

(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
2022年3月17日(17.03.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/054925 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/0793 (2010.01) A61L 27/38 (2006.01)
C12N 5/0797 (2010.01) A61L 27/44 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01) A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01) A61L 27/58 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/033387

(22) 国際出願日: 2021年9月10日(10.09.2021)

(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 2020-153257 2020年9月11日(11.09.2020) JP

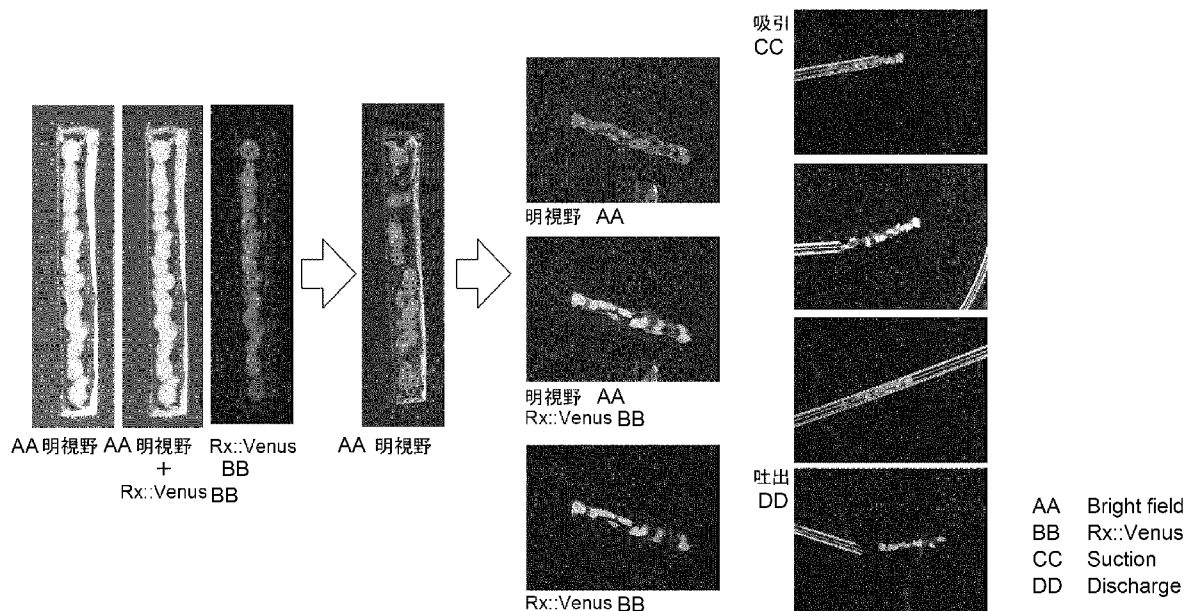
(71) 出願人: 国立研究開発法人理化学研究所
(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢

2 番 1 号 Saitama (JP). 大日本住友製薬株式会社(SUMITOMO DAINIPPON PHARMA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5418524 大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 6 番 8 号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 万代 道子 (MANDAI Michiko); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 高橋 政代(TAKAHASHI Masayo); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 山▲崎▼ 優(YAMASAKI Suguru); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町 1-5-2 神戸キメックセンタービル 5 F 大日本住友製薬株式会社内 Hyogo (JP).

(54) Title: COMPLEX CONTAINING NEURAL RETINA-CONTAINING CELL AGGREGATES AND MATRIX, AND METHOD FOR MANUFACTURING SAME

(54) 発明の名称: 神経網膜を含む細胞凝集体とマトリクスとを含む複合体及びその製造方法



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a complex containing two or more neural retina-containing cell aggregates and a matrix, and a method for manufacturing the same. The complex according to the present invention contains two or more cell aggregates, which contain pluripotent stem cell-derived neural retinas, and a matrix, where the two or more cell aggregates are disposed inside the matrix. The method for manufacturing the complex according to the present invention is a method for manufacturing a complex in which two or more neural retina-containing cell aggregates are disposed inside a matrix, the method including: (1) a first step for producing the two or more neural retina

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外 (HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 9階 創英国際特許法律事務所 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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), ヨーロッパ (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))

cell aggregates from pluripotent stem cells, and (2) a second step for making the matrix into a gel by causing the two or more cell aggregates to come into contact with the matrix or a matrix precursor in a prescribed arrangement.

(57) 要約: 本発明は、2以上の神経網膜を含む細胞凝集体を含む複合体及びその製造方法を提供することを目的とする。本発明の複合体は、2以上の多能性幹細胞由来の神経網膜を含む細胞凝集体と、マトリクスとを含み、前記2以上の細胞凝集体が前記マトリクス中に配置されている複合体である。本発明の複合体の製造方法は、マトリクス中に2以上の神経網膜を含む細胞凝集体が配置された複合体の製造方法であって、(1)多能性幹細胞から2以上の神経網膜の細胞凝集体を作製する第一工程と、(2)前記2以上の細胞凝集体を所定の配置でマトリクス又はマトリクスの前駆体と接触させてから、前記マトリクスをゲル化させる第二工程とを含む。

明 細 書

発明の名称：

神経網膜を含む細胞凝集体とマトリクスとを含む複合体及びその製造方法 技術分野

[0001] 本発明は、神経網膜を含む細胞凝集体とマトリクスとを含む複合体及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 網膜色素変性等網膜組織の障害に基づく疾患に対する網膜の移植治療に関連し、多能性幹細胞から神経網膜を製造する方法の研究が活発に行われている。多能性幹細胞から神経網膜を製造する方法として、例えば、多能性幹細胞の凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質を含む培地中で浮遊培養することにより、神経網膜を得る方法（特許文献1、2及び非特許文献1）が知られている。

[0003] 一方、これまで、移植においてゼラチンを利用する技術が検討されてきた。例えば、視細胞層を切り出す際の切り出しやすさを改善するために、生体網膜組織をゼラチンで固める方法（非特許文献2）、温度感受性ゼラチンで生体網膜組織を包埋する方法（非特許文献3）、壊れやすい胎児組織を保護するために、ヒト胎児由来網膜組織をゼラチンで包埋する方法（非特許文献4）等が挙げられる。

[0004] また、フィブリンゲルは、組織の接着及び閉鎖による組織修復の目的でヒトに投与されている。その一例は、ボルヒール（登録商標）組織接着剤が挙げられる。また、移植用組織の強度を高めるためにフィブリンゲルが用いられた、フィブリンゲルとシート状細胞培養物との積層体が開示されている（特許文献3）。さらに、フィブリンゲルに包埋した網膜前駆細胞の移植に関する報告がされている（非特許文献5）。

[0005] しかしながら、2以上の神経網膜の接着目的でのゼラチン、フィブリンゲル等のマトリクスの利用はこれまで知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2015／025967号

特許文献2：国際公開第2016／063986号

特許文献3：特開2016－52271号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Atsushi Kuwahara et al., “Generation of a ciliary margin-like stem cell niche from self-organizing human retinal tissue”, Nature Communications, 6, Article number:6286 (2015)

非特許文献2：Taylor et al., IOVS 1989 Aug; Volume30, Issue 8

非特許文献3：M’ Barek et al., Sci. Transl. Med.2017 Dec; Volume 9, Issue 421

非特許文献4：Seiler et al., Prog Retin Eye Res.2012Nov;31(6):661-687

非特許文献5：Tamer A.E. Ahmed et al., Frontiersin Bioengineering and Biotechnology, Biomaterials, February 2015, Volume2, Article 85, 1-11

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 再生医療応用するための、移植用組織を製剤化する方法として、複数の組織を簡便に接着させる方法が切望されている。そこで、本発明は、2以上の神経網膜を含む細胞凝集体を含む複合体を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、2以上の神経網膜を含む細胞凝集体を何らかの「糊」を用いて接着又は包埋させ、複合体を形成させる方法の検討を行った。異物である「糊」は、当該複合体の移植後の生着の妨げになり、生体にとっても異物になり得る。そのため、「糊」としては、少量で強固に接着し、生体内で分解される物質であるマトリクスが好ましいと考えた。

[0010] 本発明者らは鋭意検討の結果、フィブリンゲル又はゼラチンを「糊」とし

て用い、2以上の神経網膜を含む細胞凝集体を包埋し、2以上の神経網膜を含む細胞凝集体とマトリクスとの複合体を製造することに成功した。この方法では、2以上の神経網膜を含む細胞凝集体をマトリクスに包埋することにより、マトリクスゲルを崩すことなく、注射器での吸い込み・吹き出しを可能とする。

[0011] すなわち、本発明は以下の各発明に関する。

[1]

2以上の多能性幹細胞由来の神経網膜を含む細胞凝集体と、マトリクスとを含み、上記2以上の細胞凝集体が上記マトリクス中に配置されている、複合体。

[2]

上記神経網膜が、下記(1)～(10)の特徴を有する移植用神経網膜シートである、[1]に記載の複合体:

- (1) 多能性幹細胞由来であり、
- (2) 3次元構造を有し、
- (3) 視細胞層及び内層を含む複数の層構造を有する神経網膜層を含み、
- (4) 上記視細胞層が、視細胞前駆細胞及び視細胞からなる群から選択される1以上の細胞を含み、
- (5) 上記内層が、網膜前駆細胞、神経節細胞、アマクリン細胞及び双極細胞、水平細胞、ミュラーグリア細胞からなる群から選択される1以上の細胞を含み、
- (6) 上記神経網膜層の表面が、頂端面を有し、
- (7) 上記頂端面に沿って存在する視細胞層の内側に上記内層が存在し、
- (8) 上記移植用神経網膜シートの表面の総面積に対して、上記神経網膜層の面積が50%以上であり、
- (9) 上記神経網膜層の頂端面の総面積に対して、連続上皮構造の面積が80%以上であり、
- (10) 上記移植用神経網膜シート中の神経網膜系細胞関連遺伝子の発現が

認められ、かつ、非神経網膜系細胞関連遺伝子の発現が認められず、上記非神経網膜系細胞関連遺伝子が、脳脊髄組織マーカー遺伝子及び眼球関連組織マーカー遺伝子からなる群から選択される1以上の遺伝子を含む。

[3]

上記細胞凝集体が $600\mu\text{m}\sim 2500\mu\text{m}$ の長径を有し、上記2以上の細胞凝集体が上記マトリクス中に列状に配置されている、[1]又は[2]に記載の複合体。

[4]

上記マトリクスがフィブリンゲル又はゼラチンである、[1]～[3]のいずれかに記載の複合体。

[5]

マトリクス中に2以上の神経網膜を含む細胞凝集体が配置された複合体の製造方法であって、

(1) 多能性幹細胞から2以上の神経網膜の細胞凝集体を作製する第一工程と、

(2) 上記2以上の細胞凝集体を所定の配置でマトリクス又はマトリクスの前駆体と接触させてから、上記マトリクスをゲル化させる第二工程と、を含む、製造方法。

[6]

第二工程において、2個～20個の細胞凝集体を列状に配置することを含む、[5]に記載の製造方法。

[7]

上記マトリクスがフィブリンゲルであり、第二工程において、上記2以上の細胞凝集体を列状に配置し、配置された2以上の細胞凝集体を、フィブリノーゲン溶液及びトロンビン溶液のいずれか一方に接触させ、さらにフィブリノーゲン溶液及びトロンビン溶液の他方に接触させることにより、上記フィブリノーゲン及び上記トロンビンを反応させ、ゲル化させる、[5]又は[6]に記載の製造方法。

[8]

上記マトリクスがゼラチンである、[5] 又は [6] に記載の製造方法。

[9]

[1] ～ [3] のいずれかに記載の複合体を含む、医薬組成物。

[1 0]

[1] ～ [3] のいずれかに記載の複合体を、移植を必要とする対象に移植することを含む、網膜系細胞若しくは網膜組織の障害又は網膜組織の損傷に基づく疾患の、治療方法。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、2以上の神経網膜を含む細胞凝集体とマトリクスを含む複合体を提供することができ、それによって複数の神経網膜（N R）を含む細胞凝集体の同時移植を容易に実施することができるようになる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]実施例1において、複数個（8～13個）の移植用神経網膜（C a p）をフィブリンゲル（複合体）に封入する過程およびサーフロを用いて吸引・吐出検討した明視野実体顕微鏡写真、蛍光実体顕微鏡写真及び明視野＋蛍光顕微鏡写真である。

[図2]実施例2において、複数個（8～10個）の移植用神経網膜（C a p）をゼラチン（複合体）に封入する過程および先端が太い1 m l のチップを用いて吸引・吐出検討した明視野実体顕微鏡写真、蛍光実体顕微鏡写真及び明視野＋蛍光顕微鏡写真である。

[図3]参考例1における、移植用神経網膜を含む細胞凝集体に対してC r x及びC h x 1 0で免疫染色を行った結果を示す蛍光顕微鏡画像である。

[図4]参考例1における、移植用神経網膜を含む細胞凝集体に対してR x及びR e c o v e r i nで免疫染色を行った結果を示す蛍光顕微鏡画像である。

[図5]典型的な細胞凝集体からキャップ及びリングを作製する概念図である。

[図6]様々な形状をした細胞凝集体からキャップ及びリングを作製する概念図である。黒色及び灰色で示される部分は目的外組織を意味する。

[図7]典型的な移植片の画像及び移植片の模式図とともに、参考例3における、移植片の高さ、長径及び短径を示す。

[図8]参考例4における、移植片に対してC r x、C h x 1 0、R x及びR e c o v e r i nで免疫染色を行った結果を示す共焦点蛍光顕微鏡画像である。

[図9A]参考例5における、キャップ及びリングから抽出されたRNAにおける遺伝子発現を定量PCRで解析した結果を示す。

[図9B]参考例5における、キャップ及びリングから抽出されたRNAにおける遺伝子発現を定量PCRで解析した結果を示す。

[図10]参考例6における、リングから抽出したRNAを定量PCRで解析した後に、移植片（キャップ）をラット網膜下に移植し、移植後の生着像を蛍光顕微鏡による観察した結果を示す画像である。

[図11]参考例7における、一つの細胞凝集体から作製したキャップ及びリングに対して免疫染色を行った結果を示す蛍光顕微鏡画像である。

[図12]参考例8における、一つの細胞凝集体から作製したキャップに対して免疫染色を行った結果を示す蛍光顕微鏡画像である。

発明を実施するための形態

[0014] [定義]

「幹細胞」とは、分化能及び増殖能（特に自己複製能）を有する未分化な細胞を意味する。幹細胞には、分化能力に応じて、多能性幹細胞（*pluripotent stem cell*）、複能性幹細胞（*multipotent stem cell*）、単能性幹細胞（*unipotent stem cell*）等の亜集団が含まれる。多能性幹細胞とは、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ、三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）及び／又は胚体外組織に属する細胞系譜すべてに分化しうる能力（分化多能性（*pluripotency*））を有する幹細胞をいう。複能性幹細胞とは、全ての種類ではないが、複数種の組織や細胞へ分化し得る能力を有する幹細胞を意味する。単能性幹細胞とは、特定の組織や細胞へ分化し得る能力を

有する幹細胞を意味する。

[0015] 「多能性幹細胞」は、受精卵、クローン胚、生殖幹細胞、組織内幹細胞、体細胞等から誘導することができる。多能性幹細胞としては、胚性幹細胞（ES細胞：Embryonic stem cell）、EG細胞（Embryonic germ cell）、人工多能性幹細胞（iPS細胞：induced pluripotent stem cell）等を挙げることが出来る。間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell；MSC）から得られるMuse細胞（Multi-lineage differentiating stress enduring cell）や、生殖細胞（例えば精巢）から作製されたGS細胞も多能性幹細胞に包含される。

[0016] 1998年にヒト胚性幹細胞が樹立されており、再生医学にも利用されつつある。胚性幹細胞は、内部細胞凝集体をフィーダー細胞上又はbFGFを含む培地中で培養することにより製造することが出来る。胚性幹細胞の製造方法は、例えば、WO96/22362、WO02/101057、US5,843,780、US6,200,806、US6,280,718等に記載されている。胚性幹細胞は、所定の機関より入手でき、また、市販品を購入することもできる。例えば、ヒト胚性幹細胞であるKHES-1、KHES-2及びKHES-3は、京都大学再生医科学研究所より入手可能である。ヒト胚性幹細胞であるRx::Venus、Rx::AcGFP及びCrx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞（KHES-1由来、非特許文献1）は国立研究開発法人理化学研究所より入手可能である。

[0017] 「人工多能性幹細胞」とは、体細胞を、公知の方法等により初期化（reprogramming）することにより、多能性を誘導した細胞である。

[0018] 人工多能性幹細胞は、2006年、山中らによりマウス細胞で樹立された（Cell, 2006, 126（4），pp. 663-676）。人工多能性幹細胞は、2007年にヒト線維芽細胞でも樹立され、胚性幹細胞と同様

に多能性と自己複製能を有する (Cell, 2007, 131 (5), pp. 861-872; Science, 2007, 318 (5858), pp. 1917-1920; Nat. Biotechnol., 2008, 26 (1), pp. 101-106)。

[0019] 人工多能性幹細胞は、具体的には、線維芽細胞や末梢血単核球等分化した体細胞をOct3/4、Sox2、Klf4、Myc (c-Myc、N-Myc、L-Myc)、Glis1、Nanog、Sal14、Lin28、Esrrb等を含む初期化遺伝子群から選ばれる複数の遺伝子の組合せのいずれかの発現により初期化して多分化能を誘導した細胞が挙げられる。好ましい初期化因子の組み合わせとしては、(1) Oct3/4、Sox2、Klf4、及びMyc (c-Myc又はL-Myc)、(2) Oct3/4、Sox2、Klf4、Lin28及びL-Myc (Stem Cells, 2013; 31: 458-466) を挙げることが出来る。

[0020] 人工多能性幹細胞として、遺伝子発現による直接初期化で製造する方法以外に、化合物の添加等により体細胞より人工多能性幹細胞を誘導することもできる (Science, 2013, 341, pp. 651-654)。

[0021] また、株化された人工多能性幹細胞を入手することも可能であり、例えば、京都大学で樹立された201B7細胞、201B7-Ff細胞、253G1細胞、253G4細胞、1201C1細胞、1205D1細胞、1210B2細胞、1231A3細胞等のヒト人工多能性細胞株が、京都大学及びiPSアカデミアジャパン株式会社より入手可能である。株化された人工多能性幹細胞として、例えば、京都大学で樹立されたFf-101細胞、Ff-114細胞及びQHJ101s04細胞が、京都大学より入手可能である。

[0022] 本明細書において、多能性幹細胞は、好ましくは胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞であり、より好ましくは人工多能性幹細胞である。

[0023] 本明細書において、多能性幹細胞は、ヒトの多能性幹細胞であり、好ましくはヒト人工多能性幹細胞 (iPS細胞) 又はヒト胚性幹細胞 (ES細胞) (例えば、受精14日以内の胚から樹立した胚性幹細胞) である。

[0024] ヒト i P S 細胞等の多能性幹細胞は、当業者に周知の方法で維持培養及び拡大培養に付することができる。

[0025] 「網膜組織 (Retinal tissue)」とは、生体網膜において各網膜層を構成する網膜系細胞が、一種類又は複数種類、一定の秩序に従い存在する組織を意味し、「神経網膜 (Neural Retina)」は、網膜組織であって、後述する網膜層のうち網膜色素上皮層を含まない内側の神経網膜層を含む組織を意味する。

[0026] 「網膜系細胞 (Retinal cell)」とは、生体網膜において各網膜層を構成する細胞又はその前駆細胞を意味する。網膜系細胞には、視細胞 (桿体視細胞、錐体視細胞)、水平細胞、アマクリン細胞、介在神経細胞、網膜神経節細胞 (神経節細胞)、双極細胞 (桿体双極細胞、錐体双極細胞)、ミュラーグリア細胞、網膜色素上皮 (RPE) 細胞、毛様体、これらの前駆細胞 (例: 視細胞前駆細胞、双極細胞前駆細胞等)、網膜前駆細胞等の細胞が含まれるがこれらに限定されない。網膜系細胞のうち、神経網膜層を構成する細胞 (神経網膜細胞又は神経網膜系細胞 (Neural retina-related cell) ともいう) として、具体的には、視細胞 (桿体視細胞、錐体視細胞)、水平細胞、アマクリン細胞、介在神経細胞、網膜神経節細胞 (神経節細胞)、双極細胞 (桿体双極細胞、錐体双極細胞)、ミュラーグリア細胞、及びこれらの前駆細胞 (例: 視細胞前駆細胞、双極細胞前駆細胞等) 等の細胞が挙げられる。すなわち、神経網膜系細胞には網膜色素上皮細胞及び毛様体細胞が含まれない。

[0027] 「成熟した網膜系細胞」とは、ヒト成人の網膜組織に含まれ得る細胞を意味し、具体的には、視細胞 (桿体視細胞、錐体視細胞)、水平細胞、アマクリン細胞、介在神経細胞、網膜神経節細胞 (神経節細胞)、双極細胞 (桿体双極細胞、錐体双極細胞)、ミュラーグリア細胞、網膜色素上皮 (RPE) 細胞、毛様体細胞等の分化した細胞を意味する。「未成熟な網膜系細胞」とは、成熟した網膜系細胞への分化が決定づけられている前駆細胞 (例: 視細胞前駆細胞、双極細胞前駆細胞、網膜前駆細胞等) を意味する。

[0028] 視細胞前駆細胞、水平細胞前駆細胞、双極細胞前駆細胞、アマクリン細胞前駆細胞、網膜神経節細胞前駆細胞、ミュラーグリア前駆細胞、網膜色素上皮前駆細胞とは、それぞれ、視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞、ミュラーグリア細胞、網膜色素上皮細胞への分化が決定付けられている前駆細胞をいう。

[0029] 「網膜前駆細胞 (retinal progenitor cell)」とは、視細胞前駆細胞、水平細胞前駆細胞、双極細胞前駆細胞、アマクリン細胞前駆細胞、網膜神経節細胞前駆細胞、ミュラーグリア細胞、網膜色素上皮前駆細胞等のいずれの未成熟な網膜系細胞にも分化しうる前駆細胞であって、最終的に、視細胞、桿体視細胞、錐体視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞、網膜色素上皮細胞等のいずれの成熟した網膜系細胞にも分化しうる前駆細胞をいう。

[0030] 「視細胞 (photoreceptor cell)」とは、生体においては網膜の視細胞層に存在し、光刺激を吸収し電気信号へと変換する役割を持つ。視細胞には、明所で機能する錐体 (cone) と暗所で機能する杆体 (又は桿体、rod) の2種類がある (それぞれ、錐体視細胞、杆体視細胞という)。また、錐体視細胞としては、S-opsinを発現し青色光を受容するS錐体視細胞、L-opsinを発現し赤色光を受容するL錐体視細胞、及びM-opsinを発現し緑色光を受容するM錐体視細胞を挙げることができる。視細胞は視細胞前駆細胞から分化し、成熟する。細胞が視細胞若しくは視細胞前駆細胞であるか否かは、当業者であれば、例えば後述する細胞マーカー (視細胞前駆細胞で発現するCrx及びBlimp1、視細胞で発現するリカバリン (Recoverin)、成熟視細胞で発現するロドプシン、S-Opsin及びM/L-Opsin等) の発現、外節構造の形成等により容易に確認できる。一態様において、視細胞前駆細胞はCrx陽性細胞であり、視細胞はロドプシン、S-Opsin及びM/L-Opsin陽性細胞である。一態様において、桿体視細胞はNRL及びRhodopsin陽性細胞である。一態様において、S錐体視細胞はS-opsin陽

性細胞、L錐体視細胞はL-opsin陽性細胞、及びM錐体視細胞はM-opsin陽性細胞である。すなわち本明細書における視細胞は、視細胞前駆細胞及び成熟視細胞を含む概念である。

[0031] 神経網膜は、好ましくは視細胞又は視細胞前駆細胞を10%以上、より好ましくは20%以上含む。

[0032] 神経網膜は、好ましくは神経網膜前駆細胞を10%以上、より好ましくは20%以上含む。また、神経網膜は、好ましくは視細胞前駆細胞を10%以上含む。また、一態様において、神経網膜は、成熟視細胞を3%以上含む。

[0033] 神経網膜系細胞の存在は、神経網膜系細胞関連遺伝子（以下、「神経網膜系細胞マーカー」、又は「神経網膜マーカー」という場合がある。）の発現の有無によって確認することができる。神経網膜系細胞マーカーの発現の有無、又は細胞集団若しくは組織における神経網膜系細胞マーカー陽性細胞の割合は、当業者であれば容易に確認することができる。例えば、抗体を用いた手法、核酸プライマーを用いた手法、シーケンス反応を用いた手法が挙げられる。抗体を用いた手法としては、神経網膜系細胞マーカーのタンパク質の発現を、例えば、市販の抗体を用いたフローサイトメトリー、免疫染色等の手法によって、特定の神経網膜系細胞マーカー陽性細胞の数を全細胞数で除することにより確認することができる。核酸プライマーを用いた手法としては、神経網膜系細胞マーカーのRNAの発現を、例えば、PCR法、半定量PCR法、定量PCR法（例：リアルタイムPCR法）で確認することができる。シーケンス反応を用いた手法としては、神経網膜系細胞マーカーのRNAの発現を、例えば、核酸シーケンサ（例：次世代シーケンサ）を用いて確認することができる。

[0034] 神経網膜系細胞マーカーとしては、網膜前駆細胞で発現するRx（Raxとも言う）及びPAX6、神経網膜前駆細胞で発現するRx、PAX6及びChx10（Vsx2とも言う）、視細胞前駆細胞で発現するCrx及びBlimp1等が挙げられる。また、双極細胞で強発現するChx10、双極細胞で発現するPKC α 、Go α 、VSX1及びL7、網膜神経節細胞で発

現する *TuJ1* 及び *Brn3*、アマクリン細胞で発現する *Calretinin* 及び *HPC-1*、水平細胞で発現する *Calbindin*、視細胞及び視細胞前駆細胞で発現する *Recoverin*、桿体細胞で発現する *Rhodopsin*、桿体視細胞及び桿体視細胞前駆細胞で発現する *Nrl*、錐体視細胞で発現する *S-opsin* 及び *LM-opsin*、錐体細胞、錐体視細胞前駆細胞及び神経節細胞で発現する *RXR-γ*、錐体視細胞のうち、分化初期に出現する錐体視細胞又はその前駆細胞で発現する *TRβ2*、*OTX2* 及び *OC2*、水平細胞、アマクリン細胞及び神経節細胞で共通して発現する *Pax6* 等が挙げられる。

[0035] 「陽性細胞」とは、特定のマーカーを細胞表面上又は細胞内に発現している細胞を意味する。例えば、「*Chx10*陽性細胞」とは、*Chx10*タンパク質を発現している細胞を意味する。

[0036] 「網膜色素上皮細胞」とは、生体網膜において神経網膜の外側に存在する上皮細胞を意味する。細胞が網膜色素上皮細胞であるか否かは、当業者であれば、例えば細胞マーカー（*RPE65*、*MITF*、*CRALBP*、*MERTK*、*BEST1*、*TTR*等）の発現や、メラニン顆粒の存在（黒褐色）、細胞間のタイトジャンクション、多角形・敷石状の特徴的な細胞形態等により容易に確認できる。細胞が網膜色素上皮細胞の機能を有するか否かは、*VEGF* 及び *PEDF* 等のサイトカインの分泌能等により容易に確認できる。一態様において、網膜色素上皮細胞は *RPE65* 陽性細胞、*MITF* 陽性細胞、又は、*RPE65* 陽性かつ *MITF* 陽性細胞である。

[0037] 「網膜層」とは、網膜を構成する各層を意味し、具体的には、網膜色素上皮層、視細胞層、外境界膜、外顆粒層、外網状層、内顆粒層、内網状層、神経節細胞層、神経線維層及び内境界膜を挙げることができる。

[0038] 「神経網膜層」とは、神経網膜を構成する各層を意味し、具体的には、視細胞層、外境界膜、外顆粒層、外網状層、内顆粒層、内網状層、神経節細胞層、神経線維層及び内境界膜を挙げることができる。「視細胞層」とは、神経網膜の最も外側に形成され、視細胞（桿体視細胞、錐体視細胞）、視細胞

前駆細胞及び網膜前駆細胞からなる群から選択される１種以上の細胞を多く含む網膜層を意味する。視細胞層以外の各層を内層という。それぞれの細胞がいずれの網膜層を構成する細胞であるかは、公知の方法、例えば細胞マーカーの発現の有無又は発現の程度等によって確認できる。

[0039] 視細胞又は視細胞前駆細胞の出現割合が少ない段階の網膜組織の場合、増殖する神経網膜前駆細胞を含む層を「ニューロブラスティックレイヤー (neuroblastic layer)」といい、inner neuroblastic layerとouter neuroblastic layerが存在する。当業者であれば周知の方法、例えば明視野顕微鏡の下では、色の濃淡 (outer neuroblastic layerが薄く、inner neuroblastic layerが濃い) により判断することができる。

[0040] 「毛様体」は、発生過程及び成体の「毛様体」、「毛様体周縁部」、「Ciliary body」を含む。「毛様体」のマーカーとしては、Zic1、MAL、HNF1beta、FoxQ1、CLDN2、CLDN1、GPR177、AQP1及びAQP4があげられる。「毛様体周縁部 (ciliary marginal zone; CMZ)」としては、例えば、生体網膜において神経網膜と網膜色素上皮との境界領域に存在する組織であり、且つ、網膜の組織幹細胞 (網膜幹細胞) を含む領域を挙げることができる。毛様体周縁部は、毛様体縁 (ciliary margin) 又は網膜縁 (retinal margin) と呼ばれ、毛様体周縁部、毛様体縁及び網膜縁は同等の組織である。毛様体周縁部は、網膜組織への網膜前駆細胞、分化細胞の供給、網膜組織構造の維持等に重要な役割を果たしていることが知られている。毛様体周縁部のマーカー遺伝子としては、例えば、Rdh10遺伝子 (陽性)、Otx1遺伝子 (陽性) 及びZic1 (陽性) を挙げることができる。「毛様体周縁部様構造体」とは、毛様体周縁部と類似した構造体のことである。

[0041] 「細胞凝集体」 (Cell Aggregate) とは、複数の細胞同士が接着して立体構造を形成しているものであれば特に限定はなく、例えば、培地等の媒体中に分散していた細胞が集合して形成する塊、又は細胞分裂を

経て形成される細胞の塊等をいう。細胞凝集体には、特定の組織を形成している場合も含まれる。

[0042] 「スフェア (s p h e r e) 状細胞凝集体」は、球状に近い立体的な形を有する細胞凝集体を意味する。球状に近い立体的な形とは、3次元構造を有する形であって、二次元面に投影したときに、例えば、円形又は楕円形を示す球形状、及び球形状が複数融合して形成される形状（例えば二次元に投影した場合に2～4個の円形若しくは楕円形が重なりあって形成する形を示す）が挙げられる。一態様において、凝集体のコア部は、小胞性層状構造を有し、明視野顕微鏡の下では、中央部が暗く外縁部分が明るく観察されるという特徴を有する。

[0043] 「上皮組織」とは、体表面、管腔（消化管など）、体腔（心膜腔など）などの表面を細胞が隙間なく覆うことで形成される組織である。上皮組織を形成している細胞を上皮細胞という。上皮細胞は、細胞が頂端 (a p i c a l) -基底 (b a s a l) 方向の極性を持つ。上皮細胞は、接着結合 (a d h e r e n c e j u n c t i o n) 及び／又は密着結合 (t i g h t j u n c t i o n) により上皮細胞同士で強固な結合をつくり、細胞の層を形成できる。この細胞層が、1ないし十数層重なってできた組織が上皮組織である。上皮組織を形成し得る組織には、胎児期及び／又は成体の網膜組織、脳脊髄組織、眼球組織、神経組織等も含まれる。本明細書における神経網膜も上皮組織である。「上皮構造」とは、頂端面又は基底膜などの、上皮組織が特徴的に有する構造を意味する。

[0044] 本明細書において、神経組織を含む上皮構造を神経上皮という。特に、神経網膜を含む上皮構造を、神経網膜上皮 (neural retinal epithelium) と呼ぶ。

[0045] 「連続上皮組織」とは、連続上皮構造を有する組織である。連続上皮構造とは、上皮組織が連続している状態のことである。上皮組織が連続しているとは、例えば、上皮組織に対する接線方向に 10^0 細胞～ 10^7 細胞、好ましくは接線方向に 30 細胞～ 10^7 細胞、さらに好ましくは 10^2 細胞～ 10^7 細胞

、並んでいる状態のことである。連続上皮構造は、ロゼット様構造でみとめられるような頂端面が分断される構造を持たない。一態様において、連続上皮構造を有する網膜組織の断面の面積あたり細胞数は、例えば10 μ m厚程度の凍結切片における細胞の一態様において、連続上皮構造を有する網膜組織の断面の面積あたり細胞数は、例えば10 μ m厚程度の凍結切片における細胞の核の数を評価した場合に、100 μ m²あたり、10細胞～900細胞、好ましくは30細胞～300細胞、より好ましくは50細胞～250細胞、更により好ましくは75細胞～160細胞である。

[0046] 例えば、網膜組織において形成される連続上皮は、網膜組織が上皮組織に特有の頂端面を持ち、頂端面が神経網膜層を形成する各層のうち、少なくとも視細胞層（外顆粒層）等と概ね平行に、かつ連続的に網膜組織の表面に形成される。例えば、多能性幹細胞より作製した網膜組織を含む細胞凝集体の場合、凝集体の表面に頂端面が形成され、表面に対して接線方向に10細胞以上、好ましくは30細胞以上、より好ましくは100細胞以上、さらに好ましくは400細胞以上の視細胞又は視細胞前駆細胞が規則正しく連続して列状に配置する、連続神経上皮が形成される。このような連続神経上皮を含む神経網膜は、連続上皮を含む神経網膜上皮である。

[0047] 一態様において、上皮組織は極性化して「頂端面（apical surface）」と「基底膜」ができる。「基底膜」とは、上皮細胞が産生した基底（basal）側の層（基底膜）のことをいい、ラミニン及びIV型コラーゲンを多く含み、50～100nmの厚さを有する。「頂端面」は、「基底膜」と反対側に形成される表面（表層面）のことをいう。一態様において、「頂端面」は視細胞又は視細胞前駆細胞が認められる程度に発生段階が進行した網膜組織においては、外境界膜が形成され、視細胞、視細胞前駆細胞が存在する視細胞層（外顆粒層）に接する面のことをいう。また、このような頂端面は、頂端面のマーカー（例：atypical-*PKC*（以下、「a*PKC*」と略す）、*E-cadherin*、*N-cadherin*）に対する抗体を用いて、当業者に周知の免疫染色法等で同定することができる

。

[0048] 網膜組織が連続上皮を含むかどうかは、網膜組織が有する頂端面の連続性（すなわち、分断されていない形態）により確認する事ができる。頂端面の連続性は、例えば、頂端面のマーカー（例：aPKC、E-cadherin、N-cadherin）、頂端面側に位置する視細胞又は視細胞前駆細胞のマーカー（例：Crxまたはリカバリン）を免疫染色し、取得した画像等について頂端面と視細胞層、及び各網膜層の位置関係を解析することにより判定できる。頂端面や視細胞層（外顆粒層）以外の網膜層については、細胞核を染色するDAPI染色、PI染色、Hoechst染色、又は細胞核に局在するマーカータンパク（Rx、Chx10、Ki67、Crx等）等による免疫染色等により同定できる。

[0049] 具体的には、頂端面側に存在する細胞のマーカー、すなわち視細胞マーカー又は視細胞前駆細胞マーカー及び細胞核を染色可能なマーカーを共に発現する細胞が、連続して存在することで、頂端面の連続性を同定することができる。

[0050] [複合体]

本発明の複合体は、2以上の多能性幹細胞由来の神経網膜を含む細胞凝集体と、マトリクスとを含み、前記2以上の細胞凝集体が前記マトリクス中に配置されている。以下、神経網膜を含む細胞凝集体、マトリクス、及びこれらを含む複合体について詳細に説明する。

[0051] (1) 神経網膜を含む細胞凝集体

一態様において、神経網膜を含む細胞凝集体は、後述の細胞凝集体（スフェア状細胞凝集体）である。一態様において、神経網膜を含む細胞凝集体は、スフェア状細胞凝集体から切り出されたシート状の網膜組織である。シート状の網膜組織は、好ましくは神経網膜の連続上皮を含むシート状の神経網膜（以下、神経網膜シートともいう。）である。一態様において、神経網膜を含む細胞凝集体は、移植用神経網膜、好ましくは移植用神経網膜シートである。移植用神経網膜又は移植用神経網膜シートは、ヒト移植用に適したヒ

ト神経網膜であり、より好ましくは神経網膜のみからなる。

[0052] 神経網膜において、少なくとも視細胞層を含む神経網膜層が形成されており、視細胞層は少なくとも視細胞、視細胞前駆細胞及び網膜前駆細胞からなる群から選択される1種以上の細胞を含む。視細胞層は少なくとも細胞凝集体の最も外側に形成されており、また、細胞凝集体の内側にも視細胞又は視細胞前駆細胞が存在してもよく、又は内側にも視細胞層が形成されていてもよい。視細胞等は細胞凝集体の表面の接線方向に連続して、すなわち互いに接着して存在しており、視細胞等が細胞凝集体の表面の接線方向に連続して存在することで、視細胞等を含む視細胞層を形成している。なお、接線方向とは、細胞凝集体の表面に対する接線方向、すなわち視細胞層における視細胞等が並んでいる方向のことをいい、当該神経網膜に対して平行方向又は横方向のことである。

[0053] 神経網膜は、多能性幹細胞由来のものであり、ヒト多能性幹細胞由来のものであることが好ましい。ヒト多能性幹細胞は、好ましくはヒト胚性幹細胞又はヒト人工多能性幹細胞であり、より好ましくはヒト人工多能性幹細胞である。また、神経網膜は移植用神経網膜であることが好ましい。

[0054] 本明細書における網膜組織の一態様として、表面（Apical面）と裏面（Basal面）を含み、表面は細胞間で接着結合を形成して上皮組織である神経網膜層を含む頂端面を構成し、裏面は神経網膜の内層に近接する基底面を構成する網膜組織が挙げられる。このような網膜組織を神経網膜上皮ということが出来る。このような網膜組織としては、シート状の網膜組織である神経網膜シート（neural retina sheet）であることが好ましい。表面は曲率の変化が少ないなめらかな形状をしており、裏面は曲率の変化が大きい不規則な形状を有する。一態様において例えば、網膜組織の表面の曲率の変化は、楕円（短径1に対して例えば、長径1～10）の曲率の変化（曲率の連続的な変化ともいえる）に近い場合がある。一態様において例えば、網膜組織の裏面の曲率の変化は、「鋸の歯」のような正の値と負の値を行き来する曲率の急激な変化（曲率の急激な変化ともいえる）に近い場合がある。

[0055] (細胞凝集体の製造方法)

神経網膜を含む細胞凝集体は、多能性幹細胞由来であり、具体的に多能性幹細胞を分化誘導することによって得ることができる。WO 2011/055855、WO 2013/077425、WO 2015/025967、WO 2016/063985、WO 2016/063986、WO 2017/183732、PLOS One. 2010 Jan 20; 5(1): e8763.、Stem Cells. 2011 Aug; 29(8): 1206-18.、Proc Natl Acad Sci USA. 2014 Jun 10; 111(23): 8518-23、Nat Commun. 2014 Jun 10; 5: 4047に開示されている方法が、神経網膜の分化誘導方法として挙げられるが、特に限定されない。

[0056] また、網膜組織の製造方法として、Bryce T. McLellandら著、IOVS, May 2018, Vol. 59, No. 6, p2586に記載された方法を挙げることができる。また、網膜組織の製造方法として、下記の文献に記載された方法が挙げられる。

Nakano, T. et al. Cell Stem Cell 10, 771-785 (2012).

Kawahara A. et al. Nature Communications, 6, p.6286(2015).

Kuwahara A, Yamasaki S, et al. Sci Rep. 2019 Dec 12; 9(1): 18936.

Lamba, D. A., Gust, J. & Reh, T. A. Cell Stem Cell 4, 73-79, (2009).

Zhu, J., Cifuentes, H., Reynolds, J. & Lamba, D. A. Cell Stem Cell 20, 374-384. e375(2017)

Meyer, J. S. et al. Stem Cells 29, 1206-1218, (2011).

Zhong, X. et al. Nat Commun 5, doi:10.1038/ncomms5047 (2014).

Boucherie, C., et al. Stem Cells 31, 408-414, doi:10.1002/stem.1268 (2013).

Gonzalez-Cordero, A. et al. Nat Biotechnol 31, 741-747, (2013).

Mellough, C. B. et al. Stem Cells 33, 2416-2430, (2015).

Hallam, D. et al. Stem Cells, doi:10.1002/stem.2883 (2018).

Reichman, S. et al. PNAS 111, 8518-8523, (2014).

Gagliardi, G. et al. Stem Cell Reports 11,665-680, (2018).

Tucker, B. A., et al. Stem Cells Transl Med2, 16-24, (2013).

Wahlin, K. J. et al. Sci Rep 7, 766, (2017).

DiStefano, T. et al. Stem Cell Reports 10,300-313, (2018).

[0057] 具体的な一態様として、下記工程（A）、（B）、（C）及び（D）を含む方法によって神経網膜を含む細胞凝集体を調製することができる。

（A）多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、多能性幹細胞培養用の培地で培養する工程、

（B）工程（A）で得られた細胞を浮遊培養することによって細胞凝集体を形成させる工程、

（C）工程（B）で得られた細胞凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質を含む培地中でさらに浮遊培養する工程、及び

（D）工程（C）で得られた細胞凝集体を、浮遊培養し、成熟化させる工程。

なお、工程（A）は、さらにTGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含んでもよい。

また、工程（B）は、後述するように、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、及び／又はWntシグナル伝達経路阻害物質を含んでもよい。

[0058] 本方法は、例えばWO2015/025967、WO2016/063985、WO2017/183732にも開示されており、より詳細にはWO2015/025967、WO2016/063985、WO2017/183732、WO2019/017492、WO2019/054514、WO2019/054515等を参照することが可能である。

[0059] 工程（A）で用いられる「多能性幹細胞培養用培地」とは、フィーダーフリー条件下で多能性幹細胞を培養可能な培地であり、当該培地として、未分化維持因子を含む培地が挙げられる。

[0060] 本明細書において、未分化維持因子は、多能性幹細胞の分化を抑制する作用を有する物質であれば特に限定はない。当業者に汎用されている未分化維持因子としては、FGFシグナル伝達経路作用物質、TGF β ファミリーシグナル伝達経路作用物質、insulin等を挙げることができる。FGFシグナル伝達経路作用物質として具体的には、線維芽細胞増殖因子（例えば、bFGF、FGF4やFGF8）が挙げられる。また、TGF β ファミリーシグナル伝達経路作用物質としては、TGF β シグナル伝達経路作用物質、Nodal/Activinシグナル伝達経路作用物質が挙げられる。TGF β シグナル伝達経路作用物質としては、例えばTGF β 1、TGF β 2が挙げられる。Nodal/Activinシグナル伝達経路作用物質としては、例えばNodal、ActivinA、ActivinBが挙げられる。ヒト多能性幹細胞（ヒトES細胞、ヒトiPS細胞）を培養する場合、工程（A）における培地は、好ましくは未分化維持因子として、bFGFを含む。

[0061] 工程（A）において用いられる培地中の未分化維持因子濃度は、培養する多能性幹細胞の未分化状態を維持可能な濃度であり、当業者であれば、適宜設定することができる。例えば、具体的には、フィーダー細胞非存在下で未分化維持因子としてbFGFを用いる場合、その濃度は、通常4ng~500ng/mL程度、好ましくは10ng~200ng/mL程度、より好ましくは30ng~150ng/mL程度である。

[0062] フィーダーフリー条件で使用可能な多能性幹細胞培養用培地として、多くの合成培地が開発・市販されており、例えばEssential 8培地（Life Technologies社製）が挙げられる。Essential 8培地は、DMEM/F12培地に、添加剤として、L-ascorbic acid-2-phosphate magnesium (64mg/L)、sodium selenium (14 μ g/L)、insulin (19.4mg/L)、NaHCO₃ (543mg/L)、transferrin (10.7mg/L)、bFGF (100ng/mL)、及び

、 $TGF\beta$ ファミリーシグナル伝達経路作用物質 ($TGF\beta 1$ (2 ng/mL) 又は $Nodal$ (100 ng/mL)) を含む (Nature Methods、8、424–429 (2011))。その他市販のフィーダーフリー培地としては、 $S\text{-medium}$ (DSファーマバイオメディカル社製)、 $StemPro$ (Life Technologies社製)、 $hESF9$ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA、2008 Sep 9; 105 (36): 13409–14)、 $mTeSR1$ (STEMCELL Technologies社製)、 $mTeSR2$ (STEMCELL Technologies社製)、 $TeSR-E8$ (STEMCELL Technologies社製)、又は $StemFit$ (味の素社製) が挙げられる。上記工程 (A) ではこれらを用いることにより、簡便に本発明を実施することが出来る。これら培地を使用することで、フィーダーフリー条件での多能性幹細胞の培養をおこなうことが可能である。工程 (A) で使用する培地は、一例として、 BMP シグナル伝達経路作用物質、 Wnt シグナル伝達経路作用物質及び Wnt シグナル伝達経路阻害物質のいずれも添加されていない無血清培地である。

[0063] 神経網膜を含む細胞凝集体の調製に使用する培地、すなわち上記工程 (B)、(C) 及び (D) で用いられる培地は、特段の記載がない限り、細胞増殖用基礎培地 (基礎培地とも呼ぶ) を使用することができる。細胞増殖用基礎培地は細胞の培養が可能な限り特に限定はなく、適宜細胞増殖用培地として市販されている基礎培地を用いることができる。具体的には、例えば、 BME 培地、 $BGJb$ 培地、 $CMRL 1066$ 培地、 $Glasgow MEM$ ($GMEM$) 培地、 $Improved MEM Zinc Option$ 培地、 $IMDM$ 培地、 $Medium 199$ 培地、 MEM 培地、 $Eagle MEM$ 培地、 αMEM 培地、 $DMEM$ 培地、 $F-12$ 培地、 $DMEM/F-12$ 培地、 $IMDM/F-12$ 培地、ハム培地、 $RPMI 1640$ 培地、 $Fischer's$ 培地、 $Leibovitz's L-15$ 培地又はこれらの混合培地など、動物細胞の培養に用いることのできる培地を挙げることが

できる。また、補助培地であるN2培地を添加した培地を用いてもよい。

- [0064] 本明細書において、TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質とは、TGF β ファミリーシグナル伝達経路、すなわちSmadファミリーによって伝達される、シグナル伝達経路を阻害する物質を表し、具体的にはTGF β シグナル伝達経路阻害物質（例：SB431542、LY-364947、SB505124、A-83-01等）、Nodal/Activinシグナル伝達経路阻害物質（例：SB431542、A-83-01等）及びBMPシグナル伝達経路阻害物質（例：LDN193189、Dorsomorphin等）を挙げることができる。これらの物質は市販されており入手可能である。
- [0065] 本明細書において、ソニック・ヘッジホッグ（以下、「Shh」と記すことがある。）シグナル伝達経路作用物質とは、Shhによって媒介されるシグナル伝達を増強し得る物質である。Shhシグナル伝達経路作用物質としては、例えば、SHH、SHHの部分ペプチド（例えば、Sonic Hedgehog N-Terminus (Shh-N)、リコンビナントHuman Sonic Hedgehog (C2411) N-Terminus (SHH-C2411)、リコンビナントMouse Sonic Hedgehog (C2511) N-Terminus (SHH-C2511)）、Shh以外のヘッジホッグファミリータンパク質（例えば、Hh、IHH、DHH、EHH、TWHH）、PMA (Purmorphamine)、SAG (Smoothened Agonist) 等が挙げられる。
- [0066] 上記工程（A）において、TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の濃度は、網膜系細胞への分化を誘導可能な濃度であればよい。例えば、SB431542は、通常0.1～200 μ M、好ましくは2～50 μ Mの濃度で使用される。A-83-01は、通常0.05～50 μ M、好ましくは0.5～5 μ Mの濃度で使用される。LDN193189は、通常1～2000nM、好ましくは10～300nMの濃度で使用される。SAGは、通常、1～2000n

M、好ましくは10～700 nMの濃度で使用される。PMAは、通常0.002～20 μ M、好ましくは0.02～2 μ Mの濃度で使用される。

[0067] 工程（A）におけるフィーダーフリー条件での多能性幹細胞の培養においては、フィーダー細胞に代わる足場を多能性幹細胞に提供するため、適切なマトリクスを足場として用いてもよい。足場として用いることのできるマトリクスとしては、ラミニン（Nat Biotechnol 28, 611–615, (2010)）、ラミニン断片（Nat Commun 3, 1236, (2012)）、基底膜標品（Nat Biotechnol 19, 971–974, (2001)）、ゼラチン、コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン、ビトロネクチン（Vitronectin）等が挙げられる。

[0068] 工程（A）における多能性幹細胞の培養時間は、TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質（例：100 nM～700 nM）の存在下で培養する場合、工程（B）において形成される細胞凝集体の質を向上させる効果が達成可能な範囲で特に限定されないが、通常0.5～144時間である。一態様において、好ましくは2～96時間、より好ましくは6～48時間、さらに好ましくは12～48時間、よりさらに好ましくは18～28時間（例、24時間）である。

[0069] 工程（B）において用いられる培地は血清含有培地又は無血清培地であり得る。化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、無血清培地が好適に用いられる。調製の煩雑さを回避するには、例えば、市販のKSR等の血清代替物を適量添加した無血清培地が挙げられる。無血清培地へのKSRの添加量としては、通常約1%から約30%であり、好ましくは約2%から約20%である。

[0070] 凝集体の形成に際しては、まず、工程（A）で得られた細胞の分散操作により、分散された細胞を調製する。分散操作により得られた「分散された細胞」とは、例えば7割（好ましくは8割以上）以上が単一細胞であり2～5

0細胞の塊が3割以下（好ましくは2割以下）存在する状態が挙げられる。
分散された細胞とは、細胞同士の接着（例えば面接着）がほとんどなくなった状態が挙げられる。

[0071] 分散された細胞の懸濁液を培養器中に播き、分散させた細胞を、培養器に対して、非接着性の条件下で培養することにより、複数の細胞を集合させて凝集体を形成する。一態様として、96ウェルプレートのようなマルチウェルプレート（U底、V底）の各ウェルに一定数の分散された幹細胞を入れて、これを静置培養すると、細胞が迅速に凝集することにより、各ウェルにおいて1個の凝集体が形成される（S F E B q法）。96ウェルプレートを用いて細胞を浮遊培養する場合、1ウェルあたり約 1×10^3 から約 1×10^5 細胞（好ましくは約 3×10^3 から約 5×10^4 細胞、約 4×10^3 から約 2×10^4 細胞）となるように調製した液をウェルに添加し、プレートを静置して凝集体を形成させる。

[0072] 一態様において、工程（B）において用いられる培地は、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含む。

すなわち、具体的な一態様として、下記工程（A）、（B）及び（C）を含む方法によって神経網膜を含む細胞凝集体を調製することができる：

（A）多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、かつ任意でTGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含んでもよい、未分化維持因子を含む培地で培養する工程、

（B）工程（A）で得られた細胞を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含む培地中で浮遊培養することによって細胞凝集体を形成させる工程、

（C）工程（B）で得られた細胞凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質を含む培地中でさらに浮遊培養する工程。

工程（B）におけるソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質としては、上述したものを上述の濃度（例：10 nM～300 nM）で用いる

ことができる。ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質は、好ましくは、浮遊培養開始時から培地に含まれる。培地には、ROCK阻害剤（例、Y-27632）を添加してもよい。培養時間は例えば、12時間～6日間である。工程（B）において用いられる培地は、一例において、BMPシグナル伝達経路作用物質、Wntシグナル伝達経路作用物質、TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及びTGF β ファミリーシグナル伝達経路作用物質からなる群から選択される1以上（好ましくは全部）を添加されていない培地である。

[0073] 一態様として、工程（B）における細胞凝集体は、多能性マーカーを発現する分化段階である。具体的には、Oct3/4、Sox2、Klf4、Nanog、Sal14、Lin28、Esrrb及びEsrrbから選択される1又は複数のマーカーが検出され得る分化段階である。

[0074] 本明細書において、BMPシグナル伝達経路作用物質とは、BMPによって媒介されるシグナル伝達経路を増強し得る物質である。BMPシグナル伝達経路作用物質としては、例えばBMP2、BMP4若しくはBMP7等のBMPタンパク質、GDF7等のGDFタンパク質、抗BMP受容体抗体、又は、BMP部分ペプチド等が挙げられる。BMP2タンパク質、BMP4タンパク質及びBMP7タンパク質は例えばR&D Systems社から、GDF7タンパク質は例えば和光純薬から入手可能である。

[0075] 工程（C）において用いられる培地は、例えば、BMPシグナル伝達経路作用物質が添加された無血清培地又は血清培地（好ましくは、無血清培地）が挙げられる。無血清培地、血清培地は上述の通り準備することができる。工程（C）において用いられる培地は、一例において、Wntシグナル伝達経路作用物質、TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及びTGF β ファミリーシグナル伝達経路作用物質からなる群から選択される1以上（好ましくは全部）を添加されていない培地である。また、工程（C）において用いられる培地は、一例において、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を添加されていない培地である。また、工程（C）において用い

られる培地は、Wntシグナル伝達経路作用物質が添加されていてもよい培地である。

[0076] BMPシグナル伝達経路作用物質の濃度は、網膜系細胞への分化を誘導可能な濃度であればよい。例えばヒトBMP4タンパク質の場合は、約0.01 nM～約1 μ M、好ましくは約0.1 nM～約100 nM、より好ましくは約1 nM～約10 nM、さらに好ましくは約1.5 nM (55 ng/mL) の濃度となるように培地に添加する。

[0077] BMPシグナル伝達経路作用物質は、工程(A)の浮遊培養開始から約24時間後以降に添加されていればよく、浮遊培養開始後数日以内(例えば、15日以内)に培地に添加してもよい。好ましくは、BMPシグナル伝達経路作用物質は、浮遊培養開始後1日目～15日目までの間、より好ましくは1日目～9日目までの間、最も好ましくは3日目に培地に添加する。

[0078] 具体的な態様として、例えば、工程(B)の浮遊培養開始後1～9日目、好ましくは1～3日目に、培地の一部又は全部をBMP4を含む培地に交換し、BMP4の終濃度を約1～10 nMになるように培地を調製し、BMP4の存在下で例えば1～12日、好ましくは2～9日、さらに好ましくは2～5日間培養することができる。ここにおいて、BMP4の濃度を、同一濃度を維持すべく、1回若しくは2回程度培地の一部又は全部をBMP4を含む培地に交換することができる。又はBMP4の濃度を段階的に減じることでもできる。例えば、工程(B)の浮遊培養開始後2～10日目までBMPシグナル伝達経路作用物質(BMP4)の濃度を維持した後、工程(B)の浮遊培養開始後6～20日目まで段階的にBMPシグナル伝達経路作用物質(BMP4)の濃度を減じてよい。

[0079] 上記工程(A)～工程(C)における培養温度、CO₂濃度等の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、例えば約30℃～約40℃、好ましくは約37℃である。またCO₂濃度は、例えば約1%～約10%、好ましくは約5%である。

[0080] 上記工程(C)における培養期間を変動させることによって、細胞凝集体

に含まれる網膜系細胞として、様々な分化段階の網膜系細胞を製造することができる。すなわち、未成熟な網膜系細胞（例：網膜前駆細胞、視細胞前駆細胞）と成熟した網膜系細胞（例：視細胞）とを様々な割合で含む、細胞凝集体中の網膜系細胞を製造することができる。工程（C）の培養期間を延ばすことによって、成熟した網膜系細胞の割合を増やすことができる。

[0081] 上記工程（B）及び／又は工程（C）は、WO 2017/183732に開示された方法を使用することもできる。すなわち、工程（B）及び／又は工程（C）において、Wntシグナル伝達経路阻害物質をさらに含む培地で浮遊培養し、細胞凝集体を形成することができる。

[0082] 工程（B）及び／又は工程（C）に用いる、Wntシグナル伝達経路阻害物質としては、Wntにより媒介されるシグナル伝達を抑制し得るものである限り特に限定されず、タンパク質、核酸、低分子化合物等のいずれであってもよい。Wntにより媒介されるシグナルは、Frizzled (Fz) 及びLRP5/6 (low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6) のヘテロ二量体として存在するWnt受容体を介して伝達される。Wntシグナル伝達経路阻害物質としては、例えば、Wnt又はWnt受容体に直接作用する物質（抗Wnt中和抗体、抗Wnt受容体中和抗体等）、Wnt又はWnt受容体をコードする遺伝子の発現を抑制する物質（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA等）、Wnt受容体とWntの結合を阻害する物質（可溶性Wnt受容体、ドミナントネガティブWnt受容体等、Wntアンタゴニスト、Dkk1、Cerberusタンパク質等）、Wnt受容体によるシグナル伝達に起因する生理活性を阻害する物質 [CK1-7 (N-(2-アミノエチル)-5-クロロイソキノリン-8-スルホンアミド)、D4476 (4-[4-(2,3-ジヒドロ-1,4-ベンゾジオキシ-6-イル)-5-(2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド)、IWR-1-endo (IWR1e) (4-[(3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-ヘキサヒドロ-1,3-

ジオキソ-4, 7-メタノ-2H-イソインドール-2-イル]-N-8-キノリニル-ベンズアミド)、並びに、IWP-2 (N-(6-メチル-2-ベンゾチアゾリル)-2-[(3, 4, 6, 7-テトラヒドロ-4-オキソ-3-フェニルチエノ[3, 2-d]ピリミジン-2-イル)チオ]アセタミド)等の低分子化合物等]等が挙げられるが、これらに限定されない。Wntシグナル伝達経路阻害物質として、これらを一種又は二種以上含んでもよい。CK1-7、D4476、IWR-1-endo (IWR1e)、IWP-2等は公知のWntシグナル伝達経路阻害物質であり、市販品等を適宜入手可能である。Wntシグナル伝達経路阻害物質として好ましくはIWR1eが用いられる。

[0083] 工程(B)におけるWntシグナル伝達経路阻害物質の濃度は、良好な細胞凝集体の形成を誘導可能な濃度であればよい。例えばIWR-1-endoの場合は、約0.1 μ Mから約100 μ M、好ましくは約0.3 μ Mから約30 μ M、より好ましくは約1 μ Mから約10 μ M、更に好ましくは約3 μ Mの濃度となるように培地に添加する。IWR-1-endo以外のWntシグナル伝達経路阻害物質を用いる場合には、上記IWR-1-endoの濃度と同等のWntシグナル伝達経路阻害活性を示す濃度で用いられることが望ましい。

[0084] 工程(B)において、Wntシグナル伝達経路阻害物質を培地に添加するタイミングは、早い方が好ましい。Wntシグナル伝達経路阻害物質は、工程(B)における浮遊培養開始から、通常6日以内、好ましくは3日以内、より好ましくは1日以内、より好ましくは12時間以内、更に好ましくは工程(B)における浮遊培養開始時に、培地に添加される。具体的には、例えば、Wntシグナル伝達経路阻害物質を添加した基礎培地の添加や、該基礎培地への一部若しくは全部の培地交換を行う事ができる。工程(A)で得られた細胞を、工程(B)においてWntシグナル伝達経路阻害物質に作用させる期間は特に限定されないが、好ましくは、工程(B)における浮遊培養開始時に培地へ添加した後、工程(B)終了時(BMPシグナル伝達経路作

用物質添加直前)まで作用させる。更に好ましくは、後述する通り、工程(B)終了後(すなわち工程(C)の期間中)も、継続してWntシグナル伝達経路阻害物質に曝露させる。一態様としては、後述する通り、工程(B)終了後(すなわち工程(C)の期間中)も、継続してWntシグナル伝達経路阻害物質に作用させ、網膜組織が形成されるまで作用させてもよい。

[0085] 工程(C)において、Wntシグナル伝達経路阻害物質としては、前述のWntシグナル伝達経路阻害物質のいずれかを用いる事ができるが、好ましくは、工程(B)で用いたWntシグナル伝達経路阻害物質と同一の種類のものを工程(C)において使用する。

[0086] 工程(C)におけるWntシグナル伝達経路阻害物質の濃度は、網膜前駆細胞及び網膜組織を誘導可能な濃度であればよい。例えばIWR-1-endoの場合は、約0.1 μ Mから約100 μ M、好ましくは約0.3 μ Mから約30 μ M、より好ましくは約1 μ Mから約10 μ M、更に好ましくは約3 μ Mの濃度となるように培地に添加する。IWR-1-endo以外のWntシグナル伝達経路阻害物質を用いる場合には、上記IWR-1-endoの濃度と同等のWntシグナル伝達経路阻害活性を示す濃度で用いられることが望ましい。工程(C)の培地中のWntシグナル伝達経路阻害物質の濃度は、工程(B)の培地中のWntシグナル伝達経路阻害物質の濃度を100としたとき、好ましくは50~150、より好ましくは80~120、更に好ましくは90~110であり、工程(B)の培地中のWntシグナル伝達経路阻害物質の濃度と同等であることが、より好ましい。

[0087] Wntシグナル伝達経路阻害物質の培地への添加時期は、網膜系細胞若しくは網膜組織を含む凝集体形成を達成できる範囲で特に限定されないが、早ければ早い方が好ましい。好ましくは、工程(C)開始時にWntシグナル伝達経路阻害物質が培地に添加される。より好ましくは、工程(B)においてWntシグナル伝達経路阻害物質が添加された後、工程(C)においても継続して(即ち、工程(B)の開始時から)培地中に含まれる。更に好ましくは、工程(B)の浮遊培養開始時にWntシグナル伝達経路阻害物質が添

加された後、工程（C）においても継続して培地中に含まれる。例えば、工程（B）で得られた培養物（W n t シグナル伝達経路阻害物質を含む培地中の凝集体の懸濁液）に BMP シグナル伝達経路作用物質（例、BMP 4）を添加すればよい。

[0088] W n t シグナル伝達経路阻害物質に作用させる期間は、特に限定されないが、好ましくは、工程（B）における浮遊培養開始時に W n t シグナル伝達経路阻害物質が添加される場合において、工程（B）における浮遊培養開始時を起算点として、2日間から30日間、より好ましくは6日間から20日間、8日間から18日間、10日間から18日間、又は10日間から17日間（例えば、10日間）である。別の態様において、W n t シグナル伝達経路阻害物質に作用させる期間は、工程（B）における浮遊培養開始時に W n t シグナル伝達経路阻害物質が添加される場合において、工程（B）における浮遊培養開始時を起算点として、好ましくは3日間から15日間（例えば、5日間、6日間、7日間）であり、より好ましくは6日間から10日間（例えば、6日間）である。

[0089] 上述した方法で得た細胞凝集体を W n t シグナル伝達経路作用物質、及び／又は、F G F シグナル伝達経路阻害物質を含む無血清培地又は血清培地中で2日間から4日間程度の期間培養（工程（D））後、W n t シグナル伝達経路作用物質及び F G F シグナル伝達経路阻害物質を含まない無血清培地又は血清培地中で30日間～200日間程度（30日間～150日間、50日間～120日間、60日間～90日間）培養する（工程（E））ことによって、毛様体周縁部様構造体を含む神経網膜を製造することもできる。

[0090] 一態様として、工程（A）～（C）で得られた細胞凝集体であって、工程（B）の浮遊培養開始後6～30日目、10～20日目（10日目、11日目、12日目、13日目、14日目、15日目、16日目、17日目、18日目、19日目又は20日目）の細胞凝集体から、上記工程（D）及び工程（E）により、毛様体周縁部様構造体を含む神経網膜を製造できる。

[0091] W n t シグナル伝達経路作用物質としては、W n t によって媒介されるシ

グナル伝達を増強し得るものである限り特に限定されない。具体的なWntシグナル伝達経路作用物質としては、例えば、GSK3 β 阻害剤（例えば、6-Bromoindirubin-3'-oxime (BIO)、CHIR99021、Kenpaulone）を挙げることができる。例えばCHIR99021の場合には、約0.1 μ M～約100 μ M、好ましくは約1 μ M～約30 μ Mの範囲を挙げることができる。

[0092] FGFシグナル伝達経路阻害物質としては、FGFによって媒介されるシグナル伝達を阻害できるものである限り特に限定されない。FGFシグナル伝達経路阻害物質としては、例えば、SU-5402、AZD4547、BGJ398等が挙げられる。例えばSU-5402の場合、約0.1 μ M～約100 μ M、好ましくは約1 μ M～約30 μ M、より好ましくは約5 μ Mの濃度で添加する。

[0093] 工程（D）において用いられる培地は、一例において、BMPシグナル伝達経路作用物質、Wntシグナル伝達経路阻害物質、SHHシグナル伝達経路作用物質、TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及びTGF β ファミリーシグナル伝達経路作用物質からなる群から選択される1以上（好ましくは全部）を添加されていない培地である。

[0094] 上記工程（E）の一部又は全部の工程は、WO2019/017492に開示された連続上皮組織維持用培地を用いて培養することができる。すなわち、連続上皮組織維持用培地を用いて培養することにより、神経網膜の連続上皮構造を維持することができる。一例として、Neurobasal培地（例：サーモフィッシュァーサイエンティフィック社製、21103049）にB27サプリメント（例：サーモフィッシュァーサイエンティフィック、12587010）を配合した培地を連続上皮組織維持用培地として挙げるることができる。

[0095] 上記工程（E）における培養は、網膜系細胞（特に視細胞）の分化及び／又は成熟化と、連続上皮構造の維持を両立させるために、段階的に連続上皮組織維持用培地に交換することが好ましい。例えば、始めの10日間～30

日間を細胞増殖用基礎培地（例：DMEM／F12培地に10%牛胎仔血清、1%N2 supplement、及び100 μ Mタウリンが添加された培地）、次の10日間～40日間を細胞増殖用基礎培地と連続上皮組織維持用培地の混合培地（DMEM／F12培地に10%牛胎仔血清、1%N2 supplement、及び100 μ Mタウリンが添加された培地と、Neurobasal培地に、10%牛胎仔血清、2%B27 supplement、2mM glutamine、及び100 μ Mタウリンが添加された培地を1：3の比率で混合した培地）、次の20日間～140日間を連続上皮組織維持用培地（例：Neurobasal培地に、10%牛胎仔血清、2%B27 supplement、2mM glutamine、及び100 μ Mタウリンが添加された培地）、を用いて培養することができる。

[0096] 上記工程（E）の一部又は全部の工程において、細胞増殖用基礎培地、連続上皮組織維持用培地又はこれらの混合培地のいずれの培地を用いている場合であっても、甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質をさらに含んでよい。甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質を含む培地を用いた培養方法の詳細については、WO2019/054514を参照することができる。甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質を含む培地で培養することにより、神経網膜に含まれる双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞又は水平細胞等の割合が低く、かつ視細胞前駆細胞の割合を増大させた神経網膜を含む細胞凝集体の製造が可能となる。

[0097] 本明細書において、甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質とは、甲状腺ホルモンにより媒介されるシグナル伝達を増強し得る物質であり、甲状腺ホルモンシグナル伝達経路を増強し得るものであれば特に限定はない。甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質としては、例えば、トリヨードサイロニン（以下、T3と略すことがある）、サイロキシン（以下、T4と略すことがある）、甲状腺ホルモン受容体（好ましくはTR β 受容体）アゴニスト等が挙げられる。

[0098] また、当業者に周知の甲状腺ホルモン受容体アゴニストとして、国際公開

第97／21993号パンフレット、国際公開第2004／066929号パンフレット、国際公開第2004／093799号、国際公開第2000／039077号パンフレット、国際公開第2001／098256号パンフレット、国際公開第2003／018515号パンフレット、国際公開第2003／084915号パンフレット、国際公開第2002／094319号パンフレット、国際公開第2003／064369号パンフレット、特開2002-053564号公報、特開2002-370978号公報、特開2000-256190号公報、国際公開第2007／132475号パンフレット、国際公開第2007／009913号パンフレット、国際公開第2003／094845号パンフレット、国際公開第2002／051805号パンフレット又は国際公開第2010／122980号パンフレットに記載のジフェニルメタン誘導体、ジアリールエーテル誘導体、ピリダジン誘導体、ピリジン誘導体若しくはインドール誘導体等の化合物を挙げることができる。

[0099] 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質としてT3を用いる場合には、例えば、0.1～1000 nMの範囲となるように培地に添加することができる。好ましくは、1～500 nM；より好ましくは10～100 nM；更に好ましくは30～90 nM；更により好ましくは60 nM前後の濃度のT3に相当する甲状腺ホルモンシグナル伝達亢進活性を有する濃度が挙げられる。甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質としてT4を用いる場合には、例えば、1 nM～500 μMの範囲となるように培地に添加することができる。好ましくは、50 nM～50 μM；より好ましくは500 nM～5 μMの範囲である。その他の甲状腺ホルモン受容体アゴニストを用いる場合、上述の濃度のT3又はT4が示すアゴニスト活性と同程度の活性を示す濃度であればよい。

[0100] 工程（E）において用いられる培地は、適宜、L-グルタミン、タウリン、血清などを含んでもよい。工程（E）において用いられる培地は、一例において、BMPシグナル伝達経路作用物質、FGFシグナル伝達経路阻

害物質、Wntシグナル伝達経路作用物質、Wntシグナル伝達経路阻害物質、SHHシグナル伝達経路作用物質、TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及びTGF β ファミリーシグナル伝達経路作用物質からなる群から選択される1以上（好ましくは全部）を添加されていない培地である。

[0101] 具体的な一態様として、下記工程（A）～（E）を含む方法によって神経網膜を含む細胞凝集体を調製することができる：

（A）多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、未分化維持因子を含み、かつ任意でTGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含んでもよい培地で培養する工程、

（B）工程（A）で得られた細胞を、Wntシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含んでいてもよい培地中で浮遊培養することによって細胞凝集体を形成させる工程、

（C）工程（B）で得られた細胞凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質を含む培地中でさらに浮遊培養する工程、

（D）工程（C）で得られた細胞凝集体を、Wntシグナル伝達経路作用物質、及び／又は、FGFシグナル伝達経路阻害物質を含む無血清培地又は血清培地中で2日間から4日間程度の期間培養する工程、及び、

（E）工程（D）で得られた細胞凝集体を、Wntシグナル伝達経路作用物質及びFGFシグナル伝達経路阻害物質を含まず、甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質を含んでいてもよい無血清培地又は血清培地中で30日間～200日間程度培養する工程。

[0102] 具体的な一態様として、下記工程（A）～（E）を含む方法によって神経網膜を含む細胞凝集体を調製することができる：

（A）多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、未分化維持因子を含み、かつTGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含む培地で12時間～48時間培養する工程、

(B) 工程 (A) で得られた細胞を、W n t シグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含む培地中で、12時間～72日間(24時間～48時間)浮遊培養することによって細胞凝集体を形成させる工程、

(C) 工程 (B) で得られた細胞凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質を含む培地中でさらに8日間～15日間(10日間～13日間)浮遊培養する工程、

(D) 工程 (C) で得られた細胞凝集体を、W n t シグナル伝達経路作用物質、及び／又は、FGFシグナル伝達経路阻害物質を含む無血清培地又は血清培地中で2日間から4日間培養する工程、及び、

(E) 工程 (D) で得られた細胞凝集体を、W n t シグナル伝達経路作用物質及びFGFシグナル伝達経路阻害物質を含まず、甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質を含んでいてもよい無血清培地又は血清培地中で10日間～200日間程度培養する工程。

[0103] ここで工程 (E) は10日間～30日間細胞増殖用基礎培地で培養し、次いで10日間～40日間細胞増殖用基礎培地と甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質を含む連続上皮組織維持用培地の混合培地で培養し、更に20日間～140日間甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質を含む連続上皮組織維持用培地で培養する工程を含んでいてもよい。

一態様において、工程 (E) は、甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質の存在下に20日間～60日間(30日間～50日間)培養することを含む。

一態様において、工程 (B) ～工程 (E) までの培養期間は、70日間～100日間(80日間～90日間)である。

[0104] 上述の方法によって、神経網膜を含む細胞凝集体を製造することができるが、これらに限定されない。一態様として、神経網膜を含む細胞凝集体は、細胞凝集体の混合物として得ることもできる。別の態様として、例えば96ウェルプレートの1ウェルに1個の細胞凝集体を製造することもでき、神経

網膜を含む細胞凝集体を１個ずつ得ることもできる。

[0105] 本発明に係る神経網膜は、視細胞層及び内層を含む神経網膜層を含み、視細胞層において視細胞前駆細胞及び視細胞からなる群から選択される１種以上の細胞を含み、かつ、上皮組織の構造を有し、頂端面と基底とを有する。上皮組織の構造は連続上皮構造であることが好ましい。

[0106] 一態様において、本発明に係る神経網膜は、ピンセット、ナイフ、ハサミ等を用いて神経網膜の細胞凝集体から切り出すことによって得ることができる。スフェア状の神経網膜の細胞凝集体から切り出すことにより、神経網膜シートを得ることができる。神経網膜シートとは、上述の神経網膜層の層構造を維持した重層のシート状の構造体を意味する。

[0107] 一態様において、神経網膜を含む細胞凝集体の中には、複数の神経網膜が重なりあって存在する場合がある（例：図６における概念図（１）及び（２）などを参照）。一態様において、神経網膜を含む細胞凝集体は、少なくとも第一の上皮組織及び第二の上皮組織を含み、第一の上皮組織は、ヒト神経網膜を含み、第二の上皮組織は、第一の上皮組織の表面における接線の傾きの連続性と異なる表面の接線の傾きの連続性を有し、かつ網膜系細胞以外の細胞及び／又は網膜色素上皮細胞を含んでいてよい。第二の上皮組織に含まれる網膜系細胞以外の細胞は、眼球関連組織及び脳脊髄組織の細胞が挙げられ、眼球関連組織としては、網膜色素上皮細胞及び毛様体周縁部構造体が挙げられる。本発明に係る神経網膜は、目視により当該凝集体より第二の上皮組織を含まない様に神経網膜を切り出すことにより得ることができる。本発明に係る神経網膜は、上記細胞凝集体における、第二の上皮組織から最も離れた第一の上皮組織上の領域、特に第一の上皮組織の中心付近の領域を含んでいてよい。一態様において、本発明に係る神経網膜は、連続上皮組織の中心付近の領域を含んでいてよい。

[0108] 一態様において、神経網膜を含む細胞凝集体は、移植用神経網膜を含む第一の上皮組織（目的上皮組織）、及び、第一の上皮組織の表面における接線の傾きの連続性と異なる表面の接線の傾きの連続性を有し、かつ非神経網膜

系細胞を含む第二の上皮組織（目的外上皮組織）を含む。ここで、第一の上皮組織は実質的に非神経網膜系細胞（目的外細胞）を含まず、移植用神経網膜を切り出すことが可能な上皮組織を表す。一方、第二の上皮組織は、神経網膜を含んでいてもよいが、目的外細胞を含むため移植用神経網膜を切り出すためには不適格な上皮組織である。別の態様において、神経網膜を含む細胞凝集体は、移植用神経網膜を含む第一の上皮組織（目的上皮組織）のみを含み、目的外上皮組織を含まない。

[0109] 移植用神経網膜は少なくとも視細胞層を含み、視細胞層は少なくとも細胞凝集体の最も外側に形成されており、また、内側にも視細胞又は視細胞前駆細胞が存在してもよく、又は内側にも視細胞層が形成されていてもよい。視細胞等は細胞凝集体の表面の接線方向に連続して、すなわち互いに接着して存在しており、視細胞等が細胞凝集体の表面の接線方向に連続して存在することで、視細胞等を含む視細胞層を形成している。なお、接線方向とは、細胞凝集体の表面に対する接線方向、すなわち視細胞層における視細胞等が並んでいる方向のことをいい、当該神経網膜に対して平行方向又は横方向のことである。また、上皮組織の表面における接線の傾きとは、上皮組織において一つ一つの細胞が一定方向に並んでいる場合の細胞が並んでいる方向のことをいい、上皮組織（又は上皮シート）に対して平行方向又は横方向のことをいう。

[0110] 移植用神経網膜を調製するために用いられる細胞凝集体は、神経網膜以外の目的外組織を含んでいてもよい。当該目的外組織として、神経網膜以外の上皮組織、すなわち、目的外上皮組織を含む第二の上皮組織が挙げられる。第二の上皮組織としては、眼球関連組織及び脳脊髄組織が挙げられる。眼球関連組織は、非神経網膜の眼球組織周辺の組織を意味し、網膜色素上皮細胞、毛様体（例：毛様体周縁部）、水晶体、角膜が挙げられる。脳脊髄組織は、脳及び脊髄の神経組織を意味し、前脳、終脳、大脳、間脳、視床下部、中脳、後脳、小脳、脊髄が挙げられる。一態様にて、脳脊髄組織は、脳下垂体を含んでも良い。

[0111] 第一の上皮組織及び第二の上皮組織を含む細胞凝集体の一例としては、図5における概念図及び図6における概念図（3）及び（5）などが示す細胞凝集体が挙げられる。図5における概念図は、第一の上皮組織である神経網膜の一部において、第二の上皮組織として眼球関連組織（網膜色素上皮細胞、毛様体）（図5の黒色部分）が存在する細胞凝集体の一例を示している。図6における概念図（3）は、複数の神経網膜が重なりあって存在する場合（例：図6における概念図（1）及び（2））において、更に第二の上皮組織として眼球関連組織（網膜色素上皮細胞、毛様体）（図6における概念図（3）の黒色部分）が存在する細胞凝集体の一例を示している。図6における概念図（5）は、第二の上皮組織として脳脊髄組織（大腦など）（図6における概念図（5）の灰色部分）が存在する細胞凝集体の一例を示している。図6における概念図（4）のように、移植用神経網膜を含む細胞凝集体の内側に目的外組織が含まれる場合がある。この場合は、「第一の上皮組織の表面における接線の傾きの連続性と異なる表面の接線の傾きの連続性を有し、」という定義に該当しないため、第二の上皮組織には該当しない。移植用神経網膜及び品質評価用サンプルは、内側に目的外組織を含まない細胞凝集体から選択する方が好ましい。

[0112] <抽出工程>

細胞凝集体から移植用神経網膜を切り出す場合、視細胞又は視細胞前駆細胞のマーカー陽性細胞を含むことを指標とすることが望ましい。細胞凝集体から移植用神経網膜を切り出す場合、網膜前駆細胞又は神経網膜前駆細胞のマーカー陽性細胞を含むことを指標とすることが望ましい。また、目的外細胞のマーカー陽性細胞を含まないことを指標とすることが望ましい。

[0113] 視細胞又は視細胞前駆細胞マーカー陽性細胞を含み、目的外細胞のマーカー陽性細胞が基準以下である（又は、目的外細胞マーカー陰性である）移植用神経網膜を得るためには、予め移植用神経網膜の品質を評価することが望ましい。

[0114] 例えば、移植用神経網膜の品質は、多能性幹細胞由来の上皮構造を有する

神経網膜を含む細胞凝集体の一部又は全部を品質評価用サンプルとして抽出（sampling）し（以下、「抽出工程」という）、抽出されたサンプルに発現するマーカーを当業者に周知の方法で検出することにより、評価することができる。細胞凝集体の一部を品質評価用サンプルとして抽出するとは、複数の細胞凝集体の中から一部の細胞凝集体（1若しくは複数）、又は全部の細胞凝集体を選択し、選択した細胞凝集体中の一部分をピンセット、ハサミ及び／又はナイフ等を用いて評価用サンプルとして単離する（例：切り出す（dissect））ことを意味する。細胞凝集体の全部を品質評価用サンプルとして抽出するとは、複数の細胞凝集体の中から一部の細胞凝集体（1若しくは複数）の細胞凝集体を選択し、選択した1又は複数の細胞凝集体の全部を品質評価用サンプルとして別々に取り出す（pick up）ことを意味する。複数の細胞凝集体の中から1又は複数の細胞凝集体を選択する場合は、ランダムに抽出する方が好ましい。本明細書において、細胞凝集体の一部を品質評価用サンプルとして抽出する場合の細胞凝集体を「品質評価用サンプルを含む細胞凝集体」、細胞凝集体の全部を品質評価用サンプルとして抽出する場合の細胞凝集体を「品質評価用サンプルの細胞凝集体」と記載する。

[0115] 一態様において、品質評価用サンプルは、多能性幹細胞由来の上皮構造を有する神経網膜を含む細胞凝集体の一部である。細胞凝集体の一部を品質評価用サンプルとして抽出することにより、細胞凝集体を全破壊せず、残りの部分に含まれる神経網膜を移植に用いられるという利点がある。すなわち、細胞凝集体の一部である品質評価用サンプルについて後述する判定工程によって合格と判定されれば、当該品質評価用サンプルを含む細胞凝集体における上皮構造を有する神経網膜を、移植用神経網膜として使用可能であるとし、移植に用いることができる。

[0116] 細胞凝集体において、連続した上皮構造をしており、outer neuroblastic layerとinner neuroblastic layerが2層に分かれて見える部位を、神経網膜と判定することができる。一方、第二の上皮組織としての眼球関連組織、特

に網膜色素上皮細胞は、目視又は顕微鏡下において黒色を呈していることから、当業者であれば神経網膜と容易に区別することができる。また、第二の上皮組織としての脳脊髄組織は、目視又は顕微鏡下において、形態的な特徴である、細胞凝集体の表面上に連続した上皮構造が確認できないこと、神経網膜特有の形態的な特徴が確認できないこと、及び／又は、色調がくすんで見えること等に着目すれば、当業者であれば神経網膜と容易に区別することができる。したがって、当業者であれば第二の上皮組織を含む細胞凝集体であっても、神経網膜を含む第一の上皮組織から移植用神経網膜及び品質評価用サンプルを単離することができる。

[0117] 上述の通り、一態様において、移植用神経網膜又は移植用神経網膜の候補との一定の位置関係によって品質評価用サンプルが設定され、抽出される。すなわち、移植用神経網膜又はその候補の設定により、品質評価用サンプルとして切り出す領域を確定することができる。ここで、移植用神経網膜（移植片、キャップ（Cap）ともいう）及びその候補は、一態様において、上述した細胞凝集体中の位置（例：上皮組織（連続上皮組織）の中心付近であり、第二の上皮組織を有する場合は、さらに第二の上皮組織から最も離れた第一の上皮組織上の領域である）、及び、後述の（移植用神経網膜シート）において記載される大きさなどにより特定することができる。従って、当業者であれば当該特徴を有する神経網膜を、移植用神経網膜又はその候補として設定できる。

同一の細胞凝集体から移植用神経網膜と品質評価用サンプルを抽出する場合の品質評価用サンプル（リング（Ring）ともいう）は、当業者であれば、上述の通り設定した移植用神経網膜と少なくとも一部において連続又は近接する領域であり、品質評価が可能な範囲でできるだけ狭い領域として設定できる。同一ロットの該細胞凝集体中の1個又は複数の細胞凝集体の一部を品質評価用サンプルとして抽出する場合の品質評価用サンプルは、当業者であれば、当該細胞凝集体における上述の移植用神経網膜又はその候補の部分を抽出することができる。この場合の品質評価用サンプルとして切り出す

大きさは、後述する（移植用神経網膜シート）に記載された大きさであってもよいし、さらに小さくてもよい。従って、移植用神経網膜又はその候補の位置との関係及び上記大きさにより、品質評価用サンプルを設定し、抽出することができる。

[0118] <検出工程>

本発明に係る移植用神経網膜の品質を評価する方法は、品質評価用サンプル中の神経網膜系細胞関連遺伝子及び非神経網膜系細胞関連遺伝子（目的外細胞関連遺伝子）の発現を検出すること（検出工程）を含む。当該検出工程は、前記遺伝子の発現量を定量的に検出する方が好ましい。目的外細胞関連遺伝子は、脳脊髄組織マーカー遺伝子及び眼球関連組織マーカー遺伝子からなる群から選択される1以上の遺伝子を含む。

[0119] （神経網膜系細胞関連遺伝子）

神経網膜系細胞関連遺伝子（目的細胞関連遺伝子）は、神経網膜系細胞が発現する遺伝子を意味する。神経網膜系細胞関連遺伝子としては、視細胞（桿体視細胞、錐体視細胞）、水平細胞、アマクリン細胞、介在神経細胞、網膜神経節細胞（神経節細胞）、双極細胞（桿体双極細胞、錐体双極細胞）、ミューラーグリア細胞、あるいはこれらの細胞の前駆細胞、神経網膜前駆細胞等で、目的外細胞と比べて高く発現している遺伝子が好ましい。神経網膜系細胞関連遺伝子としては、上記の神経網膜系細胞マーカーが挙げられ、*RAX*、*Chx10*、*SIX3*、*SIX6*、*RCVRN*、*CRX*、*NRL*及び*NESTIN*が好ましい。神経網膜系細胞マーカーのGenBank IDを下記の表1に示す。

[表1]

遺伝子名	GenBank ID
RAX	NM_013435.2
Chx10	NM_182894.2
SIX3	NM_005413.4
SIX6	NM_007374.2
RCVRN	NM_002903.2
CRX	NM_000554.6
NRL	NM_006177.4
NESTIN	NM_006617.2

[0120] 神経網膜系細胞関連遺伝子は、表1記載の遺伝子が好ましいが、これらに限定されない。このほかに神経網膜系細胞関連遺伝子として、*Rax2*、*Vsx1*、*Blimp1*、*RXRG*、*S-opsin*、*M/L-opsin*、*Rhodopsin*、*Brn3*、*L7*等が挙げられる。

[0121] (非神経網膜系細胞関連遺伝子)

神経網膜を含む細胞凝集体を医薬品原材料として製造する過程で副生成物として誘導される目的外細胞、及び当該目的外細胞が副産物として製造される可能性のある細胞又は組織に発現する遺伝子（以下、非神経網膜系細胞関連遺伝子又は目的外細胞関連遺伝子という。）を検出することで同定することができる。

[0122] 一態様において、非神経網膜系細胞関連遺伝子（目的外細胞関連遺伝子）は、脳脊髄組織マーカー遺伝子及び眼球関連組織マーカー遺伝子が挙げられる。一態様において、非神経網膜系細胞関連遺伝子として未分化iPS細胞マーカー遺伝子を含んでもよい。

[0123] 一態様において、脳脊髄組織マーカー遺伝子は、終脳マーカー遺伝子、間脳・中脳マーカー遺伝子及び脊髄マーカー遺伝子からなる群から選択される1以上の遺伝子であってよい。間脳・中脳マーカー遺伝子は、間脳マーカー遺伝子、中脳マーカー遺伝子、及び、間脳の一部である視床下部に関する視床下部マーカー遺伝子からなる群から選択される1以上の遺伝子であってよ

い。

[0124] 一態様において、眼球関連組織マーカー遺伝子は、*optic stalk* マーカー遺伝子、毛様体マーカー遺伝子、水晶体マーカー遺伝子及び網膜色素上皮マーカー遺伝子からなる群から選択される1以上の遺伝子であってよい。

[0125] 終脳マーカー遺伝子とは、終脳に発現する遺伝子を意味する。終脳マーカー遺伝子は、*FoxG1*（別名*Bf1*）、*Emx2*、*DLX2*、*DLX1*及び*DLX5*からなる群から選択される1以上の遺伝子を含んでいてよい。終脳マーカー遺伝子の*GenBank ID*を下記の表2に示す。

[表2]

遺伝子名	GenBank ID
FOXG1	NM_005249.4
Emx2	NM_004098.4 NM_001165924.1
DLX2	NM_004405.4
DLX1	NM_178120.5 NM_001038493.1
DLX5	NM_005221.6 XM_005250185.3 XM_017011803.1

[0126] 終脳マーカー遺伝子は、表2記載の遺伝子が好ましいが、これらに限定されない。このほかに終脳マーカー遺伝子としては、*Emx1*、*LHX2*、*LHX6*、*LHX7*、*Gsh2*等が挙げられる。

[0127] 間脳・中脳マーカー遺伝子とは、間脳及び／又は中脳に発現する遺伝子を意味する。間脳・中脳マーカー遺伝子は、*OTX1*、*OTX2*及び*DMBX1*からなる群から選択される1以上の遺伝子を含んでいてよい。間脳・中脳マーカー遺伝子の*GenBank ID*を下記の表3に示す。間脳・中脳マーカー遺伝子は、間脳の一領域である視床下部に関して後述する視床下部マーカーを含んでもよい。すなわち、間脳・中脳マーカー遺伝子は、*OTX1*、*OTX2*、*OTX2*、*DMBX1*、*Rx*、*Nkx2.1*、*OTP*、*FGF*

R 2、E F N A 5 及び G A D 1 からなる群から選択される 1 以上の遺伝子を含んでいてよい。

[表3]

遺伝子名	GenBank ID
OTX1	NM_001199770.1 NM_014562.4
OTX2	NM_001270523.1 NM_001270524.1 NM_001270525.1 NM_021728.3 NM_172337.2
DMB X 1	NM_172225.1 NM_147192.2 XM_011540668.2 XM_017000289.1

[0128] 視床下部マーカー遺伝子は、視床下部に発現する遺伝子を意味する。視床下部マーカー遺伝子は、R x、N k x 2. 1、D m b x 1、O T P、g a d 1、F G F R 2 及び E F N A 5 からなる群から選択される 1 以上の遺伝子を含んでいてよい。視床下部マーカー遺伝子の G e n B a n k I D を下記の表 4 に示す。

[表4]

遺伝子名	GenBank ID
Rx	NM_013435.2
Nkx2.1	NM_003317.3, NM_001079668.2
OTP	NM_032109.2
gad1	NM_000817.3, NM_013445.3 XM_005246444.3, XM_011510922.1 XM_017003756.1, XM_017003758.2 XM_017003757.2, XM_024452783.1
FGFR2	NM_022970.3, NM_000141.4 NM_023029.2, NM_001144913.1 NM_001144914.1, NM_001144915.1 NM_001144916.1, NM_001144917.1 NM_001144918.1, NM_001144919.1 NM_001320654.1, NM_001320658.1 NR_073009.1, XM_006717708.3 XM_006717710.4, XM_017015920.2 XM_017015921.2, XM_017015924.2 XM_017015925.2, XM_024447888.1 XM_024447887.1, XM_024447890.1 XM_024447889.1, XM_024447892.1 XM_024447891.1
EFNA5	NM_001962.3, XM_006714565.3 XM_011543250.3, XM_011543251.2 XM_017009205.1

[0129] 脊髄マーカー遺伝子は、脊髄に発現する遺伝子を意味する。脊髄マーカー遺伝子は、HoxB2、HoxA5、HOXC5、HOXD1、HOXD3及びHOXD4からなる群から選択される1以上の遺伝子を含んでいてよい。脊髄マーカー遺伝子のGenBank IDを下記の表5に示す。

[表5]

遺伝子名	GenBank ID
HOXB2	NM_002145.3 XM_005257275.4
HOXA5	NM_019102.4
HOXC5	NM_018953.3 NR_003084.2
HOXD1	NM_024501.3
HOXD3	NM_006898.4 XM_005246509.4 XM_005246511.4 XM_005246513.5 XM_011511065.3 XM_011511066.3
HOXD4	NM_014621.3 XM_005246514.4

[0130] 脊髄マーカー遺伝子は、表5記載の遺伝子が好ましいが、これらに限定されない。このほかに脊髄マーカー遺伝子としては、Hoxクラスターを形成する遺伝子群等が挙げられる。

[0131] 一方、一態様において、製造工程にレチノイド類（例えば、レチノイン酸、レチナール、レチノール、all-trans-レチノイン酸、11-cis-レチノイン酸が挙げられる）を用いる場合には、良品の網膜組織が製造されている場合においても、HOX遺伝子（例えば、HOXC5、HOXA5及びHOXB2）の発現が認められ得る。HOX遺伝子はレチノイン酸シグナルにより発現が制御されていると考えられており、網膜組織の分化誘導に影響を与えない程度にHOX遺伝子発現が増加する。このレチノイン酸シグナルの効果は、前後軸に沿っての後方化を促進することによると考えられる。従って、製造工程にレチノイド類を用いる場合（特に網膜への分化誘導が開始した時期以降にレチノイド類を用いる場合）、HOX遺伝子（例えば、HOXC5、HOXA5及びHOXB2）を品質評価対象遺伝子から除外する、若しくは、これら遺伝子の発現が認められても移植用神経網膜の品

質を良品であると判断することができる。

[0132] Optic Stalk マーカー遺伝子は、Optic Stalk に発現する遺伝子を意味する。Optic Stalk マーカー遺伝子は、GREM1、GPR17、ACVR1C、CDH6、Pax2、Pax8、GAD2 及び SEMA5A からなる群から選択される 1 以上の遺伝子を含んでよい。Optic Stalk マーカー遺伝子の GenBank ID を下記の表 6 に示す。

[表6]

遺伝子名	GenBank ID
GREM1	NM_013372.7, NM_001191322.1 NM_001191323.1, NM_001368719.1 XM_017022077.1
GPR17	NM_001161417.1, NM_005291.2 NM_001161415.1, NM_001161416.1 XM_017003833.2
ACVR1C	NM_145259.3, NM_001111031.1 NM_001111032.1, NM_001111033.1
CDH6	NM_004932.4, NM_001362435.1 XM_011513921.3, XM_017008910.2 XR_001741972.2
Pax2	NM_000278.4, NM_003987.4 NM_003988.4, NM_003989.4 NM_003990.4, NM_001304569.1
Pax8	NM_003466.4, NM_013952.3 NM_013953.3, NM_013992.3
GAD2	NM_001134366.2, NM_000818.2
SEMA5A	NM_003966.3, XM_006714506.3 XM_006714507.3, XM_011514155.2 XM_011514156.2, XM_011514157.2 XM_011514158.2, XM_011514159.2 XM_017010016.2

[0133] 水晶体マーカー遺伝子は、水晶体に発現する遺伝子を意味する。水晶体マーカー遺伝子は、CRYAA 及びCRYBA1 からなる群から選択される 1

以上の遺伝子を含んでいてよい。水晶体マーカー遺伝子のGenBank IDを下記の表7に示す。

[表7]

遺伝子名	GenBank ID
CRYAA	NM_000394.3
	NM_001363766.1
CRYBA1	NM_005208.4
	XM_017024198.1

[0134] 毛様体マーカー遺伝子は、毛様体、毛様体周縁部、及び又はCiliary bodyに発現する遺伝子を意味する。毛様体マーカー遺伝子は、Zic1、MAL、HNF1beta、FoxQ1、CLDN2、CLDN1、GPR177、AQP1及びAQP4からなる群から選択される1以上の遺伝子を含んでいてよい。毛様体マーカー遺伝子のGenBank IDを下記の表8に示す。

[表8]

遺伝子名	GenBank ID
Zic1	NM_003412.4
MAL	NM_002371.4, NM_022438.2 NM_022439.2, NM_022440.2
HNF1beta	NM_000458.4, NM_001165923.3 NM_001304286.1, XM_011525160.1 XM_011525161.1, XM_011525162.2 XM_011525163.2, XM_011525164.1
FoxQ1	NM_033260.4
CLDN2	NM_001171092.1, NM_020384.3 NM_001171095.1
CLDN1	NM_021101.5
GPR177	NM_024911.7, NM_001002292.3 NM_001193334.1, XM_011542191.2 XM_011542192.3, XM_017002390.2
AQP1	NM_198098.3, NM_001329872.1
AQP4	NM_001650.7, NM_004028.4 NM_001317384.2, NM_001317387.2 NM_001364286.1, NM_001364287.1 NM_001364289.1, XM_011525942.3

[0135] 網膜色素上皮マーカー遺伝子は、網膜色素上皮細胞に発現する遺伝子を意味する。網膜色素上皮マーカー遺伝子は、上記網膜色素上皮マーカーが挙げられ、MITF、TTR及びBEST1からなる群から選択される1以上の遺伝子を含んでいてよい。網膜色素上皮マーカー遺伝子のGenBank IDを下記の表9に示す。

[表9]

遺伝子名	GenBank ID
MITF	NM_000248.3, NM_006722.2 NM_198158.2, NM_198159.2 NM_198177.2, NM_198178.2 NM_001184967.1, NM_001184968.1 NM_001354604.1, NM_001354605.1 NM_001354606.1, NM_001354607.1 NM_001354608.1
BEST1	NM_004183.4, NM_001139443.1 NM_001300786.1, NM_001300787.1 NM_001363591.1, NM_001363592.1 NM_001363593.1, NR_134580.1 XM_005274210.4, XM_005274215.4 XM_005274216.4, XM_005274219.4 XM_005274221.4, XM_011545229.3 XM_011545230.3, XM_011545233.3 XM_017018230.2, XR_001747952.2 XR_001747953.2, XR_001747954.2
TTR	NM_000371.3

[0136] 一態様において、目的外細胞関連遺伝子は、未分化多能性幹細胞マーカー遺伝子をさらに含んでいてよい。

[0137] 未分化多能性幹細胞マーカー遺伝子は、Oct 3／4、Nanog及びLin 28からなる群から選択される1以上の遺伝子を含んでいてよい。好ましくは、未分化多能性幹細胞マーカー遺伝子はOct 3／4、Nanog及びLin 28からなる群から選択される1以上の遺伝子である。未分化多能性幹細胞マーカー遺伝子のGenBank IDを下記の表10に示す。

[表10]

遺伝子名	GenBank ID
Oct3/4 (POU5F1)	NM_002701.6, NM_203289.5 NM_001173531.2, NM_001285986.1 NM_001285987.1
Nanog	NM_024865.4, NM_001297698.1
lin28	NM_024674.6, XM_011542148.2
SOX2	NM_003106.4
KLF4	NM_001314052.1, NM_004235.6
c-Myc	NM_001354870.1, NM_002467.6
Glis1	NM_001367484.1, NM_147193.2 XM_017000409.1, XM_017000411.1 XM_017000408.1, XM_017000410.1 XM_017000412.1
Sall4	NM_001318031.1, NM_020436.5 XM_011528921.2, XM_011528922.2 XM_005260467.4
Esrrb	NM_004452.3, XM_011536553.2 XM_024449508.1, XM_011536547.2 XM_011536554.2, XM_011536550.2 XM_024449509.1, XM_017021085.1

[0138] (検出手法)

一態様において、神経網膜系細胞関連遺伝子及び非神経網膜系目的外細胞関連遺伝子の発現の検出は、特に限定されないが、ウェスタンブロッティング、免疫染色、フローサイトメトリー解析／フローサイトメーター（FACS（登録商標、BD社製）等）、ノーザンブロッティング、電気泳動法、PCR（好ましくは、定量PCR（qPCR）及び又はリアルタイムPCR）、ジーンチップ解析、次世代シーケンサー等の手法が挙げられる。このうち、定量性、検出感度、結果の安定性及び早さの観点で、定量PCRが有用である。さらに、シングルセルの定量PCRを行うために用いられる装置（例えば、Biomark HD（Fluidigm社製）等）を通常の定量PCRに応用することで、複数の品質評価用サンプルを短時間で評価するこ

とが可能である。

[0139] 一態様において、2以上の品質評価用サンプルにおける、それぞれの神経網膜系細胞関連遺伝子及び非神経網膜系細胞関連遺伝子の発現量を、定量PCRによって同時に検出してもよい。該定量PCRは、例えば、下記の下記(1)～(5)の工程を含む方法によって行われてもよい。具体的な方法は、当業者に周知である。

(1) 1群の8以上800以下の独立したサンプルウェルからなるサンプルウェル群、1群以上の8以上800以下の独立したプライマーウェルからなるプライマーウェル群、及び、サンプルウェル群における独立したサンプルウェルとそれぞれのプライマーウェル群における独立したプライマーウェルとをつなぐ流路を有する流路プレートと、2以上の上記品質評価用サンプルから得られた核酸を含有する溶液(サンプル溶液)と、1以上の上記神経網膜系細胞関連遺伝子又は上記非神経網膜系細胞関連遺伝子に特異的なプライマーを1又は複数含有する溶液(プライマー溶液)を準備すること、

(2) サンプルウェル群において、上記サンプル溶液を上記品質評価用サンプルごとに1サンプル溶液／1サンプルウェルとなるように添加すること、

(3) 上記1以上のプライマーウェル群において、上記プライマー溶液を、異なるプライマーウェル群となるように、1以上のプライマーウェルに添加すること、

(4) 上記流路を介して、上記核酸に対して、上記プライマーを別々に混合すること、及び

(5) (4)で得られた混合液を用いて定量PCRを行うこと。

[0140] また、発現細胞の割合を検出可能であるフローサイトメーターを用いたフローサイトメトリー解析も有用である。近年、検出速度の改良が進み、ハイスループット性を備えた多数検体を評価可能なフローサイトメーター(FACS(登録商標)等)も利用可能である。従って、神経網膜系細胞関連遺伝子及び非神経網膜系目的外細胞関連遺伝子の発現の検出には、ハイスループ

ットフローサイトメーターの利用も有用である。このようなハイスループットフローサイトメーターは、市販品（例：MACSQuant（登録商標）Analyzers: Miltenyi Biotec社製）を用いることが可能である。

[0141] <判定工程>

細胞凝集体から切り出された移植用神経網膜シートは、神経網膜系細胞関連遺伝子の発現が認められ、かつ、非神経網膜系細胞関連遺伝子の発現が認められない場合に、移植に使用可能である、すなわち移植に適していると判定すること（判定工程）ができる。

[0142] 神経網膜系細胞関連遺伝子の発現が認められることとは、遺伝子の発現の検出法において、当該検出法によって実質的に検出可能なレベル（例えば、検出下限値以上）の神経網膜系細胞関連遺伝子の発現が認められることを意味する。また、非神経網膜系細胞関連遺伝子の発現が認められないこととは、遺伝子の発現の検出法において、当該検出法によって実質的に非神経網膜系細胞関連遺伝子の発現を検出できない（例えば、検出下限値未満）ことを意味する。実質的な検出可能性とは、当該遺伝子が実質的に機能しているとは言えない程度を超えて、当該遺伝子が検出されることをいう。当業者であれば当該遺伝子及び当該検出法に応じて適宜設定可能である。例えば、定量性のある遺伝子発現の検出法の場合、当該遺伝子発現の検出下限値を基準として0%超～10%以下、0%超～5%以下の範囲を、実質的に検出可能なレベルではない（すなわち、当該遺伝子の発現を検出できない）と判断することができる。

[0143] 一態様において、定量PCR法において、以下の基準1及び基準2を満たす場合に、移植用神経網膜として使用可能と判定することが好ましい。

基準1：神経網膜系細胞関連遺伝子のThreshold Cycle (Ct) 値と内部標準遺伝子のCt値との差 (ΔCt 値) が10以下

基準2：. 非神経網膜系細胞関連遺伝子のCt値と内部標準遺伝子のCt値との差 (ΔCt 値) が5以上

[0144] **Threshold Cycle (Ct)** 値とは、PCRによる遺伝子の増幅が指数関数的に起こる領域で一定の増幅産物量になるサイクル数を意味する。Ct 値は遺伝子の初期量と逆相関になるため、遺伝子の初期コピー数の算出に使用される。一態様において、「 $2^{\text{Ct 値}}$ (2のCt 値乗)」は遺伝子の初期量と反比例になるため、遺伝子の初期コピー数の算出に使用される。具体的には、2 倍の初期量の遺伝子を含むサンプルは、増幅前に半分のコピー数の遺伝子しか含まないサンプルよりもCt 値が1 サイクル早くなる。一定の増幅産物量は、PCRによる遺伝子の増幅が指数関数的に起こる領域内であればよく、当業者であれば設定可能である。

[0145] 内部標準遺伝子とは、試料間において発現量の差が小さい遺伝子を意味する。内部標準遺伝子としては、当業者に周知のものを適宜用いることができ、例えば、18S リボソームRNA、 β アクチン、HPRT、 α チューブリン、トランスフェリン受容体、ユビキチン、GAPDH等が挙げられるが、好ましくはGAPDHである。

[0146] Ct 値は、遺伝子の初期量に逆相関するため、細胞内における遺伝子の発現量に依存する。すなわち、核酸含有溶液の濃度が一定の場合、用いる内部標準遺伝子によってCt 値は異なり、特定遺伝子のCt 値と内部標準遺伝子のCt 値との差 (Δ Ct 値) は、用いる内部標準遺伝子に影響を受ける。本明細書における Δ Ct 値は、特段の記載がない場合は、内部標準遺伝子としてGAPDHを使用した場合の値を基準として記載する。

[0147] 内部標準遺伝子として、GAPDH以外の内部標準遺伝子を用いる場合、GAPDHと当該GAPDH以外の内部標準遺伝子の発現量を比べることで、前記基準1 及び基準2 の Δ Ct 値を補正することができる。

[0148] 一態様において、内部標準遺伝子として β アクチンを用いる場合、本願製法において、GAPDHと β アクチンでは、GAPDHのCt 値が β アクチンのCt 値より、およそ1 程度低い、すなわちGAPDHのRNAの絶対量が β アクチンのRNAの絶対量の2 倍程度であることから、

基準1：神経網膜系細胞関連遺伝子の**Threshold Cycle** (

C t) 値と内部標準遺伝子のC t 値との差 ($\Delta C t$ 値) が9以下

基準2：非神経網膜系細胞関連遺伝子のC t 値と内部標準遺伝子のC t 値との差 ($\Delta C t$ 値) が4以上とすることができる。

[0149] 一態様において、内部標準遺伝子としてH P R Tを用いる場合、本願製法において、G A P D HとH P R Tでは、G A P D HのC t 値がH P R Tよりもおよそ7程度低い、すなわちG A P D HのR N Aの絶対量がH P R TのR N Aの絶対量の 2^7 (128倍) 程度であることから、

基準1：神経網膜系細胞関連遺伝子のThresho l d C y c l e (C t) 値と内部標準遺伝子のC t 値との差 ($\Delta C t$ 値) が3以下

基準2：非神経網膜系細胞関連遺伝子のC t 値と内部標準遺伝子のC t 値との差 ($\Delta C t$ 値) が-2以上とすることができる。

[0150] 神経網膜系細胞関連遺伝子は上述した遺伝子であればよい。神経網膜系細胞関連遺伝子としては、複数の遺伝子が存在する。すなわち、同一の神経網膜系細胞から抽出した場合であっても、神経網膜系細胞関連遺伝子の種類によって前記基準値1のC t 値は異なってもよい。当業者であれば、当該神経網膜系細胞関連遺伝子の発現部位や発現量などの公知情報から、遺伝子ごとに神経網膜系細胞関連遺伝子が発現していると判断可能な $\Delta C t$ 値を設定することができる。

[0151] 例えば、C h x 1 0 遺伝子について、G A P D Hを内部標準とした場合、 $\Delta C t$ 値は20以下であってよく、好ましくは15以下、より好ましくは10以下であってよい。

[0152] 例えば、R e c o v e r i n 遺伝子について、G A P D Hを内部標準とした場合、 $\Delta C t$ 値は16以下、好ましくは11以下、より好ましくは6以下であってよい。

[0153] 一般的には、神経網膜系細胞関連遺伝子のC t 値と内部標準遺伝子(例：G A P D H)のC t 値との差 ($\Delta C t$ 値) は、例えば、25以下、20以下、15以下又は10以下であってよい。神経網膜系細胞関連遺伝子のC t 値と内部標準遺伝子のC t 値との差は、例えば、-10以上、-5以上、0以

上又は5以上であってよい。

[0154] 非神経網膜系細胞関連遺伝子は上述した遺伝子であればよい。非神経網膜系細胞関連遺伝子としては、複数の遺伝子が存在する。すなわち、同一の非神経網膜系細胞から抽出した場合であっても、非神経網膜系細胞関連遺伝子によりCt値は異なる。当業者であれば、当該非神経網膜系細胞関連遺伝子の発現部位や発現量などの公知情報から、遺伝子ごとに神経網膜系細胞関連遺伝子が発現していると判断可能な Δ Ct値を設定することができる。例えば、PAX2遺伝子について、GAPDHを内部標準とした場合、 Δ Ct値は5以上であってよい。HOXB2遺伝子について、GAPDHを内部標準とした場合、 Δ Ct値は5以上であってよい。一般的には、非神経網膜系細胞関連遺伝子のCt値と内部標準遺伝子のCt値との差は、30以下、25以下、20以下であってよい。また、非神経網膜系細胞関連遺伝子のCt値と内部標準遺伝子のCt値との差は、例えば、0以上、3以上又は5以上であってよい。

[0155] 一態様において、本発明に係る神経網膜は、

- (1) 多能性幹細胞由来であり、
- (2) 3次元構造を有し、
- (3) 視細胞層及び内層を含む複数の層構造を有する神経網膜層を含み、
- (4) 視細胞層が、視細胞前駆細胞及び視細胞からなる群から選択される1種以上の細胞を含み、
- (5) 内層が、網膜前駆細胞、神経節細胞、アマクリン細胞及び双極細胞からなる群から選択される1種以上の細胞を含み、
- (6) 神経網膜層の表面が、頂端面を有し、
- (7) 頂端面に沿って存在する視細胞層の内側に内層が存在し、
- (8) 移植用神経網膜シートの表面の総面積に対して、神経網膜層の面積が50%以上であり、
- (9) 神経網膜層の頂端面の総面積に対して、連続上皮構造の面積が80%以上である、

(10) 移植用神経網膜シート中の神経網膜系細胞関連遺伝子の発現が認められ、かつ、非神経網膜系細胞関連遺伝子の発現が認められず、上記非神経網膜系細胞関連遺伝子が、脳脊髄組織マーカー遺伝子及び眼球関連組織マーカー遺伝子からなる群から選択される1以上の遺伝子を含む、ことを特徴とする移植用神経網膜シートである。

[0156] 一態様において、上記移植用神経網膜シートは、多能性幹細胞由来のスフェア状の細胞凝集体から、神経網膜を含む一部を切り出したシート状の細胞凝集体であることが好ましい。具体的な作製方法は、例えば国際出願PCT/JP2020/011254に記載されているとおりである。

[0157] 一態様において、当該神経網膜は、(3) 視細胞層及び内層を含む複数の層構造を有する神経網膜層を含む。(6) 及び(7)に記載の通り、視細胞層は当該神経網膜の外側(表面)に存在するが、内層にも異所性の視細胞層が存在してもよい。

[0158] 一態様において、当該神経網膜は、(5) 内層が、網膜前駆細胞、神経節細胞、アマクリン細胞及び双極細胞からなる群から選択される1種以上の細胞を含むが、異所性の視細胞前駆細胞及び視細胞からなる群から選択される1種以上の細胞を含んでもよい。一態様において、神経節細胞、アマクリン細胞、水平細胞の含有率が総細胞数の30%以下である神経網膜、神経節細胞、アマクリン細胞、水平細胞及び双極細胞の含有率が総細胞数の30%以下である神経網膜、及び／又は、双極性細胞の含有率が総細胞数の10%以下である神経網膜も提供される。

[0159] 一態様において、当該神経網膜は、(8) 神経網膜の表面の総面積に対して、神経網膜層の面積が40%以上であり、好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上である。当該神経網膜は、(9) 神経網膜層の頂端面の総面積に対して、連続上皮構造の面積が60%以上であり、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上である。

[0160] 神経網膜系細胞関連遺伝子及び非神経網膜系細胞関連遺伝子(脳脊髄組織マーカー遺伝子及び眼球関連組織マーカー遺伝子)は、上述した遺伝子であ

る。

[0161] (10) 移植用神経網膜シート中の神経網膜系細胞関連遺伝子の発現が認められ、かつ、非神経網膜系細胞関連遺伝子の発現が認められないことは、移植用神経網膜シートの一部を取って、遺伝子の発現を検出することによって判明することができる。また、神経網膜系細胞関連遺伝子の発現が実質的に認められ、かつ、非神経網膜系細胞関連遺伝子の発現が実質的に認められない細胞凝集体から単離した移植用神経網膜シートであれば、移植用神経網膜シート自体の遺伝子発現の検出は不要である。実質的に当該遺伝子の発現が認められる又は発現が認められないとは、当該検出法によって実質的に検出可能なレベルか否かで決定される。

[0162] 移植用神経網膜シート中の神経網膜系細胞関連遺伝子は、例えば、 $R \times$ 、 $Ch \times 10$ 、 $Pa \times 6$ 及び $Cr \times$ からなる群から選択される1以上であってよい。総細胞数に対する神経網膜系細胞関連遺伝子を発現する細胞（陽性細胞）の割合は、神経網膜の分化段階によって異なる。

[0163] 一態様において、移植用神経網膜シート中の総細胞数に対する $R \times$ 陽性細胞の割合は、30%以上、40%以上、50%以上、又は60%以上であってよい。一態様において、移植用神経網膜シート中の総細胞数に対する $Ch \times 10$ 陽性細胞または $Pa \times 6$ 陽性細胞の割合は、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、又は50%以上であってよい。一態様において、移植用神経網膜シート中の総細胞数に対する $Cr \times$ 陽性細胞の割合は、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、又は50%以上であってよい。

[0164] 一態様において、移植用神経網膜シート中の総細胞数に対する $R \times$ 陽性細胞の割合は、30%以上80%以下、40%以上70%以下、45%以上60%以下、又は50%以上60%以下であってよい。一態様において、移植用神経網膜シート中の総細胞数に対する $Ch \times 10$ 陽性細胞または $Pa \times 6$ 陽性細胞の割合は、10%以上80%以下、20%以上70%以下、30%以上60%以下、又は40%以上50%以下であってよい。一態様において

、移植用神経網膜シート中の総細胞数に対するC r x 陽性細胞の割合は、10%以上70%以下、10%以上60%以下、20%以上60%以下、30%以上60%以下、40%以上60%以下、又は50%以上60%以下である。

[0165] 一態様において、移植用神経網膜シート中の総細胞数に対する、(1) C h x 10陽性かつP a x 6陽性細胞（神経網膜前駆細胞）の割合は、10%以上50%以下又は10%以上30%以下、(2) C h x 10陽性かつP a x 6陰性細胞（双極細胞に偏った前駆細胞）の割合は、10%以上25%以下又は15%以上25%以下(3) C h x 10陰性かつP a x 6陽性細胞（神経節細胞及びアマクリン細胞）の割合は、10%以上25%以下又は10%以上20%以下であってよい。

[0166] 別の態様において、移植用神経網膜シート中の総細胞数に対する、(1) C h x 10陽性かつP a x 6陽性細胞（神経網膜前駆細胞）の割合は、20%以上40%以下、(2) C h x 10陽性かつP a x 6陰性細胞（双極細胞に偏った前駆細胞）の割合は5%以上20%以下、(3) C h x 10陰性かつP a x 6陽性細胞（神経節細胞及びアマクリン細胞）の割合は、5%以上20%以下又は5%以上15%以下であってよい。

[0167] 一態様において、本発明に係る移植用神経網膜シートは、上記移植用神経網膜の品質評価方法によって、移植用神経網膜として使用可能であると判定された移植用神経網膜であって、単離されたシート状の移植用神経網膜であってよい。

[0168] 一態様において、本発明に係る移植用神経網膜シートは、神経網膜を含む細胞凝集体より単離されたものであり、該細胞凝集体における連続上皮組織の中心付近の領域を含む移植用神経網膜シートであってよい。

[0169] 一態様において、神経網膜は、移植用神経網膜シートであって、
(1) 神経網膜層を含む細胞凝集体より単離されたものであり、
(2) 該細胞凝集体における連続上皮組織の中心付近の領域を含み、かつ、
(3) 長径が600 μ m～2500 μ m、短径が200 μ m～1500 μ m

及び厚みが $100\mu\text{m}\sim1000\mu\text{m}$ である

移植用神経網膜シートである。

[0170] 一態様において、本発明に係る移植用神経網膜シートは、神経網膜、網膜色素上皮細胞及び毛様体周縁部構造体を含む細胞凝集体より単離されたものであり、神経網膜上皮構造の表面における接線の傾きの連続性と異なる表面の接線の傾きの連続性を有し、網膜色素上皮細胞を含む部分から最も離れた上皮構造上の領域を含む移植用神経網膜シートであってよい。

[0171] 一態様において、本発明に係る移植用神経網膜シートは、神経網膜と脳脊髄組織を含む細胞凝集体より単離されたものであり、神経網膜上皮構造の表面における接線の傾きの連続性と異なる表面の接線の傾きの連続性を有し、脳脊髄組織を含む部分から最も離れた上皮構造上の領域を含む移植用神経網膜シートであってよい。

[0172] 一態様において、本発明に係る移植用神経網膜シートは、2つ以上の神経網膜上皮を含む細胞凝集体より単離されたものであり、そのうち単離に好適な形態的に良好及び又は大きさの大きい神経網膜上皮について、その中央部を含む移植用神経網膜シートであってよい。

[0173] 一態様において、神経網膜は、移植用神経網膜シートであって、

(1) 少なくとも第一の上皮組織及び第二の上皮組織を含む細胞凝集体より単離されたものであり、第一の上皮組織はヒト神経網膜を含み、第二の上皮組織は、第一の上皮組織の表面における接線の傾きの連続性と異なる表面の接線の傾きの連続性を有し、かつ非神経網膜系細胞を含み、

(2) 第二の上皮組織から最も離れた第一の上皮組織上の領域を含み、かつ、

(3) 長径が $600\mu\text{m}\sim2500\mu\text{m}$ であり、短径が $200\mu\text{m}\sim1500\mu\text{m}$ であり、厚みが $100\mu\text{m}\sim1000\mu\text{m}$ であり、

第二の上皮組織が、眼球関連組織、脳脊髄組織及びその他の第一の上皮組織の神経網膜とは異なる組織からなる群から選択される組織である

移植用神経網膜シートである。

- [0174] 一態様において、本発明に係る移植用神経網膜シートの長径は、例えば $300\mu\text{m} \sim 3300\mu\text{m}$ であってよく、好ましくは $600\mu\text{m} \sim 2500\mu\text{m}$ 、より好ましくは $1100\mu\text{m} \sim 1700\mu\text{m}$ である。
- [0175] 一態様において、本発明に係る移植用神経網膜シートの短径は、例えば $100\mu\text{m} \sim 2000\mu\text{m}$ であってよく、好ましくは $200\mu\text{m} \sim 1500\mu\text{m}$ 、より好ましくは $400\mu\text{m} \sim 1100\mu\text{m}$ である。
- [0176] 一態様において、本発明に係る移植用神経網膜シートの高さは、例えば $50\mu\text{m} \sim 1500\mu\text{m}$ であってよく、好ましくは $100\mu\text{m} \sim 1000\mu\text{m}$ 、より好ましくは $200\mu\text{m} \sim 700\mu\text{m}$ である。
- [0177] 一態様において、本発明に係る移植用神経網膜シートの体積は、例えば $0.001\text{mm}^3 \sim 4.0\text{mm}^3$ であってよく、好ましくは $0.01\text{mm}^3 \sim 1.5\text{mm}^3$ 、より好ましくは $0.07\text{mm}^3 \sim 0.57\text{mm}^3$ である。
- [0178] 移植用神経網膜シートの長径、短径及び高さを測定する方法は、特に限定されず、例えば、顕微鏡下で撮像した画像から測定すればよい。例えば、細胞凝集体から切り出した移植用神経網膜シートについて、切断面を対物レンズ側に向けた状態で撮像した正面画像と、切断面が対物レンズから見て垂直になるよう傾けた状態で撮像した横面画像とを、実体顕微鏡で撮像し、撮像した画像から測定できる。ここで、長径とは、正面画像において、該シート断面上の2つの端点を結ぶ線分のうち、最も長い線分及びその長さを意味する。短径とは、正面画像において、該シート断面上の2つの端点を結ぶ線分で長径と直交する線分のうち、最も長い線分及びその長さを意味する。高さとは、該シート断面に直交する線分で、該シート断面との交点と網膜シートの頂点を端点とする線分のうち、最も長い線分及びその長さを意味する。該シートの体積とは、移植片が、断面が長径を通るように半割した楕円体であると近似したうえで、以下の計算式に従い算出した体積を意味する。

$$\text{体積} = 2/3 \times \text{円周率}(\pi) \times (\text{長径}/2) \times (\text{短径}/2) \times \text{高さ}$$

[0179] (2) マトリクス

本発明におけるマトリクス（以下、マトリクスゲルという場合がある）は

、2以上の神経網膜を含む細胞凝集体を生きたまま包埋でき、ゲル状、好ましくはハイドロゲルになり得るマトリクスであればよく、例えば、フィブリンゲル、ゼラチン、コラーゲン、ペクチン、ヒアルロン酸、アルギン酸が挙げられ、フィブリンゲル又はゼラチンであることが好ましい。本明細書における「ハイドロゲル」とは、三次元の網目構造に架橋された高分子の内部に、水等の液体を取り込んだものである。これらのハイドロゲルは、生分解性及び所望の融解点を有するため、扱いやすく、かつ、高い生着率を期待できる。生分解性とは、生体内の酵素等により分解され、吸収若しくは排泄されることを意味する。

[0180] 本発明におけるハイドロゲルは、融解点が20℃～40℃の範囲のハイドロゲルであってよい。すなわち、移植した場合に体温で融解するという特徴を有する。以下、「ゼラチン」を例に、その物性を詳細に記載する。ゼラチン以外のフィブリンゲル等のハイドロゲルについて、後述するゼラチンと同様の物性を有することが好ましい。

[0181] マトリクスゲルは好ましくはフィブリンゲルである。フィブリンゲルとは、フィブリノーゲン溶液とトロンビン溶液とを反応させることで得られるゲル状フィブリンである。本明細書において、反応によってゲルを形成する性質の物質をマトリクス前駆体といい、例えば、反応することによってフィブリンゲルを形成するトロンビン及びフィブリノーゲンはマトリクス前駆体の一例である。フィブリノーゲン溶液は、フィブリノーゲン粉末などを、アプロチニンを含むフィブリノーゲンを溶解できる溶解液に溶解させることで作製でき、その濃度は特に限定されないが、例えば40～480mg/mL、好ましくは、80mg/mL～320mg/mL（例：160mg/mL）である。また、正常人血漿1mL中に含まれる血液凝固第V因子活性を1単位とした時、37.5単位/mL～225単位/mL（例：75単位/mL）であってよい。トロンビン溶液は、トロンビン粉末などを、塩化カルシウム水和物を含むトロンビン溶解液に溶解させることで作製でき、その濃度は特に限定されないが、例えば125単位/mL～750単位/mL（

例：75単位/mL）である。フィブリノーゲン溶液とトロンビン溶液を接触又は混合させることで、両者を反応させることができ、その際、フィブリノーゲン溶液とトロンビン溶液を活性比で、1：1～1：9、好ましくは1：3～1：4の範囲で使用されることが好ましい。

[0182] マトリクスゲルは好ましくはゼラチンである。ゼラチンとは、水に不溶性のコラーゲンを、例えば酸あるいはアルカリで前処理し、熱加水分解するなどにより可溶化したものである。本明細書において、特別の記載がなければ、ハイドロゲルの状態のゼラチンを意味するが、「ゼラチンのハイドロゲル」と明確化して記載することもある。加熱によりコラーゲンの3本鎖らせんの分子構造が壊れ、ランダムな3本の分子に分かれることにより可溶化される。ゼラチンの原材料としては、主として牛骨及び牛皮、豚皮、豚骨、魚鱗などが用いられる。これらのコラーゲン原材料からゼラチンを抽出するために、塩酸や硫酸などの無機酸もしくは石灰を用いて、原料の前処理を行う。原料の前処理条件により、前者を酸処理ゼラチン（又は、Aタイプゼラチン）、後者をアルカリ処理（石灰処理）ゼラチン（Bタイプゼラチン）と呼ぶこともある。酸処理ゼラチンとアルカリ処理ゼラチンではゼラチンの性質が異なる。また、加熱処理により加水分解を行うことで、ゼラチンの分子量は低下し、溶解度は向上し、同条件においてゼリー強度は低下する。例えば、温水（50℃～80℃）により加熱処理することもでき、複数回繰り返してもよい。市販のゼラチンを入手することも可能であり、例えば、ゼラチンLS-H（新田ゼラチン（株）、豚皮アルカリ処理ゼラチン、非加熱処理ゼラチン、高ゼリー強度）やゼラチンLS-W（新田ゼラチン（株）、豚皮アルカリ処理ゼラチン、加熱処理ゼラチン、低ゼリー強度）が挙げられる。アルカリ処理（石灰処理）ゼラチン（Bタイプゼラチン）が好ましく、加熱処理ゼラチンが好ましい。

[0183] コラーゲンは約10万の分子量をもつ3本のポリペプチド鎖（ α 鎖）で構成されている。コラーゲン分子が加熱処理によって変性すると、3本の α 鎖（ α 成分）にわかれる。それ以外に α 鎖の2量体（ β 成分：約20万の分子

量)と3量体(γ成分:約30万の分子量)も生成され得る。また、ゼラチンの処理工程によって、コラーゲン、ゼラチンの分子間又は分子内結合の一部もランダムに切断されるため、ゼラチンは種々の分子量を持つ分子の集合体である。加熱処理の有無等により異なるが、通常、市販ゼラチンは、数万～数百万の分子量分布を有する。一態様として、ゼラチンでは、50%以上(好ましくは60%以上、70%以上、80%以上、90%以上)が約10万～約30万の範囲に含まれる分子量分布が好ましい。また、ゼラチンの好ましい平均分子量は、約5万～約100万、約10万～約80万、約10万～約60万、約20万～約50万、約30万～約50万の範囲である。

[0184] なお、分子量分布及び平均分子量は、当業者であれば周知知られた方法により測定することができる。例えば、高速液体クロマトグラフを用いて、ゼラチン水溶液をゲル濾過法によってクロマトグラムを求めることで分子量分布を推定し、さらにプルラン換算などにより平均分子量を推定することができる。

[0185] 「等イオン点」とは、タンパク質もしくは両性電解質の水溶液が、他のイオンの共存しない状態(水が電離して生成する水素イオン、水酸化物イオン、対象となる両性電解質そのもののイオンを除く)で示すpHを意味する。等イオン点は当業者であれば周知知られて方法により測定することができる。具体例として、イオン交換樹脂により脱塩した検液(ゼラチン水溶液)のpH計により水素イオン濃度を測定すればよい。例えば、ゼラチンの製造工程においてアルカリ処理を行うと、大部分が脱アミドされているため、等イオン点は約pH5と低くなる。これに対し、酸処理ゼラチンでは、脱アミド率が低く、コラーゲンに近いpH7～9の等イオン点を示す。ゼラチン水溶液は等イオン点より低pH側で+(プラス)、高pH側では-(マイナス)に荷電する。本明細書におけるハイドロゲル(ゼラチン等)は、約pH4～約pH7、約pH5～約pH7、約pH6～約pH7の等イオン点を示す方が好ましい。

[0186] ゼラチンを含むハイドロゲルは、加熱又は冷却によって、溶液がゲルから

ゾル、ゾルからゲルに相変化する。ゼラチンなどのハイドロゲルは、冷却して流動性を失うことでゲル（ゼリー）化し、加熱して流動性を獲得することによりゾル（水溶液）化する。ゼラチンを例にとると、ゼラチンがゼリー化するのは、冷却により、ゼラチン分子の一部が、コラーゲンと同様のらせん構造をとることで分子間にネットワークを形成するためである。ここで、「融解点」とは、一定圧力のもとで、ゾル化する温度を意味し、「凝固点」とは、一定圧力のもとで、ゲル化する温度を意味する。上述の通り、冷却を続けるとより強固なゲルを形成する。本明細書におけるハイドロゲルは、融解点が $20^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ （例： $20^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、 $35^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ ）である。一般に、ゲルの融点は、ネットワークの強さの尺度であり、ハイドロゲルの濃度及び分子量の上昇に伴い、ハイドロゲル（例：ゼラチン）の融解点は上昇する。また、例えば、糖類により固形分を増加させると融解点及び凝固点は上昇する傾向にある。この様に、一定の範囲で融解点及び凝固点を変動させることが可能である。

[0187] ハイドロゲルの融解点の測定方法は、特に限定されず、例えば、JIS K 6503に定められた方法によって測定できる。具体的には、検液（例： $10\text{ w/w}\%$ 濃度のゼラチン溶液）を、直径 10 mm のガラス管中で、末端 5 mm の位置から 45 mm の高さのゲルを作り、末端 5 mm が下に来るように水槽に入れて昇温したとき、ゲルが融けて末端の気泡の上端が 10 mm 上昇した温度を融解点とすればよい。

[0188] ハイドロゲルの凝固点の測定方法は、特に限定されず、例えば、JIS K 6503に定められた方法によって測定できる。具体的には、 35°C にした検液（例： $10\text{ w/w}\%$ 濃度のゼラチン溶液）を 35°C の緩衝浴を持った 15°C の水槽で攪拌しながら徐々に冷却させ、戻り現象（溶液を攪拌した時に生ずる気泡などが、攪拌を止めたとき、慣性で攪拌方向へ動くのではなく、逆の方向に引き戻される現象）が認められた時の温度を凝固点とすればよい。戻り現象を確認しやすくするために、検液には、濾紙片などを入れておくとよい。

[0189] ハイドロゲルの「ゼリー強度」とは、ゲルを形成した物体の機械的強度を意味する。通常一定形状のゲルを変形させるのに要する力又はゲルを破断させるのに要する力（単位： g 、 dyne (s) / cm^2 又は g / cm^2 ）で表現され、主としてゲルの硬さの尺度である。なお、1ダイン（ dyne (s) ）は、質量1グラム（ g ）の物体に働くとき、その方向に1センチメートル毎秒毎秒（ cm / s^2 ）の加速度を与える力と定義される。例えばゼラチンを含むハイドロゲルのゼリー強度は、その濃度、温度、 pH 及び共存物質などにより変動があるが、同一条件では分子量などの固有の性質に依存して変化する。ゼラチンの「ゼリー強度」は、例えば、日本薬局方 薬食発0531第3号やJIS K6503に定められた方法で試験される。具体的には、ゼラチン溶液を 10°C で17時間冷却して調製したゼリーの表面を、2分の1インチ（12.7mm）径のプランジャーで4mm押し下げるのに必要な荷重を、ゼリー強度とする。通常、ゼラチン濃度が増加するにつれて、ゼリー強度も増加する。また、通常、酸性 pH （例： $\text{pH}4$ 以下）及びアルカリ性 pH （例： $\text{pH}8$ 以上）においてはゼラチンのゼリー強度は大きく低下する。また、ある一定の範囲（例：分子量3万～7万）では、分子量が高いほどゼリー強度は高くなるが、ある程度以上（例：分子量10万以上）になるとゼリー強度は一定になる。さらに、通常、ゲル化には 20°C 以下での冷却が必要であり、例えば 4°C ～ 20°C 程度の冷却温度の範囲において、冷却温度が低いほどゼリー強度は高くなる。分子の配向やネットワーク形成する反応は比較的遅い速度で進行するため、その内部においては、ゲル形成後も分子間のネットワークが形成するため、冷却開始後1～5時間程度をかけてゼリー強度は上昇する。また、急速に冷却する方がゼリー強度は上昇する。分子が配向する時間的余裕なく分子間に細かくネットワークが形成されるためである。

[0190] 本明細書において、例えば 10°C ～ 20°C において、包埋される細胞や組織に影響を与えない範囲であって、かつ、複合体の通常の移植操作等において、ハイドロゲルが崩れない程度のゼリー強度であればよい。ゼリー強度は

、5重量%～30重量%程度のハイドロゲル（ゼラチン）において、例えば、ハイドロゲル（ゼラチン）のゼリー強度は、JIS K6503に定められた方法において、50g以上、100g以上、200g以上、500g以上、1000g以上、1200g以上、1300g以上、1400g以上又は1500g以上であってよい。また、ハイドロゲル（ゼラチン）のゼリー強度は、3000g以下、2500g以下又は2000g以下であってよい。

[0191] 「粘度」とは、流体の粘りの強さを表す指標である。当業者であれば、周知知られた方法により粘度を測定することができる。例えば、JIS K6503に定められた方法で測定することができる。すなわち、一定量のゼラチン溶液（60℃、6.67%）が、ピペット型粘度計を流下する時間を、粘度値（単位：mPa・s）に換算すればよい。

[0192] ゼラチンを含むハイドロゲルのゾル状態における粘度は、ゼラチンなどの濃度や系の温度、pH、共存塩類などによって影響される。一般に、ゼラチンなどの濃度の上昇や温度の低下にともない、粘度は上昇する。例えば、Bタイプゼラチンでは、粘度はpHに依存し、等イオン点のpH付近において、粘度が最小となる。一方、Aタイプゼラチンにおいては、粘度とpHに顕著な関係は認められない。

[0193] ゼラチンを含むハイドロゲルの粘度は、後述する複合体を形成できる程度の粘度であれば特に限定はない。生きた細胞を包埋するため、細胞へのダメージを考慮すると、約40℃（約30℃～約50℃程度）のハイドロゲルを用いて細胞を包埋する必要がある。従って、約40℃（30℃～50℃程度）において、細胞を包埋するのに必要な程度の粘度、例えば、2～50mPa・s（5～30mPa・s）程度の粘度を示すハイドロゲルが挙げられる。

[0194] 「起泡率」とは、検体の元の体積（ V_0 ）に対する泡を含む全体積（ V_1 ）の割合（ V_1/V_0 ）を意味する。起泡率は低い方が好ましい。具体的には、1.2以下（好ましくは、1.15以下、1.1以下、1.05以下）であ

る。起泡率は、例えば、写真用ゼラチン試験法であるパギイ法第10版（2006年版）により測定することができる。具体的には、メスシリンダーに入れた50℃の50mLの検液を、振幅300mm、振動数145回／分で1分間振動させ後、振動停止から3分後に泡を含む全体積を読みとればよい。

[0195] 本明細書に記載のハイドロゲルは、移植により生体内に投与するため、日本薬局方に定める純度試験の基準をクリアしている方が好ましい。例えば、日本薬局方において、ゼラチン及び精製ゼラチンの品質規格と試験法が定められており、具体的には下記の基準を満たす。

（1）異臭及び不溶物 本品1.0gに水40mLを加え、加熱して溶かすとき、液は不快臭がない。また、この液は澄明であるか、又は濁ることがあってもわずかであり、その色は色の比較液Aより濃くない。

（2）亜硫酸塩 60ppm以下

（3）重金属 50ppm以下（20ppm以下）

（4）ヒ素 1ppm以下

（5）水銀 0.1ppm以下

（6）乾燥減量 15.0%以下

（7）強熱残分 2.0%以下

[0196] ハイドロゲルの濃度は、各種操作による崩れや操作中の溶解等を防止するという観点から、高い方が好ましい。ハイドロゲルの濃度は、ハイドロゲルを溶解させる媒体（溶媒）に対するハイドロゲルの割合である。ハイドロゲルの濃度は、例えば、ゼラチンを用いる場合、10重量%～50重量%であってよく、好ましくは25重量%～50重量%、30重量%～50重量%、又は20重量%～40重量%である。

[0197] ハイドロゲルの濃度は、上述の範囲になるように、計量したハイドロゲルに対し適切な媒体により溶解させればよい。媒体は細胞に影響を与えないものであればよく、例えば、HBSSなどの緩衝塩溶液などが挙げられる。

[0198] ハイドロゲルのpHは、包埋する組織や移植後の生体への傷害を軽減する

目的で、中性付近が好ましい。例えば6～8又は6.5～7.5であってよく、好ましくは7～7.5である。ハイドロゲルのpHは、溶液若しくはゾル状態におけるpHとして測定すればよい。上述の通り、当該pH範囲であれば、ゼリー強度が大きく低下することもない。ハイドロゲルのpHの測定方法は、特に限定されず、例えば、市販のpH計やpH試験紙によって測定できる。

[0199] 一態様において、ハイドロゲルは、生分解性を有するハイドロゲルであることが好ましい。複合体をヒトに移植した後、生分解性のハイドロゲルの生分解により、移植された神経網膜が徐々に生体網膜と接触するようになり、高い生着率を得られる。主たる生体構成成分であるコラーゲンを処理することで得られるゼラチンは、生分解性を有するハイドロゲルである。

[0200] 一態様において、本明細書におけるハイドロゲルは、20℃～40℃の範囲の融解点を有し、かつ下記の物性の1以上を満たすハイドロゲルが好ましい。

- (1) 調製方法：アルカリ処理及び／又は加熱処理
- (2) 平均分子量：約10万～約50万
- (3) 濃度：10重量%～50重量%（好ましくは25重量%～50重量%、30重量%～50重量%、又は20重量%～40重量%）
- (4) ゼリー強度：50g以上、100g以上、200g以上、500g以上、1000g以上、1200g以上、1300g以上、1400g以上又は1500g以上（3000g以下、2500g以下又は2000g以下）
- (5) pH：6～8（好ましくは、6.5～7.5、7～7.5）
- (6) 等イオン点：酸性領域（約pH4～約pH7、約pH5～約pH7、約pH6～約pH7）
- (7) 起泡率：1.2以下（好ましくは、1.15以下、1.1以下、1.05以下）
- (8) 粘度：約40℃（30℃～50℃程度）において、約5～30mPa・s。

[0201] (3) 複合体

＜複合体の構造＞

一態様において、複合体は、2以上の神経網膜を含む細胞凝集体と、マトリクスとを含み、2以上の細胞凝集体がマトリクス中に配置されているものである。ここで、「マトリクス中に配置される」こととは、2以上の細胞凝集体がマトリクスゲルの中に埋め込まれた状態、すなわち、マトリクスゲルによって覆われている状態で存在することを意味する。また、2以上の細胞凝集体はマトリクスゲルによって覆われているため、細胞凝集体は複合体の外部環境（保存液など）に直接的に接しない。細胞凝集体、特にスフェア状の細胞凝集体から切り出した移植用神経網膜シート（Cap）が小さいため、そのままでは扱いにくい、マトリクスゲルの中に配置されることで扱いやすくなるという利点がある。また、複数の細胞凝集体を同時に移植可能となる。

[0202] 複合体において、2以上の細胞凝集体が互いに部分的に接していてもよく、接していなくてもよいが、機械的な接触による細胞の傷害を低減する観点から、2以上の細胞凝集体がマトリクスゲルによって隔てられて互いに接していないことが好ましい。なお、互いに接していないこととは、細胞凝集体同士が物理的に接していないことを意味する。細胞凝集体同士が接していないことは、例えば目視（例：顕微鏡下）により確認することができる。

[0203] 一態様において、2以上の神経網膜を含む細胞凝集体がマトリクスゲルの中に列状に配置されていることが好ましい。ここで、列状とは、2以上の神経網膜を含む細胞凝集体が連なって線状を呈していることを意味し、線状は凡そ一定の方向に延びている直線又は曲線であってよい。2個～20個の細胞凝集体を列状に配置されることが好ましく、4～16個、4～14個、4～10個、6～8個の細胞凝集体を列状に配置されることがより好ましい。また、2以上の神経網膜は、それぞれの頂端面又は基底が同じ方向に向いてもよく、バラバラの方向に向いてもよいが、それぞれの頂端面が同じ方向に、線状方向と凡そ直角の方向に向いて横一列に並んでいることが好

ましい。

[0204] 一態様において、神経網膜としては、細胞凝集体から切り出した移植用神経網膜（移植片、キャップ（Cap）ともいう）であってよく、又は、細胞凝集体を単一細胞に分散して再シート化した神経網膜シートであってよい。本発明の複合体は、2以上の神経網膜を含む細胞凝集体を包含することで、より広い範囲の網膜組織の障害状態を治療することができる。

[0205] 〔複合体の製造方法〕

本発明のマトリクス中に2以上の神経網膜を含む細胞凝集体が配置された複合体の製造方法は、（1）多能性幹細胞から2以上の神経網膜の細胞凝集体を作製する第一工程と、（2）2以上の細胞凝集体を所定の配置でマトリクス又はマトリクスの前駆体と接触させてから、上記マトリクスをゲル化させる第二工程と、を含む。

[0206] （1）第一工程において、2以上の神経網膜を含む細胞凝集体は、ヒト多能性幹細胞由来であることが好ましく、また、移植用の組織であることが好ましい。

[0207] 多能性幹細胞から神経網膜を含む細胞凝集体（スフェア状細胞凝集体、神経網膜シート、移植用神経網膜シート）の製造方法は上記の通りである。細胞外マトリクス（例：コラーゲン）上で培養し製造した場合、神経網膜を含む細胞凝集体の回収には細胞外マトリクスを分解する酵素（例：コラゲナーゼ）による剥離を行うことがある。その場合は、当該酵素の混入を防止するため、培地等により複数回洗浄することが好ましい。

[0208] （2）第二工程において、一態様では、2以上の細胞凝集体を所定の配置でマトリクス前駆体と接触させてから、上記マトリクスをゲル化させることを含む。マトリクスがフィブリンゲルである場合、マトリクス前駆体がトロンビン及びフィブリノーゲンである。なお、一般的にトロンビンがゲル化剤であり、前駆体と呼ばれないが、本明細書においてトロンビンもマトリクス前駆体という。2以上の細胞凝集体の全てを、マトリクス前駆体としてのフィブリノーゲン溶液及びトロンビン溶液のいずれか一方と接触させてから、

フィブリノーゲン溶液及びトロンビン溶液の他方とさらに接触させ、反応させて、ゲル化させてもよく、2以上の細胞凝集体の一部の細胞凝集体を、フィブリノーゲン溶液及びトロンビン溶液のいずれか一方と接触させてから、2以上の細胞凝集体の残りの細胞凝集体をフィブリノーゲン溶液及びトロンビン溶液の他方と接触させて反応させて、ゲル化させてもよい。ここで溶液との接触とは、細胞凝集体をフィブリノーゲン溶液又はトロンビン溶液に浸かるよう触れさせることをいう。

[0209] フィブリノーゲン溶液とトロンビン溶液を活性比で、1 : 1 ~ 1 : 9、好ましくは1 : 3 ~ 1 : 4の範囲で使用されることが好ましい。

[0210] (2) 第二工程において、一態様では、2以上の細胞凝集体を所定の配置でマトリクスと接触させてから、上記マトリクスをゲル化させることを含む。マトリクスとしては、上記のとおり、ゼラチン、コラーゲン、ペクチン、ヒアルロン酸、アルギン酸が挙げられ、ゼラチンであることが好ましい。ゼラチン溶液の適切な濃度、ゲル化方法は上述のとおりである。

[0211] 2以上の細胞凝集体を所定の配置でマトリクス若しくはマトリクスの前駆体と接触させることとは、2以上の細胞凝集体を所望の配置（例えば、列状）となるように並べてから、マトリクス若しくはマトリクスの前駆体と接触させること、又は、マトリクス若しくはマトリクスの前駆体中に2以上の細胞凝集体を所望の配置（例えば、列状）となるように並べることを意味する。例えば、長細い溝を有する容器を用意し、2以上の細胞凝集体を所定の間隔及び向きで並べることによって実施することができる。溝の形状はV字であってもU字であってもコの字であってもよく、形状にとらわれない。溝の径は、複合体の径となり得、例えば、深さが100 μm ~ 2000 μm であってもよく、また、溝の長さは複合体の長さとなり得、例えば、300 μm ~ 50000 μm であってもよいが長さについては特に限定されず、移植可能な長さに調節することが好ましい。また、2以上の細胞凝集体同士の間10 μm ~ 50 μm 程度の間隔を空けることが好ましい。2以上の細胞凝集体のそれぞれの神経網膜の頂端面が同じ方向に向いて、特に溝の伸び方向と凡そ

直角の方向に向いて横一列に並んでいることが好ましい。一態様として、溝の横幅の径を細胞凝集体の短径と同じ程度から2倍程度に設定することで、細胞凝集体を横一列に並ばせやすくなる。

[0212] マトリクス前駆体の場合、フィブリンゲルの前駆体であるフィブリノーゲン溶液及びトロンビン溶液のいずれか一方を溝に添加し、その中に、2以上の細胞凝集体を所定の間隔及び向きで配置し、フィブリノーゲン溶液及びトロンビン溶液の他方をさらに、2以上の細胞凝集体が所定の位置から流されないよう静かに添加し、ゲル化させてもよい。また、ゼラチンの場合、ゼラチン溶液を溝に添加し、その中に、2以上の細胞凝集体を所定の間隔及び向きで配置し、さらに、2以上の細胞凝集体が所定の位置から流されないよう静かにゼラチン溶液を添加し、冷却することによってゲル化させてもよい。当該操作の前に、細胞凝集体をマトリクス前駆体又はマトリクスになじませる操作を行ってもよい。具体的には、ゲル化させる濃度より薄い濃度のマトリクス前駆体又はマトリクスで段階的に馴染ませることで、目的の最終ゼラチン濃度に達しやすくなる。

[0213] 一態様において、本発明の製造方法によって得られる複合体は、マトリクスゲルを崩すことなく、注射器での吸い込み・吹き出しを可能である。それによって、一度の移植でより多くの神経網膜を含む細胞凝集体を移植部位のように導入することができる。また、マトリクスゲルが生分解性を有するため、移植される神経網膜は生体網膜と徐々に接触し、生着するようになる。

[0214] 〔医薬組成物、治療薬及び治療方法〕

本発明の一態様として、本発明で得られる複合体を有効成分として含有する医薬組成物が挙げられる。医薬組成物は、本発明の複合体のほか、好ましくはさらに医薬として許容される担体を含む。

[0215] 医薬組成物は、網膜系細胞若しくは網膜組織の障害又は網膜組織の損傷に基づく疾患の治療に使用し得る。網膜系細胞若しくは網膜組織の障害に基づく疾患としては、例えば、網膜変性疾患、黄斑変性症、加齢黄斑変性、網膜色素変性、緑内障、角膜疾患、網膜剥離、中心性漿液性網脈絡膜症、錐体ジ

ストロフィー、錐体桿体ジストロフィー等の眼科疾患が挙げられる。網膜組織の損傷状態としては、例えば、視細胞や網膜色素上皮細胞等が変性死している状態等が挙げられる。

[0216] 医薬として許容される担体としては、生理的な水性溶媒（生理食塩水、緩衝液、無血清培地等）を用いることができる。必要に応じて、医薬組成物には、移植医療において、移植する組織又は細胞を含む医薬に、通常使用される保存剤、安定剤、還元剤、等張化剤等を配合させてもよい。

[0217] 本発明の一態様として、本発明で得られる複合体を含有してなる、網膜系細胞若しくは網膜組織の障害又は網膜組織の損傷に基づく疾患の治療薬が挙げられる。

[0218] 本発明の治療薬は、網膜系細胞若しくは網膜組織の障害又は網膜組織の損傷に基づく疾患を有する患者に、本発明で得られる複合体を移植することによって、網膜系細胞若しくは網膜組織の障害状態又は網膜組織の損傷状態を治療することができる。網膜系細胞若しくは網膜組織の障害又は網膜組織の損傷に基づく疾患としては、上述した疾患が挙げられる。

[0219] 本発明の一態様として、本発明で得られる複合体を含有してなる、移植用組成物が挙げられる。患者の眼底に移植するために、本発明の複合体を用いることができる。また、移植された患者において、移植された複合体の神経網膜が該患者の神経網膜層に向いた状態で生着するように移植できるために、本発明の複合体を用いることができる。移植用組成物は、本発明の複合体のほか、好ましくはさらに医薬として許容される担体を含む、医薬として許容される担体は上述した通りである。

[0220] 本発明の一態様として、以下の工程を含む、網膜系細胞若しくは網膜組織の障害又は網膜組織の損傷に基づく疾患の治療方法が挙げられる。

（１）本発明で得られる複合体を患者の眼底に移植する工程、

（２）患者の生体内において、移植された複合体の神経網膜が該患者の神経網膜層に向いた状態で生着される工程。

[0221] 本発明の一態様として、本発明で得られる複合体を、移植を必要とする対

象（例えば、眼科疾患が起きている眼の網膜下）に移植することを含む、網膜系細胞若しくは網膜組織の障害又は網膜組織の損傷に基づく疾患を治療する方法が挙げられる。網膜系細胞若しくは網膜組織の障害に基づく疾患の治療薬として、又は、当該網膜組織の損傷状態において、該当する損傷部位を補充するために、本発明の複合体を用いることができる。移植を必要とする、網膜系細胞若しくは網膜組織の障害に基づく疾患を有する患者、又は網膜組織の損傷状態の患者に、本発明の複合体を移植し、当該障害を受けた網膜組織を補充することによって、網膜組織の障害に基づく疾患、又は網膜組織の損傷状態を治療することができる。移植方法としては、例えば、眼球の切開などにより損傷部位の網膜下に移植用本発明の複合体を移植する方法が挙げられる。移植する方法としては、例えば細い管を用いて注入する方法やピンセットで挟んで移植する方法が挙げられ、細い管としては注射針等が挙げられる。

実施例

[0222] <実施例 1 フィブリンゲルと複数個の移植用神経網膜との複合ゲルの作製>

複数個の神経網膜を含む細胞凝集体（移植片）を、フィブリンゲル内に封入する複合体の検討を行った。移植片として神経網膜組織片（capということもある）を用いた。Capは以下のように作成した。Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞（KHES-1株由来（非特許文献6））を、「Scientific Reports, 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地（商品名：AK03N、味の素社製）、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8（商品名、ニッピ社製）を用いた。

[0223] 具体的なヒトES細胞の維持培養操作は、以下のように行った。まず、サブコンフレント（培養面積の6割が細胞に覆われる程度）になったヒトES細胞を、PBSにて洗浄後、TrypLE Select（商品名、Lif

e Technologies社製)を用いて単一細胞へ分散した。その後、単一細胞へ分散されたヒトES細胞を、Laminin511-E8にてコートしたプラスチック培養ディッシュに播種し、Y27632(ROCK阻害物質、 $10\mu\text{M}$)存在下、StemFit培地にてフィーダーフリー条件下で培養した。上記プラスチック培養ディッシュとして、6ウェルプレート(イワキ社製、細胞培養用、培養面積 9.4cm^2)を用いた場合、上記単一細胞へ分散されたヒトESの播種細胞数は1ウェルあたり 1.2×10^4 細胞とした。播種した1日後に、Y27632を含まないStemFit培地に交換した。以降、1~2日ごとに一回Y27632を含まないStemFit培地にて培地交換した。その後、サブコンフレント1日前になるまでフィーダーフリー条件下で培養した。当該サブコンフレント1日前のヒトES細胞を、SB431542(TGF β シグナル伝達経路阻害物質、 $5\mu\text{M}$)及びSAG(Shhシグナル伝達経路作用物質、 300nM)の存在下(Precondition処理)で、1日間フィーダーフリー条件下で培養した。

[0224] ヒトES細胞を、PBSにて洗浄後、TrypLE Selectを用いて細胞分散液処理し、更にピペティング操作によって単一細胞に分散した。その後、単一細胞に分散されたヒトES細胞を非細胞接着性の96ウェル培養プレート(商品名:PrimeSurface 96ウェルV底プレート、住友ベークライト社製)の1ウェルあたり 1.2×10^4 細胞になるように $100\mu\text{L}$ の無血清培地に浮遊させ、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ で浮遊培養した。その際の無血清培地(gfCDM+KSR)には、F-12培地とIMDM培地との1:1混合液に10% KSR、 $450\mu\text{M}$ 1-モノチオグリセロール、 $1\times$ Chemically defined lipid concentrateを添加した無血清培地を用いた。

[0225] 浮遊培養開始時(浮遊培養開始後0日目)に、上記無血清培地にY27632(ROCK阻害物質、終濃度 $10\mu\text{M}$)及びSAG(Shhシグナル伝達経路作用物質、 300nM 又は 30nM 、 0nM)を添加した。浮遊培養

開始後3日目に、Y27632及びSAGを含まず、ヒト組み換えBMP4（商品名：Recombinant Human BMP-4、R&D社製）を含む培地を用いて、外来性のヒト組み換えBMP4を終濃度1.5 nMで含む培地を50 μ L添加した。浮遊培養開始後6日目以降、3日に一回Y27632及びSAG及びヒト組み換えBMP4を含まない培地で半量交換した。

[0226] 更に当該浮遊培養開始後14日目の凝集体を、90 mmの低接着培養皿（住友ベークライト社製）に移し、Wntシグナル伝達経路作用物質（CHIR99021、3 μ M）及びFGFシグナル伝達経路阻害物質（SU5402、5 μ M）を含む無血清培地（DMEM/F12培地に1% N2 Supplementが添加された培地）で37℃、5%CO₂の条件下、3日間培養した。その後、90 mmの低接着培養皿（住友ベークライト社製）にて、Wntシグナル伝達経路作用物質及びFGFシグナル伝達経路阻害物質を含まず血清を含むDMEM/F12培地（NucT0培地）を用いて培養した。当該浮遊培養開始後40日目以降は、NucT0培地とNucT2培地の混合培地（NucT1培地）を用いて培養した。60日目以降は甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質T3を含むNeurobasal培地（NucT2培地）を用いて培養した。浮遊培養開始後82日の凝集体からマイクロシザーズを用いてCapを複数個切り出した。このようにして得られた神経網膜組織片（Cap）を用いて複合体の形成の検討を行った。

[0227] Capを並べて静置するための容器として、メスを用いてシリコンゲルに横幅1 mm程度、深さ1 mm、長さ20 mm程度の溝を掘った容器を作製した。切り出したCapを8～13個、ピンセットを用いて上記溝に凡そ等間隔で並べた。

[0228] 上記Capが並べられた溝にまず50 μ Lのフィブリノーゲンを添加し、なじませ、除去した。再度50 μ Lのフィブリノーゲンを添加し全体にいきわたらせた。次に、トロンピンを50 μ L添加し、室温で20分間インキュベートすることで、フィブリン化させた。このようにして、フィブリンゲル

化させたC a p が縦に連なった、複合体（複合ゲル）を作製することができた（図1）。

[0229] 複合ゲルの取り扱いのしやすさを検討した。フィブリンゲル化させた複合ゲル溝からピンセット及びメスを用いて回収したところ、固まったまま回収することができた。このフィブリンゲルをHBSS中に移動し、20Gのサーフローで、吸引・吐出の操作に耐えられるか確認したところ、ゲルが崩壊することなく、複合体の状態で問題なく出し入れできることが確認できた（図1）。この複合ゲルは、移植時の操作に耐える強度を持っていることを確認できた。

[0230] 以上のように、トロンビンとフィブリノーゲンを神経網膜組織片（C a p）にそれぞれ添加し、フィブリンゲル化させることで複数個の神経網膜C a pを固めて、取り扱いのしやすい複合ゲルを作製することがわかった。

[0231] <実施例2 ゼラチンと複数個の移植用神経網膜との複合ゲルの作製>

複数個の神経網膜を含む細胞凝集体（移植片）を、ゼラチン内に封入する複合体の検討を行った。移植片として神経網膜組織片（c a pということもある）を用いた。C a pは以下のように作成した。R x : : V e n u s レポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞（K h E S - 1 株由来（非特許文献1））を、「S c i e n t i f i c R e p o r t s , 4 , 3 5 9 4 （2014）」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはS t e m F i t 培地（商品名：A K O 3 N、味の素社製）、フィーダー細胞に代わる足場としてL a m i n i n 5 1 1 - E 8（商品名、ニッピ社製）を用いた。

[0232] 実施例1のようにして作製された、浮遊培養開始後82日の凝集体からマイクロシザーズを用いてC a p を複数個切り出した。このようにして得られた神経網膜組織片（C a p）を用いて複合体の形成の検討を行った。

[0233] C a p を並べて静置するための容器として、メスを用いてシリコンゲルに幅1mm程度、深さ1mm、長さ20mm程度の溝を掘った容器を作製した。切り出したC a p を8～10個、ピンセットを用いて上記溝に凡そ等間隔

で並べた。

[0234] 上記C a p が並べられた溝にまず50 μ Lの10%G e l a t i n (w/v) (新田ゼラチン社L S - W) を添加し、なじませ、除去した。再度50 μ Lの20%G e l t a i n (w/v) を添加し、なじませ、除去した。次に、30%G e l a t i n を50 μ L添加し4℃で20分間インキュベートさせた。このようにして、固形化させたC a p が縦に連なった、複合体(複合ゲル)を作製することができた(図2)。

[0235] 複合ゲルの取り扱いのしやすさを検討した。ゼラチン固形化させた複合ゲル溝からピンセット及びメスを用いて回収したところ、固まったまま回収することができた。このゼラチンをH B S S 中に移動し、先端が太い1 m l のチップで、吸引・吐出の操作に耐えられるか確認したところ、ゲルが崩壊することなく、複合体の状態の問題なく出し入れできることが確認できた(図2)。この複合ゲルは、移植時の操作に耐える強度を持っていることを確認できた。

[0236] 以上のように、ゼラチンを神経網膜組織片(C a p)に添加し、固形化させることで複数個の神経網膜C a p を固めて、取り扱いのしやすい複合ゲルを作製できることがわかった。

[0237] <参考例1 神経網膜を含む網膜シートの製造>

ヒトi P S細胞(D S P - S Q株、大日本住友製薬株式会社にて樹立)を、S c i e n t i f i c R e p o r t s、4、3594(2014)に記載の方法に準じてフィーダーフリー培養した。フィーダーフリー培地としてはS t e m F i t 培地(A K O 3 N、味の素社製)、フィーダーフリー足場にはL a m i n i n 511-E8(ニッピ社製)を用いた。

[0238] 分化誘導操作としては、ヒトi P S細胞(D S P - S Q株)を、S t e m F i t 培地を用いて、サブコンフレント2日前(培養面積の3割が細胞に覆われる程度)になるまでフィーダーフリー培養した。当該サブコンフレント2日前のヒトi P S細胞を、S A G (300 nM) 存在下で2日間フィーダーフリー培養した(P r e c o n d i t i o n 処理)。

[0239] Precondition処理したヒトiPS細胞を、TrypLE Select (Life Technologies社製)を用いて細胞分散液処理し、更にピペティング操作により単一細胞に分散した。その後、上記単一細胞に分散されたヒトiPS細胞を非細胞接着性の96穴培養プレート(PrimeSurface 96V底プレート、住友ベークライト社製)の1ウェルあたり 1.3×10^4 細胞になるように100 μ lの無血清培地に浮遊させ、37℃、5%CO₂で浮遊培養した。その際の無血清培地(gfCDM+KSR)には、F-12培地とIMDM培地の1:1混合液に10%KSR、450 μ M 1-モノチオグリセロール、1×Chemically defined lipid concentrateを添加した無血清培地を用いた。浮遊培養開始時(浮遊培養開始後0日目)に、無血清培地にY27632(終濃度20 μ M)及びSAG(終濃度10 nM)を添加した。浮遊培養開始後2日目に、Y27632及びSAGを含まず、ヒト組み換えBMP4(R&D社製)を含む培地にて、外来性のヒト組み換えBMP4の終濃度が1.5 nM(55 ng/ml)になるように新しい上記無血清培地を50 μ l添加した。

[0240] その4日後(浮遊培養開始6日後)に、Y27632、SAG及びヒト組み換えBMP4を含まない上記無血清培地にて培地交換した。培地交換の操作としては、培養器中の培地を60 μ l廃棄し、新しい上記無血清培地を90 μ l加える操作を実施し、培地量は合計180 μ lとなるようにした。その後、2~4日に一回、Y27632、SAG及びヒト組み換えBMP4を含まない上記無血清培地にて半量培地交換した。半量培地交換操作としては、培養器中の培地を体積の半分量即ち90 μ l廃棄し、新しい上記無血清培地を90 μ l加え、培地量は合計180 μ lとした。

[0241] このようにして得られた浮遊培養開始後13日目の細胞塊を、CHIR99021(3 μ M)及びSU5402(5 μ M)を含む無血清培地(DMEM/F12培地に、1%N₂ supplementが添加された培地)で3日間即ち浮遊培養開始後16日目まで培養した。

[0242] 得られた浮遊培養開始後16日目の細胞凝集体を、下記の培養液については下記[1]、[2]及び[3]に示した血清培地を使用し、5%CO₂条件下で、浮遊培養開始後75日目まで培養した。

[1] 浮遊培養開始後16日目から40日目まで：DMEM/F12培地に、10%牛胎児血清、1%N₂ supplement、及び100μMタウリンが添加された培地（以下A培地という）。

[2] 浮遊培養開始後40日目から60日目まで：A培地と、Neurobasal培地に、10%牛胎児血清、2%B27 supplement、2mM glutamine、60nMのT3及び100μMタウリンが添加された培地（以下B培地という）を1：3の比率で混合した培地。

[3] 浮遊培養開始後60日目以降：B培地。

[0243] 浮遊培養開始後75日目の細胞塊を倒立顕微鏡で観察し、形態を確認した。このとき神経上皮構造が形成されていることがわかった。

[0244] 浮遊培養開始後75日目の細胞塊を、4%パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成した。凍結切片を、神経網膜マーカーの1つであるChx10（抗Chx10抗体、Exalpha社、ヒツジ）、及び、視細胞前駆細胞のマーカーの1つであるCrx（抗Crx抗体、Takara社、ウサギ）について免疫染色を行った（図3）。別の凍結切片を、神経網膜マーカーの1つであるRx（抗Rx抗体、Takara社、ギニアピッグ）、及び、視細胞のマーカーの1つであるRecoverin（抗Recoverin抗体、Proteintech社、ウサギ）について免疫染色を行った（図4）。DAPIで細胞核を染色した。

[0245] これらの染色された切片を、蛍光顕微鏡（Keyence社製）を用いて観察し、免疫染色像を取得した。製造された細胞を蛍光顕微鏡で観察した写真を図3及び図4に示す。図3及び図4は、上段が低倍レンズで撮像した画像であり、下段が高倍レンズで撮像した画像である。

[0246] 図3及び図4のDAPIの染色像から、細胞塊の表面に、細胞が密につまった神経組織が形成され、当該神経組織が連続上皮構造を形成していること

がわかった。図3の画像を解析した結果、この神経組織には、細胞塊の表面に、2～5細胞程度の厚さのC r x陽性層（視細胞層）が形成され、C r x陽性層の内側に5～20細胞程度の厚さのC h x 10陽性層が形成され、さらにその内側にC r x陽性細胞が疎らに存在する層が形成されていることがわかった（図3）。この細胞塊の表面は、形態的に頂端面（a p i c a l s u r f a c e）であることがわかった。さらに、図4の画像を解析した結果、この神経組織には、R e c o v e r i n陽性層（視細胞層）が形成され、R x陽性層も形成されていることがわかった。これらの結果から、この神経組織は、表面にC r x陽性細胞及びR e c o v e r i n陽性細胞を含む視細胞層が形成され、視細胞層の内側にはC h x 10陽性細胞を含む網膜前駆細胞層が形成され、網膜前駆細胞の内側にも細胞層形成されていることがわかった。すなわち、この製法にて、ヒトi P S細胞から視細胞層及び網膜前駆細胞層を含む神経網膜作製でき、この神経網膜が連続上皮構造をもつことがわかった。

[0247] ＜参考例2 移植片の作成及び評価＞

ヒトi P S細胞から作製した立体網膜は、細胞の組成・分布に連続性のある神経上皮構造をもつ神経網膜からなる。この神経上皮構造をもつ神経網膜は、視細胞層と内層から構成される層構造をもち、特徴的な外観・形態をもつ（図3）。

[0248] ヒト立体網膜は、1～2mm程度の大きさに1つ1つ形状が異なる。また、自己組織化培養を用いる製造方法の特性により、移植に用いる神経網膜が主生成物となるものの、非神経網膜である眼球関連組織（R P E、毛様体等）や脳脊髄組織（終脳、脊髄等）が副生することから、非神経網膜を含まない神経網膜の中心部を切り出して網膜片（移植片、C a p、キャップ）を得た（図5及び図6）。すなわち、網膜片（C a p）の周辺部を、品質評価用サンプル（R i n g、リング）として用い、分析（好ましくは、定量P C R）することによって、基準に適合したR i n gに対応したC a pのみを移植用神経網膜として使用することとした。

[0249] なお、図5及び図6は、典型的な細胞凝集体の概念図である。視細胞層と内層とが2層に分かれて見える神経網膜特有の神経上皮構造（好ましくは連続上皮構造）が認められる部位を移植片（キャップ）とし、キャップの周辺部位で、キャップと同様の神経上皮構造（好ましくは連続上皮構造）が見られる部位を品質評価用サンプル（リング）とし、キャップ、リング以外の部位をルートと呼ぶこととした。

[0250] 1つの細胞凝集体に含まれる神経上皮構造から、キャップとリングを単離する手法は以下のとおりである。

[0251] <参考例3 移植片（キャップ）の形状>

移植片（キャップ）を以下の方法で作製した（図7）。まず、参考例1に記載した方法に従ってヒトiPS細胞（DSP-SQ株）から作製した浮遊培養開始後99日目の細胞凝集体の明視野像（位相差像）を倒立顕微鏡（オリンパス社製）で撮像した。細胞凝集体上に神経網膜があることを確かめた後に、細胞凝集体を実体顕微鏡下に移し、以下の方法で、様々な大きさの神経網膜を移植片として切り出した。また、移植片の大きさによる移植用デバイスによる移植操作への影響について検討した。

[0252] （神経網膜の網膜シートの切り出し）

細胞凝集体について、倒立顕微鏡（ニコン社製、ECLIPSE Ti）で明視野像（位相差像）を観察した。特に一つ一つ細胞の形態及び細胞同士の接着状態の特徴に着目して観察した。そして、細胞凝集体において、連続した上皮構造をしており、outer neuroblastic layer（視細胞層及び神経網膜前駆細胞層を含む）とinner neuroblastic layerとが2層に分かれて見える部位を神経網膜と判定した。また、連続した上皮構造が認められない組織や、連続した上皮構造が見られるものの、outer neuroblastic layerとinner neuroblastic layerとが区別できず1層に見える部位を、副産物とした。その後、実体顕微鏡で観察しながら、細胞凝集体から神経網膜を先細ピンセット及びハサミを用いて実体顕微鏡下で切

り出して組織片を作製した。

[0253] (切り出した網膜シートの移植操作への影響)

切り出した移植片について、切断面を対物レンズ側に向けた状態で撮像した正面画像と、切断面が対物レンズから見て垂直になるよう傾けた状態で撮像した横面画像とを、実体顕微鏡で撮像した。その後、撮像した画像から、移植片の長径、短径、及び高さを測定した。測定するにあたって、長径とは、正面画像において、網膜シート断面上の2つの端点を結ぶ線分のうち、最も長い線分及びその長さを指すこととした。短径とは、正面画像において、網膜シート断面上の2つの端点を結ぶ線分で長径と直交する線分のうち、最も長い線分及びその長さを指すこととした。高さとは、横面画像において、網膜シート断面に直交する線分で、網膜シート断面との交点と網膜シートの表面を端点とする線分のうち、最も長い線分及びその長さを指すこととした。さらに、移植片の体積について、移植片が、断面が長径を通るように半割した楕円体であると近似し、以下の計算式に従い算出した。

$$\text{体積} = 2 / 3 \times \text{円周率} \pi \times (\text{長径} / 2) \times (\text{短径} / 2) \times \text{高さ}$$

[0254] その結果、移植用デバイス中への移植片の設置、移植用デバイス中での移植片の安定性及び移植用デバイスからの移植片の吐き出しは、移植片の大きさによって影響を受けることがわかった。また、特に短径が有用なパラメーターであることが示唆された。移植用デバイスによる移植操作が良好であった11個の移植片について、長径、短径、高さ及び体積をそれぞれ計算した。それぞれのパラメーターについて、平均値、最大値及び最小値を求めた結果を、表11にまとめた。この結果から、移植片（キャップ）は、少なくとも、長径が0.8～1.7mm、短径が0.4～1.1mm、高さが0.2～0.7mm、見かけ上の体積が0.07～0.57mm³程度であることがわかった。

[表11]

	長径 [mm]	短径 [mm]	高さ [mm]	体積 [mm ³]
平均値	1.184	0.646	0.421	0.184
最大値	1.606	1.051	0.640	0.565
最小値	0.870	0.462	0.258	0.070

[0255] <参考例4 移植片（キャップ）の細胞の組成>

移植片（キャップ）を以下の方法で作製した（番号：18001MF、d89、H5）。まず、参考例1に記載した方法に従ってヒトiPS細胞（DSP-SQ株）から作製した浮遊培養開始後89日目の細胞凝集体から、参考例2及び3に記載の方法で移植片（キャップ）を単離した。

[0256] 移植片を、4%パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成した。凍結切片を、神経網膜マーカーの1つであるChx10（抗Chx10抗体、Exalpha社、ヒツジ）、及び、視細胞前駆細胞のマーカーの1つであるCrx（抗Crx抗体、Takara社、ウサギ）について免疫染色を行った（図8）。別の凍結切片を、神経網膜マーカーの1つであるRx（抗Rx抗体、Takara社、ギニアピッグ）、及び、視細胞のマーカーの1つであるRecoverin（抗Recoverin抗体、Proteintech社、ウサギ）について免疫染色を行った（図8）。DAPIで細胞核を染色した。これらの染色された切片を、共焦点レーザー顕微鏡（Olympus社製）を用いて観察し、免疫染色像を取得した。

[0257] 染色像から、移植片（キャップ）の表面に（図中左側）、細胞が密につまった神経組織が形成され、当該神経組織が神経上皮構造（特に連続上皮構造）を形成していることがわかった（図8）。さらにこの神経組織には、細胞塊の表面に、2～10細胞程度の厚さのCrx陽性層（視細胞層、図8）が形成され、Crx陽性層の内側に5～20細胞程度の厚さのChx10陽性層が形成され、さらにその内側にCrx陽性細胞が存在する層が形成されていることがわかった（図8）。この移植片（キャップ）の表面は、形態的に頭頂面（apical surface）であることがわかった。さらに、

この神経組織には、Recoverin陽性層（視細胞層、図8矢印）が形成され、Rx陽性層も形成されていることがわかった。これらの結果から、この神経組織は、表面にCrx陽性細胞及びRecoverin陽性細胞を含む視細胞層が形成され、視細胞層の内側にはChx10陽性細胞を含む網膜前駆細胞層が形成され、網膜前駆細胞の内側にも細胞層形成されていることがわかった。すなわち、移植片（キャップ）は、視細胞層及び網膜前駆細胞層を含む神経網膜作製でき、この神経網膜が連続上皮構造をもつことがわかった。

[0258] <参考例5 キャップとリングの同等性の検証>

キャップ及びリングの遺伝子発現を以下の方法で比較した。まず、参考例1に記載した方法に従って、ヒトiPS細胞（DSP-SQ株）から浮遊培養開始後99日目の細胞凝集体を作製し、ロット1とした。さらに、参考例1に記載した方法に従って、ヒトiPS細胞（DSP-SQ株）から浮遊培養開始後82日目の細胞凝集体を作製し、ロット2とした。この2つのロットについて、参考例3に記載の方法で、顕微鏡を用いて主産物である神経網膜と副産物を判定し、神経網膜のキャップと副産物のキャップをそれぞれ単離した。リングは、移植片と同様に先細ピンセット及びハサミを用いて実体顕微鏡下で切り出して単離した。神経網膜及び副産物から単離したキャップ及びリングをスピンカラム（QIAGEN社製，RNeasy Micro kit）を用いて、キットに付属のマニュアルに記載の方法でtotal RNAを抽出した。

[0259] total RNAの濃度を測定器（Nanodrop、Thermo scientific社製）にて測定した後に、逆転写酵素及びprimer（Reverse Transcription Master Mix Kit、Fluidigm社製）を用いてcDNAへと逆転写した。cDNAを、検証に使用する全プローブを使用して、PCR装置（Veriti 96well thermal cycler、Applied Biosystems社製）を用いて、multiplex-PCR反応（Pre

ーRun)を実施した。その後、Pre-Run済みの反応液を、IFCコントローラ HX (Fluidigm社製)を用いて流路付マルチウェル (96.96 Dynamic Array IFC、Fluidigm社製)に注入し、多検体リアルタイムPCRシステム (Biomark HD、Fluidigm社製)を用いて神経網膜及び神経網膜以外の副産物のマーカー遺伝子の発現量をリアルタイムPCRで測定した。検証に使用したPCR用プローブを表12に示した。

[0260] [表12]

分類	遺伝子名	プローブ ID	GenBank ID
内部標準	GAPDH	Hs02758991_g1	NM_001256799.2, NM_001289745.2 NM_001289746.1, NM_001357943.1 NM_002046.7
	ActinB	Hs01060665_g1	NM_001101.5
神経網膜	RAX	Hs00429459_m1	NM_013435.2
	Chx10	Hs01584047_m1	NM_182894.2
	SIX3	Hs00193667_m1	NM_005413.4
	SIX6	Hs00201310_m1	NM_007374.2
	RCVRN	Hs00610056_m1	NM_002903.2
	CRX	Hs00230899_m1	NM_000554.6
	NRL	Hs00172997_m1	NM_006177.4
	NESTIN	Hs04187831_g1	NM_006617.2
脳脊髄	FOXP1	Hs01850784_s1	NM_005249.4
	Emx2	Hs00244574_m1	NM_004098.4, NM_001165924.1
	Nkx2.1	Hs00968940_m1	NM_003317.3, NM_001079668.2
	Dmbx1	Hs00542612_m1	NM_172225.1, NM_147192.2 XM_011540668.2, XM_017000289.1
	HOXB2	Hs01911167_s1	NM_002145.3, XM_005257275.4
	HoxA5	Hs00430330_m1	NM_019102.4
眼球	MITF	Hs01117294_m1	NM_000248.3, NM_006722.2 NM_198158.2, NM_198159.2 NM_198177.2, NM_198178.2 NM_001184967.1, NM_001184968.1 NM_001354604.1, NM_001354605.1 NM_001354606.1, NM_001354607.1 NM_001354608.1
	aqp1	Hs01028916_m1	NM_198098.3, NM_001329872.1
	ZIC1	Hs00602749_m1	NM_003412.4
	PAX2	Hs01057416_m1	NM_000278.4, NM_003987.4 NM_003988.4, NM_003989.4 NM_003990.4, NM_001304569.1
未分化 iPSC	POU5F1	Hs00999632_g1	NM_002701.6, NM_203289.5 NM_001173531.2, NM_001285986.1 NM_001285987.1
	Nanog	Hs04260366_g1	NM_024865.4, NM_001297698.1

[0261] 結果を図9 A 及び図9 B にヒートマップにて示す。遺伝子発現量は、目的遺伝子のC t 値と内部標準として用いた遺伝子であるG A P D HのC t 値の差から算出した $\Delta C t$ 値で評価した。 $\Delta C t$ 値が低いほど遺伝子発現量が高く、 $\Delta C t$ 値が高いほど遺伝子発現量が高い。灰色は遺伝子発現量が高いことを示しており、黒色は遺伝子発現量が高いことを示している（色がより薄いほうが遺伝子発現がより高いことを示す）。各キャップ及びリングの遺伝子発現を調べたところ、ロット1 及びロット2 のいずれにおいても、神経網膜から単離したキャップ及びリングにおいて、神経網膜マーカー遺伝子群が発現していた。一方で、副産物から単離したキャップ及びリングにおける遺伝子発現を調べたところ、どちらのロットにおいても、神経網膜とは逆に、神経網膜マーカー遺伝子群の発現量は低く、副産物のマーカー遺伝子群の発現量が高かった。さらに、同じ細胞凝集体から単離したキャップとリングにおける遺伝子発現を比較したところ、どの神経網膜及び副産物から単離したキャップとリングにおいても、神経網膜マーカー遺伝子の発現量と副産物のマーカー遺伝子の発現量が同等であることがわかった。

[0262] これらの結果から、リングが神経網膜であれば、キャップも神経網膜であることが実証できた。また、キャップとリングで遺伝子発現が同等であることが実証できた。

[0263] <参考例6 移植片の移植結果>

参考例5 に記載の方法でリングの遺伝子発現を解析した後に、対応するキャップ（神経網膜シート）を網膜シートとして使用した。網膜シートに、移植用媒体として「ビスコート4 倍希釈（ビスコート：オベガード＝1：3）」に浸して移植用組成物を調製した。これを網膜変性ヌードラットに移植し、移植後の生着像を評価した。

[0264] まず、参考例1 に記載した方法に従ってヒトi P S細胞（D S P－S Q株）から細胞凝集体を作製した。その後、浮遊培養開始後7 5 日目以降の細胞凝集体から、参考例5 記載の方法でキャップ及びリングを単離した。単離したキャップは、リングの遺伝子解析を実施する間、市販の保存液を用いて保

存した。単離したリングは、参考例5記載の方法でBiomark HD (Fluidigm社製)を用いたリアルタイムPCR法で遺伝子発現解析を実施した。遺伝子発現解析の結果から、神経網膜マーカー遺伝子を発現し、副産物のマーカー遺伝子を発現していないリングを選び、このリングに対応するキャップを移植片(移植に供される網膜シート)として選んだ。移植片は、緩衝液(Thermo Fisher Scientific社製)で洗浄した後、移植用媒体に浸して、移植用組成物を調製した。これを公知文献(Shirai et al., PNAS 113, E81-E90)記載の注入器を用いて網膜変性ヌードラット(視細胞変性モデル、SD-Foxn1 Tg (S334ter) 3LavRrrc nude rat)の網膜下へ移植した。

[0265] 浮遊培養開始後230～240日相当齢の眼組織をパラホルムアルデヒド固定(PFA固定)してスクロース置換した。固定された眼組織をクライオスタットを用いて、凍結切片を作製した。これらの凍結切片を、ヒト核(抗HuNu抗体、Millipore社、マウス、又は、抗HNA抗体)、視細胞のマーカーの1つであるRecoverin(抗Recoverin抗体、Proteintech社、ウサギ)、双極細胞のマーカーの1つであるPKC α (抗PKC α 抗体、R&D systems社、ヤギ)について免疫染色を行った。

[0266] リングの遺伝子発現解析による移植片の品質評価結果と移植結果とをまとめた結果を表13に示す。 ΔCt 値の算出方法は、参考例5に記載の方法を用いた。リングの遺伝子発現解析は、神経網膜マーカー遺伝子の1つであるRecoverinの ΔCt 値が10以下であり、副産物のマーカー遺伝子であるFOXG1、HOXB2、ZIC1及びOCT3/4の ΔCt 値がそれぞれ5以上である場合、品質評価試験(ring-PCR試験)合格とした。移植結果については、網膜下にヒト核陽性かつRecoverin陽性の視細胞が検出できた場合、生着良好と評価した。また、移植箇所が適正な生着のサイズを大きく上まって厚くなっていなければ、肥大は検出されな

ったと判定した。

[0267] 代表的な生着像を図10に示す。移植前の品質評価試験を合格した14眼について移植後の生着像を評価したところ、14眼全てにおいて、Recoverin陽性の視細胞が検出され、良好に生着することがわかった。これらの細胞はHuNu陽性であったことから、Recoverin陽性な視細胞は、移植したキャップ由来であることがわかった。また、14眼全てにおいて、肥大は検出されなかった。

[0268] 以上の結果から、リングの遺伝子発現解析で神経網膜と副産物のマーカー遺伝子の発現量を移植前に調べ、網膜下に良好に生着する、すなわち視細胞が生着し肥大が起きない、移植片を選別できた。

[0269] また移植用媒体である「ビスコート4倍希釈（ビスコート：オペガード＝1：3）」の網膜下投与における安全性を実証することができた。すなわち、ビスコート4倍希釈にはヒアルロン酸およびコンドロイチン硫酸が含まれているが、ヒアルロン酸およびコンドロイチン硫酸の、この試験に用いた濃度での網膜下投与における安全性を実証することができた。

[0270] [表13]

移植片		移植結果	
株	品質評価試験	視細胞の生着	肥大
DSP-SQ	ring-PCR 試験 合格	14 眼 全例 生着良好	14 眼 全例 観察されなかった

[0271] <参考例7 キャップとリングにおけるマーカーの発現>。

参考例5では、PCR法でキャップとリングの細胞の組成が同等であることを実証した。そこで次に免疫染色法で、キャップとリングの細胞の組成と組織構造が同等かを調べた。

[0272] まず、ヒトiPS細胞（DSP-SQ株）を参考例1記載の製法で網膜に分化させた。その後、浮遊培養開始後120日目の細胞凝集体から、参考例5記載の方法で神経網膜のキャップ及びリングを単離した。その後、キャップ及びリングを洗浄した後に、4%パラホルムアルデヒド固定（PFA固定

）してスクロース置換した。固定されたキャップ及びリングを、クライオスタットを用いて、凍結切片を作製した。これらの凍結切片を、核を染色するDAPI、視細胞前駆細胞のマーカーの1つであるCrx（抗Crx抗体、Takara社、ウサギ）、神経網膜マーカーの1つであるChx10（抗Chx10抗体、Exalpha社、ヒツジ）、桿体視細胞前駆細胞マーカーの1つであるNRL（抗NRL抗体、Bio-Techne社、ヤギ）、終脳マーカーの1つであるFOXG1（抗FOXG1抗体、タカラバイオ社、ウサギ）、Optic Stalkマーカーの1つであるPAX2（抗PAX2抗体、Thermo Fisher Scientific社、ウサギ）、並びに、未分化な多能性幹細胞マーカーの1つであるNANOG（抗NANOG抗体、メルク社、マウス）について免疫染色を行った。

[0273] 免疫染色した結果を図11に示した。同じ細胞凝集体から切り出したキャップとリングについて、リングの免疫染色結果を上段に、キャップの免疫染色結果を下段に示す。これらの結果から、キャップ及びリングのいずれにおいても、Crx陽性な視細胞前駆細胞、Chx10陽性な神経網膜、及び、NRL陽性な桿体視細胞前駆細胞が、連続して層状に発現していることがわかった。また、キャップ及びリングのいずれにおいても、FOXG1陽性である終脳や、PAX2陽性であるOptic Stalk、及び、NANOG陽性である多能性幹細胞は検出されなかった。さらに、Crx、Chx10及びNRLの染色像を比較すると、これらの神経網膜マーカーが、キャップとリングとでほぼ同等の分布を示していることが確認された。

[0274] <参考例8 移植用神経網膜シートを構成する視細胞前駆細胞及び神経網膜前駆細胞の割合>

多能性幹細胞から分化した細胞凝集体から作製した神経網膜シートの構成細胞のうち、視細胞前駆細胞及び神経網膜前駆細胞の割合を、免疫染色法の一つである免疫組織染色（Immunohistochemistry；IHC）で解析・定量した。

[0275] ヒトiPS細胞（DSP-SQ株）を参考例1記載の製法で網膜に分化さ

せた。その後、浮遊培養開始後84日目、92日目、93日目の細胞凝集体から参考例3に記載の方法でキャップ及びリングを単離した。参考例6記載の方法で、単離したリングの遺伝子発現解析を実施した。参考例6記載の方法で、神経網膜マーカー遺伝子を発現し、副産物のマーカー遺伝子を発現していないリングを選び、このリングに対応するキャップを移植用神経網膜シートとした。このようにして、浮遊培養開始後84日目の細胞凝集体から移植用神経網膜シートを1つ、浮遊培養開始後92日目の細胞凝集体から移植用神経網膜シートを2つ、浮遊培養開始後93日目の細胞凝集体から移植用神経網膜シートを1つ作製した。すなわち合計4枚の移植用神経網膜シートを作製した。

[0276] 得られた移植用神経網膜シートを、解析のため、B培地にて7日間培養した。培養した移植用神経網膜シートを、4%パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成した。凍結切片を、神経網膜前駆細胞マーカーの1つであるChx10（抗Chx10抗体、Exalpha社、ヒツジ）、及び、視細胞前駆細胞のマーカーの1つであるCrx（抗Crx抗体、Takara社、ウサギ）について免疫染色を行った。別の凍結切片を、神経網膜マーカーの1つであるRx（抗Rx抗体、Takara社、ギニアピッグ）、及び、視細胞のマーカーの1つであるRecoverin（抗Recoverin抗体、Proteintech社、ウサギ）について免疫染色を行った。DAPIで細胞核を染色した。これらの染色された切片を、蛍光顕微鏡（Keyence社製）を用いて観察し、免疫染色像を取得した。その一例（D3）を図12に示す。

[0277] 免疫染色像をImageJ（version 1.52a, NIH製）で解析し、4枚の移植用神経網膜シートのそれぞれについて、DAPI陽性細胞数、DAPI陽性かつChx10陽性細胞数、及び、DAPI陽性かつCrx陽性細胞数を解析した。同様に免疫染色像を解析し、DAPI陽性細胞数、及び、DAPI陽性かつRx陽性細胞数を解析した。これらの数値から、Chx10陽性細胞の割合、Crx陽性細胞の割合、及び、Rx陽性

細胞の割合を算出した。得られた結果を表 14 に記載した。

[表14]

Cap 識別番号	浮遊培養開始後 の日数(日)	陽性細胞の割合(%)		
		Chx10	Crx	Rx
B3	84+7	44.6	29.7	39.5
D2	92+7	38.9	41.5	44.3
D3	92+7	22.7	39.0	53.5
G3	93+7	36.6	55.5	53.5

[0278] 以上の結果から、細胞凝集体から切り出された移植用神経網膜シートに含まれる Chx10 陽性細胞の割合が 23～45% 程度、Crx 陽性細胞の割合が 30～56% 程度、Rx 陽性細胞の割合が 40～54% 程度であることがわかった。

[0279] すなわち、移植用神経網膜シートには、Chx10 陽性の神経網膜前駆細胞が約 34% 程度（23～45% 程度）、Crx 陽性の視細胞前駆細胞が約 40%（30～56%）、Rx 陽性細胞が約 47%（40～54%）含まれていることが示唆された。

[0280] <参考例 9 移植用神経網膜シートを構成する視細胞前駆細胞及び神経網膜前駆細胞の割合>

様々な多能性幹細胞から分化した細胞凝集体から作製した移植用神経網膜シートの構成細胞の組成を、免疫染色法の一つであるフローサイトメトリー法（FACSともいう）により調べた。

[0281] ヒト iPS 細胞（QHJ101s04 株）を参考例 1 記載の製法で網膜に分化させた。その後、浮遊培養開始後 88 日目の細胞凝集体から、参考例 3 に記載の方法でキャップ及びリングを単離した。そして、キャップを移植用神経網膜シートとした。移植用神経網膜シートを 2 日間、17℃で低温保存した。得られた移植用神経網膜シートを、5 枚まとめて 1 つのサンプルとし、PBS で洗浄し、神経細胞分散液（WAKO 社製、パパインを含む）を用いて 37℃で 30 分間ほど酵素処理し、ピペッティングにより単一細胞へと

分散し、単一細胞懸濁液を得た。得られた単一細胞懸濁液を、固定液（BD社製、C y t o F i x）を用いて固定し、F A C S用サンプルを得た。F A C S用サンプルを、血清を含むP e r m / W a s h液（BD社製）を用いてブロッキング及び透過処理（細胞膜の穴あけ）を行った。そして、蛍光標識した以下の抗体、抗C h x 1 0抗体（S a n t a C r u z社製）及び抗P a x 6抗体（BD社製）、抗C r x抗体（S a n t a C r u z社製）にて免疫染色を行った。そしてアナライザー（BD社製）を用いて、フローサイトメトリーで解析した。

[0282] その結果、C h x 1 0陽性かつP a x 6陽性画分（神経網膜前駆細胞画分）は11.5%、C h x 1 0陽性かつP a x 6陰性画分（双極細胞に偏った前駆細胞画分）は23.4%、C h x 1 0陰性かつP a x 6陽性画分（神経節細胞及びアマクリン細胞画分）は10.7%、C r x陽性細胞画分（視細胞前駆細胞画分）は17.4%であることがわかった。

[0283] さらに、ヒトi P S細胞（D S P - S Q株）を参考例1記載の製法で網膜に分化させた。その後、浮遊培養開始後88日目の細胞凝集体を11個作製し、それぞれの細胞凝集体から、参考例3に記載の方法で11個ずつのキャップ及びリングを単離した。11個のキャップをまとめて1つのキャップサンプルとした。同様に、11個のリングをまとめて1つのリングサンプルとした。キャップサンプルとリングサンプルとをそれぞれP B Sで洗浄し、神経細胞分散液（W A K O社製、パパインを含む）を用いて37℃で30分間ほど酵素処理し、キャップとリングそれぞれの単一細胞懸濁液を得た。得られたキャップとリングそれぞれの単一細胞懸濁液を、固定液（BD社製、C y t o F i x）を用いて固定し、F A C S用サンプルを得た。F A C S用サンプルを、血清を含むP e r m / W a s h液（BD社製）を用いてブロッキングと穴あけを行い、蛍光標識した以下の抗体、抗C h x 1 0抗体（S a n t a C r u z社製）、抗C r x抗体（S a n t a C r u z社製）、抗S S E A - 4抗体にて免疫染色を行った。免疫染色の陰性対照としてI s o t y p e c o n t r o lを用いた。そしてアナライザー（BD社製）を用い

て、フローサイトメトリーで解析した。Chx10陽性細胞の割合、Crx陽性細胞、SSEA-4陽性細胞の割合を、それぞれのisotype controlとの差分で算出した。その結果を表15に記載した。

[表15]

サンプル	浮遊培養開始後 の日数(日)	陽性細胞の割合(%)		
		Chx10	Crx	SSEA-4
キャップ	88	29.4	15.8	<1
リング	88	28.1	21.7	<1

[0284] キャップサンプルでは、神経網膜前駆細胞マーカーであるChx10陽性細胞の割合が29.4%、視細胞前駆細胞マーカーであるCrx陽性細胞の割合が15.8%、多能性幹細胞マーカー（目的外細胞）であるSSEA-4陽性細胞の割合が1%未満であった。リングサンプルでは、神経網膜前駆細胞マーカーであるChx10陽性細胞の割合が28.1%、視細胞前駆細胞マーカーであるCrx陽性細胞の割合が21.7%、多能性幹細胞マーカー（目的外細胞）であるSSEA-4陽性細胞の割合が1%未満であった。

[0285] これらの結果から、まず、このキャップサンプル及びリングサンプルは、Chx10陽性細胞とCrx陽性細胞とを含む神経網膜であり、未分化iPS細胞を実質的に含まないことがわかった。そして、キャップサンプルに含まれるChx10陽性細胞とCrx陽性細胞の割合が、リングサンプルに含まれるChx10陽性細胞とCrx陽性細胞の割合と同等であることが実証できた。そして、リングサンプルが神経網膜であれば、キャップも神経網膜であることが実証できた。

[0286] そして、これらのキャップやリング（好ましくはキャップ）を移植用神経網膜シートとして用いる場合、この移植用神経網膜シートに含まれるChx10陽性細胞画分（神経網膜前駆細胞画分）は約30%程度（20～40%程度）、Crx陽性細胞画分（視細胞前駆細胞画分）は約17%程度（10～30%程度）であることがわかった。

請求の範囲

[請求項1]

2以上の多能性幹細胞由来の神経網膜を含む細胞凝集体と、マトリクスとを含み、前記2以上の細胞凝集体が前記マトリクス中に配置されている、複合体であって、

前記神経網膜が、下記(1)～(10)の特徴を有する移植用神経網膜シートである複合体:

- (1) 多能性幹細胞由来であり、
- (2) 3次元構造を有し、
- (3) 視細胞層及び内層を含む複数の層構造を有する神経網膜層を含み、
- (4) 前記視細胞層が、視細胞前駆細胞及び視細胞からなる群から選択される1以上の細胞を含み、
- (5) 前記内層が、網膜前駆細胞、神経節細胞、アマクリン細胞及び双極細胞からなる群から選択される1以上の細胞を含み、
- (6) 前記神経網膜層の表面が、頂端面を有し、
- (7) 前記頂端面に沿って存在する視細胞層の内側に前記内層が存在し、
- (8) 前記移植用神経網膜シートの表面の総面積に対して、前記神経網膜層の面積が50%以上であり、
- (9) 前記神経網膜層の頂端面の総面積に対して、連続上皮構造の面積が80%以上であり、
- (10) 前記移植用神経網膜シート中の神経網膜系細胞関連遺伝子の発現が認められ、かつ、非神経網膜系細胞関連遺伝子の発現が認められず、前記非神経網膜系細胞関連遺伝子が、脳脊髄組織マーカー遺伝子及び眼球関連組織マーカー遺伝子からなる群から選択される1以上の遺伝子を含む。

[請求項2]

前記細胞凝集体が600 μ m～2500 μ mの長径を有し、前記2以上の細胞凝集体が前記マトリクス中に列状に配置されている、請求

項 1 に記載の複合体。

[請求項3] 前記マトリクスがフィブリンゲル又はゼラチンである、請求項 1 又は 2 に記載の複合体。

[請求項4] マトリクス中に 2 以上の神経網膜を含む細胞凝集体が配置された複合体の製造方法であって、

(1) 多能性幹細胞から 2 以上の神経網膜の細胞凝集体を作製する第一工程と、

(2) 前記 2 以上の細胞凝集体を所定の配置でマトリクス又はマトリクスの前駆体と接触させてから、前記マトリクスをゲル化させる第二工程と、

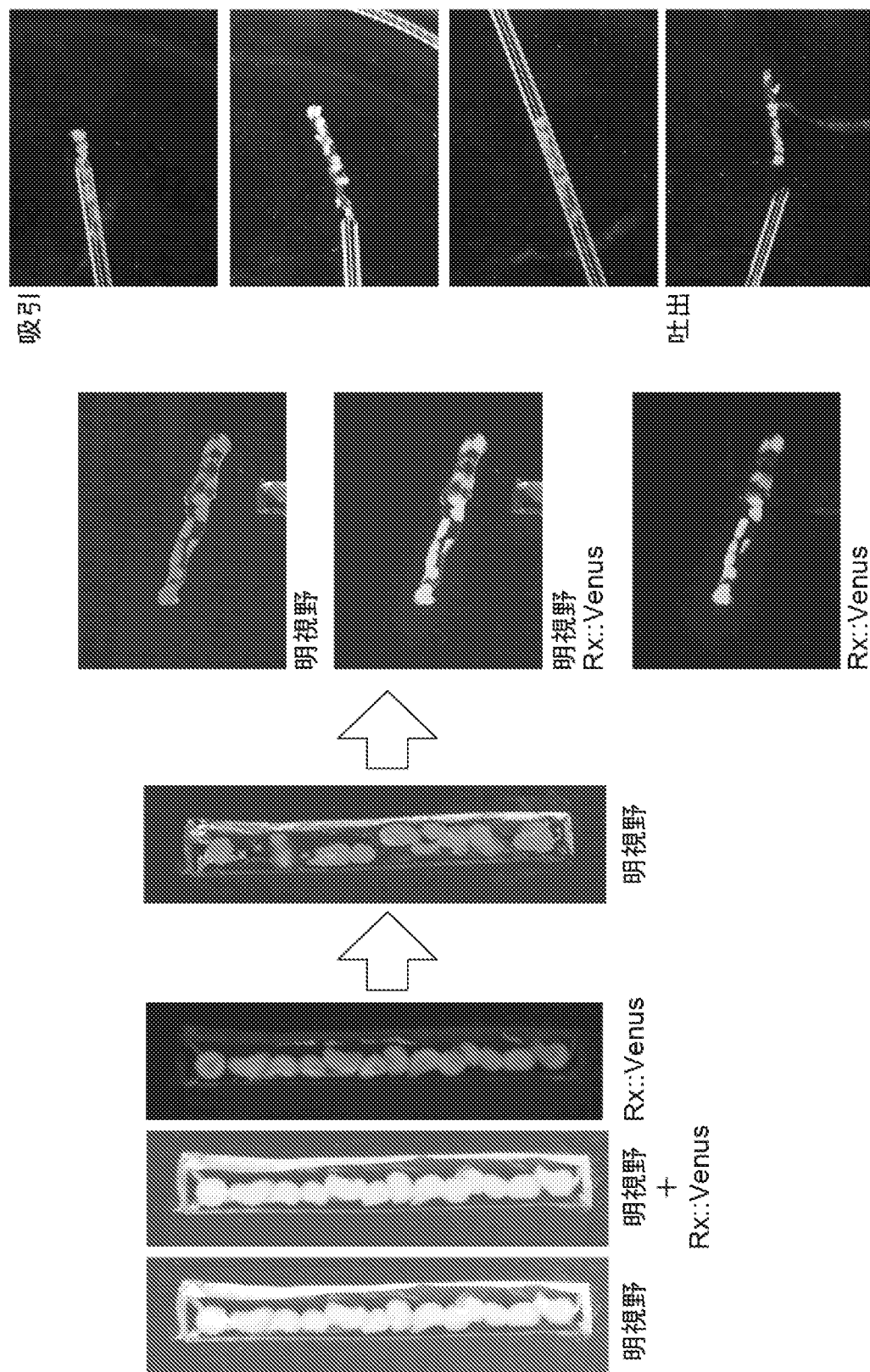
を含む、製造方法。

[請求項5] 第二工程において、2 個～20 個の細胞凝集体を列状に配置することを含む、請求項 4 に記載の製造方法。

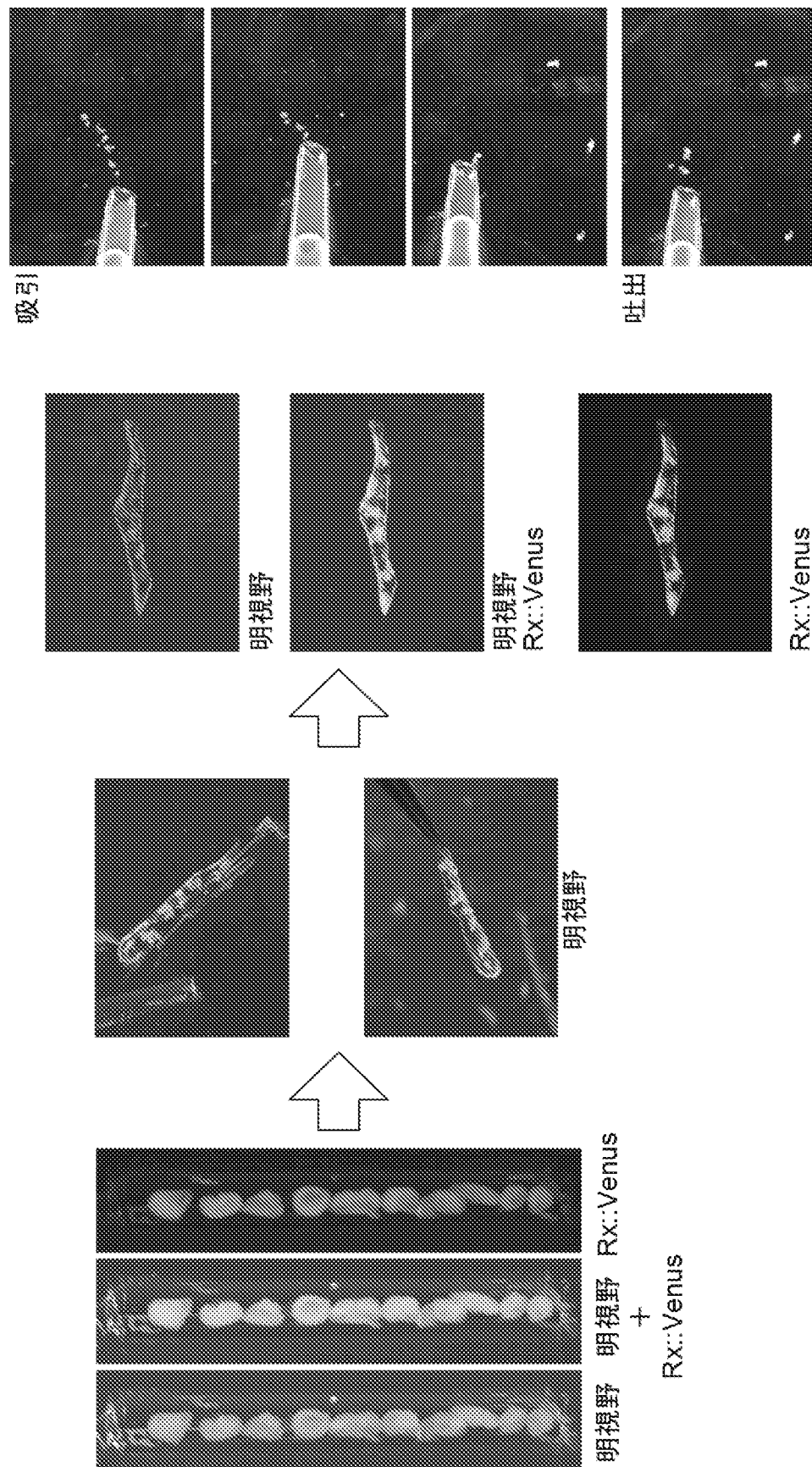
[請求項6] 前記マトリクスがフィブリンゲルであり、第二工程において、前記 2 以上の細胞凝集体を列状に配置し、配置された 2 以上の細胞凝集体を、フィブリノーゲン溶液及びトロンビン溶液のいずれか一方に接触させ、さらにフィブリノーゲン溶液及びトロンビン溶液の他方に接触させることにより、前記フィブリノーゲン及び前記トロンビンを反応させ、ゲル化させる、請求項 4 又は 5 に記載の製造方法。

[請求項7] 前記マトリクスがゼラチンである、請求項 4 又は 5 に記載の製造方法。

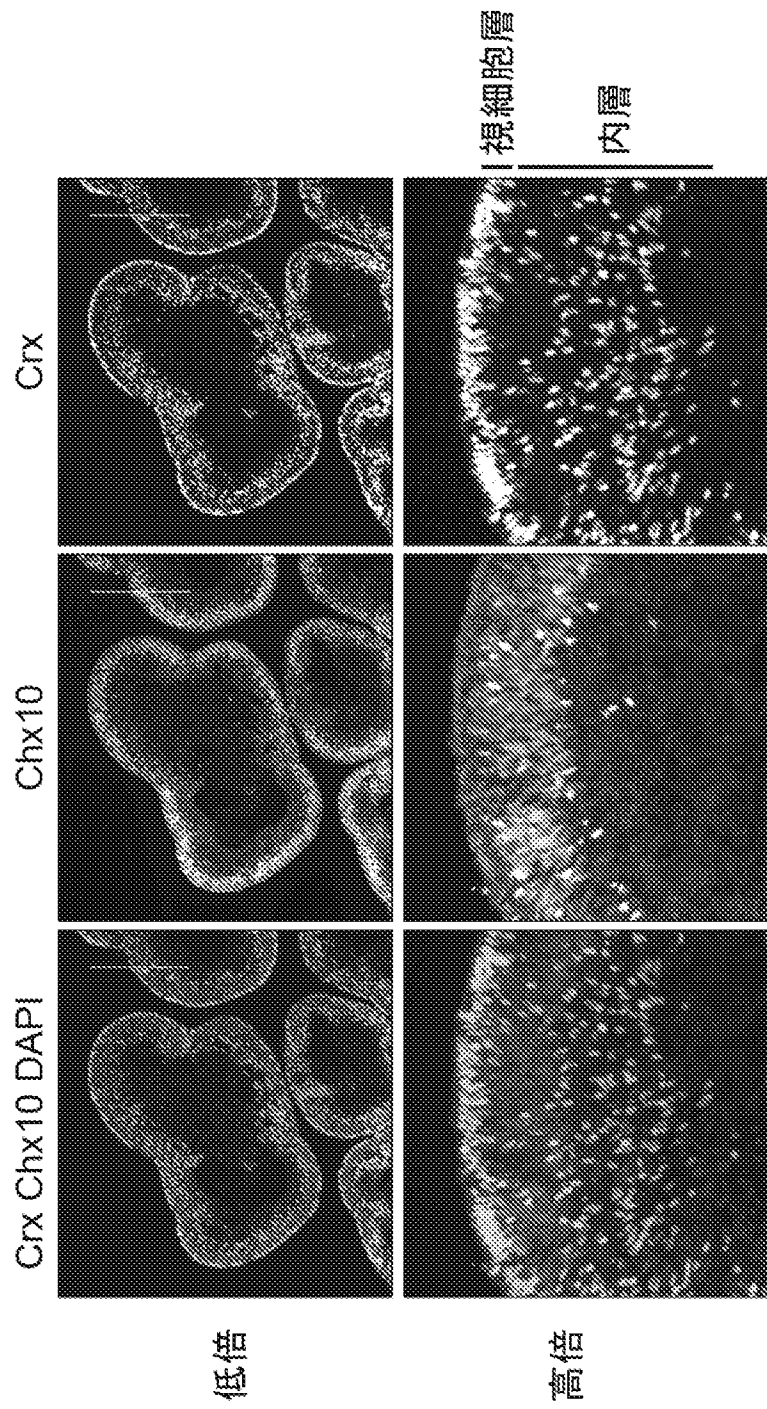
[図1]



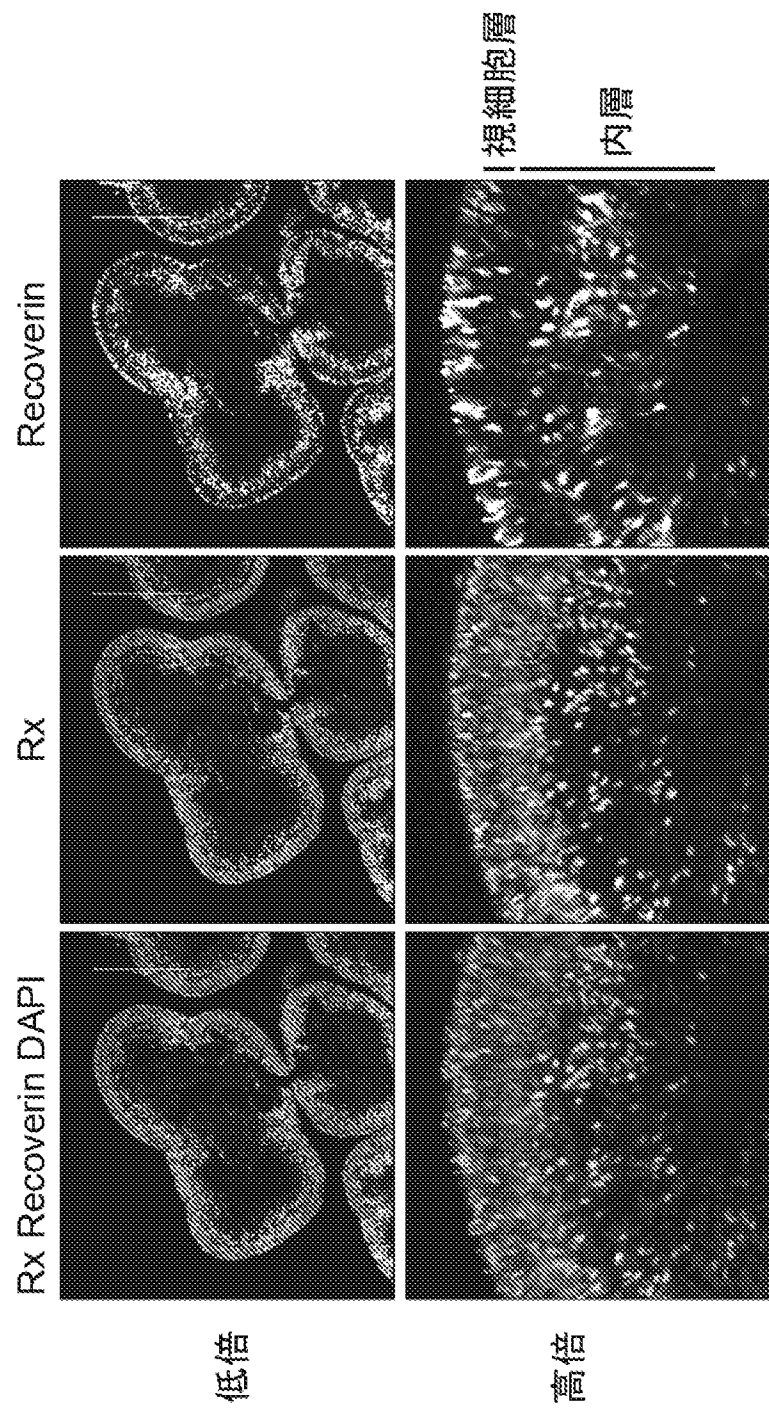
[図2]



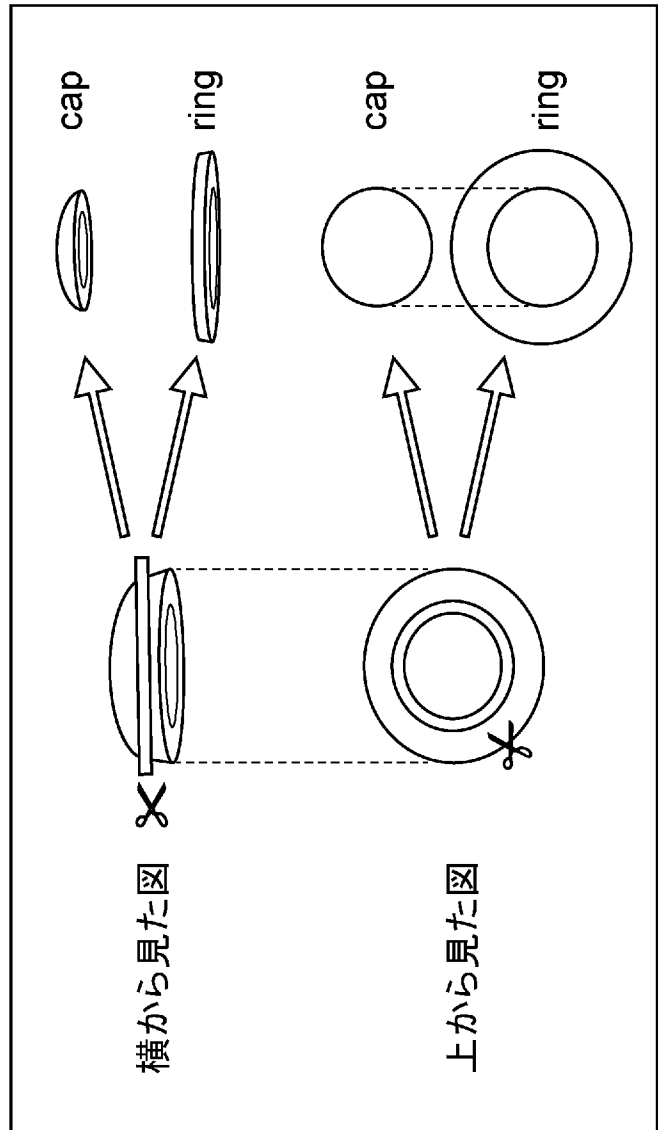
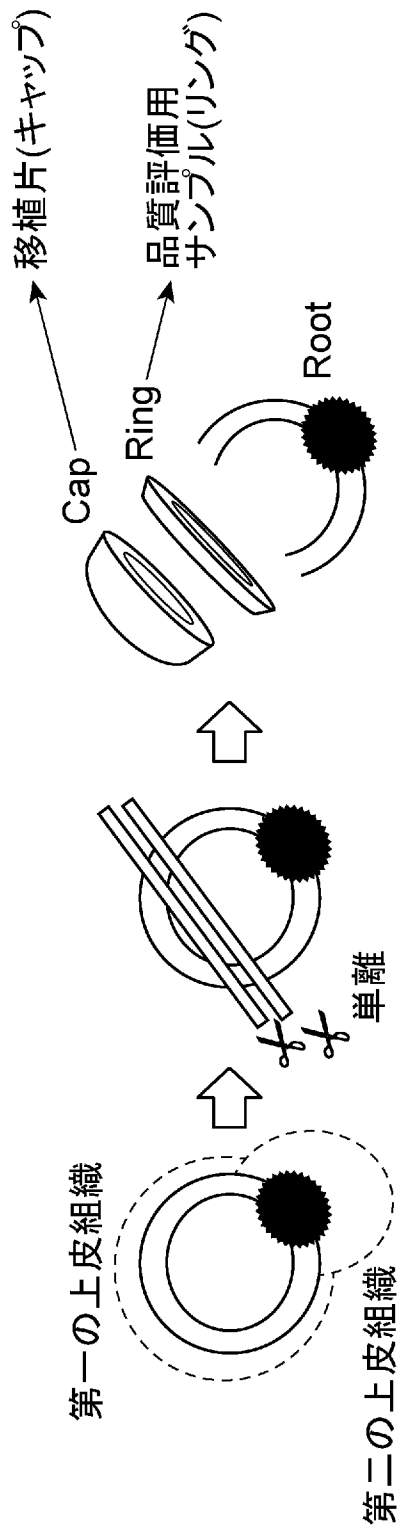
[図3]



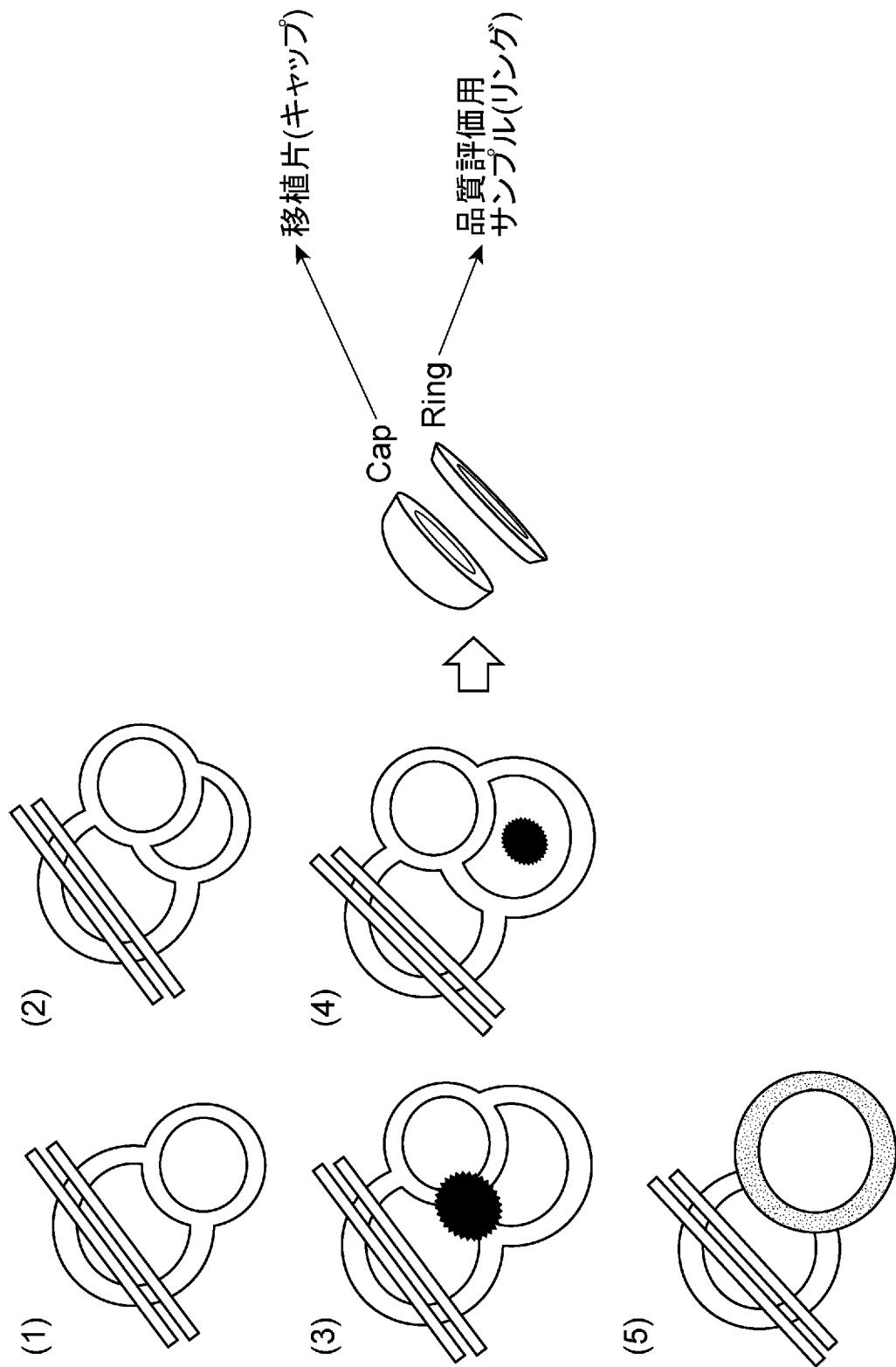
[図4]



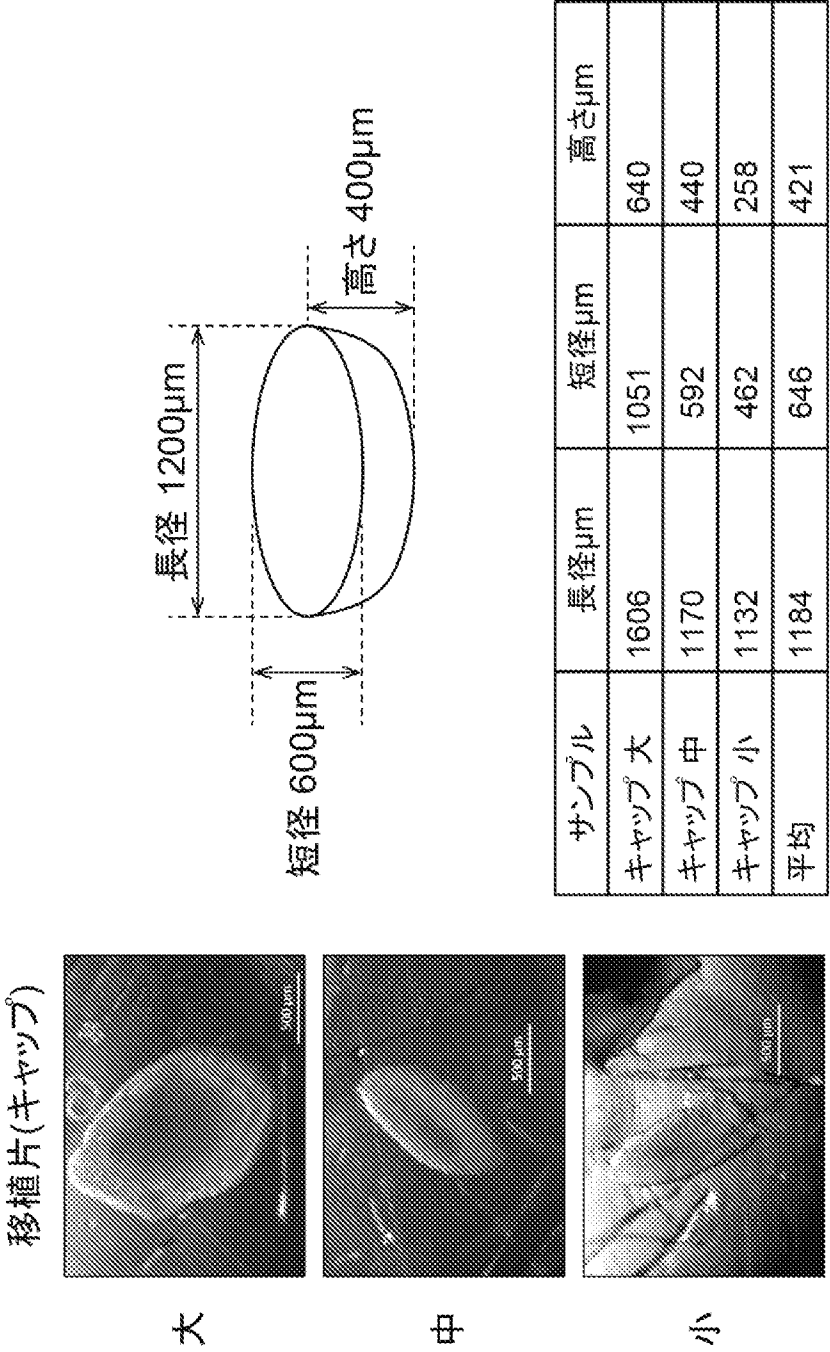
[図5]



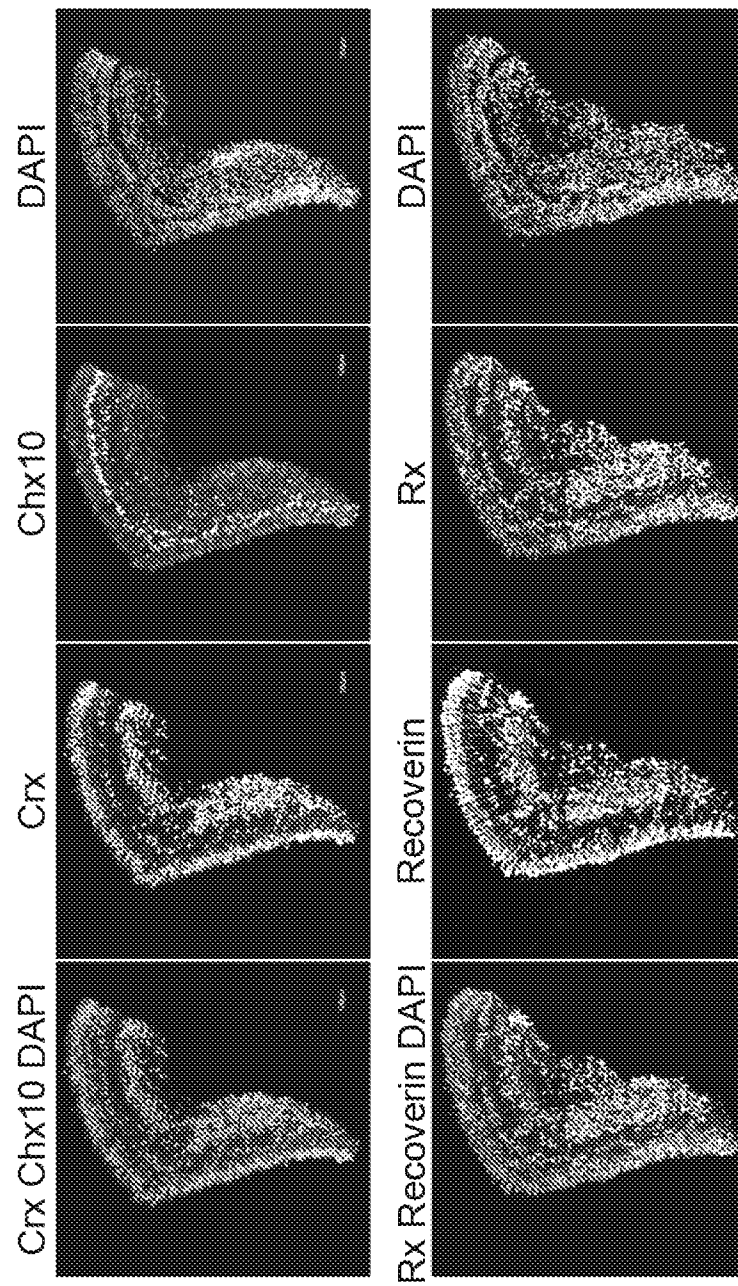
[図6]



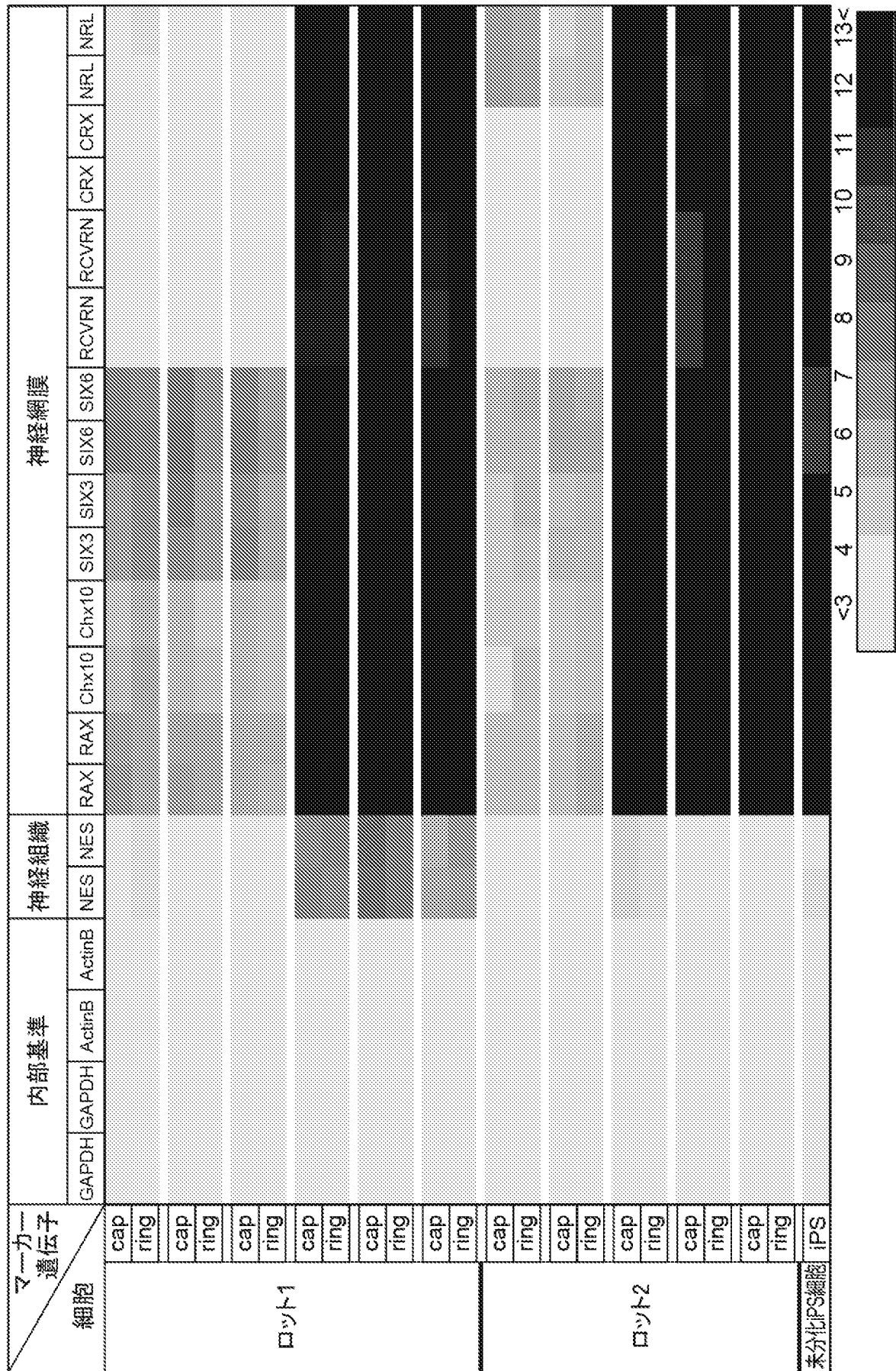
[図7]



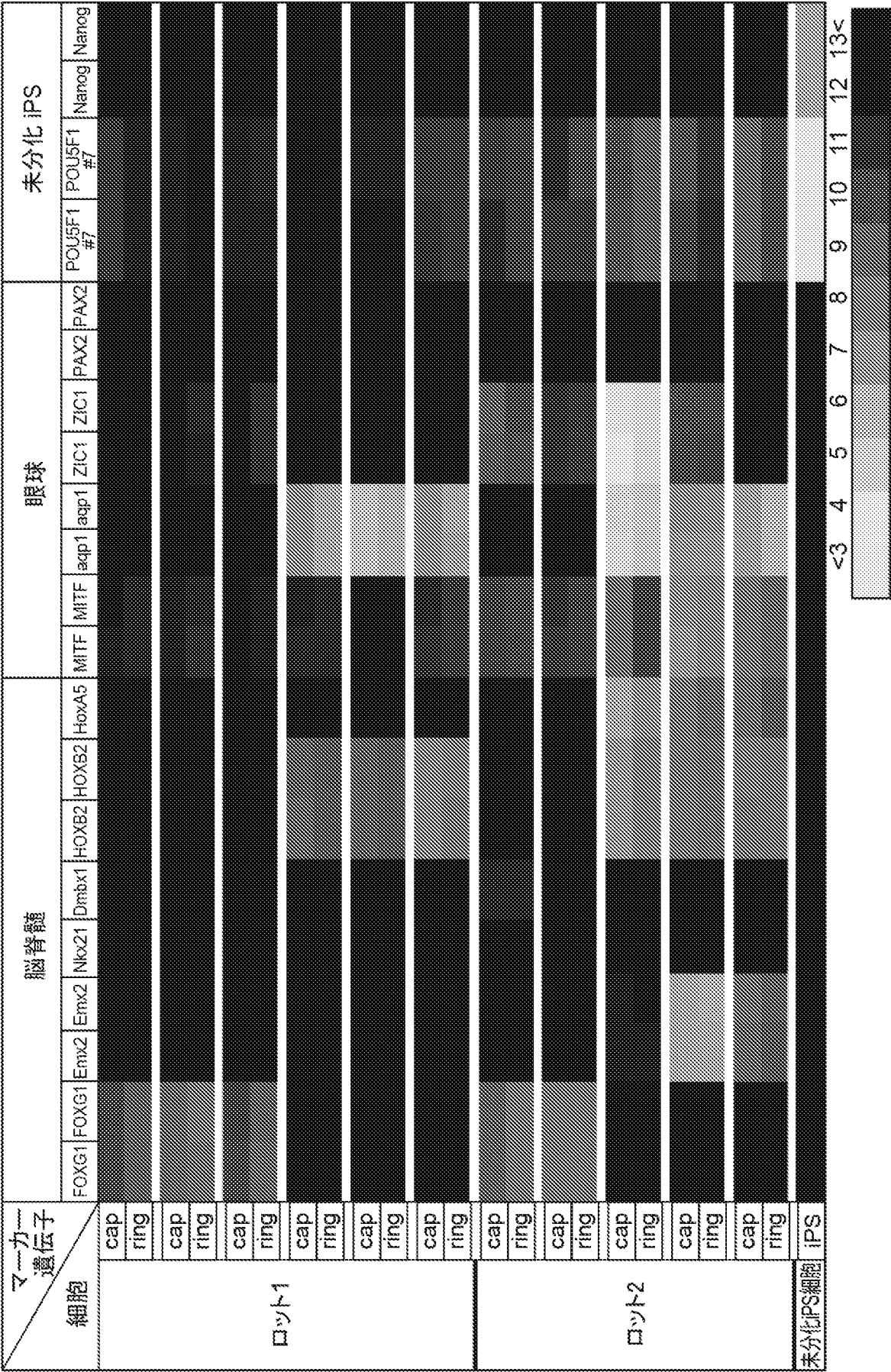
[図8]



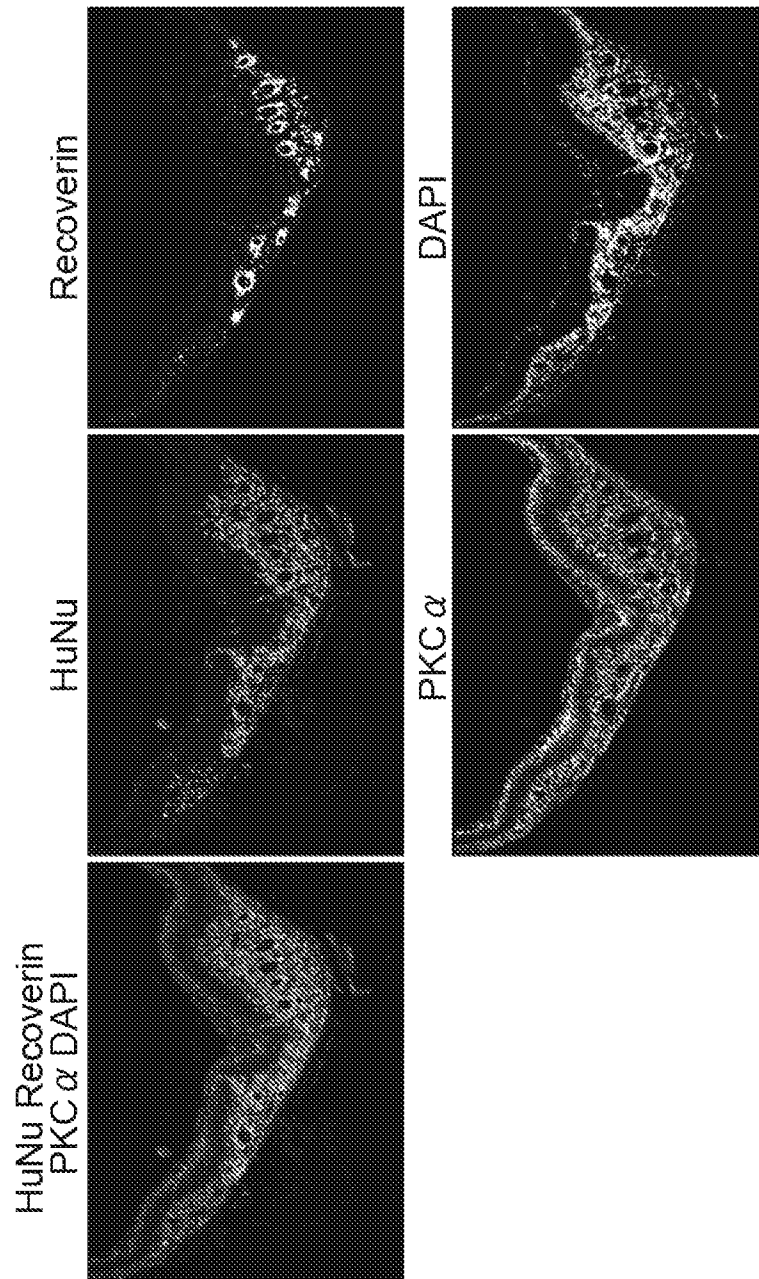
[図9A]



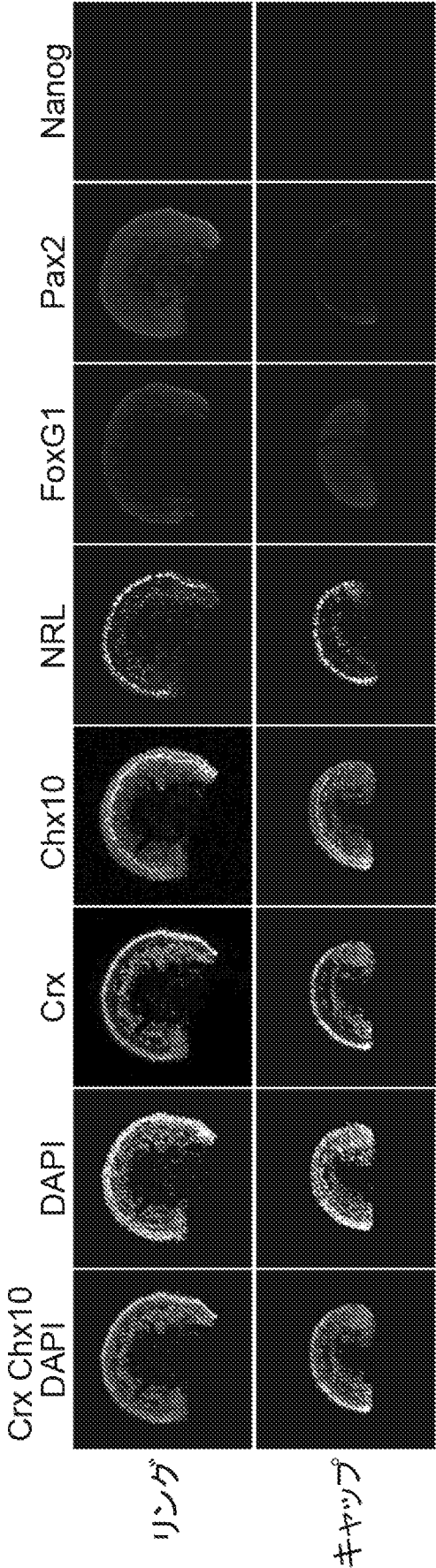
[図9B]



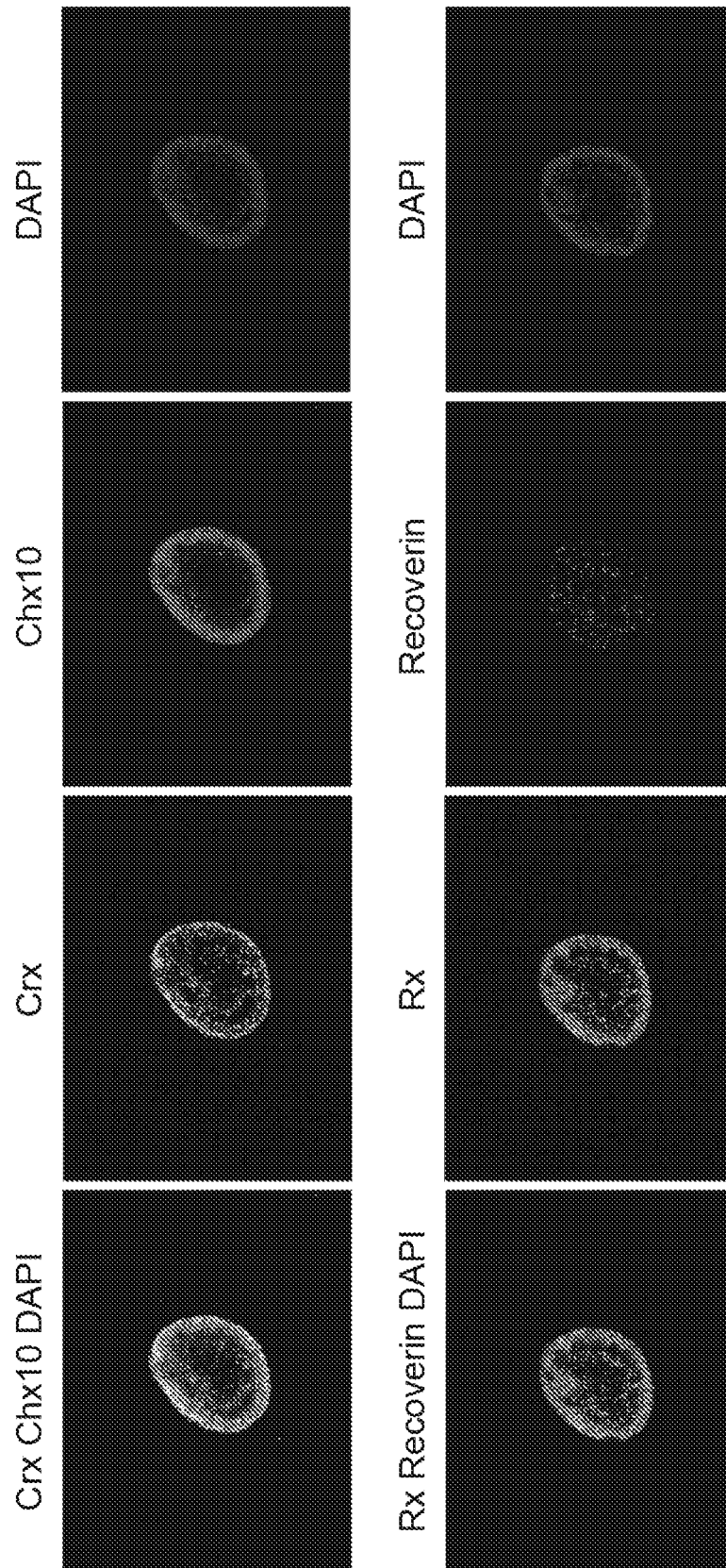
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/033387

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/0793(2010.01)i; **C12N 5/0797**(2010.01)i; **A61L 27/22**(2006.01)i; **A61L 27/36**(2006.01)i; **A61L 27/38**(2006.01)i; **A61L 27/44**(2006.01)i; **A61L 27/52**(2006.01)i; **A61L 27/58**(2006.01)i
 FI: C12N5/0793; A61L27/38 100; A61L27/44; A61L27/58; A61L27/36 400; A61L27/36 300; A61L27/52; A61L27/22; A61L27/38 200; A61L27/36 130; C12N5/0797

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)

C12N5/0793; C12N5/0797; A61L27/22; A61L27/36; A61L27/38; A61L27/44; A61L27/52; A61L27/58

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/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	WO 2019/028088 A1 (BIOTIME, INC.) 07 February 2019 (2019-02-07) claims, abstract, page 4, lines 1-9, page 19, lines 6-19, page 21, lines 24-30	4, 5
Y	claims, abstract, page 4, lines 1-9, page 19, lines 6-19, page 21, lines 24-30	1-3, 6, 7
Y	AHMED, Tamer A. E. et al. Autologous fibrin glue as an encapsulating scaffold for delivery of retinal progenitor cells. <i>Frontiers in Bioengineering and Biotechnology</i> , 2015, vol. 2, Article 85, pp. 1-11	3, 6
A	abstract, method and materials	1, 2, 4, 5, 7
Y	M'BAREK, Karim Ben et al. Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration. <i>SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE</i> , 2017, vol. 9, eaai7471, pp. 1-12	3, 7
A	abstract, fig. 3	1, 2, 4-6

☒ 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

19 November 2021

Date of mailing of the international search report

30 November 2021

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/033387

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KUWAHARA, Atsushi et al. Generation of a ciliary margin-like stem cell niche from self-organizing human retinal tissue. Nat. Commun., 2015, vol. 6, no. 6286, pp. 1-15	1-3
A	page 2, right column, line 23 to page 4, right column, line 22, page 4, right column, line 23 to line 15 from the bottom, page 4, right column, lines 14-1 from the bottom, page 12, left column, line 23 to page 13, line 1 from the bottom, fig. 1-3	
	page 2, right column, line 23 to page 4, right column, line 22, page 4, right column, line 23 to line 15 from the bottom, page 4, right column, lines 14-1 from the bottom, page 12, left column, line 23 to page 13, line 1 from the bottom, fig. 1-3	4-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/033387

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2019/028088	A1	07 February 2019	JP	2020-530839	A	
				US	2020/0368394	A1	
				EP	3661529	A1	
				CN	111511377	A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/0793(2010.01)i; C12N 5/0797(2010.01)i; A61L 27/22(2006.01)i; A61L 27/36(2006.01)i; A61L 27/38(2006.01)i; A61L 27/44(2006.01)i; A61L 27/52(2006.01)i; A61L 27/58(2006.01)i FI: C12N5/0793; A61L27/38 100; A61L27/44; A61L27/58; A61L27/36 400; A61L27/36 300; A61L27/52; A61L27/22; A61L27/38 200; A61L27/36 130; C12N5/0797																							
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）） C12N5/0793; C12N5/0797; A61L27/22; A61L27/36; A61L27/38; A61L27/44; A61L27/52; A61L27/58 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2021年</td> </tr> </table> 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)			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2021年	日本国実用新案登録公報	1996-2021年	日本国登録実用新案公報	1994-2021年													
日本国実用新案公報	1922-1996年																						
日本国公開実用新案公報	1971-2021年																						
日本国実用新案登録公報	1996-2021年																						
日本国登録実用新案公報	1994-2021年																						
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2019/028088 A1 (BIOTIME, INC.) 07.02.2019 (2019-02-07) 特許請求の範囲、要約、第4頁第1-9行、第19頁第6-19行、第21頁 第24-30行</td> <td>4, 5</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>特許請求の範囲、要約、第4頁第1-9行、第19頁第6-19行、第21頁 第24-30行</td> <td>1-3, 6, 7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>AHMED Tamer A.E. et al., Autologous fibrin glue as an encapsulating scaffold for delivery of retinal progenitor cells, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2015, Vol.2, Article 85, p.1-11 要約、方法と材料</td> <td>3, 6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>要約、方法と材料</td> <td>1, 2, 4, 5, 7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>M' BAREK Karim Ben et al., Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration, SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, 2017, Vol.9, eaai7471, p.1-12 要約、図3</td> <td>3, 7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>要約、図3</td> <td>1, 2, 4-6</td> </tr> </tbody> </table>			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	WO 2019/028088 A1 (BIOTIME, INC.) 07.02.2019 (2019-02-07) 特許請求の範囲、要約、第4頁第1-9行、第19頁第6-19行、第21頁 第24-30行	4, 5	Y	特許請求の範囲、要約、第4頁第1-9行、第19頁第6-19行、第21頁 第24-30行	1-3, 6, 7	Y	AHMED Tamer A.E. et al., Autologous fibrin glue as an encapsulating scaffold for delivery of retinal progenitor cells, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2015, Vol.2, Article 85, p.1-11 要約、方法と材料	3, 6	A	要約、方法と材料	1, 2, 4, 5, 7	Y	M' BAREK Karim Ben et al., Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration, SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, 2017, Vol.9, eaai7471, p.1-12 要約、図3	3, 7	A	要約、図3	1, 2, 4-6
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	WO 2019/028088 A1 (BIOTIME, INC.) 07.02.2019 (2019-02-07) 特許請求の範囲、要約、第4頁第1-9行、第19頁第6-19行、第21頁 第24-30行	4, 5																					
Y	特許請求の範囲、要約、第4頁第1-9行、第19頁第6-19行、第21頁 第24-30行	1-3, 6, 7																					
Y	AHMED Tamer A.E. et al., Autologous fibrin glue as an encapsulating scaffold for delivery of retinal progenitor cells, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2015, Vol.2, Article 85, p.1-11 要約、方法と材料	3, 6																					
A	要約、方法と材料	1, 2, 4, 5, 7																					
Y	M' BAREK Karim Ben et al., Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration, SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, 2017, Vol.9, eaai7471, p.1-12 要約、図3	3, 7																					
A	要約、図3	1, 2, 4-6																					
☒ 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、一般的な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抵 触するものではなく、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 19.11.2021		国際調査報告の発送日 30.11.2021																					
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 原 大樹 4N 5278 電話番号 03-3581-1101 内線 3488																					

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
Y	KUWAHARA Atsushi et al., Generation of a ciliary margin-like stem cell niche from self-organizing human retinal tissue, Nat. Commun., 2015, Vol.6, No.6286, p.1-15 第2頁右欄第23行-第4頁右欄第22行、第4頁右欄第23行-下から第15行、第4頁右欄下から第14-1行、第12頁左欄第23行-第13頁下から第1行、図1-3	1-3
A	第2頁右欄第23行-第4頁右欄第22行、第4頁右欄第23行-下から第15行、第4頁右欄下から第14-1行、第12頁左欄第23行-第13頁下から第1行、図1-3	4-7

国際出願番号
PCT/JP2021/033387

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2019/028088	A1	07.02.2019	JP	2020-530839	A	
				US	2020/0368394	A1	
				EP	3661529	A1	
				CN	111511377	A	