

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6401307号
(P6401307)

(45) 発行日 平成30年10月10日 (2018. 10. 10)

(24) 登録日 平成30年9月14日 (2018. 9. 14)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 M 3/00 (2006. 01)

C 1 2 M 3/00 A

C 1 2 N 5/071 (2010. 01)

C 1 2 N 5/071

C 1 2 N 5/0735 (2010. 01)

C 1 2 N 5/0735

C 1 2 N 5/074 (2010. 01)

C 1 2 N 5/074

C 1 2 N 5/075 (2010. 01)

C 1 2 N 5/075

請求項の数 10 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-572448 (P2016-572448)
 (86) (22) 出願日 平成26年8月1日 (2014. 8. 1)
 (65) 公表番号 特表2017-517267 (P2017-517267A)
 (43) 公表日 平成29年6月29日 (2017. 6. 29)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2014/007113
 (87) 国際公開番号 W02015/190644
 (87) 国際公開日 平成27年12月17日 (2015. 12. 17)
 審査請求日 平成29年2月17日 (2017. 2. 17)
 (31) 優先権主張番号 10-2014-0069970
 (32) 優先日 平成26年6月10日 (2014. 6. 10)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 515036246
 コリア アドバンスド インスティテュー
 ト オブ サイエンスアンド テクノロジ
 ー
 KOREA ADVANCED INST
 ITUTE OF SCIENCE AN
 D TECHNOLOGY
 大韓民国 305-701 テジョン ユ
 ソング テハロ 291
 291, Daehak-ro, Yus
 eong-gu, Daejeon, 3
 05-701 Republic of
 Korea

(74) 代理人 100107515
 弁理士 廣田 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞培養基板と、その製造方法及び用途

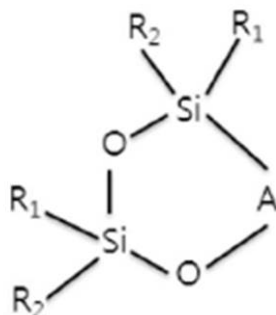
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

シクロシロキサン化合物が形成した重合体を含む細胞培養基板であって、
 前記シクロシロキサン化合物は、下記の化学式 1 で表され、

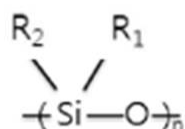
【化 1】

化学式 1



前記式において、
 A は、

【化 2】



であり ($n = 1 \sim 8$ の整数) ;

R_1 は、互いに独立して水素または C_{2-10} アルケニルであり ;

R_2 は、互いに独立して水素、 C_{1-10} アルキル、 C_{2-10} アルケニル、ハロ、金属元素、 C_{5-14} ヘテロシクロ、 C_{3-10} シクロアルキル、または C_{3-10} シクロアルケニルであり、

前記シクロシロキサンは、 R_1 位置に $n + 1$ 個または $n + 2$ 個の C_{2-10} アルケニルを有する細胞培養基板。

【請求項 2】

前記シクロシロキサン化合物は、2, 4, 6, 8 - テトラ (C_{1-10}) アルキル - 2, 4, 6, 8 - テトラ (C_{2-10}) アルケニルシクロテトラシロキサン、1, 3, 5 - トリ (C_{1-10}) アルキル - 1, 3, 5 - トリ (C_{2-10}) アルケニルシクロトリシロキサン、1, 3, 5, 7 - テトラ (C_{1-10}) アルキル - 1, 3, 5, 7 - テトラ (C_{2-10}) アルケニルシクロテトラシロキサン、1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ (C_{1-10}) アルキル - 1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ (C_{2-10}) アルケニルシクロペンタシロキサン、1, 3, 5 - トリ (C_{1-10}) アルキル - 1, 3, 5 - トリ (C_{2-10}) アルケニルシクロトリシロキサン、1, 3, 5, 7 - テトラ (C_{1-10}) アルキル - 1, 3, 5, 7 - テトラ (C_{2-10}) アルケニルシクロテトラシロキサン、1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ (C_{1-10}) アルキル - 1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ (C_{2-10}) アルケニルシクロペンタシロキサン、1, 3, 5 - トリ (C_{1-10}) アルキル - 1, 3, 5 - トリ (C_{2-10}) アルケニルシクロトリシロキサン、1, 3, 5, 7 - テトラ (C_{1-10}) アルキル - 1, 3, 5, 7 - テトラ (C_{2-10}) アルケニルシクロテトラシロキサン、1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ (C_{1-10}) アルキル - 1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ (C_{2-10}) アルケニルシクロペンタシロキサン、ヘキサ (C_{2-10}) アルケニルシクロトリシロキサン、オクタ (C_{2-10}) アルケニルシクロテトラシロキサン、デカ (C_{2-10}) アルケニルシクロペンタシロキサン、及びこれらの組合せで構成された群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の細胞培養基板。

【請求項 3】

前記シクロシロキサン化合物が形成した重合体は、前記シクロシロキサン化合物である第 1 単量体と、これと重合することができる第 2 単量体と、が形成した共重合体であることを特徴とする請求項 1 に記載の細胞培養基板。

【請求項 4】

前記第 2 単量体は、第 1 単量体と異なるシクロシロキサン化合物であることを特徴とする請求項 3 に記載の細胞培養基板。

【請求項 5】

前記第 2 単量体は、第 1 単量体との重合のための炭素二重結合を有する化合物であることを特徴とする請求項 3 に記載の細胞培養基板。

【請求項 6】

前記第 2 単量体は、ビニル基を有するシロキサン、メタクリレート系単量体、アクリレート系単量体、芳香族ビニル系単量体、アクリルアミド系単量体、無水マレイン酸、ビニル基を有するシラザンまたはシクロシラザン、ビニル基を有する C_{3-10} シクロアルカン、ビニルピロリドン、2 - (メタクリロイルオキシ) アセト酢酸エチル、1 - (3 - アミノプロピル) イミダゾール、ビニルイミダゾール、ビニルピリジン、ビニル基を有するシラン、及びこれらの組合せで構成された群から選択されることを特徴とする請求項 5 に記載の細胞培養基板。

【請求項 7】

10

20

30

40

50

前記細胞培養基板は、細胞スフェロイド形態の細胞集合体の製造用であることを特徴とする請求項 1 に記載の細胞培養基板。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の細胞培養基板上で細胞を培養する段階を含む細胞スフェロイド形態の細胞集合体の製造方法。

【請求項 9】

前記細胞は、体細胞、生殖細胞、癌細胞または幹細胞であることを特徴とする請求項 8 に記載の製造方法。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の化学式 1 で表されるシクロシロキサン化合物を単量体として含む重合体薄膜を蒸着を通じて基板上に形成させる段階を含む請求項 1 から 9 のいずれかに記載の細胞培養基板の製造方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、シクロシロキサン化合物が形成した重合体を含む細胞培養基板と、その製造方法、及び該細胞培養基板を用いて細胞スフェロイド形態の細胞集合体または誘導万能幹細胞を製造する方法に関する。

【背景技術】

20

【0002】

動物細胞培養は、動物体から生体組織を切り取って細胞を分離した後、培養器内で増殖させる過程を意味する。細胞の種類によって、寒天培地などの基質に付着させて培養する方法と培養液に浮遊させる方法などがあるが、3次元培養細胞を得るための多様な培養法が多く研究された（非特許文献1）。

【0003】

このような方法としては、コラーゲン、多孔性支持体（scaffold）、ヒドロゲルなどの支持体を用いる方法があり（非特許文献2～4）、支持体に依存しない方法としては、細胞スフェロイド（cell spheroid）を形成する懸滴培養（hanging-drop culture）方式がある。前記懸滴培養方式は、支持体を使わないという長所はあるが、1mm以下の微小細胞組織のみ製造することができる限界がある。

30

【0004】

最近、細胞の表面に付着するRGD塩基配列を有する磁化されたヒドロゲルとナノマイクロ粒子サイズの物質重合体とを用いた磁力浮上を基盤とする新たな培養法が開発された（非特許文献5）。しかし、この培養方法は、細胞表面に人工的な物質を付着しなければならない限界点がある。

【0005】

一方、誘導万能幹細胞（induced Pluripotent Stem Cell、iPSC）とは、胚芽幹細胞とは異なって、受精卵や女性の卵子を使わず、倫理的問題から自由でありながらも、分化能力は、胚芽幹細胞と類似しているレベルである幹細胞である。これは、体細胞に遺伝子の変形を加えて胚芽幹細胞と類似している分化特性を有する幹細胞を誘導する方式で作られるが、その方法には、体細胞から分離した核と核を除去した卵子とを結合して胚芽幹細胞を作る方法と、体細胞に4種の遺伝子を注入する方法、そして、最近発表された外部環境的刺激を通じて分化能力を誘導する方法などが知られている。

40

【0006】

既存の方法のうち、核置換方法は、成功率が低く、卵子を使うために、生命倫理的な論難から自由ではないという問題があり、同時に免疫反応が1つの問題点として指摘された。2012年ノーベル生理学医学賞を受賞した日本京都大学の山中伸弥（やまなかしんや）

50

教授研究チームによって、体細胞に4種の遺伝子発現因子を注入する方式で誘導万能幹細胞を作るには成功したが、ウイルスを用いるために、副作用として癌の発生が高くなるという短所を解決することができなかった状態である。また、細胞を採取し、幹細胞に逆分化させる過程を経て安定性を確保するためには、少なくとも6ヶ月の時間がかかるために、癌患者の治療に効果的に使われにくいという短所も存在する。

【0007】

最近、日本で体細胞を遺伝子操作なしに弱酸性に浸して置くことだけで、如何なる細胞にも分化することができる万能細胞を誘導することができるという発表があったが、実験結果を操作したという論難があるなど現在としては信頼するほどの結果として見られる状態ではない。

10

【0008】

このような研究に先立って、中国の研究チームによって、遺伝子を使わず、7種の小分子化合物を用いて誘導万能幹細胞を作った研究も存在するが、既存の遺伝子を用いた方法よりも注入される小分子化合物の数がさらに多いだけではなく、効率も既存の誘導万能幹細胞の誘導方法のように1%にも及ばないという限界を有している。

【0009】

本明細書の全般に亘って多数の論文及び特許文献が参照され、その引用が表示されている。引用された論文及び特許文献の開示内容は、その全体として本明細書に参照して挿入されて、本発明が属する技術分野のレベル及び本発明の内容がより明確に説明される。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Haycock JW. Methods Mol Biol, 695 (2011), pp. 1 - 15

【非特許文献2】Chevallay B, Herbage D., Med Biol Eng Comput, 38(2)(2000), pp. 211 - 218

【非特許文献3】Malet al., Biomed Microdevices, 12(4)(2010), pp. 753 - 760

【非特許文献4】Tibbitt MW et al., Biotechnol Bioeng, 103(4)(2009), pp. 655 - 663

30

【非特許文献5】Souza GR et al., Nat Nanotechnol, 5(4)(2010), pp. 291 - 296

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明者らは、前記問題点を解決するために鋭意努力した結果、シクロシロキサン化合物が形成した同種重合体または共重合体上で癌細胞、幹細胞及び体細胞のような多様な細胞を培養して、誘導万能幹細胞の初期分化段階として知られた細胞スフェロイドを形成させ、遺伝子及びタンパク質の発現分析を通じて、これら細胞スフェロイドがリプログラミングされたことを確認することによって、前記重合体を細胞培養のためのプラットフォームとして活用することができることを確認し、本発明を完成した。

40

【0012】

したがって、本発明の目的は、細胞培養基板を提供することである。

【0013】

本発明の他の目的は、細胞スフェロイド形態の細胞集合体の製造方法を提供することである。

【0014】

本発明のさらに他の目的は、誘導万能幹細胞の製造方法を提供することである。

【0015】

本発明のさらに他の目的は、細胞培養基板の製造方法を提供することである。

50

【 0 0 1 6 】

本発明の他の目的及び利点は、下記の発明の詳細な説明、特許請求の範囲及び図面によってより明確になる。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 7 】

本発明の一態様によれば、本発明は、シクロシロキサン化合物が形成した重合体を含む細胞培養基板を提供する。

【 0 0 1 8 】

本発明者らは、前記問題点を解決するために鋭意努力した結果、シクロシロキサン化合物が形成した同種重合体または共重合体上で癌細胞、幹細胞及び体細胞のような多様な細胞を培養して、誘導万能幹細胞の初期分化段階として知られた細胞スフェロイドを形成させ、遺伝子及びタンパク質の発現分析を通じて、これら細胞スフェロイドがリプログラミングされたことを確認することによって、前記重合体を細胞培養のためのプラットフォームとして活用することができるということを確認した。

【発明の効果】

【 0 0 1 9 】

本発明の特徴及び利点を要約すれば、次の通りである：

(i) 本発明は、シクロシロキサン化合物が形成した重合体を含む細胞培養基板と、その製造方法、及び前記細胞培養基板を用いて細胞スフェロイド形態の細胞集合体または誘導万能幹細胞を製造する方法を提供する。

(i i) 本発明の細胞培養基板上で細胞を培養することによって、容易に細胞スフェロイド形態の細胞集合体を形成させ、さらに前記細胞培養基板は、誘導万能幹細胞の製造のための細胞培養プラットフォームとして活用可能である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 0 】

【図 1】本発明の一実施例による細胞培養基板の模式図を示す。

【図 2】蒸着前後の細胞培養基板の表面接触角を測定した結果を示す。

【図 3】本発明の細胞培養基板上で培養して形成された細胞スフェロイドのイメージを示す。

【図 4】免疫染色法を通じる細胞スフェロイドの分析結果を示す。スケールバーは、1 0 0 μ m である。

【図 5】免疫染色法を通じる細胞スフェロイドの分析結果を示す。スケールバーは、1 0 0 μ m である。

【図 6】細胞スフェロイドの遺伝子の分析結果を示す。

【図 7】細胞スフェロイドのタンパク質の分析結果を示す。

【図 8】細胞スフェロイドで N a n o g が発現されたことを示す。スケールバーは、1 0 0 μ m である。

【図 9】多様なシクロシロキサン化合物が形成した重合体で表面コーティングされたそれぞれの細胞培養基板上で培養して形成された細胞スフェロイドのイメージを示す。

【図 1 0】シクロシロキサン化合物を含む多様な共重合体で表面コーティングされたそれぞれの細胞培養基板上で培養して形成された細胞スフェロイドのイメージを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 1 】

本明細書で使われた表現、“シクロシロキサンが形成した重合体を含む細胞培養基板”は、シクロシロキサンが形成した重合体が細胞培養基板の一部である場合（例えば、前記重合体で表面がコーティングされた細胞培養基板）を意味するだけではなく、シクロシロキサンが形成した固相の重合体自体を細胞培養基板として使えるということの意味するために使われる。

【 0 0 2 2 】

本発明によれば、前記細胞培養基板は、細胞を培養することができる任意の空間を提供

10

20

30

40

50

することで十分であるために、その形態は制限もない。例えば、前記細胞培養基板は、ディッシュ（培養皿）、シャレープレート（例えば、6 ウェル、24 ウェル、48 ウェル、96 ウェル、384 ウェル、9600 ウェルなどのマイクロタイタープレート、マイクロプレート、ディープウェルプレートなど）、フラスコ、チャンバスライド、チューブ、セルファクトリー、ローラーボトル、スピナーフラスコ、中空繊維（hollow fiber）、マイクロキャリア、ビーズなどの形状を有する。

【0023】

また、支持性を有する物質であれば、前記細胞培養基板として制限なしに使い、例えば、プラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンなど）、金属、シリコン及びガラスなどを細胞培養基板として使うことができる。本発明の一実施例による細胞培養基板の構造は、図1に示されている。

10

【0024】

本明細書で使われた表現、“シクロシロキサン化合物が形成した重合体”は、(i) 同種のシクロシロキサン化合物が重合して形成した同種重合体（homopolymer）、(ii) 異種のシクロシロキサン化合物が重合して形成した共重合体（copolymer）、及び(iii) 同種または異種のシクロシロキサン化合物と他の単量体化合物とが重合して形成した共重合体をいずれもを包括する意味として使われる。本明細書で、前記共重合体は、ランダム共重合体、ブロック共重合体、交互共重合体またはグラフト共重合体であり得るが、これらに制限されるものではない。

20

【0025】

したがって、本発明の一具現例によれば、前記シクロシロキサン化合物が形成した重合体は、同種のシクロシロキサン化合物が重合して形成した同種重合体である。

【0026】

本発明の他の一具現例によれば、前記シクロシロキサン化合物が形成した重合体は、前記シクロシロキサン化合物である第1単量体と、これと重合することができる第2単量体と、が形成した共重合体である。下記の実施例から確認したように、シクロシロキサン化合物を含む共重合体上で細胞を培養することによって、細胞スフェロイド形態の細胞集合体を製造することができる（図10参照）。

【0027】

1つの特定例によれば、前記第2単量体は、第1単量体と異なるシクロシロキサン化合物である（異種のシクロシロキサン化合物が形成した共重合体）。

30

【0028】

他の1つの特定例によれば、前記第2単量体は、第1単量体との重合のための炭素二重結合を有する化合物である。この際、第1単量体も、第2単量体との重合のための炭素二重結合を有する。このような第2単量体化合物は、例えば、ビニル基を有するシロキサン（例えば、ヘキサビニルジシロキサン、テトラメチルジシロキサンなど）、メタクリレート系単量体、アクリレート系単量体、芳香族ビニル系単量体（例えば、ジビニルベンゼン、安息香酸ビニル、スチレンなど）、アクリルアミド系単量体（例えば、N-イソプロピルアクリルアミド、N,N-ジメチルアクリルアミドなど）、無水マレイン酸、ビニル基を有するシラザンまたはシクロシラザン（例えば、2,4,6-トリメチル-2,4,6-トリビニルシクロシラザンなど）、ビニル基を有するC₃₋₁₀シクロアルカン（例えば、1,2,4-トリビニルシクロヘキサンなど）、ビニルピロリドン、2-（メタクリロイルオキシ）アセト酢酸エチル、1-（3-アミノプロピル）イミダゾール、ビニルイミダゾール、ビニルピリジン、ビニル基を有するシラン（例えば、アリルトリクロロシラン、アクリロキシメチルトリメトキシシランなど）、及びこれらの組合せで構成された群から選択される。

40

【0029】

前記メタクリレート系単量体には、例えば、メタクリレート、メタクリル酸、グリシジルメタクリレート、パーフルオロメタクリレート、ベンジルメタクリレート、2-（ジメチルアミノ）エチルメタクリレート、フルフリルメタクリレート、3,3,4,4,5,

50

5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 10 - ヘプタデカフルオロデシルメ
タクリレート、ヘキシルメタクリレート、無水メタクリル酸、ペンタフルオロフェニルメ
タクリレート、プロペニルメタクリレート、テトラヒドロフルフリルメタクリレート、ブ
チルメタクリレート、メタクリロイルクロリド、及びジ(エチレングリコール)メチルエ
ステルメタクリレートなどがある。

【0030】

前記アクリレート系単量体には、例えば、アクリレート、2-(ジメチルアミノ)エチ
ルアクリレート、エチレングリコールジアクリレート、1H, 1H, 7H-ドデカフルオ
ロヘプチルアクリレート、1H, 1H, 7H-ドデカフルオロヘプチルアクリレート、イ
ソボニルアクリレート、1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロデシルアクリレート、テ
トラヒドロフルフリルアクリレート、ポリ(エチレングリコール)ジアクリレート、1H
, 1H, 7H-ドデカフルオロヘプチルアクリレート、及びプロペニルアクリレートなど
がある。

10

【0031】

本発明の共重合体は、本明細書で言及した単量体以外に他の単量体を共単量体として追
加含みうる。

【0032】

本発明の一具現例によれば、前記共重合体には、シクロシロキサン化合物が少なくとも
50%以上含有される。1つの特定例によれば、前記共重合体には、シクロシロキサン化
合物が少なくとも60%以上、70%以上、80%以上、または90%以上含有される。
このような含有量は、流量(flow rate; 単位: sccm)を基準とし、90%
は、9:1の流量比率(シクロシロキサン化合物:他の単量体)で各単量体を流動させて
(流した)形成された共重合体に含まれたシクロシロキサン化合物の含有量を意味し、8
0%は、8:1の流量比率で、70%は、7:1の流量比率で、60%は、6:1の流量
比率で流動させて形成された共重合体に含まれたシクロシロキサン化合物の含有量を意味
する。

20

【0033】

本明細書で使われた用語、“シクロシロキサン化合物”は、シクロシロキサン構造を基
本骨格として有しながら、そのケイ素原子位置に官能基(例えば、アルキル基、アルケニ
ル基など)を有する化合物を包括するために使われる。

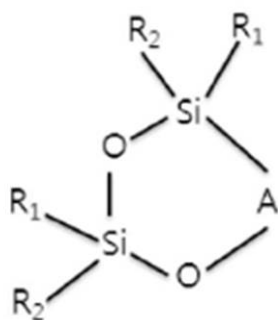
30

【0034】

本発明の一具現例によれば、前記シクロシロキサン化合物は、下記の化学式1で表され
る。

【化1】

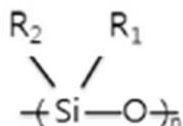
化学式1



40

前記式において、
Aは、

【化 2】



であり ($n = 1 \sim 8$ の整数) ;

R_1 は、互いに独立して水素または C_{2-10} アルケニルであり (但し、 R_1 のうち少なくとも 2 箇所は、 C_{2-10} アルケニルである) ;

R_2 は、互いに独立して水素、 C_{1-10} アルキル、 C_{2-10} アルケニル、ハロ、金属元素、 C_{5-14} ヘテロシクロ、 C_{3-10} シクロアルキル、または C_{3-10} シクロアルケニルである。

10

【0035】

本明細書で使われた用語、“アルキル”は、直鎖状または分枝鎖状の非置換または置換の飽和炭化水素基を意味し、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソブチル、ペンチルまたはヘキシルなどを含む。 $C_1 \sim C_{10}$ アルキルは、炭素数 1 ~ 10 のアルキルユニットを有するアルキル基を意味し、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキルが置換された場合、置換体の炭素数は含まれていないものである。

【0036】

本発明の一具現例によれば、本明細書で、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキルは、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_7$ アルキルまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルである。

20

【0037】

本明細書で使われた用語、“アルケニル”は、指定された炭素数を有する直鎖状または分枝鎖状の非置換または置換の不飽和炭化水素基を示し、例えば、ビニル、プロペニル、アリル、イソプロペニル、ブテニル、イソブテニル、 t -ブテニル、 n -ペンテニル及び n -ヘキセニルを含む。 C_{2-10} アルケニルは、炭素数 1 ~ 10 のアルケニルユニットを有するアルケニル基を意味し、 C_{2-10} アルケニルが置換された場合、置換体の炭素数は含まれていないものである。

【0038】

本発明の一具現例によれば、本明細書で、 C_{2-10} アルケニルは、 C_{2-8} アルケニル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-5} アルケニル、 C_{2-4} アルケニルまたは C_{2-3} アルケニルである。

30

【0039】

本発明の一具現例によれば、前記 R_1 のうち少なくとも 3 箇所は、 C_{2-10} アルケニルである。

【0040】

本発明の一具現例によれば、前記シクロシロキサンは、 R_1 位置に $n + 1$ 個または $n + 2$ 個の C_{2-10} アルケニルを有する。例えば、 n が 2 である場合、化学式 1 の化合物は、 R_1 位置に 3 または 4 個の C_{2-10} アルケニルを有するシクロテトラシロキサンになる。このようなアルケニル基は、重合反応に関与する。

【0041】

40

本明細書で使われた用語、“ハロ”は、ハロゲン族元素を示し、例えば、フルオロ、クロロ、ブロモ及びヨードを含む。

【0042】

本明細書で使われた用語、“金属元素”は、アルカリ金属元素 (Li 、 Na 、 K 、 Rb 、 Cs 、 Fr)、アルカリ土類金属元素 (Ca 、 Sr 、 Ba 、 Ra)、アルミニウム族元素 (Al 、 Ga 、 In 、 Tl)、錫族元素 (Sn 、 Pb)、貨幣金属元素 (Cu 、 Ag 、 Au)、亜鉛族元素 (Zn 、 Cd 、 Hg)、希土類元素 (Sc 、 Y 、57 - 71)、チタン族元素 (Ti 、 Zr 、 Hf)、バナジウム族元素 (V 、 Nb 、 Ta)、クロム族元素 (Cr 、 Mo 、 W)、マンガン族元素 (Mn 、 Tc 、 Re)、鉄族元素 (Fe 、 Co 、 Ni)、白金族元素 (Ru 、 Rh 、 Pd 、 Os 、 Ir 、 Pt)、及びアクチノイド元素 (89

50

～ 103) のような金属性単元素物質を作る元素を意味する。

【0043】

本明細書で使われた用語、“ヘテロシクロ”は、一部または完全に飽和されたモノサイクル型またはバイサイクル型の5員～14員のヘテロシクロ環を意味する。N、O及びSは、ヘテロ原子の例である。ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、ピラゾール、オキサゾール、イソオキサゾール、チアゾール、イソチアゾール、テトラゾール、1, 2, 3, 5 - オキサチアジアゾール - 2 - オキシド、トリアゾール、オキサジアゾール、イソオキサゾール、オキサチアゾリジンジオン、3 - ヒドロキシピロ - 2, 4 - ジオン、5 - オキソ - 1, 2, 4 - チアジアゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、インドール、イソインドール、インダゾール、フタラジン、キノリン、イソキノリン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン及びカルボリンは、 C_{5-14} ヘテロシクロの例である。

10

【0044】

本明細書で使われた用語、“シクロアルキル”は、サイクリック炭化水素ラジカルを意味し、これは、シクロプロピル、シクロブチル及びシクロペンチルを含む。 C_{3-10} シクロアルキルは、リング構造を形成する炭素数が3～10であるシクロアルキルを意味し、 C_{3-10} シクロアルキルが置換された場合、置換体の炭素数は含まれていないものである。

【0045】

本発明の一具現例によれば、本明細書で、 $C_1 \sim C_{10}$ シクロアルキルは、 $C_1 \sim C_8$ シクロアルキル、 $C_1 \sim C_7$ シクロアルキル、または $C_1 \sim C_6$ シクロアルキルである。

20

【0046】

本明細書で使われた用語、“シクロアルケニル”は、少なくとも1つの二重結合を有するサイクリック炭化水素基を意味し、例えば、シクロペンテン、シクロヘキセン及びシクロヘキサジエンを含む。 C_{3-10} シクロアルケニルは、リング構造を形成する炭素数が3～10であるシクロアルケニルを意味し、 C_{3-10} シクロアルケニルが置換された場合、置換体の炭素数は含まれていないものである。

【0047】

本発明の一具現例によれば、本明細書で、 C_{2-10} シクロアルケニルは、 C_{2-8} シクロアルケニル、 C_{2-6} シクロアルケニル、 C_{2-5} シクロアルケニル、 C_{2-4} シクロアルケニル、または C_{2-3} シクロアルケニルである。

30

【0048】

本発明の一具現例によれば、前記 R_2 は、互いに独立して水素、 C_{1-10} アルキルまたは C_{2-10} アルケニルである。1つの特定例によれば、前記 R_2 のうち少なくとも2箇所または少なくとも3箇所は、 C_{1-10} アルキルまたは C_{2-10} アルケニルであり得る。1つの特定例によれば、前記シクロシロキサンは、 R_2 位置に $n+1$ 個または $n+2$ 個の C_{1-10} アルキルまたは C_{2-10} アルケニルを有しうる。

【0049】

本発明の一具現例によれば、前記 n は、1～7の整数、1～6の整数、1～5の整数、1～4の整数、または1～3の整数である。

【0050】

本発明の一具現例によれば、前記シクロシロキサン化合物は、2, 4, 6, 8 - テトラ(C_{1-10})アルキル - 2, 4, 6, 8 - テトラ(C_{2-10})アルケニルシクロテトラシロキサン、1, 3, 5 - トリ(C_{1-10})アルキル - 1, 3, 5 - トリ(C_{2-10})アルケニルシクロトリシロキサン、1, 3, 5, 7 - テトラ(C_{1-10})アルキル - 1, 3, 5, 7 - テトラ(C_{2-10})アルケニルシクロテトラシロキサン、1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ(C_{1-10})アルキル - 1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ(C_{2-10})アルケニルシクロペンタシロキサン、1, 3, 5 - トリ(C_{1-10})アルキル - 1, 3, 5 - トリ(C_{2-10})アルケニルシクロトリシロキサン、1, 3, 5, 7 - テトラ(C_{1-10})アルキル - 1, 3, 5, 7 - テトラ(C_{2-10})アルケニルシクロテトラシロキサン、1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ(C_{1-10})アルキル - 1, 3, 5, 7,

40

50

9 - ペンタ (C_{2-10}) アルケニルシクロペンタシロキサン、1, 3, 5 - トリ (C_{1-10}) アルキル - 1, 3, 5 - トリ (C_{2-10}) アルケニルシクロトリシロキサン、1, 3, 5, 7 - テトラ (C_{1-10}) アルキル - 1, 3, 5, 7 - テトラ (C_{2-10}) アルケニルシクロテトラシロキサン、1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ (C_{1-10}) アルキル - 1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ (C_{2-10}) アルケニルシクロペンタシロキサン、ヘキサ (C_{2-10}) アルケニルシクロトリシロキサン、オクタ (C_{2-10}) アルケニルシクロテトラシロキサン、デカ (C_{2-10}) アルケニルシクロペンタシロキサン、及びこれらの組合せで構成された群から選択される。

【0051】

1つの特定例によれば、前記シクロシロキサン化合物は、2, 4, 6, 8 - テトラ (C_{1-6}) アルキル - 2, 4, 6, 8 - テトラ (C_{2-4}) アルケニルシクロテトラシロキサン (一例として、2, 4, 6, 8 - テトラメチル - 2, 4, 6, 8 - テトラビニルシクロテトラシロキサン)、1, 3, 5 - トリ (C_{1-6}) アルキル - 1, 3, 5 - トリ (C_{2-4}) アルケニルシクロトリシロキサン (一例として、1, 3, 5 - トリイソプロピル - 1, 3, 5 - トリビニルシクロトリシロキサン)、1, 3, 5, 7 - テトラ (C_{1-6}) アルキル - 1, 3, 5, 7 - テトラ (C_{2-4}) アルケニルシクロテトラシロキサン (一例として、1, 3, 5, 7 - テトライソプロピル - 1, 3, 5, 7 - テトラビニルシクロテトラシロキサン)、1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ (C_{1-6}) アルキル - 1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ (C_{2-4}) アルケニルシクロペンタシロキサン (一例として、1, 3, 5, 7, 9 - ペンタイソプロピル - 1, 3, 5, 7, 9 - ペンタビニルシクロペンタシロキサン)、1, 3, 5 - トリ (C_{1-6}) アルキル - 1, 3, 5 - トリ (C_{2-4}) アルケニルシクロトリシロキサン (一例として、1, 3, 5 - トリ - sec - ブチル - 1, 3, 5 - トリビニルシクロトリシロキサン)、1, 3, 5, 7 - テトラ (C_{1-6}) アルキル - 1, 3, 5, 7 - テトラ (C_{2-4}) アルケニルシクロテトラシロキサン (一例として、1, 3, 5, 7 - テトラ - sec - ブチル - 1, 3, 5, 7 - テトラビニルシクロテトラシロキサン)、1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ (C_{1-6}) アルキル - 1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ (C_{2-4}) アルケニルシクロペンタシロキサン (一例として、1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ - sec - ブチル - 1, 3, 5, 7, 9 - ペンタビニルシクロペンタシロキサン)、1, 3, 5 - トリ (C_{1-6}) アルキル - 1, 3, 5 - トリ (C_{2-4}) アルケニルシクロトリシロキサン (一例として、1, 3, 5 - トリエチル - 1, 3, 5 - トリビニルシクロトリシロキサン)、1, 3, 5, 7 - テトラ (C_{1-6}) アルキル - 1, 3, 5, 7 - テトラ (C_{2-4}) アルケニルシクロテトラシロキサン (一例として、1, 3, 5, 7 - テトラエチル - 1, 3, 5, 7 - テトラビニルシクロテトラシロキサン)、1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ (C_{1-6}) アルキル - 1, 3, 5, 7, 9 - ペンタ (C_{2-4}) アルケニルシクロペンタシロキサン (一例として、1, 3, 5, 7, 9 - ペンタエチル - 1, 3, 5, 7, 9 - ペンタビニルシクロペンタシロキサン)、ヘキサ (C_{2-4}) アルケニルシクロトリシロキサン (一例として、ヘキサビニルシクロトリシロキサン)、オクタ (C_{2-4}) アルケニルシクロテトラシロキサン (一例として、オクタビニルシクロテトラシロキサン)、デカ (C_{2-4}) アルケニルシクロペンタシロキサン (一例として、デカビニルシクロペンタシロキサン)、及びこれらの組合せで構成された群から選択される。

【0052】

本発明の一具現例によれば、前記細胞培養基板は、細胞スフェロイド形態の細胞集合体の製造のための細胞培養基板である。分化または未分化細胞を、本発明の細胞培養基板上で培養して、細胞スフェロイド形態の細胞集合体を形成させることができる。

【0053】

本発明の一具現例によれば、前記細胞培養基板は、誘導万能幹細胞の製造のための細胞培養基板である。体細胞、生殖細胞、癌細胞などの分化された細胞を、本発明の細胞培養基板上で培養して、これら分化細胞から万能幹細胞を誘導 (形成) することができる。

【0054】

10

20

30

40

50

本発明の一具現例によれば、前記シクロシロキサン化合物が形成した重合体は、細胞培養基板の上にコーティングされる。このような重合体の表面コーティングは、当該分野によく知られた化学気相蒸着法でなされうる。

【0055】

本発明の一具現例によれば、前記細胞培養基板は、細胞培養のための培養器具（培養装置）内に備えられうる。

【0056】

本発明の一具現例によれば、前記細胞培養基板は、水接触角が90°以上（例えば、90～100°）である。

【0057】

本発明の他の態様によれば、本発明は、本発明の細胞培養基板上で細胞を培養する段階を含む細胞スフェロイド形態の細胞集合体の製造方法を提供する。

【0058】

本発明のさらに他の態様によれば、本発明は、本発明の細胞培養基板上から分化された細胞を培養する段階を含む誘導万能幹細胞の製造方法を提供する。

【0059】

本発明の一具現例によれば、前記細胞の培養は、培地で実施する。すなわち、細胞の培養は、培地の存在下でシクロシロキサンが形成した重合体上でなされる。本明細書で使われた用語、“培地（culture media）”は、体外培養条件で細胞の生存を支持させる培養液を意味し、細胞の培養に適切な当該分野で使われる通常の培地をいずれも含む。また、細胞の種類によって、培地と培養条件とを異なるように選択することができる。培養に使われる培地としては、例えば、細胞培養最小培地（cell culture minimum medium；CCMM）を使い、前記細胞培養最小培地は、一般的に炭素源、窒素源及び微量元素成分を含む。このような細胞培養最小培地には、例えば、DMEM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）、MEM（Minimal essential Medium）、BME（Basal Medium Eagle）、RPMI1640、F-10、F-12、αMEM（α Minimal essential Medium）、GMEM（Glasgow's Minimal essential Medium）、及びIscove's Modified Dulbecco's Mediumなどがある。

【0060】

細胞の培養方法や培養条件は、本発明の細胞培養基板を使う点を除けば、通常の細胞培養方法や培養条件をそのまま使うことができる。動物細胞の培養方法及び培養条件は、当該分野によく知られた参考書籍であるAnimal Cell Culture：A Practical Approach 第3版（Masters編、Oxford University Press，2000）に示されており、細胞培養のための試薬及びキット類は、Sigma-Aldrich社、Invitrogen/GIBCO社、Clontech社、Stratagene社などの販売業者から入手可能である。

【0061】

細胞の培養は、細胞スフェロイド形態の細胞集合体が形成されるまでなされ、例えば、10時間～60時間（一例として、10時間～48時間、または20時間～48時間）の間になされうる。

【0062】

本発明の一具現例によれば、前記分化された細胞は、体細胞または癌細胞である。前記体細胞は、生体を構成する細胞のうち、生殖細胞以外のあらゆる細胞を含む。1つの特定例によれば、前記体細胞は、哺乳類（例えば、マウス、ラット、兎、豚、羊、山羊、牛、猿及びヒト）の体細胞である。

【0063】

本発明の一具現例によれば、細胞スフェロイド形態の細胞集合体の製造のために、本発明の細胞培養基板上で培養される細胞は、分化された細胞（例えば、体細胞、生殖細胞、

10

20

30

40

50

癌細胞)または未分化細胞(例えば、間葉幹細胞と脂肪由来幹細胞のような幹細胞)である。

【0064】

本発明の一具現例によれば、前記細胞スフェロイドは、SOX2、OCT4またはNanogを発現する。

【0065】

本発明の一具現例によれば、前記細胞スフェロイドは、 β -カテニンとサバイビン(survivin)タンパク質の付着細胞に比べて、さらに高いレベルに発現する。

【0066】

下記の実施例では、重合体薄膜が蒸着された細胞培養基板で体細胞を培養して、細胞スフェロイド形態の集合体を形成させた後、細胞スフェロイドの遺伝子及びタンパク質の発現の様相が、本来の細胞と差があることを確認して、細胞がリプログラミングされたことを確認した(図3ないし図8参照)。また、ラット由来の線維芽細胞を前記細胞培養基板で培養した結果、未分化多能性幹細胞で必ず発現されなければならない遺伝子であるOCT₄とNanogとが発現されたことを確認し(図5及び図8参照)、RT-PCRを通じて遺伝子レベルでも多能性と関連した遺伝子であるSOX2の発現を確認した(図6参照)。

10

【0067】

誘導万能幹細胞の形成を確認する方法(細胞多能性を確認する方法)としては、AP染色、細胞蛍光染色、幹細胞-特異的遺伝子発現及びウイルス遺伝子サイレンシングの定量PCR分析、キメラ形成分析、及び生殖系トランスミッション検出などの方法を利用できる。

20

【0068】

本発明のさらに他の態様によれば、本発明は、シクロシロキサン化合物を単量体として含む重合体薄膜を蒸着を通じて基板上に形成させる段階を含む本発明の細胞培養基板の製造方法を提供する。

【0069】

本発明の一具現例によれば、前記重合体薄膜は、化学気相蒸着法で基板上に形成される。一例として、前記重合体薄膜は、開始剤を用いる化学気相蒸着法(iCVD)で基板上に形成されうる。iCVDは、工程全体で添加剤や溶媒が全く使われず、生成された高分子薄膜の純度が非常に高いために、細胞培養への適用において、有害な溶媒を使わないという長所がある。iCVDによる蒸着は、重合体薄膜が蒸着される基板表面の温度を35~45℃、反応器内のチャンバの圧力を200~250mbarに保持しながら、30~60分間実施することができる。

30

【0070】

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳しく説明する。これら実施例は、単に本発明をより具体的に説明するためのものであって、本発明の要旨によって、本発明の範囲が、これら実施例によって制限されないということは、当業者にとって自明である。

【実施例】

【0071】

40

実施例

実施例1. 重合体薄膜が表面コーティングされた細胞培養基板の製造

図1に示すように、化学気相蒸着反応器(iCVD、Daeki Hi-Tech Co., Ltd)の単量体タンクに単量体であるV4D4(2, 4, 6, 8-テトラメチル-2, 4, 6, 8-テトラビニルシクロテトラシロキサン、Sigma-Aldrich)を入れ、70℃に加熱した。TBPO(tert-butyl peroxide、Sigma-Aldrich)を開始剤として、それを開始剤タンクに入れて常温で保持した。ポリスチレン細胞培養プレートを基板として蒸着を進行した。V4D4蒸着時に、V4D4単量体とTBPOとを1:1の比率(流量基準、単位: sccm)で化学気相蒸着反応器内に流しながら、反応器内のフィラメントの温度を200℃、反応器内の基板温度

50

を40、反応器内のチャンバの圧力を200mbarに保持しながら、40分蒸着を行って、約200nm厚さのpV4D4 (poly-V4D4) が蒸着された細胞培養基板を製造した。

【0072】

実施例2．接触角の測定

重合体薄膜を蒸着した後、接触角の測定装置 (Phoenix series, S.E.O.Co.Ltd) を用いて、各測定ごとに8μl 蒸溜水の水泡を基板の表面に落とし、基板の表面接触角を測定した。

【0073】

その結果、図2に示されたように、シリコンウェーハ表面の重合体薄膜蒸着前後の接触角の写真を比較する時、重合体薄膜が基板の表面に均一に塗布されながら、接触角が蒸着後に変わることを確認することができた (図2)。

【0074】

実施例3．細胞スフェロイドの形成

実施例1で製造した重合体薄膜が蒸着された細胞培養基板 (皿) で細胞を培養した後、細胞スフェロイドの形成の有無を確認した。使った細胞は、図3に示したヒト由来の癌細胞、幹細胞、体細胞、及びラット由来の体細胞と癌細胞である。癌細胞の培養は、最小培地 (CCMM) に10% (v/v) のウシ胎児血清 (fetal bovine serum, Thermo) 及び5%の1% (w/v) ペニシリン/ストレプトマイシン (penicillin streptomycin, Gibco) を添加した組成の培地を使って実施し、NIH3T3のような体細胞とhMSC (Human Mesenchymal stem cells) とhADSC (Human adipose-derived stem cells) のような幹細胞の培養は、下記の表1 (ヒト幹細胞) 及び表2 (ラット幹細胞) に示した組成の培地 (Gibco) を使って実施した。培養は、24時間実施した。

【0075】

【表1】

試薬	最終濃度	100mL内容量
KnockOut™ DMEM	1X	78mL
KnockOut™ SR	20%	20mL
NEAA*	0.1mM	1mL
bFGF	4ng/mL	40μL
L-glutamine	2mM	1mL
2-Mercaptoethanol**	0.1mM	182μL

*非必須アミノ酸；**使用前に添加

【0076】

【表 2】

試薬	最終濃度	100 mL 内容量
KnockOut™ DMEM	1 X	83 mL
KnockOut™ SR	15 %	15 mL
NEAA*	0.1 mM	1 mL
LIF	10 ng/mL	100 μL
L-glutamine	2 mM	1 mL
2-Mercaptoethanol**	0.1 mM	182 μL

*非必須アミノ酸；**使用前に添加

10

【0077】

図3に示されたように、重合体薄膜上で多様な細胞を培養した結果、培養24時間内に特定細胞に限定されず、あらゆる細胞で細胞スフェロイド形態の細胞集合体を得られた(図3)。

【0078】

実施例4．細胞スフェロイドの免疫蛍光染色

実施例1で製造した重合体薄膜が蒸着された細胞培養基板(皿)から得られた細胞スフェロイドを免疫蛍光染色法を通じて染色した。免疫蛍光染色法のために、細胞スフェロイドを0.1%ゼラチン(Gelatin)でコーティングされたカバーガラス(Cover glass)に移して一日間培養した。細胞を室温で10分間4%パラホルムアルデヒド(paraformaldehyde)を用いて固定させた。DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)を用いて3回洗浄した後に、15分間室温で0.1%トリトン X-100(Triton X-100)に細胞透過させ、再びDPBSを用いて3回洗浄した。1次抗体の非特異的反応を防ぐために10分間1%BSA(Bovine serum albumin)を処理した。細胞をDPBS/0.1%BSAで希釈させたテナイシン(Tenascins)に付着する1次抗体(CHEMICON)を使って4℃で12時間反応した。洗浄後、細胞を1時間室温でDPBSに希釈させたFITC(Fluorescein isothiocyanate)が付着された2次抗体(SantaCruz)を使って反応した。洗浄した後、細胞をDPBSに2 μg/mLで希釈させたHoechst 33342(Invitrogen)に5分間対比染色した。カバーガラスは、マウンティングミディアム(Mounting medium)を用いてスライドガラス(Slide glass)上に固定してニコン共焦点顕微鏡(Nikon confocal microscope)で分析した。使われた抗体を、表3に示した。

20

30

【0079】

【表 3】

抗体	カタログNo.	製造社	希釈
anti-Tenasci	AB19011	Chemicon	1:100 (免疫染色)
anti-rabbit IgG-FITC	SC-2012	Santa Cruz Biotechnology	1:200 (免疫染色)
anti- β Catenin	SC-7963	Santa Cruz Biotechnology	1:200 (ウェスタンブロット)
anti-survivin	71G4B7	Cell Signalling	1:1000 (ウェスタンブロット)
anti-GAPDH	SC-25778	Santa Cruz Biotechnology	1:200 (ウェスタンブロット)
anti-rabbit IgG-HRP	NCI1460	Thermo scientific	1:5000 (ウェスタンブロット)
anti-mouse IgG-HRP	NCI1430	Thermo scientific	1:5000 (ウェスタンブロット)

10

【0080】

20

その結果、図4及び図5に示されたように、本来の細胞とは変わった遺伝子の発現現象が、細胞スフェロイドの内部に存在するということを確認した(図4及び図5)。

【0081】

実施例5. 細胞スフェロイドの遺伝子分析

実施例1で製造した重合体薄膜が蒸着された細胞培養基板(皿)から得られた細胞スフェロイドを対象にして遺伝子分析を実施した。全体RNA(Ribonucleic acid)は、Hybrid-R^TMキット(GeneA11)を使って形成された細胞スフェロイドから抽出した。cDNA合成は、AccuPower RocketScript RT-PCR premixキット(Bioneer)を使って行った。重合酵素連鎖反応(RT-PCR)を、次の条件によってThermal Cyclers PCR機械(Bio-Rad)を使って行った。42℃で60分間cDNA合成を、次いで95℃で5分間あらかじめ変性過程(pre-denaturation)を、再び95℃で30秒間変性(denaturation)を、55℃で30秒間熱処理過程(annealing)を、72℃で10秒間延長過程(extension)を終えて変性過程への繰り返しを35周期(cycles)実施し、72℃で5分間最後延長した。使ったプライマーを、表4に示した。

30

【0082】

【表 4】

遺伝子	正方向プライマー	逆方向プライマー
human Sox2	GGGAAATGGGAGGGGTGC AAAACAGG (配列番号1)	TTGCGTGAGTGTGGATGGG ATTGGTG (配列番号2)
human Gapdh	CGTCTTCACCACCATGGA GA (配列番号3)	CGGCCATCACGCCACAGTT T (配列番号4)
mouse Sox2	TAGAGCTAGACTCCGGGC GATGA (配列番号5)	TTGCCTTAAACAAGACCAC GAAA (配列番号6)
mouse Gapdh	TGTCCGTCGTGGATCTGA C (配列番号7)	CCTGCTTCACCACCTTCTT G (配列番号8)

40

【0083】

その結果、図6に示されたように、既存のPS細胞培養皿で培養された細胞に比べて、

50

遺伝子の発現程度が変わり（図6）、このような結果は、細胞がリプログラミングされたことを示す。

【0084】

実施例6．細胞スフェロイドのタンパク質分析

実施例1で製造した重合体薄膜が蒸着された細胞培養基板（皿）から得られた細胞スフェロイドをタンパク質レベルで分析した。形成された細胞スフェロイドをタンパク質分解酵素抑制剤混合物（Thermo scientific）が含まれたRIPA緩衝液で溶解し、氷で15分間培養した後、4℃で10分間20,000gで遠心分離した。上澄み液を分離してBradford assayキット（Bio-Rad）を使ってタンパク質濃度を測定した。分離されたタンパク質をSDS PAGEに分画し、4℃で電気移動装置を用いてPVDF（Polyvinylidene fluoride）メンブレイン（Millipore）でタンパク質を移動させた。膜を室温で30分間0.1%トウイン-20（Tween-20）と5%脱脂乳（Skim milk）とが含まれたPBSで反応させ、4℃で12時間5%脱脂乳が含まれたPBSに希釈された1次抗体（mouse anti-beta catenin、rabbit anti-survivin）を反応させた。0.1%トウイン-20が含まれたPBSで3回洗浄した後、膜をHRP（Horseradish peroxidase）が付着された2次抗体（anti-mouse、anti-rabbit）で室温で1時間反応した。前記バンドをECL（Enhanced chemiluminescence、Thermo scientific）溶液で視覚化した。バンドをChemiDocTM MP System（Bio-Rad）を使ってタンパク質密度を分析し、ローディング対照群（GAPDH）バンドで標準化した。使われた抗体を、前記表3に示した。

【0085】

その結果、図7に示されたように、既存のPS細胞培養皿で培養された細胞に比べて、タンパク質の発現程度が変わり（図7）、このような結果は、細胞がリプログラミングされたことを示す。

【0086】

実施例7．マウス胚芽線維芽細胞の細胞スフェロイドの形成

Nanogが発現されれば、緑色蛍光タンパク質（Green fluorescence protein；GFP）が同時に発現されるように遺伝子変形された雌ラット（STOCK Tg（Nanog-GFP、Puro）1Yam（No. RBRC02290）、RIKEN BRC）で、妊娠後、16日目の胚芽状態のラットを採取して体細胞（Mouse embryonic fibroblast）を培養した。実施例1から製作された重合体薄膜が蒸着された細胞培養基板（皿）で7日間培養する間に、培養液を1回交換した。細胞培養液の場合、表2に示した培養成分が含まれたラット幹細胞の培養液を使った。培養7日目に形成された細胞スフェロイドは、共焦点顕微鏡で観察するために、固定液（4% paraformaldehyde）を使って固定し、該固定された細胞スフェロイドを共焦点顕微鏡（Zeiss confocal microscope）で観察した。

【0087】

その結果、図8に示されたように、形成された細胞スフェロイドで緑色蛍光タンパク質が発現されることを確認し（図8）、このような結果は、幹細胞の標識因子の1つであるNanogが、細胞スフェロイド内で発現されることを示す。

【0088】

実施例8．多様なシクロシロキサン重合体の細胞スフェロイドの形成効果

実施例1のように、化学気相蒸着反応器（iCVD、Daeki Hi-Tech Co., Ltd）の単量体タンクに単量体である表5のシクロシロキサン（Sigma-Aldrich）を入れ、70℃に加熱した。TBPO（Sigma-Aldrich）を開始剤として、それを開始剤タンクに入れて常温で保持した。ポリスチレン細胞培養プレートを基板として蒸着を進行した。蒸着時に、単量体とTBPOとを1：1の比率（流量

基準、単位：s c c m) で化学気相蒸着反応器内に流しながら、反応器内のフィラメントの温度を200、反応器内の基板温度を40、反応器内のチャンバの圧力を200 m b a r に保持しながら、40分蒸着を行って、約200 n m厚さのシクロシロキサン重合体が蒸着された細胞培養基板を製造した。

【0089】

【表5】

シクロシロキサン単量体	
(1)	1, 3, 5-トリイソプロピル-1, 3, 5-トリビニルシクロトリシロキサン
(2)	1, 3, 5, 7-テトライソプロピル-1, 3, 5, 7-テトラビニルシクロテトラシロキサン
(3)	1, 3, 5, 7, 9-ペンタイソプロピル-1, 3, 5, 7, 9-ペンタビニルシクロペンタシロキサン
(4)	1, 3, 5-トリ-sec-ブチル-1, 3, 5-トリビニルシクロトリシロキサン
(5)	1, 3, 5, 7-テトラ-sec-ブチル-1, 3, 5, 7-テトラビニルシクロテトラシロキサン
(6)	1, 3, 5, 7, 9-ペンタ-sec-ブチル-1, 3, 5, 7, 9-ペンタビニルシクロペンタシロキサン
(7)	1, 3, 5-トリエチル-1, 3, 5-トリビニルシクロトリシロキサン
(8)	1, 3, 5, 7-テトラエチル-1, 3, 5, 7-テトラビニルシクロテトラシロキサン
(9)	1, 3, 5, 7, 9-ペンタエチル-1, 3, 5, 7, 9-ペンタビニルシクロペンタシロキサン
(10)	ヘキサビニルシクロトリシロキサン
(11)	オクタビニルシクロテトラシロキサン
(12)	デカビニルシクロペンタシロキサン

【0090】

以後、シクロシロキサン重合体薄膜が蒸着された細胞培養基板で細胞を培養した後、細胞スフェロイドの形成の有無を確認した。使った細胞は、図9に示した癌細胞であり、その培養は、最小培地に10% (v/v) のウシ胎児血清 (Thermo) 及び5%の1% (w/v) ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco) を添加した組成の培地を使って48時間実施した。

【0091】

実験の結果は、図9に示した。図9の(1)は、1, 3, 5-トリイソプロピル-1, 3, 5-トリビニルシクロトリシロキサンが形成した重合体上でT47D細胞を培養した結果を示し、(2)は、1, 3, 5, 7-テトライソプロピル-1, 3, 5, 7-テトラビニルシクロテトラシロキサンが形成した重合体上でNCI-H358細胞を培養した結果を示し、(3)は、1, 3, 5, 7, 9-ペンタイソプロピル-1, 3, 5, 7, 9-ペンタビニルシクロペンタシロキサンが形成した重合体上でHEL細胞を培養した結果を示し、(4)は、1, 3, 5-トリ-sec-ブチル-1, 3, 5-トリビニルシクロトリシロキサンが形成した重合体上で22RV1細胞を培養した結果を示し、(5)は、1, 3, 5, 7-テトラ-sec-ブチル-1, 3, 5, 7-テトラビニルシクロテトラシロキサンが形成した重合体上で22RV1細胞を培養した結果を示し、(6)は、1, 3, 5, 7, 9-ペンタ-sec-ブチル-1, 3, 5, 7, 9-ペンタビニルシクロペンタシロキサンが形成した重合体上でU251細胞を培養した結果を示し、(7)は、1, 3, 5-トリエチル-1, 3, 5-トリビニルシクロトリシロキサンが形成した重合体

上でC A C O 2細胞を培養した結果を示し、(8)は、1 , 3 , 5 , 7 - テトラエチル - 1 , 3 , 5 , 7 - テトラビニルシクロテトラシロキサンが形成した重合体上でN C I - H 3 5 8細胞を培養した結果を示し、(9)は、1 , 3 , 5 , 7 , 9 - ペンタエチル - 1 , 3 , 5 , 7 , 9 - ペンタビニルシクロペンタシロキサンが形成した重合体上でU 2 5 1細胞を培養した結果を示し、(1 0)は、ヘキサビニルシクロトリシロキサンが形成した重合体上でH E P G 2細胞を培養した結果を示し、(1 1)は、オクタビニルシクロテトラシロキサンが形成した重合体上でM C F - 7細胞を培養した結果を示し、(1 2)は、デカビニルシクロペンタシロキサンが形成した重合体上でM C F - 7細胞を培養した結果を示す。

【 0 0 9 2 】

10

図9に示されたように、多様なシクロシロキサン化合物が形成したそれぞれの重合体上で細胞を培養することによって、細胞スフェロイドを形成させることができた(図9)。

【 0 0 9 3 】

実施例9．共重合体の細胞スフェロイドの形成効果

化学気相蒸着反応器(i C V D、D a e k i H i - T e c h C o . , L t d)の単量体タンクに第1単量体であるV 4 D 4 (S i g m a - A l d r i c h)と表6から選択された第2単量体とを入れ、それぞれ加熱した。この際、加熱温度は、次の通りであった。V 4 D 4 : 7 0 、(1)番単量体 : 7 0 、(2)番単量体 : 4 0 、(3)番単量体 : 3 5 、(4)番単量体 : 加熱しない(常温)、(5)番単量体 : 5 0 、(6)番単量体 : 8 0 、(7)番単量体 : 4 0 、(8)番単量体 : 5 0 、(9)番単量体 : 加熱しない(常温)、(1 0)番単量体 : 4 0 、(1 1)番単量体 : 5 0 、(1 2)番単量体 : 5 0 。T B P O (S i g m a - A l d r i c h)を開始剤として、それを開始剤タンクに入れて常温で保持した。ポリスチレン細胞培養プレートを基板として蒸着を進行した。V 4 D 4と第2単量体の共重合体薄膜蒸着時に、V 4 D 4単量体、第2単量体、そして、T B P Oを9 : 1 : 9の比率(流量基準、単位 : s c c m)で反応器内に流しながら、反応器内のフィラメントの温度を2 0 0 、反応器内の基板温度を4 0 、反応器内のチャンバの圧力を2 5 0 m b a rに保持しながら、4 0分蒸着を行って、約2 0 0 n m厚さの共重合体が蒸着された細胞培養プレートを得た。

20

【 0 0 9 4 】

【表 6】

共重合体の形成のための第2単量体		入手先
(1)	1, 3, 5-トリビニル-1, 3, 5-トリメチルシクロトリシロキサン	Sigma-Aldrich
(2)	ヘキサビニルジシロキサン	Gelest Inc.
(3)	グリシジルメタクリレート	Sigma-Aldrich
(4)	パーフルオロメタクリレート	Sigma-Aldrich
(5)	ベンジルメタクリレート	Sigma-Aldrich
(6)	3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 10-ヘプタデカフルオロデシルメタクリレート	Sigma-Aldrich
(7)	4-ビニルピリジン	Sigma-Aldrich
(8)	ブチルメタクリレート	Sigma-Aldrich
(9)	スチレン	Sigma-Aldrich
(10)	1-ビニルイミダゾール	Sigma-Aldrich
(11)	ジビニルベンゼン	Sigma-Aldrich
(12)	プロペニルアクリレート	Sigma-Aldrich

【0095】

以後、シクロシロキサン共重合体薄膜が蒸着された細胞培養基板で細胞を培養した後、細胞スフェロイドの形成の有無を確認した。使った細胞は、図10に示した癌細胞であり、その培養は、最小培地に10% (v/v) のウシ胎児血清 (Thermo) 及び5%の1% (w/v) ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco) を添加した組成の培地を使って48時間実施した。

【0096】

実験の結果は、図10に示した。図10の(1)は、2, 4, 6, 8-テトラメチル-2, 4, 6, 8-テトラビニルシクロテトラシロキサンと1, 3, 5-トリビニル-1, 3, 5-トリメチルシクロトリシロキサンとの共重合体の表面でHep3B細胞を培養した結果を示し、(2)は、2, 4, 6, 8-テトラメチル-2, 4, 6, 8-テトラビニルシクロテトラシロキサンとヘキサビニルジシロキサンとの共重合体の表面でOVCA3細胞を培養した結果を示し、(3)は、2, 4, 6, 8-テトラメチル-2, 4, 6, 8-テトラビニルシクロテトラシロキサンとグリシジルメタクリレートとの共重合体の表面でNCI-H460細胞を培養した結果を示し、(4)は、2, 4, 6, 8-テトラメチル-2, 4, 6, 8-テトラビニルシクロテトラシロキサンとパーフルオロメタクリレートとの共重合体の表面でHT29細胞を培養した結果を示し、(5)は、2, 4, 6, 8-テトラメチル-2, 4, 6, 8-テトラビニルシクロテトラシロキサンとベンジルメタクリレートとの共重合体の表面でHepG2細胞を培養した結果を示し、(6)は、2, 4, 6, 8-テトラメチル-2, 4, 6, 8-テトラビニルシクロテトラシロキサンと3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 10-ヘプタデカフルオロデシルメタクリレートとの共重合体の表面でHep3B細胞を培養した結果を示し、(7)は、2, 4, 6, 8-テトラメチル-2, 4, 6, 8-テトラビニルシク

ロテトラシロキサンの4-ビニルピリジンとの共重合体の表面でB16BL6細胞を培養した結果を示し、(8)は、2,4,6,8-テトラメチル-2,4,6,8-テトラビニルシクロテトラシロキサンとブチルメタクリレートとの共重合体の表面でB16BL6細胞を培養した結果を示し、(9)は、2,4,6,8-テトラメチル-2,4,6,8-テトラビニルシクロテトラシロキサンとスチレンとの共重合体の表面でA549細胞を培養した結果を示し、(10)は、2,4,6,8-テトラメチル-2,4,6,8-テトラビニルシクロテトラシロキサンと1-ビニylimダゾールとの共重合体の表面でBT474細胞を培養した結果を示し、(11)は、2,4,6,8-テトラメチル-2,4,6,8-テトラビニルシクロテトラシロキサンとジビニルベンゼンとの共重合体の表面でBT474細胞を培養した結果を示し、(12)は、2,4,6,8-テトラメチル-2,4,6,8-テトラビニルシクロテトラシロキサンとプロベニルアクリレートとの共重合体の表面でNCI-H460細胞を培養した結果を示す。

10

【0097】

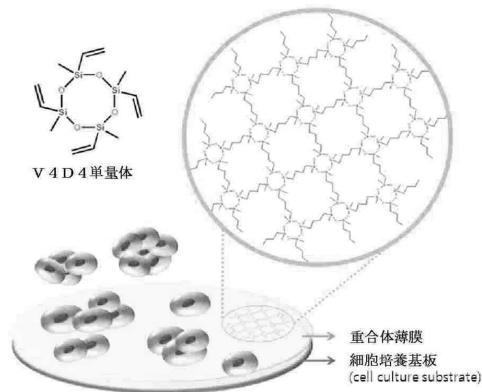
図10に示されたように、シクロシロキサンが形成した多様な共重合体上で細胞を培養することによって、細胞スフェロイドを形成させることができた(図10)。

【0098】

以上、本発明の特定の部分を詳しく記述したところ、当業者において、このような具体的な技術は、単に一具現例であり、これにより、本発明の範囲が制限されるものではない点は明白である。したがって、本発明の実質的な範囲は、添付の請求項とその等価物とによって定義される。

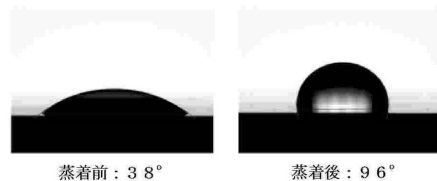
20

【図1】



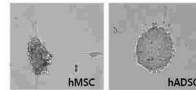
【図2】

基板：シリコンウエーハ

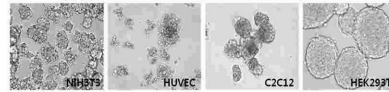


【図3】

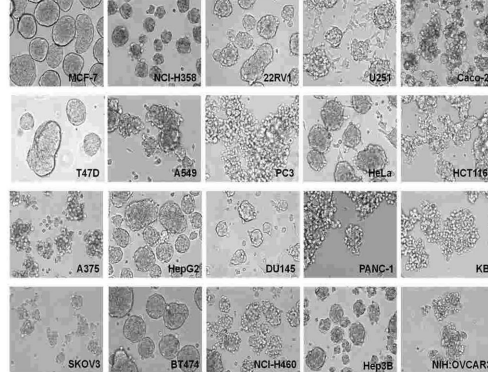
・ 幹細胞



・ 体細胞

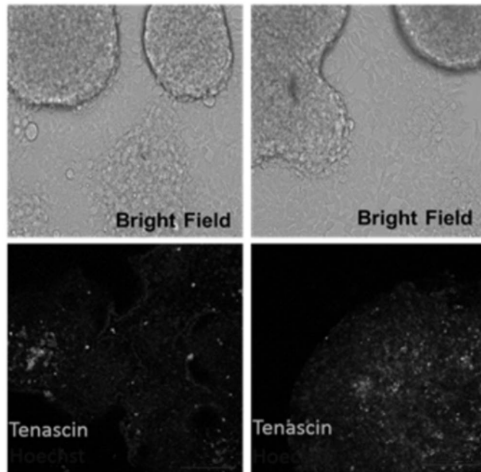


・ 癌細胞



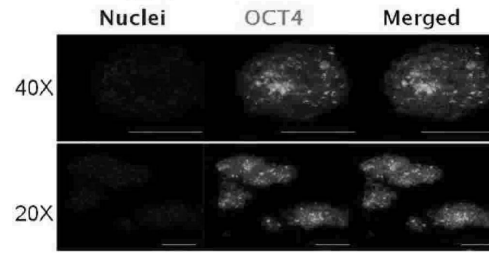
【図 4】

HEK293T cell

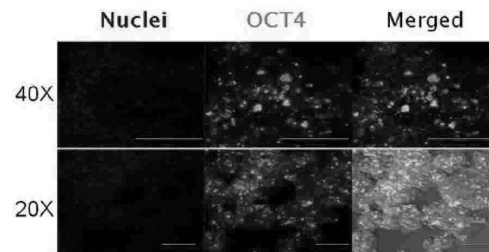


【図 5】

NIH3T3-由来スフェロイド (7日)

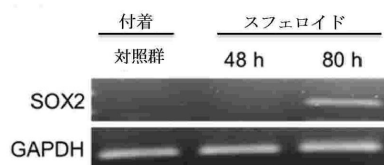


NIH3T3-由来スフェロイド (14日、p 2)

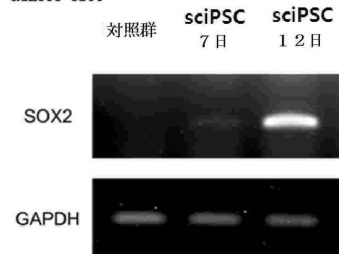


【図 6】

HEK293T Cell

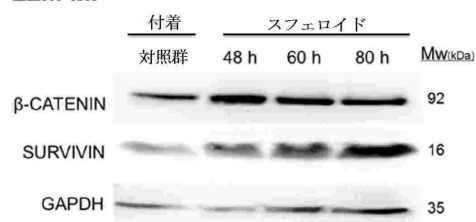


NIH3T3 Cell

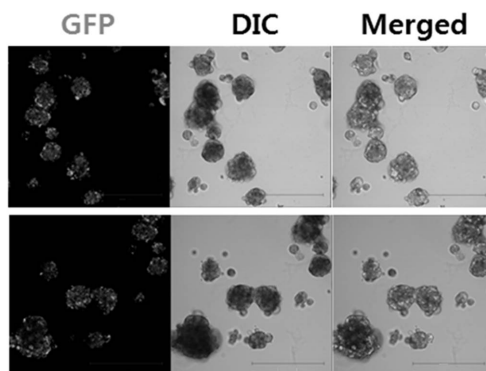


【図 7】

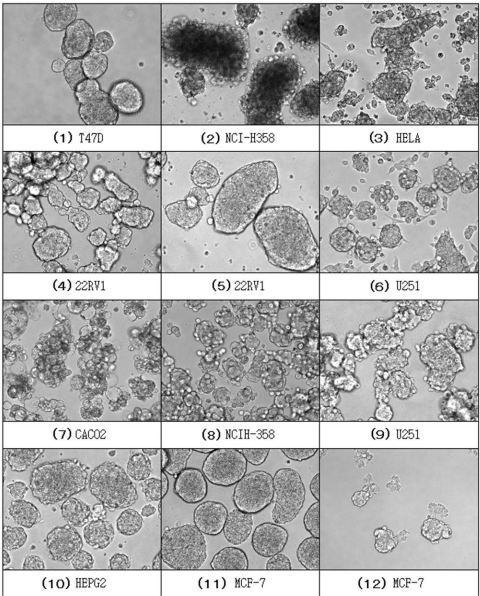
HEK293T cell



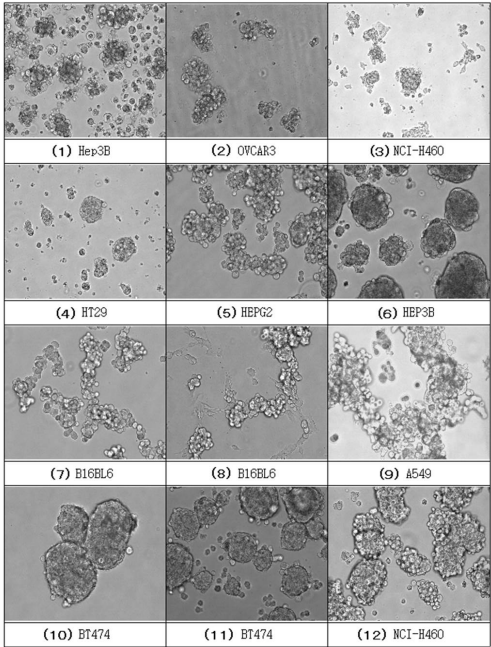
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

0006401307000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/076 (2010.01)	C 1 2 N	5/076
C 1 2 N	5/0775 (2010.01)	C 1 2 N	5/0775
C 1 2 N	5/0789 (2010.01)	C 1 2 N	5/0789
C 1 2 N	5/0797 (2010.01)	C 1 2 N	5/0797
C 1 2 N	5/09 (2010.01)	C 1 2 N	5/09
C 1 2 Q	1/686 (2018.01)	C 1 2 Q	1/686 Z
C 1 2 Q	1/6876 (2018.01)	C 1 2 Q	1/6876 Z N A Z

特許法第30条第2項適用 平成26年2月2日、ウェスティン・セントフランシスホテル・ユニオンスクエア
(米国サンフランシスコ)において開催された、ASME 2014 医学及び生物学ナノエンジニアリング
第3回 グローバルコンgresに公開

(74)代理人 100107733

弁理士 流 良広

(74)代理人 100115347

弁理士 松田 奈緒子

(74)代理人 100163038

弁理士 山下 武志

(72)発明者 スンガブ・イム

大韓民国 305-701 テジョン ユソン-グ テハク-ロ カイストウ 291

(72)発明者 ハクレ・リ

大韓民国 305-701 テジョン ユソン-グ テハク-ロ カイストウ 291

(72)発明者 サンヨン・チョン

大韓民国 305-701 テジョン ユソン-グ テハク-ロ カイストウ 291

(72)発明者 ミンソク・チョイ

大韓民国 305-701 テジョン ユソン-グ テハク-ロ カイストウ 291

審査官 小林 薫

(56)参考文献 国際公開第2007/007489(WO,A1)

米国特許出願公開第2011/0053800(US,A1)

特開2010-252631(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12M 1/00-3/10

C12N 1/00-7/08

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

DWPI(Derwent Innovation)