

(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
2017年11月2日(02.11.2017)



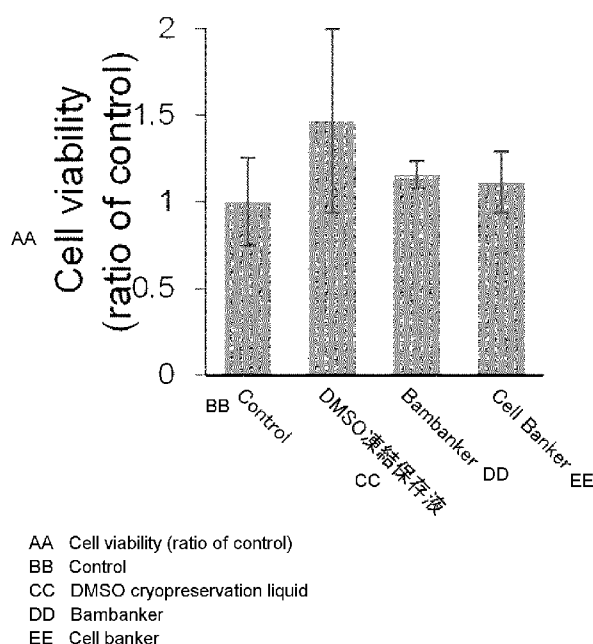
(10) 国際公開番号

WO 2017/187941 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/0775 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/014545
- (22) 国際出願日: 2017年4月7日(07.04.2017)
- (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 2016-089188 2016年4月27日(27.04.2016) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人広島大学(HIROSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目3番2号 Hiroshima (JP).
- (72) 発明者: 栗原 英見 (KURIHARA Hidemi); 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬保健学研究院内 Hiroshima (JP). 加治屋 幹人(KAJIYA Mikihito); 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬保健学研究院内 Hiroshima (JP). 本池 総太(MOTOIKE Souta); 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬保健学研究院内 Hiroshima (JP).
- (74) 代理人: 木村 満(KIMURA Mitsuru); 〒1010054 東京都千代田区神田錦町二丁目7番地 協販ビル2階 Tokyo (JP).

(54) Title: FROZEN CELL CLUSTER AND METHOD FOR PRODUCING FROZEN CELL CLUSTER

(54) 発明の名称: 凍結細胞集塊及び凍結細胞集塊の製造方法



(57) Abstract: This frozen cell cluster is a cell cluster in a frozen state in which mesenchymal stem cells formed granularly. This method for producing the frozen cell cluster involves culturing mesenchymal stem cells in a growth culture medium containing a factor capable of causing mesenchymal stem cells to produce collagen so as to form a granular cell cluster that contains the collagen produced from the mesenchymal stem cells, isolating the cell cluster from the growth culture medium, and cryopreserving the cell cluster together with a cryopreservation agent.



(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, DJ, 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, KH, KN, KP, KR, KW, 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:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(57) 要約: 凍結細胞集塊は、間葉系幹細胞が粒状に形成され、凍結状態の細胞集塊である。凍結細胞集塊の製造方法は、間葉系幹細胞にコラーゲンを産生させる因子を含有する増殖培地にて間葉系幹細胞を培養し、間葉系幹細胞から産生されるコラーゲンを含有する粒状の細胞集塊を形成させ、増殖培地から分離した細胞集塊を凍結保存剤とともに凍結保存する。

明 細 書

発明の名称：凍結細胞集塊及び凍結細胞集塊の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、凍結細胞集塊及び凍結細胞集塊の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 間葉系幹細胞（MSC：Mesenchymal stem cell）は多分化能・自己増殖能を有しており、遺伝子導入などが不要であるとともに、患者から確実に得られるため、組織再生療法に適した細胞である。

[0003] 例えば、骨折や歯周炎などの骨破壊疾患に対して、現在のMSC移植治療法では、患者からMSCを分離、増殖させ、細胞数を十分に確保して一旦凍結保存しておく。その後、患者への移植手術の直前に、凍結保存しておいたMSCを融解し、CPC（Cell Processing Center）で培養してMSCが集塊状の形態となったMSC移植体の形態に加工する。

[0004] 例えば、融解したMSCを人工足場材料（ハイドロキシアパタイト、リン酸三カルシウムアパタイト、ポリ乳酸、キトサン、アテロコラーゲンゲル、ヒアルロン酸ゲルなど）と混和して培養することで、MSC移植体が作成される。そして、このMSC移植体が患者の欠損組織に移植され、MSCの組織再生能を発揮させる。

[0005] また、近年では、人工足場材料を要しないMSC移植体があり、このようなMSC移植体として、細胞シートや細胞スフェロイドのほか、細胞集塊（非特許文献1）がある。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：M KITAKA, M KAJIYA, H SHIBA, M TAKEWAKI, K TAKESHITA, R KHUNG, T FUJITA, T IWATA, T Q NGUYEN, K OUHARA, K TAKEDA, T FUJITA, H KURIHARA; "Clumps of a mesenchymal stromal cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering therapy for bone regenera

tion”; International Society for Cellular Therapy; Cytotherapy, 2015, 17, 860-873

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] これまでのMSC移植体は、移植手術の直前に、凍結保存しておいたMSCを融解してから製造されている。移植手術の直前の限られた期間内に、その都度MSC移植体を作製することから、MSC移植体に含まれる細胞数や細胞機能を均一にできる保証はない。このため、所望のMSC移植体を製造できなかった場合には、移植手術が延期されることがある。
- [0008] 本発明は上記事項に鑑みてなされたものであり、その目的とするところは、集塊状で凍結保存可能な凍結細胞集塊及び凍結細胞集塊の製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明の第1の観点に係る凍結細胞集塊は、
間葉系幹細胞が粒状に形成され、凍結状態の細胞集塊である、
ことを特徴とする。
- [0010] また、前記凍結細胞集塊が0.5mm～1.5mm径の粒状であることが好ましい。
- [0011] また、前記凍結細胞集塊が0.8mm～1.2mm径の粒状であることが好ましい。
- [0012] 本発明の第2の観点に係る凍結細胞集塊の製造方法は、
間葉系幹細胞にコラーゲンを産生させる因子を含有する増殖培地にて前記間葉系幹細胞を培養し、
前記間葉系幹細胞から産生されるコラーゲンを含有する粒状の細胞集塊を形成させ、
前記増殖培地から分離した前記細胞集塊を凍結保存剤とともに凍結保存する、
ことを特徴とする。

- [0013] 本発明の第3の観点に係る凍結細胞集塊の製造方法は、
間葉系幹細胞にコラーゲンを産生させる因子を含有する増殖培地にて前記間葉系幹細胞を培養して細胞シートを形成し、
前記細胞シートの周囲を自由縁にして自己凝集作用によって粒状の細胞集塊を形成し、
前記増殖培地から分離した前記細胞集塊を凍結保存剤とともに凍結保存する、
ことを特徴とする。
- [0014] また、培養容器にて前記間葉系幹細胞を培養してコンフルエントになるまで増殖させ、
前記培養容器の周壁に接着した前記細胞シートの縁を前記培養容器の周壁から離間させることにより、前記細胞シートの周囲を自由縁にしてもよい。
- [0015] 1. 5 cm²～2. 5 cm²の円筒状の前記培養容器を用い、0. 5 mm～1. 5 mm径の粒状の細胞集塊を得てもよい。
- [0016] 本発明の第4の観点に係る凍結細胞集塊の製造方法は、
増殖培地にて間葉系幹細胞を培養して凝集させ、
前記増殖培地に前記間葉系幹細胞にコラーゲンを産生させる因子を添加して、前記間葉系幹細胞から産生されるコラーゲンを含有する粒状の細胞集塊を形成させ、
前記増殖培地から分離した前記細胞集塊を凍結保存剤とともに凍結保存する、
ことを特徴とする。
- [0017] 予備凍結を行わずに凍結保存してもよい。

発明の効果

- [0018] 本発明に係る凍結細胞集塊は、MSCが集塊状の形態で凍結されているので、移植手術等において、直前の限られた期間内にMSC移植体の製造を行う必要がない。このため、移植手術が延期される事態を防ぐことができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]細胞生存活性の測定結果を示すグラフである。

[図2]図2はC-MSCsの位相差顕微鏡像を示す写真であり、図2（A）は凍結保存しなかったC-MSCsの写真、図2（B）はDMSO凍結保存液で凍結保存したC-MSCsの写真、図2（C）はBambanker（商品名：和光純薬工業株式会社）で凍結保存したC-MSCsの写真、図2（D）はCell Banker（商品名：タカラバイオ株式会社）で凍結保存したC-MSCsの写真である。

[図3]C-MSCのHE染色像を示す写真であり、図3（A）は凍結前の写真、図3（B）は図3（A）の部分拡大写真、図3（C）は融解1日後の写真、図3（D）は図3（C）の部分拡大写真、図3（E）は融解5日後の写真、図3（F）は図3（E）の部分拡大写真である。

[図4]細胞シートのHE染色像を示す写真であり、図4（A）は凍結前の写真、図4（B）は図4（A）の部分拡大写真、図4（C）は融解1日後の写真、図4（D）は図4（C）の部分拡大写真、図4（E）は融解5日後の写真、図4（F）は図4（E）の部分拡大写真である。

[図5]細胞スフェロイドのHE染色像を示す写真であり、図5（A）は凍結前の写真、図5（B）は図5（A）の部分拡大写真、図5（C）は融解1日後の写真、図5（D）は図5（C）の部分拡大写真、図5（E）は融解5日後の写真、図5（F）は図5（E）の部分拡大写真である。

[図6]凍結前のC-MSCs、並びに、凍結して融解した5日後のC-MSCs、細胞シート及び細胞スフェロイドの細胞死の割合を示すグラフである。

[図7]図7（A）～（D）は、コラゲナーゼを添加しなかったC-MSCsの凍結保存前の状態を示す写真であり、図7（A）はHE染色写真、図7（B）はTUNNEL／DAPI染色写真、図7（C）は図7（B）の部分拡大写真、図7（D）は免疫染色写真、図7（E）～（H）は、コラゲナーゼを添加したC-MSCsの凍結保存前の状態を示す写真であり、図7（E）はHE染色写真、図7（F）はTUNNEL／DAPI染色写真、図7（G）は図7（F）の部分拡大写真、図7（H）は免疫染色写真である。

[図8]図8 (A) ~ (C) は、コラゲナーゼを添加しなかったC-MSCsを凍結保存して融解5日後の状態を示す写真であり、図8 (A) はHE染色写真、図8 (B) はTUNNEL/DAPI染色写真、図8 (C) は図8 (B) の部分拡大写真、図8 (D) ~ (F) は、コラゲナーゼを添加したC-MSCsの凍結保存して融解5日後の状態を示す写真であり、図8 (D) はHE染色写真、図8 (E) はTUNNEL/DAPI染色写真、図8 (F) は図8 (E) の部分拡大写真である。

[図9]C-MSCsの融解5日後における死細胞の割合を示すグラフである。

[図10]図10 (A) ~ (D) は、アスコルビン酸を培地に添加せずに製造した細胞スフェロイドの凍結保存前の状態を示す写真であり、図10 (A) はHE染色写真、図10 (B) はTUNNEL/DAPI染色写真、図10 (C) は図10 (B) の部分拡大写真、図10 (D) は免疫染色写真、図10 (E) ~ (H) は、アスコルビン酸を培地に添加して製造した細胞スフェロイドの凍結保存前の状態を示す写真であり、図10 (E) はHE染色写真、図10 (F) はTUNNEL/DAPI染色写真、図10 (G) は図10 (F) の部分拡大写真、図10 (H) は免疫染色写真である。

[図11]図11 (A) ~ (C) は、アスコルビン酸を培地に添加せずに製造した細胞スフェロイドを凍結保存して融解5日後の状態を示す写真であり、図11 (A) はHE染色写真、図11 (B) はTUNNEL/DAPI染色写真、図11 (C) は図11 (B) の部分拡大写真、図11 (D) ~ (F) は、アスコルビン酸を培地に添加して製造した細胞スフェロイドの凍結保存前の状態を示す写真であり、図11 (D) はHE染色写真、図11 (E) はTUNNEL/DAPI染色写真、図11 (F) は図11 (E) の部分拡大写真である。

[図12]細胞スフェロイドの融解5日後における死細胞の割合を示すグラフである。

[図13]石灰化誘導培地で培養したC-MSCs内のカルシウム沈着量を示すグラフである。

[図14]ラット頭蓋冠にC-MSCsを移植して4週間後のCT写真であり、図14(A)が移植を行わなかった写真、図14(B)がDMSO凍結保存液で凍結保存したM-MSCsを移植した写真、図14(C)がCell Banker(商品名:タカラバイオ株式会社)で凍結保存したC-MSCsを移植した写真、図14(D)がBambanker(商品名:和光純薬工業株式会社)で凍結保存したC-MSCsを移植した写真である。

[図15]長期凍結保存して融解したC-MSCsの状態を示す写真であり、図15(A)がHE染色写真、図15(B)がTUNEL/DAPI染色写真、図15(C)がTUNEL染色した部分拡大写真、図15(D)がTUNEL/DAPI染色した部分拡大写真である。

[図16]C-MSCsの移植効果を示すラット頭蓋冠のCT写真であり、図16(A)が移植を行わなかった写真、図16(B)はC-MSCsを移植して4週間後の写真である。

[図17]C-MSCsの移植効果を示すラット頭蓋冠のHE染色断面写真であり、図17(A)が移植を行わなかった写真、図17(B)はC-MSCsを移植して4週間後の写真である。

発明を実施するための形態

[0020] 本実施の形態に係る凍結細胞集塊は、複数の間葉系幹細胞が集塊状に、粒状に形成された凍結状態の細胞集塊である。

[0021] 凍結細胞集塊は、使用される形態に応じた大きさであればよく、例えば、凍結細胞集塊が骨折や歯周炎などの骨破壊疾患に対する移植体として使用される場合移植手術時に欠損組織に移植しやすい大きさであることが好ましく、0.5mm~1.5mm径、より好ましくは0.8mm~1.2mm径である。

[0022] なお、ここで移植体とは、骨欠損部位など直接埋め込まれて使用される形態のほか、注射等による体内への注入により組織再生を図る形態など、手法を問わず、組織再生に用いられる形態全般をいう。

[0023] 凍結細胞集塊は、移植手術等の前に融解されて、移植手術等に用いられる

。凍結細胞集塊は、融解後もその形態を保持し、細胞機能を失うことがないので、例えば、欠損組織に移植することで組織再生能を発揮する。なお、凍結細胞集塊の融解は、凍結細胞集塊が入れられている凍結保存容器をフリーザー等から取り出し、室温に置くことや温浴（例えば、40℃～60℃）に置くなど種々の手法で行うことができる。

[0024] 上記の凍結細胞集塊は、以下のようにして製造することができる。まず、採取した間葉系幹細胞を培養皿等の培養器を用い、MSCにコラーゲンを産生させる因子を含有する増殖培地で培養する。間葉系幹細胞は、患者の髄、脂肪組織、胎盤組織又は臍帯組織、歯髄等、種々の組織から採取されたものが用いられる。

[0025] 増殖培地は、間葉系幹細胞を増殖させ得る培地であればよく、一般に市販されている増殖培地（例えば、DMEM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）+10%FBS（fetal bovine serum））を用いればよい。また、MSCにコラーゲンを産生させる因子は、化合物やタンパク質など、結果としてMSCにコラーゲンを産生させ得るものであれば限定されず、アスコルビン酸のほか、デキサメタゾン等のステロイドやサイトカイン等が挙げられ、アスコルビン酸であることが好ましい。

[0026] 間葉系幹細胞が増殖すると、シート状の細胞集団（以下、細胞シート）が形成される。そして、細胞シートの周囲が培養器の縁に接着し、コンフルエントに達するまで増殖させる。

[0027] 次いで、培養器の周壁に接着した細胞シートの縁を培養器から離間させる。例えば、細い棒体を細胞シートの縁が接着している培養器の内壁に差し込み、培養器の内壁に沿って棒体を一周移動させることにより、細胞シートを培養器から離間させることができる。これにより、細胞シートは浮遊することになる。

[0028] この浮遊する細胞シートは自己凝集作用により、くるまってゆく。そして、間葉系幹細胞自身が産生する細胞外マトリクス（ECM：extracellular matrix）を利用して塊状の間葉系幹細胞集塊となる。このようにして、粒状の

細胞集塊を得ることができる。

[0029] なお、培養器は1.5 cm²~2.5 cm²の円筒状のものをを用いると、0.5 mm~1.5 mmの粒径の細胞集塊が得られる。培養器として、例えば、表面積2 cm²の24ウェルプレートなどを用いればよい。

[0030] また、スフェロイド形態の細胞集塊を得る場合、以下のようにして製造することができる。増殖培地でMSCが浮遊するように培養すると、細胞間接着によってMSC同士が凝集、粒状になる。その後、MSCにコラーゲンを産生させる物質を増殖培地に添加する。これによりMSCがコラーゲンを産生し、通常の細胞スフェロイドに比べて、コラーゲンを豊富に含んだスフェロイド形態の細胞集塊が得られる。

[0031] 得られたMSC移植体を凍結保存剤とともに凍結用バイアル等の凍結保存用の容器に入れ、凍結保存する。このようにして凍結移植体を得ることができる。

[0032] 凍結保存剤として、種々の細胞凍結用の保存液を用いればよく、例えば、10% DMSO (Dimethyl sulfoxide)、20% FBS、70% DMEMを含有する凍結保存液のほか、市販のCell banker (商品名：タカラバイオ株式会社)、Bambanker (商品名：和光純薬工業株式会社)などの凍結保存液が挙げられる。

[0033] 凍結保存は、-70℃~-90℃、好ましくは-75℃~-85℃の温度で行えばよい。また、凍結保存は、保存容器をフリーザーに置くなど、種々の手法で行うことができる。また、一ヶ月以上の長期保存を行う場合は、保存容器を上記温度に24時間置いた後、液体窒素タンク(-196℃)に移して保存してもよい。

[0034] なお、凍結保存に際し、予備凍結を行わなくてもよい。予備凍結を行わずに直接凍結保存しても、MSC移植体の細胞組織が崩壊することはほぼない。

[0035] なお、人工足場材料（例えば、ハイドロキシアパタイト、リン酸三カルシウムアパタイト、ポリ乳酸、キトサン、アテロコラーゲングル、ヒアルロン

酸ゲルなど）を用いたMSC移植体では、凍結させると人工足場材料の物性が変わってしまい、融解後にMSC移植体としての機能を発揮しないため、凍結保存はなされていない。また、足場材料を用いない移植体として、細胞シートや細胞スフェロイドがあるが、これらは後述の実施例でも記すように、凍結、融解後にそれぞれの形態を維持できないため、凍結保存はできなかった。

[0036] 一方、本実施の形態に係る凍結細胞集塊については、MSC細胞集塊を作製した後に凍結保存された状態であることから、患者から分離したMSCからMSC細胞集塊を作製し、その細胞機能や細胞の均一性を事前に検査することができる。そして、検査して一定品質のもののみを選別し、凍結細胞集塊として凍結保存される。これにより、品質管理されたMSC細胞集塊であるMSC移植体を移植日当日に確実に供給することが可能になり、移植手術が延期されるという事態を防ぐことができる。

[0037] 例えば、歯周炎患者から分離した骨髄間葉系幹細胞をMSC移植体の形にし、細胞機能・異物混入などの検査を行った後に凍結保存しておく。その間に移植前に必要となる感染源除去、炎症の軽減などの歯周基本治療を済ませておき、その後、移植日当日に品質管理されたMSC移植体を融解して欠損組織に移植することで歯周組織再生が実現できる。

[0038] 更には、MSCはその低い抗原性のため、他家移植に応用可能な細胞であると考えられている。したがって、MSCバンクなどの他家移植のためのMSC供給システムが構築された場合、MSCのまま凍結するのではなく、MSC細胞集塊の形態で凍結保存することで、患者に必要な際に速やか且つ確実に良好なMSC細胞集塊を提供できる細胞製剤医療が行えるようになる。

実施例

[0039] （凍結移植体の作製、融解）

3週齢ラットの大腿骨の骨髄から間葉系幹細胞を採取した。DMEM（Sigma）に10%FBS（Biowest）、100U/mLペニシリン（Sigma）、1

00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン (Sigma)、及び、500 ng/mL アムホテリシン B (Invitrogen) を添加した増殖培地 (以下、GM培地) にて、採取した間葉系幹細胞を培養した。24 時間後、非接着性の細胞を取り除き、接着性の細胞を更に培養して得た第三継代細胞を以下の実験に用いた。

[0040] 24 well 培養プレートに、MSC を $7.0 \times 10^4 \text{ cells}/\text{well}$ の割合で播種し、L-アスコルビン酸 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した増殖培地 (DMEM + 10% FBS) で 7 時間培養した。

[0041] 培養することにより、MSC 自身が産生した細胞外マトリクスにより MSC/ECM 複合体からなる細胞シートが形成され、そして、細胞シートの周囲が 24 well 培養プレートの周壁に接してコンフルエントまで達した後、マイクロピペットの先端を使って、細胞シートの周囲を 24 well 培養プレートから剥がした。これにより、細胞シートは浮遊し、自らくるまっていた。

[0042] そして、1 日培養した後、直径 0.9 ~ 1.2 mm の粒状の細胞集塊である MSC 移植体 (以下、C-MSCs と記す) を得た。

[0043] C-MSCs を 1 塊 ($2 \times 10^5 \text{ cells}$)、凍結保存液 500 μL に浸漬し、1.5 mL 凍結バイアルを用いて、予備凍結を行わずに、 -80°C の deep freezer 内に置いて凍結した。

[0044] 凍結保存液として、10% DMSO、20% FBS、70% DMEM を混合した凍結保存液 (以下、DMSO 凍結保存液)、Cell banker (商品名: タカラバイオ株式会社)、及び、Bambanker (商品名: 和光純薬工業株式会社) の 3 種を用い、それぞれについて行った。

[0045] 48 時間凍結後、 37°C に設定した恒温水槽で急速解凍して融解し、C-MSCs を取り出した。そして、500 μL 通常培地 (DMEM + 10% FBS) を入れた 24 well 培養プレートに C-MSCs を浸漬し、再度培養した。

[0046] (細胞生存活性の検証)

それぞれの C-MSCs を融解した後、Cell viability

k i t を用い、細胞生存活性を測定した。図 1 に、その結果を示す。なお、凍結しなかった C-MSCs (コントロール) についても行い、図 1 の C e l l v i a b i l i t y はコントロールに対する相対値として示している。

[0047] 図 1 を見ると、いずれの凍結保存液で凍結させた C-MSCs についても、コントロールに対して有意差はなく、凍結させた C-MSCs の細胞生存活性は、凍結を行わなかった場合に比べて劣ることはなかった。

[0048] また、それぞれについて、位相差顕微鏡像を撮影した。その結果を図 2 に示す。図 2 を見ると、全ての C-MSCs から細胞が遊出してくることが確認された。これにより、移植体としての正常な機能を発揮し得ることを確認した。

[0049] (H E 染色による検証)

C-MSCs の凍結保存前、凍結保存して融解 1 日後、融解 5 日後について、H E (Hematoxylin-Eosin) 染色を行って、H E 染色像を撮影し、組織形態を観察した。H E 染色像を図 3 に示す。

[0050] 図 3 を見ると、凍結保存前、融解 1 日後、融解 5 日後にかけて、C-MSCs の形態はほぼ崩れておらず、C-MSCs を凍結保存しても細胞及び基質が残存していることがわかる。

[0051] また、C-MSCs に代えて、細胞シート (2×10^5 c e l l s)、細胞スフェロイド (2×10^5 c e l l s) を用い、上記と同様に DMSO 凍結保存液を使用して凍結、融解を行った。そして、これらを上記と同様に、H E 染色像を撮影した。図 4 に細胞シートの H E 染色像を、図 5 に細胞スフェロイドの H E 染色像を示す。なお、細胞シート、細胞スフェロイドは、それぞれ「Akabane M et al., 2008, J Tissue Eng Regen Med」、「Priya R et al., 2012, Cell Tissue Res」を参照して作製して用いた。

[0052] 図 4 を見ると、細胞シートの形態は時間依存的に崩壊していることがわかる。また、図 5 を見ると細胞シートと同様、細胞スフェロイドの形態は時間依存的に崩壊している。

[0053] このように、細胞シート、細胞スフェロイドについては、凍結保存すると形態が崩壊し、移植体として利用できないことがわかる。C-MSCsと比較して、細胞シートは基質が粗であったこと、細胞スフェロイドは基質（細胞外マトリクス）が少なく細胞間接着によって形成されているものであることから、いずれも凍結保存すると、凍結による氷晶がその形態を損傷したものと考えられる。

[0054] (TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法による検証)

また、凍結前のC-MSCs、並びに、凍結して融解した5日後のC-MSCs、細胞シート及び細胞スフェロイドについて、TUNELアッセイを行った。

[0055] その結果を図6に示す。凍結前のC-MSCsの細胞死の割合は1.96%であり、凍結、融解後のC-MSCsでは5.41%であった。C-MSCsでは凍結、融解を経ても、さほど細胞死は増えていない。一方、凍結、融解後の細胞シート及び細胞スフェロイドでは、細胞死の割合が65.6%、及び44.8%と非常に高く、C-MSCsに比べて非常に高い割合となっている。

[0056] このように、C-MSCsでは凍結、融解を経ても、細胞死はさほど生じず、凍結保存が可能であること、一方、細胞シート及び細胞スフェロイドでは凍結させると多くの細胞死が生じ、凍結保存ができないことを確認した。

[0057] (凍結C-MSCsにおける細胞外マトリクスの役割の検討)

C-MSCsにおいては、細胞シートや細胞スフェロイドと異なり、細胞から細胞外マトリクスが豊富に産生されていることから凍結保存が可能になったと考えられる。これを検証すべく、細胞外マトリクスの主成分であるコラーゲンの分解酵素を用い、以下の検証実験を行った。

[0058] 上記と同様にしてC-MSCsを作製した後、C-MSCsを凍結する直前に3mg/mlのコラーゲン分解酵素(Collagenase (Sigma))を15分間作用させた(collagenase(+))群。

[0059] このC-MSCsを一塊ずつDMSO凍結保存液500μlに浸漬し、上

記と同様の手法で凍結保存した。48時間後に上記と同様の手法で融解し、GM培地500 μ lで培養した。C-MSCsを解凍5日後、1%ホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋を行い、連続して5 μ m、20 μ mの切片を作製した。5 μ mの切片をHE染色し、光学顕微鏡で組織学的構造を観察した。20 μ m切片をDeadEnd Fluorometric terminal deoxynucleotidyl transferase SystemでTUNEL染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて死細胞数を観察した。

[0060] また、コントロール実験として、コラーゲン分解酵素を作用させないもの (collagenase (-) 群) も同様に行った。

[0061] 図7 (A) ~ (D)、及び、図8 (A) ~ (C) にcollagenase (-) 群の凍結保存前、及び、融解5日後の状態を、また、図7 (E) ~ (H)、及び、図8 (D) ~ (F) にcollagenase (+) 群の凍結保存前、及び、融解5日後の状態を示す。なお、図7 (B)、(C)、(F)、(G)、図8 (B)、(C)、(E)、(F)において、輝度が高い部位 (一例として、破線で囲っている部位) が死細胞の細胞核を表している。

[0062] 図7 (D)を見ると、C-MSCsをcollagenase処理することで、凍結保存前にType I collagenの発現レベルが低下したことがわかる。そして、図8 (D) ~ (F)を見ると、このcollagenase (+) 群は、凍結融解後に形態が崩れ、死細胞が増加することが観察された。

[0063] 一方、通常のC-MSCsであるcollagenase (-) 群は、図8 (A) ~ (C)を見ると、凍結融解後もその形態を保持しており、死細胞の数も僅かであった。

[0064] また、図9にcollagenase (-) 群、及び、collagenase (+) 群における細胞死の割合を示す。図9から、collagenase (-) 群とcollagenase (+) とでは、細胞死の割合において、有意差が現れている。以上のことから、C-MSCsでは、コラーゲ

ンを主成分とするECMが凍結に対する保護効果を発揮していることが示唆された。

[0065] (コラーゲンを産生させて作製した細胞スフェロイド形態のMSCの凍結保存の検証)

C-MSCsではECMの保護効果により、凍結保存が可能であることから、細胞スフェロイドの形態においても、細胞からコラーゲンが産生されていれば、凍結保存が可能であると考え、スフェロイドの形態でも凍結保存が可能か否か検証を行った。

[0066] MSCをultra low binding 24wellプレートに 2×10^5 cells/wellの細胞密度で播種し、GM培地で4日間培養することで、MSCから構成される細胞スフェロイド (VC (-) 群) を得た。

[0067] また、培養中、MSCが凝集した後に、 $50 \mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸 (Sigma) をGM培地に添加して培養した細胞スフェロイドも作成した (VC (+) 群)。

[0068] 凍結保存前の細胞スフェロイドの生存性およびECMとしてのType I Collagenの発現をHE染色、TUNEL染色、および免疫染色にて観察した。

[0069] 更に、細胞スフェロイドを一塊ずつDMSO凍結保存液 $500 \mu\text{l}$ に浸漬し、 1.5 ml 凍結バイアル (True line) を用いて -80°C で凍結した。48時間後、 37°C に設定した恒温水槽で急速解凍後、24well培養プレートに再播種し、 $500 \mu\text{l}$ GM培地で培養した。

[0070] 細胞スフェロイドを解凍して5日後に1%ホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋を行い、連続して $5 \mu\text{m}$ 、 $20 \mu\text{m}$ の切片を作製した。 $5 \mu\text{m}$ の切片をヘマトキシリン-エオジン染色 (HE染色) し、光学顕微鏡で組織学的構造を観察した。 $20 \mu\text{m}$ 切片をDead End Fluorometric terminal deoxynucleotidyl transferase System (Promega) でTUNEL染色し、

共焦点レーザー顕微鏡にて死細胞数を観察した。

[0071] 図10(A)～(D)及び図11(A)～(C)に、VC(－)群の凍結保存前、及び、融解5日後の状態を、また、10(E)～(H)及び図11(D)～(F)に、VC(＋)群の凍結保存前、及び、融解5日後の状態をそれぞれ示す。なお、図10(B)、(F)、(G)、図11(B)、(C)、(E)、(F)において、輝度が高い部位（一例として、破線で囲っている部位）が死細胞の細胞核を表している。

[0072] 図10(D)を見ると、アスコルビン酸無添加のVC(－)群のスフェロイドでは、Type I collagenの発現レベルは低い。そして、図11(A)～(C)を見ると、凍結融解後、その形態は崩れ、死細胞の増加が観察された。

[0073] 一方、図10(H)を見ると、アスコルビン酸添加のVC(＋)群のスフェロイドでは高いType I collagenの発現が観察された。そして、図11(D)～(F)を見ると、凍結融解後もその形態が保持され、死細胞の数も僅かであった。

[0074] また、図12に、VC(＋)群及びVC(－)群の融解5日後の死細胞の割合を示す。図12から、VC(＋)群とVC(－)群とでは、細胞死の割合において、有意な差が現れている。以上のことから、細胞スフェロイドにおいても、ECMを豊富に産生させておくことで、凍結保存可能であることがわかった。

[0075] (石灰分化能の検証)

続いて、C-MSCsの石灰化分化能について検証した。低接着培養皿を用い、通常培地(GM)及び石灰化誘導培地(OIM)にて、それぞれC-MSCsを培養した。そして、培養5日後、及び、10日後に、C-MSCs内のカルシウム沈着量を定量した。

[0076] その結果を図13に示す。図13を見ると、凍結、融解しなかったC-MSCsと同様、凍結、融解したC-MSCsは、石灰化誘導培地での培養によってカルシウム沈着量が上昇しており、石灰化分化能が失われていないこ

とを確認した。

[0077] (骨再生の検証)

続いて、C-MSCsの移植による骨再生の検証を行った。ラットの頭蓋冠1.6mm径骨欠損モデルに対し、凍結保存、融解したC-MSCsを移植した。

[0078] そして、移植して4週間後にCT (Computed Tomography) 撮影を行い、骨再生の有無について検証した。

[0079] 図14にCT写真を示す。いずれの凍結剤で凍結保存させたC-MSCsについても、移植を行わなかったものと比較して、骨再生が誘導されている。

[0080] (C-MSCsの長期凍結保存による影響の検証)

上記と同様の手法にて、DMSO凍結保存液を用い、C-MSCsを6ヶ月間凍結保存した。そして、上記と同様の手法にて、C-MSCsを融解した。このC-MSCsのHE染色、TUNEL染色、DIP染色を行った。その結果を図15に示す。

[0081] 図15から、6ヶ月凍結保存されたC-MSCsにおいてもその形態は保持されており、顕著な死細胞の増加は観察されなかった。

[0082] 更に、この6ヶ月凍結保存の後に融解したC-MSCsを、上記と同様の手法にて、ラット頭蓋冠欠損モデルに移植し、骨再生の有無について検証した。図16にCT写真を示す。また、図17にHE染色した断面写真を示す。図16(A)、図17(A)のコントロールに対して、図16(B)、図17(B)のC-MSCsを移植した頭蓋冠では、骨再生が促進されていることがわかる。したがって、C-MSCsを6ヶ月間もの長期凍結保存をしても、これを融解し、移植することで骨再生を促進させ得ることを確認した。

[0083] 以上の検証から、凍結保存されたC-MSCsは、融解しても移植体としての機能を損なわず、移植手術による再生医療に利用できることを立証した。

[0084] 本発明は、本発明の広義の精神と範囲を逸脱することなく、様々な実施の形態及び変形が可能とされるものである。また、上述した実施の形態は、この発明を説明するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。すなわち、本発明の範囲は、実施の形態ではなく、特許請求の範囲によって示される。そして、特許請求の範囲内及びそれと同等の発明の意義の範囲内で施される様々な変形が、この発明の範囲内とみなされる。

[0085] 本出願は、2016年4月27日に出願された、日本国特許出願特願2016-89188号に基づく。本明細書中に日本国特許出願特願2016-89188号の明細書、特許請求の範囲、図面全体を参照として取り込むものとする。

産業上の利用可能性

[0086] 本発明に係る凍結細胞集塊は、移植再生医療等にて利用可能である。

請求の範囲

- [請求項1] 間葉系幹細胞が粒状に形成され、凍結状態の細胞集塊である、ことを特徴とする凍結細胞集塊。
- [請求項2] 前記凍結細胞集塊が0.5 mm～1.5 mm径の粒状である、ことを特徴とする請求項1に記載の凍結細胞集塊。
- [請求項3] 前記凍結細胞集塊が0.8 mm～1.2 mm径の粒状である、ことを特徴とする請求項2に記載の凍結細胞集塊。
- [請求項4] 間葉系幹細胞にコラーゲンを産生させる因子を含有する増殖培地にて前記間葉系幹細胞を培養し、
前記間葉系幹細胞から産生されたコラーゲンを含有する粒状の細胞集塊を形成させ、
前記増殖培地から分離した前記細胞集塊を凍結保存剤とともに凍結保存する、
ことを特徴とする凍結細胞集塊の製造方法。
- [請求項5] 間葉系幹細胞にコラーゲンを産生させる因子を含有する増殖培地にて前記間葉系幹細胞を培養して細胞シートを形成し、
前記細胞シートの周囲を自由縁にして自己凝集作用によって粒状の細胞集塊を形成し、
前記増殖培地から分離した前記細胞集塊を凍結保存剤とともに凍結保存する、
ことを特徴とする凍結細胞集塊の製造方法。
- [請求項6] 培養容器にて前記間葉系幹細胞を培養してコンフルエントになるまで増殖させ、
前記培養容器の周壁に接着した前記細胞シートの縁を前記培養容器の周壁から離間させることにより、前記細胞シートの周囲を自由縁にする、
ことを特徴とする請求項5に記載の凍結細胞集塊の製造方法。
- [請求項7] 1.5 cm²～2.5 cm²の円筒状の前記培養容器を用い、0.

5 mm～1.5 mm径の粒状の前記細胞集塊を得る、
ことを特徴とする請求項6に記載の凍結細胞集塊の製造方法。

[請求項8]

増殖培地にて間葉系幹細胞を培養して凝集させ、
前記増殖培地に前記間葉系幹細胞にコラーゲンを産生させる因子を
添加して、前記間葉系幹細胞から産生されるコラーゲンを含有する粒
状の細胞集塊を形成させ、

前記増殖培地から分離した前記細胞集塊を凍結保存剤とともに凍結
保存する、

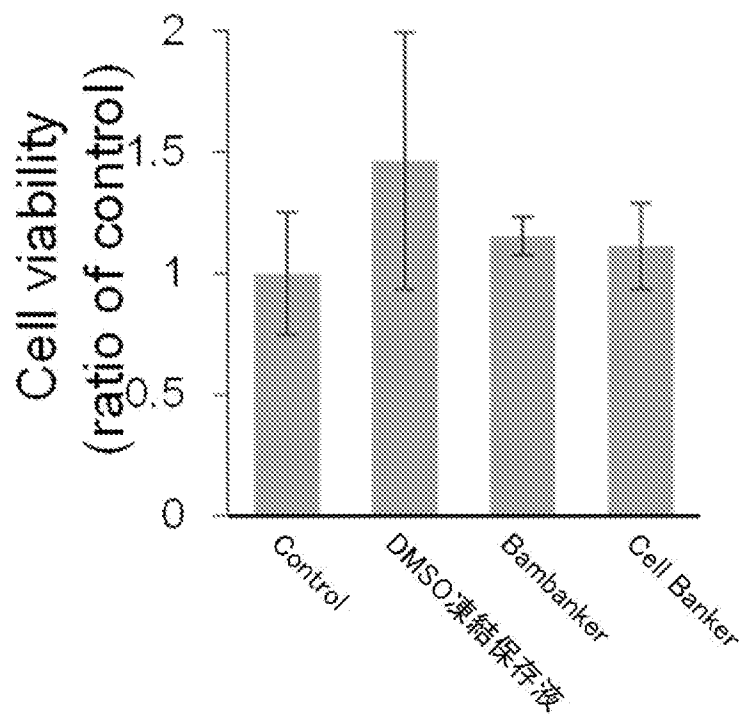
ことを特徴とする凍結細胞集塊の製造方法。

[請求項9]

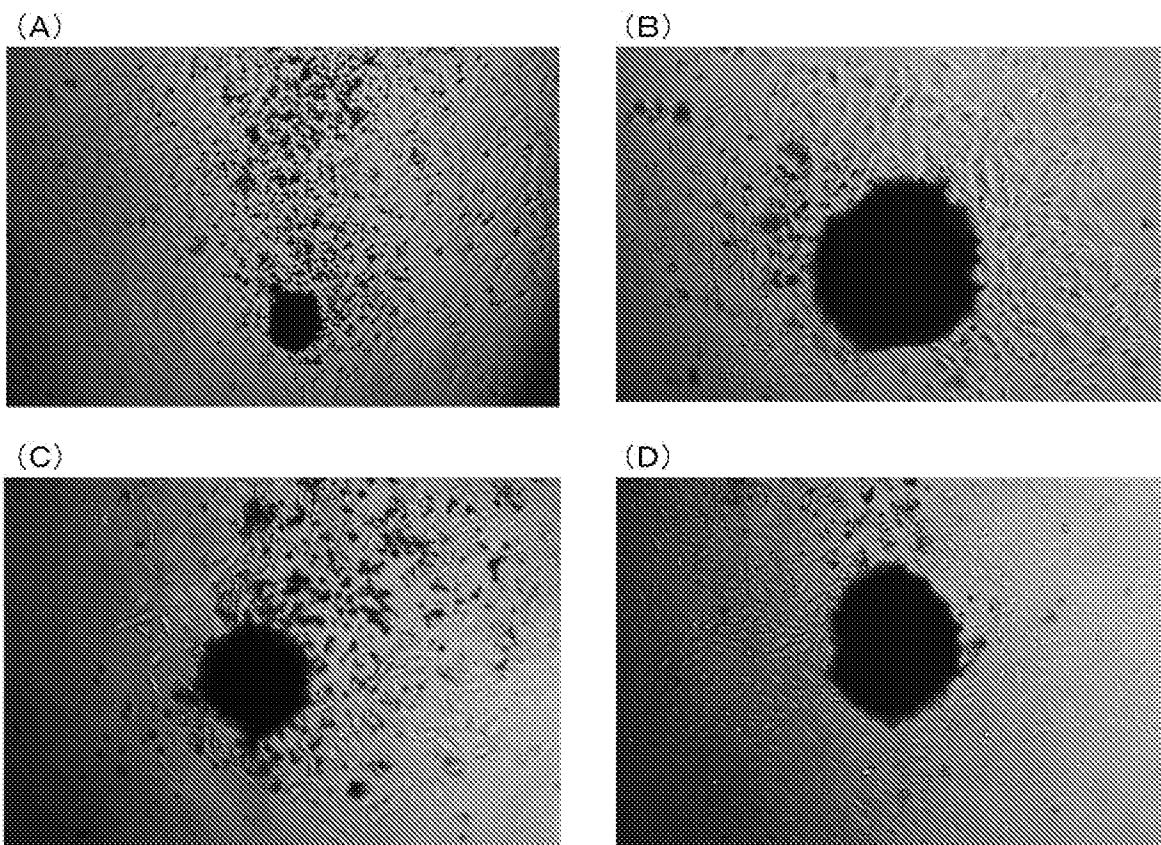
予備凍結を行わずに凍結保存する、

ことを特徴とする請求項4乃至8のいずれか一項に記載の凍結細胞
集塊の製造方法。

[図1]

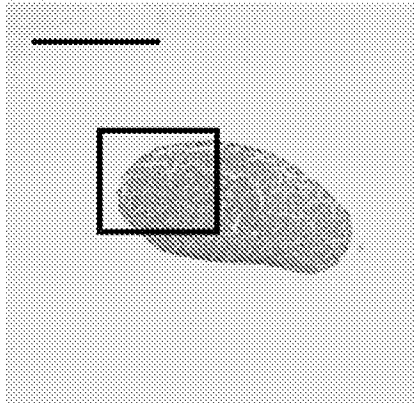


[図2]

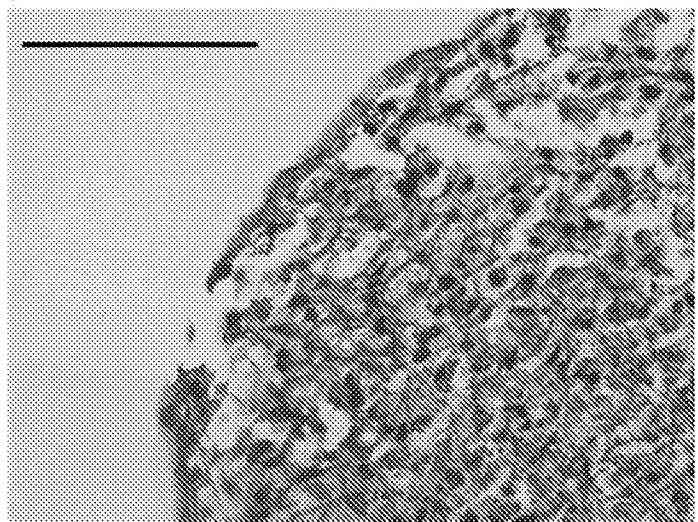


[図3]

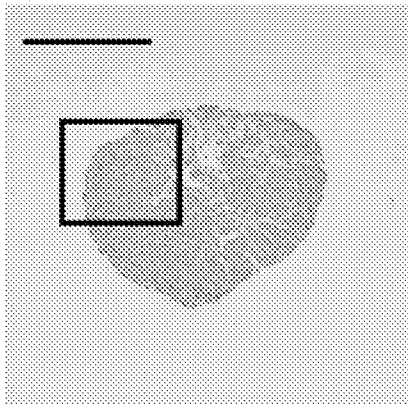
(A)



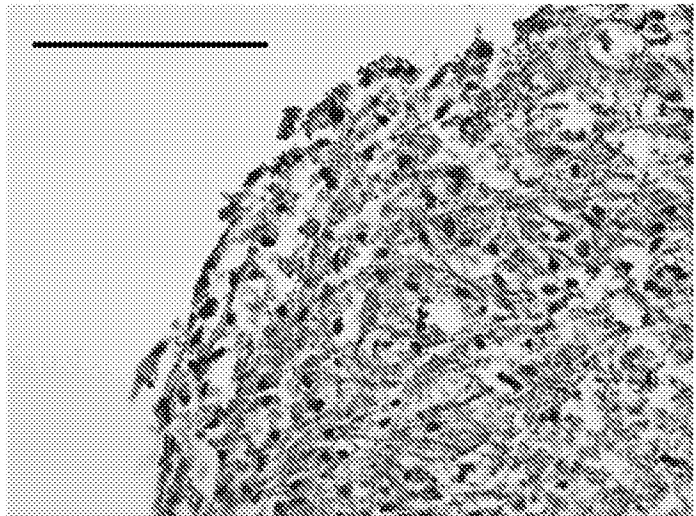
(B)



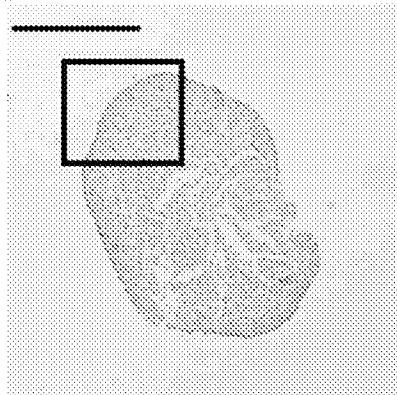
(C)



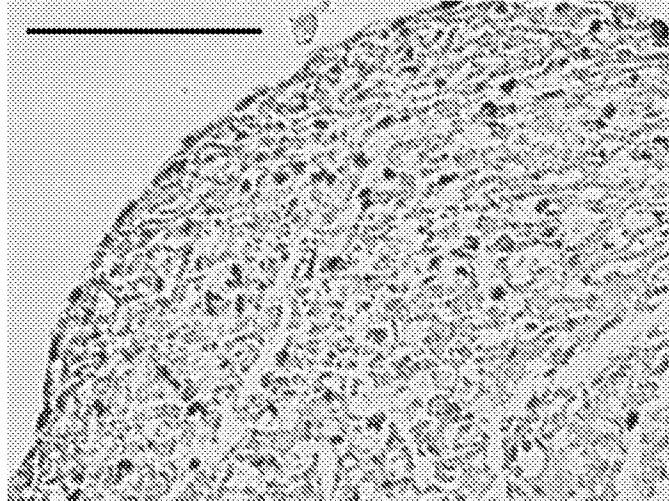
(D)



(E)



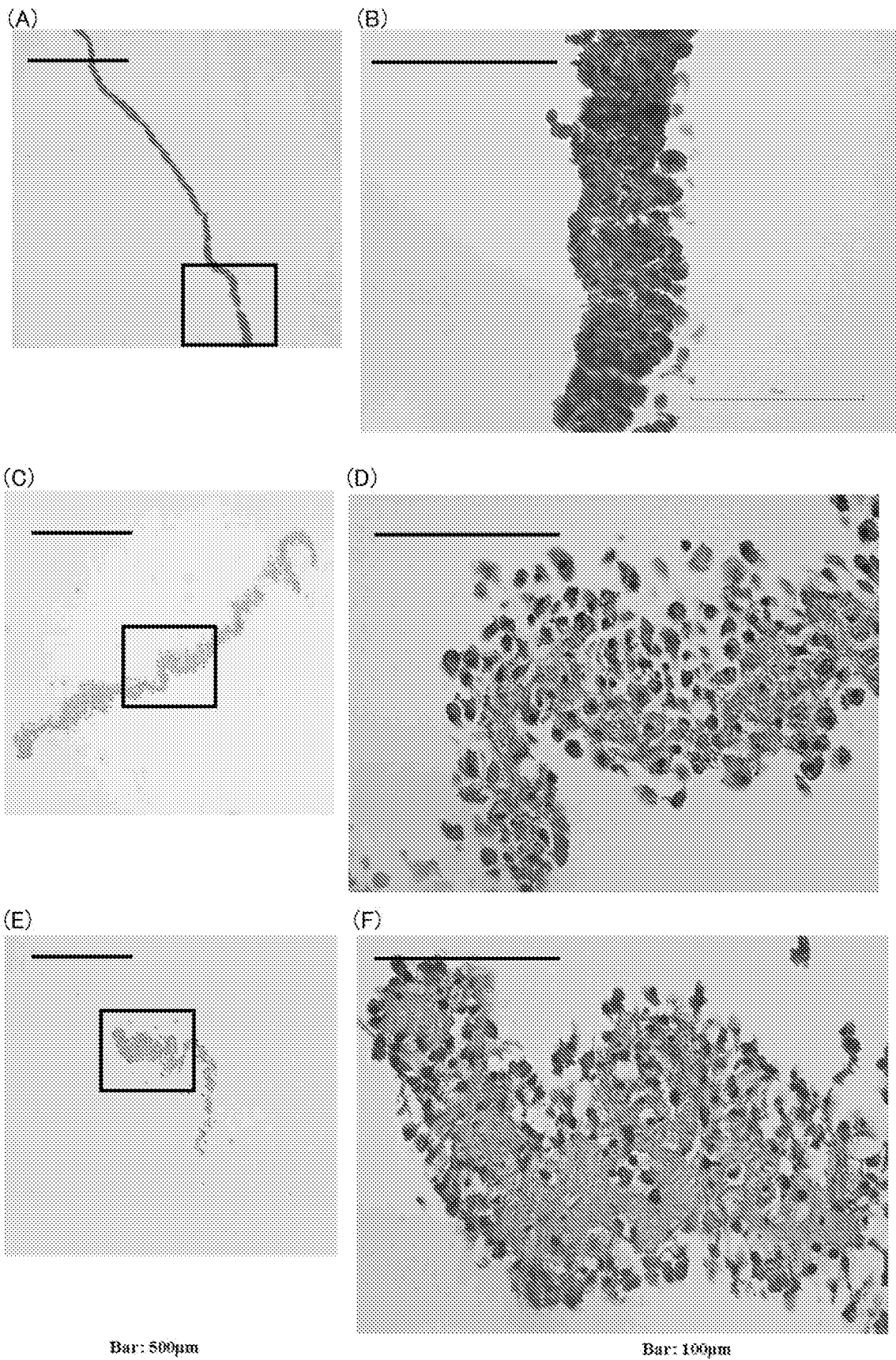
(F)



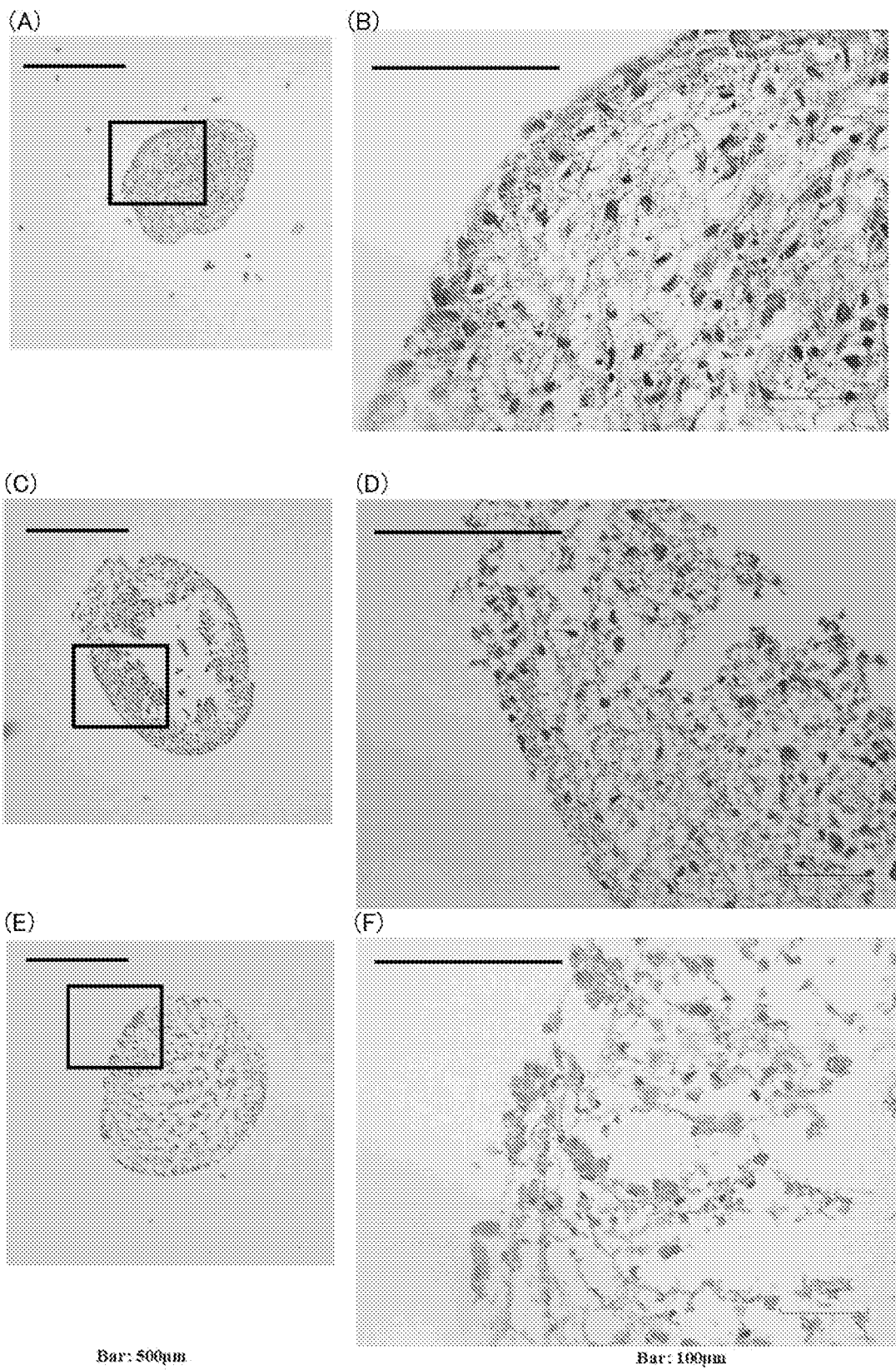
Bar: 500μm

Bar: 100μm

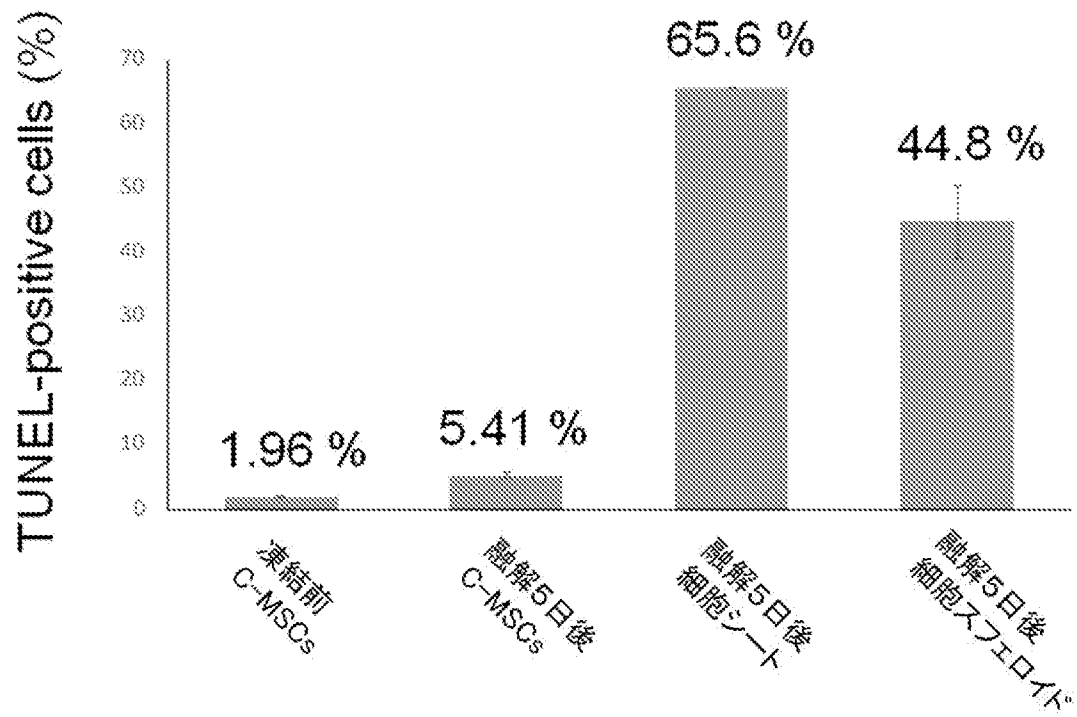
[図4]



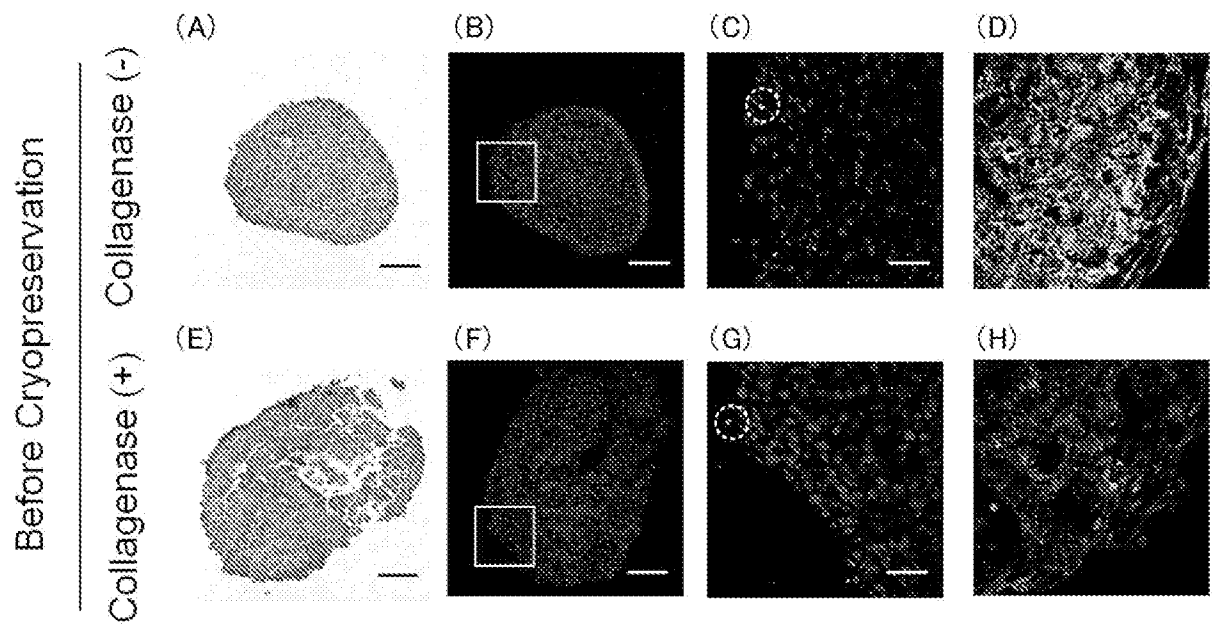
[図5]



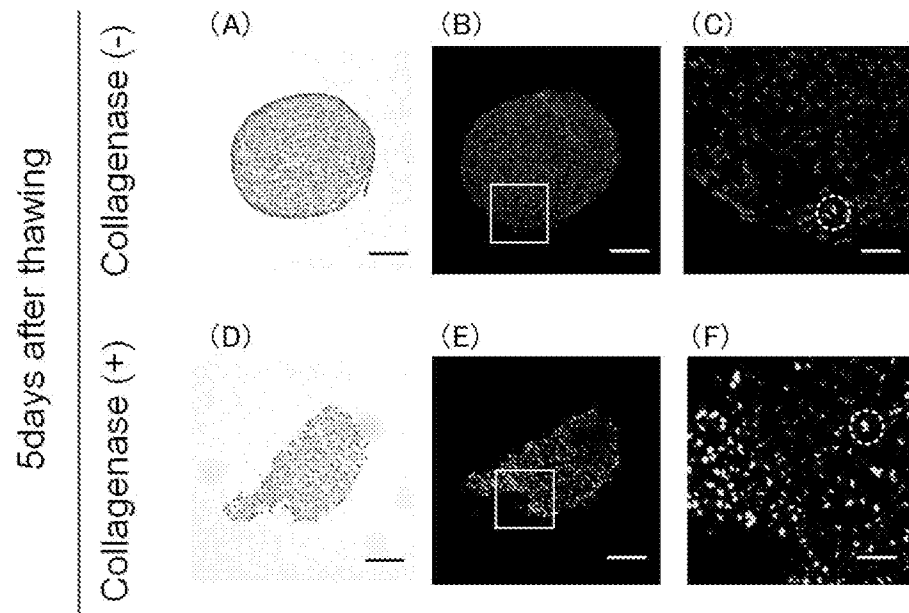
[図6]



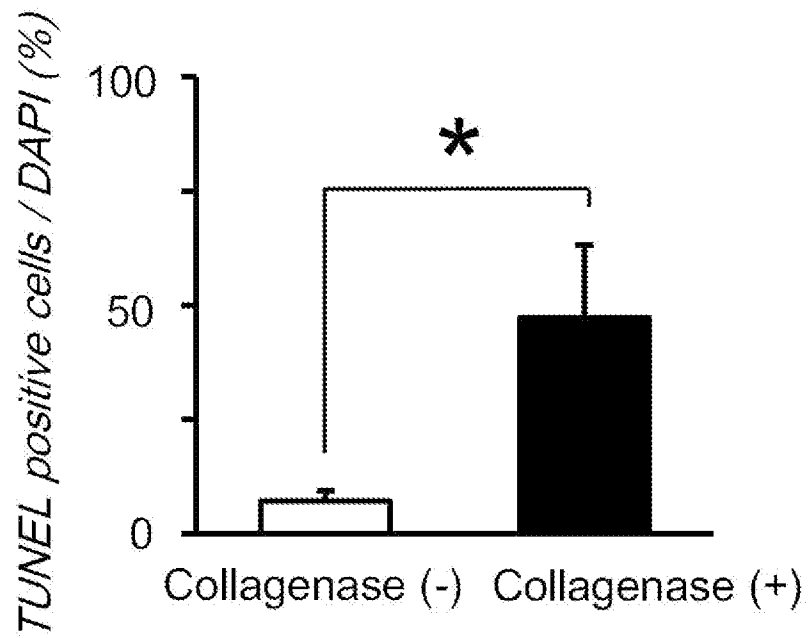
[図7]



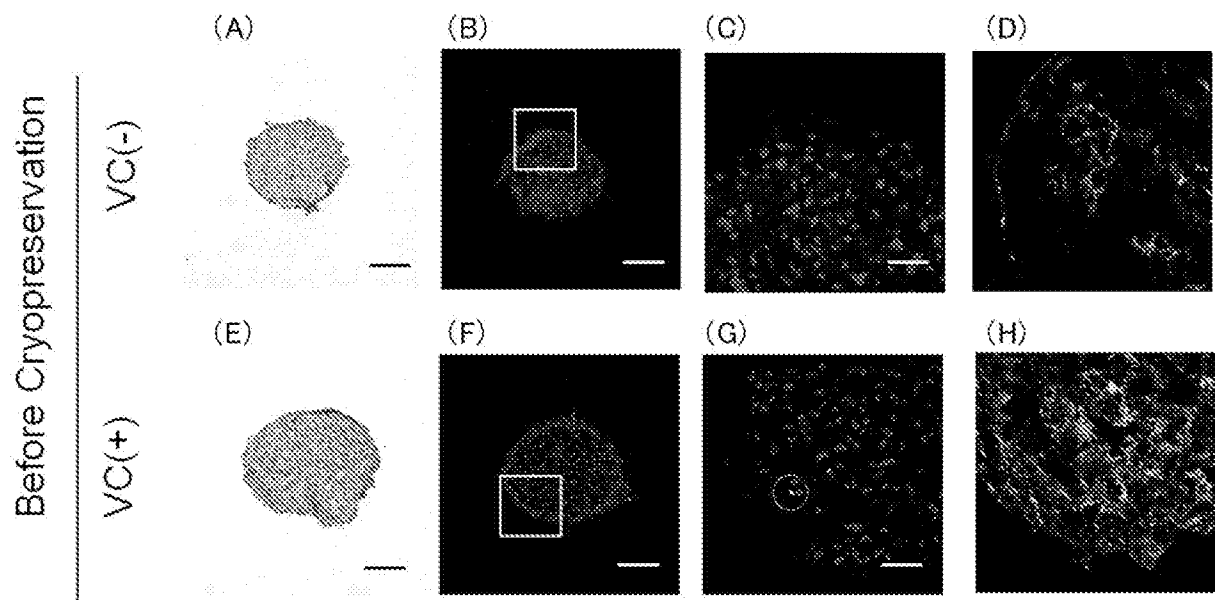
[図8]



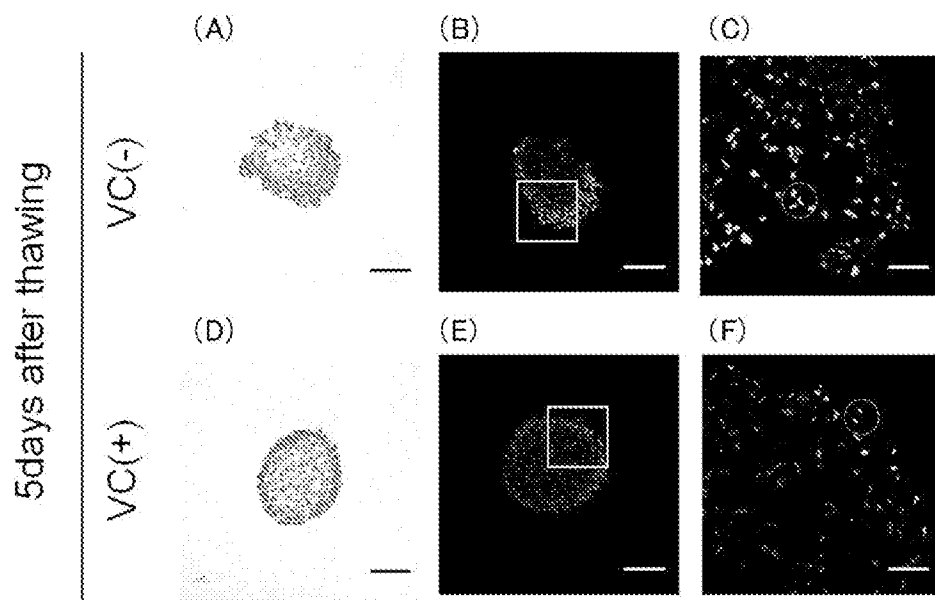
[図9]



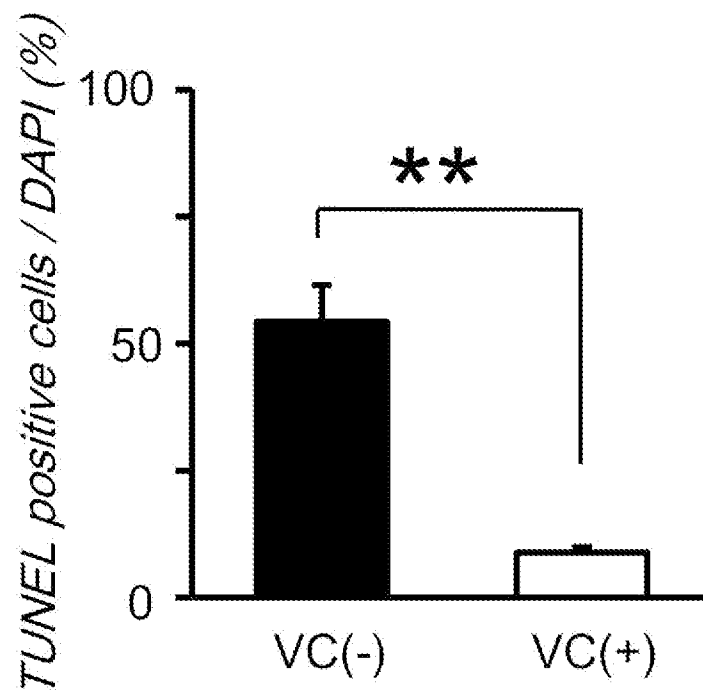
[図10]



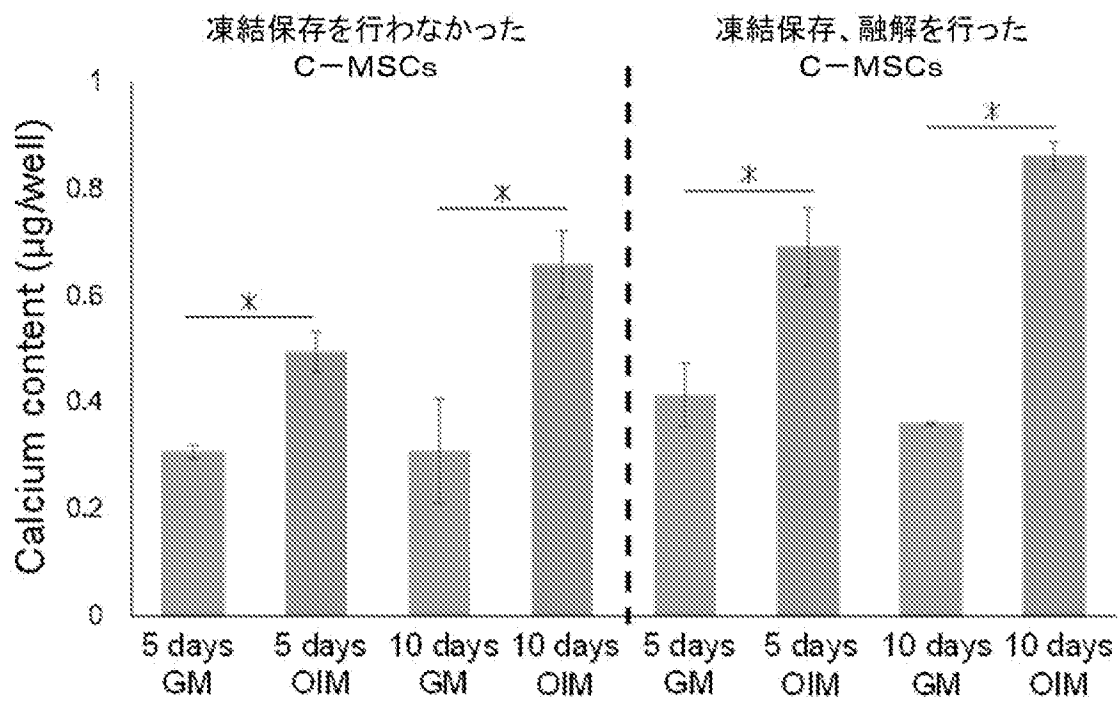
[図11]



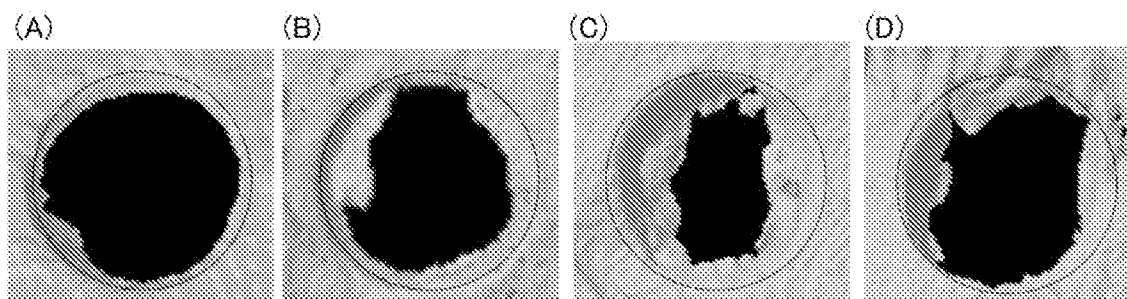
[図12]



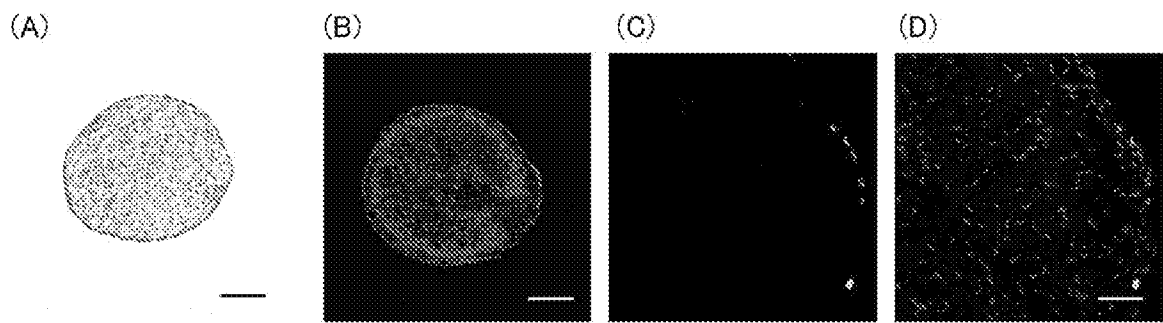
[図13]



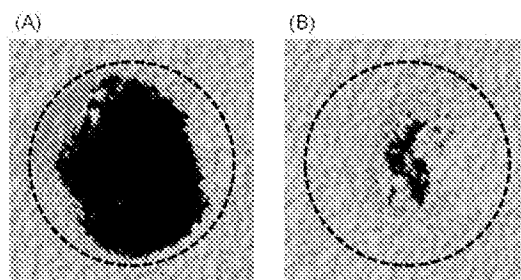
[図14]



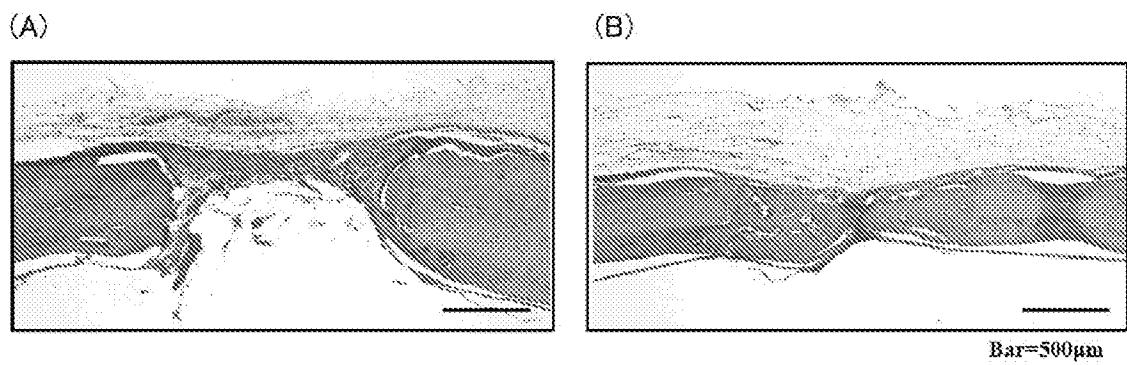
[図15]



[図16]



[図17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/014545

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/0775(2010.01) 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)

C12N5/0775

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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), WPIDS/WPIX(STN), Japio-GPG/FX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{Y}$	Sota MOTOIKE, "Toketsu Hozon ga Kan'yokei Kansaibo Shukai Clumps fo MSCs/ECM complex ni yoru Hone Saisei ni Oyobosu Eikyo", Journal of the Japanese Society of Periodontology, 18 April 2016 (18.04.2016), vol.58, spring special issue, page 123, 0-30 3199, entire text	$\frac{1-3}{4-9}$
Y	KITAKA, M., et al., Clumps of a mesenchymal stromal cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering therapy for bone regeneration, Cytotherapy, 2015.03.03, Vol. 17, No. 7, p. 860-873, Abstract, p. 864	4-9

☒ 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
18 May 2017 (18.05.17)

Date of mailing of the international search report
30 May 2017 (30.05.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/014545

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2015-181433 A (Terumo Corp.), 22 October 2015 (22.10.2015), paragraph [0023] & US 2017/0006857 A1 paragraph [0035] & WO 2015/146631 A1 & EP 3101119 A1	4-9
P,X	Sota MOTOIKE et al., "Toketsu Hozon shita Kan'yokei Kansaibo Shukai Clumps of MSCs/ECM complex no Hone Saiseino no Kento", Journal of the Japanese Society for Regenerative Medicine, 01 February 2017 (01.02.2017), vol.16, Suppl, page 368, P-01-024	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

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

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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), WPIDS/WPIX (STN), Japio-GPG/FX

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	本池総太, 凍結保存が間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complex による骨再生に及ぼす影響, 日本歯周病学会会誌, 2016.04.18, Vol. 58 春季特別号, p. 123, 0-30 3199, 全文	1-3
Y		4-9
Y	KITAKA, M., et al., Clumps of a mesenchymal stromal cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering therapy for bone regeneration, Cytotherapy, 2015.03.03, Vol. 17, No. 7, p. 860-873, Abstract, p. 864	4-9

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

18.05.2017

国際調査報告の発送日

30.05.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

太田 雄三

4 B

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
Y	JP 2015-181433 A (テルモ株式会社) 2015. 10. 22, 【0023】 & US 2017/0006857 A1, [0035] & WO 2015/146631 A1 & EP 3101119 A1	4-9
P, X	本池総太, 他, 凍結保存した間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complex の骨再生能の検討, 日本再生医療学会雑誌, 2017. 02. 01, Vol. 16, Suppl, p. 368, P-01-024	1-9