

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7624746号  
(P7624746)

(45)発行日 令和7年1月31日(2025.1.31)

(24)登録日 令和7年1月23日(2025.1.23)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 5/077(2010.01)	C 1 2 N 5/077
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00 Z
A 6 1 L 27/20 (2006.01)	A 6 1 L 27/20
A 6 1 L 27/18 (2006.01)	A 6 1 L 27/18
A 6 1 L 27/38 (2006.01)	A 6 1 L 27/38

請求項の数 3 (全13頁)

(21)出願番号	特願2022-530685(P2022-530685)	(73)特許権者	522205024 アクロセル バイオサイエンス インコーポレイテッド 大韓民国 ソウル 0 2 4 5 5 トンデムン グ、フェギ ロ、1 1 7 3、ソウル バイオハブ エリア、3 0 6 ホ、ローカル オープン ビルディング
(86)(22)出願日	令和2年6月11日(2020.6.11)	(74)代理人	110000383 弁理士法人エビス国際特許事務所
(65)公表番号	特表2023-503467(P2023-503467 A)	(72)発明者	イ ユンア 大韓民国、ソウル 0 5 2 6 2、ソチョグ、ジャムウォン ロ、6 0、ソウル 1 0 7 8 0 1、ガンドン グ、オリンピック ロ 9 8ガ ギル、4 7、1 1 1 0ホ
(43)公表日	令和5年1月30日(2023.1.30)		
(86)国際出願番号	PCT/KR2020/007604		
(87)国際公開番号	WO2021/107303		
(87)国際公開日	令和3年6月3日(2021.6.3)		
審査請求日	令和4年7月22日(2022.7.22)		
(31)優先権主張番号	10-2019-0152197		
(32)優先日	令和1年11月25日(2019.11.25)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		
前置審査			

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒアルロン酸及びポリエチレングリコールを含んで製造された細胞シートの製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) ヒアルロン酸を含む成長培地で細胞を沈降させて培養するステップと、  
b) ポリエチレングリコールを含む成長培地を追加するステップとを含む、細胞シートの製造方法であって、

前記細胞は、表皮細胞、線維芽細胞、肝細胞、中胚葉性幹細胞及び軟骨細胞からなる群から選択される1つ以上である、細胞シートの製造方法。

【請求項 2】

前記細胞シートは板 ( p l a t e ) 状である、請求項 1 に記載の細胞シートの製造方法。

【請求項 3】

前記細胞シートは、細胞の凝集が抑制されたものである、請求項 1 に記載の細胞シートの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、支持体なしに非付着状態で細胞シートを構成し、別途の積層段階なしに多層で構成された細胞シートを製造する方法、及び該方法により製造された細胞シートに関する。

【背景技術】

【0002】

細胞は、付着状態を維持する場合にさらに高い活性を示すので、移植される細胞の活性を極大化するためには、単一細胞の形態で収集された懸濁液よりも、細胞 - 細胞間又は細胞 - 基質間の結合が維持される細胞シート又はスカフォードベースの細胞複合体が有利である。

【0003】

前記のような理由で、移植可能な細胞シートを形成するための様々な技術が開発されており、このようにシート状態で培養された細胞は、細胞 - 細胞接触 (cell-cell contact) と細胞周囲の基質分子 (pericellular matrix molecules) が維持されることによって細胞の活性が高く維持され得るという利点が存在する。

10

【0004】

しかし、単層シート状態で培養された細胞構造物は、細胞移植などのために扱う過程で構造的損傷が容易に起こり得るという欠点が存在し、再生される組織の厚さを確保するために一体性高く細胞シートを多層化する場合、そのためのさらなる技術が求められるなどの問題点が存在した。

【0005】

現在までは、細胞自体を注入又は移植する形態の細胞治療剤が主流をなしているが、今後、移植可能な組織を体外で培養して製造する組織工学製剤に対する需要の増加により、これと関連する分野の持続的な開発が求められているのが実情である。

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、ヒアルロン酸 (hyaluronic acid、HA) 及びポリエチレングリコール (Poly ethylene glycol、PEG) の処理ステップを含む板状の細胞シート (cell slap) の製造方法を提供することである。

【0007】

本発明の他の目的は、前記製造方法により製造された板状の細胞シート (cell slap) を提供することである。

【0008】

本発明の更に他の目的は、前記板状の細胞シート (cell slap) 及び生分解性高分子物質を含む、軟骨修復用移植材を提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記のような目的を達成するための本発明の一態様は、a) ヒアルロン酸が含まれた成長培地で細胞を沈降させて培養するステップと; b) ポリエチレングリコールが含まれた成長培地を追加するステップと; を含む、細胞シートの製造方法を提供する。

【0010】

具体的には、前記製造方法により製造される細胞シートは板 (plate) 状であってもよい。

【0011】

40

本発明において、前記“細胞シート (cell slap)”は、一つ以上の細胞が層をなして配列されていることを指し、その形態は板 (plate) 状であってもよいが、これに制限されるものではない。用語“多層の細胞シート”は、前記細胞シートが垂直方向に一つ以上積層されることによって形成される細胞シートの集合を指す。以下、本明細書に記載されている“細胞シート”は、単一の層を有する細胞シート及び多層の細胞シートの両方を指すものとして使用される。

【0012】

本発明において、前記“積層”又は“形成”は、薄膜層が生成された順に積み重ねられたことを意味する。このような積層された構造は、当業界で公知の方法により製造されたものであれば、特に制限しない。

50

## 【0013】

本発明において、前記“ヒアルロン酸(hyaluronic acid、HA)”は、アミノ酸とウロン酸からなる複雑な多糖類の一つであって、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸からなる高分子化合物である。眼の硝子体や臍帯などに主に存在し、細菌の侵入や毒物の浸透を防ぐ役割を果たす。また、ヒアルロン酸は、各種眼科手術の補助剤、関節内注射剤、人工涙液、傷の治癒などの目的で使用される薬物であって、自重の300～1000倍に該当する水分を含有できる多糖類の一種で、保湿作用に優れていると知られているが、本発明のようにPEGと共に使用されて細胞シートを製造する方法については報告されたことがない。

## 【0014】

本発明において、前記“ポリエチレングリコール(Polyethylene glycol、PEG)”は、界面活性剤の一種で、化粧品の製造時に製品を安定的に維持させ、グリセリンのような役割を行うことで、化粧水、クリーム、シャンプーなどに多様に使用される化学成分であって、本発明のようにHAと共に使用されて細胞シートを製造する方法については報告されたことがない。

## 【0015】

具体的には、前記細胞シートに使用される細胞は、表皮細胞、線維芽細胞、肝細胞、中胚葉性幹細胞及び軟骨細胞で構成された群から1つ以上選択されたものであってもよく、より具体的には軟骨細胞であってもよいが、これに制限されない。

## 【0016】

本発明の一実施例において、前記軟骨細胞は、ウサギの半月板に由来したものであって、前記軟骨細胞を用いて板状の細胞シート(cell slap)を製造したが、これに制限されるものではない。

## 【0017】

前記細胞シートに使用される細胞は、ヒト多分化能性幹細胞から分化したものであってもよい。

## 【0018】

本発明において、前記“ヒト多分化能性幹細胞(Pluripotent stem cells、PSCs)”は、人体を構成する3つの胚葉(germ layer)、すなわち、内胚葉(endoderm)、中胚葉(mesoderm)、外胚葉(ectoderm)のいずれにも分化できる分化能を有した幹細胞を意味するものであって、前記ヒト多分化能性幹細胞は、様々な疾患の治療のための臨床試験、新たな薬物の開発、毒性の評価、疾患モデリング及び初期の胚芽発生の研究のために非常に有用な材料として評価されている。

## 【0019】

具体的に、前記細胞シートは、細胞の凝集が抑制されることを特徴とすることができる。

## 【0020】

本発明の一実施例において、前記細胞シートは、非付着状態で別途の支持体(scaffold)なしに形成されたことを特徴とし、このように形成された細胞シートは、細胞の凝集が著しく抑制されてスフェロイド(spheroid)がほとんど生じず、培養液中で底に沈降したままで細胞がシートの形態を維持することを確認した(実験例1、図2乃至図4)。

## 【0021】

このような結果は、培養液中に存在するヒアルロン酸(HA)及びポリエチレングリコール(PEG)の差別的な作用によって細胞の挙動を調節することによって、細胞の凝集によるスフェロイド(spheroid)形成の傾向性を変化させたためであり、ハイドロゲルの特性を有するヒアルロン酸(HA)が培地成分を均一に分布させながら、細胞間結合を維持する反面、培地に含まれたポリエチレングリコール(PEG)が細胞に対して斥力を示すので、培地に含まれたPEGと細胞との界面を最小化しようとする力が発生して板状の細胞シート(cell slap)の形態が維持されるものと考えられる。

10

20

30

40

50

## 【0022】

本発明において、前記“ハイドロゲル”は、水を大量に含むことができる物質であり、酸素、水、水溶性栄養物、酵素及びサイトカインなどのポリペプチドなどの細胞生存に必要な物質、老廃物などを容易に伝染移動させることができる材料又は形態であり、通常、生体適合性であるものを意味する。ハイドロゲルの形状や形態としては、細胞シートに統合できれば特に限定されないが、例えば、微粒子、顆粒状、フィルム状、チューブ状、ディスク状、網状、メッシュ状、多孔質状、懸濁状あるいは分散状などの様々な形状または形態のものが使用されてもよい。その中でも、コロイド粒子を含有する水溶液を固相化した結果としてなるハイドロゲル粒子が好ましい。前記のハイドロゲルの性質を有するものであれば、いずれの材料からなる粒子でも用いることができる。例えば、ポリアクリルアミド (polyacrylamide)、ポリアクリル酸 (polyacrylic acid)、ポリヒドロキシエチルメタクリレート (polyhydroxyethyl methacrylate)、ポリビニルアルコール (polyvinyl alcohol)、ポリ乳酸 (polylactic acid)、ポリグリコール酸 (polyglycolic acid) 及びポリエチレングリコール (polyethylene glycol) などの水溶性、親水性、または水吸収性合成高分子；及び多糖類、タンパク質、及び核酸などを化学架橋したハイドロゲルからなる粒子である。多糖類としては、ヒアルロン酸 (hyaluronic acid) 及びコンドロイチン硫酸 (chondroitin sulfate) などのグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan)、澱粉、グリコーゲン、アガロース、ペクチン、セルロースなどが挙げられるが、これに限定されない。また、タンパク質として、コラーゲン及びその加水分解物であるゼラチン、プロテオグリカン (proteoglycan)、フィブロネクチン (fibronectin)、ビトロネクチン (vitronectin)、ラミニン (laminin)、エンタクチン (entactin)、テネイシン (tenascin)、トロンボスポンジン (thrombospondin)、フォンヴィレブランド因子 (von Willebrand factor)、オステオポンチン (osteopontin)、フィブリノーゲン (fibrinogen) などが挙げられるが、これに限定されない。具体的には、生体適合性であり、かつ生体内で細胞によって分解される材料からなる粒子が本発明に適しており、最も具体的には、ヒアルロン酸及びポリエチレングリコールであってもよい。

10

20

30

## 【0023】

具体的に、前記細胞シートは、多層の細胞で構成され得、前記多層を構成する各細胞層は、細胞層間の一体性が維持されながら、構造的連続性を有することを特徴とすることができる。

## 【0024】

既存の細胞シートは、通常、支持体をベースとして形成されるが、このように支持体をベースとして形成された細胞シートは、支持体内部の細胞の分布が均一に形成されにくく、支持体が占める体積の分だけ細胞密度が低くなるので、移植時に伝達される細胞数の効率が低いという問題があった。また、残存する支持体が次第に分解されながら構造的変形及び組織連続性の変化が生じ得るという問題があった。

40

## 【0025】

一方、前記のような問題点にもかかわらず、支持体なしに2D培養を通じて単層の細胞で構成された細胞シートは、強度が弱いため、裂けやすく、ハンドリングが難しいという欠点が存在し、単一層の細胞で構成されるため、移植用としての使用時に高濃度の細胞の伝達が難しいという限界点が存在した。このような問題点を解決するために、細胞密度を高めるために多層構造を形成しようとする試みがあったが、多層構造を形成する過程が複雑であり、100%の層間一体性を実現することが難しいという限界点が存在した。

## 【0026】

高濃度で細胞をシーディング (seeding) して多層の細胞構造を形成する場合、単位面積当たり高い数の細胞を伝達することができるが、高濃度でシーディングされた細

50

胞が局所的に凝集してスフェロイド ( s p h e r o i d ) を形成するようになるので、均一な厚さ及び構造的連続性を有する細胞シートを形成できないという限界点が存在した。

【 0 0 2 7 】

反面、本発明の細胞シートは、支持体なしにも、多層の細胞で構成された、細胞密度が高いシートを形成することによって、細胞伝達効率が高く、組織の再生に有利であることを確認した ( 実験例 4、図 6 )。また、細胞シートの形成過程で支持体が不要であるため、支持体の分解過程で起こる構造変形の恐れがないので構造的安定性が高く、コーティングではなく培地の組成を通じて細胞の挙動を制御するので、特に他の工程を追加することなく、既存の細胞を扱う工程と同一であるので、適用が容易であるという利点がある。

【 0 0 2 8 】

本発明の細胞シートは、非付着条件で細胞シートの形成を誘導するので、細胞と基質との間の相互作用などに大きく制限されず、培養容器の表面処理が不要であるので、3Dプリンティングなどを用いた様々な材質の培養容器の構成が可能であるという利点がある。さらに、本発明の細胞シートは、積層過程がなくても多層の細胞で構成された細胞構造物の形成が可能であることによって、積層による多層構造ではないので構造的安定性が高く、積層過程を省略できるので工程が短縮され、細胞層がそれ自体で厚く形成され、より安定的なハンドリングが可能であることを確認した ( 実験例 3、図 5 )。

【 0 0 2 9 】

本発明の他の態様は、前記製造方法により製造された細胞シートを提供する。

【 0 0 3 0 】

本発明の更に他の態様は、前記細胞シートを含む、組織修復用移植材を提供する。

【 0 0 3 1 】

具体的に、前記組織は、軟骨、骨、角膜、結膜、脂肪組織、皮膚、筋肉、筋膜、腱、腱膜、靭帯、関節包、粘液嚢及び上皮組織からなる群から選択される1つ以上であってもよく、より具体的には軟骨を意味するものであってもよいが、これに制限されない。

【 0 0 3 2 】

前記細胞シートに使用される細胞は、ヒト多分化能性幹細胞から目的とする組織の細胞に分化したものであってもよい。

【 0 0 3 3 】

本発明において、前記“組織修復 ( t i s s u e r e p a i r )”は、組織の再生 ( r e g e n e r a t i o n ) と治癒 ( h e a l i n g ) をいずれも含む概念として使用され得、再生 ( r e g e n e r a t i o n ) は、損傷した細胞と同じ組織構成で損傷部位を再構成することを意味し、治癒 ( h e a l i n g ) は、損傷した組織に付け足す ( p a t c h ) 繊維増殖型反応を意味する。

【 0 0 3 4 】

本発明において、前記“組織修復用”とは、損傷した組織の修復のための用途であれば、その種類を制限せず、軟骨の損傷、筋肉又は腱の損傷だけでなく、美容用フィラーの用途、成形用補形物の用途などをいずれも含むことを意味することができる。

【 0 0 3 5 】

軟骨及び軟組織は、損傷した後、自ら再生又は治癒されないため、他の組織とは異なって、組織の生長を促進する方法は適用するには不向きであり、移植を介した治療法が効果的であると知られている。

【 0 0 3 6 】

本発明の“組織修復用移植材”は、軟骨、骨、角膜、結膜、脂肪組織、皮膚、筋肉、筋膜、腱、腱膜、靭帯、関節包、粘液嚢などのような組織が損傷した場合に、物理的な物性を用いて損傷部位を埋めることによって、欠損又は陥没部位の損傷を治療し、元の体積に回復させる組成物を意味するもので、前記のような目的で使用される組成物であれば、その実施形態に制限されずに適宜変更して適用可能である。

【 0 0 3 7 】

本発明の細胞シートは、別途の支持体を含まないながらも、高濃度の細胞で構成される

10

20

30

40

50

ことで、移植された組織部位の治療及び再生の効用に優れることを確認したところ（図6）、前記細胞シートを含む組織修復用移植材は、高い組織再生効率を示すことができる。

【発明の効果】

【0038】

本発明の細胞シートの製造方法は、支持体なしに非付着状態で細胞シートを形成することが可能であり、別途のコーティング処理なしに脱着してハンドリングが可能であることを特徴とする。また、別途の積層過程又は多層化過程を経なくても、単位面積当たり高い数の細胞を移植できる細胞シートを製造することができる。

【0039】

本発明の効果は、前記の効果に限定されるものではなく、本発明の詳細な説明又は特許請求の範囲に記載された発明の構成から推論可能なすべての効果を含むものと理解されなければならない。

10

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】ヒアルロン酸（hyaluronic acid、HA）及びPEG（ポリエチレングリコール）を用いて細胞シートを製造する方法を図式化して示した図である。

【図2】24時間培養後の実施例1及び比較例1～3の製造方法により製造された細胞シートの細胞凝集（cell aggregate）の程度を確認した結果を示した図である。

【図3】実施例1及び比較例1～3の凝集体（nodule）の個数を観察した結果を示した図である。

20

【図4】実施例1及び比較例1～3の凝集体（nodule）の大きさを観察した結果を示した図である。

【図5】実施例1の細胞シートをPLA（Poly Lactic Acid）メッシュに付着する過程を示した図である。

【図6】細胞シートをサンドイッチ状にPLAメッシュに付着した後、2、3週間軟骨分化を誘導し、形成された組織の形態及び基質形成の有無を、組織学的染色を通じて確認した結果を示した図である（A：実施例1の細胞シート、B：コラーゲンゲルシートの表面に高濃度でシーディングされた細胞シート）。

【発明を実施するための形態】

30

【0041】

以下、本発明を実施例によって詳細に説明する。但し、下記の実施例は、本発明を例示するものに過ぎず、本発明が下記の実施例によって限定されるものではない。

【0042】

実施例1．HA及びPEGを用いた細胞シート（Cell slap）の製造方法

【0043】

ヒアルロン酸（hyaluronic acid、HA）及びポリエチレングリコール（Polyethylene glycol、PEG）を用いて細胞シートを製造する方法を、図1に簡略に示した。

【0044】

40

具体的に、四方が塞がった四角形のウェルに底表面をポリ-HEMA（ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート））でコーティングして細胞の結合を防止した。

【0045】

ウェルの底表面と細胞の結合が防止された状態で、継代数3～5の間のウサギの半月板由来の軟骨細胞を、1mg/mlのヒアルロン酸（HA）を含む成長培地に $2 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$ の濃度でシーディング（seeding）し、2.5時間培養して、細胞層が均一に沈むように誘導した。このとき、前記成長培地は、 $\alpha$ -MEM（ $\alpha$ -Minimum Essential Medium、Gibco Invitrogen）培地に5%牛胎児血清（Fetal bovine serum：FBS、Lonza）、1%ペニシリン/ストレプトマイシン（penicillin/streptomycin、W

50

e l g e n e )、2 m M の L - グルタミン ( W e l g e n e )、 $10^{-8}$  M のデキサメタゾン ( d e x a m e t h a s o n e、S i g m a A l d r i c h ) 及び  $10^{-4}$  M のアスコルビン酸 ( a s c o r b i c a c i d、S i g m a A l d r i c h ) を添加して製造した。

【 0 0 4 6 】

以降、1 % のポリエチレングリコール ( P E G ) を含む成長培地を追加して培養することによって、実施例 1 の細胞シートを製造した。

【 0 0 4 7 】

比較例 1 . 成長培地のみを処理した細胞シートの製造

【 0 0 4 8 】

実施例 1 と全ての条件を同一に維持するが、ヒアルロン酸 ( H A ) 及びポリエチレングリコール ( P E G ) を添加しない点を異にして、前記実施例 1 の製造方法により比較例 1 の細胞シートを製造した。

【 0 0 4 9 】

比較例 2 . H A のみを処理した細胞シートの製造

【 0 0 5 0 】

前記実施例 1 の製造方法を用いて比較例 2 の細胞シートを製造するが、ヒアルロン酸 ( H A ) を含む成長培地を用いることは実施例 1 と同一に維持し、2 . 5 時間培養した後、ポリエチレングリコール ( P E G ) を含まない成長培地を追加することによって、比較例 2 の細胞シートを製造した。

【 0 0 5 1 】

比較例 3 . P E G のみを処理した細胞シートの製造

【 0 0 5 2 】

実施例 1 と全ての条件を同一に維持するが、最初にウサギの半月板由来の軟骨細胞をシーディングする際に、ヒアルロン酸 ( H A ) を添加していない成長培地を用いることによって、比較例 3 の細胞シートを製造した。

【 0 0 5 3 】

前記実施例 1 及び比較例 1 ~ 3 の製造方法を図 1 に簡略に示した。

【 0 0 5 4 】

実験例 1 . H A 及び P E G を含むか否かによる細胞シートの形態の分析

【 0 0 5 5 】

ヒアルロン酸 ( H A ) 及びポリエチレングリコール ( P E G ) を含むか否かによる細胞シートの形態を分析するために、前記製造方法により製造した細胞シートが、細胞凝集 ( c e l l a g g r e g a t e ) 現象なしに均一な厚さの表面を有するか否かを確認した。

【 0 0 5 6 】

具体的には、前記実施例 1 及び比較例 1 ~ 3 の製造方法により製造された細胞シートを対象として、培養状態を維持しながら、24 時間後の細胞凝集 ( c e l l a g g r e g a t e ) の程度を確認し、その結果を図 2 に示した。

【 0 0 5 7 】

その結果、図 2 に示されたように、最初の細胞のシーディング ( s e e d i n g ) 時に  $1 \text{ mg / ml}$  の濃度のヒアルロン酸 ( H A ) を含むか否か、及び培地の追加時に 1 % の P E G が培地に含まれるか否かが、それぞれ細胞の凝集の程度に大きく作用することを確認した。

【 0 0 5 8 】

具体的には、H A 及び P E G がいずれも含まれていない比較例 1 は、培養 24 時間後、一般的なスフェロイド ( s p h e r o i d ) 形成条件とほぼ同様に、低い密度のスフェロイドが多数形成され、細胞のシーディング時に H A が含まれた比較例 2 の場合、比較的密度が高いスフェロイド ( s p h e r o i d ) を形成する傾向性が高く示され、H A なしで、P E G を含む培地のみが追加された比較例 3 の場合には、細胞の凝集が無秩序に起こり、巨大なスフェロイドを形成することが観察された。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 9 】

反面、H A が含まれた条件で細胞をシーディングし、P E G が含まれた培地を追加した実施例 1 の場合、細胞の凝集が最小限に抑制されてスフェロイドが生じず、培養液中で底に沈降したままで細胞がシートの形態を維持して、比較的均一な厚さを維持することを確認した。

## 【 0 0 6 0 】

このような結果は、培養液中に存在する 2 種類のハイドロゲル成分の差別的作用によって細胞の挙動を調節することによって、細胞の凝集によるスフェロイド形成の傾向性を変化させたためであると考えられる。

## 【 0 0 6 1 】

すなわち、ハイドロゲルの特性を有する H A が培地成分を均一に分布させながら、細胞間結合を維持する反面、培地に含まれた P E G が細胞に対して斥力を示すので、培地に含まれた P E G と細胞との界面を最小化しようとする力が発生して細胞シート ( c e l l s l a p ) の形態が維持されるものと考えられる。

## 【 0 0 6 2 】

実験例 2 . H A 及び P E G を含むか否かによる凝集体 ( n o d u l e ) 形成の程度の確認

## 【 0 0 6 3 】

前記実験例 1 と同じ方法を通じて、H A 及び P E G を含むか否かによる凝集体 ( n o d u l e ) 形成の程度を確認するために、実施例 1 及び比較例 1 ~ 3 の凝集体 ( n o d u l e ) の個数及び大きさを観察し、個数を確認した結果を図 3 に、大きさを確認した結果を図 4 に示した。

## 【 0 0 6 4 】

その結果、図 3 に示したように、何も処理していない比較例 1 で形成された凝集体の数が最も多く、比較的大きいスフェロイドが形成されるヒアルロン酸単独処理群 ( 比較例 2 ) 及び細胞の凝集が無秩序に起こる P E G 単独処理群 ( 比較例 3 ) では、比較例 1 に比べて形成された凝集体の数が低いことを確認し、H A 及び P E G を全て処理した実施例 1 で形成された凝集体の数が最も少ないことを確認した。

## 【 0 0 6 5 】

また、図 4 に示されたように、何も処理していない比較例 1 と H A 及び P E G を全て処理した実施例 1 の凝集体の大きさが、比較例 2 及び 3 よりも著しく小さいことを確認した。

## 【 0 0 6 6 】

前記の結果を総合してみると、H A 及び P E G を全て処理した実施例 1 の場合に、形成される凝集体の数が最も少なく、大きさも最も小さいことを確認したところ、このような結果は、従来に存在していた技術的限界を克服するための非常に重要な内容に該当するものである。

## 【 0 0 6 7 】

既存の単一細胞層ベースの細胞シートは、物理的強度が弱く、移植用として使用する場合に細胞の濃度が低いという限界点が存在した。このような単一細胞層ベースの細胞シートの限界点を克服するために、多層の細胞で構成された細胞シート及びその製造方法が求められたが、高濃度で細胞をシーディングすることによって多層の細胞で構成された細胞シートを形成しようとする試みは、細胞の濃度が高くなるほど凝集が多く発生し、多数のスフェロイド ( s p h e r o i d ) を形成するようになる問題点を解決することができなかった。それ故に、多層の細胞で構成された細胞シートを製造するためには、別途の積層過程を経ることが要求されるので、構造的に不安定であり、工程が長くなるという欠点があった。

## 【 0 0 6 8 】

しかし、本発明の H A 及び P E G を含む細胞シートの製造方法を用いると、過度のスフェロイドが形成される問題を解決できるので、別途の積層過程なしにも、多層の細胞で構成された細胞シートの製造が可能となり得る。

## 【 0 0 6 9 】

10

20

30

40

50

**実験例 3 . H A 及び P E G を含んで製造された細胞シートの使用性の確認****【 0 0 7 0 】**

前記実施例 1 で製造された細胞シートを使用するにおいて、既存の細胞シートの製造方法により製造された細胞シートの使用過程に存在していた限界点及び不便さを克服したかを確認した。

**【 0 0 7 1 】**

既存の支持体を使用して細胞シートを製造する場合には、別途の処理過程なしでは細胞シートをきれいに分離しにくく、さらに、支持体の分解又は支持体から分離する過程で細胞シートの構造の変形及び組織連続性の変化の可能性が存在した。

**【 0 0 7 2 】**

また、既存の単一細胞層ベースの細胞シートの場合、強度が弱いため、裂けやすく、別途のハンドリング道具なしではハンドリングしにくいという欠点が存在し、多層構造を形成する場合には、その過程が非常に複雑であるだけでなく、100%の層間一体性を実現することが難しく、均一な厚さ及び構造的連続性を有する細胞シートを形成することが不可能であった。

**【 0 0 7 3 】**

本発明の細胞シートは、支持体なしに非付着条件で形成され、別途の積層過程なしにも多層の細胞で構成されて十分に厚く形成されることを特徴とするところ、このような内容を確認するために、実施例 1 の細胞シートを P L A ( P o l y L a c t i c A c i d ) メッシュに付着する過程を試演した ( 図 5 ) 。

**【 0 0 7 4 】**

図 5 に示されたように、細胞シートを P L A メッシュよりも広く形成した後、コラーゲンがコーティングされた P L A メッシュの前後に巻いて付着させることによって軟骨分化用複合体を形成した。

**【 0 0 7 5 】**

このとき、実施例 1 の細胞シートは、別途の支持体なしに非付着条件で形成されたので、細胞スクレーパー ( c e l l s c r a p e r ) のみで、一定の厚さを有する均一な細胞シートの分離が可能であった。

**【 0 0 7 6 】**

また、分離された細胞シートは、多層の細胞で構成されて十分に厚く形成されたので、別途のハンドリング道具なしにピンセットだけでも裂けずにハンドリングすることが可能であることを確認した。

**【 0 0 7 7 】**

すなわち、本発明の細胞シートの製造方法により製造された細胞シートは、支持体なしに非付着条件で形成されたものであって、別途の積層過程なしに独自で多層の細胞構造を形成することによって、構造的に安定しているだけでなく、均一な厚さ及び構造的連続性を有することを確認した。

**【 0 0 7 8 】****実験例 4 . H A 及び P E G を含んで製造された細胞シートの基質形成の効果の確認****【 0 0 7 9 】**

本発明の製造方法により製造された細胞シートの基質形成の効果を確認するために、P L A メッシュにサンドイッチ状に細胞シートを付着させ、メッシュの両側の表面の細胞が互いに結合して一つの組織として一体化されるか否か、及び軟骨分化時の基質形成の効能を確認した。

**【 0 0 8 0 】**

具体的には、コラーゲングルシートの表面に高濃度でシーディングされた細胞シート及び前記実施例 1 の細胞シートをサンドイッチ状に P L A メッシュに付着した後、2、3 週間軟骨分化を誘導した。以降、形成された組織の形態及び基質形成の有無を、組織学的染色を通じて確認した ( 図 6 ) 。

**【 0 0 8 1 】**

10

20

30

40

50

具体的には、固定された組織を5～7μmの厚さにパラフィン切断(paraffin section)し、乾燥させた後、ヘマトキシリン/エオジン染色(H&E, Hematoxylin & Eosin staining)を行った後、高解像度光学顕微鏡で観察して組織の形態を確認した。サフラニンO染色(Safranin O staining)を通じた軟骨特異的基質の形成の有無を確認するために、Weigert'sヘマトキシリンで5分間核を染色した後、蒸留水で10分間洗浄した。70%エタノール溶液に浸して組織をエタノール溶液に適應させた後、0.02%ファストグリーン(fast green)で5分間染色し、1%酢酸で洗浄した。0.1%水性サフラニンOを用いて5分間染色した後、70%、80%、90%、100%アルコールに順に適應させて組織を脱水し、キシレンに入れて適應させた後、プラスチックマウンティング溶液(mountant)でマウンティングした。

10

**【0082】**

トリクローム染色(Trichrome staining)法で繊維状基質タンパク質を染色することによってコラーゲンゲルシートの残存有無を確認するために、Weigert'sヘマトキシリンで10分間核を染色した後、蒸留水で10分間洗浄し、ビーブリッヒスカーレット酸レッドフクシン(Biebrich scarlet acid red fuchsin)水溶液で5分間細胞質を染色した。アニリンブルー(Aniline blue)で繊維状基質を染色した後、1%酢酸で染色を固定し、70%、80%、90%、100%アルコールに順に適應させて組織を脱水し、キシレンに入れて適應させた後、プラスチックマウンティング溶液(PermOUNT, Fisher Chemical)でマウンティングした。全ての試薬は、別途の表示がない限り、シグマ-アルドリッチ(Sigma Aldrich)の製品を使用した。

20

**【0083】**

その結果、図6Aに示されたように、実施例1の細胞シートから形成された組織は、中央に位置するPLAメッシュに浸透した後、互いに結合して一つの組織を形成し、軟骨特異的基質の形成が良好に起こることを確認した。

**【0084】**

反面、図6Bに示されたように、コラーゲンゲルシートを用いて形成した細胞シートは、コラーゲン表面にシーディングされた細胞がPLAメッシュの内部に浸透又は移動する程度が著しく低く、PLAメッシュを境界として2つの分離された層を形成した。また、実施例1の細胞シートと比較するとき、軟骨性基質の形成の程度が非常に低く、細胞がシーディングされたコラーゲンゲルシートが残存し続けることを確認した(トリクローム染色の結果)。

30

**【0085】**

前記の結果から、HA及びPEGを含んで製造した本発明の細胞シートは、コラーゲンゲルシートなどの別途の支持体なしに形成されたものであって、高い細胞密度を有するので細胞伝達効率が高く、組織再生に有利であるだけでなく、完璧な一体性を有し、高い構造的連続性を示すことを確認した。

**【0086】**

前述した本発明の説明は例示のためのものであり、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者は、本発明の技術的思想や必須の特徴を変更せずに他の具体的な形態に容易に変形可能であるということを理解できるであろう。したがって、以上で記述した実施例は、すべての面で例示的なものであり、限定的なものではないと理解しなければならない。例えば、単一型として説明されている各構成要素は分散して実施されてもよく、同様に、分散したものとして説明されている構成要素も結合された形態で実施されてもよい。

40

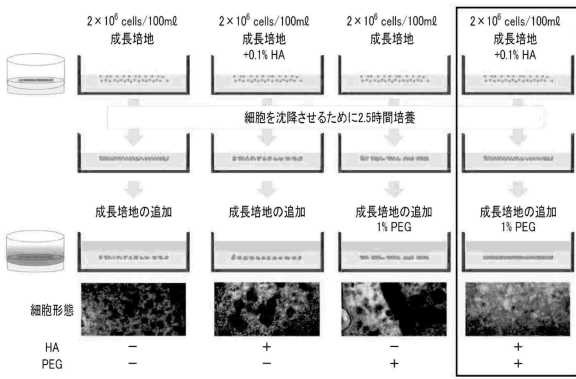
**【0087】**

本発明の範囲は、後述する特許請求の範囲によって示され、特許請求の範囲の意味、範囲及びその均等概念から導かれるすべての変更又は変形された形態が本発明の範囲に含まれるものと解釈されなければならない。

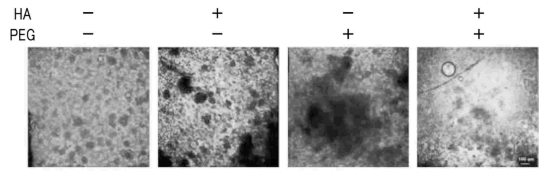
50

【図面】

【図 1】

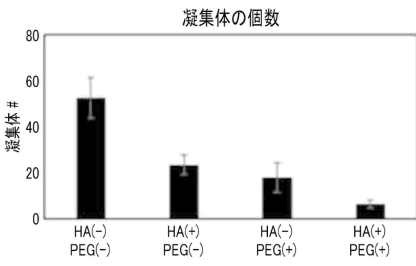


【図 2】

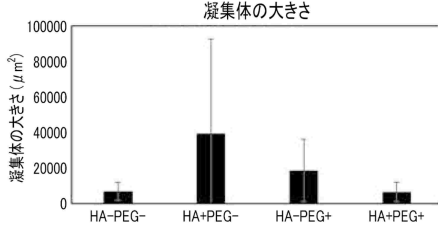


10

【図 3】



【図 4】



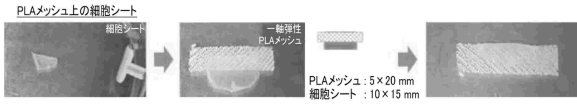
20

30

40

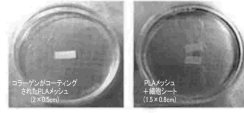
50

【 図 5 】

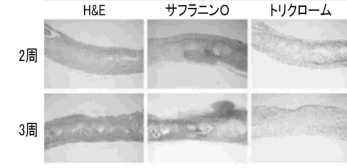


【 図 6 】

A PLAメッシュ上の細胞シート

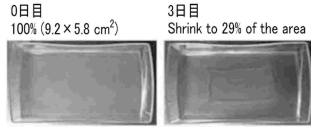


細胞シート培養

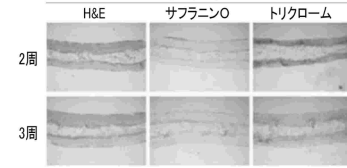


10

B コラーゲンゲル上にシーディングされた細胞



コラーゲンゲル



20

30

40

50

---

フロントページの続き

(72)発明者 オ トンイン

大韓民国、ソウル 01727、ノウォン グ、ジュンギェ ロ 8 ギル、103、115ドン  
808ホ

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 特開2005-261292(JP, A)

国際公開第2006/093151(WO, A1)

特開2015-204838(JP, A)

国際公開第2012/118097(WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 7/08

CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)