

(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2016-516394

(P2016-516394A)

(43) 公表日 平成28年6月9日(2016.6.9)

(51) Int.Cl.	F 1			テーマコード (参考)
<b>C 12 N 5/077</b> (2010.01)	C 12 N	5/077	Z N A	4 B 0 2 4
<b>C 12 N 15/09</b> (2006.01)	C 12 N	15/00	A	4 B 0 6 5
<b>A 61 K 35/36</b> (2015.01)	A 61 K	35/36		4 C 0 8 1
<b>A 61 K 35/33</b> (2015.01)	A 61 K	35/33		4 C 0 8 7
<b>A 61 L 27/00</b> (2006.01)	A 61 L	27/00	C	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-548081 (P2015-548081)	(71) 出願人	512214580 株式会社 C I i o 東京都千代田区内神田一丁目13番4号
(86) (22) 出願日	平成26年4月1日 (2014.4.1)	(71) 出願人	504157024 国立大学法人東北大学
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月30日 (2015.11.30)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(86) 國際出願番号	PCT/JP2014/060045	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敏
(87) 國際公開番号	W02014/163206	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 國際公開日	平成26年10月9日 (2014.10.9)	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(31) 優先権主張番号	61/807, 465		
(32) 優先日	平成25年4月2日 (2013.4.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト線維芽細胞において特徴的な幹細胞であるMuse細胞から容易に分化した機能性メラノサイトの使用

## (57) 【要約】

簡単に入手可能な幹細胞からのメラノサイトの誘導は、白斑などの色素異常又はメラノサイト機能障害の治療に注目されている。本発明者らは、ヒト皮膚線維芽細胞中の特徴的な幹細胞型であるMuse (multilineage-differentiation stress-enduring) 細胞が、機能性メラノサイトに容易に分化し得ることを見出した。この技術は、Muse 細胞を用いることによって入手可能なヒト線維芽細胞からメラノサイトの効率的な產生に適用され得て、それによって色素異常のための移植に貢献するものである。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

チロシナーゼを発現し、メラニンを産生するMuse - メラノサイト。

## 【請求項 2】

Muse - メラノサイトが、DCT、Ki - 67 及びS100 からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーをさらに発現する、請求項1に記載のMuse - メラノサイト。

## 【請求項 3】

チロシナーゼを発現し、メラニンを産生するMuse - メラノサイトを含む医薬組成物。

10

## 【請求項 4】

Muse - メラノサイトが、DCT、Ki - 67 及びS100 からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーをさらに発現する、請求項3に記載の医薬組成物。

## 【請求項 5】

ナイーブなMuse 細胞が組成物に残存することを特徴とする、請求項3又は4に記載の医薬組成物。

## 【請求項 6】

Muse - メラノサイト及び場合によりケラチノサイトを含む三次元皮膚。

## 【請求項 7】

ナイーブMuse 細胞が皮膚に残っている、請求項6に記載の三次元皮膚。

20

## 【請求項 8】

三次元皮膚を生成するための方法であって、以下：

(a) 間葉系組織からMuse 細胞を用意し；

(b) 分化培地内でMuse 細胞を培養し；

(c) ゲル層でケラチノサイトとともにMuse 細胞由来のメラノサイトを培養し；及び

(d) 三次元皮膚を得る

工程を含む上記方法。

## 【請求項 9】

前記間葉系組織が皮膚 (dermal) 組織である、請求項8に記載の方法。

## 【請求項 10】

Muse 細胞が前記間葉系組織中の線維芽細胞から分離される、請求項8に記載の方法。

30

## 【請求項 11】

前記分化培地が、Wnt3a、幹細胞因子 (SCF) 、エンドセリン - 3 (ET - 3) 、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b - FGF) 、リノール酸、コレラ毒素、L - アスコルビン酸、12 - O - テトラデカノイル - ホルボール13 - アセテート (TPA) 、インスリン - トランスフェリン - セレン (ITS) 、及びデキサメタゾンからなる群から選択される、2種以上の因子及び/又はサイトカインを含む、請求項8～10のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 12】

請求項1に記載のMuse - メラノサイト、請求項2に記載の医薬組成物、又は請求項3に記載の三次元皮膚を、障害によって引き起こされた患部に適用することを含む、このような治療を必要とする対象における色素異常を治療するための方法。

## 【請求項 13】

Wnt3a、幹細胞因子 (SCF) 、エンドセリン - 3 (ET - 3) 、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b - FGF) 、リノール酸、コレラ毒素、L - アスコルビン酸、12 - O - テトラデカノイル - ホルボール13 - アセテート (TPA) 、インスリン - トランスフェリン - セレン (ITS) 、及びデキサメタゾンからなる群から選択される2種以上の因子及び/又はサイトカインを用いてMuse 細胞を分化させることによってMuse - メラノサイトを得るための方法。

40

50

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本出願は、2013年4月2日に出願した米国仮特許出願第61/807,465号の利益を主張する米国特許出願に対応し、その米国仮特許出願第61/807,465号の全内容は、参照により本明細書に援用される。

**【0002】**

本発明は、再生医療におけるMuse-メラノサイトの使用に関する。具体的には、本発明は、Muse-メラノサイト及びケラチノサイトを含む医薬組成物、並びに色素異常を治療するための方法を提供する。本発明は、各種因子及びサイトカインの特定の組み合わせを用いることによって、機能性メラノサイトに容易に分化される、ヒト皮膚線維芽細胞において新たに同定されたMuse細胞の発見に基づく。

10

**【背景技術】****【0003】**

メラノサイトは、メラニンを産生し、紫外線(UV)から皮膚を保護するために、近接するケラチノサイトにメラニンを届ける(Kondo et al, 2011; Słomiński et al, 2004)。メラノサイト機能不全は、色素欠乏症や白斑などの様々な色素異常をもたらし、これは、美容上の問題だけでなく、紫外線からの不完全な保護に起因した皮膚癌のリスクを増加させる(Mabula et al, 2012)。

20

**【0004】**

白斑の現在の治療としては、コルチコステロイド又は免疫調節剤を用いた局所治療；UV処置、及び自家皮膚移植が挙げられる(Alikhani et al, 2011; Felsenstein et al, 2011)。しかしながら、これらの治療の有効性は不十分である。自家培養のメラノサイト移植は、潜在的な細胞療法であるが(Fioramonti et al, 2012; van Geel et al, 2001)であるが、成人メラノサイトを培養し、インビトロで大規模に増幅することが困難であるため、広範には使用されていない。最近、いくつかの研究グループは、胚性幹(ES)細胞又は人工多能性幹(iPS)細胞からメラノサイト誘導を成功させたことを報告している(Nissan et al, 2011; Yang et al, 2011; Fang et al, 2006; Motohashi et al, 2006; Ohta et al, 2011; Yamane et al, 1999)。実際に、これらは、メラノサイト誘導のための魅力的な細胞源ではあるが、ES細胞を得るために倫理的な問題(Knoppers et al, 2009; Manzar et al, 2011)やES細胞とiPS細胞の腫瘍形成のリスクが臨床使用への障害となっている(Fong et al, 2010; Goldring et al, 2011; Ben-David 2011; Okita et al, 2007)。

30

**【0005】**

間葉系幹細胞(MSC)は成人幹細胞であり、腫瘍形成のリスクは低く、骨髄、皮膚、脂肪組織及び歯髄などの間葉系組織に存在し、多種多様の疾患を治療するために使用される(Sng et al, 2012; Hare et al, 2009; Macchiarini et al, 2008; Jiang et al, 2011)。MSCは、幅広い領域の細胞に分化する能力があるため、注目を集めている。MSCは、中胚葉系細胞に分化し得るだけでなく、外胚葉系細胞又は内胚葉系細胞にも分化し得る(Phinney et al, 2007; Pittenger et al, 1999; Dezawa et al, 2004; Sakaida et al, 2004)。また、メラノサイトは歯髄幹細胞(DPSC)から誘導されている(Stevens et al, 2008; Paino et al, 2010)。しかしながら、MSCは、一般的に、粗細胞集団を含み、それらの細胞表面抗原に基づいて異なる細胞型を含む。これは、MSCが、通常、間葉系組織から接着細胞と全く同様に回収されるためである。したがって、中胚葉と外胚葉間のオリゴ系統の境界を越えて分化に関与する細胞(すなわち、間葉系からメラ

40

50

ノサイト)は、これまで知られていない。

【0006】

本発明者らは、最近、Muse細胞(Multilineage-differentiating stress enduring cell)と命名した成人MSC中に存在する新しいタイプの幹細胞を報告した(Kuroda et al., 2010; Wakao et al., 2011)。Muse細胞は、通常、皮膚線維芽細胞及び骨髄間質細胞などのヒト間葉系培養細胞において存在し、さらに、皮膚及び骨髄などの間葉系組織にも存在する。Muse細胞は、多能性幹細胞とMSCの両方に類似した特性を有する: 蛍光活性化細胞選別(FACS)によって、多能性[ステージ特異的胎児抗原-3(SEA-3)、未分化ヒトES細胞に関するマーカー]と間葉系マーカー(CD105)についてのダブル陽性の細胞として単離することができ、セルフリニューアルし、単一の細胞から内胚葉系細胞、中胚葉系細胞、及び外胚葉系細胞へと分化する能力を有する。しかしながら、ES細胞やiPS細胞などの他の多能性幹細胞とは異なり、Muse細胞は、低いテロメラーゼ活性を有し、インビボで腫瘍を形成しない。したがって、Muse細胞は、臨床応用に高い可能性を有する。最近では、皮膚由来の前駆細胞(SKP)は、ヒト包皮における多能性間葉系幹細胞として報告されている(Toma et al., 2005)。しかしながら、SKPとは異なり、Muse細胞は、真皮組織及び脂肪組織の結合組織に疎らに配置され、皮膚乳頭、結合組織鞘、又は毛包上皮などの任意の特定の構造に関連付けられない。さらに、Muse細胞は、SKPマーカーであるSna1及びSlug(Wakao, et al., 2011)を発現しない。これらのデータは、Muse細胞がSKPとは異なるものであることを示す。

【発明の概要】

【0007】

本発明者らは、最近、ヒト皮膚線維芽細胞におけるMuse細胞が、ある種の因子及びサイトカインの組み合わせを用いることによって機能性メラノサイトに容易に分化されることを発見した。Muse細胞由来のメラノサイト(Muse-メラノサイト)は、小眼球症関連転写因子(MITF)、チロシナーゼ関連タンパク質1(TRP-1)、ドーパクローム異性化酵素(DCT)、KIT、gp100、及びチロシナーゼなどのメラノサイトマーカーを発現したMuse細胞由来のメラノサイト(Muse-メラノサイト)は、3,4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニン(L-DOPA)反応アッセイに対して陽性であり、メラニンを産生し、表皮の基底層に組み込まれる。他方、Muse細胞をメラノサイ誘導前にヒト線維芽細胞から除去すると、残りの細胞(すなわち、「非Muse細胞」)は、メラノサイトにはならず、メラニンを産生しない。この発見は、すでに三胚葉分化能を有する細胞であるMuse細胞が、中胚葉系と外胚葉系間のオリゴ系の境界を超えることができるため、メラノサイトに分化されるが、一方、残りの線維芽細胞はこの事象に関与しない。したがって、Muse細胞は、色素異常のための自家移植又は同種移植に適用され得る成人線維芽細胞から機能性メラノサイトを生じさせる理想的な細胞供給源である。

【0008】

第一の実施形態において、本発明は、チロシナーゼを発現し、メラニンを産生するMuse-メラノサイトを提供する。一態様において、Muse-メラノサイトは、DCT、Ki-67及びS100からなる群から選択される、少なくとも1つのマーカーをさらに発現することができる。本発明によれば、Muse-メラノサイトは、Wnt3a、幹細胞因子(SCF)、エンドセリン-3(ET-3)、塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF)、リノール酸、コレラ毒素、L-アスコルビン酸、12-O-テトラデカノイル-ホルボール13-アセテート(TPA)、インスリン-トランスフェリン-セレン(ITS)、及びデキサメタゾンからなる群から選択される、2種以上の因子及び/又はサイトカインの使用によって、Muse細胞から誘導されてもよい。

【0009】

第二の実施形態において、本発明は、第一の実施形態において定義されたMuse-メ

ラノサイトを含む医薬組成物を提供する。一態様において、本発明は、ナイープMuse細胞が残っている医薬組成物を提供する。

【0010】

第三の実施形態において、本発明は、上記Muse-メラノサイトを含む三次元皮膚を提供する。場合により、ケラチノサイトは、三次元皮膚に含まれてもよい。一態様において、本発明は、ナイープMuse細胞が残っている三次元皮膚を提供する。

【0011】

第四の実施形態において、本発明は、(a)間葉系組織からMuse細胞を用意し；(b)分化培地中でMuse細胞を培養し；(c)ゲル層でケラチノサイトとともにMuse細胞由来のメラノサイトを培養し；及び(d)三次元皮膚を得るステップを含む、三次元皮膚を生成するための方法を提供する。一態様において、間葉系組織は真皮組織であつてもよい。別の態様において、Muse細胞は、間葉系組織における線維芽細胞から分離されてもよい。さらに、上記方法において使用される分化培地は、Wnt3a、幹細胞因子(SCF)、エンドセリン-3(ET-3)、塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF)、リノール酸、コレラ毒素、L-アスコルビン酸、12-O-テトラデカノイル-ホルボール13-アセテート(TPA)、インスリン-トランスフェリン-セレン(ITS)、及びデキサメタゾンからなる群から選択される、2種以上の因子及び/又はサイトカインを含有してもよい。

10

【0012】

第五の実施形態において、本発明は、第一の実施形態によるMuse-メラノサイト、第二の実施形態による医薬組成物、又は第三の実施形態による三次元皮膚を、障害によつて引き起こされた患部に適用することを含む、このような治療を必要とする対象における色素異常を治療するための方法を提供する。

20

【0013】

第六の実施形態において、本発明は、Wnt3a、幹細胞因子(SCF)、エンドセリン-3(ET-3)、塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF)、リノール酸、コレラ毒素、L-アスコルビン酸、12-O-テトラデカノイル-ホルボール13-アセテート(TPA)、インスリン-トランスフェリン-セレン(ITS)、及びデキサメタゾンからなる群から選択される、2種以上の因子及び/又はサイトカインを用いて、Muse細胞を分化させることによってMuse-メラノサイトを得るための方法を提供する。

30

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、Muse細胞の特徴付けを示すデータである。(a)ナイープな正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)におけるステージ特異的胚抗原-3(SSSEA-3)発現についての蛍光活性化細胞選別(FACS)分析。(b)7日目の単一細胞の懸濁培養において形成したM-クラスター。(c)M-クラスターのALP染色。(d-f)単一のM-クラスター由来の細胞における、ニューロフィラメント(d)、アルファ平滑筋アクチン(-SMA)(e)、及びGATA4(f)についての免疫細胞化学。(g)Muse細胞と非Muse細胞からのメラノサイト分化の概略図。(スケールバー:b-f、50μm)。略語:b-FGF、塩基性線維芽細胞増殖因子;ET-3、エンドセリン-3;SCF、幹細胞因子;TPA、12-O-テトラデカノイルホルボール13-アセテート。

40

【図2】図2は、分化後のMuse細胞と非Muse細胞の形態を示すデータである。(a)分化前と分化の3、5、及び6週後のMuse細胞と非Muse細胞の顕微鏡画像。ナイープな正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)及びヒトメラノサイトの顕微鏡画像もまた与えられる(スケールバー:100μm)。(b)分化から6週後のMuse細胞と非Muse細胞の拡大画像。正常ヒトメラノサイト及びNHDFもまた示す。

【図3】図3は、Muse-メラノサイトの特徴付けを示すデータである。(a)Muse細胞と非Muse細胞の両方における分化から3、5、及び6週後のMuse細胞と非Muse細胞の細胞表面マーカーの発現。MITF、KIT、チロシナーゼ関連タンパク質1(TRP-1)、ドーパクロ

50

ーム異性化酵素 (DCT) 、gp100、及びチロシナーゼのRT-PCR分析。陽性対照はヒトメラノサイトであり、陰性対照はナイーブな正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) 及びテンプレートなしであった。(b)分化から6週後、Museと非Muse細胞におけるメラノサイトマーカーであるMITF、gp100、及びチロシナーゼの免疫細胞化学分析。陽性対照はヒトメラノサイトであり、陰性対照は一次抗体なしのナイーブMuse細胞であった。(スケールバー: 50 μm)。(c)Muse-メラノサイト(6週)、ヒトメラノサイト、及びナイーブNHDFのL-DOPA反応アッセイ。色素沈着細胞はL-DOPA陽性の細胞である。(スケールバー: 100 μm)。

【図4】図4は、メラノサイト分化に対する因子の効果を示すデータである。(a)7つの異なる培地中で培養したMuse細胞の増殖能とメラノサイトマーカー発現の概要。(b)4つの異なる培地中での培養6週目のMuse細胞における、小眼球症関連転写因子 (MITF) 、KIT、チロシン-タンパク質1 (TRP-1) 、ドーパクローム異性化酵素 (DCT) 、gp100、及びチロシナーゼのRT-PCR。陽性対照はヒトメラノサイトであり、陰性対照はテンプレートなしであった。(c)培養6週目の4つの異なる培地中のMuse細胞の形態。略語: b-FGF、塩基性線維芽細胞増殖因子; ET-3、エンドセリン3; ITS、インスリン-トランスフェリン-セレン; RA、レチノイン酸; SCF、幹細胞因子。

【図5】図5は、三次元培養皮膚の組織学的分析を示すデータである。(a)ヒトメラノサイト、Muse-メラノサイト、非Muse細胞、及びケラチノサイトのみを含む三次元培養皮膚のヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色。(b)Muse-メラノサイトを含む三次元培養皮膚のHE染色。(矢頭はMuse-メラノサイトを示す)。(c)三次元培養皮膚の小眼球症関連転写因子 (MITF) 、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質1 (TRP-1) 、gp100、及びS-100の免疫組織化学分析、並びにフォンタナ・マッソン染色。(スケールバー: 50 μm)。

【図6】図6は、SCIDマウスの背中の皮膚への移植後のMuse-メラノサイトの機能的特徴を示すデータである。(a)移植からたった10日後のMuse-メラノサイト、ヒトメラノサイト、及びケラチノサイトを含む皮膚移植片の巨視的観察。(b)各皮膚移植片のヘマトキシリン・エオシン染色(スケールバー: 上段パネル、100 μm、下段パネル、50 μm)。(c)皮膚移植片における小眼球症関連転写因子 (MITF) 、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質1 (TRP-1) 、gp100、及びS-100の免疫組織化学分析、並びにフォンタナ・マッソン染色。(d)抗GFP抗体によって検出される緑色蛍光タンパク質 (GFP) とAlexa-568 (赤色) で標識されたMuse-メラノサイトの局在化が観察された(矢印)。(スケールバー: 50 μm)。

【図7】図7は、表皮用にナイーブMuse細胞とヒトケラチノサイトを混合することによって作製される三次元 (3D) 培養ヒト皮膚の組織学的分析を示すデータである。(a)緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識したナイーブMuse細胞の局在化は、表皮で観察された(矢印)。(b)GFPで標識されたナイーブMuse細胞における、チロシナーゼ (TYR) 、S100、およびチロシナーゼ関連タンパク質-1 (TRP-1) の免疫組織化学的分析。陽性対照はヒトメラノサイトである。(スケールバー: 50 μm)。略語: DAPI、4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール。

【図8】図8は、真皮同等物にナイーブMuse細胞又はMuse-メラノサイトを含ませることによって作製された三次元 (3D) 培養皮膚の組織学的分析を示すデータである。(a)GFPで標識したナイーブMuse細胞の局在化は、真皮同等物にナイーブMuse細胞を含ませることによって作製した3D培養ヒト皮膚の表皮と真皮において観察された(矢印)。これらのナイーブMuse細胞は、S100とチロシナーゼ関連タンパク質-1 (TRP-1) の両方について陰性であった(データを示さず)。(b)真皮同等物にMuse-メラノサイトを含ませることによって作製された3D培養ヒト皮膚のS100及びTRP-1の免疫組織化学分析。S100及びTRP-1について陽性であるMuse-メラノサイトは、表皮の基底膜において検出された。(スケールバー: 50 μm)。略語: DAPI、4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール。

10

20

30

40

50

【図9】図9は、Muse-メラノサイトを含む皮膚移植片における抗Ki-67抗体 (Roche, Basel, Switzerland) 及び抗S100抗体を用いた免疫組織化学的解析を示すデータである。Ki-67発現は、HRP-DABシステム (茶色) (Wako, Osaka, Japan) によって検出された。S100発現は、アルカリホスファターゼ・パーマネントレッドキット (赤色) (DAKO) によって検出された。Ki-67とS100のダブル陽性の細胞は、表皮の基底層で検出された (挿入図)。(スケールバー: 50 μm)。略語: HRP、西洋ワサビペルオキシダーゼ; DAB、ジアミノベンジン。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、メラノサイト及びケラチノサイトを含む医薬組成物を提供し、ここで、メラノサイトは、ある種の因子及びサイトカインの組み合わせを用いることによって、Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) 細胞から誘導される。本発明はまた、Muse細胞を用いて三次元皮膚を作製するための方法、及び色素異常を治療するための方法を提供する。

【0016】

本発明によれば、Muse細胞由来のメラノサイト (すなわち、Muse-メラノサイト) とケラチノサイトを含む医薬組成物が提供され、ここで、Muse-メラノサイトは、限定されないが、Wnt3a、幹細胞因子 (SCF)、エンドセリン-3 (ET-3)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF)、リノール酸、コレラ毒素、L-アスコルビン酸、12-O-テトラデカノイル-ホルボール 13-アセテート (TPA)、インスリン-トランスフェリン-セレン (ITS)、及びデキサメタゾンを含む、2種以上の因子及び/又はサイトカインの使用によって、Muse細胞から誘導される。

【0017】

本発明によれば、Muse-メラノサイト及び場合によりケラチノサイトを含む三次元皮膚が提供される。三次元皮膚は、それを構築するために必要な細胞及び/又はタンパク質を含んでもよい。

【0018】

本発明によれば、Muse-メラノサイト及びケラチノサイトを含む三次元皮膚を生成するための方法が提供される。該方法は、

- (a) 正常な皮膚線維芽細胞又は他の間葉系組織からMuse細胞を用意し；
- (b) 限定されないが、Wnt3a、幹細胞因子 (SCF)、エンドセリン-3 (ET-3)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF)、リノール酸、コレラ毒素、L-アスコルビン酸、12-O-テトラデカノイル-ホルボール 13-アセテート (TPA)、インスリン-トランスフェリン-セレン (ITS)、及びデキサメタゾンを含む、2種以上の因子及び/又はサイトカインを含む分化培地でMuse細胞を培養して、Muse-メラノサイトを得て；
- (c) ゲル層でMuse-メラノサイトとケラチノサイトを培養し；及び
- (d) 三次元皮膚を得る

工程を含む。

【0019】

本発明によれば、治療を必要とする対象において、色素異常を治療するための方法であって、該障害によって引き起こされた患部に上記皮膚を適用することを含む上記方法が提供される。

【0020】

本発明によれば、Muse細胞からMuse-メラノサイトを得るための方法が提供され、該方法は、限定されないが、Wnt3a、幹細胞因子 (SCF)、エンドセリン-3 (ET-3)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF)、リノール酸、コレラ毒素、L-アスコルビン酸、12-O-テトラデカノイル-ホルボール 13-アセテート (TPA)、インスリン-トランスフェリン-セレン (ITS)、及びデキサメタゾンを含む、

10

20

30

40

50

2種以上の因子及び／又はサイトカインを用いて、Muse細胞を分化する工程を含む。

【0021】

本発明に使用されるMuse細胞は、皮膚線維芽細胞又は他の間葉系組織に由来し得る。

【0022】

1. 治療のための適用症例

本発明は、再生医療におけるMuse-メラノサイトの使用に関する。具体的には、本発明は、Muse-メラノサイトを用いて、皮膚の色素異常を治療及び／又は予防するための医薬組成物及び三次元皮膚を提供する。本明細書で使用するとき、用語「色素異常」は、皮膚が正常と比べて明るく見え若しくは暗く見え、又は染みが現れ、変色している状態を指す。色素異常は、美容上の問題を引き起こすだけでなく、紫外線からの不完全な保護のために皮膚癌のリスクを高める色素欠乏症や白斑を含む。さらに、色素異常には、皮膚火傷、熱傷、火傷の瘢痕、創傷及びケロイド瘢痕の傷跡が含まれる。

10

【0023】

2. Muse-メラノサイト

本発明によれば、Muse-メラニン細胞は、特定の因子及び／又はサイトカインを用いて、Muse細胞を分化させることによって得ることができる。

【0024】

2-1. Muse細胞 (Multilineage-differentiating stress-enduring cell)

20

本発明によれば、メラノサイトを誘導するために使用されるMuse細胞は、骨髓液、脂肪組織 (Ogura, F., et al., Stem Cells Dev., Nov 20, 2013 (Epub)) (2014年1月17日公開)、真皮結合組織などの皮膚組織、又は間葉系組織から得ることができる。Muse細胞は、臓器において結合組織周囲に散在する。さらに、Muse細胞は、多能性幹細胞と間葉系幹細胞の両方の性質を有し、例えば、「SSEA-3 (Stage-specific embryonic antigen-3)」と「CD105」のダブル陽性細胞として同定され得る。SSEA-3 及び CD105 は、それぞれ、多能性幹細胞と間葉系細胞の細胞表面マーカーである。したがって、Muse細胞又はMuse細胞を含む細胞集団は、例えば、これらの抗原マーカーを指標として生体組織から分離することができる。Muse細胞の分離法、同定法、及び特徴などの詳細は、国際公開第WO2011/007900号に開示されている。また、Wakaoら (2011、上述) によって報告されているように、骨髓、皮膚などから間葉系細胞を培養し、それをMuse細胞の母集団として用いる場合、SSEA-3 陽性細胞の全てが CD105 陽性細胞であることが分かっている。したがって、本発明における医薬組成物において、生体の間葉系組織又は培養間葉系幹細胞からMuse細胞を分離する場合は、単にSSEA-3 を抗原マーカーとしてMuse細胞を精製することができる。本明細書においては、生体の間葉系組織又は培養間葉系組織から分離された多能性幹細胞 (Muse細胞) 又はMuse細胞を含む細胞集団を「SSEA-3 陽性細胞」と称することがある。また、本明細書において使用するとき、「非Muse細胞」なる用語は、生体の間葉系組織又は培養間葉系細胞に含まれる (「SSEA-3 陽性細胞」以外の) 細胞を指す。

30

【0025】

簡単には、Muse細胞又はMuse細胞を含む細胞集団は、SSEA-3 に対する抗体を用いて、又はSSEA-3 とCD105 に対するそれぞれの抗体を両方用いて、生体組織 (例えば、間葉系組織) から分離することができる。用語「生体」は、哺乳動物の生体を指す。生体には、受精卵や胞胚期より発生段階が前の胚は含まれないが、胎児や胞胚を含む胞胚期以降の発生段階の胚は含まれる。哺乳動物の例としては、限定されないが、ヒト、サル等の靈長類、マウス、ラット、ウサギ、モルモット等のげっ歯類、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ロバ、ヤギ、フェレット等が挙げられる。本発明の医薬組成物に使用されるMuse細胞は、生体の組織からマーカー (単数又は複数) を用いて分

40

50

離される点で、胚性幹細胞（E S 細胞）や i P S 細胞と明確に区別される。また、「間葉系組織」なる用語は、骨、滑膜、脂肪、血液、骨髄、骨格筋、真皮、靭帯、腱、歯髄、臍帯、臍帯血などの組織及び各種臓器に存在する組織をいう。例えば、M u s e 細胞は、骨髄、皮膚、又は脂肪組織から得ることができる。生体の間葉系組織を採取し、この組織からM u s e 細胞を分離し、利用することができる。また、上記分離手段を用いて、線維芽細胞又は骨髄間葉系幹細胞などの培養間葉系細胞からM u s e 細胞を分離してもよい。本発明の医薬組成物においては、使用されるM u s e 細胞は、レシピエントに対して自家であってもよく、又は他家であってもよい。

## 【0026】

上記のように、M u s e 細胞又はM u s e 細胞を含む細胞集団は、例えば、S S E A - 3 陽性、及びS S E A - 3 とC D 1 0 5 の二重陽性を指標にして分離することができる。さらに、ヒト成人皮膚には、種々のタイプの幹細胞及び前駆細胞を含むことが知られているしかしながら、M u s e 細胞は、これらの細胞と同じではない。このような幹細胞及び前駆細胞には、皮膚由来前駆細胞（S K P）、神経堤幹細胞（N C S C）、メラノblast（M B）、血管周囲細胞（P C）、内皮前駆細胞（E P）、及び脂肪由来幹細胞（A D S C）が挙げられる。これらの細胞に固有のマーカーの「非発現」を指標として、M u s e 細胞を分離することができる。具体的には、M u s e 細胞は、C D 3 4（E P及びA D S Cのマーカー）、C D 2 7 1（N G F R）（N C S Cのマーカー）、N G 2（P Cのマーカー）、v W F 因子（フォンビルブランド因子）（E Pのマーカー）、S o x 1 0（N C S Cのマーカー）、S n a i 1（S K Pのマーカー）、S l u g（S K Pのマーカー）、T y r p 1（M Bのマーカー）、及びD c t（M Bのマーカー）からなる群から選択される少なくとも1個、例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個又は11個のマーカーの非発現を指標に分離することができる。例えば、C D 1 1 7 及びC D 1 4 6 の非発現を指標に分離することができ、さらに、C D 1 1 7 、C D 1 4 6 、N G 2 、C D 3 4 、v W F 及びC D 2 7 1 の非発現を指標に分離することができ、さらに、上記の11個のマーカーの非発現を指標に分離することができる。

## 【0027】

医薬組成物に使用される上記特徴を有するM u s e 細胞は、（i）テロメラーゼ活性が低いか又は無い；（i i ）三胚葉のいずれの胚葉の細胞に分化する能力を持つ；（i i i ）腫瘍性増殖を示さない；及び（i v ）セルフリニューアル能を持つ、からなる群から選択される少なくとも1つの性質を有してもよい。本発明の一局面では、医薬組成物に使用されるM u s e 細胞は、上記性質を全て有する。ここで、上記（i ）について、「テロメラーゼ活性が低いか又は無い」とは、例えば、T R A P E Z E X L t e l o m e r a s e d e t e c t i o n k i t（M i l l i p o r e社）を用いてテロメラーゼ活性を検出した場合に、低いか又は検出できないことをいう。テロメラーゼ活性が「低い」とは、ヒト線維芽細胞と同程度のテロメラーゼ活性を有しているか、又はH e l a 細胞に比べて1/5以下、好ましくは1/10以下のテロメラーゼ活性を有していることをいう。上記（i i ）について、M u s e 細胞は、i n v i t r o 及びi n v i v o において、三胚葉細胞（内胚葉細胞系列、中胚葉細胞系列、及び外胚葉細胞系列）に分化する能力を有し、肝細胞、神経細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、骨細胞、脂肪細胞に分化し得る。また、精巣に移植した場合にも三胚葉細胞に分化することができる。さらに、静注により生体に移植することで損傷を受けた臓器（例えば、皮膚、脊髄、肝臓、筋肉）に遊走及び生着し、分化することができる。上記（i i i ）について、M u s e 細胞は、浮遊培養では増殖速度約1.3日で増殖するが、1細胞から増殖し、胚様体様細胞塊を作り14日間程度で増殖が止まる、という性質を有する。しかしながら、胚様体様細胞塊を接着培養に持っていくと、再び細胞増殖が開始され、細胞塊から増殖した細胞が広がっていく。さらに精巣に移植した場合、M u s e 細胞は、少なくとも半年間は癌化しないという性質を有する。また、上記（i v ）について、M u s e 細胞は、セルフリニューアル（自己複製）能を有する。「セルフリニューアル」なる用語は、1個のM u s e 細胞から浮遊培養により得られる胚様体様細胞塊に含まれる細胞が3胚葉性の細胞に分化することができるのと

10

20

30

40

50

同時に、次世代の胚様体様細胞塊が、先の胚様体様細胞塊に含まれていた1つの細胞の懸濁培養によって形成することができ、次に、懸濁培養によりそこに含まれていた細胞が3胚葉性の細胞に分化し得て、胚様体様細胞塊が形成され得る。セルフリニューアルは、1回又は複数回のサイクルを繰り返せばよい。

【0028】

2-2. メラノサイトへのMuse細胞の分化

本発明によれば、Muse細胞は、特定の組み合わせの因子及びサイトカインの使用によって、メラノサイト（本明細書では、「Muse-メラノサイト」と称する）に分化し得る。これらの因子及びサイトカインとしては、限定されないが、Wnt3a、幹細胞因子（SCF）、エンドセリン-3（ET-3）、塩基性線維芽細胞増殖因子（b-FGF）、リノール酸、コレラ毒素、L-アスコルビン酸、幹細胞因子（SCF）、12-O-テトラデカノイルホルボール13-アセテート（TPA）、インスリントランスフェリン-セレン（ITS）、及びデキサメタゾンが挙げられる。メラノサイトにMuse細胞を分化させるために、上記の10個の因子からなる群から選択される2つ以上の因子及び/又はサイトカインを使用することが好ましい。本明細書で使用するとき、用語「のWnt3a」は、分泌性シグナル伝達タンパク質をコードする、構造的に関連した遺伝子からなるWNT遺伝子ファミリーのメンバーを指す。用語「幹細胞因子（SCF）」は、c-Ki t受容体（CD117）に結合するサイトカインを指す。用語「エンドセリン-3（ET-3）」は、産生され、血管内皮細胞から放出される強力な血管収縮因子を指す。用語「塩基性線維芽細胞増殖因子（b-FGF）」は、血管形成、創傷治癒及び胚発生に関連する増殖因子を指す。用語「リノール酸」は、天然に存在する不飽和遊離酸である。用語「コレラ毒素」は、コレラ菌によって分泌されるタンパク質複合体を指す。用語「L-アスコルビン酸」は、抗酸化性を有する天然に存在する有機化合物を指す。用語「12-O-テトラデカノイルホルボール13-アセテート（TPA）」は、腫瘍プロモーターを指す。用語「インスリン-トランスフェリン-セレン（ITS）」は、細胞培養用の基礎培地補足剤を指す。用語「デキサメタゾン」は、抗炎症作用及び免疫抑制作用を有する、グルココルチコイドクラスのステロイド剤の強力な合成メンバーを指す。本発明によれば、上述の因子及びサイトカインの組み合わせは、Muse細胞が、Wnt3a、SCF、ET-3、b-FGF、リノール酸、コレラ毒素、L-アスコルビン酸、TPA、ITS、及び/又はデキサメタゾンからなる群から選択される2つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個）を用いて、メラノサイトに分化され得る限り、特定の組み合わせに限定されない。

【0029】

本発明によれば、Muse細胞は、例えば、以下のようにメラノサイトに分化され得る：1~1000ng/ml Wnt3a、0.1~500ng/ml SCF、0.1~100nM ET-3、0.1~100ng/ml b-FGF、0.01~100mg/mlリノール酸、1~1000pMコレラ毒素、10<sup>-6</sup>~10<sup>-2</sup>M L-アスコルビン酸、1~500nM TPA、0.1~10×ITS、及び/又は0.01~1Mデキサメタゾンを含む分化培地中でMuse細胞を培養する。細胞の生存に必須の基礎培地は、限定されないが、-最小必須培地（-MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（D-MEM）、RPMI 1640、基礎培地イーグ（BME）、ダルベッコ改変イーグル培地：栄養混合物F-12（D-MEM/F-12）、グラスゴー最小必須培地（グラスゴーMEME）、ハンクス平衡溶液、及びMCD B 153培地が挙げられる。上記の因子及び/又はサイトカインが溶解している上記の基礎培地は、分化培地として使用することができる。加えて、Muse細胞は、1~12週間、分化培地中に維持され、さらに、Muse細胞からのこのようなメラノサイト誘導は、少なくとも2回、好ましくは3回繰り返されてもよい。あるいは、メラノサイト誘導は、1日3回、1日2回、1日1回、2日に1回、3日に1回、週1回、2週に1回、3週に1回、又は4週に1回、上記の因子及び/又はサイトカインを基礎培地に添加することによって行われてもよい。

【0030】

10

20

30

40

50

本発明によれば、Muse細胞がメラノサイトに分化した（すなわち、Muse-メラノサイトが得られた）ことを確認するために、メラノサイトに関連したマーカーの発現を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）及びFACSなどの様々な検出法により調べることができる。メラノサイトに関連したマーカーとしては、限定されないが、MiTF、c-kit、TRP-1、gp100、DCT、及びチロシナーゼが挙げられる。誘導されたMuse細胞は、MiTF、c-kit、TRP-1、gp100、DCT、及びチロシナーゼのうちの少なくとも1つを発現している場合、細胞は、Muse-メラノサイトと考えることができる。

【0031】

3. 本発明に係る医薬組成物の調製及び使用

本発明に係る医薬組成物は、例えば、通常の生理食塩水又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）などの適切な緩衝液中でMuse-メラノサイトとケラチノサイトを懸濁させることによって得ることができる。これに関連して、Muse-メラノサイトの数は、治療又は移植のための使用には十分でない場合、Muse-メラノサイト又は（誘導されていない）Muse細胞は、細胞の所望数になるまで、細胞培地内で増殖され得る。WO2011/007900に記載されているように、Muse細胞は腫瘍化しないため、生体組織から得られた未分化細胞が細胞培養に含まれる場合でさえ、細胞の癌化の可能性は低く、安全であり得る。

【0032】

医薬組成物にMuse-メラノサイトを用いる場合、医薬組成物は、細胞を保護するためにDMSO及び/又は血清アルブミン、及び/又は細菌による汚染から細胞を防ぐために抗生素質を含んでもよい。さらに、担体、賦形剤、崩壊剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定化剤、保存剤、防腐剤、及び通常の生理食塩水などの医薬として許容される様々な種類の成分を医薬組成物に含ませることができる。

【0033】

4. 三次元皮膚及びその製造

一実施形態において、本発明は、Muse-メラノサイトを含む三次元皮膚を提供する。さらに、三次元皮膚は、ケラチノサイト、並びにコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、及びマトリケル（登録商標）などの細胞外マトリックスを含むことができる。本発明によれば、このような三次元皮膚を製造する方法は、以下の工程を含む：

- (a) 正常な皮膚線維芽細胞又は他の間葉系組織からMuse細胞を用意し；
- (b) Wnt3a、幹細胞因子（SCF）、エンドセリン-3（ET-3）、塩基性線維芽細胞増殖因子（b-FGF）、リノール酸、コレラ毒素、L-アスコルビン酸、12-O-テトラデカノイル-ホルボール-13-アセテート（TPA）、インスリン-トランスフェリン-セレン（ITS）、及びデキサメタゾンからなる群から選択される2つ以上の因子及び/又はサイトカインを含む分化培地内でMuse細胞を培養し、Muse-メラノサイトを得て；
- (c) ゲル層でケラチノサイトとともにMuse-メラノサイトを培養し；及び
- (d) 三次元皮膚を得る。

【0034】

具体的には、細胞外マトリックス（例えば、コラーゲン）及び正常皮膚線維芽細胞を含むゲル層は、真皮を模倣するように生成されてもよい。その後、Muse-メラノサイトは、必要に応じて、ケラチノサイトと組み合わせて、ゲル層上に播種されてもよく、次に、所望の組織構築物が得られるまで培養されてもよい。

【0035】

Muse-メラノサイトがインビオで所定期間、生存し、メラノサイトの機能を維持し得るかどうかを調べるために、本発明による三次元皮膚を動物モデルに移植し、評価することができる。Muse細胞の多能性の評価は、例えば、免疫細胞化学、L-DOPA反応アッセイ、免疫組織化学、及びフォンタナ・マッソン染色によって行うことができ、こ

10

20

30

40

50

れらは全て当業者に知られている。

#### 【0036】

特に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、一般的に、本開示が属する技術分野の当業者によって理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中で使用するとき、続く用語は以下の意味を有する。

#### 【0037】

本明細書で使用するとき、用語「含んでいる」又は「含む」は、他を排除するわけではなく、本組成物及び方法が、引用された要素を含むことを意味することが意図される。組成物及び方法を定義するために使用するとき、「本質的に含む」とは、記述された目的の組み合わせに何らかの本質的に重要な他の要素を他の要素を排除することを意味する。したがって、本明細書で定義される要素から本質的になる組成物は、請求されている開示の基本的であり、新規な特徴（単数又は複数）に実質的に影響を及ぼさない他の材料又は工程を排除しない。「からなる」とは、他の成分及び実質的な方法工程の微量成分よりも多くを除外することを意味する。これらの移行用語のそれぞれによって定義される実施形態は、本開示の範囲内である。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるとき、文脈が特に明確に指示しない限り、単数形「1つの（a）」、「1つの（an）」、及び「その（the）」は、文脈が他に明確に記述していない限り、複数の対象を含むことに留意されたい。したがって、例えば、「スレッド（thread）」への言及は、複数のスレッドを含む。

10

#### 【実施例】

20

#### 【0038】

以下、本発明は、実施例を参照してより詳細に説明されるが、本発明は実施例に限定されない。

#### 【0039】

##### 材料及び方法

全ての動物実験は、東北大学医学部の動物実験と実験委員会によって承認された。

#### 【0040】

##### 細胞培養

NHDF (Lonza, Walkersville, MD) は、10% FBS (Hyclone; Thermo Fisher Scientific, Logan, UT) を含有する -MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中で培養された。ヒトメラノサイト (LifeLine Cell Technology, Frederick, MD) は、Dermalife (登録商標) M LifeFactors 培地 (LifeLine Cell Technology) 中に維持された。

30

#### 【0041】

##### メラノサイト誘導

ソーティング後、Mus e 細胞及び非Mus e 細胞を別々に、6 ウェルプレートあたり 10,000 細胞の密度で播種し、-MEM 中で 1 日培養した。次に、0.05M デキサメタゾン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、1×ITS (Invitrogen)、1mg/ml リノール酸 - ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich)、30% 低グルコース DMEM、20% MCDB-201 培地、10<sup>-4</sup>M の L-アスコルビン酸 (Sigma-Aldrich)、L-Wnt3a 細胞によって馴らされた 50% DMEM (American Type Culture Collection, Manassas, VA)、50ng/ml の SCF (R&D System Inc., Minneapolis, MN)、10nM の ET-3 (Sigma-Aldrich)、20pM コレラ毒素 (Wako, Osaka, Japan)、50nM の TPA (Sigma-Aldrich)、及び 4ng/ml の b-FGF (Wako) を含有する分化培地 中で細胞を培養した。すべての化学試薬は、製品情報シートに従って取り扱われた。この分化培地 中で 6 週間、細胞を維持した。培地を 2 日ごとに交換した。細胞が 50% ~ 80% のコンフルエントに達したとき、培養物を継代した。Mus e 細胞と

40

50

非Muse細胞の両方からのメラノサイト誘発を少なくとも3回繰り返した。

【0042】

細胞培養方法、FACS、Muse細胞の多能性の評価、Wnt3a馴化培地の調製、RT-PCR、免疫細胞化学、L-DOPA反応アッセイ、免疫組織化学、フォンタナ・マッソン染色、インビトロでの3D培養皮膚の作製及び皮膚移植は、補足資料オンラインに記載されている。

【0043】

蛍光活性化細胞選別(FACS)

Muse細胞を得るために、正常なヒト皮膚線維芽細胞(NHDF、Lonza Walkersville, MD)をFACS抗体希釈物中のラットステージ特異的胎児抗原-3(SSEA-3) IgM抗体(1:50; Millipore, Billerica, MA; 蛍光イソチオシアネート結合した抗ラットIgMによって検出される)(Jackson Immuno Research, West Grove, PA)とともにインキュベートされ、従来報告されているSpecial Order Research ProductであるFACStar III(Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)によって分類された。

【0044】

Muse細胞の多能性の評価

以前の報告(Kurodaraら、2010)に従って、分類されたMuse細胞を個々に-MEM(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いた細胞の限界希釈によって96ウェルプレートの各ウェルに播種し、単一細胞の懸濁培養において7日間培養した。ディッシュは、細胞接着を防止するために、ポリHEMA(Sigma Aldrich, St. Louis, MO)でコーティングされた。M-クラスター形成を7日目に観察した。次に、アルカリホスファターゼ(ALP)染色は、白血球アルカリホスファターゼキット(Sigma Aldrich)を用いて行われた。インビトロでのM-クラスターの分化能力を分析するために、M-クラスターをゼラチンコートしたディッシュに個別に移した。以前に記載(Kurodaraら、2010)されているように、培養の7日後、免疫細胞化学を行った。本研究で用いた抗体は、-SMA(Lab Vision, Fremont, CA)、ニューロフィラメント(Chemicon, Millipore)、及びGATA-4(Abcam, Cambridge, UK)であった。

【0045】

L-のWnt3a細胞からの馴化培地(Wnt3a-CM)

L-のWnt3a細胞株をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(Massas, VA)から入手した。最初に、10%FBS(Hyclone; Thermo Fisher Scientific, Logan, UT)及び0.4mg/mlのG418を含む高グルコースDMEM(Invitrogen)を用いて、L-Wnt3a細胞を10cmディッシュで培養した。約90%コンフルエントになるまで細胞を増殖させた後、10cm培養ディッシュにおいて10%FBSを含む10mlの高グルコースDMEM中で1:5に分割し、4日間増殖させた。次に、ディッシュの馴化培地を回収し、0.22μmフィルターで濾過後、4にて保存した。これは、第1バッチの培地であった。続いて、10mlの高グルコースDMEM+10%FBSをディッシュに添加し、さらに3日間培養した。3日後、馴化培地を回収し、濾過した。これは、第2バッチの培地であった。第1及び第2のバッチを混合した。これは、4週間まで4で保存することができるWnt3a馴化培地であった。馴化培地中のWnt3aタンパク質の存在をウエスタンプロット分析においてシグナルを検出することによって確認した。

【0046】

MCD201培地

MCD201培地をSigma-Aldrich社から入手した。MCD201培地は、ホルモン、増殖因子、微量成分、及び低レベルのウシ胎児血清タンパク質を用いて、ニワトリ胚線維芽細胞のクローニング用に設計されたHam栄養混合F-12の変形で

10

20

30

40

50

ある。M C D B 2 0 1 培地は、D M E M 及び 1 0 種の分化誘導因子を含む分化培地を作成するために使用された。

【 0 0 4 7 】

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 ( R T - P C R )

R Ne a s y ミニキット ( Q I A G E N , V e n l o , T h e N e t h e r l a n d s ) を用いて総 R N A を精製した。c D N A 合成は、オリゴ ( d T ) <sub>15</sub> プライマー ( P r o m e g a , M a d i s o n , W I ) を用いてプライミングされた S u p e r S c r i p t I I 逆転写酵素 ( I n v i t r o g e n ) を用いて行われた。次のように P C R を行つた：1 サイクル、9 4 、5 分間、続く、3 6 又は 4 0 サイクル、9 4 、1 分；遺伝子特異的アニーリング温度、1 分；7 2 、1 分；次に、7 2 、7 分にて伸長。

10

【 0 0 4 8 】

プライマーを次のように設計した：K I T フォワードプライマー、5' - G A A A G T G A C G T C T G G T C C T A T G G - 3'；リバースプライマー、5' - G T G C T C T C T G A A A T C T G C T T C T C A - 3'；ドーパクローム異性化酵素 ( D C T ) フォワードプライマー、5' - T C C T T C C T G A A C G G G A C A A A - 3'；リバースプライマー、5' - T G G C A T A G C T G T A G C C A A G T T G - 3'。M I T F フォワードプライマー、5' - C G G G A A C A G G A C C A T G G T T A - 3'；リバースプライマー、5' - A G C T A G C C C C T G A A A T G A A T C C - 3'；g p 1 0 0 フォワードプライマー、5' - C C A G T G T A T C C C C A G G A A A C T G - 3'；リバースプライマー、5' - G A A T G A G C A A G A G G G A C A T A G C T - 3'；T R P - 1、フォワードプライマー、5' - T G C A C A C C T T C A C A G A T G C A - 3'；リバースプライマー、5' - A A G C G C C A A C T A C T G C T A T G G - 3'；チロシナーゼフォワードプライマー、5' - G A G G T C A G C A C C C C A C A A A T - 3'；リバースプライマー、5' - G C A G C T T T A T C C A T G G A A C C A - 3'。

20

【 0 0 4 9 】

免疫細胞化学

リン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) 中の 4 % パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、M I T F ( L a b V i s i o n ) 、チロシナーゼ ( L a b V i s i o n ) 、及び g p 1 0 0 ( D a k o , C a r p i n t e r i a , C A ) に特異的な一次抗体とともにインキュベートした。洗浄後、A l e x a F l u o r 4 8 8 ( I n v i t r o g e n ) でコンジュゲートした二次抗体とともに細胞をインキュベートし、D A P I とともに対比染色した。次に、c 1 s i ニコン共焦点顕微鏡システム ( N i k o n , T o k y o , J a p a n ) を用いて細胞を調べた。

30

【 0 0 5 0 】

L - D O P A 反応アッセイ

0 . 1 M リン酸ナトリウム緩衝液 ( p H 6 . 8 ) で細胞を 2 回洗浄し、2 0 分間室温で 4 % パラホルムアルデヒドを用いて固定した。その後、リン酸緩衝液で細胞を 3 回洗浄し、リン酸ナトリウム緩衝液中、3 7 にて 1 8 時間、暗所で 5 m M の L - D O P A ( S i g m a - A l d r i c h ) とともに細胞をインキュベートした。インキュベーション後、細胞を蒸留水で洗浄し、2 0 分間、4 % パラホルムアルデヒドで固定し、光学顕微鏡下で撮影した。

40

【 0 0 5 1 】

インビトロでの 3 D 培養皮膚

組織培養トレイ ( C o r n i n g L i f e S c i e n c e s , P i t t s t o n , P A ) の挿入物は、1 型コラーゲン ( N i t t a G e l a t i n I n c , O s a k a , J a p a n ) 、ハンクス緩衝塩 ( N i t t a G e l a t i n I n c . ) を含む最小必須培地、及び 3 . 5 × 1 0 <sup>5</sup> N H D R 細胞 / m l を含む混合溶液を用い層状にされた。

3 7 で 3 日間インキュベート後、M u s e - メラノサイト又は非 M u s e 細胞由来の細胞 ( メラノサイト誘導のために処理された非 M u s e 細胞 ) は、M u s e - メラノサイト

50

ヒケラチノサイトを1:2.5の比率で、ヒト表皮ケラチノサイトとともにコラーゲン層上に播種された。細胞をHumedia KG2培地(Kuraboo)中で5日間培養した。Ca<sup>++</sup>濃度は徐々に増加した。Ca<sup>++</sup>濃度は、1日目で0.15mMであり、2日目で1.0mMであり、3~5日目で1.5mMであった。気液界面でさらに7日間、3D培養皮膚を培養し、次に、評価のために10%ホルムアルデヒドで固定し、SCIDマウスに移植した。ヒトメラノサイトを含む3D培養皮膚を陽性対照として使用し、ヒトメラノサイトを含まない3D培養皮膚を陰性対称として使用した。

## 【0052】

## 3D培養皮膚及び皮膚移植片の免疫組織化学

3D培養皮膚及び皮膚移植片を10%ホルムアルデヒドで固定し、パラフィン中に包埋し、3μm厚の切片に切断した。切片をメタノール中の0.3%過酸化水素で12分間処理し、固有のペルオキシダーゼ活性を不活性化し、その後、標準的な免疫ペルオキシダーゼ技術を用いて、S100(ポリクローナル、DAKO)、TRP-1(ポリクローナル、Sigma)、MITF、チロシナーゼ、及びgp100抗体を用いて染色した。

## 【0053】

GFPで標識されたMuse-メラノサイトを含む皮膚移植片は、新たに調製されたヨウ素酸-リシン-パラホルムアルデヒドで6時間、4℃にて固定され、OCT化合物(Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan)に包埋され、8μm厚の凍結切片に切断された。試料をPBSで洗浄し、室温で30分間、プロッキング溶液とともにインキュベートした。次に、スライドを4℃で一晩、抗GFP抗体(Abcam)で染色した。スライドをPBSで3回洗浄し、室温で2時間、Alexa Fluor 568(Invitrogen)をコンジュゲートした二次抗体とともにインキュベートした。その後、PBSで3回洗浄し、30分間、DAPI(Invitrogen)で対比染色し、ニコン蛍光顕微鏡を用いて調べた。

## 【0054】

## フォンタナ・マッソン染色

3D培養皮膚及び皮膚移植片をメラニンの組織学的検出のために、フォンタナ・マッソン染色を用いて調べた。パラフィン包埋切片を脱パラフィンし、蒸留水で濯いだ。スライドは、フォンタナ硝酸銀溶液(Muto Pure Chemicals Co., Ltd, Tokyo, Japan)を用いて、暗所にて24時間、室温で処理された。蒸留水で洗浄後、スライドを5秒間、金塩化物溶液(Muto Pure Chemicals Co., Ltd)で処理し、1分間、酸硬化定着液(Muto Pure Chemicals Co., Ltd)を入れた。スライドを洗浄し、1分間、ニュートラルレッド(Muto Pure Chemicals Co., Ltd)で対比染色した。

## 【0055】

## 皮膚移植

3D培養皮膚は、8~14週齢のSCIDマウスの背部皮膚に移植された。トリプロモエタノール(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)の腹腔内注射によってマウスを麻酔し、移植片ベッド(8mm×8mm)をマウス背部皮膚に調製した。3D培養皮膚は、移植片ベッド上に適用され、ワセリンガーゼ、Steri-Strip(3M Company, St. Paul, MN)、及び包帯で覆われた。包帯を3日に除いた。移植片の生存について、さらに7日間観察した。インビボでのMuse-メラノサイトを追跡するために、以前の報告(Kurodaら、2010)に従って、緑色蛍光タンパク質(GFP)を含むレンチウイルスでMuse細胞を感染し、次に、細胞をMuse-メラノサイトに分化し、3D培養に供し、SCIDマウスの背部皮膚に移植した。本発明者らは、Muse-メラノサイトを用いた皮膚移植片の移植について4匹のSCIDマウスを使用し、ヒトメラノサイトを用いた皮膚移植片について2匹のSCIDマウスを使用し、ケラチノサイトのみで2匹を使用した。皮膚移植片試料を10日目に10%ホルムアルデヒドで固定した。

## 【0056】

10

20

30

40

50

## GFPで標識したMuse細胞(Muse-GFP)を調製する方法

プラスミドpMD.2G、pCMV-dR8.74、及びpWPXL-GFPをTrono博士(Geneva, CH, Switzerland)の好意で入手した。高力価GFPレンチウイルス上清は、リポフェクタミン2000(Invitrogen)とOpti-MEM I培地(GIBCO, Invitrogen)を用いて、293FT細胞における3つのプラスミドの一過性同時移植によって作製された。293FT細胞(100mmディッシュで90%~95%コンフルエント)は、3μgのpWPXL-E GFP、3μgのpCMV-dR8.74、及び3μgのpMD.2Gとともにトランスフェクトされた。トランスフェクトされた293T細胞の上清をトランスフェクションから2日及び3日後に回収した。上清を0.45mmポアサイズのフィルター(Millipore)を通して濾過し、Amicon-Ultra15(Millipore)を用いて濃縮した。ウイルス溶液を10%FBSを含む10mlのMEMと混合した。GFPでNHDFを標識するために、NHDFを24~48時間、混合培地内で培養した。Muse-GFPは、FACSを用いてSSSES-3/GFPの二重陽性細胞としてNHDF-GFPから単離された。  
10

## 【0057】

## 実施例1：ヒト線維芽細胞からのMuse細胞の単離

Muse細胞は、正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF, Lonza Walkersville, MD)から回収された。従来報告されているように(Kurodaら、2010)、NHDFからの100%のSSSEA-3陽性細胞はCD105に陽性であるため、本発明者らは、SSSEA-3陽性細胞としてFACSによってMuse細胞を単離した。NHDFにおけるSSSEA-3陽性細胞の比率は、2%~3%の範囲であり、以前の報告と一致していた(図1a)。  
20

## 【0058】

本発明者らは、回収したMuse細胞の分化能を評価した。限界希釈後、各Muse細胞を単一細胞の懸濁培養において培養したとき、ES細胞由来の胚様体に非常に類似した細胞クラスター、すなわちMuse細胞由来の細胞クラスター(Mクラスター)が7日目までに生じた(図1b)。これらのクラスターは、アルカリホスファターゼ(ALP)染色について陽性であり(図1c)；Nanog、OCT3/4、Sox2などの多能性マーカーを発現し；従前に報告されているように(Wakaoら、2011)、セルフリニューアルを行うことができた(データ示さず)。それらの分化能を観察するために、単一のMクラスターを個別にゼラチンコートしたディッシュに移した。7日後、Mクラスターから増殖した細胞の、神経フィラメント(外胚葉マーカー)、平滑筋アクチン(-SMA、中胚葉マーカー)、及びGATA4(内胚葉マーカー)に陽性である細胞への自発的分化を検出した(図1d-f)。一方、非Muse細胞は、単一細胞懸濁培養においてクラスターを形成しなかった。したがって、内胚葉、中胚葉及び外胚葉系統細胞への非Muse細胞の分化は観察されなかった。これらの結果は、本発明者らの以前の報告(Wakaoら、2011)と一致していた。  
30

## 【0059】

## 実施例2：Muse細胞のメラノサイトへの分化

NHDFをFACSによってMuse細胞と非Muse細胞に分離し、両者を10個の因子：Wnt3a、幹細胞因子(SCF)、エンドセリン-3(ET-3)、塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF)、リノール酸、コレラ毒素、L-アスコルビン酸、1,2-O-テトラデカノイルホルボール13-アセテート(TPA)、インスリン-トランスフェリン-セレニウム(ITS)、及びデキサメタゾンを含む特定の分化培地で別々に培養した(図1g)。Muse細胞の形態が変化し始め、樹状突起を有する細胞が3週間以内に出現した。細胞の大きさは、5週までに僅かに減少し、6週間で、細胞はヒトメラノサイトに類似した形態を有した(図2)。しかしながら、このような変化は、非Muse細胞では起こらなかった。非Muse細胞由来の細胞のほとんどが、分化の6週間後でさえ線維芽細胞様のままであった(図2)。  
40  
50

## 【0060】

## 実施例3：Muse-メラノサイトの特徴付け

メラノサイト関連マーカーの発現は、分化の6週間後、Muse-メラノサイト及び非Muse細胞由来の細胞において調べられた。ヒトメラノサイトを陽性対照として使用した。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）において、Muse細胞から誘導された細胞は、3週間でMITF、KIT、TRP-1、及びgp100を発現した（図3a）。また、Muse細胞は、5週でDCTを発現し、6週でチロシナーゼを発現した。本発明者らは、以前に、ナイーブMuse細胞がDCT又はTRP-1のいずれも発現しないことを報告した（Wakaoら、2011）；したがって、Muse細胞におけるこれらのメラノサイト関連マーカーの発現は、分化によって誘導されると考えられる。非Muse細胞由来の細胞は、3週後にMITF、KIT、及びTRP-1を発現したが、DCT、gp100、及びチロシナーゼは、分化の6週後でさえ、これらの細胞において発現されなかった（図3a）。

## 【0061】

免疫細胞化学において、チロシナーゼ、gp100、及びMITFに陽性の細胞は、ヒトメラノサイトの場合のように、Muse-メラノサイト（6週）において検出され、一方、これらのメラノサイトマーカーに陽性の細胞のいずれも同時点で非Muse細胞由来の細胞において観察されなかった（図3b）。MITFシグナルは、RT-PCRでは非Muse細胞由来の細胞において検出されたが、タンパク質の発現レベルは、免疫細胞化学によって検出されるには十分に高くなかった。

## 【0062】

Muse-メラノサイトは、メラニンの生産性を調べるために、L-DOPA反応アッセイによってさらに評価された。多くの細胞は、L-DOPA反応アッセイについて陽性であった（図3c）。これらの結果は、ヒトメラノサイトと類似した特徴を有する細胞が、Muse細胞から誘導されるが、非Muse細胞からは誘導されないことを示唆した。

## 【0063】

## 実施例4：メラノサイト分化における因子の影響

メラノサイト誘導に必須の因子を調べ、及び因子の数が10から現象され得るのかどうかを推定するために、因子の7つの組み合わせを作製した（図4a）。Muse細胞は、培地1、2、3、4及び7で培養し、十分に増殖させたが、それらは真正のヒトメラノサイトに類似していなかった。培地5及び6中で培養したMuse細胞は十分に増殖せず、すべてが20日目以内に死滅した（図4a）。RT-PCR分析は、6週目で、全7セットの培地にチロシナーゼ発現を示さなかった。したがって、これらの培地は、メラノサイト誘導において、10因子を含む培地よりも優れていなかった（図4a、b）。培地1及び2中で培養したMuse細胞は、MITF及び/又はKITのみを発現した。培地3、4、及び7において、Muse細胞は、いくつかのメラノサイト関連マーカーを発現したが、チロシナーゼを発現しなかった（図4a、b）。

## 【0064】

## 実施例5：Muse-メラノサイトの使用による3D培養皮膚の作製

本発明者らは、Muse-メラノサイト及び他の細胞型を用いた3D培養皮膚を構築することを試みた。真皮を模倣するために、1型コラーゲンとNHDFを含むゲル層を作製した。表皮の構築のために、培養1）：ケラチノサイト+Muse-メラノサイト、培養2）：ケラチノサイトのみ、培養3）：ケラチノサイト+ヒトメラノサイト、又は培養4）ケラチノサイト+非Muse細胞由来の細胞のいずれかをゲル層上に播種した。15日後、色素沈着細胞を培養1）及び3）の表皮の基底層において観察した（図5a-b）。培養1）はヒトケラチノサイトとMuse-メラノサイトを含み、ケラチノサイトは、通常、メラニンを産生しないため、培養1）においてメラニンを産生する細胞は、Muse-メラノサイトであると考えられた（図5b）。さらに、MITF、チロシナーゼ、TRP-1、gp100、及びS100に陽性である細胞を培養1）と3）の両方において同定し、フォンタナ・マッソン染色によって、両培養物の表皮においてメラニンの存在を明ら

かにした(図5c)。対照的に、色素沈着細胞、及びメラニン細胞関連マーカーに陽性である細胞は、培養2)及び4)からの培養皮膚において観察されなかった(図5a、c)。

#### 【0065】

また、3D培養皮膚におけるMus-e細胞の自発的分化能を調べた。本発明者らは、緑色蛍光タンパク質(GFP)で標識した未分化Mus-e細胞(ナイープMus-e細胞)とケラチノサイトを混合し、3D培養皮膚の表皮を構築した。15日後、GFP陽性のナイープMus-e細胞を表皮において同定したが、それらのいずれもメラノサイト関連マーカーであるS100、TRP-1、及びチロシナーゼを発現しなかった(図7a-b)。この結果は、ナイープMus-e細胞が3D培養皮膚の表皮層に組み込まれたとしても、メラノサイトに自発的に分化しないことを示した。

10

#### 【0066】

いくつかのグループは、3D培養ヒト皮膚モデルが、マウス皮膚を用いることによって、実験よりも正確にヒト皮膚におけるヒトメラノサイトの生理学的状況を反映することを報告しているため(Haake and Scott, 1991; Meier et al, 2000)、本発明者らは、3D培養皮膚を用いて、ナイープMus-e細胞とMus-e-メラノサイトの移動能を評価した。GFP陽性のナイープMus-e細胞をNHDFと混合し、3D培養皮膚の真皮同等物に埋め込み、次に、該真皮同等物の上部のみにヒトケラチノサイトを播種した。15日後、GFP標識したナイープMus-eを3D培養皮膚の表皮に検出したが(図8a)、上述したように、S100、TRP-1、及びチロシナーゼを発現しなかった(図7)。Mus-e-メラノサイトのうちのいくつかは、真皮同等物から移動し、表皮層に組み込み、S100とTRP-1を発現した(図8b)。これは、ヒトメラノサイトが通常存在する表皮に、Mus-e-メラノサイトが移動する能力を有することを示す。

20

#### 【0067】

##### 実施例6：インビボにおけるMus-e-メラノサイトの機能評価

インビボにおいて所定期間、Mus-e-メラノサイトが生存し、メラノサイト機能を維持し得るかどうかを調べるために、本発明者らは、重症複合免疫不全(SCID)マウスの背中にMus-e-メラノサイトを含む3D培養皮膚を移植した。ヒトメラノサイトを含む3D培養皮膚と、ケラチノサイトのみを含む3D培養皮膚をそれぞれ、陽性対照及び陰性対照として移植した。ヒトメラノサイトを含む皮膚の移植から10日後、いくらかのメラノサイトを移植片の基底層において組織学的に検出した(図6a、b)。陰性対照において、皮膚移植片は色素沈着されているようではなく、色素沈着細胞は組織学的に観察されなかった(図6a、b)。組織学的評価は、Mus-e-メラノサイトを有する皮膚移植片が、茶色の基底層に局在化してMus-e-メラノサイトを含んでいたことを示し(図6a、b)、免疫組織学的分析は、該皮膚移植片が、ヒトメラノサイトを移植した場合と同様に、MITF、チロシナーゼ、TRP-1、gp100、及びS100に陽性であることを示した(図6c)。さらに、Mus-e-メラノサイト及び近接するケラチノサイトは、ヒトメラノサイトにおいて観察されたように、フォンタナ・マッソン染色に陽性であった(図6c)。GFP標識したMus-e-メラノサイトを含む3D培養皮膚の移植後、GFP陽性Mus-e-メラノサイトは、移植された皮膚内に局在化していることが確認され、これは、これらのGFP陽性細胞が、移植された細胞であって、宿主に由来しないことを示している(図6d)。これらの知見は、Mus-e-メラノサイトが、インビボにおいて、表皮の基底層にホーミングし、メラニンを産生し、近接するケラチノサイトにメラニンを輸送することを示した。陰性対照であるケラチノサイトのみを有する皮膚片は、全てのメラノサイト関連マーカー及びフォンタナ・マッソン染色に陰性であった(図6c)。

30

#### 【0068】

本発明者らは、メラノサイトマーカーであるS100と増殖マーカーであるKi-67について二重染色を行い、Mus-e-メラノサイトの増殖能について調べた；Mus-e-メラノサイトの9.5%がKi-67とS100の両方を発現した(図9)。

40

50

## 【0069】

## 考察

本研究の知見は、N H D F うち、特定型の幹細胞であるM u s e 細胞は、特定の組み合わせの因子及びサイトカインを用いることによって、機能性メラノサイトに容易に分化し得るが、N H D F のうち他の細胞である非M u s e 細胞は分化し得ないことを示した。M u s e - メラノサイトは、免疫細胞化学においてメラノサイトマーカーを発現し、R T - P C R は、インビトロでL - D O P A に陽性反応を示し、3 D 培養皮膚において成長することができ、インビオにおいて生存し、メラノサイトマーカーを発現し、S C I D マウスの背部皮膚に移植後にメラニンを産生した。したがって、M u s e - メラノサイトは、メラノサイトに匹敵すると考えられる。

10

## 【0070】

間葉系幹細胞型であるD P S C は、メラノサイトに分化することが報告されている (S t e v e n s e t a l , 2 0 0 8 ; P a i n o e t a l , 2 0 1 0 )。S t e v e n s らは、C D 3 4 ( - ) / C D 2 7 1 ( + ) D P S C から、T 細胞 1 によって認識され、メラノサイトマーカーであるメラノーマ抗原 (M a r t - 1) を発現する細胞を首尾よく誘導した。N H D F におけるM u s e 細胞はまたC D 3 4 ( - ) であるが、N H D F 由来のM u s e 細胞は、従前に報告されているように、C D 2 7 1 に陰性であるため、M u s e 細胞は歯髄細胞とは異なっていてもよい。P a i n o らは、D P S C が、何ら刺激を与えずに、自発的にメラノサイトに分化することを報告した。自然発生的に分化した細胞は、D C T 、T R P - 1 、及びM A R T - 1 を発現し、L - D O P A 反応アッセイにおいて陽性である。自発的分化は確かに魅力的である一方で、1 5 0 日を超える日数を必要とした。D P S C 由来のメラノサイトと比較して、M u s e 細胞は、6 週間以内にメラノサイトに分化し、メラニンを生成するための必須の酵素であるチロシナーゼを発現した。これらの理由から、M u s e - メラノサイトは、臨床用途に実用的であることが予想される。

20

## 【0071】

いくつかのグループは、メラノサイトがE S 細胞およびi P S 細胞から誘導され得ることをすでに報告している (N i s s a n e t a l , 2 0 1 1 ; Y a n g e t a l , 2 0 1 1 ; F a n g e t a l , 2 0 0 6 ; M o t o h a s h i e t a l , 2 0 0 6 ; O h t a e t a l , 2 0 1 1 ; Y a m a n e e t a l , 1 9 9 9 )。これらのメラノサイトは、M u s e - メラノサイトのように、チロシナーゼを含むいくつかのメラノサイト関連マーカーを発現し、三次元培養皮膚においてメラニンを生成する。M u s e 細胞からメラノサイトを誘導する技術は、臨床応用に関連して重要である。E S 細胞およびi P S 細胞は腫瘍形成のリスクを増加させる (F o n g e t a l , 2 0 1 0 ; G o l d r i n g e t a l , 2 0 1 1 ; B e n - D a v i d e t a l , 2 0 1 1 ; O k i t a e t a l , 2 0 0 7 )。一方、M u s e 細胞を含むM S C は腫瘍形成のリスクが低く、すでに多くの臨床試験において患者に適用されている (K u r o d a e t a l , 2 0 1 1 )。したがって、M u s e 細胞は癌にならない性質を有するため、分化したM u s e - メラノサイトと、メラノサイトに分化しなかったM u s e 細胞の両方は、三次元皮膚を構築するために使用することができ、そこに含まれる分化していないM u s e 細胞を取り除くことなしに、生体に投与することができる。E S 細胞は受精卵から取得されるため、E S 細胞の処理には、非常に多くの労力を必要とし、より多くの倫理的な問題を提起する (K n o p p e r s e t a l , 2 0 0 9 ; M a n z a r e t a l , 2 0 1 1 )。i P S 細胞は、線維芽細胞などの体細胞から得られるため、倫理的な問題は回避されるが、多能性幹細胞を生成するために人工的な遺伝子を導入する必要がある (T a k a h a s h i e t a l , 2 0 0 6 ; T a k a h a s h i e t a l , 2 0 0 7 )。一方、M u s e 細胞は、通常、真皮などの利用し易い間葉系組織及び市販の線維芽細胞に存在するため、臨床用途及び産業用途に魅力的な細胞供給源である。さらに、M u s e 細胞は、セルソーティングシステムにおいて、S S E A - 3 で単に標識することによって間葉系細胞から容易に単離され、これは、特に産業用途に有益である。M u s e 細胞

30

40

50

は利用し易い間葉系組織から得ることができるため、Muse - メラノサイトの自家移植又は同種移植もまた期待できる。

【0072】

ヒトメラノサイト幹細胞は、毛囊に存在し、セルフリニューアル能を有し、表皮においてメラニン細胞の数を維持するための役割を果たす。DCTとPAX3の両方は、メラノサイト幹細胞のマーカーとして知られていた。本発明者らは、mRNAレベルでMuse - メラノサイトのDCT発現を実証した。Muse - メラノサイトの増殖能を調査するために、本発明者らは、Muse - メラノサイトのKi-67発現を調べた(図9)。結果は、9.5%のMuse - メラノサイトがKi-67を発現したことを示した。また、これらのKi-67陽性細胞は、メラノサイトのマーカーであるS-100に対しても陽性であった。これらの結果は、移植後のMuse - メラノサイトのセルフリニューアル能を間接的に示唆した。

10

【0073】

分化培地において使用されるWnt3a、ET-3、SCF、b-FGF、及びcAMP誘導物質(コレラ毒素およびTPA)は、細胞内シグナル伝達を介して、転写因子PAX3、SOX10、CREB、LEF1の発現を促進することが知られていた(Steingrimsson et al, 2004, Dong et al, 2012, Kondo et al, 2011)。これら4つの転写因子は、メラノサイトに特異的なMITF変異体の1つであるMITF-Mのプロモーターを調節し、メラノサイトの分化、増殖、生存、およびメラニン形成において重要な役割を有する。この点から見て、分化培地中のWnt3a、ET-3、SCF、b-FGF及びcAMP誘導物質は、MITF-Mの活性化を通じて、Muse細胞においてメラノサイト関連因子を誘導するものと考えられる。アスコルビン酸は、チロシナーゼの活性及び合成を刺激することが知られている(Lee SA, et al, 2011)。最近、デキサメタゾンは、マウスES細胞からのメラニン細胞の発生を促進することが報告された(Yamane et al, 1999)。リノール酸とITSサプリメントの両方が、低血清培地中で補足因子として使用された。総合的に、これらの因子は、Muse細胞のメラノサイトへの効率的な誘導において協調的に作用していることが想定される。メラノサイトの分化に不可欠な因子を調査するために、本発明者らは、様々な幹細胞からのメラノサイト誘導について報告している記事(Yamane et al, 1999; Paino et al, 2010; Motohashi et al, 2007)に基づいて、7つの因子の組み合わせを想到した。Fangらは、3つの因子(Wnt3a、ET-3、及びSCF)の組み合わせが、多能性幹細胞からメラノサイトを誘導するのに十分であることを報告した。本発明者らの実験において、Muse細胞をこれらの3つの因子のいずれかを欠損した培地中で培養したとき、Muse細胞は、非常に僅かであるがメラノサイト関連マーカーを発現し、それらの形態は真正メラノサイトの形態と異なっていた。さらに、それらの3つの因子を含有する培地中で培養したMuse細胞は、MITF、KIT、TRP-1、DCT、及びgp100を発現したが、チロシナーゼを発現しなかった。これは、これらの3つの因子がメラノサイトへの分化に望ましい一方で、コレラ毒素、TPA、及びリノール酸などのさらなる分化増強因子が、Muse細胞を成熟メラノサイトに分化するために使用され得ることを示唆している。

20

【0074】

すべての参考資料及び対応する出願の全開示は、全体として参照により本明細書に援用される。

30

【0075】

参考文献

1. Alikhan A, Felsten LM, Daly M, et al. (2011) Vitiligo: a comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. J Am Acad Dermatol 65:473-91.

40

50

2. Ben-David U, Benvenisty N (2011) The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer* 11:268-77.

3. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, et al. (2004) Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 113:1701-10.

4. Dong L, Li Y, Cao J, et al. (2012) FGF2 regulates melanocytes viability through the STAT3-transactivated PAX3 transcription. *Cell Death Differ.* 19:616-22

5. Fang D, Leishear K, Nguyen TK, et al. (2006) Defining the conditions for the generation of melanocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 24:1668-77.

6. Felsten LM, Alikhan A, Petronic-Rosic V (2011) Vitiligo: a comprehensive overview Part II: treatment options and approach to treatment. *J Am Acad Dermatol* 65:493-514.

7. Fioramonti P, Onesti MG, Marchese C, et al. (2012) Autologous cultured melanocytes in vitiligo treatment comparison of two techniques to prepare the recipient site: erbium-doped yttrium aluminum garnet laser versus dermabrasion. *Dermatol Surg* 38:809-12.

8. Fong CY, Gauthaman K, Bongso A (2010) Teratomas from pluripotent stem cells: A clinical hurdle. *J Cell Biochem* 111:769-81.

9. Goldring CE, Duffy PA, Benvenisty N, et al. (2011) Assessing the safety of stem cell therapeutics. *Cell stem cell* 8:618-28.

10. Haake AR, Scott GA (1991) Physiologic distribution and differentiation of melanocytes in human fetal and neonatal skin equivalents. *J Invest Dermatol* 96:71-7.

11. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, et al. (2009) A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 54:2277-86.

12. Jeon S, Kim NH, Koo BS, et al. (2009) Lotus (*Nelumbo nuficera*) flower essential oil increased melanogenesis in normal human melanocytes. *Exp Mol Med* 41:517-25.

13. Jiang R, Han Z, Zhuo G, et al. (2011) Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study. *Front Med* 5:94-100.

14. Knoppers BM, Bordet S, Isasi R (2009) The human embryo: ethical and legal aspects. *Methods Mol Biol* 550:281-305.

15. Kondo T, Hearing VJ (2011) Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert rev Dermatol* 6:97-108.

16. Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, et al. (2011) Bone marrow mesenchymal cells: how do they contribute to tissue repair and are they really stem cells? *Arch Immunol Ther Exp* 59:369-78.

17. Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, et al. (2010) Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:8639-43.

18. Lee SA, Son YO, Kook SH, et al. (2011) Ascorbic acid increases the activity and synthesis of tyrosinase in B16F10 cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Arch Dermatol Res* 303:669-78.

19. Mabula JB, Chalya PL, McHembe MD, et al. (2012) Skin cancers among Albinos at a University teaching hospital in Northwestern Tanzania: a retrospective review of 64 cases. *BMC Dermatol*, 8 Jun 2012; 10.1186/1471-5945-12-5

20. Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, et al. (2008) Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 372:2023-30.

10

20

30

40

50

21. Manzar N, Manzar B, Hussain N, et al. (2011) The Ethical Dilemma of Embryonic Stem Cell Research. *Sci Eng Ethics*. 29 Oct 2011; 10.1007/s11948-011-9326-7

22. Motohashi T, Aoki H, Chiba K, et al. (2007) Multipotent cell fate of neural crest-like cells derived from embryonic stem cells. *Stem Cells* 25:402-10.

23. Motohashi T, Aoki H, Yoshimura N, et al. (2006) Induction of melanocytes from embryonic stem cells and their therapeutic potential. *Pigment Cell Res* 19:284-9.

24. Meier F, Nesbit M, Hsu MY, et al. (2000) Human melanoma progression in skin reconstructs : biological significance of bFGF. *Am J Pathol* 156:193-200.

25. Nissan X, Larribere L, Saidani M, et al. (2011) Functional melanocytes derived from human pluripotent stem cells engraft into pluristratified epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:14861-6. 10

26. Ohta S, Imaizumi Y, Okada Y, et al. (2011) Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. *PLoS one* 6:e16182.

27. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448:313-7.

28. Paino F, Ricci G, De Rosa A, et al. (2010) Ecto-mesenchymal stem cells from dental pulp are committed to differentiate into active melanocytes. *Eur Cell Mater* 20:295-305.

29. Phinney DG, Prockop DJ (2007) Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 25:2896-902. 20

30. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. (1999) Multilineage potential of a adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-7.

31. Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, et al. (2004) Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 40:1304-11.

32. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, et al. (2004) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 84:1155-228.

33. Sng J, Lufkin T (2012) Emerging stem cell therapies: treatment, safety, and biology. *Stem Cells Int*, 2 Aug 2012; 10.1155/2012/521343. 30

34. Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA. (2004) Melanocytes and the microphtalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet* 38:365-411.

35. Stevens A, Zuliani T, Olejnik C, et al. (2008) Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev* 17:1175-84.

36. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-72.

37. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-76.

38. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, et al (2005) Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*. 23:727-37. 40

39. van Geel N, Ongenae K, Naeyaert JM (2001) Surgical techniques for vitiligo: a review. *Dermatology* 202:162-6.

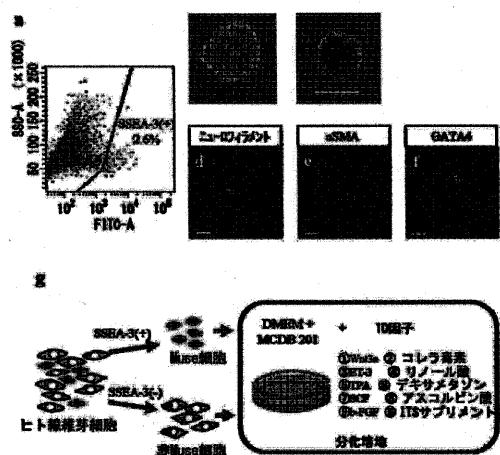
40. Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, et al. (2011) Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9875-80.

41. Yamane T, Hayashi S, Mizoguchi M, et al. (1999) Derivation of melanocytes from embryonic stem cells in culture. *Dev Dyn* 216:450-8.

42. Yang R, Jiang M, Kumar SM, et al. (2011) Generation of melanocytes from induced pluripotent stem cells. *J Invest Dermatol* 131:2458-66. 50

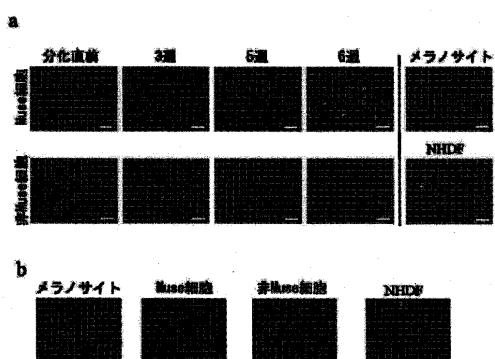
【図1】

FIG.1



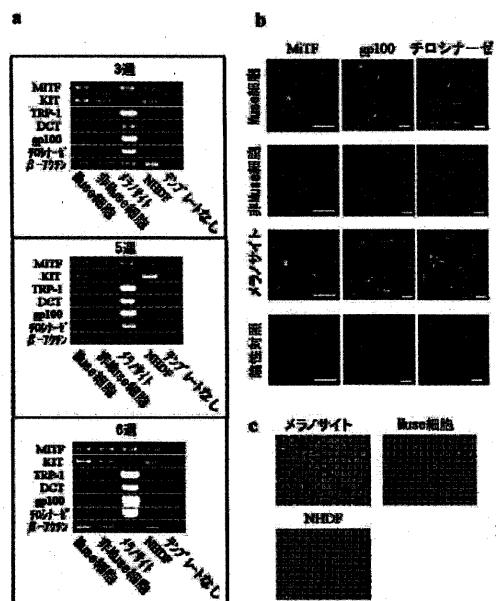
【図2】

FIG.2



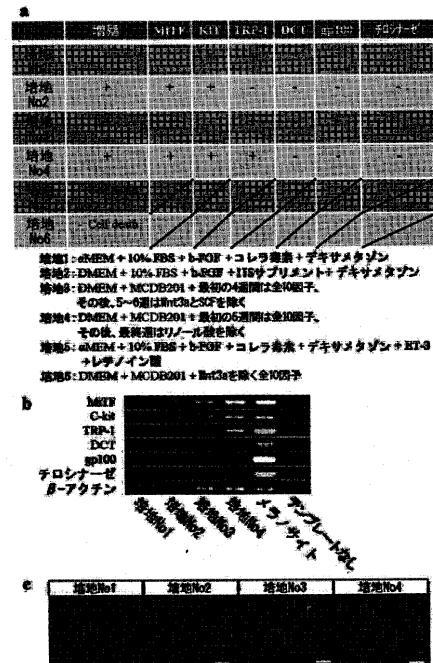
【図3】

FIG.3

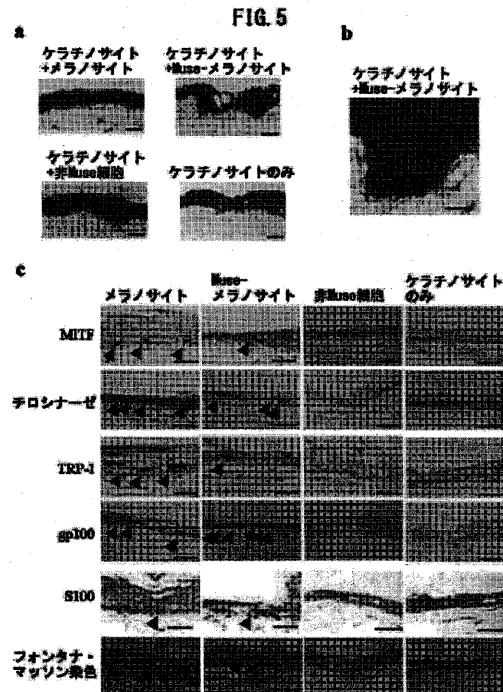


【図4】

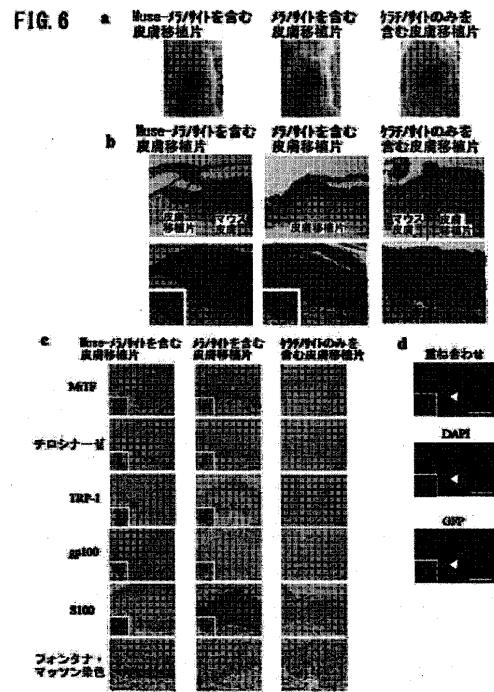
FIG.4



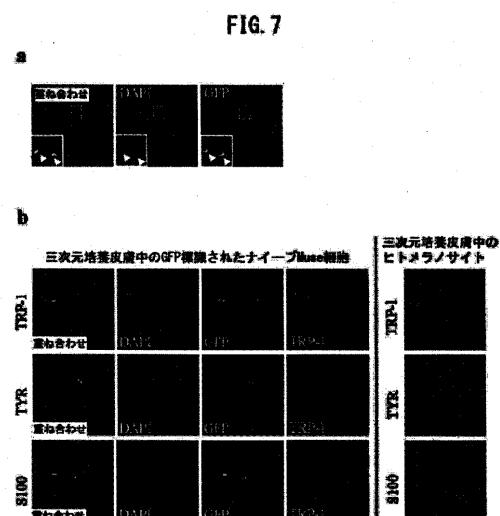
【図5】



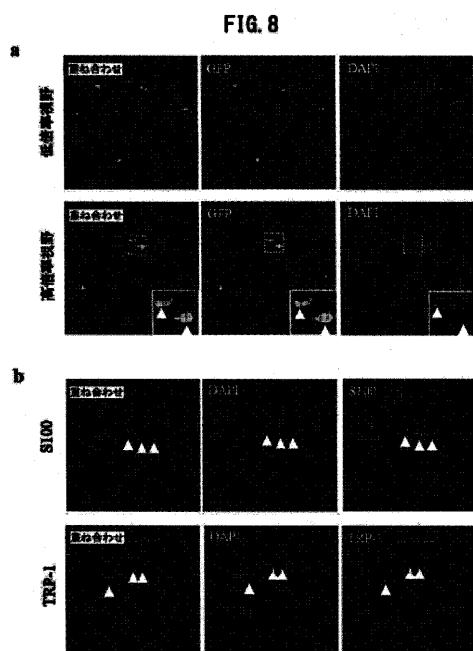
【図6】



【図7】

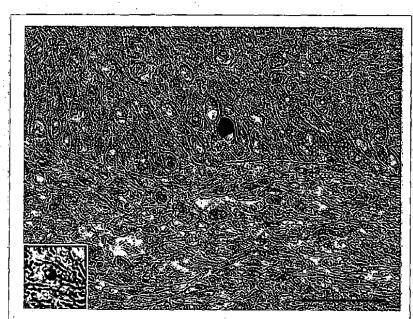


【図8】



【図9】

FIG. 9



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/060045
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>Int.Cl. C12N5/071 (2010.01)</b>  <i>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</i>		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>  <i>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</i> <b>Int.Cl. C12N5/071</b>  <i>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</i> <i>Published examined utility model applications of Japan 1922-1996</i> <i>Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2014</i> <i>Registered utility model specifications of Japan 1996-2014</i> <i>Published registered utility model applications of Japan 1994-2014</i>		
<i>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</i> <b>CAPLus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN) , JST Plus / JMEDPlus / JST 7580 (JDreamIII) , PubMed , Thomson Innovation</b>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	FANG, D. et al., Defining the conditions for the generation of melanocytes from human embryonic stem cells., <i>Stem Cells</i> , 2006.07, Vol.24, No.7, pp.1668-77	1-4, 6 5, 7-11, 13
X Y	OHTA, S. et al., Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells., <i>PLoS One</i> , 2011.01.13, Vol.6, No.1, e16182	1-4 5-11, 13
X Y	NISSAN, X. et al., Functional melanocytes derived from human pluripotent stem cells engraft into pluristratified epidermis., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 2011.09.06, Vol.108, No.36, pp.14861-6	1, 3, 6 2, 4-5, 7-11, 1 3
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  03.06.2014	Date of mailing of the international search report  10.06.2014	
Name and mailing address of the ISA/JP  <b>Japan Patent Office</b> 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer  Toshiki KOHDA	4N 4671 Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3488

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP2014/060045

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*		Relevant to claim No.
X	WO 2011/104200 A1 (INSERM(Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale)) 2011.09.01, the whole document	1,3,6
Y	& JP 2013-520163 A & EP 2539438 A & CN 102858955 A & KR 10-2012-0120971 A	2,4-5,7-11,13
X	PAINO, F. et al., Ecto-mesenchymal stem cells from dental pulp are committed to differentiate into active melanocytes., Eur. Cell. Mater., 2010.10.07, Vol.20, pp.295-305	1-4
Y	KURODA, Y. et al., Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010.05.11, Vol.107, No.19, pp.8639-43	5-11,13
Y	WAKAO, S. et al., Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011.06.14, Vol.108, No.24, pp.9875-80	1-11,13
T	TSUCHIYAMA, K. et al., Functional melanocytes are readily reprogrammable from multilineage-differentiating stress-enduring (muse) cells, distinct stem cells in human fibroblasts., J. Invest. Dermatol., 2013.10, Vol.133, No.10, pp.2425-35	1-11,13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2014/060045
--

## Box No. 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.: 12  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The subject matter of claim 12 appears to be methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, which does not require an international search by the International Searching Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and [Rule 39.1(iv)].
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 No. 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	

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

(出願人による申告) 平成24年度、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構、「次世代機能代替技術の研究開発 / 次世代再生医療技術の研究開発 / 少量の細胞により生体内で自己組織の再生を促す自律成熟型再生デバイスの開発 (Muscle細胞を用いた in situ stem cell therapyの基盤研究開発)」委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(74) 代理人 100117019  
弁理士 渡辺 陽一  
(74) 代理人 100141977  
弁理士 中島 勝  
(74) 代理人 100150810  
弁理士 武居 良太郎  
(72) 発明者 出澤 真理  
宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内  
(72) 発明者 土山 健一郎  
宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内  
(72) 発明者 吉田 正順  
秋田県秋田市飯島字砂田100-4 株式会社Clio内  
(72) 発明者 相場 節也  
宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内  
(72) 発明者 山崎 研志  
宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内  
F ターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA20 DA03 EA04 GA11  
4B065 AA93X AB01 BA01 BA24 BB10 BB19 BB20 BB34 CA44  
4C081 AB19 BA17 DA02 EA02  
4C087 AA01 AA02 AA03 BB48 BB64 CA04 MA23 MA66 MA67 NA14  
ZA89