

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 215225

(P2001 - 215225A)

(43)公開日 平成13年8月10日(2001.8.10)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	Y
A 6 1 K 49/00			A 6 1 K 49/00	Z
G 0 1 N 33/577			G 0 1 N 33/577	B
// C 0 7 K 16/18			C 0 7 K 16/18	

審査請求 有 請求項の数 12 O L (全 4 数)

(21)出願番号	特願2000 - 368860(P2000 - 368860)	(71)出願人	391023932 ロレアル LOREAL 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(2000.12.4)	(72)発明者	ダニエル アスリノー フランス国 92160 アントニ,アヴニュー レオン ブルム 1,レジダンス デ カ トル キャドラン
(31)優先権主張番号	9915292	(74)代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆 (外1名)
(32)優先日	平成11年12月3日(1999.12.3)		
(33)優先権主張国	フランス(FR)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 乳頭線維芽細胞に特異的な抗体の皮膚の質のマーカ-としての使用

(57)【要約】

【課題】 再構成された皮膚が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ために使用できる、簡単かつ効果的で皮膚等価物を損なうことのないマーカ-を提供する。

【解決手段】 P G 4 抗体等の、乳頭線維芽細胞に特異的な少なくとも1種の抗体を使用し、マーカ-とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 乳頭線維芽細胞に特異的な少なくとも1つの抗体からなる、皮膚の質のマーカー。

【請求項2】 乳頭線維芽細胞に特異的な少なくとも1つの抗体からなる、皮膚等価物の質のマーカー。

【請求項3】 抗体がモノクローナル抗体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。

【請求項4】 抗体が、ウマ、ヤギ、マウス、ラット又はウサギ抗体であることを特徴とする請求項1ないし3のいずれか1項に記載のマーカー。

【請求項5】 抗体がマウス抗体であることを特徴とする請求項4に記載のマーカー。

【請求項6】 PG4抗体からなる乳頭線維芽細胞のマーカー。

【請求項7】 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6に記載のマーカー。

【請求項8】 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6又は7に記載のマーカー。

【請求項9】 PG4抗体からなる、皮膚又は皮膚等価物の質のマーカー。

【請求項10】 PG4抗体からなる、真皮又は真皮等価物の質のマーカー。

【請求項11】 乳頭線維芽細胞に特異的な少なくとも1つの抗体を使用し、皮膚又は皮膚等価物に対して免疫標識を行うことを特徴とする、皮膚又はインビトロで得られた皮膚等価物の質を決定するための方法。

【請求項12】 PG4抗体を使用し、皮膚又は皮膚等価物に対して免疫標識を行うことを特徴とする、皮膚又はインビトロで得られた皮膚等価物の質を決定するための方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、皮膚、特に皮膚等価物の質に対するマーカーとしての、乳頭線維芽細胞に特異的な少なくとも1つの抗体の使用に関する。

【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タ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】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することを見出した。このエピトープに特異的な抗体、特にモノクロ

ーナル抗体を使用して、真皮線維芽細胞の特定の集団を標識することができる。そして、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。

【0009】よって、本発明の主題は、皮膚、特に皮膚等価物の質に対するマーカーとしての、乳頭線維芽細胞に特異的な少なくとも1つの抗体の使用にある。本発明において「質に対するマーカー」という表現は、正常な皮膚中に存在する生物学的成分の、皮膚又は皮膚等価物中における存在を効果的に示すあらゆるマーカーを意味するものである。本発明において「マーカー」という用語は、存在、不存在、発現の変化又は分布の変化を測定することができる任意の要素を意味するものである。マーカーの例としては、限定するものではないが、エピトープ、核酸(リボ核酸又はデオキシリボ核酸)、抗体、タンパク質又は結合していてもしていなくてもよいタンパク質の群、イオン、細胞オルガネラ、脂質又は多糖類を挙げることができる。本発明において、マーカーは抗体である。

【0010】抗体はポリクローナル又はモノクローナル抗体である。好ましくは、本発明では抗体はモノクローナル抗体である。抗体は任意の起源から由来する抗体、すなわち任意の動物、例えばウマ、ヤギ、マウス、ラット又はウサギから得られた抗体でありうる。好ましくは、抗体はマウス抗体である。より好ましくは、抗体はマウスモノクローナル抗体である。

【0011】本発明の好ましい抗体は、Sorrellらによる刊行物(The Histochemical Journal 31:549-558, 1999)に記載されているPG4の名で知られている抗体である。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。

【0012】よって、本発明の主題は、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としての、PG4モノクローナル抗体の使用にある。本発明の他の主題は、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に対するマーカーとしての、PG4モノクローナル抗体の使用にある。

【0013】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。

【0014】本発明の他の主題は、乳頭線維芽細胞に特異的な少なくとも1つの抗体、特にPG4抗体を使用し、皮膚及び/又は皮膚等価物について免疫標識を行うことを特徴とする、皮膚、特にインビトロで得られた皮膚等価物の質を決定するための方法にある。

【0015】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ピ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。(ヨウ化プロピ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。

【0016】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

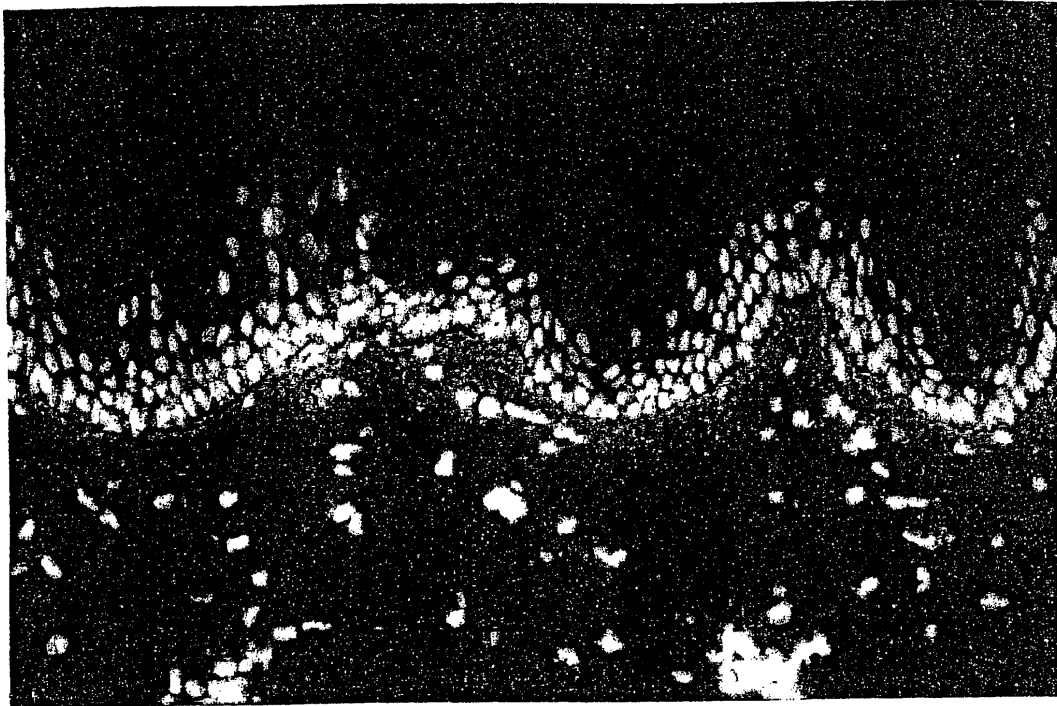
形成外科から得られた正常な皮膚のサンプルをTissue-Tekに埋設し、液体窒素で凍らせ、-80の冷凍庫で保管した。4ミクロン厚の切片を通常の技術に従いクリオスタットで調製した。1切片当たり20µlの純粋なPG4モノクローナル抗体(培養上清)を用いて(Sorrellら, The Histochemical Journal 31:549-558, 1999を参照)、一般的な間接免疫蛍光標識法(Asselineauら, J.I.D., 86, 181-186, 1986を参照)により免疫標識を行った。ついで、ダコ社(Dako)から得られたマウス抗体に対する抗体(マウス接合体)を1切片当たり20µl、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%のヨウ化プロピジウムを含む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。

【0017】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ピ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】



专利名称(译)	使用对乳头状成纤维细胞特异的抗体作为皮肤质量标记物		
公开(公告)号	JP2001215225A	公开(公告)日	2001-08-10
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		
[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	JP3516263B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种不损害皮肤等效性的简单有效的标记物，可用于确定重建的皮肤是否具有乳头和网状成纤维细胞。 解决方案：至少将一种乳头状成纤维细胞特异性抗体（例如PG4抗体）用作标记。

【图1】

