(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
2016 年 10 月 6 日(06.10.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/159380 A1

(51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01) *C12N 1/00* (2006.01)
C08G 81/00 (2006.01) *C12N 5/00* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/061017

(22) 国際出願日: 2016 年 4 月 4 日(04.04.2016)

(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 2015-077159 2015 年 4 月 3 日(03.04.2015) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所 **(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY)** [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目３番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 杉浦　慎治 **(SUGIURA Shinji)**; 〒3058565 茨城県つくば市東１－１－１　中央第５　国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 田村　磨聖 **(TAMURA Masato)**; 〒3058565 茨城県つくば市東１－１－１　中央第５　国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 高木　俊之 **(TAKAGI Toshiyuki)**; 〒3058565 茨城県つくば市東１－１－１　中央第５　国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 須丸　公雄 **(SUMARU Kimio)**; 〒3058565 茨城県つくば市東１－１－１　中央第５　国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 金森　敏幸 **(KANAMORI Toshiyuki)**; 〒3058565 茨城県つくば市東１－１－１　中央第５　国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 柳川　史樹 **(YANAGAWA Fumiki)**; 〒3058565 茨城県つくば市東１－１－１　中央第５　国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 志賀　正武, 外 **(SHIGA Masatake** et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目９番２号 Tokyo (JP).

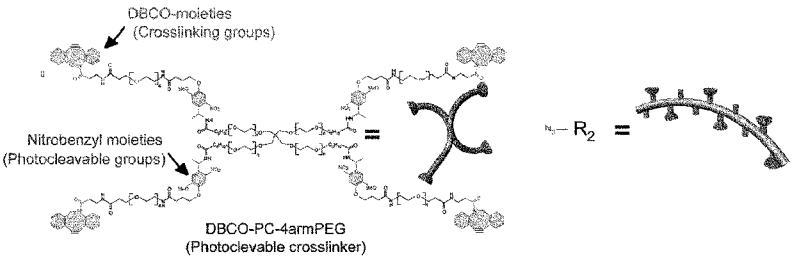
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, 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, SE, SI, SK, SM, TR),

[続葉有]

(54) **Title**: PHOTODEGRADABLE HYDROGEL, CULTURE DEVICE, METHOD FOR FORMING TISSUE, AND METHOD FOR SEPARATING CELLS

(54) 発明の名称 : 光分解性ハイドロゲル、培養器具、組織体形成方法及び細胞分離方法



(57) **Abstract**: Provided are a photodegradable hydrogel, a culture device using the same, a method for forming tissue, and a method for separating cells, wherein the photodegradable hydrogel includes a protein as one of the main constituents thereof and allows cells to be embedded in a photodegradable gel without causing cell damage when cells are made to coexist during preparation of the photodegradable gel so as to embed the cells in the photodegradable gel. A photodegradable hydrogel obtained by condensing an azide group in compound B and an alkyne group included in an azacyclooctyne ring or cyclooctyne ring of compound A. (Compound A) A compound that is a photocleavable crosslinking agent including: a main chain having a polyethylene glycol structure that is a straight type or a branched type having three or more branches, a photodegradable nitrobenzyl group disposed at both terminals of the main chain or a branch terminal, and a group having a azacyclooctyne ring or cyclooctyne ring disposed at the terminal side of the nitrobenzyl group. (Compound B) A compound that is an azide-modified protein, wherein a protein is used as a main chain, and at least some amino groups present in the lysine and arginine side chains of the main chain and amino groups present in a terminal of the main chain are modified by an azide group.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2016/159380 A1

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)）

光分解性ゲルの作製時に細胞を共存させることにより細胞を光分解性ゲルに包埋する際に、細胞傷害を生じさせることなく細胞を光分解性ゲルに包埋させることができ、なおかつタンパク質を主たる構成成分の一つとして含む光分解性ハイドロゲル、およびそれを用いた培養器具、組織体形成方法及び細胞分離方法を提供する。下記化合物Ａのシクロオクチン環又はアザシクロオクチン環に含まれるアルキン基と下記化合物Ｂのアジド基が縮合して得られる、光分解性ハイドロゲル。(化合物Ａ)直鎖型ないし３分岐以上の分岐型の、ポリエチレングリコール構造を含む主鎖と、前記主鎖の両末端ないし分岐末端に配置された光分解性のニトロベンジル基と、前記ニトロベンジル基の末端側に配置されたシクロオクチン環又はアザシクロオクチン環を有する基とを含む光開裂性架橋剤である化合物。(化合物Ｂ)タンパク質を主鎖とし、前記主鎖のリジンおよびアルギニン側鎖に存在するアミノ基および主鎖末端に存在するアミノ基の少なくとも一部がアジド基で修飾されているアジド修飾タンパク質である化合物。

明　細　書

発明の名称 ：

光分解性ハイドロゲル、培養器具、組織体形成方法及び細胞分離方法

技術分野

[0001] 本発明は、材料工学の分野に属し、特に、複雑且つ微細な三次元組織体の製造に用いることができる光分解性ゲルと、それを用いた細胞培養装置、細胞分別方法、組織体形成方法および組織体に関する。

本願は、２０１５年４月３日に、日本に出願された特願２０１５－７７１５９号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 新たな物質の開発や物質の新たな用途の開発にあたっては、それらの使用形態によっては前記物質が人体に与える影響を検証することが重要であり、中でも、医薬品や食品添加物などの開発にあたっては、これらが人体に対しどのような影響を与えるかを検証することが必須である。

このような検証には、通常、動物実験や培養細胞を用いた細胞レベルでの実験が行われるが、技術の進展に伴い、培養細胞を用いた、よりハイスループットな細胞レベルでのアッセイが求められている。

一方、一般的な細胞アッセイで利用されている単層培養においては、細胞周囲の環境が動物体内の環境と大きく異なっているため、このような培養細胞では本来体内で発現すべき機能の多くを喪失しているという問題がある。

次世代の細胞アッセイ技術では、生体内の三次元構造を模倣した組織体を人工的に再構成し、より機能の高い組織体を利用したより信頼性の高いアッセイを適用することで、より高いvivo-vitro相関を得ることが期待されている。

[0003] 細胞培養方法の一つとして、ハイドロゲルを利用した方法が挙げられる。ハイドロゲルは、高い含水率、力学的性質の調整が容易、栄養素の拡散性に優れる等の細胞の担体としての優れた特性を有している。細胞をハイドロゲ

ルの内部に三次元的に分散させた状態で培養する包埋培養法は、細胞とハイドロゲルとの相互作用により細胞の機能を高める方法として知られている。

この包埋培養法では、ハイドロゲルを構成する高分子の分子構造が細胞の機能に大きく影響を及ぼすことが知られている。特に、コラーゲン、ゼラチン、ラミニンやマトリゲルといった細胞外基質を含む生体由来の高分子を主成分としたハイドロゲル内で細胞が高い機能を示す例が多く知られている。

コラーゲンは生体内の様々な組織に存在し、細胞外基質の主成分であることが知られており、コラーゲンを主成分としたハイドロゲルの多くは細胞接着性を有していることが知られている。通常の培養ディッシュで機能を失いやすい細胞も、コラーゲンゲル包埋培養法やコラーゲンゲルサンドイッチ培養法を適用することでその機能を維持できることがある。ゼラチンはコラーゲンを酸、アルカリ、熱などで変性させることで水溶性を高くした高分子であり、変性してはいるが細胞接着性を維持しており、コラーゲンと同様に細胞培養の基材として利用される。コラーゲンと比べて安価であるため、培養ディッシュのコーティングにも頻繁に利用される。マトリゲルはCorning社より販売されている細胞培養基材であるが、その主成分であるラミニン、コラーゲンといった細胞外基質に加えて、トランスフォーミング増殖因子(TG)、上皮細胞増殖因子(EGF)、インスリン様成長因子(IGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)といった各種増殖因子が含まれている。

一方、ポリエチレングリコールなどの合成高分子を主成分としたハイドロゲルの中では細胞の増殖や機能が高まらないことが知られている(非特許文献１)。合成高分子のハイドロゲルでは、細胞接着性を付与するために、コラーゲンの細胞接着因子の一つである、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)ペプチドをハイドロゲルに修飾することで、細胞の機能を高めることができることも知られている(非特許文献２)。

[0004] また、ハイドロゲルは、光分解性の基を分子内に組み込むことで光分解性を付与することができる。この光分解性を利用して、光により加工することが可能な光分解性ゲルが開発されている。光分解性ゲルとしては、例えばポ

リエチレングリコールを主鎖とし、ニトロベンジル基を分子内に有するものがある。このような構成を有する高分子モノマーから形成されるハイドロゲルの物性は、光照射によって時間的・空間的に制御可能であり、また、前記光分解は生細胞に対して大きな細胞傷害性が無いことが知られている。

このような光分解性ゲル中で細胞を培養することにより、前記ゲルに光照射してゲルを分解することによって、培養細胞を容易にゲル中から取り出すことができる。このことを利用して、例えば、ゲルの特定の位置のみに光照射してゲルを分解することにより、前記特定の位置の細胞のみを取り出すこともでき、培養細胞群の特定の細胞を分離することが可能となる(非特許文献３)。

[0005] これまでに、光分解性ゲルを調整する方法として、ラジカル重合を利用した方法がよく知られている(非特許文献４、５)。ラジカル重合を利用する場合では、酸素の存在下で重合すると酸素の影響を受けてゲル化の反応が阻害される場合がある。また、ラジカルが細胞や生理活性物質にダメージを与えてしまう。また、主鎖として使用できる高分子化合物が、ラジカル重合できるモノマーの重合物に限定されるため、その利用が限局される。

本発明者らは、ラジカル重合を利用せず、高分子化合物と混合するだけで架橋反応が起こり、光分解性ゲルを形成可能な光開裂性架橋剤の開発を行ってきた(特許文献１)。しかしながら、このゲルは、溶媒を吸収することで崩れてしまい、意図した構造が構築できないことがある。また、ゲルの強度が低く、生体構造を再現するような複雑な三次元構造の作製が難しいという問題があった。

本発明者らは、光開裂性架橋剤の分岐数を高めることでゲルの強度を高められ、前記架橋剤を用いることで、細胞担体として適切な含水率、適度な水溶性、及び複雑かつ微細な三次元構造を構築することが可能な強度とを併せ持つ光分解性ゲルを形成できることを見出し、先に特許出願した(特許文献２、３、非特許文献６)。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開２０１２－０８０８４４公報

特許文献2：特開２０１４－２２６０８８公報

特許文献3：特願２０１３－１０８４２９公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：C.B.Hutson, J.W.Nichol, H.Aubin, H.Bae, S.Yamanlar, S.Al-Haque, S.T.Koshy and A.Khademhosseini, "Synthesis and characterization of tunable poly(ethylene glycol): Gelatin methacrylate composite hydrogels", Tissue Engineering Part A, 17, 1713-1723 (2011).

非特許文献2：L.Schukur, P.Zorlutuna, J.M.Cha, H.Bae and A.Khademhosseini, "Directed differentiation of size-controlled embryoid bodies towards endothelial and cardiac lineages in rgd-modified poly(ethylene glycol) hydrogels", Adv. Healthc. Mat., 2, 195-205 (2013).

非特許文献3：Tamura, M.et al. Optical cell separation from three-dimensional environment in photodegradable hydrogels for pure culture techniques. Sci. Rep. 4, 4793, (2014)

非特許文献4：Tibbitt, M. W., Kloxin, A. M., Dyamenahalli, K. U. & Anseth, K. S. Controlled two-photon photodegradation of PEG hydrogels to study and manipulate subcellular interactions on soft materials. Soft Matter 6, 5100-5108 (2010).

非特許文献5：Kloxin, A. M. et al., Science (2009) Vol.324, pp.59-63.

非特許文献6：Yanagawa, F. et al. Activated-Ester-Type Photocleavable Crosslinker for Preparation of Photodegradable Hydrogels Using a Two-Component Mixing Reaction. Adv. Healthc. Mat. , in press, doi:10.1002/adhm.201400180 (2014).

非特許文献7：DeForest, C. A. & Anseth, K. S. Cytocompatible click-based hydrogels with dynamically tunable properties through orthogonal photoconjugation and photocleavage reactions. Nature Chem. 3, 925-931

(2011).

非特許文献8：Azagarsamy, M. A. & Anseth, K. S. Bioorthogonal Click Chemistry: An Indispensable Tool to Create Multifaceted Cell Culture Scaffolds. Acs Macro Letters 2, 5-9, doi:10.1021/mz300585q (2013).

非特許文献9：Miedel, M. C., Hulmes, J. D. & Pan, Y. C. E. The Use of Fluorescamine as a Detection Reagent in Protein Microcharacterization. J. Biochem. Biophys. Methods 18, 37-52 (1989).

非特許文献10：Ninan, G., Joseph, J. & Abubacker, Z. Physical, Mechanical, and Barrier Properties of Carp and Mammalian Skin Gelatin Films. J. Food Sci. 75, E620-E626, (2010).

非特許文献11：K.Kikuchi , K.Sumaru , J.Edahiro , Y.Ooshima , S.Sugiura , T.Takagi , T.Kanamori , Biotechnol. Bioeng. 103, 552-561 (2009).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 組織工学研究のために細胞を光分解性ゲルに包埋して培養する場合や、光分解性ゲルに細胞を包埋して細胞分離を行う場合、生存率を保った状態で細胞包埋をすることが重要である。しかしながら、上述の先行技術では、ゲルの作製にラジカル重合反応や、アミド縮合反応を用い、前記反応時に細胞を共存させて、細胞を光分解性ゲルに包埋しているが、これらの反応は細胞傷害を引き起こすことが知られており、これらの方法でゲルを作製すると、限局された条件下でしか生存率を維持して細胞を包埋することができない。

[0009] また、非特許文献７では、細胞傷害性の低いクリック反応を利用して光分解性ゲルを調製する方法が報告されているが、この方法で作製されるゲルは、ポリエチレングリコールと細胞接着性のないポリペプチドによって構成されており、細胞接着性を付加するために、前記ポリペプチドにオレフィン-チオールカップリング反応により細胞接着性のRGD基を別途導入している。このように、非特許文献７の方法は、細胞接着性の光分解性ゲルを得るためにクリック反応によるゲルの形成とラジカルを利用したオレフィン-チオールカッ

プリング反応の２段階の工程が必要であり、複雑である。さらに、一般的に細胞と細胞外基質との相互作用は不明な場合が多く、適切な細胞接着性を付加するために導入すべき官能基が明らかでない場合も多い。このような場合では、細胞外基質を構成するタンパク質そのものを主成分とする光分解性ゲルが必要となる。

本発明は、光分解性ゲルの作製時に細胞を共存させることにより細胞を光分解性ゲルに包埋する際に、細胞傷害を生じさせることなく細胞を光分解性ゲルに包埋させることができ、なおかつタンパク質を主たる構成成分の一つとして含む光分解性ゲルを調製する方法、および、前記方法に用いる光開裂性架橋剤と化学修飾タンパク質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

[0010] 本発明者らは、光開裂性架橋剤として、dibenzocyclooctyne-terminated photocleavable tetraarm-polyethylene glycol (DBCO-PC-4armPEG)を新たに合成し、これとアジド修飾ゼラチンとを反応させることにより、DBCO基とアジド基の間で生じるクリック反応により、一段階の反応で細胞接着性の光分解性ゲルを作製できること、そして前記クリック反応に際し、細胞を共存させても、細胞傷害を生じないことを見出し、また、前記光分解性ゲルに光を照射することにより、光照射部位が特異的に分解できることを確認して、上記課題を解決した。

[0011] DBCO-PC-4armPEGの分子構造を図１Ａに示す。このDBCO-PC-4armPEGは以下の特徴を有する。

（１）基本骨格として多官能型ポリエチレングリコール(4armPEG；分子量10,000前後)を有している。これにより、比較的水になじみやすい。

（２）分子内に光開裂性を有するo-ニトロベンジル基を４つ有している。

（３）分子末端にアジド基とクリック反応が可能なdibenzocyclooctyne (DBCO)基を４つ有している。

前記DBCO-PC-4armPEGをアジド基で修飾された高分子と混合すると、DBCO基とアジド基がクリック架橋反応することで、複数の高分子がDBCO-PC-4armPEG

を介して架橋し、ゲル化する(図１Ｂ)。また、形成した架橋は、光照射によりDBCO-PC-4armPEG分子内のo-ニトロベンジル基部分が開裂する(実施例４)ことで、光開裂させることができ(図１Ｃ)、これによりゲルが分解する。

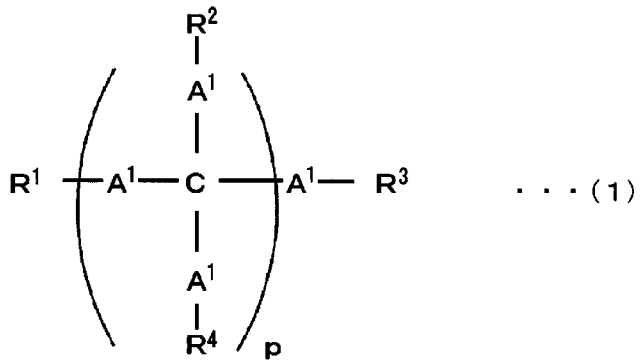
したがって、この“クリック架橋型光開裂性架橋剤の水溶液”と“アジド基を有する高分子の水溶液”を混ぜるだけでゲルを形成し(実施例５)、また、光照射によって前記ゲルを溶解させる(実施例６)ことが可能となる(図１Ｄ)。

[0012] 本実施形態に用い得るクリック架橋型光開裂性架橋剤（後述する、光分解性ハイドロゲルを構成する化合物Ａ）は、上述のDBCO-PC-4armPEGに限られるものではないが、上述の(１)水溶性の基本骨格、(２)複数の、光開裂性の基、(３)複数の、アジド基とクリック架橋反応する基という３つの特徴を有することが必要とされる。ここで、（１）基本骨格の水溶性とは、常温から０度の温度において水又は中性近傍の緩衝液に１０質量％以上溶解し得ることを指す。具体的な水溶性は、基本骨格となる化合物又は基本骨格を含む化合物Ａを1-100mg/mL程度の濃度でHEPESバッファー等の干渉液(pH7.0-7.6)中に分散させ、溶解し得るかを目視で検討する等で判断することができる。また、具体的に水溶性である基本骨格の構造としては、基本骨格の一部が水溶性基に置換されている等であってもよい。（２）光開裂性の基を有するとは、光のエネルギーにより分子が開裂又は解離可能な構造を有することを指す。このような光開裂性の基には、従来知られた光分解性の基を用いることができ、例としては光分解性のベンジル基が挙げられる。本実施形態では、ニトロベンジル基を用いる。（３）アジド基とクリック架橋反応するとは、アジド基と容易かつ特異的に架橋する反応を起こし得る基である。特にアジド基とアルキンの縮合が挙げられる。本実施形態では、具体的には、シクロアルキン又はアザシクロアルキン等がこのような性質を有し、本実施形態では、シクロオクチン環又はアザシクロオクチン環を有する構造が好ましく挙げられる。

[0013] 例えば、直鎖型ないし３分岐以上の分岐型のポリエチレングリコールから

なる主鎖と、前記主鎖の両末端ないし分岐末端に配置された光分解性のニトロベンジル基と、前記ニトロベンジル基の末端側に配置された、アジド基とクリック反応が可能なジベンゾシクロオクチン基などの基とを含むことを特徴とする光開裂性架橋剤であれば、このような特徴を有する光開裂性架橋剤として、本実施形態に使用可能である。主鎖の分岐数は、４分岐又は８分岐であってもよい。また、主鎖はネオペンチル骨格を有しているものでもよい。このような化合物としては、具体的には、例えば、以下の一般式(１)の化合物が挙げられる。

[0014] [化1]



・・・(1)

[0015] 一般式(１)中、R^1～R^4は、それぞれ独立して水素原子、$-L^1-Z^1-L^2-Z^2$基、$-O(CH_2CH_2O)_n-L^1-Z^1-L^2-Z^2$基、又は炭素原子数1～20の直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す。

複数のA^1は、連結基を表し、それぞれ独立に単結合、又は炭素原子数1～20の直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し、

前記アルキレン基中の１個又は非隣接の２個以上の$-CH_2-$はそれぞれ独立して-CH=CH-、-C≡C-、-O-、-CO-、-COO-、-OCO-、又はシクロヘキシレン基によって置換されていてもよい。前記$-CH_2-$の数は２～５０であってもよい。

ｐは0又は１以上の整数を表し、複数存在するR^2及びR^4は同一でも異なってもよい。ｐは０～５０であってもよい。

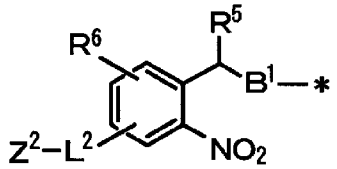
R^1～R^4のうちの少なくとも２つ、好ましくは３つ以上のRが$-L^1-Z^1-L^2-Z^2$基を

含み、２つ以上のRが-O(CH_2CH_2O)$_n$-L^1-Z^1-L^2-Z^2基であることが好ましい。Rが-L^1-Z^1-L^2-Z^2基を３つ以上含むことで、光開裂性架橋剤と高分子化合物との間に形成される架橋剤１分子当たりの架橋点が十分に多くなり、形成した光分解性ゲルの強度を高めることができる。

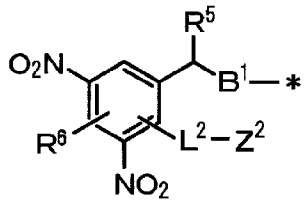
エチレングリコールの平均繰返し数ｎは、20から500の範囲にあり、30から250の範囲にあることがより好ましく、40から125の範囲にあることがさらに好ましい。エチレングリコールの繰返し数を上記範囲に設定することで、ゲルの水に対する溶解度を高めることができ、製造時および使用時において扱いが容易で、状態が均一な光分解性ゲルを得ることができる。エチレングリコールの上記平均繰り返し数は、ゲル濾過クロマトグラフィーや質量分析によって分子量を測定し、NMRによってR^1～R^4基の数を推定することで推定することができる。

Z^1は光分解性のベンジル基を表し、前記ベンジル基は、-L^2-Z^2基、及び、一つ又は複数のニトロ基をベンゼン環に有する。前記ニトロ基の数は１又は２であることが好ましい。このようなベンジル基としては、下記一般式(２)又は(３)で表される基が望ましい。

[0016] [化2]



・・・(２)



・・・(３)

[0017] 前記一般式(２)、(３)中、B^1は-B^2-C(=O)-(CH_2)$_m$-で表される基を表し、B^2は-NH-又は-O-を表し、ｍは0～5の整数を表し、5が好ましい。＊はL^1を介してエ

チレングリコールの酸素原子と結合する位置を表す。R^5は、水素原子又は炭素数1～6の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキル基を表し、炭素数1～6の直鎖状のアルキル基がより好ましく、メチル基が特に好ましい。R^6は、炭素数1～6の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキル基、又は、炭素数1～6の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルコキシ基を表し、炭素数1～6の直鎖状のアルコキシ基がより好ましく、メトキシ基が特に好ましい。

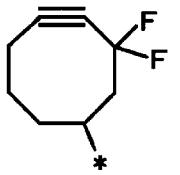
L^1は、単結合又は一般式(２)、(３)の化合物とエチレングリコール若しくはA^1とを結合させる反応形式に応じて導入されるリンカーを表す。L^1の例としては、

エステル結合、エーテル結合、アミド結合、カルボニル基、チオエステル結合、またはカルバメート結合、アルキル基等、およびこれらの組み合わせが挙げられる。

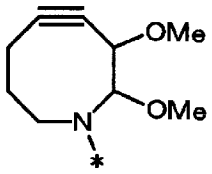
Z^2は、シクロオクチン環若しくはアザシクロオクチン環を有する基を表す。シクロオクチン環およびアゾシクロオクチン環中のアルキン基はアジド基に対する反応性が高く、銅触媒等の触媒を用いることなく、アジド基とクリック反応することができる。このようなシクロオクチン環若しくはアザシクロオクチン環を有する基としては、下記一般式(４)～(７)で表される基が望ましい。

[0018]

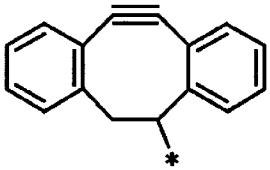
[化3]



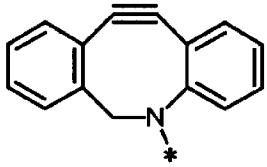
・・・(4)



・・・(5)



・・・(6)

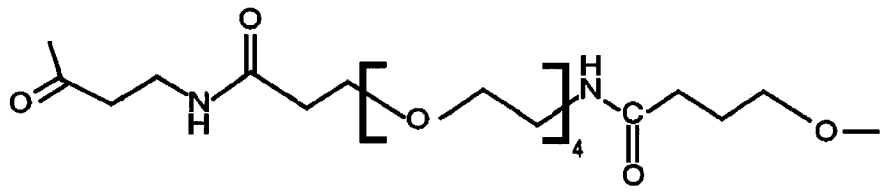


・・・(7)

[0019] 前記一般式(４)～(７)中、＊はリンカー基L^2との結合位置を表す。又、式中のＦはフッ素原子を、Ｍｅはメチル基を指す。

L^2は、Z^2基とZ^1基を連結するリンカーである。例えば、本願実施例で用いられるDBCO-PC-4armPEGにおいては、以下の式(８)で示される部分がL^2に相当する。

[0020] [化4]



・・・(8)

[0021] 上記式(８)の構造は、Z^1基とZ^2基を連結するにあたって用いた、それぞれZ^1基の構造とZ^2基の構造を有する原料化合物およびこれらの原料化合物を連結させる反応形式により定まったものである。例えば、式（８）のＣＯ－側がＺ^{1}基の＊に、Ｏ－側がＺ^{2}基の＊に結合してもよいが、又は、式（８）のＣＯ－側がＺ^{1}基の＊に、Ｏ－側がＺ^{2}基の＊に結合してもよい。これらの原料化合物及び反応形式は、原料化合物の入手しやすさ、及び、反応の容易さの観点から選択されたものであり、L^2の構造は、このような観点からZ^1基とZ^2基を連結するのに適した構造であればよく、上記式(８)の構造に限られるものではない。上述のL^1についても同様である。

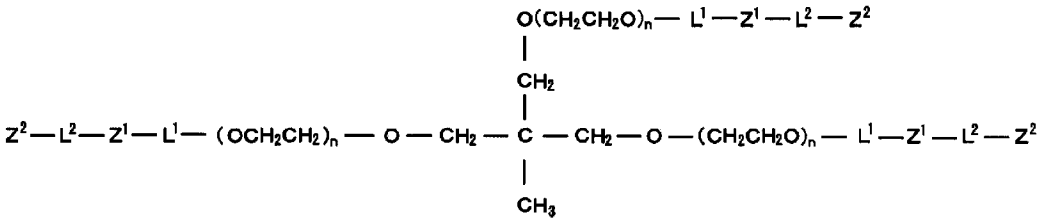
前記一般式(１)で表される化合物として、より具体的には、以下の一般式(９)～(１１)の化合物が、好ましい化合物として挙げられる。以下の一般式(９)～(１１)においては、各種パラメータは前記したものと同様の意味を有する。

[0022] [化5]

$$Z^2—L^2—Z^1—L^1—(OCH_2CH_2)_nO—L^1—Z^1—L^2—Z^2$$

・・・(9)

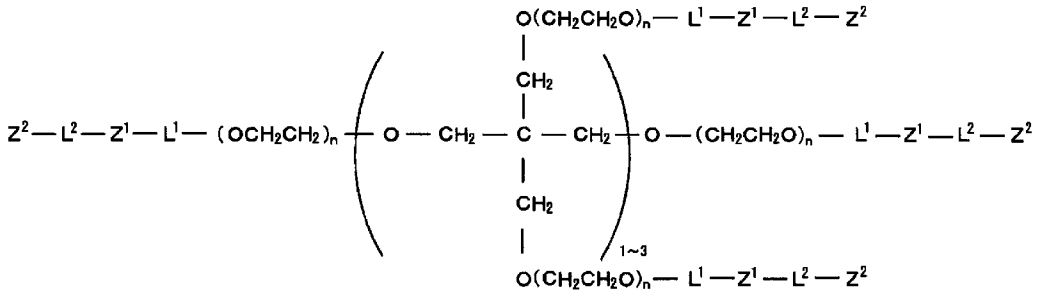
[0023] [化6]



・・・(１０)

[0024]

[化7]



・・・（１１）

[0025] 本実施形態のクリック型光開裂性架橋剤の光開裂性の評価は、例えば光開裂反応を光照射前後の吸光スペクトル変化によって評価することができる。本実施形態のクリック型光開裂性架橋剤の光開裂性を評価するためには、本実施形態の架橋剤をHEPES等の緩衝剤水溶液として調製し、紫外光源から長波長カットフィルター及び短波長カットフィルターを通して波長365nmの紫外光をエッペンチューブ内の溶液に照射することで行うことができる。吸収スペクトルは吸光光度計にて測定できる。さらに、上記測定は、300nm～700nmの範囲で測定できる。

[0026] （光分解性ハイドロゲル）

本実施形態の光分解性ハイドロゲルは、上述の光開裂性架橋剤（化合物Ａ）が、後述するアジド修飾高分子、好ましくはアジド修飾タンパク質（化合物Ｂ）によって、化合物Ｂが有するアジド基を介して修飾されている。具体的には、下記化合物Ａのシクロオクチン環又はアザシクロオクチン環に含まれるアルキン基が下記化合物Ｂによって、前記化合物Ｂが有するアジド基を介して修飾されている。アルキン基全体に対する修飾率は、１０～１００％であることが好ましい。このような光分解性ハイドロゲルは、例としては、光開裂性架橋剤の有する前記アルキン基と、下記アジド修飾タンパク質のアジド基とが縮合する反応によって得られるものである。

光分解性ハイドロゲル中の化合物Ａ及び化合物Ｂの含有量は、それぞれ０

～２．５ｍＭの範囲内で、光分解性ハイドロゲル中に細胞を包埋した際の細胞生存率（細胞生残率）が実質的に低下することはない。ここで実質的に低下しないとは、包埋する前と後で細胞生存率が８０％以上、好ましくは９０％以上であることを指す。しかし、目安として、光分解性ハイドロゲル中のモル濃度として化合物Ａは０．６～２．５ｍＭ、化合物Ｂは１２．５～２５．０ mg/mLであることが好ましい。なお、前記の細胞生残率は、顕微鏡を用いて細胞を培養したゲル中の単位体積（0.005～0.050 ｍＬ）あたりの生細胞及び死細胞の数（合計１００細胞以上）を計数することで測定できる。

[0027] アジド修飾タンパク質は、タンパク質を主鎖とし、前記主鎖のリジンおよびアルギニン側鎖に存在するアミノ基および主鎖末端に存在するアミノ基の少なくとも一部がアジド基で修飾されている化合物である。このタンパク質は、細胞接着性を有するタンパク質であることが好ましい。細胞接着性を有するとは、タンパク質が細胞外マトリックスとして細胞が付着しやすい性質、すなわち細胞接着活性部位であるアルギニンーグリシンーアスパラギン酸（RGD）を多く含むことをいう。このようなタンパク質の具体例としては、ゼラチン、コラーゲン、ラミニン又はマトリゲル等が挙げられる。本実施形態では、タンパク質としてゼラチンが好ましく挙げられる。本実施形態のアジド修飾タンパク質は、ゼラチンがアジドで修飾されたアジド修飾ゼラチンが好ましい。アジド修飾タンパク質の分子量は特に限定されず、適宜選択してよいが、目安として10^4～10^5のものを用いることができる。

[0028] アジド修飾ゼラチン(以下、Azide-gelatinと表記することもある)の分子構造の模式図を図１Ａに示す。Azide-gelatin は、主鎖であるゼラチンの末端、リジンおよびアルギニン由来のアミノ基にアジド基が導入されている。

本実施形態に用い得るアジド修飾高分子は、上記Azide-gelatinに限られるものではなく、分子内にアジド基を導入する基を複数有する高分子であれば、本実施形態に使用可能である。このような高分子としては、ゼラチン、コラーゲン、ラミニンなどの細胞接着性のタンパク質およびこれらのタンパク質を主成分とするマトリゲルなどの細胞培養基材が好ましい。

これら高分子へのアジド基の導入は、例えば、後述の実施例１に示すAzide-PEG_4－NHSなどの修飾試薬を用いて、高分子中のアミノ基に対しリンカーを介してアジド基を導入する方法などにより行われるが、これに限られるものではない。

このようなアジド修飾高分子の一例として、アジド修飾マトリゲル(Azide-matrigel)を挙げることができる(実施例１)。Azide-matrigelは、Corning社のマトリゲル(商品名：Corning Matrigel 基底膜マトリックス)を透析して得られる基底膜成分(Corning社によるとラミニンおよびコラーゲンが主成分とされている)の分子鎖の末端、リジンおよびアルギニン由来のアミノ基にアジド基が導入されている。

[0029] 高分子に対するアジド修飾試薬の使用量を適宜調節することにより、高分子のアジド修飾度を調節することができる。例えば、Azide-gelatin およびAzide-matrigelについては、ゼラチンおよびマトリゲルに対するAzide-PEG_4－NHSの使用量を後述の表１、表２に示すように調整することにより、アジド基の導入率を、ゼラチンおよびマトリゲル中のアミノ基の数の修飾率として10％から100％までの範囲で調節可能である。

また、アジド基の導入により、多くの高分子で水溶性が向上し(実施例２)、これにより、クリック架橋型光開裂性架橋剤との架橋反応を、両者の水溶液を混合するという簡便な方法で実施することが可能となる。

例えば、DBCO-PC-4armPEGの水溶液とAzide-gelatinもしくはAzide-matrigelの水溶液とを混合することで、常温で数分から数十分の反応時間で光分解性ゲルを調製することが可能である(実施例５、及び、図４)。クリック反応によるゲルの形成が有効に行われたかの確認は、ゾル－ゲル転移を確認するための従来知られた方法で行うことができ、例えば、レオロジー測定により行うことができる。本実施形態では、レオメーター等によって貯蔵弾性率（Ｇ´）及び損失弾性率（Ｇ´´）を測定し、Ｇ´がＧ´´を上回った際にゲル化が起こったことを確認することができる。この測定は、上述のAzide-GelatinおよびDBCO-PC-4armPEGからなる光分解性ハイドロゲルのゲル化を測定する

際には、これらの化合物をDBCO-PC-4armPEGが0.6～2.3 mM、Azide-gelatinが12.5～25.0 mg/mLの濃度となるように等量ずつ混合し、0.5 mLの混合溶液を使用して、25°Cの恒温条件下で、30秒間隔の測定を１時間行うことが好ましい。また、本実施形態の光分解性ハイドロゲルは、Ｇ´が0.01～1000 Pa、Ｇ´´が0.01～100の範囲にあることが好ましい。

本実施形態の光分解性ハイドロゲルは、細胞培養に用いられる他の成分を含んでいてもよい。例えば、細胞培地に含まれる成分を含んでいてもよい。また、目的とする細胞の増殖に適した細胞増殖因子を含んでいてもよい。細胞増殖因子には、例えばトランスフォーミング増殖因子(TG)、上皮細胞増殖因子(EGF)、インスリン様成長因子(IGF)、又は線維芽細胞増殖因子(FGF)といった各種増殖因子が挙げられる。細胞増殖因子の含有率は光分解性ハイドロゲルの全体質量あたり0～10 質量%含有することができる。

[0030] 本実施形態において採用されたクリック型反応は、反応に際して、系に存在する細胞に対し細胞傷害を及ぼすことがない(実施例７)。

これに対し、ゲルを作製するために従来技術で採用されているラジカル重合法やアミド縮合法は、細胞を共存させた場合、細胞傷害性を示すことが知られており、また、本発明者らによる先行出願(特許文献１～３)において用いられている、高分子上のアミノ基若しくはヒドロキシ基と架橋を形成する基としてＮ－ヒドロキシコハク酸イミド誘導体基を有する活性エステル型の架橋剤を用いるゲル化法においても、架橋剤の濃度を高めると細胞傷害性を示すことが確認された(実施例７)。

[0031] また、上記活性エステル型架橋剤は、原理的には水溶液中で様々なアミノ基と反応する。一方、本実施形態のクリック型架橋剤において利用するDBCO基とアジド基の反応については、これらの反応基が天然のタンパク質や糖、核酸等の生体分子には存在せず、生体分子に存在する他の官能基との反応性が低いことが知られている(非特許文献８)。

すなわち、ハイドロゲルを形成する際に、活性エステル型架橋剤は、培地成分や細胞増殖因子といった生理活性物質を予め混合した状態では、ゲルを

形成する高分子のアミノ基のみならず、培地成分などの有するアミノ基とも反応することになる。一方、本実施形態のクリック型架橋剤の場合は、培地成分や細胞増殖因子といった生理活性物質を予め混合した状態でも、架橋剤とゲルを形成する高分子のアジド基のみと反応するので、このような好ましくない副反応を回避できるため、ハイドロゲルに様々な生理活性因子を予め混合できるという利点がある。

例えば、本実施形態のクリック型光開裂性架橋剤とAzide-gelatinとを用いゲルを形成させる系にアジド修飾されていないマトリゲルを添加しても、前記マトリゲルを添加しない系と同様にハイドロゲルが形成され(実施例５)、前記ゲルは光照射により分解される(実施例６)。

一方、活性エステル型架橋剤を用いてハイドロゲルを形成する際に、同濃度でマトリゲルを添加した場合、ハイドロゲルを形成できないことが確認されている。これは、ハイドロゲル形成時に、活性エステル基が、マトリゲルに含まれるタンパク質やアミノ酸等の成分のアミノ基と反応してしまうことにより、ハイドロゲルを形成するために必要な架橋反応が阻害され、ハイドロゲルが形成できないためと考えられる。

[0032] 本実施形態のクリック型光開裂性架橋剤と、マトリゲルを添加して形成する４種類のハイドロゲル(表７)、PD-gelatin(25)_M+、PD-gelatin(50)_M+、PD-gelatin(75)_M+、PD-gelatin(100)_M+（前記ＰＤはポリデキストロース、Ｍ＋は金属元素を指す）へDU145細胞およびHeLa細胞を内包させ、細胞生存率を評価した結果、いずれの細胞においても、広い架橋剤の濃度範囲において細胞の高い増殖性が確認された。ゆえに、本実施形態のクリック型光開裂性架橋剤が、マトリゲルを添加した組成においても細胞傷害性の低い優れた架橋剤であることが確認された(実施例７及び図７Ｂ)。また、同手法にて形成したマトリゲル添加ハイドロゲルは、マトリゲルを添加しないハイドロゲルと比べて、細胞がより顕著な増殖を示すことも同様に確認された(実施例８及び図８Ａ、図８Ｂ)。

[0033] なお、非特許文献７には、本実施形態と同様にクリック反応を利用するゲ

ル作成法が報告されているが、この方法は、（１）「“クリック架橋型架橋剤”と“細胞非接着性低分子型光分解性ポリペプチド”から光分解性ゲルを形成」した後に、細胞接着機能を付与するため、（２）「“ポリペプチド内オレフィン基(-C=C)”と“細胞接着性物質の有するチオール基(-SH)”のラジカルカップリング反応」を利用して細胞接着性RGD（Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ）基を導入している。すなわち、非特許文献７の方法は、細胞接着性の光分解性ゲルを得るためにクリック反応によるゲルの形成とラジカルを利用したオレフィン-チオールカップリング反応の２段階の工程があり複雑である。このゲルに細胞を内包させるためには、細胞の存在下でこれら２つの反応を行う必要がある。また、得られた三次元培養物における細胞増殖率は、本実施形態のものよりも低い。例えば、非特許文献７のFigure 6cではゲルが分解した領域で細胞が著しく増殖しているが、ゲルの中では細胞が増殖していない様子が観察されている。一方、本実施形態のアジド修飾ゼラチンとDBCO-PC-4armPEGによって構成される光分解性ゲルにマトリゲルを添加した系では、広い架橋剤の濃度範囲において包埋された細胞が高い増殖性を示すことが確認されている(実施例７及び図７Ｂ)。

[0034] （培養器具）

本実施形態の光分解性ハイドロゲルはまた、培養器具に用いることができる。例えば、本実施形態の光分解性ハイドロゲルを容器の底面に形成した培養容器に用いることができる。培養容器は、ディッシュ、プレート、又はフラスコ等の従来知られたものをいずれも用いることができる。底面とは、前記培養容器の有するいずれかの平面の、容器内側における面を指す。この培養器具の製造方法としては、上述の光分解性ハイドロゲルを容器の底面に形成する方法であり、例えば、光分解性ハイドロゲルを溶解した水溶液を容器の底面に配置（塗布）した後に乾燥させることによって光分解性ハイドロゲルを前記底面にコーティングする方法など、従来知られたコーティング手段を用いることができる。本実施形態では、化合物Ａ及びＢを目安として25～200ｍｇ／ｍＬとなるよう緩衝液に溶解させる。例えば、Azide-gelatinを25～

400ｍｇ／ｍＬ、DBCO-PC-4armPEGを0.5～40ｍＭとなるようＨＥＰＥＳバッファー（ｐＨ７－８）に溶解することが好ましい。この化合物Ａ及びＢの溶液を混合し、厚みが５０－１０００μｍ程度となるよう培養容器に充填し、室温（およそ１８－３０℃）付近で０．２５～６時間程度インキュベートすることで培養容器にゲルを形成する。また、この培養器具に包埋培養あるいはサンドイッチ包埋培養の方法を用いて細胞を導入することができる。好ましい細胞の導入量は、光分解性ハイドロゲルの容積あたり10^3～10^7cells/mLである。

[0035]（組織体形成方法）

本実施形態の光分解性ハイドロゲルはまた、組織体形成方法に用いることができる。例えば、前記光分解性ゲルを用い、以下の工程を含む組織体形成方法を行うことができる。

（Ｉ）細胞を内包させた前記光分解性ハイドロゲルを形成する工程、

（ＩＩ）光照射によって前記光分解性ハイドロゲルの構造を規定する工程、及び、

（ＩＩＩ）前記細胞を培養して組織体を形成する工程。

（Ｉ）の細胞を内包させた前記光分解性ハイドロゲルを形成する工程では、まず化合物Ａ及びＢをそれぞれ緩衝液に溶解する。本実施形態では、化合物Ａとしてアジド修飾ゼラチン(Azide-gelatin)を25～400ｍｇ／ｍＬ、DBCO-PC-4armPEGを0.5～40ｍＭとなるよう、ＨＥＰＥＳバッファー（ｐＨ７－８）に溶解することが好ましい。このうち化合物Ｂの溶液に、培養した細胞を目安として10^3～10^7cells/mLの濃度で分散させる。本実施形態では、培養細胞液を0.5-3.0×10^5cells/mLの濃度で分散させている。次いで、前記細胞を分散させた化合物Ｂの溶液に化合物Ａの緩衝液を加え、ゲルを調整する。本実施形態では、化合物Ａ及びＢの溶液を等量混合し、スペーサーを使用してゲルを作成するための容器を形成し、厚みが50-300μｍとなるよう前記混合溶液を調整して、室温で０．２５－６時間程度インキュベートし、光分解性ハイドロゲルを調整する。

前記（ＩＩ）の光分解性ハイドロゲルの構造を規定する工程では、前記光照射は0.25～3.0Jのエネルギー、具体的には40～350 mW/ cm^{2}の光強度及び1～75秒の光を照射して、光分解性ハイドロゲルを分解させる。この際、前記条件の光を照射することで、細胞の死滅を最小限としたまま、光分解性ハイドロゲルを分解して、マイクロパターンに応じたゲルの構造を形成することが可能である。その後、0.01%Coomassie Brilliant Blueにより、前記光分解性ハイドロゲルの構造を特定する。光分解性ハイドロゲルの構造の特定において、本実施形態では、顕微鏡にて光分解性ハイドロゲルの構造を観察し、光分解性ハイドロゲル内に形成されたマイクロパターンから、光を照射した部位のハイドロゲル構造すなわち分解の状態を観察する。

前記（ＩＩＩ）の細胞を培養して組織体を形成する工程では、前記光分解性ハイドロゲルに、細胞に適した培養液を添加し、細胞によって最適な温度及び時間において細胞培養する。例えば、本実施形態のHeLa細胞およびDU145細胞にはDMEM等の培養液を好適に用い、３５～３９℃（最も好ましくはおよそ３７℃）で１２～４８時間（最も好ましくはおよそ２４時間）で培養している。

[0036] （細胞分離方法）

本実施形態の光分解性ハイドロゲルはまた、細胞分離方法に用いることができる。例えば、前記光分解性ゲルを用い、以下の工程を含む細胞分離方法を行うことができる。

（I）細胞を内包させた前記光分解性ハイドロゲルを形成する工程、

（II）光照射によって前記細胞のうち特定の細胞を含む領域の前記光分解性ハイドロゲルを溶解する工程、及び、

（III）溶解した前記光分解性ハイドロゲルを洗浄し、溶解した領域の前記特定の細胞を回収する工程。

（Ｉ）の細胞を内包させた前記光分解性ハイドロゲルを形成する工程では、まず化合物Ａ及びＢをそれぞれ緩衝液に溶解する。本実施形態では、化合物Ａとしてアジド修飾ゼラチン(Azide-gelatin)を12.5～50ｍｇ／ｍＬ、DBCO

-PC-4armPEGを0.5～5.0 ｍＭとなるよう、ＨＥＰＥＳバッファー（ｐＨ７－８）に溶解することが好ましい。このうち化合物Ｂの溶液に、培養した細胞を目安として10^3～10^7 cells/mLの濃度で分散させる。本実施形態では、培養細胞液を0.5-3.0×10^5cells/mLの濃度で分散させている。次いで、前記細胞を分散させた化合物Ｂの溶液に化合物Ａの緩衝液を加え、ゲルを調整する。本実施形態では、化合物Ａ及びＢの溶液を等量混合し、スペーサーを使用してゲルを作成するための容器を形成し、厚みが50-300μｍとなるよう前記混合溶液を調整して、室温でＯ．２５－６時間程度インキュベートし、光分解性ハイドロゲルを調整する。

前記（ＩＩ）の光分解性ハイドロゲルを溶解する工程では、前記光照射は0.25～3.0Jのエネルギー、具体的には具体的には40～350 mW/ cm^2の光強度及び1～75秒の光を照射して、光分解性ハイドロゲルを分解させる。この際、前記条件の光を照射することで、細胞を死滅させることなく、光分解性ハイドロゲルを分解（溶解）して、マイクロパターンに応じたゲルの構造を形成することが可能である。

前記（ＩＩＩ）の溶解した前記光分解性ハイドロゲルから、溶解した領域の前記特定の細胞を回収する工程では、ピペットを用いて細胞培養液を吸引、あるいは細胞培養液を用いて1～10回ピペッティング後に吸引することにより、溶解した領域の前記特定の細胞を回収する。

[0037] 本出願は、具体的には、以下の発明を提供する。

〈１〉下記化合物Ａのシクロオクチン環又はアザシクロオクチン環に含まれるアルキン基と下記化合物Ｂのアジド基が縮合して得られる、光分解性ハイドロゲル。

（化合物Ａ）

直鎖型ないし３分岐以上の分岐型の、ポリエチレングリコール構造を含む主鎖と、前記主鎖の両末端ないし分岐末端に配置された光分解性のニトロベンジル基と、前記ニトロベンジル基の末端側に配置されたシクロオクチン環又はアザシクロオクチン環を有する基とを含むことを特徴とする、光開裂性

架橋剤。

（化合物Ｂ）

タンパク質を主鎖とし、前記主鎖のリジンおよびアルギニン側鎖に存在するアミノ基および主鎖末端に存在するアミノ基の少なくとも一部がアジド基で修飾されていることを特徴とする、アジド修飾タンパク質。

〈２〉前記化合物Ｂのタンパク質が、ゼラチン、コラーゲン、ラミニン、マトリゲルといった細胞接着性のタンパク質である、〈１〉に記載の光分解性ハイドロゲル。

〈３〉前記化合物Ａのポリエチレングリコール構造のエチレングリコール単位の平均繰り返し数が30から250の範囲にある、〈１〉又は〈２〉に記載の光分解性ハイドロゲル。

〈４〉前記化合物Ａの分岐型の主鎖の分岐数が４分岐もしくは８分岐であることを特徴とする、〈１〉～〈３〉のいずれかに記載の光分解性ハイドロゲル。

〈５〉前記化合物Ａの分岐型の主鎖が中心にネオペンチル骨格を有することを特徴とする、〈１〉～〈４〉のいずれかに記載の光分解性ハイドロゲル

〈６〉シクロオクチン環又はアザシクロオクチン環を有する基がアザジベンゾシクロオクチン(DBCO)基であることを特徴とする、〈１〉～〈５〉のいずれかに記載の光分解性ハイドロゲル。

〈７〉前記光分解性ハイドロゲルが細胞増殖因子を含むことを特徴とする、〈１〉～〈６〉のいずれかに記載の光分解性ハイドロゲル。

〈８〉〈１〉～〈７〉のいずれかに記載の光分解性ハイドロゲルを培養容器の底面に形成していることを特徴とする、培養器具。

〈９〉〈１〉～〈７〉のいずれかに記載の光分解性ゲルを用い、以下の工程を含む、組織体形成方法。

（I）細胞を内包させた光分解性ゲルを形成する工程、

（II）光照射によってゲルの構造を規定する工程、

（III）細胞を培養して組織体を形成する工程。

〈１０〉〈１〉～〈７〉のいずれかに記載の光分解性ゲルを用い、以下の工程を含む、細胞分離方法。

（I）細胞を内包させた光分解性ゲルを形成する工程、

（II）光照射によって特定の細胞を含む領域のゲルを溶解する工程、

（III）溶解したゲルを洗浄し、溶解した領域の細胞を回収する工程。

[0038] 本発明の実施態様はまた、以下の側面を有する。

〈１〉 下記化合物Ａのシクロオクチン環又はアザシクロオクチン環に含まれるアルキン基が下記化合物Ｂによって、前記化合物Ｂが有するアジド基を介して修飾されている、光分解性ハイドロゲル。

（化合物Ａ）

直鎖型ないし３分岐以上の分岐型の、ポリエチレングリコール構造を含む主鎖と、前記主鎖の両末端ないし分岐末端に配置された光分解性のニトロベンジル基と、前記ニトロベンジル基の末端側に配置されたシクロオクチン環又はアザシクロオクチン環を有する基とを含む光開裂性架橋剤である化合物。

（化合物Ｂ）

タンパク質を主鎖とし、前記主鎖のリジンおよびアルギニン側鎖に存在するアミノ基および主鎖末端に存在するアミノ基の少なくとも一部がアジド基で修飾されているアジド修飾タンパク質である化合物。

〈２〉 前記化合物Ｂのタンパク質が、ゼラチン、コラーゲン、ラミニン及びマトリゲルから選ばれる１以上の細胞接着性のタンパク質を含む、〈１〉に記載の光分解性ハイドロゲル。

〈３〉 前記化合物Ａのポリエチレングリコール構造のエチレングリコール単位の平均繰り返し数が30から250の範囲にある、〈１〉又は〈２〉に記載の光分解性ハイドロゲル。

〈４〉 前記化合物Ａの分岐型の主鎖の分岐数が４分岐もしくは８分岐である、〈１〉～〈３〉のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲル。

〈５〉 前記化合物Ａの分岐型の主鎖が中心にネオペンチル骨格を有する、

〈１〉～〈４〉のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲル。

〈６〉　前記化合物Ａのシクロオクチン環又はアザシクロオクチン環を有する基がアザジベンゾシクロオクチン(DBCO)基である、〈１〉～〈５〉のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲル。

〈７〉　前記光分解性ハイドロゲルが細胞増殖因子を含む、請求項〈１〉～〈６〉のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲル。

〈８〉　前記アルキン基のアジド基を介した修飾の修飾率が、前記アルキン基の数に対して10～100％である、〈１〉～〈８〉のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲル。

〈９〉　前記化合物Ｂは、前記アジド修飾タンパク質の前記アミノ基のアジド修飾率が、前記アミノ基の数に対して１０～１００％である、〈１〉～〈８〉のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲル。

〈１０〉　〈１〉～〈９〉のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲルを培養容器の底面に形成している、培養器具。

〈１１〉　〈１〉～〈９〉のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲルを用い、以下の工程を含む、組織体形成方法。

（Ｉ）細胞を内包させた光分解性ハイドロゲルを形成する工程、

（II）光照射によって前記光分解性ハイドロゲルの構造を規定する工程、及び、

（III）細胞を培養して組織体を形成する工程。

〈１２〉　前記光分解性ハイドロゲルゲルの構造を規定する工程では、前記光照射は300～500 nmの波長の光を照射し、CBB染色、蛍光染色あるいは顕微鏡観察により前記光分解性ハイドロゲルの構造を特定する、〈１１〉の組織体形成方法。

〈１３〉　〈１〉～〈９〉のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲルを用い、以下の工程を含む、細胞分離方法。

（Ｉ）細胞を内包させた光分解性ハイドロゲルを形成する工程、

（II）光照射によって特定の細胞を含む領域の前記光分解性ハイドロゲルを

溶解する工程、及び、

（III）溶解した前記光分解性ハイドロゲルを洗浄し、溶解した領域の細胞を回収する工程。

〈１４〉　前記光分解性ハイドロゲルを溶解する工程では、前記光照射は0.005～1.0 W/ cm^{2}の光強度の光を照射し、ピペッティングにより前記光分解性ハイドロゲルを溶解する、〈１３〉の細胞分離方法。

発明の効果

[0039] 本発明の一実施形態によれば、架橋剤を用いて高分子化合物を架橋することによりゲルを形成する際に、架橋剤として本実施形態のクリック架橋型光開裂性架橋剤を用い、高分子としてアジド修飾高分子を用いることにより、一段階の反応で、光分解性ゲルを作製することができる。

本実施形態のクリック架橋型光開裂性架橋剤と高分子上のアジド基の反応は細胞傷害性が少ないので、上記光分解性ゲルの形成を細胞の存在下に行うことができ、これにより、作製したゲルの内部に三次元的に分散し内包された細胞を含むゲルを作製することができる。前記ゲル中の細胞は生存率が高く、前記ゲル中で細胞を培養することにより、細胞の三次元培養物を得ることが出る。

前記細胞の三次元培養物に光照射してゲルを分解することにより、三次元培養された細胞を取り出すことができる。光照射を特定の部位のみに行うことにより、前記特定部位の細胞のみを取り出すこともできる。

本実施形態のクリック架橋型光開裂性架橋剤を用いた光分解性ゲルを用い、ゲルに内包された細胞を培養することにより、生体内の三次元構造を模倣した組織体を人工的に再構成することができ、また、これを適宜取り出すことで、より信頼性の高いアッセイなどに利用することができる。

図面の簡単な説明

[0040] [図1A]クリック反応による架橋形成およびハイドロゲル形成と光照射による分解の模式図。 クリック架橋型光開裂性架橋剤DBCO-PC-4armPEGおよびアジド修飾ゼラチンの分子構造の模式図。 R_2がゼラチン分子の主鎖を示す。

[図1B]DBCO-PC-4armPEGとアジド修飾ゼラチンとの間のクリック反応による架橋形成。R_1がDBCO-PC-4armPEGの主鎖側の部位を示す。

[図1C]架橋部位の光照射による分解の模式図。R_3がDBCO-PC-4armPEGの主鎖側由来の部位を示し、R_4がアジド修飾ゼラチンおよびDBCO-PC-4armPEGの側鎖側由来の部位を示す。

[図1D]DBCO-PC-4armPEGとアジド修飾ゼラチンとの反応によるハイドロゲル形成と光照射による分解の模式図。

[図1E]DBCO-PC-4armPEGの光照射による吸収スペクトル変化。

[図2]ゼラチンとDBCO-sulfo-NHSを37℃で反応させ２時間後の様子を示す写真。左から順にゼラチン、DBCO-gelatin(25)、DBCO-gelatin(50)、DBCO-gelatin(75)、およびDBCO-gelatin(100)の反応２時間後の様子。

[図3A]合成したクリック架橋型光開裂性架橋剤DBCO-PC-4armPEGのNMRスペクトル図。DBCO-PC-4armPEGの^{1}H-NMRスペクトル、下方にピーク積分値を表示。

[図3B]DBCO-PC-4armPEG(上)とNHS-PC-4armPEG(下)の^{1}H-NMRスペクトルの対比図。

[図4A]クリック反応によるゲル形成の際の貯蔵弾性率(G′)および損失弾性率(G″)の経時変化を示す図。G′がG″を超えた点(crossover point, CP)をゲル化が起こった時点とした。PD-gelatin(25)のゲルを調製する際の弾性率変化を示す。各ゲルの組成は表７に示す。

[図4B]図４Ａ同様にPD-gelatin(50)を示す。

[図4C]図４Ａ同様にPD-gelatin(75)を示す。

[図4D]図４Ａ同様にPD-gelatin(100)を示す。

[図5A]マイクロパターン光照射による光分解性ゲルのマイクロパターン分解の様子を示す写真。PD-gelatin(25)のゲルを光分解した際の様子を示す。濃い色の部分はCBBで染色されているハイドロゲルを示し、薄い色の部分は分解した部分。各ゲルの組成は表７に示す。縮尺は図５Ｄ同様。

[図5B]図５Ａ同様にPD-gelatin(50)のゲルを光分解した際の様子を示す。縮尺は図５Ｄ同様。

[図5C]図５Ａ同様にPD-gelatin(75)のゲルを光分解した際の様子を示す。縮尺は図５Ｄ同様。

[図5D]図５Ａ同様にPD-gelatin(100)のゲルを光分解した際の様子を示す。スケールバーは200μm。

[図5E]照射パターンのイメージ。照射パターンイメージの黒色部分が照射像となる。

[図6A]クリック型架橋剤を用い、マトリゲルを添加して光分解性ゲルを作製した際のマイクロパターン光照射によるマイクロパターン分解の様子を示す写真。PD-gelatin(25)_M+のゲルを分解した際の様子を示す。濃い色の部分はCBBで染色されているハイドロゲルを示し、薄い色の部分は分解した部分。各ゲルの組成は表７に示す。縮尺は図６Ｄ同様。

[図6B]図６Ａ同様にPD-gelatin(50)_M+のゲルを分解した際の様子を示す。縮尺は図６Ｄ同様。

[図6C]図６Ａ同様にPD-gelatin(75)_M+のゲルを分解した際の様子を示す。縮尺は図６Ｄ同様。

[図6D]図６Ａ同様にPD-gelatin(100)_M+のゲルを分解した際の様子を示す。スケールバーは200μm。

[図7A]クリック型架橋剤を用いDU145細胞およびHeLa細胞を光分解性ゲルに包埋した際の、架橋剤濃度と細胞生存率の関係を示す図。クリック型架橋剤を利用した場合の各ゲルの組成(Gelatin、PD-gelatin(25)、PD-gelatin(50)、PD-gelatin(75),PD-gelatin-gelatin(25)_M+、PD-gelatin(50)_M+、PD-gelatin(75)_M+、およびPD-gelatin(100)_M+)は表７に示す。また、活性エステル型架橋剤を利用した場合は、ゼラチン濃度を25mg/Lの濃度で活性エステル型架橋剤と混合し、光分解性ゲルを調製した。

[図7B]クリック型架橋剤を用い、かつ、マトリゲルを添加して図７Ａと同様に測定した架橋剤濃度と細胞生存率の関係を示す図。

[図7C]活性エステル型架橋剤を用いて図７Ａと同様に測定した架橋剤濃度と細胞生存率の関係を示す図。

[図8A]光分解性ゲルに内包されたHeLa細胞の増殖および形態変化の様子を示す写真。クリック型架橋剤を用いた場合の様子を示す。図中縦軸の25、50、75、100の数字はそれぞれ、細胞を内包したゲルが表７のPD-gelatin(25)、PD-gelatin(50)、PD-gelatin(75)、およびPD-gelatin(100)のゲルであることを示す。スケールバーは100μm。

[図8B]光分解性ゲルに内包されたHeLa細胞の増殖および形態変化の様子を示す写真。クリック型架橋剤を用い、かつ、マトリゲルを添加した場合の様子を示す。図中縦軸の25、50、75、100の数字はそれぞれ、表７のPD-gelatin(25)_M+、PD-gelatin(50)_M+、PD-gelatin(75)_M+、およびPD-gelatin(100)_M+であることを示す。スケールバーは100μm。

発明を実施するための形態

実施例

[0041] 以下、本実施形態を実施例に基づいてさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によって何ら制限されず、本発明の要旨を逸脱しない範囲で各種の材料変更、設計変更、設定調整等が可能であることは言うまでもない。

なお、以下の実施例においては、以下の材料を用いた。

ゼラチン(G2500, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO), Azide-PEG$_4$-NHS ester (Click Chemistry Tools LLC. Scottsdale, AZ)、DBCO-PEG$_4$-amine (Click Chemistry Tools LLC.)、DBCO-sulfo-NHS (Click Chemistry Tools LLC.)、マトリゲル(Corning, Tewksbury, MA)を購入し使用した。4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES、Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)を300mMの濃度でMilliQ水(Millipore, Billerica, USA)に溶解し、0.1Nの水酸化ナトリウム水溶液でpHを7.4に調整してHEPESバッファーとした。調製した溶液は口径0.2μmのフィルター (Millipore Co., Billerica, MA)を使って濾過した後に使用した。

[0042] (実施例１．アジド修飾ゼラチンおよびアジド修飾マトリゲルの合成)

以下の手順で、ゼラチンおよびマトリゲルをクリック反応にてゲル化させるために、アジド修飾ゼラチンおよびアジド修飾マトリゲルを合成した(式１

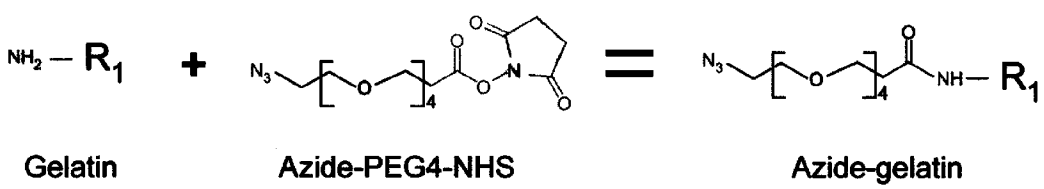
)。

ゼラチンは、細胞接着性タンパク質であるコラーゲンを酸、アルカリ、熱などで変性させることで水溶性を高くした高分子であり、変性してはいるが細胞接着性を維持しており、コラーゲンと同様に細胞培養の機材として利用される。コラーゲンと比べて安価であるため、培養ディッシュのコーティングにも頻繁に利用される。

アジド修飾ゼラチンはゼラチンとAzide-PEG_4-NHS ester を表１に示す比率で混合することで合成した。合成スキームを式１に示す。ゼラチンはpH7.4の300 mM HEPESバッファー、Azide-PEG_4-NHS esterは10mMフタル酸バッファー(pH4.0)に溶解して混合し、37℃で2時間攪拌した。反応液を透析膜(分画分子量 6,000-8,000, Spectrum laboratories, Inc., Rancho Domingues, CA)内に入れ、MilliQ水(5L)に対して24時間透析した。MilliQ水は30分、1、3, 5, 7時間後に計5回交換した。透析したサンプルを凍結乾燥機(FDS-1000, Tokyo RIKAKIKAI Co., LTD., Tokyo, Japan)を用いて乾燥し、アジド修飾ゼラチンを得た。収率は71から82%の間であった。得られたアジド修飾ゼラチンは37℃でpH7.4の300mM HEPESに溶解し、4℃で保存した。アジド修飾ゼラチンの反応性アミノ基に対するアジド修飾量は非特許文献９に記載の反応性アミノ基の蛍光ラベル化法を用いてfluorescamineを用いて定量した。

[0043] 式１．ゼラチンとAzide-PEG_4-NHSとの反応による アジド修飾ゼラチンの合成の模式図

[化8]



[0044] 表１．アジド修飾ゼラチンを合成する際のゼラチンとAzide-PEG_4-NHSの混合濃度

[表1]

Type of azide-modified gelatin	合成時の仕込み濃度		ゼラチン中のアミノ基に対するアジド基の比率[a] Azide/-NH_2 (mol%)[a]	ゼラチン中の反応性アミノ基のアジド化修飾率[b] (mol%)
	ゼラチン (mg/mL)	Azide-PEG_4-NHS (mM)		
Gelatin	25	0	0	0
Azide-gelatin (25)		4.7	25	37
Azide-gelatin (50)		9.4	50	67
Azide-gelatin (75)		14.1	75	87
Azide-gelatin (100)		18.8	100	98

[a]ゼラチン中のアミノ基の含有量は非特許文献１０の情報に基づいて計算した

。

[b]アジド修飾量は非特許文献９に記載の方法を用いてfluorescamineを用いて定量した。

[0045] マトリゲルはCorning社より販売されている細胞培養基材であり、その主成分であるラミニン、コラーゲンといった細胞外基質に加えて、トランスフォーミング増殖因子(TG)、上皮細胞増殖因子(EGF)、インスリン様成長因子(IGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)といった各種増殖因子が含まれている。

アジド修飾マトリゲルを合成する際には、予めマトリゲルを上述のプロトコルと同様のプロトコルで透析、凍結乾燥した後に使用した。アジド修飾マトリゲルはアジド修飾ゼラチンの合成と同様の方法で、マトリゲルとAzide-PEG_4-NHS ester を表２に示す比率で混合することで合成した。収率は68から93％の間であった。得られたアジド修飾マトリゲルはpH7.4の300mM HEPESを加え、4℃で溶解した。また、溶解したアジド修飾マトリゲルは使用直前まで4℃で保存した。アジド修飾マトリゲルの反応性アミノ基に対するアジド修飾量は非特許文献９に記載の反応性アミノ基の蛍光ラベル化法を用いてfluorescamineを用いて定量した。

[0046] 表２．アジド修飾マトリゲルを合成する際の精製マトリゲルとAzide-PEG_4-NHSの混合濃度

[表2]

Type of azide-modified matirgel	合成時の仕込み濃度		マトリゲル中のアミノ基に対するアジド基の比率 [a] Azide/·NH_2 (mol%)[a]	ゼラチン中の反応性アミノ基のアジド化修飾率 [b] (mol%)
	マトリゲル (mg/mL)	Azide·PEG_4·NHS (mM)		
Gelatin	5	0	0	0
Azide-matrigel (25)		3.8	25	44
Azide- matrigel (50)		7.5	50	67
Azide- matrigel (75)		11.3	75	80
Azide- matrigel (100)		15.0	100	83

[a]マトリゲル中のアミノ基の含有量は非特許文献９に記載の方法を用いてfluor

escamineを用いて定量した。この際、ゼラチン溶液を反応性アミノ基100 mol%とし、HEPESを反応性アミノ基0 mol%としたときの情報を元に、Azide化反応ゼラチンの反応性アミノ基を比較定量した。

[b]アジド修飾量は非特許文献９に記載の反応性アミノ基の蛍光ラベル化法を用いてfluorescamineを用いて定量した。

[0047] （実施例２．アジド修飾ゼラチンおよびアジド修飾マトリゲルの水溶性の検討）

アジド修飾ゼラチンおよびアジド修飾マトリゲルの溶解度を300mM HEPESバッファー(pH7.4)中で検討した(表５および表６)。ゼラチンの25mg/mL水溶液を4℃および25℃に保つとゲル化するが、37℃では溶解することが知られている。一方、ゼラチンをアジド修飾してアジド修飾ゼラチンとすると25mg/mL水溶液を25℃に保持してもゲル化しないことが確認された(表５)。これはアジド基の導入により、ゼラチンの親水性が増したため、ゼラチンの水溶性が向上したと考えられる。この親水性の向上により、室温(25℃)で溶液の混合操作が可能となった点は、光分解性ゲルを調製する上で優れた性状であるといえる。

[0048] 表３．ゼラチンおよびアジド修飾ゼラチンの水に対する溶解性の比較。それぞれ、25mg/mLの濃度で300mM HEPES バッファー(pH7.4)中に分散させ、溶解性を検討した。

[表3]

	ゼラチン濃度 (mg/mL)	温度 (℃)	水溶性
Gelatin	25	4	不溶(ゲル化)
		25	不溶(ゲル化)
		37	溶解
Azide-gelatin(25)		4	不溶(ゲル化)
		25	溶解
		37	溶解
Azide-gelatin(50)		4	不溶(ゲル化)
		25	溶解
		37	溶解
Azide-gelatin(75)		4	不溶(ゲル化)
		25	溶解
		37	溶解
Azide-gelatin(100)		4	不溶(ゲル化)
		25	溶解
		37	溶解

[0049] また、マトリゲルの25mg/mL水溶液は4℃では溶解状態を維持できるが、25℃に保つとゲル化することが確認されている(表４)。一方、マトリゲルをアジド修飾してアジド修飾マトリゲルとすると25mg/mL水溶液を25℃に保持してもゲル化しないことが確認された(表４)。これはアジド基の導入により、マトリゲルの親水性が増したため、マトリゲルの水溶性が向上したと考えられる。この親水性の向上により、室温(25℃)で溶液の混合操作が可能となった点は、光分解性ゲルを調製する上で優れた性状であるといえる。

[0050] 表４．マトリゲルおよびアジド修飾マトリゲルの水に対する溶解性の比較。それぞれ、25mg/mLの濃度で300mM HEPES バッファー(pH7.4)中に分散させ、

溶解性を検討した。

[表4]

	Matrigel濃度 (mg/mL)	温度 (℃)	水溶性
matrigel	25	4	溶解
		25	不溶(ゲル化)
		37	不溶(ゲル化)
Azide-matrigel (25)		4	溶解
		25	溶解
Azide-matrigel (50)		4	溶解
		25	溶解
Azide-matrigel (75)		4	溶解
		25	溶解
Azide-matrigel (100)		4	溶解
		25	溶解

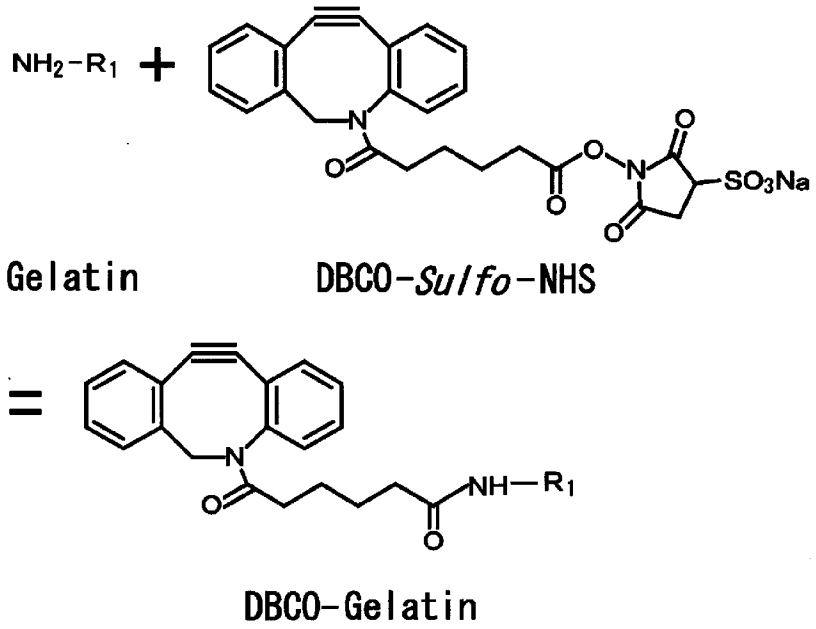
[0051] (比較例１．DBCO修飾ゼラチンの合成とその水溶性の検討)

クリック反応はDBCO基とアジド基との反応によって共有結合を形成するため、クリック反応を用いてゲルを形成するためには、DBCO基をゼラチンに導入し、アジド基を架橋剤に導入しても良いのではないかと考えられる。これを検証するために、DBCO基をゼラチンに導入し、DBCO修飾ゼラチンを合成し、300mM HEPESバッファー(pH7.4)中で水溶性を検討した。

DBCO修飾ゼラチンは、ゼラチンとDBCO-sulfo-NHS esterを表５に示す比率で混合することで合成した。 合成スキームを式２に示す。ゼラチンはpH7.4の300mM HEPESバッファー、DBCO-sulfo-NHS ester 溶液は10mMフタル酸バッファー(pH4.0)に溶解して混合し、37℃で2時間反応させた。

[0052] 式２．ゼラチンとDBCO-sulfo-NHSとの反応による、DBCO修飾ゼラチンの合成の模式図

[化9]



[0053] 表５．DBCO修飾ゼラチンを合成する際のゼラチンとDBCO-PEG_4-NHSの混合濃度（混合後）

[表5]

Type of DBCO-gelatin	ゼラチン濃度 (mg/mL)	DBCO-sulfo-NHS 濃度 (mM)	ゼラチン中のアミノ基に対する DBCO 基の仕込み量 [a] (DBCO/-NH_2) (mol%)
Gelatin	25	0	0
DBCO-gelatin (25)		4.7	25
DBCO-gelatin (50)		9.4	50
DBCO-gelatin (75)		14.1	75
DBCO-gelatin (100)		18.8	100

[a]ゼラチン中のアミノ基の含有量は非特許文献１０の情報に基づいて、ゼラチンが含有するアミノ基のモル質量を元に計算した。

[0054] 合成したDBCO修飾ゼラチンについて、300mM HEPESバッファー(pH7.4)中でのその水溶性を検討した結果、DBCO修飾ゼラチンを合成する過程で、DBCO修飾ゼラチンは25℃において溶解可能な条件は無く、37℃においても、DBCO基の導入率の低いDBCO-gelatin(25)のみが溶解することが確認された(表６および図２)。

以上の結果より、DBCO修飾ゼラチンと比較して、アジド修飾ゼラチン及びアジド修飾マトリゲルの方がHEPESバッファー中での溶解性が高く、クリック反応を利用して光分解性ゲルを調製するために優れていることが確認された。

[0055] 表６．ゼラチンおよびDBCO修飾ゼラチンの水に対する溶解性の比較。それぞれ、25mg/mLの濃度で300mM HEPES バッファー(pH7.4)中に分散させ、溶解性を検討した。

[表6]

	ゼラチン濃度 (mg/mL)	温度 (℃)	水溶性
Gelatin	25	4	不溶(ゲル化)
		25	不溶(ゲル化)
		37	溶解
DBCO-gelatin(25)		4	不溶(ゲル化)
		25	不溶(ゲル化)
		37	溶解
DBCO-gelatin(50)		4	不溶(沈殿)
		25	不溶(沈殿)
		37	不溶(沈殿)
DBCO-gelatin(75)		4	不溶(沈殿)
		25	不溶(沈殿)
		37	不溶(沈殿)
DBCO-gelatin(100)		4	不溶(沈殿)
		25	不溶(沈殿)
		37	不溶(沈殿)

[0056] (実施例３．DBCO-PC-4armPEGの合成)

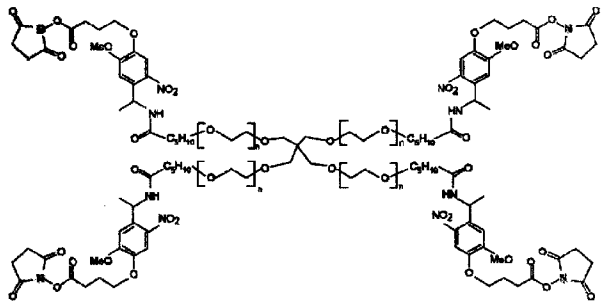
クリック架橋型光開裂性架橋剤DBCO-PC-4armPEGを合成するために、まず、活性エステル型光開裂性架橋剤NHS-PC-4armPEGを非特許文献６に記載の、活性エステル末端4armPEGへのニトロベンジル基導入法に従って合成した。

DBCO-PC-4armPEG はNHS-PC-4armPEGとDBCO-PEG_4-amineを反応させることで合成した。合成スキームを式３に示す。DBCO-PEG_4-amine(600mg)とNHS-PC-4ar

mPEG(3.018g)を125mLの dimethyl sulfoxide(DMSO)中に添加し、40℃に加熱して攪拌した。反応物はジエチルエーテル中で沈殿させることで精製した。まず、反応液を1Lのジエチルエーテル中に滴下して30分間氷冷した。上澄みをデカンテーションによって除去した後、沈殿物を10mLのTHFに溶解した。次に、THFに溶解した反応物を400mLのジエチルエーテルに滴下し、沈殿を得た。このエーテル沈殿を３回繰り返し、3.4gのDBCO-PC-4armPEG を得た(収率:99%)。

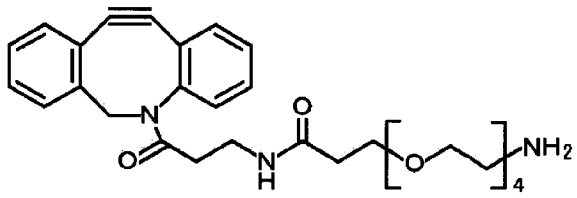
[0057] 式３．NHS-PC-4armPEGとDBCO-PEG_4-amineとの反応によるDBCO-PC-4armPEGの合成の模式図

[化10]



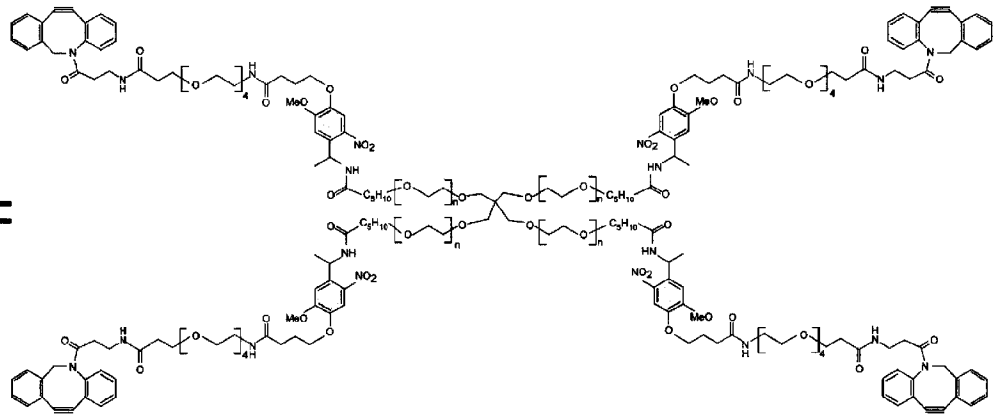
NHS-PC-4armPEG

+



DBCO-PEG4-amine

=



DBCO-PC-4armPEG

[0058] 合成したDBCO-PC-4armPEGの分子構造は重クロロホルム中での^{1}H-NMRにて確認した(図３Ａ)。NHS-PC-4armPEGと比較して、DBCO-PC-4armPEGでは、DBCOに帰属されるピークが7.3ppm前後に確認された(図３Ｂ)。

[0059] (実施例４．DBCO-PC-4armPEGの光開裂性の評価)

DBCO-PC-4armPEGの光開裂反応を光照射前後の吸光スペクトル変化によって評価した。

吸光スペクトルを測定するために、120μMのDBCO-PC-4armPEG溶液を300mM HEPES pH7.4を用いて調製し、1.5L入れた。紫外光源(UVE-251S, San-Ei Electric, Osaka, Japan)から350nm長波長カットフィルターおよび385 nm短波長カットフィルターをとおして紫外光(365nm, 25.2mW・cm^{-2}, 0-7.6J)をエッペンチューブ内の溶液に照射した。吸収スペクトルは吸光光度計(Nanodrop, Thermo Fisher Scientific K.K., Kanagawa, Japan)を用いて10℃ にて測定した。

結果を図１ｅに示す。0.4J・cm^{-2}以上の光照射でo-ニトロベンジル基の開裂反応に起因する390nmの吸収の増大が確認された。

[0060] (実施例５．アジド修飾ゼラチンとDBCO-PC-4armPEGとのクリック反応による光分解性ゲルの調製)

（１）レオロジー測定によるゲル形成の確認

動的粘弾性変化からクリック反応のゾルーゲル転移を確認するため、貯蔵弾性率(G′)および損失弾性率(G″)をレオメーター(MCR-302; Anton Paar Ltd., Graz, Austria)にて測定した。Azide-gelatinおよびDBCO-PC-4armPEGをHEPESバッファー(300mM 、pH7.4)に溶解させて後に、両溶液を表７(後述の(２)参照)に示す濃度となるように等量ずつ混合した。二液を混合した直後に、500 μL混合溶液を装置内へ充填し、直ちに測定(・周波数f ：5Hz・温度：25℃・測定間隔：30秒毎、1時間)を開始した。

クリック反応によるゲル形成の際のG′およびG″の経時変化を図４に示す。G′がG″を超えた点(crossover point, CP)をゲル化が起こった時点とした。表７に組成を示す４種類のゲル、PD-gelatin(25)、PD-gelatin(50)、PD-gelatin(75)、およびPD-gelatin(100)について検討した(それぞれ、図４Ａ、図４Ｂ、図４Ｃ及び図４Ｄ)ところ、いずれの組成においても、５分以内にG′がG″を上回り、その後、数十分間にわたってG′の上昇が確認された。

[0061] （２）光分解性ゲル膜の調製

アジド修飾ゼラチンおよびDBCO-PC-4armPEGをpH7.4の300mM HEPESバッファーに溶解して使用した。アジド修飾ゼラチン溶液とDBCO-PC-4armPEG溶液を最

終濃度で表７に示す濃度となるように等量ずつ混合し、テフロン(登録商標)製のスペーサーを用いて厚みが300μmとなるようにテフロンブロックで挟み込み、室温で30分インキュベートすることで、膜状の光分解性ゲルを調製した。

また、アジド修飾ゼラチン溶液を調製する際に1.0mg/mLのマトリゲルを含むHEPESバッファーを使用し、上記と同様のプロトコルに基づき、DBCO-PC-4armPEG溶液と混合し、成形することで、マトリゲルを含む膜状の光分解性ハイドロゲルを調製した。

[0062] 表７．光分解性ゲルを調製する際のアジド修飾ゼラチンとDBCO-PC-4armPEG(及びマトリゲル)の混合濃度(混合後)

[表7]

Type of hydrogel	Type of azide-gelatin	Azide-gelatin (mg/mL)	DBCO-PC-4armPEG (mM)[b]	Matrigel (mg/mL)
Gelatin	Gelatin	12.5	0	0
PD-gelatin (25)	Azide-gelatin (25)	12.5	0.6	0
PD-gelatin (50)	Azide-gelatin (50)	12.5	1.2	0
PD-gelatin (75)	Azide-gelatin (75)	12.5	1.8	0
PD-gelatin (100)	Azide-gelatin (100)	12.5	2.3	0
Gelatin_M+	Gelatin	12.5	0	0.5
PD-gelatin (25)_M+	Azide-gelatin (25)	12.5	0.6	0.5
PD-gelatin (50)_M+	Azide-gelatin (50)	12.5	1.2	0.5
PD-gelatin (75)_M+	Azide-gelatin (75)	12.5	1.8	0.5
PD-gelatin (100)_M+	Azide-gelatin (100)	12.5	2.3	0.5

[0063] （実施例６．マイクロパターン光照射による光分解性ゲルのマイクロパターン分解の確認）

実施例５で調製した膜状のヒドロゲルに対しマイクロパターン光を照射し

、ヒドロゲルがマイクロパターンに応じて光分解することを確認した。

マイクロパターン光照射は、非特許文献１１の方法に基づき、PC制御型のマイクロプロジェクションシステム(DESM-01, Engineering System, Co. Ltd., Nagano, Japan)を用いて、行った。

照射するパターンはAdobe illustrator CS4 (Adobe systems software Ireland Ltd.)を用いて作製した。強度156mW・cm^{-2}、波長365nmのマイクロパターン光を30秒間 照射し、ハイドロゲルを37℃で1時間インキュベートした。その後、ハイドロゲルをCoomassie Brilliant Blue(CBB、0.01%)染色し、ハイドロゲル内に形成されたマイクロパターンを倒立型顕微鏡(IX-71, Olympus Corporation, Tokyo, Japan)で観察した。

表７に組成を示す４種類のゲル、PD-gelatin(25)、PD-gelatin(50)、PD-gelatin(75)、およびPD-gelatin(100)について、マイクロパターン光照射による光分解性ゲルのマイクロパターン分解の結果を図５Ａ～Ｄに示す。それぞれのゲルに図５Ｅに示すパターン光を照射した後、ハイドロゲルをタンパク質の染色試薬であるCBBで染色した。図５Ａ～Ｄにおいて照射部位の色が抜けていることが確認され、照射部位のハイドロゲルが照射パターンに応じて分解したことが確認された。

同様に、表７に組成を示すマトリゲルを含む４種類のゲル、PD-gelatin(25)_M+、PD-gelatin(50)_M+、PD-gelatin(75)_M+、およびPD-gelatin(100)_M+についても、マイクロパターン光照射による光分解性ゲルのマイクロパターン分解を行った。その結果を図６Ａ～Ｄに示す。それぞれのゲルに図５Ｅに示すパターン光を照射した後、ハイドロゲルをタンパク質の染色試薬であるCBBで染色した。図６において照射部位の色が抜けていることが確認され、照射部位のハイドロゲルが照射パターンに応じて分解したことが確認された。

[0064] （実施例７．細胞傷害性試験）

以下の手順で、ハイドロゲルへ細胞を内包し、内包された細胞の生存性について、傷害性をLive/Dead細胞生存率アッセイキット(Life Technologies, Carlsbad, USA)を用いて評価した。

細胞として、理化学研究所 バイオリソースセンターより提供されたヒト子宮頸癌由来細胞(以下、HeLa細胞)およびヒト前立腺癌由来細胞株(以下、DU145 細胞)を、それぞれ10%の血清を添加したDulbecco's modification of Eagle's medium(DMEM、Life technologies)を培養液として用い、37℃、5%CO_2環境下にて培養したものを用いた。

アジド修飾ゼラチンおよびDBCO-PC-4armPEGはpH7.4の300mM HEPESバッファーに溶解して使用した。HeLa細胞およびDU145細胞をアジド修飾ゼラチン溶液に1.4×10^5cells/mLの濃度で分散させた。7μLのアジド修飾ゼラチン溶液および7μLのDBCO-PC-4armPEG溶液を混合し、テフロン製のスペーサーを用いて厚みが300μmとなるようにテフロンブロックで挟み込み、室温で30分インキュベートした。ハイドロゲルを形成した後に500μLの培養液を添加し、5%CO_2環境下、37度24時間培養した。

Live/Dead細胞生存率アッセイの試験溶液を、1μLのcalcein AMおよび4μLのethidium homodimer-1溶液を5mLのphosphate buffered saline(PBS)に添加することで調製した。ハイドロゲル中で培養した細胞をPBSで洗浄し、Live/Dead細胞生存率アッセイの試験溶液を添加し、37℃で30分間インキュベートした後に、共焦点レーザー顕微鏡 (FV300, Olympus)を用いて観察した。生細胞と死細胞を各サンプルについて合計100細胞以上となるように計数した。

表７に組成を示す、アジド修飾ゼラチンとDBCO-PC-4armPEGとを用いて作製した４種類のハイドロゲル、PD-gelatin(25)、PD-gelatin(50)、PD-gelatin(75)、およびPD-gelatin(100)、表７に組成を示す、これにさらにマトリゲルを加えて作製した４種類のハイドロゲルPD-gelatin(25)_M+、PD-gelatin(50)_M+、PD-gelatin(75)_M+、およびPD-gelatin(100)_M+、および、ゼラチンと活性エステル型架橋剤をこれらと同様の濃度で用いて作製した光分解性ハイドロゲルについて、DU145細胞およびHeLa細胞を上述の方法で光分解性ゲルに包埋した際の細胞生存率を調べた結果を図７に示す。

クリック型架橋剤DBCO-PC-4armPEGを使用した場合(図７Ａ及び図７Ｂ)に、架橋剤の広い濃度範囲で、包埋された細胞が高い生存率を示すことが確認さ

れた。一方、活性エステル型の架橋剤を利用した場合(図７Ｃ)では、架橋剤濃度が1.8mMを超えたところから細胞の生存率が急激に低下することが確認された。

これらの結果より、本実施形態のクリック型光開裂性架橋剤が、先行文献に示す活性エステル型の光開裂性架橋剤と比べて、より細胞傷害性の低い優れた架橋剤であることが確認された。

[0065] (実施例８．細胞培養試験)

以下の手順で、ハイドロゲルに内包させた細胞の培養試験を行った。

細胞として、理化学研究所 バイオリソースセンターより提供されたHeLa細胞を、10%の血清を添加したDulbecco's modification of Eagle's medium(DMEM、Life technologies)を培養液として用い、37℃、5%CO_2環境下にて培養したものを用いた。

HeLa細胞をアジドゼラチン溶液に3.3×10^3cells/ mLの濃度で混合したものを用いた以外は実施例７のプロトコルに従って、細胞を内包した光分解性ハイドロゲルを作製した。細胞観察は、倒立型顕微鏡(IX-71, Olympus)を用いて24、48および72時間後に行った。

また、表７に組成を示す８種類のハイドロゲル、PD-gelatin(25)、PD-gelatin(50)、PD-gelatin(75)、PD-gelatin(100)、PD-gelatin(25)_M+、PD-gelatin(50)_M+、PD-gelatin(75)_M+、およびPD-gelatin(100)_M+について、実施例７に記載の手順でHeLa細胞を内包して３日間培養した際の細胞の増殖および形態変化の様子を図８Ａ及び図８Ｂに示す。マトリゲルを添加しない系(図８Ａ)よりも、マトリゲルを添加した光分解性ハイドロゲル(図８Ｂ)の中で、細胞がより顕著な増殖を示すことが確認された。

以上の結果より、クリック型の架橋剤を用いることで、マトリゲルという添加因子を含んだ系においても、光分解性ハイドロゲルを形成することが可能であることが確認された。また、マトリゲル存在下において、光分解性ハイドロゲル中における細胞の増殖がより顕著であることも確認され、本実施形態のクリック型光開裂性架橋剤が、先行文献に示す活性エステル型の光開

裂性架橋剤よりも優れた性質を有していることが確認された。

産業上の利用可能性

[0066] 現在、再生医療では細胞シートや細胞懸濁液を用いた細胞移植が主流であるが、今後は血管や神経といった複雑な構造を有する組織体や、肝組織、腎組織といったより大きな組織体や臓器を、体外で人工的に加工して移植するEngineered Tissueを用いた再生医療が重要となってくると考えられる。大きな組織体を体外で人工的に形成するには、酸素や栄養分、老廃物を交換するための血管様流路網を組織体内に形成する必要があり、その三次元構造は必然的に複雑な構造となる。

光で分解するゲルは微細パターン光照射やスキャン照射と組み合わせて複雑な構造を造形することが可能となる。本発明によって開示される光分解性ゲルは低毒性で細胞を内包化でき、光で分解するため、複雑な三次元構造を有する組織体の加工に利用できる。加工された組織体は再生医療に応用できる。

また、本発明の光分解性ゲルは、細胞分離にも利用できる。例えば、光分解性ゲル内に細胞を包埋して培養したり、光分解性ゲルの上で細胞を培養した状態で、分離対象となる細胞の周囲に光照射し、ゲルを溶解させることで細胞を単離できる。本発明の光分解性ゲルは、細胞毒性がなく、なおかつ二液混合という簡便な手法で、細胞接着性を有する光分解性ゲルを提供できるので、このような細胞分離に応用する際にも、有用な材料となる。

請求の範囲

[請求項1] 下記化合物Ａのシクロオクチン環又はアザシクロオクチン環に含まれるアルキン基が下記化合物Ｂによって、前記化合物Ｂが有するアジド基を介して修飾されている、光分解性ハイドロゲル。

（化合物Ａ）

直鎖型ないし３分岐以上の分岐型の、ポリエチレングリコール構造を含む主鎖と、前記主鎖の両末端ないし分岐末端に配置された光分解性のニトロベンジル基と、前記ニトロベンジル基の末端側に配置されたシクロオクチン環又はアザシクロオクチン環を有する基とを含む光開裂性架橋剤である化合物。

（化合物Ｂ）

タンパク質を主鎖とし、前記主鎖のリジンおよびアルギニン側鎖に存在するアミノ基および主鎖末端に存在するアミノ基の少なくとも一部がアジド基で修飾されているアジド修飾タンパク質である化合物。

[請求項2] 前記化合物Ｂのタンパク質が、ゼラチン、コラーゲン、ラミニン及びマトリゲルから選ばれる１以上の細胞接着性のタンパク質を含む、請求項１に記載の光分解性ハイドロゲル。

[請求項3] 前記化合物Ａのポリエチレングリコール構造のエチレングリコール単位の平均繰り返し数が30から250の範囲にある、請求項１又は２に記載の光分解性ハイドロゲル。

[請求項4] 前記化合物Ａの分岐型の主鎖の分岐数が４分岐もしくは８分岐である、請求項１～３のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲル。

[請求項5] 前記化合物Ａの分岐型の主鎖が中心にネオペンチル骨格を有する、請求項１～４のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲル。

[請求項6] 前記化合物Ａのシクロオクチン環又はアザシクロオクチン環を有する基がアザジベンゾシクロオクチン(DBCO)基である、請求項１～５のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲル。

[請求項7] 前記光分解性ハイドロゲルが細胞増殖因子を含む、請求項１～６の

いずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲル。

[請求項8] 前記アルキン基のアジド基を介した修飾の修飾率が、前記アルキン基の数に対して１０～１００％である、請求項１～７のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲル。

[請求項9] 前記化合物Ｂは、前記アジド修飾タンパク質の前記アミノ基のアジド修飾率が、前記アミノ基の数に対して１０～１００％である、請求項１～８のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲル。

[請求項10] 請求項１～９のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲルを培養容器の底面に形成している、培養器具。

[請求項11] 請求項１～９のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲルを用い、以下の工程を含む、組織体形成方法。

（I）細胞を内包させた前記光分解性ハイドロゲルを形成する工程、

（II）光照射によって前記光分解性ハイドロゲルの構造を規定する工程、及び、

（III）前記細胞を培養して組織体を形成する工程。

[請求項12] 前記光分解性ハイドロゲルの構造を規定する工程では、前記光照射は0.001～1.0 W/ cm^2の光強度の光を照射し、CBB染色、蛍光染色あるいは顕微鏡観察により前記光分解性ハイドロゲルの構造を特定する、請求項１１の組織体形成方法。

[請求項13] 請求項１～９のいずれか一項に記載の光分解性ハイドロゲルを用い、以下の工程を含む、細胞分離方法。

（I）細胞を内包させた前記光分解性ハイドロゲルを形成する工程、

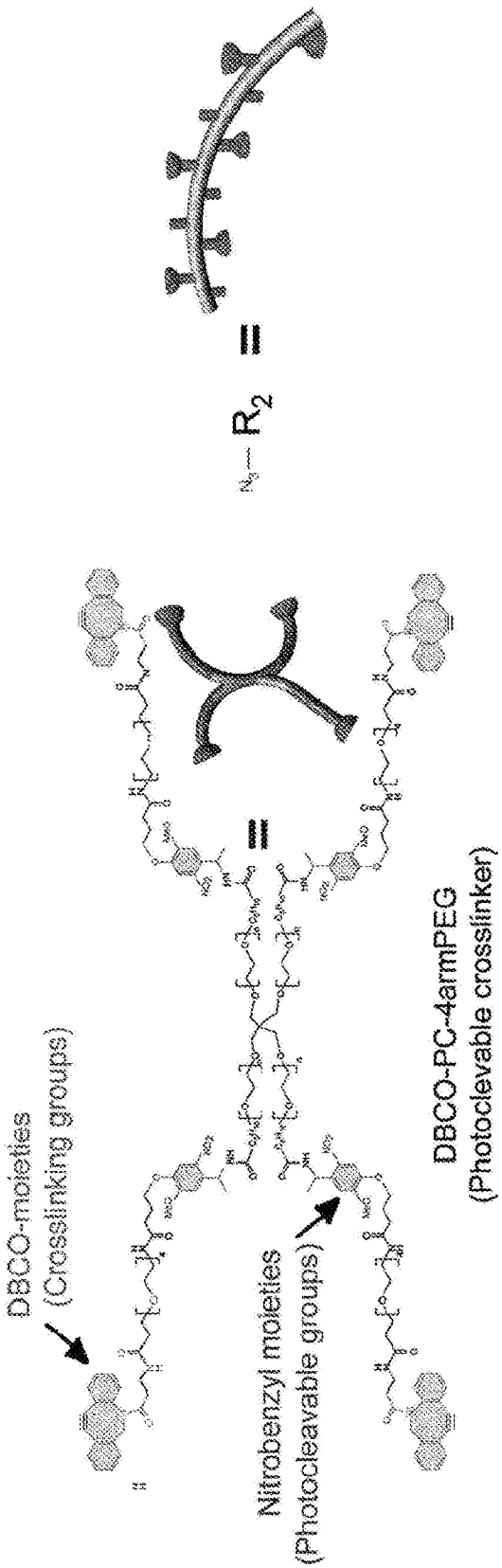
（II）光照射によって前記細胞のうち特定の細胞を含む領域の前記光分解性ハイドロゲルを溶解する工程、及び、

（III）溶解した前記光分解性ハイドロゲルを洗浄し、溶解した領域の前記特定の細胞を回収する工程。

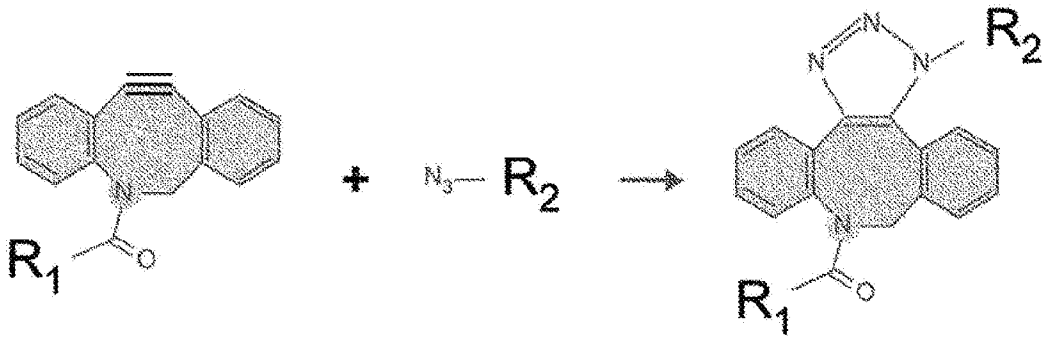
[請求項14] 前記光分解性ハイドロゲルを溶解する工程では、前記光照射は300～500 nmの波長の光を照射し、ピペッティングにより前記光分解性ハ

イドロゲルを溶解する、請求項１３の細胞分離方法。

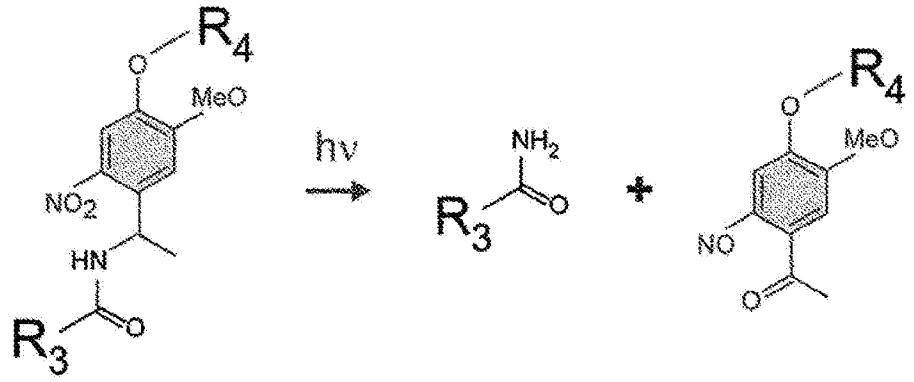
[図1A]


DBCO-moieties
(Crosslinking groups)
Nitrobenzyl moieties
(Photocleavable groups)
DBCO-PC-4armPEG
(Photoclevable crosslinker)

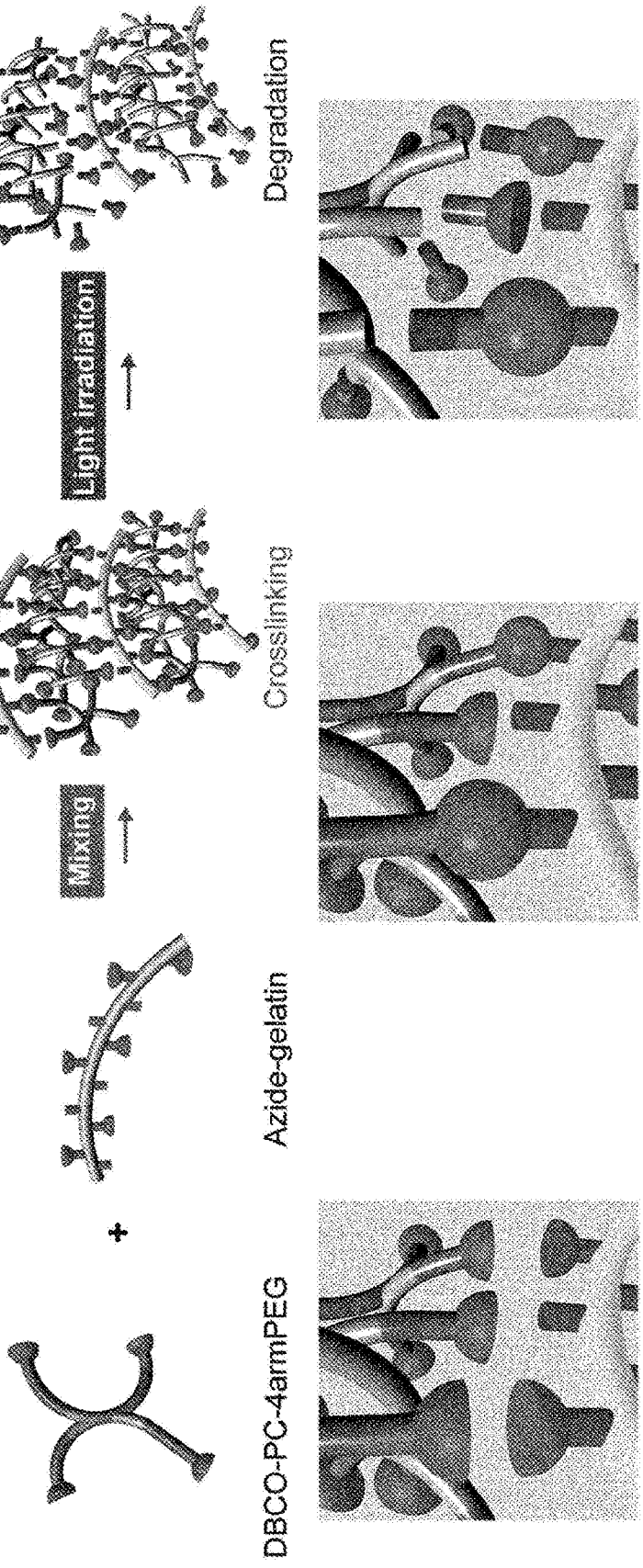
[図1B]



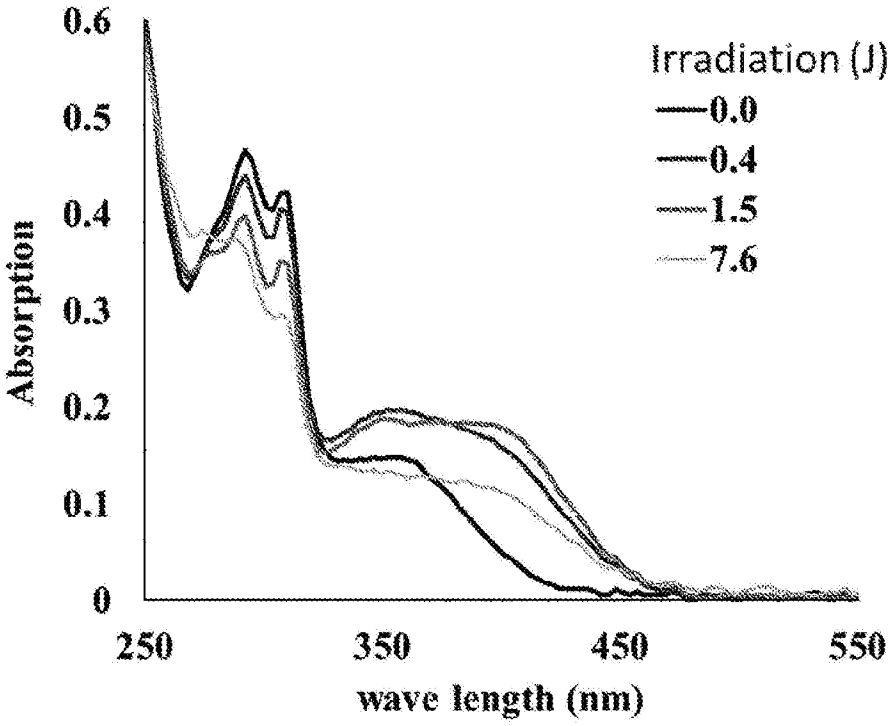
[図1C]



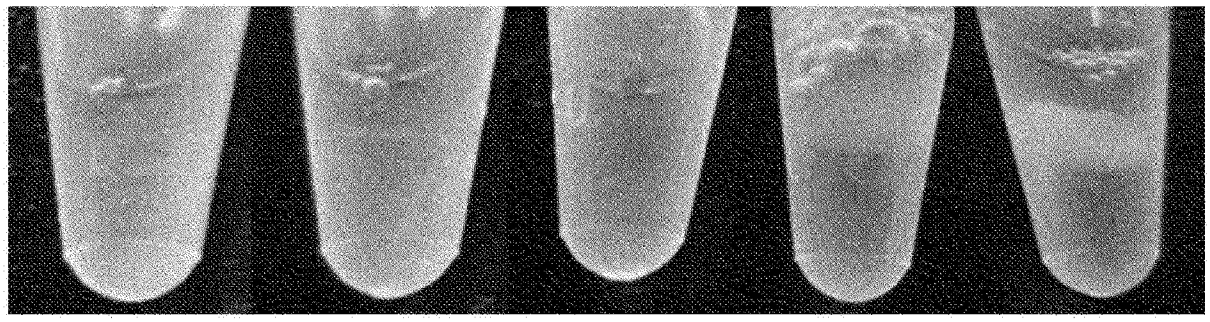
[図1D]


DBCO-PC-4armPEG
Azide-gelatin
Mixing
Crosslinking
Light irradiation
Degradation

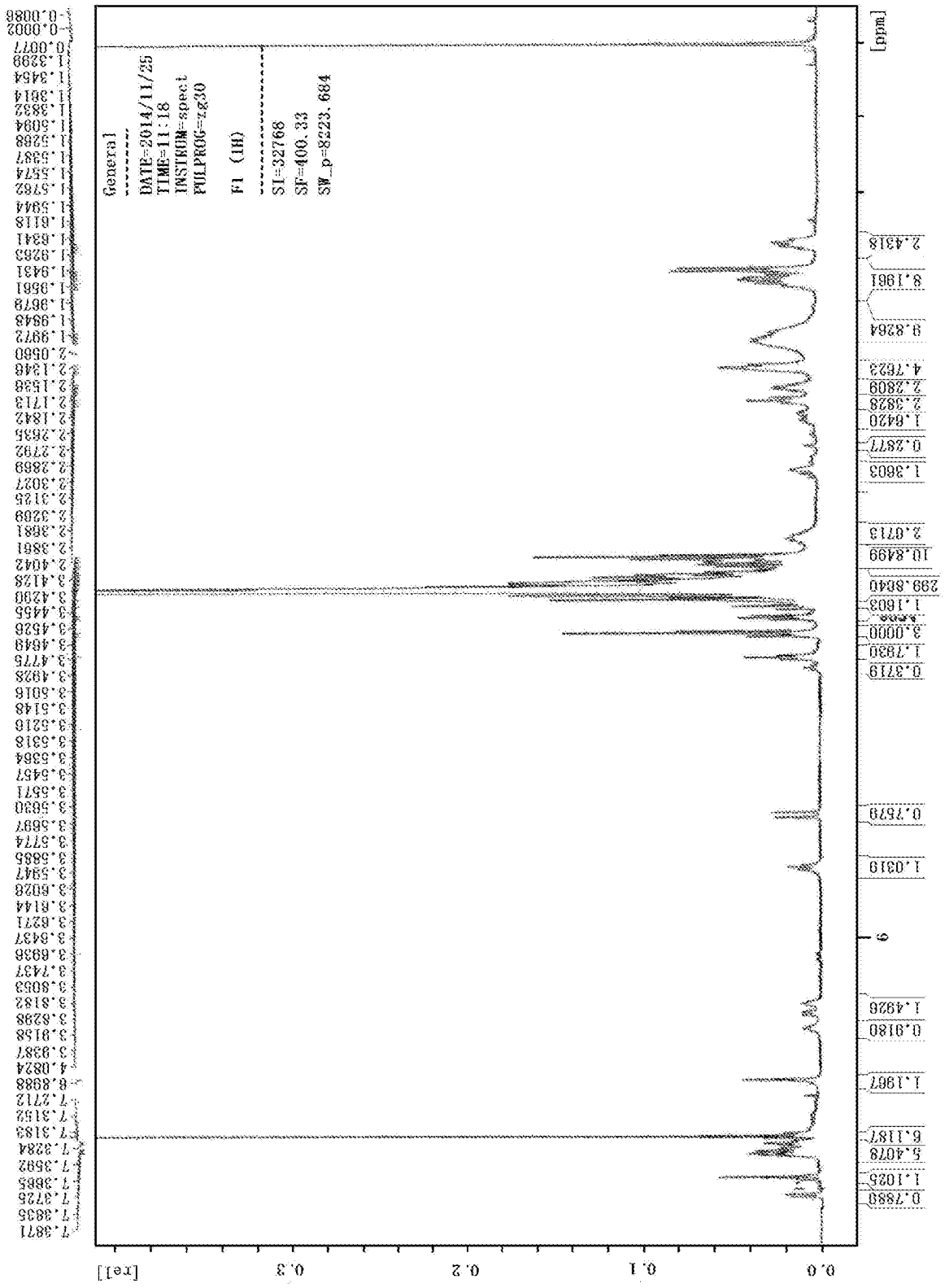
[図1E]


0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Absorption
250
350
450
550
wave length (nm)
Irradiation (J)
0.0
0.4
1.5
7.6

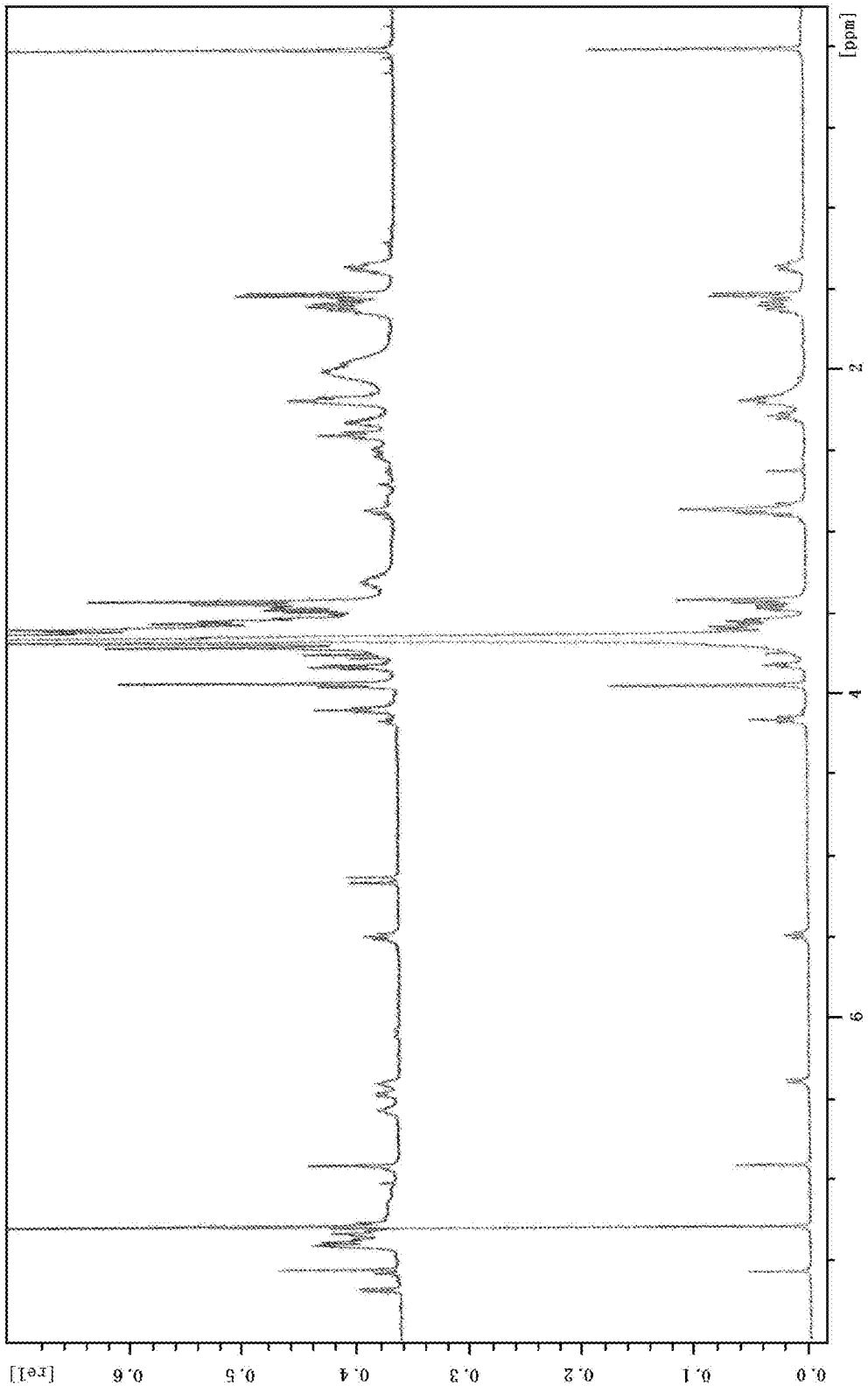
[図2]



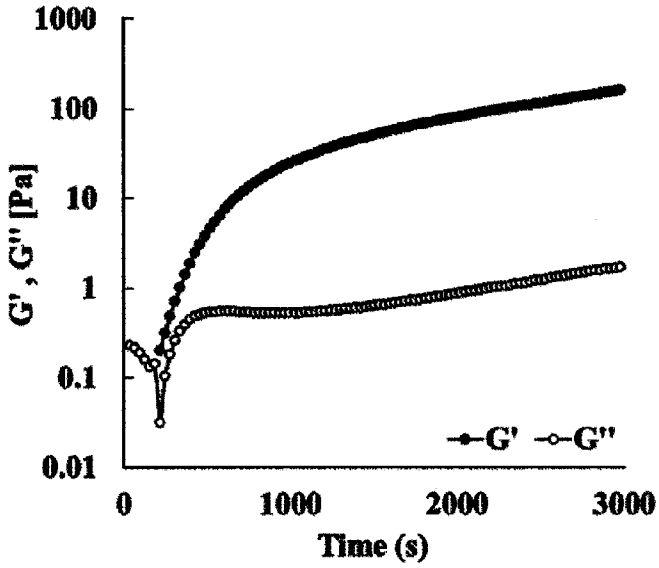
[図3A]


General
DATE=2014/11/25
TIME=11:18
INSTRUM=spect
PULPROG=zg30
F1 (1H)
SI=32768
SF=400.33
SW_p=8223.684
[ppm]
[rel]
0.0
0.1
0.2
0.3

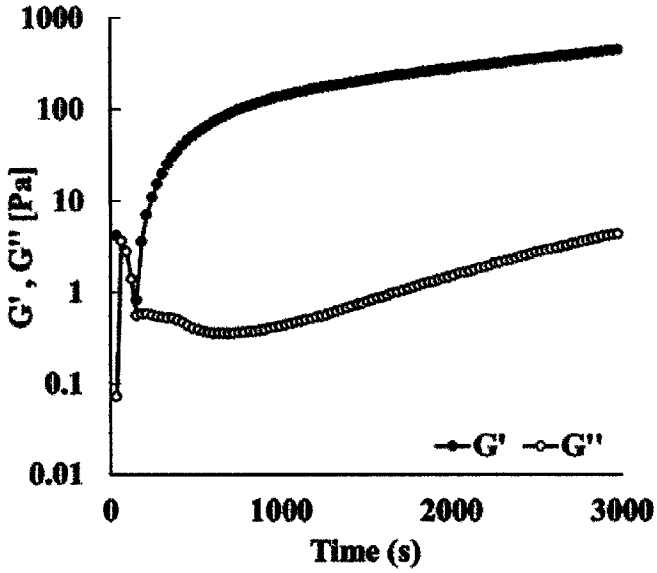
[図3B]



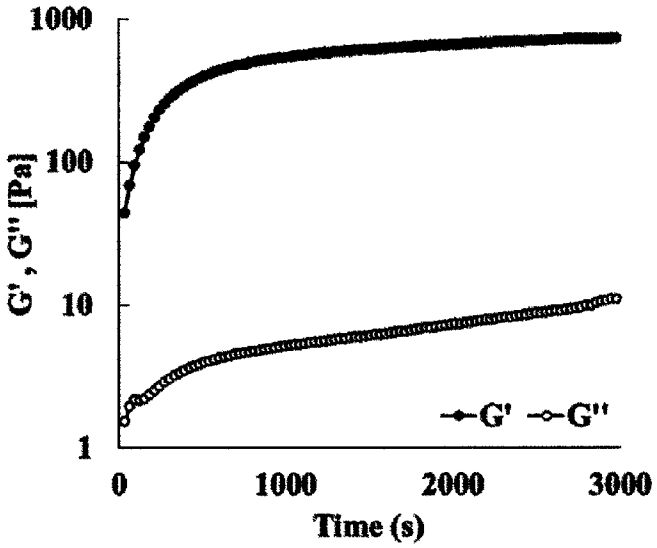
[図4A]


1000
100
10
1
0.1
0.01
G', G'' [Pa]
0
1000
2000
3000
Time (s)
G'
G''

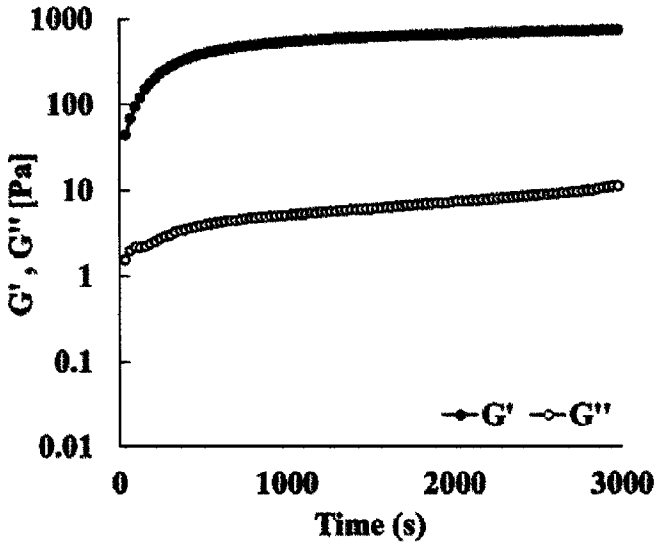
[図4B]


1000
100
10
1
0.1
0.01
G', G'' [Pa]
0
1000
2000
3000
Time (s)
G'
G''

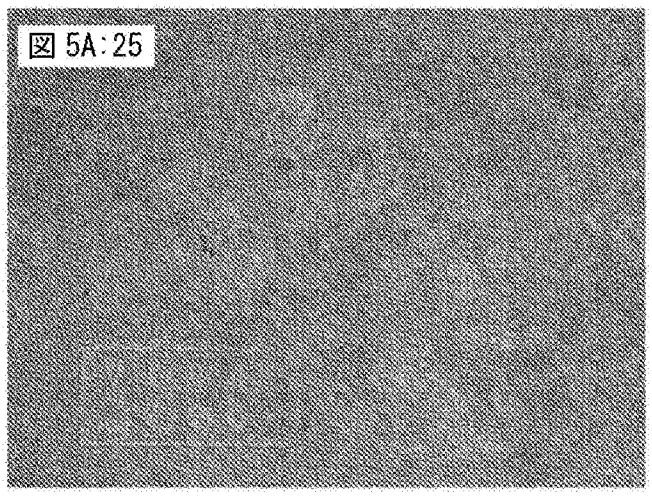
[図4C]


1000
100
10
1
G', G'' [Pa]
G'
G''
0
1000
2000
3000
Time (s)

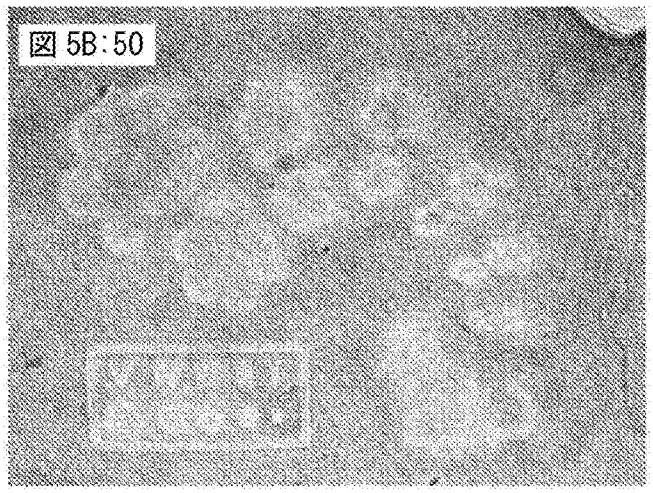
[図4D]


1000
100
10
1
0.1
0.01
G', G'' [Pa]
G'
G''
0
1000
2000
3000
Time (s)

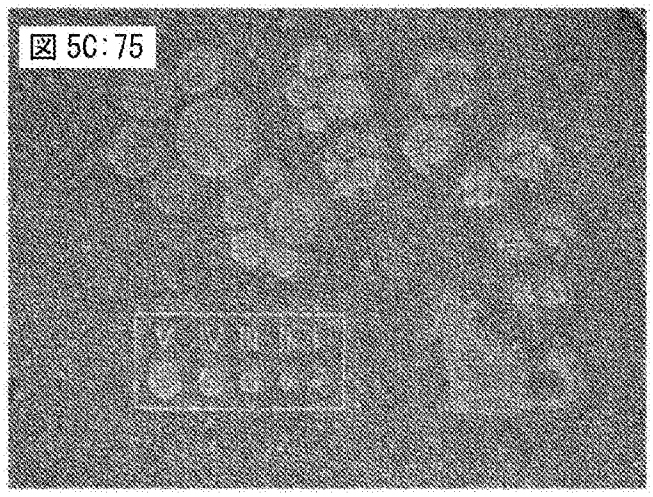
[図5A]



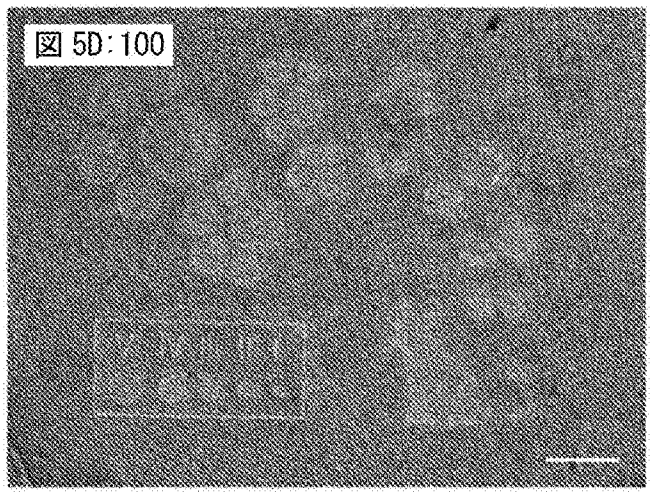
[図5B]



[図5C]



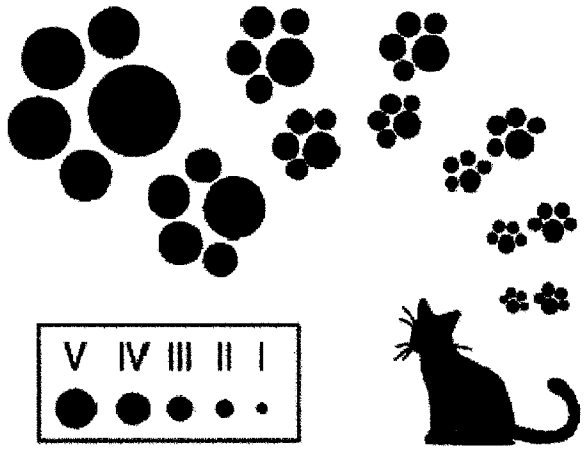
[図5D]



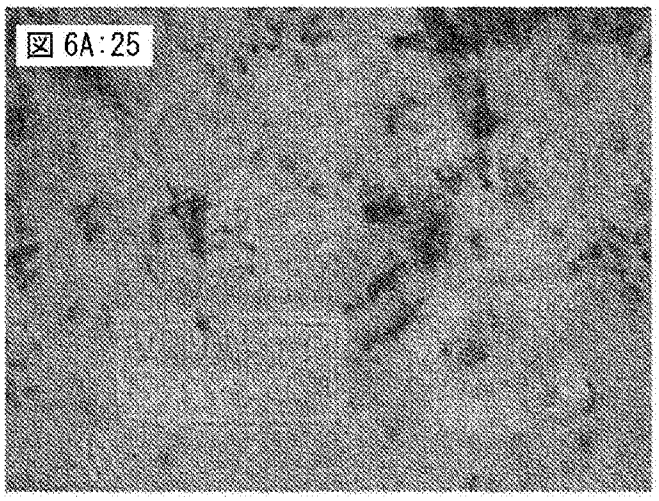
Scale bar: 200 μm

Diameter: I = 20μm, II = 30 μm, III = 45 μm, IV = 68 μm, V = 101
Line width of frame border: 10 μm

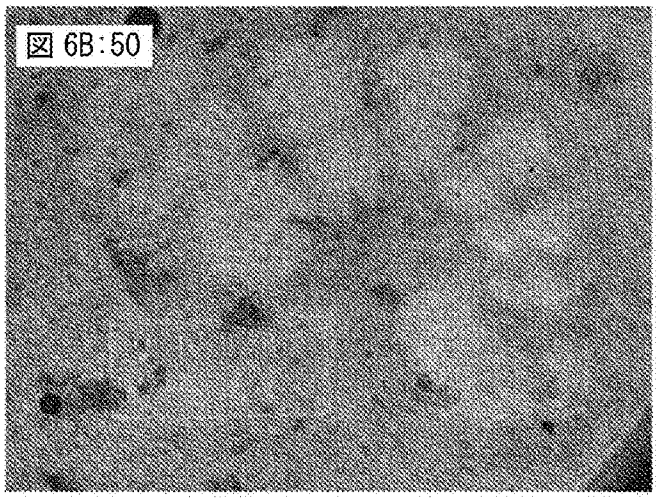
[図5E]



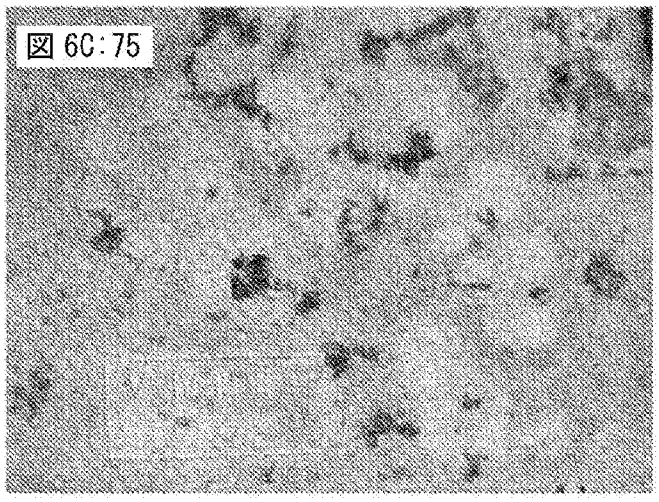
[図6A]



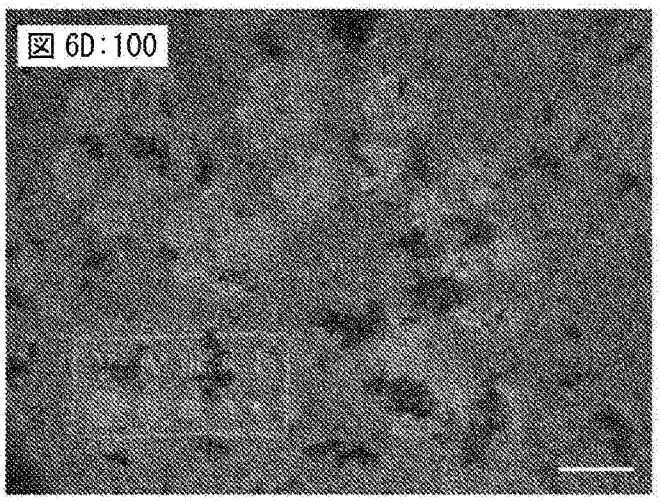
[図6B]



[図6C]



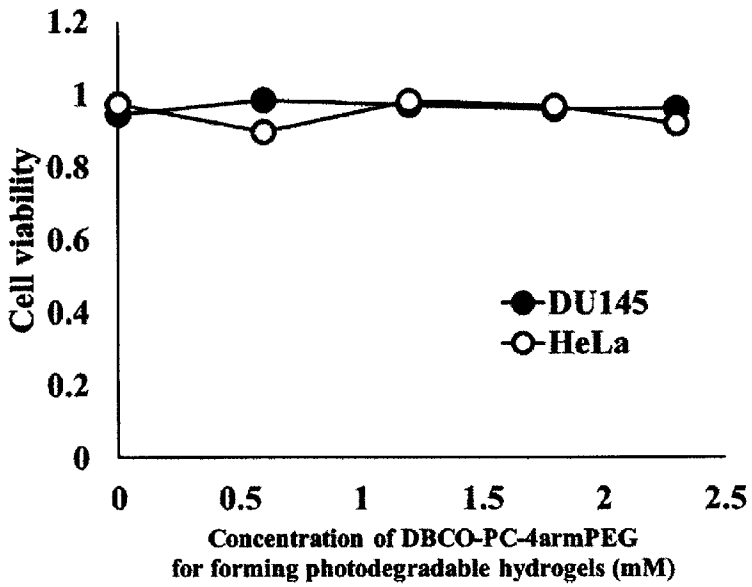
[図6D]



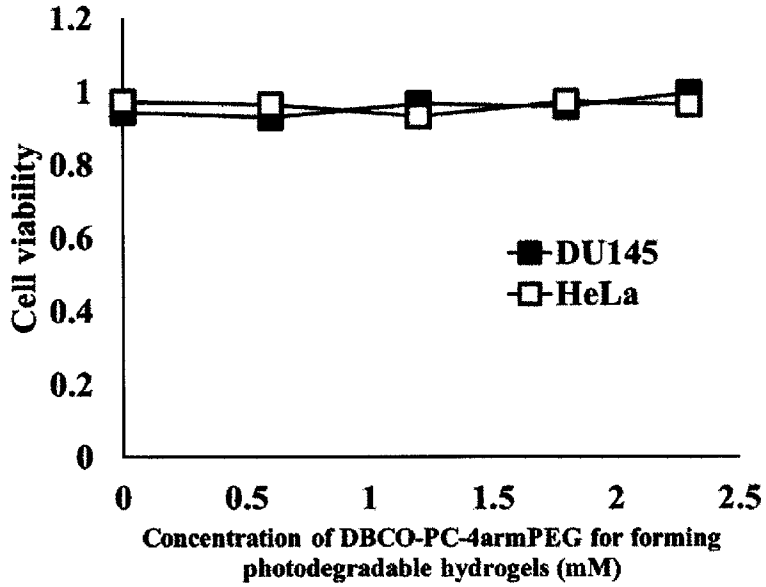
Scale bar: 200 μm

Diameter: I = 20μm, II = 30 μm, III = 45 μm, IV = 68 μm, V = 101
Line width of frame border: 10 μm

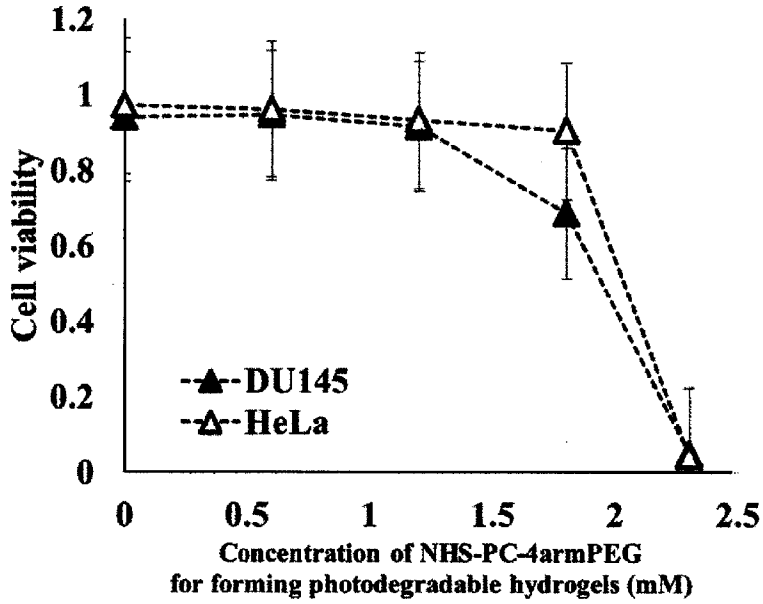
[図7A]



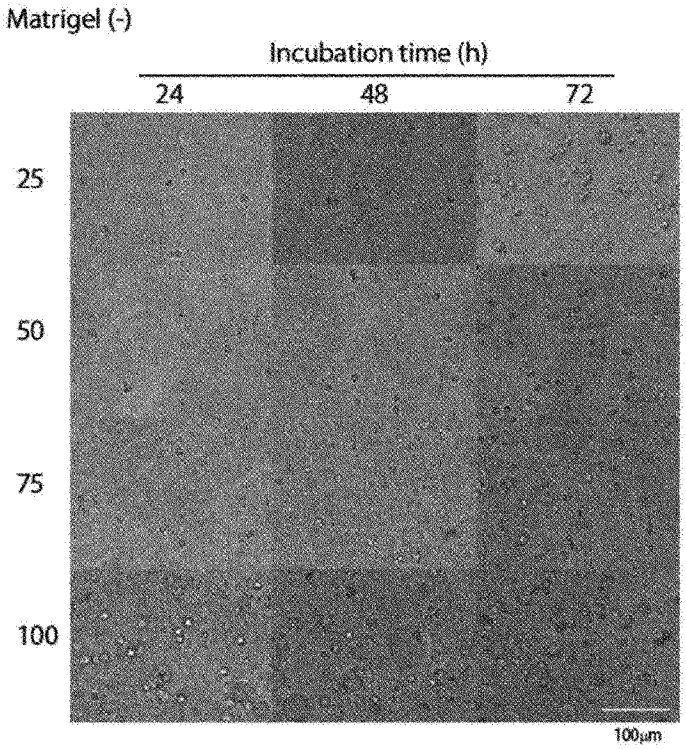
[図7B]


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Cell viability
DU145
HeLa
0
0.5
1
1.5
2
2.5
Concentration of DBCO-PC-4armPEG for forming photodegradable hydrogels (mM)

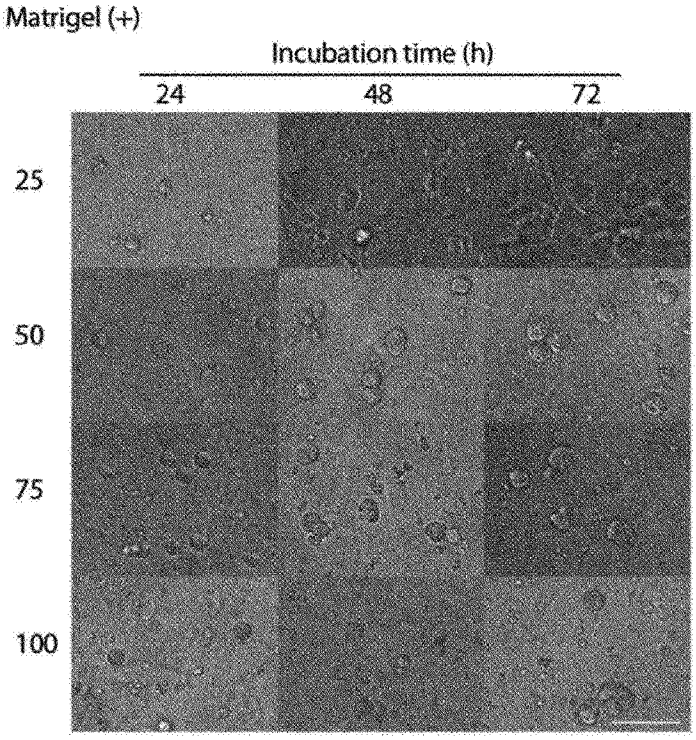
[図7C]


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Cell viability
DU145
HeLa
0
0.5
1
1.5
2
2.5
Concentration of NHS-PC-4armPEG
for forming photodegradable hydrogels (mM)

[図8A]


Matrigel (-)
Incubation time (h)
24
48
72
25
50
75
100
100μm

[図8B]


Matrigel (+)
Incubation time (h)
24
48
72
25
50
75
100

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/061017

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12M3/00(2006.01)i, *C08G81/00*(2006.01)i, *C12M1/00*(2006.01)i, *C12N1/00*(2006.01)i, *C12N5/00*(2006.01)i

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)
C12M3/00, C08G81/00, C12M1/00, C12N1/00, C12N5/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/188911 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 27 November 2014 (27.11.2014), claims; figures & EP 3000836 A claims; figures	1-14
Y	TAMURA Masato et al., Optical cell separation from three-dimensional environment in photodegradable hydrogels for pure culture techniques, SCIENTIFIC REPORTS, 2014.05.07, vol.4, p.4793	1-14

☒ 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
"T" 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	Date of mailing of the international search report
09 June 2016 (09.06.16)	21 June 2016 (21.06.16)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/061017

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GIULBUDAGIAN Michael et al., Fabrication of thermoresponsive nanogels by thermo-nanoprecipitation and in situ encapsulation of bioactives, Polymer Chemistry, 2014, vol.5, pp.6909-6913	1-14
Y	WO 2012/165462 A1 (The University of Tokyo), 06 December 2012 (06.12.2012), claims; paragraph [0006] & US 2014/0256831 A1 claims; paragraph [0007] & EP 2716662 A1	1-14
Y	WO 2014/189370 A1 (STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT), 27 November 2014 (27.11.2014), claims; abstract & EP 3004062 A	1-14
P,A	TRUONG Vinh X. et al., Photodegradable Gelatin-Based Hydrogels Prepared by Bioorthogonal Click Chemistry for Cell Encapsulation and Release, BIOMACROMOLECULES, 2015.06.07, vol.16, pp.2246-2253	1-14

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０６１０１７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12M3/00(2006.01)i, C08G81/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N5/00(2006.01)i

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.　C12M3/00, C08G81/00, C12M1/00, C12N1/00, C12N5/00

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	１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１６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）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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	WO 2014/188911 A1 (独立行政法人産業技術総合研究所) 2014.11.27, 請求の範囲、図 & EP 3000836 A (Claims, Figure)	1-14
Y	TAMURA Masato et al., Optical cell separation from three-dimensional environment in photodegradable hydrogels for pure culture techniques, SCIENTIFIC REPORTS, 2014.05.07, vol.4, p.4793	1-14

☑　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、国際出願日以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	国際調査報告の発送日
０９．０６．２０１６	２１．０６．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｂ　３３４７
松岡　徹
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	GIULBUDAGIAN Michael et al., Fabrication of thermoresponsive nanogels by thermo-nanoprecipitation and in situ encapsulation of bioactives, Polymer Chemistry, 2014, vol.5, pp.6909-6913	1-14
Y	WO 2012/165462 A1 (国立大学法人　東京大学) 2012.12.06, 特許請求の範囲、０００６段落 & US 2014/0256831 A1(claims, paragraph0007) & EP 2716662 A1	1-14
Y	WO 2014/189370 A1 (STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT) 2014.11.27, Claims, Abstract & EP 3004062 A	1-14
P, A	TRUONG Vinh X. et al., Photodegradable Gelatin-Based Hydrogels Prepared by Bioorthogonal Click Chemistry for Cell Encapsulation and Release, BIOMACROMOLECULES, 2015.06.07, vol.16, pp.2246-2253	1-14