(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6452807号
(P6452807)

(45)発行日　平成31年1月16日(2019.1.16)　(24)登録日　平成30年12月21日(2018.12.21)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 35/28	(2015.01)	A61K	35/28
A61K 9/06	(2006.01)	A61K	9/06
A61K 47/42	(2017.01)	A61K	47/42
A61P 17/02	(2006.01)	A61P	17/02
A61P 29/00	(2006.01)	A61P	29/00

請求項の数 7　(全 11 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-515684 (P2017-515684)
(86)(22)出願日　平成26年11月3日 (2014.11.3)
(65)公表番号　特表2017-529362 (P2017-529362A)
(43)公表日　平成29年10月5日 (2017.10.5)
(86)国際出願番号　PCT/KR2014/010457
(87)国際公開番号　WO2016/047849
(87)国際公開日　平成28年3月31日 (2016.3.31)
審査請求日　平成29年4月7日 (2017.4.7)
(31)優先権主張番号　10-2014-0125981
(32)優先日　平成26年9月22日 (2014.9.22)
(33)優先権主張国　韓国 (KR)

(73)特許権者　515291188
アンテロジェン　シーオー．，エルティーディー．
ＡＮＴＥＲＯＧＥＮ　ＣＯ．，ＬＴＤ．
大韓民国、ソウル、クムチョーング、デジタルーロ、１３０、ナムソンプラザ　４０５ホ（カサンードン）
４０５，ＮａｍｓｕｎｇＰｌａｚａ（Ｇａｓａｎ－ｄｏｎｇ）　１３０，Ｄｉｇｉｔａｌ－ｒｏ　Ｇｅｕｍｃｈｅｏｎ－ｇｕ　Ｓｅｏｕｌ　１５３－７８２（ＫＲ）
(74)代理人　110001139
ＳＫ特許業務法人
(74)代理人　100130328
弁理士　奥野　彰彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】間葉系幹細胞－ヒドロゲルを含有する組成物及びこれの製造方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）脂肪由来の間葉系幹細胞を培養する段階；
（ｂ）前記培養された脂肪由来の間葉系幹細胞とヒドロゲル溶液を混合してゲルを形成する段階；及び
（ｃ）前記ゲルを培養する段階を備え、
前記ヒドロゲルは、フィブリン糊であり、前記フィブリン糊は、０．９乃至１．６ｍｇ／ｍＬの濃度のフィブリノーゲンを含むことを特徴とする
間葉系幹細胞－ヒドロゲル組成物の製造方法。
【請求項２】
フィブリン糊は、１乃至３００Ｉ．Ｕ．／ｍＬ濃度のトロンビンを含むことを特徴とする、請求項１に記載の間葉系幹細胞－ヒドロゲル組成物の製造方法。
【請求項３】
フィブリン糊は、１０乃至１５Ｉ．Ｕ．／ｍＬ濃度のトロンビンを含むことを特徴とする、請求項１に記載の間葉系幹細胞－ヒドロゲル組成物の製造方法。
【請求項４】
段階（ｃ）以後、間葉系幹細胞－ヒドロゲル組成物をアンプル、バイアルまたは注射器に充填する段階（ｄ）をさらに備えることを特徴とする、請求項１に記載の間葉系幹細胞－ヒドロゲル組成物の製造方法。
【請求項５】

段階（ｄ）で製造されたアンプル、バイアルまたは注射器に充填された間葉系幹細胞－ヒドロゲルでカウントした細胞数が、段階（ｃ）で収得された間葉系幹細胞をカウントした細胞数の７０％以上であることを特徴とする、請求項４に記載の間葉系幹細胞－ヒドロゲル組成物の製造方法。

【請求項６】

段階（ｄ）で製造されたアンプル、バイアルまたは注射器に充填された間葉系幹細胞－ヒドロゲルでカウントした細胞数が、段階（ｃ）で収得された間葉系幹細胞をカウントした細胞数の８０％以上であることを特徴とする、請求項４に記載の間葉系幹細胞－ヒドロゲル組成物の製造方法。

【請求項７】

請求項１に記載の方法で製造された間葉系幹細胞－ヒドロゲル組成物を有効成分として含有する、細胞治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、ヒドロゲルで培養した間葉系幹細胞組成物、さらに詳しくは、ヒト脂肪由来の間葉系幹細胞－ヒドロゲル組成物及びこれの製造方法に関するものであり、さらに詳しくは、間葉系幹細胞をヒドロゲル内で培養した後、洗浄して注射器に充填して提供することで、即刻の投与が可能で、最終の移植細胞の準備過程で酵素処理を必要とせず、遠心分離法等を用いる洗浄段階を経ることなくヒドロゲルの状態で洗浄することになるため、細胞の損失がほとんど無く、ヒドロゲル孔（ｐｏｒｅ）内に生理活性物質が固着されており、個体に投与した直後から治療効果を奏するという長所を有する。

【背景技術】

【０００２】

従来の１世代の幹細胞治療剤は、トリプシンまたはディスパーゼ等のタンパク質分解酵素を処理して得た、単離された細胞でタンパク質分解酵素を処理する間、細胞膜に晒されている全てのタンパク質を非選択的に分解したため、細胞間の結合と基底膜タンパク質などがほとんど保持されていなかった。また、タンパク質分解酵素を非活性化させるために、ＦＢＳ等の動物由来の物質を添加することになり、これを除去するために、数回に渡って洗浄－遠心分離過程を行うことになるが、通常、１回の洗浄－遠心分離過程の間５～１０％程の細胞損失が発生する。従って、タンパク質分解酵素を使用した細胞収集過程は、非常に非効率的な方法である。

【０００３】

また、単離された単一細胞を疾患部位に移植すると、拡散及び吸収等を通じてターゲット部位から流出されるため、定着する細胞の割合が低い。さらに、間葉系幹細胞は、付着性の強い細胞であるため、単一細胞に分離した際に、６～２４時間内に死滅することになり、生着率が非常に低いという欠点を有している。

【０００４】

ＷＯ２００６/００４９５１号には、生体適合性スキャフォールド内の成体の間葉系幹細胞（ＭＳＣ）から、所定の形態及び規模の軟組織を新たに（ｄｅ　ｎｏｖｏ）生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）合成する方法、並びにこのような方法で製造された組成物について開示している。前記文献には、生体適合性スキャフォールドでヒドロゲル重合体、さらに詳しくは、ポリエチレングリコールジアクリレートを使用する方法が提示されている。しかしながら、前記組成物は、軟組織結合の復旧のためのものであって、ポリエチレングリコールジアクリレートがスキャフォールドに使用された場合、直径の変化がほとんどない状態でなければならないという点を想定しているのみで、培養後、注射器に充填して即刻の投与ができるようにする製造過程については開示または示唆していない。

【０００５】

韓国登録特許第１，２８９，８３４号には、羊水由来の幹細胞を含有する括約筋再生細胞治療剤が開示されており、前記細胞治療剤がヒドロゲル複合体、具体的には、アルジネー

ト／ＰＦ－１２７／ヒアルロン酸に注入されて、その効果が増大され得るという点が提示されている。しかしながら、前記文献では、幹細胞を収集する過程自体を改善して収得率を高められるという点については開示していない。

【０００６】

韓国登録特許６８４，９４０号には、間葉系幹細胞を軟骨細胞に分化させる方法が開示されており、さらに具体的には、間葉系幹細胞を生分解性高分子であるフィブリン／ＨＡを含有する混合支持体に固定して培養する方法が開示されている。しかしながら、前記文献では、フィブリン／ＨＡを支持体として使用する場合、従来、細胞分化のために添加されていたＴＧＦ－ｂｅｔａを添加しなくても、間葉系幹細胞から軟骨細胞に分化が促進され得るという点が開示されているのみである。

【０００７】

従来の方法の場合、最終の移植細胞の準備過程で酵素処理を行うことになるため、細胞間結合と基底膜タンパク質が損傷することがあり、細胞収集、洗浄、バイアル充填段階及びバイアルから再び注射器に充填する各段階において細胞損失が生じかねず、また、酵素処理後、単一細胞のみを収集して注射することになるため、細胞培養の間に合成されたコラーゲンのような活性物質は、ほとんど除去されるという問題があった。

【０００８】

そこで、本発明では、細胞をヒドロゲル内で培養した後、洗浄して注射器に充填して即刻の投与が可能な形態の組成物を提供することで、最終の移植細胞の準備過程で酵素処理が不要であり、遠心分離法等を用いる洗浄段階を経なくても、ヒドロゲルの状態で洗浄することになるため、細胞損失がほとんど無く、生理活性物質がヒドロゲル孔（ｐｏｒｅ）内に固着されており、個体に投与した直後から有効な治療効果を奏するという点を新たに究明することで、本発明を完成するに至った。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００９】

【特許文献１】ＷＯ２００６/００４９５１号

【特許文献２】韓国登録特許第１，２８９，８３４号

【特許文献３】韓国登録特許６８４，９４０号

【非特許文献】

【００１０】

【非特許文献１】Ｗｕ Ｘ，Ｒｅｎ Ｊ，Ｌｉ Ｊ．，Ｃｙｔｏｔｈｅｒａｙ，２０１２ Ｍａｙ；１４（５）：５５５－６２

【非特許文献２】Ｌｉａｏ ＨＴ． ｅｔ ａｌ．，Ｊ． Ｔｒａｕｍａ．，２０１１ Ｊａｎ；７０（１）：２２８－３７

【非特許文献３】Ｗａｎｇ Ｋ． ｅｔ ａｌ．，Ｔｉｓｓｕｅ Ｅｎｇ Ｐａｒｔ Ａ．，２０１２ Ｄｅｃ；１８（２３－２４）：２５０７－１７

【非特許文献４】Ｆａｎｇ Ｈ． ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｈｕａｚｈｏｎｇ Ｕｎｉｖ Ｓｃｉ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇ Ｍｅｄ Ｓｃｉ．，２００４；２４（３）：２７２－４

【非特許文献５】Ｉｎｏｋ Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｔｉｓｓｕｅ Ｅｎｇ Ｐａｒｔ Ａ．，２０１３；１９（２１－２２）：２３７３－８１．

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１１】

本発明は、ヒトの脂肪組織から分離した間葉系幹細胞を疾患治癒に使用するためのものであって、１）細胞を充分な量で培養した後収集する過程における細胞の損失を防ぎ、２）タンパク質酵素処理などによる細胞の損傷を防ぎ、３）ターゲット部位で細胞の損失を最小限にするための最大に改善された方法の細胞組成物の製造方法及びこれから得られた組成物を提供することを目的とする。また、改善された方法で製造された細胞組成物を注射器に充填して提供することで、使用が容易であるようにした。本発明にて製造され充填さ

れた細胞－ヒドロゲルは、２０～２５ゲージのニードルを用いて局所投与が可能な全ての疾患の治療剤として適用され得る。

【課題を解決するための手段】

【００１２】

前記目的を達成すべく、本発明では、脂肪由来の間葉系幹細胞をヒドロゲルで培養した後、注射器を用いて幹細胞－ヒドロゲルを収集する方法を提供する。

【００１３】

本発明による疾患治療用組成物において、間葉系幹細胞は、ＣＤ２９、ＣＤ４４、ＣＤ７３、ＣＤ９０などに対して陽性であり、ＣＤ３４及びＣＤ４５に対して陰性である自己または同種由来細胞であってもよい。

【００１４】

本発明による一様態において、ヒドロゲルは、フィブリン糊、ヒアルロン酸またはこれの誘導体、ゼラチン、コラーゲン、アルギン酸、セルロース及びペクチンからなる群から選択されることができ、この際、フィブリン糊を形成するフィブリノーゲンの濃度は、０．４乃至１．８ｍｇ／ｍＬであってもよく、さらに詳しくは、０．９乃至１．６ｍｇ／ｍＬであってもよい。

【００１５】

本発明による一様態において、幹細胞１００，０００～２，０００，０００個を１ｍＬのヒドロゲルと混合して１２～２４ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅに１ｍＬ～２ｍＬ添加してゲルを作った後、培地を添加して３～６日間培養して製造する。培地は、従来の特許（瘻孔治療のための自己及び同種の脂肪由来のストロマ幹細胞組成物、韓国登録番号：１，３２８，６０４）で提示する１０％ＦＢＳ及びｂＦＧＦまたはＥＧＦが含まれたＤＭＥＭ培地であってもよく、または１～１０％ヒト血清アルブミンと、１～５０％の従来特許（高濃度の細胞成長因子を含む間葉系幹細胞培養液の製造方法及びこれから得られた組成物、韓国出願番号：１０－２０１１－００４３９５３）に従って製造された組成物とを含むＤＭＥＭであってもよい。

【発明の効果】

【００１６】

本発明による脂肪由来の間葉系幹細胞－ヒドロゲルを含有する組成物の製造方法は、細胞をヒドロゲル内で培養した後、洗浄して即刻注射器に充填して使用することで、最終の移植細胞の準備過程で酵素処理が不要であり、遠心分離法等を用いる洗浄段階を経ることなく、ヒドロゲルの状態で洗浄することになるため、細胞の損失がほとんど無く、ヒドロゲル孔（ｐｏｒｅ）内に生理活性物質が固着されており、個体に投与した直後から治療効果を奏するので非常に有用である。

【００１７】

さらに詳しく説明すると、本発明による脂肪由来の間葉系幹細胞－ヒドロゲルを含有する組成物の製造方法は、タンパク質分解酵素を用いた単離（選別）段階を経ないため、従来の細胞収集過程による細胞の損失を防いで細胞を効率的に得ることができる。また、このような方法で得られた幹細胞は、高活性の状態で疾患部位に投与することができ、投与された細胞は、ヒドロゲルが分解して全て吸収される前までターゲット部位に留まっており、治療効果を持続的に奏することができる。また、培養段階で間葉系幹細胞から分泌されるコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、エラスチンのような細胞外基質が完全にヒドロゲルに固着されて存在することで、従来の治療剤に比べて治療能力が著しく優れており、治療期間を短縮させ得る有利な効果を奏する。

【００１８】

実験結果、本発明による脂肪由来の間葉系幹細胞－ヒドロゲルは、幹細胞がヒドロゲル内で一週間以上生存し線維芽細胞の形態を保持して、従来の幹細胞治療剤に比べて生存期間が著しく増加しており、また、１週間の間、細胞成長及び血管形成を促す様々な成長因子とサイトカインが持続的に分泌され、様々な種類の細胞外基質を多量分泌するだけでなく、分泌された細胞外基質がヒドロゲル内に留まっており、体内に移植したとき、多様な基

質を提供することで傷の治癒を容易にすることができるということが分かった。また、免疫反応を誘発せず、却って活性化した免疫細胞から分泌される炎症誘発物質のＴＮＦ－ａｌｐｈａを抑えて炎症を緩和させることで、傷の治癒に役立つという長所があることが分かった。

【図面の簡単な説明】

【００１９】

【図１】ヒト脂肪由来の間葉系幹細胞－ヒドロゲルの写真であって、ａは、培養後の細胞－ヒドロゲルを形成した状態であり、ｂは、ａの細胞－ヒドロゲルを注射器に充填した後の写真であり、ｃとｄは、注射器に充填された細胞－ヒドロゲルをニードルを通じて注射する過程及び注射後の写真であって、ゲル形態をそのまま保持していることを示す。

【図２ａ】フィブリノーゲン及びトロンビン溶液を段階別に希釈して作ったフィブリンゲルと混合して培養したヒト脂肪由来の間葉系幹細胞を注射器に充填して、即刻２３ゲージのニードルを通じて注射した幹細胞－ヒドロゲルを光学顕微鏡で観察した写真である（１００倍率）。最終のヒドロゲルでのフィブリノーゲンとトロンビンの希釈倍数及び濃度を表記した。

【図２ｂ】注射器に充填した細胞－ヒドロゲルを体内温度と同じ３７℃で２４時間保管した後、２３ゲージのニードルを通じて注射した後、光学顕微鏡で観察した写真である（１００倍率）。最終のヒドロゲルでのフィブリノーゲンとトロンビンの希釈倍数及び濃度を表記した。

【図３】従来の技術によって２次培養した細胞の収集、洗浄、バイアル充填、そして注射器に充填する各段階において、細胞回収率と、ヒドロゲルで培養した細胞の収集、洗浄、そして注射器に充填する段階における細胞回収率を示したグラフである。

【図４】従来の技術によって２次培養してバイアルに充填した細胞（比較例１）と、ヒドロゲルで培養して注射器に充填した細胞－ヒドロゲル（実施例３）の生存をＡＯ／ＥｔＢｒで染色して示した写真である。

【図５】従来の技術によって２次培養、収集、洗浄、充填した細胞懸濁液（比較例１）と、ヒドロゲルで培養、洗浄、注射器に充填した細胞－ヒドロゲル（実施例３）とに含まれている細胞外基質であるコラーゲンタイプＩの量を酵素結合免疫吸収分析法で定量して示したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００２０】

本発明は、脂肪由来の間葉系幹細胞－ヒドロゲルを含有する組成物の製造方法を提供し、本発明の製造方法を使用する場合、細胞をヒドロゲル内で培養した後、洗浄して即刻注射器に充填して使用することで、最終の移植細胞の準備過程で酵素処理が不要であり、遠心分離法等を用いる洗浄段階を経ることなく、ヒドロゲルの状態で洗浄することになるため、細胞の損失がほとんど無く、ヒドロゲル孔（ｐｏｒｅ）内に生理活性物質が固着されており、個体に投与した直後から治療効果を奏することになり非常に有用である。

【００２１】

以下、さらに詳しく本発明を説明する。

【００２２】

本発明は、（ａ）脂肪由来の間葉系幹細胞を培養する段階；（ｂ）前記培養された脂肪由来の間葉系幹細胞とヒドロゲル溶液を混合してゲルを形成する段階；及び（ｃ）前記ゲルを培養する段階を備える、間葉系幹細胞－ヒドロゲル組成物の製造方法に関する。

【００２３】

本発明の一様態において、ヒドロゲルとしては、フィブリン糊、ヒアルロン酸、ゼラチン、コラーゲン、アルギン酸、キトサン、セルロース、ペクチン、２－ヒドロキシエチルメタクリレート誘導体及びそれの共重合体、ポリエチレンオキシド及びポリビニルアルコールからなるヒドロゲル群から選ばれた何れか１種または２種以上の複合体を使用してもよく、さらに詳しくは、ヒドロゲルとしては、フィブリン糊、ヒアルロン酸、ゼラチン、コラーゲン、アルギン酸、セルロース及びペクチンからなる群から選択された何れか１種ま

たは２種以上の複合体を使用してもよく、さらに詳しくは、フィブリン糊を使用してもよい。

【００２４】

本発明の一様態において、前記フィブリン糊は、０．４乃至１．８ｍｇ／ｍＬの濃度のフィブリノーゲンを含んでもよく、さらに詳しくは、０．９乃至１．６ｍｇ／ｍＬの濃度のフィブリノーゲンを含んでもよい。実験結果、フィブリン糊の最終濃度が前記範囲を逸した場合、細胞が増殖し難かったり、細胞とヒドロゲルが分離されたりすることが分かった。

【００２５】

本発明の一様態において、フィブリン糊は、１乃至３００Ｉ．Ｕ．／ｍＬの濃度、具体的には、５乃至３０Ｉ．Ｕ．／ｍＬ濃度のトロンビンを含んでもよく、さらに詳しくは、１０乃至１５Ｉ．Ｕ．／ｍＬ濃度のトロンビンを含んでもよい。前記範囲内で細胞の増殖及び細胞－ヒドロゲルの付着性の面において問題が発生しない。

【００２６】

本発明の一様態において、前記段階（ｃ）の後、間葉系幹細胞－ヒドロゲル組成物をアンプル、バイアルまたは注射器に充填する段階（ｄ）をさらに備えてもよい。前記本発明の製造方法に従って製造された脂肪由来の間葉系幹細胞－ヒドロゲル組成物は、２０乃至２５ゲージのニードルを使用して即刻局所投与が可能である。

【００２７】

本発明の一様態において、段階（ｄ）で製造されたアンプル、バイアルまたは注射器に充填された間葉系幹細胞－ヒドロゲルでカウントした細胞数は、段階（ｃ）で収得された間葉系幹細胞をカウントした細胞数の７０％以上、さらに詳しくは、８０％以上であってもよい。

【００２８】

実験結果、従来の方法を用いる場合、注射器に充填した状態で測定した結果、細胞が約７０％以上失われることが示された反面、本発明による製造方法を用いた場合、２０％未満程度のみが失われることが示され、細胞損失率が従来の方法に比べて著しく低いことが分かった。

【００２９】

本発明は、前記方法で製造された間葉系幹細胞－ヒドロゲル組成物を有効成分として含有する、細胞治療剤を提供する。

【００３０】

本発明において用語"細胞治療剤"とは、ヒトから分離、培養及び特殊製作を通じて製造された細胞及び組織であって、治療、診断及び予防の目的として使用される医薬品を言う。特に、細胞或いは組織の機能を復元させるために生きている自己、同種、または異種細胞を体外で増殖選別したり、他の方法で細胞の生物学的特性を変化させたりする等の一連の行為を介して治療、診断及び予防の目的として使用される医薬品を称する。細胞治療剤は、細胞の分化程度に応じ、大別して体細胞治療剤、幹細胞治療剤に分類され、本発明は、さらに詳しくは、脂肪由来の幹細胞治療剤に関する。

【００３１】

本発明において用語、"個体"とは、本発明による細胞治療剤の投与を通じて予防または治療できる疾患が既に発病しているか、発病する恐れのあるヒトを含んだ全ての動物を意味する。

【実施例】

【００３２】

以下、本発明を実施例によってさらに詳しく説明する。ただし、下記の実施例は、本発明の理解を助けるためのものであり、本発明の権利範囲がこれに限定されるのを意図するものではない。

【００３３】

実施例１．ヒト脂肪由来の間葉系幹細胞の培養方法

脂肪組織は、通常、脂肪吸引法で得られるが、これに限定されない。

【００３４】

脂肪吸引によって得られた脂肪組織から次のように脂肪由来の間葉系幹細胞を分離した：血液を除去するために、脂肪組織を同体積のＰＢＳで３～４回洗浄した。脂肪組織と同体積のコラゲナーゼ溶液を入れ、３７℃の水浴で反応させた。これを遠心分離用チューブに移し入れ、２０℃、１５００ｒｐｍで１０分間遠心分離した。上澄み液である脂肪層を除去し、下層のコラゲナーゼ溶液を揺れないように丁寧に分離した。基質培地を入れ、懸濁させた後、２０℃、１２００ｒｐｍで５分間遠心分離した。この際、底に沈んでいるものがストロマ－血管分画であり、上澄み液を除去した。ストロマ－血管分画を基質培地に懸濁させて培養容器に接種し、３７℃、５％CO_2インキュベータで２４時間培養した。培養液の除去後、燐酸塩緩衝溶液で洗浄し、基質培地、または基質培地に塩基性線維芽細胞成長因子（ｂＦＧＦ）が１ｎｇ／ｍＬ濃度で含まれた増殖培地、または基質培地に表皮細胞成長因子（ＥＧＦ）が５ｎｇ／ｍＬ濃度で含まれた培地を用いて増殖させた。脂肪由来の間葉系幹細胞が培養容器の８０～９０％程度までに伸びると、トリプシン処理して単一細胞に分離し、収得した。

【００３５】

実施例２．フィブリン糊ヒドロゲルの濃度決定

前記実施例１から得た脂肪由来の間葉系幹細胞５ｘ１０^{5}個／ｍＬにトロンビン溶液（４００～６００Ｉ．Ｕ．）を１：１０、１：２０、１：４０の比率で添加した。フィブリノーゲン（７１．５～１２６．５ｍｇ／ｍＬ）は、それぞれ１：２０、１：４０、１：８０に希釈して準備した。デュープロジェクト（Ｄｕｐｌｏｊｅｃｔ）シリンジシステムを用いて１２ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅの各ｗｅｌｌにフィブリノーゲンとトロンビンが含まれた細胞懸濁液をそれぞれ５００～７００ｕＬずつ添加した。ゲルが完全に固まると、１０％ＦＢＳ、１ｎｇ／ｍＬ　ｂＦＧＦが含まれた培養培地を添加した後、３７℃、５％CO_2インキュベータで５日間培養した。ＤＭＥＭで３回洗浄した後、１ｎｇ／ｍＬ　ｂＦＧＦが含まれたＤＭＥＭを添加し、３７℃、５％CO_2インキュベータで約１２時間培養した。上澄み液を除去し、１ｍＬ注射器を利用して細胞－ヒドロゲルを収集した。注射器に２３ゲージのニードルを連結して細胞－ヒドロゲルをディッシュに押し出した後、光学顕微鏡で観察した。

【００３６】

図１ａは、１２ｗｅｌｌで培養した細胞－ヒドロゲルをディッシュに移して観察した写真であって、ヒドロゲルが形成された後、培養期間の間そのまま保持された。

【００３７】

図１ｂは、細胞－ヒドロゲルを注射器に充填したものであって、細胞－ヒドロゲルが注射器に充填された後にも、ゲルの状態をそのまま保持していることを示している。

【００３８】

図１ｃは、細胞－ヒドロゲルが充填された注射器に２３ゲージのニードルを連結した後、細胞－ヒドロゲルを注射する過程であり、図１ｄは、２３ゲージのニードルを通じて注射された細胞－ヒドロゲルが、相変わらずヒドロゲルの形態をそのまま保持していることが分かる。

【００３９】

図２ａは、それぞれの比率で製造された細胞－ヒドロゲルを注射器に充填し、２３ゲージのニードルを通じてプレートに注射した後、顕微鏡で観察した写真である。フィブリン糊濃度が希釈されるほど細胞がよく増殖しており、フィブリン糊の最終濃度が０．９～１．６ｍｇ／ｍＬまたは０．４～０．８ｍｇ／ｍＬの場合、細胞がよく増殖し、細胞とフィブリン糊ヒドロゲルが好適に融和していることを示している。トロンビン濃度による有意的な相違は観察されていない。

【００４０】

図２ｂは、それぞれの比率で製造された細胞－ヒドロゲルを注射器に充填し、３７℃で２４時間放置した２３ゲージのニードルを通じてプレートに注射した後、顕微鏡で観察した

写真である。フィブリノーゲンの最終濃度が１．８～３．２ｍｇ／ｍＬの場合と、０．４～０．８ｍｇ／ｍＬの場合、細胞とヒドロゲルがほぼ分離されているが、フィブリノーゲンの最終濃度が０．９～１．６ｍｇ／ｍＬであるときには、２４時間まで細胞がヒドロゲル内に好適に融和されていることを示している。トロンビン濃度による有意的な相違は観察されていない。

【００４１】

実施例３．細胞－ヒドロゲル培養液の製造

前記実施例１で得た脂肪由来の間葉系幹細胞５ｘ１０^{5}個／ｍＬにトロンビン溶液を１：２０の比率で添加し、フィブリノーゲンは１：４０に希釈して準備した後、実施例２に従って培養し、洗浄した後、注射器に充填した。

【００４２】

比較例１．従来の細胞治療剤の培養法を用いた製造

従来の細胞治療剤の培養法では、次のような方法を用いた：

【００４３】

培養容器に脂肪由来の間葉系幹細胞を培養した後、８０％ほど満たされたとき、トリプシン－イーディーティー－エー（ＥＤＴＡ）を添加して単一細胞に分離した後、牛胎児血清が含まれたＤＭＥＭで酵素を不活性化させ、遠心分離用チューブに集めた後、１，５００ｒｐｍで遠心分離した。上澄み液を除去した後、牛胎児血清を除去するためにＤＭＥＭを添加して細胞を懸濁した後、再び１，５００ｒｐｍで遠心分離し、上澄み液を除去した。総３回洗浄し、最後の段階で細胞を適正の体積の細胞懸濁剤で懸濁した後、バイアルに充填した。充填された細胞は、２３ゲージのニードルが連結された１ｍＬの注射器に移し入れた。

【００４４】

実験例１．細胞回収率の測定試験

前記実施例３の各段階で細胞－ヒドロゲルにトリプルエクスプレス酵素を添加してフィブリン糊を溶かした後、細胞数を測定した。同様に、比較例１の各段階において細胞数を測定した。

【００４５】

図３ａは、既存の製造方法（比較例１）に従って細胞治療剤を製造したとき、各段階での細胞回収率を最初の収集段階（トリプシン－イーディーティー－エー不活性化）と比べて示したグラフであって、各段階別に１０～２５％ずつ減少しており、最終的に注射器に充填した以後には、最初の収集段階に比べて約３０％の細胞のみ回収された。

【００４６】

図３ｂは、本発明の製造方法（実施例３）に従って製造したとき、各段階での細胞回収率を最初の収集段階（培養完了後）と比べて示したグラフであって、各段階別に１～５％の細胞が減少しており、最終の注射器充填の段階までに８０％以上の細胞が回収された。

【００４７】

実験例２．細胞－ヒドロゲルで培養した細胞の生存率及び細胞の形態

前記実施例３に従ってヒドロゲルで培養して１ｍＬの注射器に充填した後、常温で保管し、０、２４、４８時間及び７日後に細胞の生存率をアクリジンオレンジ－エチジウムブロマイド（Ａｃｒｉｄｉｎ　Ｏｒａｎｇｅ／Ｅｔｉｄｉｕｍ　Ｂｒｏｍｉｄｅ）で染色して測定した。対照群としては、前記実施例３において既存の方法に従って製造してバイアルに充填した細胞を利用した。

【００４８】

図４に示されたように、既存の方法で製造してバイアルに充填された細胞は、０時間には９５％以上の高い生存率を保持したが、２４時間目には細胞が死滅することで、細胞膜が破壊されて細胞の形態を保持することができなかったり、固まったりし、７２時間目にはほぼ全ての細胞が死滅して観察されなかった。その一方、細胞－ヒドロゲルで培養した細胞は、７日目まで細胞が生存しており、線維芽細胞の形態をそのまま保持していた。

【００４９】

実験例３．細胞－ヒドロゲルに含まれた細胞外基質

前記実施例３に従ってヒドロゲルで培養して１ｍＬの注射器に充填された細胞－ヒドロゲルを酵素処理して溶かした後、コラーゲンタイプＩの量を酵素結合免疫吸収分析法（ＥＬＩＳＡ）を用いて分析した。対照群としては、前記実施例３の既存の方法に従って培養した後、１ｍＬの注射器に充填された細胞懸濁液を利用した。

【００５０】

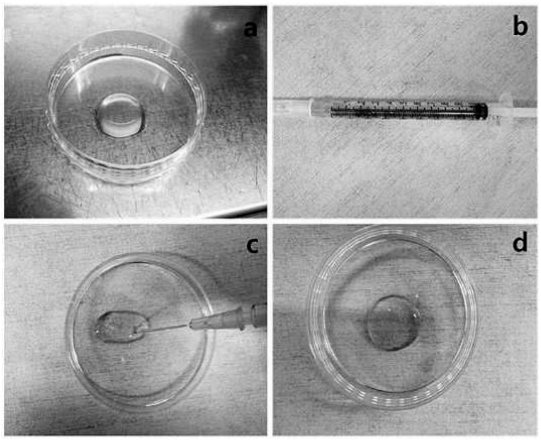
図５に示されたように、既存の細胞治療剤の製造方法に従って培養した細胞懸濁液には、コラーゲンがほとんど含まれていなかったが、細胞－ヒドロゲルには、３ｕｇ／ｍＬ以上のコラーゲンが含まれている。

【産業上の利用可能性】

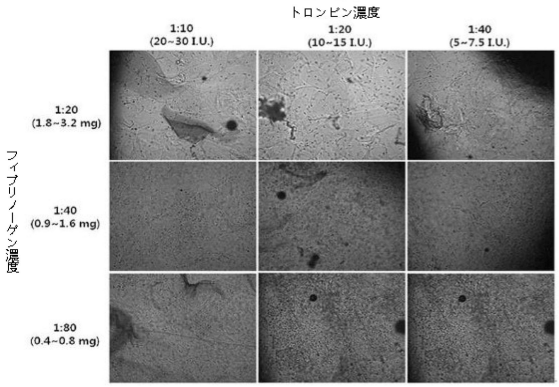
【００５１】

本発明による脂肪由来の間葉系幹細胞－ヒドロゲルを含有する組成物は、細胞をヒドロゲル内で培養した後、洗浄して即刻注射器に充填して使用することで、最終の移植細胞の準備過程で酵素処理が不要であり、遠心分離法等を用いる洗浄段階を経ることなく、ヒドロゲルの状態で洗浄することになるため、細胞の損失がほとんど無く、ヒドロゲル孔（ｐｏｒｅ）内に生理活性物質が固着されており、個体に投与した直後から治療効果を奏するようになるため、産業上非常に有用である。

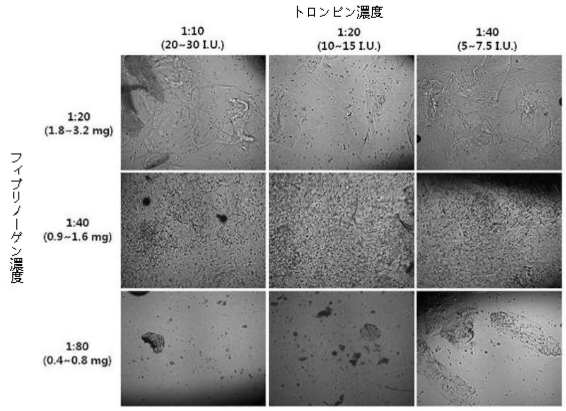
【図１】



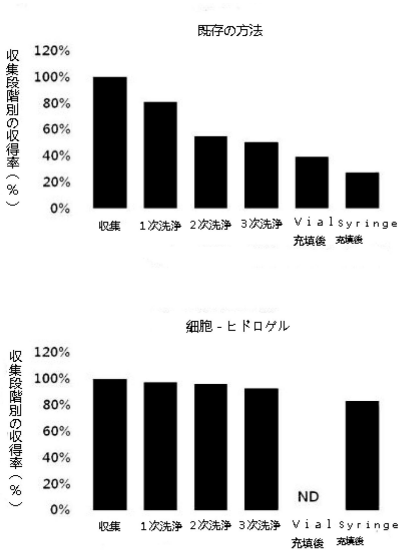
【図２ａ】



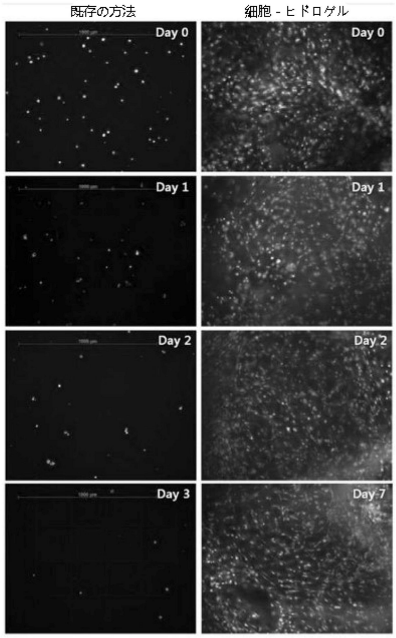
【図２ｂ】



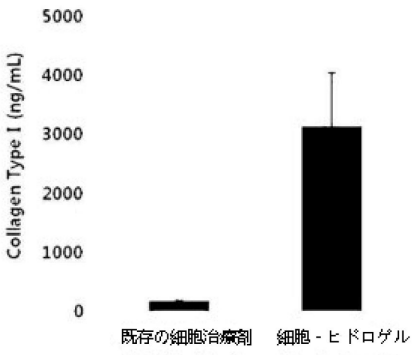
【図３】


既存の方法
収集段階別の収得率（%）
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
収集
1次洗浄
2次洗浄
3次洗浄
Vial充填後
Syringe充填後
細胞 - ヒドロゲル
収集段階別の収得率（%）
ND
収集
1次洗浄
2次洗浄
3次洗浄
Vial充填後
Syringe充填後

【図４】


既存の方法
細胞 - ヒドロゲル
Day 0
Day 0
Day 1
Day 1
Day 2
Day 2
Day 3
Day 7

【図５】


Collagen Type I (ng/mL)
5000
4000
3000
2000
1000
0
既存の細胞治療剤
細胞 - ヒドロゲル

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI	
A61P	***37/06***	***(2006.01)***	A61P	37/06
A61K	*47/36*	*(2006.01)*	A61K	47/36
A61K	*47/38*	*(2006.01)*	A61K	47/38
A61K	*47/32*	*(2006.01)*	A61K	47/32
A61K	*47/34*	*(2017.01)*	A61K	47/34

(74)代理人 100130672
弁理士 伊藤 寛之
(72)発明者 イ、ソンク
大韓民国、ソウル、クムチョンーグ、デジタルーロ、１３０、ナムソンプラザ ４０５ホ（カサンードン）
(72)発明者 キム、ミヒョン
大韓民国、ソウル、クムチョンーグ、デジタルーロ、１３０、ナムソンプラザ ４０５ホ（カサンードン）

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 韓国登録特許第１０－０６８４９４０（ＫＲ，Ｂ１）
特表２０１４－５２０５２１（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１１／０６７９８３（WO，Ａ１）
特表２０１０－５２８１０７（ＪＰ，Ａ）
特表２００７－５２１００９（ＪＰ，Ａ）
特表２０１１－５２３９３４（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１３／０７１１２３（WO，Ａ１）
特開２０１２－１９３１１７（ＪＰ，Ａ）
特開２００６－３４６４２０（ＪＰ，Ａ）
Tissue Engineering，２００６年，12(8)，p.2385-2396
Biomaterials，２０１１年，32，p.39-47
Tissue Engineering:Part A，２０１０年，16(2)，p.453-464
Tissue Engineering:Part A，２０１３年，19(21)，p.2373-2381

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ３５／００－３５／７６８
ＷＰＩ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）