

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和1年8月8日(2019.8.8)

【公開番号】特開2019-17393(P2019-17393A)

【公開日】平成31年2月7日(2019.2.7)

【年通号数】公開・登録公報2019-005

【出願番号】特願2018-193565(P2018-193565)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/686 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)

【F I】

C 1 2 N 5/071 Z N A

C 1 2 N 15/09 Z

C 1 2 Q 1/686 Z

C 1 2 Q 1/6876 Z

【手続補正書】

【提出日】令和1年6月27日(2019.6.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

生体組織からのバイオマトリックス足場の製造方法であって、

a)第1基礎培地で生体組織を灌流するかまたは生体組織をホモジナイズし、ここで前記第1基礎培地の重量オスモル濃度は250mOsm/kg～350mOsm/kgであり、前記第1基礎培地は無血清かつ中性pHであり；

b)前記第1基礎培地中に洗浄剤およびリパーゼを含む脱脂緩衝液で、段階(a)の生体組織を灌流するかまたは段階(a)のホモジネートを抽出し、ここで前記洗浄剤はドデシル硫酸ナトリウムまたはTritonX-100を含まない；

c)中性pHかつ塩濃度を含む緩衝液で段階(b)の組織を灌流するかまたは段階(b)のホモジネートを抽出し；

d)中性pHかつ無血清であり、250mOsm/kg～350mOsm/kgの重量オスモル濃度を有する第2培地で段階(c)の組織またはホモジネートをリンスする段階；
を含み、それによって生体組織から、無傷のまたはホモジナイズしたバイオマトリックス足場であって、コラーゲンの少なくとも95%、生体組織のコラーゲン結合性マトリックス成分およびマトリックス結合性増殖因子、ホルモンおよびサイトカインを含む前記足場を製造する前記方法。

【請求項2】

洗浄剤が、非イオン性洗浄剤または双性イオン洗浄剤を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

非イオン性洗浄剤が、n-デシルα-D-グルコピラノシド、n-デシルβ-D-マルトピラノシド、n-ドデシルβ-D-マルトシド、n-オクチルβ-D-グルコピラノシド、ソルビタンエステル、n-テトラデシルβ-D-マルトシド、トリトン、Nonidet-P-40、またはボロキサマー188を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

双性イオン洗浄剤が、アルキルベタイン、アルキルアミドアルキルベタイン、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホナートまたはホスファチジルコリンを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

洗浄剤がデオキシコール酸ナトリウムを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

生体組織が、肝臓、肺、甲状腺、皮膚、膵臓、血管、膀胱、腎臓、脳、胆管、十二指腸、腹部大動脈、腸骨静脈、心臓および腸からなる群より選ばれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

基礎培地が、RPMI 1640、DME/F12、DME、F12、ウェイマウスおよびウィリアム培地からなる群より選ばれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

段階(c)の緩衝液の塩濃度が2M NaCl ~ 5M NaClである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

段階(c)の緩衝液がプロテアーゼインヒビターを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

細胞培養物の製造方法であって、

a) 請求項1に記載の方法によってバイオマトリックス足場を製造し；

b) 段階(a)のバイオマトリックス足場と細胞培養培地を培養装置内で接触させ；

c) 段階(b)のバイオマトリックス足場に細胞を播種すること；

を含み、それによって細胞培養物を製造する前記方法。

【請求項 11】

細胞培養培地が、間質液に存在する成分の少なくとも1つを含み、前記培地の重量オスモル濃度が約250mOsm/kg ~ 約350mOsm/kgであり、前記培地が無血清である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

細胞培養培地がRPMI-1640である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

細胞が、バイオマトリックス足場の製造に用いられる生体組織の細胞と同じ型である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

細胞が、胚性幹(ES)細胞、人工多能性幹(iPS)細胞、決定された幹細胞、周産期幹細胞、羊水由来幹細胞(AFSC)、任意の起源の間葉系幹細胞(MSC)、任意の組織型の、分化方向を決定された前駆細胞または成人細胞、成熟細胞、正常細胞、罹患細胞、腫瘍細胞およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

細胞が、肝臓細胞、実質細胞、星細胞、内皮細胞、肝細胞、胆管細胞、胆管細胞ではない胆樹細胞および膵臓細胞からなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 16】

幹細胞および/または前駆細胞の成熟細胞への分化を増進し加速させる方法であって、請求項 10 に記載の方法によって細胞培養物を製造することを含む前記方法において、細胞が幹細胞であり、成熟細胞のための細胞培養培地を処方し、それによって幹細胞および/または前駆細胞の成熟細胞への分化を増進し加速させる前記方法。

【請求項 17】

細胞が、任意の型の成人細胞であるか、あるいは胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、胚葉幹細胞、決定された幹細胞、周産期幹細胞、羊水由来幹細胞、間葉系幹細胞、一過性増殖細胞または任意の組織型の、分化方向を決定された前駆細胞からなる群から選択される幹細胞または前駆細胞である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

細胞培養培地が、RPMI 1640、DME/F12、DME、F12、ウェイマウスおよびウィリアム培地からなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

細胞培養物の製造方法であって、

- a) 請求項 1 に記載のバイオマトリックス足場を凍結し；
- b) 段階(a)のバイオマトリックス足場から細胞培養基材として凍結切片を調製し；
- c) 段階(b)の細胞培養基材と細胞培養培地を培養装置内で接触させ；
- d) 段階(c)の細胞培養基材に細胞を播種すること；

を含み、それによって細胞培養物を製造する前記方法。

【請求項 20】

細胞培養培地が、間質液に存在する成分の少なくとも1つを含み、前記培地の重量オスモル濃度が約250mOsm/kg～約350mOsm/kgであり、前記培地が無血清である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

細胞培養培地がRPMI-1640である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

細胞が、バイオマトリックス足場の製造に用いられる生体組織の細胞と同じ型である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

細胞が、胚性幹(ES)細胞、人工多能性幹(iPS)細胞、決定された幹細胞、周産期幹細胞、羊水由来幹細胞(AFSC)、任意の起源の間葉系幹細胞(MSC)、任意の組織型の、分化方向を決定された前駆細胞または成人細胞、成熟細胞、正常細胞、罹患細胞、腫瘍細胞およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 24】

細胞が、肝臓細胞、実質細胞、星細胞、内皮細胞、肝細胞、胆管細胞、胆管細胞ではない胆樹細胞および膵臓細胞からなる群から選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 25】

幹細胞および/または前駆細胞の成熟細胞への分化を増進し加速させる方法であって、請求項 19 に記載の方法によって細胞培養物を製造することを含む前記方法において、細胞が幹細胞であり、成熟細胞のための細胞培養培地を処方し、それによって幹細胞および/または前駆細胞の成熟細胞への分化を増進し加速させる前記方法。

【請求項 26】

細胞が、任意の型の成人細胞であるか、あるいは胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、胚葉幹細胞、決定された幹細胞、周産期幹細胞、羊水由来幹細胞、間葉系幹細胞、一過性増殖細胞または任意の組織型の、分化方向を決定された前駆細胞からなる群から選択される幹細胞または前駆細胞である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

細胞培養培地が、RPMI 1640、DME/F12、DME、F12、ウェイマウスおよびウィリアム培地からなる群から選択される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

細胞培養物の製造方法であって、

- a) 請求項 1 に記載のバイオマトリックス足場を粉末に粉砕し；
- b) 培養装置の少なくとも一部に段階(a)の粉末をコーティングして細胞培養基材を製造し；
- c) (b)の細胞培養基材と細胞培養培地を培養装置内で接触させ；
- d) (c)の細胞培養基材に細胞を播種すること；

を含み、それによって細胞培養物を製造する前記方法。

【請求項 29】

バイオマトリックス足場の粉砕が、フリーザーミル内で液体窒素温度またはその付近の

温度で行われる、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

系統依存性ウイルスのウイルス粒子の製造方法であって、

a) 請求項 1 記載のバイオマトリックス足場と細胞培養培地を培養装置内で接触させ；

b) (a) のバイオマトリックス足場に、系統依存性ウイルスに感染されることが出来る型および系統段階の細胞を播種し；

c) (b) の細胞を系統依存性ウイルスに感染させ；

d) バイオマトリックス足場での感染細胞を培養条件下に維持し；

e) 感染細胞内で製造されるウイルス粒子を採取すること；

を含み、それによって系統依存性ウイルスのウイルス粒子を製造する前記方法。

【請求項 31】

系統依存性ウイルスが、C型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、ノロウイルスおよびヒト乳頭腫ウイルスからなる群から選択される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

バイオマトリックス足場の再細胞化によって形成される生物工学的組織の製造方法であって、

a) 請求項 1 に記載のバイオマトリックス足場と細胞培養培地を培養装置内で接触させ；

b) (a) のバイオマトリックス足場に、バイオマトリックス足場の製造に用いた生体組織と同じ組織型の細胞を播種し；

c) バイオマトリックス足場での細胞を培養条件下に維持し、それによって細胞から生物工学的組織が形成されること；

を含み、それによってバイオマトリックス足場の再細胞化によって形成される生物工学的組織を製造する前記方法。

【請求項 33】

補助デバイスとして使用するために、生物工学的組織を被験者に接触させる段階をさらに含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

細胞が肝臓細胞である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

下記の段階 a) ~ f)：

a) 第1培地で生体組織を灌流するかまたは生体組織をホモジナイズし、ここで前記第1培地の重量オスモル濃度は約250mOsm/kg ~ 約350mOsm/kgであり、前記第1培地は無血清かつ中性pHであり；

b) 前記第1培地中にリパーゼおよび/または洗浄剤を含む脱脂緩衝液で、段階(a)の生体組織を灌流するかまたは段階(a)のホモジネートを抽出し、ここで前記洗浄剤はドデシル硫酸ナトリウムまたはTritonX-100を含まない；

c) 中性pHかつ約2.0M ~ 約5.0M NaClの塩濃度を含む緩衝液で段階(b)の組織を灌流するかまたは段階(b)のホモジネートを抽出し；

d) 中性pHかつ無血清であり、約250mOsm/kg ~ 約350mOsm/kgの重量オスモル濃度を有する第2培地で段階(c)の組織またはホモジネートをリンスする段階であって；それによって生体組織から、無傷のまたはホモジナイズしたバイオマトリックス足場であって、コラーゲンの少なくとも95%および生体組織のコラーゲン結合性マトリックス成分およびマトリックス結合性増殖因子、ホルモンおよびサイトカインの大部分を含む前記足場を製造する段階；

e) 前記バイオマトリックス足場を凍結し；

f) 段階(e)のバイオマトリックス足場から細胞培養基材として凍結切片を調製する段階を含む方法により製造される細胞培養基材。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0151

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0151】

組織に存在するコラーゲンの型は、宿主の年齢によって異なる。例えば、胎児肝臓は、高濃度のIII、IVおよびV型コラーゲン(4.0Mより上の塩濃度を必要とする)を有するのに対し、成人肝臓は、I、III、IV、V、VIおよびXVIII型コラーゲンの混合物(より低い塩濃度を必要とする)を有する。従って、バイオマトリックス足場の製造に必要な塩濃度は、その組織において優位なコラーゲンのレパートリーによって規定される。さらなる詳細に関しては、実施例1の文献23を参照のこと。

【表 2】

表2.肝臓バイオマトリックス足場におけるコラーゲン含量の分析

アミノ酸	バイオマトリックス足場(N=4)						肝臓組織(N=3)				
	試料1	試料2	試料3	試料4	平均	SD	試料1	試料2	試料3	平均	SD
	残基/1000	残基/1000	残基/1000	残基/1000			残基/1000	残基/1000	残基/1000		
Hyp	10.0	13.8	15.3	12.1	12.8	2.3	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*
Asp	82.7	77.1	78.4	85.5	80.9	3.9	93.0	94.5	90.8	92.8	1.8
Thr	52.6	51.1	45.6	52.4	50.4	3.3	52.2	51.0	53.7	52.3	1.3
Ser	56.5	53.7	61.9	62.4	58.6	4.2	57.7	57.0	62.0	58.9	2.7
Glu	112.0	107.0	117.4	118.1	113.6	5.2	123.9	122.0	130.1	125.4	4.2
Pro	52.3	52.2	55.7	51.6	52.9	1.9	46.6	45.9	46.4	46.3	0.4
Gly	118.7	134.0	125.4	109.4	121.9	10.4	88.2	84.6	89.1	87.3	2.4
Ala	88.3	86.1	89.5	83.6	86.9	2.6	79.0	78.2	90.6	82.6	7.0
Val	64.3	57.2	54.8	65.9	60.6	5.4	71.6	71.3	70.1	71.0	0.8
Met	21.7	20.6	20.7	20.4	20.8	0.6	21.4	21.4	21.7	21.5	0.2
Ile	51.8	47.7	47.4	41.7	47.2	4.2	49.6	50.1	42.3	47.3	4.3
Leu	92.7	83.8	109.7	87.5	93.4	11.5	93.8	95.1	92.7	93.9	1.2
Tyr	30.8	26.9	22.4	28.1	27.0	3.5	31.8	32.1	27.5	30.5	2.6
Phe	45.5	40.7	42.4	42.8	42.8	2.0	47.8	51.0	43.7	47.5	3.7
His	21.0	18.8	13.2	21.8	18.7	3.9	21.8	21.5	24.1	22.5	1.4
Hyl	1.0	1.8	1.6	4.3	2.2	1.5	0.0**	0.0**	0.0**	0.0**	0.0**
Lys	40.6	70.0	49.8	66.2	56.7	13.8	74.6	78.5	73.0	75.3	2.8
Arg	57.5	57.6	48.7	46.1	52.5	6.0	47.0	46.0	42.1	45.0	2.6

注: * 0.2残基/1,000未満; ** 不検出。

【表 3】

表3.胆管バイオマトリックス足場に結合する増殖因子の分析

名称	サイトカインのフルネーム	ヒト胆管	ヒト胆管 バイオマトリックス足場	%
bFGF	塩基性線維芽細胞増殖因子	58299	126	0%
b-NGF	神経成長因子(β ポリペプチド)	516	81	16%
EGF	上皮増殖因子	91	108	119%
EGF R	上皮増殖因子受容体	479	145	30%
FGF-4	線維芽細胞増殖因子-4	31	36	116%
FGF-6	線維芽細胞増殖因子-6	14	17	121%
FGF-7	線維芽細胞増殖因子-7	149	23	15%
GCSF	顆粒球コロニー刺激因子	207	233	113%
GDNF	グリア由来神経栄養因子	53	49	92%
GM-CSF	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	108	97	90%
HB-EGF	ヘパリン結合性上皮増殖因子	28	23	82%
IGFBP-1	インスリン様成長因子結合タンパク質1	431	61	14%
IGFBP-2	インスリン様成長因子結合タンパク質2	255	20	8%
IGFBP-3	インスリン様成長因子結合タンパク質3	77	54	70%
IGFBP-4	インスリン様成長因子結合タンパク質4	81	58	72%
IGFBP-6	インスリン様成長因子結合タンパク質6	783	107	14%
IGF-I	インスリン様成長因子-1	18	6	33%
IGF-I SR	インスリン様成長因子-1	89	25	28%
IGF-II	インスリン様成長因子-2	2873	3945	137%
M-CSF	マクロファージコロニー刺激因子	149	105	70%
M-CSF R	マクロファージコロニー刺激因子受容体	358	71	20%
NT-3	ニューロトロフィン-3	71	71	100%
NT-4	ニューロトロフィン-4	75	58	77%
PDGF R a	血小板由来増殖因子受容体 α	104	63	61%
PDGF R b	血小板由来増殖因子受容体 β	489	110	22%
PDGF-AA	血小板由来増殖因子AA	114	52	46%
PDGF-AB	血小板由来増殖因子AB	87	65	75%
PDGF-BB	血小板由来増殖因子BB	155	75	48%
PIGF	ホスファチジルイノシトールグリカンアンカ 生合成クラスF	146	14	10%
SCF	ストロマ細胞由来因子1	39	22	56%
SCF R	ストロマ細胞由来因子受容体	159	31	19%
TGF-a	トランスフォーミング増殖因子 α	52	25	48%
TGF-b	トランスフォーミング増殖因子 β	234	277	118%
TGF-b 2	トランスフォーミング増殖因子 β 2	103	121	117%
TGF-b 3	トランスフォーミング増殖因子 β 3	28	16	57%
VEGF	血管内皮細胞増殖因子	74	35	47%
VEGF R2	血管内皮細胞増殖因子受容体2	108	33	31%
VEGF R3	血管内皮細胞増殖因子受容体3	45	40	89%

【表 4】

表4.使用した抗体

抗体の名称	宿主およびアイソタイプ	会社	カタログ番号	希釈
細胞外マトリックス成分に対する一次抗体				
1. コラーゲン1	マウスIgG1	Sigma	C2456	1/2000
2. コラーゲン3A1	マウスIgG1	Sigma	C7805	1/2000
3. コラーゲン4A1	ヤギIgG	Santa Cruz	sc-9302	1/50
4. コラーゲン5A1	ウサギIgG	Santa Cruz	sc-20648	1/50
5. コラーゲン6	ウサギIgG	Santa Cruz	Sc-20649	1/50
6. コンドロイチン硫酸	マウスIgM	Sigma	C8035	1/200
7. エラスチン	ウサギIgG	Abcam	ab21610	1/200
8. エンタクチン(ナイドジェン1)	ラットIgG	GeneTex	GTX72367	1/200
9. ヘパラン硫酸	マウスIgM	Seiko, Japan	270426	1/200
10. HS-PG: パールカン	マウスIgG2a	NeoMarkers	RT-794	1/200
11. HS-PG: シンデカン1	ヤギIgG	R&D	AF2780	1/100
12. フィブロネクチン	マウスIgG1	Sigma	F7387	1/200
13. ラミニン	マウスIgG1	Sigma	L8271	1/1000
他のタンパク質に対する一次抗体				
1. AFP	ウサギIgG	Novus Biologicals	NB100-1611	1/200
2. アルブミン	ウサギIgG	Novus Biologicals	NB 600-570	1/200
3. ASMA	マウスIgG2a	Sigma	A2547	1/300
4. Ck18	マウスIgG2b	Sigma	SAB3300016	1/400
5. hCK19	マウスIgG2a	Abcam	ab7754	1/250
6. CK19	ウサギIgG	Abcam	Ab52625	1/200
7. CYP3A4	マウスIgG	Abnova	H00001576-B01P	1/200
8. デスミン	ウサギIgG	Abcam	Ab8592	1/200
9. EpCAM	マウスIgG1	NeoMarkers	MS-181	1/200
10. セクレチン受容体	ウサギIgG	Santa Cruz	sc-28633	1/100
11. PAN CK	マウスIgG1	Abcam	ab-7753	1/300
12. チューブリン- α	マウスIgG1	Neomarkers	MS-581	1/1000
13. ビメンチン	マウスIgG1	Abcam	Ab8978	1/200
蛍光細胞染色または組織免疫組織化学のための二次抗体または色素				
1. Alexa Fluor(登録商標)488/594ヤギ抗マウスIgG1もしくは2aまたは抗ウサギIgG	Molecular Probes			1/500
2. VECTASTAIN(登録商標)ABCシステム	Vector Laboratories			
3. NovaRED(登録商標)基質キット	Vector Laboratories			
4. Phalloidin 488	Molecular Probes			1/500

【表 5】

表5.RT-PCRに使用したプライマー

No.	名称	フルネーム	GenBankアクセッション番号	配列 (5' → 3')	Tm	アンプリコンサイズ
1	CXCR4	ケモカイン(C-X-Cモチーフ) 受容体4	AJ224869	TACACCGAGGAATGGGCTCA AGATGATGGAGTAGATGGTGGG	63 60.4	112
2	EpCAM	上皮細胞接着分子	NM_002354	ATAACCTGCTCTGAGCGAGTG TGAAGTGCAGTCCGCAAACT	61.6 62.3	104
3	KRT19	ケラチン19	NM_002276	ACCAAGTTTGAGACGGAACAG CCCTCAGCGTACTGATTTTCCT	60.2 61.3	181
4	HNF6	肝細胞核因子6、α	NM_004498	ATGTGGAAGTGGCTGCAGGA TGTGTGCTCTATCCTTCCC	60.7 61.2	105
5	FOXA2	フォークヘッドボックスA2	NM_021784	GCGACCCCAAGACCTACAG GGTTCGCGGTAGAAAGG	61.7 61.7	162
6	PROX1	プロスペロホメオボックス1	NM_002763	TTGACATTGGAGTGAAAGGACG TGCTCAGAACCTTGGGGATTCT	61 61.8	100
7	AFP	α-フェトプロテイン	NM_001134	CTTGACACACAAAGGCCACT GGGATGCCCTCTTGCTATCTCAT	61.9 61.8	138
8	ALB	アルブミン	M12523	TTTATGCCCGGAACTCCTTT ACAGGAGGCGAGCTTTATCAG	61.4 62.4	90
9	TF	トランスフェリン	NM_001063	CCTCCTACCTTGATTCATCAG TTTGGACCCATAGAACTCTGCC	60.2 60	137
10	CYP3A4	シクロムP450、ファミリー3、 サブファミリーA、ポリペプチド4	NM_017460	AAGTCGCTCGAAGATACACA AAGGAGAGAACACTGCTCGTG	60.9 61.7	174
11	TAT	チロシンアミントランスフェラーゼ	NM_000353	TTTGGACCCCTGTACCATTTGT GCATTGGACTTGAGGAAGCTC	61 61	102
12	G6PC	グルコース-6-ホスファターゼ 触媒サブユニット	NM_000151	TCAGGGAAGATAAAGCCGACC AGGTAGATTCGTGACAGACAGAC	61.8 61.1	105
13	CFTR	囊胞性線維症膜貫通 コンダクタンス調節因子	NM_000492	AAAAGGCCAGCGTTGTCTCC TGAAGCCAGCTCTCTATCCCA	63 62.1	170
14	GGT1	γ-グルタミルトランスフェラーゼ1	J05235	GGGGAGATCGAGGGCTATGAG GATGACGGTCCGCTGTTTTC	63 61.8	150
15	AE2	SLC4A2	NM_003040	GCCAAGGCGCGGATTTCTT CCAGGGTSCGGTGAAGTTC	63 62.9	103
16	ASBT	SLC10A2	NM_000452	TGTGTGGCTTCTCTGTCTCAG GGCAGCATCCTATATGAGCAC	62 60.9	115
17	GAPDH	グリセルアルデヒド-3- ホスフェート脱水素酵素	NM_002046	CATGAGAAGTATGACAACAGCCT AGTCCTTCCACGATACCAAAAGT	60 60.8	113

【表 6】

表6.肝臓バイオマトリックス足場に結合する増殖因子の分析

名称	サイトカインフルネーム	ラット肝臓	ラットバイオマトリックス足場	パーセント
bFGF	塩基性線維芽細胞増殖因子	100.06	394.14	394
EGF	上皮増殖因子	74.81	76.02	102
EGF R	上皮増殖因子受容体	92.81	81.64	88
FGF-4	線維芽細胞増殖因子-4	15.06	13.21	88
FGF-6	線維芽細胞増殖因子-6	4.81	3.77	78
FGF-7	線維芽細胞増殖因子-7	10.06	6.32	63
GCSF	顆粒球コロニー刺激因子	348.06	338.20	97
GM-CSF	グリア由来神経芽細胞因子	81.31	43.59	54
HB-EGF	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	133.56	105.38	79
IGFBP-1	ヘパリン結合性上皮増殖因子	44.56	38.23	86
IGFBP-3	インスリン様成長因子結合タンパク質1	67.81	70.40	104
IGFBP-4	インスリン様成長因子結合タンパク質3	140.81	201.90	143
IGFBP-6	インスリン様成長因子結合タンパク質4	83.56	58.92	71
IGF-I	インスリン様成長因子結合タンパク質6	91.81	72.19	79
IGF-I SR	インスリン様成長因子-1	1.56	1.98	127
IGF-II	インスリン様成長因子-1	7.31	3.51	48
M-CSF	インスリン様成長因子2	3749.06	3482.52	93
M-CSF R	マクロファージコロニー刺激因子	170.31	134.68	79
NT-3	マクロファージコロニー刺激因子受容体	70.56	50.47	72
NT-4	ニューロトロフィン-3	25.56	5.03	20
PDGF R a	ニューロトロフィン-4	55.06	43.59	79
PDGF R b	血小板由来増殖因子受容体 α	10.56	21.11	200
PDGF-AA	血小板由来増殖因子受容体 β	113.81	85.46	75
PDGF-AB	血小板由来増殖因子AA	62.06	106.40	171
PDGF-BB	血小板由来増殖因子AB	19.31	19.34	100
PGF	血小板由来増殖因子BB	9.56	14.23	149
SCF	ホスファチジルイノシトールグリカンアンカー合成クラスF	4.81	8.36	174
SCF R	ストロマ細胞由来因子1	2.06	42.56	2064
TGF-a	ストロマ細胞由来因子受容体	17.06	17.80	104
TGF-b	トランスフォーミング増殖因子 α	21.31	21.63	102
TGF-b 2	トランスフォーミング増殖因子 β	330.31	342.77	104
TGF-b 3	トランスフォーミング増殖因子 β 2	134.06	152.34	114
VEGF	トランスフォーミング増殖因子 β 3	1.06	0.18	17
VEGF R2	血管内皮細胞増殖因子	70.56	94.14	133
VEGF R3	血管内皮細胞増殖因子受容体2	13.56	11.93	88
	血管内皮細胞増殖因子受容体3	459.56	469.1	10

【表 7】

表7.単離後および培養中のヒト肝幹細胞(hHpSC)の性質

性質	新鮮分離 hHpSC	自己複製条件(12日目)	分化条件(12日目)
接着時間	----	KMおよびTCPまたはIII型コラーゲン TCPには~4~5時間; III型コラーゲンには~3時間	DMおよびI型コラーゲン 7~12時間 ~3時間
生存細胞の接着%	---	TCPには60~80%、 III型コラーゲンには~100%	~100%
コロニーの形態		2次元(単層)コロニー	細胞の帯、ややサイコロ状 細胞の帯、大変立体的
倍加時間(分裂速度)	---	TCP上では~36時間ごとに、III型コラーゲン上では~24~26時間ごとに分裂	数回のみ分裂で、5日までに増殖停止に移行
生存期間		>6ヶ月(幹細胞のままである)	~2週間 >8週間(分化細胞で) (これ以上は試験していない)
EpCAM		100%	特定のマーカーを発現している細胞の百分率 小胆管細胞の膜上に存在、成熟肝細胞には全く発現していない
NCAM		>80%	なし
CD133/1		90%	なし
SOX 17		100%	なし
CK8/18、E-カドヘリン		100%	100%
CK19		90%	胆管細胞には存在するが、肝細胞には存在しない
α -フェトプロテイン	なし、存在する場合は、肝芽細胞での汚染による		最初の2~3日目において発現、その後劇的に減少し、7日目からは発現なし
P450s	なしまたは無視しうるレベル		100% (~18,000 RLU)*
合成された尿素	なし		~2.5mg/dL
マーカー:成熟肝細胞	大部分の細胞は発現しない、発現している細胞であっても大変弱い(例えばアルブミン);すべてがトランスフェリンmRNAを発現するが、トランスフェリンタンパク質を発現するものはない		アルブミン、トランスフェリンタンパク質、チロシンアミノトランスフェラーゼ(TAT)、グリコゲン、I型コラーゲン上では弱いレベルであるのに対し、パイオマトリックス足場では強いレベル
マーカー:成熟胆管細胞	大部分はなし、発現しているものであっても、大変弱い(例えばGFTR、GGT1、AE2、ASBTおよび後期アクアポリン)の発現なし		セクレチン受容体、AE2、ABAT、CFTR、GGT1、AE2、ASBT (I型コラーゲン上では大変弱いレベルであるが、パイオマトリックス足場上では大変強いレベル)

KM=Kubota培地、hHpSCおよび前駆細胞に用いられる無血清培地;HDM-L=本方法で与えられるホルモンおよび因子を含むKM由来の分化培地。TCP=組織培養プラスチック。*図5F参照; **図5E参照

【表 8】

表8.コロニーを得るのに必要なマトリックス/ウェルの量

	ug/CM ² でのマトリックス量			
	コラーゲン	結腸	肝臓	肺
低	5	3	10	30
中	50	5	25	50
高	100	7	50	100

【表 9 - 1】

表9.患者6名からの結果

患者1	コロニー数				
	プラスチック	結腸	肝臓	肺	コラーゲン
低濃度のマトリックス	6	5.5	7.5	5.5	4
中程度の濃度のマトリックス		7.5	14.5	14	1.5
高濃度のマトリックス		9	9.5	19	2

患者2	コロニー数				
	プラスチック	結腸	肝臓	肺	コラーゲン
低濃度のマトリックス	5	15	13.5	25	1
中程度の濃度のマトリックス		9	22.5	24	2.5
高濃度のマトリックス		5	19.5	23.5	3

患者3	コロニー数				
	プラスチック	結腸	肝臓	肺	コラーゲン
低濃度のマトリックス	6	7	5	5.5	1.5
中程度の濃度のマトリックス		10.5	40.5	28	3.5
高濃度のマトリックス		9.5	18.5	21	5.5

【表 9 - 2】

表9(続)

	コロニー数				
患者4	プラスチック	結腸	肝臓	肺	コラーゲン
低濃度のマトリックス	5.5	5.5	9	12	3
中程度の濃度のマトリックス		6.5	11	16	2
高濃度のマトリックス		7.5	13.5	18	1

	コロニー数				
患者5	プラスチック	結腸	肝臓	肺	コラーゲン
低濃度のマトリックス	5	6	10.5	14.5	4
中程度の濃度のマトリックス		6.5	12.5	20	2.5
高濃度のマトリックス		6.5	13	24.5	1.5

	コロニー数				
患者6	プラスチック	結腸	肝臓	肺	コラーゲン
低濃度のマトリックス	3.5	5.5	9	19	2.5
中程度の濃度のマトリックス		6.5	15.5	18	3.5
高濃度のマトリックス		4.5	16.5	25.5	3.5

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔 1 〕 生体組織からのバイオマトリックス足場の製造方法であって、

a) 第1培地で生体組織を灌流するかまたは生体組織をホモジナイズし、ここで前記第1培地の重量オスモル濃度は約250mOsm/kg～約350mOsm/kgであり、前記第1培地は無血清かつ中性pHであり；

b) 前記第1培地にリパーゼおよび/または洗浄剤を含む脱脂緩衝液で段階(a)の生体組織を

灌流するかまたは段階(a)のホモジネートを抽出し；

c) 中性pHかつ約2.0M NaCl ~ 約5.0NaClの塩濃度であって、生体組織内で同定されるコラーゲンを不溶性に保つように選択された塩濃度を含む緩衝液で段階(b)の組織を灌流するかまたは段階(b)のホモジネートを抽出し；

d) 緩衝液中、RNアーゼおよびDNアーゼで段階(c)の組織を灌流するかまたは段階(c)のホモジネートを抽出し；

e) 中性pHかつ無血清であり、約250mOsm/kg ~ 約350mOsm/kgの重量オスモル濃度を有する第2培地で段階(d)の組織またはホモジネートをリンスする段階；

を含み、それによって生体組織から、無傷のまたはホモジナイズしたバイオマトリックス足場であって、コラーゲンの少なくとも95%および生体組織のコラーゲン結合性マトリックス成分およびマトリックス結合性増殖因子、ホルモンおよびサイトカインの大部分を含む前記足場を製造する前記方法。

〔2〕第1培地が、塩、ミネラル、アミノ酸、ビタミンおよび糖を含む、前記〔1〕に記載の方法。

〔3〕第1培地が基礎培地である、前記〔1〕に記載の方法。

〔4〕基礎培地が、RPMI 1640、DME/F12、DME、F12、ウェイマウスおよびウィリアム培地からなる群から選択される、前記〔3〕に記載の方法。

〔5〕第2培地が、間質液に存在する成分の少なくとも1つを含む、前記〔1〕に記載の方法。

〔6〕段階(b)の脱脂緩衝液が、第1培地に約20単位/L ~ 約50単位/LのホスホリパーゼA2および約1%のデオキシコール酸ナトリウムを含む、前記〔1〕に記載の方法。

〔7〕段階(c)の緩衝液の塩濃度が、成人肝臓からの足場製造に用いる場合、約3.4M NaCl ~ 約3.5M NaClであり、胎児肝臓からの足場製造に用いる場合、約4.0M NaCl ~ 約4.5M NaClである、前記〔1〕に記載の方法。

〔8〕段階(c)の緩衝液がプロテアーゼインヒビターをさらに含む、前記〔1〕に記載の方法。

〔9〕プロテアーゼインヒビターが大豆トリプシンインヒビターである、前記〔8〕に記載の方法。

〔10〕段階(d)の緩衝液がプロテアーゼインヒビターをさらに含む、前記〔1〕に記載の方法。

〔11〕プロテアーゼインヒビターが大豆トリプシンインヒビターである、前記〔10〕に記載の方法。

〔12〕段階(a) ~ (e)のすべての培地および緩衝液が、細胞外マトリックス成分を分解する酵素の検出可能な量を含まない、前記〔1〕に記載の方法。

〔13〕バイオマトリックス足場を滅菌することをさらに含む、前記〔1〕に記載の方法。

〔14〕滅菌段階がバイオマトリックス足場のγ線照射を含む、前記〔13〕に記載の方法。

〔15〕生体組織が肝臓組織、肺組織、膵臓組織、甲状腺組織、腸管組織、皮膚組織、血管組織、膀胱組織、心臓組織および腎臓組織からなる群から選択される、前記〔1〕に記載の方法。

〔16〕生体組織が哺乳動物由来である、前記〔1〕に記載の方法。

〔17〕前記〔1〕 ~ 〔16〕のいずれかに記載の方法によって製造されるバイオマトリックス足場。

〔18〕コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ナイドジェン/エンタクチン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、増殖因子、サイトカインまたはそれらの任意の組み合わせをすべてバイオマトリックス足場の一部として含むバイオマトリックス足場。

〔19〕細胞培養物の製造方法であって、

a) 前記〔1〕 ~ 〔16〕のいずれかに記載の方法によってバイオマトリックス足場を製造し；

b) 段階(a)のバイオマトリックス足場と細胞培養培地を培養装置内で接触させ；

c) 段階(b)のバイオマトリックス足場に細胞を播種すること；

を含み、それによって細胞培養物を製造する前記方法。

〔20〕細胞培養物の製造方法であって、

a) 前記〔1〕～〔16〕のいずれかに記載の方法によってバイオマトリックス足場を製造し；

b) 段階(a)のバイオマトリックス足場を凍結し；

c) 段階(b)のバイオマトリックス足場から細胞培養基材として凍結切片を調製し；

d) 段階(c)の細胞培養基材と細胞培養培地を培養装置内で接触させ；

e) 段階(d)の細胞培養基材に細胞を播種すること；

を含み、それによって細胞培養物を製造する前記方法。

〔21〕細胞培養物の製造方法であって、

a) 前記〔1〕～〔16〕のいずれかに記載の方法によってバイオマトリックス足場を製造し；

b) 段階(a)のバイオマトリックス足場を粉末に粉碎し；

c) 培養装置の少なくとも一部に段階(b)の粉末をコーティングして細胞培養基材を製造し；

d) (c)の細胞培養基材と細胞培養培地を培養装置内で接触させ；

e) (d)の細胞培養基材に細胞を播種すること；

を含み、それによって細胞培養物を製造する前記方法。

〔22〕バイオマトリックス足場の粉碎が、フリーザーミル内で液体窒素温度またはその付近の温度で行われる、前記〔21〕に記載の方法。

〔23〕細胞培養培地が、間質液に存在する成分の少なくとも1つを含み、前記培地の重量オスモル濃度が約250mOsm/kg～約350mOsm/kgであり、前記培地が無血清である、前記〔19〕～〔22〕のいずれかに記載の方法。

〔24〕培地がRPMI-1640である、前記〔23〕に記載の方法。

〔25〕細胞が、バイオマトリックス足場の製造に用いられる生体組織の細胞と同じ型である、前記〔19〕～〔24〕のいずれかに記載の方法。

〔26〕細胞が、胚性幹(ES)細胞、人工多能性幹(iPS)細胞、決定された幹細胞、周産期幹細胞、羊水由来幹細胞(AFSC)、任意の起源の間葉系幹細胞(MSC)、任意の組織型の、分化方向を決定された前駆細胞または成人細胞、成熟細胞、正常細胞、罹患細胞、腫瘍細胞およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、前記〔19〕～〔24〕のいずれかに記載の方法。

〔27〕細胞が、肝臓細胞、実質細胞、星細胞、内皮細胞、肝細胞、胆管細胞、胆管細胞ではない胆樹細胞および膵臓細胞からなる群から選択される、前記〔19〕～〔24〕のいずれかに記載の方法。

〔28〕胚性幹細胞または人口多能性細胞の特定の運命への分化を促進するための組織特異的バイオマトリックス足場の使用。

〔29〕羊水由来幹細胞または骨髄、脂肪組織、任意の胎児組織もしくは任意の出生後組織からの間葉系幹細胞または決定された幹細胞の特定の成人運命への分化を促進するための組織特異的バイオマトリックス足場の使用。

〔30〕前記〔19〕～〔27〕のいずれかに記載の方法によって製造される細胞培養物。

〔31〕幹細胞および/または前駆細胞の成熟細胞への分化を増進し加速させる方法であって、前記〔19〕～〔27〕のいずれかに記載の方法によって細胞培養物を製造することを含む前記方法において、細胞が幹細胞であり、成熟細胞のための細胞培養培地を処方し、それによって幹細胞および/または前駆細胞の成熟細胞への分化を増進し加速させる前記方法。

〔32〕細胞が、任意の型の成人細胞であるか、あるいは胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、胚葉幹細胞、決定された幹細胞、周産期幹細胞、羊水由来幹細胞、間葉系幹細胞、一過性増殖細胞または任意の組織型の、分化方向を決定された前駆細胞からなる群から選択される幹細胞または前駆細胞である、前記〔31〕に記載の方法。

〔33〕細胞培養培地が、RPMI 1640、DME/F12、DME、F12、ウェイマウスおよびウィリアム培地からなる群から選択される、前記〔31〕に記載の方法。

〔 3 4 〕被験者に細胞を送達する方法であって、前記〔17〕または〔18〕のいずれかに記載のバイオマトリックス足場に細胞を播種し、次いで、細胞を播種されたバイオマトリックス足場を被験者に移植することを含む前記方法。

〔 3 5 〕組織型における腫瘍細胞の転移能を同定する方法であって、

a)前記〔1〕～〔16〕のいずれか1つに記載の方法によってバイオマトリックス足場を製造し；

b)(a)のバイオマトリックス足場と細胞培養培地を培養装置内で接触させ；

c)(b)のバイオマトリックス足場に腫瘍細胞を播種し；

d)(c)のバイオマトリックス足場を培養条件下に維持し；

e)(d)のバイオマトリックス足場での腫瘍細胞の増殖をモニタリングすること；

を含む前記方法において、バイオマトリックス足場での腫瘍細胞の増殖が、バイオマトリックス足場が製造された組織型に腫瘍細胞がin vivoでコロニーを形成することができることを同定し、それによって前記組織型における腫瘍細胞の転移能を同定する前記方法。

〔 3 6 〕抗腫瘍処置に感受性のある腫瘍細胞を同定する方法であって、

a)前記〔1〕～〔16〕のいずれか1つに記載の方法によってバイオマトリックス足場を製造し；

b)(a)のバイオマトリックス足場と細胞培養培地を培養装置内で接触させ；

c)(b)のバイオマトリックス足場に腫瘍細胞を播種し；

d)(c)のバイオマトリックス足場を培養条件下に維持し；

e)バイオマトリックス足場での腫瘍細胞に抗腫瘍処置を適用し；

f)(e)のバイオマトリックス足場での腫瘍細胞の増殖をモニタリングすること；

を含む前記方法において、(e)のバイオマトリックス足場での腫瘍細胞の増殖の欠如および/または腫瘍細胞の死が抗腫瘍処置に感受性のある腫瘍細胞を同定する前記方法。

〔 3 7 〕宿主動物への移植のための腫瘍移植片の製造方法であって、

a)前記〔1〕～〔16〕のいずれか1つに記載の方法によってバイオマトリックス足場を製造し；

b)(a)のバイオマトリックス足場と細胞培養培地を培養装置内で接触させ；

c)(b)のバイオマトリックス足場に腫瘍細胞を播種し；

d)(c)のバイオマトリックス足場を培養条件下に維持し；

e)(d)のバイオマトリックス足場で腫瘍細胞集団を確立すること；

を含み、それによって宿主動物への移植のための腫瘍移植片を製造する前記方法。

〔 3 8 〕宿主動物に腫瘍移植片を移植する段階をさらに含む、前記〔37〕に記載の方法。

〔 3 9 〕腫瘍移植片が宿主動物に対して同系、同種または異種である、前記〔38〕に記載の方法。

〔 4 0 〕系統依存性ウイルスのウイルス粒子の製造方法であって、

a)前記〔1〕～〔16〕のいずれか1つに記載の方法によってバイオマトリックス足場を製造し；

b)(a)のバイオマトリックス足場と細胞培養培地を培養装置内で接触させ；

c)(b)のバイオマトリックス足場に、系統依存性ウイルスに感染されることが出来る型および系統段階の細胞を播種し；

d)(c)の細胞を系統依存性ウイルスに感染させ；

e)バイオマトリックス足場での感染細胞を培養条件下に維持し；

f)感染細胞内で製造されるウイルス粒子を採取すること；

を含み、それによって系統依存性ウイルスのウイルス粒子を製造する前記方法。

〔 4 1 〕系統依存性ウイルスが、C型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、ノロウイルスおよびヒト乳頭腫ウイルスからなる群から選択される、前記〔40〕に記載の方法。

〔 4 2 〕バイオマトリックス足場の再細胞化によって形成されるオルガノイドの製造方法であって、

a)前記〔1〕～〔16〕のいずれか1つに記載の方法によってバイオマトリックス足場を製造し；

- b)(a)のバイオマトリックス足場と細胞培養培地を培養装置内で接触させ；
c)(b)のバイオマトリックス足場に、バイオマトリックス足場の製造に用いた生体組織と同じ組織型の細胞を播種し；
d)バイオマトリックス足場での細胞を培養条件下に維持し、それによって細胞からオルガノイドが形成されること；
を含み、それによってバイオマトリックス足場の再細胞化によって形成されるオルガノイドを製造する前記方法。
〔43〕補助デバイスとして使用するために、オルガノイドを被験者に接触させる段階をさらに含む、前記〔42〕に記載の方法。
〔44〕細胞が肝臓細胞である、前記〔42〕に記載の方法。
〔45〕バイオマトリックス足場で培養された細胞内での目的とするタンパク質の製造方法であって、
a)前記〔1〕～〔16〕のいずれか1つに記載の方法によってバイオマトリックス足場を製造し；
b)(a)のバイオマトリックス足場と細胞培養培地を培養装置内で接触させ；
c)(b)のバイオマトリックス足場に目的とするタンパク質を製造する細胞を播種し；
d)バイオマトリックス足場での(c)の細胞を培養条件下に維持し；
e)(d)の細胞によって製造される目的とするタンパク質を採取すること；
を含み、それによってバイオマトリックス足場で培養された細胞内で目的とするタンパク質を製造する前記方法。
〔46〕段階(e)において採取した目的とするタンパク質を精製する段階をさらに含む、前記〔45〕に記載の方法。