(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
2010 年 10 月 28 日(28.10.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/122787 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01) *A61L 27/00* (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) *A61P 41/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/002865

(22) 国際出願日: 2010 年 4 月 21 日(21.04.2010)

(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 2009-104704 2009 年 4 月 23 日(23.04.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 岡山大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目１番１号 Okayama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 喜多村真治 (KITAMURA, Shinji) [JP/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目５番１号国立大学法人岡山大学岡山大学病院内 Okayama (JP). 杉山斉 (SUGIYAMA, Hitoshi) [JP/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目５番１号国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 槇野博史 (MAKINO, Hirofumi) [JP/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目５番１号国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP).

(74) 代理人: 庄司隆, 外 (SHOJI, Takashi et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋３－４－１ ６階 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

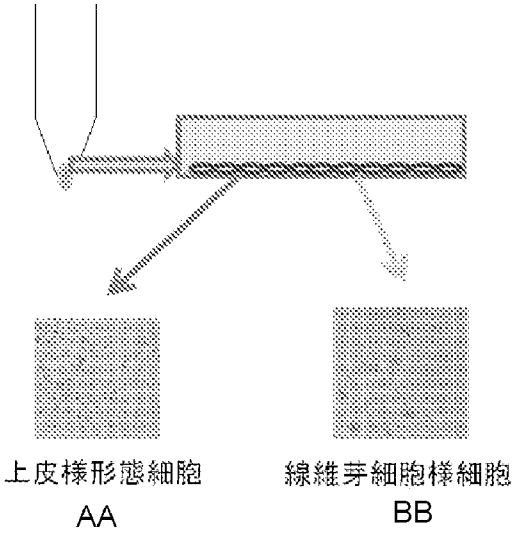
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,

[続葉有]

(54) **Title**: PERITONEUM-PROTECTING AGENT AND METHOD FOR PRODUCING PERITONEUM-PROTECTING AGENT

(54) 発明の名称 : 腹膜保護剤および腹膜保護剤の調製方法

[図1]



AA EPITHELIOID-SHAPED CELL
BB FIBROBLAST-LIKE CELL

(57) **Abstract**: Provided are a method for easily collecting a sufficient amount of peritoneal mesothelial cells and the collected peritoneal mesothelial cells. Also provided is a peritoneum-protecting agent which comprises said peritoneal mesothelial cells as the active ingredient, or a material for regenerative medicine which comprises said peritoneum-protecting agent. A sufficient amount of peritoneal mesothelial cells can be easily collected by selecting epithelioid-shaped cells, either morphologically or using a marker that is expressed on the cell surface as an indication, from among cells in a peritoneal dialysis waste fluid obtained from a patient undergoing peritoneal dialysis. The peritoneal mesothelial cells thus obtained exert peritoneum-protecting effects, i.e., effects of protecting the peritoneum from adhesion, thickening, damages and so on, and, therefore, can be used as a peritoneum-protecting agent or a material for regenerative medicine.

(57) 要約: 本発明は、十分量の腹膜中皮細胞を簡便に採取する方法および採取された腹膜中皮細胞を提供する。該腹膜中皮細胞を有効成分として含む腹膜保護剤、または当該腹膜保護剤を含む再生医療用材料を提供する。腹膜透析を受けている患者から得た腹膜透析排液中の細胞を形態学的または細胞表面に発現するマーカーを指標として上皮様形態細胞を選別することにより、十分量の腹膜中皮細胞を簡便に採取しうる。得られた腹膜中皮細胞は、腹膜保護、即ち腹膜癒着形成、腹膜肥厚、腹膜損傷などに対して保護機能を有するため、腹膜保護剤または再生医療用材料をして利用することができる。

WO 2010/122787 A1

MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： 腹膜保護剤および腹膜保護剤の調製方法

技術分野

[0001] 本発明は、腹膜癒着形成、腹膜肥厚、腹膜損傷などに対して有効に作用する腹膜中皮細胞を有効成分とする腹膜保護剤に関し、さらに当該腹膜保護剤の調製方法に関する。また、当該腹膜保護剤を含む再生医療用材料に関する。

[0002] 本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願特願２００９－１０４７０４号優先権を請求する。

背景技術

[0003] 腹膜癒着は、消化器科、婦人科など各種領域の外科手術の跡に生じ、予後に大きな影響を与える。例えば、開腹手術後、特に消化器手術に際して生じる腸管の癒着は、手術手技および機器の向上に伴い少なくなる傾向にあるが、手術後、数年から十数年経過後にイレウス（腸閉塞）症状などを発症し、外科手術後の合併症の中でも最も重大な障害のひとつとなっている。開腹手術における腸壁や腸管の癒着は腸閉塞の原因ともなるため、再手術となったり、術後患者の予後を悪化させる傾向も散見される（非特許文献１）。このような合併症において癒着がおきると思われる部位に、特殊な癒着防止剤を使用する方法があるが、いまだ完全な予防法ではなく、新たなアプローチが求められている。

[0004] また、腹膜透析患者において致死的な合併症に被嚢性腹膜硬化症（ＥＰＳ）がある。この合併症は、長年の腹膜透析液の刺激や腹膜炎の刺激により腹膜肥厚が進行し、腸閉塞が引き起こされ、場合によっては死に至る合併症である。本合併症においては、外科的に肥厚した腹膜を開腹切除するしかないが、手術後に再度癒着を引き起こすことが多く、いまだ有効な治療がない。

[0005] 安全性に優れた癒着防止剤として、原材料が生体吸収性材料であるヒアルロン酸ナトリウムおよびカルボキシメチルセルロースを２：１の割合で含有

するセプラフィルム®（科研製薬株式会社、Genzyme社）が既に臨床で使用されている。セプラフィルム®は貼付後２４時間から４８時間でゲル状となり、およそ７日間貼付部位に貯留して、損傷を受けた組織とその周囲の組織を物理的に隔離することで、癒着防止効果を発揮する。また、該癒着防止剤は貼付後２８日以内に体外へ排出されるため、外科的除去は不要であることが特長点である。しかしながら、該癒着防止剤は乾燥状態では柔軟性がないため、使用部位が複雑な形状であると使用できず、また腹腔鏡下での手術時には適さないという問題点が挙げられている。また、そのような癒着防止剤を使用しても、壁側・臓側腹膜全体に発生する腹膜透析患者のＥＰＳ術後の癒着を予防することは難しい。

[0006] 癒着形成防止について多く検討されているが、その殆どが生体分解性または生体適合性のポリマー材料などによる癒着防止材料（特許文献１～４）、または上皮細胞の足場となる材料（特許文献５）に関するものある。

[0007] 近年、腹膜中皮細胞の移植とその可能性についていくつか報告がある。例えば、中皮細胞の腹腔内への移植は、腹膜癒着形成の減少や中皮細胞露出部のリモデリングに有効であることが示されている（非特許文献２）。また、腹膜中皮細胞は、前駆細胞の再生能のみからでは説明できない顕著な自己再生能力を有し、中皮細胞は再生医療に用いられる有望な選択肢になる可能性があることが報告されている（非特許文献３）。さらに、腹膜中皮細胞の移植は、腹膜機能不全に対する治療の選択肢の一つと考えられることも示されている（非特許文献４）。しかしながら、移植に用いる中皮細胞のソースなど、解決すべき課題が多く残されている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開２００８－２８４２５７号公報

特許文献2：特開２００６－３３３９４２号公報

特許文献3：特開２００６－１１１８６７号公報

特許文献4：国際公開２００７／０１３３３１号パンフレット

特許文献5：特開２００５－１１８１２３号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Ann R Coll Surg Engl. Jan;72(1):60-63, 1990

非特許文献2：Int J Artif Organs. 30(6):456-476, 2007

非特許文献3：Int J Artif Organs. 30(6):501-512, 2007

非特許文献4：Int J Artif Organs. 30(6):513-519, 2007

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、十分量の腹膜中皮細胞を簡便に採取する方法および採取された腹膜中皮細胞を有効成分とする腹膜保護剤を提供することを課題とする。また、当該腹膜保護剤の調製方法並びに当該腹膜保護剤を含む再生医療用材料を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、腹膜透析を受けている患者から得た腹膜透析排液中に、患者由来の腹膜中皮細胞が混入していると考えられることに着目し、鋭意研究を重ねた結果、腹膜透析排液中の細胞のうち、上皮様形態細胞を選別することで、十分量の腹膜中皮細胞を簡便に採取しうることを見出した。得られた腹膜中皮細胞は、腹膜保護剤として機能しうることを見出し、本発明を完成した。

[0012] 即ち本発明は、以下よりなる。

１．腹膜透析排液から回収した腹膜中皮細胞を有効成分として含む、腹膜保護剤。

２．腹膜透析排液から回収した腹膜中皮細胞を１ｍｌあたり少なくとも１０個含む、前項１に記載の腹膜保護剤。

３．腹膜透析排液から回収した腹膜中皮細胞が、上皮様形態細胞である前項１または２に記載の腹膜保護剤。

４．上皮様形態細胞が、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）を発現してなる前項３に

記載の腹膜保護剤。

５．腹膜保護が、腹膜癒着形成、腹膜肥厚および／または腹膜損傷に対する保護である、前項１～４のいずれか１に記載の腹膜保護剤。

６．採取した腹膜透析排液から細胞を回収し、さらに上皮様形態細胞を選別する工程を含む前項１～５のいずれか１に記載の腹膜保護剤の調製方法。

７．前記上皮様形態細胞の選別が、腹膜透析排液から回収された細胞を培養し、形態学的に上皮様形態細胞と認められる細胞を選別することによる前項６に記載の腹膜保護剤の調製方法。

８．前記上皮様形態細胞の選別が、腹膜透析排液から回収された細胞について、上皮様形態細胞に特異的に発現されるマーカーを指標として選別することによる前項６に腹膜保護剤の調製方法。

９．上皮様形態細胞に特異的に発現されるマーカーが肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）である前項８に腹膜保護剤の調製方法。

１０．採取した腹膜透析排液から細胞を回収し、さらに上皮様形態細胞を選別する工程を含む腹膜中皮細胞の採取方法。

１１．前項１０の方法により採取された腹膜中皮細胞。

１２．前項１１に記載の腹膜中皮細胞を含む腹膜保護剤。

１３．前項１～５および前項１２のいずれか１に記載の腹膜保護剤を含む再生医療用材料。

発明の効果

[0013] 本発明の腹膜中皮細胞の採取方法により、十分量の腹膜中皮細胞を簡便に採取することができる。採取された腹膜中皮細胞は、腹膜保護作用、即ち腹膜癒着形成、腹膜硬化、腹膜損傷など対して有効に作用し、これらの防止剤や治療剤としての腹膜保護剤として使用することができ、さらには損傷を受けた腹膜の再生医療用材料となりうる。本発明の採取方法により得られる腹膜中皮細胞は、腹膜透析排液から回収されるものであり、非侵襲的に回収することができ、患者にとって負担が軽いものである。また、腹膜透析排液は従来廃棄処理していたものであるので、資源の有効活用ができる。

[0014] 本発明の採取方法により得られる腹膜中皮細胞を腹膜保護剤、または当該腹膜保護剤を含む再生医療用材料として用いる場合に、それらの適用部位が複雑な形状であっても腹膜中皮細胞が障害腹膜等に生着・増殖し、腹膜再生が可能であるため、従来不可能であった部位での腹膜保護作用、即ち腹膜癒着形成防止、腹膜硬化防止、腹膜再生などの機能が発揮される。

[0015] また、本発明の腹膜保護剤や再生医療用材料は、生体由来のものであり、人工的に合成した材料を用いることなく使用することができる点で安全性の高いものである。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]本発明の腹膜中皮細胞の採取方法を示す模式図である。さらに、上皮様形態細胞と線維芽細胞様細胞の形態も示す図である。（実施例１）

[図2]本発明の腹膜中皮細胞の採取方法で選別した上皮様形態細胞および比較例としての線維芽細胞様細胞について、光学顕微鏡による形態学的な特徴並びに各種コラーゲンの発現を示す写真図である。（実験例１）

[図3]免疫寛容マウス(nu/nu)を用いた腹膜傷害モデルに対する移植試験における、上皮様形態細胞または線維芽細胞様細胞の投与スケジュールおよび試験ケジュールを示す図である。（実験例２）

[図4]腹膜傷害モデルに、上皮様形態細胞または線維芽細胞様細胞を移植した場合の壁側腹膜の肥厚に及ぼす結果を示す写真図である。（実験例２）

[図5]腹膜傷害モデルに、上皮様形態細胞または線維芽細胞様細胞を移植した場合の臓側腹膜の肥厚に及ぼす結果を示す写真である。（実験例２）

[図6]腹膜傷害モデルに、上皮様形態細胞または線維芽細胞様細胞を移植した場合の壁側および臓側腹膜での癒着部位数並びに腹膜肥厚に及ぼす結果を示す図である。（実験例２）

[図7]腹膜傷害モデルに、上皮様形態細胞または線維芽細胞様細胞を移植した場合の腹膜でのタイプＩコラーゲンまたはフィブロネクチンの発現結果を示す写真図である。（実験例３）

[図8]腹膜傷害モデルに、上皮様形態細胞または線維芽細胞様細胞を移植した

場合の移植細胞での肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）および血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）の発現結果を示す図である。（実験例４）

[図9]腹膜傷害モデルに、上皮様形態細胞または線維芽細胞様細胞を移植した場合の壁側および臓側腹膜でのＨＧＦの発現結果を示す図である。（実験例５）

[図10]腹膜傷害モデルに、上皮様形態細胞または線維芽細胞様細胞を移植した場合の壁側および臓側腹膜でのＶＥＧＦの発現結果を示す図である。（実験例５）

発明を実施するための形態

[0017] 本発明は、腹膜透析排液から回収した腹膜中皮細胞を有効成分として含む、腹膜保護剤に関する。また、腹膜透析排液から回収した腹膜中皮細胞が、上皮様形態細胞であり、当該上皮様形態細胞は、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）を発現してなる。本発明において、腹膜保護は、腹膜癒着形成、腹膜肥厚および／または腹膜損傷を含む腹膜の障害に有効に作用する概念で用いられ、本発明の腹膜保護剤は、腹膜癒着形成、腹膜肥厚および／または腹膜損傷に対して、予防的および／または治療的に用いることができる。

[0018] 本発明の腹膜保護剤は、採取した腹膜透析排液から細胞を回収し、さらに上皮様形態細胞を選別する工程を含む方法により調製することができる。前記上皮様形態細胞の選別は、腹膜透析排液から回収された細胞を培養し、形態学的に上皮様形態細胞と認められる細胞を選別することによる。または、前記上皮様形態細胞の選別は、腹膜透析排液から回収された細胞について、上皮様形態細胞に特異的に発現されるマーカーを指標として選別することによる。ここで、上皮様形態細胞に特異的に発現されるマーカーとしては、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）が挙げられる。

[0019] 本発明の腹膜中皮細胞の採取方法は、採取した腹膜透析排液に含まれる細胞を収集し、上皮様形態細胞を選別する工程を含む。

[0020] 腹膜透析とは腹膜を透析膜として行う人工透析の一種であり、殺菌した透析液を腹腔内に注入し、体内の老廃物を腹膜を介して除去することにより行

われる。実際には、腹腔内に挿入されたカテーテルから透析液（灌流液）を注入し、数時間後にバッグなどに排液を回収することにより行われる。本発明の腹膜透析排液は、前述のように腹膜透析後にバッグなどに回収される排液をいう。回収する排液は、腹膜透析後の排液であればよく、特に限定されないが、例えば連続携行式腹膜透析（Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis:ＣＡＰＤ）や 自動腹膜透析（Automated Peritoneal Dialysis:ＡＰＤ）により回収される排液が挙げられる。

[0021] 腹膜透析排液には、血液等を含む体液からの老廃物、例えば体液中の過剰の水分、タンパク質の代謝の結果生じた窒素含有老廃物等のほか、腹膜透析液の刺激などにより生体から脱落した細胞、特に腹膜上を覆う一層の腹膜中皮細胞（peritoneal mosothelial cells:ＰＭＣ）が含まれる。腹膜透析排液中の腹膜中皮細胞は、上皮細胞（epithelial cells）と線維芽細胞（fibroblast cells）などに分類される。ここで上皮細胞とは、動物の組織や体の表面で上皮を形成する細胞で、二次元的な層状構造をとり、細胞間は密着結合によって内容物を保ったり外部と遮蔽する機能を有する。一方、線維芽細胞とは、結合組織を構成する細胞の１種である。線維芽細胞は、ＩＩＩ型、ＩＶ型コラーゲンなどの線維性物質を産生するといわれている。本発明で回収される腹膜中皮細胞は、前記細胞のうち上皮細胞が好適である。本発明において、腹膜中皮細胞は、腹膜癒着、腹膜肥厚あるいは腹膜損傷を改善するために用いることを目的とするため、上記コラーゲンなどの線維性物質を産生する線維芽細胞様細胞を排除し、上皮様形態細胞を選別することが重要である。

[0022] 本発明において、腹膜透析排液からの細胞の取得方法は、特に限定されないが、例えば腹膜透析排液を遠心分離し、沈殿物を取得することに達成される。腹膜透析排液から遠心分離等により細胞を採取するまでの工程では、細胞が凍結しない条件で可能な限り低温、かつ迅速に処理することが好ましく、例えば１～４℃で、１０時間以内、好ましくは６時間以内、より好ましくは４時間以内に処理するのが好適である。

[0023] 本発明において、上皮様形態細胞は、目視的または上皮様形態細胞に特異的に発現されるマーカーを指標として選別することができる。上記選別工程の前に、取得した細胞を培養液中で培養する工程を含んでもよい。培養する場合は、取得した細胞を、ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地に１０％ＦＣＳのほか、デキサメタゾン、ニコチナマイド、ＨＧＦ（hepatocyte growth factor）やｂ－ＦＧＦ（basic fibroblast growth factor）を添加した培養液などに、９６ウェル フィブロネクチンコート培養皿に細胞数１～１００個／ウェル程度になるように懸濁したものを、細胞培養用容器に加え、３７℃で一か月程度培養することができる。添加するデキサメタゾンの濃度は１～１００ｎＭ、好ましくは２０～７５ｎＭ、より好ましくは６２．５ｎＭとすることができ、ニコチナマイドの濃度は１～５ｍＭ、好ましくは２．５ｍＭとすることができ、ＨＧＦの濃度は１～３０ｎｇ／ｍｌ、好ましくは１～１０ｎｇ／ｍｌ、より好ましくは６．２５ｎｇ／ｍｌとすることができ、ｂ－ＦＧＦの濃度は１～３０ｎｇ／ｍｌ、好ましくは１～１０ｎｇ／ｍｌ、より好ましくは６．２５ｎｇ／ｍｌとすることができる。具体的な培養液としては、例えばＫＳ培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２＋１０％ＦＣＳ＋ＩＴＳ（ＧＩＢＣＯ® ＩＴＳ－Ｘ：インスリン５μｇ／ｍｌ、トランスフェリン２．７５μｇ／ｍｌ、亜セレン酸ナトリウム３．３５ｎｇ／ｍｌ）＋デキサメタゾン（６２．５ｎＭ）＋ニコチナマイド（２．５ｍＭ）＋ＨＧＦ（６．２５ｎｇ／ｍ）＋ｂ－ＦＧＦ（６．２５ｎｇ／ｍｌ））を用いて培養することができる。培養可能であれば、上記の培養方法に限定されることはない。

[0024] 上皮様形態細胞を目視的に選別する方法としては、細胞の形状を観察し、いわゆる当業者が選別する方法で選別することができる。具体的には、上記培養により得られたコロニーを低密度培養または限界希釈法にて培養し、培養細胞から敷石状の細胞を選別することで、上皮様形態細胞を選別することができる。上皮様形態細胞または線維芽様細胞の形態については、図１を参照されたい。また、上皮様形態細胞に特異的に発現されるマーカーを指標として選別する場合、そのようなマーカーとしては、例えば肝細胞増殖因子（

ＨＧＦ）、サイトケラチン、Ｅ－カドヘリンを挙げることができ、より好ましくはＨＧＦが挙げられる。マーカーを指標とする細胞の選別は、フローサイトメーターを用いたＦＡＣＳ解析などにより行うことができる。

[0025] 本発明の採取方法により得られた腹膜中皮細胞は、細胞が凍結しない条件、例えば１～４℃で、１０時間以内、好ましくは６時間以内、より好ましくは４時間程度保存することができる。また、細胞株の凍結保存用培地を用いて－８０℃以下で凍結保存することもできる。

[0026] 本発明の採取方法により得られた腹膜中皮細胞は、腹膜癒着形成、腹膜肥厚、腹膜損傷などに対して有効に作用する。例えば腹腔内臓器手術による腹膜癒着形成、消化管炎症や腹膜炎等による腹膜癒着形成、さらに腹膜透析による腹膜中皮細胞の脱落等による腹膜癒着形成などに対して、予防効果または治療効果が期待できる。また、腹膜炎や腹膜透析などの腹膜透析液の刺激等による腹膜肥厚に対しても予防効果または治療効果が期待できる。例えば、腹膜透析患者に多く見られる合併症のひとつに、腹膜癒着や被嚢性腹膜硬化症（ＥＰＳ）が挙げられるが、これらは上皮様細胞である腹膜中皮細胞の脱落や、中皮細胞から上皮間葉系細胞へと移行する上皮間葉移行（epithelial-mesenchymal transition:ＥＭＴ）などが原因と考えられる。このような場合にも、本発明の腹膜中皮細胞は、脱落した腹膜中皮細胞を補い、上皮間葉移行を抑制することができる。さらには、腹膜中皮細胞は、損傷した腹膜を再生可能である他、前駆細胞の再生能のみからでは説明できない顕著な自己再生能力を有していることが報告されていることからも（非特許文献３）、中皮細胞は再生医療に用いられる有望な選択肢になる可能性があると考えられる。

[0027] 本発明は、上記採取方法により得られた腹膜中皮細胞を含む腹膜保護剤、および当該腹膜保護剤を含む再生医療用材料にも及ぶ。本発明の腹膜保護剤は、例えばＫＳ培地を含む凍結保存用培地を用いて－８０℃以下で凍結保存することができる。本発明の採取方法で得られた腹膜中皮細胞を凍結保存することにより、免疫タイプに応じたセルバンクを構築し、腹膜保護剤や腹膜

の再生医療用材料として提供することもできる。上記採取方法得られた細胞、あるいは上記採取方法で得られ、凍結保存されたのち、通常の方法で融解処理された細胞は、生理食塩水、ＰＢＳやハンクス緩衝液などの細胞移植に使用可能な溶液に懸濁して細胞製剤とすることができる。細胞製剤に含まれる細胞は、１ｍｌあたり少なくとも１０個の腹膜中皮細胞を含むことが必要とされる。また、多くとも１×１０^{20}個／ｍｌの細胞数とすることができ、好適には１０～１×１０^{7}個／ｍｌの細胞数で使用することができる。

[0028] 腹膜中皮細胞を含む腹膜保護剤、または当該腹膜保護剤を含む再生医療用材料は、腹膜癒着や腹膜炎や腹膜肥厚などの腹膜損傷が危惧される部位や、あるいは既に癒着または腹膜損傷をきたしている部位に、予防的・治療的に用いることができる。拒絶反応を抑制する観点から、腹膜保護剤に用いる腹膜中皮細胞は自己由来であるのが最も好適であるが、骨髄移植の場合と同様に免疫タイプがよく近似している個体由来のものも使用することができる。自己以外の腹膜中皮細胞を適用する場合は、必要に応じて免疫抑制剤などを適宜併用してもよい。また、本発明の腹膜中皮細胞を含む腹膜保護剤または当該腹膜保護剤を含む再生医療用材料は、腹膜癒着、腹膜肥厚、腹膜損傷等の各症状に対する自体公知の処理方法、例えば腹膜硬化部切除術などと併用することができる。

実施例

[0029] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記の実施例の範囲に限定されることはない。

[0030] （実施例１）腹膜中皮細胞の採取方法

腹膜透析患者にインフォームドコンセントを行い、腹膜透析排液１０ｍｌを採取し、１５００ｒｐｍ×５分間遠心分離を行った。沈殿に分離された細胞をＫＳ培地に懸濁し、ＫＳ培地およびフィブロネクチンコートした培養皿に播種した。３７℃で４～７日培養後、得られた細胞をさらに培養液を用いて希釈し、限外希釈法にて３７℃で７日間培養した。得られた細胞のうち、敷石状の上皮様形態細胞を選別した。比較例として、線維芽細胞様細胞も選

別した（図１参照）。

[0031] （実験例１）採取した腹膜中皮細胞の性状分析

実施例１の方法により得られた各細胞を光学顕微鏡により観察した。さらに各細胞に発現したサイトケラチン(Santa Cruz社：pan-cytokeratin抗体)、タイプＩコラーゲン（Chemicon社）、ならびにビメンチン（Sigma社）、タイプＩＶコラーゲン（Chemicon社）を蛍光染色し、観察した。上皮の性格を示す細胞はサイトケラチンの骨格タンパクが多く、線維芽細胞の性格を示す細胞はビメンチンの骨格タンパクが多く、その骨格タンパクの違いでも上皮系、線維芽系細胞がわかる。一般に、線維化に関与する細胞は線維芽細胞でと考えられている。サイトケラチン（緑）、タイプＩコラーゲン（赤）、ならびにビメンチン（緑）、タイプＩＶコラーゲン（赤）の蛍光染色はKEYENCE社のオールインワン蛍光顕微鏡（BZ-8000)を用いて観察した。上記の結果、線維芽細胞様細胞には硬化進展に関与するタイプＩコラーゲンおよびタイプＩＶコラーゲンの発現が観察されたのに対し、上皮様形態細胞ではコラーゲンの発現は認められなかった（図２）。

[0032] （実験例２）腹膜硬化に対する腹膜中皮細胞の作用

免疫寛容マウス(nu/nu)雌を開腹手術し、腹膜（壁側）および腸管腹膜（臓側）をガーゼにて各５０回擦り、計１００回擦過することで腹膜障害を形成させ、腹膜障害モデルを構築した対照マウスは、免疫寛容マウス(nu/nu)雌を開腹手術のみ行ったシャムオペ群（sham-ope群）とした。各マウスに、実施例１の方法で調製した各細胞をVybrant® 細胞染色溶液(Molecular probe社)を使用し、DiO™色素（緑色蛍光）(Molecular probe社）をとりこませ、移植後でも追跡できるよう蛍光ラベルを行った。その細胞を各々ＰＢＳに懸濁したもの（細胞数１×１０^{7}個／ｍｌ）１ｍｌを、図３に示す投与スケジュールで腹腔内投与により移植した。第１回の細胞移植後１４日目にマウスを屠殺し、腹膜に及ぼす形態的作用を観察した。

[0033] 上記の結果、上皮様形態細胞を移植した群（ｎ＝３）では、シャムオペ群（ｎ＝３）と同様に、腹膜（壁側）および腸管腹膜（臓側）での腹膜癒着お

よび肥厚化は認められなかったが、線維芽細胞様細胞を移植した群（ｎ＝４）では、腹膜障害を起こした部位で腹膜癒着が認められた（図４、図５）。各腹膜（壁側、臓側）について、上皮様形態細胞または線維芽細胞様細胞を移植した群における腹膜癒着部位の数および腹膜の厚さを測定した結果を図６に示した。この結果からも、上皮様形態細胞を移植した群では、シャムオペ群と同様に、腹膜癒着および肥厚化が抑えられていることが観察された。

[0034] （実験例３）各細胞移植後の腹膜組織の性状

実験例２の方法で、腹膜障害モデルに上皮様形態細胞または線維芽細胞様細胞を移植した後の各腹膜組織について、核内増殖抗原（ＰＣＮＡ）(Pharmingen社）、タイプＩコラーゲン(Chemicon社）、フィブロネクチン（Chemicon社）の発現を蛍光染色により観察した。

上記の結果、腹膜障害群で、タイプＩコラーゲンの発現が最も多く認められ、線維芽細胞様細胞を移植した群でもやや多く発現していることが観察されたのに対し、上皮様形態細胞を移植した群では、シャムオペ群と同様に、タイプＩコラーゲンの発現が抑制されていた（図７）。DiO™色素では３娘細胞分裂まで認識できるが、それ以上の分裂時には薄くなり蛍光認識できなくなる。本色素を認識した細胞が分裂が激しい場合は、DIO™色素と分裂マーカーであるＰＣＮＡが両陽性になる。細胞移植群において、上皮形態細胞も線維芽形態細胞もDiO™色素陽性であり、それらが腹膜に生着し、それらの細胞の一部がＰＣＮＡも陽性となったため、生着細胞が分裂増殖し、移植効果が発揮されていることがわかる。

[0035] （実験例４）各細胞移植後の細胞の性状

実施例１の方法により得られた各細胞について、ＨＧＦおよび血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）の発現を蛍光染色により観察した。

上記の結果、上皮様形態細胞からＨＧＦの発現が観察され、ＶＥＧＦの発現は軽度であった。一方。線維芽細胞様細胞では、ＨＧＦの発現は殆ど認められず、ＶＥＧＦは高度に発現していることが確認された（図８）。

[0036] （実験例５）各細胞移植後の腹膜組織中の細胞の性状

実験例２の方法で上皮様形態細胞または線維芽細胞様細胞を移植した後の各腹膜組織について、ＨＧＦおよびＶＥＧＦの発現を蛍光染色により観察した。

上記の結果、移植後の上皮様形態細胞からＨＧＦの発現が観察されたが、線維芽細胞様細胞からのＨＧＦの発現は殆ど認められなかった（図９）。一方、上皮様形態細胞からのＶＥＧＦの発現は軽度であったが、線維芽細胞様細胞からＶＥＧＦが高度に発現していることが確認された（図１０）。

[0037] 実験例３～５の結果より、上皮様形態細胞の移植により上皮様形態細胞が障害部位に接着・増殖して障害腹膜上を覆い、再生因子であるＨＧＦを発現し、腹膜癒着・硬化を防止すると考えられた。一方、線維芽細胞様細胞の移植では、線維芽細胞様細胞が障害部位に接着・増殖し、タイプＩコラーゲンを産生し、腹膜癒着・硬化を促進し、かつ血管透過因子であるＶＥＧＦを発現することにより、炎症反応を助長することとなると考えられた。

産業上の利用可能性

[0038] 以上詳述したように、本発明の腹膜中皮細胞の採取方法により、十分量の腹膜中皮細胞を簡便に採取することができる。採取された腹膜中皮細胞は、腹膜癒着形成、腹膜肥厚、腹膜損傷など対して有効に作用し、これらの防止剤や治療剤などの腹膜保護剤として使用することができ、さらには損傷を受けた腹膜の再生医療用材料となりうる。本発明の採取方法により得られる腹膜中皮細胞は、腹膜透析排液から回収されるものであり、非侵襲的に回収することができ、患者等の負担が軽いものである。また、腹膜透析排液は、従来は廃棄処理していたものであるので、資源の有効活用ができる。

[0039] 腹膜保護剤や再生医療用材料として利用する場合、適用部位が複雑な形状であっても、腹膜中皮細胞が障害腹膜等に生着・増殖し、腹膜再生が可能であるため、従来不可能であった部位での腹膜癒着形成防止、腹膜肥厚防止、腹膜再生機能などが発揮される。

[0040] また、本発明の採取方法により得られる腹膜中皮細胞は生体由来のものであり、該腹膜中皮細胞を含む腹膜保護剤、または当該腹膜保護剤を含む再生

医療用材料は、人工的に合成した材料を用いることなく使用することができる点で安全性の高いものである。

[0041] 拒絶反応を抑制する観点から、適用される腹膜中皮細胞は自己由来であるのが最も好適であるが、骨髄移植の場合と同様に免疫タイプがよく近似している個体由来のものも使用することができる。本発明の採取方法で得られた腹膜中皮細胞を凍結保存することにより、免疫タイプに応じたセルバンクを構築し、腹膜保護剤としての医薬組成物や腹膜保護剤を含む再生医療用材料として提供することもできる。

請求の範囲

[請求項1] 腹膜透析排液から回収した腹膜中皮細胞を有効成分として含む、腹膜保護剤。

[請求項2] 腹膜透析排液から回収した腹膜中皮細胞を１ｍｌあたり少なくとも１０個含む、請求項１に記載の腹膜保護剤。

[請求項3] 腹膜透析排液から回収した腹膜中皮細胞が、上皮様形態細胞である請求項１または２に記載の腹膜保護剤。

[請求項4] 上皮様形態細胞が、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）を発現してなる請求項３に記載の腹膜保護剤。

[請求項5] 腹膜保護が、腹膜癒着形成、腹膜肥厚および／または腹膜損傷に対する保護である、請求項１～４のいずれか１に記載の腹膜保護剤。

[請求項6] 採取した腹膜透析排液から細胞を回収し、さらに上皮様形態細胞を選別する工程を含む請求項１～５のいずれか１に記載の腹膜保護剤の調製方法。

[請求項7] 前記上皮様形態細胞の選別が、腹膜透析排液から回収された細胞を培養し、形態学的に上皮様形態細胞と認められる細胞を選別することによる請求項６に記載の腹膜保護剤の調製方法。

[請求項8] 前記上皮様形態細胞の選別が、腹膜透析排液から回収された細胞について、上皮様形態細胞に特異的に発現されるマーカーを指標として選別することによる請求項６に腹膜保護剤の調製方法。

[請求項9] 上皮様形態細胞に特異的に発現されるマーカーが肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）である請求項８に腹膜保護剤の調製方法。

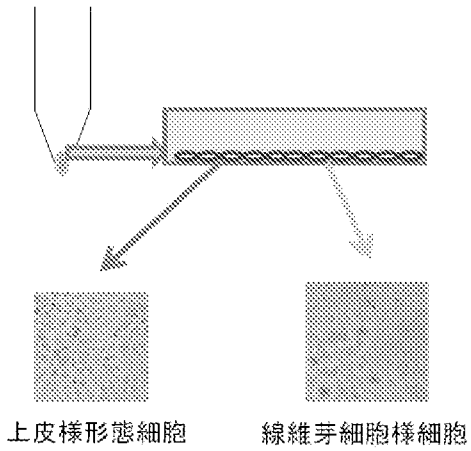
[請求項10] 採取した腹膜透析排液から細胞を回収し、さらに上皮様形態細胞を選別する工程を含む腹膜中皮細胞の採取方法。

[請求項11] 請求項１０の方法により採取された腹膜中皮細胞。

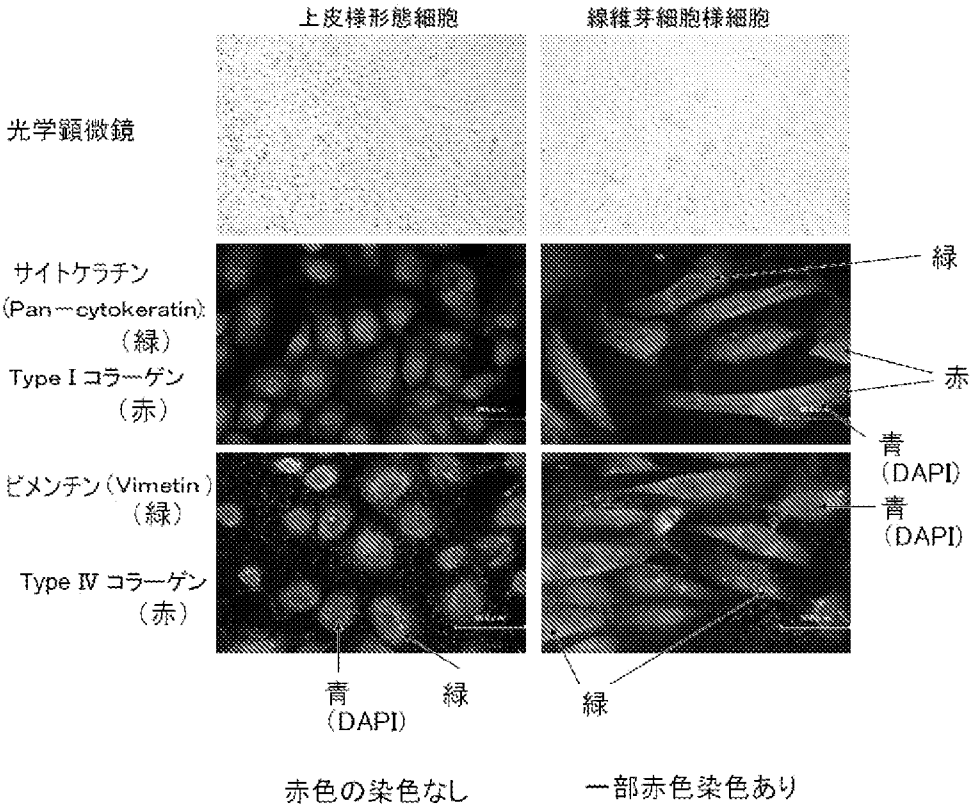
[請求項12] 請求項１１に記載の腹膜中皮細胞を含む腹膜保護剤。

[請求項13] 請求項１～５および請求項１２のいずれか１に記載の腹膜保護剤を含む再生医療用材料。

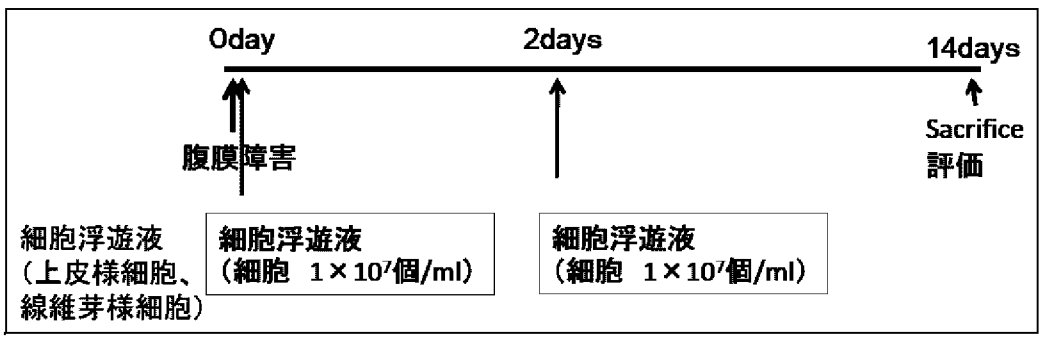
[図1]


上皮様形態細胞
線維芽細胞様細胞

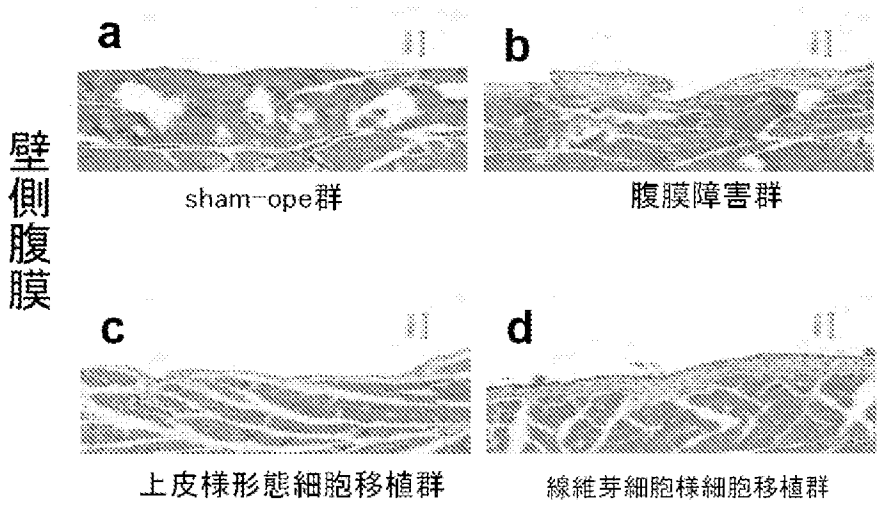
[図2]


上皮様形態細胞
線維芽細胞様細胞
光学顕微鏡
サイトケラチン
(Pan－cytokeratin)
（緑）
Type Ⅰコラーゲン
（赤）
ビメンチン（Vimetin）
（緑）
Type Ⅳ コラーゲン
（赤）
緑
赤
青
(DAPI)
青
(DAPI)
青
(DAPI)
緑
緑
赤色の染色なし
一部赤色染色あり

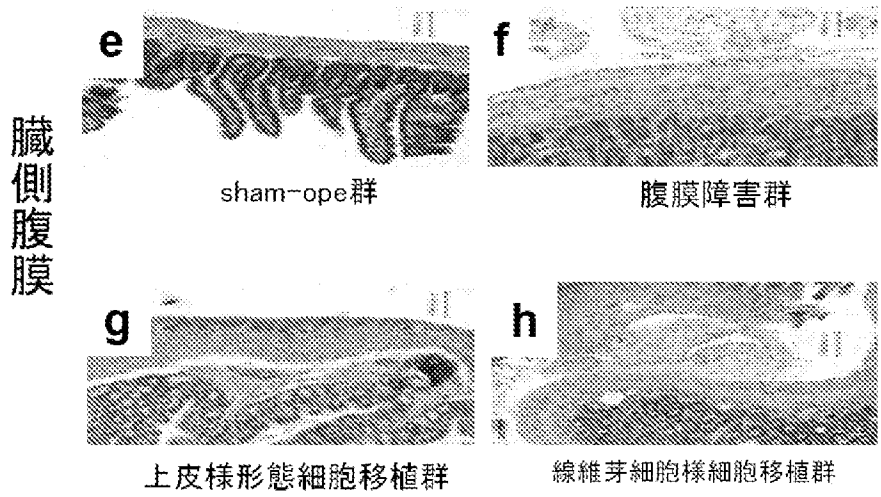
[図3]


0day
2days
14days
腹膜障害
Sacrifice
評価
細胞浮遊液
（上皮様細胞、
線維芽様細胞）
細胞浮遊液
（細胞 1×10⁷個/ml）
細胞浮遊液
（細胞 1×10⁷個/ml）

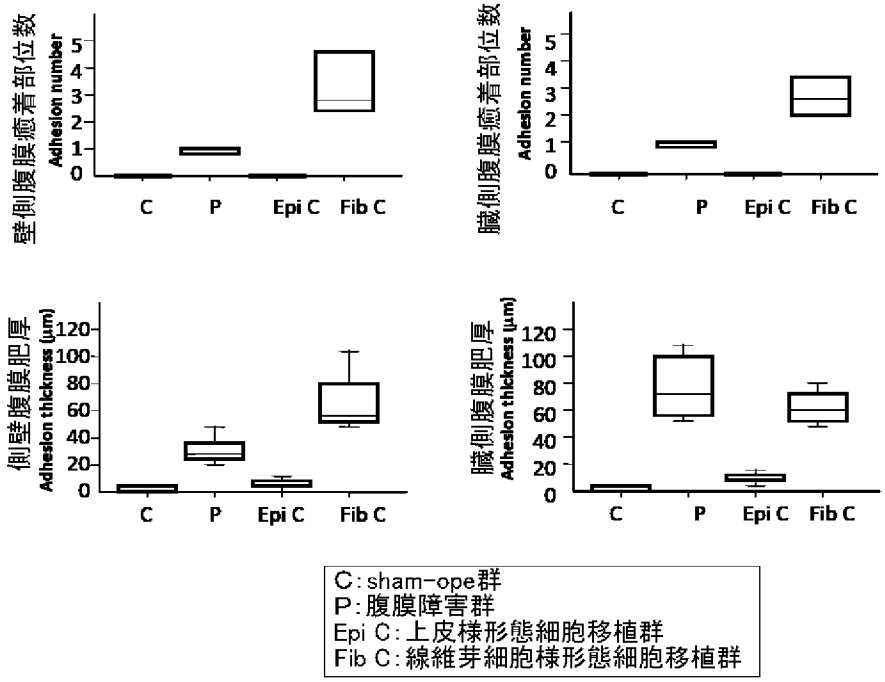
[図4]


壁側腹膜
a
b
sham-ope群
腹膜障害群
c
d
上皮様形態細胞移植群
線維芽細胞様細胞移植群

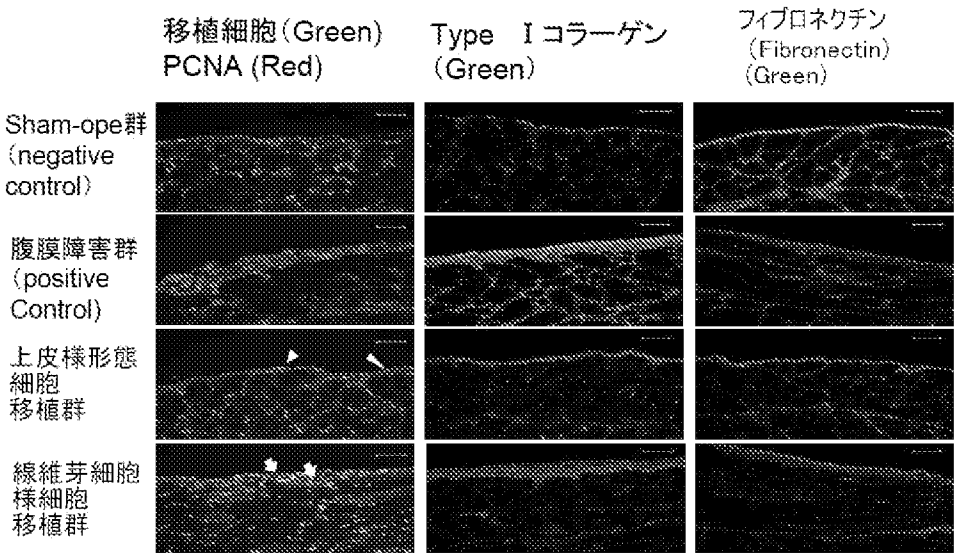
[図5]


臓側腹膜
e
f
sham-ope群
腹膜障害群
g
h
上皮様形態細胞移植群
線維芽細胞様細胞移植群

[図6]

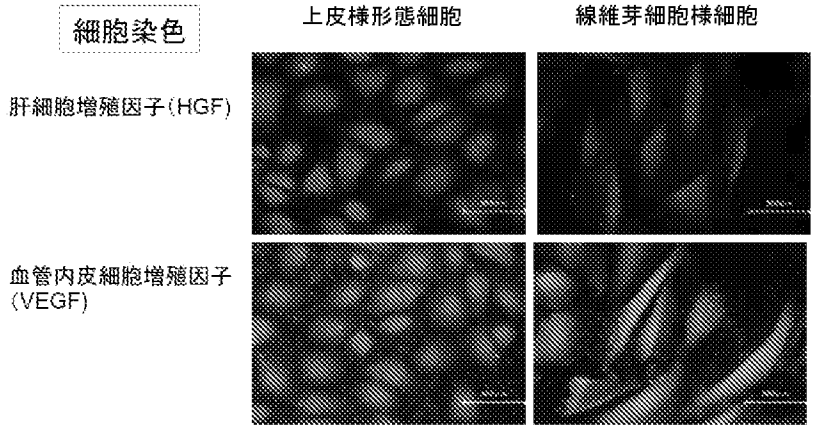

壁側腹膜癒着部位数
Adhesion number
臓側腹膜癒着部位数
Adhesion number
側壁腹膜肥厚
Adhesion thickness (μm)
臓側腹膜肥厚
Adhesion thickness (μm)
C
P
Epi C
Fib C
C:sham-ope群
P:腹膜障害群
Epi C:上皮様形態細胞移植群
Fib C:線維芽細胞様形態細胞移植群

[図7]

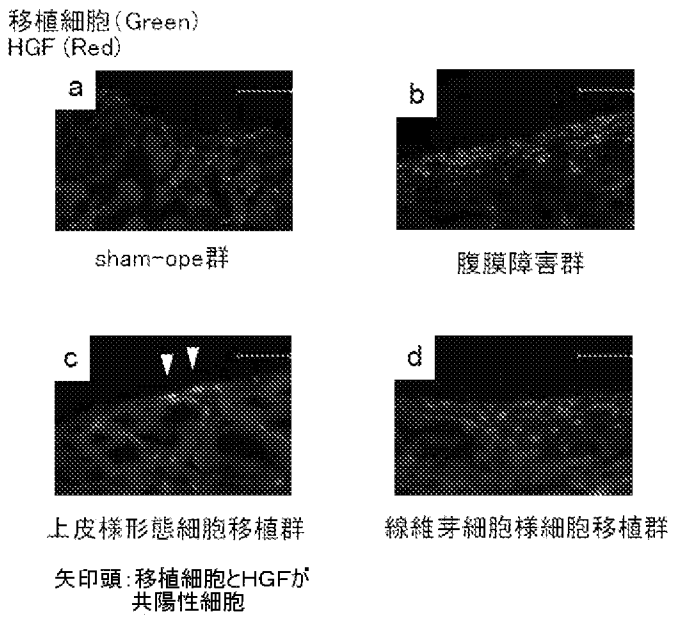


(矢印頭・矢印:移植細胞・PCNA共陽性細胞) Bule :DAPI染色

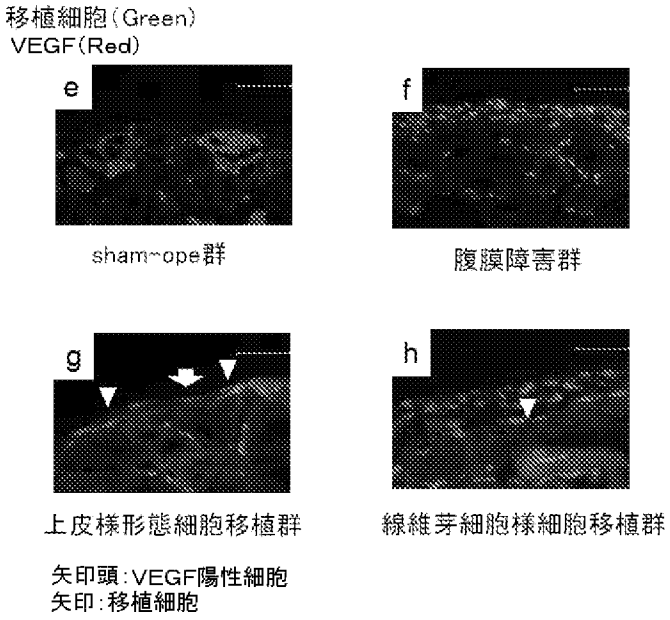
[図8]



[図9]



[図10]


移植細胞(Green)
VEGF(Red)
e
f
sham~ope群
腹膜障害群
g
h
上皮様形態細胞移植群
線維芽細胞様細胞移植群
矢印頭:VEGF陽性細胞
矢印:移植細胞

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/002865

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/071(2010.01)i, *A61K35/12*(2006.01)i, *A61L27/00*(2006.01)i, *A61P41/00*(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N5/071, A61K35/12, A61L27/00, A61P41/00

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/SCISEARCH/CONFSCI/DISSABS/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII), Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HEKKING L H P and van den BORN J, Feasibility of mesothelial transplantation during experimental peritoneal dialysis and peritonitis., Int. J. Artif. Organs, 2007, vol. 30, p. 513-519	1-13
X/Y	YANEZ-MO M et al., Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells., New Engl. J. Med., 2003, vol. 348, p. 403-413	10,11/1-13
Y	Di PAOLO N et al., Implant of autologous mesothelial cells in animals and a peritoneal dialysis patient., Int. J. Artif. Organs, 1989, vol. 12, p. 485-501	1-13

☒ 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	Date of mailing of the international search report
28 May, 2010 (28.05.10)	08 June, 2010 (08.06.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/002865

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BERTRAM P et al., Intraperitoneal transplantation of isologous mesothelial cells for prevention of adhesions., Eur. J. Surg., 1999, vol. 165, p. 705-709	1-13
A	RAMPINO T et al., Hepatocyte growth factor/ scatter factor released during peritonitis is active on mesothelial cells., Am. J. Pathol., 2001, vol. 159, p. 1275-1285	1-13
A	FOLEY-COMER A J et al., Evidence for incorporation of free-floating mesothelial cells as a mechanism of serosal healing., J. Cell Sci., 2002, vol. 115, p. 1383-1389	1-13
A	MUTSAERS S and Di PAOLO N, Future directions in mesothelial transplantation research., Int. J. Artif. Organs, 2007, vol. 30, p. 557-561	1-13
A	Di PAOLO N et al., State of the art on autologous mesothelial transplant in animals and humans., Int. J. Artif. Organs, 2007, vol. 30, p. 456-476	1-13
P,X	Shinji KITAMURA et al., "Fukumaku Toseki Haieki kara Saishu shita Hito Fukumaku Chuhi Saibo o Shiyo shita Fukumaku Shogai eno Saibo Ryoho no Kokoromi", Journal of Japanese Society for Dialysis Therapy, 08 May 2009 (08.05.2009), vol.42, suppl.1, page 485 (Abstract O-0497)	1-13
P,X	Hitoshi SUGIYAMA, Shinji KITAMURA, "Fukumaku Shogai ni Taisuru Saisei Chiryo", Therapeutics & Engineering, 02 April 2010 (02.04.2010), vol.22, suppl., page 71 (Abstract S6-4)	1-13

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／００２８６５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/071(2010.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P41/00(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/071, A61K35/12, A61L27/00, A61P41/00

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

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）

CA/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/SCISEARCH/CONFSCI/DISSABS/WPIDS(STN),
JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII), 医学・薬学予稿集全文データベース

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	HEKKING L H P and van den BORN J, Feasibility of mesothelial transplantation during experimental peritoneal dialysis and peritonitis., Int. J. Artif. Organs, 2007, vol. 30, p. 513-519	1-13
X／Y	YANEZ-MO M et al., Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells., New Engl. J. Med., 2003, vol. 348, p. 403-413	10, 11/1-13

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２８．０５．２０１０	０８．０６．２０１０

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　３５３７
中村　正展
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Ｙ	Di PAOLO N et al., Implant of autologous mesothelial cells in animals and a peritoneal dialysis patient., Int. J. Artif. Organs, 1989, vol. 12, p. 485-501	1-13
Ｙ	BERTRAM P et al., Intraperitoneal transplantation of isologous mesothelial cells for prevention of adhesions., Eur. J. Surg., 1999, vol. 165, p. 705-709	1-13
Ａ	RAMPINO T et al., Hepatocyte growth factor/scatter factor released during peritonitis is active on mesothelial cells., Am. J. Pathol., 2001, vol. 159, p. 1275-1285	1-13
Ａ	FOLEY-COMER A J et al., Evidence for incorporation of free-floating mesothelial cells as a mechanism of serosal healing., J. Cell Sci., 2002, vol. 115, p. 1383-1389	1-13
Ａ	MUTSAERS S and Di PAOLO N, Future directions in mesothelial transplantation research., Int. J. Artif. Organs, 2007, vol. 30, p. 557-561	1-13
Ａ	Di PAOLO N et al., State of the art on autologous mesothelial transplant in animals and humans., Int. J. Artif. Organs, 2007, vol. 30, p. 456-476	1-13
ＰＸ	喜多村　真治、他, 腹膜透析排液から採取したヒト腹膜中皮細胞を使用した腹膜障害への細胞療法の試み, 日本透析医学会雑誌, 2009.05.08, vol. 42, suppl. 1, p. 485 (Abstract O-0497)	1-13
ＰＸ	杉山　斉、喜多村　真治, 腹膜障害に対する再生治療, 医工学治療, 2010.04.02, vol. 22, suppl., p. 71 (Abstract S6-4)	1-13