

明 細 書

発明の名称： ヒドロキシ基又はスルホ基を有するポリロタキサン

技術分野

[0001] 本発明は、ヒドロキシ基又はスルホ基を有するポリロタキサンに関する。

背景技術

[0002] 細胞培養技術は、医薬品及び化粧品分野、再生医療研究において広く利用されており、重要な技術である。細胞培養の環境としては、適切な培養環境、培養液、培養基材が必要となる。中でも、培養基材は、細胞が接着する足場としての役割を有しており、細胞の培養に適した表面であるか加工できる、細胞毒性がない、滅菌処理ができるか滅菌状態が維持できること、培養条件下において変質しない、顕微鏡における観察を妨げない等の特性が求められる。

[0003] 従来、培養基材としては、ガラス製品が多用されていたが、現在ではポリスチレン製品が汎用されている。しかし、ポリスチレン樹脂を成形した培養基材は、表面が疎水性であり、細胞との親和性も低いため、一般的に表面処理が施されている。表面処理としては、プラズマ処理、コロナ放電処理、酸化剤処理、親水性物質によるコーティングが挙げられる。コーティング剤としては、細胞接着を促進するものが多く、例えば、Ⅰ型コラーゲン、ⅠⅤ型コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、マトリゲル、ハイドロキシアパタイト等が知られている。また、水溶性エラスチンでコーティングすると、血管平滑筋細胞又はエラスチン反応性細胞の分化誘導を促進することも知られている。

[0004] 間葉系幹細胞は自己複製能と骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、靱帯細胞などの間葉系組織への多分化能を有する中胚葉由来の体性幹細胞である。成体組織では真皮、骨格筋、脂肪組織などの結合組織や主に骨髓間質に存在し、結合組織の修復や恒常性の維持、造血幹細胞の増殖や分化の制御に機能している。間葉系幹細胞の分化は、生物学的因子や物理学的因子に

より、複雑に制御されている。例えば、間葉系幹細胞の培地に、デキサメタゾン、 β -グリセロリン酸、アスコルビン酸を加えると骨芽細胞へ、デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、インスリン、インドメタシンを添加すると脂肪細胞へ分化誘導できることが知られている。

[0005] 近年、培養基材の特性（例えば、硬さ等のバルク特性、コーティングの表面特性）が培養細胞の機能に影響を与えることが注目されており、所望の機能を有する細胞を増殖させる研究が報告されている（非特許文献1～3）。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1: Cell, 2006, 126, 677-689.

非特許文献2: Nature Reviews Materials, 2020, 5, 686-705.

非特許文献3: Adv. Healthcare Mater. 2015, 4, 215-222.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

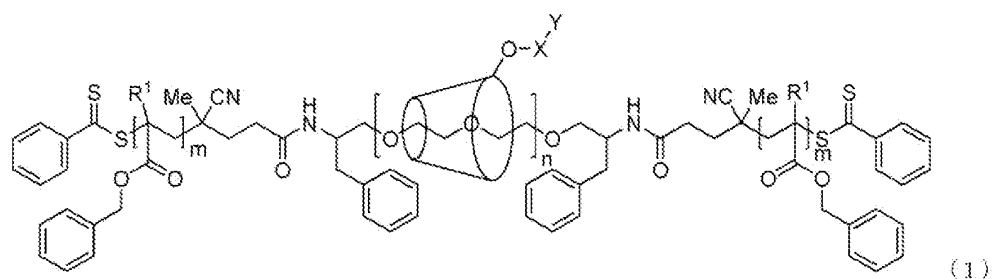
[0007] しかしながら、所望の機能を有する細胞を得るために、細胞培養基材のバルク特性（硬さ等）を微調整することは、いまだ困難である。間葉系幹細胞を所望の細胞系統に分化させるために、適切な物理学的因子を選択することは有用であると考えられる。そこで、本発明の目的は、間葉系幹細胞の分化誘導を促進できるコーティング剤及び培養基材を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明は、以下の[1]～[10]を提供する。

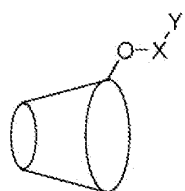
[1] 間葉系幹細胞の骨芽分化及び／又は脂肪分化を促進させるための、式(1)で表されるポリロタキサンを含有するコーティング剤。

[化1]



[式中、 R^1 は水素原子又はメチル基であり、 m は1～2000であり、 n は10～500であり、

[化2]



は、少なくとも1つの水酸基が、 $-X-Y$ で表される基で修飾されたシクロデキストリンであり、 X は2価の有機基であり、 Y は水酸基又はスルホ基である。]

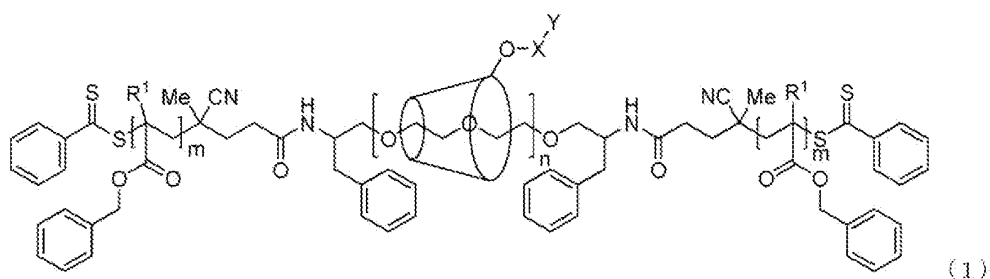
[2] 前記ポリロタキサンが、1～18個の水酸基が $-X-Y$ で表される基で修飾されたシクロデキストリンを含む、[1]に記載のコーティング剤。

[3] 前記ポリロタキサンにおいて、シクロデキストリンの貫通数が3～220個である、[1]又は[2]に記載のコーティング剤。

[4] 間葉系幹細胞の骨芽分化及び／又は脂肪分化を促進させるための細胞培養方法であって、

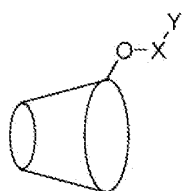
式(1)で表されるポリロタキサンを含有する組成物でコーティングされた基板の表面上で、間葉系幹細胞を培養することを含む、方法。

[化3]



[式中、 R^1 は水素原子又はメチル基であり、 m は1～2000であり、 n は10～500であり、

[化4]



は、少なくとも1つの水酸基が $-X-Y$ で表される基で修飾されたシクロデキストリンであり、 X は2価の有機基であり、 Y は水酸基又はスルホ基である。]

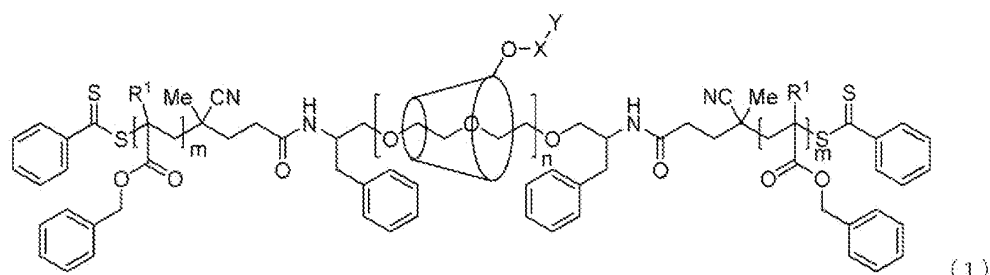
[5] 基板の表面上に、式(1)で表されるポリロタキサンを含有する組成物をコーティングすることを含む、[4]に記載の方法。

[6] 前記ポリロタキサンが、1～18個の水酸基が $-X-Y$ で表される基で修飾されたシクロデキストリンを含む、[4]又は[5]に記載の方法。

[7] 前記ポリロタキサンにおいて、シクロデキストリンの貫通数が3～220個である、[4]～[6]のいずれかに記載の方法。

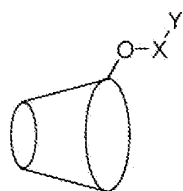
[8] 式(1)で表されるポリロタキサンを含有する組成物でコーティングされた基板を含む培養基材。

[化5]



[式中、 R^1 は水素原子又はメチル基であり、 m は1～2000であり、 n は10～500であり、

[化6]



は、少なくとも1つの水酸基が $-X-Y$ で表される基で修飾されたシクロデキストリンであり、 X は2価の有機基であり、 Y は水酸基又はスルホ基である。]

[9] 前記ポリロタキサンが、1～18個の水酸基が $-X-Y$ で表される基で修飾されたシクロデキストリンを含む、[8]に記載の培養基材。

[10] 前記ポリロタキサンにおいて、シクロデキストリンの貫通数が3～200個である、[8]又は[9]に記載の培養基材。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、間葉系幹細胞の骨芽分化及び／又は脂肪分化を促進できるコーティング剤を提供することができる。また、本発明によれば、当該コーティング剤でコーティングした基板（培養基材）を提供することもできる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]参考例1、実施例1～2及び比較例1～2の ^1H-NMR スペクトルを比較した図である。

[図2]参考例1、実施例1、比較例2のTOF-SIMS測定により得られた質量スペクトルである。

[図3]比較例1、実施例2、TCPSのTOF-SIMS測定により得られた質量スペクトルである。

[図4]参考例1、実施例1～2及び比較例1～2のフィブロネクチン吸着量を示すグラフである。

[図5]参考例1、実施例1～2及び比較例1～2の細胞密度を示すグラフである。

[図6]参考例1、実施例1～2及び比較例1～2を用いて、骨芽分化を誘導した細胞を撮影した顕微鏡写真である（スケールバーは100 μ mである。）

。

[図7]（A）は、参考例1、実施例1～2及び比較例1～2を用いて、骨芽分化を誘導した細胞をアリザリンレッドSで染色した写真（スケールバーは200 μ mである。）であり、（B）は、染色面積を比較したグラフである。

[図8]参考例1、実施例1～2及び比較例1～2の脂肪分化を誘導した細胞を撮影した顕微鏡写真である（スケールバーは100 μ mである。）。

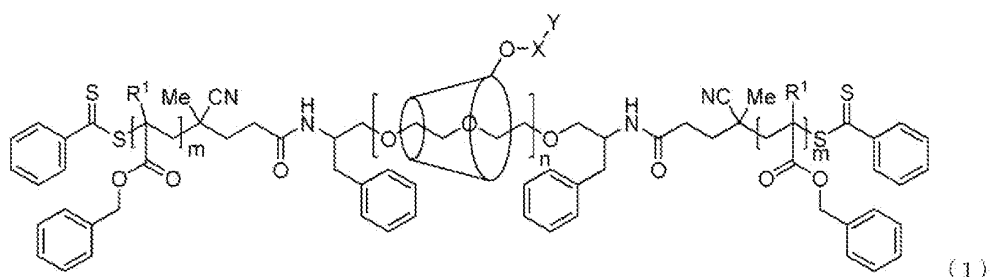
[図9]（A）は、参考例1、実施例1～2及び比較例1～2を用いて、脂肪分化を誘導した細胞をオイルレッドOで染色した写真（スケールバーは100 μ mである。）であり、（B）は、染色面積を比較したグラフである。

発明を実施するための形態

[0011] <第一実施形態>

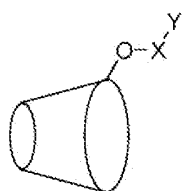
本発明の第一実施形態は、間葉系幹細胞の骨芽分化及び／又は脂肪分化を促進させるための、式（1）で表されるポリロタキサンを含有するコーティング剤である。

[化7]



式中、 R^1 は水素原子又はメチル基であり、 m は1～2000であり、 n は10～500であり、

[化8]

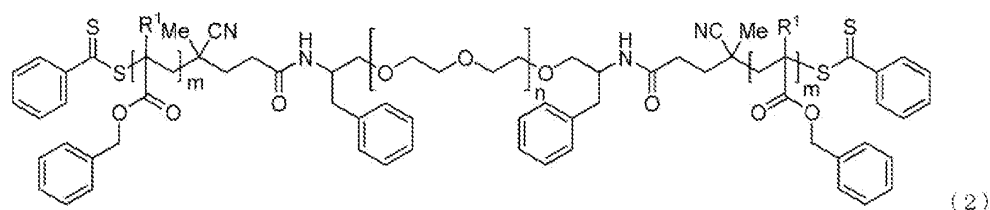


は、少なくとも1つの水酸基が、 $-X-Y$ で表される基で修飾されたシクロデキストリンであり、 X は2価の有機基であり、 Y は水酸基($-OH$)又はスルホ基($-SO_3H$)である。ポリロタキサン1分子中に、少なくとも1つの当該シクロデキストリンが含まれる。

[0012] 式(1)で表されるポリロタキサンは、軸分子(線状高分子)と修飾されたシクロデキストリン(CD、環状分子)からなり、軸分子が少なくとも1つの修飾されたシクロデキストリンを貫通しており、その両端でキャップされている。

[0013] 軸分子は、以下の式(2)で表され、ポリエチレングリコール構造を分子中央に有し、末端にフェニルジチオエステル基でキャップされたポリ(メタ)アクリレート構造を有する。式中、 R^1 は水素原子又はメチル基である。ポリエチレングリコール構造部分にシクロデキストリンが貫通される。各 R^1 は互いに同一であっても異なってもよい。 R^1 としては、メチル基が好ましい。

[化9]



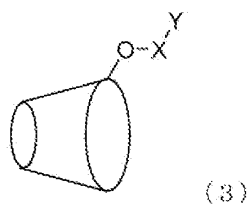
[0014] ポリエチレングリコール構造は、モノマー単位としてエチレングリコールを含み、少なくとも1つのシクロデキストリンを貫通できる分子長を備えていればよい。ポリエチレングリコール構造を形成するエチレングリコール単位の数は、20～1000であってよく、85～800が好ましく、100～700がより好ましい。式中、 n は10～500であってよく、43～400が好ましく、50～350がより好ましい。

[0015] ポリ(メタ)アクリレート構造は、モノマー単位としてベンジル(メタ)アクリレートを含む。本明細書中、「(メタ)アクリレート」という語は、「アクリレート」及び「メタアクリレート」の両方を意味する。発明者らは、ポリ(メタ)アクリレート構造は、ポリスチレン等の基板への密着性を高める作用を有しているため、シクロデキストリンを貫通したポリエチレングリコール部分がループ状に基板から離れた状態になっていると考えている。ポリ(メタ)アクリレート構造を形成するベンジル(メタ)アクリレート単位の数 m は、トリブロック共重合体の片末端のポリベンジル(メタ)アクリレートあたり、1～2000であってよく、20～1000が好ましく、30～500がより好ましい。各 m は互いに同一であっても異なってもよい。

[0016] 本実施形態で使用される修飾されたシクロデキストリンは、以下の式(3)で表され、構成するグルコースの水酸基の少なくとも1つが-X-Yで修飾されている。シクロデキストリンは、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン及びこれらの組合せのいずれであってもよい。好ましいシクロデキストリンは、 α -シクロデキストリンである。下記は、-X-Yで修飾されたシクロデキストリンを模式的に表した図

である。図中の「 $-O-X-Y$ 」は、シクロデキストリンを構成するグルコース中の水酸基が $-X-Y$ で修飾されたことを示す。図中、「 $-O-X-Y$ 」は1つのみ示しているが、1つの水酸基のみが $-X-Y$ で修飾されていると限定的に解釈されるべきではない。

[化10]



[0017] ポリロタキサンでは、少なくとも1つの修飾されたシクロデキストリンが、軸分子によって貫通されている。ポリロタキサン1分子あたりのシクロデキストリンの数は、独立に定めることができ、ポリエチレングリコール構造の分子長によって、一義的に定める必要はない。また、化学量論的には、シクロデキストリンはポリエチレングリコールの繰り返し単位であるエチレングリコールの2ユニットを包接可能であることから、環状分子の数には、使用する線状高分子の分子量によって上限がある。例えば、数平均分子量20000のポリエチレングリコール1分子あたりのシクロデキストリンの数は、3～220であってもよく、5～150が好ましく、5～120がより好ましく、5～100が特に好ましい。但し、シクロデキストリンの軸分子の主鎖方向の長さ（ポリロタキサンが複数のシクロデキストリンを有する場合は、その長さの合計）が、ポリエチレングリコールの分子長を超えることはない。

[0018] シクロデキストリン中の $-X-Y$ で修飾された水酸基の数は、1つのシクロデキストリンに対して、1～18個であってよく、1～10個が好ましく、2～8個がより好ましい。 $-X-Y$ で修飾された水酸基の数が上記範囲であると、間葉系幹細胞の脂肪分化及び／又は骨芽分化を促進させる効果がより優れる。 $-X-Y$ で修飾された水酸基の数は10個以下であると、ジメチルスルホキシド（DMSO）等の有機溶媒に対する溶解性により優れる。ま

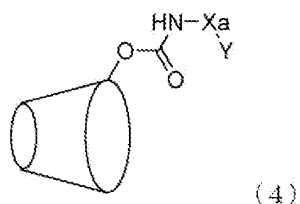
た、 $-X-Y$ で修飾された水酸基の数は2個以上であると、分子可動性の変化量、表面の化学組成、表面の物理化学的特性（例えば、接触角、ゼータ電位）の変化量が大きくなる。 $-X-Y$ で修飾された水酸基の数によりポリロタキサンの分子可動性、表面の化学組成、表面の物理化学的特性（例えば、接触角、ゼータ電位）が調節できるため、間葉系幹細胞の脂肪分化及び／又は骨芽分化促進に適した分子可動性のポリロタキサン表面が作製できる。

[0019] X は、2価の有機基であり、特に制限されない。有機基としては、例えば、炭素原子数1～10のアルキレン基、炭素原子数1～20のアルケニレン基、炭素原子数1～20のアルキニレン基が挙げられ、任意の位置にオキシ基を有していてもよく、オキシ基、イミノ基を介していてもよく、これらの組合せであってもよい。例えば、オキシ基を有する炭素原子とオキシ基を組み合わせるとエステル結合を成し、オキシ基を有する炭素原子とイミノ基を組み合わせるとアミド結合を成す。また、複数のオキシ基を有するアルキレン基は、オキシアルキレン基とも呼ばれ、例えば、炭素原子数1～10のポリオキシエチレン基、炭素原子数1～10のポリオキシプロピレン基が含まれる。有機基の具体例は、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、ブチレン基、ペンチレン基、ヘキシレン基、ヘプチレン基、オクチレン基、ノニレン基、デシレン基等のアルキレン基；プロピニレン基、ブテニレン基、ペンテニレン基、ヘキセニレン基、ヘプテニレン基、オクテニレン基、ノネニレン基、デセニレン基等のアルケニレン基；プロパルギル基、ブチニレン基、ペンチニレン基、ヘキシニレン基、ヘプチニレン基、オクチニレン基、ノニレン基、デシニレン基等のアルキニレン基が挙げられる。オキシ基、オキシ基、又はイミノ基を有する有機基としては、シクロデキストリンの水酸基由来の酸素原子とともにエステル結合、炭酸エステル結合、又はウレタン結合を形成していることが好ましい。オキシ基、オキシ基、又はイミノ基を有する有機基としては、例えば、カルボニルメチレン基（ $-C(=O)CH_2-$ ）等のカルボニルアルキレン基；メチレンカルボニル基（ $-CH_2C(=O)-$ ）等のアルキレンカルボニル基；カルボニルアミノメチレン基（ $-C(=$

O) NHCH_2- 等のカルボニルアミノアルキレン基；メチレンカルボニルアミノ基 ($-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$) 等のアルキレンカルボニルアミノ基；カルボニルアミノエチレン基 ($-\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$) 等のカルボニルアミノアルキレン基、カルボニルアミノエチレンオキシエチレン基 ($-\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2-$) 等のカルボニルアミノアルキレンオキシアルキレン基；オキシプロピレン基 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) 等のオキシアルキレン基が挙げられる。

[0020] 修飾されたシクロデキストリンは、好ましくは式(4)で表される。式中、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{Xa}-$ は、式(3)中のXに対応し、Xがオキソ基とイミノ基を有する態様の1つに相当する。Xaは、炭素原子数1～9の有機基であり、好ましくは炭素原子数2～9のアルキレン基であり、より好ましくは炭素原子数2～8のポリオキシエチレン基である。

[化11]



[0021] ポリロタキサンは、軸分子が少なくとも1個のシクロデキストリンを貫通した構造を備えている。各シクロデキストリンは、軸分子の主鎖方向に沿って移動することができ、軸分子の主鎖を中心に回転することができる。このような構造特性は、分子可動性と呼ばれる。分子可動性は、例えば、シクロデキストリンの数、構成するシクロデキストリンを構成するグルコースに修飾された置換基の数にしたがって変動し得る。

[0022] 分子可動性は、培養基材の表面上にコーティングを施した後、コーティング表面の静的接触角を、接触角計を用いて測定し、液滴法及びキャプティブバブル法を用いて評価できる。分子可動性の評価は、例えば、Soft Matter, 2012, 8, 5477-5485(Ji-Hun Seo et al.)、Adv. Healthcare Mater. 2015, 4, 215-222等に記載の方法を参照してもよい。具体的には、コーティング表

面の接触角ヒステリシス値を、液滴法で測定した水の接触角（大気中での水の接触角）とキャプティブバブル法で測定した気泡の接触角から求めた水の接触角（水中での水の接触角）の差から計算できる。対照として、DMSOでコーティングした培養基材に対する効果と比較してもよい。

[0023] 分子可動性は、シクロデキストリンの貫通数及び／又はシクロデキストリン中の－X－Yで修飾された水酸基の数を変更することにより、調整することができる。例えば、シクロデキストリンの貫通数が3～120であると、間葉系幹細胞の脂肪分化及び／又は骨芽分化の促進により好適となり得る。シクロデキストリンの貫通数が多いと、再沈殿により精製しやすくなる。

[0024] ポリロタキサンの含有量は、コーティング剤の質量を基準として、0.0005～5質量%であってもよく、0.01～1質量%が好ましく、0.02～0.5質量%がより好ましい。

[0025] 本実施形態にかかるコーティング剤は、上述のポリロタキサンに加えて、溶剤、任意の添加剤を含有してもよい。溶剤としては、例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO）、テトラヒドロフラン（THF）、N，N-ジメチルホルムアミド（DMF）、メタノール、2-プロパノール、クロロホルム、塩化メチレンが挙げられる。また、このような添加剤としては、酸化防止剤等が挙げられる。

[0026] 本実施形態に係るコーティング剤は、培養基材として使用できる基板の表面にコーティングするために使用される。培養基材として使用できる基板は、当業者に周知なものであってよい。基板の材質としては、例えば、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリオレフィン、ポリカーボネート、アクリル系ブロック共重合体（BCF）等が挙げられる。

[0027] 本実施形態にかかるコーティング剤によれば、シクロデキストリンを構成するグルコースにおいて、－X－Yで修飾された水酸基の数を調整することにより、基板自体のバルク特性に依存することなく、間葉系幹細胞の脂肪分化及び／又は骨芽分化の促進を調整することが可能となる。より具体的には、脂肪分化が進むにつれて、細胞内の脂肪滴蓄積量が増加する。細胞内に

蓄積した脂肪滴をオイルレッドO色素により染色し、細胞内の脂肪滴蓄積の程度を評価することができる。間葉系幹細胞の脂肪分化は、脂肪分化を示す指標である分化マーカー遺伝子（例えば、PPAR γ 、C/EBP α 、aP2）の発現量によって判断してもよい。骨芽分化においては、分化が進むにつれて骨結節が形成される（石灰化とも呼ばれる。）。また、骨結節をアリザリンレッドS色素により染色し、石灰化の程度を評価することができる。間葉系幹細胞の骨芽分化は、骨芽分化を示す指標である分化マーカー遺伝子（例えば、RUNX2、アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、オステオポンチン、骨シアロタンパク、I型コラーゲン）の発現量により判断してもよい。

[0028] ポリロタキサンは、実施例を参考にして製造することができ、以下のように製造してもよい。所望の長さのポリエチレングリコールの両末端にある水酸基を脱離基に変換し（例えば、ハロゲン化、メタンスルホニル化、トルエンスルホニル化）、フェニルアラニノールとエーテル化して、ジアミンを得る。得られたジアミンを、シクロデキストリンと混合することにより、擬ロタキサンを得る。このとき、ジアミン1分子に対するシクロデキストリンの量を調整することにより、シクロデキストリンの貫通数を調整することができる。続いて、CPADB及びDMT-MMと反応させてシクロデキストリンが軸分子から抜けないようにキャップした後、可逆的付加開裂連鎖移動重合反応（RAFT重合反応）により、アンカリングセグメントとして両末端にベンジルメタクリレート（（メタ）アクリレート構造に相当する。）を導入する。

[0029] <第二実施形態>

本発明の第二実施形態は、間葉系幹細胞の脂肪分化を促進させるための細胞培養方法であって、式（1）で表されるポリロタキサンを含有する組成物でコーティングされた基板の表面上で、間葉系幹細胞を培養することを含む、方法である。

[0030] 本実施形態において、「式（1）で表されるポリロタキサン」は、第一実

施形態で説明したものを参照でき、「式（１）で表されるポリロタキサンを含有する組成物」は、第一実施形態で説明したコーティング剤を利用できる。

[0031] 本実施形態にかかる細胞培養方法では、培養基材として、式（１）で表されるポリロタキサンを含有する組成物をコーティングした基板を使用する。細胞の培養は、上記コーティングされた基板の表面に細胞を接着させて実施する。

[0032] 培養基材は、基板に、式（１）で表されるポリロタキサンを含有するコーティングを施したものである。基板は、当業者に周知なものであってよい。基板の材質としては、例えば、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリオレフィン、ポリカーボネート、アクリル系ブロック共重合体（ＢＣＦ）等が挙げられる。基板は、市販のガラス製基板又はプラスチック製基板であってもよい。

[0033] 本実施形態にかかる細胞培養方法では、基板上に施されたコーティング表面上に、細胞が浸るように培地を投入し、培養対象の細胞を播種し、培養する。培地は、必要に応じて新しい培地に交換してもよい。また、細胞を分化させる前に増殖用培地を投入して、播種した細胞を増殖させる工程を設けてもよい。この場合、十分な細胞数が得られるまで増殖した後、増殖用培地を分化用培地に置き換える。増殖用培地及び分化用培地は、当業者に周知な培地を利用できる。

[0034] 間葉系幹細胞の脂肪分化用培地としては、例えば、PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany)社のMesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium2(C-28016)が使用できる。

[0035] 細胞培養環境は当業者に周知な条件で、任意に設定することができる。

[0036] 間葉系幹細胞の脂肪分化とは、間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化を意味する。脂肪分化が進むにつれて、細胞内の脂肪滴蓄積量が増加する。間葉系幹細胞の脂肪分化促進効果は、オイルレッドＯによる細胞染色（細胞内の脂肪滴を染色）により評価できる。分化マーカーの発現量の変化を測定するこ

とにより、判断してもよい。例えば、脂肪分化の分化マーカーとしては、 $P\text{PAR}\gamma$ 、 $C/EBP\alpha$ 、 $aP2$ が挙げられる。未修飾ポリロタキサン（例えば、後述する $PRX-PBzMA$ ）を基板（ガラス製又はポリスチレン製）にコーティングした培養基材を用いた場合と比較して、統計学的有意に分化が促進されていれば、間葉系幹細胞の脂肪分化促進効果を有すると判断できる。

[0037] 本実施形態に係る細胞培養方法は、上記基板の表面上に、式（１）で表されるポリロタキサンを含有する組成物をコーティングすることを含んでいてもよい。

[0038] 式（１）で表されるポリロタキサンを含有する組成物は、基板にコーティングすることができる。コーティングの方法は特に制限されず、例えば、キャストリング、スピンコーティング、グラビアコーティング、ダイコーティング、ナイフコーティング、バーコーティング、ブレードコーティング、ロールコーティング等が挙げられる。好ましいコーティングの方法は、キャストリングである。

[0039] <第三実施形態>

本発明の第三実施形態は、間葉系幹細胞の骨芽分化を促進させるための細胞培養方法であって、式（１）で表されるポリロタキサンを含有する組成物でコーティングされた基板の表面上で、間葉系幹細胞を培養することを含む、方法である。

[0040] 本実施形態において、「式（１）で表されるポリロタキサン」は、第一実施形態で説明したものを参照でき、「式（１）で表されるポリロタキサンを含有する組成物」は、第一実施形態で説明したコーティング剤を利用できる。

[0041] 本実施形態にかかる細胞培養方法では、培養基材として、式（１）で表されるポリロタキサンを含有する組成物をコーティングした基板を使用する。細胞の培養は、上記コーティングされた基板の表面に細胞を接着させて実施する。

- [0042] 培養基材は、基板に、式（１）で表されるポリロタキサンを含有するコーティングを施したものである。基板は、当業者に周知なものであってよい。基板の材質としては、例えば、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリオレフィン、ポリカーボネート、アクリル系ブロック共重合体（ＢＣＦ）等が挙げられる。基板は、市販のガラス製基板又はプラスチック製基板であってもよい。
- [0043] 本実施形態にかかる細胞培養方法では、基板上に施されたコーティング表面上に、細胞が浸るように培地を投入し、培養対象の細胞を播種し、培養する。培地は、必要に応じて新しい培地に交換してもよい。また、細胞を分化させる前に増殖用培地を投入して、播種した細胞を増殖させる工程を設けてもよい。この場合、十分な細胞数が得られるまで増殖した後、増殖用培地を分化用培地に置き換える。増殖用培地及び分化用培地は、当業者に周知な培地を利用できる。
- [0044] 間葉系幹細胞の骨芽分化用培地としては、例えば、PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany)社のMesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium (C-28013)を使用できる。
- [0045] 細胞培養環境は当業者に周知な条件で、任意に設定することができる。
- [0046] 間葉系幹細胞の骨芽分化とは、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を意味する。骨芽分化が進むにつれて骨結節が形成される（石灰化とも呼ばれる）。間葉系幹細胞の骨芽分化促進効果は、アリザリンレッドＳによる細胞染色（骨結節が染色される。）によって評価できる。分化マーカーの発現量の変化を測定することにより、判断してもよい。例えば、骨芽分化の分化マーカーとしては、RUNX2、アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、オステオポンチン、骨シアロタンパク、Ⅰ型コラーゲンが挙げられる。未修飾ポリロタキサン（例えば、後述するPRX-PBzMA）を基板（ガラス製又はポリスチレン製）にコーティングした培養基材を用いた場合と比較して、統計学的有意に分化が促進されていれば、間葉系幹細胞の骨芽分化促進効果を有すると判断できる。

[0047] 本実施形態に係る細胞培養方法は、上記基板の表面上に、式（１）で表されるポリロタキサンを含有する組成物をコーティングすることを含んでもよい。

[0048] 式（１）で表されるポリロタキサンを含有する組成物は、基板にコーティングすることができる。コーティングの方法は特に制限されず、例えば、キャストリング、スピンコーティング、グラビアコーティング、ダイコーティング、ナイフコーティング、バーコーティング、ブレードコーティング、ロールコーティング等が挙げられる。好ましいコーティングの方法は、キャストリングである。

[0049] ＜第四実施形態＞

本発明の第四実施形態は、式（１）で表されるポリロタキサンを含有する組成物でコーティングされた基板を含む培養基材である。

[0050] 本実施形態において、「式（１）で表されるポリロタキサン」は、第一実施形態で説明したものを参照でき、「式（１）で表されるポリロタキサンを含有する組成物」は、第一実施形態で説明したコーティング剤を利用できる。また、コーティング方法は、第二又は第三実施形態で説明した方法を参照できる。

[0051] 本実施形態に係るコーティングされた基板（培養基材）は、間葉系幹細胞の脂肪分化及び／又は骨芽分化を促進させるための培養基材として特に好適である。

[0052] 本実施形態に係る培養基材によれば、シクロデキストリンを構成するグルコースにおいて、－X－Yで修飾された水酸基の数を調整することにより、基板自体のバルク特性に依存することなく、間葉系幹細胞の分化（脂肪分化及び／又は骨芽分化の促進）、間葉系幹細胞の増殖（促進又は抑制）を調整することが可能となる。

実施例

[0053] 以下、実施例を用いて、本発明をより詳細に説明する。しかし、本発明はこれらに限定されることはない。また、実施例において使用される略語は当

業者に周知の慣用的な略語であり、いくつかの略語の意味を以下に示す。

α CD : α -シクロデキストリン

CDI : カルボニルジイミダゾール

CPADB : 4-シアノペンタノイックアシッド ジチオベンゾエート

DMEM : ダルベッコ改変イーグル培地

DMF : N, N-ジメチルホルムアミド

DMSO : ジメチルスルホキシド

DMT-MM : 4-(4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウム クロリド

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

FBS : ウシ胎児血清

IBMX : 3-イソブチル-1-メチルキサンチン

α -MEM : α -最小必須培地

MeOH : メタノール

MsCl : メタンサルホン酸クロリド

PBS : リン酸緩衝生理食塩水

PEG : ポリエチレングリコール

TCPS : 細胞培養用ポリスチレン

TEA : トリエチルアミン

THF : テトラヒドロフラン

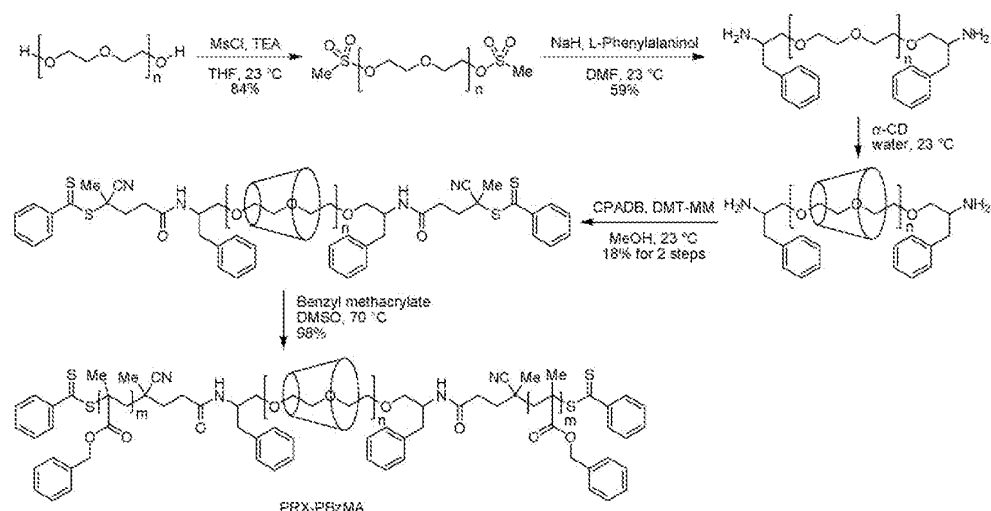
$^1\text{H-NMR}$: プロトン核磁気共鳴スペクトルメトリー

[0054] 1. ポリロタキサンの合成

(実施例1)

ポリロタキサンの合成方法を、以下に示す。

[化12]

[0055] 工程 1 : α , ω -ビスメシルポリエチレングリコールの合成

数平均分子量 20000 のポリエチレングリコール (25.0 g、1.25 mmol) 及び TEA (5.3 mL、37.5 mmol) を無水 THF (130 mL) に溶解させ、MsCl (2.0 mL、25.0 mmol) を滴下して、23 °C にて攪拌した。5 時間後、反応液をろ過し、そのろ液をジエチルエーテルで沈殿させて、沈殿物を固体として回収した。得られた沈殿物を減圧下乾燥し、 α , ω -ビスメシルポリエチレングリコール (21.1 g、収率：84%) を得た。

[0056] 工程 2 : ビス (2-アミノ-3-フェニルプロピル) ポリエチレングリコールの合成

L-フェニルアラニノール (1.49 g、9.85 mmol) と水素化ナトリウム (0.971 g、60% 鉱油) を窒素雰囲気下、無水 DMF (86 mL) に溶解した。この混合液に α , ω -ビスメシルポリエチレングリコール (20.0 g、0.992 mmol) を加えて、23 °C で攪拌した。24 時間後、反応液をろ過し、そのろ液をジエチルエーテルで沈殿させて、沈殿物を固体として回収した。得られた沈殿物を減圧下乾燥し、ビス (2-アミノ-3-フェニルプロピル) ポリエチレングリコール (11.8 g、収率：59%) を得た。

[0057] 工程3：擬ポリロタキサンの合成

ビス（2-アミノ-3-フェニルプロピル）ポリエチレングリコール（10.1 g、0.499 mmol）を水（50 mL）に溶解させ、 α CD（55.2 g、56.6 mmol）の飽和水溶液（380 mL）を加えて、23℃で攪拌した。19時間後、反応液を遠心分離することにより沈殿物を回収し、凍結乾燥を9日間行うことで、粗精製物として擬ポリロタキサンを得た。

[0058] 工程4：ポリロタキサンPRX-CPADBの合成

CPADB（5.50 g、19.7 mmol）及びDMT-MM（5.50 g、19.9 mmol）をメタノール（500 mL）に溶解させ、上記で得られた擬ポリロタキサンを23℃で反応液に加えて、攪拌した。1日後、粗精製物をメタノールで洗浄し、含水DMSOで再沈殿させ、遠心分離を行い、9日間凍結乾燥することにより、ポリロタキサンPRX-CPADB（11.9 g、2工程収率：18%）を粉末として得た。ポリロタキサンPRX-CPADBの構造は、 $^1\text{H-NMR}$ （溶媒：DMSO- d_6 ）によって確認した。また、 α CDの貫通数は、 $^1\text{H-NMR}$ （溶媒：D $_2$ O）によって決定した。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 3.12-3.91 (m, PEG backbone and H2, H3, H4, H5, and H6 protons of α CD), 4.43 (m, OH6 of α CD), 4.80 (m, H1 of α CD), 5.49 (m, OH3 of α CD), 5.65 (m, OH2 of α CD), 7.17 (t, aromatics of phenylalanyl group), 7.25 (t, aromatics of phenylalanyl group), 7.52 (t, aromatics of CPADB group), 7.70 (t, aromatics of CPADB), and 7.91 (t, aromatics of CPADB).

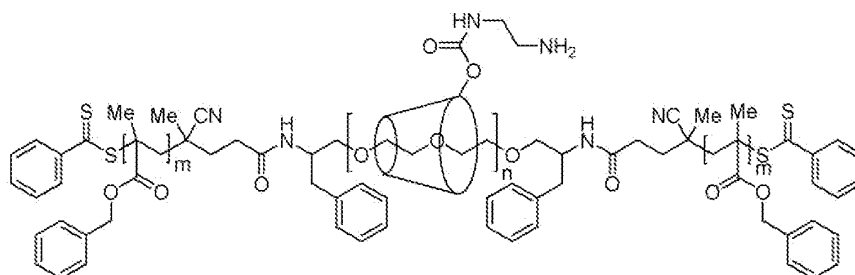
[0059] 工程5：参考例1のポリロタキサン（PRX-PBzMA）の合成

ポリロタキサンPRX-CPADB（1.50 g、13.9 μ mol）を無水DMSO（12 mL）に溶解させ、この混合液にベンジルメタクリレート（1.71 g、9.70 mmol）及び4,4'-アゾビス（4-シアノ吉草酸）（1.55 mg、5.54 μ mol）を加えた。FPTサイクル（F

reeze-Pump-Thawサイクル)によって脱気した後、70℃で攪拌した。1日後、粗精製物をジエチルエーテルで沈殿させ、減圧下乾燥して、ポリロタキサンPRX-PBzMA (3.13 g、収率: 98%)を得た。ポリベンジルメタクリレート構造を形成するベンジルメタクリレート単位の数mは、¹H-NMR (溶媒: DMSO-d₆)によって決定した。

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 0.40-0.95 (m, -CH(-CH₃)-CH₂- of PBzMA), 1.43-2.10 (m, -CH(-CH₃)-CH₂- of PBzMA), 3.17-4.02 (m, PEG backbone and H2, H3, H4, H5, and H6 protons of αCD), 4.44 (m, OH6 of αCD), 4.80 (m, H1 of αCD), 4.86 (m, -CH₂-Ph of PBzMA), 5.49 (m, OH3 of αCD), 5.66 (m, OH2 of αCD), and 7.26 (m, aromatics of PBzMA).

[0060] 工程6a: 比較例1のポリロタキサン(NH₂-PRX)の合成
[化13]



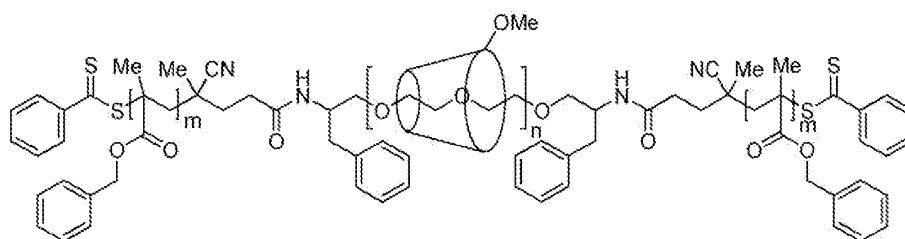
ポリロタキサンPRX-PBzMA (200 mg, 0.895 μmol) を無水DMSO (10 mL) に溶解し、次いでCDI (104 mg, 0.643 mmol) を溶液に添加した。23℃で1日間攪拌した後、この溶液にエチレンジアミン (0.43 mL, 6.43 mmol) を加え、さらに23℃で1日間攪拌した。次いで、反応液を4日間の透析によって精製した。生成物を7日間凍結乾燥して、粉末としてNH₂-PRX (176 mg、収率73%)を得た。アミノ基の数は、¹H-NMR分析 (溶媒: DMSO-d₆)によって決定した。

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 0.38-0.92 (m, -CH(-CH₃)-CH₂- of PBzMA), 1.47-2.02 (m, -CH(-CH₃)-CH₂- of PBzMA), 3.00 (m, -O-CO-NH-CH₂-CH₂-NH₂), 3.15-4.55 (m, PEG backbone, H2, H3, H4, H5, and H6 protons of α-C

D, and OH6 of α -CD), 4.86 (m, $-\underline{\text{CH}_2}$ -Ph of PBzMA, H1 of α -CD), and 7.26 (m, aromatics of PBzMA).

[0061] 工程 6 b : 比較例 2 のポリロタキサン (CH_3 -PRX) の合成

[化14]

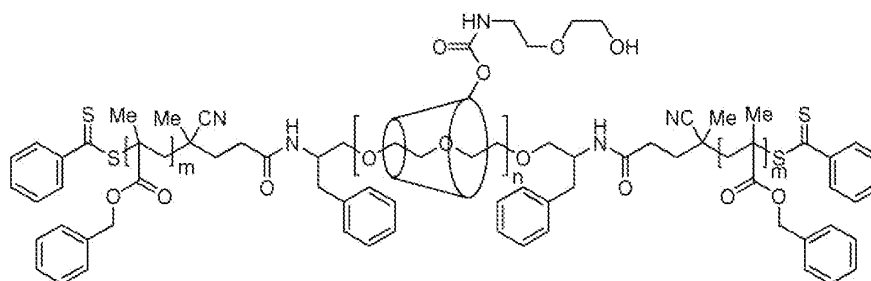


ポリロタキサン PRX-PBzMA (0.15 g, 0.671 μmol) を無水 DMSO (1.31 mL) に溶解させ、水酸化ナトリウム (28.7 mg, 0.716 mmol) 及びヨードメタン (15 μL , 0.239 mmol) を加えて、23℃で攪拌した。1時間後、メタノールを加えて反応を停止し、3日間透析することで、比較例 1 のポリロタキサン (115 mg、収率：75%) を得た。メチル基の数は、 ^1H -NMR 分析 (溶媒：DMSO- d_6) によって決定した。

^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 0.40-0.95 (m, $-\text{CH}(-\underline{\text{CH}_3})-\text{CH}_2-$ of PBzMA), 1.43-2.10 (m, $-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\underline{\text{CH}_2}-$ of PBzMA), 3.17-4.02 (m, PEG backbone, H2, H3, H4, H5, and H6 protons of α CD, and $-\text{OCH}_3$ of α CD), 4.44 (m, OH6 of α CD), 4.57-5.10 (m, H1 of α CD and $-\underline{\text{CH}_2}$ -Ph of PBzMA), 5.49 (m, OH3 of α CD), 5.64 (m, OH2 of α CD), and 7.26 (m, aromatics of PBzMA).

[0062] 工程 6 c : 実施例 1 のポリロタキサン (OH-PRX) の合成

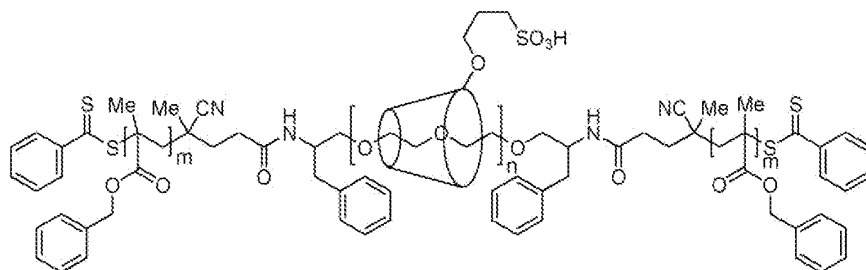
[化15]



ポリロタキサンPRX-PBzMA (200 mg, 0.895 μ mol) を無水DMSO (10 mL) に溶解し、CDI (130 mg, 0.804 mmol) を溶液に添加した。23°Cで1日間攪拌した後、2-(2-アミノエトキシ)エタノール (0.80 mL, 8.04 mmol) を溶液に添加し、23°Cでさらに1日間攪拌した。次いで、反応液を4日間の透析によって精製した。生成物を7日間凍結乾燥し、粉末としてOH-PRX (194 mg, 収率74%) を得た。OH基の数は、¹H-NMR分析 (溶媒: DMSO-d₆) によって決定した。

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 0.42-0.95 (m, -CH(-CH₃)-CH₂- of PBzMA), 1.45-2.02 (m, -CH(-CH₃)-CH₂- of PBzMA), 3.14 (m, -O-CO-NH-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-OH), 3.17-4.70 (m, PEG backbone, H2, H3, H4, H5, and H6 protons of α -CD, OH6 of α -CD, and -O-CO-NH-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-OH), 4.86 (m, -CH₂-Ph of PBzMA, H1 of α -CD), and 7.26 (m, aromatics of PBzMAH).

[0063] 工程6d: 実施例2のポリロタキサン(SO₃H-PRX)の合成
[化16]



ポリロタキサンPRX-PBzMA (150 mg, 0.671 μ mol) を無水DMSO (3.0 mL) に溶解し、その後、NaOH粉末 (65.1 mg, 1.63 mmol) および1,3-プロパンスルホン (66.3 mg, 0.543 mmol) を溶液に添加した。23°Cで1日間攪拌した後、5日間透析精製した。生成物を7日間凍結乾燥し、粉末としてSO₃H-PRX (155 mg, 収率68%) を得た。スルホ基(-SO₃H)の数は、¹H-NMR分析 (溶媒: DMSO-d₆) によって決定した。

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 0.33-0.95 (m, -CH(-CH₃)-CH₂- of PBzMA), 1

.41-2.12 (m, $-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\underline{\text{CH}_2}-$ of PBzMA and $-\text{O}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{Na}$), 2.92-4.23 (m, PEG backbone, H2, H3, H4, H5, and H6 protons of α -CD, and $-\text{O}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{Na}$), 4.86 (m, $-\underline{\text{CH}_2}-\text{Ph}$ of PBzMA, H1 of α -CD), 7.26 (m, aromatics of PBzMA).

[0064] 得られたポリロタキサンのデータを表1に示す。図1は、参考例1、実施例1～2、比較例1～2のポリロタキサンの各 ^1H -NMRスペクトルを比較した図である。各スペクトルにおける特徴的なピークをグレーで示した。括弧内の数字は、1個のシクロデキストリンあたりの官能基修飾数を示す。

[表1]

	PEG部分の数平均分子量	ポリベンジルメタクリレートの数平均分子量	α CDの貫通数	官能基化された水酸基の数
参考例1	20000	115200	89.8	0 (0)
比較例1	20000	115200	89.8	310 (3.5)
比較例2	20000	115200	89.8	312 (3.5)
実施例1	20000	115200	89.8	392 (4.4)
実施例2	20000	115200	89.8	568 (6.3)

[0065] 得られたポリロタキサンをDMSOに溶解し、コーティング剤を製造した。得られたコーティング剤をTCPSにキャストした。

[0066] 2. 表面化学組成の分析

(1) 表面の元素組成

ポリロタキサン表面の化学組成を30keVの Bi^{3++} 一次イオンを用いたTOF-SIMS (PHI NanoTOF II、ULVAC-PHI) により分析した。分析視野は $100 \times 100 \mu\text{m}$ である。表面の元素組成は、1486.6eVのエネルギーを有する単色化されたX線放射を用いたX線光電子分光 ($\text{Al-K}\alpha$ 、サーモフィッシャー・サイエンティフィック、イーストグリンステッド) によって決定した。分析領域の直径は $400 \mu\text{m}$ であり、元素組成は各表面の3点の平均から計算した。

[0067] TOF-SIMS測定により得られた質量スペクトルを図2～3に示す。

TCP S以外の表面では $m/z = 85$ の特性ピークが観測された。このピークはメタクリレート基 ($C_4H_5O_2^-$) の存在を示唆し、TCP S表面がPBzMA構造を含むトリブロック共重合体でコーティングされていると推察された。また、比較例1と実施例1の表面に対して、N含有基 (CNO^-) の存在を示唆する $m/z = 42$ での特徴的なピークを検出した。表2に示すXPS分析の結果から、窒素および酸素の元素組成は、 NH_2-PRX 表面 (比較例1) および $OH-PRX$ (実施例1) 上で他の表面上よりも顕著に高かった。

[表2]

	Element (atom%)			
	C1s	O1s	N1s	S2p
参考例1	95.8±0.3	4.0±0.5	0.2±0.1	0.0±0.0
比較例1	78.8±0.2	19.1±0.3	2.1±0.1	0.0±0.0
比較例2	94.0±2.4	5.8±2.3	0.3±0.1	0.0±0.0
実施例1	77.7±0.4	20.4±0.4	1.9±0.0	0.0±0.0
実施例2	92.6±2.7	6.5±2.3	0.2±0.2	0.3±0.2

[0068] (2) 接触角及びゼータ電位の測定

細胞培養用ポリスチレン (TCP S) の表面に、実施例1～2及び比較例1～2のポリロタキサンを含有するコーティングを施した。接触角計 (商品名: DM-501、協和界面科学株式会社製) とソフトウェアを用いて、コーティング表面の静的接触角を液滴法とキャプティブバブル法の両方で測定した。各表面の接触角ヒステリシス値は、液滴法で測定した水の接触角 (大気中での水の接触角) とキャプティブバブル法で測定した気泡の接触角から求めた水の接触角 (水中での水の接触角) の差から算出した。すべての測定値は4つの異なる表面で得たものであり、各表面の3つの異なるポイントの平均値を記録した。接触角ヒステリシスの差は、表面間の分子可動性の差を示すことが知られている。

[0069] 参考例1、実施例1～2及び比較例1～2のポリロタキサン表面の接触角及び接触角ヒステリシスを表3に示す。ポリロタキサン表面の大気中での水

の接触角は $80 \sim 100^\circ$ の範囲であり、ポリロタキサンコーティングによりTCPS表面（接触角は 74° ）表面とは濡れ性が変化したことが確認された。実施例1～2及び比較例1～2のポリロタキサン表面の大気中の水の接触角は、参考例1のポリロタキサン表面の接触角よりわずかに小さく、ポリロタキサン表面間に有意差はなかった。一方、水中でキャプティブバブル法を用いて測定した水中での水の接触角は異なる傾向を示し、ポリロタキサン表面間で有意差が見られた。

[0070] ポリロタキサン表面は、 α CDとポリエチレングリコール鎖間のインターロック構造に由来した分子可動性を有し、水和状態で独特の挙動を示す。例えば、ポリロタキサン表面の水和時の分子可動性を、（1）散逸を伴う水晶マイクロバランスを用いて水中で測定した散逸エネルギー損失（QCM-D）から求めた結果と、及び（2）空気中の水の接触角と水中の気泡の接触角から求めた水の接触角の差で測定した接触角ヒステリシスの結果に関連性があることが知られている。実施例1～2及び比較例1～2を用いた各コーティング表面において、表面官能基の種類により接触角ヒステリシスの値が変化したことから、シクロデキストリンの水酸基の官能基修飾は、分子可動性を調整するために有用であると考えられる。

[0071] また、ポリロタキサン表面のゼータ電位を、電気泳動光散乱分光計（ELS Z-2、大塚電子）を用いて、平板試料用の石英フローセルを用いて測定した。表面上の電気浸透の移動度を、 10 mM PBS中のモニタリング粒子（大塚電子）を用いて分析し表面上のゼータ電位を算出した。すべての測定は3つの異なる表面で行った。

[0072] 参考例1、実施例1～2及び比較例1～2のポリロタキサン表面のゼータ電位を、表3に示す。比較例1のポリロタキサン表面は最も負電荷が小さく、実施例2は全表面の中で最も負に帯電していた。アミノ基は $\text{pH } 7.4$ で正に帯電するはずであるが、比較例1のポリロタキサン表面は負に帯電していた。これはコーティングの下地の基板（TCPS）の負電荷と、非修飾PRX表面の負電荷によると考えられる。

[表3]

	大気中での 水の接触角 (θ)	水中での 水の接触角 (θ)	接触角 ヒステリシス (θ)	ゼータ電位 (mV)
参考例 1	93.8 $\pm$ 1.3	75.5 $\pm$ 1.5	18.3 $\pm$ 1.1	-24.6 $\pm$ 2.8
比較例 1	80.8 $\pm$ 2.1	43.0 $\pm$ 1.4	37.8 $\pm$ 2.8	-9.9 $\pm$ 0.7
比較例 2	85.0 $\pm$ 1.7	60.0 $\pm$ 2.4	25.0 $\pm$ 3.9	-29.3 $\pm$ 2.8
実施例 1	83.5 $\pm$ 1.1	52.9 $\pm$ 4.0	30.7 $\pm$ 5.1	-16.3 $\pm$ 6.3
実施例 2	86.5 $\pm$ 2.7	22.2 $\pm$ 2.0	64.3 $\pm$ 3.8	-33.6 $\pm$ 3.4

[0073] (3) ポリロタキサン表面へのフィブロネクチン吸着（マイクロBCAアッセイ）

ポリロタキサン表面へのフィブロネクチン吸着を調べるために、参考例1、実施例1～2及び比較例1～2の各表面でヒトフィブロネクチンのPBS溶液（100 μ g/mL）を37℃で3時間インキュベートした。各ウェルをPBSで3回洗浄して、非吸着フィブロネクチンを除去した。J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 2017, 28, 986-999.又はACSBiomater. Sci. Eng., 2018, 4, 1591-1597.に記載の方法に従って、5%SDSおよび0.1N NaOH水溶液を添加し、37℃で1時間インキュベートすることによって、吸着されたフィブロネクチンを抽出した。フィブロネクチン濃度は、製造業者の指示に従って、ヒトフィブロネクチン標準と共にタンパク質アッセイキット（Micro BCA（商標）、Thermo Scientific製）を用いて測定した。

[0074] 結果を図4に示す。比較例1の表面でフィブロネクチンが最も多く吸着した。フィブロネクチンは負に帯電しており、正に帯電したアミノ基との静電的相互作用により、フィブロネクチンが多く吸着したと考えられた。実施例1～2及び比較例2のポリロタキサン表面のフィブロネクチン吸着量には、参考例1に対して有意差はなかった。

[0075] 2. ポリロタキサン表面における細胞応答

(1) ポリロタキサン表面上のヒト間葉系幹細胞（hMSC）接着および増殖

各ポリロタキサン表面上のhMSCの初期接着および増殖を評価するために、細胞を6.0 $\times$ 10³細胞/cm²の濃度で各表面上に播種し、5%CO₂

を含む加湿雰囲気中で37℃にて3日間、hMSC増殖用培地Bulliet Kitを用いて培養した。細胞の形態は、位相差顕微鏡（BZ-X700、キーエンス）を用いて観察し、接着した細胞をトリプシン／EDTA溶液を用いた処理により基板から剥がし、各表面に接着したhMSCの数を1日間隔で血球計算盤を用いて測定した。

[0076] 結果を図5に示す。播種後1日目には、各ポリロタキサン表面間で細胞密度に有意差は認められなかった。播種3日目において、比較例1の表面上の細胞密度は最も低かった。

[0077] (2) ポリロタキサン表面上のhMSCの骨芽分化

骨芽分化（骨形成分化）を誘導するために、各ポリロタキサン表面にhMSCを 2.4×10^4 細胞/cm²の密度で播種し、hMSC増殖用培地Bulliet Kitを用いて、細胞の密度が過剰コンフルエントになるまで、5%CO₂を含む加湿雰囲気下で37℃にて5日間培養した。増殖用培地を骨芽分化用培地に交換し、細胞を14日間インキュベートした。培地を3～4日ごとに新鮮な培地と交換した。骨芽分化用培地として、PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany)社のMesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium (C-28013)を使用した。

[0078] 分化誘導の14日後に、細胞をアリザリンレッドSで染色して、hMSCの石灰化の程度を評価した。細胞をPBSで2回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて、23℃で10分間処理することによって固定した。細胞をMilliQ水で2回洗浄し、アリザリンレッドS溶液を用いて、23℃で10分間染色した。染色液を除去した後、細胞をMilliQ水で4回洗浄し、顕微鏡で観察した。染色面積はImageJソフトウェアを用いて算出した。すべての測定値は3つの異なる表面で得たものであり、各表面の4つの異なる点の平均値を各表面の平均値とした。

[0079] 結果を図6に示す。骨形成分化の誘導後、細胞形態は、細長い形状から正方形の形状に変化し、細胞密度は、特に実施例2の表面上で増加した。各表面上で培養したhMSCの骨結節形成を評価するために、骨芽分化誘導後1

4 日目にアリザリンレッド S を用いてカルシウム結節を染色した。図 7 は、
(A) アリザリンレッド S による染色写真と (B) 各ポリロタキサン表面に
おける染色面積を比較したグラフである。染色面積に有意差が認められ、最
も負に帯電した表面 (実施例 2) で最も大きく、最も負に帯電していない表
面 (比較例 1) で最も小さく、他の表面 (参考例 1、実施例 1、比較例 2)
では中程度であった。

[0080] (3) ポリロタキサン表面上の hMSC の脂肪分化

脂肪分化を誘導するために、各ポリロタキサン表面に hMSC を 1.0×10^4 細胞 / cm^2 の密度で播種し、hMSC 増殖用培地 Bullet Kit を用いて、5% CO_2 を含む加湿雰囲気下、 37°C で 5 日間培養した。増殖用培地を脂肪分化用培地に交換し、細胞を 15 日間培養した。培地を 3 ~ 4 日ごとに新鮮な培地と交換した。脂肪分化用培地として、PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany) 社の Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium2 (C-28016) を使用した。

[0081] 分化誘導の 15 日後、細胞をオイルレッド O で染色し、細胞内の脂肪滴蓄積を評価した。細胞を PBS で 2 回洗浄し、4% パラホルムアルデヒド溶液を用いて、 23°C で 10 分間処理することによって固定した。細胞を PBS で 2 回洗浄し、60% 2-プロパノールで 1 回洗浄した。細胞を 23°C で 20 分間オイルレッド O 溶液を用いて染色し、60% 2-プロパノールで 1 回洗浄した。最後に、細胞を PBS で 2 回洗浄し、顕微鏡を用いて PBS 中で観察した。染色面積は Image J ソフトウェアを用いて算出した。すべての測定値は 3 つの異なる表面で得たものであり、各表面の 3 つの異なる点の平均値を各表面の平均値とした。

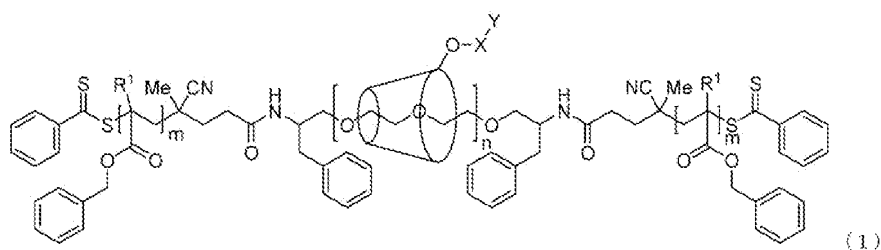
[0082] 結果を図 8 に示す。脂肪分化に伴う細胞内の脂肪滴形成が全ての表面に観察され、培養期間に従って脂肪滴の増加が見られた。図 9 は、(A) オイルレッド O による染色写真と (B) 各ポリロタキサン表面における染色面積を比較したグラフである。比較例 1 及び実施例 1 ~ 2 の表面上の染色面積は、参考例 1 及び比較例 2 の表面上の染色面積より大きかった。オイルレッド O

による染色面積は、接触角ヒステリシスの増加と共に増加する傾向が見られた。接触角ヒステリシスの差は、表面の分子可動性の差を示すので、特に比較例 1 及び実施例 1 ～ 2 のポリロタキサン表面の分子可動性は、脂肪分化の促進により適していると考えられる。

請求の範囲

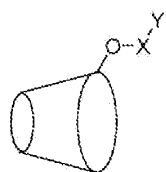
[請求項1] 間葉系幹細胞の骨芽分化又は脂肪分化を促進させるための、式（1）で表されるポリロタキサンを含有するコーティング剤。

[化1]



[式中、R¹は水素原子又はメチル基であり、mは1～2000であり、nは10～500であり、

[化2]



は、少なくとも1つの水酸基が、-X-Yで表される基で修飾されたシクロデキストリンであり、Xは2価の有機基であり、Yは水酸基又はスルホ基である。]

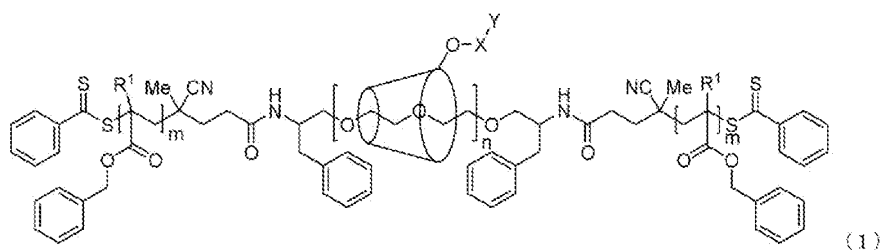
[請求項2] 前記ポリロタキサンの、1～18個の水酸基が-X-Yで表される基で修飾されたシクロデキストリンを含む、請求項1に記載のコーティング剤。

[請求項3] 前記ポリロタキサンにおいて、シクロデキストリンの貫通数が3～220個である、請求項1又は2に記載のコーティング剤。

[請求項4] 間葉系幹細胞の骨芽分化又は脂肪分化を促進させるための細胞培養方法であって、

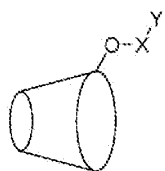
式（1）で表されるポリロタキサンを含有する組成物でコーティングされた基板の表面上で、間葉系幹細胞を培養することを含む、方法。

[化3]



[式中、 R^1 は水素原子又はメチル基であり、 m は1～2000であり、 n は10～500であり、

[化4]



は、少なくとも1つの水酸基が $-X-Y$ で表される基で修飾されたシクロデキストリンであり、 X は2価の有機基であり、 Y は水酸基又はスルホ基である。]

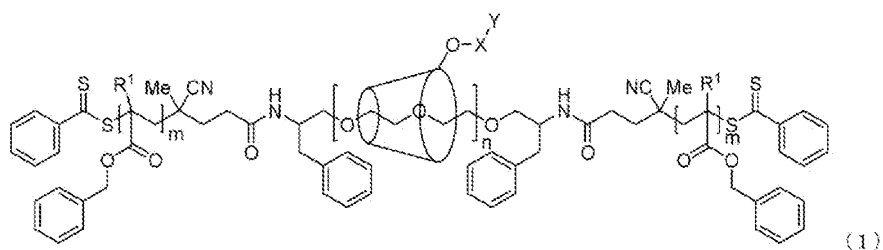
[請求項5] 基板の表面上に、式(1)で表されるポリロタキサンを含有する組成物をコーティングすることを含む、請求項4に記載の方法。

[請求項6] 前記ポリロタキサンの、1～18個の水酸基が $-X-Y$ で表される基で修飾されたシクロデキストリンを含む、請求項4又は5に記載の方法。

[請求項7] 前記ポリロタキサンにおいて、シクロデキストリンの貫通数が3～220個である、請求項4～6のいずれか一項に記載の方法。

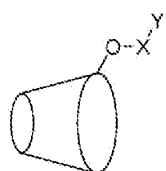
[請求項8] 式(1)で表されるポリロタキサンを含有する組成物でコーティングされた基板を含む培養基材。

[化5]



[式中、 R^1 は水素原子又はメチル基であり、 m は1～2000であり、 n は10～500であり、

[化6]



は、少なくとも1つの水酸基が $-X-Y$ で表される基で修飾されたシクロデキストリンであり、 X は2価の有機基であり、 Y は水酸基又はスルホ基である。]

[請求項9]

前記ポリロタキサンが、1～18個の水酸基が $-X-Y$ で表される基で修飾されたシクロデキストリンを含む、請求項8に記載の培養基材。

[請求項10]

前記ポリロタキサンにおいて、シクロデキストリンの貫通数が3～200個である、請求項8又は9に記載の培養基材。