

(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2018-68192

(P2018-68192A)

(43) 公開日 平成30年5月10日(2018.5.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071	4 B 0 6 5
C O 8 G 81/00 (2006.01)	C O 8 G 81/00	4 J 0 0 5
C O 8 G 65/332 (2006.01)	C O 8 G 65/332	4 J 0 3 1

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2016-211067 (P2016-211067)	(71) 出願人	304036754
(22) 出願日	平成28年10月27日 (2016.10.27)		国立大学法人山形大学
			山形県山形市小白川町1丁目4-12
		(74) 代理人	100086771
			弁理士 西島 孝喜
		(74) 代理人	100088694
			弁理士 弟子丸 健
		(74) 代理人	100094569
			弁理士 田中 伸一郎
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
		(74) 代理人	100119013
			弁理士 山崎 一夫

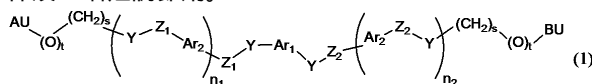
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞挙動を制御するブロック共重合体

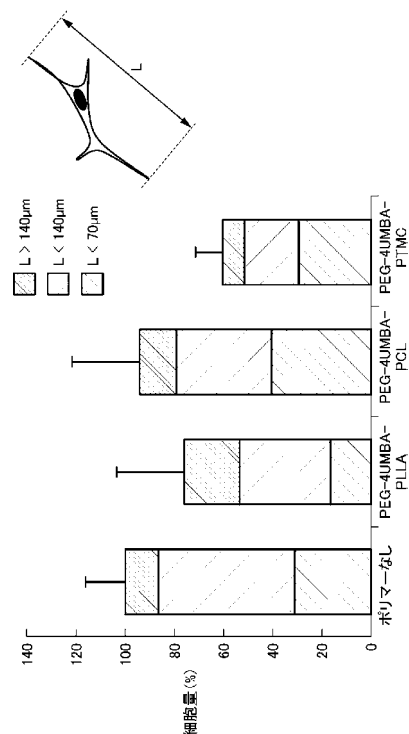
(57) 【要約】

【課題】本発明は、細胞挙動を制御することのできる化合物及び新規な手法を提供することを課題とする。

【解決手段】下式(1)で表される化合物を含む、細胞伸展・増殖調節剤。



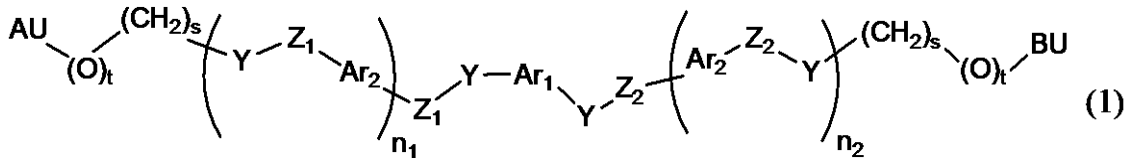
【選択図】 図 6



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下式(1)で表される化合物を含む、細胞伸展・増殖調節剤。



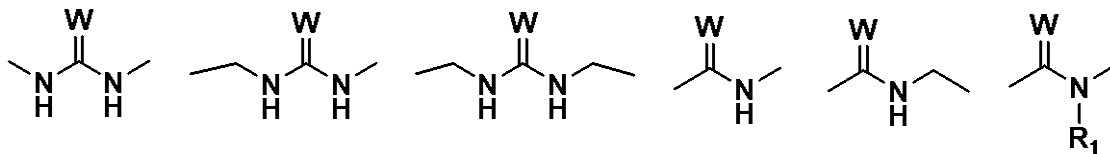
式中、

Ar_1 は、少なくとも1つの基-Rによって水素原子が置換されていてよい、 C_6-18 アリレン又はピリジレンを表し、

Ar_2 は、少なくとも1つの基-Rによって水素原子が置換されていてよい、 C_6-18 アリレン又はピリジレンを表すか、又は存在せず、 Ar_2 が複数存在するとき、 Ar_2 はそれぞれ同じでも異なってもよく、

Rは、水素原子、ハロゲン原子、又は C_1-3 アルキル基を表し、

Yは、以下から選択される基を表し、Yはそれぞれ同じでも異なってもよく、



Wは、酸素原子又は硫黄原子を表し、

R_1 は、 $-(\text{CH}_2)_{m_1}-\text{N}^+\text{A}^-$ 又は $-(\text{CH}_2)_{m_1}-\text{SO}_3^-\text{M}^+$ を表し、

A^- は、ハロゲン原子のアニオンを表し、

M^+ は、一価の金属原子のカチオンを表し、

m_1 は、1~5の整数を表し、

Z_1 及び Z_2 は、それぞれ、アルキレン、オキシアルキレン又は脂環式構造を表すか、或いは存在せず、

n_1 は、0又は1を表し、 n_1 が1のときは、 Z_1 は C_1-2 アルキレンであるか存在せず、 Z_1 はそれぞれ同じでも異なってもよく、

n_2 は、0又は1を表し、 n_2 が1のときは、 Z_2 は C_1-2 アルキレンであるか存在せず、 Z_1 はそれぞれ同じでも異なってもよく、

sは、0~3の整数を表し、

tは、0又は1の整数を表し、

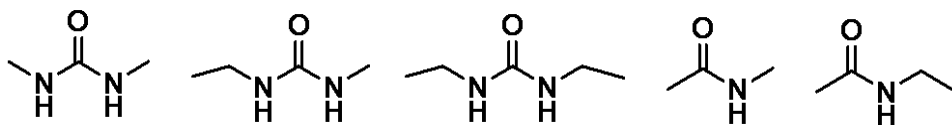
AUは、分子量500~100,000の親水性ブロックポリマー単位を表し、

BUは、分子量500~100,000の疎水性ブロックポリマー単位を表す。

【請求項 2】

Ar_1 がフェニレンを表し、

Yが以下から選択される基を表し、

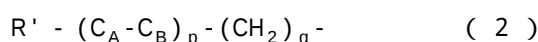


Rが水素原子を表す、

請求項1に記載の細胞伸展・増殖調節剤。

【請求項 3】

親水性ブロックポリマー単位が、ポリエチレングリコール構造、ポリエチレンイミン構造、又は以下の式(2)により表される繰り返し構造を有する、請求項1又は2に記載の細胞伸展・増殖調節剤。



10

20

30

40

50

式中、

C_A は、少なくとも1つの基 - R_A によって水素原子が置換されている、鎖状又は環式の、飽和又は不飽和 $C_1 \sim 8$ 脂肪族炭化水素基であって、当該脂肪族炭化水素基中の C_B に隣接する炭素原子以外の少なくとも1つの炭素原子がN、O又はSから選択されるヘテロ原子で置換されていてもよく、当該脂肪族炭化水素基中、少なくとも1つの水素原子が $C_1 \sim 3$ アルキル基及び/又はハロゲン原子で更に置換されていてもよく、更に2つの水素原子が合わせて=Oで置換されていてもよい脂肪族炭化水素基を表し、

R_A は、 $-L-(R_a)_r$ を表し、

R_a は、ヒドロキシ基、アミノ基、カルボキシ基、スルホン基、ホスホン基、チオール基、グアニジル基、アミジル基、ピリジニウム基、ホスホニウム基、アンモニウム基、グアニジウム基、ホスホリルコリン基、 $-(CH_2CH_2O)_{x1}CH_3$ 、又は単糖類を表し、

$x1$ は、1～1000の整数を表し、

r は、1以上の整数を表し、 r が2以上のとき、 R_a はそれぞれ同じでも異なってもよく、

L は、リンカーであり、アルキレン基、アリーレン基、トリアゾレン基、エーテル結合、チオエーテル結合、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合及びウレア結合、並びにそれらの組み合わせを有する単位構造から選択され、

C_B は、カーボネート結合、エステル結合、エーテル結合、アミド結合、ウレタン結合及びウレア結合から選択されるか、或いは存在せず、

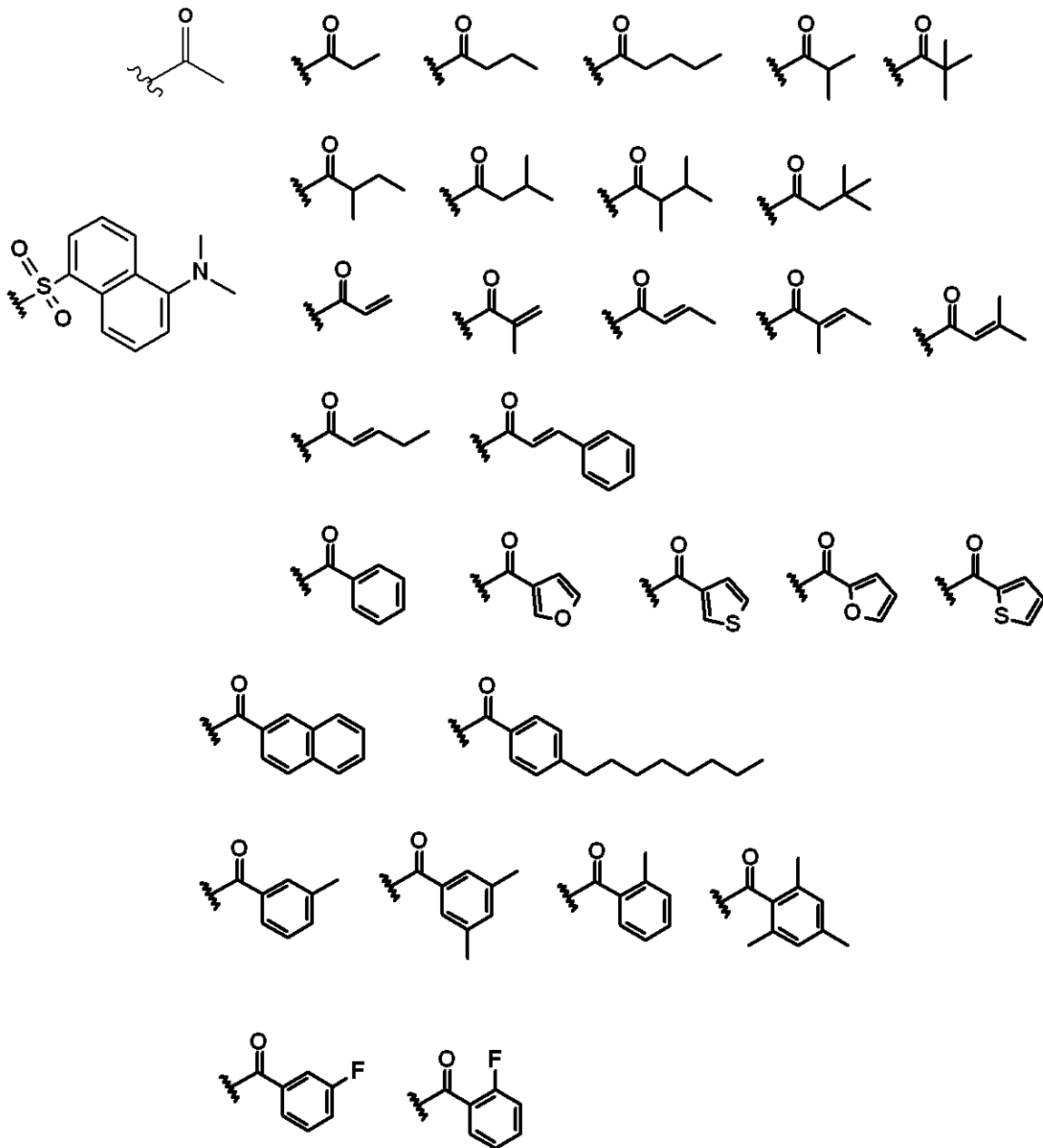
p は、2～2000の整数を表し、

q は、0～20の整数を表し、

R' は、水素原子であるか、以下から選択される基を表す。

10

20



10

20

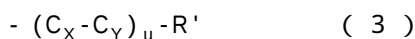
30

40

50

【請求項 4】

疎水性ブロックポリマー単位が、以下の式（3）により表される繰り返し構造を有する、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の細胞伸展・増殖調節剤。



式中、

C_X は、カーボネート結合、エステル結合又はカルボニル結合を表すか、或いは存在せず

C_Y は、少なくとも 1 つの基 - R_B によって水素原子が置換されていてもよい、鎖状又は環式の、飽和又は不飽和 C_{1-8} 脂肪族炭化水素基であって、当該脂肪族炭化水素基中の C_X に隣接する炭素原子以外の少なくとも 1 つの炭素原子が N、O 又は S から選択されるヘテロ原子で置換されていてもよく、当該脂肪族炭化水素基中、少なくとも 1 つの水素原子が C_{1-3} アルキル基及び / 又はハロゲン原子で置換されていてもよく、更に 2 つの水素原子が合わせて =O で置換されていてもよい脂肪族炭化水素基を表し、

R_B は、-L- (R_b)_v を表し、

R_b は、アルキル基、アリール基、アリールアルキル基、アルキルアリール基、脂環式構造、疎水性アミノ酸又は疎水ペプチドを表し、これらの基において、少なくとも 1 つの水

素原子がハロゲン原子で置換されていてもよく、

v は、1以上の整数を表し、 v が2以上のとき、 R_b はそれぞれ同じでも異なってもよく、

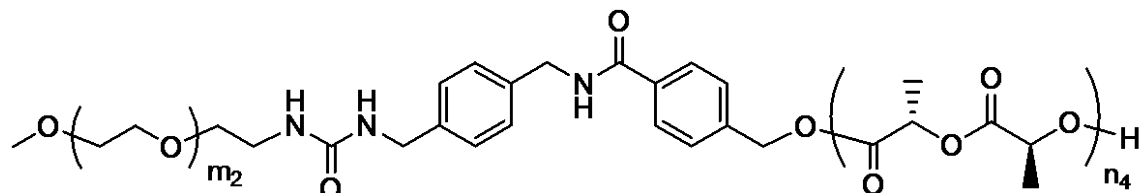
L は、式(2)で定義されるものと同じ範囲のリンカーを表し、

R' は、式(2)で定義されるものと同じ範囲の基を表し、

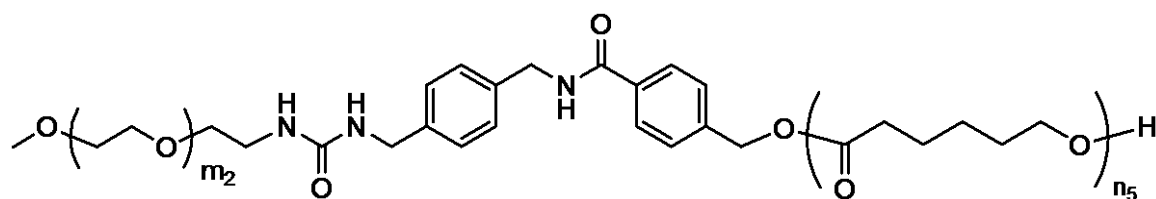
u は、2~3000の整数を表す。

【請求項5】

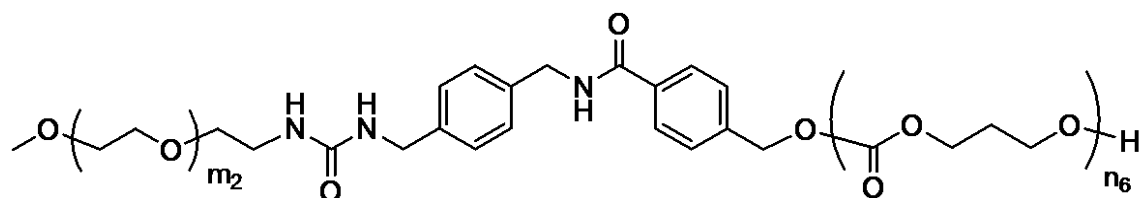
式(1)で表される化合物が以下から選択される、請求項1~4のいずれか1項に記載の細胞伸展・増殖調節剤。



10



20



30

(式中、

n_4 は、3~700を表し

n_5 は、4~900を表し、

n_6 は、5~1000を表し、

m_2 は、10~2300を表す。)

【請求項6】

請求項1に記載の式(1)で表される化合物を含む培地中で細胞を培養することを含む、細胞の伸展及び/又は増殖を調節する方法。

【請求項7】

請求項1に記載の式(1)で表される化合物を備える、細胞培養用キット。

【請求項8】

請求項1に記載の式(1)で表される化合物を含む、細胞培養用培地。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特定の化合物を含む、細胞伸展・増殖調節剤に関する。また、本発明は、細胞の伸展及び/又は増殖を調節する方法、細胞培養用キット及び細胞培養用培地等に関する。

【背景技術】

【0002】

自己の細胞を利用し、病変・欠損した組織を再生させる「再生医療」は、幹細胞研究の

50

発展も相まって、近年ますます注目を浴びている。一般に、細胞を直接患部に移植・注入しても組織の修復は芳しくないため、生体外で培養し、増殖させて移植片を構築させる手法がとられる。実用的な移植片に必要な細胞数は数千万～数億と言われ、近年、3Dプリンティングや「細胞シート」積層化、細胞積層・集積技術など「トップダウン」型手法を用いて、複数異種の細胞からなる「生体に近い」秩序的な三次元組織の構築が可能になってきたが、大型化や量産化、コスト面など改善すべき技術的課題は未だ多く残されている。

一方、培養器の構造や材質によって、単純な培養操作でサブミリサイズの球状の細胞凝集体（スフェロイド）を形成させることができるため、生産性の点で優位であるが、秩序的な組織構造構築が難しく、細胞塊の生存性が低い。

【0003】

10

また、近年、ナノ材料の形状が与える生体内動態への影響に注目が集まっている。両親媒性ブロック共重合体が水中で形成するナノ会合体は、ドラッグデリバリーシステムへの応用が検討されてきた。更には、非特許文献1には、親水性のポリエチレングリコール（PEG）と疎水性のポリ-L-乳酸（PLLA）からなる両親媒性ブロック共重合体のブロック間に、芳香環と水素結合ユニットからなるN-(4-(ureidomethyl)benzyl)benzamide（4UMBA）を導入したPEG-4UMBA-PLLAが、ナノチューブを形成することが報告されている。非特許文献2及び3には、ドラッグデリバリーシステムや抗菌剤において、ナノ形状効果が報告されている。

しかしながら、これら従来技術においては、PEG-4UMBA-PLLAやその類似体が形成するナノ会合体が、細胞挙動に対してどのような影響を与えるかについて何ら示されてこなかった。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】S-H. Kim et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2009, 48, 4508-4512

【非特許文献2】D. Li et al., Adv. Funct. Mater., 2016, 26, 66-79

【非特許文献3】K. Fukushima et al., ACS Nano, 2012, 6, 9191-9199

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

30

上記したように、再生医療に関連する細胞培養技術において、改善すべき技術的課題が未だ多く残されている状況に鑑み、本発明は、細胞挙動を制御することのできる化合物及び新規な手法を提供することを課題とする。

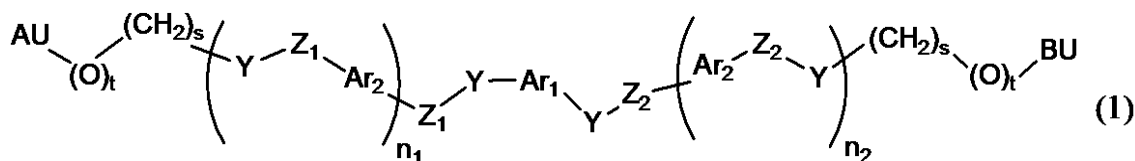
【課題を解決するための手段】

【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、両親媒性ブロック共重合体のブロック間に芳香環と水素結合ユニットからなる構造を有する化合物が、細胞の増殖や形態制御に作用することを新たに見出した。本発明は、これらの新規な知見に基づいて完成されたものである。

一実施態様において、本発明は、下式（1）で表される化合物を含む、細胞伸展・増殖調節剤に関する。

40



（式中、

Ar₁は、少なくとも1つの基-Rによって水素原子が置換されていてもよい、C₆₋₁₈アリレン又はピリジレンを表し、

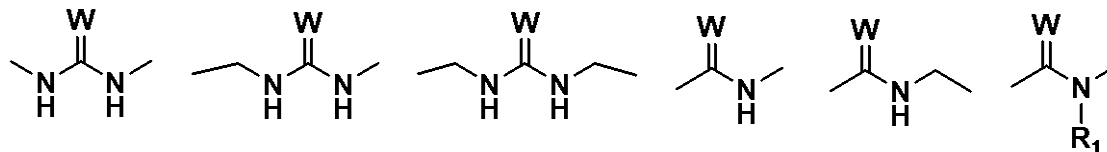
Ar₂は、少なくとも1つの基-Rによって水素原子が置換されていてもよい、C₆₋₁₈アリ

50

ーレン又はピリジレンを表すか、又は存在せず、 Ar_2 が複数存在するとき、 Ar_2 はそれぞれ同じでも異なってもよく、

R は、水素原子、ハロゲン原子、又は $C_1 \sim 3$ アルキル基を表し、

Y は、以下から選択される基を表し、 Y はそれぞれ同じでも異なってもよく、



W は、酸素原子又は硫黄原子を表し、

R_1 は、 $-(CH_2)_{m_1}-N^+A^-$ 又は $-(CH_2)_{m_1}-SO_3^-M^+$ を表し、

A^- は、ハロゲン原子のアニオンを表し、

M^+ は、一価の金属原子のカチオンを表し、

m_1 は、1～5の整数を表し、

Z_1 及び Z_2 は、それぞれ、アルキレン、オキシアルキレン又は脂環式構造を表すか、或いは存在せず、

n_1 は、0又は1を表し、 n_1 が1のときは、 Z_1 は $C_1 \sim 2$ アルキレンであるか存在せず、 Z_1 はそれぞれ同じでも異なってもよく、

n_2 は、0又は1を表し、 n_2 が1のときは、 Z_2 は $C_1 \sim 2$ アルキレンであるか存在せず、 Z_2 はそれぞれ同じでも異なってもよく、

s は、0～3の整数を表し、

t は、0又は1の整数を表し、

AU は、分子量500～100,000の親水性ブロックポリマー単位を表し、

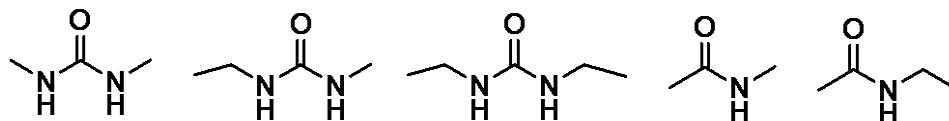
BU は、分子量500～100,000の疎水性ブロックポリマー単位を表す。）

【0007】

本発明の一実施態様によれば、式(1)中、

Ar_1 がフェニレンを表し、

Y が以下から選択される基を表し、

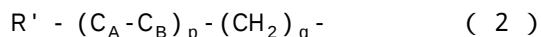


R が水素原子を表す、

上記細胞伸展・増殖調節剤が提供される。

【0008】

本発明の一実施態様によれば、式(1)中、親水性ブロックポリマー単位が、ポリエチレングリコール構造、ポリエチレンイミン構造、又は以下の式(2)により表される繰り返し構造を有する、上記細胞伸展・増殖調節剤が提供される。



(式中、

C_A は、少なくとも1つの基 $-R_A$ によって水素原子が置換されている、鎖状又は環式の、飽和又は不飽和 $C_1 \sim 8$ 脂肪族炭化水素基であって、当該脂肪族炭化水素基中の C_B に隣接する炭素原子以外の少なくとも1つの炭素原子が N 、 O 又は S から選択されるヘテロ原子で置換されていてもよく、当該脂肪族炭化水素基中、少なくとも1つの水素原子が $C_1 \sim 3$ アルキル基及び/又はハロゲン原子で更に置換されていてもよく、更に2つの水素原子が合わせて $=O$ で置換されていてもよい脂肪族炭化水素基を表し、

R_A は、 $-L-(R_a)_r$ を表し、

R_a は、ヒドロキシ基、アミノ基、カルボキシ基、スルホン基、ホスホン基、チオール基、グアニジル基、アミジル基、ピリジニウム基、ホスホニウム基、アンモニウム基、グアニジウム基、ホスホリルコリン基、 $-(CH_2CH_2O)_{x_1}CH_3$ 、又はグルコース、ガラクトース、

10

20

30

40

50

マンノース及びフルクトース等の単糖類を表し、

x1は、1～1000の整数を表し、

rは、1以上の整数を表し、rが2以上のとき、R_aはそれぞれ同じでも異なってもよく、

Lは、リンカーであり、アルキレン基、アリーレン基、トリアゾレン基、エーテル結合、チオエーテル結合、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合及びウレア結合、並びにそれらの組み合わせを有する単位構造から選択され、

C_Bは、カーボネート結合、エステル結合、エーテル結合、アミド結合、ウレタン結合及びウレア結合から選択されるか、或いは存在せず、

pは、2～2000の整数を表し、

10

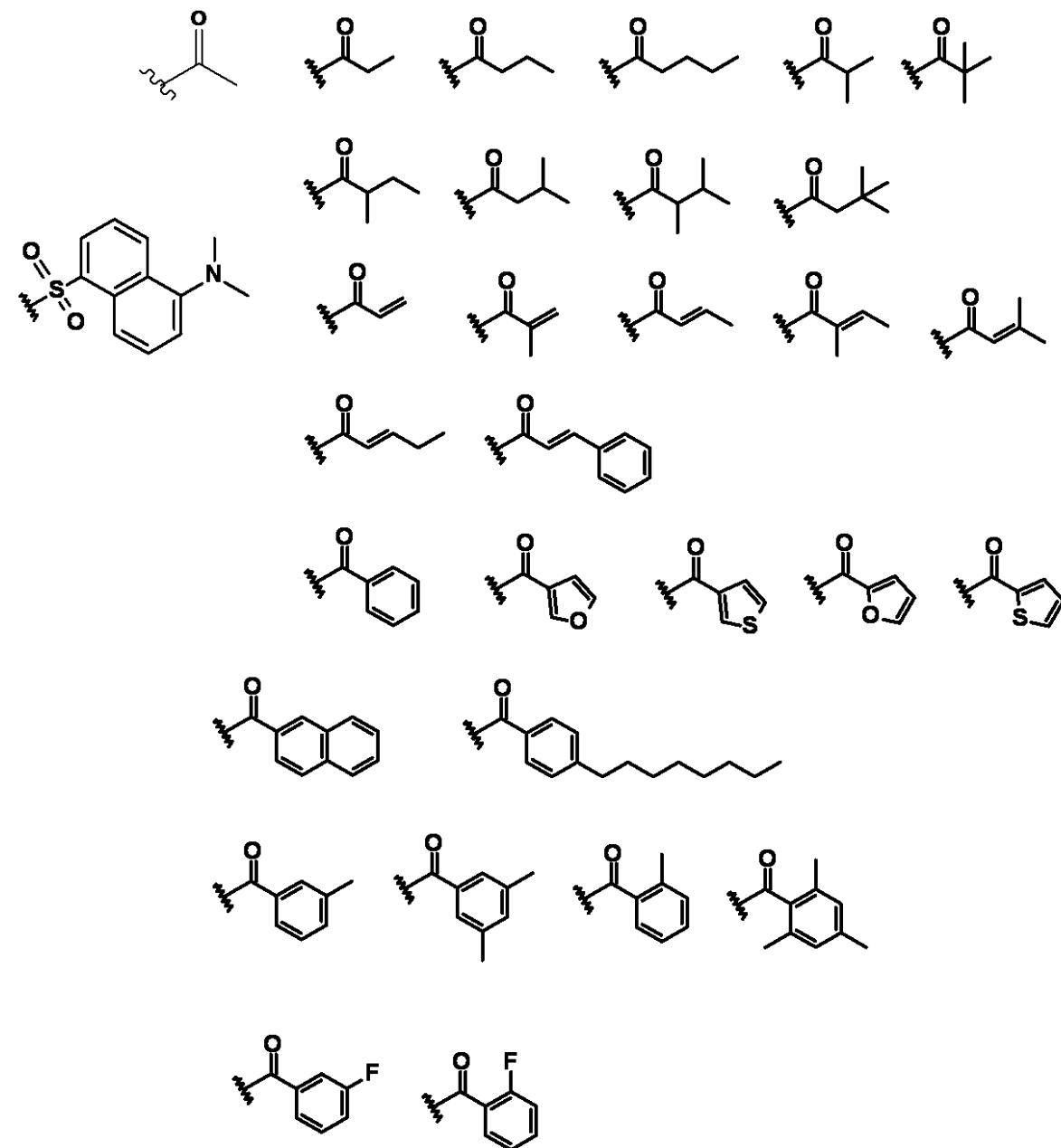
qは、0～20の整数を表し、

R'は、水素原子であるか、以下から選択される基を表す。)

20

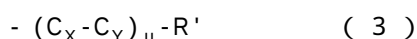
30

40



【0009】

本発明の一実施態様によれば、式(1)中、疎水性ブロックポリマー単位が、以下の式(3)により表される繰り返し構造を有する、上記細胞伸展・増殖調節剤が提供される。



50

(式中、

C_X は、カーボネート結合、エステル結合又はカルボニル結合を表すか、或いは存在せず、

C_Y は、少なくとも1つの基- R_B によって水素原子が置換されているもよい、鎖状又は環式の、飽和又は不飽和 C_{1-8} 脂肪族炭化水素基であって、当該脂肪族炭化水素基中の C_X に隣接する炭素原子以外の少なくとも1つの炭素原子がN、O又はSから選択されるヘテロ原子で置換されているもよく、当該脂肪族炭化水素基中、少なくとも1つの水素原子が C_{1-3} アルキル基及び/又はハロゲン原子で置換されているもよく、更に2つの水素原子が合わせて=Oで置換されているもよい脂肪族炭化水素基を表し、

R_B は、 $-L-(R_b)_v$ を表し、

R_b は、アルキル基、アリール基、アリールアルキル基、アルキルアリール基、脂環式構造、疎水ペプチド又はコレステロールを表し、これらの基において、少なくとも1つの水素原子がハロゲン原子で置換されているもよく、

v は、1以上の整数を表し、 v が2以上のとき、 R_b はそれぞれ同じでも異なっているもよく、

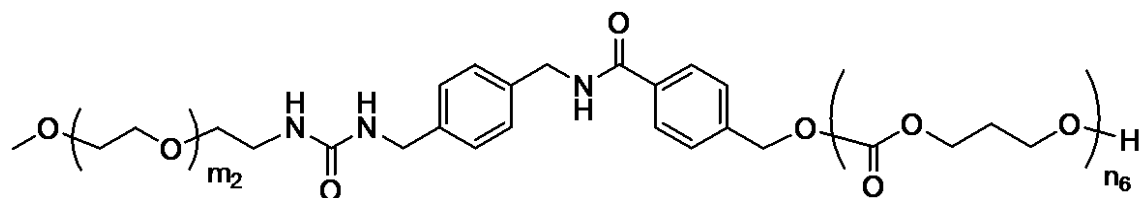
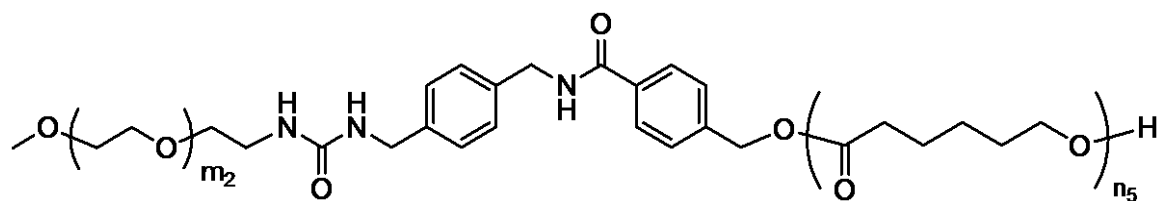
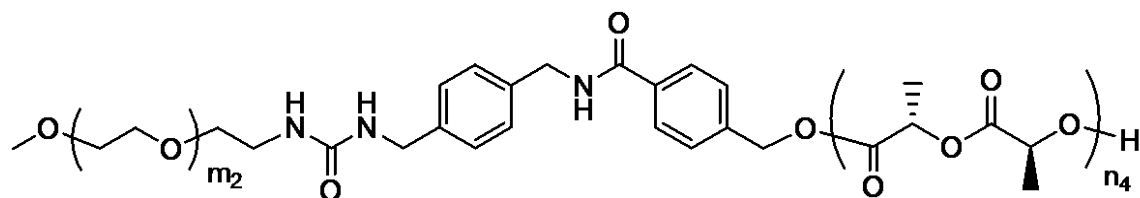
L は、式(2)で定義されるものと同じ範囲のリンカーを表し、

R' は、式(2)で定義されるものと同じ範囲の基を表し、

u は、2~3000の整数を表す。)

【0010】

本発明の一実施態様によれば、式(1)で表される化合物が以下から選択される、前記細胞伸展・増殖調節剤。



(式中、

n_4 は、3~700を表し、

n_5 は、4~900を表し、

n_6 は、5~1000を表し、

m_2 は、10~2300を表す。)

【0011】

別の一実施態様において、本発明は、式(1)で表される化合物を含む培地中で細胞を培養することを含む、細胞の伸展及び/又は増殖を調節する方法に関する。

また別の一実施態様において、本発明は、式(1)で表される化合物を備える、細胞培

養用キットに関する。

また更に別の一実施態様において、本発明は、式(1)で表される化合物を含む、細胞培養用培地に関する。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、細胞挙動を制御することのできる化合物及び新規な手法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】 PEG-4UMBA-PLLA、PEG-4UMBA-ポリεカプロラクトン(PCL)及びPEG-4UMBA-ポリトリメチレンカーボネート(PTMC)の透過型電子顕微鏡(TEM)画像である。

10

【図2】 PEG-b-PLLA、PEG-b-PCL及びPEG-b-PTMCのTEM画像である。

【図3】 PEG-4UMBA-PLLA、PEG-4UMBA-PCL及びPEG-4UMBA-PTMCに関する、動的光散乱解析の結果である。

【図4】 培養6時間後の、正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)の位相差像である。

【図5】 培養48時間後、クリスタルバイオレットで染色したNHDFの位相差像である。

【図6】 培養48時間後の、NHDFの伸展及び増殖を示すグラフである。

【図7】 培養48時間後の、NHDFの伸展及び増殖を示すグラフである。

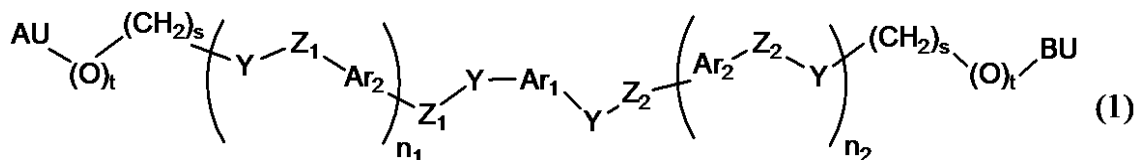
【発明を実施するための形態】

【0014】

20

以下、本発明について詳述する。

本発明において、細胞挙動を制御することのできる化合物は、以下の式(1)で表される(以下、本明細書において、式(1)で表される化合物を、「本発明ポリマー」という。)。



(式中、

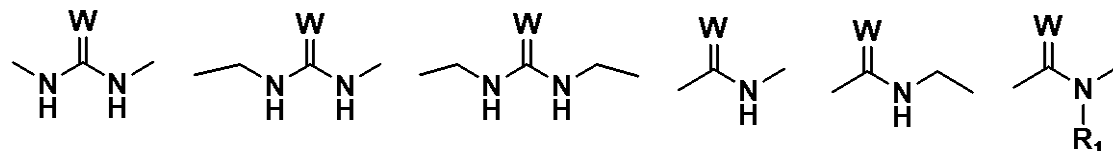
30

Ar_1 は、少なくとも1つの基-Rによって水素原子が置換されていてもよい、 C_6-18 アリレン又はピリジレンを表し、

Ar_2 は、少なくとも1つの基-Rによって水素原子が置換されていてもよい、 C_6-18 アリレン又はピリジレンを表すか、又は存在せず、 Ar_2 が複数存在するとき、 Ar_2 はそれぞれ同じでも異なってもよく、

Rは、水素原子、ハロゲン原子、又は C_1-3 アルキル基を表し、

Yは、以下から選択される基を表し、Yはそれぞれ同じでも異なってもよく、



40

Wは、酸素原子又は硫黄原子を表し、

R_1 は、 $-(\text{CH}_2)_{m_1}-\text{N}^+\text{A}^-$ 又は $-(\text{CH}_2)_{m_1}-\text{SO}_3^-\text{M}^+$

A^- は、ハロゲン原子のアニオンを表し、

M^+ は、一価の金属原子のカチオンを表し、

m_1 は、1~5の整数を表し、

Z_1 及び Z_2 は、それぞれ、アルキレン、オキシアルキレン又は脂環式構造を表すか、或いは存在せず、

n_1 は、0又は1を表し、 n_1 が1のときは、 Z_1 は C_1-2 アルキレンであるか存在せず、 Z_1 はそ

50

れぞれ同じでも異なってもよく、

n_2 は、0又は1を表し、 n_2 が1のときは、 Z_2 は C_{1-2} アルキレンであるか存在せず、 Z_2 はそれぞれ同じでも異なってもよく、

s は、0～3の整数を表し、

t は、0又は1の整数を表し、

AUは、分子量500～10万の親水性ブロックポリマー単位を表し、

BUは、分子量500～10万の疎水性ブロックポリマー単位を表す。）

なお、Yは2価の基であるが、表記されているとおりの向きだけでなく、表記されているのとは左右反対の向きで結合していてもよい。

【0015】

本発明ポリマーは、両親媒性ブロック共重合体のブロック間に、芳香環と水素結合ユニットを含む構造を有する。この芳香環と水素結合ユニットを含む構造は、液晶性を発現する部位でもあり得、メソゲンとも呼ばれる。

本発明ポリマーは、水中で異方性のナノ会合体を形成し、この異方性ナノ会合体が、細胞培養液内に添加される液性因子として作用、又は細胞培養液内成分（血清タンパク質等）に作用し、細胞の増殖や形態の制御に作用するものと考えられる。異方性ナノ会合体の形成は、アミド基やウレア基等が形成する水素結合と、芳香環の π - π 相互作用等の平面性構造間に働く分子間相互作用による配向誘起を、疎水性ブロックが補足・強化することで行われると考えられる。従って、本明細書において、上記式（1）で示される構造中、AUで示される親水性ブロック単位及びBUで示される疎水性ブロック単位以外の部分を、「配向誘起ユニット」と言う。

【0016】

上記式（1）中、 Ar_1 は、少なくとも1つの基-Rによって水素原子が置換されていてもよい、 C_{6-18} アリーレン又はピリジレンを表す。 C_{6-18} アリーレンは、炭素数6～18のアリーレンを意味する。本明細書において、「 C_{6-18} 」との記載は、いずれも炭素数を意味する。

C_{6-18} アリーレンとしては、例えば、フェニレン、ナフチレン、アントリレン、フェナントリレン、ピレニレン、ナфтаセニレン等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。好ましくは、 Ar_1 はフェニレンであるが、これに限定されない。

フェニレンとしては、1,3-フェニレン、1,4-フェニレンが好ましい。

ナフチレンとしては、1,3-ナフチレン、1,4-ナフチレン、1,6-ナフチレン、1,7-ナフチレン、2,6-ナフチレン、2,7-ナフチレンが好ましい。

アントリレンとしては、1,3-アントリレン、1,4-アントリレン、1,5-アントリレン、1,6-アントリレン、1,7-アントリレン、1,8-アントリレン、2,5-アントリレン、2,6-アントリレン、2,7-アントリレン、2,8-アントリレンが好ましい。

フェナントリレンとしては、1,6-フェナントリレン、1,7-フェナントリレン、1,8-フェナントリレン、2,6-フェナントリレン、2,7-フェナントリレン、2,8-フェナントリレンが好ましい。

ピレニレンとしては、1,6-ピレニレン、1,7-ピレニレン、1,8-ピレニレン、2,6-ピレニレン、2,7-ピレニレン、2,8-ピレニレンが好ましい。

ナфтаセニレンとしては、1,3-ナфтаセニレン、1,4-ナфтаセニレン、1,7-ナфтаセニレン、1,8-ナфтаセニレン、1,9-ナфтаセニレン、1,10-ナфтаセニレン、2,7-ナфтаセニレン、2,8-ナфтаセニレン、2,9-ナфтаセニレン、2,10-ナфтаセニレンが好ましい。

ピリジレンとしては、2,4-ピリジレン、2,5-ピリジレン、2,6-ピリジレンが好ましい。

Ar_1 において、Rは、水素原子、ハロゲン原子、又は C_{1-3} アルキル基を表し、好ましくは水素である。

【0017】

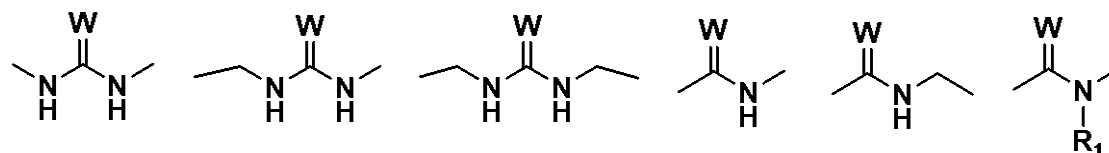
上記式(1)中、 Ar_2 は、少なくとも1つの基-Rによって水素原子が置換されていてもよい、 $C_6 \sim 18$ アリーレン又はピリジレンを表すか、又は存在せず、 Ar_2 が複数存在するとき、 Ar_2 はそれぞれ同じでも異なってもよい。

$C_6 \sim 18$ アリーレン及びピリジレンの例としては、 Ar_1 について上記したものと同じである。

Ar_2 において、Rは、水素原子、ハロゲン原子、又は $C_1 \sim 3$ アルキル基を表し、好ましくは水素である。

【0018】

上記式(1)中、Yは、以下から選択される基を表し、Yはそれぞれ同じでも異なってもよい。



ここで、Wは、酸素原子又は硫黄原子を表し、好ましくは、酸素原子である。

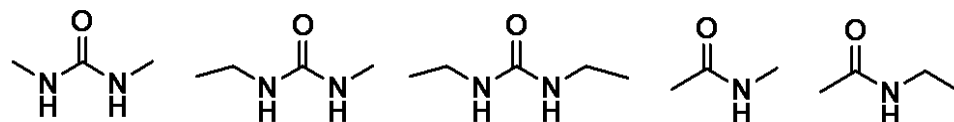
R_1 は、 $-(CH_2)_m-N^+A^-$ 又は $-(CH_2)_m-SO_3^-M^+$ を表し、 A^- は、ハロゲン原子のアニオンを表し、 M^+ は、一価の金属原子のカチオンを表す。

本明細書において、ハロゲン原子には、例えば、F、Cl、Br、Iが含まれ、一価の金属原子には、例えば、Li、Na、K、Agが含まれるが、これらに限定されるものではない。

mは、1～5の整数を表し、好ましくは、2～4である。

R_1 の具体例としては、 $-CH_2-N^+Br^-$ 、 $-CH_2-N^+Cl^-$ 、 $-(CH_2)_2-N^+Br^-$ 、 $-(CH_2)_2-N^+Cl^-$ 、 $-(CH_2)_3-N^+Br^-$ 、 $-(CH_2)_3-N^+Cl^-$ 、 $-(CH_2)_4-N^+Br^-$ 、 $-(CH_2)_4-N^+Cl^-$ 、 $-(CH_2)_5-N^+Br^-$ 、 $-(CH_2)_5-N^+Cl^-$ 、 $-CH_2-SO_3^-Li^+$ 、 $-CH_2-SO_3^-Na^+$ 、 $-(CH_2)_2-SO_3^-Li^+$ 、 $-(CH_2)_2-SO_3^-Na^+$ 、 $-(CH_2)_3-SO_3^-Li^+$ 、 $-(CH_2)_3-SO_3^-Na^+$ 、 $-(CH_2)_4-SO_3^-Li^+$ 、 $-(CH_2)_4-SO_3^-Na^+$ 、 $-(CH_2)_5-SO_3^-Li^+$ 、 $-(CH_2)_5-SO_3^-Na^+$ が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

好ましいYとしては、例えば、



が挙げられる。

【0019】

上記式(1)中、 Z_1 及び Z_2 は、それぞれ、アルキレン、オキシアルキレン又は脂環式構造を表すか、或いは存在せず、好ましくは、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキレン、 $C_1 \sim C_{20}$ オキシアルキレンであるか、存在しない。例えば、アルキレン及びオキシアルキレンの炭素数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19及び20のうちのいずれの数であってもよい。アルキレン及びオキシアルキレンは、直鎖であっても分岐鎖であってもよい。

アルキレンには、例えば、メチレン、エチレン、n-プロピレン、メチルエチレン、ジメチルメチレン、n-ブチレン、イソブチレン、ジメチルエチレン、メチルプロピレン、エチルエチレン、n-ペンチレン、イソペンチレン、ネオペンチレン、トリメチルエチレン、ジメチルプロピレン、メチルブチレン、エチルプロピレン、n-ヘキシレン、イソヘキシレン、ネオヘキシレン、メチルペンチレン、ジメチルブチレン、トリメチルプロピレン、メチルエチルプロピレン、n-ヘプチレン、イソヘプチレン、ネオヘプチレン、ジメチルペンチレン、エチルペンチレン、トリメチルブチレン、メチルエチルブチレン、n-オクチレン、イソオクチレン、ネオオクチレン、メチルヘプチレン、ジメチルヘキシレン、トリメチルペンチレン、メチルエチルペンチレン、n-ノニレン、イソノニレン、ネオノニレン、メチルオクチレン、ジメチルヘプチレン、トリメチルヘキシレン、メチルエチルヘキシレン、n-デシレン、イソデシレン、ネオデシレン、メチルノニレン、ジメチル

オクチレン、トリメチルヘプチレン、メチルエチルヘプチレン、トリメチルオクチレン、メチルエチルオクチレン、及びテトラメチルヘキシレンが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0020】

オキシアルキレンには、例えば、オキシメチレン、オキシエチレン、オキシn-プロピレン、オキシメチルエチレン、オキシジメチルメチレン、オキシn-ブチレン、オキシイソブチレン、オキシジメチルエチレン、オキシメチルプロピレン、オキシエチルエチレン、オキシn-ペンチレン、オキシイソペンチレン、オキシネオペンチレン、オキシトリメチルエチレン、オキシジメチルプロピレン、オキシメチルブチレン、オキシエチルプロピレン、オキシn-ヘキシレン、オキシイソヘキシレン、オキシネオヘキシレン、オキシメチルペンチレン、オキシジメチルブチレン、オキシトリメチルプロピレン、オキシメチルエチルプロピレン、オキシn-ヘプチレン、オキシイソヘプチレン、オキシネオヘプチレン、オキシジメチルペンチレン、オキシエチルペンチレン、オキシトリメチルブチレン、オキシメチルエチルブチレン、オキシn-オクチレン、オキシイソオクチレン、オキシネオオクチレン、オキシメチルヘプチレン、オキシジメチルヘキシレン、オキシトリメチルペンチレン、オキシメチルエチルペンチレン、オキシn-ノニレン、オキシイソノニレン、オキシノニレン、オキシメチルオクチレン、オキシジメチルヘプチレン、オキシトリメチルヘキシレン、オキシメチルエチルヘキシレン、オキシn-デシレン、オキシイソデシレン、オキシネオデシレン、オキシメチルノニレン、オキシジメチルオクチレン、オキシトリメチルヘプチレン、オキシメチルエチルヘプチレン、オキシトリメチルオクチレン、オキシメチルエチルオクチレン、及びオキシテトラメチルヘキシレンが含まれるが、これらに限定されるものではない。なお、オキシアルキレン中の酸素原子は、2価のアルキレン鎖のいずれの末端にあってもよく、いずれか一方の末端において酸素原子であり、酸素原子を介して他の分子構造に結合するものである。

10

20

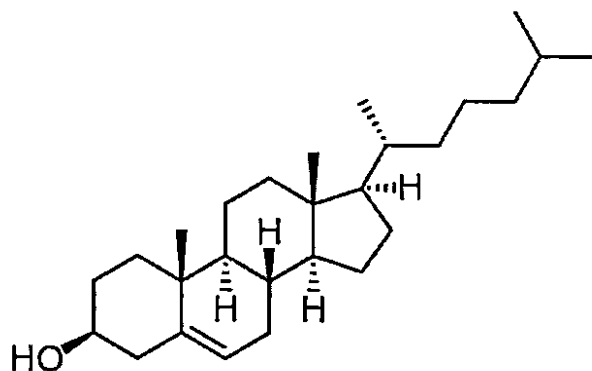
【0021】

脂環式構造とは、芳香族性を有しない環式炭化水素基であり、単環式であっても多環式であってもよい。

単環式炭化水素基としては、例えば、シクロアルキレン又はシクロアルケニレンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

多環式炭化水素基としては、ビスシクロアルキレン、ビスシクロアルケニレン、トリシクロアルキレン、トリシクロアルケニレン、以下のコレステロール骨格を有する基が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30



40

脂環式構造の炭素数は、例えば、3～30である。

単環式炭化水素基の炭素数は、3以上であり、好ましくは、4以上であり、より好ましくは、5以上であり、例えば、12以下であり、好ましくは、10以下であり、より好ましくは、8以下である。

シクロアルキレンには、例えば、シクロプロピレン、シクロブチレン、シクロペンチレン、シクロヘキシレン、シクロヘプチレン、及びシクロオクチレンが含まれる。

シクロアルケニレンには、例えば、シクロペンテニレン、シクロヘキセニレン、シクロ

50

ヘプテニレン、及びシクロオクテニレンが含まれる。

【 0 0 2 2 】

上記式 (1) 中、 n_1 は、0又は1を表し、 n_1 が1のときは、 Z_1 は $C_1 \sim 2$ アルキレンであるか存在しない。 Z_1 はそれぞれ同じでも異なってもよい。

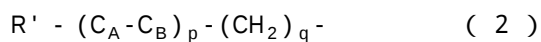
上記式 (1) 中、 n_2 は、0又は1を表し、 n_2 が1のときは、 Z_2 は $C_1 \sim 2$ アルキレンであるか存在しない。 Z_2 はそれぞれ同じでも異なってもよい。

【 0 0 2 3 】

上記式 (1) 中、AUは、分子量500～100,000の親水性ブロックポリマー単位を表す。親水性ブロックポリマー単位の分子量は、好ましくは1,000以上、より好ましくは2,000以上であり、好ましくは20,000以下、より好ましくは10,000以下である。

なお、本明細書において、分子量の値は、別に記載がない限り、数平均分子量 (Mn) を意味する。

AUは、例えば、ポリエチレングリコール構造、ポリエチレンイミン構造、又は以下の式 (2) により表される繰り返し構造を有するが、これらに限定されるものではない。



(式中、

C_A は、少なくとも1つの基 - R_A によって水素原子が置換されている、鎖状又は環式の、飽和又は不飽和 $C_1 \sim 8$ 脂肪族炭化水素基であって、当該脂肪族炭化水素基中の C_B に隣接する炭素原子以外の少なくとも1つの炭素原子がN、O又はSから選択されるヘテロ原子で置換されていてもよく、当該脂肪族炭化水素基中、少なくとも1つの水素原子が $C_1 \sim 3$ アルキル基及び/又はハロゲン原子で更に置換されていてもよく、更に2つの水素原子が合わせて=Oで置換されていてもよい脂肪族炭化水素基を表し、

R_A は、- L - (R_a)_rを表し、

R_a は、ヒドロキシ基、アミノ基、カルボキシ基、スルホン基、ホスホン基、チオール基、グアニジル基、アミジル基、ピリジニウム基、ホスホニウム基、アンモニウム基、グアニジウム基、ホスホリルコリン基、- (CH_2CH_2O)_{x1}CH₃、又はグルコース、ガラクトース、マンノース及びフルクトース等の単糖類を表し、

x_1 は、1～1000の整数を表し、好ましくは2以上、より好ましくは3以上で、好ましくは100以下、より好ましくは50以下であり、

r は、1以上の整数を表し、 r が2以上のとき、 R_a はそれぞれ同じでも異なってもよく、

Lは、リンカーであり、アルキレン基、アリーレン基、トリアゾレン基、エーテル結合、チオエーテル結合、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合及びウレア結合、並びにそれらの組み合わせを有する単位構造から選択され、

C_B は、カーボネート結合、エステル結合、エーテル結合、アミド結合、ウレタン結合及びウレア結合から選択されるか、或いは存在せず、

p は、2～2000の整数を表し、好ましくは5～1000であり、

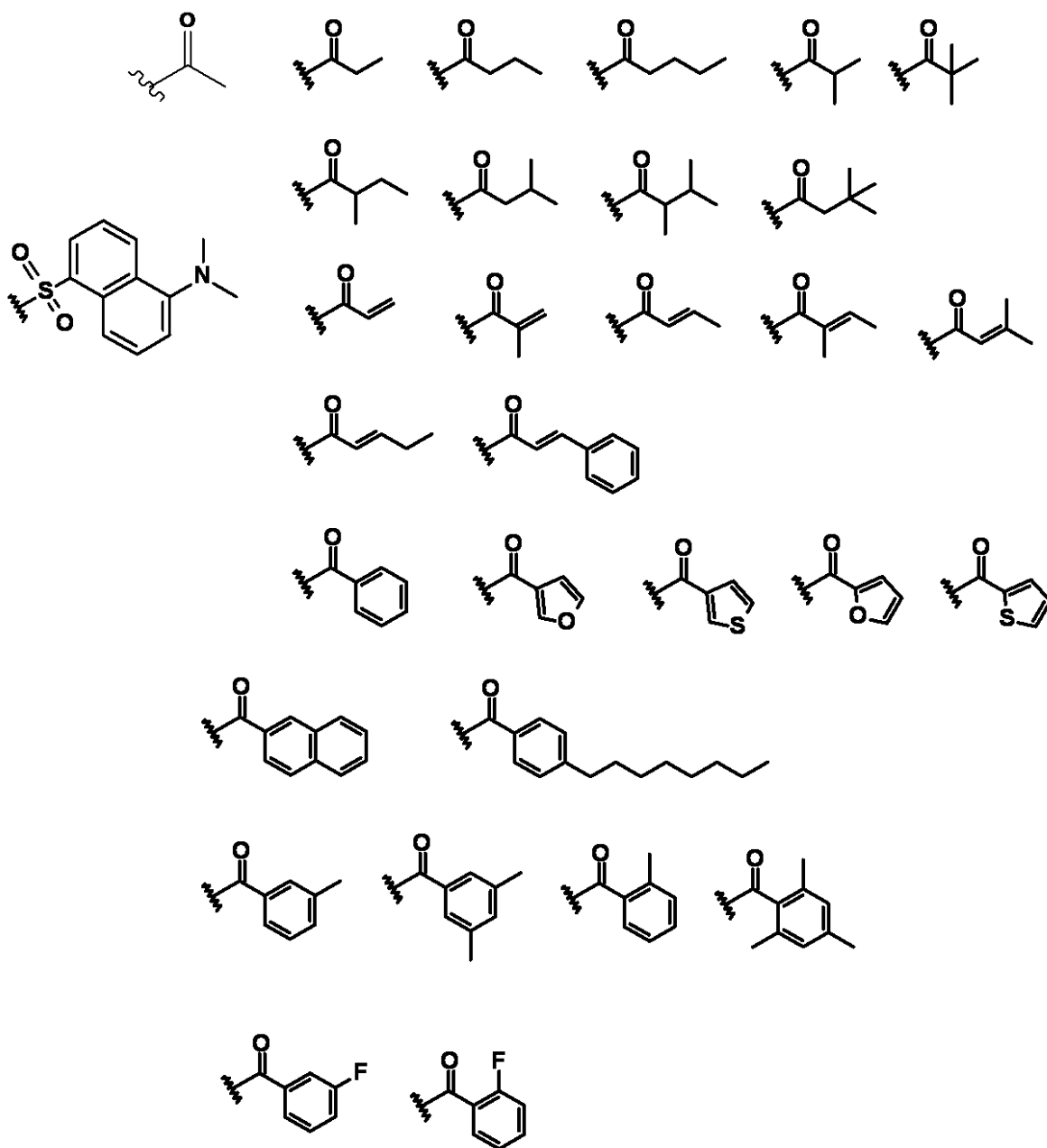
q は、0～20の整数を表し、好ましくは0～10であり、より好ましくは0～5であり、

R' は、水素原子であるか、以下から選択される基を表す。)

10

20

30



10

20

30

【 0 0 2 4 】

リンカーLの構造中のアルキレンには、式(1)で定義されるものと同じ範囲のものが含まれ、好ましくは、メチレン、エチレン、プロピレンであるが、これらに限定されるものではない。

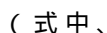
リンカーLの構造中のアリーレンには、式(1)で定義される $C_6 \sim 18$ アリーレンと同じ範囲のものが含まれ、好ましくは、フェニレンであるが、これに限定されるものではない。

40

リンカーLは、例えば、以下に示される基から選択され得る。



ここで、ポリエチレングリコール構造とは、例えば、以下の構造である。

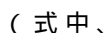


30

。アルコキシ基の具体例としては、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基等が挙げられる。

R_Cのアリール基は、例えば、炭素数 1 ~ 10であり、好ましくは、フェニル基又はナフチル基である。

ここで、ポリエチレンイミン構造とは、例えば、以下の構造である。



40

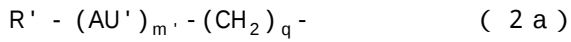
。アルコキシ基の具体例としては、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基等が挙げられる。

50

ル基である。

【 0 0 2 7 】

AUの具体例としては、例えば、下式(2a)で示されるものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

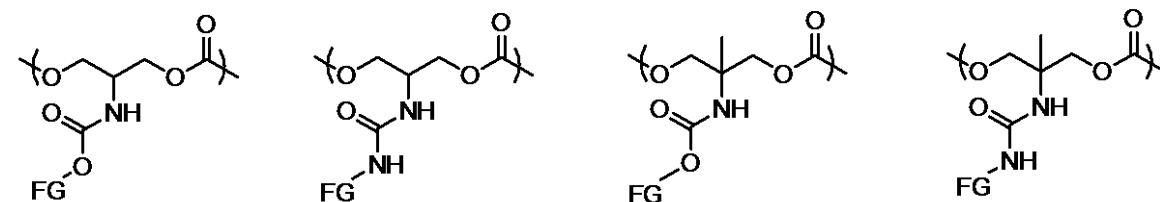
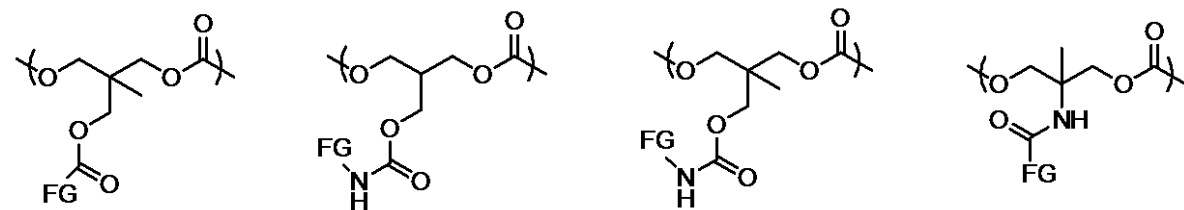
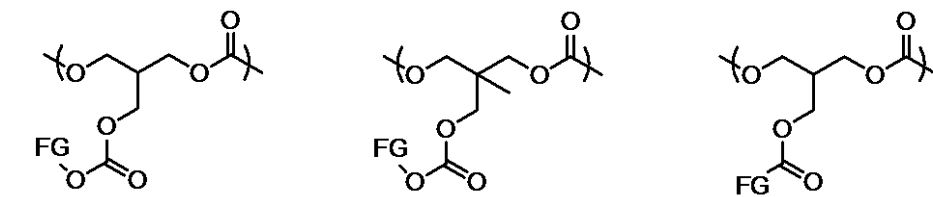
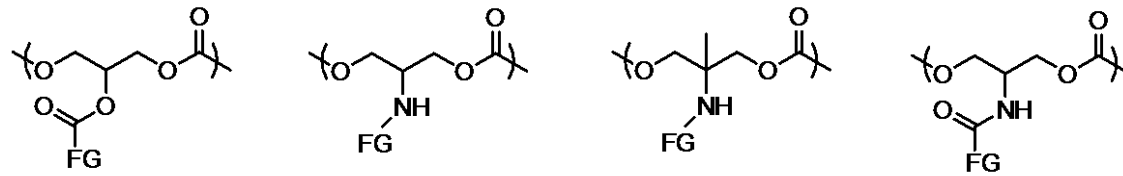
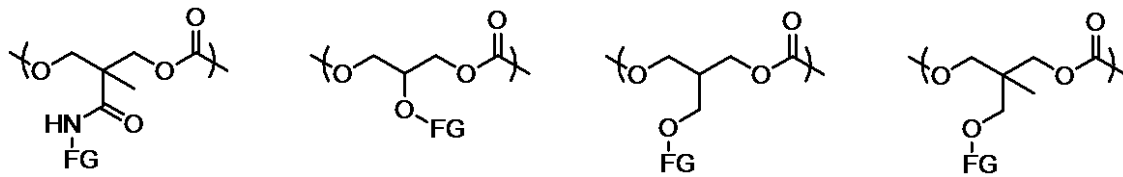
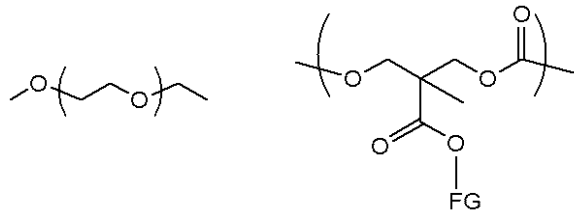


(式中、

R'及びqは、式(2)で定義されるとおりであり、

m'は、2~2300の整数を表し、

(AU')は、以下に示される構造から選択される。)



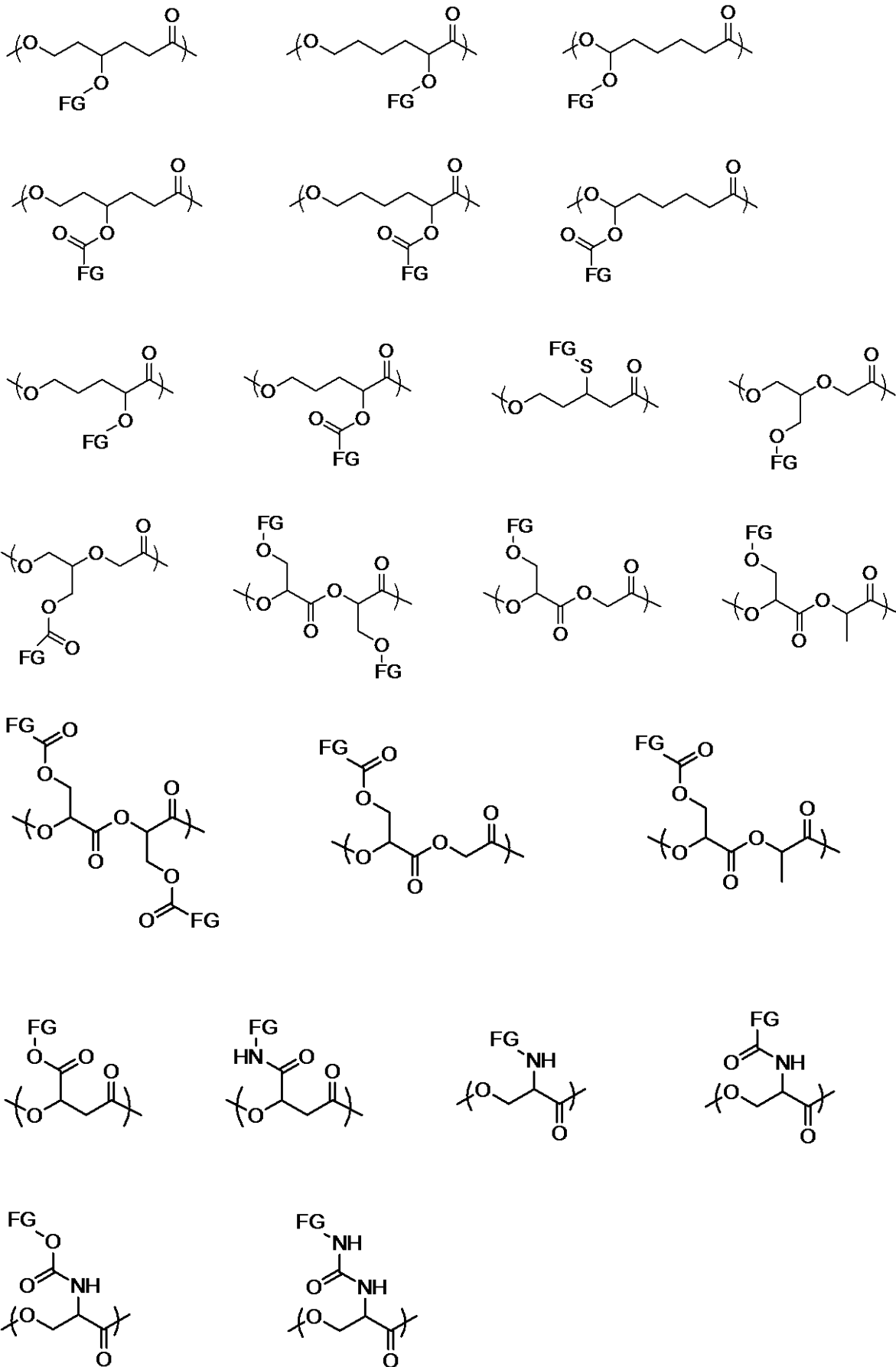
10

20

30

40

50



10

20

30

40

(式中、

FGは、H、 $-(CH_2)_{x2}$ -ヒドロキシ、 $-(CH_2)_{x2}$ -アミノ、 $-(CH_2)_{x2}$ -カルボキシ、 $-(CH_2)_{x2}$ -スルホン、 $-(CH_2)_{x2}$ -ホスホン、 $-(CH_2)_{x2}$ -チオール、 $-(CH_2)_{x2}$ -グアニジル

50

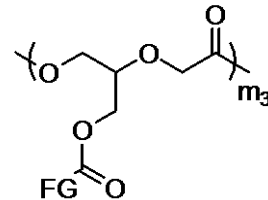
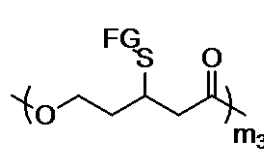
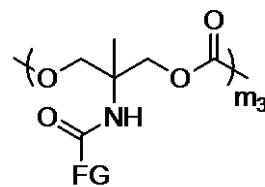
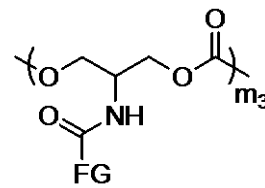
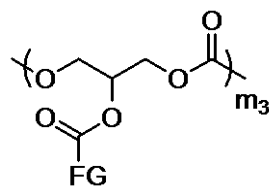
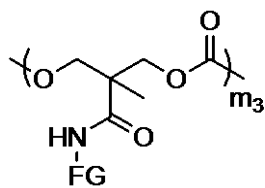
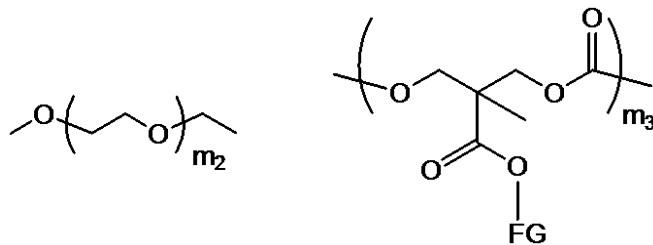
、 $-(\text{CH}_2)_{x_2}-$ アミジル、 $-(\text{CH}_2)_{x_2}-$ ピリジニウム、 $-(\text{CH}_2)_{x_2}-$ ホスホニウム、 $-(\text{CH}_2)_{x_2}-$ アンモニウム、 $-(\text{CH}_2)_{x_2}-$ グアニジウム、 $-(\text{CH}_2)_{x_2}-$ ホスホリルコリン、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{x_1}\text{CH}_3$ 、又は $-(\text{CH}_2)_{x_2}-$ 単糖類を表し、好ましくは、 H 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{x_1}\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、又は $-\text{CH}_2\text{COOH}$ を表し、

x_1 は、1～1000の整数を表し、好ましくは2以上、より好ましくは3以上で、好ましくは100以下、より好ましくは50以下であり、

x_2 は、0～8の整数を表し、好ましくは0～5、より好ましくは0～3である。）

【0028】

$-(\text{AU}')_m-$ として、より好ましくは、以下の構造が挙げられるが、これらに限定されるものではない。



(式中、

FGは、式(2a)で定義されるとおりであり、

m_2 は、10～2300の整数を表し、好ましくは20以上、より好ましくは45以上で、好ましくは450以下、より好ましくは230以下であり、

m_3 は、2～500の整数を表し、好ましくは5以上、より好ましくは10以上で、好ましくは100以下、より好ましくは50以下である。）

【0029】

上記式(1)中、BUは、分子量500～100,000の疎水性ブロックポリマー単位を表す。疎水性ブロックポリマー単位の分子量は、好ましくは1,000以上、より好ましくは2,000以上であり、好ましくは20,000以下、より好ましくは10,000以下である。

疎水性ブロックポリマー単位の分子量は、親水性ブロックポリマー単位の分子量と同程度であることが好ましい。例えば、親水性ブロックポリマー単位の分子量：疎水性ブロックポリマー単位の分子量は、1:0.7～1.3、1:0.8～1.2、1:0.9～1.1であり得る。

本発明の一実施態様において、疎水性ブロックポリマー単位は、疎水性結晶性ブロックポリマー単位である。異方性ナノ会合体の形成は、アミド基やウレア基等が形成する水素結合と、芳香環の $\pi-\pi$ 相互作用等の平面性構造間に働く分子間相互作用による配向誘起を、疎水性ブロックが補足・強化することで行われると考えられるが、疎水性ブロックが結晶性であると、上記補足・強化する作用がより向上するため、異方性ナノ会合体の形成に有利である。

【0030】

10

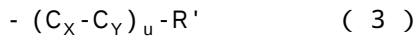
20

30

40

50

BUは、例えば、以下の式(3)により表される繰り返し構造を有するが、これらに限定されるものではない。



(式中、

C_X は、カーボネート結合、エステル結合又はカルボニル結合を表すか、或いは存在せず、

C_Y は、少なくとも1つの基- R_B によって水素原子が置換されていてもよい、鎖状又は環式の、飽和又は不飽和 C_{1-8} 脂肪族炭化水素基であって、当該脂肪族炭化水素基中の C_X に隣接する炭素原子以外の少なくとも1つの炭素原子がN、O又はSから選択されるヘテロ原子で置換されていてもよく、当該脂肪族炭化水素基中、少なくとも1つの水素原子が C_{1-3} アルキル基及び/又はハロゲン原子で置換されていてもよく、更に2つの水素原子が合わせて=Oで置換されていてもよい脂肪族炭化水素基を表し、

R_B は、 $-L-(R_b)_v$ を表し、

R_b は、アルキル基、アリール基、アリールアルキル基、アルキルアリール基、脂環式構造、疎水性アミノ酸又は疎水ペプチドを表し、これらの基において、少なくとも1つの水素原子が、F、Cl、Br、I等のハロゲン原子で置換されていてもよく、

v は、1以上の整数を表し、 v が2以上のとき、 R_b はそれぞれ同じでも異なってもよく、

L は、式(2)で定義されるものと同じ範囲のリンカーを表し、

R' は、式(2)で定義されるものと同じ範囲の基を表し、

u は、2~3000の整数を表し、好ましくは10~2000である。)

【0031】

R_b のアルキル基は、例えば、炭素数1~30であり、好ましくは、炭素数1~20であり、より好ましくは、炭素数1~12であり、直鎖であっても分岐鎖であってもよい。アルキル基には、メチル、エチル、 n -プロピル、メチルエチル、ジメチルメチル、 n -ブチル、イソブチル、ジメチルエチル、メチルプロピル、エチルエチル、 n -ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、トリメチルエチル、ジメチルプロピル、メチルブチル、エチルプロピル、 n -ヘキシル、イソヘキシル、ネオヘキシル、メチルペンチル、ジメチルブチル、トリメチルプロピル、メチルエチルプロピル、 n -ヘブチル、イソヘブチル、ネオヘブチル、ジメチルペンチル、エチルペンチル、トリメチルブチル、メチルエチルブチル、 n -オクチル、イソオクチル、ネオオクチル、メチルヘブチル、ジメチルヘキシル、トリメチルペンチル、メチルエチルペンチル、 n -ノニル、イソノニル、ネオノニル、メチルオクチル、ジメチルヘブチル、トリメチルヘキシル、メチルエチルヘキシル、 n -デシル、イソデシル、ネオデシル、メチルノニル、ジメチルオクチル、トリメチルヘブチル、メチルエチルヘブチル、トリメチルオクチル、メチルエチルオクチル、及びテトラメチルヘキシルが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0032】

R_b のアリール基は、例えば、炭素数6~40であり、好ましくは、炭素数6~30であり、より好ましくは、炭素数6~20である。アリール基には、フェニル基、ナフチル基、アントリル基、及びピレニル基が含まれるが、これらに限定されるものではない。

R_b のアリールアルキル基は、前記 R_b のアルキル基において、少なくとも1つの水素原子が前記 R_b のアリール基により置換された基を意味する。

R_b のアルキルアリール基は、前記 R_b のアリール基において、少なくとも1つの水素原子が前記 R_b のアルキル基により置換された基を意味する。

R_b の脂環式構造は、式(1)で定義されるとおりである。

R_b の疎水性アミノ酸は、アラニン、グリシン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン及びバリンからなる群から選択されるアミノ酸である。

R_b の疎水ペプチドは、例えば、少なくとも、前記疎水性アミノ酸が2~50個、好ましくは2~20個、より好ましくは2~5個結合して構成されるペプチドであるが、これに限定されるものではない。また、疎水ペプチドは、疎水性を保つ範囲内で、前記疎水性アミノ酸

以外にも、他の親水的な残基を持つアミノ酸（アスパラギン酸、リシン、グルタミン酸、アルギニン、システイン、ヒスチジン、セリン、プロリン、トレオニン、チロシン）を含んでいてもよい。

【 0 0 3 3 】

BUの具体例としては、例えば、下式（ 3 a ）で示されるものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

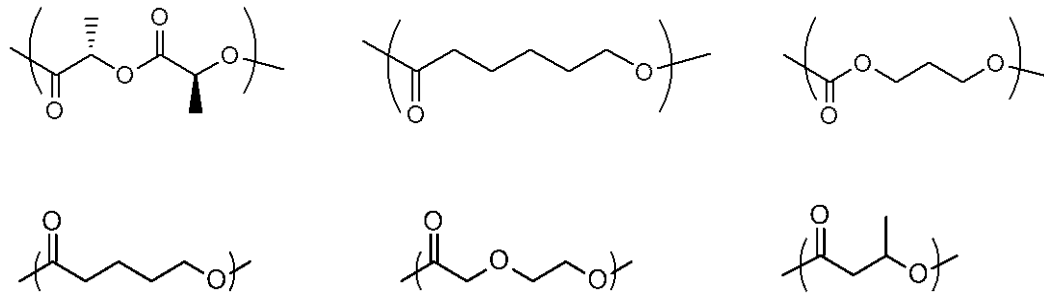


（式中、

R' は、式（ 2 ）で定義されるものと同じ範囲の基を表し、

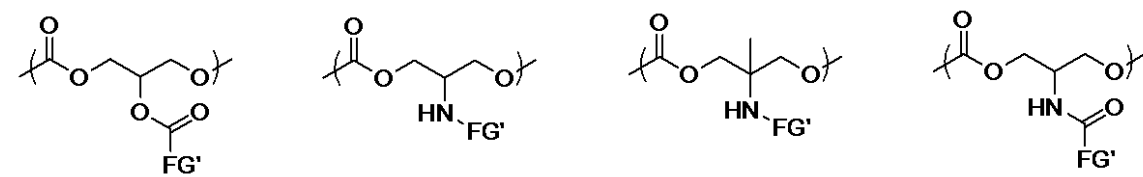
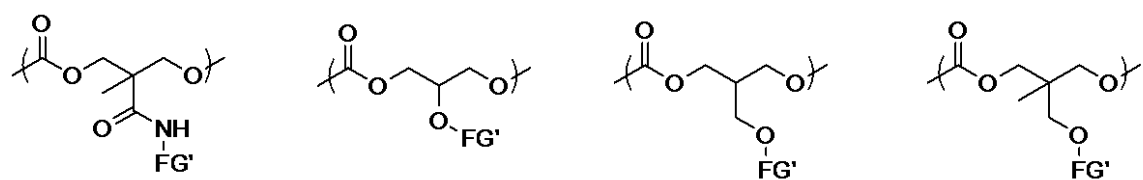
n' は、2～1000の整数を表し、

(BU') は、以下に示される構造から選択される。）

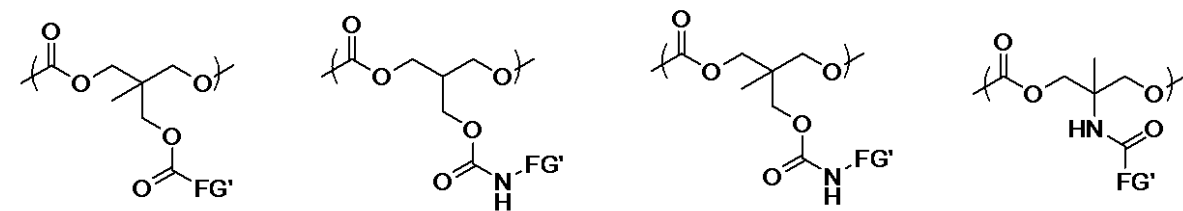
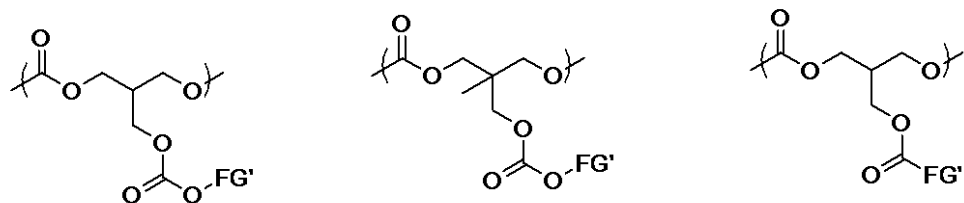


10

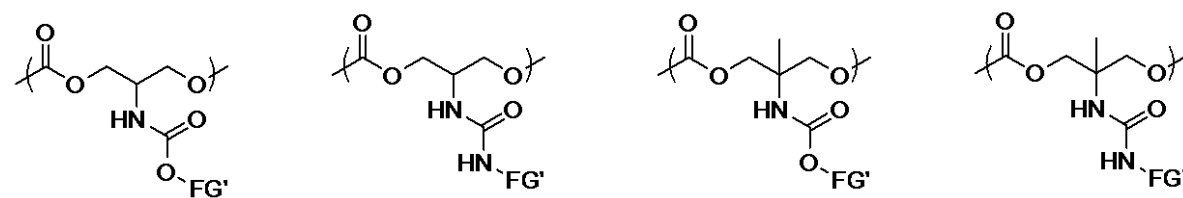
20



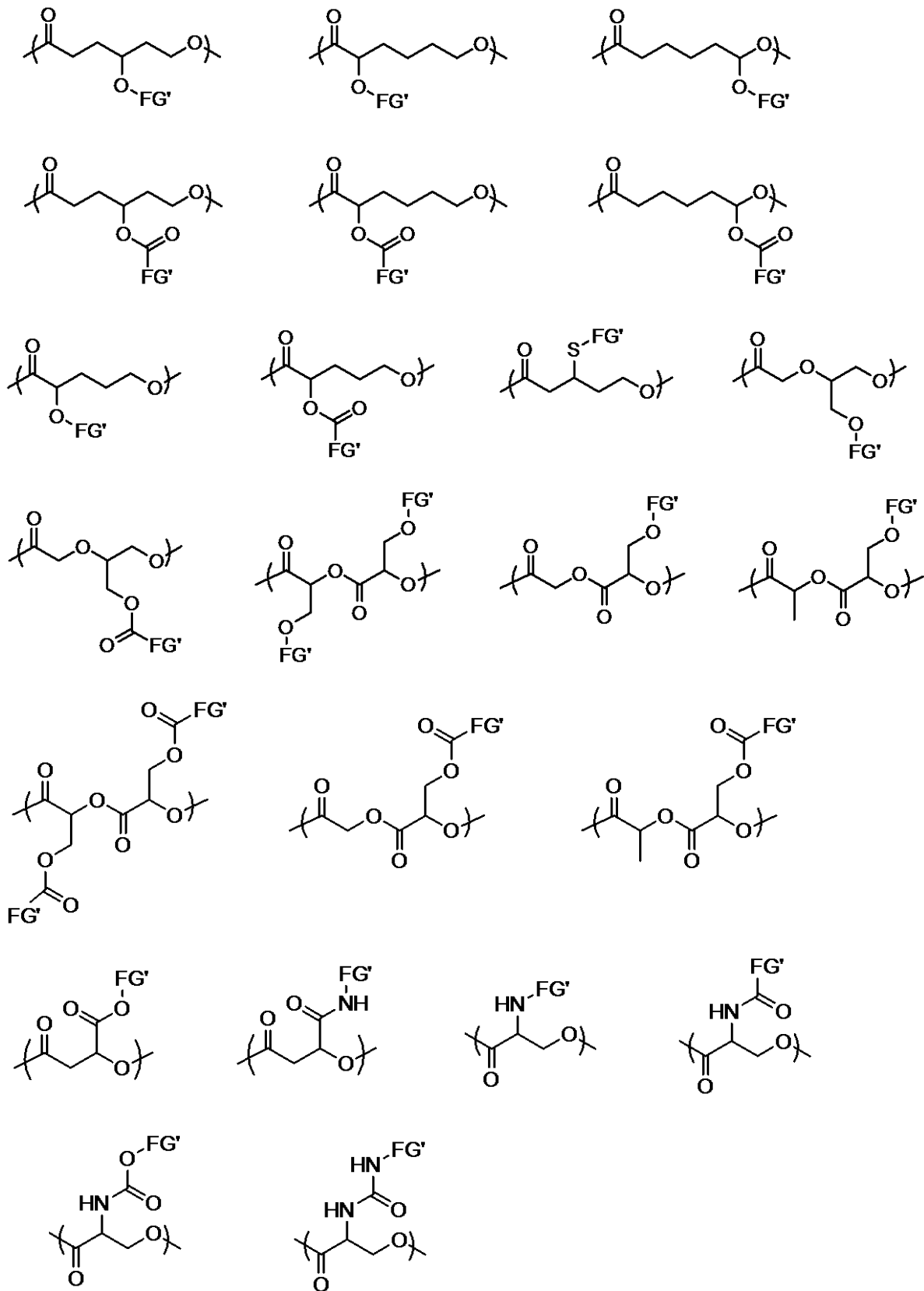
10



20



30



10

20

30

40

50

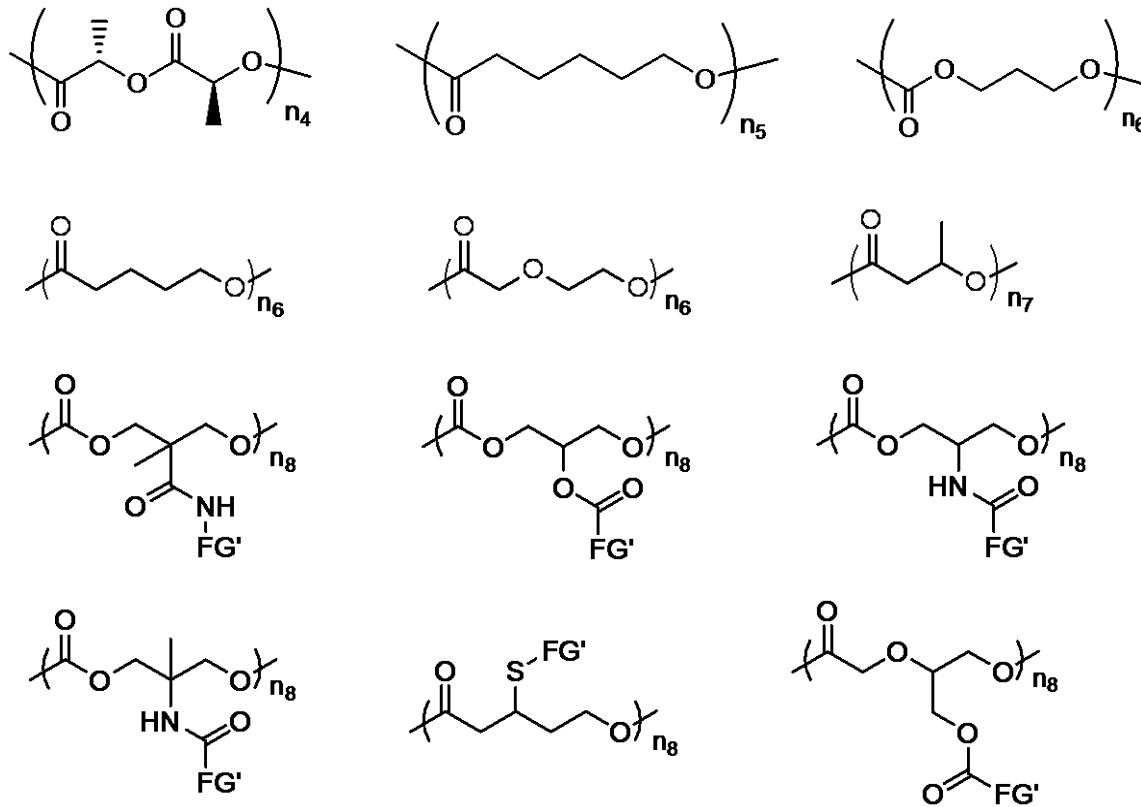
(式中、

FG'は、アルキル基、アリール基、アリールアルキル基、アルキルアリール基、脂環式構造、またはこれらのハロゲン置換物、疎水性アミノ酸又は疎水ペプチドを表し、好ましくは、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシル、シクロペンチル、シクロヘキシル、ベンジル、フェニル、ナフチル、アントラセニル、ピレニル、アダマンチル、コレステロイル、アゾベンジル、トリチル、ノルボルニル、トリフルオロメチル、

ペンタフルオロフェニル、ペンタフルオロエチルを表す。)

【 0 0 3 4 】

- (BU')_n - として、より好ましくは、以下の構造が挙げられるが、これらに限定されるものではない。



(式中、

FG' は、式 (3 a) で定義されるとおりであり、

n₄ は、3 ~ 700 を表し、好ましくは7以上、より好ましくは15以上で、好ましくは150以下、より好ましくは70以下であり、

n₅ は、4 ~ 900 を表し、好ましくは8以上、より好ましくは15以上で、好ましくは200以下、より好ましくは90以下であり、

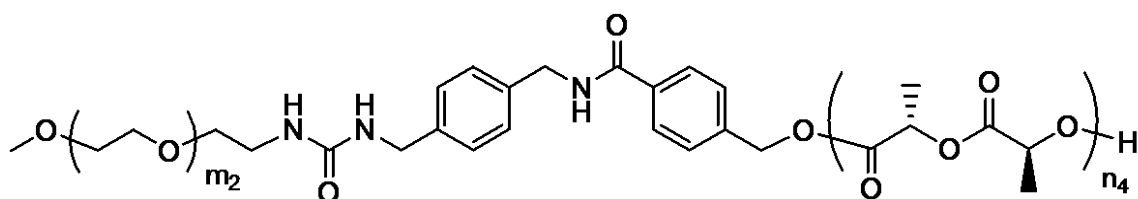
n₆ は、5 ~ 1000 を表し、好ましくは10以上、より好ましくは20以上で、好ましくは250以下、より好ましくは100以下であり、

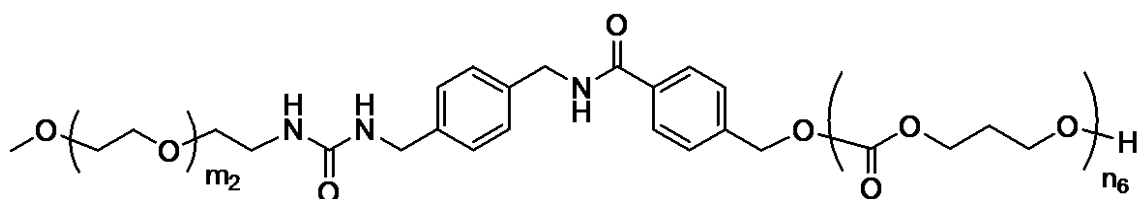
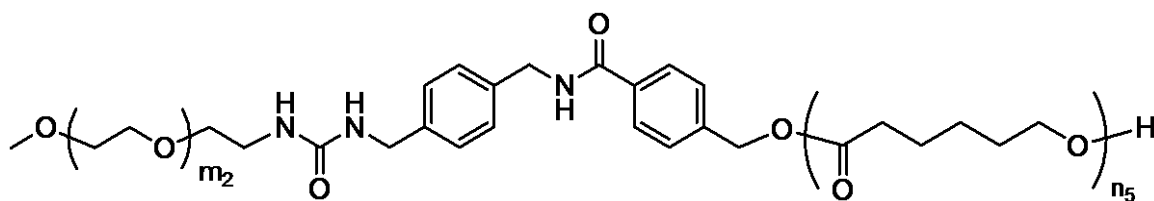
n₇ は、6 ~ 1200 を表し、好ましくは12以上、より好ましくは25以上で、好ましくは300以下、より好ましくは120以下であり、

n₈ は、2 ~ 500 の整数を表し、好ましくは5以上、より好ましくは10以上で、好ましくは100以下、より好ましくは50以下である。)

【 0 0 3 5 】

本発明ポリマーの一例として、以下の化合物が例示される。





10

(式中、

n_4 は、3～700を表し、好ましくは7以上、より好ましくは15以上で、好ましくは150以下、より好ましくは70以下であり、

n_5 は、4～900を表し、好ましくは8以上、より好ましくは15以上で、好ましくは200以下、より好ましくは90以下であり、

n_6 は、5～1000を表し、好ましくは10以上、より好ましくは20以上で、好ましくは250以下、より好ましくは100以下であり、

m_2 は、10～2300を表し、好ましくは20以上、より好ましくは45以上で、好ましくは450以下、より好ましくは230以下である。) 20

【0036】

本発明ポリマーの分子量分布 (D_M) は、特に限定されるものではないが、例えば、2.0以下、好ましくは1.5以下、より好ましくは1.2以下である。分子量分布が狭いほど、本発明ポリマーが水中で形成する異方性ナノ会合体のサイズが均一となり、本発明の効果を発揮しやすくなると考えられるが、上記のとおり、本発明ポリマーの分子量分布は特に限定されない。

【0037】

本発明ポリマーは、公知の方法に従って製造することができる。例えば、S-H. Kim et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2009, 48, 4508-4512に記載の方法に従って、或いは、目的物の構造に応じて使用する原料化合物を変更する以外は、S-H. Kim et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2009, 48, 4508-4512に記載の方法と同様の方法で、本発明ポリマーを製造し得る。 30

例えば、第一に、「配向誘起ユニット」に相当する化合物を合成し、次いで、その化合物の一端にポリエチレングリコール等の親水性ブロックポリマーを結合させる。その後、「配向誘起ユニット」と親水性ブロックポリマーが結合してなる化合物の、親水性ブロックポリマーが結合している部位とは反対の「配向誘起ユニット」の端部に、L-乳酸 (LLA)、 ϵ -カプロラクトン (CL) 及びトリメチレンカーボネート (TMC) 等のモノマーを重合させて結合させ、疎水性ブロックポリマーを結合させる。このように、本発明ポリマーを製造し得るが、PEG-4UMBA-PLLA等の製造方法が既に公知であり、当業者はこれに基づいて、適宜、本発明ポリマーを製造し得る。 40

【0038】

本発明ポリマーは、培地中に添加して用いることができる。本発明ポリマーを含む培地中で細胞を培養することで、細胞挙動の制御、例えば、細胞の伸展や増殖を調節することができる。

培地中に添加し得る本発明ポリマーの最終濃度は、例えば、0.01 ppm以上、好ましくは1 ppm以上、より好ましくは0.001%以上であり、例えば、10%以下、好ましくは1%以下、より好ましくは0.1%以下であるが、特に限定されるものではない。

【0039】

50

本発明において、培養することのできる細胞については、特に限定されるものではなく、初代培養細胞、培養細胞株、組換え培養細胞株であってもよい。培養することのできる細胞の由来について、その種類は特に限定されるものではないが、例えば、哺乳類（ヒト、チンパンジー、サル、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウス、ハムスターなど）、鳥類（ニワトリなど）などが例示される。本発明において、種の異なる2つ以上の細胞をハイブリッドさせて作成された細胞を用いることもできる。

細胞が由来する器官・組織としては、例えば、血球・リンパ系、血管系、脳・神経系、骨髄、筋組織、胸腺、唾液腺、口腔、食道、胃、肝臓、胆嚢、脾臓、小腸、大腸、直腸、皮膚、角膜、肺、甲状腺、哺乳器、子宮、子宮頸部、卵巣、精巣、膵臓、腎臓、副腎皮質、膀胱、胎盤、臍帯、胎仔、胎子、尾、間葉系幹細胞、癌細胞などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

また、本発明は、胚性幹細胞(ES細胞)、人工多能性幹細胞(iPS細胞)、胚性腫瘍細胞(EC細胞)、胚性生殖幹細胞(EG細胞)、核移植ES細胞、体細胞由来ES細胞等の分化多能性を有する幹細胞、造血幹細胞、骨髄由来間葉系幹細胞、脂肪組織由来間葉系幹細胞、臍帯由来間葉系幹細胞、その他間質由来幹細胞、Muse細胞、神経幹細胞等の組織幹細胞、多分化能を有する幹細胞、肝臓、膵臓、脂肪組織、骨組織、軟骨組織、神経組織等の各種組織における前駆細胞や線維芽細胞等の各種の幹細胞の培養にも用いることができる。

【0040】

本発明において、本発明ポリマーが添加される、細胞を培養するための培地は、細胞が生存・増殖できるものであれば特に制限されず、培養する細胞の種類に応じて従来公知のものから適宜選択し得る。細胞を培養するための培地は、無血清培地又は血清含有培地であり得るが、好ましくは血清含有培地である。血清含有培地において、ウシ胎仔血清(FBS)、ウマ血清、ヒト血清等の血清を、例えば30%以下の濃度で配合し得るが、これらに限定されるものではない。

公知の培地としては、例えば、イーグル培地、ダルベッコ変法イーグル培地（低グルコース又は高グルコース）、イーグルMEM培地、 α MEM培地、IMDM培地、ハムF10培地、ハムF12培地、RPMI1640培地や、これらのブレンド培地が挙げられるが、前述のとおり、本発明においては、培養する細胞の種類に応じて適宜培地を選択し得る。

また、培地中には、必要に応じて、ビタミン（ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンB12、ビタミンC、ビタミンD等）、補酵素（葉酸等）、アミノ酸（グリシン、アラニン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、イソロイシン、ロイシン、等）、炭素源としての糖又は有機酸（乳酸等）、成長因子（EGF、FGF、PDGF、TGF- β 等）、インターロイキン（IL-1、IL-6等）、サイトカイン（TNF- α 、TNF- β 、レプチン等）、金属トランスポーター（トランスフェリン）、金属イオン（鉄イオン、セレンイオン、亜鉛イオン等）、SH試薬（ β -メルカプトエタノール、グルタチオン等）、血清由来成分（アルブミン）等を添加してもよい。

【0041】

本発明における細胞の培養方法は、それぞれの細胞に適した方法であれば特に限定されず、従来と同様の方法が用いられる。通常、細胞の培養は、30～40の範囲内、好ましくは37の温度で、70～100%の範囲内、好ましくは95～100%の範囲内の湿度で、2%～7%CO₂、好ましくは5%CO₂環境下で行われる。また、細胞の継代の時期及び方法もそれぞれの細胞に適していれば特に限定されず、細胞の様子を見ながら、公知の方法に則って行うことができる。

【0042】

本発明の一実施態様において、本発明ポリマーを備える、細胞培養用キットが提供される。当該キットは、本発明ポリマーを備える容器とは別の容器に、それぞれ、培養する細胞、培養培地等を備えることができる。また、当該キットは、使用説明書等や、培養に使用する器具等を備えていてもよい。

【実施例】

10

20

30

40

50

【 0 0 4 3 】

以下において、本発明について、具体的な製造例及び実施例を参照しながら更に詳細に説明するが、本発明の範囲は、これらの製造例及び実施例によって何ら限定されるものではない。

【 0 0 4 4 】

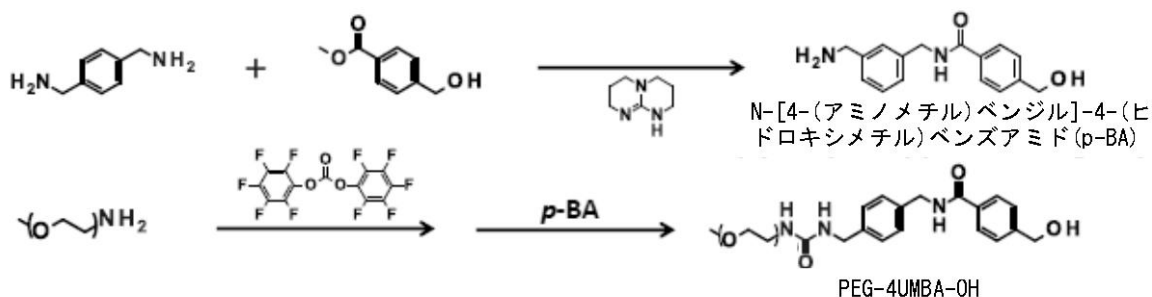
< 製造例 >

(1) 本発明ポリマー (PEG-4UMBA-PLLA、PEG-4UMBA-PCL及びPEG-4UMBA-PTMC) の調製

S-H. Kim et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2009, 48, 4508-4512に記載の方法に準じて、以下のとおりPEG-4UMBA-PLLA、PEG-4UMBA-PCL及びPEG-4UMBA-PTMCを調製した。

(i) PEG-4UMBA-OHの合成

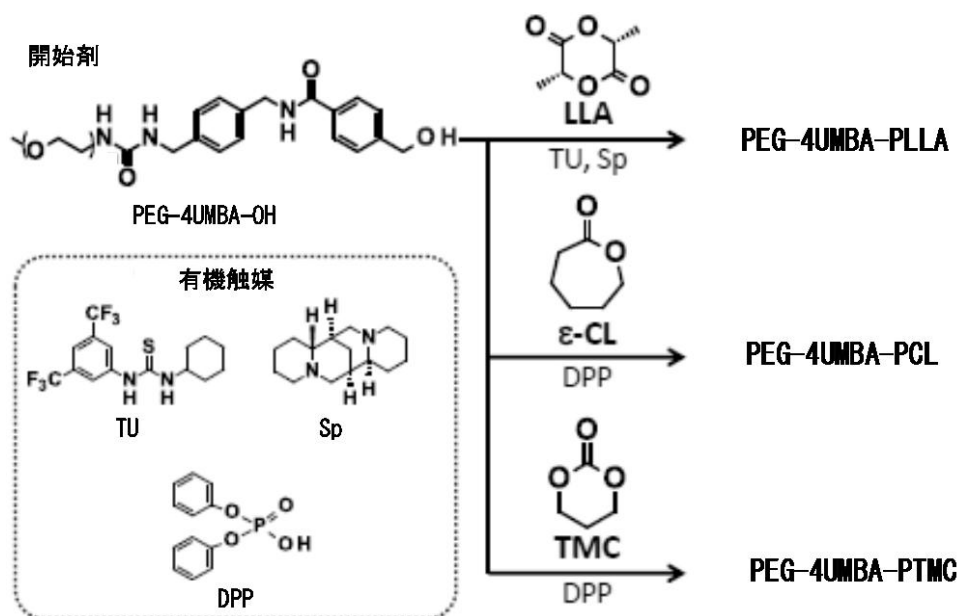
10



20

上記化学反応式中、-(OCH₂CH₂)-は、PEGを意味する。以下同じである。

(ii) PEG-4UMBA-PLLA、PEG-4UMBA-PCL及びPEG-4UMBA-PTMCの合成



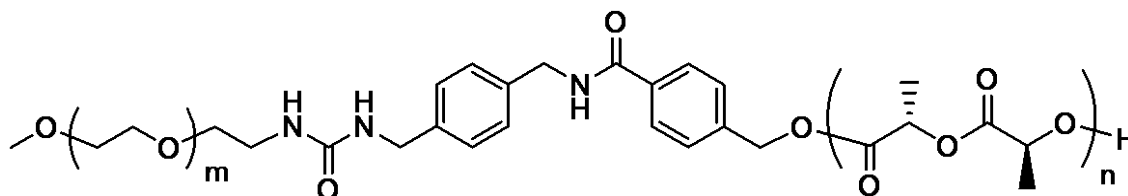
30

40

【 0 0 4 5 】

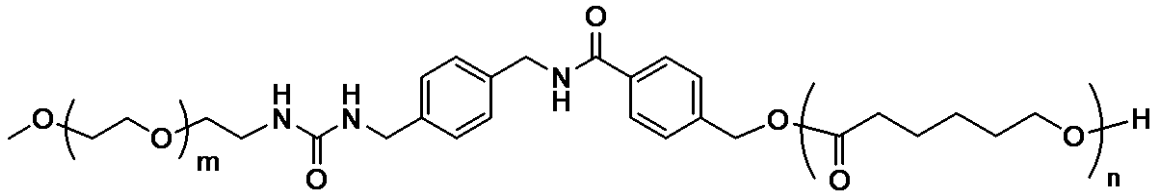
本発明ポリマーであるPEG-4UMBA-PLLA、PEG-4UMBA-PCL及びPEG-4UMBA-PTMCは、それぞれ以下の構造を有する。

PEG-4UMBA-PLLA

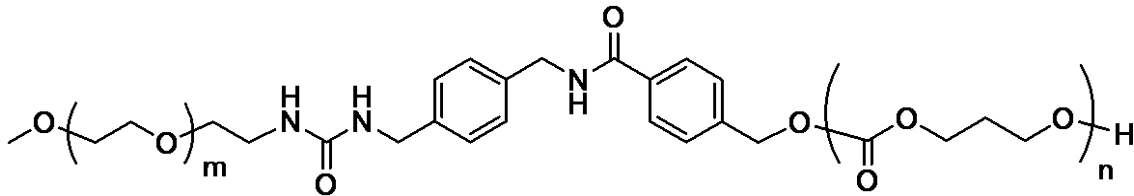


50

PEG-4UMBA-PCL



PEG-4UMBA-PTMC



10

【 0 0 4 6 】

得られたPEG-4UMBA-PLLAは、サイズ排除クロマトグラフィー（溶離液：THF、標準物質のポリマー：ポリスチレン）で測定したところ、 $D_M = 1.17$ であった。また、NMRにより、各ブロックの重合度 n 、 m を求めたところ、 $m = 113$ (5.0k)、 $n = 31$ (4.5k)であった。

得られたPEG-4UMBA-PCLは、サイズ排除クロマトグラフィー（溶離液：THF、標準物質のポリマー：ポリスチレン）で測定したところ、 $D_M = 1.25$ であった。また、NMRにより、各ブロックの重合度 n 、 m を求めたところ、 $m = 113$ (5.0k)、 $n = 41$ (4.7k)であった。

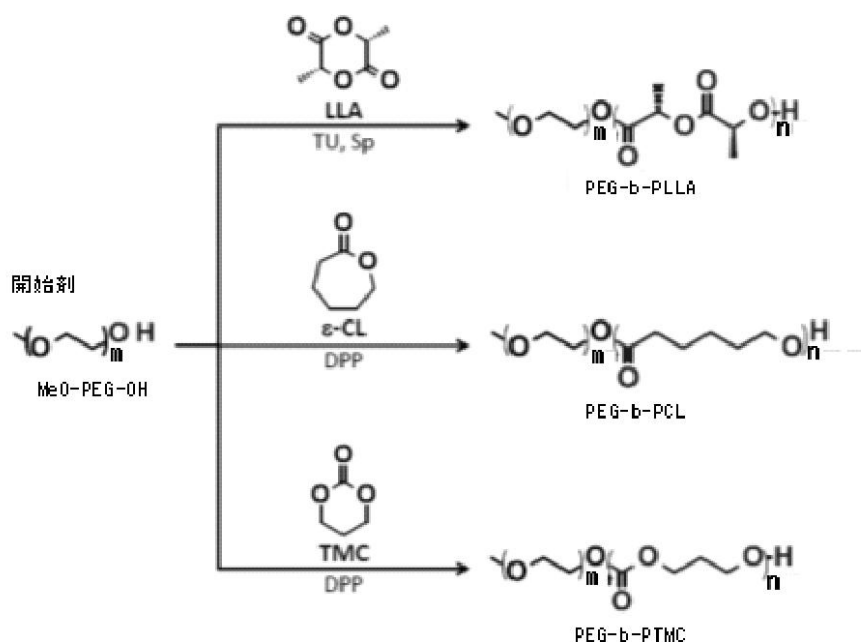
20

得られたPEG-4UMBA-PTMCは、サイズ排除クロマトグラフィー（溶離液：THF、標準物質のポリマー：ポリスチレン）で測定したところ、 $D_M = 1.15$ であった。また、NMRにより、各ブロックの重合度 n 、 m を求めたところ、 $m = 113$ (5.0k)、 $n = 45$ (4.6k)であった。

【 0 0 4 7 】

(2) 比較例ポリマー（PEG-*b*-PLLA、PEG-*b*-PCL及びPEG-*b*-PTMC）の調製（*b*は単にブロックを意味する。）

PEG-*b*-PLLA、PEG-*b*-PCL及びPEG-*b*-PTMCを、MeO-PEG-OHから以下のとおり合成した。



30

40

【 0 0 4 8 】

得られたPEG-*b*-PLLAは、サイズ排除クロマトグラフィー（溶離液：THF、標準物質のポリマー：ポリスチレン）で測定したところ、 $D_M = 1.02$ であった。また、NMRにより、各ブロックの重合度 n 、 m を求めたところ、 $m = 113$ (5.0k)、 $n = 35$ (5.0k)であった。

50

得られたPEG-b-PCLは、サイズ排除クロマトグラフィー（溶離液：THF、標準物質のポリマー：ポリスチレン）で測定したところ、 $D_M = 1.10$ であった。また、NMRにより、各ブロックの重合度 n 、 m を求めたところ、 $m = 113$ (5.0k)、 $n = 48$ (5.5k)であった。

得られたPEG-b-PTMCは、サイズ排除クロマトグラフィー（溶離液：THF、標準物質のポリマー：ポリスチレン）で測定したところ、 $D_M = 1.02$ であった。また、NMRにより、各ブロックの重合度 n 、 m を求めたところ、 $m = 113$ (5.0k)、 $n = 50$ (5.1k)であった。

【0049】

(3) 透過型電子顕微鏡 (TEM) 及び動的光散乱での解析

得られたPEG-4UMBA-PLLA、PEG-4UMBA-PCL及びPEG-4UMBA-PTMCについて、各々、水分散液とし、TEMで観察した。その結果を図1に示す。

PEG-4UMBA-PLLAではロッド状構造が観察され、PEG-4UMBA-PCLでは繊維状構造が観察され、PEG-4UMBA-PTMCでは球状構造が観察された。

同様に、PEG-b-PLLA、PEG-b-PCL及びPEG-b-PTMCについてもTEMで観察した。その結果を図2に示す。

PEG-b-PLLA、PEG-b-PCL及びPEG-b-PTMCのいずれにおいても、球状構造が観察された。

【0050】

次いで、得られたPEG-4UMBA-PLLA、PEG-4UMBA-PCL及びPEG-4UMBA-PTMCについて、動的光散乱にて詳細に解析した。その結果を図3に示す。会合体の円柱型構造の高さに対応する長さを L とし、底面の直径の長さを D としたとき、PEG-4UMBA-PLLAでは、 L が330~400 nm、 D が~30 nmであり、PEG-4UMBA-PCLでは、 L が310~330 nm、 D が~20 nmであり、PEG-4UMBA-PTMCでは、 L が180~200 nm、 D が~45 nmであった。

この解析結果から、PEG-4UMBA-PLLA、PEG-4UMBA-PCL及びPEG-4UMBA-PTMCはいずれも、水中で異方性会合体を形成していることが判明した。前述のTEMでの観察では、試料作製の際に乾燥工程があるため、その影響により観察された画像がPEG-4UMBA-PLLA、PEG-4UMBA-PCL及びPEG-4UMBA-PTMCで異なったものと考えられる。

【0051】

<実施例>

(1) 本発明ポリマーを含有する培地の作製

上記製造例に示すとおり製造した本発明ポリマーを0.1 w/v%水分散液とし、本発明ポリマー0.1 w/v%水分散液を、10% ウシ胎仔血清 (FBS) 添加 α 改変型イーグル最少必須培地 (10% FBS α -MEM) と混合し、0.05 w/v%の本発明ポリマーを懸濁させた10% FBS α -MEMを作製した。

【0052】

(2) ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) 培養試験

24ウェルプレート中のポリエチレンテレフタレート (PET) 基板上にNHDFを播種 (播種密度: 5.0×10^3 cells/cm²) し、10% FBS α -MEMと共にCO₂ 5%、37 °Cの環境下で24時間培養した。(24時間培養後をday 0とした。)

培養後、10% FBS α -MEMを、(1) で作製した0.05 w/v%の本発明ポリマーを懸濁させた10% FBS α -MEMに交換し、CO₂ 5%、37 °Cの環境下で48時間培養した。6、12、18、24、48時間培養後、位相差顕微鏡を用いて細胞の形態を観察した。6時間培養後に観察された位相差像を図4に示す。

48時間培養後、本発明ポリマー懸濁10% FBS α -MEMを取り除き、PBS(-)を加え室温で10分静置後、0.1 w/v%グルタルアルデヒドを加え、37 °Cのインキュベーターに6時間静置し、細胞を固定した。固定後、0.1 w/v%グルタルアルデヒドを取り除き超純水で洗浄後、クリスタルバイオレットを加え20分静置し、細胞を染色した。20分後、クリスタルバイオレットを取り除き超純水で2回洗浄し、室温で1晩乾燥後、位相差顕微鏡を用いて接着している細胞数を観察した。位相差像を図5に示す。また、比較例として、本発明ポリマーを全く添加しない場合についても同時に試験を行った。結果を表1及び2、並びに図6に示す。

【0053】

10

20

30

40

50

【表 1】

		PEG-4UMBA-		
L (μm)	ポリマーなし	-PLLA	-PCL	-PTMC
< 70	3175±1234	1748±1262	4103±2231	2979±995
< 140	5601±1594	3693±1619	3943±1362	2248±857
> 140	1374±685	2248±953	1499±614	928±390
合計	10151±1620	7689±2815	9544±2441	6155±1103

L は、図 6 に示すとおり、細胞の長さ（最大長）である。

10

【0054】

【表 2】

		PEG-4UMBA-		
L (μm)	ポリマーなし	-PLLA	-PCL	-PTMC
< 70	31.3±12.2	17.2±12.4	40.4±22.0	29.3±9.8
< 140	55.2±15.7	36.4±15.9	38.8±13.4	22.1±8.4
> 140	13.5±6.7	22.1±4	14.8±6.0	9.1±3.8
合計	100	75.7±27.7	94.0±24.1	60.6±10.9

20

L は、図 6 に示すとおり、細胞の長さ（最大長）である。

ポリマー無添加条件での総細胞数を基準とし、全て%で表している。

【0055】

更に、比較例として、本発明ポリマーに代えて、上記製造例に示すとおり製造した比較例ポリマーを添加した場合と、本発明ポリマーも比較例ポリマーも添加しない場合について、別途、試験を行った。結果を表 3 及び 4、並びに図 7 に示す。

【0056】

【表 3】

		PEG-b-		
L (μm)	ポリマーなし	-PLLA	-PCL	-PTMC
< 70	3291±994	589±394	723±419	883±703
< 140	7305±2533	3425±1155	3559±1122	3291±747
> 140	3398±725	455±400	1177±608	910±361
合計	13995±2896	4469±1359	5459±1324	5084±993

30

L は、図 7 に示すとおり、細胞の長さ（最大長）である。

【0057】

【表 4】

		PEG-b-		
L (μm)	ポリマーなし	-PLLA	-PCL	-PTMC
< 70	23.5±7.1	4.2±2.8	5.2±3.0	6.3±5.0
< 140	52.2±18.1	24.5±8.3	25.4±8.0	23.5±5.3
> 140	24.3±5.2	3.3±2.9	8.4±4.3	6.5±2.6
合計	100	31.9±9.7	39.0±9.5	36.3±7.1

40

L は、図 7 に示すとおり、細胞の長さ（最大長）である。

ポリマー無添加条件での総細胞数を基準とし、全て%で表している。

【0058】

50

得られた結果によると、PEG-4UMBA-PLLA添加の場合、48時間培養後の140 μm 以上の最大長を有する細胞数は、ポリマー無添加の場合と比較して約164%となっている。一方、PEG-b-PLLA添加の場合、48時間培養後の140 μm 以上の最大長を有する細胞数は、ポリマー無添加の場合と比較して大きく減少している。従って、PEG-4UMBA-PLLA添加の場合、ポリマー無添加の場合やPEG-b-PLLAと比較して、140 μm 以上の最大長を有する細胞を顕著に増加させたことがわかる。これは、PEG-4UMBA-PLLAが、細胞挙動を制御し、特に細胞の伸展を促進したことを意味する。

PEG-4UMBA-PCL添加の場合では、48時間培養後の140 μm 以上の最大長を有する細胞数は、ポリマー無添加の場合と比較して約109%となっている。一方、PEG-b-PCL添加の場合、48時間培養後の140 μm 以上の最大長を有する細胞数は、ポリマー無添加の場合と比較して大きく減少している。従って、PEG-4UMBA-PCL添加の場合、ポリマー無添加の場合やPEG-b-PCLと比較して、140 μm 以上の最大長を有する細胞を増加させたことがわかる。これは、PEG-4UMBA-PCLが、細胞挙動を制御し、特に細胞の伸展を促進したことを意味する。

PEG-4UMBA-PTMC添加の場合では、48時間培養後の140 μm 以上の最大長を有する細胞数は、ポリマー無添加の場合と比較して約68%となっており、PEG-4UMBA-PTMCが、細胞挙動を制御し、特に細胞の伸展を抑制したことを意味する。

【0059】

比較例ポリマー（PEG-b-PLLA、PEG-b-PCL及びPEG-b-PTMC）添加の場合、48時間培養後の合計細胞数はいずれも5,000程度に留まっていた。細胞を10% FBS α -MEMと共にCO₂ 5%、37℃の環境下で24時間培養した時点（day 0）での細胞数は、およそ5,000個であったと想定されることに鑑みると、比較例ポリマーを添加すると細胞の増殖がほとんど進んでいないことがわかる。

一方、本発明ポリマー（PEG-4UMBA-PLLA、PEG-4UMBA-PCL及びPEG-4UMBA-PTMC）添加の場合、48時間培養後の合計細胞数は少なくとも6,000個を超えており、比較例ポリマーとは異なり細胞の増殖を抑制する作用は大きくない。PEG-4UMBA-PCL添加の場合では、ポリマー無添加の場合と比較して、140 μm 以上の最大長を有する細胞を増加させただけでなく、全体の細胞数に関してはポリマー無添加の場合と同程度である。即ち、PEG-4UMBA-PCLは、全体の細胞数に関してはほとんど影響を与えることなく、細胞の伸展のみを促進したことを意味する。

【0060】

70 μm 未満の最大長を有する比較的小さな細胞には、細胞分裂直後の細胞が多く含まれるものと考えられるところ、比較例ポリマー（PEG-b-PLLA、PEG-b-PCL及びPEG-b-PTMC）添加の場合、48時間培養後の70 μm 未満の最大長を有する細胞数が著しく減少している。この結果からも言えるとおり、比較例ポリマーを添加すると細胞の増殖がほとんど進んでいないことがわかる。

PEG-4UMBA-PTMC添加の場合では、一見して、ポリマー無添加の場合と比較して、総細胞数の観点から細胞の増殖がほとんど進んでいないようにも見える。しかしながら、48時間培養後の70 μm 未満の最大長を有する細胞数は、PEG-4UMBA-PTMC添加の場合とポリマー無添加の場合とでほぼ同じである。このことから、PEG-4UMBA-PTMC添加の場合とポリマー無添加の場合とで、細胞分裂直後の細胞数は大差ないことが予想され、PEG-4UMBA-PTMCは、細胞の増殖、或いは細胞の分裂に関してはあまり影響を与えることなく、細胞の伸展のみを、或いは伸展した細胞の数のみを抑制したと考えられる。

PEG-4UMBA-PCL添加の場合では、48時間培養後の70 μm 未満の最大長を有する細胞数は、ポリマー無添加の場合よりも増えている。従って、PEG-4UMBA-PCLは、細胞の増殖、或いは細胞の分裂をむしろ促進しているのかもしれない。

【0061】

PEG-4UMBA-PLLAにおいても、PEG-4UMBA-PCLにおいても、PEG-4UMBA-PTMCにおいても、それぞれ比較例ポリマー（PEG-b-PLLA、PEG-b-PCL及びPEG-b-PTMC）と比較すると、「配向誘起ユニット」の存否により、細胞挙動への影響が顕著に異なることがわかる。本発明ポリマーは、「配向誘起ユニット」におけるアミド基やウレア基等が形成する水素結合と

、芳香環の π - π 相互作用等の平面性構造間に働く分子間相互作用による配向誘起を、疎水性ブロックが補足・強化することで、水中で異方性会合体形成していると考えられる。一方で、比較例ポリマーにおいては「配向誘起ユニット」が存在せず、本発明ポリマーのような異方性会合体を形成することはできない。その結果、本発明ポリマーと比較例ポリマーとの間で、細胞挙動への影響が顕著に異なることとなるものと考えられる。

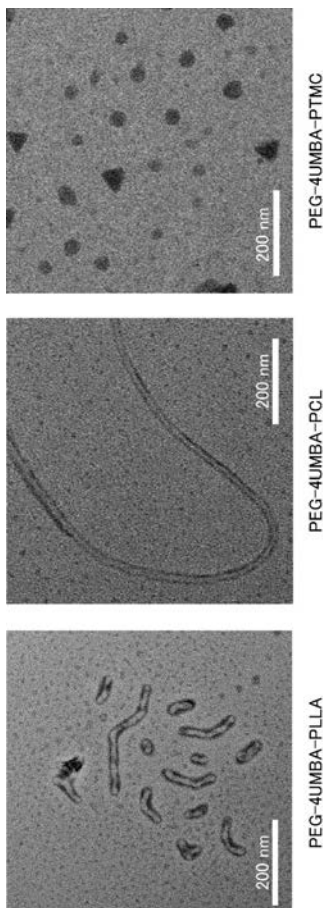
【産業上の利用可能性】

【0062】

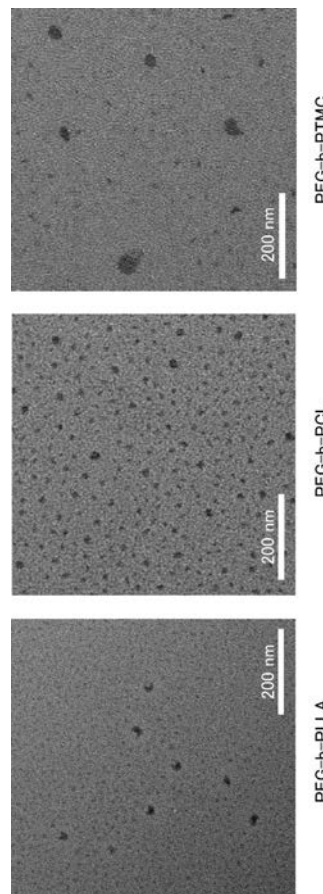
本発明によれば、細胞挙動を制御することのできる化合物及び新規な手法を提供することができる。本発明は、細胞の接着・増殖・分化・機能発現を司る細胞外基質（ECM）の人工材料化・高機能化のために利用し得、「混ぜたらできる」フルボトムアップ型三次元複合組織の構築を可能にする、中心的な基盤技術となり得る。

10

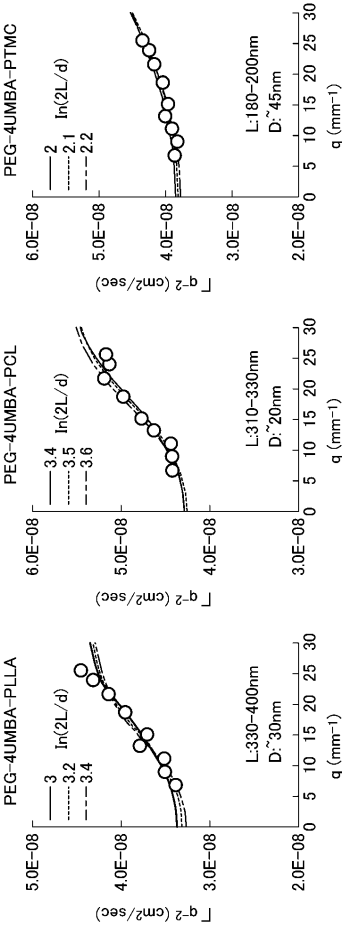
【図 1】



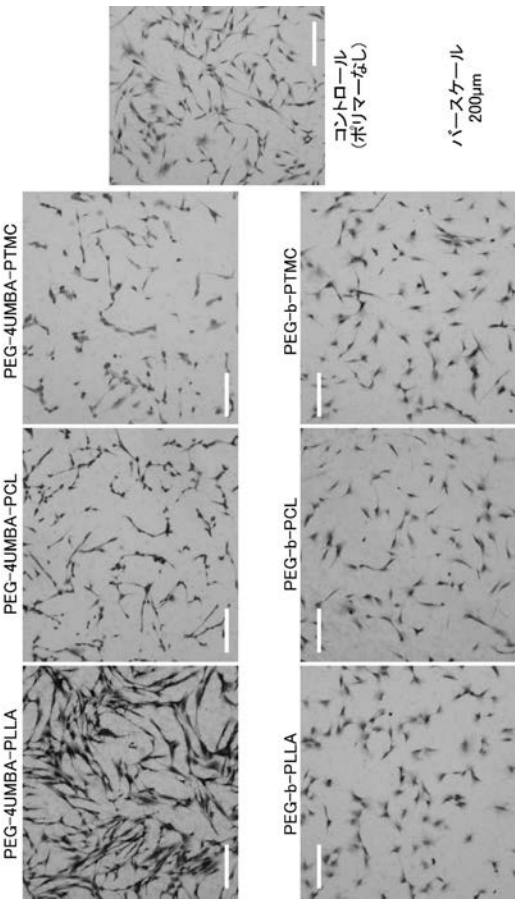
【図 2】



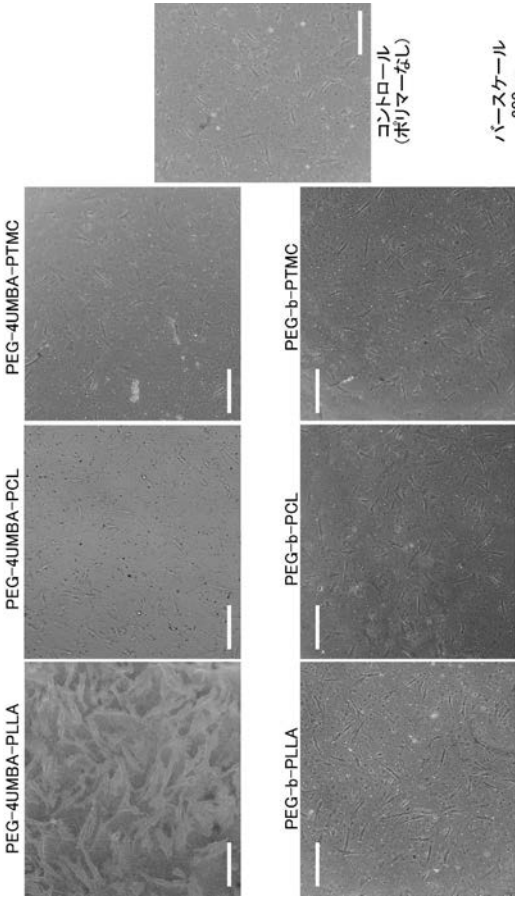
【図 3】



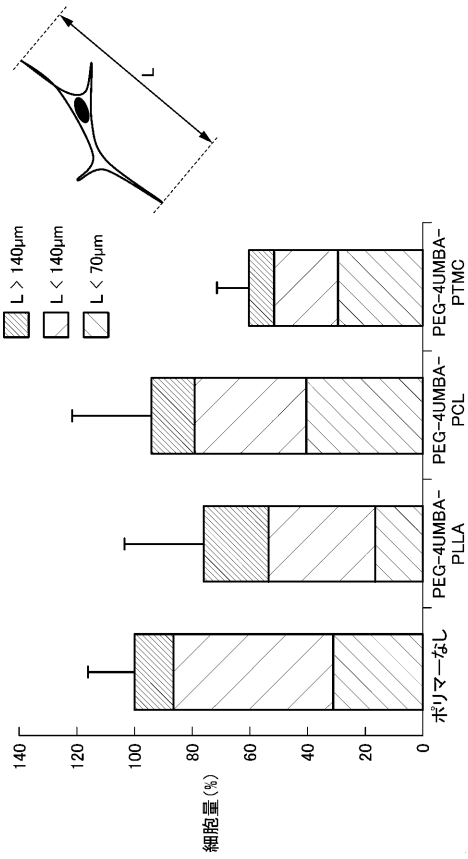
【図 5】

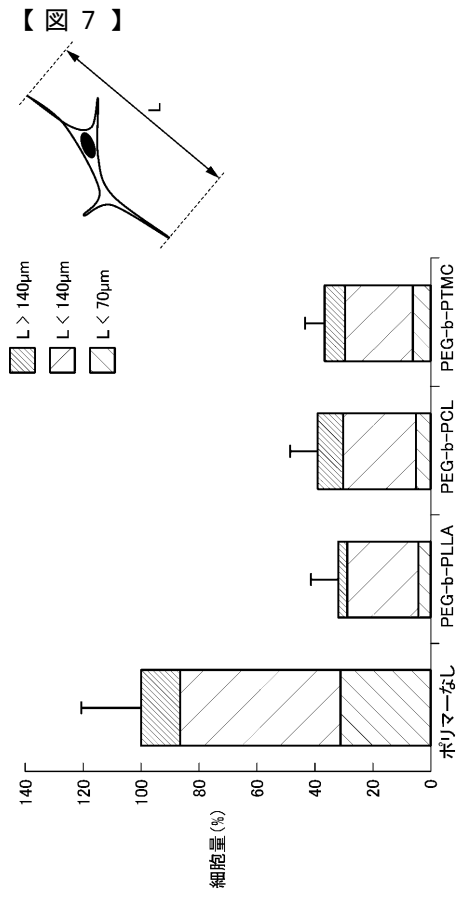


【図 4】



【図 6】





フロントページの続き

特許法第30条第2項適用申請有り 平成28年4月27日 http://tech4pco.com/wbc2016/mywbc/Abstract_Book/WBC2016_Abstracts.pdfにおける発表〔刊行物等〕平成28年5月18日 第10回世界バイオマテリアル学会における発表〔刊行物等〕平成28年5月10日 http://cloud.dynacom.co.jp/spsj2016/index.php?id=1K27&place_num=15 及び http://cloud.dynacom.co.jp/spsj2016/download_pdf.php?id=1K27における公開〔刊行物等〕平成28年5月25日 第65回高分子学会年次大会における発表〔刊行物等〕平成28年6月28日 16-1高分子ナノテクノロジー研究会予稿配布資料における公開〔刊行物等〕平成28年6月28日 16-1高分子ナノテクノロジー研究会における発表〔刊行物等〕平成28年8月24日 http://cloud.dynacom.co.jp/tohron2016/index.php?id=2Pf094&place_num=48 及び http://cloud.dynacom.co.jp/tohron2016/download_pdf.php?id=2Pf094における公開〔刊行物等〕平成28年9月15日 第65回高分子討論会における発表(「異方性ナノ会合体を形成する生分解性ブロックポリマーの細胞培養系への添加効果」)〔刊行物等〕平成28年8月24日 http://cloud.dynacom.co.jp/tohron2016/index.php?id=2R04&place_num=18 及び http://cloud.dynacom.co.jp/tohron2016/download_pdf.php?id=2R04における公開〔刊行物等〕平成28年9月15日 第65回高分子討論会における発表(「超分子会合ユニットを含む生分解性ブロックポリマーのナノバイオ材料への応用」)

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100109070

弁理士 須田 洋之

(74)代理人 100162422

弁理士 志村 将

(72)発明者 福島 和樹

山形県米沢市城南四丁目3-16 国立大学法人山形大学 大学院理工学研究科内

(72)発明者 田中 賢

山形県米沢市城南四丁目3-16 国立大学法人山形大学 大学院理工学研究科内

(72)発明者 土屋 遥

山形県米沢市城南四丁目3-16 国立大学法人山形大学 大学院理工学研究科内

(72)発明者 大治 雅史

山形県米沢市城南四丁目3-16 国立大学法人山形大学 大学院理工学研究科内

Fターム(参考) 4B065 AA87X AA90X BC31 BD25 BD32 BD40 CA44

4J005 AA11 BB02 BD02

4J031 AA49 AA52 AA53 AB04 AC03 AD01 AE11 AF03 AF09