

明 細 書

発明の名称： 下肢の疾患を処置するための細胞培養物

技術分野

[0001] 本発明は、細胞外マトリクスを外表面に有する細胞培養物、該細胞培養物の製造方法、および該細胞培養物を用いた末梢動脈疾患の処置方法等に関する。

背景技術

[0002] 近年、高齢化の進展や食生活の欧米化、運動不足などに伴い、動脈硬化症の患者が増加しており、それに関連して末梢動脈疾患の患者数も増加している。かかる疾患の治療方法として、疾患が軽度であるうちは、生活習慣改善の指導や薬物治療が選択され、重症下肢虚血などの重度の疾患になると、カテーテルを用いた血管形成療法、バイパス手術といった治療法が選択される。しかし、さらに重症化するとそのような治療法でも治療が不可能となり、虚血肢の切断が必要となる。このため、侵襲性が低く、重症化した患者にも使用できるような新たな治療法の開発が望まれている。

これに対して、血管内皮前駆細胞の発見を契機として、かかる疾患に対する再生医療を利用した治療法について開発が進められるようになった。そのような治療法として、例えば、自己骨髄細胞の単核細胞分画を対象の虚血肢に移植する方法（非特許文献1）、末梢血単核球や間葉系幹細胞を末梢動脈疾患の対象に投与する方法（特許文献1、2）、ゲルでシート状に成形したiPS細胞由来血管前駆細胞を下肢虚血を有する対象に移植する方法（特許文献3）などが挙げられる。

先行技術文献

特許文献

- [0003] 特許文献1：特表2012-512843号公報
特許文献2：特表2015-524437号公報
特許文献3：国際公開2013/069661号公報

非特許文献

[0004] 非特許文献1：吉岡徹他、J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 161-165

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、細胞外マトリクスを外表面に有する細胞培養物、該細胞培養物の製造方法および該細胞培養物を用いた末梢動脈疾患の処置方法等を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 特許文献1、2に記載の自己骨髄細胞の単核細胞分画、末梢血単核球または間葉系幹細胞を末梢動脈疾患を有する対象に投与する方法においては、それぞれシングルセルの状態で投与されており、投与部位における投与した細胞の生着が不十分であるという課題が残存している。

本発明者らは、細胞外マトリクスを外表面に有する、骨格筋芽細胞を含む細胞培養物を投与することにより、生体内において高い生着性を確保し、血管新生を促進できることを見出し、かかる知見に基づいてさらに研究を続けた結果、本発明を完成させるに至った。

[0007] すなわち、本発明は以下に関する。

[1] 下肢の疾患を処置するための100～500 μ mの大きさを有する細胞培養物であって、該細胞培養物の外表面に細胞外マトリクスを有する、前記細胞培養物。

[2] 血管新生を促進するための、[1]に記載の細胞培養物。

[3] 骨格筋芽細胞を含む、[1]または[2]に記載の細胞培養物。

[4] 細胞培養物がシート状細胞培養物の破碎片である、[1]～[3]のいずれか1つに記載の細胞培養物。

[5] 下肢の疾患が末梢動脈疾患である、[1]～[4]のいずれか1つに記載の細胞培養物。

[6] 細胞外マトリクスを有する、シート状細胞培養物の破碎片。

[0008] [7] シート状細胞培養物の破砕片を作製するための方法であって、以下：

基材上に細胞を播種するステップ、
播種した細胞をシート化するステップ、および
形成されたシート状細胞培養物を破砕するステップ、
を含む、前記方法。

[8] シート状細胞培養物の破砕が、シリンジを用いて4～6回懸濁することである、[7]に記載の方法。

[9] 末梢動脈疾患を処置するための、骨格筋芽細胞を含む細胞培養物と細胞外マトリクスとを含む医薬組成物。

[10] 末梢動脈疾患を処置するための方法であって、骨格筋芽細胞を含み、細胞外マトリクスを有する、シート状細胞培養物の破砕片を投与することを含む、前記方法。

[11] 末梢動脈疾患を処置するための方法であって、骨格筋芽細胞を含む細胞培養物と細胞外マトリクスとを含む医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

[12] 投与が、筋肉内への投与である、[10]または[11]に記載の方法。

発明の効果

[0009] 本発明の細胞培養物を投与することにより、血管形成を促進し、末梢動脈疾患を処置することができる。また、本発明の細胞培養物は、投与された部位において長く生着することができる。さらに本発明の細胞培養物は、例えば注射により対象の患部へ直接投与することが可能であるため、対象の患部が広範囲であっても、複数箇所へ分けて簡便に投与することができる。より詳細には、本発明の細胞培養物を患部へ投与することにより、例えば、中心に核のある筋線維を発生させたり、血流量を改善したりすることができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1] 図1は、シート状細胞培養物の作製に用いた細胞のFACSを用いた細胞純度の測定結果を示す。

[図2A]図2 Aは、作製したシート状細胞培養物の写真である。

[図2B]図2 Bは、ヘマトキシリン・エオジン染色したシート状細胞培養物の断面の顕微鏡写真である。

[図2C]図2 Cは、免疫染色したシート状細胞培養物の断面の顕微鏡写真である。

[図3A]図3 に、シート状細胞培養物の懸濁液の顕微鏡写真を示す。図3 Aは、懸濁として吸引・排出のセットを5回繰り返した懸濁液の写真である。

[図3B]図3 Bは、図3 Aの懸濁液の拡大された顕微鏡写真である。

[図3C]図3 Cは、懸濁として吸引・排出のセットを10回繰り返した懸濁液の拡大された顕微鏡写真である。

[0011] [図4]図4 は、レーザードップラー灌流イメージング（LDPI）により測定した、マウス虚血モデル作製前の血流量を100%とした第0、7、14、21、および28日目における各群のマウスの血流量%の結果を示すグラフである。図中のClustered cellsは、破砕片投与群のマウスを、Single cellsは、シングルセル投与群のマウスを、Salineは、生理食塩水投与群のマウスを示す。また、図中*は、生理食塩水投与群に対してダネット検定を行い $P < 0.05$ であったものを示す。

[図5]図5は、LDPIにより測定した、第7、14、21および28日目のそれぞれの群の代表的なマウスのイメージングの結果を示す。図中のClustered cellsは、破砕片投与群のマウスを、Single cellsは、シングルセル投与群のマウスを、Salineは、生理食塩水投与群のマウスを示す。

[図6A-F]図6は、第3、5、7および28日目における、破砕片投与群、シングルセル投与群、生理食塩水投与群のそれぞれのマウスから採取した組織におけるRT-PCRの結果を示す。図中のClustered cellsは、破砕片投与群のマウスを、Single cellsは、シングルセル投与群のマウスを、Salineは、生理食塩水投与群のマウスを示す。また、図中*は、生理食塩水投与群に対してダネット検定を行い $P < 0.05$ であったもの、図中+は、シングルセル投与群に対してダネット検定を行い $P < 0.05$ であったものを示す。

図6AはVEGFについての、図6BはHGFについての、図6CはFGFについての、図6DはAng-1についての、および図6EはAng-2についての、図6FはSDF-1についてのRT-PCRの結果を示す。

[図6GH]図6GはPax7についての、図6HはMyoDについてのRT-PCRの結果を示す。

[図7]図7は、第3、5、7および28日目における、破砕片投与群2、シングルセル投与群2、生理食塩水投与群2のそれぞれのマウスから採取した組織のヘマトキシリン・エオジン染色した顕微鏡写真を示す。図中のClustered cellsは、破砕片投与群2のマウスを、Single cellsは、シングルセル投与群2のマウスを、Salineは、生理食塩水投与群2のマウスを示す。

[図8]図8Aは、ヘマトキシリン・エオジン染色したそれぞれの組織における、中心に核がある筋線維（新生筋線維）の数をカウントした結果を示す。図8Bは、ヘマトキシリン・エオジン染色したそれぞれの組織における、中心に核がある筋線維（新生筋線維）の数と辺縁に核のある成熟した筋線維の数との比率を算出した結果を示す。図中のClustered cellsは、破砕片投与群2のマウスを、Single cellsは、シングルセル投与群2のマウスを、Salineは、生理食塩水投与群2のマウスを示す。また、図中*は、生理食塩水投与群2に対してダネット検定を行い $P < 0.05$ であったもの、図中+は、シングルセル投与群2に対してダネット検定を行い $P < 0.05$ であったものを示す。図8Cは、第3日目における、破砕片投与群2、シングルセル投与群2、生理食塩水投与群2のそれぞれのマウスから採取した組織中のembryonic MHC陽性である細胞数をカウントした結果を示す。MHCは骨格筋のマーカーであり、このマーカーが陽性で細胞は筋肉の細胞であることを表している。

[図9]図9は、第7日目における、破砕片投与群2およびシングルセル投与群2のそれぞれのマウスから採取した組織の凍結標本の顕微鏡写真を示す。図9(A)は、破砕片投与群2のマウスから採取した標本の写真を、図9(B)は、シングルセル投与群2のマウスから採取した標本の写真を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の一側面は、下肢の疾患を処置するための100～500 μ mの大きさを有する細胞培養物であって、該細胞培養物の外表面に細胞外マトリクスを有する、前記細胞培養物に関する。

[0013] 本発明において、「細胞培養物」は、細胞培養ステップを経て得られる組成物を指す。本発明の細胞培養物は、細胞培養物を構成する細胞により産生された細胞外マトリクスを介して、少なくとも一部の細胞が細胞同士接合している。本発明において、細胞培養物は、細胞外マトリクスを、細胞培養物の内部における細胞同士の間のみでなく、細胞培養物の外表面にも有する。一態様において、本発明の細胞培養物は、細胞外マトリクスの層を細胞培養物の外表面全体に有している。別の態様において、本発明の細胞培養物はシート状の形態をしており、ここで、シート状の形態とは、第1の面とそれとほぼ平行である第2の面を有する形態を指し、細胞培養物はその1つの面に細胞外マトリクスの層を有している。さらに別の態様において、本発明の細胞培養物は、スフェロイドを形成しており、スフェロイドが基材と接していた部分、例えば略球状であるスフェロイドの外表面部分の約半分において、細胞外マトリクスの層を有している。

本発明において、細胞培養物を構成する細胞により産生された細胞外マトリクスは、種々の条件によるが、例えば、細胞の播種後、24時間以上、例えば、24時間、30時間、36時間、42時間、48時間、54時間、60時間、66時間、72時間、培養することにより生じる。

細胞外マトリクスは、細胞培養物が投与部位に接着することに寄与し、細胞培養物を投与する際に、投与部位における細胞培養物の生着率を向上させることができる。また細胞外マトリクスは細胞由来成分であるため、本発明の細胞培養物と共に投与に供することにおいてなんら問題はない。本発明の細胞培養物は、外表面に細胞外マトリクスを有していることが好ましいが、例えば、細胞培養物としてシングルセルを使用する場合など、細胞培養物が投与部位に接着するのに十分な細胞外マトリクスを有していない場合には、

必要な量の細胞外マトリクスと組み合わせて、投与してもよい。例えば、 $7 \sim 10 \times 10^5$ 個の細胞から作製されるシート状細胞培養物は、投与部位に接着するのに十分な細胞外マトリクスを有しており、それに相当する量の細胞外マトリクスを、細胞培養物と組み合わせて投与してもよい。ここで、シングルセルとは、互いに接着しておらず、単一の状態で存在する細胞を指し、これには元々接着していた複数の細胞を単一の細胞に分離された細胞および単一の細胞の状態で調製された細胞を含む。また本明細書において、シングルセルは、シングルセルに近い形態である細胞を含む。ここで、シングルセルに近い形態とは、少なくとも一部の細胞が少数の細胞同士で接着しているが、シングルセルと同様の挙動を示す形態を指す。シングルセルに近い形態の細胞は、細胞同士が接着している状態の細胞を、 $1 \sim 30\%$ 、好ましくは $1 \sim 20\%$ 、より好ましくは $1 \sim 10\%$ 含む。

[0014] 本発明の細胞培養物に含まれる細胞は、細胞外マトリクスを産生し得るものであれば特に限定されず、例えば、接着細胞（付着性細胞）を含む。接着細胞は、例えば、接着性の体細胞（例えば、心筋細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、肝細胞、膵細胞、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞、滑膜細胞、軟骨細胞など）および幹細胞（例えば、筋芽細胞、心臓幹細胞などの組織幹細胞、胚性幹細胞、iPS (induced pluripotent stem) 細胞などの多能性幹細胞、間葉系幹細胞等）などを含む。体細胞は、幹細胞、特にiPS細胞から分化させたもの（iPS細胞由来接着細胞）であってもよい。本発明の細胞培養物に含まれる細胞の非限定例としては、例えば、筋芽細胞（例えば、骨格筋芽細胞など）、間葉系幹細胞（例えば、骨髄、脂肪組織、末梢血、皮膚、毛根、筋組織、子宮内膜、胎盤、臍帯血由来のものなど）、心筋細胞、線維芽細胞、心臓幹細胞、胚性幹細胞、iPS細胞、滑膜細胞、軟骨細胞、上皮細胞（例えば、口腔粘膜上皮細胞、網膜色素上皮細胞、鼻粘膜上皮細胞など）、内皮細胞（例えば、血管内皮細胞など）、肝細胞（例えば、肝実質細胞など）、膵細胞（例えば、膵島細胞など）、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞等

が挙げられる。ここで、iPS細胞は、遺伝子を導入することにより誘導された、分化万能性および自己複製能を有する細胞である。iPS細胞由来接着細胞の非限定例としては、iPS細胞由来の心筋細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、肝細胞、膵細胞、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞、滑膜細胞、軟骨細胞などが挙げられる。

別の態様において、本発明の細胞培養物に含まれる細胞は、血管新生を促進できる細胞、例えば、血管新生を促進する因子、例えば、VEGFなどのサイトカインを分泌できる細胞が特に好ましい。

[0015] 細胞培養物を構成する細胞は、細胞培養物による処置に供する任意の生物に由来することができ、かかる生物は、これらに限定されるものではないが、ヒト、霊長類、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、げっ歯目動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモットなど）、ウサギなどを含む。また、細胞培養物を構成する細胞は、1種類のみであってもよいが、2種類以上の細胞を用いることもできる。本発明の好ましい態様において、細胞培養物を構成する細胞が2種類以上ある場合、最も多い細胞の含有比率（純度）は、細胞培養物製造終了時において、60%以上、好ましくは、70%以上、より好ましくは75%以上である。

[0016] 細胞は異種由来細胞であっても同種由来細胞であってもよい。ここで「異種由来細胞」は、細胞培養物が移植に用いられる場合、そのレシピエントとは異なる種の生物に由来する細胞を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、サルやブタに由来する細胞などが異種由来細胞に該当する。また、「同種由来細胞」は、レシピエントと同一の種の生物に由来する細胞を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、ヒト細胞が同種由来細胞に該当する。同種由来細胞は、自己由来細胞（自己細胞または自家細胞ともいう）、すなわち、レシピエントに由来する細胞と、同種非自己由来細胞（他家細胞ともいう）を含む。自己由来細胞は、移植しても拒絶反応が生じないため、本開示においては好ましい。しかしながら、異種由来細胞や同種非自己由来細胞を利用することも可能である。異種由来細胞や同種非自己由

来細胞を利用する場合は、拒絶反応を抑制するため、免疫抑制処置が必要となることがある。なお、本明細書中で、自己由来細胞以外の細胞、すなわち、異種由来細胞と同種非自己由来細胞を非自己由来細胞と総称することもある。本開示の一態様において、細胞は自家細胞または他家細胞である。本開示の一態様において、細胞は自家細胞である。本開示の別の態様において、細胞は他家細胞である。

[0017] 本発明において、細胞培養物は、対象の組織内、好ましくは、下肢の疾患を有している対象の病変部位へ投与される。一態様において、細胞培養物は、末梢動脈疾患の患者において、血流量が悪化している病変部位、例えば、下肢の大腿内転筋群へ投与される。一態様において、細胞培養物を、病変部位に投与することにより、例えば投与7日後に、健常状態と比較して、例えば35%、40%、45%まで血流量を改善することができる。一態様において、細胞培養物を、病変部位に投与することにより、対照の生理食塩水と比較して、例えば、血流量を約1.5倍、約2倍、約2.5倍改善することができる。好ましくは、細胞培養物は、注射により組織内へ投与される。したがって、本発明の細胞培養物は、投与に用いる注射針の内部を通り、かつ投与後に細胞培養物が微小血管へ入り込まない程度の大きさを有する。このような大きさとして、例えば、平均直径が $30\mu\text{m}$ ～ $1000\mu\text{m}$ 、好ましくは $100\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ の細胞培養物が挙げられる。ここで、 $100\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ の細胞培養物とは、例えば、顕微鏡下などで細胞培養物を平面的に観察した際の、観察された形状が多角形である場合における、任意の角を結ぶあらゆる線分が $100\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ の長さである細胞培養物、または観察された形状が略円形である場合における、長径および短径が各々 $100\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ である細胞培養物を指す。一態様において、このような大きさの細胞培養物は、約 10^2 ～ 10^6 個の細胞を有するシート状細胞培養物、シート状細胞培養物の破砕片、スフェロイドなどが挙げられる。

[0018] 本発明において、「下肢の疾患」は、下肢に障害を有するあらゆる疾患を含む。かかる疾患の例として、これらに限定されないが、末梢動脈疾患、下

肢静脈瘤、深部静脈血栓症などが挙げられる。好ましくは、本発明における下肢の疾患は、下肢において血管が狭窄または閉塞し、その下肢の血流量が悪化している疾患、例えば、末梢動脈疾患である。本発明において、末梢動脈疾患は、これらに限定されるものではないが、下肢閉塞性動脈硬化症、バージャー病、膠原病などを含み、特に重症化した下肢閉塞性動脈硬化症を重症下肢虚血と称する。

[0019] 本発明において「処置する」とは、疾患の治癒、一時的寛解または予防などを目的とする医学的に許容される全ての種類の予防的および／または治療的介入を行うことを包含するものとする。例えば、「処置する」とは、組織の異常に関連する疾患の進行の遅延または停止、病変の退縮または消失、当該疾患発症の予防または再発の防止をすることなどを含む、種々の目的の医学的に許容される介入を行うことを包含する。

特定の理論に拘束されることはないが、本発明の細胞培養物の末梢動脈疾患への作用は、投与された本発明の細胞培養物から持続的に分泌される VEGF などのサイトカインが、虚血部位の細胞に直接的および／または間接的に作用し、血管新生を促進することによるものと考えられる。また、本発明の細胞培養物は細胞外マトリクスを含んでいるため、細胞培養物の虚血部位における生着率が高くなり、虚血部位の細胞に効率的に作用すると考えられる。このように、本発明の細胞培養物は、虚血部位における生着率が高く、虚血部位の細胞に作用して血管形成を促進するので、早期に筋新生を生じさせることができると考えられる。例えば、マウスにおいては、虚血モデルの筋肉の回復が起こるのは2ヶ月は必要であるとされているが (Mohiuddin M et.al, Scientific Reports volume 9, Article number: 9551 (2019)参照)、本発明の細胞培養物を用いることより、例えば、3日で筋線維を生じさせ、1カ月で筋新生を終了させることができる。

本発明の細胞培養物を虚血部位に投与し、虚血部位の細胞に作用することにより、中心に核のある筋線維（新生筋線維）を生じさせることができ、かかる筋線維の発生は、例えば、ヘマトキシリン・エオジン染色したそれぞれ

の組織における、辺縁に核のある成熟した筋線維の数、および、中心に核がある筋線維（新生筋線維）の数をカウントすることによって、組織中のembryonic MHC陽性である細胞数をカウントすることによって、あるいは、VEGF、HGF、FGF、Ang-1、Ang-2およびSDF-1などの血管新生関連因子、Pax7、MyoDなどの筋分化制御因子の遺伝子発現を解析することによって確認することができる。一態様において、本発明の細胞培養物を虚血部位に投与することにより、例えば、2日以内、3日以内、4日以内に中心に核のある筋線維を生じさせることができ、上述のとおり、筋肉の治癒を確認することができる。

[0020] 一態様において、細胞培養物は骨格筋由来の細胞を含む。本発明において、骨格筋由来の細胞とは、衛星細胞、骨格筋芽細胞、骨格筋細胞、骨格筋管および骨格筋線維を指す。好ましくは、骨格筋由来の細胞とは、骨格筋芽細胞である。かかる態様において本発明の細胞培養物を構成する細胞は、骨格筋由来の細胞を、50%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、または90%以上含み、好ましくは60%以上含む。

[0021] 骨格筋芽細胞は当該技術分野においてよく知られており、骨格筋から任意の既知の方法（例えば、特開2007-89442号公報記載の方法など）により調製することもできるし、例えば、ロンザジャパン株式会社のカタログ番号：CC-2580、コスモ・バイオ株式会社の商品コード3520など、商業的に入手することもできる。骨格筋芽細胞は、これらに限定されるものではないが、CD56、 α 7インテグリン、ミオシン重鎖IIa、ミオシン重鎖IIb、ミオシン重鎖II d (IIx)、MyoD、Myf5、Myf6、ミオゲニン、デスミン、PAX3などのマーカーにより同定することができる。一態様において、骨格筋芽細胞はCD56陽性である。一態様において、骨格筋芽細胞はCD56陽性およびデスミン陽性である。

[0022] 横紋筋組織から骨格筋芽細胞を調製する場合、調製した細胞集団には線維芽細胞が含まれる。本発明に係る細胞培養物を製造する際に、横紋筋組織か

ら調製した骨格筋芽細胞を含む細胞集団を用いる場合、当該細胞集団には一定量の線維芽細胞が含まれることになる。線維芽細胞は当該技術分野においてよく知られており、TE-7（例えば、Rosendaal et al., J Cell Sci. 1994; 107(Pt1): 29-37、Goodpaster et al. J Histochem Cytochem. 2008; 56(4): 347-358など参照）などのマーカーにより同定することができる。

一態様において、本発明の細胞培養物を構成する細胞は、横紋筋組織から調製された骨格筋芽細胞を含む。したがって本発明の細胞培養物の製造において用いられる細胞集団には、骨格筋芽細胞および線維芽細胞が含まれ得る。一態様において、本発明の細胞培養物の製造において用いられる細胞集団は、CD56陽性率が50%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上であり得、好ましくは60%以上である。

[0023] 本発明の細胞培養物の製造において用いられる細胞集団は、線維芽細胞を含み得るが、線維芽細胞の含有率が高すぎる場合、骨格筋芽細胞の含有率が低下するため、好ましくない。したがって一態様において、本発明の細胞培養物の製造において用いられる細胞集団は、TE-7陽性率が50%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下であり得、好ましくは40%以下である。

本発明の細胞培養物の製造において用いられる細胞集団は、骨格筋芽細胞および線維芽細胞以外の細胞も含み得るが、かかる細胞は少ないほど好ましい。したがってCD56陽性率およびTE-7陽性率の合計値は、高い方が好ましく、例えば80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上などであり得、好ましくは90%以上である。

[0024] 本発明において、骨格筋由来の細胞を含む細胞培養物からは、サイトカインが分泌される。

本発明において、骨格筋由来の細胞を含む細胞培養物から分泌されるサイトカインは、これらに限定されるものではないが、例えば、IL-1b、I

L-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、エオタキシン、FGF-basic、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IP-10、MCP-1 (MCAF)、MIP-1a、PDGF-bb、MIP-1b、RANTES、TNF-a、HGF-1、SDF-1、およびVEGFなどが挙げられる。

[0025] 一態様において、本発明の細胞培養物は、シート状細胞培養物の破砕片である。本発明において、「シート状細胞培養物の破砕片」とは、シート状細胞培養物を破砕することにより、複数の破砕片へと分割したものを指す。破砕片の大きさは、これに限定されるものではないが、破砕片のうち大部分が、微小血管へ入らず、かつ注射針の内部を通る大きさであることが好ましい。かかる大きさは、例えば、シート形状の平面の対角線の長さの平均が30 μm ~ 1000 μm であり、好ましくは100 μm ~ 500 μm である。本発明において破砕は、シート状細胞培養物の破砕片を得られるものであれば、既知の任意の方法によって行うことができ、例えば、シリンジおよびニードルまたはピペットなどにより、シート状細胞培養物を含む液体を懸濁することによって行うことができる。

[0026] 本発明において「シート状細胞培養物」は、細胞が互いに連結してシート状になったものをいう。細胞同士は、直接（接着分子などの細胞要素を介するものを含む）および／または介在物質を介して、互いに連結していてもよい。介在物質としては、細胞同士を少なくとも物理的（機械的）に連結し得る物質であれば特に限定されないが、例えば、細胞外マトリクスなどが挙げられる。介在物質は、好ましくは細胞由来のもの、特に、細胞培養物を構成する細胞に由来するものである。細胞は少なくとも物理的（機械的）に連結されるが、さらに機能的、例えば、化学的、電氣的に連結されてもよい。シート状細胞培養物は、1の細胞層から構成されるもの（単層）であっても、2以上の細胞層から構成されるもの（積層（多層）体、例えば、2層、3層、4層、5層、6層など）であってもよい。また、シート状細胞培養物は、

細胞が明確な層構造を示すことなく、細胞 1 個分の厚みを超える厚みを有する 3 次元構造を有してもよい。例えば、シート状細胞培養物の垂直断面において、細胞が水平方向に均一に整列することなく、不均一に（例えば、モザイク状に）配置された状態で存在していてもよい。

[0027] シート状細胞培養物は、好ましくはスキャフォールド（支持体）を含まない。スキャフォールドは、その表面上および／またはその内部に細胞を付着させ、シート状細胞培養物の物理的一体性を維持するために当該技術分野において用いられることがあり、例えば、ポリビニリデンジフルオリド（PVDF）製の膜等が知られているが、本開示のシート状細胞培養物は、かかるスキャフォールドがなくともその物理的一体性を維持することができる。また、本開示のシート状細胞培養物は、好ましくは、シート状細胞培養物を構成する細胞由来の物質のみからなり、それら以外の物質を含まない。

[0028] 本発明において、シート状細胞培養物の厚みは特に限定されていない。シート状細胞培養物として単層のシートを用いる場合、その厚みは通常細胞 1 個分以上の厚みを有し、シート状細胞培養物のシートを形成する細胞の種類によっても厚みは異なるが、一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、 $30\text{ }\mu\text{m}$ 以上の厚みを有し、好ましい一態様において、 $50\text{ }\mu\text{m}$ 以上の厚みを有する。本発明のシート状細胞物の値の範囲としては、例えば $30\text{ }\mu\text{m}\sim 200\text{ }\mu\text{m}$ 、好ましくは $50\text{ }\mu\text{m}\sim 150\text{ }\mu\text{m}$ 、より好ましくは $60\text{ }\mu\text{m}\sim 100\text{ }\mu\text{m}$ が挙げられる。シート状細胞培養物として積層したシートを用いる場合、前記単層シートの厚み $\times$ 積層枚数を超えない厚みとなる。したがって、一態様として例えば単層シートを 5 枚重ねたシートを用いる場合、その厚みは $150\text{ }\mu\text{m}$ 以上の厚みを有し、好ましい一態様において、 $250\text{ }\mu\text{m}$ 以上の厚みを有する。その場合におけるシート状細胞物の値の範囲としては、例えば $150\text{ }\mu\text{m}\sim 1000\text{ }\mu\text{m}$ 、好ましくは $250\text{ }\mu\text{m}\sim 750\text{ }\mu\text{m}$ 、より好ましくは $300\text{ }\mu\text{m}\sim 500\text{ }\mu\text{m}$ が挙げられる。

[0029] 本発明の別の側面は、基材上に細胞を播種するステップ、播種した細胞をシート化するステップ、および形成されたシート状細胞培養物を破砕するス

テップを含むシート状細胞培養物の破砕片を作製するための方法に関する。

[0030] 本発明のシート状細胞培養物の破砕片の作製方法において、シート状細胞培養物は、当業者に既知の任意の方法（例えば、特許文献1、特開2010-081829、特開2011-110368など参照）で製造することができる。シート状細胞培養物の製造方法は、典型的には、基材上に細胞を播種するステップ、播種した細胞をシート化するステップ、形成されたシート状細胞培養物を基材から剥離するステップを含むが、これに限定されない。ここで、播種した細胞をシート化するステップにおいて、シート状細胞培養物の基材側の一面に細胞外マトリクスの層が形成されており、続く形成されたシート状細胞培養物を基材から剥離するステップにおいて、シート状細胞培養物を、その一面に細胞外マトリクスの層を有した状態で基材から剥離する。細胞を基材上に播種するステップの前に、細胞を凍結するステップおよび細胞を解凍するステップを行ってもよい。さらに、細胞を解凍するステップの後に細胞を洗浄するステップを行ってもよい。これら各ステップは、シート状細胞培養物の製造に適した既知の任意の手法で行うことができる。シート状細胞培養物を製造するステップは、サブステップとして上記シート状細胞培養物の製造方法に係るステップの1または2以上を含んでもよい。ある一態様において、細胞を解凍するステップの後、細胞を基材上に播種するステップの前に細胞を増殖させるステップを含まない。

本発明のシート状細胞培養物の破砕片の作製方法は、シート状細胞培養物の製造の後に形成されたシート状細胞培養物を破砕するステップをさらに含む。シート状細胞培養物を破砕するステップは、シート状細胞培養物を複数の細胞培養物に分離し、上記のシート状細胞培養物の破砕片を作製することができる。一態様において、シート状細胞培養物の破砕は、シリンジとニードルを用いて2～8回シート状細胞培養物の吸引と排出のセットを繰り返し、懸濁することであり、好ましくは4～6回吸引と排出のセットを繰り返し、懸濁することである。

[0031] 基材は、細胞がその上で細胞培養物を形成し得るものであれば特に限定さ

れず、例えば、種々の材質の容器、容器中の固形もしくは半固形の表面などを含む。容器は、培養液などの液体を透過させない構造・材料が好ましい。かかる材料としては、限定することなく、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、テフロン（登録商標）、ポリエチレンテレフタレート、ポリメチルメタクリレート、ナイロン6, 6、ポリビニルアルコール、セルロース、シリコン、ポリスチレン、ガラス、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、金属（例えば、鉄、ステンレス、アルミニウム、銅、真鍮）等が挙げられる。また、容器は、少なくとも1つの平坦な面を有することが好ましい。かかる容器の例としては、限定することなく、例えば、細胞培養物の形成が可能な基材で構成された底面と、液体不透過性の側面とを備えた培養容器が挙げられる。かかる培養容器の特定の例としては、限定されずに、細胞培養皿、細胞培養ボトルなどが挙げられる。容器の底面は透明であっても不透明であってもよい。容器の底面が透明であると、容器の裏側から細胞の観察、計数などが可能となる。また、容器は、その内部に固形もしくは半固形の表面を有してもよい。固形の表面としては、上記のごとき種々の材料のプレートや容器などが、半固形の表面としては、ゲル、軟質のポリマーマトリックスなどが挙げられる。基材は、上記材料を用いて作製してもよいし、市販のものを利用してよい。好ましい基材としては、限定することなく、例えば、シート状細胞培養物の形成に適した、接着性の表面を有する基材が挙げられる。具体的には、親水性の表面を有する基材、例えば、コロナ放電処理したポリスチレン、コラーゲンゲルや親水性ポリマーなどの親水性化合物を該表面にコーティングした基材、さらには、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンなどの細胞外マトリクスや、カドヘリンファミリー、セレクトインファミリー、インテグリンファミリーなどの細胞接着因子などを表面にコーティングした基材などが挙げられる。また、かかる基材は市販されている（例えば、Corning（登録商標）TC-Treated Culture Dish、Corningなど）。基材は全体または部分が透明であっても不透明であってもよい。

[0032] 基材は、刺激、例えば、温度や光に応答して物性が変化する材料で表面が被覆されていてもよい。かかる材料としては、限定されずに、例えば、（メタ）アクリルアミド化合物、N-アルキル置換（メタ）アクリルアミド誘導体（例えば、N-エチルアクリルアミド、N-n-プロピルアクリルアミド、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミド、N-シクロプロピルアクリルアミド、N-シクロプロピルメタクリルアミド、N-エトキシエチルアクリルアミド、N-エトキシエチルメタクリルアミド、N-テトラヒドロフルフリルアクリルアミド、N-テトラヒドロフルフリルメタクリルアミド等）、N、N-ジアルキル置換（メタ）アクリルアミド誘導体（例えば、N、N-ジメチル（メタ）アクリルアミド、N、N-エチルメチルアクリルアミド、N、N-ジエチルアクリルアミド等）、環状基を有する（メタ）アクリルアミド誘導体（例えば、1-（1-オキソ-2-プロペニル）-ピロリジン、1-（1-オキソ-2-プロペニル）-ピペリジン、4-（1-オキソ-2-プロペニル）-モルホリン、1-（1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル）-ピロリジン、1-（1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル）-ピペリジン、4-（1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル）-モルホリン等）、またはビニルエーテル誘導体（例えば、メチルビニルエーテル）のホモポリマーまたはコポリマーからなる温度応答性材料、アゾベンゼン基を有する光吸収性高分子、トリフェニルメタンロイコハイドロオキシドのビニル誘導体とアクリルアミド系単量体との共重合体、および、スピロベンゾピランを含むN-イソプロピルアクリルアミドゲル等の光応答性材料などの公知のものを用いることができる（例えば、特開平2-211865、特開2003-33177参照）。これらの材料に所定の刺激を与えることによりその物性、例えば、親水性や疎水性を変化させ、同材料上に付着した細胞培養物の剥離を促進することができる。温度応答性材料で被覆された培養皿は市販されており（例えば、株式会社セルシードのUpCell（登録商標）やDIC株式会社のCepalliet（登録商標））、これらを本開示の製造方法に

使用することができる。

- [0033] 基材は、種々の形状であってもよいが、平坦であることが好ましい。また、その面積は特に限定されないが、例えば、約 1 cm^2 ～約 200 cm^2 、約 2 cm^2 ～約 100 cm^2 、約 3 cm^2 ～約 50 cm^2 などであってよい。例えば、基材として直径 10 cm の円形の培養皿が挙げられる。この場合、面積は 56.7 cm^2 となる。

基材は血清でコート（被覆またはコーティング）されていてもよい。血清でコートされた基材を用いることにより、より高密度のシート状細胞培養物を形成することができる。「血清でコートされている」とは、基材の表面に血清成分が付着している状態を意味する。かかる状態は、限定されずに、例えば、基材を血清で処理することにより得ることができる。血清による処理は、血清を基材に接触させること、および、必要に応じて所定期間インキュベートすることを含む。

- [0034] 血清としては、異種血清および／または同種血清を用いることができる。異種血清は、シート状細胞培養物を移植に用いる場合、そのレシピエントとは異なる種の生物に由来する血清を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、ウシやウマに由来する血清、例えば、ウシ胎仔血清（FBS、FCS）、仔ウシ血清（CS）、ウマ血清（HS）などが異種血清に該当する。また、「同種血清」は、レシピエントと同一の種の生物に由来する血清を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、ヒト血清が同種血清に該当する。同種血清は、自己血清（自家血清ともいう）、すなわち、レシピエントに由来する血清、およびレシピエント以外の同種個体に由来する同種他家血清を含む。なお、本明細書中で、自己血清以外の血清、すなわち、異種血清と同種他家血清を非自己血清と総称することもある。

基材をコートするための血清は、市販されているか、または、所望の生物から採取した血液から定法により調製することができる。具体的には、例えば、採取した血液を室温で約20分～約60分程度放置して凝固させ、これを約 $1000\times g$ ～約 $1200\times g$ 程度で遠心分離し、上清を採取する方法

などが挙げられる。

- [0035] 基材上でインキュベートする場合、血清は原液で用いても、希釈して用いてもよい。希釈は、任意の媒体、例えば、限定することなく、水、生理食塩水、種々の緩衝液（例えば、PBS、HBSSなど）、種々の液体培地（例えば、DMEM、MEM、F12、DMEM/F12、DME、RPMI1640、MCDB（MCDB102、104、107、120、131、153、199など）、L15、SkBM、RITC80-7など）等で行うことができる。希釈濃度は、血清成分が基材上に付着することができれば特に限定されず、例えば、約0.5%～約100%（v/v）、好ましくは約1%～約60%（v/v）、より好ましくは約5%～約40%（v/v）である。
- [0036] インキュベート時間も、血清成分が基材上に付着することができれば特に限定されず、例えば、約1時間～約72時間、好ましくは約2時間～約48時間、より好ましくは約2時間～約24時間、さらに好ましくは約2時間～約12時間である。インキュベート温度も、血清成分が基材上に付着することができれば特に限定されず、例えば、約0℃～約60℃、好ましくは約4℃～約45℃、より好ましくは室温～約40℃である。
- [0037] インキュベート後に血清を廃棄してもよい。血清の廃棄手法としては、ピペットなどによる吸引や、デカンテーションなどの慣用の液体廃棄手法を用いることができる。本開示の好ましい態様においては、血清廃棄後に、基材を無血清洗浄液で洗浄してもよい。無血清洗浄液としては、血清を含まず、基材に付着した血清成分に悪影響を与えない液体媒体であれば特に限定されず、例えば、限定することなく、水、生理食塩水、種々の緩衝液（例えば、PBS、HBSSなど）、種々の液体培地（例えば、DMEM、MEM、F12、DMEM/F12、DME、RPMI1640、MCDB（MCDB102、104、107、120、131、153、199など）、L15、SkBM、RITC80-7など）等で行うことができる。洗浄手法としては、慣用の基材洗浄手法、例えば、限定することなく、基材上に無血清洗

浄液を加えて所定時間（例えば、約5秒～約60秒間）攪拌後、廃棄する手法などを用いることができる。

[0038] 本開示において、基材を、成長因子でコートしてもよい。ここで、「成長因子」は、細胞の増殖を、それがない場合に比べて促進する任意の物質を意味し、例えば、上皮細胞成長因子（EGF）、血管内皮成長因子（VEGF）、線維芽細胞成長因子（FGF）などを含む。成長因子による基材のコート手法、廃棄手法および洗浄手法は、インキュベーション時の希釈濃度が、例えば、約0.0001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは約0.0005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、より好ましくは約0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である以外は、基本的に血清と同じである。

[0039] 本開示において、基材を、ステロイド剤でコートしてもよい。ここで「ステロイド剤」は、ステロイド核を有する化合物のうち、生体に、副腎皮質機能不全、クッシング症候群などの悪影響を及ぼし得るものをいう。かかる化合物としては、限定されずに、例えば、コルチゾール、プレドニゾロン、トリアムシノロン、デキサメタゾン、ベタメタゾン等が含まれる。ステロイド剤による基材のコート手法、廃棄手法および洗浄手法は、インキュベーション時の希釈濃度が、デキサメタゾンとして、例えば、約0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは約0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、より好ましくは約1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である以外は、基本的に血清と同じである。

[0040] 基材は、血清、成長因子およびステロイド剤のいずれか1つでコートしても、これらの任意の組み合わせ、すなわち、血清と成長因子、血清とステロイド剤、血清と成長因子とステロイド剤、または、成長因子とステロイド剤の組み合わせでコートしてもよい。複数の成分でコートする場合、これらの成分を混合して同時にコートしてもよいし、別々のステップでコートしてもよい。

[0041] 基材は、血清等でコートした後直ちに細胞を播種してもよいし、コートし

た後に保存しておき、その後細胞を播種することもできる。コートした基材は、例えば約4℃以下、好ましくは約-20℃以下、より好ましくは約-80℃以下に保つことにより長期間保存することができる。

[0042] 基材への細胞の播種は、既知の任意の手法および条件で行うことができる。基材への細胞の播種は、例えば、細胞を培養液に懸濁した細胞懸濁液を基材（培養容器）に注入することにより行ってもよい。細胞懸濁液の注入には、スポイトやピペットなど、細胞懸濁液の注入操作に適した器具を用いることができる。

[0043] 一態様において、播種は、約 7.1×10^5 個/cm²～約 3.0×10^6 個/cm²、約 7.3×10^5 個/cm²～約 2.8×10^6 個/cm²、約 7.5×10^5 個/cm²～約 2.5×10^6 個/cm²、約 7.8×10^5 個/cm²～約 2.3×10^6 個/cm²、約 8.0×10^5 個/cm²～約 2.0×10^6 個/cm²、約 8.5×10^5 個/cm²～約 1.8×10^6 個/cm²、約 9.0×10^5 個/cm²～約 1.6×10^6 個/cm²、約 1.0×10^6 個/cm²～約 1.6×10^6 個/cm²などの密度で行うことができる。

[0044] 本発明のさらに別の側面は、末梢動脈疾患を処置するための、骨格筋芽細胞を含む細胞培養物と細胞外マトリクスとを含む、医薬組成物に関する。

本発明の医薬組成物は、本発明の細胞培養物に加えて、細胞外マトリクスなどの種々の追加成分、例えば、薬学的に許容し得る担体や、細胞培養物の生存性、生着性および／または機能などを高める成分、対象疾患の処置に有用な他の有効成分などを含んでいてもよい。かかる追加成分としては、既知の任意のものを使用することができ、当業者はこれらの追加成分について精通している。また、本発明の医薬組成物は、細胞培養物の生存性、生着性および／または機能などを高める成分や、対象疾患の処置に有用な他の有効成分などと併用することができる。一態様において、本発明の医薬組成物は、下肢の疾患の処置に用いるためのものである。処置の対象となる組織や疾患は、本発明の細胞培養物について上記したとおりである。

[0045] 本発明の医薬組成物において、細胞培養物と細胞外マトリクスとは別々に

調製され、同時に投与されてもよい。本発明の医薬組成物において、細胞培養物は、上記の細胞培養物を用いることができるが、投与部位に接着するのに十分な量の細胞外マトリクスと併せて用いられる限り、シングルセルを用いてもよい。ここで、シート状細胞培養物の破砕片を投与する場合には、シート状細胞培養物を作成する際の基材との接着面に、虚血部位に接着するのに十分な量の細胞マトリクスが形成されているので、別途、細胞外マトリクスを投与する必要はない。スフェロイドである細胞培養物を投与する場合には、同数の細胞から形成されるシート状細胞培養物に含まれる細胞外マトリクスの量に対して不足している量を投与すればよく、例えば、スフェロイド細胞培養物がシート状細胞培養物の半分の量の細胞外マトリクスを有している場合、残り半分に該当する量を投与すればよい。細胞外マトリクスは、市販されており（例えば、Advanced BioMatrix社／V i t r o C o l（商標）ヒト由来Ⅰ型コラーゲンなど）、これらを本発明の医薬組成物に使用することができる。

[0046] 本発明の別の側面は、対象において末梢動脈疾患を処置する方法であって、本発明の細胞培養物または医薬組成物の有効量をそれ必要とする対象に投与するステップを含む方法に関する。本発明の処置方法の対象となる組織や疾患は、本発明の細胞培養物について上記したとおりである。また、本発明の処置方法においては、細胞培養物の生存性、生着性および／または機能などを高める成分や、対象疾患の処置に有用な他の有効成分などを、本発明の細胞培養物または医薬組成物と併用することができる。

[0047] 本発明において、用語「対象」は、任意の生物個体、好ましくは動物、さらに好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトの個体を意味する。

[0048] また、用語「処置」は、疾患の治療、一時的寛解または予防などを目的とする医学的に許容される全ての種類の予防的および／または治療的介入を包含するものとする。例えば、「処置」の用語は、疾患の進行の遅延または停止、病変の退縮または消失、当該疾患発症の予防または再発の防止などを含む、種々の目的の医学的に許容される介入を包含する。

[0049] 本発明において、「有効量」とは、例えば、疾患の発症や再発を抑制し、症状を軽減し、または進行を遅延もしくは停止し得る量（例えば、細胞培養物に含まれる細胞数、細胞培養物のサイズ、重量など）であり、好ましくは、当該疾患の発症および再発を予防し、または当該疾患を治癒する量である。また、投与による利益を超える悪影響が生じない量が好ましい。かかる量は、例えば、マウス、ラット、イヌまたはブタなどの実験動物や疾患モデル動物における試験などにより適宜決定することができ、このような試験法は当業者によく知られている。また、処置の対象となる組織病変の大きさは、有効量決定のための重要な指標となり得る。一態様において、末梢動脈疾患を有するマウス疾患モデルに対して、合計 $7 \sim 10 \times 10^5$ 個の細胞を、1 個当たり約 $10^2 \sim 10^6$ 個の細胞を含む細胞培養物の形態で投与することができる。別の態様において、末梢動脈疾患を有するヒトに対して、合計 $7 \sim 10 \times 10^6$ 個の細胞を、1 個当たり約 $10^2 \sim 10^6$ 個の細胞を含む細胞培養物の形態で投与することができる。

[0050] 本発明のさらに別の側面は、末梢動脈疾患を処置するための方法であって、骨格筋芽細胞を含み、細胞外マトリクスを有する、シート状細胞培養物の破砕片または骨格筋芽細胞を含む細胞培養物と細胞外マトリクスとを含む医薬組成物を投与することを含む方法に関する。

[0051] 本発明の処置方法は、本発明の製造方法に従って、本発明のシート状細胞培養物の破砕片を製造するステップをさらに含んでもよい。本発明の処置方法は、シート状細胞培養物の破砕片を製造するステップの前に、対象からシート状細胞培養物の破砕片を製造するための細胞（iPS細胞を用いる場合は、例えば、皮膚細胞、血球等）または細胞の給源となる組織（iPS細胞を用いる場合は、例えば、皮膚組織、血液等）を採取するステップをさらに含んでもよい。一態様において、細胞または細胞の給源となる組織を採取する対象は、シート状細胞培養物の破砕片または医薬組成物等の投与を受ける対象と同一の個体である。別の態様において、細胞または細胞の給源となる組織を採取する対象は、シート状細胞培養物の破砕片または医薬組成物等の

投与を受ける対象とは同種の別個体である。別の態様において、細胞または細胞の給源となる組織を採取する対象は、シート状細胞培養物の破砕片または医薬組成物等の投与を受ける対象とは異種の個体である。

[0052] 投与方法としては、典型的には組織への直接的な適用が挙げられ、好ましくは、投与対象の筋肉組織への直接的な適用である。本発明の細胞培養物および医薬組成物は、シート状細胞培養物の断片を用いる場合には、注射による投与が可能な種々の経路、例えば、静脈内、筋肉内、皮下、局所、動脈内、門脈内、心室内、腹腔内等の経路から投与してもよい。一態様において、投与方法は、投与対象の筋肉内への注射である。注射は、1回の処置において、複数箇所に分けて行われてもよい。

投与頻度は、典型的には1回の処置につき1回であるが、所望の効果が得られない場合には、複数回投与することも可能である。例えば、細胞外マトリクスを外表面に有する細胞培養物を投与する場合、複数箇所に分けて注射してもよく、同一箇所に複数回注射してもよい。シングルセルと細胞外マトリクスを投与する場合、シングルセルと、細胞外マトリクスを別々に分けて1回ずつまたは複数回ずつ注射してもよく、シングルセルと細胞外マトリクスを混合したものを、1回または複数回、同一箇所または複数箇所に注射してもよい。

実施例

[0053] 例1. マウス由来骨格筋芽細胞シートの破砕片の作製

(1) マウス由来骨格筋芽細胞シートの作製

4週齢のC57BL/6マウス（日本クレア株式会社）の下肢から骨格筋を採取し、コラゲナーゼおよびトリプシンを含む溶液で処理し、単一の細胞に分散させた。かかる細胞を37℃、5%CO₂条件下で、20%FBS含有MCDB131培地でコンフルエントになるまで培養し、細胞を回収した。

回収した細胞を、FACSを用いて測定した。測定結果を図1に示す。回収した細胞のうち95%以上が、骨格筋芽細胞であった。

[0054] 回収した細胞を、12穴の温度応答性培養容器（UpCell（登録商標

）、12穴マルチウェル、CS3003、株式会社セルシード）に $7 \sim 10 \times 10^5 / \text{cm}^2$ の濃度で播種し、20% FBS含有DMEM/F12培地で6時間以上培養し、シート化を行った。その後、温度を20℃まで下げること、シート状細胞培養物を温度応答性培養容器から剥離させた。

剥離したシート状細胞培養物を、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色により、細胞核をヘマトキシリンで青紫色に、その他構造物をエオジンで種々の濃さの紅色に染色し、その断面を顕微鏡（20倍）で観察を行った。また、別の剥離したシート状細胞培養物を、免疫染色により、細胞核を青色に、デスミンを緑色に染色し、その断面を顕微鏡（20倍）で観察を行った。

図2Aに、シート状細胞培養物の写真を、図2Bに、ヘマトキシリン・エオジン染色したシート状細胞培養物の断面の顕微鏡写真を、図2Cに、免疫染色したシート状細胞培養物の断面の顕微鏡写真を示す。

[0055] （2）破碎片の作製

（1）において染色に供していないシート状細胞培養物について、温度応答性培養容器から培地等を除去し、0.3 mLの生理食塩水を添加した。添加後、1.0 mLシリンジ（テルモ社製）および23Gニードル（テルモ社製）を用いてシート状細胞培養物ごと生理食塩水を吸引、排出することを繰り返し、シート状細胞培養物を破碎し、生理食塩水に懸濁させた。懸濁液は、吸引・排出のセットを5回繰り返したものと、10回繰り返したものをそれぞれ用意した。

図3に、それぞれの懸濁液の顕微鏡写真を示す。図3Aは、吸引・排出のセットを5回繰り返した懸濁液の写真であり、図3Bは、その拡大された顕微鏡写真である。図3Cは、吸引・排出のセットを5回繰り返した懸濁液の拡大された顕微鏡写真である。

吸引・排出のセットを5回繰り返した懸濁液においては、約300～500 μm の破碎片が確認された。しかし、10回繰り返した懸濁液においては、ほぼすべての細胞がシングルセルに近い形態であった。

例1で得られた破碎片はシート状細胞培養物が培養基材に接着していた面

に細胞外マトリクス（ECM）が多く存在する破砕物であると考えられた。

[0056] 例 2. マウス虚血モデルにおける、シート状細胞培養物の破砕片の投与

（1）マウス虚血モデルの作製

投与試験開始の 7 日前に、8 週齢の C57BL/6 マウス（日本クレア株式会社）の右後肢の大腿動脈以遠で結紮および血管切除した。結紮および血管切除を行う前に、レーザードップラー灌流イメージング（LDPI）により、健常な状態でのマウスの血流量を測定した。

（2）移植

（1）において作製したマウス虚血モデルを各群 10 匹ずつになるようランダムに 3 つの群に分けた。第 1 の群のマウスに対して、例 1 にて作製した、吸引・排出のセットを 5 回繰り返した懸濁液を注入した（以降、破砕片投与群と称する）。対照として、第 2 の群のマウスに対して、シート状細胞培養物に用いた細胞と同じ由来の細胞 $7 \sim 10 \times 10^5$ 個を、培養することなくシングルセルの状態で 0.3 mL の生理食塩水に懸濁させたものを注入し（以降、シングルセル投与群と称する）、第 3 の群のマウスに対して、0.3 mL の生理食塩水のみを注入した（以降、生理食塩水投与群と称する）。いずれの群のマウスにおいても、注入は、マウス虚血モデルの虚血肢の血管を取り除いた部分の筋中に、2 か所に分けて行われた。

（3）試験計画

試験は、注入した日を第 0 日として試験開始後の日数を数え、第 28 日まで実施された。それぞれのマウスについて、第 0、7、14、21 および 28 日目に LDPI により、血流量を測定した。また、第 1、3、5、7 および 28 日目に、遺伝子の発現について確認するために、投与した部位の組織を採取した。それぞれの群のマウスから採取した組織中の遺伝子の発現について RT-PCR により評価した。

[0057] （4）結果

マウス虚血モデル作製前の血流量を 100% とした、第 0、7、14、21 および 28 日目における各群のマウスの血流量%の LDPI による結果を

、図4に示す。また、第7、14、21および28日目のそれぞれの群の代表的なマウスのLDPIによるイメージングの結果を図5に示す。図4、図5ともに、図中のClustered cellsは、破砕片投与群のマウスを、Single cellsは、シングルセル投与群のマウスを、Salineは、生理食塩水投与群のマウスを示す。また、図4中*は、生理食塩水投与群に対してダネット検定を行い $P < 0.05$ であったものを示す。

図4に示すように、各群ともに第0日目においては、マウス虚血モデル作製時の20%未満にまで血流量が下がっていたが、第7、14、21および28日目には、破砕片投与群のマウスにおいて、生理食塩水投与群のマウスおよびシングルセル投与群のマウスと比べて、血流量の有意な改善が見られた。

図5に示すように、破砕片投与群のマウスは、第7、14、21および28日目のいずれの測定においても、生理食塩水投与群およびシングルセル投与群と比べて、より血流量が改善しており、健常状態にある左肢に近い状態となっていることが確認された。

図6に示すように、シングルセル投与群のマウスから採取した組織および生理食塩水投与群のマウスから採取した組織と比べて、破砕片投与群のマウスから採取した組織において極めて高いレベルでVEGF、HGF、FGF、Ang-1、Ang-2、SDF-1、Pax7、およびMyoDが発現していることが確認された。

[0058] 例3. 投与細胞の生着確認

(1) 試験計画

4週齢のGFP導入C57BL/6マウス（日本エスエルシー株式会社）の下肢から骨格筋を採取し、例1と同様にして（同じ条件で）、シート状細胞培養物ごと生理食塩水を吸引、排出することを繰り返し、シート状細胞培養物を破砕し、生理食塩水に懸濁させて懸濁液を作製した。次いで、例2（1）と同様にしてマウス虚血モデルを作製し、3つの群に分けた。第1の群のマウスに対して、作製した懸濁液を注入した（以降、破砕片投与群2と称

する)。対照として、第2の群のマウスに対して、GFP導入C57BL/6マウスの下肢から採取した骨格筋の細胞 $7 \sim 10 \times 10^5$ 個を、培養することなくシングルセルの状態で0.3 mLの生理食塩水に懸濁させたものを注入し(以降、シングルセル投与群2と称する)、第3の群のマウスに対して、0.3 mLの生理食塩水のみを注入した(以降、生理食塩水投与群2と称する)。いずれの群のマウスにおいても、注入は、マウス虚血モデルの虚血肢の血管を取り除いた部分の筋中に、2か所に分けて行われた。

注入した日を第0日として試験開始後の日数を数え、第1、3、5、7および28日目にそれぞれの群のマウスを屠殺し、内転筋を採取した。それぞれのマウスの採取した内転筋から得た組織の一部については、ホルマリン溶液にて固定後にヘマトキシリン-エオジン染色を行い、別の一部については、パラホルムアルデヒド溶液にて固定後に凍結標本を作製した。ヘマトキシリン-エオジン染色したそれぞれの組織については、中心に核がある筋線維(新生筋線維)および辺縁に核のある成熟した筋線維の数をカウントした。凍結標本については、GFPのエリアを確認した。第3日目にそれぞれの群のマウスから採取した組織においてはさらに、embryonic MHC陽性である細胞の数をカウントした。

[0059] (2) 結果

第3、5、7および28日目における、破碎片投与群2、シングルセル投与群2、生理食塩水投与群2のそれぞれのマウスから採取した組織のヘマトキシリン・エオジン染色した顕微鏡写真を示す。図中のClustered cellsは、破碎片投与群2のマウスを、Single cellsは、シングルセル投与群2のマウスを、Salineは、生理食塩水投与群2のマウスを図7に示す。また、ヘマトキシリン・エオジン染色したそれぞれの組織における、中心に核がある筋線維(新生筋線維)の数をカウントした結果を図8Aに、ヘマトキシリン・エオジン染色したそれぞれの組織における、中心に核がある筋線維(新生筋線維)の数と辺縁に核のある成熟した筋線維の数との比率を算出した結果を図8Bに示す。また、図中*は、生理食塩水投与群2に対してダネット検定を

行い $P < 0.05$ であったもの、図中+は、シングルセル投与群2に対してダネット検定を行い $P < 0.05$ であったものを示す。第3日目における、破砕片投与群2、シングルセル投与群2、生理食塩水投与群2のそれぞれのマウスから採取した組織中のembryonic MHC陽性である細胞数をカウントした結果を図8Cに示す。

図8Aおよび図8Bに示すように、第28日目に破砕片投与群2のマウスは、筋新生がほぼ終了しているのに対して、シングルセル投与群2および生理食塩水投与群2においては、筋新生が継続していることから、破砕片投与群2のマウスにおいては、早期に筋新生が起こっていることが確認された。図8Cに示すように、第3日目においてembryonic MHC陽性である細胞数が、シングルセル投与群2、生理食塩水投与群2のマウスから採取した組織中に比べて、破砕片投与群2のマウスから採取した組織中で著しく多く存在していることが確認された。

第7日目における、破砕片投与群2、シングルセル投与群2それぞれのマウスから採取した組織の凍結標本の顕微鏡写真を図9に示す。

図9に示すように、シングルセル投与群2のマウスから採取した組織の標本と比べて、破砕片投与群2のマウスから採取した組織の標本の方がGFPのエリアが広いことが確認された。