

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年5月31日(31.05.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/097189 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/0775 (2010.01) *C12M 3/00* (2006.01) SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/042042
- (22) 国際出願日: 2017年11月22日(22.11.2017)
- (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 2016-228099 2016年11月24日(24.11.2016) JP
- (71) 出願人:株式会社バイオ未来工房(BIOFUTURE TECHNOLOGIES LTD.) [JP/JP]; 〒1050014 東京都港区芝3-17-15 クリエイト三田106 Tokyo (JP). 日本ゼオン株式会社(ZEON CORPORATION) [JP/JP]; 〒1008246 東京都千代田区丸の内一丁目6番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 石塚 保行 (ISHIZUKA Yasuyuki); 〒1050014 東京都港区芝3-17-15 クリエイト三田106 株式会社バイオ未来工房内 Tokyo (JP). 足達 慧(ADACHI Satoru); 〒1008246 東京都千代田区丸の内一丁目6番2号 日本ゼオン株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 杉村 憲司 (SUGIMURA Kenji); 〒1000013 東京都千代田区霞が関三丁目2番1号 霞が関コモンゲート西館36階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
- (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), 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))

(54) **Title:** STEM CELL ISOLATION METHOD AND USE OF NONWOVEN FABRIC FORMED OF NORBORNENE-BASED POLYMER

(54) 発明の名称: 幹細胞の分離方法及びノルボルネン系重合体で構成される不織布の使用

(57) **Abstract:** The present invention selectively isolates and cultures a specific stem cell with ease by means of a simple culturing operation. Provided is a method for isolating stem cells, wherein a group of tissue-derived cells including stem cells is cultured on a nonwoven fabric in which at least a culturing surface thereof is formed of a norbornene-based polymer.

(57) 要約: 単純な培養操作で、容易に特定の幹細胞を選択的に分離培養する。幹細胞を含む組織由来細胞群を、少なくとも培養面がノルボルネン系重合体で構成される不織布上で培養する、幹細胞の分離方法を提供する。



WO 2018/097189 A1

明 細 書

発明の名称：

幹細胞の分離方法及びノルボルネン系重合体で構成される不織布の使用 技術分野

[0001] 本発明は、幹細胞を含む細胞群から幹細胞を分離する幹細胞の分離方法、及びこの方法を実施するためのノルボルネン系重合体で構成される不織布の使用に関する。

背景技術

[0002] 近年、幹細胞又は幹細胞から派生した細胞を用いて、ダメージを受けた患者の細胞や組織を修復したり再生したりする幹細胞治療の開発が進んでいる。例えば、特許文献1には、患者から脂肪組織を取得し、濃縮処理により濃縮された幹細胞を患者へ投与する閉鎖系の治療システムが提案されている。

[0003] こうした目的に用いられる幹細胞は、脂肪吸引手術により取得された脂肪組織細胞群などから調製される。採取された脂肪組織細胞群から幹細胞を取得するためには、通常、遠心分離処理やコラゲナーゼ等の酵素による処理を行い、脂肪幹細胞や繊維芽細胞や血管内皮細胞や血管平滑筋様細胞などの脂肪組織由来細胞と血液由来細胞とその他の細胞とからなる間質血管細胞群を得る（例えば、特許文献2参照）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第03／053346号

特許文献2：国際公開第2005／042730号

特許文献3：特開2013－034436号公報

特許文献4：特開2008－199897号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] このようにして得られた細胞群にも様々な細胞が含まれており、この中か

ら幹細胞を効率よく単離することが求められている。

[0006] 不織布を幹細胞の分離に用いる例は多くあり、通常、特許文献3などに記載されているように、不織布は濾過基材として用いられている。しかしながら、この方法では、細胞の懸濁液を調製する必要があり、懸濁液の濃度調整なども必要となる。

一方、細胞の懸濁液を用いない方法として、特許文献4では、ハイドロキシアパタイトで表面をコートした不織布を用いて細胞を培養する方法が提案されている。しかしながら、この方法は、不織布表面のハイドロキシアパタイトが均一にコートされていることを担保することが難しいことに加え、不織布に塗布されたハイドロキシアパタイトが剥離しやすいという問題を有している。

[0007] 本発明は、かかる従来技術の実情に鑑みてなされたものであり、単純な培養操作で、容易に特定の幹細胞を選択的に分離培養することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決すべく、組織由来細胞群からの幹細胞の分離方法について鋭意検討を行った。

その結果、少なくとも細胞を培養する面（培養面）がノルボルネン系重合体で構成される不織布上で、脂肪組織由来細胞群を培養すると、表面コート処理などをしなくても脂肪幹細胞のみが不織布表面に接着するため、脂肪幹細胞を選択的に分離培養することができ、結果として、脂肪幹細胞を分離することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] かくして本発明によれば、下記（１）、（２）の幹細胞の分離方法、及び（３）のノルボルネン系重合体で構成される不織布の使用が提供される。

（１）幹細胞を含む組織由来細胞群を、少なくとも培養面がノルボルネン系重合体で構成される不織布上で培養する、幹細胞の分離方法。

（２）前記組織由来細胞群が、脂肪組織由来の細胞群である、（１）に記載の幹細胞の分離方法。

（３）幹細胞を含む組織由来細胞群から幹細胞を分離するための、少なくと

も培養面がノルボルネン系重合体で構成される不織布の使用。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、単純な培養操作で、容易に特定の幹細胞を選択的に分離培養することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、実施例1におけるゼオノア不織布上に増殖している培養開始から18日後の脂肪組織由来の間葉系幹細胞（ASC）の位相差顕微鏡写真である。

[図2]図2は、実施例1におけるゼオネックス不織布2上に増殖している培養開始から18日後のASCの位相差顕微鏡写真である。

[図3]図3は、実施例1において、フラスコ内で4日間継代培養したASCの位相差顕微鏡写真である。

[図4]図4は、実施例2におけるゼオノア不織布上に増殖している培養開始から18日後の骨髓由来幹細胞（BMSC）の位相差顕微鏡写真である。

[図5]図5は、実施例2におけるゼオネックス不織布1上に増殖している培養開始から18日後のBMSCの位相差顕微鏡写真である。

[図6]図6は、実施例2において、フラスコ内で4日間継代培養したBMSCの位相差顕微鏡写真である。

[図7]図7は、比較例におけるBMSCの位相差顕微鏡写真である。

[図8]図8は、比較例におけるBMSCの位相差顕微鏡写真である。

[図9]図9は、実施例3における脂肪細胞が染色された顕微鏡写真である。

[図10]図10は、実施例3における骨芽細胞が染色された顕微鏡写真である。

[図11]図11は、実施例3における軟骨細胞が染色された顕微鏡写真である。

[図12]図12は、実施例3における神経細胞が染色された蛍光顕微鏡写真である。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。

本発明に用いるノルボルネン系重合体で構成される不織布（以下、単に「本発明に用いる不織布」又は「不織布」ということがある）は、少なくとも培養面が繊維状のノルボルネン系重合体で構成されるものである。

本発明の不織布において、「少なくとも培養面がノルボルネン系重合体で構成される」とは、少なくとも細胞を培養する面（細胞と接触する部分、例えば、不織布の片面を構成する繊維）が、ノルボルネン系重合体を含むことを意味する。なお、培養面がノルボルネン系重合体のみからなることとしてもよい。

[0013] 本発明に用いる不織布は、通常、細胞を培養するのに用いられる様々な容器の中に入れて用いることができる。不織布は容器底面から浮いていても、容器底面に沈んでいても良い。また、細胞は不織布の片面のみに接着していても、両面に接着していても良いが、細胞の保持性の観点から、不織布は容器の底面全面を覆い、不織布の片面のみに細胞を接着させ、増殖させることが望ましい。

不織布を入れる容器の材質は特に制限されず、細胞培養用のポリスチレン製容器やガラス容器などの従来公知の容器を用いることができる。

[0014] 本発明に用いる不織布を構成するノルボルネン系重合体は、ノルボルネン骨格を有する単量体単位を、ノルボルネン系重合体を構成する全単量体単位に対して50質量%以上、好ましくは60質量%以上含む重合体である。より具体的には、ノルボルネン系重合体は、ノルボルネン骨格を有する単量体であるノルボルネン系単量体を重合してなるものであり、開環重合によって得られるものと、付加重合によって得られるものに大別される。

[0015] 開環重合によって得られるものとしては、ノルボルネン系単量体の一種若しくは二種以上の混合物を開環重合して得られる開環重合体、ノルボルネン系単量体とこれと開環共重合可能なその他の単量体とを開環重合して得られる開環重合体、及び、これらの水素化物などが挙げられる。

付加重合によって得られるものとしては、ノルボルネン系単量体の一種若

しくは二種以上の混合物を付加重合して得られる付加重合体及びノルボルネン系単量体とこれと共重合可能なその他の単量体とを付加重合して得られる付加重合体などが挙げられる。

これらの中でも、本願発明の効果がより得られ易いことから、ノルボルネン系単量体の一種若しくは二種以上の混合物を開環重合して得られる開環重合体の水素化物、又は、ノルボルネン系単量体とこれと開環共重合可能なその他の単量体とを開環重合して得られる開環重合体の水素化物が好ましく、ノルボルネン系単量体の一種若しくは二種以上の混合物を開環重合して得られる開環重合体の水素化物がより好ましい。

[0016] ノルボルネン系重合体の合成に使用可能なノルボルネン系単量体としては、ビスクロ〔2. 2. 1〕ヘプター-2-エン（慣用名ノルボルネン）、5-メチルビスクロ〔2. 2. 1〕ヘプター-2-エン、5, 5-ジメチルビスクロ〔2. 2. 1〕ヘプター-2-エン、5-エチルビスクロ〔2. 2. 1〕ヘプター-2-エン、5-エチリデンビスクロ〔2. 2. 1〕ヘプター-2-エン、5-ビニルビスクロ〔2. 2. 1〕ヘプター-2-エン、5-プロピニルビスクロ〔2. 2. 1〕ヘプター-2-エン、5-メトキシカルボニルビスクロ〔2. 2. 1〕ヘプター-2-エン、5-シアノビスクロ〔2. 2. 1〕ヘプター-2-エン、5-メチル-5-メトキシカルボニルビスクロ〔2. 2. 1〕ヘプター-2-エン等の2環式単量体；

トリシクロ〔4. 3. 0^{1, 6}. 1^{2, 5}〕デカー-3, 7-ジエン（慣用名ジシクロペンタジエン）、2-メチルジシクロペンタジエン、2, 3-ジメチルジシクロペンタジエン、2, 3-ジヒドロキシジシクロペンタジエン等の3環式単量体；

テトラシクロ〔4. 4. 0. 1^{2, 5}. 1^{7, 10}〕-3-ドデセン（テトラシクロドデセン）、テトラシクロ〔4. 4. 0. 1^{2, 5}. 1^{7, 10}〕-3-ドデセン、8-メチルテトラシクロ〔4. 4. 0. 1^{2, 5}. 1^{7, 10}〕-3-ドデセン、8-エチルテトラシクロ〔4. 4. 0. 1^{2, 5}. 1^{7, 10}〕-3-ドデセン、8-エチリデンテトラシクロ〔4. 4. 0. 1^{2, 5}. 1^{7, 10}〕-3-

ドデセン、8, 9-ジメチルテトラシクロ [4. 4. 0. 1^{2, 5}. 1^{7, 10}]
 -3-ドデセン、8-エチル-9-メチルテトラシクロ [4. 4. 0. 1^{2, 5}
 . 1^{7, 10}] -3-ドデセン、8-エチリデン-9-メチルテトラシクロ [4
 . 4. 0. 1^{2, 5}. 1^{7, 10}] -3-ドデセン、8-メチル-8-カルボキシ
 メチルテトラシクロ [4. 4. 0. 1^{2, 5}. 1^{7, 10}] -3-ドデセン、

7, 8-ベンゾトリシクロ [4. 3. 0. 1^{2, 5}] デカー3-エン（慣用名
 メタノテトラヒドロフルオレン：1, 4-メタノ-1, 4, 4a, 9a-テ
 تراヒドロフルオレンともいう）、1, 4-メタノ-8-メチル-1, 4,
 4a, 9a-テトラヒドロフルオレン、1, 4-メタノ-8-クロロ-1,
 4, 4a, 9a-テトラヒドロフルオレン、1, 4-メタノ-8-ブromo-
 1, 4, 4a, 9a-テトラヒドロフルオレン等の4環式単量体；等が挙げ
 られる。

これらのノルボルネン系単量体は、置換基を1種又は2種以上有してい
 もよい。置換基としては、アルキル基、アルキレン基、アリール基、シリル
 基、アルコキシカルボニル基、アルキリデン基等が挙げられる。

[0017] ノルボルネン系単量体と開環共重合可能なその他の単量体としては、シク
 ロヘキセン、シクロヘプテン、シクロオクテン、1, 4-シクロヘキサジエ
 ン、1, 5-シクロオクタジエン、1, 5-シクロデカジエン、1, 5, 9
 -シクロドデカトリエン、1, 5, 9, 13-シクロヘキサデカテトラエン
 等の単環のシクロオレフィン系単量体が挙げられる。

[0018] ノルボルネン系単量体と付加共重合可能なその他の単量体としては、エチ
 レン、プロピレン、1-ブテン、1-ペンテン、1-ヘキセン等の炭素数2
 ~20の α -オレフィン系単量体；シクロブテン、シクロペンテン、シクロ
 ヘキセン、シクロオクテン、テトラシクロ [9. 2. 1. 0^{2, 10}. 0^{3, 8}]
 テトラデカー3, 5, 7, 12-テトラエン（3a, 5, 6, 7a-テトラ
 ヒドロ-4, 7-メタノ-1H-インデンとも言う）等のシクロオレフィン
 系単量体；1, 4-ヘキサジエン、4-メチル-1, 4-ヘキサジエン、5
 -メチル-1, 4-ヘキサジエン、1, 7-オクタジエン等の非共役ジエン

系単量体；等が挙げられる。

これらの中でも、ノルボルネン系単量体と付加共重合可能なその他の単量体としては、 α -オレフィン系単量体が好ましく、エチレンがより好ましい。

これらのその他の単量体は、置換基を1種又は2種以上有していてもよい。置換基としては、アルキル基、アルキレン基、アリール基、シリル基、アルコキシカルボニル基、アルキリデン基等が挙げられる。

[0019] ノルボルネン系単量体の開環重合体、又はノルボルネン系単量体とこれと開環共重合可能なその他の単量体との開環重合体は、単量体成分を、公知の開環重合触媒の存在下で重合して得ることができる。

開環重合触媒としては、例えば、ルテニウム、オスミウムなどの金属のハロゲン化物と、硝酸塩又はアセチルアセトン化合物、及び還元剤とからなる触媒、あるいは、チタン、ジルコニウム、タングステン、モリブデンなどの金属のハロゲン化物又はアセチルアセトン化合物と、有機アルミニウム化合物とからなる触媒を用いることができる。

ノルボルネン系単量体の開環重合体水素化物は、通常、上記開環重合体の重合溶液に、ニッケル、パラジウムなどの遷移金属を含む公知の水素化触媒を添加し、炭素-炭素不飽和結合を水素化することにより得ることができる。

[0020] ノルボルネン系単量体の付加重合体、又はノルボルネン系単量体とこれと共重合可能なその他の単量体との付加重合体は、単量体成分を、公知の付加重重合触媒の存在下で重合して得ることができる。

付加重重合触媒としては、例えば、チタン、ジルコニウム又はバナジウム化合物と有機アルミニウム化合物とからなる触媒を用いることができる。

[0021] ノルボルネン系重合体の分子量に格別な制限はないが、シクロヘキサン溶液（重合体が溶解しない場合はトルエン溶液）のゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー（GPC）で測定したポリスチレン換算の重量平均分子量で、通常5,000以上であり、好ましくは5,000~500,000

、より好ましくは8,000～200,000、特に好ましくは10,000～100,000である。重量平均分子量がこの範囲内であるときに、機械的強度と成形加工性とが高度にバランスし、好適である。

[0022] ノルボルネン系重合体のガラス転移温度は、使用目的に応じて適宜選択されればよいが、通常50～300℃、好ましくは100～280℃、特に好ましくは115～250℃、さらに好ましくは130～200℃である。ガラス転移温度がこの範囲内であるときに、耐熱性と成形加工性とが高度にバランスし、好適である。

本発明においてガラス転移温度は、JIS K 7121に基づいて測定されたものである。

[0023] ノルボルネン系重合体は、それぞれ単独で、あるいは2種以上を組み合わせ用いることができる。

また、不織布を構成する樹脂成分として、ノルボルネン系重合体に加えて、任意で、熱可塑性樹脂材料で通常用いられている配合剤、例えば、軟質重合体、酸化防止剤、紫外線吸収剤、光安定剤、近赤外線吸収剤、離型剤、染料や顔料などの着色剤、可塑剤、帯電防止剤、蛍光増白剤などの配合剤を、通常採用される量、添加することができる。ここで、ノルボルネン系重合体に対して軟質重合体を混合して用いる場合には、ノルボルネン系重合体である脂環構造含有重合体100質量部に対して、通常0.01～20質量部、好ましくは0.05～10質量部、より好ましくは0.05～5質量部である。

[0024] また、不織布を構成する樹脂成分として、ノルボルネン系重合体、及び上述した配合剤の一つである軟質重合体以外に、その他の重合体（以下、単に「その他の重合体」という）を混合しても良い。ノルボルネン系重合体に混合されるその他の重合体の量は、ノルボルネン系重合体100質量部に対して、通常200質量部以下、好ましくは150質量部以下、より好ましくは100質量部以下である。

ノルボルネン系重合体に対して配合する各種配合剤やその他の重合体の割

合が多すぎると細胞が浮遊し難くなるため、いずれもノルボルネン系重合体の性質を損なわない範囲で配合することが好ましい。

[0025] ノルボルネン系重合体と、配合剤やその他の重合体との混合方法は、ポリマー中に配合剤が十分に分散する方法であれば、特に限定されない。また、配合の順番に格別な制限はない。配合方法としては、例えば、ミキサー、一軸混練機、二軸混練機、ロール、ブラベンダー、押出機などを用いて樹脂を溶融状態で混練する方法、適当な溶剤に溶解して分散させた後、凝固法、キャスト法、又は直接乾燥法により溶剤を除去する方法などが挙げられる。

二軸混練機を用いる場合、混練後は、通常は溶融状態で棒状に押出し、ストランドカッターで適当な長さに切り、ペレット化して用いられることが多い。

[0026] 本発明に用いる不織布を製造する方法に格別な制限はなく、一般的な不織布の製造方法を採用することができる。

なかでも、後述する好ましい繊維径、目付量及び表面被覆率を有する不織布を製造する場合、メルトブロー法を用いる方法が好適に採用される。

[0027] 本発明で用いる不織布の繊維径は、好ましくは $10 \sim 20 \mu\text{m}$ である。ここで繊維径は、不織布の表面をデジタルマイクロスコープVHX-1000（キーエンス社製）を用いて、撮影し、測定した値である。

不織布の目付量は、好ましくは $0.8 \text{ mg/cm}^2 \sim 1.0 \text{ mg/cm}^2$ である。ここで目付量は、 3 cm 四方の不織布の重量から単位面積当たりの重量を算出した値である。

不織布の表面被覆率は、好ましくは $50\% \sim 95\%$ である。ここで表面被覆率は、前記デジタルマイクロスコープで撮影した画像を、画像解析ソフト（Image J）を用いて、画像全体の面積から繊維が存在していない空隙部を除いた面積を画像全体の面積から除して換算した値である。

[0028] 本発明に用いる不織布は、通常、滅菌処理して用いられる。滅菌処理の方法に格別な制限はなく、高圧蒸気法や乾熱法などの加熱法； γ 線や電子線などの放射線を照射する放射線法；高周波を照射する照射法；酸化エチレンガ

ス（E O G）などのガスを接触させるガス法；滅菌フィルタを用いる濾過法；など、医療分野で一般的に採用される方法から、任意に選択することができる。

[0029] 本発明に用いる不織布上で培養される幹細胞を含む組織由来細胞群は、幹細胞を含む複数種類の細胞を含む組織由来の細胞群であれば、特に限定されない。例えば、細胞治療に供する間葉系血管細胞群、脂肪由来細胞群、骨髓由来細胞群などが挙げられる。また、これらの細胞群から、一部の細胞が既に分離されたものであっても良い。

[0030] かかる不織布を用いて、組織由来細胞群より幹細胞を分離するための培地は、分離対象となる幹細胞を増殖させることのできる培地を用いれば良く、特に未分化性を維持したまま増殖させることのできる培地を用いるのが好ましい。このような培地は市販されており、例えば、脂肪由来幹細胞であれば、コージンバイオ社製のK B M A D S Cシリーズなどが挙げられ、骨髓由来幹細胞であれば、S I G M A - A L D R I C H社製のS t e m l i n e、間葉系幹細胞増殖培地シリーズなどが挙げられる。

[0031] 培地には、添加剤を配合することもできる。添加剤としては、タンパク質等の誘導因子、ミネラル、金属、ビタミン成分等が挙げられる。

これらの添加剤は一種単独で、あるいは二種以上を組み合わせ用いることができる。

[0032] 細胞の培養条件は特に限定されず、用いる細胞や目的に応じて適宜決定することができる。

例えば、二酸化炭素濃度が5 %程度で、温度が2 0℃～3 7℃の範囲で一定に維持された、加湿された恒温器を用いて細胞を培養することができる。

[0033] 本発明は、少なくとも培養面がノルボルネン系重合体で構成される不織布上で、組織由来細胞群を培養すると、脂肪幹細胞のみが接着して培養することができ、結果として、脂肪幹細胞を分離することができるというものである。

[0034] 分離された幹細胞は、幹細胞治療用途に用いるほか、更に分化誘導培地に

て培養することにより分化細胞を得、創薬用途や医療用途に利用することができる。

[0035] 本発明の方法により単離された幹細胞を分化誘導する場合に用いられる培地は、幹細胞の分化誘導に適した培地を用いれば良く、基礎培地に分化誘導するための添加剤を加えた培地や、市販の分化誘導培地を用いることができる。

[0036] 分化誘導するための添加剤としては、細胞表面の受容体に作用する、リガンド、アゴニスト、アンタゴニスト；核内受容体の、リガンド、アゴニスト、アンタゴニスト；コラーゲンやファイブネクチンなどの細胞外マトリックス；細胞外マトリックスの一部あるいは、模擬した化合物；細胞内の情報伝達経路に関わるタンパク質に作用する成分；細胞内の1次代謝又は2次代謝の酵素に作用する成分；細胞内の核内又はミトコンドリア内の遺伝子の発現に影響を与える成分；ウィルスベクターなどと組み合わせて細胞内に導入することができるDNAやRNA；等が挙げられる。

これらの添加剤は、一種単独で、あるいは二種以上を組み合わせる用いることができる。

市販の分化誘導培地としては、R & D Systems社製「Stem Cell Kits」などが挙げられる。

[0037] 細胞の培養条件は特に限定されず、用いる細胞や目的に応じて適宜決定することができる。

例えば、二酸化炭素濃度が5%程度で、温度が20℃～37℃の範囲で一定に維持された、加湿された恒温器を用いて細胞を培養することができる。

実施例

[0038] 以下、本発明を、実施例によりさらに詳細に説明する。但し、本発明は以下の実施例により何ら限定されるものではない。

[0039] <ノルボルネン系重合体で構成される不織布>

ノルボルネン系重合体（ゼオノア（登録商標）1060R、日本ゼオン社製；ノルボルネン系開環重合体水素化物）、及び、ノルボルネン系重合体（

ゼオネックス（登録商標）５０００、日本ゼオン社製；ノルボルネン系開環重合体水素化物）を用いて、メルトブロー法で、以下の条件により、ゼオノア（登録商標）１０６０Ｒ製の不織布（以下「ゼオノア不織布」という）、及び、ゼオネックス（登録商標）５０００製の、２種の不織布（以下、「ゼオネックス不織布１」、「ゼオネックス不織布２」という）を、それぞれ作製した。

[0040] ＜ゼオノア不織布＞

- ・樹脂：ゼオノア（登録商標）１０６０Ｒ
- ・ノズル温度：２９３℃
- ・ダイス温度：２９８℃
- ・回転数：１００ｒｐｍ
- ・コンベアースピード：１４．５ｍ／ｍｉｎ
- ・紡糸口金からコレクターまでの距離（以下、「ＤＣＤ」という）：４５ｍ

[0041] ＜ゼオネックス不織布１＞

- ・樹脂：ゼオネックス（登録商標）５０００
- ・ノズル温度：３００℃
- ・ダイス温度：２９０℃
- ・回転数：１００ｒｐｍ
- ・コンベアースピード：１４．２ｍ／ｍｉｎ
- ・ＤＣＤ：８５ｍｍ

[0042] ＜ゼオネックス不織布２＞

- ・樹脂：ゼオネックス（登録商標）５０００
- ・ノズル温度：２９８℃
- ・ダイス温度：２９０℃
- ・回転数：１００ｒｐｍ
- ・コンベアースピード：１４．２ｍ／ｍｉｎ
- ・ＤＣＤ：５２ｍｍ

[0043] 得られた不織布の繊維径、目付量及び表面被覆率は以下の通りである。

- ・ゼオノア不織布：繊維径 $10.05 \mu\text{m}$ 、目付量 0.98 mg/cm^2 、表面被覆率 91%
- ・ゼオネックス不織布 1：繊維径 $15.05 \mu\text{m}$ 、目付量 0.94 mg/cm^2 、表面被覆率 58%
- ・ゼオネックス不織布 2：繊維径 $13.33 \mu\text{m}$ 、目付量 0.81 mg/cm^2 、表面被覆率 82%

[0044] [実施例 1]

＜脂肪組織からの ASC の分離＞

ヒトより摘出した直径約 3 mm の脂肪組織を 4 分割し、このものを直径 2 cm の円形に切り取られたゼオノア不織布及びゼオネックス不織布 2 に乗せた後、この組織が乗った不織布をそれぞれ別の細胞培養用ポリスチレン製ディッシュ（FALCON（登録商標）、コーニング社製、直径 35 mm の TCPS）に入れた。

その後、当該ディッシュに、 2% ウシ胎児血清（FBS）を添加した間葉系幹細胞増殖培地（Stemline（登録商標）、シグマアルドリッチ社製）を入れ、 $5\% \text{ CO}_2$ 雰囲気 37°C の条件で培養した。

いずれの不織布上でも、 $7 \sim 10$ 日後に、脂肪組織由来幹細胞（ASC）が分離増殖し始めたのが確認できた。ASC の分離増殖を確認したら培地を交換し、培養を継続し、培養開始から 18 日後、ASC を不織布からトリプシン-EDTA で剥がした後、 279.8 mL の細胞培養用フラスコ（型番「T-75」、エッペンドルフ社製）に移し、同じ培地で 4 日間継代培養すると 90% コンフルエントになった。

ゼオノア不織布及びゼオネックス不織布 2 上に増殖している培養開始から 18 日後の ASC の位相差顕微鏡写真（倍率 64 倍）を図 1 及び図 2 に示す。いずれの不織布上にも ASC が増殖していることが確認される。

また、細胞培養用フラスコに移して 4 日間継代培養した時の位相差顕微鏡写真（倍率 64 倍）を図 3 に示す。ASC が増殖していることが確認される。

。

[0045] [実施例2]

<骨髓液からのBMSCの分離>

ヒトより採取した骨髓液10mlに、Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) を当量加え、良く攪拌して骨髓液希釈液を調製した。直径2cmの円形に切り取られたゼオノア不織布及びゼオネックス不織布1を、100 μ mのセルストレーナー (Falcon (登録商標) 型番352360、コーニング社製) にそれぞれセットし、先に調製した骨髓液希釈液を通し、HBSSで2回洗浄した後、不織布をそれぞれ別の細胞培養用ポリスチレン製ディッシュ (FALCON (登録商標)、コーニング社製、直径35mmのTCPS) に入れた。その後、当該ディッシュに、2%ウシ胎児血清 (FBS) を添加した間葉系幹細胞増殖培地 (Stemline (登録商標); シグマアルドリッチ社製) を入れ、5%CO₂雰囲気37℃の条件で培養した。

いずれの不織布でも、7~10日後に、骨髓由来幹細胞 (BMSC) が分離増殖し始めたのが確認できた。BMSCの分離増殖を確認した後、培地を交換し、さらに培養を継続した。培養開始から18日後、BMSCを不織布からトリプシン-EDTAで剥がした後、279.8mLの細胞培養用フラスコ (型番「T-75」、エッペンドルフ社製) に移し、同じ培地で、4日間継代培養すると90%コンフルエントになった。

ゼオノア不織布及びゼオネックス不織布1上に増殖している、培養開始から18日後のBMSCの位相差顕微鏡写真 (倍率64倍) を図4及び図5に示す。いずれの不織布上にもBMSCが増殖していることが確認される。

また、このBMSCを細胞培養用フラスコに移して4日間継代培養したときの位相差顕微鏡写真 (倍率64倍) を図6に示す。BMSCが増殖していることが確認される。

[0046] [比較例]

中芯ポリエチレン外層ポリプロピレン不織布 (10mm×32mm) を6

穴プレート入れ、そこにBMSCの懸濁液、3 mL (0.45×10^6 cells/mL) を添加し、3日間培養した。培地は2% FBSを添加した間葉系幹細胞増殖培地〔シグマアルドリッチ社製、Stemline (登録商標)〕を用いた。

その結果、中芯ポリエチレン外層ポリプロピレン不織布上には、MSCが僅かに接着しているだけで(図7)、プレート底面には100%コンフルエントな状態で接着しており(図8)、幹細胞の分離効果が得られなかった。

[0047] [実施例3]

実施例1において、ゼオノア不織布及びゼオネックス不織布2上で分離され、その後継代されたASC(以下、「継代ASC」という)の分化誘導実験を、以下の通り行った。

(1) 脂肪細胞への分化

継代ASCを24ウェルマルチプレート(FALCON (登録商標) 型番353047、コーニング社製)に、 1.9×10^5 cells/wellで播種し、2%ウシ胎児血清(FBS)を添加した間葉系幹細胞増殖培地(Stemline (登録商標)、シグマアルドリッチ社製)を入れ、5%CO₂ 雰囲気37℃の条件で培養した。24時間後、培地を捨て、リン酸緩衝液(PBS)で2回洗浄してから、脂肪細胞分化培地(型番BBDM2、DSファーマバイオメディカル社製)に交換して1週間培養した。その後、脂肪細胞培養用培地(型番BBAM1、DSファーマバイオメディカル社製)に交換して、1週間培養した後、Oil-Red染色した。脂肪細胞が染色された顕微鏡写真を図9に示す。

図9から、Oil-Red染色された脂肪滴を持つ脂肪細胞が見られ、実施例1で得られた継代ASCは、脂肪細胞への分化能を有することが確認された。

[0048] (2) 骨芽細胞への分化

継代ASCを24ウェルマルチプレート(FALCON (登録商標) 型番353047、コーニング社製)に、 1.5×10^4 cells/wellで

播種し、2%ウシ胎児血清（FBS）を添加した間葉系幹細胞増殖培地（Stemline（登録商標）、シグマアルドリッチ社製）を入れ、5%CO₂ 雰囲気37℃の条件で培養した。その後、培地を骨芽細胞分化培地（型番BBOB1、DSファーマバイオメディカル社製）に交換して、細胞の密集度60%程度（約60%confluency）で2週間培養した。その後、細胞をAlizarin Red染色した。骨芽細胞が染色された顕微鏡写真を図10に示す。

図10から、細胞とその周囲がAlizarin Redで薄い赤で染色されたことから、カルシウムの沈着が認められ、実施例1で得られた継代ASCは、骨芽細胞への分化能も有することが確認された。

[0049] （3）軟骨細胞への分化

24ウェルマルチプレート（FALCON（登録商標）型番353047、コーニング社製）に、 1.6×10^7 cells/mLに調製した継代ASCを5μL滴下して、2時間後に、軟骨細胞分化培地（StemPro Chondrogenesis differentiation Kit；型番A10070-01、コーニング社製）を添加し、5%CO₂ 雰囲気37℃の条件で培養した。その後、4～5日間隔で培地交換しながら2週間培養した。得られた細胞をAlcian Blue染色した。軟骨細胞が染色された顕微鏡写真を図11に示す。

図11から、細胞とその周囲がAlcian Blueで青く染色されたことから、軟骨に多く含まれる酸性ムコ多糖の沈着が認められ、実施例1で得られた継代ASCは、軟骨細胞への分化能も有することが確認された。

[0050] （4）神経細胞への分化

継代ASCを24ウェルマルチプレート（FALCON（登録商標）型番353047、コーニング社製）に、 4.8×10^3 cells/wellで播種し、2%ウシ胎児血清（FBS）を添加した間葉系幹細胞増殖培地（Stemline（登録商標）、シグマアルドリッチ社製）を入れ、5%CO₂ 雰囲気37℃の条件で培養した。培養を開始してから48時間後、培地を捨

て、リン酸緩衝液（PBS）で2回洗浄してから、神経細胞分化培地（HyClone AdvanceSTEM Neural Differentiation Kit、サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社製）に交換して、細胞の密集度30%程度（約30%confluency）で2日間培養したところ、神経突起が確認できた。そこで、Alexa Fluor（登録商標）488（サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社製）でラベリングした、マウス抗 β -Tubulin Class III抗体（フナコシ社より入手）で蛍光染色した。神経細胞が染色された蛍光顕微鏡写真を図12に示す。

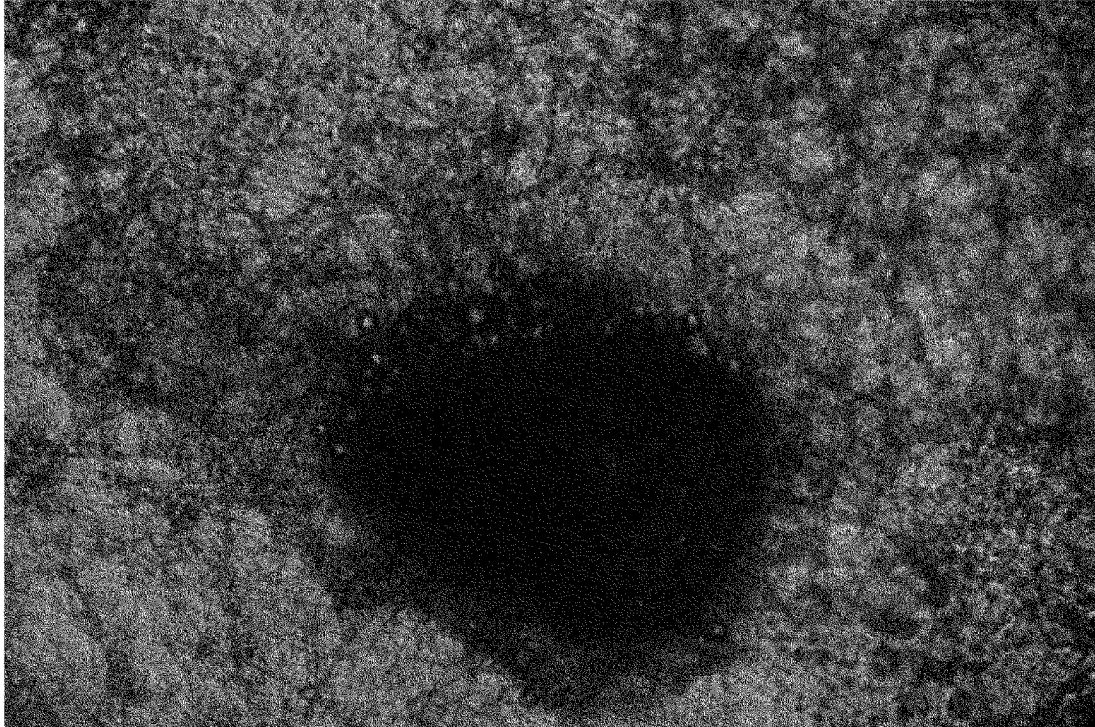
図12から、細胞体及び突起が緑色に染色されていることから、成熟哺乳動物の神経細胞であることが認められ、実施例1で得られた継代ASCは、神経細胞への分化能も有することが確認された。

[0051] 以上の結果から、少なくとも培養面がノルボルネン系重合体で構成される不織布を用いることで、組織から幹細胞を容易に単離し、増殖させることができること、増殖させた幹細胞が高い分化能を有することがわかる。

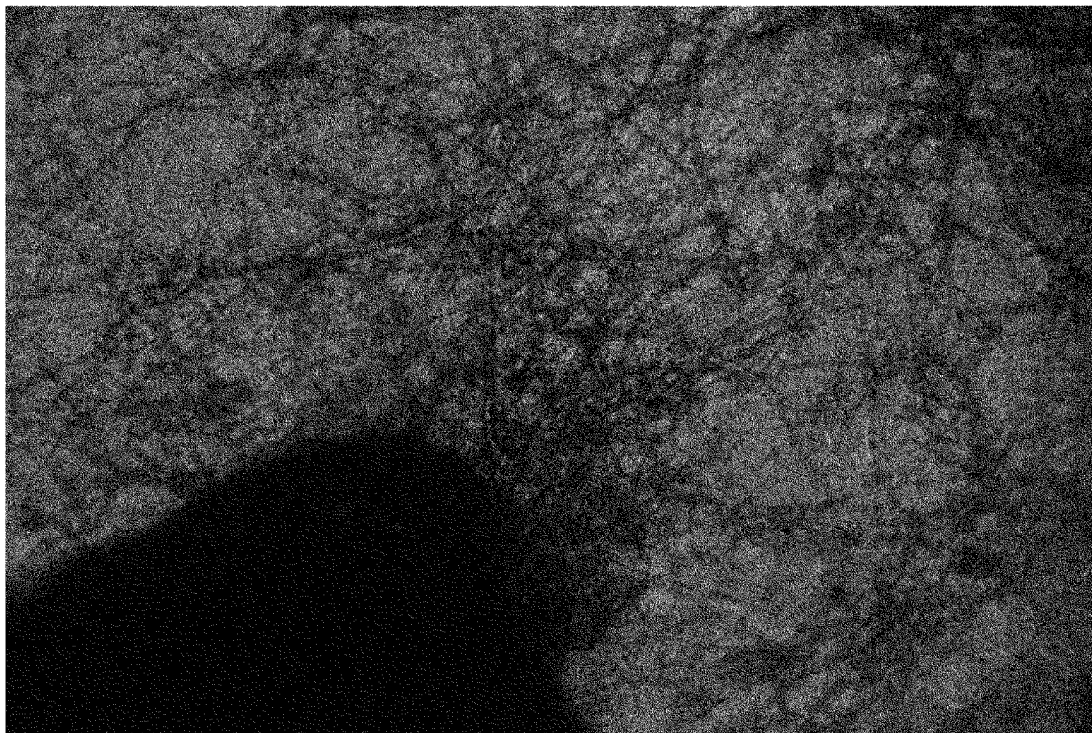
請求の範囲

- [請求項1] 幹細胞を含む組織由来細胞群を、少なくとも培養面がノルボルネン系重合体で構成される不織布上で培養する、幹細胞の分離方法。
- [請求項2] 組織由来細胞群が、脂肪組織由来である請求項1記載の幹細胞の分離方法。
- [請求項3] 幹細胞を含む組織由来細胞群から幹細胞を分離するための、少なくとも培養面がノルボルネン系重合体で構成される不織布の使用。

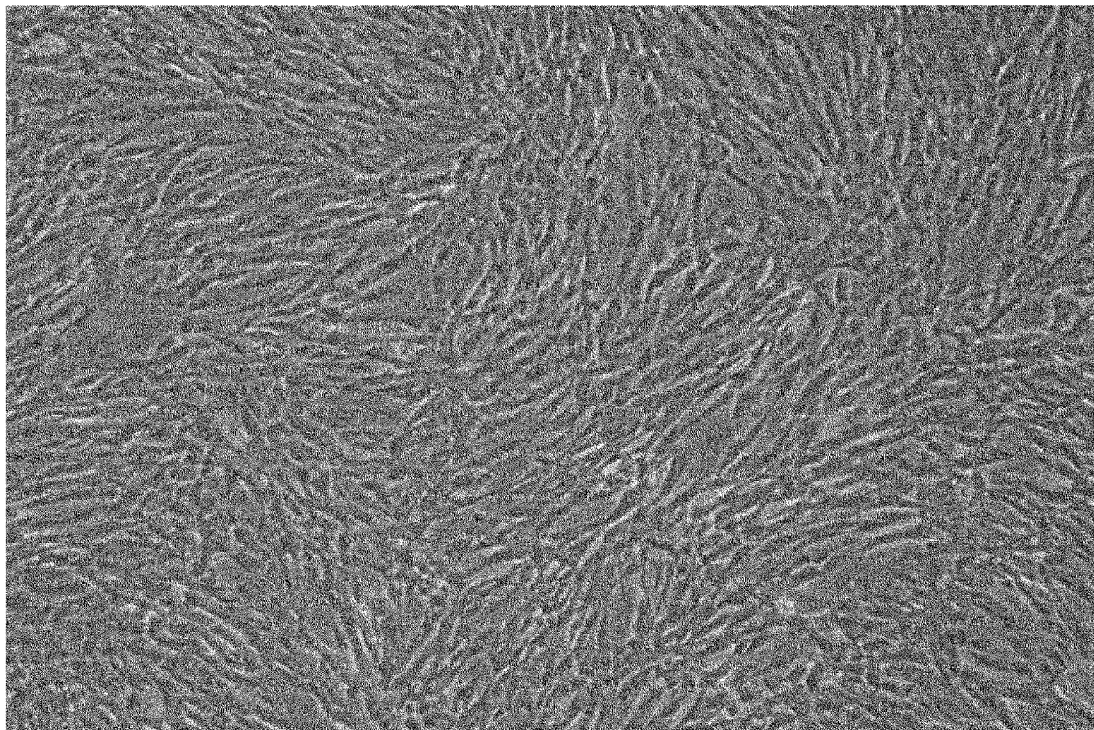
[図1]



[図2]



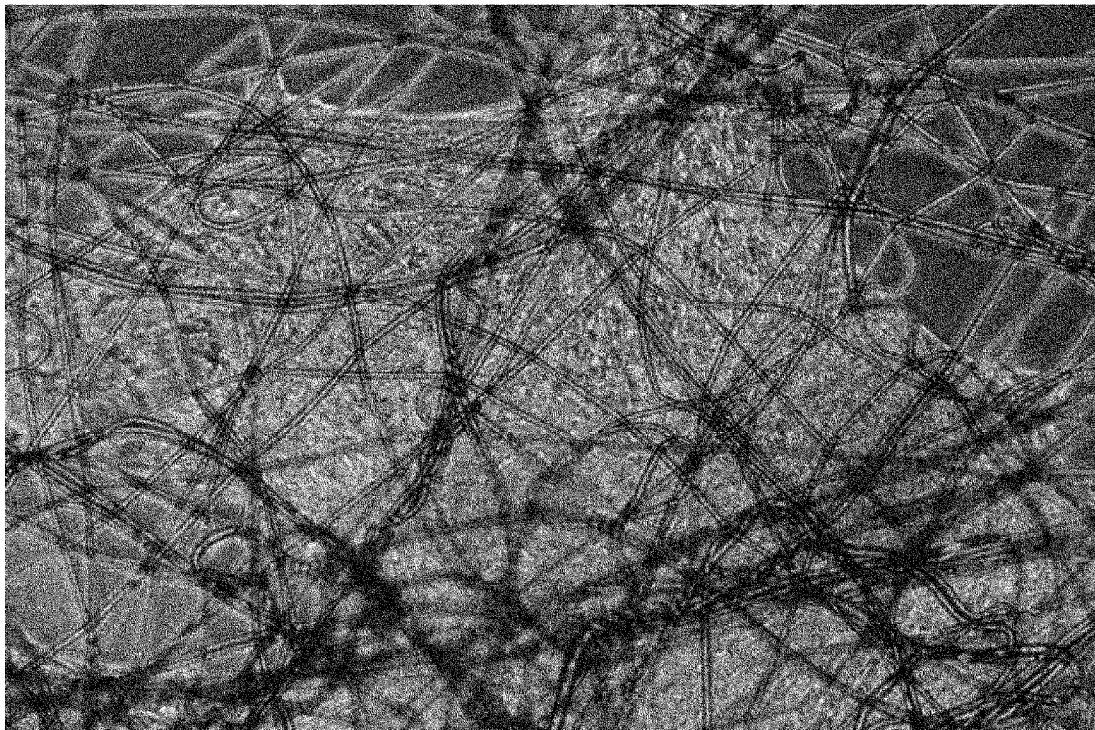
[図3]



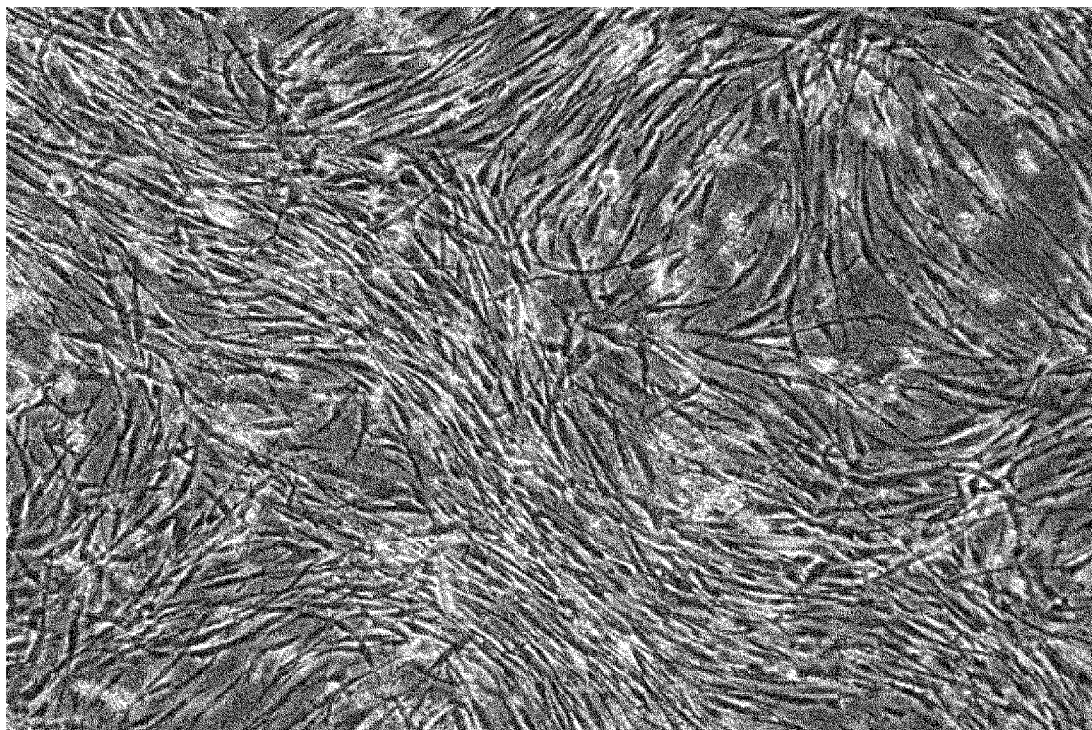
[図4]



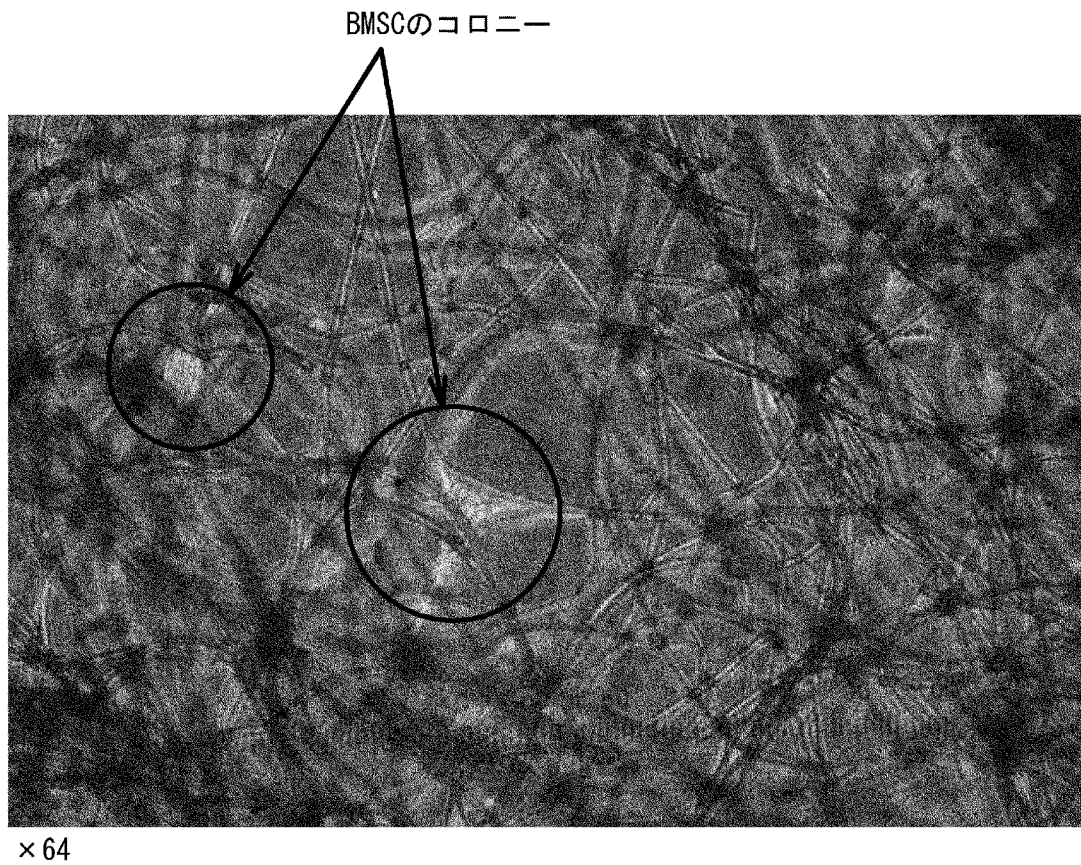
[図5]



[図6]

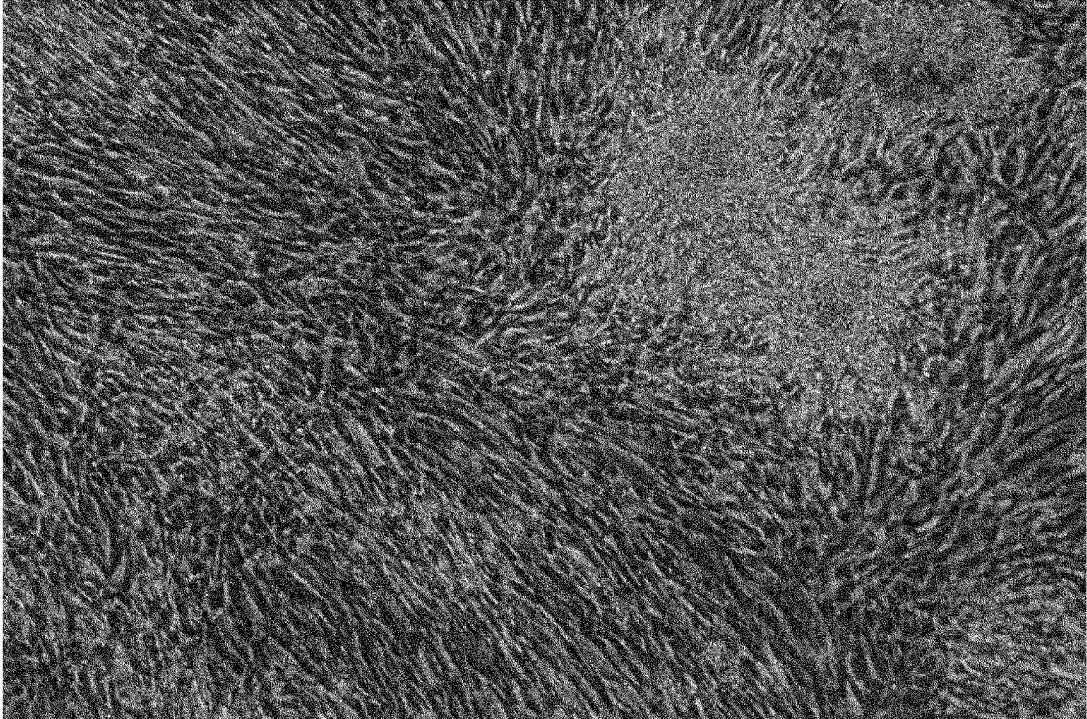


[図7]



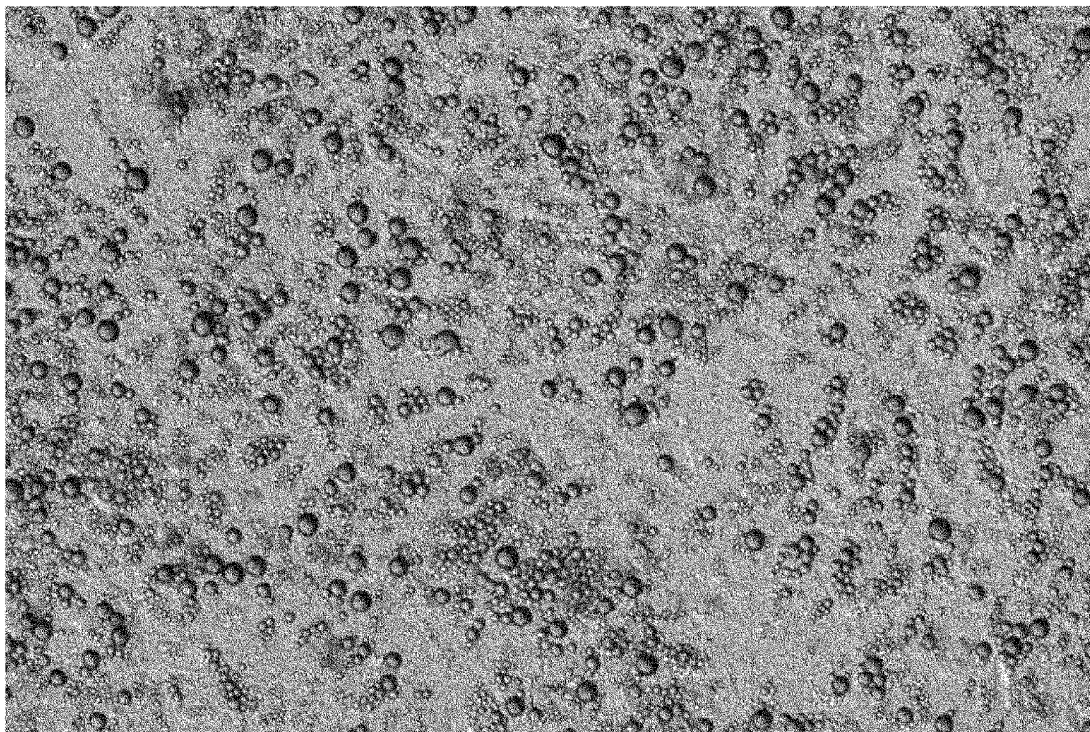
[図8]

ウエルの底面

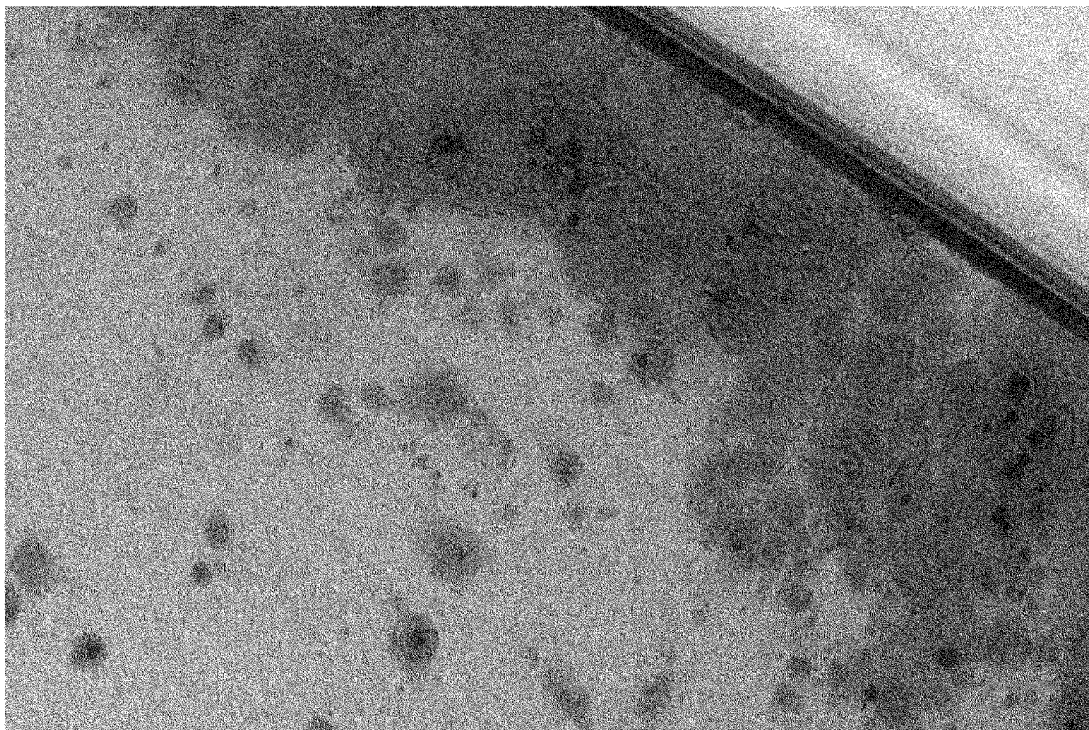


× 64

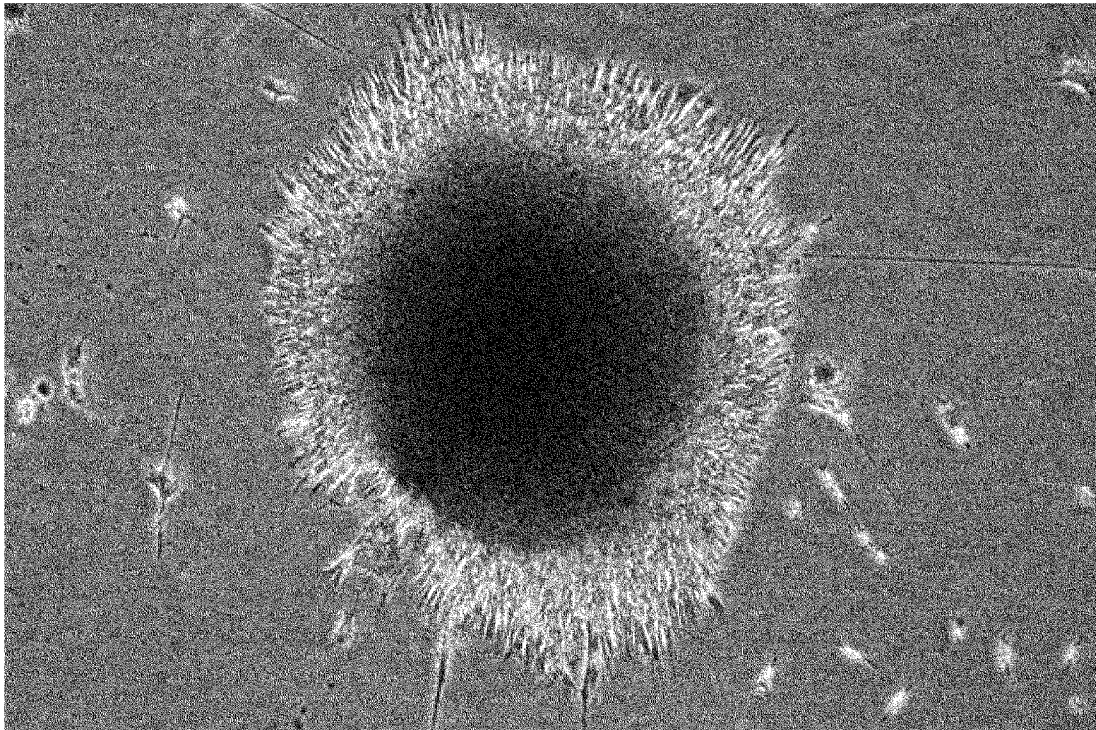
[図9]



[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/042042

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C12N5/0775(2010.01) i, C12M3/00(2006.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. C12N5/0775, C12M3/00

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-017839 A (NIPRO CORP.) 31 January 2008, claims, paragraphs [0030], [0032]-[0060], [0069], embodiments (Family: none)	1-3
Y	JP 2009-106160 A (NIPRO CORP.) 21 May 2009, claims, paragraphs [0008], [0015]-[0042], [0052], embodiments (Family: none)	1-3

☒ 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

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/042042

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2012-044970 A (TOKYO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND TECHNOLOGY) 08 March 2012, claims, paragraphs [0027], [0028] (Family: none)	1-3
Y	WO 2016/121775 A1 (UBE INDUSTRIES, LTD.) 04 August 2016, paragraph [0073], claims & CA 2974278 A & CN 107208031 A, paragraph [0073], claims & KR 10-2017-0093251 A	1-3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/0775(2010.01)i, C12M3/00(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/0775, C12M3/00

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

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2008-017839 A (ニプロ株式会社) 2008.01.31, 【特許請求の範囲】、【0030】、【0032】 - 【0060】、【0069】、実施例 (ファミリーなし)	1-3
Y	JP 2009-106160 A (ニプロ株式会社) 2009.05.21, 【特許請求の範囲】、【0008】、【0015】 - 【0042】、【0052】、実施例 (ファミリーなし)	1-3

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

14.02.2018

国際調査報告の発送日

27.02.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

太田 雄三

4 B

3959

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	JP 2012-044970 A (国立大学法人東京農工大学) 2012.03.08, 【特許請求の範囲】、【0027】、【0028】 (ファミリーなし)	1-3
Y	WO 2016/121775 A1 (宇部興産株式会社) 2016.08.04, [0073]、請求の範囲 & CA 2974278 A & CN 107208031 A:[0073], claim & KR 10-2017-0093251 A	1-3