

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

**特開2016-54696  
(P2016-54696A)**

(43) 公開日 平成28年4月21日(2016.4.21)

(51) Int.Cl.

**C 12 N 5/071 (2010.01)**

F 1

C 12 N 5/00

202 A

テーマコード(参考)

4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号

特願2014-184700 (P2014-184700)

(22) 出願日

平成26年9月10日 (2014. 9. 10)

(71) 出願人 304021831

国立大学法人 千葉大学

千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号

(74) 代理人 100121658

弁理士 高橋 昌義

(72) 発明者 山田 真澄

千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 国立大学法人千葉大学 大学院工学研究科内

(72) 発明者 関 実

千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 国立大学法人千葉大学 大学院工学研究科内

(72) 発明者 堀 綾香

千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 国立大学法人千葉大学 大学院工学研究科内

最終頁に続く

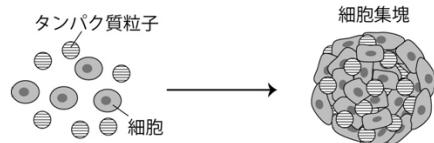
(54) 【発明の名称】細胞培養方法

## (57) 【要約】

【課題】従来の、細胞集塊を作製する細胞培養方法や、細胞外基質成分を用いる培養手法では困難であった、(1)立体的な細胞-細胞間相互作用を形成することができ、かつ、(2)細胞外基質成分が各細胞に密接に接触した状態を形成することができ、さらに(3)細胞と細胞外基質成分の接触を長期にわたって維持できる、新規細胞培養方法を提供する。

【解決手段】(1)タンパク質を溶解あるいは分散させた水溶液を準備する工程と、(2)水溶性有機溶媒に多孔質膜を介して前記水溶液を液滴として投入する工程と、(3)前記液滴が前記水溶性有機溶媒中で収縮することにより形成されたタンパク質粒子を回収し洗浄する工程を含む方法によって製造したタンパク質粒子に対し、細胞を接着させる、細胞培養方法を用いる。

【選択図】図1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

- (1) タンパク質を溶解あるいは分散させた水溶液を準備する工程と、  
(2) 多孔質膜を介して前記水溶液を液滴として水溶性有機溶媒に投入する工程と、  
(3) 前記液滴が前記水溶性有機溶媒中で収縮することにより形成されたタンパク質凝集体を回収し洗浄する工程と、を含む方法によって製造したタンパク質粒子に対し、細胞を接着させた上で前記細胞を培養することを特徴とする細胞培養方法。

**【請求項 2】**

前記タンパク質粒子は、前記タンパク質凝集体における前記タンパク質を化学的に架橋することによって製造される請求項 1 記載の細胞培養方法。 10

**【請求項 3】**

前記タンパク質粒子は、前記タンパク質凝集体における前記タンパク質を、グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド、タンニン酸、ゲニピン、N - ヒドロキシコハク酸イミドを有するタンパク質架橋剤、トランスグルタミナーゼ、あるいはこれらの任意の混合物のいずれかを用いて、化学的に架橋することによって製造される請求項 1 乃至 2 のいずれか 1 項に記載の細胞培養方法。

**【請求項 4】**

前記タンパク質とは、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、エラスチン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、テネイシン、エンタクチン、ポリ - L - リジン、ポリ - D - リジン、あるいはこれらの任意の混合物のいずれかである請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載の細胞培養方法。 20

**【請求項 5】**

前記水溶液に含まれる前記タンパク質の濃度は、前記水溶液 100 mLあたり 0.01 g 以上 1 g 以下である請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載の細胞培養方法。

**【請求項 6】**

前記水溶性有機溶媒の純水に対する溶解度は、摂氏 20 において 0.3 質量 % 以上、3.0 質量 % 未満である請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の細胞培養方法。

**【請求項 7】**

前記水溶性有機溶媒とは、ギ酸、酢酸、プロピオン酸のいずれかのカルボン酸と、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノールのいずれかのアルコールによって形成されたエステル、あるいは、それらエステルの任意の混合物である請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の細胞培養方法。 30

**【請求項 8】**

前記多孔質膜における細孔の平均面積は、0.1  $\mu\text{m}^2$  以上、1000  $\mu\text{m}^2$  以下である請求項 1 乃至 7 のいずれか 1 項に記載の細胞培養方法。

**【請求項 9】**

前記タンパク質粒子の平均直径は、0.5  $\mu\text{m}$  以上、30  $\mu\text{m}$  以下である請求項 1 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の細胞培養方法。

**【請求項 10】**

前記タンパク質粒子と前記細胞とを含有する集塊を形成させることを特徴とする請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 項に記載の細胞培養方法。 40

**【請求項 11】**

前記タンパク質粒子と前記細胞を細胞非接着性のウェルに播種することで、前記タンパク質粒子と前記細胞とを含有する集塊を形成させることを特徴とする請求項 1 乃至 10 のいずれか 1 項に記載の細胞培養方法。

**【請求項 12】**

前記タンパク質粒子と前記細胞を細胞接着性の培養器材上に播種することを特徴とする請求項 1 乃至 10 のいずれか 1 項に記載の細胞培養方法。

**【請求項 13】**

前記細胞とは、哺乳動物由来の接着性細胞である請求項 1 乃至 12 のいずれか 1 項に記 50

載の細胞培養方法。

【請求項 1 4】

前記細胞とは、肝実質細胞、肝前駆細胞、肝幹細胞、E S 細胞あるいは i P S 細胞から分化させた肝細胞様細胞、のいずれかである、請求項 1 乃至 1 3 のいずれか 1 項に記載の細胞培養方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

10

本発明は、細胞の培養方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

生体外において人工的に培養される哺乳動物細胞は、創薬において薬剤の動態評価を効率的に行う際に、あるいは化合物や医用材料の生体に対する毒性を評価する際に、さらにあるいは細胞生物学の実験を行う際に、それぞれ広く用いられている。特に、ヒト培養細胞を用いて薬剤の代謝アッセイや毒性アッセイを行うことによって、動物実験や臨床試験の前段階として新規化合物の薬効・毒性・代謝動態などを正確に評価することが可能となるため、創薬をより効果的に進めるための基盤技術として様々な細胞培養系が利用されている。

20

【0 0 0 3】

また、生体から採取した細胞を生体外において培養して組織を作製し、病変組織や臓器の代替とする再生医療の試みが近年行われつつある。特に、生体組織における構造を模倣した 2 次元的、あるいは 3 次元的な組織を構築することで、生体に近い細胞機能を再現できると期待されている。

【0 0 0 4】

30

接着性の細胞を培養するために用いられる最も一般的な手法は、ポリスチレンなどのプラスチック製のシャーレやフラスコなどの平面的な培養器材に細胞を接着させつつ培養する方法である。このような平面的な培養手法は、操作が簡便であり、特殊な培養装置や基材が不要であるため、広く用いられている。

【0 0 0 5】

しかし生体内においては、細胞は同種あるいは異種の細胞と互いに化学的・生物学的な作用を及ぼしあいつつ、組織特異的な細胞外基質 ( E C M ) 成分によって 3 次元的に取り囲まれている。通常のシャーレやフラスコを用いた一般的な培養環境は、そのような生体内的環境からは大きくかけ離れているため、培養対象とする細胞の種類によっては、通常の培養手法ではその生存率や機能を維持することが困難である場合がある。つまり、細胞に対する薬剤の効果や毒性を評価する上で、通常の平面培養手法では、生体内で実際に起きる薬剤に対する反応を再現する上で限界がある。

【0 0 0 6】

40

そこで、平面培養と比較して生体の環境をより正確に模倣した細胞培養環境を構築するために、細胞を 3 次元的に培養するための試みが数多く報告されている。例として、肝細胞は薬剤代謝の機能を担う主要な細胞であるため、その培養は新薬の開発などにおいて非常に重要であるが、肝細胞を生体外に取り出すと、その機能は急速に低下することが知られている。そこで、特許文献 1 、非特許文献 1 、あるいは非特許文献 2 に示されるように、肝細胞の集塊を形成する 3 次元的な培養法を用いることで、その機能を長期に維持できることが報告されている。また同様の集塊を用いた培養法の応用として、胚性幹 ( E S ) 細胞や人工多能性幹 ( i P S ) 細胞などの多能性幹細胞を特定の細胞に分化誘導する際に、胚様体と呼ばれる球状の細胞集塊を経る手法を用いることで、その効率を向上できることが知られている。また、神経幹細胞の培養系において、ニューロスフェアと呼ばれる神経細胞塊を形成させることで、分化した神経細胞としての機能を発現できることが知られ

50

ている。このような細胞集塊を用いる培養法では、細胞と細胞の相互作用を3次元的に形成することで、生体組織に類似した環境を形成でき、細胞の機能や分化誘導効率を向上させることができる。

#### 【0007】

また、細胞と細胞外基質（ECM）成分の相互作用を形成することで、細胞の機能を向上することができる。たとえば、通常の平面的な培養器材であっても、その表面にコラーゲンやラミニン等の細胞外基質タンパク質をコーティングすることで、細胞の機能が向上することが知られている。また、非特許文献3に示されるように、細胞をコラーゲンなどのハイドロゲルの内部に導入して培養する方法も用いられている。このような細胞培養法では、細胞の種類や特定の組織に特異的な細胞外基質成分を選択することで、細胞の接着率を向上させることができ、その機能や生存率を長期にわたって維持することが可能となる。

10

#### 【先行技術文献】

##### 【特許文献】

##### 【0008】

##### 【特許文献1】特開2013-9598号公報

##### 【非特許文献】

##### 【0009】

【非特許文献1】「バイオマテリアルズ（Biomaterials）」、2006、27、1061-1070.

20

【非特許文献2】「ラボ オン ア チップ（Lab on a Chip）」、2013、13、3529-3537.

【非特許文献3】「ザ ファセブ ジャーナル（The FASEB Journal）」、1989、3、174-177.

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0010】

非特許文献1には、細胞接着性・非接着性のパターンを有する微小なウェルに対して細胞を播種すると、細胞同士が高密度に凝集した細胞集塊（スフェロイド）が得られる、という手法が示されている。この手法では、ウェルの大きさや接着部の面積を調節することによって、細胞集塊の大きさを制御することが可能である。集塊の内部では生体組織に類似した立体的な細胞-細胞間相互作用を形成することができるため、細胞機能を維持・向上させることが可能である。また、非特許文献2には、細胞非接着性のウェルに対し、複数種の細胞を播種し集塊を形成させるという培養手法が示されている。肝細胞と肝星細胞を共培養することで、これら異種細胞間の相互作用を形成することができ、肝細胞単独の培養に比べ、細胞の機能を維持・向上できることが報告されている。さらに、特許文献1には、マイクロ流体デバイスを用いて作製した微小なハイドロゲルファイバーの中に、2種類の細胞を包埋し培養することで、線形の細胞集塊を形成する手法が示されている。この手法では、肝臓の微細単位構造である肝細胞索を模倣した組織体の作製が可能であり、肝細胞の機能を長期にわたって維持できることが示されている。

30

#### 【0011】

これらの例に示されるように、細胞集塊を形成することによって、同種、あるいは異種細胞間の相互作用を形成することができ、肝細胞のように生体外では急速に機能を失ってしまう細胞であっても、その機能を生体外において長期に維持することができる。しかしながら、微小なウェルを用いた細胞培養系においては、生体内に存在する細胞外基質成分を任意に添加した細胞集塊を形成することは困難である。また、ハイドロゲル内部での細胞集塊形成法においては、ゲルの内部にコラーゲンなどの生体外基質成分をあらかじめ添加することは可能であるが、添加された生体外基質成分は数日間の培養後に失われてしまうことが知られており、それらをゲルの内部において長期にわたって維持することは困難である。

40

50

**【0012】**

非特許文献3に示されるような、コラーゲンゲルやマトリゲルの内部において細胞を培養する手法においては、細胞の機能が長期に維持されることが知られている。たとえば、肝細胞の周囲をコラーゲンが取り囲む構造は、生体内で見られるような肝細胞の環境を模倣していると言える。しかしながら、このようなゲルの内部に細胞を包埋する手法では、細胞集塊の場合のような生体組織に類似した立体的な細胞・細胞間相互作用を形成することは不可能である。

**【0013】**

本発明は上記のような問題点に鑑みてなされたものであり、その目的とするところは、従来の、細胞集塊を作製する細胞培養方法や、細胞外基質成分を用いる培養手法では困難であった、(1)立体的な細胞・細胞間相互作用を形成することができ、かつ、(2)細胞外基質成分が各細胞に密接に接触した状態を形成することができ、さらに(3)細胞と細胞外基質成分の接触を長期にわたって維持できる、新規細胞培養方法を提供しようとするものである。

10

**【課題を解決するための手段】****【0014】**

上記目的を達成するため、本発明の一観点に係る発明は、(1)タンパク質を溶解あるいは分散させた水溶液を準備する工程と、(2)多孔質膜を介して前記水溶液を液滴として水溶性有機溶媒に投入する工程と、(3)前記液滴が前記水溶性有機溶媒中で収縮することにより形成されたタンパク質凝集体を回収し洗浄する工程と、を含む方法によって製造したタンパク質粒子に対し、細胞を接着させた上で前記細胞を培養する、というものである。このようにすることによって、細胞とタンパク質の間の相互作用を形成しながら細胞を培養することができ、また、そのような培養を可能とするタンパク質粒子として、サイズの小さい、たとえば直径数 $\mu\text{m}$ の、サイズの揃ったタンパク質粒子を効率的かつ大量に作製することが可能となる。

20

**【0015】**

また、本観点に係る発明において、限定されるわけではないが、前記タンパク質粒子は、前記タンパク質凝集体における前記タンパク質を化学的に架橋することによって製造されることが好ましい。このようにすることで、前記タンパク質粒子の強度及び安定性が向上するため、細胞培養においてその物理的形態および化学的性質を長期にわたって維持することが可能となる。

30

**【0016】**

また、本観点に係る発明において、限定されるわけではないが、前記タンパク質粒子は、前記タンパク質凝集体における前記タンパク質を、グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド、タンニン酸、ゲニピン、N-ヒドロキシコハク酸イミドを有するタンパク質架橋剤、トランスクルタミナーゼ、あるいはこれらの任意の混合物のいずれかを用いて、化学的に架橋することによって製造されることが好ましい。このようにすることで、前記タンパク質を化学的に、かつ強固に架橋することができるため、得られるタンパク質粒子の強度および安定性をより一層向上させることができるとなる。

40

**【0017】**

また、本観点に係る発明において、限定されるわけではないが、前記タンパク質とは、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、エラスチン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、テネイシン、エンタクチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、あるいはこれらの任意の混合物のいずれかであることが好ましい。このようにすることで、細胞外基質成分であるタンパク質を主成分とした、細胞接着性の高いタンパク質粒子を作製することができ、細胞培養において細胞の機能や活性を向上させることができるとなる。

**【0018】**

また、本観点に係る発明において、限定されるわけではないが、前記水溶液に含まれる前記タンパク質の濃度は、前記水溶液100mLあたり0.01g以上1g以下であることが好ましい。このようにすることで、形成された液滴の内部に含まれる水分が水溶性有

50

機溶媒中に抽出されることで、形成された液滴と比較して、サイズの小さいタンパク質粒子を作製することができるため、細胞培養において有用なサイズの小さい粒子を簡便に得ることが可能となる。

#### 【0019】

また、本観点に係る発明において、限定されるわけではないが、前記水溶性有機溶媒の純水に対する溶解度は、摂氏20°において0.3質量%以上、30質量%未満であることが好ましい。このようにすることで、水溶性有機溶媒中に前記水溶液の液滴を安定に形成できるほか、形成された液滴の内部に含まれる水分が水溶性有機溶媒中に抽出されることで、形成された液滴と比較して、サイズの小さいタンパク質粒子を作製することが可能となる。

10

#### 【0020】

また、本観点に係る発明において、限定されるわけではないが、前記水溶性有機溶媒とは、ギ酸、酢酸、プロピオン酸のうちいずれかのカルボン酸と、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノールのうちいずれかのアルコールによって形成されたエステル、あるいは、それらエステルの任意の混合物であることが好ましい。このようにすることで、水溶性有機溶媒中に前記水溶液の液滴を安定に形成できるほか、形成された液滴の内部に含まれる水分が水溶性有機溶媒中に抽出されることで、形成された液滴と比較して、サイズの小さいタンパク質粒子を作製することが可能となる。

#### 【0021】

また、本観点に係る発明において、限定されるわけではないが、前記多孔質膜における細孔の平均面積は、0.1μm<sup>2</sup>以上、1000μm<sup>2</sup>以下であることが好ましい。このようにすることで、サイズの小さい液滴を安定的に形成することができ、サイズの小さいタンパク質粒子を容易に得ることが可能となる。

20

#### 【0022】

また、本観点に係る発明において、限定されるわけではないが、前記タンパク質粒子の平均直径は、0.5μm以上、30μm以下であることが好ましい。このようにすることで、タンパク質粒子と細胞を効率的に接着させることができると、細胞とタンパク質粒子からなる集塊を作製した際に、その内部において細胞-細胞間相互作用及び細胞-細胞外基質間相互作用をともに効率的に形成することができる。

#### 【0023】

また、本観点に係る発明において、限定されるわけではないが、前記タンパク質粒子と前記細胞を含有する集塊を形成させ培養しても良い。このようにすることで、生体組織に類似した立体的な集塊の内部において、細胞-細胞間相互作用及び細胞-細胞外基質間相互作用をともに効率的に形成することができる、細胞の機能、生存率、分化効率などをより向上させることができる。

30

#### 【0024】

また、本観点に係る発明において、限定されるわけではないが、前記タンパク質粒子と前記細胞を細胞非接着性のウェルに播種することで、前記タンパク質粒子と前記細胞を含有する集塊を形成させることができると、このようにすることで、タンパク質粒子を含む細胞集塊を簡便かつ効率的に作製することができるほか、ウェルの大きさと播種細胞数を調節することによって、得られる細胞集塊の大きさを任意に制御することができる。

40

#### 【0025】

また、本観点に係る発明において、限定されるわけではないが、前記タンパク質粒子と前記細胞を細胞接着性の培養器材上に播種しても良い。このようにすることによって、細胞の一部分は細胞培養器材上に接着しつつ、その上面にタンパク質粒子を介して別の細胞が積層化した状態で細胞を培養することができる。そのため、細胞-細胞間相互作用及び細胞-細胞外基質間相互作用をともに効率的に形成することができる、細胞の機能、生存率、分化効率などをより向上させることができると、細胞およびタンパク質粒子を培養器材上に大量に播種することで、シート状の肉厚の組織を作製することもかかるう

50

である。

**【0026】**

また、本観点に係る発明において、限定されるわけではないが、前記細胞とは、哺乳動物由来の接着性細胞であることが好ましい。このようにすることで、薬剤アッセイや再生医療において有用な各種細胞を用いることが可能となるため、医療や医薬品分野において有用な様々な応用を行うことが可能となる。

**【0027】**

また、本観点に係る発明において、限定されるわけではないが、前記細胞とは、肝実質細胞、肝前駆細胞、肝幹細胞、ES細胞あるいはiPS細胞から分化させた肝細胞様細胞、のいずれかであることが好ましい。このようにすることで、薬剤代謝アッセイなどにおいて特に有用な、肝細胞あるいは肝細胞に類似した細胞を培養することができ、さらにこれらの機能や生存率を長期にわたって維持することが可能となる。

10

**【発明の効果】**

**【0028】**

本発明は、以上に述べられたように構成されているため、タンパク質粒子に対して細胞を接着させて培養することにより、既存の細胞培養方法では不可能あるいは困難であった、(1)立体的な細胞-細胞間相互作用を形成することができ、かつ、(2)細胞外基質成分が各細胞に密接に接触した状態を形成することができ、さらに(3)細胞と細胞外基質成分の接触を長期にわたって維持できる、といった利点を同時に実現する、有用な細胞培養方法を提供することが可能となる。

20

**【0029】**

また、本発明は、以上に述べられたように構成されているため、生体内環境に類似した細胞培養環境を再現でき、細胞の機能、生存率、あるいは分化効率を向上させることができ。そのため、本発明は、細胞を用いた創薬スクリーニング、細胞生物学的研究、再生医療のための機能性組織の構築、といった様々な応用において有用な細胞培養方法を提供できる。

30

**【図面の簡単な説明】**

**【0030】**

【図1】実施形態に係る、細胞培養方法の一例として細胞集塊の形成プロセスを模式的に示した概略図である。

30

【図2】実施例において製造したタンパク質粒子の顕微鏡写真であり、図2(a)、(b)、(c)は、それぞれ細孔径5μm、10μm、20μmの多孔質膜を用いて作製したタンパク質粒子の顕微鏡写真である。

40

【図3】実施例において製造したタンパク質粒子の直径の分布を示したグラフであり、図3(a)、(b)、(c)は、それぞれ細孔径5μm、10μm、20μmの多孔質膜を用いて作製したタンパク質粒子の直径の分布を示している。

【図4】実施例において細胞非接着性のウェル内に形成した、タンパク粒子及びラット肝細胞からなる集塊の顕微鏡写真であり、図4(a)および(b)は、それぞれ播種直後および培養後1日目の細胞集塊の顕微鏡写真である。

【図5】実施例において作製し回収した細胞集塊の顕微鏡写真であり、図5(a)および(b)は、それぞれ、タンパク質粒子と細胞の混合比1:1の条件で作製した細胞集塊の明視野画像および蛍光画像であり、図5(c)および(d)は、それぞれ、タンパク質粒子と細胞の混合比4:1の条件で作製した細胞集塊の明視野画像および蛍光画像である。

【図6】実施例において形成された細胞集塊の遺伝子発現量を相対的に定量評価したグラフであり、図6(a)は、培養後7日目のアルブミン、図6(b)は、培養後14日目のアルブミン、図6(c)は、培養後7日目のオルニチントランスカルバミラーゼ、図6(d)は、培養後14日目のオルニチントランスカルバミラーゼ、のそれぞれ平面培養を基準とした相対的遺伝子発現量を示すグラフである。

50

**【発明を実施するための最良の形態】**

**【0031】**

以下、本発明に係る、細胞培養方法の最良の形態を詳細に説明するものとする。ただし、本発明は多くの異なる形態による実施が可能であり、以下に示す実施形態、実施例の例示にのみ限定されるものではない。

#### 【0032】

図1には、細胞培養方法の一例として細胞集塊の形成プロセスを模式的に示した概略図が示されている。タンパク質粒子に対し、細胞を接着させて培養し、さらにそれらの集塊を形成することにより、細胞・細胞間および細胞・細胞外基質間の相互作用をともに効率的に形成することが可能となる。

#### 【0033】

細胞培養に用いるタンパク質粒子を作製する際には、多孔質膜を利用する膜乳化法を用いることが好ましい。この手法によって、たとえばマイクロ流路乳化法と比較して短時間に多量の液滴を形成でき、またスプレーを用いた噴霧法と比較してサイズの均一な液滴を形成することができる。そして、多孔質膜を介して、タンパク質を含む水溶液の液滴を、連続相である水溶性有機溶媒の中に投入すると、タンパク質水溶液の液滴に含まれる水分子が水溶性有機溶媒中に溶解していくため、最終的にタンパク質を高濃度に含む凝集体を得られる。そして、最終的に洗浄を行い、水溶性有機溶媒を除去することによって、タンパク質を主成分とする粒子を得ることができる。

#### 【0034】

なお液滴が収縮した後に、タンパク質を化学的に架橋することによって、タンパク質粒子の強度と安定性を向上させることができる。また、タンパク質を架橋することによって、水溶性のタンパク質を用いた場合であっても、水に不溶な粒子を作製することができる。これらの理由から、タンパク質を化学的に架橋することが好ましい。なお架橋操作としては、得られたタンパク質凝集体を、架橋剤を含む水溶液中に導入する手法などを用いることが可能である。

#### 【0035】

タンパク質を架橋する際に用いる架橋剤としては、使用するタンパク質の種類や、タンパク質粒子に求められる安定性などの性質に応じて、任意の架橋剤を用いることができる。しかしながら、グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド、タンニン酸、ゲニピン、N-ヒドロキシコハク酸イミドを有するタンパク質架橋剤、トランスグルタミナーゼ、あるいはこれらの任意の混合物のいずれかを用いることで、簡便かつ強固に、タンパク質架橋することが可能であるため、これらの架橋剤の使用は好ましい。なお、架橋に用いた架橋剤を粒子から取り除くという観点からも、得られた粒子に対して洗浄操作を行うことが好ましい。

#### 【0036】

タンパク質粒子の主成分となるタンパク質としては、細胞接着性を有するタンパク質であれば任意のものを用いることができる。ただし、高い細胞接着性を有し、また細胞外基質としての機能を発揮するという観点から、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、エラスチン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、テネイシン、エンタクチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、あるいはこれらの任意の混合物のいずれかを用いることが好ましい。なお、ポリ-L-リジンおよびポリ-D-リジンについては、高い細胞活性を有するという観点から、分子量が1万以上のものを用いることが好ましい。なお、マトリケルのような、これらのタンパク質のうちのいくつかを成分として含む混合物を用いることも可能であり、このような生体から抽出した細胞外基質の混合物を用いることで、生体適合性の高いタンパク質粒子を得ることも可能である。

#### 【0037】

また、タンパク質粒子の作製において、タンパク質水溶液に含まれるタンパク質の濃度は、タンパク質粒子が得られる条件であれば、どのような濃度であっても構わない。ただし、水溶液100mLあたりのタンパク質濃度が、0.01g以上1g以下となるようにすることによって、多孔質膜を利用して形成される液滴と比較して、サイズの小さいタンパク質粒子を効率的に作製することが可能であるため、タンパク質の濃度はこの範囲にあ

10

20

30

40

50

ることが好ましい。

【0038】

用いる水溶性有機溶媒としては、タンパク質水溶液が液滴を形成できるものであれば、任意の溶媒を用いることが可能である。ただし、摂氏20において水溶性有機溶媒の純水に対する溶解度が、0.3質量%以上、30質量%未満である水溶性有機溶媒を用いることによって、その内部にタンパク質水溶液の液滴を安定的にかつ再現性良く形成することが可能である。ただし、粒子の作製において、タンパク質水溶液の液滴に含まれる水分を溶解できる十分量の水溶性有機溶媒を用いることが好ましく、この点を留意する必要がある。

【0039】

水溶性有機溶媒として使用できるものの例としては、ギ酸、酢酸、プロピオン酸のいずれかのカルボン酸と、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノールのいずれかのアルコールによって形成されたエステル、あるいは、それらエステルの任意の混合物を用いることが可能である。これらの水溶性有機溶媒は、摂氏20において純水に対し0.3質量%以上、30質量%以下溶解することが知られており、また、その内部にタンパク質水溶液の液滴を、一時的であるが、形成することを可能とするためである。

【0040】

タンパク質粒子の作製において用いる多孔質膜としては、任意の形状・細孔径のものを用いることができる。ただし、細胞と同程度、あるいはそれ以下のサイズのタンパク質粒子を効率的に作製するという観点から、多孔質膜における細孔の平均面積が、 $0.1\text{ }\mu\text{m}^2$ 以上、 $1000\text{ }\mu\text{m}^2$ 以下である多孔質膜を使用することが好ましい。

10

20

30

40

50

【0041】

なお、多孔質膜を介し、水溶性有機溶媒へ液滴を投入する際には、水溶性有機溶媒を攪拌する、あるいはフローチャンバーを用いて水溶性有機溶媒を供給することで、多孔質膜に対してせん断応力を与えることが好ましい。このようにせん断応力を加えることによって、単分散性の高いタンパク質粒子を得ることが可能となる。

【0042】

このようにして得られたタンパク質粒子のサイズとしては、細胞接着性を有するサイズであれば、どのようなサイズであっても構わない。ただし、より効果的に細胞・タンパク質粒子間の相互作用を形成する、という観点から、前記タンパク質粒子のサイズは細胞と同程度であることが好ましく、より具体的には、その平均直径が、 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ 以上、 $30\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。

【0043】

このようにして得られたタンパク質粒子に対し、細胞を接着させて培養を行うことによって、細胞と細胞外基質間の相互作用を形成することが可能となる。たとえば、細胞非接着性の培養器材において、細胞をタンパク質粒子とともに培養すると、細胞とタンパク質が接着した複合体が形成され、さらにその複合体が合一することで、集塊が形成される。また、細胞接着性の培養器材において、コンフルエンスとなる量よりも多量の細胞を適切な量のタンパク質粒子とともに培養すると、一部の細胞は培養器材表面に接着しつつ、その上部にタンパク質粒子を介して細胞が接着し積層化するため、ある意味平面的な集塊が形成される。そのため、厚みのある細胞組織をワンステップで形成することも可能となる。このように、細胞集塊を形成することによって、細胞・細胞間相互作用および細胞・細胞外基質間相互作用を、立体的に効率的に形成することが可能となる。なお、集塊の形状は、必ずしも球形でなくても良く、3次元的な細胞・細胞間相互作用を形成できる形状であればよい。つまり、厚みを持った平面状、線形、などの形であっても良い。

【0044】

細胞とタンパク質粒子によって形成された細胞集塊を形成させる手法としては、様々な手法を用いることができるが、タンパク質粒子と細胞を細胞非接着性のウェルに播種することで集塊を形成する手法は、懸濁培養、ハンギングドロップ法、ハイドロゲルファイバー内細胞集塊形成法などと比較して、操作性、集塊サイズの制御性、作製効率などの点に

おいて優れているため、好ましい。

**【0045】**

培養対象とする細胞としては、目的に応じてどのような細胞を用いることも可能である。ただし、細胞外基質との相互作用によって機能を向上する細胞であることが好ましいため、接着性の細胞を対象とすることが好ましい。また、薬剤の毒性評価や代謝試験などに用いるという観点からは、哺乳動物由来の細胞であることが好ましく、ヒト由来の細胞であることがより一層好ましい。

**【0046】**

さらに、肝細胞やその類似細胞である、肝実質細胞、肝前駆細胞、肝幹細胞、ES細胞あるいはiPS細胞から分化させた肝細胞様細胞、などは、薬剤代謝試験や毒性評価試験において最も重要な細胞であるため、培養対象とする細胞としては、これらの細胞は好ましい。ただし、各種幹細胞からの細胞分化や、様々な種類の再生組織を構築するといった応用を行うという観点からは、必ずしも肝細胞およびその類似細胞以外を用いなくとも良く、心筋細胞、神経細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、などを用いることも可能である。

10

**【実施例】**

**【0047】**

以下、上記実施形態に係る細胞培養方法を実際に行うことで、本発明の効果を確認した。以下説明する。

20

**【0048】**

図2には、実施例において製造したタンパク質粒子の顕微鏡写真が示されており、図2(a)、(b)、(c)は、それぞれ細孔径5μm、10μm、20μmの多孔質膜を用いて作製したタンパク質粒子の顕微鏡写真である。

20

**【0049】**

図2に示したタンパク質粒子を作製するにあたり、まず、ベクトン・ディッキンソン社製タイプIコラーゲン水溶液を純水に希釈することで、濃度0.1g/100mLのコラーゲン水溶液を調製した。なお、細胞集塊におけるコラーゲン粒子の位置を観察するために、コスモバイオ社製FITC標識コラーゲンを、タイプIコラーゲンに対し10%の割合で0.01%加えた。

30

**【0050】**

次に、調製したタンパク質水溶液を、シリングポンプを用いて加圧しながら、多孔質膜を介して、500mL容量のビーカーに入れた200mLの酢酸メチル中へ導入することにより、液滴を形成させた。なお、タンパク質水溶液を導入する際には、マグネットクスターを用いて酢酸メチルを攪拌し、多孔質膜に対してせん断応力を与えた。タンパク質水溶液の導入においては、流量100μL/minとし、合計で10mLの水溶液を導入した。多孔質膜としては、細孔の直径が5μm、10μm、20μmの、SPGテクノ社製SPGダイレクトコネクターを使用した。

30

**【0051】**

さらに、水溶液を導入した後、2.5%グルタルアルデヒド水溶液を10mL加え、タンパク質を架橋した。10分間静置した後、作製したタンパク質粒子を回収し、血清を含む細胞培養用培地を用いて3回洗浄した。

40

**【0052】**

図3には、実施例において製造したタンパク質粒子の直径の分布を示したグラフが示されており、図3(a)、(b)、(c)は、それぞれ細孔径5μm、10μm、20μmの多孔質膜を用いて作製したタンパク質粒子の直径の分布を示している。得られたタンパク質粒子の平均直径およびその変動係数は、細孔径5μm、10μm、20μmの多孔質膜を用いた場合に、それぞれ、5.6μm(変動係数:31.0%)、8.6μm(変動係数:28.5%)、15.2μm(変動係数:30.2%)であった。この結果から、ある程度大きさの揃ったタンパク質粒子が形成されることが確認された。なお、細孔径10μmの多孔質膜を用いた場合に、タンパク質粒子の作製速度は、1時間当たり約300

50

0万個であり、簡便な操作であるにも関わらず大量のタンパク質粒子を得ることが可能であった。

#### 【0053】

続いて、細孔径10μmの多孔質膜を使用して得られたタンパク質粒子を用いて、ラット初代肝細胞の培養を行った。タンパク質粒子とラット初代肝細胞を含む懸濁液を、直径200μmの、アガロースゲルによって形成された細胞非接着性のウェル内部に播種し、培養を行った。なお、タンパク質粒子と細胞の混合比率としては、個数の比として、1:1、および4:1の2つの条件を設定した。

#### 【0054】

図4には、実施例において細胞非接着性のウェル内に形成した、タンパク粒子及びラット肝細胞からなる集塊の顕微鏡写真が示されており、図4(a)および(b)は、それぞれ播種直後および培養後1日目の細胞集塊の顕微鏡写真である。この細胞集塊は、アガロースゲル製のウェル内部において、タンパク質粒子と細胞の混合比が1:1の条件下で形成されたものである。この図に示されるように、培養開始後わずか1日後に、細胞とタンパク質粒子からなる集塊が形成されることが確認された。

#### 【0055】

図5には、実施例において作製し回収した細胞集塊の顕微鏡写真が示されており、図5(a)および(b)は、それぞれ、タンパク質粒子と細胞の混合比1:1の条件で作製した細胞集塊の、培養後7日目の明視野画像および蛍光画像であり、図5(c)および(d)は、それぞれ、タンパク質粒子と細胞の混合比4:1の条件で作製した細胞集塊の培養後7日目の明視野画像および蛍光画像である。なおこれらの細胞集塊は、アガロースゲル製のウェル構造から取り出されたものである。細胞集塊の平均直径は約160μmであり、その大きさはほぼ均一であった。また、細胞集塊の内部には、FITC標識されたコラーゲンがほぼ均一に分散している様子が観察された。

#### 【0056】

形成された細胞集塊における肝細胞の機能を評価するため、定量的PCRを用い、遺伝子発現の定量を行った。比較の対象として、平面培養、タンパク質粒子を含まない肝細胞集塊、タンパク質粒子と肝細胞を1:1の個数比で用いて作製した細胞集塊、タンパク質粒子と肝細胞を4:1の個数比で用いて作製した細胞集塊、のそれぞれに対して、遺伝子発現量を評価した。肝細胞特異的遺伝子として、肝臓が主に産出するアルブミン(ALB)と、アンモニアを解毒する尿素サイクルにおいて重要な働きをするオルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)の発現量を評価した。内部標準遺伝子としては、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)を用いた。

#### 【0057】

図6には、実施例において、形成された細胞集塊の遺伝子発現量を相対的に定量評価したグラフが示されており、図6(a)は、培養後7日日のアルブミン、図6(b)は、培養後14日日のアルブミン、図6(c)は培養後7日日のオルニチントランスカルバミラーゼ、図6(d)は培養後14日日のオルニチントランスカルバミラーゼ、のそれぞれ平面培養を基準とした相対的遺伝子発現量を示すグラフである。これらのグラフに示されるように、コラーゲン粒子と肝細胞を1:1で含む細胞集塊では、これらの肝機能が2週間という比較的長期間の培養において、平面培養やコラーゲン粒子を含まない肝細胞集塊と比較して上昇することが確認された。これは、立体的な細胞-細胞間相互作用を形成させ、かつ、細胞-細胞外基質間相互作用を形成させたためであると考えられる。一方で、コラーゲン粒子と肝細胞を4:1で含む細胞集塊では、1:1で含む細胞集塊と比較して、肝機能が低下するという結果になった。これは、細胞-細胞間相互作用の形成が不十分であったためであると考えられる。これらの結果から、コラーゲン粒子と肝細胞の比率を調節することで、細胞-細胞間相互作用、および細胞-細胞外基質間の相互作用をともに形成し、さらにその割合を制御することが可能であるため、生体内環境に類似した肝細胞培養環境を提供できるものと考えられる。初代肝細胞は、生体外において通常のプレート上の培養を行うと、その機能が急速に失われることが知られており、本発明が提供する細

10

20

30

40

50

胞培養方法が、肝細胞の培養に好適であることが確認された。

**【産業上の利用可能性】**

**【0058】**

本発明は、以上説明したように構成されているため、既存の細胞培養方法では不可能あるいは困難であった、(1)立体的な細胞-細胞間相互作用を形成することができ、かつ、(2)細胞外基質成分が各細胞に密接に接触した状態を形成することができ、さらに(3)細胞と細胞外基質成分の接触を長期にわたって維持できる、といった利点を同時に実現する新規細胞培養方法を提供することが可能となるため、細胞生物学の基礎研究から応用に至る広い分野において汎用的に用いられる有用な手法となるものと期待できる。

**【0059】**

また、本発明は、以上説明したように構成されているため、細胞を用いた薬剤代謝試験や毒性評価試験などにおいて通常用いられる、平面的な培養器材を利用した細胞培養系と比較して、3次元的な生体を模倣した環境における細胞の培養を可能とする。そのため、たとえば創薬スクリーニングにおいて利用することにより、新薬の開発効率を大幅に向上させることができる、重要かつ汎用的な新規ツールを提供できると考えられる。

**【0060】**

また、本発明は、以上説明したように構成されているため、通常の3次元的な培養系では困難な、細胞外基質の成分であるタンパク質を任意の割合で含む組織を構築することができるため、生体外において、たとえば幹細胞から分化させた細胞を用いて組織体を構築する際に、より生体組織に近い状態を再現できる。近年再生医療を目的とした様々な組織構築手法が提案されており、その実用化および産業化が図られている状況であるため、本発明はそれら再生医療における汎用的な手法として幅広く用いられるものと考えられる。

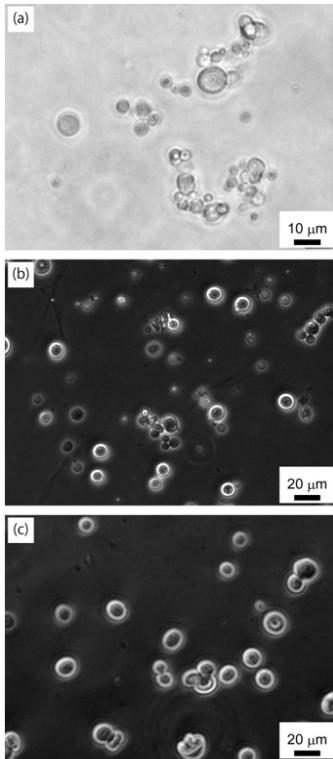
10

20

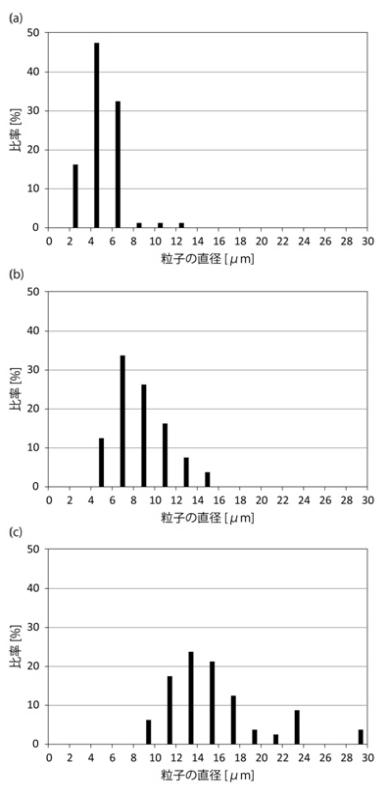
**【図1】**



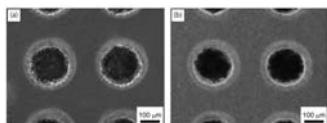
**【図2】**



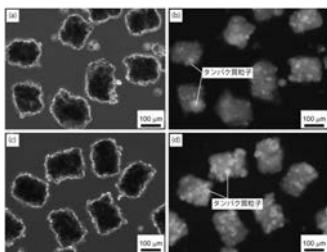
【図3】



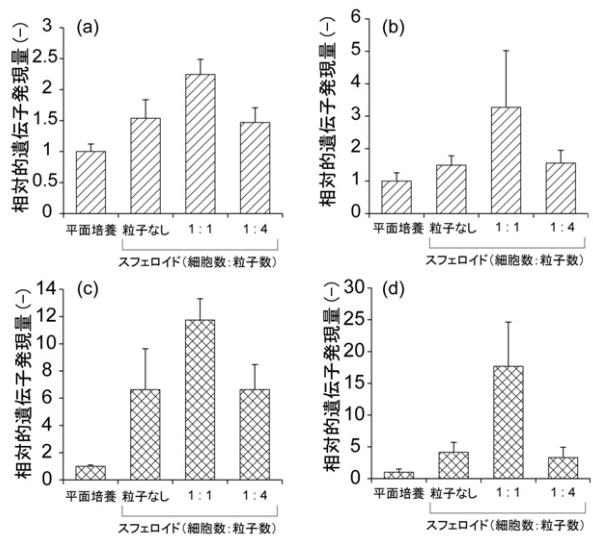
【図4】



【図5】



【図6】



---

フロントページの続き

(72)発明者 矢嶋 祐也

千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 国立大学法人千葉大学 大学院工学研究科内

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02 BC41 CA44 CA46