

明 細 書

発明の名称：肝機能障害を処置するためのシート状細胞培養物

技術分野

[0001] 本発明は、肝機能障害を処置するためのシート状細胞培養物等に関する。

背景技術

[0002] 近年、損傷した組織等の修復のために、種々の細胞を移植する試みが行われている。例えば、狭心症、心筋梗塞等の虚血性心疾患により損傷した心筋組織の修復のために、胎児心筋細胞、骨格筋芽細胞、間葉系幹細胞、心臓幹細胞、ES細胞、iPS細胞等の利用が試みられている（非特許文献1）。

[0003] このような試みの一環として、スキャフォールドを利用して形成した細胞構造物や、細胞をシート状に形成したシート状細胞培養物が開発されてきた（特許文献1、非特許文献2）。

シート状細胞培養物の治療への応用については、火傷等による皮膚損傷に対する培養表皮シートの利用、角膜損傷に対する角膜上皮シート状細胞培養物の利用、食道がん内視鏡的切除に対する口腔粘膜シート状細胞培養物の利用等の検討が進められており、その一部は臨床応用の段階に入っている。

[0004] そのような応用の一つとして、消化管等の臓器の損傷の治癒にシート状細胞培養物を利用することが提案されている。例えば特許文献2には、縫合不全等により生じた消化管の損傷部からの漏出を治癒または予防するために、間葉系幹細胞を含むシート状細胞培養物を利用することが記載されている。

また、特許文献3には、臓器の表面への生着性がよく、臨床応用での操作性の良い生着シート状物について記載されている。具体的には、一方の面に細胞外マトリクス層を、他方の面に生体内分解ゲル層を有する筋芽細胞シートについて、細胞外マトリクス層の面を臓器に移植することで、肝臓や大腸の表面に良好に生着できることが実証されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表2007-528755号公報

特許文献2：国際公開第2017/130802号

特許文献3：国際公開第2021/149830号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Haraguchi Y. et al., Stem Cells Transl. Med., 1(2), 136-141 (2012)

非特許文献2：Sawa Y. et al., Surg. Today, 42(2), 181-184 (2012)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、肝機能障害を処置するための手段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

[0008] 本発明者は、肝機能障害を処置するための方法を研究する中で、シート状細胞培養物に由来するサイトカイン産生によって肝機能障害を処置する可能性に着目した。そして、かかる可能性を実証すべく鋭意研究を進めたところ、骨格筋芽細胞を含むシート状細胞培養物を使用することにより、シート状細胞培養物に由来するサイトカイン産生によって肝細胞の増殖、肝組織の再生、および血管新生が促進されることを見出し、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。

[0009] すなわち本発明は、以下に関する。

〔1〕肝機能障害を処置するための、または肝機能を改善するための、骨格筋芽細胞を含む、シート状細胞培養物。

〔2〕肝機能障害が、肝炎、肝線維症、肝硬変、肝臓がん、または肝不全である、〔1〕のシート状細胞培養物。

〔3〕肝機能障害が、肝硬変である、〔1〕または〔2〕のシート状細胞培養物。

〔4〕肝機能障害が、肝臓がんである、〔1〕または〔2〕のシート状細胞

培養物。

〔５〕肝臓がん切除後の肝臓に適用するための、〔４〕のシート状細胞培養物。

[0010] 〔６〕肝細胞の増殖、肝組織の再生、および／または血管新生を促進するための、〔１〕～〔５〕のいずれかのシート状細胞培養物。

〔７〕肝線維化を抑制するための、〔１〕～〔６〕のいずれかのシート状細胞培養物。

〔８〕サイトカイン産生を介して肝機能障害を処置するための、〔１〕～〔７〕のいずれかのシート状細胞培養物。

〔９〕ゲルおよび／またはポリマーを含む補強層をさらに含む、〔１〕～〔８〕のいずれかのシート状細胞培養物。

〔１０〕〔１〕～〔９〕のいずれかのシート状細胞培養物を製造する方法であって、骨格筋芽細胞を含む細胞集団を培養基材上に播種するステップ、播種された細胞集団をシート化し、シート状細胞培養物を形成するステップ、および形成されたシート状細胞培養物を培養基材から剥離するステップを含む、前記製造方法。

[0011] 〔１１〕肝機能障害を処置する方法であって、〔１〕～〔９〕のいずれかのシート状細胞培養物を、肝機能障害を示す部位に適用するステップを含む、前記方法。

〔１２〕シート状細胞培養物を、肝機能障害を示す部位に適用するステップが、シート状細胞培養物を、移植デバイスで肝臓表面に移植することによってなされる、〔１１〕の方法。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、肝炎、肝線維症、肝硬変、肝臓がん、または肝不全等の肝機能障害を処置することができる。特に、本発明によれば、現行の内科的な治療では改善が見込めない末期の非代償性肝硬変を処置することができ、また、肝臓がん切除後に残存する肝臓の肝不全を処置することができる。また、本発明によれば、肝細胞の増殖、肝組織の再生、および／または血管新

生を促進することができる。また、本発明によれば、肝線維化を抑制することができる。さらに、本発明によれば、サイトカイン産生を介して肝機能障害を処置することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1] 図1は、70%肝部分切除モデルマウスにおける、シート状細胞培養物が移植された肝部分切除後の肝臓を示す。実線の円はシート状細胞培養物の移植部位を示し、破線の円は肝部分切除部位を示す。

[図2] 図2は、70%肝部分切除モデルマウスにおける、シート状細胞培養物の移植部位の切片のヘマトキシリンエオジン（HE）染色画像を示す。

[図3] 図3は、70%肝部分切除モデルマウスにおける、シート状細胞培養物の移植部位の切片の免疫蛍光染色画像を示す。

[0014] [図4] 図4は、70%肝部分切除モデルマウスにおける、シート状細胞培養物の移植部位の切片の免疫染色の結果を示す。図4Aは、シート状細胞培養物の移植部位の切片の免疫染色画像を示す。図4Bは、一視野あたりのKi67陽性細胞の数を定量してプロットすることにより作成したグラフを示す。各値はシート処置群（n=7）および対照群（n=12）のそれぞれの平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

[図5] 図5は、70%肝部分切除モデルマウスにおける、術後日数の経過に伴う肝重量／体重比の変化を示す。各値はシート処置群（n=7）および対照群（n=12）のそれぞれの平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

[0015] [図6] 図6は、70%肝部分切除モデルマウスにおける、シート状細胞培養物の移植部位のライセートを、Akt、p-Akt（Ser473）、およびβアクチンについてウェスタンブロッティングに供した結果を示す。図6Aは得られた画像を、図6Bはp-Akt（Ser473）についてバンド領域を定量してプロットすることにより作成したグラフをそれぞれ示す。各値はシート処置群（n=7）および対照群（n=12）のそれぞれの平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

[図7] 図7は、70%肝部分切除モデルマウスにおける、シート状細胞培養物

の移植部位のライセートを、CD31および β アクチンについてウェスタンブロッティングに供した結果を示す。図7Aは得られた画像を、図7BはCD31についてバンド領域を定量してプロットすることにより作成したグラフをそれぞれ示す。各値は各タイミングにおけるシート処置群（ $n=5$ ）および対照群（ $n=5$ ）のそれぞれの平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

[0016] [図8]図8は、70%肝部分切除モデルマウスにおける、シート状細胞培養物の移植部位のライセートから抽出したRNAをリアルタイムPCRに供した結果を示す。図8AはVEGFのmRNAの発現量を、図8BはHGFのmRNAの発現量をそれぞれ示す。各値はシート処置群（ $n=7$ ）および対照群（ $n=12$ ）のそれぞれの平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

[図9]図9は、70%肝部分切除モデルマウスにおける、シート状細胞培養物の移植部位のライセートを、HGFについてELISAに供した結果を示す。各値はシート処置群（ $n=7$ ）および対照群（ $n=12$ ）のそれぞれの平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

[0017] [図10]図10は、90%肝部分切除モデルマウスにおける、術後の時間経過に伴うシート処置群（ $n=7$ ）および対照群（ $n=12$ ）のそれぞれの生存率の変化を示す。

[図11]図11は、肝線維症モデルマウスの作製および処置の方法を示す。図11Aは、チオアセトアミド（TAA）の注射、シート状細胞培養物による処置、およびマウスの犠牲死のスケジュールを示す。図11Bは、シート状細胞培養物が移植された肝臓（シート処置群）およびシート状細胞培養物の非存在下の肝臓（対照群）を示す。

[0018] [図12]図12は、肝線維症モデルマウスにおける、肝臓の切片のヘマトキシリンエオジン（HE）染色画像を示す（図12A：術後3週、図12B：術後5週）。

[図13]図13は、肝線維症モデルマウスにおける、肝臓の切片のシリウスレッド染色の結果を示す。図13AおよびCは、肝臓の切片のシリウスレッド

染色画像を示す（図13A：術後3週、図13C：術後5週）。図13BおよびDは、赤色領域を定量してプロットすることにより作成したグラフを示す（図13B：術後3週、図13D：術後5週）。各値はシート処置群（ $n=5$ ）および対照群（ $n=5$ ）のそれぞれの平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

[0019] [図14]図14は、肝線維症モデルマウスにおける、肝臓の切片のマッソントリクローム染色の結果を示す。図14AおよびCは、肝臓の切片のマッソントリクローム染色画像を示す（図14A：術後3週、図14C：術後5週）。図14BおよびDは、線維化領域を定量してプロットすることにより作成したグラフを示す（図14B：術後3週、図14D：術後5週）。各値はシート処置群（ $n=5$ ）および対照群（ $n=5$ ）のそれぞれの平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

[図15]図15は、肝線維症モデルマウスにおける、肝臓の切片の免疫染色の結果を示す。図15AおよびCは、肝臓の切片の免疫染色画像を示す（図15A：術後3週、図15C：術後5週）。図15BおよびDは、一視野あたりのKi67陽性細胞の数を定量してプロットすることにより作成したグラフを示す（図15B：術後3週、図15D：術後5週）。各値はシート処置群（ $n=5$ ）および対照群（ $n=5$ ）のそれぞれの平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

[0020] [図16]図16は、肝線維症モデルマウスにおける、肝臓のライセートから抽出したRNAをリアルタイムPCRに供した結果を示す。図16AおよびCは、 α SMAのmRNAの発現量を示す（図16A：術後3週、図16C：術後5週）。図16BおよびDは、I型コラーゲン $\alpha 1$ のmRNAの発現量を示す（図16B：術後3週、図16D：術後5週）。各値はシート処置群（ $n=5$ ）および対照群（ $n=5$ ）のそれぞれの平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

[図17]図17は、肝線維症モデルマウスにおける、肝臓のライセートをELISAに供した結果を示す。図17A～Eは、それぞれ、総タンパク質、ア

ルブミン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、および総ビリルビンの発現量を示す。各値はシート処置群（ $n = 5$ ）および対照群（ $n = 5$ ）のそれぞれの平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

[0021] 本明細書において別様に定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術用語および科学用語は、当業者が通常理解しているものと同じ意味を有する。本明細書中で参照する全ての特許、出願および他の出版物や情報は、その全体を参照により本明細書に援用する。

発明を実施するための形態

[0022] [肝機能障害を処置するためのシート状細胞培養物]

本発明の一側面は、肝機能障害を処置するための、または肝機能を改善するための、骨格筋芽細胞を含む、シート状細胞培養物（「本発明のシート状細胞培養物」と記す場合がある）に関する。

一態様において、肝機能障害は、肝炎、肝線維症、肝硬変、肝臓がん、または肝不全である。

一態様において、肝機能障害は、肝硬変である。

一態様において、肝機能障害は、肝臓がんである。

一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、肝臓がん切除後の肝臓に適用するためのものである。

一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、肝細胞の増殖、肝組織の再生、および／または血管新生を促進するためのものである。

一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、肝線維化を抑制するためのものである。

一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、サイトカイン産生を介して肝機能障害を処置するためのものである。

一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、ゲルおよび／またはポリマーを含む補強層をさらに含む。

[0023] 肝臓は、代謝、体液の恒常性の維持、消化等の広範な機能を有するととも

に、再生能力を有する臓器である。肝臓において、血液は、肝動脈および門脈から流入し、中心静脈を経て肝静脈から流出する。肝臓の組織は、肝小葉が集積することによって構成され、肝小葉の中軸部は中心静脈が貫いている。肝細胞は、中心静脈の周囲に放射状に配列して肝細胞板を形成し、肝臓における全細胞の大半を占める。本明細書において、「肝細胞」は「肝実質細胞」と互換的に用いられる。肝臓における肝細胞以外の細胞は、「肝非実質細胞」と呼ばれ、類洞内皮細胞、クッパー細胞、樹状細胞、ナチュラル・キラー（NK）細胞、肝星細胞、および単球由来マクロファージ等が挙げられる。

本発明において、肝臓は、任意の生物の肝臓であってよく、限定されずに、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター、モルモット等）、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の哺乳動物の肝臓である。

[0024] 本発明において、「肝機能」とは、代謝、体液の恒常性の維持、消化等の正常な肝臓が有する機能を指す。

本発明において、「肝機能障害」とは、肝臓が、任意の原因によって肝機能を阻害されること、抑制されること、および／または損失することを指す。例えば、肝機能障害は、肝炎、肝線維症、肝硬変、肝臓がん、または肝不全である。

本発明において、「正常な肝臓」とは、疾患、障害、および／または処置等による何らかの影響を受けていない無傷（インタクト）の肝臓を指す。

[0025] 本発明において、「骨格筋芽細胞」とは、骨格筋に存在する筋芽細胞を指す。骨格筋芽細胞は当該技術分野でよく知られており、骨格筋から任意の既知の方法（例えば、特開2007-89442号公報に記載の方法等）により調製することもできるし、商業的に入手することもできる（例えば、Lonza、Cat# CC-2580）。骨格筋芽細胞は、限定されずに、例えば、CD56、 α 7インテグリン、ミオシン重鎖I1a、ミオシン重鎖I1b、ミオシン重鎖I1d（I1x）、MyoD、Myf5、Myf6、ミオゲニン、デスミン

、PAX3等のマーカーにより同定することができる。特定の態様において、骨格筋芽細胞はCD56陽性である。さらに特定の態様において、骨格筋芽細胞はCD56陽性およびデスミン陽性である。骨格筋芽細胞は、骨格筋を有する任意の生物、限定されずに、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター、モルモット等）、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の哺乳動物に由来してもよい。一態様において、骨格筋芽細胞は哺乳動物の骨格筋芽細胞である。特定の態様において、骨格筋芽細胞はヒト骨格筋芽細胞である。また、骨格筋芽細胞は、任意の骨格筋から採取できる。一態様において、骨格筋芽細胞は、大腿部、頸部、腹部由来の骨格筋芽細胞である。

[0026] 本発明において、「シート状細胞培養物」とは、細胞が互いに連結してシート状になったものを指す。細胞同士は、直接（接着分子等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、細胞外マトリックス等が挙げられる。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層等）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] 本発明のシート状細胞培養物は、肝臓に適用されることによって、肝機能障害を処置するか、または肝機能を改善する。一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、肝臓の表面に適用されることによって、肝機能障害を

処置するか、または肝機能を改善する。一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、移植デバイスによって肝臓に適用されることによって、肝機能障害を処置するか、または肝機能を改善する。一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、移植デバイスによって肝臓の表面に適用されることによって、肝機能障害を処置するか、または肝機能を改善する。

本発明において、「肝臓の表面」とは、正常な肝臓の任意の表面、または疾患、障害、および／または処置等による何らかの影響を受けた肝臓の任意の表面を指す。一態様において、肝臓の表面は、肝部分切除後の肝臓の表面である。一態様において、肝臓の表面は、肝線維症を示す（線維化領域を有する）肝臓の表面である。

[0028] 本発明において、「適用」とは、シート状細胞培養物を貼付すること、移植すること、および／または生着させることを指す。

本発明において、「移植デバイス」とは、シート状細胞培養物を肝臓に適用することができる、任意の医療機器を指す。一態様において、移植デバイスは、シート状細胞培養物を肝臓の表面に適用することができる、任意の医療機器である。移植デバイスは、例えば、シート状細胞培養物を支持し、剥離し得る、平面構造を備える医療機器であり、腹腔内で操作する観点から、内視鏡手術において体腔内に経腹腔的に挿入された筒状体に挿通し得る形態のものが好ましい。

[0029] 本発明において、「肝炎」とは、肝臓における任意の炎症を指す。肝炎として、ウイルス性肝炎（A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎等）、アルコール性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、薬剤性肝炎、自己免疫性肝炎等が挙げられる。肝炎は急性肝炎および慢性肝炎に大別される。急性肝炎は一過性に肝炎を起こし得るが、慢性肝炎は長期間にわたる肝炎の維持によって肝臓の線維化および肝細胞の変性や壊死等を起こし得る。慢性肝炎は、肝臓の線維化および肝細胞の変性や壊死等を経て、肝線維症、肝硬変、次いで肝臓がんに進捗し得る。

本発明において、「肝線維症」とは、繰り返される損傷や慢性肝炎に起因

する肝臓の線維化および肝細胞の変性や壊死等によって、正常な肝臓の実質組織が結合組織に置き換わり、そして、コラーゲンなどの細胞外マトリックス成分が蓄積することによって、肝臓において瘢痕組織が形成されることを指す。

[0030] 本発明において、「肝硬変」とは、繰り返される損傷や慢性肝炎に起因する肝臓の線維化および肝細胞の変性や壊死等によって、正常な肝臓の実質組織が結合組織に大量に置き換わり、そして、コラーゲンなどの細胞外マトリックス成分が大量に蓄積することによって、肝臓において大量の瘢痕組織が形成されることを指す。肝硬変は、症状のない初期の段階では代償性肝硬変と呼ばれる（肝臓の一部に生じた障害を肝臓の残りの部分が代償し得る）。他方、肝硬変は、病状の進行とともに、黄疸、クモ状血管腫、手掌紅斑等の症状が生じる末期の段階では非代償性肝硬変と呼ばれる。代償性肝硬変および初期の非代償性肝硬変は、現行の内科的な治療（インターフェロン、グリチルリチン製剤、利尿薬、アルブミン製剤、食事療法等）によって処置することができる。他方、末期の非代償性肝硬変は、現行の内科的な治療では改善が見込めず、病状が進行して肝臓がんや肝不全となった後、外科的な治療を行わざるを得ない状況にある。

一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、代償性肝硬変または非代償性肝硬変を処置するためのものである。一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、初期または末期の非代償性肝硬変を処置するためのものである。

本発明において、「肝臓がん」とは、肝臓に生じた悪性腫瘍を指す。肝臓がんは原発性肝臓がんおよび転移性肝臓がん到大別される。原発性肝臓がんの大部分は肝細胞がん（肝細胞に由来する悪性腫瘍）である。肝細胞がんは、多くの場合、慢性肝炎、肝線維症、肝硬変を経て、肝臓がんに進捗することによって生じ得る。

[0031] 本発明において、「肝不全」とは、肝臓の大半が損傷を受けることによって、代謝、体液の恒常性の維持、消化等の正常な肝臓が有する機能が大幅に

低下することを指す。肝不全の原因としては、ウイルス性肝炎、肝硬変、アルコールによる肝傷害、薬による肝傷害等が挙げられる。また、肝臓がん切除後に残存する肝臓が肝不全を示すこともある。肝不全は急性肝不全および慢性肝不全に大別される。急性肝不全は短い期間で急速に進行するが、慢性肝不全は長い期間をかけて徐々に進行する。

[0032] 本発明において、「肝臓がん切除後の肝臓に適用する」とは、肝臓がんを部分的または完全に切除した後に残存する肝臓において、本発明のシート状細胞培養物を貼付すること、移植すること、および／または生着させることを指す。一態様において、肝臓がんを部分的または完全に切除した後に残存する肝臓の表面において、本発明のシート状細胞培養物を適用する。一態様において、肝臓がんを部分的または完全に切除した後に残存する肝臓の表面において、移植デバイスによって本発明のシート状細胞培養物を適用する。一態様において、肝臓がん切除後の肝臓は肝不全を示す。

[0033] 本発明において、「肝細胞」とは、肝臓における肝小葉の中心静脈の周囲に放射状に配列して肝細胞板を形成し、肝臓における全細胞の大半を占める細胞を指す。本明細書において、「肝細胞」は「肝実質細胞」と互換的に用いられる。

本発明において、「肝組織」とは、肝小葉が集積することによって構成される組織を指す。

本発明において、「血管新生」とは、肝臓等において既に存在する血管から新たな血管が生じ、分岐して血管網を構築する現象を指す。

本発明において、「肝線維化」とは、繰り返される損傷や慢性肝炎によって、正常な肝臓の実質組織が結合組織に置き換わり、そして、コラーゲンなどの細胞外マトリックス成分が蓄積することを指す。

本発明において、「サイトカイン産生」とは、血管新生や細胞の保護、修復等を担う血管内皮増殖因子（VEGF）、肝細胞増殖因子（HGF）等のサイトカインが産生されることを指す。例えば、本発明のシート状細胞培養物を適用した肝臓において、血管新生や細胞の保護、修復等を担うVEGF

、HGF等のサイトカインが産生される。

本発明において、「補強層」とは、本発明のシート状細胞培養物の機能を損なわず、構造を補強できる層状物を指す。

[0034] 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、本発明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、本発明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。

[0035] 本発明のシート状細胞培養物は、骨格筋芽細胞に加えて任意の他の細胞を含み得る。かかる細胞は、シート状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、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、軟骨細胞等）および幹細胞（例えば、筋芽細胞、心臓幹細胞等の組織幹細胞、胚性幹細胞、iPS（induced pluripotent stem）細胞等の多能性幹細胞、間葉系幹細胞等）等を含む。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。シート状細胞培養物を構成する細胞の非限定例としては、例えば、筋芽細胞、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、臍帯血由来のもの等）、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、鼻粘膜上皮細胞等）、内皮細胞（例えば、血管内皮細胞等）、肝細胞（例えば、肝実質細胞等）、膵細胞（例えば、膵島細胞等）、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。iPS細胞由来接着細胞の非限定例としては、

i P S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、軟骨細胞等が挙げられる。

[0036] シート状細胞培養物を構成する細胞は、シート状細胞培養物による治療が可能な任意の生物に由来し得る。かかる生物には、限定されずに、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、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、モルモット等）、ウサギ等が含まれる。また、シート状細胞培養物を構成する細胞の種類数は特に限定されず、1種類のみ細胞で構成されていてもよいが、2種類以上の細胞を用いたものであってもよい。シート状細胞培養物を形成する細胞が2種類以上ある場合、最も多い細胞の含有比率（純度）は、シート状細胞培養物の形成終了時において、50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは75%以上である。

[0037] 一態様において、細胞は自己由来細胞である。ここで「自己由来細胞」とは、シート状細胞培養物が移植に用いられる場合、そのレシピエントに由来する細胞を指す。

一態様において、細胞は同種同系由来細胞である。ここで「同種同系由来細胞」とは、レシピエントと同一の種の生物に由来し、遺伝的な近縁度で同系の（すなわち、レシピエントへの移植後に拒絶反応が起こらない）細胞を指す。例えば、レシピエントがヒトである場合、遺伝的な近縁度で同系のヒト細胞が同種同系由来細胞に該当する。

一態様において、細胞は同種異系由来細胞である。ここで「同種異系由来細胞」とは、レシピエントと同一の種の生物に由来し、遺伝的な近縁度で異系の（すなわち、レシピエントへの移植後に拒絶反応が起こる）細胞を指す。例えば、レシピエントがヒトである場合、遺伝的な近縁度で異系のヒト細胞が同種異系由来細胞に該当する。

本明細書において、「自己由来細胞」は「自家細胞」と互換的に用いられ、「同種同系由来細胞」および「同種異系由来細胞」は「他家細胞」と互換

的に用いられる。

[0038] 一態様において、細胞は異種由来細胞である。ここで「異種由来細胞」とは、シート状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指す。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等が異種由来細胞に該当する。

自己由来細胞および同種同系由来細胞は、移植しても拒絶反応が生じないため、本発明において好ましいが、同種異系由来細胞および異種由来細胞を利用することも可能である。同種異系由来細胞および異種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。

[0039] シート状細胞培養物は、既知の任意の方法（例えば、特開2010-081829号公報、特開2011-110368号公報等参照）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、細胞を培養基材上に播種するステップ、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培養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。細胞を培養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。ある一態様において、細胞を解凍するステップの後、細胞を培養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。

[0040] 培養基材は、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等を含む。容器は、培養液等の液体を透過させない構造および材料が好ましい。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培養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、細胞培養ボトル等が挙げられる。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、計数等が可能となる。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、上記のような種々の材料のプレートや容器等が、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等が挙げられる。培養基材は、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。好ましい培養基材としては、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等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等の細胞外マトリックスや、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等の細胞接着因子等を表面にコーティングした基材等が挙げられる。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等）。培養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。

- [0041] 培養基材は、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、

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等の公知のものを用いることができる(例えば、特開平2-211865号公報、特開2003-33177号公報参照)。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、CellSeed Inc.のUpCell(登録商標))、これをシート状細胞培養物の製造方法に使用することができる。

- [0042] 培養基材は、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 等であってよい。例えば、培養基材として直径 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。
- 培養基材は、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培養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、培養基材の表面に血清成分が付着している状態を指す。かかる状態は、限定されずに、例えば、培養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、血清を培養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。

培養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常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×g～約1200×g程度で遠心分離し、上清を採取する方法等が挙げられる。

[0043] 培養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等）、種々の液体培地（例えば、DMEM、MEM、F12、DMEM/F12、DME、RPMI 1640、MCDB（MCDB102、104、107、120、131、153、199等）、L15、SkBM、RITC80-7等）等で行うことができる。希釈濃度は、血清成分が培養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。

[0044] インキュベート時間も、血清成分が培養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、血清成分が培養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。

[0045] 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

ペット等による吸引や、デカンテーション等の慣用の液体廃棄手法を用いることができる。本発明の好ましい態様においては、血清廃棄後に、培養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、培養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等）、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等）、L15、SkBM、RITC80-7等）等で行うことができる。洗浄手法としては、慣用の培養基材洗浄手法、例えば、限定することなく、培養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、廃棄する手法等を用いることができる。

[0046] 本発明において、培養基材を、成長因子でコートしてもよい。ここで、「成長因子」とは、細胞の増殖を、それが無い場合に比べて促進する任意の物質を指し、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）等を含む。成長因子による培養基材のコート手法、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。

[0047] 本発明において、培養基材を、ステロイド剤でコートしてもよい。ここで「ステロイド剤」とは、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、クッシング症候群等の悪影響を及ぼし得るものを指す。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培養基材のコート手法、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 $0.1\mu\text{g}$

／mL～約100 μ g／mL、好ましくは約0.4 μ g／mL～約40 μ g／mL、より好ましくは約1 μ g／mL～約10 μ g／mLである以外は、基本的に血清と同じである。

[0048] 培養基材は、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。

[0049] 培養基材は、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。

培養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。培養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培養基材（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等、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。

[0050] 播種は、約7.1 $\times 10^5$ 個／cm²～約3.0 $\times 10^6$ 個／cm²、約7.3 $\times 10^5$ 個／cm²～約2.8 $\times 10^6$ 個／cm²、約7.5 $\times 10^5$ 個／cm²～約2.5 $\times 10^6$ 個／cm²、約7.8 $\times 10^5$ 個／cm²～約2.3 $\times 10^6$ 個／cm²、約8.0 $\times 10^5$ 個／cm²～約2.0 $\times 10^6$ 個／cm²、約8.5 $\times 10^5$ 個／cm²～約1.8 $\times 10^6$ 個／cm²、約9.0 $\times 10^5$ 個／cm²～約1.6 $\times 10^6$ 個／cm²、約1.0 $\times 10^6$ 個／cm²～約1.6 $\times 10^6$ 個／cm²等の密度で行うことができる。

[0051] 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。本発明のシート状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でよく知られており、TE-7（例えば、Rosendaal et al., J Cell Sci. 1994; 107 (Pt 1):29-37、Goodpaster et al., J Histochem Cytochem. 2008;56(4):347-58等参照）等のマーカーにより同定することができる。

[0052] 一態様において、本発明のシート状細胞培養物を形成する細胞は、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シート状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、本発明のシート状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。

[0053] 本発明のシート状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してしまい好ましくない。したがって一態様において、本発明のシート状細胞培養物の製造において用いられる細胞集団は、TE7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。

[0054] 本発明のシート状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、かかる細胞はなるべく少ない方が好ましい。したがってCD56陽性率およびTE7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%以上等であり得、好ましくは90%以上である。

[0055] 本発明のシート状細胞培養物の厚みは特に限定されない。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、通常は細胞1個分以上の厚みを有し、シート状細胞培養物を構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 μ m以上の厚みを有し、好ましい一態様において、50 μ m以上の厚みを有する。本

発明のシート状細胞培養物の厚みの範囲としては、例えば $30\mu\text{m}\sim 200\mu\text{m}$ 、好ましくは $50\mu\text{m}\sim 150\mu\text{m}$ 、より好ましくは $60\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ 等が挙げられる。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枚積層したシートを用いる場合、その厚みは $150\mu\text{m}$ 以上、好ましくは $250\mu\text{m}$ 以上となり、また厚みの範囲としては、例えば $150\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$ 、好ましくは $250\mu\text{m}\sim 750\mu\text{m}$ 、より好ましくは $300\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ 等が挙げられる。

したがって本発明のシート状細胞培養物の厚みは、例えば $30\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$ 、好ましくは $50\mu\text{m}\sim 750\mu\text{m}$ 、 $50\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ 、 $60\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ 等が挙げられる。

[0056] ある態様においては、本発明のシート状細胞培養物は、非常に脆弱であり、取り扱いが困難である場合がある。したがって本発明のシート状細胞培養物は、取り扱いを簡便にし、破損のリスクを低減する目的で、さらに補強層を有してよい。補強層としては、本発明のシート状細胞培養物の機能を損なわず、構造を補強できるものであればいかなるものであってもよく、例えばゲルおよび／またはポリマーを含む補強層であってよいが、生体内に移植するものであるため、好ましくは、例えば生体適合性ゲルやポリマー等を含む、生体適合性の補強層である。

[0057] 補強層に用い得るゲル、好ましくは生体適合性ゲルとしては、生体内に導入した際に生体に悪影響を及ぼさないゲルであればいかなるものであってもよく、これに限定するものではないが、例えばフィブリンゲル、フィブリノーゲンゲル、ゼラチンゲル、コラーゲンゲル等が挙げられる。

補強層に用い得るポリマー、好ましくは生体適合性ポリマーとしては、生体内に導入した際に生体に悪影響を及ぼさないポリマーであればいかなるものであってもよく、これに限定するものではないが、例えばポリ乳酸、ポリジオキサノ、ポリグリカプロ、コラーゲン等が挙げられる。

[0058] 生体適合性ゲルを含む補強層の形成方法は、当該技術分野において公知の

方法を用いることができる。かかる方法としては、これに限定するものではないが、例えばシート状細胞培養物上に生体適合性ゲルやポリマーまたはその材料となる成分を噴霧する方法、シート状細胞培養物上にゾル状の生体適合性物質を積層してゲル化する方法、液状のゲルに浸漬したのちゲルを固形化させる方法等のほか、特開2016-52271号公報等に記載の方法等が挙げられる。

[0059] 補強層は、本発明のシート状細胞培養物の取り扱いを簡便にし、破損のリスクを低減するためのものであるため、一定以上の強度を有していることが好ましく、さらに弾力性を有していることが好ましい。ゲルやポリマーを含む構造物の強度の公知の評価単位としては、例えばゼリー強度等が挙げられ、シート状構造物の強度の公知の評価単位としては、例えば引張破断荷重等が挙げられる。ゼリー強度の測定方法については、例えばJIS K 6503等に記載されている。引張破断荷重は、シート状細胞培養物等の両端を水平方向に引っ張り、破断するまでの最大荷重を意味し、その測定方法は、例えば特開2016-52272号公報等に記載されている。

[0060] 本発明のシート状細胞培養物の補強層としては、これに限定するものではないが、例えば引張破断荷重として約0.010N以上、約0.015N以上、約0.020N以上、約0.025N以上、約0.030N以上、約0.035N以上、約0.040N以上、約0.045N以上等であってよく、また、約0.010N～約0.200N、約0.015N～約0.100N、約0.020N～約0.50N等の範囲であってよい。補強層を有するシート状細胞培養物は、補強層を有しないシート状細胞培養物と比較して、強度が約1.5倍以上、約2倍以上、約3倍以上、約4倍以上、約5倍以上、約6倍以上、約7倍以上、約8倍以上、約9倍以上、約10倍以上となり得、また、約1.5倍～約20倍、約2倍～約15倍、約2.5倍～約10倍等の範囲となり得る。

[0061] 補強層を有するシート状細胞培養物を適用する場合、補強層が適用部位に直接接触しないように適用するのが好ましい。すなわち、適用部位と補強層

との間にシート状細胞培養物が位置するように適用するのが好ましい。

一態様において、本発明のシート状細胞培養物を組織に適用する際、治癒を促進する他の組成物および／または移植片等と併せて適用してもよい。治癒を促進する他の組成物および／または移植片としては、これに限定するものではないが、例えば、有茎大網片等の有茎血管を含む移植片、フィブリンゲル、アドスプレー（登録商標）等が挙げられる。好ましい一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、有茎血管を含む移植片とともに適用される。有茎血管を含む移植片の典型例としては、例えば有茎大網片等が挙げられる。

かかる治癒を促進する他の組成物および／または移植片は、本発明のシート状細胞培養物とは独立した別の組成物または移植片であってもよいし、例えばシート状細胞培養物または補強層等に組み込まれたものであってもよい。

[0062] 本発明のシート状細胞培養物が、独立した治癒を促進する他の組成物および／または移植片とともに適用される場合、かかる組成物および／または移植片は、シート状細胞培養物の適用の前に適用されても、適用後に適用されてもよい。シート状細胞培養物の適用の前に他の組成物および／または移植片を適用する場合、適用部位とシート状細胞培養物との間に位置するように適用される。すなわち、まず適用部位に他の組成物および／または移植片を適用した後、その上からシート状細胞培養物（任意に補強層を含む）を適用する。シート状細胞培養物の適用の後に適用される場合、適用部位に対してシート状細胞培養物（任意に補強層を含む）の上から適用される。すなわち、まず適用部位にシート状細胞培養物を適用し、その上から他の組成物および／または移植片を適用する。

[0063] 組織再生のメカニズムとしては、例えば障害部位で血管新生や細胞の保護、修復等を担う V E G F、H G F 等のサイトカインやコラーゲン等を、シート状細胞培養物が持続的に放出するパラクライン効果によるもの、および／または、適用された周囲組織の前駆細胞や幹細胞が活性化して、コラーゲン

産生等を促すオートクライン効果が得られること等が考えられる。

本発明のシート状細胞培養物の大きさは、生体組織の所定の部位を覆うことができるものであれば特に限定されないが、例えば、シート状細胞培養物の形状が円形である場合、その直径は、10～55 mm、15～50 mm、20～45 mm、25～40 mm、または30～35 mmである。

[0064] [本発明のシート状細胞培養物を製造する方法]

本発明の別の側面は、本発明のシート状細胞培養物を製造する方法であって、骨格筋芽細胞を含む細胞集団を培養基材上に播種するステップ、播種された細胞集団をシート化し、シート状細胞培養物を形成するステップ、および形成されたシート状細胞培養物を培養基材から剥離するステップを含む、前記製造方法（「本発明の製造方法」と記す場合がある）に関する。

[0065] [肝機能障害を処置する方法]

本発明の別の側面は、肝機能障害を処置する方法であって、本発明のシート状細胞培養物を、肝機能障害を示す部位に適用するステップを含む、前記方法（「本発明の処置方法」と記す場合がある）に関する。

本発明において、「肝機能障害を示す部位」とは、肝機能が阻害され、抑制され、および／または損失した肝臓の任意の部位を指す。一態様において、肝機能障害を示す部位は、肝機能が阻害され、抑制され、および／または損失した肝臓の表面の任意の部位である。一態様において、肝機能障害を示す部位は、肝炎、肝線維症、肝硬変、肝臓がん、または肝不全を示す肝臓の表面の任意の部位である。一態様において、肝機能障害を示す部位は、代償性肝硬変または非代償性肝硬変を示す肝臓の表面の任意の部位である。一態様において、肝機能障害を示す部位は、初期または末期の非代償性肝硬変を示す肝臓の表面の任意の部位である。一態様において、肝機能障害を示す部位は、肝臓がん切除後に肝不全を示す、残存する肝臓の表面の任意の部位である。

[0066] 一態様において、本発明の処置方法において、本発明のシート状細胞培養物を、肝機能障害を示す部位に適用するステップは、本発明のシート状細胞

培養物を、肝機能障害を示す部位に貼付するステップである。

一態様において、本発明の処置方法において、本発明のシート状細胞培養物を、肝機能障害を示す部位に適用するステップは、本発明のシート状細胞培養物を、肝機能障害を示す部位に移植するステップである。

一態様において、本発明の処置方法において、本発明のシート状細胞培養物を、肝機能障害を示す部位に適用するステップは、本発明のシート状細胞培養物を、肝機能障害を示す部位に生着させるステップである。

一態様において、本発明の処置方法において、本発明のシート状細胞培養物を、肝機能障害を示す部位に適用するステップは、本発明のシート状細胞培養物を、移植デバイスで肝臓表面に移植することによってなされる。一態様において、移植デバイスは、本発明のシート状細胞培養物を肝臓の表面に適用することができる、任意の医療機器である。移植デバイスは、例えば、シート状細胞培養物を支持し、剥離し得る、平面構造を備える医療機器であり、腹腔内で操作する観点から、内視鏡手術において体腔内に経腹腔的に挿入された筒状体に挿通し得る形態のものが好ましい。

[0067] [本発明のシート状細胞培養物を含む組成物等]

本発明の別の側面は、本発明のシート状細胞培養物を含む、組成物（例えば、医薬組成物等）、移植片および医療製品等（「本発明の組成物等」と記す場合がある）に関する。

本発明の組成物等は、本発明のシート状細胞培養物に加えて、種々の追加成分を含むことができる。かかる追加成分は、例えば、薬学的に許容し得る担体、シート状細胞培養物の生存性、生着性および／または機能性等を高める成分、生体組織の再生および／または治癒またはその促進等に有用な成分、および／または移植片等である。当業者は、かかる追加成分について精通し、既知の任意の追加成分を適宜選択し、使用することができる。また、本発明の組成物等は、本発明のシート状細胞培養物に加えて、前記の追加成分を併用することもできる。

[0068] 一態様において、本発明の組成物等は、肝機能障害を処置するための、ま

たは肝機能を改善するためのものである。

一態様において、本発明の組成物等は、肝臓がん切除後の肝臓に適用するためのものである。

一態様において、本発明の組成物等は、肝細胞の増殖、肝組織の再生、および／または血管新生を促進するためのものである。

一態様において、本発明の組成物等は、肝線維化を抑制するためのものである。

一態様において、本発明の組成物等は、サイトカイン産生を介して肝機能障害を処置するためのものである。

一態様において、本発明の組成物等は、代償性肝硬変または非代償性肝硬変を処置するためのものである。一態様において、本発明の組成物等は、初期または末期の非代償性肝硬変を処置するためのものである。一態様において、本発明の組成物等は、肝臓がん切除後に肝不全を示す、残存する肝臓を処置するためのものである。

[0069] [肝機能障害を処置するための医薬の製造における使用]

本発明の別の側面は、肝機能障害を処置するための医薬の製造における、本発明のシート状細胞培養物、または本発明の組成物等の使用（「本発明の医薬の製造における使用」と記す場合がある）に関する。

[肝機能障害を処置するための使用]

本発明の別の側面は、本発明のシート状細胞培養物、または本発明の組成物等の、肝機能障害を処置するための使用（「本発明の使用」と記す場合がある）に関する。

本発明を以下の例を参照してより詳細に説明するが、これは本発明の特定の具体例を示すものであり、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0070] 例 1. シート状細胞培養物の調製

(1) 細胞の準備

マウス (C57BL/6J、日本クレア株式会社) 下肢の横紋筋を全身麻酔下で採

取し、採取した組織をコラゲナーゼおよびトリプシンを含む酵素消化液で処理して単一の細胞に分散させた。かかる細胞を、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下で、 $20\% \text{FBS}$ 含有 $\text{MCDB } 131$ 培地でコンフルエントになるまで培養した。

[0071] (2) シート状細胞培養物の調製

例2および3に示す肝部分切除モデルマウスおよび例4に示す肝線維症モデルマウスにおけるシート状細胞培養物の移植の当日に、(1)で培養した細胞を回収し、 24 ウェルプレートの温度応答性培養皿(UpCell(登録商標)、株式会社セルシード)に 3.0×10^6 個播種し、 $20\% \text{FBS}$ 含有 $\text{DMEM}/\text{F } 12$ 培地中で 12 時間培養した。その後 20°C まで温度を下げることでシート状細胞培養物を温度応答性培養皿から剥離して回収した。

以下、肝機能障害モデルマウス(70% 肝部分切除モデルマウス、 90% 肝部分切除モデルマウス、および肝線維症モデルマウス)を作製し、かかるマウスの肝臓の表面にシート状細胞培養物を移植することにより、シート状細胞培養物による肝機能障害の治療効果について検討した。

[0072] 例2. シート状細胞培養物による 70% 肝部分切除モデルマウスの処置

(1) 肝部分切除モデルマウスの作製

例1において使用したマウスを各タイミングにおいてシート処置群($n=5$)および対照群($n=5$)に分類した上で、それぞれのマウスについて全身麻酔下で腹部の体毛を剃り、 37°C の加熱パッド上でテープを使用してX字型の仰臥位に固定した。 70% エタノールで腹部の皮膚を消毒した。 3 cm の長さの腹部皮膚および筋肉の切開を介して正中開腹術を行い、腹部臓器および肝臓を露出させた。肝臓の中葉および外側葉を切除することによって肝臓の 70% を切除し、右葉、尾状葉および下大静脈は残存させた。肝部分切除の直後に、シート処置群では、例1で得たシート状細胞培養物を残存する肝臓の表面に移植し、縫合糸(PDS PLUS(登録商標)、ジョンソンエンドジョンソン株式会社)によって一箇所のみ縫合した(図1)。他方、対照群では、上記の肝部分切除の直後に、例1で得たシート状細胞培養物の非存在

下、シート処置群におけるシート状細胞培養物の移植部位に対応する部位で、残存する肝臓に対して縫合糸によって一箇所のみ縫合した。縫合糸によって血管および胆管を結紮し、腹腔内および臓器を生理食塩水で洗浄し、縫合糸によって腹部を閉じた。その後、シート処置群および対照群について、70%エタノールで縫合糸の周囲の腹部の皮膚を消毒した後、術中の出血等による体液喪失を補うために、0.5 mLの無菌等張液を皮下注射した。

[0073] (2) 肝臓の組織学検査

(2-1) 肝臓の切片の作製

シート状細胞培養物の移植から2日後および3日後に、シート処置群および対照群を再度全身麻酔下で開腹し、シート処置群におけるシート状細胞培養物の移植部位（シート状細胞培養物が肉眼で確認される部位）および対照群における対応する部位を摘出した。摘出した部位をエタノールに3時間浸漬させ、次いでキシレンに3時間浸漬させ、さらに溶解したパラフィンに終夜浸漬させた。パラフィンを冷やして固化させた後、ミクロトームを使用して切片を作製した。切片を乾燥させ、脱パラフィンした。

[0074] (2-2) ヘマトキシリンエオジン（HE）染色

上記（2-1）で得た切片（シート状細胞培養物の移植から2日後のもの）をヘマトキシリン溶液（マイヤーヘマトキシリン、武藤化学株式会社）で10分間染色した。次いで切片を流水で15分間洗い、エオジン溶液（1%エオシンY液、武藤化学株式会社）で10分間染色した。その後、切片をアルコールで脱水させ、室温で自然乾燥させた。染色した切片を200倍の倍率で光学顕微鏡によって観察した。

[0075] その結果、シート状細胞培養物の移植から2日後の移植部位において、シート状細胞培養物が肝臓表面に密着した状態で維持されていることを確認した（図2）。よって、移植したシート状細胞培養物が肝臓表面に生着していることがわかった。

[0076] (2-3) 免疫蛍光染色

上記（2-1）で得た切片（シート状細胞培養物の移植から2日後のもの

）をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、次いでPBSを除去した。切片をPBSに溶解した0.5%（v/v）Triton（登録商標）X-100溶液（浸透処理溶液）に浸漬させ、15分間室温でインキュベートした。浸透処理溶液を除去し、切片をPBSで洗浄し、次いでPBSを除去した。切片をPBSに溶解した3%ウシ血清アルブミン溶液（ブロッキング溶液）に浸漬させ、60分間室温でインキュベートした。ブロッキング溶液を除去し、切片をPBSで洗浄し、次いでPBSを除去した。切片を一次抗体溶液（抗デスミン抗体（ab8470、アブカム株式会社）を含む）に浸漬させ、1時間室温でインキュベートした。一次抗体溶液を除去し、切片をPBSで洗浄し、次いでPBSを除去した。切片を二次抗体溶液（蛍光標識したヤギ抗マウスIgG抗体（A-11001、サーモフィッシュサイエンティフィック株式会社）を含む）に浸漬させ、30分室温でインキュベートした。二次抗体溶液を除去し、切片をPBSで洗浄し、次いでPBSを除去した。切片をヘキスト溶液（SD024、株式会社同仁化学研究所）に浸漬させ、30分室温でインキュベートした。ヘキスト溶液を除去し、切片をPBSで洗浄し、次いでPBSを除去した。染色した切片を200倍の倍率で蛍光顕微鏡によって観察した。

[0077] その結果、シート状細胞培養物の移植から2日後の移植部位において、シート状細胞培養物が肝臓表面に密着した状態で維持されていることを確認した（図3）。よって、移植したシート状細胞培養物が肝臓表面に生着していることがわかった。

[0078] （2-4）免疫染色

上記（2-1）で得た切片（シート状細胞培養物の移植から2日後および3日後のもの）をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、次いでPBSを除去した。切片をPBSに溶解した0.5%（v/v）Triton（登録商標）X-100溶液（浸透処理溶液）に浸漬させ、15分間室温でインキュベートした。浸透処理溶液を除去し、切片をPBSで洗浄し、次いでPBSを除去した。切片をPBSに溶解した3%ウシ血清アルブミン溶液（ブロッキング溶液）に浸漬させ、60分間室温でインキュベートした。ブロッキング溶液を

除去し、切片をPBSで洗浄し、次いでPBSを除去した。切片を一次抗体溶液（抗Ki67抗体（ab16667、アブカム株式会社）を含む）に浸漬させ、1時間室温でインキュベートした。一次抗体溶液を除去し、切片をPBSで洗浄し、次いでPBSを除去した。切片を二次抗体溶液（酵素標識した抗体（LSAB2 System-HRP（K0672）、アジレントテクノロジー株式会社）を含む）に浸漬させ、30分室温でインキュベートした。二次抗体溶液を除去し、切片をPBSで洗浄し、次いでPBSを除去した。切片を酵素基質溶液（酵素基質（LSAB2 System-HRP（K0672）、アジレントテクノロジー株式会社）を含む）に浸漬させ、30分室温でインキュベートし、呈色反応を生じさせた。酵素基質溶液を除去し、切片をPBSで洗浄し、次いでPBSを除去した。染色した切片を光学顕微鏡によって観察した。

[0079] その結果、シート状細胞培養物の移植から2日後および3日後の移植部位において、シート処置群および対照群のいずれにおいても、Ki67（細胞増殖マーカー）陽性細胞が存在していることを確認した（図4）。特に、シート状細胞培養物の移植から2日後の移植部位において、シート処置群では、対照群と比べてKi67陽性細胞の数がより多かった。よって、シート状細胞培養物の肝臓表面への移植により、肝細胞の増殖および肝組織の再生が促進されることがわかった。

[0080] （2－5）肝重量／体重比の算出

シート状細胞培養物の移植から1、2、3、および7日後に、シート処置群および対照群について体重を測定するとともに、再度全身麻酔下で開腹して肝臓の重量（肝重量）を測定した。測定した体重および肝重量から、シート状細胞培養物の移植から1、2、3、および7日後の肝重量／体重比をそれぞれ算出した。

[0081] その結果、シート処置群および対照群のいずれについても、術後日数が経過するにつれて肝重量／体重比が増加することを確認した（図5）。シート処置群では、対照群と比べて肝重量／体重比がより大きい傾向を示した。よって、シート状細胞培養物の肝臓表面への移植により、肝細胞の増殖および

肝組織の再生が促進されることがわかった。

[0082] (3) 肝臓の臨床化学検査

(3-1) ライセートの調製

シート状細胞培養物の移植から1、2、3、および7日後に、シート処置群および対照群を再度全身麻酔下で開腹し、シート処置群におけるシート状細胞培養物の移植部位（シート状細胞培養物が肉眼で確認される部位）および対照群における対応する部位を摘出した。摘出した部位を冷却したPBSで洗浄し、氷上で冷やしつつ細かな断片に切断した。かかる断片をホモジェナイザーに入れ、これにRIPAバッファー（プロテアーゼ阻害剤を含む）を加えてホモジェナイズ後、超音波処理し、次いで10,000×g、4℃で20分間遠心分離を行い、上清（ライセート）を得た。

[0083] (3-2) ウェスタンブロッティング

上記(3-1)で得たライセート（シート状細胞培養物の移植から2日後および3日後のもの）に2×SDSサンプルバッファー（125mM Tris-HCl、4% SDS、20%グリセロール、0.01%ブロモフェノールブルー、および10%2-メルカプトエタノール）を最終濃度が1×になるように加え、混合した。混合液を95℃で5分間加熱し、ポリアクリルアミドゲルに供して電気泳動した。次いで、電気泳動後のゲルをPVDFメンブレンに転写した。メンブレンを2%スキムミルク溶液でブロッキングした後、ペルオキシダーゼ標識された抗Akt抗体（9272、セルシグナリングテクノロジー）、抗p-Akt（Ser473）抗体（9271、セルシグナリングテクノロジー）、抗CD31抗体（ab124432、アブカム株式会社）、および抗βアクチン抗体（A2066、シグマアルドリッチ）と反応させた。次いで、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）標識二次抗体（NA934V、サイティバ）との反応後、ペルオキシダーゼ基質溶液（RPN2236、サイティバ）を加えて発光させ、化学発光撮影装置を用いてイメージングを行った。

[0084] その結果、シート状細胞培養物の移植から2日後に、シート処置群では、対照群と比べてAkt（細胞増殖マーカー）およびp-Akt（Ser473

3) (細胞増殖マーカー) について発現量がより多いことを確認した (図 6)。よって、シート状細胞培養物の肝臓表面への移植により、肝細胞の増殖および肝組織の再生が促進されることがわかった。

また、シート状細胞培養物の移植から 2 日後および 3 日後に、シート処置群では、対照群と比べて CD 31 (血管新生マーカー) について発現量がより多いことを確認した (図 7)。よって、シート状細胞培養物の肝臓表面への移植により、肝臓において血管新生が促進されることがわかった。

[0085] (3-3) リアルタイム PCR

上記 (3-1) で得たライセート (シート状細胞培養物の移植から 1、2、3、および 7 日後のもの) から市販の RNA 精製キット (Rneasy Mini Kit、株式会社キアゲン) を使用して総 RNA を精製した後、かかる RNA について市販のリアルタイム PCR キット (Reverse Transcription System、プロメガ株式会社) を使用して RNA の逆転写およびリアルタイム PCR を行い、上記 (3-1) で得たライセートに含まれる VEGF および HGF の mRNA の発現量を定量した。VEGF について、フォワードプライマーは、5' -GAAGGAGAGCAGAAGTCCCA-3' (配列番号 1) とし、リバープライマーは、5' -ACACAGGACGGCTTGAAGAT-3' (配列番号 2) とした。また、HGF について、フォワードプライマーは、5' -TGACCTGCAATGGTGAAAGC-3' (配列番号 3) とし、リバープライマーは、5' -GGGTCAAGAGTGTAAGCACC-3' (配列番号 4) とした。サーマルサイクラーの設定は表 1 に示されるものとした。

[表1]

表 1. サーマルサイクラーの設定

温度	時間	サイクル数
98℃	1 分間	—
98℃	10 秒間	30 回
55℃	15 秒間	
72℃	40 秒間	
72℃	2 分間	—

[0086] その結果、VEGF（血管新生マーカー）について、シート処置群および対照群のいずれについても、術後日数が経過するにつれてmRNAの発現量が増加する傾向を確認した（図8）。他方、HGF（血管新生マーカー）については、シート処置群および対照群のいずれについても、術後日数が経過するにつれてmRNAの発現量が増加する傾向を示さなかった。よって、シート状細胞培養物の肝臓表面への移植により、肝臓における血管新生が促進されることがわかった。

[0087] (3-4) ELISA

上記(3-1)で得たライセート（シート状細胞培養物の移植から1日後および3日後のもの）について市販のELISAキット（ab223862、アブカム株式会社）を使用してELISAを行い、上記(3-1)で得たライセートに含まれるHGFのタンパク質の発現量を定量した。

[0088] その結果、シート状細胞培養物の移植から1日後に、シート処置群では、対照群と比べてHGF（血管新生マーカー）について発現量がより多いことを確認した（図9）。他方、シート状細胞培養物の移植から3日後に、シート処置群では、対照群と比べてHGF（血管新生マーカー）について発現量がより少なかった。よって、シート状細胞培養物の肝臓表面への移植により、早期にHGFの発現を増加させることがわかった。

[0089] 例3. シート状細胞培養物による90%肝部分切除モデルマウスの処置

(1) 肝部分切除モデルマウスの作製

例1において使用したマウスをシート処置群 ($n = 7$) および対照群 ($n = 12$) に分類した上で、それぞれのマウスについて全身麻酔下で腹部の体毛を剃り、 37°C の加熱パッド上でテープを使用してX字型の仰臥位に固定した。 70% エタノールで腹部の皮膚を消毒した。 3 cm の長さの腹部皮膚および筋肉の切開を介して正中開腹術を行い、腹部臓器および肝臓を露出させた。肝臓の中葉および外側葉を切除することによって肝臓の 90% を切除し、右葉、尾状葉および下大静脈は残存させた。肝部分切除の直後に、シート処置群では、例1で得たシート状細胞培養物を残存する肝臓の表面に移植し、縫合糸 (PDS PLUS (登録商標)、ジョンソンエンドジョンソン株式会社) によって一箇所のみ縫合した。他方、対照群では、上記の肝部分切除の直後に、例1で得たシート状細胞培養物の非存在下、シート処置群におけるシート状細胞培養物の移植部位に対応する部位で、残存する肝臓に対して縫合糸によって一箇所のみ縫合した。縫合糸によって血管および胆管を結紮し、腹腔内および臓器を生理食塩水で洗浄し、縫合糸によって腹部を閉じた。その後、シート処置群および対照群について、 70% エタノールで縫合糸の周囲の腹部の皮膚を消毒した後、術中の出血等による体液喪失を補うために、 0.5 mL の無菌等張液を皮下注射した。

[0090] (2) 肝部分切除後の生存率の算出

シート状細胞培養物の移植から6、12、24、36、および47時間後のシート処置群 ($n = 7$) および対照群 ($n = 12$) の生存率を算出した。各生存率は、各時間において生存しているマウスを各群の全体数で除することによって算出した。

[0091] その結果、対照群では術後25時間以内にすべてのマウスが死亡したが、シート処置群では術後35時間を超えてもなお一部のマウスが生存していることを確認した (図10)。よって、シート状細胞培養物の肝臓表面への移植により、マウスの生存率が向上することがわかった。

[0092] 例4. シート状細胞培養物による肝線維症モデルマウスの処置

(1) 肝線維症モデルマウスの作製

例1において使用したマウスをシート処置群 ($n=5$) および対照群 ($n=5$) に分類した上で、それぞれのマウスについて 150 mg/kg のチオアセトアミド (TAA) (204-00881、富士フイルム和光純薬株式会社) を1週間に2回腹腔内注射した (図11A)。次いで、それぞれのマウスについて全身麻酔下で腹部の体毛を剃り、 37°C の加熱パッド上でテープを使用してX字型の仰臥位に固定した。 70% エタノールで腹部の皮膚を消毒した。 3 cm の長さの腹部皮膚および筋肉の切開を介して正中開腹術を行い、腹部臓器および肝臓を露出させた。シート処置群では、例1で得たシート状細胞培養物を肝臓の表面に移植し、縫合糸 (PDS PLUS (登録商標)、ジョンソンエンドジョンソン株式会社) によって一箇所のみ縫合した (図11B)。他方、対照群では、例1で得たシート状細胞培養物の非存在下、シート処置群におけるシート状細胞培養物の移植部位に対応する部位で、肝臓に対して縫合糸によって一箇所のみ縫合した。腹腔内および臓器を生理食塩水で洗浄し、縫合糸によって腹部を閉じた。その後、シート処置群および対照群について、 70% エタノールで縫合糸の周囲の腹部の皮膚を消毒した後、術中の出血等による体液喪失を補うために、 0.5 mL の無菌等張液を皮下注射した。その後、それぞれのマウスについて週2回のTAA腹腔内注射を3週間継続することによって肝線維症を誘発させ、肝線維症モデルマウスを作製した (図11A)。マウスは3週目の最終日に犠牲死させ、肝臓を摘出し、また尾静脈から静脈血を採取した。

また、上記と同様に、肝線維症モデルマウス (シート処置群 ($n=5$) および対照群 ($n=5$)) (それぞれのマウスについて週2回のTAA腹腔内注射を5週間継続することによって肝線維症を誘発) も併せて作製した (図11A)。マウスは5週目の最終日に犠牲死させ、肝臓を摘出し、また尾静脈から静脈血を採取した。

[0093] (2) 肝臓の組織学検査

(2-1) 肝臓の切片の作製

上記（１）で得た肝臓をエタノールに３時間浸漬させ、次いでキシレンに３時間浸漬させ、さらに溶解したパラフィンに終夜浸漬させた。パラフィンを冷やして固化させた後、ミクロトームを使用して切片を作製した。切片を乾燥させ、脱パラフィンした。

[0094] （２－２）ヘマトキシリンエオジン（ＨＥ）染色

上記（２－１）で得た切片をヘマトキシリン溶液（マイヤーヘマトキシリン、武藤化学株式会社）で１０分間染色した。次いで切片を流水で１５分間洗い、エオジン溶液（１％エオシンＹ液、武藤化学株式会社）で１０分間染色した。その後、切片をアルコールで脱水させ、室温で自然乾燥させた。染色した切片を２００倍の倍率で光学顕微鏡によって観察した。

[0095] その結果、シート処置群から摘出した肝臓では、対照群から摘出した肝臓と比べて、線維化領域が減少していることを確認した（図１２）。よって、シート状細胞培養物の肝臓表面への移植により、肝線維化が抑制されることがわかった。

[0096] （２－３）シリウスレッド染色

上記（２－１）で得た切片をシリウスレッド溶液（１％シリウスレッド液、武藤化学株式会社）で１０分間染色した。次いで切片をアルコールで脱水させ、室温で自然乾燥させた。染色した切片を２００倍の倍率で光学顕微鏡によって観察した。

[0097] その結果、シート処置群から摘出した肝臓では、対照群から摘出した肝臓と比べて、線維化領域が減少していることを確認した（図１３）。よって、シート状細胞培養物の肝臓表面への移植により、肝線維化が抑制されることがわかった。

[0098] （２－４）マッソントリクローム染色

上記（２－１）で得た切片をマッソントリクローム溶液（０．７５％オレンジＧ液・２．５％りんタングステン酸液・アニリン青液・マッソン染色液Ａ、武藤化学株式会社）で１０分間染色した。次いで切片をアルコールで脱水させ、室温で自然乾燥させた。染色した切片を２００倍の倍率で光学顕微

鏡によって観察した。

[0099] その結果、シート処置群から摘出した肝臓では、対照群から摘出した肝臓と比べて、線維化領域が減少していることを確認した（図14）。よって、シート状細胞培養物の肝臓表面への移植により、肝線維化が抑制されることがわかった。

[0100] （2-5）免疫染色

上記（2-1）で得た切片をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、次いでPBSを除去した。切片をPBSに溶解した0.5%（v/v）Triton（登録商標）X-100溶液（浸透処理溶液）に浸漬させ、15分間室温でインキュベートした。浸透処理溶液を除去し、切片をPBSで洗浄し、次いでPBSを除去した。切片をPBSに溶解した3%ウシ血清アルブミン溶液（ブロッキング溶液）に浸漬させ、60分間室温でインキュベートした。ブロッキング溶液を除去し、切片をPBSで洗浄し、次いでPBSを除去した。切片を一次抗体溶液（抗Ki67抗体（ab16667、アブカム株式会社）を含む）に浸漬させ、1時間室温でインキュベートした。一次抗体溶液を除去し、切片をPBSで洗浄し、次いでPBSを除去した。切片を二次抗体溶液（酵素標識した抗体（LSAB2 system-HRP（K0672）、アジレントテクノロジー株式会社）を含む）に浸漬させ、30分室温でインキュベートした。二次抗体溶液を除去し、切片をPBSで洗浄し、次いでPBSを除去した。切片を酵素基質溶液（酵素基質（LSAB2 system-HRP（K0672）、アジレントテクノロジー株式会社）を含む）に浸漬させ、30分室温でインキュベートし、呈色反応を生じさせた。酵素基質溶液を除去し、切片をPBSで洗浄し、次いでPBSを除去した。染色した切片を光学顕微鏡によって観察した。

[0101] その結果、シート処置群から摘出した肝臓では、対照群から摘出した肝臓と比べて、Ki67（細胞増殖マーカー）陽性細胞の数がより多かった（図15）。よって、シート状細胞培養物の肝臓表面への移植により、肝細胞の増殖および肝組織の再生が促進されることがわかった。

[0102] （3）肝臓の臨床化学検査

(3-1) ライセートの調製

上記(1)で得た肝臓を冷却したPBSで洗浄し、氷上で冷やしつつ細かな断片に切断した。かかる断片をホモジェナイザーに入れ、これにRIPAバッファー(プロテアーゼ阻害剤を含む)を加えてホモジェナイズ後、超音波処理し、次いで10,000×g、4℃で20分間遠心分離を行い、上清(ライセート)を得た。

(3-2) 静脈血からの血清の調製

上記(1)で得た静脈血を10,000×g、4℃で10分間遠心分離することによって上清(血清)を得た。

[0103] (3-3) リアルタイムPCR

上記(3-1)で得たライセートから市販のRNA精製キット(Rneasy Mini Kit、株式会社キアゲン)を使用して総RNAを精製した後、かかるRNAについて市販のリアルタイムPCRキット(Reverse Transcription System、プロメガ株式会社)を使用してRNAの逆転写およびリアルタイムPCRを行い、上記(3-1)で得たライセートに含まれる α SMAおよびI型コラーゲン $\alpha 1$ のmRNAの発現量を定量した。 α SMAについて、フォワードプライマーは、5'-GTCCCAGACATCAGGGAGTAA-3'(配列番号5)とし、リバースプライマーは、5'-TCGGATACTTCAGCGTCAGGA-3'(配列番号6)とした。また、I型コラーゲン $\alpha 1$ について、フォワードプライマーは、5'-GCTCCTCTTAGGGGCCACT-3'(配列番号7)とし、リバースプライマーは、5'-CCACGTCTCACCAATTGGGG-3'(配列番号8)とした。サーマルサイクラーの設定は表2に示されるものとした。

[表2]

表2. サーマルサイクラーの設定

温度	時間	サイクル数
98℃	1分間	—
98℃	10秒間	30回
55℃	15秒間	
72℃	40秒間	
72℃	2分間	—

[0104] その結果、シート処置群から摘出した肝臓では、対照群から摘出した肝臓と比べて、 α SMA（肝線維化マーカー）およびI型コラーゲン α 1（肝線維化マーカー）についてmRNAの発現量がより少ないことを確認した（図16）。よって、シート状細胞培養物の肝臓表面への移植により、肝線維化が抑制されることがわかった。

[0105] (3-4) ELISA

上記(3-2)で得た血清についてオリエンタル酵母工業株式会社にてELISAを行い、血清に含まれる総タンパク質、アルブミン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、および総ビリルビンの発現量を定量した。

[0106] その結果、シート処置群から摘出した肝臓では、対照群から摘出した肝臓と比べて、総タンパク質について術後3週および5週で発現量がより多いこと、アルブミンについて術後3週では発現量がより小さいが術後5週では発現量がより多いこと、ASTについて術後3週および5週で発現量がより少ないこと、ALTについて術後3週では発現量がより多いが術後5週では発現量がより少ないこと、総ビリルビンについて術後3週および5週で発現量がより少ないことを確認した（図17）。よって、シート状細胞培養物の肝臓表面への移植により、肝機能障害を抑制し得ることがわかった。

[0107] 以上の結果から、本発明によれば、肝炎、肝線維症、肝硬変、肝臓がん、

または肝不全等の肝機能障害を処置することができる。特に、本発明によれば、現行の内科的な治療では改善が見込めない末期の非代償性肝硬変を処置することができ、また、肝臓がん切除後に残存する肝臓の肝不全を処置することができる。また、本発明によれば、肝細胞の増殖、肝組織の再生、および／または血管新生を促進することができる。また、本発明によれば、肝線維化を抑制することができる。さらに、本発明によれば、サイトカイン産生を介して肝機能障害を処置することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 肝機能障害を処置するための、または肝機能を改善するための、骨格筋芽細胞を含む、シート状細胞培養物。
- [請求項2] 肝機能障害が、肝炎、肝線維症、肝硬変、肝臓がん、または肝不全である、請求項1に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項3] 肝機能障害が、肝硬変である、請求項1または2に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項4] 肝機能障害が、肝臓がんである、請求項1または2に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項5] 肝臓がん切除後の肝臓に適用するための、請求項4に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項6] 肝細胞の増殖、肝組織の再生、および／または血管新生を促進するための、請求項1～5のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項7] 肝線維化を抑制するための、請求項1～6のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項8] サイトカイン産生を介して肝機能障害を処置するための、請求項1～7のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項9] ゲルおよび／またはポリマーを含む補強層をさらに含む、請求項1～8のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項10] 請求項1～9のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物を製造する方法であって、
骨格筋芽細胞を含む細胞集団を培養基材上に播種するステップ、
播種された細胞集団をシート化し、シート状細胞培養物を形成するステップ、および
形成されたシート状細胞培養物を培養基材から剥離するステップを含む、前記製造方法。
- [請求項11] 肝機能障害を処置する方法であって、請求項1～9のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物を、肝機能障害を示す部位に適用するス

テップを含む、前記方法。

[請求項12] シート状細胞培養物を、肝機能障害を示す部位に適用するステップが、シート状細胞培養物を、移植デバイスで肝臓表面に移植することによってなされる、請求項 1 1 に記載の方法。