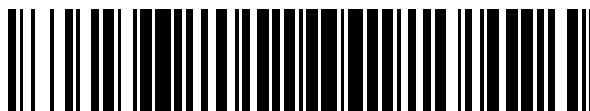


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 998**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 15/09 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2010 E 10817219 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2479258**

54 Título: **Método de aislamiento de citoblastos dérmicos**

30 Prioridad:

15.09.2009 JP 2009213291

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.12.2014

73 Titular/es:

**SHISEIDO COMPANY, LIMITED (100.0%)
5-5, Ginza 7-chome Chuo-ku
Tokyo 104-8010, JP**

72 Inventor/es:

**SOMA, TSUTOMU y
YAMANISHI, HARUYO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 523 998 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de aislamiento de citoblastos dérmicos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método de aislamiento de citoblastos dérmicos a partir de tejido cutáneo.

5 Antecedentes de la invención

Los citoblastos son células que tienen tanto propiedades de potencial multipotente de producción de células que se diferencian en una pluralidad de células como potencial autorreplicativo de producción de células idénticas mediante división celular. Los citoblastos derivados de un embrión, una etapa de desarrollo temprana de un óvulo fertilizado, son citoblastos embrionarios (CE). Se espera que los CE humanos se apliquen a medicina regenerativa pero, debido a preocupaciones éticas asociadas al uso de óvulos fertilizados, no está permitida la creación de nuevos CE.

En los últimos años, como células que tienen propiedades similares a los citoblastos embrionarios, se ha centrado también la atención en citoblastos pluripotentes inducidos artificialmente (CPI). Sin embargo, la creación de CPI está asociada a diversos problemas tales como cambios cancerosos en células y mala eficacia de generación de células. Por otro lado, los citoblastos somáticos capaces de diferenciarse en un tejido específico no tienen dichos problemas éticos, al contrario que los citoblastos embrionarios, puesto que derivan del propio tejido del paciente, tal como médula ósea.

Es bien conocido que, en la piel, existen citoblastos epidérmicos en la capa basal epidérmica (documento no de patente 1) y se reseña que existen citoblastos epiteliales foliculares (documento no de patente 2) y citoblastos melanocíticos cutáneos (documento no de patente 3) en una región a la que se hace referencia como la zona de protuberancia del folículo piloso. Por otro lado, en la dermis están presentes fibroblastos finos fusiformes en el componente fibroso que comprenden colágeno como ingrediente principal, pero no se ha demostrado si están presentes citoblastos en los fibroblastos dérmicos. Es también conocido que en la dermis existen células precursoras derivadas de la piel (SKP) que se diferencian en una pluralidad de linajes celulares tales como adipocitos, gliocitos, condrocitos y miocitos (documento no de patente 4), pero no se ha confirmado ninguna relación entre fibroblastos dérmicos y SKP.

Los citoblastos mesenquimáticos aislados de médula ósea como células precursoras de fibroblastos (documento no de patente 5) pueden diferenciarse en diversas células (osteocitos, miocitos, condrocitos, adipocitos, etc.) pertenecientes al sistema mesenquimático, y por tanto se espera que se apliquen a medicina regenerativa, tal como a reconstrucción de huesos, vasos sanguíneos y músculos. Últimamente, hay cada vez más pruebas que muestran la probabilidad de que los citoblastos mesenquimáticos puedan aparecer en muchos tejidos que tienen tejido mesenquimático, y se han aislado también citoblastos mesenquimáticos de grasa, sangre del cordón, placenta, etc. (documentos no de patente 6 a 8). Sin embargo, la presencia de citoblastos mesenquimáticos en la dermis no se ha mostrado todavía.

Documentos de la técnica anterior**35 Documentos no de patente**

Documento no de patente 1: Watt FM, J. Dermatol. Sci. 28: 173-180, 2002

Documento no de patente 2: Cotsarelis G *et al.*, Cell 57: 201-209, 1989

Documento no de patente 3: Nishimura EK *et al.*, Nature 416: 854-860, 2002

Documento no de patente 4: Wong CE *et al.*, J. Cell Biol. 175: 1005-1015, 2006

40 Documento no de patente 5: Pittenger MF *et al.*, Science 284: 143-147, 1999

Documento no de patente 6: Park KW *et al.*, Cell Metab. 8: 454-457, 2008

Documento no de patente 7: Flynn A, *et al.*, Cytotherapy 9: 717-726, 2007

Documento no de patente 8: Igura K *et al.*, Cytotherapy 6: 543-553, 2004

Sumario de la invención**45 Problemas para resolver por la invención**

Existen muy pocos citoblastos mesenquimáticos en la médula ósea, y la sangre del cordón y placenta derivan de un número muy limitado de sujetos, y por lo tanto están limitados como fuente de citoblastos mesenquimáticos autólogos. Si pueden aislarse citoblastos mesenquimáticos de la dermis, la piel puede proporcionar una fuente muy importante de citoblastos mesenquimáticos para uso en medicina regenerativa y medicina cosmética. Por tanto, es

un objeto de la presente invención proporcionar un método de aislamiento de citoblastos mesenquimáticos de la dermis.

Después de una investigación para demostrar la presencia de citoblastos mesenquimáticos en la dermis, así como para establecer un método para aislar eficazmente los citoblastos mesenquimáticos, el presente inventor ha confirmado realmente la presencia de células positivas de marcadores de citoblastos en la zona perivascular de la dermis (humana). Sin embargo, cuando el tejido cutáneo se trata con enzima con el fin de aislar las células, puede reducirse notablemente la expresión de los marcadores de citoblastos específicos. En el cultivo en suspensión de las células tratadas con enzima, el presente inventor ha encontrado que no solo se restaura la expresión de marcadores de los citoblastos, sino que las células mantienen una alta capacidad de diferenciación en comparación con células cultivadas por adhesión, y por lo tanto ha completado la presente invención.

Por tanto, la presente invención engloba las siguientes invenciones:

(1) Un método de aislamiento de citoblastos dérmicos que comprende:

someter a células separadas de la piel por tratamiento enzimático a cultivo en suspensión, y

aislar las células positivas de marcadores de citoblastos de las células cultivadas, en el que las células positivas de marcadores de citoblastos son las células positivas de CD34.

(2) El método según (1), en el que las células positivas de CD34 son adicionalmente positivas de NG2.

(3) El método según (1) o (2), en el que el cultivo en suspensión se lleva a cabo durante un periodo de tiempo suficiente para restaurar la expresión de marcadores de citoblastos en las células.

Efectos de la invención

Sin desear ligarse a ninguna teoría, se cree que los citoblastos dérmicos aparecen en la zona de la microvasculatura como población de células de tipo pericito, y que se activan en el momento de lesión cutánea y se diferencian en fibroblastos y miofibroblastos, contribuyendo así a la regeneración y restauración cutáneas. También se espera que los citoblastos se consuman debido al envejecimiento y estimulación cutánea, lo que da como resultado no solo la reducción de la función cutánea, sino la reducción de la capacidad regenerativa cutánea y la inestabilidad de los vasos sanguíneos, causando así el envejecimiento de la piel.

De acuerdo con el método de la presente invención, pueden aislarse fácilmente citoblastos dérmicos. Los citoblastos dérmicos obtenidos mediante la presente invención se espera que contribuyan a la elucidación del mecanismo de homeostasia y envejecimiento cutáneos y que se usen en medicina regenerativa.

Breve explicación de los dibujos

Fig. 1

La Fig. 1 muestra una microfotografía de células de tipo fibroblasto obtenidas mediante el cultivo de células altamente adhesivas entre células aisladas de dermis humana según el método de la presente invención en un medio para citoblastos mesenquimáticos.

Fig. 2

La Fig. 2 muestra colonias formadas por las células de tipo fibroblasto de la Fig. 1.

Fig. 3

La Fig. 3 muestra que las células de tipo fibroblasto pueden diferenciarse en adipocitos, osteocitos y condrocitos.

Fig. 4

La Fig. 4 representa una tinción histoquímica de una zona de vaso sanguíneo de la dermis teñida usando los marcadores de citoblastos CD34 y NG2, así como el agente de tinción nuclear Hoechst 33258.

Fig. 5

La Fig. 5 representa una microfotografía que muestra la capacidad formadora de colonias de una fracción celular obtenida mediante clasificación de células positivas de CD34 derivadas de dermis humana.

Fig. 6

La Fig. 6 representa una microfotografía que muestra que las células positivas de CD34 derivadas de dermis humana son citoblastos mesenquimáticos dérmicos que se diferenciarán en grasa y hueso.

Fig. 7

La Fig. 7 representa una gráfica que muestra la relación de expresión génica de los marcadores de citoblastos mesenquimáticos NANOG, SDF-1 α y HGF en los citoblastos dérmicos obtenidos según el método de la presente invención, en que la relación de expresión era una comparación con la cantidad expresada por los citoblastos obtenidos mediante el cultivo por adhesión.

Modo de llevar a cabo la invención

La presente invención proporciona un método de aislamiento de citoblastos dérmicos que comprende:

someter a células separadas de la piel por tratamiento enzimático a cultivo en suspensión, y

aislar las células positivas de marcadores de citoblastos de las células cultivadas, en el que las células positivas de marcadores de citoblastos son células positivas de CD34.

Las células derivadas de piel anteriores pueden separarse, pero sin limitación, según un método de aislamiento de citoblastos mesenquimáticos de la médula ósea. Por ejemplo, con tejido cutáneo tratado con enzima, se separan las células dérmicas del tejido cutáneo. El tratamiento enzimático puede llevarse a cabo usando una enzima proteolítica común tal como tripsina y colagenasa. El tejido cutáneo para usar puede ser, pero sin limitación, aquel derivado de un mamífero, preferiblemente un ser humano.

En células que recibieron dicho tratamiento enzimático, pueden reducirse la expresión de un marcador de citoblastos específico. Como se usa en la presente memoria, el término "un marcador de citoblastos" significa un marcador útil para aislar citoblastos dérmicos, cuya expresión se reduce mediante el tratamiento enzimático para separar las células de un tejido, tal como un antígeno de superficie celular CD34. Aunque el antígeno de superficie celular CD34, conocido como marcador de citoblastos hematopoyético, se ha confirmado por el presente inventor que se expresa en las zonas de vaso sanguíneo de la dermis, como se describe a continuación, la cantidad de CD34 expresada en las células inmediatamente después del tratamiento enzimático se reduce enormemente. Por tanto, incluso si las células derivadas de piel obtenidas mediante el tratamiento enzimático se sometían a citometría de flujo, las células positivas de marcador de citoblastos no podían separarse suficientemente. También la expresión de un marcador de citoblastos en las células tratadas con enzima puede reducirse notablemente incluso cuando las células se someten a un cultivo por adhesión, que es un método de cultivo común de citoblastos mesenquimáticos. Sin embargo, se encontró que cuando las células obtenidas mediante el tratamiento enzimático de un tejido cutáneo se sometían a un cultivo en suspensión durante un cierto periodo de tiempo, podía restaurarse la expresión de un marcador de citoblastos. Más sorprendentemente, los citoblastos dérmicos aislados mediante un cultivo en suspensión exhiben una mayor capacidad de diferenciación que los obtenidos mediante un cultivo por adhesión.

El cultivo en suspensión anterior puede llevarse a cabo durante un periodo de tiempo suficiente para restaurar la expresión reducida de un marcador de citoblasto, por ejemplo durante 4 horas, y si es necesario durante unos pocos días, tal como durante 5 días. Desde el punto de vista de la modificación postraduccional de un marcador de citoblastos con una cadena de azúcar, etc., el cultivo en suspensión puede llevarse a cabo preferiblemente durante 6 horas. Para el cultivo en suspensión, puede usarse un medio para uso en el cultivo de citoblastos mesenquimáticos. Si está contenido suero en el medio de cultivo usado, puede surgir adhesión a la superficie del recipiente de cultivo debido a un factor de adhesión en el suero, y por tanto puede preferirse el uso de un medio exento de suero. Para evitar la adhesión de células entre sí, puede añadirse metilcelulosa al medio de cultivo. El medio de cultivo puede usarse en un recipiente para cultivo en suspensión.

Las células positivas de marcador de citoblastos pueden aislarse usando un citómetro de flujo tal como un clasificador celular. Como clasificador celular, por ejemplo, puede usarse el sistema de perlas MACS™. El término "células positivas de marcador de citoblastos" significa las células que expresan un factor ampliamente conocido como un marcador común para citoblastos somáticos, tal como CD34, CD44, CD105, CD133, CD146, c-kit, p75NTR, integrina $\alpha 6$ e integrina $\beta 1$. En la presente invención, las células positivas de marcador de citoblastos son células positivas de CD34. También usando NG2, que es un marcador de pericitos que aparece en el perímetro de las células endoteliales vasculares, pueden aislarse más precisamente los citoblastos dérmicos. Por tanto, las células positivas de marcador de citoblastos aisladas en la presente invención pueden ser preferiblemente células doblemente positivas de CD34/NG2.

Las células positivas de marcador de citoblastos pueden someterse a cultivo en placa en un medio de cultivo para citoblastos mesenquimáticos. Al seleccionar y cultivar células altamente adhesivas entre las células, pueden obtenerse citoblastos dérmicos que crecerán en colonias. Los citoblastos dérmicos así obtenidos pueden diferenciarse en diversas células tales como osteocitos y adipocitos.

Ejemplos

A continuación, se explicará la presente invención con detalles adicionales con referencia a los ejemplos. Debería observarse que la presente invención no está limitada a ellos.

Método experimental

Separación de células de tejido cutáneo humano

5 Después de retirar con un escalpelo bajo un microscopio estereoscópico la sección de sebo de un tejido cutáneo humano en medio DMEM (Invitrogen) suplementado con 10 % de suero fetal bovino, se troceó el tejido cutáneo con tijeras para autopsia hasta pequeñas secciones de tejido de 1-2 mm². Se dispersaron entonces las secciones de tejido obtenidas en 10 ml de medio DMEM que contenía 0,1 % de tripsina y 0,2 % de colagenasa en un tubo de 50 ml, y se digirió enzimáticamente el tejido cutáneo usando un incubador agitado a 37 °C durante 3 horas. Al final de la digestión enzimática, se añadieron 30 ml de medio DMEM y se dispersaron las células por pipeteado. Después de centrifugar, se resuspendieron las células en medio DMEM y se contaron como células derivadas de tejido humano.

10 Cultivo primario de células derivadas de tejido humano

15 Después de suspender las células derivadas de piel separadas de la piel humana en 5 ml de medio MesenPro (Invitrogen), un medio de cultivo para citoblastos mesenquimáticos, se sembraron en un matraz de cultivo T-25 no recubierto (Falcon) y se cultivaron durante una noche en un incubador de CO₂. Se aspiró entonces el líquido de cultivo, dejando solo las células adheridas, y se añadieron 5 ml a las mismas de medio MesenPro reciente para continuar el cultivo. Cambiando el medio cada tres días, se continuó el cultivo, y cuando la densidad celular alcanzó la confluencia, se recogieron las células y se usaron las células obtenidas como células derivadas de dermis humana.

Clasificación de células derivadas de dermis humana usando perlas magnéticas

20 Después de suspender las células derivadas de tejido humano en 10 ml de medio de cultivo en suspensión (DMEM/F-12 (3:1) (Invitrogen), FGF 2 40 ng/ml (Sigma) / EGF 20 ng/ml (R & D Systems) / B27 (Invitrogen), un agente antimicrobiano (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), se sembraron en un matraz de cultivo T-25 no recubierto (Falcon) y se cultivaron en suspensión en un incubador de CO₂ durante 5 días. Se clasificaron entonces las células usando el kit CD34 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec). Las condiciones operativas fueron como se describe en el protocolo proporcionado por Miltenyi Biotec.

25 En primer lugar, se dispersó físicamente la masa celular de las células derivadas de piel humana cultivadas en suspensión usando una pipeta Pasteur con la punta redondeada, y se pasó entonces la suspensión celular a través de un colador (Falcon) con un tamaño de orificio de 40 µm. A continuación, después de lavar una vez con tampón MACS enfriado con hielo (PBS que contiene un 0,5 % de BSA y EDTA 2 mM, pH 7,2), se contaron las células y se resuspendieron un millón de células en 300 µl de tampón MACS. Posteriormente, se añadieron 100 µl de reactivo de bloqueo FcR y se mezcló, se añadieron adicionalmente 100 µl de microperlas CD34, se mezclaron bien de nuevo y se incubaron en una nevera durante 30 minutos. Después de lavar con 5 ml de tampón MACS, se recuperaron las células por centrifugación y se resuspendieron entonces en 500 µl de tampón MACS. Se insertó una columna de EM en el campo magnético del separador MACS, se lavó con 500 µl de tampón MACS y se aplicó entonces la suspensión celular anterior a la columna. Se lavó la columna 3 veces con 500 µl de tampón MACS y se usaron las células recuperadas de la misma como células derivadas de piel negativas de CD34. Se retiró entonces la columna del campo magnético y se dispuso en un tubo para recuperación. Se añadió 1 ml de tampón MACS a la columna, se extruyó de la parte superior de la columna usando un émbolo adjunto y se usaron las células recuperadas como células derivadas de piel positivas de CD34. Se cultivaron las células derivadas de piel positivas o negativas de CD34 respectivas en medio MesePro y se usaron las células obtenidas como células derivadas de dermis positivas de CD34 o células derivadas de dermis negativas de CD34.

Ensayo de formación de colonias

45 Después de suspender las células derivadas de dermis en medio MesenPro, se sembraron en una placa Petri de 6 o 10 cm a una baja concentración, y se cultivaron en un incubador de CO₂ durante 2 semanas. Después de completar el cultivo, se tiñeron con tinte Giemsa para contar las colonias formadas. Se llevó a cabo la tinción Giemsa como sigue. Se fijaron las células en metanol y se secaron al aire ligeramente. Se vertió entonces un tinte Giemsa (Nacalai Tesque Inc.) diluida 5 veces con agua del grifo en la placa Petri para teñir, y finalmente se lavó con agua del grifo corriente durante un periodo de tiempo apropiado.

Subcultivo de células derivadas de dermis humana

50 Se llevó a cabo el subcultivo de células derivadas de dermis humana usando el medio MesenPro mediante siembra a una relación de 1000 células por cm². Se continuó el cultivo con cambio de medio cada 3 días, y cuando la densidad celular alcanzó la confluencia, se almacenaron las células congeladas y se subcultivaron.

Experimento de cultivo de diferenciación

55 Para las células derivadas de dermis humana derivadas de cada muestra que se subcultivó en medio MesenPro, se llevó a cabo el cultivo para la diferenciación de adipocitos, osteocitos y condrocitos usando el kit de identificación funcional de citoblastos mesenquimáticos humanos de R&D Systems. Se suspendieron las células derivadas de

dermis respectivas en medio α MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino y se sembraron 40.000 células en el caso de diferenciación de adipocitos, y 18.000 células en el caso de diferenciación de osteocitos, en un portaobjetos con cámaras de dos orificios recubierto con una solución de colágeno ácido (Koken). Se continuó entonces el cultivo reemplazando el medio de cultivo por medio α MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino cada 3 días.

Entonces, en el caso de diferenciación de adipocitos, cuando las células alcanzaron la confluencia se reemplazó el medio por un medio α MEM que contiene 10 % de suero fetal bovino al que se había añadido un aditivo para diferenciación de adipocitos contenido en el kit anterior, y se cultivaron durante 2 semanas. También en el caso de diferenciación de osteocitos, cuando las células alcanzaron subconfluencia, se reemplazó el medio por medio α MEM que contiene 10 % de suero fetal bovino al que se había añadido un aditivo para diferenciación de osteocitos contenido en el kit anterior, y se cultivaron durante 2 semanas. Para la diferenciación de condrocitos, se centrifugaron 250.000 células derivadas de dermis en un tubo de 15 ml y, después de lavar con 1 ml de DMEM/F-12 (Invitrogen), se reemplazó el medio por 0,5 ml de medio DMEM/F-12 al que se había añadido un aditivo para diferenciación de condrocitos contenido en el kit anterior, y se cultivaron las células durante 3 semanas mientras estaban en forma de masa

Tinción con aceite rojo O

Se fijaron en un tampón de paraformaldehído-fosfato al 4 % a temperatura ambiente durante 15 minutos las células derivadas de dermis, que se sometieron a un cultivo de diferenciación de grasa. Después de aclarar con agua destilada estéril, se trató con isopropanol al 60 % a temperatura ambiente durante 1 minuto y se hizo reaccionar entonces con el tinte aceite rojo O a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se trató con isopropanol al 60 % para tinción diferencial, y después de aclimatarse a agua destilada estéril, se examinó microscópicamente.

Tinción con Kassa

Se fijaron en un tampón de paraformaldehído-fosfato al 4 % a temperatura ambiente durante 15 minutos las células derivadas de dermis, que se sometieron a un cultivo de diferenciación de hueso. Después de aclarar con agua destilada estéril tres veces, se añadió una solución acuosa al 5 % de nitrato de plata preparada inmediatamente antes del uso. Se dejó reposar el portaobjetos con cámaras aproximadamente 10 cm separado de fondo de una lámpara fluorescente de 27 W, se cubrió el conjunto con una lámina de aluminio y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante una hora y media. Después de completar la reacción, se lavó con agua destilada estéril tres veces, se añadió a la misma una solución acuosa al 5 % de tiosulfato de sodio y se dejó reposar durante 2 minutos. Mediante lavado adicional tres veces con agua destilada estéril, se examinó microscópicamente.

Tinción del tejido cutáneo humano

Se embebió el tejido cutáneo humano en el compuesto OTC, reactivo de imbibición de tejido congelado (Sakura Finetek Japan) y se seccionó con un instrumento de preparación de secciones congeladas Cryostat (Leica), preparando secciones congeladas. Se fijaron a temperatura ambiente durante 15 minutos secciones congeladas secadas al aire a temperatura ambiente usando acetona fría enfriada a -20 °C durante 15 minutos. Entonces, después de lavar con TBS, se bloquearon con un reactivo de bloqueo exento de suero (DAKO) durante 30 minutos y se hicieron reaccionar a 4 °C durante una noche con un anticuerpo anti-CD34 humano (Becton Dickinson) y un anticuerpo de conejo anti-NG2 humano (Millipore), que se había diluido 100 veces con TBST que contenía 3 % de BSA. Después de lavar dos veces con TBST durante 15 minutos y una vez con TBS durante 15 minutos para un total de tres veces, se hicieron reaccionar con una IgG anti-conejo marcada con Alexa 488 y un anticuerpo secundario (Invitrogen) de IgG anti-ratón marcada con Alexa 594, que se había diluido 200 veces con TBST que contenía 3 % de BSA durante 1 hora. Después de lavar las secciones después de la reacción dos veces con TBST durante 15 minutos y una vez con TBS durante 15 minutos para un total de tres veces, se sometieron a tinción nuclear con Hoechst 33258 y se examinaron entonces usando un microscopio fluorescente confocal LSMS PASCAL (Zeiss).

Tinción celular

Después de lavar las células derivadas de dermis que se sometieron a diferenciación de adipocitos o diferenciación de osteocitos con PBS, se fijaron las células con PFA al 4 % durante 15 minutos. Después de lavar con TBS, se incubaron las células con una solución de TBS que contenía 0,1 % de Triton X100 durante 15 minutos para potenciar la permeabilidad de la membrana celular (permeabilización). En el caso de diferenciación de condrocitos, se prepararon secciones congeladas de la masa celular de células derivadas de dermis después del experimento de diferenciación, y se trataron entonces de manera similar al procedimiento anterior y se usaron en tinción. Entonces, después de bloquear con un reactivo de bloqueo exento de suero (DAKO) durante 30 minutos, se incubaron a 4 °C durante una noche con un anticuerpo anti-FABP-4 (para la detección de grasas), un anticuerpo anti-osteocalcina (para la detección de hueso) y un anticuerpo anti-agrecano (para la detección de cartílago), que se habían diluido 25 veces con TBST que contenía 3 % de BSA. Después de lavar dos veces con TBST durante 15 minutos y una vez con TBS durante 15 minutos para un total de tres veces, se hicieron reaccionar con un anticuerpo secundario marcado con Alexa 350 (o Alexa 448, Alexa 594) (Invitrogen) que se había diluido 200 veces con TBST que contenía

3 % de BSA durante 1 hora. Después de lavar dos veces con TBST durante 15 minutos y una vez con TBS durante 15 minutos para un total de tres veces, se montaron con un Vector Sheered (Vector) que contenía un reactivo antidifuminante y un cubreobjetos, y se examinaron entonces usando un microscopio fluorescente (Olympus).

PCR cuantitativa

5 Usando Isogen (Nippon Gene), se extrajo el ARN total de las células derivadas de dermis según el protocolo proporcionado. Se determinó la concentración de ARN total purificado usando el instrumento de cuantificación de ácido nucleico Nanodrop (Thermo Scientific). Para cada una de las células derivadas de dermis, usando una cantidad igual de ARN total con un cebador aleatorio (Invitrogen) y un Superscript III de transcriptasa inversa (Invitrogen), se sintetizó ADNc según el manual de Invitrogen Corporation. Usando un reactivo de reacción LighCycler FastStart DNA Master PLUS SYBR Green (Roche) y un instrumento de reacción LightCycler (Roche) con el ADNc sintetizado como molde, se llevó a cabo una PCR cuantitativa. Las condiciones de la composición fueron como se describen en el protocolo de Roche. Las condiciones de PCR comprendían una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, desnaturalización a 95 °C durante 10 segundos, reasociación a 60 °C durante 10 segundos y extensión a 72 °C durante 10 segundos. Las secuencias de los cebadores usados son como sigue:

15 G3PDH:

Cebador de codificación: 5' -GCACCGTCAAGGCTGAGAAC - 3' (SEQ ID NO: 1)

Cebador inverso: 5' -ATGGTGGTGAAGACGCCAGT - 3' (SEQ ID NO: 2)

HGF:

Cebador de codificación: 5' -GAGGGAAGGTGACTCTGAATGAG - 3' (SEQ ID NO 3)

20 Cebador inverso: 5' -AATACCAGGACGATTTGCAATGGCAC - 3' (SEQ ID NO 4)

NANOG:

Cebador de codificación: 5' -TGCTTATTCAGGACAGCCCT - 3' (SEQ ID NO: 5)

Cebador inverso: 5' -TCTGGTCTTCTGTTTCTTGACT - 3' (SEQ ID NO: 6)

SDF1a:

25 Cebador de codificación: 5' -TGSGCTACAGATGCCCATGC - 3' (SEQ ID NO: 7)

Cebador inverso: 5' -CCACTTTAGCTTCGGGTCAA - 3' (SEQ ID NO: 8)

Usando un software ligado a LightCycler, se determinó la cantidad expresada de cada gen. Se usó G3PDH como patrón interno, y en la cuantificación de cada gen, se usó este para corregir la cantidad de ADNc del grupo de control.

30 Resultados

Se separó con enzima el tejido cutáneo humano con retirada del sebo y se cultivaron las células adheridas durante 24 horas a la bandeja de cultivo no recubierta con medio MesenPro, un medio de cultivo para citoblastos mesenquimáticos. Como resultado, en el punto temporal de una semana después del inicio del cultivo, se observó la aparición de células de tipo fibroblasto como se muestra en la Fig. 1. Entonces, después de crecer estas células hasta confluencia, se sometieron a un ensayo de colonias y se formaron una multitud de colonias circulares (Fig. 2). También, cuando se subcultivaron dos veces para examinar la diferenciación de células de grasa, hueso y cartílago, se expresaron los marcadores de diferenciación respectivos en el punto temporal 2-3 semanas después del inicio del cultivo como se muestra en la Fig. 3, confirmando la diferenciación de grasa, hueso y cartílago. Los resultados anteriores revelaron que los citoblastos mesenquimáticos están presentes en la piel humana.

40 Entonces, se demostró la distribución de citoblastos mesenquimáticos en piel humana por tinción histológica. En primer lugar, se investigó la distribución de CD34, que es bien conocido como marcador de células precursoras y citoblastos tales como citoblastos hematopoyéticos, células endoteliales vasculares y citoblastos derivados de grasa, en el tejido dérmico humano. El resultado indicaba que CD34 estaba localizado en una zona vascular diferente que los fibroblastos esporádicamente presentes en las fibras de colágeno dérmico (datos no mostrados). Entonces, con doble tinción con el marcador de pericitos NG2 y el marcador de citoblastos CD34, realizada para diferenciar de las células endoteliales vasculares, se encontró que estaban presentes en la zona vascular células que son doblemente positivas del marcador de pericitos NG2 y del marcador de citoblastos CD34 (Fig. 4). Por tanto, era altamente probable que estas poblaciones celulares fueran citoblastos mesenquimáticos dérmicos.

Para demostrar que las células doblemente positivas de NG2/CD34 son citoblastos mesenquimáticos dérmicos o que pueden aislarse eficazmente citoblastos mesenquimáticos dérmicos usando estos marcadores, se sometieron las células a clasificación celular con estos marcadores y se investigó su capacidad de diferenciación. Se presentan los resultados con CD34. Cuando se separó un tejido cutáneo humano de un tamaño de 2 cm² por tratamiento en solución enzimática (medio DMEM que contenía 0,1 % de tripsina/0,2 % de colagenasa) a 37 °C durante 3 horas, se obtuvieron aproximadamente 100.000 células. Se sometieron las células a un cultivo en suspensión durante hasta 5 días, se recuperaron entonces por centrifugación y se separaron físicamente usando una pipeta Pasteur con la punta redondeada con llama. Se sometieron las células obtenidas (un millón) a clasificación celular usando el kit CD34 MicroBead (Miltenyi Biotec). Después de suspender las fracciones positivas o negativas de CD34 respectivas en medio MesePro, se sembraron en una placa Petri de 10 cm a una relación de 5.000 células por placa, y se cultivaron en un incubador de CO₂ durante 2 semanas. Cuando se examinaron las células bajo microscopio invertido en el punto temporal 2 semanas después de iniciar el cultivo, la fracción de células positivas de CD34 formaba una multitud de colonias propagativas, mientras que solo se observaron unas pocas colonias diferenciadas en la fracción de células negativas de CD34, y posteriormente las células no pudieron crecer tampoco (Fig. 5). Cuando se sometieron las células directamente después de la separación de tejido cutáneo a clasificación celular sin cultivo en suspensión, no se observaron colonias en la fracción celular positiva de CD34 tampoco. A continuación, cuando se subcultivó dos veces la fracción celular positiva de CD34 en medio MesenPro para investigar la capacidad de diferenciar en grasa y hueso, se diferenciaron en adipocitos positivos de aceite rojo O u osteocitos positivos de Kassa (Fig. 6). Se encontró que los citoblastos mesenquimáticos dérmicos obtenidos por clasificación celular mantienen una alta capacidad de diferenciación en comparación con los citoblastos mesenquimáticos dérmicos obtenidos mediante el método de adhesión (Tabla 1). Además, en los citoblastos mesenquimáticos dérmicos obtenidos mediante clasificación celular, la expresión de factores altamente expresados en citoblastos mesenquimáticos tales como NANOG, SDF-1 α y HGF era claramente mayor que en los citoblastos mesenquimáticos dérmicos obtenidos mediante el método de adhesión (Fig. 7).

Tabla 1: Capacidad de diferenciación de citoblastos mesenquimáticos dérmicos

| | Adipocitos | Osteocitos |
|-----------------------------|------------|------------|
| SK-MSC _s * | ++ | + |
| SK-MSC _s (CD34+) | +++ | +++ |

*SK-MSC_s: citoblastos mesenquimáticos dérmicos aislados después de cultivo por adhesión

SK-MSC_s (CD34): citoblastos mesenquimáticos dérmicos aislados mediante clasificación de perlas magnéticas CD34

***+++: 10.000 ≤ células diferenciadas, ++: 1.000 ≤ células diferenciadas < 10.000,

30 +: 100 ≤ células diferenciadas < 1.000, ±: 10 ≤ células diferenciadas <100,

-: células diferenciadas <10

Listado de secuencias

| | | | |
|----|-------|---|-----------|
| | <110> | SHISEIDO COMPANY, LTD | |
| 5 | <120> | Método para aislar citoblastos dérmicos | |
| | <130> | Y731-PCT | |
| | <150> | JP2009-213291 | |
| 10 | <151> | 15-09-2009 | |
| | <160> | 8 | |
| | <170> | PatentIn versión 3.1 | |
| 15 | <210> | 1 | |
| | <211> | 20 | |
| | <212> | ADN | |
| | <213> | Artificial | |
| 20 | <220> | | |
| | <223> | Cebador de codificación de G3PDH | |
| | <400> | 1 | |
| 25 | | gcaccgtcaa ggctgagaac | 20 |
| | <210> | 2 | |
| | <211> | 20 | |
| 30 | <212> | ADN | |
| | <213> | Artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador inverso de G3PDH | |
| 35 | <400> | 2 | |
| | | atggtggtga agacgccagt | 20 |
| 40 | <210> | 3 | |
| | <211> | 23 | |
| | <212> | ADN | |
| | <213> | Artificial | |
| 45 | <220> | | |
| | <223> | Cebador de codificación de HGF | |
| | <400> | 3 | |
| 50 | | gaggggaaggt gactctgaat gag | 23 |
| | <210> | 4 | |
| | <211> | 26 | |
| | <212> | ADN | |
| 55 | <213> | Artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador inverso de HGF | |
| 60 | <400> | 4 | |
| | | aataccagga cgatttggaa tggcac | 26 |
| | <210> | 5 | |
| 65 | <211> | 20 | |
| | <212> | ADN | |

ES 2 523 998 T3

<213> Artificial
<220>
<223> Cebador de codificación de NANOG
5 <400> 5
tgcttattca ggacagccct 20
10 <210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Cebador inverso de NANOG
<400> 6
20 **tctqgtcttc tqtttttga ct** 22
<210> 7
<211> 20
<212> ADN
25 <213> Artificial
<220>
<223> Cebador de codificación de SDF1a
30 <400> 7
tgsgctacag atgcccattgc 20
<210> 8
35 <211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
40 <223> Cebador inverso de SDF1a
<400> 8
ccacttttagc ttcgggtcaa 20
45

REIVINDICACIONES

1. Un método de aislamiento de citoblastos dérmicos que comprende:

someter a células separadas de la piel por tratamiento enzimático a un cultivo en suspensión; y

5 aislar las células positivas de marcadores de citoblastos de las células cultivadas, siendo las células positivas de marcadores de citoblastos las células positivas de CD34.

2. El método según la reivindicación 1, en el que las células positivas de CD34 son adicionalmente positivas de NG2.

3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que se lleva a cabo el cultivo en suspensión durante un periodo de tiempo suficiente para restaurar la expresión de los marcadores de citoblastos en las células.

10

Fig.1

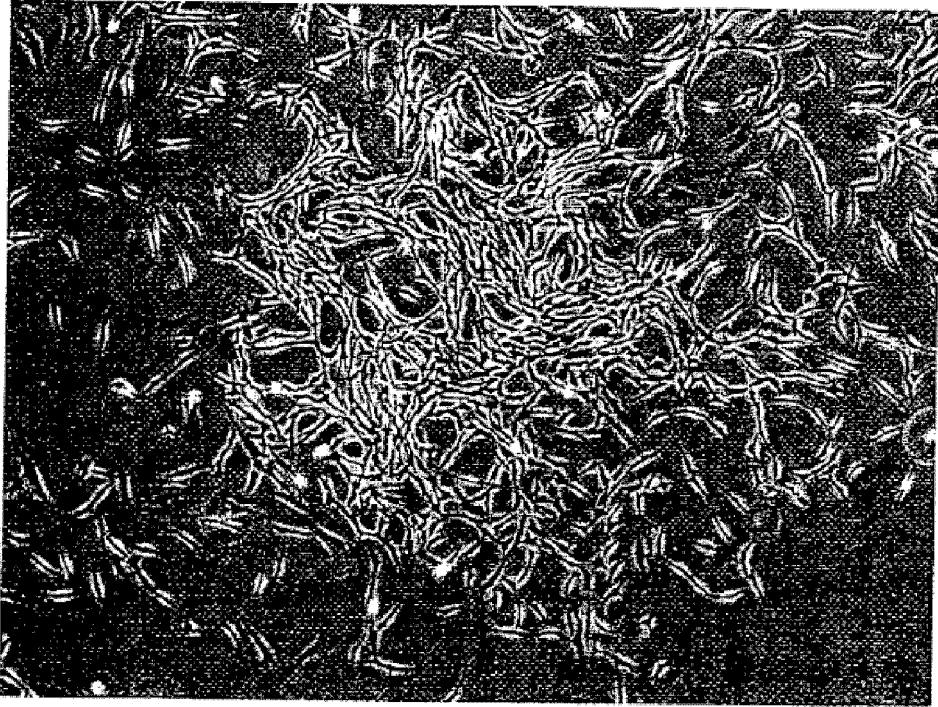


Fig.2

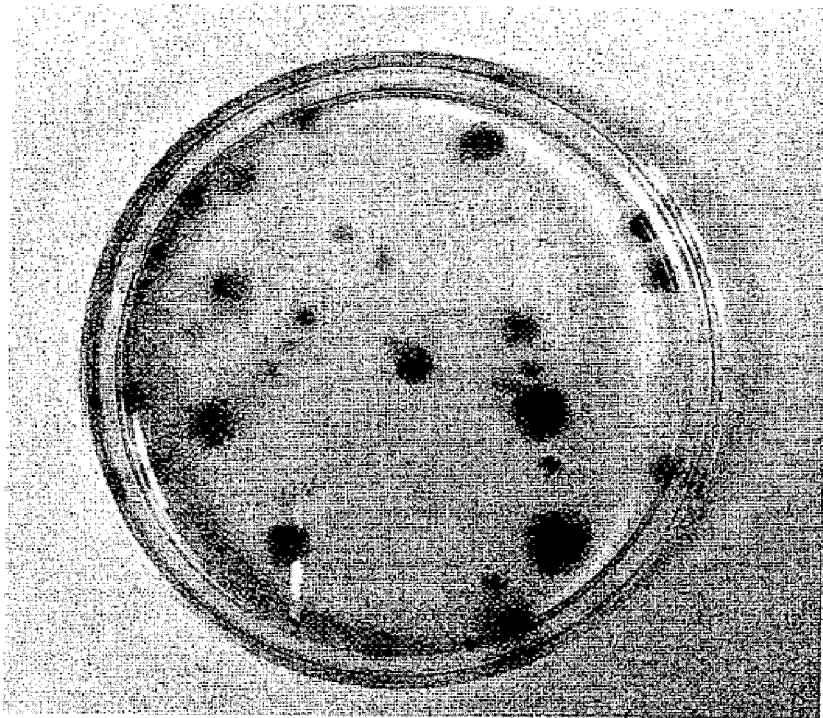


Fig.3

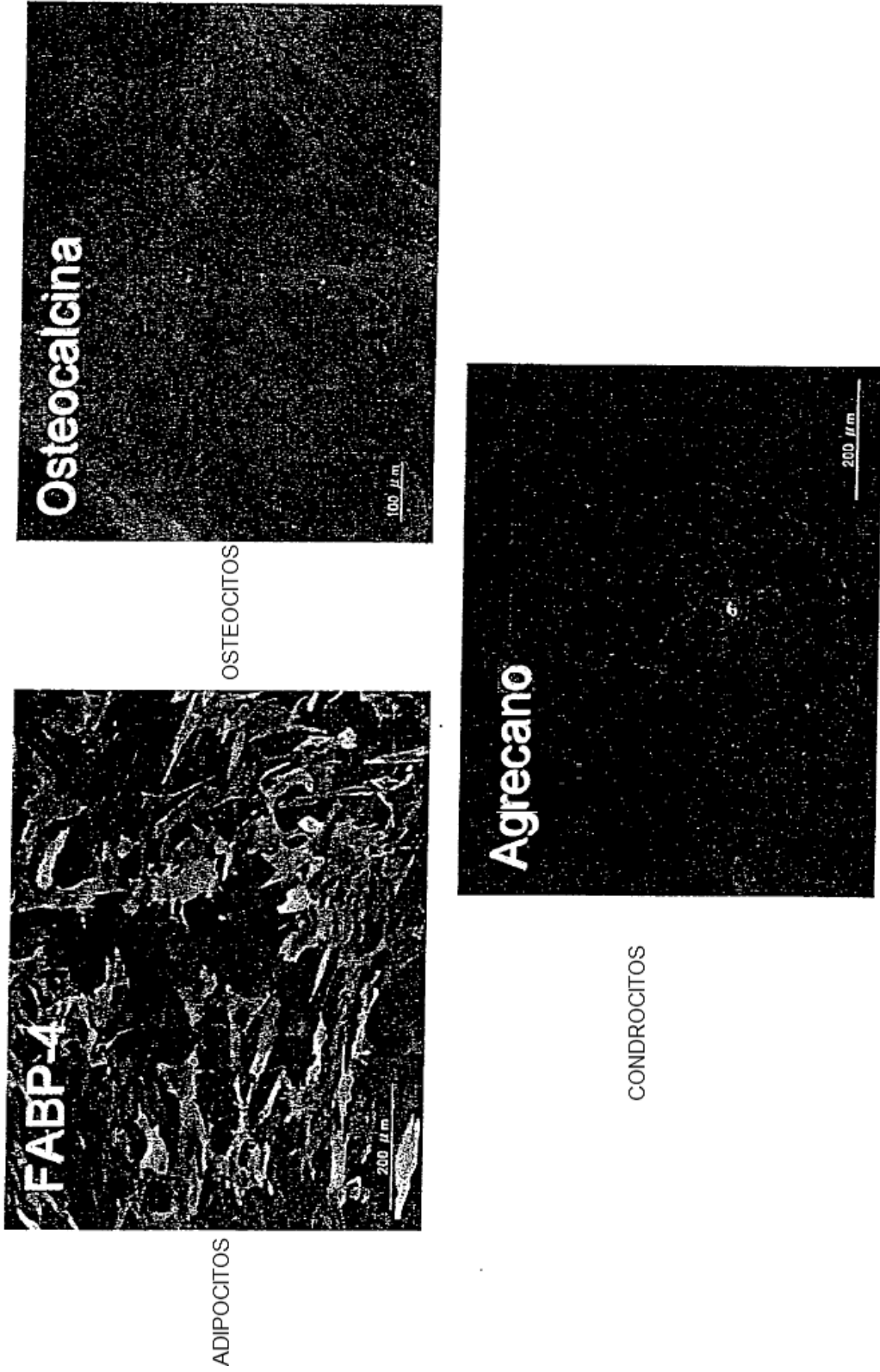


Fig.4

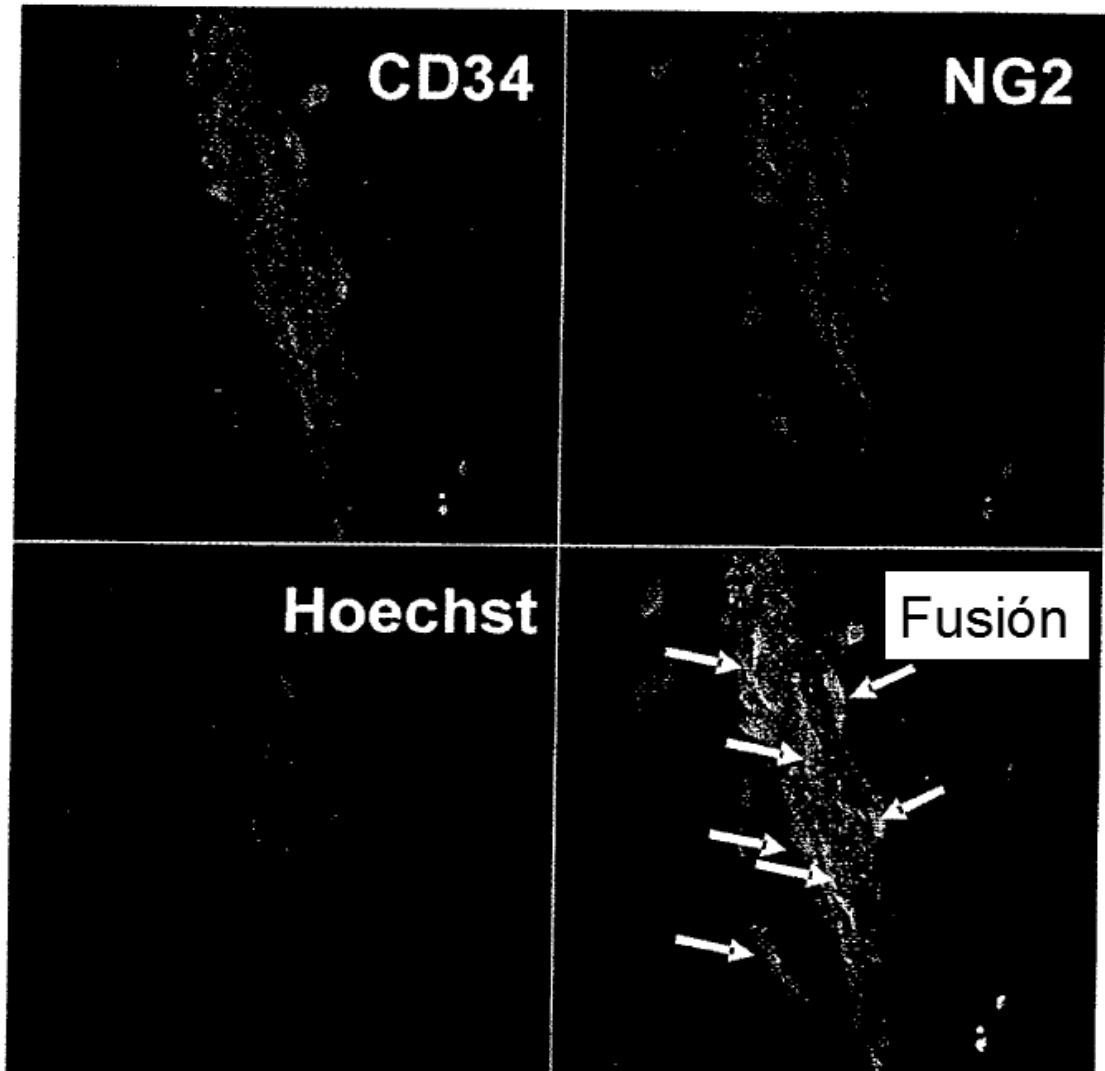
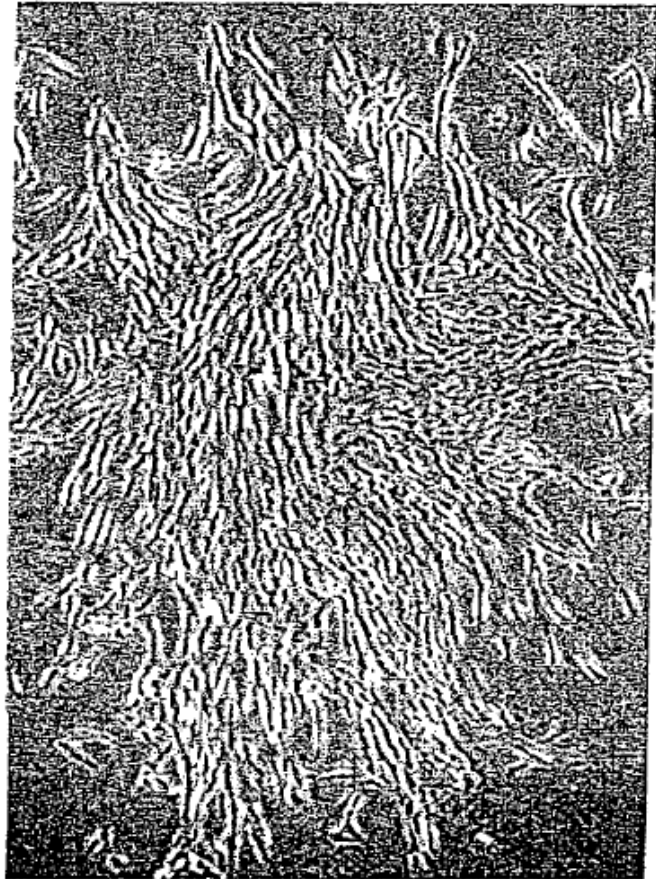


Fig.5

FRACCIÓN CELULAR POSITIVA DE CD34



FRACCIÓN CELULAR NEGATIVA DE CD34

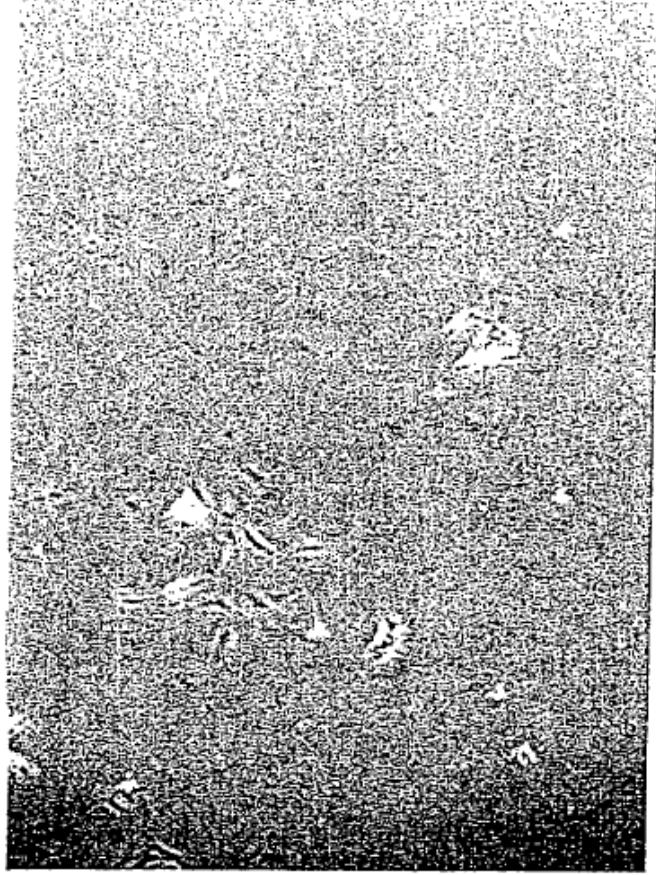
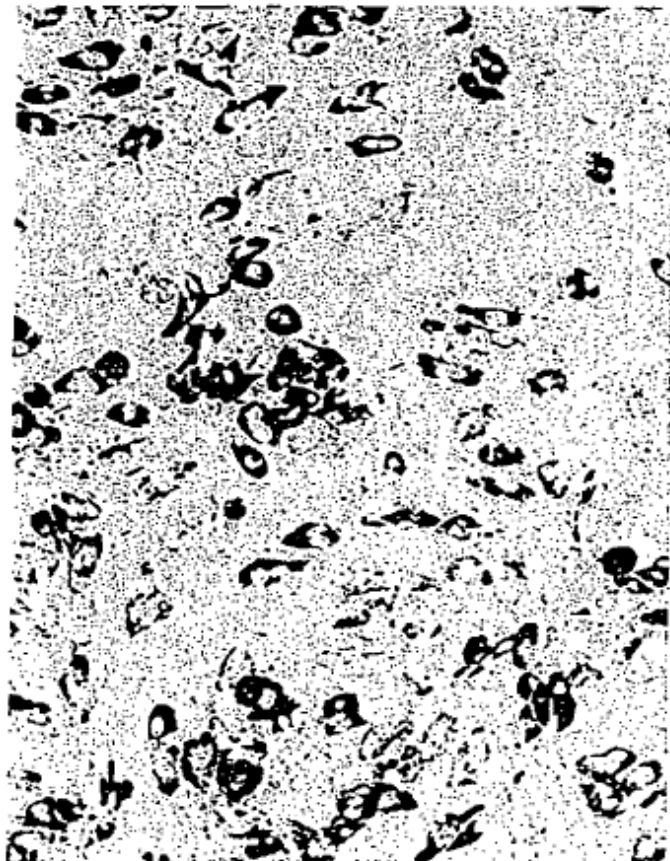


Fig.6

DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS



DIFERENCIACIÓN DE OSTEOCITOS

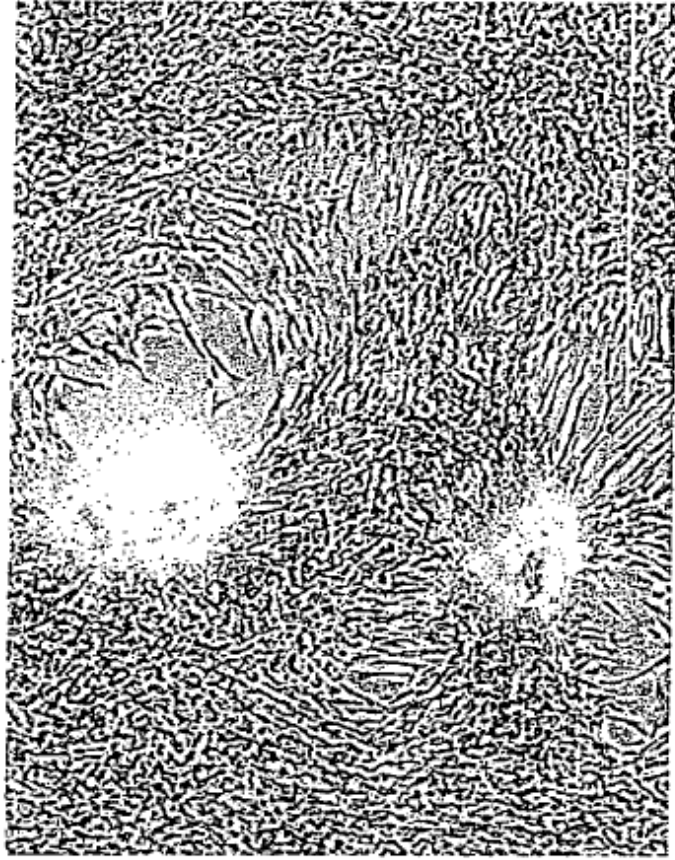


Fig.7

