(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
2016 年 3 月 24 日(24.03.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/043201 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/077 (2010.01) *A61P 9/10* (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/076207

(22) 国際出願日: 2015 年 9 月 16 日(16.09.2015)

(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 2014-188322 2014 年 9 月 16 日(16.09.2014) JP

(71) 出願人: 国立大学法人山口大学(YAMAGUCHI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田１６７７－１ Yamaguchi (JP).

(72) 発明者: 濱野公一(HAMANO Kimikazu); 〒7558505 山口県宇部市南小串１丁目１－１ 国立大学法人山口大学医学部内 Yamaguchi (JP). 細山徹(HOSOYAMA Tohru); 〒7558505 山口県宇部市南小串１丁目１－１ 国立大学法人山口大学医学部内 Yamaguchi (JP). 上野耕司(UENO Koji); 〒7558505 山口県宇部市南小串１丁目１－１ 国立大学法人山口大学医学部内 Yamaguchi (JP).

(74) 代理人: 奥原 康司, 外(OKUHARA Koji et al.); 〒1900023 東京都立川市柴崎町２丁目１０番１８号 観月ビル ３０５ ウイングリーン特許事務所 立川オフィス Tokyo (JP).

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

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 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)）

(54) **Title**: METHOD OF PREPARING FUNCTIONALLY ACTIVATED CELL SHEET THROUGH LOW OXYGEN TREATMENT

(54) 発明の名称 : 低酸素処理により機能賦活した細胞シートの製造方法

(57) **Abstract**: The present invention provides a method of preparing a cell sheet which is more usefully used in the treatment of damage in living tissue. In particular, the present invention provides a method for preparing a cell sheet which achieves a sufficient functional improvement of an infarcted myocardium by transplanting the cell sheet for an infarcted myocardium in myocardial infarction. More specifically, the present invention relates to a method of preparing a cell sheet, the method comprising: a step for culturing cells on a culture substrate to form a cell sheet derived from the cells; a step for culturing the cell sheet under a low oxygen condition at a predetermined temperature for a predetermined period of time; and a step for detaching the cell sheet from the culture substrate after cultured under said condition.

(57) 要約: 本発明は、生体組織の損傷を治療するために用いる上で、より有効な細胞シートを製造する方法を提供する。特に、心筋梗塞における梗塞心において、該細胞シートを移植することにより、梗塞心の十分な機能改善を実現する細胞シートの製造方法を提供する。 すなわち、本発明は細胞シートを製造する方法であって、培養基材上で細胞を培養し、該細胞由来の細胞シートを形成させる工程、該細胞シートを、所定の温度及び低酸素条件にて、所定の期間培養する工程、該条件にて培養後、該細胞シートを培養基材から剥離する工程からなる方法である。

WO 2016/043201 A1

明　細　書

発明の名称 ：

低酸素処理により機能賦活した細胞シートの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、低酸素処理により機能賦活した細胞シートの製造方法、および該製造方法によって製造された細胞シートに関する。

背景技術

[0002] 高齢化社会を迎え、わが国の心不全患者数は潜在的な患者を含めると約１６０万人に上り、さらにその中で、心筋梗塞を含む虚血性心疾患患者の占める割合は約半数の８０万人に達する（非特許文献１）。

とりわけ心血管の慢性的な梗塞によって引き起こされる陳旧性心筋梗塞は、自覚症状が少なく心筋細胞の壊死と心臓の菲薄化・瘢痕化が広範囲に生じ重篤な心不全（慢性心不全）を導くことから、効果的な治療法の早期確立が望まれる。

[0003] 細胞移植療法は様々な疾患や組織損傷に対する有効な治療手段として注目されており、動物実験では心筋梗塞に対する治療効果も認められている（非特許文献２）。特に間葉系幹細胞やＣａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅ由来細胞（ＣＤＣ）は、種々の血管成長因子（ＶＥＧＦなど）を産生し、移植後に血管新生や心機能回復を誘導できることから、心不全治療における有望な細胞種と考えられている（非特許文献３）。

しかし、こうした移植細胞では、梗塞心に対して生着率が低く、血管成長因子の産生能も十分でない、といった問題点が指摘されており、より高い心筋再生誘導効果を得るには、これらの課題をクリアし、移植細胞の持つ特性を最大限引き出す方法論の確立が必要であった。

[0004] 近年、移植用の生物材料として、所望の細胞をシート状に培養した細胞シートの開発が進められている。細胞シートは、所望の細胞を大量に、損傷部位に定着させることができ、更には、レシピエント組織の特性に合わせて、

適度に組織化させた細胞集団を移植することも可能とする、大変有用な治療用材料である。

[0005] 該細胞シートは、循環器系外科領域においても、標的部位での細胞生着率を向上させる技術として研究され、特に心臓分野では梗塞心における高い生着性とそれに伴う心筋再生誘導の促進が報告されている（非特許文献４、５）。

[0006] しかしながら、通常の培養細胞にかわり、細胞シートを心筋梗塞などの疾患治療に用いたとしても、梗塞心の十分な機能改善を実現するためには、更なる細胞機能の増強が望まれており、具体的には、移植細胞の生存率や血管新生効果の向上が必要である。このように、細胞シートの移植については、これまで様々な報告はあるものの、該細胞シートの機能において、その移植用生物材料としての治療効果をより亢進する条件については、未だ十分には解明されておらず、生体組織の損傷を治療するために用いる上で、より良い細胞シートを製造する方法に関し、改善すべき問題が残されている。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1：厚生労働省ＨＰ： ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｍｈｌｗ．ｇｏ．ｊｐ／ｔｏｕｋｅｉ／ｓａｉｋｉｎ／ｈｗ／ｋａｎｊａ／０８／ｉｎｄｅｘ．ｈｔｍｌ

非特許文献2：Ｐｔａｓｚｅｋ ｅｔ ａｌ． ２０１２， Ｌａｎｃｅｔ， Ｖｏｌ．３７９ ｐｐ．９３３－９４２

非特許文献3：Ｇｎｅｃｃｈｉ ｅｔ ａｌ． ２０１２， Ｖａｓｃｕｌａｒ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ， Ｖｏｌ．５７， ｐｐ．４８－５５

非特許文献4：Ｍｉｙａｈａｒａ ｅｔ ａｌ． Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ Ｖｏｌ．１２， ｐｐ．４５９－４６５

非特許文献5：Ａｌｓｈａｍｍａｒｙ ｅｔ ａｌ． ２０１３， Ｓｕｒｇ Ｔｏｄａｙ． Ｖｏｌ．４３ ｐｐ．９７０－９７６

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、生体組織の損傷を治療するために用いる上で、より有効な細胞シートを製造する方法を提供する。特に、心筋梗塞における梗塞心において、該細胞シートを移植することにより、梗塞心の十分な機能改善を実現する細胞シートの製造方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0009] 発明者らは、細胞シートの製造方法につき鋭意研究を行った結果、一旦、培養基材上で細胞を培養し、細胞シートを形成させた後、該シートを、低温及び低酸素条件にて、所定の期間培養し（低酸素プレコンディショニング）、その後、該シートを培養基材から剥離することで得られる細胞シートは、該プレコンディショニング処理を行わないものに比べ、血管新生に重要な働きを果たす血管成長因子の産生量が大幅に増加していることを見出した。更に、発明者らは、該処理を施した細胞シートを、陳旧性心筋梗塞モデルマウスの不全心に移植したところ、未処理の細胞シートによる移植に比べ、有意な心機能（左室駆出率及び左室内径短縮率）の改善を見出すことにより、本発明を完成させた。

[0010] 従って、本発明は以下の（１）～（６）である。

（１） 以下の（ａ）～（ｃ）の工程を含む細胞シートを製造する方法。

（ａ）培養基材上で細胞を培養し、該細胞由来の細胞シートを形成させる工程、

（ｂ）該細胞シートを、所定の温度及び低酸素条件にて、所定の期間培養する工程、

（ｃ）該条件にて培養後、該細胞シートを培養基材から剥離する工程

（２） 前記細胞が、Ｃａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅ由来細胞であることを特徴とする（１）に記載の方法。

（３） 前記低酸素条件が、酸素濃度０％～８％であることを特徴とする（１）又は（２）に記載の方法。

（４） 前記所定の温度が、３０℃～３６℃であることを特徴とする（１）

乃至（３）のいずれかに記載の方法。

（５）　前記培養期間が、１２時間～７２時間であることを特徴とする（１）乃至（４）のいずれかに記載の方法。

（６）　（１）乃至（５）のいずれかに記載の方法により製造した細胞シート。

発明の効果

[0011]　本発明の方法によれば、血管新生に重要な働きを果たす血管成長因子の産生量が大幅に増加し、これを心筋梗塞モデルマウスに移植することで、有意な心機能（左室駆出率及び左室内径短縮率）の改善を可能とする細胞シートを製造することができる。

従って、本発明により、心筋梗塞に代表される虚血性心疾患の治療に用いることのできる移植用生物材料として、より有益な細胞シートを取得することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]ｃａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅ由来細胞（ＣＤＣ）シート作成の流れ。心臓組織片から心臓組織由来細胞（Ｅｘｐｌａｎｔ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｃｅｌｌ：ＥＤＣ）を調製し、該ＥＤＣがサブコンフルエントに達した時点で細胞を培養皿から剥離して、浮遊培養に移行することで、微小なＣａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅを得た。該Ｃａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅを培養皿に播種し、再び接着培養を行うことで、接着したＣａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅから這い出てきた細胞をＣａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｃｅｌｌ（Ｃａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅ由来細胞；ＣＤＣ）とし、該ＣＤＣ由来の細胞シート（ＣＤＣ　ｓｈｅｅｔ；ＣＤＣシート）を成形した。

[図2]通常培養（Ｎｏｒｍｏｘｉａ）及び低酸素プレコンディショニング処理（Ｈｙｐｏｘｉａ）を施したＣＤＣシートにおけるカスパーゼ７に対するウェスタンブロット解析。

[図3]通常培養（Ｎｏｒｍｏ　ｓｈｅｅｔ）に対する低酸素プレコンディショニング処理（Ｈｙｐｏ　ｓｈｅｅｔ）を施したマウスＣＤＣシートにおける

血管内皮細胞増殖因子（ｍＶＥＧＦ）及び肝細胞増殖因子（ｍＨＧＦ）の産生促進。

[図4]通常培養（Ｎｏｒｍｏ　ｓｈｅｅｔ）に対する低酸素プレコンディショニング処理（Ｈｙｐｏ　ｓｈｅｅｔ）を施したヒトＣＤＣシートにおける血管内皮細胞増殖因子（ｈＶＥＧＦ）の産生促進。

[図5]ヒト臍帯由来血管内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）のチューブ形成に対する、通常培養（Ｎｏｒｍｏ）及び低酸素プレコンディショニング処理（Ｈｙｐｏ）を施したＣＤＣシート培養上清の影響。Ａ；培養上清処理開始12時間後の培養細胞像。血管様チューブ構造物の形成が認められる。Ｂ：Ｎｏｒｍｏ群及びＨｙｐｏ群における、１視野当たりに形成された血管様チューブ構造物の数。

[図6]低酸素プレコンディショニングによるＣＤＣシートでのＡｋｔシグナル伝達経路の亢進。

[図7]通常培養（Ｎｏｒｍｏ）に対する、低酸素プレコンディショニング刺激（Ｈｙｐｏ）によるＣＤＣシート内のリン酸化Ａｋｔの増加。

[図8]ＰＩ３Ｋ阻害剤ＬＹ２９４００２添加による、低酸素プレコンディショニング処理（Ｈｙｐｏｘｉａ又はＨｙｐｏ）を施したＣＤＣシート内でのリン酸化Ａｋｔの減少（Ａ）および培養上清中のヒトＶＥＧＦ（ｈＶＥＧＦ）産生亢進の抑制（Ｂ）。いずれも通常培養（Ｎｏｒｍｏｘｉａ又はＮｏｒｍｏ）レベルに留まっている。

[図9]Ａ；マウス筋線維芽細胞株ＳｍｃＭＦに対する、ヒトＣＤＣシート培養上清の処理及びリン酸化ヒストンＨ３（ｐＨＨ３）に対する免疫蛍光染色のスケジュール。Ｂ；通常培養（Ｎｏｒｍｏ）又は低酸素プレコンディショニング処理（Ｈｙｐｏ）ＣＤＣシート培養上清により処理したＳｍｃＭＦの、ｐＨＨ３に対する免疫蛍光染色像及びＤＡＰＩ染色像。Ｃ；Ｎｏｒｍｏ又はＨｙｐｏ処理ＣＤＣシート培養上清により処理したＳｍｃＭＦにおける、増殖中の筋線維芽細胞率（視野あたりのｐＨＨ３陽性細胞／総細胞数（％））。

[図10]通常培養（Ｎｏｒｍｏｘｉａ又はＮｏｒｍｏ）に対する、低酸素プレコンディショニング刺激（Ｈｙｐｏｘｉａ又はＨｙｐｏ）による、ＣＤＣシートにおける抑制性液性因子エンドグリン（Ｅｎｄｏｇｌｉｎ）の発現促進。

[図11]マウス慢性心不全モデル（ｏＭＩ）での左室駆出率（ＬＶＥＦ）及び左室内径短縮率（ＬＶＦＳ）の低下。左図；ｏＭＩ作成（冠動脈左前下行枝（ＬＡＤ）結紮（ｌｉｇａｔｉｏｎ））、心エコーによるモデル形成確認（ｃｈｅｃｋ）及びサンプリングのスケジュール。右図；ＬＡＤ　ｌｉｇａｔｉｏｎ　４週間後における擬似手術群（Ｓｈａｍ　Ｏｐｅｒａｔｉｏｎ群；Ｓｈａｍ）及びマウス慢性心不全モデル群（ｏＭＩ）での左室駆出率（ＬＶＥＦ）および左室内径短縮率（ＬＶＦＳ）の比較。

[図12]機能増強したＣＤＣシート移植による、マウス慢性心不全モデルでの左室駆出率（ＬＶＥＦ）及び左室内径短縮率（ＬＶＦＳ）の回復。マウスＣＤＣシートに対して、移植２４時間前に低酸素プレコンディショニング処理を行う群（Ｈｙｐｏ　Ｓｈｅｅｔ群）と行わない群（通常培養群；Ｎｏｒｍｏ　Ｓｈｅｅｔ群）を作成し、該ＣＤＣシート群を、マウス慢性心不全モデル（ｏＭＩ）に移植して、両群間でのＬＶＥＦおよびＬＶＦＳそれぞれの移植前からの回復率（ΔＬＶＥＦおよびΔＬＶＦＳ）を比較した。

[図13]Ａ：通常培養（Ｎｏｒｍｏ）及び低酸素プレコンディショニング処理（Ｈｙｐｏ）を施したＣＤＣシートの、マウス心筋梗塞モデル梗塞心への移植群及び非移植群（対照群；Ｃｏｎｔｒｏｌ）での移植４週間後における左室前壁厚（梗塞部心筋層の厚さ）の測定。Ｂ；梗塞心の梗塞部（ＩＦＡ：Ｉｎｆａｒｃｔｅｄ　Ａｒｅａ）と非梗塞部との境界部分（ボーダーゾーン）における、対照群（Ｃｏｎｔｒｏｌ；ＣＤＣシート非移植群）、Ｎｏｒｍｏ又はＨｙｐｏ処理ＣＤＣシート移植群（それぞれＮｏｒｍｏ　Ｓｈｅｅｔ及びＨｙｐｏ　Ｓｈｅｅｔ）での免疫蛍光染色像（Ｌｅｃｔｉｎ及びｃＴｎＴ）及びＤＡＰＩ染色像及び血管内皮細胞総面積／ボーダーゾーン（％）の比較。Ｃ；正常心臓（Ｓｈａｍ群）、梗塞心（Ｃｏｎｔｒｏｌ群；ＣＤＣシー

ト非移植群）、通常培養したＣＤＣシートを移植した梗塞心（Ｎｏｒｍｏ群）、低酸素プレコンディショニング処理したＣＤＣシートを移植した梗塞心（Ｈｙｐｏ群）におけるマッソントリクローム染色像及び梗塞面積（梗塞部面積／心臓全体の断面積）の比較。

[図14]通常培養（Ｎｏｒｍｏ）及び低酸素プレコンディショニング処理（Ｈｙｐｏ）を行ったＣＤＣシートにおける、ＨＩＦ－１ａｌｐｈａ発現に対するＷｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔ解析。

[図15]ヒトＣＤＣシート培養上清における、細胞外基質分解酵素マトリックスメタロプロテアーゼ２（ＭＭＰ－２）およびマトリックスメタロプロテアーゼ３（ＭＭＰ－３）濃度のＥＬＩＳＡによる定量。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明は、以下の（ａ）～（ｃ）の工程を含む細胞シートを製造する方法である。

（ａ）培養基材上で細胞を培養し、該細胞由来の細胞シートを形成させる工程、

（ｂ）該細胞シートを、所定の温度及び低酸素条件にて、所定の期間培養する工程、

（ｃ）該条件にて培養後、該細胞シートを培養基材から剥離する工程

本発明において、「細胞シート」とは、細胞同士がシート状に結合した細胞の培養物の総称であり、該細胞シートは、１つの細胞層からなるものでも、２以上の細胞層からなるものであってもよい。

[0014] まず（ａ）の工程は、培養基材上で細胞培養を行うことで、該細胞由来の細胞シートの形成が可能であれば、いかなる方法を用いてもよく、用いられる細胞それぞれに適した、当該技術分野において通常実施される条件等で行うことができる。例えば、培養温度は３０～４０℃、好ましくは３６～３８℃、CO_2濃度は０～１０％、好ましくは４～６％、O_2濃度は大気中酸素濃度（およそ２０％）の条件を挙げることができるが、この条件は限定されるものではなく、培養する細胞の特性に応じて、適宜、培養温度、CO_2濃度、

O_2濃度を選択することができる。例えば、成体心臓から調製したＣＤＣを用いて形成した細胞シート（ＣＤＣシート）における培養温度は３７℃、CO_2濃度は５％、O_2濃度は大気中酸素濃度（およそ２０％）であってもよい。培養時間は、所望の細胞シートが形成されるために必要な時間であれば、特に限定されるものではなく、例えば、１０時間～２４０時間程度であってもよく、好ましくは、１２時間～１６８時間程度の培養時間であり、特に、ＣＤＣシートにおいては、特に限定はしないが、４８時間～９６時間であってもよい。

また、細胞シートを形成すべく、最初に播種する細胞密度は、細胞培養において通常実施される条件であればよく、特に限定はしないが、状態の良好な細胞シートを製造する為には、細胞播種時にほぼコンフルエントな状態であることが好ましく、例えば、2×10^5細胞／cm^2～3×10^5細胞／cm^2程度の範囲である。また、細胞シート形成後の細胞の状態は、健康な状態であれば特に限定はしないが、好ましくは、コンフルエントな状態となっていてもよい。

[0015] ここで、「培養基材」とは細胞がその表面上で細胞シートを形成し得るものであればいかなるものであってもよく、少なくとも、細胞が接着し得るような平坦な部分を具備し、典型的には、細胞培養皿、細胞培養ボトル（又はフラスコ）であり、市販される培養用ディッシュなどが使用可能であり、材質も特に限定されない。培養基材の材料としては、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンテレフタレートなどが挙げられる。

また、「培養基材」の培養表面は、温度変化等によってその物性が変化する材料（温度応答性材料）で作製されているか、あるいは、該温度応答性材料によって培養基材の培養表面が層状に被覆されていてもよい。

更に、本培養基材の培養表面上には、細胞接着性成分および／または細胞接着阻害性成分が存在していてもよい。細胞接着性成分としては、細胞培養技術において、培養表面に細胞を接着させるために通常使用される成分であればいかなるものでもよく、例えば、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミ

ニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、カドヘリン、ゼラチン、フィブリノゲン、フィブリン、ポリＬリジン、ヒアルロン酸、多血小板血漿、ポリビニルアルコールなどが挙げられる。細胞接着阻害性成分も、細胞培養技術において、培養表面への細胞の接着を阻害させるために通常使用される成分であればいかなるものでもよく、例えば、アルブミンやグロブリンなどが挙げられる。これらの成分で細胞培養基材の培養表面上を被覆する場合、各成分によって、培養表面を被覆するために使用する溶液の濃度が異なるため、予備的な実験等、当業者であれば容易に検討できる方法によって、各成分の被覆のために適当な溶液濃度を決定することができる。

[0016] 本発明の細胞シートの形成に用いられる「細胞」として、いかなる動物種、組織由来の細胞であっても使用することができる。かかる細胞の例としては、限定されずに、筋芽細胞、心筋細胞、ｃａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅ由来細胞（ｃａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅ ｄｅｒｉｖｅｄ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ：ＣＤＣ）、間葉系幹細胞、線維芽細胞、造血幹細胞、腸管幹細胞、毛包幹細胞、乳腺幹細胞、神経幹細胞、内皮幹細胞、嗅粘膜幹細胞、胚性幹細胞、ｉＰＳ細胞、滑膜細胞、上皮細胞（例えば、角膜上皮細胞、口腔粘膜上皮細胞）、内皮細胞、肝細胞、膵細胞、歯根膜細胞、皮膚細胞などが挙げられ、好ましくは、間葉系幹細胞又はＣＤＣである。

[0017] ここで、ＣＤＣに係るｃａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅとは、小片に分離した心筋生検標本を培養し、その周囲に生じた増殖細胞を浮遊培養することで得られる３次元細胞塊であり、該細胞塊を分散した後、回収した細胞がＣＤＣである。ＣＤＣは、少量の心臓組織から単離することの出来る、心筋分化効率のきわめて高い組織幹細胞であるため、心筋梗塞に代表される虚血性心疾患の治療に用いうる移植用生物材料としては好適である。

[0018] 本発明の細胞シートの形成に用いられる「細胞」は、対象から採取した組織または生体液から所望の細胞を単離する工程、単離した細胞を増殖させる工程、増殖させた細胞を特定の細胞に分化させる工程を経て製造したものでも、既に株化された市販の細胞株であっても良い。

また、本細胞シートの形成に用いる細胞は１種類のみであってもよいが、２種類以上の細胞を用いてもよい。

[0019] 本発明のシート状細胞培養物の製造方法において使用される培地は、培養する細胞に適した培地を適宜選択して使用することができる。例えば、一般的に使用可能な培地として、ＭＥＭ、ＤＭＥＭ、Ｆ１２、ＩＭＥＭ、ＩＭＤＭ、ＲＰＭＩ－１６４０、Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌなどを挙げることができる。これらの培地は市販のものを購入して使用してもよい。また、これらの培地は単独で用いても、また、２種類以上を組み合わせて用いてもよい。

さらに、培地に対し、必要に応じて適当な添加物を加えて使用してもよい。添加物としては、例えば、Ｌ型アミノ酸類（例としては、Ｌ－アルギニン、Ｌ－シスチン、Ｌ－グルタミン、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リジン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－セリン、Ｌ－トリオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシンなど）、ビタミン類（例えば、葉酸、リボフラビン、チアミンなど）、Ｄ－グルコース、その他、ウシ胎児血清、ウマ血清などの動物血清などを含んでもよい。また、緩衝剤（例えば、ＰＢＳ、ＨＥＰＥＳ、ＭＥＳ、ＨＡＮＫ’Ｓなど）を適宜培地に加えてもよい。さらに、培養する細胞の特性に応じて、適宜、細胞成長因子などを添加してもよい。

例としては、ＣＤＣを培養し、細胞シートに形成させる際に用いる培地はＩＭＤＭであってもよく、添加物としてウシ胎児血清（１０％）およびＬ－グルタミン（１ｍＭ）を用いてもよい。

[0020] （ｂ）の工程は、上記の細胞シートを、所定の温度及び低酸素条件にて、所定の期間培養する工程である。ここで低酸素条件とは、大気中酸素濃度（およそ２０％）を下回る酸素濃度条件である。また、該所定の温度及び低酸素条件及び処理期間とは、細胞シートが由来する細胞によって異なり、予備的な実験等、当業者であれば容易に検討できる方法によって、細胞シートごとに適当な条件を決定することができる。

発明者らは、繊維芽細胞の懸濁液において、O_2濃度を０、１、２、３、又

は５％とした低酸素プレコンディショニング処理を行った場合に、O_2濃度０、１、２、３、又は５％のいずれの場合でも同等のＶＥＧＦ産生を示すことを確認している。このことより、本発明に係る細胞シートの製造方法においても、低酸素プレコンディショニング処理におけるO_2濃度として０～８％であれば、後記の実施例にて示しているO_2濃度２％の場合と同様のＶＥＧＦ産生効果があると考えられる。

従って、例えば、成体心臓から調製したＣＤＣを用いて形成した細胞シート（ＣＤＣシート）においては、低酸素条件は、O_2濃度が０％～８％、好ましくは０．１％～５％、更に好ましくは２％である。

温度条件については、例えば、培養温度が３０℃～３６℃、好ましくは３２℃～３４℃、更に好ましくは３３℃であり、そして、処理期間は、例えば１２時間～７２時間であり、好ましくは２４時間でもよい。

また、前記処理期間経過後、細胞シートは、すぐに（ｃ）の工程に移行してもよく、一定期間通常の培養条件に戻してから（ｃ）の工程に移行してもよい。該条件は、細胞シートごとに設定することが出来、一定期間通常の培養条件に戻す場合の一定期間についても、特に限定はしないが、例えば、前記ＣＤＣシートにおいては、１時間～１２時間であってもよく、好ましくは１時間～６時間であり、更に好ましくは１時間～２時間であってもよい。

[0021] （ｃ）の工程は、前記条件にて培養後、細胞シートを培養基材から剥離する工程である。細胞シートの培養基材部からの剥離は、シート状の構造が破損されないような方法で実施することができ、例えば、シート状細胞培養物を直接ピンセットなどによって摘み、培養表面から剥離させる、あるいは、ピペッティングにより細胞を培養表面との間を剥離する等、物理的な手法を用いてもよい。あるいは、シート状構造に破損が生じない限り、トリプシン、コラゲナーゼなどの酵素処理等を行ってもよく、細胞の性質に応じて適切な方法を選択することができる。あるいは、細胞シート上面に、ＰＶＤＦ膜、ニトロセルロース膜のような、細胞に親和性を有する基材を被せて、細胞を膜に写し取ることによって細胞を剥離、回収することもできる。

温度応答性材料で表面を被覆した細胞培養基材を使用した場合には、容器の温度を、例えば、０～３０℃程度に下げたのちに、上記、細胞の剥離、回収を実施してもよい。

[0022] 本発明には、本発明の方法によって製造される細胞シートも含まれる。該細胞シートは、低温及び低酸素条件にて、所定の期間培養することにより、機能の増強がなされることから、移植用生物材料として優れた治療効果を期待することができる。即ち、本発明により製造された細胞シートは、動物の、いずれかの組織、器官、臓器等における機能不調を改善する目的で、該組織等に移植を行う為の生物材料として使用することが出来る。ここで「動物」とは、特に限定はしないが、移植により機能改善がなされることが期待される動物が望ましく、具体的には、ヒトの他、イヌ、ネコ、ウサギなどのペット動物、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマなどの家畜動物などのことである。

[0023] 更に、本発明により製造された細胞シートを移植する組織、器官、臓器等については、特に限定はしないが、心臓、脳、肺、腎臓、肝臓、膵臓、小腸、骨髄、角膜、皮膚、骨格筋などが挙げられ、好ましくは、心臓である。

心臓を対象とする場合の疾患としては、特に限定はしないが、狭心症や心筋梗塞などに代表される虚血性心疾患、拡張型心筋症などが挙げられ、好ましくは心筋梗塞、さらに好ましくは、心筋梗塞の中でも発症から３０日以上経過している、いわゆる陳旧性心筋梗塞 （Ｏｌｄ Ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ Ｉｎｆａｒｃｔｉｏｎ：ＯＭＩ） である。

なお、本発明には、本発明の方法によって製造される細胞シートを用いた、疾患の治療又は予防方法も含まれる。ここで、対象となる疾患は、該細胞シートを移植することによって治療又は予防が可能となるものであればよく、特に限定はしないが、例えば、狭心症や心筋梗塞などに代表される虚血性心疾患、拡張型心筋症などが挙げられ、好ましくは心筋梗塞、さらに好ましくは陳旧性心筋梗塞である。

[0024] 前記心臓を対象とする疾患の治療又は予防を目的とした移植用生物材料としての細胞シートを製造する場合、特に限定はしないが、好ましくは、間葉

系幹細胞やＣＤＣより細胞シートを形成することが出来る。特に、該疾患の罹患している患者自身から、間葉系幹細胞やＣＤＣを採取し、自己幹細胞シートの形成に供する場合、拒絶反応の抑制により、心臓における移植細胞の生着率は向上するため、該細胞シートに、本発明に係る低酸素プレコンディショニングを施すことで機能増強させた細胞シートを移植用生物材料として用いることで、更に高い生着性、血管新生の亢進、瘢痕の減少、瘢痕形成の抑制・縮小及び心機能回復が期待される。

[0025] 以下に実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例により何ら限定されるものではない。

実施例

[0026] 実施例１

成体心臓由来のｃａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅ由来細胞（ＣＤＣ）を調製し、細胞シートに成形した。

成体心臓の右心房からバイオプシーにより心臓組織片を採取し、０．５ｍｍ角程度に細切後に、フィブロネクチンでコーティングした培養皿に心臓組織片を静置した。静置後２～３週間の間に２日に一度の培地交換（１０％ＦＢＳ／１ｍＭ　Ｌ－グルタミンを含むＩＭＤＭ）を行い、心臓組織片から培養皿に心臓組織由来細胞（Ｅｘｐｌａｎｔ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｃｅｌｌ：ＥＤＣ）が培養皿上に這い出てくるのを確認した。ＥＤＣがサブコンフルエントに達した時点で細胞をトリプシン処理により培養皿から剥離し、Ｃａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅ形成培地中での浮遊培養へ移行した。尚、Ｃａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅ形成培地の組成は、３５％　ＩＭＤＭと６５％　ＤＭＥＭ／Ｆ１２を基本培地とし、３．５％ウシ胎児血清、１ｍＭ　Ｌ－グルタミン、０．１ｍＭ　メルカプトエタノール、１ユニット／ｍＬ　トロンビン、１％Ｂ－２７、８０ｎｇ／ｍＬ　ｂＦＧＦ、２５ｎｇ／ｍＬ　ＥＧＦ、４ｎｇ／ｍＬ　Ｃａｒｄｉｏｔｒｏｐｈｉｎ－１で構成される。浮遊培養２４時間以内に微小なＣａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅが形成され、４８時間後の培地交換を経て９６時間培養した。回収したＣａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅをファイブロネ

クチンでコーティングした培養皿に播種し、再び接着培養を行い一週間培養した。接着したＣａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅから這い出てきた細胞がＣａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｃｅｌｌ（Ｃａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅ由来細胞；ＣＤＣ）である。尚、ＣＤＣを得る際に用いた培地は、１０％ＦＢＳ／１ｍＭ　Ｌ－グルタミンを含むＩＭＤＭであり、二日に一度の培地交換を行った。

調製した成体心臓由来のＣＤＣは、心筋幹細胞マーカーであるｃ－Ｋｉｔを発現し、培養皿に播種後には血管平滑筋細胞マーカー（αＳＭＡ）や血管内皮細胞マーカー（ＣＤ３１）を発現しており（図１）、血管平滑筋細胞や血管内皮細胞への分化能を有することが確認された。上記の方法に従い、ＣＤＣ由来の細胞シート（ＣＤＣシート）を成形した。

[0027] 実施例２

ＣＤＣシートに、所定の温度及び低酸素条件にて、所定の期間培養する処理（低酸素プレコンディショニング）を施した。

温度応答性培養皿（セルシード社）を用いて作製したＣＤＣシートは、３３℃、O_2濃度２％、CO_2濃度５％の低酸素条件下で、２４時間培養した。

[0028] 実施例３

前記低酸素プレコンディショニングによる細胞シートへのダメージの有無を明らかにするために、アポトーシス（細胞死）の指標であるカスパーゼ７（Ｃａｓｐａｓｅ　７）の発現解析を行った。

ＣＤＣシートを２４時間、O_2濃度２％、CO_2濃度５％、３３℃の条件（低酸素プレコンディショニング条件）もしくは２４時間、O_2濃度２０％、CO_2濃度５％、３７℃の条件（通常培養条件）で培養したのち、ＲＩＰＡバッファーに溶解しＷｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔ法によるカスパーゼ７タンパク質発現解析を行った。一次抗体にはＣｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社の抗Ｃａｓｐａｓｅ　７抗体（＃９４９２：１０００倍に希釈）を用いた。

アポトーシスが誘導されると細胞内に消化酵素により、プロ型が切断され

た切断型（Ｃｌｅａｖｅｄ）カスパーゼ７が検出されるが、低酸素プレコンディショニング条件に晒したＣＤＣシートでは、通常条件でのＣＤＣシートと同様に、切断型は認められなかった（図２）。このことは、低酸素プレコンディショニングによって細胞シートにダメージは生じてないことを示している。

[0029] 実施例４

上記方法にてマウスより調製した細胞シートに低酸素プレコンディショニング処理を施すことで、該シートの血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）及び肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）産生能に如何なる影響を及ぼすか確認するべく、該処理の有無によるＣＤＣシートでのＶＥＧＦ及びＨＧＦ産生量を測定した。

低酸素プレコンディショニングを施したＣＤＣシートの培養上清を回収し、Ｅｎｚｙｍｅ－Ｌｉｎｋｅｄ Ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂｅｎｔ Ａｓｓａｙ（ＥＬＩＳＡ）（Ｒ＆Ｄシステムズ社）により、ＣＤＣシートより分泌されたＶＥＧＦおよびＨＧＦ濃度を測定した。各群ともに測定に用いたサンプル数は、ｎ＝６である。

通常の条件（３７℃、O_2濃度２０％、CO_2濃度５％）で２４時間培養した群（Ｎｏｒｍｏ Ｓｈｅｅｔ）に対し、低酸素プレコンディショニング処理した群（Ｈｙｐｏ Ｓｈｅｅｔ）では、ＶＥＧＦ、ＨＧＦ共に有意に産生が促進されていた（図３）。特にＶＥＧＦにおいては、実に２３倍以上の大幅な増加が認められた。

[0030] 実施例５

マウスのみならず、実施例１に係る方法によりヒトから調製した細胞シートにおいても、低酸素プレコンディショニング処理を施すことで、該シートのＶＥＧＦ産生能が亢進されるかを確認した。

低酸素プレコンディショニング（３３℃、O_2濃度２％、CO_2濃度５％にて２４時間培養）を施したヒトＣＤＣシートの培養上清を回収、実施例４と同様に、ＥＬＩＳＡ（Ｒ＆Ｄシステムズ社）により、ＣＤＣシートより分泌

されたＶＥＧＦ濃度を測定し、通常の条件（３７℃、O_2濃度２０％、CO_2濃度５％で２４時間培養）処理群のＶＥＧＦ濃度と比較した。

マウスＣＤＣシートと同様に、通常の条件で培養した群（Ｎｏｒｍｏ　Ｓｈｅｅｔ）に対し、低酸素プレコンディショニング処理した群（Ｈｙｐｏ　Ｓｈｅｅｔ）では、ＶＥＧＦが２倍以上増加していた（図４）。

[0031] これまで発明者らは、ＶＥＧＦを産生する、様々な細胞種（但し細胞シートを成形していない）に対して、低酸素プレコンディショニング処理の効果を検討しており、例えば、細胞シート形成していないヒト末梢血単核球培養細胞においては、該処理により有意なＶＥＧＦ産生亢進は認められたものの、その増加量は約１．３倍程度に留まっており（Ｋｕｄｏ　ｅｔ　ａｌ．２０１４，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．Ｖｏｌ．４４４　ｐｐ．３７０－３７５）、本実施例で認められたような大幅な産生量の増加は確認されていない。

このことから、従来知られている低酸素プレコンディショニングによる培養細胞への機能増強効果を、単なる培養細胞ではなく、細胞シートに用いることにより、当業者の予想を大きく上回る効果を示すことが出来た。

[0032] 実施例６

低酸素プレコンディショニングによって、細胞シートの血管新生効果の亢進が誘導されるか否かについてヒト血管内皮培養細胞を用いたｉｎ　ｖｉｔｒｏ実験系により検証した。

ヒトＣＤＣシートを３３℃、O_2濃度２％、CO_2濃度５％の条件もしくは３７℃、O_2濃度２０％、CO_2濃度５％の条件で２４時間培養した後、培養上清を回収し、それぞれの培養上清でヒト臍帯血管内皮細胞（ＨＵＶＥＣ：Ｌｏｎｚａ社から購入）を培養することで血管形成が促進されるか否かを検証した。

具体的には、ＨＵＶＥＣをＣＤＣシートの培養上清で１２時間培養し、形成された血管様チューブ構造物（図５Ａ）の１視野当たりの数をカウントした。

低酸素プレコンディショニング処理したＣＤＣシート培養上清中で培養下ＨＵＶＥＣにおいてチューブ形成が有意に亢進しており、低酸素曝露により細胞シートの血管新生因子発現が増加したことが示唆される（図５Ｂ）。低酸素プレコンディショニングによりＣＤＣシートのＶＥＧＦおよびＨＧＦ発現が亢進することから（実施例４及び実施例５）、該血管因子群の産生増加がＨＵＶＥＣの血管形成能に影響を与えたと推察される。

[0033] 実施例７

実施例４にて示した、ＣＤＣシートへの低酸素プレコンディショニング処理によるＶＥＧＦの発現増加が、いかなるシグナル伝達経路を介して生じたかを明らかとするために、パスウェイ解析を行った（図６左図）。

低酸素プレコンディショニングを施したＣＤＣシートは、Ｒａｄｉｏ－Ｉｍｍｕｎｏｐｒｅｃｉｐｉｔａｔｉｏｎ　Ａｓｓａｙ（ＲＩＰＡ）バッファーに溶解し、Ｒ＆Ｄシステムズ社のＨｕｍａｎ　Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｋｉｎａｓｅ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ａｒｒａｙ（登録商標）をもちいて４３種類のキナーゼタンパク質のリン酸化状態を比較した（パスウェイ解析）。アッセイは本キット添付のマニュアルに従って行い、メンブレンに固定した各キナーゼタンパク質のスポットの濃さをＩｍａｇｅＪソフトウェアで数値化した後に通常の条件で培養した群と比較した。

リン酸化が５倍以上増加したタンパク質と１／２に減少したタンパク質で分けると、ＥＧＦＲ、Ａｋｔ、ＨＳＰ６０パスウェイが促進され、Ｓｔａｔ５パスウェイで抑制が認められた（図６右図）。この中で、Ａｋｔシグナル伝達経路はＶＦＧＦの直接の制御因子として知られていることから、低酸素プレコンディショニングによってＣＤＣシートで生じたＶＥＧＦ発現増加は、Ａｋｔシグナル伝達経路の亢進によって生じたものと推察される。

[0034] 実施例８

実施例７において、低酸素プレコンディショニング刺激によりＣＤＣシート内の複数のシグナル伝達経路が活性化されることを示した。そのうちのＡｋｔを介したシグナル伝達経路に注目し、低酸素プレコンディショニング刺

激のメディエーターとして実際に機能しているか否かを検証した。

ヒトＣＤＣシートを３３℃、O_2濃度２％、CO_2濃度５％の条件（低酸素条件）もしくは３７℃、O_2濃度２０％、CO_2濃度５％の条件（通常条件）で２４時間培養したのち、ＲＩＰＡバッファーに溶解しＷｅｓｔｅｒｎ Ｂｌｏｔ法によりリン酸化Ａｋｔ（ｐＡｋｔ）発現を比較したところ、通常条件群（Ｎｏｒｍｏ）に対して、低酸素条件群（Ｈｙｐｏ）においてＡｋｔのリン酸化亢進が生じていることが確認された（図７）。この結果は、先に行ったＰｈｏｓｐｈｏ－Ｋｉｎａｓｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ａｒｒａｙのデータを裏付けるものである（実施例７）。一次抗体にはＣｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社の抗ｐＡｋｔ抗体（＃４０６０：１０００倍に希釈）および抗Ａｋｔ抗体（＃９２７２：１０００倍に希釈）を用いた。

[0035] 実施例９

更に、Ａｋｔのリン酸化制御因子ＰＩ３Ｋの阻害剤（ＬＹ２９４００２；Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：＃９９０１：１０マイクロM）を培地に添加した状態で、ヒトＣＤＣシートを上記低酸素プレコンディショニング条件（Ｈｙｐｏｘｉａ又はＨｙｐｏ）に曝露し、その後、細胞及び培養上清を回収、リン酸化Ａｋｔ発現およびＶＥＧＦ産生を確認したところ、ＬＹ２９４００２添加群では低酸素プレコンディショニング刺激によるＡｋｔリン酸化およびＶＥＧＦ産生亢進がいずれも抑制され、通常培養条件（Ｎｏｒｍｏｘｉａ又はＮｏｒｍｏ）レベルに留まった（図８ＡおよびＢ）。この結果は、低酸素プレコンディショニングがＰＩ３Ｋ／Ａｋｔシグナル伝達経路を介してＣＤＣシートのＶＥＧＦ産生亢進を促していることを示唆している。

[0036] 実施例１０

低酸素プレコンディショニングによるＣＤＣシートの筋線維芽細胞増殖抑制効果について、培養細胞株を用いて検証した。

まず、筋線維芽細胞株ＳｍｃＭＦ（Ｋａｗａｓａｋｉ ｅｔ ａｌ．，

Ｗｏｒｌｄ Ｊ Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．１９：２６２９－２６３７）を培養皿に播種し１０％ＦＢＳ／ＤＭＥＭ中で培養した（３５，０００細胞／ウェル）。培養開始２４時間後に、低酸素条件（Ｈｙｐｏ；３３℃、O_2濃度２％、CO_2濃度５％）もしくは通常条件（Ｎｏｒｍｏ；３７℃、O_2濃度２０％、CO_2濃度５％）で２４時間培養したＣＤＣシートからそれぞれ回収した培養上清を、該１０％ＦＢＳ／ＤＭＥＭと置換し、ＳｍｃＭＦを更に２４時間培養した。該培養細胞に対し、４％パラホルムアルデヒドによる固定後に抗リン酸化ヒストンＨ３抗体（抗ｐＨＨ３抗体；Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社：＃９７０１：２００倍に希釈）による免疫蛍光染色及びＤＡＰＩ染色を実施し、増殖中のＳｍｃＭＦ細胞数を計測した（図９Ａ）。具体的には、蛍光染色画像（図９Ｂ）から「抗ｐＨＨ３抗体陽性細胞数／ＤＡＰＩ陽性細胞数ｘ１００」を算出し、これをｐＨＨ３＋ｃｅｌｌｓ（％）とした。低酸素条件で処理したＣＤＣシート由来の培養上清中で、ＳｍｃＭＦの増殖が有意に抑制されていたことから（図９Ｃ）、何らかの筋線維芽細胞増殖抑制因子の発現亢進が推察される。

[0037] 実施例１１

筋線維芽細胞の抑制効果を有する因子の一つとして、エンドグリンが知られている。そこで、ＣＤＣシートに対する低酸素プレコンディショニング処理により、該処理を施したＣＤＣシートにおいて、エンドグリンの発現量が変動するか検討したところ、エンドグリンの発現亢進が生じることが確認された（図１０）。具体的には、低酸素条件（Ｈｙｐｏｘｉａ；３３℃、O_2濃度２％、CO_2濃度５％）もしくは通常条件（Ｎｏｒｍｏｘｉａ；３７℃、O_2濃度２０％、CO_2濃度５％）にて２４時間、ＣＤＣシートを処理した後、該ＣＤＣシートより細胞抽出液を調製した。その後、該抽出液に発現しているエンドグリン及びアクチンについて、それぞれＷｅｓｔｅｒｎ Ｂｌｏｔを行い（図１０Ａ）、該Ｗｅｓｔｅｒｎ Ｂｌｏｔ像におけるエンドグリン／アクチンのデンシトメトリー比を、Ｒｅｌａｔｉｖｅ Ｅｎｄｏｇｌｉｎ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎとして表示したところ（図１０Ｂ）、通常条件（Ｎ

ｏｒｍｏ）に対し、低酸素条件（Ｈｙｐｏ）において有意なエンドグリンの発現亢進が認められた。

このことから、低酸素プレコンディショニング刺激したＣＤＣシートが、エンドグリンの発現増加を介して線維化を抑制する可能性が考えられ、生理的現象としては、該シートによる瘢痕形成の抑制・縮小といった効果が期待される。

[0038] 実施例１２

上記ＣＤＣシートの移植により、心機能が改善するかを明らかにするために、まずは、マウス陳旧性心不全モデル（ｏＭＩ）を作成し、冠動脈左前下行枝（ＬＡＤ）結紮後４週間での左室駆出率（ＬＶＥＦ）および左室内径短縮率（ＬＶＦＳ）を測定した。

マウス（Ｃ５７ＢＬ／６；オス；１０週齢）を麻酔下で開胸した後に冠動脈左前下行枝を８－０ポリプロピレン縫合糸で結紮し、３０日後の心エコー検査において左室駆出率がおよそ３０％まで低下したもの（正常値はおよそ７０％）をマウスｏＭＩモデルとして移植実験に用いた。このモデルマウスの梗塞部に通常条件下で培養したＣＤＣシートを移植し、４週間後に心エコー検査によりＬＶＥＦおよびＬＶＦＳを測定した。ＬＶＥＦ（％）は、（左室拡張期末期容積－左室収縮末期容積）÷左室拡張末期容積×１００、ＬＶＦＳ（％）は、（左室拡張末期径－左室収縮末期径）÷左室拡張末期径×１００、でそれぞれ算出した。左室容積と左室径は心エコー測定時にＭモードにより計測した。

ｏＭＩ群でのＬＶＥＦ及びＬＶＦＳの数値が、擬似手術群（Ｓｈａｍ　Ｏｐｅｒａｔｉｏｎ群；Ｓｈａｍ）に比して有意に低下していることを確認した（図１１）。

[0039] 実施例１３

マウスＣＤＣシートに対して、移植２４時間前に低酸素プレコンディショニング処理を行う群と行わない群（通常培養群）を作成し、該ＣＤＣシート群を、前記マウス陳旧性心不全モデル（ｏＭＩ）に移植して、両群間でのＬ

ＶＥＦおよびＬＶＦＳの差異を検討した。

マウス（Ｃ５７ＢＬ／６；オス；１０週齢）を麻酔下で開胸した後に冠動脈左前下行枝を８－０ポリプロピレン縫合糸で結紮し、３０日後の心エコー検査において左室駆出率がおよそ３０％まで低下したもの（正常値はおよそ７０％）をマウスｏＭＩモデルとして移植実験に用いた。このモデルマウスの梗塞部に低酸素プレコンディショニングを２４時間施したＣＤＣシートを移植し、４週間後に心エコー検査によりＬＶＥＦおよびＬＶＦＳを測定した。ＬＶＥＦ（％）は、（左室拡張期末期容積－左室収縮末期容積）÷左室拡張末期容積×１００、ＬＶＦＳ（％）は、（左室拡張末期径－左室収縮末期径）÷左室拡張末期径×１００、でそれぞれ算出した。左室容積と左室径は心エコー測定時にＭモードにより計測した。

低酸素プレコンディショニング処理及び未処理ＣＤＣシートをｏＭＩに移植し、４週間後にＬＶＥＦおよびＬＶＦＳを測定し、それぞれの移植前からの回復率（ΔＬＶＥＦおよびΔＬＶＦＳ）を比較したところ（図１２左図：ΔＬＶＥＦ、右図：ΔＬＶＦＳ）、いずれも低酸素プレコンディショニング処理群において有意な回復率の亢進が認められた。

以上より、低酸素プレコンディショニング未処理のＣＤＣシートに比べて、該処理を施したＣＤＣシートにて有意な心機能回復が確認され、低酸素プレコンディショニング処理によるＣＤＣシートの機能増強（ＶＥＧＦ及びＨＧＦ発現増加）は、慢性の虚血性心疾患治療に極めて有効であることが示唆された。

[0040] 実施例１４

実施例１３においてＣＤＣシート移植により不全心の心機能が回復することが示されたが、どのようなメカニズムで心機能が改善したかは明らかではない。そこで、シートを移植した不全心における組織学的な解析を行った。

低酸素プレコンディショニング処理（３３℃、O_2濃度２％、CO_2濃度５％にて２４時間培養）及び通常培養（３７℃、O_2濃度２０％、CO_2濃度５％にて２４時間培養）を行った細胞シートを移植し、該移植の４週間後に左

心室前壁厚（梗塞部）を比較したところ、細胞シート非移植群に対して、細胞シート移植群（通常培養群）において前壁厚の有意な肥厚が認められた（図１３Ａ）。低酸素プレコンディショニング処理群と通常培養群との間に有意差は生じていなかったが、低酸素プレコンディショニング処理群にてより高値となる傾向は認められた（図１３Ａ）。

このことより、細胞シート移植、特に低酸素プレコンディショニング処理したものによって、梗塞心のリモデリングが生じていることが示唆される。なお、左心室前壁厚は、エコー測定に使用している小動物用超音波高解像度イメージングシステムＶｅｖｏ７７０（ＶｉｓｕａｌＳｏｎｉｃｓ社製）により算出した。

[0041] また、梗塞部と非梗塞部との境目部分（ボーダーゾーン）での血管新生に対する、細胞シート移植の効果について、血管内皮細胞（Ｌｅｃｔｉｎ；Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ：ＤＬ－１１７４：２００倍に希釈）および心筋細胞（ｃＴｎＴ：Ａｂｃａｍ；ａｂ１０２１４：１００倍に希釈）に対する免疫蛍光染色後の「ボーダーゾーンにおける血管内皮細胞総面積（％）」（ボーダーゾーン一視野に対するレクチン陽性血管内皮細胞の占有総面積の比率を、ＢＺ－ＩＩアナライザー（株式会社キーエンス製）を用いて算出）を指標に検討したところ、通常培養のＣＤＣ細胞シート移植群に対し、低酸素プレコンディショニング処理したＣＤＣ細胞シート移植群で、該指標について有意な増加を認めた（図１３Ｂ）。

すなわち、該事象は、低酸素プレコンディショニング処理したＣＤＣ細胞シートが、梗塞心における血管新生を促進していることを示唆している。

[0042] 更に、不全心における梗塞部面積をマッソントリクローム染色により可視化し、正常心臓（Ｓｈａｍ群）、梗塞心（Ｃｏｎｔｒｏｌ群）、通常培養したＣＤＣシートを移植した梗塞心（Ｎｏｒｍｏ群）、低酸素プレコンディショニング処理したＣＤＣシートを移植した梗塞心（Ｈｙｐｏ群）との間で「Ｉｎｆａｒｃｔｅｄ　Ａｒｅａ；梗塞面積（％）」（ＢＺ－ＩＩアナライザーを用いて、梗塞部面積／心臓全体の断面積を算出）を比較したところ、Ｈ

ｙｐｏ群において有意な梗塞面積の縮小を認めた（図１３Ｃ）。

このことは、低酸素プレコンディショニングによりＣＤＣシートの瘢痕縮小効果が促進されたことを示唆しており、先に示した左室前壁厚の肥厚が、血管新生亢進や瘢痕縮小による心筋リモデリングにより生じたことを推察させる。

[0043] 実施例１５

ＨＩＦ－１ａｌｐｈａは酸素濃度の主要なセンシング分子として知られ、通常酸素濃度下では合成後に直ちに分解されるが、低酸素条件下では分解が抑制され、下流の低酸素応答分子群が活性化する。また、血管新生因子であるＶＥＧＦは、ＨＩＦ－１ａｌｐｈａの主要な下流標的分子として知られている。そこで、ＣＤＣシートの低酸素応答性を確認する為に、ＨＩＦ－１ａｌｐｈａ発現に対するＷｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔ解析を行った。

ヒトＣＤＣシートを３３℃、O_2濃度２％、CO_2濃度５％の条件（低酸素プレコンディショニング処理）もしくは３７℃、O_2濃度２０％、CO_2濃度５％の条件（通常培養）で２４時間培養したのち、Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔ法によりＨＩＦ－１ａｌｐｈａの発現解析をしたところ、低酸素プレコンディショニング処理したＣＤＣシート（Ｈｙｐｏ）でのみＨＩＦ－１ａｌｐｈａが検出され、通常培養でのＣＤＣシート（Ｎｏｒｍｏ）では認められなかった。このことから、前者でのみ低酸素応答が生じていることが確認された（図１４）。一次抗体には、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社の抗ＨＩＦ－１ａｌｐｈａ抗体（＃３７１６：１０００倍に希釈）を用いた。

[0044] 実施例１６

ヒトＣＤＣシートの培養上清中における、細胞外基質分解酵素マトリックスメタロプロテアーゼ２（ＭＭＰ－２）および／又はマトリックスメタロプロテアーゼ３（ＭＭＰ－３）の有無及び存在する場合の濃度をＥＬＩＳＡ法により検出した。培養上清中のＭＭＰ濃度測定には、Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ社製　Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＭＭＰ－３　ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ　ｋ

ｉｔ（ＤＭＰ３Ｇ０）及び Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ Ｈｕｍａｎ ＭＭＰ－２ ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ ｋｉｔ（ＤＭＰ２Ｆ０）ＥＬＩＳＡキットを用いた。

ＣＤＣシートにおいては、ＭＭＰ－３は発現しておらず、ＭＭＰ－２が特異的に発現していることが明らかとなった（図１５）。このことより、該分解酵素が、ＣＤＣシートにおける、梗塞心に形成された瘢痕組織を消化する機能を担っている可能性が示唆された。

産業上の利用可能性

[0045] 本発明は、低酸素プレコンディショニング処理を施すことで、機能増強した細胞シートを製造する方法を提供することから、移植に関連する医療分野における利用性が高く、特に、低酸素プレコンディショニングを処理した間葉系幹細胞やＣＤＣ由来の細胞シートは、慢性の虚血性心疾患治療に極めて有効であり、該医療分野の発展にも貢献するものである。

請求の範囲

[請求項1] 以下の（ａ）～（ｃ）の工程を含む細胞シートを製造する方法。

（ａ）培養基材上で細胞を培養し、該細胞由来の細胞シートを形成させる工程、

（ｂ）該細胞シートを、所定の温度及び低酸素条件にて、所定の期間培養する工程、

（ｃ）該条件にて培養後、該細胞シートを培養基材から剥離する工程

[請求項2] 前記細胞が、Ｃａｒｄｉｏｓｐｈｅｒｅ由来細胞であることを特徴とする請求項１に記載の方法。

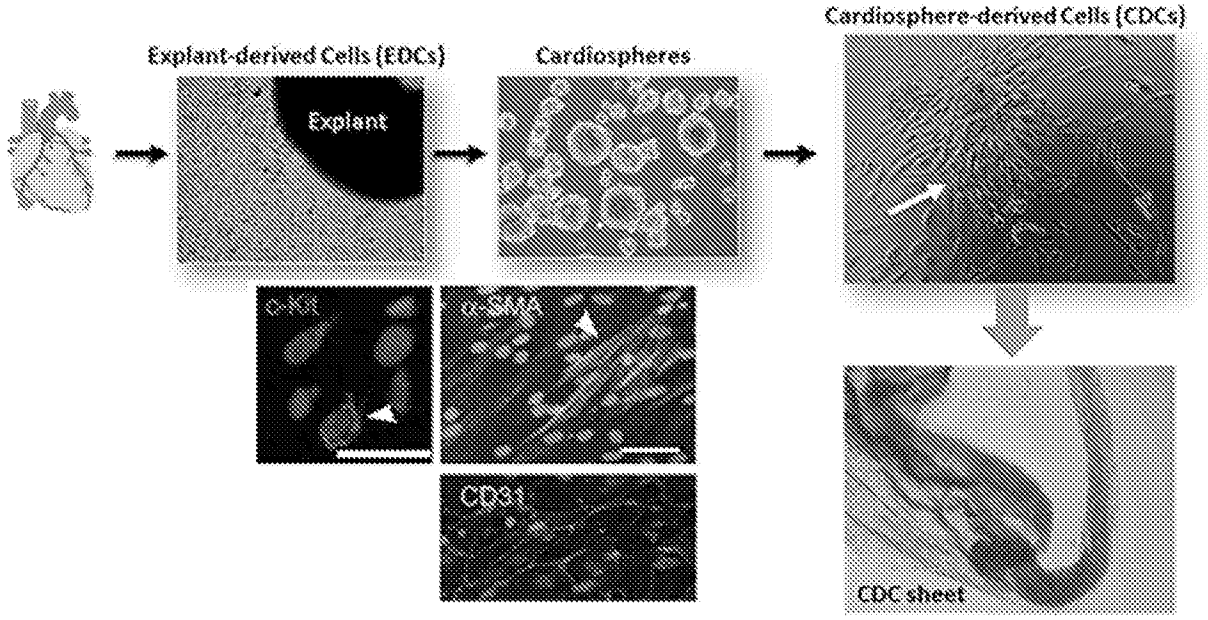
[請求項3] 前記低酸素条件が、酸素濃度０％～８％であることを特徴とする請求項１又は２に記載の方法。

[請求項4] 前記所定の温度が、３０℃～３６℃であることを特徴とする請求項１乃至３のいずれかに記載の方法。

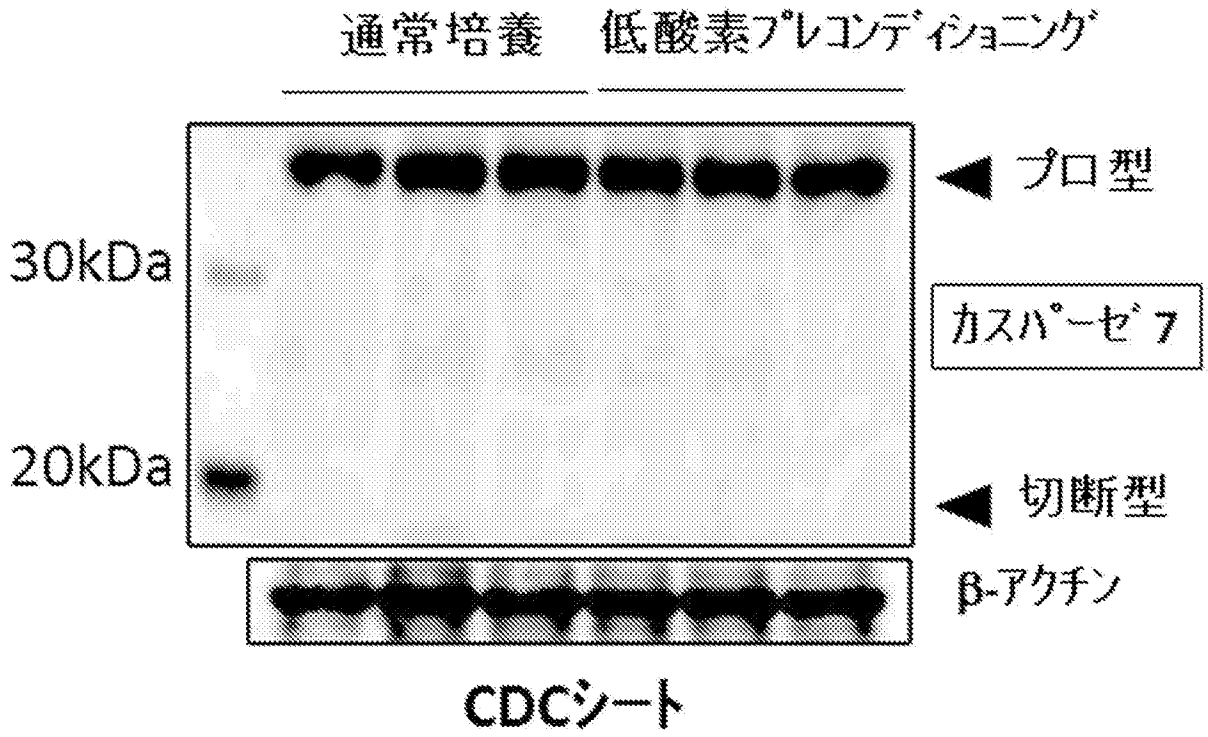
[請求項5] 前記培養期間が、１２時間～７２時間であることを特徴とする請求項１乃至４のいずれかに記載の方法。

[請求項6] 請求項１乃至５のいずれかに記載の方法により製造した細胞シート。

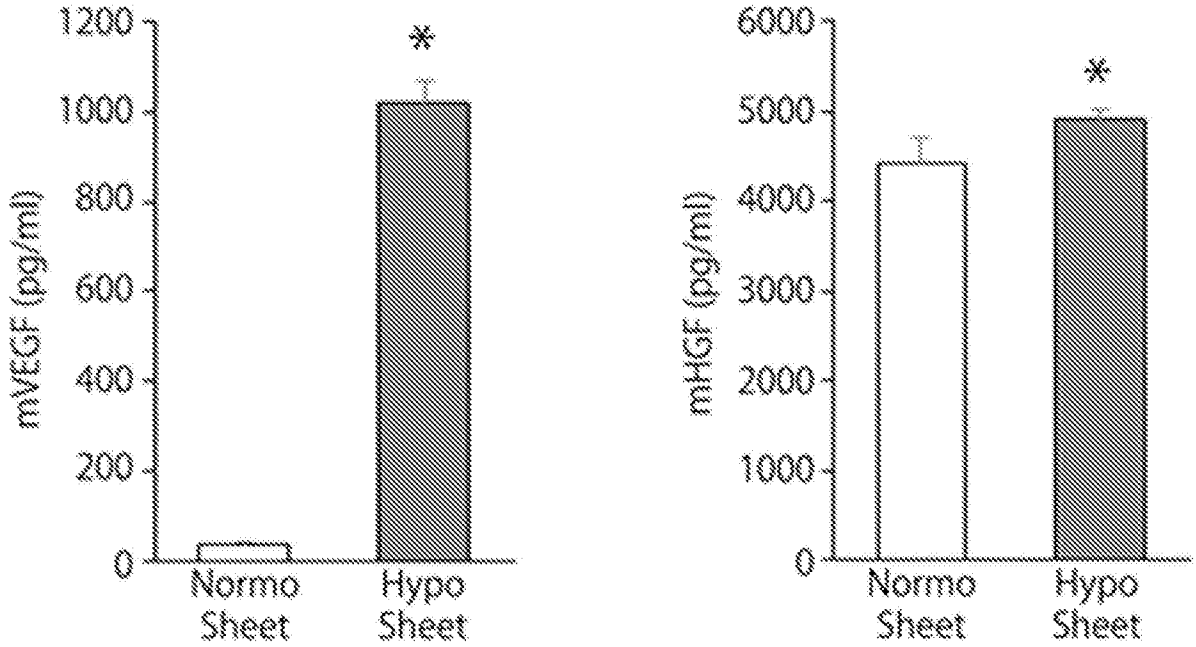
[図1]


Explant-derived Cells (EDCs)
Cardiospheres
Cardiosphere-derived Cells (CDCs)
Explant
α-SMA
CD31
CDC sheet

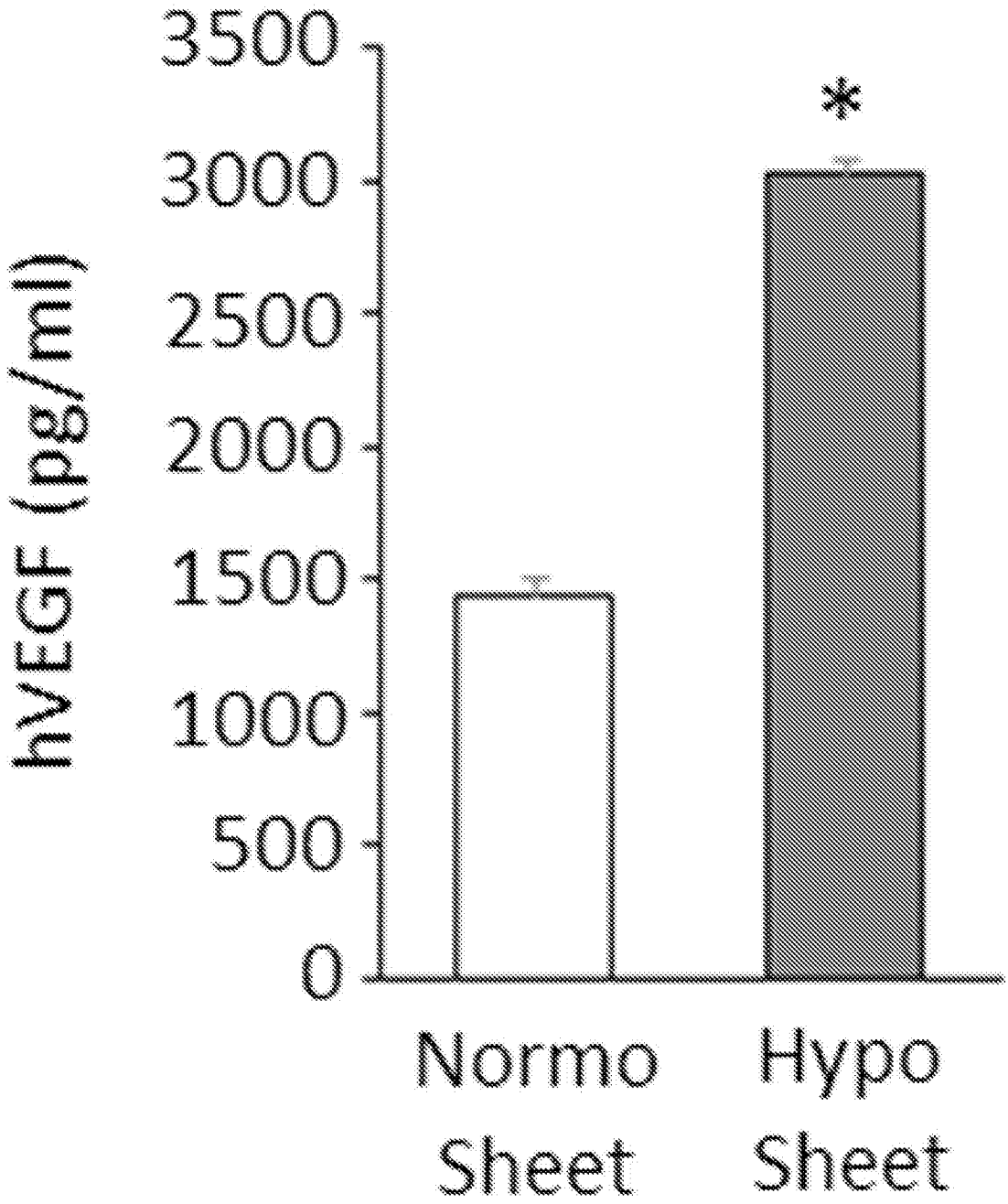
[図2]


通常培養
低酸素プレコンディショニング
30kDa
20kDa
プロ型
カスパーゼ7
切断型
β-アクチン
CDCシート

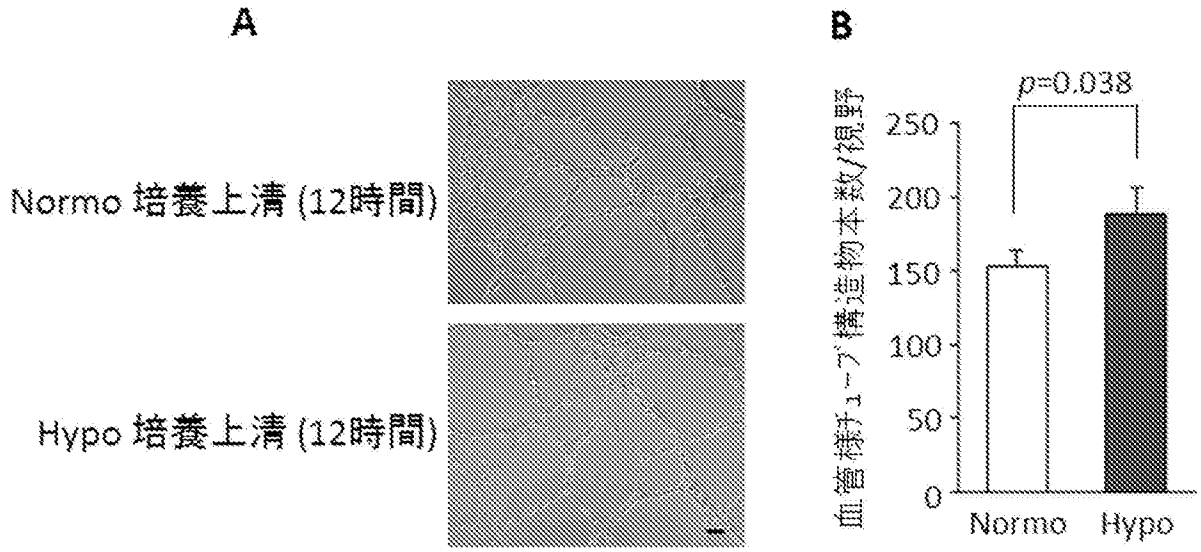
[図3]


mVEGF (pg/ml)
1200
1000
800
600
400
200
0
*
Normo Sheet
Hypo Sheet
mHGF (pg/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
*
Normo Sheet
Hypo Sheet

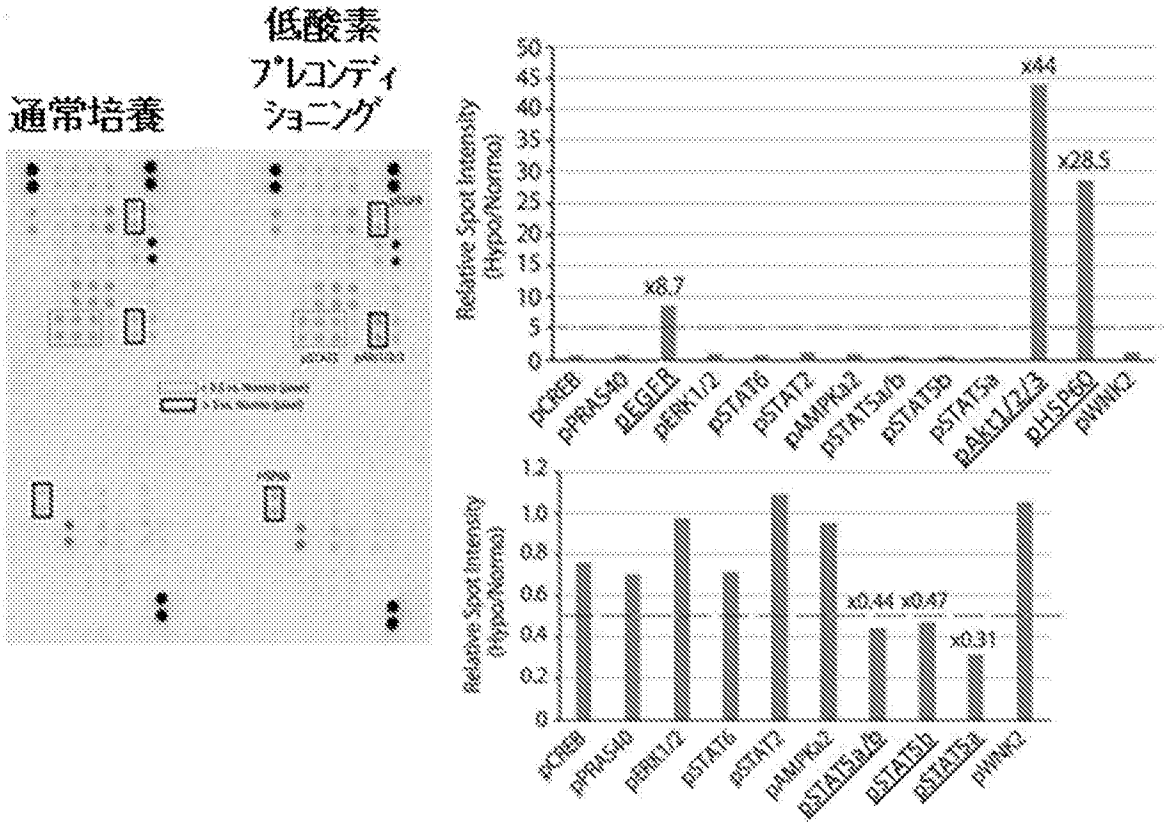
[図4]


3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
hVEGF (pg/ml)
*
Normo Sheet
Hypo Sheet

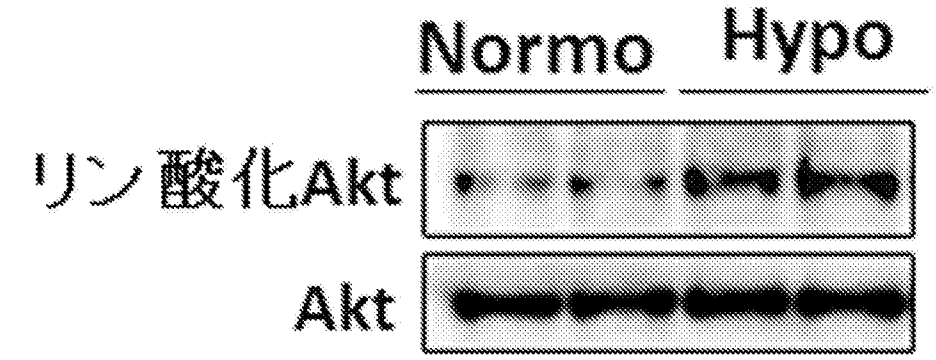
[図5]


A
Normo 培養上清 (12時間)
Hypo 培養上清 (12時間)
B
p=0.038
血管様チューブ構造物本数/視野
250
200
150
100
50
0
Normo
Hypo

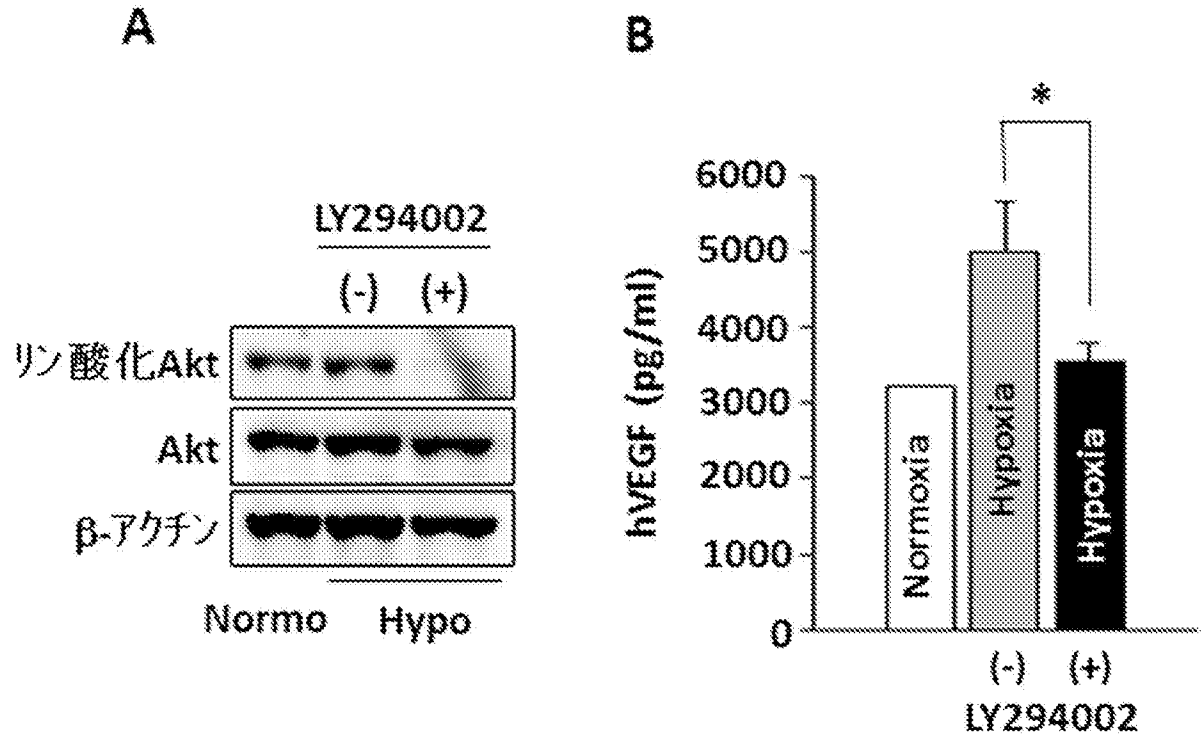
[図6]


通常培養
低酸素
プレコンディ
ショニング
Relative Spot Intensity (Hypo/Normo)
×44
×28.5
×8.7
pCREB
pPRAS40
pEGFR
pERK1/2
pSTAT6
pSTAT2
pAMPKα2
pSTAT5a/b
pSTAT5b
pSTAT5a
pAKT1/2/3
pHSP60
pMMP2
×0.44
×0.47
×0.31

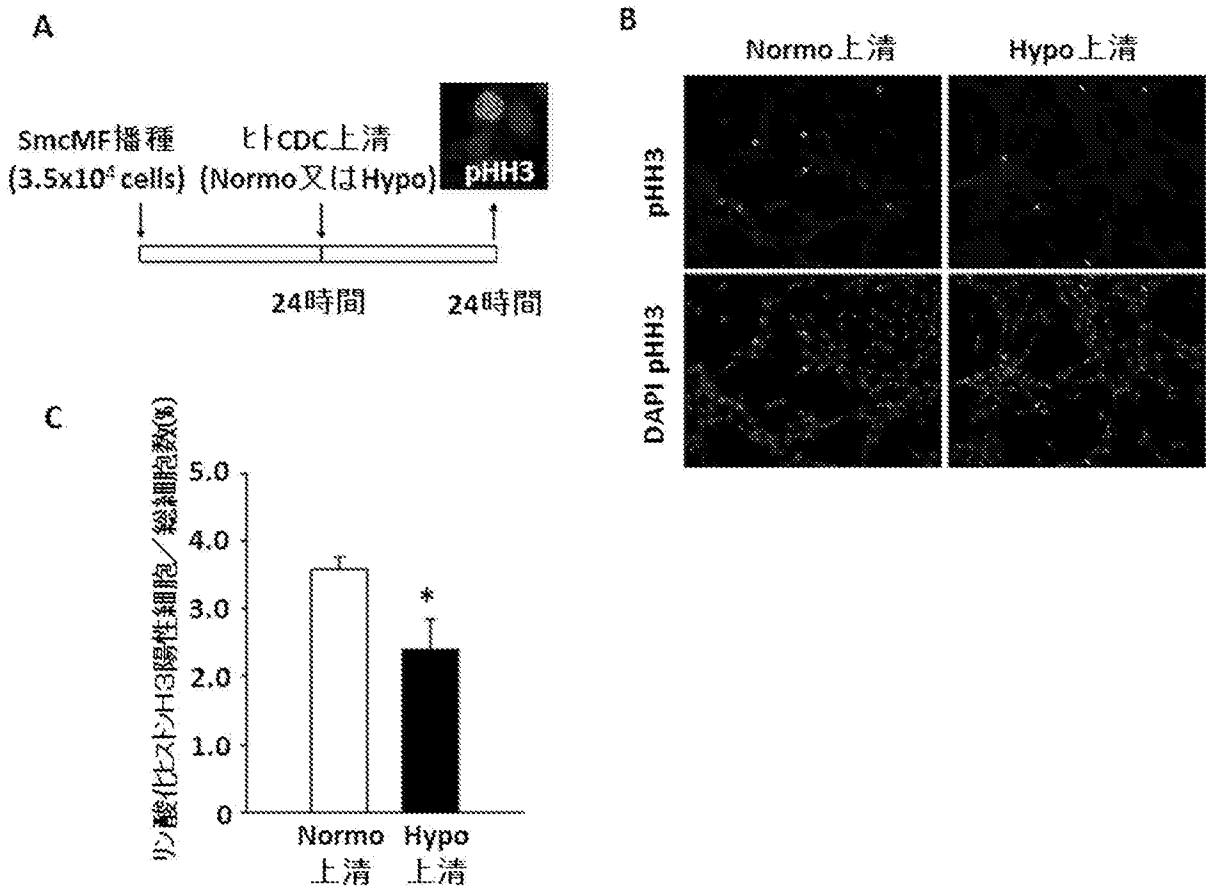
[図7]


Normo
Hypo
リン酸化Akt
Akt

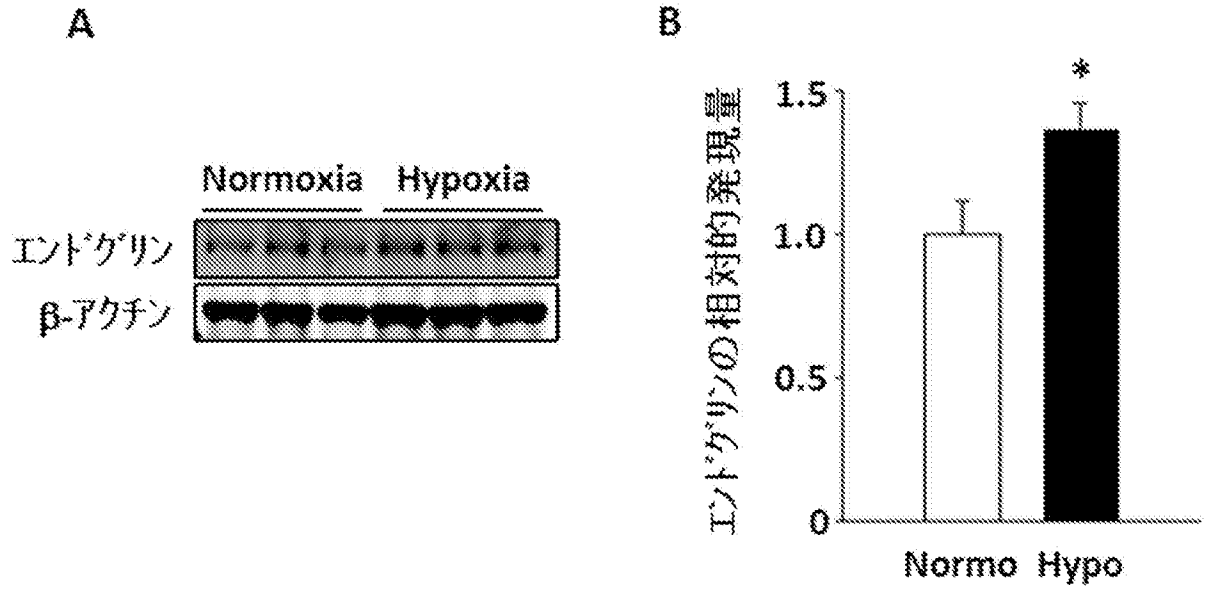
[図8]


A
LY294002
(-)
(+)
リン酸化Akt
Akt
β-アクチン
Normo
Hypo
B
*
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
hVEGF (pg/ml)
Normoxia
Hypoxia
Hypoxia
(-)
(+)
LY294002

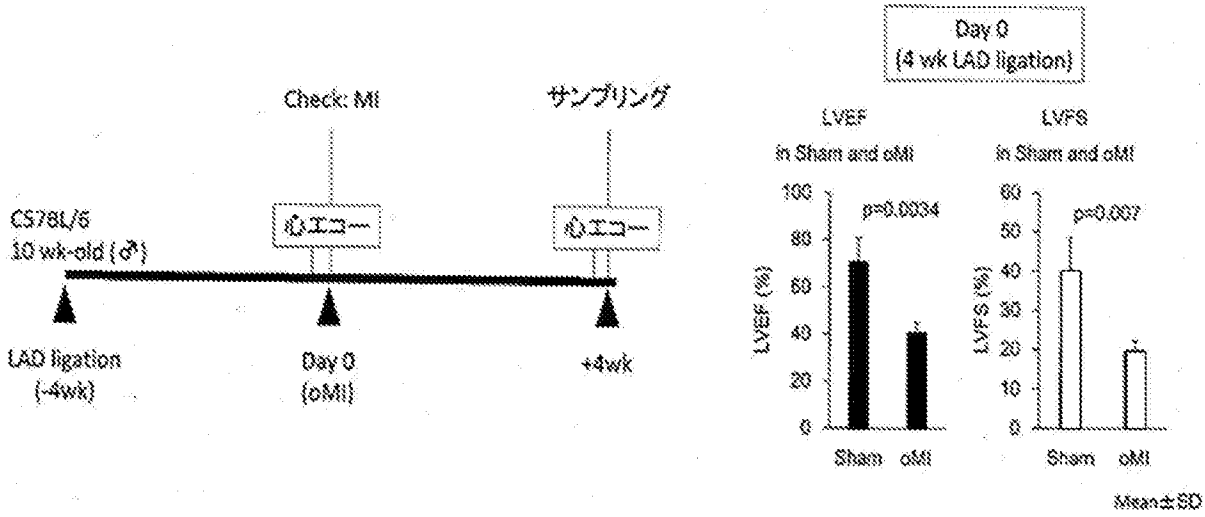
[図9]


A
SmcMF播種
(3.5x10⁴ cells)
ヒトCDC上清
(Normo又はHypo)
pHH3
24時間
24時間
B
Normo上清
Hypo上清
pHH3
DAPI pHH3
C
リン酸化ヒストンH3陽性細胞／総細胞数(%)
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0
*
Normo 上清
Hypo 上清

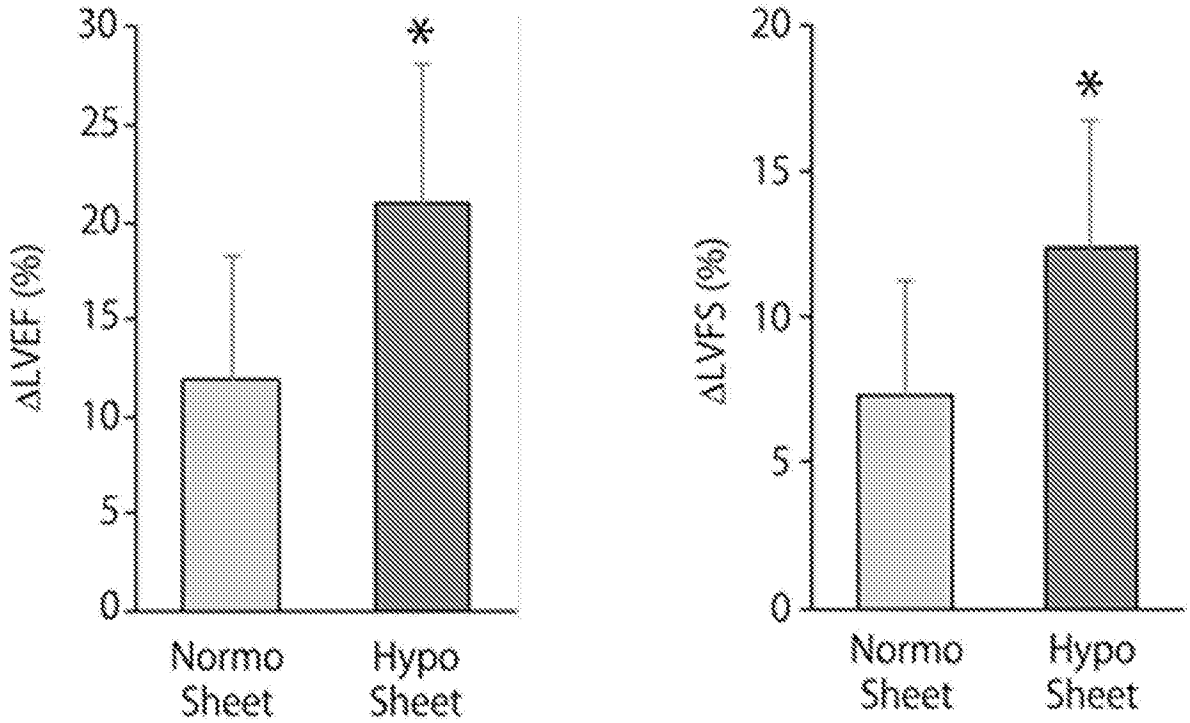
[図10]


A
Normoxia
Hypoxia
エンドグリン
β-アクチン
B
エンドグリンの相対的発現量
1.5
1.0
0.5
0
*
Normo
Hypo

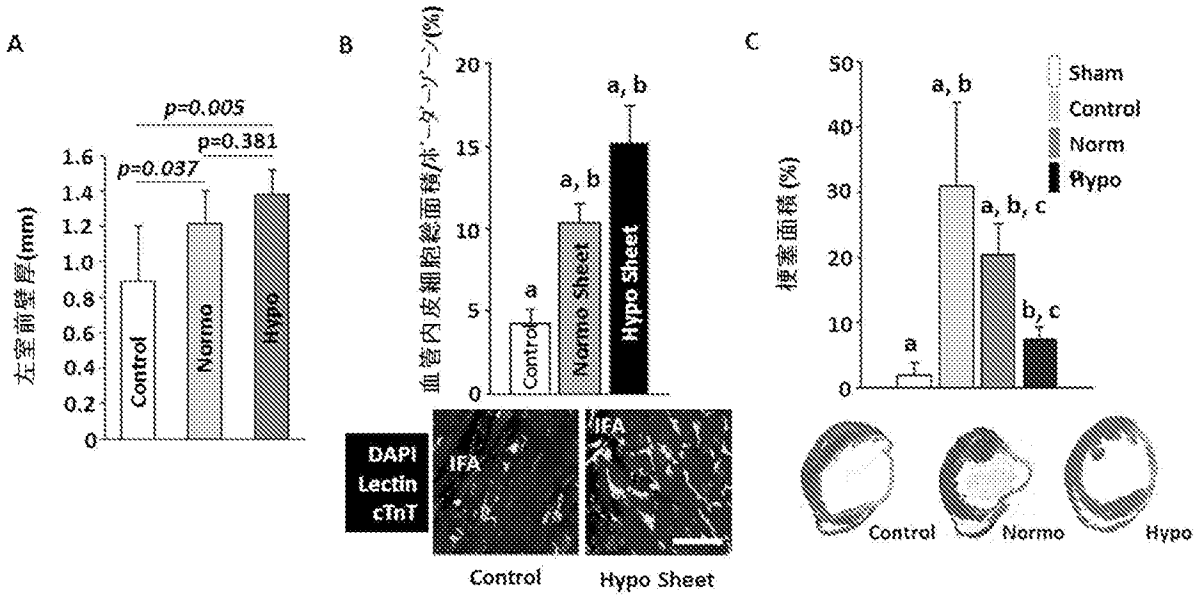
[図11]


Check: MI
サンプリング
C57BL/6
10 wk-old (♂)
心エコー
心エコー
LAD ligation
(-4wk)
Day 0
(oMI)
+4wk
Day 0
(4 wk LAD ligation)
LVEF
in Sham and oMI
LVFS
in Sham and oMI
p=0.0034
p=0.007
LVEF (%)
LVFS (%)
Sham
oMI
Sham
oMI
Mean±SD

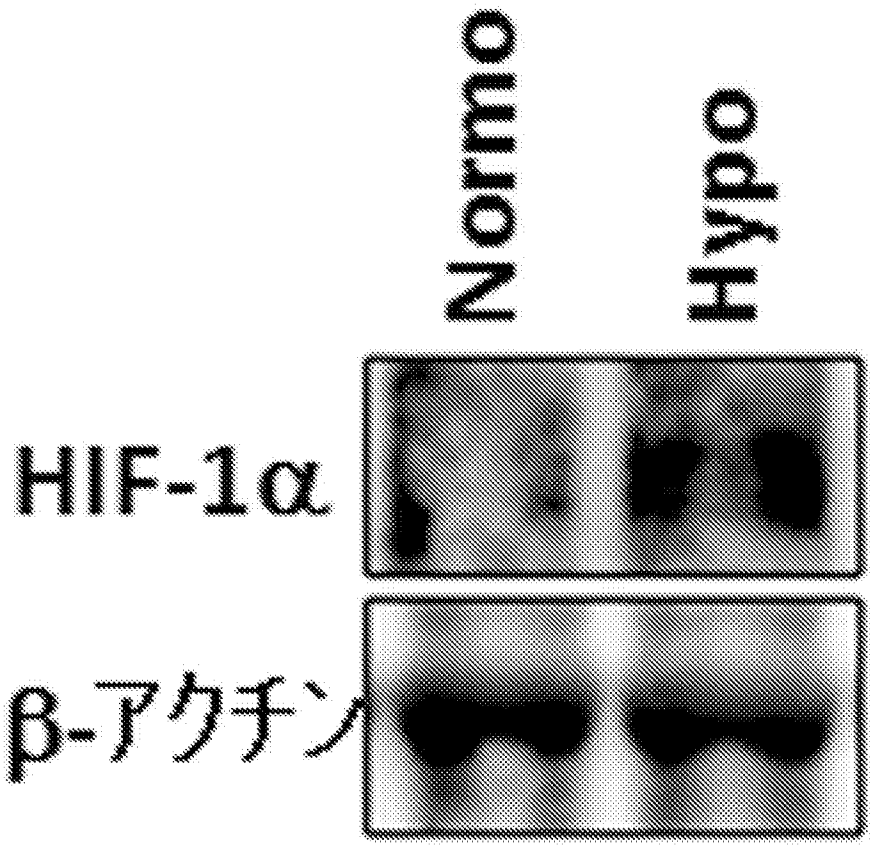
[図12]


ΔLVEF (%)
ΔLVFS (%)
Normo Sheet
Hypo Sheet
Normo Sheet
Hypo Sheet

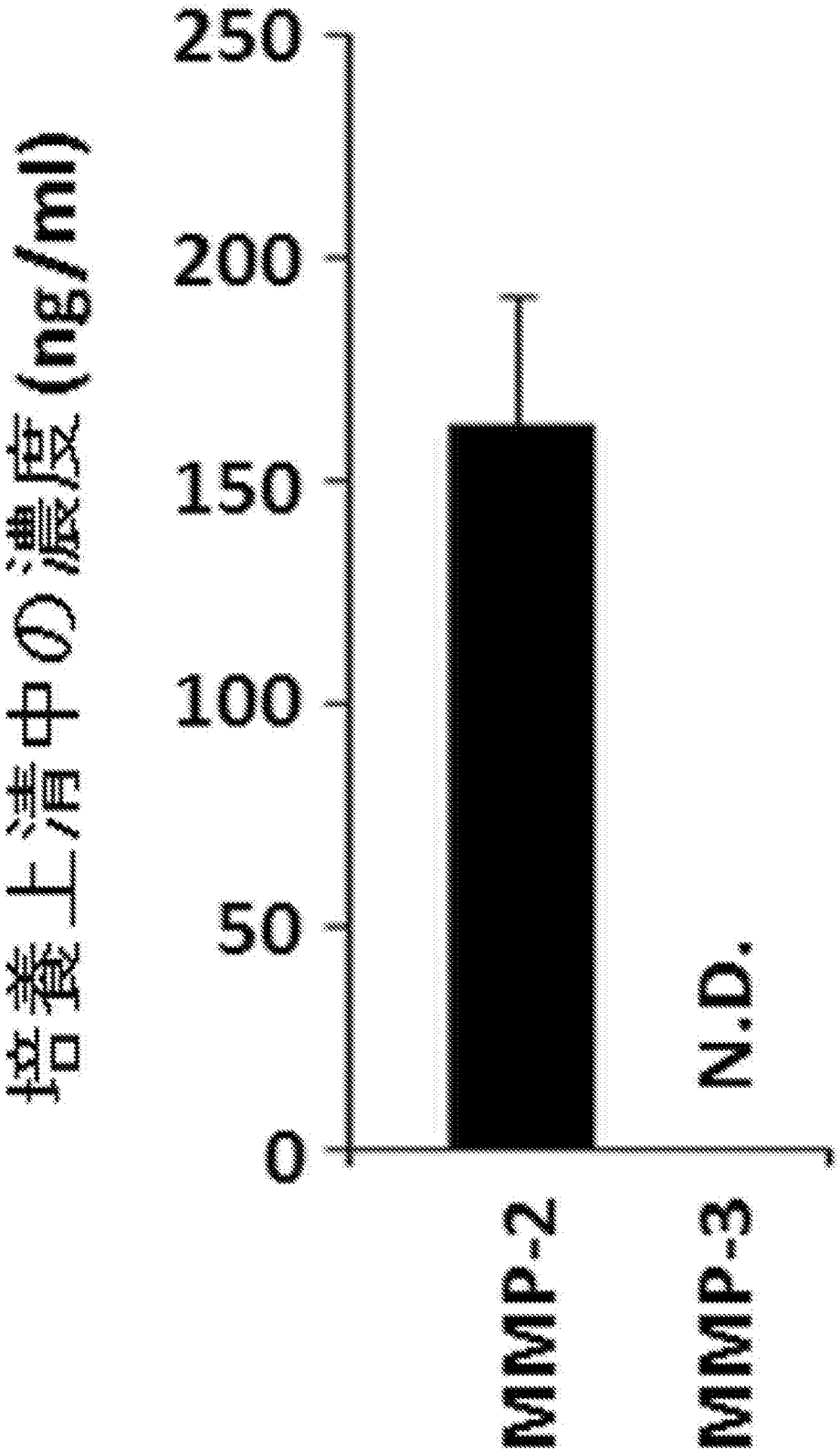
[図13]


A
p=0.005
p=0.381
p=0.037
左室前壁厚(mm)
Control
Normo
Hypo
B
血管内皮細胞総面積/ホ゛ケ゛ーソ゛ン(%)
a
a, b
a, b
Control
Normo Sheet
Hypo Sheet
DAPI
Lectin
cTnT
IFA
Control
Hypo Sheet
C
梗塞面積(%)
a
a, b
a, b, c
b, c
Sham
Control
Norm
Hypo
Control
Normo
Hypo

[図14]


Normo
Hypo
HIF-1α
β-アクチン

[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/076207

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/077(2010.01)i, *A61L27/00*(2006.01)i, *A61P9/10*(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)
C12N5/077, A61L27/00, A61P9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), PubMed, CiNii, WPIDS/WPIX(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YEH, T-S., et al., Baculovirus-transduced, VEGF-expressing adipose-derived stem cell sheet for the treatment of myocardium infarction, Biomaterials, 2013.10.10, Vol. 35, p. 174-184, ABSTRACT, p .175, 179, Fig. 2, 3	1-6
X	AUGUSTIN, M., et al., Heat shock attenuates VEGF expression in three-dimensional myoblast sheets deteriorating therapeutic efficacy in heart failure, Medical Science Monitor, 2011.12.01, Vol. 17, No. 12, p. BR345-BR353, Summary, p. BR346-BR348, Figure 4.	1-6

☒ 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	Date of mailing of the international search report
25 November 2015 (25.11.15)	08 December 2015 (08.12.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/076207

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Toru HOSOYAMA et al., "Teisanso Shigeki ni yoru Saibo Sheet no Kino Fukatsuka to Shinfuzen Chiryo eno Oyo", Regenerative Medicine, 01 February 2015 (01.02.2015), vol.14, Suppl 2015, page 225, O-27-4	1-6

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０７６２０７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/077(2010.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P9/10(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.　C12N5/077, A61L27/00, A61P9/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１５年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed, CiNii, WPIDS/WPIX (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	YEH, T-S., et al., Baculovirus-transduced, VEGF-expressing adipose-derived stem cell sheet for the treatment of myocardium infarction, Biomaterials, 2013.10.10, Vol. 35, p. 174-184, ABSTRACT, p .175, 179, Fig. 2, 3	1-6

☑　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
２５．１１．２０１５	０８．１２．２０１５

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）		
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	太田　雄三	４Ｂ	３９５９
	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	関連する請求項の番号
X	AUGUSTIN, M., et al., Heat shock attenuates VEGF expression in three-dimensional myoblast sheets deteriorating therapeutic efficacy in heart failure, Medical Science Monitor, 2011.12.01, Vol. 17, No. 12, p. BR345-BR353, Summary, p. BR346-BR348, Figure 4.	1-6
P, X	細山徹, 他, 低酸素刺激による細胞シートの機能賦活化と心不全治療への応用, 再生医療, 2015.02.01, Vol. 14, Suppl 2015, p. 225, O-27-4	1-6