

(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
2018年9月7日(07.09.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/159797 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 2/00 (2006.01) C12N 11/08 (2006.01)
C12N 1/04 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/007943
- (22) 国際出願日: 2018年3月2日(02.03.2018)
- (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 2017-038938 2017年3月2日(02.03.2017) JP
- (71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目2番30号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 中村 健太郎 (NAKAMURA Kentaro); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 吉岡 康弘 (YOSHIOKA Yasuhiro); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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,

(54) Title: EMBEDDING AGENT FOR CELL MASS OR CELL STRUCTURE, AND CELL MASS- OR CELL STRUCTURE-CONTAINING COMPOSITION AND KIT

(54) 発明の名称: 細胞塊または細胞構造体の包埋剤、細胞塊または細胞構造体含有組成物およびキット

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: an embedding agent for a cell mass or a cell structure which allows the cell mass or the cell structure to be stably transported during transportation at low temperature, and allows the cell mass or the cell structure to be easily recovered from the embedding agent in which the cell mass or the cell structure is embedded, after transportation; and a cell mass- or cell structure-containing composition and kit. The present invention provides an embedding agent that is for a cell mass or a cell structure, and that contains a polypeptide which is represented by formula 1 and in which the area size of the largest molecular weight peak is 80% or more of the total area size of all molecular weight peaks as measured by a molecular weight distribution measurement. Formula 1: A-[(Gly-X-Y)_n]_m-B, wherein X and Y each independently represent an amino acid, m represents an integer of 2-10, n represents an integer of 3-100, and A and B represent an arbitrary amino acid or amino acid sequence.

(57) 要約: 本発明の課題は、低温での輸送時に安定して細胞塊または細胞構造体を輸送することができ、輸送後、簡便に細胞塊または細胞構造体の包埋剤から細胞塊または細胞構造体を回収することができる細胞塊または細胞構造体の包埋剤、並びに細胞塊または細胞構造体含有組成物およびキットを提供することである。本発明によれば、下記式1で示され、かつ分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の80%以上であるポリペプチドを含む、細胞塊または細胞構造体の包埋剤が提供される。式1: A-[(Gly-X-Y)_n]_m-B 式中、XおよびYはそれぞれ独立にアミノ酸を示し、mは2~10の整数であり、nは3~100の整数であり、AおよびBは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示す。

SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
（規則5.2(a)）

明 細 書

発明の名称：

細胞塊または細胞構造体の包埋剤、細胞塊または細胞構造体含有組成物およびキット

技術分野

[0001] 本発明は、分子量分布が所定の条件を満たすポリペプチドを含む細胞塊または細胞構造体の包埋剤に関する。本発明はさらに、上記細胞塊または細胞構造体の包埋剤を含む細胞塊または細胞構造体含有組成物およびキットに関する。

背景技術

[0002] 近年、多くの再生医療および細胞移植治療が実施されている。特に、細胞を細胞塊または細胞構造体として利用する治療が検討されている。個々の細胞を懸濁液として投与することに比べて、細胞塊または細胞構造体は構造物として維持されることから、体内での生着が良く有効性が向上するとされている。

特許文献1（特開2004-357694）には、組織由来幹細胞の細胞塊を使って骨軟骨再生を実施する方法が記載されている。また、特許文献2（国際公開WO2011/108517号）には、生体親和性を有する高分子ブロックと細胞とを含み、上記複数個の細胞間の隙間に複数個の上記高分子ブロックが配置されている細胞構造体が記載されている。特許文献2に記載の細胞構造体においては、外部から細胞構造体の内部への栄養送達が可能であり、十分な厚みを有するとともに、構造体中で細胞が均一に存在している。特許文献2の実施例においては、リコンビナントゼラチンや天然ゼラチン素材からなる高分子ブロックを用いて高い細胞生存活性が実証されている。特許文献3（特開2005-35945号公報）には、生体親和性を有する高分子ブロックと少なくとも一種類の細胞とを含み、上記複数個の細胞間の隙間に複数個の上記高分子ブロックが配置されている細胞移植用細胞構造

体が記載されている。特許文献3の実施例においては、細胞移植用細胞構造体を用いて血管形成が評価されている。

[0003] 一方、特許文献4（国際公開WO2008/103041号公報）には、細胞付着を伴う幾つかの用途、例えば、細胞培養作業、および足場依存性細胞の細胞培養を伴う用途、ならびに多様な医療用途にも特に有用な、遺伝子組換えゼラチンが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2004-357694

特許文献2：国際公開WO2011/108517号

特許文献3：特開2005-35945号公報

特許文献4：国際公開WO2008/103041号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 細胞塊または細胞構造体は非常にもろく、輸送時に壊れやすいという問題があり、病院施設等に輸送する際の問題になる。また、病院施設等では、細胞塊または細胞構造体の輸送後に、簡便に細胞塊または細胞構造体を移植できることが望ましい。細胞塊または細胞構造体の移植においては上記の問題を解決することが望まれている。本発明は、低温での輸送時に安定して細胞塊または細胞構造体を輸送することができ、輸送後、簡便に細胞塊または細胞構造体の包埋剤から細胞塊または細胞構造体を回収することができる細胞塊または細胞構造体の包埋剤を提供することを解決すべき課題とする。本発明はさらに、上記細胞塊または細胞構造体の包埋剤を含む細胞塊または細胞構造体含有組成物、および上記細胞塊または細胞構造体の包埋剤を含むキットを提供することを解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、特定の配列を

有するポリペプチドであって、分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の80%以上であるポリペプチドを含む細胞塊または細胞構造体の包埋剤によれば、低温での輸送時に安定して細胞塊または細胞構造体を輸送することができ、さらに輸送後の細胞塊または細胞構造体移植時に、室温において簡便に細胞塊または細胞構造体の包埋剤から細胞塊または細胞構造体を回収することができることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。本発明によれば以下の発明が提供される。

[0007] [1] 下記式1で示され、かつ分子量分布が下記条件Xを満たすポリペプチドを含む、細胞塊または細胞構造体の包埋剤。

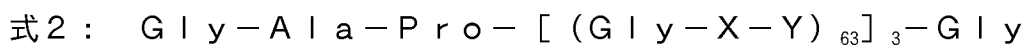


式中、n個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、n個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、mは2～10の整数であり、nは3～100の整数であり、Aは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示し、Bは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示す。

条件X：ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の80%以上である。

[2] ポリペプチドがリコンビナントゼラチンである、[1]に記載の細胞塊または細胞構造体の包埋剤。

[3] ポリペプチドが、下記式2で示されるポリペプチドである、[1]または[2]に記載の細胞塊または細胞構造体の包埋剤。



式中、63個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、63個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示す。なお、63個のGly-X-Yはそれぞれ同一でも異なってもよい。

[4] ポリペプチドが、(1)配列番号1に記載のアミノ酸配列、または(2)配列番号1に記載のアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有し、

生体親和性を有するアミノ酸配列を有する、[1]～[3]のいずれかに記載の細胞塊または細胞構造体の包埋剤。

[5] ポリペプチドが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する、[1]～[4]のいずれかに記載の細胞塊または細胞構造体の包埋剤。

[6] 細胞塊または細胞構造体と、[1]～[5]のいずれかに記載の細胞塊または細胞構造体の包埋剤とを含み、上記細胞塊または細胞構造体が入記細胞塊または細胞構造体の包埋剤により包埋されている、細胞塊または細胞構造体含有組成物。

[7] 細胞塊または細胞構造体と、[1]～[5]のいずれかに記載の細胞塊または細胞構造体の包埋剤とを含む、キット。

[0008] [8] 細胞塊または細胞構造体の包埋において使用するための、下記式1で示され、かつ分子量分布が下記条件Xを満たすポリペプチド。

$$\text{式1: } A - [(Gly - X - Y)_n]_m - B$$

式中、n個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、n個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、mは2～10の整数であり、nは3～100の整数であり、Aは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示し、Bは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示す。

条件X：ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の80%以上である。

[9] 細胞塊または細胞構造体の包埋剤の製造のための、下記式1で示され、かつ分子量分布が下記条件Xを満たすポリペプチドの使用。

$$\text{式1: } A - [(Gly - X - Y)_n]_m - B$$

式中、n個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、n個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、mは2～10の整数であり、nは3～100の整数であり、Aは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示し、Bは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示す。

条件X：ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定における最大の

分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の80%以上である。

[10] 細胞塊または細胞構造体を、下記式1で示され、かつ分子量分布が下記条件Xを満たすポリペプチドで包埋することを含む、細胞塊または細胞構造体の包埋方法。

式1: $A - [(Gly - X - Y)_n]_m - B$

式中、n個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、n個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、mは2～10の整数であり、nは3～100の整数であり、Aは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示し、Bは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示す。

条件X: ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の80%以上である。

発明の効果

[0009] 本発明の細胞塊または細胞構造体の包埋剤、細胞塊または細胞構造体含有組成物およびキットによれば、低温での輸送時に安定して細胞塊または細胞構造体を輸送することができ、輸送後、簡便に細胞塊または細胞構造体の包埋剤から細胞塊または細胞構造体を回収することができる

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、リコンビナントゼラチンの分子量分布を示す。

[図2]図2は、天然動物ゼラチンの分子量分布を示す。

[図3]図3は、CBE3包埋細胞構造体の振とう前および振とう後の形状を示す。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

<細胞塊または細胞構造体の包埋剤>

本発明の細胞塊または細胞構造体の包埋剤は、下記式1で示され、かつ分子量分布が下記条件Xを満たすポリペプチドを含む、細胞塊または細胞構造

体の包埋剤である。



式中、 n 個の X はそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、 n 個の Y はそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、 m は 2 ～ 10 の整数であり、 n は 3 ～ 100 の整数であり、 A は任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示し、 B は任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示す。

条件 X : ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の 80 % 以上である。

[0012] 本明細書で言う細胞塊または細胞構造体の包埋剤とは、細胞塊または細胞構造体を包埋処理することができる物質である。包埋処理とは、細胞塊または細胞構造体の表面の一部又は全部に、細胞塊または細胞構造体の包埋剤を浸漬等により接触させ、次いで細胞塊または細胞構造体の表面の一部又は全部を細胞塊または細胞構造体の包埋剤で被覆する処理である。

[0013] [ポリペプチド]

上記式 1 で示されるポリペプチドは、溶液の状態（低温度ではない条件）細胞塊または細胞構造体を包埋し、温度を低下させることにより、ゲル化し、輸送に適した状態となる。なお、細胞の保存の観点でも、輸送の際には低温とする必要がある。また、本発明においては、ポリペプチドが、条件 X （ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の 80 % 以上である）を満たすことにより、低温（4℃）でのゲル化と室温（25℃）での溶解とがシャープになり、細胞塊または細胞構造体移植時に、室温において簡便に、細胞塊または細胞構造体の包埋剤から細胞塊または細胞構造体を回収することが可能になる。

[0014] 上記の通り、本発明において、ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積は、全ての分子量ピークの合計面積の 80 % 以上であるが、より好ましくは 85 % 以上であり、特に好まし

くは90%以上である。

[0015] ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）（Waters社製AQUITY UPLCシステムEmpower2）を使用し、緩衝液には100mmol/Lリン酸バッファー（pH6.8）を用いて測定することができる。

[0016] 上記式1において、mは2～10の整数であるが、好ましくは3～5の整数を示す。

上記式1において、nは3～100の整数であり、好ましくは15～70の整数であり、より好ましくは50～65の整数である。

[0017] 本発明で用いる式1で示されるポリペプチドは、分子量分布が上記条件Xを満たす限り、リコンビナントポリペプチド、化学合成ポリペプチド、または天然ポリペプチドの何れでもよい。

[0018] 化学合成ポリペプチドとは、人工的に合成したポリペプチドを意味する。ポリペプチドの合成は、固相合成でも液相合成でもよいが、好ましくは固相合成である。ポリペプチドの固相合成は当業者に公知であり、例えば、アミノ基の保護としてFmoc基（Fluorenyl-Methoxy-Carbonyl基）を使用するFmoc基合成法、並びにアミノ基の保護としてBoc基（tert-Butyl Oxy Carbonyl基）を使用するBoc基合成法などが挙げられる。

[0019] ポリペプチドは好ましくは、リコンビナントポリペプチドである。本明細書においては、式1で示されるリコンビナントポリペプチドのことを、リコンビナントゼラチンと称する。リコンビナントゼラチンについては本明細書中において後記する。

[0020] 本発明で用いるポリペプチドの親水性値「1/IOB」値は、0から1.0が好ましい。より好ましくは、0から0.6であり、さらに好ましくは0から0.4である。IOBとは、藤田穆により提案された有機化合物の極性/非極性を表す有機概念図に基づく、親疎水性の指標であり、その詳細は、例えば、“Pharmaceutical Bulletin”, vol.2, 2, pp.163-173 (1954)、「化学の領域」vol.11, 10, pp.719-725 (1957)、「フレグランスジャーナル」, v

ol. 50, pp. 79-82 (1981) 等で説明されている。簡潔に言えば、全ての有機化合物の根源をメタン (CH_4) とし、他の化合物はすべてメタンの誘導体とみなして、その炭素数、置換基、変態部、環等にそれぞれ一定の数値を設定し、そのスコアを加算して有機性値 (OV)、無機性値 (IV) を求め、この値を、有機性値を X 軸、無機性値を Y 軸にとった図上にプロットしていくものである。有機概念図における IOB とは、有機概念図における有機性値 (OV) に対する無機性値 (IV) の比、すなわち「無機性値 (IV) / 有機性値 (OV)」をいう。有機概念図の詳細については、「新版有機概念図ー基礎と応用ー」(甲田善生等著、三共出版、2008) を参照されたい。本明細書中では、IOB の逆数をとった「 $1 / \text{IOB}$ 」値で親疎水性を表している。「 $1 / \text{IOB}$ 」値が小さい (0 に近づく) 程、親水性であることを表す表記である。

[0021] 本発明で用いるポリペプチドの「 $1 / \text{IOB}$ 」値を上記範囲とすることにより、親水性が高く、かつ吸水性が高くなる。

[0022] 本発明で用いるポリペプチドは、Grand average of hydropathicity (GRAVY) 値で表される親疎水性指標が、0.3 以下、マイナス 9.0 以上であることが好ましく、0.0 以下、マイナス 7.0 以上であることがさらに好ましい。Grand average of hydropathicity (GRAVY) 値は、『Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server ; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). pp. 571-607』および『Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A.; ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis.; Nucleic Acids Res. 31:3784-3788(2003).』の方法により得ることができる。

本発明で用いるポリペプチドの GRAVY 値を上記範囲とすることにより、親水性が高く、かつ、吸水性が高くなる。

[0023] [リコンビナントゼラチン]

本発明で用いるポリペプチドは、好ましくはリコンビナントゼラチンである。

リコンビナントゼラチンとしては、例えばEP 1 0 1 4 1 7 6、米国特許 6 9 9 2 1 7 2 号、国際公開WO 2 0 0 4 / 8 5 4 7 3、国際公開WO 2 0 0 8 / 1 0 3 0 4 1 等に記載のものをを用いることができるが、これらに限定されるものではない。本発明で用いるリコンビナントゼラチンとして好ましいものは、以下の態様のリコンビナントゼラチンである。

[0024] リコンビナントゼラチンは、天然のゼラチン本来の性能から、生体親和性に優れ、且つ天然由来ではないことで牛海綿状脳症（BSE）などの懸念がなく、非感染性に優れている。

[0025] リコンビナントゼラチンの分子量は、特に限定されないが、好ましくは2 0 0 0 以上1 0 0 0 0 0 以下（2 kDa（キロダルトン）以上1 0 0 kDa 以下）であり、より好ましくは2 5 0 0 以上9 5 0 0 0 以下（2.5 kDa 以上9 5 kDa 以下）であり、さらに好ましくは5 0 0 0 以上9 0 0 0 0 以下（5 kDa 以上9 0 kDa 以下）であり、最も好ましくは1 0 0 0 0 以上9 0 0 0 0 以下（1 0 kDa 以上9 0 kDa 以下）である。

[0026] リコンビナントゼラチンは、コラーゲンに特徴的なG I y - X - Yで示される配列の繰り返しを有することが好ましい。ここで、複数個のG I y - X - Yはそれぞれ同一でも異なってもよい。G I y - X - Y において、G I yはグリシンを表し、XおよびYは、任意のアミノ酸（好ましくは、グリシン以外の任意のアミノ酸）を表す。コラーゲンに特徴的なG I y - X - Yで示される配列とは、ゼラチン・コラーゲンのアミノ酸組成および配列における、他のタンパク質と比較して非常に特異的な部分構造である。この部分においてはグリシンが全体の約3分の1を占め、アミノ酸配列では3個に1個の繰り返塊になっている。グリシンは最も簡単なアミノ酸であり、分子鎖の配置への束縛も少なく、ゲル化に際してのヘリックス構造の再生に大きく寄与している。XおよびYで表されるアミノ酸はイミノ酸（プロリン、オキシプロリン）が多く含まれ、全体の10%～45%を占めることが好ましい。

好ましくは、リコンビナントゼラチンの配列の80%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは99%以上のアミノ酸が、G I y - X - Yの繰り返し構造である。

[0027] 一般的なゼラチンは、極性アミノ酸のうち電荷を持つものと無電荷のものが1 : 1で存在する。ここで、極性アミノ酸とは具体的にシステイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシンおよびアルギニンを指し、このうち極性無電荷アミノ酸とはシステイン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニンおよびチロシンを指す。本発明で用いるリコンビナントゼラチンにおいては、構成する全アミノ酸のうち、極性アミノ酸の割合が10~40%であり、好ましくは20~30%である。且つ上記極性アミノ酸中の無電荷アミノ酸の割合が好ましくは5%以上20%未満であり、より好ましくは5%以上10%未満である。さらに、セリン、スレオニン、アスパラギン、チロシンおよびシステインのうちいずれか1アミノ酸、好ましくは2以上のアミノ酸を配列上に含まないことが好ましい。

[0028] 一般にポリペプチドにおいて、細胞接着シグナルとして働く最小アミノ酸配列が知られている（例えば、株式会社永井出版発行「病態生理」Vol. 9、No. 7（1990年）527頁）。本発明で用いるリコンビナントゼラチンは、これらの細胞接着シグナルを一分子中に2以上有するものでもよい。具体的な配列としては、接着する細胞の種類が多いという点で、アミノ酸一文字表記で表される、RGD配列、LDV配列、REDV配列、YIGSR配列、PDSGR配列、RYVVLP R配列、LGTIPG配列、RNIAEIIKD I配列、IKVAV配列、LRE配列、DGEA配列、およびHAV配列の配列が好ましい。さらに好ましくはRGD配列、YIGSR配列、PDSGR配列、LGTIPG配列、IKVAV配列およびHAV配列、特に好ましくはRGD配列である。RGD配列のうち、好ましくはERGD配列である。

[0029] 本発明で用いるリコンビナントゼラチンにおけるRGD配列の配置として

は、R G D間のアミノ酸数が0～100の間、好ましくは25～60の間で均一でないことが好ましい。

この最小アミノ酸配列の含有量は、タンパク質1分子中3～50個が好ましく、さらに好ましくは4～30個、特に好ましくは5～20個である。最も好ましくは12個である。

[0030] 本発明で用いるリコンビナントゼラチンにおいて、アミノ酸総数に対するR G Dモチーフの割合は少なくとも0.4%であることが好ましい。リコンビナントゼラチンが350以上のアミノ酸を含む場合、350のアミノ酸の各ストレッチが少なくとも1つのR G Dモチーフを含むことが好ましい。アミノ酸総数に対するR G Dモチーフの割合は、より好ましくは少なくとも0.6%であり、さらに好ましくは少なくとも0.8%であり、さらに一層好ましくは少なくとも1.0%であり、特に好ましくは少なくとも1.2%であり、最も好ましくは少なくとも1.5%である。リコンビナントペプチド内のR G Dモチーフの数は、250のアミノ酸あたり、好ましくは少なくとも4、より好ましくは6、さらに好ましくは8、特に好ましくは12以上16以下である。R G Dモチーフの0.4%という割合は、250のアミノ酸あたり、少なくとも1つのR G D配列に対応する。R G Dモチーフの数は整数であるので、0.4%の特徴を満たすには、251のアミノ酸からなるゼラチンは、少なくとも2つのR G D配列を含まなければならない。好ましくは、本発明のリコンビナントゼラチンは、250のアミノ酸あたり、少なくとも2つのR G D配列を含み、より好ましくは250のアミノ酸あたり、少なくとも3つのR G D配列を含み、さらに好ましくは250のアミノ酸あたり、少なくとも4つのR G D配列を含む。本発明のリコンビナントゼラチンのさらなる態様としては、少なくとも4つのR G Dモチーフ、好ましくは6つ、より好ましくは8つ、さらに好ましくは12以上16以下のR G Dモチーフを含む。

[0031] リコンビナントゼラチンは部分的に加水分解されていてもよい。

[0032] より好ましくは、本発明で用いるポリペプチドは、下記式2で示される。

式 2 : $\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Pro}-[(\text{Gly}-\text{X}-\text{Y})_{63}]_3-\text{Gly}$

式中、63個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、63個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示す。なお、63個の $\text{Gly}-\text{X}-\text{Y}$ はそれぞれ同一でも異なってもよい。

[0033] 繰り返し単位には天然に存在するコラーゲンの配列単位を複数結合することが好ましい。ここで言う天然に存在するコラーゲンとは天然に存在するものであればいずれでも構わないが、好ましくはI型、II型、III型、IV型、またはV型コラーゲンである。より好ましくは、I型、II型、またはIII型コラーゲンである。別の形態によると、上記コラーゲンの由来は好ましくは、ヒト、ウシ、ブタ、マウスまたはラットであり、より好ましくはヒトである。

[0034] 本発明で用いるリコンビナントゼラチンの等電点は、好ましくは5～10であり、より好ましくは6～10であり、さらに好ましくは7～9.5である。リコンビナントゼラチンの等電点の測定は、等電点電気泳動法 (Maxey, C. R. (1976; Phitogr. Gelatin 2, Editor Cox, P. J. Academic, London, Engl. 参照) に記載されたように、1質量%ゼラチン溶液をカチオンおよびアニオン交換樹脂の混晶カラムに通したあとのpHを測定することで実施することができる。

[0035] 好ましくは、リコンビナントゼラチンは脱アミン化されていない。

好ましくは、リコンビナントゼラチンはテロペプチドを有さない。

好ましくは、リコンビナントゼラチンは、アミノ酸配列をコードする核酸により調製された実質的に純粋なポリペプチドである。

[0036] リコンビナントゼラチンは、特に好ましくは、

(1) 配列番号1に記載のアミノ酸配列；または

(2) 配列番号1に記載のアミノ酸配列と80%以上（好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上）の配列同一性を有し、生体親和性を有するアミノ酸配列；

を有する。

なお、生体親和性とは、生体に接触した際に、長期的かつ慢性的な炎症反応などのような顕著な有害反応を惹起しないことを意味する。

リコンビナントゼラチンは、最も好ましくは、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する。

[0037] 本発明における配列同一性は、以下の式で計算される値を指す。

$$\% \text{配列同一性} = \left[\left(\text{同一残基数} \right) / \left(\text{アラインメント長} \right) \right] \times 100$$

2つのアミノ酸配列における配列同一性は当業者に公知の任意の方法で決定することができ、BLAST ((Basic Local Alignment Search Tool)) プログラム (J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990) 等を使用して決定することができる。

[0038] リコンビナントゼラチンは、配列番号1に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ生体親和性を有するアミノ酸配列を有するものでもよい。

[0039] 「1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」における「1若しくは数個」とは、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、特に好ましくは1～3個を意味する。

[0040] リコンビナントゼラチンは、当業者に公知の遺伝子組み換え技術によって製造することができ、例えばEP1014176A2号公報、米国特許第6992172号公報、国際公開WO2004/85473号、国際公開WO2008/103041号等に記載の方法に準じて製造することができる。具体的には、所定のリコンビナントゼラチンのアミノ酸配列をコードする遺伝子を取得し、これを発現ベクターに組み込んで、組み換え発現ベクターを作製し、これを適当な宿主に導入して形質転換体を作製する。得られた形質転換体を適当な培地で培養することにより、リコンビナントゼラチンが産生されるので、培養物から産生されたリコンビナントゼラチンを回収することにより、本発明で用いるリコンビナントゼラチンを調製することができる。

[0041] [細胞塊または細胞構造体の包埋剤の形態]

本発明の細胞塊または細胞構造体の包埋剤の形態は特に限定されず、式 1 で示され、かつ分子量分布が条件 X を満たすポリペプチドを含む限り、任意の形態とすることができる。例えば、溶液（水溶液など）、懸濁液、粉末、またはゲルなどの何れでもよい。粉末、またはゲル等の場合には使用時に、水などの溶媒に溶解して使用することができる。

[0042] 本発明の細胞塊または細胞構造体の包埋剤における上記ポリペプチドの含有量は特に限定されないが、一般的には 0.1 質量% から 100 質量% であり、好ましくは 0.5 質量% から 100 質量% である。

本発明の細胞塊または細胞構造体の包埋剤を適用する細胞塊または細胞構造体については、本明細書中後記する。

[0043] <細胞塊または細胞構造体含有組成物>

本発明はさらに、細胞塊または細胞構造体と、本発明の細胞塊または細胞構造体の包埋剤とを含み、上記細胞塊または細胞構造体が上記細胞塊または細胞構造体の包埋剤により包埋されている、細胞塊または細胞構造体含有組成物に関する。

[0044] [細胞塊]

本発明における細胞塊とは、細胞が複数個会合して一つの塊になった状態であり、一つの塊の直径が 100 μm 以上、かつ、一つの塊の長軸÷短軸の値が 200 以下のものを意味する。

[0045] 細胞同士は、直接および／または介在物質を介して、互いに連結してもよい。介在物質としては、細胞同士を少なくとも機械的に連結し得る物質であれば特に限定されないが、例えば、細胞外マトリックスなどが挙げられる。介在物質は、好ましくは細胞由来のもの、特に、細胞塊または細胞構造体を構成する細胞に由来するものである。細胞は少なくとも機械的に連結されるが、さらに機能的、例えば、化学的、電氣的に連結されてもよい。

[0046] 細胞塊は、公知の細胞塊の製造方法またはそれに準ずる方法で製造することができる。例えば、細胞を U 字底プレートやマルチウェルディッシュで培養し、細胞が塊状になった後に、塊を培養皿から回収すればよい。別の方法

としては、細胞を攪拌することにより細胞の自己凝集力で細胞塊を製造することができる。上記の通り、細胞塊の製造方法は特に限定されないが、一例としては、特開平5-268933公報に記載の方法により細胞塊または細胞構造体を製造することができる。

[0047] 細胞塊は、典型的には、細胞を培養皿に播種する工程、および細胞を培養して細胞塊を形成させる工程により製造される。別の方法としては、細胞を攪拌培養する工程により製造される。

[0048] 細胞の培養は、本技術分野で通常なされている条件で行うことができる。例えば、典型的な培養条件としては、37℃、5%CO₂での培養が挙げられる。

[0049] [細胞構造体]

本発明における細胞構造体とは、細胞と細胞支持体とが接触または接着し、三次元的な形態を有するものを意味する。

細胞構造体としては、生体親和性高分子ブロックと細胞とを含み、複数の細胞間の隙間に複数の生体親和性高分子ブロックが配置されている、細胞構造体が好ましい。

[0050] [生体親和性高分子ブロック]

(1) 生体親和性高分子

生体親和性とは、生体に接触した際に、長期的かつ慢性的な炎症反応などのような顕著な有害反応を惹起しないことを意味する。本発明で用いる生体親和性高分子は、生体に親和性を有するものであれば、生体内で分解されるか否かは特に限定されないが、生分解性高分子であることが好ましい。非生分解性材料として具体的には、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、ポリウレタン、ポリプロピレン、ポリエステル、塩化ビニル、ポリカーボネート、アクリル、ステンレス、チタン、シリコン、及びMPC（2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン）などが挙げられる。生分解性材料としては、具体的には、天然由来のペプチド、リコンビナントペプチド又は化学合成ペプチドなどのポリペプチド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸

・グリコール酸コポリマー（PLGA）、ヒアルロン酸、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、コンドロイチン、セルロース、アガロース、カルボキシメチルセルロース、キチン、及びキトサンなどが挙げられる。上記の中でも、ポリペプチドが特に好ましい。これら生体親和性高分子には細胞接着性を高める工夫がなされていてもよい。具体的には、「基材表面に対する細胞接着基質（フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン）や細胞接着配列（アミノ酸一文字表記で表される、RGD配列、LDV配列、REDV配列、YIGSR配列、PDSGR配列、RYVVLPR配列、LGTIPG配列、RNIAEIIKDI配列、IKVAV配列、LRE配列、DGEA配列、及びHAV配列）ペプチドによるコーティング」、「基材表面のアミノ化、カチオン化」、又は「基材表面のプラズマ処理、コロナ放電による親水性処理」といった方法を使用できる。

生体親和性高分子として好適なポリペプチドは本発明で用いる式1で示されるポリペプチドと同様である。

[0051] （2）架橋

生体親和性高分子は、架橋されているものでもよいし、架橋されていないものでもよいが、架橋されているものが好ましい。架橋されている生体親和性高分子を使用することにより、培地中で培養する際及び生体に移植した際に瞬時に分解してしまうことを防ぐという効果が得られる。一般的な架橋方法としては、熱架橋、アルデヒド類（例えば、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドなど）による架橋、縮合剤（カルボジイミド、シアナミドなど）による架橋、酵素架橋、光架橋、紫外線架橋、疎水性相互作用、水素結合、及びイオン性相互作用などが知られており、本発明においても上記の架橋方法を使用することができる。本発明で使用する架橋方法としては、さらに好ましくは熱架橋、紫外線架橋、又は酵素架橋であり、特に好ましくは熱架橋である。

[0052] 酵素による架橋を行う場合、酵素としては、高分子材料間の架橋作用を有するものであれば特に限定されないが、好ましくはトランスグルタミナーゼ

又はラッカーゼ、最も好ましくはトランスグルタミナーゼを用いて架橋を行うことができる。トランスグルタミナーゼで酵素架橋するタンパク質の具体例としては、リジン残基及びグルタミン残基を有するタンパク質であれば特に制限されない。トランスグルタミナーゼは、哺乳類由来のものであっても、微生物由来のものであってもよく、具体的には、味の素（株）製アクティバシリーズ、試薬として販売されている哺乳類由来のトランスグルタミナーゼ、例えば、オリエンタル酵母工業（株）製、Upstate USA Inc.製、Bioscience International製などのモルモット肝臓由来トランスグルタミナーゼ、ヤギ由来トランスグルタミナーゼ、ウサギ由来トランスグルタミナーゼなど、並びにヒト由来の血液凝固因子（Factor XIIIa、Haematologic Technologies, Inc. 社）などが挙げられる。

[0053] 架橋（例えば、熱架橋）を行う際の反応温度は、架橋ができる限り特に限定されないが、好ましくは、 -100°C ～ 500°C であり、より好ましくは 0°C ～ 300°C であり、更に好ましくは 50°C ～ 300°C であり、特に好ましくは 100°C ～ 250°C であり、最も好ましくは 120°C ～ 200°C である。

[0054] （３）生体親和性高分子ブロック

生体親和性高分子ブロックの形状は特に限定されるものではない。例えば、不定形、球状、粒子状（顆粒）、粉状、多孔質状、繊維状、紡錘状、扁平状及びシート状であり、好ましくは、不定形、球状、粒子状（顆粒）、粉状及び多孔質状である。不定形とは、表面形状が均一でないもののことを示し、例えば、岩のような凹凸を有する物を示す。なお、上記の形状の例示はそれぞれ別個のものではなく、例えば、粒子状（顆粒）の下位概念の一例として不定形となる場合もある。

生体親和性高分子ブロックの大きさは、好ましくは $1\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $700\text{ }\mu\text{m}$ 以下であり、より好ましくは $10\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $700\text{ }\mu\text{m}$ 以下であり、さらに好ましくは $10\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $300\text{ }\mu\text{m}$ 以下であり、さらに好ましくは $20\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $150\text{ }\mu\text{m}$ 以下である。

[0055] 生体親和性高分子ブロックの製造方法は、特に限定されないが、例えば、生体親和性高分子を含有する固形物（生体親和性高分子の多孔質体など）を、粉碎機（ニューパワーミルなど）を用いて粉碎することにより、生体親和性高分子ブロックを得ることができる。生体親和性高分子を含有する固形物（多孔質体など）は、例えば、生体親和性高分子を含有する水溶液を凍結乾燥して得ることができる。

[0056] [細胞]

本発明における細胞塊または細胞構造体または細胞構造体には、細胞塊または細胞構造体または細胞構造体を形成し得る任意の細胞が含まれる。使用する細胞として、好ましくは、動物細胞であり、より好ましくは脊椎動物由来細胞、特に好ましくはヒト由来細胞である。脊椎動物由来細胞（特に、ヒト由来細胞）の種類は、万能細胞、体性幹細胞、前駆細胞、又は成熟細胞の何れでもよく、特に好ましくは体性幹細胞である。

[0057] 万能細胞としては、例えば、胚性幹（E S）細胞、生殖幹（G S）細胞、又は人工多能性幹（i P S）細胞を使用することができる。体性幹細胞としては、例えば、間葉系幹細胞（M S C）、造血幹細胞、羊膜細胞、臍帯血細胞、骨髓由来細胞（例えば、骨髓由来間M S C等）、心筋幹細胞、脂肪由来幹細胞、又は神経幹細胞を使用することができる。前駆細胞及び成熟細胞としては、例えば、皮膚、真皮、表皮、筋肉、心筋、神経、骨、軟骨、内皮、脳、上皮、心臓、腎臓、肝臓、膵臓、脾臓、口腔内、角膜、骨髓、臍帯血、羊膜、又は毛に由来する細胞を使用することができる。ヒト由来細胞としては、例えば、E S細胞、i P S細胞、M S C、軟骨細胞、骨芽細胞、骨芽前駆細胞、間充織細胞、筋芽細胞、心筋細胞、心筋芽細胞、神経細胞、肝細胞、ベータ細胞、線維芽細胞、角膜内皮細胞、血管内皮細胞、角膜上皮細胞、羊膜細胞、臍帯血細胞、骨髓由来細胞、又は造血幹細胞を使用することができる。また、細胞の由来は、自家細胞又は他家細胞の何れでも構わない。

[0058] [細胞構造体]

本発明における細胞構造体は、上記した生体親和性を有する高分子ブロッ

クと上記した細胞とを用いて、複数個の細胞間の隙間に複数個の該高分子ブロックをモザイク状に3次的に配置させたものである。

細胞構造体の厚さ又は直径は、所望の厚さとすることが出来るが、下限としては、 $150\text{ }\mu\text{m}$ 以上であることが好ましく、 $215\text{ }\mu\text{m}$ 以上がさらに好ましく、 $400\text{ }\mu\text{m}$ 以上であることが最も好ましい。厚さ又は直径の上限は特に限定されないが、使用上の一般的な範囲としては 3 cm 以下が好ましく、 2 cm 以下がより好ましく、 1 cm 以下であることが更に好ましい。

[0059] 細胞構造体は、生体親和性高分子ブロックと、細胞とを交互に配置することにより製造できる。製造方法は特に限定されないが、好ましくは生体親和性高分子ブロックを形成したのち、細胞を播種する方法である。具体的には、生体親和性高分子ブロックと細胞含有培養液との混合物をインキュベートすることによって、細胞構造体を製造することができる。例えば、容器中、容器に保持される液体中で、細胞と、予め作製した生体親和性を有する高分子ブロックをモザイク状に配置する。配置の手段としては、自然凝集、自然落下、遠心、攪拌を用いることで、細胞と生体親和性基材からなるモザイク状の配列形成を、促進、制御することが好ましい。

[0060] 用いられる容器としては、細胞低接着性材料、細胞非接着性材料からなる容器が好ましく、より好ましくはポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ガラス、ポリカーボネート、ポリエチレンテレフタレートからなる容器である。容器底面の形状は平底型、U字型、V字型であることが好ましい。容器としては、マルチウェル型の容器を用いてもよい。

[0061] [細胞塊または細胞構造体含有組成物の製造]

上記した細胞塊または細胞構造体を本発明の細胞塊または細胞構造体の包埋剤により包埋することによって、細胞塊または細胞構造体含有組成物を製造することができる。包埋の方法は特に限定されないが、細胞塊または細胞構造体を含む容器に、本発明の包埋剤（好ましくは溶液）を添加して、低温（例えば、 $2\sim 12^{\circ}\text{C}$ ）で冷却することによって、溶液をゲル化させることができる。上記により、細胞塊または細胞構造体が細胞塊または細胞構造体

の包埋剤により包埋されている細胞塊または細胞構造体含有組成物を製造することができる。

[0062] <キット>

本発明によればさらに、上記した細胞塊または細胞構造体と、本発明の細胞塊または細胞構造体の包埋剤とを含む、キットが提供される。細胞塊または細胞構造体および細胞塊または細胞構造体の包埋剤の詳細、好ましい態様は本明細書中上記した通りである。キットにはさらに、包埋処理を行うための容器、および取扱説明書などが含まれていてもよい。

[0063] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0064] (1) リコンビナントゼラチン

リコンビナントゼラチンとして以下のCBE3を用意した（国際公開WO 2008/103041号公報に記載）。

CBE3：

分子量：51.6 kD

構造：GAP [(GXY)₆₃]₃G

アミノ酸数：571個

RGD配列：12個

イミノ酸含量：33%

ほぼ100%のアミノ酸がGXYの繰り返し構造である。CBE3のアミノ酸配列には、セリン、スレオニン、アスパラギン、チロシンおよびシステインは含まれていない。CBE3はERGD配列を有している。

等電点：9.34

GRAVY値：-0.682

1/IOB値：0.323

アミノ酸配列（配列表の配列番号1）（国際公開WO 2008/103041号公報の配列番号3と同じ。但し末尾のXは「P」に修正）

GAP (GAPGLQGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGAPGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPP)3G

[0065] (2) リコンビナントゼラチンの分子量分布の測定

上記(1)に記載のリコンビナントゼラチンCBE3(実施例1)について、ゲル浸透クロマトグラフ(GPC)を用いて分子量分布の測定を実施した。分子量分布の測定はHPLC(Waters社製AQUITY UPLCシステムEmpower2)を使用し、緩衝液には100mmol/Lリン酸バッファー(pH6.8)を用いた。これらを用いてリコンビナントゼラチンの分子量分布の相対性を測定した。

[0066] その結果を図1に示す。CBE3の分子量ピークは2つ存在していた。それら2つのピークについて面積比から全ピーク中の占有率を計算したところ、1つ目のピークが92.1%、2つ目のピークが7.9%となっていた。このことから、CBE3は占有率の高いピークとして、92%占有する分子量ピークを有することが分かった。

[0067] (3) 天然動物ゼラチンの分子量分布の測定

比較として、天然動物ゼラチン(比較例1)について、上記(2)と同様にGPCを用いて分子量分布の測定を実施した。結果を図2に示す。天然動物ゼラチンの分子量ピークが2つ存在していた。それら2つのピークについて面積比から全ピーク中の占有率を計算したところ、1つ目のピークが47.6%、2つ目のピークが52.4%となっていた。このことから、天然動物ゼラチンは占有率の高いピークとして、52%の分子量ピークを有することが分かった。

[0068] (4) 包埋剤性能試験(ゲル化速度)

細胞塊または細胞構造体を輸送する際の包埋剤として使うためには、低温でのゲル化速度が速く、逆に可逆反応である常温下では素早く液体に戻る性能が重要となる。そこで1質量%濃度で、低温でのゲル化速度、常温での液体へ戻る速さを試験した。

[0069] その結果、実施例 1 の C B E 3 では 4℃に移すことで速やかにゲル化し、液の流動性が素早く低下し、完全にゲル化させた試料を 25℃の室温環境下へ移すと、早期に液体へと戻る現象が観察された。

具体的には、C B E 3 では 4℃に移すことで 40 分後からゲル化が始まり 50 分後にはほぼ安定なゲルになった。また、そのゲルは強度があり、手で押してもつぶれることのないゲルであった。そのゲルを 25℃の室温に戻すと、40 分で完全な液体に戻った。

[0070] 一方で、比較例 1 の天然動物ゼラチンは、4℃に移すことでゲル化は起こるものの、その速度が C B E 3 の時よりも緩やかであり遅かった。また、完全にゲル化させた試料を 25℃の室温環境下へ移して、再度液体へ戻る速さを試験した結果、実施例 1 の C B E 3 に比べて比較例 1 の天然動物ゼラチンは液体に戻るのが遅かった。

具体的には、天然動物ゼラチンでは、4℃に移すことで 60 分後からゲル化が始まるが、90 分後でもゆるいゲル状にしかならなかった。その後も強度のあるゲルには移行せず、手で押すと簡単に潰れる程度のゆるいゲル状でとどまった。ゲル状のものを 25℃の室温に戻した場合、天然動物ゼラチンでは完全な液体に戻るまでに、70 分要した。

[0071] (5) C B E 3 包埋細胞塊または C B E 3 包埋細胞構造体の作製

ヒト骨髓由来間葉系幹細胞 (hMSC) を増殖培地 (タカラバイオ: MSCGM BulletKit (商標)) に懸濁し、そこに W02015046216 A1 と同様の生体親和性高分子ブロック (53-106 μm) を加えて、最終的に hMSC (1.2×10^6 cells) と生体親和性高分子ブロック (1 mg) が 4 mL の培地に懸濁された状態で、細胞非接着性の 35 mm ディッシュである EZSPHERE (登録商標) ディッシュ Type 903 (スフェロイドウエル口径 800 μm 、スフェロイドウエル深さ 300 μm 、スフェロイドウエル数 ~ 約 1,000 ウエル。底面が窪み部を有する培養面であり、培養面の周縁に立設される側外壁部を有する。AGC テクノグラス製) に播種した。69 時間培養することで約 1,000 個の細胞構造体を得た。尚、別途、生体親和性高分子ブロックを加えず

に同様の作業をすることで細胞塊も得られた。

得られた細胞構造体、または細胞塊を数個ずつ 96well plate に分取し、1 質量% CBE3 を含む HBSS+ (Thermo Fisher Scientific 社製) 200 μ L を添加し、2～8℃で1時間冷却してゲル化させ、CBE3 包埋細胞塊またはCBE3 包埋細胞構造体を作製した。HBSSは、Hanks' Balanced Salt solutionの略称である。

[0072] (6) 振動評価

(6-1)

上記(5)で作製したCBE3 包埋細胞塊またはCBE3 包埋細胞構造体を MicroPlate Mixer (NS-P, アズワン製) に載せ、最大振とう数に設定し2～8℃で2日間振とうさせた。対照として、細胞塊または細胞構造体にCBE3 を含まないHBSS+を添加して、同様に振とうさせた。振とう後、CBE3 包埋細胞塊またはCBE3 包埋細胞構造体を室温に静置し、ゲルを融解して細胞塊または細胞構造体を回収した。振とう前および振とう後の細胞構造体の形状を図3に示す。

[0073] CBE3 を含まないHBSS+を添加した場合、振とう後の細胞塊または細胞構造体が壊れたのに対し、1 質量% CBE3 を含むHBSS+を用いて細胞塊または細胞構造体を包埋した場合、振とう後でも細胞塊または細胞構造体が壊れなかった。

[0074] (6-2)

1 質量% CBE3 を含むHBSS+を添加して、振とうさせた後に回収した細胞塊または細胞構造体を培養したところ、細胞塊また細胞構造体同士が融合することが確認された。これは細胞塊また細胞構造体中の細胞が生存していることを示しており、十分にその性能を発揮できる細胞塊または細胞構造体であることが確認された。

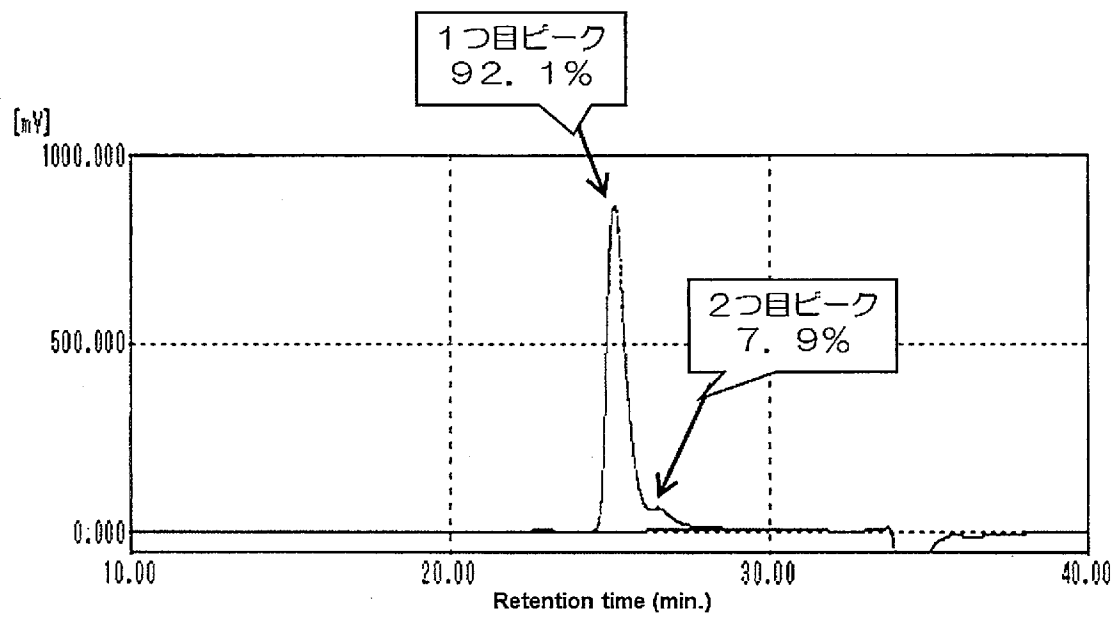
請求の範囲

- [請求項1] 下記式 1 で示され、かつ分子量分布が下記条件 X を満たすポリペプチドを含む、細胞塊または細胞構造体の包埋剤。
- 式 1 : $A - [(Gly - X - Y)_n]_m - B$
- 式中、n 個の X はそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、n 個の Y はそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、m は 2 ～ 10 の整数であり、n は 3 ～ 100 の整数であり、A は任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示し、B は任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示す。
- 条件 X : ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の 80 % 以上である。
- [請求項2] ポリペプチドがリコンビナントゼラチンである、請求項 1 に記載の細胞塊または細胞構造体の包埋剤。
- [請求項3] ポリペプチドが、下記式 2 で示されるポリペプチドである、請求項 1 または 2 に記載の細胞塊または細胞構造体の包埋剤。
- 式 2 : $Gly - Ala - Pro - [(Gly - X - Y)_{63}]_3 - Gly$
- 式中、63 個の X はそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、63 個の Y はそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示す。なお、63 個の $Gly - X - Y$ はそれぞれ同一でも異なってもよい。
- [請求項4] ポリペプチドが、(1) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列、または (2) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と 80 % 以上の配列同一性を有し、生体親和性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の細胞塊または細胞構造体の包埋剤。
- [請求項5] ポリペプチドが、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の細胞塊または細胞構造体の包埋剤。
- [請求項6] 細胞塊または細胞構造体と、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の細胞塊または細胞構造体の包埋剤とを含み、前記細胞塊または細胞構造体が前記細胞塊または細胞構造体の包埋剤により包埋されている、細

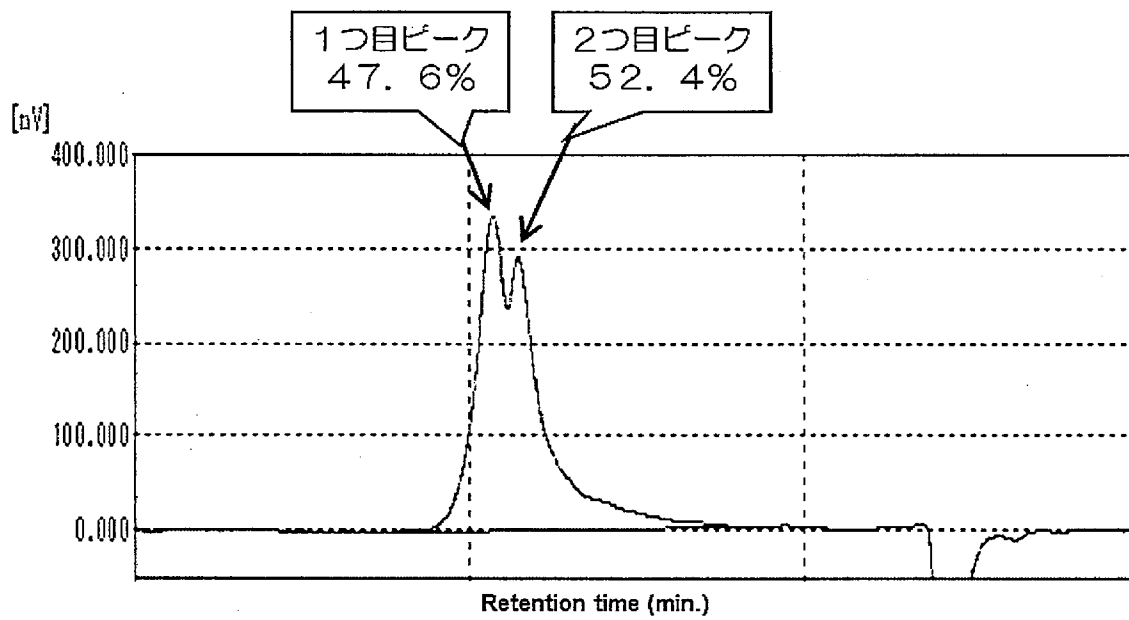
胞塊または細胞構造体含有組成物。

[請求項7] 細胞塊または細胞構造体と、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の細胞塊または細胞構造体の包埋剤とを含む、キット。

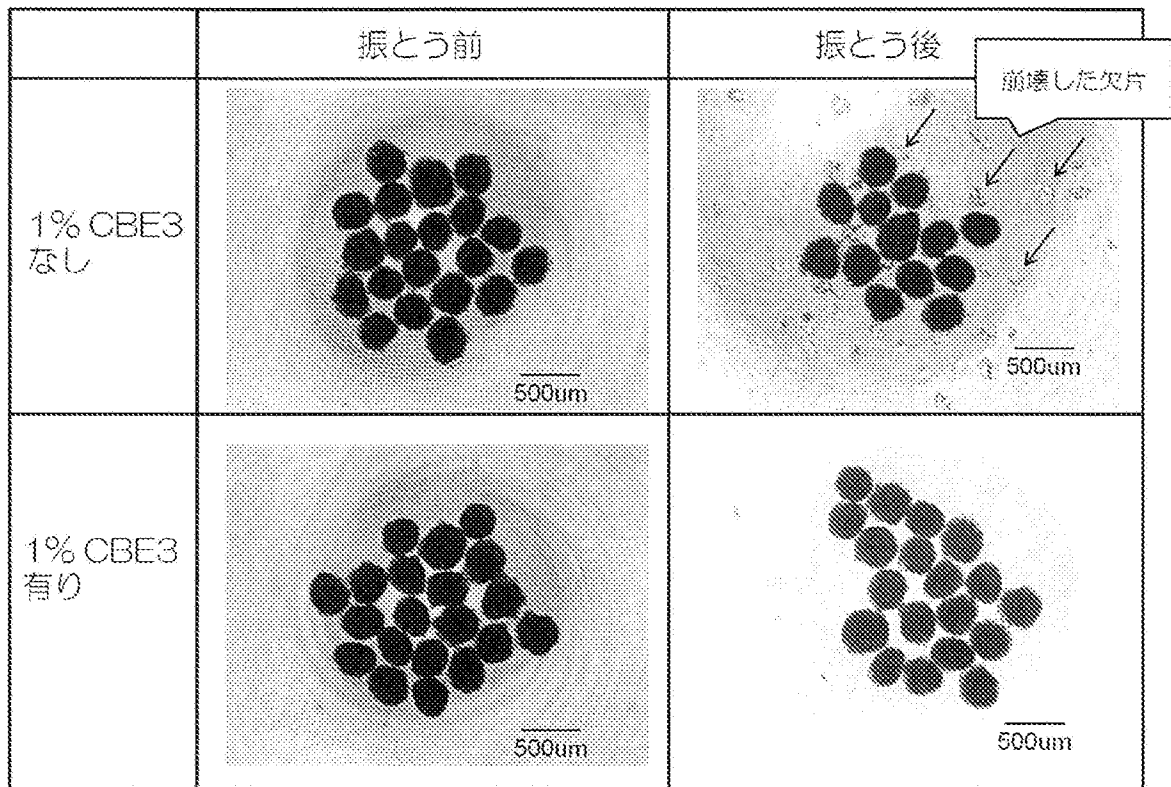
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/007943

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C07K2/00 (2006.01) i, C12N1/04 (2006.01) i, C12N11/08 (2006.01) i,
C12N15/09 (2006.01) n

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)

Int.Cl. C07K2/00, C12N1/04, C12N11/08, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 8-9966 A (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) 16 January 1996, claims, examples (Family: none)	1-7
Y	JP 2010-519251 A (FUJIFILM MANUFACTURING EUROPE B.V) 03 June 2010, claims, paragraphs [0008], [0017], [0018], [0029], [0030], examples & WO 2008/050098 A1, claims, pp. 2, 1.5-21, 4, 1.10-5, 1.7, 7, 1.29-8, 1.15, examples & US 2010/0119574 A1 & EP 2121749 A1	1-7
Y	WO 2011/108537 A1 (FUJIFILM CORP.) 09 September 2011, claims, paragraph [0042], examples & US 2013/0004549 A1, paragraph [0041] & EP 2543398 A1	1-7



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

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 May 2018 (18.05.2018)

Date of mailing of the international search report

29 May 2018 (29.05.2018)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/007943

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-183595 A (NITTA GELATIN INC.) 03 July 2003, paragraph [0007] (Family: none)	1-7
Y	JP 6-242541 A (KONICA CORP.) 02 September 1994, paragraph [0023] (Family: none)	1-7
Y	高橋真哉他, ゼラチンのゲル化挙動について 振動式粘度計を用いたゾルゲル変化挙動測定, ゼラチンシンポジウム講演要旨, 1998, vol. 4, pp, 16-20, 17, ("On the gelation behavior of gelatin. Sol gel change behavior measurement with vibratory viscometer."), non-official translation (TAKAHASHI, Shinya et al., Lecture Abstracts Gelatin Symposium)	1-7
A	JP 2011-172925 A (TERUMO CORP.) 08 September 2011 (Family: none)	1-7
P, X	WO 2017/170342 A1 (FUJIFILM CORP.) 05 October 2017, claims, examples (Family: none)	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K2/00(2006.01)i, C12N1/04(2006.01)i, C12N11/08(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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. C07K2/00, C12N1/04, C12N11/08, C12N15/09

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	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

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
Y	JP 8-9966 A (住友ベークライト株式会社) 1996.01.16, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-7
Y	JP 2010-519251 A (フジフィルム・マニファクチュアリング・ヨーロッパ・ベスローテン・フエンノートシャップ) 2010.06.03, 特許請求の範囲、[0008]、[0017]、[0018]、[0029]、[0030]、実施例 & WO 2008/050098 A1, Claims, p.2, l.5-21, p.4, l.10-p.5, l.7, p.7, l.29-p.8, l.15, Examples & US 2010/0119574 A1 & EP 2121749 A1	1-7

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

18.05.2018

国際調査報告の発送日

29.05.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

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)

平林 由利子

4 B

3634

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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
Y	WO 2011/108537 A1 (富士フイルム株式会社) 2011.09.09, 特許請求の範囲、[0042]、実施例 & US 2013/0004549 A1, [0041] & EP 2543398 A1	1-7
Y	JP 2003-183595 A (新田ゼラチン株式会社) 2003.07.03, [0007] (ファミリーなし)	1-7
Y	JP 6-242541 A (コニカ株式会社) 1994.09.02, [0023] (ファミリーなし)	1-7
Y	高橋真哉他, ゼラチンのゲル化挙動について 振動式粘度計を用いたゾルゲル変化挙動測定, ゼラチンシンポジウム講演要旨, 1998, Vol. 4, pp, 16-20, p. 17	1-7
A	JP 2011-172925 A (テルモ株式会社) 2011.09.08 (ファミリーなし)	1-7
P, X	WO 2017/170342 A1 (富士フイルム株式会社) 2017.10.05, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-7