



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202308704 A

(43)公開日：中華民國 112 (2023) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：111126970

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 07 月 19 日

(51)Int. Cl. :

*A61K48/00 (2006.01)**C12M1/34 (2006.01)**C12Q1/04 (2006.01)**G01N33/53 (2006.01)**G01N33/48 (2006.01)**C12M1/26 (2006.01)*

(30)優先權：2021/07/20 日本

2021-119463

2021/07/20 日本

2021-119466

(71)申請人：日商東洋製罐集團控股股份有限公司(日本) TOYO SEIKAN GROUP HOLDINGS, LTD. (JP)

日本

(72)發明人：戶谷貴彦 TOTANI, TAKAHIKO (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：42 項 圖式數：5 共 44 頁

(54)名稱

利用針狀體之細胞內反應之控制手段

(57)摘要

本發明之目的在於提供一種能夠以簡便且有效率之操作對多個細胞導入特定之因子的用以控制細胞內反應的新穎之技術、手法，且提供一種細胞內反應之控制方法，其包括：使固定有細胞內導入因子之針狀體與細胞接觸，將上述針狀體之一部分插入至上述細胞內，將上述細胞內導入因子導入至上述細胞內之步驟；以及將上述針狀體之一部分從上述細胞抽出之步驟。



【發明摘要】

【中文發明名稱】

利用針狀體之細胞內反應之控制手段

【中文】

本發明之目的在於提供一種能夠以簡便且有效率之操作對多個細胞導入特定之因子的用以控制細胞內反應的新穎之技術、手法，且提供一種細胞內反應之控制方法，其包括：使固定有細胞內導入因子之針狀體與細胞接觸，將上述針狀體之一部分插入至上述細胞內，將上述細胞內導入因子導入至上述細胞內之步驟；以及將上述針狀體之一部分從上述細胞抽出之步驟。

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

利用針狀體之細胞內反應之控制手段

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種將固定於針狀體之細胞內導入因子簡便且有效率地導入至多個細胞內之方法、以及利用其之細胞內反應之控制手段。

又，本發明係關於一種用以控制細胞內反應之固定有可與細胞內分子結合之結合體之針狀粒子、及具備該針狀粒子之細胞處理用複合基材、以及利用該等之細胞內反應之控制方法。

【先前技術】

【0002】 目前，已經開發、報告了用以控制細胞內反應之各種技術、手法。然而，該等多為利用基因重組技術或基因組編輯技術者，且該等技術通常涉及繁雜之作業、巨額之費用等，對作業帶來沉重之負擔。又，有時亦會對在基因重組技術或基因組編輯技術之過程中導入至細胞內之因子本身引起某種細胞內反應之可能性、或此種因子殘留於細胞內之可能性等產生顧慮。因此，於該領域中依然迫切期望一種用以控制細胞內反應之新穎之技術、手法。

【0003】 於專利文獻1中，提出了一種細胞插入用針狀材料，其固定有針對細胞內或細胞間蛋白質抗原之抗體，且記載了將該針狀材料與細胞位置對齊，進行上下動作而插入至細胞，藉此於仍存活之細胞中，對細胞內或細胞間蛋白質進行定量、評估等。

【0004】 於專利文獻2、3中，提出了一種細胞插入構件，其係利用

光微影法與乾式蝕刻及濕式蝕刻法而成形，於支持體上排列有多個奈米針，且記載了於各奈米針上固定與基因或基因表現相關之物質等或與抗體等標記物質結合之物質，藉此可將多個奈米針同時插入至基板上所排列之多個細胞，於多個細胞中，在細胞存活之狀態下，對基因之表現狀態進行解析，或選擇性地將靶細胞提起。

【0005】 然而，該等針狀材料或奈米針在插入至細胞內等時存在其位置對齊或上下動作之操作繁雜之情形，存在對作業帶來沉重之負擔之情形，又，存在由針狀材料或奈米針所固定之抗體等物質亦會與除針狀材料或奈米針以外之部分(支持體上)等結合而產生該等物質之損耗(浪費)之情形。

先前技術文獻

專利文獻

【0006】 專利文獻1：日本專利特開2006-246731號公報

專利文獻2：日本專利特開2013-183706號公報

專利文獻3：日本專利特開2006-166884號公報

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0007】 本發明之目的在於提供一種能夠以簡便且有效率之操作對多個細胞導入特定之因子之用以控制細胞內反應的新穎之技術、手法。

又，本發明之目的在於提供一種能夠以簡便之操作對多個細胞進行處理，且所導入之因子不會殘留於操作後之細胞之用以控制細胞內反應之新穎之技術、手法。

[解決問題之技術手段]

【0008】 本發明者等為解決上述課題進行了銳意研究，結果發現，與使針狀體與未結合重物之細胞接觸之情形相比，使結合了重物之細胞與針狀體接觸之情形時，針狀體之針狀部有效率地插入至細胞內。並且發現，藉由將細胞內導入因子固定於針狀體，使其與結合了重物之細胞接觸，可將該導入因子簡便且有效率地導入至多個細胞內，對細胞內反應進行控制、分析等。

【0009】 本發明係基於該等新穎見解而完成者，包含以下發明。

[1]一種改型細胞之製造方法，其包括：

使固定有細胞內導入因子之針狀體與結合了重物之細胞接觸，將上述針狀體之一部分插入至上述細胞內，將上述細胞內導入因子導入至上述細胞內之步驟；以及

將上述針狀體之一部分從上述細胞抽出之步驟。

[2]如[1]之方法，其中上述重物係選自由樹脂、金屬、磁性物質、及該等之組合所組成之群中之一種或複數種物質。

[3]如[1]或[2]之方法，其中上述重物具有顆粒狀之形態。

[4]如[1]至[3]中任一項之方法，其中將上述針狀體之一部分插入至細胞內及/或從細胞抽出之步驟係使用選自由離心力、磁力、水流、水壓、及靜電相互作用所組成之群中之一種或複數種外力而進行。

[5]如[1]至[4]中任一項之方法，其中上述細胞內導入因子係可與細胞內分子結合之結合體，且包括將上述針狀體從上述細胞抽出，將於上述細胞內與上述結合體結合之細胞內分子與上述針狀體一同從上述細胞抽出。

[6]如[5]之方法，其中上述結合體係核酸、蛋白質、肽、或低分子化

合物。

[7]如[5]或[6]之方法，其中上述結合體係抗體或其片段。

[8]如[1]至[4]中任一項之方法，其中上述細胞內導入因子為生理活性物質，且包括將上述針狀體從上述細胞抽出，使上述細胞內導入因子殘留於上述細胞內。

[9]如[8]之方法，其中上述生理活性物質係選自由核酸、肽、蛋白質、糖類、多糖、脂肪酸、膽固醇、脂質、訊號傳遞物質、配體物質、激素物質、細胞激素、離子、金屬粒子、磁性微粒子、無機化合物、量子點、有機化合物及藥劑所組成之群中之一種或複數種物質。

[10]如[8]或[9]之方法，其中上述生理活性物質與上述針狀體之間之結合係可於細胞內分離之結合。

[11]如[10]之方法，其中上述細胞內導入因子與上述針狀體之間之結合係選自由靜電結合、藉由疏水性相互作用之結合、螯合物結合、於細胞內切斷之共價鍵結、經由光切斷連接子之結合、經由酶切斷連接子之結合所組成之群中之至少1種。

[12]如[1]至[11]中任一項之方法，其中上述針狀體為針狀粒子。

[13]如[12]之方法，其中上述針狀粒子之針狀部之長度為1~50 μm 。

[14]如[12]或[13]之方法，其中上述針狀粒子為氧化鋅。

[15]如[1]至[14]中任一項之方法，其中上述針狀體具有固定於基材之形態。

[16]如[15]之方法，其中上述基材於其表面具有黏合劑，上述針狀體之一部分藉由上述黏合劑而固定於上述基材。

[17]如[16]之方法，其中上述黏合劑包含蛋白質非吸附性材料。

[18]如[15]之方法，其中上述針狀體係使用選自由光微影法、乾式蝕刻、濕式蝕刻、及該等之組合所組成之群中之一種或複數種製造。

[19]如[1]至[18]中任一項之方法，其中上述基材之具有上述針狀體之面具有可收容細胞之微細凹凸構造。

[20]一種解析上述細胞內導入因子之功能之方法，其包括對藉由如[1]至[19]中任一項之方法所製造之改型細胞之狀態進行解析的步驟。

[21]如[20]之方法，其中對上述改型細胞之狀態進行解析之步驟係對選自由細胞之增殖速度、存活率、代謝、活性氧物種之定量、基因表現所組成之群中之一項或複數項進行解析。

【0010】

又，本發明者等為了解決上述課題進行銳意研究，結果發現，藉由利用固定有可與細胞內分子結合之結合體之針狀粒子、及具備該針狀粒子之細胞處理用複合基材，可將其針狀部插入至細胞，將目標細胞內分子拔出，藉此可以簡便之操作對多個細胞進行處理，且在不曾使所導入之因子殘留於操作後之細胞的情況下，對細胞內反應進行控制、分析等。

【0011】本發明係基於該等新穎見解而成者，包含以下發明。

[1]一種針狀粒子，其固定有可與細胞內分子結合之結合體。

[2]如[1]之針狀粒子，其中上述針狀粒子之針狀部之長度為1～50 μm 。

[3]如[1]或[2]之針狀粒子，其中上述針狀粒子為氧化鋅。

[4]如[1]至[3]中任一項之針狀粒子，其中上述結合體係核酸、蛋白質、肽、或低分子化合物。

[5]如[4]之針狀粒子，其中上述結合體係抗體或其片段。

【0012】 [6]一種細胞處理用複合基材，其係使針狀粒子固定於基材而成。

[7]如[6]之細胞處理用複合基材，其中上述針狀粒子之針狀部之長度為1~50 μm 。

[8]如[6]或[7]之細胞處理用複合基材，其中上述針狀粒子為氧化鋅。

[9]如[6]至[8]中任一項之細胞處理用複合基材，其中上述基材包含樹脂。

[10]如[6]至[9]中任一項之細胞處理用複合基材，其中上述基材於其表面具有黏合劑，上述針狀粒子之一部分藉由上述黏合劑而固定於上述基材。

[11]如[10]之細胞處理用複合基材，上述黏合劑包含蛋白質非吸附性材料。

[12]如[6]至[11]中任一項之細胞處理用複合基材，其中於上述基材之固定有上述針狀粒子之面形成有可收容細胞之微細凹凸構造。

[13]如[6]至[12]中任一項之細胞處理用複合基材，其中於上述針狀粒子固定有可與細胞內分子結合之結合體。

[14]如[13]之細胞處理用複合基材，其中上述結合體係核酸、蛋白質、肽、或低分子化合物。

[15]如[14]之細胞處理用複合基材，其中上述結合體係抗體或其片段。

【0013】 [16]一種改型細胞之製造方法，該改型細胞去除或減少了上述細胞內分子之功能者，該製造方法包括：將如[1]至[5]中任一項之針

狀粒子、或如[13]至[15]中任一項之細胞處理用複合基材中之針狀粒子之一部分插入至細胞內之步驟；

使細胞內分子與固定於上述針狀粒子之上述結合體結合之步驟；以及

將上述針狀粒子與經由上述結合體而結合之上述細胞內分子一同從上述細胞抽出之步驟。

[17]如[16]之方法，其中上述改型細胞用以解析上述細胞內分子之功能。

[18]如[16]或[17]之方法，其中將上述針狀粒子之一部分插入至細胞內及/或從細胞抽出之步驟係利用選自由離心力、磁力、水流、水壓、及靜電相互作用所組成之群中之一種或複數種外力而進行。

[19]如[16]至[18]中任一項之方法，其中於上述細胞結合有重物。

【0014】 [20]一種對細胞內分子之功能進行解析之方法，其包括：將如[1]至[5]中任一項之針狀粒子、或如[13]至[15]中任一項之細胞處理用複合基材中之針狀粒子之一部分插入至細胞內之步驟；

使細胞內分子與固定於上述針狀粒子之上述結合體結合之步驟；

將上述針狀粒子與經由上述結合體而結合之上述細胞內分子一同從上述細胞抽出之步驟；以及

對上述細胞之狀態進行解析之步驟。

[21]如[20]之方法，其中對細胞之狀態進行解析之步驟係對選自由細胞之增殖速度、存活率、代謝、活性氧物種之定量、基因表現所組成之群中之一項或複數項進行解析。

[22]如[20]或[21]之方法，其中將上述針狀粒子之一部分插入至細胞

內及/或從細胞抽出之步驟係利用選自由離心力、磁力、水流、水壓、及靜電相互作用所組成之群中之一種或複數種外力而進行。

[23]如[20]至[22]中任一項之方法，其中於上述細胞結合有重物。

本說明書包含作為本申請案之優先權之基礎之於2021年7月20日申請的日本專利申請2021-119463號以及日本專利申請2021-119466號之說明書等所記載之內容。

將本說明書中所引用之所有出版物、專利及專利申請直接作為參考而併入本說明書中。

[發明之效果]

【0015】 根據本發明，可提供一種能夠以簡便且有效率之操作對多個細胞導入特定之因子之用以控制細胞內反應的新穎之技術、手法。

又，根據本發明，可提供一種能夠以簡便操作對多個細胞進行處理，且所導入之因子不會殘留於操作後之細胞之用以控制細胞內反應的新穎之技術、手法。

【圖式簡單說明】

【0016】

圖1係表示固定有針狀粒子之細胞處理用複合基材之製作方法之概略圖。

圖2係觀察固定於細胞處理用複合基材之針狀粒子(panatetra)所得之照片。

圖3係表示將由抗Cbl抗體所包被之panatetra之針狀部插入、拔去所得之PBMC中的活化細胞(CD25⁺或CD137⁺)之比率之圖表。(A)與(B)分別表示培養開始1天後、培養開始3天後之結果。

圖4係表示對細胞進行藉由細胞處理用複合基材之重複處理之情形時之活細胞率(即panatetra之針部向細胞之之插入效率)的圖表。

圖5係表示將由抗GSK3 β 抗體所包被之panatetra之針狀部插入、拔去所得之MSC(間葉系幹細胞)中的分化細胞(由CD56⁺之表現型所表示之神經細胞)之比率之圖表。

【實施方式】

【0017】 於本發明中，所謂「針狀體」意指至少具備一個針狀部之微細構造體。

【0018】 「針狀部」細長，且前端、寬度足夠小，具有在插入至細胞之情形時，對該細胞造成之損害較小或幾乎沒有、較佳為完全不造成損害之形狀。針狀部只要具有上述形狀即可，例如可具有圓筒形、圓錐形、筒狀(角柱狀等)、角錐形等(並不限定於該等)之形狀，其前端可銳利，亦可不銳利。就對細胞之低侵入性及插入效率之觀點而言，較佳為圓筒形或圓錐形。針狀部之長度為0.5~100 μm ，較佳為1~50 μm ，更佳為5~40 μm ，進而較佳為10~30 μm (例如10 μm 、20 μm 等)。又，針狀部之長徑比並無特別限定，可為5:1~50:1左右，較佳為10:1~40:1。

【0019】 「針狀體」包含對細胞而言毒性較小或幾乎無毒性、較佳為完全無毒性之材料，作為此種材料，可例舉：金屬氧化物(例如氧化鋅等)、無機物(例如石英、氧化鎳、二氧化矽、氧化鋁、鑽石、氧化鈦、及氧化銻等)、金屬(例如金、銀、銅、鉑、及鋁等)、金屬晶體(例如鎢、鈦、矽晶體、及銻等)、玻璃、樹脂(例如聚乙烯、聚丙烯、環狀聚烯烴、環狀烯烴共聚物、聚酯、聚苯乙烯、聚丙烯酸甲酯、聚乳酸、聚醚醚酮、及氟樹脂等)、氮化矽、及矽等(並不限定於該等)，可適當使用針狀之固

體材料。

【0020】 「針狀體」之形態只要為能夠將針狀部插入至細胞並在其後拔去(或亦稱為「拔出」)即可，並無特別限定，例如「針狀體」可具有針狀粒子或固定於基材之形態。

【0021】 關於「針狀體」之形態，所謂「針狀粒子」意指具備至少一個針狀部之微細顆粒。針狀粒子之形狀可具有於中心部配置/結合一個或複數個針狀部而成之形狀，例如可採用棒狀、L字形、V字形、T字形、Y字形、放射狀(例如三腳架狀、四腳架(quattro pod)狀、四腳錐(tetrapod)狀等)等形狀，但並不限定於該等。於具備複數個針狀部之情形時，各針狀部可具有相同形狀及/或長度，亦可分別具有不同形狀及/或長度。於中心部，複數個針狀部可具有互相直接連結之構造，亦可具有於作為核之構件上連結有一個或複數個針狀部之構造。針狀粒子之大小可根據所具備之針狀部之長度或數量而變化，可設為容納於半徑 $0.5\ \mu\text{m} \sim 100\ \mu\text{m}$ 之球體之程度之大小。

【0022】 再者，於本說明書中，與「針狀體」、「針狀粒子」、及「針狀部」之大小相關之數值以平均值表示。

【0023】 較佳為，於本發明中，針狀粒子由具備複數個針狀部之氧化鋅構成，更佳為具有使長度 $10 \sim 20\ \mu\text{m}$ 之氧化鋅單晶構成之針狀部配置成四腳錐狀而成的形狀。作為此種針狀粒子，例如可適當使用panatetra(註冊商標)WZ-0501(Amtec製造)等。

【0024】 又，關於「針狀體」之形態，所謂「固定於基材之形態」意指其表面具有複數個針狀體(或針狀部)之基材。以下，只要沒有特別提及，則所謂固定於基材之表面之針狀體或針狀粒子意指複數個針狀體或針

狀粒子。「基材」只要可使針狀體固定於其表面作為支持體發揮功能即可，並無特別限定，例如可例舉：樹脂(聚苯乙烯、聚乙烯(例如直鏈狀低密度聚乙烯(LLDPE, Linear Low Density Polyethylene)、超低密度聚乙烯(VLDPE, Very Low Density Polyethylene/ULDPE, Ultra Low Density Polyethylene)、低密度聚乙烯(LDPE, Low Density Polyethylene)、或該等之組合)、聚丙烯、聚酯、聚丙烯腈、苯乙烯-丁二烯共聚物、(甲基)丙烯酸酯聚合物、氟樹脂等)、矽膠、交聯葡聚糖、多醣、瓊脂糖等多糖類、玻璃、金屬、磁性物質、以及該等之組合等。基材之形狀只要可使針狀體固定化即可，並無特別限定，例如可為膜(薄膜(film)或膜(membrane))、平板、盤、粒子(顆粒)、球、容器(試管、管、微量盤、微型管、槽、比色管、皿、燒瓶、袋)、纖維、凝膠等任意形狀。具體而言，例如可例舉：聚乙烯薄膜、聚乙烯板、及磁性顆粒等，但並不限定於該等。

【0025】 針狀體於基材之表面之固定化只要在對細胞插入、拔去該針狀部後亦能夠維持兩者之結合即可，可使用任意方法進行。針狀體於基材之表面之固定化例如可藉由物理吸附法、共價鍵結法、離子鍵結法、嵌埋至基材中、利用黏合劑(接著劑)等而進行，但並不限定於該等。

【0026】 於本發明中，作為可利用之「黏合劑」，只要可將針狀體固定至基材之表面即可，並無特別限定，例如可例舉：聚乙烯醇(PVA)、聚(甲基丙烯酸2-羥基乙酯)(Poly HEMA)、聚乙烯吡咯啉酮、乙酸乙烯酯樹脂、聚胺酯樹脂、氯乙烯樹脂、環氧樹脂、氯乙烯-乙酸乙烯酯共聚樹脂、改性矽樹脂、2-氰基丙烯酸乙酯、聚苯乙烯、氯丁二烯橡膠、腈橡膠、苯乙烯-丁二烯橡膠、硝化纖維素、澱粉、糊精、海藻酸、瓊脂糖、

及凝膠狀蛋白質(明膠、彈力蛋白、血纖維蛋白等)等，可利用該等之一種或複數種之組合。藉由將黏合劑塗佈於基材表面之特定區域，使所塗佈之黏合劑固化，於該黏合劑接著針狀體以使其一部分與黏合劑接觸、較佳為其一部分嵌埋於黏合劑，從而固定於該基材之表面。較佳為黏合劑為下文所詳細描述之與「細胞內導入因子」之結合性及吸附性較低者，作為此種黏合劑可例舉PVA、Poly HEMA等。藉由利用此種黏合劑，可在欲將細胞內導入因子固定至固定於基材之針狀體之情形時，抑制細胞內導入因子結合或吸附於除針狀體以外之部分(例如基材)，可抑制未固定至針狀體之細胞內導入因子之損耗。又，亦可使黏合劑中包含與細胞表面蛋白相互作用之分子。作為此種分子，例如可例舉：纖維黏連蛋白、層黏連蛋白、膠原蛋白、鈣黏素或該等片段等，可利用該等之一種或複數種之組合。此種分子例如可在預先與黏合劑成分混合後一同塗佈至基材上，或者亦可對基材上之黏合劑進行塗佈，可藉由簡便之方法包含此種分子。藉由利用此種分子，在對細胞進行處理時，可抑制由於從通常之培養環境變化所導致之細胞狀態的惡化。

【0027】 或者，於其他態樣中，針狀體於基材表面之固定化可藉由利用一體成形或一體加工而製造基材與針狀體(或針狀部)而進行。例如可使用依據先前公知之手法(例如日本專利特開2006-246731號公報、日本專利特開2013-183706號公報、日本專利特開2006-166884號公報)之選自由光微影法、乾式蝕刻、濕式蝕刻、及該等之組合所組成之群中的一種或複數種手法而進行。

【0028】 於基材之表面亦可形成有能夠將細胞與固定化之針狀體一同收容之微細凹凸構造。微細凹凸構造可收容細胞，藉由側壁(例如凹部

之內壁)與底部而保持，限制細胞朝橫方向之移動(例如相對於基材表面之水平方向之移動)，減少或防止可隨著細胞朝橫方向移動而產生之由針狀體所導致之較大損傷(例如切斷、撕裂等)。於本發明中「微細凹凸構造」之形狀只要為可發揮上述效果之形狀即可，並無特別限定，例如具有凹陷為球冠狀、研鉢狀(圓錐狀、角錐狀)、筒狀(圓柱狀、角柱狀等)等形狀的形狀(凹部)。於此凹部之底部上配置、固定有針狀體。凹部之大小只要為可發揮上述效果之大小即可，並無特別限定，例如可使開口部之直徑或對角線之長度為1~500 μm ，深度為1~500 μm 左右。各凹部中可收容一個細胞，亦可收容複數個細胞。

【0029】 再者，本說明書中，有時會將「固定於基材之形態」之針狀體(針狀粒子)稱作「細胞處理用複合基材」。

【0030】 於本發明中，於針狀體上固定有「細胞內導入因子」。

【0031】 於本發明之一實施方式中，作為「細胞內導入因子」，可例舉與細胞內分子結合之結合體。「可與細胞內分子結合之結合體」只要可在所導入之細胞內與目標細胞內分子結合、較佳為選擇性地結合、更佳為特異性地結合而形成複合體即可，可根據目標細胞內分子而適當選擇。作為此種結合體，例如可例舉：核酸(DNA、RNA、DNA-RNA雜合體等)、蛋白質(抗體、抗原、酶、受質、輔酶、配體、受體、複合體之次單元、或該等之片段等)、肽、低分子化合物等(例如Y-27632、Z-VAD-FMK等)，但並不限定於該等。於本發明中，「可與細胞內分子結合之結合體」較佳為其自身並不會對任意基因之表現造成直接影響者。此處，所謂「並不會造成直接影響」意指細胞內之任意訊號傳遞路徑並不會由於該結合體之導入而直接活化。較佳為於本發明中，「可與細胞內分子結合之

結合體」係可與目標細胞內分子結合、較佳為選擇性結合、更佳為特異性結合之抗體或其片段。作為抗體之「片段」，可例舉 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、dsFv、雙鏈抗體、sc(Fv)₂等，該等片段之多聚體(例如二聚物、三聚物、四聚物、聚合物)亦可用於本發明中。

【0032】 於本發明之另一態樣中，作為「細胞內導入因子」，可例舉於所導入之細胞內發揮任意功能者、或預測發揮任意功能者。作為此種因子，例如可例舉生理活性物質等。作為「生理活性物質」，例如可例舉選自由核酸(DNA、RNA、DNA-RNA雜合體等)、質體、病毒粒子、染色體等；蛋白質、胺基酸、寡肽、多肽、多次單元蛋白質；糖類、多糖、脂肪酸、膽固醇、脂質、訊號傳遞物質、配體物質、激素物質、細胞激素、離子、金屬粒子、磁性微粒子、無機化合物、量子點、有機化合物、藥劑等所組成之群中之一種或複數種物質，但並不限定於該等。

【0033】 於本發明中，「針狀體」與「細胞內導入因子」之結合(固定化)方法可根據所使用之「細胞內導入因子」之種類而適當選擇。於所使用「細胞內導入因子」為上述「可與細胞內分子結合之結合體」之情形時，針狀體與上述結合體之結合(固定化)只要為在將針狀部插入至細胞、其後拔出時亦維持著該結合之強度即可，可使用業者所周知之方法進行。作為該結合方法，例如可例舉物理吸附法、共價鍵結法、離子鍵結法等，較佳為共價鍵結法。例如，共價鍵結法在上述結合體為蛋白質或肽之情形時，可藉由使針狀部之表面之官能基(例如羥基、胺基、N-羥基丁二醯亞胺基、硫氫基、環氧基、乙烯基等)與蛋白質或肽之羧基末端進行化學反應，形成酯鍵或醯胺鍵等而進行。可視需要對針狀部之表面進行處理以導入官能基，例如可使用聚離胺酸、聚乙烯亞胺、乙烯基三烷氧基矽烷、3-巰

丙基三烷氧基矽烷、胺烷基三烷氧基矽烷、含環氧基之烷基三烷氧基矽烷等而進行。

【0034】 針狀粒子與可與細胞內分子結合之結合體之結合(固定化)可為相互直接結合，或亦可經由連接子間接地結合。

【0035】 又，在所使用之「細胞內導入因子」為上述「生理活性物質」之情形時，較佳為至少在將針狀部插入至細胞前維持兩者之結合(固定化)，另一方面結合於細胞內被分離/切斷，使該因子可釋放至細胞內之結合。作為此種結合方法，例如可例舉：靜電結合；藉由疏水性相互作用之結合；螯合物結合；雙硫鍵(S-S鍵)等可於細胞內切斷之共價鍵；經由光切斷連接子之結合；經由酯酶等具有酶識別序列之連接子(酶切斷連接子)之結合等(並不限定於該等)，可使用業者所周知之方法進行(日本專利特開2006-166884號公報等)。

【0036】 固定於一個針狀體之細胞內導入因子可全部相同，亦可固定有複數種不同細胞內導入因子。又，關於複數個針狀體，可固定有完全相同之細胞內導入因子，或亦可於每個針狀體上固定不同之細胞內導入因子。

【0037】 於本發明中，可於針狀體上預先固定特定之細胞內導入因子，或者亦可於使用時，於針狀體上如上所述地固定所需之細胞內導入因子後使用(即，提供時之針狀體上亦可不預先固定特定之細胞內導入因子)。

【0038】 固定有細胞內導入因子之針狀體可用以控制細胞內反應，且可於細胞內反應得到控制之改型細胞之製造方法中使用。以下，只要未特別提及，則針狀體意指複數個針狀體。

【0039】 本製造方法包括：

使固定有細胞內導入因子之針狀體與結合了重物之細胞接觸；

藉此將上述針狀體之一部分插入至細胞內，將上述細胞內導入因子導入至細胞內；其後

將上述針狀體之一部分從上述細胞抽出。

【0040】 於本發明中作為對象之細胞並無特別限定，可為接著細胞、及懸浮細胞中之任一者，其種類例如可例舉：多能幹細胞或其分化誘導細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、神經幹細胞、淋巴細胞、神經細胞、神經膠細胞、神經節細胞、胰島細胞、腎上腺髓質細胞、心肌細胞、肝細胞、纖維母細胞、上皮細胞、內皮細胞、肌母細胞、視網膜上皮細胞、角膜幹細胞、成骨細胞、破骨細胞、肝細胞等，但並不限定於該等。細胞之來源並無特別限定，例如可較佳利用人類、小鼠、大鼠、猴、犬、豬、牛、豚鼠、倉鼠等哺乳動物細胞。

【0041】 於本發明中，所謂「多能幹細胞(pluripotent stem cell)」係指胚胎幹細胞(ES細胞)及潛在性地具有與其相同之分化多能性、即化為生物體之各種組織(所有內胚層、中胚層、外胚層)之能力之細胞。作為具有與ES細胞相同之分化多能性之細胞，可例舉「人工多能幹細胞」(有時亦稱為「iPS細胞」)。較佳為於本發明中，所謂多能幹細胞係人類多能幹細胞。所謂「人工多能幹細胞」係指藉由於哺乳動物體細胞或未分化幹細胞中導入Oct3/4、Sox2、Klf4及c-Myc等特定因子(核初始化因子)進行再編程所得之細胞。又，上述多能幹細胞之所謂「分化誘導細胞」意指分化誘導多能幹細胞所得之以特定表現型或標記物之表現為特徵之細胞。所謂「標記物」意指「標記蛋白質」、「標記基因」等根據特定之細胞型而

特異性表現之細胞抗原或其基因。

【0042】於本發明中，細胞可為自生物體採取之細胞，亦可為培養細胞，進而可為將該等細胞凍融所得之細胞。細胞較佳為使用解離或分散狀態之細胞。

【0043】於本態樣中，細胞與重物結合。藉由結合重物，可使細胞之重量增加，提高細胞與針狀體接觸時之衝擊，使針狀體之針狀部容易地插入至細胞內(即，提高插入概率)。作為「重物」，可使用選自由樹脂、金屬、磁性物質、及該等之組合等所組成之群中一種或複數種。重物之形態並無特別限定，例如可為顆粒狀之形態。例如於本發明中，可將 Dynabeads(註冊商標、VERITAS股份有限公司)等磁性顆粒適當地用作細胞之「重物」。細胞與重物之結合可使用業者所周知之方法進行，例如可使用抗體或其片段、抗生物素蛋白-生物素、鏈黴抗生素蛋白-生物素等之一種或複數種進行。

【0044】向細胞內插入針狀體之針狀部可藉由使細胞與針狀體接觸而進行。此細胞與針狀體之接觸可藉由於細胞中添加針狀體(針狀粒子之形態)(或藉由於針狀體中添加細胞)，或者藉由於固定於基材之形態之針狀體(細胞處理用複合基材)中添加細胞而進行。亦可視需要對細胞與針狀體之接觸施加外力。此處所謂「外力」意指施加於細胞及/或針狀體之力，可例舉離心力、磁力、靜電相互作用、水流(水壓)等，可使用選自該等之一種或複數種。離心只要於不會對細胞造成損傷之條件下即可，例如可以100~30000 g進行30~600秒。水流(水壓)可藉由移液操作提供。藉由利用外力，可提高細胞與針狀體之接觸時之衝擊，使針狀體之針狀部容易地插入至細胞內(即，提高插入概率)。

【0045】 向細胞內插入針狀粒子之針狀部只要於培養基中進行即可，較佳為於細胞培養環境下進行，例如可一面維持37°C、5%CO₂之培養條件一面進行。於插入時間較短之情形時，亦可於室溫、大氣環境下等下進行。

【0046】 並且，於固定於針狀體之細胞內導入因子為上述「可與細胞內分子結合之結合體」之情形時，向細胞內插入針狀體之針狀部只要維持足以於細胞內使固定於所插入的針狀體之上述結合體與細胞內之目標細胞內分子結合之時間即可，該時間可由業者根據上述結合體或目標細胞內分子之種類適當設定，例如可設為1~120分鐘、較佳為5~60分鐘、更佳為30分鐘左右。

【0047】 其後，藉由將針狀部與上述結合體所結合之目標細胞內分子一同從細胞抽出，可使該細胞內目標細胞內分子之量減少或消失，藉此可獲得該細胞內分子之功能被去除或減少之改型細胞。

【0048】 又，於固定於針狀體之細胞內導入因子為上述「生理活性物質」之情形時，向細胞內插入針狀體之針狀部只要維持足以於細胞內使固定於針狀體之上述生理活性物質從針狀體中釋放之時間即可(視需要進行結合之切斷處理)，該時間可由業者根據上述生理活性物質等或結合之種類適當設定，例如可設為1~120分鐘、較佳為5~60分鐘、更佳為30分鐘左右。

【0049】 其後，藉由將針狀部從細胞抽出，使上述生理活性物質殘留於細胞內，可於該細胞內使上述生理活性物質之量增加，藉此可獲得導入或增強了該生理活性物質之功能的改型細胞。

【0050】 從細胞抽出針狀部可藉由施加外力，將所接觸之細胞與針

狀體拉離而進行。此處所謂「外力」可使用上述定義。

【0051】 於本方法中，向細胞內插入針狀體之針狀部、及從細胞抽出針狀部之步驟可對同一細胞進行一次或複數次。此處所謂「複數次」係2次以上、3次以上、4次以上、或5次以上，其上限並無特別限定，就降低細胞之負擔，良好地保持其存活狀態及生理狀態之觀點而言，較佳為15次以下或10次以下。又，此處所謂「進行複數次」不僅意指連續地進行複數次上述步驟之情形，亦意指於一定之時間間隔進行複數次上述步驟之情形。

【0052】 所得之改型細胞根據所導入之細胞內導入因子之功能而多種多樣。於所導入之細胞內導入因子為上述「可與細胞內分子結合之結合體」、例如與上述結合體結合之細胞內分子為具有抑制或阻礙細胞之活化之功能的因子之情形時(例如T細胞中之CIN85、Sts-2、Cbl等之類的因子(Mei Suen Kong等、Science Signaling 05 Feb 2019:Vol.12, Issue 567, eaav4373))，藉由去除或減少該因子之功能，可獲得該因子之細胞內反應得到控制、即被活化之改型細胞。又，例如於與上述結合體結合之細胞內分子為具有抑制或阻礙細胞之分化誘導之功能的因子之情形時，藉由去除或減少該因子之功能，可獲得該因子之細胞內反應得到控制、即被分化誘導之改型細胞(改型細胞之例並不限定於該等)。

【0053】 於所導入之細胞內導入因子為上述「生理活性物質」、例如其為具有促進細胞活化之功能的因子之情形時，藉由導入或增強該因子之功能，可獲得該因子之細胞內反應得到控制、即促進了活化之改型細胞。又，例如於該生理活性物質為具有促進細胞分化誘導之功能的因子之情形時，藉由導入或增強該因子之功能，可獲得該因子之細胞內反應得到

控制、即被分化誘導之改型細胞(改型細胞之例並不限定於該等)。

【0054】 所得之改型細胞可用以解析所導入之細胞內導入因子之功能。

【0055】 所導入之細胞內導入因子之功能之解析可藉由對利用上述方法所得之改型細胞之狀態進行解析而進行。作為解析對象之改型細胞之狀態，例如可例舉細胞之增殖速度、存活率、代謝、活性氧物種、基因表現等(並不限定於該等)，對選自該等中之一種或複數種狀態進行定量、解析。

【0056】 例如，於所導入之細胞內導入因子為上述「可與細胞內分子結合之結合體」之情形時，在與未改型之細胞相比，於所得之改型細胞中，增殖速度、存活率、代謝、活性氧物種、或基因表現下降、抑制、或消失之情形時，可判斷上述結合體具有該種功能，即上述結合體具有有助於維持或促進目標細胞內分子之增殖速度、存活率、代謝、活性氧物種、或基因表現之功能。或者，例如在與未改型之細胞相比，於所得之改型細胞中增殖速度、存活率、代謝、活性氧物種、或基因表現增加或被誘導之情形時，可判斷上述結合體具有該種功能，即上述結合體具有抑制或阻礙目標細胞內分子之增殖速度、存活率、代謝、活性氧物種、或基因表現之功能。

【0057】 或者，於所導入之細胞內導入因子為上述「生理活性物質」之情形時，在與未改型之細胞相比，於所得之改型細胞中，增殖速度、存活率、代謝、活性氧物種、或基因表現下降、抑制、或消失之情形時，可判斷該生理活性物質具有有助於細胞之增殖速度、存活率、代謝、活性氧物種、或基因表現之下降、抑制、或消失之功能。或者，例如，在

與未改型之細胞相比，於所得改型細胞中，增殖速度、存活率、代謝、活性氧物種、或基因表現增加或被誘導之情形時，可判斷該生理活性物質具有增加或誘導增殖速度、存活率、代謝、活性氧物種、或基因表現之功能。

【0058】 再者，於改型細胞中之基因表現之解析中，作為解析對象之基因由其編碼之蛋白質可使用任意者，為了使細胞之舉動明確，較佳為與上述目標細胞內分子或上述結合體、及所導入之上述生理活性物質不同者。

【0059】 於本發明之另一實施方式中，本發明係關於一種固定有可與細胞內分子結合之結合體之針狀粒子、及使該針狀粒子固定於基材而成之細胞處理用複合基材。關於本實施方式，「針狀粒子」、「可與細胞內分子結合之結合體」、「細胞處理用複合基材」以及各種「固定化」方法係指如上所述者，且遵循上述定義。於本實施方式中，「針狀粒子」及「細胞處理用複合基材」可以於針狀粒子預先固定特定之上述結合體之形態提供，或者亦可於使用時，於針狀粒子上如上所述地固定所需之上述結合體後使用(即，提供時之針狀粒子上亦可不預先固定特定之上述結合體)。

【0060】 關於本實施方式，上述固定有可與細胞內分子結合之結合體之針狀粒子、以及具備上述固定有可與細胞內分子結合之結合體之針狀粒子之細胞處理用複合基材可於改型細胞之製造方法中使用。以下，只要未特別提及，則所有針狀粒子均意指複數個針狀粒子。

【0061】 本製造方法包括以下步驟：

將上述固定有可與細胞內分子結合之結合體之針狀粒子之針狀部、

或具備上述固定有可與細胞內分子結合之結合體之針狀粒子之細胞處理用複合基材中的該針狀粒子之針狀部插入至細胞內；

於細胞內使目標細胞內分子與固定於上述針狀粒子之上上述結合體結合；其後

將上述針狀部與經由上述結合體結合之上上述細胞內分子一同從細胞抽出。

關於本實施方式，「細胞」、向細胞內「插入」針狀粒子之針狀部、及從細胞「抽出」針狀部、以及各種操作如上所述，且遵循上述定義。尤其是向細胞內插入針狀粒子之針狀部只要維持足以於細胞內使固定於所插入的針狀體之上上述結合體與細胞內之目標細胞內分子結合之時間即可，該時間可由業者根據上述結合體或目標細胞內分子之種類適當設定，例如可設為1～120分鐘、較佳為5～60分鐘、更佳為30分鐘左右。其後，藉由將針狀部與上述結合體所結合之目標細胞內分子一同從細胞抽出，可使該細胞內目標細胞內分子之量減少或消失，藉此可獲得該細胞內分子之功能被去除或減少之改型細胞。根據本實施方式，能夠以簡便操作對多個細胞進行處理，且可在不會使所導入之因子殘留於操作後之細胞中的情況下，對細胞內反應進行控制。

【0062】 關於本實施方式，亦可視需要使細胞與上述「重物」結合。藉由結合重物，可使細胞之重量增加，提高細胞與針狀粒子之接觸時之衝擊，使針狀體之針狀部容易地插入至細胞內(即，提高插入概率)。

【0063】 關於本實施方式，所得之改型細胞在所導入之細胞內導入因子為「可與細胞內分子結合之結合體」之情形時如上所述，且遵循上述定義。又，所得之改型細胞可用以對目標細胞內分子之功能進行解析。關

於本實施方式，目標細胞內分子之功能解析可藉由對利用上述方法所得之該細胞內分子的功能被去除或減少之改型細胞之狀態進行解析而進行。作為解析對象之改型細胞之狀態，例如可例舉細胞之增殖速度、存活率、代謝、活性氧物種、基因表現等(並不限定於該等)，可對選自該等中之一種或複數種狀態進行定量、解析，如上所述地進行判斷。

【0064】 以下，藉由實施例對本發明更加詳細地進行說明，但本發明並不限定於該等實施例。

[實施例]

【0065】 實驗1：藉由細胞處理用複合基材處理之細胞改型

1-1.細胞處理用複合基材之製作

將本實驗中之固定有針狀粒子之細胞處理用複合基材之製作方法的概要示於圖1。於直鏈狀低密度聚乙烯(LLDPE)製薄膜上覆蓋開有 $\phi 4$ mm孔之LLDPE製薄膜(遮罩)，添加水溶性感光性樹脂(BIOSURFINE(註冊商標)AWP(東洋合成製造))之1%水溶液後，利用聚苯乙烯製圓筒刮去剩餘液體。

【0066】 使針狀粒子(panatetra(註冊商標)WZ-0501(Amttec製造))附著於海綿粉撲(Emulsion Pact用之107(NBR)(資生堂製造))，用其輕輕敲擊添加有感光性樹脂之基材表面複數次，藉此進行panatetra之包被。

【0067】 將遮罩剝離，利用低壓水銀燈(TUV15W/G15T8(飛利浦製造))對感光性樹脂進行UV交聯而接著panatetra。UV照射條件設為以12 cm之距離進行30分鐘。其次，用水洗淨，沖洗接著不充分之剩餘panatetra。

【0068】 將LDPE製之環型構件(內徑4 mm)與基材上之已包被

panatetra之部位($\phi 4$ mm)之中心對齊重疊並進行熱封，製作容器狀細胞處理用複合基材。

【0069】 針對所得之細胞處理用複合基材，取出一部分用於觀察，將其底面切下，利用超深多角度顯微鏡(VHX-D500(基恩士製造))進行觀察，結果觀察到一部分埋嵌於水溶性感光性樹脂而固定化之針狀粒子狀之panatetra包被(圖2)。

【0070】 1-2.於細胞處理用複合基材上之抗體包被

於上述1-1.中所得之細胞處理用複合基材上，以10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之濃度添加50 μL 之抗Cb1抗體(Biolegend製造)，於37 $^{\circ}\text{C}$ 下靜置2小時，將panatetra用抗體包被。用60 μL 之PBS(Nacalai Tesque製造)將所得之抗體包被細胞處理用複合基材洗淨2次後，用於以下之細胞處理。

【0071】 1-3.細胞之製備

將PBMC(末梢血液單核細胞，HameCare製造)解凍，培養1天。培養基使用於ALyS505N-7(細胞科學研究所製造)中添加有10%胎牛血清(Thermo Fisher製造)者。

【0072】 為了促進PBMC之活化，將與細胞數量相同之Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28(Thermo Fisher製造)添加至細胞培養物中，於4 $^{\circ}\text{C}$ 下反應1小時，在刺激PBMC的同時，於細胞之表面結合顆粒(重物)。

【0073】 1-4.藉由細胞處理用複合基材之細胞之處理及評估

於上述1-2.中所得之抗體包被細胞處理用複合基材中，與培養基一同添加上述1-3.中所刺激之PBMC之 2.5×10^5 個細胞，進行離心(21880 g、23 $^{\circ}\text{C}$ 、3分鐘)，將由抗Cb1抗體所包被之panatetra之針狀部插入至該細胞，

直接於23°C下靜置30分鐘。

【0074】藉由移液操作使細胞漂浮，將其從細胞處理用複合基材剝下，回收至96孔板(well plate)中，追加培養基150 μL，於37°C、5%CO₂環境下培養1天或3天(實施例1)。

【0075】另一方面，作為比較例，使用如下細胞：利用除抗Cbl抗體及panatetra均未被包被之方面以外與上述細胞處理用複合基材同樣地製備所得之細胞處理用複合基材，或除panatetra未由抗Cbl抗體包被之方面以外與上述細胞處理用複合基材同樣地製備所得之細胞處理用複合基材，與上述同樣地處理所得之細胞(將藉由前者之細胞處理用複合基材所處理之細胞記載為「比較例1」，將藉由後者之細胞處理用複合基材所處理之細胞記載為「比較例2」)。

【0076】在96孔板中開始培養1天後及3天後，回收各細胞培養物，藉由抗CD3抗體(螢光：APC-Cy7、Biolegend製造)、抗CD25抗體(螢光：APC、Biolegend製造)及抗CD137抗體(螢光：Brilliant Violet 421、Biolegend製造)染色後，利用流式細胞儀CytoFLES S(Beckman coulter製造)對各抗體之染色強度進行解析。在解析時，對CD3陽性集群進行排序，從中算出CD25及/或CD137之陽性率。又，陽性陰性判定之標準係使用未染色之細胞。

【0077】 1-5.結果

通常，已知PBMC經由基於CD3刺激之細胞內信號級聯而被活化，促進作為活化標記之CD25及CD137之表現(Endocrine Journal 2005, 52(5),635-641; J Immunol Methods. 2008 Nov 30; 339(1)：23-37.)。另一方面，已知該基於CD3刺激之細胞內信號級聯之一部分被作為泛素連接酶

之Cbl所阻礙，導致細胞活化受到抑制，即CD25及CD137之表現受到抑制 (Science Signaling 05 Feb 2019 : Vol.12, Issue 567, eaav4373)。

【0078】 確認了於插入、拔去了由抗Cbl抗體所包被之panatetra之針狀部之細胞(實施例1)中，與比較例1及比較例2相比，未活化之細胞(CD25⁻與CD137⁻)之比率降低，由活CD25⁺且CD137⁻、CD25⁺且CD137⁺、及CD25⁺且CD137⁻之表現型所表示之活化細胞之比率分別顯著地增大(圖3)。並且，於實施例1、比較例1及比較例2中，培養3天後之活化細胞之比率均大於培養1天後，且實施例1之活化細胞之比率高於比較例1及比較例2，因此確認了與比較例1及比較例2相比，實施例1之活化進行得更快，且其強度亦提高(圖3之(A)對(B))。

【0079】 該等結果提示：在將由抗Cbl抗體所包被之panatetra之針狀部插入、留置於PBMC中，使針狀部之抗Cbl抗體與細胞內之Cbl結合，其後將針狀部拔去時，由於與抗Cbl抗體結合之Cbl被一同抽出至細胞外，因此基於CD3刺激之細胞內信號級聯中之Cbl之阻礙被去除，促進了細胞之活化。又，確認了藉由該處理去除Cbl之影響並非暫時之效果，而是可持續至少3天之長期效果。

【0080】 實驗2：藉由使細胞與重物結合而提高細胞處理用複合基材之處理效率

2-1.細胞之製備、重物之結合

將Jurkat E6.1(購自DS PHARMA BIOMEDICAL)於添加有2%胎牛血清(Thermo Fisher製造)之ALyS505N-0(細胞科學研究所製造)中進行培養。

【0081】 將與細胞數量相同之Dynabeads Human T-Activator

CD3/CD28(Thermo Fisher製造)添加至細胞培養物中，於4°C下反應1小時，使Jurkat之表面與顆粒結合而製成重物。

【0082】 2-2.藉由細胞之離心處理之panatetra針部之插入效率

於上述1-1.中所獲得之細胞處理用複合基材中，與培養基(50 μL)一同添加上述2-1.中所製備之重物結合Jurkat之 2.5×10^5 個細胞。反覆進行如下操作：對其進行離心處理(2000 g、23°C、1分鐘)，將panatetra之針狀部插入至該細胞，藉由移液剝離後，再次供至離心處理。離心處理合計進行10次。

【0083】 在最後之(第10次之)離心處理後，藉由移液使細胞懸浮，與等量之錐蟲藍溶液(富士膠片和光純藥製造)混合。置於血球計數盤，利用顯微鏡進行觀察，將染色之細胞作為死細胞，未染色之細胞作為活細胞而分別計數，根據其值算出活細胞率(實施例E)。

【0084】 另一方面，作為比較例，使用如下細胞之存活率(比較例F)：使用除panatetra未包被之方面外與上述細胞處理用複合基材同樣地製備所得之細胞處理用複合基材，除此以外與上述實施例E同樣地處理所得之細胞。

【0085】 又，使用除使用未結合重物之Jurkat以外與上述實施例E同樣地處理所得之細胞之存活率(比較例C)、及除使用未結合重物之Jurkat以外與上述比較例F同樣地處理所得之細胞之存活率(比較例D)。

【0086】 進而，使用除將所添加之細胞數增加至4倍以外與上述比較例C同樣地處理所得之細胞之存活率(參考例A)、及除將所添加之細胞數增加至4倍以外與上述比較例D同樣地處理所得之細胞之存活率(參考例B)。

【0087】 2-3.結果

將反覆離心處理後之各細胞之存活率示於圖4中。

確認了藉由離心處理使結合了重物之細胞與細胞處理用複合基材作用之情形時的細胞之存活率(實施例E、81%)，比使該細胞與panatetra未經包被之細胞處理用複合基材作用之情形時的存活率(比較例F、95.9%)低。該存活率之降低可以說是由於藉由反覆之離心處理使panatetra之針狀部反覆插入至細胞中而造成的。即，該存活率之降低表示panatetra之針狀部成功地插入至細胞，該存活率越低，越意味著panatetra之針狀部插入至細胞之效率較高。

【0088】 另一方面，雖然藉由離心處理使未與重物結合之細胞與細胞處理用複合基材作用之情形時的細胞之存活率(比較例C、95.7%)，比使該細胞與panatetra未經包被之細胞處理用複合基材作用之情形時的存活率(比較例D、98.9%)低，但比使用結合了重物之細胞之情形時的存活率(實施例E、81%)高。該結果提示：藉由對細胞附加重物，而提高藉由離心處理將細胞壓向panatetra之針狀部之力，從而使該針狀部容易插入至細胞。

【0089】 又，確認了在即使是未結合重物之細胞其細胞數亦增大之情形時(參考例A、81.1%)，可獲得與使用結合了重物之細胞之情形同等程度之存活率。但，於細胞數較多之情形時，實用上處理效率有時會降低，存在欠佳之情形。

【0090】 實驗3：藉由細胞處理用複合基材之處理之間葉系幹細胞之改型

1-1.細胞處理用複合基材之製作

於直鏈狀低密度聚乙烯(LLDPE)製薄膜上覆蓋開有 $\phi 4$ mm孔之LLDPE製薄膜(遮罩)，添加水溶性感光性樹脂(BIOSURFINE(註冊商標)AWP(東洋合成製造))之2%水溶液後，利用矽製刮刀刮去剩餘液體。

【0091】 將針狀粒子(panatetra(註冊商標)WZ-0501L(Amtec製造)；平均針長 $20\ \mu\text{m}$)之5%乙醇分散液滴加至上述基材，使用棒式塗佈機(No.20)，進行panatetra之包被。

【0092】 將遮罩剝離，利用低壓水銀燈(TUV15W/G15T8(飛利浦製造))對感光性樹脂進行UV交聯而接著panatetra。UV照射條件設為以12 cm之距離進行30分鐘。其次，用水洗淨，沖洗接著不充分之剩餘panatetra。

【0093】 將LDPE製之環型構件(內徑4 mm)與基材上之已包被panatetra之部位之($\phi 4$ mm)中心對齊重疊並進行熱封，製作容器狀細胞處理用複合基材。

【0094】 3-2.於細胞處理用複合基材上之抗體包被

於上述3-1.中所獲得之細胞處理用複合基材上，以 $40\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 之濃度添加 $25\ \mu\text{L}$ 之抗GSK3 β 抗體(Biolegend製造)，於 37°C 下靜置3小時，將panatetra用抗體包被。用 $60\ \mu\text{L}$ 之PBS(Nacalai Tesque製造)將所得之抗體包被細胞處理用複合基材洗淨1次後，用於以下之細胞處理。

【0095】 3-3.細胞之準備

將MSC(間葉系幹細胞、PromoCell製造)解凍，培養15天。培養基使用Cellartis(註冊商標)MSC Xeno-Free Culture Medium(Takara Bio製造)。

【0096】 3-4.藉由細胞處理用複合基材之間葉系幹細胞之處理及評

估

於上述3-2.中所得之抗體包被細胞處理用複合基材中，與培養基一同添加上述3-3.中所準備之MSC之 1.0×10^5 個細胞，進行離心(2000 g、4°C、3分鐘)，將由抗GSK3 β 抗體所包被之panatetra之針狀部插入至該細胞，直接於37°C下靜置30分鐘。

【0097】藉由移液操作使細胞漂浮，將其細胞處理用複合基材剝下，回收至48孔板中，置換為間葉系幹細胞神經細胞分化培養基500 μ L，於37°C、5%CO₂環境下培養3天(實施例2)。

【0098】另一方面，作為比較例，將使用除抗GSK3 β 抗體未包被之方面外與上述細胞處理用複合基材同樣地製備所得之細胞處理用複合基材進行處理所得之細胞記載為「比較例3」，將使用除panatetra及抗GSK3 β 抗體未包被之方面及在基材上進行離心時之培養基中添加相當於1 μ g之抗GSK3 β 抗體之方面外與上述細胞處理用複合基材同樣地製備所得的細胞處理用複合基材，與上述同樣地處理所得之細胞記載為「比較例4」，將使用除panatetra及抗GSK3 β 抗體未包被之方面外與上述細胞處理用複合基材同樣地製備所得之細胞處理用複合基材，與上述同樣地處理所得之細胞記載為「比較例5」。

【0099】在48孔板中開始培養3天後，回收各細胞培養物，藉由抗CD56抗體(螢光：BV421、Biolegend製造)染色後，利用流式細胞儀CytoFLES S(Beckman coulter製造)對染色強度進行解析。在解析時，算出CD56之陽性率。又，陽性陰性判定之標準係使用使同型抗體(螢光：BV421、Biolegend製造)於相同條件下作用所得之細胞。

【0100】 3-5.結果

詳細之機制雖不明確，但已知MSC藉由使用市售之神經細胞分化培養基而進行向神經細胞之分化，促進作為神經細胞標記之CD56之表現。另一方面，已知與體細胞性幹細胞之神經細胞分化相關之細胞內信號級聯之一部分被GSK3 β 所阻礙，導致細胞之分化受到抑制，即CD56之表現受到抑制(Cell Biology International 2012 36, 967-972)。

【0101】 確認了於插入、拔去了由抗GSK3 β 抗體所包被之panatetra之針狀部之細胞(實施例2)中，與比較例3、比較例4及比較例5相比，由CD56⁺之表現型所表示之分化細胞之比率增大(圖5)。

【0102】 此等結果提示：在將由抗GSK3 β 抗體所包被之panatetra之針狀部插入、留置於MSC中，使針狀部之抗GSK3 β 抗體與細胞內之GSK3 β 結合，其後將針狀部拔去時，由於與抗GSK3 β 抗體結合之GSK3 β 被一同抽出至細胞外，因此細胞內信號級聯中之GSK3 β 之阻礙被去除，促進了向神經細胞之分化。

【0103】 根據上述實驗1、2及3之結果，可確認藉由使固定有細胞內導入因子之針狀粒子與結合了鉛之細胞接觸，可以簡便且有效率之操作使細胞內導入因子導入、作用於多個細胞，可控制細胞內反應。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種改型細胞之製造方法，其包括：

使固定有細胞內導入因子之針狀體與結合了重物之細胞接觸，將上述針狀體之一部分插入至上述細胞內，將上述細胞內導入因子導入至上述細胞內之步驟；以及

將上述針狀體之一部分從上述細胞抽出之步驟。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中上述重物係選自由樹脂、金屬、磁性物質、及該等之組合所組成之群中之一種或複數種物質。

【請求項3】

如請求項1或2之方法，其中上述重物具有顆粒狀之形態。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之方法，其中將上述針狀體之一部分插入至細胞內及/或從細胞抽出之步驟係使用選自由離心力、磁力、水流、水壓、及靜電相互作用所組成之群中之一種或複數種外力而進行。

【請求項5】

如請求項1至4中任一項之方法，其中上述細胞內導入因子係可與細胞內分子結合之結合體，且包括將上述針狀體從上述細胞抽出，將於上述細胞內與上述結合體結合之細胞內分子與上述針狀體一同從上述細胞抽出。

【請求項6】

如請求項5之方法，其中上述結合體係核酸、蛋白質、肽、或低分子

化合物。

【請求項7】

如請求項5或6之方法，其中上述結合體係抗體或其片段。

【請求項8】

如請求項1至4中任一項之方法，其中上述細胞內導入因子為生理活性物質，且包括將上述針狀體從上述細胞抽出，使上述細胞內導入因子殘留於上述細胞內。

【請求項9】

如請求項8之方法，其中上述生理活性物質係選自由核酸、肽、蛋白質、糖類、多糖、脂肪酸、膽固醇、脂質、訊號傳遞物質、配體物質、激素物質、細胞激素、離子、金屬粒子、磁性微粒子、無機化合物、量子點、有機化合物及藥劑所組成之群中之一種或複數種物質。

【請求項10】

如請求項8或9之方法，其中上述生理活性物質與上述針狀體之間之結合係可於細胞內分離之結合。

【請求項11】

如請求項10之方法，其中上述細胞內導入因子與上述針狀體之間之結合係選自由靜電結合、藉由疏水性相互作用之結合、螯合物結合、於細胞內切斷之共價鍵結、經由光切斷連接子之結合、經由酶切斷連接子之結合所組成之群中之至少1種。

【請求項12】

如請求項1至11中任一項之方法，其中上述針狀體為針狀粒子。

【請求項13】

如請求項12之方法，其中上述針狀粒子之針狀部之長度為1～50 μm 。

【請求項14】

如請求項12或13之方法，上述針狀粒子為氧化鋅。

【請求項15】

如請求項1至14中任一項之方法，其中上述針狀體具有固定於基材之形態。

【請求項16】

如請求項15之方法，其中上述基材於其表面具有黏合劑，上述針狀體之一部分藉由上述黏合劑而固定於上述基材。

【請求項17】

如請求項16之方法，其中上述黏合劑包含蛋白質非吸附性材料。

【請求項18】

如請求項15之方法，其中上述針狀體係使用選自由光微影法、乾式蝕刻、濕式蝕刻、及該等之組合所組成之群中之一種或複數種製造。

【請求項19】

如請求項1至18中任一項之方法，其中上述基材之具有上述針狀體之面具有可收容細胞之微細凹凸構造。

【請求項20】

一種解析上述細胞內導入因子之功能之方法，其包括對藉由如請求項1至19中任一項之方法所製造之改型細胞之狀態進行解析的步驟。

【請求項21】

如請求項20之方法，其中對上述改型細胞之狀態進行解析之步驟係

對選自由細胞之增殖速度、存活率、代謝、活性氧物種之定量、基因表現所組成之群中之一項或複數項進行解析。

【請求項22】

一種針狀粒子，其固定有可與細胞內分子結合之結合體。

【請求項23】

如請求項22之針狀粒子，其中上述針狀粒子之針狀部之長度為1～50 μm 。

【請求項24】

如請求項22或23之針狀粒子，其中上述針狀粒子為氧化鋅。

【請求項25】

如請求項22至24中任一項之針狀粒子，其中上述結合體係核酸、蛋白質、肽、或低分子化合物。

【請求項26】

如請求項25之針狀粒子，其中上述結合體係抗體或其片段。

【請求項27】

一種細胞處理用複合基材，其係使針狀粒子固定於基材而成。

【請求項28】

如請求項27之細胞處理用複合基材，其中上述針狀粒子之針狀部之長度為1～50 μm 。

【請求項29】

如請求項27或28之細胞處理用複合基材，其中上述針狀粒子為氧化鋅。

【請求項30】

如請求項27至29中任一項之細胞處理用複合基材，其中上述基材包含樹脂。

【請求項31】

如請求項27至30中任一項之細胞處理用複合基材，其中上述基材於其表面具有黏合劑，上述針狀粒子之一部分藉由上述黏合劑而固定於上述基材。

【請求項32】

如請求項31之細胞處理用複合基材，其中上述黏合劑包含蛋白質非吸附性材料。

【請求項33】

如請求項27至32中任一項之細胞處理用複合基材，其中於上述基材之固定有上述針狀粒子之面形成有可收容細胞之微細凹凸構造。

【請求項34】

如請求項27至33中任一項之細胞處理用複合基材，其中於上述針狀粒子固定有可與細胞內分子結合之結合體。

【請求項35】

如請求項34之細胞處理用複合基材，其中上述結合體係核酸、蛋白質、肽、或低分子化合物。

【請求項36】

如請求項35之細胞處理用複合基材，其中上述結合體係抗體或其片段。

【請求項37】

一種改型細胞之製造方法，該改型細胞係去除或減少了上述細胞內

分子之功能者，該製造方法包括：

將如請求項22至26中任一項之針狀粒子、或如請求項34至36中任一項之細胞處理用複合基材中之針狀粒子之一部分插入至細胞內之步驟；

使細胞內分子與固定於上述針狀粒子之上述結合體結合之步驟；以及

將上述針狀粒子與經由上述結合體而結合之上述細胞內分子一同從上述細胞抽出之步驟。

【請求項38】

如請求項37之方法，其中上述改型細胞用以解析上述細胞內分子之功能。

【請求項39】

如請求項37或38之方法，其中將上述針狀粒子之一部分插入至細胞內及/或從細胞抽出之步驟係利用選自由離心力、磁力、水流、水壓、及靜電相互作用所組成之群中之一種或複數種外力而進行。

【請求項40】

一種對細胞內分子之功能進行解析之方法，其包括：

將如請求項22至26中任一項之針狀粒子、或如請求項34至36中任一項之細胞處理用複合基材中之針狀粒子之一部分插入至細胞內之步驟；

使細胞內分子與固定於上述針狀粒子之上述結合體結合之步驟；

將上述針狀粒子與經由上述結合體而結合之上述細胞內分子一同從上述細胞抽出之步驟；以及

對上述細胞之狀態進行解析之步驟。

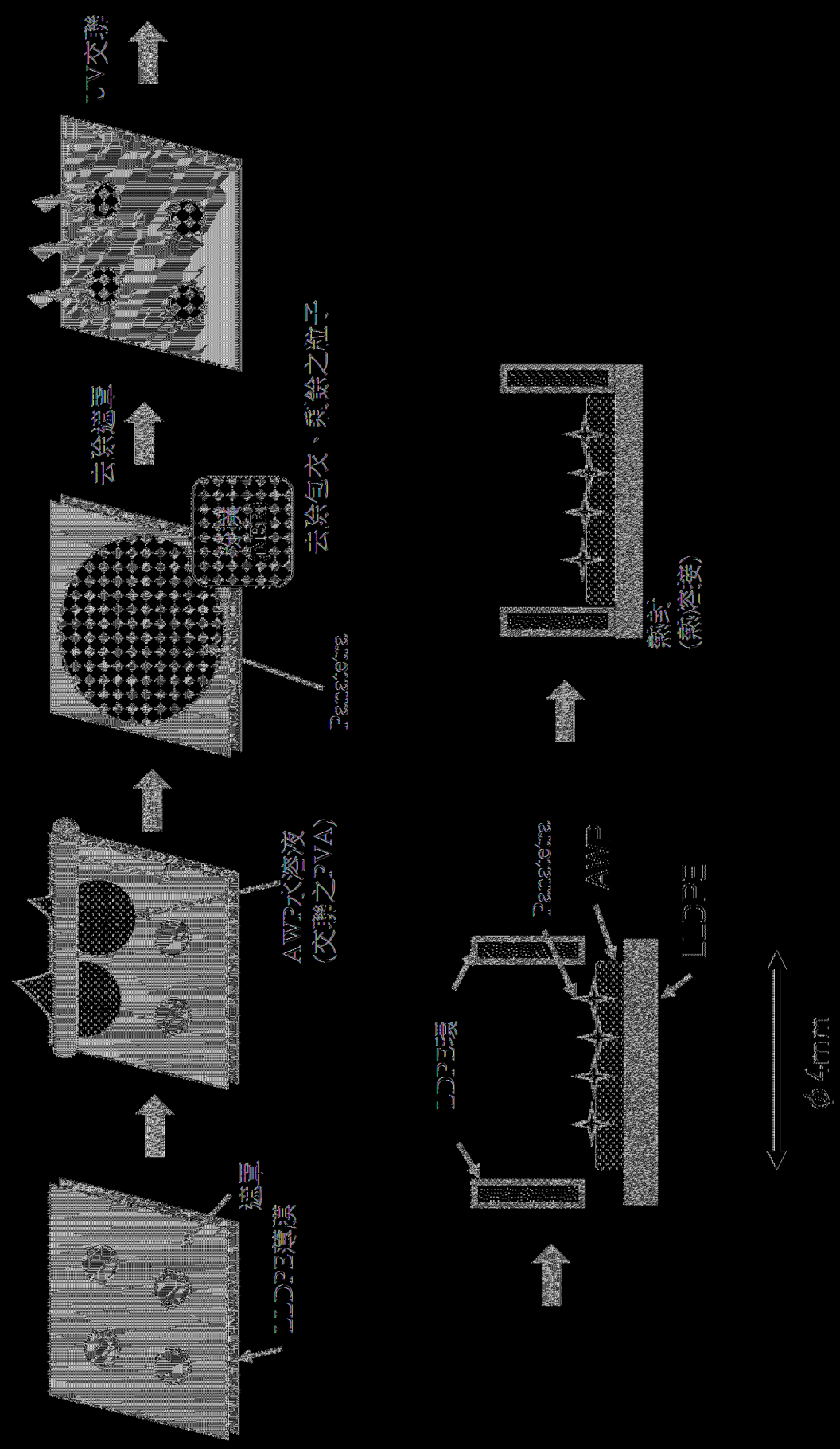
【請求項41】

如請求項40之方法，其中對細胞之狀態進行解析之步驟係對選自由細胞之增殖速度、存活率、代謝、活性氧物種之定量、基因表現所組成之群中之一項或複數項進行解析。

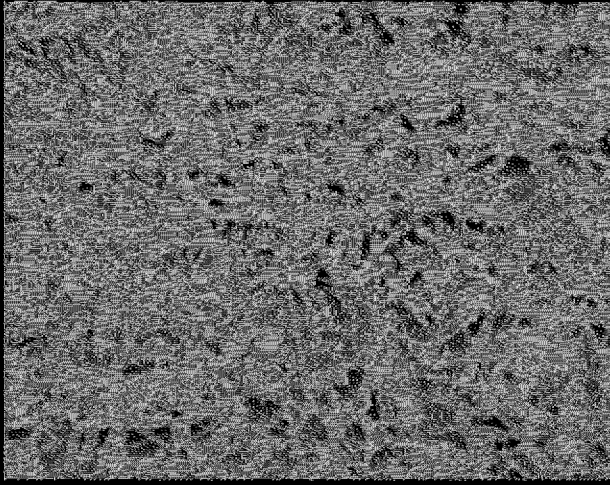
【請求項42】

如請求項40或41之方法，其中將上述針狀粒子之一部分插入至細胞內及/或從細胞抽出之步驟係利用選自由離心力、磁力、水流、水壓、及靜電相互作用所組成之群中之一種或複數種外力而進行。

(發明圖式)



(圖二)

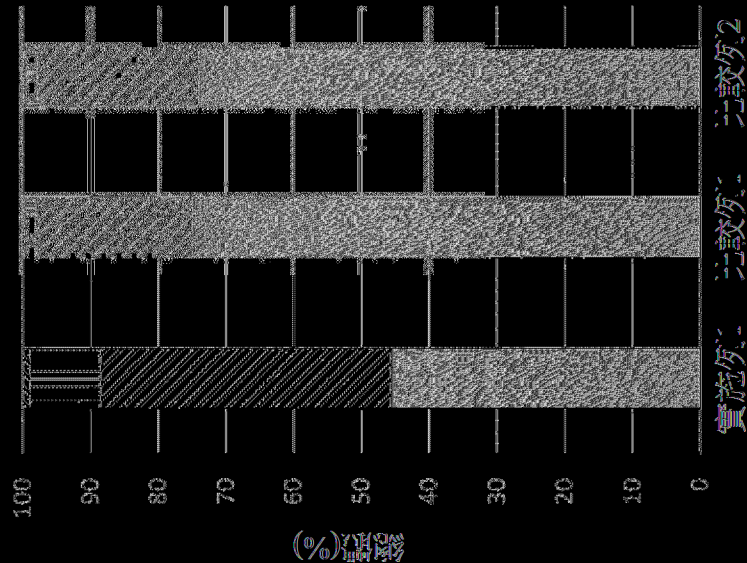


20μm

(圖2)

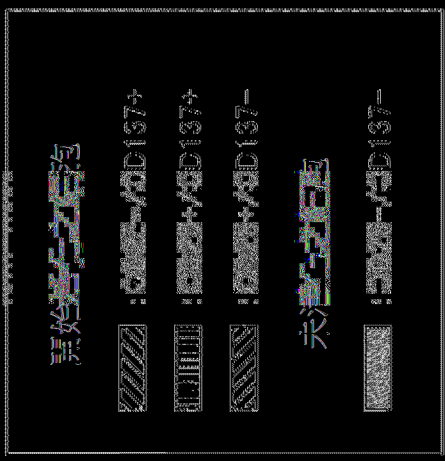
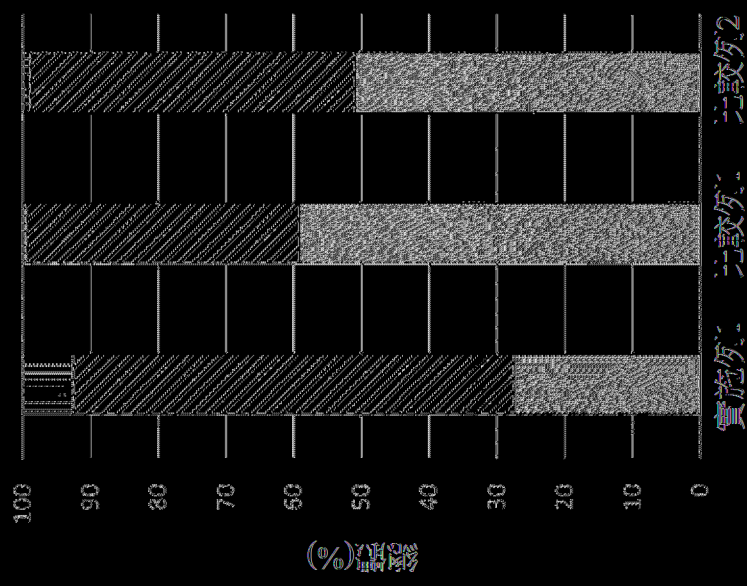
(A)

3天後



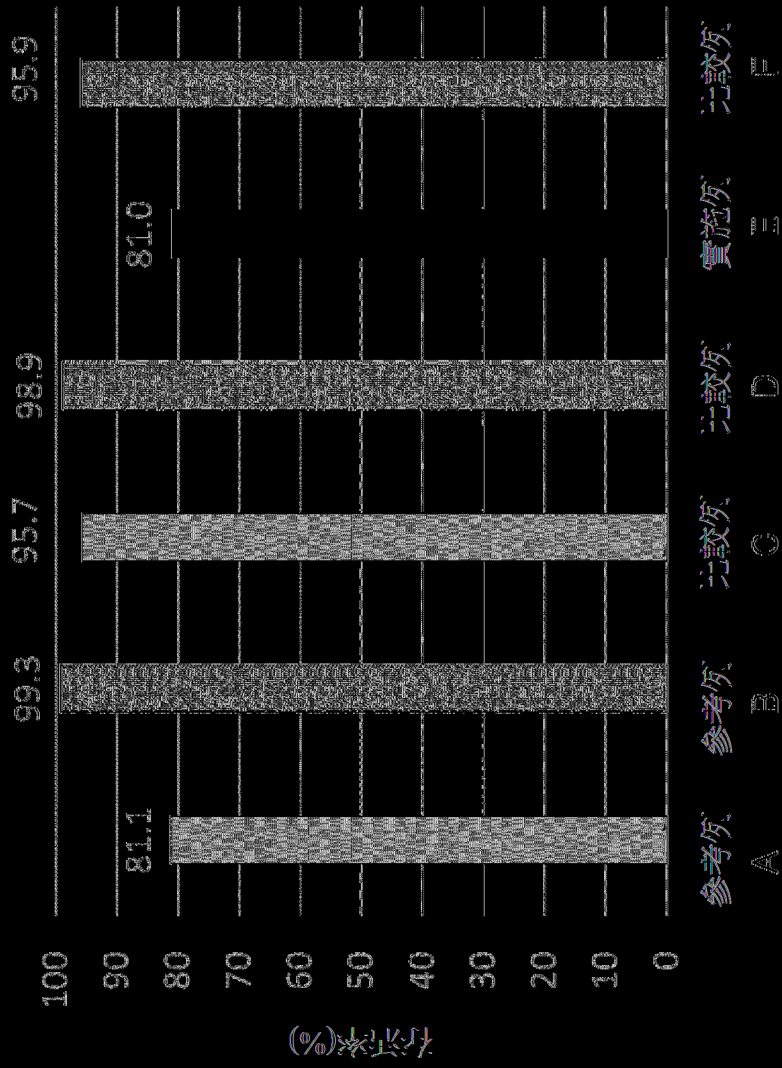
(B)

3天後



| 包衣 | 實施例1 | 比較例1 | 比較例2 |
|---------------|------|------|------|
| 消C.芽體 | 有 | 無 | 無 |
| Decontaminate | 有 | 無 | 有 |

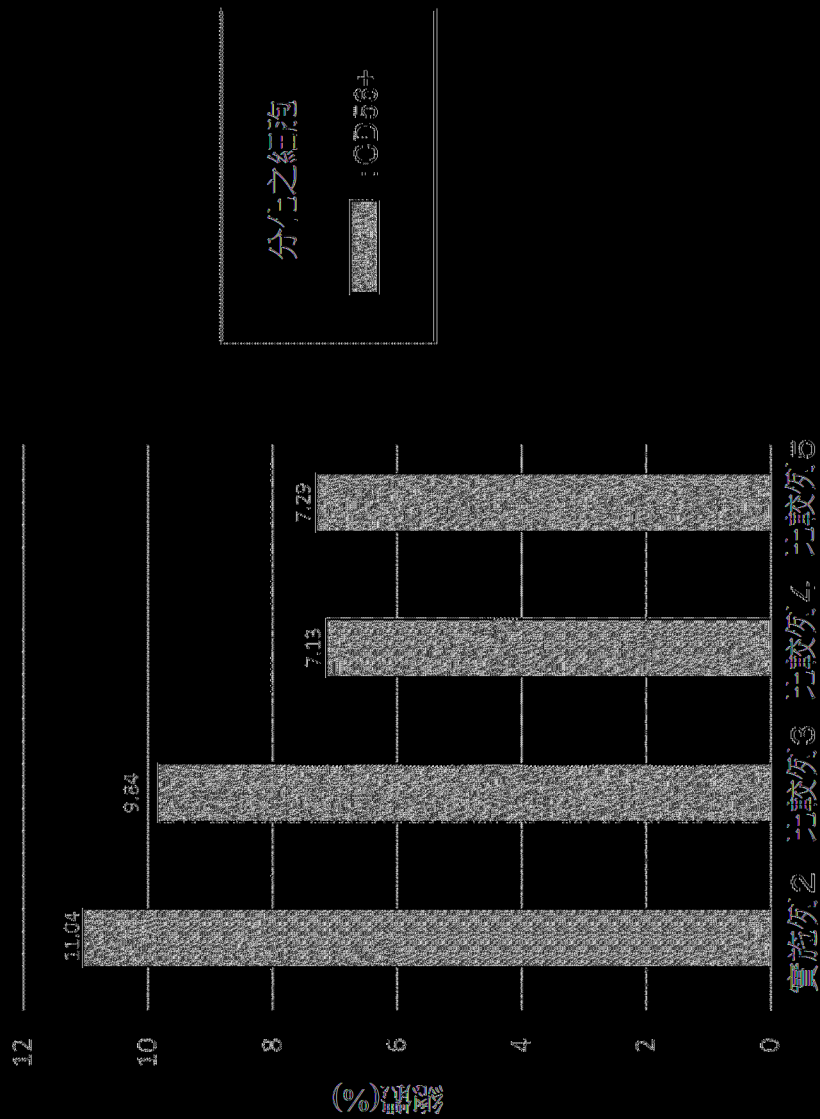
[圖3]



| | 參考例 A | 參考例 B | 比較例 C | 比較例 D | 實施例 E | 比較例 F |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Parameters | 有 | 無 | 有 | 無 | 有 | 無 |
| 重飾 | 無 | 無 | 無 | 無 | 有 | 有 |
| 紅泡數 (μm^2 紅泡/ cm^2) | 800萬 | 800萬 | 200萬 | 200萬 | 200萬 | 200萬 |

【圖4】

3天後



分之組均

CD55+

| 實施例 2 | 實施例 3 | 實施例 4 | 實施例 5 |
|-------|-------|--------|-------|
| 塗佈 | 無 | 添加至培養基 | 無 |
| 有 | 有 | 無 | 無 |

[圖5]