



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112867788 A

(43) 申请公布日 2021.05.28

(21) 申请号 201980069037.0

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

(22) 申请日 2019.08.30

代理人 杨宏军 焦成美

(30) 优先权数据

2018-164042 2018.08.31 JP

2019-134058 2019.07.19 JP

(51) Int.Cl.

C12N 5/0775 (2006.01)

C12P 1/00 (2006.01)

C12N 5/071 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.04.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2019/034099 2019.08.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/045620 JA 2020.03.05

(71) 申请人 日产化学株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 金木达朗 木田克彦 南昌孝

畑中大辅

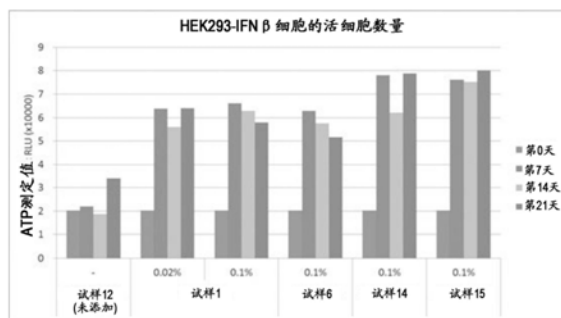
权利要求书3页 说明书41页 附图2页

(54) 发明名称

粘附性细胞的悬浮培养用培养基组合物

(57) 摘要

本发明提供粘附性细胞的悬浮培养用培养基组合物,其包含:(1)甲壳质纳米纤维;及(2)壳聚糖纳米纤维或多糖类。



1. 粘附性细胞的悬浮培养用培养基组合物,其包含:

- (1) 甲壳质纳米纤维;及
- (2) 壳聚糖纳米纤维或多糖类。

2. 如权利要求1所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,培养基组合物包含甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维,甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的比率为甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维=1:0.5~20。

3. 如权利要求1所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,培养基组合物包含甲壳质纳米纤维及多糖类,多糖类选自由甲基纤维素、脱酰基结冷胶、及海藻酸钠组成的组。

4. 如权利要求1~3中任一项所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,粘附性细胞为在悬浮培养下自体凝集的粘附性细胞。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,粘附性细胞为干细胞。

6. 如权利要求5所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,干细胞为间充质干细胞。

7. 如权利要求5或6所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,悬浮培养用于干细胞的增殖,且用于维持干细胞的多能性及迁移性。

8. 粘附性细胞的培养方法,其包括将粘附性细胞在下述培养基组合物中悬浮培养的步骤,所述培养基组合物包含:

- (1) 甲壳质纳米纤维;及
- (2) 壳聚糖纳米纤维或多糖类。

9. 如权利要求8所述的培养方法,其中,培养基组合物包含甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维,培养基组合物中的甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的比率为甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维=1:0.5~20。

10. 如权利要求8所述的培养方法,其中,培养基组合物包含甲壳质纳米纤维及多糖类,多糖类选自由甲基纤维素、脱酰基结冷胶、及海藻酸钠组成的组。

11. 如权利要求8~10中任一项所述的培养方法,其中,粘附性细胞为在悬浮培养下自体凝集的粘附性细胞。

12. 如权利要求8~11中任一项所述的培养方法,其中,粘附性细胞为干细胞。

13. 如权利要求12所述的培养方法,其中,干细胞为间充质干细胞。

14. 如权利要求12或13所述的培养方法,其中,悬浮培养用于干细胞的增殖,且用于干细胞的多能性及迁移性的维持。

15. 如权利要求8~14中任一项所述的培养方法,其还包括以下的步骤:

步骤(1) 不进行使经悬浮培养的细胞从甲壳质纳米纤维以及壳聚糖纳米纤维或多糖类剥离的处理,进一步添加权利要求1~7中任一项所述的悬浮培养用培养基组合物;及

步骤(2) 将步骤(1)中得到的混合物供于悬浮培养。

16. 生产细胞分泌物的方法,其包括将粘附性细胞在下述培养基组合物中悬浮培养的步骤,所述培养基组合物包含:

- (1) 甲壳质纳米纤维;及
- (2) 壳聚糖纳米纤维或多糖类。

17. 如权利要求16所述的方法,其中,培养基组合物包含甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米

纤维,培养基组合物中的甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的比率为甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维=1:0.5~20。

18.如权利要求16所述的方法,其中,培养基组合物包含甲壳质纳米纤维及多糖类,多糖类选自自由甲基纤维素、脱乙酰基结冷胶、及海藻酸钠组成的组。

19.如权利要求16~18中任一项所述的方法,其中,粘附性细胞为在悬浮培养下自体凝集的粘附性细胞。

20.如权利要求16~19中任一项所述的方法,其中,粘附性细胞为干细胞。

21.如权利要求20所述的方法,其中,干细胞为间充质干细胞。

22.如权利要求16~21中任一项所述的方法,其中,培养基组合物中的血清的浓度为2%以下。

23.如权利要求16~22中任一项所述的方法,其中,细胞分泌物为选自自由低分子化合物、蛋白质、核酸、及细胞分泌小泡组成的组中的至少一者。

24.粘附性细胞的悬浮培养用培养基组合物,其包含具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖纳米纤维,其中,所述特定的乙酰化度为5~70%。

25.如权利要求24所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,培养基组合物中的具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖纳米纤维的浓度为0.0001~0.2%(w/v)。

26.如权利要求24或25所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,粘附性细胞为在悬浮培养下自体凝集的粘附性细胞。

27.如权利要求24~26中任一项所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,粘附性细胞为干细胞。

28.如权利要求27所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,干细胞为间充质干细胞。

29.如权利要求27或28所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,悬浮培养用于干细胞的增殖,且用于干细胞的多能性及迁移性的维持。

30.粘附性细胞的培养方法,其包括将粘附性细胞在包含具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖纳米纤维的培养基组合物中悬浮培养的步骤,其中,所述特定的乙酰化度为5~70%。

31.如权利要求30所述的培养方法,其中,培养基组合物中的具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖纳米纤维的浓度为0.0001~0.2%(w/v)。

32.如权利要求30或31所述的培养方法,其中,粘附性细胞为在悬浮培养下自体凝集的粘附性细胞。

33.如权利要求30~32中任一项所述的培养方法,其中,粘附性细胞为干细胞。

34.如权利要求33所述的培养方法,其中,干细胞为间充质干细胞。

35.如权利要求33或34所述的培养方法,其中,悬浮培养用于干细胞的增殖,且用于干细胞的多能性及迁移性的维持。

36.如权利要求30~35中任一项所述的培养方法,其还包括以下的步骤:

步骤(1)不进行使经悬浮培养的细胞从具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖纳米纤维剥离的处理,进一步添加权利要求24~29中任一项所述的悬浮培养用培养基组合物;及

步骤(2)将步骤(1)中得到的混合物供于悬浮培养。

37. 用于生产细胞分泌物的方法,其包括将粘附性细胞在包含具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基- β -D-氨基葡萄糖纳米纤维的培养基组合物中悬浮培养的步骤,其中,所述特定的乙酰化度为5~70%。

38. 如权利要求37所述的方法,其中,培养基组合物中的具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基- β -D-氨基葡萄糖纳米纤维的浓度为0.0001~0.2% (w/v)。

39. 如权利要求37或38所述的方法,其中,粘附性细胞为在悬浮培养下自体凝集的粘附性细胞。

40. 如权利要求37~39中任一项所述的方法,其中,粘附性细胞为干细胞。

41. 如权利要求40所述的方法,其中,干细胞为间充质干细胞。

42. 如权利要求37~41中任一项所述的方法,其中,培养基组合物中的血清的浓度为2%以下。

43. 如权利要求37~42中任一项所述的方法,其中,细胞分泌物为选自由低分子化合物、蛋白质、核酸、及细胞分泌小泡组成的组中的至少一者。

粘附性细胞的悬浮培养用培养基组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及粘附性细胞的悬浮培养用培养基组合物、及粘附性细胞的悬浮培养方法。更详细而言,本发明涉及包含甲壳质(chitin)纳米纤维及壳聚糖(chitosan)纳米纤维的粘附性细胞的悬浮培养用培养基组合物、及使用了该培养基组合物的粘附性细胞的悬浮培养方法。

背景技术

[0002] 再生医疗的领域中,对使用了iPS细胞、ES细胞等多能干细胞的器官再生手段的构建进行了深入研究。但是,ES细胞的建立伴随有伦理性问题,另外,也认识到iPS细胞有癌化风险、培养时间长的问题。因此,同时也探索了使用了癌化风险较低的间充质干细胞、神经干细胞等成体干细胞、分化诱导时间较短的前体脂肪细胞、前体心肌细胞等祖细胞、或软骨细胞等的手段的可能性。

[0003] 使用了成体干细胞等的治疗手段大量地需要高质量的该细胞,因此要求能高效地制备高质量的细胞的培养方法。例如,已知间充质干细胞可通过在培养皿中进行单层培养(也被称为二维(2D)培养等)而容易地增殖。

[0004] 但是,由于在一个培养皿中所能培养的细胞数量是有限的,使用该方法大量培养细胞的情况下,需要研究累叠许多培养皿等等,因此该培养方法从大量生产的观点考虑并不合适。另外,最近的报道中,利用培养皿的二维培养法存在使间充质干细胞的未分化能力、增殖能力降低的可能性,并且,间充质干细胞所具有的包括归巢(homing)作用在内的迁移能力、抗炎作用等功能也有可能降低。因此,利用培养皿的二维培养法从生产高质量的细胞的观点考虑也不合适。

[0005] 另一方面,作为大量地培养粘附性细胞的方法,报道了将细胞在粘附于微载体的状态下培养而使其增殖的装置(专利文献1)。然而,目前通常能获得的微载体在静置条件下会在培养液中沉降,因此,培养时需要进行搅拌。已指出了由于该搅拌时载体之间的碰撞等引起细胞死亡的课题。此外,另一个课题是,出于更换培养基、扩大培养规模等目的而从微载体回收细胞时,需要对细胞之间、细胞与载体进行剥离,而该剥离处理中使用的胰蛋白酶等蛋白水解酶会使细胞受到损伤,由此导致细胞的生存率降低。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本专利第3275411号公报

发明内容

[0009] 发明所要解决的课题

[0010] 鉴于上述背景,本发明的课题在于,提供能解决由搅拌时的微载体的碰撞导致的细胞死亡、传代培养时的蛋白水解酶处理对细胞造成的损伤等使用了以往的微载体的粘附性细胞的悬浮培养中的多个课题的新型培养方法。

[0011] 本申请发明人为了解决上述课题而反复进行了深入研究, 结果发现, 通过在液体培养基中以特定的比率配合甲壳质纳米纤维以及壳聚糖纳米纤维或特定的多糖类, 从而可实现: (1) 该液体培养基能够悬浮培养粘附性细胞, 由于不需要搅拌, 因此能够使粘附性细胞高效地增殖; (2) 该液体培养基可通过缓缓搅拌来容易地使载体及附着于载体的粘附性细胞再分散, 若继续将其静置, 则可再次连续地实施悬浮培养; (3) 利用该液体培养基增殖得到的干细胞(例如间充质干细胞)的分化能力、迁移能力维持在非常高的水平; (4) 在使用该液体培养基的情况下, 能够在低血清条件下长期维持培养细胞, 能够高效地生产细胞分泌物; (5) 在使用该液体培养基的情况下, 能够长期维持球体(sphere)的分散性; 等等, 并基于上述见解继续进行研究, 从而完成了本发明。即, 本发明如下所述。

[0012] [1]粘附性细胞的悬浮培养用培养基组合物, 其包含:

[0013] (1) 甲壳质纳米纤维; 及

[0014] (2) 壳聚糖纳米纤维或多糖类。

[0015] [2]如[1]所述的悬浮培养用培养基组合物, 其中, 培养基组合物包含甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维, 甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的比率为甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维=1:0.5~20。

[0016] [3]如[1]所述的悬浮培养用培养基组合物, 其中, 培养基组合物包含甲壳质纳米纤维及多糖类, 多糖类选自由甲基纤维素、脱乙酰基结冷胶、及海藻酸钠组成的组。

[0017] [4]如[1]~[3]中任一项所述的悬浮培养用培养基组合物, 其中, 粘附性细胞为在悬浮培养下自体凝集的粘附性细胞。

[0018] [5]如[1]~[4]中任一项所述的悬浮培养用培养基组合物, 其中, 粘附性细胞为干细胞。

[0019] [6]如[5]所述的悬浮培养用培养基组合物, 其中, 干细胞为间充质干细胞。

[0020] [7]如[5]或[6]所述的悬浮培养用培养基组合物, 其中, 悬浮培养用于干细胞的增殖, 且用于维持干细胞的多能性及迁移性。

[0021] [8]粘附性细胞的培养方法, 其包括将粘附性细胞在下述培养基组合物中悬浮培养的步骤, 所述培养基组合物包含:

[0022] (1) 甲壳质纳米纤维; 及

[0023] (2) 壳聚糖纳米纤维或多糖类。

[0024] [9]如[8]所述的培养方法, 其中, 培养基组合物包含甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维, 培养基组合物中的甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的比率为甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维=1:0.5~20。

[0025] [10]如[8]所述的培养方法, 其中, 培养基组合物包含甲壳质纳米纤维及多糖类, 多糖类选自由甲基纤维素、脱乙酰基结冷胶、及海藻酸钠组成的组。

[0026] [11]如[8]~[10]中任一项所述的培养方法, 其中, 粘附性细胞为在悬浮培养下自体凝集的粘附性细胞。

[0027] [12]如[8]~[11]中任一项所述的培养方法, 其中, 粘附性细胞为干细胞。

[0028] [13]如[12]所述的培养方法, 其中, 干细胞为间充质干细胞。

[0029] [14]如[12]或[13]所述的培养方法, 其中, 悬浮培养用于干细胞的增殖, 且用于干细胞的多能性及迁移性的维持。

- [0030] [15]如[8]~[14]中任一项所述的培养方法,其还包括以下的步骤:
- [0031] 步骤(1)不进行使经悬浮培养的细胞从甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维或多糖类剥离的处理,进一步添加[1]~[7]中任一项所述的悬浮培养用培养基组合物;及
- [0032] (2)将步骤(1)中得到的混合物供于悬浮培养。
- [0033] [16]生产细胞分泌物的方法,其包括将粘附性细胞在下述培养基组合物中悬浮培养的步骤,所述培养基组合物包含:
- [0034] (1)甲壳质纳米纤维;及
- [0035] (2)壳聚糖纳米纤维或多糖类。
- [0036] [17]如[16]所述的方法,其中,培养基组合物包含甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维,培养基组合物中的甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的比率为甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维=1:0.5~20。
- [0037] [18]如[16]所述的方法,其中,培养基组合物包含甲壳质纳米纤维及多糖类,多糖类选自自由甲基纤维素、脱乙酰基结冷胶、及海藻酸钠组成的组。
- [0038] [19]如[16]~[18]中任一项所述的方法,其中,粘附性细胞为在悬浮培养下自体凝集的粘附性细胞。
- [0039] [20]如[16]~[19]中任一项所述的方法,其中,粘附性细胞为干细胞。
- [0040] [21]如[20]所述的方法,其中,干细胞为间充质干细胞。
- [0041] [22]如[16]~[21]中任一项所述的方法,其中,培养基组合物中的血清的浓度为2%以下。
- [0042] [23]如[16]~[22]中任一项所述的方法,其中,细胞分泌物为选自由低分子化合物、蛋白质、核酸、及细胞分泌小泡组成的组中的至少一者。
- [0043] [24]粘附性细胞的悬浮培养用培养基组合物,其包含具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖纳米纤维,其中,所述特定的乙酰化度为5~70%。
- [0044] [25]如[24]所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,培养基组合物中的具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖纳米纤维的浓度为0.0001~0.2%(w/v)。
- [0045] [26]如[24]或[25]所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,粘附性细胞为在悬浮培养下自体凝集的粘附性细胞。
- [0046] [27]如[24]~[26]中任一项所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,粘附性细胞为干细胞。
- [0047] [28]如[27]所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,干细胞为间充质干细胞。
- [0048] [29]如[27]或[28]所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,悬浮培养用于干细胞的增殖,且用于干细胞的多能性及迁移性的维持。
- [0049] [30]粘附性细胞的培养方法,其包括将粘附性细胞在包含具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖纳米纤维的培养基组合物中悬浮培养的步骤,其中,所述特定的乙酰化度为5~70%。
- [0050] [31]如[30]所述的培养方法,其中,培养基组合物中的具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖纳米纤维的浓度为0.0001~0.2%(w/v)。
- [0051] [32]如[30]或[31]所述的培养方法,其中,粘附性细胞为在悬浮培养下自体凝集

的粘附性细胞。

[0052] [33]如[30]~[32]中任一项所述的培养方法,其中,粘附性细胞为干细胞。

[0053] [34]如[33]所述的培养方法,其中,干细胞为间充质干细胞。

[0054] [35]如[33]或[34]所述的培养方法,其中,悬浮培养用于干细胞的增殖,且用于干细胞的多能性及迁移性的维持。

[0055] [36]如[30]~[35]中任一项所述的培养方法,其还包括以下的步骤:

[0056] 步骤(1)不进行使经悬浮培养的细胞从具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖纳米纤维剥离的处理,进一步添加[24]~[29]中任一项所述的悬浮培养用培养基组合物;及

[0057] 步骤(2)将步骤(1)中得到的混合物供于悬浮培养。

[0058] [37]用于生产细胞分泌物的方法,其包括将粘附性细胞在包含具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖纳米纤维的培养基组合物中悬浮培养的步骤,其中,纳米纤维的所述特定的乙酰化度为5~70%。

[0059] [38]如[37]所述的方法,其中,培养基组合物中的具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖纳米纤维的浓度为0.0001~0.2%(w/v)。

[0060] [39]如[37]或[38]所述的方法,其中,粘附性细胞为在悬浮培养下自体凝集的粘附性细胞。

[0061] [40]如[37]~[39]中任一项所述的方法,其中,粘附性细胞为干细胞。

[0062] [41]如[40]所述的方法,其中,干细胞为间充质干细胞。

[0063] [42]如[37]~[41]中任一项所述的方法,其中,培养基组合物中的血清的浓度为2%以下。

[0064] [43]如[37]~[42]中任一项所述的方法,其中,细胞分泌物为选自由低分子化合物、蛋白质、核酸、及细胞分泌小泡组成的组中的至少一者。

[0065] 另外,一个方式中,本发明如下所述。

[0066] [1']粘附性细胞的悬浮培养用培养基组合物,其包含甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维。

[0067] [2']如[1']所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的比率为甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维=1:0.5~20。

[0068] [3']如[1']或[2']所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,粘附性细胞为干细胞。

[0069] [4']如[3']所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,悬浮培养用于干细胞的增殖,且用于干细胞的多能性及迁移性的维持。

[0070] [5']如[4']所述的悬浮培养用培养基组合物,其中,干细胞为间充质干细胞。

[0071] [6']粘附性细胞的培养方法,其包括将粘附性细胞在包含甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物中悬浮培养的步骤。

[0072] [7']如[6']所述的培养方法,其中,培养基组合物中的甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的比率为甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维=1:0.5~20。

[0073] [8']如[6']或[7']所述的培养方法,其中,粘附性细胞为干细胞。

[0074] [9']如[8']所述的培养方法,其中,悬浮培养用于干细胞的增殖,且用于干细胞的多能性及迁移性的维持。

[0075] [10']如[9']所述的培养方法,其中,干细胞为间充质干细胞。

[0076] [11']如[6']~[10']中任一项所述的培养方法,其还包括以下的步骤:

[0077] 步骤(1)不进行使经悬浮培养的细胞从甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维剥离的处理,进一步添加[1']~[5']中任一项所述的悬浮培养用培养基组合物;及

[0078] 步骤(2)将步骤(1)中得到的混合物供于悬浮培养。

[0079] [12']用于生产细胞分泌物的方法,其包括将粘附性细胞在包含甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物中悬浮培养的步骤。

[0080] [13']如[12']所述的方法,其中,培养基组合物中的甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的比率为甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维=1:0.5~20。

[0081] [14']如[12']或[13']所述的方法,其中,培养基组合物中的血清的浓度为2%以下。

[0082] [15']如[12']~[14']中任一项所述的方法,其中,粘附性细胞为间充质干细胞。

[0083] [16']如[12']~[15']中任一项所述的方法,其中,细胞分泌物为选自由低分子化合物、蛋白质、核酸、及细胞分泌小泡组成的组中的至少一者。

[0084] 发明效果

[0085] 根据本发明,通过将粘附性细胞在粘附于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下进行培养,能够无需存在引起细胞损伤、功能丧失的风险的振荡、旋转等操作而在静置形成的状态下悬浮培养。另外,利用本发明所培养的粘附性细胞为干细胞的情况下,能够高效地制备将作为干细胞的特性(例如,间充质干细胞中的分化能力、迁移·归巢能力等)维持在高水平的高品质干细胞。此外,根据本发明,不进行使用胰蛋白酶等蛋白水解酶的、将载体与粘附于载体的细胞剥离的操作,仅通过利用吹吸等的缓慢搅拌和补加新鲜的培养基,即能够简单地实施培养规模的扩大。结果,还能够高效地生产有用的细胞分泌物。

附图说明

[0086] [图1]图1为示出使用添加了试样1(甲壳质纳米纤维)、试样6(甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的混合物)、试样14(通过同时解纤制备的甲壳质/壳聚糖纳米纤维)、或试样15(N-乙酰基氨基葡萄糖量调节纳米纤维(N-乙酰基氨基葡萄糖量:50%))的培养基组合物将HEK293-IFN β 细胞进行21天悬浮培养时的、经时性的活细胞数量的图。各试样的4根条形图(bar graph)自左起分别表示第0天、第7天、第14天、第21天的时间点时的活细胞数量。

[0087] [图2]图2为示出使用添加了各纳米纤维的培养基组合物悬浮培养HEK293-IFN β 细胞时的、细胞的球体状态(第8天)的照片。

[0088] [图3]图3为示出使用添加了各纳米纤维的培养基组合物悬浮培养HEK293-IFN β 细胞时的、细胞的球体状态(第15天)的照片。

[0089] [图4]图4为示出使用添加了各纳米纤维的培养基组合物悬浮培养HEK293-IFN β 细胞时的、细胞的球体状态(第21天)的照片。

具体实施方式

[0090] 以下,对本发明进行详细说明。

[0091] 1.粘附性细胞的悬浮培养用培养基组合物

[0092] 本发明提供包含(1)甲壳质纳米纤维;及(2)壳聚糖纳米纤维或多糖类的粘附性细胞的悬浮培养用培养基组合物(以下有时称为“本发明的培养基组合物”)。本发明的培养基组合物通过含有甲壳质纳米纤维以及壳聚糖纳米纤维或多糖类,从而能够在不进行搅拌、振荡等操作的情况下悬浮培养粘附性细胞。

[0093] 本发明中使用的粘附性细胞是指存活、增殖需要容器壁等支承物的细胞。

[0094] 本发明中,作为使用的粘附性细胞,没有特别限定,可举出例如干细胞、祖细胞、成体非干细胞、原代培养细胞、细胞株、癌细胞等。所谓干细胞,是兼具自体自身复制能力和分化为其他多个系统的细胞的能力的细胞。作为粘附性的干细胞的例子,不限于以下,可举出例如间充质干细胞、神经干细胞、造血干细胞、肝干细胞、胰脏干细胞、肌干细胞、生殖干细胞、肠干细胞、癌症干细胞、毛囊干细胞等成体干细胞等。所谓间充质干细胞,是指具有向骨细胞、软骨细胞及脂肪细胞中的全部或几种分化的能力的干细胞。间充质干细胞在骨髓、末梢血、脐带血、脂肪组织等组织中以低频率存在,可使用已知的方法从这些组织中分离。所谓祖细胞,是指处于从上述干细胞分化为特定的体细胞、生殖细胞的中途阶段的细胞。作为粘附性的祖细胞的例子,不限于以下,可举出例如前体脂肪细胞、前体心肌细胞、前体内皮细胞、神经祖细胞、肝祖细胞、胰脏祖细胞、肾脏祖细胞等。作为粘附性的成体非干细胞的例子,不限于以下,包括例如成纤维细胞、骨细胞、骨周细胞、角质形成细胞、脂肪细胞、间质细胞、上皮细胞、表皮细胞、内皮细胞、血管内皮细胞、肝实质细胞、软骨细胞、卵丘细胞、神经系统细胞、神经胶质细胞、神经元、少突胶质细胞、小胶质细胞、星形胶质细胞、心脏细胞、食道细胞、肌肉细胞(例如平滑肌细胞或骨骼肌细胞)、胰脏β细胞、黑色素细胞等。所谓原代培养细胞,是指处于将从生物体分离的细胞、组织接种、到进行第一次传代之前的培养的状态的细胞。原代培养细胞可以从例如皮肤、肾脏、脾脏、肾上腺、肝脏、肺、卵巢、胰脏、子宫、胃、结肠、小肠、大肠、脾脏、膀胱、前列腺、精巢、胸腺、肌肉、结缔组织、骨、软骨、血管组织、血液、心脏、眼、脑或神经组织等任意的组织采集的细胞。所谓细胞株,是指通过在生物体外的人工操作而获得了无限的增殖能力的细胞。本发明中使用的粘附性细胞优选为干细胞或祖细胞,更优选为间充质干细胞。

[0095] 本发明中使用的粘附性细胞的来源没有特别限定,可以是来自动物及植物中的任何的细胞。作为动物,没有限定,可举出例如鱼类、两栖动物类、爬行动物类、鸟类、泛甲壳动物类、六足类(Hexapoda)、哺乳类等,优选为哺乳类。作为哺乳类的例子,没有限定,可举出大鼠、小鼠、兔、豚鼠、松鼠、仓鼠、田鼠、鸭嘴兽、海豚、鲸、犬、猫、山羊、牛、马、绵羊、猪、大象、普通狨、松鼠猴、猕猴、黑猩猩、人等。作为植物,只要所采集的细胞可进行液体培养即可,没有特别限定。可举出例如生产生药类(例如皂角苷、生物碱类、小檗碱、东莨菪苷、植物甾醇等)的植物(例如药用人参、长春花、莨菪、黄连、颠茄等);生产用作化妆品·食品原料的色素、多糖体(例如花青色素、红花色素、茜草色素、藏红花色素、黄酮类等)的植物(例如蓝莓、红花、茜草、藏红花等);或产生医药品原材料的植物等,但不限于此。本发明中优选使用哺乳类的粘附性细胞。

[0096] 一个方式中,粘附性细胞可以是在悬浮培养下自体凝集的粘附性细胞。在悬浮培养下自体凝集的粘附性细胞包括在悬浮培养下形成球体的细胞。作为在悬浮培养下自体凝集的粘附性细胞,例如,作为体细胞,可举出HEK293细胞、HeLa细胞、A549细胞等,作为干细胞,可举出间充质干细胞、前体脂肪细胞、iPS细胞等。本发明的一个方式中,对于在悬浮培

养下自体凝集的粘附性细胞而言,作为体细胞优选HEK293细胞、HeLa细胞,作为干细胞优选间充质干细胞、iPS细胞。

[0097] 本发明中使用的甲壳质纳米纤维以及壳聚糖纳米纤维或多糖类分散于液体培养基中,显示出使附着于该纳米纤维或多糖类的粘附性细胞悬浮于该液体培养基中的效果。

[0098] 本发明中使用的甲壳质纳米纤维以及壳聚糖纳米纤维或多糖类具有下述效果:在与液体培养基混合时,该纳米纤维在保持一次纤维直径的同时分散于该液体中,不会实质性地提高该液体的粘度,实质性地保持附着于纳米纤维的细胞,防止其沉降而粘附于培养容器。所谓不会实质性地提高液体的粘度,表示液体的粘度不超过 $8\text{mPa}\cdot\text{s}$ 。此时的该液体的粘度(即,下述的本发明的培养基组合物的粘度)为 $8\text{mPa}\cdot\text{s}$ 以下,优选为 $4\text{mPa}\cdot\text{s}$ 以下,更优选为 $2\text{mPa}\cdot\text{s}$ 以下。包含甲壳质纳米纤维以及壳聚糖纳米纤维或多糖类的液体的粘度可例如在 25°C 条件下使用音叉振动式粘度测定(SV-1A,A&D Company Ltd.)进行评价。

[0099] 本发明中使用的甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维是由作为非水溶性多糖类的甲壳质及壳聚糖(即,甲壳质类物质)构成的。所谓糖类,表示单糖类(例如三碳糖、四碳糖、五碳糖、六碳糖、七碳糖等)以10个以上聚合而成的糖聚合物。

[0100] 所谓甲壳质类物质,是指选自由甲壳质及壳聚糖组成的组中的1种以上糖类。构成甲壳质及壳聚糖的主要的糖单元分别为N-乙酰氨基葡萄糖及氨基葡萄糖,一般而言,N-乙酰氨基葡萄糖的含量多、对于酸性水溶液为难溶性的甲壳质类物质为甲壳质,氨基葡萄糖的含量多、对于酸性水溶液为可溶性的甲壳质类物质为壳聚糖。本说明书中,出于方便起见,有时将N-乙酰氨基葡萄糖在构成糖中所占的比例为50%以上的称为甲壳质,将小于50%的称为壳聚糖。一个方式中,N-乙酰基氨基葡萄糖在构成甲壳质的糖单元中所占的比例可以是80%以上、90%以上、98%以上、或100%。另外,一个方式中,N-乙酰基氨基葡萄糖在构成壳聚糖的糖单元中所占的比例可以是40%以下、30%以下、20%以下、或10%以下。

[0101] 作为甲壳质的原料,可使用例如虾、蟹、昆虫、贝、蘑菇等多种生物资源。本发明中使用的甲壳质可以是来源于蟹壳、虾壳的甲壳质等具有 α 型晶体结构的甲壳质,也可以是来源于海螵蛸(cuttlebone)的甲壳质等具有 β 型晶体结构的甲壳质。蟹、虾的外壳被作为产业废弃物处理的情况较多,从容易获得且有效利用的观点考虑,其作为原料是优选的,但为了除去作为杂质包含的蛋白质、灰分等而需要脱蛋白工序及脱灰工序。因此,本发明中,优选使用已经施以脱基质处理的纯化甲壳质。纯化甲壳质已有贩售。作为本发明中使用的甲壳质纳米纤维的原料,可以是具有 α 型及 β 型中的任一种晶体结构的甲壳质,优选 α 型甲壳质。

[0102] 另外,壳聚糖可通过将甲壳质在浓碱(例如浓NaOH水溶液等)中实施煮沸处理等进行脱乙酰化来制造。壳聚糖也可使用市售的壳聚糖。

[0103] 通过将上述的甲壳质及壳聚糖粉碎(有时也称为纳米纤维化或解纤),能够得到甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维。粉碎方法没有限定,为了微细化至实现符合本发明目的的纤维直径·纤维长度,优选高压均化器、磨床(石臼)、或者珠磨机等介质搅拌磨等能够得到强剪切力的方法。本发明中使用的甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的混合物可通过将分别解纤后的甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维混合来制备,也可通过将甲壳质粉末与壳聚糖粉末混合、将该混合物同时解纤来制备。

[0104] 其中,优选使用高压均化器进行微细化,期望使用例如日本特开2005-270891号公报、日本专利第5232976号中公开的那样的湿式粉碎法进行微细化(粉碎化)。具体而言,可

使用通过将原料分散而成的分散液从一对喷嘴以高压分别喷射并使其碰撞来将原料粉碎的装置、例如Starburst System (Sugino Machine Limited制的高压粉碎装置)、NanoVater (吉田机械兴业(株)的高压粉碎装置)来实施。

[0105] 使用前述的高压均化器将原料微细化(粉碎化)时,微细化、均质化的程度取决于向高压均化器的超高压腔室压送的压力、通过超高压腔室的次数(处理次数)、及水分散液中的原料的浓度。压送压力(处理压力)没有特别限定,通常为50~250MPa,优选为100~200MPa。

[0106] 另外,微细化处理时的水分散液中的原料的浓度没有特别限定,通常为0.1质量%~30质量%,优选为1质量%~10质量%。微细化(粉碎化)的处理次数没有特别限定,取决于前述水分散液中的原料的浓度,原料的浓度为0.1~1质量%时,处理次数为10~100次左右充分地微细化,但为1~10质量%时,存在处理次数需要为10~1000次左右的情况。

[0107] 前述微细化处理时的水分散液的粘度没有特别限定,例如, α 甲壳质的情况下,该水分散液的粘度的范围为1~100mPa·S,优选为1~85mPa·S(利用25℃条件下的音叉振动式粘度测定(SV-1A、A&D Company Ltd.))。另外,壳聚糖的情况下,该水分散液的粘度的范围为0.7~30mPa·S,优选为0.7~10mPa·S(利用25℃条件下的音叉振动式粘度测定(SV-1A、A&D Company Ltd.))。另外,微细化处理时的水分散液中的甲壳质或壳聚糖的粒径也没有特别限定,例如, α 甲壳质的情况下,该水分散液中的 α 甲壳质的平均粒径的范围为0.5~200 μ m,优选为30~150 μ m(利用激光衍射/散射式粒径分布测定装置LA-960(堀场制作所))。另外,壳聚糖的情况下,该水分散液中的壳聚糖的平均粒径的范围为0.5~300 μ m,优选为50~100 μ m(利用激光衍射/散射式粒径分布测定装置LA-960(堀场制作所))。

[0108] 关于纳米纤维的制备方法,记载于W02015/111686A1等。

[0109] 本发明的培养基组合中可添加多糖类。本说明书中,所谓多糖类,表示单糖类(例如三碳糖、四碳糖、五碳糖、六碳糖、七碳糖等)以10个以上聚合而成的糖聚合物。

[0110] 作为非水溶性多糖类,可举出纤维素、半纤维素等纤维素类;甲壳质、壳聚糖等甲壳质类物质等,但不限于这些。

[0111] 作为水溶性多糖类,可举出具有阴离子性的官能团的酸性多糖类。作为具有阴离子性的官能团的酸性多糖类,没有特别限定,例如,可举出在结构中具有糖醛酸(例如,葡糖醛酸、艾杜糖醛酸、半乳糖醛酸、甘露糖醛酸)的多糖类;在结构中具有硫酸或磷酸的多糖类、或者具有这两种结构的多糖类等。更具体而言,可示例由选自透明质酸、结冷胶、脱酰基结冷胶、鼠李聚糖胶(rhamsan gum)、迪特胶(Diutan gum)、黄原胶(xanthan gum)、卡拉胶、汉生胶(zanthan gum)、己糖醛酸(hexuronic acid)、岩藻多糖(fucoidan)、果胶、果胶酸(pectin acid)、果胶酯酸(pectinic acid)、硫酸乙酰肝素(heparan sulfate)、肝素、硫酸类肝素(heparitin sulfate)、硫酸角质(kerato sulfate)、硫酸软骨素(chondroitin sulfate)、硫酸皮肤素(dermatan sulfate)、硫酸鼠李聚糖(rhamnan sulfate)、海藻酸及它们的盐中的1种或者2种以上构成的物质。

[0112] 作为此处的盐,可以举出:锂、钠、钾这样的碱金属的盐;钙、钡、镁这样的碱土类金属的盐;铝、锌、铜、铁等的盐;铵盐;四乙基铵、四丁基铵、甲基三丁基铵、十六烷基三甲基铵、苄基甲基己基癸基铵、胆碱等季铵盐;与吡啶、三乙胺、二异丙胺、乙醇胺、二乙醇胺、三

羟甲基氨基甲烷、葡甲胺、普鲁卡因、氯普鲁卡因等有机胺形成的盐；与甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸等氨基酸形成的盐等。

[0113] 一个方式中,作为多糖类,可优选使用甲基纤维素、脱酰基结冷胶、海藻酸、黄原酸胶、角叉菜胶、迪特胶、刺槐豆胶、罗望子胶、果胶、及羧甲基纤维素或它们的盐。

[0114] 为了在本发明的培养基组合物中起到所期望的效果,甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的配合比例可以是重要的。首先,将甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维以按比率(重量)计甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维=1:0.5~20(优选甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维=1:0.5~10、更优选甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维=1:0.7~9、进一步优选甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维=1:1~8、更进一步优选甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维=1:2~7、特别优选甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维=1:3~6)掺混(blend)。可将得到的甲壳质纳米纤维/壳聚糖纳米纤维的混合物以培养基组合物中所含的总纳米纤维(甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维)的浓度成为通常0.0001~0.2% (w/v)、优选0.0005~0.1% (w/v)、进一步优选0.001~0.05% (w/v)、特别优选0.006~0.05% (w/v)的方式配合至液体培养基中。或者,也可通过向液体培养基中分别地添加所需量的甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维、充分搅拌来制备本发明的培养基组合物。一个方式中,对于本发明的培养基组合物而言,关于纳米纤维的浓度,满足以下的条件:

[0115] (1) 培养基组合物中所含的总纳米纤维(甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维)的浓度为0.0001~0.2% (w/v),且该培养基组合物中所含的甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维的重量比为1:0.5~20(优选1:0.5~10、1:0.7~9、1:1~8、1:2~7、或1:3~6);

[0116] (2) 培养基组合物中所含的总纳米纤维(甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维)的浓度为0.0005~0.1% (w/v),且该培养基组合物中所含的甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维的重量比为1:0.5~20(优选1:0.5~10、1:0.7~9、1:1~8、1:2~7、或1:3~6);

[0117] (3) 培养基组合物中所含的总纳米纤维(甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维)的浓度为0.001~0.05% (w/v),且该培养基组合物中所含的甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维的重量比为1:0.5~20(优选1:0.5~10、1:0.7~9、1:1~8、1:2~7、或1:3~6);或者

[0118] (4) 培养基组合物中所含的总纳米纤维(甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维)的浓度为0.006~0.05% (w/v),且该培养基组合物中所含的甲壳质纳米纤维:壳聚糖纳米纤维的重量比为1:0.5~20(优选1:0.5~10、1:0.7~9、1:1~8、1:2~7、或1:3~6)。

[0119] 另外,使用甲壳质纳米纤维和多糖类的情况下,可示例以下的浓度,但不限于这些:

[0120] 甲壳质纳米纤维:甲基纤维素=0.0005~0.1% (w/v):0.0004~0.4(w/v)(更优选0.001~0.05% (w/v):0.001~0.04% (w/v))

[0121] 甲壳质纳米纤维:脱酰基结冷胶=0.0005~0.1% (w/v):0.0001~0.1(w/v)(更优选0.001~0.05% (w/v):0.001~0.01% (w/v))

[0122] 甲壳质纳米纤维:海藻酸钠=0.0005~0.1% (w/v):0.0004~0.4(w/v)(更优选0.001~0.05% (w/v):0.001~0.04% (w/v))

[0123] 甲壳质纳米纤维:罗望子胶=0.0005~0.1% (w/v):0.0004~0.4% (w/v)(更优选0.001~0.05% (w/v):0.001~0.04% (w/v))

[0124] 甲壳质纳米纤维:果胶=0.0005~0.1% (w/v):0.0004~0.4% (w/v)(更优选

0.001~0.05% (w/v) : 0.001~0.04% (w/v))

[0125] 甲壳质纳米纤维:羧甲基纤维素=0.0005~0.1% (w/v) : 0.0004~0.4% (w/v) (更优选0.001~0.05% (w/v) : 0.001~0.04% (w/v))

[0126] 另外,虽不希望受到理论的限制,但可以认为,甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的配合比例对于得到本发明的所期望的效果是重要的这一事实暗示了甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维中的经乙酰化的氨基葡萄糖的总量是重要的。因此,本发明的一个方式中,作为使用甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维这2种纳米纤维的混合物的替代,也可使用从具有与这2种纳米纤维混合物中的乙酰基数对应的乙酰基数量的、乙酰化度经过优化的单一的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖制备的纳米纤维(以下有时称为“N-乙酰基氨基葡萄糖量调节纳米纤维”等)。因此,本发明在一个方式中也提供包含具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖纳米纤维的、粘附性细胞的悬浮培养用培养基。作为该聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖的特定的乙酰化度,可以是通常为5~70%,优选为9~70%、更优选为11~55%,进一步优选为14~50%,进一步优选为16~50%、特别优选为22~33%,但只要能得到所期望的效果则不限于这些。

[0127] 上述那样的具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖可通过自身已知的方法来制造。作为一例,可举出将乙酰化的比例较高的(例如90%以上)甲壳质在碱(例如浓NaOH水溶液等)中实施煮沸处理等进行脱乙酰化来制造具有所期望的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖的方法,但不限于此。

[0128] 通过将如此得到的具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖利用上述的方法进行微细化(有时也称为纳米纤维化或解纤),从而能够制备具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖纳米纤维。

[0129] 本发明的一个方式中,可以在液体培养基组合物中添加N-乙酰基氨基葡萄糖量调节纳米纤维。对于N-乙酰基氨基葡萄糖量调节纳米纤维在液体培养基组合物中的浓度而言,可以以培养基组合物中所含的该纳米纤维的浓度成为通常0.0001~0.2% (w/v)、优选0.0005~0.1% (w/v)、进一步优选0.001~0.1% (w/v)、特别优选0.006~0.06% (w/v)的方式添加至液体培养基中,但只要能得到所期望的效果则不限于这些。

[0130] 本发明的培养基组合物中所含的培养基可根据使用的粘附性细胞的种类等而适当选择,例如,以哺乳类的粘附性细胞的培养为目标的情况下,可使用通常用于哺乳类细胞的培养的培养基作为本发明的培养基组合物所含的培养基。作为哺乳类细胞用的培养基,可举出例如杜氏改良Eagle培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM)、Ham F12培养基(Ham's Nutrient Mixture F12)、DMEM/F12培养基、McCoy 5A培养基(McCoy's 5A medium)、Eagle MEM培养基(Eagle's Minimum Essential Medium; EMEM)、αMEM培养基(alpha Modified Eagles's Minimum Essential Medium; αMEM)、MEM培养基(Minimum Essential Medium)、RPMI1640培养基、伊思柯夫改良杜氏培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium; IMDM)、MCDB131培养基、William培养基E、IPL41培养基、Fischer's培养基、StemPro34(Invitrogen公司制)、X-VIVO 10(Cambrex公司制)、X-VIVO 15(Cambrex公司制)、HPGM(Cambrex公司制)、StemSpan H3000(STEMCELL Technologies公司制)、StemSpanSFEM(STEMCELL Technologies公司制)、StemlineII(Sigma Aldrich公司制)、QBSF-60(Qualitybiological公司制)、StemProhESCSFM(Invitrogen公司制)、mTeSR1或

mTeSR2培养基 (STEMCELL Technologies公司制)、Sf-900II (Invitrogen公司制)、Opti-Pro (Invitrogen公司制)等。

[0131] 本领域技术人员可以根据目的在上述培养基中自由地添加钠、钾、钙、镁、磷、氯、各种氨基酸、各种维生素、抗生素、血清、脂肪酸、糖等。在培养哺乳类细胞时,本领域技术人员也可根据目的组合添加一种以上的其他化学成分或生物体成分。作为可添加至哺乳类细胞用的培养基的成分,可举出胎牛血清、人血清、马血清、胰岛素、转铁蛋白、乳铁蛋白、胆固醇、乙醇胺、亚硒酸钠、硫代甘油、2-巯基乙醇、牛血清白蛋白、丙酮酸钠、聚乙二醇、各种维生素、各种氨基酸、琼脂、琼脂糖、胶原蛋白、甲基纤维素、各种细胞因子、各种激素、各种生长因子、各种胞外基质、各种细胞粘附分子等。作为可添加至培养基中的细胞因子,可举出例如白细胞介素-1 (IL-1)、白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-3 (IL-3)、白细胞介素-4 (IL-4)、白细胞介素-5 (IL-5)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-7 (IL-7)、白细胞介素-8 (IL-8)、白细胞介素-9 (IL-9)、白细胞介素-10 (IL-10)、白细胞介素-11 (IL-11)、白细胞介素-12 (IL-12)、白细胞介素-13 (IL-13)、白细胞介素-14 (IL-14)、白细胞介素-15 (IL-15)、白细胞介素-18 (IL-18)、白细胞介素-21 (IL-21)、干扰素 α (IFN- α)、干扰素 β (IFN- β)、干扰素 γ (IFN- γ)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、单核细胞集落刺激因子 (M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、干细胞因子 (SCF)、f1k2/f1t3配体 (FL)、白血病细胞抑制因子 (LIF)、制瘤素M (OM)、促红细胞生成素 (EPO)、促血小板生成素 (TPO)等,但不限于这些。

[0132] 作为可添加至培养基中的激素,可举出褪黑素、5-羟色胺、甲状腺素、三碘甲状腺原氨酸、肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺、抗穆勒氏管激素、脂联素、促肾上腺皮质激素、血管紧张素原及血管紧张素、抗利尿激素、心房钠尿肽、降钙素、缩胆囊素、促肾上腺皮质激素释放激素、促红细胞生成素、促卵泡激素、胃泌素、胃饥饿素 (ghrelin)、胰高血糖素、促性腺激素释放激素、生长激素释放激素、人绒毛膜促性腺激素、人胎盘催乳素、生长激素、抑制素、胰岛素、胰岛素样生长因子、瘦素、促黄体生成素、黑色素细胞刺激素、催产素、甲状旁腺激素、催乳素、促胰液素、促生长素抑制素、血小板生成素 (thrombopoietin)、促甲状腺激素、促甲状腺激素释放激素、皮质醇、醛固酮、睾酮、脱氢表雄酮、雄烯二酮、双氢睾酮、雌二醇、雌酮、雌三醇、孕酮、骨化三醇、骨化二醇、前列腺素、白三烯、前列环素、血栓素、催乳激素释放激素、促脂素 (lipotropin)、脑尿钠肽、神经肽Y、组胺、内皮素、胰多肽、肾素及脑啡肽,但不限于这些。

[0133] 作为可添加至培养基的生长因子,可举出转化生长因子- α (TGF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)、巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)、上皮细胞生长因子 (EGF)、成纤维细胞生长因子-1、2、3、4、5、6、7、8、或9 (FGF-1、2、3、4、5、6、7、8、9)、神经细胞生长因子 (NGF)、肝细胞生长因子 (HGF)、白血病抑制因子 (LIF)、蛋白酶连接蛋白I、蛋白酶连接蛋白II、血小板源生长因子 (PDGF)、胆碱能分化因子 (CDF)、趋化因子、Notch配体 (Delta1等)、Wnt蛋白、血管生成素样蛋白2、3、5或7 (Angpt2、3、5、7)、胰岛素样生长因子 (IGF)、胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBP)、多效蛋白 (Pleiotrophin)等,但不限于这些。

[0134] 另外,也可以添加通过基因重组技术人工改变这些细胞因子、生长因子的氨基酸序列而得到的物质。作为其例子,可举出IL-6/可溶性IL-6受体复合体或者Hyper IL-6 (IL-6与可溶性IL-6受体的融合蛋白)等。

[0135] 作为各种胞外基质、各种细胞粘附分子的例子,可举出胶原蛋白I至XIX、纤连蛋

白、层粘连蛋白-1至12、Nitogen、腱生蛋白、血小板反应蛋白、血管性血友病(von Willebrand)因子、骨桥蛋白、纤维蛋白原、各种弹性蛋白、各种蛋白多糖、各种钙粘蛋白、桥粒糖蛋白(desmocollin)、桥粒芯糖蛋白(desmogleins)、各种整合素、E-选择蛋白、P-选择蛋白、L-选择蛋白、免疫球蛋白超家族、基质胶、多聚D-赖氨酸、多聚L-赖氨酸、甲壳质、壳聚糖、琼脂糖、透明质酸、海藻酸凝胶、各种水凝胶、以及它们的切割片段等。

[0136] 作为可添加至培养基中的抗生素的例子,可举出磺胺类制剂、青霉素、非奈西林、甲氧西林、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、氟氯西林、萘夫西林、氨苄青霉素、青霉素、阿莫西林、环青霉素、羧苄青霉素、替卡西林、哌拉西林、阿洛西林、美洛西林、美西林、阿德诺西林(andinocillin)、头孢菌素及其衍生物、噁唑酸、氨基沙星、替马沙星、萘啶酸、吡咯米酸、环丙沙星、西诺沙星、诺氟沙星、甲氟哌酸、Rosaxacin、氧氟沙星、依诺沙星、吡哌酸、舒巴坦、克拉维酸、 β -溴青霉烷酸(β -bromopenicillanic acid)、 β -氯青霉烷酸(β -chloropenicillanic acid)、6-乙酰基亚甲基-青霉烷酸、头孢噁唑、舒他西林、Adinoshirin及舒巴坦的甲醛合物·完全无水物酯(sulbactam formaldehyde hydrate ester)、他佐巴坦、氨曲南(aztreonam)、磺胺泽辛(sulfazethin)、异磺胺泽辛(isosulfazethin)、Norcardicin、苯乙酰氨基磷酸甲酯(phenylacetamidophosphonic acid methyl)、氯四环素、土霉素、四环素、地美环素、多西环素、美他环素、以及米诺环素。

[0137] 需要说明的是,如上所述,可以在本发明的培养基组合中添加血清及/或血清替代物,而使用本发明的培养基组合时,即使将培养基中的血清及/或血清替代物设为比通常使用的浓度(例如10重量%)更低的浓度,仍然能够实现细胞的维持及/或扩大。添加至本发明的培养基组合中的血清的浓度根据细胞的种类、培养条件、培养目的等而适宜设定即可,作为一个方式,本发明的培养基组合中的血清(及/或血清替代物)的浓度可设为15重量%以下、10重量%以下、9重量%以下、8重量%以下、7重量%以下、6重量%以下、5重量%以下、4重量%以下、3重量%以下、2重量%以下、1重量%以下、0.9重量%以下、0.8重量%以下、0.7重量%以下、0.6重量%以下、0.5重量%以下、0.4重量%以下、或0.3重量%以下。需要说明的是,血清的浓度可以在培养期间设为恒定的浓度,也可根据需要而在更换培养基时等增减浓度。

[0138] 一个方式中,细胞培养的目的为生产用于再生医疗的细胞分泌物等的情况下,有时为了降低血清风险而优选将本发明的培养基组合中的血清浓度设定为低水平。该方式中,本发明的培养基组合中的血清的浓度可设为例如2重量%以下、1重量%以下、0.9重量%以下、0.8重量%以下、0.7重量%以下、0.6重量%以下、0.5重量%以下、0.4重量%以下、或0.3重量%以下。

[0139] 另一个方式中,在低血清浓度下、使维持·扩大培养的细胞数量最大化的情况下,血清浓度可设为通常0.05~2.0重量%、优选0.1~2.0重量%、进一步优选0.2~2.0重量%、特别优选0.2~1.0重量%。

[0140] 另外,另一个方式中,作为使细胞分泌物的产量最大化的情况下的血清浓度的范围,可设为通常0.05~2.0重量%、优选0.1~1.5重量%、进一步优选0.2~0.9重量%、特别优选0.4~1.0重量%。

[0141] 需要说明的是,在低血清培养基中对细胞进行维持培养及/或扩大培养的时间根据细胞的种类、培养条件、或培养目的适宜设定即可,可设为例如1天以上、3天以上、5天以

上、7天以上、9天以上、11天以上、13天以上、15天以上、20天以上、25天以上、30天以上、40天以上、50天以上、60天以上、80天以上、或100天以上。

[0142] 一个方式中,培养时间可设为1~200天、1~100天、1~80天、1~60天、1~50天、1~40天、1~30天、1~25天、1~20天、1~15天、1~13天、1~11天、1~9天、1~7天、1~5天、或1~3天。一个更优选的方式中,培养时间可设为优选10~60天、更优选15~50天、进一步优选20天~50天、特别优选25天~40天。

[0143] 可以如下制造上述本发明的培养基组合物:以在使用该培养基组合物将粘附细胞供于悬浮培养时成为能够使该粘附性细胞悬浮(优选使其悬浮静置)的浓度的方式,将上述甲壳质纳米纤维以及壳聚糖纳米纤维或多糖类与合适的液体培养基混合。

[0144] 优选方式中,可通过将上述甲壳质纳米纤维以及壳聚糖纳米纤维或多糖类的水性溶剂中的分散液、与液体培养基混合来制备本发明的培养基组合物。该分散液可进行灭菌(高压釜、伽马射线灭菌等)。或者,也可在将该分散液与将粉末培养基溶解于水制成的液体培养基(培养基的水溶液)混合后,灭菌进行使用。该分散液和液体培养基的灭菌也可在混合前分别进行。作为水性溶剂的例子,可举出水、二甲基亚砜(DMSO)等,但不限于这些。作为水性溶剂,优选水。水性溶剂中可含有适当的缓冲剂、盐。上述纳米纤维的分散液可用于用于制备本发明的培养基组合物的培养基添加剂。

[0145] 混合比率没有特别限定,纳米纤维的分散液:液体培养基(培养基的水溶液)(体积比)通常为1:99~99:1,优选为10:90~90:10,更优选为20:80~80:20。

[0146] 本发明中,所谓细胞的悬浮,是指细胞未粘附于培养容器的状态(非粘附),与细胞是否沉降无关。此外,本发明中,将下述状态称为“悬浮静置”:对细胞进行培养时,在不伴有针对液体培养基组合物的来自外部的压力、振动或者该组合物中的振荡、旋转操作等的情况下,细胞在该液体培养基组合物中分散且处于悬浮状态;将在该状态下培养细胞及/或组织的情况称为“悬浮静置培养”。作为在“悬浮静置”中能够悬浮的时间,为至少5分钟以上,优选为1小时以上、24小时以上、48小时以上、6天以上、21天以上,但只要保持悬浮状态则不限于这些时间。

[0147] 优选方式中,本发明的培养基组合物可于能够培养细胞的温度范围(例如,0~40℃)中的至少1点实现细胞的悬浮静置。本发明的培养基组合物优选于25~37℃的温度范围中的至少1点、最优选于37℃实现细胞的悬浮静置。

[0148] 通过将粘附性细胞在附着于甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维或多糖类的状态下进行培养,能够悬浮培养粘附性细胞。该悬浮培养可通过在上述本发明的培养基组合物中培养粘附性细胞来实施。甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维或多糖类显示出使附着于该纳米纤维或多糖类的细胞在培养基中悬浮的效果(优选使其悬浮静置的效果)。本发明的培养基组合物中,甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维或多糖类在既不溶解、也未附着于培养容器的情况下分散,因此,在该培养基组合物中培养粘附性细胞时,粘附性细胞附着于该纳米纤维或多糖类,悬浮于该培养基组合物中。基于该悬浮效果,能够较之单层培养增加每一定体积内的细胞数量而进行培养。另外,在以往的伴有旋转、振荡操作的悬浮培养中,针对细胞的剪切力发挥作用,因此,存在细胞的增殖率、回收率低、或者细胞的功能受损的情况,但通过使用本发明的培养基组合物,能够无需振荡等操作而将细胞在分散的状态下培养,因此,可期待不损失细胞功能、容易且大量地悬浮培养目标粘附性细胞。另外,在以往的含

有凝胶基材的培养基中悬浮培养细胞时,存在细胞的观察、回收困难、或回收时损害其功能的情况,但通过使用本发明的培养基组合物,可期待对悬浮培养的细胞在不损害其功能的情况下进行观察、回收。另外,以往的含有凝胶基材的培养基存在粘度高、培养基更换困难的情况,但本发明的培养基组合物由于为低粘度,因此可期待使用移液器、泵等容易地更换培养基。

[0149] 使用甲壳质纳米纤维以及壳聚糖纳米纤维或多糖类悬浮培养粘附性细胞情况下,向本发明的培养基组合物中添加另外制备的粘附性细胞,均匀地混合即可。这时的混合方法没有特别限定,可举出例如吹吸等采用手动进行的混合、使用磁力搅拌器、旋涡混合器(Vortex Mixer)、微孔板混合器、振荡机等设备的混合。混合后,可以在静置状态下培养得到的细胞悬浮液,也可根据需要一边旋转、振荡或者搅拌一边进行培养。其转速及频率可以根据本领域技术人员的目的适当地设定。例如,将粘附性细胞从传代培养回收,使用合适的细胞解离液分散至单一细胞或接近单一细胞的状态,将被分散的粘附性细胞悬浮于本发明的培养基组合物中,对其进行悬浮培养(优选悬浮静置培养)。

[0150] 对于培养细胞时的温度而言,为动物细胞时通常为25~39℃,优选为33~39℃(例如37℃)。对于CO₂浓度而言,通常在培养的气氛中,为4~10体积%,优选为4~6体积%。培养时间根据培养的目的适当设定即可。

[0151] 本发明的培养基组合物中的粘附性细胞的培养可使用通常用于细胞的培养的培养皿、烧瓶、塑料袋、Teflon(注册商标)袋、皿、陪替氏培养皿、组织培养用皿、多皿、微量板、微孔板、多板、多孔板、腔室载玻片、管、盘、培养袋、滚瓶等培养容器实施。期望这些培养容器为细胞低粘附性,从而附着于纳米纤维的粘附性细胞不向培养容器粘附。作为细胞低粘附性的培养容器,可使用培养容器的表面未基于提高与细胞的粘附性的目的进行人工处理(例如,利用细胞外基体等的包被处理)的培养容器,或者培养容器的表面基于降低与细胞的粘附性的目的进行了人工处理的培养容器。

[0152] 需要更换培养基时,在通过进行离心、过滤处理分离细胞后,将新鲜的培养基或本发明的培养基组合物添加至该细胞即可。或者,通过进行离心、过滤处理将细胞适当浓缩后,将新鲜的培养基或本发明的培养基组合物添加至该浓缩液即可。例如,离心时的重力加速度(G)为100G至400G,进行过滤处理时使用的过滤器的微孔的大小为10μm至100μm,但不限于此。

[0153] 粘附性细胞的培养可利用能够在机械控制下且于封闭环境中自动执行接种细胞、更换培养基、获取细胞图像、回收培养细胞、控制pH、温度、氧浓度等、同时可实现高密度培养的生物反应器、自动培养装置进行。

[0154] 将粘附性细胞在附着于甲壳质纳米纤维以及壳聚糖纳米纤维或多糖类的状态下进行悬浮培养时,由于可高效地增殖粘附性细胞,因此,该悬浮培养作为粘附性细胞的增殖方法是优异的。将粘附性细胞在附着于甲壳质纳米纤维以及壳聚糖纳米纤维或多糖类的状态下进行悬浮培养时,粘附性细胞并未仅局部存在于培养容器的底面,而是以三维性地扩展的方式分散,促进增殖。结果,增殖的细胞成为以葡萄串状连结于纳米纤维或多糖类上的状态。对于该增殖促进效果而言,只要在培养基组合物中包含对于使粘附性细胞悬浮(即,避免粘附性细胞向培养容器的粘附)而言充分的浓度的纳米纤维即可,并非必须实现悬浮静置(即,在不伴有来自外部的压力、振动、振荡、旋转操作等的情况下,细胞在液体培养基

组合物中均匀地分散且处于悬浮状态)。

[0155] 将粘附性细胞以附着于甲壳质纳米纤维以及壳聚糖纳米纤维或多糖类的状态进行悬浮培养、增殖该细胞的情况下,作为该悬浮培养中使用的本发明的培养基组合物中所含的培养基,可使用能够在维持该粘附性细胞的性状的同时使该细胞增殖的培养基。根据粘附性细胞的种类,本领域技术人员可适当选择该培养基。

[0156] 一个方式中,通过将哺乳动物的干细胞(例如间充质干细胞)在附着于甲壳质纳米纤维以及壳聚糖纳米纤维或多糖类的状态下进行悬浮培养,使该细胞增殖。通过该悬浮培养,能够在维持哺乳动物的干细胞(例如间充质干细胞)的分化能力、归巢·迁移能力的同时使其增殖。因此,使用本发明的培养基组合物时,能够制备高质量的干细胞。需要说明的是,干细胞是否维持了分化能力、迁移能力等特性可通过自身已知的方法来判别。简单而言,可通过基于mRNA水平及/或蛋白质量水平确定干细胞中的与未分化性有关的细胞标志物(例如OCT4基因、SOX2基因、NANOG基因等)、与迁移性有关的细胞标志物(例如CXCR4基因等)的表达量来容易地进行判别。

[0157] 将粘附性细胞在附着于甲壳质纳米纤维以及壳聚糖纳米纤维或多糖类的状态下进行悬浮培养的情况下,不需要从培养容器剥离细胞的操作,仅通过将新鲜的培养基或本发明的培养基组合物仅仅添加至该悬浮培养物、或者向新鲜的培养基或本发明的培养基组合物添加该悬浮培养物的全部或一部分,即能够将粘附性细胞传代。通过使用该传代培养方法,能够在不进行从培养容器剥离细胞的操作的情况下传代培养粘附性细胞。另外,通过使用该传代培养方法,能够在不进行从培养容器剥离细胞的操作的情况下,扩大粘附性细胞的培养规模。作为从培养容器剥离细胞的操作,可举出利用螯合剂(例如EDTA)及/或蛋白水解酶(例如胰蛋白酶、胶原酶)的处理。上述传代培养方法有利于对于从培养容器剥离细胞的操作敏感性高的粘附性细胞(例如,由于剥离操作导致存活性降低的粘附性细胞、由于剥离操作导致性状容易变化的粘附性细胞)的传代培养。作为对于从培养容器剥离细胞的操作敏感性高的粘附性细胞,可举出干细胞(例如间充质干细胞)、祖细胞(例如前体脂肪细胞)、原代培养细胞等,但不限于这些。

[0158] 使用本发明的培养基组合物进行增殖而得的粘附性细胞可在甲壳质酶、壳二糖酶、壳聚糖酶、 β -1,3-葡聚糖酶等分解酶中的1种以上将甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维分解从而将该纳米纤维与粘附性细胞剥离后进行回收。需要说明的是,Yatalase(Takara Bio Inc.)是包含甲壳质酶、壳二糖酶、壳聚糖酶、及 β -1,3-葡聚糖酶的混合物,可优选作为甲壳质及壳聚糖的分解酶使用。

[0159] 例如,向附着于甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的粘附性细胞的悬浮液中添加甲壳质及壳聚糖的分解酶,将混合物孵育对于粘附性细胞的剥离而言充分的时间。甲壳质及壳聚糖的基于分解酶的孵育温度通常为 $20^{\circ}\text{C}\sim 37^{\circ}\text{C}$ 。孵育时间也取决于酶的种类等,但通常为5~60分钟。

[0160] 在纳米纤维分解、粘附性细胞从纳米纤维剥离后,可通过对悬浮液进行离心分离来回收剥离的粘附性细胞。

[0161] 如此回收的粘附性细胞的损伤被抑制为最小限度,因此,可优选用于功能分析、移植等。

[0162] 2. 粘附性细胞的培养方法

[0163] 本发明还提供粘附性细胞的培养方法(以下有时称为“本发明的培养方法”),其包括将粘附性细胞在包含(1)甲壳质纳米纤维;及(2)壳聚糖纳米纤维或多糖类的培养基组合物中悬浮培养的步骤。

[0164] 本发明的培养方法的特征在于,使用上述的本发明的培养基组合物培养粘附性细胞。因此,本发明的培养方法中的培养基组合物、粘附性细胞、培养条件等与就本发明的培养基组合物所说明的同样。需要说明的是,如上所述,对于使用甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的方式而言,也可使用N-乙酰基氨基葡萄糖量调节纳米纤维代替这2种纳米纤维。

[0165] 3. 生产细胞分泌物的方法

[0166] 本发明还提供生产细胞分泌物的方法(以下有时称为“本发明的生产方法”),其包括将粘附性细胞在包含(1)甲壳质纳米纤维;及(2)壳聚糖纳米纤维或多糖类的培养基组合物中悬浮培养的步骤。需要说明的是,如上所述,对于使用甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的方式而言,也可使用N-乙酰基氨基葡萄糖量调节纳米纤维代替这2种纳米纤维。

[0167] 本发明的生产方法的特征在于,使用上述的本发明的培养基组合物培养粘附性细胞。因此,本发明的培养方法中的培养基组合物、粘附性细胞、培养条件等与就本发明的培养基组合物所说明的同样。

[0168] 本发明的生产方法中使用的粘附性细胞只要是生产细胞分泌物的细胞即可,没有特别限定,一个方式中,粘附性细胞可以是间充质干细胞。需要说明的是,该间充质干细胞的来源可以是骨髓、脂肪细胞、脐带、及牙髓等中的任一者。

[0169] 本发明的生产方法中的细胞分泌物可包括低分子化合物、蛋白质、核酸(miRNA或mRNA等)、及细胞分泌小泡(参见以下)等的细胞所分泌的任何物质。

[0170] 可通过本发明的生产方法生产的细胞分泌物可举出例如前列腺素E2(PGE2)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、肿瘤坏死因刺激基因6(TSG-6)、血管内皮生长因子(VEGF)、吡哆胺-2,3-双加氧酶(IDO)、转化生长因子 β (TGF- β)、肝细胞生长因子(HGF)、类胰岛素生长因子(IGF)、脑来源神经营养因子(BDNF)、神经生长因子(NGF)、血管生成素-1等,但不限于这些。

[0171] 本说明书中,所谓细胞分泌小泡,典型而言,表示从细胞中释放的、具有能够使用电子显微镜确认的大小的的小泡。该细胞分泌小泡的大小可以是按平均粒径计为1~1,000nm、10~500nm、或30~200nm。此处,平均粒径是指基于动态光散射法或使用电子显微镜的测定的各粒子的直径的平均值。该细胞分泌小泡可由包围生物体分子的脂质双分子层构成。

[0172] 作为该细胞分泌小泡的具体例,可举出例如膜粒子、膜小泡、微小泡、纳米小泡、微囊泡(microvesicles,平均粒径为30~1,000nm)、外泌体样小泡、外泌体(exosome,平均粒径为30~200nm)、核外粒体样小泡、核外粒体(ectosome)或外来泡(exovesicle)等,但不限于这些。本发明的生产方法的一个优选方式中,细胞分泌小泡可以是外泌体。

[0173] 需要说明的是,本发明的生产方法的一个方式中,也可添加用于开始及/或促进细胞分泌物的生产的化合物。用于开始及/或促进细胞分泌物的生产的化合物可根据所要生产的细胞分泌物而选择已知的物质。该化合物包括TNF- α 、IFN- γ 、及白细胞介素-1 β (IL-1 β),但不限于这些。作为一例,细胞分泌物为PGE2或TSG-6的情况下,可优选向培养基组合物中添加TNF- α 。另外,细胞分泌物为PGE2、IDO的情况下,可优选向培养基组合物中添加IFN-

γ 。需要说明的是,向培养基组合中添加的用于开始及/或促进细胞分泌物的生产的化合物的浓度只要能得到所期望的效果即可没有特别限定,基于所要生产的细胞分泌物与该化合物的组合等而适宜决定即可。

[0174] 另外,本发明的生产方法的另一个方式中,为了使细胞分泌物的生产量增加,可以适宜地优化本发明的生产方法中使用的细胞、培养条件。作为一例,存在优选将已暴露于低氧条件下的粘附细胞(例如间充质干细胞)用于本发明的制造方法的情况(参见J Cell Mol Med.2018 Mar;22(3):1428-1442)。细胞及/或培养条件的该优化可使用自身已知的任何技术。

[0175] 在以下的实施例中对本发明更具体地进行了说明,但本发明不受这些例子的任何限定。

[0176] 实施例

[0177] (试验例1:使用了甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物的3D培养中的来源于人脂肪组织的间充质干细胞的增殖)

[0178] 将基于W02015/111686中公开的制造方法制备的 α 甲壳质纳米纤维(N-乙酰基氨基葡萄糖的比例:95%以上)或壳聚糖纳米纤维(N-乙酰基氨基葡萄糖的比例:20%以下)(生物物质纳米纤维BiNF-i-S 2质量%,Sugino Machine Limited)以成为1%(w/v)的方式悬浮于超纯水(Milli-Q水)中后,通过颠倒混合分散,将该水溶液于121℃高压釜灭菌20分钟。使用的 α 甲壳质纳米纤维为在200MPa、循环(pass)5次的条件下纳米纤维化而得的 α 甲壳质纳米纤维(试样1)。另外,壳聚糖纳米纤维为在200MPa、循环(pass)5次的条件下纳米纤维化而得的壳聚糖纳米纤维(试样2)。然后以试样1与试样2的比率(体积)成为50%:50%(试样3)、33%:67%(试样4)、25%:75%(试样5)、20%:80%(试样6)、15%:85%(试样7)、10%:90%(试样8)、5%:95%(试样9)、1%:99%(试样10)的方式将试样1与试样2混合,得到甲壳质纳米纤维/壳聚糖纳米纤维混合物(试样3~10)。

[0179] 制备在作为血清培养基的间充质干细胞增殖培养基(C-28009,Takara Bio Inc.制)中以各种最终浓度(最终浓度:0.0006%(w/v)、0.002%(w/v)、0.006%(w/v)、0.02%(w/v))添加有上述中得到的试样1~10的培养基组合、及不含上述基材的未添加培养基组合(试样11)。接着,将经培养的来源于人脂肪的间充质干细胞(C-12977,Takara Bio Inc.制)以成为13333个细胞/mL的方式悬浮于上述的各培养基组合中后,以150 μ L/孔接种于96孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3474)。将细胞于CO₂孵育器(37℃、5%CO₂)内以静置状态培养10天。向接种后第4、8天的时间点的培养液中添加ATP试剂150 μ L(CellTiter-Glo™发光法细胞活力检测(Luminescent Cell Viability Assay),Promega公司制)、使其悬浮,于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3(Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去培养基本身的发光值,算出活细胞的数量(3个点的平均值)。

[0180] 结果,使用包含 α 甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物的培养基组合在96孔平底超低粘附表面微量板中培养来源于人脂肪的间充质干细胞时,培养基组合中所含的 α 甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的总量之中、 α 甲壳质纳米纤维为5重量%以上的情况下,显示出细胞增殖促进效果。另外,培养基组合中所含的 α 甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的总量之中、 α 甲壳质纳米纤维为25重量%以上的情况下,显示出与单独添加 α 甲壳质纳米纤维的情况相比为同等水平的细胞增殖促进效果。各培养中的RLU值(ATP测定,

发光强度) 示于表1、表2及表3。

[0181] [表1]

	添加浓度 (% (w/v))	α 甲壳质 纳米纤维 (% (w/v))	壳聚糖 纳米纤维 (% (w/v))	第4天 (细胞数量)	第8天 (细胞数量)
未添加 (试样11)	0	0	0	4497	4645
试样1	0.0006	0.0006	0	7199	11322
试样1	0.002	0.002	0	8576	17237
试样1	0.006	0.006	0	8621	17967
试样1	0.02	0.02	0	8253	16248
试样3	0.0006	0.0003	0.0003	7826	11783
试样3	0.002	0.001	0.001	8840	15982
试样3	0.006	0.003	0.003	9106	18086
试样3	0.02	0.01	0.01	8965	14807
试样4	0.0006	0.0002	0.0004	8521	13091
试样4	0.002	0.00066	0.00134	8128	15131
试样4	0.006	0.002	0.004	9281	16592
试样4	0.02	0.0066	0.0134	8681	15563
试样5	0.0006	0.00015	0.00045	8091	11637
试样5	0.002	0.0005	0.0015	8305	15511
试样5	0.006	0.0015	0.0045	8660	15877
试样5	0.02	0.005	0.015	8831	14308

[0182]

[0183] [表2]

	添加浓度 (% (w/v))	α 甲壳质 纳米纤维 (% (w/v))	壳聚糖 纳米纤维 (% (w/v))	第4天 (细胞数量)	第8天 (细胞数量)
未添加 (试样11)	0	0	0	5310	5172
试样1	0.0006	0.0006	0	8323	11133
试样1	0.002	0.002	0	8971	17892
试样1	0.006	0.006	0	9431	18533
试样1	0.02	0.02	0	9033	16561
试样6	0.0006	0.00012	0.00048	8197	10659
试样6	0.002	0.0004	0.0016	8565	13953
试样6	0.006	0.0012	0.0048	9511	16357
试样6	0.02	0.004	0.016	9191	14821
试样7	0.0006	0.00009	0.00051	8233	11726
试样7	0.002	0.0003	0.0017	9083	13067
试样7	0.006	0.0009	0.0051	8994	15627
试样7	0.02	0.003	0.017	9273	13158
试样8	0.0006	0.00006	0.00054	8487	12210
试样8	0.002	0.0002	0.0018	8415	12155
试样8	0.006	0.0006	0.0054	9114	14262
试样8	0.02	0.002	0.018	8838	12877

[0184]

[0185] [表3]

[0186]

	添加浓度 (% (w/v))	α 甲壳质 纳米纤维 (% (w/v))	壳聚糖 纳米纤维 (% (w/v))	第4天 (细胞数量)	第8天 (细胞数量)
未添加 (试样11)	0	0	0	4217	5202
试样1	0.0006	0.0006	0	8067	14232
试样1	0.002	0.002	0	9146	18102
试样1	0.006	0.006	0	8790	17444
试样1	0.02	0.02	0	8456	13679
试样9	0.0006	0.00003	0.00057	7451	9347
试样9	0.002	0.0001	0.0019	7528	10821
试样9	0.006	0.0003	0.0057	7591	11740
试样9	0.02	0.001	0.019	8106	11778
试样10	0.0006	0.000006	0.000594	7587	8802
试样10	0.002	0.00002	0.0018	7494	7568
试样10	0.006	0.00006	0.00594	7198	8508
试样10	0.02	0.0002	0.018	7169	9057
试样2	0.0006	0	0.0006	7144	8280
试样2	0.002	0	0.002	6953	7554
试样2	0.006	0	0.006	7247	8666
试样2	0.02	0	0.02	7018	8246

[0187] (试验例2:使用了甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物的3D培养中的来源于人骨髓组织的间充质干细胞的增殖)

[0188] 将基于W02015/111686制备的 α 甲壳质纳米纤维或壳聚糖纳米纤维(生物质纳米纤维BiNF-S 2质量%, Sugino Machine Limited)以成为1% (w/v)的方式悬浮于超纯水(Milli-Q水)中后,通过颠倒混合分散,将该水溶液于121°C高压釜灭菌20分钟。使用的 α 甲壳质纳米纤维为在200MPa、循环(pass)5次的条件下纳米纤维化而得的 α 甲壳质纳米纤维(试样1)。另外,壳聚糖纳米纤维为在200MPa、循环(pass)5次的条件下纳米纤维化而得的壳聚糖纳米纤维(试样2)。然后以试样1与试样2的比率(体积)成为50%:50%(试样3)、33%:67%(试样4)、20%:80%(试样6)的方式将试样1与试样2混合,得到甲壳质纳米纤维/壳聚糖纳米纤维混合物(试样3、4、6)。

[0189] 制备在作为血清培养基的间充质干细胞增殖培养基(C-28009, Takara Bio Inc. 制)中以各种最终浓度(最终浓度:0.0006% (w/v)、0.002% (w/v)、0.006% (w/v)、0.02% (w/v))添加有上述中得到的试样1~4、6的培养基组合物、及不含上述基材的未添加培养基组合物(试样11)。接着,将经培养的来源于人骨髓的间充质干细胞(C-12977, Takara Bio Inc. 制)以成为13333个细胞/mL的方式悬浮于上述的各培养基组合物中后,以150 μ L/孔接种于96孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制, #3474)。将细胞于CO₂孵育器(37°C、5% CO₂)内以静置状态培养10天。向第7天的培养液中添加ATP试剂150 μ L (CellTiter-Glo™ 发光法细胞活力检测, Promega公司制)、使其悬浮,于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3 (Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去培养基本身的发光值,算出活细胞的数量(3个点的平均值)。

[0190] 结果,使用包含 α 甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物的培养基组合物在96孔平底超低粘附表面微量板中培养来源于人骨髓的间充质干细胞时,培养基组合物中所含的 α 甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的总量之中, α 甲壳质纳米纤维为20重量%以上的情况下,显示出与仅 α 甲壳质纳米纤维的情况(即,试样1)相比为同等程度的细胞增殖促进

效果。各培养中的RLU值(ATP测定,发光强度)示于表4。

[0191] [表4]

[0192]

	添加浓度 (% (w/v))	α 甲壳质 纳米纤维 (% (w/v))	壳聚糖 纳米纤维 (% (w/v))	第7天 (细胞数量)
未添加 (试样11)	0	0	0	2147
试样1	0.0006	0.0006	0	5808
试样1	0.002	0.002	0	8421
试样1	0.006	0.006	0	7826
试样1	0.02	0.02	0	5658
试样3	0.0006	0.0003	0.0003	5399
试样3	0.002	0.001	0.001	7566
试样3	0.006	0.003	0.003	8771
试样3	0.02	0.01	0.01	7249
试样4	0.0006	0.0002	0.0004	5218
试样4	0.002	0.00066	0.00134	7169
试样4	0.006	0.002	0.004	8174
试样4	0.02	0.0066	0.0134	6833
试样6	0.0006	0.00012	0.00048	5074
试样6	0.002	0.0004	0.0016	7368
试样6	0.006	0.0012	0.0048	8294
试样6	0.02	0.004	0.016	6506

[0193] (试验例3:使用了甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物的3D培养中的来源于人脂肪组织的间充质干细胞的连续扩大培养)

[0194] 将基于W02015/111686制备的 α 甲壳质纳米纤维或壳聚糖纳米纤维(生物质纳米纤维BiNF-i-S 2质量%, Sugino Machine Limited)以成为1% (w/v)的方式悬浮于超纯水(Milli-Q水)中后,通过颠倒混合分散,将该水溶液于121℃高压釜灭菌20分钟。用于混合的是在200MPa、循环(pass) 5次的条件下纳米纤维化而得的 α 甲壳质纳米纤维(试样1)、和在200MPa、循环(pass) 5次条件下纳米纤维化而得的壳聚糖纳米纤维(试样2)。然后以试样1与试样2的比率(体积)成为50%:50%(试样3)、25%:75%(试样4)、20%:80%(试样6)、15%:85%(试样7)的方式将试样1与试样2混合,得到甲壳质纳米纤维/壳聚糖纳米纤维混合物(试样3、4、6、7)。

[0195] 制备在作为血清培养基的间充质干细胞增殖培养基(C-28009, Takara Bio Inc. 制)中以成为0.006% (w/v)的最终浓度的方式添加有上述中得到的试样1~4、6、7的培养基组合物。需要说明的是,制备的培养基组合物中的甲壳质纳米纤维及/或壳聚糖纳米纤维的最终浓度如下所示:

[0196] (1) 添加有试样1的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.006% (w/v)、壳聚糖纳米纤维:0% (w/v))

[0197] (2) 添加有试样2的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0% (w/v)、壳聚糖纳米纤维:0.006% (w/v))

[0198] (3) 添加有试样3的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.003% (w/v)、壳聚糖纳米纤维:0.003% (w/v))

[0199] (4) 添加有试样4的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.0015% (w/v)、壳聚糖纳米

纤维:0.0045% (w/v))

[0200] (5) 添加有试样6的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.0012% (w/v)、壳聚糖纳米纤维:0.0048% (w/v))

[0201] (6) 添加有试样7的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.0009% (w/v)、壳聚糖纳米纤维:0.0051% (w/v))

[0202] 接着,将经培养的来源于人脂肪的间充质干细胞(C-12977,Takara Bio Inc.制)以成为13333个细胞/mL的方式悬浮于上述的各培养基组合物中后,以150 μ L/孔接种于96孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3474)。将细胞于CO₂孵育器(37 $^{\circ}$ C、5%CO₂)内于静置状态培养5天。向接种时(第0天)和接种后第5天的培养液中添加ATP试剂150 μ L(CellTiter-GloTM发光法细胞活力检测,Promega公司制)而使其悬浮,于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3(Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去培养基本身的发光值,算出活细胞的数量(3个点的平均值)。

[0203] 在接种后第5天,利用吹吸使细胞所附着的纳米纤维分散,从96孔平底超低粘附表面微量板分别回收该悬浮液,通过吹吸与含有新的各试样(0.006%)的间充质干细胞增殖培养基600 μ L混合,以总量/孔接种于24孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3473)(24孔微量板接种第0天)。将24孔微量板接种后第5天和第10天的细胞培养液分别回收至1.5mL管中,以2800g离心3分钟,由此使细胞·纳米纤维部分进行沉降。向细胞·纳米纤维的沉淀添加间充质干细胞增殖培养基150 μ L和ATP试剂150 μ L(CellTiter-GloTM发光法细胞活力检测,Promega公司制)、使其悬浮,于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3(Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去培养基本身的发光值,算出活细胞的数量(3个点的平均值)。

[0204] 在24孔微量板接种后第10天,利用吹吸使细胞所附着的纳米纤维分散,从24孔平底超低粘附表面微量板分别回收该悬浮液,通过吹吸与含有新的各试样(0.006%)的间充质干细胞增殖培养基3000 μ L混合,以总量/孔接种于6孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3471)(6孔微量板接种第0天)。

[0205] 对于6孔微量板接种后第8天的细胞培养液,通过吹吸而使其悬浮,将蒸发部分也考虑在内,添加间充质干细胞增殖培养基,由此使总量成为3500 μ L。添加500 μ L的细胞培养液和ATP试剂500 μ L(CellTiter-GloTM发光法细胞活力检测,Promega公司制)、使其悬浮,于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3(Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去培养基本身的发光值,算出活细胞的数量(3个点的平均值)。另外,最终的ATP值以总量成为3500 μ L的方式进行了换算。

[0206] 结果,使用培养基组合物中所含的 α 甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的总量之中、 α 甲壳质纳米纤维为15重量%~50重量%的、含有 α 甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的培养基组合物培养来源于人脂肪的间充质干细胞时,能够重复进行纤维之间缓和的凝集和利用吹吸的分散。另外,通过添加含有新鲜的 α 甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的培养基组合物,能够在不使用胰蛋白酶的情况下实现扩大培养。特别是培养基组合物中所含的 α 甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的总量之中、 α 甲壳质纳米纤维为15重量%~20重量%的情况下,在连续扩大培养时,不易发生由纳米纤维上的来源于人脂肪的间充质干细胞凝集化导致的细胞增殖速度降低,即使在6孔板中也显示出良好的增殖促进作用。各培养中的

RLU值(ATP测定,发光强度)示于表5。

[0207] [表5]

	第0天 (96孔)	第5天 (96孔)	第5天 (24孔)	第10天 (24孔)	第8天 (6孔)换算
[0208] 试样3	1761	8188	16690	91054	126474
试样4	1823	8176	18165	73453	162159
试样6	1755	7159	16400	71173	201973
试样7	1823	6305	17364	65044	210427

[0209] (试验例4:使用了壳聚糖纳米纤维或者甲壳质纳米纤维与壳聚糖纳米纤维的混合物的3D培养中的来源于人脂肪的间充质干细胞的干细胞标志物表达变化)

[0210] 将基于W02015/111686制备的 α 甲壳质纳米纤维或壳聚糖纳米纤维(生物质纳米纤维BiNFi-S 2质量%,Sugino Machine Limited)以成为1% (w/v)的方式悬浮于超纯水(Milli-Q水)中后,通过颠倒混合分散,将该水溶液于121℃高压釜灭菌20分钟。使用的 α 甲壳质纳米纤维为在200MPa、循环(pass)5次的条件下纳米纤维化而得的 α 甲壳质纳米纤维(试样1)。另外,壳聚糖纳米纤维为在200MPa、循环(pass)5次的条件下纳米纤维化而得的壳聚糖纳米纤维(试样2)。然后以试样1与试样2的比率(体积)成为50%:50%(试样3)、33%:67%(试样4)、25%:75%(试样5)的方式将试样1与试样2混合,得到甲壳质纳米纤维/壳聚糖纳米纤维混合物(试样3~5)。制备在间充质干细胞增殖培养基2培养基(C-28009,Takara Bio Inc.制)中以成为0.015% (w/v)的最终浓度的方式添加有上述中得到的试样1~5的培养基组合物、及不含上述基材的未添加培养基组合物(试样11)。需要说明的是,制备的培养基组合物中的甲壳质纳米纤维及/或壳聚糖纳米纤维的最终浓度如下所示:

[0211] (1) 添加有试样1的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.015% (w/v)、壳聚糖纳米纤维:0% (w/v))

[0212] (2) 添加有试样2的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0% (w/v)、壳聚糖纳米纤维:0.015% (w/v))

[0213] (3) 添加有试样3的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.0075% (w/v)、壳聚糖纳米纤维:0.0075% (w/v))

[0214] (4) 添加有试样4的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.005% (w/v)、壳聚糖纳米纤维:0.01% (w/v))

[0215] (5) 添加有试样5的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.00375% (w/v)、壳聚糖纳米纤维:0.01125% (w/v))

[0216] 接着,将经培养的来源于人脂肪的间充质干细胞(C-12977,Takara Bio Inc.制)以成为50000个细胞/mL的方式接种于上述的添加有甲壳质及/或壳聚糖纳米纤维的培养基组合物或者未添加培养基组合物后,以成为每1孔为2mL的方式分注至6孔平底超低粘附表面微量板(#3471,康宁公司制)的孔中。另外,作为比较对象,将25000个细胞/mL接种于未添加培养基组合物后,以成为每1孔为2mL的方式分注至6孔平底粘附表面微量板(#3516,康宁公司制)的孔(试样12)。各板于CO₂孵育器(37℃、5%CO₂)内于静置状态培养,持续6天。在第6天回收细胞,添加350 μ L(RNeasy mini kit(QIAGEN公司制,#74106)RLT溶液,制成RNA提取溶液。向RNA提取溶液中加入70%乙醇350 μ L后,添加至RNeasy纯化柱中,以8000xg离心15秒。接着,向RNeasy纯化柱中添加700 μ L的RW1溶液,以8000xg离心15秒。接着,添加500 μ L的

RPE溶液,以8000xg离心15秒。进一步添加500 μ L的RPE溶液,以8000xg离心2分钟。向存在于RNeasy纯化柱中的RNA添加无RNase溶液,使其溶出。然后,从得到的RNA使用PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio Inc.制,#RR037A)合成cDNA。使用合成的cDNA和Premix EX Taq (Perfect Real Time) (Takara Bio Inc.制,#RR039A)、Taq man探针 (Applied Bio Systems公司制) 实施实时PCR。作为Taq man探针 (Applied Bio Systems公司制),OCT4使用了Hs04260367_gH,SOX2使用了Hs01053049_s1,NANOG使用了Hs04399610_g1,CXCR4使用了Hs00607978s1,GAPDH使用了Hs99999905_m1。仪器使用了Real Time PCR7500。就分析而言,算出将各目的基因的值基于GAPDH的值校正的相对值,进行比较。

[0217] 结果,通过使用包含壳聚糖纳米纤维及 α 甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物的培养基组合物,在6孔平底超低粘附表面微量板中培养来源于人脂肪的间充质干细胞,确认到反映未分化性的OCT4、SOX2、NANOG基因和反映与归巢有关的迁移性的CXCR4基因的相对表达量的上升。另一方面,在粘附板中进行单层培养的条件、仅使用甲壳质纳米纤维在低粘附板中进行3D培养的条件下,未确认到这些基因的表达量的明显增加。各基因表达的相对值示于表6。

[0218] [表6]

		SOX 2	OCT 4	NANOG	CXCR 4
[0219] 低粘附板	未添加 (试样11)	0.04	0.05	0.05	0.4
	试样1	0.04	0.05	0.05	0.4
	试样2	1.04	0.79	0.87	10.7
	试样3	0.21	0.22	0.2	2.4
	试样4	0.12	0.23	0.19	2.6
	试样5	0.22	0.36	0.26	5.7
粘附板	未添加 (试样12)	0.03	0.05	0.05	0.7

[0220] 需要说明的是,试验例1~4(及后述试验例5、6、7)中使用的在各种解纤条件(压力·撕碎次数)下制备的 α 甲壳质纳米纤维分散液及壳聚糖纳米纤维分散液的物性值(α 甲壳质或壳聚糖的实测浓度、粘度、中值粒径、平均粒径等)示于表7。

[0221] [表7]

纳米纤维原料	压力 (MPa)	撕碎次数 (Pass)	实测浓度 % (w/v)	粘度 mPa·S (0-20°C)	激光衍射平均粒径 (μm)	激光衍射中值粒径 (μm)
甲壳质	200	5	1.05%	6.73	80.7	65
壳聚糖	200	5	0.94%	3.95	51.2	44.3

[0222]

[0223] (试验例5:使用了甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物的3D培养中的来源于人脐带的间充质干细胞的连续扩大培养)

[0224] 制备在作为血清培养基的间充质干细胞增殖培养基(C-28009,Takara Bio Inc.制)中以成为0.05% (w/v)的最终浓度的方式添加有上述中得到的试样6的培养基组合物(以下有时将此处制备的培养基组合物称为“含有纳米纤维的间充质干细胞增殖培养基”)。需要说明的是,制备的含有纳米纤维的间充质干细胞增殖培养基中的甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的最终浓度如下所示:甲壳质纳米纤维:0.01% (w/v)、壳聚糖纳米纤维:0.04% (w/v)。

[0225] 接着,将经培养的来源于人脐带的间充质干细胞(C-12971,Takara Bio Inc.制)以成为15000个细胞/mL的方式悬浮于上述的含有纳米纤维的间充质干细胞增殖培养基中后,以10mL/孔接种于6孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3471)。将细胞于CO₂孵育器(37°C、5%CO₂)内于静置状态培养3天。培养时,与纳米纤维粘附的细胞沉淀在培养孔的底部,但未发生与培养孔的表面的粘附。在第3天,除去约5mL实质上不含纳米纤维/细胞的沉淀物的孔中的培养基上清液,添加5mL新鲜的含有纳米纤维的间充质干细胞增殖培养基,利用移液器悬浮,继续培养至第7天。向接种时(第0天)和接种后第7天的培养液300μL中添加ATP试剂300μL(CellTiter-GloTM发光法细胞活力检测,Promega公司制)、使其悬浮,于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3(Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去培养基本身的发光值,算出活细胞的数量(2点的平均值)。

[0226] 在接种后第7天,通过吹吸使细胞所粘附的纳米纤维分散,从6孔平底超低粘附表面微量板回收该悬浮液,通过吹吸与新鲜的含有纳米纤维的间充质干细胞增殖培养基(40mL)混合,以总量/烧瓶接种于125mL烧瓶(Thermo Scientific公司制,4115-0125)进行培养。在第10天将烧瓶中的培养基除去约25mL,添加新鲜的含有纳米纤维的间充质干细胞增殖培养基25mL,利用移液器悬浮,继续培养至接种后第14天。向在125mL烧瓶中扩大后第7天的细胞培养液500μL中添加ATP试剂500μL(CellTiter-GloTM发光法细胞活力检测,Promega公司制)、使其悬浮,于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3(Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去培养基本身的发光值,算出活细胞的数量(2点的平均值)。另外,烧瓶中的最终的ATP值使用从6孔至烧瓶的扩大比率(5倍)进行了换算。

[0227] 结果,使用含有α甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的培养基组合物培养来源于人脐带的间充质干细胞时,能够重复进行纤维之间缓和的凝集和利用吹吸的分散。另外,通过添加含有新鲜的α甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的培养基组合物,能够在不使用胰蛋白酶的情况下实现扩大培养。各培养中的RLU值(ATP测定,发光强度)示于表8。

[0228] [表8]

	第0天 (6孔)	第7天 (6孔)	第14天 (125mL烧瓶)
[0229] 试样6	1935	21036	73764

[0230] (试验例6:使用了含有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物的来源于人脐带的间充质干细胞的低血清浓度下的悬浮培养、和连续性的细胞分泌物的回收1)

[0231] 使用了试验例5中、利用含有 α 甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的培养基组合物(即,含有纳米纤维的间充质干细胞增殖培养基)对来源于人脐带的间充质干细胞进行培养的第14天的125mL烧瓶培养液。在第14天将烧瓶中的实质上不含纳米纤维/细胞的沉淀物的培养基上清液除去约25mL,添加25mL新鲜的DMEM培养基(044-29765,FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation,不含纳米纤维及血清),利用移液器悬浮,继续培养至第17天。然后在第17天将烧瓶中的实质上不含纳米纤维/细胞的沉淀物的培养基上清液回收约25mL,向孔中添加25mL新鲜的DMEM培养基(044-29765,FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation,不含纳米纤维及血清),利用移液器悬浮,继续培养至第21天。然后在第24、28、31、35天,将烧瓶中的培养基上清液回收约25mL,向孔中添加新鲜的DMEM培养基:间充质干细胞增殖培养基(3:1)(任一培养基均不含纳米纤维)25mL,利用移液器悬浮,继续培养至第35天。

[0232] 在第21、24、28、31、35天,将回收的培养基上清液离心(400g、3分钟)后,回收培养上清液。回收的培养上清液于-80℃保存至使用时。另外,离心后的沉淀(纳米纤维/细胞等)送回细胞培养中的烧瓶中,继续利用烧瓶的培养。即,在上述的全部步骤中,培养基中的纳米纤维浓度一直是恒定的。

[0233] 在第14、21、28、35天,向125mL烧瓶的细胞培养液500 μ L中添加ATP试剂500 μ L(CellTiter-GloTM发光法细胞活力检测,Promega公司制)、使其悬浮,于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3(Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去培养基本身的发光值,算出活细胞的数量(2点的平均值)。

[0234] [利用酶标抗体法的外泌体产生量的测定]

[0235] 使用酶标抗体法(ELISA;酶联免疫吸附测定,enzyme-linked immunosorbent assay)测定各培养上清液中(第17、21、24、28、31、35天)的外泌体产生量。测定使用了PS CaptureTM Exosome ELISA Kit(和光纯药株式会社制,#297-79201)。重复3次向Exosome Capture 96Well Plate中以300 μ L/孔添加反应/洗涤液的操作。以100 μ L/孔分注稀释10倍后的培养上清液,使用微量板振荡器,使其于室温反应2小时。反应结束后,弃去反应液,重复3次向各孔中以300 μ L/孔添加反应/洗涤液的操作。以100 μ L/孔分注检测用对照抗CD63抗体反应液,使用微量板振荡器,使其于室温反应1小时。反应结束后,弃去反应液,重复3次向各孔中以300 μ L/孔添加反应/洗涤液的操作。以100 μ L/孔分注检测用二抗反应液,使用微量板振荡器,使其于室温反应1小时。反应结束后,弃去反应液,重复5次向各孔中以300 μ L/孔

添加反应/洗涤液的操作。以100 μ L/孔分注TMB溶液(TMB Solution),使其于室温反应30分钟。反应后,以100 μ L/孔添加终止液(Stop Solution),测定450nm及620nm的吸光度。各试样的吸光度值设为从450nm的吸光度减去620nm的吸光度而得的值(Δ Abs)。

[0236] 结果,在含有 α 甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的培养基组合物上增殖的来源于人脐带的间充质干细胞在间充质干细胞培养基的比率为25%的低血清培养基中,仍然维持活细胞数量至第35天。另外,对于各培养上清液中的CD63值(外泌体)而言,与间充质干细胞培养基的比率为50%的情况相比,其为25%时的生产量更高。另外,在25%的低血清培养基中生产量随着继续培养而增加。各培养中的RLU值(ATP测定,发光强度)示于表9,来自CD63的 Δ Abs值示于表10示于。

[0237] [表9]

[0238]		第14天	第21天	第28天	第35天
	试样6	14753	14934	16439	15320

[0239] [表10]

	14~17天回收	17~21天回收	21~24天回收
间充质干细胞增殖培养基比率(%)	50	25	25
血清浓度(%)	1	0.5	0.5
试样6	1.19	1.24	1.77

[0240]

	24~28天回收	28~31天回收	31~35天回收
间充质干细胞增殖培养基比率(%)	25	25	25
血清浓度(%)	0.5	0.5	0.5
试样6	1.99	1.87	2.5

培养基	缓冲液
0.12	0.12

[0241] (试验例7:使用了含有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物的来源于人脐带的间充质干细胞的阶段性低血清化条件下的悬浮培养、和细胞分泌物的回收2)

[0242] 制备在作为血清培养基的间充质干细胞增殖培养基(C-28009,Takara Bio Inc.制)中以成为0.05%(w/v)的最终浓度的方式添加有上述中得到的试样3及6的培养基组合物(以下有时将此处制备的培养基组合物称为“含有纳米纤维的间充质干细胞增殖培养基”)。需要说明的是,制备的含有纳米纤维的间充质干细胞增殖培养基中的甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的最终浓度如下所示:

[0243] (1) 添加有试样3的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.025% (w/v)、壳聚糖纳米纤维:0.025% (w/v))

[0244] (2) 添加有试样6的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.01% (w/v)、壳聚糖纳米纤维:0.04% (w/v))

[0245] 接着,将经培养的来源于人脐间的间充质干细胞(C-12971,Takara Bio Inc.制)以成为15000个细胞/mL的方式悬浮于上述的含有纳米纤维的间充质干细胞增殖培养基中后,以1.2mL/孔接种于24孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3473)。将细胞于CO₂孵育器(37℃、5%CO₂)内于静置状态培养3天。培养时,与纳米纤维粘附的细胞沉淀在培养孔的底部,但未发生与培养孔的表面的粘附。在第3天将孔中的实质上不含纳米纤维/细胞的沉淀物的培养基上清液除去约0.6mL,添加0.6mL间充质干细胞增殖培养基,利用移液器悬浮,继续培养至第6天。在接种后第6天,通过吹吸使细胞所粘附的纳米纤维分散,从24孔平底超低粘附表面微量板回收该悬浮液,通过吹吸与新鲜的含有纳米纤维的间充质干细胞增殖培养基(8.4mL)混合,以9.6mL/孔接种于6孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3473)。将细胞于CO₂孵育器(37℃、5%CO₂)内于静置状态培养4天。在第10天将孔中的培养基上清液除去约5mL,添加5mL间充质干细胞增殖培养基(不含纳米纤维),利用移液器悬浮,继续培养至第14天。在接种后第14天,通过吹吸使细胞所粘附的纳米纤维分散,从6孔平底超低粘附表面微量板回收该悬浮液,通过吹吸与新鲜的含有纳米纤维的间充质干细胞增殖培养基(约40mL)混合,以总量/烧瓶接种于125mL烧瓶(Thermo Scientific公司制,4115-0125)进行培养。在第17天将烧瓶中的培养基上清液除去约25mL,添加新鲜的间充质干细胞增殖培养基(不含纳米纤维)25mL,利用移液器悬浮,继续培养至接种后第20天。

[0246] 在第20天将烧瓶中的培养基上清液除去约25mL,添加25mL新鲜的DMEM培养基(044-29765,FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation,不含纳米纤维及血清),利用移液器悬浮,继续培养至第23天。然后在第23天将烧瓶中的培养基上清液回收约25mL,向孔中添加25mL新鲜的DMEM培养基(044-29765,FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation,不含纳米纤维及血清),利用移液器悬浮,继续培养至第26天。然后在第29、32、35天将烧瓶中的培养基上清液回收约25mL,向孔中添加25mL新鲜的DMEM培养基(不含纳米纤维及血清),利用移液器悬浮,继续培养至第35天。

[0247] 在第26、29、32、35天,将回收的培养基离心(400g、3分钟)后,回收培养上清液。回收的培养上清液于-80℃保存至使用时。另外,将离心后的沉淀(纳米纤维/细胞等)送回细胞培养中的烧瓶中,继续利用烧瓶的培养。即,在上述的全部步骤中,培养基中的纳米纤维浓度一直是恒定的。

[0248] 在第26、29、32、35天,向125mL烧瓶的细胞培养液500μL中添加ATP试剂500μL(CellTiter-Glo™发光法细胞活力检测,Promega公司制)、使其悬浮,于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3(Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去仅培养基时的发光值,算出活细胞的数量(2点的平均值)。

[0249] [利用酶标抗体法的外泌体产生量的测定]

[0250] 使用酶标抗体法(ELISA;酶联免疫吸附测定)测定各培养上清液中(第26、29、32、35天)的外泌体产生量。测定使用了PS Capture™ Exosome ELISA Kit(和光纯药株式会社制,#297-79201)。重复3次向Exosome Capture 96Well Plate中以300μL/孔添加反应/洗涤

液的操作。以100 μ L/孔分注稀释10倍后的培养上清液,使用微量板振荡器,使其于室温反应2小时。反应结束后,弃去反应液,重复3次向各孔中以300 μ L/孔添加反应/洗涤液的操作。以100 μ L/孔分注检测用对照抗CD63抗体反应液,使用微量板振荡器,使其于室温反应1小时。反应结束后,弃去反应液,重复3次向各孔中以300 μ L/孔添加反应/洗涤液的操作。以100 μ L/孔分注检测用二抗反应液,使用微量板振荡器,使其于室温反应1小时。反应结束后,弃去反应液,重复5次向各孔中以300 μ L/孔添加反应/洗涤液的操作。以100 μ L/孔分注TMB溶液,使其于室温反应30分钟。反应后,以100 μ L/孔添加终止液,测定450nm及620nm的吸光度。各试样的吸光度值设为从450nm的吸光度减去620nm的吸光度而得的值(Δ Abs)。

[0251] 结果,向在含有 α 甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的培养基组合物上增殖的来源于人脐带的间充质干细胞阶段性地添加DMEM培养基以使其成为低血清培养基时,含有血清的间充质干细胞培养基的比率成为6.25%后,活细胞数量降低。另一方面,关于各培养上清液中的CD63值(外泌体),生产量随着低血清化的进展而减少,间充质干细胞培养基的比率为25%(即,血清浓度为0.5重量%)的条件下,生产量最高。各培养中的RLU值(ATP测定,发光强度)示于表11,来自CD63的 Δ Abs值示于表12。

[0252] [表11]

[0253]		第26天	第29天	第32天	第35天
	试样3	894900	886450	568208	441348
	试样6	527673	750692	410465	437438

[0254] [表12]

		23~26天回收	26~29天回收	29~32天回收
	间充质干细胞增殖培养基比率(%)	25	12.5	6.25
[0255]	血清浓度(%)	0.5	0.25	0.125
	试样3	1.64	1.11	0.99
	试样6	1.03	1.01	0.93

		32~35天回收
	间充质干细胞增殖培养基比率(%)	3.13
[0256]	血清浓度(%)	0.063
	试样3	0.36
	试样6	0.51

[0257] (试验例8:使用了甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物的来源于人骨髓及来源于人脐带的间充质干细胞的3D培养中的PGE2产生量)

[0258] 制备在间充质干细胞增殖培养基2培养基(C-28009, Takara Bio Inc. 制)中添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物(最终浓度:0.05% (w/v)) (试样6)、及不含上述基材的未添加培养基组合物(试样12)。接着,将经培养的来源于人骨髓的间充质干细胞(C-12974, Takara Bio Inc. 制)以成为40000个细胞/mL的方式、以及、将来源于人脐带的间充质干细胞(C-12971, Takara Bio Inc. 制)以成为80000个细胞/mL的方式接种于上述的添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物或者未添加培养基组合物后,将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物以成为每1孔为1mL的方式分注至24孔平底超低粘附表面微量板(#3473, 康宁公司制)的孔中。另外,作为比较对象,以成为每1孔为1mL或2mL的方式分注至24孔平底粘附表面微量板(#3526, 康宁公司制)或6孔平底粘附表面微量板(#3516, 康宁公司制)的孔中。各板于CO₂孵育器(37°C、5%CO₂)内于静置状态培养,持续2天。在第2天从各孔中将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物及未添加培养基组合物移至15mL管,以300xg离心3分钟后,回收培养上清液。除去培养上清液后,将1mL的间充质干细胞增殖培养基2培养基或包含最终浓度为10ng/mL的TNF- α (#210-TA, R&D System公司制)的间充质干细胞增殖培养基2培养基添加至15mL管中,将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物送回24孔平底超低粘附表面微量板(#3473, 康宁公司制)的孔。24孔平底粘附表面微量板(#3526, 康宁公司制)在除去培养基后添加1mL的间充质干细胞增殖培养基2培养基或包含最终浓度为10ng/mL的TNF- α 的间充质干细胞增殖培养基2培养基。各板于CO₂孵育器(37°C、5%CO₂)内于静置状态培养,持续1天。在第1天从各孔中将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物及未添加培养基组合物移至15mL管,以300xg离心3分钟后,回收培养上清液。此时,为了评价细胞数量,将ATP试剂1mL(CellTiter-Glo(注册商标)发光法细胞活力检测, Promega公司制)添加至培养上清液回收后的各试样中、使其悬浮,于室温静置10分钟后,使用Enspire(Perkin Elmer公司制)测定发光强度(RLU值),减去培养基本身的发光值,由此测得活细胞的数量。然后,关于回收的培养上清液中所含的PGE₂,使用PGE₂ELISA试剂盒(#ADI-900-001, Enzo Life Sciences公司制)进行定量。将使用测定缓冲液(Assay Buffer)稀释的标准品(standard)及培养上清液100 μ L添加至试剂盒附带的96孔板的各孔中。然后,向各孔中添加50 μ L的蓝色缀合物(blue conjugate)。然后向各孔中添加50 μ L的黄色抗体(yellow antibody),在室温条件下振荡2小时。接着,弃去溶液,以400 μ L/孔添加洗涤液(wash solution)后,弃去溶液。重复3次上述操作。向各孔中添加200 μ L的pNpp底物溶液(substrate solution),在室温条件下振荡45分钟。最后添加50 μ L的终止液终止反应,测定405nm的吸光度。各试样中所含的PGE₂浓度由标准曲线的四参数逻辑回归算出。为了算出每单位细胞数量的分泌量,将算出的PGE₂量除以发光强度,算出相对值。

[0259] 结果,较之使用未添加培养基组合物和粘附板进行单层培养的情况而言,将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物和低粘附板组合的3D培养中PGE₂分泌量的相对值增加。另外,在就TNF- α 处理进行比较的情况下,使用添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物、与低粘附板组合的3D培养仍然比使用未添加培养基组合物和粘附板进行单层培养的情况更多。来源于人骨髓及来源于人脐带的间充质干细胞各试样的相对值示于表13及表14。

[0260] [表13]

来源于人骨髓的间充质干细胞			相对值 (PGE2/Celltiter glo)
[0261] 粘附板	未添加 (试样12)	对照	1.59E-08
		TNF- α 10ng/mL	1.19E-07
低粘附板	试样6	对照	5.87E-06
		TNF- α 10ng/mL	1.12E-05

[0262] [表14]

来源于人脐带的间充质干细胞			相对值 (PGE2/Celltiter glo)
[0263] 粘附板	未添加 (试样12)	对照	4.19E-06
		TNF- α 20ng/mL	1.91E-05
低粘附板	试样6	对照	0.00252
		TNF- α 20ng/mL	0.00424

[0264] (试验例9:使用了甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物的来源于人骨髓及来源于人脂肪的间充质干细胞的3D培养中的bFGF产生量)

[0265] 制备在间充质干细胞增殖培养基2培养基(C-28009,Takara Bio Inc.制)中添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物(最终浓度:0.05% (w/v)) (试样6)、及不含上述基材的未添加培养基组合物(试样12)。接着,将经培养的来源于人骨髓的间充质干细胞(C-12974,Takara Bio Inc.制)以成为80000个细胞/mL的方式、以及、将来源于人脂肪的间充质干细胞(C-12977,Takara Bio Inc.制)以成为100000个细胞/mL的方式接种于上述的添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物或者未添加培养基组合物后,将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物以成为每1孔为1mL的方式分注至24孔平底超低粘附表面微量板(#3473,康宁公司制)的孔中。另外,作为比较对象,以成为每1孔为1mL的方式分注至24孔平底粘附表面微量板(#3526,康宁公司制)的孔中。各板于CO₂孵育器(37℃、5%CO₂)内于静置状态培养,持续2天。在第2天从各孔中将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物及未添加培养基组合物移至15mL管,以300xg离心3分钟后,除去培养上清液。接着,添加1mL含有17%FBS的MEM α 培养基,将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物送回24孔平底超低粘附表面微量板(#3473,康宁公司制)的孔。对于未添加培养基组合物而言,在除去间充质干细胞增殖培养基2培养基后将1mL含有17%FBS的MEM α 培养基添加至24孔平底粘附表面微量板(#3526,康宁公司制)中。各板于CO₂孵育器(37℃、5%CO₂)内在静置状态下培养,持续1天。在第1天从各孔中将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物及未添加培养基组合物

移至15mL管,以300xg离心3分钟后,回收培养上清液。此时,为了评价细胞数量,将ATP试剂1mL (CellTiter-Glo (注册商标) 发光法细胞活力检测, Promega公司制) 添加至培养上清液回收后的各试样中而使其悬浮,于室温静置10分钟后,使用Enspire (Perkin Elmer公司制) 测定发光强度 (RLU值), 减去培养基本身的发光值, 由此测得活细胞的数量。然后, 关于回收的培养上清液中所含的bFGF, 使用bFGF ELISA试剂盒 (#ELH-bFGF-1, RayBiotech公司制) 进行了定量。将100 μ L的标准品 (standard) 或试样溶液添加至孔中, 于室温振荡2.5小时。接着, 弃去溶液, 添加300 μ L的1x洗涤液后, 除去。重复4次上述操作。添加100 μ L的1x检测抗体, 于室温振荡1小时。弃去溶液, 添加300 μ L的1x洗涤液后, 除去。重复4次上述操作。添加100 μ L的HRP-链霉亲和素溶液, 于室温振荡45分钟。接着, 弃去溶液, 添加300 μ L的1x洗涤液后, 除去。重复4次上述操作。添加100 μ L的TMB One-Step Substrate试剂, 在暗处于室温振荡30分钟。最后添加50 μ L的终止液, 测定450nm的吸光度。各试样中所含的bFGF浓度由标准曲线的四参数逻辑回归算出。为了算出每单位细胞数量的分泌量, 将算出的bFGF量除以发光强度, 算出相对值。

[0266] 结果, 无论是来源于人骨髓的间充质干细胞还是来源于人脂肪的间充质干细胞, 与使用未添加培养基组合物和粘附板进行单层培养的情况相比, 将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物和低粘附板组合的3D培养的情况下, bFGF分泌量的相对值均增加。来源于人骨髓的间充质干细胞或来源于人脂肪的间充质干细胞的相对值示于表15及表16。

[0267] [表15]

来源于人骨髓的间充质干细胞		相对值 (bFGF/Celltiter glo)
[0268] 粘附板	未添加 (试样12)	0.00013
低粘附板	试样6	0.00381

[0269] [表16]

来源于人脂肪的间充质干细胞		相对值 (bFGF/Celltiter glo)
[0270] 粘附板	未添加 (试样12)	8.99E-05
低粘附板	试样6	0.00077

[0271] (试验例10: 使用了甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物的来源于人骨髓及来源于人脐带的间充质干细胞的3D培养中的TSG-6产生量)

[0272] 制备在间充质干细胞增殖培养基2培养基 (C-28009, Takara Bio Inc. 制) 中添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物 (最终浓度: 0.05% (w/v)) (试样6)、及不含上述基材的未添加培养基组合物 (试样12)。接着, 将经培养的来源于人骨髓的间充

质干细胞(C-12974,Takara Bio Inc.制)以成为80000个细胞/mL方式、以及、将来源于人脐带的间充质干细胞(C-12971,Takara Bio Inc.制)以成为40000个细胞/mL的方式接种于上述的添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物或者未添加培养基组合物后,将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物以成为每1孔为1mL的方式分注至24孔平底超低粘附表面微量板(#3473,康宁公司制)的孔中。另外,作为比较对象,以成为每1孔为1mL的方式分注至6孔平底粘附表面微量板(#3516,康宁公司制)或24孔平底粘附表面微量板(#3526,康宁公司制)的孔中。各板于CO₂孵育器(37℃、5%CO₂)内于静置状态培养,持续2天。在第2天从各孔中将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物及未添加培养基组合物移至15mL管,以300xg离心3分钟后,除去培养上清液。除去培养上清液后,将1mL的间充质干细胞增殖培养基2培养基或含有最终浓度为10ng/mL或20ng/mL的TNF- α (#210-TA,R&D System公司制)的间充质干细胞增殖培养基2培养基添加至15mL管中,将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物送回24孔平底超低粘附表面微量板(#3473,康宁公司制)的孔。24孔平底粘附表面微量板(#3526,康宁公司制)在除去培养基后添加1mL的间充质干细胞增殖培养基2培养基或含有最终浓度为10ng/mL或20ng/mL的TNF- α 的间充质干细胞增殖培养基2培养基。各板于CO₂孵育器(37℃、5%CO₂)内于静置状态培养,持续1天。在第1天从各孔中将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物及未添加培养基组合物移至15mL管,以300xg离心3分钟后,回收培养上清液。此时,为了评价细胞数量,将ATP试剂1mL(CellTiter-Glo(注册商标)发光法细胞活力检测, Promega公司制)添加至培养上清液回收后的各试样中、使其悬浮,于室温静置10分钟后,使用Enspire(Perkin Elmer公司制)测定发光强度(RLU值),减去培养基本身的发光值,由此测得活细胞的数量。然后,关于回收的培养上清液中所含的TSG-6,使用ELISA进行了定量。向Maxisorp平底板(#44-2404-21,Thermo Fisher Scientific公司制)中以50 μ L/孔添加用0.2M碳酸-重碳酸缓冲液(pH9.2)稀释为10 μ g/mL的TSG-6抗体(#sc-65886,Santacruz公司制),于4℃静置24小时。24小时后,添加300 μ L在D-PBS(-)(#043-29791,FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制)中以最终浓度成为0.05%(v/v)的方式添加有吐温20(#P7949,Sigma-Aldrich公司制)的PBST溶液,然后除去。重复3次该操作。添加100 μ L含有5%的BSA(#A2153,Sigma-Aldrich公司制)的PBST溶液,于室温静置30分钟。弃去该溶液后,添加300 μ L的PBST溶液,除去。重复3次该操作。和,将用于标准曲线而制备的TSG-6(#2104-TS,R&D Systems公司制)及评价试样以50 μ L添加至各孔中,于室温静置2小时。弃去该溶液后,添加300 μ L的PBST溶液,除去。重复3次该操作。添加50 μ L用PBST稀释为5 μ g/mL的生物素标记(Biotinylated)抗人TSG-6抗体(#BAF2104,R&D Systems公司制)的溶液,于室温静置120分钟。弃去该溶液后,添加300 μ L的PBST溶液,除去。重复3次该操作。添加50 μ L用PBST溶液稀释为200ng/mL的链霉亲和素-HRP(#ab7403,Abcam公司制)的溶液,于室温静置30分钟。弃去该溶液后,添加300 μ L的PBST溶液,除去。重复3次该操作。添加100 μ L的底物溶液(#52-00-03,KPL公司制),于室温静置15分钟。最后添加100 μ L的终止液(#50-85-06,KPL公司制),测定450nm的吸光度。各试样中所含的TSG-6浓度由标准曲线的四参数逻辑回归算出。为了算出每单位细胞数量的分泌量,将算出的TSG-6量除以发光强度,算出相对值。

[0273] 结果,与使用未添加培养基组合物和粘附板进行单层培养的情况相比,将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物和低粘附板组合的3D培养的情况下,

TSG-6分泌量的相对值增加。另外,对于各试样的将对照与TNF- α 处理进行比较时的增加率而言,与使用未添加培养基组合物和粘附板进行单层培养的情况相比,将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物和低粘附板组合的3D培养的情况下,所述增加率也更多。来源于人骨髓的间充质干细胞及来源于人脐带的间充质干细胞的各试样的相对值示于表17及表18。

[0274] [表17]

来源于人骨髓的间充质干细胞			相对值 (TSG-6/Celltiter glo)	增加率
粘附板	未添加 (试样12)	对照	1.04E-06	1
		TNF- α 10ng/mL	2.95E-06	2.8
低粘附板	试样6	对照	4.73E-06	1
		TNF- α 10ng/mL	3.09E-05	6.5

[0276] [表18]

来源于人脐带的间充质干细胞			相对值 (TSG-6/Celltiter glo)	增加率
粘附板	未添加 (试样12)	对照	2.98E-06	1
		TNF- α 20ng/mL	7.32E-06	2.5
低粘附板	试样6	对照	7.59E-06	1
		TNF- α 20ng/mL	3.22E-05	4.2

[0278] (试验例11:使用了甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物的来源于人骨髓的3D培养中的VEGF产生量)

[0279] 制备在间充质干细胞增殖培养基2培养基(C-28009,Takara Bio Inc.制)中添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物(最终浓度:0.05% (w/v)) (试样6)、及不含上述基材的未添加培养基组合物(试样12)。然后,将经培养的来源于人骨髓的间充质干细胞(C-12974,Takara Bio Inc.制)以成为100000个细胞/mL的方式接种于上述的添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物或者未添加培养基组合物后,将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物以成为每1孔为1mL的方式分注至24孔平底超低粘附表面微量板(#3473,康宁公司制)中,将未添加培养基组合物以成为每1孔为1mL的方式分注至24孔平底粘附表面微量板(#3526,康宁公司制)的孔中。各板于CO₂孵育器(37°C、5%CO₂)内于静置状态培养,持续2天。在第2天从各孔中将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物及未添加培养基组合物移至15mL管,以300xg离心3分钟后,除去培养上清液。接着,添加1mL含有17%FBS的MEM α 培养基,将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物送回24孔平底超低粘附表面微量板(#3473,康宁公司制)的孔。对于未添加培养基组合物而言,在除去间充质干细胞增殖培养基2培养基后将含

有1mL的17%FBS的MEM α 培养基添加至24孔平底粘附表面微量板(#3526,康宁公司制)中。各板于CO₂孵育器(37℃、5%CO₂)内于静置状态培养,持续1天。在第1天从各孔中将添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物及未添加培养基组合物移至15mL管,以300xg离心3分钟后,回收培养上清液。此时,为了评价细胞数量,将ATP试剂1mL(CellTiter-Glo(注册商标)发光法细胞活力检测,Promega公司制)添加至培养上清液回收后的各试样中而使其悬浮,于室温静置10分钟后,使用Enspire(Perkin Elmer公司制)测定发光强度(RLU值),减去培养基本身的发光值,由此测得活细胞的数量。接着,关于回收的培养上清液中所含的VEGF,使用VEGF165 ELISA kit,Human(#ENZ-KIT156-0001,Enzo Life Sciences公司制)进行了定量。将100 μ L的标准品或试样溶液添加至孔中,于室温振荡60分钟。然后,弃去溶液,添加300 μ L的1x洗涤液后,除去。重复3次上述操作。添加100 μ L的VEGF检测抗体,于室温振荡30分钟。弃去溶液,添加300 μ L的1x洗涤液后,除去。重复3次上述操作。添加100 μ L的VEGF结合物(conjugate)(蓝),于室温振荡30分钟。然后,弃去溶液,添加300 μ L的1x洗涤液后,除去。重复4次上述操作。添加100 μ L的TMB溶液,于室温振荡30分钟。最后添加100 μ L的终止液2,测定450nm的吸光度。各试样中所含的VEGF浓度由标准曲线的四参数逻辑回归算出。为了算出每单位细胞数量的分泌量,将算出的VEGF量除以发光强度,算出相对值。

[0280] 结果,在添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物中进行培养的情况下,与在未添加培养基组合物中进行培养的情况相比,每单位细胞的VEGF产生量增加。各试样的相对值示于表19。

[0281] [表19]

		相对值 (VEGF/Celltiter glo)
[0282]	粘附板 未添加 (试样12)	0.00049
	低粘附板 试样6	0.00115

[0283] (试验例12:使用了甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物或微载体的3D培养中的来源于人脐带的间充质干细胞的干细胞标志物表达变化)

[0284] 制备在间充质干细胞增殖培养基2培养基(C-28009,Takara Bio Inc.制)中以成为0.05%(w/v)的最终浓度的方式添加有上述中得到的试样6的培养基组合物。另外,称量Corning低浓度SynthemaxII微载体(Corning公司制,3781)360mg,使用灭菌蒸馏水水合后,于10mL的乙醇中浸渍30分钟。然后,除去乙醇,用30mL的PBS(-)洗涤2次,最后用10mL的间充质干细胞增殖培养基2培养基洗涤。作为比较对照,将上述的微载体添加至10mL的间充质干细胞增殖培养基2培养基中,制备培养基组合物(试样13)。接着,将经培养的来源于人脐带的间充质干细胞(C-12971,Takara Bio Inc.制)的600000个细胞悬浮于上述的含有纳米纤维的间充质干细胞增殖培养基40mL中,填充至作为培养袋使用的抗体固相化袋A(NIPRO公司制,87-362)中后,于CO₂孵育器(37℃、5%CO₂)内于静置状态培养3天。另外,将经培养的来源于人脐带的间充质干细胞的600000个细胞悬浮于含有微载体的间充质干细胞增殖培养基15mL中后,移至Corning 125mL一次性旋转瓶中,于CO₂孵育器(37℃、5%CO₂)内于静置状

态培养1天。在1天后,通过使用Micro-Stir慢速磁力搅拌器(WHEATON公司制,W900701-B)以30rpm振荡15分钟、然后静置2小时的方法继续培养2天。3天后,在抗体固相化袋A及一次性旋转瓶中培养的细胞更换一半量的培养基,继续在与上述同样的条件下培养4天。4天后,从40mL中取出1mL移至1.5mL管,以300xg离心3分钟。除去上清液后,添加350 μ L的RLT溶液(RNeasy mini kit,QIAGEN公司制,#74106),制成RNA提取溶液。接着,向RNA提取溶液中加入70%乙醇350 μ L后,添加至RNeasy纯化柱中,以8000xg离心15秒。接着,向RNeasy纯化柱中添加700 μ L的RW1溶液,以8000xg离心15秒。接着,添加500 μ L的RPE溶液,以8000xg离心15秒。进一步添加500 μ L的RPE溶液,以8000xg离心2分钟。向存在于RNeasy纯化柱中的RNA添加无RNase溶液,使其溶出。然后,从得到的RNA使用PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio Inc.制,#RR037A)合成cDNA。使用合成的cDNA和Premix EX Taq (Perfect Real Time) (Takara Bio Inc.制,#RR039A)、Taq man探针(Applied Bio Systems公司制)实施实时PCR。作为Taq man探针(Applied Bio Systems公司制),OCT4使用了Hs04260367_gH,SOX2使用了Hs01053049_s1,NANOG使用了Hs04399610_g1,CXCR4使用了Hs00607978s1,GAPDH使用了Hs99999905_m1。仪器使用了Real Time PCR7500。分析算出将各目的基因的值基于GAPDH的值校正的相对值,进行比较。

[0285] 结果,通过使用包含甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物的培养基组合物、将来源于人脐带的间充质干细胞在培养袋中进行培养,确认到反映未分化性的OCT4、SOX2、NANOG基因和反映与归巢有关的迁移性的CXCR4基因的相对表达量的上升。另一方面,使用Corning低浓度SynthemaxII微载体进行培养的条件下,未确认到这些基因的表达量的明显增加。各基因表达的相对值示于表20。

[0286] [表20]

		SOX2	OCT4	NANOG	CXCR4
[0287]	第0天	1.3	1.9	1.5	2
	第7天	试样13	0.1	0.2	0.3
		试样6	383.9	418.3	376.1

[0288] (试验例13:使用了甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物或微载体的来源于人脂肪的间充质干细胞的3D培养中的bFGF产生量)

[0289] 制备在间充质干细胞增殖培养基2培养基(C-28009,Takara Bio Inc.制)中以成为0.05% (w/v)的最终浓度的方式添加有上述中得到的试样6的培养基组合物。另外,称量Corning低浓度SynthemaxII微载体(Corning公司制,3781)360mg,使用灭菌蒸馏水水合后,于10mL的乙醇中浸渍30分钟。然后,除去乙醇,用30mL的PBS(-)洗涤2次,最后用10mL的间充质干细胞增殖培养基2培养基洗涤。作为比较对照,将上述的微载体添加至10mL的间充质干细胞增殖培养基2培养基中,制备培养基组合物(试样13)。接着,将经培养的来源于人脂肪的间充质干细胞(C-12977,Takara Bio Inc.制)的600000个细胞悬浮于上述的含有纳米纤

维的间充质干细胞增殖培养基40mL中,填充至作为培养袋使用的抗体固相化袋A (NIPRO公司制,87-362)中后,于CO₂孵育器(37℃、5%CO₂)内在静置状态下培养3天。另外,将经培养的来源于人脂肪的间充质干细胞的600000个细胞悬浮于含有微载体的间充质干细胞增殖培养基15mL中后,移至Corning 125mL一次性旋转瓶中,于CO₂孵育器(37℃、5%CO₂)内于静置状态培养1天。在1天后,通过使用Micro-Stir慢速磁力搅拌器(WHEATON公司制,W900701-B)以30rpm振荡15分钟、然后静置2小时的方法继续培养2天。3天后,从培养袋及旋转瓶中的40mL中取出1mL移至1.5mL管,以300xg离心3分钟。离心后,除去上清液,添加2mL的PBS(-)进行洗涤。洗涤后,以300xg离心3分钟,除去PBS(-)后,使用含有17%FBS的MEM α 培养基(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation,135-15175)1mL悬浮后,添加至24孔平底超低粘附表面微量板(#3473,康宁公司制)中,于CO₂孵育器(37℃、5%CO₂)内于静置状态培养1天。在1天后取出培养液,移至1.5mL管中后,以300xg离心3分钟,将培养上清液回收至新的1.5mL管中。此时,为了评价细胞数量,将ATP试剂1mL(CellTiter-Glo(注册商标)发光法细胞活力检测,Promega公司制)添加至培养上清液回收后的各试样中而使其悬浮,于室温静置10分钟后,使用Enspire(Perkin Elmer公司制)测定发光强度(RLU值),减去培养基本身的发光值,由此测得活细胞的数量。接着,关于回收的培养上清液中所含的bFGF,使用bFGF ELISA kit(#ELH-bFGF-1,RayBiotech公司制)进行了定量。将100 μ L的标准品或试样溶液添加至孔中,于室温振荡2.5小时。接着,弃去溶液,添加300 μ L的1x洗涤液后,除去。重复4次上述操作。添加100 μ L的1x检测抗体,于室温振荡1小时。弃去溶液,添加300 μ L的1x洗涤液后,除去。重复4次上述操作。添加100 μ L的HRP-链霉亲和素溶液,于室温振荡45分钟。接着,弃去溶液,添加300 μ L的1x洗涤液后,除去。重复4次上述操作。添加100 μ L的TMB One-Step Substrate reagent,在暗处于室温振荡30分钟。最后添加50 μ L的终止液,测定450nm的吸光度。各试样中所含的bFGF浓度由标准曲线的四参数逻辑回归算出。为了算出每单位细胞数量的分泌量,将算出的bFGF量除以发光强度,算出相对值。

[0290] 结果,与使用添加有微载体的培养基组合物实施的3D培养相比,将来源于人脂肪的间充质干细胞使用添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物实施的3D培养的bFGF分泌量的相对值增加。结果示于表21。

[0291] [表21]

	相对值 (bFGF/Celltiter glo)
[0292] 试样13	0.0004
试样6	0.0118

[0293] (试验例14:使用了通过同时解纤制造的甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物或具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基- β -D-氨基葡萄糖纳米纤维的3D培养中的来源于人脂肪的间充质干细胞的干细胞标志物表达变化)

[0294] 将甲壳质粉末及壳聚糖粉末以重量比1:4混合,将该混合物在200MPa、循环(pass)

5次的条件下纳米纤维化,由此制备 α 甲壳质/壳聚糖纳米纤维(以下有时将通过本方法制造的甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的混合物称为“通过同时解纤制备的甲壳质/壳聚糖纳米纤维”等)。另外,具有特定的乙酰化度(本试验例中为约50%)的聚(1,4)-N-乙酰基- β -D-氨基葡萄糖纳米纤维(以下有时称为“N-乙酰基氨基葡萄糖量调节纳米纤维”等)通过下述方法制备:将聚(1,4)-N-乙酰基- β -D-氨基葡萄糖在30%氢氧化钠水溶液中加热回流处理4小时,从而将N-乙酰基氨基葡萄糖量调节为约50%,然后将其在200MPa、循环(pass)5次的条件下纳米纤维化。将如此得到的通过同时解纤制备的甲壳质/壳聚糖纳米纤维和N-乙酰基氨基葡萄糖量调节纳米纤维分别以成为1% (w/w)的方式用注射用水(OTSUKA DISTILLED WATER)稀释后,通过颠倒混合分散,将该水悬浮液于121°C高压釜灭菌处理20分钟(分别为试样14及试样15)。制备在间充质干细胞增殖培养基2培养基(C-28009, Takara Bio Inc.制)中以成为0.05% (w/v)的最终浓度的方式添加有上述中得到的试样14或试样15的培养基组合物。

[0295] (1) 添加有试样14的培养基组合物(通过同时解纤制备的甲壳质/壳聚糖纳米纤维:0.05% (w/v))

[0296] (2) 添加有试样15的培养基组合物(N-乙酰基氨基葡萄糖量调节(50%)纳米纤维:0.05% (w/v))

[0297] 接着,将经培养的来源于人脂肪的间充质干细胞(C-12977, Takara Bio Inc.制)在培养皿中进行2D培养从而使其增殖,以成为50000个细胞/mL的方式接种于上述的添加有纳米纤维的培养基组合物或者未添加培养基组合物后,以成为每1孔为1.2mL的方式分注至24孔平底超低粘附表面微量板(#3473, 康宁公司制)的孔中。各板于CO₂孵育器(37°C、5% CO₂)内在静置状态下培养,持续13天。接种时,在第8天及第13天回收细胞,添加300 μ L RLT溶液(RNeasy mini kit (QIAGEN公司制,#74106),制成RNA提取溶液。向RNA提取溶液中添加70%乙醇300 μ L后,添加至RNeasy纯化柱中,以8000xg离心15秒。接着,向RNeasy纯化柱中添加600 μ L的RW1溶液,以8000xg离心15秒。接着,添加500 μ L的RPE溶液,以8000xg离心15秒。进一步添加500 μ L的RPE溶液,以8000xg离心2分钟。向存在于RNeasy纯化柱中的RNA添加无RNase溶液,使其溶出。然后,从得到的RNA使用PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio Inc.制,#RR037A)合成cDNA。使用合成的cDNA和Premix EX Taq (Perfect Real Time) (Takara Bio Inc.制,#RR039A)、Taq man探针(Applied Bio Systems公司制)实施实时PCR。作为Taq man探针(Applied Bio Systems公司制),OCT4使用了Hs04260367_gH,NANOG使用了Hs04399610_g1,PPIA使用了Hs99999904_m1。仪器使用了Real Time PCR7500。就分析而言,算出将各目的基因的值基于PPIA的值校正的相对值,进行比较。

[0298] 结果,与接种时的2D培养条件相比,通过使用包含通过同时解纤制备的甲壳质/壳聚糖纳米纤维或N-乙酰基氨基葡萄糖量调节纳米纤维的培养基组合物,将来源于人脂肪的间充质干细胞在24孔平底超低粘附表面微量板中进行3D培养,确认到反映未分化性的NANOG及OCT4基因的相对表达量的上升。NANOG基因表达的相对值示于表22,OCT4基因表达的相对值示于表23。

[0299] [表22]

	NANOG/PPIA	接种时	第8天 (24孔)	第13天 (24孔)
[0300]	试样14	0.07	3.9	2.24
	试样15	0.07	9.41	1.91

[0301] [表23]

	OCT4/PPIA	接种时	第8天 (24孔)	第13天 (24孔)
[0302]	试样14	0.13	3.08	1.68
	试样15	0.13	8.38	2.37

[0303] (试验例15:使用了甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物或甲壳质纳米纤维和其他多糖类的混合物的3D培养中的来源于人脂肪的间充质干细胞的增殖及干细胞标志物表达变化)

[0304] 将甲基纤维素粉末(1.0g)添加至水(100mL)中搅拌并悬浮后,进行高压釜灭菌处理(121℃、20分钟),由此得到1.0%(w/v)的甲基纤维素水溶液(8mL),向其中添加试样1(2mL),通过吹吸进行混合,由此制备0.2%(w/v)甲壳质纳米纤维和0.8%(w/v)甲基纤维素的混合物(试样16)。

[0305] 将脱乙酰基结冷胶粉末(0.8g)添加至水(100mL)中搅拌并溶解后,进行高压釜灭菌处理(121℃、20分钟),由此得到0.8%(w/v)的脱乙酰基结冷胶水溶液。使用培养基制备试剂盒(日产化学FCeM(注册商标)-系列制备试剂盒)将该脱乙酰基结冷胶水溶液(12.5mL)与D-PBS(+)(含有Ca、Mg)(27.5mL)混合,由此得到0.25%(w/v)的脱乙酰基结冷胶2价阳离子交联结构体分散液(8mL),向其中添加试样1(2mL),通过吹吸进行混合,由此制备0.2%(w/v)甲壳质纳米纤维和0.2%(w/v)脱乙酰基结冷胶的混合物(试样17)。

[0306] 将海藻酸钠粉末(1.0g)添加至水(50mL)中搅拌并溶解后,进行高压釜灭菌处理(121℃、20分钟),由此得到2.0%(w/v)的海藻酸钠水溶液。使用培养基制备试剂盒(日产化学FCeM(注册商标)-系列制备试剂盒)将该海藻酸钠水溶液(10mL)与D-PBS(+)(含有Ca、Mg)混合,由此得到1.0%(w/v)海藻酸2价阳离子交联结构体分散液(8mL),向其中添加试样1(2mL),通过吹吸进行混合,由此制备0.2%(w/v)甲壳质纳米纤维和0.8%(w/v)海藻酸的混合物(试样18)。

[0307] 接下来,制备在间充质干细胞增殖培养基2培养基(C-28009,Takara Bio Inc.制)中以成为0.05%(w/v)的最终浓度的方式添加有上述中得到的试样6、16、17及18的培养基组合物。需要说明的是,制备的培养基组合物中的甲壳质纳米纤维以及壳聚糖纳米纤维或者其他多糖类(甲基纤维素、脱乙酰基结冷胶、海藻酸)的最终浓度如下所示:

[0308] (1)添加有试样6的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.01%(w/v)、壳聚糖纳米纤

维:0.04% (w/v))

[0309] (2) 添加有试样16的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.01% (w/v)、甲基纤维素:0.04% (w/v))

[0310] (3) 添加有试样17的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.01% (w/v)、脱酰基结冷胶:0.04% (w/v))

[0311] (4) 添加有试样18的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.01% (w/v)、海藻酸:0.04% (w/v))

[0312] 接着,将经培养的来源于人脂肪的间充质干细胞(C-12977,Takara Bio Inc.制)以成为13333个细胞/mL的方式接种于向上述的甲壳质纳米纤维添加壳聚糖纳米纤维或者其他多糖类(甲基纤维素、脱酰基结冷胶、海藻酸)而得的培养基组合物后,以每1孔成为1.2mL的方式分注至24孔平底超低粘附表面微量板(#3473,康宁公司制)的孔中。各板于CO₂孵育器(37℃、5%CO₂)内于静置状态培养,持续14天。在接种时(第0天)和接种后第7、14天,悬浮各培养液并以300μL分注,然后添加ATP试剂300μL(CellTiter-Glo™发光法细胞活力检测,Promega公司制)、使其悬浮,于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3(Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去培养基本身的发光值,算出活细胞的数量。

[0313] 在第7天及第14天回收细胞,添加RLT溶液300μL(RNeasy mini kit(QIAGEN公司制,#74106),制成RNA提取溶液。向RNA提取溶液中添加70%乙醇300μL后,添加至RNeasy纯化柱中,以8000xg离心15秒。接着,向RNeasy纯化柱中添加600μL的RW1溶液,以8000xg离心15秒。接着,添加500μL的RPE溶液,以8000xg离心15秒。进一步添加500μL的RPE溶液,以8000xg离心2分钟。向存在于RNeasy纯化柱中的RNA添加无RNase溶液,使其溶出。然后,从得到的RNA使用PrimeScript RT reagent Kit(Perfect Real Time)(Takara Bio Inc.制,#RR037A)合成cDNA。使用合成的cDNA和Premix EX Taq(Perfect Real Time)(Takara Bio Inc.制,#RR039A)、Taq man探针(Applied Bio Systems公司制)实施实时PCR。作为Taq man探针(Applied Bio Systems公司制),OCT4使用了Hs04260367_gH,NANOG使用了Hs04399610_g1,PPIA使用了Hs99999904_m1。仪器使用了Real Time PCR7500。就分析而言,算出将各目的基因的值基于PPIA的值校正的相对值,进行比较。

[0314] 结果,与α甲壳质纳米纤维组合的多糖类之中,就包含和壳聚糖纳米纤维的混合物的培养基组合物而言,来源于人脂肪的间充质干细胞的增殖能力最高,并且,反映未分化性的OCT4基因及NANOG基因的表达能力高。虽然包含甲壳质纳米纤维、和甲基纤维素、脱酰基结冷胶、海藻酸中的任一种多糖类的混合物的培养基组合物也使来源于人脂肪的间充质干细胞增殖,确认到OCT4基因及NANOG基因的表达亢进作用,但与和壳聚糖纳米纤维的混合物相比较弱。活细胞数量的结果示于表24,NANOG基因表达的结果示于表25,OCT4基因表达的结果示于表26。

[0315] [表24]

	细胞数量	接种时	第7天 (24孔)	第14天 (24孔)
[0316]	试样 6	1129	2754	9943
	试样 16	1129	154	1849
	试样 17	1129	834	3764
	试样 18	1129	3625	7157

[0317] [表25]

	NANOG/PPIA	接种时	第7天 (24孔)	第14天 (24孔)
[0318]	试样 6	0.5	5.18	2.62
	试样 16	0.5	1.24	1.18
	试样 17	0.5	0.75	0.5
	试样 18	0.5	2.12	0.57

[0319] [表26]

	OCT4/PPIA	接种时	第7天 (24孔)	第14天 (24孔)
[0320]	试样 6	0.52	4.43	3.44
	试样 16	0.52	1.7	0.93
	试样 17	0.52	1	0.56
	试样 18	0.52	2.27	0.74

[0321] (试验例16:使用了甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物、通过同时解纤制造的甲壳质纳米纤维和壳聚糖纳米纤维的混合物、或具有特定的乙酰化度的聚(1,4)-N-乙酰基- β -D-氨基葡萄糖纳米纤维的3D培养中的HEK293-IFN β 细胞的增殖、存活维持、细胞凝集块的分散性)

[0322] 制备在含有10% (v/v) 胎牛血清的EMEM培养基(和光纯药株式会社制)中以成为0.02% (w/v) 或0.1% (w/v) 的最终浓度的方式添加有上述中得到的试样1的培养基组合物。另外,制备在含有10% (v/v) 胎牛血清的EMEM培养基(和光纯药株式会社制)中以成为0.02% (w/v) 的最终浓度的方式添加有试样6、14或15的培养基组合物。此外,制备不含上述基材的未添加培养基组合物(试样12)。需要说明的是,制备的包含纳米纤维、且含有10% (v/v) 胎牛血清的EMEM培养基中的各纳米纤维的最终浓度如下所示:

[0323] (1) 添加有试样1的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.02% (w/v)、壳聚糖纳米纤维:0% (w/v))

[0324] (2) 添加有试样1的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.1% (w/v)、壳聚糖纳米纤维:0% (w/v))

[0325] (3) 添加有试样6的培养基组合物(甲壳质纳米纤维:0.02% (w/v)、壳聚糖纳米纤维:0.08% (w/v))

[0326] (4) 添加有试样14的培养基组合物(通过同时解纤制备的甲壳质/壳聚糖纳米纤维:0.1% (w/v))

[0327] (5) 添加有试样15的培养基组合物(N-乙酰基氨基葡萄糖量调节(50%) 纳米纤维:0.1% (w/v))

[0328] 接着,将经培养的稳地产生人IFM β 的HEK293-IFM β 细胞以成为约200000个细胞/mL的方式悬浮于上述的各培养基组合物中后,以1.2mL/孔接种于24孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3473)。将细胞于CO₂孵育器(37°C、5%CO₂)内于静置状态培养最大21天,每隔1天或2天更换培养基。在接种时(第0天)和接种后第7、14、21天,悬浮各培养液并分注300 μ L,然后添加ATP试剂300 μ L(CellTiter-GloTM发光法细胞活力检测,Promega公司制)、使其悬浮,于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3(Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去培养基本身的发光值,算出活细胞的数量。另外,在接种后第8天、第15天、第21天拍摄照片,确认细胞球形块的分散性。

[0329] 结果,与未添加的条件相比,在添加了各基材的全部条件下确认到增殖及维持存活的效果。另外,使用包含通过同时解纤制备的甲壳质/壳聚糖纳米纤维或N-乙酰基氨基葡萄糖量调节纳米纤维的培养基组合物时,显示出与甲壳质纳米纤维单独相比更高的细胞密度。另外,通过经时性的观察,在未添加的条件下,于第8天观察到大的细胞凝集块,甲壳质纳米纤维单独(试样1)的条件下,细胞凝集物缓缓增大、并且凝集物的数量减少。可以认为,在这些条件下发生了细胞凝集物之间的进一步的凝集化。另一方面,使用添加有甲壳质纳米纤维及壳聚糖纳米纤维的培养基组合物及包含通过同时解纤制备的甲壳质/壳聚糖纳米纤维的培养基组合物时,抑制了细胞凝集物之间的凝集化。尤其使用包含N-乙酰基氨基葡萄糖量调节纳米纤维的培养基组合物时,在第21天的时间点,小的细胞凝集物仍然维持了分散的倾向。活细胞数量的结果示于图1,照片观察的结果示于图2(第8天)、图3(第15天)、图4(第21天)。

[0330] 产业上的可利用性

[0331] 根据本发明,能够高效地生产高质量的粘附性细胞(例如间充质干细胞)。通过本发明得到的细胞为干细胞的情况下,这些细胞为以理想的状态维持了未分化性、迁移性等特性的、极高质量的干细胞。因此,通过本发明得到的干细胞(例如间充质干细胞)可优选用于填补由于疾病等而丧失的器官、组织。此外,通过本发明得到的细胞分泌物还可用于各种疾病的治疗。因此,可以认为,本发明在例如再生医疗领域中是极其有用的。

[0332] 本申请以在日本提出申请的日本特愿2018-164042(申请日:2018年8月31日)及日本特愿2019-134058(申请日:2019年7月19日)为基础,上述申请的内容全部包括在本说明书中。

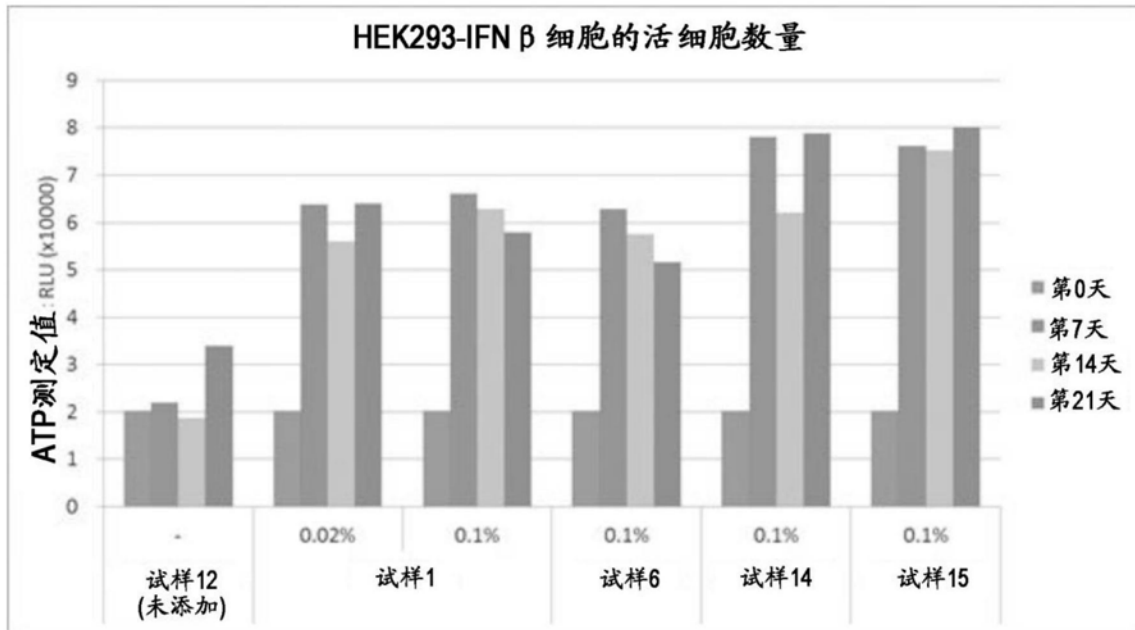


图1

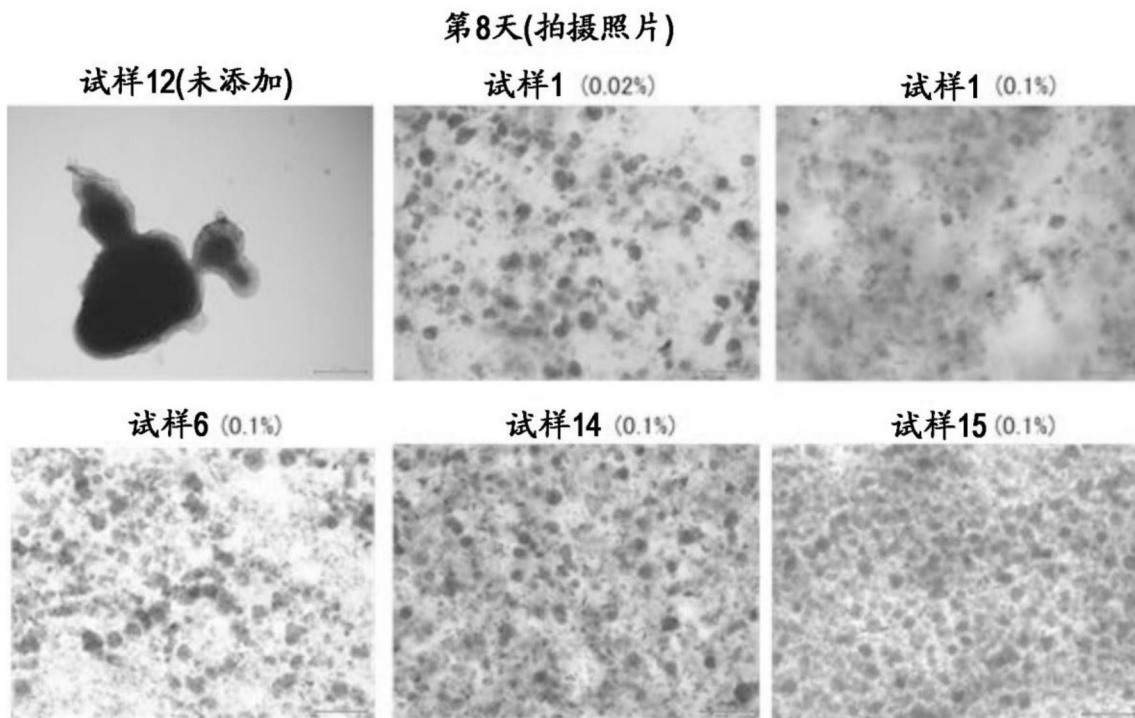


图2

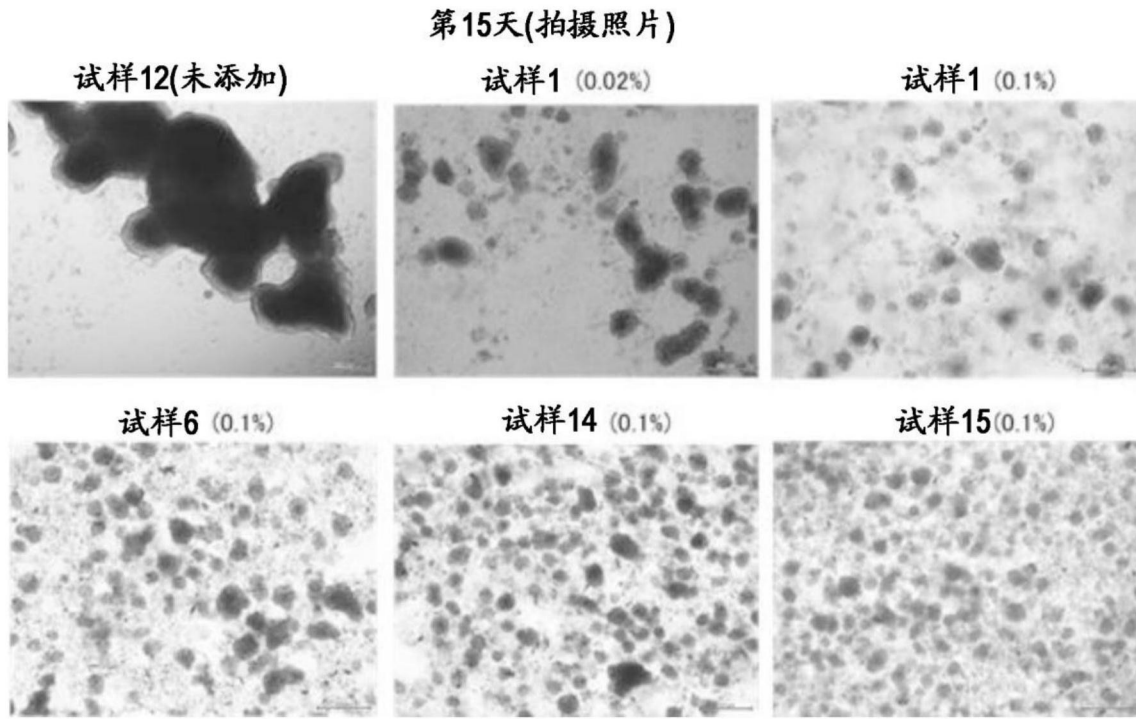


图3

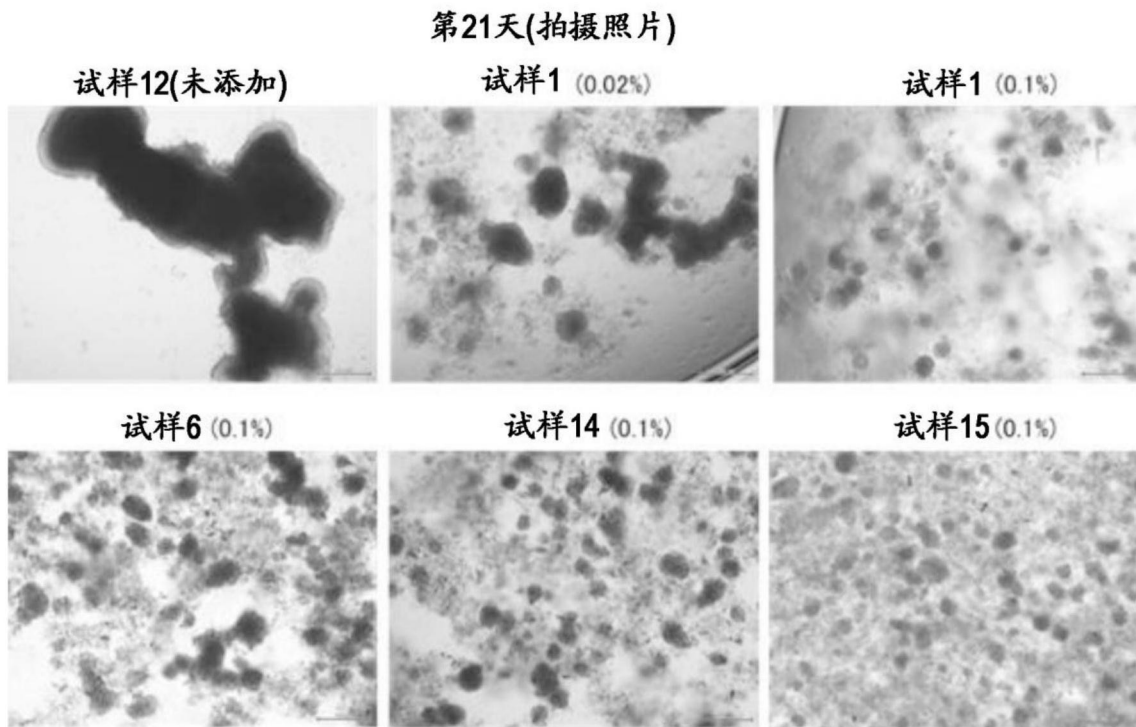


图4