

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 041**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

A61L 27/00 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2012 PCT/JP2012/054055**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2012 WO12115079**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2012 E 12749896 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2679674**

54 Título: **Método de preparación de germen de folículo piloso regenerado para trasplante en el que se controla el color del pelo**

30 Prioridad:

24.02.2011 JP 2011038777

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

11.10.2019

73 Titular/es:

**ORGAN TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
5-1-4, Toranomon, Minato-ku
Tokyo 105-0001, JP**

72 Inventor/es:

**TOYOSHIMA, KOH-EI y
TSUJI, TAKASHI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 727 041 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 preparación de germen de folículo piloso regenerado para trasplante en el que se controla el color del pelo

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir un germen de folículo piloso (primordio) regenerativo (obtenido mediante bioingeniería) para trasplante en el que se controla el color del pelo. También se describe una composición que incluye el germen de folículo piloso regenerativo para trasplante, y un método para trasplantar el germen de folículo piloso regenerativo para trasplante.

10

Técnica anterior

La medicina regenerativa, en la que una parte del cuerpo u órgano que se ha vuelto disfuncional debido a diversas enfermedades o lesiones por traumatismo se reemplaza por una parte del cuerpo u órgano regenerado, se muestra prometedora como técnica médica de próxima generación para complementar el trasplante médico (bibliografía no de patente 1). En pasadas investigaciones de la medicina regenerativa, se han hecho avances en la terapia de trasplante de células madre en la que se trasplantan células madre o células precursoras en un tejido lesionado o en un órgano parcialmente disfuncional para restablecer su función.

15

20

En la regeneración de tejido bidimensional que consiste en un solo tipo de células tales como células epiteliales de la piel o la córnea, células del músculo cardíaco, una tecnología de regeneración tisular en la que las células se organizan cultivando las células en forma de lámina usando tecnología de lámina celular está cerca de su aplicación práctica. En ella, ahora es posible regenerar un tejido cutáneo funcional estratificando fibroblastos, que son células mesenquimatosas, y células epidérmicas de la piel para reproducir artificialmente una estructura en capas apropiada histológicamente, y esta técnica se ha aplicado clínicamente en el tratamiento de quemaduras graves.

25

Mientras, se sabe que en un órgano, múltiples tipos de células funcionales adoptan una disposición tridimensional para expresar una función única. Casi todos los órganos se generan mediante interacciones entre células epiteliales y células mesenquimatosas durante el periodo fetal, y presentan morfología y funciones de órgano únicas. En las técnicas de la medicina regenerativa actual, es difícil disponer múltiples tipos de células de forma tridimensional, y todavía tiene que desarrollarse una construcción de órgano regenerativo que pueda funcionar inmediatamente *ex vivo*.

30

35

Recientemente, se ha llevado a cabo investigación con el objetivo de la regeneración de órganos regenerando un germen de órgano y reproduciendo su proceso de desarrollo para apéndices ectodérmicos tales como los dientes y las glándulas salivares y apéndices cutáneos tales como los folículos pilosos. Estos órganos no están relacionados directamente con el mantenimiento de la vida, pero se sabe que adolecen de pérdida o disfunción de órganos. Como ejemplo, puede mencionarse la pérdida de dientes debido a caries dental, lesión e hipoplasia de germen dentario, trastorno de secreción salivar asociado con la edad y pérdida de pelo debido a calvicie de patrón masculino y displasia folicular del pelo. Estos tipos de pérdida o disfunción de órganos tienen un gran impacto sobre la QOL (calidad de vida), y por tanto se han puesto altas expectativas en el restablecimiento funcional mediante la regeneración de órganos.

40

45

En general, en mamíferos y aves, los apéndices cutáneos ectodérmicos tales como el pelo, la piel, las plumas y las uñas son ubicuos en la piel y tienen funciones específicas de especie tales como supervivencia y reproducción. En mamíferos, el pelo funciona para mantener el calor corporal y protegerse de lesiones y rayos ultravioleta. Además, en mamíferos superiores tales como los primates, el pelo produce colores y patrones característicos sobre la superficie corporal, y se cree que esto es útil en el atractivo de rango y fertilidad dentro de una población reproductora. El pelo también produce diferencias en la calidad del pelo tales como el grosor, la dureza y el color según su área o función sobre la superficie corporal, y presenta un valor estético y funcional cuando existe en gran número en una zona específica. En particular en los seres humanos, el color y la calidad del pelo de la cabeza posee importancia social, y se cree que los cambios en el mismo debido al envejecimiento o a enfermedad tienen un gran impacto sobre la QOL del individuo.

50

55

Con el fin de establecer técnicas médicas de regeneración de folículo piloso suficientes para la aplicación clínica, es necesario el crecimiento y el alargamiento del pelo en que el folículo piloso regenerativo tiene una estructura tisular normal y tallo del pelo es adecuado para el sitio de trasplante. Tales apéndices ectodérmicos, incluyendo los apéndices cutáneos tales como el pelo, se generan normalmente mediante interacciones entre células epiteliales y mesenquimatosas durante el periodo fetal. Un folículo piloso, que es un tipo de apéndice ectodérmico, repite crecimiento y regresión (el ciclo piloso) a lo largo de la vida de un individuo. Se sabe que la regeneración de un bulbo piloso durante el periodo de crecimiento está inducida por un mecanismo molecular similar al de la fase emergente del órgano de folículo piloso. Además, se cree que la regeneración de un bulbo piloso durante tal ciclo piloso está inducida por células de papila pilosa, que son células mesenquimatosas. Dicho de otro modo, en el periodo de crecimiento, las células de papila pilosa, que son células mesenquimatosas, inducen la diferenciación de

60

65

las células madre epiteliales de folículo piloso para regenerar un bulbo piloso. Además, puesto que existen nichos de células madre derivadas de la cresta neural en la región de protuberancia y la región por debajo de la región de protuberancia, se cree que los folículos pilosos mantienen múltiples nichos de células madre y funcionan como una población de células madre.

5 En el pasado, se han realizado intentos de regeneración de folículo piloso mediante la regeneración de la región variable del folículo piloso reemplazando las células mesenquimatosas (células de papila pilosa y células de vaina de raíz dérmica), la neogénesis del folículo piloso mediante células mesenquimatosas que tienen capacidad de inducción de folículo piloso, la reconstrucción del folículo piloso mediante células epiteliales/mesenquimatosas, y
10 similares. Además, recientemente los presentes inventores demostraron que un germen de folículo piloso regenerativo reconstruido a partir de células epiteliales de la región de protuberancia derivadas de vibrisa de ratón adulto y células cultivadas de papila pilosa derivadas de vibrisa de ratón adulto mediante el método de órgano-germen (por ejemplo, véase el documento de patente 1) emula el desarrollo normal y puede regenerar los folículos pilosos y el pelo. Sin embargo, cuando se regenera un folículo piloso usando un germen de folículo piloso regenerativo derivado de una vibrisa de ratón adulto, se ha dado el problema de que casi todos los pelos regenerados se convierten en pelos blancos.

Lista de referencias

20 Bibliografía de patente

Documento de patente 1: publicación internacional PCT n.º WO 2006/129672

Documento de patente 2: publicación internacional PCT n.º WO 2009/118283

25 Documento de patente 3: publicación internacional PCT n.º WO 2004/113514

Los documentos WO 2009/118283 y WO 2004/113514 describen métodos para producir papilas pilosas y usos de las mismas.

30 Bibliografía no de patente

Documento no de patente 1: Sharpe PT, Young CS. Test-tube teeth. Sc. Am. 293, 34-41, 2005

35 Sumario de la invención

Problema técnico

40 Tal como se describió anteriormente, todavía no hay ningún informe hasta la fecha en cuanto a una técnica de regeneración de folículo piloso suficiente para aplicación clínica, y en particular una técnica de regeneración de folículo piloso en la que se controle el color del pelo. En particular, cuando se aplican técnicas de regeneración de pelo en seres humanos, es necesario obtener pelo regenerativo en el que se controle el color del pelo a partir de un tejido derivado de adulto, y por tanto se desea enormemente un método para controlar el color del pelo de un pelo regenerativo derivado de tejido de adulto.

45 Solución al problema

50 Con el fin de resolver el problema descrito anteriormente, los presentes inventores se centraron en primer lugar en la distribución y las regiones de distribución de melanoblastos, que son las células responsables del color del pelo, y analizaron la función de las células que existen en cada región de distribución. Los presentes inventores descubrieron de ese modo un método para producir un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante en el que el color del pelo se controla aplicando la función de las células incluidas en las regiones de distribución de melanoblastos.

55 Concretamente, la presente invención es un método para producir un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante que puede formar de manera permanente pelo de color tras el trasplante que comprende: preparar una primera masa de células que comprende células mesenquimatosas, preparar una segunda masa de células que comprende células epiteliales, preparar una masa de células que comprende células madre pigmentarias que se prepara a partir de la región bajo la protuberancia o a partir de la base de la matriz del pelo de un folículo piloso o a
60 partir de una combinación de las mismas, y someter la masa de células que comprende células madre pigmentarias a un tratamiento de unificación, unir la masa de células que comprende las células madre pigmentarias a al menos una de entre la primera masa de células y la segunda masa de células, y poner en contacto estrechamente después la primera masa de células y la segunda masa de células, habiéndose unido al menos una de las cuales a la masa de células que comprende las células madre pigmentarias, y cultivarlas dentro de un soporte.

65 En el presente documento, en una realización del método para producir un germen de folículo piloso regenerativo

para trasplante de la presente invención, la primera masa de células consiste sustancialmente en células mesenquimatosas.

5 Además, en una realización del método para producir un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante de la presente invención, la segunda masa de células consiste sustancialmente en células epiteliales.

10 Tal como se mencionó anteriormente, el método para producir un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante de la presente invención comprende una etapa en la que la masa de células que comprende las células madre pigmentarias se somete a un tratamiento de unificación.

15 Además, en una realización del método para producir un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante de la presente invención, las células madre pigmentarias son melanoblastos derivados de la región bajo la protuberancia o células precursoras de melanocitos derivadas de la base de la matriz del pelo.

20 Además, en una realización del método para producir un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante de la presente invención, cuando se unen las masas de células entre sí, la razón del número de células en la primera masa de células o el número de células en la segunda masa de células en relación con el número de células en la masa de células que comprende las células madre pigmentarias está dentro de un intervalo de 0,1:1 a 100:1.

25 Además, en una realización del método para producir un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante de la presente invención, las células mesenquimatosas son células de papila pilosa o células de vaina de raíz dérmica.

30 Además, en una realización del método para producir un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante de la presente invención, las células epiteliales son células epiteliales de la región de protuberancia o células epiteliales basales de la matriz del pelo.

35 Además, en una realización del método para producir un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante de la presente invención, las células mesenquimatosas o las células epiteliales se derivan de un folículo piloso de adulto.

40 Además, en una realización del método para producir un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante de la presente invención, el método comprende además insertar una guía en el germen de folículo piloso regenerativo.

45 El folículo piloso regenerativo que se regenera tras trasplantar el germen de folículo piloso regenerativo puede comprender un nicho de células madre de melanoblastos.

50 Tal como se mencionó anteriormente, el folículo piloso regenerativo que se regenera tras trasplantar el germen de folículo piloso regenerativo puede formar de manera permanente pelo de color.

55 También se describe una composición que comprende un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante en el que se controla el color del pelo que se produce mediante el método descrito anteriormente para producir un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante.

60 Además se describe un método para trasplantar un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante en el que se controla el color del pelo que comprende: trasplantar un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante que se produce mediante el método descrito anteriormente para producir un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante en un sitio diana.

65 Una parte en el lado de células epiteliales del germen de folículo piloso regenerativo trasplantado y las células epiteliales de la diana pueden alargarse y conectar a lo largo de la guía manteniendo la guía en un estado en el que sobresale de un sitio de trasplante.

Efectos de la invención

Según la presente invención, puede producirse un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante en el que el pelo que crece primero tras el trasplante es pelo de color mediante el uso de células madre pigmentarias preparadas independientemente de las células epiteliales o células mesenquimatosas durante la producción del germen de folículo piloso regenerativo. Además, el germen de folículo piloso regenerativo para trasplante producido mediante la presente invención puede regenerar pelo que tiene, no solo el color del pelo, sino también un tallo del pelo normal.

60 Además, puede formarse un nicho de células madre de melanoblastos en un folículo piloso regenerativo que se regenera tras el trasplante de un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante producido mediante la presente invención. De ese modo, el nicho de células madre de melanoblastos en el folículo piloso puede mantener los melanoblastos y proporcionar melanocitos de manera apropiada, y por tanto puede formarse pelo de color a lo largo de un periodo de tiempo prolongado.

65

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una vista esquemática que ilustra la distribución de melanoblastos y células precursoras de melanocitos en un folículo piloso. Existe un nicho de melanoblastos en el que se distribuyen melanoblastos en una región bajo la protuberancia del folículo piloso, y las células precursoras de melanocitos se distribuyen en una base de la matriz del pelo. En la figura 1, DP indica una papila (dérmica) pilosa, y SG indica una glándula sebácea.

La figura 2 muestra fotografías capturadas por un microscopio estereoscópico que representan un sitio de trasplante en el que se ha regenerado un folículo piloso y ha crecido pelo tras el trasplante de un germen de folículo piloso regenerativo producido en las tres condiciones siguientes (figuras 2a a 2c). La figura 2a muestra un sitio de crecimiento de pelo tras trasplantar un germen de folículo piloso regenerativo producido a partir de células epiteliales de la región de protuberancia derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto y células de papila pilosa derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto (control). Además, la figura 2b muestra un sitio de crecimiento de pelo tras trasplantar un germen de folículo piloso regenerativo producido añadiendo adicionalmente células de la región bajo la protuberancia derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto a células epiteliales de la región de protuberancia derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto y células de papila pilosa derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto (segmento de adición bajo la protuberancia). La figura 2c muestra un sitio de crecimiento de pelo tras trasplantar un germen de folículo piloso regenerativo producido añadiendo adicionalmente células recogidas de una base de la matriz del pelo derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto a células epiteliales de la región de protuberancia derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto y células de papila pilosa derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto (segmento de adición de base de la matriz del pelo). Se obtuvo pelo blanco en el control (figura 2a), mientras que pudo obtenerse pelo negro en el segmento de adición bajo la protuberancia y el segmento de adición de base de la matriz del pelo (marca de flecha negra en la figura 2b y la figura 2c). La marca de flecha blanca en la figura 2b indica un pelo regenerativo blanco.

La figura 3 muestra los resultados tras hibridación *in situ* de dopacromo tautomerasa (Dct), que es un marcador de linaje de diferenciación de melanoblastos, en una vaina de raíz externa de la región bajo la protuberancia, que es una zona en la que existe un nicho de células madre de melanoblastos, de un folículo piloso natural o un folículo piloso que se regeneró mediante trasplante de un germen de folículo piloso regenerativo. Las imágenes en la figura 3 se capturaron con un microscopio fluorescente tras hibridación *in situ*. La figura 3A muestra una imagen de un folículo piloso natural que tiene pelo negro, la figura 3B muestra una imagen de un folículo piloso que tiene pelo blanco derivado de un germen de folículo piloso regenerativo producido a partir de células epiteliales de la región de protuberancia derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto y células de papila pilosa derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto, y la figura 3C muestra una imagen de un folículo piloso que tiene pelo negro derivado de un germen de folículo piloso regenerativo producido añadiendo células de la región bajo la protuberancia derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto (segmento de adición bajo la protuberancia) a células epiteliales de la región de protuberancia derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto y células de papila pilosa derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto. Las marcas de flecha en la figura 3 indican zonas de detección de dopacromo tautomerasa.

La figura 4 respectivamente ilustra la razón de pelo de color que crece en primer lugar tras el trasplante de un germen de folículo piloso regenerativo producido a partir de células epiteliales de la región de protuberancia derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto y células de papila pilosa derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto (control), un germen de folículo piloso regenerativo producido añadiendo adicionalmente células de la región bajo la protuberancia derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto a células epiteliales de la región de protuberancia derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto y células de papila pilosa derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto (segmento de adición bajo la protuberancia), y un germen de folículo piloso regenerativo producido añadiendo adicionalmente células recogidas de una base de la matriz del pelo derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto a células epiteliales de la región de protuberancia derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto y células de papila pilosa derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto (segmento de adición de base de la matriz del pelo).

La figura 5 muestra los resultados tras la observación bajo un microscopio electrónico de un tallo del pelo de un pelo crecido a partir de un folículo piloso que se regeneró mediante trasplante de un germen de folículo piloso regenerativo producido usando células epiteliales de la región de protuberancia derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto, células de papila pilosa derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto, y células recogidas de una base de la matriz del pelo derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto en la piel de un ratón receptor.

La figura 6 muestra fotografías capturadas por un microscopio estereoscópico que representan un sitio de trasplante en el que ha crecido pelo 36 días tras el trasplante y 306 días tras el trasplante de un germen de folículo piloso regenerativo producido en las dos condiciones siguientes. Las imágenes izquierda y central en la figura 6 muestran un sitio de crecimiento de pelo 36 días tras el trasplante y 306 días tras el trasplante de un germen de folículo piloso regenerativo producido añadiendo adicionalmente células recogidas de una base de la matriz del pelo derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto a células epiteliales de la región de protuberancia derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto y células de papila pilosa derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto (segmento de adición de base de la matriz del pelo). Además, la imagen derecha en la figura 6 muestra un sitio de crecimiento de pelo 306 días tras el trasplante de un germen de folículo piloso regenerativo producido a partir de células epiteliales de la región de protuberancia derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto y células de papila pilosa derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto (control).

Descripción de realizaciones

5 Una primera realización del método de producción según la presente invención es un método para producir un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante que puede formar de manera permanente pelo de color tras el trasplante que comprende: preparar una primera masa de células que comprende células mesenquimatosas, preparar una segunda masa de células que comprende células epiteliales, preparar una masa de células que comprende células madre pigmentarias que se prepara a partir de la región bajo la protuberancia o a partir de la base de la matriz del pelo de un folículo piloso o a partir de una combinación de las mismas, y someter la masa de células que comprende células madre pigmentarias a un tratamiento de unificación, unir la masa de células que comprende las células madre pigmentarias a al menos una de entre la primera masa de células y la segunda masa de células, y poner en contacto estrechamente después la primera masa de células y la segunda masa de células, habiéndose unido al menos una de las cuales a la masa de células que comprende las células madre pigmentarias, y cultivarlas dentro de un soporte.

15 En la presente memoria descriptiva, "células mesenquimatosas" indican células derivadas de un tejido mesenquimatoso y células obtenidas cultivando tales células derivadas de tejido mesenquimatoso, y "células epiteliales" indican células derivadas de un tejido epitelial y células obtenidas cultivando tales células derivadas de tejido epitelial.

20 Las células pigmentarias son células que se distribuyen dentro de la capa epidérmica y la capa dérmica de la piel y dentro de la capa epitelial de los folículos pilosos y producen melanina. La melanina producida por las células pigmentarias está implicada profundamente en el color del pelo. Además, se sabe que las células pigmentarias se diferencian a partir de células madre pigmentarias o células precursoras de células pigmentarias.

25 Además, en la presente memoria descriptiva, "células madre pigmentarias" indican células precursoras de melanocitos y melanoblastos (células madre pigmentarias) que se diferencian para dar células pigmentarias (melanocitos). Cuando se incluyen células madre pigmentarias, puede usarse un tipo de las células mencionadas anteriormente, y también puede usarse una mezcla de ambos tipos. Además, melanoblastos indican células madre en un estado indiferenciado que no tienen pigmento y pueden diferenciarse para dar melanocitos y células precursoras de melanocitos. Los melanoblastos se mantienen en un estado indiferenciado a lo largo de un periodo de tiempo prolongado en un nicho de células madre específico en un folículo piloso. Además, células precursoras de melanocitos indican células precursoras en un estado indiferenciado que no tienen pigmentos y que pueden diferenciarse para dar melanocitos. Además, las células pigmentarias (melanocitos) indican células diferenciadas de manera terminal que tienen pigmento.

35 Además, en la presente memoria descriptiva, "una masa de células que comprende células madre pigmentarias" incluye un tejido o región que comprende células madre pigmentarias tales como las células madre pigmentarias descritas anteriormente, células en un estado en el que tal tejido o región se ha aislado en unidades celulares mediante un tratamiento enzimático o tratamiento de unificación o similar, o un agregado celular obtenido mediante separación centrífuga o similar de tales células aisladas. Además, una masa de células que comprende células madre pigmentarias puede ser una masa de células que consiste sustancialmente en células madre pigmentarias.

40 Además, en la presente invención, una "región de protuberancia" indica una región constante del folículo piloso que está por debajo del sitio de unión de la glándula sebácea del folículo piloso y por encima del sitio de unión del músculo erector del pelo. En el caso de una vibrisa lateral de ratón o similar en la que no existen músculos erectores del pelo, existe un reborde anular en una zona que corresponde al sitio de unión del músculo erector del pelo. Un reborde anular es una estructura en forma de anillo que consiste en células mesenquimatosas derivadas de la cresta neural unidas al extremo más inferior de una región invariable del folículo piloso de una vibrisa lateral, y esta estructura es característica de las vibrisas laterales de los roedores. Por tanto, en la presente memoria descriptiva, la "región de protuberancia" en un folículo piloso de una vibrisa lateral o similar en la que no existen músculos erectores del pelo indica una región que está por debajo del sitio de unión de la glándula sebácea del folículo piloso y por encima del reborde anular. Una región constante (región invariable) indica una región en la que no hay cambios en la estructura tisular del folículo piloso tal como crecimiento o regresión asociado con el ciclo piloso del folículo piloso. La "región bajo la protuberancia" indica la parte de extremo más inferior de una región constante que es adyacente a la región por debajo de la región de protuberancia.

45 Además, en la presente invención, una "base de la matriz del pelo" indica una región que está situada por debajo de la línea de Auber en la matriz del pelo de un bulbo piloso, en la que no se distribuyen melanocitos que producen melanina.

50 En la presente memoria descriptiva, un "folículo piloso regenerativo" significa un germen de folículo piloso producido mediante un método que comprende: poner en contacto estrechamente una primera masa de células que comprende células mesenquimatosas y una segunda masa de células que comprende células epiteliales y cultivarlas dentro de un soporte.

60

La etapa para “poner en contacto estrechamente una primera masa de células que comprende células mesenquimatosas y una segunda masa de células que comprende células epiteliales y cultivarlas dentro de un soporte” se describe en, por ejemplo, documento de patente 1, solicitud de patente no examinada japonesa, primera publicación n.º 2008-29756, solicitud de patente no examinada japonesa, primera publicación n.º 2008-206500, solicitud de patente no examinada japonesa, primera publicación n.º 2008-200033, y solicitud de patente no examinada japonesa, primera publicación n.º 2008-29757.

Al menos una de la primera masa de células y la segunda masa de células se une a la masa de células que comprende las células madre pigmentarias. Posteriormente, esta masa de células se cultiva dentro de un soporte junto con la otra masa de células para producir un germen de folículo piloso regenerativo. En él, la masa de células que comprende las células madre pigmentarias pueden unirse a cualquiera de la primera masa de células y la segunda masa de células, o la masa de células que comprende las células madre pigmentarias puede unirse tanto a la primera masa de células como a la segunda masa de células.

Puesto que existen melanoblastos en la capa epitelial de un folículo piloso, cuando se usan melanoblastos como células madre pigmentarias, es preferible unir la masa de células que comprende melanoblastos a la masa de células que comprende células epiteliales porque puede mantenerse la función de las células madre.

En la presente memoria descriptiva, “unir la primera o la segunda masa de células y la masa de células que comprende células madre pigmentarias” incluye mezclar completa o parcialmente una masa de células con otra masa de células, y también incluye poner en contacto o adherir las superficies de las masas de células entre sí. Por tanto, la primera o la segunda masa de células que se han unido a la masa de células que comprende las células madre pigmentarias está en un estado en el que las células madre pigmentarias se han mezclado o incorporado en la masa de células.

Cuando se une la masa de células que comprende las células madre pigmentarias a al menos una de la primera masa de células y la segunda masa de células, la razón del número de células en la primera masa de células o el número de células en la segunda masa de células en relación con el número de células en la masa de células que comprende las células madre pigmentarias puede ajustarse de manera apropiada dependiendo de condiciones tales como las células que van a usarse. Sin embargo, por ejemplo, la razón se ajusta preferiblemente para que esté dentro de un intervalo de 0,1:1 a 100:1, más preferiblemente se ajusta para que esté dentro de un intervalo de 0,1:1 a 10:1, y se ajusta todavía más preferiblemente para que esté dentro de un intervalo de 0,5:1 a 2:1.

Sin embargo, la razón del número de células en la primera masa de células o el número de células en la segunda masa de células en relación con el número de células en la masa de células que comprende las células madre pigmentarias no se limita a los intervalos descritos anteriormente siempre que pueda controlarse el color del pelo del germen de folículo piloso regenerativo que se produce.

Cuando la masa de células que comprende las células madre pigmentarias se une tanto a la primera masa de células como a la segunda masa de células, la masa de células que comprende las células madre pigmentarias puede unirse de modo que se satisfagan los intervalos descritos anteriormente en relación con cada una de las masas de células primera y segunda.

Además, en este momento, también puede controlarse el tono del color del pelo ajustando la proporción del número de las células madre pigmentarias que se unen a la primera masa de células o la segunda masa de células.

Además, cuando se ponen en contacto estrechamente la primera masa de células y la segunda masa de células tras unir la masa de células que comprende las células madre pigmentarias y cultivarlas en un soporte, la razón del número de células en la masa de células que comprende células mesenquimatosas en relación con el número de células en la masa de células que comprende células epiteliales puede ajustarse de manera apropiada dependiendo de condiciones tales como las células que van a usarse. Sin embargo, por ejemplo, la razón se ajusta preferiblemente para que esté dentro de un intervalo de 0,1:1 a 3:1, y se ajusta más preferiblemente para que esté dentro de un intervalo de 0,3:1 a 1:1. Durante el cultivo, es preferible elevar la proporción del número de células epiteliales porque esto permite mejorar la tasa de crecimiento y la calidad del pelo del pelo regenerativo.

Además, cuando se incorporan células madre pigmentarias en una de la primera masa de células y la segunda masa de células, la otra masa de células puede consistir esencialmente solo en células mesenquimatosas o solo en células epiteliales. En la presente invención, la expresión “consiste sustancialmente solo en células mesenquimatosas” significa que la masa de células realiza una función idéntica a una masa de células que consiste solo en células mesenquimatosas. Preferiblemente indica un estado en el que la masa de células no incluye otra cosa más que células que son células mesenquimatosas en la medida de lo posible. Además, la masa de células puede incluir células de diferentes tipos siempre que sean células mesenquimatosas. Lo mismo se aplica a la expresión “consiste sustancialmente solo en células epiteliales”.

En el presente documento, una masa de células puede estar en un estado en el que las células se adhieren estrechamente o no se adhieren estrechamente, y puede ser un tejido, o un grupo de células que se ha sometido a

un tratamiento de unificación tras recogerse de un tejido, o un agregado celular preparado a partir de células aisladas. El uso de un tejido es ventajoso porque es fácil de obtener un órgano con una disposición y forma de células correcta, pero puede haber restricciones sobre la cantidad que puede obtenerse. También pueden usarse células cultivadas para preparar un agregado celular, y un agregado celular es relativamente fácil de obtener cuando se usan células cultivadas, lo que hace que las células cultivadas sean preferibles al menos desde este punto de vista. Cuando se inyectan las masas de células en un soporte y se ponen en contacto estrechamente y luego se cultivan con el fin de producir un germen de folículo piloso regenerativo, las masas de células son preferiblemente tejidos o agregados celulares en los que las células se adhieren estrechamente.

Como células madre pigmentarias usadas en la presente invención, es preferible usar células madre pigmentarias derivadas de un folículo piloso porque esto facilita la orientación hacia la regeneración del folículo piloso. Por ejemplo, cuando se usan melanoblastos como células madre pigmentarias, pueden usarse los melanoblastos que existen en la región bajo la protuberancia de un folículo piloso, y cuando se usan células precursoras de melanocitos como células madre pigmentarias, pueden usarse las células precursoras de melanocitos que existen en la base de la matriz del pelo de un folículo piloso.

Además, como células madre pigmentarias que se derivan de otro lugar diferente de un folículo piloso, pueden usarse células que se distribuyen en la capa epidérmica en la piel.

Al menos una de las células mesenquimatosas y las células epiteliales usadas en la presente invención se derivan preferiblemente de un folículo piloso (incluyendo un órgano, tejido, y células que constituyen un folículo piloso). De este modo, puede formarse fácilmente un órgano usando células que ya están orientadas hacia el folículo piloso. Además, con el fin de producir un folículo piloso de manera más fiable, lo más preferible tanto para las células mesenquimatosas como para las células epiteliales es que se deriven de un folículo piloso.

Dicho de otro modo, cuando se produce un germen de folículo piloso regenerativo, pueden usarse células epiteliales o células mesenquimatosas derivadas de folículo piloso. Más específicamente, pueden usarse células de papila pilosa, células de vaina de raíz dérmica, células mesenquimatosas cutáneas emergentes, y similares como células mesenquimatosas, y pueden usarse células de capa más exterior de la vaina de raíz externa de la región de protuberancia, células epiteliales basales de la matriz del pelo, y similares como células epiteliales. Además, también pueden usarse células mesenquimatosas del folículo piloso inducidas a partir de una célula iPS o una célula ES como células mesenquimatosas, y también pueden usarse células epiteliales del folículo piloso inducidas a partir de una célula iPS o una célula ES como células epiteliales.

Además, un folículo piloso para recoger células mesenquimatosas, células epiteliales y células madre pigmentarias está preferiblemente en la fase de crecimiento. Mediante el uso de células derivadas de un folículo piloso en la fase de crecimiento, es posible inducir pelo regenerativo de alta calidad con alta frecuencia. Además, el folículo piloso puede derivarse de un embrión o de un adulto. Es preferible recoger células de un folículo piloso derivado de embrión porque las células del folículo piloso en la fase emergente del órgano de folículo piloso pueden recogerse eficazmente y pueden obtenerse células indiferenciadas. Por otra parte, es preferible recoger células de un folículo piloso derivado de adulto porque las células útiles pueden aislarse y obtenerse utilizando la regionalidad de la distribución celular en un órgano. En particular, para la aplicación clínica de la presente invención en seres humanos, pueden utilizarse células del sujeto y esto es preferible con respecto a evitar el rechazo de trasplante inmunitario y evitar problemas éticos tales como usar una célula ES. Además, ha habido informes de que un folículo piloso tras el trasplante se tolera inmunológicamente (Reynolds *et. al.*, Trans-gender induction of hair follicles. Nature. 4 de noviembre de 1999; 402 (6757): 33-4). Alternativamente, si es posible la supresión inmunitaria mediante otros métodos, pueden usarse materiales quirúrgicos y similares derivados de un adulto de otra familia producidos mediante cirugía plástica cosmética o similar, y esto es preferible dado su valor extremadamente alto para la aplicación industrial.

También pueden usarse células derivadas de otro tejido mesenquimatoso *in vivo* como células mesenquimatosas derivadas de otro lugar diferente de un folículo piloso. Preferiblemente, tales células son células de médula ósea o células mesenquimatosas que no incluyen células sanguíneas, y preferiblemente además células mesenquimatosas de dentro de la cavidad bucal, células de médula ósea de dentro de la mandíbula, células mesenquimatosas derivadas de células de la cresta neural craneal, células precursoras mesenquimatosas o células madre de las mismas que pueden diferenciarse para dar tales células mesenquimatosas, y similares. La solicitud de patente no examinada japonesa, primera publicación n.º 2008-206500 describe un ejemplo en el que se usan células derivadas del amnios como células mesenquimatosas, y la solicitud de patente no examinada japonesa, primera publicación n.º 2008-200033 describe un ejemplo en el que se usan células obtenidas mediante inducción de diferenciación de células madre totipotentes como células mesenquimatosas.

También pueden usarse células derivadas de otro tejido epitelial *in vivo* como células epiteliales derivadas de otro lugar diferente de un folículo piloso. Preferiblemente, tales células son células epiteliales de piel, membranas mucosas dentro de la cavidad bucal o las encías, y preferiblemente además células precursoras epiteliales inmaduras, por ejemplo células epiteliales no queratinizadas o células madre de las mismas, o similares que pueden diferenciarse para dar células epiteliales tales como piel o membranas mucosas o similares que se han diferenciado,

por ejemplo queratinizado o paraqueratinizado. La solicitud de patente no examinada japonesa, primera publicación n.º 2008-29756 describe un ejemplo en el que se usan células epiteliales de la cavidad bucal o células cultivadas primarias de las mismas como células epiteliales, y las descripciones en ella se incorporan en su totalidad como referencia en la presente memoria descriptiva. Desde el punto de vista del uso de un tejido autógeno, es preferible usar células mesenquimatosas y células epiteliales o un tejido que incluya estas células procedentes de la diana de trasplante.

Las células mesenquimatosas, células epiteliales, células madre pigmentarias o un tejido que incluya estas células para producir el germen de folículo piloso regenerativo pueden recogerse de mamíferos tales como primates (por ejemplo seres humanos, monos, etc.) y ungulados (por ejemplo cerdos, vacas, caballos, etc.), pequeños mamíferos tales como roedores (por ejemplo ratones, ratas, conejos, etc.), así como otros diversos animales tales como perros y gatos. La recogida de células mesenquimatosas, células epiteliales, células madre pigmentarias o un tejido que incluya estas células debe llevarse a cabo mediante extracción en condiciones asépticas y almacenamiento en una disolución de almacenamiento apropiada, a la vez que se aplican las condiciones usadas normalmente para una recogida de tejido sin cambios.

Las células mesenquimatosas y células epiteliales de un folículo piloso se preparan, por ejemplo, separando en primer lugar el folículo piloso que se ha aislado de un tejido circundante en su tejido mesenquimatoso y tejido epitelial según su forma.

Además, en la preparación de células madre pigmentarias a partir de un folículo piloso, por ejemplo, cuando se aísla la región bajo la protuberancia que incluye melanoblastos, puede aislarse como el extremo más inferior de una región constante que es adyacente a la región de protuberancia usando las glándulas sebáceas y los músculos erectores del pelo bajo observación microscópica como marcadores. Además, cuando se aísla una base de la matriz del pelo que incluye células precursoras de melanocitos, puede aislarse del extremo más inferior de una región variable por debajo de la línea de Auber usando el bulbo piloso de la papila pilosa bajo observación microscópica como marcador. Además, cuando se usan células derivadas de un animal o células cultivadas en las que se ha introducido como material un gen en el que se ha incorporado GFP bajo un promotor Dct, que es un marcador de melanoblastos, pueden aislarse/adquirirse adicionalmente melanoblastos usando un clasificador celular de células que se han unificado mediante un tratamiento enzimático. Además, cuando se aíslan células mesenquimatosas, células epiteliales, una región bajo la protuberancia, una base de la matriz del pelo, y similares de un tejido, puede usarse una enzima para facilitar el aislamiento. Como enzima, pueden mencionarse enzimas conocidas tales como dispasa, colagenasa y tripsina, y los expertos en la técnica pueden usar una enzima apropiada de su elección.

Además, una masa de células que incluye células mesenquimatosas, células epiteliales o células madre pigmentarias aisladas de un folículo piloso se somete preferiblemente a un tratamiento de unificación mediante el paso a través de un filtro para segregación celular antes de usarse en la producción de un germen de folículo piloso regenerativo. Un tratamiento de unificación implica liberar la adhesión entre células para conferirles fluidez, y este tratamiento se lleva a cabo preferiblemente porque permite que las células añadidas se mezclen uniformemente y permite que las células se manejen con una micropipeta cuando se produce un germen de folículo piloso regenerativo. El filtro para segregación celular no está limitado particularmente siempre que pueda segregar una masa de células que incluya células mesenquimatosas, células epiteliales o células madre pigmentarias de otro tejido y otras células. El diámetro del filtro para segregación celular puede seleccionarse de manera apropiada por un experto en la técnica para cada célula que va a recogerse. Por ejemplo, puede usarse un filtro que tiene un diámetro de 40 µm a 100 µm.

Un agregado celular en la presente invención significa una agregación de células derivadas de un tejido mesenquimatoso o un tejido epitelial, una agregación de un grupo de células que contiene células madre pigmentarias, o una agregación de un grupo de células que contiene células derivadas de un tejido mesenquimatoso o un tejido epitelial y células madre pigmentarias, y similares. Un agregado celular de este tipo puede prepararse, por ejemplo, agregando células obtenidas dispersando un tejido mesenquimatoso, un tejido epitelial o una región que contiene células madre pigmentarias para dar células aisladas o agregando células obtenidas mediante cultivo primario o subcultivo de tales células.

Con el fin de dispersar células, puede usarse una enzima tal como dispasa, colagenasa y tripsina. Cuando se realiza un cultivo primario o subcultivo de células dispersas antes de preparar un agregado celular con el fin de obtener un número suficiente de células, puede usarse un medio que se usa generalmente en el cultivo de células animales tales como medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) como medio para cultivo. Con el fin de promover el crecimiento celular, puede añadirse suero, o como alternativa al suero, por ejemplo, un factor de crecimiento celular tal como FGF, EGF y PDGF o un componente sérico conocido tal como transferrina. Cuando se añade suero, la concentración puede modificarse de manera apropiada dependiendo del estado del cultivo en el momento de la adición, pero normalmente puede fijarse en aproximadamente el 10%. Para el cultivo celular, se aplican condiciones de cultivo normales, por ejemplo cultivo en un incubador que tiene concentración de CO₂ del 5% a una temperatura de aproximadamente 37°C. Además, también puede añadirse un antibiótico tal como estreptomycin según sea apropiado.

Con el fin de agregar células, por ejemplo, puede centrifugarse una suspensión celular. En un agregado celular de células mesenquimatosas y células epiteliales, las células respectivas están preferiblemente en un estado de alta densidad con el fin de garantizar que las células interactúen de manera fiable entre sí cuando se llevan en estrecho contacto. Un estado de alta densidad significa un grado de densidad equivalente a cuando constituyen un tejido, por ejemplo de 5×10^7 células/ml a 1×10^9 células/ml, preferiblemente de 1×10^8 células/ml a 1×10^9 células/ml, y lo más preferiblemente de 2×10^8 células/ml a 8×10^8 células/ml. El método para lograr la alta densidad del agregado celular no está limitado particularmente, y, por ejemplo, puede lograrse mediante un método en el que las células se agregan mediante centrifugación y luego precipitan. Se prefiere la centrifugación porque puede lograr fácilmente alta densidad sin poner en peligro la actividad de las células. La centrifugación puede llevarse a cabo durante de 3 a 10 minutos con un número de rotaciones que proporciona una fuerza centrífuga de $300 \times g$ a $1200 \times g$ y preferiblemente de $500 \times g$ a $1000 \times g$. Si la centrifugación es menor de $300 \times g$, la densidad celular tiende a no alcanzar un nivel suficientemente alto, mientras que si la centrifugación es mayor de $1200 \times g$, las células pueden resultar dañadas.

Cuando se prepara un agregado celular de alta densidad mediante centrifugación, normalmente se prepara una suspensión celular en un recipiente tal como un tubo usado para la centrifugación de células y luego las células se centrifugan. Tras la centrifugación, las células permanecen como un precipitado y se retira tanto sobrenadante como sea posible. En este momento, la cantidad de componentes distintos a las células diana (tal como disolución de cultivo, tampón, etc.) es preferiblemente igual a o menor que la cantidad de las células, y lo más preferiblemente no se incluye ningún componente distinto de las células diana. Si estos tipos de masas de células de alta densidad se llevan en estrecho contacto dentro de un portador de soporte mediante un método que va a explicarse a continuación, las células establecen estrecho contacto entre sí y se muestra eficazmente la interacción célula-célula.

Además, también puede prepararse un agregado celular que contiene células mesenquimatosas o células epiteliales y células madre pigmentarias, por ejemplo, mediante un tratamiento de centrifugación como el que se describió antes. Específicamente, se prepara una masa de células que comprende células mesenquimatosas o células epiteliales y células madre pigmentarias que se incluyen en proporciones preferidas, respectivamente, y se incorpora en una suspensión celular que va a usarse para centrifugación, y tal suspensión celular se centrifuga entonces para producir un agregado celular en el que se mezclan células madre pigmentarias.

El portador de soporte que va a usarse para el fin de cultivar las masas de células primera y segunda no está limitado particularmente siempre que pueda llevarse a cabo el cultivo celular en él. Por ejemplo, se prefieren portadores de soporte de gel, fibra o sólidos. Mediante el uso de un portador de soporte de este tipo, puede evitarse la presión excesiva sobre el germen de folículo piloso regenerativo *in vivo*.

Como portador de soporte que va a usarse en la presente invención, puede mencionarse, por ejemplo, colágeno, gel de agarosa, carboximetilcelulosa, gelatina, agar, hidrogel, Cell Matrix (nombre de producto), Mebiol Gel (nombre de producto), Matrigel (nombre de producto), elastina, fibrina, laminina, una mezcla de matriz extracelular, poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), copolímero de ácido láctico/ácido glicólico (PLGA), y similares. Entre ellos se prefiere colágeno, gel de agarosa, carboximetilcelulosa, gelatina, agar, hidrogel, Cell Matrix, Mebiol Gel, Matrigel, una mezcla de matriz extracelular, elastina, fibrina y laminina, que tienen dureza y retentividad apropiadas.

Por ejemplo, puede usarse un portador de soporte líquido y curarse tras disponer en el mismo un germen de folículo piloso regenerativo que consiste en las masas de células primera y segunda. Por ejemplo, preparando una gota de gel de colágeno sobre una placa de cultivo, disponiendo el germen de folículo piloso regenerativo en la gota de colágeno, y luego cultivando dentro de un incubador de CO_2 a 37°C , puede gelificarse colágeno.

El portador de soporte usado para el fin de cultivar las masas de células primera y segunda tiene preferiblemente una retentividad suficiente para retener el estado de estrecho contacto de las masas de células sin dispersión de las células. En el presente documento, el "estado de estrecho contacto" significa un estado en el que las masas de células de alta densidad de células mesenquimatosas y células epiteliales descritas anteriormente mantienen una densidad igualmente alta incluso cerca de la superficie de contacto entre las células mesenquimatosas y las células epiteliales. Si el portador de soporte que puede retener un estado de estrecho contacto es, por ejemplo, colágeno, puede proporcionarse dureza apropiada mediante el uso del colágeno a una concentración de manera que la concentración final sea de 2 mg/ml a 3 mg/ml , o dicho de otro modo una concentración de manera que la resistencia de gelatina sea de 120 g a 250 g según un método, cambiando lo que corresponda, según la norma JIS-K6503-1996 (medida como una carga necesaria para hacer bajar un émbolo de $12,7 \text{ mm}$ de diámetro 4 mm). Otros tipos de portadores de soporte pueden usarse preferiblemente como portador de soporte en la presente invención siempre que tengan resistencia equivalente según un método de evaluación equivalente. Además, puede obtenerse un portador de soporte que tiene una dureza correspondiente la resistencia de gelatina deseada mezclando uno o más tipos de portadores de soporte.

El método para disponer las masas de células primera y segunda en el portador de soporte no está limitado particularmente. Si las masas de células son agregados celulares, por ejemplo, puede disponerse un precipitado obtenido mediante centrifugación tal como se describió anteriormente insertándolo en el portador de soporte con una microjeringa o similar. Si las masas de células son un tejido, éste puede disponerse en una ubicación arbitraria en el

portador de soporte usando la punta de una aguja de jeringa o similar.

El método para disponer las masas de células primera y segunda en estrecho contacto en el portador de soporte en la presente invención no está limitado particularmente. Por ejemplo, las masas de células pueden llevarse en estrecho contacto disponiendo una de las masas de células en el portador de soporte y luego disponiendo la otra masa de células de modo que presione contra la primera masa de células. Más específicamente, una de las masas de células puede presionarse contra la otra masa de células cambiando de manera apropiada la posición de la punta de la aguja de jeringa anterior en el portador de soporte. Cuando se usa un tejido epitelial o un tejido mesenquimatoso como masas de células, es preferible disponer la superficie del tejido epitelial o tejido mesenquimatoso en el que se ha puesto en contacto el tejido con el tejido mesenquimatoso o tejido epitelial, respectivamente, en el órgano original (incluyendo un tejido que pertenece al órgano) de modo que entre en contacto con la otra masa de células.

También es preferible incluir la solidificación del portador de soporte tras disponer las masas de células. De este modo, las células se agregan adicionalmente y puede lograrse un estado de incluso mayor densidad. Por ejemplo, cuando se usa gel de colágeno, puede solidificarse dejándolo en reposo durante de varios minutos a varias decenas de minutos a la temperatura del cultivo. En este momento, cuanto menor sea el número de componentes distintos de células que hay en las masas de células, mayor será la densidad que puede lograrse.

La duración del cultivo difiere dependiendo del número de células dispuestas dentro del portador de soporte, del estado de las masas de células, de las condiciones de cultivo, del tipo de animal, y similares, y la duración puede elegirse de manera apropiada por un experto en la técnica.

Al aumentar la duración del cultivo, puede hacerse que la formación del germen de folículo piloso regenerativo avance adicionalmente. Con el fin de obtener una condición deseada, por ejemplo, el cultivo puede llevarse a cabo durante 1 día o más, 2 días o más, 6 días o más, 30 días o más, 50 días o más, 100 días o más, o 300 días o más, y pueden cambiarse el medio y las condiciones de cultivo durante el cultivo.

Por ejemplo, cuando se trasplanta un germen de folículo piloso regenerativo, con el fin de obtener pelo funcional, el germen de folículo piloso regenerativo se cultiva preferiblemente durante al menos un día, y más preferiblemente se cultiva durante 2 o más días.

Para el proceso de cultivo dentro del portador de soporte, un portador de soporte que incluye las masas de células primera y segunda puede cultivarse sólo o puede cultivarse en presencia de otras células animales o similares.

Cuando se cultiva el portador de soporte solo, pueden usarse las condiciones que se usan generalmente para el cultivo de células animales como condiciones de cultivo. Además, puede añadirse suero derivado de mamífero al cultivo, y también pueden añadirse diversos factores celulares que se sabe que son eficaces en la proliferación o diferenciación de tales células. Los ejemplos de tales factores celulares pueden incluir FGE, BMP, y similares.

Desde el punto de vista del intercambio de gases y el suministro de nutrientes a las masas de células, y desde el punto de vista de poder realizar todas las etapas *in vitro* sin contacto/contaminación con otras células animales, el cultivo dentro del portador de soporte es preferiblemente un cultivo de órganos. En un cultivo de órganos, el cultivo se lleva a cabo generalmente haciendo flotar una membrana porosa sobre un medio adecuado para el crecimiento de células animales y colocando luego el portador de soporte que incluye las masas de células primera y segunda sobre la membrana. La membrana porosa usada en el presente documento tiene preferiblemente muchos poros de aproximadamente 0,3 a 5 μm , y puede mencionarse, por ejemplo, Cell Culture Insert (nombre de producto) e Isopore Filter (nombre de producto).

Además, según otra realización de la presente invención, puede insertarse una guía en el germen de folículo piloso regenerativo que consiste en las masas de células primera y segunda tras disponer las masas de células primera y segunda en estrecho contacto en el portador de soporte o after el cultivo.

Una "guía" que puede usarse en la presente invención se inserta en el germen de folículo piloso regenerativo durante el cultivo que se construyó mediante cultivo de órganos y facilita la conexión entre una parte de lado de células epiteliales del germen de folículo piloso regenerativo y las células epiteliales de lado de receptor tras el trasplante del germen de folículo piloso regenerativo. La guía que va a usarse no está limitada particularmente siempre que tenga los efectos mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede mencionarse una fibra compuesta por un polímero tal como nailon o un polímero bioabsorbible natural o sintético, una fibra metálica tal como acero inoxidable, una fibra de carbono, una fibra química tal como una fibra de vidrio, y una fibra animal o fibra vegetal, y similares. Más específicamente, puede mencionarse una hebra de nailon, un hilo de acero inoxidable, o similar. En particular, en un germen de folículo piloso regenerativo, puede usarse pelo derivado de un cuerpo vivo como guía. Además, la guía usada en la presente invención puede adoptar la forma de una hebra hueca. El diámetro de la guía puede ajustarse de manera apropiada por un experto en la técnica. Por ejemplo, el diámetro es preferiblemente de 5 a 100 μm , y más preferiblemente de 20 a 50 μm . Además, la longitud de la guía usada en el germen de folículo piloso regenerativo también puede ajustarse apropiadamente por un experto en la técnica. Por ejemplo, la longitud

es preferiblemente de 1 a 10 mm, y más preferiblemente de 4 a 6 mm.

La guía se inserta desde el lado de células epiteliales de las masas de células que se convierten en el germen de folículo piloso regenerativo, de manera que la estructura del germen de folículo piloso regenerativo, particularmente la superficie de contacto entre la primera masa de células y la segunda masa de células, no resulte dañada por la inserción de la guía, y la guía penetra verticalmente a través de la primera masa de células y la segunda masa de células.

Además, la guía puede insertarse en las masas de células que se convierten en el germen de folículo piloso regenerativo inmediatamente después del comienzo del cultivo de órganos, o dicho de otro modo, inmediatamente después de disponer las células epiteliales y las células mesenquimatosas en el medio. Cuando se inserta la guía algún tiempo después del comienzo del cultivo, puesto que la resistencia de las células epiteliales del germen de folículo piloso regenerativo aumenta debido a la adhesión celular por cultivo de órganos, puede aumentarse la penetración de la guía usando un material fuerte para la guía (tal como un hilo de acero inoxidable o similar) y afilando la punta de la guía y similares, permitiendo que la guía se inserte de 1 a 2 días tras el inicio del cultivo. Preferiblemente, la guía se inserta inmediatamente después de la preparación del germen de órgano porque en ese momento puede usarse un material flexible con baja reacción de cuerpo extraño-organismo en un cuerpo vivo tal como una hebra de nailon. Además, insertar la guía algún tiempo tras el inicio de cultivo también es preferible porque la superficie de contacto entre la primera masa de células y la segunda masa de células se adhiere más fuertemente y la superficie de contacto no resulta dañada por la inserción de la guía.

Además, tras insertar la guía en el germen de folículo piloso regenerativo, el germen de folículo piloso regenerativo puede cultivarse en un estado en el que se ha insertado la guía. La duración del cultivo tras la inserción de la guía es, por ejemplo, preferiblemente de 1 a 4 días, y más preferiblemente de 1,5 a 2 días. Mediante el cultivo durante 2 días tras la inserción de la guía, la adhesión entre la guía y el germen de folículo piloso regenerativo se vuelve fuerte y esto ayuda a impedir cualquier desviación que pudiera producirse durante el trasplante. Además, es preferible el cultivo una vez que la guía se ha insertado porque la parte en el lado de células epiteliales del germen de folículo piloso regenerativo puede alargarse a lo largo de la guía. Este alargamiento puede mejorar la eficacia y la estabilidad de la adhesión autónoma entre la parte de lado de células epiteliales del germen de folículo piloso regenerativo y las células epiteliales del receptor tras el trasplante del germen de folículo piloso regenerativo.

En una realización de la presente invención, el germen de folículo piloso regenerativo para trasplante producido mediante el método para producción de la presente invención es un germen de folículo piloso regenerativo que puede formar un nicho de células madre de melanoblastos funcional en el folículo piloso que se regenera tras el trasplante. Este nicho de células madre de melanoblastos se forma en una vaina de raíz externa de la región bajo la protuberancia similar a un folículo piloso natural. En el presente documento, un nicho de células madre de melanoblastos funcional indica un nicho de células madre que tiene una función de mantener melanoblastos y una función para diferenciar/suministrar melanocitos en una parte que constituye el nicho. El germen de folículo piloso regenerativo para trasplante en una realización de la presente invención puede regenerar un folículo piloso que comprende un nicho de células madre de melanoblastos funcional, y por tanto el folículo piloso puede formar de manera permanente pelo de color.

También se describe un método para trasplantar un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante en el que se controla el color del pelo que se produce mediante el método para producción de la presente invención en un sitio diana.

Al trasplantar el germen de folículo piloso regenerativo para trasplante en el que se controla el color del pelo que se produce mediante el método para producción de la presente invención, puede obtenerse crecimiento de pelo en el que se controla el color del pelo en el sitio de trasplante. En particular, incluso cuando el germen de folículo piloso regenerativo se ha reconstruido a partir de folículos pilosos derivados de adulto, puede obtenerse pelo de color en el sitio de trasplante mediante el trasplante del germen de folículo piloso regenerativo.

El germen de folículo piloso regenerativo para trasplante en el que se controla el color del pelo puede trasplantarse a un sitio diana según métodos conocidos públicamente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede trasplantarse usando un trasplante de pelo que utiliza la técnica de trasplante de pelo de Shapiro o un dispositivo de trasplante de pelo Choi o un dispositivo de implante que utiliza presión de aire o similar. La técnica de trasplante de pelo de Shapiro es un método en el que se crea una herida de injerto en el sitio diana de trasplante usando un microescalpelo o similar y entonces se trasplanta el trasplante usando pinzas. Cuando se aplica este tipo de técnica de trasplante de pelo, puesto que el germen de folículo piloso regenerativo para trasplante tiene una guía, es posible operar sin tocar directamente el germen de folículo piloso regenerativo y por tanto, la operación puede realizarse fácilmente.

La profundidad de trasplante del germen de folículo piloso regenerativo es, por ejemplo, preferiblemente de 0,05 a 5 mm, más preferiblemente de 0,1 a 1 mm, y lo más preferiblemente de 0,3 a 0,5 mm. En particular, cuando se trasplanta un germen de folículo piloso regenerativo en un receptor, hay casos en los que se trasplanta preferiblemente en la capa dérmica y más preferiblemente por encima de la superficie de límite entre el tejido

dérmico y el subdérmico en la que la formación del folículo piloso y la posterior eficacia de crecimiento del pelo son excelentes. El germen de folículo piloso regenerativo durante el trasplante preferiblemente se trasplanta de modo que el lado de células epiteliales del germen de folículo piloso regenerativo se oriente hacia el lado de la superficie del cuerpo del receptor y el lado de células mesenquimatosas del germen de folículo piloso regenerativo se oriente hacia el interior del cuerpo del receptor, porque esto permite que se controle la dirección de crecimiento del pelo hacia el lado de la superficie del cuerpo. También es preferible ajustar la profundidad del trasplante de modo que el extremo superior de la parte de células epiteliales del germen de folículo piloso regenerativo se exponga en el extremo superior de la herida de injerto porque esto puede aumentar adicionalmente la continuidad con las células epiteliales del receptor.

Además, tras el trasplante del germen de folículo piloso regenerativo dotado de una guía, la guía puede fijarse al sitio diana usando una cinta adhesiva o banda para unir la piel, o similar de modo que la guía no caiga fuera.

Una vez que se ha asegurado la continuidad entre las células epiteliales de lado de receptor y el lado derivado de células epiteliales del germen de folículo piloso regenerativo algún tiempo después del trasplante del germen de folículo piloso regenerativo, puede retirarse la guía del sitio de trasplante. El tiempo para retirar la guía puede ajustarse de manera apropiada, y por ejemplo, la guía se retira preferiblemente del sitio de trasplante de 3 a 7 días tras el trasplante. Alternativamente, la guía también puede dejarse de modo que caiga naturalmente fuera del sitio de trasplante. Puede dejarse que una guía de material bioabsorbible caiga de manera natural fuera del sitio de trasplante o hasta que se descomponga o absorba.

De este modo, al equipar el germen de folículo piloso regenerativo para trasplante con una guía, las células epiteliales de lado de receptor se alargan hacia el interior del sitio de trasplante a lo largo de la guía para eliminar sustancias extrañas, mientras que las células del germen de folículo piloso regenerativo derivadas de células epiteliales se alargan a lo largo de la guía. De este modo, puede mejorarse la continuidad entre las células epiteliales de lado de receptor y el lado de células epiteliales del germen de folículo piloso regenerativo tras el trasplante. También es preferible insertar una guía porque el mantenimiento de la polaridad de las células epiteliales y las células mesenquimatosas puede mejorarse en el germen de folículo piloso regenerativo durante el cultivo. De este modo, puede aumentarse la eficacia de formación de folículo piloso y puede facilitarse la orientación durante el trasplante. En particular, cuando se usa una guía en un germen de folículo piloso regenerativo, puede estimularse la formación del folículo piloso en una dirección deseada porque puede asegurarse la continuidad entre el germen de folículo piloso regenerativo y las células epiteliales de lado de receptor. Como resultado, puede mejorarse la velocidad de crecimiento de pelo a partir del germen de folículo piloso regenerativo y también es posible controlar la dirección de crecimiento de pelo.

Los términos usados en la presente memoria descriptiva se usan para explicar las realizaciones específicas descritas en el presente documento y no se pretende que limiten la presente invención.

Se pretende que los términos “comprender/incluir/contener” usados en la presente memoria descriptiva significa que existen las materias tal como se describe (miembros, etapas, elementos, números, etc.) excepto cuando queda explícita otra comprensión de las mismas a partir del contexto, y tales términos no excluyen la existencia de otras materias (miembros, etapas, elementos, números, etc.).

A menos que se facilite una definición diferente, todos los términos usados en el presente documento (incluyendo términos técnicos y términos científicos) tienen el mismo significado que los entendidos ampliamente por los expertos en la técnica en el campo técnico al que pertenece la presente invención. A menos que se facilite explícitamente una definición diferente, los términos usados en el presente documento deben interpretarse con un significado que es coherente con el significado en la presente memoria descriptiva y el campo técnico relacionado, y no deben idealizarse ni interpretarse con un significado excesivamente formal.

Algunas de las realizaciones de la presente invención se han explicado haciendo referencia a diagramas esquemáticos, pero los diagramas esquemáticos pueden estar exagerados con el fin de aclarar la explicación.

Los términos “primero”, “segundo”, y similares se usan para expresar diversos elementos en el presente documento, pero se entiende que no se pretende que estos elementos se limiten a tales términos. Estos términos se usan sólo para distinguir un elemento de otro elemento, y, por ejemplo, el elemento marcado como “primero” puede marcarse como “segundo” y de manera similar, el elemento marcado como “segundo” puede marcarse como “primero” sin apartarse del alcance de la presente invención.

Además, en la presente memoria descriptiva, con respecto a las expresiones “arriba” o “abajo/inferior/de fondo” en el folículo piloso, por motivos de conveniencia, en la estructura de un folículo piloso, “abajo/inferior/de fondo” indica una parte en la que existe la papila pilosa, y “arriba” indica el lado opuesto de la papila pilosa en el folículo piloso, o dicho de otro modo una dirección en la que el pelo crece/se alarga.

La presente invención se explicará ahora en mayor detalle a continuación haciendo referencia a los ejemplos. Sin embargo, la presente invención puede implementarse mediante diversos aspectos y no debe considerarse limitada a

los ejemplos descritos en el presente documento.

Ejemplos

5 1. Materiales y métodos

(1) Animales de experimentación

10 Se recogieron folículos pilosos de un ratón C57BL/6 (CLEA Japan) y un ratón CS7BL/6 6-TgN (act-EGFP) con de 7 a 8 semanas de edad. Además, se trasplantó el germen de folículo piloso regenerativo producido mediante el método experimental descrito a continuación en un ratón Balb/c nu/nu (SLC) con de 6 a 8 semanas de edad. El cuidado y la experimentación con animales se llevaron a cabo con la aprobación del comité de ética de experimentación con animales de la universidad de Tokio de conformidad con las leyes, las ordenanzas ministeriales y las directrices relacionadas.

15 (2) Cultivo celular de papila pilosa

Tras sacrificar un ratón C57BL/6 con de 7 a 8 semanas de edad mediante dislocación cervical, se recogieron todas las capas de la piel de la boca y tejidos subcutáneos para no dañar los bulbos pilosos. Tras retirar los tejidos subcutáneos que rodean las vibrisas laterales, se aislaron los folículos pilosos. Se seleccionó un folículo piloso de vibrisa lateral en las fases de crecimiento I a IV de los folículos pilosos aislados y se retiró la vaina de colágeno del folículo piloso de vibrisa lateral seleccionado usando una aguja de inyección 25G para exponer el folículo piloso. A continuación, se aisló el bulbo piloso del folículo piloso expuesto para extraer la papila pilosa. Como disolución de conservación para conservar el folículo piloso aislado y la papila pilosa extraída durante el procedimiento, se usó un medio DMEM (DMEM10) que contenía 10 mM de HEPES, de suero bovino fetal al 10% y disolución de penicilina-estreptomicina al 1%. Se sembró la papila pilosa aislada sobre una placa de cultivo de plástico de 3,5 cm (Nippon Becton Dickinson), y se realizó el cultivo primario en un entorno del 5% de CO₂, 37°C y el 95% de humedad en DMEM10 que contenía 10 ng/ml de FGF2 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Tras cultivar durante 9 días a la vez que se intercambiaba el medio en los días 4º y 8º, las células cultivadas primarias de papila pilosa se usaron para producir un germen de folículo piloso regenerativo. Las células cultivadas primarias de papila pilosa tras el cultivo de 9 días se lavaron 3 veces con PBS (-), se sometieron a ablación con disolución de EDTA 10 mM (GIBCO) que contenía el 0,05% de tripsina, se neutralizaron con tripsina en DMEM10, se lavaron suficientemente, y luego se conservaron en hielo hasta el momento de uso.

35 (3) Adquisición de células epiteliales de protuberancia de folículo piloso

Del folículo piloso del tejido de vibrisa lateral aislado en (2) anterior, se retiró la vaina de colágeno usando una aguja de inyección 25G para aislar la región de protuberancia. El tejido de la región de protuberancia se hizo reaccionar durante cuatro minutos a 37°C en una disolución de dispasa II que tenía una concentración final de 4,8 U/ml (Becton Dickinson) y colagenasa 100 U/ml (Worthington, Lakewood, NJ). Posteriormente, el tejido de la región de protuberancia se separó quirúrgicamente en un tejido epitelial de región de protuberancia y un tejido mesenquimatoso alrededor de la protuberancia usando una aguja de inyección 25G. El tejido epitelial de la región de protuberancia aislado se sometió a tratamiento enzimático durante 1 hora en un incubador con tripsina al 0,05% (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.), y luego se hizo pasar a través de un colador de células de 35 µm de tamaño de poro para obtener células unificadas.

Además, inmediatamente antes de producir el germen de folículo piloso regenerativo, se recogieron las células cultivadas de papila pilosa con tripsina al 0,05% (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.), y luego se hicieron pasar a través de un colador de células de 35 µm de tamaño de poro para obtener células unificadas.

50 (4) Producción de germen de folículo piloso regenerativo

Se produjo un germen de folículo piloso regenerativo según el método de germen del órganos. Los procedimientos detallados fueron los siguientes. Las células unificadas de la región de protuberancia y las células cultivadas unificadas de papila pilosa obtenidas tal como se describió anteriormente se transfirieron individualmente a microtubos de 1,5 ml (Eppendorf) recubiertos con grasa de silicona y luego se centrifugaron. Se retiró completamente el sobrenadante en la disolución de cultivo tras la centrifugación usando una punta GELoader de 0,5-20 ml (Eppendorf) con el fin de recoger las células unificadas de la región de protuberancia o las células cultivadas unificadas de papila pilosa que habían precipitado debido a centrifugación. A continuación, se preparó una gota de gel de colágeno dejando caer gota a gota 30 ml de Cellmatrix tipo I-A (Nitta Gelatin, Osaka, Japón) sobre una placa de Petri recubierta con grasa de silicona (Dow Corning Toray). Se inyectaron aproximadamente 0,2 ml de las células cultivadas unificadas de papila pilosa preparadas tal como se describió anteriormente en la gota de gel de colágeno usando una punta de pipeta de 0,1 a 10 ml (Quality Scientific Plastics) para producir un agregado celular. A continuación, se inyectaron aproximadamente 0,2 ml de las células de la región de protuberancia preparadas tal como se describió anteriormente en la misma gota de gel usando una punta de pipeta de 0,1 a 10 ml (Quality Scientific Plastics) para poner en contacto estrechamente el agregado celular de papila pilosa cultivado, produciendo

de este modo un agregado celular de las células cultivadas de papila pilosa y las células de la región de protuberancia. Además, se insertó una hebra de nailon (Matsuda Medical Industry) con una longitud total de 5 mm a partir de las células de la región de protuberancia del agregado celular. Posteriormente, se dejó reposar la gota de gel durante 5 minutos a 37°C para que solidificara y de este modo se reforzara la unión entre las células de la región de protuberancia y las células cultivadas de papila pilosa, y por consiguiente se produjo el germen de folículo piloso regenerativo.

Tal como se describe a continuación en (5) y (6), se prepararon células de la región bajo la protuberancia y células de la base de la matriz del pelo y se usaron en la producción del germen de folículo piloso regenerativo.

(5) Preparación de células de la región bajo la protuberancia

Usando el mismo procedimiento que se describió anteriormente en (3) para la adquisición de la región de protuberancia, se aisló una región constante por encima del sitio de unión de reborde anular de un folículo piloso de vibrisa lateral de un ratón CS7BL/6 con de 7 a 8 semanas de edad, y se aisló el extremo más inferior de la parte constante que es adyacente a la región de protuberancia como la región bajo la protuberancia. Posteriormente, se obtuvieron células unificadas de la región bajo la protuberancia usando un tratamiento enzimático y un filtro para segregación celular.

(6) Preparación de células de la base de la matriz del pelo

Se retiraron la vaina de colágeno y la vaina de raíz dérmica del bulbo piloso del folículo piloso del tejido de vibrisa lateral de un ratón CS7BL/6 con de 7 a 8 semanas de edad que se había aislado en (2) anteriormente, para aislar el tejido de la base de la matriz del pelo que es adyacente a la base de la papila pilosa usando una aguja de inyección 25G. El tejido de la base de la matriz del pelo se trató durante 10 minutos a 37°C con tripsina al 0,25%, se lavó con DMEM10, y luego se hizo pasar a través de un colador de células de 35 µm de poro para obtener células unificadas de la base de la matriz del pelo.

En el método para producir un germen de folículo piloso regenerativo descrito anteriormente en (4), cuando se concentraron las células unificadas de la región de protuberancia mediante centrifugación, se mezclaron aproximadamente 400 de las células unificadas de la región bajo la protuberancia o aproximadamente 400 de las células unificadas de la base de la matriz del pelo obtenidas tal como se describió anteriormente en (6) o (7) con aproximadamente 10.000 de las células epiteliales de la región de protuberancia y luego se centrifugaron, produciendo de este modo un agregado celular que incluía las células unificadas de la región bajo la protuberancia o las células unificadas de la base de la matriz del pelo y las células unificadas de la región de protuberancia. El agregado celular obtenido de este modo se inyectó en la gota de gel en lugar de las células de la región de protuberancia para poner en contacto estrechamente la parte superior del agregado celular de las células cultivadas de papila pilosa dentro de la gota de gel. De este modo, se obtuvo un germen de folículo piloso regenerativo como grupo de adición de células de la región bajo la protuberancia o grupo de adición de células de la base de la matriz del pelo.

Cada germen de folículo piloso regenerativo producido dentro de un gel mediante los métodos descritos anteriormente se transfirió junto con el gel de colágeno a un Cell Culture Insert de 0,4 ml de tamaño de poro (Becton Dickinson) en el que se había fijado una placa de 6 pocillos (Becton Dickinson) a la que añadió 1 ml de DMEM10 y luego se sometió a cultivo durante 2 días en condiciones de 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

(8) Trasplante de germen de folículo piloso regenerativo en piel de ratón desnudo

Se anestesió un ratón desnudo con pentobarbital según un método convencional, y se colocó en una posición recostada natural tras desinfectar su lomo con Iodine. Se practicó una punción en el ratón usando un microescalpelo V-lance (Alcon Japan) para formar una herida de injerto desde la capa epidérmica de la piel hasta la parte de capa inferior de la capa dérmica. La herida de injerto se extendió desde la superficie del cuerpo hasta una profundidad de hasta 400 µm en la dirección vertical y aproximadamente 1 mm en la dirección horizontal. Se retiró el gel de colágeno del germen de folículo piloso regenerativo en el que se insertó una guía compuesta por hebra de nailon, y se insertó el germen de folículo piloso regenerativo de modo que el componente de células epiteliales estuviera orientado hacia el lado de superficie corporal de la herida de injerto. Se ajustó la profundidad del trasplante de modo que el extremo superior del componente de células epiteliales del germen de folículo piloso regenerativo quedara expuesto en el extremo superior de la herida de injerto, y se colocó el germen de folículo piloso regenerativo de modo que la guía de hebra de nailon quedara expuesta en la superficie corporal. La guía de hebra de nailon se fijó con una tira Steritest (3M) a la superficie de la piel cerca de la herida de injerto, y luego se protegió la herida de injerto con Nurseban y cinta adhesiva quirúrgica (3M). Se retiró la cinta adhesiva protectora de 5 a 7 días tras el trasplante, y luego se observó el sitio de trasplante a lo largo del tiempo una vez que se había determinado visualmente la adherencia del trasplante o con un estereomicroscopio de fluorescencia.

(9) Observación de crecimiento del pelo a lo largo del tiempo y análisis histológico

El sitio de trasplante del germen de folículo piloso regenerativo se observó visualmente y bajo un estereomicroscopio de fluorescencia para evaluar el crecimiento del pelo.

2. Resultados

(1) Color del pelo en la regeneración de pelo corporal y vibrisas mediante trasplante intracutáneo de germen de folículo piloso regenerativo

Las vibrisas que se regeneraron mediante trasplante del germen de folículo piloso regenerativo producido a partir de la región de protuberancia y las células de papila pilosa derivadas de una vibrisa lateral de ratón adulto de un ratón de color eran blancas con una frecuencia del 95,5% (figura 2a). Tal como se muestra en la figura 1, se sabe que las células madre pigmentarias que controlan el color del pelo mediante pigmentación con melanina en el tallo del pelo se distribuyen en la región bajo la protuberancia por debajo de la región de protuberancia. Además, las células precursoras de melanocitos también se distribuyen en la base de la matriz del pelo del bulbo piloso, y se diferencian para dar melanocitos dentro de la matriz del pelo para colorear el tallo del pelo. El germen de folículo piloso regenerativo derivado de una vibrisa lateral de adulto se confinó a la región de protuberancia que no incluye melanoblastos para construir el germen de folículo piloso regenerativo, y por tanto el germen de folículo piloso regenerativo no tenía melanoblastos, y se sugirió que el pelo regenerativo podía volverse blanco porque la matriz del pelo del folículo piloso regenerado no contiene ningún melanocito diferenciado.

(2) Control de color del pelo mediante la adición de células madre pigmentarias

Se realizó un examen con respecto a si el color del pelo de un pelo regenerativo resultaba afectado cuando se obtenían células unificadas de la región bajo la protuberancia en la que existen melanoblastos de pelo de color y la región de base de la matriz del pelo en la que células precursoras de melanocitos se distribuyen en un folículo piloso de vibrisa lateral de ratón adulto, respectivamente, y luego se añadieron las células unificadas a una masa de células que constituye un germen de folículo piloso regenerativo. Tras analizar el color y las propiedades de un tallo del pelo que creció a las tres semanas tras el trasplante intracutáneo del germen de folículo piloso regenerativo, se obtuvo satisfactoriamente pelo de color negro regenerativo en ambos segmentos en los que se añadieron células de la región bajo la protuberancia o la base de la matriz del pelo (marca de flecha negra en la figura 2b y la figura 2c).

En el presente documento, con el fin de confirmar si se forma un nicho de células madre de melanoblastos en un folículo piloso que se regeneró a partir de un germen de folículo piloso regenerativo y que formó pelo negro similar al de un folículo piloso natural, se llevó a cabo hibridación *in situ* de dopacromo tautomerasa (Dct), que es un marcador de linaje de diferenciación de melanoblastos. Como resultado, en un folículo piloso que se derivaba de un germen de folículo piloso regenerativo producido añadiendo células unificadas de la región bajo la protuberancia a una masa de células de región de protuberancia y células de papila pilosa derivadas de una vibrisa lateral de color de ratón adulto y que formaron pelo negro, se detectaron melanoblastos en una vaina de raíz externa de la región bajo la protuberancia, que es una ubicación en la que debería existir un nicho de células madre de melanoblastos, de manera similar al de un folículo piloso natural. Esto demuestra que un folículo piloso regenerado a partir de un germen de folículo piloso regenerativo producido añadiendo células unificadas de la región bajo la protuberancia forma un nicho de células madre de melanoblastos y los melanoblastos se almacenan de manera apropiada. Por otra parte, en un folículo piloso que se regeneró a partir de un germen de folículo piloso regenerativo producido a partir de células de la región de protuberancia y de papila pilosa derivadas de una vibrisa lateral de ratón adulto de color y que formó pelo blanco, no se detectaron melanoblastos en una ubicación en la que debería existir un nicho de células madre de melanoblastos (figura 3).

Además, se midió la frecuencia de cambios en el color del pelo dependiendo de si se añadieron o no células de la región bajo la protuberancia o células de la base de la matriz del pelo. Como resultado, en el grupo de adición de células de la región bajo la protuberancia, el 65,4% del pelo fue de color y la tasa de pelo negro fue 14,5 veces mayor que el control que usaba solo células de la región de protuberancia como células epiteliales (figura 4). De manera similar, en el grupo de adición de células de la base de la matriz del pelo, el 31,6% del pelo fue negro y la tasa de pelo negro fue 7,0 veces mayor que la del control que usaba solo células de la región de protuberancia (figura 4). Además, tras la recogida de pelo que creció a partir de un germen de folículo piloso regenerativo producido añadiendo células de la base de la matriz del pelo y analizando luego la morfología de la superficie de tallo del pelo bajo un microscopio electrónico de barrido, se observó que se había desarrollado una estructura de cutícula similar a la del pelo natural (figura 5).

En el presente documento, con el fin de confirmar si el nicho de células madre de melanoblastos replica la función de mantenimiento de las células madre de manera que el folículo piloso pueda formar pelo negro de manera permanente en un folículo piloso regenerado que produce pelo negro, se observó la capacidad de formación de pelo negro en un folículo piloso regenerado una vez transcurrido un largo periodo de tiempo desde el trasplante. Como germen de folículo piloso regenerativo usado para la observación, se usó un germen de folículo piloso regenerativo producido añadiendo células unificadas derivadas de región de base de la matriz del pelo a células epiteliales de la región de protuberancia derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto de color y células de papila pilosa derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto (segmento de adición de base de la matriz del pelo). Como segmento de control, se

observó un folículo piloso regenerado mediante el trasplante de un germen de folículo piloso regenerativo producido a partir de células epiteliales de la región de protuberancia derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto de color y células de papila pilosa derivadas de vibrisa lateral de ratón adulto.

5 Como resultado, en el segmento de adición de la base de la matriz del pelo, se confirmó que se formaba pelo negro 36 días y 306 días tras el trasplante del germen de folículo piloso regenerativo (figura 6). En esta prueba, en el folículo piloso formado a partir del germen de folículo piloso regenerativo, un ciclo piloso duró como promedio aproximadamente 15 días, y por tanto se confirmó que la formación de pelo negro se repetía como promedio aproximadamente 20 veces. Por otra parte, en el segmento de control, se confirmó solo pelo blanco incluso 306 días tras el trasplante.

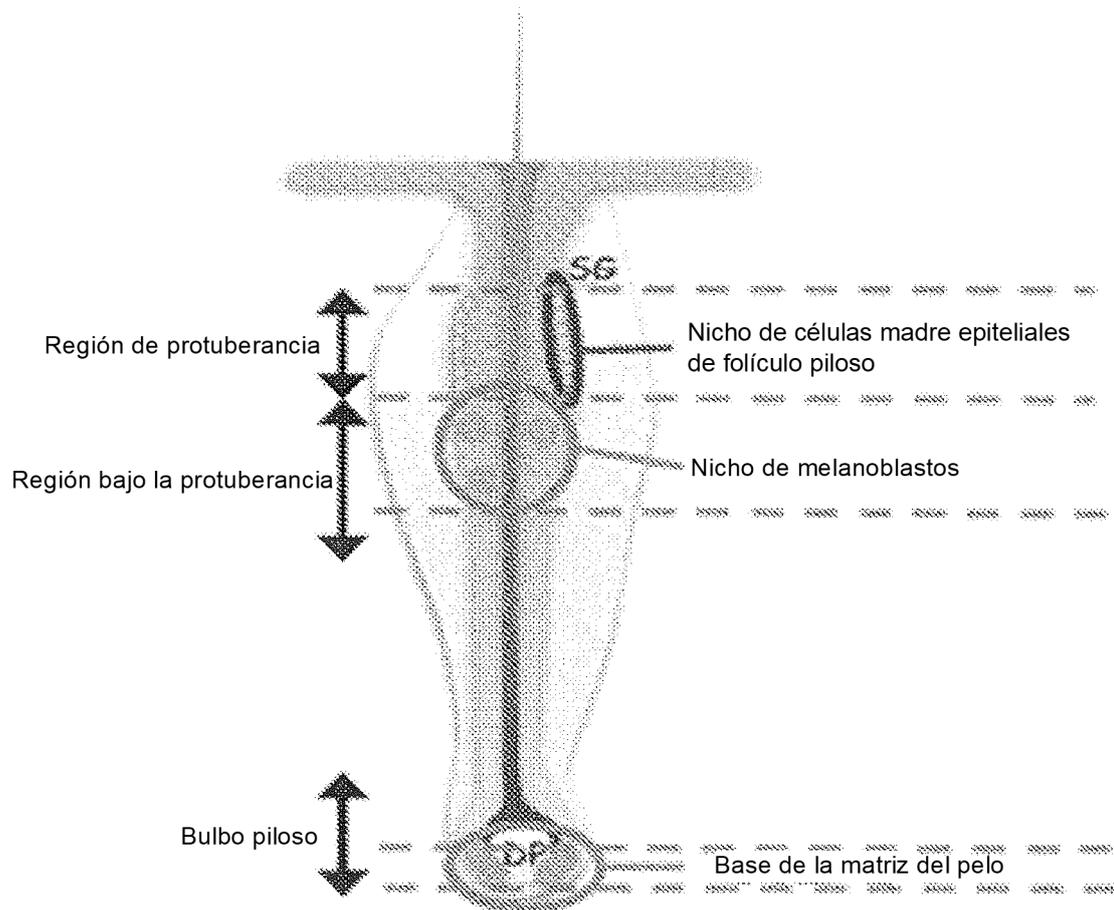
10 A partir de los resultados anteriores, se demostró que es posible controlar el color del pelo añadiendo células de una región que incluye melanoblastos o células precursoras de melanocitos a un germen de folículo piloso regenerativo. Además, se demostró que el pelo de color generado por un germen de folículo piloso regenerativo producido añadiendo células madre pigmentarias tiene un tallo del pelo con morfología normal.

15 Además, se demostró que un folículo piloso regenerado a partir un germen de folículo piloso regenerativo producido añadiendo células madre pigmentarias puede regenerar un nicho de células madre de melanoblastos en el folículo piloso. Además, se demostró que un folículo piloso regenerado a partir de un germen de folículo piloso regenerativo producido añadiendo células madre pigmentarias puede mantener de manera permanente la formación de pelo de color. Esto demuestra que los melanoblastos pueden mantenerse a lo largo de un largo periodo de tiempo en un nicho de células madre de melanoblastos dentro de un folículo piloso regenerado, y que la función fisiológica de un folículo piloso puede replicarse para suministrar melanocitos a la matriz del pelo.

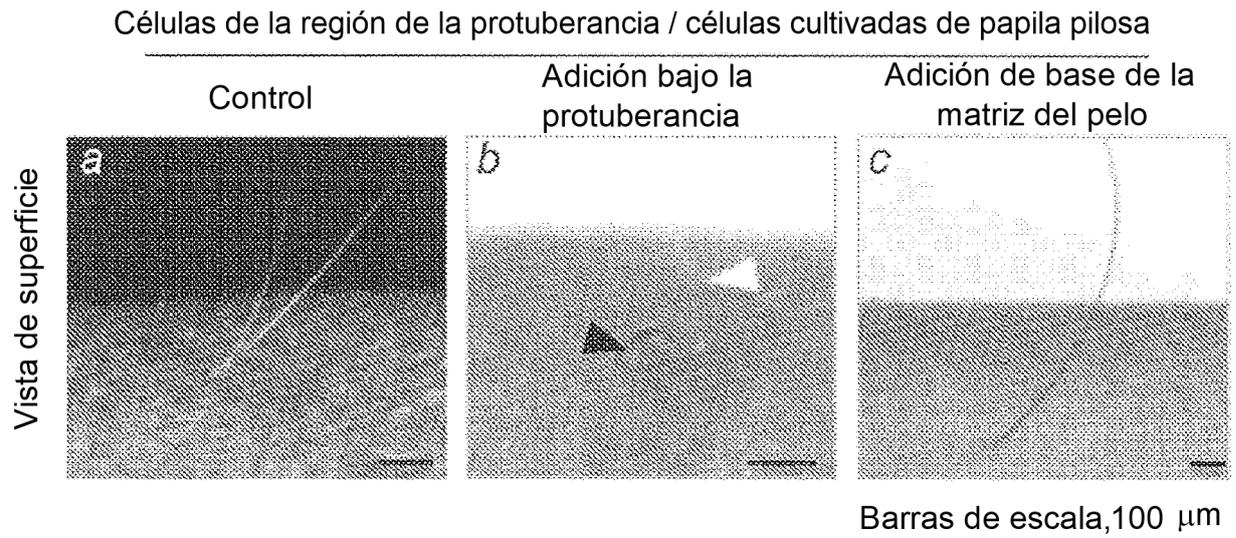
REIVINDICACIONES

1. Método para producir un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante que puede formar de manera permanente pelo de color tras el trasplante, que comprende:
 - 5 preparar una primera masa de células que comprende células mesenquimatosas,
 - preparar una segunda masa de células que comprende células epiteliales,
 - 10 preparar una masa de células que comprende células madre pigmentarias que se prepara a partir de la región bajo la protuberancia o a partir de la base de la matriz del pelo de un folículo piloso o a partir de una combinación de las mismas, y someter la masa de células que comprende células madre pigmentarias a un tratamiento de unificación,
 - 15 unir la masa de células que comprende las células madre pigmentarias a al menos una de entre la primera masa de células y la segunda masa de células, y
 - poner en contacto estrechamente después la primera masa de células y la segunda masa de células, habiéndose unido al menos una de las cuales a la masa de células que comprende las células madre pigmentarias, y cultivarlas dentro de un soporte.
 - 20
2. Método según la reivindicación 1, en el que la primera masa de células consiste sustancialmente en células mesenquimatosas.
- 25 3. Método según la reivindicación 1, en el que la segunda masa de células consiste sustancialmente en células epiteliales.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células madre pigmentarias son melanoblastos derivados de la región bajo la protuberancia o células precursoras de melanocitos derivadas de la base de la matriz del pelo.
- 30 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células madre pigmentarias son células precursoras de melanocitos derivadas de la base de la matriz del pelo.
- 35 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que cuando se unen las masas de células entre sí, la razón del número de células en la primera masa de células o el número de células en la segunda masa de células en relación con el número de células en la masa de células que comprende las células madre pigmentarias está dentro de un intervalo de 0,1:1 a 100:1.
- 40 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que cuando se ponen en contacto estrechamente la primera masa de células y la segunda masa de células y se cultivan en el soporte, la razón del número de células en la primera masa de células en relación con el número de células en la segunda masa de células está dentro de un intervalo de 0,3:1 a 1:1.
- 45 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las células mesenquimatosas son células de papila pilosa o células de vaina de raíz dérmica.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que las células epiteliales son células epiteliales de la región de protuberancia o células epiteliales basales de la matriz del pelo.
- 50 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las células mesenquimatosas o las células epiteliales se derivan de un folículo piloso de adulto.
- 55 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el método comprende además insertar una guía en el germen de folículo piloso regenerativo, en el que la guía es una fibra que facilita conexiones entre una parte de lado de células epiteliales del germen de folículo piloso regenerativo y las células epiteliales de lado de receptor tras el trasplante del germen de folículo piloso regenerativo.

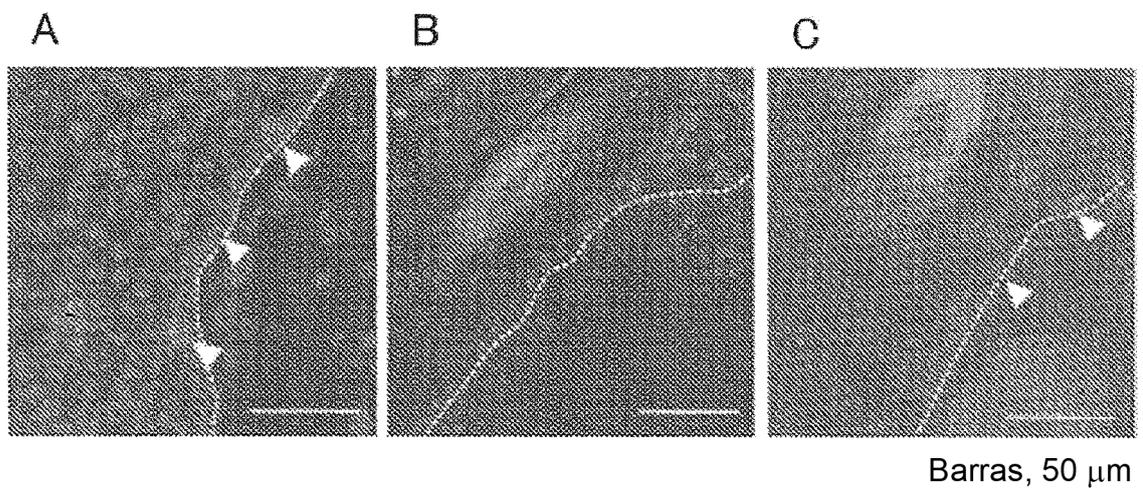
[FIG. 1]



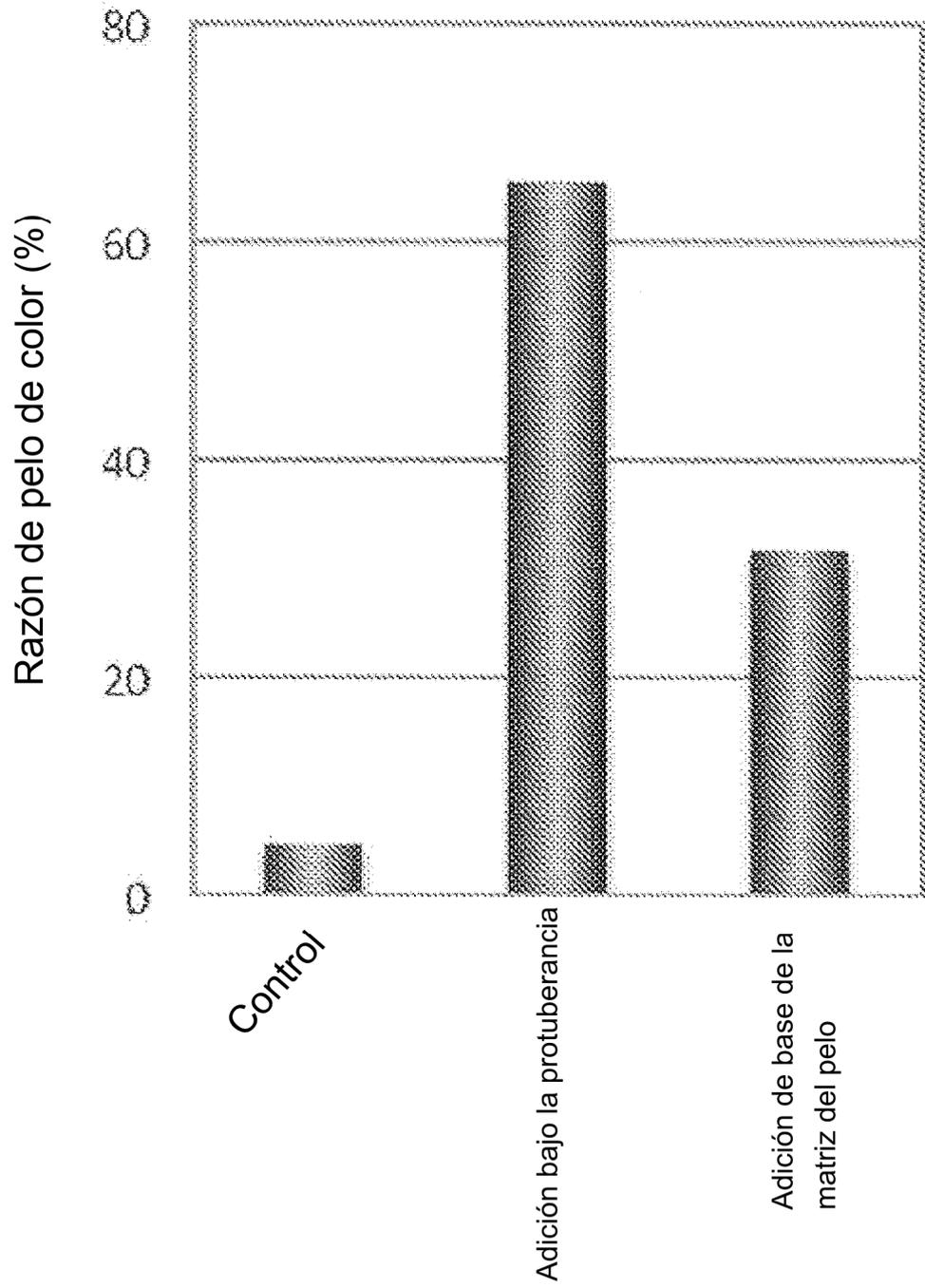
[FIG. 2]



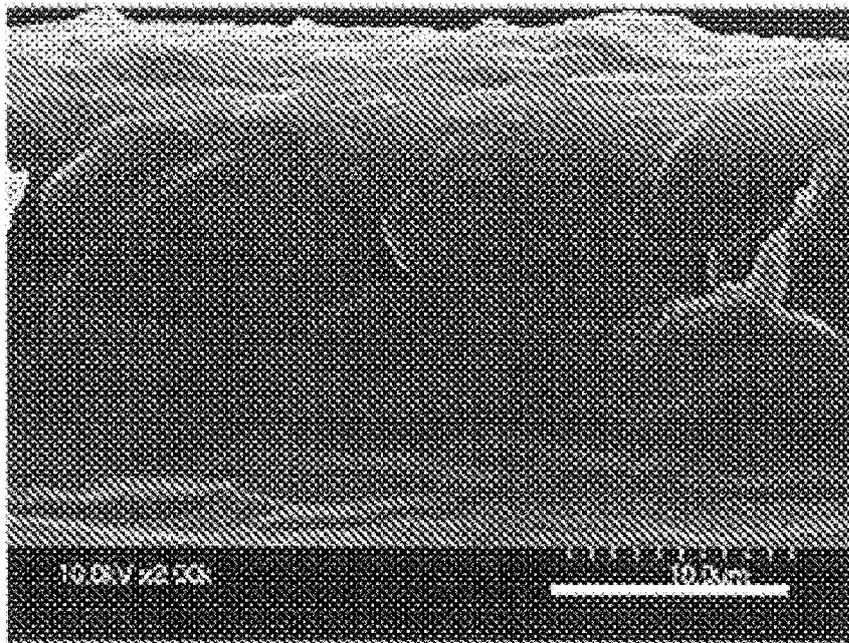
[FIG. 3]



[FIG. 4]



[FIG. 5]



Barras de escala, 10 μ m

[FIG. 6]

