

明 細 書

発明の名称：細胞移植用のフィブリンゲルシート

技術分野

[0001] 本発明は、細胞がフィブリンゲルシートに均一に分散され内包されてなり、かつこれまでになかった大きなサイズを有する細胞移植用のフィブリンゲルシート、ならびにその製造方法に関する。

[0002] [発明の背景]

人工多能性細胞や胚性幹細胞（E S細胞）等の多能性幹細胞から誘導される機能性分化細胞は、移植再生医療の細胞供給源として期待されている。今日では、そのような機能性分化細胞が生分解性ゲル中に内包されてなる各種構造体が開発され、それを利用した細胞移植治療の研究が進められている。

[0003] 例えば、非特許文献1には、フィブリンゲルに内包された膵島細胞を、7 mm×7 mmの大きさのバイクリル（登録商標）メッシュで挟んで形成されたシート状構造体が開示され、当該構造体をレシピエントとなる糖尿病モデルラットの予め血管新生処置が施された部位へ移植したことが記載されている。

[0004] 非特許文献2には、ポリビニルアルコール（PVA）を含むハイドロゲルに内包された膵島細胞を、20 mm×15 mmの大きさのポリエチレンテレフタレート（PET）メッシュで挟んで形成されたシート状構造体が開示され、当該構造体をレシピエントとなる糖尿病モデルラットへ移植したことが記載されている。

[0005] 特許文献1には、PVAを含むハイドロゲルに内包された膵島細胞を、直径15 mmの円形型PETメッシュで挟んで形成されたシート状構造体が開示され、当該構造体をレシピエントとなる糖尿病モデルマウスへ移植したことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：WO 2018／155622

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Hirotake Komatsuら、Transplant International 2020；33：806－818.

非特許文献2：Meirigeng Qiら、Biomaterials. 2004 Dec；25（27）：5885－92.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 一方、従来報告されている機能性分化細胞が生分解性ゲル中に内包されるシート状構造体は、糖尿病モデル動物（ラットやマウス）への移植を目的としたものであり、そのサイズはヒト等の大型の哺乳動物を対象とした場合には十分なサイズとはいえない場合があり、また搭載される細胞数も十分な量とはいえない場合があった。そのため、当該分野においてはヒト等においても利用可能なより大きなサイズを有し、かつより多くの細胞を含む前記構造体の開発が切望されていた。

[0009] 当該課題を解決すべく、本発明者らはフィブリンゲルを用いてより大きなサイズを有する前記構造体の作製を試みたところ、より大きなサイズを作製するために調製されたより大量のフィブリンゲルは、所望のサイズまで広げてシート状に成型しようとした場合、十分に広げる前にゲル化（固化）し、目的とするサイズに成型することは困難であることを見出した。また、当該大量のフィブリンゲルを連続的に注入しながら所望のサイズを有するシート状に成型しようとした場合、溶液中の細胞が沈殿を生じ、連続的注入のはじまりから終わりにかけて細胞の含有量が徐々に減少し、結果的に細胞密度が均一でない前記構造体しか作製できないことが明らかとなった。細胞密度の不均一性は、治療効率の低下や、移植された細胞の長期の生着に影響を及ぼす虞があり、好ましくない。

[0010] そこで本発明は、本発明者らが見出したこれらの課題を解決することを目的とするものであり、従来なかったより大きなサイズを有すると同時に、よ

り多くの細胞が均一に分散され内包されてなるシート状のフィブリンゲル構造体（すなわち、フィブリンゲルシート）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

[0011] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、フィブリンゲルの形成において、フィブリノーゲンとトロンプインの配合量及び／又はゲル化（固化）時の温度を調整することによって、形成されるフィブリンゲルのゲル化（固化）速度を調整することができ、所望のより大きなサイズを有するフィブリンゲルシートへと広げて成形できることを見出した。

[0012] また、フィブリンゲルの形成において、細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液に生分解性粒子を添加、懸濁することによって、または、生分解性ゲル化剤を添加、溶解することによって、当該フィブリノーゲン溶液中にて細胞が沈殿するのを抑制して、細胞が均一に分散して懸濁された状態を維持することができ、これをゲル化（固化）させることにより、連続的注入による成形においても、細胞密度が均一なフィブリンゲルシートが得られることを見出した。

[0013] 本発明は、これらの新規知見に基づくものであり、以下の発明を包含する。

[1] 細胞がフィブリンゲルシートに均一に分散され内包されてなり、一面の表面積が 2.25 cm^2 以上のサイズを有し、 1 mm 以下の厚さを有する、細胞移植用のフィブリンゲルシート。

[2] 細胞が 1.5×10^6 個超/ cm^2 の量で内包される、[1]のフィブリンゲルシート。

[3] 細胞がスフェロイドの形態である、[1]又は[2]のフィブリンゲルシート。

[4] 細胞がiPS細胞由来臍島細胞である、[1]～[3]のいずれかのフィブリンゲルシート。

[5] さらに、生分解性ゲル化剤を含む、[1]～[4]のいずれかのフィブリンゲルシート。

〔６〕 生分解性ゲル化剤を０．２～２ｗ／ｖ％の量で含む、〔５〕のフィブリンゲルシート。

〔７〕 生分解性ゲル化剤がコラーゲンである、〔５〕又は〔６〕のフィブリンゲルシート。

〔８〕 さらに、生分解性粒子を内包する、〔１〕～〔４〕のいずれかのフィブリンゲルシート。

〔９〕 生分解性粒子が目開き１００μｍ～１０００μｍを通過できるサイズである、〔８〕のフィブリンゲルシート。

〔１０〕 生分解性粒子を１０～３０ｗ／ｖ％の量で含む、〔８〕又は〔９〕のフィブリンゲルシート。

〔１１〕 生分解性粒子がゼラチンゲル粒子である、〔８〕～〔１０〕のいずれかのフィブリンゲルシート。

〔１２〕 支持体をさらに備える、〔１〕～〔１１〕のいずれかのフィブリンゲルシート。

〔１３〕 細胞がフィブリンゲルシートに均一に分散され内包されてなり、一面の表面積が２．２５ｃｍ^２以上のサイズを有し、１ｍｍ以下の厚さを有する、細胞移植用のフィブリンゲルシートの製造方法であって、

細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液をトロンビンと作用させて、一面の表面積が２．２５ｃｍ^２以上のサイズを有し、１ｍｍ以下の厚さを有するシート状に成型してゲル化させる工程、を含む、製造方法。

〔１４〕 細胞が、フィブリンゲルシートにおいて１．５×１０^６個超／ｃｍ^２となる量にて、フィブリノーゲン溶液に懸濁される、〔１３〕の製造方法。

〔１５〕 細胞がスフェロイドの形態である、〔１３〕又は〔１４〕の製造方法。

〔１６〕 細胞がｉＰＳ細胞由来臍島細胞である、〔１３〕～〔１５〕のいずれかの製造方法。

〔１７〕 細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液がさらに、生分解性ゲル

化剤を含む、[13]～[16]のいずれかの製造方法。

[18] 細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液が、生分解性ゲル化剤を0.2～2w/v%の量で含む、[17]の製造方法。

[19] 生分解性ゲル化剤がコラーゲンである、[17]又は[18]の製造方法。

[20] 支持体上に塗布することによりシート状に成型する、[17]～[19]のいずれかの製造方法。

[21] バイオプリントにより支持体上に塗布する、[20]の製造方法。

[22] 支持体がトロンビンを含む、[20]又は[21]の製造方法。

[23] 細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液がさらに、生分解性粒子を含む、[13]～[16]のいずれかの製造方法。

[24] 生分解性粒子が目開き100 μ m～1000 μ mを通過できるサイズである、[23]の製造方法。

[25] 細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液が、生分解性粒子を10～30w/v%の量で含む、[23]又は[24]の製造方法。

[26] 生分解性粒子がゼラチンゲル粒子である、[23]～[25]のいずれかの製造方法。

[27] 支持体上に塗布することによりシート状に成型する、[23]～[26]のいずれかの製造方法。

[28] バイオプリントにより支持体上に塗布する、[27]の製造方法。

[29] 支持体がトロンビンを含む、[27]又は[28]の製造方法。

[30] トロンビンを、フィブリノーゲン1mgに対して0.4U以下の配合比となる量にて作用させる、[13]～[16]のいずれかの製造方法。

[31] 2～8℃の冷却下にてシート状に成型する、[30]の製造方法。

[32] さらに、支持体をフィブリンゲルシートと一体化させる工程を含む、[30]又は[31]の製造方法。

[33] [1]～[12]のいずれかのフィブリンゲルシートが複数積層されてなる、細胞移植用のフィブリンゲルシートの積層体。

[1a] 細胞がフィブリンゲルシートに均一に分散され内包されてなり、一面の表面積が 2.25 cm^2 以上のサイズを有し、 1 mm 以下の厚さを有する、細胞移植治療方法において使用されるフィブリンゲルシート。

[2a] 細胞が 1.5×10^6 個超/ cm^2 の量で内包される、[1a]のフィブリンゲルシート。

[3a] 細胞がスフェロイドの形態である、[1a]又は[2a]のフィブリンゲルシート。

[4a] 細胞がiPS細胞由来膵島細胞である、[1a]～[3a]のいずれかのフィブリンゲルシート。

[5a] さらに、生分解性ゲル化剤を含む、[1a]～[4a]のいずれかのフィブリンゲルシート。

[6a] 生分解性ゲル化剤を $0.2 \sim 2\text{ w/v}\%$ の量で含む、[5a]のフィブリンゲルシート。

[7a] 生分解性ゲル化剤がコラーゲンである、[5a]又は[6a]のフィブリンゲルシート。

[8a] さらに、生分解性粒子を内包する、[1a]～[4a]のいずれかのフィブリンゲルシート。

[9a] 生分解性粒子が目開き $100\text{ }\mu\text{m} \sim 1000\text{ }\mu\text{m}$ を通過できるサイズである、[8a]のフィブリンゲルシート。

[10a] 生分解性粒子を $10 \sim 30\text{ w/v}\%$ の量で含む、[8a]又は[9a]のフィブリンゲルシート。

[11a] 生分解性粒子がゼラチンゲル粒子である、[8a]～[10a]のいずれかのフィブリンゲルシート。

[12a] 支持体をさらに備える、[1a]～[10a]のいずれかのフ

ィブリンゲルシート。

[33a] [1a] ~ [12a] のいずれかのフィブリンゲルシートが複数積層されてなる、細胞移植治療方法において使用されるフィブリンゲルシートの積層体。

本明細書は本願の優先権の基礎である2022年7月14日に出願された日本国特許出願2022-113546号の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、従来なかったより大きなサイズを有すると同時に、より多くの細胞が均一に分散され内包されてなるフィブリンゲルシートならびにその製造方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図1は、(A) i P I Cを内包したフィブリンゲル塊、及び(B) i P I Cを内包したフィブリンゲルシートの外観を示す写真図である。スケールバー：10mm。

[図2]図2は、i P I Cを内包したフィブリンゲル塊、又はi P I Cを内包したフィブリンゲルシートが皮下移植されたヌードラットにおける血中ヒトc-ペプチド濃度をE L I S A法により経時的に測定した解析結果を示すグラフ図である。

[図3]図3は、(A) i P I Cを内包したフィブリンゲル塊、又は(B) i P I Cを内包したフィブリンゲルシートが皮下移植されたヌードラットにおける、移植10日後と6週後における移植部位の組織学的解析結果を示す写真図である。スケールバー：1mm。

[図4]図4は、トロンビン濃度とフィブリンゲルのゲル化時間の関係を解析した結果を示すグラフ図である。

[図5]図5は、冷却した金属製の型を使用した方法により製造された、大動物

・ヒトサイズのiPICを内包したフィブリンゲルシートの外観（A）及び、当該シートの1～4の位置を位相差顕微鏡により観察した結果（B）を示す写真図である。

[図6]図6は、（A）フィブリノーゲン溶液および（B）フィブリノーゲン+ゼラチンマイクロスフェア溶液に懸濁し、所定時間静置した後のiPICの状態を示す写真図である。（A）における矢頭は、iPICの沈殿を示す。

[図7]図7は、iPICを内包したフィブリンゲルシート、又はiPICを内包したフィブリン+ゼラチンマイクロスフェアゲルシートが皮下移植されたヌードラットにおける血中ヒトc-ペプチド濃度をELISA法により経時的に測定した解析結果を示すグラフ図である。

[図8]図8は、ピペット注入による手作業と3Dプリンターを用いて作製した大動物・ヒトサイズのiPICを内包したフィブリン+ゼラチンマイクロスフェアゲルシートの外観と断面を示す写真図（A）及び各シートの輝度分布を画像解析し標準偏差を算出した結果（B）、ならびに、3Dプリンターを用いて作製した当該フィブリン+ゼラチンマイクロスフェアゲルシートの任意の4か所（1～4）に含まれる細胞数の測定結果を示すグラフ図（C）である。

[図9]図9は、シリンジから排出されたフィブリノーゲン+コラーゲン溶液中の細胞数（濃度）の計測結果を示すグラフ図である。

[図10]図10は、iPICを内包したフィブリン+ゼラチンマイクロスフェアゲルシート、又はiPICを内包したフィブリン+コラーゲンゲルシートが皮下移植されたヌードラットにおける血中ヒトc-ペプチド濃度をELISA法により測定した解析結果を示すグラフ図である。

[図11]図11は、3Dプリンターを用いて作製した大動物・ヒトサイズのiPICを内包したフィブリン+コラーゲンゲルシートの任意の6か所（1～6）に含まれる細胞数の測定結果を示すグラフ図である。

発明を実施するための形態

[0016] 1. 用語

以下、本明細書において記載される用語について説明する。

- [0017] 本明細書において、「約」とは、基準値に対してプラス又はマイナスそれぞれ25%、20%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%又は1%まで変動する値を示す。好ましくは、「約」という用語は、基準値に対してプラス又はマイナスそれぞれ15%、10%、5%、又は1%の範囲を示す。
- [0018] 本明細書において、「～を含む (comprise(s) 又は comprising)」とは、その語句に続く要素の包含を示すがこれに限定されないことを意味する。したがって、その語句に続く要素の包含は示唆するが、他の任意の要素の除外は示唆しない。
- [0019] 本明細書において、「～からなる (consist(s) of 又は consisting of)」とは、その語句に続くあらゆる要素を包含し、かつ、これに限定されることを意味する。したがって、「～からなる」という語句は、列挙された要素が要求されるか又は必須であり、他の要素は実質的に存在しないことを示す。
- [0020] 本明細書において、「フィーダー細胞を使用」しないとは、基本的にフィーダー細胞を含まないこと、フィーダー細胞を培養することによってプレコンディショニングした培地などを使用しないことを意味する。したがって、培地中にはフィーダー細胞から分泌される成長因子及びサイトカインなどの物質は含まれない。
- [0021] なお、「フィーダー細胞」又は「フィーダー」とは、別の種類の細胞と共培養され、その細胞を支持し、成長することができる環境をもたらす細胞を意味する。フィーダー細胞は、それらが支持する細胞とは同じ種由来であっても、異なる種由来であってもよい。例えば、ヒト細胞のフィーダーとして、ヒト皮膚線維芽細胞又はヒト胚性幹細胞を使用してもよいし、マウス胚線維芽細胞の初代培養物、及び不死化マウス胚線維芽細胞を使用してもよい。フィーダー細胞は、放射線照射又はマイトマイシンC処理などによって不活性化することができる。

- [0022] 本明細書において、「接着」とは、細胞が容器に付着していること、例えば、細胞が適切な培地の存在下で滅菌プラスチック（又はコーティングされたプラスチック）の細胞培養ディッシュ又はフラスコに付着していることを指す。細胞のなかには、細胞培養容器に接着させなければ培養物中で維持できない、あるいは成長しないものもある。これに対し、非接着性細胞は、容器に接着させることなく培養物中で維持され、増殖できる。
- [0023] 本明細書において、「培養」とは、細胞をインビトロ環境において維持し、成長させ、かつ／又は分化させることを指す。「培養する」とは、組織又は体外で、例えば、細胞培養ディッシュ又はフラスコ中で細胞を持続させ、増殖させ、かつ／又は分化させることを意味する。培養には2次元培養（平面培養）や、3次元培養（浮遊培養）が含まれる。
- [0024] 本明細書において、「純化する（purify）」及び「純化すること（purification）」とは、細胞の組成物などの組成物中の不純物を取り除き、特定の構成成分について純粋なものにすることを指し、「純化された（purified）」とは、細胞の組成物を説明するために使用される場合、不純物の量が、純化される前の細胞の組成物におけるそのような構成成分の割合と比較して減少し、特定の構成成分の純度が向上している細胞の組成物を指す。例えば、細胞の組成物を、標的細胞型に関して純化することができ、したがって、標的細胞型の割合は、純化する前の細胞の組成物内に存在する標的細胞の割合と比較して増加する。細胞の組成物は、当技術分野で公知の細胞選択及び選別方法によって、標的細胞型について純化させることもできる。細胞の組成物は、本明細書に記載した特定の選別又は選択プロセスによって純化することもできる。本発明の特定の実施形態では、標的細胞を純化する方法により、標的細胞の純度は、少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%又は99%になるか、不純物（夾雑細胞を含む）は検出できない程度になりうる。
- [0025] 本明細書において、「増殖因子」は特定の細胞の分化及び／又は増殖を促す内因性タンパク質である。「増殖因子」としては、例えば、上皮成長因子

(EGF)、酸性線維芽細胞増殖因子(aFGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、インスリン様増殖因子1(IGF-1)、インスリン様増殖因子2(IGF-2)、ケラチノサイト増殖因子(KGF)、神経増殖因子(NGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、形質転換増殖因子 β (TGF- β)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、トランスフェリン、種々のインターロイキン(例えば、IL-1~IL-18)、種々のコロニー刺激因子(例えば、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF))、種々のインターフェロン(例えば、IFN- γ など)及び幹細胞に対する効果を有する他のサイトカイン、例えば、幹細胞因子(SCF)及びエリスロポエチン(Epo)が挙げられる。

[0026] 本明細書において、「ROCK阻害剤」とは、Rhoキナーゼ(ROCK: Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase)を阻害する物質を意味し、ROCK IとROCK IIのいずれを阻害する物質であってもよい。ROCK阻害剤は、上記の機能を有する限り特に限定されず、例えば、N-(4-ピリジニル)-4 β -[(R)-1-アミノエチル]シクロヘキサノ-1 α -カルボアミド(本明細書中、Y27632と称することもある)、Fasudil(HA1077)、(2S)-2-メチル-1-[(4-メチル-5-イソキノリニル)スルホニル]ヘキサヒドロ-1H-1,4-ジアゼピン(H-1152)、4 β -[(1R)-1-アミノエチル]-N-(4-ピリジル)ベンゼン-1 α -カルボアミド(Wf-536)、N-(1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-4-イル)-4PER[(R)-1-アミノエチル]シクロヘキサノ-1 α -カルボアミド(Y-30141)、N-(3-{[2-(4-アミノ-1,2,5-オキサジアゾール-3-イル)-1-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-6-イル]オキシ}フェニル)-4-{[2-(4-モルホリニル)エチル]-オキシ}ベンズアミド(GSK269962A)、N-(6-フルオロ-1H-インダゾール-5-イル)-6-メチル-2-オキソ-4-[4-(トリフルオロメ

チル) フェニル] - 3, 4-ジヒドロ-1H-ピリジン-5-カルボキサミド (GSK429286A) を挙げることができる。ROCK阻害剤はこれらに限定されるものではなく、ROCKのmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNA、ROCKに結合する抗体、ドミナントネガティブROCK変異体等もROCK阻害剤として使用することができ、商業的に入手可能であるか公知の方法に従って合成することができる。

[0027] 本明細書において、「GSK3 β 阻害剤」とは、GSK3 β (グリコーゲンシンターゼキナーゼ3 β) に対する阻害活性を有する物質である。GSK3 (グリコーゲンシンターゼキナーゼ3) は、セリン/スレオニンプロテインキナーゼの一種であり、グリコーゲンの産生やアポトーシス、幹細胞の維持などにかかわる多くのシグナル経路に参与する。GSK3には α と β の2つのアイソフォームが存在する。本発明で用いられる「GSK3 β 阻害剤」は、GSK3 β 阻害活性を有すれば特に限定されず、GSK3 β 阻害活性と合わせてGSK3 α 阻害活性を併せ持つ物質であってもよい。

[0028] GSK3 β 阻害剤としては、CHIR98014 (2-[[2-[(5-ニトロ-6-アミノピリジン-2-イル) アミノ] エチル] アミノ] -4-(2, 4-ジクロロフェニル) -5-(1H-イミダゾール-1-イル) ピリミジン)、CHIR99021 (6-[[2-[[4-(2, 4-ジクロロフェニル) -5-(4-メチル-1H-イミダゾール-2-イル) -2-ピリミジニル] アミノ] エチル] アミノ] ニコチノニトリル)、TDZD-8 (4-ベンジル-2-メチル-1, 2, 4-チアジアゾリジン-3, 5-ジオン)、SB216763 (3-(2, 4-ジクロロフェニル) -4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン)、TWS-119 (3-[6-(3-アミノフェニル) -7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-4-イルオキシ] フェノール)、ケンパウロン (Kenpaulone)、1-アザケンパウロン (Azakenpaulone)、SB216763 (3-(2, 4-ジクロロフェニル) -4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル) -1H-ピロール-2,

5-ジオン)、SB415286(3-[(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニル)アミノ]-4-(2-ニトロフェニル)-1H-ピロール-2,5-ジオン)及びAR-AO144-18、CT99021、CT20026、BIO、BIO-アセトキシム、ピリドカルバゾール-シクロペンタジエニルルテニウム複合体、OTDZT、アルファ-4-ジブromoアセトフェノン、リチウム等が例示される。GSK3 β 阻害剤はこれらに限定されるものではなく、GSK3 β のmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNA、GSK3 β に結合する抗体、ドミナントネガティブGSK3 β 変異体等もGSK3 β 阻害剤として使用することができ、商業的に入手可能であるか公知の方法に従って合成することができる。

[0029] 本明細書において「血清代替物」とは、例えば、KnockOut™ Serum Replacement (KSR: Thermo Fisher Scientific)、StemSure (登録商標) Serum Replacement (Wako)、B-27サプリメント、N2-サプリメント、アルブミン(例えば、脂質リッチアルブミン)、インスリン、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素(例えば亜鉛、セレン(例えば、亜セレン酸ナトリウム))、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロール又はこれらの混合物(例えば、ITS-G)が挙げられる。血清代替物としては、B-27サプリメント、KSR、StemSure (登録商標) Serum Replacement、ITS-Gが好ましい。培地に血清代替物を添加する場合の培地中の濃度は0.01~10重量%、好ましくは0.1~2重量%である。本発明においては、血清に代えて「血清代替物」を使用することが好ましい。

[0030] 本明細書において、「CDK8/19阻害活性を有する因子」とは、CDK8/19の阻害活性を有するあらゆる物質を意味する。同じCDKファミリーの他のタンパク質とは対照的に、CDK8は、細胞増殖には必要とされず、CDK8の阻害は、通常の条件下では大きな効果はない。CDK19とCDK8は類似しており、CDK8阻害は通常CDK19の阻害も伴う。「

CDK8／19阻害活性を有する因子」は従来公知のものを使用することができ、このようなCDK8／19阻害剤は、特許文献又は非特許文献から見つけることができる。例えば、US2012／0071477、WO2015／159937、WO2015／159938、WO2013／116786、WO2014／0038958、WO2014／134169、JP2015／506376、US2015／0274726、US2016／0000787、WO2016／009076、WO2016／0016951、WO2016／018511、WO2016／100782及びWO2016／182904に記載される化合物のうち、CDK8／19阻害活性を有する化合物又はその塩を、本発明における「CDK8／19阻害活性を有する因子」として利用することができる。例えば、本発明においては、ジエチル（E）－（4－（3－（5－（4－フルオロフェニル）－1－メチル－1H－ピラゾール－4－イル）アクリルアミド）ベンジル）ホスホネート、2－（4－（4－（イソキノリン－4－イル）フェニル）－1H－ピラゾール－1－イル）－N，N－ジメチルアセトアミド、4－（（2－（6－（4－メチルピペラジン－1－カルボニル）ナフタレン－2－イル）エチル）アミノ）キナゾリン－6－カルボニトリル、4－（4－（2，3－ジヒドロベンゾ[b][1，4]ジオキシン－6－イル）－1H－ピラゾール－3－イル）ベンゼン－1，3－ジオール、3－（2－（イミダゾ[1，2-b]ピリダジン－6－イルチオ）エチル）－4－（ナフタレン－1－イルスルホニル）－3，4－ジヒドロキノキサリン－2（1H）－オン、及び（E）－3－（4－（1－シクロプロピル－1H－ピラゾール－4－イル）ピリジン－3－イル）－N－（4－（モルホリノメチル）フェニル）アクリルアミド又はその塩を「CDK8／19阻害活性を有する因子」として利用することができる。CDK8／19阻害活性を有する因子はこれらに限定されるものではなく、CDK8／19のmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNA、CDK8／19に結合する抗体、ドミナントネガティブCDK8／19変異体等もCDK8／19阻害活性を有する因子として使

用することができ、商業的に入手可能であるか公知の方法に従って合成することができる。

[0031] 2. 細胞移植用のフィブリンゲルシート

本発明は、細胞がフィブリンゲルシートに均一に分散され内包されてなる、細胞移植用のフィブリンゲルシート（以下、単に「本発明のフィブリンゲルシート」と記載する場合がある）に関するものである。

[0032] 本発明のフィブリンゲルシートは、従来の細胞移植用のフィブリンゲルシートでは達成し得なかったサイズを有することを特徴とするものであり、シート的一面（すなわち、シートの主表面のいずれかの面、もしくはシートの片面とも称される）の表面積が 2.25 cm^2 以上、好ましくは 4 cm^2 以上、より好ましくは 9 cm^2 以上、さらに好ましくは 16 cm^2 以上、よりさらに好ましくは 25 cm^2 以上、とりわけ好ましくは 36 cm^2 以上、とりわけより好ましくは 49 cm^2 以上、とりわけさらに好ましくは 64 cm^2 以上、とりわけよりさらに好ましくは 81 cm^2 以上、特に好ましくは 100 cm^2 以上であり、その上限は特に限定されず、移植部位の大きさや形状に応じて適宜選択することが可能であるが、例えば 400 cm^2 以下となるサイズを有することができる。

[0033] 本発明のフィブリンゲルシートにおける上記表面積の範囲は前記下限及び上限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、本発明のフィブリンゲルシートの上記表面積は、 2.25 cm^2 以上～ 400 cm^2 以下、好ましくは 4 cm^2 以上～ 400 cm^2 以下、より好ましくは 9 cm^2 以上～ 400 cm^2 以下、さらに好ましくは 16 cm^2 以上～ 400 cm^2 以下、よりさらに好ましくは 25 cm^2 以上～ 400 cm^2 以下、とりわけ好ましくは 36 cm^2 以上～ 400 cm^2 以下、とりわけより好ましくは 49 cm^2 以上～ 400 cm^2 以下、とりわけさらに好ましくは 64 cm^2 以上～ 400 cm^2 以下、とりわけよりさらに好ましくは 81 cm^2 以上～ 400 cm^2 以下、特に好ましくは 100 cm^2 以上～ 400 cm^2 以下の範囲より適宜選択される大きさとすることができる。

- [0034] 本発明のフィブリングルシートの上記一面の形状は、特に限定されず、移植部位の大きさや形状に応じて適宜選択することが可能であり、例えば、多角形（例えば、三角形、四角形、五角形、六角形、八角形等）角丸多角形、円形、楕円形等が挙げられるがこれらに限定はされない。
- [0035] 例えば、本発明のフィブリングルシートが四角形を有する場合、その大きさはタテの長さが、15 mm以上、好ましくは20 mm以上、より好ましくは30 mm以上、さらに好ましくは40 mm以上、よりさらに好ましくは50 mm以上、とりわけ好ましくは60 mm以上、とりわけより好ましくは70 mm以上、とりわけさらに好ましくは80 mm以上、とりわけよりさらに好ましくは90 mm以上、特に好ましくは100 mm以上であり、その上限は特に限定されないが、例えば200 mm以下とすることができる。また、本発明のフィブリングルシートはヨコの長さが、15 mm以上、好ましくは20 mm以上、より好ましくは30 mm以上、さらに好ましくは40 mm以上、よりさらに好ましくは50 mm以上、とりわけ好ましくは60 mm以上、とりわけより好ましくは70 mm以上、とりわけさらに好ましくは80 mm以上、とりわけよりさらに好ましくは90 mm以上、特に好ましくは100 mm以上であり、その上限は特に限定されないが、例えば200 mm以下とすることができる。
- [0036] 当該タテの長さ及びヨコの長さの範囲は前記下限及び上限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、本発明のフィブリングルシートの大きさは（タテの長さ×ヨコの長さ（ヨコの長さ×タテの長さであってもよい））、15 mm以上～200 mm以下×15 mm以上～200 mm以下、好ましくは20 mm以上～200 mm以下×20 mm以上～200 mm以下、より好ましくは30 mm以上～200 mm以下×30 mm以上～200 mm以下、さらに好ましくは40 mm以上～200 mm以下×40 mm以上～200 mm以下、よりさらに好ましくは50 mm以上～200 mm以下×50 mm以上～200 mm以下、とりわけ好ましくは60 mm以上～200 mm以下×60 mm以上～200 mm以下、とりわけより

好ましくは70 mm以上～200 mm以下×70 mm以上～200 mm以下、とりわけさらに好ましくは80 mm以上～200 mm以下×80 mm以上～200 mm以下、とりわけよりさらに好ましくは90 mm以上～200 mm以下×90 mm以上～200 mm以下、特に好ましくは100 mm以上～200 mm以下×100 mm以上～200 mm以下の範囲より適宜選択される大きさとすることができる。例えば、本発明のフィブリンゲルシートの大さは（タテの長さ×ヨコの長さ（ヨコの長さ×タテの長さであってもよい））、15 mm以上×15 mm以上、好ましくは20 mm×20 mm、20 mm×30 mm、もしくは30 mm×30 mm、より好ましくは40 mm×40 mm、40 mm×50 mm、50 mm×50 mm、40 mm×60 mm、もしくは60 mm×60 mm、さらに好ましくは70 mm×70 mm、80 mm×80 mm、90 mm×90 mm、100 mm×100 mm、もしくは200 mm×200 mm等が挙げられるが、これらに限定はされない。

[0037] 本発明のフィブリンゲルシートの厚みは、内包される細胞の大きさや量、移植部位の大きさ等の要因に応じて適宜設定することができるが、好ましくは1 mm以下である。本発明のフィブリンゲルシートの厚みが1 mm以下であることによって、フィブリンゲルシートに内包される細胞への栄養分や酸素の供給等を効率的に行うことができ、また移植後、速やかなフィブリンゲルの分解を達成することができ、好ましい。本発明のフィブリンゲルシートの厚みは、例えば1 mm以下、900 μ m以下、800 μ m以下、700 μ m以下、600 μ m以下、500 μ m以下、又は400 μ m以下とすることができ、その下限は特に限定されないが、例えば100 μ m以上、200 μ m以上、又は300 μ m以上とすることができる。また、本発明のフィブリンゲルシートの厚みの範囲は前記上限及び下限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、本発明のフィブリンゲルシートの厚みは、100 μ m以上～1 mm以下、100 μ m～800 μ m以下、200 μ m～600 μ m以下、又は300 μ m以上～400 μ m以下とすることができ、これらの範囲より適宜選択される厚みとすることができる。

例えば、本発明のフィブリンゲルシートの厚みは約400 μ mである。なお、本発明のフィブリンゲルシートの厚みは、シート全体で均一である必要はなく、最も厚みのあるところでも上記の範囲にあればよい。

[0038] 本明細書において、細胞が「均一に分散され内包」されてなるとは、播種された細胞が本発明のフィブリンゲルシートのいずれかの部位に限局することなく、当該フィブリンゲルシート中に広く分布して含まれることを意味する。細胞は全て、その全体がフィブリンゲルシート中に、包埋されている必要はないが、フィブリンゲルの表面に播種して接着培養された細胞培養物は、フィブリンゲルシートの表面のみに、細胞が限局して存在するものであることから、細胞が「分散され内包」されてなる態様とは異なるものである。より詳細には、本明細書において、細胞が「均一に分散され内包」されてなるとは、本発明のフィブリンゲルシートの任意の複数個所（例えば、2か所、4か所、又は6か所等）における所定の範囲中に含まれる各細胞数（細胞密度）の偏りが小さいことを意味し、好ましくは当該各細胞数の値が、それらの平均値の $\pm 20\%$ 以内、好ましくは $\pm 15\%$ 以内、より好ましくは $\pm 10\%$ 以内の範囲にあることを意味する。また、本明細書において、細胞が「均一に分散され内包」されてなるとは、播種された細胞間についての位置関係を意味するものであり、例えば、フィブリンゲルの表面又は内部に播種された細胞が培養され増殖して、播種された細胞の由来が異なる細胞群が互いに接触／結合している場合は、播種された細胞間で少なくとも細胞が分散されているとはいえないため、細胞が「均一に分散され内包」されている状態に該当しない。このような播種された細胞間で接触／結合している状態としては、例えば、フィブリンゲルの表面／内部に播種・培養して形成された細胞培養物（例えば、細胞シート等）が挙げられ、このような態様は、本発明に含まれることを意図するものではない。一方、このような播種された細胞間で接触／結合している状態でない限り、播種された細胞の形態が、例えば、細胞同士が集合・凝集化した細胞塊または細胞集合体の状態、すなわちスフェロイドの形態であることや、播種された細胞が増殖すること等を、除外

することを意図するものではない。

[0039] 本発明において「細胞」は、細胞治療のためにそれを必要とする患者に移植される細胞であり、患者の症状に応じて適宜選択することができ、例えば、表皮、神経、脳、脊髄、食道、胃、小腸、大腸、膀胱、尿道、肺、甲状腺、脾臓、肝臓、筋肉、骨格、心臓、血管、脾臓、腎臓、血液等（これらに限定はされない）の器官や組織を構成する細胞やその前駆細胞と同等又は類似する機能を有する細胞等が挙げられる。「細胞」は、いずれか単独で用いてもよいし、異なる細胞を組み合わせて用いてもよい。本発明のフィブリンゲルシート中における細胞の形態は特に限定されず、相互に分離された細胞（シングルセルの状態）であってもよいし、細胞同士が集合・凝集化した細胞塊または細胞集合体の状態、すなわちスフェロイドの形態で存在していてもよいし、浮遊培養した細胞であってもよい。スフェロイドの形態の細胞としては、例えば、膵島細胞、肝細胞、心筋細胞等が挙げられるが、これらに限定はされない。

[0040] 本発明において「細胞」は、生体より採取された細胞であってもよいし、培養細胞であってもよく、さらにこれら細胞を凍結融解した細胞であってもよい。好ましくは、本発明において「細胞」は、多能性幹細胞より分化誘導して得られた多能性幹細胞由来の細胞である。

[0041] 本明細書において、「多能性（*pluripotency*）」とは、種々の異なった形態や機能を持つ組織や細胞に分化でき、3胚葉のどの系統の細胞にも分化し得る能力を意味する。「多能性（*pluripotency*）」は、胚盤には分化できず、したがって個体を形成する能力はないという点で、胚盤を含めて、生体のあらゆる組織に分化しうる「全能性（*totipotency*）」とは区別される。

[0042] 本明細書において「多能性（*multipotency*）」とは、複数の限定的な数の系統の細胞へと分化できる能力を意味する。例えば、間葉系幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞は*multipotent*だが、*pluripotent*ではない。

- [0043] 本明細書において、「多能性幹細胞 (pluripotent stem cell)」とは、胚性幹細胞 (ES細胞) 及びこれと同様の分化多能性、すなわち生体の様々な組織 (内胚葉、中胚葉、外胚葉の全て) に分化する能力を潜在的に有する細胞を指す。ES細胞と同様の分化多能性を有する細胞としては、「人工多能性幹細胞」 (本明細書中、「iPS細胞」と称することもある) が挙げられる。好ましくは、本発明において、多能性幹細胞とはヒト多能性幹細胞である。
- [0044] 「ES細胞」としては、マウスES細胞であれば、inGenious社、理化学研究所 (理研) 等が樹立した各種マウスES細胞株が利用可能であり、ヒトES細胞であれば、米国国立衛生研究所 (NIH)、理研、京都大学、Cellartis社が樹立した各種ヒトES細胞株が利用可能である。たとえばES細胞株としては、NIHのCHB-1~CHB-12株、RUES1株、RUES2株、HUES1~HUES28株等、WiCell Research InstituteのH1株、H9株、理研のKhES-1株、KhES-2株、KhES-3株、KhES-4株、KhES-5株、SSES1株、SSES2株、SSES3株等を利用することができる。
- [0045] 「人工多能性幹細胞」とは、哺乳動物体細胞又は未分化幹細胞に、特定の因子 (核初期化因子) を導入して再プログラミングすることにより得られる細胞を指す。現在、「人工多能性幹細胞」にはさまざまなものがあり、山中らにより、マウス線維芽細胞にOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4因子を導入することにより、樹立されたiPS細胞 (Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676) のほか、同様の4因子をヒト線維芽細胞に導入して樹立されたヒト細胞由来のiPS細胞 (Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131: 861-872.)、上記4因子導入後、Nanogの発現を指標として選別し、樹立したNanog-iPS細胞 (Okita, K., Ichisaka, T., an

d Yamanaka, S. (2007). Nature 448, 313-317.)、c-Mycを含まない方法で作製されたiPS細胞(Nakagawa M, Yamanaka S., et al. Nature Biotechnology, (2008) 26, 101-106))、ウイルスフリーで6因子を導入して樹立されたiPS細胞(Okita K et al. Nat. Methods 2011 May; 8 (5): 409-12, Okita K et al. Stem Cells. 31 (3): 458-66.)も用いることができる。また、Thomsonらにより作製されたOCT3/4、SOX2、NANOG及びLIN28の4因子を導入して樹立された人工多能性幹細胞(Yu J., Thomson JA, et al., Science (2007) 318: 1917-1920.)、Daleyらにより作製された人工多能性幹細胞(Park IH, Daley GQ. et al., Nature (2007) 451: 141-146)、桜田らにより作製された人工多能性幹細胞(特開2008-307007号)等も用いることができる。

[0046] このほか、公開されているすべての論文(例えば、Shi Y., Ding S., et al., Cell Stem Cell, (2008) Vol 3, Issue 5, 568-574; Kim JB., Scholer HR., et al., Nature, (2008) 454, 646-650; Huangfu D., Melton, DA., et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, No 7, 795-797)、あるいは特許(例えば、特開2008-307007号、特開2008-283972号、US2008/2336610、US2009/047263、WO2007/069666、WO2008/118220、WO2008/124133、WO2008/151058、WO2009/006930、WO2009/006997、WO2009/007852)に記載されている当該分野で公知の人工多能性幹細胞のいずれも用いることができる。

[0047] 人工多能性細胞株としては、NIH、理化学研究所（理研）、京都大学等が樹立した各種iPS細胞株が利用可能である。例えば、ヒトiPS細胞株であれば、理研のHiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株、京都大学のFf-WJ-18株、Ff-I01s01株、Ff-I01s02株、Ff-I01s04株、Ff-I01s06株、Ff-I14s03株、Ff-I14s04株、QHJ-I01s01株、QHJ-I01s04株、QHJ-I14s03株、QHJ-I14s04株、253G1株、201B7株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株、CDI社のMyCell iPS Cells (21525, 102, 10A) 株、MyCell iPS Cells (21526, 101, 10A) 株、等が挙げられる。

[0048] 本発明において利用可能な多能性幹細胞由来の細胞としては、iPS細胞由来膵島細胞（以下、「iPIC」と記載する場合がある）が挙げられるが、これに限定されるものではない。iPICには、インスリン産生細胞、及び／又は膵β細胞が含まれる。インスリン産生細胞はインスリン及びNK6ホメオボックス1（NKX6, 1）の少なくとも一つのマーカーの発現により特徴付けられる細胞である。膵β細胞はインスリン産生細胞より成熟した細胞であり、MAFA、UCN3、及びIAPPの少なくとも一つのマーカーの発現により特徴付けられる。「マーカー」とは、「マーカータンパク質」、「マーカー遺伝子」など、所定の細胞型により特異的に発現される細胞抗原又はその遺伝子を意味する。好ましくは、マーカーは細胞表面マーカーであり、その場合、生存細胞の濃縮、単離、及び／又は検出が実施可能となる。マーカーは、陽性選択マーカー或いは陰性選択マーカーでありうる。

[0049] マーカータンパク質の検出は、当該マーカータンパク質に特異的な抗体を用いた免疫学的アッセイ（ELISA、免疫染色、フローサイトメトリー等）を利用して行うことができる。マーカー遺伝子の検出は、当該分野で公知の核酸増幅方法及び／又は核酸検出方法（RT-PCR、マイクロアレイ、

バイオチップ等)を利用して行うことができる。例えば、マーカータンパク質が「陽性」であるとは、フローサイトメトリーで陽性と検出されることを意味し、「陰性」とは、フローサイトメトリーで検出限界以下であることを意味する。また、マーカー遺伝子が「陽性」であるとは、R T - P C Rにより検出されることを意味し、「陰性」とはR T - P C Rで検出限界以下であることを意味する。

[0050] 「発現 (e x p r e s s i o n) 」とは、細胞内のプロモーターにより駆動される特定のヌクレオチド配列の転写及び／又は翻訳として定義される。

[0051] i P I Cは、多能性幹細胞から公知の手法 (W O 2 0 0 9 / 0 1 2 4 2 8 , W O 2 0 1 6 / 0 2 1 7 3 4 , S t e m C e l l R e s e a r c h (2 0 1 5) 1 4 , 1 8 5 - 1 9 7)) に準じて分化誘導を行うことにより得ることができる。すなわち、以下の分化誘導工程を利用してi P I Cを得ることができる：

工程1) 多能性幹細胞から胚体内胚葉細胞へと分化誘導する；

工程2) 胚体内胚葉細胞から原腸管細胞へと分化誘導する；

工程3) 原腸管細胞から後方前腸細胞へと分化誘導する；

工程4) 後方前腸細胞から腭前駆細胞へと分化誘導する；

工程5) 腭前駆細胞から内分泌前駆細胞へと分化誘導する；

工程6) 内分泌前駆細胞からi P I Cへと分化誘導する。

以下、各工程を説明するが、各細胞への分化誘導はこれらの手法に限定されない。

[0052] 工程1) 胚体内胚葉細胞への分化

多能性幹細胞は、まず胚体内胚葉細胞に分化させる。多能性幹細胞から胚体内胚葉を誘導する方法は既に公知であり、そのいずれの方法を用いてもよい。好ましくは、多能性幹細胞は、アクチビンAを含む培地、より好ましくはアクチビンA、R O C K阻害剤、G S K 3 β 阻害剤を含む培地で培養して、胚体内胚葉細胞に分化させる。培養開始時の細胞数としては、特に限定されず、22000~150000細胞/cm²、好ましくは22000~10

0000細胞/cm²、より好ましくは22000～80000細胞/cm²である。培養期間は1日～4日、好ましくは1日～3日、特に好ましくは3日である。

[0053] 培養温度は、特に限定されないが、30～40℃（例えば、37℃）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば5%程度である。培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。

[0054] 本工程で用いる培地としては、RPMI 1640培地、MEM培地、iMEM培地、DMEM/F12培地、Improved MEM Zinc Option培地、Improved MEM/1%B-27/Penisilin Streptomycin培地、MCDB131/20mM Glucose/NaHCO₃/FAF-BSA/ITS-X/GlutamaxTM/アスコルビン酸/Penisilin Streptomycin培地など、哺乳類細胞の培養に使用される基本培地を使用することができる。

[0055] アクチビンAの培地中の濃度は、通常30～200ng/mL、好ましくは50～150ng/mL、より好ましくは70～120ng/mL、特に好ましくは約100ng/mLである。

[0056] 別の態様として、アクチビンAは培地中に低用量にて、例えば、5～100ng/mL、好ましくは5～50ng/mL、より好ましくは5～10ng/mLの量にて含めることができる。

[0057] さらに別の態様として、アクチビンAの培地中の濃度は、約0.1～100ng/mL、好ましくは約1～50ng/mL、より好ましくは約3～10ng/mLである。

[0058] GSK3β阻害剤の培地中の濃度は、用いるGSK3β阻害剤の種類によって適宜設定され、例えばGSK3β阻害剤としてCHIR99021を使用する場合の濃度は、通常2～5μM、好ましくは2～4μM、特に好ましくは約3μMである。

[0059] ROCK阻害剤の培地中の濃度は、用いるROCK阻害剤の種類によって

適宜設定され、例えばROCK阻害剤としてY27632を使用する場合の濃度は、通常5～20 μM 、好ましくは5～15 μM 、特に好ましくは約10 μM である。

[0060] 培地にはさらに、インスリンを添加することができる。インスリンは培地中に0.01～20 μM 、好ましくは0.1～10 μM 、より好ましくは0.5～5 μM の量で含めることができる。培地中のインスリンの濃度は、添加したB-27サプリメントに含まれるインスリンの濃度であってもよいが、これに限定されない。

[0061] 特定の態様では、アクチビンA、ROCK阻害剤、GSK3 β 阻害剤を含む培地で1日培養した後、アクチビンAのみを含む培地で1日毎に培地を交換しながらさらに2日培養する。あるいは、低用量のアクチビンAの存在下、多能性幹細胞を、インスリンを0.01～20 μM 含む培地中で第1の培養を行い、続いて、インスリンを含まない培地中で第2の培養を行うことにより製造することができる。

[0062] 工程2) 原腸管細胞への分化

工程1) で得られた胚体内胚葉細胞を、さらに増殖因子を含む培地で培養して原腸管細胞に分化誘導する。培養期間は2日～8日、好ましくは約4日である。

[0063] 培養温度は、特に限定されないが、30～40℃（例えば、37℃）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば5%程度である。培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。

[0064] 培地は、工程1) と同様に、哺乳類細胞の培養に用いられる基本培地を用いることができる。培地には、増殖因子のほか、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。

[0065] 増殖因子としては、EGF、KGF、FGF10が好ましく、EGF及び／又はKGFがより好ましく、KGFがさらに好ましい。

[0066] 増殖因子の培地中の濃度は、用いる増殖因子の種類によって適宜設定されるが、通常約0.1 nM～1000 μM 、好ましくは約0.1 nM～100

μM である。EGFの場合、その濃度は、約 $5\sim 2000\text{ ng/mL}$ （すなわち、約 $0.8\sim 320\text{ nM}$ ）、好ましくは約 $5\sim 1000\text{ ng/mL}$ （すなわち、約 $0.8\sim 160\text{ nM}$ ）、より好ましくは約 $10\sim 1000\text{ ng/mL}$ （すなわち、約 $1.6\sim 160\text{ nM}$ ）である。FGF10の場合、その濃度は、約 $5\sim 2000\text{ ng/mL}$ （すなわち、約 $0.3\sim 116\text{ nM}$ ）、好ましくは約 $10\sim 1000\text{ ng/mL}$ （すなわち、約 $0.6\sim 58\text{ nM}$ ）である。例えば増殖因子としてKGFを使用する場合の濃度は、通常 $5\sim 150\text{ ng/mL}$ 、好ましくは $30\sim 100\text{ ng/mL}$ 、特に好ましくは約 50 ng/mL である。

[0067] 工程3) 後方前腸細胞への分化

工程2) で得られた原腸管細胞を、さらに増殖因子、シクロパミン、ノギン等を含む培地で培養し、後方前腸細胞に分化誘導する。培養期間は1日～5日、好ましくは約2日程度である。培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。

[0068] 培養温度は、特に限定されないが、 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ （例えば、 37°C ）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば5%程度である。

[0069] 培地は、工程1) と同様に、哺乳類細胞の培養に用いられる基本培地を用いることができる。培地には、増殖因子のほか、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。

[0070] 増殖因子としては、EGF、KGF、FGF10が好ましく、EGF及び／又はKGFがより好ましく、KGFがさらに好ましい。

[0071] 増殖因子の培地中の濃度は、用いる増殖因子の種類によって適宜設定されるが、通常約 $0.1\text{ nM}\sim 1000\text{ }\mu\text{M}$ 、好ましくは約 $0.1\text{ nM}\sim 100\text{ }\mu\text{M}$ である。EGFの場合、その濃度は、約 $5\sim 2000\text{ ng/mL}$ （すなわち、約 $0.8\sim 320\text{ nM}$ ）、好ましくは約 $5\sim 1000\text{ ng/mL}$ （すなわち、約 $0.8\sim 160\text{ nM}$ ）、より好ましくは約 $10\sim 1000\text{ ng/mL}$ （すなわち、約 $1.6\sim 160\text{ nM}$ ）である。FGF10の場合、その濃度は、約 $5\sim 2000\text{ ng/mL}$ （すなわち、約 $0.3\sim 116\text{ nM}$ ）、

好ましくは約 $10 \sim 1000 \text{ ng/mL}$ （すなわち、約 $0.6 \sim 58 \text{ nM}$ ）である。例えば増殖因子としてKGFを使用する場合の濃度は、通常 $5 \sim 150 \text{ ng/mL}$ 、好ましくは $30 \sim 100 \text{ ng/mL}$ 、特に好ましくは約 50 ng/mL である。

[0072] シクロパミンの培地中の濃度は、特に限定するものではないが、通常 $0.5 \sim 1.5 \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.3 \sim 1.0 \mu\text{M}$ 、特に好ましくは約 $0.5 \mu\text{M}$ である。

[0073] ノギンの培地中の濃度は、特に限定するものではないが、通常 $10 \sim 200 \text{ ng/mL}$ 、好ましくは $50 \sim 150 \text{ ng/mL}$ 、特に好ましくは約 100 ng/mL である。

[0074] 工程4) 臍前駆細胞への分化

工程3) で得られた後方前腸細胞を、さらにCDK8/19阻害活性を有する因子を含む培地、好ましくはCDK8/19阻害活性を有する因子と増殖因子を含む培地で培養し、臍前駆細胞に分化誘導する。培養期間は2日～10日、好ましくは約5日程度である。培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。

[0075] 2次元培養の場合には、既報（Toyoda et al., Stem Cell Research (2015) 14, 185-197）に従い、工程3) で得られた後方前腸細胞を 0.25% トリプシン-EDTA溶液で処理し、ピペティングにより当該液中に分散させて細胞分散液を得、得られた分散液を遠心分離に付し、回収した細胞を少量の新たな培地に再懸濁し、その細胞懸濁液を工程4) の新しい培地に再播種する。

[0076] 培地は、工程1) と同様に、哺乳類細胞の培養に用いられる基本培地を用いることができる。培地には、増殖因子のほか、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。

[0077] CDK8/19阻害活性を有する因子としては、前述した各種化合物又はその塩を用いることができ、用いる化合物又はその塩に応じて、培地への添加量は適宜決定されるが、通常約 $0.00001 \mu\text{M} \sim 5 \mu\text{M}$ 、好ましくは

0.00001 μ M $\sim$ 1 μ Mである。CDK8/19阻害活性を有する因子の培地中の濃度としては、CDK8/19に対して50%以上の阻害活性に達する濃度が好ましい。

[0078] 増殖因子としては、EGF、KGF、FGF10が好ましく、KGF及び／又はEGFがより好ましく、KGF及びEGFがさらに好ましい。

[0079] 増殖因子の培地中の濃度は、用いる増殖因子の種類によって適宜設定されるが、通常約0.1 nM $\sim$ 1000 μ M、好ましくは約0.1 nM $\sim$ 100 μ Mである。EGFの場合、その濃度は、約5 $\sim$ 2000 ng/mL（すなわち、約0.8 $\sim$ 320 nM）、好ましくは約5 $\sim$ 1000 ng/mL（すなわち、約0.8 $\sim$ 160 nM）、より好ましくは約10 $\sim$ 1000 ng/mL（すなわち、約1.6 $\sim$ 160 nM）である。FGF10の場合、その濃度は、約5 $\sim$ 2000 ng/mL（すなわち、約0.3 $\sim$ 116 nM）、好ましくは約10 $\sim$ 1000 ng/mL（すなわち、約0.6 $\sim$ 58 nM）である。例えば増殖因子としてKGF及びEGFを使用する場合の濃度は、EGFは通常通常5 $\sim$ 150 ng/mL、好ましくは30 $\sim$ 100 ng/mL、特に好ましくは約50 ng/mL、KGFは通常10 $\sim$ 200 ng/mL、好ましくは50 $\sim$ 150 ng/mL、特に好ましくは約100 ng/mLである。

[0080] 工程4)における培養の最初の1日はROCK阻害剤の存在下で行い、以後はROCK阻害剤を含まない培地で培養してもよい。

[0081] また、培地にはプロテインキナーゼC（PKC）活性化剤を含めても良い。PKC活性化剤としては、PDBu（PKC activator II）、TPB（PKC activator V）などを使用するが、その限りでない。PKC活性化剤の濃度は約0.1 $\sim$ 100 ng/mL、好ましくは約1 $\sim$ 50 ng/mL、より好ましくは約3 $\sim$ 10 ng/mLで添加する。

[0082] また、培地にはジメチルスルホキシド、及び／又はアクチビン（1 $\sim$ 50 ng/mL）を添加してもよい。

- [0083] いずれの工程においても、培地には、上記した成分のほか、血清代替物（例えば、B-27サプリメント、ITS-G）を添加してもよい。また、必要に応じて、アミノ酸、L-グルタミン、GlutaMAX（製品名）、非必須アミノ酸、ビタミン、ニコチンアミド、抗生物質（例えば、Antibiotic-Antimycotic、ペニシリン、ストレプトマイシン、又はこれらの混合物）、抗菌剤（例えば、アンホテリシンB）、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類等を添加してもよい。培地に抗生物質を添加する場合には、その培地中の濃度は通常0.01～20重量%、好ましくは0.1～10重量%である。培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。
- [0084] また細胞培養は、2次元培養の場合は、フィーダー細胞を使用せず、接着培養にて行う。培養時には、ディッシュ、フラスコ、マイクロプレート、OptiCell（製品名）（Nunc社）等の細胞培養シートなどの培養容器が使用される。培養容器は、細胞との接着性（親水性）を向上させるための表面処理や、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ラミニン、フィブロネクチン、マトリゲル（例：BDマトリゲル（日本ベクトン・デッキンソン社））、ビトロネクチンなどの細胞接着用基質でコーティングされていることが好ましい。培養容器としては、I型コラーゲン、マトリゲル、フィブロネクチン、ビトロネクチン又はポリ-D-リジンなどでコートされた培養容器が好ましく、マトリゲル又はポリ-D-リジンでコートされた培養容器がより好ましい。
- [0085] 培養温度は、特に限定されないが、30～40℃（例えば、37℃）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば5%程度である。
- [0086] 工程4）で得られた膵前駆細胞は公知の表面マーカーである糖タンパク質2（GP2）などを利用して、さらに純化することができる。上記純化は自体公知の方法、例えば、抗GP2抗体を固定化したビーズを用いて行うことができる。
- [0087] 工程5）内分泌前駆細胞への分化

工程４）で得られた膵前駆細胞を、さらに増殖因子を含む培地で培養して内分泌前駆細胞に分化誘導する。培養は２次元培養及び３次元培養のいずれで行ってもよい。２次元培養の場合には、工程４）で得られた膵前駆細胞を、０．２５％トリプシン－ＥＤＴＡ溶液で処理し、ピペッティングすることにより当該液中に分散させて細胞分散液を得、得られた分散液を遠心分離に付し、回収した細胞を少量の新たな培地に再懸濁し、その細胞懸濁液を工程５）の新しい培地に再播種する。培養期間は２日～３日、好ましくは約２日である。

[0088] 培地は、工程１）と同様に、哺乳類細胞の培養に用いられる基本培地を用いることができる。培地には、既報（Nature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133）に従い、SANT1、レチノイン酸、ALK5インヒビター１１、T3、LDNを添加し、さらに、Wnt阻害薬、ROCK阻害剤、FGF（好ましくはFGF2）、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。

[0089] 培養は、フィーダー細胞を使用せず、非接着培養にて行う。培養時には、ディッシュ、フラスコ、マイクロプレート、多孔プレート（Nunc社）等あるいはバイオリアクターが使用される。培養容器は、細胞との接着性を低下させるための表面処理されていることが好ましい。

[0090] 培養温度は、特に限定されないが、３０～４０℃（例えば、３７℃）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば５％程度である。

[0091] 工程５）で得られた内分泌前駆細胞は公知の表面マーカーである糖タンパク質２（GP2）などを利用して、さらに純化することができる。上記純化は自体公知の方法、例えば、抗GP2抗体を固定化したビーズを用いて行うことができる。

[0092] 工程６）iPICへの分化

工程５）で得られた内分泌前駆細胞を、さらに増殖因子を含む培地で培養してiPICに分化誘導する。培養期間は１０日～３０日、好ましくは約１０～２０日である。

- [0093] 培地は、工程1)と同様に、哺乳類細胞の培養に用いられる基本培地を用いることができる。培地には、既報 (Nature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133) に従い、ALK5インヒビター11、T3、LDN、 γ -secretase阻害剤XX、 γ -secretase阻害剤RO、N-システイン、AXLインヒビター、アスコルビン酸を添加し、さらに、Wnt阻害薬、ROCK阻害剤、FGF (好ましくはFGF2)、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。例えば、培地にはALK5インヒビター11、T3、LDN、 γ -secretase阻害剤RO、及びアスコルビン酸を添加してもよく、あるいはT3、ALK5インヒビター11、 $ZnSO_4$ 、ヘパリン、N-アセチルシステイン、Trolox、及びR428を添加してもよい。
- [0094] 培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。培養は、フィーダー細胞を使用しない。3次元培養の場合、非接着培養にて行う。培養時には、ディッシュ、フラスコ、マイクロプレート、多孔プレート (Nunc社) 等あるいはバイオリアクターが使用される。培養容器は、細胞との接着性を低下させるための表面処理されていることが好ましい。
- [0095] 培養温度は、特に限定されないが、30~40℃ (例えば、37℃) で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば5%程度である。
- [0096] 本発明のフィブリンゲルシートは、従来の細胞移植用のフィブリンゲルシートでは達成し得なかったより多くの細胞数 (高い密度の細胞数) を有することを特徴とするものであり、細胞を1cm²あたり、 1.5×10^6 個超、好ましくは 2×10^6 個以上、より好ましくは 2.5×10^6 個以上、さらに好ましくは 3×10^6 個以上、よりさらに好ましくは 4.5×10^6 個以上、とりわけ好ましくは 5×10^6 個以上の量で含み、その上限は特に限定されないが、例えば、 10×10^6 個以下、好ましくは 7×10^6 個以下とすることができる。本発明のフィブリンゲルシートに内包される細胞数の範囲は前記下限及び上限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、本発明のフィブリンゲルシートには細胞を、 1.5×10^6 個超~10

$\times 10^6$ 個以下/ cm^2 、好ましくは 2×10^6 個以上 $\sim 10 \times 10^6$ 個以下/ cm^2 、より好ましくは 2.5×10^6 個以上 $\sim 10 \times 10^6$ 個以下/ cm^2 、さらに好ましくは 3×10^6 個以上 $\sim 10 \times 10^6$ 個以下/ cm^2 、よりさらに好ましくは 4.5×10^6 個以上 $\sim 10 \times 10^6$ 個以下/ cm^2 、とりわけ好ましくは 5×10^6 個以上 $\sim 10 \times 10^6$ 個以下/ cm^2 の範囲より適宜選択される量にて含めることができる。

[0097] 上述のiPICは通常、 $100\mu\text{m} \sim 200\mu\text{m}$ 程度の大きさを有する細胞塊の状態で存在するが、本発明のフィブリンゲルシートにはiPICを細胞塊の個数にして 1cm^2 あたり、3000個超、好ましくは4000個以上、より好ましくは5000個以上、さらに好ましくは6000個以上、よりさらに好ましくは9000個以上、とりわけ好ましくは10000個以上の量で含み、その上限は特に限定されないが、例えば、20000個以下、好ましくは14000個以下とすることができる。本発明のフィブリンゲルシートに内包されるiPIC（細胞塊）の個数の範囲は前記下限及び上限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、本発明のフィブリンゲルシートにはiPIC（細胞塊）を、3000個超 ~ 20000 個以下/ cm^2 、好ましくは4000個以上 ~ 20000 個以下/ cm^2 、より好ましくは5000個以上 ~ 20000 個以下/ cm^2 、さらに好ましくは6000個以上 ~ 20000 個以下/ cm^2 、よりさらに好ましくは9000個以上 ~ 20000 個以下/ cm^2 、とりわけ好ましくは10000個以上 ~ 20000 個以下/ cm^2 の範囲より適宜選択される量にて含めることができる。

[0098] 本発明のフィブリンゲルシートにおいて、フィブリンゲルは適当な溶媒（例えば、水、生理食塩水等）中にてフィブリノーゲンとトロンビンとを作用させることによって形成されたものである。フィブリンゲルの形成に用いられるフィブリノーゲン及びトロンビンの量及び両者の混合方法は、下記に詳述する本発明のフィブリンゲルシートの製造方法に基づいて、適宜決定することができる。

- [0099] 一態様において、本発明のフィブリンゲルシートはさらに、粒子状の形態を有する生分解性材料（以下、「生分解性粒子」と記載する場合がある）を内包する。
- [0100] 本発明において「生分解性粒子」は、下記に詳述する本発明のフィブリンゲルシートの製造方法において、細胞と共にフィブリノーゲン溶液中に添加、懸濁され、当該溶液中にて細胞の沈殿を抑制し分散を維持するものであり、これにより最終的に得られるフィブリンゲルシートにおいて、細胞が分散され内包されることを可能とする。
- [0101] 「生分解性粒子」を構成する生分解性材料としては、生体内で加水分解等により分解可能な物質であればよく、特に限定されるものではないが、例えば、ポリ乳酸（PLA）、ポリカプロラクトン（PCL）、ポリウレタン（PU）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリエステル、ポリグリコール酸（PGA）、ポリ乳酸-ε-グリコール酸（PLGA）、ポリ（3-ヒドロキシブチレート-ε-ヒドロキシバリレート）（PHBV）、ポリ（エチレン-ε-ビニルアセテート）（PEVA）ポリアクリルアミド、ポリエチレンオキシド、ポリエチレンアミン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリ（N-ビニルピロリドン）、ポリビニルアルコール、ポリフマル酸プロピレン、ポリアクリル酸、ポリε-カプロラクトン、ポリメタクリル酸、ポリビニリデンジフルオライド（PVDF）、ペクチン酸、ヒアルロン酸、ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、ヘパリン、キチン、キトサン、キサンタン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルキトサン、アルギン酸、アルギン酸エステル、コラーゲン、セルロース、シルクフィブロイン、ケラチン、ゼラチン、フィブリン、プルラン、ラミニン、ゲラン、シリコン、ウレタン、エラスチン等及びそれらの修飾体、ならびにそれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、生分解性粒子は、ゼラチン、コラーゲン、ヒアルロン酸、カルボキシメチルセルロース、PLA、PGA、PLGA等及びそれらの修飾体、ならびにそれらの組み合わせからな群より選択されるゲル状の生分

解性材料より構成される。

- [0102] 「生分解性粒子」の形態は、前記溶液中にて細胞の沈殿を抑制し分散を維持することが可能な形態であればよく、ブロック状、ビーズ状、ペレット状、シート状、ゲル状等の任意の形態を有することができ、中実又は多孔性とすることができる。「生分解性粒子」の形態としては、好ましくは立体形状であり、例えば、球体、四面体、六面体等の多面体、円柱、角柱、円錐、円錐台、角錐、角錐台、トーラス体、円盤体、楕円体それらの変形立体等が挙げられるが、これらに限定はされない。
- [0103] 「生分解性粒子」のサイズは、前記溶液中にて細胞の沈殿を抑制し分散を維持することができ、かつ本発明のフィブリンゲルシートの形成を妨げないサイズであればよく、目開き $100\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$ 、好ましくは $100\mu\text{m}\sim 800\mu\text{m}$ 、より好ましくは $150\mu\text{m}\sim 400\mu\text{m}$ 、さらに好ましくは $200\mu\text{m}$ を通過できる程度のサイズとすることができる。
- [0104] 本発明の一態様において、生分解性粒子はゼラチンゲルであり、目開き $200\mu\text{m}$ を通過できる球体の形状を有する。
- [0105] 本発明のフィブリンゲルシートに含まれる生分解性粒子の量は、前記フィブリノーゲン溶液中にて細胞の沈殿を抑制し分散を維持することができ、かつ本発明のフィブリンゲルシートの形成を妨げない量であればよく、例えば、前記フィブリノーゲン溶液中に生分解性粒子を $10\sim 30\text{w}/\text{v}\%$ 、好ましくは $15\sim 25\text{w}/\text{v}\%$ 、より好ましくは $18\sim 22\text{w}/\text{v}\%$ 、さらに好ましくは $20\text{w}/\text{v}\%$ の量で含むことができる。
- [0106] なお、本発明のフィブリンゲルシート中、生分解性粒子はその形態及び形状が維持されていてもよいし、あるいは、その一部又は全体がフィブリンゲルと一体化していてもよい。
- [0107] また別の態様において、本発明のフィブリンゲルシートはさらに、生分解性ゲル化剤を含む。
- [0108] 本発明において「生分解性ゲル化剤」は、下記に詳述する本発明のフィブリンゲルシートの製造方法において、細胞と共にフィブリノーゲン溶液中に

添加して溶解し、当該溶液に粘性を付与して、当該溶液中細胞の沈殿を抑制し分散の維持を可能とするものであり、これにより最終的に得られるフィブリンゲルシートにおいて、細胞が分散され内包されることを可能とする。

[0109] 「生分解性ゲル化剤」としては、生体内で加水分解等により分解可能な物質であるとともに、前記溶液に細胞の沈殿を抑制し分散を維持することが可能な粘度を付与することができ、かつ本発明のフィブリンゲルシートの形成を妨げないものであればよく、特に限定されるものではないが、例えば、前出の生分解性材料を用いることができる（ただし、フィブリンは除く）。好ましくは、生分解性ゲル化剤は、コラーゲン、ヒアルロン酸、ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸、セルロース、シルクフィブロイン、ケラチン、ゼラチン、デキストラン、PEG等及びそれらの修飾体、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される生分解性材料を用いることができる。

[0110] 本発明のフィブリンゲルシートに含まれる生分解性ゲル化剤の量は、前記フィブリノーゲン溶液中にて細胞の沈殿を抑制し分散を維持することができ、かつ本発明のフィブリンゲルシートの形成を妨げない量であればよく、例えば、前記フィブリノーゲン溶液中に生分解性ゲル化剤を0.2～2 w/v %、好ましくは0.4～1.5 w/v %、より好ましくは0.5～1 w/v %、さらに好ましくは0.75 w/v %の量で含むことができる。

[0111] また、本発明のフィブリンゲルシートはさらに、支持体を備えることができる。支持体は、本発明のフィブリンゲルシートの製造時及び／又は使用時において当該フィブリンゲルシートを支持するとともに、当該フィブリンゲルシートの操作性の向上に寄与し得る。支持体は、前出の生分解性材料や非生分解性材料、例えばポリエステル（PEs）、ポリプロピレン（PP）、ポリエチレン（PE）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ナイロン、シルク（これらに限定はされない）からなり、本発明のフィブリンゲルシートを支持することが可能な任意の形状（例えば、シート状、メッシュ状、プレート状、織布状、不織布状

等)を有する。支持体は、本発明のフィブリンゲルシートの表面に接着されていてもよいし、あるいはその一部又は全体が、本発明のフィブリンゲルシート中に固定されていてもよい。

[0112] 本発明の一態様において、本発明のフィブリンゲルシートは、ポリエステル、又はポリ乳酸- α -グリコール酸からなるメッシュ状の形状を有する支持体を備える。

[0113] 本発明のフィブリンゲルシートは、複数の当該フィブリンゲルシートが積層された積層体の形態で提供されてもよい。積層体は、各フィブリンゲルシートが全て同じ細胞を内包するものであってもよいし、一部又は全てが異なる細胞をそれぞれ内包するフィブリンゲルシートの組み合わせからなるものであってもよい。

[0114] 3. 本発明のフィブリンゲルシートの製造方法

本発明はまた、前記本発明のフィブリンゲルシートの製造方法（以下、「本発明方法」と記載する場合がある）に関するものであり、当該方法は、細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液をトロンビンと作用させて、一面の表面積が 2.25 cm^2 以上のサイズを有し、 1 mm 以下の厚さを有するシート状に成型・ゲル化（固化）させる工程を含む。フィブリンゲルは、適当な溶媒（例えば、水、生理食塩水等）中にてフィブリノーゲンとトロンビンと合わせ、ゲル化（固化）させることにより得ることができる。

[0115] フィブリノーゲン溶液中には細胞が均一分散して懸濁されており、その細胞量は成型された後のフィブリンゲルシートに基づいて決定することができ、すなわちフィブリンゲルシート 1 cm^2 あたり、 1.5×10^6 個超、好ましくは 2×10^6 個以上、より好ましくは 2.5×10^6 個以上、さらに好ましくは 3×10^6 個以上、よりさらに好ましくは 4.5×10^6 個以上、とりわけ好ましくは 5×10^6 個以上となる量にて、その上限は特に限定されないが、例えば、 10×10^6 個以下、好ましくは 7×10^6 個以下となる量にて懸濁することができる。フィブリノーゲン溶液中に懸濁される細胞数の範囲は前記下限及び上限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことがで

き、例えば、フィブリノーゲン溶液中には細胞を、フィブリンゲルシートにおいて1. 5×10^6 個超～ 10×10^6 個以下/ cm^2 、好ましくは 2×10^6 個以上～ 10×10^6 個以下/ cm^2 、より好ましくは2. 5×10^6 個以上～ 10×10^6 個以下/ cm^2 、さらに好ましくは 3×10^6 個以上～ 10×10^6 個以下/ cm^2 、よりさらに好ましくは4. 5×10^6 個以上～ 10×10^6 個以下/ cm^2 、とりわけ好ましくは 5×10^6 個以上～ 10×10^6 個以下/ cm^2 となる範囲より適宜選択される量にて懸濁することができる。

[0116] 本発明方法の一実施形態において、細胞がiPICである場合には、フィブリノーゲン溶液には、iPICを細胞塊の個数にしてフィブリンゲルシート1 cm^2 あたり、3000個超、好ましくは4000個以上、より好ましくは5000個以上、さらに好ましくは6000個以上、よりさらに好ましくは9000個以上、とりわけ好ましくは10000個以上となる量にて、その上限は特に限定されないが、例えば、20000個以下、好ましくは14000個以下となる量にて懸濁することができる。フィブリノーゲン溶液中に懸濁されるiPIC（細胞塊）の個数の範囲は前記下限及び上限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、フィブリノーゲン溶液中にはiPIC（細胞塊）を、フィブリンゲルシートにおいて3000個超～20000個以下/ cm^2 、好ましくは4000個以上～20000個以下/ cm^2 、より好ましくは5000個以上～20000個以下/ cm^2 、さらに好ましくは6000個以上～20000個以下/ cm^2 、よりさらに好ましくは9000個以上～20000個以下/ cm^2 、とりわけ好ましくは10000個以上～20000個以下/ cm^2 となる範囲より適宜選択される量にて懸濁することができる。

[0117] フィブリンゲルシートへの成型は、シートの一面（すなわち、シートの主表面いずれかの面、もしくはシートの片面とも称される）の表面積が2. 25 cm^2 以上、好ましくは4 cm^2 以上、より好ましくは9 cm^2 以上、さらに好ましくは16 cm^2 以上、よりさらに好ましくは25 cm^2 以上、とりわけ好ましくは36 cm^2 以上、とりわけより好ましくは49 cm^2 以上、とりわけさら

に好ましくは 64 cm^2 以上、とりわけよりさらに好ましくは 81 cm^2 以上、特に好ましくは 100 cm^2 以上であり、その上限は特に限定されず、移植部位の大きさや形状に応じて適宜選択することが可能であるが、例えば 400 cm^2 以下となるサイズとすることができる。

[0118] 成型により得られるフィブリングルシートにおける上記表面積の範囲は前記下限及び上限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、成型により得られるフィブリングルシートの上記表面積は、 2.25 cm^2 以上 $\sim 400\text{ cm}^2$ 以下、好ましくは 4 cm^2 以上 $\sim 400\text{ cm}^2$ 以下、より好ましくは 9 cm^2 以上 $\sim 400\text{ cm}^2$ 以下、さらに好ましくは 16 cm^2 以上 $\sim 400\text{ cm}^2$ 以下、よりさらに好ましくは 25 cm^2 以上 $\sim 400\text{ cm}^2$ 以下、とりわけ好ましくは 36 cm^2 以上 $\sim 400\text{ cm}^2$ 以下、とりわけより好ましくは 49 cm^2 以上 $\sim 400\text{ cm}^2$ 以下、とりわけさらに好ましくは 64 cm^2 以上 $\sim 400\text{ cm}^2$ 以下、とりわけよりさらに好ましくは 81 cm^2 以上 $\sim 400\text{ cm}^2$ 以下、特に好ましくは 100 cm^2 以上 $\sim 400\text{ cm}^2$ 以下の範囲より適宜選択される大きさとすることができる。

[0119] 成型により得られるフィブリングルシートの上記一面の形状は、特に限定されず、移植部位の大きさや形状に応じて適宜選択することが可能であり、例えば、多角形（例えば、三角形、四角形、五角形、六角形、八角形等）角丸多角形、円形、楕円形等が挙げられるがこれらに限定はされない。

[0120] 成型により得られるフィブリングルシートが四角形を有する場合、タテの長さが、 15 mm 以上、好ましくは 20 mm 以上、より好ましくは 30 mm 以上、さらに好ましくは 40 mm 以上、よりさらに好ましくは 50 mm 以上、とりわけ好ましくは 60 mm 以上、とりわけより好ましくは 70 mm 以上、とりわけさらに好ましくは 80 mm 以上、とりわけよりさらに好ましくは 90 mm 以上、特に好ましくは 100 mm 以上であり、その上限は特に限定されないが、例えば 200 mm 以下とすることができ、また、ヨコの長さが、 15 mm 以上、好ましくは 20 mm 以上、より好ましくは 30 mm 以上、さらに好ましくは 40 mm 以上、よりさらに好ましくは 50 mm 以上、とり

わけ好ましくは60 mm以上、とりわけより好ましくは70 mm以上、とりわけさらに好ましくは80 mm以上、とりわけよりさらに好ましくは90 mm以上、特に好ましくは100 mm以上であり、その上限は特に限定されないが、例えば200 mm以下とすることができる。

[0121] 当該タテの長さ及びヨコの長さの範囲は前記下限及び上限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、成型により得られるフィブリングルシートの大きさは（タテの長さ×ヨコの長さ（ヨコの長さ×タテの長さであってもよい））、15 mm以上～200 mm以下×15 mm以上～200 mm以下、好ましくは20 mm以上～200 mm以下×20 mm以上～200 mm以下、より好ましくは30 mm以上～200 mm以下×30 mm以上～200 mm以下、さらに好ましくは40 mm以上～200 mm以下×40 mm以上～200 mm以下、よりさらに好ましくは50 mm以上～200 mm以下×50 mm以上～200 mm以下、とりわけ好ましくは60 mm以上～200 mm以下×60 mm以上～200 mm以下、とりわけより好ましくは70 mm以上～200 mm以下×70 mm以上～200 mm以下、とりわけさらに好ましくは80 mm以上～200 mm以下×80 mm以上～200 mm以下、とりわけよりさらに好ましくは90 mm以上～200 mm以下×90 mm以上～200 mm以下、特に好ましくは100 mm以上～200 mm以下×100 mm以上～200 mm以下の範囲より適宜選択される大きさとすることができる。例えば、成型により得られるフィブリングルシートの大きさは（タテの長さ×ヨコの長さ（ヨコの長さ×タテの長さであってもよい））、15 mm以上×15 mm以上、好ましくは20 mm×20 mm、20 mm×30 mm、もしくは30 mm×30 mm、より好ましくは40 mm×40 mm、40 mm×50 mm、50 mm×50 mm、40 mm×60 mm、もしくは60 mm×60 mm、さらに好ましくは70 mm×70 mm、80 mm×80 mm、90 mm×90 mm、100 mm×100 mm、もしくは200 mm×200 mm等が挙げられるが、これらに限定はされない。

- [0122] 成型により得られるフィブリンゲルシートの厚みは、内包される細胞の大きさや量、移植部位の大きさ等の要因に応じて適宜設定することができるが、好ましくは1 mm以下である。成型により得られるフィブリンゲルシートの厚みが1 mm以下であることによって、フィブリンゲルシートに内包される細胞への栄養分や酸素の供給等を効率的に行うことができ、また移植後、速やかなフィブリンゲルの分解を達成することができ、好ましい。成型により得られるフィブリンゲルシートの厚みは、例えば1 mm以下、900 μ m以下、800 μ m以下、700 μ m以下、600 μ m以下、500 μ m以下、又は400 μ m以下とすることができ、その下限は特に限定されないが、例えば100 μ m以上、200 μ m以上、又は300 μ m以上とすることができ、また、成型により得られるフィブリンゲルシートの厚みの範囲は前記上限及び下限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、成型により得られるフィブリンゲルシートの厚みは、100 μ m以上～1 mm以下、100 μ m～800 μ m以下、200 μ m～600 μ m以下、又は300 μ m以上～400 μ m以下とすることができ、これらの範囲より適宜選択される厚みとすることができ、例えば、成型により得られるフィブリンゲルシートの厚みは約400 μ mとすることができ、なお、成型により得られるフィブリンゲルシートの厚みは、シート全体で均一である必要はなく、最も厚みのあるところでも上記の範囲にあればよい。
- [0123] 本発明方法の一態様においては、フィブリノーゲンとトロンビンの配合量及び／又は成型時の温度を調整することによって、形成されるフィブリンゲルのゲル化（固化）速度を調整し、所望のサイズを有するフィブリンゲルシートへと広げて成形することを可能とするものである。
- [0124] 本態様においてフィブリノーゲン溶液は、フィブリノーゲンを5～150 mg/mL、好ましくは10～80 mg/mL、より好ましくは20 mg/mLの量で含み、トロンピンはフィブリノーゲン1 mgに対して0.4 U以下、好ましくは0.3 U以下もしくは0.25 U以下、より好ましくは0.2 U以下もしくは0.15 U以下、さらに好ましくは0.1 U以下もしくは

0.08 U以下であり、その下限は特に限定されないが0.04 U以上の配合比となる量にて作用させる。フィブリノーゲン及び／又はトロンビンの配合量が、上記範囲よりも多い場合には、ゲル化（固化）が速くすすみ、所望のサイズを有するシート状に広げて成型することが困難又はできない場合がある。一方、フィブリノーゲン及び／又はトロンビンの配合量が、上記範囲よりも少ない場合には、十分にゲル化（固化）せず、所望のサイズを有するシート状に成型することが困難又はできない場合がある。トロンピンは任意の形態でフィブリノーゲンに作用させることができ、フィブリノーゲン溶液に直接添加してもよいし、あるいはあらかじめ適当な溶媒（例えば、水、生理食塩水等）に溶解してトロンピン溶液とした後に、フィブリノーゲン溶液と混合してもよい。

[0125] トロンピンと作用させたフィブリノーゲン溶液を、所望のサイズと厚みを有するシート状に成型する手段は、任意の手段を用いることができ、例えば、ポリマーシートの製造分野において従来公知の任意の成形手段（例えば、型枠成形、押出成形、カレンダー成形インフレーション成形等）の一又は複数の組み合わせにより行うことができ、好ましくは型枠成形により行う。本態様においては、トロンピンと作用させたフィブリノーゲン溶液を、所望のサイズと厚みを有するシート状に押し広げて成形することを可能とするものであり、型枠成形、すなわち、所望のサイズと厚みを有するシート型枠に当該フィブリノーゲン溶液を注入し、必要に応じてヘラ、コテ等を利用して押し広げて成形することを容易に実施することができる。

[0126] トロンピンと作用させたフィブリノーゲン溶液の成型は冷却下にて行う。当該フィブリンゲル溶液を冷却下に置くことにより、ゲル化（固化）の速度を抑えて、所望のサイズと厚みを有するシート状への成型、より詳細には、シート状に広げて成型することを可能とする。冷却の温度は、当該フィブリンゲル溶液を所望のサイズと厚みを有するシート状に成型することを可能とする温度であればよく、特に限定されないが、例えば、2～8℃、好ましくは2～6℃、より好ましくは4℃である。冷却は、当該フィブリンゲル溶液

を冷却できればよく、当該フィブリンゲル溶液を冷却してもよいし、あるいは当該フィブリンゲル溶液が接する成型手段（例えば、型枠等）を冷却してもよい。

[0127] 必要に応じて、成型されたフィブリンゲル溶液がゲル化（固化）する前に、上述の支持体をフィブリンゲルシートと一体化させてもよい。当該支持体は、当該フィブリンゲル溶液の表面に接着させてもよいし、あるいはその一部又は全体を当該フィブリンゲル溶液中に浸漬させてもよい。これをゲル化（固化）させることにより、当該支持体を一体化させて備えるフィブリンゲルシートを得ることができる。

[0128] 本発明方法の別の態様においては、細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液にさらに、「生分解性粒子」を添加、懸濁することによって、または、「生分解性ゲル化剤」を添加、溶解することによって、当該フィブリノーゲン溶液中にて細胞が沈殿するのを抑制し、当該フィブリノーゲン溶液中にて細胞が均一に分散して懸濁された状態を維持し、細胞が分散され内包されてなるフィブリンゲルシートの製造を可能とする。

[0129] 「生分解性粒子」は、上記定義のものを用いることができ、細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液中にて細胞の沈殿を抑制し分散を維持することができ、かつ本発明のフィブリンゲルシートの形成を妨げない量で添加、懸濁することができ、例えば、細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液に生分解性粒子を10～30w/v%、好ましくは15～25w/v%、より好ましくは18～22w/v%、さらに好ましくは20w/v%の量で添加、懸濁する。本態様の一実施形態において、生分解性粒子はゼラチンゲル粒子であり、目開き200μmを通過できる球体の形状を有し、細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液に20w/v%の量で添加、懸濁する。

[0130] 「生分解性ゲル化剤」は、上記定義のものを用いることができ、細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液中にて細胞の沈殿を抑制し分散を維持することができ、かつ本発明のフィブリンゲルシートの形成を妨げない量で添加、溶解することができ、例えば、細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液に生

分解性ゲル化剤を0.2～2 w/v%、好ましくは0.4～1.5 w/v%、より好ましくは0.5～1 w/v%、さらに好ましくは0.75 w/v%の量で添加、溶解する。本態様の一実施形態において、生分解性ゲル化剤はコラーゲンであり、細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液に0.75 w/v%の量で添加、溶解する。

[0131] 本態様においてフィブリノーゲン溶液は、フィブリノーゲンを5～150 mg/mL、好ましくは20～100 mg/mL、より好ましくは80 mg/mLの量で含む。トロンピンはフィブリノーゲン溶液がゲル化（固化）するのに十分な量で作用させればよく、例えば、フィブリノーゲン1 mgに対して0.5～5 U、好ましくは1～4 U、より好ましくは1.5～3.5 Uとなる量にて作用させる。トロンピンは任意の形態でフィブリノーゲンに作用させることができ、フィブリノーゲン溶液に直接添加することによって、あらかじめ適当な溶媒（例えば、水、生理食塩水等）に溶解してトロンピン溶液とした後に、フィブリノーゲン溶液に添加することによって、下記に詳述する「基材」にトロンピンを含ませることによって、あるいはそれらの複数の組み合わせによって作用させることができる。基材がトロンピンを含む場合には、基材にフィブリノーゲン溶液を塗布することによって、フィブリノーゲンとトロンピンと合わせることができる。

[0132] 細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液を、所望のサイズと厚みを有するシート状に成型する手段は、任意の手段を用いることができ、例えば、当該フィブリンゲル溶液の適当な基材への塗布、ポリマーシートの製造分野において従来公知の任意の成形手段（例えば、型枠成形、押出成形、カレンダー成形インフレーション成形等）の一又は複数の組み合わせにより行うことができ、好ましくは適当な基材への塗布により行う。本態様においては、懸濁された細胞の均一な分散を維持することを可能とするものであり、細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液を一度に注入する場合だけでなく、連続的に注入する（注入開始から終了までを時間をかけて行う）場合においても、細胞が均一に分散したシート状に成形することを容易に実施することができる。

[0133] 「基材」はその表面にてシートを形成することを可能とする平面を有するものであればよく、特に限定されるものではないが、好ましくは上述の支持体を基材として利用することができる。基材への細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液の塗布は任意の手段により行うことができ、例えば、注入、ヘラ、コテ、スプレー、バイオプリンタ（２Ｄもしくは３Ｄプリンタ）等の一又は複数を用いて、手動により及び／又は機械を用いて行うことができ、好ましくはバイオプリンタを用いて機械的に行う。

[0134] 本発明に方法により製造された本発明のフィブリンゲルシートは、細胞培養用培地、例えばダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI 1640培地、MEM培地、CMRL培地等（これらに限定はされない）や緩衝液、例えばリン酸緩衝生理食塩水（PBS）、ハンクス平衡塩溶液（HBSS）等（これらに限定はされない）や等張液、例えば生理食塩水等（これらに限定はされない）中にて使用まで保存することができる。

[0135] ４．本発明のフィブリンゲルシートの用途

本発明のフィブリンゲルシートは、分散され内包される上述の細胞に応じて、例えば、表皮、神経、脳、脊髄、食道、胃、小腸、大腸、膀胱、尿道、肺、甲状腺、膵臓、肝臓、筋肉、骨格、心臓、血管、脾臓、腎臓、血液等（これらに限定はされない）の器官や組織を構成する細胞やその前駆細胞と同等又は類似する機能を有し、それら器官や組織の機能を増強又は維持するために、あるいは、疾患や障害等の原因により低減又は消失したそれら器官や組織の機能を補助又は補充するための細胞治療方法において利用することができる、それを必要とする患者に移植するために用いられる。

[0136] 本発明の一実施形態として、本発明のフィブリンゲルシートが多能性幹細胞由来のiPSCを含む場合、本発明のフィブリンゲルシートはiPSCの分泌するインスリンやグルカゴンの働きにより移植された患者における血糖値（グルコース）のレベルを改善及び／又は維持することができ、血糖値を正常値にコントロールすることができる。したがって、iPSCを含む本発明のフィブリンゲルシートは、血糖値のレベルを改善及び／又は維持するこ

とが必要とされる疾患、障害、又は症状を治療又は予防するために用いることができる。このような疾患、障害、又は症状としては、糖尿病（1型糖尿病、2型糖尿病）、空腹時及び食後グルコースレベルの変調、低血糖症（例えば、糖尿病患者におけるインスリン投与による低血糖症）等が挙げられるが、これらに限定はされない。なお、「治療」とは、疾患、障害、又は症状の治療、治癒、防止もしくは、寛解の改善、又は、疾患、障害、又は症状の進行速度の低減を意味する。また、「予防」とは、疾患、障害、又は症状の発症の可能性、危険性を低下させる、又は疾患、障害、又は症状の発症を遅らせることを意味する。

[0137] 本発明のフィブリンゲルシートの移植対象は、細胞治療のためにそれを必要とする患者であり、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒト等の哺乳動物（これらに限定はされない）が挙げられ、好ましくは大型の哺乳動物であり、特に好ましくはヒトである。

[0138] 本発明のフィブリンゲルシートは、移植されるとフィブリンゲルが速やかに分解され、内包される細胞はホストの組織と速やかに接することができ、酸素、栄養等を受けることができる。このため、本発明のフィブリンゲルシートは、血管が乏しい組織（例えば皮下等）へ移植することも可能であり、また、移植に際して事前の血管新生処置は行わなくてもよく、必須ではない。

[0139] 本発明のフィブリンゲルシートは、患者の症状や移植部位の大きさに応じて、一又は複数のシートを移植することが可能であり、また、本発明のフィブリンゲルシートはその厚みの薄さから、必要に応じて、複数のシートを積層して移植してもよい。

[0140] 以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例

[0141] ・ i P I C の製造

i P I Cは、上記工程1) - 6)、既報 (Stem Cell Research (2015) 14、185-197; Nature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133) に従い、ヒト i P S細胞 (F f - I 1 4 - s 0 4株) から分化誘導して調製した。

[0142] すなわち、ヒト i P S細胞より分化誘導して調製した腭前駆細胞を分化因子 (SANT1、レチノイン酸、T3、LDN、Wnt阻害薬、ROCK阻害剤、FGF2) と共に、ALK5 i l l (10 μ M) を含む分化誘導培地 (Improved MEM/1%B-27/Penisilin Streptomycin培地) で2日間培養して内分泌前駆細胞に分化誘導した。

[0143] 次いで、分化因子 (T3、LDN、 γ -secretase阻害剤RO、FGF受容体1阻害剤PD-166866) と共に、ALK5 i l l (10 μ M) 含む分化誘導培地 (Improved MEM/1%B-27/Penisilin Streptomycin培地) で7日間培養後、T3、LDN、 γ -secretase阻害剤RO、N-アセチルシステイン、AXL阻害剤R428、アスコルビン酸、ROCK阻害剤、ZnSO₄、ヘパリン、Troloxと共に、ALK5 i l l (10 μ M) を含む分化誘導培地 (MCDB131/20mM Glucose/NaHCO₃/FAF-BSA/ITS-X/Glutamax/Penisilin Streptomycin培地) で4日間培養してi P I Cに分化誘導した。

[0144] 得られたi P I Cは、500個程度の細胞が凝集した凝集塊 (スフェロイド) (直径約150 μ m) の形態を有した。

[0145] 実施例1 移植形状の評価

<方法>

・フィブリンゲル塊の作製

i P I C 3 x 10⁶ cells (凝集塊にして約6000個) を1.5 mLチューブに分取し遠心分離した後、培地上清を除去し、フィブリノーゲン溶液 (80 mg/mL) 25 μ Lを添加し懸濁した。さらにトロンビン溶液

(125 U/mL) 25 μ L を添加し5分間静置しゲル化させ、iPIC を内包したフィブリンゲル塊(直径約5 mm)を作製した。

[0146] ・フィブリンゲルシートの作製

iPIC 3 × 10⁶ cells を1.5 mL チューブに分取し遠心分離した後、培地上清を除去し、フィブリノーゲン溶液(80 mg/mL) 25 μ L を添加し懸濁した。トロンビン溶液(125 U/mL) 12.5 μ L を含侵させたポリエステル製メッシュ(開口率69%、10 × 10 mm)の上にiPIC を懸濁したフィブリノーゲン溶液を薄く塗布した後、トロンビン溶液25 μ L を全体に塗布し5分間静置しゲル化させ、iPIC を内包した薄層のフィブリンゲルシートを作製した。

[0147] ・In vivo 評価

麻酔下にてヌードラットの皮下に、iPIC を内包したフィブリンゲル塊、iPIC を内包したフィブリンゲルシートを移植した。移植後、尾静脈より採血し血漿を分取し、ELISA 法にてヒトc-ペプチド濃度を測定した。

[0148] <結果>

図1にフィブリンゲル塊とフィブリンゲルシートの外観を示す。いずれもiPIC がゲル内に保持されており、細胞の漏出は認められなかった。

[0149] 図2に、iPIC を内包したフィブリンゲル塊、又はiPIC を内包したフィブリンゲルシートが皮下に移植されたヌードラットの血中ヒトc-ペプチド濃度の経時的測定結果を、また、図3に移植10日後と6週間における各移植部位の組織学的解析結果を示す。

[0150] 図2の結果は、血中ヒトc-ペプチド濃度は、iPIC を内包したフィブリンゲルを塊状で移植するよりもシート状で移植した方が高い値を示した。

[0151] また、図3に示す移植10日後の組織学的解析結果から、塊状では周辺部分のフィブリンゲルのみが分解され、その部分のiPIC は宿主組織と接しているが、大部分のフィブリンゲルは残存しており、宿主組織と接していないiPIC がその中に認められた。一方、シート状ではほぼすべてのフ

ィブリンゲルが速やかに分解されており移植された i P I C がホスト組織と接していた。

[0152] 移植6週間後では、塊状で移植してもすべてのゲルが分解されていたが、血中ヒトc-ペプチド濃度はシート状で移植した方が高い値を示した。従って、生分解性素材のゲルを用いた場合であっても、移植初期に速やかにゲルが分解され、移植細胞がホストと接し酸素、栄養等が供給されることが移植細胞の生存には重要であり、その後の長期的な薬効にも影響することが示唆され、薄層のシート状で移植することの有用性が示された。

[0153] 実施例2 大動物・ヒトサイズフィブリンゲルシートの作製（製造方法1 __ 冷却した金属製の型を使用した方法）

<方法>

・ゲル化時間の評価

フィブリノーゲン溶液（40 mg/mL）とトロンビン溶液（31 U/mL, 15.6 U/mL, 10.4 U/mL, 5.2 U/mL, 3.1 U/mL）を調製し、1.5 mL チューブ内でそれぞれ440 μL ずつ合わせ、1～2回ピペッティングして混合した後、ゲル化の状態を以下の基準で評価して、トロンビン濃度とゲル化時間の関係を解析した。

[0154] ゲル化状態の評価基準：

○：チューブ内でピペッティング操作が可能

△：ピペッティング操作が可能であるが、部分的にゲル化している

×：全体的にゲル化して、ピペッティング操作を行うことができない

[0155] ・大動物・ヒトサイズフィブリンゲルシートの作製

i P I C 4.5×10^6 cells を1.5 mL チューブに分取し遠心分離した後、培地上清を除去し、フィブリノーゲン溶液（40 mg/mL）360 μL を添加し懸濁した。その後、トロンビン溶液（15.6 U/mL）360 μL を添加し懸濁した後、予め4℃に冷却した金属製の型（40×60×0.4 mm）に素早く広げ、さらにポリエステル製メッシュ（開口率69%、サイズ40×10 mm）をのせ、室温で6分間静置しゲル化させた。

[0156] ＜結果＞

トロンビン濃度とゲル化時間の関係を解析した結果、トロンビン濃度が低下するに従って、ゲル化時間が遅延し、15.6 U/mL以下の濃度であれば、40×60×0.4 mmの大きさのフィブリンゲルシートを成型するのに必要な時間が確保できることが示された（図4）。

[0157] フィブリノーゲン溶液（40 mg/mL）とトロンビン溶液（15.6 U/mL）を冷却した金属製の型に素早く広げることによって、大動物・ヒトに利用可能な40×60×0.4 mmのサイズのフィブリンゲルシートを作製することができた（図5）。さらに、得られたフィブリンゲルシートを位相差顕微鏡にて確認した結果、内包したiPICがいずれの位置においても均一に分散していることが確認できた（図5（B）においてiPICは黒色の粒状に観察される）。

[0158] 実施例3 大動物・ヒトサイズフィブリンゲルシートの作製（製造方法2－1__フィブリン＋ゼラチンマイクロスフェアゲルシート）

＜方法＞

・細胞分散性保持の確認

ゼラチンを2 w/v%となるように生理食塩水を用いて溶解し、4℃冷蔵庫内にて冷却しゲル化させた後、ゼラチンゲルを目開き200 μmのメッシュに通すことにより、約200 μmのゼラチンゲルのマイクロスフェア（以下、「ゼラチンマイクロスフェア」と記載する）を作製した。ゼラチンマイクロスフェアを20 w/v%となるようにフィブリノーゲン溶液（40 mg/mL）に懸濁し、フィブリノーゲン＋ゼラチンマイクロスフェア溶液を調製した。iPICをフィブリノーゲン溶液（40 mg/mL）およびフィブリノーゲン＋ゼラチンマイクロスフェア溶液に懸濁したのち静置し、沈殿の形成の有無により、細胞の分散状態の保持を評価した。

[0159] ・in vivo試験

iPIC 3×10⁶ cellsを1.5 mLチューブに分取し遠心分離した後、培地上清を除去し、上記のとおり調製したフィブリノーゲン＋ゼラチ

ンマイクロスフェア溶液 $25 \mu\text{L}$ を添加し懸濁した。トロンビン溶液 (62.5 U/mL) $12.5 \mu\text{L}$ を含侵させたポリエステル製メッシュ (開口率 69% 、サイズ $10 \times 10 \text{ mm}$) の上に iPIC を懸濁したフィブリノーゲン+ゼラチンマイクロスフェア溶液を薄く塗布した後、トロンビン溶液 $25 \mu\text{L}$ を全体に塗布し5分間静置してゲル化させ、 iPIC を内包した薄層のフィブリン+ゼラチンマイクロスフェアゲルシートを作製した。

[0160] 麻酔下にてヌードラットの皮下に、実施例1に記載の iPIC を内包したフィブリンゲルシート、および上記 iPIC を内包したフィブリン+ゼラチンマイクロスフェアゲルシートを移植した。移植後、尾静脈より採血し血漿を分取し、 ELISA 法にてヒト c-ペプチド 濃度を測定した。

[0161] ・大動物・ヒトサイズの作製

iPIC $75 \times 10^6 \text{ cells}$ を 15 mL チューブに分取し遠心分離した後、培地上清を除去し、フィブリノーゲン+ゼラチンマイクロスフェア溶液 $600 \mu\text{L}$ を添加し懸濁した。トロンビン溶液 (62.5 U/mL) $300 \mu\text{L}$ を含侵させたポリエステル製メッシュ (開口率 69% 、サイズ $40 \times 60 \text{ mm}$) 及びグリコール酸/乳酸ポリエステル ($90/10$ 、ポリ(グリコリド- ϵ - CL -ラクチド)、サイズ $40 \times 60 \text{ mm}$) メッシュの上に iPIC を懸濁したフィブリノーゲン+ゼラチンマイクロスフェア溶液をピペット又は3Dプリンターを用いてそれぞれ薄く塗布した後、トロンビン溶液 $600 \mu\text{L}$ を全体に塗布し5分間静置しゲル化させ、 iPIC を内包した薄層のフィブリン+ゼラチンマイクロスフェアゲルシートを作製した。

[0162] <結果>

図6にフィブリノーゲン溶液およびフィブリノーゲン+ゼラチンマイクロスフェア溶液に懸濁し静置した iPIC の状態を示す。フィブリノーゲン溶液 (図6 (A)) では静置10分後には iPIC の沈殿が認められた (矢頭)。一方、フィブリノーゲン+ゼラチンマイクロスフェア溶液 (図6 (B)) では静置30分後でも iPIC の分散状態が維持されていた。

[0163] また、製造された iPIC を内包した薄層のフィブリン+ゼラチンマイク

ロスフェアゲルシートにおいて、iPICはゲルシート内に保持されており、細胞の漏出は認められなかった。

[0164] 図7に、iPICを内包したフィブリンゲルシート、又はiPICを内包したフィブリン+ゼラチンマイクロロスフェアゲルシートが皮下に移植されたヌードラットの血中ヒトc-ペプチド濃度の経時的測定結果を示す。当該フィブリンゲルシートとフィブリン+ゼラチンマイクロロスフェアゲルシートで血中ヒトc-ペプチド量に有意差は認められず、シート中にゼラチンマイクロロスフェアを用いても、iPICのヒトc-ペプチド分泌に負の影響を与えないことが示された。

[0165] 図8にピペット注入による手作業と3Dプリンターを用いて作製した大動物・ヒトサイズのiPICを内包したフィブリン+ゼラチンマイクロロスフェアゲルシートを示す。いずれの方法でも大動物・ヒトサイズの当該フィブリン+ゼラチンマイクロロスフェアゲルシートを作製することが可能であり、iPICがゲル内に保持され細胞の漏出は認められなかった（図8（A））。

[0166] ピペット注入による手作業と3Dプリンターを用いて作製した大動物・ヒトサイズのiPICを内包したフィブリン+ゼラチンマイクロロスフェアゲルシートの輝度分布を画像解析し標準偏差を算出した結果、それぞれ19.437と15.630であった（図8（B））。この結果は、3Dプリンターを用いて作製した方が、より均一にフィブリン+ゼラチンマイクロロスフェアゲルを塗布できることが示された。さらに、3Dプリンターを用いて作製した当該フィブリン+ゼラチンマイクロロスフェアゲルシートにおける任意の4か所を直径12mmの円形にくり抜き、そこに内包される細胞数を測定したところ、ほぼ同程度の細胞数であることが確認された（図8（C））。この結果は、3Dプリンターを用いることにより、均一に細胞が分布して内包されるフィブリン+ゼラチンマイクロロスフェアゲルシートを作製可能であることが示された。

[0167] 実施例4 大動物・ヒトサイズフィブリンゲルシートの作製（製造方法2-2__フィブリン+コラーゲンゲルシート）

<方法>

・細胞分散性保持の確認

フィブリノーゲン溶液（80 mg/mL）とコラーゲン溶液（3 w/v %）を3 : 1の比率で混合し、フィブリノーゲン+コラーゲン溶液を調製した。iPICをフィブリノーゲン+コラーゲン溶液中に懸濁した後、シリンジ内に充填した。シリンジを、筒先を下にして垂直に保持し、静置0、10、20、30分後に排出液の一定量を分取し細胞数（濃度）を計測することによって、フィブリノーゲン+コラーゲン溶液の細胞分散性保持機能を評価した。

[0168] ・in vivo試験

フィブリノーゲン溶液（80 mg/mL）とコラーゲン溶液（3 w/v %）を3 : 1の比率で混合し、フィブリノーゲン+コラーゲン溶液を調製した。iPIC 3×10^6 cellsを1.5 mLチューブに分取し遠心分離した後、培地上清を除去し、フィブリノーゲン+コラーゲン溶液25 μ Lを添加し懸濁した。トロンビン溶液（125 U/mL）12.5 μ Lを含侵させたグリコール酸/乳酸ポリエステル（90/10、ポリ（グリコリド- ϵ - κ -ラクチド））メッシュの上にiPICを懸濁したフィブリノーゲン+コラーゲン溶液を薄く塗布した後、トロンビン溶液25 μ Lを全体に塗布し5分間静置しゲル化させ、iPICを内包した薄層のフィブリン+コラーゲンゲルシートを作製した。

[0169] 麻酔下にてヌードラットの皮下に、実施例3の「in vivo試験」に記載のiPICを内包したフィブリン+ゼラチンマイクロスフェアゲルシート、および上記iPICを内包したフィブリン+コラーゲンゲルシートを移植した。移植後、尾静脈より採血し血漿を分取し、ELISA法にてヒト α -ペプチド濃度を測定した。

[0170] ・大動物・ヒトサイズの作製

iPIC 7.5×10^6 cellsを15 mLチューブに分取し遠心分離した後、培地上清を除去し、フィブリノーゲン+コラーゲン溶液600 μ Lを

添加し懸濁した。トロンビン溶液（ 125 U/mL ） $300\text{ }\mu\text{L}$ を含浸させたポリ（グリコリド- α - L -ラクチド）、サイズ $40\times 60\text{ mm}$ ）メッシュの上にiPICを懸濁したフィブリノーゲン+コラーゲン溶液を3Dプリンターを用いて薄く塗布した後、トロンビン溶液 $600\text{ }\mu\text{L}$ を全体に塗布し5分間静置しゲル化させ、iPICを内包した薄層のフィブリン+コラーゲンゲルシートを作製した。

[0171] <結果>

図9にシリンジから排出されたフィブリノーゲン+コラーゲン溶液中の細胞数（濃度）の計測結果を示した。排出液中の細胞濃度は静置時間にかかわらずほぼ一定であり、シリンジを垂直に保持したにもかかわらずiPICが沈殿することなく、ほぼ一定数の細胞数が排出されたことが示された。従って、フィブリノーゲン+コラーゲン溶液を用いることにより、細胞の分散状態を維持できることが示された。

[0172] また、製造されたiPICを内包した薄層のフィブリノーゲン+コラーゲンシートにおいて、iPICはゲルシート内に保持されており、細胞の漏出は認められなかった。

[0173] 図10に、iPICを内包したフィブリン+ゼラチンマイクロスフェアゲルシート、又はiPICを内包したフィブリン+コラーゲンゲルシートが皮下に移植されたヌードラットの血中ヒト α -ペプチド濃度の経時的測定結果を示す。当該フィブリン+ゼラチンマイクロスフェアゲルシートとフィブリン+コラーゲンゲルシートで血中ヒト α -ペプチド量に有意差は認められず、両者は同等の性能を有することが示された。

[0174] 3Dプリンターを用いて大動物・ヒトサイズの当該フィブリン+コラーゲンシートを作製することが可能であり、iPICがゲル内に保持され細胞の漏出は認められなかった。作製した大動物・ヒトサイズの当該フィブリン+コラーゲンゲルシートにおける任意の6か所を直径 12 mm の円形にくり抜き、そこに内包される細胞数を測定したところ、ほぼ同程度の細胞数であることが確認された（図11）。この結果は、フィブリノーゲン+コラーゲン

溶液を用いて i P I C を懸濁し、3 D プリンターを用いて塗布することにより、均一に細胞が分布して内包されるフィブリン+コラーゲンゲルシートが作製可能であることが示された。

請求の範囲

- [請求項1] 細胞がフィブリンゲルシートに均一に分散され内包されてなり、
該フィブリンゲルシートがさらに、 $0.2 \sim 2 \text{ w/v} \%$ の量のコラーゲン、及び／又は $10 \sim 30 \text{ w/v} \%$ の量の $100 \mu\text{m} \sim 1000 \mu\text{m}$ を通過できるゼラチンゲル粒子を含む、
細胞移植用のフィブリンゲルシート。
- [請求項2] 一面の表面積が 2.25 cm^2 以上のサイズを有し、 1 mm 以下の厚さを有する、請求項1に記載のフィブリンゲルシート。
- [請求項3] 前記細胞が 1.5×10^6 個超/ cm^2 の量で内包される、請求項1に記載のフィブリンゲルシート。
- [請求項4] 前記細胞がスフェロイドの形態である、請求項1に記載のフィブリンゲルシート。
- [請求項5] 前記細胞がiPS細胞由来臍島細胞である、請求項1に記載のフィブリンゲルシート。
- [請求項6] 支持体をさらに備える、請求項1に記載のフィブリンゲルシート。
- [請求項7] 細胞がフィブリンゲルシートに均一に分散され内包されてなる細胞移植用のフィブリンゲルシートの製造方法であって、
該細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液をトロンビンと作用させて、シート状に成型してゲル化させる工程、を含み、
該細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液がさらに、 $0.2 \sim 2 \text{ w/v} \%$ の量のコラーゲン、及び／又は $10 \sim 30 \text{ w/v} \%$ の量の $100 \mu\text{m} \sim 1000 \mu\text{m}$ を通過できるゼラチンゲル粒子を含む、製造方法。
- [請求項8] 前記ゲル化させる工程が、前記細胞が懸濁されたフィブリノーゲン溶液をトロンビンと作用させて、一面の表面積が 2.25 cm^2 以上のサイズを有し、 1 mm 以下の厚さを有するシート状に成型してゲル化させる、請求項7に記載の製造方法。
- [請求項9] 前記細胞が、フィブリンゲルシートにおいて 1.5×10^6 個超／

cm^2 となる量にて、フィブリノーゲン溶液に懸濁される、請求項 7 に記載の製造方法。

[請求項10] 前記細胞がスフェロイドの形態である、請求項 7 に記載の製造方法。

[請求項11] 前記細胞が i P S 細胞由来膵島細胞である、請求項 7 に記載の製造方法。

[請求項12] 支持体上に塗布することによりシート状に成型する、請求項 7 に記載の製造方法。

[請求項13] バイオプリントにより支持体上に塗布する、請求項 1 2 に記載の製造方法。

[請求項14] 支持体がトロンビンを含む、請求項 1 2 に記載の製造方法。

[請求項15] 請求項 1 に記載のフィブリンゲルシートが複数積層されてなる、細胞移植用のフィブリンゲルシートの積層体。