

(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
2012 年 8 月 16 日(16.08.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/108069 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01) *A61L 27/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/067045
- (22) 国際出願日: 2011 年 7 月 27 日(27.07.2011)
- (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 2011-026614 2011 年 2 月 9 日(09.02.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社オーガンテクノロジーズ(ORGAN TECHNOLOGIES, INC.) [JP/JP]; 〒1010048 東京都千代田区神田司町 2 丁目 2 番 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 豊島 公栄 (TOYOSHIMA Koh-ei) [JP/JP]; 〒2780055 千葉県野田市岩名 2 0 1 5 - 1 2 Chiba (JP). 辻 孝 (TSUJI, Takashi) [JP/JP]; 〒2700111 千葉県流山市江戸川台東 3 - 1 9 8 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 南条 雅裕, 外(NANJO, Masahiro et al.); 〒1070052 東京都港区赤坂 9 - 7 - 2 - 1 4 1 6 東京 A C T i 国際特許事務所 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, 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 FOR PRODUCING REGENERATIVE ORGAN PRIMORDIUM PROVIDED WITH GUIDE FOR TRANSPLANTATION, COMPOSITION CONTAINING REGENERATIVE ORGAN PRIMORDIUM PROVIDED WITH GUIDE FOR TRANSPLANTATION PRODUCED THEREBY, AND METHOD FOR TRANSPLANTING REGENERATIVE ORGAN PRIMORDIUM PROVIDED WITH GUIDE FOR TRANSPLANTATION

(54) 発明の名称: ガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法、当該方法によって製造される、ガイドを有する移植用再生器官原基を含む組成物、およびガイドを有する移植用再生器官原基の移植方法

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a method for producing a regenerative organ primordium for transplantation, said regenerative organ primordium for transplantation ensuring continuity with a recipient after transplantation and facilitating transplantation procedures. Provided is a method for producing a regenerative organ primordium provided with a guide for transplantation, said method comprising: a step for preparing a regenerative organ primordium by tightly contacting a first cell mass, which substantially consists of mesenchymal cells, with a second cell mass, which substantially consists of epithelial cells, and culturing these cell masses within a supporting medium; and a step for inserting the guide into the regenerative organ primordium.

(57) 要約: 本発明は、移植後のレシピエントとの連続性を確保でき、且つ、移植操作の容易な移植用再生器官原基の製造方法を提供することを課題とする。本発明は、ガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法であって、間葉系細胞から実質的に構成される第 1 の細胞集合体と、上皮系細胞から実質的に構成される第 2 の細胞集合体とを密着させて支持体内部で培養することにより再生器官原基を調製する工程と、前記再生器官原基にガイドを挿入する工程とを含む製造方法を提供する。



WO 2012/108069 A1

明 細 書

発明の名称：

ガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法、当該方法によって製造される、ガイドを有する移植用再生器官原基を含む組成物、およびガイドを有する移植用再生器官原基の移植方法

技術分野

[0001] この出願の発明は、再生器官原基を用いた器官置換的再生医療において、再生器官原基がレシピエント側の上皮性組織と適切に連結し機能する移植用器官原基の製造方法、当該製造方法によって製造される、ガイドを有する移植用再生器官原基を含む組成物、およびガイドを有する移植用再生器官原基の移植方法に関するものである。

背景技術

[0002] 移植医療を補完する次世代の医療技術として種々の疾病や外傷により機能不全となった臓器や器官を、再生した臓器や器官と置換する再生医療が期待されている（非特許文献1）。これまでの再生医療研究では、傷害を受けた組織や部分的に機能障害のある器官に幹細胞や前駆細胞を移入し、機能回復させる幹細胞移入療法が進められている。

[0003] また、単一の細胞種からなる二次元的な組織の再生においては、皮膚や角膜上皮細胞、心筋細胞などについて、細胞シートテクノロジーにより細胞をシート状に培養して組織化する組織再生技術も実用化に近い段階にある。なかでも皮膚組織は、間葉系細胞である繊維芽細胞と皮膚表皮細胞とを重層化し、組織学的に適切な層構造を人為的に再現させることで機能的な皮膚を再生することが可能であり、重篤な熱傷の治療において臨床応用されている。

[0004] 一方、器官は複数種の機能的な細胞が三次元的な配置をとり固有の機能を発現することが知られている。ほとんどすべての器官は、胎児期の上皮系細胞と間葉系細胞の相互作用により発生し、固有の形態や器官機能を発揮するようになる。現在の再生医療技術では、複数種の細胞を三次元的に配置する

ことは困難であり、生体外において即時機能可能な再生器官構築はまだ開発されていない。

最近になり、上皮性付属器官である歯や唾液腺、皮膚付属器官である毛包において、器官原基を再生し、発生過程を再現することによって器官再生を目指した研究が進められている。これらの器官は生命の維持に直結するわけではないものの、器官喪失や機能不全に陥ることが知られている。このような例としては、う蝕や傷害、歯胚形成不全による歯の喪失や、高齢化に伴う唾液分泌障害、男性型脱毛症や毛包形成不全による毛髪の喪失などが挙げられる。このような、器官喪失や機能不全は、QOLに大きな影響を与えるため、器官再生による機能回復が大いに期待されている。なかでも歯の再生において、胎児性の歯胚由来の上皮系細胞と胎児性の歯胚由来の間葉系細胞を適切に三次元配置させた再生歯胚の移植や、生体内で異所的に再生した再生歯ユニットの移植や、歯と歯槽骨、歯根膜を有する機能的ユニットの移植により歯の生理機能をすべて有する機能的な歯の再生が示されている（例えば、特許文献1参照）。さらに、口腔内上皮細胞やその初代培養細胞を上皮系細胞として利用した場合（例えば、特許文献2参照）、羊膜由来細胞を間葉系細胞として利用した場合（例えば、特許文献3参照）、全能性幹細胞を分化誘導した細胞を間葉系細胞として利用した場合（例えば、特許文献4参照）にも、同様に特有の細胞配置と方向性を備えた再生歯胚や再生歯ユニットが得られることが示されている。

これらの研究成果から、再生器官原基、あるいは再生器官原基より再生した器官の移植による機能的な器官再生の実現可能性が示されたといえ、その他の上皮性付属器官についても、再生器官原基による器官置換的再生医療が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2006／129672号パンフレット

特許文献2：特開2008－29756号公報

特許文献3：特開2008-206500号公報

特許文献4：特開2008-200033号公報

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：Sharpe PT, Young CS. Test-tube teeth. Sc. Am. 293, 34-41, 2005

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 一般的に毛包や皮脂腺、涙腺、唾液腺などの上皮性付属器官は、胎児期において外胚葉由来または内胚葉由来の上皮細胞と、中胚葉または神経提由来の間葉系細胞との相互作用により発生することが知られている。

皮膚付属器官である毛包は、個体の生涯にわたって成長と退行（毛周期）を繰り返し、成長期における毛球部の再生は、毛包器官発生期と同様な分子機構により誘導されることが知られている。また、このような毛周期における毛球部の再生は、間葉系細胞である毛乳頭細胞により誘導されると考えられている。そして、成長期において、毛包上皮幹細胞が間葉系細胞である毛乳頭細胞により分化誘導され毛球部が再生されると考えられている。また、バルジ領域および下方領域には、神経提由来幹細胞のニッチが存在することから、毛包は複数の幹細胞ニッチを保持し、幹細胞プールとして機能していると考えられている。毛包形成誘導能を保持した毛乳頭細胞については、その培養法が報告されている。毛包間葉系細胞の幹細胞ニッチについては未だに確定的な報告はされていないが、毛乳頭には軟骨細胞、血球系細胞、脂肪細胞に分化可能な細胞が含まれており、成体皮膚真皮組織からは毛包および皮膚の真皮を再生するSKIPs細胞を得ることができることから、毛包間葉系幹細胞の存在が示唆されている。これらのことより、他の器官では実現されていない成体由来細胞による完全な器官再生の可能性が示唆され、臨床応用可能な毛包再生技術の実用化が期待されている。

- [0008] 臨床応用に足る毛包再生医療の確立には、再生毛包が正常な組織構造を有し、移植部位に適した毛幹を有する毛が形成、伸長することが必要である。

さらに毛包に特有の幹細胞ニッチによる幹細胞の維持と毛周期による毛包の誘導が起りうること、皮脂腺や立毛筋が付随し、交感神経により立毛する反応性を有する機能的な毛包であることが期待されている。これまでに毛包再生に向けて間葉系細胞（毛乳頭細胞および真皮毛根鞘細胞）を置換することによる毛包可変領域の再生や毛包誘導能を有する間葉系細胞による毛包新生、上皮・間葉細胞による毛包の再構築などが試みられてきた。なかでも毛包の再構築や毛包原基の再生は臓器置換再生医療のモデルと考えられており、最近、発明者らが開発した器官原基法により再構築した再生毛包原基は正常発生を模倣して、毛包と毛を再生しうることを示した。しかしながら、生体内において完全に機能的な毛包が再生され、臨床応用可能な毛包再生モデルはいまだ報告されていない。

[0009] 皮膚の付属器官である毛髪は、皮膚が変化したものであり、二種類に大別される細胞群、すなわち上皮系細胞と間葉系細胞との相互作用によって形成された毛包から産生される。従って、この二種類の細胞を、目的とする皮膚領域に移植し、毛包を再生させることが基本的戦略となる。この基本戦略を実現する方法として、培養毛乳頭細胞を新生児ラット表皮細胞と混合し、ヌードマウス背部皮膚を全層除去することで形成した移植創に移植する方法（グラフトチャンバー法）により毛包を含む皮膚全体を再生する方法が報告されている。しかし、この方法では、皮膚全体を再生するために大きな移植創の形成が必須であり、非常に侵襲性が高いことから広く医療技術として応用することは難しい。

[0010] また、同様の上皮系細胞と間葉系細胞を混合し、皮下組織や腎臓皮膜下に移植し毛包を再生し、異所的に再生した毛包を皮内に再移植する方法が報告されている。この方法では、再生した毛包を既存の植毛術に準じた方法で目的とするレシピエント皮膚内に移植することが可能であるが、毛包を再生するための場を他の臓器・器官内に求めることとなる。また、皮下組織などに上皮系細胞を移植すると高頻度で嚢胞を形成し、これは周辺組織を圧迫して炎症に伴う疼痛を引き起こすことが知られており、技術そのものが新たな疾

病リスクを含んでいる。

[0011] この問題を解決するために、器官原基法を先行特許として出願している（特許文献1）。この先行特許では、人為的に作製した微小な器官原基から器官を再生可能とする方法を提供している。既に歯の再生では、顎骨内に移植した再生歯原基より正常な機能を有する再生歯が口腔内に萌出することが示されている。再生した歯の上皮系細胞と口腔粘膜上皮は直接連結をとることがなく、再生歯の成長により自律的に萌出され则认为られている。しかしながら、毛包のように皮膚表皮層との連結が必要な場合には再生した毛包から体表面に毛を成長させることが必要であり、移植した毛包より発毛ができない場合には、嚢胞形成をしてしまうという問題を有していた。

[0012] 毛髪、皮脂腺などの皮膚付属器は皮膚に遍在し、かつ非常に多数存在する。特に、毛髪は特定部位に多数存在することで、その審美的および機能的価値を発揮する。さらに、毛髪を生み出す微小な器官である毛包は皮膚内において表皮層と毛穴部を介して適切な方向性を持って接続し、体表面より毛髪（幹）を成長させることで機能する。

[0013] また、例えば唾液腺や涙腺のような導管を有する外分泌腺の移植による再生技術においては、移植した唾液腺または涙腺等とレシピエント側の唾液等を通す導管とが正しく結合されて初めてその機能を発揮することができる。しかしながら、導管を有する唾液腺等を移植した場合に、レシピエント側の導管と上手く結合できずに機能しないものが生じてしまうという問題を有していた。

[0014] すなわち、毛包や唾液腺のような上皮性付属器官を再生する場合には、レシピエント側の上皮性の組織と再生された器官とが適切な方向性と様式で接続することがその機能の発揮にきわめて重要であると考えられている。

課題を解決するための手段

[0015] 上述のように、毛包や皮脂腺、唾液腺、涙腺などの上皮性付属器官を再生し、所定の機能を発揮させるためには、多数の移植物がレシピエントと適切に接続されなければならない。本発明者らは、上記課題を解決するために、

鋭意検討の結果、器官原基法にて再生した器官原基とレシピエント組織とをガイドを介して連結させる、上皮組織間接続形成法（inter-epithelial tissue-connecting plastic method）を見出した。本発明者らは、この方法により、再生器官原基の極性の方向を確保し、かつ、移植後のレシピエント側との接着性の向上を図ることがで、再生した器官が適切にレシピエントと結合し機能的に再生できることを見いだした。

[0016] 即ち、本発明は、ガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法であって、間葉系細胞から実質的に構成される第1の細胞集合体と、上皮系細胞から実質的に構成される第2の細胞集合体とを密着させて支持体内部で培養することにより再生器官原基を調製する工程と、前記再生器官原基にガイドを挿入する工程とを含む、製造方法に関する。

ここで、本発明のガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法の一実施態様においては、ガイドを挿入する工程後、さらに数日、前記再生器官原基を培養する工程を含むことを特徴とする。

本発明のガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法の一実施態様においては、前記第1の細胞集合体と前記第2の細胞集合体のうち、少なくともいずれか一方が、再生対象の器官由来であることを特徴とする。

本発明のガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法の一実施態様においては、前記第1の細胞集合体および前記第2の細胞集合体が、ともに再生対象の器官由来であることを特徴とする。

本発明のガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法の一実施態様においては、前記再生器官原基が、上皮性付属器官原基であることを特徴とする。

本発明のガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法の一実施態様においては、前記再生器官原基が、再生毛包原基、再生汗腺原基、再生皮脂腺原基、再生唾液腺原基、再生乳腺原基、再生腎臓ネフロン原基、再生涙腺原基、および、再生内分泌腺原基からなる群より選択されるいずれか一つの器官原基であることを特徴とする。

本発明のガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法の一実施態様においては、前記再生器官原基が再生毛包原基であり、前記上皮系細胞がバルジ領域上皮細胞または毛母基底部上皮細胞であることを特徴とする。

本発明のガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法の一実施態様においては、前記再生器官原基が再生毛包原基であり、前記間葉系細胞が毛乳頭細胞または真皮毛根鞘細胞であることを特徴とする。

本発明のガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法の一実施態様においては、前記再生器官原基が再生唾液腺原基であり、前記上皮系細胞が唾液腺由来の上皮系細胞であり、前記間葉系細胞が唾液腺由来の間葉系細胞であることを特徴とする。

本発明のガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法の一実施態様においては、前記再生器官原基が再生涙腺原基であり、前記上皮系細胞が涙腺由来の上皮系細胞であり、前記間葉系細胞が涙腺由来の間葉系細胞であることを特徴とする。

本発明のガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法の一実施態様においては、前記ガイドが、化学繊維であることを特徴とする。

本発明のガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法の一実施態様においては、前記ガイドが、生体吸収性であることを特徴とする。

本発明のガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法の一実施態様においては、前記ガイドが、ナイロン系であることを特徴とする。

[0017] また、本発明の別の態様によれば、ガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法によって作製される、ガイドを有する移植用再生器官原基を含む組成物に関する。

また、本発明の別の態様によれば、ガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法により作製されたガイドを有する移植用再生器官原基を、対象の部位へ移植する工程を含む、移植用再生器官原基の移植方法に関する。

ここで、本発明のガイドを有する移植用再生器官原基の移植方法の一実施態様においては、前記ガイドを移植部位より突出した状態で維持することに

より、移植した再生器官原基の上皮系細胞側の部分と前記対象の上皮系細胞とがガイドに沿って伸長し、連結することを特徴とする。

また、本発明のガイドを有する移植用再生器官原基の移植方法の一実施態様においては、前記再生器官原基が、導管を有する器官の再生を目的とした器官原基であり、前記再生器官原基の移植時に、前記ガイドを前記対象部位に存在する導管内に挿入し、前記再生器官原基の上皮系細胞側の部分と前記導管とを連絡させることにより、前記再生器官原基の上皮系細胞側の部分がガイドに沿って伸長し、前記対象部位の導管と連結することを特徴とする。

発明の効果

[0018] 本発明によれば、再生器官原基の極性の方向を確保し、移植後のレシピエント側の上皮性組織に対して適切な方向性を保持したまま、接着を向上させることのできる移植用再生器官原基を提供することができる。また、本発明により作製される移植用再生器官原基は、ガイドを有しているため、移植時の操作を簡便にすることができ、移植時の深度や移植の方向等を簡便に調整することが可能である。

また、ガイドに沿って再生器官原基の上皮系細胞とレシピエント側の上皮層（上皮系細胞）とが連結することにより、特に毛包形成の過程においては、再生器官原基由来の嚢胞形成を阻止することができる。また、唾液腺のように、導管を有する外分泌腺等においては、上皮系細胞がガイドに沿って伸長しているため、レシピエント側の導管との連結効率を向上させることができる。

さらに、本発明により作製される再生器官原基は、毛包、汗腺、唾液腺等を含む上皮性付属器官に対して適用可能であり、体表面にかぎらず口腔内や腸管、あるいは内分泌組織のような内腔に管腔構造を介して接続する器官の再生にも適用可能である。これらの器官および組織の再生においても、適用できることから、皮膚付属器官のみならず、広く器官および組織再生医療に応用可能な技術を提供する。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]図1は、本発明の一実施形態である、マウス胎児上皮由来の上皮系細胞およびマウス胎児上皮由来の間葉系細胞を用いた移植用再生毛包原基の作製フローを示す模式図である。

[図2]図2は、マウス胎児上皮由来の上皮系細胞および間葉系細胞より作製した移植用再生毛包原基を、レシピエント上皮に移植した直後、3日目、および、10日目の状態を示す。上段は上皮の写真を示し、下段は移植部位の切片をHE染色し、蛍光顕微鏡で観察した結果を示す。

[図3]図3は、本発明の一実施形態である、マウス成体髭由来のバルジ領域上皮細胞およびマウス成体髭由来の培養乳頭細胞を用いた移植用再生毛包原基の作製フローを示す模式図である。

[図4]図4Aは、培養中の再生毛包原基にガイドを挿入した状態を示す。図4Bは、再生毛包原基移植直後の移植部位（矢印）を示す。図4Cは、移植後21日目の移植部位を示す。

[図5]図5は、マウス成体髭由来の再生毛包原基の移植により再生した、毛包の組織切片をHE染色した結果（上段）、および再生した毛包の組織切片のGFP蛍光を観察した結果（下段）を示す。

[図6]図6aは、本発明の一実施の形態であるマウス成体髭由来の移植用再生毛包を移植後、再生した再生髭の断面を光学顕微鏡により撮影した写真を示す。図6bは、再生髭の毛幹表面を電子顕微鏡により撮影した写真を示す。

[図7]図7は、本発明の一実施の形態である移植用再生毛包移植により発毛したマウス再生髭の移植後27日目、31日目、41日目、および46日目の状態を示す。個別の再生毛（識別した再生毛を矢印、矢尻で示す）の成長をそれぞれ追跡した。

[図8]図8は、再生髭の毛周期示すグラフであり、最初の発毛から3回目の発毛までの、それぞれの成長期および退行期の期間を示す。なお、コントロールは、マウスの天然髭をヌードマウス背部に移植し再発毛した後に追跡した3回の毛周期の平均を示す。

[図9]図9は、本発明の一実施形態である、マウス胎児顎下腺上皮組織由来の

上皮系細胞およびマウス胎児顎下腺間葉組織由来の間葉系細胞を用いた移植用再生唾液腺原基の作製フローを示す模式図である。図9中、摘出された顎下腺原基から分離した上皮系組織を上段の写真に示し、顎下腺原基より分離した間葉系組織を下段の写真に示す。図9中の作製した再生唾液腺原基を示す写真において、Eは上皮系細胞の細胞集合体を示し、Mは間葉系細胞の細胞集合体を示す。なお、図9に示すように、胎齢13.5日のマウス胎児からは、発生段階に差がある顎下腺原基が得られた（前記、中期、後期）。

[図10]図10は、マウス胎児より摘出した顎下腺と、マウス胎児顎下腺上皮組織由来の上皮系細胞およびマウス胎児顎下腺間葉組織由来の間葉系細胞を用いて作製した移植用再生唾液腺原基とを、器官培養した際の各時間（培養開始時、培養12時間後、培養24時間後、培養36時間後、培養48時間後、培養60時間後、培養72時間後）における唾液腺原基および再生唾液腺原基の状態を、光学顕微鏡により撮影した写真を示す。また、培養72時間後の再生唾液腺原基をH E染色した結果も示す。

[図11]図11は、マウス胎児顎下腺上皮組織由来の上皮系細胞およびマウス胎児顎下腺間葉組織由来の間葉系細胞を用いて作製した移植用再生唾液腺原基に、生体吸収性糸をガイドとして挿入し、60時間器官培養した際の、各時間経過時（培養12時間後、培養24時間後、培養36時間後、培養44時間後、培養60時間後）における再生唾液腺原基の状態を、光学顕微鏡により撮影した写真を示す。また、最下段の写真は、器官培養60時間後の再生唾液腺原基を示す。再生唾液腺原基の上皮細胞側は、ガイド糸に沿って移動・伸長し始め、導管様の構造を呈していた（矢印の部分）。

[図12]図12は、マウス胎児顎下腺上皮組織由来の上皮系細胞およびマウス胎児顎下腺間葉組織由来の間葉系細胞を用いて作製したガイドを有する移植用再生唾液腺原基を、成体マウスの耳下腺導管部へ移植する際の各工程（固定、耳下腺導管部の露出、耳下腺摘出、ゲルの固定、および、縫合）を示す写真である。また、図12中、e lは涙腺を示し、m aは咬筋を示し、pは耳下腺を示し、o dは脂肪組織を示し、p d耳下腺導管を示し、R Oは再生

顎下腺を示す。

[図13]図13の上段は、マウス胎児顎下腺上皮組織由来の上皮系細胞およびマウス胎児顎下腺間葉組織由来の間葉系細胞を用いて作製したガイドを有する移植用再生唾液腺原基の移植直前の状態、および、耳下腺を除去した成体マウスの耳下腺導管部へ移植した後34日目の状態を、光学顕微鏡により撮影した写真を示す。なお、図中、Aは移植した再生唾液腺原基より伸長した導管を示し、Bは移植した再生唾液腺原基を示し、pdは耳下腺を示す。また、図13の下段は、移植後34日後の再生顎下腺をH E染色した結果を示す。なお、図中の矢印は、漿液性腺房細胞様細胞を示す。

[図14]図14は、成体マウスに移植後30日目の再生唾液腺原基に対して、導管側より再生唾液腺原基へエバンスブルーを注入した際の写真を示す。また、図14中、Aは、エバンスブルーを注入した部位を示し、Bは、再生顎下腺の移植部位を示す。

[図15]図15は、唾液腺を全て除去した唾液腺欠損マウスと唾液腺を全て除去した後に本発明のガイドを有する再生唾液腺原基を顎下腺部位に移植したマウスとの、体重および生存率の推移の比較を示すグラフである。

[図16]図16は、本発明の一実施形態である、マウス胎児涙腺上皮組織由来の上皮系細胞およびマウス胎児涙腺間葉組織由来の間葉系細胞を用いた移植用再生涙腺原基の作製フローを示す模式図である。なお、左の写真は、胎齢16.5～17.5のマウス胎児より摘出した涙腺原基を実体顕微鏡下で撮影したものである。また、涙腺原基から分離した上皮系組織（中央上段の写真）と、涙腺原基から分離した間葉系組織（中央下段の写真）と、再構築させた再生涙腺原基（右の写真）を実体顕微鏡下で撮影したものも示す。

[図17]図17は、マウス胎児より摘出した涙腺原基と、マウス胎児涙腺上皮組織由来の上皮系細胞およびマウス胎児涙腺間葉組織由来の間葉系細胞を用いて作製した移植用再生涙腺原基とを、器官培養した際の各時間（培養開始時、培養1日後、培養2日後、培養3日後、培養4日後）における涙腺原基および再生涙腺原基の状態を、光学顕微鏡により撮影した写真を示す。

[図18]図 1 8 は、マウス胎児涙腺上皮組織由来の上皮系細胞およびマウス胎児涙腺間葉組織由来の間葉系細胞を用いて作製したガイドを有する移植用再生唾液腺原基の移植直前の状態、および、涙腺の腺房部分を除去した成体マウスの涙腺導管部へ移植した後、20日目の状態を、光学顕微鏡により撮影した写真を示す。なお、図中、Aは移植した再生唾液腺原基が生着した部分を示し、Bは眼の方向を示し、d t は、涙腺の導管を示す。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、この出願について、実施形態を詳しく説明する。

本発明に係る製造方法の第一の態様は、哺乳動物（例えば、ヒト）に移植するための移植用再生器官原基の製造方法であって、間葉系細胞と上皮系細胞とを器官培養することにより作製した培養中の再生器官原基へガイドを挿入する工程を含むことを特徴とする。

[0021] 本明細書において「間葉系細胞」とは、間葉組織由来の細胞及びその細胞を培養して得られる細胞を意味し、「上皮系細胞」とは、上皮組織由来の細胞及びその細胞を培養して得られる細胞を意味する。

また、本明細書において、「上皮性付属器官」とは、外胚葉由来または内胚葉由来の上皮細胞と、中胚葉または神経提由来の間葉系細胞との相互関係により形成される器官であり、例えば、内胚葉性上皮由来の器官や、外胚葉性付属器官、内分泌腺、導管を介して他の上皮組織と接続する外分泌腺等の器官を意味し、より具体的には、例えば、毛包、汗腺、涙腺、皮脂腺等の表皮付属器官や、口腔内、腸管、もしくは内分泌組織のような内腔に管腔構造を介して接続する器官を意味する。

また、本明細書において、「外胚葉性付属器官」とは、「上皮性付属器官」のうち、外胚葉由来の器官であり、毛包、汗腺、涙腺、皮脂腺等の表皮付属器官等を意味する。

[0022] 次に、本発明の方法に用いられる再生器官原基について説明する。

再生器官原基は、間葉系細胞から実質的に構成される第1の細胞集合体と、上皮系細胞から実質的に構成される第2の細胞集合体とを密着させて支持

体内部で培養する工程を含む方法によって作製することができる。

[0023] 「間葉系細胞から実質的に構成される第1の細胞集合体と、上皮系細胞から実質的に構成される第2の細胞集合体とを密着させて支持体内部で培養する工程」は、例えば、特許文献1乃至4及び特開2008-29757号公報に記載されており、それら各文献の開示は全体として本明細書に参照として組み込まれる。

なお、本明細書において、上記のような方法により、例えば、毛包原基を作製した場合には、作製された毛包原基を「再生毛包原基」という。

[0024] 上記第1の細胞集合体と第2の細胞集合体は、それぞれ実質的に間葉系細胞のみ、又は上皮系細胞のみで構成されている。「実質的に間葉系細胞のみで構成されている」とは、本発明において、ある細胞集合体が間葉系細胞のみから構成されている場合と同じ機能を果たすことを意味する。好ましくは、間葉系細胞となる細胞以外のものをできるだけ含まない状態をいう。また、間葉系細胞であれば、異なる種類の細胞を含んでいてもよい。「実質的に上皮系細胞のみからなる」という場合も同様である。

ここで、細胞集合体とは、細胞が密着した状態をいい、組織であっても、ばらばらの細胞から調製された細胞凝集塊であってもよい。組織を用いれば、細胞配置や形状の正しい器官が得られやすいという利点があるが、入手できる量に制約がある場合もある。細胞凝集塊の調製には、培養細胞も用いることができるので、培養細胞を用いる場合には、細胞集合体を比較的入手しやすく、少なくともその点においては好ましい。

[0025] 本発明に使用される、間葉系細胞と上皮系細胞の少なくとも一方は、再生対象の器官（当該器官に属する組織を含む）に由来することが好ましい。これにより、目的とする器官へ方向付けがすでに行われている細胞を用いて容易に器官を形成することができる。また、より確実に目的とする器官を製造するには、間葉系細胞と上皮系細胞とが、共に対象とする器官に由来することが最も好ましい。

[0026] 本発明の対象となる再生器官原基としては、上皮性付属器官の器官原基を

挙げることができるが、これに限定されず、例えば、再生毛包原基、再生汗腺原基、再生皮脂腺原基、再生唾液腺原基、再生乳腺原基、再生腎臓ネフロン原基、再生涙腺原基、再生内分泌腺原基等を挙げることができる。これらの再生器官原基を作製する場合には、対象の器官由来の間葉系細胞または上皮系細胞を用いることができ、また、未分化細胞の誘導により得られる間葉系細胞または上皮系細胞を用いることもできる。例えば、再生毛包原基を作製する場合には、間葉系細胞として、毛乳頭細胞や真皮毛根鞘細胞、発生期の皮膚間葉系細胞およびiPS細胞やES細胞から誘導した毛包間葉系細胞を用いることができ、上皮系細胞としては、バルジ領域の外毛根鞘最外層細胞や毛母基部の上皮系細胞およびiPS細胞やES細胞から誘導した毛包上皮系細胞を用いることができる。また、再生汗腺原基を作製する場合には、間葉系細胞として、発生期にある皮膚の間葉系細胞や毛包の真皮集塊細胞、iPS細胞やES細胞から誘導した皮膚の間葉系細胞を用いることができ、上皮系細胞としては、発生期にある皮膚の上皮系細胞やiPS細胞やES細胞から誘導した汗腺上皮系細胞を用いることができる。また、再生唾液腺原基を作製する場合には、間葉系細胞として、発生期にある唾液腺原基の間葉系細胞やiPS細胞やES細胞から誘導した唾液腺間葉系細胞を用いることができ、上皮系細胞として、唾液腺介在部の上皮系細胞やiPS細胞やES細胞から誘導した唾液腺上皮系細胞を用いることができる。また、再生涙腺原基を作製する場合には、間葉系細胞として、発生期にある涙腺原基の間葉系細胞やiPS細胞やES細胞から誘導した涙腺間葉系細胞を用いることができ、上皮系細胞としては、発生期にある涙腺原基の上皮系細胞やiPS細胞やES細胞から誘導した唾液腺上皮系細胞を用いることができる。

また、間葉系細胞及び上皮系細胞を採取する器官は、細胞の分化段階の幼若性と均質性の観点から、正常な成体内で再生する能力を保持しているものであることが好ましい。または、人為的な外科的操作や薬剤投与、遺伝子導入により再生可能となったものも使用することができる。

[0027] 再生対象の器官以外に由来する間葉系細胞として、生体内の他の間葉系組

織に由来する細胞を用いることもできる。好ましくは、血液細胞を含まない骨髓細胞や間葉系細胞、さらに好ましくは口腔内間葉系細胞や顎骨の内部の骨髓細胞、頭部神経堤細胞に由来する間葉系細胞、これらの間葉系細胞に分化しうる間葉系前駆細胞やその幹細胞等である。間葉系細胞として、羊膜由来細胞を用いる例が特許文献3に、全能性幹細胞を分化誘導した細胞を用いる例が特許文献4に記載されており、その開示は全体として本明細書に参照として組み込まれる。

[0028] 再生対象の器官以外に由来する上皮系細胞として、生体内の他の上皮系組織に由来する細胞を用いることもできる。好ましくは、皮膚や口腔内の粘膜や歯肉の上皮系細胞、さらに好ましくは皮膚や粘膜などの分化した、例えば角化した、あるいは錯角化した上皮系細胞に分化しうる未熟な上皮系前駆細胞、例えば非角化上皮系細胞やその幹細胞等である。口腔内上皮細胞やその初代培養細胞を上皮系細胞として用いる例が特許文献2に記載されており、その開示は全体として本明細書に参照として組み込まれる。なお、自家組織の利用の観点からは、移植対象の間葉系細胞および上皮系細胞又はこれらの細胞を含む組織を用いることが好ましい。

[0029] 再生器官原基を作製するための間葉系細胞および上皮系細胞又はこれらの細胞を含む組織は、哺乳動物の霊長類（例えばヒト、サルなど）、有蹄類（例えばブタ、ウシ、ウマなど）、小型哺乳類のげっ歯類（例えばマウス、ラット、ウサギなど）のほか、イヌ、ネコなど種々の動物等から採取することができる。間葉系細胞および上皮系細胞又はこれらの細胞を含む組織の採取は、通常、組織の採取で用いられる条件をそのまま適用すればよく、無菌状態で取り出し、適当な保存液に保存すればよい。

[0030] 再生対象の器官（当該器官に属する組織を含む）からの間葉系細胞及び上皮系細胞の調製は、例えば、まず周囲の組織から単離された器官（当該器官に属する組織を含む）を、形状に従って、間葉組織及び上皮組織に分離することによって行われる。この際、分離を容易に行うため酵素を用いてもよい。酵素としては、ディスパーゼ、コラゲナーゼ、トリプシン等、公知のもの

を挙げることができ、当業者は適宜好ましい酵素を使用することができる。

[0031] 本発明における細胞凝集塊は、間葉組織または上皮組織に由来する細胞が凝集したものを意味し、間葉組織又は上皮組織をばらばらに分散させて得た細胞、あるいは当該細胞の初代または継代培養によって得た細胞を凝集させて調製することができる。

[0032] 細胞を分散させるためには、ディスパーゼ、コラゲナーゼ、トリプシン等の酵素を用いてもよい。十分な細胞数を得るために、細胞凝集塊を調製する前に分散した細胞の初代または継代培養を行う場合、培養に用いられる培地としては、一般に動物細胞の培養に用いられる培地、例えばダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）等を用いることができる。細胞の増殖を促進するための血清を添加するか、あるいは血清に代替するものとして、例えばFGF、EGF、PDGF等の細胞増殖因子やトランスフェリン等の既知血清成分を添加してもよい。なお、血清を添加する場合の濃度は、そのときの培養状態によって適宜変更することができるが、通常10%前後とすることができる。細胞の培養には、通常の培養条件、例えば約37℃の温度で5%CO₂濃度のインキュベータ内での培養が適用される。また、適宜、ストレプトマイシン等の抗生物質を添加したものであってもよい。

[0033] 細胞を凝集させるためには、例えば、細胞懸濁液を遠心処理すればよい。間葉系細胞及び上皮系細胞の細胞凝集塊は、両者を密着させたときに確実に細胞同士が相互作用するよう、それぞれを高密度の状態にしておくことが好ましい。高密度の状態とは、組織を構成する際の密度と同等程度であることをいい、例えば、 5×10^7 個/ml $\sim 1 \times 10^9$ 個/ml、好ましくは 1×10^8 個/ml $\sim 1 \times 10^9$ 個/ml、最も好ましくは 2×10^8 個/ml $\sim 8 \times 10^8$ 個/mlである。細胞凝集塊を高密度にする方法は特に限定されないが、例えば、細胞を遠心処理によって凝集させ沈殿化する方法によって行うことができる。遠心処理は細胞の活性を損なわずに簡便に高密度化できるため好ましい。遠心処理は、 $300 \times g \sim 1200 \times g$ 、好ましくは $500 \times g \sim 1000 \times g$ の遠心力を与える回転数で3分間 ~ 10 分間行えばよい。

300×gよりも低い遠心処理では、細胞密度を十分に高くできなくなる傾向があり、一方、1200×gよりも高い遠心処理では、細胞が損傷を受ける場合がある。

[0034] 遠心分離によって高密度の細胞凝集塊を調製する場合には、通常、細胞を遠心分離するために用いられるチューブ等の容器に細胞の懸濁液を調製した後、遠心分離を行う。遠心分離後、沈殿物としての細胞を残して上清をできるだけ除去すればよい。このとき、目的とする細胞以外の成分（例えば、培養液、緩衝液等）は、細胞の容量と等量以下であることが好ましく、目的とする細胞以外の成分を含まないことが最も好ましい。このような高密度の細胞集合体を、後述する方法により支持担体内でお互いに密着させれば、細胞が緊密に接触し、細胞間相互作用が効果的に発揮される。

[0035] 支持担体としては、内部で細胞の培養が可能なものであれば特に限定されないが、例えば、ゲル状、繊維状、固体状のものが好ましく、かかる支持担体を用いることによって、さらに生体内で再生器官原基に過剰な圧力がかかるのを防ぐことができる。

本発明で用いられる支持担体としては、例えば、コラーゲン、アガロースゲル、カルボキシメチルセルロース、ゼラチン、寒天、ハイドロゲル、セルマトリクス（商品名）、メビオールゲル（商品名）、マトリゲル（商品名）、エラスチン、フィブリン、ラミニン、細胞外マトリクス混合物、ポリグリコール酸（PGA）、ポリ乳酸（PLA）、乳酸／グリコール酸共重合体（PLGA）等を挙げることができる。中でも、適切な硬さや保持力を有するコラーゲン、アガロースゲル、カルボキシメチルセルロース、ゼラチン、寒天、ハイドロゲル、セルマトリクス、メビオールゲル、マトリゲル、細胞外マトリクス混合物、エラスチン、フィブリン、ラミニンが好ましい。

例えば、支持担体は液状のものをを用い、再生器官原基を配置した後に硬化させてもよい。例えば培養用のディッシュ上にコラーゲンゲルドロップを作製し、コラーゲンドロップ内に再生器官原基を配置した後、37℃のCO₂インキュベータ内で培養することにより、コラーゲンをゲル化させることがで

きる。

[0036] 第1及び第2の細胞集合体を培養する目的で用いられる支持担体は、細胞が分散することなく、細胞集合体の密着状態を保持可能な保持力を備えていることが好ましい。密着した状態とは、上述した高密度の間葉系細胞及び上皮系細胞の細胞集合体が、間葉系細胞と上皮系細胞の接触面付近においても同程度の高さの密度を維持している状態を意味する。密着状態を保持可能な支持担体は、例えば、コラーゲンの場合、最終濃度 $2 \text{ mg/ml} \sim 3 \text{ mg/ml}$ の濃度、即ち J I S - K 6 5 0 3 - 1 9 9 6 に準拠した方法（12.7 mm 径のプランジャーで4 mm 押し下げるのに必要な荷重として測定）によって $120 \text{ g} \sim 250 \text{ g}$ のゼリー強度となる濃度での使用が適切な硬さを提供する。他の種類の支持担体においても、同様の評価方法によって同様の強度があれば本発明の支持担体として好ましく用いられる。また1種又は複数種の支持担体を混合することによって、目的とするゼリー強度に相当する硬さの支持担体を得てもよい。

[0037] 第1及び第2の細胞集合体を支持担体内に配置する方法は特に限定されないが、細胞集合体が細胞凝集塊である場合は、例えば上述した遠心分離で得られる沈殿物をマイクロシリンジ等で支持担体内に挿入して配置することができる。細胞集合体が組織である場合には、シリンジの針の先端などを用いて支持担体内の任意に位置に配置することができる。

[0038] 本発明において第1と第2の細胞集合体を支持担体に密着させて配置する方法は特に限定されないが、例えば、一方の細胞集合体を支持担体内に配置したあと、他方の細胞集合体をそれに押しつけるように配置することによって、両者を密着させることができる。より具体的には、支持担体内において上記シリンジの針の先端の位置を適宜変更することで一方の細胞集合体を他方の細胞集合体に押し付けることが可能である。なお、細胞集合体として上皮系組織又は間葉系組織を用いる場合には、当該組織が元々の器官（当該器官に属する組織を含む）においてそれぞれ間葉系組織又は上皮系組織と接触していた面を、他方の細胞集合体に接触するように配置することが好ましい。

。

また、配置した後に、支持担体を固化する工程を設けることも好ましい。これにより、細胞がさらに凝集して、より高密度な状態とすることができる。例えば、コラーゲンゲルの場合、培養温度下で数分～数十分間静置することによって固化することができる。このとき、細胞集合体内に細胞以外の成分が少なければ少ないほど、より高密度な状態が実現される。

[0039] 培養期間は、支持担体内部に配置された細胞数、細胞集合体の状態、培養の条件、動物種等によって異なり、当業者が適宜選択することができる。また、再生対象となる器官によっても、適宜変更することができる。

培養期間は、長くすることによって、再生器官原基の形成をより進行させることができる。所望の状態を得るために、例えば、6日以上、30日以上、50日以上、100日以上、又は300日以上培養してもよく、培養の途中で、培地や培養条件を変更することもできる。

例えば、再生毛包原基を移植した際に、機能的な毛髪を得るためには、再生毛包原基を少なくとも1日培養することが好ましく、2日以上培養することがより好ましい。

再生唾液腺原基や再生涙腺原基を移植し、機能的な唾液腺や涙腺を得る際にも、再生唾液腺原基または再生涙腺原基を少なくとも1日培養することが好ましく、2日以上培養することがより好ましい。

[0040] 支持担体内部における培養工程は、第1及び第2の細胞集合体を内包する支持担体を単独で培養してもよく、他の動物細胞等の存在下で培養してもよい。

支持担体を単独で培養する場合、培養条件は、一般的な動物細胞の培養に用いられる条件とすることができる。また、培養には、哺乳動物由来の血清を添加してもよく、またこれらの細胞の増殖や分化に有効であることが知られている各種細胞因子を添加してもよい。このような細胞因子としては、FGF、BMP等を挙げることができる。

[0041] 細胞集合体へのガス交換や栄養供給の観点、及び他の動物細胞との接触・

混入がなく、且つ全工程を *in vitro* で行うことができるという観点から、支持担体内部における培養を、器官培養とすることが好ましい。器官培養では、一般に、動物細胞の増殖に適した培地上に多孔性の膜をフロートさせ、その膜上に第1及び第2の細胞集合体を内包する支持担体を載置して培養を行う。ここで用いられる多孔性の膜は、0.3～5 μm 程度の孔を多数有するものであることが好ましく、例えば、セルカルチャーインサート（商品名）やアイソポアフィルター（商品名）を挙げることができる。

[0042] 上記のようにして、上皮系細胞および間葉系細胞より再生器官原基を構築した後、再生器官原基へガイドを挿入する。

[0043] 本発明に使用される「ガイド」とは、器官培養により構築した培養中の再生器官原基へ挿入し、再生器官原基の移植後に、再生器官原基の上皮系細胞側の部分とレシピエント側の上皮系細胞との連結を促進させることができるものであれば特に制限されず、例えば、ナイロン等のポリマーや合成又は天然の生体吸収可能なポリマーより作られた繊維、ステンレス等の金属繊維、炭素繊維、および、ガラス繊維等の化学繊維、ならびに天然の動物繊維や植物繊維等を挙げることができ、より具体的には、ナイロン糸やステンレス線等を挙げることができる。特に、再生毛包原基に対してガイドを使用する際は、生体由来の毛髪をガイドとして使用することもできる。また、本発明に使用されるガイドは、中空糸の形状とすることもできる。ガイドの直径および長さは、再生対象となる器官により適宜設計することができる。例えば、再生毛包原基に対して使用するガイドであれば、その直径は、5～100 μm とすることが好ましく、20～50 μm とすることがより好ましい。また、再生毛包原基に対して使用するガイドであれば、その長さは、1～10 mm とすることが好ましく、4～6 mm とすることがより好ましい。

また、再生唾液腺原基のように、移植時にレシピエント側の導管へガイドを挿入する必要がある場合には、例えば、ガイドの直径を5 μm ～60 μm とすることが好ましく、20 μm ～40 μm とすることがより好ましい。また、ガイドの長さは、1 mm～6 mm とすることが好ましく、2 mm～3 mm

mとすることがより好ましい。さらに、導管へガイドを挿入しやすいように表面が滑らかであり、また、組織を傷つけない程度の固さを保持するガイドが好ましい。このようなガイドとしては、ブレードのようなマルチフィラメントよりも、モノフィラメントの素材が好ましい。

[0044] ガイドの挿入は、再生器官原基となる細胞集合体の構造、特に上皮系細胞と間葉系細胞との接触面を壊さず、また、上皮系細胞面分と間葉系細胞面分とを垂直に貫くように、再生器官原基となる細胞塊の上皮系細胞側より挿入する。

また、再生器官原基となる細胞塊へのガイドの挿入は、器官培養開始直後、すなわち、上皮系細胞と間葉系細胞との細胞集合体を培地内へ配置した後すぐに挿入することができる。また、再生毛包原基の上皮系細胞は器官培養により細胞接着により強度を増すことから、ガイドの素材強度（たとえばステンレス線などを用いたり）とガイドの先端を鋭利とする等により貫通力を増すことで、培養開始後1～2日目に挿入することもできる。ガイド挿入のタイミングを、器官原基作成直後とすることにより、ナイロン糸などの生体に対する異物応答が低くフレキシブルな素材を用いることができる点で好ましい。

[0045] また、再生器官原基へガイドを挿入した後は、再生器官原基を、ガイドが挿入された状態で培養することができる。ガイド挿入後の培養期間は、再生対象となる器官により適宜設定することができるが、例えば、再生毛包原基を作製する場合には、1～4日間培養することが好ましく、1.5～2日間培養することがより好ましい。なお、ガイド挿入後、2日間培養することにより、ガイドと再生器官との接着が強くなり、移植時に容易にはずれることがなくなる。また、ガイド挿入後の培養により、上皮系細胞側の再生器官原基を、ガイドに沿って伸長させることができ好ましい。このような伸長は、再生器官原基移植後に、再生器官原基の上皮系細胞側の部分とレシピエントの上皮系細胞との自律的な接着の効率および安定性を向上させることができる。

[0046] また、本発明の別の態様によれば、本発明の製造方法により作製されたガイドを有する移植用再生器官原基は、対象となる部位に移植することができる。

ガイドを挿入した移植用再生器官原基は、当業者に公知の方法で対象とする部位に移植することができる。例えば、再生毛包原基を移植する際には、シャピロ式植毛術やチョイ式植毛器を用いた植毛、空気圧を利用したインプランター等を使用し、移植することができる。シャピロ式植毛術とは、移植部位をマイクロメス等で移植創を作った後に、ピンセットを用いて移植する方法である。このような植毛術を適用する際には、本発明により提供される移植用再生器官原基がガイドを有しているため、ガイドを摘むことにより、再生毛包原基を直接触れることなく操作可能であり、簡便に操作することができる。

[0047] 再生器官原基の移植深度としては、再生対象となる器官により適宜変更することができる。例えば、再生毛包原基を移植する際には、0.05～5 mmとすることが好ましく、0.1～1 mmとすることがより好ましく、0.3～0.5 mmとすることが最も好ましい。特に、再生毛包原基をレシピエントに移植する際には、真皮層内に移植することが好ましく、さらに好ましくは、毛包形成およびその後の発毛効率の優れた真皮・皮下組織の境界面より上方とすることが好ましい。また、移植創上端部に再生毛包原基の上皮系細胞成分の上端部が露出するよう移植深度を調節すると、さらにレシピエントの上皮系細胞との連続性を高めることができ好ましい。

また、例えば、再生唾液腺原基の移植時のように、レシピエント側の導管へガイドを挿入する必要がある器官原基を移植する際には、レシピエント側の導管を長く保存しておくことで、移植後にガイドが抜けるのを防ぐことができ好ましい。また、栄養供給の向上の観点からも、移植部位を大静脈の近くとすることが好ましい。その際、レシピエント側の導管を長く保存しておくことで、移植部位を調節しやすくなる。

また、再生器官原基を移植後は、ガイドが抜けないように皮膚接合用のテ

ープやバンド、縫合等により、ガイドと移植対象部位とを固定することもできる。

[0048] ガイドは、再生器官原基を移植後しばらくしてレシピエント側の上皮系細胞と、再生器官原基の上皮系細胞由来の側との連続性が確保された後、移植部位より抜くことができる。再生器官原基により適宜設定することができるが、例えば、再生毛包原基を移植した際には、移植後3日～7日で移植部位から抜くことが好ましい。または、ガイドが、自然と移植部位より抜けるまで放置することもできる。生体吸収性の材料のガイドは、自然と移植部位より抜けるか、分解・吸収されるまで放置することができる。特に、再生唾液腺原基のように、移植後、ガイドが再生器官原基とともにレシピエントの皮下に埋まる場合には、生体吸収性のガイドを用いることが好ましい。

[0049] このように、移植用の再生器官原基へガイドを保持させることにより、再生器官原基の上皮系細胞由来の細胞が、ガイドに沿って伸長する。これにより、移植後のレシピエント側の上皮系細胞と再生器官原基の上皮系細胞側との連続性を向上させることができる。特に、毛包や汗腺のように、ガイドが移植部位の表皮より外に維持される場合には、レシピエント側の上皮系細胞が、異物を排除するように、ガイドに沿って移植部位の内側へ伸長するため、連続性をさらに向上させることができる。また、ガイドの挿入により、培養中の再生器官原基において、上皮系細胞および間葉系細胞との極性の維持も向上させることができ好ましい。これにより、再生器官形成の効率を高めるとともに、移植時の方向づけを容易にすることができる。特に、再生毛包原基へガイドを使用した場合には、再生毛包原基とレシピエント側の上皮系細胞との連続性を確保できる上、意図した方向へ毛包形成を促すことができる。その結果、再生毛包原基からの発毛率を向上させることができるとともに、発毛方向の制御も可能となる。

[0050] なお、本明細書において用いられる用語は、特定の実施態様を説明するために用いられるのであり、発明を限定する意図ではない。

また、本明細書において用いられる「含む」との用語は、文脈上明らかに

異なる理解をすべき場合を除き、記述された事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを意図するものであり、それ以外の事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを排除しない。

異なる定義が無い限り、ここに用いられるすべての用語（技術用語及び科学用語を含む。）は、本発明が属する技術の当業者によって広く理解されるのと同じ意味を有する。ここに用いられる用語は、異なる定義が明示されていない限り、本明細書及び関連技術分野における意味と整合的な意味を有するものとして解釈されるべきであり、理想化され、又は、過度に形式的な意味において解釈されるべきではない。

本発明の実施態様は模式図を参照しつつ説明される場合があるが、模式図である場合、説明を明確にするために、誇張されて表現されている場合がある。

第一の、第二のなどの用語が種々の要素を表現するために用いられるが、これらの要素はそれらの用語によって限定されるべきではないことが理解される。これらの用語は一つの要素を他の要素と区別するためのみに用いられているのであり、例えば、第一の要素を第二の要素と記し、同様に、第二の要素は第一の要素と記すことは、本発明の範囲を逸脱することなく可能である。

[0051] 以下において、本発明を、実施例を参照してより詳細に説明する。しかしながら、本発明はいろいろな態様により具現化することができ、ここに記載される実施例に限定されるものとして解釈されてはならない。

実施例

[0052] (I. 再生毛包の作製)

1. 材料と方法

(1) 実験動物

7-8週齢のC57BL/6マウス（日本クレア）およびC57BL/6-*TgN* (*act-EGFP*) マウスより毛包を採取した。また、胎齢18.0-18.5日齢のC57BL/6-*TgN* (*act-EG*

F P) マウス (S L C) より、体毛原基を含む皮膚を採取した。また、下記実験手法により作製した再生毛包原基は6－8週齢のB a l b / c n u / n u マウス (S L C) に移植した。動物の飼育および実験は、関連法規、省令、および指針を遵守し、東京理科大学動物実験倫理審査会の承認のもとに実施した。

[0053] (2) 毛乳頭細胞の培養

C 5 7 B L / 6 の E G F P マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後に、毛球部を傷つけないように頬部皮膚全層および皮下組織を採取した。頬髭周囲の皮下組織を除去した後に、毛包を分離した。成長期 I－I V 期の頬髭毛包を選択し、25 G 注射針を用いてコラーゲン鞘を取り除き、毛包を露出させた。毛球部を分離し、毛乳頭を摘出した。摘出した毛包および毛乳頭は、10%牛胎児血清と1%ペニシリン・ストレプトマイシン溶液を含むDMEM培地 (DMEM 10) 中で保存した。分離した毛乳頭は、3.5 cm 培養プラスチックディッシュ (日本ベクトン・ディッキンソン) に播種し、10 ng / ml の F G F 2 (和光純薬) を含むDMEM 10にて、5% C O 2、37℃、湿度95%環境下にて初代培養を行った。初代培養毛乳頭細胞は4日目および8日目に培地交換し、9日間培養したのちに使用した。初代培養毛乳頭細胞は、P B S (－) で3回洗浄した後に、0.05%トリプシンを含む10 mM E D T A 溶液 (G I B C O) で剥離し、DMEM 10でトリプシン中和し、十分洗浄した後に氷温下で使用時まで保存した。

[0054] (3) 毛包バルジ上皮細胞の取得

摘出した頬髭組織より、25 G 注射針を用いてコラーゲン鞘を取り除き、バルジ領域に細分化した。バルジ領域組織は終濃度4.8 U / ml の D i s p a s e I I (B e c t o n D i c k s o n) 及び100 U / ml の C o l l a g e n a s e (W o r t h i n g t o n, L a k e w o o d, N J) 溶液にて37℃で4分間反応させ、その後、25 G 注射針を用いて外科的にバルジ領域上皮組織とバルジ周囲の間葉組織に分離した。分離したバルジ領域上皮組織は0.05% T r y p s i n (I n v i t r o g

en, Carlsbad, US) でインキュベータにて1時間酵素処理を行い、 $35\mu\text{m}$ poreセルストレイナーを通して単一化細胞とした。また、(2) で得た培養毛乳頭細胞は0.05% Trypsin (Invitrogen, Carlsbad, US) にて回収し、 $35\mu\text{m}$ poreセルストレイナーを通して単一化細胞とした。

[0055] (4) 再生毛包原基の作製と器官培養

再生毛包原基は器官原基法に従って作製した。以下に手順の詳細を記載する。取得したバルジ領域上皮組織由来の単一化バルジ領域細胞と培養毛乳頭細胞とを、シリコングリースを塗布した1.5mlマイクロチューブ (エッペンドルフ) にそれぞれ別々に移し、遠心分離により沈殿として回収し、遠心後の培養液の上清をGELoader Tip 0.5-20ml (エッペンドルフ) を用いて完全に除去した。次に、シリコングリース (東レ・ダウコーニング) を塗布したペトリディッシュ上にCellmatrix type I-A (Nitta gelatin, Osaka, Japan) を30ml滴下してコラーゲンゲルドロップを作製し、上記にて調製した培養毛乳頭細胞を0.1-10mlのピペットチップ (Quality Scientific plastics) を用いて、0.2ml程度注入し細胞凝集塊を作製した。続いて、同ゲルドロップ内へ、上記にて調製したバルジ領域上皮細胞を0.1-10mlのピペットチップ (Quality Scientific plastics) を用いて、培養毛乳頭細胞の凝集塊に密着させるように0.2ml程度注入し細胞凝集塊を作製した。さらに培養毛乳頭細胞とバルジ領域上皮細胞との細胞凝集塊のバルジ領域上皮細胞側より、全長5mmのナイロン糸 (松田医科工業) を、細胞凝集塊の構造 (特に上皮細胞と間葉系細胞との接触面) を壊さず培養毛乳頭細胞の細胞面分とバルジ領域上皮細胞面分との接触面を垂直に貫くように実体顕微鏡下で確認のうえで挿入し、その後37℃にて5分間静置し、ゲルドロップを固化させることにより、上皮系細胞と間葉系細胞の結合をより強固にすることでガイドを有する再生毛包原基を作製した。

[0056] (5) 胎児皮膚上皮細胞および間葉系細胞の取得

胎齢18.0-18.5日齢のEGFPマウス胎児より背部皮膚を採取し、中尾等が報告した方法(Nakao K et al., Nat. Methods, 4(3), 227-30, 2007)を一部改変し、ディスパーゼ処理を1時間、4℃、55 rpm震とう条件で行い、上皮層と真皮層を分離した。真皮層をさらに、37℃で40分間の100 units/mlのコラゲナーゼI処理を2回行い、その後、単一化処理を行い、間葉系細胞を取得した。また、上皮層を37℃で40分間100 units/mlのコラゲナーゼI処理を2回行って、混入している間葉系細胞を除去し、さらに100 units/mlのコラゲナーゼIを含む0.25%トリプシン溶液で37℃、10分間処理し、その後、単一化処理を行い、上皮系細胞を取得した。

また培養毛乳頭細胞の代わりに胎児皮膚間葉細胞をコラーゲンゲルドロップ中に注入し、かつ、バルジ領域細胞の代わりに胎児皮膚上皮細胞をコラーゲンゲルドロップ中の胎児皮膚間葉細胞塊に密着するように注入することにより、(4)に記載の方法と同様の方法により、ガイドを有する胎児皮膚間葉細胞と胎児皮膚上皮細胞との細胞凝集塊を作製した。

[0057] ゲル中で作製した上皮系細胞と間葉系細胞との細胞凝集塊は、DMEM 10を1ml加えた6well Plate (ベクトン・ディッキンソン)にセットした0.4ml pore sizeのCell Culture Insert (ベクトン・ディッキンソン)上にコラーゲンゲルごと移して37℃、5%CO₂、湿度95%条件下にて2日間器官培養を行い、再生毛包原基を作製した。

[0058] (6) 再生毛包原基のヌードマウス皮内移植

胎児皮膚上皮細胞および間葉細胞より作製した再生毛包原基と、成体髭由来のバルジ領域上皮細胞および培養乳頭際細胞より作製した再生毛包原基とを、下記のようにして、ヌードマウスの皮内へ移植した。

ヌードマウスを定法に従ってペントバルビタール麻酔を行い、背部をイソ

ジン消毒した後に自然横臥位をとらせた。Vランスマイクロメス（日本アルコン）を用いて穿刺し、皮膚表皮層から真皮層下層部に至る移植創を形成した。移植創は体表面より垂直方向に約400 μ mの深度までとし、水平方向は約1mm程度とした。ナイロン糸製ガイド（8-0ナイロン縫合糸相当、長さ約5mm）を挿入した再生毛包原基よりコラーゲンを除去し、移植創の体表側に上皮系細胞成分が向くように、先鋭ピンセットNo. 5（夏目製作所）を用いて挿入した。移植創上端部に再生毛包原基の上皮系細胞成分の上端部が露出するよう移植深度を調節し、ナイロン糸製ガイドが体表面に露出するように位置させた。ナイロン糸製ガイドを移植創に近接した皮膚表面にステリストリップ（スリーエム）で固定し、その後、ナースバンおよびサージカルテープ（スリーエム）で移植創を保護した。移植後5-7日で保護テープを除去し、ナイロン糸製ガイドを移植部位に残存させ、1日後に残存している場合は抜去した。移植物の生着を目視または蛍光実体顕微鏡で判定した後に経過観察を行った。

[0059] （7）発毛経過観察および組織学的分析

再生毛包原基の移植部位を目視および蛍光実体顕微鏡にて観察し、発毛を評価した。発毛後に、定期的な写真撮影にて毛成長と退行を評価した。採取した組織はマイルドホルム10N（和光純薬）で固定した後に、定法に従ってパラフィン包埋ブロックまたは凍結ブロックとした。連続切片を作製し、HE染色またはHoechstによる蛍光核染色を施し、組織学的解析を行った。

[0060] 2. 結果

（1）再生毛包原基の皮内移植による発毛

皮内移植した再生毛包原基の移植位置を解析するために、胎齢18.5日齢のマウス皮膚細胞より再生毛包原基を作製し、ヌードマウス皮膚内に移植した。移植後に皮膚を摘出し、パラフィン切片を作製してHE染色を行った。その結果、移植位置は皮膚真皮層内であり、体表面よりの深度は平均393 μ mであった。移植直後、移植後3日目、および10日目の結果を図2に示

す。図2に示すように、皮膚内に再生毛包原基を移植した際には、ガイドが体表面より突出した状態でガイドを固定していた（Day 0の上段の写真、矢印はガイドを示す）。また、移植時には、再生毛包原基とレシピエント上皮とは接続していなかった（図2中、Day 0の下段のHE染色した切片の写真）。移植後3日目までに再生毛包原基の上皮成分と、レシピエント皮膚表皮層はガイドを介して接続していた（図2中、Day 3の下段のHE染色した切片の写真、矢印は接続した部分を示す）。移植後10日までに毛包を再生し、平均14日で体表面より再生毛が発毛し（図2中、Day 10）、その発毛頻度は90%であった。

また、同様の移植深度となるように成体頬髭由来の再生毛包原基をヌードマウス背部へ移植した結果を図4に示す。図4Aは、再生毛包原基へガイドを挿入した写真を示し、Eは、バルジ領域上皮細胞由来の部分を示し、DPは、培養乳頭細胞由来の部分を示し、Gはガイドを示す。図4Bは、移植部位を蛍光実体顕微鏡で追跡した写真を示す。成体髭由来の再生毛包原基を移植したところ、移植後平均21日で再生毛が体表面より発毛した（図4C）。また、その発毛頻度は74%であった。

[0061] (2) 再生毛包の組織分析

再生した毛包を採取し、組織分析を行った。結果を図5に示す。左の弱拡大顕微鏡像中の四角い枠の部分を拡大したものが、写真中央および右である。再生毛包はGFP蛍光により周辺のヌードマウス毛包と識別された（図5の左下の写真）。再生した毛包の上皮組織はレシピエント皮膚表皮層と連結し、連結部の表皮基底層はレシピエント由来細胞が優性であった。また、再生毛上部の拡大写真において、皮脂腺の再生が確認された（図5の中央の上下の写真において、矢印の部分）。皮脂腺は再生毛包原基由来とレシピエント細胞由来が混在していたが、再生毛包の皮脂腺より下方は移植した再生毛包原基由来であった。さらに、図5の右側の写真は毛球部を示すが、右下の写真において、毛乳頭（DP）部位におけるGFPの蛍光を確認できたことから、毛乳頭は移植した再生毛包原基由来であることが示された。このよう

に、再生毛包は組織学的に正常な毛包構造を示し、また、成体頬髭由来の再生毛包は体毛より明らかに大型であった。

[0062] (3) 再生毛幹の分析

胎児体毛由来の再生毛は100%黒色毛であり、成体頬髭由来の再生毛は95.5%が白色毛であった。図6は、光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡により観察した写真を示す。点線部内には髭様硬毛に特徴的な螺旋状の毛髄(M)が認められ(図6a)、かつ、正常な頬髭と同等なキューティクル構造を認めた(図6b)。このように、再生髭は天然毛と同等の毛髄と皮質を呈し、明らかな髭状を呈していた。

[0063] (4) 再生毛の毛周期

再生髭の毛幹成長と退行を追跡したところ、毛周期の進展に伴い退行し脱毛した毛穴部位より新たな毛幹が成長していた(図7)。また、その毛周期の期間は天然髭の毛周期と同等であり、有意差は認められなかった(図8)。この結果より、再生毛は毛周期を経てもレシピエント表皮層との連結を保持し、毛成長と退行を繰り返すことが明らかとなった。

[0064] (I I. 再生唾液腺の作製)

(1) 再生唾液腺原基の作製および器官培養

唾液腺の再生を目的として、器官原基法を用いた唾液腺原基の作製を行なった。

胎齢13.5~14.5日のC57BL/6マウス胎仔から顎下腺原基を外科的に摘出した。摘出した顎下腺原基を終濃度50U/mlのDispase II(Becton Dickinson)溶液にて、25℃で1.5分間反応させ、その後、25G注射針を用いて顎下腺上皮組織と顎下腺間葉組織に分離した。さらに、間葉組織は終濃度50U/mlのCollagenase(Worthington, Lakewood, NJ)溶液と終濃度0.25%のTrypsin(Invitrogen, Carlsbad, US)溶液で37℃温浴にて10分間酵素処理を行い、22μporeセルストレイナーを通して、完全に単一化された間葉系細胞を取得した。上

皮組織は終濃度100U/mlのCollagenase (Worthington, Lakewood, NJ) 溶液で37℃温浴にて15分間の酵素処理を2回行った後、終濃度0.25%のTrypsin (Invitrogen, Carlsbad, US) 溶液で37℃温浴にて5分間酵素処理を行い、22µm poreセルストレイナーを通して、完全に単一化された上皮系細胞を取得した。

得られた上皮系細胞と間葉系細胞とを用いて、器官原基法により、コラーゲングル中に再成唾液腺原基を作製した (図9)。以下に手順の詳細を記載する。取得した単一化上皮系細胞と単一化間葉系細胞とを、シリコングリースを塗布した1.5mlマイクロチューブ (エッペンドルフ) にそれぞれ別々に移し遠心分離にかけた。遠心分離後の培養液の上清をGELoader Tip 0.5-20ml (エッペンドルフ) を用いて完全に除去し、沈殿として単一化上皮系細胞および単一化間葉系細胞をそれぞれ回収した。次に、シリコングリース (東レ・ダウコーニング) を塗布したペトリディッシュ上にCellmatrix type I-A (Nitta gelatin, Osaka, Japan) を30µl滴下してコラーゲングルドロップを作製し、上記にて調製した単一化間葉系細胞を0.1-10mlのピペットチップ (Quality Scientific plastics) を用いて、0.3µl程度注入し細胞凝集塊を作製した。続いて、同グルドロップ内へ、上記にて調製した単一化上皮系細胞を0.1-10mlのピペットチップ (Quality Scientific plastics) を用いて、間葉系細胞の凝集塊に密着させるように0.2µl程度注入し、顎下腺原基由来の上皮系細胞と間葉系細胞との細胞凝集塊を作製した。

[0065] ゲル中で作製した顎下腺原基由来の上皮系細胞と間葉系細胞との細胞凝集塊は、DMEM10を1ml加えた6well Plate (ベクトン・ディッキンソン) にセットした0.4ml pore sizeのCell Culture Insert (ベクトン・ディッキンソン) 上にコラ

ーゲングルごと移して37℃、5%CO₂、湿度95%条件下にて器官培養を行い、再生唾液腺原基を作製した。

[0066] 再成唾液腺原基を器官培養したところ、培養開始から24時間後に上皮系細胞が間葉系細胞側に陥入し始めている様子が観察された(図10)。なお、図10の上段の写真は、胎児マウスより摘出した顎下腺を、摘出したままの状態にて器官培養した際の各経過時間における状態を示し、図10の下段の写真は、器官原基法により構築した再生唾液腺原基を器官培養した際の各経過時間における状態を示す。ヘマトキシリン-エオジン染色(HE染色)により解析したところ、培養開始から72時間後には陥入した上皮組織の先端が分岐している様子が認められた(図10)。

上記の結果より、器官原基法を用いることで再成唾液腺原基の作製が可能であることが示された。

なお、図9に示すように、胎齢13.5日のマウス胎児からは、発生段階に差がある顎下腺原基が得られたが(図9中の前記、中期、後期の写真参照)、いずれの発生段階における顎下腺原基からも、上記の方法により、上皮系細胞および間葉系細胞から再構築した再生唾液腺原基を作製することができた。

[0067] (2) ガイド糸付き再生唾液腺原基の作製

上記(1)方法で作製した再成唾液腺原基に対して、上皮系細胞側より、全長約3mmの生体吸収性糸(グンゼ社製)を、再生唾液腺原基の構造(特に上皮系細胞と間葉系細胞との接触面)を壊さず上皮系細胞部分と間葉系細胞部分との接触面を垂直に貫くように、実体顕微鏡下で確認のうえで挿入した。ガイド挿入後は、60時間器官培養を行なった。

[0068] その結果、器官培養開始から24時間を経過したあたりから、再生唾液腺原基の上皮細胞側がガイド糸に沿って移動・伸長し始め、培養開始から60時間後には、導管様の構造を呈している様子が観察された(図11。最下段の写真中の矢印は、導管様構造を示す)。

[0069] (3) 再成唾液腺原基の耳下腺導管部への移植

外科的に、成体マウスの耳下腺の腺房部分を除去し、耳下腺へ連結していた導管部分を露出させた。次に、上記（２）の方法で作製した、２日間器官培養したガイドを有する再生唾液腺原基をコラーゲンゲルとともに、耳下腺導管部へ移植した。移植の際、導管の切断面と再生唾液腺原基の上皮組織とが近接するようにガイド糸の位置を調製し、レシピエント側の耳下腺導管にガイドを挿入した。また、移植した再生唾液腺原基が動かないように再生唾液腺原基を含むコラーゲンゲルと咬筋を8-0ナイロン縫合糸（ベアーメディック、千葉、日本）で縫合した（図１２）。

[0070] 移植後３０日目の再生唾液腺原基をＨＥ染色により組織学的に評価した。ＨＥ染色像より、再生唾液腺原基において、天然の顎下腺と同様に導管細胞や漿液性腺房細胞様の細胞が認められた（図１３。図１３の下段の写真中、矢印は、漿液性腺房細胞様細胞を示す）。

このように、再生器官原基法により唾液腺を再構築することができた。また、顎下腺由来の再生唾液腺原基であっても、別の唾液腺である、耳下腺部位において、顎下腺を再構築すること可能であった。

[0071] （４）再生唾液腺の唾液分泌経路の評価

顎下腺由来の再生唾液腺原基と成体マウスの耳下腺導管が結合し、唾液分泌経路が保持されていることを明らかにすることを目的とし、再生唾液腺原基の移植後３０日目において、外科的手法により、移植部位および耳下腺導管を露出させ、再生唾液腺原基の移植部位よりも口腔側の導管から再生唾液腺原基に向けてエバンスブルー溶液をマイクロインジェクションにより注入した。

[0072] その結果、実体顕微鏡での観察より、注入されたエバンスブルー溶液は、耳下腺導管を通り、移植された再生唾液腺原基へと流入している様子が観察された（図１４）。このことより、再生唾液腺と耳下腺導管とは結合し、唾液の分泌経路が保持されていることが示唆された。

また、唾液腺を全て除去した唾液腺欠損マウスと、唾液腺を全て除去した後にガイドを有する再生唾液腺原基を顎下腺部位に移植したマウス（移植マ

ウス)との、体重および生存率の推移の比較したところ、唾液腺欠損マウスは、唾液腺摘出日より日を追うごとに体重が減少し続けたのに対して、移植マウスは、移植後約3、4日目から、次第に体重が回復し、約6日目には、ほぼ正常な体重まで回復した(図15)。また、唾液腺欠損マウスは、唾液腺摘出日より4日目以降において生存率が20%以下であったのに対して、移植マウスでは、移植日より4日目以降において約70%の生存率を示した(図15)。

[0073] (111. 再生涙腺の作製)

(1) 再生涙腺原基の作製および器官培養

涙腺の再生を目的として、器官原基法を用いて再生涙腺原基の作製を下記のように行なった。

胎齢16.5~17.5日のC57BL/6マウス胎仔から涙腺原基を外科的に摘出した。摘出した涙腺原基を終濃度50U/mlのDispase II (Becton Dickinson)溶液にて、25℃で1.5分間反応させ、その後、25G注射針を用いて涙腺上皮組織と涙腺間葉組織に分離した。さらに、間葉組織は終濃度50U/mlのCollagenase (Worthington, Lakewood, NJ)溶液と終濃度0.25%のTrypsin (Invitrogen, Carlsbad, US)溶液で37℃温浴にて10分間酵素処理を行い、22μm poreセルストレイナーを通して、完全に単一化された間葉系細胞を取得した。上皮組織は終濃度100U/mlのCollagenase (Worthington, Lakewood, NJ)溶液で37℃温浴にて15分間の酵素処理を2回行った後、終濃度0.25%のTrypsin (Invitrogen, Carlsbad, US)溶液で37℃温浴にて5分間酵素処理を行い、22μm poreセルストレイナーを通して、完全に単一化された上皮系細胞を取得した。

得られた上皮系細胞と間葉系細胞とを用いて、器官原基法により、コラーゲンゲル中に再成涙腺原基を作製した。以下に手順の詳細を記載する。取得

した単一化上皮系細胞と単一化間葉系細胞とを、シリコングリースを塗布した1.5 mlマイクロチューブ（エッペンドルフ）にそれぞれ別々に移し遠心分離にかけた。遠心分離後の培養液の上清をGELoader Tip 0.5-2.0 ml（エッペンドルフ）を用いて完全に除去し、沈殿として単一化上皮系細胞および単一化間葉系細胞をそれぞれ回収した。次に、シリコングリース（東レ・ダウコーニング）を塗布したペトリディッシュ上にCellmatrix type I-A（Nitta gelatin, Osaka, Japan）を30 μ l滴下してコラーゲンゲルドロップを作製し、上記にて調製した単一化間葉系細胞を0.1-1.0 mlのピペットチップ（Quality Scientific plastics）を用いて、0.3 μ l程度注入し細胞凝集塊を作製した。続いて、同ゲルドロップ内へ、上記にて調製した単一化上皮系細胞を0.1-1.0 mlのピペットチップ（Quality Scientific plastics）を用いて、間葉系細胞の凝集塊に密着させるように0.2 μ l程度注入し、涙腺原基由来の上皮系細胞と間葉系細胞との細胞凝集塊を作製した（図16）。

[0074] ゲル中で作製した涙腺原基由来の上皮系細胞と涙腺原基由来の間葉系細胞との細胞凝集塊は、DMEM10を1 ml加えた6 well Plate（ベクトン・ディッキンソン）にセットした0.4 ml pore sizeのCell Culture Insert（ベクトン・ディッキンソン）上にコラーゲンゲルごと移して37℃、5%CO₂、湿度95%条件下にて器官培養を行い、再生涙腺原基を作製した。

[0075] 再生涙腺原基を器官培養したところ、胎児より摘出した涙腺原基と同様に、培養開始から24時間後に上皮系細胞が間葉系細胞側に陥入し始めている様子が観察された（図17）。この結果より、器官原基法を用いることで再生涙腺の作製が可能であることが示された。

[0076] （2）ガイド糸付き再生涙腺原基の作製と移植

上記（1）の方法で作製した再生涙腺原基に対して、上皮系細胞側より、

全長約3 mmの生体吸収性糸（グンゼ社製）を、再生唾液腺原基の構造（特に上皮系細胞と間葉系細胞との接触面）を壊さず上皮系細胞部分と間葉系細胞部分との接触面を垂直に貫くように、実体顕微鏡下で確認のうえで挿入した。ガイド挿入後は、2日間器官培養を行なった。

器官培養を行った後、成体マウスの涙腺の腺房部分を除去して導管部分を露出させ、再生唾液腺原基を移植する場合と同様の方法で、再生涙腺原基を涙腺導管部へ移植した。

[0077] その結果、移植20日後の再成涙腺原基を確認すると、移植部位で生着し、大きく成長している様子が確認された（図18）。また、目視により天然涙腺導管と再成涙腺原基が繋がっていることが確認された。

[0078] 以上詳しく説明した通り、この出願の発明によるガイドを有する再生器官原基はレシピエント側の上皮系細胞と確実に連結し、移植後に機能を有する再生器官となった。特に、再生毛包原基においては、高い頻度で体表面より発毛することが明らかとなった。再生毛包は毛周期を経てもレシピエント表皮層と毛穴部分を介して連続を保持し、同一箇所での発毛を繰り返すことが見目された。また、ガイドを付加した再生毛包原基の移植手技は極めて簡便であり、広く応用可能な技術であった。また、導管を有する再生器官においては、レシピエントに移植後、安定して再生器官原基の上皮系細胞由来の部分とレシピエント側の導管とを結合させることができ、導管を通じた器官の機能を発揮可能であることが明らかとなった。

以上の効果を提供することにより、本発明により作製される移植用再生器官原基は、医療産業分野において広く活用することが出来る、新たな器官置換的再生医療を提供することができる。

請求の範囲

- [請求項1] ガイドを有する移植用再生器官原基の製造方法であって、
間葉系細胞から実質的に構成される第1の細胞集合体と、上皮系細胞から実質的に構成される第2の細胞集合体とを密着させて支持体内部で培養することにより再生器官原基を調製する工程と、
前記再生器官原基にガイドを挿入する工程と、
を含む、製造方法。
- [請求項2] ガイドを挿入する工程後、さらに数日前記再生器官原基を培養する工程を含む、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] 前記第1の細胞集合体と前記第2の細胞集合体のうち、少なくともいずれか一方が、再生対象の器官由来である、請求項1または2に記載の製造方法。
- [請求項4] 前記第1の細胞集合体および前記第2の細胞集合体が、ともに再生対象の器官由来である請求項1または2に記載の製造方法。
- [請求項5] 前記再生器官原基が、上皮性付属器官原基である請求項1～4のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項6] 前記再生器官原基が、再生毛包原基、再生汗腺原基、再生皮脂腺原基、再生唾液腺原基、再生乳腺原基、再生腎臓ネフロン原基、再生涙腺原基、および、再生内分泌腺原基からなる群より選択されるいずれか一つの器官原基である請求項1～4に記載の製造方法。
- [請求項7] 前記再生器官原基が再生毛包原基であり、前記上皮系細胞がバルジ領域上皮細胞または毛母基底部上皮細胞である請求項6に記載の製造方法。
- [請求項8] 前記再生器官原基が再生毛包原基であり、前記間葉系細胞が毛乳頭細胞または真皮毛根鞘細胞である請求項6または7に記載の製造方法。
- [請求項9] 前記再生器官原基が再生唾液腺原基であり、前記上皮系細胞が唾液腺由来の上皮系細胞であり、前記間葉系細胞が唾液腺由来の間葉系細胞

胞である請求項 6 に記載の製造方法。

[請求項10] 前記再生器官原基が再生涙腺原基であり、前記上皮系細胞が涙腺由来の上皮系細胞であり、前記間葉系細胞が涙腺由来の間葉系細胞である請求項 6 に記載の製造方法。

[請求項11] 前記ガイドが、化学繊維である請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項12] 前記ガイドが、生体吸収性である請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項13] 前記ガイドが、ナイロン糸である請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項14] 請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の方法によって作製される、ガイドを有する移植用再生器官原基を含む組成物。

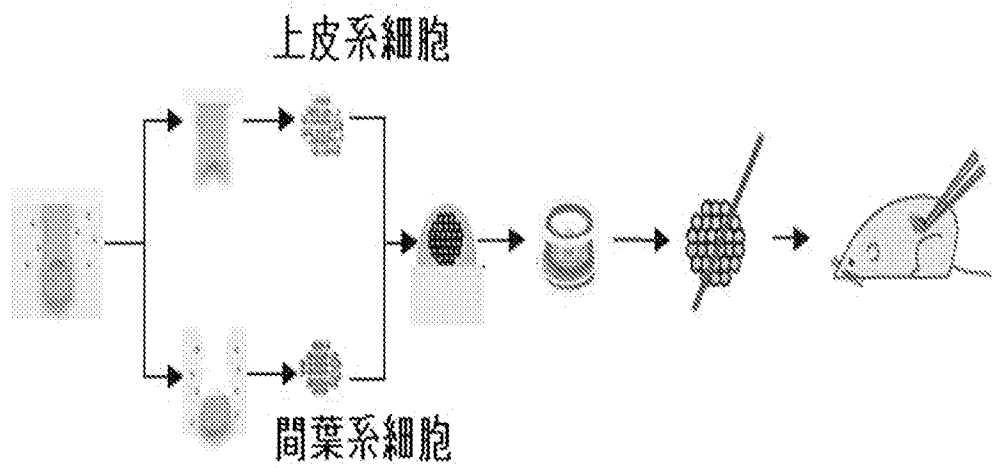
[請求項15] 請求項 1 ～ 13 に記載の製造方法により作製されたガイドを有する移植用再生器官原基を、対象の部位へ移植する工程を含む、ガイドを有する移植用再生器官原基の移植方法。

[請求項16] 請求項 15 に記載の移植方法であって、前記ガイドを移植部位より突出した状態で維持することにより、移植した再生器官原基の上皮系細胞側の部分と前記対象の上皮系細胞とがガイドに沿って伸長し、連結することを特徴とする、ガイドを有する移植用再生器官原基の移植方法。

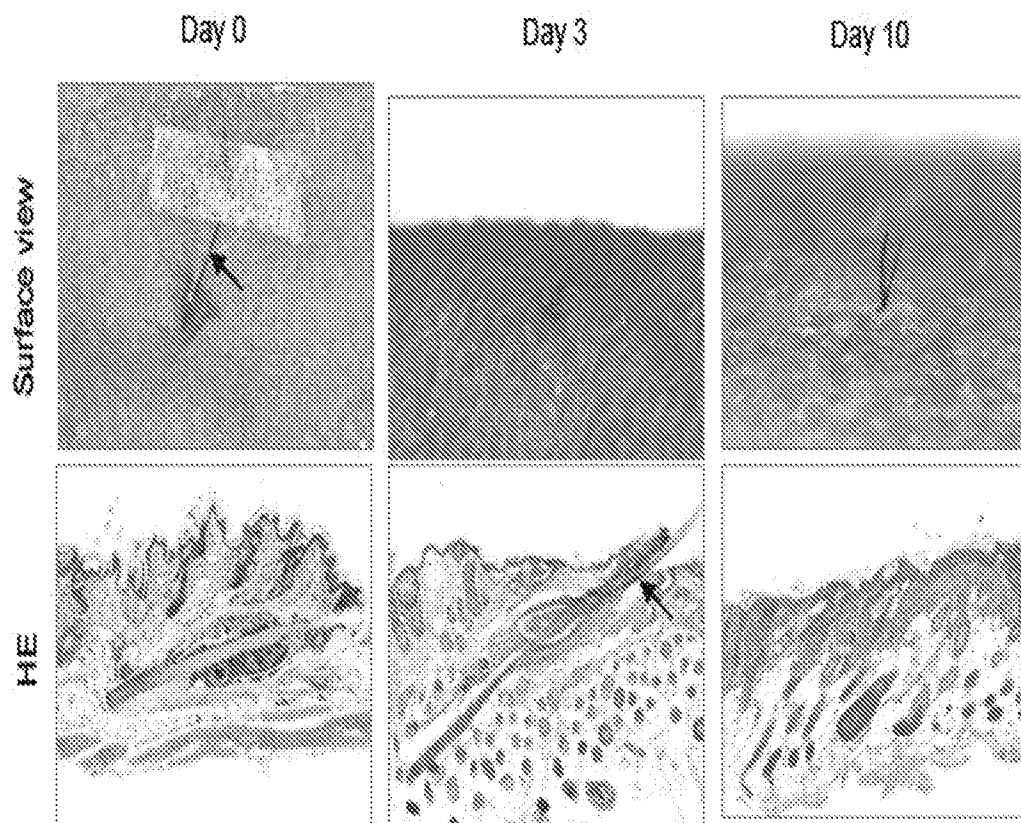
[請求項17] 請求項 15 に記載の移植方法であって、
前記再生器官原基が、導管を有する器官の再生を目的とした器官原基であり、

前記再生器官原基の移植時に、前記ガイドを前記対象部位に存在する導管内に挿入し、前記再生器官原基の上皮系細胞側の部分と前記導管とを連絡させることにより、前記再生器官原基の上皮系細胞側の部分がガイドに沿って伸長し、前記対象部位の導管と連結することを特徴とする、ガイドを有する移植用再生器官原基の移植方法。

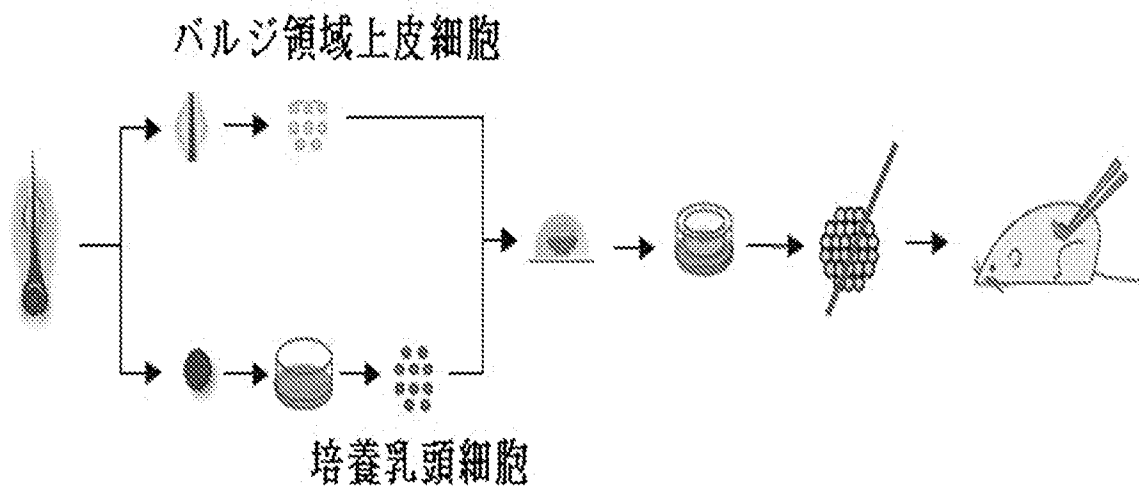
[図1]



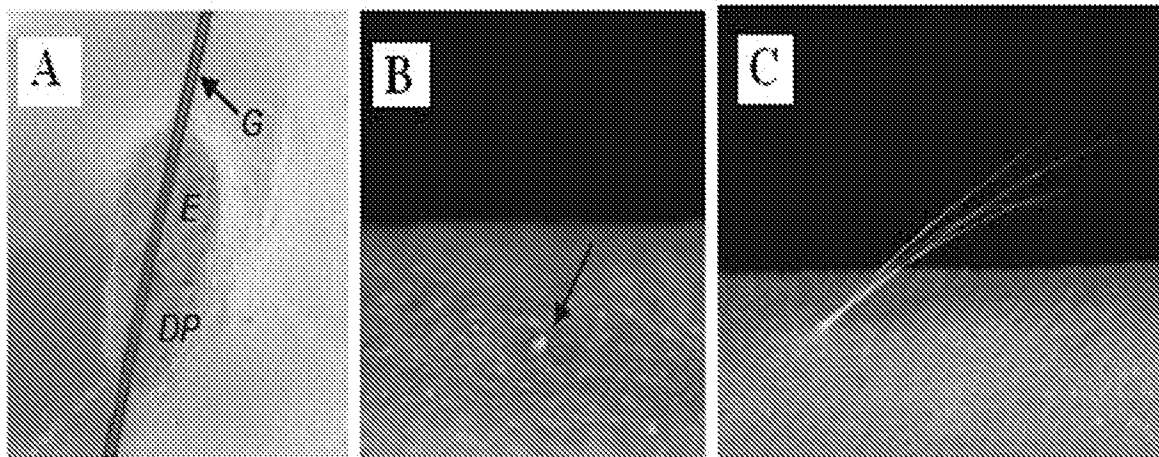
[図2]



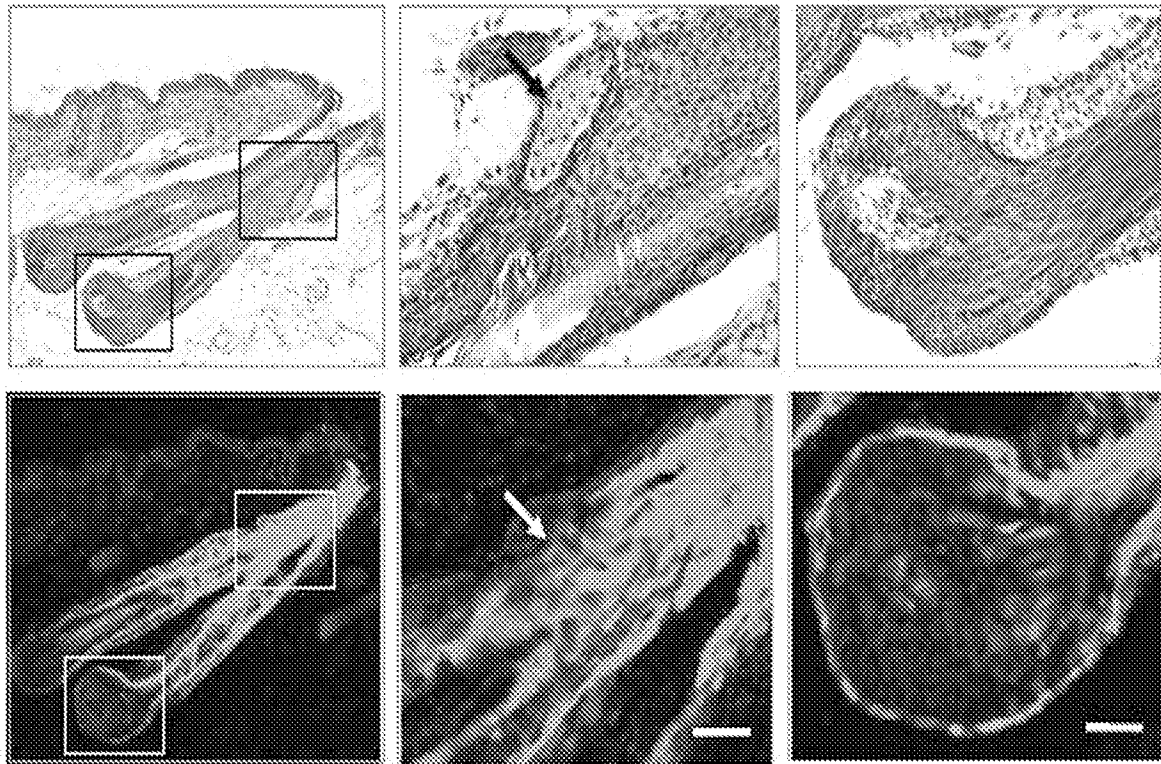
[図3]



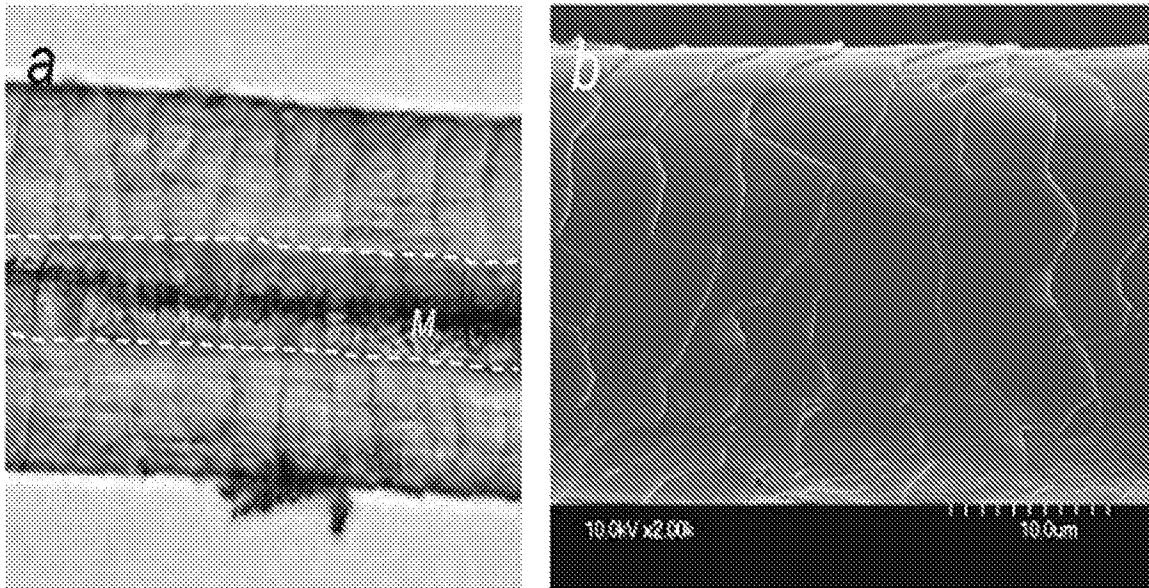
[図4]



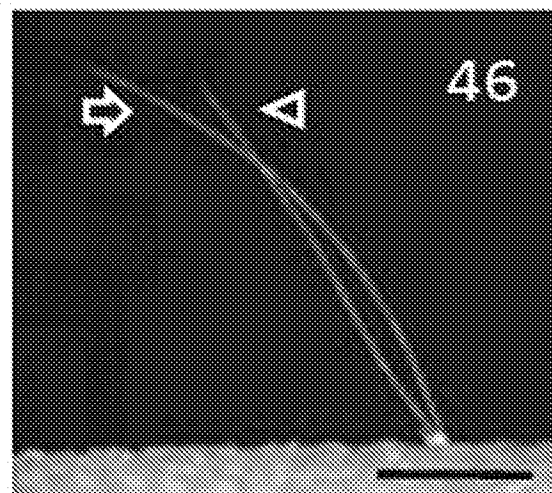
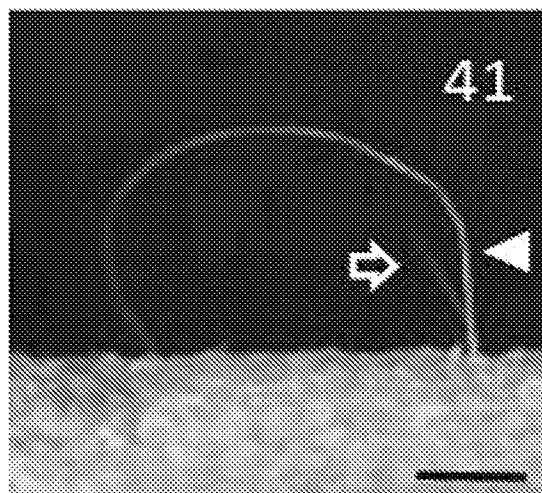
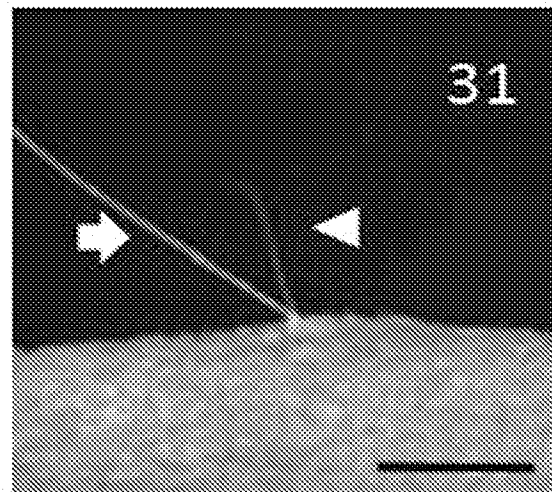
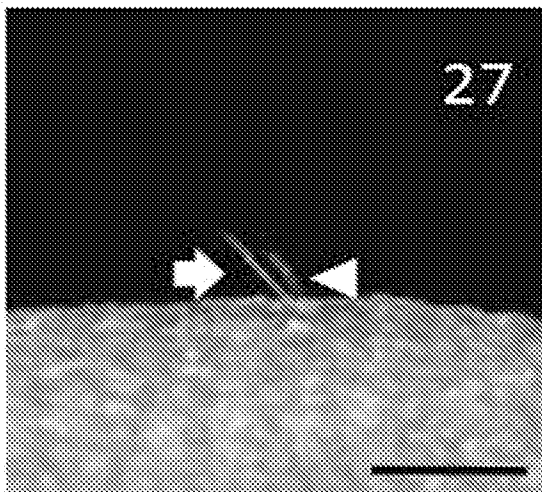
[図5]



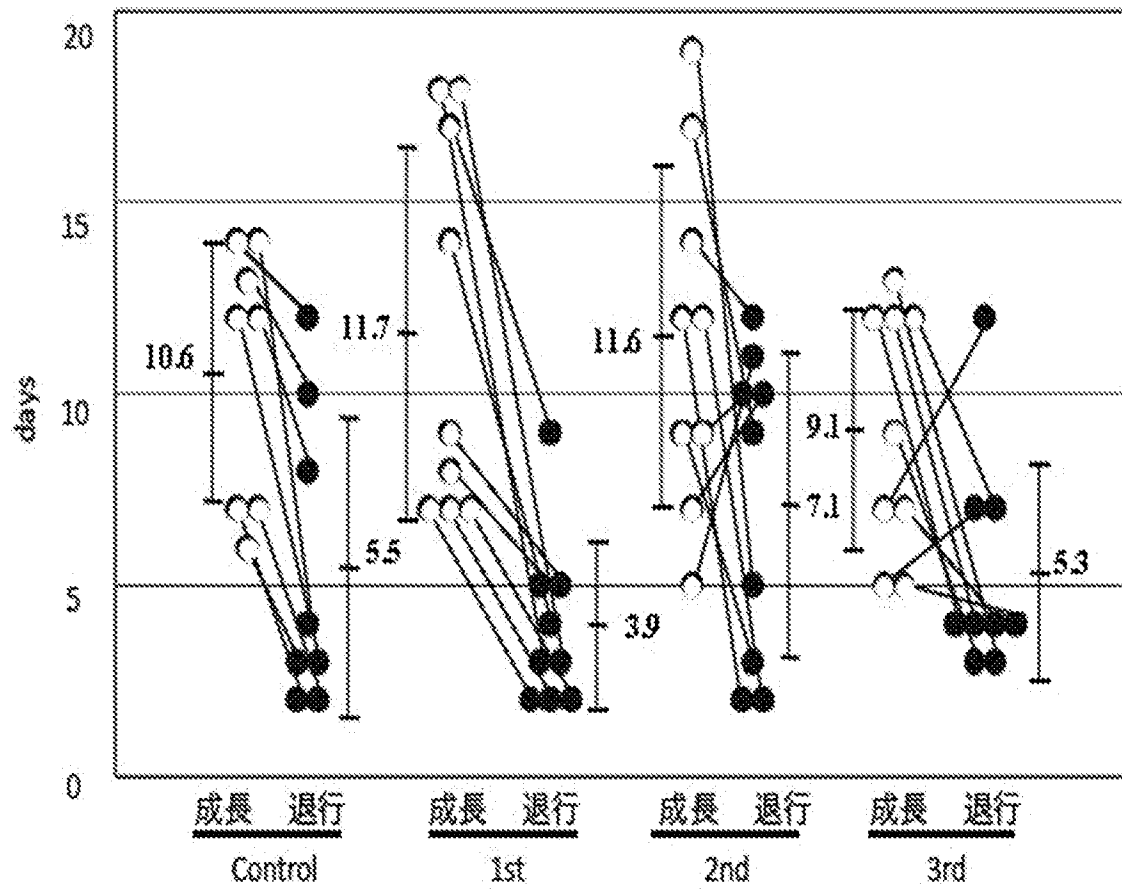
[図6]



[図7]



[図8]



[図9]

再成唾液腺原基の作製

単一化

分離

摘出

E13.5

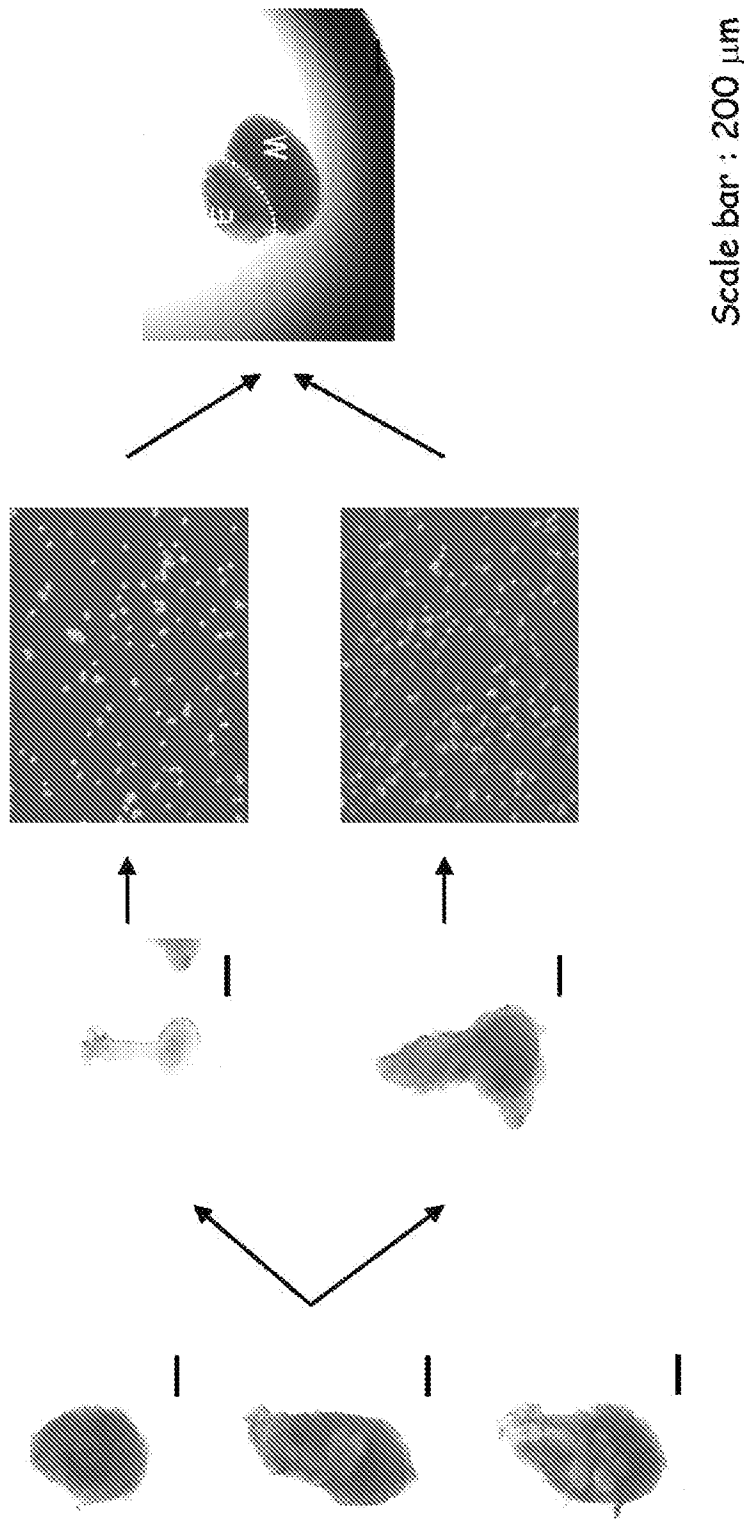
前期

E13.5

中期

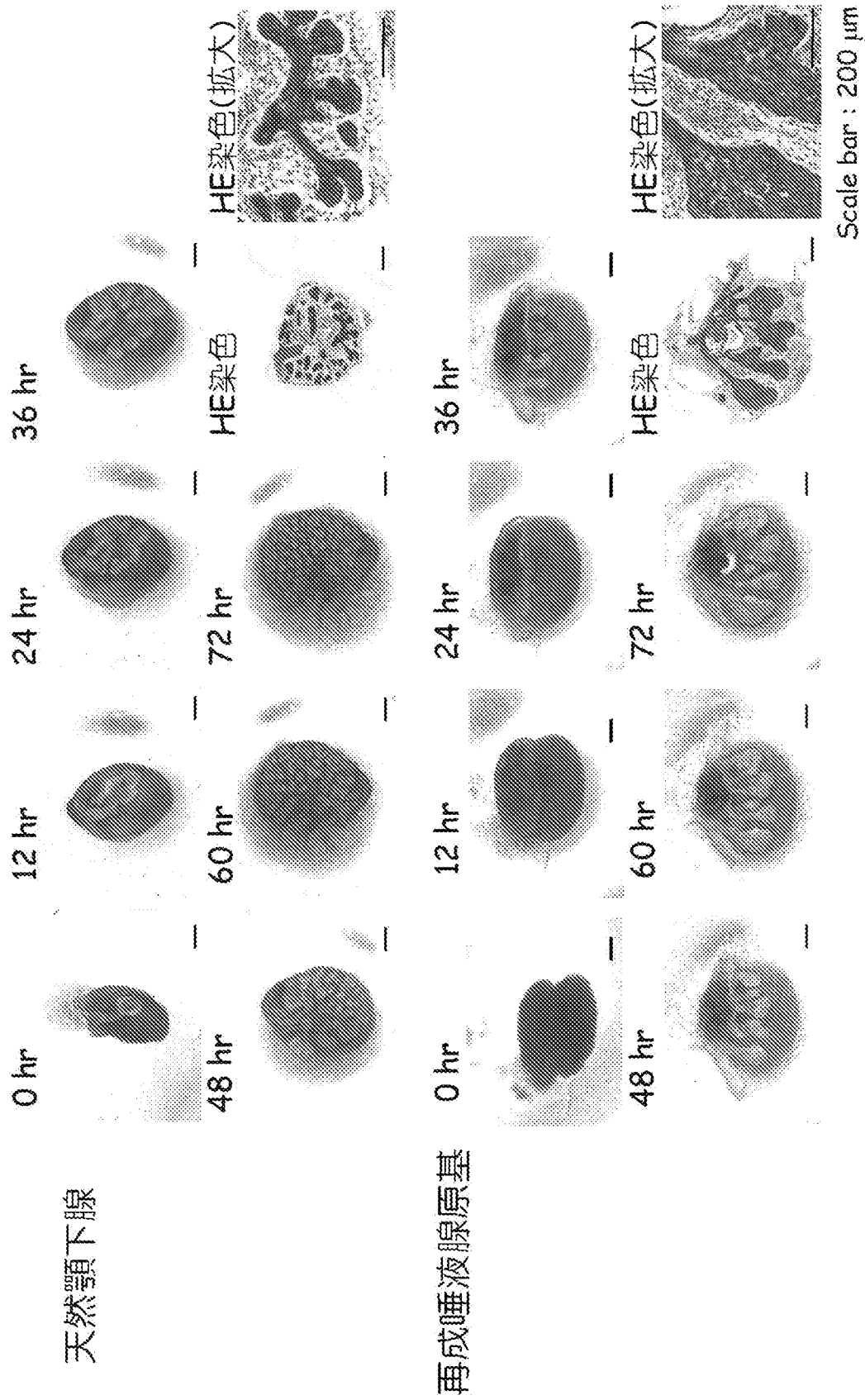
E13.5

後期

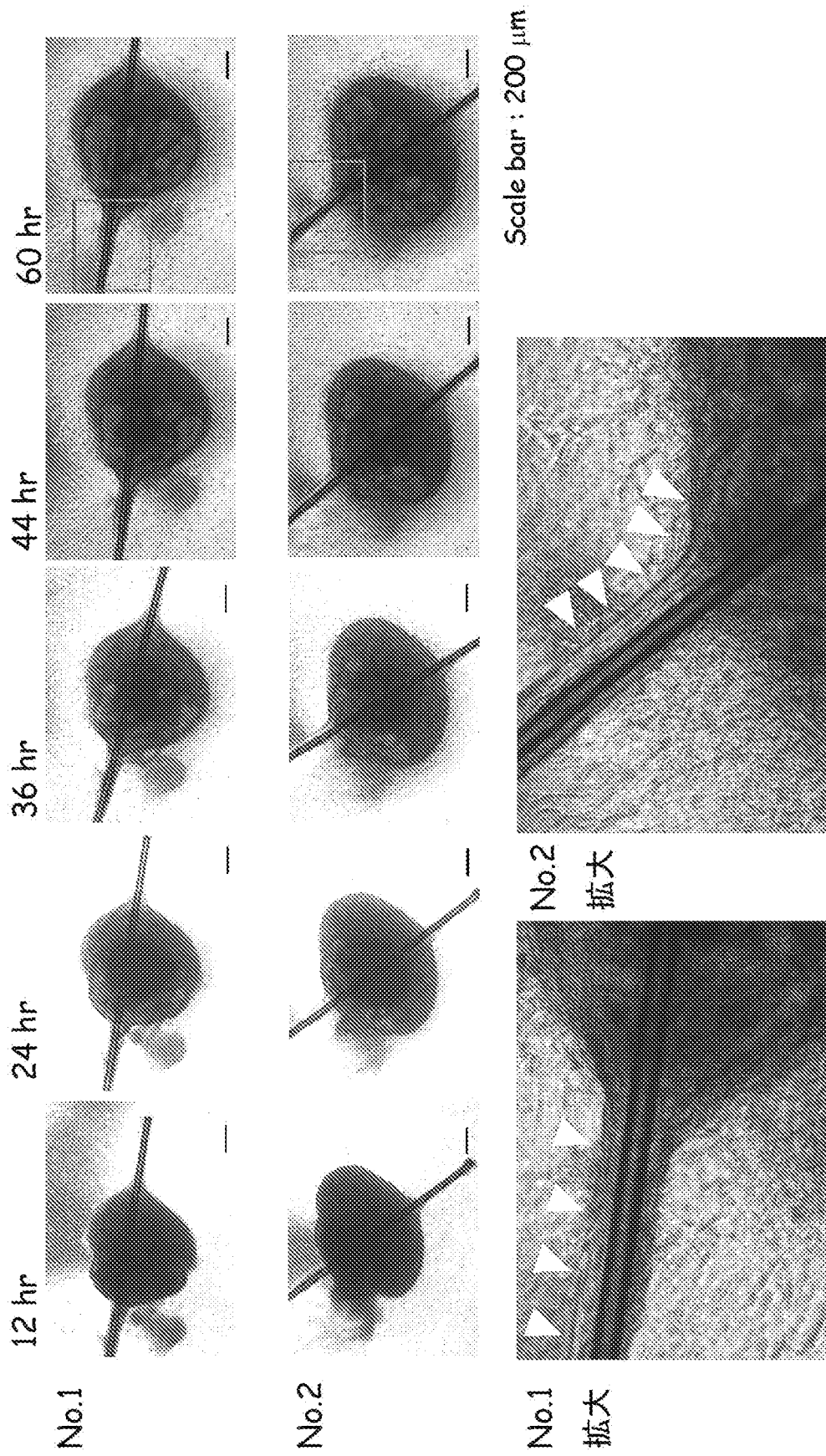


Scale bar : 200 μm

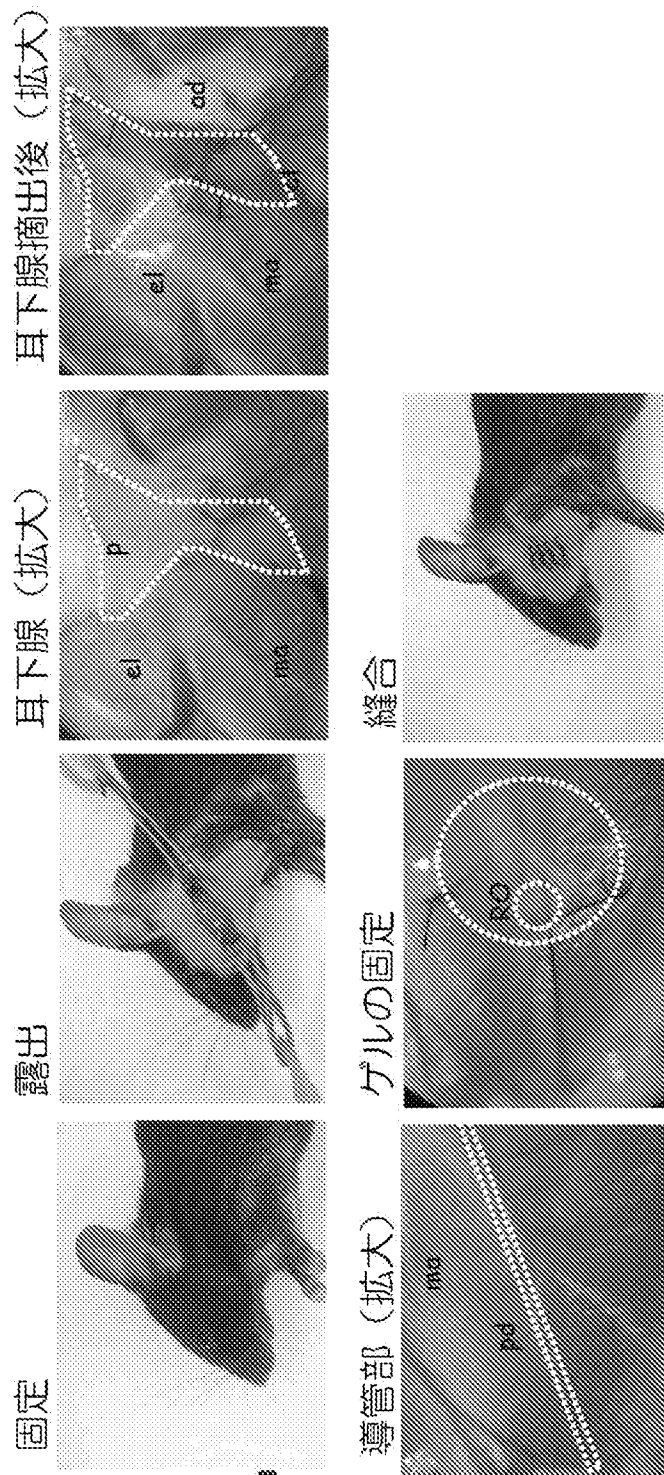
[図10]



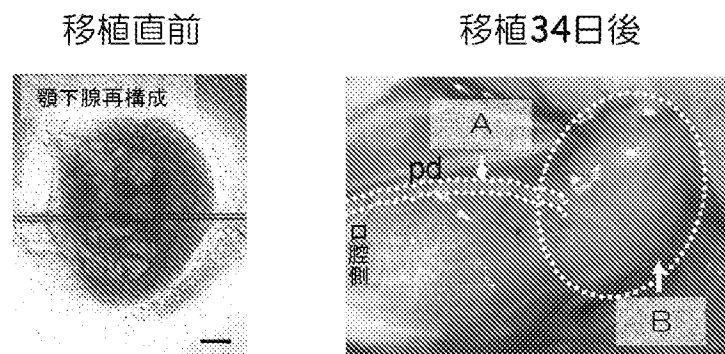
[図11]



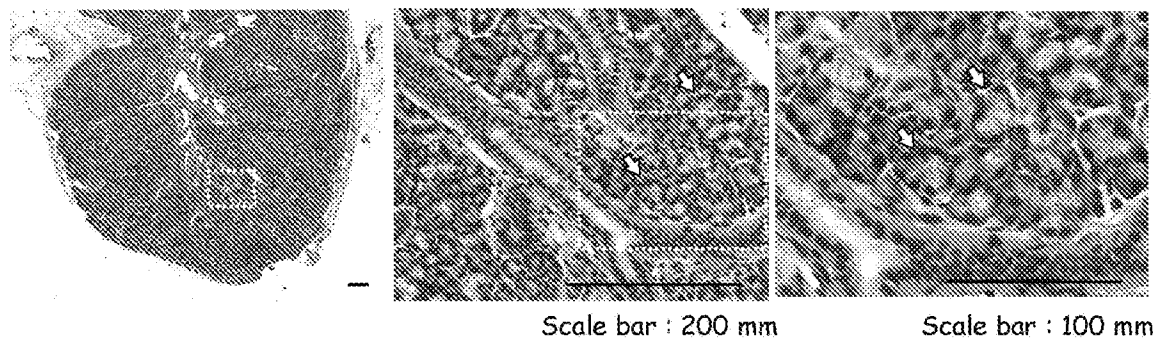
[図12]



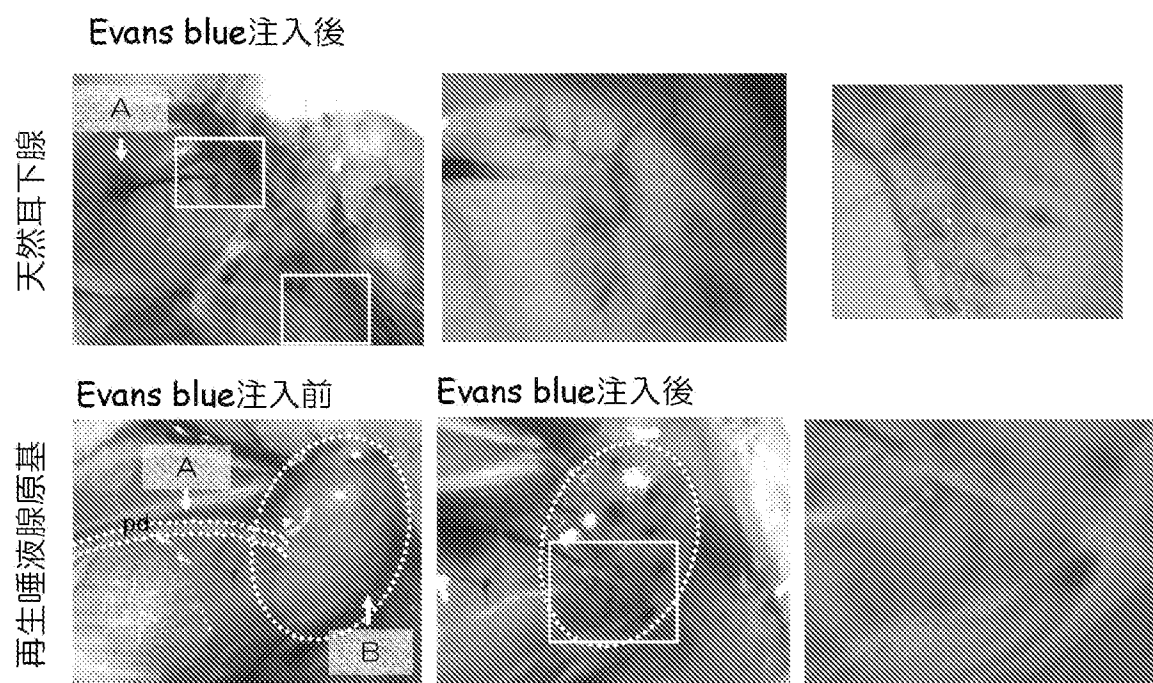
[図13]



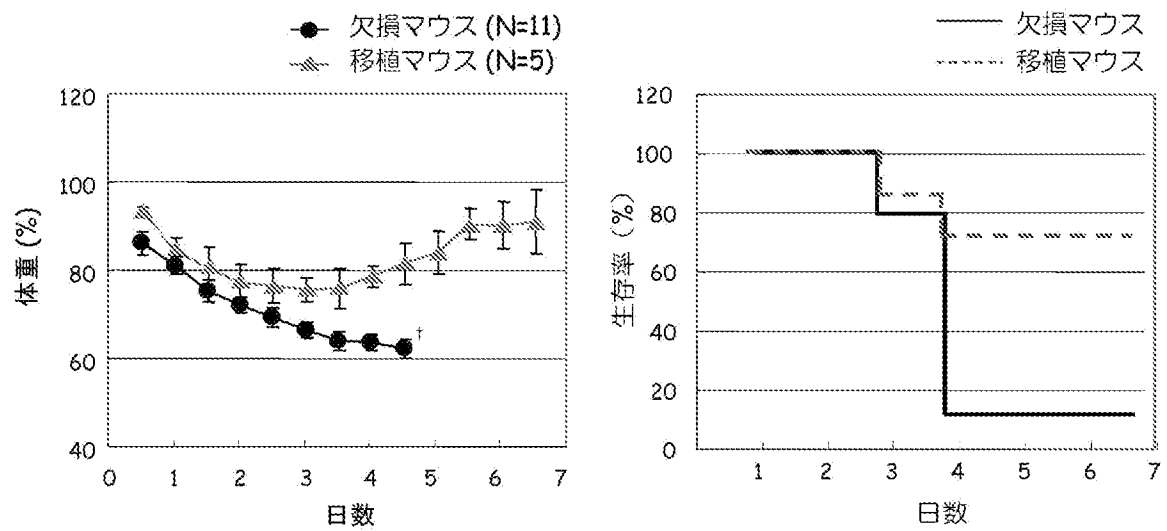
HE染色像（移植34日後）



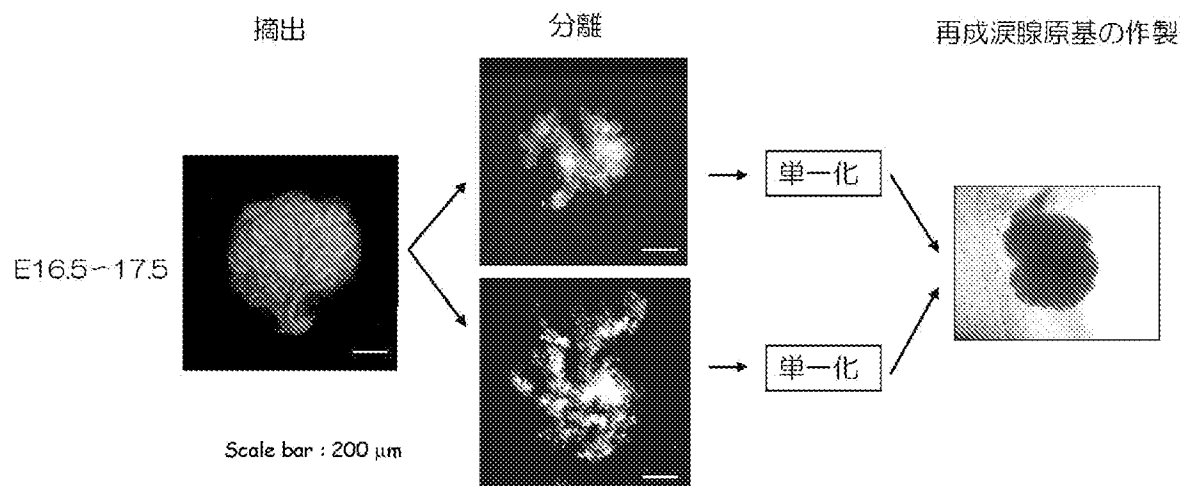
[図14]



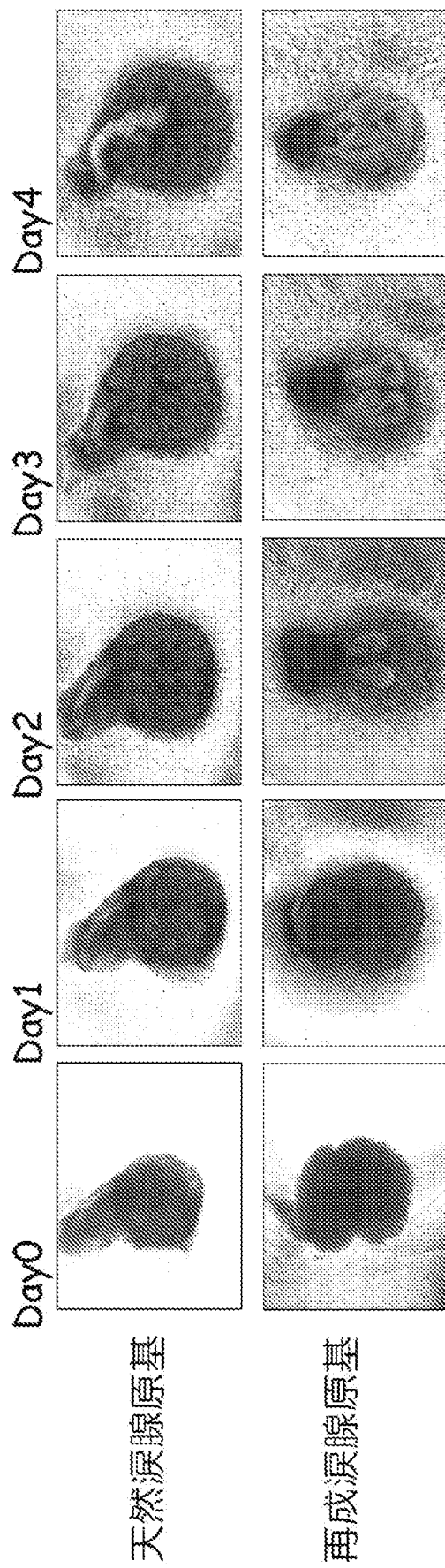
[図15]



[図16]

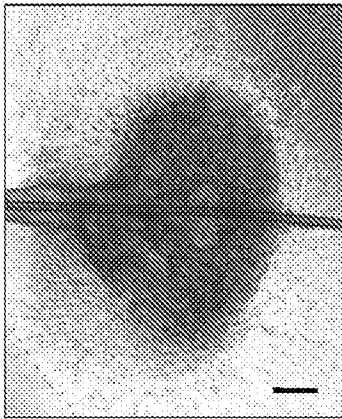


[図17]

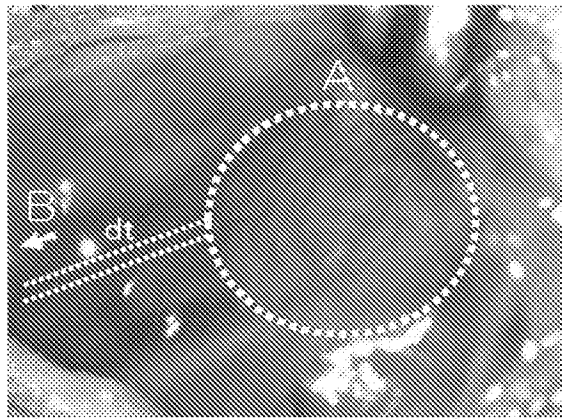


[図18]

移植直前



移植20日後



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/067045

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/071 (2010.01) i, A61L27/00 (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)

C12N5/00-5/28, A61L27/00

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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/SCISEARCH/BIOENG/CONFSCI/WPIDS (STN) ,
JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII), Igaku Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/129672 A1 (Tokyo University of Science), 07 December 2006 (07.12.2006), claims; paragraphs [0036], [0058] & US 2010/0021866 A1 & EP 1905459 A1	1-14
A	WO 2008/105499 A1 (Tokyo University of Science et al.), 04 September 2008 (04.09.2008), claims; paragraphs [0046], [0073] & US 2010/0129771 A1 & EP 2130909 A1 & JP 2008-206500 A	1-14



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 August, 2011 (18.08.11)

Date of mailing of the international search report

30 August, 2011 (30.08.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/067045

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/090826 A1 (Tokyo University of Science, Otsuka Chemical Co., Ltd.), 31 July 2008 (31.07.2008), claims; paragraphs [0051], [0085] & US 2010/0119997 A1 & EP 2119768 A1 & JP 2008-200033 A	1-14
A	JP 2008-29757 A (Tokyo University of Science), 14 February 2008 (14.02.2008), claims; paragraphs [0041], [0060], [0069] (Family: none)	1-14
A	JP 2008-29756 A (Tokyo University of Science), 14 February 2008 (14.02.2008), claims; paragraphs [0033], [0055] (Family: none)	1-14
A	WO 2005/014774 A1 (National Institute of Agrobiological Sciences, Asahi Techno Glass Corp.), 17 February 2005 (17.02.2005), claims; pages 10 to 11 (Family: none)	1-14
A	SONOYAMA W et al., Mesenchymal stem cell- mediated functional tooth regeneration in swine., PLoS ONE, vol. 1, 2006, e79 (doi:10.1371/journal.pone.0000079) http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000079	1-14
P,X	Koei TOYOSHIMA et al., "Kikan Genki-ho ni yoru Mohatsu no Saisei I Sai Kosei Moho Genki no Hinai Ishoku ni yoru Mohatsu Saisei", Regenerative Medicine, Issued date 01 February 2011 (01.02.2011), JST received date 14 February 2011 (14.02.2011), vol.10, suppl., page 276 (abstract 2P-141)	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/067045

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15-17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions set forth in claims 15 to 17 pertain to methods for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, (Continued to extra sheet.)
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/067045

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv),
to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/071(2010.01)i, A61L27/00(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 (I P C))

Int.Cl. C12N5/00 - 5/28, A61L27/00

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/SCISEARCH/BIOENG/CONFSCI/WPIDS (STN),
JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII), 医学・薬学予稿集全文データベース

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
A	WO 2006/129672 A1 (学校法人東京理科大学) 2006. 12. 07, 請求の範囲、[0036]、[0058] & US 2010/0021866 A1 & EP 1905459 A1	1-14
A	WO 2008/105499 A1 (学校法人東京理科大学、他) 2008. 09. 04, 請求の範囲、[0046]、[0073] & US 2010/0129771 A1 & EP 2130909 A1 & JP 2008-206500 A	1-14

☒ 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

1 8 . 0 8 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

3 0 . 0 8 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

中村 正展

4 N

3 5 3 7

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

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
A	WO 2008/090826 A1 (学校法人東京理科大学、大塚化学株式会社) 2008. 07. 31, 請求の範囲、[0051]、[0085] & US 2010/0119997 A1 & EP 2119768 A1 & JP 2008-200033 A	1-14
A	JP 2008-29757 A (学校法人東京理科大学) 2008. 02. 14, 特許請求の範囲、[0041]、[0060]、[0069] (ファミリーなし)	1-14
A	JP 2008-29756 A (学校法人東京理科大学) 2008. 02. 14, 特許請求の範囲、[0033]、[0055] (ファミリーなし)	1-14
A	WO 2005/014774 A1 (独立行政法人農業生物資源研究所、旭テクノグ ラス株式会社) 2005. 02. 17, 請求の範囲、10-11 頁 (ファミリーなし)	1-14
A	SONOYAMA W et al., Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine., PLoS ONE, vol. 1, 2006, e79 (doi:10.1371/journal.pone.0000079) http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000079	1-14
P X	豊島 公栄、他, 器官原基法による毛髪再生 I 再構成毛包原基の皮内移植による 毛髪再生, 再生医療, 2011. 02. 01 (発行日), 2011. 02. 14 (JST 受入日) , vol. 10, suppl., p. 276 (Abstract 2P-141)	1-14

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 1 5 - 1 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 1 5 乃至 1 7 に記載された発明は、手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法に該当するものであり、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)により、この国際調査機関が調査をすることを要しない発明であると認められる。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。