

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年5月24日(24.05.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/092670 A1

(51) 国際特許分類:

C12M 3/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)

TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/040382

(22) 国際出願日: 2017年11月9日(09.11.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

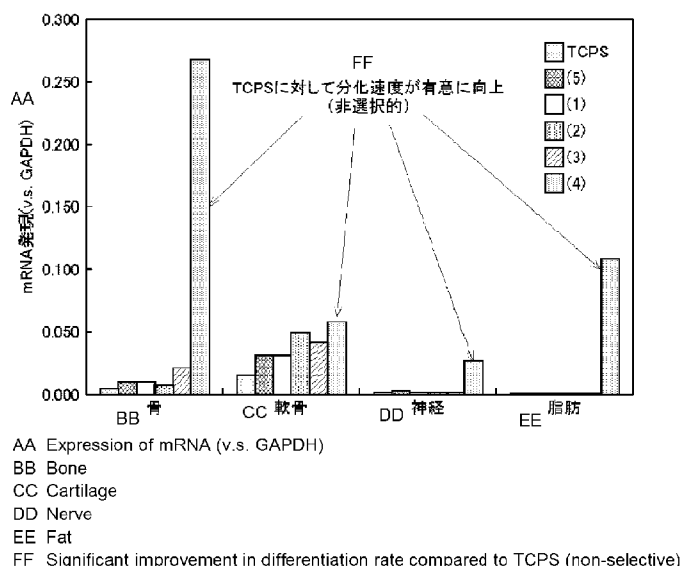
(30) 優先権データ:
特願 2016-222732 2016年11月15日(15.11.2016) JP

(71) 出願人: アイシン精機株式会社(AISIN SEIKI KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒4488650 愛知県刈谷市朝日町二丁目一番地 Aichi (JP). 国立大学法人東京医科歯科大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION

(72) 発明者: 朝生敏裕(ASO Toshihiro); 〒4488650 愛知県刈谷市朝日町二丁目一番地 アイシン精機株式会社内 Aichi (JP). 笹木隆一郎(SASAKI Ryuichiro); 〒4488650 愛知県刈谷市朝日町二丁目一番地 アイシン精機株式会社内 Aichi (JP). 埴隆夫(HANAWA Takao); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 陳鵬(CHEN Peng); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP).

(54) Title: CULTURE SUBSTRATE AND METHOD FOR PRODUCING CULTURE SUBSTRATE

(54) 発明の名称: 培養基材、及び培養基材の作製方法



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of constructing a culture substrate capable of accelerating differentiation induction of stem cells. The present invention also addresses the problem of constructing a culture substrate capable of accelerating differentiation induction in all of the differentiation directions in which stem cells have been determined. The present invention pertains to: a culture substrate which has a nanometer-order periodic protrusion structure on the surface thereof and which cultures stem cells on said surface; and a method for producing the culture substrate.

(74) 代理人: 特許業務法人 R & C (R&C IP LAW FIRM); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島三丁目3番3号 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(57) 要約: 本発明は、幹細胞の分化誘導を加速できる培養基材を構築することを課題とする。また、本発明は、幹細胞が決定づけられたあらゆる分化方向への分化誘導を加速できる培養基材を構築することを課題とする。本発明は、ナノメートルオーダーの周期突起構造を表面に有し、幹細胞を前記表面にて培養する培養基材、及び培養基材の作製方法である。

明 細 書

発明の名称：培養基材、及び培養基材の作製方法

技術分野

[0001] 本出願は、培養基材に関し、特に、ナノメートルオーダーの周期突起構造を表面に有し、幹細胞を前記表面にて培養する培養基材、及び培養基材の作製方法に関する。本出願は、2016年11月15日に提出された日本特許出願番号2016-222732号に基づいており、この出願の全体の内容が参照文献として組み込まれていることを主張する。

背景技術

[0002] 近年、再生医療の研究が盛んに行われ、従来医療の一翼を担うことが期待されている。再生医療とは、病気や怪我により機能障害や機能不全に陥った組織や臓器を再生し、その機能を回復させる治療法である。再生医療の実現において重要な役割を果たすのが幹細胞である。幹細胞は自己複製能と分化能とを有し、この幹細胞の分化能を利用することにより、病気や怪我の治療に必要な組織や臓器を人工的に作り出すことが可能となる。幹細胞はまた、幹細胞から分化誘導を行った生体細胞を、開発候補薬の薬理や毒性評価に用いる等の創薬スクリーニングや、発生、分化や疾患メカニズムの解明、タンパク質医薬となり得る生体機能を担っているタンパク質等の有用物質の生産技術等に利用することができる。そのため、幹細胞利用技術は、医療や創薬等の広範な技術分野への応用が期待されている。

[0003] しかしながら、移植治療や創薬スクリーニング等に利用可能なほどの組織や臓器を再生するためには、適切に幹細胞の増殖と分化を制御することが必要となる。つまり、幹細胞を再生医療に応用するためには、未分化性を維持しつつ安全かつ安定に幹細胞を培養及び増殖させ、所望の細胞に効率的に分化誘導できる培養技術の確立等、解決の必要な課題がある。

[0004] 例えば、特許文献1には、N-カドヘリンが多能性幹細胞から神経細胞への分化制御因子であり、神経システム発生の重要な機能を果たしていることが

記載されている。かかるN-カドヘリン又は相同性物質を培養基材表面上に固定することで、多能性幹細胞の神経細胞への選択的分化が起きることが確認されている。また、特許文献2には、インシュリン様成長因子結合タンパク質（以下、「IGFBP」と略する）が多能性幹細胞の心筋細胞への分化制御因子であり、心筋細胞への誘導を強く促進することが記載されている。かかるIGFBP又は相同性物質を培養基材表面上に固定することで心筋細胞への選択的分化が起きることが確認されている。

[0005] しかしながら、特許文献1及び特許文献2に記載の分化制御因子は、何れも生化学活性の高い有機物である。そのため、培養基材上に固定化した後、培養を行うまでの間は滅菌環境下で保管する必要がある等、高度の知識や技術、設備を必要とする。

[0006] 幹細胞の培養には、フィーダー細胞に付随する問題もある。幹細胞を培養する際には、フィーダー細胞との共培養が一般的であった。フィーダー細胞は、幹細胞の生存、増殖、及び未分化性維持のために必要な因子を提供すると共に、細胞接着のための足場を提供する。しかしながら、フィーダー細胞との共培養では、フィーダー細胞由来の成分が混入するため再生医療等の生体適用をする際には安全性に問題があり、また高品質のフィーダー細胞を安定的に供給することも容易ではなかった。上記特許文献1の技術は、フィーダー細胞を用いない幹細胞の培養系ではあるが、上記の通り、高度の知識や技術、設備を必要とするものであった。

[0007] 幹細胞を培養する際に、培養基材表面の微細構造が幹細胞の生存、増殖、分裂過程、未分化性保持、及び細胞接着に及ぼす影響の検討が行われている。特許文献3には、多能性幹細胞の分化が表面微細構造によって生じる可能性が記載されている。特許文献3に記載の技術は、培養基材表面上の格子点にトポグラフィ的（円形、星形、長方形、三日月型等）な突起を設けている。

[0008] 特許文献3には、幹細胞の分化に影響を与える突起の間隔及び断面直径としてそれぞれ1～2 μm 及び1～8 μm を提示している。これを作成するための手

法として、フォトリソグラフィー、電子ビームリソグラフィー、ホットエンボシングの他、ナノインプリント、レーザーアブレーション、化学エッチング、プラズマスプレーコーティング、吹き付け研削、エングレービング、スクラッチング、微細加工が提示されている。しかしながら、通常は集光スポットの大きさが数～数十 μm になるレーザーアブレーションにより、特許文献3に提示の形状を精密に作製するのは困難であった。してみると、実際に作製に足る手法としては、フォトリソグラフィー等の高コストな加工手段を選択せざるを得ないと考えられる。

[0009] また、特許文献4には、高強度フェムト秒レーザーパルス照射により、周囲に溝を有するマイクロメートルオーダーの半球状隆起と、該周囲の溝及び半球状隆起の表面全体に、ナノメートルオーダーの多数の微細球状突起と微細嵌凹からなる微細な表面構造を有する表面加工チタンが記載されている。チタンは、生体に埋入した際にも、免疫反応を起こすことが少ないことから人工関節や人工歯根をはじめとするインプラント材の主流となっているが、本来は生体にとって異物であるチタン表面への細胞の接着性が悪く、組織が再生され難い傾向がある等の改善すべき課題が残っていた。これに対して、特許文献4は、チタン表面の微細加工により、骨芽細胞のチタン表面への接着性を向上させるものであり、骨髓から分離した骨芽細胞の前駆細胞である骨芽細胞系細胞の増殖を促進し、骨芽細胞への分化誘導を引き起こすことが報告された。

[0010] しかしながら、特許文献4の技術は、骨芽細胞系細胞の増殖と骨芽細胞への分化を促進することが確認されているが、未分化性の高い幹細胞への適用については検討がなされていなかった。また、特許文献4には、チタン表面への800 μJ でフェムト秒レーザーパルス照射により、溝に囲まれた半球状の2～20 μm の隆起が形成される共に、100～300nmの微細球状突起と微細嵌凹からなる表面構造が形成されることが記載されており、かかる記載を鑑みるとナノメートルオーダーの微細構造はマイクロメートルオーダーの微細構造作製に付随して形成されたものであるといえる。

[0011] 培養基材として、簡便かつ低コストなものであって、生体適合性及び生体細胞親和性が高いものであって、幹細胞を、未分化性を維持しつつ安全かつ安定に培養及び増殖でき、かつ幹細胞を効率的に分化誘導できるものが求められている。そこで、本発明者らは、マイクロメートルオーダーの周期溝構造にナノメートルオーダーの周期溝構造を上書きして互いに平行に配列するように同一平面上に形成したハイブリッド周期溝構造をその表面に有する培養基材を構築した（非特許文献1及び非特許文献2）。かかる培養基材の表面で幹細胞を培養することにより、特段の生体適合性及び生体細胞親和性の向上が認められたことが報告され、幹細胞をその未分化性を維持しつつ安全かつ安定に増殖できるものであり、さらに、幹細胞を特定の細胞種に効率的に分化誘導できるものである。また、培養基材の表面に形成される周期微細構造を適切に制御することにより、幹細胞を、同一平面上で異なる組織に分化誘導できるものである。

[0012] 非特許文献1及び非特許文献2の技術は、培養基材の表面に形成される周期微細構造と幹細胞を分化誘導できる方向が密接に関連しており、オーダーメイド医療を視野に入れた将来世代のインプラント作製等に好適な技術である。しかしながら、現状の発生及び分化のメカニズムを探索することが主要な課題である研究段階では、幹細胞の特定の分化方向への誘導加速よりも全般的な分化誘導時間の短縮が求められている。

先行技術文献

特許文献

- [0013] 特許文献1：特開2014-82956号公報
特許文献2：特開2013-223446号公報
特許文献3：特開2014-138605号公報
特許文献4：特開2010-227551号公報

非特許文献

- [0014] 非特許文献1：陳鵬他、“Role of topography of titanium surface on mesenchymal stem cells behaviors”、第37回 日本バイオマテリアル学会大

会 予稿集 1D-12、p125

非特許文献2：陳鵬他、“Role of topography of titanium surface on multiple differentiations of mesenchymal stem cells”、日本金属学会2016年春季大会 予稿集 講演301

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0015] そこで、本発明は、幹細胞の分化誘導を加速できる培養基材を構築することを課題とする。また、幹細胞が決定づけられたあらゆる分化方向への分化誘導を加速できる培養基材を構築することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0016] 本発明者らは、上記課題を解決すべく研究を重ねた結果、培養基材において、ナノメートルオーダーの微細な周期突起構造を表面に形成することにより、効率的に幹細胞を分化誘導できることを見出した。かかる分化誘導効果は、骨細胞、軟骨細胞、神経細胞、及び、脂肪細胞の分化に対して、組織細胞を選択することなく認められた。これらの知見に基づいて、本発明を完成するに至った。

[0017] 即ち、本願は、上記目的を達成するため、以下の〔1〕～〔4〕に示す発明を提供する。

〔1〕 ナノメートルオーダーの周期突起構造を表面に有し、幹細胞を前記表面にて培養する培養基材。

〔2〕 前記ナノメートルオーダーの周期突起構造は、径0.1～1 μm 、高さ0.01～0.5 μm 、ピッチ0.1～1 μm である上記〔1〕の培養基材。

〔3〕 材質が、チタンである上記〔1〕又は〔2〕の培養基材。

〔4〕 超短パルスレーザーの円偏光によるナノ周期構造形成により基板表面に前記ナノメートルオーダーの周期突起構造を形成する工程を有する、上記〔1〕～〔3〕の何れかの培養基材の作製方法。

[0018] 上記〔1〕の構成によれば、ナノメートルオーダーの微細な周期突起構造を表面に有する幹細胞培養用の培養基材を提供できる。本発明の培養基材は

、その表面で幹細胞を培養することにより効率的に幹細胞を分化誘導でき、より成熟した細胞への分化誘導を加速できる。かかる幹細胞の分化誘導加速効果は、特定の方向へのみでなく、幹細胞が決定付けられたあらゆる分化方向に認められる。このような特性を有する本発明の培養基材は、大量の分化細胞を生産する際の培養基材として期待され、幹細胞を利用した発生及び分化メカニズムの探索に利用できる。ひいては、再生医療や創薬スクリーニング等の幹細胞利用技術の発展に寄与することができる。

[0019] 上記〔2〕の構成によれば、ナノメートルオーダーの周期突起構造の寸法の好適化を図った幹細胞培養用の培養基材を提供できる。本発明の培養基材は、好適寸法のナノメートルオーダーの周期突起構造が表面に形成されており、特定寸法の微細な周期突起構造の存在により、さらに効率的に幹細胞を分化誘導でき、より成熟した細胞への分化誘導を加速できる。かかる幹細胞の分化誘導加速効果は、幹細胞が決定付けられたあらゆる分化方向に認められる。

[0020] 上記〔3〕の構成によれば、本発明の培養基材は、生体適合性及び生体細胞親和性が高いチタン材に微細な周期突起構造を形成して作製できることから、生体適合性及び生体細胞親和性が高く、さらなる幹細胞の分化誘導の効率化を図ることができる。

[0021] 上記〔4〕の構成によれば、本発明の培養基材のナノメートルオーダーの微細な周期突起構造の形成は、例えば、超短パルスレーザーの走査により簡便に形成することができ、熱影響が少ないことから、大気中での加工が可能である等、作製への制約が少ないという利点がある。これにより、本発明の培養基材を簡便かつ低コストに作製することができる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]培養基材の作製検討を行った実施例1の結果を示し、作製した本発明の培養基材の断面SEM像を示す。

[図2]培養基材上でのMSCの分化誘導解析（分化マーカーでの確認）を行った実施例2の結果を示すグラフ。

発明を実施するための形態

[0023] 以下、本願発明について詳細に説明する。

[0024] [培養基材 1]

本発明の培養基材 1 は、ナノメートルオーダーの周期突起構造 2 が表面に形成されている。以下、本願発明の培養基材 1 が有するナノメートルオーダーの周期突起構造 2 を「ナノ周期突起 2」と略する場合がある。

[0025] 本発明の培養基材 1 の材質としては、化学的に安定で、生体適合性及び生体細胞親和性が良い物質を選択することが好ましい。ここで、化学的に安定とは、所要の強度や、耐久性、耐摩耗性を有することを意味する。例えば、培養基材 1 をインプラント材として使用する場合には、埋植される箇所に応じた力学的適合性を有することが必要となる。生体適合性とは、生体、及び細胞や組織、臓器、血液等の生体由来の成分に影響を与えず、これら生体及び生体由来の成分からも影響を受けない性質であり、生体内で異物として認識され難い性質を意味する。生体細胞親和性とは、特に、生体細胞及び生体細胞由来の成分に影響を与えず、生体細胞及び生体細胞由来の成分からも影響を受けないことを意味し、生体細胞の生存や増殖等を阻害し難い性質を意味する。具体的には、生体適合性及び生体細胞親和性とは、毒性や発がん性、抗原性を有しないこと、血液凝固や溶血、代謝異常を惹起しないこと等が例示される。好ましくは、培養基材 1 の用途に応じて、必要とされるレベルの生体適合性及び生体細胞親和性を有する材質を選択する。

[0026] 具体的には、金属材料、セラミックス材料、合成高分子材料等のうち、上記性質を有する限り公知の物質を利用することができる。金属材料としては、チタン、及びチタン合金及び酸化物、ステンレス、ニオブ、ニオブ合金及び酸化物、タンタル、タンタル合金及び酸化物、ニッケルクロム合金、クロムコバルト合金等を例示することができる。合金とは、複数の金属元素あるいは金属元素と非金属元素から構成される金属的性質を示すものである。例えば、チタン合金としては、チタンに、ニッケル、ニオブ、タンタル、モリブデン、ジルコニウムや白金等の 1 以上の他の元素を添加し組成を調節

したものを利用することができる。セラミックス材料としては、アルミナ及びその酸化物、ジルコニウム及びその酸化物、ハイドロキシアパタイト等を例示できる。セラミックス材料に他の添加物を含ませて成形したものや、上記の金属材料表面を溶融させたセラミックス材料をコーティングしたもの、逆にセラミックス材料を合金等の金属材料でコーティングしたものを利用することもできる。合成高分子材料としては、シリコンやポリウレタン等を例示することができる。

[0027] 本発明の培養基材 1 の形状や大きさには特に制限はなく、板状、立方体状、柱状、棒状、繊維状、球状、粒状、塊状等、用途に応じて適宜選択することができる。ナノ周期突起 2 は、培養基材 1 の全ての面に形成されていてもよいし、一部の面や、面の一部分に形成されていてもよい。本発明の培養基材 1 の使用目的に応じて、適宜、その形状や大きさを設定することができる。例えば、本発明の培養基材 1 をインプラントとして使用する場合には、埋植個所や再生を所望する組織に応じて、適宜、その形状や大きさを設定することができる。

[0028] 本発明の培養基材 1 の表面に形成されるナノ周期突起 2 とは、一定間隔で規則的にナノメートルオーダーの微細な突起を設けた構造を意味する。つまり、ナノ周期突起 2 とは、nm 単位で表示することが妥当な程度の寸法で形成された微細な複数の突起が周期的に配置された構造を意味し、例えばレーザー照射等により構造形成が現象としてとらえることができる程度の寸法の微細な構造を意味する。具体的には 10~1000nm である。ここでは、ナノ周期突起 2 の寸法、例えば、矩形の突起の場合には、その 1 辺の長さ、高さ、及びピッチ等、円形の突起の場合には、その直径、高さ、及びピッチ等、がナノメートルオーダーの寸法で形成されていることを意味する。

[0029] ナノ周期突起 2 の各突起の形状は、三角錐、四角錐、六角錐等の角錐状、円錐状、円柱状、半球状、波形状、釣鐘状等として形成でき、ドットとも称することができる。複数の突起が平行状、同心円状、格子状、螺旋状、ランダム状等に配列したものが例示される。突起は、高さ方向に直交する断面の

面積は、底部から頂部に向かって変化していても変化していなくてもよく、変化する場合には、次第に減少するような形状であっても、増加するような形状であっても、増減を組み合わせた形状であってもよい。

[0030] ナノ周期突起2の各突起の寸法は、好ましくは、径 $0.1\sim 1\mu\text{m}$ ($100\sim 1000\text{nm}$)、高さ $0.01\sim 0.5\mu\text{m}$ ($10\sim 500\text{nm}$)、ピッチ $0.1\sim 1\mu\text{m}$ ($100\sim 1000\text{nm}$)に設定する。特に、好ましくは、突起の径 $0.5\mu\text{m}$ (500nm)、高さ $0.2\mu\text{m}$ (200nm)、ピッチ $0.5\sim 0.8\mu\text{m}$ ($500\sim 800\text{nm}$)、特に好ましくは $0.7\mu\text{m}$ (700nm)に設定する。ナノ周期突起2の密度は、好ましくは、 1mm^2 当たり1万 $\sim$ 3万個とすることができる。

[0031] ここで、径とは、突起の端から端までの距離を意味し、矩形の突起の場合その1辺の距離であり、円形の突起の場合には直径の距離である。当該距離が突起の高さ方向に向かって変化する場合においても、培養基材1表面上の距離を意味する。突起の高さとは、突起の最底面の平均高から最上面の平均高までの距離を意味する。突起のピッチとは、最近接する突起との間隔を意味し、培養基材1表面上の凹凸の一周期分の距離となる。突起の径、高さ、ピッチ等の寸法は、一定領域内、例えば 1mm^2 の領域に存在する突起の寸法の測定値の平均として算出することが好ましい。

[0032] 本発明の培養基材1におけるナノ周期突起2は等方性であり、つまり、ナノ周期突起2の配列が方向に依存しない無方向性である。

[0033] 本発明の培養基材1のナノ周期突起2は、公知の方法によって形成することができる。例えば、数フェムト秒 $\sim$ 数ピコ秒のパルス幅をもつ超短パルスレーザーを利用することにより形成することができる。超短パルスレーザーとしては、波長 $800\text{nm}\sim 1500\text{nm}$ の近赤外線領域、パルス時間幅 10ps 以下、出力 1W 以上の加工用レーザー装置が好適で、特にフェムト秒パルスレーザーが好ましい。フェムト秒パルスレーザーとしては、イムラアメリカ社製のFCPA μ Jewel D-1000を好ましく利用することができる。

[0034] 例えば、超短パルスレーザーの直線偏光により偏光方向と垂直な方向に周期的な溝構造を形成することができ、円偏光により粒状構造、楕円偏光によ

り畝状構造を形成することができることから、ナノ周期突起2を円偏光により形成することが好ましい。チタン材にナノ周期突起2を形成する場合には、好ましくは、波長800～1500nm、フルエンス 0.5～1.5J/cm²、パルス線密度100～1000パルス/mm、走査回数1～10回とする。特に好ましくは、フルエンス0.8J/cm²、パルス線密度200パルス/mm、走査回数1回、偏光を円偏光とする。

[0035] レーザー光が基板表面で所望の形状を描画するように、レーザー光を照射することにより形成される。レーザー光の走査は、ラスタースキャン、ベクタースキャン、スポットスキャン等の方式の何れも利用することができるが、ラスタースキャン方式が好ましい。

[0036] [本発明の培養基材1を用いた細胞の培養]

本発明の培養基材1は、幹細胞の培養のための基材であり、ナノ周期突起2が形成された面を培養面として幹細胞を培養する。再生医療の実現において、幹細胞は未分化性を維持した状態で増殖され（以下、「未分化増殖段階」と称する場合がある）、続いて、増殖された幹細胞を分化誘導して目的の細胞に分化させる（以下、「分化誘導段階」と称する場合がある）。移植治療が可能なほどの組織や臓器を再生するためには、非常に膨大な細胞数の幹細胞が必要であり、これを目的とする細胞に効率的に分化誘導することが必要となるが、本発明の培養基材1によれば、幹細胞の増殖と分化を適切に制御することが可能となる。

[0037] 幹細胞は、分化能と自己複製能を有する未分化な細胞である。ここで、分化能とは、組織や臓器を構成する特定の機能を持ったさまざまな細胞に変化する能力を意味する。つまり、体内に存在する細胞は一定の機能や形を有するが、幹細胞がある一定の機能や形を有する細胞に変化する能力を意味する。分化能の観点から幹細胞は、体内に存在する全ての細胞に変化することができる多分化能を有するものであってもよいし、一部の細胞にのみに分化することができるものであってもよい。ここで、未分化とは、特定の機能や形を有する体細胞や生殖細胞に分化していない状態を意味する。自己複製能とは、細胞が細胞分裂を繰り返しながら自分と同じ細胞を作る能力を意味する。

。

[0038] 幹細胞は、最終的に分化していない細胞であり、分化能と自己複製能を有する全ての細胞が含まれる。従って、幹細胞が最終分化するまでの過程で発生する分化能を有する細胞も、分化能と自己複製能を有する限り幹細胞に含むものとする。幹細胞としては、人工多能性幹細胞（以下、「iPS細胞」と略する）、胚性幹細胞（以下、「ES細胞」と略する）、核移植胚性幹細胞（以下、「ntES細胞」と略する）、体性幹細胞、臍帯血幹細胞等が例示されるが、これらに限定するものではない。幹細胞には階層性があり、上位にあるiPS細胞やES細胞は自己複製能が高く様々な細胞系列に分化することができるが、体性幹細胞等のように下位になるに従い自己複製性は失われていき、特定の細胞系列にしか分化できないようになる。

[0039] iPS細胞は、本来、分化能を喪失している体細胞に特定の遺伝子を導入することによって人為的に誘導される多能性幹細胞である。ES細胞は、受精卵の胚盤胞の段階の胚の中の内部細胞塊を培養した多能性幹細胞であり、ntES細胞は、核を除いた卵子に体細胞の核を入れて胚を作り、ES細胞と同様に胚の中の内部細胞塊を培養した多能性幹細胞である。iPS細胞は、Takahashi K.他著, " Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." , Cell, 126(4), 663-676 (2006)、Takahashi K.他著、Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 131(5), 861-872 (2007)、Yu J.他著、" Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells" 、Science, 318(5858), 1917-1920 (2007)、"Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts" 、Nakagawa M.他著、Nat Biotechnol., 26(1), 101-106, (2008)等に記載の方法に基づいて取得することができる。ES細胞は、M. J. Evans他著、" Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos" , Nature, 292, 154-156 (1981)、Thomson JA他著、" Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." , Science, 282(5391),

1145-1147 (1988) , Amit, M., 他著、” Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture.” , Dev. Biol. 227(2), 271-278 (2000) 等の記載に基づき取得することができる。また、iPS細胞及びES細胞は、市販品や細胞バンクから得たものであってもよい。

[0040] iPS細胞及びES細胞は、外胚葉、中胚葉、内胚葉の三胚葉、そして、三胚葉が分化して生み出される全ての種類の細胞に分化する能力を有する多能性幹細胞である。多能性幹細胞は胎盤と羊膜を除く全ての組織や臓器を構成する細胞に分化することができる。例えば、外胚葉は、神経系の神経細胞、軸索、髄鞘、消化器系の口腔上皮、舌、歯エナメル質、感覚器系の皮膚、角膜、網膜、内耳、外耳等に分化し、中胚葉は、骨、軟骨等の骨格系、心臓、血管内皮細胞、白血球、血小板、赤血球等の血液細胞、脾臓、骨髓等の循環器系、神経系の神経小膠細胞、泌尿器系の腎臓、尿管、生殖器系の卵巣、子宮、精巣、結合組織等に分化し、内胚葉は、消化器系の食道上皮、胃上皮、肝臓、膵臓、内分泌系の甲状腺、胸腺、感覚器系の耳管、鼓室、呼吸器系の扁桃、咽頭上皮、喉頭上皮、気管上皮、肺等に分化する。

[0041] 体性幹細胞は、生体内に存在する最終分化していない細胞であり、間葉系幹細胞（以下、「MSC」と略する場合がある）、神経幹細胞、造血幹細胞、肝幹細胞、血管内皮幹細胞、上皮幹細胞等のいろいろな種類がある。また、体性幹細胞は、iPS細胞やES細胞が最終分化する過程で生み出すこともできる。体性幹細胞は、多能性幹細胞とは異なり、特定の組織、臓器を構成する細胞にのみに分化することができる。

[0042] MSCは、体性幹細胞の一種であり、中胚葉由来の間質細胞（骨髓）、骨芽細胞（骨細胞）、軟骨芽細胞（軟骨細胞）、筋細胞、脂肪細胞、繊維芽細胞（腱、靱帯）、血管内皮細胞等に分化する能力を有する。また、胚葉の差をこえて、外胚葉系細胞の神経細胞、内胚葉系細胞の肝細胞、膵臓細胞に分化する能力を有することも報告されている。

[0043] MSCは、骨髓、脂肪組織や筋肉等の種々の組織から得ることができるが、好

ましくは骨髄から骨髄間葉系幹細胞を得ることができる。骨髄間葉系幹細胞は骨髄間質細胞の中に含まれ、例えば、骨髄穿刺により採取した骨髄液をシャーレ上に播種し、シャーレ底面に沈降して増殖する線維芽様細胞を継代培養によって増殖させることによって取得することができる。また、MSCは、iPS細胞及びES細胞等の多能性幹細胞から分化誘導することもできる。例えばES細胞をレチノイン酸存在下で培養しSOX1陽性の細胞を選別することによりMSCを取得できること、及び、ES細胞を培養し、ストロマ細胞様形態であり、PDGFR α 陽性かつFLK1陰性あり、Mesp2を発現しない細胞を選別することによりMSCを取得できることが報告されている（特開2005-304443号公報、国際公開2004/106502号公報を参照のこと）。MSCは、市販品や細胞バンクから得たものであってもよい。

[0044] 本発明の培養基材1で培養される細胞の由来は問わない。従って、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ等の哺乳類、鳥類、爬虫類由来の細胞であってもよく、好ましくは哺乳類由来の細胞の培養に使用することができる。

[0045] 未分化増殖段階における幹細胞の培養は、本発明の培養基材1のナノ周期突起2が形成された面上で行う。分化誘導を行わない未分化増殖段階では、本発明の培養基材1を用いて培養することで、自発的な分化等による分化細胞の出現を抑制し、幹細胞は未分化性を維持したままで増殖することができる。つまり、本発明の培養基材1上では、幹細胞は分化誘導しない限り何れの細胞への分化を行わず、核型異常も伴わない。一方で、幹細胞は、自己と同じ性質を持つ細胞を複製する自己複製能を十分に発揮することができる。これにより、幹細胞を、未分化性を維持した状態で効率よく増殖することができ、良質な幹細胞集団を安定して提供することが可能となる。これにより、再生医療や創薬スクリーニング等に利用可能な十分な量の分化細胞を提供することが可能な量の幹細胞を提供することが可能となる。

[0046] 未分化増殖段階における幹細胞の培養は、幹細胞が維持できる限り特に限定されない。従って、当該分野で公知の方法に基づいて行うことができ、初

代培養用の液体培地に細胞を播種し、適当な条件下で培養することができる。液体培地の交換や継代も、公知の方法と同様に行なうことができる。

[0047] 具体的には、iPS細胞及びES細胞の培養において、培地及び培養条件等は、iPS細胞及びES細胞が維持できる限り特に限定されず、公知の培地及び培養条件に基づいて行うことができる。培地は、通常のiPS細胞及びES細胞の培養に用いる公知の培地を使用できる。例えば、無血清培地に、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）等の細胞増殖因子を添加した培地等を用いることができ、培養する細胞に合わせて適宜選択することができる。また、市販のiPS細胞及びES細胞培養用の培地を使用することができ、例えば、StemPro（登録商標）hESC（Life technologies）、ReproFF2（Reprocell）等を利用することができる。

[0048] MSCの培養において、培地及び培養条件等は、MSCが維持できる限り特に限定されず、公知の培地及び培養条件に基づいて行うことができる。培地としては、通常MSCの培養に用いる培地を用いることができる。MEM培地、DMEM培地等が例示されるが、培養する細胞に合わせて適宜選択することができる。また、市販のMSC増殖培地やキットを使用することができ、例えば、MSCGM™ BulletKit™（Lonza、カタログ番号PT-3001）を使用することができる。

[0049] 培養条件についても培養する細胞に合わせて適宜選択することができる。例えば、初期蒔種密度は、5000～6000細胞/cm²とし、37℃、5% CO₂に設定したインキュベーター内にて培養することができる。

[0050] 幹細胞が分化能を維持しているか否かの確認は、細胞形態の観察、分化能の確認、及び未分化性マーカーの確認等により行うことができる。未分化性マーカーとしては、未分化の幹細胞に特異的に発現し、分化能の発現に非常に重要な働きをする分子であり、かかる分子の発現、若しくは発現レベルは、公知の方法によって検出することができる。例えば、マーカー遺伝子の発現の検出には、Real time RT-PCR等を利用することができ、タンパク質マーカーの発現の検出には、マーカー特異的なポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を利用した免疫染色法や酵素活性測定法等を利用することができ

る。抗体を利用した免疫染色法としては、抗体蛍光染色法を好ましく利用することができる。ここで、抗体蛍光染色法は、抗原抗体反応を利用し、蛍光色素で標識した抗体を試料に取り込ませて染色を行う方法であり、抗原となる物質（未分化マーカー）に対して高い特異性で染色を行うことができる。

[0051] 未分化性マーカーとしては、iPS細胞及びES細胞等の多能性幹細胞の場合には、Nanog、SRY (sex determining region Y)-box 2 (SOX2)、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、OCT3/4等が例示される。MSCの場合には、CD29、CD44、CD71、CD73 (SH3/4)、CD90 (Thy-1)、CD105 (SH2)、CD106、CD166、Stro-1等が例示される。陰性マーカーも利用でき、MSCの陰性マーカーとして、CD11b、CD14、CD19、CD31、CD18、CD34、CD45、CD56、CD79 α 、HLA-DR等が例示される。

[0052] 分化誘導段階における幹細胞の分化誘導は、本発明の培養基材1のナノ周期突起2が形成された面上で行う。分化誘導段階では、本発明の培養基材1を用いて分化誘導することで、本発明の培養基材1上で、幹細胞は未分化性を維持する幹細胞の発生を抑制しつつ、効率的により成熟した細胞に分化させることができる。本発明の培養基材1は、分化誘導効率が高く、分化誘導に要する時間を短縮することができ、かかる高い分化誘導効率は、一定方向の分化に対するものではなく、あらゆる方向に対して高い分化誘導効率を示す。従って、幹細胞から大量の分化細胞を取得することが可能となる。

[0053] 分化誘導のための方法は、幹細胞を目的の細胞へ分化させることができる限り、当該分野で公知の方法の何れをも用いることができる。例えば、分化誘導因子を含む分化誘導培地を用いて本発明の培養基材1上で細胞を培養することによって行うことができ、上記した本発明の培養基材1での未分化増殖段階の後、培地を分化誘導培地に切り替えることで目的とする分化細胞を得ることができる。また、未分化増殖段階又は分化誘導段階の一方のみを、本発明の培養基材1を利用して行うこともできる。

[0054] 分化誘導因子は、分化を所望する細胞の種類や、分化させる幹細胞の分化階層等に応じて適宜選択することができる。分化誘導因子との接触時間等の

誘導条件についても、目的細胞への分化誘導が起きる限りにおいて、限定されない。また、市販の分化誘導用試薬やキットを利用することができる。

[0055] 例えば、iPS細胞及びES細胞等の多能性幹細胞の場合には、分化誘導因子を特定の時期、順序及び濃度で接触させることにより、胚葉を経由して特定系統の細胞に分化させていくことができる。例えば、多能性幹細胞に、アクチビン及び塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を添加することにより中内胚葉、内胚葉を、骨形成タンパク質（BMP）を添加することにより中胚葉を分化できる。

[0056] MSCから脂肪細胞への分化誘導には、インシュリン、デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン（IBMX）、インドメタシン、3,3,5-トリヨードサイロニン（T3）等を用いることができる。骨細胞への分化には、デキサメタゾン、L-グルタミン、アスコルビン酸、 β -グルセロリン酸等を用いることができる。軟骨細胞への分化には、デキサメタゾン、アスコルビン酸、ITS（インシュリン、トランスフェリン、セレンウム）等を用いることができる。神経細胞への分化には、 β -メルカプトエタノール及びジメチルスルホキシド（DMSO）、フォルスコリンとbFGF等を用いることができる。骨格筋細胞への分化には、5-アザシチジン等を用いることができる。肝細胞への分化には、ITS、デキサメタゾン、肝細胞増殖因子（HGF）、オンコスタチン等を用いることができる。心筋細胞への分化には、Dickkopf-1（Dkk1）、インシュリン様増殖因子結合タンパク質4（IGFBP-4）等を用いることができる。

[0057] 具体的には、MSCから脂肪細胞への分化誘導を行う場合には、MSCが好ましくは80～90%コンフルエントとなった時点で分化誘導を開始することができる。脂肪細胞分化誘導培地は、hMSC-BulletKit™-脂肪細胞分化用（Lonza、カタログ番号PT-3004）を使用し、製造業者の指示に従って脂肪細胞への分化誘導を行うことができる。このキットは、基本培地（Basal medium）、L-グルタミン、間葉系細胞増殖サプリメント（Mesenchymal cell growth supplement（MCGS））、デキサメタゾン、インドメタシン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン（IBMX）、GA-1000（ゲンタマイシン、アンホテリシンB）を含んで

構成される。初期細胞蒔種密度は 2.1×10^4 細胞/cm²であることが好ましい。

[0058] MSCから軟骨細胞への分化を行う場合には、MSCが好ましくは100%コンフルエントとなった時点で分化誘導を開始することができる。軟骨細胞分化誘導培地は、hMSC-BulletKit™-軟骨分化用 (Lonza、カタログ番号PT-3003)を使用し、製造業者の指示に従って軟骨細胞への分化誘導を行うことができる。このキットは、基本培地、L-グルタミン、デキサメタゾン、アスコルビン酸、ITS + supplement、ピルビン酸ナトリウム、プロリン、GA-1000 (ゲンタマイシン、アンホテリシンB)を含んで構成される。初期細胞蒔種密度は 5×10^5 細胞/cm²であることが好ましい。

[0059] MSCから骨細胞への分化を行う場合には、MSCが好ましくは100%コンフルエントとなった時点で分化誘導を開始することができる。骨細胞分化誘導培地は、hMSC-BulletKit™-骨芽分化用 (Lonza、カタログ番号PT-3002)を使用し、製造業者の指示に従って骨細胞への分化誘導を行うことができる。このキットは、基本培地、L-グルタミン、デキサメタゾン、アスコルビン酸、ITS + supplement、ピルビン酸ナトリウム、プロリン、間葉系細胞増殖サプリメント (MCGS)、 β -グリセロホスフェート、ペニシリン/ストレプトマイシンを含んで構成される。初期細胞蒔種密度は 3.1×10^5 細胞/cm²であることが好ましい。

[0060] MSCから神経細胞への分化を行う場合には、MSCが好ましくは80~90%コンフルエントとなった時点で分化誘導を開始することができる。神経細胞分化誘導培地は、間葉系幹細胞神経細胞分化培地 (Mesenchymal Stem Cell Neurogenic Differentiation Medium、PromoCell、カタログ番号C-28015)を使用し、製造業者の指示に従って神経細胞への分化誘導を行うことができる。このキットは、基本培地、Supplement Mix(PromoCell、カタログ番号C-39815)を含んで構成される。初期細胞蒔種密度は5000細胞/cm²であることが好ましい。

[0061] 幹細胞の目的とする細胞に分化したか否かは、細胞の形態の観察や、目的とする分化細胞に特有な分化確認用の分化マーカーの発現を確認することにより行うことができる。分化マーカーの発現確認は、当該技術分野で公知の

方法を利用することができる。例えば、マーカー遺伝子の発現の検出には、Real time RT-PCR等を利用することができ、タンパク質マーカーの発現の検出には、マーカー特異的なポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を利用した免疫染色法や酵素活性測定法等を利用することができる。抗体を利用した免疫染色法としては、抗体蛍光染色法を好ましく利用することができる。ここで、抗体蛍光染色法は、抗原抗体反応を利用し、蛍光色素で標識した抗体を試料に取り込ませて染色を行う方法であり、抗原となる物質（分化マーカー）に対して高い特異性で染色を行うことができる。

[0062] 具体的には、脂肪細胞への分化の確認はペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 γ (PPAR γ 、(NR1C3、PPARGとも称する))、CCAAT/エンハンサー結合タンパク質 β (C/EBP β)、脂肪酸結合タンパク質 (FABP (aP2とも称する))、リポタンパクリパーゼ (LPL) 等を利用することができる。軟骨細胞への分化の確認はSex determining region Y-type high mobility group box protein 9 (SOX9)、アグリカン (Aggrecan) 等を利用することができる。骨細胞への分化の確認は分泌性リン酸タンパク質 1 (SPP1、(オステオポンチン : OPNとも称する))、骨シアロタンパク質 (BSP)、オステオカルシン (OCN)、アルカリフォスファターゼ (ALP) 及び石灰能等を利用することができる。神経細胞への分化の確認は微小管関連タンパク質 2 (MAP2)、ネスチン、クラス III β チューブリン (β_{III} -tubulin) 等を利用することができる。

[0063] ここで、PPAR γ は、核内受容体スーパーファミリーに属するタンパク質であり、転写因子としても機能し、主に脂肪組織に分布して、前駆脂肪細胞からの脂肪細胞分化誘導に関与する。SOX9は、未分化の間葉系細胞の凝集及びその後の軟骨細胞の分化過程において必須的な役割を果たしている。一方、SOX5及びSOX6は、SOX9により誘導され、三者は協調してII型コラーゲン等の軟骨特異的遺伝子の転写を誘導し、軟骨細胞への分化を決定づける。SPP1は、石灰化した骨マトリックスへの破骨細胞の付着に関与しており、骨芽細胞分化の前、中期に発現量が増加する。MAP2は、脊椎動物のニューロンに豊富に存在する微小管結合タンパク質である。MAP2は神経前駆細胞から分化すると

発現し始め、成熟したニューロンでは軸索には殆ど存在せず樹状突起と細胞体にほぼ特異的に局在する。

[0064] 本発明の培養基材 1 は、ナノ周期突起 2 が表面に形成された幹細胞培養用の培養基材 1 であり、効率的に幹細胞を分化誘導でき、より成熟した細胞への分化誘導を加速できる。かかる幹細胞の分化誘導加速効果は、幹細胞が決定付けられたあらゆる分化方向に認められる。従って、特定の細胞種への分化のみを選択的に誘導するものではない。このような特性を有する本発明の培養基材 1 は、幹細胞からの組織の作り分けよりもむしろ、大量の分化細胞を生産する際の培養基材 1 として期待される。

[0065] 本発明の培養基材 1 のナノ周期突起 2 の形成は、例えば、超短パルスレーザーの走査により簡便に形成することができ、熱影響が少ないことから、大気中での加工が可能である等、作製への制約が少ないとの利点がある。これにより、本発明の培養基材 1 を簡便かつ低コストに作製することができる。また、本発明の培養基材 1 は、生体適合性及び生体細胞親和性が高いチタン材にナノ周期突起 2 を形成して作製できることから、生体適合性及び生体細胞親和性の向上効果と相まって、さらなる分化誘導の加速化を図ることができる。

[0066] このような特性を有する本発明の培養基材 1 は、幹細胞を利用する技術分野に好適に利用することができる。特に、発生及び分化メカニズムの探索に利用できる。例えば、組織や器官の発生経路、器官形成過程における細胞間相互作用、分化誘導経路、及び分化誘導能や分化方向を制御する分子機構の解明等に好適に利用することができ、幹細胞利用技術の臨床応用をはじめとする実用化のための基盤技術の確立に寄与し得る。さらに、本発明の培養基材 1 上で幹細胞を培養することにより、作り出された細胞、組織、器官を、開発候補薬の薬効評価や、薬物動態評価、安全性評価等の薬理試験や創薬スクリーニング、損なわれた臓器や器官の機能を回復させる再生医療や細胞治療に応用する等、創薬、生命科学や医療への貢献が期待される。再生医療分野においては、例えば、骨細胞への分化は難治性骨折、人工関節、人工歯根

等のインプラント等に利用することができる等、オーダーメイド医療の発展に貢献することができる。

実施例

[0067] 以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、実施例では、ナノ周期突起2として略円形の突起を形成した培養基材1を作製し、間葉系幹細胞を用いて骨細胞、軟骨細胞、神経細胞、及び脂肪細胞への分化誘導を行った例を開示する。しかしながら、本発明は、これに限定するものではない。

[0068] [実施例1] 培養基材1の作製検討

1. 概要

本実施例では、MSCの分化誘導加速効果を示す培養基材1を構築するため、ナノ周期突起2をその表面に形成した培養基材1の作製について検討した。

[0069] 2. 材料及び方法

2-1. レーザー

基板表面にナノ周期突起2を形成するためのレーザーとして、フェムト秒レーザーを使用した。フェムト秒レーザーとして、イムラアメリカ社製のFCP A μ Jewel D-1000、(以下、「D-1000」と称する)を用いた。レーザーの詳細を下記表1に要約する。

[0070] [表1]

装置	D-1000
発振波長	1040nm (基本波)
繰返し周波数	100kHz
出力	1.2W (基本波)
パルス幅	400fs
M ²	1.1

[0071] 2-2. 基板

培養基材1作製のための基板として、鏡面研磨した医療用チタン板(ϕ 14mm $\times$ 1mmの片面研磨品)を用いた。チタン素材は株式会社ティ・ディ・シー(宮城県宮城郡利府町飯土井長者前24-15)からグレード2の純チタン丸棒より切り出し鏡面としたものを購入した。

[0072] チタンは、生体に埋入した際にも、免疫反応を起こすことが少ないことから人工関節や人工歯根をはじめとするインプラント材として汎用されている。しかしながら、チタン材料の軟組織への適合性は未だに検討が進んでいない分野であり、不適合によるインプラントの摘出等が生じること等が報告されている。そこで、本実施例では、周期微細構造形成による生体適合性向上の可能性を探るべく、レーザー加工により周期微細構造を表面に形成した培養基材 1 の作製について検討した。

[0073] 2-2-1. マイクロメートルオーダーの周期溝を基板表面に形成した培養基材（比較例）

基板の表面に複数のマイクロメートルオーダーの溝が平行に配置されたマイクロメートルオーダーの周期溝（以下、「マイクロ周期溝」と称する場合がある）を、フェムト秒レーザー光を上記医療用チタン板表面に照射しつつ走査することで、形成した（フルエンス： 0.7 J/cm^2 、走査速度： 300 mm/秒 、走査回数：14回、偏光：円偏光又は直線偏光）。この結果、幅 $6 \text{ }\mu\text{m}$ 、深さ $0.6 \text{ }\mu\text{m}$ 、ピッチ $12 \text{ }\mu\text{m}$ の周期溝を形成した（（1））。

[0074] ここで、溝の幅とは、溝の端から端までの距離を意味し、溝の長手方向に直交する方向における距離である。当該距離が溝の高さ方向に向かって変化する場合においても、培養基材表面上の距離を意味する。溝の高さとは、溝の最底面の平均高から最上面の平均高までの距離を意味する。溝のピッチとは、最近接する溝の間隔を意味し、溝の長手方向に直交する方向における最近接する溝の間隔であり、溝の長手方向に直交する方向における凹凸の一周期分の距離とする。

[0075] 2-2-2. ナノメートルオーダーの周期溝を基板表面に形成した培養基材（比較例）

基板の表面に複数のナノメートルオーダーの溝が平行に配置されたナノメートルオーダーの周期溝（以下、「ナノ周期溝」と称する場合がある）を、フェムト秒レーザー光を上記医療用チタン板表面に照射しつつ走査することで、形成した（フルエンス： 0.8 J/cm^2 、走査速度： 500 mm/秒 、走査回数：1回

、偏光：直線偏光）。この結果、深さ $0.2\mu\text{m}$ 、ピッチ $0.7\mu\text{m}$ の周期溝を形成した（（2））。

[0076] 2-2-3. ハイブリッド周期溝を基板表面に形成した培養基材（比較例）

当該培養基材は、従来技術の項に記載の本発明者らが開発したマイクロ周期溝とナノ周期溝とを互いに平行に配置し共存させたハイブリッド周期溝を基板表面に形成した培養基材（非特許文献1及び2を参照）である。フェムト秒レーザー光を上記医療用チタン板表面に照射しつつ走査することで、形成した。走査回数を20回にする以外は上記2-2-1. に記載の手順でマイクロ周期溝を形成した後に、上記2-2-2. に記載の手順でナノ周期溝を上書きした。ナノ周期溝は、偏光方向を走査方向に直交させた。この結果、溝の幅 $6\mu\text{m}$ 、深さ $0.6\mu\text{m}$ 、ピッチ $12\mu\text{m}$ のマイクロ周期溝と、深さ $0.2\mu\text{m}$ 、ピッチ $0.7\mu\text{m}$ のナノ周期溝が形成されたハイブリッド周期溝を有する培養基材が作製された（（3））。

[0077] 2-2-4. ナノ周期突起2を基板表面に形成した培養基材1（実施例）

ナノ周期突起2は、フルエンス $0.8\text{J}/\text{cm}^2$ 、走査速度： $500\text{mm}/\text{秒}$ 、走査回数：1回、偏光：円偏光にて行った。この結果、径 $0.5\mu\text{m}$ 、高さ $0.2\mu\text{m}$ 、ピッチ $0.7\mu\text{m}$ のナノ周期突起2が表面に形成された培養基材1が作製された（（4））。作製されたナノ周期突起2を基板表面に形成した培養基材1の加工表面の走査型電子顕微鏡（SEM）像を図1に示す。

[0078] 〔実施例2〕培養基材1上でのMSCの分化誘導解析（分化マーカーでの確認）

1. 概要

本実施例では、上記実施例1にて作製したナノ周期突起2を表面に形成した培養基材1上でのMSCの分化誘導について検討した。本実施例では、MSCの骨細胞、軟骨細胞、神経細胞、及び脂肪細胞への分化誘導について検討し、分化マーカーをもって分化誘導状態を確認した。

[0079] 2. 材料及び試験方法

2-1. 培養基材

上記実施例1の2-2-1. ～2-2-4. で作製した比較例及び実施例

の培養基材を使用した。鏡面研磨した医療用チタン板にレーザー加工を施さずにそのまま使用したものをコントロールとした（（５））。

[0080] ２－２．細胞

ヒトMSC（hMSC 間葉系幹細胞、Lonza、カタログ番号PT-2501）を用いた。

[0081] ２－３．分化誘導

上記各培養基材を70%エタノール中に20分間浸漬し滅菌した後、蒸留水にて3回洗浄を行った。洗浄後、培養基材を12ウェル細胞培養プレートのウェル底面に静置し、培地を添加し培養基材を培地中に浸漬した。培地中に浸漬した各培養基材に、MSCを播種し6時間培養した。

[0082] このとき、細胞の初期蒔種密度は、5000/cm²であった。培地は、使用調製済みのMSCGM™ BulletKit™（Lonza、カタログ番号PT-3001）を使用した。

[0083] 上記各培養基材上で培養したMSCを、72時間（上記した所望のコンフルエント（骨細胞、軟骨細胞への分化の場合には100%コンフルエント、神経細胞、脂肪細胞への分化の場合には80～90%コンフルエント）となるまで）増殖培地で培養した。その後、72時間分化誘導培地で培養することにより分化誘導をした。ここで、増殖培地としては実施例3の培地を使用し、4継代目のMSCを分化誘導した。分化誘導方法の詳細は以下の通りである。

[0084] ２－１－１．骨細胞への分化誘導

骨細胞への分化を行う場合には、MSCが好ましくは100%コンフルエントとなった時点で分化誘導を開始する。骨細胞分化誘導培地は、hMSC-BulletKit™-骨芽分化用（Lonza、カタログ番号PT-3002）を使用し、製造業者の指示に従って骨細胞への分化誘導を行うことができる。このキットは、基本培地、L-グルタミン、デキサメタゾン、アスコルビン酸、ITS + supplement（hMSC-BulletKit™-軟骨分化用（Lonza、カタログ番号PT-3003）に含まれる）、ピルビン酸ナトリウム、プロリン、間葉系細胞増殖サプリメント（MCGS）、β-グリセロホスフェート、ペニシリン／ストレプトマイシンを含んで構成される。初期細胞蒔種密度は 3.1×10^5 細胞/cm²であることが好ましい。

[0085] ２－１－２．軟骨細胞への分化誘導

軟骨細胞への分化を行う場合には、MSCが好ましくは100%コンフルエントとなった時点で分化誘導を開始する。軟骨細胞分化誘導培地は、hMSC-BulletKit™-軟骨分化用（Lonza、カタログ番号PT-3003）を使用し、製造業者の指示に従って軟骨細胞への分化誘導を行うことができる。このキットは、基本培地、L-グルタミン、デキサメタゾン、アスコルビン酸、ITS + supplement、ピルビン酸ナトリウム、プロリン、GA-1000（ゲンタマイシン、アンホテリシンB）を含んで構成される。初期細胞蒔種密度は 5×10^5 細胞/cm²であることが好ましい。

[0086] 2-1-3. 神経細胞への分化

神経細胞への分化を行う場合には、MSCが好ましくは80~90%コンフルエントとなった時点で分化誘導を開始することができる。神経細胞分化誘導培地は、間葉系幹細胞神経細胞分化培地（Mesenchymal Stem Cell Neurogenic Differentiation Medium、PromoCell、カタログ番号C-28015）を使用し、製造業者の指示に従って神経細胞への分化誘導を行うことができる。このキットは、基本培地、Supplement Mix（PromoCell、カタログ番号C-39815）を含んで構成される。初期細胞蒔種密度は5000細胞/cm²であることが好ましい。

[0087] 2-1-4. 脂肪細胞への分化

脂肪細胞への分化誘導を行う場合には、MSCが好ましくは80~90%コンフルエントとなった時点で分化誘導を開始することができる。脂肪細胞分化誘導培地は、hMSC-BulletKit™-脂肪細胞分化用（Lonza、カタログ番号PT-3004）を使用し、製造業者の指示に従って脂肪細胞への分化誘導を行うことができる。このキットは、基本培地（Basal medium）、L-グルタミン、間葉系細胞増殖サプリメント（Mesenchymal cell growth supplement（MCGS））、デキサメタゾン、インドメタシン、3-イソブチル-1-メチル-キサンチン（IBMX）、GA-1000（ゲンタマイシン、アンホテリシンB）を含んで構成される。初期細胞蒔種密度は 2.1×10^4 細胞/cm²であることが好ましい。

[0088] 2-2. 分化誘導の確認

培養後、MSCでは発現せず、骨細胞、軟骨細胞、神経細胞、脂肪細胞特異的

に発現する分化マーカーを解析することにより、分化誘導を確認した。分化マーカーとしては、骨細胞への分化の確認はSPP1を、軟骨細胞への分化の確認はSOX9を、神経細胞への分化の確認はMAP2を、脂肪細胞への分化の確認はPPARGを用いた。実験はN=3で行った。

[0089] 細胞の分化マーカーの発現解析は、Real time RT-PCR遺伝子解析法で行った。具体的には、分化誘導後の細胞からtotal RNAを抽出し、逆転写反応によりRNAからcDNAを合成した。続いて、合成したcDNAを鋳型としてPCRを行った。同様にしてGAPDHの発現量を測定し、GAPDHに対する相対発現量を算出した。また、組織培養用ポリスチレン（TCPS）についても同様にして各細胞への分化誘導の確認を行った。

[0090] ここでは、遺伝子特異的プライマーを、アメリカハーバード大学メディカルスクールのプライマーバンク（<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>）を利用し、デザインした。デザインしたプライマーをグライナー社bio-oneに依頼し作成した。表2に、本実施例で使用した遺伝子特異的プライマーの配列情報を要約する。また、コントロールとして、GAPDHの発現量を測定した。

[0091] [表2]

マーカー	遺伝子	遺伝子特異的プライマーの配列 (5'→3')
骨細胞への分化	SPP1	フォワード CTCCATTGACTCGAACGACTC (配列番号1)
		リバース CAGGTCTGCGAACTTCTTAGAT (配列番号2)
軟骨細胞への分化	SOX9	フォワード AGCGAACGCACATCAAGAC (配列番号3)
		リバース CTGTAGGCGATCTGTTGGGG (配列番号4)
神経細胞への分化	MAP2	フォワード CTCAGCACCG CTAACAGAGG (配列番号5)
		リバース CATTGGCGCT TCGGACAAG (配列番号6)
脂肪細胞への分化	PPARG	フォワード GGGATCAGCT CCGTGGATCT (配列番号7)
		リバース TGCACTTTGG TACTCTTGAA GTT (配列番号8)
コントロール	GAPDH	フォワード GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT (配列番号9)
		リバース GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG (配列番号10)

[0092] 3. 結果

結果を図2のグラフに示す。図中(1)は比較例のマイクロ周期溝を基板表面に形成した培養基材、(2)は比較例のナノ周期溝を基板表面に形成した培養基材、(3)は比較例のハイブリッド周期溝を基板表面に形成した培養基材、(4)は実施例のナノ周期突起2を基板表面に形成した培養基材1、(5)はコントロールである。

[0093] ナノ周期突起2を基板表面に形成した培養基材1では、検討を行った骨細胞、軟骨細胞、神経細胞及び脂肪細胞の何れの細胞種への分化誘導に対しても、高い加速効果を示した((4))。この効果は、特に、骨細胞において顕著であった。一方、本発明者らが以前に構築したハイブリッド周期溝を基板表面に形成した場合には、骨及び軟骨細胞への分化誘導に対して有意な加速効果が認められた((3))。マイクロ周期溝及びナノ周期溝を単独で基板表面に形成した場合、及びコントロールでは、分化の度合いは基板のない環境で培養した場合と有意差が認められず、分化誘導加速効果があるとはいえなかった((1)、(2)、(5))。

[0094] この結果から、以前構築したハイブリッド周期溝は、骨及び軟骨細胞への分化誘導という特定方向への分化に対して、分化誘導加速効果を奏することができるものである。これに対して、本発明のナノ周期突起2を表面に形成した培養基材1は、幹細胞が運命づけられている分化誘導方向の何れの方向に対しても高い分化誘導加速効果を奏することができるものであることが理解できる。

産業上の利用可能性

[0095] 本発明は、培養基材に関し、特に幹細胞の培養が要求されるあらゆる分野、特に、創薬、生命科学、及び医療等の産業分野において利用可能である。例えば、発生や分化や疾患メカニズムの解明等に好適に利用でき、幹細胞利用技術の臨床応用をはじめとする実用化のための基盤技術の確立に寄与し得る。また、本発明の培養基材は、骨細胞への分化誘導に対して顕著な加速効果が認められたことから、具体的な用途として、表面に骨形成機能を備える

将来世代のインプラント等が挙げられる。

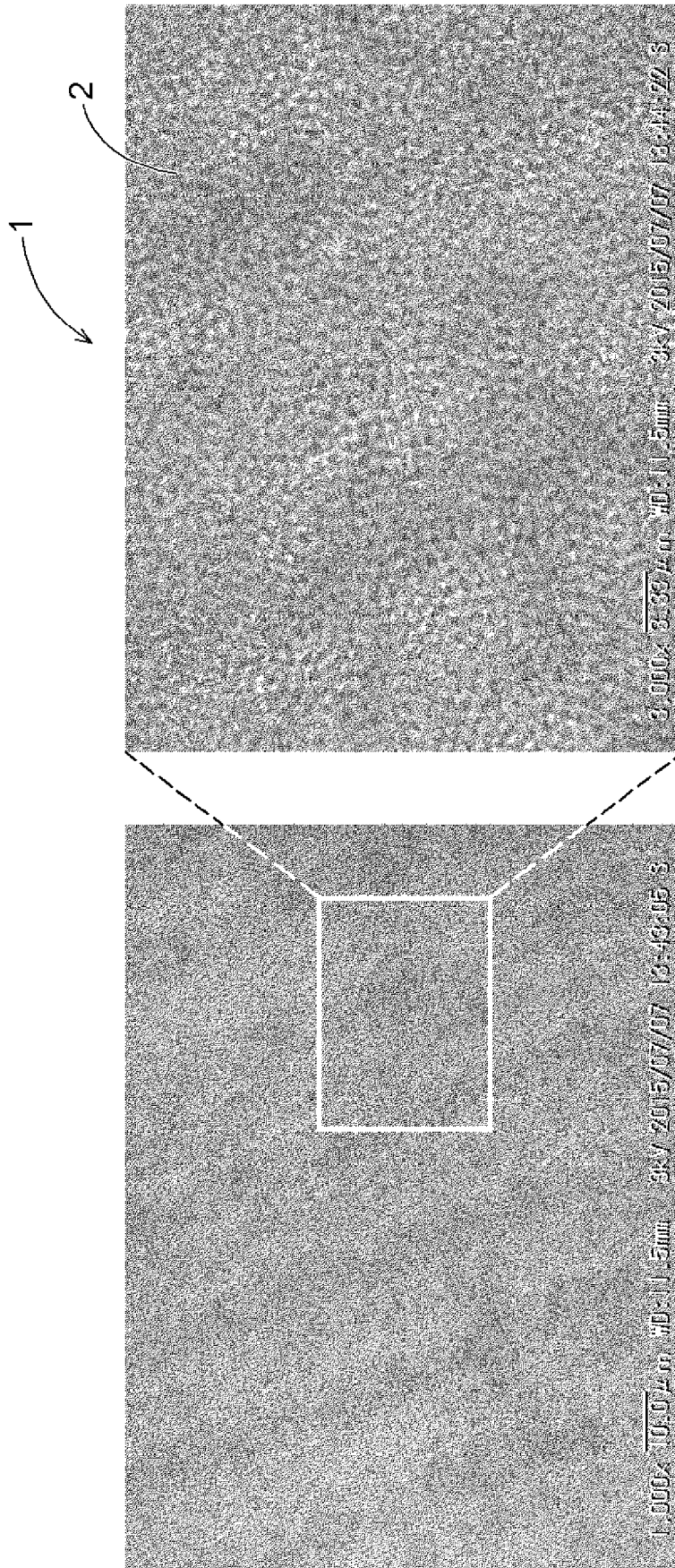
符号の説明

- [0096] 1 培養基材
- 2 ナノメートルオーダーの周期突起構造（ナノ周期突起）

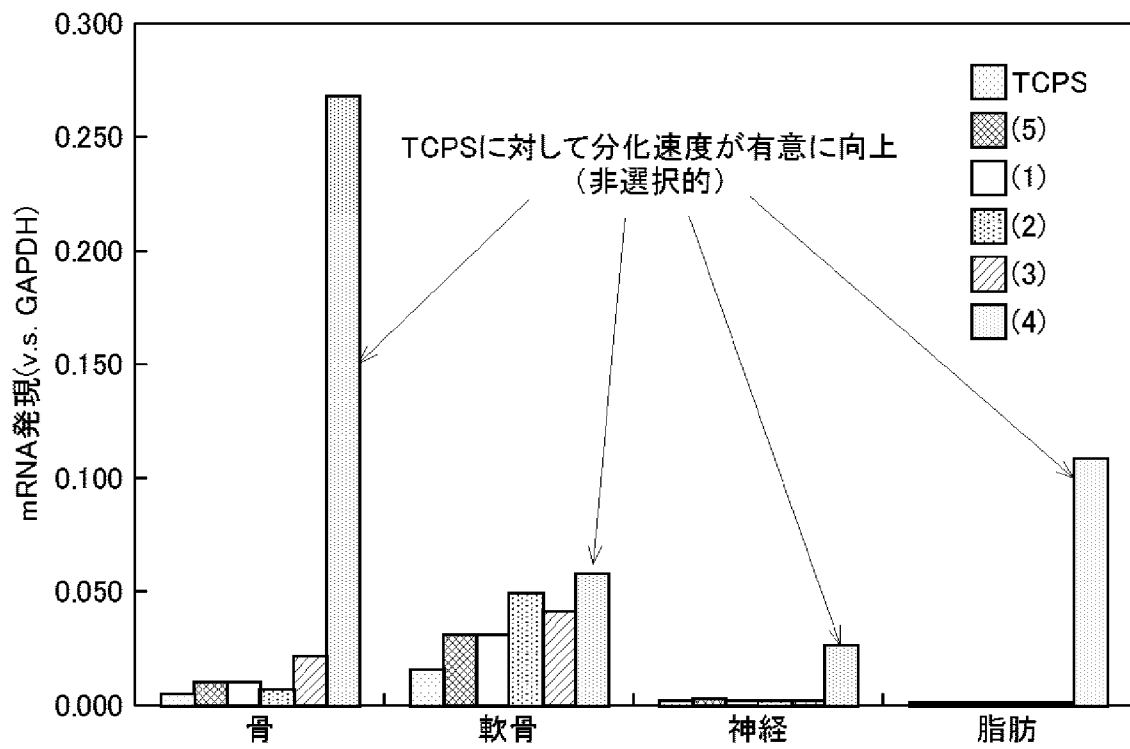
請求の範囲

- [請求項1] ナノメートルオーダーの周期突起構造を表面に有し、幹細胞を前記表面にて培養する培養基材。
- [請求項2] 前記ナノメートルオーダーの周期突起構造は、径 $0.1\sim 1\mu\text{m}$ 、高さ $0.01\sim 0.5\mu\text{m}$ 、ピッチ $0.1\sim 1\mu\text{m}$ である請求項1に記載の培養基材。
- [請求項3] 材質が、チタンである請求項1又は2に記載の培養基材。
- [請求項4] 超短パルスレーザーの円偏光によるナノ周期構造形成により基板表面に前記ナノメートルオーダーの周期突起構造を形成する工程を有する、請求項1～3の何れか一項に記載の培養基材の作製方法。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/040382

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C12M3/00 (2006.01) i, C12N5/0775 (2010.01) n, C12N15/09 (2006.01) n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. C12M3/00, C12N5/0775, C12N15/09

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

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

JSTPIus/JMEDPIus/JST7580 (JDreamlII)

CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BI01IS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2015-164406 A (DAINIPPON PRINTING CO., LTD.) 17	1-2
Y	September 2015, claims, paragraphs [0037], [0066], [0070], fig. 6a (Family: none)	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/040382

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	SJOSTROM, T. et al., "Fabrication of pillar-like titania nanostructures on titanium and their interactions with human skeletal stem cells", Acta Biomaterialia, 05 June 2009, vol. 5, no. 5, pp. 1433-1441, abstract, fig. 3, table 1	1, 3 1-4
X Y	JP 2014-138605 A (UNIV AARHUS) 31 July 2014, claims, paragraphs [0016]-[0018] (Family: none)	1, 3 1-4
X Y	JP 2010-227551 A (PUENTE KK) 14 October 2010, claims, paragraphs [0020], [0025] (Family: none)	1, 3 1-4
Y	JP 2016-034250 A (DAINIPPON PRINTING CO., LTD.) 17 March 2016, paragraph [0050] (Family: none)	1-4
Y	CHEN, P. et al., "Role of topography of titanium surface on multiple differentiations of mesenchymal stem cells," 日本金属学会講演概要集 2016 年 (第 158 回) 春期講演大会 (Collected abstracts of Meeting of the Japan Institute of Metals), 09 March 2016, p. 301, column "Experimental procedure"	1-4
Y	CHEN, P. et al., Role of hierarchical topography of titanium surface on mesenchymal stem cells adhesion and differentiation behaviours in vitro, frontiers [online], 30 March 2016, < https://www.frontiersin.org/10.3389/conf.FBIOE.2016.01.02024/event_abstract > [retrieved on 2017-1-25], column "Materials and Methods"	1-4
Y	CHEN, P. et al., Role of topography of titanium surface on mesenchymal stem cells behaviors, The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials, abstracts, 09 November 2015, p. 125, 1D-12, column "Materials and Methods"	1-4

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12M3/00(2006.01)i, C12N5/0775(2010.01)n, C12N15/09(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（I P C））

Int.Cl. C12M3/00, C12N5/0775, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2015-164406 A（大日本印刷株式会社）	1-2
Y	2015.09.17, 特許請求の範囲、[0037]、[0066]、[0070]、 図6a (ファミリーなし)	1-4

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「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

29.01.2018

国際調査報告の発送日

06.02.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A/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）

厚田 一拓

4N

5575

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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	SJÖSTRÖM Terje et al, Fabrication of pillar-like titania nanostructures on titanium and their interactions with human skeletal stem cells, Acta Biomaterialia, 2009.06.05, Vol.5, No.5, pp.1433-1441 特に、Abstract、Fig.3、Table 1	1, 3 1-4
X Y	JP 2014-138605 A (オーフス ユニベルシテット) 2014.07.31, 特許請求の範囲、[0016]-[0018] (ファミリーなし)	1, 3 1-4
X Y	JP 2010-227551 A (合同会社 P U E N T E) 2010.10.14, 特許請求の範囲、[0020]、[0025] (ファミリーなし)	1, 3 1-4
Y	JP 2016-034250 A (大日本印刷株式会社) 2016.03.17, [0050] (ファミリーなし)	1-4
Y	CHEN Peng et al., Role of topography of titanium surface on multiple differentiations of mesenchymal stem cells, 日本金属学会講演概要集 2016 年(第 158 回)春期講演大会, 2016.03.09, p.301 特に、” Experimental procedure” の欄	1-4
Y	CHEN Peng et al., Role of hierarchical topography of titanium surface on mesenchymal stem cells adhesion and differentiation behaviours in vitro, frontiers [online], 2016.03.30, < https://www.frontiersin.org/10.3389/conf.FBIOE.2016.01.02024/event_abstract > [retrieved on 2017-1-25] 特に、” Materials and Methods” の欄	1-4
Y	陳鵬 et al., Role pf topography of titanium surface on mesenchymal stem cells behaviors, 第 37 回 日本バイオマテリアル学会大会 予稿集, 2015.11.09, p.125 1D-12 特に、” Materials and Methods” の欄	1-4