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、コラーゲンゲル上に網膜色素上皮細胞を播種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と基底膜からなる移植用細胞シートに関する。

背景技術

[0002] 加齢黄斑変性（ａｇｅ‐ｒｅｌａｔｅｄ　ｍａｃｕｌａｒ　ｄｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ：　ＡＭＤ）は、現在、先進国における法的失明の主要原因疾患の一つであり、主に５０歳以上の高齢者に見られる。加齢黄斑変性は黄斑の加齢に伴う変化によっておこる疾患であり、滲出型と萎縮型に大別される。滲出型加齢黄斑変性は高齢者の黄斑に脈絡膜から新生血管が発生し、網膜色素上皮下又は網膜下に出血や滲出性病変を生じ、ついには瘢痕組織を形成する疾患である。萎縮型加齢黄斑変性は黄斑部の萎縮やドルーゼンの蓄積を伴う疾患である。また、滲出型及び萎縮型加齢黄斑変性に到る前駆病変を、特に早期加齢黄斑変性と呼ぶことがあり、本病変も加齢黄斑変性の一病態と考えられている。

[0003] 加齢黄斑変性の治療は、軽度の滲出型の場合には、光線力学的療法、レーザー光凝固術、新生血管抜去術などの外科的療法、または血管新生に関わる血管内皮増殖因子（ｖａｓｃｕｌａｒ　ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ：ＶＥＧＦ）に対する阻害剤の投与などの薬物療法による新生血管の退縮・除去を目的とした治療方法を選択することができる。しかし、網膜色素上皮（ｒｅｔｉｎａｌ　ｐｉｇｍｅｎｔ　ｅｐｉｔｈｅｌｉｕｍ：ＲＰＥ）の高度の萎縮や欠損に至るまで進行した滲出型や萎縮型の場合、前記手段で治療の有効性を得ることができない。かかる場合は、網膜色素上皮細胞または網膜色素上皮を網膜下の欠損部位に移植することが有効な治療方法となる。

[0004] 網膜色素上皮細胞移植による治療法は種々試みられている。ヒト胎児から得た網膜色素上皮細胞を細胞浮遊液の状態で移植した場合、移植細胞の生着が悪いことが報告されている。死体眼からシート状に剥離したブルッフ膜、脈絡膜も含んだ網膜色素上皮細胞シートを移植した例では、術後に拒絶反応が起こり十分な治療効果が得られていなかった（非特許文献１）。また、死体眼を利用するこれらの方法は倫理的な問題も指摘されている。一方、加齢黄斑変性症患者自身から正常な網膜色素上皮細胞と脈絡膜を採取し、黄斑下の欠損部位に移植する方法で視力の向上が見られた例が報告されている。しかし、この方法は患者に与える負担や手術のリスクが極めて高い。網膜色素上皮細胞に代えて、加齢黄斑変性症患者自身から採取した虹彩色素上皮細胞を移植に利用する試みもあるが、最終視力の上限が低く十分な効果が得られておらず、患者の細胞を利用することの負担やリスクも高い（非特許文献２）。このように、死体眼から採取した細胞や患者由来細胞を用いる従来の治療法は、倫理面、安全性、効果等の点で実用的でなく、真に移植治療に用いることができる網膜色素上皮細胞が求められていた。

[0005] 網膜色素上皮細胞シートの作成方法の１つとしては、細胞培養基材を細胞外マトリクス等で被覆し、その上で網膜色素上皮細胞を培養することによってシートを形成させる方法が挙げられる。例えば、ｆｉｂｒｏｎｅｃｔｉｎコートされた基材上で網膜色素上皮細胞を培養して細胞シートを形成させることはできるが、基底膜の形成は報告されておらず、シートを形成した容器からシートを取り出す方法について一切記載がない（非特許文献３）。かかる問題点を考慮し、あらかじめ基底膜を人工膜で代用して網膜色素上皮細胞シートを作成する方法が複数の研究室で開発されている。しかし、人工膜は移植時の生着および生体における機能維持障害となることが懸念される。生体反応の少ない人工膜も開発されているが、細胞自身が作り出す基底膜とは組成や性質、剛性などが異なるため、炎症やそれに伴う拒絶反応を誘起するという問題があり、移植用途には不向きである。また、従来、極性をもつ網膜色素上皮細胞シートを培養する方法は知られていたが、容器内で生体由来

の網膜色素上皮細胞や不死化株をシート化し、そのまま利用する実験モデル用途にとどまり、実際に容器から網膜色素上皮細胞シートを生体内と同じ基底膜を備えた状態で回収するまでには至っていない（非特許文献４）。細胞外マトリクス等を用いないで、培養皿の上で直接培養された網膜色素上皮細胞を擦過して網膜色素上皮細胞シートを得る方法があるが、このように擦過により剥がす方法によっては、シートの形や大きさ、基底膜等が安定せず、擦過による網膜色素上皮細胞へのダメージが大きく、ほとんどの場合は擦過によりシート形状が崩壊して細胞がばらばらになり、移殖などに使用可能な状態の細胞シートを得ることができない（非特許文献５）。また、細胞培養基材をコラーゲンで被覆し、細胞をコラーゲン上で培養することは報告されているが、ヒト網膜色素上皮細胞を用いるものではなく、またゲル強度を上げるために別途架橋剤を添加する必要があり、簡便・迅速な方法とは言えない（特許文献１）。このような現状から、加齢黄斑変性などの網膜疾患に対する治療上有効かつ調製が簡便で安定的な網膜色素上皮細胞シートの作成が依然課題となっている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開２００５－２６１２９２号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Ｏｐｈｔｈａｌｍｉｃ　Ｓｕｒｇ．１９９１　Ｆｅｂ；２２（２）：１０２－８．

非特許文献2：Ｔｏｈｏｋｕ　Ｊ　Ｅｘｐ　Ｍｅｄ．１９９９　Ｄｅｃ；１８９（４）：２９５－３０５．

非特許文献3：Ｎａｔ．Ｐｒｏｔｏｃ．，４（５），２００９，６６２－６７３．

非特許文献4：Ｉｎｖｅｓｔ．Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．Ｖｉｓ．Ｓｃｉ．，４７，２００６，３６１２－３６２４．

非特許文献5：Ｉｎｖｅｓｔ．Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．Ｖｉｓ．Ｓｃｉ．，３

６(２)，１９９５,３８１－３９０.

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、以って加齢黄斑変性等の網膜色素上皮の欠損を伴う疾患患者に対して生着率の高い、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、細胞培養基材にコラーゲンゲル層を作り、その上に網膜色素上皮細胞を播種し、培養することで細胞シートを作成した。かかる方法によって得られる細胞シート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シートを容易に細胞培養基材から剥離することができた。また、細胞シートを構成する細胞は、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。本発明者らは、鋭意検討の結果、これらの発見から本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、

［１］以下の工程を含む、細胞シートの製造方法

（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；

［２］網膜色素上皮細胞が、幹細胞又は前駆細胞を分化誘導して得られた細胞である上記［１］記載の細胞シートの製造方法；

［３］幹細胞が、ＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞である上記［２］記載の細胞シートの製造方法；

［４］コラーゲンゲルのコラーゲン濃度が、０．１％～０．５％である上記

［１］記載の細胞シートの製造方法；

［５］以下の工程（３）をさらに含む、上記［１］～［４］のいずれか１項に記載の細胞シートの製造方法

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

［６］上記［１］～［５］のいずれか１項に記載の方法で製造された細胞シート；

［７］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、当該細胞から分泌された基底膜からなる移植用細胞シート；

［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と、当該細胞から分泌された基底膜からなるスクリーニング用細胞シート；

を提供する。

発明の効果

[0010] 本発明により、基底膜が表出した構成を有する網膜色素上皮細胞シートを、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、移殖用途として極めて有用であるため、基底膜と網膜色素上皮細胞から構成されるシートを作成することにより、加齢黄斑変性患者等の眼疾患患者に移植適用することができる。特に、培養に用いる細胞をｉＰＳ細胞由来の網膜色素上皮細胞とした場合、患者自身の細胞をソースとして利用することで、移植の際の拒絶反応を回避することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]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。

本発明は以下の工程を含む、細胞シートの製造方法を提供する。

（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

[0013] 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。

[0014] 播種さ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細胞数を確保することができる。

[0015] 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により、適宜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、例えばヒトＥＳ細胞やｉＰＳ細胞等の多能性幹細胞を、Ｄｋｋ－１やＣＫＩ－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、Ｍｉｔｆ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］。

［0016］　本発明の網膜色素上皮細胞はコラーゲンゲル上に播種されることによって、培養される。コラーゲンゲ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型コラーゲンを用いることが好ましい。コラーゲンゲルは、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ゲルとして好ましい。また、本発明に用いられるコラーゲンは、コラーゲンゲ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。

[0017] 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。

[0018] 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１００μｌ～約２５０μｌが好ましく、より好ましくは約１５０μｌ～約２００μｌ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、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、細胞シートへのダメージが懸念される。

[0019] 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、ペトリデッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチデッシュ、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。

[0020] 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／ｃｍ^{2}～約８．５×１０^{5}細胞数／ｃｍ^{2}、より好ましくは、約８．５×１０^{4}細胞数／ｃｍ^{2}～約８．５×１０^{5}細胞数／ｃｍ^{2}、最も好ましくは約４．５×１０^{5}細胞数／ｃｍ^{2}である。

[0021] 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、αＭＥＭ、ＩＭＤ培地、ＥＳ培地、ＤＭ－１６０培地、Ｆｉｓｈｅｒ培地、ＷＥ培地およびＲＰＭＩ１６４０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撹拌を行いながら、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。

[0022] 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。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。

[0023] 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、０．１Ｕ／ｍｇ以上であることが好ましい。コラゲナーゼの比活性が０．１Ｕ／ｍｇ未満である場合、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０．１～１０，０００Ｕ／ｍｇ、さらに好ましくは１～３，０００Ｕ／ｍｇの範囲である。

[0024] 本発明の細胞シート製造方法において、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。

[0025] 本発明の細胞シート製造方法において、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好ましくない。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。

[0026] 本発明の細胞シート製造方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、細胞は一般に生体内温度の１０℃以下（人では約３０℃）になると細胞質の流動性が低下して代謝能が低下する場合、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、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。

[0027] 本発明の細胞シート製造方法において、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。

[0028] 上記の如く回収された細胞シートは、そのまま各種用途に用いることができるが、細胞シート同士の接着性や組織へ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。

本発明の方法で得られる細胞シートは、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。本発明の方法によれば、このように、生体内と同様の機能を有する細胞シートを得ることができる。

[0029] 本発明の方法で得られる細胞シートは、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、本発明の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、６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．Ｏｐｈｔｈ

ａｌｍｏｌ．Ｖｉｓ．Ｓｃｉ．，３６(２)，１９９５,３８１－３９０）、本発明の方法によれば、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、本発明の細胞シートは、基底膜を伴い十分な剛性を有するため、シートを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、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、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、本発明の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。

[0030] 本発明の細胞シートの作成方法は、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ゲルとの接触面に基底膜の有無を確認する工程

[0031] 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、コラーゲンゲルとの接触面で発現しているマーカーを対象とする。

[0032] 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。

[0033] 「剥離された細胞シートのコラーゲンゲ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。

[0034] 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。

[0035] 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、グアニジンー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。

[0036] 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×ＳＳＣ（ｓｏｄｉｕｍ ｃｈｌｏｒｉｄｅ／ｓｏｄｉｕｍ ｃｉｔｒａｔｅ）中４５℃でのハイブリダイゼーション反応の後、０．２×ＳＳＣ／０．１％ ＳＤＳ中６５℃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。

[0037] 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、〔^{32}Ｐ〕、〔^{3}Ｈ〕、〔^{14}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ー（ストレプト）アビジンを用いることもできる。

[0038] 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。

[0039] 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。

[0040] 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。

[0041] 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－ＴＯＦＭＳ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。

[0042] 個々の免疫学的測定法を本発明の検査方法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条件、操作法に当業者の通常の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（ＰａｒｔＡ））、同書 Ｖｏｌ． ７３（Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（ＰａｒｔＢ））、同書 Ｖｏｌ． ７４（Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（ＰａｒｔＣ））、同書 Ｖｏｌ． ８４（Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（ＰａｒｔＤ：Ｓｅｌｅｃｔｅｄ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ））、同書 Ｖｏｌ． ９２（Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（ＰａｒｔＥ：Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｇｅｎｅｒａｌ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ Ｍｅｔｈｏｄｓ））、同書 Ｖｏｌ． １２１（Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（ＰａｒｔＩ：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。

[0043] 本発明は、また前記細胞シート作製方法に従って、得られる細胞シート、好ましくは、生体外で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基底膜からなる移植用細胞シートに関する。本発明の網膜色素上皮細胞シートは、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、加齢黄斑変性疾患、網膜色素変性症、糖尿病性網膜症、及び網膜剥離等の網膜変性疾患が挙げられる。本発明の細胞シートは、基底膜を伴うため、ブルッフ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。また、本発明の網膜色素上皮細胞シートは、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、本発明の網膜色素上皮細胞シートは、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ｖｉｔｒｏモデルとして利用することも可能である。

［0044］ 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。

［0045］ 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。

[0046] 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。

[0047] 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

[0048] 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。

[0049] 製造例１．網膜色素上皮細胞の調製

下記実施例１のシート化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、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は健常者に由来、Ｋ１１ＰＤ２と５９Ｍ８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、Ｃｅｌｌ １３１，８６１-８７２，２００７に記載の方法に準じて、レトロ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遺伝子を導入する方法で樹立された細胞である。

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．４４，２３１-２３５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。

[0050] 実施例１．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＞

Ａ：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）３．０ｍｇ／ｍｌ、Ｂ：５倍濃度の濃縮培養液（ＤＭＥＭ／Ｆ１２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１２５００－０６２）３ｇをＭｉｌｌｉＱ水に溶解させ、ｔｏｔａｌ ｖｏｌｕｍｅ ５０ｍｌをフィルタ

一処理）、Ｃ：再構成用緩衝液（１Ｎ　ＮａＯＨ　（５０ｍＭ）５ｍｌ、ＮａＨＣＯ$_3$（２６０ｍＭ）２．２ｇ、ＨＥＰＥＳ（２００ｍＭ）４．７７ｇをＭｉｌｌｉＱ水に溶解させ、ｔｏｔａｌ　ｖｏｌｕｍｅ　１００ｍｌをフィルター処理）を調製した。冷却しながらＡ（７容量）にＢ（２容量）を泡立てないように混合（薄黄色）した。次に、Ｃ（１容量）を加え混合（薄ピンク色）し、０．２１％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　Ｐｏｌｙｅｓｔｅｒ　メンブレン；Ｃｏｒｎｉｇ、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、Ｎ６９０８）４４５ｍｌ，ＦＢＳ　５０ｍｌ，Ｐｅｎｉｃｉｌｉｎ－Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ（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で得た各網膜色素上皮細胞が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１５００μｌ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，Ｐｅｎｉｃｉｌｉｎ－Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１５１４０－１２２）５ｍｌ，ｂＦＧＦ（ｗａｋｏ、０６０－０４５４３）１０ｎｇ／ｍｌ）に交換し（インサート外１５００μｌ、インサート内５００μｌ、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）１００μｌ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。

［0051］実施例２．網膜色素上皮細胞シートの製造方法（コラーゲンの種類）

実施例１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。

実施例１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（３ｍｇ／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、実施例１のブタ腱由来酸可溶性のＴｙｐｅ－Ｉコラーゲン Ｃｅｌｌｍａｔｒｉｘ　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。

[0052] 実施例３．網膜色素上皮細胞シートの製造方法（コラーゲン量）

実施例１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２００μｌに代えて、１００μｌ、または３００μｌ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。

実施例１と比較して、コラーゲンゲル混合溶液の使用量が１００μｌ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３００μｌ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。コラーゲンゲル混合溶液の使用量が１００μｌの場合、細胞が直接メンブレンに接触し、メンブレンを除去する際に当該箇所から細胞シートが破砕してしまった。

[0053] 実施例４．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）

実施例１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３０μｌ用いて網膜色素上皮細胞シートに３０ｍｉｎ接触する条件に代えて、それぞれ１０μｌで１０ｍｉｎ、１０μｌで２０ｍｉｎ、１０μｌで３０ｍｉｎ、２０μｌで２０ｍｉｎ、２０μｌで６０ｍｉｎ、３０μｌで５０ｍｉｎ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。

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

[0054] 実施例５．網膜色素上皮細胞シートの製造方法（播種細胞数）

実施例１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５×１０^{5}個／５００μｌに代えて、（Ａ）５×１０^{4}／５００μｌ、（Ｂ）１×１０^{5}／５００μｌ、（Ｃ）１×１０^{6}／５００μｌ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。

実施例１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。

[0055] 実施例６．網膜色素上皮細胞シートに形成された基底膜

実施例１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、ｃｒｙｏ　ｓｅｃｔｉｏｎ（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ｒ

ａｂｂｉｔ　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、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ社製4’，６－ｄｉａｍｉｄｉｎｏ－２－ｐｈｅｎｙｌｉｎｄｏｌｅ（ＤＡＰＩ；１μｇ／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。

[0056] 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

実施例１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ーラー細胞に発現する遺伝子である。

[0057] 評価２．網膜色素上皮シートのコラーゲン残存測定

実施例１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ｃｒｙｏ　ｓｅｃｔｉｏｎ（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－ｐｈｅｎｙｌｉｎｄｏｌｅ（ＤＡＰＩ；１μｇ／ｍｌ）で染色し、Ｃｏｌｌａｇｅｎ　ｔｙｐｅ１の染色にＣａｌｂｉｏｃｈｅｍ社製ｒａｂｂｉｔ　ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ｃｏｌｌａｇｅｎ　ｔｙｐｅ　Ⅰａｎｔｉｂｏｄｙ（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。

[0058] 評価３．網膜色素上皮細胞シートのサイトカイン分泌能

実施例１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、ぞ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１）。本発明の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。

[0059] 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。実施例１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を電気的に測定した。その結果、ＴＥＲは６４０Ω・ｃｍ^{2}であり、Ｎａｔｕｒｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｖｏｌ４，Ｎｏ５ ６６２－６７３ （２００９）のＦｉｇ１０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。本発明の細胞シートは生体内と同様の高いバリア機能を有していることが示された。

[0060] 評価５．サルＥＳ細胞由来網膜色素上皮細胞シートの移植

実施例１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。

[0061] 評価６．サルｉＰＳ細胞由来網膜色素上皮細胞シートの移植

実施例１においてサルｉＰＳ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、自家移植ではこの様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

[0062] 本発明の方法によって、加齢黄斑変性患者に移植適用する網膜色素上皮細胞シートを比較的簡便に製造することができる。特に、培養に用いる細胞をｉＰＳ細胞由来の網膜色素上皮細胞とした場合、患者自身の細胞を利用可能となるため、移植の際の拒絶反応を回避することができる。また、本発明の方法で得られる細胞シートは、生体と同じ成分の基底膜を伴うため、より生体内の状態に近い網膜色素上皮細胞シートを再現でき、各種スクリーニング用途として有用である。

本出願は、日本で出願された特願２０１１－０４０１３０（出願日：平成２３年２月２５日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

請求の範囲

[請求項1] 以下の工程を含む、細胞シートの製造方法。

（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2] 網膜色素上皮細胞が、幹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記載の細胞シートの製造方法。

[請求項3] 幹細胞が、ＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞である請求項２記載の細胞シートの製造方法。

[請求項4] コラーゲンゲルのコラーゲン濃度が、０．１％～０．５％である請求項１記載の細胞シートの製造方法。

[請求項5] 以下の工程（３）をさらに含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の細胞シートの製造方法。

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

[請求項6] 請求項１～５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7] 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、当該細胞から分泌された基底膜からなる移植用細胞シート。

[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と、当該細胞から分泌された基底膜からなるスクリーニング用細胞シート。