

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年5月26日 (26.05.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/047496 A1

(51) 国際特許分類: C12N 5/08, A61L 27/38
 (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/017227
 (22) 国際出願日: 2004年11月12日 (12.11.2004)
 (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 2003-385677
 2003年11月14日 (14.11.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田2丁目15番45号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 須藤 亮 (SUDO,

Ryo) [JP/JP]; 〒2238522 神奈川県横浜市港北区日吉3丁目14番1号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 谷下一夫 (TANISHITA, Kazuo) [JP/JP]; 〒2238522 神奈川県横浜市港北区日吉3丁目14番1号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 池田満里子 (IKEDA, Mariko) [JP/JP]; 〒2238522 神奈川県横浜市港北区日吉3丁目14番1号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 三高俊広 (MITAKA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目 札幌医科大学医学部附属がん研究所内 Hokkaido (JP).

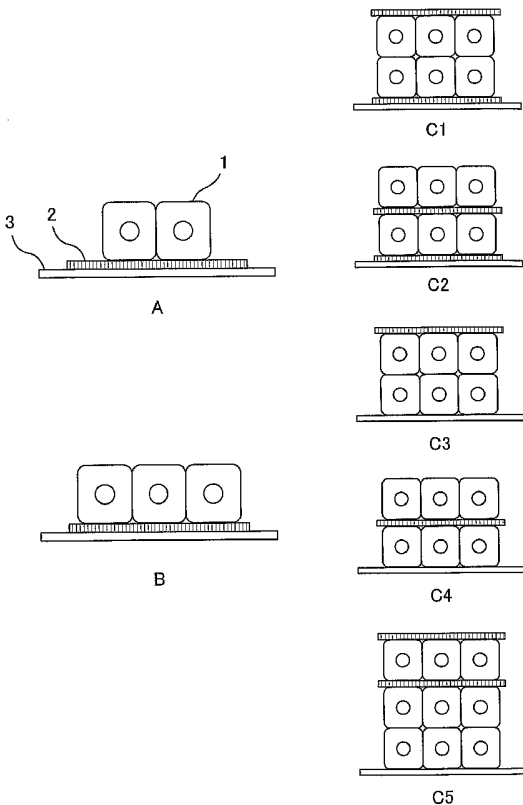
(74) 代理人: 一色国際特許業務法人 (ISSHIKI & CO.); 〒1050004 東京都港区新橋2丁目12番7号 労金新橋ビル Tokyo (JP).

(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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

[続葉有]

(54) Title: CELL CULTURE METHOD, THREE-DIMENSIONAL CELL CULTURE METHOD, THREE-DIMENSIONAL TISSUE, ARTIFICIAL ORGAN AND TISSUE TRANSPLANTATION METHOD

(54) 発明の名称: 細胞培養法、細胞の三次元培養法、三次元組織、人工臓器、及び組織移植方法



(57) Abstract: Cells having been flat-cultured on a permeable sheet are layered, together with the permeable sheet, on other cells having been flat-cultured to thereby form a three-dimensional tissue. This three-dimensional tissue is transplanted into a living body. Alternatively, it is layered in an artificial organ to construct a biological artificial organ module of the layered three-dimensional tissue type. The colony form of these cultured cells can be controlled by using a porous sheet as the permeable sheet and controlling the pore positions so as to appropriately design the form of the artificial organ.

(57) 要約: 透過性シート上で平面培養した培養細胞を前記透過性シートと共に、他の平面培養された培養細胞上に積層することにより三次元組織を形成させる。この三次元組織を生体内に移植する。また、人工臓器装置中に積層することにより、積層型三次元組織バイオ人工臓器モジュールを作製する。また、透過性シートとして多孔性シートを用い、孔の位置を調節することにより、培養細胞のコロニーの形状を調節することができ、人工臓器の形状を設計することができる。

WO 2005/047496 A1



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(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, LS, MW, 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,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

1

明 細 書

細胞培養法、細胞の三次元培養法、三次元組織、人工臓器、及び組織移植方法

5 関連文献とのクロスリファレンス

本願は、2003年11月14日付けで出願した日本国特願2003-385677号に基づく優先権を主張する。この文献を本明細書に援用する。

技術分野

- 10 本発明は、細胞培養法、三次元組織を形成させるための細胞の三次元培養法、培養細胞を用いて形成した三次元組織、人工臓器、及び組織移植方法に関する。

背景技術

- 15 移植治療の分野において、近年、細胞を *in vitro* で培養し、培養条件下で、生体内の組織や臓器を再構築し、人工臓器として患者へ移植する治療法が研究されている。

- 20 組織や臓器のなかでも、特に肝臓は、消化・解毒など複雑多岐な機能を有し、判明しているだけで500種類以上の代謝反応を行う代謝の中心臓器であり、一度肝臓が機能不全に陥ると生命の危機にかかわる。しかし、その機能があまりにも複雑であるため、肝臓の機能を代替するのに、完全に人工的な装置に行わせるのは極めて困難であり、長期的にも生体中の肝細胞を利用する以外に方法が無いと
- 考えられている。現在は、重度の肝不全患者の根本的な治療法は生体肝移植であるが、臓器提供者は数少ないこともあって、肝臓は、培養条件下での組織の再構築や人工肝臓の開発が最も期待されている臓器の1つである。

- 25 現在、人工肝臓としては、*in vitro* で培養した肝細胞を利用したハイブリッド型人工肝臓の開発がさかんに行われている。現在最もよく用いられているのは、中空糸型のリアクターに肝細胞を充填し、半透膜を介して物質交換を行う方法であるが、その他にも、浮遊肝細胞型、積層型、コラーゲンゲルサンドイッチ型、マイクロキャリア付着型、マイクロカプセル封入型など、様々な形態の人工肝臓

2

が開発されている（例えば、松下通明ら、バイオ人工肝臓、組織培養工学、14
(5)、1998年 188-192頁参照）。

そのようなハイブリッド型人工肝臓の構築には、高密度で三次元的に培養され
た肝細胞を必要とする。従来から用いられている単層培養では、肝細胞は数日間
5 のうちに機能が消失し、7日～10日ほどで死に絶え、実用的な人工肝臓は困難
であった。そこで、スフェロイド培養法や温度応答性培養皿を用いた培養などが
開発されてきた。

スフェロイド培養法においては、単離した肝細胞を電気的あるいは高分子など
で処理をした培養皿に播種することにより、部分的に皿底と接着した肝細胞スフ
10 エロイドが生じる。この方法によると、1ヶ月以上に渡り、肝細胞スフェロイド
及び肝細胞からのアルブミン合成が観察されている。

このスフェロイド培養法を応用したハイブリッド型人工肝臓モジュールも開
発されている。生体適合性高分子材料であるポリウレタン発泡体（PUF）孔内で
肝細胞を培養すると、約200個の肝細胞が集合し、直径150 μ m程度の球状組織
15 体（スフェロイド）が自発的に形成される。このことを利用し、円筒形のPUFブ
ロックに液流動用の細管を多数設け、細管間のPUF孔内に大量の肝細胞スフェロ
イドを形成させた人工肝臓モジュールが開発された。

一方、温度応答性培養皿を用いた肝細胞培養では、温度応答性高分子であるポ
リN-イソプロピルアクリルアミド（PIPAAm）を表面グラフトした培養皿が用いら
20 れる。培養温度（37 $^{\circ}$ C）では皿底表面が疎水性となるため、細胞が皿に接着する
のに対し、低温（32 $^{\circ}$ C以下）では皿底表面が高度に親水化するため、細胞が培養
皿表面からその構造と機能を損なうことなく自発的に脱着する。この培養法にお
いて、細胞を密な状態で培養した場合、細胞と細胞外マトリックス（ECM）から
なる細胞層を回収することができ、この単層の細胞層を重層化することにより、
25 肝臓の再構築が試みられている。

しかしながら、現在まで、培養条件で肝臓をはじめとする臓器の組織化に成功
した例は報告がない。

そこで、本発明は、細胞培養法、三次元組織を形成させるための細胞の三次元
培養法、培養細胞を用いて形成した三次元組織、人工臓器、及び組織移植方法を

提供することを目的とする。

発明の開示

肝臓は、再生能力の旺盛な臓器として知られているが、生体外に細胞を分離すると急速に機能を失ってしまう。そこで、発明者らは、小型肝細胞と呼ばれる肝前駆細胞を用いることで、肝細胞の長期培養を可能にした。小型肝細胞をコラーゲンで被覆したポリカーボネート性の多孔性シート上で培養すると、シートに接着し、増殖を続ける。培養30日目の細胞の付着したシートを図1C1～5のように積層させると上下の細胞同士が接着することによって、積層したシート同士が接着した。透過型電子顕微鏡で断面の微細構造を観察したところ、上下の細胞間に毛細胆管様構造の形成していることが明らかとなり、本発明が完成した。

本発明にかかる細胞の三次元培養法は、透過性シート上で平面培養した培養細胞を、その透過性シートと共に、他の平面培養した培養細胞上に積層することにより複数の層から成る三次元組織を形成させることである。ここで、「三次元組織」とは、単なる細胞の立体的集合体ではなく、その集合体中で、細胞同士が相互作用し合って、何らかの機能を有するように結合した細胞の集合体をいう。その機能は、その細胞が由来する元の組織が有する固有の機能であることが好ましいが、それには限らず、多分化能を持つ幹細胞などの場合は、分化することにより新たな機能を獲得しても良い。また、分化転換が起き、元の組織と異なる機能を有するようになって良い。

この培養法において、培養細胞が、実質臓器、上皮組織、筋肉組織のいずれかに由来してもよいが、特に肝臓由来であることが好ましく、小型肝細胞であることが最も好ましい。ここで「実質臓器」とは、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓などの中が詰まった臓器をいう。「上皮組織」とは、体表面、管腔（消化管、呼吸器、泌尿器、生殖器、血管など）、体腔（心膜腔、胸膜腔、腹膜腔）などの表面を覆う組織のことで、狭義の上皮(epithelium)、内皮(endothelium)、中皮(mesothelium)を含み、例えば皮膚、消化管上皮、角膜上皮、血管内皮、胸膜中皮などが挙げられる。「筋肉組織」とは、心筋、平滑筋、骨格筋のいずれかを意味する。なお、実質臓器内の上皮組織(例えば肝臓内の血管内皮)というように、

4

細胞の由来が複数にまたがっていてもよい。

また、本発明にかかる肝臓由来の細胞の三次元培養法によって形成された三次元組織中には、毛細胆管が形成されることが好ましい。

さらに、本発明にかかる三次元組織は、透過性シート上で平面培養した培養細胞を、その透過性シートと共に、他の平面培養した培養細胞上に積層することにより形成される。

この三次元組織を形成するために用いられる培養細胞が、実質臓器、上皮組織、筋肉組織のいずれかに由来してもよいが、特に肝臓由来であることが好ましく、小型肝細胞であることが最も好ましい。

また、この肝臓由来の細胞によって形成された三次元組織内には、毛細胆管が形成されることが好ましい。

さらに、本発明にかかる人工臓器は、前記いずれかの三次元組織を用いて構成される。ここで「人工臓器」とは、人工的に作製された生物体の全ての組織を含み、狭義の臓器に限らず、上皮、筋肉、神経、など組織化して機能する細胞の集合体であれば何でも良い。

さらに、本発明にかかる細胞培養法は、多孔性シート上で培養細胞を平面培養する細胞培養法であって、多孔性シートに開いている孔の位置を調節することにより、培養細胞のコロニーの形状を制御することを特徴とする。

この細胞培養法によって培養した培養細胞を、多孔性シートと共に、他の平面培養した培養細胞上に積層することにより三次元組織を形成させてもよい。

さらに、本発明にかかる組織移植方法は、ヒト以外の脊椎動物において、上記いずれかの三次元組織を生体内に移植する。なお、この組織移植方法は、ヒトにも応用可能である。

25 図面の簡単な説明

図1は、本発明にかかる三次元培養法の一実施の形態において、三次元組織を形成させる方法の概念図である。Aは細胞の播種直後、Bは細胞の増殖後の細胞シート、C1～5は積層の方法を示す。

図2は、本発明にかかる人工臓器の一実施の形態において、(A)積層型三次

5

元組織バイオ人工肝臓モジュールの概念図 (B) Aのモジュールを組み込んだ積層型人工肝臓装置の概念図、である。

図3は、本発明にかかる三次元培養法の一実施例において、形成された三次元組織の断面の透過型電子顕微鏡写真である。(A)の白い矢印はデスマゾーム、
5 (B)の白い矢印は毛細胆管内腔の微絨毛を示す。

図4は、本発明にかかる三次元培養法の一実施例において、形成された三次元組織中の毛細胆管がフルオレセインで染色された写真である。色の薄い部分が蛍光によるシグナルを示す。

図5は、本発明にかかる三次元培養法の一実施例において、培養液中に分泌されるアルブミン量の時間的経過を示すグラフである。
10

図6は、本発明にかかる三次元培養法の一実施例において、孔(円形の黒色部分)の配置に従ってコロニーの形態が制御されていることを示す写真である。

図7は、本発明に係る三次元培養法の一実施例において、形成された三次元組織中の細胞における肝細胞分化マーカーの発現の有無を調べた結果を示す図である。なお、図中の「PH」は、ラットから単離した成熟肝細胞から抽出したRNAを意味し、「S5又はS10」は、三次元組織を形成後、5日目又は10日目に当該三次元組織から抽出したRNAを意味する。
15

図面に用いた主な符号の凡例を以下に示す。

- 1 細胞
- 20 2 透過性シート
- 3 培養皿

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明にかかる細胞培養法、細胞の三次元培養法、その方法を用いて形成した三次元組織、形成された三次元組織を用いて構成した人工臓器、上記三次元組織の組織移植方法について、図を参照しながら詳細に記述する。
25

なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的な実施例など

6

は、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

- 5 本発明にかかる細胞の三次元培養法は、透過性シート上で平面培養した培養細胞（以下、細胞シートと呼び、透過性シートと細胞を含む）を、その透過性シートと共に、他の平面培養した培養細胞上に積層することにより三次元組織を形成させる方法である。図1にその概略を示す。なお、形成させる組織は何でも良いが、積層により三次元再構成ができる実質臓器、一層から数十層の細胞からなる
- 10 上皮組織、繰り返し構造を有する筋肉組織などに適している。細胞の由来は特定の動物種に限定されないが、ヒトへの移植という応用を考慮に入れると、ヒトまたはブタが好ましい。

- まず、生体から組織を単離し、目的の細胞1を解離し、培養皿3上の透過性シート2上にその細胞1を播種する（図1A）。透過性シートの材質としては、ポリカーボネート膜、コラーゲン膜、ポリエステル膜、ポリグリコール酸やポリ乳酸などで作成された生体適合性膜、などを用いることができるが、移植材料という点から、生体吸収性や生分解性という性質を有する生体適合性膜がより好ましい。シートの厚さはなるべく薄い方が好ましいが、100 μ m以下であればよく、20 μ m以下であればさらに好ましく、10 μ m以下であれば最も好ましい。透過性シートの特性は、栄養素などに対し膜自体が十分な透過性を持てばよく、例えば、半透膜でも、透過性膜でも、孔径が0.01~20 μ m程度の孔を持つ多孔性膜でもよい。市販のシートでは、ニュクリポアトラックエッチメンブレン（WHATMAN社）や組織培養用透過性コラーゲン膜MEN-1（高研）などが挙げられるが、使用できるシートはこれらに限らない。また、シートは、コラーゲン
- 25 コートなどのコーティング処理をしてもよい。

培養液中、この透過性シートを敷いた上で、播種した細胞を平面培養する（図1B）。細胞は平面培養できるものであれば何でも良いが、長期培養が可能で、分化能力や増殖能力などの三次元組織形成能力を維持している幹細胞や前駆細胞が好ましい。また、単一細胞ではなく、異なる種類の細胞間で相互作用したり、

7

複数の構造を作ったりできるように、複数の種類の細胞であってもよい。実施例では、小型肝細胞を高濃度に含んだ肝細胞を用いた。

5 適切な期間、透過性シート上で培養することにより、高密度に培養細胞の付着した細胞シートを作製する。透過性シートとして多孔性シートを用い、適当な大きさの孔を適当な間隔で開ける時、細胞のコロニーが孔を足場にして広がること
10 がある。即ち、孔の位置に一致してコロニーの周辺部が配置されることになる。その場合、好ましい形で孔を開けることにより、コロニーの形を規定することができる。このようにして、孔の開け方を調節することにより、三次元組織の形を制御することができ、例えば移植に適した形態に三次元構造を構築することが
15 できるようになる。

以上のようにして作製した細胞シートを用いて、三次元組織を構築する。上皮組織のうちで単層の組織は、この細胞シートの状態で組織化するので、そのまま移植に利用できる。実質臓器など二層以上からなる組織に関しては、細胞シートを他の平面培養した培養細胞に積層することにより、三次元組織を構築できる
15 (図1C1~5)。この積層は、裏返し(図1C1)あるいは表裏そのまま(図1C2)もよく、培養皿側と細胞の接着面にはシートがなくても良い(図1C3、図1C4)。二層だけでなく、三層以上に積層させることもできる(図1C5など)。なお、積層する細胞シートは、同じ細胞種を含む細胞シートどうしてもよく、異なる細胞種を含む細胞シートどうしてもよい。

20 また、培養細胞は、細胞シートの片側ではなく、シートの両側に付着させても良い。例えば、市販の組織培養用透過性コラーゲン膜(MEN-1、高研製)では、この膜に支持体がついているため、水中に浮かせた形で細胞培養が可能であり、従って、膜の両面に細胞を播種することもできる。

細胞シートを積層した後、さらに適当な期間培養を続け、細胞を組織化させる。
25 その結果、細胞間接着が形成され、細胞が分化し、その組織特有の形態形成が起き、機能的な細胞集合体としての組織が構築される。

このようにして組織化された三次元肝組織を、ヒト及びヒト以外の脊椎動物にそのまま移植することができる。移植場所としては、肝臓が好ましいが、肝臓以外の組織、例えば脾臓、皮下、腎臓皮膜下、精巣、腹腔でも構わない。

また、この三次元組織をハイブリッド型人工臓器に利用してもよい。人工臓器の形態は制限されないが、本発明の三次元組織の基本構成は細胞シートであることから、積層型が好ましい。本発明の三次元組織を用いた人工臓器の一例として、図2(A)に、積層型三次元組織バイオ人工肝臓モジュールの概略図を示す。半透膜上、好ましくは生体適合性多孔性膜上に小型肝細胞を培養し、平面培養した後、細胞シートを、細胞の側同士を接着させることによって二段積層させ、三次元組織を形成させる。このような二層から成る組織同士の間隔を空けてモジュールとし、図2(B)に示すように、積層型人工肝臓装置中に積層する。組織間の間隙には血液や血液の血漿成分を灌流させることにより、細胞との物質交換を行うことができ、人工肝臓として機能させることができる。この人工肝臓は、人体外部で機能させてもよく、人体内部に埋め込み型として機能させてもよい。

[実施例]

本発明にかかる三次元組織を形成させるための細胞の三次元培養法に関し、肝臓の組織を例にした実施例を以下に説明する。肝臓は、中を通る門脈から非常に多くの血管が放射状に伸びており、その血管の隙間を埋めるように肝実質細胞が二層になって存在する。従って、肝臓は、本発明を実施する最も典型的な例として適していることがわかる。

==小型肝細胞の単離==

ヒトその他の動物から採取した肝臓組織をコラゲナーゼ等を含む溶液で処理すると肝臓由来の細胞を得ることができる。ここでは、8~12週齢のラットの肝臓から通常のコラゲナーゼ肝灌流法を利用して細胞を分離した。得られた細胞懸濁液は250 μ mおよび80 μ mのメッシュを通して未消化の組織残渣その他の組織破砕片等を除去した。この細胞懸濁液を50xgで1分間遠心することにより、主として実質細胞を含む重い画分と、星細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞等の非実質細胞を主として含む比較的軽い細胞を含む軽い上清画分とに分画した。小型肝細胞はこの時の上清画分に含まれる。上清画分を、50xgで5分間遠心し、沈殿を培地に懸濁し、更に50xgで5分間遠心した。再び沈殿を培地に懸濁し、50xgで5分間遠心した。さらに、得られた沈殿を培地に懸濁し、150xgで5分間遠心して、沈殿した細胞を新鮮な培地に懸濁した。細胞

9

懸濁液中の細胞数を数え、その後の培養に必要な細胞密度となるように調製した。

==細胞シートの調製==

単離した小型肝細胞を、コラーゲンコートした多孔性ポリカーボネート膜（商品名：ニュクリポアートラックエッチメンブレン、WHATMAN 社）上で培養する。

- 5 具体的には、 3×10^5 細胞/mlの密度に調製した細胞をラットの尾部由来のコラーゲンで被覆した多孔性ポリカーボネート膜を含む35mmの培養皿に2ml播種した。培養液には、10%牛胎児血清、 $0.1 \mu\text{M}$ デキサメタゾン、 $0.5 \text{mg}/1$ インシュリン、 10mM ニコチンアミド、 1mM アスコルビン酸2リン酸、抗生物質、 $10 \mu\text{g}/1$ 上皮細胞増殖因子（EGF）、その他の細胞培養
- 10 に一般的に使用される添加物を更に含むダルベッコ改変イーグル培地で 37°C にて培養した。培養4日目より1%DMSOを添加した。また、培養液は通常2日に1度の割合で交換した。

==三次元組織の構築==

- 培養30日目に、図1C1に示したように細胞シートを積層させ、さらに数日
- 15 間、同条件で培養した。その後、2.5%グルタルアルデヒド、 0.1M カコジレート緩衝液で細胞を固定し、後固定、脱水処理を行い、樹脂に包埋した後、縦断面の超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡で積層した細胞シートの断面の微細構造を観察したところ、上下の細胞間には細胞接着構造（デスモゾームやタイト結合）が観察され、接着分子によって上下の細胞が結合していることが明らか
- 20 となった（図3A）。また、上下の細胞間に管状構造が形成されており（図3B）、管内に微絨毛が存在することから、これは毛細胆管であると考えられた。

- 肝細胞は、フルオレセインジアセテート（fluorescein diacetate）を投与すると、この物質を細胞質に取り込み、代謝することにより蛍光物質であるフルオレセインにして毛細胆管内に排出するという性質を有する。この性質を利用して、
- 25 本実施例の培養で上下の細胞間に観察された管状構造が毛細胆管であるかどうか調べた。 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で培養液にフルオレセインジアセテートを添加し、20分静置した後、 37°C に温めた培養液で細胞を洗浄し、蛍光観察装置を付けた顕微鏡でフルオレセインの蛍光を観察した。図4に示すように、積層後約3日目から管状構造が蛍光色素で染色されはじめ、この管状構造が毛細胆管で

あることが明らかになった。

次に、この細胞シートの培養開始から積層後にわたって、肝臓細胞の分化マーカーであるアルブミンの分泌量を測定した。培養2、4、10、16、20、26、30、35、39、42、47、67日目においてそれぞれ培養液交換後2
5 4時間経過した培養液を同一の培養皿から採取して冷凍保存した。その後、冷凍保存しておいた試料を解凍し、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法を用いてアルブミン分泌量を測定した。図5に示すように、細胞シートの積層後は、積層により細胞数が2倍になっているのに対し、アルブミン分泌量は4倍になった。このことは、積層処理が細胞分
10 化の1つである反応を加速したことを示す。

以上のように、細胞接着、機能的な形態形成、細胞分化というような多面的変化より、この細胞シートは積層によって組織化したことが明らかになった。

==孔の配置によるコロニーの形態制御==

ポリカーボネート膜で培養した小型肝細胞が形成するコロニーの形状が孔の
15 配置に一致していることを確認するために、培養31日目の細胞を2%グルタルアルデヒドおよび2%オスミウム酸で固定した後、エタノールで脱水処理を行い、走査型電子顕微鏡でコロニーの形状と孔の配置を観察した。図6に示すように、コロニーの外側の細胞は孔の部分に接着しており、孔の配置に依存してコロニーの形状が決定されていることが明らかになった。

20 ==三次元組織の細胞における幹細胞分化マーカーの発現==

次に、上述の三次元組織の細胞が成熟肝細胞としての機能を有しているかどうかを確認するために、三次元組織の細胞からRNAを抽出し、肝細胞分化マーカーが発現しているかどうかを調べた。

上述のように構築した三次元組織中の細胞からRNeasy RNA isolation kit (Qiagen社)を用いてTotal RNAを抽出し、oligo(dT) primerとSuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen社)を用いて1 μ g Total RNAを逆転写して(5
25 5°Cで50分間) cDNAを合成した。その後、PCR法によりアルブミン、MRP2 (multidrug-resistance associated protein 2)、HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4)、TAT (tyrosine aminotransferase)、TO (tryptophan-2, 3-dioxygenase)、及びG

APDH (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase ; 対照として用いた。) の各cDNAを増幅し、アガロースゲル電気泳動した。その結果を図7に示す。

5 なお、上記PCR反応は、表1に示すプライマー及びEx Taq (TaKaRa社)を用いてApollo 201 thermal cycler (CLP社)で行った。PCRの反応条件は、95°C×5分間
→ [(94°C×30秒間→表1に示すアニーリング温度×30秒間→72°C×30秒間) ×
表1に示すサイクル数] →72°C×5分間とした。

[表1]

プライマー名	配列 (5'-3')	アニーリング温度 (°C)	サイクル数
アルブミン	P1 AAGGCACCCCGATTACTCCG (配列番号1)	56	30
	P2 TGCGAAGTCACCCATCACGG (配列番号2)		
MRP2	P3 ACCTTCCACGTAGTGATCCT (配列番号3)	54	26
	P4 ACTGTAGGCTCTGGGAAATC (配列番号4)		
HNF-4	P5 TCTACAGAGCATTACCTGGC (配列番号5)	54	26
	P6 TGAGGGGAAGATGAAGACGG (配列番号6)		
TAT	P7 TACTCAGTTCTGCTGGAGCC (配列番号7)	56	26
	P8 GCAAAGTCTCTAGAGAGGCC (配列番号8)		
TO	P9 GAAGACGGAGCTCAAAGTGG (配列番号9)	56	26
	P10 AATAGCGTCTGCTCCTGCTC (配列番号10)		
GAPDH	P11 ACCACAGTCCATGCCATCAC (配列番号11)	53	30
	P12 TCCACCACCCTGTTGCTGTA (配列番号12)		

図7に示すように、本発明にかかる三次元組織の細胞において、調べた全ての肝細胞分化マーカーが発現していることから、当該細胞（肝前駆細胞；小型肝細胞）が成熟肝細胞としての機能を有することが示された。この結果は、本発明にか

5 5 かかる三次元組織を人工臓器として利用することができることを支持する。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、細胞培養法、三次元組織を形成させるための細胞の三次元培養法、培養細胞を用いて形成した三次元組織、人工臓器、及び組織移植方法を提供することができる。

請求の範囲

1. 透過性シート上で平面培養した培養細胞を、前記透過性シートと共に、他の平面培養した培養細胞上に積層することにより三次元組織を形成させる細胞の三次元培養法。
- 5 2. 前記培養細胞が、実質臓器、上皮組織、筋肉組織のいずれかに由来することを特徴とする請求の範囲第1項に記載の細胞の三次元培養法。
3. 前記培養細胞が、肝臓由来であることを特徴とする請求の範囲第2項に記載の細胞の三次元培養法。
- 10 4. 前記培養細胞が、主として小型肝細胞を含むことを特徴とする請求の範囲第3項に記載の細胞の三次元培養法。
5. 前記三次元組織中に、毛細胆管が形成されることを特徴とする請求の範囲第3項または第4項に記載の細胞の三次元培養法。
6. 透過性シート上で平面培養した培養細胞を、前記透過性シートと共に、他の平面培養した培養細胞上に積層することにより形成した三次元組織。
- 15 7. 前記培養細胞が、実質臓器、上皮組織、筋肉組織のいずれかに由来することを特徴とする請求の範囲第6項に記載の三次元組織。
8. 前記培養細胞が、肝臓由来であることを特徴とする請求の範囲第7項に記載の三次元組織。
- 20 9. 前記培養細胞が、主として小型肝細胞を含むことを特徴とする請求の範囲第8項に記載の三次元組織。
10. 請求の範囲第8項または第9項に記載の細胞の三次元組織であって、組織内に毛細胆管が形成されることを特徴とする三次元組織。
11. 請求の範囲第6項～第10項のいずれかに記載の三次元組織を用いて構成された人工臓器。
- 25 12. 多孔性シート上で培養細胞を平面培養する細胞培養法であって、前記多孔性シートに開いている孔の位置を調節することにより、前記培養細胞のコロニーの形状を制御することを特徴とする細胞培養法。
13. 請求の範囲第12項に記載の細胞培養法によって培養した培養細胞を、

15

前記多孔性シートと共に、他の平面培養した培養細胞上に積層することにより三次元組織を形成させる細胞の三次元培養法。

14. ヒト以外の脊椎動物において、請求の範囲第6項～第10項に記載の三次元組織を生体内に移植する組織移植方法。

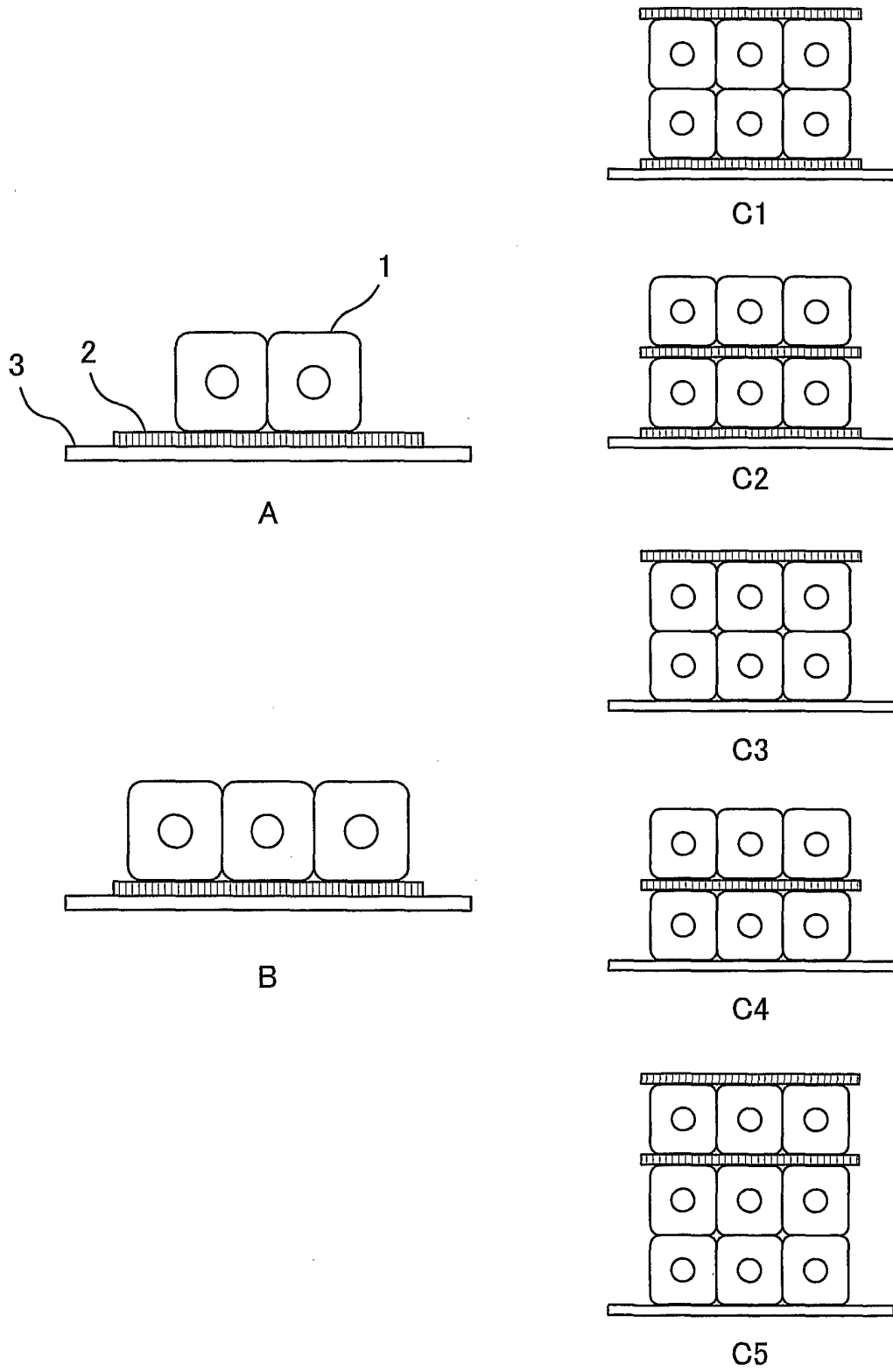
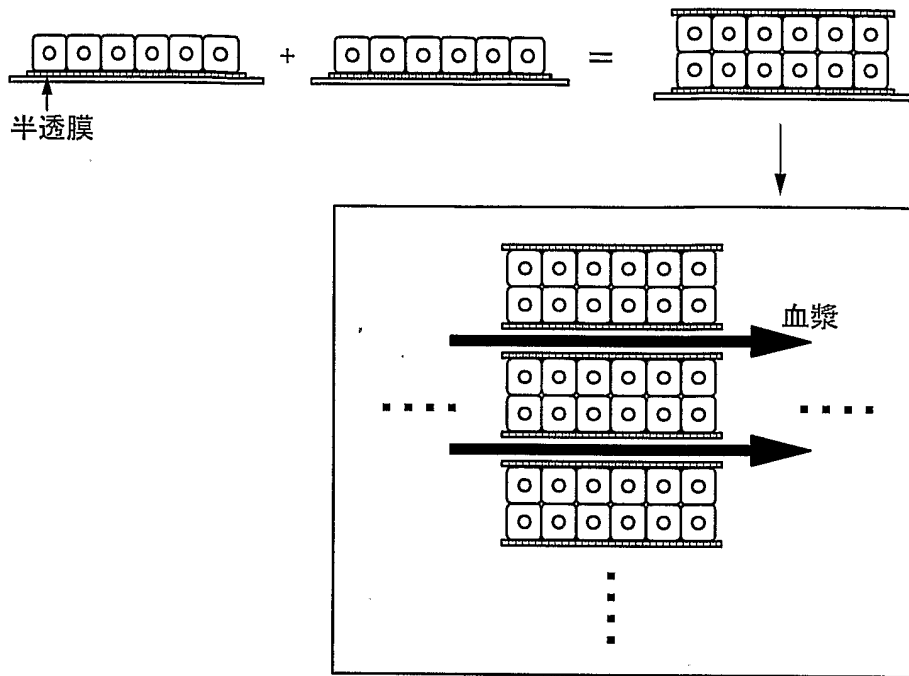


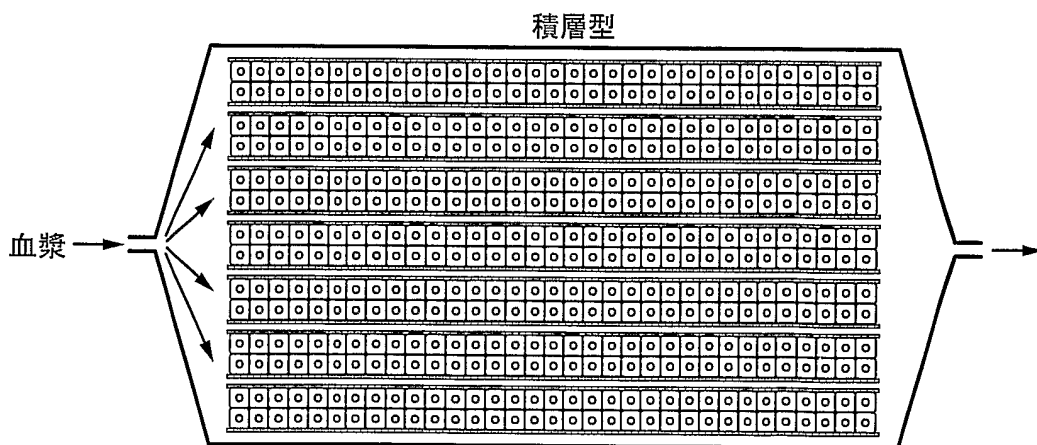
図1

2/7



積層型三次元組織バイオ人工肝臓モジュール

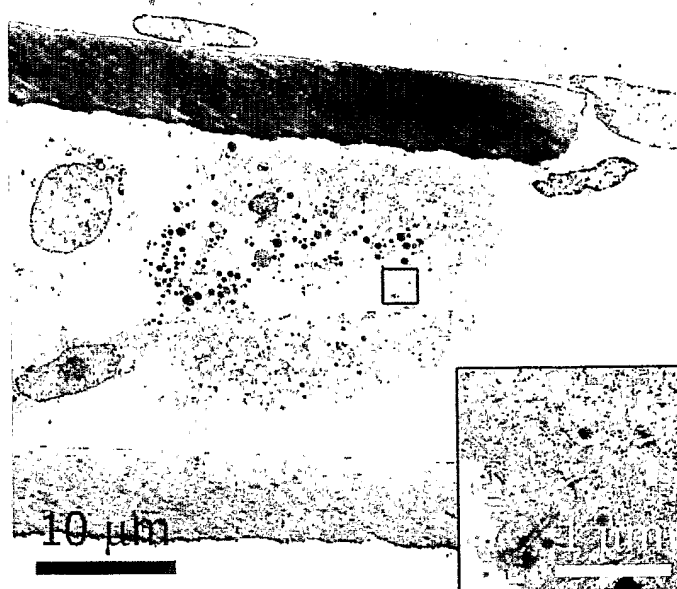
(A)



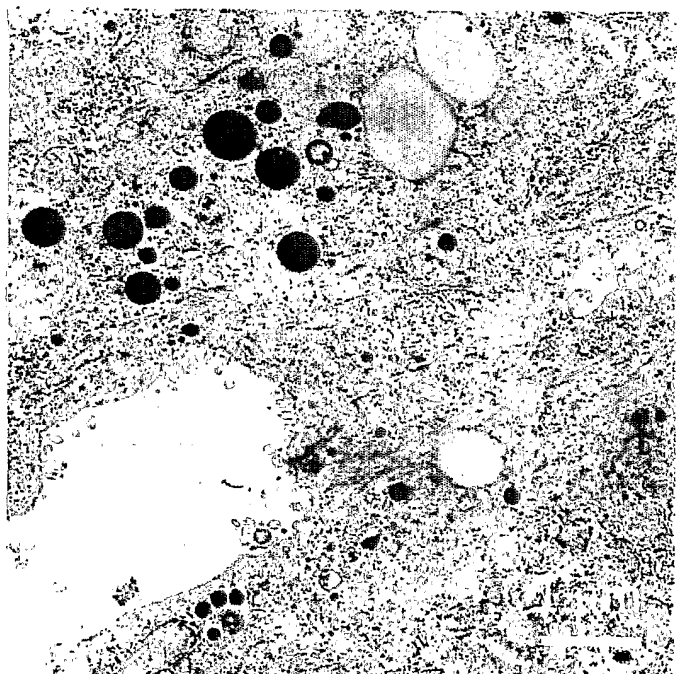
(B)

図2

3/7



(A)



(B)

図3

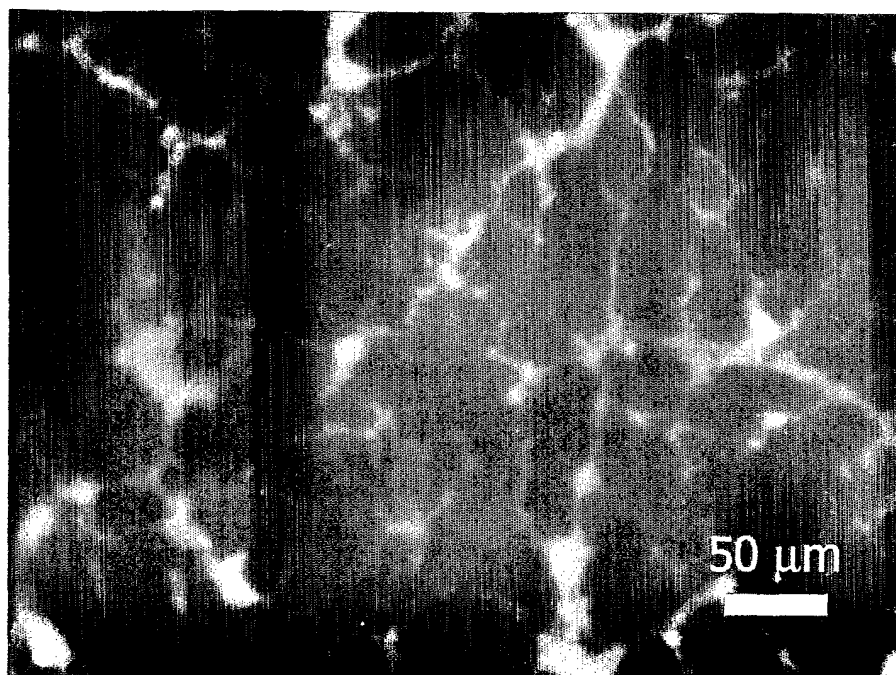


図4

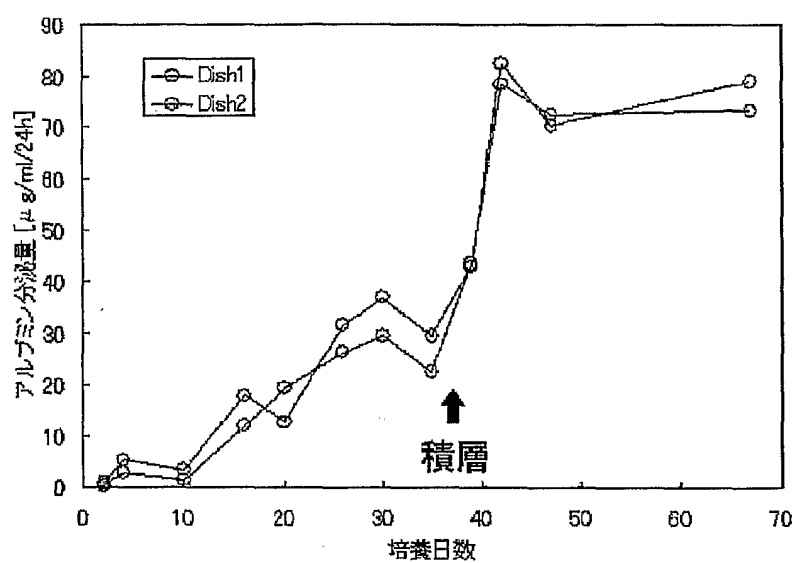
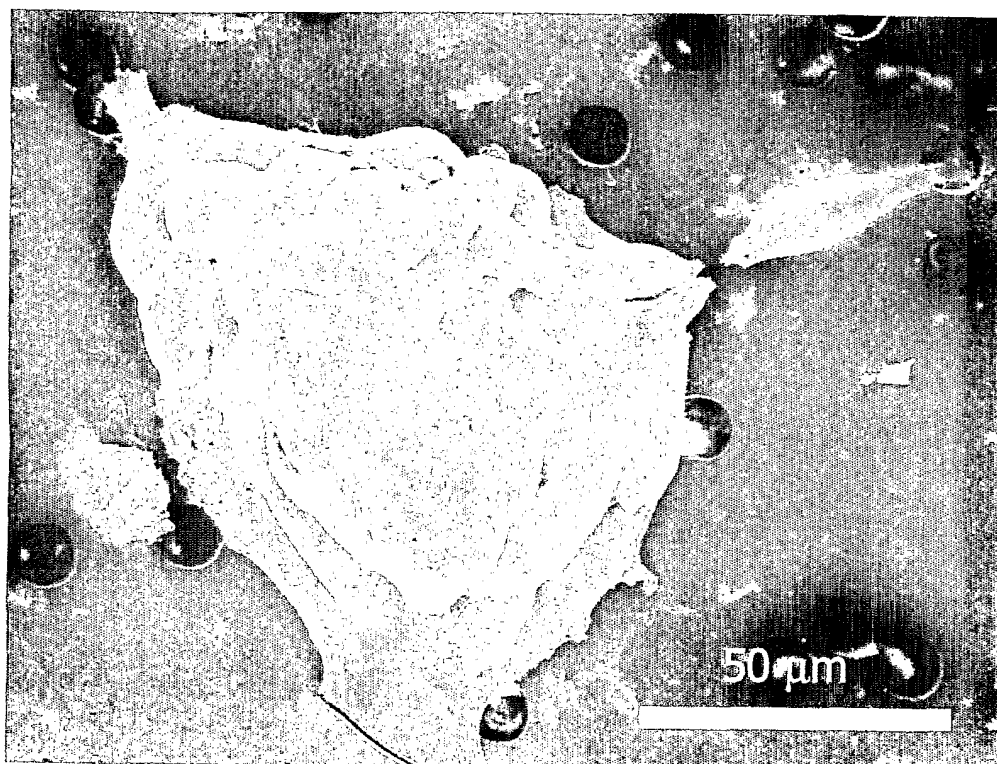


図5



7/7

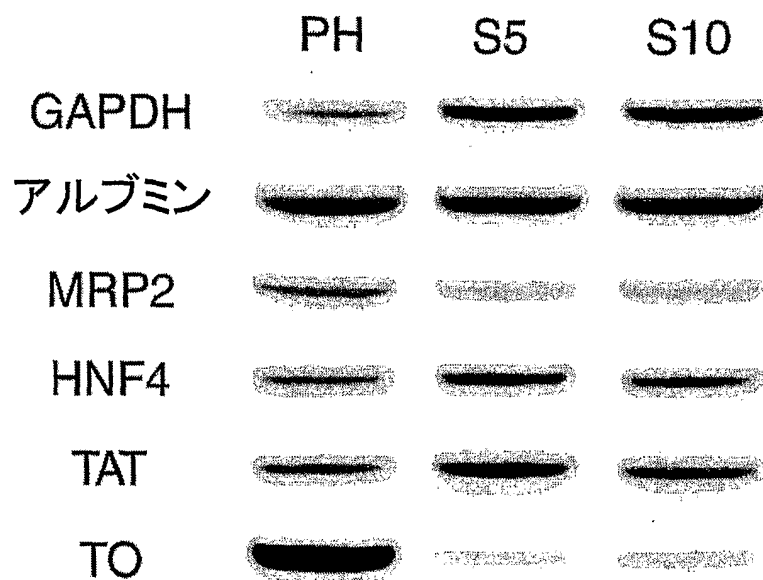


図7

SEQUENCE LISTING

SEQ

<110> KEIO UNIVERSITY

<120> Methods of cell culture, cell 3D culture, and tissue transplantation, and 3D tissue and artificial organ made thereby

<130> PCT835

<150> JP 2003/385677

<151> 2003-11-14

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Inventor: Sudo, Ryo
Inventor: Tanishita, Kazuo
Inventor: Ikeda, Mariko
Inventor: Mitaka, Toshihiro

<220>

<223> P1

<400> 1

aaggcacccc gattactccg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P2

<400> 2

tggaagtca cccatcacccg

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P3

<400> 3

acottccacg tagtgatcct

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P4

<400> 4

actgtaggct ctgggaaatc

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

SEQ

<223> P5

<400> 5

tctacagagc attacctggc

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P6

<400> 6

tgaggggaag atgaagacgg

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P7

<400> 7

tactcagttc tgctggagcc

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P8

<400> 8

gcaaagtctc tagagaggcc

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P9

<400> 9

gaagacggag ctcaaaactgg

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P10

<400> 10

aatagcgtct gotcotgctc

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P11

<400> 11

accacagtcc atgcatcac

20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> P12

<400> 12
tccaaccacc tgttgctgta

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/017227

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N5/08, A61L27/38

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)
Int.Cl⁷ C12N5/08, A61L27/38

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)
JSTPlus, WPI (DIALOG), PUBMED

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2002/010349 A1 (Kabushiki Kaisha Serushido), 07 February, 2002 (07.02.02),	<u>1, 2, 6, 7,</u> <u>10-14</u>
Y	& EP 1312669 A1 & US 2004/0028657 A	3-5, 8-9
X	Tatsuya SHIMIZU, "Shinkin Soshiki ni Taisuru Saisei Iryo", Igaku no Ayumi (2003 May),	<u>1, 2, 6, 7,</u> <u>10-14</u>
Y	Vol.205, No.9, pages 693 to 698	3-5, 8, 9
X	T. SHIMIZU et al., Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction, Biomaterials	<u>1, 2, 6, 7,</u> <u>10-14</u>
Y	(2003 June), Vol.24, No.13, pages 2309 to 2316	3-5, 8, 9
Y	WO 2002/088332 A1 (Hokkaido Technology Licensing Office Co., Ltd.), 07 November, 2002 (07.11.02), & EP 1382672 A1 & US 2004/0073391 A1	3-5, 8, 9

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 19 January, 2005 (19.01.05)	Date of mailing of the international search report 08 February, 2005 (08.02.05)
--	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017227

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Toshihiro MITAKA, "Kogata Kansaibo o Mochiita in vitro Kansoshiki Keisei", The Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry Sokai Gakujutsu Shukai Koen Program Yokoshu (2003 October), Vol.44th, pages 33	3-5, 8, 9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ C12N5/08, A61L27/38		
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 ⁷ C12N5/08, A61L27/38		
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		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus, WPI(DIALOG), PUBMED		
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 請求の範囲の番号
<u>X</u> <u>Y</u>	WO 2002/010349 A1 (株式会社セルシード) 2002.02.07 &EP 1312669 A1 &US 2004/0028657 A	1, 2, 6, <u>7, 10-14</u> 3-5, 8, 9
<u>X</u> <u>Y</u>	清水達也, 心筋組織に対する再生医療, 医学のあゆみ (2003-May), Vol. 205, No. 9, p. 693-698	1, 2, 6, <u>7, 10-14</u> 3-5, 8, 9
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 19.01.2005	国際調査報告の発送日 08.2.2005	
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) 上 條 肇	4B 9453
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

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 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	SHIMIZU T. et al., Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction, Biomaterials (2003-Jun), Vol.24, No.13, p.2309-2316	1, 2, 6, <u>7, 10-14</u> 3-5, 8, 9
Y	WO 2002/088332 A1 (北海道ティー・エル・オー株式会社) 2002. 11. 07 &EP 1382672 A1 &US 2004/0073391 A1	3-5, 8, 9
Y	三高俊広, 小型肝細胞を用いたin vitro肝組織形成, 日本組織細胞化学会総会・学術集会講演プログラム・予稿集 (2003-Oct), Vol. 44th, p. 33	3-5, 8, 9