

(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



(10) 国際公開番号

WO 2011/155565 A1

(43) 国際公開日

2011年12月15日(15.12.2011)

PCT

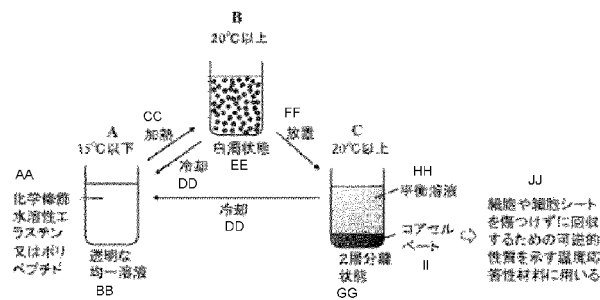
- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) A61K 35/12 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/063265
- (22) 国際出願日: 2011年6月9日(09.06.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-132976 2010年6月10日(10.06.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人九州工業大学(KYUSHU INSTITUTE OF TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒8048550 福岡県北九州市戸畑区仙水町1番1号 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岡元 孝二 (OKAMOTO Kouji) [JP/JP]; 〒8208502 福岡県飯塚市川津680-4 九州工業大学大学院情報工学研究科生命情報工学研究系内 Fukuoka (JP). 吉野 絵理香 (YOSHINO Erika) [JP/JP]; 〒8080196 福岡県北九州市若松区ひびきの2-4 九州
- (74) 代理人: 野口 恭弘 (NOGUCHI Yasuhiro); 〒1050001 東京都港区虎ノ門1丁目16番4号 アーバン虎ノ門ビル 野口特許事務所 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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,

[続葉有]

(54) Title: TEMPERATURE RESPONSIVE SHEET THAT DISPLAYS REVERSIBLE PROPERTIES AND CELL SHEET PRODUCTION METHOD USING SAME

(54) 発明の名称: 可逆的な性質を示す温度応答性シートとそれを用いた細胞シートの製造方法

[図2]



- A 15 °C or less
- B 20 °C or more
- C 20 °C or more
- AA Chemically modified water-soluble elastin or polypeptide
- BB Clear, homogenous aqueous solution
- CC Heat
- DD Cold
- EE Opaque state
- FF Leave standing
- GG Separated into two layers
- HH Equilibrium solution
- II Cocervate
- JJ Use temperature responsive material that displays reversible characteristics for recovering cells and cell sheet without damage

(57) Abstract: Provided is a method that produces a temperature responsive sheet that is derived from an organism, has extremely low toxicity and exhibits reversible properties. Said properties are used to recover sheets of cultured cells intact. Provided is a temperature responsive sheet formed from a chemically modified water-soluble elastin obtained by the N-acylation of at least some of the first amines and the second amines in the molecule of a high molecular weight water-soluble elastin, and the coupling of some or all of the carboxyl groups in said molecule with the alkyl ether of an amino acid. Also provided is a production method for a cell sheet that is characterised by: the manufacture of a film that forms a scaffold for animal cells on the temperature responsive sheet; the culturing of specific cells on the film and manufacture of a cell sheet; and the separation of the cell sheet and the temperature responsive sheet, which is formed from the chemically modified water-soluble elastin, at a temperature at or below the cell culturing temperature.

(57) 要約: 本発明の課題は、生体由来で毒性が極めて低く、可逆的な性質を示す温度応答性のシートを作製し、その性質を利用して、シート状の培養細胞を、そのままの形態で回収する方法を提供することである。この課題は、高分子量水溶性エラスチンの分子中に含まれる第

1アミン及び第2アミンの少なくとも一部をN-アシル化すると共に、該分子中に含まれるカルボキシル基の一部又は全部をアミノ酸のアルキルエステルとカップリングさせて得られる化学修飾水溶性エラスチンからなる温度応答性シート、及び、この温度応答性シート上に動物細胞の足場となる膜を作製し、その膜上で特定の細胞を培養して細胞シートを作製し、次いで、該細胞の培養温度以下の条件で、前記化学修飾水溶性エラスチンからなる温度応答性シートと前記細胞シートとを分離することを特徴とする細胞シートの製造方法により解決された。

WO 2011/155565 A1

NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI 添付公開書類:
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, — 國際調查報告 (條約第 21 條(3))
NE, SN, TD, TG).

明 細 書

発明の名称：

可逆的な性質を示す温度応答性シートとそれを用いた細胞シートの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、可逆的な性質を示す温度応答性シート及びそれを用いた培養細胞を含む細胞シートの製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、細胞シート工学の技術を用いた再生医療が注目されており、各種の細胞シートを移植する試みが多くみられる。移植に際して、細胞シートは、単層のシートの移植、同一の細胞シートの積層化による均一な組織の移植、数種の異なる細胞シートの積層化による層状構造を呈する組織の移植などの方法で利用される。現在では、20～30種類の細胞シートが作られ、角膜、網膜や皮膚、膀胱上皮、歯根膜などの上皮細胞系を用いた臨床応用が進められている。

[0003] しかし、細胞シートを製造する上では問題点がある。それは培養した細胞あるいは細胞シートを培養皿から剥がす際、培養皿上の接着タンパク質に細胞が強く接着しているため、タンパク分解酵素を使用せざるを得ず、細胞及び細胞外マトリックスを傷つけてしまう結果となっていた。そこで最近、タンパク分解酵素を使用しない方法、即ち、温度により表面の性質が変化するポリアクリルアミド類のN-イソプロピルアクリルアミドポリマー（PIPAAM）を培養皿表面にコーティングし、細胞シートを回収する方法が開発されている。PIPAAMは、32℃を境に水との親和性が大きく変化する素材である。このPIPAAMを、培養皿表面にナノオーダーの均一な厚さで固定すると、細胞の培養に適した37℃では表面が疎水性になり、細胞が接着・増殖する。一方、培養後32℃以下まで温度を下げると、表面は親水性になって、シート状の細胞を無傷のまま剥がすことができる（例えば、特

許文献 1 及び 2 参照)。

- [0004] しかし、PIPAAm の様なアクリルアミドポリマー類そのものには、アクリルアミドモノマーのような毒性は認められないものの、アクリルアミドポリマー類の製造過程において、毒性を有する未重合のアクリルアミドモノマーが、ポリマー内に残留する恐れがあり、その問題が指摘されてきた。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：国際公開第2002/10349号パンフレット
特許文献2：国際公開第2005/103233号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明の課題は、生体由来で毒性が極めて低く、可逆的な性質を示す温度応答性のシートを作製し、その性質を利用して、シート状の培養細胞を、そのままの形態で回収する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者らは、PIPAAm の代わりに、毒性が極めて低い生体由来の材料である水溶性エラスチンに着目し、水溶性エラスチンの有するコアセルベーション形成能を利用し、水溶性エラスチンの荷電を低減して高い分子集合能を持つ化学修飾水溶性エラスチンを含む可逆的な温度応答性のシートを作製し、これを細胞シートの製造に利用することを試みた。また毒性が極めて低く、且つコアセルベーションを示し、高い分子集合能を有するエラスチン中のペプチド配列を有するポリペプチドを可逆的な温度応答性シートに用いるために、その製造を試みた。

本発明者らは、上記課題は、具体的には、下記のような本発明の各態様によって達成されることを見いだした。

- [0008] 本発明の一態様は、水溶性エラスチンの分子中に含まれる第1アミン及び第2アミンの少なくとも一部をN-アシル化すると共に、該分子中に含まれ

るカルボキシル基の少なくとも一部をアミノ酸のアルキルエステルとカップリングさせて得られる化学修飾した水溶性エラスチンを含む温度応答性シートである。

[0009] 本発明の温度応答性シートについて以下に好ましい実施態様を列記する。

温度応答性シートは、第1アミン及び第2アミンの少なくとも一部をN-アセチル化すると共に、カルボキシル基の少なくとも一部をグリシンのメチルエステルとカップリングさせることが好ましい。

上記のN-アセチル化は、式(1)により規定される修飾率が80モル%以上であることが好ましい。

$$\text{修飾率 (モル\%)} = (1 - B/A) \times 100 \quad (1)$$

ここで、Aは、水溶性エラスチンの吸光度(波長345nm)の平均値からブランクの吸光度の平均値を引いた値を表し、Bは、N-アセチル化水溶性エラスチンの吸光度(波長345nm)の平均値からブランクの吸光度の平均値を引いた値を表す。

カルボキシル基の保護は、カルボキシル基の90モル%以上がグリシンのメチルエステルにより保護されることが好ましい。

本発明の温度応答性シートは、化学修飾した水溶性エラスチンが、pH7.4、温度37℃でコアセルベートを形成し、温度を20℃以下、好ましくは1~20℃、より好ましくは1~15℃に低下させると、該コアセルベートが溶解する性質を持つ。

また、水溶性エラスチンが低分子量フラクションを透析により除去した高分子量水溶性エラスチンであることが好ましい。

本発明の温度応答性シートは、細胞シート作製用に好ましく使用される。

上記の好ましい実施態様の組み合わせはさらに好ましい。

[0010] 本発明の他の態様は、前記の化学修飾した水溶性エラスチンを含む、温度応答性シート上で特定の細胞を培養して細胞シートを作製する工程、次いで、該細胞の培養温度以下の条件で、前記温度応答性シートと前記細胞シートとを分離する工程を含む、細胞シートの製造方法である。

上記の製造方法は、温度応答性シートを形成する工程に引き続いて、前記温度応答性シート上に、細胞の足場となるゲル膜を形成する工程、を含むことが好ましい。足場となる膜は、いわゆる細胞外マトリックスよりなる群から選ばれたゲル膜であることが好ましい。足場となる膜は、具体的には、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ポリリシン、及び、ゼラチン群から選ばれたゲル膜であることが好ましく、コラーゲン、ポリリシン、及び、ゼラチンよりなる群から選ばれたゲル膜がより好ましく、コラーゲンのゲル膜であることが特に好ましい。

上記の「細胞の足場となるゲル膜」は、コラーゲン等の細胞外マトリックスの主成分に、細胞接着・細胞増殖を促進する、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、テネイシン、トロンボスポンジン、エンタクチン、オステオポンチン、フォンビルブランド因子、フィブリノーゲン、コンドロイチン-6 硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヒアルロン酸等の異種の細胞外マトリックスを任意成分として少量含有していてもよい。

[0011] 本発明の更なる他の態様は、前記の化学修飾水溶性エラスチンと同様にコアセルベーションを示すエラスチン中のペプチド配列を有するポリペプチドを化学合成すること、及びこのポリペプチドを主成分として含むシートを可逆的な温度応答性シートに用いることである。主成分として含むとは、90重量%以上を意味し、ポリペプチドのみからなるシートであることが好ましい。このポリペプチドについては後に詳述する。

発明の効果

[0012] 本発明によると、化学修飾した水溶性エラスチンの可逆的な温度応答性を利用して、細胞シートを傷つけることなくそのままの形態で作製することができる。従来のPIPAAMを用いた温度応答性培養皿では、毒性のあるアクリルアミドモノマーが残留するという危険性があったが、本発明においては、生体由来の安全な蛋白質やポリペプチドを用いて、同様に温度を下げるだけで、培養細胞をシート状に回収することができる。

図面の簡単な説明

- [0013] [図1]化学修飾水溶性エラスチン及びポリペプチドのコアセルベーションを示す図。
- [図2]化学修飾水溶性エラスチン及びポリペプチドのコアセルベーションを模式的に示した図。
- [図3]コラーゲンのゲル化を示す図。
- [図4]コラーゲンのゲル化を模式的に示した図。
- [図5]化学修飾水溶性エラスチンN-Ac-Ela-0-Gly-0Meの各pH条件下（溶媒：PBS）における濁度曲線を示す図。
- [図6]化学修飾水溶性エラスチンN-Ac-Ela-0-Gly-0Meの可逆的な濁度曲線を示す図。
- [図7]化学修飾水溶性エラスチンN-Ac-Ela-0-Gly-0Meコアセルベートの硬さを示す図。
- [図8]I型コラーゲンの不可逆的な濁度曲線を示す図。
- [図9]I型コラーゲンゲル上での細胞増殖を示す図。
- [図10]化学修飾水溶性エラスチンN-Ac-Ela-0-Gly-0Meのコアセルベート上にコラーゲンゲルを作製し、そのゲル上に線維芽細胞を播種した状態を模式的に示した図。
- [図11]化学修飾水溶性エラスチンN-Ac-Ela-0-Gly-0Meのコアセルベート上にコラーゲンゲルを作製し、そのゲル上に線維芽細胞を播種した直後（0時間）の線維芽細胞の球状の状態の光学顕微鏡写真。
- [図12]化学修飾水溶性エラスチンN-Ac-Ela-0-Gly-0Meのコアセルベート上にコラーゲンゲルを作製し、そのゲル上に線維芽細胞を播種し、24時間培養後の線維芽細胞の紡錘状の状態の光学顕微鏡写真。
- [図13]化学修飾水溶性エラスチンN-Ac-Ela-0-Gly-0Meのコアセルベートが溶解し、コラーゲンゲル及び線維芽細胞からなる細胞シートが剥離している状態を模式的に示した図。
- [図14]poly(VPGVG)の4種類の製造（ポリマー化）方法を示す図。

[図15]エラスチン由来のポリペプチドpoly(VPGVG)の可逆的な濁度曲線を示す図。

[図16]エラスチン由来のポリペプチドpoly(VPGVG)のコアセルベート上にコーゲンゲルを作製し、そのゲル上に線維芽細胞を播種し、24時間培養後の線維芽細胞の紡錘状の状態の光学顕微鏡写真。

発明を実施するための形態

[0014] 以下に本発明の態様を順に説明する。

図1及び図2を参照しながら、水溶性エラスチン、その誘導体である本発明の化学修飾した水溶性エラスチン（本発明において「化学修飾水溶性エラスチン」ともいう。）、又はエラスチン中のペプチド配列を有するポリペプチドのコアセルベーションについて説明する。

図1は、化学修飾水溶性エラスチン及び上記ポリペプチドのコアセルベーションを示す図である。図1中、Aに示すように、化学修飾水溶性エラスチン又はポリペプチドは15℃以下では透明な均一溶液である。同じく、Bに示すように、20℃以上に加熱すると、相転移を起こして平衡溶液とコアセルベート液滴からなる白濁状態になる。この白濁状態は冷却すると元の透明な均一溶液に戻る。Cに示すように、20℃以上でそのまま放置すると、コアセルベート液滴は互いに融合して大きな液滴になり、淡黄色の高粘性のコアセルベートとして沈層して、平衡溶液とコアセルベートの2層に分離する。この2層分離状態を冷却すると、コアセルベートは溶解して元の透明な均一溶液に戻る。

[0015] 図2は、化学修飾水溶性エラスチン又はポリペプチドのコアセルベーションを模式的に示した図である。図2中、Cの下層のコアセルベートは冷却すると溶解し、元の透明な均一溶液に戻るため、このコアセルベートは細胞や細胞シートを傷つけずに回収するための温度応答性材料に用いられる。

[0016] 例えば、化学修飾水溶性エラスチン又はポリペプチドの水溶液は、低温では透明な均一溶液であるが、加熱すると白濁し、そのまま放置すると、透明な平衡溶液（上層）と淡黄色の高粘性のコアセルベート（下層）の2層に分

離する。この過程は可逆的で、冷却すると再び元の均一溶液に戻る。本発明は、かかる可逆的な性質を利用して、細胞及び細胞外マトリックスを傷つけないで、細胞シートを製造し回収するものである。

[0017] 本発明における化学修飾水溶性エラスチンは、水溶性エラスチンの分子中に含まれる第1アミン及び第2アミンの少なくとも一部をN-アシル化すると共に、該分子中に含まれるカルボキシル基の少なくとも一部をアミノ酸のアルキルエステルとカップリングすることにより得られるものである。N-アシル化にはN-ホルミル化、N-アセチル化、N-ベンゾイル化などがあるが、N-アセチル化が好ましい。また、N-アシル化にはウレタン型やアルキル型を用いてもよい。カップリングに用いられるアミノ酸は、タンパク質を構成するグリシン、バリン、フェニルアラニンなどの約20種類の中から選ばれる。

本発明において高分子量の水溶性エラスチンを使用することが好ましい、「高分子量」とは、水溶性エラスチンから比較的low分子（約5,000以下）の成分を除去したものを言う。区画分子量が、6,000~8,000の透析膜を用いた透析により、低分子量成分を除去することが好ましい。高分子量の水溶性エラスチンの主たる分子量は約1万以上であることが好ましく、約3~30万であることがより好ましい。

[0018] 本発明において、「水溶性エラスチン」とは、水不溶性エラスチンを部分加水分解して得られるものであり、具体的には、動物の大動脈や項靭帯、魚の動脈球など動物性生体組織を、酸性可溶化液又はアルカリ性可溶化液により処理して得られる。水溶性エラスチンには、熱シュウ酸処理して得られる α -エラスチン若しくは β -エラスチン、エラスチンをアルカリエタノール処理して得られる κ -エラスチンが代表的である。この他に、エラスターゼ等により酵素処理したエラスチン消化物及びエラスチン生合成経路における前駆体であるトロポエラスチンなどが含まれる。水溶性エラスチンの水への溶解度は、5℃において約0.001mg/ml以上約600mg/ml以下であることを意味し、1mg/ml以上600mg/ml以下であること

が好ましい。

水不溶性エラスチンの部分加水分解に先立って、エラスチンを含む生体組織の細断処理、熱水、熱稀アルカリ水溶液処理、アセトン抽出等による脱脂処理、塩化ナトリウム可溶の不要タンパク質の抽出除去等を行うことが好ましい。

[0019] 前記の化学修飾水溶性エラスチンの製造に際しては、水溶性エラスチンのN末端及びリジン (lysine)、アルギニン等のアミノ酸残基側鎖のアミノ基等をN-アシル化し、引き続き、C末端及びアスパラギン酸、グルタミン酸等のアミノ酸残基側鎖のカルボキシル基等とアミノ酸アルキルエステルのアミノ基をカップリングさせて化学修飾水溶性エラスチンが得られる。化学修飾によってアミノ基等とカルボキシル基等が修飾されることにより、エラスチンの荷電が低減又は消失し、その結果、エラスチン分子間の疎水的相互作用が増し、得られた化学修飾水溶性エラスチンは、未修飾エラスチンに比べて高い自己集合性を有するようになるものと考えられる。

[0020] 以下、水溶性エラスチンの製造方法、水溶性エラスチンの化学修飾方法、及び本発明の化学修飾水溶性エラスチンを含む温度応答性シートを作製する方法、そして、得られた温度応答性シートを用いて、該シート上で特定の細胞を培養して細胞シートを作製し、次いで、該細胞の培養温度以下の条件で、前記温度応答性シートと前記細胞シートとを分離し、該細胞シートを無傷で回収する方法について詳細に説明する。

[0021] 水溶性エラスチンの製造方法は色々と提案されている。好ましいのは、本発明者が提案した下記の方法である（特開2007-45722号公報参照）。

[0022] 第1の方法は、動物性生体組織からコラーゲンやその他の不要タンパク質の除去処理を行って不溶性エラスチンを得、次いでこの不溶性エラスチンをシュウ酸等を含む酸性可溶化液、又は水酸化ナトリウム等を含むアルカリ性可溶化液に浸漬・溶解させ、水溶性エラスチンを製造する。コラーゲンやその他の不要タンパク質の除去処理は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、

水酸化カルシウム、水酸化バリウムの少なくともいずれか一つを含むアルカリ性溶液であって、このアルカリ性溶液中に添加した水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化バリウムの総量を、1 Lあたり0.03~0.5 mol、好ましくは0.05~0.3 molとしたアルカリ性溶液中に、動物性生体組織を、90~105℃において、5~60分間浸漬して行うのが好ましい。また、コラーゲンやその他の不要タンパク質の除去処理に際しては、アルカリ性溶液による処理の前に、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、又は、塩化バリウムのいずれか一つを含む塩溶液に、動物性生体組織を浸漬させる浸漬処理（前処理）を行うのも好ましい。

[0023] 動物性生体組織としては、特に制限はないが、エラスチンの含量が多い点で、豚、馬、牛、羊などの哺乳動物から得られた項靭帯や大動脈血管を使用することが好ましい。またエラスチン含量の多い魚類の動脈球などを使用しても良い。動物性生体組織は、先ず、ホモジナイザーを用いてホモジナイズするのが良い。ホモジナイズはミキサー、ミートチョッパーなど動物性生体組織を細断できれば良く、好ましくは3ミリメートル角以下、さらに好ましくはペースト状に細断できる器具を用いると良い。細断した動物性生体組織の粒が小さいほど、コラーゲンやその他の不要なタンパク質の除去効率を上げることができるので好ましい。ホモジナイズした動物性生体組織は、例えば、熱水又は熱希薄アルカリ水溶液で煮沸するか、もしくは有機溶媒で処理することによって脱脂処理を行っても良い。

[0024] 前記可溶化液としては、シュウ酸、蟻酸、酢酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、ベタイン、ジフルオロ酢酸、トリフルオロ酢酸、リン酸、スルファミン酸、過塩素酸、トリクロロ酢酸の少なくともいずれか一つを含む酸性溶液が用いられる。そして、この酸性溶液の酸の総量は、1 Lあたり0.05~5 mol、好ましくは0.1~2 molとし、かつ、液温を90~105℃とするのが好ましい。

[0025] 前記可溶化液は、また、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カル

シウム、水酸化バリウムの少なくともいずれか一つを含むアルカリ性溶液であっても良い。このアルカリ性溶液中に添加した水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化バリウムの総量を、1 Lあたり0.05~5 mol、好ましくは0.05~2 molとし、かつ、液温が90~105℃のアルカリ性溶液とするのが好ましい。

[0026] 第2の方法は、動物性生体組織の不要部分の除去処理、動物性生体組織の脱脂処理、動物性生体組織の細断処理の少なくともいずれか一つを含む前処理工程と、前処理された動物性生体組織をアルカリ性溶液に浸漬してコラーゲンやその他の不要タンパク質を濾別するアルカリ抽出工程と、アルカリ抽出工程後の残渣をアルカリで溶解するアルカリ溶解工程を所定回数繰り返す、濾別により水溶性エラスチンを含む濾液を得る濾液回収工程と、濾液から水溶性エラスチンを生成する水溶性エラスチン生成工程とを順次行って水溶性エラスチンを製造する方法である。前記アルカリ溶解工程で用いるアルカリとしては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化バリウムのいずれか一つ又は混合物が好ましい。

[0027] この操作は、前記の、組織からコラーゲンやその他の不要タンパク質を除去して不溶性エラスチンを得て、次いで、この不溶性エラスチンを可溶化して水溶性エラスチンを得る第1の方法とは異なり、組織から不溶性エラスチンを得ることなく、直接水溶性エラスチンを得る方法である。即ち、1 Lあたり0.03~0.5 mol、好ましくは0.05~0.3 molで90~105℃としたアルカリ性溶液中に、脱脂、細断、塩処理した動物性生体組織を5~60分間浸漬し、エラスチン以外のコラーゲンや不要タンパク質を除去した処理組織を得て、次いで、この処理組織を1 Lあたり0.05~5 mol、好ましくは0.05~2 mol（アルカリ液の濃度がより高濃度）で90~105℃のアルカリ性溶液中に5~420分間、好ましくは10~240分間（時間がより長い）浸漬して溶解し、水溶性エラスチンを得る方法である。

[0028] 前記のごとく第1又は第2の方法で得られた水溶性エラスチンは、次いで

、それを、例えば、透析処理することによって低分子量のフラクションを除去して、本発明で好ましく用いられる高分子量水溶性エラスチンが得られる。低分子量のフラクションを除去することにより、より高いコアセルベーション能を有する水溶性エラスチンである利点を得られる。

[0029] 本発明の化学修飾水溶性エラスチンの製造においては、先ず、水溶性エラスチンの分子中に含まれる第1アミン及び第2アミンの少なくとも一部をN-アシル化、好ましくは、N-アセチル化してN-アシル化水溶性エラスチンを得る。エラスチンを構成するアミノ酸残基の中で、反応性の第1アミン又は第2アミンを有するアミノ酸（塩基性アミノ酸）としては、リジン、アルギニン及びヒスチジンが挙げられるが、水溶性エラスチンの分子中に含まれる第1アミンとしては、末端アミノ基も含まれる。

[0030] 本発明においては、高分子量水溶性エラスチンの分子中に含まれる第1アミン及び第2アミンの少なくとも一部がN-アセチル化される。好ましくは、無水酢酸等のアセチル化試薬によってN-アセチル化されるが、N-アセチル化の程度は、下記の式（1）で表される修飾率で、80モル%以上であることが好ましく、90モル%であることがより好ましく、95モル%以上であるものが特に好ましい。

$$\text{修飾率 (モル\%)} = (1 - B/A) \times 100 \quad (1)$$

式中、Aは、水溶性エラスチンの吸光度（波長345nm）の平均値からブランクの吸光度の平均値を引いた値を表す。Bは、N-アセチル化水溶性エラスチンの吸光度（波長345nm）の平均値からブランクの吸光度の平均値を引いた値を表す。

N-アセチル化以外のN-アシル化も同様の条件で光学的に定量することができる。

水溶性エラスチン中に含まれる第1アミン及び第2アミンが、90モル%以上N-アセチル化されるためには、水溶性エラスチン1g当たり無水酢酸を0.5～5mmol使用することが好ましい。

[0031] 本発明においては、得られたN-アシル化、好ましくは、N-アセチル化

水溶性エラスチン分子中に含まれるカルボキシル基の少なくとも一部をアミノ酸のアルキルエステルとカップリングさせて得られる化学修飾水溶性エラスチンが得られる。本発明においては炭素数1～4の低級アルキルエステルが好ましいが、特にメチルエステルが好ましい。またベンジルエステルなどのようなものを用いてもよい。エラスチンを構成するアミノ酸残基の中で、カルボキシル基を有するアミノ酸（酸性アミノ酸）としては、アスパラギン酸とグルタミン酸があるが、水溶性エラスチンの分子中に含まれるカルボキシル基としては、末端カルボキシル基も含まれる。

[0032] 本発明においては、N-アシル化、好ましくは、N-アセチル化水溶性エラスチン分子中に含まれるカルボキシル基のほぼ全部が、アミノ酸のアルキルエステルとのカップリングにより修飾されているものが好ましい。ここで、「ほぼ全部」とは、反応率が90モル%以上であることをいう。反応率は95モル%以上であることが好ましい。カップリング反応に際しては、水溶性エラスチンの1モル当量に対して、カルボジイミド等のカップリング剤又は縮合剤を過剰に使用することが好ましく、60～200モル当量用いるのが好ましく、80～120モル当量用いることがより好ましい。高活性のカップリング剤を60～200モル当量用いる場合、90モル%以上の反応率が得られる。

水溶性エラスチン中に含まれるカルボキシ基を、90モル%以上エステル化するためには、原料水溶性エラスチン1g当たり、カルボジイミド等のカップリング剤を0.3～1mmol使用することが好ましい。

図5に示すように、pHを5～9の範囲において変化させても濁度曲線が変化しないことから、カルボキシル基のほぼ全部が修飾されていると解釈される。

水溶性エラスチンのアミノ基をN-アシル化した後にカルボキシ基をエステル化する代わりに、水溶性エラスチンのカルボキシ基をエステル化した後にアミノ基をN-アシル化してもよい。

[0033] 本発明において、化学修飾水溶性エラスチンを含む組成物は温度応答性シ

ートとして使用される。化学修飾水溶性エラスチンの他に、温度応答性の機能を阻害しない限り、他の成分を併用しうるが、温度応答性シートには化学修飾水溶性エラスチンのみ又はエラスチン中のペプチド配列を有するポリペプチドのみを使用することが好ましい。

[0034] 図3は、試験管中でコラーゲンのゲル化を示す図である。図3のAに示すように、10℃以下ではコラーゲン溶液はゾル状態にある。図3のBに示すように、15℃以上に加熱するとコラーゲン溶液は白濁してゲル化し、コラーゲンゲルになる。このコラーゲンゲルは冷却しても元のゾル状態には戻らない。

図4は、コラーゲンのゲル化を模式的に示した図である。コラーゲンゲルは細胞シート作製のための細胞の足場に用いられる。足場は、細胞シートの形状を保持するために使用される。細胞の足場は、当業者によく知られているように、正常な動物細胞（上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞など）が生きて行くために必要な細胞外マトリックスを意味する。細胞外マトリックスの種類は、コラーゲン群、非コラーゲン性糖タンパク質群、エラスチン群、及び、プロテオグリカン群に大別され、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ポリリシン、及び、ゼラチンが好ましい具体例として例示される。

[0035] 本発明の細胞シートの製造で用いられるコラーゲンは、医療用途として知られているどのようなものでも用いることができる。通常、医療用途に適したコラーゲンは、主として原料である動物から、酸、アルカリ、中性等の条件下で酵素などにより抽出し、粘調なコラーゲン溶液又はこの溶液を乾燥させた固体の状態として得る方法が一般的に用いられている。また、更に、ペプシン処理を施すことによって抗原性発現部位を除去し、体内又は体表面に移植した際に抗原性が無い、より医療基材に好適なコラーゲン（アテロコラーゲン）を得ることもできる。本発明で用いられる代表的なコラーゲンとしては、酸可溶化コラーゲン、アルカリ可溶化コラーゲン、酵素可溶化コラーゲン、中性可溶化コラーゲン等の可溶化コラーゲンが挙げられ、特に、可溶

化処理と同時にコラーゲンの抗原決定基であるテロペプチドの除去処理が施されている、アテロコラーゲンが好適である。コラーゲン溶液は、低温下ではゾル状態にあるが、加熱するとゲル化してコラーゲングルになる。図10及び13に示すように、このコラーゲングルは冷却しても元のゾル状態に戻らないので、細胞シートの製造において細胞の足場に用いることができる。

[0036] 本発明の細胞シートの製造方法は、化学修飾水溶性エラスチンを含む温度応答性シートを支持体上に形成する工程、前記温度応答性シート上で、特定の細胞を培養して細胞シートを作製する工程、次いで、該細胞の培養温度以下の1～20℃、好ましくは5～15℃の条件で、前記温度応答性シートと前記細胞シートを分離する工程を含むことを特徴とする。細胞シートを作製する工程の前に、温度応答性シート上に細胞外マトリックスである足場としてコラーゲングル等の層を設ける工程を加入して、このコラーゲングル等の層の上で特定の細胞を培養することが好ましい。

以下に上記の各工程を説明する。

[0037] 化学修飾水溶性エラスチンを含む温度応答性シートを支持体上に形成する工程について説明する。

温度応答性シートを作製するための基材である支持体は、特に限定されず、細胞培養に悪影響のない、不活性な支持体が使用される。このような支持体として、通常の培養容器を構成するガラス、ポリスチレン（PS）等の樹脂が例示できる。

化学修飾水溶性エラスチンを含む温度応答性シートは、化学修飾水溶性エラスチンを主成分（90重量%以上）として含むことが好ましく、化学修飾水溶性エラスチンのみからなることがより好ましい。このシートの厚さは、nm～ μ mのオーダーであることが好ましく、50nm～500 μ mであることがより好ましい。言い換えると、0.01～100g/m²の乾燥塗設量とすることが好ましい。コアセルベートを形成させるためのインキュベート温度は40℃～80℃であることが好ましく、50℃～70℃であることが

より好ましい。乾燥条件は35℃～40℃で5分～20分間乾燥させるのが好ましい。

[0038] 温度応答性シート上にコラーゲンゲル層を設ける工程について説明する。コラーゲンゲル層の厚さは、約1～1,000μmであることが好ましく、約10～500μmであることがより好ましい。膜形成のためのインキュベート温度は30℃～40℃であることが好ましく、37℃付近であることがより好ましい。溶液の濃度は0.1mg/ml～10mg/mlであることが好ましく、0.5mg/ml～2mg/mlであることがより好ましい。

[0039] 前記温度応答性シート上で、特定の細胞を培養して細胞シートを作製する工程について説明する。特定の細胞には、上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞などが例示できる。細胞培養の方法は定法に従う。

細胞シートは単層でも複層にしてもよい。複層の場合には、同一細胞でも、異種の細胞であってもよい。

[0040] 細胞シートの作製を促進するために、細胞の培養を促進する血管内皮細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子、上皮成長因子、インスリン様成長因子、トランスフォーミング成長因子、血小板由来成長因子等の成長因子を培地に加えて培養することができる。

[0041] 温度応答性シートと前記細胞シートとを分離する工程について説明する。この工程は、前記細胞の培養温度以下の条件で、前記温度応答性シートと前記細胞シートとを分離する工程である。「培養温度以下」とは、培養温度が37℃の場合、好ましくは、1～20℃、より好ましくは、10～15℃をいう。

[0042] 図10は、化学修飾水溶性エラスチンN-Ac-Ela-0-Gly-OMeのコアセルベート上に、線維芽細胞を播種したコラーゲンゲルの状態を模式的に示した図である。図10において、1はコラーゲンゲルを表し、2はN-Ac-Ela-0-Gly-OMeのコアセルベート（温度応答性シート）を表し、3は線維芽細胞を表す。線維芽細胞を培養して細胞シートを作製する工程に続いて、該線維芽細胞の培

養温度以下に温度を下げて、前記化学修飾水溶性エラスチンからなる温度応答性シート2と前記細胞シート3とを分離する工程を実施する。

[0043] 図11は、コラーゲンゲル上に播種した直後（0時間）の線維芽細胞の球状の状態の一例を表す光学顕微鏡写真であり、3は線維芽細胞を表す。図12は、コラーゲンゲル上に播種後、24時間培養した線維芽細胞の紡錘状の状態を表す光学顕微鏡写真であり、3は線維芽細胞を表す。

[0044] 図13は、化学修飾水溶性エラスチンN-Ac-Ela-0-Gly-0Meのコアセルベートが溶解し、コラーゲンゲル及び線維芽細胞からなる細胞シートが剥離している状態を模式的に例示した図である。1はコラーゲンゲル、3は線維芽細胞、4は剥離している細胞シート、5はN-Ac-Ela-0-Gly-0Meのコアセルベート（温度応答性シート）が溶解している状態を表す。

[0045] 本発明において、化学修飾水溶性エラスチンを使用する代わりに、エラスチン中のペプチド配列を化学合成したポリペプチドを使用することができる。

エラスチン中のペプチド配列にはpoly(VPGVG)及びpoly(VPGG)が例示できる。これらのポリペプチドはヒト、ブタ、ウシ等の哺乳動物のエラスチンに共通して存在するペプチドであり、毒性や免疫学的等の面で極めて問題が少ないポリペプチドである。またpoly(VPGVG)の順列入れ替えポリペプチドであるpoly(PGVGV)、poly(GVGVP)、poly(VGVPG)及びpoly(GVPGV)、poly(VPGG)の順列入れ替えポリペプチドであるpoly(PGGV)、poly(GGVP)及びpoly(GVPG)もエラスチン由来ポリペプチドに含まれる。さらにpoly(VPGVG)の置換体であるpoly(X₁PX₂X₃X₄)、poly(PGVGV)の置換体であるpoly(PX₂X₃X₄X₁)、poly(GVGVP)の置換体であるpoly(X₂X₃X₄X₁P)、poly(VGVPG)の置換体であるpoly(X₃X₄X₁PX₂)、poly(GVPGV)の置換体であるpoly(X₄X₁PX₂X₃)、poly(VPGG)の置換体であるpoly(X₁PX₂X₃)、poly(PGGV)の置換体であるpoly(PX₂X₃X₁)、poly(GGVP)の置換体であるpoly(X₂X₃X₁P)、poly(GVPG)の置換体であるpoly(X₃X₁PX₂)も本発明のポリペプチドに含まれる。本発明においてポリペプチドとは、分子量が約3,000以上、好ましくは5,000~100,000のものを意味する。またX₁、X₂、X₃

、 X_4 はタンパク質を構成する約20種類のアミノ酸のいずれでもよい。

[0046] 図14は、poly(VPGVG)の4種類の製造（ポリマー化）方法を示すフロー図である。ONpはp-ニトロフェニルエステル、TFAはトリフルオロ酢酸、DMSOはジメチルスルホキシド、NMMはN-メチルモルホリン、WSCIは水溶性カルボジイミド、HOBt・H₂Oは1-ヒドロキシベンゾトリアゾール・一水和物、Sulfo-NHSはスルホスクシンイミド、DWは蒸留水、Bis-PNPCは炭酸ビス（4-ニトロフェノール）を表す。

実施例

[0047] 以下、実施例により本発明を具体的に説明する。各種測定法は以下のとおりである。

[0048] - N-アセチル化の修飾率 -

N-アセチル化の修飾率は、TNBS（2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸）法より以下のようにして測定し計算される。1 mg/mlのN-アセチル化水溶性エラスチン（N-Ac-Ela）水溶液に、4%の炭酸水素ナトリウム溶液、0.1%のTNBS水溶液を、それぞれ1 ml加えた。4%の炭酸水素ナトリウム溶液、0.1%のTNBS水溶液をそれぞれ1 ml加えただけのものを、ブランクとした（n=3）。作製した溶液をアルミホイルで遮光し、40℃で2時間反応させた。反応終了後、作製した溶液0.17 mlに10% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）1 ml、1 N HClを0.5 ml加え、345 nmにおける吸光度をそれぞれ測定した。また、修飾率は以下の式より求めた。

[0049] 修飾率（モル%）= $(1 - B/A) \times 100$

式中、Aは、エラスチン水溶液の吸光度（波長345 nm）の平均値からブランクの吸光度の平均値を引いたものを表し、Bは、N-Ac-Ela水溶液の吸光度（波長345 nm）の平均値からブランクの吸光度の平均値を引いたものを表す。

[0050] - 濁度測定 -

化学修飾水溶性エラスチン、エラスチン由来のポリペプチド、及びI型コ

ラーゲンをそれぞれ生理的条件下を考慮してリン酸緩衝液生理食塩水 (phosphate buffered saline ; P B S 溶液) に 5 °C において溶解し、その溶液を、波長 4 0 0 n m、温度変化 0. 5 °C / 分、窒素気流下の条件で濁度測定を行った。測定機器はペルチェ式温度コントローラー付分光光度計 (JASCO:Ubest-50) を用いた。

[0051] ブタ由来水溶性エラスチンの作製

1) ブタ由来不溶性エラスチンの単離

以下の手順に従ってブタ大動脈脱脂組織から NaCl 可溶及び NaOH 可溶性エラスチン以外の不要タンパク質やコラーゲンを抽出により除去した。

[0052] ブタ大動脈組織 (生体組織) を用い、前処理として付着している脂肪や筋肉などエラスチン含量の低い部分を、刃物などを用いて削ぎ落とすことで不要部分の除去処理を行い、次いで、生体組織をホモジナイザーを用いてホモジナイズすることで細断処理を行った。ホモジナイズした生体組織を熱水、熱希薄アルカリ水溶液又はアセトン等の有機溶媒で処理して脱脂処理を行った後に乾燥させた。ついで脱脂乾燥組織重量の約 1 0 倍容量の 1 M 塩化ナトリウムを加え、室温で 1 時間攪拌して NaCl 可溶性の不要タンパク質を抽出、除去した。この操作を 5 回繰り返し、その後蒸留水で洗浄し、遠心分離 (3, 0 0 0 r p m、5 分) により水切りした。

[0053] 上記のようにして脱脂及び塩処理した生体組織の重量に対して約 1 0 倍容量 (重量 1 g 当たり 1 0 m l) の 0. 1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加え、1 0 0 °C で 1 5 分間攪拌し、エラスチン以外のコラーゲンや不要タンパク質を除去する工程を行った。そして、生体組織とアルカリ性溶液とを分離した。分離したアルカリ性溶液を、例えば、ビュレット法にて総タンパク質の定量を行い、アルカリ性溶液中に含まれる総タンパク質量が 0. 1 m g / m l 以下になるまで、この操作を繰り返した。その後、冷却して遠心分離 (5, 0 0 0 r p m、2 0 分) により洗浄し、残渣を乾燥して不溶性エラスチンを得た。

[0054] 2) ブタ由来高分子量水溶性エラスチンの作製

ブタ由来不溶性エラスチンに、その乾燥重量の10倍容量の0.5N-NaOHを加え、100℃の油浴中で30分攪拌した。反応後、溶液を速やかに氷冷し、酢酸、塩酸又はクエン酸で中和した。その後、分画分子量6,000~8,000の透析膜を用いて1週間透析し、透析膜内の溶液を凍結乾燥して、主たる分子量が約3~30万であるブタ由来の高分子量水溶性エラスチンを得た。

[0055] -化学修飾したブタ由来高分子量水溶性エラスチンの作製-

下記の手順に従って、ブタ由来の高分子量水溶性エラスチンのN-アセチル化を行い、次いで、アミノ酸（グリシン）メチルエステルを用いてカップリングを行い、化学修飾したブタ由来の高分子量水溶性エラスチン（N-Ac-Ela-0-Gly-OMe）を作製した。

[0056] 1) ブタ由来高分子量水溶性エラスチンのN-アセチル化

前記で得られたブタ由来高分子量水溶性エラスチンを少量のトリフルオロエタノールに溶解したものに、ピリジン（100当量）と無水酢酸（100当量）を加え、室温で攪拌した。ニンヒドリン試験でアセチル化が定量的に進行したことを確認した後、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。このN-アセチル化は、TNBS法よりアミノ基等の修飾率が95モル%以上になるまで、数回繰り返し行った。その後、この溶液を1週間透析して溶媒や未反応試薬等を除去し、凍結乾燥してN-アセチル水溶性エラスチンを得た。TNBS法による修飾率は97モル%であった。

[0057] 2) 化学修飾水溶性エラスチン（N-Ac-Ela-0-Gly-OMe）の作製

前記で得られたN-アセチル水溶性エラスチン（N-Ac-Ela）を少量のジメチルホルムアミドに溶解し、水溶性カルボジイミド（100当量）を加えて室温で15分間攪拌した。その後、H-Gly-OMe・HCl（100当量）及びトリエチルアミン（100当量）を溶かした少量のジメチルホルムアミドを加え、一昼夜室温で攪拌した。次いで真空ポンプで減圧濃縮し、1週間透析して溶媒や未反応試薬等を除去し、凍結乾燥して、化学修飾水溶性エラスチン（N-Ac-Ela-0-Gly-OMe）を得た。

[0058] 3) N-Ac-Ela-0-Gly-0Meを用いた濁度測定

前記で得られたN-Ac-Ela-0-Gly-0Meの1.0mgをpH5.0、pH7.4、pH9.0のPBS溶液にそれぞれに5℃下で溶解して、5～60℃の温度範囲、0.5℃/分の温度上昇で、波長400nmでの濁度を測定した。その結果を図5に示した。図5より、N-Ac-Ela-0-Gly-0Me(1.0mg/ml)のpH5.0、pH7.4、pH9.0での濁度曲線は、酸性、中性、アルカリ性のどの条件でもほとんど同じ曲線を与える結果であった。この結果から、N-アセチル化によるアミノ基の保護に加えて、H-Gly-0Meとのカップリングによるカルボキシル基の修飾によって、水溶性エラスチンの荷電がなくなったことがわかり、ほぼ定量的にN-Ac-Ela-0-Gly-0Meが合成できたことが確認された。

[0059] -N-Ac-Ela-0-Gly-0Meの可逆的な濁度曲線の測定-

N-Ac-Ela-0-Gly-0Meを、5℃下でPBS溶液(pH7.4)に溶解して30mg/mlの溶液を作製し、5～25℃の温度範囲、窒素気流下で0.5℃/分の温度変化で、温度上昇及び温度下降における濁度測定を行った。その結果を図6に示した。図6よりN-Ac-Ela-0-Gly-0Meの濁度曲線は、温度上昇に伴う濁度曲線と温度下降に伴う濁度曲線がほぼ一致し、可逆的であることがわかった。この図6の結果と図1及び2より、N-Ac-Ela-0-Gly-0Meはコアセルベーションにより、加熱すると白濁し、細胞培養条件下の37℃、pH7.4でコアセルベートを形成し、20℃以下で元の透明な溶液状態に戻ることが示唆された。

[0060] -N-Ac-Ela-0-Gly-0Meのコアセルベートに対する押し込み試験-

N-Ac-Ela-0-Gly-0Meを5℃においてPBS溶液(pH7.4)に溶解させて、バイアル瓶の中で200mg/mlに調製した。次いで、50℃に加熱すると白濁し、その温度で24時間静置すると2層に分離した。上層の平衡溶液を取り除き、下層のコアセルベートの表面を約10分間乾燥させた後、25℃と37℃に温度を保持したままRHEONER-II-CREEP-METER-RE2-3305B-YAMADENを用いて押し込み試験を行った。コアセルベートの硬さは押し込みに

対する荷重 (MPa) で表した。その結果を図 7 に示した。図 7 より、N-Ac-Ela-0-Gly-0Me のコアセルベートは、25℃ に比べて高い温度の 37℃ では硬くなることが確認された。即ち、コアセルベートは、細胞培養条件下の 37℃ では硬い状態を保持しているが、25℃ にすると柔らかくなり、溶けやすい状態になることが分かった。また 15℃ ではコアセルベートが溶解し、測定できなかった。

[0061] コラーゲンの不可逆的な濁度曲線

I 型コラーゲンの 1 mg/ml の PBS 溶液 (pH 7.4) を 5℃ 下で作製し、5℃~40℃ の温度範囲において、窒素気流下で 0.5℃/分の温度変化で温度上昇及び温度下降における濁度測定を行った。その結果を図 8 に示した。図 8 より、I 型コラーゲンの濁度曲線は、温度上昇に伴う濁度曲線と温度下降に伴う濁度曲線が一致しないで、不可逆的であることが分かった。この図 8 の結果と図 3 及び 4 より、I 型コラーゲンは、温度上昇に伴ってゾルからゲルに変化し、細胞培養条件下の 37℃、pH 7.4 ではゲルを形成し、冷却しても元のゾル状態に戻らないで、ゲル化したままであることが示された。

[0062] コラーゲンゲル上での細胞増殖実験

I 型コラーゲンの 0.5 mg/ml、1.0 mg/ml、1.5 mg/ml、2.0 mg/ml の PBS 溶液 (pH 7.4) の 50 µl ずつを、96 ウェル培養皿に加え、1 時間インキュベート (37℃、5%炭酸ガス中) して作製したコラーゲンゲル上に、0.5%ウシ胎児血清を添加した Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium (DMEM) 培地に懸濁した、ヒト皮膚線維芽細胞 2.0×10^4 cells/ml の 100 µl を各々のウェルに播種した。2 日間培養 (37℃、5%炭酸ガス中) した後、培地交換を行い、さらに 2 日間培養を続けて細胞数をカウントした (×400、3 視野)。その結果を図 9 に示した。図 9 より、コラーゲンゲル量が多くなるにつれて、細胞数が増加することが分かった。

[0063] 細胞シートの作製

N-Ac-Ela-0-Gly-0MeをPBS溶液（pH 7.4）に溶解させ30 mg/mlに調製し、Filter-Unit 0.22 μmの滅菌用フィルターを通して滅菌し、100 μlずつ96ウェル培養皿に分注し、24時間インキュベート（60℃、5%炭酸ガス中）して2層に分離させた。その後、上層の平衡溶液を取り除き、下層のコアセルベートの表面を約10分間、37℃で乾燥させた。次いで、I型コラーゲンの1 mg/mlのPBS溶液を作製し（滅菌済み）、100 μlずつコアセルベート上に加え、1時間インキュベート（37℃、5%炭酸ガス中）することでコラーゲンゲルの膜を作製した。10.0%ウシ胎児血清を添加したDMEM培地で懸濁した、ヒト皮膚線維芽細胞 2.0×10^4 cells/mlを各ウェルのコラーゲンゲル膜上に100 μlずつ播種し、5%炭酸ガスインキュベーター中で37℃、24時間培養を行った。そのときの細胞の状態を光学顕微鏡で観察した結果を図11～図12に示した。

[0064] N-Ac-Ela-0-Gly-0Meのコアセルベート上に、線維芽細胞を播種したコラーゲンゲルが存在していることは、肉眼観察によって確認できた。図10に、N-Ac-Ela-0-Gly-0Meのコアセルベート上にコラーゲンゲルを作製し、そのゲル上に線維芽細胞を播種した状態を模式的に示した。この状態では細胞は接着する前のゲル上に付着した状態である。図10において、1はコラーゲンゲル、2はN-Ac-Ela-0-Gly-0Meのコアセルベート、3は接着する前の線維芽細胞を表している。図11は、播種した直後（0時間）の細胞が、接着前の付着した状態（球状）でコラーゲンゲル上に存在していることを示す光学顕微鏡写真である。図11において、3は接着する前の線維芽細胞である。図12は、24時間培養後の線維芽細胞が、コラーゲンゲル上に紡錘状の状態が存在し、接着、伸展、増殖していることを示す光学顕微鏡写真である。図12において、3は接着、伸展、増殖している線維芽細胞である。

[0065] ー細胞シートの剥離ー

N-Ac-Ela-0-Gly-0Meのコアセルベート上にコラーゲンゲルを作製し、その上に線維芽細胞を播種し、24時間培養して細胞シートを作製した後に、1

5℃に冷却して30分間インキュベートすることでN-Ac-Ela-0-Gly-0Meのコアセルベートが溶解し、線維芽細胞・コラーゲンゲルからなる細胞シートを剥離した。コラーゲンゲル上で接着、伸展、増殖した細胞シートが剥離している状態は肉眼で観察できた。図13は、N-Ac-Ela-0-Gly-0Meのコアセルベートが溶解し、コラーゲンゲル及び線維芽細胞からなる細胞シートが剥離している状態を模式的に示した図である。図13において、1はコラーゲンゲル、3は接着、伸展、増殖している線維芽細胞、4は細胞シート、5はN-Ac-Ela-0-Gly-0Meのコアセルベートが溶解して消失している状態を表している。このように温度を下げることにより、N-Ac-Ela-0-Gly-0Meのコアセルベートが溶解し、線維芽細胞・コラーゲンゲルからなる細胞シートが、無傷の状態ですぐに製造・回収された。

[0066] N-Ac-Ela-0-Gly-0MeをPBS溶液(pH7.4)に溶解させて、30mg/mlの溶液を10ml調製し、Filter-Unit 0.22µmの滅菌用フィルターを通して滅菌し、3.6mlずつ直径6cm培養皿に分注し(塗布量は38g/m²)、24時間インキュベート(60℃、5%炭酸ガス中)して2層に分離させた。その後、上層の平衡溶液を取り除き、下層のコアセルベート膜(100~200µmの厚さ)の表面を約10分間、37℃で乾燥させた。次いで、I型コラーゲンの1mg/mlのPBS溶液を10ml作製し(滅菌済み)、3.6mlずつコアセルベート上に加え(塗布量は1.3g/m²)、1時間インキュベート(37℃、5%炭酸ガス中)することでコラーゲンゲルの膜(200~300µmの厚さ)を作製した。10.0%ウシ胎児血清を添加したDMEM培地で懸濁した、ヒト皮膚線維芽細胞2.0×10⁴ cells/mlの細胞懸濁液を10ml作製し、3.6mlずつをコラーゲンゲル膜上に播種し、5%炭酸ガスインキュベーター中で37℃、24時間培養を行って細胞シートを作製した。24時間後の細胞の状態を光学顕微鏡で観察した結果は図12と同様であった。

[0067] エラスチン中のペプチド配列を有するポリペプチドの化学合成—

化学修飾水溶性エラスチンと同様に温度応答性シートに用いることができ

るエラスチン由来のポリペプチドの製造について、ポリペプチドの一つであるpoly(VPGVG)の製造（ポリマー化）例を説明する（図14参照）。

[0068] ー活性エステル法によるpoly(VPGVG)(1)の製造ー

H-VPGVG-ONp · TFA (0.23 mmol) をDMSO (0.5 ml) に溶解し、NMMでpHを9にし、7日間攪拌してポリマー化した。分画分子量3,500の透析膜を用いて透析し、凍結乾燥した。収率は37%、平均分子量は約17,000であった。なお、平均分子量は、定法により電気泳動法を用いて、分子量マーカーに基づく標準曲線から求めた。

[0069] ー有機溶媒中のカルボジイミド法によるpoly(VPGVG)(2)の製造ー

H-VPGVG-OH · TFA (0.37 mmol) をDMSO (0.5 ml) に溶解し、HOBt · H₂O (0.37 mmol) を加え、10分後に水溶性カルボジイミド (0.74 mmol) を加え、NMMでpHを9にし、7日間攪拌してポリマー化した。分画分子量3,500の透析膜を用いて透析し、凍結乾燥した。収率は61%、平均分子量は約20,000であった。

[0070] ー水溶媒中のカルボジイミド法によるpoly(VPGVG)(3)の製造ー

H-VPGVG-OH · TFA (0.37 mmol) を蒸留水 (0.5 ml) に溶解し、Sulfo-NHS (0.37 mmol) を加え、ついで水溶性カルボジイミド (0.37 mmol) を加え、NMMでpHを9にし、7日間攪拌してポリマー化した。分画分子量3,500の透析膜を用いて透析し、凍結乾燥した。収率は6.3%、平均分子量は約22,000であった。

[0071] [炭酸ビス(4-ニトロフェニル)法によるpoly(VPGVG)(4)の製造]

H-VPGVG-OH · TFA (0.37 mmol) をピリジン (0.5 ml) に溶解し、Bis-PNPC (0.11 mmol) を加え、NMMでpHを9にし、7日間攪拌してポリマー化した。分画分子量3,500の透析膜を用いて透析し、凍結乾燥した。収率は16%、平均分子量は約14,000であった。

[0072] ーpoly(VPGVG)の可逆的な濁度曲線の測定ー

前記の活性エステル法によって製造したpoly(VPGVG)(1)を、5℃下でPBS溶液 (pH7.4) に溶解して30 mg/mlの溶液を作製し、5~65

℃の温度範囲、窒素気流下で0.5℃/分の温度変化で、温度上昇及び温度下降における濁度測定を行った。その結果を図15に示した。図15よりpoly(VPGVG)の濁度曲線は、温度上昇に伴う濁度曲線と温度下降に伴う濁度曲線がほぼ一致し、可逆的であることがわかった。この図15の結果と図1及び2より、poly(VPGVG)はコアセルベーションにより、加熱すると白濁し、細胞培養条件下の37℃、pH7.4でコアセルベートを形成し、20℃以下で元の透明な溶液状態に戻ることが示唆された。

[0073] −poly(VPGVG)のコアセルベートを用いた細胞シートの作製−

前記の活性エステル法によって製造したpoly(VPGVG)(1)をPBS溶液(pH7.4)に溶解させ30mg/mlに調製し、Filter-Unit 0.22µmの滅菌用フィルターを通して滅菌し、100µlずつ96ウェル培養皿に分注し、24時間インキュベート(60℃、5%炭酸ガス中)して2層に分離させた。その後、上層の平衡溶液を取り除き、下層のコアセルベートの表面を約10分間、37℃で乾燥させた。次いで、I型コラーゲンの1mg/mlのPBS溶液を作製し(滅菌済み)、100µlずつコアセルベート上に加え、1時間インキュベート(37℃、5%炭酸ガス中)することでコラーゲングル膜を作製した。10.0%ウシ胎児血清を添加したDMEM培地で懸濁した、ヒト皮膚線維芽細胞 2.0×10^4 cells/mlを各ウェルのコラーゲングル膜上に100µlずつ播種し、5%炭酸ガスインキュベーター中で37℃、24時間培養を行った。図16は24時間培養後の線維芽細胞が、コラーゲングル膜上に紡錘状の状態が存在し、接着、伸展、増殖していることを示す光学顕微鏡写真である。図16において、3は接着、伸展、増殖している線維芽細胞である。

[0074] −poly(VPGVG)のコアセルベートの溶解による細胞シートの剥離−

前記に示すように細胞シートを作製した後に、15℃に冷却して30分間インキュベートすることでpoly(VPGVG)のコアセルベートが溶解し、線維芽細胞・コラーゲングル膜からなる細胞シートを剥離した。コラーゲングル膜上で接着、伸展、増殖した細胞シートが剥離している状態は肉眼で観察できた。そ

の結果は図 1 3 に示した結果と同様の結果であった。このように温度を下げることにより、poly(VPGVG)のコアセルベートが溶解し、線維芽細胞・コラーゲンゲルからなる細胞シートが、無傷の状態ですぐに製造・回収された。

[0075] 上記のポリペプチドはいずれも温度応答性シートとして使用することができる。

産業上の利用可能性

[0076] 生体の組織や臓器はシート状の細胞からできている構造が基本であり、色々な形状に折り重なって血管や臓器などの立体的な組織ができている。このような細胞シートを、細胞培養により細胞外マトリックスを足場にして作製し、培養皿から剥離し、重ねることができる技術は細胞シート工学と呼ばれている。しかし細胞シート作製の際、接着タンパク質によって細胞が培養皿に強く接着しているため、剥離する際にタンパク質分解酵素を使用せざるを得ず、細胞及び細胞外マトリックスを損なうことが問題となっている。水溶性エラスチン、その誘導体の化学修飾水溶性エラスチン、又はエラスチン由来のポリペプチドのコアセルベートが、無傷の細胞シートを回収するのに有用であることが分かり、本発明によって、生体由来の安全な蛋白質及びポリペプチドを用いて細胞をシート状に回収することができ、これらは細胞シート工学において利用することができる。

符号の説明

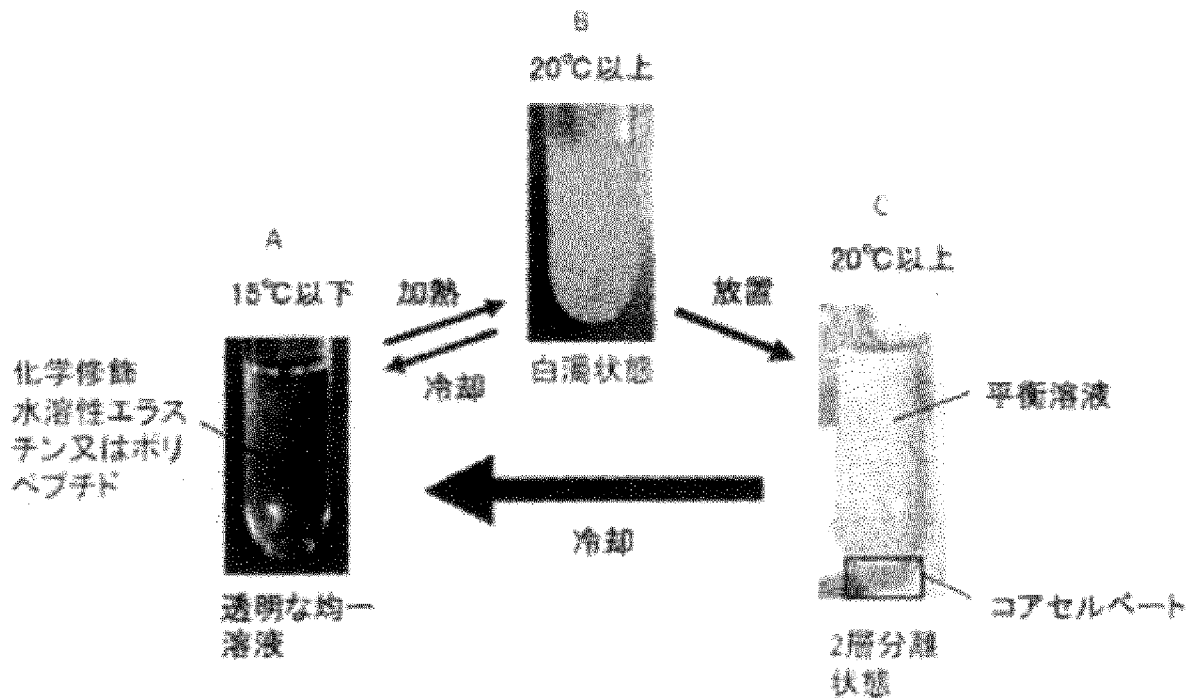
- [0077] 1 コラーゲンゲル
2 N-Ac-Ela-0-Gly-OMeのコアセルベート
3 線維芽細胞
4 細胞シート
5 N-Ac-Ela-0-Gly-OMeのコアセルベートが溶解して消失している状態

請求の範囲

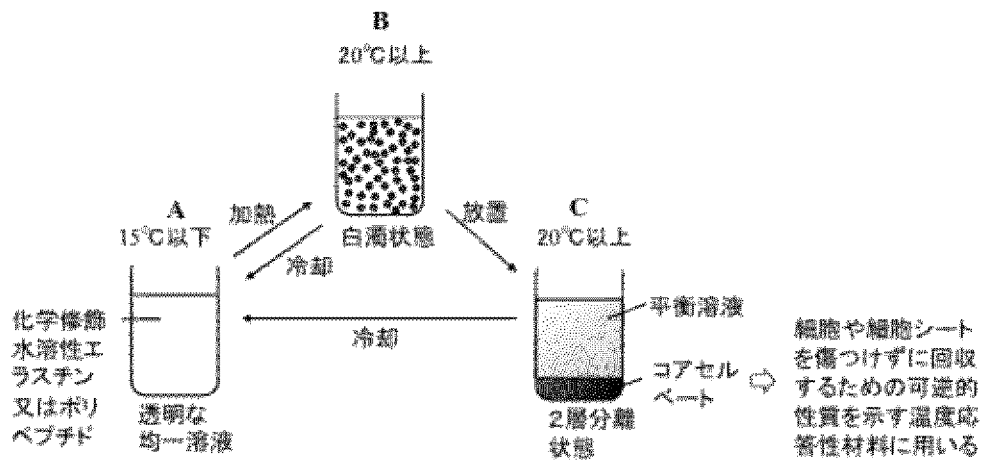
- [請求項1] 水溶性エラスチンの分子中に含まれる第1アミン及び第2アミンの少なくとも一部をN-アシル化すると共に、該分子中に含まれるカルボキシル基の少なくとも一部をアミノ酸のアルキルエステルとカップリングさせて得られる化学修飾した水溶性エラスチンを含むことを特徴とする温度応答性シート。
- [請求項2] 第1アミン及び第2アミンの少なくとも一部をN-アセチル化すると共に、カルボキシル基の少なくとも一部をグリシンのメチルエステルとカップリングさせて得られる、請求項1に記載の温度応答性シート。
- [請求項3] 式(1)により規定される修飾率が80モル%以上となるようにN-アセチル化された、請求項2に記載の温度応答性シート。
- $$\text{修飾率 (モル\%)} = (1 - B/A) \times 100 \quad (1)$$
- ここで、Aは、水溶性エラスチンの吸光度(波長345nm)の平均値からブランクの吸光度の平均値を引いた値を表し、Bは、N-アセチル化水溶性エラスチンの吸光度(波長345nm)の平均値からブランクの吸光度の平均値を引いた値を表す。
- [請求項4] カルボキシル基の90モル%以上がグリシンのメチルエステルとカップリングした、請求項2又は3に記載の温度応答性シート。
- [請求項5] 化学修飾した水溶性エラスチンが、pH7.4、温度37℃でコアセルベートを形成し、温度を15℃に低下させると、該コアセルベートが溶解する性質を持つ、請求項1～4いずれか1つに記載の温度応答性シート。
- [請求項6] 水溶性エラスチンが低分子量フラクションを透析により除去した高分子量水溶性エラスチンである、請求項1～5いずれか1つに記載の温度応答性シート。
- [請求項7] 細胞培養用である、請求項1～6いずれか1つに記載の温度応答性シート。

- [請求項8] 請求項1～7いずれか1つに記載の温度応答性シートを支持体上に形成する工程、前記温度応答性シート上に細胞の足場となる膜を作製する工程、前記足場となる膜上で特定の細胞を培養して細胞シートを作製する工程、次いで、該細胞の培養温度以下の1～20℃において、前記温度応答性シートと前記細胞シートとを分離する工程を含むことを特徴とする細胞シートの製造方法。
- [請求項9] 前記足場となる膜が、細胞外マトリックスよりなる群から選ばれたゲル膜である、請求項8に記載の細胞シートの製造方法。
- [請求項10] 前記足場となる膜が、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ポリリシン、及び、ゼラチンよりなる群から選ばれたゲル膜である請求項8又は9に記載の細胞シートの製造方法。
- [請求項11] エラスチン中のペプチド配列を化学合成したポリペプチド。
- [請求項12] 請求項11に記載のポリペプチドを主成分として含む温度応答性シート。

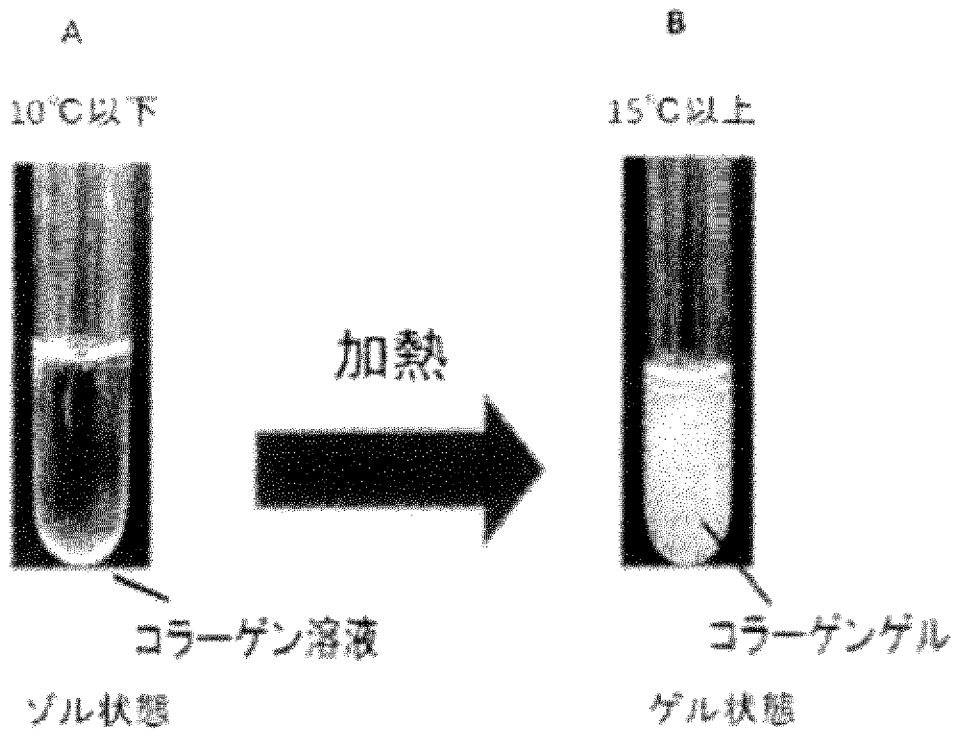
[図1]



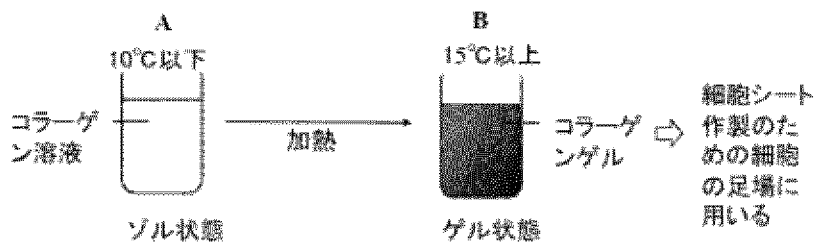
[図2]



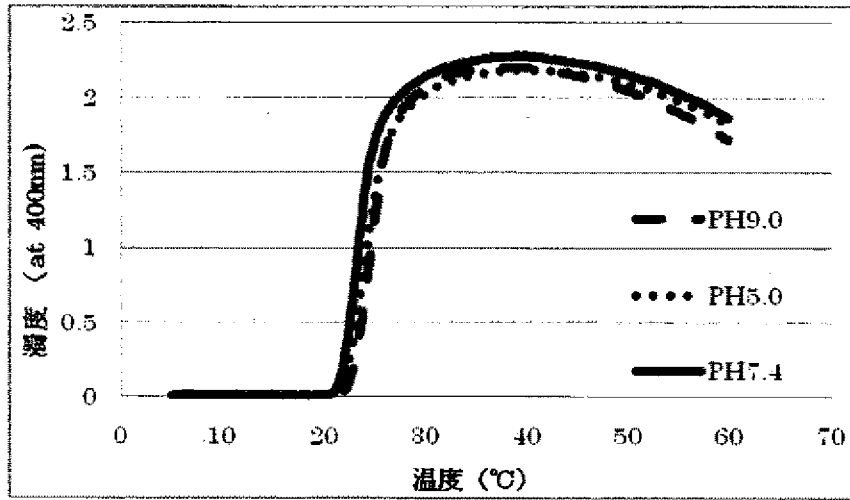
[図3]



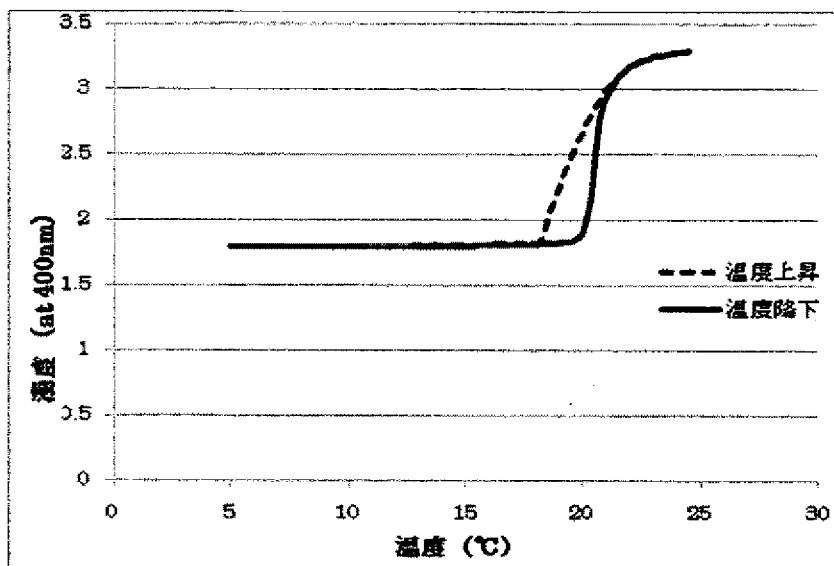
[図4]



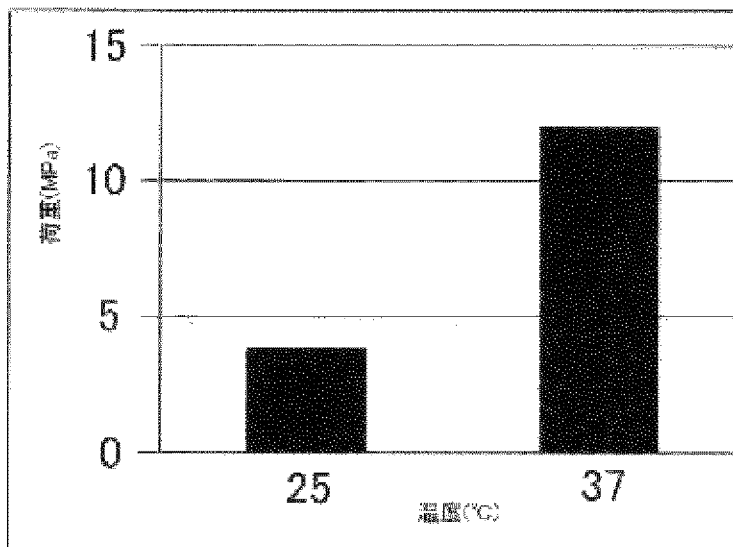
[図5]



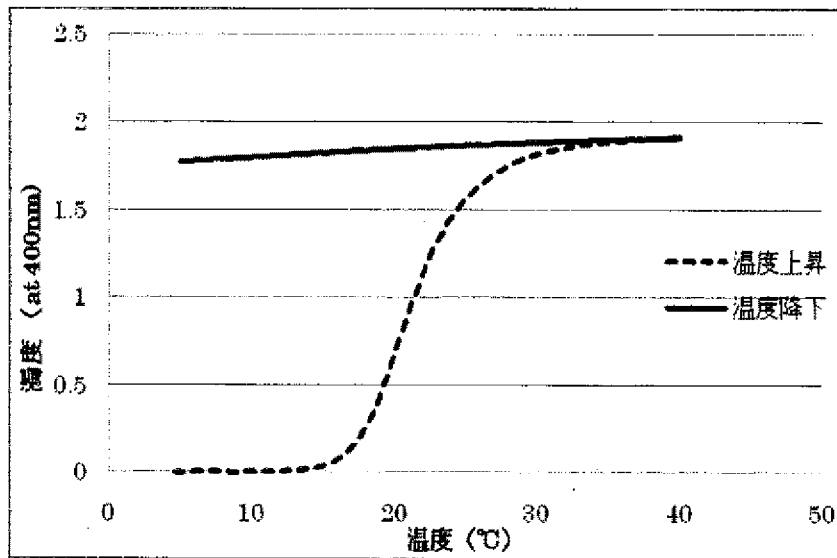
[図6]



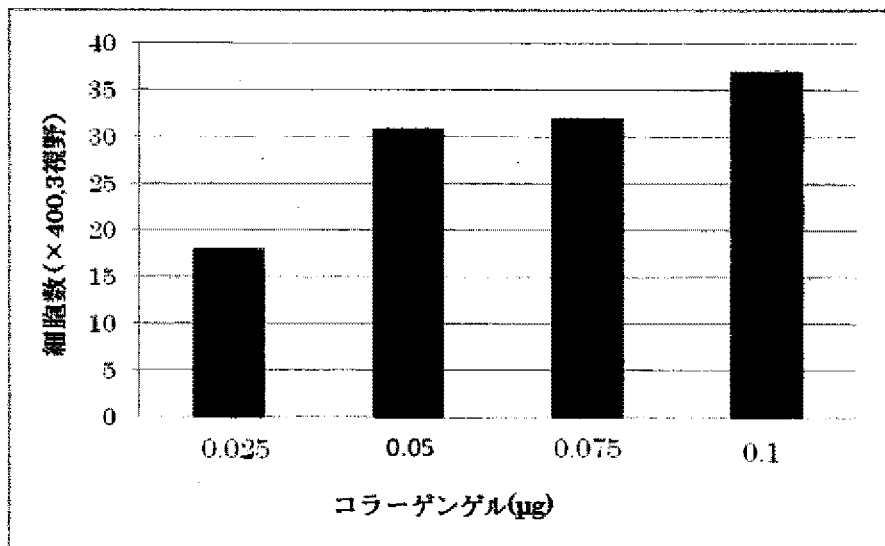
[図7]



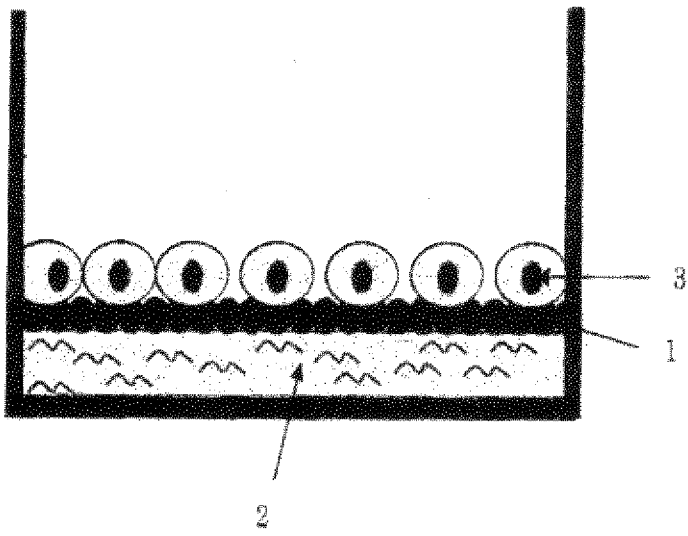
[図8]



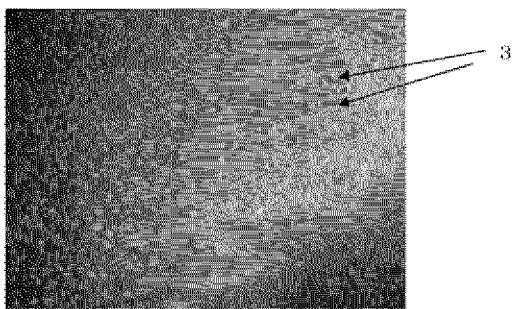
[図9]



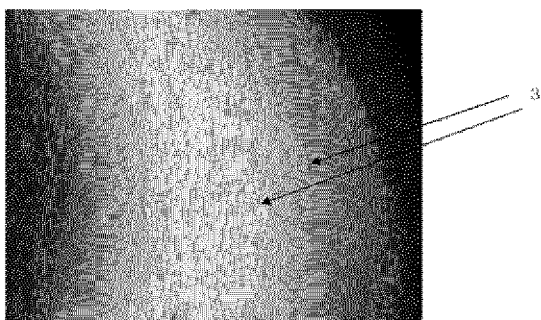
[図10]



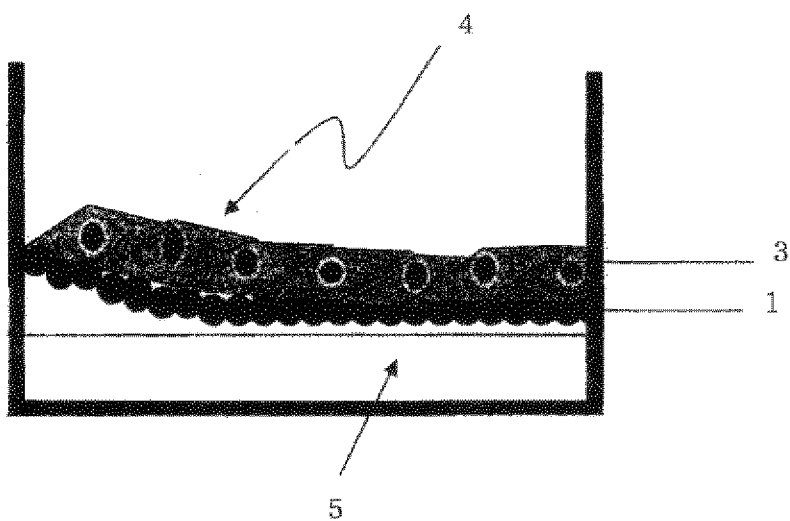
[図11]



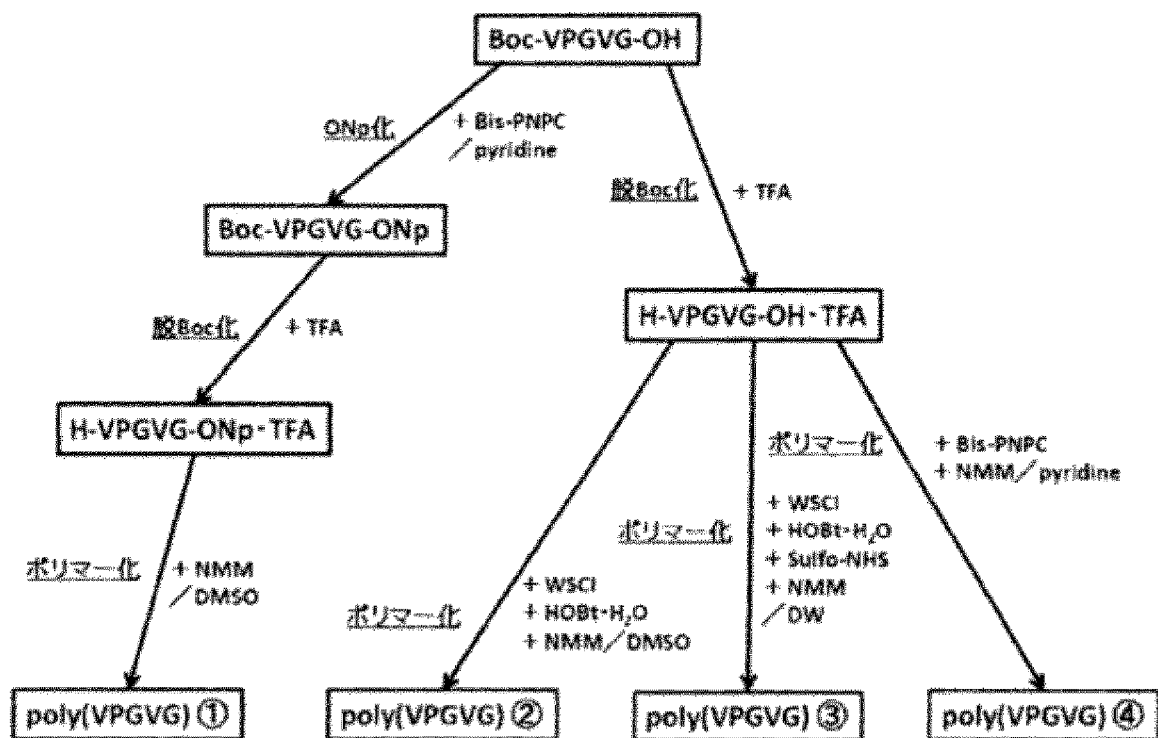
[図12]



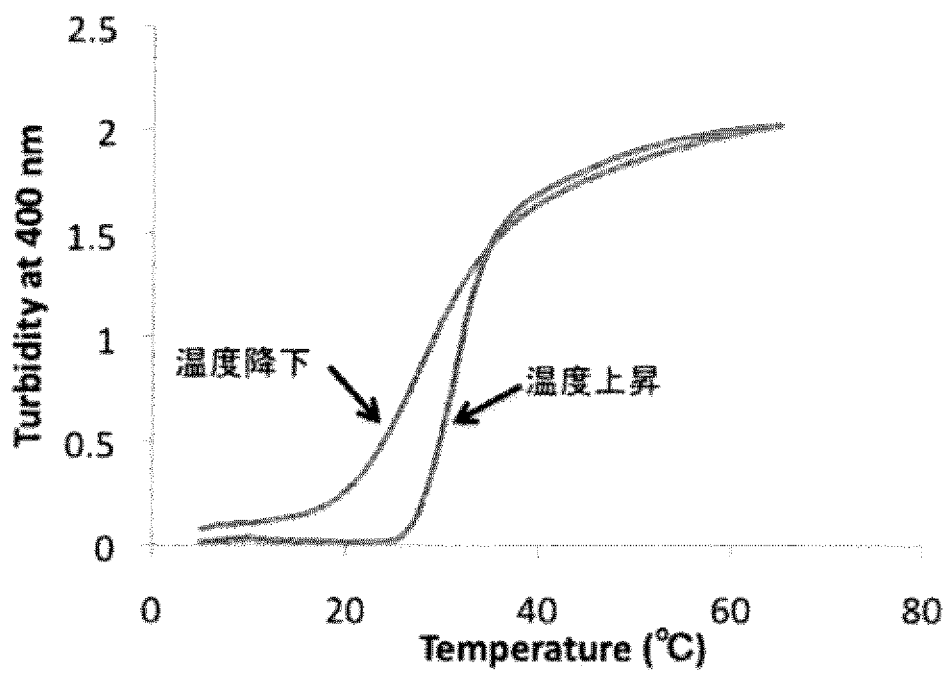
[図13]



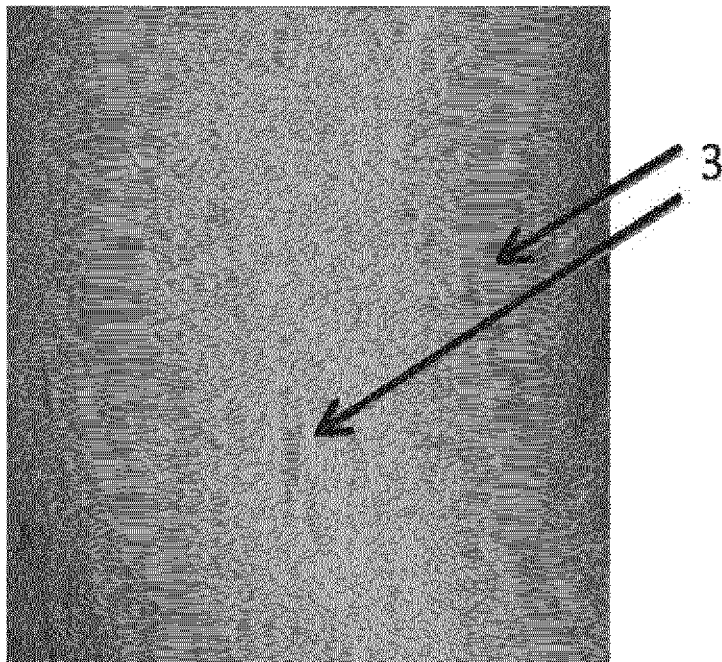
[図14]



[図15]



[図16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/063265

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/00(2006.01) i, C07K14/78(2006.01) i, A61K35/12(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)

C12M1/00, C07K14/78, A61K35/12

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	MIE, M., et al., Novel extracellular matrix for cell sheet recovery using genetically engineered elastin-like protein., 2007, Journal of Biomedical Materials Research. Part B. Applied Biomaterials, Vol.86, No.1, p.283-290, entire text	11/1-10,12
X/Y	Yasunori MIZUSHIMA et al., "Kokino Saibo Sheet Kochiku no Tameno Jinko Tanpakushitsu Zairyo no Kaihatsu", 2006, The Chemical Society of Japan Dai 86 Shunki Nenkai Koen Yokoshu II, page 899, 4G4-11, entire text	11/1-10,12

 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
28 June, 2011 (28.06.11)Date of mailing of the international search report
05 July, 2011 (05.07.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12M1/00(2006.01)i, C07K14/78(2006.01)i, A61K35/12(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. C12M1/00, C07K14/78, A61K35/12

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 1971-2011年
 日本国実用新案登録公報 1996-2011年
 日本国登録実用新案公報 1994-2011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)
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), PubMed

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
X/ Y	MIE, M., et al., Novel extracellular matrix for cell sheet recovery using genetically engineered elastin-like protein., 2007, Journal of Biomedical Materials Research. Part B. Applied Biomaterials, Vol.86, No.1, p.283-290 全文	11/ 1-10, 12
X/ Y	水島康徳 et al., 高機能細胞シート構築のための人工タンパク質材料の開発, 2006, 日本化学会第86春季年会講演予稿集 I I, p.899 4G4-11 全文	11/ 1-10, 12

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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 28.06.2011	国際調査報告の発送日 05.07.2011
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) 福澤 洋光 電話番号 03-3581-1101 内線 3448
	4B 3963

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
X/ Y	前川陽祐 et al., 化学修飾水溶性エラスチン及びI型コラーゲン共存状態 における自己集合特性, 2010 Apr., 北九州医工学会誌, Vol.20, p.25-28 全文	11/ 1-10, 12
A	WO 2006/046626 A1 (KYUSHU INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 2006.05.04, 全文 & JP 4078431 B & US 2008/0096812 A1	1-12