明　細　書

発明の名称 ： 臓器の表面への貼付のための生着シート状物

技術分野

[0001] 細胞外マトリクス層、シート状細胞培養物、および生体内分解性ゲル層を含み、一方の面に細胞外マトリクス層を有し、シート状細胞培養物を介した他方の面に生体内分解性ゲル層を有する、細胞外マトリクス層を臓器の表面へ貼付して用いるための生着シート状物、該生着シート状物の製造方法および該生着シート状物を用いた疾患を処置する方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、損傷した組織などの修復のために、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、心筋梗塞など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細胞など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例として、細胞をシート状に成形したシート状細胞培養物が開発されており、その一部は臨床応用の段階に入っている。そのような応用の例としては、例えば、患者自身由来の心筋シートの移植による機能不全心筋の修復（非特許文献２）、間葉系幹細胞から誘導された肝細胞を含む細胞シートを肝障害を抑制する目的で肝臓の表面に貼付すること（特許文献１）、ＩＣ－２で操作した間葉系幹細胞シートの移植により肝線維化を低減すること（非特許文献３）、管腔臓器の創傷部に貼付し、該管腔臓器の該創傷部からの漏出を治癒または予防するための細胞シート組成物（特許文献１）、などが挙げられる。

[0004] また、シート状細胞培養物は脆弱であるため、臨床応用での操作には困難が生じる。そのために例えば、良好に組織に付着するよう改良されたシート状細胞培養物（特許文献３）、フィブリンゲルとシート状細胞培養物の積層体（特許文献４）などが提案されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第６００８２９７号公報

特許文献2：国際公開２０１７／１３０８０２号公報

特許文献3：国際公開２００６／０９３１５３号公報

特許文献4：特許第６４９５６０３号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Haraguchi et al., Stem Cells Transl Med. 2012 Feb;1(2):136-41

非特許文献2：Imran A. Memon et al., The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Volume 130, Number 5, 1333-1341

非特許文献3：Noriko Itaba et al., SCIENTIFIC REPORT (2019) 9:6841

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 再生医療のさらなる普及のために、より高い操作性を有する、新たなシート状細胞培養物の開発が求められているとの認識の下、本発明は、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、及びその製造方法、該生着シート状物を用いた疾患を処置する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

[0008] 本発明者らは、様々な組織において良好に生着するシート状細胞培養物について鋭意研究する中で、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が、細胞外マトリクス層の面を臓器に貼付することで、肝臓や大腸の表面に良好に生着できることを初めて見出し、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］細胞外マトリクス層、シート状細胞培養物、および生体内分解性ゲル層を含む生着シート状物であって、一方の面に細胞外マトリクス層を有し、シート状細胞培養物を介した他方の面に生体内分解性ゲル層を有する、細胞外マトリクス層を臓器の表面へ貼付して用いるための前記生着シート状物。

［２］臓器が、ヒトの臓器である、［１］に記載の生着シート状物。

［３］臓器の表面への貼付が、腹腔鏡下または胸腔鏡下での貼付である、［１］または［２］に記載の生着シート状物。

［４］シート状細胞培養物が、体細胞を含む、［１］～［３］のいずれか１つに記載の生着シート状物。

［５］体細胞が、骨格筋芽細胞または間葉系幹細胞である、［４］に記載の生着シート状物。

［６］臓器が、体外から腹腔鏡または胸腔鏡によってアプローチ可能な体内の臓器である、［１］～［５］のいずれか１つに記載の生着シート状物。

［７］薬効成分をさらに含む、［１］～［６］のいずれか１つに記載の生着シート状物。

[0010] ［８］［１］～［７］のいずれか１つに記載の生着シート状物を製造する方法であって、

基材上に細胞を播種するステップ、

播種した細胞をシート化するステップ、および

形成されたシート状細胞培養物を基材から剥離するステップ

を含む、前記方法。

［９］［１］～［７］のいずれか１つに記載の生着シート状物の適用により改善される疾患を処置する方法であって、前記生着シート状物の有効量を、前記生着シート状物の細胞外マトリクス層を有する面を、それを必要とする対象の臓器へ貼付することを含む、前記方法。

［１０］対象の臓器へ貼付することが、腹腔鏡下または胸腔鏡下において実施される、［９］に記載の方法。

［１１］対象の臓器へ貼付することが、

生着シート状物を支持するための支持体と、支持体の一面を保護するための摩擦係数の低い保護部材とを含み、生着シート状物を支持した支持体を保護部材で保護して丸め、筒状体内に挿通することができるデバイスを用いて実施される、［９］または［１０］に記載の方法。

発明の効果

[0011] 本発明の生着シート状物を用いることにより、対象の臓器へとシート状細胞培養物を含む生着シート状物を貼付する際に、良好な生着性を得ることができる。また本発明の生着シート状物は、対象の臓器への貼付をより容易に実施することができる。さらに本発明の生着シート状物は、対象の臓器への貼付において、送達用のデバイスを使用することができ、より対象に対して低侵襲である方法、例えば腹腔鏡を用いた方法によって対象の臓器へと貼付することが可能である。また該生着シート状物を貼付した後の臓器は良好な状態を保持することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図１Ａおよび図１Ｂは、生着シート状物を貼付した胃から得た組織を、ヘマトキシリン・エオジン（ＨＥ）染色した組織染色像を示す。破線の円で囲った部分は貼付された生着シート状物を示す。直線の円で囲った部分は、組織学的に連続であることを表す部分を示す。図１Ｂは、図１Ａの一部をさらに拡大したものである。

[図2AB]図２Ａおよび図２Ｂは、生着シート状物を貼付した大腸から得た組織を、ヘマトキシリン・エオジン染色した組織染色像を示す。図２Ｂは、図２Ａの一部をさらに拡大したものである。

[図2CD]図２Ｃおよび図２Ｄは、生着シート状物を貼付した大腸から得た組織を、抗デスミン抗体を用いた免疫染色をした組織染色像を示す。図２Ｄは、図２Ｃの一部をさらに拡大したものである。

[図3AB]図３Ａおよび図３Ｂは、生着シート状物を貼付した肝臓から得た組織を、アザン（ＡＺＡＮ）染色した組織染色像を示す。図３Ｂは、図３Ａの一部をさらに拡大したものである。図中の矢印は、組織学的に連続しているこ

とが顕著に表れている部分を指す。

[図3CD]図３Ｃおよび図３Ｄは、生着シート状物を貼付した肝臓から得た組織を、抗デスミン抗体を用いた免疫染色をした組織染色像を示す。図３Ｃおよび図３Ｄは、同一スライド内の異なる視野のものである。図中の矢印は、組織学的に連続していることが顕著に表れている部分である。また、図中「Ｓｈｅｅｔ」と表した側に生着シート状物を貼付した。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明は、細胞外マトリクス層、シート状細胞培養物、および生体内分解性ゲル層を含み、一方の面に細胞外マトリクス層を有し、シート状細胞培養物を介した他方の面に生体内分解性ゲル層を有する、細胞外マトリクス層を臓器の表面へ貼付して用いるための生着シート状物に関する。

本発明において、生着シート状物とは、良好な生着を伴い対象に貼付して用いられるシート状に成形されたものを指す。本発明の生着シート状物は、細胞外マトリクス層、シート状細胞培養物、および生体内分解性ゲル層を含み、生着シート状物に含まれるシート状細胞培養物の一方の面に細胞外マトリクス層を有し、シート状細胞培養物を介した他方の面に生体内分解性ゲル層を有する。

本発明において、良好な生着とは、例えば、生着シート状物と生着シート状物を貼付した臓器が組織学的に連続していることをいう。生着シート状物と臓器とが組織学的に連続しているとは、連続的に隙間なく生着シート状物と臓器とが接していることを指す。ここで隙間がないとは、少なくとも部分的に生着シート状物と臓器とがそれぞれの間に間隙を形成することなく接触していることを指す。例えば、生着シート状物と臓器の間の隙間をなくすために、生着シート状物と臓器とは縫合されていてもよい。生着シート状物と臓器との間に隙間が存在する場合には、他の細胞が隙間に浸潤すること、穿孔防止効果や臓器からの液体漏出防止効果または線維化に対する治療効果といった生着シート状物中のシート状細胞培養物の効果が低減することなどが生じ得る。本発明の生着シート状物は、その細胞外マトリクス層（ＥＣＭと

も称する）を臓器の表面に貼付するため、生着シート状物中のシート状細胞培養物と臓器との間には細胞外マトリクス層が存在する。生着シート状物と臓器とが接触している部分においては、生着シート状物を構成する細胞が臓器内に遊走すること、その逆に臓器を構成する細胞が生着シート状物に入り込むことが考えられる。このとき細胞外マトリクスを標的として細胞が遊走すること、および細胞が入り込むことが考えられる。

[0014] 本発明において、「細胞外マトリクス層」は、細胞外マトリクスが層状に形成されたものを指し、生着シート状物が対象の臓器に接着することに寄与し、生着シート状物を貼付する際に、貼付部位における生着シート状物の生着率を向上させる。また細胞外マトリクスは細胞由来成分であるため、含まれる細胞外マトリクス層ごと本発明の生着シート状物を対象の臓器への貼付に供することにおいてなんら問題はない。本発明において、細胞外マトリクス層の厚さは、１ｎｍ～１００ｎｍであり、好ましくは、１ｎｍ～５０ｎｍである。

[0015] 本発明において「シート状細胞培養物」は、細胞が互いに連結してシート状になったものをいう。細胞同士は、直接（接着分子など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、細胞外マトリクスなどが挙げられる。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、電気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層など）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。

[0016] 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、本発明の生着シート状物に含まれる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、本発明の生着シート状物に含まれる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。

[0017] 本発明において、シート状細胞培養物の厚みは特に限定されていない。シート状細胞培養物として単層のシートを用いる場合、その厚みは通常細胞１個分以上の厚みを有し、シート状細胞培養物のシートを形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、３０μｍ以上の厚みを有し、好ましい一態様において、５０μｍ以上の厚みを有する。本発明のシート状細胞物の値の範囲としては、例えば３０μｍ～２００μｍ、好ましくは５０μｍ～１５０μｍ、より好ましくは６０μｍ～１００μｍ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×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枚重ねたシートを用いる場合、その厚みは１５０μｍ以上の厚みを有し、好ましい一態様において、２５０μｍ以上の厚みを有する。その場合におけるシート状細胞物の値の範囲としては、例えば１５０μｍ～１０００μｍ、好ましくは２５０μｍ～７５０μｍ、より好ましくは３００μｍ～５００μｍが挙げられる。

[0018] 生着シート状物に含まれる細胞は、生着シート状物の貼付に供する任意の生物に由来することができ、かかる生物は、これらに限定されるものではないが、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、モルモットなど）、ウサギなど

を含む。また、生着シート状物に含まれる細胞は、１種類のみであってもよいが、２種類以上の細胞を用いることもできる。本発明の好ましい態様において、生着シート状物に含まれる細胞が２種類以上ある場合、最も多い細胞の含有比率（純度）は、生着シート状物製造終了時において、６０％以上、好ましくは、７０％以上、より好ましくは７５％以上である。

[0019] 細胞は異種由来細胞であっても同種由来細胞であってもよい。ここで「異種由来細胞」は、生着シート状物を貼付するレシピエントとは異なる種の生物に由来する細胞を意味する。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などが異種由来細胞に該当する。また、「同種由来細胞」は、レシピエントと同一の種の生物に由来する細胞を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、ヒト細胞が同種由来細胞に該当する。同種由来細胞は、自己由来細胞（自己細胞または自家細胞ともいう）、すなわち、レシピエントに由来する細胞と、同種非自己由来細胞（他家細胞ともいう）を含む。自己由来細胞は、移植しても拒絶反応が生じないため、本発明においては好ましい。しかしながら、異種由来細胞や同種非自己由来細胞を利用することも可能である。異種由来細胞や同種非自己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。なお、本明細書中で、自己由来細胞以外の細胞、すなわち、異種由来細胞と同種非自己由来細胞を非自己由来細胞と総称することもある。本発明の一態様において、細胞は自家細胞または他家細胞である。本発明の一態様において、細胞は自家細胞である。本発明の別の態様において、細胞は他家細胞である。

[0020] 本発明の生着シート状物に含まれるシート状細胞培養物は、当業者に既知の任意の方法（例えば、特許文献１、特開２０１０－０８１８２９、特開２０１１－１１０３６８など参照）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、基材上に細胞を播種するステップ、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。シート状細胞培養物を製造するステップは、サブステップとして上記シート状細胞培養物の製造方法に係るステップの１または２以上を含んでもよい。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。

[0021] 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などを含む。容器は、培養液などの液体を透過させない構造・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、細胞培養ボトルなどが挙げられる。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、計数などが可能となる。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、上記のごとき種々の材料のプレートや容器などが、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などが挙げられる。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もよい。好ましい基材としては、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など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などの細胞外マトリクスや、カドヘリンファミリー、セレクチンファミリー、インテグリンファミリーなどの細胞接着因子などを表面にコーティングした基材などが挙げられる。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など）。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。

[0022] 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、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などの公知のものを用いることができる（例えば、特開平２－２１１８６５、特開２００３－３３１７７参照）。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、株式会社セルシードのＵｐＣｅｌｌ（登録商標）やＤＩＣ株式会社のＣｅｐａｌｌｅｔ（登録商標））、これらを本開示の製造方法に使用することができる。

[0023] 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１ｃｍ^2～約２００ｃｍ^2、約２ｃｍ^2～約１００ｃｍ^2、約３ｃｍ^2～約５０ｃｍ^{2}などであってよい。例えば、基材として直径１０ｃｍの円形の培養皿が挙げられる。この場合、面積は５６．７ｃｍ^{2}となる。

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、基材の表面に血清成分が付着している状態を意味する。かかる状態は、限定されずに、例えば、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。

[0024] 血清としては、異種血清および／または同種血清を用いることができる。異種血清は、生着シート状物を貼付して用いる場合、そのレシピエントとは異なる種の生物に由来する血清を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、ウシやウマに由来する血清、例えば、ウシ胎仔血清（ＦＢＳ、ＦＣＳ）、仔ウシ血清（ＣＳ）、ウマ血清（ＨＳ）などが異種血清に該当する。また、「同種血清」は、レシピエントと同一の種の生物に由来する血清を

意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、ヒト血清が同種血清に該当する。同種血清は、自己血清（自家血清ともいう）、すなわち、レシピエントに由来する血清、およびレシピエント以外の同種個体に由来する同種他家血清を含む。なお、本明細書中で、自己血清以外の血清、すなわち、異種血清と同種他家血清を非自己血清と総称することもある。

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定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などが挙げられる。

[0025] 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など）、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など）、Ｌ１５、ＳｋＢＭ、ＲＩＴＣ８０－７など）等で行うことができる。希釈濃度は、血清成分が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。

[0026] インキュベート時間も、血清成分が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。

[0027] 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、ピペットなどによる吸引や、デカンテーションなどの慣用の液体廃棄手法を用

いることができる。本開示の好ましい態様においては、血清廃棄後に、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、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など）、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など）、Ｌ１５、ＳｋＢＭ、ＲＩＴＣ８０－７など）等で行うことができる。洗浄手法としては、慣用の基材洗浄手法、例えば、限定することなく、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）撹拌後、廃棄する手法などを用いることができる。

[0028] 本発明において、基材を、成長因子でコートしてもよい。ここで、「成長因子」は、細胞の増殖を、それがない場合に比べて促進する任意の物質を意味し、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）などを含む。成長因子による基材のコート手法、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０．０００１μｇ／ｍＬ～約１μｇ／ｍＬ、好ましくは約０．０００５μｇ／ｍＬ～約０．０５μｇ／ｍＬ、より好ましくは約０．００１μｇ／ｍＬ～約０．０１μｇ／ｍＬである以外は、基本的に血清と同じである。

[0029] 本発明において、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」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、クッシング症候群などの悪影響を及ぼし得るものをいう。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０．１μｇ／ｍＬ～約１００μｇ／ｍＬ、好ましくは約０．４μｇ／ｍＬ～約４０μｇ／ｍＬ、

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

[0030] 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。

[0031] 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。

[0032] 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。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など、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。

[0033] 一態様において、播種は、約７．１×１０^{5}個／ｃｍ^{2}～約３．０×１０^{6}個／ｃｍ^{2}、約７．３×１０^{5}個／ｃｍ^{2}～約２．８×１０^{6}個／ｃｍ^{2}、約７．５×１０^{5}個／ｃｍ^{2}～約２．５×１０^{6}個／ｃｍ^{2}、約７．８×１０^{5}個／ｃｍ^{2}～約２．３×１０^{6}個／ｃｍ^{2}、約８．０×１０^{5}個／ｃｍ^{2}～約２．０×１０^{6}個／ｃｍ^{2}、約８．５×１０^{5}個／ｃｍ^{2}～約１．８×１０^{6}個／ｃｍ^{2}、約９．０×１０^{5}個／ｃｍ^{2}～約１．６×１０^{6}個／ｃｍ^{2}、約１．０×１０^{6}個／ｃｍ^{2}～約１．６×１０^{6}個／ｃｍ^{2}などの密度で行うことができる。

[0034] 本発明において「生体内分解性ゲル層」は、生体内において分解し、体内へ吸収され、代謝、排泄されるゲルである生体内分解性ゲルが層状を形成しているものを指す。生体内分解性ゲルは、これらに限定されないが、フィブリンゲル、アドスプレー（登録商標）（テルモ社製）により形成されるゲル

などを含む。生体内分解性ゲルは、好ましくは２種類の液体を混合させることにより粘性を生じるものを指す。例えば、フィブリンゲルは、フィブリノゲンを含む液体（以下、フィブリノゲン液と称する）とトロンビンを含む液体（以下、トロンビン液と称する）を混合することにより、フィブリノゲンにトロンビンが作用して形成される高い強度を備えるゲルである。

また、生体内分解性ゲルは生体内で分解することが可能であるため、本発明の生着シート状物を、含まれる生体内分解性ゲル層ごと対象の臓器への貼付に供することが可能である。本発明において、生体内分解性ゲル層の厚さは、５μｍ～１３００μｍであり、好ましくは、５０μｍ～３００μｍである。

[0035] 一態様において、生体内分解性ゲル層は厚みが均一となっている。ここで均一とは、厚みの最も厚い部分と最も薄い部分の差異が２０％以下であることを指す。均一は、厚みの差異が好ましくは、１０％以下であることを指し、さらに好ましくは、５％以下であることを指す。

[0036] 本発明の生着シート状物は、生着シート状物に含まれる細胞外マトリクス層を臓器の表面へ貼付して用いられる。本発明の生着シート状物を貼付する臓器は、任意の生物個体の臓器であってもよいが、好ましくは動物の臓器、より好ましくは哺乳動物の臓器、さらに好ましくはヒトの臓器である。本発明において臓器は、体腔内にある、特定の形態および機能を有する器官を指し、例えば、肝臓、胆のう、大腸、胃、十二指腸などの消化器、心臓、脾臓などの循環器、肺などの呼吸器、腎臓などの泌尿器、前立腺、子宮、卵巣などの生殖器、副腎などの内分泌器が挙げられる。シート状細胞培養物が臓器に良好に生着し、臓器を良好な状態に保持するためには、シート状細胞培養物に酸素や栄養などが供給される必要があると考えられるところ、本発明の生着シート状物は、細胞外マトリクス層を含んでいることから、血管新生作用を有するＶＥＧＦ、ＨＧＦなどの種々のサイトカインをより多く放出しているものと考えられる。

[0037] 一態様において、本発明の生着シート状物の臓器の表面への貼付は、腹腔

鏡下または胸腔鏡下での貼付である。ここで腹腔鏡下または胸腔鏡下での貼付とは、生着シート状物が、対象において腹腔鏡下手術または胸腔鏡下手術のために用意された器具の通り道（例えば、腹腔鏡用ポート、胸腔鏡用ポートなど）を通って対象の臓器付近へと送達され、臓器の表面へと貼付されることを指す。腹腔鏡下または胸腔鏡下での貼付を実施する際に、生着シート状物を鉗子などを用いて湾曲させて、器具の通り道を通し、臓器付近で広げ、臓器に貼付してもよい。また、このようにして器具の通り道を通す際に、送達用デバイスなどを用いてもよい。送達用デバイスは、これに限定されないが、例えば、治療用物質の運搬投与器具（特開２００９－０００５１１参照）などが使用できる。

したがって一態様において、本発明の生着シート状物を貼付する臓器は、腹腔鏡下手術または胸腔鏡下手術の対象となり得る臓器、すなわち体外から腹腔鏡または胸腔鏡によってアプローチ可能な体内の臓器であり、例えば、これらに限定することはないが、肝臓、胆のう、脾臓、大腸、胃、十二指腸、前立腺、腎臓、副腎、子宮、卵巣、心臓が挙げられる。本発明の生着シート状物は、小腸において腹壁に癒着する場合もあるため、本発明の生着シート状物を貼付する臓器は、好ましくは、胃、大腸、十二指腸、および肝臓からなる群より選択される臓器である。

[0038] 本発明の生着シート状物に含まれる細胞は、シート状細胞培養物を形成し、細胞外マトリクスを産生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、軟骨細胞など）および幹細胞（例えば、筋芽細胞、心臓幹細胞などの組織幹細胞、胚性幹細胞、ｉＰＳ（induced pluripotent stem）細胞などの多能性幹細胞、間葉系幹細胞等）などを含む。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。本発明の細胞培養物に含まれる細胞の非限定例としては、例えば、筋芽細胞（例えば、骨

格筋芽細胞など）、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、臍帯血由来のものなど）、心筋細胞、中皮細胞、間質細胞（例えば、線維芽細胞、脂肪由来細胞）、肺胞組織細胞、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、小腸上皮細胞、口腔粘膜上皮細胞、網膜色素上皮細胞、鼻粘膜上皮細胞など）、内皮細胞（例えば、血管内皮細胞など）、肝細胞（例えば、肝実質細胞、肝前駆細胞など）、膵細胞（例えば、膵島細胞、膵臓前駆細胞など）、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、免疫細胞（Ｔ細胞、ＮＫ細胞）、皮膚細胞（例えば、表皮角化細胞）等が挙げられる。ここで、ｉＰＳ細胞は、遺伝子を導入することにより誘導された、分化万能性および自己複製能を有する細胞である。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、軟骨細胞などが挙げられる。本発明の生着シート状物に含まれる細胞は、好ましくは間葉系幹細胞または骨格筋芽細胞であり、さらに好ましくは骨格筋芽細胞である。

[0039] 骨格筋芽細胞は当該技術分野においてよく知られており、骨格筋から任意の既知の方法（例えば、特開２００７－８９４４２号公報記載の方法など）により調製することもできるし、例えば、ロンザジャパン株式会社のカタログ番号：CC-2580、コスモ・バイオ株式会社の商品コード3520など、商業的に入手することもできる。骨格筋芽細胞は、これらに限定されるものではないが、ＣＤ５６、α７インテグリン、ミオシン重鎖ＩＩａ、ミオシン重鎖ＩＩｂ、ミオシン重鎖ＩＩｄ（ＩＩｘ）、ＭｙｏＤ、Ｍｙｆ５、Ｍｙｆ６、ミオゲニン、デスミン、ＰＡＸ３などのマーカーにより同定することができる。一態様において、骨格筋芽細胞はＣＤ５６陽性である。一態様において、骨格筋芽細胞はＣＤ５６陽性およびデスミン陽性である。

[0040] 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。本発明に係る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においてよく知られており、ＴＥ－７（例えば、Rosendaal et al., J Cell Sci. 1994; 107(Pt1): 29-37、Goodpaster et al. J Histochem Cytochem. 2008; 56(4): 347-358など参照）などのマーカーにより同定することができる。

一態様において、本発明の細胞培養物を構成する細胞は、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。

[0041] 本発明の生着シート状物に骨格筋芽細胞を含む場合、生着シート状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するため、好ましくない。したがって一態様において、本発明の細胞培養物の製造において用いられる細胞集団は、ＴＥ－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。

本発明の生着シート状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、かかる細胞は少ないほど好ましい。したがってＣＤ５６陽性率およびＴＥ－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％以上などであり得、好ましくは９０％以上である。

[0042] 一態様において、本発明の生着シート状物は、薬効成分をさらに含む。ここで、薬効成分は、生着シート状物が生着した臓器に対し、臓器が有する異常を処置する任意の成分を意味する。臓器が有する異常とは、これらに限定

されないが、臓器において生じている炎症、臓器において形成された腫瘍、臓器において形成された潰瘍などが含まれ、このような臓器が有する異常を処置する薬効成分として、これらに限定されないが、抗炎症剤、抗菌剤、抗真菌剤、抗ヒスタミン剤、副腎皮質ホルモン、抗がん剤およびこれらのいずれかの組み合わせなどが挙げられる。

本発明の生着シート状物は、細胞外マトリクス層、シート状細胞培養物、生体内分解性ゲル層、および／または薬効成分に加えて、種々の追加成分、例えば、薬学的に許容し得る担体や、生着シート状物の生存性、生着性および／または機能などを高める成分、対象の臓器が有する異常の処置に有用な薬効成分を補助する成分などを含んでいてもよい。かかる追加成分としては、既知の任意のものを使用することができ、当業者はこれらの追加成分について精通している。また、本発明の生着シート状物は、生着シート状物の生存性、生着性および／または機能などを高める成分や、対象の臓器が有する異常の処置に有用な薬効成分を補助する成分などと併用することができる。

[0043] 本発明の別の側面は、基材上に細胞を播種するステップ、播種した細胞をシート化するステップ、および形成されたシート状細胞培養物を基材から剥離するステップを含む生着シート状物を製造するための方法に関する。

[0044] 本発明の生着シート状物に含まれるシート状細胞培養物は、上述のとおり当業者に既知の任意の方法（例えば、特許文献１、特開２０１０－０８１８２９、特開２０１１－１１０３６８など参照）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、基材上に細胞を播種するステップ、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。

[0045] 本発明の生着シート状物の製造方法は、細胞外マトリクス層を形成するステップをさらに含んでもよい。本発明において、細胞外マトリクス層を形成する細胞外マトリクスは、種々の条件によるが、例えば、細胞の播種後、２４時間以上、例えば、２４時間、３０時間、３６時間、４２時間、４８時間、５４時間、６０時間、６６時間、７２時間、培養することによりシート状

細胞培養物に含まれる細胞により産生される。産生された細胞外マトリクスは、例えば、シート状細胞培養物と基材との間で層状に形成される。この場合に、続く形成されたシート状細胞培養物を基材から剥離するステップにおいて、シート状細胞培養物は、好ましくは、形成された細胞外マトリクス層を壊さないように基材から剥離される。形成された細胞外マトリクス層を壊さないように基材からシート状細胞培養物を剥離する方法としては、これに限定されるものではないが、培養に温度応答性材料で被覆された培養皿を使用することが挙げられる。

本発明の生着シート状物の製造方法はまた、生体内分解性ゲル層を形成するステップをさらに含んでもよい。生体内分解性ゲル層の形成は、これに限定されるものではないが、例えばシート状細胞培養物上にフィブリノゲン液を滴下し、その後トロンビン液を噴霧することによりフィブリンゲル層を形成する方法（特許６４９５６０３号公報参照）などが挙げられる。本発明の生着シート状物の製造方法は、薬効成分を加えるステップをさらに含んでもよい。薬効成分を加えるステップは、播種した細胞をシート化するステップの前にあっても、後にあってもよく、または生体内分解性ゲル層を形成するステップの後であってもよい。

[0046] 本発明のさらに別の側面は、生着シート状物の有効量を、生着シート状物の細胞外マトリクス層を有する面を、それを必要とする対象の臓器へ貼付することを含む、生着シート状物の適用により改善される疾患を処置する方法に関する。

本発明において、用語「対象」は、任意の生物個体、好ましくは動物、より好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトの個体を意味する。

[0047] また、用語「処置」は、疾患の治癒、一時的寛解または予防などを目的とする医学的に許容される全ての種類の予防的および／または治療的介入を包含するものとする。例えば、「処置」の用語は、疾患の進行の遅延または停止、病変の退縮または消失、当該疾患発症の予防または再発の防止などを含む、種々の目的の医学的に許容される介入を包含する。

[0048] 本発明において、「有効量」とは、例えば、疾患の発症や再発を抑制し、症状を軽減し、または進行を遅延もしくは停止し得る量（例えば、生着シート状物に含まれる細胞数、生着シート状物に含まれるシート状細胞培養物のサイズ、重量など）であり、好ましくは、当該疾患の発症および再発を予防し、または当該疾患を治癒する量である。また、投与による利益を超える悪影響が生じない量が好ましい。かかる量は、例えば、マウス、ラット、イヌまたはブタなどの実験動物や疾患モデル動物における試験などにより適宜決定することができ、このような試験法は当業者によく知られている。また、処置の対象となる組織病変の大きさは、有効量決定のための重要な指標となり得る。

[0049] 本発明の処置方法は、本発明の製造方法に従って、本発明の生着シート状物を製造するステップをさらに含んでもよい。本発明の処置方法は、生着シート状物を製造するステップの前に、対象から生着シート状物に含まれるシート状細胞培養物を製造するための細胞（ｉＰＳ細胞を用いる場合は、例えば、皮膚細胞、血球等）または細胞の給源となる組織（ｉＰＳ細胞を用いる場合は、例えば、皮膚組織、血液等）を採取するステップをさらに含んでもよい。一態様において、細胞または細胞の給源となる組織を採取する対象は、生着シート状物の貼付を受ける対象と同一の個体である。別の態様において、細胞または細胞の給源となる組織を採取する対象は、生着シート状物の貼付を受ける対象とは同種の別個体である。さらに別の態様において、細胞または細胞の給源となる組織を採取する対象は、生着シート状物の貼付を受ける対象とは異種の個体である。

[0050] 貼付する方法としては、典型的には組織への直接的な貼付が挙げられ、例えば、貼付対象の臓器への直接的な貼付である。本発明の生着シート状物を貼付する方法は、それ以外にも例えば、腹腔鏡下または胸腔鏡下における貼付であってもよい。ここで腹腔鏡下または胸腔鏡下における貼付とは、生着シート状物が、腹腔鏡下手術または胸腔鏡下手術のために用意された器具の通り道（例えば、腹腔鏡用ポート、胸腔鏡用ポートなど）を通って対象の臓

器付近へと送達され、対象の臓器の表面へと貼付されることを指し、このような対象の臓器付近への送達は、送達用デバイスを用いたものであってもよい。送達用デバイスは、例えば、生着シート状物を支持するための支持体と、支持体の一面を保護するための摩擦係数の低い保護部材とを含み、生着シート状物を支持した支持体を保護部材で保護して丸め、筒状体内に挿通することができるようなデバイスであってもよい。

実施例

[0051] 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。

[0052] 例１．シート状細胞培養物の作製

ブタの下肢の横紋筋を全身麻酔下に採取し、採取した組織をコラゲナーゼと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℃、５％CO_2の条件下で、２０％ＦＢＳ含有ＭＣＤＢ１３１培地でコンフルエントになるまで培養し、細胞を回収した。回収した細胞は６０ｍｍの温度応答性培養皿（ＵｐＣｅｌｌ（登録商標）、６ｃｍディッシュ、ＣＳ３００６、株式会社セルシード）に２．２×10^7個播種し、２０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地中で１２時間培養し、シート形成および細胞外マトリクス層の形成を行った。その後２０℃まで温度を下げることで細胞外マトリクス層を有したままシート状細胞培養物を培養皿から剥離して回収した。かかるシート状細胞培養物の細胞外マトリクス層を有する面とは逆側の面に、５００μＬのフィブリノゲン液（ボルヒール（登録商標）組織接着用（帝人ファーマ社）のバイアル１の内容物（フィブリノゲン凍結乾燥粉末）をバイアル２の内容物（フィブリノゲン溶解液）で溶解したもの、フィブリノゲン濃度８０ｍｇ／ｍＬ）を滴下し、次いで、８００μＬのトロンビン液（ボルヒール（登録商標）組織接着用（帝人ファーマ社）のバイアル３の内容物（トロンビン凍結乾燥粉末）をバイアル４の内容物（トロンビン溶解液）で溶解したもの、トロンビン濃度２５０単位／ｍＬ）を噴霧した。フィブリノゲン液の滴下とそれに続くトロンビン液の噴霧における反応により、

シート状細胞培養物の細胞外マトリクス層を有する面とは逆側の面に、フィブリンゲルによる生体内分解性ゲル層を形成し、生着シート状物とした。

[0053] 例２．生着シート状物の臓器への貼付および組織の採取

例１で横紋筋を採取したブタに対し、例１で作製した生着シート状物を全身麻酔下で貼付した。貼付は、胃、大腸、および肝臓の表面に対して生着シート状物の細胞外マトリクス層の面を貼付するように実施された。生着シート状物を貼付したブタを、術後３日目に再度全身麻酔下で開腹し、貼付部位を観察した後、組織を採取した。

[0054] 例３．採取した組織からの組織染色像の観察

採取した組織から、それぞれ組織染色像を得た。胃から得た組織について、ヘマトキシリン・エオジン染色により染色した組織染色像を図１Ａおよび図１Ｂに示す。大腸から得た組織について、ヘマトキシリン・エオジン染色により染色した組織染色像を図２Ａおよび図２Ｂに、抗デスミン抗体を用いた免疫染色により染色した組織染色像を図２Ｃおよび図２Ｄに示す。肝臓から得た組織について、アザン染色により染色した組織染色像を図３Ａおよび図３Ｂに、抗デスミン抗体を用いた免疫染色により染色した組織染色像を図３Ｃおよび図３Ｄに示す。

図１～図３の各組織染色像から、胃、大腸および肝臓において、生着シート状物が貼付対象である臓器に生着しており、臓器と生着シート状物とが組織学的に連続していることが確認された。特に図１Ｂの直線の円で囲っている部分、図３Ｂ、図３Ｃおよび図３Ｄの矢印で示す部分において、臓器と生着シート状物とが組織学的に連続していることが顕著に確認された。