(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117545835 A
(43)申请公布日 2024.02.09

(21)申请号 202280044373.1
(22)申请日 2022.06.23
(30)优先权数据
2021-103763 2021.06.23 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.12.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/025023 2022.06.23
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/270569 JA 2022.12.29
(71)申请人 株式会社ADEKA
地址 日本东京都
(72)发明人 武藤美音 日渡谦一郎 熊谷光伦
(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
专利代理师 陈玉净 谢顺星
(51)Int.Cl.
C12N 5/07(2006.01)

权利要求书1页 说明书17页
序列表2页 附图3页

(54)发明名称

脱细胞化细胞结构体

(57)摘要

本发明的目的在于提供一种具有任意厚度或特定形状的脱细胞化移植片。所述技术问题可通过一种脱细胞化细胞结构体而解决,其为将本发明的培养细胞结构体脱细胞化而形成的脱细胞化细胞结构体,其特征在于孔隙率为30%~80%。

CN 117545835 A

1.一种脱细胞化细胞结构体,其为将培养细胞结构体脱细胞化而形成的脱细胞化细胞结构体,其特征在于,所述脱细胞化细胞结构体的孔隙率为30％～80％。

2.根据权利要求1所述的脱细胞化细胞结构体,其中,脱细胞化结构体的硬度为0.20～5.00(N)。

3.根据权利要求1或2所述的脱细胞化细胞结构体,其中,脱细胞化细胞结构体的每单位干燥质量的DNA含量为0.020质量％以下。

4.根据权利要求1或2所述的脱细胞化细胞结构体,其含有:(a)分子量为45,000～53,000且(b)等电点pI为4.00～4.90的蛋白质。

5.根据权利要求4所述的脱细胞化细胞结构体,其中,所述蛋白质为微管蛋白。

6.一种脱细胞化细胞结构体的制造方法,其包括:

通过培养细胞形成培养细胞结构体的培养细胞结构体形成工序,与将所述培养细胞结构体脱细胞化并使孔隙率达到30％～80％的脱细胞化工序。

7.根据权利要求6所述的脱细胞化细胞结构体的制造方法,其中,在培养细胞结构体形成工序中,在形成培养细胞结构体之前或在形成培养细胞结构体的同时,将细胞培养成任意形状。

8.根据权利要求7所述的脱细胞化细胞结构体的制造方法,其中,在所述培养细胞结构体形成工序中,在形成培养细胞结构体之前的细胞的任意形状的培养为片状细胞的培养或细胞凝聚体的培养。

9.根据权利要求6所述的脱细胞化细胞结构体的制造方法,其中,在培养细胞结构体形成工序之后,将细胞培养成任意形状。

10.根据权利要求6～9中任一项所述的脱细胞化细胞结构体的制造方法,其中,所述脱细胞化通过高静水压处理实施。

11.根据权利要求6～9中任一项所述的脱细胞化细胞结构体的制造方法,其中,所述脱细胞化工序中的脱细胞前与脱细胞化后的厚度维持率为90％以上。

脱细胞化细胞结构体

技术领域

[0001] 本发明涉及脱细胞化细胞结构体。

背景技术

[0002] 在移植来自他人或不同种动物的生物体组织的移植片时,因被移植者一方的组织造成的移植片的排斥反应成为问题。对此,为了提高与生物体组织的相容性,开发了一种将由从生物体组织中去除细胞而残留的支撑组织(细胞外基质,ECM)构成的脱细胞化组织用作移植片的技术。脱细胞化是指去除对于被移植者而言具有抗原性的核酸等细胞成分,由此能够避免免疫排斥(专利文献1及2)。

现有技术文献

专利文献

[0003] 专利文献1:日本特表2005-514971号公报

专利文献2:国际公开第2016/136633号

专利文献3:日本特开2012-139541号公报

专利文献4:日本再表2014-148321号公报

专利文献5:日本再表2018-051415号公报

专利文献6:日本特开2004-357694号公报

专利文献7:日本特开2020-198794号公报

专利文献8:日本专利第4517125号公报

发明内容

本发明要解决的技术问题

[0004] 所述脱细胞化组织就通过将生物组织脱细胞化从而得到无排斥反应的移植片这一点而言是有用的。然而,有时需要层叠工序的工艺以获得规定厚度。此外,制作成特定形状也并不容易。并且,维持作为移植片的强度也并非易事。

因此,本发明的目的在于提供一种具有任意厚度且可维持硬度的经脱细胞化的移植片。

解决技术问题的技术手段

[0005] 本申请的发明人对具有任意厚度或特定形状的脱细胞化移植片进行了深入研究,结果惊奇地发现,通过将培养所获得的培养细胞结构体(专利文献3~7)脱细胞化,可得到具有任意厚度且可维持硬度的脱细胞化移植片。

本发明基于以上的认知。

因此,本发明涉及以下内容:

(1)一种脱细胞化细胞结构体,其为将培养细胞结构体脱细胞化而形成的脱细胞化细胞结构体,其特征在于,所述脱细胞化细胞结构体的孔隙率为30%~80%;

(2)根据(1)所述的脱细胞化细胞结构体,其中,脱细胞化结构体的硬度为0.20~

5.00(N)；

(3)根据(1)或(2)所述的脱细胞化细胞结构体,其中,脱细胞化细胞结构体的每单位干燥质量的DNA含量为0.020质量%以下；

(4)根据(1)或(2)所述的脱细胞化细胞结构体,其含有:(a)分子量为45,000～53,000且(b)等电点pI为4.00～4.90的蛋白质；

(5)根据(4)所述的脱细胞化细胞结构体,其中,所述蛋白质为微管蛋白；

(6)一种脱细胞化细胞结构体的制造方法,其包括:通过培养细胞形成培养细胞结构体的培养细胞结构体形成工序,与将所述培养细胞结构体脱细胞化并使孔隙率达到30%～80%的脱细胞化工序；

(7)根据(6)所述的脱细胞化细胞结构体的制造方法,其中,在培养细胞结构体形成工序中,在形成培养细胞结构体之前或在形成培养细胞结构体的同时,将细胞培养成任意形状；

(8)根据(7)所述的脱细胞化细胞结构体的制造方法,其中,在所述培养细胞结构体形成工序中,在形成培养细胞结构体之前的细胞的任意形状的培养为片状细胞的培养或细胞凝聚体的培养；

(9)根据(6)所述的脱细胞化细胞结构体的制造方法,其中,在培养细胞结构体形成工序之后,将细胞培养成任意形状；

(10)根据(6)～(9)中任一项所述的脱细胞化细胞结构体的制造方法,其中,所述脱细胞化通过高静水压处理实施；

(11)根据(6)～(9)中任一项所述的脱细胞化细胞结构体的制造方法,其中,所述脱细胞化工序中的脱细胞前与脱细胞化后的厚度维持率为90%以上。

发明效果

[0006] 根据本发明的脱细胞化细胞结构体,能够提供具有任意厚度且可维持硬度的脱细胞化移植片。此外,本发明的制造方法能够维持脱细胞化后相对于脱细胞化前的厚度,且可维持脱细胞化前后的形状。即,由于能够提供具有任意厚度的脱细胞化材料,由此能够提供具有特定形状的脱细胞化材料,并能够根据移植片或细胞疗法等目的的用途区分制作脱细胞化材料。并且,能够制作具有强度且不会发生排斥反应的脱细胞化材料。

附图说明

[0007] 图1为示出实施例1～4及比较例1的脱细胞化细胞结构体的孔隙率的图表。

图2为示出实施例1～4及比较例1的脱细胞化细胞结构体的厚度维持率的图表。

图3为脱细胞化细胞结构体经天狼星红染色后的显微镜照片。

图4为示出实施例1～4及比较例1的脱细胞化细胞结构体的硬度试验的结果的图表。

图5为示出实施例1(A)及比较例1(B)的双向电泳的蛋白质点的照片。

具体实施方式

[0008] [1]脱细胞化细胞结构体

本发明的脱细胞化细胞结构体为将培养细胞结构体脱细胞化而形成的脱细胞化

细胞结构体,其孔隙率为30％～80％。

[0009] ＜＜培养细胞结构体＞＞

本发明的培养细胞结构体为通过体外(in vitro)培养获得的细胞结构体。培养细胞结构体只要能够通过细胞向细胞外生产细胞外基质(Extracellular matrix、ECM)而使细胞粘附且维持了三维形状,则没有特别限定,但三维中的最小距离(厚度)优选为50μm以上,更优选为100μm以上。其他的二维尺寸也没有特别限定,例如为1mm以上,优选为6mm以上。由此,能够高效地制作脱细胞化细胞结构体。

关于培养细胞结构体的强度,同样只要能够维持恒定的三维形状,则没有特别限定,但优选在湿润状态下具有能够用镊子进行操作或缝合的强度。培养细胞结构体的形状没有特别限定,例如可列举出片状、管状或块状。由此,容易根据移植片或细胞疗法等目的的用途区分制作脱细胞化细胞结构体。

[0010] 本发明的脱细胞化细胞结构体可以为湿润状态,也可以为干燥状态。以湿润状态提供的脱细胞化细胞结构体能够立即用于移植。而以干燥状态提供的脱细胞化细胞结构体能够进行长期保存,且容易运输,并且能够在使用时复原以进行使用。

[0011] 细胞可大致分为悬浮系细胞和粘附性细胞,但培养细胞结构体的细胞没有限定,从培养细胞结构体的制作难易度的角度出发,优选粘附性细胞。

粘附性细胞没有特别限定,能够根据培养结构体的使用目的适当选择。例如,作为分化后的粘附细胞,可列举出肝细胞、星形细胞、库普弗(Kupffer)细胞、血管内皮细胞、窦内皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、成骨细胞、破骨细胞、牙周膜衍生细胞、表皮细胞、气管上皮细胞、消化道上皮细胞、宫颈上皮细胞、上皮细胞、乳腺细胞、周细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、肌细胞、肾细胞、胰岛细胞、末梢神经细胞、神经细胞、软骨细胞或骨细胞。例如,作为未分化的粘附细胞,可列举出胚胎干细胞(ES细胞)、胚胎生殖细胞(EG细胞)、生殖细胞系干细胞(GS细胞)、诱导性多能干细胞(iPS细胞)、间充质干细胞、造血干细胞、神经干细胞、心肌前体细胞、血管内皮前体细胞、神经前体细胞、脂肪前体细胞、真皮成纤维细胞、骨骼肌成肌细胞、成骨细胞或成牙质细胞。从培养细胞结构体的制作难易度的角度出发,优选真皮成纤维细胞、间充质干细胞、心肌前体细胞。

细胞的来源没有特别限定,包括真核细胞、原核细胞、多细胞生物细胞或单细胞生物细胞。作为真核细胞,可列举出动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、真菌、藻类或原生动物。动物细胞没有限定,可列举出来自人、猴、犬、猫、兔、雪貂、绵羊、山羊、牛、猪、马、骆驼、小鼠、大鼠、仓鼠、旱獭或沙鼠的细胞。

[0012] 培养细胞结构体没有限定,优选通过细胞外基质而粘附。通过粘附于细胞外基质,培养细胞结构体能够获得一定的强度。作为细胞外基质,可列举出例如胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白、硫酸软骨素、硫酸肝素(heparin sulfate)、硫酸角蛋白、透明质酸等,但其因细胞种类而异,没有特别限定。

[0013] ＜＜DNA含量＞＞

脱细胞化细胞结构体的每单位干燥质量的DNA含量为0.020质量％以下,优选为0.015质量％以下,更优选为0.010质量％以下,进一步优选为0.008质量％以下,进一步优选为0.006质量％以下,进一步优选为0.004质量％以下,进一步优选为0.002质量％以下,进一步优选为0.0018质量％以下,进一步优选为0.0015质量％以下。由此,能够得到适当地

进行了脱细胞化且在移植时排斥反应较少的脱细胞化细胞结构体。

DNA含量能够通过荧光染料(PicoGreen)法进行测定。在将脱细胞化细胞结构体的干燥试验片(以下,有时称之为样本)浸渍在蛋白质分解酶溶液中而使其溶解之后,使用苯酚/氯仿进行处理以去除蛋白质,并通过乙醇沉淀法回收DNA。利用PicoGreen(Life Technologies Corporation)对回收的DNA进行荧光染色,并测定荧光强度,由此对DNA进行定量,并计算出样本的DNA含量(质量)。利用使用PicoGreen中附带的标准DNA制作的标准曲线进行定量。按照下述公式,由样本的干燥质量与DNA含量计算出DNA比。

(每单位干燥质量的DNA含量(以下,有时称之为脱细胞化DNA比)=(脱细胞化细胞结构体的干燥试验片的DNA含量)/(脱细胞化细胞结构体的干燥试验片的质量)

[0014] <<孔隙率>>

本发明的脱细胞化细胞结构体的孔隙率为30%~80%。孔隙率的下限优选为33%,更优选为37%,进一步优选为40%,更进一步优选为42%,更加优选为44%,更加进一步优选为47%,最优选为50%。孔隙率的上限优选为77%,更优选为73%,进一步优选为70%,更进一步优选为68%,更加优选为66%,更加进一步优选64%,最优选为55%。通过使孔隙率在所述范围内,能够得到具有充分的强度且不会发生排斥反应的移植片。此外,还能够提供具有任意厚度或特定形状的脱细胞化移植片。

在本说明书中,孔隙率的计算以如下方式实施。通过会将细胞外基质染色的天狼星红对脱细胞化细胞结构体的切片进行染色。利用图像处理软件对显微镜组织图像进行分析,将没有被天狼星红染色的部分判定为孔隙,并计算出孔隙率。

天狼星红染色以如下方式实施。对脱细胞化细胞结构体的切片样本进行脱蜡处理。接着,用铁苏木精对切片样本进行处理。接着,进行使用盐酸/乙醇溶液的处理、及使用磷钼酸水溶液的处理。然后,用天狼星红(Direct Red 80)进行处理,并进行脱水处理、封片。

使用显微镜观察所得到的天狼星红染色切片,并使用图像处理软件(ImageJ)计算出孔隙率。以10倍的倍率对切片进行摄影,分别测量脱细胞化细胞结构体整体的面积与天狼星红染色部分的面积(图3)。根据下述公式计算出孔隙率。

孔隙率(%)=(脱细胞化细胞结构体整体的面积-天狼星红染色部分的面积)/脱细胞化细胞结构体整体的面积×100

[0015] [2]脱细胞化细胞结构体的制造方法

本发明的脱细胞化细胞结构体的制造方法包括:通过培养细胞形成培养细胞结构体的培养细胞结构体形成工序、和将所述培养细胞结构体脱细胞化并使孔隙率达到30%~80%的脱细胞化工序。

[0016] <<培养细胞结构体形成工序(1)>>

在所述培养细胞结构体形成工序(1)中,通过培养细胞形成培养细胞结构体。所使用的细胞只要为能够进行体外培养的细胞则没有特别限定,例如,可以为直接采集自组织或器官的初代细胞,也可以为将直接采集自组织或器官的初代细胞进行了几代继代培养而形成的继代细胞。此外,也可以为进行长期继代培养而形成的继代细胞。具体而言,可以没有限定地使用上述“[1]脱细胞化细胞结构体”中记载的细胞。

培养细胞结构体可通过细胞向细胞外生产细胞外基质(Extracellular matrix、

ECM)并使细胞彼此粘附结合而形成,其维持了三维形状。培养细胞结构体的形成方法只要为利用基于细胞外基质的粘附的方法则没有特别限定,例如,能够使用专利文献3～8中记载的方法。具体而言,可列举出:不使用支架(scaffold)的制造片状三维结构体的方法(专利文献3)、层叠多层细胞片的方法(专利文献4)、对由多个丝或针状构件形成了网格状空间的支撑体提供细胞凝聚体并制造结构体的方法(专利文献5)、通过在腔室中培养细胞凝聚体进行制造的方法(专利文献6)、通过培养模具对细胞凝聚体进行培养并制造三维细胞结构体的方法(专利文献7)或通过具备贯穿细胞凝聚体的丝状体或针状体的支撑体进行培养从而进行制造的方法(专利文献8)。这些结构体的制造方法均为利用由细胞分泌的细胞外基质从而使细胞彼此粘附并形成细胞结构体的方法。细胞外基质没有特别限定,可列举出上述“[1]脱细胞化细胞结构体”中记载的细胞外基质。

[0017] 例如,可通过以如下方式培养细胞凝聚体(球状体(spheroid))从而形成培养细胞结构体。作为用于培养的培养基,可根据所使用的细胞选择合适的培养基。将细胞凝聚体放入被具有比细胞凝聚体的大小更小的间隙的网状/梳齿状支撑体围绕的腔(cavity)中。腔由网状/梳齿状的支撑体与培养板形成为所需的形状,并在支撑体上有多个开口部分。培养基可从该开口部分与细胞凝聚体接触。通过在细胞凝聚体被保持在腔内的状态下,对振荡培养用容器进行振荡,可有效地使培养基与细胞凝聚体接触,良好地培养细胞凝聚体。细胞凝聚体生产细胞外基质,细胞凝聚体开始彼此粘附,能够制作具有所需形状的三维结构的培养细胞结构体。

[0018] 在所述培养细胞结构体形成工序(1)中,例如,可以在形成培养细胞结构体之前或在形成培养细胞结构体的同时,将细胞培养成任意形状。培养成任意形状是指,以成为任意厚度或平面形状的方式进行培养。例如,可以调整面积,以使细胞成为任意平面形状的方式进行培养。也可以层叠任意平面形状的细胞,以成为任意厚度及形状的方式进行调整并进行培养。此外,也可以将所培养的细胞以成为所需形状的方式进行切断。在所述培养细胞结构体形成工序(1)中,也可以在使培养细胞结构体形成的同时,进行培养并形成任意形状。例如,也可以在实施形成上述的培养细胞结构体的方法的同时,以成为任意形状的方式进行培养。例如,也能够通过在包含细胞外基质的凝胶中对细胞进行三维(3D)培养,形成培养细胞结构体。

[0019] 此外,也可以在形成培养细胞结构体之前,将细胞以任意形状进行培养。在培养细胞结构体形成工序中,关于在形成培养细胞结构体之前的细胞的任意形状的培养,例如,优选片状的细胞培养或细胞凝聚体(球状体)的培养。作为在形成培养细胞结构体之前的培养,例如,可列举出:将细胞以成为任意平面形状的方式进行培养,或层叠多层专利文献4中记载的细胞片(片状的细胞),并在形成培养细胞结构体之前,对该层叠后的细胞片进行培养。关于细胞片的培养,可按照本领域通常所实施的使用培养板等的细胞片的制作进行实施。通过层叠所得到的细胞片并进行培养,能够将细胞培养成任意厚度及形状。然后,通过由细胞分泌细胞外基质,层叠后的细胞片发生粘附,能够得到维持三维形状的培养细胞结构体。

[0020] 进一步作为形成培养细胞结构体之前的培养,例如,可列举出:如专利文献5或7中所记载地通过在使细胞发生粘附之前进行培养从而制作细胞凝聚体(球状体)。粘附性细胞无法以漂浮在溶液中的状态长期存活。若将粘附性细胞置于非粘附环境下,则细胞会寻求

立足点而彼此粘附,进而形成细胞凝聚体。

具体而言,通过使多个细胞凝聚,能够制造细胞凝聚体(球状体)。在对细胞进行单层培养之后,若将其转移到拒水性或细胞非粘附性的圆底多孔培养板或U型培养板(凹坑培养板(dimple plate))中进行培养,则细胞会发生凝聚而产生细胞凝聚体。从效率性的角度出发,直至产生细胞凝聚体为止的培养时间优选为6～48小时,更优选为6～24小时。然而,细胞凝聚体的制造方法并不限定于上述方法,还可采用向旋转的溶液中加入细胞悬浊液的旋转培养法、向试验管中加入细胞悬浊液并使用离心分离机使其沉淀的方法、或者藻酸盐微球(alginate beads)法、专利文献5、6或8中所记载的制造方法。从能够大量处理均匀的细胞凝聚体的角度出发,向拒水性或非细胞粘附性多孔培养板中加入细胞悬浊液的方法效率较高,故而优选。

通过调整细胞凝聚体(球状体)的培养时间,能够将细胞凝聚体培养成任意厚度。此外,通过使细胞凝聚体(球状体)彼此相连,能够将细胞凝聚体培养成任意厚度及形状。通过进一步培养以上述方式得到的细胞凝聚体(球状体),由细胞分泌细胞外基质,细胞彼此粘附,能够得到维持三维形状的培养细胞结构体。此外,通过利用将细胞凝聚体(球状体)以上述方式放入腔中的方法进行培养,能够准确地制作具有所需的三维形状的培养细胞结构体。

在形成培养细胞结构体之前的、将细胞培养成任意形状时的细胞外基质(Extracellular matrix、ECM)的量,优选少于形成培养细胞结构体时的细胞外基质的量。

[0021] 此外,也可以在培养细胞结构体形成工序之后将细胞培养成任意形状。例如,可以在实施形成上述培养细胞结构体的方法之后,以使其成为任意形状的方式进一步进行培养,此外,可列举出:在用细胞外基质覆盖细胞之后,以成为任意形状的方式进行层叠并进行培养。

在培养细胞结构体形成工序之后的、将细胞培养成任意形状时的细胞外基质(Extracellular matrix、ECM)的量,优选与形成培养细胞结构体时的细胞外基质的量相同或比其多。

[0022] ＜＜脱细胞化工序(2)＞＞

在所述脱细胞化工序(2)中,将所述细胞结构体脱细胞化并使孔隙率达到30％～80％。即,脱细胞化后的细胞结构体的孔隙率为30％～80％。孔隙率的下限优选为33％,更优选为37％,进一步优选为40％,更进一步优选为42％,更加优选为44％,更加进一步优选为47％,最优选为50％。孔隙率的上限优选为77％,更优选为73％,进一步优选为70％,更进一步优选为68％,更加优选为66％,更加进一步优选为64％,最优选为55％。通过使孔隙率在所述范围内,能够得到具有充分的强度且不会发生排斥反应的移植片。并且,还能够提供具有任意厚度或特定形状的脱细胞化移植片。

[0023] 脱细胞化工序能够使用以往公知的方法。只要能够获得本发明的效果,则脱细胞化的方法没有特别限定,例如可列举出:利用高静水压处理的方法、利用冻融处理的方法、利用超声波处理进行处理的方法、使用酶的方法、或利用高渗电解质溶液进行处理的方法、利用物理搅拌的方法、高渗液低渗液法、利用蛋白分解酶或核酸分解酶等进行酶处理的方法、利用醇溶剂进行的处理等,也可以组合上述方法中的两种以上的方法,由于能够有效获得脱细胞化细胞结构体,且能够发挥本申请发明的效果,优选利用高静水压处理的方法。

[0024] 在通过所述利用高静水压处理的方法获得所述脱细胞化结构体时,在介质中对所得到的细胞结构体施加50～1500MPa的静水压。从能够充分进行脱细胞化的角度出发,所施加的静水压优选为50MPa以上,从不需要耐受施压的压力容器、不需要庞大的能量,以及防止当施压时使用的介质为水性介质时生成冰,进而使得细胞结构体因生成的冰受到损伤的角度出发,优选为1500MPa以下。所施加的静水压更优选为80～1300MPa,进一步优选为90～1200MPa,进一步更加优选为95～1100MPa,更加优选为95～700MPa,从发挥脱细胞化效果、杀菌效果及病毒灭活效果,且施压的容易度的角度出发,最优选为400～700MPa。

[0025] 作为施加静水压时使用的介质,可列举出水、生理盐水、注射用水、丙二醇或其水溶液、甘油或其水溶液、糖类水溶液等。作为缓冲液,可列举出乙酸缓冲液、磷酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、硼酸缓冲液、酒石酸缓冲液、tris缓冲液、HEPES缓冲液、MES缓冲液等。这些介质也可以含有表面活性剂。

[0026] 关于高静水压处理的温度,只要为不生成冰、不会因热对细胞结构体造成损伤的温度,则没有特别限定,从顺利进行脱细胞处理、对细胞结构体的影响少的角度出发,优选为0～45℃,进一步优选为4～37℃,最优选为15～36℃。若高静水压处理的时间过短,则无法充分破坏细胞,而当高静水压处理的时间较长时,会牵涉到能量的浪费,因此在高静水压处理中,维持目标的施加压力的时间优选为1～120分钟,更优选为5～60分钟,进一步优选为7～30分钟。

[0027] 优选对经所述高静水压处理的细胞结构体进行核酸分解酶处理。核酸分解酶为从施加了静水压的细胞结构体中去除核酸成分的物质,没有特别限定,例如可列举出来自胰脏、来自脾脏或来自大肠菌的脱氧核糖核酸酶(DNase)(例如,脱氧核糖核酸酶I(DNaseI)、脱氧核糖核酸酶II(DNaseII))。

核酸分解酶能够通过添加于用于所述高静水压处理的介质(例如,水、生理盐水、注射用液或缓冲液等)中而发挥作用。所添加的酶量根据酶的种类或单元数(U)的定义而有所不同,本领域技术人员能够适当设定。例如,若为脱氧核糖核酸酶I,则以50～1000U/mL进行使用即可。处理温度也根据所使用的核酸分解酶而有所不同,但例如设定为1℃～40℃的温度即可。处理时间也没有特别限定,例如可以为1～120小时(优选为1～96小时,更优选为1～48小时),低温时可进行长时间的处理,高温时可进行短时间的处理。

[0028] 用洗涤液洗涤经所述高静水压处理的细胞结构体。洗涤液可以与高静水压处理的介质相同,也可以不同。洗涤液优选含有有机溶剂或螯合剂。有机溶剂能够提高去除脂质的效率,螯合剂能够通过使脱细胞化细胞结构体中的钙离子、镁离子失活来防止将本发明的粒子化脱细胞化细胞结构体应用于疾病部位时发生钙化。作为有机溶剂,由于去除脂质的效果高,优选水溶性的有机溶剂,优选乙醇、异丙醇、丙酮、二甲基亚砜。作为螯合剂,可列举出乙二胺四乙酸(EDTA)、次氮基三乙酸(NTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、羟乙基乙二胺三乙酸(HEDTA)、三亚乙基四胺六乙酸(TTHA)、1,3-丙二胺四乙酸(PDTA)、1,3-二氨基-2-羟基丙烷四乙酸(DPTA-OH)、羟乙基亚氨基二乙酸(HIDA)、二羟乙基甘氨酸(DHEG)、乙二醇醚二胺四乙酸(GEDTA)、二羧甲基谷氨酸(CMGA)、3-羟基-2,2'-亚氨基二琥珀酸(HIDA)、二羧甲基天冬氨酸(ASDA)等亚氨基羧酸类螯合剂或其盐;柠檬酸、酒石酸、苹果酸、乳酸等羟基羧酸类螯合剂或其盐,作为这些螯合剂的盐,可列举出钠盐或钾盐。

关于洗涤温度,只要为不会因热对细胞结构体造成损伤的温度,则没有特别限定,

由于洗涤性良好,且对细胞结构体的影响小,优选0～45℃,进一步优选1～40℃,最优选2～35℃,在进行洗涤时,可以根据需要对洗涤液进行振荡或搅拌。

[0029] 在通过利用冻融处理的方法获得所述脱细胞化细胞结构体时,重复进行1次或2次以上(优选为2～5次)的下述工序:将细胞结构体于-85～-20℃(优选-82～-40℃)的温度下保持15分钟～48小时(优选20分钟～15小时)而使其冻结之后,于20～40℃的温度下使其融化的工序。然后,优选进行核酸分解酶处理,核酸分解酶处理可以为与所述高静水压处理中的处理相同的方法。对于经冻融处理的细胞结构体,细胞结构体中的细胞被破坏,且该细胞通过洗涤液而被去除。洗涤的方法可以为与高静水压处理中的洗涤相同的方法。

[0030] 在通过利用超声波处理进行处理的方法获得所述脱细胞化细胞结构体时,对细胞结构体例如在生理盐水中进行超声波处理(例如,强度:10W/cm^2,频率:10kHz,作用时间:2分钟)。然后,优选在表面活性剂溶液(例如,1％质量％Triton X(辛基苯基聚氧乙烯醚)溶液)中于2～10℃(优选4℃)振荡1～120小时(优选12～120小时)。进一步,优选进行核酸分解酶处理,核酸分解酶处理可以为与所述高静水压处理中的处理相同的方法。然后,优选利用与高静水压处理中的洗涤相同的方法进行洗涤。

[0031] 对于所得到的脱细胞化细胞结构体,优选进行冻结干燥处理,但并不限定于此。冻结干燥能够根据细胞结构体的部位而省略。此外,对于所得到的脱细胞化细胞结构体,可以通过伽马射线照射、UV照射等进行杀菌。

[0032] ＜＜厚度维持率＞＞

在本发明的脱细胞化细胞结构体的制造方法中,能够在所述脱细胞化工序(2)的脱细胞化之前及之后维持厚度。脱细胞化前后的厚度维持率没有限定,例如为90％以上,更优选为92％以上,进一步优选为94％以上。

厚度维持率可通过如下方式计算出。

厚度维持率(％)＝(脱细胞化细胞结构体的厚度/脱细胞化前的培养细胞结构体的厚度)×100

[0033] ＜＜硬度试验＞＞

关于本发明的脱细胞化细胞结构体的硬度,只要可得到本发明的效果则没有特别限定,例如为0.20～5.00(N)。硬度的下限优选为0.30(N),更优选为0.40(N),进一步优选为0.50(N),更进一步优选为0.60(N),更加优选为0.65(N),更加进一步优选为0.70(N),最优选为0.73(N)。硬度的上限优选为3.00(N),更优选为1.00(N),进一步优选为0.95(N),更进一步优选为0.90(N),更加优选为0.87(N),更加进一步优选为0.83(N),最优选为0.80(N)。通过使硬度在所述范围内,能够得到具有更充分的强度且不会发生排斥反应的移植片。用镊子夹持、或用外科用针进行穿刺等以进行缝合等、将本发明作为移植片进行移植时的操作变得更容易。此外,还能够提供具有任意厚度或特定形状的脱细胞化移植片。

在本发明中,关于硬度的测定,按照如下方式进行质构分析(TPA,Texture Profile Analysis)。在室温下,利用具备P/4圆柱探针(直径为4mm)的质构仪TA.XT plus(EKO INSTRUMENTS CO.,LTD)进行测定。将对探针施加有0.01(N)的载荷的点设为0点,以0.02mm/秒的速度进行两次0.5mm距离的压缩。将最初的压缩循环时的最大力(N)作为硬度。

[0034] ＜＜蛋白质＞＞

关于本发明的脱细胞化细胞结构体,只要可得到本发明的效果则没有特别限定,

例如包含(a)分子量为45,000～53,000且(b)等电点为4.00～4.90的蛋白质。由此,能够进一步发挥本发明的效果。

关于所述蛋白质的分子量及等电点(pI),例如对蛋白质进行双向电泳,蛋白质的鉴定能够通过质量分析而进行。

在双向电泳法中,可以先进行等电点分离及分子量分离中的任意一者(作为第一向),但从提高测定精度的角度出发,优选在第一向进行等电点分离,在第二向进行分子量分离。双向电泳法能够按照常规方法而进行,能够使用市售的试剂盒及装置。例如,能够将毛细管凝胶或胶条凝胶(strip gel)等作为分离介质进行等电点电泳,并使用平面状的凝胶(例如,SDS-聚丙烯酰胺凝胶),在相对于等电点电泳的展开方向为直角的方向上对完成了电泳的凝胶进行电泳,从而进行分子量分离。能够通过按照常规方法对进行了双向电泳的凝胶进行染色,确认蛋白质的有无、分子量、等电点。

[0035] 从发挥本发明的效果的角度出发,所述蛋白质A的分子量优选为45,000～53,000,更优选为47,000～51,000,进一步优选为50,000～50,500。所述蛋白质的等电点(pI)优选为4.00～4.90,更优选为4.40～4.85,进一步优选为4.60～4.80。

[0036] 作为所述蛋白质,可优选列举出微管蛋白,更优选列举出α-微管蛋白或β-微管蛋白,进一步优选列举出β-微管蛋白。对于人而言,存在α(阿尔法)、β(贝塔)、γ(伽马)、δ(德尔塔)、ε(依普西隆)这5种微管蛋白。微管蛋白在物种之间高度保守,可形成异二聚体,并进一步进行多聚化而形成微丝。α-微管蛋白和β-微管蛋白的异二聚体为参与细胞分裂的微管的基本结构单元。α-微管蛋白和β-微管蛋白具有约55000的分子量,二者类似。

对于人而言,至少鉴定出了7种β-微管蛋白同型。这些同型按照羧基末端结构域的序列,可分为I类(HM40)、II类(Hβ9)、III类(Hβ4)、IVa类(H5β)、IVb类(Hβ2)、V类及VI类(Hβ1)(罗马数字表示蛋白质同型,括号内表示为人基因分类)。III类(Hβ4),即微管蛋白β-4B链(智人)(tubulin beta-4B chain(Homo sapiens))为形成主要由细胞骨架蛋白质构成的微管的蛋白质,其具有维持细胞形状及生理活动的作用。微管蛋白β-4B链为由445个氨基酸构成的蛋白质(SEQ ID NO:1),其分子量为50255,pI为4.79。

[0037] 关于脱细胞化细胞结构体中所含有的微管蛋白的来源,只要是来自真核生物则没有特别限定,但优选来自哺乳类或鸟类的微管蛋白。作为哺乳类,可列举出牛、马、骆驼、美洲驼、驴、牦牛、绵羊、猪、山羊、鹿、羊驼、狗、貉、鼬、狐狸、猫、兔、仓鼠、旱獭、大鼠、小鼠、松鼠或浣熊等。此外,作为鸟类,可列举出鹦哥、鹦鹉、鸡、鸭、火鸡、鹅、珍珠鸡、雉、鸵鸟、鹌鹑或鸸鹋等。

[0038] 进一步,关于本发明的脱细胞化细胞结构体,只要可以获得本发明的效果,则能够包含微管蛋白的改性体。作为微管蛋白改性体,例如,可列举出以下多肽:

(1)包含在微管蛋白的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:1所表示的氨基酸序列)的一个或多个位置上,作为整体经过缺失、取代、插入和/或添加一个或多个(优选1～10个,更优选1～7个,进一步优选1～5个)氨基酸而成的氨基酸序列,例如作为整体经过缺失、取代、插入和/或添加一个～几个氨基酸而成的氨基酸序列,且具有微管蛋白的活性的多肽;或

(2)具有与微管蛋白的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:1所表示的氨基酸序列)的同源性为90％以上的氨基酸序列,且具有微管蛋白的活性的多肽。

作为微管蛋白的活性,可列举出:与作为本发明的脱细胞化细胞结构体的不含改

性体的结构体相比,提高维持脱细胞化后的厚度和硬度的能力。

[0039] (经过缺失、取代、插入和/或添加一个或几个氨基酸而成的氨基酸序列)

所述改性体可以为由在微管蛋白(例如,SEQ ID NO:1)的氨基酸序列中经过缺失、取代、插入和/或添加一个或几个氨基酸而成的氨基酸序列构成的多肽。并且,所述改性体的多肽能够维持脱细胞化后的厚度和硬度。即,所述改性体的多肽中不包含不显示出能够维持脱细胞化后的厚度和硬度的能力的多肽。在本说明书中,“经过缺失、取代、插入和/或添加一个或几个氨基酸而成的氨基酸序列”是指,通过氨基酸的取代等而进行了改性。氨基酸的改性个数例如能够为1～30个、1～20个、1～15个、1～10个,优选为1～8个,更优选为1～6个,进一步优选为1～5个,最优选为1～2个。作为能够用于本发明的改性体的氨基酸序列的例子,能够优选为该氨基酸具有一个或几个(优选1、2、3或4个)保守性取代的氨基酸序列。

[0040] (与氨基酸序列的同源性为90%以上的氨基酸序列)

所述改性体可以为由相对于微管蛋白(例如,SEQ ID NO:1)的氨基酸序列而言与氨基酸序列的同源性为90%以上的氨基酸序列构成的多肽。并且,所述改性体的多肽能够维持脱细胞化后的厚度和硬度。即,所述改性体的多肽中不包含不显示出能够维持脱细胞化后的厚度和硬度的能力的多肽。更优选由该同源性为95%以上的氨基酸序列构成且表现出能够维持脱细胞化后的厚度和硬度的能力的多肽;更优选由该同源性为96%以上的氨基酸序列构成且表现出能够维持脱细胞化后的厚度和硬度的能力的多肽;更优选由该同源性为97%以上的氨基酸序列构成且表现出能够维持脱细胞化后的厚度和硬度的能力的多肽;更优选由该同源性为98%以上的氨基酸序列构成且表现出能够维持脱细胞化后的厚度和硬度的能力的多肽;更优选由该同源性为99%以上的氨基酸序列构成且显示出能够维持脱细胞化后的厚度和硬度的能力的多肽。

[0041] 在所述微管蛋白(例如,SEQ ID NO:1)的氨基酸序列中,“经过缺失、取代、插入和/或添加一个或几个氨基酸而成的氨基酸序列”或“同源性为90%以上的氨基酸序列”虽为微管蛋白(例如,SEQ ID NO:1)的氨基酸序列经取代而成的氨基酸序列,但该氨基酸序列的取代为维持本发明中使用的微管蛋白的功能的保守性取代。换言之,“保守性取代”是指不丧失微管蛋白的优异效果的取代。即,其为即使在经所述插入、取代、或缺失或者添加时,也能够维持脱细胞化后的厚度和硬度的取代。具体而言,是指使用其他化学上类似的氨基酸残基对氨基酸残基进行取代。例如,可列举出通过其他疏水性残基取代某些疏水性残基的情况、通过具有相同电荷的其他极性残基取代某些极性残基的情况等。对于能够进行这种取代的功能上类似的氨基酸,每个氨基酸在该技术领域中为公知的氨基酸。作为非极性(疏水性)氨基酸,例如可列举出丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、脯氨酸、色氨酸、苯基丙氨酸、蛋氨酸等。作为极性(中性)氨基酸,例如可列举出甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、半胱氨酸等。作为具有正电荷的(碱性)氨基酸,可列举出精氨酸、组氨酸、赖氨酸等。此外,作为具有负电荷的(酸性)氨基酸,可列举出天冬氨酸、谷氨酸等。

[0042] 所述蛋白质(例如,微管蛋白)为形成主要由细胞骨架蛋白质构成的微管的蛋白质,推测其具有维持细胞形状的作用。即,虽并不限定于此,但认为该维持细胞形状的功能与维持脱细胞化后的厚度和硬度相关,。因此,认为所述蛋白质(例如,微管蛋白)对于脱细胞化细胞结构体的强度起到了有效的作用。

[0043] 本申请中可列举出以下的方案:

(1)一种脱细胞化细胞结构体,其为将培养细胞结构体脱细胞化而形成的脱细胞化细胞结构体,其特征在于,所述脱细胞化细胞结构体的孔隙率为30%～80%;

(2)根据(1)所述的脱细胞化细胞结构体,其中,脱细胞化结构体的硬度为0.20～5.00(N);

(3)根据(1)或(2)所述的脱细胞化细胞结构体,其中,脱细胞化细胞结构体的每单位干燥质量的DNA含量为0.020质量%以下;

(4)根据(1)～(3)中的任一项所述的脱细胞化细胞结构体,其含有:(a)分子量为45,000～53,000且(b)等电点pI为4.00～4.90的蛋白质;

(5)根据(4)所述的脱细胞化细胞结构体,其中,所述蛋白质为微管蛋白;

(6)一种脱细胞化细胞结构体的制造方法,其包括:通过培养细胞形成培养细胞结构体的培养细胞结构体形成工序,与将所述培养细胞结构体脱细胞化并使孔隙率达到30%～80%的脱细胞化工序;

(7)根据(6)所述的脱细胞化细胞结构体的制造方法,其中,在培养细胞结构体形成工序中,在形成培养细胞结构体之前或在形成培养细胞结构体的同时,将细胞培养成任意形状;

(8)根据(7)所述的脱细胞化细胞结构体的制造方法,其中,在所述培养细胞结构体形成工序中,在形成培养细胞结构体之前的细胞的任意形状的培养为片状细胞的培养或细胞凝聚体的培养;

(9)根据(6)所述的脱细胞化细胞结构体的制造方法,其中,在培养细胞结构体形成工序之后,将细胞培养成任意形状;

(10)根据(6)～(9)中任一项所述的脱细胞化细胞结构体的制造方法,其中,所述脱细胞化通过高静水压处理实施;

(11)根据(6)～(9)中任一项所述的脱细胞化细胞结构体的制造方法,其中,所述脱细胞化工序中的脱细胞前与脱细胞化后的厚度维持率为90%以上。

[0044] 本发明并不限定于上述实施方案。上述实施方案仅为示例,具有与本发明的权利要求书所记载的技术构思实质相同的构成并实现相同技术效果的方案,均涵盖在本发明的保护范围内。

实施例

[0045] 以下,通过实施例对本发明进行具体说明,但本发明的范围并不受其限定。

[0046] ＜＜实施例1＞＞

本实施例中使用成纤维细胞制造脱细胞化细胞结构体。

(培养细胞结构体的制作)

使用T-175细胞培养瓶(透气盖,175cm^2,VIOLAMO公司制造)培养NHDF-Neo-真皮成纤维细胞(CC-2509,Lonza公司制造)。当达到约90-100%的汇合率状态时将其剥离,并制造细胞悬浊液(10mL)(约2.0×10^7个细胞)。将凹坑培养板设置于10cm培养皿中,添加100%乙醇(10mL),并使其在凹坑培养板的整个表面上融合,并在确认没有气泡之后将其去除。使用磷酸缓冲液(PBS、0.01M、pH7.4)反复实施两次该操作。向凹坑培养板中添加10mL的FKCM培养基(成纤维细胞用无血清培养基,FUKOKU CO.,LTD.制造),并将上述细胞悬浊液均匀地加

入,在37℃、5％CO_2培养箱(IP400、Yamato Scientific co.,ltd.)中进行培养。过夜培养,并使用倒置显微镜(CKX31,Olympus Corporation)确认凹坑培养板内的球状体(细胞的凝聚)。以从凹坑培养板的凹坑中取出球状体的方式进行移液,将其转移至10cm培养皿中。使10cm培养皿旋转,将球状体集中到中心部并对其进行回收,将其加入网模(net mold)(ネットモールドスターターキットV6,TISSUE BY NET公司制造)中。将网模转移至装有FKCM培养基(80mL)的60mL安全柜(safe container)(WATSON Co.,Ltd.制造)中,并设置于37℃、5％CO_2培养箱内的振荡器(OS-762、OPTIMACo.,Ltd.制造)中,开始在振荡下(45rpm)的培养。每周更换1～2次一半量的培养基,并继续培养。当培养约3周后拔去网模,得到培养细胞结构体。

上述的培养细胞结构体的形成方法示出了通过权利要求中的在培养细胞结构体形成工序中,在形成培养细胞结构体之前,将细胞培养成任意形状的方法;在所述培养细胞结构体形成工序中,在形成培养细胞结构体之前的细胞的任意的形状的培养为细胞凝聚体(球状体)的培养的方法形成的例子。上述的培养细胞结构体的形成方法示出了通过将细胞凝聚体(球状体)以保持在腔内的状态下进行培养,使细胞凝聚体生产细胞外基质(Extracellular matrix、ECM),进而形成培养细胞结构体的例子。

[0047] (培养细胞结构体的脱细胞化处理)

将从网模中取出的培养细胞结构体与FKCM培养基放入尼龙真空袋(KYO BIJIN,kurilon,Inc.制造)中,使用封口机(sealer)对其四边进行双层封口。使用研究开发用高压处理装置(Dr.CHEF,KOBE STEEL,LTD.制造),以FKCM培养基作为介质,于600MPa下进行10分钟的高静水压处理。高静水压处理在最低温度为23.3℃,最高温度为35.9℃的温度域内实施。将培养细胞结构体从尼龙真空袋中取出,并转移至包埋盒(TISSUE-TEK公司制造)中,然后,浸渍于生理盐水中,于4℃下振荡洗涤5分以上。然后,将培养细胞结构体浸渍于核酸分解酶的DNaseI溶液(800U/mL)中,于4℃下振荡洗涤18小时以上。然后,将培养细胞结构体浸渍于生理盐水中,于4℃下反复进行3次5分钟以上的振荡洗涤,得到脱细胞化细胞结构体。

[0048] ＜＜实施例2＞＞

本实施例中,使用成纤维细胞,于200MPa下实施高静水压处理,制造脱细胞化细胞结构体。

除了实施200MPa的高静水压处理来代替600MPa的高静水压处理以外,重复进行实施例1的操作,得到脱细胞化细胞结构体。

[0049] ＜＜实施例3＞＞

本实施例中,使用成纤维细胞,于400MPa下实施高静水压处理,制造脱细胞化细胞结构体。

除了实施400MPa的高静水压处理来代替600MPa的高静水压处理以外,重复进行实施例1的操作,得到脱细胞化细胞结构体。

[0050] ＜＜实施例4＞＞

本实施例中,通过冻融处理制造脱细胞化细胞结构体。

利用干冰或冷冻柜将从网模中取出的培养细胞结构体冻结,并于-80℃下保存30分钟以上之后,使其在加热至37℃的磷酸缓冲液(PBS、0.01M、pH7.4)中溶解。将反复进行了3次该冻融的培养细胞结构体浸渍于核酸分解酶的DNaseI溶液(800U/mL)中,并于4℃下振荡洗涤24小时。进一步,在生理盐水中于4℃下振荡洗涤2小时以上,得到脱细胞化细胞结构

体。

[0051] ＜＜比较例1＞＞

本比较例中,通过表面活性剂处理进行脱细胞化处理。通过以下的表面活性剂处理将实施例1所得到的细胞结构体脱细胞化。

利用注射用水于4℃下对从网模中取出的培养细胞结构体洗涤1小时。然后,利用0.25质量%的十二烷基硫酸钠溶液(10mMTris、pH8.0)于4℃下对培养细胞结构体进行24小时的处理。接着,使用0.5质量%Triton-X(辛基苯基聚氧乙烯醚)溶液(10mM Tris、pH8.0)于4℃下对培养细胞结构体进行24小时的处理。然后,将培养细胞结构体浸渍于生理盐水中,于4℃下反复进行3次5分钟以上的振动洗涤,得到脱细胞化细胞结构体。

[0052] ＜＜脱细胞化DNA比的计算＞＞

测定实施例1～4及比较例1的脱细胞化细胞结构体的质量,以此为样本,在浸渍于蛋白质分解酶溶液中并溶解之后,用苯酚/氯仿进行处理以去除蛋白质,通过乙醇沉淀法回收DNA。利用PicoGreen(Life Technologies Corporation)对回收的DNA进行荧光染色,并测定荧光强度,由此对DNA进行定量,并由样本的质量与DNA的量计算出样本的DNA含量。其中,使用利用PicoGreen中附带的标准DNA制作的标准曲线进行DNA的定量。使用另外的样本,由样本的质量(水分量70%)与干燥样本(在60℃的恒温槽中保存了12小时的样本)的质量求出干燥减量比,并由样本的DNA含量与干燥减量比计算出样本的每单位干燥质量的DNA含量。将结果示于表1。

(脱细胞化DNA比)＝(脱细胞化细胞结构体的干燥试验片的DNA含量)/(脱细胞化细胞结构体的干燥试验片的质量)

[0053] [表1]

	DNA量(ng) (A)	试验片的质量(mg) (B)	脱细胞化DNA比 (A／B×１００；质量%)
实施例1	87.9	6.64	0.00132
实施例2	178.0	9.29	0.00192
实施例3	137.5	8.51	0.00162
实施例4	166.7	9.15	0.00182
比较例1	2106.4	6.68	0.0315

[0054] ＜＜石蜡包埋组织标本及切片染色样本的制作＞＞

作为预处理,将实施例1～4或比较例1中得到的脱细胞化细胞结构体在4质量%PFA(用于固定组织的4质量%多聚甲醛磷酸缓冲液、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造)中浸渍48小时以上。然后,将脱细胞化细胞结构体浸渍于磷酸缓冲液(PBS、0.01M、pH7.4)中,并于4℃下进行30分钟以上的振荡洗涤。接着,将脱细胞化细胞结构体浸渍于70质量%乙醇中,并于4℃下进行30分钟以上的振荡洗涤,制成用于制作石蜡包埋组织标本的样本。

[0055] 按照以下的步骤由上述样本制作石蜡包埋组织标本,制作用于染色的切片染色样本(后述)。用自来水冲洗组织30分钟～40分钟以去除甲醛。使用石蜡包埋装置(CT-Pro20,GENOSTAFF CO.,LTD.制造),在乙醇浴中按照以下步骤对样本进行脱水。

70质量％乙醇20分钟(×1)→

95质量％乙醇20分钟(×2)→

100质量％乙醇20分钟(×2)

进一步,在二甲苯中洗涤样本2次,每次20分钟。将样本在65℃的石蜡浴中培养2次,每次30分钟。将融化的石蜡注入模具中,并将样本放入模具并使其冷却15-20分钟,制作石蜡包埋组织标本。接着,使用石蜡包埋组织标本,在切片机上制作厚度为5μm连续切片,并使其悬浮于装有脱离子水的37℃的水槽中。将切片一片一片地浮在载置在载玻片上的蒸馏水上,在展片台上进行加热(30-40℃)而使其展平,在恒温器中(37℃)放置1-2晚,从而使其干燥,制成切片染色样本。

[0056] (天狼星红染色)

按照以下步骤,进行切片染色样本的天狼星红染色,将细胞外基质(Extracellular matrix,ECM)染色。

首先,对切片染色样本进行脱蜡处理,使其在蒸馏水中水合,并用蒸馏水进行冲洗。接着,用铁苏木精(将铁苏木精I(1质量％苏木精(Sigma-Aldrich公司制造)/95质量％乙醇)与铁苏木精II(MUTO PURE CHEMICALS CO.,LTD.制造)等量混合)对切片染色样本进行2分钟的处理,并用蒸馏水进行冲洗。接着,用0.5质量％盐酸/70质量％乙醇溶液处理3分钟。然后,用0.2质量％磷钼酸水溶液处理5分钟。接着,用0.1质量％Direct Red80(天狼星红、Sigma-Aldrich公司制造)/饱和苦味酸溶液处理90分钟。接着,用0.01N盐酸进行3次浸泡处理(dip treatment)。然后,将切片染色样本脱水,通过透明利用二甲苯进行脱水,并用封片剂(Mount-Quick,OHMICHI Co.,ltd.制造)进行封片。

[0057] ＜＜孔隙率的计算＞＞

用显微镜观察所得到的天狼星红染色切片,并以10倍的倍率对切片进行摄影,并使用图像处理软件(ImageJ),计算出实施例1～4及比较例1的脱细胞化细胞结构体的孔隙率。读取切片染色样本的图像,分别测量脱细胞化细胞结构体整体的面积与天狼星红染色部分(ECM)的面积。

按照下述公式,计算出脱细胞化细胞结构体的孔隙率。作为测定区域,设定四边形(310μm×310μm)的区域,求出三处孔隙率的平均值。为了排除较大的孔洞,设定不含34,000(约35％)μm^2以上的孔洞的区域。

孔隙率(％)＝(脱细胞化细胞结构体整体的面积(测定区域)－实施例或比较例的天狼星红染色部分的面积)/脱细胞化细胞结构体整体的面积(测定区域)×100

[0058] ＜＜厚度维持率的计算＞＞

由培养细胞结构体的厚度与实施例1～4及比较例1的脱细胞化细胞结构体的厚度计算出厚度维持率。另外,在后述的图2中,培养细胞结构体的厚度是指未处理。

厚度维持率(％)＝(脱细胞化细胞结构体的厚度/培养细胞结构体的厚度)×100

[0059] 将孔隙率的结果示于图1,将计算厚度维持率而得到的结果示于图2。关于孔隙率,实施例1～4为30～80％,比较例1为大于实施例的值。此外,关于厚度维持率,相较于比较例1,实施例1～4中,脱细胞化后相对于脱细胞化前的厚度得以维持,且脱细胞化前后的形状得以维持。由此可知,通过将脱细胞化细胞结构体的孔隙率设为规定值,能够维持细胞结构体的脱细胞化前后的形状,并且能够将脱细胞化细胞结构体制成任意形状。

[0060] ＜＜硬度试验＞＞

为了测定实施例及比较例中得到的脱细胞化细胞结构体的硬度,按照如下方法进行质构分析(TPA、Texture Profile Analysis)。

TPA通过在室温下利用具备P/4圆柱探针(直径4mm)的质构仪TA.XT plus(EKO INSTRUMENTS CO.,LTD.)而实施。将对探针施加0.01(N)的载荷的点设为0点,并以0.02mm/秒的速度压缩两次0.5mm的距离。将最初的压缩循环时的最大力(N)表示为硬度。

对以下的制造例1、2也进行同样的测定。

[0061] (制造例1)

将牛心包膜切成片状,去除整体脂肪(以下,将该片状的牛心包膜称作“心包膜片”)。将其作为制造例1的心包膜片。

[0062] (制造例2)

将制造例1的心包膜片装入尼龙真空袋中,将向注射用水添加磷酸缓冲液(PBS、0.01M、pH7.4)而形成的物质作为介质,使用研究开发用高压处理装置,于600MPa下进行10分钟的高静水压处理。将经高静水压处理的心包膜片浸渍于核酸分解酶的DNaseI(125U/mL)中,并于4℃下振荡洗涤18小时以上,接着在80%乙醇中于4℃下处理1小时以上,最后于4℃下用4L注射用水进行洗涤。在进行冻结干燥处理之后,实施伽马射线照射(25kGy)。将其作为制造例2的脱细胞化心包膜片(脱细胞化组织)。

[0063] 将试验结果分别示于图4。制造例1的心包膜片的硬度为10.13(N),制造例2的脱细胞化心包膜片(脱细胞化组织)的硬度为13.62(N)。

可知与比较例相比,实施例能够维持硬度,并且能够稳定地用作移植片。特别是,可知实施例1在作为移植片的稳定性方面得到了良好的结果。此外,可知实施例比制造例1的心包膜片及制造例2的脱细胞化组织更柔软,具有不同于制造例1和制造例2的硬度。

[0064] ＜＜蛋白质的分析＞＞

关于所述实施例1的脱细胞化细胞结构体与比较例1的脱细胞化细胞结构体的组成差异,通过双向电泳进行分析。

向实施例及比较例的脱细胞化细胞结构体中添加0.3mL蛋白质溶解溶液(含尿素和表面活性剂),于室温下以1,400rpm振荡2小时。在利用POLYTRON均质机进行均质之后,以20,000Xg于室温下进行30分钟离心并回收上清。使用2-D Clean-Up Kit(2-D纯化试剂盒)(cytiiva,Global Life Sciences Technologies Japan K.K.)进行样本溶液的纯化。然后,实施蛋白质定量、导电度测定,并确认测定值在允许实施双向电泳的范围内,将其作为双向电泳用试料。

向双向电泳用试料中添加缓冲液之后,添加蛋白质溶解溶液(含尿素和表面活性剂),从而将总量制成0.34mL,并将此作为试样溶液。将试样溶液加入溶胀用托盘中,将第一向电泳预制胶(Immobiline DryStrip(Immobiline胶条),cytiiva,Global Life Sciences Technologies Japan K.K.)覆盖在溶液上,进一步覆盖干胶条覆盖液(PlusOne DryStrip Cover Fluid(PlusOne干胶条覆盖液),cytiiva,Global Life Sciences Technologies Japan K.K.)并静置过夜。将溶胀的预制胶设置在电泳装置(Multiphor II Electrophoresis Unit(Multiphor II电泳装置),cytiiva,Global Life Sciences Technologies Japan K.K.)中,进行电泳(于500V下1分钟,并于3500V下7.5小时,20℃)。

使用具有10～20％的浓度梯度的丙烯酰胺凝胶。在制备后静置24小时，使丙烯酰胺完全聚合。将经平衡化的第一向电泳预制胶载置在丙烯酰胺凝胶上，使用加入了0.125％溴酚蓝的1％琼脂糖溶液进行固定。在凝胶左端施加分子量标记，作为分子量的标准，以80V进行17小时的电泳，直至在凝胶下端能够看到溴酚蓝的条带。

[0065] ＜＜蛋白质染色＞＞

使用全蛋白质检测用荧光染色剂(SYPRO Ruby protein gel stain(SYPRO Ruby蛋白凝胶染色剂)，S21900，Thermo Fisher Scientific Inc.)对电泳后的凝胶进行染色，使用荧光扫描仪保存图像。使用扫描仪获得的图像的读取，在激发波长：488nm、荧光滤光片：640nm Bandpass(带通滤光片)、分辨率：100micrometer(微米)下进行。

将所得到的荧光染色像的tiff图像文件导入ImageMaster Platinum(cytiiva，Global Life Sciences Technologies Japan K.K.)，并进行数值化分析。在数值化分析中，首先，手动对凝胶的共通点标记特征点(landmark)。在对每片凝胶进行直至340个点的标记特征点的操作之后，进行凝胶的匹配。通过该操作，在两片凝胶(加样有实施例1的凝胶及加样有比较例1的凝胶)上展开的点被赋予了共通的点ID。然后，进行凝胶的点检测，并计算出点信号浓度(％体积)。

点信号浓度由点的信号在凝胶内的所有点的合计信号中所占的比例计算出。％体积值以百分率表示，并将最小表示设为0.001％。

将满足下述两个条件的点设为蛋白质鉴定的条件。

• SYPRO Ruby染色像的点信号浓度的总和(每两片彼此组合时的凝胶彼此的和)为0.1以上；

• 点的浓度变化量(每两片彼此组合时的凝胶之间的变化量)为0.5倍以下或2倍以上。

将双向电泳的结果示于图5。实施例1在等电点pI为4.00～4.90、分子量为45,000～53,000处检测到1个点(1)。然而，比较例1并未检测到实施例1中检测到的点。可知实施例1含有比较例1中没有的特定蛋白质。

[0066] ＜＜点的鉴定＞＞

在读取荧光染色图像之后，使用硝酸银(195-09382，FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造)进行银染色。

切取通过银染色而可视化的点，在切断为1mm见方大小的凝胶片上加入15mM铁氰化钾、50mM硫代硫酸钠100μL，并振荡10分钟。废弃溶液，加入Milli-Q水并进行振荡，洗涤至凝胶片脱色。对凝胶片加入乙腈，从而进行脱水。加入100mM碳酸氢铵、0.02μg/μL胰蛋白酶的酶溶液10μL，使凝胶片溶胀，并于37℃放置16小时。加入50μL的0.1％TFA、50％乙腈，并振荡20分钟，提取肽。进行2次提取。使用真空离心机将肽提取液浓缩至约10μL。使样本吸附在ZipTip C18(millipore(微孔过滤器)，ZTC18S960)上，并使用60％乙腈、0.1％TFA溶液2.5μL，使肽溶出。将1μL的样本溶液与1μL的CHCA基质溶液混合，滴加在靶板上并使其干燥之后，使用质谱仪(ultrafleXtreme)进行测定。基于得到的质量值，进行登录于数据库(NCBI Refseq)中的蛋白质的鉴定。

分析装置ultrafleXtreme(Bruker Daltonics)

靶板MTP Anchorchip 600/384(209513，Bruker Daltonics)

极性positive mode(阳性模式)

检测模式reflector mode(反射模式)(300-6,000m/z)

CHCA基质溶液0.3g/L CHCA、33％丙酮、66％乙醇

MS/MS Ion Search检索条件

鉴定软件Mascot(Matrix Science)

数据库NCBI RefSeq

检索生物种类human(人)(Genome assembly GRCh38.p13)

酶胰蛋白酶

固定修饰脲甲基化

[0067] 将使用质量分析仪对实施例1的点进行鉴定所获得的结果示于表2。表2的点编号对应于图5的点编号。点被鉴定为微管蛋白。

[0068] [表2]

点编号	蛋白质名称	分子量	等电点
①	微管蛋白β-4B链	50255	4.79

工业实用性

[0069] 本发明的脱细胞化细胞结构体能够作为不会发生排斥反应的移植片用于各种疾病的治疗。

序列表

<110> 株式会社ADEKA
<120> 脱细胞化细胞结构体
<130> KHP232111840.2
<150> JP 2021-103763
<151> 2021-06-23
<160> 1
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 445
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 1

Met Arg Glu Ile Val His Leu Gln Ala Gly Gln Cys Gly Asn Gln Ile
1 5 10 15
Gly Ala Lys Phe Trp Glu Val Ile Ser Asp Glu His Gly Ile Asp Pro
20 25 30
Thr Gly Thr Tyr His Gly Asp Ser Asp Leu Gln Leu Glu Arg Ile Asn
35 40 45
Val Tyr Tyr Asn Glu Ala Thr Gly Gly Lys Tyr Val Pro Arg Ala Val
50 55 60
Leu Val Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp Ser Val Arg Ser Gly Pro
65 70 75 80
Phe Gly Gln Ile Phe Arg Pro Asp Asn Phe Val Phe Gly Gln Ser Gly
85 90 95
Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr Thr Glu Gly Ala Glu Leu
100 105 110
Val Asp Ser Val Leu Asp Val Val Arg Lys Glu Ala Glu Ser Cys Asp
115 120 125
Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Thr His Ser Leu Gly Gly Gly Thr Gly
130 135 140
Ser Gly Met Gly Thr Leu Leu Ile Ser Lys Ile Arg Glu Glu Tyr Pro
145 150 155 160
Asp Arg Ile Met Asn Thr Phe Ser Val Val Pro Ser Pro Lys Val Ser
165 170 175
Asp Thr Val Val Glu Pro Tyr Asn Ala Thr Leu Ser Val His Gln Leu
180 185 190
Val Glu Asn Thr Asp Glu Thr Tyr Cys Ile Asp Asn Glu Ala Leu Tyr

195 200 205

Asp Ile Cys Phe Arg Thr Leu Lys Leu Thr Thr Pro Thr Tyr Gly Asp
210 215 220

Leu Asn His Leu Val Ser Ala Thr Met Ser Gly Val Thr Thr Cys Leu
225 230 235 240

Arg Phe Pro Gly Gln Leu Asn Ala Asp Leu Arg Lys Leu Ala Val Asn
245 250 255

Met Val Pro Phe Pro Arg Leu His Phe Phe Met Pro Gly Phe Ala Pro
260 265 270

Leu Thr Ser Arg Gly Ser Gln Gln Tyr Arg Ala Leu Thr Val Pro Glu
275 280 285

Leu Thr Gln Gln Met Phe Asp Ala Lys Asn Met Met Ala Ala Cys Asp
290 295 300

Pro Arg His Gly Arg Tyr Leu Thr Val Ala Ala Val Phe Arg Gly Arg
305 310 315 320

Met Ser Met Lys Glu Val Asp Glu Gln Met Leu Asn Val Gln Asn Lys
325 330 335

Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu Trp Ile Pro Asn Asn Val Lys Thr Ala
340 345 350

Val Cys Asp Ile Pro Pro Arg Gly Leu Lys Met Ser Ala Thr Phe Ile
355 360 365

Gly Asn Ser Thr Ala Ile Gln Glu Leu Phe Lys Arg Ile Ser Glu Gln
370 375 380

Phe Thr Ala Met Phe Arg Arg Lys Ala Phe Leu His Trp Tyr Thr Gly
385 390 395 400

Glu Gly Met Asp Glu Met Glu Phe Thr Glu Ala Glu Ser Asn Met Asn
405 410 415

Asp Leu Val Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln Asp Ala Thr Ala Glu Glu
420 425 430

Glu Gly Glu Phe Glu Glu Glu Ala Glu Glu Glu Val Ala
435 440 445

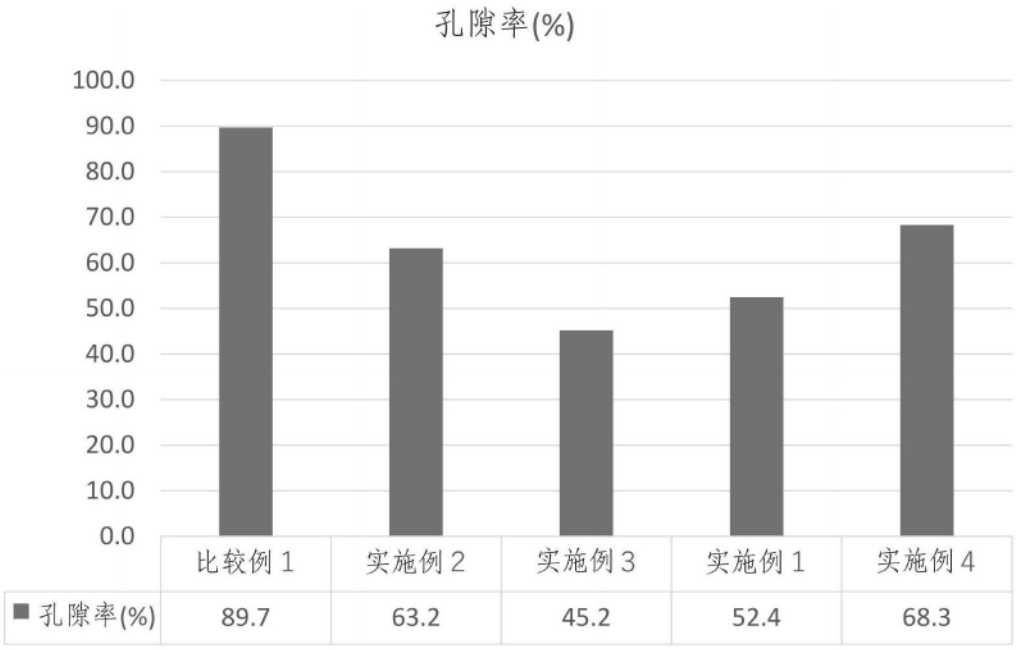

孔隙率(%)
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
比较例 1
实施例 2
实施例 3
实施例 1
实施例 4
孔隙率(%)
89.7
63.2
45.2
52.4
68.3

图1

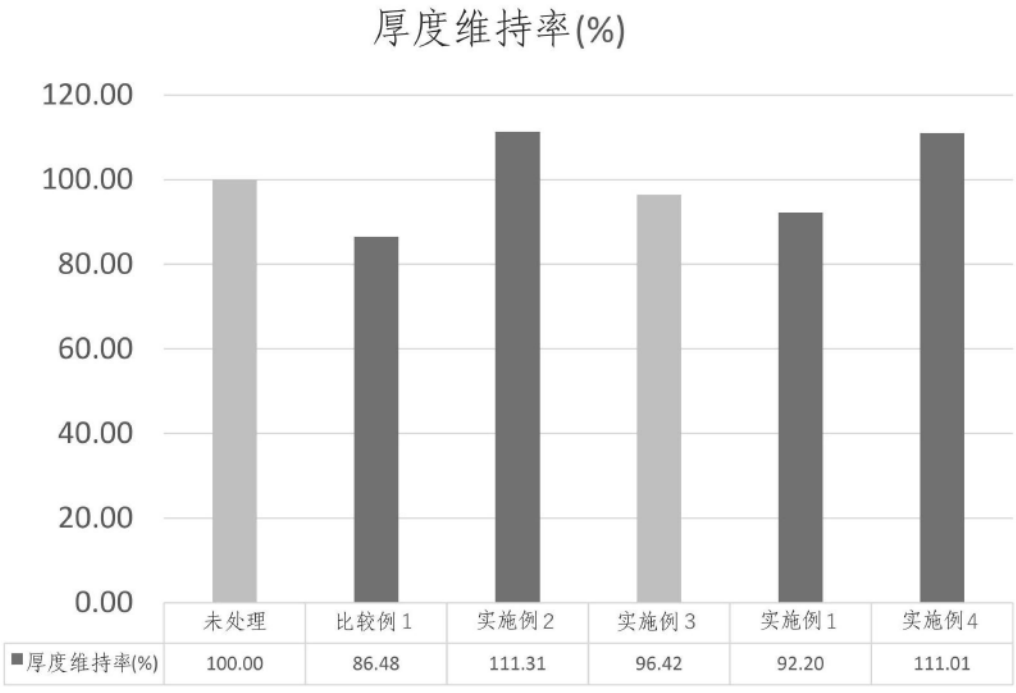

厚度维持率(%)
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
未处理
比较例 1
实施例 2
实施例 3
实施例 1
实施例 4
厚度维持率(%)
100.00
86.48
111.31
96.42
92.20
111.01

图2

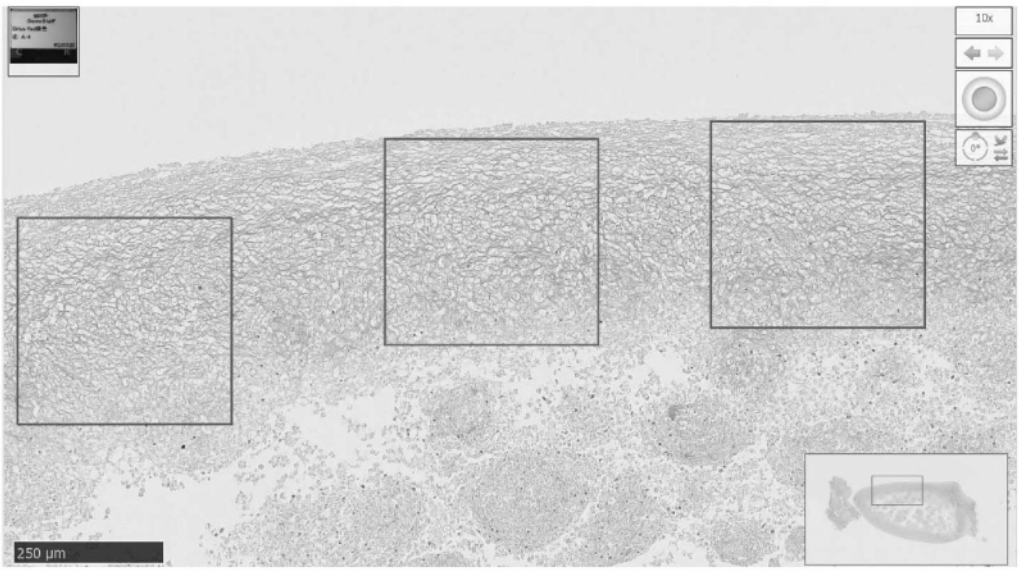

250 μm

图3

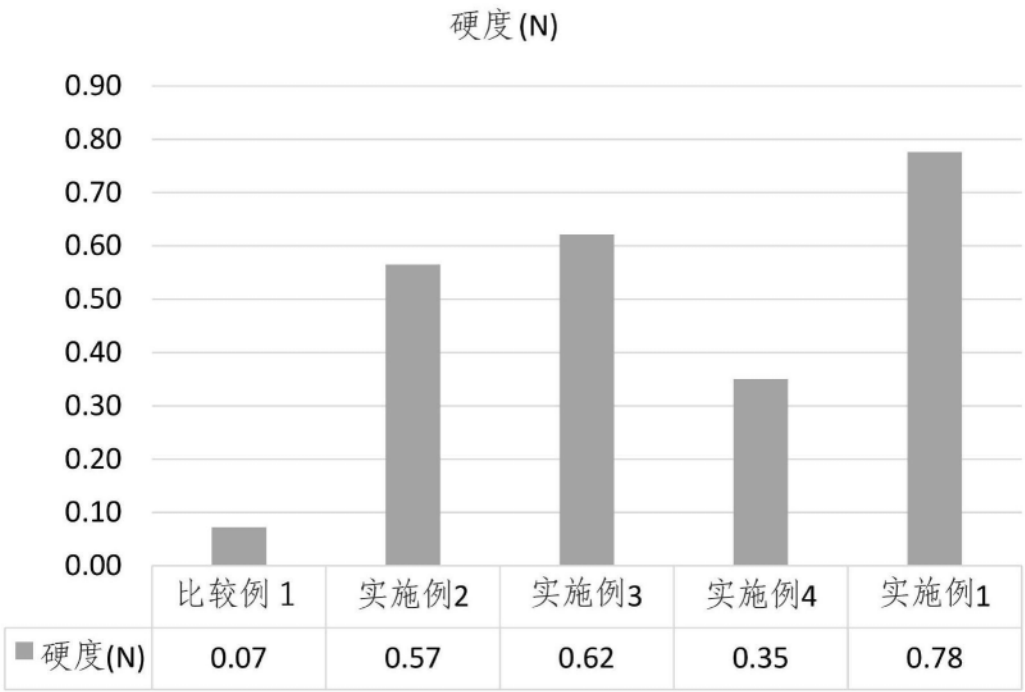

硬度(N)
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
比较例 1
实施例2
实施例3
实施例4
实施例1
硬度(N)
0.07
0.57
0.62
0.35
0.78

图4

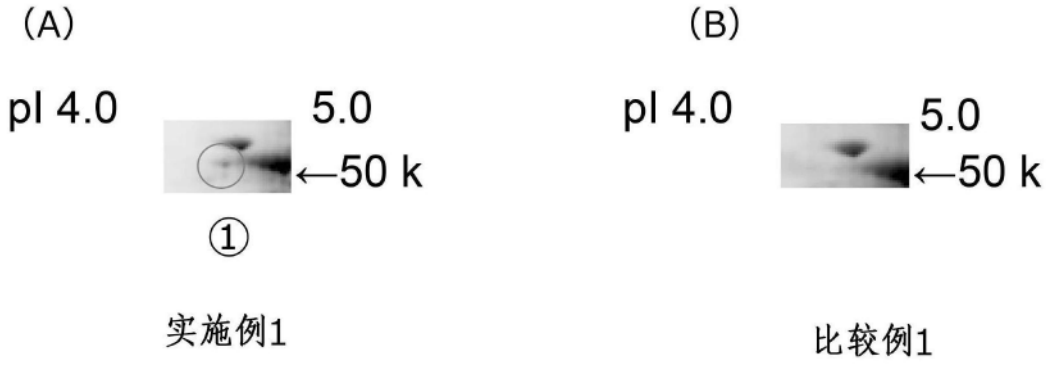


图5