

明 細 書

発明の名称：

間葉系幹細胞を含む細胞集団、細胞シート及び細胞シートの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、間葉系幹細胞を含む細胞集団、細胞シート及び細胞シートの製造方法に関する。

背景技術

[0002] 間質性細胞に含まれる間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cells（MSC））とは、主に、中胚葉由来の組織である骨、軟骨、血管、心筋細胞などに分化できる能力を有する幹細胞をいう。国際細胞治療学会では、ヒトMSCを定義するための基準として、（１）標準的な培養条件でプラスチックに接着性を有すること、（２）細胞表面マーカーのCD73、CD90、CD105が陽性であり、CD79 α 、CD34、CD45、HLA-DRが陰性であること、（３）骨芽細胞、軟骨細胞又は脂肪細胞への分化能を有すること、を必要最低条件とすることが提案されている（非特許文献１）。

[0003] MSCは、抗炎症作用や増殖因子誘発作用、血管新生促進作用などをもち、組織の修復に重要な役割を果たすことが知られる。近年、MSCの再生医療への応用が進められており、組織や臓器の再生や機能改善を促進する新たな治療法の実用化が急速に進んでいる。例えば、特許文献１には、歯周病等によって損傷した歯周組織の再生に使用可能な、MSCを含む歯根膜由来細胞のシートが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献１：国際公開公報2005／103233

非特許文献

[0005] 非特許文献１：M. Dominici, MD et al., Cytotherapy, : 8, 315-317 (2006)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] MSCを評価するための有用なマーカーは複数提案されており、例えば、上記の通り、非特許文献1では、CD105、CD73、CD90などがMSCに必須のマーカーとして開示されている。しかしながら、これらのマーカーを発現する細胞が必ずしも良好な増殖を示すとは限らないことから、より有用なマーカーが望まれている。
- [0007] MSCは、由来組織によってその増殖能、分化能が大きく異なることから、MSCの由来組織や用途によって、有用なMSC評価用マーカーも異なり得る。特許文献1には、歯根膜由来細胞の細胞シートの製造方法が開示されているが、材料となる細胞を選別するためのマーカー等については開示されていない。
- [0008] 本発明は、増殖能と骨芽細胞分化能に優れ、歯周組織の再生に有用な間葉系幹細胞を含む細胞集団を得ることを目的とする。また、本発明は、増殖能と骨芽細胞分化能に優れ、歯周組織の再生に有用な間葉系幹細胞を含む細胞集団を材料とする細胞シート及び細胞シートの製造方法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

- [0009] 本発明者らは、歯周組織の再生に適用するためのMSCについて、増殖能と骨芽細胞分化能に優れるMSCを分化誘導前に判別可能なマーカーを探索し、これを見出した。さらに、当該マーカーを選別指標として使用することで、歯周組織再生能の高いMSCを得ることができ、さらにこれを材料として歯周組織再生に有用な細胞シートを得ることができることを見出し、本発明を完成させるに至った。
- [0010] すなわち、本明細書によれば、以下の発明が提供される。
- (1) 歯又は歯周組織に由来する間葉系幹細胞を含む細胞集団であって、石灰化誘導前のアルカリフォスファターゼ活性が1 U以上である、細胞集団。
 - (2) 石灰化誘導後のアルカリフォスファターゼ活性が5 U以上である、(

1) に記載の細胞集団。

(3) 前記間葉系幹細胞が、歯根膜に由来する間葉系幹細胞である、(1) 又は(2) に記載の細胞集団。

(4) 歯又は歯周組織に由来する間葉系幹細胞を含む細胞集団を含む細胞シートであって、前記細胞集団の石灰化誘導後のアルカリフォスファターゼ活性が5 U以上である、細胞シート。

(5) 前記細胞集団の石灰化誘導前のアルカリフォスファターゼ活性が1 U以上である、(4) に記載の細胞シート。

(6) 下記の(a)～(c)の工程を含む、細胞シートの製造方法：

(a) アルカリフォスファターゼ活性を有し、歯又は歯周組織に由来する間葉系幹細胞を含む細胞集団を取得する工程；

(b) 前記細胞集団を石灰化誘導培地で培養し、プラスチック基板上で増殖させる工程；及び

(c) 前記プラスチック基板上に形成されるシート状の細胞集団を回収、洗浄する工程。

(7) 前記工程(a)における細胞集団のアルカリフォスファターゼ活性が1 U以上である、(6) に記載の方法。

(8) 前記細胞集団の石灰化誘導後のアルカリフォスファターゼ活性が5 U以上である、(6) 又は(7) に記載の方法。

(9) 歯又は歯周組織に由来する間葉系幹細胞を含む細胞集団を含む細胞シートを保存及び／又は輸送する方法であって、前記細胞集団が高いアルカリフォスファターゼ活性を有し、前記細胞シートは常温の α 改変イーグル最小必須培地中に維持される、方法。

(10) 前記細胞シートが、常温の α 改変イーグル最小必須培地中に7日間以上使用可能な状態で維持可能である、(9) に記載の方法。

(11) 前記細胞シートが、(4) 若しくは(5) に記載の細胞シート、又は(6)～(8)のいずれかに記載の方法で製造された細胞シートである、(9) 又は(10) に記載の方法。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2021-188216号の開示内容を包含する。

発明の効果

- [0011] 本発明によれば、増殖能と骨芽細胞分化能に優れ、歯周組織の再生に有用な間葉系幹細胞を得ることが可能である。また、増殖能と骨芽細胞分化能に優れ、歯周組織の再生に有用な間葉系幹細胞を材料とする細胞シート及び細胞シートの製造方法を提供することが可能である。

図面の簡単な説明

- [0012] [図1]石灰化誘導前及び石灰化誘導後において、各MSCを含む細胞集団のアルカリフォスファターゼ活性を測定した結果を示すグラフである。
- [図2]石灰化誘導前において、各MSCを含む細胞集団の細胞増殖能を測定した結果を示すグラフである。
- [図3]石灰化誘導前において、各MSCを含む細胞集団のコロニー形成能を測定した結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

- [0013] [1] 間葉系幹細胞を含む細胞集団

本発明の間葉系幹細胞（MSC）を含む細胞集団（以下、「本発明の細胞集団」とも称する）は、歯又は歯周組織に由来するMSCを含む細胞集団であって、石灰化誘導前のアルカリフォスファターゼ活性（以下、アルカリフォスファターゼを「ALP」、アルカリフォスファターゼ活性を「ALP活性」とも称する）が1U以上である、ことを特徴とする。本発明の細胞集団は、増殖能と骨芽細胞分化能に優れ、歯周組織の再生に有用である、という利点を有する。また、本発明の細胞集団は、細胞シート、特に歯周組織の再生に有用な細胞シートの製造に使用できる、という利点を有する。

- [0014] 本発明において、「間葉系幹細胞（MSC）」とは、各種組織及び器官から採取することができる体性細胞（組織細胞）のうち、以下の定義を満たす細胞を指す。

（1）標準的な培養条件でプラスチックに接着性を有すること；

(2) 細胞表面マーカーのCD73、CD90、CD105が陽性であり、CD79 α 、CD34、CD45、HLA-DRが陰性であること；

(3) 骨芽細胞、軟骨細胞又は脂肪細胞への分化能を有すること。

[0015] 本発明において、「MSCを含む細胞集団」とは、MSCを主として含む細胞集団を指すものとする。ここで、「MSCを主として含む」状態とは、フローサイトメトリー分析において、「CD73、CD90、CD105が陽性、CD79 α 、CD34、CD45、HLA-DRが陰性」という条件を満たす細胞が90%以上、特に95%以上存在する状態をいう。MSCを含む細胞集団の由来は、歯又は歯周組織に由来するMSCを含む細胞集団である。歯又は歯周組織に由来するMSCとしては、例えば歯髄、歯根膜、歯小嚢、歯乳頭、乳歯に由来するMSCが挙げられるが、特に、歯根膜に由来するMSCであることが好ましい。以下、歯根膜由来のMSCを使用する実施形態について例示的に説明するが、本発明の範囲の限定を意図するものではない。

[0016] 本発明において、石灰化誘導前の細胞集団の「ALP活性」は、以下の手法で測定される酵素活性を指す。石灰化誘導前の細胞集団を96ウェルマイクロプレートに 1×10^4 細胞/ウェル(100 μ L)となるように播種する。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂環境下で2日間、基礎培地(10%FBS添加 α 改変イーグル最小必須培地(α -MEM))中で培養する。培地を交換して、さらに5日間培養する。培地を除去し、洗浄した後、基質(例えば、p-ニトロフェニルリン酸(pNPP))緩衝液を加えて37 $^{\circ}$ Cの条件下で反応させ、必要に応じて停止液を加えた後に吸光度を測定する。濃度既知のp-ニトロフェノール(pNP)液の測定値から作成した検量線を用いて、上記細胞集団のALPを算出する。すなわち、本明細書に示されるALP活性(U)は、初期細胞数 1×10^4 細胞から所定の条件で7日間培養した後の細胞集団における活性量を指す。

[0017] ALP活性(U)の具体的な測定方法は、特に限定されないが、例えば、下記の方法で算出することができる。複数濃度のpNP標準液をマイクロウ

エルプレートに分注し、405 nmの吸光度を測定して下記検量線を割り出す。

$$Y = aX + b$$

(XはpNP濃度 (mmol/L)、Yは405 nmの吸光度)

試料のALP活性は、試料100 μLをpNPP溶液と5分間反応させ、測定した405 nmの吸光度から算出する。上記検量線のYに吸光度を代入して、試料のALPにより生成されたpNPの濃度X (mmol/L)を算出する。次いで、1 μLあたりのALP活性 (unit/μL)を算出する。なお、本明細書において、ALP活性 1 unitは、pH9.8、37℃で1分間に1 nmolのpNPを生成する酵素活性をいう。

$$\text{ALP活性 (unit/μL)} = X \text{ (mmol/L)} / 5 \text{ (分)}$$

試料100 μLの全活性量 (U)は、下記式で算出される。

$$\text{ALP活性 (U)} = \text{ALP活性 (unit/μL)} \times 100$$

[0018] 本発明において、石灰化誘導前の細胞集団のALP活性は、1 U以上、好ましくは1.2 U以上、より好ましくは1.4 U以上、さらに好ましくは2 U以上である。

[0019] また本発明において、石灰化誘導後の細胞集団のALP活性は、5 U以上であることが好ましく、7 U以上であることがより好ましく、8.5 U以上であることがさらに好ましく、15 U以上であることがよりさらに好ましい。「石灰化誘導後のALP活性」とは、本発明の細胞集団を石灰化誘導培地で培養して得られた細胞集団のALP活性を表す。

[0020] 「石灰化誘導培地」としては、一般に石灰化誘導培地として市販されている培地をいずれも使用可能であるが、例えば、基礎培地（例えば、10% FBS添加α-MEM）にL-アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩n水和物、デキサメタゾン、β-グリセロリン酸等を添加した培地を使用できる。

[0021] 石灰化誘導培地を用いてMSCを含む細胞集団を培養する条件は、MSCが十分に誘導され、増殖することが可能な条件であれば特に限定されないが、例えば、以下の条件とすることができる。すなわち、石灰化誘導前のAL

P活性を指標として得られた細胞懸濁液を96ウェルマイクロプレートに 1×10^4 細胞/ウェル($100 \mu\text{L}$)となるように播種する。 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 環境下で2日間、基礎培地($10\% \text{FBS}$ 添加 α 改変イーグル最小必須培地(α -MEM))中で培養する。続いて、培地を石灰化誘導培地(例えば、L-アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩n水和物、デキサメタゾン、 β -グリセロリン酸等を含む α -MEM)に交換し、さらに 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 環境下で5日間の培養を行う。かかる石灰化誘導後の細胞集団のALP活性は、石灰化誘導前の細胞集団と同様の手法を用いて測定する。

[0022] 通常、歯根膜由来のMSCについて、石灰化誘導前のALP活性は、石灰化誘導後のALP活性より低く、個体間差も比較的小さい。しかし、その中でも石灰化誘導前により高いALP活性を呈するMSCを含む細胞集団が、高い増殖能を有することが確認された。また、このような細胞において、石灰化誘導後に顕著なALP活性の亢進が見られ、高い骨芽細胞分化能を有することが確認された。したがって、ALP活性を指標とすることで、増殖能及び骨芽細胞分化能の高いMSCを含む細胞集団を選別して取得することが可能である。

[0023] 取得したMSCを含む細胞集団は、高い細胞増殖能及びコロニー形成能を示す。ここでいう「細胞増殖能」は、例えば、以下の手法で測定することができる。 1×10^3 細胞を96ウェルプレートに播種し、基礎培地で2日間および4日間、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 環境下で培養する。新鮮な基礎培地 $100 \mu\text{L}$ で培地交換を行い、Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)を用いて測定を行う。

[0024] 「コロニー形成能」は、例えば、以下の手法で測定することができる。 100 細胞を 60cm^2 ペトリ皿に播種し、基礎培地で14日間 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 環境下で培養する。この間、1週間に2回の培地交換を実施する。その後常法にしたがってクリスタルバイオレットで染色する。播種した 100 細胞のうち、コロニーを形成した細胞数、すなわちコロニー数をカウントし、そ

の割合（％）をコロニー形成能の指標とする。

[0025] 細胞増殖能及びコロニー形成能の測定は、例えば、Iwata et al., J. Clin . Periodontol., Vol. 37, pp. 1088-1099 (2010)に記載の方法で測定することが可能である。

[0026] [2] 細胞シート

本発明の細胞シートは、MSCを含む細胞集団を含む細胞シートであって、前記細胞集団の石灰化誘導後のALP活性が5 U以上である、ことを特徴とする。ここでいう「MSCを含む細胞集団」としては、「[1] 間葉系幹細胞を含む細胞集団」の項に記載した細胞集団を使用することができる。本発明の細胞シートは、高いALP活性を有することで、歯周組織に対して高い生着能と再生能を備え、これにより、特に、歯周組織の再生に有用な細胞シートである、という利点を有する。

[0027] 本発明において「細胞シート」とは、プラスチック基板上にコンフルエントな状態で付着した細胞をシート形状のまま剥離したもの、又は前記シート形状の細胞を積層したものを指す。特に、温度応答性細胞培養基材（例えば、UpCell（登録商標）（セルシード社製））上で細胞を増殖させることで、酵素処理等を行うことなく、温度変化のみで容易に細胞をシート形状で剥離することができる。このような細胞は、酵素処理を受けていないため、細胞本来の機能が維持される。また、細胞間の接着タンパク質が保持されているため、生体に適用した場合により速やかに生着するという利点を有する。

[0028] 本明細書において、「プラスチック」とは、可塑性を有する合成樹脂を指す。平板状に形成できる合成樹脂材料であれば特に限定されず、例えば、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリ（メタ）アクリルアミド等をいずれも使用できる。具体的には、特開平2-211865号公報に記載されている（メタ）アクリルアミド化合物、N-（もしくはN，N-ジ）アルキル置換（メタ）アクリルアミド誘導体等のモノマーの単独重合または共重合によって得られる材料が挙げられ、特に、温度変

化によって接着した細胞を剥離できる温度応答性細胞培養基材（例えば、UpCell（登録商標））を好適に使用できる。

[0029] 本発明の細胞シートを構成するMSCを含む細胞集団における石灰化誘導後のALP活性は、5 U以上、好ましくは7 U以上、より好ましくは8.5 U以上、さらに好ましくは15 U以上である。また、前記細胞集団の石灰化誘導前のALP活性は1 U以上であることが好ましく、1.2 U以上であることがより好ましく、1.4 U以上であることがさらに好ましい。ここでいうALP活性値の定義は、「[1] 間葉系幹細胞を含む細胞集団」の項に記載した通りであり、石灰化の誘導及び選別・取得も「[1] 間葉系幹細胞を含む細胞集団」の項に記載した方法により行うことができる。

[0030] 本発明の細胞シートは、後述する「[3] 細胞シートの製造方法」の項に記載の方法により製造することができる。より具体的には、本発明の細胞シートは、「[3] 細胞シートの製造方法」の項に記載の方法によって製造された細胞シートであり、細胞シートの性質、材料、製造方法等の詳細な条件は、特に矛盾のない限り、「[1] 間葉系幹細胞を含む細胞集団」及び「[3] 細胞シートの製造方法」の項に記載した通りである。

[0031] [3] 細胞シートの製造方法

本発明の細胞シートの製造方法（以下、単に「本発明の方法」とも称する）は、下記の（a）～（c）の工程を含むことを特徴とする。

（a）ALP活性を有し、歯又は歯周組織に由来するMSCを含む細胞集団を取得する工程；

（b）前記細胞集団を石灰化誘導培地で培養し、プラスチック基板上で増殖させる工程；及び

（c）形成されたシート状の細胞集団を回収、洗浄する工程。

本発明の方法は、上記の特徴を備えることで、増殖能と骨芽細胞分化能に優れるMSCを材料として、特に歯周組織の再生に有用な細胞シートを製造することが可能である。

[0032] [3-1] MSCを含む細胞集団を取得する工程（工程（a））

本発明の方法は、ALP活性を有するMSCを含む細胞集団を取得する工程（以下、「工程（a）」とも称する）を含む。

[0033] 本工程で取得される、「ALP活性を有するMSCを含む細胞集団」は、「[1] 間葉系幹細胞を含む細胞集団」の項に記載の歯又は歯周組織に由来するMSC（好ましくは歯根膜に由来するMSC）を含む細胞集団のうち、「[1] 間葉系幹細胞を含む細胞集団」の項に記載の方法で測定された石灰化誘導前のALP活性が一定以上の値を示すことを指標として選別、取得された細胞集団である。

[0034] 工程（a）において細胞集団を選別、取得する指標としてのALP活性、すなわち石灰化誘導前の細胞集団のALP活性は、1 U以上とすることが好ましく、1. 2 U以上とすることがより好ましく、1. 4 U以上とすることがさらに好ましい。

[0035] [3-2] MSCを含む細胞集団を石灰化誘導培地で培養する工程（工程（b））

本発明の方法は、工程（a）で取得したMSCを含む細胞集団を石灰化誘導培地で培養して、プラスチック基板上で増殖させる工程（以下、「工程（b）」とも称する）を含む。

[0036] 工程（b）において、細胞集団の培養は、プラスチック基板を有する容器内で行われる。容器の底部及び／又は壁部の内部が平らなプラスチックで形成されたものを使用し、該底部及び／又は壁部の内面をプラスチック基板としてもよい。あるいは、容器を形成する素材とは別に平板状に形成された平板状のプラスチック素材を容器内に存在させ、プラスチック基板として機能させてもよい。プラスチック基板は、好適には容器の底部及び／または壁部の内面で形成され、より好適には容器の底部の内面で形成される。

[0037] 工程（b）で使用するプラスチック基板の素材としては、特に、温度応答性細胞培養基材（例えば、UpCell（登録商標））を好適に使用できる。工程（b）において培養に使用される容器としては、マイクロウェルプレート、ペトリ皿、組織培養フラスコ等が挙げられる。特に、底部又は壁部に

温度応答性細胞培養基材を使用したマイクロウェルプレート、ペトリ皿等を好適に使用できる。以下、温度応答性細胞培養基材を備えるペトリ皿を使用する態様について例示的に説明するが、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

[0038] 工程（b）で使用される石灰化誘導培地としては、一般に石灰化誘導培地として市販されている培地をいずれも使用可能であるが、例えば、基礎培地（例えば、10% FBS 添加 α -MEM）に L-アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩 n 水和物、デキサメタゾン、 β -グリセロリン酸を添加した培地を使用できる。

[0039] 石灰化誘導培地を用いて MSC を含む細胞集団を培養する際の培養条件は、MSC が十分に誘導され、増殖することが可能な条件であれば特に限定されないが、例えば、以下の条件とすることができる。

[0040] （1）播種

石灰化誘導前の ALP 活性を指標として得られた細胞懸濁液を融解し、必要に応じて前培養を行った後、ペトリ皿中の石灰化誘導培地（例えば、L-アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩 n 水和物、デキサメタゾン、 β -グリセロリン酸を含む α -MEM）に、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/cm²、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 細胞/cm² となるように播種する。

[0041] （2）培養・石灰化誘導

培養は、石灰化誘導培地で、例えば、37℃、5% CO₂ の条件下で実施できる。培養は、3～4 日ごとに培地交換を行いながら 7～10 日間程度行うことが好ましい。培養により、MSC を含む細胞集団は、その性質上、通常、培養系のプラスチック基板上に接着した状態で増殖し、シート形状をとる。

[0042] 工程（b）で石灰化誘導された MSC を含む細胞集団は、石灰化誘導前よりも高い ALP 活性を有することが好ましい。石灰化誘導後の ALP 活性は、特に、誘導前の 2 倍以上、さらに 3 倍以上であることが好ましい。石灰化誘導後の MSC を含む細胞集団の ALP 活性は、上記の方法で測定した場合

、5 U以上となることが好ましく、7 U以上となることがより好ましく、8
、5 U以上となることがさらに好ましく、15 U以上となることがよりさら
に好ましい。

[0043] [3-3] シート状の細胞集団を回収、洗浄する工程

本発明の方法は、工程（b）においてプラスチック基板上に形成されたシ
ート状の細胞集団を回収、洗浄する工程（以下、「工程（c）」とも称する
）を含む。

[0044] 工程（b）で石灰化誘導された細胞集団は、プラスチック基板上に接着し
た状態でシート状に形成される。接着したシート状の細胞集団は、シート形
状を維持できる条件であれば、トリプシン処理、スクレーパー処理等の公知
のいずれの方法で剥離させてもよい。プラスチック基板として温度応答性細
胞培養基材を使用した場合は、培地に温度変化を加えることによって細胞接
着因子を分解することなく剥離させることが可能である。

[0045] 剥離処理を行ったシート状の細胞集団は、洗浄液で洗浄される。工程（c
）で使用する洗浄液としては、生理食塩水、PBS、血清を含まない基礎培
地等を使用することができる。洗浄したシートは、保存溶液を入れた保存容
器内に載置される。さらに他の細胞集団のシートを洗浄し、先に載置したシ
ート上に積層してもよい。シートの積層は、2～5層、例えば3層とするこ
とが好ましい。収容容器としては、例えば、特開2018-121568号
公報に記載されるような収容容器を使用できる。保存容器内に入れる保存液
は、 α -MEMとすることが好ましい。

[0046] [4] 細胞シートを保存及び／又は輸送する方法

本発明は、歯又は歯周組織に由来するMSCを含む細胞集団を含む細胞シ
ートを保存及び／又は輸送する方法（以下、「保存／輸送方法」とも称する
）を提供する。本発明の保存／輸送方法で保存及び／又は輸送される細胞シ
ートを構成する細胞集団は、高いALP活性を有する。また、本発明の保存
／輸送方法において、前記細胞シートは、 α -MEM中に維持され、常温で
保存及び／又は輸送される。

[0047] 細胞シートは、専用の収容容器内に収容して保存及び輸送を行うことがある。従来は、細胞シートは、2～10℃、特に2～5℃程度の低温条件下で保存及び輸送が行われており、冷蔵機器の準備等のコストや手間を要した。細胞シートの取扱をより簡易なものとするためには、常温での保存及び輸送が望まれる。本明細書において「常温」とは、通常的生活環境下で特に加温・冷却を行わない場合の温度全般を指すが、細胞シートの保存及び輸送条件としては、15～25℃とすることが好ましい。

[0048] 本発明者らは、細胞シートを保存及び／又は輸送において、細胞シートを α -MEM中に浸漬することによって、常温で使用可能な状態で維持されることを見出した。本発明の保存／輸送方法において、細胞シートは、常温の α -MEM中で7日間以上、好ましくは10日間以上保存されても、使用可能な状態で維持可能である。ただし、実際の保存期間は7日間以下、特に5日間以下とすることが好ましい。

[0049] 本発明において、「使用可能な状態」の細胞シートとは、具体的には、細胞数、細胞生存率、ALP活性及びALP純度が、全て予め設定した規格値以上となる細胞シートをいう。各規定値は、以下の通りである。

細胞数：1×10⁶細胞／製品（上面：直径21mm円）

細胞生存率：80%

ALP活性：10U以上

ALP陽性細胞率：50%

[0050] 細胞シートの「ALP活性」は、細胞シート製品から生検トレパン（φ8.0mm）で回収された細胞シート片について測定したALP活性を指す。

[0051] 細胞シートの「細胞数」及び「細胞生存率」は、例えば、以下の手法で測定することができる。生検トレパンで回収した残りの細胞シートをコラゲナーゼ処理して、次いでトリプシン処理を行い、細胞懸濁液を調製する。細胞を洗浄した後に、トリパンブルー染色を行い、検鏡下で細胞数および生存率を確認する。

[0052] 「ALP陽性細胞率」は、細胞シートから回収した細胞懸濁液に抗ALP

抗体を反応させた後、FACSを用いて測定することができる。

[0053] 細胞シートの「細胞数」「細胞生存率」及び「ALP陽性細胞率」は、例えば、Washio, et al., Int. J. Oral Maxillofac. Implants, vol. 29, No. 1, e117-121 (2014)に記載の方法で測定することができる。

[0054] 本発明の保存／輸送方法において、保存及び／又は輸送される細胞シートは、「[2] 細胞シート」の項に記載した細胞シート、又は「[3] 細胞シートの製造方法」の項に記載の方法によって製造された細胞シートであることが好ましい。保存の対象となる細胞シートの性質、材料、製造方法等は、特に矛盾のない限り、「[1] 間葉系幹細胞を含む細胞集団」、「[2] 細胞シート」、及び「[3] 細胞シートの製造方法」の項に記載した通りである。

実施例

[0055] 以下、実施例を示して本発明をより詳細に説明するが、本発明を実施例の範囲に限定することを意図するものではない。

[0056] [実施例1] 歯根膜組織細胞の採取、単離及び培養

倫理委員会の承認の下、インフォームドコンセントを得た7名（P303～P309）の健常人ドナーから試料を採取した。健常人ドナーより、局所麻酔下にて第三大臼歯またはそれに準ずる歯を1本抜歯し、歯根の中央1／3の領域から歯根膜組織を採取した。得られた歯根膜組織に酵素処理を行い、細胞を単離する。実際の手技は、Iwata et al., Regen. Ther., Vol. 9, p. 38-44 (2018)に記載の手技を採用した。

[0057] 採取した細胞を、 α -MEM（10% FBS、L-グルタミン、ゲンタシン、ファンギゾンを含む）を用いて37℃、5%CO₂環境下で1週間ほど培養した後、継代培養を行った。継代数3でSTEM-CELL BANKER（登録商標）を用いて1×10⁵細胞／チューブとなるように調整し、液体窒素内で凍結保存した。

[0058] [実施例2] アルカリフォスファターゼ活性の測定

以下の方法で、各試料由来の細胞集団について、ALP活性を測定した。

1×10^5 細胞/mLで96ウェルプレートに播種した ($100 \mu\text{L} : 1 \times 10^4$ 細胞/ウェル)。2日間 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 環境下で基礎培地 ($10\% \text{FBS}$ 添加 α -MEM) にて培養した後、培地交換を行い、さらに5日間培養した。培地を除去し、 $200 \mu\text{L}$ の生理食塩水で2回洗浄した。Lab Assay ALP (富士フイルム和光純薬社製) の基質緩衝液 $100 \mu\text{L}$ を添加し、 37°C 、5分間インキュベートした。その後 $80 \mu\text{L}$ の反応停止液を添加し、 405nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。Lab Assay ALP の標準液の吸光度に基づいて作成した検量線を用いて、各吸光度から各細胞集団のALP活性 (U) を算出した。

[0059] 各細胞集団について、石灰化誘導後のALP活性を測定した。 1×10^5 細胞/mLで96ウェルプレートに播種した ($100 \mu\text{L} : 1 \times 10^4$ 細胞/ウェル)。2日間 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 環境下で基礎培地にて培養した後、石灰化誘導培地 ($10\% \text{FBS}$ 、L-アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩n水和物、デキサメタゾン、 β -グリセロリン酸を添加した α -MEM) に交換し、さらに5日間 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 環境下で培養した。培地を除去し、 $200 \mu\text{L}$ の生理食塩水で2回洗浄した。Lab Assay ALP (富士フイルム和光純薬社製) の基質緩衝液 $100 \mu\text{L}$ を添加し、 37°C 、5分間インキュベートした。その後 $80 \mu\text{L}$ の反応停止液を添加し、 405nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。Lab Assay ALP の標準液の吸光度に基づいて作成した検量線を用いて、各吸光度から各細胞集団のALP活性 (U) を算出した。

[0060] 図1に、石灰化誘導前及び石灰化誘導後の各細胞集団のALP活性測定結果を示す。石灰化誘導前のALP活性の高いP304及びP305の組織由来の細胞集団 (以下、単に「P304」「P305」等と記載) が、誘導後に顕著に高いALP活性を示した。一方で、誘導前のALP活性の低いP307及びP309では、誘導後のALP活性があまり増加しなかった。これにより、石灰化誘導前のALP活性が高い細胞集団において、誘導後にALP活性の著しい増加が生じることが分かった。

[0061] [実施例3] 細胞増殖能の測定

誘導前の各細胞集団について、 1×10^3 細胞で96ウェルプレートに播種し、基礎培地で2日間及び4日間37℃、5%CO₂環境下で培養した。その後、新鮮な基礎培地100μLに交換し、CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) を20μL添加し、37℃、5%CO₂環境下で1時間インキュベートした。その後、マイクロプレートリーダー (Model 450; Bio-Rad) を用いて490nmで吸光度を測定した。なお、本測定の詳細な条件は、Iwata et al., J. Clin. Periodontol., Vol. 37, pp. 1088-1099 (2010)に記載の条件とした。

[0062] 図2に、各細胞集団の細胞増殖能を示す。P304及びP305において、十分に高い細胞増殖能が見られた。これにより、石灰化誘導前のALP活性が高い細胞集団が、十分に高い細胞増殖能を有することが分かった。

[0063] [実施例4] コロニー形成能の測定

各細胞集団について、100細胞を60cm²ペトリ皿に播種し、基礎培地で14日間37℃、5%CO₂環境下で培養した。この間、1週間に2回の培地交換を実施した。その後、0.5%クリスタルバイオレットで染色し、蒸留水で2回洗浄した。ペトリ皿を乾燥した後、染色部をカウントした。播種した100細胞に占めるコロニーを形成した細胞の数、すなわちコロニーカウント数をコロニー形成能(%)とした。なお、本測定の詳細な条件は、Iwata et al., J. Clin. Periodontol., Vol. 37, pp. 1088-1099 (2010)に記載の条件とした。

[0064] 図3に、各細胞集団のコロニー形成能を示す。P304及びP305において、十分に高いコロニー形成能が見られた。これにより、石灰化誘導前のALP活性がコロニー形成能を有することが分かった。

[0065] [実施例5] 細胞シートの調製

細胞シートの材料としてP304の細胞集団を使用した。細胞集団を、 $3 \sim 4 \times 10^5$ 細胞でUpCell (セルシード社製) に播種し、石灰化誘導培

地で37℃、5%CO₂環境下で9～10日間培養を行った。この間、3～4日ごとに細胞の状態の確認及び培地交換を行った。培地を除去し、37℃に加温した生理食塩水1mLで2回洗浄を行った。その後、リング状の支持体で細胞シートを回収した。回収した細胞シートを、洗浄済みの他の細胞シートの上に載置して重ねて回収した。最終的に3層の細胞シート製品を調製した。

[0066] [実施例6] 細胞シートの保存／輸送安定性試験

実施例5で調製した細胞シートの保存／輸送条件下での安定性を検討した。実施例5で調製した細胞シートを、 α -MEMを入れた専用の輸送容器内に収容した。細胞シートを収容した輸送容器を、常温で0日間及び7日間静置した。また、輸送容器を7日間静置した後、常温条件下で1時間の輸送（徒歩及び電車）を行った。コントロールとして、 α -MEMに代えてPBSを入れた輸送容器についても同様に細胞シートを収容し、7日間静置した後、常温条件下で1時間の輸送を行った。

[0067] 各輸送容器内の細胞シートについて、細胞数、細胞生存率、ALP活性及びALP陽性細胞率を測定した。ALP活性は、以下の手法で測定した。細胞シート製品から生検トレパン（ ϕ 8.0mm）で細胞シートの一部を回収し、96ウェルプレートに入れた（n=3）。その後、Lab Assay ALPを用いて実施例2と同様の条件でALP活性の測定を行った。

[0068] 細胞数及び細胞生存率は、以下の手法で測定した。生検トレパンで回収した残りの細胞シートに α -MEM 200 μ Lを添加し、さらにコラゲナーゼを20 μ L添加し、37℃、5%CO₂環境下でインキュベートした。10分後に細胞シートを取り出し、ピペッティングによりほぐし、さらに5分インキュベートした。その後、0.25%トリプシン-EDTAを200 μ L添加して、ピペッティングにより再度細胞シートをほぐし、5分間インキュベートした。細胞シートが十分にほぐれて、細胞懸濁液になったことを確認した後、細胞洗浄液（PBS+10%FBS）を600 μ L加えて、1.5mLチューブに移して500g×5分、室温で遠心分離した。上清を除いた

後に、再度細胞洗浄液を 1 mL 加えて細胞懸濁液を調製し、新しい 1.5 mL チューブに 15 μ L を移した。トリパンプルーを 15 μ L 添加してピペッティングで細胞を分散させ、細胞数及び生存率を確認した。

[0069] ALP 陽性細胞率は、以下の手法で測定した。上記と同様に細胞シートから回収した細胞を細胞洗浄液に懸濁した。細胞懸濁液を ALP 試液とコントロール試液に分けて、ALP 試液にはフィコエリスリン標識抗 ALP 抗体を添加して反応させ、コントロール試液には、フィコエリスリン標識マウス非特異的 γ G1 イムノグロブリンを添加して反応させた。4℃で 30 分間インキュベーションした後、各試液の細胞を細胞洗浄液で洗浄し、1%パラフォルムアルデヒドで固定して細胞試料を作成した。各細胞試料について、フローサイトメトリーを用いて測定を行い、ALP 陽性細胞率 (%) を算出した。

[0070] ALP 活性、細胞数、細胞生存率及び ALP 陽性細胞率の詳細な測定条件は、Washio, et al., Int. J. Oral Maxillofac. Implants, vol. 29, No. 1, e117-121 (2014)に記載の条件を使用した。

[0071] 各輸送容器内の細胞シートの、細胞数、細胞生存率、ALP 活性及び ALP 陽性細胞率を表 1 に示す。 α -MEM 中で保存した細胞シートについて、7 日間常温で保存し、1 時間輸送しても、製品としての性能が十分に維持されていることが示された。一方、 α -MEM に代えて PBS 中に浸漬した細胞シートについては、7 日間常温保存 + 1 時間輸送により細胞生存率が 0% となった。

[0072]

[表1]

	規格値	0 日間保存	7 日間保存	7 日間保存 1 時間輸送
細胞数 (細胞/製品)	1×10^6	1.3×10^6	1.8×10^6	1.2×10^6
細胞生存率 (%)	≥ 80	99.2	99.4	97.4
ALP 活性 (U)	≥ 0.1	3.36	3.03	4.12
ALP 陽性細胞率 (%)	≥ 50	86.2	82.6	75.1

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 歯又は歯周組織に由来する間葉系幹細胞を含む細胞集団であって、石灰化誘導前のアルカリフォスファターゼ活性が1 U以上である、細胞集団。
- [請求項2] 石灰化誘導後のアルカリフォスファターゼ活性が5 U以上である、請求項1に記載の細胞集団。
- [請求項3] 前記間葉系幹細胞が、歯根膜に由来する間葉系幹細胞である、請求項1に記載の細胞集団。
- [請求項4] 歯又は歯周組織に由来する間葉系幹細胞を含む細胞集団を含む細胞シートであって、前記細胞集団の石灰化誘導後のアルカリフォスファターゼ活性が5 U以上である、細胞シート。
- [請求項5] 前記細胞集団の石灰化誘導前のアルカリフォスファターゼ活性が1 U以上である、請求項4に記載の細胞シート。
- [請求項6] 下記の（a）～（c）の工程を含む、細胞シートの製造方法：
（a）アルカリフォスファターゼ活性を有し、歯又は歯周組織に由来する間葉系幹細胞を含む細胞集団を取得する工程；
（b）前記細胞集団を石灰化誘導培地で培養し、プラスチック基板上で増殖させる工程；及び
（c）前記プラスチック基板上に形成されるシート状の細胞集団を回収、洗浄する工程。
- [請求項7] 前記工程（a）における細胞集団のアルカリフォスファターゼ活性が1 U以上である、請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 前記細胞集団の石灰化誘導後のアルカリフォスファターゼ活性が5 U以上である、請求項6に記載の方法。
- [請求項9] 歯又は歯周組織に由来する間葉系幹細胞を含む細胞集団を含む細胞シートを保存及び／又は輸送する方法であって、前記細胞集団が高いアルカリフォスファターゼ活性を有し、前記細胞シートは常温の α 改変イーグル最小必須培地中に維持される、方法。

- [請求項10] 前記細胞シートが、常温の α 改変イーグル最小必須培地中に7日間以上使用可能な状態で維持可能である、請求項9に記載の方法。
- [請求項11] 前記細胞シートが、請求項4若しくは5に記載の細胞シート、又は請求項6～8のいずれか1項に記載の方法で製造された細胞シートである、請求項9又は10に記載の方法。