

明 細 書

発明の名称：網膜色素上皮細胞シートの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、網膜色素上皮細胞層と、移植後に血管を構成する細胞の層とを積層することを特徴とする、細胞シートの製造方法に関する。本発明はまた、網膜色素上皮細胞で形成された細胞層、基底膜、及び移植後に血管を構成する細胞の層を含む移植用細胞シートに関する。

背景技術

[0002] 網膜色素上皮細胞を、生体内における形態に近い細胞シートの状態で移植して網膜変性疾患を治療する方法が試みられている。例えば、加齢黄斑変性患者の網膜組織から網膜色素上皮細胞を（脈絡膜を伴う層として）切り出した細胞シートを、障害を受けた黄斑部分に移植する自家組織移植が行われている（例えば非特許文献１～３）。この患者組織由来の細胞シートは、移植手術のほかに患者網膜の切除手術による侵襲リスクが加わり、合併症の発症率が高く、移植後の黄斑機能の改善や安定維持の効果が認められる割合が低いなどの問題があった。

[0003] また、患者網膜の採取によらず、生体外で培養した網膜色素上皮細胞を利用する方法として、非常に脆い単層上皮の剛性不足を補うため、人工膜や羊膜上で網膜色素上皮細胞を培養した細胞シートを移植に用いる方法が知られている。しかし、人工膜は、生体内で網膜色素上皮細胞自身が作る基底膜とは組成や性質、剛性などが異なり、炎症やそれに伴う拒絶反応を誘起しやすいため、移植用途には不向きであった。これに対し、本発明者らは、生体外で培養した網膜色素上皮細胞と、当該細胞自身が作る基底膜とで構成された細胞シートを簡易に作成する方法を報告している（例えば特許文献１など）。この方法で得られる細胞シートは、生体と同様の成分の基底膜を伴うため、生着しやすく、剛性があり取扱性に優れ、移植治療用途に好適である。

[0004] ここで、網膜色素上皮の障害は、脈絡膜の線維化や萎縮を併発し、脈絡膜

毛細血管を欠き、網膜色素上皮や視細胞への栄養供給が不能となっている場合がある。このような症状に対しては、基底膜を伴う網膜色素上皮細胞のシートを移植しても、脈絡膜毛細血管を欠くため、移植後の網膜色素上皮へ栄養や酸素が十分に供給されないため、移植された細胞が生体内で機能を十分に発揮できず、本来の治療効果が得られにくいという問題があった。

[0005] 一方、血管再生を利用した治療法として、内皮前駆細胞を移植し、生体内で血管を形成して網膜疾患を治療する方法が知られている。例えば、特許文献2は、硝子体内に注入した骨髓由来内皮前駆細胞が、網膜の星状細胞へ局在し、脈管に組み込まれることによって正常な網膜血管を形成したことを報告している。しかし、内皮前駆細胞が星状細胞に局在する性質を利用した網膜血管を再生する特許文献2の方法によっては、位置的にも隔離している網膜色素上皮細胞や視細胞を保護する脈絡膜血管を形成することはできなかった。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：WO 2011 / 142364

特許文献2：特表2005-538742

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Am J Ophthalmol. 2012 Jan; 153 (1) : 120-7

非特許文献2：Acta Ophthalmol. 2011 Sep; 89 (6) : e490-5

非特許文献3：Br J Ophthalmol. 2011 Mar; 95 (3) : 370-5

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の課題は、人工膜を用いることなく、簡便で安定的に網膜色素上皮

細胞シートを製造する新たな方法を開発し、以って網脈絡膜変性疾患、特に網脈絡膜の萎縮を伴う強度近視や重度のブドウ膜炎等の疾患患者に対しても生着率の高い、機能性に優れた移植用網膜色素上皮細胞シートを提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、鋭意検討の結果、網膜色素上皮細胞層と、移植後に血管を形成する能力を有する細胞とを積層することを含む、細胞シートの製造方法を開発した。かかる方法によって得られる細胞シートは、網膜色素上皮細胞層と血管形成細胞層の両方を含むため、患者に移植すると、網膜組織を再構築するのみならず、脈管形成を通じて脈絡膜をも再構築するため、網脈絡膜変性疾患、特に脈絡膜の障害を伴う網膜変性疾患の治療に有用であることを見出した。更に、網膜色素上皮細胞層を、コラーゲンゲル層上に網膜色素上皮細胞を播種し、培養することにより調製すると、得られる網膜色素上皮細胞層は、コラーゲンゲルと網膜色素上皮細胞シート間に基底膜を保持しており、生体内の網膜色素上皮細胞と同様のサイトカイン分泌能及び細胞間の密着性を有し、コラゲナーゼでコラーゲンゲルを分解することで基底膜を保持したまま網膜色素上皮細胞層を容易に細胞培養基材から剥離することができた。また、網膜色素上皮細胞層を構成する細胞は、網膜色素上皮細胞特異的マーカーの発現を維持していた。これらの知見に基づき、更に検討を加えた結果、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、以下を提供する：

〔１〕 網膜色素上皮細胞層と血管形成細胞層とを積層する工程を含む、網膜色素上皮細胞層及び血管形成細胞層を含む細胞シートの製造方法。

〔２〕 血管形成細胞層が網膜色素上皮細胞層の基底面と接触するように、網膜色素上皮細胞層と血管形成細胞層とを積層する、〔１〕記載の製造方法。

〔３〕 血管形成細胞層が、血管芽細胞、血管内皮前駆細胞、及び血管内皮細胞からなる群から選択される少なくとも一つの細胞で構成されている、〔１〕又は〔２〕記載の製造方法。

〔４〕血管形成細胞層が、細胞シートの移植対象となる患者由来組織若しくは細胞、又は患者とＨＬＡ型が適合するドナー由来細胞で構成されている、

〔１〕又は〔２〕記載の製造方法。

〔５〕網膜色素上皮細胞層が、以下の工程を含む方法で製造される細胞シートである、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の製造方法：

（１）コラーゲンゲル上に網膜色素上皮細胞を播種、培養し、網膜色素上皮細胞で構成された細胞シートを形成させる工程、

（２）コラーゲンゲルをコラゲナーゼで分解し、網膜色素上皮細胞で構成された細胞シートを剥離する工程。

〔６〕網膜色素上皮細胞が、ＥＳ細胞、ｉＰＳ細胞又は前駆細胞を分化誘導して得られた細胞である〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の製造方法。

〔７〕〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の方法で製造された細胞シート。

〔８〕生体外で幹細胞又は前駆細胞を分化誘導して得られた網膜色素上皮細胞で形成された細胞層、当該細胞から分泌された基底膜、及び血管形成細胞層を含む移植用細胞シート。

発明の効果

[0010] 本発明により、生体内の欠損した脈絡膜血管を補い、移植後に酸素や養分を網膜へ補給できる血管構成細胞層を有する網膜色素上皮細胞の積層シートを、簡易かつ安定的に製造することができる。本発明の細胞シートは、生着率及び機能性に優れるため、網脈絡膜変性疾患、特に網脈絡膜萎縮を伴う強度近視や重度のブドウ膜炎など、網膜色素上皮細胞移植のみでは十分な治療効果が得られにくい重篤な網脈絡膜変性疾患をも治療の対象とすることができるため、極めて有用である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本発明の細胞シートを移植した宿主の組織切片の免疫組織化学染色を示す図である。

[図2]（Ａ）は、培地ごとの血管内皮前駆細胞の脈管形成数を示すグラフであり、（Ｂ）は、マトリゲルを用いた場合の培地ごとの血管内皮前駆細胞の脈

管形成数を示すグラフである。

[図3]網膜色素上皮細胞シートのサイトカイン分泌能を試験した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] 以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明は、網膜色素上皮細胞層と血管形成細胞層とを積層する工程を含む、網膜色素上皮細胞層及び血管形成細胞層を含む細胞シートの製造方法（本発明の製造方法）を提供する。

[0013] 1. 血管形成細胞層

本発明における血管形成細胞層は、血管形成能を有する細胞（血管形成細胞）で構成されている。本発明の製造方法により得られる細胞シートを網膜変性症患者の脈絡膜欠損部位へ移植すると、移植部位において当該細胞シートに含まれる血管形成細胞が血管（好ましくは、脈絡膜血管）を再構成することにより網膜色素上皮細胞への酸素や栄養分の供給等を担う。そのため、本発明の製造方法により得られる細胞シートは、特に脈絡膜欠損を伴う網膜変性疾患の患者の脈絡膜欠損部位に移植することにより優れた治療効果を発揮することができる。

[0014] 本発明における血管形成細胞は、哺乳動物（例：ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、ウサギ、ハムスター、モルモット等）由来の細胞であれば、いずれの哺乳動物由来の細胞であってもよいが、好ましくはヒト由来の細胞である。

[0015] 本発明に用いられる血管形成細胞としては、例えば、血管芽細胞、血管内皮前駆細胞、血管内皮細胞等が挙げられる。なかでも、血管形成細胞としては、移植後に生体内で脈管形成する過程で既存の血管網に組み込まれやすいと考えられることから、血管内皮前駆細胞等が好ましい。血管形成細胞層には、血管形成細胞以外の細胞及び細胞以外の成分が含まれていても良く、血管形成細胞を含む細胞集団又は組織で構成されていてもよい。血管形成細胞層を構成する細胞の、通常70%以上（好ましくは80%以上、より好まし

くは90%以上、最も好ましくは100%)が、血管形成細胞(好ましくは、血管内皮前駆細胞)である。

[0016] 血管内皮前駆細胞とは、血管内皮細胞に分化する能力を持ち、血管内皮細胞への分化がコミットされた細胞をいう。なお、血管内皮前駆細胞については、複数の細胞表面マーカーの発現パターンが報告されており、少なくとも細胞表面マーカーの発現パターンによる統一した定義は困難であることが知られている。過去に報告された血管内皮前駆細胞の表面マーカーの発現パターンには、末梢血単核細胞由来CD34陽性血管内皮細胞CD34⁺、CD44⁺、VEGFR2⁺(KDR)(Science, 1997 Feb 14; 275(5302):964-7); 臍帯血単核細胞由来血管内皮前駆細胞CD31⁺、VEGFR2⁺、eNOS⁺、CD105⁺、CD34^{+/-}、CD133⁻、CD45⁻、CD14⁻、CD117⁻(ヒト内皮コロニー形成細胞(ECFCs(登録商標)、タカラバイオ社製)); などが挙げられる。これらは、それぞれ由来する組織、分化ステージ、採取方法等の相違に起因するものと考えられるが、いずれも血管内皮細胞へ分化する能力を持つ細胞である点において共通する。従って、本願明細書においては、血管内皮前駆細胞を、「血管内皮細胞に分化する能力を持ち、血管内皮細胞への分化がコミットされた細胞」と定義することとし、細胞表面マーカーの発現パターンは複数の組み合わせの存在を許容するものとする。

[0017] 血管内皮前駆細胞は、卵黄嚢、末梢血、骨髓、臍帯血、及びこれらの単核細胞等に含まれることが知られており、これらの組織又は細胞から公知の単離方法を用いて調製することができる。単離方法としては、例えばCD34、VEGF受容体2(KDR)等の細胞表面マーカーの発現を指標として磁気ビーズやFACSを用いて単離する方法; 市販の内皮細胞コロニー形成ユニット(CFU-ECs; endothelial cell colony-forming units)を利用する方法(N Engl J Med, 2003; 348:593-600)などが挙げられる。末梢血単核細胞または骨髓単核細胞由来血管内皮前駆細胞の製法の具体例としては、末

梢血や骨髓から慣用の方法により分離した単核細胞を、VEGFなどのサイトカインを含む血管内皮分化促進培地を用いて培養し、血管内皮前駆細胞を付着細胞として回収する方法；G-CSFを用いて骨髓から動員した血管内皮前駆細胞を、末梢血中からCD34陽性細胞として分離回収する方法（Yakugaku Zasshi 2007 125（5） 841-845等）などが知られている。

[0018] また、血管内皮前駆細胞は、種々の細胞から分化誘導することもでき、例えば、線維芽細胞から脱分化を経て分化誘導する方法；ES細胞、iPS細胞等の多能性幹細胞から血管内皮前駆細胞を分化誘導する方法（WO2008/056779、WO2009/035217など）などが知られている。これらの血管内皮前駆細胞は、単一で又は複数の種類を組み合わせ用いることができる。本発明における血管内皮前駆細胞として、他の細胞を含む細胞混合物を用いることもでき、例えば、血管内皮前駆細胞を含む骨髓細胞、末梢血単核細胞、骨髓単核細胞等をそのまま用いることもできる。

[0019] 血管内皮細胞は、生体内の血管組織からCD31等の細胞表面マーカーの発現を指標として磁気ビーズやFACSを用いて分離する方法；上記血管内皮前駆細胞をVEGF等の誘導因子の存在下で培養して分化誘導する方法などの公知の方法により調製することができる。また、血管内皮細胞は、種々の細胞から分化誘導することもでき、例えば、間葉系幹細胞、脂肪組織由来幹細胞等の体性幹細胞；心筋前駆細胞、神経前駆細胞等の前駆細胞；ES細胞、iPS細胞等の多能性幹細胞などから分化誘導できることが知られている。さらに、血管内皮細胞の市販品として、ヒト微小血管内皮細胞（HMVEC）、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）、ヒト大動脈血管内皮細胞（HAEC、HAOEC）などが入手可能である。

[0020] 血管芽細胞は、血管内皮前駆細胞と造血系幹細胞の共通の祖先となる細胞であって、生体内の血管組織からCD133、CD144、CD45等の細胞表面マーカーの発現を指標として磁気ビーズやFACSを用いて分離する方法などの公知の方法により調製できる。血管芽細胞の細胞表面マーカーの

発現パターンとして、例えば、CD133⁺、CD144⁺、CD45⁺、CD34⁺、VEGFR2⁺、CD31⁻の組み合わせが報告されている (Stem Cells Dev. 2004 Jun; 13 (3) : 229-42.)。

[0021] 本発明に用いられる血管形成細胞としては、例えば、本発明の製造方法で得られる細胞シートの移植対象となる患者由来組織若しくは細胞、又は患者とHLA型が適合するドナー由来細胞等を利用することができる。本発明に用いられる血管形成細胞としては、特に血管内皮前駆細胞が好ましい。

[0022] 自家移植用途に好適な血管形成細胞としては、患者への負担が少ない点で、例えば、患者組織、これから採取した細胞、患者体細胞から樹立されたiPS細胞（患者iPS細胞）由来細胞が好ましく用いられる。侵襲が少ない点で、患者末梢血、そこから採取した単核細胞、患者末梢血単核細胞由来細胞、患者iPS細胞由来細胞等が好ましく用いられる。これらは、患者由来細胞を用いて上述の方法により調製することができる。

[0023] 他家移植用途に好適な血管形成細胞としては、拒絶反応を抑える点で、例えば、患者とHLA型が適合するドナー由来細胞が好ましく用いられる。患者とHLA型が適合するドナー由来細胞には、患者とHLA型が適合するドナー組織、これから採取した細胞、患者とHLA型が適合するドナー体細胞から樹立されたiPS細胞（HLA適合ドナーiPS細胞）に由来する細胞などが含まれる。HLA型が適合するドナー組織及び細胞は、骨髄バンクや細胞バンクなどから入手することもできる。特に、他のHLA型との拒絶反応が低い3座（HLA-A、HLA-B、HLA-DR）ホモ接合型をもつ細胞は、多くの患者に適合するため、ドナー細胞として好ましい。

[0024] 血管形成細胞層は、血管形成細胞層が網膜色素上皮細胞層の基底面と接触するように、網膜色素上皮細胞層に積層されていることが好ましい。網膜色素上皮細胞層の少なくとも一部に血管形成細胞層が積層されていればよい。網膜色素上皮細胞層に対する血管形成細胞の密度は特に限定されず、移植部位の脈絡膜の障害状況や既存の血管網との親和性などを考慮して、適宜選択

して設定することができる。血管形成細胞が低密度であると、血管形成細胞を生体内の既存の血管に組み込みやすいとの観点から、網膜色素上皮細胞層に対する血管形成細胞の密度は、例えば、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/cm²程度、好ましくは $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 細胞/cm²程度である。脈絡膜の損傷が大きく残存血管が著しく少ない患者への移植を目的とする場合には、血管形成細胞が高密度の血管形成細胞層が好ましい。

[0025] 網膜色素上皮細胞層と血管形成細胞層とを積層する工程（積層工程）としては、複数の細胞層を積層する方法として公知の方法を利用できる。このような方法には、例えば、複数のシート状の細胞層を積層する方法、一方のシート状の細胞層上に他方の細胞層を構成する細胞を播種する方法、培養容器中で培養した一方の細胞層上に他方のシート状の細胞層を重ねる方法、培養容器中で培養した一方の細胞層上に他方の細胞層を構成する細胞を播種する方法等が含まれる。本発明においては、血管形成細胞層が網膜色素上皮細胞層の基底面と接触するように、2つの細胞層を積層することが好ましい。例えば培養容器中で培養した血管形成細胞層上に、シート状の網膜色素上皮細胞層を重ねることにより、血管形成細胞層が網膜色素上皮細胞層の基底面と接触する。培養容器内で積層して得られた細胞シートは、そのまま利用に供することができる。

[0026] 本発明における積層工程の好ましい態様としては、例えば、培地を用いて血管形成細胞を培養容器に播種し、培養することにより血管形成細胞層を培養容器中に形成させた後、別途形成した網膜色素上皮細胞シートを血管形成細胞層の上に重ね、培地を吸引することにより、血管形成細胞層が網膜色素上皮細胞層の基底面と接触するように、両細胞層を積層することができる。前記培地としては、血管形成細胞と網膜色素上皮細胞を維持培養できる組成であれば特に限定されないが、通常、血管形成細胞培養用培地、血管内皮前駆細胞培養用培地の双方とも使用可能である。例えば血管内皮前駆細胞培養用培地としてタカラバイオ社製のEGM-2培地等の市販品を利用できる。血管形成細胞を播種した後、少なくとも培養容器表面に細胞が接着し、血管

形成細胞層を形成するために必要な時間（例えば10時間～24時間程度）静置することが好ましく、必要に応じて所望の細胞数まで増殖させるために1日～3日程度培養期間を設けても良い。

[0027] 本発明の製造方法は、さらに、網膜色素上皮細胞層と血管形成細胞層が積層された細胞シートを回収する工程（回収工程）を含んでいても良い。細胞シートを回収する方法としては、シート構造を維持した状態で回収できる方法であれば特に限定されず、公知の方法を利用できる。このような方法として、例えば、酵素処理により培養容器から細胞シートを剥離する方法、細胞非接着性培養容器を用いる方法、細胞接着性となるように表面処理された培養容器を用いて細胞層を積層した後に酵素等で処理して形成された細胞シートを剥離する方法などが挙げられる。本発明においては、積層工程中、培養容器表面に血管形成細胞が接着し、細胞が固定されることにより、血管形成細胞層上へ網膜色素上皮細胞層を積層しやすくなるので、細胞接着性となるように表面処理された培養容器を用いて細胞層を積層した後に、当該培養容器から形成された細胞シートを剥離する方法が好適である。一態様において、温度応答性ポリマーで表面処理された培養容器中で、細胞シートを形成した後、温度変化による処理で細胞シートを剥離する。温度応答性ポリマーとは、温度依存的に水和力が変化するポリマーをいい、例えば、特開平2-211865号公報に0～80℃の温度範囲で水和力が変化する温度応答性ポリマーが記載されている。具体的には、例えば、以下のモノマーの単独重合または共重合によって得られる。使用し得るモノマーとしては、例えば、（メタ）アクリルアミド化合物、N-（若しくはN，N-ジ）アルキル置換（メタ）アクリルアミド誘導体、またはビニルエーテル誘導体が挙げられ、コポリマーの場合は、これらの中で任意の2種以上を使用することができる。更には、上記モノマー以外のモノマー類、細胞の付着性や増殖性を向上するためのイオン性モノマーとの共重合、ポリマー同士のグラフトまたは共重合、あるいはポリマー、コポリマーの混合物を用いてもよい。温度応答性ポリマーは、温度を変えることで水和、脱水和を起こすものであり、その温度域

は0℃～80℃、好ましくは10℃～50℃、さらに好ましくは20℃～45℃である。好適な温度応答性ポリマーとしてポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）を挙げることができる。ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）は31℃に下限臨界溶解温度を有するポリマーであり、遊離状態であれば、水中で31℃以上の温度で脱水和を起こしポリマー鎖が凝集し、白濁する。逆に31℃未満の温度ではポリマー鎖は水和し、水に溶解した状態となる。このポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）を培養容器の表面に固定すると、31℃以上の温度であれば、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）が脱水和することにより、培養容器表面が疎水性を示すようになり、細胞（例えば、血管形成細胞、網膜色素上皮細胞）に対して接着性となるのに対して、31℃未満の温度では、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）が水和し、培養容器表面が親水性を示すようになり、細胞に対して非接着性となる。この温度応答性を利用して、積層工程においては、下限臨界溶解温度（ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）の場合31℃）以上の温度（例えば、37℃）で細胞を培養して、細胞シートを培養容器に接着させ、回収工程においては、下限臨界溶解温度未満の温度（例えば、20℃）とすることにより、酵素処理を要することなく細胞シートを培養容器から剥離し、単離することが可能である。このような温度応答性ポリマーで被覆した培養容器については、特開平2-211865号公報、特開平05-192138号公報、特開2008-220354号公報等に記載されている。また、このような培養容器は温度感受性培養容器（セルシード社製、UpCell（登録商標））として市販品が入手可能である。培養容器に播種した血管形成細胞は、網膜色素上皮細胞層へ確実に転写されるようにするためには、培養容器上に接着していることが好ましい。

[0028] 好ましい態様において、血管形成細胞を、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）で被覆された温度応答性培養容器中、下限臨界溶解温度（31℃）以上の温度（例えば、37℃）にて接着培養することにより、血管形成細胞層を形成する。次に、下限臨界溶解温度以上の温度（例えば、37℃）を維

持したまま、別途調製した網膜色素上皮細胞層（網膜色素上皮細胞シート）を、血管形成細胞層が網膜色素上皮細胞層の基底面と接触するように、血管形成細胞層の上に積層する。血管形成細胞層と網膜色素上皮細胞層とが接着するのに十分な時間、下限臨界溶解温度以上の温度（例えば、37℃）で、インキュベートした後、培養物を下限臨界溶解温度未満（例えば、20℃）まで冷却することにより、形成された細胞シートを培養容器から剥離する。冷却及び剥離は、例えば、培地を吸引した後、下限臨界溶解温度未満（例えば、20℃）の培地を培養容器へ添加し、培養容器から細胞シートを剥離するために必要な時間（例えば30分以上）静置した後、積層細胞シートを回収することにより行う。培地は、積層工程の好ましい態様として例示のものと同様である。冷却用の培地を添加した後の静置時間は、長すぎると細胞シートが剥れにくくなるため、培地を添加したら1日以内にシートを回収することが好ましい。

[0029] 本発明の製造方法は、また、血管形成細胞層に脈管形成処理を施す工程を含んでいても良い。脈管形成処理工程は、網膜色素上皮細胞層と血管形成細胞層とを積層させる工程の前工程、及び後工程の何れであっても良い。脈管形成処理は、公知の方法により施すことができ、例えば、血管形成細胞をコラーゲンゲル中でVEGF、IGF-1、PDGF等の因子の存在下で培養する方法、血管形成細胞層をマトリゲルと接触させる方法などの管腔形成を誘導する公知の方法により施すことができる。網膜色素上皮細胞は、VEGFを分泌することから、網膜色素上皮細胞の培養上清を脈管形成に用いることもできる。

[0030] 脈管形成処理を施した場合、血管形成細胞層は、構成する全ての血管形成細胞が脈管構造を有していても良く、一部のみ脈管構造を有していてもよい。血管形成細胞層は、生体内で移植部位の環境にあった構造の血管が構成されることが望ましい。例えば、生体外で脈管形成処理を施すことなく、脈管構造を呈していない状態で、本発明の製造方法により得られる細胞シートを移植すると、移植された血管形成細胞が生体内で自発的に脈管を形成し、そ

の過程で既存の血管と連結して機能的な血管網が形成されやすいと考えられる。一方、脈絡膜の損傷が大きく、残存血管が著しく少ない場合には、血管形成細胞層に脈管形成処理を施すことにより、移植された脈管構造を基礎として血管網の再構築を促すことができ好ましい。

[0031] 血管形成細胞層は、血管形成細胞以外の細胞、例えば造血幹細胞等の脈管形成・血管新生を支持する細胞や、血管平滑筋細胞、血球細胞等の血管内皮細胞以外の血管構成細胞等を1種又は複数種含んでも良い。血管形成細胞層は、さらに細胞以外の成分、例えば血管形成を促進する因子等を含んでも良い。

[0032] 2. 網膜色素上皮細胞層

本発明において用いられる網膜色素上皮細胞は、眼球から直接採取した初代細胞でもよく、あるいは、それらを何代か継代させたものでもよい。初代網膜色素上皮細胞は公知の方法で単離することができ、例えば、眼球由来の網膜色素上皮細胞は死体眼球摘出後、速やかに赤道部で眼球を分割し、硝子体と網膜を除去した後、必要に応じてコラゲナーゼやヒアルロニダーゼ等で処理し、セルスクレーパーによる擦過またはトリプシンやEDTA溶液にて細胞をブルッフ膜より遊離させて回収した後、培養液の中で静置することにより培養皿への接着、増殖を誘導することにより必要量の細胞を増殖させ、トリプシン処理などで適宜継代し十分な細胞数を確保することができる。

[0033] さらにこれら細胞は、未分化細胞である胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）などの多能性幹細胞、神経幹細胞などの体性幹細胞を含む幹細胞、あるいは神経前駆細胞、網膜前駆細胞を含む前駆細胞を分化誘導することによって得られる細胞であっても良い。ES細胞は体細胞から核初期化されて生じたES細胞であってもよい。また、幹細胞としては、近年報告された人工多能性幹細胞（iPS細胞）を分化誘導することにより、目的の細胞を調製してもよい。iPS細胞は、ある特定の核初期化物質（核酸、タンパク質、低分子化合物等）を、体細胞に導入することにより作製することができる、ES細胞と同等の特性を有する体細胞由来の人工の幹細胞

胞である [Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell, 126: 663-676 (2006); Takahashi, K. et al., Cell, 131: 861-872 (2007)]。前記幹細胞を目的の分化細胞に分化させる条件・培地は従来公知の条件・培地に従ってもよいし、当業者が適宜設定してもよい。本発明においては、細胞シートに用いる網膜色素上皮細胞として、幹細胞又は前駆細胞、好ましくは多能性幹細胞を分化誘導して得られた細胞を用いることが、適切な成熟段階の網膜色素上皮細胞を調製することができる点で好ましく、特に比較的未熟な網膜色素上皮細胞を調製し、細胞シートを形成することができる点で有利である。また、本発明によって作成される細胞シートを移植用とする場合、移植する対象の体細胞を iPS 細胞のソースとして用いることによって、得られる細胞シートは対象に対して抗原性を持たない細胞シートとなる点で、iPS 細胞の使用は好ましい。幹細胞を分化誘導させる場合は、例えば ES 細胞や iPS 細胞等のヒト多能性幹細胞を、Dkk-1 や CK1-7 等の Wnt アンタゴニストおよび Lefty A や SB-431542 等の Nodal アンタゴニストを添加した ES 細胞分化培地で培養を行う。一定期間培養することで網膜前駆細胞マーカーである Rx、Pax6、Mittf が発現し、光学顕微鏡観察による形態観察から多角性形態と色素を有する細胞を確認することで、ヒト網膜色素上皮細胞を得ることができる [Neuroscience Letters 2009 Jul 24 458 (3) 126-31, Journal of Cell Science 2009 Sep 1 122 (Pt 17) 3169-79]。

[0034] 本発明における網膜色素上皮細胞層は、網膜色素上皮細胞が平面上に配列して層で構成されたものであって、例えば、公知の方法で製造される網膜色素上皮細胞を含む細胞シートとして構成できる。このような細胞シート（網膜色素上皮細胞層）を製造する方法として、例えば、WO 2011/142364 に記載の方法が知られている。

[0035] 本発明の細胞シートの好ましい態様としては、網膜色素上皮細胞層が以下

の工程を含む方法（以下、「コラーゲン法」と称する）で製造された、細胞シートである：

（１）コラーゲングル上に網膜色素上皮細胞を播種、培養し、網膜色素上皮細胞で構成された細胞シートを形成させる工程；及び

（２）コラーゲングルをコラゲナーゼで分解し、網膜色素上皮細胞で構成された細胞シートを剥離する工程。

[0036] 工程（１）において、播種される網膜色素上皮細胞としては、哺乳動物（例：ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、ウサギ、ハムスター、モルモット等）由来の細胞であれば、いずれの哺乳動物由来の細胞であってもよいが、好ましくはヒト由来の細胞である。

[0037] コラーゲン法において、網膜色素上皮細胞はコラーゲングル上に播種されることによって、培養される。コラーゲングルに用いられるコラーゲンは、哺乳動物（例：ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、ウサギ、ハムスター、モルモット等）由来のコラーゲンであれば、いずれのものであってもよいが、例えば、ヒト、ブタ由来のコラーゲンをを用いることが挙げられる。また、コラーゲンの由来する組織としては、腱、皮膚などが挙げられる。また、コラーゲンの種類としては、いずれの型のコラーゲンであってもよいが、ヒトの基底膜を構成するコラーゲンと異なるものが好ましく、具体的にはⅠⅤ型コラーゲン以外のコラーゲンが好適であり、そのなかでもⅠ型コラーゲンをを用いることが好ましい。コラーゲングルは、例えば、従来公知の製造方法で作成することができるが、本発明においては、後述の実施例に記載のように、コラーゲンの線維化を誘発させ、コラーゲン線維ネットワークから構成されるゲルを作成している。線維化されたコラーゲンは、強度および柔軟性を合わせ持つため取り扱いが容易であり、細胞増殖および細胞分化の維持に良好であり、本発明で用いられるコラーゲングルとして好ましい。また、本発明に用いられるコラーゲンは、コラーゲングル上に細胞を播種した際、ゲルの層に沈み込むことなく、ゲル表

面に保持されていることが必要である。従って、コラーゲンとしては、ゲルが細胞増殖に必要な強度を有するものが好ましく、例えば分子間架橋量の多いコラーゲンが好ましい。このようなコラーゲンとして、腱由来のコラーゲンが挙げられる。

[0038] 前記コラーゲンゲルのコラーゲン濃度は、網膜色素上皮細胞が定着し、増殖することができる強度があり、コラゲナーゼで容易に分解できるような溶解性、取り扱い易い粘性、等が満たされたゲルを作成しうる濃度であれば、どのような範囲であってもよいが、好ましくは0.1% (W/V) ~ 0.5% (W/V)、より好ましくは0.2% (W/V) ~ 0.3% (W/V) である。コラーゲンゲルのコラーゲン濃度が0.1% (W/V) 未満である場合には、コラーゲンゲルの強度が不足するため、網膜色素上皮細胞の定着率、細胞増殖速度が低下する。また、コラーゲンゲルのコラーゲン濃度が0.5% (W/V) を超える場合は、コラーゲンゲルを分解するためのコラゲナーゼ処理時間が長くなり、細胞に悪影響を与えることが懸念される。

[0039] 前記コラーゲンゲル作成に用いられるコラーゲンゲル混合溶液の容量は、細胞培養に用いる培養用基材の培養面積、形状にもよるが、単位面積 (cm^2) 当たり約100 μl ~ 約250 μl が好ましく、より好ましくは約150 μl ~ 約200 μl である。コラーゲンゲル混合溶液量が少なすぎる場合は、ゲル表面に働く表面張力の影響で中央部分が薄いコラーゲンゲル層が形成され、網膜色素上皮細胞の培養に伴い、細胞が直接培養用基材に接触するため、網膜色素上皮細胞から構成される細胞シートの切り出しの際に、シートにダメージが起きやすい。また、コラーゲンゲル混合溶液量が過剰な場合は、培養用基材に厚みのあるコラーゲンゲル層が形成され、相対的に培養液量が少なくなるため、維持培養が行いにくく、またコラゲナーゼ処理に時間がかかり、網膜色素上皮細胞から構成される細胞シートへのダメージが懸念される。

[0040] 工程(1)において、前記網膜色素上皮細胞を細胞培養基材のコラーゲンゲル上に播種し、培養することによって、網膜色素上皮細胞から構成される

細胞シートを作成することができる。本明細書における細胞培養基材としては、細胞培養用であれば特に限定されないが、例えば、トランスウェル等の多孔質膜を有する培養用容器、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウエルプレート、マルチプレート、マルチウエルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、ローラーボトルが挙げられるが、コラゲナーゼ処理や細胞シートの切除の操作の簡便性から多孔質膜を有する培養用容器が好ましく、例えば市販されているトランスウェルを用いることが好ましい。本明細書における細胞培養基材の材質としては、例えば、金属、ガラス、セラミック、シリコン等の無機材料、エラストマー、プラスチック（例えば、ポリエステル樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ABS樹脂、ナイロン、アクリル樹脂、フッ素樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリウレタン樹脂、メチルペンテン樹脂、フェノール樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂、塩化ビニル樹脂）で代表される有機材料を挙げることができるが、それらに限定されない。

[0041] 播種される網膜色素上皮細胞の細胞数は、細胞シートを形成させることができる細胞密度であればいかなる範囲であってもよい。しかし、細胞密度が疎にすぎる場合は、細胞の形が悪く、細胞がコンフルエントな状態に達するまでの培養時間が長く、さらに細胞が成熟して着色するまでにかかる時間も長くなり、また密にすぎる場合であっても同様に細胞増殖を抑制し、コンフルエントな状態に達するまでの培養時間が長くなる傾向がある他、過密なために細胞が死んでしまうこともある。従って播種される細胞密度は、好ましくは、約 4.5×10^4 細胞数/cm² ~ 約 8.5×10^5 細胞数/cm²、より好ましくは、約 8.5×10^4 細胞数/cm² ~ 約 8.5×10^5 細胞数/cm²、最も好ましくは約 4.5×10^5 細胞数/cm² である。

[0042] コラーゲンゲル上に播種した網膜色素上皮細胞を培養液中で培養することにより、該網膜色素上皮細胞で構成された単層状の細胞集団（細胞シート）を形成することができる。培養液としては、当技術分野で通常用いられる細

胞培養用培地であれば特に制限なく用いることができる。例えば、F-10培地、F12培地、MEM、BME培地、DMEM、 α MEM、IMD培地、ES培地、DM-160培地、Fisher培地、WE培地およびRPMI 1640培地等、朝倉書店発行「日本組織培養学会編 組織培養の技術第三版」581頁に記載されているような基礎培地を用いることができる。さらに、基礎培地に血清（ウシ胎児血清等）、各種増殖因子（EGF、FGF、HGF、PDGFなど）、抗生物質、アミノ酸などを加えてもよい。培地のpHは、好ましくは約6～約8である。培養は、例えば、通常約30～約40℃で、約15～約60時間、網膜色素上皮細胞がコンフルエントな状態になるまで一次培養が行なわれる。その後培地を交換しつつ、約1週間～約2ヶ月間二次培養を行い、必要に応じて通気や攪拌を行いながら、細胞シートの形成まで培養が行われる。かかる培養によって得られる細胞シートを構成する細胞は、網膜色素上皮細胞として維持される。細胞が網膜色素上皮細胞として維持されていることは、特異的な分化マーカーとしてBEST1、RPE65、MERTK、またはCRALBPなどを検出することで確認できる。

- [0043] 工程（1）で形成された細胞シートはコラーゲンゲルに接着しているため、例えば、移植などの用途に用いる場合、そのままではコラーゲンゲルが被移植者への定着を妨げることが懸念される。また、血管形成細胞層と網膜色素上皮細胞層との結合や接着をコラーゲンゲルが妨げることも懸念される。コラーゲンゲルを予め除去することができれば、かかる問題の解決に資する。本発明の工程（2）においては、工程（1）で形成された細胞シートに接着しているコラーゲンゲルをコラゲナーゼで分解する。コラーゲンゲルの調製の際に用いられたコラーゲンの種類に応じて、当業者であれば適切なコラゲナーゼを選択することができる。コラーゲンゲルの分解に用いられるコラゲナーゼとしては、コラーゲンゲルを消化できる活性を有するものであれば特に限定されるものではないが、ヒト基底膜を構成するコラーゲン（例えばⅠⅤ型コラーゲンなど）を分解しにくいものが好ましく、例えば、商業レベ

ルで入手可能であり、安全で高い酵素活性を有するクロストリジウム (*Clostridium histolyticum*) やストレプトマイセス (*Streptomyces parvulus*) から誘導される微生物由来のコラゲナーゼを用いることができる。

[0044] 上記コラゲナーゼの活性としては、その単位質量あたりの活性やコラゲナーゼ水溶液の単位容積あたりの活性よりもむしろ、コラーゲンゲル中のコラーゲン質量に対する比活性が重要である。コラーゲンゲル溶解に用いられるコラゲナーゼの比活性 (コラゲナーゼ活性/コラーゲン質量) としては、0.1 U/mg 以上であることが好ましい。コラゲナーゼの比活性が0.1 U/mg 未満であると、コラーゲンゲルの溶解に時間がかかりすぎる場合、あるいはゲルが十分に溶解されない場合があり好ましくない。より好ましくは0.1~10,000 U/mg、さらに好ましくは1~3,000 U/mg の範囲である。

[0045] コラーゲン法において、コラーゲンゲルにコラゲナーゼを作用させる方法は、特に限定されるものではない。培地または緩衝能を有する等張液を溶媒として調製したコラゲナーゼ溶液を培地に添加してもよいし、細胞培養ディッシュから剥離した細胞付着コラーゲンゲルを前記コラゲナーゼ溶液に浸漬してもよい。本発明では、細胞培養基材としてトランスウェルを用いているため、インサートを回収し、該インサート底面のメンブレンを除去することによってコラーゲンゲル層を露出させることができ、露出したコラーゲンゲルに直接上記コラゲナーゼ溶液を浸漬させることが好ましい。

[0046] コラーゲン法において、コラゲナーゼによってコラーゲンゲルを溶解させる場合の時間については特に限定されないが、コラゲナーゼを作用させる時間が長すぎると接着能、増殖能などの細胞機能が低下する場合があります。コラゲナーゼ溶解を行う時間は、コラゲナーゼの比活性、温度、コラーゲンゲルの形状、コラゲナーゼ処理方法などの影響を受けるが、通常15分~60分である。また、コラゲナーゼ処理は単回処理でもよいし、複数回に分けて行ってもよい。

[0047] コラーゲン法におけるコラーゲンゲルのコラゲナーゼ処理時の温度は、細胞においては一般に生体内温度より 10℃以上低く（人では約 30℃）なると細胞質の流動性が低下して代謝能が低下し、温度が 42℃を超えるとタンパク質が変性して細胞機能が低下する場合があります、また、コラゲナーゼの至適温度は 37℃であるものが多くこれ以下の温度では溶解時間が長くなる場合があるので、10～42℃の範囲で設定するのが好ましい。より好ましくは 30～40℃、さらに好ましくは 36～38℃である。

[0048] コラーゲン法において、コラーゲンゲルの溶解が進行すると、細胞シートがゲルから徐々に剥離し、ついにはコラゲナーゼ溶液中に遊離する。細胞シートを回収するために、細胞シートを残存ゲルから機械的に剥離してもよいし、ゲルが完全に溶解してから細胞シートを回収してもよい。機械的に剥離させることで細胞シートを回収するまでの時間が短縮されるが、細胞シートが破壊される場合があるため、ゲルが完全に溶解してから細胞シートを回収することが好ましい。

[0049] 上記の如く回収された細胞シートは、そのまま血管形成細胞層との積層工程に用いることができるが、血管形成細胞層との接着性を残留コラゲナーゼが阻害する場合があるので、培地または緩衝能を有する等張液で洗浄することが好ましい。洗浄時の温度はコラーゲンゲルのコラゲナーゼ溶解処理に準じて設定することができる。残留コラゲナーゼを十分に除去するために、培地または緩衝能を有する等張液で 1 回以上洗浄するのが好ましい。

コラーゲン法で得られる網膜色素上皮細胞から構成される細胞シートは、網膜色素上皮細胞特有のサイトカインが生体内と同様の極性をもって分泌しており、また細胞間の密着結合の指標となる経上皮電気抵抗（TER）が生体内と同様に上昇していたことから生体内と同様の細胞層のバリア機能を有している。コラーゲン法によれば、このように、生体内と同様の機能を有する網膜色素上皮細胞から構成される細胞シートを得ることができる。

[0050] コラーゲン法で得られる細胞シートでは、網膜色素上皮細胞間にタイトジャンクションが形成され、且つコラーゲンゲルとの接触面に基底膜が形成さ

れる。本明細書において「基底膜」とは、網膜色素上皮細胞から産生された成分で形成された膜であって、基底膜成分の少なくとも一部を含む膜（以下、「網膜色素上皮細胞の基底膜」という。）を意味している。生体内における網膜色素上皮細胞の基底膜は、網膜色素上皮細胞層とブルッフ膜を構成する内コラーゲン層の間に薄い膜状で存在し、ⅠⅤ型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン（パールカン）、ニドゲン等を代表的な成分とする細胞外マトリックスである。なお、ブルッフ膜とは、網膜色素上皮細胞層と脈絡膜の間にある薄い膜で、網膜色素上皮細胞の基底膜、内コラーゲン層、エラスチン層、外コラーゲン層、脈絡膜毛細管板の基底膜の5層構造からなる膜であり、コラーゲン法で得られる網膜色素上皮細胞から構成される細胞シートは当該ブルッフ膜の構造の一部（網膜色素上皮細胞の基底膜）を含んでいる。タイトジャンクション形成は、六角形状の密着しあう細胞形態と、免疫染色による細胞間のオクルディンやZO-1等の発現を観察することで確認できる。基底膜の形成は、免疫染色によりラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン（パールカン）、ニドゲン、またはⅠⅤ型コラーゲン等の基底膜マーカーの細胞表面での発現を観察することや、走査型電子顕微鏡による観察により確認することができる。

一般に、網膜色素上皮細胞は、培養皿の上で培養した場合、基底膜成分を産生するものの、培養皿から剥離して使用可能な状態の網膜色素上皮細胞シートとして剥離することが極めて困難であるが（Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 36(2), 1995, 381-390）、コラーゲン法によれば、人工膜を利用することなく、網膜色素上皮細胞から産生された基底膜を伴う網膜色素上皮細胞をシートとして回収することが可能である。また、網膜色素上皮細胞は単層構造であるため、それ単独で扱おうとするとシート構造が崩壊し、細胞単位にばらばらになってしまいシートとして移植することが極めて困難であった。一方、コラーゲン法により得られる網膜色素上皮細胞から構成される細胞シートは、基底膜を伴い十分な剛性を有するため、シートの回収時にしわになりにくく、取扱いが極めて容易

となる。そのため、血管形成細胞層との積層操作を円滑に行うことができる。また、細胞移植デバイスへの搭載や移植操作を円滑に行うことができるため、細胞移植を最小限の侵襲で実施でき、効果、予後、ともに向上することが期待される。また、コラーゲン法により得られる網膜色素上皮細胞から構成される細胞シートが基底膜を伴うことは、基底膜も同時に障害を受けている疾患に対する移植用途として極めて有利である。例えば、加齢黄斑変性は、ブルッフ膜も障害を受けている場合があるが、コラーゲン法により得られる網膜色素上皮細胞シートを、上記本発明の製造方法における網膜色素上皮細胞層として用いることにより、当該方法により製造される細胞シートが有する基底膜がその障害部分を補うことにより、細胞シートの生着率を向上させることができ、これによる治療効果も期待できる。このため、本発明の製造方法において、コラーゲン法により得られる網膜色素上皮細胞シートを網膜色素上皮細胞層として用いると、製造される細胞シートは、基底膜の障害を伴う疾患を対象とする移植用シートとして好適であり、特に加齢黄斑変性を対象とする移植用シートとして好適に利用できる。

[0051] コラーゲン法は、以下の工程（３）をさらに含んでもよい。

（３）剥離された細胞シートのコラーゲングルとの接触面に基底膜の有無を確認する工程

[0052] 工程（３）において、細胞シートにおける基底膜の有無を確認することによって、網膜色素上皮細胞で構成される細胞層と基底膜からなる細胞シートの形成を判定することができる。基底膜の有無の確認は、基底膜マーカーの発現や走査型電子顕微鏡による観察など上述の基底膜の形成の確認と同様の方法で行うことができる。基底膜の検出は基底膜マーカーの発現を細胞の任意の箇所（例えば、細胞質、細胞膜、核膜など）で確認してもよいが、好ましくは、コラーゲングルとの接触面で発現しているマーカーを対象とする。

[0053] 本明細書における基底膜マーカーとしては、基底膜において特異的に発現している遺伝子の転写産物、翻訳産物またはその分解産物が含まれる。そのような遺伝子としては、例えば、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン

(パールカン)、ニドゲンまたはⅠⅤ型コラーゲンなどが挙げられる。なかでも、基底膜の主成分であるラミニン、ⅠⅤ型コラーゲンなどが好ましく用いられる。

[0054] 「剥離された細胞シートのコラーゲングルとの接触面に基底膜の有無の確認」に用いられる試料としては、工程(2)で剥離された細胞シート(または細胞)由来の基底膜マーカー(例、RNA、タンパク質、その分解産物など)を含有するものであれば特に制限されない。

[0055] 上記試料がRNAの場合における基底膜マーカー遺伝子の発現は、工程(2)で剥離された細胞シートの細胞からRNA(例：全RNA、mRNA)画分を調製し、該画分中に含まれる該マーカー遺伝子の転写産物を検出するか、あるいは該細胞からRNAを抽出せずに直接細胞中のマーカー遺伝子産物を検出することにより調べることができる。

[0056] 細胞からRNA(例：全RNA、mRNA)画分を調製する場合、RNA画分の調製は、グアニジソーCsCl超遠心法、AGPC法など公知の手法を用いて行うことができるが、市販のRNA抽出用キット(例：RNeasy Mini Kit；QIAGEN製等)を用いて、微量試料から迅速且つ簡便に高純度の全RNAを調製することができる。RNA画分中の基底膜マーカー遺伝子の転写産物を検出する手段としては、例えば、ハイブリダイゼーション(ノーザンブロット、ドットブロット、DNAチップ解析等)を用いる方法、あるいはPCR(RT-PCR、競合PCR、リアルタイムPCR等)を用いる方法などが挙げられる。微量試料から迅速且つ簡便に定量性よく基底膜マーカー遺伝子の発現変動を検出できる点で競合PCRやリアルタイムPCRなどの定量的PCR法が、また、複数のマーカー遺伝子の発現変動を一括検出することができ、検出方法の選択によって定量性も向上させ得るなどの点でDNAチップ解析が好ましい。

[0057] ノーザンブロットまたはドットブロットハイブリダイゼーションによる場合、基底膜マーカー遺伝子の検出は、該遺伝子の転写産物とハイブリダイズし得る核酸(プローブ)を用いて行うことができる。そのような核酸として

は、基底膜マーカー遺伝子の転写産物とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る核酸が挙げられる。「ハイストリンジェントな条件」とは、例えば、 $6\times\text{SSC}$ (sodium chloride/sodium citrate) 中 45°C でのハイブリダイゼーション反応の後、 $0.2\times\text{SSC}/0.1\%$ SDS 中 65°C での一回以上の洗浄などが挙げられる。当業者は、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、ハイブリダイゼーション反応の温度、プローブ濃度、プローブの長さ、ミスマッチの数、ハイブリダイゼーション反応の時間、洗浄液の塩濃度、洗浄の温度等を適宜変更することにより、所望のストリンジェンシーに容易に調節することができる。該核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。好ましくはDNAが挙げられる。

[0058] プローブとして用いられる核酸は、二本鎖であっても一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、アンチセンス鎖を用いることができる。該核酸の長さは標的核酸と特異的にハイブリダイズし得る限り特に制限はなく、例えば約15塩基以上、好ましくは約30塩基以上である。該核酸は、標的核酸の検出・定量を可能とするために、標識剤により標識されていることが好ましい。標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^3\text{P}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、プローブと標識剤との結合にビオチン（ストレプト）アビジンを用いることもできる。

[0059] ノーザンハイブリダイゼーションによる場合は、上記のようにして調製し

たRNA画分をゲル電気泳動にて分離した後、ニトロセルロース、ナイロン、ポリビニリデンジフロリド等のメンブレンに転写し、上記のようにして調製された標識プローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液中、上記「ハイストリンジェントな条件下で」ハイブリダイゼーションさせた後、適当な方法でメンブレンに結合した標識量をバンド毎に測定することにより、各基底膜マーカー遺伝子の発現量を測定することができる。ドットブロットの場合も、RNA画分をスポットしたメンブレンを同様にハイブリダイゼーション反応に付し（各マーカー遺伝子についてそれぞれ行う）、スポットの標識量を測定することにより、各マーカー遺伝子の発現量を測定することができる。

[0060] DNAチップ解析による場合、例えば、上記のようにして調製したRNA画分から、逆転写反応によりT7プロモーター等の適当なプロモーターを導入したcDNAを合成し、さらにRNAポリメラーゼを用いてcRNAを合成する（この時ビオチンなどで標識したモノヌクレオチドを基質として用いることにより、標識されたcRNAが得られる）。この標識cRNAを、上記したプローブを固相化したチップと接触させてハイブリダイゼーション反応させ、固相上の各プローブに結合した標識量を測定することにより、各基底膜マーカー遺伝子の発現量を測定することができる。当該方法は、検出する分化マーカー遺伝子（従って、固相化されるプローブ）の数が多くなるほど、迅速性および簡便性の面で有利である。

[0061] 一方、細胞からRNAを抽出せずにマーカー遺伝子を検出する場合、その検出手段として、*in situ* ハイブリダイゼーションを用いることができる。該方法では、細胞からRNAを抽出する代わりに、細胞を固定剤、好ましくは沈殿固定剤、例えばアセトンで処理するか、又は緩衝ホルムアルデヒド溶液の中に短い時間インキュベーションすることによって細胞を固定する。固定化後、細胞をパラフィンの中に包埋してブロックを形成し、薄片を切り取ることで試料として用いることができる。良好に調製したパラフィン包埋サンプルは室温で何年も保存できる。プローブとして用いられる核酸

は、上記したものと同様のものを用いることができる。in situ ハイブリダイゼーションは、細胞のコラーゲンゲルとの接触面に基底膜マーカーの発現を直接確認することができる点で、本発明において好適に用いられる。

[0062] あるいは、工程（２）における剥離された細胞シートにおける基底膜マーカー遺伝子の発現の確認は、該細胞シート（または細胞）からタンパク質画分を調製し、該画分中に含まれる該マーカー遺伝子の翻訳産物（即ち、マーカータンパク質）を検出するか、あるいは該細胞シート（または細胞）からタンパク質を抽出することなく直接細胞シート（または細胞）中のマーカー遺伝子の翻訳産物を検出することにより調べることができる。マーカータンパク質の検出は、各タンパク質に対する抗体を用いて、免疫学的測定法（例：ELISA、FIA、RIA、ウェスタンブロット等）によって行うこともできるし、酵素などの測定可能な生理活性を示すタンパク質においては、該生理活性を、各マーカータンパク質について公知の手法を用いて測定することによっても行い得る。あるいはまた、マーカータンパク質の検出は、MALDI-TOF MS等の質量分析法を用いても行うことができる。

尚、各マーカータンパク質に対する抗体は、該マーカータンパク質または該タンパク質、あるいはその部分ペプチドを感作抗原として、通常使用されるポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体作製技術に従って取得することができる。

[0063] 個々の免疫学的測定法を本発明に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常技術的配慮を加えて基底膜マーカータンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭

和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

[0064] 前記網膜色素上皮細胞層には、血管形成細胞層を直接積層してもよいし、他の層を介して血管形成細胞層を積層させてもよい。本発明においては、好ましくは網膜色素上皮細胞層と、血管形成細胞層とを直接積層する。

[0065] 本発明は、また上記本発明の製造方法により得られる、網膜色素上皮細胞層及び血管形成細胞層を含む細胞シートに関する。本発明の細胞シートは、好ましくは、生体外で幹細胞又は前駆細胞を分化誘導して得られた網膜色素上皮細胞で形成された細胞層と血管形成細胞層を含む。また、網膜色素上皮細胞層を上記コラーゲン法で製造した場合、本発明の細胞シートは、網膜色素上皮細胞層から分泌された基底膜を更に含む。本発明の細胞シートは、眼疾患患者への網膜治療用移植材料として好適である。眼疾患としては、例えば、加齢黄斑変性、網膜色素変性、糖尿病性網膜症、網膜剥離、網膜中心動脈閉塞、網膜中心静脈閉塞、網脈絡膜萎縮症、網膜色素上皮剥離、ぶどう膜炎(ベーチェット病、原田病等)、高度近視(病的近視)等の網脈絡膜変性

疾患が挙げられる。

[0066] 本発明の細胞シートは、血管形成細胞層を伴うため、脈絡膜も同時に障害を受けた疾患に対しても高い生着率で移植することができる。そのため、本発明の製造方法で得られる細胞シートは、上記に例示の網脈絡膜変性疾患のうち、特に、網膜色素上皮細胞単独の移植では治療効果が表れにくかった網脈絡膜萎縮を伴う眼疾患（加齢黄斑変性、網膜色素変性症、網脈絡膜萎縮症、網膜色素上皮剥離、ぶどう膜炎（ベーチェット病、原田病等）、高度近視（病的近視）等）に対する治療用途に好ましく用いられる。

[0067] また、本発明の細胞シートは、生体と同様の成分からなる基底膜を有するため、前記眼疾患に対する薬効スクリーニングや毒性評価などの各種スクリーニング用途としても利用できる。前記眼疾患に対する薬効スクリーニングとしては、例えば、特表2007-500509に記載の方法に従って、前記眼疾患に対して薬効を有する物質のスクリーニングに本発明の細胞シートを適用することができる。具体的には、薬効を有する候補物質の存在下または非存在下において本発明の細胞シートを、前記眼疾患の原因となり得るストレス条件下（例えば、光（例えば、白色光、青色光；光は網膜細胞、特に光受容体細胞の死を引き起こし、黄斑変性誘発因子になり得る）、A2E〔レチノイドN-レチニリデン-N-レチニルエタノールアミン〕（A2Eの蓄積は加齢性の網膜細胞の神経変性、特に黄斑変性の発現へ寄与すると考えられている）、タバコ煙凝集物（喫煙は黄斑変性の危険因子と考えられている）、外圧（例えば、静水圧；眼圧の上昇は緑内障との関連が疑われている））で培養し、ロドプシン発現する光受容体の数、抗カスパーゼ3抗体を用いた免疫染色によって評価することができる。また、毒性評価としては、例えば、特表2007-517210に記載の方法に従って、毒性物質のスクリーニングに本発明の細胞シートを適用することができる。具体的には、毒性候補物質の存在下または非存在下において、本発明の細胞シートを特表2007-517210に記載のインテグリンマーカーペプチドを用いて培養し、488nm波長のレーザーで励起し、520nmで蛍光を検出するこ

とで評価できる。さらに、本発明の細胞シートは、視細胞外節の貪食能や神経保護作用などの視細胞の維持に関わる機能、ポンプ作用、タイトジャンクションによる網膜血管バリア機能などの、生体内における網膜色素上皮細胞が備える種々の様々な機能を評価するための *in vitro* モデルとして利用することも可能である。

[0068] 本発明の移植用細胞シートは、ヒト、ヒト以外の哺乳動物（例：サル、マウス、ラット、イヌ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、ウサギ、ハムスター、モルモット等）における上記疾患を治療するために用いることができる。

[0069] 本発明の移植用細胞シートの適用可能な疾患部位の範囲は、対象疾患、投与対象の動物種、年齢、性別、体重、症状などに依存して適宜選択される。

[0070] 本発明の移植用細胞シートは、一度にもしくは数回に分けて移植してもよい。移植の適用回数は疾患に応じて医療従事者、ガイドラインに従って決定されるが、例えば疾患が加齢黄斑変性疾患であった場合には、本発明の移植用細胞シートを、その重篤度によって2回以上移植してもよい。また複数回移植を行う場合、インターバルは特に限定されないが、数日～数週間の期間を置いても良い。

[0071] 本発明の移植用細胞シートは、医療従事者、ガイドラインに沿った適切な移植方法に従って移植される。網膜下に本発明の網膜色素上皮細胞シートを移植する場合、眼球網膜下の移植部位まで刺入した注射針から水流に乗せる移植方法のほか、専用の運搬用治療器具によっても行うことができる。

実施例

[0072] 以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは単なる例示であって、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

[0073] 製造例 1. 網膜色素上皮細胞の調製

下記製造例 2 に用いる網膜色素上皮細胞として、*Neuroscience Letters* 458 (2009) 126-131 に記載の方法に準じて、ヒト iPS 細胞から分化誘導した成熟網膜色素上皮細胞 (253G1、

K11PD2、59M8、59SV2、59SV3、59SV9、46a、K21EV15、101EV3、K11EV9、454E2)、及びES細胞から分化誘導した網膜色素上皮細胞(hES, CMK6)を用いた。

<ヒトiPS由来網膜色素上皮細胞>

253G1は、Nature Biotechnology 26,101-106,2008に記載された健常者に由来するヒトiPS細胞(253G1)から分化誘導した網膜色素上皮細胞である。

59SV2、59SV3、59SV9は、同一の網膜色素変性症患者に由来するヒトiPS細胞から分化誘導した網膜色素上皮細胞であり、同iPS細胞は、Proc. Jpn. Acad., Ser. B 85(2009)348-362に記載の方法に準じて、センダイウィルスを用いて、ヒト皮膚由来線維芽細胞にOct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycを導入する方法で樹立された細胞である。

K21EV15、101EV3、K11EV9、454E2は互いに異なる網膜色素変性症患者に由来する、ヒトiPS細胞から分化誘導した網膜色素上皮細胞であり、同iPS細胞は、Nat Methods. 2011 May; 8(5):409-12に記載の方法に準じて、エピソーマルベクターを用いて、ヒト皮膚由来線維芽細胞にヒトOct3/4、Sox2、Klf4、L-Myc、LIN28を導入する方法で樹立された細胞である。

<サルiPS由来網膜色素上皮細胞>

46aは、Jpn. J. Transplant. 44(2009)231-235に記載の方法に従ってサル(cynomolgus monkey)iPS細胞から分化誘導した網膜色素上皮細胞である。

<ES由来網膜色素上皮細胞>

hESは、ヒトES細胞株khES-1から分化誘導した網膜色素上皮細胞である。CMK6は、Neuroscience Letters 458(2009)126-131に記載の方法に準じて、サルES細胞から分化誘導した網膜色素上皮細胞である。

[0074] 製造例 2. 網膜色素上皮細胞シートの製造方法

<コラーゲンゲル混合溶液の調製>

以下のA液、B液及びC液を調製した。

A液：ブタ腱由来酸可溶性

Type-IコラーゲンCellmatrix I-A（新田ゼラチン）3
. 0mg/ml

B液：5倍濃度の濃縮培養液

DMEM/F12（Invitrogen、12500-062）3gをM
illiq水に溶解させ、total volume 50mlをフィルタ
ー処理

C液：再構成用緩衝液

1N NaOH（50mM）5ml、NaHCO₃（260mM）2.2g
、HEPES（200mM）4.77gをMilliq水に溶解させ、to
tal volume 100mlをフィルター処理

冷却しながらA液（7容量）にB液（2容量）を泡立てないように混合（
薄黄色）した。次に、C液（1容量）を加え混合（薄ピンク色）し、0.2
1%コラーゲンゲル混合溶液とした。

<網膜色素上皮細胞シートの作成>

12mmトランスウェルインサート（0.4µm Pore Polye
ster メンブレン；Corning、3460）のインサート内に0.
21%コラーゲンゲル混合溶液を200µl加え、37℃で30minイン
キュベートした。次に、F10-10%FBS（F-10（Sigma、N
6908）445ml、FBS 50ml、Penicillin-Stre
ptomycin（Invitrogen、15140-122）5ml）
をインサート外に1500µl、インサート内に500µl加え、37℃で
24hrインキュベートした。その後、インサート内およびインサート外を
F10-10%FBSで1回洗浄し、インサート内に製造例1で得た網膜色
素上皮細胞を 5×10^5 個（F10-10%FBS、500µl）となるよう

に播種し、インサート外にF10-10%FBSを1500 μ l加えた。網膜色素上皮細胞がコンフルエントになるまでF10-10%FBSで培養し、コンフルエント後、培地をSFRM-B27 (DMEM (Sigma、D6046) 350ml, F12 HAM (Sigma、N6658) 150ml, B27 (Invitrogen、17504-044) 10ml, 200mM L-Glutamine (Sigma、G7513) 5ml, Penicillin-Streptomycin (Invitrogen、15140-122) 5ml, bFGF (wako、060-04543) 10ng/ml) に交換し (インサート外1500 μ l、インサート内500 μ l、培地交換は3回/week) 網膜色素上皮細胞の色や形が適当になるまで培養した。

<切り出し>

培養開始から6週間経過後、インサートのメンブレンを切除した。コラゲナーゼ L (コラゲナーゼ L : 新田ゼラチン, PBS (+) : Sigma, 2600U/ml) 100 μ l をインサート下に加え、37℃で60分インキュベートしPBS (+) で3回洗浄した。網膜色素上皮細胞シートが乾かないようにSFRM-B27を滴下し、PALM MicroBeam (ZEISS) にて好みの大きさに切除した。

<特性>

組織切片に対する免疫組織化学により、作成した細胞シートは、タイトジャンクション (ZO-1陽性) が形成された網膜色素上皮細胞シートが、基底膜 (ラミニン、IV型コラーゲン陽性) に裏打ちされた構造を有し、シート形成に用いた1型コラーゲンの残存がないこと (Collagen type 1 陰性) が確認された。

[0075] 実施例1 血管内皮前駆細胞層と網膜色素上皮細胞層の積層細胞シートの製造

<血管内皮前駆細胞の調製>

内皮細胞培養キット-2 (EGM-2培地 (2% FBS含有) ; タカラ

バイオ社製、B3162)を用い、ヒト血管内皮前駆細胞(ECFCs;タカラバイオ社製、PT056)を $1.3 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ となるように、温度応答性培養皿(3.5 cm dish;セルシード社製、CS3007)へ播種した。

＜血管内皮前駆細胞の網膜色素上皮細胞シートへの重層＞

15hr経過後、温度応答性培養皿に、製造例1で得たヒトiPS細胞由来網膜色素上皮細胞シートを入れて血管内皮前駆細胞へ重ねて置き、培地を静かに吸引して、細胞シートが温度応答性培養皿の中央部分にくるように配置した。その後、乾燥防止のために20℃のEGM-2培地を100μl添加して、30分間静置することにより、培養皿表面の温度応答性ポリマーを親水性に転換させ、細胞シートを剥離した。

EGM-2培地で1回洗浄し、得られた細胞シートを、付着細胞用培養皿(Lumox dish 35;グライナー社製、077331;底面をメスで切り取り可能)に移した。レーザマイクロダイセクション(PALM MicroBeam;ZEISS社製)を用いて細胞シートを好みの大きさに切除して、ヒト血管内皮前駆細胞とヒト網膜色素上皮細胞が積層された細胞シートを得た。

[0076] 実施例2 細胞シート移植

実施例1で得た積層細胞シートを、NOD/SCIDマウス広背筋の皮下に移植し、1週間後に組織切片を作成した。抗CD31抗体(内皮細胞)、抗HLA-1抗体(移植ヒト細胞)、DAPIを用いた免疫組織化学の結果、移植した細胞シートの生着と、移植細胞に由来する脈管構造の形成が認められた(図1中、矢印「capillary (donor)」)。この結果から、血管内皮前駆細胞が、移植後に内皮細胞へ成熟し、脈管を形成し得たことを確認した。

[0077] 実施例3 細胞シート移植

実施例1で得た積層細胞シートを、部分的に網膜色素上皮細胞と脈絡膜とを欠損させたウサギの網膜下に移植し、1週間後に組織切片を作成する。抗CD31抗体(内皮細胞)、抗HLA-1抗体(移植ヒト細胞)、DAPI

を用いた免疫組織化学により、移植した細胞シートの生着と、移植細胞に由来する脈管形成を確認できる。

[0078] 比較例 1

製造例 2 で得たヒト網膜色素上皮細胞シート（ヒト血管内皮前駆細胞なし）を、部分的に網膜色素上皮細胞と脈絡膜とを欠損させたウサギの網膜下に移植し、1 週間後に組織切片を作成する。抗 CD 31 抗体（内皮細胞）、抗 HLA-1 抗体（移植ヒト細胞）、DAPI を用いた免疫組織化学により、移植細胞はシート構造が破壊し、少数が分散した状態で検出され、実施例 3 と比較して、移植細胞の生着率が著しく低下する現象が認められる。

[0079] 参考例 1. 脈管形成

VEGF を含む培地で培養した血管内皮前駆細胞が脈管を形成することを次の方法で確認した。

（培地）

「EM」：EGM-2 培地（2% FBS 含有；タカラバイオ社製、B3162）

「F10」：F10-10%FBS（F-10（Sigma、N6908）445ml，FBS 50ml，Penicillin-Streptomycin（Invitrogen、15140-122）5ml）。この培地を脈管形成用培地として用いた結果を図 2 中「F10」と示す。

「F10-1」：製造例 2 で作成した網膜色素上皮細胞シートを、12mm トランスウェルインサート（0.4 μ m Pore Polyester メンブレン；Corning、3460）のインサート内に置き、F10-10%FBS をインサート内およびインサート外にそれぞれ 500 μ l、1500 μ l 加えた状態で一日培養し、培養上清を回収した。この培養上清を脈管形成用培地として用いた結果を図 2 中「F10-1」と示す。

「F10-2」：製造例 2 で作成した網膜色素上皮細胞シートを、12mm トランスウェルインサート（0.4 μ m Pore Polyester メンブレン；Corning、3460）のインサート内に置き、F10

ー 10% FBS をインサート内およびインサート外にそれぞれ $500 \mu\text{l}$ 、
 $1500 \mu\text{l}$ 加えた状態で二日培養し、培養上清を回収した。この培養上清
 を脈管形成用培地として用いた結果を図 2 中「F10-2」と示す。

(脈管形成)

上記 4 種類の培地を用いて、それぞれ培養皿に、ヒト血管内皮前駆細胞 (ECFCs; タカラバイオ社製、PT056) を $1.3 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ となるように播種した。37°C、5% CO_2 で保温し、4 時間後に顕微鏡下で脈管形成数を数えた。3 回実験を繰り返した結果を、図 2 (A) に、得られた脈管形成数を用いた培地ごとに示した (* $P < 0.001$; ANOVA, Scheffé test)。それぞれ、光学顕微鏡写真及び蛍光顕微鏡写真により脈管形成を形態的に確認できた。

用いた 4 種類の培地中の VEGF の濃度を測定したところ、EM は 1.44 ng/ml 、F10 は 0 ng/ml 、F10-1 は 2.64 ng/ml 、F10-2 は 2.80 ng/ml であった。VEGF を含まない F10 は脈管の形成数が著しく低かった。F10 以外の培地では脈管形成数が多くみられたことから、VEGF により血管内皮前駆細胞の脈管形成が促進されることが確認された。また、この結果より、網膜色素上皮細胞の培養上清により脈管形成を促進できたことから、血管内皮前駆細胞層と網膜色素上皮細胞層を積層した細胞シート状態で脈管形成処理を施すことも可能であることが確認できた。

[0080] 参考例 2. マトリゲルの使用

マトリゲルコートした培養皿を用いた点以外は参考例 1 と同様の方法で、4 種類の培地を用いてヒト血管内皮前駆細胞を培養し、脈管形成数を数えた。3 回実験を繰り返した結果を、図 2 (B) に、得られた脈管形成数を用いた培地ごとに示した (* $P < 0.01$ ** $P < 0.05$; ANOVA, Scheffé test)。それぞれ、光学顕微鏡写真及び蛍光顕微鏡写真により脈管形成を形態的に確認できた。

参考例 1 と比較して、マトリゲルを用いた場合はすべての培地において脈

管形成数が著しく向上した。特に、VEGFを含まないF10は脈管の形成数が著しく低かったが（参考例1）、マトリゲルを用いた場合は脈管形成の促進が認められた。これらの結果より、VEGFの存在に関わらず、マトリゲルを利用して脈管形成を促進しうることが確認できた。

[0081] 網膜色素上皮細胞シートの製造条件

参考例3. 網膜色素上皮細胞シートの製造方法（コラーゲンの種類）

製造例2の253G1（iPS-網膜色素上皮細胞）を用いた細胞シートを作成する工程において、ブタ腱由来酸可溶性のType-IコラーゲンCellmatrix I-A（新田ゼラチン）3mg/mlを0.21%コラーゲン混合溶液/wellとして用いるのに代えて、（A）ブタ皮由来Type-IコラーゲンTE（特注品：主にI型コラーゲン、若干のIII型コラーゲンを含む）（新田ゼラチン）5mg/mlを0.35%コラーゲン混合溶液/well、（B）ブタ腱由来Type-IコラーゲンT-1002（特注品：I型コラーゲン）（新田ゼラチン）5.1mg/mlを0.35%コラーゲン混合溶液/well、（C）FITC標識コラーゲンI（Chondrex）1mg/mlを0.07%コラーゲン混合溶液/well、（D）FITC標識コラーゲンI（特注）（Chondrex）3mg/mlを0.21%コラーゲン混合溶液/well、（E）アテロコラーゲン（高研）3mg/mlを0.21%コラーゲン混合溶液/well、（F）細胞培養用透過性コラーゲン膜（高研）としてそれぞれ用いた点以外は製造例2と同様の方法で細胞シートを作成し、切り出すことにより網膜色素上皮細胞シートを回収した。

製造例2と前記の各コラーゲンを用いた場合の試験結果を4つの項目〔1. ゲルの強度；2. 細胞の接着；3. 細胞の増殖；4. 安全性〕において比較・評価した。その結果、（A）{1. 劣る；2. 同等；3. 劣る；4. 良}、（B）{1. 良（5.1mg/ml）；2. 同等；3. 劣る；4. 良}、（C）{1. 劣る（1mg/ml）；2. 劣る；3. 不明；4. 不明}、（D）{1. 同等（3mg/ml）；2. 同等；3. 劣る；4. 不明}、

(E) {1. 同等 (3 mg/ml) ; 2. 劣る ; 3. 不明 ; 4. 良}、(F) {コラゲナーゼで溶解せず使用できなかった}であった。ゲルの強度に関して、網膜色素上皮細胞が増殖するためにはある程度の固さが求められる。このような観点からはコラーゲンの種類と濃度は、製造例2のブタ腱由来酸可溶性のType I コラーゲンCell matrix I-Aと(B) ブタ腱由来Type I コラーゲンT-1002を上記の濃度で用いることが特に好適であった。基質がある程度固くない場合、網膜色素上皮が増殖しないため本発明の使用に耐えない。

[0082] 参考例4. 網膜色素上皮細胞シートの製造方法 (コラーゲン量)

製造例2の253G1 (iPS-網膜色素上皮細胞) を用いた細胞シートを作成する工程において、コラーゲンゲル混合溶液の使用量を200 μ lに代えて、100 μ l、または300 μ lとした点以外は製造例2と同様の方法で細胞シートを作成し、切り出すことにより網膜色素上皮細胞シートを回収した。

製造例2と比較して、コラーゲンゲル混合溶液の使用量が100 μ lの場合はコラーゲンゲル混合溶液量が少ないため、表面張力の影響で中央部分が薄いコラーゲンゲル層が形成され、培養が進むと、播種した網膜色素上皮細胞が底部のメンブレンに直接接触しやすく、シートの切り出し作業時に網膜色素上皮細胞シートが破れる場合があった。コラーゲンゲル混合溶液の使用量が300 μ lの場合はコラーゲンゲル混合溶液量が多いため、厚みのあるコラーゲンゲルの層が形成され、相対的にインサート内に保持することができる培地の量が少なくなり維持培養が行いにくく、また、コラゲナーゼ処理に時間がかかるため細胞シートへのダメージが大きくなる恐れがある。

[0083] 参考例5. 網膜色素上皮細胞シートの製造方法 (コラゲナーゼの量と処理時間)

製造例2の253G1 (iPS-網膜色素上皮細胞) を用いた細胞シートを作成する工程において、1%コラゲナーゼL (新田ゼラチン) 又はI型コラゲナーゼ (ロシュ) を30 μ l用いて網膜色素上皮細胞シートに30 mi

n接触する条件に代えて、それぞれ10 μ lで10min、10 μ lで20min、10 μ lで30min、10 μ lで60min、20 μ lで20min、20 μ lで60min、30 μ lで50minとした点以外は製造例2と同様の方法で細胞シートを作成し、切り出すことにより網膜色素上皮細胞シートを回収した。

その結果、コラゲナーゼ処理を10 μ lで60min又は20 μ lで60min行った場合、30 μ lで30minと同程度のコラーゲンの分解が見られた。

[0084] 参考例6．網膜色素上皮細胞シートの製造方法（播種細胞数）

製造例2の253G1（iPS－網膜色素上皮細胞）を用いた細胞シートを作成する工程において、インサート内に播種する細胞数を5 $\times$ 10⁵個／500 μ lに代えて、（A）5 $\times$ 10⁴／500 μ l、（B）1 $\times$ 10⁵／500 μ l、（C）1 $\times$ 10⁶／500 μ lとした点以外は実施例1と同様の方法で細胞シートを作成し、切り出すことにより網膜色素上皮細胞シートを回収した。

製造例2と比較して、（A）、（B）は細胞数が少ないため細胞がコンフルエントになるまでに時間が長く、（C）は増殖が遅くやはり細胞がコンフルエントになるまでの時間が長くなる傾向にあった。

[0085] 参考例7．網膜色素上皮細胞シートに形成された基底膜

製造例2において、253G1（iPS－網膜色素上皮細胞）から作成した細胞シートについて、cryosection（凍結切片）を作成し、免疫組織化学染色を行った。ZO-1の発現によりタイトジャンクションが形成されていること、ラミニン、IV型コラーゲンの発現により基底膜が構成されていることを確認した。各タンパク質の検出には、Zymed社製rabbit anti-ZO-1（1：100希釈）、Abcam社製rabbit laminin（1：200希釈）、Calbiochem社製mouse anti-human collagen type IV antibody（1：40）の各抗体を用いた。さらに、Molecul

ar Probes社製4', 6-diamidino-2-phenyl indole (DAPI; 1 μ g/ml) を用いた核染色の状態から網膜色素上皮細胞シートは単層上皮形態をとっていることが確認された。

[0086] 網膜色素上皮細胞シートの評価

評価1. 細胞シートの網膜色素上皮特異的遺伝子発現プロファイル

製造例2において、59SV3、59SV9 (iPS-網膜色素上皮細胞) から細胞シートを作成する工程において、細胞がコンフルエントになってから培地をSFRM-B27へ交換した日を0日として、1週間、4週間、2カ月経過後のシートを構成する細胞について、RT-PCRによりBEST1、RPE65、MERTK、CRALBPの発現を確認したところ、ポジティブコントロール (ヒト網膜色素上皮細胞 total RNA (Sciencell社製、Cat NO. 6545)) と同程度以上の発現が認められた。ここで、BEST1、RPE65、MERTKは網膜色素上皮細胞に特異的に発現する遺伝子である。また、CRALBPは網膜色素上皮細胞とミュラー細胞に発現する遺伝子である。

[0087] 評価2. 網膜色素上皮シートのコラーゲン残存測定

製造例2において、253G1 (iPS-網膜色素上皮細胞) から作成した細胞シートについて、コラゲナーゼ処理前及び後に切り出した各シートについてcryosection (凍結切片) を作成し、免疫組織化学染色を行った。核をMolecular Probes社製4', 6-diamidino-2-phenyl indole (DAPI; 1 μ g/ml) で染色し、Collagen type1の染色にCalbiochem社製 rabbit anti-human collagen type I antibody (1:40希釈) を用いたところ、コラゲナーゼ処理後のシートからはコラーゲンは検出されず、コラゲナーゼにより培養皿にコートしたコラーゲンが除去されていることを確認した。一方、コラゲナーゼ処理前に切り出したシートからはコラーゲンが検出された。

[0088] 評価3. 網膜色素上皮細胞シートのサイトカイン分泌能

製造例 2 において、253G1 (iPS-網膜色素上皮細胞) 及び 454E2 (iPS-網膜色素上皮細胞) から作成した細胞シートについて、それぞれ網膜色素上皮細胞シートを切り出す工程の前に、トランスウェル内の Apical 側及び Basal 側の培養液を回収し、Arvydas M, IOVS. 2006; 47: 3612-3624 に記載の方法に準じて、ELISA で VEGF 及び PEDF の産生量を検出した。その結果、Arvydas M, IOVS. 2006; 47: 3612-3624 で報告されているヒト胎児由来網膜色素上皮と同様、VEGF は Basal 側に主に分泌され、PEDF は Apical 側に主に分泌されていることが確認された (図 4)。製造例 2 において 253G1 及び 454E2 から作成した網膜色素上皮細胞シートは生体内と同様のサイトカイン分泌能を有し、機能性に優れていることが示された。

[0089] 評価 4. 網膜色素上皮細胞シートの経上皮電気抵抗

細胞層のバリア機能と電気抵抗、いわゆる経上皮／内皮電気抵抗 (TER) には強い相関関係が見られる。製造例 2 において、454E2 (iPS-網膜色素上皮細胞) から作成した細胞シートについて、網膜色素上皮細胞シートを切り出す工程の前に、MILLIPORE 社記載の方法 (Millicell ERS-2 を使用) に準じて、インサートの内側と外側の培地中にプローブを入れ、TER を電氣的に測定した。その結果、TER は $640 \Omega \cdot \text{cm}^2$ であり、Nature Protocols vol 4, No 5 662-673 (2009) の Fig 10 で報告されているヒト胎児由来網膜色素上皮と同様、高い TER 値を示した。製造例 2 において作成した網膜色素上皮細胞シートは生体内の網膜色素上皮と同様の高いバリア機能を有していることが示された。

[0090] 評価 5. サル ES 細胞由来網膜色素上皮細胞シートの移植

製造例 2 においてサル ES 細胞由来網膜色素上皮細胞、CMK6 から作成したサル網膜色素上皮細胞シートを、Invest Ophthalmol Vis Sci. 1995 Feb; 36 (2): 381-90. に記載

の方法に準じてサル1の片眼に移植した。移植前に、移植予定の眼の網膜に障害を与える目的で網膜光凝固術を施し、網膜光凝固斑を形成させたサル1の片眼移植後28日目に、眼底写真、及びOCT（Optical coherence tomograph）光干渉断層計を用いて眼底の断面を組織切片のように画像化し、網膜の状態を確認したところ、蛍光眼底造影検査による蛍光の漏出はなく、移植片は生着しており、感覚網膜の菲薄化などの障害は起きていなかった。

[0091] 評価6．サル1 P S細胞由来網膜色素上皮細胞シートの移植

製造例2においてサル1 P S細胞由来網膜色素上皮細胞、46aから作成したサル網膜色素上皮細胞シートを、Invest Ophthalmol Vis Sci. 1995 Feb; 36(2): 381-90.に記載の方法に準じて自家移植1眼、他家移植3眼の網膜下に移植した。移植後1年後まで、眼底写真、及びOCT（Optical coherence tomograph）光干渉断層計を用いて眼底の断面を組織切片のように画像化し、網膜の状態を経過観察したところ、他家移植は移植片周囲の線維性変化や蛍光眼底造影検査による蛍光の漏出、OCTでは網膜下の高輝度病変といった明らかな拒絶反応がみられた。一方、自家移植ではこのような明らかな拒絶反応は認められず、蛍光眼底造影検査による蛍光の漏出はなく、移植片は生着しており、感覚網膜の菲薄化などの障害は起きていなかった。

産業上の利用可能性

[0092] 本発明により、生体内の欠損した脈絡膜血管を補い、移植後に酸素や養分を網膜へ補給できる血管構成細胞層を有する網膜色素上皮細胞の積層シートを、簡易かつ安定的に調製することができる。本発明の細胞シートは、生着率及び機能性に優れるため、網脈絡膜変性疾患、特に網脈絡膜萎縮を伴う強度近視や重度のブドウ膜炎など、網膜色素上皮細胞移植のみでは十分な治療効果が得られにくい重篤な網脈絡膜変性疾患をも治療の対象とすることができるため、極めて有用である。

[0093] 本明細書中で挙げられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記

載された内容は、本明細書での引用により、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

[0094] 本出願は日本で出願された特願２０１２－１８５９３２（出願日：２０１２年８月２４日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

- [請求項1] 網膜色素上皮細胞層と血管形成細胞層とを積層する工程を含む、網膜色素上皮細胞層及び血管形成細胞層を含む細胞シートの製造方法。
- [請求項2] 血管形成細胞層が網膜色素上皮細胞層の基底面と接触するように、網膜色素上皮細胞層と血管形成細胞層とを積層する、請求項1記載の製造方法。
- [請求項3] 血管形成細胞層が、血管芽細胞、血管内皮前駆細胞、及び血管内皮細胞からなる群から選択される少なくとも一つの細胞で構成されている、請求項1又は2記載の製造方法。
- [請求項4] 血管形成細胞層が、細胞シートの移植対象となる患者由来組織若しくは細胞、又は患者とHLA型が適合するドナー由来細胞で構成されている、請求項1又は2記載の製造方法。
- [請求項5] 網膜色素上皮細胞層が、以下の工程を含む方法で製造される細胞シートである、請求項1～4のいずれか1項に記載の製造方法：
(1) コラーゲンゲル上に網膜色素上皮細胞を播種、培養し、網膜色素上皮細胞で構成された細胞シートを形成させる工程、
(2) コラーゲンゲルをコラゲナーゼで分解し、網膜色素上皮細胞で構成された細胞シートを剥離する工程。
- [請求項6] 網膜色素上皮細胞が、ES細胞、iPS細胞又は前駆細胞を分化誘導して得られた細胞である請求項1～5のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか1項に記載の方法で製造された細胞シート。
- [請求項8] 生体外で幹細胞又は前駆細胞を分化誘導して得られた網膜色素上皮細胞で形成された細胞層、当該細胞から分泌された基底膜、及び血管形成細胞層を含む移植用細胞シート。