



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I821280 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：108114451

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 04 月 25 日

(51)Int. Cl. : C12N5/0775 (2010.01)

A61F2/02 (2006.01)

(30)優先權：2018/04/25 日本

2018-084565

(71)申請人：北海道公立大學法人札幌醫科大學 (日本) SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY
(JP)

日本

(72)發明人：千見寺貴子 CHIKENJI, TAKAKO (JP)；藤宮峯子 FUJIMIYA, MINEKO (JP)；齋藤悠城 SAITO, YUKI (JP)；中野正子 NAKANO, MASAKO (JP)；小成直人 KONARI, NAOTO (JP)；大谷美穂 OTANI, MIHO (JP)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 2010/0254953A1

WO 2006/110110A1

審查人員：吳嫻諄

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：21 共 56 頁

(54)名稱

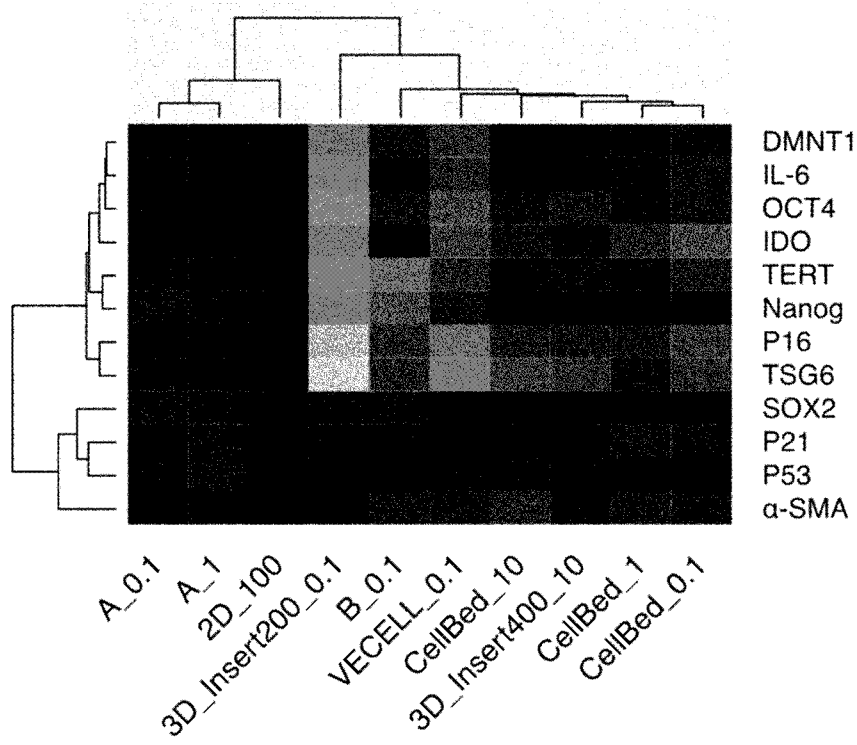
生物體移植用細胞片及其製造方法

(57)摘要

本發明係關於一種生物體移植用細胞片，其於其表面具有平均細胞密度為 3.0×10^4 細胞/cm² 以下之間葉系幹細胞。又，本發明係關於一種生物體移植用細胞片之製造方法，其包括以下之步驟：於具有包含纖維之三維構造之細胞培養載體上，以 3.0×10^5 細胞/cm² 以下之細胞數播種間葉系幹細胞；及培養間葉系幹細胞而製備平均細胞密度為 3.0×10^4 細胞/cm² 以下之細胞片。

The present invention is directed to a cell sheet for transplantation, having mesenchymal stem cells at an average cell density of 3.0×10^4 cells/cm² or less on the surface thereof. The present invention is also directed to a method for producing a cell sheet for transplantation, including a step of seeding 3.0×10^5 cells/cm² or less of mesenchymal stem cells onto a cell culture carrier, wherein the carrier has a three-dimensional structure consisting of fibers, and a step of culturing the mesenchymal stem cells, thereby preparing a cell sheet having mesenchymal stem cells at an average cell density of 3.0×10^4 cells/cm² or less.

指定代表圖：



將無活化劑之2D MSC設為1時之mRNA表現

【圖1】



I821280

【發明摘要】

【中文發明名稱】

生物體移植用細胞片及其製造方法

【英文發明名稱】

CELL SHEET FOR TRANSPLANTATION AND METHOD FOR PRODUCING SAME

【中文】

本發明係關於一種生物體移植用細胞片，其於其表面具有平均細胞密度為 3.0×10^4 細胞/cm²以下之間葉系幹細胞。又，本發明係關於一種生物體移植用細胞片之製造方法，其包括以下之步驟：於具有包含纖維之三維構造之細胞培養載體上，以 3.0×10^5 細胞/cm²以下之細胞數播種間葉系幹細胞；及培養間葉系幹細胞而製備平均細胞密度為 3.0×10^4 細胞/cm²以下之細胞片。

【英文】

The present invention is directed to a cell sheet for transplantation, having mesenchymal stem cells at an average cell density of 3.0×10^4 cells/cm² or less on the surface thereof. The present invention is also directed to a method for producing a cell sheet for transplantation, including a step of seeding 3.0×10^5 cells/cm² or less of mesenchymal stem cells onto a cell culture carrier, wherein the carrier has a three-dimensional structure consisting of fibers, and a step of culturing the mesenchymal stem cells, thereby preparing a cell sheet having mesenchymal stem cells at an average cell density of 3.0×10^4 cells/cm²

or less.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

生物體移植用細胞片及其製造方法

【英文發明名稱】

CELL SHEET FOR TRANSPLANTATION AND METHOD FOR PRODUCING SAME

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種用於生物體移植之細胞片及其製造方法。

【先前技術】

【0002】 間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell，以下亦稱為MSC)係具有多分化能力及自我複製能力之幹細胞，其具有不僅分化為成骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、肌肉細胞等屬於間葉系之細胞，亦跨胚層分化為神經細胞或肝細胞等之能力。又，已知MSC亦具有自身產生之體液因子所引起之旁分泌效應及細胞接著相互作用。業界認為MSC基於該等作用發揮靶組織或細胞之修復、再生能力及抗炎等免疫抑制能力，結果表現出對各種疾病之治療效果。

【0003】 MSC易於單離培養且增殖能力旺盛而可在短時間內確保可移植之細胞數，可進行無免疫排斥之自體移植，倫理問題亦較少，並且由於低免疫原性而無需預處理即可實現同種移植，因此將其作為理想之細胞移植療法之材料而應用於針對多種疾病之治療之研究不斷推進。

【0004】 期待應用使用MSC之細胞移植療法之疾病之一為腎臟病，尤其是慢性腎臟病。慢性腎臟病係指以蛋白尿為代表之腎損傷及以絲球體

過濾量為指標之腎功能降低之任一者或兩者持續3個月以上之狀態，在日本，8位成年人中即有1人罹患此病。若慢性腎臟病之症狀發展並達到末期腎功能衰竭，則藥劑治療效果無法預期，許多患者不得不進行人工透析。由於人工透析是對症療法，故而陷入慢性腎功能衰竭之患者必須終身持續接受人工透析，給患者造成之身體上及經濟上之負擔較大。進而，透析醫療費之增加成為於醫療經濟方面令人擔憂之問題。

【0005】 本發明者等人於確立使用MSC之細胞移植療法之過程中發現：患者例如糖尿病患者之MSC為異常之MSC，具體而言，失去如上述之多種能力或該等能力與正常之MSC相比降低，結果MSC失去疾病治療效果或者治療效果與正常之MSC相比降低；來自哺乳動物之胎兒附屬物中之提取物可使上述異常之MSC活化而使治療效果恢復；以及可進行使用該經活化之MSC之自體移植治療等；從而發明了一種含有來自哺乳動物之胎兒附屬物中之提取物作為有效成分之針對異常之MSC的活化劑，並申請了專利(專利文獻1)。該活化劑尤其於針對處於需要治療之階段之患者亦可進行MSC之自體移植之方面具有重要意義。

【0006】 另一方面，於細胞移植療法中，為了減少所使用之MSC之量，可使MSC集中於所需部位之可局部應用之製劑形態之研究不斷推進。作為針對腎臟病之使用MSC之細胞移植療法，報告有藉由將包含MSC之細胞片組合物應用於腎臟而治療腎臟病之方法(專利文獻2)。該細胞片組合物係藉由於刺激響應性培養基材上播種並培養MSC後，利用剝離刺激將細胞剝離而製備。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0007】 專利文獻1：國際公開WO2015/137419號說明書

專利文獻2：日本專利特開2017-132744號公報

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0008】 本發明之目的在於提供一種治療效果較高之包含MSC之新穎之生物體移植用細胞片。

[解決問題之技術手段]

【0009】 本發明者等人發現，可藉由於特定之培養載體上以成為特定之低細胞密度之方式培養MSC而製造具有較高之疾病治療效果之MSC之細胞片，從而完成了下述各發明。

【0010】 (1)一種生物體移植用細胞片，其於其表面具有平均細胞密度為 3.0×10^4 細胞/cm²以下之MSC。

(2)如(1)所記載之細胞片，其進而包含生物體相容性之支持體。

(3)如(2)所記載之細胞片，其中支持體係具有包含纖維之三維構造之細胞培養載體。

(4)如(3)所記載之細胞片，其中細胞培養載體具有開口部，該開口部係藉由具有奈米~微米單位之平均纖維直徑之纖維而形成於與細胞之接觸面上。

(5)如(4)所記載之細胞片，其中開口部之平均直徑為500 nm~1000 μm。

(6)如(2)至(5)中任一項所記載之細胞片，其中支持體係含有包含生物降解性聚合物之奈米纖維而成之細胞培養載體。

(7)如(1)至(6)中任一項所記載之細胞片，其用於腎臟病之治療，且

於其表面具有平均細胞密度為 1.0×10^3 細胞/cm²~ 3.0×10^4 細胞/cm²之MSC。

(8)如(7)所記載之細胞片，其應用於腎臟之纖維囊下。

(9)如(1)至(6)中任一項所記載之細胞片，其用於腦損傷或神經退化性疾病之治療，且於其表面具有平均密度為 0.5×10^3 細胞/cm²~ 1.5×10^4 細胞/cm²之MSC。

(10)如(9)所記載之細胞片，其應用於腦之損傷部位、退化部位或其等之附近。

(11)如(1)至(10)中任一項所記載之細胞片，其中MSC係來自骨髓或脂肪組織之MSC。

(12)如(1)至(11)中任一項所記載之細胞片，其中MSC係自患有疾病之對象所分離之MSC。

(13)一種生物體移植用細胞片之製造方法，其包括以下之步驟：

於具有包含纖維之三維構造之細胞培養載體上，以 3.0×10^5 細胞/cm²以下之細胞數播種MSC；及

培養MSC，而製備平均細胞密度為 3.0×10^4 細胞/cm²以下之細胞片。

(14)如(13)所記載之製造方法，其中細胞培養載體具有開口部，該開口部係藉由具有奈米~微米單位之平均纖維直徑之纖維而形成於與細胞之接觸面上。

(15)如(14)所記載之製造方法，其中開口部之平均直徑為500 nm~1000 μm。

(16)如(13)至(15)中任一項所記載之製造方法，其中細胞培養載體係含有包含生物降解性聚合物之奈米纖維而成之細胞培養載體。

(17)如(13)至(16)中任一項所記載之製造方法，其中MSC係來自骨髓或脂肪組織之MSC。

(18)如(13)至(17)中任一項所記載之製造方法，其中MSC係自患有疾病之對象所分離之MSC。

[發明之效果]

【0011】 根據本發明，可製造治療效果較高之細胞片，且與先前相比，可大幅減少MSC之移植療法中所需之MSC之細胞數。又，亦能夠治療先前除腎移植以外無根治療法而不得不終身接受人工透析之發展至末期腎功能衰竭之慢性腎臟病。

【圖式簡單說明】

【0012】 圖1係表示對於具有包含纖維之三維構造之細胞培養載體(以下亦稱為三維培養載體)或比較例之細胞培養載體上，在活化劑之存在下所培養之變形性股關節病患者MSC(以下稱為OA-MSC)之基因表現曲線進行聚類分析所得之結果的圖。

圖2係表示已投予對照試劑(Vehicle)或已移植細胞片之抗癌劑處理後之糖尿病性腎病大鼠之血清肌酸酐之推移的圖表。

圖3係表示已投予對照試劑或已移植細胞片之抗癌劑處理後之糖尿病性腎病大鼠至移植後11週為止之存活率之推移的圖表。粗實線係表示各組之平均值，細實線係表示各組之95%CI(置信區間)。

圖4係已投予對照試劑或已移植細胞片之抗癌劑處理後之糖尿病性腎病大鼠之腎臟組織切片的光學顯微鏡觀察圖像。於上段表示絲球體，於下段表示腎小管/間質。

圖5係已投予對照試劑之抗癌劑處理後之糖尿病性腎病大鼠之腎臟組

織切片的電子顯微鏡觀察圖像。表示絲球體。

圖6係已投予對照試劑之抗癌劑處理後之糖尿病性腎病大鼠之腎臟組織切片的電子顯微鏡觀察圖像。表示腎小管。

圖7係已投予對照試劑之抗癌劑處理後之糖尿病性腎病大鼠之腎臟組織切片的電子顯微鏡觀察圖像。表示腎小管。

圖8係已移植細胞片之抗癌劑處理後之糖尿病性腎病大鼠之腎臟組織切片的電子顯微鏡觀察圖像。表示絲球體。

圖9係已移植細胞片之抗癌劑處理後之糖尿病性腎病大鼠之腎臟組織切片的電子顯微鏡觀察圖像。表示腎小管。

圖10係已投予對照試劑之抗癌劑處理後之糖尿病性腎病大鼠之腎臟組織切片的光學顯微鏡觀察圖像。表示腎表層部。

圖11係已移植細胞片之抗癌劑處理後之糖尿病性腎病大鼠之腎臟組織切片的光學顯微鏡觀察圖像。表示腎表層部。

圖12係表示已移植細胞片之糖尿病性腎病大鼠之血清肌酸酐及尿素氮之推移的圖表。

圖13係表示已移植細胞片之糖尿病性腎病小鼠之尿中白蛋白/肌酸酐比的圖表。

圖14係對平均細胞密度不同之細胞片上之MSC進行DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶)染色後的顯微鏡觀察圖像。

圖15係將細胞片B、G及H上之MSC中之OCT4、Nanog、p16^{ink4a}及TERT之各基因之相對表現量與細胞片B上之MSC進行比較而表示的圖表。

圖16係表示已移植平均細胞密度不同之細胞片之急性腎損傷大鼠至

移植後第10天為止之存活天數與細胞片之平均細胞密度之關係的圖。

圖17係表示已移植平均細胞密度不同之細胞片之急性腎損傷大鼠至移植後第10天為止之存活率平均值之推移的圖表。大鼠根據已移植之片之平均細胞密度分為3個組。

圖18係表示已進行或未進行腎覆膜處理之急性腎損傷大鼠至移植後第10天為止之存活率平均值之推移的圖表。

圖19係表示已移植平均細胞密度不同之細胞片之阿茲海默症模型小鼠之新奇物體認知試驗之結果的圖表。小鼠根據已移植之片之平均細胞密度分為2個組。

圖20係對平均細胞密度不同之細胞片上之來自脂肪組織之MSC進行DAPI染色後的顯微鏡觀察圖像。

圖21係表示已移植來自小鼠脂肪組織之MSC之細胞片之急性腎損傷大鼠自移植起24小時後之血中尿素氮的圖表。

【實施方式】

【0013】 生物體移植用細胞片

本發明之第1態樣係關於一種於其表面具有平均細胞密度為 3.0×10^4 細胞/cm²以下之MSC之生物體移植用細胞片(以下簡稱為細胞片)。

【0014】 細胞片於其表面具有平均細胞密度為 3.0×10^4 細胞/cm²以下之MSC(MSC組體)。所謂MSC之平均細胞密度，係指細胞片每單位面積之MSC之細胞數之算術平均值，可藉由計數利用顯微鏡等觀察細胞片之表面而確認之MSC之數量，並將合計數除以細胞片整體之面積，或者利用顯微鏡等觀察細胞片之表面並計數每單位面積之MSC之數量而算出。

【0015】 於本發明中，存在於細胞片表面上之MSC之平均細胞密度

只要為 3.0×10^4 細胞/cm²以下即可，例如可適當設定為 0.1×10^3 細胞/cm²~ 3.0×10^4 細胞/cm²、 0.1×10^3 細胞/cm²~ 2.0×10^4 細胞/cm²、 0.1×10^3 細胞/cm²~ 1.5×10^4 細胞/cm²、 0.1×10^3 細胞/cm²~ 1.0×10^4 細胞/cm²、 0.1×10^3 細胞/cm²~ 0.5×10^4 細胞/cm²、 0.3×10^3 細胞/cm²~ 3.0×10^4 細胞/cm²、 0.5×10^3 細胞/cm²~ 3.0×10^4 細胞/cm²、 1.0×10^3 細胞/cm²~ 3.0×10^4 細胞/cm²、 3.0×10^3 細胞/cm²~ 3.0×10^4 細胞/cm²、 6.0×10^3 細胞/cm²~ 3.0×10^4 細胞/cm²、 1.0×10^4 細胞/cm²~ 3.0×10^4 細胞/cm²、 0.3×10^3 細胞/cm²~ 2.0×10^4 細胞/cm²、 0.5×10^3 細胞/cm²~ 2.0×10^4 細胞/cm²、 1.0×10^3 細胞/cm²~ 2.0×10^4 細胞/cm²、 3.0×10^3 細胞/cm²~ 2.0×10^4 細胞/cm²、 6.0×10^3 細胞/cm²~ 2.0×10^4 細胞/cm²等。細胞片表面上之MSC之平均細胞密度較佳為 0.5×10^3 ~ 3.0×10^4 細胞/cm²，更佳為 0.5×10^3 ~ 2.0×10^4 細胞/cm²，進一步更佳為 2.0×10^3 細胞/cm²~ 2.0×10^4 細胞/cm²，進而較佳為 2.0×10^3 細胞/cm²~ 1.8×10^4 細胞/cm²，進一步進而較佳為 3.0×10^3 細胞/cm²~ 1.6×10^4 細胞/cm²，更進一步較佳為 3.0×10^3 細胞/cm²~ 1.0×10^4 細胞/cm²，尤佳為 3.0×10^3 細胞/cm²~ 8.0×10^3 細胞/cm²。

【0016】 平均細胞密度亦可用細胞片表面中之MSC之佔有率(融合率)表示。融合或100%融合係細胞片表面被MSC完全覆蓋之狀態，MSC係處於密集而相互接觸之狀態。與此相對之相對細胞密度係%融合，可藉由將細胞片表面上之MSC所占之面積之合計值除以片整體之面積而算出。

【0017】 於來自人類之骨髓之MSC之情形時，平均細胞密度 2.0×10^4 細胞/cm²相當於60%融合。同樣地，平均細胞密度 1.0×10^3 ~ 2.0×10^4 細胞/cm²相當於10~60%融合， 1.0×10^3 細胞

/cm²~1.6×10⁴細胞/cm²相當於10~50%融合，1.0×10³細胞/cm²~1.0×10⁴細胞/cm²相當於10~40%融合，3.0×10³細胞/cm²~1.0×10⁴細胞/cm²相當於20~40%融合，3.0×10³細胞/cm²~8.0×10³細胞/cm²相當於20~35%融合。

【0018】因此，於其表面具有平均細胞密度為2.0×10⁴細胞/cm²以下之MSC之本發明之細胞片亦可表示為於其表面具有細胞密度為60%融合以下之MSC之細胞片。於較佳之實施形態中，本發明之細胞片係於其表面具有細胞密度為10~60%融合、10~50%融合、10~40%融合、20~40%融合、20~35%融合之MSC。

【0019】細胞片只要於其表面具有平均細胞密度為3.0×10⁴細胞/cm²以下之MSC，則亦可包含MSC以外之細胞。MSC以外之細胞可為來自作為MSC之分離源之組織之細胞，又，亦可為期待與MSC之並用所帶來之較佳之效果而添加之細胞。後者之細胞例如為血管內皮細胞、纖維母細胞、上皮細胞等，可根據治療對象之疾病或預定移植之部位適當選擇。

【0020】本發明之細胞片之一例係經由MSC自身產生之細胞外基質或培養時添加於培養基之細胞外基質將MSC相互接著而成之細胞片。

【0021】本發明之細胞片之另一例係進而包含生物體相容性之支持體之細胞片。於該例中，細胞片可為將經由細胞外基質相互接著之MSC與支持體進行組合而成者，或者亦可為使MSC與片狀支持體之表面接著，並將MSC細胞體之一部分或整體填埋於位於支持體之表面之凹處或開口部等，從而使支持體與MSC一體化而成者。本發明中之「於其表面具有MSC」之細胞片中亦包含MSC細胞體之一部分或整體處於填埋於位於支持體之表面之凹處或開口部等狀態者作為其一態樣。如此，本發明之細胞片係處於MSC經由細胞外基質相互接著之狀態或與支持體一體化之

狀態者，區別於為進行細胞培養而於其上僅播種MSC之培養載體。

【0022】本發明之細胞片中所含之支持體只要為包含生物體相容性材料之片狀者即可，只要於其後移植至生物體內時易於處理，則其形狀、大小或厚度無限制。作為生物體相容性材料之例，可列舉聚氟乙烯、聚苯乙烯等聚合物化合物、氧化矽等無機化合物、生物降解性聚合物等，較佳為生物降解性聚合物。作為生物降解性聚合物，例如於合成高分子材料中可列舉聚乙醇酸、聚乳酸、聚乙二醇、聚己內酯、聚二氧雜環己酮、以及其他乳酸-乙醇酸共聚物等上述之共聚物；於無機材料中可列舉 β -磷酸三鈣、碳酸鈣等；於天然高分子材料中可列舉膠原蛋白、明膠、海藻酸、透明質酸、瓊脂糖、聚葡萄糖胺糖、血纖維蛋白、絲蛋白、甲殼素、纖維素、蠶絲等。

【0023】本發明之細胞片中所含之支持體之較佳例係具有包含纖維之三維構造之片狀細胞培養載體。尤佳為包含具有奈米(nm)~微米(μm)單位之平均纖維直徑之纖維之片狀三維培養載體。細胞培養載體或培養載體係於細胞培養時所使用之成為細胞接著之支架之載體。又，「平均纖維直徑」係指自細胞接著面之側，典型地自上觀察培養載體時作為相對於纖維之長度方向正交之方向上之長度而測定之纖維直徑之算術平均值。再者，只要未特別指定，則本說明書中所謂平均係指數量平均。又，包含具有奈米(nm)~微米(μm)單位之平均纖維直徑之纖維，且具有藉由該纖維而形成於與細胞接觸之面上之開口部之三維培養載體於本發明中亦為較佳支持體之例。此處，「開口部」係指藉由上述纖維形成之存在於載體之與細胞之接觸面上之凹處。

【0024】開口部之平均直徑係指於纖維彼此相接之情形時，自上觀

察培養載體時可確認到之以纖維為輪廓之圖形之直徑之平均值。所謂圖形之直徑，於圖形為多邊形之情形時，相當於自各頂點起之對角線之長度之算術平均值，於圖形為圓形之情形時，相當於其直徑，於圖形為橢圓形或與其類似之形狀之情形時，相當於其長徑。

【0025】 又，於纖維彼此未相接之情形時，開口部之平均直徑係指藉由ASTM(American Society for Testing Materials，美國材料試驗協會)-F316中規定之方法所得之平均流量孔徑，例如可使用氣孔計(Coulter公司製造等)藉由平均流點法測定。

【0026】 構成三維培養載體之纖維之平均纖維直徑可處於nm~ μm 單位之範圍內，較佳為10 nm~500 μm ，更佳為10 nm~300 μm 之範圍內。於特定之實施形態中，平均纖維直徑例如只要處於10 nm~1 μm 、100 nm~1 μm 、500 nm~1 μm 、1 μm ~10 μm 、1 μm ~100 μm 、1 μm ~300 μm 或1 μm ~500 μm 之範圍內，較佳為處於10 nm~1 μm 、1 μm ~10 μm 或10 μm ~300 μm 之任一範圍內即可。於本發明中，亦可使用通常被稱為奈米纖維之纖維。

【0027】 在於與細胞之接著面上具有開口部之三維培養載體中，開口部之平均直徑只要為500 nm~1000 μm 即可，較佳可處於700 nm~600 μm ，更佳可處於900 nm~400 μm 之範圍內。於特定之實施形態中，開口部之平均直徑例如只要處於500 nm~100 μm 、5 μm ~100 μm 、10 μm ~100 μm 、20 μm ~100 μm 、100 μm ~200 μm 、100 μm ~400 μm 或100 μm ~600 μm 之範圍內，較佳為處於500 nm~100 μm 或100 μm ~400 μm 之範圍內即可。

【0028】 於特定之實施形態中，三維培養載體具有60%以上，較佳

為70%以上，更佳為75%以上，尤佳為80%以上之空隙率。

【0029】於另一實施形態中，三維培養載體之開口部之平均面積為 $0.1\sim 100\ \mu\text{m}^2$ ，較佳為 $0.2\sim 60\ \mu\text{m}^2$ ，更佳為 $0.5\sim 30\ \mu\text{m}^2$ 。於開口部為孔之情形時，開口部面積相當於孔面積。

【0030】三維培養載體係具有纖維三維地集聚，即纖維於三維方向堆積之構造者，纖維之配置可規則亦可不規則，又，纖維彼此可結合亦可不結合。

【0031】三維培養載體只要為於細胞接著面具有包含纖維之三維構造者即可，亦可於未與細胞接著之部分，典型地於包含纖維之三維構造下具有成為基底之構件。基底構件只要為可支持上述三維構造者，則可為任何構造體，例如可為不織布、針織物、織物、多孔質支架材料等。又，亦可作為支持體使用之三維培養載體只要為包含生物體相容性材料之片狀者即可，只要於細胞培養或其後移植至生物體內時易於處理，則其形狀、大小或厚度並無限制，但不包含例如與細胞培養用容器一體成形者等無法用於生物體移植之形態者。

【0032】三維培養載體中之細胞接著面只要其主要部分為具有包含纖維之三維構造之部分即可，具體而言，只要自細胞接著面之側，典型地自上觀察培養載體時之培養載體之面積的50%以上被具有包含纖維之三維構造之部分佔有即可。因此，三維培養載體可於細胞接著面之一部分中，以接著面中之該部分之面積未達50%之範圍，較佳為未達40%之範圍，進而較佳為未達30%之範圍，包含非「包含纖維之三維構造」之部分，例如不具有三維構造之平坦之膜狀部分等。

【0033】作為於本發明中可利用之三維培養載體之例，可列舉

Vessel股份有限公司之VECELL(註冊商標)(聚四氟乙烯，平均纖維直徑： $<1\ \mu\text{m}$ ，平均孔面積： $1\sim 20\ \mu\text{m}^2$ ，開口部之平均直徑： $20\sim 100\ \mu\text{m}$ ，空隙率： $80\sim 90\%$)、日本Vilene股份有限公司之Cellbed(註冊商標)(高純度氧化矽纖維，平均纖維直徑： $1\ \mu\text{m}$ ，平均流量孔徑： $7\sim 8\ \mu\text{m}$ ，空隙率： $>95\%$)、3D Biotek之3D Insert-PS系列(聚苯乙烯纖維，平均纖維直徑：PS-200為 $150\ \mu\text{m}$ 以下、PS-400為 $300\ \mu\text{m}$ 以下，開口部之平均直徑：PS-200為 $200\ \mu\text{m}$ 、PS-400為 $400\ \mu\text{m}$)、國際公開WO2014/196549號說明書中所記載之細胞培養基材、國際公開WO2016/068266號說明書及與之對應之美國專利即美國專利申請公開US2017/319747號公報中所記載之細胞培養基材(生物降解性聚合物，平均纖維直徑 $50\ \text{nm}\sim 5\ \mu\text{m}$)、Liu L, Kamei K et al. Biomaterials 124(2017) 47-54中所記載之細胞培養基材(聚乙醇酸，平均纖維直徑： $345\pm 91\ \text{nm}$ ，平均孔面積： $0.68\pm 0.02\ \mu\text{m}^2$ ，根據平均孔面積算出之開口部之平均直徑： $0.93\ \mu\text{m}((0.68\ \mu\text{m}^2/\pi)^{1/2}\times 2)$)、Neoveil及Neoveil Nano(聚乙醇酸，Gunze股份有限公司)等市售之組織補強材料等。上述各文獻藉由參照將其整體併入至本說明書中。

【0034】 本發明之細胞片可藉由移植至生物體內發生疾病之部位、有發生疾病之虞之部位或成為疾病之原因之部位、或其等之附近而局部投予至生物體，可藉此治療及/或預防使用MSC之細胞移植療法有效之疾病，例如糖尿病及其併發症、腦血管疾病、腦變性疾病、脫髓鞘性疾病、功能性陣發性疾病、癡呆症性疾病、末梢神經疾病、心血管疾病、自體免疫疾病、肝臟、膽道、胰臟疾病、胃及十二指腸疾病、小腸及大腸疾病、甲狀腺疾病、血液及造血器官疾病、肺疾病、急性腎損傷及慢性腎臟病、眼疾病、皮膚疾病、肌肉及骨骼疾病、外傷及GVHD(移植物抗宿主病)。

作為可藉由細胞片之局部投予治療及/或預防之疾病，具體而言，可列舉：1型糖尿病及2型糖尿病以及該等之併發症，例如糖尿病性腎病、糖尿病性視網膜病變、糖尿病性神經障礙、糖尿病性壞疽等；腦中風(腦梗塞及腦出血)等腦血管疾病、帕金森氏症、亨廷頓舞蹈症、大腦皮質基底核變性症、多系統萎縮症、脊髓小腦變性症、肌萎縮性側索硬化症等腦變性疾病；多發性硬化症、急性彌漫性腦脊髓炎、視神經脊髓炎等脫髓鞘性疾病；癲癇或腦性麻痺等功能性陣發性疾病；血管性癡呆症、阿茲海默症、路易氏體型癡呆症、額顳葉型癡呆症、糖尿病性癡呆症等癡呆症性疾病；格林-巴利症候群、末梢神經障礙、顏面神經麻痺、三叉神經痛、排尿障礙、勃起障礙、自律神經失調症等末梢神經疾病；心肌梗塞、心絞痛、閉塞性動脈硬化症、心肌病等心血管疾病；類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡、修格連氏症候群、多發性肌炎、皮肌炎、硬皮症、混合性結締組織病、風濕性多發肌痛症、嗜酸性球增多症、貝賽特氏病、類肉瘤病、Still病、脊椎關節炎、川崎病等自體免疫疾病；急、慢性肝炎、肝硬化、自體免疫性肝炎、原發性膽汁性肝硬化、原發性硬化性膽管炎、急、慢性胰臟炎、自體免疫性胰臟炎等肝臟、膽道、胰臟疾病；急性、慢性胃炎、胃及十二指腸潰瘍等胃及十二指腸疾病；克隆氏症、潰瘍性大腸炎、缺血性大腸炎、過敏性腸症候群等小腸及大腸疾病；Basedow病、急性、慢性甲狀腺炎等甲狀腺疾病；自體免疫性溶血性貧血、真性紅細胞增多症、特發性血小板減少性紫癍等血液及造血器官疾病；慢性阻塞性肺疾病、間質性肺炎、肺纖維化症、塵肺、支氣管哮喘、嗜酸性粒細胞肺炎、ARDS(急性呼吸窘迫症候群)等肺疾病；伴隨體液量減少或缺血之急性腎損傷、ANCA(Antineutrophil Cytoplasmic Antibody，抗中性粒細胞胞漿抗體)

相關腎炎、顯微鏡下多血管炎、肉芽腫性多血管炎、嗜酸性球肉芽腫性多血管炎、惡性高血壓、冷球蛋白血症、感染後絲球體腎炎、IgA(Immunoglobulin A, 免疫球蛋白A)腎病、急性間質性腎炎、藥物性腎損傷、骨髓瘤腎、痛風腎、橫紋肌溶解症、急性腎小管壞死等急性腎損傷；膜性腎病、膜性增殖性絲球體腎炎、微小病變型腎病症候群、局灶絲球體硬化症、狼瘡性腎炎、澱粉樣變性病、腎硬化症、紫癥性腎炎、IgG4(Immunoglobulin G4, 免疫球蛋白G4)相關腎疾病、修格連氏症候群、硬皮症腎、慢性間質性腎炎、多囊性腎等慢性腎臟病；黃斑變性症、視神經炎、葡萄膜炎等眼疾病；異位性皮膚炎、水泡性疾病、Stevens-Johnson症候群等皮膚疾病；重症肌無力症、肌肉營養不良症、變形性股關節病、股骨頭壞死、骨質疏鬆症、腕隧道症候群等肌肉及骨骼疾病；脊髓損傷、腦挫傷等外傷；褥瘡等創傷、口腔內潰瘍、GVHD(移植抗宿主病)、縫合不全、器官之損傷。本發明之細胞片可適應之疾病較佳為糖尿病性腎病、急性腎損傷、慢性腎臟病、糖尿病性視網膜病變、糖尿病性神經障礙、糖尿病性壞疽、阿茲海默症、糖尿病性癡呆症、類風濕性關節炎、多發性肌炎及創傷。

【0035】 於本說明書中所使用之治療及/或預防包含以疾病或症狀之治癒、暫時緩解、預防等為目的之醫學上所容許之全部類型之治療性及/或預防性干預。即，疾病或症狀之治療及/或預防包含包括疾病或症狀之進展之延遲或停止、病變之消退或消失、發病之預防或復發之防止等在內之各種目的之醫學上所容許之干預。

【0036】 關於本發明之細胞片，其有效量局部投予至對象。此處，所謂「有效量」係指對治療及/或預防疾病有效之量。該有效量可根據疾

病之種類、接受局部投予之器官或組織、症狀之嚴重程度、患者以及其他醫學因素適當調節。於較佳實施形態中，細胞片之有效量換算成片中所含之MSC之數而相對於所投予之個體之體重每1 kg為 10^2 細胞~ 10^9 細胞，較佳為 10^4 細胞~ 10^6 細胞。

【0037】 本發明之細胞片之較佳態樣之一係一種細胞片，其用於腎臟病之治療，且於其表面具有平均細胞密度為 1.0×10^3 細胞/cm²~ 3.0×10^4 細胞/cm²，較佳為 2.0×10^3 細胞/cm²~ 3.0×10^4 細胞/cm²，更佳為 2.0×10^3 細胞/cm²~ 2.0×10^4 細胞/cm²，進而較佳為 2.0×10^3 細胞/cm²~ 1.8×10^4 細胞/cm²，進一步進而較佳為 3.0×10^3 細胞/cm²~ 1.6×10^4 細胞/cm²，更進一步較佳為 3.0×10^3 細胞/cm²~ 1.0×10^4 細胞/cm²，尤佳為 3.0×10^3 細胞/cm²~ 8.0×10^3 細胞/cm²之MSC。於本態樣中，細胞片以貼附於腎臟、較佳為腎臟之纖維囊下之方式移植，此時，較佳為儘量使已剝離之腎臟之腎筋膜及脂肪層遠離腎實質。可藉由將細胞片移植至腎臟病患者之腎臟，抑制或防止腎臟病及伴隨於其之症狀之進展，進而將其改善。例如可藉由將細胞片移植至重度慢性腎臟病之尤其是已發展至末期腎功能衰竭之腎臟之纖維囊下，而抑制腎損傷之進展，降低死亡率。

【0038】 本發明之細胞片之較佳之另一態樣係一種細胞片，其用於腦損傷或神經退化性疾病之治療，且於其表面具有平均細胞密度為 0.5×10^3 細胞/cm²~ 1.5×10^4 細胞/cm²，較佳為 1.0×10^3 細胞/cm²~ 1.5×10^4 細胞/cm²，更佳為 1.8×10^3 細胞/cm²~ 0.5×10^4 細胞/cm²之MSC。於本態樣中，細胞片以貼附於腦之損傷部位、退化部位或其附近之方式移植。可藉由將細胞片移植至腦損傷或神經退化性疾病之患者之腦，而抑制或防止腦損傷、神經退化性疾病及伴隨於該等之症狀之進展，進而將其改善。例如

可藉由將細胞片移植至神經退化性疾病之退化部位而改善認知功能。

【0039】 本發明之細胞片與先前之包含MSC之細胞片不同，MSC之平均細胞密度大幅降低。如後述之實施例中所示，本發明者等人發現，藉由具有包含纖維之三維構造之細胞培養載體上以低細胞密度培養MSC，可顯著提高各個MSC之治療效果。意外地，包含低密度培養之MSC之細胞片雖然與先前之包含MSC之細胞片相比細胞數大幅減少，但作為片整體之治療效果優於先前之細胞片。

【0040】 本發明還包含治療及/或預防使用MSC之細胞移植療法有效之疾病之方法作為另一態樣，該方法包括將有效量之本發明之細胞片局部投予至有此需要之對象。本態樣中之各用語之含義如以上所述。

【0041】 細胞片之製造方法

本發明之細胞片可藉由包括以下之步驟之方法製造：於具有包含纖維之三維構造之細胞培養載體上，以 3.0×10^5 細胞/cm²以下之細胞數播種MSC，例如自患有疾病之對象所分離之MSC；及培養MSC，而製備平均細胞密度為 3.0×10^4 細胞/cm²以下之細胞片。該製造方法係本發明之另一態樣。

【0042】 用語「對象」及「自患有疾病之對象所分離之MSC」均解釋為與專利文獻1即國際公開WO2015/137419號說明書及與之對應之美國專利即美國專利申請公開US2017/0071984號公報中所記載之各用語具有相同含義者。該等文獻藉由參照將其整體併入至本說明書中，於以下表示該等文獻及本說明書中之各用語之含義之概略。

【0043】 所謂「對象」係指具有MSC之任意之動物，較佳為哺乳動物之個體，例如人類、黑猩猩等靈長類，小鼠、大鼠、豚鼠、倉鼠等啮齒

類，牛、山羊、綿羊、豬等偶蹄目，馬等奇蹄目，兔、狗、貓等個體，進而較佳為人類之個體。

【0044】 於本發明中用於細胞片之製造之MSC可為自健康對象所分離之MSC，亦可為自患有疾病之對象所分離之MSC。又，於本發明中所使用之MSC亦可為自人工多能幹細胞(iPS細胞)、胚胎幹細胞(ES細胞)、胚胎腫瘤細胞(EC細胞)、胚胎生殖幹細胞(EG細胞)等多能幹細胞分化誘導而獲得者。

【0045】 如於專利文獻1中亦有記載般，已知患有某種疾病之對象及已衰老之對象之MSC與健康者之MSC相比治療效果較低，即便將自體MSC直接移植至該等對象亦無法期待較高之治療效果。另一方面，於本發明之製造方法中，由於可藉由三維培養載體上之低密度培養提高各個MSC之治療效果，故而即便以此種治療效果較低之MSC為原料，亦可製造治療效果較高之細胞片。具有治療效果較差之MSC之對象所罹患之疾病係慢性疾病，其例於專利文獻1中記載為MSC異常化之疾病。

【0046】 MSC於考慮其後之細胞移植療法中之安全性之情形時，較佳為自與投予細胞之個體同種或近緣種之個體採取。例如於對人類之個體進行細胞移植之情形時，較佳為使用自同種人類採取之細胞，更佳為自接受投予之同一人類個體採取之細胞，即自體MSC。

【0047】 於本發明中用於細胞片之製造之MSC可藉由一般方法自對象之骨髓液、脂肪組織、胎兒附屬組織、齒髓等試樣採取。例如，於使用骨髓液作為試樣之情形時，可藉由密度梯度離心法、骨髓播種法等公知方法分離MSC。於本發明之較佳之實施形態之一中，MSC係來自骨髓或脂肪組織之MSC。

【0048】 本發明之製造方法包括於具有包含纖維之三維構造之細胞培養載體上，以 3.0×10^5 細胞/cm²以下之細胞數播種MSC之步驟。本步驟可藉由於通常之細胞培養用容器內放置上述具有包含纖維之三維構造之片狀細胞培養載體，加入培養基浸漬細胞培養載體，並於其上播種已調節細胞數之MSC而進行。

【0049】 細胞培養用容器之底面只要為可將三維培養載體以攤開狀態配置之程度之大小即可，較佳為於將三維培養載體以攤開狀態放置時，未被三維培養載體覆蓋之部分較少。於特定之實施形態中，細胞培養用容器之底面為與三維培養載體相同之形狀，或為三維培養載體內切之形狀。

【0050】 播種之MSC之細胞數可根據製造之細胞片之平均細胞密度適當調節。典型地，播種之MSC之細胞數只要為製造之細胞片平均細胞密度之10倍量至1/10倍量之範圍即可，較佳為10倍量至1倍量之範圍。例如於製備平均細胞密度為 3.0×10^4 細胞/cm²之細胞片之情形時，播種之MSC之細胞數為 3.0×10^5 細胞/cm²~ 3.0×10^3 細胞/cm²。又，於製備平均細胞密度為 2.0×10^4 細胞/cm²之細胞片之情形時，播種之MSC之細胞數為 2.0×10^5 細胞/cm²~ 2.0×10^3 細胞/cm²，於製備平均細胞密度為 1.0×10^4 細胞/cm²之細胞片之情形時，播種之MSC之細胞數為 1.0×10^5 細胞/cm²~ 1.0×10^3 細胞/cm²，於製備平均細胞密度為 5.0×10^3 細胞/cm²之細胞片之情形時，播種之MSC之細胞數為 5.0×10^4 細胞/cm²~ 5.0×10^2 細胞/cm²，於製備平均細胞密度為 1.0×10^3 細胞/cm²之細胞片之情形時，播種之MSC之細胞數為 1.0×10^4 細胞/cm²~ 1.0×10^2 細胞/cm²，於製備平均細胞密度為 0.5×10^3 細胞/cm²之細胞片之情形時，播種之MSC之細胞數為 0.5×10^4 細胞/cm²~ 0.5×10^2 細胞/cm²。

【0051】再者，上述播種細胞數係三維培養載體之每單位面積之數值，實際之播種細胞數係藉由與將細胞培養用容器之底面積除以三維培養載體之面積所算出之值相乘而算出。

【0052】培養基可使用通常用於MSC之培養之培養基，例如 α -MEM(Alpha Minimum Essential Media， α -最低必需培養基)、DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Media，達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基)等。該等培養基亦可含有MSC之增殖所需之各種成分，例如血清成分等。

【0053】本發明之製造方法包括於具有包含纖維之三維構造之培養載體上培養MSC，而製備平均細胞密度為 3.0×10^4 細胞/cm²以下之細胞片之步驟。

【0054】三維培養載體上之MSC之培養係進行24小時~144小時，較佳為24小時~96小時，更佳為48~96小時。培養步驟中之培養溫度及氣體濃度只要為通常用於MSC之培養之溫度及氣體濃度之範圍內即可，溫度例如為25°C~37°C，較佳為30°C~37°C，更佳為37°C，氧濃度例如為2%~30%，較佳為2%~20%。可藉由於上述範圍調節於培養載體播種之細胞數及視需要調節培養時間或溫度等培養條件，而製備具有目標之平均細胞密度之細胞片。

【0055】藉由上述方法所製造之細胞片可直接以包含三維培養載體作為支持體之態樣使用，於可自三維培養載體剝離之情形時亦可剝離使用，或者亦可於自三維培養載體剝離後，視需要與另一支持體組合使用。作為可剝離細胞片之培養載體，例如可列舉表面由聚(N-異丙基丙烯醯胺)以及其他因溫度、pH值、光等之刺激而分子構造發生變化之高分子被覆

之具有包含纖維之三維構造的細胞培養載體。

【0056】 於細胞片不包含支持體之情形時，即於MSC相互接著而成之細胞片之情形時，培養載體無需為片狀。於該情形時，三維培養載體只要為培養時細胞可與包含纖維之三維構造接觸者，則形狀無限制。三維培養載體可為設置於細胞培養容器內而使用之嵌入狀之形狀，或者可為包含纖維之三維構造於細胞培養容器之內表面、例如孔之底面等一體成形之形狀。

【0057】 細胞片上之MSC可維持於未分化之狀態，或者可分化為所需之細胞。MSC之未分化狀態之維持可藉由使用適於未分化狀態之維持之培養基，例如HyClone AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cell Expansion Kit(Thermo Fisher Scientific)、MesenCult(商標)MSC Basal Medium(STEMCELL Technology)、Stromal Cellutions(商標)Media(DV Biologics)、MSC專用培養基套組(MSCGM BulletKit、Lonza)等培養MSC而進行。又，MSC之分化可藉由於加入具有向所需之細胞之分化誘導作用之因子的分化誘導培養基中進行培養等眾所周知之方法進行。例如，於分化為成骨細胞時可使用骨形態發生蛋白(BMP)4、BMP2等，於分化為脂肪細胞時可使用地塞米松、3-異丁基-1-甲基黃嘌呤、胰島素等作為分化誘導因子。

【0058】 製造方法中之活化劑之利用

為進一步提高製備之細胞片之治療效果，較佳為於本發明之製造方法中，使用包含以來自哺乳動物之胎兒附屬物中之提取物作為有效成分之活化劑之培養基進行MSC之培養。

【0059】 於本發明中可利用之「來自哺乳動物之胎兒附屬物中之提

取物」之一例係藉由參照將其整體併入至本說明書之專利文獻1即國際公開WO2015/137419號說明書及與之對應之美國專利即美國專利申請公開US2017/0071984號公報中所記載之提取物。該提取物係藉由將哺乳動物，較佳為人類之胎兒娩出後作為胎衣自母體娩出或藉由剖腹產自母體摘出之胎兒附屬物，較佳為臍帶組織、胎盤組織或卵膜直接或者切斷或破碎後浸漬於蒸餾水、生理鹽水、磷酸緩衝生理鹽水、於細胞培養中通常所使用之培養基等提取介質中等而製備之提取物。提取物尤佳為不含具有來自作為供體之哺乳動物之增殖能力之細胞者。具體之提取操作及條件只要遵循專利文獻1中所記載之操作及條件即可。

【0060】 又，「來自哺乳動物之胎兒附屬物中之提取物」之另一例可為藉由對胎兒附屬物實施自胎兒附屬物，典型地自胎盤製備生理活性物質時業者通常使用之處理，例如使用酸或酵素之水解等處理而製備者。該提取物之例係由Melsmon製藥股份有限公司銷售之作為人類胎盤酸水解物之胎盤製劑「Melsmon」、由日本生物製劑股份有限公司銷售之人類胎盤製劑「Laennec」以及其他市售胎盤製劑及被稱為胎盤萃取物之各種市售品。

【0061】 本發明中之「含有來自哺乳動物之胎兒附屬物中之提取物作為有效成分之活化劑」係指含有上述提取物作為有效成分之用於增加MSC之治療效果之用劑，以下表示為「活化劑」。

【0062】 用於培養之培養基中之活化劑之濃度以蛋白質換算之最終濃度計，只要為0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 則足夠，較佳為0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，更佳為0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，於特定之實施形態中，可為0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

【0063】藉由以下實施例進一步詳細地說明本發明，但本發明並不限定於該等例。

[實施例]

【0064】參考例1 於三維培養載體上在活化劑之存在下之MSC培養
1)活化劑之製備

依照專利文獻1中之記載，由人類胎盤組織製備活化劑。簡而言之，將已切細之人類胎盤組織以相對於濕重50 g為100 mL之比率放入無血清培養基(alpha-MEM)，於4°C振盪72小時。藉由離心分離回收上清液，獲得作為胎盤組織提取物之活化劑。

【0065】 2)MSC之培養

將來自於變形性股關節病患者之人工關節置換手術時所採取之骨髓之MSC(OA-MSC)於不含活化劑之MSC培養基(含有15%FBS(Fatal Bovine Serum，胎牛血清)、1%青黴素、1%鏈黴素、4500 mg/L葡萄糖及L-麩醯胺之DMEM)中進行培養。回收細胞，並分別於作為具有包含纖維之三維構造之細胞培養載體之Preset VECCELL 6孔(註冊商標)(Vessel股份有限公司)播種 8×10^4 細胞/孔，於Cellbed 24孔(註冊商標)(日本Vilene股份有限公司)播種 2×10^4 細胞/孔，於3D-insert PS-200 12孔及3D-insert PS-400 12孔(3DBiotek公司)播種 3.8×10^4 細胞/孔，又，於作為比較例之培養載體之細胞培養基材A(平均纖維直徑0.1~0.5 μm ，空隙率70%以下，平均孔面積0.2 μm^2 ，24孔)播種 2×10^4 細胞/孔，使用不含活化劑之MSC培養基於37°C培養72小時。基材A係於其一部分具有包含纖維之三維構造，但不具有三維構造之平坦之膜狀之部分占細胞接著面之約50%之基材。去除培養基後，將以蛋白質換算計含10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之上述活

活化劑或不含活化劑之MSC培養基分別於Preset VECCELL 6孔中加入2 mL，於Cellbed 24孔及基材A中加入0.6 mL，於3D-insert PS-200 12孔及3D-insert PS-400 12孔中加入1 mL，並於37°C培養4天。該培養進行1~3次後，回收細胞，製備繼代數1~3之OA-MSC(Osteoarthritis-Mesenchymal stem cell，骨關節炎間葉系幹細胞)。

【0066】 進而，於作為平板狀之二維細胞培養載體之Corning(註冊商標) Costar(註冊商標)細胞培養6孔板(Thermo Fisher Science公司)播種用不含活化劑之MSC培養基所培養之OA-MSC 6×10^4 細胞/孔，並於100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之活化劑之存在下進行培養。藉由進而重複該培養1次，製備繼代數2之對照之OA-MSC。

【0067】 實施例1 細胞片之製備

於不含活化劑之MSC培養基(含有15%FBS、1%青黴素、1%鏈黴素、4500 mg/L葡萄糖及L-麩醯胺之DMEM)中培養OA-MSC。回收細胞，於二維培養載體(Corning(註冊商標) Costar(註冊商標)細胞培養6孔板，Thermo Fisher Science公司)中放入2.5 cm \times 2.5 cm之細胞培養基材B，播種 8×10^4 細胞之MSC，加入含1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之活化劑之MSC培養基2 mL，並於37°C培養72小時，藉此製備繼代數1之OA-MSC之片。藉由該方法製備之MSC片包含約8500細胞/cm²之MSC。再者，細胞培養基材B係藉由國際公開WO2016/068266號說明書及Liu L, Kamei K et al. Biomaterials 124 (2017) 47-54中所記載之方法製造之於包含聚乙醇酸之基底構件上含有包含聚乙醇酸之奈米纖維之三維培養載體。

【0068】 實施例2 MSC之基因表現分析

回收於參考例1及實施例1中製備之MSC，使用Tri

Reagent(Molecular Research Center, Inc)提取總RNA(Ribonucleic Acid, 核糖核酸)。藉由反轉錄反應合成選殖DNA(Deoxyribonucleic Acid, 去氧核糖核酸), 使用包含表1所示之鹼基序列之引子組對OCT4、Nanog、SOX2、DNMT1、TERT、IL-6、IDO、TSG-6、p16^{ink4a}、p21、p53、 α -SMA及18sRNA實施即時PCR(Polymerase Chain Reaction, 聚合酶鏈鎖反應)。

表中之(F)係指正向引子, (R)係指反向引子。

[表1]

| 基因 | 鹼基序列 | 序列編號 |
|--------------|----------------------------|------|
| OCT4(F) | GACAGGGGAGGGGAGGAG | 1 |
| OCT4(R) | CTTCCCTCCAACCAGTTGCC | 2 |
| NANOG(F) | TGGACACTGGGTGAATCCTTC | 3 |
| NANOG(R) | CGTTGATTAGGCTCCAACCAT | 4 |
| SOX2(F) | GGGAAATGGGAGGGGTGCAA | 5 |
| SOX2(R) | TTGCGTGAGTGTGGATGGGA | 6 |
| DNMT1(F) | CGTAAAGAAGAATTATCCGAGG | 7 |
| DNMT1(R) | GTTTTCTAGACGTCCATTCC | 8 |
| TERT(F) | CGGAAGAGTGTCTGGAGC | 9 |
| TERT(R) | GGATGAAGCGGAGTCTGGA | 10 |
| IL-6(F) | GATGAGTACAAAAGTCCGTGATCCA | 11 |
| IL-6(R) | CTGCAGCCACTGGTTCTGT | 12 |
| IDO(F) | GCATTTTCAGTGTCTTCGCATA | 13 |
| IDO(R) | TCATACACCAGACCGTCTGATAGC | 14 |
| TSG-6(F) | CCCATTGTGAAGCCAGGGCCCAACTG | 15 |
| TSG-6(R) | GGAAGTCATCTCCACAGTATCTTCCC | 16 |
| P16INK4a(F) | AGCATGGAGCCTTCGGCTGA | 17 |
| P16INK4a(R) | CCATCATCATGACCTGGATCG | 18 |
| P21(F) | GAGACTCTCAGGGTCGAAA | 19 |
| P21(R) | TTAGGGCTTCCTCTTGGAGA | 20 |
| TP53(F) | TGACTGTACCACCATCCACTA | 21 |
| TP53(R) | AAACACGCACCTCAAAGC | 22 |
| alpha-SMA(F) | GCAGCCCAGCCAAGCACTGT | 23 |
| alpha-SMA(R) | TGGGAGCATCGTCCCCAGCA | 24 |
| RNA18S(F) | ATCGGGGATTGCAATTATTC | 25 |
| RNA18S(R) | CTCACTAAACCATCCAATCG | 26 |

【0069】基於以18sRNA為管家基因, 在二維培養載體上於100 μ g/mL之活化劑之存在下所培養之對照之OA-MSc而算出 $\Delta\Delta$ CT值, 分析

基因表現曲線，從而進行聚類。將於Preset VECCELL上在0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之活化劑之存在下所培養之OA-MS(C(VECELL_0.1)、於Cellbed上在0.1、1或10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之活化劑之存在下所培養之OA-MS(分別為CellBed_0.1、CellBed_1、CellBed_10)、於3D-insert PS-200上在0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之活化劑之存在下所培養之OA-MS(3D.insert200_0.1)、於3D-insert PS-400上在10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之活化劑之存在下所培養之OA-MS(3D.insert400_10)、於基材A上在0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之活化劑之存在下所培養之OA-MS(A_0.1)、於基材A上在1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之活化劑之存在下所培養之OA-MS(A_1)、於基材B上在0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之活化劑之存在下所培養之OA-MS(B_0.1)、及於二維培養載體上在100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之活化劑之存在下所培養之對照之OA-MS(2D_100)之結果示於圖1。

【0070】 確認到與2D_100相比，於三維培養載體上在活化劑存在下所培養之OA-MS之被設為與幹細胞性相關之基因之DNMT1、Nanog、SOX2及OCT4、被設為與免疫抑制及抗炎症功能相關之基因之IDO、TSG6及IL-6、被設為與端粒酶活性相關之基因之TERT之表現量均增加，被設為與細胞老化相關之基因之P53、被設為與細胞骨架相關之基因之 α -SMA之表現量均減少。OCT4、SOX2、Nanog、DNMT1、IDO、TSG6、IL-6及TERT均係於治療效果較高之MS中表現亢進之標記物，P53及 α -SMA係於治療效果較高之MS中表現受到抑制之標記物。又，p16^{ink4a}係本發明者等人發現之與OCT4、SOX2、Nanog、IDO及TSG6呈高度相關之治療效果為正之標記物。根據該等結果，認為於任一三維培養載體上培養之OA-MS之治療效果均優於在二維培養載體上培養之OS-MS。另一方面，A_1及A_0.1表現出與2D_100類似之基因表現曲線，推

測於基材A上培養之OA-MSc之治療效果與於通常之二維培養載體上培養之OA-MSc程度相同。

實施例3 細胞片之腎臟病治療效果(併發急性腎損傷之糖尿病性腎病)

【0071】 對發作糖尿病性腎病之14月齡之雄性OLETF大鼠(星野試驗動物)尾靜脈投予Rituximab(中外製藥)5 mg/隻，1日1次，投予4日。初次投予Rituximab 10~14日後，將實施例1之MSc片移植至已投予Rituximab之大鼠之腎臟(MSc片組，n=6)。將僅進行Rituximab投予者設為試劑對照(Vehicle)(試劑對照組，n=7)。於異氟醚吸入麻醉下，自側臥位之大鼠之最下位肋骨下切開皮膚，切開肌肉層並向體外拉出一個腎臟。以不損傷腎上腺之方式謹慎地切開腎筋膜、脂肪層及纖維囊並自腎表面剝離，牽拉至腎門部。以包裹腎臟之整體之方式貼附1片2.5 cm×2.5 cm之MSc片及1片切成1/3之相同MSc片。對另一腎臟亦同樣地貼附MSc片。於MSc片移植當天、移植後3週及6週時自大鼠採取血液，並使用酵素法(SRL)測定血清肌酸酐。

【0072】 將於移植後11週存活之動物(試劑對照組、MSc片組均n=2)之血清肌酸酐之推移示於圖2。於試劑對照組中，確認到血清肌酸酐之經時性上升，相對於此，於MSc片組中，未確認到血清肌酸酐值之上升。該6週之腎功能維持相當於人類延遲5年開始透析，表現出MSc片之較高治療效果。又，將表示至移植後11週為止之存活率之存活(Kaplan-Meier)曲線示於圖3。MSc片組與試劑對照組相比表現出較高之存活率。

【0073】 進而，製作自移植後11週之動物摘出之腎臟之組織切片，並進行PAS(Periodic Acid-Schiff，過碘酸希夫)染色標本之光學顯微鏡觀察及電子顯微鏡觀察。於試劑對照組中，在幾乎所有之絲球體確認到硬

化，並觀察到系膜細胞及足細胞之異常(圖4左上、圖5)。又，於腎小管中，確認到腎小管間質之炎症細胞浸潤、腎小管上皮細胞之異常、腎小管上皮之脫落、基底膜之肥厚等(圖4左下、圖6、圖7)。另一方面，於MSC片組中，正常之絲球體殘存(圖4右上)，系膜細胞及足細胞正常化(圖8)。又，確認到腎小管上皮細胞之再生像(圖4右下之箭頭)、微絨毛較清楚之近端腎小管上皮、腎小管間質之炎症細胞之減少(圖9)等，確認到表示治癒之組織學發現。進而，於MSC片組中，於腎表面確認到新覆膜狀構造之形成，於其外側確認到大量毛細血管之再生(圖10、圖11)。

【0074】 於本試驗中使用之大鼠係除糖尿病性腎病外，還藉由抗癌劑處理進而誘發急性腎損傷，藉此發作程度一致之危重慢性腎臟病之模型動物，呈現出相當於腎病第4期(腎功能衰竭期)之非常嚴重之末期腎損傷。確認到本發明之細胞片即便對此類危重疾病亦表現出優異之治療效果。

【0075】 實施例4 細胞片之腎臟病治療效果(糖尿病性腎病)

於發作糖尿病性腎病之14月齡之雄性OLETF大鼠腎臟中，將實施例1中所製備之細胞片以與實施例3同樣之方式移植至腎纖維囊下(n=2/組)。將實施了僅切開背部皮膚及筋膜之假手術之大鼠設為假手術(Sham)組。於MSC片移植當天、移植後4週及11週時自大鼠採取血液，並使用酵素法(SRL)測定血清肌酸酐，使用UV(Ultraviolet，紫外線)法(SRL)測定尿素氮(BUN)。

【0076】 將血清肌酸酐及BUN之推移示於圖12。於假手術組中，確認到血清肌酸酐及BUN之經時性上升，相對於此，於MSC片組中未確認到。確認到本發明之片即便於未伴有急性腎損傷之糖尿病性腎病中亦表現

出優異之治療效果。

【0077】 實施例5 細胞片之腎臟病治療效果(糖尿病性腎病)

於不含活化劑之MSC培養基(含有10%FBS、1%青黴素、1%鏈黴素、4500 mg/L葡萄糖及L-麩醯胺之DMEM)中培養OA-MSC。回收細胞，於二維培養載體(Thermo Scientific(商標) Nunc(商標) Lab-Tek™，8孔，Thermo Fisher Science公司)中放入1×0.8 cm之Neoveil Nano(Gunze股份有限公司)，播種 4×10^3 細胞之MSC，加入不含活化劑之200 μ L之MSC培養基，並於37°C培養24小時，藉此製備繼代數1之OA-MSC片。藉由該方法製備之MSC片包含4781細胞/ cm^2 (所製備之各片之平均細胞密度3923~5884細胞/ cm^2 之平均值)之MSC。

【0078】 於發作糖尿病性腎病之16週齡之雄性KK-Ay小鼠之兩腎中，以不損傷腎上腺之方式謹慎地切開腎筋膜、脂肪層及纖維皮膜並自腎表面剝離，以包裹腎臟之整體之方式貼附、移植於上述所製作之MSC片(n=12)。準備未處理之發作糖尿病性腎病之相同週齡之KK-Ay(n=9)作為對照組。於MSC片移植前及移植後4週時採取小鼠之尿，並使用免疫比濁法(Oriental酵母工業股份有限公司)測定尿中白蛋白，使用酵素法(Oriental酵母工業股份有限公司)測定尿中肌酸酐。

【0079】 將MSC片移植前與MSC片移植後4週時之尿中白蛋白/肌酸酐比之差示於圖13。確認到尿中白蛋白/肌酸酐比於未處理組中增加，但於MSC片組中反而減少之傾向。確認到於本實施例中所使用之細胞片雖然與實施例1中所製備之細胞片相比平均細胞密度較低，但與實施例1中所製備之細胞片同樣地，表現出對糖尿病性腎病之優異治療效果。

【0080】 實施例6 細胞片之腎臟病治療效果(缺血再灌注引起之急性

腎損傷)

1)細胞片之製備

按照實施例1之方法，於2.5 cm×2.5 cm之基材B播種表2所示之細胞數之MSC，並使用不含活化劑之MSC培養基進行培養，藉此製備具有不同平均細胞密度之MSC之細胞片。

[表2]

| 細胞片 | 播種細胞數(/cm ²) | 平均細胞密度數(/cm ²) | |
|-----|--------------------------|----------------------------|-----------|
| A | 80000 | 53612 | 高(high) |
| B | 100000 | 47073 | |
| C | 35600 | 38247 | |
| D | 17800 | 17898 | 中(middle) |
| E | 6700 | 6619 | |
| F | 2222 | 2697 | |
| G | 777 | 981 | 低(low) |
| H | 8900 | 8581 | - |

【0081】對細胞片A~G上之MSC進行DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶)染色，並進行顯微鏡觀察(圖14)。測定以將MSC於該培養載體上培養至達到融合時之細胞密度為100%時之各細胞片上的%融合，結果片A~C為90%~70%融合，D~F為60%~10%融合，G為未達10%融合。

【0082】 2)基因表現分析

以與實施例2同樣之方式，藉由即時PCR測定細胞片B、G及H之MSC中之OCT4、Nanog、p16^{ink4a}及TERT之表現量(圖15)。推定出平均細胞密度越低全部基因之表現量越多，平均細胞密度較低之細胞片上之各個MSC之治療效果優於平均細胞密度較高之細胞片上之各個MSC。

【0083】 3)對缺血再灌注引起之急性腎損傷模型大鼠之移植試驗

將麻醉下之5週齡之雄性SD大鼠從腹部正中切開。首先鑑定右腎，用血管鉗阻斷右腎動脈。阻斷後立即以與實施例3同樣之方式，將於上述1)中製備之細胞片A~G之各者移植至腎纖維囊下。於60分鐘之阻斷之後，打

開血管鉗，解除阻斷。對於左腎，亦與上述同樣地，阻斷左腎動脈，移植細胞片，於60分鐘阻斷之後解除阻斷(n=1或2/組)。又，準備不移植細胞片而將腎筋膜、脂肪層及纖維囊自腎表面剝離並牽拉至腎門部之組(已進行假手術-腎覆膜處理)、及牽拉後復原之組(未進行假手術-腎覆膜處理)。

【0084】 將至移植後第10天為止之各大鼠之存活天數與細胞片之平均細胞密度之關係示於圖16，將表示平均細胞密度之每組(高、中、低)之存活率之存活曲線示於圖17。移植了平均細胞密度為中等程度之片D~F之大鼠全部存活至移植後第10天，但移植了平均細胞密度較高之片A~C之小鼠中之半數、及移植了平均細胞密度較低之片G之小鼠均於第10天前死亡。推斷MSC之絕對數較多之片A~C之上述結果係由於各個MSC之治療效果較低。又，推斷被推定為各個MSC之治療效果最高之片G之上述結果係由於發揮治療效果所需之細胞之絕對數不足。

【0085】 又，將表示至移植後第10天為止之已進行假手術-腎覆膜處理組及未進行假手術-腎覆膜處理組之存活率之存活曲線示於圖18。根據已進行假手術-腎覆膜處理組與未進行假手術-腎覆膜處理組相比存活率之降低速度較小，確認到藉由自腎表面剝離腎筋膜、脂肪層及纖維囊並使其遠離腎實質，急性腎損傷之影響得以緩和。

【0086】 實施例7 細胞片之阿茲海默症治療效果

1)細胞片之製備

按照實施例6之1)之方法，於2.5 cm×2.5 cm之基材B播種表3所示之細胞數之MSC，並於不含活化劑之MSC培養基中進行培養，藉此製備具有不同平均細胞密度之MSC之細胞片。

[表3]

| 細胞片 | 播種細胞數 ($\times 10^4$ 細胞/cm ²) | 平均細胞密度數 ($\times 10^4$ 細胞/cm ²) |
|-----|---|---|
| a | 8.67 | 3.19 |
| b | 0.65 | 1.45 |
| c | 0.87 | 0.41 |
| d | 0.22 | 0.37 |
| e | 0.07 | 0.18 |

【0087】 2)對阿茲海默症模型小鼠之移植試驗

於異氟醚吸入麻醉下，自bregma level至lambda level以可形成8 mm×5 mm之大小之開窗部之方式對15月齡之雄性APP/PS1小鼠(查爾斯河實驗室)進行開顱。將切成8 mm×5 mm之大小之細胞片自開窗部分別貼附1片至腦表面，靜置5分鐘後，將頭蓋骨復原並縫合。

【0088】 於移植後第3週，進行新奇物體認知試驗。新奇物體認知試驗之內容如以下所述。於第0天，將小鼠放入空無一物之盒子裏5分鐘，使之適應環境。於第1天，將小鼠放入放有2個相同物體之盒子裏5分鐘(Familiarization)，於1小時後將其中一個物質變為新奇物體，於5分鐘時，測定探索新奇物體或現有物之各時間。算出新奇物體之探索時間相對於2個物體之總探索時間之比率(優先指數(Preference index)；新奇/(新奇+現有物體探索時間)×100%)，以50%以上為認知功能良好。物體之位置於整個試驗中設置於相同位置。

【0089】 將根據移植片之平均細胞密度分為2個組並對優先指數進行繪圖之結果示於圖19。根據移植了 1.50×10^4 細胞/cm²以下之片之小鼠中，優先指數較高，認知功能良好，確認到本發明之細胞片即便對於阿茲海默症亦表現出治療效果。

【0090】 實施例8 使用來自小鼠脂肪組織之MSC之細胞片對腎臟病之效果

1)細胞片之製備

採取C57BL/6(雄性，10週齡)之附睪周圍脂肪，細細切碎後，每1 g脂肪加入1 mL包含0.4 PZ units/mL之Liberase(商標)之PBS(Phosphate Buffered Saline，磷酸鹽緩衝液)，於37°C靜置2小時。加入5 mL包含10%FBS之DMEM培養基並懸浮後，以300 g×5分鐘進行離心分離而去除上清液。將自1 g脂肪中回收之細胞顆粒播種於1片15 cm dish，於包含10%FBS、1%PS(Phosphatidylserine，磷脂醯絲胺酸)之DMEM培養基中培養4天，更換培養基後，回收接著細胞(來自小鼠脂肪組織之MSC)。

【0091】 將 $6\times 10^4/\text{cm}^2$ 、 $3\times 10^4/\text{cm}^2$ 、 $4\times 10^3/\text{cm}^2$ 之來自小鼠脂肪組織之MSC分別播種於 1×0.8 cm之Neoveil Nano(Gunze股份有限公司)，並加入不含活化劑之MSC培養基2 mL，於37°C培養24小時，藉此製作培養後之最終細胞密度(平均值±標準誤差、DAPI染色細胞數)為 $45480\pm 4953/\text{cm}^2$ 、 $27541\pm 5475/\text{cm}^2$ 、 $3800\pm 908/\text{cm}^2$ 之繼代數1之細胞片。將對各細胞片上之MSC進行DAPI染色後之顯微鏡觀察圖像示於圖20。

【0092】 2)對缺血再灌注引起之急性腎損傷模型小鼠之移植試驗

切開麻醉下之10-11週齡之雄性C57BL6小鼠之右側後背部，使右腎臟露出。結紮右側腎動靜脈，切除右腎臟動脈靜脈，摘出右腎。確認無出血情況，將腎臟放回體內之原本之位置，將皮膚創口閉合。其次，切開左側後背部，使左腎臟露出，對左腎動靜脈使用非侵入性血管鉗阻斷血流。於22分鐘阻斷期間，以不損傷腎上腺之方式謹慎地切開腎筋膜、脂肪層及纖維皮膜並自腎表面剝離，牽拉至腎門部。以包裹腎臟之整體之方式貼附 45480 細胞/ cm^2 之細胞片(n=4)、 27541 細胞/ cm^2 之細胞片(n=4)或 3800 細胞/ cm^2 之細胞片(n=3)，左腎之缺血開始22分鐘後取下鉗，使血液再灌

注。準備於未移植細胞片而摘出右腎後使左腎缺血22分鐘並再灌注之組(假手術組：n=3)、及未處理之正常小鼠(n=4)作為對照組。

【0093】 於自細胞片貼附起24小時後，自小鼠採取血液，使用UV法(SRL)測定尿素氮(BUN)。將結果示於圖21。移植了高細胞密度(45480細胞/cm²)之細胞片之組之BUN與假手術組程度相同，確認到急性腎損傷之進展，相對於此，移植了中細胞密度或低細胞密度(27541細胞/cm²、3800細胞/cm²)之細胞片之組之BUN與正常小鼠程度相同。根據以上內容，確認到使用來自小鼠脂肪組織之MSC之本發明之細胞片與使用來自人類骨髓之MSC之本發明之細胞片同樣地，表現出抑制急性腎損傷之進展之效果。

【序列表】

<110> 北海道公立大學法人札幌醫科大學(SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY)

<120> 生物體移植用細胞片及其製造方法

<130> P17SM01W0

<140> 108114451

<141> 2019-04-25

<150> JP2018-084565

<151> 2018-04-25

<160> 26

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> OCT4正向引子

<400> 1

gacaggggag gggaggag

18

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> OCT4反向引子

<400> 2

cttccctcca accagttgcc c

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> NANOG正向引子

<400> 3

tggacactgg ctgaatcctt c

21

<210> 4

<211> 21

| | |
|--------------------------|----|
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> NANOG反向引子 | |
| <400> 4 | |
| cgttgattag gctccaacca t | 21 |
| <210> 5 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> SOX2正向引子 | |
| <400> 5 | |
| gggaaatggg aggggtgcaa | 20 |
| <210> 6 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> SOX2反向引子 | |
| <400> 6 | |
| ttgcgtgagt gtggatggga | 20 |
| <210> 7 | |
| <211> 22 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> DNMT1正向引子 | |
| <400> 7 | |
| cgtaaagaag aattatccga gg | 22 |
| <210> 8 | |
| <211> 21 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |

| | | |
|-------|----------------------------|----|
| <220> | | |
| <223> | DNMT1反向引子 | |
| <400> | 8 | |
| | gttttctaga cgtccattca c | 21 |
| <210> | 9 | |
| <211> | 18 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | TERT1正向引子 | |
| <400> | 9 | |
| | cggaagagtg tctggagc | 18 |
| <210> | 10 | |
| <211> | 19 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | TERT1反向引子 | |
| <400> | 10 | |
| | ggatgaagcg gagtctgga | 19 |
| <210> | 11 | |
| <211> | 24 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | IL-6正向引子 | |
| <400> | 11 | |
| | gatgagtaca aaagtcctga tcca | 24 |
| <210> | 12 | |
| <211> | 19 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |

| | |
|---|----|
| <223> IL-6反向引子 | |
| <400> 12 ctgcagccac tggttctgt | 19 |
| <210> 13 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| <220> <223> IDO正向引子 | |
| <400> 13 gcattttca gtgttcttcg cata | 24 |
| <210> 14 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| <220> <223> IDO反向引子 | |
| <400> 14 tcatacacca gaccgtctga tagc | 24 |
| <210> 15 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| <220> <223> TSG-6正向引子 | |
| <400> 15 cccattgtga agccagggcc caactg | 26 |
| <210> 16 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| <220> <223> TSG-6反向引子 | |

| | |
|---|----|
| <400> 16 ggaagctcat ctccacagta tcttccc | 27 |
| <210> 17 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| <220> <223> P16INK4a正向引子 | |
| <400> 17 agcatggagc cttcggctga | 20 |
| <210> 18 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| <220> <223> P16INK4a反向引子 | |
| <400> 18 ccatcatcat gacctggatc g | 21 |
| <210> 19 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| <220> <223> P21正向引子 | |
| <400> 19 gagactctca gggtcgaaaa | 20 |
| <210> 20 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| <220> <223> P21反向引子 | |
| <400> 20 ttagggcttc ctcttgaga | 20 |

| | | |
|-------|-------------------------|----|
| <210> | 21 | |
| <211> | 21 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | TP53正向引子 | |
| <400> | 21 | |
| | tgactgtacc accatccact a | 21 |
| <210> | 22 | |
| <211> | 18 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | TP53反向引子 | |
| <400> | 22 | |
| | aaacacgcac ctcaaagc | 18 |
| <210> | 23 | |
| <211> | 20 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | aSMA正向引子 | |
| <400> | 23 | |
| | gcagcccagc caagcactgt | 20 |
| <210> | 24 | |
| <211> | 20 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | aSMA反向引子 | |
| <400> | 24 | |
| | tgggagcatc gtccccagca | 20 |

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RNA18S正向引子

<400> 25
atcggggatt gcaattattc 20

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RNA18S反向引子

<400> 26
ctcactaac catccaatcg 20

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種生物體移植用細胞片，其包含間葉系幹細胞及生物體相容性之支持體，

其平均細胞密度為 3.0×10^3 細胞/cm²~ 3.0×10^4 細胞/cm²，

支持體係於細胞接著面包含具有奈米~微米單位之平均纖維直徑之纖維於三維方向堆積之構造的細胞培養載體，且

該細胞片係藉由包含以下步驟之方法而製備：於細胞培養載體上以使平均細胞密度成為 3.0×10^3 細胞/cm²~ 3.0×10^4 細胞/cm²之方式進行培養。

【第2項】

如請求項1之細胞片，其中細胞培養載體具有開口部，該開口部係藉由具有奈米~微米單位之平均纖維直徑之纖維而形成於與細胞之接觸面上。

【第3項】

如請求項2之細胞片，其中開口部之平均直徑為500 nm~1000 μm。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之細胞片，其中支持體係含有包含生物降解性聚合物之奈米纖維而成之細胞培養載體。

【第5項】

如請求項1至3中任一項之細胞片，其用於腎臟病之治療。

【第6項】

如請求項5之細胞片，其應用於腎臟之纖維囊下。

【第7項】

如請求項1至3中任一項之細胞片，其用於腦損傷或神經退化性疾病之治療，且於其表面具有平均密度為 3.0×10^3 細胞/cm²~ 1.5×10^4 細胞/cm²之間葉系幹細胞。

【第8項】

如請求項7之細胞片，其應用於腦之損傷部位、退化部位或其等之附近。

【第9項】

如請求項1至3中任一項之細胞片，其中間葉系幹細胞係來自骨髓或脂肪組織之間葉系幹細胞。

【第10項】

如請求項1至3中任一項之細胞片，其中間葉系幹細胞係自患有疾病之對象所分離之間葉系幹細胞。

【第11項】

一種生物體移植用細胞片之製造方法，該細胞片之平均細胞密度為 3.0×10^3 細胞/cm²~ 3.0×10^4 細胞/cm²，該方法包括以下之步驟：

於細胞培養載體上，以使平均細胞密度成為 3.0×10^3 細胞/cm²~ 3.0×10^4 細胞/cm²之方式培養間葉系幹細胞，且

細胞培養載體之細胞接著面包含具有奈米~微米單位之平均纖維直徑之纖維於三維方向堆積之構造。

【第12項】

如請求項11之製造方法，其中細胞培養載體具有開口部，該開口部係藉由具有奈米~微米單位之平均纖維直徑之纖維而形成於與細胞之接觸

面上。

【第13項】

如請求項12之製造方法，其中開口部之平均直徑為500 nm~1000 μm。

【第14項】

如請求項11至13中任一項之製造方法，其中細胞培養載體係含有包含生物降解性聚合物之奈米纖維而成之細胞培養載體。

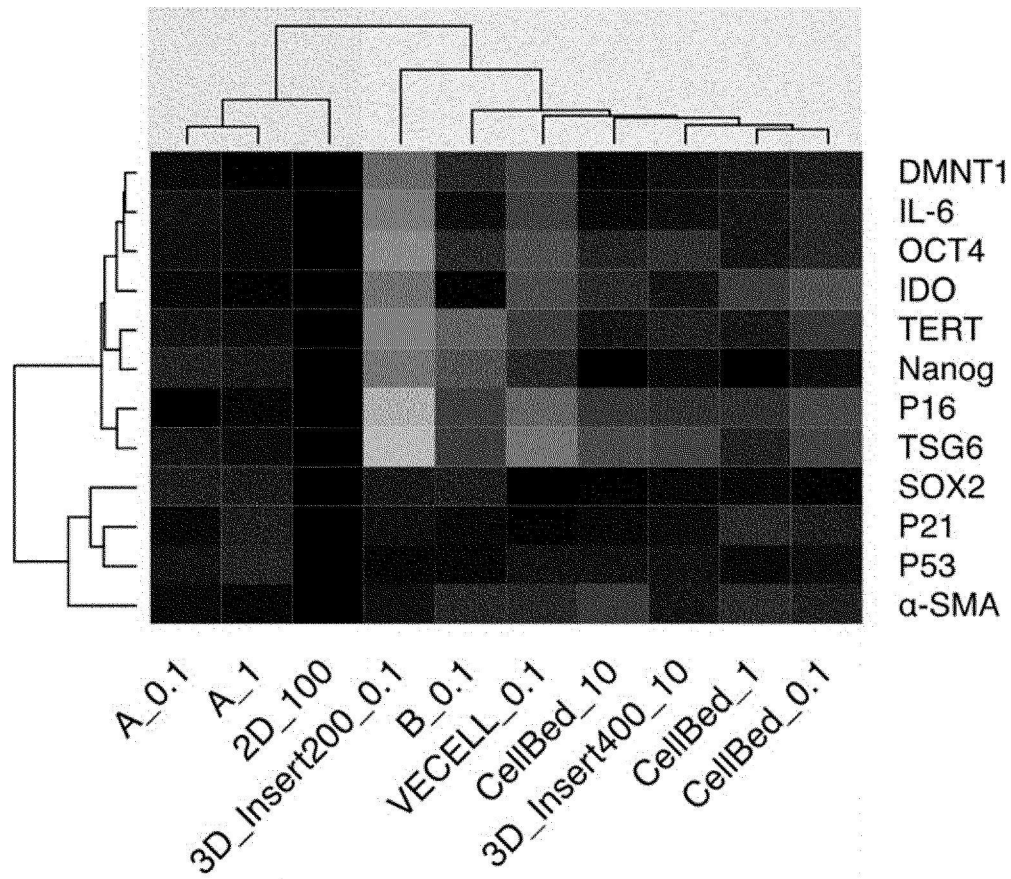
【第15項】

如請求項11至13中任一項之製造方法，其中間葉系幹細胞係來自骨髓或脂肪組織之間葉系幹細胞。

【第16項】

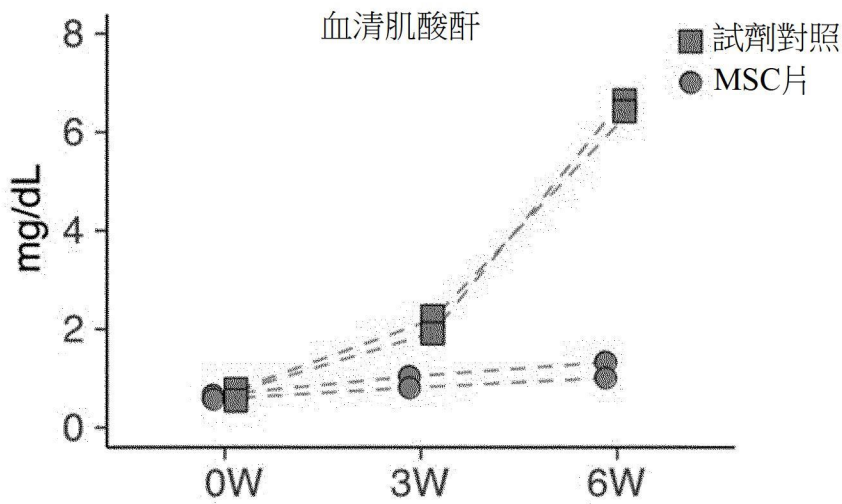
如請求項11至13中任一項之製造方法，其中間葉系幹細胞係自患有疾病之對象所分離之間葉系幹細胞。

【發明圖式】

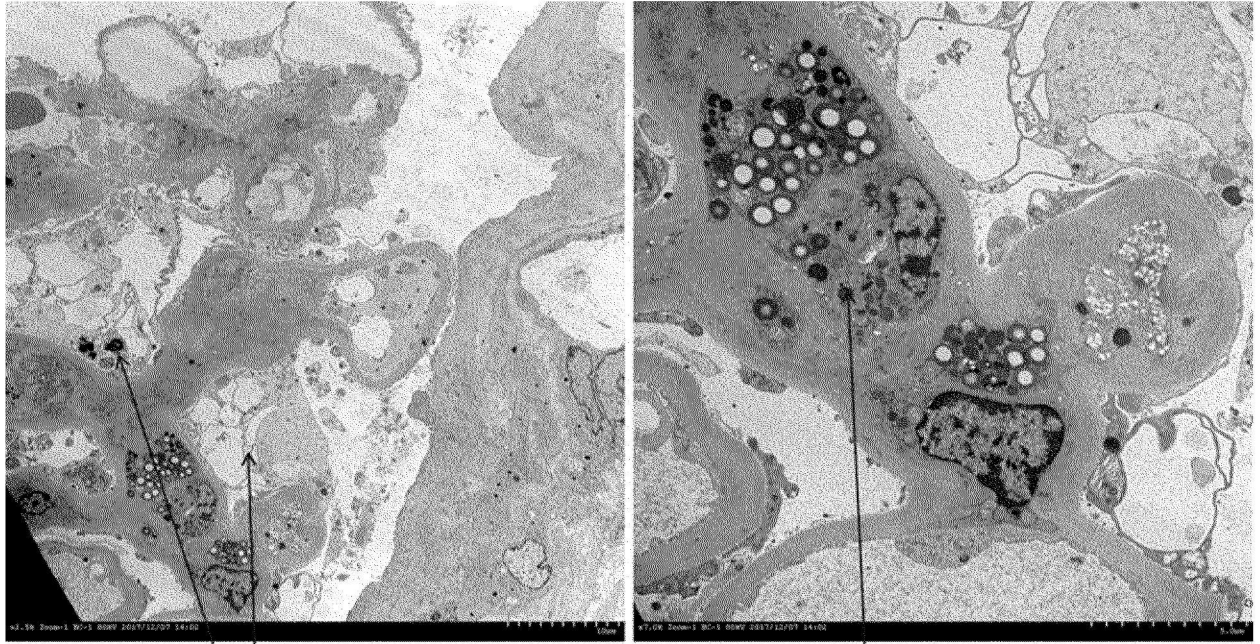


將無活化劑之2D MSC設為1時之mRNA表現

【圖1】



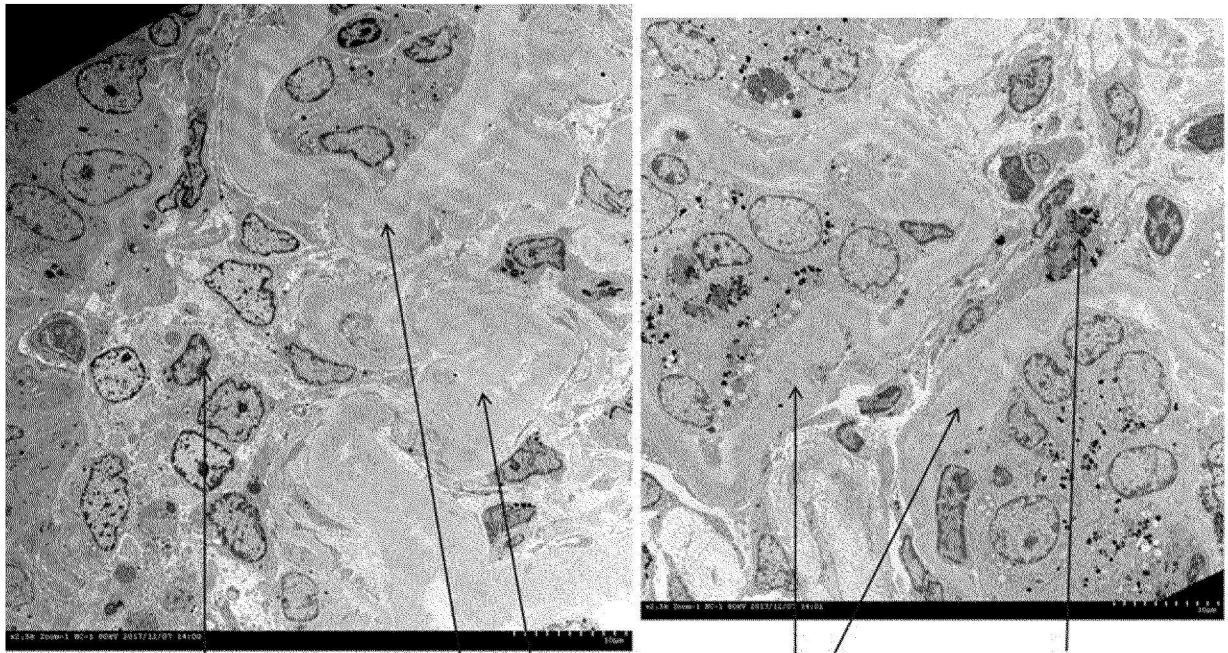
【圖2】



足細胞異常

系膜細胞異常

【圖5】



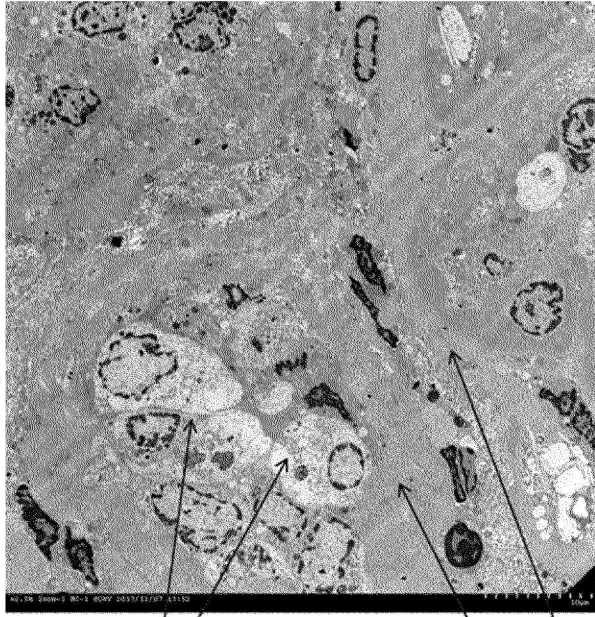
腎小管間質之炎症細胞浸潤

基底膜之肥厚

基底膜之肥厚

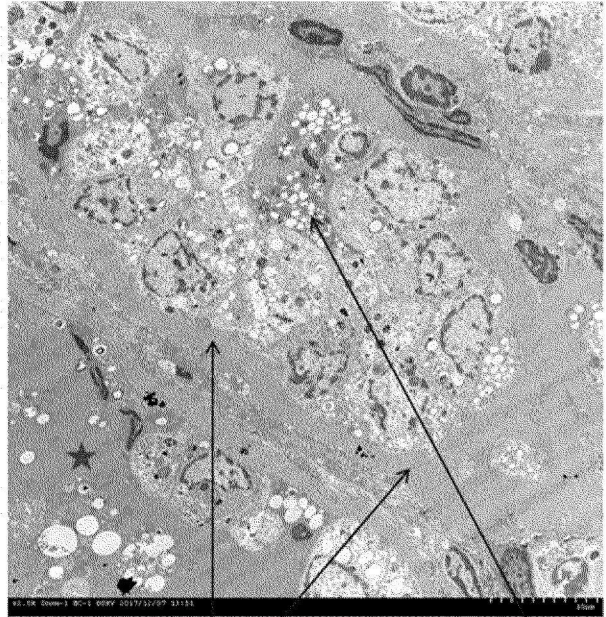
腎小管間質之炎症細胞浸潤

【圖6】



腎小管上皮細胞之異常

基底膜之肥厚

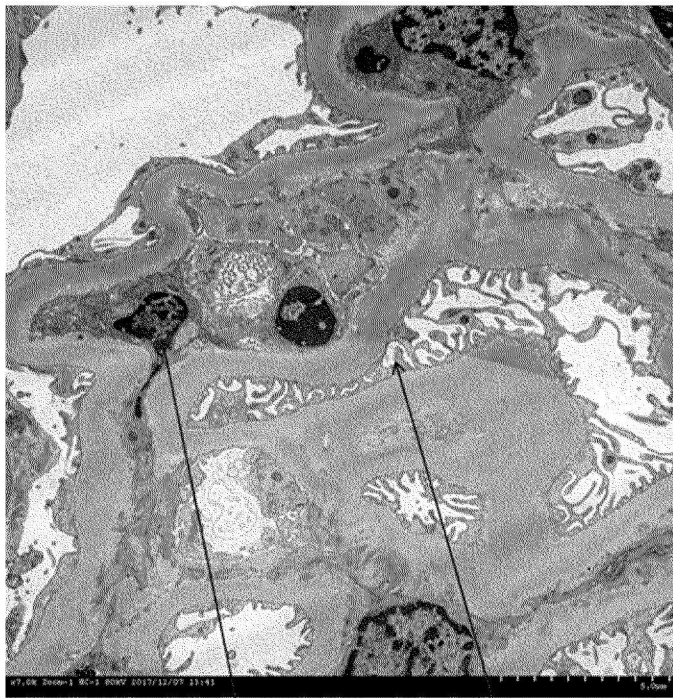


基底膜之肥厚

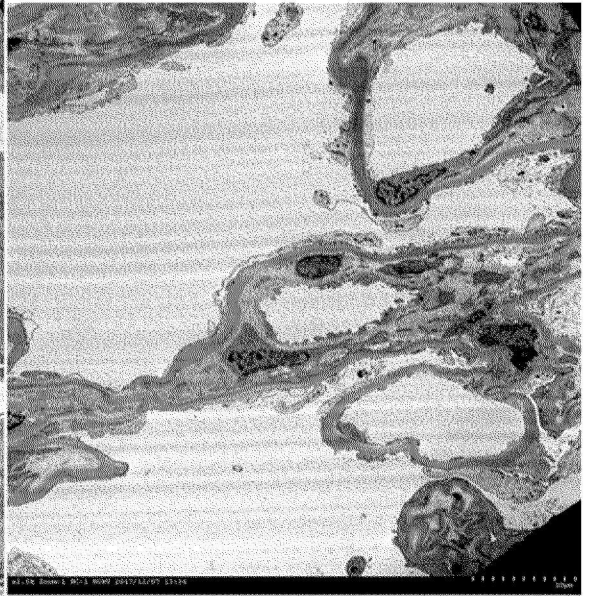
腎小管上皮細胞之異常

★ 腎小管上皮之脫落

【圖7】

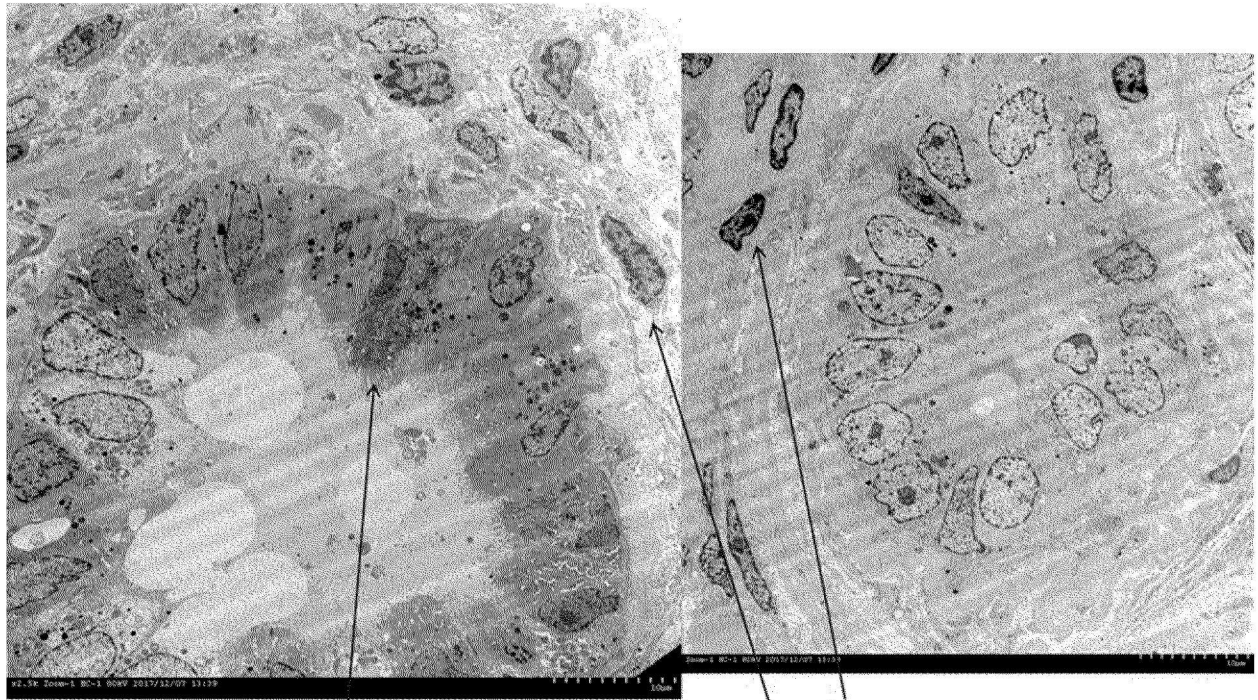


系膜細胞正常化，足細胞之足突堅挺



其他絲球體 低倍鏡
基本正常

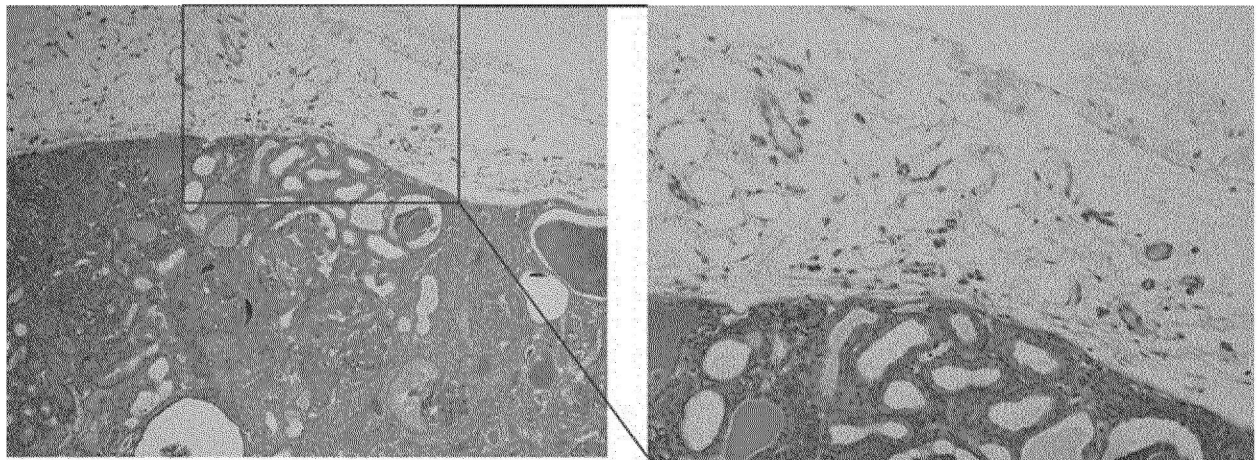
【圖8】



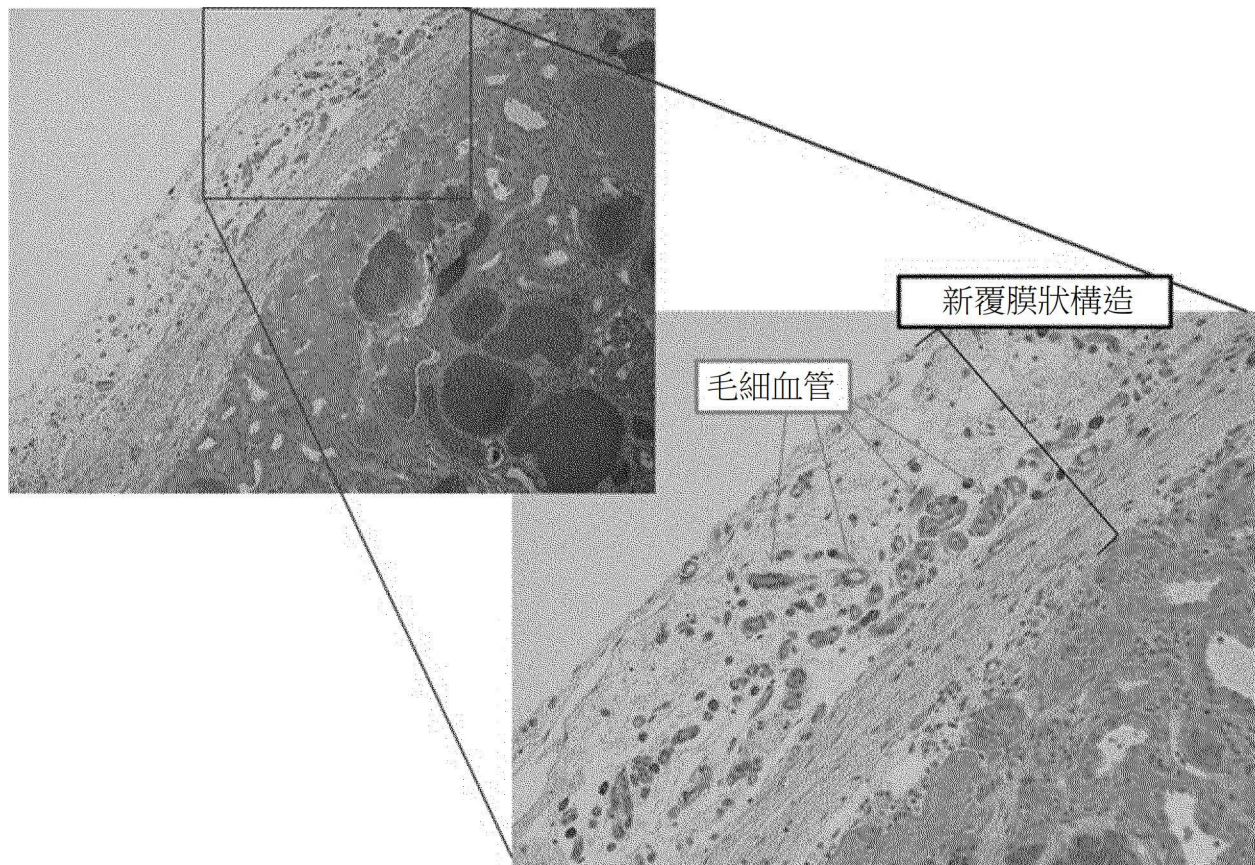
微絨毛較清楚之近端腎小管上皮

腎小管間質之炎症細胞之減少

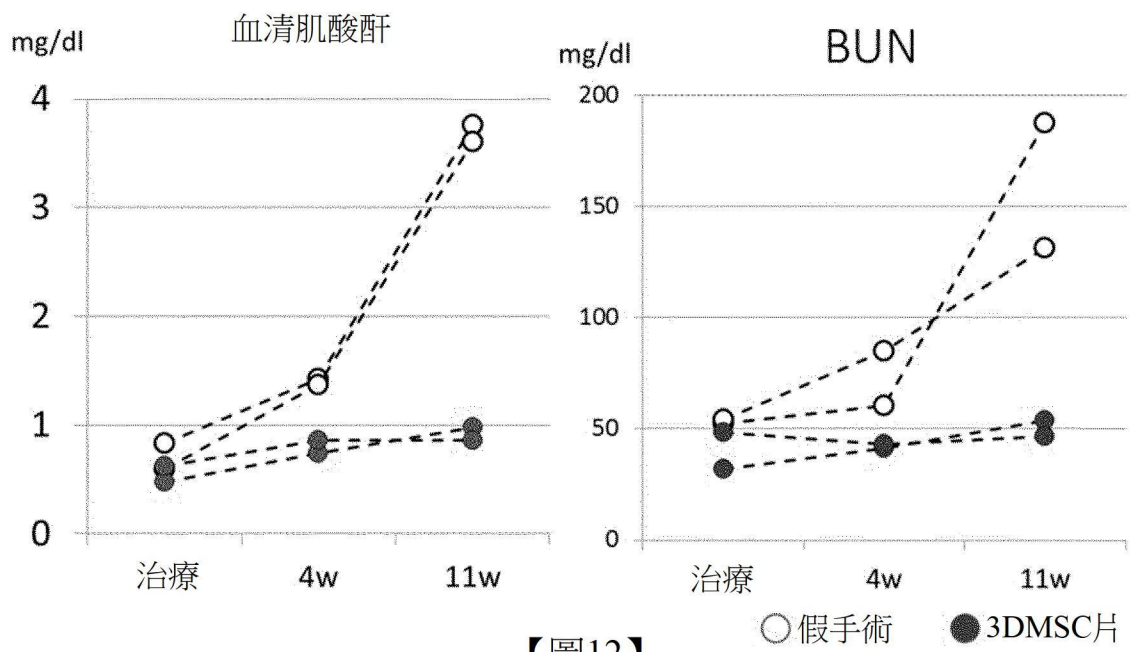
【圖9】



【圖10】

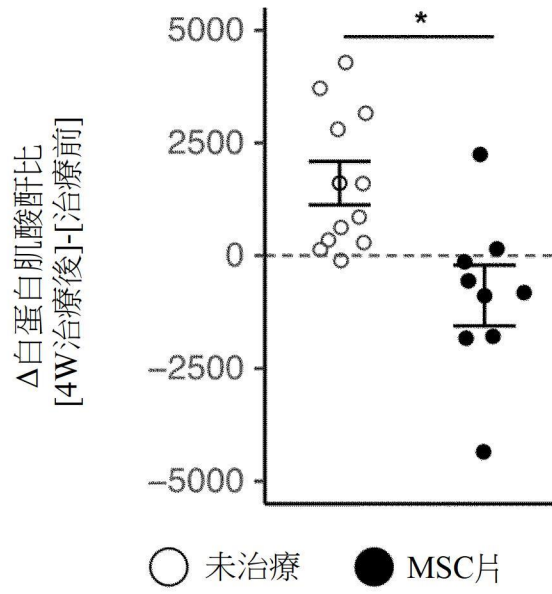


【圖11】

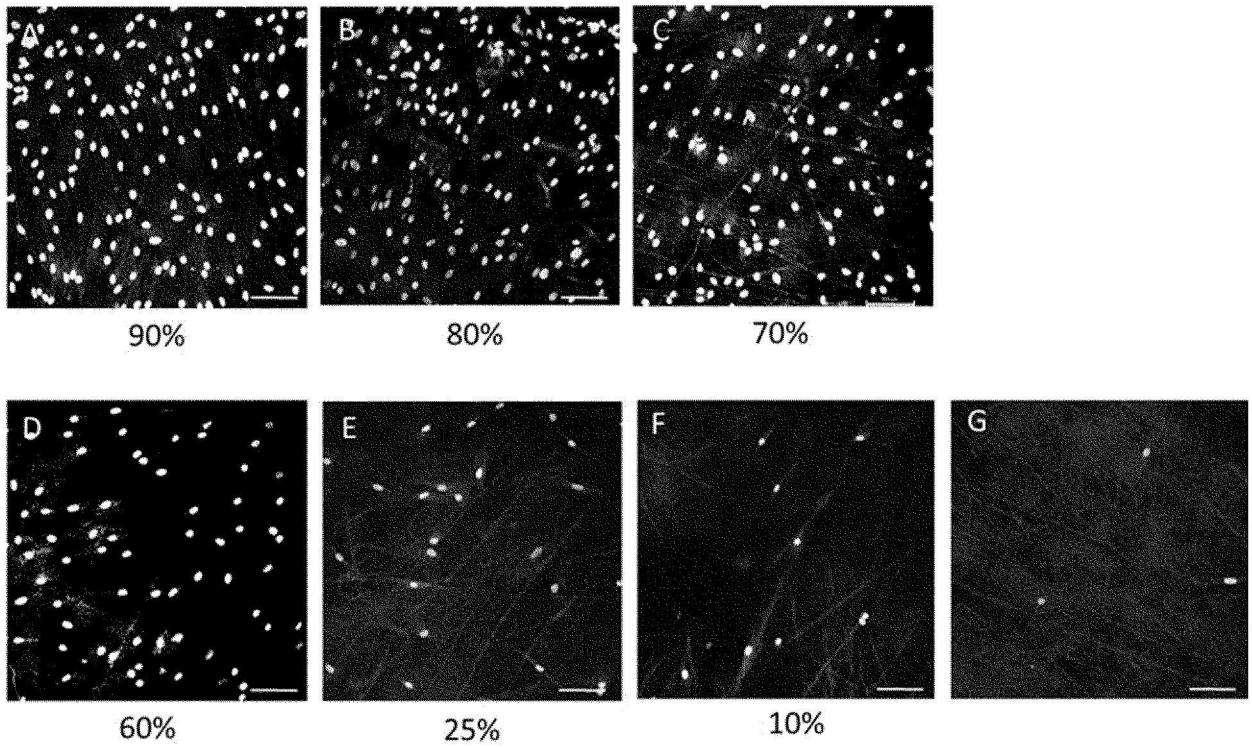


【圖12】

○假手術 ●3DMSC片

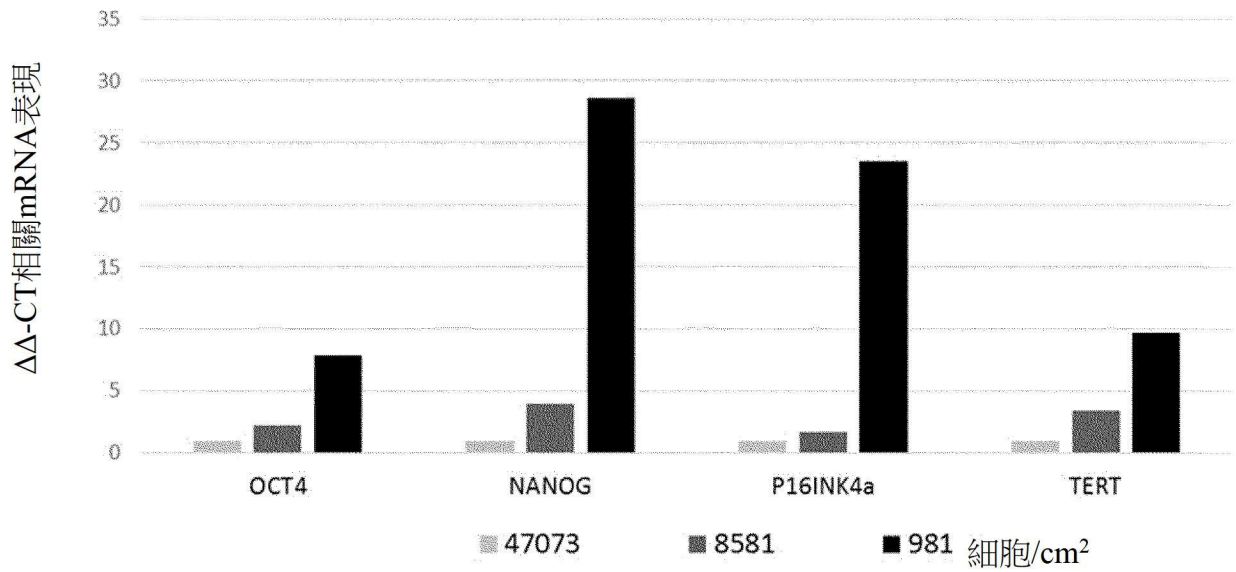


【圖13】

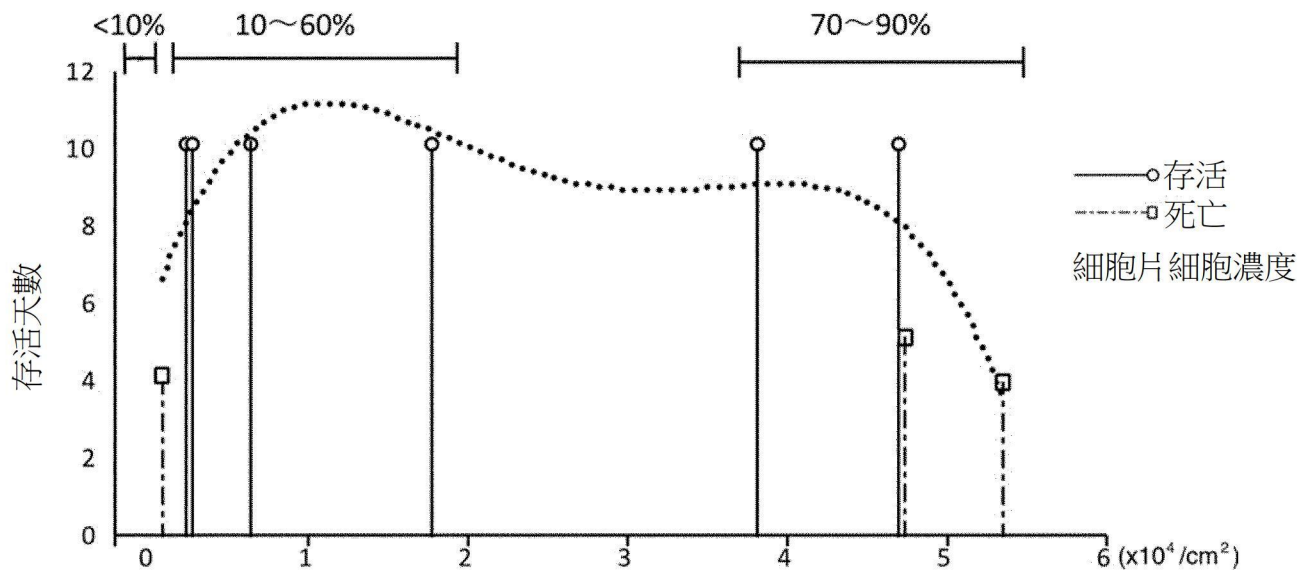


【圖14】

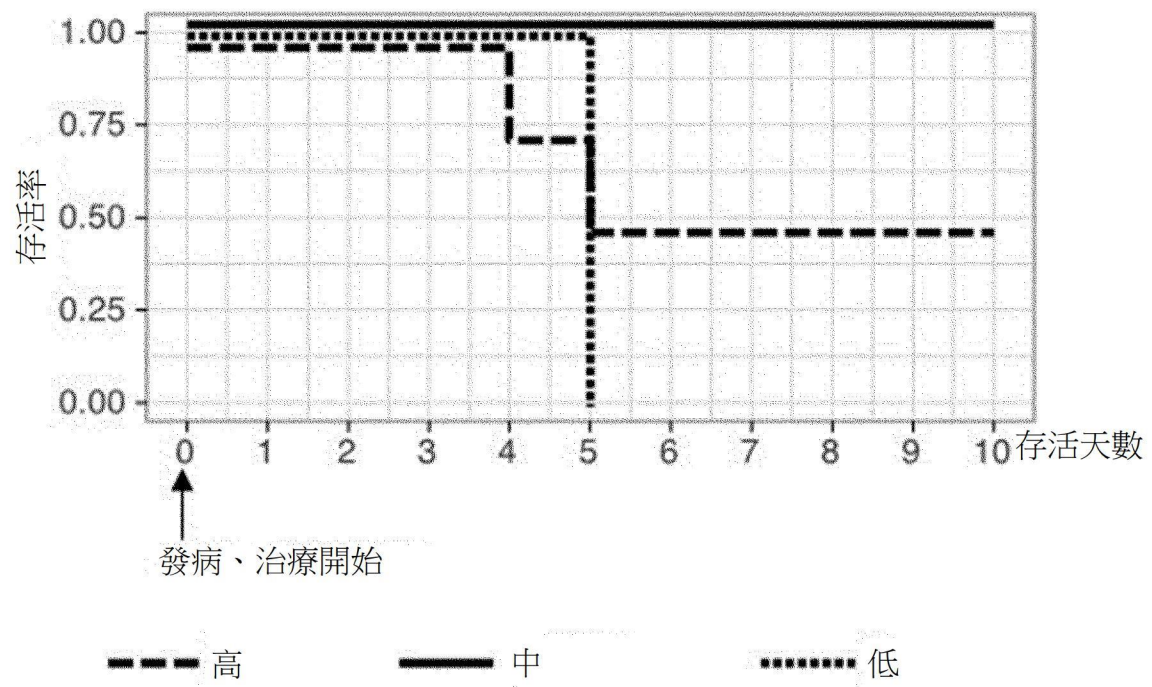
細胞之最終濃度之差異導致之基因表現量之差異



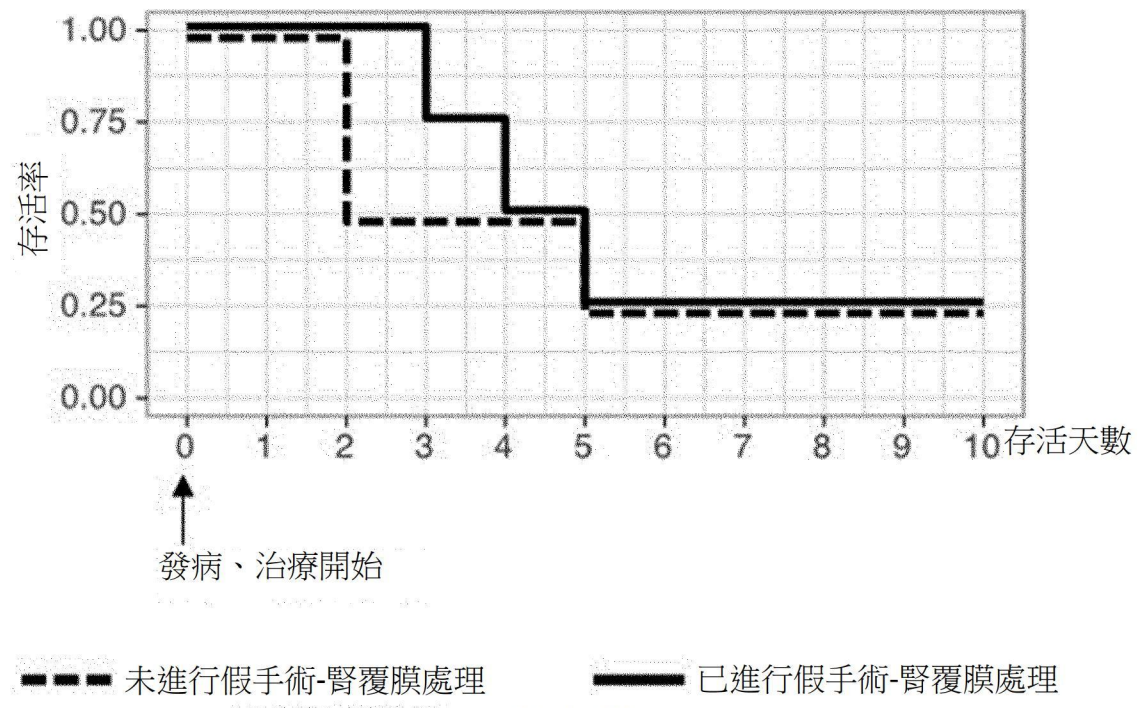
【圖15】



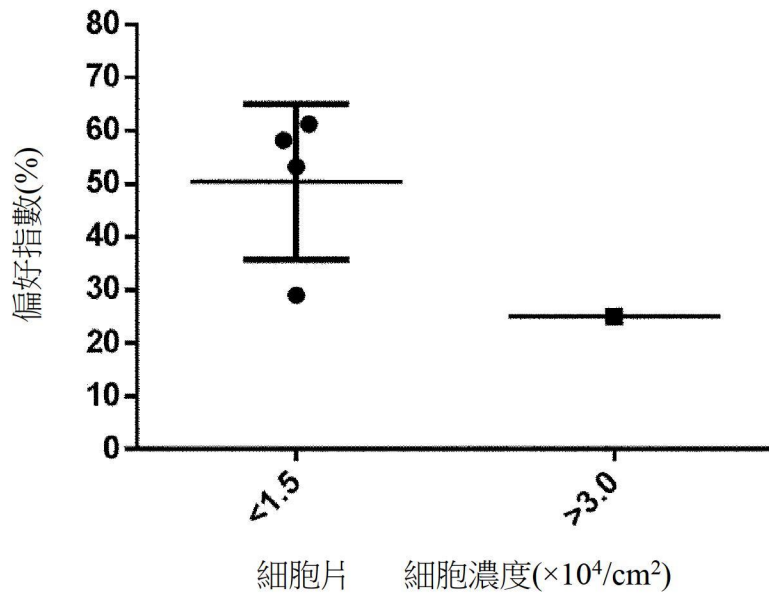
【圖16】



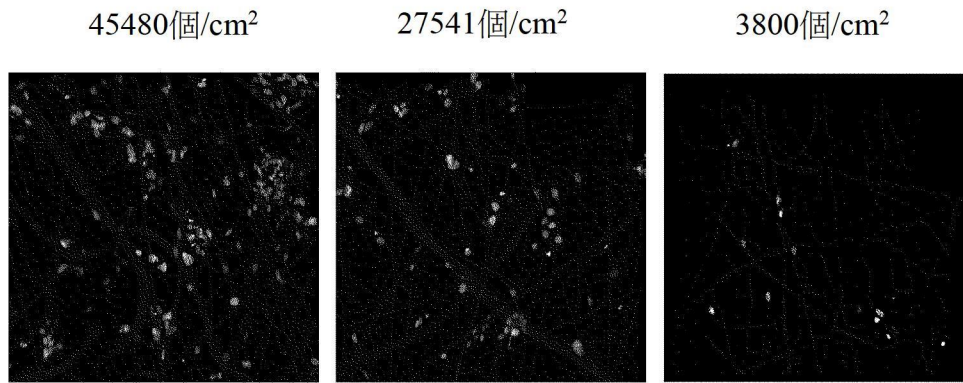
【圖17】



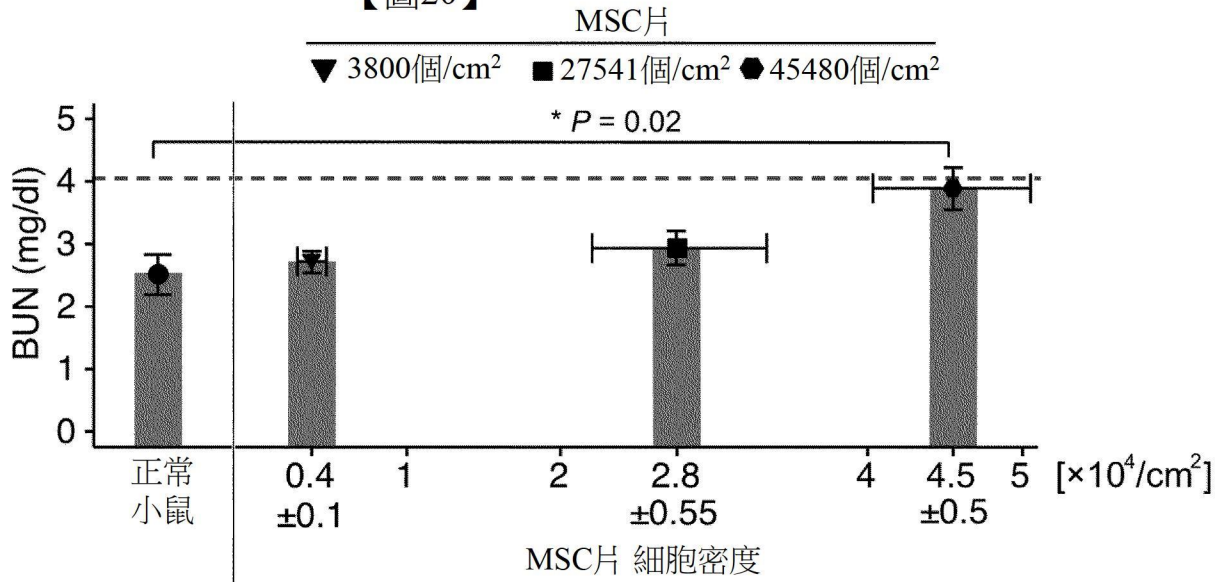
【圖18】



【圖19】



【圖20】



 急性腎功能衰竭模型小鼠假手術組之BUN平均值
 ┆ BUN之標準誤差(SE) ┆ ┆ 細胞數之標準誤差(SE)

【圖21】