

(19) 日本国特許庁 ( J P )

(12) 特 許 公 報 ( B 2 )

(11) 特許番号

特許第3516263号

( P 3 5 1 6 2 6 3 )

(45) 発行日 平成16年4月5日 ( 2 0 0 4 . 4 . 5 )

(24) 登録日 平成16年1月30日 ( 2 0 0 4 . 1 . 3 0 )

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I
G 0 1 N 33/53		Y
A 6 1 K 49/00		Z
G 0 1 N 33/577		B
// C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 16/18

請求項の数7 (全 3 頁)

(21) 出願番号	特願2000-368860 ( P 2 0 0 0 - 3 6 8 8 6 0 )	(73) 特許権者	391023932 ロレアル L O R E A L フランス国パリ, リュ ロワイヤル 14
(22) 出願日	平成12年12月4日 ( 2 0 0 0 . 1 2 . 4 )	(72) 発明者	ダニエル アスリノー フランス国 92160 アントニ, アヴェニ ュー レオン プルム 1, レジダンス デ カトル キャドラン
(65) 公開番号	特開2001-215225 ( P 2 0 0 1 - 2 1 5 2 2 5 A )	(72) 発明者	アーノールド キャプラン アメリカ合衆国 オハイオ 44106, ク リーブランド, ユークリッド アヴェニ ュー 10900
(43) 公開日	平成13年8月10日 ( 2 0 0 1 . 8 . 1 0 )	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆 (外1名)
審査請求日	平成12年12月4日 ( 2 0 0 0 . 1 2 . 4 )	審査官	亀田 宏之
(31) 優先権主張番号	9 9 1 5 2 9 2		
(32) 優先日	平成11年12月3日 ( 1 9 9 9 . 1 2 . 3 )		
(33) 優先権主張国	フランス ( F R )		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳頭線維芽細胞マーカー試薬

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 PG4抗体からなる乳頭線維芽細胞マーカー試薬。

【請求項2】 乳頭線維芽細胞が皮膚の乳頭線維芽細胞であることを特徴とする請求項1に記載のマーカー試薬。

【請求項3】 皮膚又は皮膚等価物の質及び/又は正常性を判定するためのものである、請求項2に記載のマーカー試薬。

【請求項4】 乳頭線維芽細胞が真皮の乳頭線維芽細胞であることを特徴とする請求項1又は2に記載のマーカー試薬。

【請求項5】 真皮又は真皮等価物の質及び/又は正常性を判定するためのものである、請求項4に記載のマーカー試薬。

2

【請求項6】 皮膚又は皮膚等価物の質及び/又は正常性の判定のために、皮膚サンプル又はインビトロで得られた皮膚等価物における乳頭線維芽細胞の存在を検査する方法であって、PG4抗体を使用して、上記皮膚サンプル又は皮膚等価物に対して免疫標識を行うことにより、乳頭線維芽細胞の存在を判定する方法。

【請求項7】 皮膚又は皮膚等価物が真皮又は真皮等価物である、請求項6に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、乳頭線維芽細胞マーカー試薬及びそれを用いて乳頭線維芽細胞の存在を検査する方法に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 皮

膚は2つの密接に関連した区画、すなわち表皮と真皮とからなる。表皮は主として3種類の細胞型、すなわち表皮の大部分の細胞を構成するケラチノサイト、メラニン細胞及びランゲルハンス細胞からなる。これらの細胞は、角質層を形成する死細胞層が頂部にある重なり層に分化する角質化上皮を構成している。

【0003】真皮は表皮に対するしっかりとした支持部となっている。真皮は表皮の栄養要素でもある。真皮は、主として線維芽細胞と細胞外マトリックスとからなり、細胞外マトリックスは、主にコラーゲン、エラスチン及び基質として知られている物質から構成されている。これらの細胞外成分は線維芽細胞によって合成される。さらに、白血球、肥満細胞及び組織マクロファージもまたその内部に存在する。またそれは血管と神経線維も含んでいる。正常な皮膚、すなわち病気でもなく癒痕もない皮膚において、線維芽細胞は休止状態、すなわち非増殖状態にあり、代謝は比較的不活性で、不動(immobile)である。

【0004】事実、真皮は2つの領域に細分される；第1は乳頭真皮(papillary dermis)と称される薄い表面の真皮であり、第2は真皮のほとんどを構成する、網状真皮(reticular dermis)と称される深部の真皮である。乳頭真皮は表皮に接触する真皮の一部であり、いわゆる乳頭線維芽細胞(papillary fibroblasts)を含んでいる。網状真皮は皮下脂肪層まで伸長する真皮領域であり、いわゆる網状線維芽細胞を含む。正常な皮膚では、これら2つの領域は差異を示す。乳頭真皮は網状真皮よりも代謝的により活性である。

【0005】培養した乳頭及び網状線維芽細胞はその成長性に差異を示す。免疫標識により、小さいサイズのデルマトン硫酸プロテオグリカン(DSPG)であるデコリン(decorin)が、網状真皮よりも乳頭真皮においてより豊富であることを示すことができる。乳頭線維芽細胞は網状線維芽細胞よりも約6倍のデコリンを分泌する。

【0006】しかして、正常な皮膚では、真皮は少なくとも2つの線維芽細胞集団からなり、それだけが皮膚自体に基本的な結果をもたらさう。皮膚等価物(又はインビトロで再構成された皮膚)の領域では、予め単離された各線維芽細胞集団から真皮等価物をどのように調製するかは知られている。また、予め単離された2つの集団が導入される真皮等価物の調製方法も知られてる。しかしながら、線維芽細胞のランダムな集団から再構成された真皮等価物における種々の線維芽細胞集団の同定についての問題は残ったままである。真皮等価物を培養中で達成した後、真皮等価物は、正常な皮膚の真皮中に存在する少なくとも2つの線維芽細胞集団、乳頭真皮と網状真皮を有しているのであろうか？しかして、正常な皮膚がこれらの2つの集団を有していることは以前から分かっており、インビトロで再構成された皮膚は、少なくとも2つの線維芽細胞集団を有している場合に、正常な

皮膚に近いものとなることが理解される。

【0007】本出願人の知る限りでは、再構成された皮膚が少なくとも2つの乳頭及び網状線維芽細胞集団を有しているかいないかを明確にすることを可能にする簡単で効果的な手段、特に皮膚等価物を損なうことのない手段は、今日まで存在しない。これが、本発明が解決しようとしている課題である。

【0008】

【課題を解決するための手段及び発明の実施の形態】

10 本出願人は、驚くべきことに、また予期しないことに、網状線維芽細胞に存在しないか、ほとんど存在していない特定のエピトープを乳頭線維芽細胞が発現し、またPG4抗体がこのエピトープに特異的な抗体として機能し、よってこの抗体を使用することにより、皮膚等価物が2つの乳頭及び網状線維芽細胞集団を有しているか否かを決定することができることを見出した。

20 【0009】よって、本発明の主題は、PG4モノクローナル抗体からなる、乳頭線維芽細胞、特に皮膚の乳頭線維芽細胞、なかでも真皮の乳頭線維芽細胞用のマーカー試薬にある。上記マーカー試薬は、皮膚、特に皮膚等価物、なかでもインビトロで得られた真皮等価物の質及び/又は正常性を判定するために使用される。

30 【0010】PG4抗体は、Sorrellらによる刊行物(The Histochemical Journal 31: 549-558, 1999)に記載されている。このマウスモノクローナル抗体は、皮膚においてグリコサミノグリカンに特異的な少なくとも1つのエピトープを認識すると記載されており、特に、抗コンドロイチン硫酸(CS)及び抗デルマトン硫酸(DS)モノクローナル抗体として記載されている。この抗体が真皮線維芽細胞の特定の集団、すなわち乳頭線維芽細胞に特異的であることは今まで開示されていない。

40 【0011】従来から公知の少なくとも1つの抗体を使用する任意の免疫標識法が、本発明の抗体を用いた標識を行うために使用することができる。この点に関しては、Asselineauら(J.I.D., 86, 181-186, 1986)、又はSorrellら(The Histochemical Journal 31: 549-558, 1999)に記載されている方法を挙げることができる。

40 【0012】本発明の他の主題は、皮膚又は皮膚等価物の質及び/又は正常性の判定のために、皮膚サンプル又はインビトロで得られた皮膚等価物における乳頭線維芽細胞の存在を検査する方法であって、PG4抗体を使用して、上記皮膚サンプル又は皮膚等価物に対して免疫標識を行うことにより、乳頭線維芽細胞の存在を判定する方法にある。

50 【0013】図1により、本発明をより明らかに例証することができるが、これは発明の範囲を限定するものではない。この図において、写真は、細胞核のヨウ化プロビジウムでの対比染色と共に、PG4モノクローナル抗体を使用して間接的免疫蛍光法により免疫標識を行った後の、正常なヒトの皮膚の断面図を示している。(ヨウ

化プロビジウムで標識された多くの細胞核により認識可能な表皮のレベルでの真皮上部の強い標識(薄い灰色領域)がみられるが、PG4モノクローナル抗体により特異的に認識されるエピトープを発現する乳頭線維芽細胞がこの領域に存在していることを証明している。本発明の他の特徴と利点は、本発明を例証するものであって限定するものではない次の実施例により明らかになるであろう。

【0014】実施例1：正常な皮膚における乳頭線維芽細胞の免疫標識

形成外科から得られた正常な皮膚のサンプルをTissue-Tekに埋設し、液体窒素で凍らせ、 $-80^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で保管した。4ミクロン厚の切片を通常の技術に従いクリオスタットで調製した。1切片当たり $20\mu\text{l}$ の純粋なPG4モノクローナル抗体(培養上清)を用いて(Sorrellら, The Histochemical Journal 31:549-558, 1999を参照)、一般的な間接免疫蛍光標識法(Asseineau\*

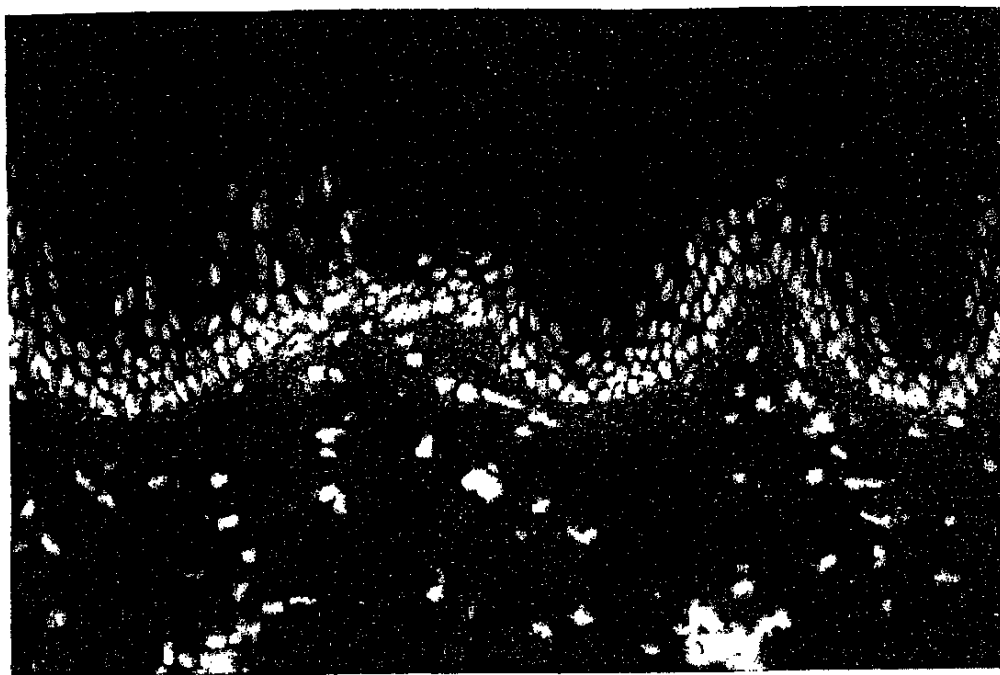
ら, J.I.D., 86, 181-186, 1986を参照)により免疫標識を行った。ついで、ダコ社(Dako)から得られたマウス抗体に対する抗体(マウス接合体)を1切片当たり $20\mu\text{l}$ 、該切片に配し、切片を製造者が薦める方法に従いインキュベートした。すすいだ後、細胞核を染色するために、切片を0.5%のヨウ化プロビジウムを含むPBS溶液にさらし、ついでPBSで洗浄し、観察のために蛍光顕微鏡に配した。

【0015】表皮レベルにおける真皮の強い標識の存在が表れており、この区間に、PG4モノクローナル抗体により特異的に認識されるエピトープを発現する乳頭線維芽細胞が存在していることが証明された。

【図面の簡単な説明】

【図1】細胞核のヨウ化プロビジウムでの対比染色と共に、PG4モノクローナル抗体を使用して間接的免疫蛍光法により免疫標識を行った後の正常なヒトの皮膚の断面図を示す写真である。

【図1】



フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)

G01N 33/53  
A61K 49/00  
G01N 33/577  
C07K 16/18

专利名称(译)	乳头状成纤维细胞标记试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP3516263B2</a>	公开(公告)日	2004-04-05
申请号	JP2000368860	申请日	2000-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	欧莱雅		
申请(专利权)人(译)	欧莱雅		
当前申请(专利权)人(译)	欧莱雅		
[标]发明人	ダニエルアスリノー アーノールドキャプラン		
发明人	ダニエル アスリノー アーノールド キャプラン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K49/00 C07K16/18 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6881 G01N2400/40 G01N2800/20 Y10S435/971		
FI分类号	G01N33/53.Y A61K49/00.Z G01N33/577.B C07K16/18 A61K49/00		
F-TERM分类号	4C085/HH20 4C085/KA04 4C085/LL20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
优先权	1999015292 1999-12-03 FR		
其他公开文献	JP2001215225A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种标记，可用于确定重建的皮肤是否具有乳头和网状成纤维细胞群，简单有效，并且不会损害皮肤等效物。 解决方案：至少一种乳头状成纤维细胞特异性抗体，如PG4抗体，用作标记物。

