

明 細 書

発明の名称：肝機能障害を処置するための組成物

技術分野

[0001] 本発明は、肝機能障害を処置するための組成物等に関する。

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、細胞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、組成物。

[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]の組成物。

[3] 肝機能障害が、肝硬変である、[1]または[2]の組成物。

[4] 肝機能障害が、肝臓がんである、[1]または[2]の組成物。

[5] 肝臓がん切除後の肝臓に適用するための、[4]の組成物。

[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]のいずれかの組成物。

[7] 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]～[6]のいずれかの組成物。

[8] 肝機能障害を処置する方法であって、[1]～[7]のいずれかの組成物を、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。

[9] 組成物を、肝機能障害を示す部位に適用するステップが、移植デバイスによってなされる、[8]の方法。

[10] 移植デバイスが、カテーテルである、[9]の方法。

発明の効果

[0011] 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、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

[0012] [図1]図1は、ヒト骨格筋芽細胞に由来する増殖因子の産生を示す。各値は平均値であり（ $n=3$ ）、エラーバーは標準偏差を示す。

[図2]図2は、ヒト骨格筋芽細胞（HSMM）に由来する因子による不死化ヒト肝内皮細胞（TMNK-1）の管形成の誘導の手順を示す。HSMM（ 1.0×10^5 個）含有培地をTMNK-1含有培地（図2A）へ浸漬させたものを処理群1とし（ $n=3$ ）（図2B）、HSMM（ 5.0×10^5 個）含有培地をTMNK-1含有培地（図2A）へ浸漬させたものを処理群2とし（ $n=3$ ）（図2B）、かかる浸漬を行わないものを対照群とした（ $n=3$ ）（図2C）。

[0013] [図3]図3は、ヒト骨格筋芽細胞に由来する因子によって誘導されたTMNK-1の管形成の光学顕微鏡画像（培養開始から1時間後および5時間後）を

示す。円で囲まれた部分において、ヒト骨格筋芽細胞に由来する因子によって誘導されたTMNK-1の管形成が生じている。

[図4]図4は、ヒト骨格筋芽細胞に由来する因子によって誘導されたTMNK-1の管形成の光学顕微鏡画像（培養開始から24時間後）（図4A）、ヒト骨格筋芽細胞に由来する因子によって誘導されたTMNK-1の管形成において見られる管の全長（図4B）、および管の分岐数（図4C）を示す。各値は、処理群1（ $n=3$ ）、処理群2（ $n=3$ ）、および対照群（ $n=3$ ）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。

[0014] 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

[0015] [肝機能障害を処置するための組成物]

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、組成物（「本発明の組成物」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、本発明の組成物は、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、本発明の組成物は、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、本発明の組成物は、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。

[0016] 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

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。

[0017] 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。

[0018] 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。

[0019] 本発明において、「骨格筋芽細胞を含む組成物」とは、少なくとも骨格筋芽細胞を含み、これに加えて生体適合性を有する任意の追加成分を含むものを指す。ここで、生体適合性を有する任意の追加成分とは、生体組織や細胞に対して炎症反応、免疫反応、中毒反応等の望まない作用を起こさないか、少なくともかかる作用が小さいものを指し、特に限定されないが、例えば、薬学的に許容し得る担体、賦形剤、骨格筋芽細胞以外の他の細胞、本発明の組成物の生存性、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、本発明の組成物に加えて、前記の追加成分を併用することもできる。

骨格筋芽細胞を含む組成物は、特に限定されないが、例えば、水溶液、懸濁液、乳液等の流動性を有する液体形状、またはシート状細胞培養物等の柔軟性を有する固体形状を示す。特に、肝臓の表面に適用する観点から、骨格筋芽細胞を含む組成物は、シート状細胞培養物であることが好ましい。一態様において、骨格筋芽細胞を含む組成物は医薬組成物である。

[0020] 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。

[0021] ある態様においては、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いてもよい。補強層としては、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。

[0022] 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。

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。

[0023] 本発明の組成物は、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、本発明の組成物は、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、本発明の組成物は、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、本発明の組成物は、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（例えば、肝臓がん切除）後に残存する肝臓の表面である。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。

[0024] 本発明において、「適用」とは、本発明の組成物を対象部位に使用することを指し、例えば、本発明の組成物を対象部位に添加、投与、注射、送達、塗布、貼付、生着、および／または移植することを指す。

本発明において、「移植デバイス」とは、本発明の組成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、本発明の組成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。本発明の組成物がシート状細胞培養物である場合、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。

[0025] 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、コラーゲン等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。

[0026] 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、コラーゲン等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。

[0027] 一態様において、本発明の組成物は、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、本発明の組成物は、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、肝臓がん大進行することによって生じ得る。

[0028] 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、肝部分切除（例えば、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到大別される。急性肝不全は短い期間で急速大進行するが、慢性肝不全は長い期間をかけて徐々に進行する。

[0029] 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、本発明の組成物を適用することを指す。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、本発明の組成物を適用する。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組成物を適用する。一態様において、肝臓がん切除後の肝臓は肝不全を示す。

[0030] 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、「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、本発明の組成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。

[0031] 本発明の組成物は、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、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、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。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、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、軟骨細胞等が挙げられる。

[0032] 本発明の組成物における細胞は、本発明の組成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、本発明の組成物における細胞の種類数は特に限定されず、1種類のみ

の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よい。組成物における細胞が2種類以上ある場合、最も多い細胞の含有比率（純度）は、本発明の組成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。

[0033] 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、本発明の組成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。

[0034] 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、本発明の組成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。

[0035] 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。本発明の組成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、T E - 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。

[0036] 一態様において、本発明の組成物における細胞は、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組成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、本発明の組成物の製造において用いられる細胞集団は、C D 5 6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。

[0037] 本発明の組成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、本発明の組成物の製造において用いられる細胞集団は、T E 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。

本発明の組成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C D 5 6陽性率およびT E 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%以上等であり得、好ましくは90%以上である。

[0038] 一態様において、本発明の組成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、本発明の組成物は、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、本発明の組成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、本発明の組成物に組み込まれたものであってもよい。

[0039] 本発明の組成物が、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、本発明の組成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。本発明の組成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、適用部位と本発明の組成物との間に位置するように適用することができる。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、その上から本発明の組成物を適用することができる。本発明の組成物の適用の後に他の組成物および／または移植片を適用する場合、適用部位に対して本発明の組成物の上から適用することができる。すなわち、まず適用部位に本発明の組成物を適用し、その上から他の組成物および／または移植片を適用することができる。

[0040] 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VEGF、HGF等のサイトカインやコラーゲン等を、本発明の組成物が持続的に放出するパラクリン効果によるもの、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リン効果が得られること等が考えられる。

本発明の組成物がシート状細胞培養物である場合、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、10～55mm、15～50mm、20～45mm、25～40mm、または30～35mmである。

[0041] [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、本発明の組成物を、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。

[0042] 一態様において、本発明の処置方法において、本発明の組成物を、肝機能障害を示す部位に適用するステップは、移植デバイスによってなされる。一態様において、移植デバイスは、本発明の組成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。本発明の組成物がシート状細胞培養物である場合、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。一態様において、移植デバイスはカテーテルである。

本発明において、「カテーテル」とは、医療用の柔軟性を有する管を指す。カテーテルを腹腔や血管等に挿入することによって、本発明の組成物を、

肝機能障害を示す部位に適用することができる。例えば、カテーテルを腹腔や血管等に挿入することによって、本発明の組成物を、肝機能障害を示す部位に添加、投与、注射、送達、塗布、貼付、生着、および／または移植することができる。

一態様において、本発明の処置方法において、本発明の組成物を、肝機能障害を示す部位に適用するステップは、本発明の組成物を、肝機能障害を示す部位に添加、投与、注射、送達、塗布、貼付、生着、および／または移植するステップである。

[0043] [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、または肝機能を改善するための医薬の製造における、本発明の組成物の使用（「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、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、本発明の組成物の使用（「本発明の使用」と記す場合がある）に関する。

[0044] [肝細胞の増殖等を促進する方法]

本発明の別の側面は、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方法であって、本発明の組成物を、肝細胞、肝組織、および／または内皮細胞と共培養するステップを含む、前記方法（「本発明の肝細胞の増殖等の促進方法」と記す場合がある）に関する。本発明の肝細胞の増殖等の促進方法は、サイトカイン産生を介して、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。

本発明において、「内皮細胞」とは、骨格筋芽細胞に由来する因子によって管形成を誘導され得る内皮を構成する細胞を指す。一態様において、内皮細胞は、動脈、静脈、および／または毛細血管を構成する血管内皮細胞である。一態様において、内皮細胞は肝内皮細胞である。一態様において、内皮細胞は類洞内皮細胞である。一態様において、内皮細胞は肝類洞内皮細胞で

ある。

[0045] 本発明において、「共培養」とは、複数の細胞および／または複数種の細胞を同一の環境で培養することを指す。

一態様において、本発明の肝細胞の増殖等の促進方法は、*in vitro*で行われる。

一態様において、本発明の肝細胞の増殖等の促進方法は、*in vivo*で行われる。

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

[0046] 例 1. ヒト骨格筋芽細胞に由来する増殖因子の産生

培養容器（IWAKI 組織培養用ディッシュ（付着性細胞用表面処理済）（3020-100）、AGCテクノグラス株式会社）において、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）培地（ナカライテスク株式会社）を加え、次いで 1.0×10^6 個のヒト骨格筋芽細胞（HSMM）（Normal HSMM、ロンザ株式会社）を播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下で培養した。培養開始から3日後の培地を $2,000 \times g$ で10分間遠心分離し、上清を回収した（ $n=3$ ）。上清について、市販のELISAキット（Human VEGF ELISA Kit（ab222510）およびHuman HGF ELISA Kit（ab100534）、アブカム株式会社）を使用して、血管内皮増殖因子（VEGF）および肝細胞増殖因子（HGF）のそれぞれについてELISAによる定量を行った。また、上記と同様に、HSMMを培養し、培養開始から7日後の培地の上清を回収し（ $n=3$ ）、上清について、VEGFおよびHGFのそれぞれについてELISAによる定量を行った。ELISAにおける呈色反応について、マイクロプレートリーダー（680XR、バイオラッドラボラトリーズ株式会社）を使用して450nmの光学密度（OD）を測定した。

[0047] その結果、培養開始から3日後から7日後にかけて、VEGFおよびHGFのそれぞれの発現量が増加していることを確認した（図1）。VEGFは

、肝臓において、類洞内皮細胞内のVEGFR2-ID1のシグナル伝達系を介して類洞内皮細胞からHGFを産生させることが知られている。そして、HGFは、肝細胞の増殖および肝組織の再生を促進することが知られている。よって、HSMMは、VEGFおよびHGF等のサイトカイン産生を介して肝細胞の増殖および肝組織の再生を促進することがわかった。

[0048] 例2. ヒト骨格筋芽細胞に由来する因子による管形成の誘導

(1) 不死化ヒト肝内皮細胞(TMNK-1)含有培地の調製

Transwell (登録商標) (6.5 mm、0.4 μ m Pore Polyester Membrane Insert 付属、コーニング株式会社) マルチウェルプレートにおいて、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM) (ナカライテスク株式会社) を加え、次いで 1.0×10^5 個の不死化ヒト肝内皮細胞(TMNK-1) (JCRB細胞バンクから分譲、細胞番号(JCRB): JCRB1564) を播種した(TMNK-1含有培地) (図2A)。

(2) ヒト骨格筋芽細胞(HSMM)含有培地の調製

Transwell (登録商標) インサートにおいて、DMEMを加え、次いで 1.0×10^5 個のヒト骨格筋芽細胞(HSMM) (Normal HSMM、ロンザ株式会社) を播種した(HSMM (1.0×10^5 個) 含有培地)。また、別途、Transwell (登録商標) インサートにおいて、DMEMを加え、次いで 5.0×10^5 個のHSMMを播種した(HSMM (5.0×10^5 個) 含有培地)。

[0049] (3) HSMM含有培地のTMNK-1含有培地への浸漬

上記(2)で調製したHSMM (1.0×10^5 個) 含有培地を含むTranswell (登録商標) インサートを、上記(1)で調製したTMNK-1含有培地を含むTranswell (登録商標) マルチウェルプレートに挿入することによって、HSMM含有培地をTMNK-1含有培地へ浸漬させ、これを処理群1とした($n=3$) (図2B)。また、同様に、上記(2)で調製したHSMM (5.0×10^5 個) 含有培地を含むTranswell (登録商標) インサートを、上記(1)で調製したTMNK-1含有培地を含むTranswell (登録商標) マルチウェルプレートに挿入することによって、HSMM含有培地をTMNK

－ 1 含有培地へ浸漬させ、これを処理群 2 とした ($n = 3$) (図 2 B)。かかる浸漬により、H S M M 含有培地と T M N K－ 1 含有培地との間の種々の因子の交換が Transwell (登録商標) インサートのメンブレンを介して可能になる。また、かかる浸漬を行わない、上記 (1) で調製した T M N K－ 1 含有培地を含む Transwell (登録商標) マルチウェルプレートに対照群とした ($n = 3$) (図 2 C)。

[0050] (4) 管形成の誘導

上記 (3) の処理群 1、処理群 2、および対照群を、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下でそれぞれ培養した。培養開始から 1 時間後、5 時間後、および 24 時間後に、処理群 1 および処理群 2 のそれぞれの Transwell (登録商標) インサートを取り外し、処理群 1、処理群 2、および対照群のそれぞれの Transwell (登録商標) マルチウェルプレートに含まれる T M N K－ 1 を 200 倍の倍率で光学顕微鏡によって観察した。

[0051] その結果、培養開始から 5 時間後に、処理群 2 において、対照群と比較して、H S M M によって T M N K－ 1 の管形成が誘導されていることを確認した (図 3)。また、培養開始から 24 時間後に、処理群 1 および 2 において、対照群と比較して、H S M M によって T M N K－ 1 の管形成が誘導されていることを確認した (図 4 A)。また、培養開始から 24 時間後に、処理群 2 は、処理群 1 と比較して、管の全長はより長く、そして管の分岐数はより多いことを確認した (図 4 B および C)。すなわち、H S M M 含有培地における H S M M の細胞数が多いほど、H S M M によって T M N K－ 1 の管形成が活発に誘導されていることを確認した。よって、H S M M に由来する因子によって T M N K－ 1 の管形成が誘導され、すなわち血管新生が促進されることがわかった。

[0052] 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、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、組成物。
- [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に記載の組成物。
- [請求項3] 肝機能障害が、肝硬変である、請求項1または2に記載の組成物。
- [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に記載の組成物。
- 。
- [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に記載の組成物。
- 。
- [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組成物。
- [請求項7] 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1～6のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項8] 肝機能障害を処置する方法であって、請求項1～7のいずれか一項に記載の組成物を、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9] 組成物を、肝機能障害を示す部位に適用するステップが、移植デバイスによってなされる、請求項8に記載の方法。
- [請求項10] 移植デバイスが、カテーテルである、請求項9に記載の方法。