

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年1月19日(19.01.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/010544 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/10 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
A61K 35/34 (2015.01) C12N 5/074 (2010.01)
A61P 9/00 (2006.01) C12N 5/0775 (2010.01)
A61P 9/04 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/070816

(22) 国際出願日: 2016年7月14日(14.07.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2015-141181 2015年7月15日(15.07.2015) JP

(71) 出願人: テルモ株式会社(TERUMO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷二丁目4番1号 Tokyo (JP). 国立大学法人大阪大学(OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 大橋文哉(OHASHI, Fumiya); 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 宮川繁(MIYAGAWA, Shigeru); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 澤芳樹(SAWA, Yoshiki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 増田茂夫(MASUDA, Shigeo); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 福島五月(FUKUSHIMA, Satsuki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号

国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 齋藤充弘(SAITO, Atsuhiko); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 葛和清司(KUZUWA, Kiyoshi); 〒1600023 東京都新宿区西新宿6丁目2番1号西新宿三井ビルディング17階 葛和国际特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: CRYOPRESERVATION METHOD FOR MYOCARDIAL CELLS DERIVED FROM PLURIPOTENT STEM CELLS OR FROM MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM ADIPOSE TISSUE OR BONE MARROW

(54) 発明の名称: 多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞の凍結保存方法

(57) Abstract: Provided is a cryopreservation method whereby tumorigenicity of undifferentiated pluripotent stem cells or mesenchymal stem cells derived from adipose tissue or bone marrow is reduced while the functionality of myocardial cells derived from differentiated pluripotent stem cells or mesenchymal stem cells derived from adipose tissue or bone marrow is maintained. A cryopreservation method for myocardial cells derived from pluripotent stem cells or from mesenchymal stem cells derived from adipose tissue or bone marrow, the method including a step for dissociating cells from a cell population that has been induced to differentiate into myocardial cells from pluripotent stem cells or mesenchymal stem cells derived from adipose tissue or bone marrow.

(57) 要約: 分化多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞の機能を維持したまま、未分化の多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞の造腫瘍性を低減させる凍結保存方法を提供する。多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞の凍結保存方法であって、多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導を受けた細胞集団から細胞を解離するステップを含む方法。



WO 2017/010544 A1

明 細 書

発明の名称：

多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞の凍結保存方法

技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞を凍結保存する技術、該心筋細胞を含むシート状細胞培養物を製造する技術、および該シート状細胞培養物の用途に関する。

背景技術

[0002] 近年の心臓病に対する治療の革新的進歩にかかわらず、重症心不全に対する治療体系は未だ確立されていない。このような重症心不全患者に対する心機能回復には細胞移植法が有用とされ、既に自己骨格筋芽細胞や i P S 細胞由来心筋細胞による臨床応用・研究が開始されている。その一例として、組織工学を応用した温度応答性培養皿を用いることによって、成体の心筋以外の部分に由来する細胞を含む心臓に適用可能な三次元に構成された細胞培養物と、その製造方法が提供された（特許文献 1）。しかし、温度応答性培養皿で調製するシート状培養物は脆弱で破れやすいため、輸送することが困難である。

[0003] 一方、シート状細胞培養物の製造に、凍結・解凍した細胞を用いることが知られており（特許文献 2）、その凍結は一般に保存液中で細胞を急速凍結または緩慢凍結して行われる（特許文献 2～12）。凍結した細胞は、上述のようなシート状培養物に生じる輸送上の問題が生じることは考えにくい。が、凍結する細胞として人工多能性幹細胞（特許文献 3）や胚性幹細胞（特許文献 5）などを好適に凍結・解凍することについての報告はなされていない。

先行技術文献

特許文献

- [0004] 特許文献1：特表2007-528755号公報
特許文献2：国際公開第2014/185517号
特許文献3：特開2010-213692号公報
特許文献4：特表2012-533620号公報
特許文献5：国際公開第2005/045007号
特許文献6：特開2007-161307号公報
特許文献7：特開2002-204690号公報
特許文献8：特開2011-115058号公報
特許文献9：特開2003-93044号公報
特許文献10：特表平5-507715号公報
特許文献11：特開2004-254597号公報
特許文献12：特開平8-308555号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明者らは、新たな細胞ソースとして期待される多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の細胞のシート状細胞培養物の作製に取り組む中で、これらの細胞から分化誘導された細胞は、その分化誘導後の細胞が凍結解凍後に、その機能を維持することができない、生存率が低下する等、凍結障害性が高い上、分化誘導後に未分化の多能性幹細胞が残存すると移植組織が腫瘍化する原因となるといった問題に直面し、これらの問題を解決しない限り前記のシート状細胞培養物の作製は不可能であるとの認識を持つに至った。すなわち本発明の目的は、かかる問題を解決した、多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞の凍結保存方法を提供し、もって該心筋細胞を含む好適なシート状細胞培養物を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者らは、かかる課題を解決するために鋭意研究に取り組む中で、多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞から心筋細胞へ

の分化誘導を受けた細胞集団から細胞を解離して凍結することで、驚くべきことに、分化多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞の機能を維持することができ、さらに未分化の多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞の造腫瘍性を低減させることができる、との知見を得、さらに研究を進めた結果本発明を完成させるに至った。

[0007] すなわち、本発明は以下に関する。

＜1＞多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞の凍結保存方法であって、
多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導を受けた細胞集団から細胞を解離するステップ、
を含む方法。

＜2＞解離した細胞を凍結保護剤を含む凍結保存液中で凍結するステップをさらに含む、上記＜1＞に記載の方法。

＜3＞凍結保護剤が、細胞膜透過性の凍結保護剤である、上記＜2＞に記載の方法。

＜4＞凍結保護剤が、ジメチルスルホキシド、エチレングリコール（EG）、プロピレングリコール（PG）、1，2-プロパンジオール（1，2-PD）、1，3-プロパンジオール（1，3-PD）、ブチレングリコール（BG）、イソプレングリコール（IPG）、ジプロピレングリコール（DPPG）およびグリセリンからなる群から選択される1種または2種以上である、上記＜2＞または＜3＞に記載の方法。

＜5＞凍結保護剤が、ジメチルスルホキシドである、上記＜4＞に記載の方法。

＜6＞凍結保護剤が、1，2-プロパンジオールである、上記＜4＞に記載の方法。

＜7＞多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞である、上記＜1＞～＜6＞のいずれか一つに記載の方法。

＜８＞シート状細胞培養物の製造方法であって、
上記＜１＞～＜７＞のいずれか一つに記載の方法により得られた凍結した細胞を解凍するステップ、および
シート状細胞培養物を形成するステップ、
を含む方法。

[0008] ＜９＞上記＜８＞に記載の方法により製造されたシート状細胞培養物、前記シート状培養物を含む組成物、あるいは上記＜１＞～＜７＞のいずれか一つに記載の方法により得られた凍結した細胞、細胞培養液および培養基材を含むキットの、薬剤のスクリーニングのための使用。

＜１０＞キットが、医療用接着剤および細胞洗浄液をさらに含む、上記＜９＞に記載の使用。

＜１１＞対象において疾患を処置する方法であって、上記＜８＞に記載の方法により製造されたシート状細胞培養物または前記シート状細胞培養物を含む組成物の有効量を、それを必要とする対象に適用することを含む方法。

＜１２＞多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導を受けた細胞集団から解離した細胞における分化した多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞の純度を高める方法であって、
解離した細胞を凍結保護剤を含む凍結保存液中で凍結するステップ、
を含む方法。

＜１３＞多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導を受けた細胞集団から解離した細胞における未分化の多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞の割合を低下させる方法であって、
解離した細胞を凍結保護剤を含む凍結保存液中で凍結するステップ、
を含む方法。

発明の効果

[0009] 本発明の方法は、多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系

幹細胞から心筋細胞への分化誘導を受けた細胞集団から細胞を解離して凍結することにより、多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞の高い細胞生存率や自律的拍動性を維持したまま当該細胞を凍結保存することを可能とする。また、本発明の方法は、臨床応用する上で腫瘍形成の原因となる分化誘導後の残存する多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞の多能性や増殖性を同時に低減することができる。さらに、本発明の方法により得られた凍結保存された多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞から、細胞生存率や自律的拍動性を維持したままシート状細胞培養物を製造することが可能である。また、本発明における凍結・解凍操作は、従来のシート状細胞培養物の製造方法と親和性が高く、手間やコストが軽微であるため、本発明の方法はシート状細胞培養物の製造に広く利用することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、i P S細胞由来の心筋細胞を含む細胞集団の凍結前後のS S E A - 4陽性率およびc - T N T陽性率を示すグラフである。

[図2]図2は、i P S細胞由来の心筋細胞を含む細胞集団の凍結前後のc - T N T陽性率を示すグラフである。

[図3]図3は、i P S細胞由来の心筋細胞を含む細胞集団の凍結前後のT r a - 1 - 6 0陽性率およびc - T N T陽性率を示すグラフである。

[図4]図4は、i P S細胞の凍結前後のS S E A - 4陽性率を示すグラフである。

[図5]図5は、完成したシート状細胞培養物の外観を示した写真図である。

[図6]図6は、完成したシート状細胞培養物の一部の細胞についてヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真図である。

[図7]図7は、完成したシート状細胞培養物の一部の細胞について多重標識した蛍光顕微鏡写真図である。

[図8]図8は、完成したシート状細胞培養物の自発的な同期拍動を示した図である。

[図9]図9は、i P S細胞由来の心筋細胞の安定性を示すグラフである。

[図10]図10は、凍結保存液を比較したグラフである。

[図11]図11は、凍結方法を比較したグラフである。

[図12]図12は、i P S細胞由来の心筋細胞シートの有効性を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0011] 本明細書において別様に定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術用語および科学用語は、当業者が通常理解しているものと同じ意味を有する。本明細書中で参照する全ての特許、出願および他の出版物（インターネットから入手可能な情報を含む）は、その全体を参照により本明細書に援用する。

[0012] 本発明の一側面は、多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導を受けた細胞集団から細胞を解離するステップを含む、多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞の凍結保存方法に関する。特定の理論に拘束されることは望まないが、本発明の方法において、多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導を受けた細胞集団から解離した細胞を凍結することにより、多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞が自律的拍動性を維持したまま細胞が残存する一方、分化誘導後に残存する多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞が脱落すると考えられる。

[0013] 多能性幹細胞は、当該技術分野で周知の用語であり、生体の様々な組織に分化する能力を有する細胞を意味する。多能性幹細胞の非限定例としては、例えば、胚性幹細胞（E S細胞）、核移植胚性幹細胞（n t E S細胞）、人工多能性幹細胞（i P S細胞）などが挙げられる。

間葉系幹細胞は、当該技術分野で周知の用語であり、間葉系組織に存在し、間葉系組織に属する細胞に分化する能力を有する細胞を意味する。本明細書では、特に別記しない限り間葉系幹細胞は脂肪組織もしくは骨髄由来の間

葉系幹細胞を指すものとする。

- [0014] 本発明において、「多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞」は、多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞に由来する心筋細胞の特徴を有する細胞を意味する。心筋細胞の特徴としては、限定されずに、例えば、心筋細胞マーカーの発現、自律的拍動の存在などが挙げられる。心筋細胞マーカーの非限定例としては、例えば、c-TNT (cardiac troponin T)、CD172a (別名SIRPAまたはSHPS-1)、KDR (別名CD309、FLK1またはVEGFR2)、PDGFRA、EMILIN2、VCAMなどが挙げられる。一態様において、多能性幹細胞または間葉系幹細胞由来の心筋細胞は、c-TNT陽性かつ／またはCD172a陽性である。
- [0015] 本発明において、「多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導を受けた細胞集団」とは、多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞を培養して誘導された心筋細胞ならびに未分化の多能性幹細胞および／または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞を含む細胞塊または細胞凝集体である。当該細胞集団には、誘導された他の細胞種も含まれ得る。当該細胞集団は、胚様体形成による方法 (例えば、Burridge et al., Cell Stem Cell, 2012 Jan 6;10(1):16-28) によって、多能性幹細胞または間葉系幹細胞から心筋細胞を誘導すること、すなわち、多能性幹細胞または間葉系幹細胞を心筋細胞の分化誘導処理に供することによって得ることができる。当該方法において、中胚葉誘導因子 (例えば、アクチビンA、BMP4、bFGF、VEGF、SCFなど)、心臓特異化 (cardiac specification) 因子 (例えば、VEGF、DKK1、Wntシグナルインヒビター (例えば、IWR-1、IWP-2、IWP-4等)、BMPシグナルインヒビター (例えば、NOGGIN等)、TGFβ/アクチビン/NODALシグナルインヒビター (例えば、SB431542等)、レチノイン酸シグナルインヒビターなど) および心臓分化因子 (例えば、VEGF、bFGF、DKK1など) を、順次作用させることにより誘導効

率を高めることができる。一態様において、多能性幹細胞からの心筋細胞誘導処理は、浮遊培養下で形成した細胞集団に、（１）BMP 4、（２）BMP 4 と bFGF とアクチビン A との組み合わせ、（３）IWR-1、および、（４）VEGF と bFGF との組み合わせを順次作用させることを含む。

[0016] 本発明の方法における、細胞集団から細胞を解離するステップは、既知の任意の手法により行うことができる。かかる手法としては、限定されずに、例えば、トリプシン、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、プロナーゼ、ディスパーゼ、コラゲナーゼ、CTK（株式会社リプロセル）などを細胞解離剤として用いて解離する化学的な方法、ピペッティングなどによる物理的方法などが挙げられる。細胞集団を培養基材に接着培養後に細胞を解離してもよい。

[0017] 本発明の方法の一側面は、解離した細胞を凍結保護剤を含む凍結保存液中で凍結するステップをさらに含む。かかる凍結するステップは、既知の任意の手法により行うことができる。かかる手法としては、限定されずに、例えば、容器内の細胞を、凍結手段、例えば、フリーザー、ディープフリーザー、低温の媒体（例えば、液体窒素等）に供することなどが挙げられる。凍結手段の温度は、容器内の細胞集団の一部、好ましくは全体を凍結させ得る温度であれば特に限定されないが、典型的には 0℃以下、好ましくは -20℃以下、より好ましくは -40℃以下、さらに好ましくは -80℃以下である。また、凍結操作における冷却速度は、凍結解凍後の細胞の生存率や機能を大きく損なうものでなければ特に限定されないが、典型的には 4℃から冷却を始めて -80℃に達するまで 1～5 時間、好ましくは 2～4 時間、特に約 3 時間かける程度の冷却速度である。具体的には、例えば、0.46℃/分の速度で冷却することができる。かかる冷却速度は、所望の温度に設定した凍結手段に、細胞を含む容器を直接、または、凍結処理容器に収容して供することにより達成することができる。凍結処理容器は、容器内の温度の下降速度を所定の速度に制御する機能を有していてもよい。かかる凍結処理容器としては、既知の任意のもの、例えば、BICELL^(R)（日本フリーザー）などを用

いることができる。また、上記冷却速度は、プログラム設定などにより冷却速度を制御することができるフリーザーまたはディープフリーザーを用いることにより達成することができる。かかるフリーザーまたはディープフリーザーとしては、既知の任意のもの、例えば、プログラムフリーザー（例えば、PDF-2000G（ストレックス）、KRYO-560-16（朝日ライフサイエンス））などを用いることができる。

[0018] 凍結操作は、細胞を浸漬させた培養液や生理緩衝液などを凍結保存液として用い、これに凍結保護剤を加えたり、培養液を凍結保護剤を含む凍結保存液と置換するなどの処理を施したうえで行ってもよい。したがって、本発明の方法は、培養液に凍結保護剤を添加するステップ、または、培養液を凍結保存液に置換するステップをさらに含んでもよい。培養液を凍結保存液に置換する場合、凍結時に細胞が浸漬している液に有効濃度の凍結保護剤が含まれていれば、培養液を実質的に全て除去してから凍結保存液を添加しても、培養液を一部残したまま凍結保存液を添加してもよい。ここで、「有効濃度」とは、凍結保護剤が、毒性を示すことなく、凍結保護効果、例えば、凍結保護剤を用いない場合と比べた、凍結解凍後の細胞の生存率、活力、機能などの低下抑制効果を示す濃度を意味する。かかる濃度は当業者に知られているか、ルーチンの実験などにより適宜決定することができる。

[0019] 本発明の方法に用いる凍結保護剤は、細胞膜透過性のものであれば特に限定されず、例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO）、エチレングリコール（EG）、プロピレングリコール（PG）、1，2-プロパンジオール（1，2-PD）、1，3-プロパンジオール（1，3-PD）、ブチレングリコール（BG）、イソプレングリコール（IPG）、ジプロピレングリコール（DPG）およびグリセリンなどを含む。特に好ましい凍結保護剤は、DMSOおよび1，2-PDである。凍結保護剤は、単独で用いても、2種または3種以上を組み合わせ用いてもよい。

凍結保護剤は、細胞外凍結保護剤と組み合わせ用いてもよい。細胞外凍結保護剤は、例えば、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロー

スナトリウム、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルスターチ（HES）、デキストラン、アルブミンなどを含む。

[0020] 培養液への凍結保護剤の添加濃度、または、凍結保存液中の凍結保護剤の濃度は、上記で定義した有効濃度であれば特に限定されず、典型的には、例えば、培養液または凍結保存液全体に対して2～20%（v/v）、さらに好ましくは5～15%、最も好ましくは8～12%、さらに最も好ましくは10%である。しかしながら、この濃度範囲からは外れるが、それぞれの凍結保護剤について知られているか、実験的に決定した代替的な使用濃度を採用することもでき、かかる濃度も本発明の範囲内である。例えば、DMSOの場合、培養液または凍結保存液全体に対して2～20%（v/v）、さらに好ましくは2.5～12.5%、最も好ましくは5～10%である。

[0021] 多能性幹細胞または間葉系幹細胞由来の心筋細胞は、誘導後に精製し、純度を高めることができる。精製方法としては、心筋細胞に特異的なマーカー（例えば、細胞表面マーカーなど）を用いた種々の分離法、例えば、磁気細胞分離法（MACS）、フローサイトメトリー法、アフィニティ分離法や、特異的プロモーターにより選択マーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子など）を発現させる方法、心筋細胞の栄養要求性を利用した方法、すなわち心筋細胞以外の細胞の生存に必要な栄養源を除いた培地で培養して心筋細胞以外の細胞を駆逐する方法（特開2013-143968）、低栄養条件下で生存することができる細胞を選抜する方法（W02007/088874）、心筋細胞と心筋細胞以外の接着タンパク質をコーティングした基材への接着性の違いを用いて心筋細胞を回収する方法（特願2014-188180）、さらにはこれらの方法の組合せなどが挙げられる（例えば、上記Burridge et al. など参照）。心筋細胞に特異的な細胞表面マーカーとしては、例えば、CD172a、KDR、PDGFRA、EMILIN2、VCAMなどが挙げられる。また、心筋細胞に特異的なプロモーターとしては、例えば、NKX2-5、MYH6、MLC2V、ISL1などが挙げられる。一態様において、心筋細胞は細胞表面マーカーであるCD172aに基づいて精製される。

[0022] 多能性幹細胞または間葉系幹細胞由来の心筋細胞を含む細胞集団から未分化の多能性幹細胞または間葉系幹細胞を除去することができる。多能性幹細胞または間葉系幹細胞由来の心筋細胞を含む細胞集団に未分化細胞が残存していると、移植後にガン化する可能性が危惧される。未分化細胞を除去する工程には、公知の未分化細胞除去方法を好適に用いることができる。精製方法としては、未分化細胞に特異的なマーカー（例えば、細胞表面マーカーなど）を用いた種々の分離法、例えば、磁気細胞分離法（MACS）、フローサイトメトリー法、アフィニティ分離法や、特異的プロモーターにより選択マーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子など）を発現させる方法、未分化細胞の生存に必要な栄養源（メチオニン等）を除いた培地で培養して未分化細胞を駆逐する方法、未分化細胞の表面抗原をターゲットにした薬剤で処理する方法、公知の未分化細胞を除去する方法としては、W02014/126146、W02012/056997に記載の方法、W02012/147992に記載の方法、W02012/133674に記載の方法、W02012/012803（特表2013-535194）に記載の方法、W02012/078153（特表2014-501518）に記載の方法、特開2013-143968およびCell Stem Cell Vol. 12 January 2013, Page 127-137に記載の方法、PNAS 2013 Aug 27;110(35): E3281-90に記載の方法などが挙げられる。

[0023] 多能性幹細胞または間葉系幹細胞由来の心筋細胞は、上記のように多能性幹細胞または間葉系幹細胞から誘導し、任意に上記のような精製処理に供した心筋細胞集団であってもよい。当該心筋細胞集団における心筋細胞の純度（例えば、心筋細胞集団の全細胞数に対する心筋細胞マーカー陽性細胞数の割合）は、例えば、約85%超、約86%超、約87%超、約88%超、約89%超、約90%超、約91%超、約92%超、約93%超、約94%超、約95%超、約96%超、約97%超、約98%超、約99%超などであってよい。一態様において、本発明における多能性幹細胞または間葉系幹細胞由来の心筋細胞は、心筋細胞の純度が90%超の心筋細胞集団である。

[0024] 多能性幹細胞または間葉系幹細胞由来の心筋細胞を含む細胞集団は、多能性幹細胞または間葉系幹細胞を心筋細胞誘導処理に供して得られる心筋細胞

誘導後の細胞集団をそのまま利用しても、心筋細胞誘導後の細胞集団から心筋細胞を精製して純度を高めたものを利用しても、心筋細胞誘導後の細胞集団から心筋細胞の一部を除去して純度を低下させたものを利用しても、精製した心筋細胞集団を他の細胞集団と混合したものを利用してもよい。一態様において、多能性幹細胞または間葉系幹細胞由来の心筋細胞を含む細胞集団は、多能性幹細胞または間葉系幹細胞を心筋細胞誘導処理に供して得られる細胞集団を精製して得た心筋細胞集団と、精製後に残った非心筋細胞集団とを、所定の比率で混合して得たものである。

[0025] 本発明の別の側面は、上記方法により得られた凍結した細胞を解凍するステップおよびシート状細胞培養物を形成するステップを含む、シート状細胞培養物の製造方法に関する。

[0026] 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、細胞外マトリッ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、電氣的に連結されてもよい。シート状細胞培養物は、1の細胞層から構成されるもの（単層）であっても、2以上の細胞層から構成されるもの（積層（多層）、例えば、2層、3層、4層、5層、6層など）であってもよい。

[0027] 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、本発明におけ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

るものであってもよい。また、シート状細胞培養物は、好ましくは、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。

[0028] シート状細胞培養物を構成する細胞は、シート状細胞培養物による治療が可能な任意の生物に由来し得る。かかる生物には、限定されずに、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、げっ歯目動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモットなど）、ウサギなどが含まれる。一態様において、シート状細胞培養物を構成する細胞はヒト細胞である。

[0029] シート状細胞培養物を形成する細胞は、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、シート状細胞培養物が移植に用いられる場合、そのレシピエントとは異なる種の生物に由来する細胞を意味する。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、細胞は他家細胞である。本発明の別の態様において、細胞は他家細胞である。

[0030] 自家または他家多能性幹細胞は、限定されずに、例えば、採取した自家または他家体細胞（例えば、皮膚細胞（線維芽細胞、ケラチノサイト等）や血

球（末梢血単核球等）などに、OCT3／4、SOX2、KLF4、C-MYC等の遺伝子を導入するなどして自家または他家iPS細胞を誘導することにより得ることができる。体細胞からiPS細胞を誘導する方法は当該技術分野において周知である（例えば、Bayart and Cohen-Haguener, *Curr Gene Ther.* 2013 Apr;13(2):73-92など参照）。

[0031] 本発明の製造方法における、凍結した細胞を解凍するステップは、既知の任意の細胞解凍手法により行うことができ、典型的には、例えば、凍結した細胞を、解凍手段、例えば、凍結温度より高い温度の固形、液状もしくはガス状の媒体（例えば、水）、ウォーターバス、インキュベーター、恒温器などに供したり、または、凍結した細胞を、凍結温度より高い温度の媒体（例えば、培養液）で浸漬することにより達成されるが、これに限定されない。解凍手段または浸漬媒体の温度は、細胞を所望の時間内に解凍できる温度であれば特に限定されないが、典型的には4～50℃、好ましくは30℃～40℃、より好ましくは36～38℃である。また、解凍時間は、解凍後の細胞の生存率や機能を大きく損なうものでなければ特に限定されないが、典型的には2分以内であり、特に20秒以内とすることで生存率の低下を大幅に抑制することができる。解凍時間は、例えば、解凍手段または浸漬媒体の温度、凍結時の培養液または凍結保存液の容量もしくは組成などを変化させて調節することができる。

[0032] 本発明の製造方法は、凍結した細胞を解凍するステップの後、かつ、シート状細胞培養物を形成するステップの前に、細胞を洗浄するステップを含んでいてもよい。細胞の洗浄は、既知の任意の手法により行うことができ、典型的には、例えば、細胞を細胞洗浄液（例えば、血清や血清成分（血清アルブミンなど）を含むもしくは含まない、培養液または生理緩衝液など）に懸濁し、遠心分離し、上清を廃棄し、沈殿した細胞を回収することにより達成されるが、これに限定されない。細胞を洗浄するステップにおいては、かかる懸濁、遠心分離、回収のサイクルを1回または複数回（例えば、2、3、4、5回など）行ってもよい。本発明の一態様において、細胞を洗浄するス

テップは、凍結した細胞を解凍するステップの直後に行われる。本発明において用いることができる市販されている細胞洗浄液の例としては、セルローション（日本全薬工業株式会社）が挙げられる。

[0033] 本発明の製造方法における、シート状細胞培養物を形成するステップは、既知の任意の手法により行うことができる。かかる手法としては、限定されずに、例えば、特許文献1や特開2012-115254に記載されたものが挙げられる。

本発明の一態様において、シート状細胞培養物を形成するステップは、細胞を培養基材上に播種するステップ、および、播種した細胞をシート化するステップを含んでもよい。

本発明の一態様において、シート状細胞培養物を形成するステップは、細胞の表面全体が接着膜で被覆された被覆細胞を培養するステップを含んでもよく、前記被覆細胞を培養するステップにおいて、前記被覆細胞と前記培養細胞とは、前記接着膜を介して互いに接着している。前記被覆細胞を被覆する接着膜は、培養細胞同士を接着できる物質であれば限定されないが、分子量1千以上1千万以下のタンパク質等の天然高分子や化学的に得られる合成高分子が好ましい。また、接着膜は、第1の物質を含む膜と第1の物質とは異なる第2の物質を含む膜とが積層された膜とすることが好ましい。第1の物質および第2の物質の組合せとしては、インテグリンが結合するアルギニン-グリシン-アスパラギン酸（RGD）配列を含む高分子とRGD配列を含む高分子と相互作用する高分子との組み合わせであることが好ましい。RGD配列を含む高分子は、元来RGD配列を有するタンパク質であってもよく、RGD配列が化学的に結合されたタンパク質であってもよい。RGD配列を含む高分子と相互作用する高分子は、例えばコラーゲン、ゼラチン、プロテオグリカン、インテグリン、酵素および抗体等の水溶性タンパク質を含む。上記ステップにより、個々の細胞に形成された接着膜同士が相互作用して組織化し、三次元構造を有するシート状細胞培養物を形成することができる。

[0034] 培養基材は、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、細胞培養皿、細胞培養ボトルなどが挙げられる。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、フィルムなどが挙げられる。培養基材は、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よい。好ましい培養基材としては、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ックスや、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^(R) TC-Treated Culture Dish、Corning社製など）。

[0035] 培養基材は、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など参照）。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、セルシード社のUpCell^(R)）、これらを本発明の製造方法に使用することができる。

[0036] 上記培養基材は、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、典型的には、1～200cm²、好ましくは2～100cm²、より好ましくは3～50cm²である。

[0037] 培養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。培養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培養基材（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。

[0038] 本発明の好ましい態様において、播種は、細胞が培養1～7日間培養後にシート状細胞培養物を形成し得る密度で行われる。ある態様では、例えば、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 個/cm²、さらに別の態様では、 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 個/cm²、さらに別の態様では、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個/cm²である。

[0039] 播種した細胞をシート化するステップも、既知の任意の手法および条件で行うことができる。かかる手法の非限定例は、例えば、特許文献1などに記載されている。細胞のシート化は、細胞同士が接着分子や、細胞外マトリックスなどの細胞間接着機構を介して互いに接着することにより達成され则认为られている。したがって、播種した細胞をシート化するステップは、例えば、細胞を、細胞間接着を形成する条件下で培養することにより達成することができる。かかる条件は、細胞間接着を形成することができればいかなるものであってもよいが、通常は一般的な細胞培養条件と同様の条件であれば細胞間接着を形成することができる。かかる条件としては、例えば、37℃、5%CO₂での培養が挙げられる。また、培養は通常の気圧（大気圧）下で行うことができる。当業者であれば、播種する細胞の種類に応じて最適な条件を選択することができる。本明細書において、播種した細胞をシート化するための培養を、「シート化培養」と呼ぶ場合もある。

[0040] 本発明の一態様において、細胞の培養は、所定の期間内、好ましくは、7日以内、より好ましくは5日以内、さらに好ましくは3日以内に行われる。

[0041] 培養に用いる細胞培養液（単に「培養液」もしくは「培地」と呼ぶ場合もある）は、細胞の生存を維持できるものであれば特に限定されないが、典型的には、アミノ酸、ビタミン類、電解質を主成分としたものが利用できる。

本発明の一態様において、培養液は、細胞培養用の基礎培地をベースにしたものである。かかる基礎培地には、限定されずに、例えば、DMEM、MEM、F12、DME、RPMI 1640、MCDB (MCDB 102、104、107、120、131、153、199など)、L15、SkBM、R1TC80-7などが含まれる。これらの基礎培地の多くは市販されており、その組成も公知となっている。

基礎培地は、標準的な組成のまま（例えば、市販されたままの状態）用いてもよいし、細胞種や細胞条件に応じてその組成を適宜変更してもよい。したがって、本発明に用いる基礎培地は、公知の組成のものに限定されず、1または2以上の成分が追加、除去、増量もしくは減量されたものを含む。

[0042] 基礎培地に含まれるアミノ酸としては、限定されずに、例えば、L-アルギニン、L-シスチン、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-セリン、L-トレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリンなどが、ビタミン類としては、限定されずに、例えば、D-パントテン酸カルシウム、塩化コリン、葉酸、L-イノシトール、ナイアシンアミド、リボフラビン、チアミン、ピリドキシン、ビオチン、リボ酸、ビタミンB12、アデニン、チミジンなどが、そして、電解質としては、限定されずに、例えば、 CaCl_2 、 KCl 、 MgSO_4 、 NaCl 、 NaH_2PO_4 、 NaHCO_3 、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 、 FeSO_4 、 CuSO_4 、 MnSO_4 、 Na_2SiO_3 、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 、 NaVO_3 、 NiCl_2 、 ZnSO_4 などがそれぞれ含まれる。基礎培地には、これらの成分のほか、D-グルコースなどの糖類、ピルビン酸ナトリウム、フェノールレッドなどのpH指示薬、プトレシンなどを含んでもよい。

[0043] 本発明の一態様において、基礎培地に含まれるアミノ酸の濃度は、L-アルギニン：63.2～84mg/L、L-シスチン：35～63mg/L、L-グルタミン：4.4～584mg/L、グリシン：2.3～30mg/L、L-ヒスチジン：42mg/L、L-イソロイシン：66～105mg/L

／L、L-ロイシン：105～131mg／L、L-リジン：146～182mg／L、L-メチオニン：15～30mg／L、L-フェニルアラニン：33～66mg／L、L-セリン：32～42mg／L、L-トレオニン：12～95mg／L、L-トリプトファン：4.1～16mg／L、L-チロシン：18.1～104mg／L、L-バリン：94～117mg／Lである。

また、本発明の一態様において、基礎培地に含まれるビタミン剤の濃度は、D-パントテン酸カルシウム：4～12mg／L、塩化コリン：4～14mg／L、葉酸：0.6～4mg／L、L-イノシトール：7.2mg／L、ナイアシンアミド：4～6.1mg／L、リボフラビン：0.0038～0.4mg／L、チアミン：3.4～4mg／L、ピリドキシン：2.1～4mg／Lである。

[0044] 細胞培養液は、上記のほか、血清、成長因子、ステロイド剤成分、セレン成分などの1種または2種以上の添加物を含んでもよい。しかし、これらの成分は臨床においてはレシipientに対するアナフィラキシーショック等の副作用要因となり得ることが否定できない製造工程由来不純物であり、臨床への適用にあたっては排除することが望ましい。したがって、本発明の好ましい態様において、細胞培養液は、これらの添加物の少なくとも1種の有効量を含まない。また、本発明のより好ましい態様において、細胞培養液は、これらの添加物の少なくとも1種を実質的に含まない。さらに、本発明の特に好ましい態様において、細胞培養液は、添加物を実質的に含まない。したがって、細胞培養液は、基礎培地のみを含んでもよい。

本発明の別の態様において、細胞培養液は、ROCK (Rho-associated coiled-coil forming kinase) (Rho結合キナーゼ) 阻害剤Y-27632を含んでもよい。

本発明において用いられる細胞培養液として、例えば20% FBS-DMEM／F12が挙げられる。

[0045] 本発明の一態様において、シート状細胞培養物を形成するステップは、心

筋細胞の精製や未分化細胞の除去を含んでもよい。心筋細胞の精製や未分化細胞の除去は、シート状細胞培養物の形成と並行して行えるものであれば特に限定はされず、例えば、特開2013-143968およびW02012/056997に記載の、低血清条件、低糖条件、低栄養条件、低カルシウム条件、弱酸性pH条件、乳酸添加条件、アスパラギン酸・グルタミン酸添加条件および／またはピルビン酸添加条件で、ならびに／あるいはメチオニン、ロイシン、システイン、チロシンおよびアルギニンからなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸を含まない細胞培養液で行ってもよい。低血清条件とは、無血清条件または分化誘導時に用いた細胞培養液に添加した血清または血清成分もしくは人工的な生理活性物質群の濃度を100%として算出した場合に0～10%にする条件である。低糖条件とは、糖類を含まない条件または分化誘導時に用いた細胞培養液中の糖類の条件と比較して糖類を1%未満まで低下させた条件である。低栄養条件とは、細胞培養液に含有されるすべての栄養成分が、細胞培養液中の栄養成分と比較して10%以下まで低下している条件である。低カルシウム条件とは、細胞培養液中のカルシウム濃度が0.3～1.3 mMの条件である。弱酸性pH条件とは、細胞培養液のpHが6～7である条件である。乳酸添加条件とは、細胞培養液に乳酸を0.1～5 mM添加した条件である。アスパラギン酸・グルタミン酸添加条件とは、細胞培養液にアスパラギン酸およびグルタミン酸をそれぞれ20～100 mg/L添加した条件である。ピルビン酸添加条件とは、細胞培養液にピルビン酸を0.5～5 mM添加した条件である。メチオニン、ロイシン、システイン、チロシンおよびアルギニンからなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸を含まないとは、細胞培養液が特定のアミノ酸を全く含まないか微量に含有する場合を含む。微量とは、例えば、20 μ M以下、好ましくは10 μ M以下、さらに好ましくは1 μ M以下、最も好ましくは0.1 μ M以下をいう。これらの条件で培養することにより、分化誘導された心筋細胞に選択的に栄養を供給できると考えられ、未分化細胞が減少または除去するかあるいは分化誘導効率が上がり、心筋細胞を精製することができる。

- [0046] 本発明の製造方法は、シート状細胞培養物を形成するステップの後に、形成されたシート状細胞培養物を回収するステップをさらに含んでもよい。シート状細胞培養物の回収は、シート状細胞培養物が少なくとも部分的に、シート構造を保ったまま、足場となっている培養基材から遊離（剥離）できれば特に限定されず、例えば、タンパク質分解酵素（例えばトリプシンなど）による酵素処理および／またはピペッティングなどの機械的処理によって行うことができる。また、細胞を、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を被覆した培養基材上で培養して細胞培養物を形成した場合には、所定の刺激を加えることで、非酵素的に遊離することもできる。
- [0047] 本発明の製造方法の一態様は、シート状細胞培養物を形成するステップの後に、シート状細胞培養物を回収するステップをさらに含み、細胞を解凍するステップが、シート状細胞培養物を回収するステップの48時間以内前に行われる。細胞を解凍するステップと、シート状細胞培養物を回収するステップとの間の時間を48時間以下、好ましくは36時間以下、より好ましくは24時間以下とすることにより、シート状細胞培養物の活性をさらに高めることができる。
- [0048] 本発明の製造方法は、細胞を凍結するステップの前に、細胞を増殖させるステップをさらに含んでもよい。細胞を増殖させるステップは、既知の任意の手法で行ってもよく、当業者は各種細胞の増殖に適した培養条件に精通している。本発明の製造方法において、細胞を解凍するステップの後、細胞を実質的に増殖させずに、シート状細胞培養物を形成する場合、または、細胞を解凍するステップを、シート状細胞培養物を回収するステップの48時間以内前に行う場合、所望の細胞数を得るために、細胞を凍結するステップの前に、細胞を増殖させるステップを行うことは有用である。
- [0049] 本発明の製造方法は、細胞を凍結するステップの前および／または後に、多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導を受けた細胞集団を分散させて単細胞化し、心筋細胞を精製し、当該細胞を凝集して細胞塊を形成するステップをさらに含んでもよい。細

胞集団を分散させて単細胞化し、心筋細胞を精製する手法は、酵素の作用により心筋細胞をバラバラに分散（単細胞化）して、個々の心筋細胞として精製することができる方法であれば、特に限定されない。例えば、心筋細胞内のミトコンドリアを指標として選択する方法（W02006/022377）、低栄養条件下で生存することができる細胞を選抜する方法（W0 2007/088874）を用いて心筋細胞のみを精製（選択）することができる。当該精製された心筋細胞を凝集して細胞塊を形成する手法は、既知の任意の手法で行ってもよく、例えば、無血清条件下の培地を用いて当該細胞を培養することにより、当該細胞を凝集させて細胞塊を形成する手法が挙げられる。好ましくは、当該培養に用いる培地にインスリン（0.1～10mg/L）、トランスフェリン（0.1～10μg/L）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF（0.1～10μg/L））、上皮細胞増殖因子（1ng～1000ng/mL）、血小板由来成長因子（1ng～1000ng/mL）およびエンドセリン-1（ET-1）（ 1×10^{-8} ～ 1×10^{-6} M）からなる物質群から選択される少なくとも1つの物質が含まれていることが望ましい。上記成分以外の培地の組成や培養条件等は、当業者であれば、W0 2009/017254等を参考に適宜設定することができる。

[0050] 一態様において、本発明の製造方法は、細胞に遺伝子を導入するステップを含まない。別の態様において、本発明の製造方法は、細胞に遺伝子を導入するステップを含む。導入する遺伝子は、対象とする疾患の処置に有用なものであれば特に限定されず、例えば、HGF、VEGFなどのサイトカインであってもよい。遺伝子の導入は、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、超音波導入法、電気穿孔法、パーティクルガン法、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどのウイルスベクター利用する方法、マイクロインジェクション法などの既知の任意の方法を用いて行うことができる。細胞への遺伝子の導入は、限定されずに、例えば、細胞を凍結するステップの前に行うことができる。

[0051] 一態様において、本発明の製造方法はその全ステップがin vitroで行われ

る。別の態様において、本発明の製造方法は、*in vivo*で行われるステップ、限定されずに、例えば、対象から細胞（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含む。一態様において、本発明の製造方法はその全ステップが無菌条件下で行われる。一態様において、本発明の製造方法は、最終的に得られるシート状細胞培養物が実質的に無菌となるように行われる。一態様において、本発明の製造方法は、最終的に得られるシート状細胞培養物が無菌となるように行われる。

[0052] 本発明の別の側面は、本発明のシート状細胞培養物を含む組成物、移植片および医療製品など（以下、「組成物等」と総称することがある）に関する。

本発明の組成物等は、本発明のシート状細胞培養物に加えて、種々の追加成分、例えば、薬学的に許容し得る担体や、シート状細胞培養物の生存性、生着性および／または機能などを高める成分、対象疾患の処置に有用な他の有効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、本発明の組成物等は、シート状細胞培養物の生存性、生着性および／または機能などを高める成分や、対象疾患の処置に有用な他の有効成分などと併用することができる。

[0053] 一態様において、本発明のシート状細胞培養物および組成物等は疾患（例えば、心疾患）を処置するためのものである。また、本発明のシート状細胞培養物は、疾患（例えば、心疾患）を処置するための組成物等の製造に使用することができる。疾患としては、限定されずに、例えば、心筋梗塞（心筋梗塞に伴う慢性心不全を含む）、拡張型心筋症、虚血性心筋症、収縮機能障害（例えば、左室収縮機能障害）を伴う心疾患（例えば、心不全、特に慢性心不全）などが挙げられる。疾患は、心筋細胞、および／または、シート状細胞培養物（細胞シート）が、その処置に有用なものであってもよい。

[0054] 本発明の別の側面は、上記方法により得られた凍結した多能性幹細胞また

は間葉系幹細胞由来の心筋細胞を含む細胞集団、細胞培養液および培養基材を含むキット（以下、「本発明のキット」と称することがある）に関する。細胞培養液および培養基材は、上記培養に用いる細胞培養液および培養基材からそれぞれ選択される。

- [0055] 本発明のキットの一側面は、医療用接着剤および細胞洗浄液をさらに含む。医療用接着剤は、外科手術等に使用される接着剤であれば、特に限定されない。医療用接着剤の例として、シアノアクリレート系、ゼラチン-アルデヒド系およびフィブリングル-系接着剤が挙げられ、ベリプラスト^(R)（CSLベーリング株式会社）およびボルヒール^(R)（帝人ファーマ株式会社）等のフィブリングル-系接着剤が好ましい。細胞洗浄液は、上述の細胞を洗浄するステップにおいて用いる細胞洗浄液である。
- [0056] 本発明のキットはさらに、血管内皮細胞、壁細胞および線維芽細胞から選択される1種または2種以上の細胞、上記添加物、培養皿、心筋細胞の精製に用いる試薬（例えば、抗体、洗浄液、ビーズ等）、器具類（例えば、ピペット、スポイト、ピンセット等）、シート状細胞培養物の製造方法や使用方法に関する指示（例えば、使用説明書、製造方法や使用方法に関する情報を記録した媒体、例えば、フレキシブルディスク、CD、DVD、ブルーレイディスク、メモリーカード、USBメモリー等）などを含んでいてもよい。
- [0057] 本発明の別の側面は、本発明のシート状細胞培養物、本発明の組成物または本発明のキットの、薬剤のスクリーニングのための使用に関する。本発明のシート状細胞培養物を、薬剤スクリーニングに従来使用されていた動物実験モデルの代替として使用することができる。薬剤の種類およびスクリーニング方法については、当業者が適宜選択および設定することができる。
- [0058] 本発明の別の側面は、本発明のシート状細胞培養物または組成物等の有効量を、それを必要とする対象に適用することを含む、前記対象における疾患を処置する方法に関する。処置の対象となる疾患は、本発明のシート状細胞培養物および組成物等について上記したとおりである。
- [0059] 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、さ

らに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。本発明において、対象は健常であっても、何らかの疾患に罹患していてもよいものとするが、組織の異常に関連する疾患の処置が企図される場合には、典型的には当該疾患に罹患しているか、罹患するリスクを有する対象を意味する。

[0060] また、用語「処置」は、疾患の治療、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、組織の異常に関連する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。

[0061] 本発明の処置方法においては、シート状細胞培養物の生存性、生着性および／または機能などを高める成分や、対象疾患の処置に有用な他の有効成分などを、本発明のシート状細胞培養物または組成物等と併用することができる。

[0062] 本発明の処置方法は、本発明の製造方法に従って、本発明のシート状細胞培養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、シート状細胞培養物を製造するステップの前に、対象から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、シート状細胞培養物または組成物等の投与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、シート状細胞培養物または組成物等の投与を受ける対象とは同種の別個体である。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、シート状細胞培養物または組成物等の投与を受ける対象とは異種の個体である。

[0063] 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、シート状細胞

培養物のサイズ、重量、枚数等）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。

[0064] 投与方法としては、典型的には組織への直接的な適用が挙げられる。投与頻度は、典型的には1回の処置につき1回であるが、所望の効果が得られない場合には、複数回投与することも可能である。組織に適用する際、本発明のシート状細胞培養物や組成物等を対象の組織に縫合糸やステープルなどの係止手段により固定してもよい。

[0065] 本発明の別の側面は、多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導を受けた細胞集団から解離した細胞を凍結保護剤を含む凍結保存液中で凍結するステップを含む、前記解離した細胞における分化した多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞から分化誘導された心筋細胞の純度を高める方法に関する。

[0066] 上記凍結するステップは、本発明の製造方法について上記したとおりである。また、「分化した多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞の純度を高める」とは、凍結後の多能性幹細胞または間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導を受けた細胞集団から解離した全細胞数に対する分化した多能性幹細胞または間葉系幹細胞由来の心筋細胞数の割合を、凍結前と比較して約5%以上、約10%以上、約15%以上または約20%以上高めることなどを意味する。

[0067] 本発明の別の側面は、多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導を受けた細胞集団から解離した細胞を凍結保護剤を含む凍結保存液中で凍結するステップを含む、前記解離した細胞における未分化の多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系

幹細胞の割合を低下させる方法に関する。

[0068] 上記凍結するステップは、本発明の製造方法について上記したとおりである。また、「未分化の多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞の割合を低下させる」とは、凍結後の多能性幹細胞または間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導を受けた細胞集団から解離した全細胞数に対する未分化の多能性幹細胞または間葉系幹細胞数の割合が、凍結前と比較して約5%以上、約10%以上、約15%以上または約20%以上低下することなどを意味する。

実施例

[0069] 本発明を以下の例を参照してより詳細に説明するが、これら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。

[0070] 例1 ヒトiPS細胞からの心筋細胞の誘導

ヒトiPS細胞株253G1を理化学研究所から購入して使用した。Matsuura K et al., Biochem Biophys Res Commun, 2012 Aug 24;425(2):321-7に記載の方法に従いリアクターを用いて心筋分化誘導を行った。具体的には、Primate ES培地（リプロセル社）に5 ng/mLのbFGFを添加したものを未分化維持培地として用い、マイトマイシンC処理を行ったMEF上で未分化253G1細胞を培養した。10 cm培養皿10枚分の未分化253G1細胞を、剥離液（リプロセル社）を用いて回収し、10 μMのY27632（ROCK阻害剤）を添加したmTESR培地（ステムセルテクノロジーズ）100 mLに懸濁した後、ベッセルに移し、バイオリアクター（エイブル社）で攪拌培養を開始した。1日後、培地からY27632を除いた。1～3日後に培地をStemPro-34（ライフテクノロジーズ）に置換し、3日～4日後に0.5 ng/mLのBMP4を添加し、4～7日後に10 ng/mLのBMP4と5 ng/mLのbFGFと3 ng/mLのアクチビンAを添加し、7～9日後に4 μMのIWR-1を添加し、9日目以降は5 ng/mLのVEGFと10 ng/mLのbFGFを添加して攪拌を続け、16～18日後に細胞を回収した。

こうしてヒト i P S 細胞由来の心筋細胞を含む細胞集団（細胞塊）を得た。当該細胞集団は、0.05%トリプシン／EDTAで解離後、残存する細胞凝集物をストレイナー（BD Bioscience社製）で除去し、その後の実験に供した。

[0071] 例2 ヒト i P S 細胞由来の心筋細胞の凍結保存・融解

例1で得た解離した細胞集団の一部を、 $2.5 \times 10^6 \sim 1.1 \times 10^7$ 個／1 mLの濃度で10%DMSOを含む細胞培養用血清代替品（10% DMSO in serum replacement containing culture medium）に懸濁し、液体窒素タンク内で凍結保存した。

凍結保存した細胞を、37℃で解凍し、0.5%血清アルブミンを含む緩衝液を用いて2回洗浄した。

[0072] 例3 ヒト i P S 細胞由来の心筋細胞の生存率評価1

例2に従い、別個に凍結保存・解凍した細胞の4つのサンプルを用意した。各サンプルから一部の細胞を採取し、トリパンブルー染色法により生細胞、死細胞をそれぞれカウントし、総細胞数と生細胞数から生存率を算出した。結果を、以下の表1に示す。

[表1]

表1. 細胞生存率

サンプル	生存率
1	95%
2	99%
3	91%
4	98%

[0073] 表1に示すとおり、本願発明の方法により凍結保存・解凍した多能性幹細胞由来の心筋細胞は、高い細胞生存率を維持することができた。

[0074] 例4 ヒト i P S 細胞由来の心筋細胞の生存率評価2

例1で得た細胞の一部を用いて、当該細胞における i P S 細胞と心筋細胞の割合を調べた。まず、細胞を、i P S 細胞のマーカーである SSEA-4

またはT r a - 1 - 6 0と心筋細胞のマーカーであるc - T N Tの両方について二重標識した。

[0075] 標識した細胞を、BD FACSCanto™ II フローサイトメーターおよびBD FACSDiva™ ソフトウェア（いずれもBD社製）を用いて解析した。全細胞数に対するi P S細胞および心筋細胞それぞれの割合は、全細胞数に対するS S E A - 4またはT r a - 1 - 6 0陽性細胞数およびc - T N T陽性細胞数それぞれの割合として算出した。結果を、図1～3に示す。

また、参考のために、例1の分化誘導前のi P S細胞の一部について、例1に記載の方法により解離および細胞凝集物除去し、例2に従い凍結保存・解凍し、上述と同様に標識、分析および算出した結果を、図4に示す。

S S E A - 4およびc - T N Tで二重標識した細胞は、図1および2に示すとおり、c - T N T陽性率は凍結前後45%台から44%台に低下したに止まったのに対し、S S E A - 4陽性率は凍結前20.6%から凍結後8.4%に減少した。i P S細胞のみで凍結保存した際にも、図4に示すとおり、S S E A - 4陽性率は約87%から約73%に減少した。T r a - 1 - 6 0およびc - T N Tで二重標識した細胞は、図3に示すとおり、c - T N T陽性率は凍結前63.5%から凍結後68.7%に上昇しているのに対し、T r a - 1 - 6 0陽性率は凍結前0.8%から凍結後0.6%に減少し、約25%の減少率を示した。

[0076] 例5 シート状細胞培養物の作製

UpCell^(R) 3.5 cmディッシュ (CellSeed Inc.) に、培養表面が全て覆われる程度の20%血清含有培地を添加し、37℃、5%CO₂の環境で3時間～3日間処理した。処理後、添加した培地は廃棄した。例2で得られた細胞を、10%血清含有培地に懸濁し、処理済みUpCell^(R)に2～10×10⁵個/cm²の密度で播種し、37℃、5%CO₂の環境で3～5日間、シート化培養を行った。

[0077] 例6 シート状細胞培養物の評価

(1) 外観

例5で作成したシート状細胞培養物は、移植に適した白色円形の形状を形成することができた(図5)。

(2) ヘマトキシリン・エオシン染色

例5で作成したシート状細胞培養物の一部の細胞を採取し、当該細胞に、ヘマトキシリン・エオシン染色(HE染色)を行った。染色した細胞を、光学顕微鏡で観察した。図6に示すとおり、細胞核が青紫に染色され、細胞質が赤黄色に染色され、例5で作成したシート状細胞培養物の細胞は、細胞膜や細胞核が正常であることが確認された。

(3) 免疫染色

例5で作成したシート状細胞培養物の一部の細胞を採取し、当該細胞を、アクチニンのマーカーであるActinin、心筋細胞のマーカーであるc-TNTおよびDNAのマーカーである4', 6-ジアミジノー2-フェニルインドール(DAPI)について多重染色した。標識した細胞を、励起波長を当てて蛍光発色させ、蛍光顕微鏡で観察した。図7に示すとおり、Actinin陽性部分は赤色に、c-TNT陽性部分は緑色に、DAPI陽性部分は青紫色に発光した。図7から、例5で作成したシート状細胞培養物の細胞は、心筋細胞であり、心筋細胞として機能することが確認された。

(4) 同期拍動

例5で作成したシート状細胞培養物を、マルチチャンネル細胞外記録法(Multi Electrode Dish: MED、アルファメッドサイエンティフィック社製、MED 64システム)を用いて解析した。当該シート状細胞培養物は、自発的な同期拍動を示した(図8)。

[0078] 例7 ヒトiPS細胞由来の心筋細胞の安定性データ

例1で得た解離した細胞集団の一部を、 1.0×10^7 個/1 mLの濃度で市販のSTEM-CELLBANKER^(R) GMP Grade(日本全薬工業株式会社)に懸濁し、プログラムフリーザーPDF-2000G(ストレックス)を用いた緩慢凍結し、液体窒素タンク内で凍結保存した。プログラムフリーザーの緩慢凍結条件は、4℃で10分間プレコンディショニングした後、 $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ での緩慢凍結で

あった。その後、凍結保存開始日を0日目として1日目と42日目に細胞を、37℃で解凍し、0.5%血清アルブミンを含む緩衝液を用いて2回洗浄した。各サンプルの細胞を採取し、トリパンブルー染色法により生細胞、死細胞をそれぞれカウントし、総細胞数と生細胞数から細胞回収率を算出した。結果を図9に示す。本願発明の方法により凍結保存・解凍した多能性幹細胞由来の心筋細胞は、凍結保存開始1日目に解凍した場合も凍結保存開始42日目に解凍した場合も70%前後の細胞回収率を維持した。上記結果から、本願発明の方法により凍結保存・解凍した多能性幹細胞由来の心筋細胞は、1ヶ月以上保存後にも高い安定性を維持していることが分かった。

[0079] 例8 凍結保存液の比較

例1で得た解離した細胞集団の一部を、 1.0×10^6 個/1 mLの濃度でDMSOが0~15%濃度範囲になるよう調整した細胞培養用血清代替品（0~15% DMSO in serum replacement containing culture medium）または市販のSTEM-CELLBANKER^(R) GMP Grade（日本全薬工業株式会社）に懸濁し、-80℃の超低温冷凍庫でBICELL^(R)を用いた緩慢凍結し、液体窒素タンク内で凍結保存した。その後、凍結保存した細胞を、37℃で解凍し、0.5%血清アルブミンを含む緩衝液を用いて2回洗浄した。各サンプルの細胞を採取し、トリパンブルー染色法により生細胞、死細胞をそれぞれカウントし、総細胞数と生細胞数から細胞回収率を算出した。結果を、図10に示す。凍結保存液としては、STEM-CELLBANKER^(R) GMP Gradeまたは5%~10%のDMSO凍結保存液が、25%以上のより高い心筋細胞の回収率を示した。

[0080] 例9 凍結方法の比較

例1で得た解離した細胞集団の一部を、 1.0×10^6 個/1 mLの濃度でDMSO濃度が10%となるように調製した細胞培養用血清代替品（10% DMSO in serum replacement containing culture medium）あるいは市販のSTEM-CELLBANKER^(R) GMP GradeまたはSTEM-CELLBANKER^(R) DMSO Free GMP Grade（日本全薬工業株式会社）に懸濁し、プログラムフリーザーPDF-2000G（ストレックス）または-80℃の超低温冷凍庫でBICELL^(R)を用いた緩慢凍結し、液体窒

素タンク内で凍結保存した。プログラムフリーザーの緩慢凍結条件は、 4°C で10分間プレコンディショニングした後、 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ での緩慢凍結であった。その後、凍結保存液および凍結手段の各組合せで凍結保存した細胞を、 37°C で解凍し、0.5%血清アルブミンを含む緩衝液を用いて2回洗浄した。各サンプルの細胞を採取し、トリパンブルー染色法により生細胞、死細胞をそれぞれカウントし、総細胞数と生細胞数から細胞回収率を算出した。結果を、図11に示す。いずれの組合せも、42%以上の心筋細胞の回収率を達成した。中でも、STEM-CELLBANKER^(R) DMSO Free GMP Gradeおよびプログラムフリーザーで凍結保存する方法が、最も高い心筋細胞の回収率(67%)を示した。

[0081] 例10 ヒトiPS細胞由来の心筋細胞シートの有効性評価

凍結したiPS細胞由来心筋細胞と凍結していないiPS細胞由来心筋細胞からそれぞれ細胞シートを調製して、虚血性心筋梗塞モデルのヌードラットに移植して、心機能改善効果を確認した。凍結するiPS細胞由来心筋細胞は 1.0×10^7 個/ 1 mL の濃度で市販のSTEM-CELLBANKER^(R) GMP Grade (日本全薬工業社)に懸濁し、プログラムフリーザーを用いた緩慢凍結し、液体窒素タンク内で凍結保存した。融解操作は 37°C で解凍し、0.5%血清アルブミンを含む緩衝液を用いて2回洗浄した。凍結しないiPS細胞由来心筋細胞細胞は、20%血清含有培地に懸濁した。各サンプルの細胞を採取し、トリパンブルー染色法により、総細胞数と生細胞数から細胞回収率を算出した。UpCell^(R) 48 wellディッシュ (CellSeed Inc.) に、培養表面が全て覆われる程度の20%血清含有培地を添加し、 37°C 、5% CO_2 の環境で3時間~3日間処理した。処理後、添加した培地は廃棄した。凍結していないiPS細胞由来心筋細胞および凍結したiPS細胞由来心筋細胞をそれぞれ10%血清含有培地に懸濁し、処理済みUpCell^(R)に $2 \sim 1.0 \times 10^5$ 個/ cm^2 の密度で播種し、 37°C 、5% CO_2 の環境で2~5日間、シート化培養を行った。作製した細胞シートを剥離して、虚血性心筋梗塞モデルのヌードラットの心臓表面に移植した。結果を、図12に示す。移植後4週目の心エコ

一および心カテテル検査で、i P S 心筋細胞シート群は細胞シートを移植しないSham ope群と比較して、心機能 (ejection fraction: EF, fractional shortening: FS) の有意な改善が認められた (非凍結心筋細胞群: $51 \pm 3\%$, $n=6$ 、凍結心筋細胞群: $51 \pm 5\%$, $n=7$ 、Sham群: $39 \pm 1\%$, $n=6$)。一方、非凍結心筋細胞群と凍結心筋細胞群では心機能に有意な差は認められなかった。また、どちらの群においても、移植した細胞シートによる腫瘍形成など、特段の異常は認められなかった。

[0082] 本明細書に記載された本発明の種々の特徴は様々に組み合わせることができ、そのような組合せにより得られる態様は、本明細書に具体的に記載されていない組合せも含め、すべて本発明の範囲内である。また、当業者は、本発明の精神から逸脱しない多数の様々な改変が可能であることを理解しており、かかる改変を含む均等物も本発明の範囲に含まれる。したがって、本明細書に記載された態様は例示にすぎず、これらが本発明の範囲を制限する意図をもって記載されたものではないことを理解すべきである。

請求の範囲

- [請求項1] 多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞の凍結保存方法であって、
多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導を受けた細胞集団から細胞を解離するステップ、
を含む方法。
- [請求項2] 解離した細胞を凍結保護剤を含む凍結保存液中で凍結するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 凍結保護剤が、細胞膜透過性の凍結保護剤である、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 凍結保護剤が、ジメチルスルホキシド、エチレングリコール（EG）、プロピレングリコール（PG）、1，2-プロパンジオール（1，2-PD）、1，3-プロパンジオール（1，3-PD）、ブチレングリコール（BG）、イソプレングリコール（IPG）、ジプロピレングリコール（DPG）およびグリセリンからなる群から選択される1種または2種以上である、請求項2または3に記載の方法。
- [請求項5] 凍結保護剤が、ジメチルスルホキシドである、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 凍結保護剤が、1，2-プロパンジオールである、請求項4に記載の方法。
- [請求項7] 多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞である、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] シート状細胞培養物の製造方法であって、
請求項1～7のいずれか一項に記載の方法により得られた凍結した細胞を解凍するステップ、および
シート状細胞培養物を形成するステップ、
を含む方法。
- [請求項9] 請求項8に記載の方法により製造されたシート状細胞培養物、前記

シート状培養物を含む組成物、あるいは請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法により得られた凍結した細胞、細胞培養液および培養基材を含むキットの、薬剤のスクリーニングのための使用。

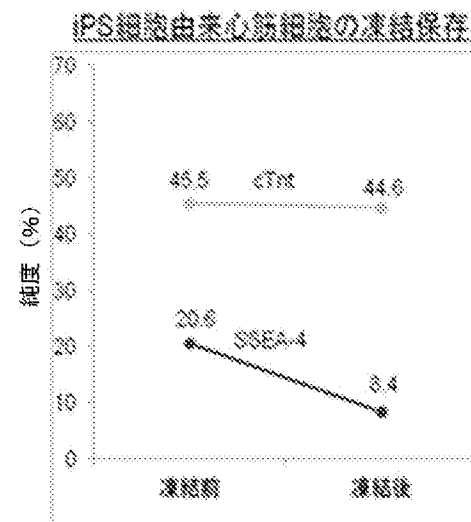
[請求項10] キットが、医療用接着剤および細胞洗浄液をさらに含む、請求項 9 に記載の使用。

[請求項11] 対象において疾患を処置する方法であって、請求項 8 に記載の方法により製造されたシート状細胞培養物または前記シート状細胞培養物を含む組成物の有効量を、それを必要とする対象に適用することを含む方法。

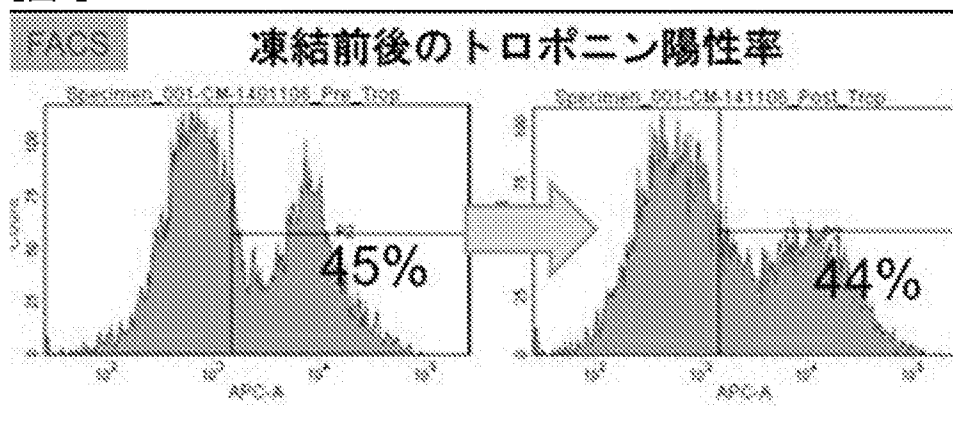
[請求項12] 多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導を受けた細胞集団から解離した細胞における分化した多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞の純度を高める方法であって、
解離した細胞を凍結保護剤を含む凍結保存液中で凍結するステップ、
を含む方法。

[請求項13] 多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導を受けた細胞集団から解離した細胞における未分化の多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞の割合を低下させる方法であって、
解離した細胞を凍結保護剤を含む凍結保存液中で凍結するステップ、
を含む方法。

[図1]

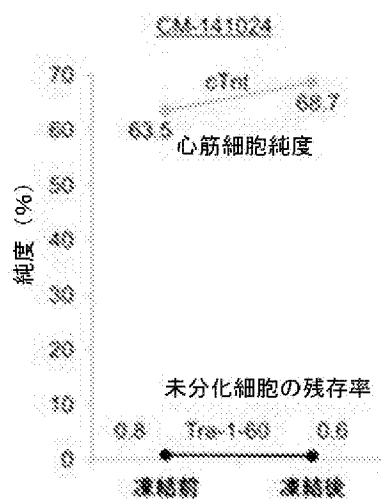


[図2]

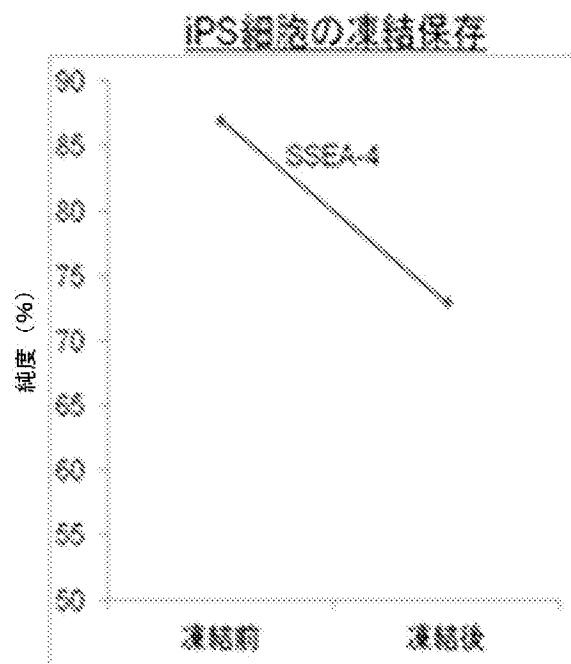


[図3]

凍結保存による未分化細胞の精製



[図4]



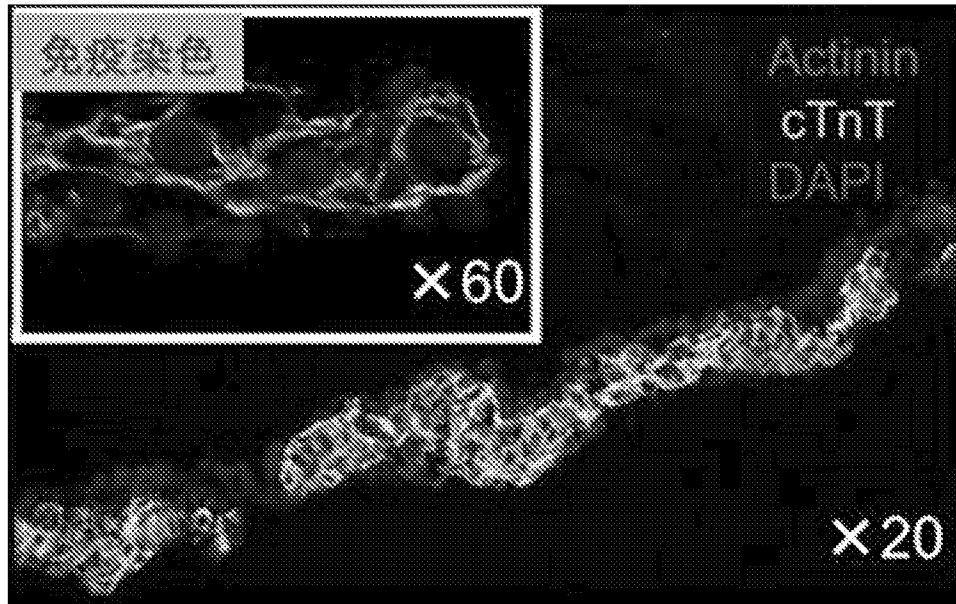
[図5]



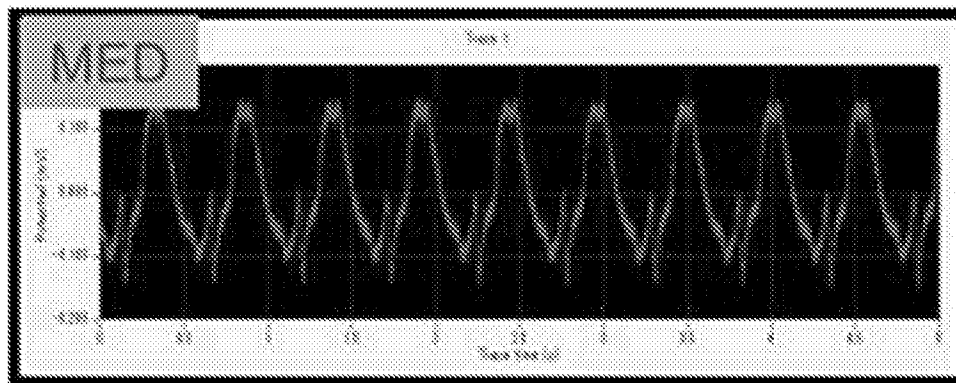
[図6]



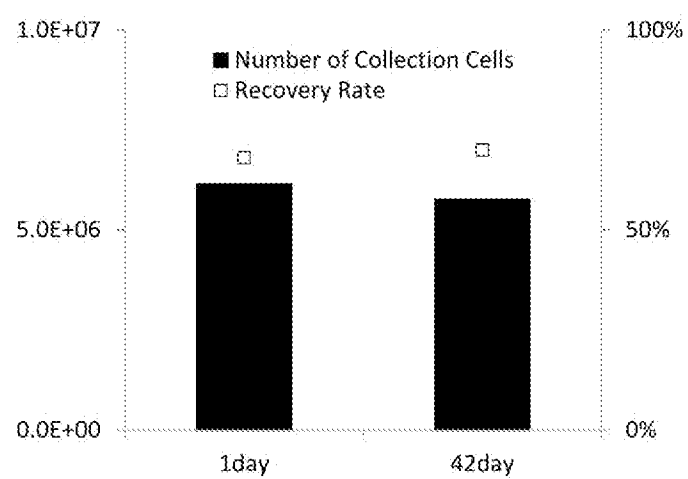
[図7]



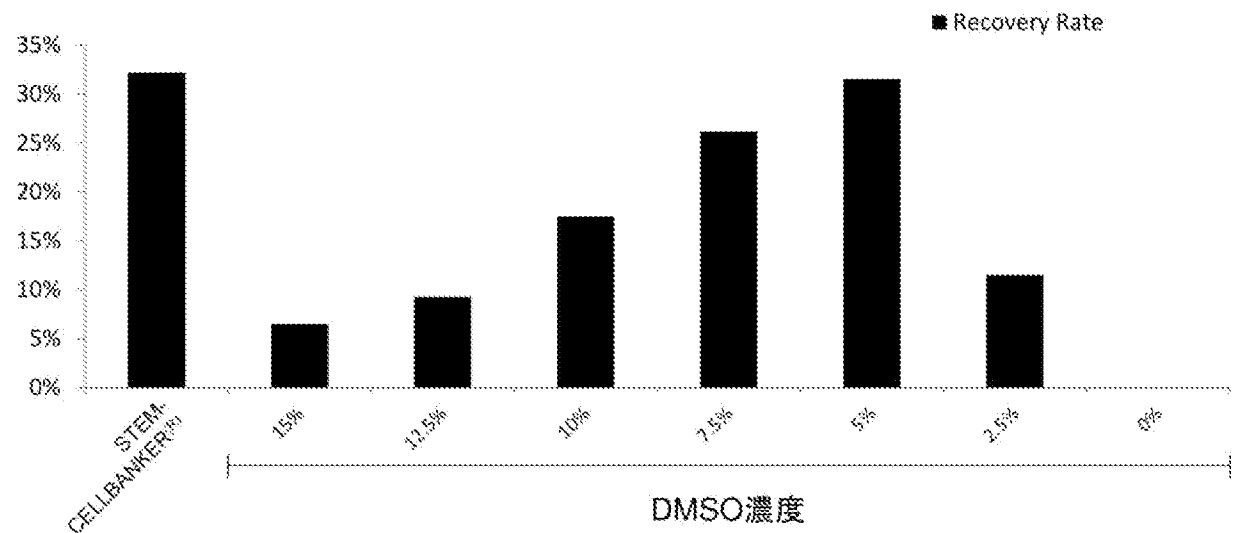
[図8]



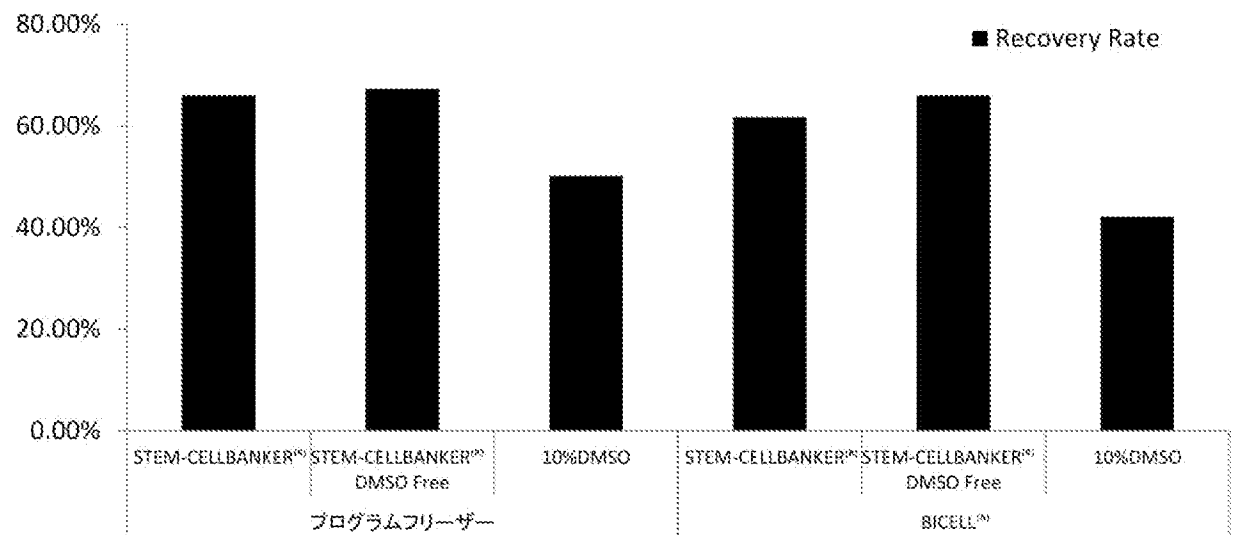
[図9]

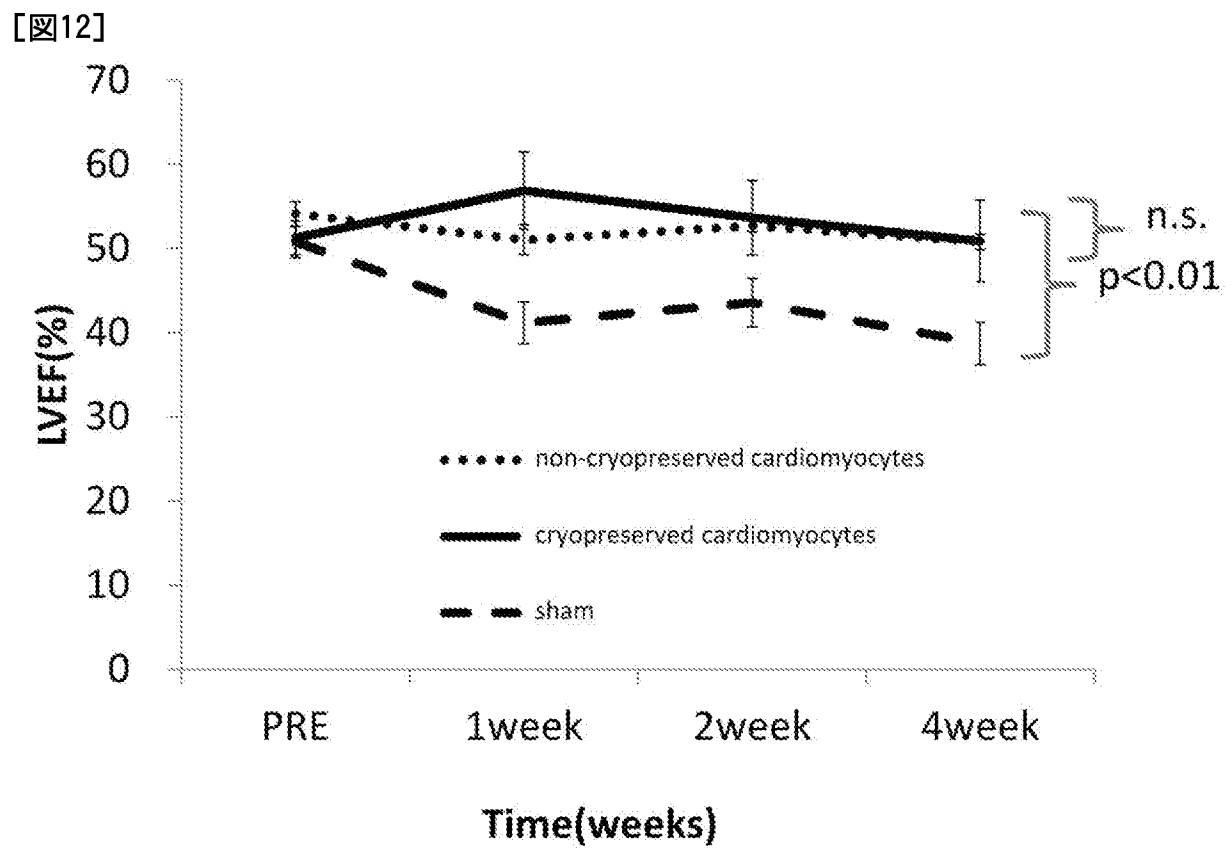


[図10]



[図11]





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/070816

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/10(2006.01)i, A61K35/34(2015.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/04(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C12N5/074(2010.01)i, C12N5/0775(2010.01)i, C12Q1/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/10, A61K35/34, A61P9/00, A61P9/04, A61P9/10, C12N5/071, C12N5/074, C12N5/0775, C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2014-183825 A (Naofumi MORIGUCHI), 02 October 2014 (02.10.2014), claims; examples (Family: none)	1-5, 7, 12-13 4, 6, 8-11
Y	JP 2013-110988 A (Sumitomo Chemical Co., Ltd.), 10 June 2013 (10.06.2013), claims; paragraphs [0024], [0026] & US 2014/0342346 A1 claims; paragraphs [0036], [0040] & WO 2013/077424 A1 & EP 2784154 A1 & AU 2012341416 A & CA 2856850 A & CN 103958669 A & KR 10-2014-0103979 A	4, 6, 8-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 September 2016 (23.09.16)

Date of mailing of the international search report
04 October 2016 (04.10.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/070816

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/185517 A1 (Terumo Corp.), 20 November 2014 (20.11.2014), claims & US 2016/0067284 A claims & JP 5634646 B & JP 2015-15963 A & JP 2015-77135 A & EP 2998389 A & CN 105229145 A	8-11
P, Y	STEM-CELLBANKER DMSO Free GMP grade, 2015.11, URL: https://www.takara-bio.co.jp/goods/catalog/pdf/stem-cellbanker_dmso_free.pdf	4, 6
P, Y	STEM-CELLBANKER DMSO Free GMP grade, Seihin Anzen Data Sheet, 01 November 2015 (01.11.2015) URL: http://www.zenoaq.jp/cellbanker/ja/pdf/msds_stem_cellbanker_dmso_gmp_grade_20151101ja.pdf	4, 6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, A61K35/34(2015.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/04(2006.01)i,
A61P9/10(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C12N5/074(2010.01)i, C12N5/0775(2010.01)i,
C12Q1/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/10, A61K35/34, A61P9/00, A61P9/04, A61P9/10, C12N5/071, C12N5/074, C12N5/0775, C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 2014-183825 A (森口 尚史) 2014. 10. 02, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-5, 7, 12-13 4, 6, 8-11
Y	JP 2013-110988 A (住友化学株式会社) 2013. 06. 10, 特許請求の範囲、[0024]、[0026] & US 2014/0342346 A1, 特許請求の範囲、[0036]、[0040] & WO 2013/077424 A1 & EP 2784154 A1 & AU 2012341416 A & CA 2856850 A & CN 103958669 A & KR 10-2014-0103979 A	4, 6, 8-11

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 3 . 0 9 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

0 4 . 1 0 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

飯室 里美

4 N

2 9 3 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2014/185517 A1 (テルモ株式会社) 2014. 11. 20, 特許請求の範囲 & US 2016/0067284 A, 特許請求の範囲 & JP 5634646 B & JP 2015-15963 A & JP 2015-77135 A & EP 2998389 A & CN 105229145 A	8-11
P, Y	STEM-CELLBANKER DMSO Free GMP grade, 2015. 11, URL: https://www.takara-bio.co.jp/goods/catalog/pdf/stem-cellbanker_dmso_free.pdf	4, 6
P, Y	STEM-CELLBANKER DMSO Free GMP grade、製品安全データシート, 2015. 11. 01 URL: http://www.zenoaq.jp/cellbanker/ja/pdf/msds_stem_cellbanker_dmso_gmp_grade_20151101ja.pdf	4, 6