸長し、機能的回復の開始を促進することができ、理想的には、3ヶ月後にBBBスケールにおいてほぼ20に増加し得ることは開示のALS系の範囲内である。分化した神経細胞および/または組織を産生する初代ニューロン細胞と共に播種した特定のALSにより、3ヶ月以内に軸索が約0.5mm/月も伸長し、且つBBBスケールが約10とことができ、1ヶ月以内に軸索が約10mm/月まで伸長し、且つ予備的に機能回復することができ、3ヶ月後にBBBスケールにおいてほぼ20に増加し得ることも開示のALS系の範囲内である。初代ニューロン細胞と共に播種したfALS系の他の特定の実施形態は、3ヶ月後に中間軸索（intermediate axon）を伸長し、どこでも約3～8mm/月で軸索が伸長し、BBBスケールにおいて約20に再度機能が回復すると想定される。

40

## 【0074】

移植された神経前駆細胞は損傷脊髄中の移植部位で長期間生存し、軸索の伸長および限定された機能回復を支持し、神経前駆細胞は神経およびグリア細胞系列に分化して神経線維が細胞（通常、任意の活性なシナプス結合前に死滅する-生存およびグリア細胞からの

50

栄養補助の要件)よりもはるかに長期間生存することが公知である。神経前駆細胞はまた、幹細胞(調節が困難であり、中枢神経系の癌の主なプロモーターの1つと考えられている)よりもはるかに安全且つ予測的と思われる。不運なことに、神経前駆細胞は、損傷脊髄に移植された場合または本発明のALS系の非存在下にてインビトロで培養した場合に、星状膠細胞系列および乏突起膠細胞系列のみに分化する。しかし、図1~7に示すように、神経前駆細胞をインビトロで本発明の実施形態のALSに播種した場合、神経前駆細胞は、神経系列およびグリア系列に分化する。

#### 【0075】

さらに、本明細書中に記載の実施形態のALS上に神経前駆細胞または星状細胞と共にインビトロで播種された神経芽細胞腫細胞は、ALS上および損傷脊髄中のインビオ移植部位でも神経芽細胞腫細胞を長期間分化し、生存させると想定される。また、本明細書中に記載のALS系の特定の実施形態の線維芽細胞によって分泌される塩基性線維芽細胞成長因子は、無血清培地条件にてALS上で成長した星状細胞によって神経成長因子(NGF)の分泌を誘導する。

#### 【0076】

(研究の設計および方法)

(実施例:神経移植片の作製のための足場としてのALSの使用)

脊髄損傷の適切な治療法は現在存在しない。身体のリハビリテーションおよび訓練、末梢神経移植片、および胎児脊髄組織の移植によって、少数の患者で限定された脊髄再生が達成されている。ほとんどの患者は、車椅子および喪失した自律機能の支持/置換を行うデバイスの使用にさえ依存するよう制限される。

#### 【0077】

現在の研究において多数の脊髄損傷治療への取り組みが存在する。これら取り組み全ての現在の制限は、損傷脊髄の部分的および一般的に最小の機能しか修復しないということである。脊髄損傷治療についての最初の臨床試験は、2002年7月11日にオーストラリアで患者の脊髄への嗅神経被覆グリアの移植によって開始された。このアプローチの制限は、脊髄損傷に起因するいくつかの機能喪失の修復に数年を要することである(Basso, Beattie, and Bresnahan(BBB)の運動機能評価スケール(スケール範囲:1~20、動物において、1は機能なしを示し、20は完全な運動機能を示す)において1~4.3)。最近(14日未満)の脊髄損傷の患者へのコポリマー-1のワクチン接種を含む別の臨床試験が、イスラエルおよび米国で始められようとしているが、この処置は、損傷脊髄の神経細胞の再生手段としてよりもむしろパーキンソン病などの疾患における神経細胞の変性の遅延およびおそらく逆転のために設計されている。

#### 【0078】

潜在的な組織操作神経構築物に必要なエレメントには、1)神経成長および軸索移動のための足場、2)支持細胞、3)成長因子、および4)細胞外マトリックスが含まれることが神経再生分野でいくらか一致する。今まで、全エレメントが含まれる系が、その後のインビオ移植のためにインビトロで神経細胞を首尾よく生成することは記載も開示もされていない。さらに、ニューロンの成長または再生のインビトロ三次元モデルは存在しない。ALSによってニューロンがインビオで曝露される細胞外環境に厳密に類似する環境が得られるため、ALSを使用して作製された提案された組織操作神経移植片を、ニューロン再生に及ぼす潜在的な治療薬の影響についての研究などの種々のインビトロ適用に使用することができる。損傷脊髄の代わりに神経移植片としての機能を果たす点から見て、この系は、神経細胞/神経組織を含むため、ヒト成分のみを使用し、巨大な領域および距離にわたって広く損傷した脊髄を置換/再生する可能性がある。

#### 【0079】

予備研究は、神経移植片の取り扱い前後にニューロン生存アッセイ(Molecular Probes LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity kit # L-3224)によって決定したところ、本発明のALS内で成長したニューロンの大部分は、厚さ約200μmの移植片自体を穩やかに折りたたみ、その後穩

10

20

30

40

50

やかに展開した後に依然として生存していることを示した（データ示さず）。しかし、このようなALSでは、厚さ約200μmの小さな移植片画分としてのニューロンのみが存在する。したがって、特定の実施形態では、ニューロンを、ALS培地の小さな修正によってALSの最大抗張力（UTS）が増加するより薄い支持ALS上に播種することができる。あるいは、他の実施形態では、ニューロンがより厚いALS全体を移動することができるようALSの空隙率を増加させることもできる。本発明の特定の実施形態のfALSを、ヒト包皮線維芽細胞を高密度でウェルまたはTransWell<sup>TM</sup>に播種し、線維芽細胞を50μmと数百μmとの間の厚さを有する三次元基質に数週間にわたって発達させることによって調製する。線維芽細胞に、いかなる血清または動物成分も含まない規定された「化学的」培地を与える。これは、本明細書中で線維芽細胞オートジェネシス生体足場培地（fALS培地）と呼ばれ、その例は基質培地であり、実施例1に記載されている。特定の実施形態では、三次元基質（ALS）の產生後、ALSを初代ニューロン細胞と共に播種する。次いで、播種したニューロン細胞を含むALSに、ニューロンの成長を支持し、線維芽細胞の成長を遅延させる別の定義された「化学的」培地（これも血清や動物成分を含まない）を与える。1つの実施形態では、初代ニューロン細胞と共に播種されたALSを、TransWell<sup>TM</sup>中に維持し、底側のALSに第1の培地（fALS培地）を与え続ける一方で、ALSの先端側に第2の培地を与える。

10

20

30

40

## 【0080】

インビトロでの機能的神経回路網の発達により、神経移植片は移植時により有用になり、本明細書中に開示のインビトロ三次元神経回路網モデルにおける異なる医薬品および方法の影響を研究するのに重要である。今まで、インビトロで成長した機能的神経回路網はこれらの神経回路網の脆弱性により宿主に導入および移植することができなかつた-神経が非常に脆弱であるため、神経自体の重量を支持することができず、これらの神経の構造を適切に支持する足場（本明細書中に開示のfALSと異なる）が開発されていなかつた。機能的神経回路網の產生を至適化するために、1つの実施形態の神経移植片を、64微小電極アレイ上で成長させるか、電圧感受性式を使用して、ALS中のニューロンの機能性（活動電位の存在）および結合性（位相バーストパターン）を決定することができる（Mistryら（2002）Proc Natl Acad Sci USA 99（3）：1621-6およびSegevら（2003）Phys Rev Lett 90（16）：168101（その両方が本明細書中で参考として援用される））。この方法では、異なる初代ニューロン型（神経前駆細胞および神経芽細胞腫細胞など）を、本明細書中に記載のALSの特定の実施形態でどの型が最も好ましい機能的神経回路網を分化および產生するのかを決定するために試験することができる。

30

40

## 【0081】

他の実施形態では、ALS中の機能的神経回路網の発達に及ぼす異なる栄養補助物質および成長因子の影響を、この方法で研究することもできる。例えば、FGF-2およびBDNFは、3週間以内に初代ニューロンからの広範且つ自発的に活性な神経回路網の発達を支持することが示されている（Mistryら、2002を参照のこと）。本発明の初代ニューロン細胞と共に播種したALSを使用した予備的結果は、ニューロンの炭水化物源はグルコースよりガラクトースが好ましく、ガラクトースはまたALS中の線維芽細胞の成長を有意に遅延させることを示す。したがって、本発明の実施形態では、一旦ニューロンがALS上に播種されると、成長培地を、ALS成長を支持する成長培地からニューロンの成長および分化を促進すると同時に線維芽細胞の成長を遅延させる成長培地に交換する。これにより、線維芽細胞がニューロンを過剰產生するのが回避され、ニューロンの発達が有效地に回避される。他の実施形態では、ニューロンの生存および発達をなおさらには増強するためにNGF、BDNF、FGF-2、およびbFGFなどの成長因子がより分泌するように線維芽細胞を遺伝子操作することができる。

## 【0082】

抗Hu MAb 16A11（Marusichら（1994）J. Neurobiol 1 25（2）：143-155（本明細書中で参考として援用される））などの特定の

50

ニューロンマーカーを使用して、線維芽細胞からニューロンを分化させることができる（図3～7および図12～13を参照のこと）。ALSによる軸索の伸長距離（4～10回観察した軸索の平均の長さ（Segelvら、2003を参照のこと））、およびALS上でニューロンの生存期間と共に、ALSへのニューロンの付着および分化の程度（分化したニューロン数／播種した初代ニューロン数）を決定することができる。ALS上でニューロンの生存期間の決定により、神経変性の数日前に移植片を移植することが可能であり、それにより、宿主／患者中で確実に神経が活動性および機能性を維持し、神経発生の機会がより増加する。さらに、組織学および透過電子顕微鏡法（TEM）を使用して、ALS中のニューロンの整列および結合性を観察することができる（Jin et al.（2002）Exp Neurol 177(1):265-75およびTuszynski et al.（2002）J Comp Neurol 449(1):88-101（その両方が本明細書中で参考として援用される））。

#### 【0083】

ALS神経移植片の特定の実施形態を脊髄損傷から2週間後に移植した場合、損傷部位周囲に出現した創傷周囲物（peri-wound）と同様に、これがBDNFの発現および小グリアの支持が有意なレベルに到達し始める場合であるため、優れた結果を得ることができると予想される。しかし、特定の実施形態では、ALS神経移植片は活性ニューロン（分化して活性な神経連絡を形成し始めた初代ニューロンが含まれる）を含むため（例えば、図2～4を参照のこと）、ALS神経移植片が移植されるかに關係なく正の結果が予想される。

#### 【0084】

他の実施形態では、ALS神経移植片は、ほとんど任意の強固でない（non-rigid）形状を取る柔軟性があり、球状または円柱に巻くことができる。いくつかの薄い神経移植片を、互いの上部に重層して神経回路網の異なる並行層を形成し、これは再度円柱に巻くか、またはいくつかの他の形状を形成することもできる。ALS神経移植片の別の形態および構造は、各脊髄損傷型（縦軸、横軸、剪断など）の機能回復に関してより良好な結果が得られると予想される。免疫抑制剤の必要性も決定することができるが、ヒトでは神経細胞は免疫系に攻撃されず、線維芽細胞は免疫応答をあまり誘発しないため、このような薬剤は必要ないと予想される。あるいは、他の特定の実施形態では、本発明の実施形態のALS神経移植片によって促進される機能回復を研究するためのヒト神経移植片の移植のためのモデルとしてヌードラットを使用することができる。

#### 【0085】

さらに他の実施形態では、本明細書中に記載のALS神経移植片を、現在の他のアプローチ（例えば、脊髄損傷誘導動物における機能回復範囲（標準としてBBBスケールを使用）、移植／再生神経細胞の活性機能性範囲（電気生理学的に測定）、合併症の範囲、手順を開始した日付からの機能回復時間、および費用／実現可能性の見通し）を基準にして調査することができる。

#### 【実施例】

#### 【0086】

（実施例1a - 線維芽細胞ALS成長のための無血清で化学的に規定された培地 - 「fALS培地」または「基質培地」）

本発明の化学的に規定された培地の処方の1つの実施形態は、以下を含む。

#### 【0087】

3:1の比のDMEM（高グルコース（4.5g/L）；L-グルタミンおよびピルビン酸ナトリウム）と以下の成分を補充したHam's F12倍地。

- 4.2×10<sup>-10</sup> M 上皮成長因子（ヒト血清アルブミン中）
- 2.8×10<sup>-10</sup> M 塩基性線維芽細胞成長因子
- 8.6×10<sup>-5</sup> M インスリン
- 1.0×10<sup>-7</sup> M デキサメタゾン
- 3.2×10<sup>-4</sup> M L-アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩n-水和物

10

20

30

40

50

- $2 \times 10^{-10}$  M L-3,3',5-トリヨードサイロニン
- $10^{-4}$  M エタノールアミン
- $3.9 \times 10^{-8}$  M 亜セレン酸
- $4 \times 10^{-3}$  M Glutamax<sup>TM</sup>
- $3.3 \times 10^{-6}$  M グルタチオン(還元)
- 1%ペニシリン/ストレプトマイシン/アンフォテリシンB

さらに、上に列挙した培地の他の実施形態および変形形態は、さらなる成分(任意の1つまたは複数の以下の成分など)を含み得る。

- 血小板由来成長因子(PDGF)

- 100:68の比のグリシンおよびL-プロリン

- L-システイン

- Tr o l o x

培地中の総浸透圧がALSの成長に許容可能なレベルを維持する限り、濃度を変化させることができる。例えば、L-アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩n-水和物の濃度は、0.1 mM~3 mMの範囲であり得、EGFの濃度は、0.002 nM~2 nMの範囲であり得、bFGFの濃度は、0.03 nM~3 nM超の範囲であり得、インスリンの濃度は、10 μM~1000 μMの範囲であり得、PDGFの濃度は0.1 ng/mL~10 ng/mLの範囲であり得、L-3,3',5-トリヨードサイロニンの濃度は0.1 nM~10 nMの範囲であり得、エタノールアミンの濃度は、1 μM~10,000 μMの範囲であり得、亜セレン酸の濃度は、10 nM~1000 nMの範囲であり得、Glutamax<sup>TM</sup>の濃度は、0 mM~10 mMの範囲であり得、グリシン:L-プロリン濃度(依然として100:68の比率)に、0 mMグリシン:146 mM L-プロリン~2.675 mMグリシン:1.965 mM L-プロリンを補充してよく、デキサメタゾン濃度は、1 nM~1000 nMで変動し得、L-システイン濃度に、さらに0.1 mM~1 mMを補充しても良い。

#### 【0088】

(実施例1b-ニューロン細胞/組織の成長のための無血清で化学的に規定された培地-「ニューロン培地」)

本発明の化学的に規定された培地の処方の1つの実施形態は、以下を含む。

#### 【0089】

以下の成分を補充した2:3の比のD MEM/F12および神経細胞培養用基礎培地(Gibco-Invitrogen Corporationのwww.invitrogen.comまたはwww.invitrogen.co.jp/focus/161006.pdfを参照のこと)。

- $3 \times 10^{-10}$  M 線維外細胞成長因子2
- $8.5 \times 10^{-6}$  M D(+)ガラクトース
- $6.0 \times 10^{-8}$  M プロゲステロン
- $6.0 \times 10^{-7}$  M 酢酸レチニル
- $9.0 \times 10^{-8}$  M コルチコステロン
- $1.0 \times 10^{-4}$  M プトレッシン
- $1.0 \times 10^{-5}$  M カルニチン
- $1.3 \times 10^{-5}$  M リノール酸
- $4.3 \times 10^{-6}$  M リノレン酸
- $4.0 \times 10^{-6}$  M ビオチン
- $4.0 \times 10^{-6}$  M Tr o l o x
- 1%ペニシリン/ストレプトマイシン/アンフォテリシンB

さらに、上に列挙した培地の他の実施形態およびバリエーションは、必要に応じて、さらなる成分を含むことができ、濃度を変化させることができる。

#### 【0090】

(実施例2.新生児ヒト包皮の真皮から単離した線維芽細胞による細胞外マトリックス

10

20

30

40

50

### の产生 )

多数の線維芽細胞を、新生児ヒト包皮の真皮から単離した。細胞を、10% N u - 血清(またはF B S またはB C S )を含むD M E M 培地を与えた細胞培養フラスコ中で数週間増殖させた。数回の継代後、線維芽細胞を1000 R P M で遠心分離し、上清を破棄し、細胞をプールした。これらのプールした線維芽細胞を、上記実施例1に記載のA L S 培地中に再懸濁し、T r a n s W e l l s <sup>TM</sup> もしくはB D F a l c o n <sup>TM</sup> / B i o C o a t <sup>TM</sup> 細胞培養インサートまたは6 ウェルもしくは12 ウェルプレート、またはインピトロ細胞培養に適切な他の小さな容器に超密集条件で播種し、それにより、細胞密度は、約200,000 細胞 / c m <sup>2</sup> から約1,000,000 細胞 / c m <sup>2</sup> であった。線維芽細胞を、過剰密集条件下で約3 週間(または任意選択的に約1 週間または10 週間超)維持し、その間に線維芽細胞が細胞外マトリックスを产生し、それにより、厚さ約300  $\mu$  m の線維芽細胞A L S が作製されることが認められた。例えば、明らかに目し可能な細胞外マトリックスを示す図3~9 および図12~13 を参照のこと。他の実施形態には、厚さ50  $\mu$  m ~ 500  $\mu$  m または厚さ1 mm までまたはそれ以上のA L S が得られる纖維外細胞によって產生された細胞外マトリックスが含まれ得る。

10

20

30

40

### 【0091】

1つの実施形態では、線維芽細胞A L S を、円形の多孔質ポリエチレン(H u a n g r a (1993) A n n a l B i o m e d E n g 21 (3) : 2890305 およびU y s a l r a (2003) P l a s t R e c o n s t r S u r g 112 (2) : 540 - 6 (その両方が本明細書中で参考として援用される) ) またはA L S の両側を培地に曝露するセラミック支持体上で成長させる。これにより、気体および栄養の拡散距離が短いためにA L S を培養ウェルの底側のみを培地に曝露した場合よりも迅速且つ厚く成長することが可能である。あるいは、A L S は、0.4  $\mu$  m のT r a n s W e l l s <sup>TM</sup> (C o r n i n g , 2003) で成長するが、これは他の細胞型のその後の播種がC D M の片側のみに制限される。O p t i C e l l s <sup>TM</sup> により、A L S の両側から有効にガス交換されるため、A L S を厚さ約2 mm まで成長させることができると。別の代替物は、M I N U C E L L S <sup>TM</sup> およびM I N U T I S S U E <sup>TM</sup> を使用することであるが、これらは、A L S の/-上の細胞に培地および酸素を一定に灌流することができるからである。0.4  $\mu$  m のT r a n s W e l l s <sup>TM</sup> または中心ウェル器官培養皿(B D B i o s c i e n c e s # 353037) もまた、より多くの栄養培地を使用することが可能であり、細胞をO <sub>2</sub> 源により近づけることが可能である。細胞および培養容器の内側が曝露されるO <sub>2</sub> の分圧(p O <sub>2</sub>) の増加によって、O <sub>2</sub> の利用可能性をさらに高めることができる。多孔質ポリエチレンまたはセラミック支持体の孔により、A L S の適切なE C M 付着部位が得られる。一旦A L S が懸濁状態または浮遊状態で成長すると、S i g m a C o t e (S i g m a # S L - 2) などの非結合物質でのこれらの領域の処理によって、細胞の多孔質ポリエチレンまたはセラミック支持体のウェルおよび外円上の成長が回避される。懸濁したA L S を、より多数の樹状線維芽細胞形態を有するように誘導し、それにより、例えば、機械的刺激の使用によってA L S の特徴をより柔軟に修正することが可能である。

### 【0092】

(実施例3. ニューロン細胞 / 組織の生成のためのインピトロプロトコール)

1つの実施形態において、多数の線維芽細胞(C a m b r e x C C - 2509)を、約1000 r p m で8 分間遠心分離し、その後、上清を除去した。得られた線維芽細胞を、A L S 培地中に再懸濁し、T r a n s W e l l s <sup>TM</sup> またはB D F a l c o n <sup>TM</sup> / B i o C o a t <sup>TM</sup> C e l l C u l t u r e I n s e r t s に超密集で(約1,000 細胞 / mm <sup>3</sup> から200,000 細胞 / mm <sup>3</sup> 超)播種し、2~3日毎に約2~3週間またはそれ以上の期間、所望の量および厚さのA L S が形成されるまで過剰密集条件下でA L S 培地を与えた。

### 【0093】

この時点で、線維芽細胞および大量のC D M を含むA L S を、神経前駆細胞(C a m b

50

rex CC-2599)と共に播種し、TransWells<sup>TM</sup>の基底外側にfALS培地を与える一方で、先端側に神経培地を2~3日毎にさらに2~4週間またはそれ以上与えた。

#### 【0094】

時間および播種した神経前駆細胞の存在に応答して線維芽細胞によって分泌され、それによりALS中に存在する（しかし、これらを補助物質として添加することもできる）適切な成長因子により、神経前駆細胞は、神経軸索の形成によって証明されるように、神経細胞およびグリア細胞の両方に分化され始めた。哺乳動物脊髄に移植され、ALS系の非存在下で成長した神経前駆細胞は、神経細胞およびグリア細胞の両方に分化せず、これらはグリア細胞のみに分化する。しかし、図2に認められるように、線維芽細胞ALS上で成長した神経前駆細胞は、神経軸索およびグリア細胞の両方に分化した。さらに、図1は、線維芽細胞ALS上で成長した神経前駆細胞から分化したニューロンのメチレンブルー染色を示す。

#### 【0095】

図3~7は、抗Hu-MAb 16A11（ニューロン末端の有糸分裂後に短期間発現する脊椎動物神経発生の初期マーカー）を発現するニューロン細胞/組織を含む線維芽細胞ALS系の断面を示す。神経細胞体中に赤茶色のスポットとしてマーカーが認められ、細胞核は青色である。認められるように、4μmから20μmまでのサイズ範囲の抗Hu MAb 16A11マーカーを発現する種々のサイズの領域（神経細胞体の異なる断面）を示す。

#### 【0096】

（実施例4.筋肉細胞/組織の作製のためのインビトロプロトコール）

1つの実施形態では、多数の線維芽細胞（Cambrex CC-2509）を、約1000rpmで8分間遠心分離し、その後、上清を除去した。得られた線維芽細胞を、fALS培地に再懸濁し、TransWells<sup>TM</sup>またはBD Falcon<sup>TM</sup>/Biocoat<sup>TM</sup>Cell Culture Insertsに超密集で（約1,000細胞/mm<sup>3</sup>から200,000細胞/mm<sup>3</sup>超）播種し、2~3日毎に約2~3週間またはそれ以上の期間、所望の量および厚さのALSが形成されるまで過剰密集条件下でfALS培地を与えた。

#### 【0097】

この時点では、線維芽細胞および大量のCDMを含むALSを、ヒト骨格筋の筋芽細胞（Cambrex CC-2580）と共に播種し、TransWells<sup>TM</sup>の基底外側にALS培地を与える一方で、先端側に骨格筋培地（Cambrex CC-3160）を2~3日毎にさらに2~4週間またはそれ以上与えた。時間および播種した骨格筋の筋芽細胞の存在に応答して線維芽細胞によって分泌され、それによりALS中に存在する（しかし、これらを補助物質として添加することもできる）適切な成長因子により、骨格筋の筋芽細胞は、骨格筋の筋芽細胞に分化され始めた。図12および13は、一方は厚さ約70μmであり（図12）、他方は厚さ約115μmである（図13）筋肉細胞/組織を含む線維芽細胞ALS系の2つの異なる断面の三重染色を示す。コラーゲン線維の線維芽細胞の細胞外マトリックスは青色であり、ALS線維芽細胞の核は（青みがかった）黒であり、ALS内の幼若骨格筋細胞は、ALS切片内に赤茶色のスポットとして認められる。

#### 【0098】

（実施例5.肝細胞の生成のためのインビトロプロトコール）

1つの実施形態では、多数の線維芽細胞（Cambrex CC-2509）を、約1000rpmで8分間遠心分離し、その後、上清を除去した。得られた線維芽細胞を、fALS培地に再懸濁し、TransWells<sup>TM</sup>またはBD Falcon<sup>TM</sup>/Biocoat<sup>TM</sup>Cell Culture Insertsに超密集で（約1,000細胞/mm<sup>3</sup>から200,000細胞/mm<sup>3</sup>超）播種し、2~3日毎に約2~3週間またはそれ以上の期間、所望の量および厚さのALSが形成されるまで過剰密集条件下でfA

10

20

30

40

50

L S 培地を与えた。

【 0 0 9 9 】

この時点で、線維芽細胞および大量の C D M を含む A L S を、ヒト骨格筋の肝細胞 ( C a m b r e x C C - 2 5 9 1 ) と共に播種し、 T r a n s W e l l s の基底外側に f A L S 培地を与え続ける一方で、先端側に肝細胞培地 ( C a m b r e x C C - 3 1 9 8 ) を 2 ~ 3 日毎にさらに 2 ~ 4 週間またはそれ以上与えた。時間および播種した肝細胞の存在に応答して線維芽細胞によって分泌され、それにより A L S 中に存在する（しかし、これらを補助物質として添加することもできる）適切な成長因子により、肝細胞は、アルブミン分泌肝細胞および組織に分化され始めた。

【 0 1 0 0 】

（実施例 6 a - 神経前駆体細胞と共に播種したインビトロ A L S 系を使用したニューロン組織の生成 / 再生のためのインビオプロトコール）

（ラット / げっ歯類の脊髄）

本発明の 1 つの実施形態では、成体ヌード F i s h e r ラットの下部脊髄を、ラットの損傷点より下を麻酔する一般的な麻酔下で部分的に切断する（完全かつ全長 5 m m の脊髄の切離）（切除後に（一般に、 T 9 - T 1 0 ）下肢が非機能的になるように損傷部位を選択する）。次に、ヒト神経前駆細胞、神経芽細胞腫細胞、ニューロン幹細胞、または他の初代神経細胞系列（実施例 3 に詳述の細胞など）と共に播種された線維芽細胞 A L S 系内にインビトロで生成されたニューロン細胞 / 組織を、ラット脊髄の損傷部位に移植する。

【 0 1 0 1 】

A L S 内の線維芽細胞は、移植部位に即座に付着し始め、移植部位の各側面上でニューロン細胞が成長し、既存の神経と活性な神経結合を形成しながら数日および数週間付着し続ける。任意の残存する初代ニューロンは、移植時に、機能的神経細胞または組織に分化するようである。ラットを維持し、8 週間またはそれ以上観察し、その後肢の移動能力またはその後肢を異常に使用した歩行能力、または後肢を使用して短距離を歩行する能力などの神経発生の兆候を観察する。これまでのところ、実験により、コントロール動物についての B B B スケールが平均 2 であることと比較して、実験動物は B B B スケールが 1 4 までに対応する感覚および移動に回復した。

【 0 1 0 2 】

（実施例 6 b - L T M 内の線維芽細胞がニューロンに分化転換したインビトロ L T M 系を使用したニューロン組織の生成 / 再生のためのインビオプロトコール）

（ラット / げっ歯類の脊髄）

本発明の 1 つの実施形態では、成体ヌード F i s h e r ラットの下部脊髄を、ラットの損傷点より下を麻酔する一般的な麻酔下で部分的に切断する（完全且つ長さ 5 m m の脊髄の切離）（切除後に（一般に、 T 9 - T 1 0 ）下肢が非機能的になるように損傷部位を選択する）。次に、 L T M 内の線維芽細胞のニューロンへの分化転換によって（ N e u r o g e n 培地中の L T M をサイトカラシン B に 6 0 時間配置し、その後培地を新鮮な N e u r o g e n 培地と 2 ~ 3 日間置換することによって） L T M 内にインビトロで生成されたニューロン細胞 / 組織を、ラット脊髄の損傷部位に移植する。

【 0 1 0 3 】

L T M 内の線維芽細胞は、成長し、数週間にわたり移植部位の各側面上で既存の神経と活性な神経結合を形成する。切離部位の各側面上の残存ニューロンも、数週間にわたり、 L T M 内で成長し始めるようである。ラットを維持し、8 週間またはそれ以上観察し、その後肢の移動能力またはその後肢を異常に使用した歩行能力、または後肢を使用して短距離を歩行する能力などの神経発生の兆候を観察する。これまでのところ、実験により、コントロール動物についての B B B スケールが平均 2 であることと比較して、実験動物は B B B スケールが 1 6 までに対応する感覚および移動に回復した。

【 0 1 0 4 】

（実施例 6 c - 動物における脊髄変性の治療のためのインビオプロトコール）

実施例 2 に詳述のように、ヒト包皮由来の線維芽細胞を培養して、大量の E C M を有す

10

20

30

40

50

るALSまたはLTMを産生させる。次いで、実施例3に記載のように、ALSを、神経前駆細胞、神経芽細胞腫細胞、ニューロン幹細胞、または他の初代神経細胞系列と共に播種するか、実施例6bに記載のように、神経細胞および/または組織が明らかとなるまで、LTM内の線維芽細胞をニューロンに分化転換する。次に、ALS+初代神経細胞/組織またはニューロンLTMを、動物の脊髄の変性部位付近もしくは変性部位または変性が広範囲な場合には脊髄に沿ったいくつかの部位に移植する。

#### 【0105】

次いで、処置した動物を維持し、必要に応じて8週間またはそれ以上観察する一方で、新規に認められた運動、感触、および感覚などの脊髄再生の証拠をモニタリングする。認められる脊髄再生を増加させるために、処置される動物の変性の重症度に依存して、初代神経細胞および/または組織を有するニューロンLTMまたはALS系でいくつかの処置を行うことができる。

#### 【0106】

このような手順を、脊椎の圧挫(crushured)、脊髄切断などによる広範な神経変性疾患(ルー・ゲーリック病、ハンチントン病、脊髄圧迫など)を離間した動物(ヒトが含まれる)に対して使用することができる。

#### 【0107】

(実施例7-軟骨細胞と共に播種したインビトロALS系を使用した軟骨組織の生成/再生のためのインビオプロトコール)

1つの実施形態では、多数の線維芽細胞を約1000rpmで8分間遠心分離し、その後、上清を除去した。次いで、得られた線維芽細胞を、ALS培地に再懸濁し、TransWell<sup>TM</sup>またはBD Falcon<sup>TM</sup>/BioCoat<sup>TM</sup>Cell Culture Insertsに超密集で(約1,000細胞/mm<sup>3</sup>から200,000細胞/mm<sup>3</sup>超)播種し、2~3日毎に約2~3週間またはそれ以上の期間、所望の量および厚さのALSが形成されるまで過剰密集条件下でALS培地を与えた。線維芽細胞および大量のCDMを含むALSを、軟骨細胞(Cambrex CC-2550)と共に播種し、TransWell<sup>TM</sup>の基底外側にALS培地を与え続ける一方で、先端側に軟骨細胞培地(Cambrex CC-3216)を2~3日毎にさらに4~6週間またはそれ以上与えた。時間および播種した軟骨細胞の存在に応答して線維芽細胞によって分泌され、それによりALS中に存在する(しかし、これらを補助物質として添加することもできる)適切な成長因子により、軟細胞は、軟骨組織に分化され始めた。

#### 【0108】

オートジェネシス生体足場を、鋳型によって特定の形状に成長させることもでき、いくらか再成形することもできる。例えば、線維芽細胞オートジェネシス生体足場の「バルーン」または中空ディスクを、容易に分解可能なタンパク質または他の物質を薄くコーティングしたテフロン(登録商標)のディスクまたは球体の周囲でfALS培養物を成長させ、その後、片側を細長く切ってディスクまたは球体を取り出し、それにより、中空空間または「バルーン」形状を作製することによって調製することができる。ALS「鋳型」の調製後、ALSディスクまたはバルーン鋳型の開いた内部空間に配置/注入することができる軟骨細胞を含むゲル(アルギン酸ゲルなど)を充填し、その後、元のように閉じて、長期にわたり密集した緻密な軟骨組織を作製することができる。ALSにより、栄養および気体がALSを通過して軟骨細胞に到達すると同時に、軟骨細胞によって分泌されたほとんどのシグナル伝達分子が残存し、機能的軟骨組織の形成を促進する一定の成長因子および物質を分泌する。線維芽細胞ALSの高抗張力により、機能的に強力な軟骨の発達を促進する新規に形成された軟骨細胞および軟骨に機械的ストレスも得られる。形成された軟骨ディスク周囲のALSの外層もまた、一旦移植されると、軟骨ディスクの付着および組み込みを促進する。このような手順を使用して、例えば、脊椎動物の脊髄内での置換のための軟骨ディスクを作製することができる。

#### 【0109】

適切なALS鋳型の作製によって任意の所望の形状またはサイズにすることができ、A

10

20

30

40

50

A L S 鑄型内で形成された得られた軟骨組織を使用して、軟骨が損傷した動物（ヒトが含まれる）を処置することができる。代わりに骨芽細胞を使用する場合も同様である。このような治療では、A L S 鑄型 + 結合組織の細胞を播種した内部または内部軟骨組織を、動物の関節に配置 / 挿入するか、軟骨再生が望ましい損傷部位付近、損傷部位、または複数の部位に配置 / 挿入する。

【 0 1 1 0 】

次いで、処置した動物を、必要に応じて、数週間および数ヶ月またはそれ以上維持して観察する一方で、M R I 画像診断または軟組織検出技術の使用および機能、痛みのレベル、強度、柔軟性などの物理的指標の観察によって軟骨再生の証拠をモニタリングする。処置すべき動物の損傷または軟骨変性の重症度に依存して、認められた軟骨再生を増大させるために、A L S 鑄型および播種した軟骨細胞を使用したいくつかの処置を行うことができる。

10

【 0 1 1 1 】

このような手順を、関節（膝、踝、および指、脊柱、鼻、耳、喉、および他の場所が含まれる）の軟骨の分解 / 変性などの広範な軟骨変性容態を罹患した動物（ヒトが含まれる）に使用することができる。

【 0 1 1 2 】

（実施例 8 - 生体組織マトリックス（L T M））

強力且つ厚い細胞産生生体組織マトリックス（L T M）を3週間以内に产生し、生存可能であり、且つ細胞集合フィブリングルまたはコラーゲンゲルなどの再構成ゲルの魅力的な代替物とすることができます。比較研究由来のデータは、完全な細胞産生E C Mは再構成したE C Mよりも機械的に優れており、再構成E C Mよりも天然のインビボE C Mと厳密に類似することを示す。この強度は、非常に安定したコラーゲン画分と非常に相関する。天然の生成 / 再生組織に密接に近似することに加えて、L T Mはまた、再構成されたE C Mよりも比較的高速のインビボ様形態の細胞の接着、移動、増殖、分化、および獲得を支持する。L T Mの細胞外マトリックス（E C M）部分は、コラーゲンI、コラーゲンI I I、フィブロネクチン、プロテオグリカン、硫酸化グリコサミノグリカン、ヒアルロン酸、およびデコリンなどのいくつかの成分からなる。

20

【 0 1 1 3 】

広範な予備研究により、これらの基質は、既存の任意の他の基質または足場よりも幼若で天然の芽株様組と厳密に類似する量、比率、および整列の多数の細胞外マトリックスタンパク質から構成されることが示された。これらの基質を、まず第1にL T Mを作製する多層線維芽細胞と共に包埋する。基質中での多層線維芽細胞の脱分化により、機能的な多層型構造の修復のための組織損傷部位に移植することができる線維芽細胞様構造を本質的に得ることができる。次いで、基質中のいくつかまたは全ての多層線維芽細胞の分化転換は、このようにして形成された纖維細胞様構造がより制御された経路に沿って発達および分化し始めるのを補助することができる。

30

【 0 1 1 4 】

図14は、細胞産生生体組織マトリックス上の初期神経分化のH & E 染色した断面を示す。Hu 1 6 A 1 1 マーカー（初期神経発生のマーカー）を有するヒト神経細胞体を目視可能であり、染色されたマーカーにより、神経細胞体中の暗色（茶色）に染色された領域として区別可能である。

40

【 0 1 1 5 】

（実施例 9 - より強力且つ厚いA L S またはL T Mを作製するための線維芽細胞の遺伝子操作）

線維芽細胞成長因子2（F G F - 2）をコードするヒト遺伝子を、- アクチンプロモーターの調節下で、（American Tyoe Culture Collection（ATCC, Manassas, Va.）から入手した）ヒト新生児包皮線維芽細胞のゲノムに挿入した。これらの形質転換されたか、もしくは遺伝子操作された線維芽細胞は、実施例2の方法に従って3週間培養したコントロール纖維外細胞よりも有意に強力且

50

つ厚い細胞由来基質を産生した。遺伝子操作された線維芽細胞は、野生型線維芽細胞よりもALSまたはLTMの細胞外空間に数倍の濃度のFGF-2を分泌することが見出された。これらのより高いFGF-2濃度により、ALSまたはLTM内の線維芽細胞による細胞外マトリックスタンパク質合成速度が増加した。

#### 【0116】

(実施例10-線維芽細胞集合コラーゲンゲルおよびフィブリングルに対する生体組織マトリックス(LTM)またはオートジェネシス生体足場(ALS)およびその細胞由来基質(CDM)成分の調製および分析方法)

##### (A. 細胞)

ヒト新生児包皮線維芽細胞(HFFs, American Type Culture Collection, Manassas, Va.)を、10%牛血清(BCS, Hyclone, Logan, UT)および1%ペニシリン/ストレプトマイシン/アンフォテリシンB(Invitrogen, Carlsbad, CA)を補充したダルベッコ変イーグル培地(DMEM, Mediatech, Herndon, VA)を含むT-300組織培養フラスコ(BD Biosciences, Bedford, MA)中、37の加湿された10%CO<sub>2</sub>条件下で培養した。細胞を、10分間の0.25%トリプシン/0.05%EDTA溶液(Mediatech)の適用によって、細胞を密集度90%で採取した。200万個の第5継代細胞を、全実験の各サンプルのために使用した。

#### 【0117】

##### (B. 標準的な血清補充培地)

10%牛胎児血清(FBS, ATCC)、150μg/mL(519μM)L-アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩n-水和物(Wako Pure Chemicals, Japan)、および1%ペニシリン/ストレプトマイシン/アンフォテリシンB(Invitrogen)を含むDMEM。

#### 【0118】

##### (C. 化学的に規定された培地)

5μg/mLインスリン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、5ng/mL亜セレン酸(Sigma-Aldrich)、10<sup>-4</sup> Mエタノールアミン(Sigma-Aldrich)、150μg/mL L-アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩n-水和物(Wako)、2.5ng/mL上皮成長因子(EGF(BD Biosciences))を含む5μg/mLヒト血清アルブミン、EMD(Biosciences, San Diego, Calif.)、5ng/mL塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF(BD Biosciences))、1.0×10<sup>-7</sup> Mデキサメタゾン(Sigma-Aldrich)、2×10<sup>-10</sup> M L-3,3',5-トリヨードサイロニン(Sigma-Aldrich)、4×10<sup>-3</sup> M Glutamax<sup>TM</sup>(Invitrogen)、1μg/mLグルタチオン(還元)(Sigma-Aldrich)、および1%ペニシリン/ストレプトマイシン/アンフォテリシンB(Invitrogen)を添加した比率が3:1のDMEM(高グルコース(4.5g/L); L-グルタミンおよびピルビン酸ナトリウム(Mediatech)を含む)およびHam's F12(Invitrogen)。実験開始時に全ストック培地に正確な濃度で(2.5ng/mL EGFおよび5.0ng/mL bFGF)成長因子を添加した\*\* CDM以外は、各供給で成長因子を新たに添加した。

#### 【0119】

##### (D. コラーゲンゲル、フィブリングル、およびALS/LTMの調製)

線維芽細胞集合コラーゲンゲル(CG)を、当該分野で公知の方法にしたがって、0.2mLのコラーゲンストック溶液(5mg/mLの5mM HCl抽出ラットテール腱コラーゲンを含む5mM酢酸)、0.05mL 5×DMEM(Mediatech)、細胞を含む0.65mL DMEM(Mediatech)、0.1mL牛胎児血清(FBS, ATCC)、150μg L-アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩n-水和物(Wako)、および1%ペニシリン/ストレプトマイシン/アンフォテリシンB(Inv

10

20

30

40

50

trogen) の室温での混合によって調製した。1 mL の得られた溶液を、直径 24 mm のウェルに添加した。コラーゲンの初期濃度は、1.0 mg / mL であり、細胞の初期濃度は 10% FBS 中に 2,000,000 細胞 / mL であった。

【0120】

線維芽細胞集合フィブリングル (FG) を、当該分野で公知の方法に基づいて調製した。簡単に述べれば、HFF を含む標準血清補充培地を、フィブリノゲン溶液 (Sigma - Aldrich F4753 type IV) に添加した。1 mL のサンプルを、室温で 4 単位のウシトロンビン (Sigma - Aldrich, T7513) と混合した。1 mL の得られた溶液を、直径 24 mm の各ウェルに添加した。フィブリノゲンの初期濃度は、1.0 mg / mL であり、細胞の初期濃度は 10% FBS 中に 2,000,000 細胞 / mL であった。 10

【0121】

最終体積が 1 mL / サンプルである 200 万個の第 5 繼代 HFF と標準的な血清補充培地または化学的に規定された上記培地 (\* CG、\* CDM、および \*\* CDM 用) との室温での混合によって ALS / LTM を調製することができる。細胞の初期濃度は 10% FBS 中に 2,000,000 細胞 / mL であった。1 mL のコラーゲンゲルサンプル、フィブリングルサンプル、および CDM サンプルを、直径 24 mm の多孔質インサート (0.4  $\mu$ m TransWells<sup>TM</sup>, Corning Life Sciences, Acton, MA) にピペットで取り、上記の標準的な 6 ウェルプレートで懸濁し、室温で静置した。1 時間後、3 mL の標準的な血清補充培地または化学的に規定された培地 (\* CG、\* CDM、および \*\* CDM 用) を注意深く下に添加し、1 mL を上に添加し、各サンプルを、37 の加湿された 10% CO<sub>2</sub> 条件下でインキュベートした。サンプルに同一の培地を 1 日おきに 3 週間与えた (3 mL を各多孔質インサートの下に、2 mL を上に与える)。 20

【0122】

(E. 力学試験)

培養 3 週間後、サンプルを ddH<sub>2</sub>O に 1 時間曝露して細胞を溶解し、線維芽細胞によって得られた収縮力を排除し、その後、生体力学試験のためにリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS, Mediatech) で平衡化した。ヒト包皮を、Analytical Biological Services Inc. (Wilmington, DE) から入手し、抗体を含む RPMI 培地で冷却して輸送し、被験体からの取り出しから 12 時間以内に試験した。サンプルの厚さ、破断張力 (failure tension)、破断歪、および最大抗張力 (UTS) を、1 mL / 分の定速で PBS にて膨らませた場合にサンプルが破裂する変位 (displacement) および圧力を測定する新規の組織膨張デバイスによって決定した。サンプルを円状に固定し、直径 1 cm の開口部を介して膨張させることにより、破断前に球状のキャップが形成される。サンプルに印加される圧力の増加を、内臓圧力変換機 (model PX102-025GV, Omega Engineering, Stamford, CT) によって測定した。キャップ中央の置換を、レーザー変位システム (LDS-080, Keyence, Woodcliff Lake, NJ) を使用して測定した。LSD-080 により、小反射ディスク (1.3 g、直径 1.3 cm) によって 1 分間僅かに加圧した後の各サンプルの厚さも測定した。球状膜についての最大膜張力 T を、以下のラプラスの法則を使用して計算した： 30

$$T = 1 / 2 PR \quad (\text{式 } 1)$$

(式中、P は、組織が破裂する圧力であり、R は破裂点での対応直径である)。R を、以下の式によって予想される球状キャップを計算した：

$$R = (w^2 + a^2) / 2w \quad (\text{式 } 2)$$

(式中、a はクランプ (5 mm) の半径であり、w はレーザーによって測定された破断でのサンプル中心の変位である)。 40

【0123】

最大抗張力 (UTS) を以下によって計算した：

$$UTS = T / t \quad (式3)$$

(式中、 $t$  は膨張前の検体の初期厚さである)。破裂時の実際の厚さは、この値よりも低かった。したがって、検体の厚さが膨張するにつれて減少するため、計算された UTS の計算値 (操作ストレス (engineering stress)) は破断時の真のストレス未満である。

【0124】

最大抗張力 / コラーゲン密度 (UTS / コラーゲン密度) を、以下によって計算した：

$$\begin{aligned} UTS / \text{コラーゲン密度} &= UTS (\text{総コラーゲン} / t (D / 2)^2) \\ &= T / (\text{総コラーゲン} / (D / 2)^2) \quad (式4) \end{aligned}$$

(式中、 $D$  は構築物の直径である (2.4 cm))。

10

【0125】

破断歪を、適切な関係を使用した変位データから評価した長さでの等軸歪から決定した：

$$\text{破断歪} = 2 / 3 (w / a)^2 - 2 / 15 (w / a)^4 + 2 / 35 (w / a)^6 \quad (式5)$$

。

【0126】

(F. 生化学分析)

生体力学試験後、サンプルを秤量し (湿重量)、一晩凍結乾燥させ、再度秤量した (乾燥重量)。各凍結乾燥サンプルを、1 mL の 0.5 M 酢酸および 1 mg / mL ペプシン (Sigma - Aldrich) に溶解し、回転させながら 20 で一晩インキュベートした。この抽出ステップを 2 回繰り返して酸およびコラーゲンのペプシン可溶性画分を完全に抽出した。次いで、サンプルを、14,000 rpm にて 15 で 1 時間遠心分離し、上清を他の 2 つの抽出物由来のサンプルと合わせ、Sircoll<sup>TM</sup> アッセイ (Biocolor, Belfast, N. Ireland) を使用して非酸およびペプシン抽出可能コラーゲン含有量の決定に使用した。Sircoll<sup>TM</sup> アッセイにより、溶液中のインタクトなコラーゲン単量体の含有量を定量し、分解コラーゲンは検出されなかった (これらの量は、ヒドロキシプロリンアッセイ (以下の方法を参照のこと) によって測定された実際のコラーゲン含有量の 5 ~ 10 % であった)。各抽出物の総非コラーゲンタンパク質の含有量を、クーマシーブリリアントブルー G を使用した Top - Blue<sup>TM</sup> 総タンパク質アッセイ (Biocolor) で測定した。総タンパク質含有量を、この値を各サンプルから得た総コラーゲン量に足すことによって得た。各サンプルの残存ペレットを、プロテイナーゼ K (Invitrogen) (50 µg) を含む 500 µL の 10 mM EDTA および 0.1 M リン酸ナトリウム (pH 6.5) (Fisher) 溶液にて 60

20

で一晩消化した。100 µL アリコートの消化物を、Blycan<sup>TM</sup> アッセイ (Biocolor) を使用して、硫酸化グリコサミノグリカンおよびプロテオグリカンの含有量 (ヒアルロン酸を含まなかった) の測定のために使用した。次いで、10 µL アリコートの消化物を使用して DNA 含有量を測定し、それにより、Hoechst 33258 色素 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) を使用して Dyna Quant 200 蛍光光度計 (Amersham Biosciences) にて細胞数 (8 pg DNA / 細胞と予想される) を測定した。100 ~ 200 µL アリコートのプロテイナーゼ K 消化物を使用して、ヒドロキシプロリンアッセイによって非酸およびペプシン抽出可能コラーゲン画分 (不溶性コラーゲン画分) を測定した。ヒドロキシプロリンアッセイは、Edwards and O'Brien (1980) の方法に基づき、各サンプルの 110 の 6.0 M HCl で 16 時間の加水分解、その後のサンプルの減圧乾燥、アッセイ緩衝液 (5 g / L クエン酸 (Sigma - Aldrich)、1.2 mL / L 氷酢酸 (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ)、12 g / L 酢酸ナトリウム (VWR, Bridgeport, NJ)、3.4 g / L 水酸化ナトリウム (VWR) からなる) での 2.0 mL への再構成、および 1.0 mL のクロラミン - T 試薬 (62 mM クロラミン - T 溶液 (VWR) を含む 20.7 % ddH<sub>2</sub>O、26% n - プロパノール (VWR)、および 53.3 % のアッセイ緩衝液から作製

30

40

50

)との室温で20分間の混合、1.0mLの新たに調製したジメチルアミノベンズアルデヒド試薬(15gのp-ジメチルアミノベンズアルデヒド(Sigma-Aldrich)を含む60mLのn-プロパノール(VWR)および26mLの60%の過塩素酸(VWR)から作製)の添加、各サンプルの60で15分間のインキュベーション、各サンプルの水道水中で5分間の冷却、および各サンプルの45分以内の550nmの吸光度の測定からなる。検量線および1μgの4-ヒドロキシプロリンに対する10μgのコラーゲンの変換係数を使用して、読み取られた吸光度はコラーゲン量と相関した。既知量のトランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン(Sigma-Aldrich)およびラットテールI型コラーゲンを使用して検量線を作成し、変換係数を決定した。

## 【0127】

10

## (G. 組織学および透過電子顕微鏡法)

各群由来の1つのサンプルを、10%亜鉛ホルマリン(VWR)中で1時間の固定、その後の4のエタノール(VWR)中での洗浄および保存による組織学的評価のために調製した。サンプルを、パラフィンブロックに包埋し、厚さ10μmの切片にし、ヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)で染色した。染色された切片を、Nikon Eclipse E600顕微鏡およびSpotデジタルカメラ(Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI)を使用して200倍に画像化し、写真撮影した。透過電子顕微鏡法(TEM)のために、各群由来の1つのサンプル(\*\*CDMおよび陰茎の皮膚を除く)を、Gibson and Lang(1979)の方法にしたがって固定した。簡単に述べれば、サンプルを2%グルタルアルデヒド中で1時間固定し、カコジル酸ナトリウム緩衝液で3回リーンスし、四酸化オスミウム中で10分間固定し、エタノール(VWR)工程で10分間脱水し、その後、酸化プロピレン(全てElectron Microscopy Sciences, Hatfield, PA)で2回洗浄した。次いで、サンプルを、エポン-アラルダイト樹脂(Electron Microscopy Sciences)に包埋した。簡単に述べれば、サンプルを、1:1の比の酸化プロピレンとエポンアラルダイトに2時間包埋し、その後、100%エポンアラルダイトに3時間包埋し、各サンプルを新鮮な100%アラルダイトを含む包埋型に移し、60で一晩硬化させた。Venable and Coggeshall(1965)の方法にしたがって、60~90nmの金色および銀色の切片を、50%エタノール中で飽和した酢酸ウリニル(uranyl acetate)で5分間染色し、その後、クエン酸鉛中で20分間染色した。次いで、細胞、コラーゲン、およびECM形態の観察のために、各サンプル由来の染色切片を、ZEISS電子顕微鏡を使用して画像化した。コラーゲン原線維の平均直径および密度を、測定した平均直径および高倍率(57,000倍または88,000倍)で取った5つの無作為に選択した視野由来のμm<sup>2</sup>あたりのコラーゲン原線維数から計算した。5倍のルーラーを使用して断面にしたコラーゲン原線維の最も薄い点でコラーゲンの直径を測定した。格子上の視野を無作為に選択した場合、サンプル上に唯一存在するまで別の視野を選択し続けた。

20

30

30

## 【0128】

30

## (H. 統計)

エラーバーは、全図における1つの標準偏差を示す。群間の統計的相違を、Tukey HSD後知恵解析(SPSS, Inc., Chicago, IL)を使用したANOVAを使用して決定した。相違は、p < 0.05で有意と見なした。線形回帰を行い、独立変数と従属変数との間の関連度を決定するためにR<sup>2</sup>値を得た(SPSS, Inc.)。

40

## 【0129】

## (結果と考察)

過剰密集細胞によって唯一産生および組み立てられた細胞外マトリックス(ECM)が、細胞を緻密にし、コラーゲンまたはフィブリンの精製溶液から成形されたゲルをリモーディングすることによって精製されたECMよりも機械的に優れているかどうかを決定するために、実験をデザインし、実施した。実験のばらつきを減少させるために、同時に同一の標準的な血清補充培地を与え、同一の6ウェルプレート上で隣り合わせで3週間成長さ

50

せた同一バッチ由来の200万個のヒト包皮線維芽細胞を使用して並行して全群を成長させた。コラーゲンゲル(CG)およびフィブリンゲル(FG)を、厚さ2.2mmから開始し、それぞれ、 $83 \pm 5 \mu\text{m}$ および $218 \pm 5 \mu\text{m}$ に収縮した。他方では、細胞由来基質(CDM)を、単層の厚さをわずかに超える細胞層から開始し、 $125 \pm 6 \mu\text{m}$ まで成長させ、これは、合成ECMが互いに適切な垂直に位置するいくつかの別の層に組織化されており、天然の軟結合組織に類似する(図17)。培養3週間後、CDMは、CGより非常に強く、FGより有意に強かった(表1を参照のこと)。

### 【0130】

CDMの厚さの他の基準を、図15に示すデジタル画像分析を使用して決定した。図15A~Eは、それぞれ線維芽細胞集合コラーゲンゲル(CG)、フィブリンゲル(FG)、3つの細胞由来の基質(CDM、<sup>\*</sup>CDM、および<sup>\*\*</sup>CDM)のヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)染色切片を示す。全サンプルを、最初に同数の線維芽細胞から開始して3週間成長させた。線維芽細胞を、1mg/mLのコラーゲンを含むコラーゲンゲルおよび1mg/mLのフィブリンを含むフィブリンゲルに包埋した。コラーゲンゲルおよびフィブリンゲルを、それぞれ厚さ1mmから開始し、最初の数日間で厚さ84μmおよび厚さ230μmまで収縮。細胞由来基質を、細胞2~3個分の厚さから開始し、それぞれ、3週間の培養期間にわたり、厚さ110μm(CDM)、465μm(<sup>\*</sup>CDM)、および240μm(<sup>\*\*</sup>CDM)に収縮した。CDMは、コラーゲン基質およびフィブリン基質よりも少なくとも5倍の強度があり(LTMについては120N/m、CGおよびFGについては25N/m)(図16Bを参照のこと)、幼若で天然の芽株様組と類似する量、比率、および整列の多数の細胞外マトリックスタンパク質を含んでいた。全顕微鏡写真を200倍で撮影した。デジタル画像分析によって厚さを測定した。スケールバー=100μm。CGおよびFGの値は、他の研究によって得られた結果と一致し、比較的短期間で細胞産生ECM(すなわち、CDM)を再構成ECMよりも強くすることができるることを示す。

### 【0131】

ここで定義された本発明の実施形態はまた、多層化線維芽細胞による高ECM合成の促進のための比較的単純な化学的に規定された培地を提供する。得られた最小無血清培地の実施形態は、血清を補充する代わりに、化学的に規定された培地に塩基性成長因子(bFGF)、上皮性帳場位置(EGF)、デキサメタゾン、およびL-3,3',5-トリヨードサイロニン、および血清中に存在する細胞成長に必要であることが認められたいいくつかの他の成分(インスリン、亜セレン酸、および脂質前駆体)を補充していること以外は血清補充培地に類似する。血清の代わりのこれらのいくつかの成分の存在により、標準的な血清補充サンプル(CDM)よりも厚さが倍増(<sup>\*\*</sup>CDM:3週間の培養期間の開始時にストック培地に成長因子を添加した)または3倍(<sup>\*</sup>CDM:各供給時に新たに成長因子を添加した)になり(表1および図16Aを参照のこと)、最大抗張力(UTS)が40%(<sup>\*</sup>CDM)または210%(<sup>\*\*</sup>CDM)増加した(表1および図16Fを参照のこと)。化学的に規定された培地のいずれかのバージョンを使用して產生された基質により、破断歪が倍増し(表1および図16Jを参照のこと)、増殖速度が4倍になり(表1および図16Iを参照のこと)、非酸およびペプシン抽出可能コラーゲン画分が5倍になった(表1および図16Kを参照のこと)-サンプル基質の強度と高度に相關する( $R^2 = 0.977$ に調整)パラメーター。興味深いことに、コラーゲンゲルに化学的に規定された培地(<sup>\*</sup>CG)を与えた場合、化学的に規定された培地と共に与えてから24時間以内に、コラーゲンゲル内の収縮力が非常に大きくなるため、ウェルから引き離され、ゲル自体が収縮した。この過剰な収縮により、ゲルの発達に及ぼす化学的に規定された培地および血清補充培地の影響の比較が妨害され、この比較はさらなる研究課題である。

### 【0132】

さらに、5つの基質型および天然の陰茎の皮膚との間の構造の特徴および生化学的組成を、どのようにしてこれらの相違がその生化学的性質に相關するのかを決定するために比較した。ECMの細胞媒介強化機構をさらに洞察するために、これらの研究を行った。ヒ

10

20

30

40

50

ト陰茎皮膚は、通常の皮膚よりも数倍弱いにもかかわらず、LTEの作製で使用した線維芽細胞がヒト新生児の包皮に由来していたため、本研究で產生された5つの異なる生体組織等価物(LTE)と天然の軟結合組織とを比較するためのものであった。

【0133】

精製コラーゲン中に捕捉された線維芽細胞が単層培養物中よりもECMタンパク質の合成がはるかに少ないことが公知であるにもかかわらず、精製フィブリン中に捕捉された線維芽細胞は、ECMタンパク質の產生能力を保持し、本発明者らのデータは、驚いたことに、自己產生コラーゲンリッチ基質中の線維芽細胞が精製フィブリングルよりもコラーゲンなどのECMタンパク質をなおさらには大量に產生することを示した。さらに、細胞由来基質はコラーゲングルと類似の量のコラーゲンを合成するにもかかわらず、CDM合成コラーゲンは細胞由来基質中のECM合成を少しも阻害しないようであった。詳細には、細胞由来基質中の細胞によって合成された総タンパク質は、コラーゲングルおよびフィブリングル中の総タンパク質の正味の増加よりも有意に多かった(表1および図16Eを参照のこと)。

【0134】

これらの値はより高いが、他の研究者によって得られたゲルおよび細胞產生基質の結果と一致した(Grinnell et al., 1989; Huang et al., 1993; Clark et al., 1997; Neider et al., 2002)。これらの相違は、CDM培養物などでより多くのECMを合成するように線維芽細胞にシグナル伝達し得る本発明者らの培養物のはるかに高い細胞密度起因し得る。これらの相違はまた、サンプルの底側の細胞のための栄養素の分散距離を短くする多孔質インサートの使用(多孔質インサートの使用により、6ウェルプレート上で成長したサンプル(示さず)よりも50%を超えて厚さが増加した(しかし、UTSには効果なし))またはより安定なL-アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩n-水和物形態(安定性はL-アスコルビン酸の24時間に対して1週間)での80%高いL-アスコルビン酸塩濃度に起因し得る。

【0135】

細胞由来の基質はまた、コラーゲングルおよびフィブリングルよりも非酸およびペプシン抽出可能コラーゲン画分(不溶性コラーゲン画分)が有意に多かった(表1および図16Kを参照のこと)。非酸およびペプシン抽出可能コラーゲン画分は、0.5M酢酸およびペプシン(1mg/mL)での抽出工程3日間にわたる繰り返しによって可溶化しなかったコラーゲン量であった。非酸およびペプシン抽出可能コラーゲンの密度は、抽出に耐えるように高度に架橋されているか束状になっている組織中の非常に安定なコラーゲンの基準となる。UTS/コラーゲン密度(サンプルの厚さに無関係であり、単位コラーゲンあたりに正規化された構築物の強度を示す測定基準)は、同様に、コラーゲングルよりも細胞由来基質のほうが有意に高かった(表1および図16Lを参照のこと)。フィブリングルのUTS/コラーゲン密度の値が高いのは( $25.9 \pm 2.4 \text{ kPa/mg/cm}^3$ -表1)、ゲル中のフィブリンなどのコラーゲン以外のECMタンパク質に起因し得る。しかし、その他は、フィブリングルのUTSは構築物の総コラーゲン量に相関する(21日目で $R^2 = 0.77$ )ことが見出され、本発明者らの研究では、コラーゲン密度に相関するUTS(21日目で $R^2 = 0.73$ )はフィブリングルだけでなく、コラーゲングルおよび細胞由来基質も相関することが見出された。本発明者らの結果は、特許請求の範囲に記載の発明のCDMのUTSはコラーゲン密度よりも非酸およびペプシン抽出可能コラーゲン密度にさらにより厳密に相関する( $R^2 = 0.993$ )ことを示す。したがって、本命書中に記載の生体組織等価物の強度は、天然の軟結合組織と同様に、コラーゲン密度に相関するだけでなく、非酸およびペプシン抽出可能コラーゲン密度によって示される非常に安定なコラーゲン形態とより特異的相関する。

【0136】

軟結合組織の強度は、線維芽細胞集合コラーゲングルなどの生体組織等価物と同様に、一般に、コラーゲン密度およびコラーゲン原線維の平均直径に寄与する。表1にまとめる

10

20

30

40

50

ように、透過電子顕微鏡(TEM)による観察により、CDM、<sup>\*</sup>CDM、コラーゲンゲル、およびフィブリンゲル中のコラーゲン原線維の直径がそれぞれ $46 \pm 5 \text{ nm}$ 、 $48 \pm 5 \text{ nm}$ 、 $52 \pm 10 \text{ nm}$ 、および $47 \pm 5 \text{ nm}$ である一方で、CDM( $79 \pm 2$ 原線維/ $\mu\text{m}^2$ )、<sup>\*</sup>CDM( $80 \pm 2$ 原線維/ $\mu\text{m}^2$ )、およびコラーゲンゲル( $81 \pm 4$ 原線維/ $\mu\text{m}^2$ )のコラーゲン密度は、フィブリンゲル( $28 \pm 4$ 原線維/ $\mu\text{m}^2$ 、 $p < 0.01$ )よりことが有意に高いことが明らかとなった。これらの直径は、天然の軟結合組織中で見出されたコラーゲン原線維の直径の範囲内( $40 \sim 100 \text{ nm}$ )である。

### 【0137】

この場合、コラーゲンゲル中のほとんどのコラーゲンが巨大な直径が約 $56 \text{ nm}$ の原線維からなるにもかかわらず、直径約 $46 \text{ nm}$ の原線維(おそらく新規に合成されたコラーゲン)が少し存在し(図17を参照のこと)、コラーゲンゲル中の総コラーゲン量が3週間にわったって変化しないため、ゲル中のいくつかの天然のコラーゲンが分解されたことを示す。本明細書中に開示のコラーゲンゲルがはるかに最も高いコラーゲン密度およびもっとも巨大なコラーゲン原線維の直径を有するにもかかわらず、これらは、理想的な条件下で成長した細胞由来基質よりも有意に弱かった。図17A～17Dで認められるように、コラーゲン原線維、CDM、コラーゲンゲル、および<sup>\*</sup>CDMの分布は、フィブリンゲルの $28$ 原線維/ $\mu\text{m}^2$ よりも $2.5$ 倍のコラーゲン原線維密度( $80$ 原線維/ $\mu\text{m}^2$ )を有していた。コラーゲン原線維を矢印で示し、全顕微鏡写真を、 $12,000$ 倍で撮影した(スケールバー= $1 \mu\text{m}$ )。細胞由来基質のコラーゲン原線維(図17CおよびD)は、より平行であり、任意の他の群よりも平行な別の層からなるようであった(顕微鏡写真が数千の平行のコラーゲン原線維の断面からなるCDMの上部を参照のこと)。コラーゲンゲルのコラーゲン原線維(図17A)は、いくらか平行なようであるが、少数の別の層のみからなり、フィブリンゲルのコラーゲン原線維(図17B)は、ECMの小領域で平行なだけなようであった。

### 【0138】

理論に制限されないが、この矛盾は、コラーゲン原線維間のより多くの分子内共有結合性架橋またはコラーゲンゲルおよびフィブリンゲル中よりも細胞由来基質中の線維へのコラーゲン線維の広範な結合に起因し得る。非酸およびペプシン抽出可能コラーゲン画分は、フィブリンゲル( $R^2 = 0.11$ )以外の全てのこれらの群のUTS/コラーゲン密度値と厳密に相關した( $R^2 = 0.93$ )。任意の他のサンプルよりも非酸およびペプシン抽出可能コラーゲンが数倍高い<sup>\*</sup>CDMおよび<sup>\*\*</sup>CDMは、任意の他のサンプルよりも熱安定性および酵素安定性も高かった(データ示さず)。非酸およびペプシン抽出可能コラーゲン画分によって示される非常に安定なコラーゲンは、抽出に耐性を示す高度に架橋または結合したコラーゲンからなり、基質をより強化するより耐性の高い構造が得られるようである。

### 【0139】

図16(表1のデータのグラフ)で認められるように、全ての細胞由来基質型がコラーゲンゲル(CG)およびフィブリンゲル(FG)よりも強いことが図16Bおよび16Fで認められる。<sup>\*</sup>CDMおよび<sup>\*\*</sup>CDMは、その血清補充類似物(companion)(CDM、コラーゲンゲルおよびフィブリンゲル)よりも厚く(図16A)、且つ総タンパク質がはるかに多い(図16E)が、プロテオグリカンおよびグリコサミノグリカンの比率はたった半分であった(図16Dおよび16H)。<sup>\*</sup>CDMおよび<sup>\*\*</sup>CDMはまた、コラーゲンゲルまたはフィブリンゲルよりも有意に高い非酸およびペプシン抽出可能コラーゲン画分を含み(図16K)、コラーゲン $1 \mu\text{g}$ あたり(UTS/コラーゲン密度)でより強かった(図16L)。CDMは、 $1 \mu\text{g}$ のコラーゲンあたりのコラーゲンゲルの2倍の強度があり、これは、CDM中のコラーゲンがコラーゲンゲル中のコラーゲンより強度を高めるために組織化されているという可能性を示していた。コラーゲンに加えて、<sup>\*</sup>CDMおよびフィブリンゲルの強度の実質的比率は、他のECMタンパク質にも起因していた。<sup>\*</sup>CDMおよび<sup>\*\*</sup>CDMは、CDM、コラーゲンゲル、およびフィブリンゲルよりも有意に伸張性が高かった。ヒト包皮の皮膚(HPS)は、機械的には<sup>\*\*</sup>CDM

10

20

30

40

50

と最も厳密に類似し、生化学的には<sup>\*</sup> CDM および<sup>\*\*</sup> CDM と類似していた。

【0140】

創傷治癒応答時にインビオで天然に起こる長期間の成長因子濃度の低下（線維芽細胞が進入して再構築するにつれて、新鮮な血餅中の高濃度の成長因子が長期間にわたって減少する）を、は、3週間の培養の開始時の供給培地（feeding media）への成長因子（EGF および bFGF）の直接的な添加および長期にわたる成長因子活性の天然の喪失の活用によって近づけた。この3週間の開始時の成長因子の1度の添加（<sup>\*\*</sup> CDM）により、成長因子を供給ごとに新たに添加する並行サンプル（<sup>\*</sup> CDM）の厚さの約1/2の基質が得られた（表1および図16Aを参照のこと）。厚さは、総タンパク質含有量と高度に相関し（ $R_{adj}^2 = 0.9$ ）、総細胞数にも相関した（ $R_{adj}^2 = 0.874$ ）。興味深いことに、<sup>\*\*</sup> CDM は、<sup>\*</sup> CDM よりも総コラーゲンが有意に多いが、<sup>\*</sup> CDM の総タンパク質は<sup>\*\*</sup> CDM のほぼ2倍であった（表1および図16Cを参照のこと）。コラーゲンは強度を与える主な細胞外マトリックスタンパク質であるため、<sup>\*</sup> CDM よりもコラーゲン画分が2倍の<sup>\*\*</sup> CDM も、強度が<sup>\*</sup> CDM のほぼ2倍であった（表1および図16Fを参照のこと）。

【0141】

長期間（6週間まで）成長させた細胞由来基質は、厚さおよび強度がさらに増加し続けた（データ示さず）。代替物として低濃度の新鮮な成長因子を供給毎に添加した場合に<sup>\*</sup> CDM よりも有意に強いが、<sup>\*\*</sup> CDM よりも有意に薄い基質が得られたため、<sup>\*\*</sup> CDM は、成長期間の初期に厚さがほとんど発達し、その後、残りの成長期間に強度が発達すると考えられる。この効果は、EGF が非コラーゲンタンパク質の合成を刺激するが、1型コラーゲン遺伝子の転写を阻害する一方で、高 bFGF 濃度では、合成を増強し、且つECMを強化するよりも細胞増殖の増加を好むという事実に起因するようである。したがって、長期間にわたる総成長因子活性の減少により、非コラーゲンタンパク質の合成が減少するが、コラーゲン合成の増加により、合成ECMの強度が増加する。多数の成長因子（bFGF が含まれる）も、ECM 内に相対的に長期間その活性を蓄積し、保持することができる。したがって、いくつかの添加した成長因子が培養初期にECM中に蓄積し、その後、基質が発達するにつれて継続的に消費される。<sup>\*</sup> CDM および<sup>\*\*</sup> CDM の破断歪も、その血清補充対応物よりも有意に高く（表1および図16Jを参照のこと）、天然の軟結合組織をより模倣している。

【0142】

これらの結果は、生体組織等価物は、細胞を産生する場合（言い換えれば、細胞を産生してゲルまたは他の生体ポリマー材料などの足場と共に供給されるよりもむしろ細胞自体の機械的環境を発達させる場合）、より強く勝つ厚いことを示す。この強度は、ゲル中よりもむしろALSLTM中の非常に安定なコラーゲンのより大きな画分および線維芽細胞の有意により迅速な合成速度に起因するようである。産生され、且つ本明細書中に記載のLTMおよびその細胞由来基質成分（<sup>\*</sup> CDM および<sup>\*\*</sup> CDM）は、動物成分を含まない化学的に適宜された培地のみを与えた細胞のみから産生されるため、軟結合組織の代替物として使用される可能性がある。急速に成長し、高価な血清を欠くため、LTMは、商業的により価値のある軟結合組織の代替物として開発され、主流の承認および魅力を有するであろう。

【0143】

化学的に規定された培地が比較的簡潔であることに起因して、これらの細胞産生生体組織等価物もまた、創傷治癒および結合組織の形成などの多数のインビオ条件の実験ならびにインビトロで細胞のみから発達する軟結合組織環境での異なる細胞および組織の発達および相互作用の調査のための軟結合組織の成長および発達に及ぼす栄養成分および薬学的生成物の栄養についてのインビトロ生体モデルとしての役割を果たすことができる。コラーゲンおよびフィブリリンの両方を超える細胞由来基質の熱および酵素に対する安定性ならびに機械的完全性により、インビオ条件下でより長く構造完全性を保持することが可能である。化学的に規定された培地において比較的短期間でLTMを厚く且つ強く成長させる

10

20

30

40

50

ことができるにより、フィブリングル、コラーゲンゲル、およびさらなる天然の組織の使用に代わる魅力的な代替物として創傷治癒および組織再生の商業的に価値のある選択肢が得られる。

表1. ヒト陰茎の皮膚および細胞由来基質(CDM、\*CDM、\*\*CDM)、ヒト包皮線維芽細胞を含む線維芽細胞集合コラーゲンゲルおよびフィブリングルの力学的分析および生化学的分析の結果。数値は、平均+/-SDを示す。括弧内の数値は、およその初期量を示す。コラーゲン原線維の直径および密度を、細胞表面付近で測定した。

【0144】

【表1】

10

測定	コラーゲンゲル	フィブリングル	CDM	*CDM	**CDM	陰茎の皮膚
最大抗張力(kPa)	168.5 ± 43.1	133.2 ± 10.6	223.2 ± 9	314.5 ± 7.2	697.1 ± 36.1	713.0 ± 55.2
厚さ(μm)	83 ± 5 (2,220 μm)	218 ± 5 (2,220 μm)	125 ± 6 (~30 μm)	395 ± 6 (~30 μm)	225 ± 7 (~30 μm)	651 ± 30
破断歪	0.13 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.31 ± 0.06	0.88 ± 0.28
総タンパク質(mg)	1.08 ± 0.03 (1.0 mg)	1.58 ± 0.04 (1.0 mg)	1.25 ± 0.06	4.40 ± 0.08	2.65 ± 0.07	6.74 ± 0.44
総コラーゲン(mg)	0.99 ± 0.02 (1.0 mg)	0.51 ± 0.03	0.85 ± 0.03	1.40 ± 0.04	1.78 ± 0.06	3.98 ± 0.37
非酸およびペプシン抽出可能コラーゲン割合(%)	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	2.3 ± 0.2	12.8 ± 0.5	13.1 ± 0.3	15.7 ± 0.7
コラーゲン密度(mg/cm <sup>3</sup> )	26.5 ± 1.5	5.2 ± 0.2	15.1 ± 0.9	7.8 ± 0.2	17.4 ± 0.1	13.5 ± 0.7
UTS/コラーゲン密度(kPa/mg/cm <sup>3</sup> )	6.4 ± 1.9	25.9 ± 2.4	14.5 ± 1.1	40.3 ± 0.4	40.0 ± 1.9	52.9 ± 3.1
コラーゲン原線維の直径(nm)	52 ± 10	47 ± 5	46 ± 5	48 ± 5	-	-
コラーゲン原線維の密度(原線維/μm <sup>2</sup> )	81 ± 4	28 ± 4	79 ± 2	80 ± 2	-	-
総プロテオグリカンおよびグリコサミノグリカン(μg)	38.4 ± 0.7	45.4 ± 0.9	31.3 ± 0.5	64.3 ± 0.6	38.4 ± 0.4	83.0 ± 5.7
湿重量/乾燥重量	16.4 ± 0.6	20.1 ± 0.4	13.0 ± 0.5	19.5 ± 0.2	20.3 ± 0.6	21.7 ± 0.4
細胞数(百万)	2.8 ± 0.1 (200万)	4.0 ± 0.1 (200万)	2.8 ± 0.1 (200万)	6.1 ± 0.1 (200万)	3.6 ± 0.1 (200万)	9.8 ± 0.4 (200万)

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0145】

【図1】図1は、線維芽細胞ALS上で成長した神経前駆細胞から分化したニューロンのメチレンブルー染色を示す。

【図2】図2は、線維芽細胞ALS上で成長した神経前駆細胞に対して行った蛍光生/死アッセイを示し、ここでこの線維芽細胞は、ヒトの神経前駆細胞とともに播種される前に死滅する。生きたニューロン(神経細胞およびグリア細胞)は緑色の蛍光を発し、死滅細胞(ほとんど線維芽細胞)の核は赤色の蛍光を発する。

【図3】図3は、抗Hu-MAb 16A11(ニューロン末端の有糸分裂後に短期間発現される脊椎動物神経発生の初期マーカー)を発現するニューロン細胞/組織を含む厚さ約50~60 μmの17日目の線維芽細胞ALS系の断面を示す(Marusich, M. F.ら(1994)J. Neurobiol. 25: 143-155)。神経細胞体中に赤茶色のスポットとしてマーカーが観察され、細胞核は青色である。ALSを4週間成長させ、その後ヒト神経前駆細胞と共に播種した。

【図4】図4は、抗Hu-MAb 16A11(ニューロン末端の有糸分裂後に短期間発現される脊椎動物神経発生の初期マーカー)を発現するニューロン細胞/組織を含む厚さ約50~60μmの17日目の線維芽細胞ALS系の別の断面を示す(Marusich, M. F. ら(1994)J. Neurobiol. 25: 143-155)。神経細胞体中に赤茶色のスポットとしてマーカーが観察され、細胞核は青色である。ALSを4週間成長させ、その後ヒト神経前駆細胞と共に播種した。

【図5】図5は、抗Hu-MAb 16A11を発現するニューロン細胞/組織を含む厚さ約216~230μmの31日目の線維芽細胞ALS系の断面を示す。ALSを3週間成長させ、その後ヒト神経前駆細胞と共に播種した。認められ得るように、20μmまでのサイズ範囲の抗Hu MAb 16A11マーカーを発現する種々のサイズの領域(神経細胞体の異なる断面)を示す。

【図6】図6は、抗Hu-MAb 16A11を発現するニューロン細胞/組織を含む厚さ約216~230μmの31日目の線維芽細胞ALS系の別の断面を示す。ALSを3週間成長させ、その後ヒト神経前駆細胞と共に播種した。認められ得るように、20μmまでのサイズ範囲の抗Hu MAb 16A11マーカーを発現する種々のサイズの領域(神経細胞体の異なる断面)を示す。

【図7】図7は、抗Hu-MAb 16A11を発現するニューロン細胞/組織を含む厚さ約153μmの24日目の線維芽細胞ALS系の断面を示す。ALSを2週間成長させ、その後ヒト神経前駆細胞と共に播種した。認められ得るように、ほぼ20μmまでのサイズ範囲の抗Hu MAb 16A11マーカーを発現する種々のサイズの領域(神経細胞体の異なる断面)を示す。

【図8】図8は、一次Hu MAb 16A11抗体が系に存在しない図3~7の神経発生マーカー実験についてのネガティブコントロール系の断面図を示す。したがって、細胞の核(青色)のみが認められ、神経発生マーカーの発現は認められない。

【図9】図9は、一次Hu MAb 16A11抗体が系に存在しない図3~7の神経発生マーカー実験についてのネガティブコントロール系の異なる断面図を示す。したがって、細胞の核(青色)のみが認められ、神経発生マーカーの発現は認められない。

【図10】図10は、ヒト脳切片を使用した図3~7の神経発生マーカー実験についてのポジティブコントロール系の断面図を示す。正の表示は、神経細胞体へのマーカー抗Hu MAb 16A11の付着が、画像全体で認められる巨大且つ多数の褐色のスポットによって示されることを示す。抗Hu MAb 16A11を染色しないほとんどの細胞はグリア細胞である。

【図11】図11は、ヒト脳切片を使用した図3~7の神経発生マーカー実験についてのポジティブコントロール系の異なる断面図を示す。正の表示は、神経細胞体へのマーカー抗Hu MAb 16A11の付着が、画像全体で認められる巨大且つ多数の褐色のスポットによって示されることを示す。抗Hu MAb 16A11を染色しないほとんどの細胞はグリア細胞である。

【図12】図12は、厚さ約70μmの筋肉細胞/組織を含む24日目の線維芽細胞ALS系の断面の三重染色を示す。ALSのコラーゲン線維は青色であり、細胞の核は(青みがかった)黒であり、ALS内の筋肉細胞(2週間前にALS上に播種されたヒト骨格筋の筋芽細胞から分化)は、ALS切片内に赤茶色のスポットとして観察される。ALSを1週間成長させ、その後ヒト骨格筋の筋芽細胞と共に播種した。

【図13】図13は、厚さ約115μmの筋肉細胞/組織を含む24日目の線維芽細胞ALS系の異なる断面の三重染色を示す。ALSのコラーゲン線維は青色であり、細胞の核は(青みがかった)黒であり、ALS内の筋肉細胞(2週間前にALS上に播種されたヒト骨格筋の筋芽細胞から分化)は、ALS切片内に赤茶色のスポットとして観察される。ALSを1週間成長させ、その後ヒト骨格筋の筋芽細胞と共に播種した。

【図14】図14は、生体組織マトリックス上の初期神経分化を示す。ヒト神経細胞体を、Hu 16A11(初期神経発生のマーカー)で染色した(茶色)。

【図15A】図15Aは、デジタル画像分析によって測定した厚さ84μmの線維芽細胞

10

20

30

40

50

含有コラーゲンゲル ( C G ) のヘマトキシリンおよびエオシン ( H & E ) 染色切片を示す。

【図 15 B】図 15 B は、デジタル画像分析によって測定した厚さ 230  $\mu\text{m}$  の線維芽細胞含有フィブリングル ( F G ) を示す。

【図 15 C】図 15 C は、デジタル画像分析によって測定した上記の C G および F G と共に同一の血清補充培地を与えた厚さ 110  $\mu\text{m}$  の生体組織マトリックス ( L T M ) を示す。

【図 15 D】図 15 D は、デジタル画像分析によって測定した厚さ 465  $\mu\text{m}$  のマトリックス培地を与えた生体組織マトリックス ( \* L T M ) を示す。

【図 15 E】図 15 E は、デジタル画像分析によって測定した厚さ 240  $\mu\text{m}$  の改変マトリックス培地を与えた生体組織マトリックス ( \* \* L T M ) を示す。図 A ~ E の全顕微鏡写真の倍率は 200 倍であった。スケールバー = 100  $\mu\text{m}$ 。

【図 16 - 1】図 16 A は、ヒト陰茎の皮膚 ( H P S ) と比較した線維芽細胞含有コラーゲンゲル ( C G ) 、フィブリングル ( F G ) 、血清補充培地を与えた細胞由来マトリックス ( C D M ) 、およびマトリックス培地を与えた細胞由来マトリックス ( \* C D M および \* \* C D M ) の厚さ (  $\mu\text{m}$  ) を示す表 1 の結果のグラフである。図 16 B は、ヒト陰茎の皮膚 ( H P S ) と比較した線維芽細胞含有コラーゲンゲル ( C G ) 、フィブリングル ( F G ) 、血清補充培地を与えた細胞由来マトリックス ( C D M ) 、およびマトリックス培地を与えた細胞由来マトリックス ( \* C D M および \* \* C D M ) の抗張力 ( N / m ) を示すグラフである。図 16 C は、ヒト陰茎の皮膚 ( H P S ) と比較した線維芽細胞含有コラーゲンゲル ( C G ) 、フィブリングル ( F G ) 、血清補充培地を与えた細胞由来マトリックス ( C D M ) 、およびマトリックス培地を与えた細胞由来マトリックス ( \* C D M および \* \* C D M ) の総コラーゲン ( mg ) を示す表 1 の結果のグラフである。

【図 16 - 2】図 16 D は、ヒト陰茎の皮膚 ( H P S ) と比較した線維芽細胞含有コラーゲンゲル ( C G ) 、フィブリングル ( F G ) 、血清補充培地を与えた細胞由来マトリックス ( C D M ) 、およびマトリックス培地を与えた細胞由来マトリックス ( \* C D M および \* \* C D M ) の総プロテオグリカンおよびグリコサミノグリカン (  $\mu\text{g}$  ) を示す表 1 の結果のグラフである。図 16 E は、ヒト陰茎の皮膚 ( H P S ) と比較した線維芽細胞含有コラーゲンゲル ( C G ) 、フィブリングル ( F G ) 、血清補充培地を与えた細胞由来マトリックス ( C D M ) 、およびマトリックス培地を与えた細胞由来マトリックス ( \* C D M および \* \* C D M ) の総タンパク質 ( mg ) を示す表 1 の結果のグラフである。図 16 F は、ヒト陰茎の皮膚 ( H P S ) と比較した線維芽細胞含有コラーゲンゲル ( C G ) 、フィブリングル ( F G ) 、血清補充培地を与えた細胞由来マトリックス ( C D M ) 、およびマトリックス培地を与えた細胞由来マトリックス ( \* C D M および \* \* C D M ) の最大抗張力 ( k P a ) を示す表 1 の結果のグラフである。

【図 16 - 3】図 16 G は、ヒト陰茎の皮膚 ( H P S ) と比較した線維芽細胞含有コラーゲンゲル ( C G ) 、フィブリングル ( F G ) 、血清補充培地を与えた細胞由来マトリックス ( C D M ) 、およびマトリックス培地を与えた細胞由来マトリックス ( \* C D M および \* \* C D M ) のコラーゲン率を示すグラフである。図 16 H は、ヒト陰茎の皮膚 ( H P S ) と比較した線維芽細胞含有コラーゲンゲル ( C G ) 、フィブリングル ( F G ) 、血清補充培地を与えた細胞由来マトリックス ( C D M ) 、およびマトリックス培地を与えた細胞由来マトリックス ( \* C D M および \* \* C D M ) のプロテオグリカンおよびグリコサミノグリカン率を示すグラフである。図 16 I は、ヒト陰茎の皮膚 ( H P S ) と比較した線維芽細胞含有コラーゲンゲル ( C G ) 、フィブリングル ( F G ) 、血清補充培地を与えた細胞由来マトリックス ( C D M ) 、およびマトリックス培地を与えた細胞由来マトリックス ( \* C D M および \* \* C D M ) の細胞数 ( 百万 ) を示す表 1 の結果のグラフである。

【図 16 - 4】図 16 J は、ヒト陰茎の皮膚 ( H P S ) と比較した線維芽細胞含有コラーゲンゲル ( C G ) 、フィブリングル ( F G ) 、血清補充培地を与えた細胞由来マトリックス ( C D M ) 、およびマトリックス培地を与えた細胞由来マトリックス ( \* C D M および \* \* C D M ) の破断歪を示す表 1 の結果のグラフである。図 16 K は、ヒト陰茎の皮膚 (

10

20

30

40

50

H P S ) と比較した線維芽細胞含有コラーゲンゲル ( C G ) 、フィブリンゲル ( F G ) 、血清補充培地を与えた細胞由来マトリックス ( C D M ) 、およびマトリックス培地を与えた細胞由来マトリックス ( \* C D M および \*\* C D M ) の非酸性およびペプシン抽出可能コラーゲン画分 ( % ) を示す表 1 の結果のグラフである。図 16 L は、ヒト陰茎の皮膚 ( H P S ) と比較した線維芽細胞含有コラーゲンゲル ( C G ) 、フィブリンゲル ( F G ) 、血清補充培地を与えた細胞由来マトリックス ( C D M ) 、およびマトリックス培地を与えた細胞由来マトリックス ( \* C D M および \*\* C D M ) の U T S / コラーゲン密度 ( k P a / m g / c m<sup>3</sup> ) を示す表 1 の結果のグラフである。

【図 17 A】図 17 A は、ほとんど ( コラーゲンゲル由来 ) の直径が約  $5.6 \pm 5$  nm であり、少数 ( おそらく線維芽細胞 I ゲルによって分泌された ) の直径が約  $4.6 \pm 5$  nm である、コラーゲンゲル ( C G ) 中のコラーゲン原線維 ( 矢印 ) の分布の T E M ( 12,000 倍、スケールバー = 1 μ m ) を示す。コラーゲン密度は、 $8.1 \pm 4$  原線維 / μ m<sup>2</sup> であった。

10

【図 17 B】図 17 B は、コラーゲン原線維の直径が約  $4.8 \pm 5$  nm である、フィブリンゲル ( F G ) 中のコラーゲン原線維 ( 矢印 ) の分布の T E M ( 12,000 倍、スケールバー = 1 μ m ) を示す。コラーゲン密度は、 $2.8 \pm 4$  原線維 / μ m<sup>2</sup> ( $p < 0.01$ ) であった。

【図 17 C】図 17 C は、コラーゲン原線維の直径が約  $5.2 \pm 1.0$  nm である、細胞由来マトリックス ( C D M ) 中のコラーゲン原線維 ( 矢印 ) の分布の T E M ( 12,000 倍、スケールバー = 1 μ m ) を示す。コラーゲン密度は、 $7.9 \pm 2$  原線維 / μ m<sup>2</sup> であった。

20

【図 17 D】図 17 D は、コラーゲン原線維の直径が約  $4.7 \pm 5$  nm である、マトリックス培地を与えた細胞由来マトリックス ( \* C D M ) 中のコラーゲン原線維 ( 矢印 ) の分布の T E M ( 12,000 倍、スケールバー = 1 μ m ) を示す。コラーゲン密度は、 $8.0 \pm 2$  原線維 / μ m<sup>2</sup> であった。

【図 1】

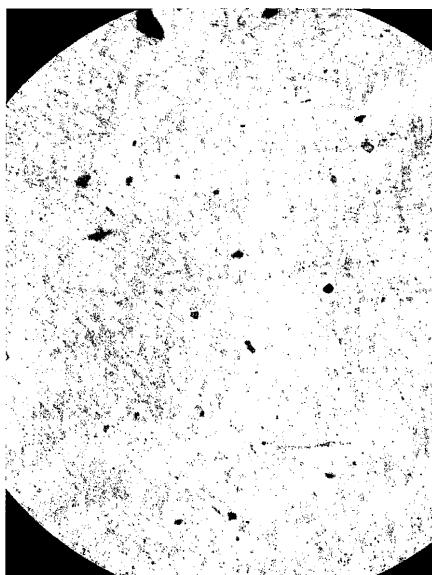


FIG. 1

【図 2】

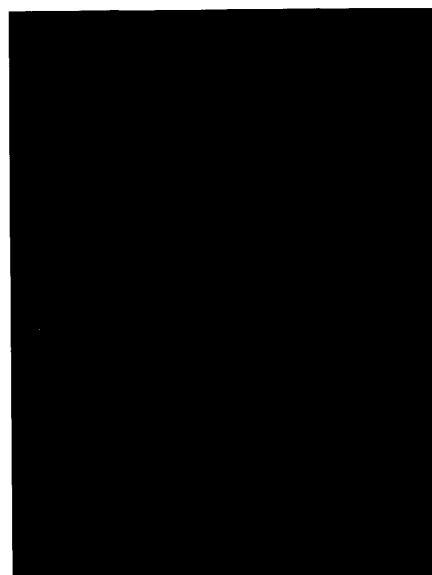


FIG. 2

【図3】

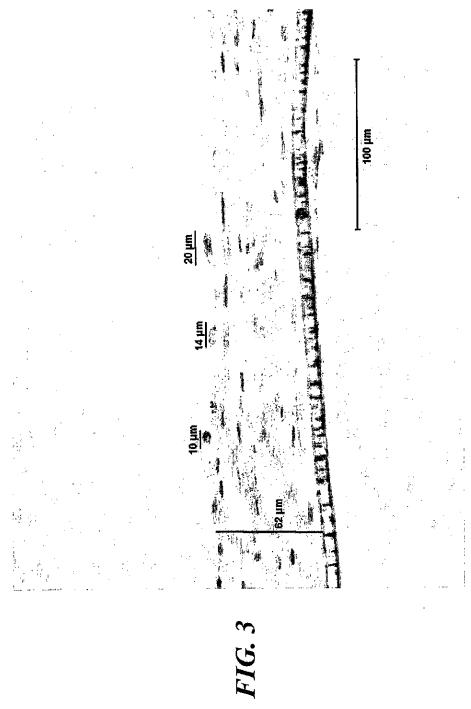


FIG. 3

【図4】

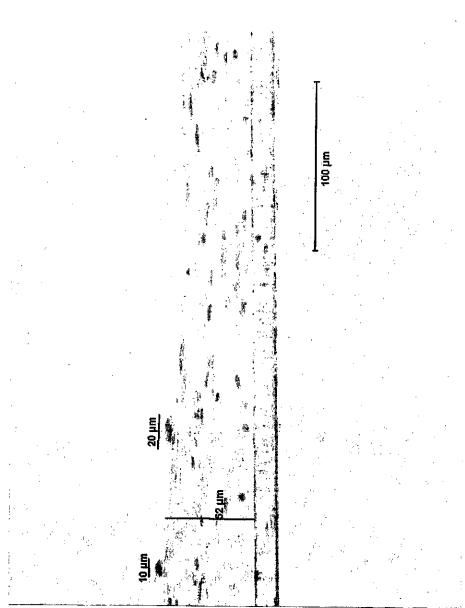


FIG. 4

【図5】

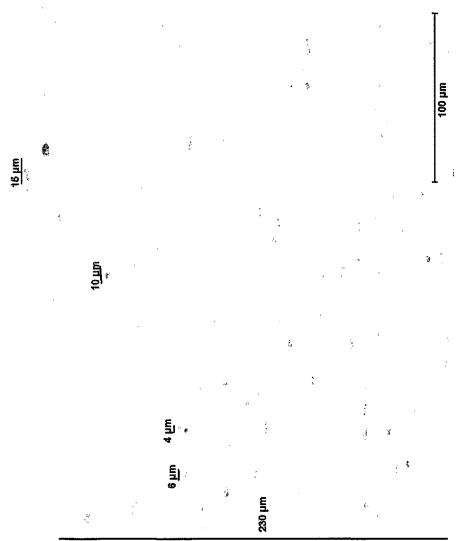


FIG. 5

【図6】

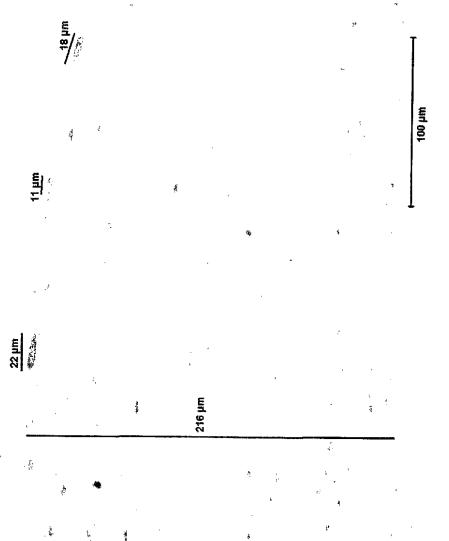


FIG. 6

【図7】

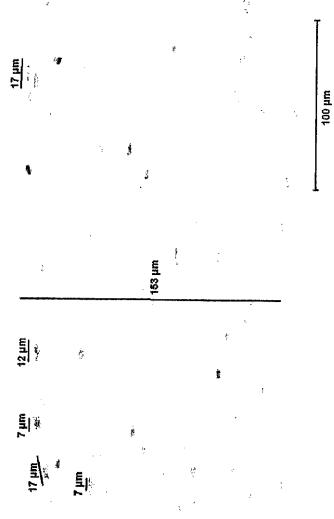


FIG. 7

【図8】

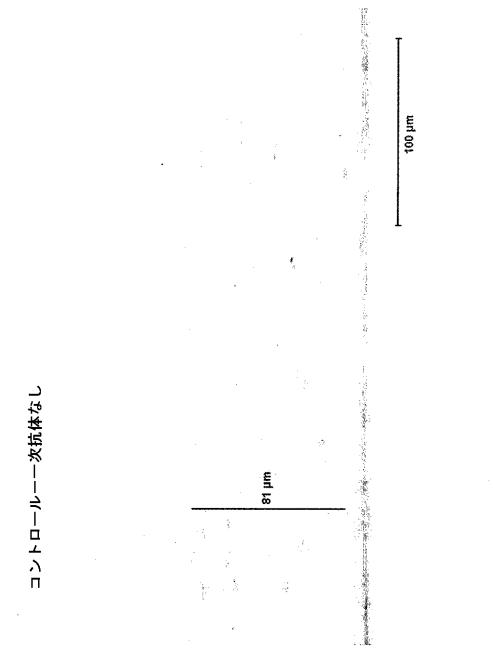


FIG. 8

コントローラー一次抗体なし

【図9】

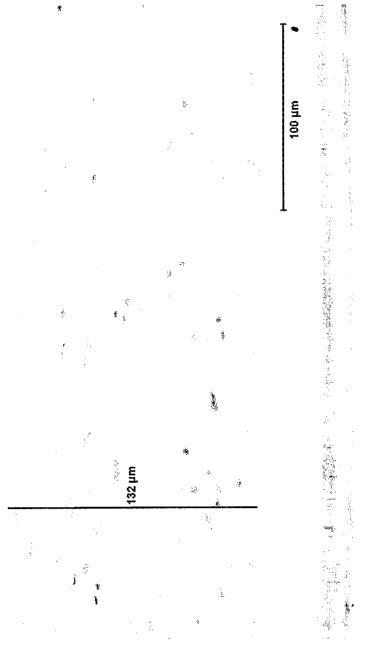


FIG. 9

【図10】

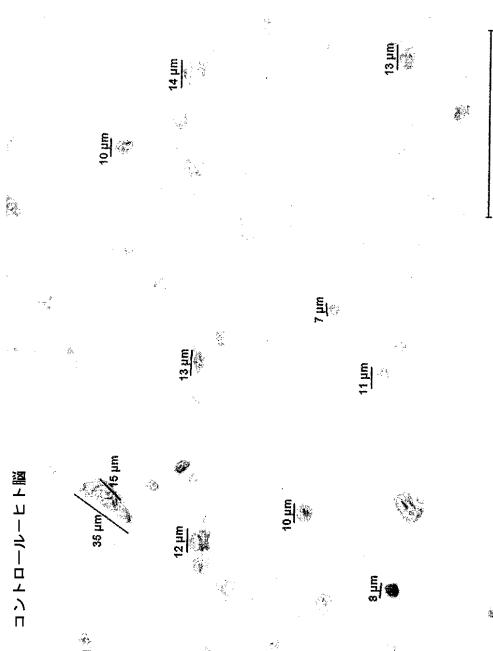


FIG. 10

コントローラー一次抗体なし

【図11】

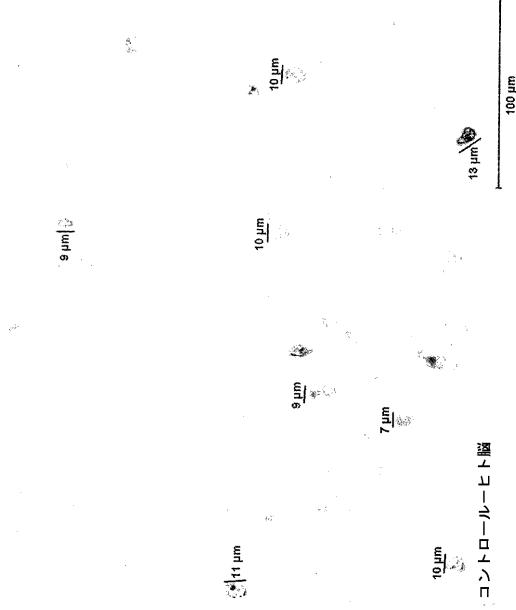


FIG. 11

【図12】

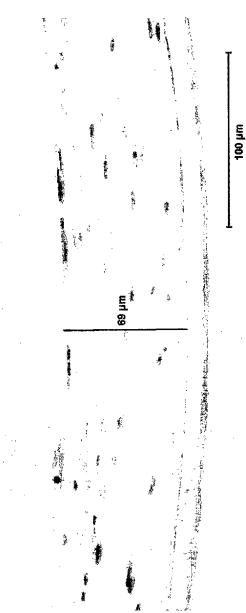


FIG. 12

【図13】

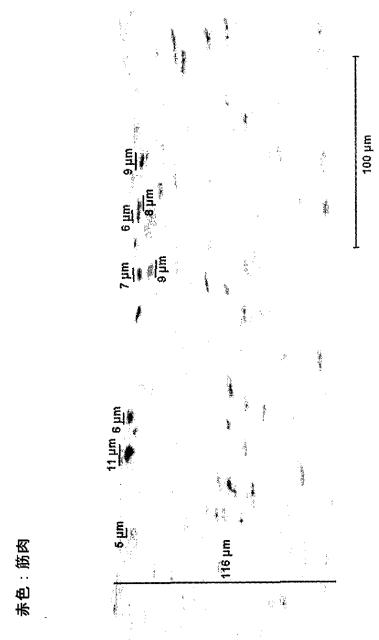


FIG. 13

【図14】

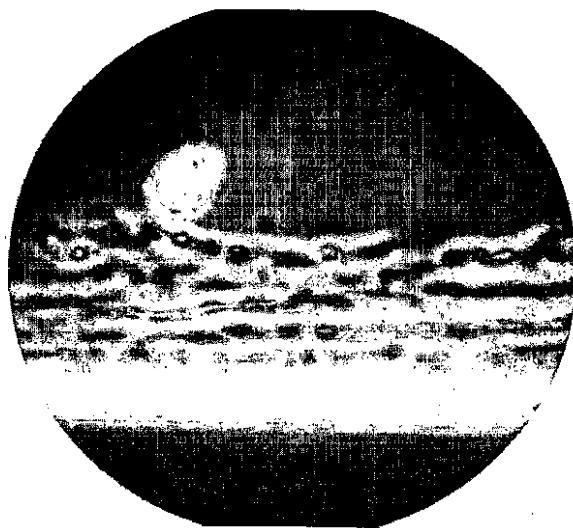


FIG. 14

赤色：筋肉

【図 15 A】

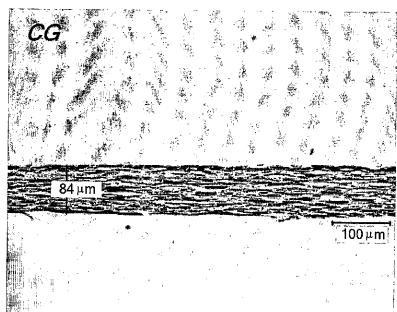


FIG. 15A

【図 15 B】

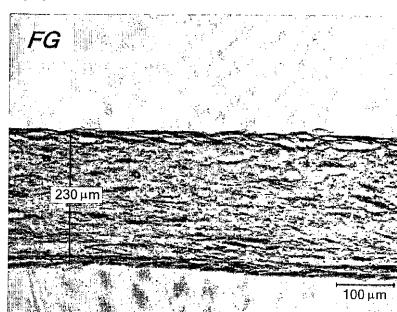


FIG. 15B

【図 15 C】

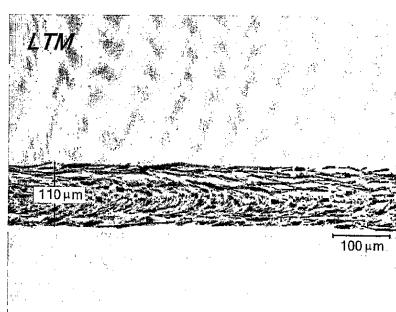


FIG. 15C

【図 15 D】

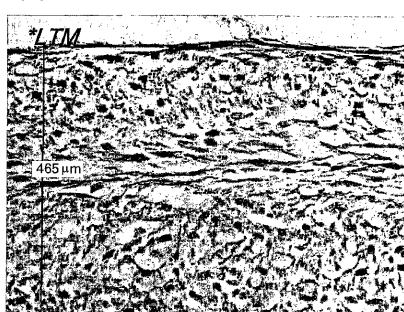


FIG. 15D

【図 15 E】

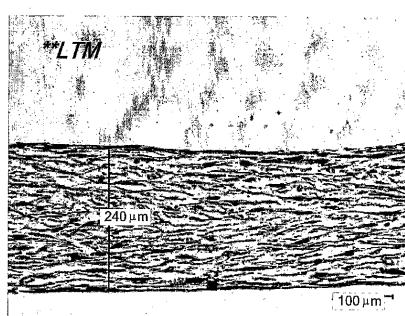


FIG. 15E

【図 16 - 1】

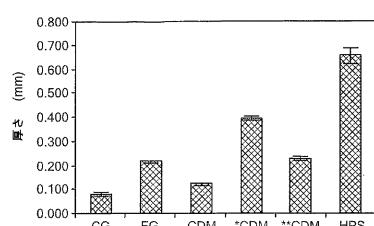


FIG. 16A

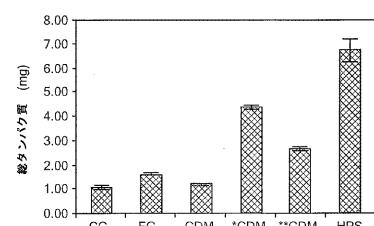


FIG. 16B

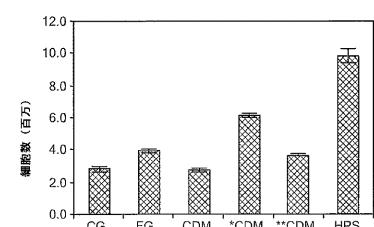


FIG. 16C

【図 16-2】

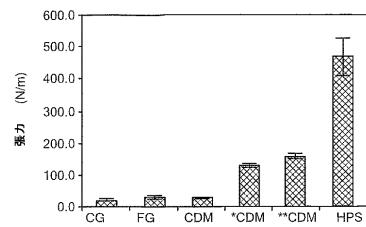


FIG. 16D

【図 16-3】

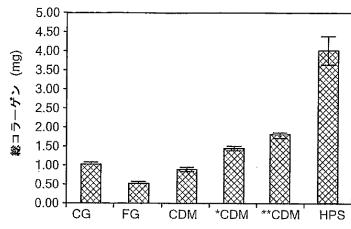


FIG. 16G

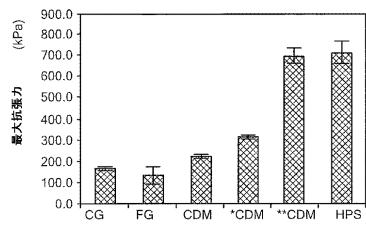


FIG. 16E

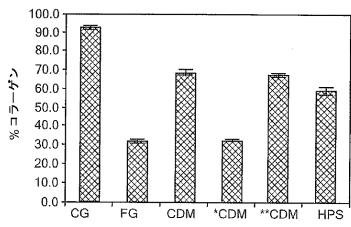


FIG. 16H

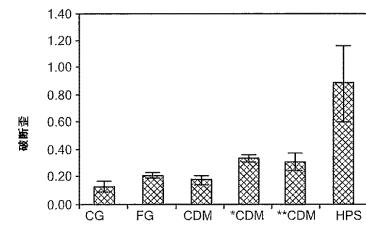


FIG. 16F

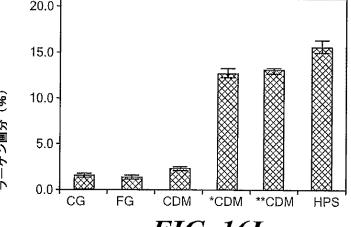


FIG. 16I

【図 16-4】

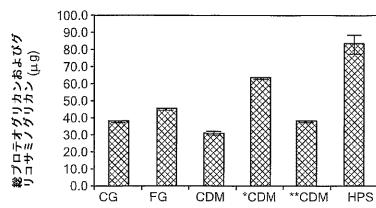


FIG. 16J

【図 17 A】



FIG. 17A

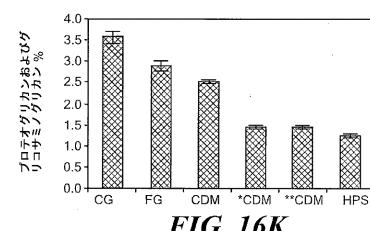


FIG. 16K

【図 17 B】

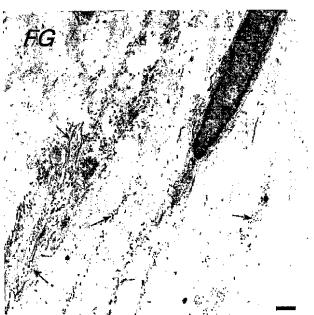


FIG. 17B

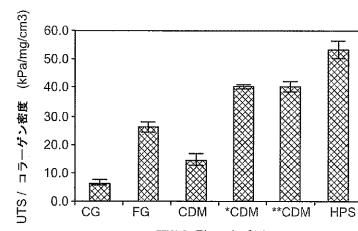


FIG. 16L

【図 17C】

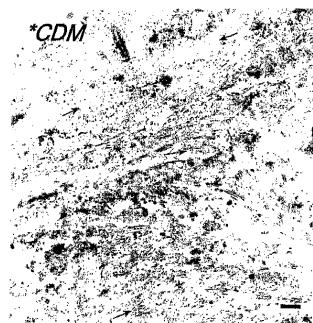


FIG. 17C

【図 17D】

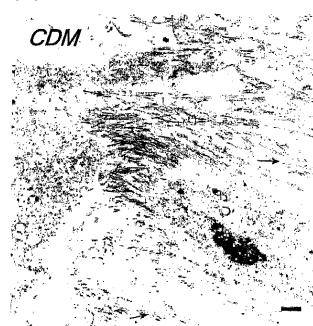


FIG. 17D

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/IB2005/004091	
---	--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/08		
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) C12N A61L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 131 410 A (ORGANOGENESIS INC) 12 September 2001 (2001-09-12)  page 7, line 3 – page 9, line 18 examples 1-12, 15, 16 page 16, line 15	1-7, 9-22, 24-49, 51-72, 74-78
Y	----- -/-	8, 50, 73, 79-86
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the International filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
1 August 2006	16/08/2006	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Manu, D	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/IB2005/004091

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MICHEL M ET AL: "Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair." IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY. ANIMAL. JUN 1999, vol. 35, no. 6, June 1999 (1999-06), pages 318-326, XP008067234 ISSN: 1071-2690 page 319, right-hand column, paragraph 4 - paragraph 7	1-3,5-7, 9-22, 24-44, 51-63, 72,74, 87-89
Y		79-86
X	EP 0 282 746 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD) 21 September 1988 (1988-09-21)  column 7, line 11 - line 40 examples 2,5 column 11, line 44 - line 46 column 12, line 3 - line 6	1-3,5-7, 9-22, 24-44, 51,52, 54-63, 72,74
Y		79-86
X	WO 02/20729 A (UNIVERSITE LAVAL; GERMAIN, LUCIE; AUGER, FRANCOIS, A; ROCHON, MARIE-HE) 14 March 2002 (2002-03-14)  page 14, line 25 - page 16, line 3	1-3,5-7, 9-22, 24-44, 51,52, 54-63, 72,74
Y		79-86
X	WO 03/018767 A (ADVANCED CELL TECHNOLOGY, INC; PAGE, RAYMOND; DOMINKO, TANJA; MALCUIT,) 6 March 2003 (2003-03-06)  examples 1-3	2,7,10, 15, 22-24, 44,74
Y	GOSPODAROWICZ D ET AL: "STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL FUNCTIONS OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR" ENDOCRINE REVIEWS, BALTIMORE, MD, US, vol. 8, no. 2, 1987, pages 95-114, XP009003095 page 100, left-hand column, paragraph 3 page 101, left-hand column, paragraph 1	8,50,73
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/IB2005/004091

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PAINO C L ET AL: "Induction of axon growth into Schwann cell implants grafted into lesioned adult rat spinal cord." <i>EXPERIMENTAL NEUROLOGY</i>. NOV 1991, vol. 114, no. 2, November 1991 (1991-11), pages 254-257, XP002391631 ISSN: 0014-4886 page 254, left-hand column, paragraph 4 – right-hand column, paragraph 1</p> <p>—</p>	79-86
Y	<p>MURAKAMI TAKESHI ET AL: "Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair." <i>BRAIN RESEARCH</i>. 6 JUN 2003, vol. 974, no. 1-2, 6 June 2003 (2003-06-06), pages 17-24, XP002392826 ISSN: 0006-8993 page 18, right-hand column, paragraph 2</p> <p>—</p>	79-86
P,X	<p>AHLFORS, JAN-ERIC: "A Comparative Analysis of the Biomechanics and Biochemistry of Cell-Derived and Cell-Remodeled Matrices: Implications for Wound Healing and Regenerative Medicine" [Online] 24 April 2004 (2004-04-24), XP002391632 thesis presentation Retrieved from the Internet: URL:HTTP://WWW.WPI.EDU/PUBS/ETD/AVAILABLE/ETD-0503104-172949/&gt; the whole document</p> <p>—</p>	1-89

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IB2005/004091

## Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 32-39, 64-71, 74-78, 84-86 and 89 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/IB2005/004091	
---	--

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 1131410	A 12-09-2001	AT 305967 T		15-10-2005
		AU 769637 B2		29-01-2004
		AU 1917100 A		05-06-2000
		AU 2004201787 A1		27-05-2004
		BR 9915476 A		02-01-2002
		CA 2351396 A1		25-05-2000
		CN 1333818 A		30-01-2002
		DE 69927600 D1		10-11-2005
		DE 69927600 T2		06-07-2006
		DK 1131410 T3		31-10-2005
		ES 2249928 T3		01-04-2006
		JP 2002530069 T		17-09-2002
		WO 0029553 A1		25-05-2000
		US 2002172705 A1		21-11-2002
EP 0282746	A 21-09-1988	NONE		
WO 0220729	A 14-03-2002	AU 9154301 A		22-03-2002
		CA 2418077 A1		14-03-2002
		EP 1315797 A2		04-06-2003
		US 2004029270 A1		12-02-2004
WO 03018767	A 06-03-2003	AU 2002313817 A1		10-03-2003

---

フロントページの続き

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

(72)発明者 アルフォース, ジャン-エリック ダブリュー.  
アンティグア・バーブーダ国 セント ジョーンズ, ヒューズ ポイント, ピー.オー. ボ  
ックス 1915

F ターム(参考) 4B065 AA93X BA30 BB01 BC11 BC41 BC50 CA43 CA44  
4C081 AB01 AB02 AB05 AB11 AB12 AB13 AB14 AB17 AB18 CD34  
DA01 EA11