

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6678997号
(P6678997)

(45) 発行日 令和2年4月15日 (2020.4.15)

(24) 登録日 令和2年3月23日 (2020.3.23)

(51) Int. Cl.

C 1 2 N 5/077 (2010.01)

F 1

C 1 2 N 5/077

請求項の数 2 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2016-572160 (P2016-572160)	(73) 特許権者	000003986
(86) (22) 出願日	平成28年1月29日 (2016.1.29)		日産化学株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2016/052571		東京都中央区日本橋二丁目5番1号
(87) 国際公開番号	W02016/121896	(73) 特許権者	304021831
(87) 国際公開日	平成28年8月4日 (2016.8.4)		国立大学法人千葉大学
審査請求日	平成30年10月26日 (2018.10.26)		千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号
(31) 優先権主張番号	特願2015-17839 (P2015-17839)	(74) 代理人	100080791
(32) 優先日	平成27年1月30日 (2015.1.30)		弁理士 高島 一
(33) 優先権主張国・地域又は機関		(74) 代理人	100125070
	日本国 (JP)		弁理士 土井 京子
(31) 優先権主張番号	特願2015-65007 (P2015-65007)	(74) 代理人	100136629
(32) 優先日	平成27年3月26日 (2015.3.26)		弁理士 鎌田 光宣
(33) 優先権主張国・地域又は機関		(74) 代理人	100121212
	日本国 (JP)		弁理士 田村 弥栄子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管平滑筋細胞の培養方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脱アシル化ジェランガムを0.01~0.03% (w/v) の濃度で含む、細胞または組織を浮遊させて培養できる培地組成物中で、細胞増殖が停止した状態の血管平滑筋細胞を浮遊培養することを含む、血管平滑筋細胞の培養方法。

【請求項 2】

脱アシル化ジェランガムを0.01~0.03% (w/v) の濃度で含む、細胞または組織を浮遊させて培養できる培地組成物中に、細胞増殖が停止した状態の血管平滑筋細胞を浮遊させることを含む、血管平滑筋細胞の保存方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血管平滑筋細胞の培養技術に関する。

【背景技術】

【0002】

血管を構成する血管内皮細胞および血管平滑筋細胞（以下、血管細胞）は、初代培養細胞としてインビトロ試験に用いられることが多く、樹立細胞株は殆どない。初代培養血管細胞は、樹立細胞とは違い、生体内の血管細胞の本来の性質を色濃く残している反面、継代や凍結保存すると形質変換を起こしやすい性質が報告されている。特に、血管平滑筋細胞は、通常のプレートを用いた培養（単層培養：2次元培養）を行うと、増殖し、収縮能

が低下する等、形質が変化してしまう。このような形質変化を回避する工夫として、以下の3つの方法が開発されている。(1) タイプIコラーゲンゲル上での培養。血管平滑筋細胞は増殖を停止させた状態で培養できる(非特許文献1)。(2) タイプIコラーゲンを主成分とする3次元マトリックスを用いた培養(非特許文献2)。この場合、細胞増殖は停止し、血管平滑筋細胞本来の収縮能が回復する。(3) 血管内皮細胞の培養は、一般的にゼラチンコートで行われる。

【0003】

しかしながら、各培養方法にはそれぞれの問題点がある。(1)の方法は長期培養に向かない点が問題である。そのため、培養3~5日目でコラーゲンゲルを溶解し血管平滑筋細胞を単離する必要がある。単離をせずにそのまま培養すると、細胞増殖が始まり通常の2次元培養と同等になる。従って、生体に近い性質を維持できない。(2)のタイプIコラーゲン3次元マトリックスを用いた培養は、血管平滑筋細胞が生体に近い性質を有するまでに約1週間程度かかる点が問題である。更に、培養した状態での保存が不可能であるため、臨床応用が難しい。(3)のゼラチンコートを用いた培養は、通常の2次元培養法と大きな違いはない。

【0004】

以上の様に現行の血管細胞の培養技術では、細胞の形質変換を回避できないこと(2次元培養法)、長期培養の困難性や煩雑さ(3次元培養法)のために、血管細胞を用いた評価法の開発、血管細胞輸送法、血管細胞の生体移植などに大きな制約を与えている。更に、培養容器表面を、細胞接着を阻害する材料によりコーティングしたり、特殊な加工を施したりすることにより細胞接着を阻害して血管平滑筋細胞を培養しても、その生存率は速やかに低下する。そのため、培養基材から血管細胞への刺激を最低限に抑えつつ、薬剤などの評価が簡便に出来る培養環境、簡便な細胞回収、及び細胞輸送のための細胞の形質変換をおこしにくい非凍結環境を実現する培養方法の開発が望まれている。

【0005】

本発明者らは、液体培地中の粘度を実質的に高めることなく、浮遊状態を維持したまま、細胞や組織を培養することが可能な培地組成物の開発に成功している(特許文献1及び2)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】 W02014/017513 A1

【特許文献2】 US2014/0106348 A1

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】 Koyama et al., Cell 1996; 87: 1069-78

【非特許文献2】 Ishii et al., Atherosclerosis 2001; 158: 377-84

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、血管平滑筋細胞を増殖させることなく、形質変化を回避しながら、長期間培養する技術を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、液体培地中の粘度を実質的に高めることなく、浮遊状態を維持したまま、細胞や組織を培養することが可能な培地組成物中で癌細胞等を浮遊培養すると、プレート上で接着培養した場合よりも細胞増殖が促進されることを見出しているが(特許文献1)、血管平滑筋細胞を、浮遊状態を維持したまま、細胞や組織を培養することが可能な培地組成物中で浮遊培養すると、意外にも、むしろ良好な生存性を維持したまま細胞周期が停止し、細胞増殖が抑制されて、形質変化のリスクを回避しながら長期間維持できること

を見出した。

このような知見に基づき、更に検討を加え、本発明を完成した。

【0010】

すなわち、本発明は下記のとおりである：

【0011】

[1]細胞または組織を浮遊させて培養できる構造体を含有する培地組成物中で、血管平滑筋細胞を浮遊培養することを含む、血管平滑筋細胞の培養方法。

[2]細胞増殖が停止した状態の血管平滑筋細胞を浮遊培養する、[1]記載の方法。

[3]細胞または組織を浮遊させて培養できる構造体を含有する培地組成物中で、血管平滑筋細胞を浮遊培養することを含む、血管平滑筋細胞の細胞増殖を抑制する方法。

10

[4]細胞または組織を浮遊させて培養できる構造体を含有する培地組成物中に、血管平滑筋細胞を浮遊させることを含む、血管平滑筋細胞の保存方法。

[5]前記構造体が脱アシル化ジェランガムを含む、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[6]培地組成物中の脱アシル化ジェランガム濃度が0.005～0.3% (w/v) である、[5]記載の方法。

[7]脱アシル化ジェランガムを0.005～0.3% (w/v) の濃度で含む、細胞または組織を浮遊させて培養できる培地組成物中で、血管平滑筋細胞を浮遊培養することを含む、血管平滑筋細胞の培養方法。

[8]脱アシル化ジェランガムを0.005～0.3% (w/v) の濃度で含む、細胞または組織を浮遊させて培養できる培地組成物中に、血管平滑筋細胞を浮遊させることを含む、血管平滑筋細胞の保存方法。

20

【発明の効果】

【0012】

本発明により、血管平滑筋細胞を細胞増殖が抑制された状態で、長期間、インビトロで維持することが可能となる。本発明により、凍結操作がない条件での血管平滑筋細胞の輸送が可能になり、かつ凍結や接着で認められる細胞の形質変化を最小限にすることが期待できる。本発明は、血管平滑筋細胞を用いた再生医療の発展に寄与する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】ウェスタンブロッティングによる、血管平滑筋細胞中の細胞周期関連タンパク質発現の解析。

30

【図2】ウェスタンブロッティングによる、血管平滑筋細胞中の細胞周期関連タンパク質発現の解析。

【図3】ウェスタンブロッティングによる、NIH3T3細胞中の細胞周期関連タンパク質発現の解析。

【図4】ウェスタンブロッティングによる、血管平滑筋細胞中の細胞周期関連タンパク質発現の解析。

【図5】ウェスタンブロッティングによる、NIH3T3細胞中の細胞周期関連タンパク質発現の解析。

【図6】血管平滑筋細胞の増殖及び生存率の経時的変化。A：総細胞数、B：生存率。白丸：プレート上で接着培養した細胞を、プレート上に播き、更に接着培養に付した。黒丸：脱アシル化ジェランガム含有培地中で浮遊培養した細胞を、プレート上に播き、接着培養に付した。

40

【発明を実施するための形態】

【0014】

(1) 本発明に用いる培地組成物

本発明に用いられる培地組成物は、細胞または組織を浮遊させて培養できる構造体を含有する培地組成物である。当該培地組成物は、浮遊状態を維持したまま、培養対象の細胞（即ち、血管平滑筋細胞）やこれを含む組織を培養することを可能にする。当該培地組成物は、WO2014/017513 A1及びUS2014/0106348 A1の記載に従い、調製することが可能であ

50

る。以下、当該培地組成物を培地組成物Iと称することがある。

【0015】

細胞とは、動物を構成する最も基本的な単位であり、その要素として細胞膜の内部に細胞質と各種の細胞小器官をもつものである。

【0016】

本発明における細胞及び／又は組織の浮遊とは、培養容器に対して細胞及び／又は組織が接着しない状態（非接着）であることをいう。更に、本発明において、細胞及び／又は組織を増殖、分化或いは維持させる際、液体培地組成物に対する外部からの圧力や振動或いは当該組成物中での振とう、回転操作等を伴わずに細胞及び／又は組織が当該液体培地組成物中で均一に分散しなおかつ浮遊状態にある状態を「浮遊静置」といい、当該状態で細胞及び／又は組織を培養することを「浮遊静置培養」という。また、「浮遊静置」において浮遊させることのできる期間としては、5分以上、1時間以上、24時間以上、48時間以上、7日以上等が含まれるが、浮遊状態を保つ限りこれらの期間に限定されない。

10

【0017】

本発明に用いる培地組成物は、細胞や組織の維持や培養が可能な温度範囲（例えば、0～40℃）の少なくとも1点において、細胞及び／又は組織の浮遊静置が可能である。本発明に用いる培地組成物は、好ましくは25～37℃の温度範囲の少なくとも1点において、最も好ましくは37℃において、細胞及び／又は組織の浮遊静置が可能である。

【0018】

浮遊静置が可能か否かは、例えば、培養対象の細胞を、 2×10^4 cells/mlの濃度で、評価対象の培地組成物中に均一に分散させ、15mlコニカルチューブ中に10ml注入し、少なくとも5分以上（例、1時間以上、24時間以上、48時間以上、7日以上）、37℃にて静置し、当該細胞の浮遊状態が維持されるか否かを観察することにより、評価することができる。全細胞のうちの70%以上が浮遊状態の場合、浮遊状態が維持されたと結論できる。細胞に代えて、ポリスチレンビーズ（Size 500-600 μ m、Polysciences Inc.製）に代替して評価してもよい。

20

【0019】

本発明に用いる培地組成物は、細胞または組織を浮遊させて培養できる（好ましくは浮遊静置培養できる）構造体と培地を含有する組成物である。

本発明に用いる培地組成物は、好ましくは、培養時の培地組成物の交換処理及び培養終了後において、培地組成物からの細胞または組織の回収が可能である組成物であり、より好ましくは、培地組成物からの細胞または組織の回収の際に、温度変化、化学処理、酵素処理、せん断力のいずれも必要としない組成物である。

30

本発明における構造体とは、特定化合物から形成されたもので、細胞及び／又は組織を均一に浮遊させる効果を示すものである。より詳細には、高分子化合物がイオンを介して集合したもの、或いは、高分子化合物が三次元のネットワークを形成したもの等が含まれる。また、多糖類が金属イオンを介してマイクロゲルを形成することは公知であり（例えば、特開2004-129596号公報）、本発明の構造体には、一態様として当該マイクロゲルも含まれる。また、高分子化合物がイオンを介して集合したものとしては、その一態様としてフィルム状の構造体が挙げられる。

40

本発明における構造体の大きさは、フィルターで濾過した場合、孔径が0.2 μ m乃至200 μ mのフィルターを通過するものが好ましい。当該孔径の下限としては、より好ましくは、1 μ mを超えるものであり、安定に細胞または組織を浮遊させることを考慮すると、更に好ましくは5 μ mを超えるものである。当該孔径の上限としては、より好ましくは、100 μ m以下のもの、細胞または組織の大きさを考慮すると、更に好ましくは70 μ m以下のものである。

本発明における特定化合物とは、特定化合物を液体培地と混合した際、不定形な構造体を形成し、当該構造体が当該液体中で均一に分散し、当該液体の粘度を実質的に高めること無く細胞及び／又は組織を実質的に保持し、その沈降を防ぐ効果を有するものである。

「液体の粘度を実質的に高めない」とは、液体の粘度が8mPa・sを上回らないことを意味

50

する。この際の当該液体の粘度（すなわち、本発明に用いる培地組成物の粘度）は、37℃において、8mPa・s以下であり、好ましくは4mPa・s以下であり、より好ましくは2mPa・s以下である。更に、当該構造体を液体培地中に形成し、当該液体の粘度を実質的に高めること無く細胞及び／又は組織を均一に浮遊させる（好ましくは浮遊静置させる）効果を示すものであれば、特定化合物の化学構造、分子量、物性等は何ら制限されない。

構造体を含む液体の粘度は、例えば、後述の実施例に記載の方法で測定することができる。具体的には37℃条件下でE型粘度計（東機産業株式会社製、TV-22型粘度計、機種：TV E -22L、コーンロータ：標準ロータ 1°34'×R24、回転数100rpm）を用いて測定することができる。

【0020】

本発明に用いる特定化合物の例としては、特に制限されるものではないが、高分子化合物が挙げられ、好ましくはアニオン性の官能基を有する高分子化合物が挙げられる。

アニオン性の官能基としては、カルボキシ基、スルホ基、リン酸基及びそれらの塩が挙げられ、カルボキシ基またはその塩が好ましい。

本発明に用いる高分子化合物は、前記アニオン性の官能基の群より選択される1種又は2種以上を有するものを使用できる。

本発明に用いる高分子化合物の好ましい具体例としては、特に制限されるものではないが、単糖類（例えば、トリオース、テトロース、ペントース、ヘキソース、ヘプトース等）が10個以上重合した多糖類が挙げられ、より好ましくは、アニオン性の官能基を有する酸性多糖類が挙げられる。ここにいう酸性多糖類とは、その構造中にアニオン性の官能基を有すれば特に制限されないが、例えば、ウロン酸（例えば、グルクロン酸、イズロン酸、ガラクトuron酸、マンヌロン酸）を有する多糖類、構造中の一部に硫酸基又はリン酸基を有する多糖類、或いはその両方の構造を持つ多糖類であって、天然から得られる多糖類のみならず、微生物により産生された多糖類、遺伝子工学的に産生された多糖類、或いは酵素を用いて人工的に合成された多糖類も含まれる。より具体的には、ヒアルロン酸、ジェランガム、脱アシル化ジェランガム（以下、DAGという場合もある）、ラムザンガム、ダイユータンガム、キサントガム、カラギーナン、ザンタンガム、ヘキスロン酸、フコイダン、ペクチン、ペクチン酸、ペクチニン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヘパリチン硫酸、ケラト硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ラムナン硫酸及びそれらの塩からなる群より1種又は2種以上から構成されるものが例示される。多糖類は、好ましくは、ヒアルロン酸、DAG、ダイユータンガム、キサントガム、カラギーナン又はそれらの塩であり、低濃度の使用で細胞又は組織を浮遊させることができ、かつ細胞又は組織の回収のし易さを考慮すると、最も好ましくは、DAGである。

ここでいう塩とは、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウムといったアルカリ金属の塩、カルシウム、バリウム、マグネシウムといったアルカリ土類金属の塩又はアルミニウム、亜鉛、銅、鉄、アンモニウム、有機塩基及びアミノ酸等の塩が挙げられる。

これらの高分子化合物（多糖類等）の重量平均分子量は、好ましくは10,000乃至50,000,000であり、より好ましくは100,000乃至20,000,000、更に好ましくは1,000,000乃至10,000,000である。例えば、当該分子量は、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）によるプルラン換算で測定できる。

更に、DAGはリン酸化したものを使用することもできる。当該リン酸化は公知の手法で行うことができる。

【0021】

本発明においては、上記多糖類を複数種（好ましくは2種）組み合わせて使用することができる。多糖類の組み合わせの種類は、上述の構造体を液体培地中に形成し、当該液体培地の粘度を実質的に高めること無く細胞及び／又は組織を均一に浮遊させる（好ましくは浮遊静置させる）ことのできるものであれば特に限定されないが、好ましくは、当該組合せは少なくともDAG又はその塩を含む。即ち、好適な多糖類の組合せには、DAG又はその塩、及びDAG又はその塩以外の多糖類（例、キサントガム、アルギン酸、カラギーナン、ダイユータンガム、メチルセルロース、ローカストビーンガム又はそれらの塩）が含ま

れる。具体的な多糖類の組み合わせとしては、DAGとラムザンガム、DAGとダイユータンガム、DAGとキサンタンガム、DAGとカラギーナン、DAGとザンタンガム、DAGとローカストビーンガム、DAGとκ-カラギーナン、DAGとアルギン酸ナトリウム、DAGとメチルセルロース等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0022】

本発明に用いる特定化合物の更に好ましい具体例としては、ヒアルロン酸、脱アシル化ジェランガム、ダイユータンガム、カラギーナン及びキサンタンガム、並びにそれらの塩が挙げられ、培地組成物の粘度を低くできる点と細胞または組織の回収のし易さの点を考慮すると、最も好ましい例としては脱アシル化ジェランガムまたはその塩が挙げられる。

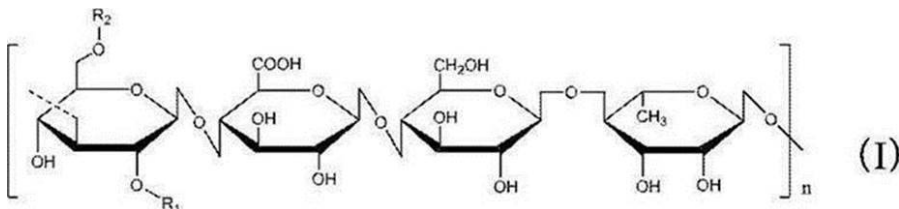
【0023】

本発明における脱アシル化ジェランガムとは、1-3結合したグルコース、1-4結合したグルクロン酸、1-4結合したグルコース及び1-4結合したラムノースの4分子の糖を構成単位とする直鎖状の高分子多糖類であり、以下の一般式 (I) において、 R_1 、 R_2 が共に水素原子であり、 n は2以上の整数で表わされる多糖類である。ただし、 R_1 がグリセリル基を、 R_2 がアセチル基を含んでいてもよいが、アセチル基及びグリセリル基の含有量は、好ましくは10%以下であり、より好ましくは1%以下である。

本発明における構造体は特定化合物により様々な形態となるが、脱アシル化ジェランガムの場合について記載すると、脱アシル化ジェランガムは、液体培地と混合した際に、液体培地中の金属イオン（例えば、カルシウムイオン）を取り込み、当該金属イオンを介した不定形な構造体を形成し、細胞及び／又は組織を浮遊させる。脱アシル化ジェランガムから調製される本発明に用いる培地組成物の粘度は、 $8\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以下であり、好ましくは $4\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以下であり、細胞または組織の回収のし易さの点を考慮すると、より好ましくは $2\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以下である。

【0024】

【化1】



【0025】

本発明における特定化合物は、化学合成法でも得ることができるが、当該化合物が天然物である場合は、当該化合物を含有している各種植物、各種動物、各種微生物から慣用技術を用いて抽出及び分離精製することにより得るのが好適である。その抽出においては、水や超臨界ガスを用いると当該化合物を効率よく抽出できる。例えば、ジェランガムの製造方法としては、発酵培地で生産微生物を培養し、菌体外に生産された粘膜物を通常の精製方法にて回収し、乾燥、粉碎等の工程後、粉末状にすればよい。また、脱アシル化ジェランガムの場合、粘膜物を回収する際にアルカリ処理を施し、1-3結合したグルコース残基に結合したグリセリル基とアセチル基を脱アシル化した後に回収すればよい。精製方法としては、例えば、液-液抽出、分別沈澱、結晶化、各種のイオン交換クロマトグラフィー、セファデックスLH-20等を用いたゲル濾過クロマトグラフィー、活性炭、シリカゲル等による吸着クロマトグラフィーもしくは薄層クロマトグラフィーによる活性物質の吸脱着処理、或いは逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー等を単独或いは任意の順序に組み合わせ、また反復して用いることにより、不純物を除き精製することができる。ジェランガムの生産微生物の例としては、これに限定されるものではないが、スフィンゴモナス・エロディア (Sphingomonas elodea) 及び当該微生物の遺伝子を改変した微生物が挙げられる。

そして、脱アシル化ジェランガムの場合、市販のもの、例えば、三晶株式会社製「KELCOGEL (シーピー・ケルコ社の登録商標) CG-LA」、三栄源エフ・エフ・アイ株式会社製「

10

20

30

40

50

ケルコゲル（シーピー・ケルコ社の登録商標）」等を使用することができる。また、ネイティブ型ジェランガムとして、三栄源エフ・エフ・アイ株式会社製「ケルコゲル（シーピー・ケルコ社の登録商標）HT」等を使用することができる。

【0026】

培地中での特定化合物の濃度は、特定化合物の種類に依存し、特定化合物が上述の構造体を液体培地中に形成し、当該液体培地の粘度を実質的に高めること無く細胞及び／又は組織を均一に浮遊させる（好ましくは浮遊静置させる）ことのできる範囲で、適宜設定することができるが、通常0.0005%乃至1.0%（w/v）、好ましくは0.001%乃至0.4%（w/v）、より好ましくは0.005%乃至0.1%（w/v）、更に好ましくは0.005%乃至0.05%（w/v）となるようにすれば良い。例えば、脱アシル化ジェランガムの場合、0.001%乃至1.0%（w/v）、好ましくは0.003%乃至0.5%（w/v）、より好ましくは0.005%乃至0.3%（w/v）、更に好ましくは0.01%乃至0.05%（w/v）、最も好ましくは、0.01%乃至0.03%（w/v）培地中に添加すれば良い。キサンタンガムの場合、0.001%乃至5.0%（w/v）、好ましくは0.01%乃至1.0%（w/v）、より好ましくは0.05%乃至0.5%（w/v）、最も好ましくは、0.1%乃至0.2%（w/v）培地中に添加すれば良い。κ-カラギーナンおよびローカストビーンガム混合系の場合、0.001%乃至5.0%（w/v）、好ましくは0.005%乃至1.0%（w/v）、より好ましくは0.01%乃至0.1%（w/v）、最も好ましくは、0.03%乃至0.05%（w/v）培地中に添加すれば良い。ネイティブ型ジェランガムの場合、0.05%乃至1.0%（w/v）、好ましくは、0.05%乃至0.1%（w/v）培地中に添加すれば良い。

【0027】

上記多糖類を複数種（好ましくは2種）組み合わせて使用する場合、当該多糖類の濃度は、当該多糖類の組み合わせが上述の構造体を液体培地中に形成し、当該液体培地の粘度を実質的に高めること無く細胞及び／又は組織を均一に浮遊させる（好ましくは浮遊静置させる）ことのできる範囲で、適宜設定することができる。例えば、DAG又はその塩と、DAG又はその塩以外の多糖類との組合せを用いる場合、DAG又はその塩の濃度としては0.005～0.02%（w/v）、好ましくは0.01～0.02%（w/v）が例示され、DAG又はその塩以外の多糖類の濃度としては、0.0001～0.4%（w/v）、好ましくは0.005～0.4%（w/v）、より好ましくは0.1～0.4%（w/v）が例示される。具体的な濃度範囲の組合せとしては、以下が例示される。

DAG又はその塩：0.005～0.02%（好ましくは0.01～0.02%）（w/v）

DAG以外の多糖類

キサンタンガム：0.1～0.4%（w/v）

アルギン酸ナトリウム：0.0001～0.4%（w/v）（好ましくは、0.1～0.4%（w/v））

ネイティブジェランガム：0.0001～0.4%（w/v）

ローカストビーンガム：0.1～0.4%（w/v）

メチルセルロース：0.1～0.4%（w/v）（好ましくは0.2～0.4%（w/v））

カラギーナン：0.05～0.1%（w/v）

ダイユータンガム：0.05～0.1%（w/v）

【0028】

なお該濃度は、以下の式で算出できる。

濃度 [%（w/v）] = 特定化合物の重量（g）／培地組成物の容量（ml）×100

【0029】

前記化合物は、化学合成法によって更に別の誘導体に変えることもでき、そのようにして得た当該誘導体も、本発明において有効に使用できる。具体的には、脱アシル化ジェランガムの場合、その一般式（I）で表される化合物のR₁及び／又はR₂に当たる水酸基を、C₁₋₃アルコキシ基、C₁₋₃アルキルスルホニル基、グルコース或いはフルクトースなどの単糖残基、スクロース、ラクトースなどのオリゴ糖残基、グリシン、アルギニンなどのアミノ酸残基などに置換した誘導体も本発明に使用できる。また、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（EDC）等のクロスリンカーを用いて当該化合物を架橋することもできる。

【0030】

本発明に使用される特定化合物或いはその塩は製造条件により任意の結晶形として存在することができ、任意の水和物として存在することができるが、これら結晶形や水和物及びそれらの混合物も本発明の範囲に含有される。また、アセトン、エタノール、テトラヒドロフランなどの有機溶媒を含む溶媒和物として存在することもあるが、これらの形態はいずれも本発明の範囲に含有される。

【0031】

本発明に使用される特定化合物は、環内或いは環外異性化により生成する互変異性体、幾何異性体、互変異性体若しくは幾何異性体の混合物、又はそれらの混合物の形で存在してもよい。本発明の化合物は、異性化により生じるか否かに拘わらず、不斉中心を有する場合は、分割された光学異性体或いはそれらを任意の比率で含む混合物の形で存在してよい。

【0032】

本発明に用いる培地組成物には、金属イオン、例えば、2価の金属イオン（カルシウムイオン、マグネシウムイオン、亜鉛イオン、鉄イオンおよび銅イオン等）が存在してもよく、好ましくはカルシウムイオンを含有する。当該金属イオンは、例えば、カルシウムイオンとマグネシウムイオン、カルシウムイオンと亜鉛イオン、カルシウムイオンと鉄イオン、カルシウムイオンと銅イオンのように、2種類以上を組み合わせて使用することができる。当業者は適宜その組み合わせを決定することができる。一態様において、培地組成物に金属イオン（例、カルシウムイオン）が含まれることにより、高分子化合物が当該金属イオンを介して集合し、高分子化合物が三次元ネットワークを形成することにより（例えば、多糖類が金属イオン（例、カルシウムイオン）を介してマイクロゲルを形成することにより）本発明の構造体が形成される。金属イオンの濃度は、特定化合物が上述の構造体を液体培地中に形成し、当該液体培地の粘度を実質的に高めること無く細胞及び／又は組織を均一に浮遊させる（好ましくは浮遊静置させる）ことのできる範囲で、適宜設定することができる。金属イオン濃度は0.1mM及至300mMで、好ましくは、0.5mM及至100mMであるが、これらに限定されない。当該金属イオンは、培地と共に混合する、或いは、塩溶液を別途調製しておき、培地に添加してもよい。また本発明に用いる培地組成物には、後述の細胞外マトリックス、接着分子等を含んでもよい。

【0033】

本発明で用いる特定化合物から構成された構造体は、細胞及び／又は組織を生体外で培養した時に、当該細胞及び／又は組織を、当該特定化合物の構造体を含有する液体中で浮遊させる効果（好ましくは浮遊静置させる効果）を示すものである。当該浮遊効果により、単層培養に比べて、一定体積あたりの細胞数及び／又は組織数を増やして培養することが可能である。また、従来の浮遊培養方法において回転や振とう操作を伴う場合、細胞及び／又は組織に対するせん断力が働くため、細胞及び／又は組織の増殖率や回収率が低い、或いは細胞の機能が損なわれてしまう場合があるが、本発明の特定化合物の構造体を含有する培地組成物を用いることにより振とう等の操作を行わずに細胞及び／又は組織を均一に分散することができるため、目的とする細胞及び／又は組織を細胞機能の損失無く容易かつ大量に取得することができる。また、従来のゲル基材を含む培地において細胞及び／又は組織を浮遊培養する際、細胞及び／又は組織の観察や回収が困難であったり、回収の際にその機能を損なったりする場合があるが、本発明の特定化合物の構造体を含有する培地組成物を用いることにより、細胞及び／又は組織を浮遊培養し、その機能を損なうこと無く観察し、回収することができる。また、従来のゲル基材を含む培地は、粘度が高く培地の交換が困難である場合があるが、本発明の特定化合物の構造体を含有する培地組成物は、低粘度であるためピペットやポンプ等を用いて容易に培地を交換することができる。

【0034】

本発明における特定化合物を用いて細胞及び／又は組織を培養する際には、細胞及び／又は組織を培養する際に用いられる培地と特定化合物を混合して培地組成物を調製するこ

とができる。このような培地の組成による分類では天然培地、半合成培地、合成培地、また、形状による分類では半固形培地、液体培地、粉末培地（以下、粉培地という場合もある）などが挙げられる。細胞及び／又は組織が動物由来である場合、動物細胞の培養に用いられる培地であればいずれも用いることができる。このような培地としては、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagles's Medium; DMEM）、ハムF12培地（Ham's Nutrient Mixture F12）、DMEM/F12培地、マッコイ5A培地（McCoy's 5A medium）、イーグルMEM培地（Eagles's Minimum Essential Medium; EMEM）、 α MEM培地（alpha Modified Eagles's Minimum Essential Medium; α MEM）、MEM培地（Minimum Essential Medium）、RPMI1640培地、イスコフ改変ダルベッコ培地（Iscove's Modified Dulbecco's Medium; IMDM）、MCDB131培地、ウィリアム培地E、IPL41培地、Fischer's培地、StemPro34（インビトロジェン社製）、X-VIVO 10（ケンブレックス社製）、X-VIVO 15（ケンブレックス社製）、HPGM（ケンブレックス社製）、StemSpan H3000（ステムセルテクノロジー社製）、StemSpanSFEM（ステムセルテクノロジー社製）、StemlineII（シグマアルドリッチ社製）、QBSF-60（クオリティバイオロジカル社製）、StemProhESCSFM（インビトロジェン社製）、Essential8（登録商標）培地（ギブコ社製）、mTeSR1或いは2培地（ステムセルテクノロジー社製）、リプロFF或いはリプロFF2（リプロセル社製）、PSGro hESC/iPSC培地（システムバイオサイエンス社製）、NutriStem（登録商標）培地（バイオロジカルインダストリーズ社製）、CSTI-7培地（細胞科学研究所社製）、MesenPRO RS培地（ギブコ社製）、MF-Medium（登録商標）間葉系幹細胞増殖培地（東洋紡株式会社製）、Sf-900II（インビトロジェン社製）、Opti-Pro（インビトロジェン社製）、などが挙げられる。

10

20

【0035】

血管平滑筋細胞の培養に用いられる培地には、上記培地に、細胞接着因子を含むことができる。その例としては、マトリゲル、コラーゲンゲル、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ラミニン、フィブロネクチンが挙げられる。これらの細胞接着因子は、2種類以上を組み合わせて添加することもできる。また更に、血管平滑筋細胞の培養に用いられる培地に対してグァーガム、タマリンドガム、アルギン酸プロピレングリコールエステル、ローカストビーンガム、アラビアガム、タラガム、タマリンドガム、メチルセルロース等の増粘剤を更に混合することができる。

【0036】

30

上記の培地には、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、リン、塩素、各種アミノ酸、各種ビタミン、抗生物質、血清、脂肪酸、糖などを当業者は目的に応じて自由に添加してもよい。動物由来の細胞及び／又は組織培養の際には、当業者は目的に応じてその他の化学成分或いは生体成分を一種以上組み合わせて添加することもできる。

動物由来の細胞及び／又は組織の培地に添加される成分としては、ウシ胎児血清、ヒト血清、ウマ血清、インシュリン、トランスフェリン、ラクトフェリン、コレステロール、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム、モノチオグリセロール、2-メルカプトエタノール、ウシ血清アルブミン、ピルビン酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、各種ビタミン、各種アミノ酸、寒天、アガロース、コラーゲン、メチルセルロース、各種サイトカイン、各種ホルモン、各種増殖因子、各種細胞外マトリックスや各種細胞接着分子などが挙げられる。

40

【0037】

培地に添加される抗生物質の例としては、サルファ製剤、ペニシリン、フェネチシリン、メチシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、ナフシリン、アンピシリン、ペニシリン、アモキシシリン、シクラシリン、カルベニシリン、チカルシリン、ピペラシリン、アズロシリン、メクズロシリン、メシリナム、アンジノシリン、セファロスポリン及びその誘導体、オキシリン酸、アミフロキサシン、テマフロキサシン、ナリジクス酸、ピロミド酸、シプロフロキサシン、シノキサシン、ノルフロキサシン、パーフロキサシン、ロザキサシン、オフロキサシン、エノキサシン、ピペミド酸、スルバクタム、クラブリン酸、 β -ブロモペニシラン酸、 β -クロロペニシラン酸、6-

50

アセチルメチレン-ペニシラン酸、セフォキサゾール、スルタンピシリン、アディノシリ
ン及びスルバクタムのホルムアルデヒド・フードラートエステル、タゾバクタム、アズト
レオナム、スルファゼチン、イソスルファゼチン、ノカルディシン、m-カルボキシフェ
ノール、フェニルアセトアミドホスホン酸メチル、クロルテトラサイクリン、オキシテ
トラサイクリン、テトラサイクリン、デメクロサイクリン、ドキシサイクリン、メタサイ
クリン、並びにミノサイクリンが挙げられる。

【0038】

本発明における特定化合物を上記の培地に添加する場合には、まず適切な溶媒にて当該
特定化合物を用時溶解または分散させる（これを、培地添加剤とする。）。その後、培地
中での特定化合物濃度として、上に詳述したように、当該液体培地の粘度を実質的に高め
ること無く細胞及び／又は組織を均一に浮遊させる（好ましくは浮遊静置させる）ことの
できる濃度、例えば、0.0005%乃至1.0%（w/v）、好ましくは0.001%乃至0.4%（w/v）
、より好ましくは0.005%乃至0.1%（w/v）、更に好ましくは0.005%乃至0.05%（w/v）
となるように、当該培地添加剤を培地中に添加すれば良い。例えば、脱アシル化ジェラン
ガムの場合、0.001%乃至1.0%（w/v）、好ましくは0.003%乃至0.5%（w/v）、より好ま
しくは0.005%乃至0.3%（w/v）、最も好ましくは、0.01%乃至0.05%（w/v）培地中に添
加すれば良い。キサンタンガムの場合、0.001%乃至5.0%（w/v）、好ましくは0.01%乃
至1.0%（w/v）、より好ましくは0.05%乃至0.5%（w/v）、最も好ましくは、0.1%乃至0
.2%（w/v）培地中に添加すれば良い。κ-カラギーナンおよびローカストビーンガム混
合系の場合、両化合物の総和として、0.001%乃至5.0%（w/v）、好ましくは0.005%乃至
1.0%（w/v）、より好ましくは0.01%乃至0.1%、最も好ましくは、0.03%乃至0.05%（w
/v）培地中に添加すれば良い。脱アシル化ジェランガムとダイユータンガムの混合系の場
合、両化合物の総和として、0.001%乃至1.0%（w/v）、最も好ましくは、0.005%乃至0
.01%（w/v）培地中に添加すれば良い。脱アシル化ジェランガムとメチルセルロースの混
合系の場合、両化合物の総和として、0.001%乃至1.0%（w/v）、最も好ましくは、0.005
%乃至0.2%（w/v）培地中に添加すれば良い。脱アシル化ジェランガムとローカストビー
ンガムの混合系の場合、両化合物の総和として、0.001%乃至1.0%（w/v）、最も好まし
くは、0.01%乃至0.1%（w/v）培地中に添加すれば良い。脱アシル化ジェランガムとアル
ギン酸ナトリウムの混合系の場合、両化合物の総和として、0.001%乃至1.0%（w/v）
、最も好ましくは、0.01%乃至0.1%（w/v）培地中に添加すれば良い。脱アシル化ジェラ
ンガムとキサンタンガムの混合系の場合、両化合物の総和として、0.001%乃至1.0%（w/
v）、最も好ましくは、0.01%乃至0.1%（w/v）培地中に添加すれば良い。脱アシル化ジ
ェランガムとκ-カラギーナンの混合系の場合、両化合物の総和として、0.001%乃至1.0
%（w/v）、最も好ましくは、0.01%乃至0.1%（w/v）培地中に添加すれば良い。なお該
濃度は、以下の式で算出できる。

$$\text{濃度} [\% (\text{w/v})] = \text{特定化合物の重量 (g)} / \text{培地組成物の容量 (ml)} \times 100$$

【0039】

ここで、培地添加剤に用いる適切な溶媒の例としては、水、ジメチルスルホキシド（DM
SO）、メタノール、エタノール、ブタノール、プロパノール、グリセリン、プロピレング
リコール、ブチレングリコール等の各種アルコールなどの水性溶媒が挙げられるが、これ
らに限られるわけではない。この際、特定化合物濃度は0.001%乃至5.0%（w/v）、好ま
しくは0.01%乃至1.0%（w/v）、より好ましくは0.1%乃至0.6%（w/v）とすることが望
ましい。その際、当該特定化合物の効果を高めたり、使用する際の濃度を下げたりするよ
うな添加物を更に添加することもできる。このような添加剤の例として、グァーガム、アル
ギン酸プロピレングリコールエステル、ローカストビーンガム、アラビアガム、タラガム
、タマリンドガム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、アガロース、タマ
リンドシードガム、プルラン等の多糖類を1種以上添加することができる。また、当該特
定化合物を培養の際に担体表面上に固定化或いは、担体内部に担持して使用することもで
きる。当該特定化合物は、提供時或いは保存時に任意の形状であり得る。当該特定化合物
は、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤のような製剤化された固体、適切な溶媒並びに溶解

剤で溶解した溶液或いは懸濁液のような液体、又は基板や単体に結合させた状態であり得る。製剤化される際の添加物としては、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤；乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニット等の賦形剤；ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤；ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤；脂肪酸エステル等の界面活性剤；グリセリン等の可塑剤等が挙げられる。これらの添加物は上記のものに限定されることはなく、当業者が利用可能であれば自由に選択することができる。また、本発明における特定化合物は、必要に応じて滅菌処理を施してもよい。滅菌方法は特に制限はなく、例えば、放射線滅菌、エチレンオキシドガス滅菌、オートクレーブ滅菌、フィルター滅菌等が挙げられる。フィルター滅菌（以下、ろ過滅菌という場合もある）を行う際のフィルター部分の材質は特に制限されないが、例えば、グラスファイバー、ナイロン、PES（ポリエーテルスルホン）、親水性PVDF（ポリフッ化ビニリデン）、セルロース混合エステル、セルロースアセテート、ポリテトラフルオロエチレン等が挙げられる。フィルターの細孔の大きさは特に制限されないが、好ましくは、 $0.1\mu\text{m}$ 乃至 $10\mu\text{m}$ 、より好ましくは、 $0.1\mu\text{m}$ 乃至 $1\mu\text{m}$ 、最も好ましくは、 $0.1\mu\text{m}$ 乃至 $0.5\mu\text{m}$ である。これらの滅菌処理は、特定化合物が固形でも溶液の状態でもよい。

【0040】

上記調製により特定化合物の溶液又は分散液を液体培地に添加することにより、液体培地中に上記構造体が形成され、本発明に用いる培地組成物を得ることができる。培地には通常、高分子化合物がイオンを介して集合、或いは、高分子化合物が三次元のネットワークを形成するのに十分な濃度の金属イオン（例、カルシウムイオン等の2価金属イオン）が含まれるので、本発明の特定化合物の溶液又は分散液を液体培地に添加するのみで、本発明に用いる培地組成物を得ることができる。或いは、培地添加剤（特定化合物の溶液又は分散液）に培地を添加してもよい。更に、本発明に用いる培地組成物は、特定化合物と培地成分とを、水性溶媒（例えば、イオン交換水や超純水等を含む水）中で混合して調製することもできる。混合の態様としては、（1）液体培地と培地添加剤（溶液）とを混合する、（2）液体培地に上記高分子化合物（粉末等の固体）を混合する、（3）培地添加剤（溶液）に粉末培地を混合する、（4）粉末培地及び上記高分子化合物（粉末等の固体）を水性溶媒と混合する、等が挙げられるが、これらに限定されない。本発明に用いる培地組成物における特定化合物の分布が不均一になるのを防ぐために、（1）若しくは（4）又は（1）若しくは（3）の態様が好ましい。

特定化合物を溶媒（例、水、液体培地等の水性溶媒）へ溶解する、または、特定化合物及び粉末培地を溶媒へ溶解する際、溶解促進のため、当該混合液を加熱するのが好ましい。加熱する温度としては、例えば、 80°C ～ 130°C 、好ましくは加熱滅菌されるような 100°C ～ 125°C （例、 121°C ）が挙げられる。加熱後、得られた特定化合物の溶液を室温まで冷却する。当該溶液に、上述の金属イオン（例、カルシウムイオン等の2価金属イオン）を添加することにより（例えば、当該溶液を液体培地へ添加することにより）、当該特定化合物から構成された上記構造体が形成される。或いは、特定化合物を、上述の金属イオン（例、カルシウムイオン等の2価金属イオン）を含む溶媒（例、水、液体培地等の水性溶媒）へ溶解する際に、加熱（例えば、 80°C ～ 130°C 、好ましくは 100°C ～ 125°C （例、 121°C ））し、得られた溶液を室温まで冷却することによっても、当該特定化合物から構成された上記構造体が形成される。

【0041】

本発明に用いる培地組成物の調製方法を例示するが、本発明はこれによって限定されるものではない。特定化合物をイオン交換水或いは超純水に添加する。そして、当該特定化合物を溶解できる温度（例えば、 60°C 以上、 80°C 以上、 90°C 以上）にて攪拌して透明な状態になるまで溶解させる。溶解後、攪拌しながら放冷し、滅菌（例えば、 121°C にて20分でのオートクレーブ滅菌）を行う。室温に戻した後、静置培養に使用する任意の培地を攪拌（例えば、ホモミキサー等）しながら、当該培地に前記滅菌後の水溶液を添加し、当該培地と均一になるように混合する。本水溶液と培地の混合方法は特に制限はなく、例えば、ピペッティング等の手動での混合、マグネチックスターラーやメカニカルスターラー、

ホモミキサー、ホモジナイザー等の機器を用いた混合が挙げられる。また、混合後に本発明に用いる培地組成物をフィルターにてろ過してもよい。ろ過処理をする際に用いるフィルターの細孔の大きさは、5 μm 乃至100 μm 、好ましくは5 μm 乃至70 μm 、より好ましくは10 μm 乃至70 μm である。

【0042】

或いは、粉末培地及び上記高分子化合物（粉末等の固体）を水性溶媒と混合し、上記温度で加熱することで本発明に用いる培地組成物を調製する。

【0043】

例えば、脱アシル化ジェランガムを調製する場合、0.1%乃至1%（w/v）、好ましくは0.2%乃至0.5%（w/v）、より好ましくは0.3%乃至0.4%（w/v）となるようにイオン交換水或いは超純水に脱アシル化ジェランガムを添加する。また、別の局面では、脱アシル化ジェランガムを調製する場合、0.1%乃至1%（w/v）、好ましくは0.2%乃至0.8%（w/v）、より好ましくは0.3%乃至0.6%（w/v）となるようにイオン交換水或いは超純水に脱アシル化ジェランガムを添加する。

そして、前記脱アシル化ジェランガムを溶解できる温度であればよいが、例えば、60℃以上、好ましくは80℃以上、より好ましくは90℃以上（例、80～130℃）にて攪拌することにより透明な状態になるまで溶解させる。溶解後、攪拌しながら放冷し、例えば、121℃にて20分間オートクレーブ滅菌を行う。室温に戻した後に、例えば、DMEM/F12培地をホモミキサー等で攪拌しながら、当該培地に本水溶液を所望の最終濃度となるように添加し（例えば、終濃度が0.015%の場合は0.3%水溶液：培地の比率は1：19）、均一に混合させる。本水溶液と培地の混合方法は特に制限はなく、例えば、ピペッティング等の手動での混合、マグネチックスターラーやメカニカルスターラー、ホモミキサー、ホモジナイザー等の機器を用いた混合が挙げられる。また、混合後に本発明に用いる培地組成物をフィルターにてろ過してもよい。ろ過処理をする際に用いるフィルターの細孔の大きさは、5 μm 乃至100 μm 、好ましくは5 μm 乃至70 μm 、より好ましくは10 μm 乃至70 μm である。

【0044】

本発明に用いる培地組成物及びその製造方法の好適な態様を以下に記載する。

本発明に用いる培地組成物は、好適には、細胞または組織を浮遊させて培養できる培地組成物であって、前記培地組成物の粘度が、8mPa・s以下（37℃条件下）であり、且つ脱アシル化ジェランガムまたはその塩を含有することを特徴とする、培地組成物である。一態様において、培地組成物中の脱アシル化ジェランガムまたはその塩の濃度が、0.005～0.3%（w/v）（好ましくは、0.01～0.05%（w/v））である。一態様において、当該培地組成物は、更に、脱アシル化ジェランガムまたはその塩以外の多糖類を含有する。一態様において、当該培地組成物には、脱アシル化ジェランガムが細胞または組織を浮遊させて培養できる構造体を形成するのに十分な濃度の2価金属イオン（例、カルシウムイオン）を含有する。該濃度は、例えば、0.1mM及至300mM、好ましくは、0.5mM及至100mMである。

【0045】

当該培地組成物は、脱アシル化ジェランガムまたはその塩と培地とを混合することにより製造することが出来る。一態様において、当該培地は液体培地である。一態様において、当該液体培地には、脱アシル化ジェランガムが細胞または組織を浮遊させて培養できる構造体を形成するのに十分な濃度の2価金属イオン（例、カルシウムイオン）を含有する。該濃度は、例えば、0.1mM及至300mM、好ましくは、0.5mM及至100mMである。一態様において、溶媒中に溶解または分散した脱アシル化ジェランガムまたはその塩と、培地とを混合する。一態様において、溶媒中に溶解または分散した脱アシル化ジェランガムまたはその塩は、滅菌された状態である。一態様において、滅菌はオートクレーブ滅菌により行われる。別の態様において、滅菌はろ過滅菌により行われる。一態様において、ろ過滅菌は0.1～0.5 μm のフィルターを通過させることにより実施する。

【0046】

(2) 血管平滑筋細胞の培養

本発明は、培地組成物I中で、血管平滑筋細胞を浮遊培養することを含む、血管平滑筋

細胞のインビトロ培養方法を提供する。血管平滑筋細胞を培地組成物I中で浮遊培養に付すことにより、良好な生存性を維持したまま細胞周期が停止し、細胞増殖が抑制されて、形質変化のリスクを回避しながら長期間維持することができる。本発明は、このような血管平滑筋細胞の細胞増殖を抑制する方法、血管平滑筋細胞の形質変化の抑制方法、及び細胞増殖停止状態にある血管平滑筋細胞の生存性の維持方法（生存率低下の抑制方法）をも包含する。

【0047】

本発明において用いられる血管平滑筋細胞は、哺乳動物の血管平滑筋細胞である。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類、ウサギ等のウサギ目、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ等の有蹄目、イヌ、ネコ等のネコ目、ヒト、サル、アカゲザル、カニクイザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類等を挙げることが出来る。哺乳動物は、好ましくはげっ歯類（マウス等）、ウサギ目又は霊長類（ヒト等）であり、好ましくはヒトである。

【0048】

本発明に用いられる血管平滑筋細胞は、好ましくは単離されている。「単離」とは、目的とする成分や細胞以外の因子を除去する操作がなされ、天然に存在する状態を脱していることを意味する。「単離された血管平滑筋細胞」の純度（全細胞に占める血管平滑筋細胞の細胞数の百分率）は、通常70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは99%以上、最も好ましくは100%である。一態様において、本発明の培養方法における培養物中に含まれる全細胞に占める血管平滑筋細胞の細胞数の百分率は、通常70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは99%以上、最も好ましくは100%である。

【0049】

血管平滑筋細胞は、例えば、大動脈より中膜のみを剥離しプレート底面に張りつけ1～2週間培養すること、或いは血管中膜をコラゲナーゼやエラスターゼで処理することにより、生体から単離することができる。血管平滑筋細胞の単離方法は、論文（May-Jun et al, 1984; Arteriosclerosis, 4 (3) : 183-188、Orekhov et al, Med Biol. 1984; 62 (4) : 255-259.）に記載されており、当該技術分野において周知である。市販された血管平滑筋細胞を用いてもよい。

【0050】

一態様において、本発明に用いられる血管平滑筋細胞は、初代培養細胞である。初代培養細胞とは、生体から分離して継代操作を行う前の細胞を意味する。本発明の培養方法を用いると、良好な生存性を維持したまま血管平滑筋細胞の細胞周期が停止し、細胞増殖が抑制されて、形質変化のリスクを回避しながら長期間維持することができるので、初代培養の血管平滑筋細胞を、生体内における形質を維持したまま長期間培養することが可能である。

【0051】

血管平滑筋細胞を浮遊培養する際には、細胞の培養に一般的に用いられるシャーレ、フラスコ、プラスチックバック、テフロン（登録商標）バック、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウエルプレート、マルチプレート、マルチウエルプレート、チャンバースライド、細胞培養フラスコ、スピナーフラスコ、チューブ、トレイ、培養バック、ローラーボトル等の培養容器を用いて培養することが可能である。培養に供する血管平滑筋細胞の一部が培養容器へ接着して、増殖し、形質変化を生じるリスクを減じるために、一態様において、本発明の培養方法に用いられる培養容器は、細胞非接着性である。細胞非接着性の培養容器としては、培養容器の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリクス等によるコーティング処理）されていないもの、或いは培養容器の表面が、細胞との接着性を低減させる目的で人工的に処理されているものを使用できる。

【0052】

培養する血管平滑筋細胞の形態や状態は、当業者が任意に選択することができる。その

好ましい具体例としては、特に制限されるものではないが、血管平滑筋細胞が単一細胞の状態、血管平滑筋細胞が担体表面上に接着した状態、血管平滑筋細胞が担体内部に包埋した状態、複数の血管平滑筋細胞が集合し細胞塊（スフェア）を形成した状態等が挙げられる。固相への接着により細胞増殖及び形質変化が生じるリスクを低減するため、血管平滑筋細胞は、好ましくは、単一細胞の状態、血管平滑筋細胞が担体内部に包埋した状態、又は複数の細胞が集合し細胞塊（スフェア）を形成した状態で、培養組成物I中で浮遊培養（好ましくは、浮遊静置培養）される。即ち、好ましくは、血管平滑筋細胞を接着や包埋するための担体を用いない。これらの状態の内、細胞塊（スフェア）を形成した状態は、生体内環境に近い細胞-細胞間相互作用及び細胞構造体が再構築されており、細胞機能を長期的に維持したまま培養でき、また細胞の回収が比較的容易であるため、好ましい。

10

【0053】

細胞凝集塊（スフェア）を形成させる方法は、特に制限は無く、当業者が適宜選択することができる。その例としては、細胞非接着表面を有する培養容器を用いた方法、ハンギングドロップ法、旋回培養法、3次元スキャフォールド法、遠心法、電場や磁場による凝集を用いた方法等が挙げられる。

【0054】

培養組成物Iを用いてスフェアを形成させることもできる。例えば、スフェアは、培養組成物I中に、単一細胞状態にまで解離した、目的とする血管平滑筋細胞を均一に分散させ、3日間乃至10日間静置して浮遊培養することにより調製される。ここで調製されたスフェアは、遠心やろ過処理を行うことにより、回収することができる。

20

【0055】

一態様において、細胞増殖が停止した血管平滑筋細胞が培養に供される。本発明の培養方法を用いると、良好な生存性を維持したまま、細胞増殖が停止した状態で血管平滑筋細胞を長期間維持することが可能である。「細胞増殖が停止した状態」とは、細胞の比増殖速度（div/day）が0.1以下、好ましくは0.001以下、より好ましくは0以下であることをいう。細胞増殖が停止した血管平滑筋細胞は、通常、細胞周期が G_0 又は G_1 期で停止している。一態様において、培養に供される血管平滑筋細胞の70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上、より更に好ましくは99%以上が、細胞周期が G_0 又は G_1 期で停止している。 G_0 又は G_1 期で停止している細胞の割合は、4'，6-ジ

30

アミジノー2-フェニルインドールで細胞を染色し、フローサイトメトリーにより細胞内DNA量を解析することにより決定することができる（Cell, vol.87, pages1069-1078, 1996）。

【0056】

一態様において、増殖中の血管平滑筋細胞が培養に供される。本発明の培養方法により、増殖中の血管平滑筋細胞を培養すると、良好な生存性を維持したまま、その増殖が抑制され、細胞増殖が停止する。本発明は、このような血管平滑筋細胞の細胞増殖の抑制方法をも提供する。「増殖中の状態」とは、細胞の比増殖速度（div/day）が0.1を上回ることをいう。

【0057】

40

血管平滑筋細胞を培養する際には、培養組成物Iに対して別途調製した血管平滑筋細胞を添加し、均一に分散される様に混合すればよい。その際の混合方法は特に制限はなく、例えば、ピペティング等の手動での混合、スターラー、ヴォルテックスミキサー、マイクロプレートミキサー、振とう機等の機器を用いた混合が挙げられる。混合後は、得られた血管平滑筋細胞懸濁液を静置で培養してもよいし、必要に応じて培養液を回転、振とう或いは攪拌してもよい。その回転数と頻度は、当業者の目的に合わせて適宜設定すればよい。また、静置培養の期間において培養組成物の交換が必要となった際には、遠心やろ過処理を行うことにより血管平滑筋細胞と培養組成物を分離した後、新鮮な培養組成物Iを細胞に添加すればよい。或いは、遠心やろ過処理を行うことにより血管平滑筋細胞を適宜濃縮した後、新鮮な上記培養組成物Iをこの濃縮液に添加すればよい。

50

【0058】

一態様において、生体から分離された初代血管平滑筋細胞、又は別途インビトロで培養された血管平滑筋細胞（例えば、接着培養された血管平滑筋細胞）を、単一細胞、又はこれに近い状態にまで分散する。血管平滑筋細胞の分散は、適切な細胞解離液を用いて行われる。細胞解離液としては、例えば、EDTA；トリプシン、コラゲナーゼIV、メタロプロテアーゼ等のタンパク分解酵素等を単独で又は適宜組み合わせ用いることができる。分散された血管平滑筋細胞を、培地組成物I中に懸濁し、これを浮遊培養（好ましくは、浮遊静置培養）する。培養物中、血管平滑筋細胞は、単一細胞の状態、又はスフェアの状態、培地組成物I中に浮遊する。

【0059】

10

培養物中の血管平滑筋細胞の濃度は、細胞増殖が抑制された状態で血管平滑筋細胞を維持することが可能な限り特に限定されないが、通常 $3.0 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^6$ cells/ml、好ましくは $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ cells/ml、より好ましくは $3.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$ cells/mlである。

【0060】

培地組成物I中での血管平滑筋細胞の培養期間は、細胞増殖が抑制された状態で血管平滑筋細胞を維持することが可能な限り特に限定されないが、例えば、12時間以上、24時間以上、48時間以上、70時間以上の培養が可能である。理論的には、培養期間の上限値はないが、細胞増殖が抑制された状態で過度に長期間にわたり血管平滑筋細胞を培養すると生存率の低下を招くおそれがあるため、培養期間は、例えば、30日以下、好ましくは14日以下、より好ましくは211時間以下程度に留めておくことが望ましい。本発明の方法を用い

20

【0061】

一態様において、増殖中の血管平滑筋細胞を、該細胞の細胞増殖が停止するまで、培地組成物I中で浮遊培養（好ましくは、静置浮遊培養）する。増殖中の血管平滑筋細胞が、細胞増殖を停止するまでに要する時間は、通常3時間以上、好ましくは12時間以上、より好ましくは24時間以上である。

【0062】

血管平滑筋細胞を培養する際の温度は、通常25乃至39℃、好ましくは37℃である。CO₂濃度は、通常、培養の雰囲気中、4乃至10体積%であり、好ましくは5体積%である。酸素濃度は、培養の雰囲気中、15～50体積%であり、好ましくは20体積%である。

30

【0063】

このような培養操作により、血管平滑筋細胞を細胞増殖が抑制された状態で、長期間、インビトロで維持することができる。

【0064】

(3) 血管平滑筋細胞の保存又は輸送方法

本発明は、上記培地組成物Iを用いた、血管平滑筋細胞の保存方法および輸送方法を提供する。本発明の保存又は輸送方法は、上記培地組成物I中に、血管平滑筋細胞を浮遊させることを特徴とする。本発明の保存又は輸送方法においては、培地組成物Iを用いることにより、細胞や組織を、非凍結条件下、浮遊状態で（好ましくは、浮遊静置状態で）、保存又は輸送することができる。

40

【0065】

保存又は輸送に用いる培地組成物Iには、上記(1)において記載した組成に加えて、細胞の非凍結状態での保存の際に、細胞延命効果がある各種成分が含まれていてもよい。該成分としては、糖類（但し、多糖類を除く）（例、単糖類、二糖類）、抗酸化剤（例、SOD、ビタミンEまたはグルタチオン）、親水性ポリマー（例、ポリビニルピロリドン）、キレート剤（例、EDTA）、糖アルコール（例、マンニトール、ソルビトール）、グリセロール等を挙げることが出来る。

【0066】

血管平滑筋細胞は、好ましくは単離されている。一態様において初代培養の血管平滑筋

50

細胞が保存・輸送に供される。一態様において、細胞増殖が停止した血管平滑筋細胞が保存・輸送に供される。一態様において、保存・輸送に供される血管平滑筋細胞の70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上が、細胞周期がG₀又はG₁期で停止している。一態様において、増殖中の血管平滑筋細胞が保存・輸送に供される。本発明の方法を用いると、非凍結条件下において、高い生存性を維持したまま、血管平滑筋細胞の細胞増殖を抑制し、細胞増殖が停止した状態を維持することができるので、凍結や細胞増殖により形質変化のリスクを回避しながら、血管平滑筋細胞を長期間にわたり、保存又は輸送することができる。

【0067】

本発明の保存又は輸送方法においては、血管平滑筋細胞を、培地組成物I中に分散した上で、密封可能な容器中に入れる。該容器としては、フラスコ、プラスチックバック、テフロン（登録商標）バック、チューブ、培養バック等を挙げることが出来るが、これらに限定されない。保存又は輸送中に、内容物の漏れや外界からの細菌等のコンタミネーションを回避するため、血管平滑筋細胞の培地組成物I中の分散物を入れた容器は、好適には密封される。

10

【0068】

保存又は輸送中の温度は、血管平滑筋細胞の生存が維持される限り特に限定されないが、通常は、37℃以下である。温度が低い方が、保存又は輸送中の血管平滑筋細胞の生存性の低下を回避することができるが、血管平滑筋細胞が凍結してしまわないよう、通常、培地組成物Iの融点を上回る温度で保存又は輸送する。従って、保存又は輸送中の温度は、通常-5～42℃、好ましくは1～37℃、より好ましくは4～32℃、更に好ましくは18～30℃で維持される。

20

【0069】

浮遊静置状態での、血管平滑筋細胞の保存又は輸送を可能とするため、保存又は輸送中の温度は、培地組成物Iが、血管平滑筋細胞の浮遊静置を可能とする温度であることが好ましい。

【0070】

保存又は輸送の期間は、培地組成物I中で血管平滑筋細胞を生存状態のまま維持できる範囲内で特に限定されないが、通常12時間以上、10日以内、好ましくは1～8日、より好ましくは1～3日である。保存又は輸送期間中、細胞又は組織は培地組成物I中で浮遊静置状態が維持されることが好ましい。

30

【0071】

本発明の保存又は輸送方法を用いると、凍結操作がない条件での血管平滑筋細胞の輸送が可能になり、かつ凍結や増殖で認められる血管平滑筋細胞への形質変化を最小限に抑制することが期待できる。

【0072】

(3) 項における各用語の定義は、特にことわりのない限り、上記(1)及び(2)において記載したものと同一である。

【0073】

ここで述べられた特許および特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

40

【実施例】

【0074】

以下に本発明に用いる培地組成物の分析例、試験例を実施例として具体的に述べることで、本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

【0075】

[試験例1]

血管平滑筋細胞およびNIH3T3細胞の生存維持試験

W02014/017513 A1に記載の製造方法に従い、細胞の浮遊培養に用いる培地組成物を調製

50

した。即ち、脱アシル化ジェランガム（KELCOGEL CG-LA、三晶株式会社製）を0.3%（w/v）となるように超純水（Milli-Q水）に懸濁した後、90℃にて加熱しながらの攪拌により溶解し、得られた脱アシル化ジェランガム水溶液を121℃で20分オートクレーブ滅菌した。本溶液を用いて終濃度0.015%（w/v）の脱アシル化ジェランガムを含有するDMEM/F12（コージンバイオ社製）を作製し、更に10%（v/v）胎児ウシ血清を添加して培地組成物を得た。引き続き、ウサギ血管平滑筋細胞（千葉大学薬学研究院病院薬学研究室にて調製）及びマウス線維芽細胞株NIH3T3（ATCC製）を、 1.0×10^5 cells/mlとなるように上記の培地組成物に調製した後、15mlチューブに5mL播種した。なお、陰性対照として脱アシル化ジェランガムを含まないDMEMにウサギ血管平滑筋細胞或いはNIH3T3細胞を懸濁したものを分注した。引き続き、本チューブをCO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）内に静置することにより、最大211時間細胞を静置状態で浮遊培養した。12時間、24時間、36時間、48時間、70時間、115時間及び211時間培養後の培養物に対して、トリパンブルー試薬（Life Technologies社製）を添加し、顕微鏡下で生細胞数及び総細胞数を計測した。総細胞数と生細胞数から生存率を算出した。

【0076】

その結果、陰性対照での各細胞の生存率は、ウサギ血管平滑筋細胞では12時間、NIH3T3細胞では36時間で50%未満であった。一方、脱アシル化ジェランガムを含有する培地では、両細胞の生存率は115時間まで50%以上の値を示した。ウサギ血管平滑筋細胞の生細胞数及び生存率を表1及び表2に、NIH3T3細胞の生細胞数及び生存率を表3及び表4に示す。

【0077】

【表1】

生細胞数	陰性対照	脱アシル化ジェランガム 0.015%
0時間	500000	500000
12時間	42000	369000
24時間	13000	336000
36時間	4000	361000
48時間	1000	306000
70時間	未実施	304000
115時間	未実施	221000
211時間	未実施	100000

【0078】

10

20

30

【表 2】

生存率 (%)	陰性対照	脱アシル化ジェランガム 0.015%
0時間	100	100
12時間	30.5	79.5
24時間	18.6	76.6
36時間	9.3	72.6
48時間	5.6	70.2
70時間	未実施	66.7
115時間	未実施	52.6
211時間	未実施	25.6

10

【0079】

【表 3】

生細胞数	陰性対照	脱アシル化ジェランガム 0.015%
0時間	500000	500000
12時間	129000	474000
24時間	40000	489000
36時間	19000	488000
48時間	19000	389000
70時間	未実施	377000
115時間	未実施	296000
211時間	未実施	140000

20

30

【0080】

【表 4】

生存率 (%)	陰性対照	脱アシル化ジェランガム 0.015%
0時間	100	100
12時間	91.3	90.0
24時間	74.7	90.9
36時間	32.5	91.9
48時間	30.6	91.7
70時間	未実施	90.1
115時間	未実施	68.1
211時間	未実施	33.6

40

【0081】

[試験例2]

血管平滑筋細胞のcell cycle解析

W02014/017513 A1に記載の製造方法に従い、細胞の浮遊培養に用いる培地組成物を調製

50

した。即ち、脱アシル化ジェランガム（KELCOGEL CG-LA、三晶株式会社製）を0.3%（w/v）となるように超純水（Milli-Q水）に懸濁した後、90℃にて加熱しながらの攪拌により溶解し、得られた脱アシル化ジェランガム水溶液を121℃で20分オートクレーブ滅菌した。本溶液を用いて終濃度0.015%（w/v）の脱アシル化ジェランガムを含有するDMEM/F12（コージンバイオ社製）を調製し、更に10%（v/v）胎児ウシ血清を添加して培地組成物を得た。引き続き、ウサギ血管平滑筋細胞（千葉大学薬学研究院病院薬学研究室にて調製）を、 4×10^5 cells/mlになるように上記の培地組成物に調製した後、15mlチューブに9mL播種した。引き続き、本チューブをCO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）内に静置することにより、最大5日間細胞を静置状態で浮遊培養した。なお、対照として脱アシル化ジェランガムを含まないDMEM（和光純薬社製）にウサギ血管平滑筋細胞を懸濁し、一般的な単層培養用のシャーレ上で培養した。

10

【0082】

各細胞から細胞溶解液（IP buffer）を用いてタンパク質を回収し、BCA法（Thermo Scientific）を用いてタンパク定量を実施した。20 µgのタンパク質を用いてWestern blot分析を行った。一次抗体（Santa Cruz Biotechnology社製）として、ポリクローナル抗p27抗体（C-19）、ポリクローナル抗p21抗体（M-19）、ポリクローナル抗CDK2抗体（M-2）、及びポリクローナル抗β-actin抗体（I-19）を200倍希釈で用いた。また、二次抗体として抗ラビットIgG-HRP抗体（Amersham Bioscience）を10,000倍希釈で用いた。検出はECL Western Blotting Detection Reagents（Amersham Bioscience）またはImmobilon Western（Millipore）を用いて、LAS4000（FUJIFILM）で行った。

20

【0083】

脱アシル化ジェランガム含有培地中での浮遊培養と、脱アシル化ジェランガム不含培地中での単層培養との間で、ウサギ血管平滑筋細胞のcell cycle因子の発現を比較した。脱アシル化ジェランガムを含有する培地でウサギ血管平滑筋細胞を培養すると、cell cycleでのG₁/S期移行を促進するcdk2の発現とG₁/S移行を抑制するp21およびp27の発現が共に低下していた（図1）。この現象は、単層培養でのウサギ血管平滑筋細胞では認められなかった。G₁/S期の促進因子および抑制因子が共に低下している結果から、脱アシル化ジェランガム含有培地中での浮遊培養はウサギ血管平滑筋細胞の細胞周期をG₀期で停止させたものと示唆された。

【0084】

[試験例3]

血管平滑筋細胞のcell cycle解析

WO2014/017513 A1に記載の製造方法に従い、細胞の浮遊培養に用いる培地組成物を調製した。即ち、脱アシル化ジェランガム（KELCOGEL CG-LA、三晶株式会社製）を0.3%（w/v）となるように超純水（Milli-Q水）に懸濁した後、90℃にて加熱しながらの攪拌により溶解し、本水溶液を121℃で20分オートクレーブ滅菌した。本溶液を用いて終濃度0.015%（w/v）のDMEM/F12（コージンバイオ社製）を作製し、更に10%（v/v）胎児ウシ血清を添加して培地組成物を調製した。引き続き、ウサギ血管平滑筋細胞（千葉大学薬学研究院病院薬学研究室にて調製）を、 3×10^5 cells/ml（ウサギ血管平滑筋細胞）になるように上記の培地組成物に調製した後、15mlチューブに5mL播種した。引き続き、本チューブをCO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）内に静置することにより、最大3日間細胞を静置状態で浮遊培養した。なお、対照として脱アシル化ジェランガムを含まないDMEM（和光純薬社製）にウサギ血管平滑筋細胞を懸濁し、一般的な単層培養用のシャーレに培養した細胞を用いた。

30

40

【0085】

各細胞から細胞溶解液（IP buffer）を用いてタンパク質を回収し、BCA法（Thermo Scientific）を用いてタンパク定量を実施した。10～15 µgのタンパク質を用いてWestern blot分析を行った。一次抗体として、Santa Cruz Biotechnology社製のポリクローナル抗cyclin E1抗体（M-20）、ポリクローナル抗CDK2抗体（M-2）、ポリクローナル抗p27抗体（C-19）、ポリクローナル抗p21抗体（M-19）、ポリクローナル抗β-actin抗体（I-19）を2

50

00倍希釈、モノクローナル抗cyclin D1抗体 (HD11) を250倍希釈、BD Biosciences社製のモノクローナル抗cyclin D3抗体を1000倍希釈、モノクローナル抗CDK4抗体を250倍希釈で用いた。また、二次抗体として抗マウスIgG-HRP抗体 (GE Healthcare) を50,000倍希釈、抗ラビットIgG-HRP抗体 (Cell Signaling Technology) を10,000倍希釈で用いた。検出はECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) またはImmobilon Western (Millipore) を用いて、LAS4000 (FUJIFILM) で行った。

【0086】

脱アシル化ジェランガム含有培地と単層培養におけるウサギ血管平滑筋細胞のcell cycle因子について比較した。脱アシル化ジェランガムを含有する培地でウサギ血管平滑筋細胞を培養すると、cell cycleでのG₁/S期移行を促進するcdk2の発現とG₁/S移行を抑制するp21の発現が共に低下しており、再現性を認めた (図2)。この現象は、単層培養でのウサギ血管平滑筋細胞では認めなかった。G₁/S期の促進因子および抑制因子が共に低下している結果から、脱アシル化ジェランガム含有培地はウサギ血管平滑筋細胞をG₀期に移行させたものと示唆された。

【0087】

[試験例4]

NIH3T3細胞のcell cycle解析

WO2014/017513 A1に記載の製造方法に従い、細胞の浮遊培養に用いる培地組成物を調製した。即ち、脱アシル化ジェランガム (KELCOGEL CG-LA、三晶株式会社製) を0.3% (w/v) となるように超純水 (Milli-Q水) に懸濁した後、90℃にて加熱しながらの攪拌により溶解し、本水溶液を121℃で20分オートクレーブ滅菌した。本溶液を用いて終濃度0.015% (w/v) のDMEM/F12 (コージンバイオ社製) を作製し、更に10% (v/v) 胎児ウシ血清を添加して培地組成物を調製した。引き続き、マウス線維芽細胞株NIH3T3 (ATCC社製) を、 3×10^5 cells/mLになるように上記の培地組成物に調製した後、15mlチューブに5mL播種した。引き続き、本チューブをCO₂インキュベーター (37℃、5%CO₂) 内にて最大5日間細胞を静置状態で浮遊培養した。なお、対照として脱アシル化ジェランガムを含まないDMEM (和光純薬社製) にNIH3T3細胞を懸濁し、一般的な単層培養用のシャーレに培養した細胞を用いた。

各細胞から細胞溶解液 (IP buffer) を用いてタンパク質を回収し、BCA法 (Thermo Scientific) を用いてタンパク定量を実施した。10~15 μgのタンパク質を用いてWestern blot分析を行った。一次抗体として、Santa CruzBiotechnology社製のポリクローナル抗cyclin E1抗体 (M-20)、ポリクローナル抗CDK2抗体 (M-2)、ポリクローナル抗p27抗体 (C-19)、ポリクローナル抗p21抗体 (M-19)、ポリクローナル抗β-actin 抗体 (I-19) を200倍希釈、モノクローナル抗cyclin D1抗体 (HD11) を250倍希釈、BD Biosciences社製のモノクローナル抗cyclin D3抗体を1000倍希釈、モノクローナル抗CDK4抗体を250倍希釈で用いた。また、二次抗体として抗マウスIgG-HRP抗体 (GE Healthcare) を50,000倍希釈、抗ラビットIgG-HRP抗体 (Cell Signaling Technology) を10,000倍希釈で用いた。検出はECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) またはImmobilon Western (Millipore) を用いて、LAS4000 (FUJIFILM) で行った。

【0088】

脱アシル化ジェランガム含有培地と単層培養におけるNIH3T3細胞のcell cycle因子について比較した。脱アシル化ジェランガムを含有する培地でNIH3T3細胞を培養すると、cell cycleでのG₁/S期移行を促進するcdk2の発現が低下しており、ウサギ血管平滑筋細胞の結果と同様であった。しかしG₁/S移行を抑制するp21の発現の低下を認めず、ウサギ血管平滑筋細胞の結果と異なっていた (図3)。脱アシル化ジェランガム含有培地でウサギ血管平滑筋細胞とNIH3T3細胞を培養すると、異なるcell cycleパターンを示すことが明らかとなった。

【0089】

[試験例5]

血管平滑筋細胞のリン酸化Erkおよびリン酸化FAKのタンパク解析

W02014/017513 A1に記載の製造方法に従い、細胞の浮遊培養に用いる培地組成物を調製した。即ち、脱アシル化ジェランガム (KELCOGEL CG-LA、三晶株式会社製) を0.3% (w/v) となるように超純水 (Milli-Q水) に懸濁した後、90℃にて加熱しながらの攪拌により溶解し、本水溶液を121℃で20分オートクレーブ滅菌した。本溶液を用いて終濃度0.015% (w/v) のDMEM/F12 (コージンバイオ社製) を作製し、更に10% (v/v) 胎児ウシ血清を添加して培地組成物を調製した。引き続き、ウサギ血管平滑筋細胞 (千葉大学薬学研究院病院薬学研究室にて調製) を、 3×10^5 cells/mLになるように上記の培地組成物に調製した後、15mlチューブに5mL播種した。なお、対照として脱アシル化ジェランガムを含まないDMEM (和光純薬社製) にウサギ血管平滑筋細胞を懸濁し、一般的な単層培養用のシャーレに培養した細胞を用いた。引き続き、本チューブをCO₂インキュベーター (37℃、5%CO₂) 内にて最大3日間細胞を静置状態で浮遊培養した。

10

各細胞から細胞溶解液 (IP buffer) を用いてタンパク質を回収し、BCA法 (Thermo Scientific) を用いてタンパク定量を実施した。10~15 µgのタンパク質を用いてWestern blot分析を行った。一次抗体として、Upstate Biotechnology社製のモノクローナル抗リン酸化FAK (p125) 抗体を100倍希釈、BD Biosciences社製のモノクローナル抗FAK抗体を200倍希釈、Cell Signaling社製のポリクローナル抗リン酸化p44/42 MAPK (Erk1/2) 抗体 (Thr202/Tyr204) を500倍希釈、ZYMED社製のモノクローナル抗MAP kinase (ERK1 + ERK2) 抗体を500倍希釈で用いた。また、二次抗体として抗マウスIgG-HRP抗体 (GE Healthcare) を50,000倍希釈、抗ラビット IgG-HRP抗体 (Cell Signaling Technology) を10,000倍希釈で用いた。検出はECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) または Immobilon Western (Millipore) を用いて、LAS4000 (FUJIFILM) で行った。

20

【0090】

脱アシル化ジェランガム含有培地と単層培養におけるウサギ血管平滑筋細胞のシグナル伝達因子 (ErkおよびFAK) について比較した。単層培養では、培養開始1時間後においてリン酸化Erkの発現量は検出不能なレベルであった。脱アシル化ジェランガムを含有する培地でウサギ血管平滑筋細胞を培養すると、リン酸化Erk量は単層培養と変わらない発現量を示した。一方、リン酸化FAK量に関しては、単層培養と比較して発現量は低い傾向を示した (図4)。

【0091】

[試験例6]

30

NIH3T3細胞のリン酸化Erkおよびリン酸化FAKのタンパク解析

W02014/017513 A1に記載の製造方法に従い、細胞の浮遊培養に用いる培地組成物を調製した。即ち、脱アシル化ジェランガム (KELCOGEL CG-LA、三晶株式会社製) を0.3% (w/v) となるように超純水 (Milli-Q水) に懸濁した後、90℃にて加熱しながらの攪拌により溶解し、本水溶液を121℃で20分オートクレーブ滅菌した。本水溶液を用いて終濃度0.015% (w/v) のDMEM/ F12 (コージンバイオ社製) を作製し、更に10% (v/v) 胎児ウシ血清を添加して培地組成物を調製した。引き続き、マウス線維芽細胞株NIH3T3 (ATCC社製) を、 3×10^5 cells/mLになるように上記の培地組成物に調製した後、15mlチューブに5mL播種した。なお、対照として脱アシル化ジェランガムを含まないDMEM (和光純薬社製) にNIH3T3細胞を懸濁し、一般的な単層培養用のシャーレに培養した細胞を用いた。引き続き、本チューブをCO₂インキュベーター (37℃、5%CO₂) 内にて最大5日間細胞を静置状態で浮遊培養した。

40

各細胞から細胞溶解液 (IP buffer) を用いてタンパク質を回収し、BCA法 (Thermo Scientific) を用いてタンパク定量を実施した。10~15 µgのタンパク質を用いてWestern blot分析を行った。一次抗体として、Upstate Biotechnology社製のモノクローナル抗リン酸化FAK (p125) 抗体を100倍希釈、BD Biosciences社製のモノクローナル抗FAK抗体を200倍希釈、Cell Signaling社製のポリクローナル抗リン酸化p44/42 MAPK (Erk1/2) 抗体 (Thr202/Tyr204) を500倍希釈、ZYMED社製のモノクローナル抗MAP kinase (ERK1 + ERK2) 抗体を500倍希釈で用いた。また、二次抗体として抗マウスIgG-HRP抗体 (GE Healthcare) を50,000倍希釈、抗ラビット IgG-HRP 抗体 (Cell Signaling Technology) を10,000倍希

50

釈で用いた。検出はECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) または Immobilon Western (Millipore) を用いて、LAS4000 (FUJIFILM) で行った。

【0092】

脱アシル化ジェランガム含有培地と単層培養におけるNIH3T3細胞のシグナル伝達因子 (ErkおよびFAK) について比較した。単層培養ではリン酸化Erkの発現量は検出不能なレベルであった。脱アシル化ジェランガムを含有する培地で培養すると、リン酸化Erkの発現は単層培養と比較して高い発現量を示した。一方、リン酸化FAK量に関しては、単層培養と比較して発現量は低い傾向を示した (図5)。ウサギ血管平滑筋細胞とNIH3T3細胞のErk及びFAKのリン酸化パターンが異なることから、両細胞間ではシグナル伝達が違うことが示唆された。

10

【0093】

[試験例7]

脱アシル化ジェランガム (KELCOGEL CG-LA、三晶株式会社製) を0.3% (w/v) となるように超純水 (Milli-Q水) に懸濁した後、90℃にて加熱しながらの攪拌により溶解し、本水溶液を121℃で20分オートクレーブ滅菌した。本水溶液を用いて終濃度0.015% (w/v) のDMEM/ F12 (コージンバイオ社製) を作製し、更に10% (v/v) 胎児ウシ血清を添加して培地組成物を調製した。引き続き、ウサギ血管平滑筋細胞 (千葉大学薬学研究院病院薬学研究室にて調製) を、 1×10^5 cells/mLとなるように上記の培地組成物に調製した後、15ml チューブに播種した。引き続き、本チューブをCO₂ インキュベーター (37℃、5%CO₂) 内にて2日間静置状態で培養した。その後、トリプシン処理をした細胞をDMEM (和光純薬工業製) を用いて 9×10^4 cells/3cm シャーレに播種し、培養を続けた。3日間、5日間及び7日間培養後に培地を交換した。1日間、3日間、5日間、7日間及び10日間培養後の細胞を回収し、トリパンプル試薬 (Life Technologies社製) を添加し懸濁させ、顕微鏡下で生細胞数、総細胞数を計測した。総細胞数と生細胞数から生存率を算出した。

20

【0094】

血管平滑筋細胞を、浮遊状態を維持したまま、脱アシル化ジェランガム含有培地中で浮遊培養すると、良好な生存性を維持したまま細胞増殖が抑制された。血管平滑筋細胞を浮遊培養からプレート上での接着培養に継代した後も、一定期間この形質が維持されたが、その後、血管平滑筋細胞は増殖した (図6)。

【産業上の利用可能性】

30

【0095】

本発明により、血管平滑筋細胞を細胞増殖が抑制された状態で、長期間、インビトロで維持することが可能となる。本発明により、凍結操作がない条件での血管平滑筋細胞の輸送が可能になり、かつ凍結や接着で認められる細胞の形質変化を最小限にすることが期待できる。本発明は、血管平滑筋細胞を用いた再生医療の発展に寄与する。

【0096】

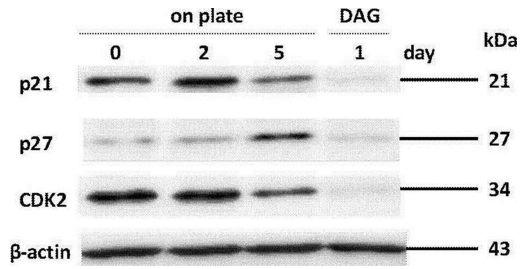
ここで述べられた特許、特許出願明細書、科学文献を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

【0097】

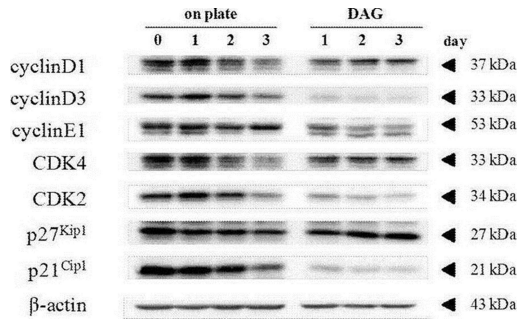
40

本出願は、日本で出願された特願2015-017839 (出願日: 2015年1月30日)、特願2015-065007 (出願日: 2015年3月26日) 及び特願2015-183940 (出願日: 2015年9月17日) を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

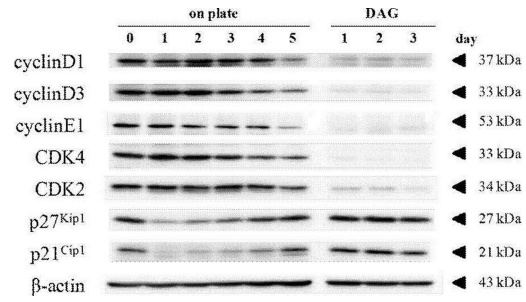
【図 1】



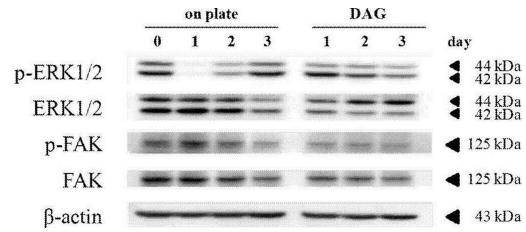
【図 2】



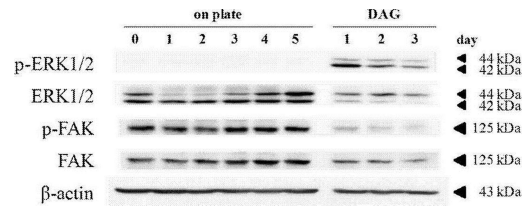
【図 3】



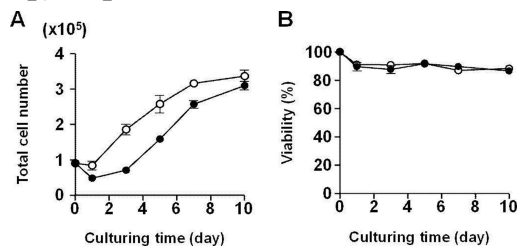
【図 4】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 特願2015-183940(P2015-183940)

(32)優先日 平成27年9月17日(2015.9.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 石井 伊都子

千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院薬学研究院内

(72)発明者 金木 達朗

埼玉県白岡市白岡1470 日産化学工業株式会社生物科学研究所内

(72)発明者 北原 真樹

埼玉県白岡市白岡1470 日産化学工業株式会社生物科学研究所内

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 国際公開第2014/017513 (WO, A1)

WACHI, H. ET AL., Cell cycle-dependent regulation of elastin gene in cultured chick vascular smooth-muscle cells., Biochem. J., 1995年 7月, Vol.309 No.2, p.575-579, ISSN 0264-6021, 要旨、第575頁右欄第9-14行、第578頁左欄第1-9行、Figure 5

AKITA, M. ET AL., Phenotypic modulation and elastin formation of cultured aortic smooth muscle cells grown on and with, Acta Anat. Nippon., 1993年12月, Vol.68 No.6, p.598-606, ISSN 0022-7722, Abstract、第600頁左欄第1-4行、第602頁右欄第5行-第603頁左欄第7行、第603頁右欄第3-21行、Fig. 8

鈴木隆 ほか, 細胞生理に関する研究—ラット胸部大動脈平滑筋細胞の浮遊培養—, 河医研研究年報, 1987年12月, Vol.37, p.101-104, ISSN 0386-748X, 要旨

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/077

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

WPIDS/WPIX (STN)