

(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
2023年10月12日(12.10.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/195531 A1

(51) 国際特許分類:
CI2N 5/0775 (2010.01)

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/014332

(22) 国際出願日: 2023年4月7日(07.04.2023)

(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 2022-064720 2022年4月8日(08.04.2022) JP

(71) 出願人: 学校法人 日本歯科大学(**THE NIPPON DENTAL UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒1028159 東京都千代田区富士見1丁目9番20号 Tokyo (JP).

(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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(72) 発明者: 中原 貴(**NAKAHARA, Taka**); 〒1028159 東京都千代田区富士見1丁目9番20号 学校法人 日本歯科大学内 Tokyo (JP). 望月 真衣(**MOCHIZUKI, Mai**); 〒1028159 東京都千代田区富士見1丁目9番20号 学校法人 日本歯科大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 伊東 忠重, 外(**ITOH, Tadashige et al.**); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号 丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 16階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) **Title:** MULTI-LAYER CELLULAR STRUCTURE AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: 多層細胞構造物及びその製造方法

(57) **Abstract:** A method for producing a multi-layer cellular structure, the method comprising culturing, by using a serum-free medium, mesenchymal stem cells derived from dental pulp in culturing equipment coated with type-I collagen or a fragment thereof, wherein the number of mesenchymal stem cells, being derived from the dental pulp, used for inoculation is more than 0.5×10^4 cells/cm² but less than 2×10^4 cells/cm².

(57) 要約: 無血清培地を用い、I型コラーゲン又はその断片でコートされた培養器材で歯髓由来の間葉系幹細胞を培養することを含み、前記歯髓由来の間葉系幹細胞の播種数が、 0.5×10^4 cells/cm²超、 2×10^4 cells/cm²未満である多層細胞構造物の製造方法である。



WO 2023/195531 A1

明 細 書

発明の名称：多層細胞構造物及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、多層細胞構造物及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 現在の再生医療の研究や臨床においては、温度応答性培養皿が広く使用されている。この温度応答性培養皿で細胞を培養し、単層化した状態で、温度を37℃から20℃に下げることによって、細胞をシート状に回収することができる。しかし、回収される細胞シートは単層で脆弱であり、移植に用いるときには細胞シートの支持具を用いて1枚ずつ重ねて多層化シートを作る必要があり、時間と手間がかかってしまう課題があった。

[0003] 再生医療に用いられる代表的な体性幹細胞の1つとして、間葉系幹細胞（以下、「MSC」と称することがある。）がある。前記MSCとしては、例えば、骨髄、臍帯、歯等に由来する幹細胞が知られている。

[0004] 一般に、MSCの培養に用いる培養液には、ウシ胎仔血清（FBS）を10～20%で添加する必要がある。ところがFBSは動物由来のため、異種抗原による免疫反応や、プリオン、ウイルス等の感染、FBS成分のロット差の問題があり、安全かつ安定な再生医療の提供には解決すべき課題が多い。

[0005] そこで近年、FBSを使用しない（以下、「FBSフリー」、「無血清」と称することがある。）培養液が求められており、免疫、感染、ロット差の問題がない無血清培養液が開発されている。前記無血清培養液としては、例えば、現行医薬品適性製造基準（current good manufacturing practice（cGMP））にて製造された無血清培養液（XFM, Irvine Scientific社製）などがある。

[0006] これまでに、XFMで培養した歯髄幹細胞（以下、「XFM細胞」と称することがある。）は、従来の15% FBS含有培養液（serum-co

ntaining medium)で培養した歯髄幹細胞（以下、「SCM細胞」と称することがある。）に比べて、培養12日目までに約2倍の細胞数が得られることが報告されている（非特許文献1参照）。また、非特許文献1では、培養8日目以降のコンフルエント（細胞がシャーレを満たした状態）では、SCM細胞は単層を保つのに対して、XFM細胞では細胞が自律的に多層化（以下、「自己多層化」と称することがある。）した細胞シート状の構造になること、培養14日目ではXFM細胞の細胞数が減少したことから、TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling) 染色で細胞死を解析するとXFM細胞は極めて多くのTUNEL陽性細胞が観察されたことも報告されている。

したがって、XFMでの培養は、従来法よりも約2倍の細胞を増やすことができる一方で、自己多層化した細胞は細胞死が生じ、細胞数が減少する問題点があった。

[0007] 非特許文献1の続報として、自己多層化によって細胞死が生じる問題を解決するため、培養器材（シャーレやプレート）のコーティングに着目し、I型コラーゲンが最適なコーティング基材であることが報告されている（非特許文献2参照）。非特許文献2では、コラーゲン塗布した培養シャーレで培養した歯髄幹細胞（以下、「COL-XFM細胞」と称することがある。）は、XFM細胞よりもさらに持続的な増殖を続け、培養20日目まで細胞数が減少することなく、最終的に約2倍の細胞数に達する自己多層化細胞シートの形成に成功したことが報告されている。また、この培養20日目の自己多層化細胞シートを切片にしてTUNEL染色すると、XFM細胞よりもTUNEL陽性細胞が少ないことも確認されている。さらに、JC-1を用いたフローサイトメトリーによるミトコンドリアの膜電位の解析では、培養10日目から20日目にかけてCOL-XFM細胞の膜電位には大きな変化は見られないのに対して、XFM細胞は膜電位の低下によって生じたJC-1

モノマーが有意に多く観察されたことが報告されている。

以上の結果は、COL-XFM細胞は細胞数が最大でプラトーに達し、細胞外マトリックス（以下、「ECM」と称することがある。）を産生して成熟した培養20日目の自己多層化細胞シートを形成するが、シート内の細胞には少なからずTUNEL陽性、一定の膜電位の低下も観察されている。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1: Mochizuki et al., Establishment of xenogeneic serum-free culture methods for handling human dental pulp stem cells using clinically oriented in-vitro and in-vivo conditions, Stem Cell Research & Therapy (2018) 9:25

非特許文献2: Mochizuki et al., Type I collagen facilitates safe and reliable expansion of human dental pulp stem cells in xenogeneic serum-free culture, Stem Cell Research & Therapy (2020) 11:267

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、前記従来の諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、多層細胞構造物の製造に要する培養期間を短縮することができ、かつ多層細胞構造物における細胞死を抑制することができ、更には様々な形状の多層細胞構造物とすることができる多層細胞構造物の製造方法及び多層細胞構造物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、前記目的を達成するべく鋭意検討を行った結果、無血清培地を用い、Ⅰ型コラーゲン又はその断片でコートされた培養器材で歯髄由来の間葉系幹細胞を培養する際に、前記歯髄由来の間葉系幹細胞の播種数を $0.5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 超、 $2 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 未満とすることで、多層細胞構造物の製造に要する培養期間を短縮することができ、かつ多層細胞構造物における細胞死を抑制することができ、更には様々な形状の多層細胞構造物とすることができることを知見し、本発明を完成するに至った。

[0011] 本発明は、本発明者らの前記知見に基づくものであり、前記課題を解決するための手段としては、以下の通りである。即ち、

＜１＞ 無血清培地を用い、Ⅰ型コラーゲン又はその断片でコートされた培養器材で歯髄由来の間葉系幹細胞を培養することを含み、

前記歯髄由来の間葉系幹細胞の播種数が、 $0.5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 超、 $2 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 未満であることを特徴とする多層細胞構造物の製造方法である。

＜２＞ 前記無血清培地が、異種動物成分を含まない前記＜１＞に記載の多層細胞構造物の製造方法である。

＜３＞ 前記多層細胞構造物の形状が、シート状、棒状、及びディスク状のいずれかである前記＜１＞から＜２＞のいずれかに記載の多層細胞構造物の製造方法である。

＜４＞ 前記多層細胞構造物の形状がシート状であり、厚みが $5 \mu\text{m} \sim 40 \mu\text{m}$ である前記＜３＞に記載の多層細胞構造物の製造方法である。

＜５＞ 前記多層細胞構造物における死細胞の割合が、５％以下である前記＜１＞から＜４＞のいずれかに記載の多層細胞構造物の製造方法である。

＜６＞ 前記多層細胞構造物が、Ⅰ型コラーゲン、ⅠⅤ型コラーゲン、及びⅤⅠⅠ型コラーゲンを発現している前記＜１＞から＜５＞のいずれかに記載の多層細胞構造物の製造方法である。

＜７＞ 歯髄由来の間葉系幹細胞の多層細胞構造物であって、
前記多層細胞構造物における死細胞の割合が、５％以下であることを特徴とする多層細胞構造物である。

＜８＞ 前記多層細胞構造物が、Ⅰ型コラーゲン、ⅠⅤ型コラーゲン、及びⅤⅠⅠ型コラーゲンを発現している前記＜７＞に記載の多層細胞構造物である。

＜９＞ 前記多層細胞構造物の形状が、シート状、棒状、及びディスク状のいずれかである前記＜７＞から＜８＞のいずれかに記載の多層細胞構造物である。

＜１０＞ 前記多層細胞構造物の形状がシート状であり、厚みが５μｍ～４０μｍである前記＜９＞に記載の多層細胞構造物である。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、前記従来の諸問題を解決し、前記目的を達成することができ、多層細胞構造物の製造に要する培養期間を短縮することができ、かつ多層細胞構造物における細胞死を抑制することができ、更には様々な形状の多層細胞構造物とすることができる多層細胞構造物の製造方法及び多層細胞構造物を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図１]図１は、試験例１における増殖曲線評価を行った結果を示すグラフである。

[図２]図２は、試験例１の増殖曲線評価における培養１０日目の位相差顕微鏡写真である。

[図３]図３は、試験例２における増殖曲線評価を行った結果を示すグラフである。

[図４]図４は、試験例２の増殖曲線評価における培養１０日目の位相差顕微鏡写真である。

[図５]図５は、試験例２－１及び２－２の培養１０日目の細胞シートの実体顕微鏡像である。

[図6]図6は、試験例2-3の培養10日目の細胞シートの実体顕微鏡像である。

[図7]図7は、試験例2の培養10日目の細胞のヘマトキシリン・エオジン（HE）染色及びマッソントリクローム（MT）染色の結果を示す図である。

[図8]図8は、試験例2の培養10日目の細胞のTUNEL染色及びDAPI染色の結果を示す免疫蛍光染色図である。

[図9]図9は、試験例2-1の培養10日目の歯髄幹細胞の自己多層化細胞シートの各種コラーゲンの免疫蛍光染色の結果を示す図である。

[図10]図10は、試験例3において、培養10日目の歯髄幹細胞の自己多層化細胞シートを巻き、ロール化した状態の外観を示す図である。

[図11]図11は、試験例3において、ロール化後培養4日目の状態の外観を示す図である。

[図12]図12は、試験例3のロール化後培養4日目のものの断面についてのヘマトキシリン・エオジン（HE）染色の結果を示す図である。

[図13]図13は、試験例3のロール化後培養4日目の細胞チューブ断面の各種コラーゲンの免疫蛍光染色の結果を示す図である。

[図14]図14は、試験例4の培養1ヶ月目の細胞の位相差顕微鏡像である。

[図15]図15は、試験例4の培養1ヶ月目の細胞の実体顕微鏡像（ピンセットで担持する前）である。

[図16]図16は、試験例4の培養1ヶ月目の細胞の実体顕微鏡像（ピンセットで担持した際）である。

[図17]図17は、試験例4の培養1ヶ月目の細胞のヘマトキシリン・エオジン（HE）染色の結果を示す図である。

[図18]図18は、試験例4の培養1ヶ月目の細胞のマッソントリクローム（MT）染色の結果を示す図である。

[図19]図19は、試験例4の培養1ヶ月目の細胞のTUNEL染色及びDAPI染色の結果を示す免疫蛍光染色図である。

[図20]図20は、試験例4-1の培養1ヶ月目の歯髄幹細胞の各種コラーゲ

ンの免疫蛍光染色の結果を示す図である。

[図21]図 2 1 は、試験例 5 における増殖曲線評価を行った結果を示すグラフである。

[図22]図 2 2 は、試験例 5 の増殖曲線評価における培養 1 0 日目の位相差顕微鏡写真である。

[図23]図 2 3 は、試験例 5 - 1 及び 5 - 2 の培養 1 0 日目の歯髄幹細胞の自己多層化細胞シートの実体顕微鏡像（ピンセットで担持した際）である。

[図24]図 2 4 は、試験例 5 の培養 1 0 日目の細胞のヘマトキシリン・エオジン（H E）染色及びマッソントリクローム（M T）染色の結果を示す図である。

[図25]図 2 5 は、試験例 5 - 1 の培養 1 0 日目の歯髄幹細胞の細胞シートの各種コラーゲンの免疫蛍光染色の結果を示す図である。

[図26]図 2 6 は、試験例 5 - 2 の培養 1 0 日目の歯髄幹細胞の細胞シートの各種コラーゲンの免疫蛍光染色の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] （多層細胞構造物及びその製造方法）

本発明の多層細胞構造物の製造方法は、培養工程を少なくとも含み、必要に応じて、さらにその他の工程を含む。

本発明の多層細胞構造物は、本発明の多層細胞構造物の製造方法により、好適に製造することができる。

以下、本発明の多層細胞構造物の製造方法の説明と併せて、本発明の多層細胞構造物についても説明する。

[0015] ＜培養工程＞

前記培養工程は、無血清培地を用い、I 型コラーゲン又はその断片でコートされた培養器材で歯髄由来の間葉系幹細胞（以下、「歯髄幹細胞」と称することがある。）を培養する工程である。

[0016] ＜＜無血清培地＞＞

前記無血清培地としては、F B S 不含有であれば、特に制限はなく、公知

の間葉系幹細胞増殖培地を目的に応じて適宜選択することができる。

前記無血清培地は、市販品を用いてもよい。

前記無血清培地の市販品としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、PRIME-XV（登録商標）MSC Expansion XSFM（Irvine Scientific社／富士フイルム和光純薬社製）などが挙げられる。

[0017] 前記無血清培地は、異種動物成分を含むものであってもよいし、含まないものであってもよいが、異種動物成分を含まないものであることが好ましい。

[0018] <<培養器材>>

前記培養器材としては、Ⅰ型コラーゲン又はその断片でコートされた培養器材であれば、特に制限はなく、公知の培養器材を目的に応じて適宜選択することができる。

前記培養器材の態様としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、培養皿（培養シャーレ）、培養プレートなどが挙げられる。

[0019] 前記Ⅰ型コラーゲンの断片とは、Ⅰ型コラーゲンのアミノ酸配列の一部を有するもののことをいう。前記Ⅰ型コラーゲンの断片は、Ⅰ型コラーゲンのアミノ酸配列のうち、重複する部分を複数連結させたものであってもよい。

前記Ⅰ型コラーゲンの断片は、組換えタンパク質（以下、「リコンビナントペプチド」と称することもある。）であってもよいし、Ⅰ型コラーゲンを分解して断片化したものであってもよい。

[0020] 前記Ⅰ型コラーゲン又はその断片としては、特に制限はなく、市販品を適宜使用することができる。例えば、Ⅰ型コラーゲンの断片の市販品としては、cellnest ヒトⅠ型コラーゲン様リコンビナントペプチド（富士フイルム社製）が挙げられる。

前記Ⅰ型コラーゲン又はその断片の培養器材への塗布方法及び塗布量としては、本発明の効果を損なわない限り、特に制限はなく、公知の方法及び塗

布量を目的に応じて適宜選択することができ、例えば、メーカー推奨の塗布方法及び塗布量などが挙げられる。

[0021] 前記培養器材は、使用時にI型コラーゲン又はその断片を塗布したものを
用いてもよいし、塗布済みの培養器材を用いてもよい。

前記培養器材は、市販品を用いてもよい。

[0022] <<歯髄幹細胞>>

前記歯髄幹細胞は、使用時に歯から調製したものを
用いてもよいし、調製済みの歯髄幹細胞を用いてもよい。

前記歯髄幹細胞の種としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択
ことができ、例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、
ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、サルなどが挙げられる。

[0023] 前記歯髄幹細胞を調製する方法としては、特に制限はなく、公知の方法を
目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒトでは、成人の抜去歯、
混合歯列期（交換期）の乳歯から調製する方法などが挙げられる。

[0024] 前記培養工程に用いる歯髄幹細胞としては、特に制限はなく、目的に
応じて適宜選択することができ、例えば、継代数3～5の歯髄幹細胞を用いる
ことができる。

[0025] <<培養>>

前記培養工程における前記歯髄幹細胞の播種数としては、 $0.5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 超、 $2 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 未満であれば、特に制限は
なく、目的に応じて適宜選択することができるが、 $0.75 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 以上 $2 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 未満が好ましく、 $0.75 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 以上 $1.5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 以下がより好まし
く、 $0.75 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 超、 $1.5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 以下が特に好ましい。

[0026] 前記培養における温度、二酸化炭素（ CO_2 ）濃度としては、本発明の効果
を損なわない限り、特に制限はなく、公知の間葉系幹細胞の培養における条
件を適宜選択することができ、例えば、温度 37°C 、 CO_2 濃度4.7%など

が挙げられる。

[0027] 前記培養の期間としては、特に制限はなく、目的とする多層細胞構造物の形状などに応じて適宜選択することができる。本発明の方法によれば、自己多層化した細胞シートを従来よりも短期間で製造することができる。

[0028] 前記培養におけるその他の条件としては、本発明の効果を損なわない限り、特に制限はなく、公知の間葉系幹細胞の培養における条件を適宜選択することができる。

[0029] <その他の工程>

前記その他の工程としては、本発明の効果を損なわない限り、特に制限はなく、適宜選択することができ、例えば、上記した歯髄幹細胞を調製する工程などが挙げられる。

[0030] <多層細胞構造物>

本発明の多層細胞構造物は、歯髄由来の間葉系幹細胞の多層細胞構造物である。前記多層細胞構造物は、自己多層化したもの（以下、「自己多層化組織」と称することがある。）であることが好ましい。

本明細書において、自己多層化とは、細胞が自律的に多層化することを行い、細胞がECMを産生していることが好ましい。

[0031] 前記多層細胞構造物における層の数としては、2層以上であれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記多層細胞構造物が多層であるか否かを確認する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、マッソントリクローム（MT）染色により病理組織学的に確認する方法、細胞内外の特定のタンパク質等を蛍光染色して共焦点レーザー顕微鏡によって確認する方法などが挙げられる。また、培養器材上のコンフルエントに達した単層構造は透明である一方で、多層化した細胞構造は培養器材の表面が肉厚になって白濁化するので、培養器材上の目視によっても、およそその多層化状態を把握することが可能である。

[0032] 前記多層細胞構造物の形状としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜

選択することができ、例えば、シート状（以下、「細胞シート」と称することがある。）、棒状（以下、「細胞チューブ」と称することがある。）、ディスク状（以下、「細胞ディスク」と称することがある。）などが挙げられる。

[0033] 前記細胞シートの厚みとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、 $5\mu\text{m}\sim 40\mu\text{m}$ などが挙げられ、 $10\mu\text{m}\sim 35\mu\text{m}$ が好ましい。なお、前記細胞シートの厚みは、細胞シートの10箇所をランダムに選択して計測した厚みの平均値のことをいう。

前記細胞シートは、上記した培養工程における培養を10日間程度行うことで形成することができる。

前記細胞シートの平面視したときの面積としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0034] 前記細胞チューブは、棒状のものである。なお、前記細胞チューブは、中実のチューブ状のものともいうこともできる。

前記細胞チューブは、例えば、上記した培養工程における培養を10日間程度行うことで得られた細胞シートを筒状に巻き、これをさらに4日間程度培養することで、形成することができる。

前記細胞チューブの太さや長さとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記細胞チューブが中実であるか否かを確認する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色などが挙げられる。

[0035] 前記細胞ディスクの厚みとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、 $40\mu\text{m}\sim 60\mu\text{m}$ 以下などが挙げられる。

前記細胞ディスクは、上記した培養工程における培養を1ヶ月間程度行うことで形成することができる。

前記細胞ディスクの平面視したときの面積としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0036] 前記細胞シート、細胞チューブ、及び細胞ディスクの機械的強度としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、前記細胞シートは圧縮強度が0.02N～0.04N程度とすることができ、前記細胞チューブは引張強度が0.2N～0.5N程度とすることができ、前記細胞ディスクは圧縮強度が0.5N～1.0N程度、引張強度が0.1N～0.5N程度とすることができる。

[0037] 前記多層細胞構造物は、細胞死が抑制されている。

[0038] 前記多層細胞構造物における死細胞の割合としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、5%以下が好ましく、3%以下がより好ましく、1%以下が特に好ましい。

前記多層細胞構造物における死細胞の割合を解析する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、Live or Dead Cell Viability Assay Kit (AT Bioquest 社製) を用いる方法などが挙げられる。

[0039] また、前記多層細胞構造物中に死細胞が含まれているか否かを確認する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling) 染色により確認する方法などが挙げられる。

前記TUNEL染色の方法としては、特に制限はなく、例えば、Roche Diagnostics 社製のTUNEL染色により行うことができる。

前記多層細胞構造物は、TUNEL染色したときに、TUNEL陽性細胞が検出されないものであることが好ましい。

[0040] 前記多層細胞構造物は、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、及びVII型コラーゲンを発現しているものであることが好ましい。

前記多層細胞構造物が、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、及びVII

型コラーゲンを発現しているか否かを確認する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、各コラーゲンに対する抗体を用いた免疫蛍光染色法により確認する方法などが挙げられる。

[0041] 前記多層細胞構造物の用途としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、再生医療の材料などとして好適に用いることができる。

具体的には、前記細胞シートは、例えば、骨、歯周組織、歯（歯髄、象牙質等）、皮膚（表皮、真皮等）、角膜上皮、軟骨、脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、子宮、中耳、甲状腺、食道、肺等の再生医療材料などとして、前記細胞チューブは、例えば、神経、筋、血管、歯（歯髄、象牙質等）、腱、靱帯等の再生医療材料などとして、前記細胞ディスクは、例えば、歯（歯髄、象牙質等）、皮膚（表皮、真皮等）、角膜上皮、顎関節円板、膝軟骨、骨等の再生医療材料などとして、好適に用いることができる。

実施例

[0042] 以下、試験例を示して本発明を説明するが、本発明はこれらの試験例に何ら限定されるものではない。

[0043] （試験例1）

<歯髄幹細胞の調製>

ヒト成人の抜去智歯を、ウシ胎仔血清（FBS）フリーの基礎培養液 [Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's nutrient mixture F12 (DMEM / F12)、100 μ M glutamate、0.1% MEM nonessential amino acids、50 U / mL ペニシリン、50 μ g / mL ストレプトマイシン、及び0.25 mg / mL ファンギゾン（全て Thermo Fisher Scientific 社製）] に入れて、4℃で研究室に輸送し、無菌的に歯髄組織を採取した。

[0044] 歯髄組織は、3 mg / mL collagenase type I (Merck KGaA 社製) と、4 mg / mL dispase (富士フイル

ム和光純薬社製)との混合液で1時間、37℃でインキュベートし、セルストレイナー(φ70μm; グライナーバイオワン社製)を通して歯髄幹細胞の懸濁液を作製した。

[0045] 常法に従い、I型コラーゲン(Cellmatrix I; 新田ゼラチン社製)を塗布した60mm培養皿(Thermo Fisher Scientific社製、以降の培養皿はI型コラーゲン塗布済)に歯髄幹細胞を播種し、cGMP xeno-/serum-free culture medium(XFM)(PRIME-XV(登録商標) MSC Expansion XSFM; Irvine Scientific社/富士フイルム和光純薬社製)にて37℃、4.7% CO₂環境下で培養した。80%コンフルエントまで細胞が増えたところで、0.25%トリプシン(Becton Dickinson社製)と、0.02%エチレンジアミン四酢酸(EDTA; Dojindo社製)との混合液で歯髄幹細胞を回収し、60mm培養皿に $5 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$ ($0.5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$)の細胞密度で継代培養を行い、継代数3~5の歯髄幹細胞を下記の実験に供した。

[0046] <増殖曲線評価>

以下の4条件で12ウェル培養皿に歯髄幹細胞を播種して、cGMP xeno-/serum-free culture medium(XFM)(PRIME-XV(登録商標) MSC Expansion XSFM; Irvine Scientific社/富士フイルム和光純薬社製)にて37℃、4.7% CO₂環境下で12日間培養し、2日毎に細胞数をカウントした。結果を図1に示す。

- ・ 試験例1-1 : $0.5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ (図1中の「◆」)
- ・ 試験例1-2 : $1 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ (図1中の「□」)
- ・ 試験例1-3 : $2 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ (図1中の「▲」)
- ・ 試験例1-4 : $4 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ (図1中の「○」)

[0047] 図1に示したように、試験例1-2～1-4は、試験例1-1よりも細胞増殖は速かった。試験例1-2では、培養10日目で自己多層化を示した。一方、試験例1-3及び1-4は、標準偏差(±SD)が大きいことから分かるように細胞増殖にバラツキがあり、培養10日目でも自己多層化を認めなかった。

[0048] 試験例1-2～1-4において、培養10日目の位相差顕微鏡写真を図2に示す。

試験例1-2は培養皿を全体的に細胞シートが被覆した状態で安定しており剥離や凝集塊は認めなかった。一方で、試験例1-3及び1-4は、培養皿からの細胞シートの剥離や、細胞が凝集塊を形成してシート化しなかった。また、これら試験例1-3及び1-4は、培養8日目においても培養皿上に細胞がない、あるいは細胞密度が低い部分が散見されて細胞シート化を認めず、一部は写真と同様に剥離や凝集塊を形成した。

[0049] 以上のように、培養日数の短縮には、より多くの細胞を播種することが有利と考えられるところ、試験例1-2が自己多層化組織を形成する最適な播種条件となる予想外の結果が得られた。

[0050] なお、上記実験では、培養皿に塗布するI型コラーゲンとして、Cell matrix I (新田ゼラチン社製)を用いたが、以下のI型コラーゲン及びリコンビナントペプチドでも同様の結果が得られることを確認した。

- ・ Corning BioCoat (Corning社製)
- ・ Collagen I-coated dish (IWAKI社製)
- ・ cellnest ヒトI型コラーゲン様リコンビナントペプチド (富士フイルム社製)

[0051] (試験例2)

<試験例2-1>

試験例1-2と同様にして、増殖曲線評価を行った。結果を図3に示す。

[0052] <試験例2-2>

歯髄幹細胞を、医科で代表的なMSCの1つである骨髄幹細胞に代えた以

外は、試験例 2-1 と同様にして、増殖曲線評価を行った。結果を図 3 に示す。

[0053] <試験例 2-3>

歯髄幹細胞を、医科で代表的な MSC の 1 つである臍帯幹細胞に代えた以外は、試験例 2-1 と同様にして、増殖曲線評価を行った。結果を図 3 に示す。

[0054] 図 3 に示したように、試験例 2-2 (図 3 中の「●」) 及び試験例 2-3 (図 3 中の「▲」) は、いずれも試験例 2-1 (図 3 中の「□」) と比べて細胞増殖が低く、自己多層化を認めなかった。

[0055] 試験例 2-1 ~ 2-3 について、培養 10 日目の位相差顕微鏡写真を図 4 に示す。

試験例 2-1 は、安定した自己多層化細胞シートを形成した。一方、試験例 2-2 は、コンフルエントに達したが、自己多層化を認めなかった。試験例 2-3 は、培養皿から細胞が剥離し、凝集塊になった。

[0056] [細胞シート]

試験例 2-1 及び 2-2 の培養 10 日目の細胞シートの実体顕微鏡像を図 5 に、試験例 2-3 の培養 10 日目の細胞シートの実体顕微鏡像を図 6 に示す。

試験例 2-1 の歯髄幹細胞の自己多層化細胞シートは、先端が鋭い精密ピンセットで把持しても破れない丈夫な細胞シートであり、驚異的な操作性と賦形性を有していた。一方で、試験例 2-2 の骨髄幹細胞の場合は、コンフルエントに達しただけでシート化はしていないので、機械的に把持することは不可能であった。試験例 2-3 の臍帯幹細胞の場合は、培養皿から剥離して凝集塊 (図 6 中の矢印) を認めた。

[0057] 試験例 2-1 ~ 2-3 の培養 10 日目の各細胞シートを 4 %パラホルムアルデヒド (関東化学社製) で 3 日間固定し、optimal cutting temperature compound (サクラファインテックジャパン社製) で凍結包埋した。

常法に従い凍結切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（H E）染色とマッソントリクローム（M T）染色を行った。結果を図 7（上段：H E 染色、下段：M T 染色）に示す。

試験例 2 - 1 は、M T 染色によってアニリンブルー陽性を示す豊富なコラーゲン線維の産生による多層細胞構造を認めた。一方、試験例 2 - 2 はアニリンブルー陰性でコラーゲン産生を認めない単層構造であり、試験例 2 - 3 は細胞が凝集していた。

[0058] 試験例 2 - 1 ~ 2 - 3 の培養 10 日目の各細胞シートを 4 % パラホルムアルデヒド（関東化学社製）で固定し、optimal cutting temperature compound（サクラファインテックジャパン社製）で凍結包埋した。

常法に従い凍結切片を作製し、メーカー推奨の方法に従って T U N E L 染色（Roche Diagnostics 社製）及び D A P I 染色（ナカライテスク社製）を行った。結果を図 8（上段：T U N E L 染色、中段：D A P I 染色、下段：マージ）に示す。

試験例 2 - 1 及び試験例 2 - 2 はいずれも T U N E L 陰性であった。一方、試験例 2 - 3 の凝集塊には、多くの T U N E L 陽性細胞を認めたことから、細胞死が確認された。

[0059] また、細胞シートの死細胞の割合を解析するため、Live or Dead Cell Viability Assay Kit（AAT Bioquest 社製）で試験例 2 - 1 及び試験例 2 - 2 の各細胞シートを染色し、死細胞を定量評価した。12 ウェルプレートに試験例 2 - 1 又は 2 - 2 の条件で各細胞を播種し、培養 10 日目に 1 ウェルあたり 10 視野（400 倍）をランダムに選択して死細胞を評価した。その結果、試験例 2 - 1 の死細胞の割合は $1.24 \pm 0.006\%$ であり、試験例 2 - 2 の死細胞の割合は $1.16 \pm 0.007\%$ であり、極めて少数の死細胞しか認めなかった。

[0060] 試験例 2 - 1 の培養 10 日目の歯髄幹細胞の自己多層化細胞シートの各種コラーゲンの免疫蛍光染色の結果を図 9 に示す。なお、試験例 2 - 2 の骨髄

幹細胞はシート化せずにコラーゲン産生を認めず、試験例 2-3 の臍帯幹細胞は凝集塊となりシート化しないので、本解析対象から除外した。

図 9 中、左列は各種コラーゲンを染色した結果を示し（上段：Ⅰ型コラーゲン、中段：ⅠⅤ型コラーゲン、下段：ⅤⅠⅠ型コラーゲン）、中央列は D A P I 染色の結果を示し、右列はマージした結果を示す。なお、使用した一次抗体は、以下のとおりである。

- ・ 抗Ⅰ型コラーゲン抗体 : collagen type Ⅰ alpha 1 (Cell Signaling Technology 社製)
- ・ 抗ⅠⅤ型コラーゲン抗体 : collagen type ⅠⅤ (Abcam 社製)
- ・ 抗ⅤⅠⅠ型コラーゲン抗体 : collagen type ⅤⅠⅠ (Abcam 社製)

[0061] 図 9 に示したように、試験例 2-1 では、Ⅰ型、ⅠⅤ型、及びⅤⅠⅠ型コラーゲンが細胞シートの全層にわたって陽性であった。これらのコラーゲンは、生体内における細胞外マトリックス (ECM) の主要な構成タンパクであり、自己多層化細胞シートに強度や柔軟性（可鍛性 (malleability)）を付与していると考えられる。

[0062] 試験例 2-1 の培養 10 日目の歯髄幹細胞の自己多層化細胞シート（以下、「細胞シート」と称する。）の機械的強度を下記のようにして測定した。

— 圧縮強度 —

荷重—変位測定ユニット (FSA-0.5KE-5N、イマダ社製) のステージ上の直径 5 mm の穴に細胞シートを静置し、直径 3 mm の計測棒で 1 mm/min の速度の荷重をかけていき、細胞シートが破断するまでの荷重変化をモニターして定量評価した。

その結果、細胞シートの圧縮強度は 0.028 ± 0.008 N であった。

[0063] (試験例 3)

[細胞チューブ]

試験例 2-1 の培養 10 日目の歯髄幹細胞の自己多層化細胞シートを巻き

、ロール化した（図10参照）。ロール化した構造物をcGMP xeno-
- / serum-free culture medium (XFM) (P
RIME-XV (登録商標) MSC Expansion XSFM;
Irvine Scientific社/富士フイルム和光純薬社製) にて
37℃、4.7% CO₂環境下で培養した。ロール化後培養4日目の状態を
図11に示す。

[0064] 図12に、ロール化後培養4日目の細胞チューブの断面について、ヘマト
キシリン・エオジン (HE) 染色を行った結果を示す。

図12に示したように、中空ではなく、中実の細胞チューブが得られた。

[0065] ロール化後培養4日目の細胞チューブの断面について、各種コラーゲンの
免疫蛍光染色の結果を図13に示す。

図13中、左列は各種コラーゲンを染色した結果を示し（上段：Ⅰ型コラ
ーゲン、中段：ⅠⅤ型コラーゲン、下段：ⅤⅠⅠ型コラーゲン）、中央列は
DAPI染色の結果を示し、右列はマージした結果を示す。なお、使用した
一次抗体は、以下のとおりである。

- ・ 抗Ⅰ型コラーゲン抗体 : collagen type I alpha 1 (Cell Signaling Technology社製)
- ・ 抗ⅠⅤ型コラーゲン抗体 : collagen type I V (Abcam社製)
- ・ 抗ⅤⅠⅠ型コラーゲン抗体 : collagen type V I I (Abcam社製)

[0066] 図13に示したように、ロール化後培養4日目の細胞チューブでは、Ⅰ型
、ⅠⅤ型、及びⅤⅠⅠ型コラーゲンが細胞チューブの全域にわたって陽性で
あった。

[0067] ロール化後培養4日目の細胞チューブの機械的強度を下記のようにして測
定した。

—引張強度—

荷重—変位測定ユニット (FSA-0.5KE-5N、イマダ社製) のフ

オースゲージ（測定装置）と専用治具（クリップ）で細胞チューブを把持し、 1 mm/min の速度で上方に牽引して細胞チューブが破断するまでの荷重変化をモニターして定量評価した。

その結果、細胞チューブの引張強度は、 $0.38 \pm 0.130\text{ N}$ であった。

[0068] （試験例4）

〔細胞ディスク〕

＜試験例4－1＞

培養期間を1ヶ月間とした以外は、試験例2－1と同様にして、歯髄幹細胞を培養した。

[0069] ＜試験例4－2＞

培養期間を1ヶ月間とした以外は、試験例2－2と同様にして、骨髄幹細胞を培養した。

[0070] 試験例4－1及び4－2について、培養1ヶ月目の細胞の位相差顕微鏡写真を図14に示す。

試験例4－1は、安定した自己多層化細胞シートを形成した。一方、試験例4－2は、試験例2－2のコンフルエントの状態よりも厚みを増し、多層化した様相を認めた。

[0071] 試験例4－1及び4－2の培養1ヶ月目の細胞の実体顕微鏡像を図15（ピンセットで担持する前）及び図16（ピンセットで担持した際）に示す。

図15及び16に示したように、試験例4－1の歯髄幹細胞の自己多層化細胞シートは、先端が鋭い精密ピンセットで把持しても破れない丈夫な細胞シートであり、試験例2－1の細胞シートよりも厚みと強度が増した、ディスク状の様態であった。一方で、試験例4－2の骨髄幹細胞のシートは、ピンセットで触れると破れてしまい、機械的に把持することは不可能であった。

[0072] 試験例4－1及び4－2の培養1ヶ月目の各細胞を4%パラホルムアルデヒド（関東化学社製）で3日間固定し、optimal cutting

temperature compound (サクラファインテックジャパン社製) で凍結包埋した。

常法に従い凍結切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (H E) 染色とマッソントリクローム (M T) 染色を行った。結果を図 1 7 (H E 染色) 及び図 1 8 (M T 染色) に示す。

試験例 4 - 1 は、死細胞を認めずに細胞の状態が良く、アニリンブルー陽性を示す豊富なコラーゲン線維の産生による多層細胞構造を認めた。一方、試験例 4 - 2 は、アニリンブルー陽性を示すコラーゲン線維の産生による多層化は認めるが、多くの細胞は死滅して、細胞の存在はきわめて乏しかった。

[0073] 試験例 4 - 1 及び 4 - 2 の培養 1 ヶ月目の各細胞を、メーカー推奨の方法に従って T U N E L 染色 (R o c h e D i a g n o s t i c s 社製) 及び D A P I 染色 (ナカライテスク社製) を行った。結果を図 1 9 (上段 : T U N E L 染色、中段 : D A P I 染色、下段 : マージ) に示す。

試験例 4 - 1 は T U N E L 陰性であり、細胞死を認めなかった。一方、試験例 4 - 2 は、すでに多くの細胞は死滅しており、観察された細胞にも T U N E L 陽性の細胞死が確認された。

[0074] 試験例 4 - 1 の培養 1 ヶ月目の歯髄幹細胞の各種コラーゲンの免疫蛍光染色の結果を図 2 0 に示す。

図 2 0 中、左列は各種コラーゲンを染色した結果を示し (上段 : I 型コラーゲン、中段 : I V 型コラーゲン、下段 : V I I 型コラーゲン)、中央列は D A P I 染色の結果を示し、右列はマージした結果を示す。なお、使用した一次抗体は、以下のとおりである。

- ・ 抗 I 型コラーゲン抗体 : collagen type I alpha 1 (C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y 社製)
- ・ 抗 I V 型コラーゲン抗体 : collagen type I V (A b c a m 社製)
- ・ 抗 V I I 型コラーゲン抗体 : collagen type V I

I (A b c a m社製)

[0075] 図20に示したように、試験例4-1では、I型、IV型、及びVII型コラーゲンが細胞シートの全層にわたって陽性であった。

一方、試験例4-2では、多くの細胞が死滅し、ECM自体も退行変性を生じているので、各種コラーゲンの染色は陰性、もしくは試験例4-1よりもはるかに弱い弱陽性を示すのみであった。

[0076] 試験例4-1の培養1ヶ月目のディスク状の様態の歯髄幹細胞の自己多層化細胞シート（以下、「細胞ディスク」と称する。）の機械的強度を下記のようにして測定した。

－圧縮強度－

荷重－変位測定ユニット（FSA-0.5KE-5N、イマダ社製）のステージ上の直径5mmの穴に細胞ディスクを静置し、直径3mmの計測棒で1mm/minの速度の荷重をかけていき、細胞ディスクが破断するまでの荷重変化をモニターして定量評価した。

その結果、細胞ディスクの圧縮強度は 0.75 ± 0.175 Nであった。

[0077] －引張強度－

荷重－変位測定ユニット（FSA-0.5KE-5N、イマダ社製）のフォースゲージ（測定装置）と専用治具（クリップ）で細胞ディスクを把持し、1mm/minの速度で上方に牽引して細胞ディスクが破断するまでの荷重変化をモニターして定量評価した。

その結果、細胞ディスクの引張強度は、 0.32 ± 0.155 Nであった。

[0078] （試験例5）

<試験例5-1>

歯髄幹細胞の播種数を 0.75×10^4 cells/cm²とした以外は、試験例1と同様にして増殖曲線評価を行った。結果を図21に示す。

[0079] <試験例5-2>

歯髄幹細胞の播種数を 1.5×10^4 cells/cm²とした以外は、試

試験例 1 と同様にして増殖曲線評価を行った。結果を図 2 1 に示す。

[0080] 図 2 1 に示したように、試験例 5 - 2 (図 2 1 中の「■」) は試験例 1 - 2 と類似した増殖を認め、試験例 5 - 1 (図 2 1 中の「●」) は試験例 1 - 1 と同等の細胞増殖を認めた。

[0081] [細胞シート]

試験例 5 - 1 ~ 5 - 2 について、培養 1 0 日目の細胞シートの位相差顕微鏡写真を図 2 2 に、実体顕微鏡像を図 2 3 に示す。

試験例 5 - 1 ~ 5 - 2 は、細胞が密に多層化した様相を呈し、いずれもピンセットで担持することができた。

[0082] 試験例 5 - 1 及び 5 - 2 の培養 1 0 日目の各細胞を 4 %パラホルムアルデヒド (関東化学社製) で固定し、optimal cutting temperature compound (サクラファインテックジャパン社製) で凍結包埋した。

常法に従い凍結切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (H E) 染色とマッソントリクローム (M T) 染色を行った。結果を図 2 4 (上段 : H E 染色、下段 : M T 染色) に示す。

試験例 5 - 1 は、組織学的には細胞とコラーゲンで緻密に構成された構造物を形成するが顕著な多層化を認めなかった。一方、試験例 5 - 2 は、細胞とコラーゲンが顕著に多層化した構造物を形成していた。

[0083] また、細胞シートの死細胞の割合を解析するため、Live or Dead Cell Viability Assay Kit (AAT Bioquest 社製) で試験例 5 - 1 及び試験例 5 - 2 の各細胞シートを染色し、死細胞を定量評価した。1 2 ウェルプレートに試験例 5 - 1 又は 5 - 2 の条件で各細胞を播種し、培養 1 0 日目に 1 ウェルあたり 1 0 視野 (4 0 0 倍) をランダムに選択して死細胞を評価した。その結果、試験例 5 - 1 の死細胞の割合は $0.51 \pm 0.003\%$ であり、試験例 5 - 2 の死細胞の割合は $1.33 \pm 0.010\%$ であり、極めて少数の死細胞しか認めなかった。

[0084] 試験例 5 - 1 の培養 1 0 日目の歯髄幹細胞の細胞シートの各種コラーゲン

の免疫蛍光染色の結果を図25に、試験例5-2の培養10日目の歯髄幹細胞の細胞シートの各種コラーゲンの免疫蛍光染色の結果を図26に示す。

図25～26中、左列は各種コラーゲンを染色した結果を示し（上段：Ⅰ型コラーゲン、中段：ⅠⅤ型コラーゲン、下段：ⅤⅠⅠ型コラーゲン）、中央列はDAPI染色の結果を示し、右列はマージした結果を示す。なお、使用した一次抗体は、以下のとおりである。

- ・ 抗Ⅰ型コラーゲン抗体 : collagen type Ⅰ alpha 1 (Cell Signaling Technology社製)
- ・ 抗ⅠⅤ型コラーゲン抗体 : collagen type ⅠⅤ (Abcam社製)
- ・ 抗ⅤⅠⅠ型コラーゲン抗体 : collagen type ⅤⅠⅠ (Abcam社製)

[0085] 図25～26に示したように、試験例5-1及び試験例5-2では、Ⅰ型、ⅠⅤ型、及びⅤⅠⅠ型コラーゲンが細胞シートの全層にわたって陽性であった。これらのコラーゲンは、生体内における細胞外マトリックス（ECM）の主要な構成タンパクであり、自己多層化細胞シートに強度や柔軟性（可鍛性（malleability））を付与していると考えられる。

[0086] （試験例6）

培養10日目で、ピンセットで把持できる自己多層化細胞シートを形成した播種条件の中で、細胞シートの厚みが最大となった試験例2-1と、最小となった試験例5-1の培養10日目の細胞シートの厚みを計測して定量評価した。

厚みの計測には、HE染色した組織写真を用いた。細胞シートの10箇所をランダムに選択してその厚みを計測した。

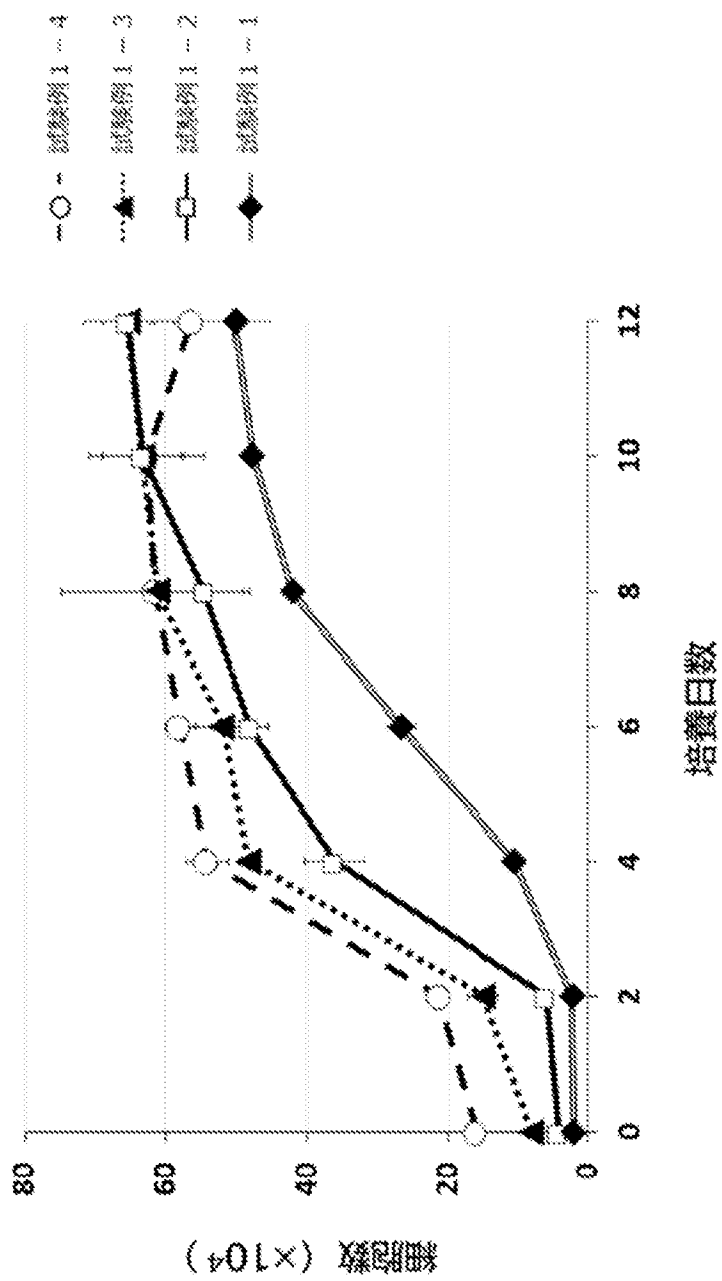
その結果、試験例2-1の細胞シートの厚みは $33.0 \pm 6.16 \mu\text{m}$ であり、試験例5-1の細胞シートの厚みは $8.0 \pm 2.20 \mu\text{m}$ であった。試験例2-1の細胞シートは、試験例5-1の細胞シートの3倍以上の厚みを有していた。

- [0087] 以上のように、本発明によれば、多層細胞構造物である細胞シートの製造に要する培養期間を短縮することができ、かつ多層細胞構造物における細胞死を抑制することができ、更には様々な形状の多層細胞構造物を製造することができる。
- [0088] 本出願は、2022年4月8日出願した日本国特許出願2022-064720号に基づく優先権を主張するものであり、日本国特許出願2022-064720号の全内容を本出願に援用する。

請求の範囲

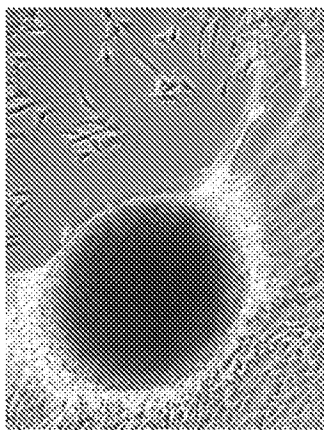
- [請求項1] 無血清培地を用い、Ⅰ型コラーゲン又はその断片でコートされた培養器材で歯髄由来の間葉系幹細胞を培養することを含み、
前記歯髄由来の間葉系幹細胞の播種数が、 $0.5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 超、 $2 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 未満であることを特徴とする多層細胞構造物の製造方法。
- [請求項2] 前記無血清培地が、異種動物成分を含まない請求項1に記載の多層細胞構造物の製造方法。
- [請求項3] 前記多層細胞構造物の形状が、シート状、棒状、及びディスク状のいずれかである請求項1から2のいずれかに記載の多層細胞構造物の製造方法。
- [請求項4] 前記多層細胞構造物の形状がシート状であり、厚みが $5 \mu\text{m} \sim 40 \mu\text{m}$ である請求項3に記載の多層細胞構造物の製造方法。
- [請求項5] 前記多層細胞構造物における死細胞の割合が、5%以下である請求項1から4のいずれかに記載の多層細胞構造物の製造方法。
- [請求項6] 前記多層細胞構造物が、Ⅰ型コラーゲン、ⅠⅤ型コラーゲン、及びⅤⅠⅠ型コラーゲンを発現している請求項1から5のいずれかに記載の多層細胞構造物の製造方法。
- [請求項7] 歯髄由来の間葉系幹細胞の多層細胞構造物であって、
前記多層細胞構造物における死細胞の割合が、5%以下であることを特徴とする多層細胞構造物。
- [請求項8] 前記多層細胞構造物が、Ⅰ型コラーゲン、ⅠⅤ型コラーゲン、及びⅤⅠⅠ型コラーゲンを発現している請求項7に記載の多層細胞構造物。
- [請求項9] 前記多層細胞構造物の形状が、シート状、棒状、及びディスク状のいずれかである請求項7から8のいずれかに記載の多層細胞構造物。
- [請求項10] 前記多層細胞構造物の形状がシート状であり、厚みが $5 \mu\text{m} \sim 40 \mu\text{m}$ である請求項9に記載の多層細胞構造物。

[図1]



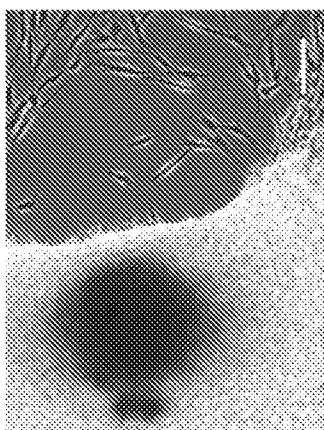
[図2]

試験例1~4

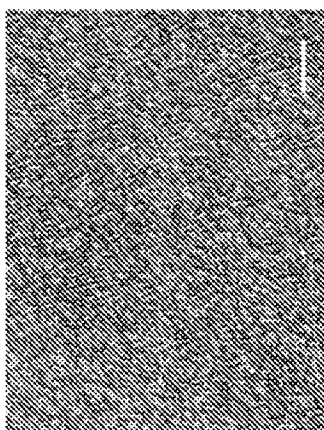


スケールバー:100 μm

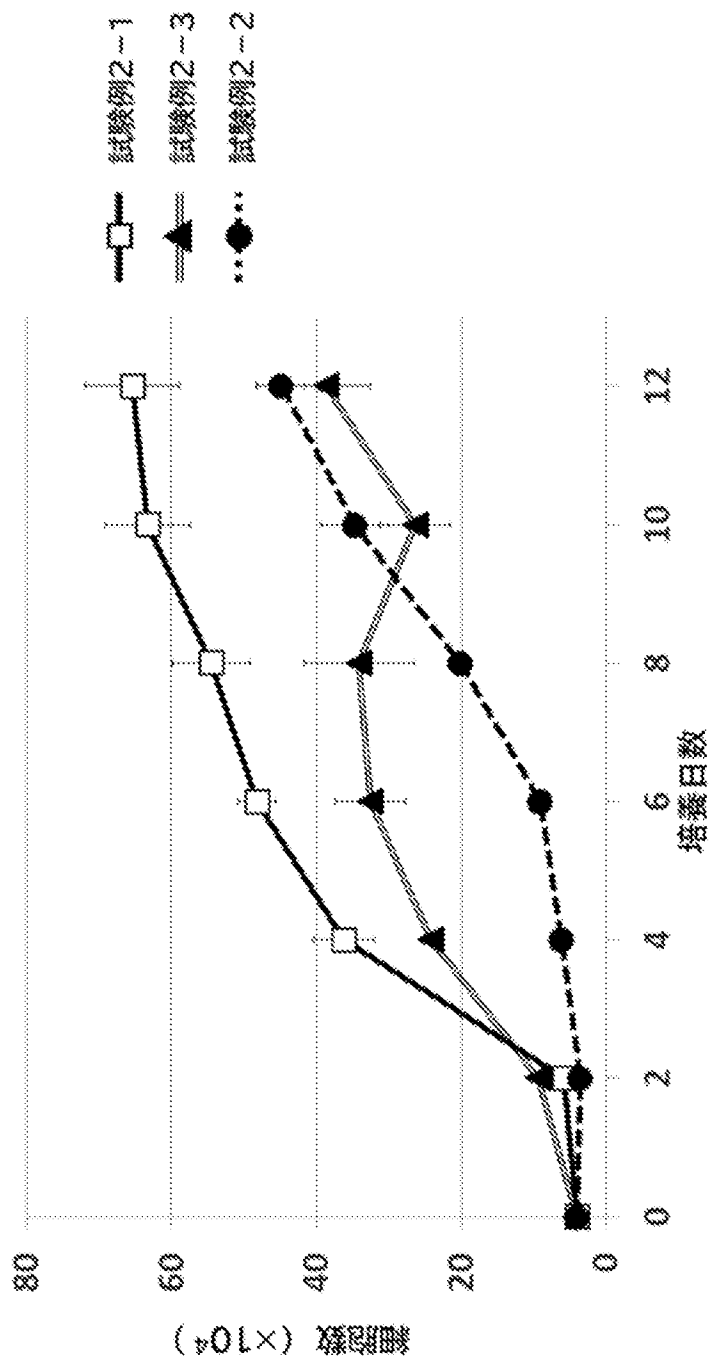
試験例1~3



試験例1~2

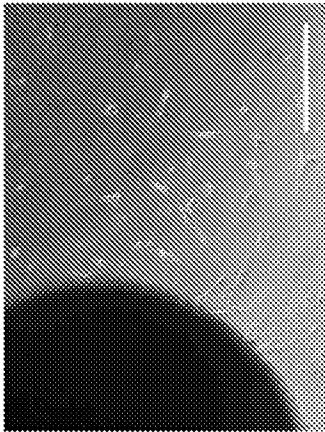


[図3]

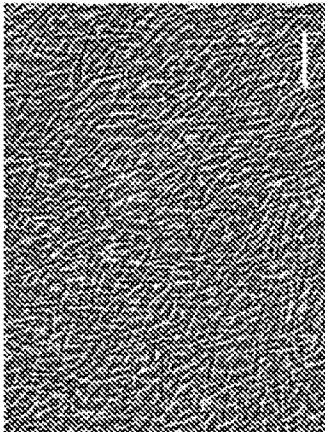


[図4]

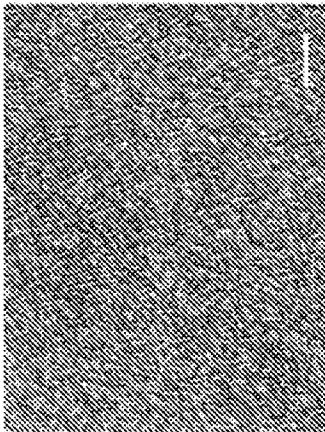
試験例2-3

スケールバー: 100 μ m

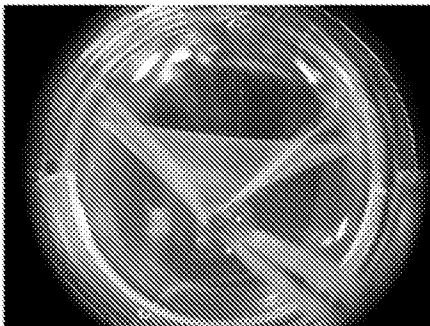
試験例2-2



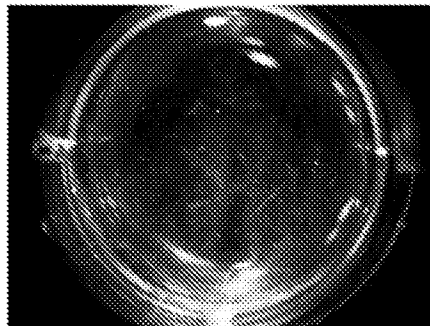
試験例2-1



[図5]

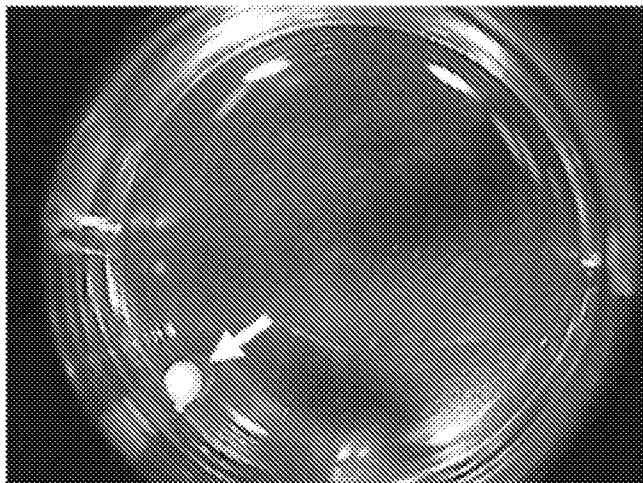


試験例2-1



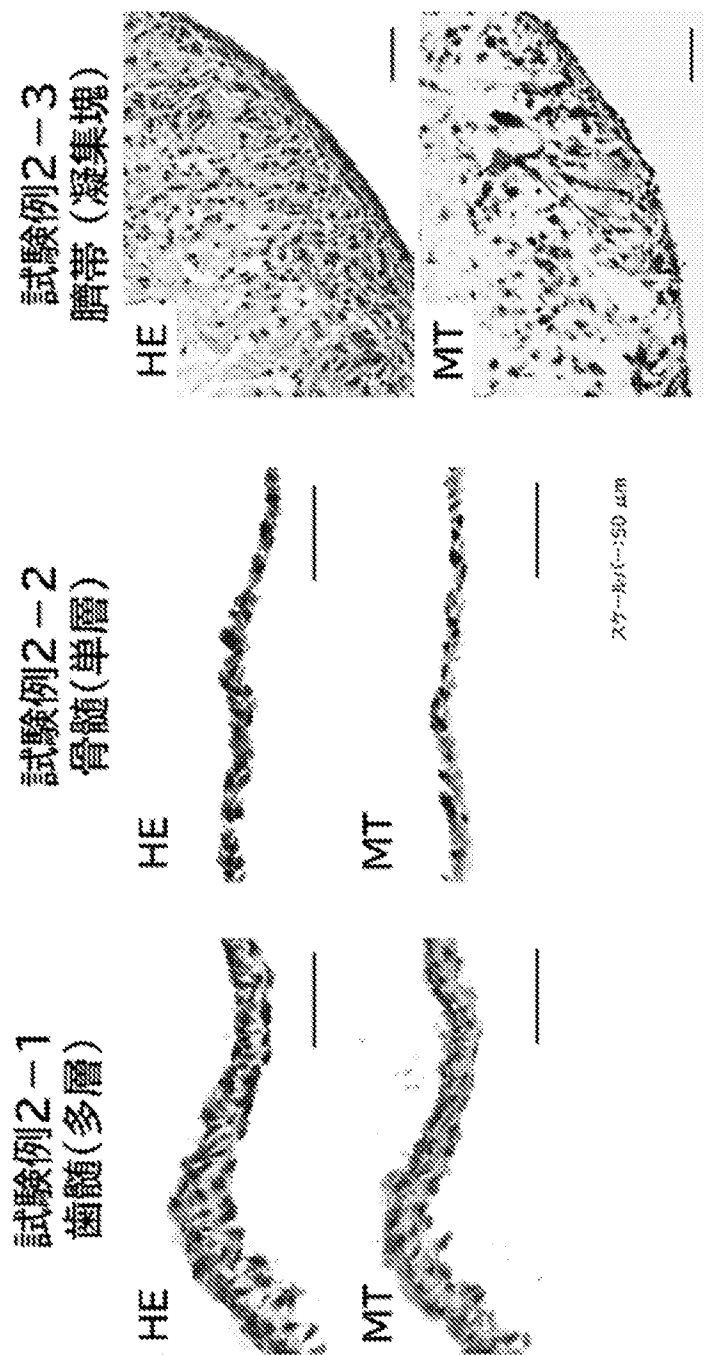
試験例2-2

[図6]

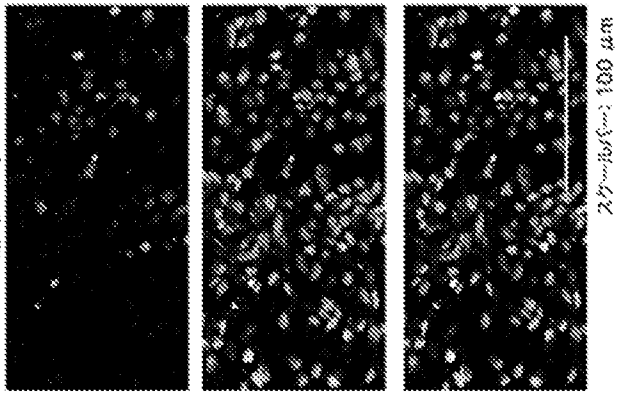
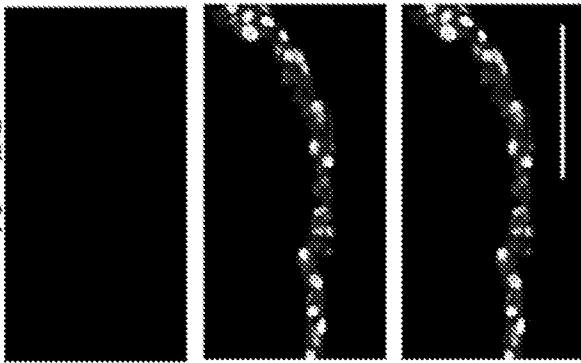
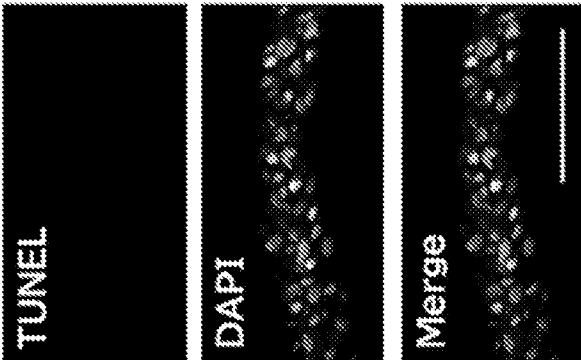


試験例 2 - 3

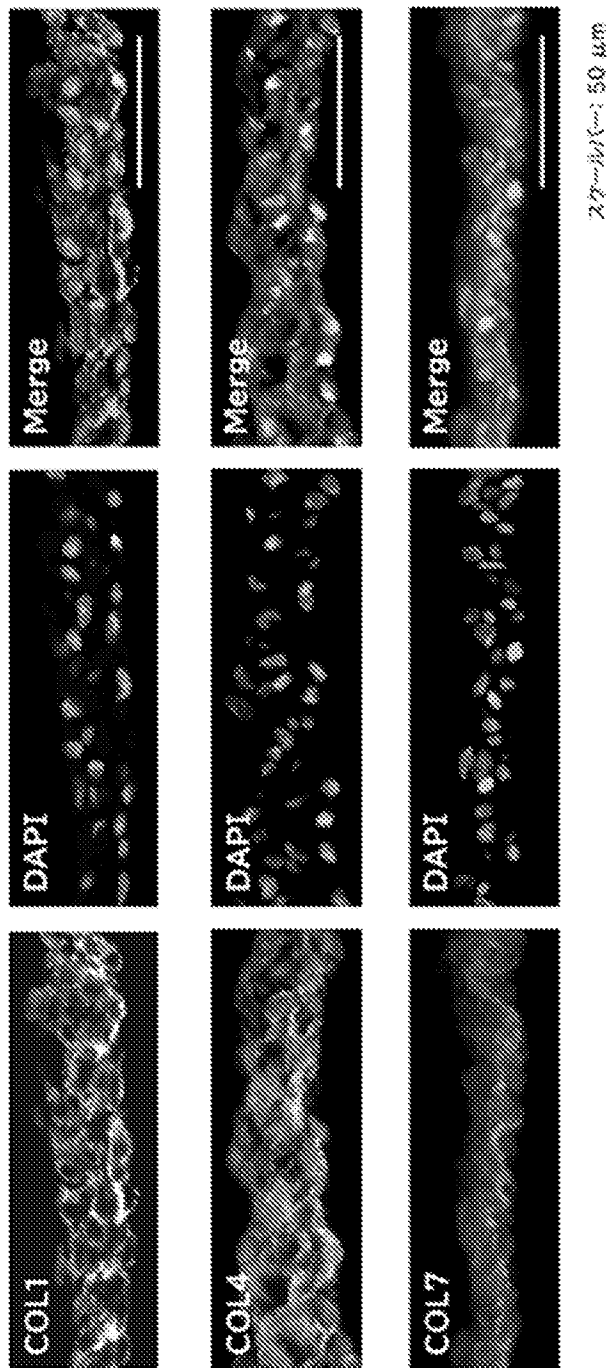
[図7]



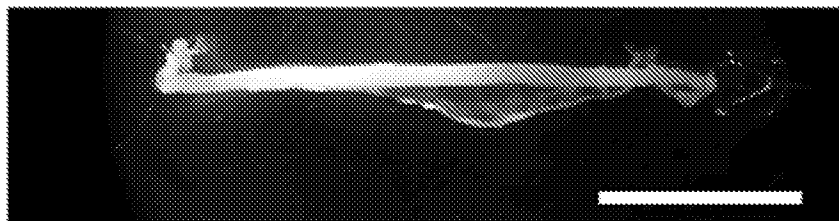
[図8]

試験例2-3
臍帯試験例2-2
骨髓試験例2-1
歯髄

[図9]

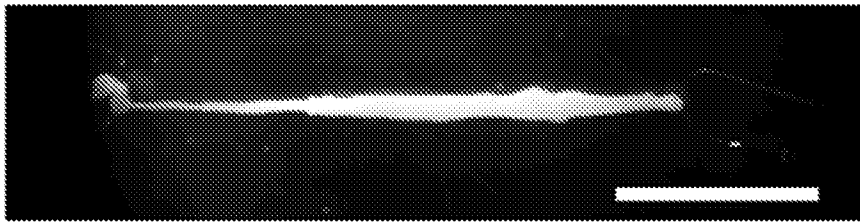


[図10]



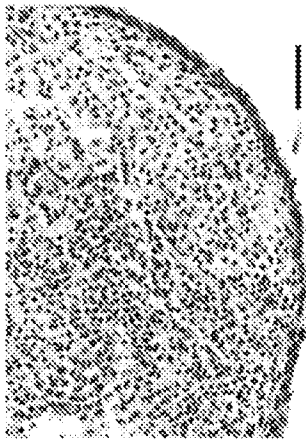
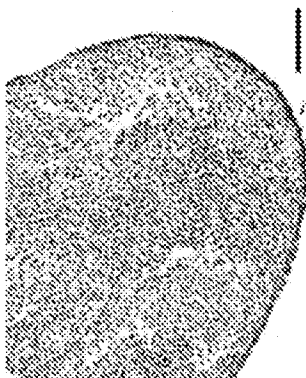
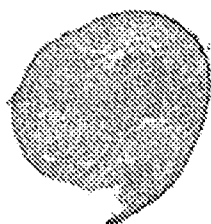
スケールバー: 1 cm

[図11]

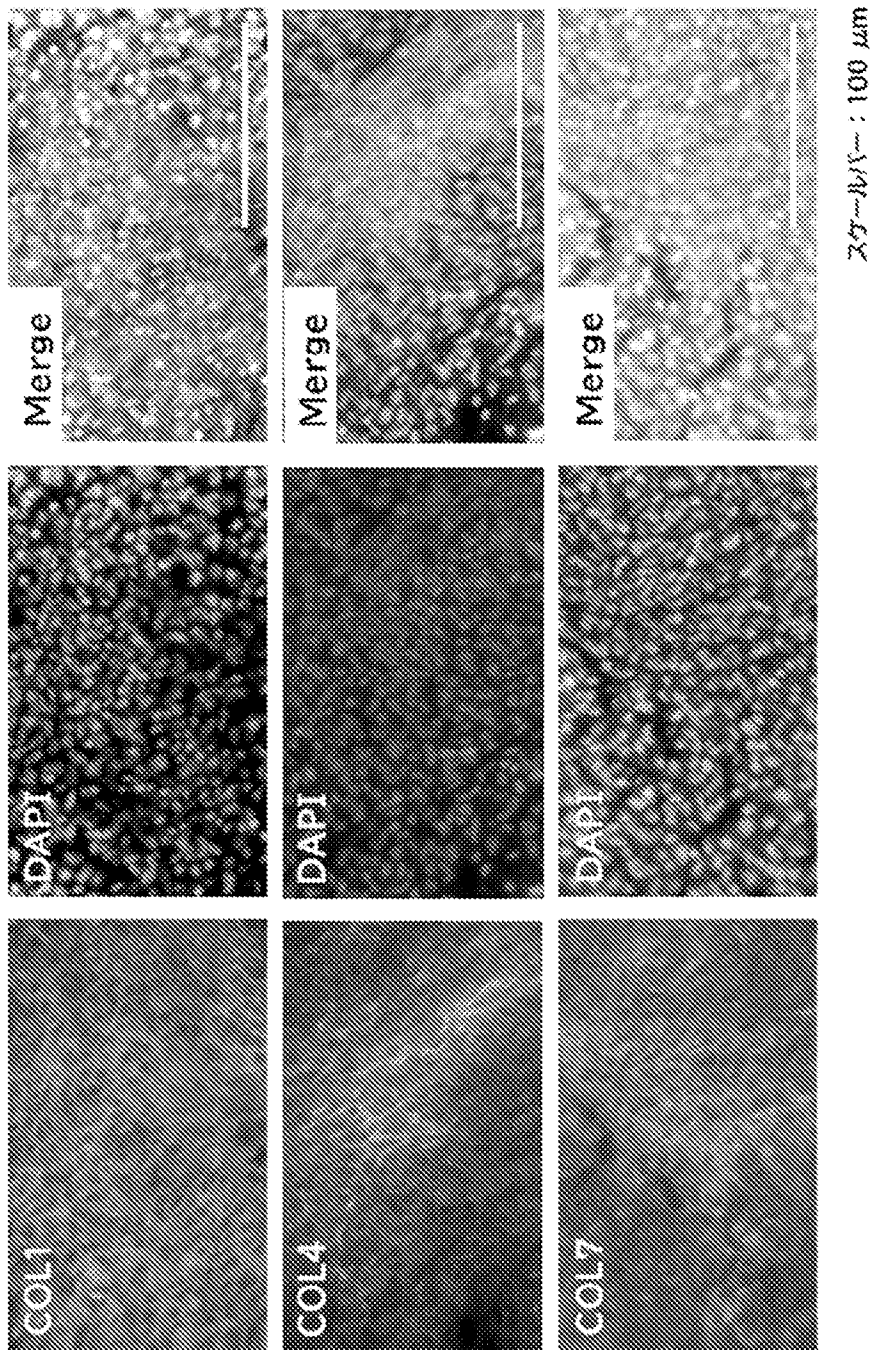


スケールバー: 1 cm

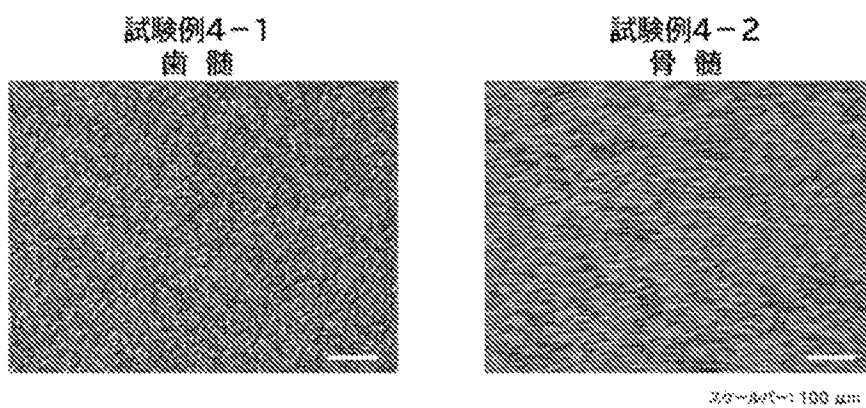
[図12]

スケールバー: 50 μm スケールバー: 100 μm スケールバー: 200 μm

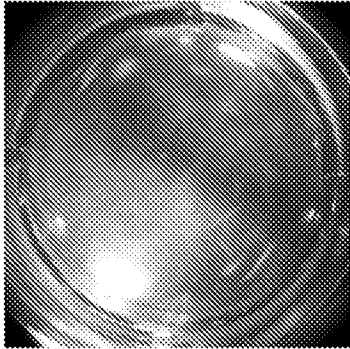
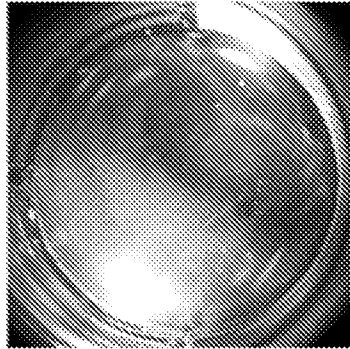
[図13]



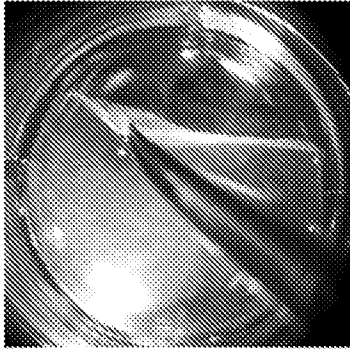
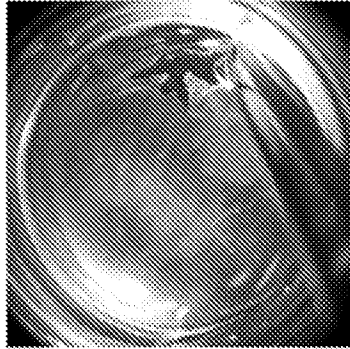
[図14]



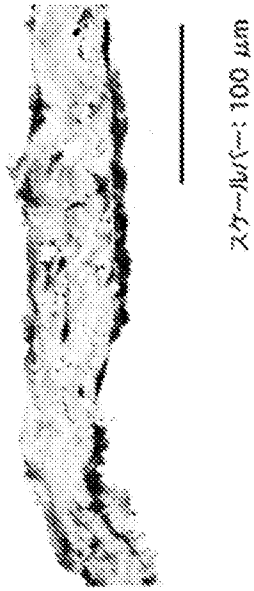
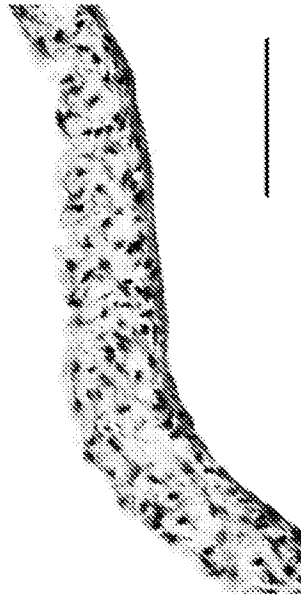
[図15]

試験例4-1
歯 髄試験例4-2
骨 髄

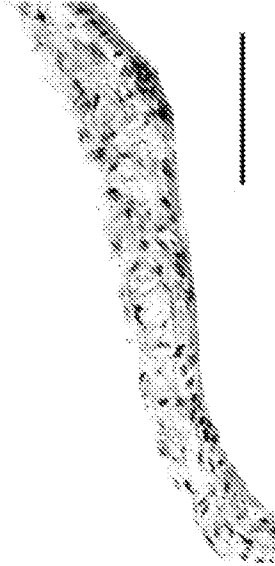
[図16]

試験例4-1
歯 髄試験例4-2
骨 髄

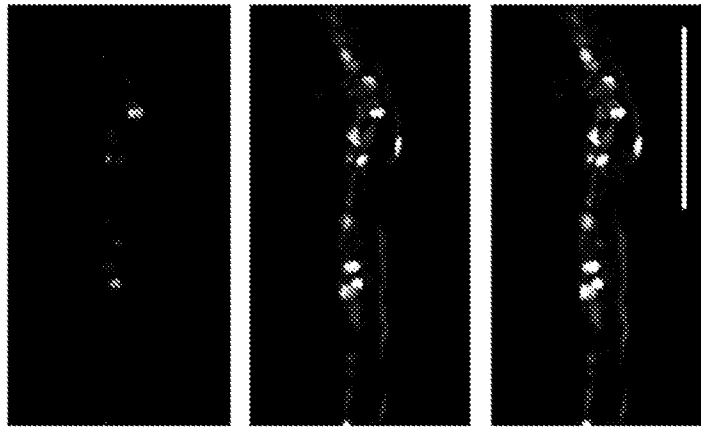
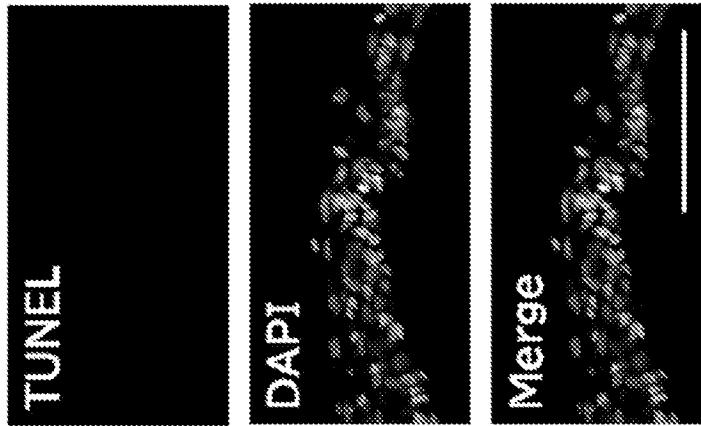
[図17]

試験例4-2
骨髓試験例4-1
歯髄

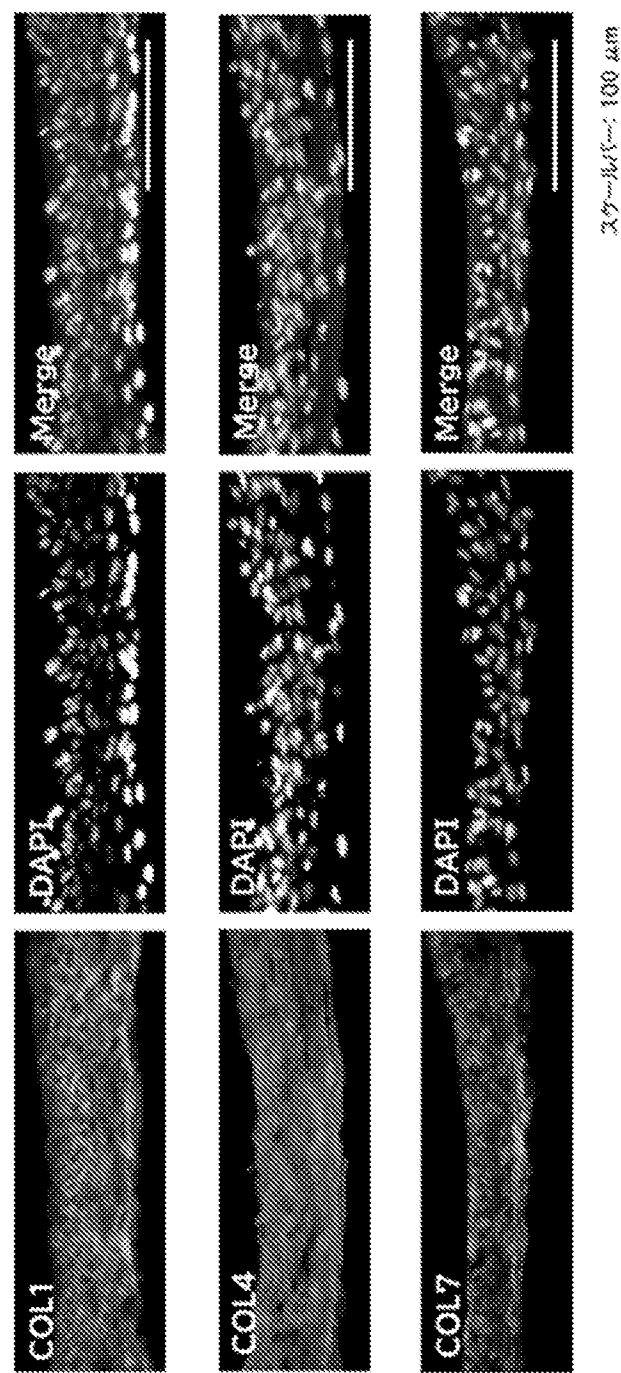
[図18]

試験例4-2
骨髓スケールバー: 100 μ m試験例4-1
歯髄スケールバー: 100 μ m

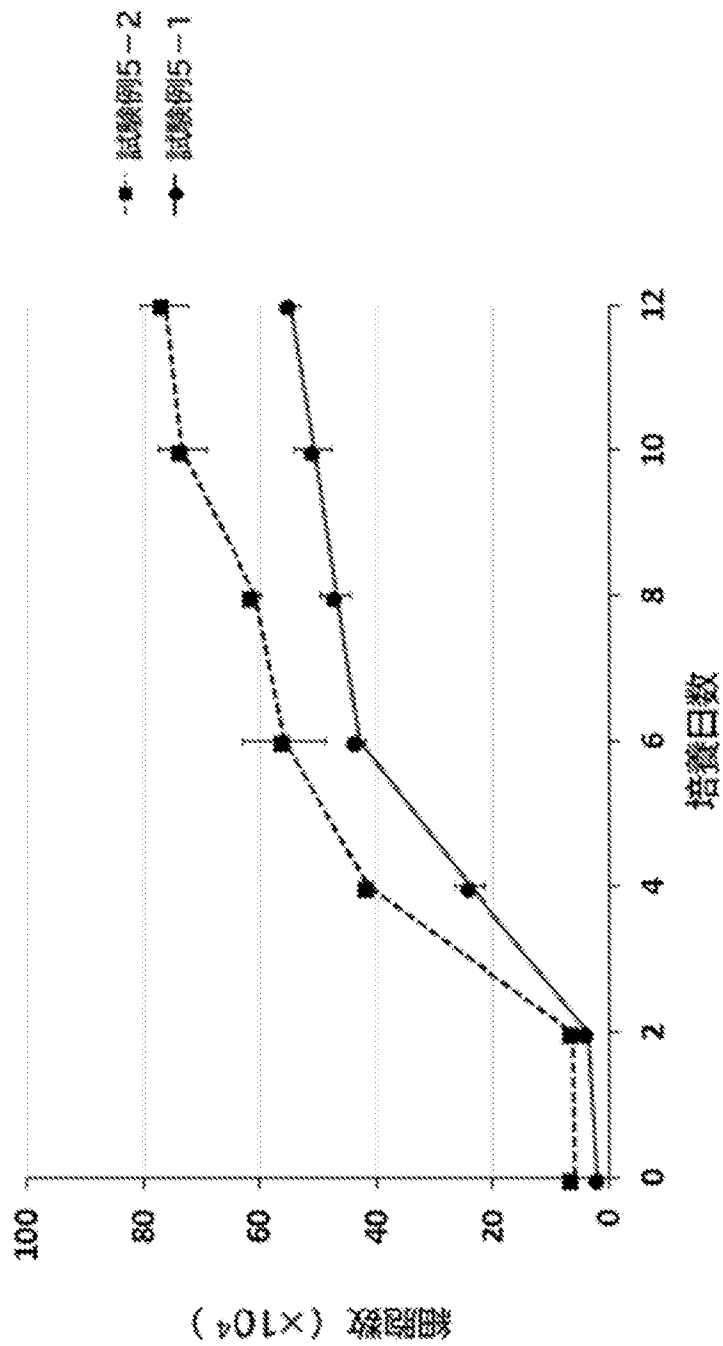
[図19]

試験例4-2
骨髄スケールバー：100 μ m試験例4-1
歯髄

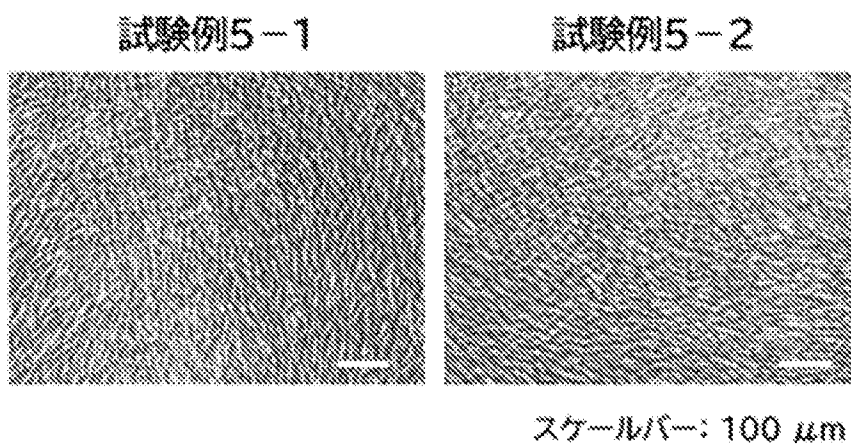
[図20]



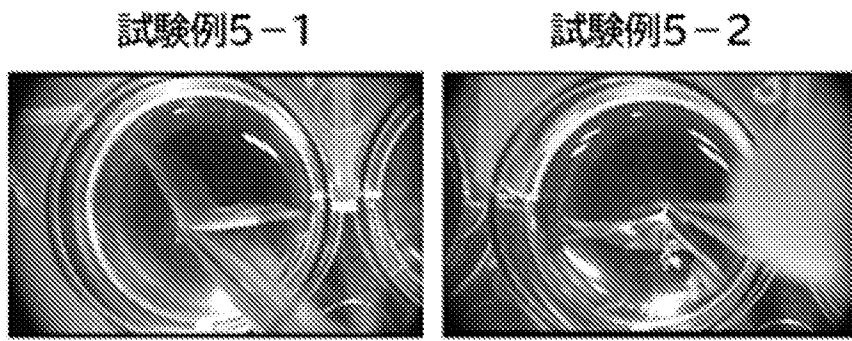
[図21]



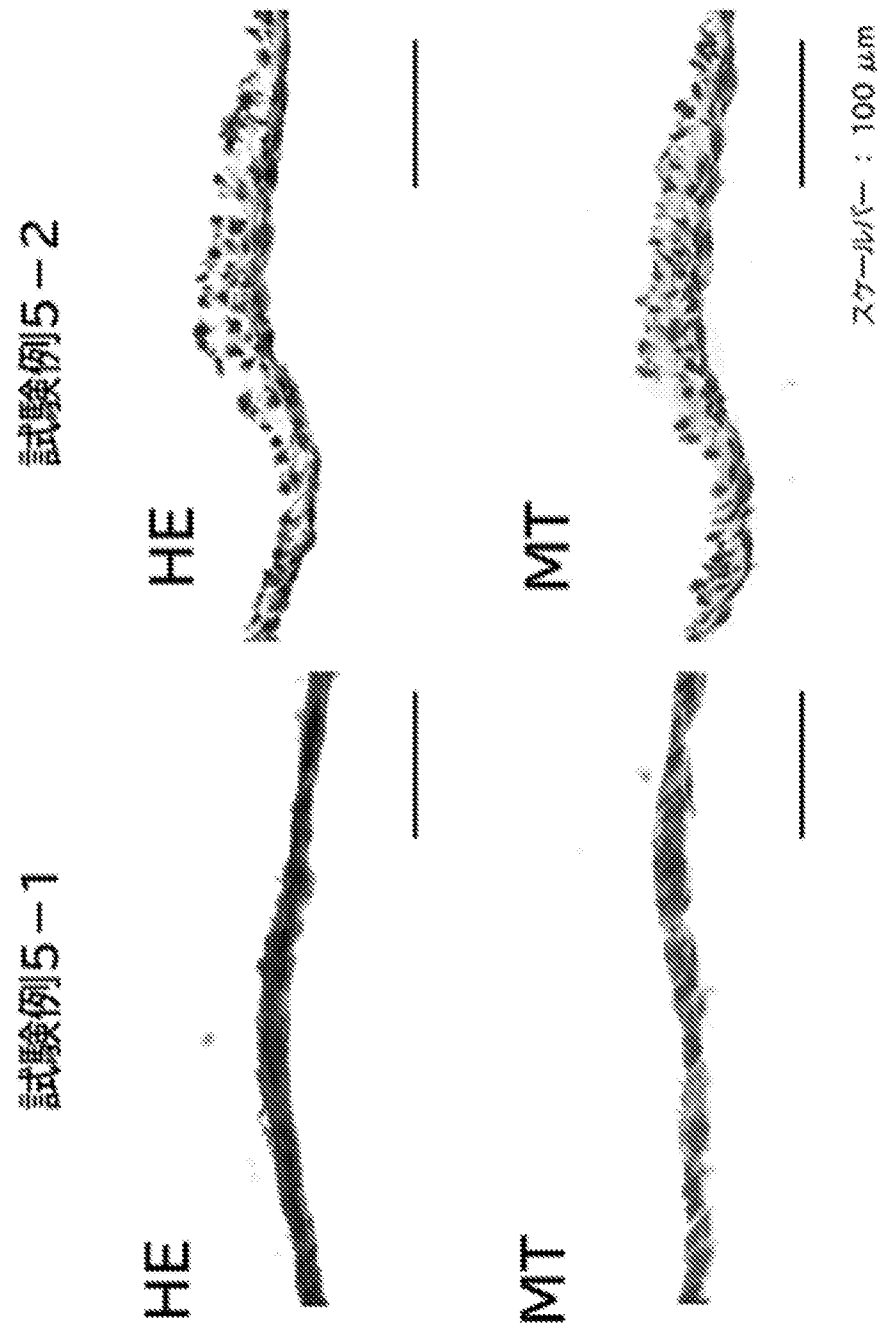
[図22]



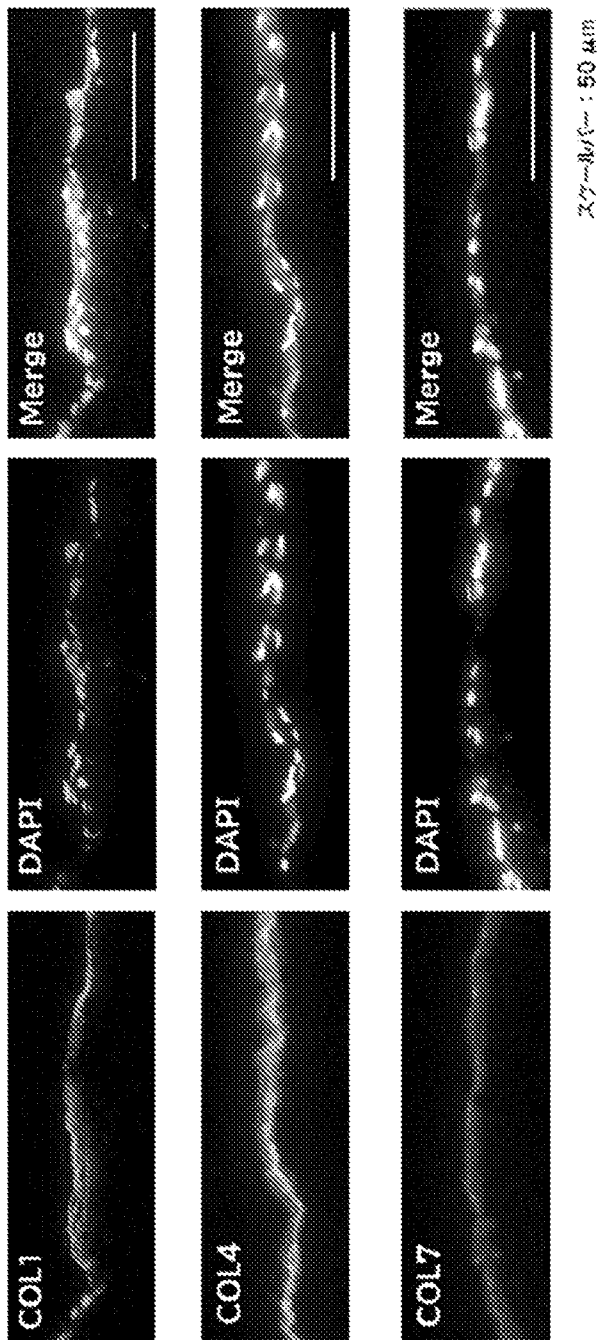
[図23]



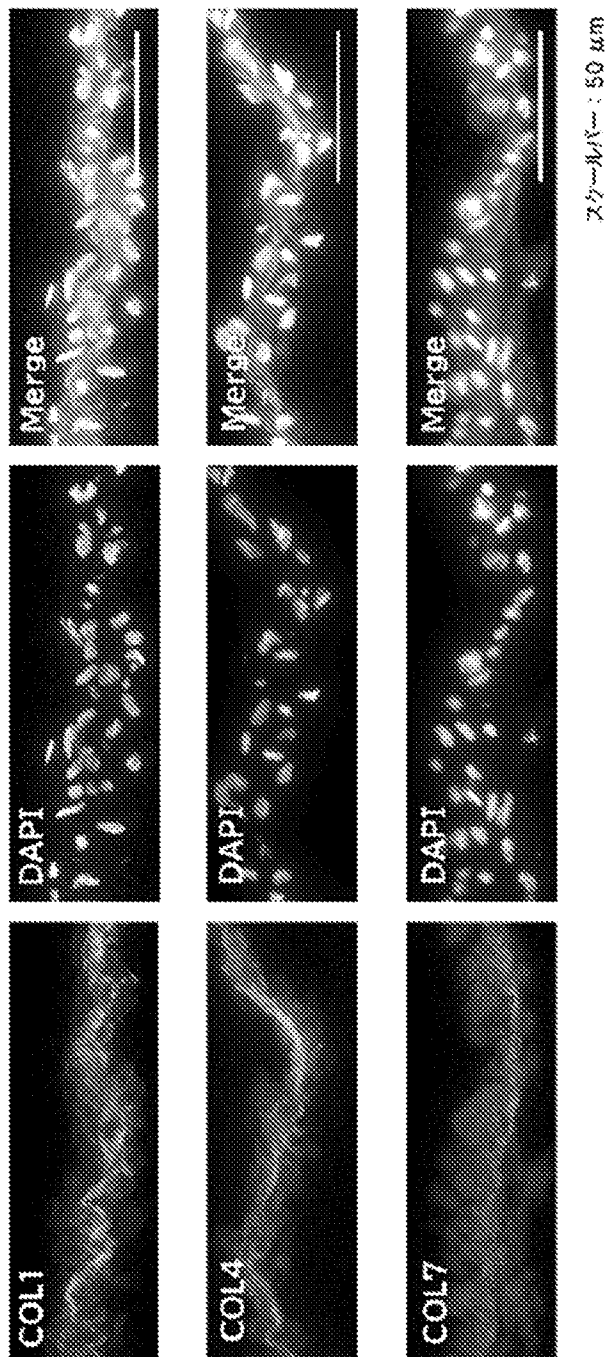
[図24]



[図25]



[図26]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/014332

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/0775 (2010.01)i FI: C12N5/0775 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) C12N5/0775 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>MOCHIZUKI, M. et al. Type I collagen facilitates safe and reliable expansion of human dental pulp stem cells in xenogeneic serum-free culture. Stem Cell Research & Therapy. 2020, 11:267, doi.org/10.1186/s13287-020-01776-7 particularly, abstract, methods pages 2, 3, fig. S4</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>望月 真衣, 無血清培養における歯髄幹細胞の接着分子メカニズムの解明~臨床的細胞培養法の確立~, Kaken. project number "19K21403", [online], update day: 19 February 2021, [retrieved on 01 June 2023], Internet: <URL: https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-19K21403/>, (MOCHIZUKI, Mai. Establishment of clinical culture method for human dental pulp stem cells under the xeno-free culture condition.) particularly, pages 1-3</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 104726406 A (CHINA MEDICAL UNIVERSITY) 24 June 2015 (2015-06-24) examples</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 106361770 A (GUANGZHOU SALIAI STEMCELL SCIENCE & TECHNOLOGY CO., LTD.) 01 February 2017 (2017-02-01) examples</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	MOCHIZUKI, M. et al. Type I collagen facilitates safe and reliable expansion of human dental pulp stem cells in xenogeneic serum-free culture. Stem Cell Research & Therapy. 2020, 11:267, doi.org/10.1186/s13287-020-01776-7 particularly, abstract, methods pages 2, 3, fig. S4	1-10	Y	望月 真衣, 無血清培養における歯髄幹細胞の接着分子メカニズムの解明~臨床的細胞培養法の確立~, Kaken. project number "19K21403", [online], update day: 19 February 2021, [retrieved on 01 June 2023], Internet: <URL: https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-19K21403/>, (MOCHIZUKI, Mai. Establishment of clinical culture method for human dental pulp stem cells under the xeno-free culture condition.) particularly, pages 1-3	1-10	Y	CN 104726406 A (CHINA MEDICAL UNIVERSITY) 24 June 2015 (2015-06-24) examples	1-10	Y	CN 106361770 A (GUANGZHOU SALIAI STEMCELL SCIENCE & TECHNOLOGY CO., LTD.) 01 February 2017 (2017-02-01) examples	1-10
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
Y	MOCHIZUKI, M. et al. Type I collagen facilitates safe and reliable expansion of human dental pulp stem cells in xenogeneic serum-free culture. Stem Cell Research & Therapy. 2020, 11:267, doi.org/10.1186/s13287-020-01776-7 particularly, abstract, methods pages 2, 3, fig. S4	1-10															
Y	望月 真衣, 無血清培養における歯髄幹細胞の接着分子メカニズムの解明~臨床的細胞培養法の確立~, Kaken. project number "19K21403", [online], update day: 19 February 2021, [retrieved on 01 June 2023], Internet: <URL: https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-19K21403/>, (MOCHIZUKI, Mai. Establishment of clinical culture method for human dental pulp stem cells under the xeno-free culture condition.) particularly, pages 1-3	1-10															
Y	CN 104726406 A (CHINA MEDICAL UNIVERSITY) 24 June 2015 (2015-06-24) examples	1-10															
Y	CN 106361770 A (GUANGZHOU SALIAI STEMCELL SCIENCE & TECHNOLOGY CO., LTD.) 01 February 2017 (2017-02-01) examples	1-10															
☒ 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 02 June 2023		Date of mailing of the international search report 20 June 2023															
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/014332

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 110669792 A (BEIJING SH BIO TECH. INC. LTD.) 10 January 2020 (2020-01-10) examples	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/014332

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	104726406	A	24 June 2015	(Family: none)	
CN	106361770	A	01 February 2017	(Family: none)	
CN	110669792	A	10 January 2020	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/0775(2010.01)i FI: C12N5/0775		
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）） C12N5/0775		
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 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023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); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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
Y	MOCHIZUKI M. et al., Type I collagen facilitates safe and reliable expansion of human dental pulp stem cells in xenogeneic serum-free culture, Stem Cell Research & Therapy, 2020, 11:267, doi.org/10.1186/s13287-020-01776-7 Especially, Abstract, Methods pages 2-3, Figure S4	1-10
Y	望月 真衣, 無血清培養における歯髄幹細胞の接着分子メカニズムの解明～臨床的細胞培養法の確立～, KAKEN, 課題番号「19K21403」, [オンライン], 更新日: 2021-02-19, [検索日: 2023.06.01], インターネット: <URL: https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-19K21403/> 特に, p. 1-3	1-10
Y	CN 104726406 A (CHINA MEDICAL UNIVERSITY) 24.06.2015 (2015-06-24) 実施例	1-10
Y	CN 106361770 A (GUANGZHOU SALIAI STEMCELL SCIENCE & TECHNOLOGY CO LTD.) 01.02.2017 (2017-02-01) 実施例	1-10
Y	CN 110669792 A (BEIJING SH BIO TECH INC LTD.) 10.01.2020 (2020-01-10) 実施例	1-10
☐ 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、一般的な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抵触するものではなく、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 02.06.2023		国際調査報告の発送日 20.06.2023
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 福岡 信子 4N 3539 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/014332

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
CN	104726406	A	24.06.2015	(ファミリーなし)	
CN	106361770	A	01.02.2017	(ファミリーなし)	
CN	110669792	A	10.01.2020	(ファミリーなし)	