

(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
2011年11月17日(17.11.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/142364 A1

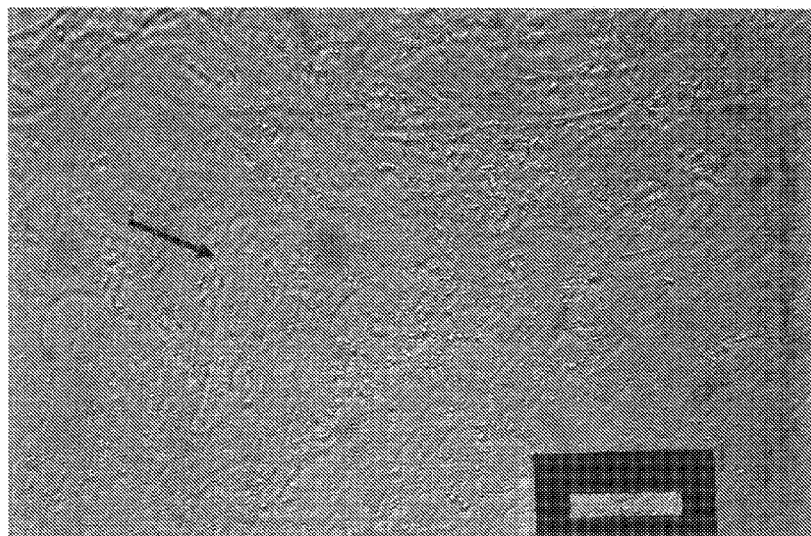
- (51) 国際特許分類:
A61L 27/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/060778
- (22) 国際出願日: 2011年5月10日(10.05.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-108674 2010年5月10日(10.05.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP). 公立大学法人名古屋市立大学 (Public University Corporation Nagoya City University) [JP/JP]; 〒4678601 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1 Aichi (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高橋 政代 (TAKAHASHI, Masayo) [JP/JP]; 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町2-2-3 独立行政法人理化学研究所 神戸研究所内 Hyogo (JP). 安川 力 (YASUKAWA, Tsutomu) [JP/JP]; 〒4678601 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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).

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CELL SHEET

(54) 発明の名称: 細胞シート作製方法

[図4]



(57) Abstract: Disclosed is a method for producing a cell sheet, which comprises: (1) a step of preparing cells derived from a mammal; and (2) a step of seeding and culturing the thus-prepared cells on a flat base at a high density. Also disclosed are: a cell sheet which is produced by the method; a material for transplantation; and a Bruch's membrane.

(57) 要約: 本発明は、(1) 哺乳動物由来細胞を調製する工程; (2) 調製した細胞を平面基材上に高密度に播種し、培養する工程; を含む細胞シートの作製方法、該方法によって作製された細胞シート、移植用材料、ブルッフ膜などを提供する。

WO 2011/142364 A1

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：細胞シート作製方法

技術分野

[0001] 本発明は、平面基材を用いた細胞シート作製方法、特に網膜色素上皮シートの作製方法に関する。本発明はまた、平面基材を用いたブルッフ膜の作製方法に関する。

背景技術

[0002] 加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration: AMD) は、現在、先進国における法的失明の主要原因疾患の一つであり、主に50歳以上の高齢者に見られる。加齢黄斑変性は黄斑の加齢に伴う変化によっておこる疾患であり、滲出型と萎縮型に大別される。滲出型加齢黄斑変性は高齢者の黄斑に脈絡膜から新生血管が発生し、網膜色素上皮下又は網膜下に出血や滲出性病変を生じ、ついには瘢痕組織を形成する疾患である。萎縮型加齢黄斑変性は黄斑部の萎縮やドルーゼンの蓄積を伴う疾患である。また、滲出型及び萎縮型加齢黄斑変性に到る前駆病変を、特に早期加齢黄斑変性と呼ぶことがあり、本病変も加齢黄斑変性の一病態と考えられている。

[0003] 加齢黄斑変性の治療は、軽度の滲出型の場合には、光線力学的療法、レーザー光凝固術、新生血管抜去術などの外科的療法、または血管新生に関わる血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) に対する阻害剤の投与などの薬物療法による新生血管の退縮・除去を目的とした治療方法を選択することができる。しかし、網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium: RPE) の高度の萎縮や欠損に至るまで進行した滲出型や萎縮型の場合、前記手段で有効性を得ることができない。かかる場合は、網膜色素上皮細胞または網膜色素上皮を網膜下の欠損部位に移植することが有効な治療方法となる (特許文献1、2)。

[0004] 移植に細胞を用いる場合、網膜色素上皮細胞としては、例えば、ドナーとなる胎児の眼球から分離・培養した網膜色素上皮細胞、患者自身の眼球から分離・培養した虹彩色素上皮細胞、手術中に擦過採取した網膜色素上皮細胞などが挙げられる。しかし、ドナーとして他人の細胞を用いた場合、患者側への拒絶反応が懸念され、また患者自身の細胞であっても、異なる細胞種を移植に用いることは治療上好適ではない。さらに、分離・培養した細胞の移植は生着率に課題があり、上皮として十分な機能を発揮できない。そこで、移植用網膜色素上皮として網膜色素上皮－ブルッフ膜－脈絡膜からなる組織あるいは人工シート上に培養した網膜色素上皮シートも提案されている（特許文献1、3）が、切除された脈絡膜や人工シートが上皮の生着および生体における機能維持障害となることが懸念される。また近年、iPS細胞を用いた網膜色素上皮細胞（非特許文献1）または人工シートの移植についても検討されており、抗原性の問題の解決が図られているが、細胞の生着やシートが生体における機能維持に対する障害の問題は依然として残されており、加齢黄斑変性に対する治療上有効かつ調製が簡便な網膜色素上皮の作成が課題となっている。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特表平9-501303号公報
特許文献2：特開2008-173333号公報
特許文献3：特表2007-509643号公報

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：Neuroscience Letters, 458, 2009, 126-131

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明の課題は、人工シートを用いることなく、簡便に哺乳類由来の細胞

シートを作成する新たな方法を開発し、以って組織移植の必要な対象に提供することである。特に、網膜色素上皮の欠損を伴う加齢黄斑変性において生着率の高い、機能性に優れた移植用上皮を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 通常、網膜色素上皮細胞を含む上皮細胞を疎な密度で平面ディッシュ上で培養した場合、細胞の基底部はディッシュとの接触面側に形成される。本発明者らは、ヒト眼球から分離・培養した網膜色素上皮細胞を平面基材上ではなく3次元的に凝集させて培養、即ち、球状 (spheroid) 培養した場合、球状になった細胞塊の内部に存在する細胞はアポトーシスによって死滅し、血清と接触する細胞塊表面にブルッフ膜が形成されることを発見した (データ未公開)。また、細胞表面は網膜色素上皮として分化していることが分かった。このことから、発明者らは、通常の平面培養であっても、細胞外基質より優先的に細胞間接着が生じる環境下では、細胞の脱分化を誘発せず、上皮に分化すること、ならびに血清接触面にブルッフ膜を形成させることの可能性を検討し、網膜色素上皮細胞を高密度な状態で平面培養することで、通常と逆側、即ち血清との接触面側にブルッフ膜が生じることを見出した。また、かかる培養では、網膜色素上皮細胞は脱分化せず、上皮として分化することを見出した。本発明者らは、鋭意検討の結果、これらの発見から本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、

[1] 以下の工程を含む、細胞シートの作製方法；

(1) 哺乳動物由来細胞を調製する工程；

(2) 調製した細胞を平面基材上に高密度に播種し、培養する工程

[2] 工程(1)において、哺乳動物由来細胞が、上皮細胞又は内皮細胞である、上記[1]の方法；

[3] 工程(1)において、哺乳動物由来細胞が、角膜内皮細胞、気管上皮細胞、消化管上皮細胞、子宮頸部上皮細胞、角膜上皮細胞、及び網膜色素上皮細胞からなる群から選択される、上記[1]の方法；

[4] 得られる細胞シートが、細胞間にタイトジャンクションが形成され、

且つ平面基材の接触する側と反対側に基底膜が形成されている、上記 [1] の方法；

[5] 工程 (1) において、哺乳動物由来細胞が、網膜色素上皮細胞である、上記 [1] の方法；

[6] 工程 (2) において、高密度が、正常な眼球において観察される細胞密度以上の密度である、上記 [5] の方法；

[7] 正常な眼球において観察される細胞密度以上の密度が、少なくとも 4,000 細胞数/mm²である、上記 [6] の方法；

[8] 以下の工程 (3) をさらに含む、上記 [5] ~ [7] のいずれか 1 つの方法；

(3) 工程 (2) で得られた培養細胞における分化マーカーの発現の有無を確認する工程

[9] 工程 (3) において、分化マーカーが、ベストロフィン-1、RPE-65、サイトケラチン、オクルディン、ZO-1、エラスチン、アクチン、1型コラーゲンおよび4型コラーゲンからなる群より選択される少なくとも1種である、上記 [8] の方法；

[10] 以下の工程 (4) をさらに含む、上記 [5] ~ [9] のいずれか 1 つの方法；

(4) 細胞の平面基材の接触する側と反対側にブルッフ膜の形成を確認する工程

[11] 上記 [10] の方法で形成されたブルッフ膜を分離する工程を含む、ブルッフ膜の作製方法；

[12] 上記 [1] ~ [10] のいずれか 1 つの方法で作製された細胞シート；

[13] 上記 [1] ~ [10] のいずれか 1 つの方法で作製された細胞シートを含む疾患治療用移植材料；

[14] 上記 [11] の方法で作製されたブルッフ膜；
を提供する。

発明の効果

[0009] 本発明により、通常の培養方法で得られる細胞シートと層構造が逆さとなった、基底膜が表出した構成を有する細胞シートを、簡易に調製することができる。本発明の細胞シートは、シートを裏返すことなく基底膜を移植対象組織に接触させることができるため、移植操作を簡略化でき、しかも生着率に優れるため、移植用途として極めて有用である。例えば、平面培養によって容易に網膜色素上皮細胞シートを作成することができ、加齢黄斑変性患者に移植適用することができる。特に、培養に用いる細胞をiPS細胞由来の網膜色素上皮細胞とした場合、患者自身の細胞を利用することで、移植の際の拒絶反応を回避することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1] 4ウェルチャンバースライド (L a b - T e k) にヒト網膜色素上皮細胞を5, 000細胞/mm²で播種した場合に観察されたシートの写真像を示す。矢印は収縮した細胞シートを示す。

[図2] 4ウェルチャンバースライド (L a b - T e k) にヒト網膜色素上皮細胞を20, 000細胞/mm²で播種した場合に観察されたシートの写真像を示す。細胞シートに収縮は観察されなかった。

[図3] ヒト網膜色素上皮細胞を20, 000細胞/mm²で播種した場合の細胞写真像および染色像を示す。(A) 播種後0日における細胞写真像、(B) 播種後1日における硬性ドルーゼン写真像、(C) 播種後1日における細胞写真像、(D) 播種後1日におけるブルッフ膜写真像、(E) 播種後1日における細胞核染色像、(F) 播種後1日におけるブルッフ膜中アクチン染色像

[図4] ヒト網膜色素上皮細胞の平面培養2週間における、網状の弾性線維を形成したエラスチンの染色像。

[図5] ヒト網膜色素上皮シートから抽出したタンパク質に関して、RPE-65、オクルディン、サイトケラチン-18、ZO-1、4型コラーゲン、エラスチンの各マーカータンパク質の発現を確認したウエスタンブロットイン

グの図を示す。

[図6]ヒト網膜色素上皮シートの走査型電子顕微鏡像を示す。矢印はコラーゲン線維や弾性線維である。図右下は、露出した基底陥入（基底部の微絨毛）図である。

発明を実施するための形態

[0011] 以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明は以下の工程を含む、細胞シートの作製方法を提供する。

(1) 哺乳動物由来細胞を調製する工程；

(2) 調製した細胞を平面基材上に高密度に播種し、培養する工程

[0012] 工程(1)において、調製される哺乳動物由来細胞としては、哺乳動物（例：ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、ウサギ、ハムスター、モルモット等）由来の細胞であれば、いずれの哺乳動物由来の細胞であってもよいが、好ましくはヒト由来の細胞である。

[0013] また、調製する細胞の細胞種としては、上皮系および内皮系いずれかの接着性を有する細胞が好適に使用される。そのような細胞としては、例えば、肝臓の実質細胞である肝細胞、クッパー細胞、血管内皮細胞や角膜内皮細胞などの内皮細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、碎骨細胞、歯根膜由来細胞、表皮基底細胞などの表皮細胞、気管上皮細胞、消化管上皮細胞、子宮頸部上皮細胞、結膜上皮細胞、角膜上皮細胞、虹彩色素上皮細胞、網膜色素上皮細胞などの上皮細胞、乳腺細胞、ペリサイト、平滑筋細胞や心筋細胞などの筋細胞、腎細胞、膝ランゲルハンス島細胞、末梢神経細胞や視神経細胞などの神経細胞、軟骨細胞、骨細胞などが挙げられるが、好ましくは角膜内皮細胞、気管上皮細胞、消化管上皮細胞、子宮頸部上皮細胞、角膜上皮細胞、網膜色素上皮細胞が挙げられ、さらに好ましくは角膜上皮細胞、角膜内皮細胞、網膜色素上皮細胞、最も好ましくは網膜色素上皮細胞が挙げられる。

[0014] 調製する細胞は、組織や器官から直接採取した初代細胞でもよく、あるいは、それらを何代か継代させたものでもよい。さらにこれら細胞は、未分化

細胞である胚性幹細胞（ES細胞）、多分化能を有する間葉系幹細胞などの多能性幹細胞、または単分化能を有する血管内皮前駆細胞などの単能性幹細胞を含む幹細胞を分化誘導することによって得られる細胞であっても良い。ES細胞は体細胞から核初期化されて生じたES細胞であってもよい。また、近年報告された人工多能性幹細胞（iPS細胞）を分化誘導することにより、目的の細胞を調製してもよい。iPS細胞は、ある特定の核初期化物質（核酸、タンパク質、低分子化合物等）を、体細胞に導入することにより作製することができる、ES細胞と同等の特性を有する体細胞由来の人工の幹細胞である [Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell, 126: 663-676 (2006); Takahashi, K. et al., Cell, 131: 861-872 (2007)]。前記幹細胞を目的の分化細胞に分化させる条件・培地は従来公知の条件・培地に従ってもよいし、当業者が適宜設定してもよい。本発明によって作成される細胞シートを移植用とする場合、移植する対象の体細胞をiPS細胞のソースとして用いることによって、得られる細胞シートは対象に対して抗原性を持たない細胞シートとなる点でiPS細胞の使用は好ましい。

[0015] 本発明の調製する哺乳動物由来細胞が、網膜色素上皮細胞である場合には、哺乳動物は前記と同様であるが、好ましくはヒトである。また、該網膜色素上皮細胞は、幹細胞由来の分化細胞または眼球由来の細胞である。眼球由来の網膜色素上皮細胞は死体眼球摘出後、速やかに赤道部で眼球を分割し、硝子体と網膜を除去した後、セルスクレーパーによる擦過またはトリプシンやEDTA溶液にて細胞をブルッフ膜より遊離させて回収した後、培養液中で静置することにより培養皿への接着、増殖を誘導することにより必要量の細胞を増殖させ、トリプシン処理などで適宜継代し細胞数を確保する。幹細胞を分化誘導させる場合は、ヒトES細胞またはiPS細胞を、Dkk-1（Wntアンタゴニスト）およびLefty A（Nodalアンタゴニスト）を添加したES細胞分化培地で培養を行う。一定期間培養することで

網膜前駆細胞マーカーである *Rx*、*Pax6*、*Mitf* が発現し、光学顕微鏡観察による形態観察から多角性形態を確認することで、ヒト網膜色素上皮細胞を得ることができる。

[0016] 工程（２）において、前記調製した細胞を平面基材上に高密度に播種し、培養することによって細胞シートを作成することができる。本明細書における平面基材としては、細胞培養用であれば特に限定されないが、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウエルプレート、マルチプレート、マルチウエルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、ローラーボトルが挙げられる。本明細書における平面基材の材質としては、例えば、金属、ガラス、セラミック、シリコン等の無機材料、エラストマー、プラスチック（例えば、ポリエステル樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ABS樹脂、ナイロン、アクリル樹脂、フッ素樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリウレタン樹脂、メチルペンテン樹脂、フェノール樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂、塩化ビニル樹脂）で代表される有機材料を挙げることができるが、それらに限定されない。また、平面基材は、接着性細胞との接着性を向上させる目的で、表面処理が施されていてもよいが、本発明の細胞シートを平面基材から剥がす工程を容易にするために、なんら処理されていなくてもよい。処理されている場合は、例えば、コラーゲン、ゼラチン、マトリゲル、ポリーレージン、ポリーDーリジン、ラミニン、フィブロネクチンなどによって表面処理されているもよい。

[0017] 本明細書における「高密度」とは、調製した細胞が由来する正常組織において観察される細胞密度以上の密度をいう。またその上限は、当業者であれば適宜決定することができるが、例えば、細胞同士が密着し合える密度でかつ過剰な播種によるシート形成不備、細胞死滅しない程度の細胞密度である。より具体的には、「高密度」とは、正常組織において観察される細胞密度に対して、例えば1～100倍、好ましくは1.2～50倍、より好ましく

は2.5～30倍程度であり、特に好ましくは5～10倍程度の細胞密度をいう。正常組織において観察される細胞密度としては、組織の種類によって異なるが、例えば、角膜内皮では、3,000細胞数/mm²、網膜色素上皮細胞では、4,000細胞数/mm²程度である。

[0018] 本発明の調製する哺乳動物由来細胞が、網膜色素上皮細胞である場合には、「高密度」とは、「正常な眼球において観察される細胞密度以上の密度」をいう。そのような密度としては、具体的には、少なくとも4,000細胞数/mm²以上である。しかし、下記実施例においても示されるように、正常眼球において観察される細胞密度以上の密度であっても、一定密度以下で平面基材上に播種した場合、形成された細胞シート自身に収縮力が働き、播種時の面積を維持することが出来ない。これは、網膜色素上皮の血清接触面を被覆するために一定数の細胞が動員されていること、細胞密度にムラが存在すること、および細胞自身の生存率から、播種時の面積を維持できないためと推察される。但し、この収縮したシートであっても、特段の不都合なく後述する用途に利用することが可能である。従って、「正常な眼球において観察される細胞密度以上の密度」とは、形成された細胞シートが播種時の面積から収縮することを許容する場合、好ましくは、5,000細胞数/mm²程度以上、より好ましくは、10,000細胞数/mm²程度以上であり、形成された細胞シートに播種時の面積を維持させる場合、好ましくは、20,000細胞数/mm²程度以上である。また、その上限としては、過剰に細胞播種することによるシート形成不全、一部細胞の死滅を誘発しない密度である。そのような上限も考慮した場合、「正常な眼球において観察される細胞密度以上の密度」とは、好ましくは、5,000細胞数/mm²～200,000細胞数/mm²、より好ましくは、10,000細胞数/mm²～120,000細胞数/mm²、特に好ましくは、20,000細胞数/mm²～40,000細胞数/mm²である。

[0019] 前記高密度で播種した細胞を培養液中で培養することにより、単層状の細胞集団を形成することができる。培養液としては、当技術分野で通常用いら

れる細胞培養用培地であれば特に制限なく用いることができる。例えば、用いる細胞の種類に応じて、F-10培地、F12培地、MEM、BME培地、DMEM、 α MEM、IMD培地、ES培地、DM-160培地、Fisher培地、WE培地およびRPMI 1640培地等、朝倉書店発行「日本組織培養学会編 組織培養の技術第三版」581頁に記載されているような基礎培地を用いることができる。さらに、基礎培地に血清（ウシ胎児血清等）、各種増殖因子、抗生物質、アミノ酸などを加えてもよい。培地のpHは、好ましくは約6～約8である。培養は、通常約30～約40℃で、約15～約60時間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

[0020] 本発明の方法で得られる細胞シートは、細胞間にタイトジャンクションが形成され、且つ平面基材の接触する側と反対側に基底膜が形成される。平面基材の接触する側と反対側とは、細胞と血清との接触面側である。タイトジャンクション形成は、六角形状の密着しあう細胞形態と、免疫染色により細胞間のオクルディンやZO-1等の発現を観察することで確認できる。基底膜を含むブルッフ膜の形成は、免疫染色によりエラスチン、1型コラーゲンまたは4型コラーゲン等の細胞表面での発現を観察することや、走査型電子顕微鏡による観察により確認することができる。

[0021] 本発明の調製する哺乳動物由来細胞が、網膜色素上皮細胞である場合には、以下の工程（3）をさらに含んでもよい。

（3）工程（2）で得られた培養細胞における分化マーカーの発現の有無を確認する工程

[0022] 工程（3）において、工程（2）で得られた培養細胞における分化マーカーの発現の有無を確認することによって、細胞シートが完成したことを判定することができる。本明細書において、分化マーカーは細胞の任意の箇所（例えば、細胞質、細胞膜、核膜など）で発現していてもよいが、好ましくは、播種した細胞と血清との接触面側で発現しているマーカーを対象とする。

[0023] 本明細書における「分化マーカー」としては、分化した細胞において特異的に発現しているか、他の分化細胞または未分化細胞、前駆細胞と比較して

発現が増幅あるいは減衰している遺伝子の転写産物、翻訳産物またはその分解産物が含まれる。そのような遺伝子としては、例えば、神経細胞分化マーカーとしては、チューブリン（特に β チューブリン）、MAP2、ニューロフィラメント、ニューロン特異的エノラーゼ、脂肪細胞分化マーカーとしては、aP2、グリセロリン酸脱水素酵素、アディプシン、レプチン、骨芽細胞分化マーカーとしては、プロコラーゲン1 α 1、RUNX2、アルカリホスファターゼ、オステオポンチン、オステオカルシン、網膜色素上皮細胞分化マーカーとしては、ベストロフィン-1（VMD2）、RPE-65、サイトケラチン、オクルディン、ZO-1、エラスチン、アクチン、1型コラーゲンまたは4型コラーゲンなどが挙げられる。

[0024] 「分化マーカーの発現の有無の確認」に用いられる試料としては、工程（2）で培養された細胞由来の分化マーカー（例、RNA、蛋白質、その分解産物など）を含有するものであれば特に制限されない。

[0025] 上記試料がRNAの場合における分化マーカー遺伝子の発現は、工程（2）で培養された細胞からRNA（例：全RNA、mRNA）画分を調製し、該画分中に含まれる該マーカー遺伝子の転写産物を検出するか、あるいは該細胞からRNAを抽出せずに直接細胞中のマーカー遺伝子産物を検出することにより調べることができる。

[0026] 細胞からRNA（例：全RNA、mRNA）画分を調製する場合、RNA画分の調製は、グアニジン-CsCl超遠心法、AGPC法など公知の手法を用いて行うことができるが、市販のRNA抽出用キット（例：RNeasy Mini Kit； QIAGEN製等）を用いて、微量試料から迅速且つ簡便に高純度の全RNAを調製することができる。RNA画分中の分化マーカー遺伝子の転写産物を検出する手段としては、例えば、ハイブリダイゼーション（ノーザンブロット、ドットブロット、DNAチップ解析等）を用いる方法、あるいはPCR（RT-PCR、競合PCR、リアルタイムPCR等）を用いる方法などが挙げられる。微量試料から迅速且つ簡便に定量性よく分化マーカー遺伝子の発現変動を検出できる点で競合PCRやリアル

タイムPCRなどの定量的PCR法が、また、複数のマーカー遺伝子の発現変動を一括検出することができ、検出方法の選択によって定量性も向上させ得るなどの点でDNAチップ解析が好ましい。

[0027] ノーザンブロットまたはドットブロットハイブリダイゼーションによる場合、分化マーカー遺伝子の検出は、該遺伝子の転写産物とハイブリダイズし得る核酸（プローブ）を用いて行うことができる。そのような核酸としては、分化マーカー遺伝子の転写産物とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る核酸が挙げられる。「ハイストリンジェントな条件」とは、例えば、 $6\times\text{SSC}$ (sodium chloride/sodium citrate) 中 45°C でのハイブリダイゼーション反応の後、 $0.2\times\text{SSC}/0.1\%$ SDS中 65°C での一回以上の洗浄などが挙げられる。当業者は、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、ハイブリダイゼーション反応の温度、プローブ濃度、プローブの長さ、ミスマッチの数、ハイブリダイゼーション反応の時間、洗浄液の塩濃度、洗浄の温度等を適宜変更することにより、所望のストリンジェンシーに容易に調節することができる。該核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。好ましくはDNAが挙げられる。

[0028] プローブとして用いられる核酸は、二本鎖であっても一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、アンチセンス鎖を用いることができる。該核酸の長さは標的核酸と特異的にハイブリダイズし得る限り特に制限はなく、例えば約15塩基以上、好ましくは約30塩基以上である。該核酸は、標的核酸の検出・定量を可能とするために、標識剤により標識されていることが好ましい。標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^3\text{P}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素な

どが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、プローブと標識剤との結合にビオチン（ストレプト）アビジンを用いることもできる。

[0029] ノーザンハイブリダイゼーションによる場合は、上記のようにして調製したRNA画分をゲル電気泳動にて分離した後、ニトロセルロース、ナイロン、ポリビニリデンジフロリド等のメンブレンに転写し、上記のようにして調製された標識プローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液中、上記「ハイストリンジェントな条件下で」ハイブリダイゼーションさせた後、適当な方法でメンブレンに結合した標識量をバンド毎に測定することにより、各分化マーカー遺伝子の発現量を測定することができる。ドットブロットの場合も、RNA画分をスポットしたメンブレンを同様にハイブリダイゼーション反応に付し（各マーカー遺伝子についてそれぞれ行う）、スポットの標識量を測定することにより、各マーカー遺伝子の発現量を測定することができる。

[0030] DNAチップ解析による場合、例えば、上記のようにして調製したRNA画分から、逆転写反応によりT7プロモーター等の適当なプロモーターを導入したcDNAを合成し、さらにRNAポリメラーゼを用いてcRNAを合成する（この時ビオチンなどで標識したモノヌクレオチドを基質として用いることにより、標識されたcRNAが得られる）。この標識cRNAを、上記したプローブを固相化したチップと接触させてハイブリダイゼーション反応させ、固相上の各プローブに結合した標識量を測定することにより、各分化マーカー遺伝子の発現量を測定することができる。当該方法は、検出する分化マーカー遺伝子（従って、固相化されるプローブ）の数が多くなるほど、迅速性および簡便性の面で有利である。

[0031] 一方、細胞からRNAを抽出せずにマーカー遺伝子を検出する場合、その検出手段として、*in situ* ハイブリダイゼーションを用いることができる。該方法では、細胞からRNAを抽出する代わりに、細胞を固定剤、

好ましくは沈殿固定剤、例えばアセトンで処理するか、又は緩衝ホルムアルデヒド溶液の中に短い時間インキュベーションすることによって細胞を固定する。固定化後、細胞をパラフィンの中に包埋してブロックを形成し、薄片を切り取ることで試料として用いることができる。良好に調製したパラフィン包埋サンプルは室温で何年も保存できる。プローブとして用いられる核酸は、上記したものと同様のものを用いることができる。in situ ハイブリダイゼーションは、細胞の血清接触面に分化マーカーの発現を直接確認することができる点で、本発明において好適に用いられる。

[0032] あるいは、工程（２）における培養した細胞における分化マーカー遺伝子の発現の確認は、該細胞からタンパク質画分を調製し、該画分中に含まれる該マーカー遺伝子の翻訳産物（即ち、マーカータンパク質）を検出するか、あるいは該細胞からタンパク質を抽出することなく直接細胞中のマーカー遺伝子の翻訳産物を検出することにより調べることができる。マーカータンパク質の検出は、各タンパク質に対する抗体を用いて、免疫学的測定法（例：ELISA、FIA、RIA、ウェスタンブロット等）によって行うこともできるし、酵素などの測定可能な生理活性を示すタンパク質においては、該生理活性を、各マーカータンパク質について公知の手法を用いて測定することによっても行い得る。あるいはまた、マーカータンパク質の検出は、MALDI-TOFMS等の質量分析法を用いても行うことができる。

尚、各マーカータンパク質に対する抗体は、該マーカータンパク質または該タンパク質、あるいはその部分ペプチドを感作抗原として、通常使用されるポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体作製技術に従って取得することができる。

[0033] 個々の免疫学的測定法を本発明の検査方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常技術的配慮を加えて分化マーカータンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江寛編「ラジオイムノア

ッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

[0034] 前記の細胞シートの作製方法であって、細胞が網膜色素上皮細胞である場合は、以下の工程(4)をさらに含んでもよい。

(4) 細胞の平面基材の接触する側と反対側にブルッフ膜の形成を確認する工程

[0035] 本明細書における「ブルッフ膜」とは、網膜色素上皮と脈絡膜の間にある薄い膜で、網膜色素上皮を裏打ちする層である。それは、膠原線維を主体とする無細胞性の構造で、脈絡膜と色素上皮細胞が接着し、脈絡膜から血管のない網膜外層へ物質を送る通路の役割を果たしている。単層上皮は移植操作などを行う際、非常に脆く破損しやすいため、従来は人工シートや羊膜など代用シート上で細胞を育てて用いていたが、細胞の分化が不十分になり、人

シートが移植部位の生物物理的現象の障害となる。それに対し、本発明では細胞自身が作る本来の基底膜や弾性線維を含むブルッフ膜が形成されることにより移植操作に耐えうる強度が得られる。また、本発明のブルッフ膜は血清に接する側に形成されるため、シートをブルッフ膜ごと培養皿から剥離することが容易である。

[0036] 本発明はまた、前記網膜色素上皮細胞シートの作製方法において、形成されたブルッフ膜を網膜色素上皮細胞シートから分離することを特徴とする、ブルッフ膜の *in vitro* 作成方法を提供する。網膜色素上皮上に形成されたブルッフ膜はEDTA処理することにより、またはマグネシウム、カルシウム無添加培地にて、シート表面でピペッティング、吸引操作によりシートからブルッフ膜を剥離、回収することが可能である。また、培養液を吸引して空気に接触させることや、希釈アルコール処理によってシート表面に脱水作用を加えることによっても剥離、回収が可能である。

[0037] 本発明は、また前記細胞シート作製方法に従って、得られる細胞シート、好ましくは、網膜色素上皮細胞シートに関する。本発明の細胞シートは、生体の用途としては、例えば、スクリーニング用途、毒性試験用途と様々な用途に用いることができる。また、本発明の細胞シートは疾患治療用移植材料として組織移植が必要な対象に好適に移植することができる。特に本発明の網膜色素上皮細胞シートは、眼疾患患者への網膜治療用移植材料として好適である。眼疾患としては、例えば、加齢黄斑変性疾患、網膜色素変性症等が挙げられる。また、本発明の網膜色素上皮細胞シートは、前記眼疾患に対する薬効スクリーニングや毒性評価などの各種スクリーニング用途としても利用できる。例えば、特表2007-517210に記載の方法に従って、毒性物質のスクリーニングに本発明の細胞シートを適用することができる。さらに、本発明の網膜色素上皮細胞シートは、視細胞外節の貪食能や神経保護作用などの視細胞の維持に関わる機能、ポンプ作用、タイトジャンクションによる網膜血管バリア機能などの、生体内における網膜色素上皮細胞が備える種々の様々な機能を評価するための *in vitro* モデルとして利用すること

も可能である。

- [0038] 本発明の疾患治療用移植材料は、ヒト、ヒト以外の哺乳動物（例：サル、マウス、ラット、イヌ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、ウサギ、ハムスター、モルモット等）における上記疾患を治療するために用いることができる。
- [0039] 本発明の疾患治療用移植材料の適用可能な疾患部位の範囲は、対象疾患、投与対象の動物種、年齢、性別、体重、症状などに依存して変化し得るが、例えば、加齢黄斑変性疾患に適用する場合は、移植すべき疾患部位の範囲が通常、 $0.07\text{ cm}^2 \sim 0.28\text{ cm}^2$ の範囲である。
- [0040] 本発明の疾患治療用移植材料は、一度にもしくは数回に分けて移植してもよい。移植の適用回数は疾患に応じて医療従事者、ガイドラインに従って決定されるが、例えば疾患が加齢黄斑変性疾患であった場合には、本発明の網膜色素上皮細胞シートを、その重篤度によって2回以上移植してもよい。また複数回移植を行う場合、インターバルは特に限定されないが、数日～数週間の期間を置いても良い。
- [0041] 本発明の疾患治療用移植材料は、医療従事者、ガイドラインに沿った適切な移植方法に従って移植される。例えば、胸部または腹腔内の治療箇所に対しては、開胸、開腹手術を適用できるほか、内視鏡的手法を採用することもできる。また、網膜下に本発明の疾患治療用移植材料として網膜色素上皮細胞シートを移植する場合、眼球網膜下の移植部位まで刺入した注射針からの水流に乗せる移植方法のほか、専用の運搬用治療器具によっても行うことができる。
- [0042] 本発明はさらに、前記ブルッフ膜作製方法によって得られるブルッフ膜を提供する。本発明のブルッフ膜は、細胞を含まない基底膜であるため、細胞を移植するよりブルッフ膜を移植するほうが規制上の制約が少なく、実用化のハードルが低い。また、機能解析などの研究用途としても有用である。

実施例

- [0043] 以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは単なる

例示であって、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

[0044] 眼球由来ヒト網膜色素上皮細胞の調製

ヒト網膜色素上皮 (RPE) 細胞 (hRPECs) を死後48時間以内の数名のドナーから採取した。該細胞をHam F-10培地 (10%ウシ胎児血清、診断用培地 (Glutamax II; Invitrogen) ペニシリンG (100IU/mL)、ストレプトマイシン (0.1mg/mL)、およびアムホテリシンB (0.25mg/L)) 中に懸濁し、10cmディッシュ上に播種した。培養は、95%空気/5%CO₂雰囲気下、37°Cで行った。

[0045] 播種細胞数の検討

細胞を播種する前に、播種細胞数を検討した。網膜色素上皮細胞の1細胞の直径は10~20μmである。本実施例においては10μmと仮定し、1細胞の面積は $5 \times 5 \times 3.14 = 78.5 \mu\text{m}^2$ と見積もった。従って、1mm²中を細胞で占める場合、播かなければならない細胞数は、 $1,000 \times 1,000 / 78.5 = \text{約} 12,740$ 細胞である。本実施例では、平面基材として4ウェルチャンバースライド (Lab-Tek) を用い (1ウェルあたり2cm²)、1ウェルを細胞で占めるためには、 $12,740 \times 2 \times 10 \times 10 = 2,548,000$ 、即ち、約250万個の細胞数が必要であると思積もることができた。通常の細胞培養では、75cm²培養皿にコンフルエントの状態まで育てた網膜色素上皮細胞の数が約100~250万個であり、250万個として細胞密度は、 $250 \text{万個} / 75 \text{cm}^2 = \text{約} 333 \text{細胞} / \text{mm}^2$ であり、生体における細胞密度 (4,000細胞/mm²程度) や本培養法で用いる細胞密度 (例えば400万個、細胞密度20,000細胞/mm²) よりかなり少ないものである。

[0046] 実施例1

ヒト網膜色素上皮シートの形成

眼球から採取した網膜色素上皮細胞を培養後、0.1%トリプシンおよび0.02%EDTAで5分間処理し、ピペットで集めた。集めたRPE細胞

を遠心し、数を計測し、上記検討結果に従い、4ウェルチャンバースライド（L a b - T e k）に100万個、200万個ずつ播種した（それぞれ5,000細胞/mm²、10,000細胞/mm²）。その結果、シートは形成されたものの、ウェル面積の1/4、1/2にそれぞれ収縮した（図1）。そこで、収縮しない細胞数は2,000,000細胞/cm²であると見積もり、新たに4ウェルチャンバースライドに播種した。その結果、細胞シートの収縮は観察されなかった（図2）。

また、細胞シートに対して免疫染色を行った。免疫染色はシートを4%パラフォルムアルデヒドにて固定後、ホルマウントによるか冷凍またはパラフィン切片を作成して、エラスチン、コラーゲンIV、コラーゲンI、アクチン、サイトケラチン、オクルディン、ZO-1など目的とするタンパク質に対する一次抗体を用いて、酵素抗体法または蛍光抗体法にて染色を行い、光学顕微鏡または蛍光顕微鏡で観察を行った。アクチンに関しては、蛍光標識したファロイジンによっても染色し観察可能である。かかる免疫染色の結果、細胞間接着および平滑筋アクチンの発現が、播種1日後に確認された（図3）。その後、ブルッフ膜のコンポーネントであるエラスチンおよびコラーゲンIVの発現がRPE細胞の血清接触表面に確認された（図4）。網膜色素上皮細胞の*in vitro*培養系で、エラスチンの発現を確認することができたことは、これまで報告がない。

[0047] また、前記の免疫染色は、別途下記の通りに行うことでも同様の結果が得られた。

作成したヒト網膜色素上皮シートを1Mリン酸バッファー生理食塩水（PBS）で2回洗浄し、4%パラフォルムアルデヒドを含有する0.2MPBS中で15分間固定を行った。固定後、網膜色素上皮シートをTween 20含有Tris-バッファー生理食塩水（TBS-T）で細胞シートを5回洗浄した。次いで、細胞シートをタンパク質ブロッキングバッファーでブロッキングの後、細胞シートを1次抗体で4℃、一晚培養した。用いた1次抗体としては、抗オクルディンヤギポリクローナル抗体（1:100; San

ta Cruz Biotechnology)、抗エラスチンウサギポリクローナル抗体(1:100; Calbiochem)を用いた。細胞シートをTBS-Tで3回洗浄した後、二次抗体で30分間、室温にて培養した。次いで、細胞シートをTBS-Tで3回洗浄し、乾燥後、DAPIと共にvectashieldで封入した。各切片は、光学顕微鏡および蛍光顕微鏡(AX-70; Olympus optical Co., Ltd., Tokyo, Japan)で観察した。

[0048] 実施例2

ヒトiPS細胞由来ヒト網膜色素上皮シートの形成

ヒト網膜色素上皮細胞として、iPS細胞由来RPE細胞を用いた点以外は、実施例1と同様の方法でヒト網膜色素上皮シートを形成した。iPS細胞由来RPE細胞として、Neuroscience Letters 458 (2009) 126-131に記載の方法で得たヒトiPS細胞を、国際公開WO01/088100号公報に記載の方法に準じた方法で分化誘導して得たRPE細胞を用いた。

[0049] 実施例3

ヒト網膜色素上皮シート由来タンパク質に対するウェスタンブロッティング

実施例1で作成したヒト網膜色素上皮シートの抽出物をプロテアーゼ阻害剤を含有するライシスバッファーで溶解した。得られたタンパク質を等量ずつSDS-PAGE(10%)で分離し、ニフッ化ポリビニリデンメンブレン(Immobilon-P; Millipore, Billerica, MA)に転写したのち、TBS-Tに溶解させた10%スキムミルクで一時間ブロッキングを行った。次いで、抗RPE-65マウスモノクローナル抗体(1:5000)、抗オクルディンウサギポリクローナル抗体(1:250)、抗サイトケラチン18マウスモノクローナル抗体(1:1000)、抗ZO-1ウサギポリクローナル抗体(1:50)、抗4型コラーゲンマウスモノクローナル抗体(1:1000)、抗エラスチンマウスモノクローナル抗体(1:1000)を1%スキムミルク含有TBS-Tにそれぞれ

れ溶解させた一次抗体で4℃一晩、メンブレンを培養した。TBS-Tで6回洗浄した後、メンブレンをアルカリホスファターゼがコンジュゲートされた二次抗体(50ng/ml)で1時間培養を行った。メンブレンを洗浄バッファーで6回洗浄して抗体を除去し、化学蛍光バッファーで染色を行った(図5)。標準化のために、メンブレンは抗GAPDHウサギモノクローナル抗体または抗アクチンウサギモノクローナル抗体でリプローブを行った。ヒト網膜色素上皮シート由来のタンパク質からは上記各抗体に対するタンパク質の発現が認められた。

[0050] 実施例4

ヒト網膜色素上皮シートの電子顕微鏡像解析

実施例1で作成したヒト網膜色素上皮シートを回収し、2.5%グルタルアルデヒドを含有する0.1Mリン酸バッファー(PB)中で60分間固定を行った。0.1MPBSで洗浄後、網膜色素上皮シートを1%OsO₄を含有する0.1MPBS中に2時間静置した。固定後、エタノールおよびブチルアルコールで脱水し、乾燥させた。次いで、網膜色素上皮シートをパラジウムでスパッタ被覆(標的試料と50mmの距離、5×10⁻²ミリバールで30mA、40秒間)を行い、走査型電子顕微鏡で観察した(図6)。電子顕微鏡像からは、コラーゲン線維および弾性線維(図6、矢印)の形成が認められた。

産業上の利用可能性

[0051] 本発明の方法によって、加齢黄斑変性患者に移植適用する網膜色素上皮細胞シートを比較的簡便に調製することができる。特に、培養に用いる細胞をiPS細胞由来の網膜色素上皮細胞とした場合、患者自身の細胞を利用可能となるため、移植の際の拒絶反応を回避することができる。

本出願は、日本で出願された特願2010-108674(出願日:平成22年5月10日)を基礎としており、その内容はすべて本明細書に含まれるものとする。

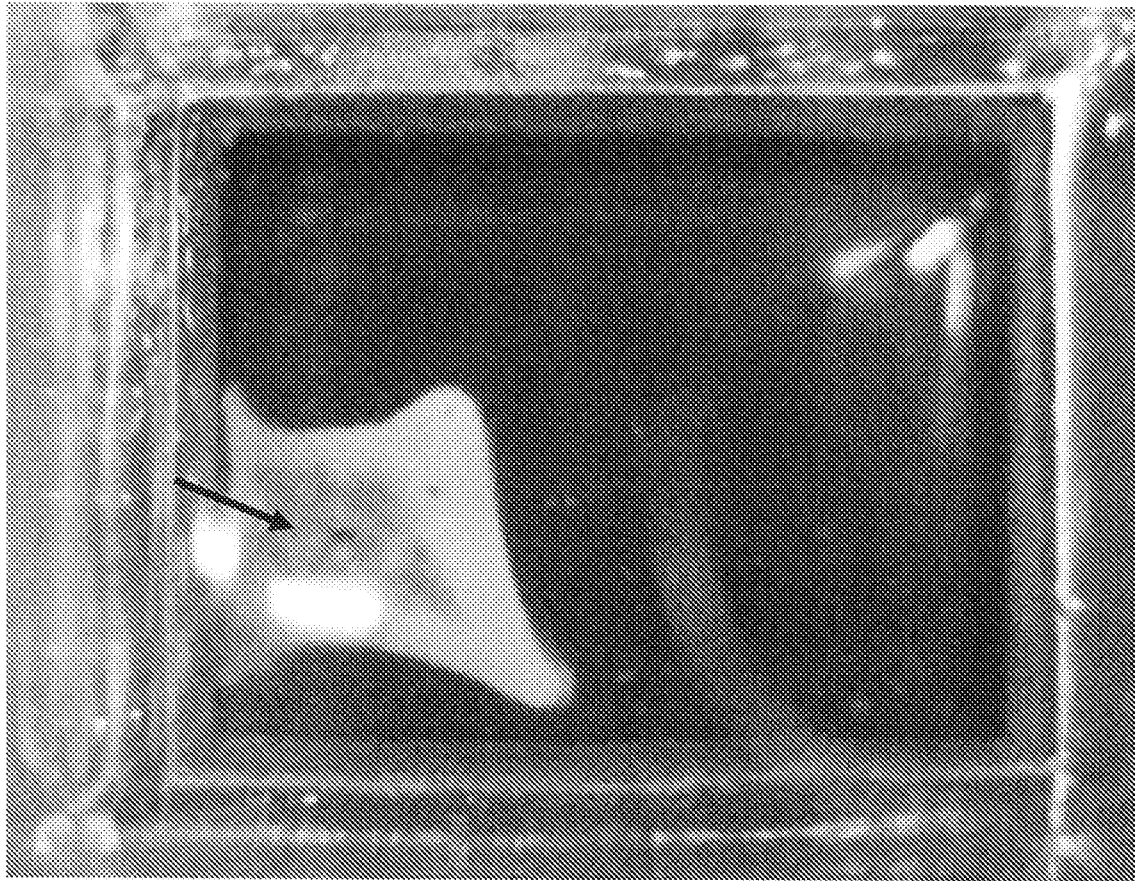
請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程を含む、細胞シートの作製方法。
- (1) 哺乳動物由来細胞を調製する工程；
- (2) 調製した細胞を平面基材上に高密度に播種し、培養する工程
- [請求項2] 工程(1)において、哺乳動物由来細胞が、上皮細胞又は内皮細胞である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 工程(1)において、哺乳動物由来細胞が、角膜内皮細胞、気管上皮細胞、消化管上皮細胞、子宮頸部上皮細胞、角膜上皮細胞、及び網膜色素上皮細胞からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 得られる細胞シートが、細胞間にタイトジャンクションが形成され、且つ平面基材の接触する側と反対側に基底膜が形成されている、請求項1に記載の方法。
- [請求項5] 工程(1)において、哺乳動物由来細胞が、網膜色素上皮細胞である、請求項1に記載の方法。
- [請求項6] 工程(2)において、高密度が、正常な眼球において観察される細胞密度以上の密度である、請求項5に記載の方法。
- [請求項7] 正常な眼球において観察される細胞密度以上の密度が、少なくとも4,000細胞数/mm²である、請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 以下の工程(3)をさらに含む、請求項5～7のいずれか1項に記載の方法。
- (3) 工程(2)で得られた培養細胞における分化マーカーの発現の有無を確認する工程
- [請求項9] 工程(3)において、分化マーカーが、ベストロフィン-1、RPE-65、サイトケラチン、オクルディン、ZO-1、エラスチン、アクチン、1型コラーゲンおよび4型コラーゲンからなる群より選択される少なくとも1種である、請求項8に記載の方法。
- [請求項10] 以下の工程(4)をさらに含む、請求項5～9のいずれか1項に記載の方法。

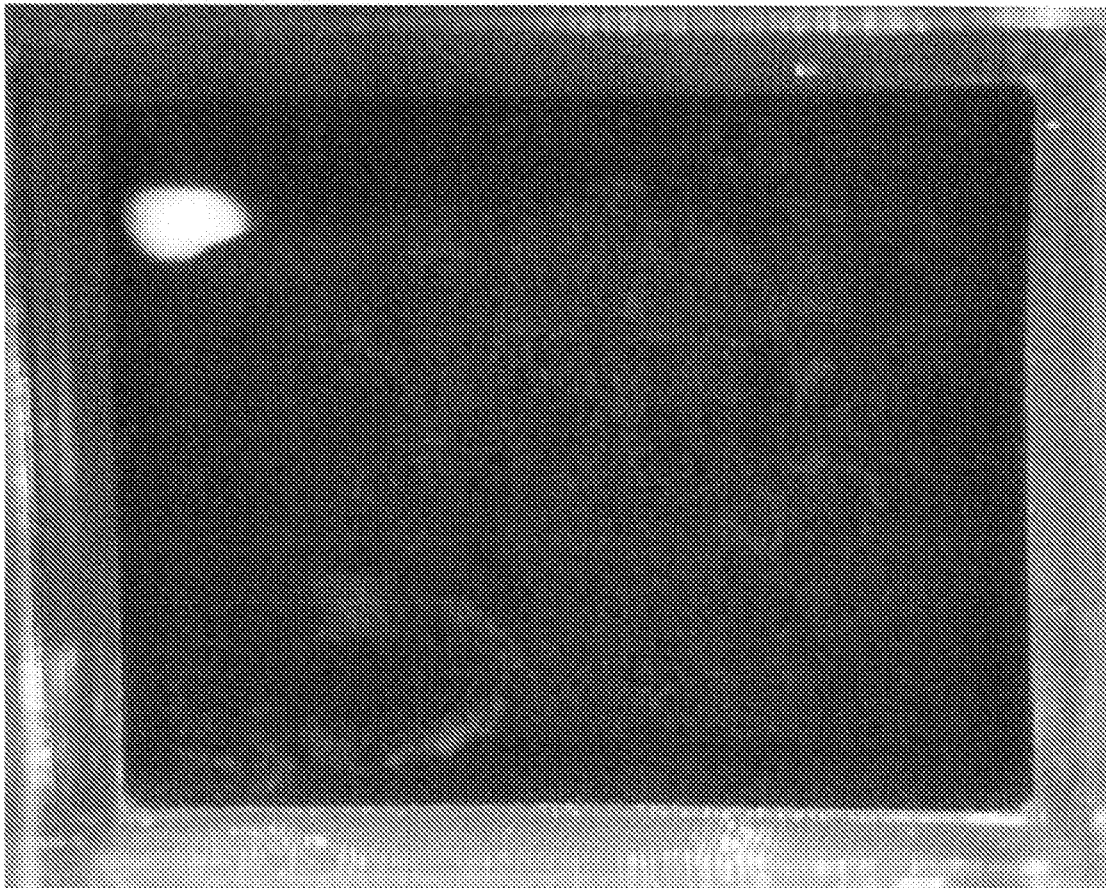
(4) 細胞の平面基材の接触する側と反対側にブルッフ膜の形成を確認する工程

- [請求項11] 請求項10に記載の方法で形成されたブルッフ膜を分離する工程を含む、ブルッフ膜の作製方法。
- [請求項12] 請求項1～10のいずれか1項に記載の方法で作製された細胞シート。
- [請求項13] 請求項1～10のいずれか1項に記載の方法で作製された細胞シートを含む疾患治療用移植材料。
- [請求項14] 請求項11に記載の方法で作製されたブルッフ膜。

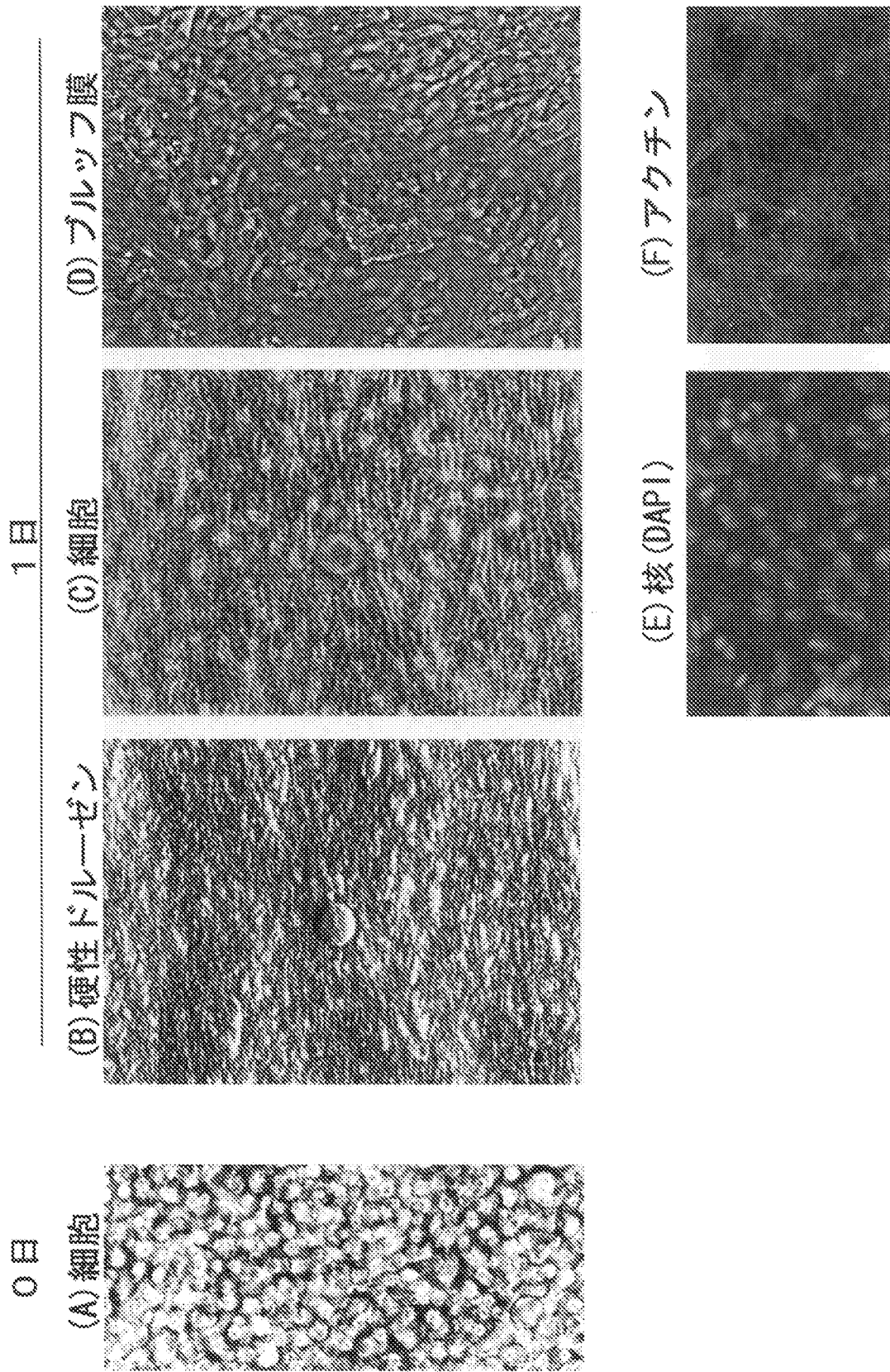
[図1]



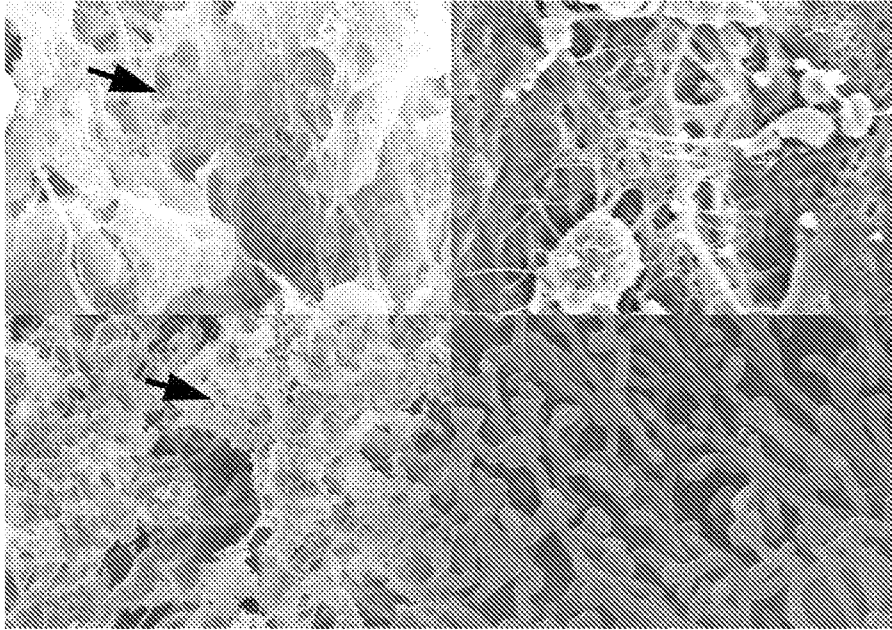
[図2]



[図3]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/060778

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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)

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)

CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	KUBOTA, A. et al, Transplantable retinal pigment epithelial cell sheets for tissue engineering, Biomaterials, 2006, Vol.27, No.19, p.3639-44, Abstract	1-9,12,13 10,11,14
X A	JP 2006-501848 A (TISSUETECH INC.), 19 January 2006 (19.01.2006), entire text; particularly, claim 22; example 16 & WO 2004/033635 A2 & EP 1556063 A2 & US 2006/002900 A1	1-9,12,13 10,11,14
X A	YAJI, N. et al, Transplantation of tissue-engineered retinal pigment epithelial cell sheets in a rabbit model, Biomaterials, 2009, Vol.30, No.5, p.797-803, Abstract	1-5,8,9,12, 13 6,7,10,11,14

 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
30 June, 2011 (30.06.11)Date of mailing of the international search report
12 July, 2011 (12.07.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/060778

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2007-509643 A (CELLULAR BIOENGINEERING INC.), 19 April 2007 (19.04.2007), entire text; particularly, claims; examples & WO 2005/037144 A2 & EP 1677848 A2	1-5, 8, 9, 12, 13 6, 7, 10, 11, 14
X A	JP 9-501303 A (Photogenesis, Inc.), 10 February 1997 (10.02.1997), entire text; particularly, claims; example 1 & WO 94/25569 A1	1-5, 8, 9, 12, 13 6, 7, 10, 11, 14
X A	NICOLAISSEN, B. et al, Behavior of human RPE cultured on Bruch's membrane and on necrotic debris, Invest Ophthalmol Vis Sci, 1989, Vol.30, No.5, p.813-22, Abstract	14 1-13
A	Risa NONAKA, "A role of fibulin-5 in the elastic fiber formation", The Annual Report of the Hoshi College of Pharmacy, no.51, 2009, pages 17 to 22, entire text	10, 11, 14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. 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 (IPC))

Int.Cl. 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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011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)

CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

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 A	KUBOTA, A. et al, Transplantable retinal pigment epithelial cell sheets for tissue engineering, Biomaterials, 2006, Vol.27, No.19, p.3639-44, Abstract	1-9, 12, 13 10, 11, 14
X A	JP 2006-501848 A (TISSUETECH INC) 2006.01.19, 全文, 特に請求項 22, 実施例 16 & WO 2004/033635 A2 & EP 1556063 A2 & US 2006/002900 A1	1-9, 12, 13 10, 11, 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

30.06.2011

国際調査報告の発送日

12.07.2011

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小堀 麻子

4C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	YAJI, N. et al, Transplantation of tissue-engineered retinal pigment epithelial cell sheets in a rabbit model, Biomaterials, 2009, Vol.30, No.5, p.797-803, Abstract	1-5, 8, 9, 12, 13 6, 7, 10, 11, 14
X A	JP 2007-509643 A (CELLULAR BIOENGINEERING INC) 2007.04.19, 全文, 特に請求項, 実施例 & WO 2005/037144 A2 & EP 1677848 A2	1-5, 8, 9, 12, 13 6, 7, 10, 11, 14
X A	JP 9-501303 A(フォトジェネシス インコーポレイテッド) 1997.02.10, 全文, 特に請求項, 実施例 1 & WO 94/25569 A1	1-5, 8, 9, 12, 13 6, 7, 10, 11, 14
X A	NICOLAISSEN, B. et al, Behavior of human RPE cultured on Bruch's membrane and on necrotic debris, Invest Ophthalmol Vis Sci, 1989, Vol.30, No.5, p.813-22, Abstract	14 1-13
A	野中里紗, 弾性線維形成における fibulin-5 の機能解析, 星薬科大学紀要, No.51, 2009, p.17-22, 全文	10, 11, 14