

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7370529号
(P7370529)

(45)発行日 令和5年10月30日(2023.10.30)

(24)登録日 令和5年10月20日(2023.10.20)

(51)国際特許分類 F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 15/12 (2006.01) C 1 2 N 15/12

請求項の数 20 (全64頁)

(21)出願番号	特願2018-510722(P2018-510722)	(73)特許権者	515238909 田邊 剛士 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 3 , パロ アルト , サン アントニオ ロード 8 0 9 , スイート 7
(86)(22)出願日	平成28年8月30日(2016.8.30)	(73)特許権者	517123221 アイ ピース , インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 3 , パロアルト , サン アントニオ ロード 8 0 9 , スイート 7
(65)公表番号	特表2018-526992(P2018-526992 A)	(74)代理人	100079108 弁理士 稲葉 良幸
(43)公表日	平成30年9月20日(2018.9.20)	(74)代理人	100109346 弁理士 大貫 敏史
(86)国際出願番号	PCT/US2016/049530	(74)代理人	100117189
(87)国際公開番号	WO2017/040548		
(87)国際公開日	平成29年3月9日(2017.3.9)		
審査請求日	令和1年8月23日(2019.8.23)		
審判番号	不服2022-5089(P2022-5089/J1)		
審判請求日	令和4年4月6日(2022.4.6)		
(31)優先権主張番号	62/356,199		
(32)優先日	平成28年6月29日(2016.6.29)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多能性幹細胞製造システム、幹細胞の誘導方法、幹細胞の浮遊培養方法、幹細胞の浮遊培養器、人工多能性幹細胞の作製方法、及び動物細胞から特定の体細胞を作製する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

体細胞に多能性誘導因子を導入した後、前記多能性誘導因子を導入された前記体細胞を沈まないように少なくとも7日間浮遊培養して前記体細胞を幹細胞へ誘導し、前記幹細胞のコロニーを形成することを含み、

前記誘導することにおける培地がゲル化されており、

前記コロニーを形成することにおける培地がゲル化されている、

幹細胞の誘導方法。

【請求項 2】

前記誘導することにおける培地が攪拌されない、請求項 1 に記載の幹細胞の誘導方法。 10

【請求項 3】

前記誘導することにおける培地が、脱アシル化ゼランガムでゲル化されている、請求項 1 又は 2 に記載の幹細胞の誘導方法。

【請求項 4】

前記誘導することにおける培地が、成長因子を含まない、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の幹細胞の誘導方法。

【請求項 5】

前記誘導することにおける培地が、成長因子を 4 0 重量 % 以下の濃度で含む、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の幹細胞の誘導方法。

【請求項 6】

前記誘導することにおける培地が、bFGFを含まない、請求項1から3のいずれか1項に記載の幹細胞の誘導方法。

【請求項7】

前記誘導することにおける培地が、bFGFを400 μ g/L以下の濃度で含む、請求項1から3のいずれか1項に記載の幹細胞の誘導方法。

【請求項8】

前記誘導することにおける培地が、TGF- β を含まない、請求項1から3のいずれか1項に記載の幹細胞の誘導方法。

【請求項9】

前記誘導することにおける培地が、TGF- β を600ng/L以下の濃度で含む、請求項1から3のいずれか1項に記載の幹細胞の誘導方法。

10

【請求項10】

前記誘導することにおける培地が、ヒトES/iPS培地を含む、請求項1から9のいずれか1項に記載の幹細胞の誘導方法。

【請求項11】

前記コロニーを形成することにおける培地が攪拌されない、請求項1に記載の幹細胞の誘導方法。

【請求項12】

前記コロニーを形成することにおける培地が、脱アシル化ゼランガムでゲル化されている、請求項1から11のいずれか1項に記載の幹細胞の誘導方法。

20

【請求項13】

前記コロニーを形成することにおける培地が、成長因子を含まない、請求項1から12のいずれか1項に記載の幹細胞の誘導方法。

【請求項14】

前記コロニーを形成することにおける培地が、成長因子を40重量%以下の濃度で含む、請求項1から12のいずれか1項に記載の幹細胞の誘導方法。

【請求項15】

前記コロニーを形成することにおける培地が、bFGFを含まない、請求項1から12のいずれか1項に記載の幹細胞の誘導方法。

【請求項16】

前記コロニーを形成することにおける培地が、bFGFを400 μ g/L以下の濃度で含む、請求項1から12のいずれか1項に記載の幹細胞の誘導方法。

30

【請求項17】

前記コロニーを形成することにおける培地が、TGF- β を含まない、請求項1から12のいずれか1項に記載の幹細胞の誘導方法。

【請求項18】

前記コロニーを形成することにおける培地が、TGF- β を600ng/L以下の濃度で含む、請求項1から12のいずれか1項に記載の幹細胞の誘導方法。

【請求項19】

前記コロニーを形成することにおける培地が、ヒトES/iPS培地を含む、請求項1から12のいずれか1項に記載の幹細胞の誘導方法。

40

【請求項20】

前記体細胞がヒト体細胞である、請求項1から19のいずれか1項に記載の幹細胞の誘導方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は細胞技術に関し、多能性幹細胞製造システム、幹細胞の誘導方法、幹細胞の浮遊培養方法、幹細胞の浮遊培養器、人工多能性幹細胞の作製方法、及び動物細胞から特定の体細胞を作製する方法に関する。

50

【背景技術】

【0002】

胚性幹細胞（ES細胞）は、ヒトやマウスの初期胚から樹立された幹細胞である。ES細胞は、由来する生体に存在する全ての細胞へと分化できる多能性を示す。ヒトES細胞は、パーキンソン病、若年性糖尿病、及び白血病等、多くの疾患を治療するための細胞移植療法に現在利用されている。しかし、ES細胞の移植に伴う欠点もある。特に、ES細胞の移植は、不成功な臓器移植に引き続いて起こる免疫拒絶反応と同様に、拒絶反応を惹起する。また、ヒト胚を破壊して樹立されるES細胞の利用は、倫理的見地に基づく多数の批判や強い反対をもたらしている。

【0003】

このような背景の状況の下、京都大学の山中伸弥教授は、4種の遺伝子：Oct3/4、Klf4、c-Myc、及びSox2を体細胞に導入することにより、誘導多能性幹細胞（iPS細胞）を樹立することに成功した。これにより、彼は、2012年のノーベル生理学・医学賞を受賞した（例えば、特許文献1参照。）。iPS細胞は、免疫拒絶反応や倫理的問題のないことから、理想的な多能性細胞である。そのため、iPS細胞は細胞移植療法への利用されることが期待されている。

【0004】

（幹細胞の誘導方法、幹細胞の浮遊培養方法、及び幹細胞の浮遊培養器の背景技術）

人工多能性幹（iPS）細胞とは、二つの特徴的な能力を有する細胞である。一つ目は、身体の全ての体細胞を生み出せる能力である。二つ目は、半永久的な増殖能を有することである。iPS細胞はこの二つの能力を示すため、自己の体細胞からiPS細胞を作製し、目的の体細胞へ変化させることで、拒絶反応のない移植治療に用いられることができる。そのためiPS細胞は、再生医療の分野にかなり有望である。

【0005】

（人工多能性幹細胞の作製方法の背景技術）

人工多能性幹（iPS）細胞とは、二つの特徴的な能力を有する細胞である。一つ目は、身体の全ての体細胞を生み出せる能力である。二つ目は、半永久的な増殖能を有することである。iPS細胞はこの二つの能力を示すため、自己の体細胞からiPS細胞を作製し、目的の体細胞へ変化させることで、拒絶反応のない移植治療に用いられることができる。そのためiPS細胞は、再生医療の分野にかなり有望である。

【0006】

iPS細胞の誕生から現在までに、いくつかのその作製方法が確立された。代表的なiPS細胞の作製方法としては、レトロウイルス又はレンチウイルスを用いた方法、及びエピソームベクターを用いた方法が挙げられる。

【0007】

レトロウイルス又はレンチウイルスを用いた方法について説明する。レトロウイルスやレンチウイルスは、体細胞に感染をして、初期化因子をコードしている遺伝子を細胞内に導入することができる。さらに、レトロウイルスやレンチウイルスは、体細胞のゲノムに初期化因子を挿入することができ、初期化因子の細胞内での安定的な発現を誘導する。

【0008】

しかし、レトロウイルス又はレンチウイルスの使用に依存する方法には、問題点がある。第一に、体細胞のゲノムへの初期化因子の挿入は、既存の遺伝子やプロモーターを傷つけるため、細胞の癌化を引き起こし得る。第二に、ゲノム上に挿入された初期化因子は、iPS細胞を体細胞に変化させた後に再度活性化するおそれがある。そのため、iPS細胞由来の移植用細胞には腫瘍発生のリスクを抱えている。実際、導入された初期化因子がマウスの体細胞で再活性化され、細胞が癌化することが確認されている（例えば、非特許文献1参照。）。

【0009】

さらに、レトロウイルス又はレンチウイルスを用いて作製されたiPS細胞は、残存ウイルスを保持し得る。このようなiPS細胞を患者に移植すると、残存しているウイルス

10

20

30

40

50

が患者に感染するおそれがあるため、移植に用いることができない。参考として、X連鎖性複合免疫不全症(X-SCID)に対し、レトロウイルスベクターによりc遺伝子を造血幹細胞に導入する遺伝子治療を行ったところ、ベクターの挿入によるLMO2遺伝子の活性化により、患者が白血病を発症したとの報告がある(例えば、非特許文献2、3参照。)

【0010】

したがって、レトロウイルス又はレンチウイルスを用いて作製されたiPS細胞は、臨床治療に利用するには問題がある。

【0011】

次に、エピソーマルベクターを用いた方法について説明する。エピソーマルベクターを用いたiPS細胞の作製方法は、レトロウイルス又はレンチウイルスを用いた遺伝子導入方法の問題点を克服するために開発された(例えば、非特許文献4参照。)。エピソーマルベクターはプラスミドの一種である。エピソーマルベクターは、細胞分裂と同時に複製される。また、レトロウイルス又はレンチウイルスと異なり、体細胞の遺伝子に初期化因子が挿入されない。この特性により、エピソーマルベクターは、標的となる体細胞のデオキシリボ核酸(DNA)に遺伝子が挿入されることがなく、長期にわたって細胞内で初期化因子を発現させ、iPS細胞を作製することが出来る。

【0012】

しかし、エピソーマルベクターを用いた方法にも、問題がある。第一に、細胞への遺伝子導入にエレクトロポレーションが必要であるが、エレクトロポレーションは細胞へのダメージが大きいため、1度のエレクトロポレーションでも多くの細胞が死んでしまう。第二に、エレクトロポレーションは繰り返し実施することができない。第三に、エピソーマルベクターを用いた方法による遺伝子導入効率は、レトロウイルス又はレンチウイルスを用いた方法よりも低い。

【0013】

近年の研究では、エピソーマルベクターの転移が、標的iPS細胞の遺伝子に挿入されたベクターDNAの断片化をもたらし得る。そのため、エピソーマルベクターを用いた場合においても、得られたiPS細胞が、そのゲノムに挿入されたベクターの断片を含む可能性が高い。そのようなiPS細胞を臨床応用に利用することには問題がある。

【0014】

これらの理由から、エピソーマルベクターを用いて作製されたiPS細胞も、臨床に利用することは困難である。

【0015】

レトロウイルス又はレンチウイルスを用いた方法、及びエピソーマルベクターを用いた方法には、両方とも、上述した問題があるため、RNAを用いたiPS細胞の作製方法が提案された(例えば、非特許文献6参照。)。しかし、これまでのところ、成功したiPS細胞の誘導は、胎児あるいは新生児の繊維芽細胞の使用によるものであり、RNAを用いて成人由来の体細胞をiPS細胞に誘導することに成功したとの報告はない。したがって、成人由来の体細胞からiPS細胞を作製できなければ、それらを医療に応用することは困難である。

【0016】

さらに、iPS細胞を作製するために必要な繊維芽細胞を集めるためには、1cm四方の皮膚を採取する必要がある。これは、皮膚の提供者に非常に大きな負担を与える。採取の後、繊維芽細胞株は、拡大培養により樹立されなければならない。これら繊維芽細胞は、拡大の過程とともに増殖するため、ゲノムにダメージが生じたり、染色体異常が生じたりする可能性が高い。

【0017】

(動物細胞から特定の体細胞を作製する方法の背景技術)

人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、身体のあらゆる体細胞に変化することができる。そのため、様々な種類の体細胞や組織に変化することができるiPS細胞は、細胞移植治

10

20

30

40

50

療や創薬研究に利用されることが期待されている。また、例えば、2014年にはiPS細胞から作製された網膜の細胞が移植治療に応用された。世界各国で、iPS細胞から脳の細胞（及び様々な各種臓器の細胞）を作製し、引き続き、移植治療に用いるプロジェクトが多数進んでいる。

【0018】

従来、iPS細胞を体細胞に変化させる方法は数多く開発されてきている。しかし、iPS細胞を移植治療に利用するためには、iPS細胞の効率の良い分化誘導方法を確立することが重要である。具体的には、iPS細胞を体細胞へと分化誘導するときに用いる装置を確立し、分化誘導の効率及び精度を向上させることが必要である。この装置は、移植治療に耐えうる機能を有する体細胞を作製できる必要がある。

10

【0019】

従来、iPS細胞やES細胞から体細胞へ分化誘導する方法は、自然発生の過程を模倣する試みにおいて、細胞の運命を操作するために、成長因子、ホルモン、及び/又は低分子の様々な組み合わせや濃度に依存している。しかし、*in vivo*で生じる自然発生を*in vitro*で再現することは困難であり、かなり効率が悪い。さらに、iPS細胞のヒト体細胞への分化誘導は、マウスと比較してヒトでは時間がかかる。例えば、ヒトの成熟した神経系細胞を作製するためには少なくとも3ヶ月を要する。さらに、ES/iPS細胞株によって分化誘導の効率が大きく異なり、誘導された体細胞の性質が不均一である等の問題がある。この現象は、由来が同じ複数のESクローンで、同一の薬品で処理されたものが、異なる表現型を生じたことから裏付けられている。これらのクローンの一部は脾臓細胞に分化し、他は心臓の細胞に分化した。このことは、分化能力が、クローン間で異なることを示している（例えば、非特許文献6参照。）。また、素早く再凝集する無血清杯様体凝集浮遊培養法（SFEbq法）と呼ばれる方法を用いて、大量のiPS細胞及びES細胞腫を神経系細胞に分化させる試みがなされたところ、iPS細胞及びES細胞は神経細胞分化を阻害する化学物質を含まない無血清培地で培養されたにも関わらず、いくつかのiPS細胞及びES細胞は、神経系細胞に変換することが困難であった（例えば、非特許文献7参照。）。

20

【0020】

具体的には、ヒトES/iPS細胞からホルモンや化学物質を利用する方法を用いて分化誘導された細胞は、初期の段階では胎児段階の体細胞であることが確認されている。ヒトの成熟した体細胞へのES/iPS細胞の分化誘導は極めて難しく、数か月にわたる長期の培養が必要である。しかし、発生が完了した個体を対象とする創薬や移植医療において、個体の年齢に一致する体細胞を作製することは非常に重要である。

30

【0021】

また、神経系細胞には、様々なサブタイプの細胞が存在する。ホルモンや化学物質を利用して、ES/iPS細胞を特定の神経系のサブタイプに分化誘導する方法は、均一な細胞集団を作製することができない。そのため、特定の神経系細胞サブタイプ特異的な創薬スクリーニングができない。したがって、創薬スクリーニングの効率が低い。また、移植医療においても、疾患治療に必要な特定の神経系細胞のサブタイプを移植のために濃縮することができない。

40

【0022】

これに対し、ウイルスを用いて特定の体細胞の性質を生成する情報を含む遺伝子をES/iPS細胞に直接を導入し、目的の体細胞を作製する方法が提案されている。この方法は、ホルモンや化学物質の使用に依存する上述した方法に比べて、非常に短い時間（2週間）で成熟した神経系細胞を特異的に作製可能である。また、特定の遺伝子をES/iPS細胞を導入することにより、例えば興奮性神経を均一に得ることができる。そのため、特定の神経系細胞サブタイプ特異的な創薬スクリーニングが可能であると考えられている。同様に、移植医療においても、特定の神経系細胞のサブタイプを濃縮して疾患の治療のために移植できる。

【0023】

50

しかし、特定の遺伝子を発現させるためにウイルスを用いて幹細胞を体細胞に分化誘導する方法においては、ES/iPS細胞のゲノム上に遺伝子が挿入され、内在性の遺伝子の傷を付けてしまう。その結果、創薬スクリーニングは必ずしも正確ではなく、移植においては癌化のリスクを内包しているという問題がある（例えば、非特許文献8、9参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0024】

【文献】特許第4183742号公報

【非特許文献】

【0025】

【文献】Nature 448, 313-317

N Eng J Med, 346:1185-1193, 2002

Science 302: 415-419, 2003

Science 324: 797-801, 2009

Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2009;85(8):348-62.

Nature Biotechnol 26(3): 313-315, 2008.

PNAS, 111:12426-12431, 2014

N Eng J Med, 346:1185-1193, 2002

Science 302: 415-419, 2003

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0026】

iPS細胞のような誘導幹細胞は、細胞に遺伝子等の誘導因子を導入することによって樹立され。そして、これらは、拡大培養、凍結保存される。しかし、例えば臨床用iPS細胞（例えば、GLP、GMPグレード）を作製し産業化するには、以下のような問題点がある。

【0027】

1) コスト

臨床用iPS細胞は完全にクリーンで無菌の「クリーンルーム」で作製、保存される必要がある。しかし、要求されるクリーン度のレベルを維持するのは非常に高額である。そのため、iPS細胞を作るのにコストがかかり、産業化への大きな障害となっている。

【0028】

2) 品質

幹細胞の樹立から保存までの一連の作業が複雑であり、多くの手作業を要する。また、幹細胞の作製は、個人の技量に負っているところがある。その為、作製者や実験バッチによって、iPS細胞の品質のばらつきが生じうる。

【0029】

3) 時間

特定のドナー以外の個々人に由来するiPS細胞とのクロスコンタミネーションを防ぐためには、一人の人間のみ由来するiPS細胞が、クリーンルーム内で、所定の期間作成される。さらに、iPS細胞の樹立及び品質評価の両方には長時間を要する。iPS細胞は1部屋で1回あたり一人の人間のためだけに作製されているため、多くの人間のためにiPS細胞を作製するのに非常に長い年月を要する。

【0030】

4) 人材

上述したように、現状、iPS細胞の作製は手作業によるところが大きい。一方、少数の技術者のみが、臨床用iPS細胞を作製するために必要な技能を有している。

【0031】

幹細胞の樹立から保存までの一連の作業が複雑であるという問題がある。これに対し、

10

20

30

40

50

本発明は、幹細胞を製造可能な幹細胞製造システムを提供することを目的の一つとする。

【0032】

(幹細胞の誘導方法、幹細胞の浮遊培養方法、及び幹細胞の浮遊培養器の課題)

iPS細胞を接着培養系で培養する場合、培養皿を必要とするため非常に大きなスペースが必要であり、培養効率が悪い。また、iPS細胞を誘導後、あるいは拡大培養するときに、iPS細胞を培養皿から剥離する必要がある。しかし、iPS細胞を培養皿から剥離する工程は、iPS細胞へのダメージが大きい。また作業も煩雑で機械化に不向きである。

【0033】

また、マウス由来のフィーダー細胞を用意し、培養皿上のフィーダー細胞の層上でiPS細胞を作製及び拡大培養すると、iPS細胞に動物由来成分が混入する。そのため、フィーダー細胞と共培養されたiPS細胞を臨床に利用することは不適切である。さらに、フィーダー細胞無しで(フィーダーフリー条件で)iPS細胞を作製及び拡大培養すると、非常に大きなストレスがiPS細胞にかかる。このストレスは、iPS細胞に核型異常や染色体損傷を起こし得る。また、フィーダー細胞を用いない場合は、特殊なコーティングを培養皿にする必要があり、作業がより煩雑である。

【0034】

またさらに、iPS細胞を接着培養系で培養する場合、iPS細胞は二次元的にしか増殖できないため、iPS細胞の成長効率が悪いという問題がある。

【0035】

これに対し、iPS細胞を三次元培養(浮遊培養)系で培養することが考えられる。しかし、従来の浮遊培養系においては、iPS細胞が沈むことを阻止するため、培養液を攪拌し続けなければならない。しかし、培養液を攪拌すると、iPS細胞同士がぶつかり、ダメージを受ける。そのため、細胞死や核型異常を引き起こす問題がある。

【0036】

また、従来の浮遊培養系では、iPS細胞同士がランダムに凝集し、結合して、様々な大きさの細胞塊(コロニー)が形成される。そのためコロニー間で均一なサイズ分布が保てない。コロニーが大きすぎると、コロニーの中心部の細胞まで栄養や成長因子が行き渡らず、これら奥深くの細胞の分化又は細胞死を生じさせる。その一方で、コロニーが小さすぎると、継代培養には適さない。

【0037】

iPS細胞は、単一の体細胞に由来する。そのため、それぞれのiPS細胞株によって、わずかに性質が異なる場合がある。したがって、それぞれのコロニーを独立して培養して、別々のiPS細胞株として樹立する事が非常に重要である。これに関し、iPS細胞を浮遊培養系で培養する場合、iPS細胞のコロニーがそれぞれ独立して成長し、互いに分離している事を担保する必要がある。

【0038】

接着培養系では、単一の体細胞に由来するiPS細胞がそれぞれ独立したコロニーを形成する。しかし、上述したように、従来の浮遊培養系では、iPS細胞同士がランダムに凝集してコロニーを形成する。そのため、従来の浮遊培養システムで作製されたコロニーにおけるクローナリティが維持できない。そのため、従来の浮遊培養システムでiPS細胞を誘導及び培養する試みで、個々の細胞由来のiPSコロニーを成功裏に作製した例はない。そのため、従来の浮遊培養を用いて、独立したiPS細胞株を樹立できる方法を確立した例がない。

【0039】

そこで、本発明は、コロニーを分離し分けたままiPS細胞を培養することが可能な幹細胞の誘導方法、幹細胞の浮遊培養方法、及び幹細胞の浮遊培養器を提供することを他の目的とする。

【0040】

(人工多能性幹細胞の作製方法の課題)

10

20

30

40

50

また、本発明は、臨床に利用可能な幹細胞の作製方法を提供することを他の目的とする。

【0041】

(動物細胞から特定の体細胞を作製する方法の課題)

本発明は、短時間で、遺伝子を傷つけることなく、動物細胞の他のタイプから特定のタイプの体細胞を効率的に作製する方法を提供することを他の目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0042】

本発明の態様によれば、(a)細胞を含む溶液が通過する導入前細胞送液路と、(b)導入前細胞送液路内に多能性誘導因子を送る誘導因子送液機構と、(c)導入前細胞送液路に接続され、細胞に多能性誘導因子を導入して誘導因子導入細胞を作製する因子導入装置と、(d)誘導因子導入細胞を培養して幹細胞からなる複数の細胞塊を作製する細胞塊作製装置と、(e)複数の細胞塊のそれぞれを順次パッケージするパッケージ装置と、(f)導入前細胞送液路、誘導因子送液機構、因子導入装置、細胞塊作製装置、及びパッケージ装置を格納する容器と、を備える、幹細胞製造システムが提供される。

10

【0043】

上記の幹細胞製造システムが、血液から細胞を分離する分離装置をさらに備え、分離装置で分離された細胞を含む溶液が導入前細胞送液路を通過してもよい。

【0044】

上記の幹細胞製造システムにおいて、細胞塊作製装置が、因子導入装置で作製された誘導因子導入細胞を培養する初期化培養装置と、初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる細胞塊を複数の細胞塊に分割する第1の分割機構と、第1の分割機構で分割された複数の細胞塊を拡大培養する拡大培養装置と、拡大培養装置で拡大培養された幹細胞からなる細胞塊を複数の細胞塊に分割する第2の分割機構と、複数の細胞塊をパッケージ装置に順次送る細胞塊搬送機構と、を備えていてもよい。

20

【0045】

初期化培養装置が、誘導因子導入細胞に培養液を補給する第1の培養液補給装置を備え、拡大培養装置が、複数の細胞塊に培養液を補給する第2の培養液補給装置を備えていてもよい。

【0046】

上記の幹細胞製造システムが、初期化培養装置で培養される細胞を撮影する初期化培養撮影装置と、拡大培養装置で培養される細胞を撮影する拡大培養撮影装置と、をさらに備え、初期化培養装置及び拡大培養装置で無色の培養液を使用してもよい。

30

【0047】

上記の幹細胞製造システムにおいて、導入前細胞送液路の内壁が、細胞非接着性であってもよい。

【0048】

上記の幹細胞製造システムにおいて、導入前細胞送液路と、誘導因子送液機構と、が、基板上に設けられていてもよい。

【0049】

上記の幹細胞製造システムにおいて、パッケージ装置が、ペルチェ素子又は液体窒素を用いて細胞塊を凍結してもよい。あるいは、パッケージ装置が、気化圧縮又は気化吸収等の冷凍方法により、細胞塊を凍結してもよい。

40

【0050】

上記の幹細胞製造システムが、容器内の気体を清浄にする空気清浄装置をさらに備えていてもよい。

【0051】

上記の幹細胞製造システムが、容器内の気体の温度を管理する温度管理装置をさらに備えていてもよい。

【0052】

上記の幹細胞製造システムが、容器内の気体の二酸化炭素濃度を管理する二酸化炭素濃

50

度管理装置をさらに備えていてもよい。

【0053】

上記の幹細胞製造システムが、容器内を乾熱滅菌又はガス滅菌する滅菌装置をさらに備えていてもよい。

【0054】

上記の幹細胞製造システムにおいて、誘導因子送液機構、因子導入装置、細胞塊作製装置、及びパッケージ装置が、サーバーによって作業手順に基づいて制御され、サーバーが、誘導因子送液機構、因子導入装置、細胞塊作製装置、及びパッケージ装置が作業手順に基づいて稼働しているか否か監視し、稼働記録を作成してもよい。

【0055】

上記の幹細胞製造システムが、幹細胞に誘導因子を導入し、体細胞に分化させる装置をさらに備えていてもよい。

【0056】

本発明の態様によれば、ゲル培地で浮遊培養されている体細胞を幹細胞へ誘導することを含む、幹細胞の誘導方法が提供される。

【0057】

上記の幹細胞の誘導方法において、ゲル培地が攪拌されなくともよい。ゲル培地が、脱アシル化ジェランガムでゲル化されていてもよい。

【0058】

上記の幹細胞の誘導方法において、ゲル培地が、成長因子を含まなくともよい。あるいは、ゲル培地が、成長因子を40重量%以下の濃度で含んでいてもよい。

【0059】

上記の幹細胞の誘導方法において、ゲル培地が、bFGFを含まなくともよい。ゲル培地が、ヒトES/iPS培地を含んでいてもよい。

【0060】

また、本発明の態様によれば、成長因子を含まないゲル培地で幹細胞を浮遊培養することを含む、幹細胞の浮遊培養方法が提供される。

【0061】

また、本発明の態様によれば、成長因子を40重量%以下の濃度で含むゲル培地で幹細胞を浮遊培養することを含む、幹細胞の浮遊培養方法が提供される。

【0062】

また、本発明の態様によれば、bFGFを含まないゲル培地で幹細胞を浮遊培養することを含む、幹細胞の浮遊培養方法が提供される。

【0063】

また、本発明の態様によれば、bFGFを400 μ g/L以下の濃度で含むゲル培地で幹細胞を浮遊培養することを含む、幹細胞の浮遊培養方法が提供される。

【0064】

上記の幹細胞の浮遊培養方法において、ゲル培地が攪拌されなくともよい。ゲル培地が、脱アシル化ジェランガムでゲル化されていてもよい。ゲル培地が、ROCK阻害剤を含んでいてもよい。ゲル培地における幹細胞の濃度が、 0.1×10^5 個/mL以上であってもよい。

【0065】

上記の幹細胞の浮遊培養方法が、浮遊培養することの前に、幹細胞をシングルセルに分解することと、シングルセルに分解された幹細胞を、ゲル培地に入れることと、を更に含んでいてもよい。

【0066】

上記の幹細胞の浮遊培養方法における浮遊培養することにおいて、シングルセルがクローナリティを保ったままコロニーを形成してもよい。

【0067】

上記の幹細胞の浮遊培養方法が、浮遊培養することの前に、格子プレートを用いて幹細

10

20

30

40

50

胞を懸滴型培養してコロニーを形成させることと、形成されたコロニーをゲル培地に入れることと、を更に含んでいてもよい。

【0068】

上記の幹細胞の浮遊培養方法において、幹細胞が未分化の状態を保ったまま増殖してもよい。

【0069】

また、本発明の態様によれば、幹細胞とゲル培地が入れられる透析チューブと、透析チューブが入れられ、透析チューブの周囲にゲル培地が入れられる容器と、を備える、幹細胞の浮遊培養器が提供される。

【0070】

上記の幹細胞の浮遊培養器において、透析チューブの分画分子量が0.1kDa以上であっててもよい。透析チューブがセルロースエステル、セルロースエステル類、再生セルロース、及びセルロースアセテートから選択される少なくとも一つからなってもよい。

【0071】

また、本発明の態様によれば、透析チューブに幹細胞とゲル培地を入れることと、容器に透析チューブを入れることと、容器内の透析チューブの周囲にゲル培地を入れることと、透析チューブ内のゲル培地で幹細胞を浮遊培養することと、を含む、幹細胞の浮遊培養方法が提供される。なお、透析チューブに幹細胞とゲル培地を入れることと、容器に透析チューブを入れることと、容器内の透析チューブの周囲にゲル培地を入れることと、の順番は特に限定されない。例えば、容器に透析チューブを入れてから、透析チューブに幹細胞とゲル培地を入れてもよい。

【0072】

上記の幹細胞の浮遊培養方法において、透析チューブの分画分子量が0.1kDa以上であっててもよい。透析チューブがセルロースエステル、セルロースエステル類、再生セルロース、及びセルロースアセテートから選択される少なくとも一つからなってもよい。

【0073】

上記の幹細胞の浮遊培養方法において、透析チューブの周囲のゲル培地にROCK阻害剤が添加されていてもよい。ゲル培地が攪拌されなくともよい。ゲル培地が、脱アシル化ジェランガムでゲル化されていてもよい。

【0074】

上記の幹細胞の浮遊培養方法において、ゲル培地が、成長因子を含まなくともよい。あるいは、ゲル培地が、成長因子を40重量%以下の濃度で含んでいてもよい。

【0075】

上記の幹細胞の浮遊培養方法において、ゲル培地が、bFGFを含まなくともよい。

【0076】

上記の幹細胞の浮遊培養方法において、ゲル培地における幹細胞の濃度が、 0.1×10^5 個/mL以上であっててもよい。

【0077】

上記の幹細胞の浮遊培養方法が、浮遊培養することの前に、幹細胞をシングルセルに分解することと、シングルセルに分解された幹細胞を、ゲル培地に入れることと、を更に含んでいてもよい。

【0078】

上記の幹細胞の浮遊培養方法の浮遊培養することにおいて、シングルセルがクローナリティを保ったままコロニーを形成してもよい。

【0079】

上記の幹細胞の浮遊培養方法が、浮遊培養することの前に、格子プレートを用いて幹細胞を懸滴型培養してコロニーを形成させることと、形成されたコロニーをゲル培地に入れることと、を更に含んでいてもよい。

【0080】

上記の幹細胞の浮遊培養方法において、幹細胞が未分化の状態を保ったまま増殖しても

10

20

30

40

50

よい。

【0081】

上記の幹細胞の浮遊培養方法が、容器内の透析チューブの周囲のゲル培地を新鮮なゲル培地に交換することを更に含んでいてもよい。

【0082】

上記の幹細胞の浮遊培養方法が、容器内の透析チューブの周囲のゲル培地に新鮮なゲル培地を補充することを更に含んでいてもよい。

【0083】

上記の幹細胞の浮遊培養方法において、透析チューブ内のゲル培地を交換しなくともよい。ゲル培地が、ヒトES/iPS培地を含んでいてもよい。

10

【0084】

また、本発明の態様によれば、透析チューブに体細胞とゲル培地を入れることと、容器に透析チューブを入れることと、容器内の透析チューブの周囲にゲル培地を入れることと、透析チューブ内のゲル培地で浮遊している体細胞を幹細胞に誘導することと、を含む、幹細胞の浮遊誘導方法が提供される。なお、透析チューブに体細胞とゲル培地を入れることと、容器に透析チューブを入れることと、容器内の透析チューブの周囲にゲル培地を入れることと、の順番は特に限定されない。例えば、容器に透析チューブを入れてから、透析チューブに体細胞とゲル培地を入れてもよい。

【0085】

上記の幹細胞の浮遊誘導方法において、透析チューブの分画分子量が0.1kDa以上であってもよい。透析チューブが、セルロースエステル、セルロースエステル類、再生セルロース、及びセルロースアセテートから選択される少なくとも一つからなってもよい。

20

【0086】

上記の幹細胞の浮遊誘導方法において、ゲル培地が攪拌されなくともよい。ゲル培地が、脱アシル化ジェランガムでゲル化されていてもよい。

【0087】

上記の幹細胞の浮遊誘導方法において、ゲル培地が、成長因子を含まなくともよい。

【0088】

上記の幹細胞の浮遊誘導方法において、ゲル培地が、bFGFを含まなくともよい。

30

【0089】

上記の幹細胞の浮遊誘導方法が、浮遊培養することの前に、体細胞をシングルセルに分解することと、シングルセルに分解された体細胞を、ゲル培地に入れることと、を更に含んでいてもよい。

【0090】

上記の幹細胞の浮遊誘導方法の浮遊培養することにおいて、シングルセルがクローナリティを保ったままコロニーを形成してもよい。

【0091】

上記の幹細胞の浮遊誘導方法が、容器内の透析チューブの周囲のゲル培地を新鮮なゲル培地に交換することを更に含んでいてもよい。

40

【0092】

上記の幹細胞の浮遊誘導方法が、容器内の透析チューブの周囲のゲル培地に新鮮なゲル培地を補充することを更に含んでいてもよい。

【0093】

上記の幹細胞の浮遊誘導方法において、透析チューブ内のゲル培地を交換しなくともよい。ゲル培地が、ヒトES/iPS培地を含んでいてもよい。

【0094】

また、本発明の態様によれば、体細胞を用意することと、体細胞に初期化因子RNAをリポフェクション法により導入することと、を含む、人工多能性幹細胞の作製方法が提供される。

50

【0095】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、体細胞が血液細胞であってもよい。血液細胞が単核球細胞であってもよい。血液細胞が血液幹前駆細胞であってもよい。血液細胞がCD34陽性であってもよい。血液細胞がCD34陽性であることを条件に分離された血液細胞であってもよい。血液細胞がCD3陽性であってもよい。血液細胞がCD3陽性であることを条件に分離された血液細胞であってもよい。

【0096】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、初期化因子RNAが、Oct3/4のmRNA、Sox2のmRNA、Klf4のmRNA、及びc-MycのmRNAを含んでもよい。初期化因子RNAが、GLIS1のmRNA、FOXH1のmRNA、L-MYCのmRNA、及びp53-dnのmRNAからなる群から選択される少なくとも一つを更に含んでもよい。初期化因子RNAが、LIN28AのmRNA又はLIN28BのmRNAを更に含んでもよい。

10

【0097】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、初期化因子RNAのリポフェクションに、siRNAのリポフェクション試薬又はmRNAのリポフェクション試薬を用いてもよい。

【0098】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、初期化因子RNAのリポフェクションに、Lipofectamine（登録商標）RNAiMAXトランスフェクション試薬、Lipofectamine（登録商標）MessengerMAXトランスフェクション試薬、Stemfect（登録商標）RNAトランスフェクション試薬、及びReproRNA（登録商標）トランスフェクション試薬から選択される少なくとも一つを用いてもよい。

20

【0099】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、初期化因子RNAのリポフェクションの際の血液細胞数が1から 1×10^8 であってもよい。初期化因子RNAのリポフェクションの際の初期化因子RNAの量が1回あたり5ngから50 μ gであってもよい。初期化因子RNAのリポフェクションの際のリポフェクション試薬の量が1回あたり0.1 μ Lから500 μ Lであってもよい。初期化因子RNAのリポフェクションを1回あたり0.1時間以上24時間以下行ってもよい。初期化因子RNAのリポフェクションを複数回行ってもよい。

30

【0100】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、初期化因子RNAのリポフェクションの際に用いられる培地がOpti-MEM（登録商標）であってもよい。

【0101】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法が、血液から、フィルターを用いて単核球細胞を分離することを更に含んでもよい。

【0102】

また、本発明の態様によれば、動物細胞を用意することと、動物細胞に誘導因子RNAをリポフェクションにより導入し、体細胞に分化させることと、を含む、動物細胞から特定の体細胞を作製する方法が提供される。

40

【0103】

上記の動物細胞から特定の体細胞を作製する方法において、動物細胞が幹細胞であってもよい。幹細胞が人工多能性幹細胞であってもよい。幹細胞がiPS細胞であってもよい。幹細胞が胚性幹細胞であってもよい。

【0104】

上記の動物細胞から特定の体細胞を作製する方法において、動物細胞がヒト繊維芽細胞であってもよい。あるいは、動物細胞が血液細胞であってもよい。

【0105】

50

上記の動物細胞から特定の体細胞を作製する方法において、誘導因子RNAが、薬剤耐性遺伝子に対応するmRNAを含んでいてもよい。

【0106】

上記の動物細胞から特定の体細胞を作製する方法が、リポフェクションの後、薬剤耐性を示す細胞を選択することを含んでいてもよい。

【0107】

上記の動物細胞から特定の体細胞を作製する方法において、誘導因子RNAが、ピューロマイシン耐性遺伝子に対応するmRNAを含んでいてもよい。

【0108】

上記の動物細胞から特定の体細胞を作製する方法が、リポフェクションの後、ピューロマイシン耐性を示す細胞を選択することを含んでいてもよい。

10

【0109】

上記の動物細胞から特定の体細胞を作製する方法において、体細胞が神経系細胞であってもよい。誘導因子RNAがNg2のmRNAを含んでいてもよい。誘導された神経系細胞がNg2陽性であってもよい。誘導された神経系細胞が - III Tubulin、MAP2、PSA-NCAM、又はvGluT陽性であってもよい。

【0110】

上記の動物細胞から特定の体細胞を作製する方法において、誘導因子RNAのリポフェクションに、メッセンジャーマックス（登録商標）を用いてもよい。

【0111】

上記の動物細胞から特定の体細胞を作製する方法において、誘導因子RNAのリポフェクションの際の細胞の数が 1×10^4 から 1×10^8 であってもよい。誘導因子RNAのリポフェクションの際の誘導因子RNAの量が1回あたり200ngから5000ngであってもよい。誘導因子RNAのリポフェクションの際のリポフェクション試薬の量が1回あたり0.1μLから100μLであってもよい。

20

【0112】

上記の動物細胞から特定の体細胞を作製する方法において、誘導因子RNAのリポフェクションの際に用いられる培地がOpti-MEM（登録商標）であってもよい。

【0113】

上記の動物細胞から特定の体細胞を作製する方法において、誘導因子RNAのリポフェクションから10日以内に動物細胞が体細胞に分化してもよい。

30

【0114】

上記の動物細胞から特定の体細胞を作製する方法において、動物細胞に誘導因子RNAをリポフェクションにより導入することを複数回繰り返してもよい。

【0115】

上記の動物細胞から特定の体細胞を作製する方法において、動物細胞が、基底膜マトリックスでコートされた基板上で培養されてもよい。

【0116】

上記の動物細胞から特定の体細胞を作製する方法において、動物細胞が、B18R含有培地で培養されてもよい。あるいは、動物細胞が、B18R非含有培地で培養されてもよい。

40

【発明の効果】

【0117】

本発明によれば、幹細胞を製造可能な幹細胞製造システムを提供可能である。

【0118】

（幹細胞の誘導方法、幹細胞の浮遊培養方法、及び幹細胞の浮遊培養器の効果）

本発明によれば、コロニーを分離したままiPS細胞を培養することが可能な幹細胞の誘導方法、幹細胞の浮遊培養方法、及び幹細胞の浮遊培養器を提供可能である。

【0119】

（人工多能性幹細胞の作製方法の効果）

50

本発明によれば、臨床に利用可能な人工多能性幹細胞の作製方法を提供可能である。

【0120】

(動物細胞から特定の体細胞を作製する方法の効果)

本発明によれば、動物細胞の遺伝子を傷つけることなく、短期間で効率よく特定の体細胞を作製可能な、動物細胞から特定の体細胞を作製する方法を提供可能である。

【図面の簡単な説明】

【0121】

【図1】本発明の実施の形態に係る幹細胞製造システムの模式図である。

【図2】本発明の実施の形態に係る幹細胞製造システムの導入細胞送液路の一例の模式的断面図である。

10

【図3】本発明の実施の形態に係る幹細胞製造システムの導入細胞送液路の一例の模式的断面図である。

【図4】本発明の実施の形態に係る幹細胞製造システムで用いられる培養バッグの模式図である。

【図5】本発明の第2の実施の形態に係る幹細胞の浮遊培養器を示す模式図である。

【図6】実施例1に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

【図7】実施例1に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

【図8】実施例1に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

【図9】実施例1に係るiPS細胞のコロニーの分化の状態を示すグラフである。

【図10】実施例2に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

20

【図11】実施例3に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

【図12】実施例3に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

【図13】実施例4に係るiPS細胞の写真である。

【図14】実施例4に係るiPS細胞のコロニー数を示すグラフである。

【図15】実施例4に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

【図16】実施例5に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

【図17】実施例5に係るiPS細胞の密度ごとのコロニー形成率を示すグラフである。

【図18】実施例5に係る培地の量ごとのコロニー形成率を示すグラフである。

【図19】実施例6に係るiPS細胞の写真である。

【図20】実施例6に係るiPS細胞のコロニー数を示すグラフである。

30

【図21】実施例7に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

【図22】実施例7に係る培養条件ごとのiPS細胞のコロニー数を示したグラフである。

【図23】実施例7に係る培地ごとのiPS細胞のコロニーの写真である。

【図24】実施例7に係るiPS細胞のコロニーの分化の状態を示すグラフである。

【図25】実施例8に係るiPS細胞の写真である。

【図26】実施例8に係る培地の量ごとのコロニー形成率を示すグラフである。

【図27】実施例9に係るゲル培地の写真である。

【図28】実施例9に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

【図29】実施例10に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

【図30】実施例11に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

40

【図31】実施例12に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

【図32】実施例12に係るiPS細胞のコロニーの大きさを示すグラフである。

【図33】実施例12に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

【図34】実施例12に係るiPS細胞のコロニーの分化の状態を示すグラフである。

【図35】実施例13に係る蛍光顕微鏡写真である。

【図36】実施例13に係る蛍光活性化フローサイトメーターによる分析結果を示すグラフである。

【図37】実施例14に係る細胞の写真である。

【図38】実施例14に係る細胞の写真である。

【図39】実施例14に係るトランスフェクション効率と生存率の割合を示したグラフで

50

ある。

【図 4 0】実施例 1 5 に係る細胞の写真である。

【図 4 1】実施例 1 5 に係る細胞の蛍光顕微鏡下の観察により撮られた写真である。

【図 4 2】実施例 1 5 に係る T U J - 1 陽性細胞の割合を示したグラフである。

【図 4 3】実施例 1 5 に係る細胞の写真である。

【図 4 4】実施例 1 6 に係るトランスフェクションの方法の模式図である。

【図 4 5】実施例 1 6 に係る細胞の写真である。

【図 4 6】実施例 1 6 に係る細胞の写真である。

【発明を実施するための形態】

【 0 1 2 2 】

以下に本発明の実施の形態を説明する。以下の図面の記載において、同一又は類似の部分には同一又は類似の符号で表している。但し、図面は模式的なものである。したがって、具体的な寸法等は以下の説明を照らし合わせて判断すべきものである。また、図面相互間においても互いの寸法の関係や比率が異なる部分が含まれていることは勿論である。

【 0 1 2 3 】

(第 1 の実施の形態)

本発明の第 1 の実施の形態に係る幹細胞製造システムは、図 1 に示すように、血液から細胞を分離する分離装置 1 0 と、分離装置 1 0 で分離された細胞を含む溶液が通過する導入前細胞送液路 2 0 と、導入前細胞送液路 2 0 内に多能性誘導因子を送る誘導因子送液機構 2 1 と、導入前細胞送液路 2 0 に接続され、細胞に多能性誘導因子を導入して誘導因子導入細胞を作製する因子導入装置 3 0 と、誘導因子導入細胞を培養して幹細胞からなる複数の細胞塊を作製する細胞塊作製装置 4 0 と、複数の細胞塊のそれぞれを順次パッケージするパッケージ装置 1 0 0 と、を備える。

【 0 1 2 4 】

幹細胞製造システムは、さらに、分離装置 1 0 、導入前細胞送液路 2 0 、誘導因子送液機構 2 1 、因子導入装置 3 0 、細胞塊作製装置 4 0 、及びパッケージ装置 1 0 0 を格納する容器 2 0 0 を備える。

【 0 1 2 5 】

幹細胞製造システムは、さらに、容器 2 0 0 内の気体を清浄にする空気清浄装置、容器 2 0 0 内の気体の温度を管理する温度管理装置、及び容器 2 0 0 内の気体の二酸化炭素 (C O ₂) 濃度を管理する二酸化炭素濃度管理装置を備えていてもよい。空気清浄装置は、容器 2 0 0 内の気体の清浄度を監視する清浄度センサを備えていてもよい。空気清浄装置は、例えば、H E P A (H i g h E f f i c i e n c y P a r t i c u l a t e A i r) フィルター等を用いて、容器 2 0 0 内の空気を清浄化する。空気清浄装置は、例えば、容器 2 0 0 内の空気を、I S O 基準 1 4 6 4 4 - 1 で I S O 1 から I S O 6 の清浄度に維持する。温度管理装置は、容器 2 0 0 内の気体の温度を監視する温度センサを備えていてもよい。C O ₂ 濃度管理装置は、容器 2 0 0 内の気体の C O ₂ 濃度を監視する C O ₂ 濃度センサを備えていてもよい。

【 0 1 2 6 】

容器 2 0 0 には、例えば扉等が設けられているが、扉が閉じられた状態では、内部が完全に閉鎖され、内部の空気の清浄度、温度、及び C O ₂ 濃度を一定に保つことが可能である。容器 2 0 0 は、外部から内部の装置の状態を観察できるよう、透明であることが好ましい。また、容器 2 0 0 は、ゴム手袋等のグローブを備える、グローブボックスであってもよい。

【 0 1 2 7 】

分離装置 1 0 は、例えばヒトの血液が入ったバイアルを受け取る。分離装置 1 0 は、例えば、エチレンジアミン四酢酸 (E D T A) 、ヘパリン、及び生物学的製剤基準血液保存液 A 液 (A C D - A 液、テルモ株式会社) 等の抗凝固剤を保存する抗凝固剤タンクを備えている。分離装置 1 0 は、ポンプ等を用いて、抗凝固剤タンクから、ヒトの血液に、抗凝固剤を添加する。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 8 】

また、分離装置 10 は、例えば、F i c o l l - P a q u e P R E M I U M (登録商標、G Eヘルスケア・ジャパン株式会社)等の単核細胞分離用試薬を保存する分離用試薬タンクを備えている。分離装置 10 は、ポンプ等を用いて、分離用試薬タンクから、例えば 15 mL チューブ 2 本に、単核細胞分離用試薬を 5 mL ずつ分注する。なお、チューブの代わりに、樹脂バッグを用いてもよい。

【 0 1 2 9 】

さらに、分離装置 10 は、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 等の緩衝液を保存する緩衝液タンクを備えている。分離装置 10 は、ポンプ等を用いて、緩衝液タンクから、例えばヒトの血液 5 mL に、緩衝液 5 mL を加えて希釈する。またさらに、分離装置 10 は、ポンプ等を用いて、希釈されヒトの血液を、チューブ中の単核細胞分離用試薬上に、5 mL ずつ加える。

10

【 0 1 3 0 】

分離装置 10 は、温度設定可能な遠心機をさらに備える。遠心機の温度は、例えば 18 に設定される。分離装置 10 は、移動装置等を用いて、単核細胞分離用試薬及びヒトの血液等が入れられたチューブを、遠心機のホルダーに入れる。遠心機は、チューブ中の溶液を、例えば 400 × g で 30 分間遠心する。チューブの代わりに、樹脂バッグを遠心させてもよい。

【 0 1 3 1 】

遠心後、分離装置 10 は、チューブ中の溶液の単核球で白く濁った中間層をポンプ等で回収する。分離装置 10 は、ポンプ等を用いて、回収した単核球の懸濁液を、導入前細胞送液路 20 に送り出す。あるいは、さらに、分離装置 10 は、回収した単核球溶液 2 mL に対し、例えば P B S 12 mL を加えて、チューブを遠心機のホルダーに入れる。遠心機は、チューブ中の溶液を、例えば 200 × g で 10 分間遠心する。

20

【 0 1 3 2 】

遠心後、分離装置 10 は、ポンプ等を用いて、チューブ中の溶液の上清を吸引して除去し、X - V I V O 10 (登録商標、ロンザジャパン株式会社)等の単核球培地 3 mL をチューブ中の単核球溶液に加えて懸濁する。分離装置 10 は、ポンプ等を用いて、単核球懸濁液を、導入前細胞送液路 20 に送り出す。なお、分離装置 10 は、透析膜を使用して、血液から単核球を分離してもよい。また、皮膚等から予め分離された繊維芽細胞等の体細胞を使用する場合は、分離装置 10 は無くともよい。

30

【 0 1 3 3 】

また、分離装置 10 は、遠心分離以外の方法で、誘導に適した細胞を分離してもよい。例えば、分離すべき細胞が T 細胞であれば C D 3 , C D 4 , C D 8 のいずれかが陽性である細胞をパニングにより分離すればよい。分離すべき細胞が血管内皮前駆細胞であれば C D 3 4 が陽性である細胞をパニングにより分離すればよい。分離すべき細胞が B 細胞であれば、C D 10 , C D 19 , C D 20 のいずれかが陽性である細胞をパニングにより分離すればよい。また、パニングに限らず、磁気細胞分離方法やフローサイトメトリー等、他の方法により分離してもよい。あるいは、分離装置 10 は、後述する実施の形態で説明する方法により、誘導に適した細胞を分離してもよい。例えば、第 5 の実施の形態で説明するように、細胞表面マーカーに基づいて、磁気分離装置を用いて、誘導に適した細胞を分離してもよい。あるいは、フィルターを用いて、誘導に適した細胞を分離してもよい。また、誘導される細胞は、血液細胞に限定されず、繊維芽細胞等であってもよい。

40

【 0 1 3 4 】

誘導因子送液機構 21 は、誘導因子導入試薬溶液等を保存する誘導因子導入試薬タンクを備える。遺伝子導入試薬溶液等の誘導因子導入試薬溶液は、例えば、H u m a n T C e l l N u c l e o f e c t o r (登録商標、ロンザジャパン株式会社)溶液等のエレクトロポレーション溶液、サプリメント溶液、及びプラスミドセットを含む。プラスミドセットは、例えば、p C X L E - h O C T 3 / 4 - s h p 5 3 - F を 0 . 8 3 μ g 、 p C X L E - h S K を 0 . 8 3 μ g 、 p C E - h U L を 0 . 8 3 μ g 、及び p C X W B - E B

50

NA1を0.5 μg含む。あるいは、誘導因子導入試薬溶液は、後述する第4及び第5の実施の形態で説明する試薬等を含んでいてもよい。例えば、第5の実施の形態で説明するように、細胞に初期化因子をコードしているRNAをリポフェクション法により導入してもよい。誘導因子送液機構21は、マイクロポンプ等を用いて、誘導因子導入試薬溶液中に単核球懸濁液が懸濁されるように、誘導因子導入試薬溶液を、導入前細胞送液路20に送り出す。

【0135】

導入前細胞送液路20の内壁には、細胞が接着しないよう、poly-HEMA (poly 2-hydroxyethyl methacrylate) をコーティングして、細胞非接着性であってもよい。あるいは、導入前細胞送液路20の材料に、細胞が接着しにくい材料を用いてもよい。また、導入前細胞送液路20の材料に、温度伝導率が良く、CO₂透過性の材料を用いることにより、導入前細胞送液路20内の条件が、容器200内の管理された温度及びCO₂濃度と同等になる。さらに、導入前細胞送液路20には、コンタミネーション防止の観点から、逆流防止弁が設けられていてもよい。

10

【0136】

導入前細胞送液路20に接続された因子導入装置30は、例えばエレクトロポレーターであり、誘導因子導入試薬溶液と単核球懸濁液の混合液を受け取り、単核球に対してプラスミドのエレクトロポレーションを実施する。因子導入装置30は、エレクトロポレーションを実施後、プラスミドをエレクトロポレーションされた単核球を含む溶液に、単核球培地を加える。因子導入装置30は、ポンプ等を用いて、プラスミドをエレクトロポレーションされた単核球(以下、「誘導因子導入細胞」という。)を含む溶液を、導入細胞送液路31に送り出す。なお、因子導入装置30は、エレクトロポレーターに限定されない。因子導入装置30は、後述する第4及び第5の実施の形態で説明する方法により、細胞に誘導因子を導入してもよい。また、培地は、ゲル培地であってもよい。この場合、ゲル培地は、例えば、basic fibroblast growth factor (bFGF) 等の成長因子を含まなくともよい。あるいは、ゲル培地は、bFGF等の成長因子を、400 μg/L以下、40 μg/L以下、あるいは10 μg/L以下の低濃度で含んでいてもよい。また、ゲル培地は、tgf- を含まないか、tgf- を600 ng/L以下、300 ng/L以下、あるいは100 ng/L以下の低濃度で含んでいてもよい。

20

【0137】

導入細胞送液路31の内壁には、細胞が接着しないよう、poly-HEMAをコーティングして、非接着性にしてもよい。あるいは、導入細胞送液路31の材料に、細胞が接着しにくい材料を用いてもよい。また、導入細胞送液路31の材料に、温度伝導率が良く、CO₂透過性の材料を用いることにより、導入細胞送液路31内の条件が、容器200内の管理された温度及びCO₂濃度と同等になる。さらに、導入細胞送液路31には、コンタミネーション防止の観点から、逆流防止弁が設けられていてもよい。また、エレクトロポレーションの後、多くの細胞が死に、死んだ細胞の細胞塊ができることがある。そのため、導入細胞送液路31に、死細胞塊を除去するフィルターを設けてもよい。あるいは、図2に示すように、導入細胞送液路31内部に、内径を断続的に変化させる一又は複数の襜を設けてもよい。またあるいは、図3に示すように、導入細胞送液路31の内径を断続的に変化させてもよい。

30

40

【0138】

導入細胞送液路31に接続された細胞塊作製装置40は、因子導入装置30で作製された誘導因子導入細胞を培養する初期化培養装置50と、初期化培養装置50で樹立された幹細胞からなる細胞塊を複数の細胞塊に分割する第1の分割機構60と、第1の分割機構60で分割された複数の細胞塊を拡大培養する拡大培養装置70と、拡大培養装置70で拡大培養された幹細胞からなる細胞塊を複数の細胞塊に分割する第2の分割機構80と、複数の細胞塊をパッケージ装置100に順次送る細胞塊搬送機構90と、を備える。

【0139】

初期化培養装置50は、内部にウェルプレートを格納可能である。また、初期化培養装

50

置50は、ピペッティングマシンを備える。初期化培養装置50は、導入細胞送液路31から誘導因子導入細胞を含む溶液を受け取り、ピペッティングマシンで、溶液をウェルに分配する。初期化培養装置50は、ウェルに誘導因子導入細胞を分配後、例えば3、5、7日目に、StemFit（登録商標、味の素株式会社）等の幹細胞培地を加える。培地にサプリメントとして塩基性の線維芽細胞成長因子（basic FGF）を添加してもよい。なお、StemBeads FGF2（フナコシ）のような、FGF-2（basic FGF, bFGF, FGF-b）を培地に供給し続ける徐放性ビーズを培地に添加してもよい。また、FGFは不安定な場合があるので、ヘパリン模倣ポリマーをFGFに共役させ、FGFを安定化させてもよい。さらに、初期化培養装置50は、ウェルに誘導因子導入細胞を分配後、例えば9日目に、培地交換を行い、以降、iPS細胞の細胞塊（コロニー）が1mmを越える程度まで、2日おきに培地交換を行う。

10

【0140】

細胞塊が形成されると、初期化培養装置50は、ピペッティングマシンで細胞塊を回収し、回収した細胞塊にTrypLE Select（登録商標、ライフテクノロジーズ社）等のトリプシン代替組み替え酵素を添加する。さらに、初期化培養装置50は、回収した細胞塊が入っている容器をインキュベータに入れて、37℃、CO₂5%で10分間、細胞塊と、トリプシン代替組み替え酵素と、を反応させる。あるいは、初期化培養装置50は、ピペッティングマシンによるピペッティングにより、細胞塊を砕く。またあるいは、初期化培養装置50は、フィルターが設けられたパイプや、図2又は図3に示した導入細胞送液路31と同様に、内径を断続的に変化させるパイプに細胞塊を通して、細胞塊を砕いてよい。その後、初期化培養装置50は、砕かれた細胞塊が入れられた溶液に、StemFit（登録商標、味の素株式会社）等の多能性幹細胞用培地を加える。

20

【0141】

なお、初期化培養装置50における培養は、ウェルプレートではなく、CO₂透過性のバッグの中で行ってもよい。また、培養は接着培養であってもよいし、浮遊培養であってもよい。浮遊培養である場合は、攪拌培養を行ってもよい。また、培地が寒天状であってもよい。寒天状の培地としては、ゲランガム（gelatin gum）ポリマーが挙げられる。寒天状の培地を用いると、細胞が沈んだり、接着したりすることがないため、浮遊培養の形態でありながら、攪拌する必要がなく、一細胞由来の単一細胞塊を作製する事が出来るさらに、初期化培養装置50における培養は、ハンギングドロップ培養であってもよい。

30

【0142】

初期化培養装置50は、ウェルプレートやCO₂透過性のバッグに培養液を補給する第1の培養液補給装置を備えていてもよい。第1の培養液補給装置は、ウェルプレートやCO₂透過性のバッグ内の培養液を回収し、フィルターや透析膜を用いて培養液をろ過して、浄化された培養液を再利用してもよい。この場合、再利用される培養液に成長因子等を添加してもよい。また、初期化培養装置50は、培養液の温度を管理する温度管理装置、及び培養液近傍の湿度を管理する湿度管理装置等をさらに備えていてもよい。

【0143】

初期化培養装置50において、例えば、細胞を、図4に示すような透析膜等の培養液透過性のバッグ301に入れ、培養液透過性のバッグ301を、培養液非透過性のCO₂透過性のバッグ302に入れて、バッグ301、302に培養液を入れてもよい。初期化培養装置50は、新鮮な培養液が入ったバッグ302を複数用意しておき、所定の期間ごとに、細胞が入ったバッグ301を入れるバッグ302を、新鮮な培養液が入っているバッグ302に交換してもよい。なお、初期化培養装置50における培養方法は、上記の方法に限定されず、後述する第2及び第3の実施の形態で説明する方法により、培養してもよい。例えば、第2の実施の形態で説明するように、ゲル培地を用いてもよい。この場合、ゲル培地は、例えば、basic fibroblast growth factor（bFGF）等の成長因子を含まなくともよい。あるいは、ゲル培地は、bFGF等の成長因子を、400µg/L以下、40µg/L以下、あるいは10µg/L以下の低濃度で含

40

50

んでいてもよい。また、ゲル培地は、 $t g f -$ を含まないか、 $t g f -$ を 600 ng/L 以下、 300 ng/L 以下、あるいは 100 ng/L 以下の低濃度で含んでいてもよい。また、第3の実施の形態で説明するように、幹細胞とゲル培地が入られる透析チューブと、透析チューブが入られ、透析チューブの周囲にゲル培地が入られる容器と、を備える浮遊培養器を用いてもよい。

【0144】

幹細胞製造システムは、初期化培養装置50における培養を撮影する初期化培養撮影装置をさらに備えていてもよい。ここで、初期化培養装置50で使用される培養液に無色の培養液を用いると、有色の培養液を用いた場合に生じる乱反射や自家蛍光を抑制することが可能となる。また、誘導された細胞と、誘導されなかった細胞とでは、細胞の形状及び大きさ等が異なるため、幹細胞製造システムは、初期化培養装置50における細胞を撮影することにより、誘導された細胞の割合を算出する誘導状態監視装置を、さらに備えていてもよい。あるいは、誘導状態監視装置は、抗体免疫染色法又はRNA抽出法により、誘導された細胞の割合を特定してもよい。さらに、幹細胞製造システムは、磁気細胞分離方法やフローサイトメトリー等により、誘導されていない細胞を取り除く、未誘導細胞除去装置を備えていてもよい。

10

【0145】

初期化培養装置50には、第1細胞塊送液路51が接続されている。初期化培養装置50は、トリプシン代替組み替え酵素と細胞塊の含有液を、ポンプ等を用いて、第1細胞塊送液路51に送り出す。なお、物理的に細胞塊を砕ける場合は、トリプシン代替組み替え酵素はなくともよい。また、第1細胞塊送液路51は、所定の大きさ未満の誘導された細胞のみを通す内径を有し、所定の大きさ以上の誘導されていない細胞を除去する分岐流路に接続されていてもよい。

20

【0146】

第1細胞塊送液路51の内壁には、細胞が接着しないよう、 $poly-HEMA$ をコーティングして、細胞非接着性であってもよい。あるいは、第1細胞塊送液路51の材料に、細胞が接着しにくい材料を用いてもよい。また、第1細胞塊送液路51の材料に、温度伝導率が良く、 CO_2 透過性の材料を用いることにより、第1細胞塊送液路51内の条件が、容器200内の管理された温度及び CO_2 濃度と同等になる。さらに、第1細胞塊送液路51には、コンタミネーション防止の観点から、逆流防止弁が設けられていてもよい。

30

【0147】

第1細胞塊送液路51は、第1の分割機構60に接続されている。第1の分割機構60は、例えば、メッシュを備える。溶液に含まれる細胞塊は、水圧によってメッシュを通過する際、メッシュの各孔の大きさの複数の細胞塊に分割される。例えば、メッシュの各孔の大きさが均一であれば、分割後の複数の細胞塊の大きさも、ほぼ均一となる。あるいは、第1の分割機構60は、ノズルを備えていてもよい。例えば、略円錐状のノズルの内部を階段状に微細加工することにより、溶液に含まれる細胞塊がノズルを通過する際に、複数の細胞塊に分割される。第1の分割機構60には、拡大培養装置70が接続されている。第1の分割機構60で分割された細胞塊を含む溶液は、拡大培養装置70に送られる。

【0148】

拡大培養装置70は、内部にウェルプレートを格納可能である。また、拡大培養装置70は、ピペティングマシンを備える。拡大培養装置70は、第1の分割機構60から複数の細胞塊を含む溶液を受け取り、ピペティングマシンで、溶液をウェルに分配する。拡大培養装置70は、ウェルに細胞塊を分配後、 $37^\circ C$ 、 $CO_2 5\%$ で細胞塊を例えば8日前後培養する。また、拡大培養装置70は、適宜培地交換を行う。

40

【0149】

その後、拡大培養装置70は、細胞塊に $TrypLE Select$ (登録商標、ライフテクノロジーズ社) 等のトリプシン代替組み替え酵素を添加する。さらに、拡大培養装置70は、細胞塊が入っている容器をインキュベータに入れて、 $37^\circ C$ 、 $CO_2 5\%$ で1日間、細胞塊と、トリプシン代替組み替え酵素と、を反応させる。その後、拡大培養装置7

50

0は、細胞塊が入れられた溶液に、維持培養培地等の培地を加える。さらに、拡大培養装置70は、自動セルスクレーパー等で容器から細胞塊を剥がし、細胞塊を含む溶液を拡大培養送液路71を介して第1の分割機構60に送る。

【0150】

なお、拡大培養装置70における培養は、ウェルプレートではなく、CO₂透過性のバッグの中で行ってもよい。また、培養は接着培養であってもよいし、浮遊培養であってもよいし、ハンギングドロップ培養であってもよい。浮遊培養である場合は、攪拌培養を行ってもよい。また、培地が寒天状であってもよい。寒天状の培地としては、ゲランガム (gellan gum) ポリマーが挙げられる。寒天状の培地を用いると、細胞が沈んだり、接着したりすることがないため、浮遊培養の形態でありながら、攪拌する必要がない。

10

【0151】

拡大培養装置70は、ウェルプレートやCO₂透過性のバッグに培養液を補給する第2の培養液補給装置を備えていてもよい。第2の培養液補給装置は、ウェルプレートやCO₂透過性のバッグ内の培養液を回収し、フィルターや透析膜を用いて培養液をろ過して、浄化された培養液を再利用してもよい。また、この場合、再利用される培養液に成長因子等を添加してもよい。また、拡大培養装置70は、培養液の温度を管理する温度管理装置、及び培養液近傍の湿度を管理する湿度管理装置等をさらに備えていてもよい。

【0152】

拡大培養装置70においても、例えば、細胞を、図4に示すような透析膜等の培養液透過性のバッグ301に入れ、培養液透過性のバッグ301を、培養液非透過性のCO₂透過性のバッグ302に入れて、バッグ301、302に培養液を入れてもよい。拡大培養装置70は、新鮮な培養液が入ったバッグ302を複数用意しておき、所定の期間ごとに、細胞が入ったバッグ301を入れるバッグ302を、新鮮な培養液が入っているバッグ302に交換してもよい。なお、拡大培養装置70における培養方法は、上記の方法に限定されず、後述する第2及び第3の実施の形態で説明する方法により、培養してもよい。

20

【0153】

幹細胞製造システムは、拡大培養装置70における培養を撮影する拡大培養撮影装置をさらに備えていてもよい。ここで、拡大培養装置70で使用される培養液に無色の培養液を用いると、有色の培養液を用いた場合に生じる乱反射や自家蛍光を抑制することが可能となる。また、誘導された細胞と、誘導されなかった細胞とでは、細胞の形状及び大きさ等が異なるため、幹細胞製造システムは、拡大培養装置70における細胞を撮影することにより、誘導された細胞の割合を算出する誘導状態監視装置を、さらに備えていてもよい。あるいは、誘導状態監視装置は、抗体免疫染色法又はRNA抽出法により、誘導された細胞の割合を特定してもよい。さらに、幹細胞製造システムは、磁気細胞分離方法やフローサイトメトリー等により、誘導されていない細胞を取り除く、未誘導細胞除去装置を備えていてもよい。

30

【0154】

第1の分割機構60で分割された細胞塊は、再び拡大培養装置70内で培養される。必要な細胞の量が得られるまで、第1の分割機構60における細胞塊の分割と、拡大培養装置70内での細胞塊の培養が繰り返される。

40

【0155】

拡大培養装置70には、第2細胞塊送液路72が接続されている。拡大培養装置70は、拡大培養され、容器から剥離された細胞塊の含有液を、ポンプ等を用いて、第2細胞塊送液路72に送り出す。第2細胞塊送液路72は、所定の大きさ未満の誘導された細胞のみを通す内径を有し、所定の大きさ以上の誘導されていない細胞を除去する分岐流路に接続されていてもよい。

【0156】

第2細胞塊送液路72の内壁には、細胞が接着しないよう、poly-HEMAをコーティングして、細胞非接着性であってもよい。あるいは、第2細胞塊送液路72の材料に、細胞が接着しにくい材料を用いてもよい。また、第2細胞塊送液路72の材料に、温度

50

伝導率が良く、CO₂透過性の材料を用いることにより、第2細胞塊送液路72内の条件が、容器200内の管理された温度及びCO₂濃度と同等になる。さらに、第2細胞塊送液路72には、コンタミネーション防止の観点から、逆流防止弁が設けられていてもよい。

【0157】

第2細胞塊送液路72は、第2の分割機構80に接続されている。第2の分割機構80は、例えば、メッシュを備える。溶液に含まれる細胞塊は、水圧によってメッシュを通過する際、メッシュの各孔の大きさの複数の細胞塊に分割される。例えば、メッシュの各孔の大きさが均一であれば、分割後の複数の細胞塊の大きさも、ほぼ均一となる。あるいは、第2の分割機構80は、ノズルを備えていてもよい。例えば、略円錐状のノズルの内部を階段状に微細加工することにより、溶液に含まれる細胞塊がノズルを通過する際に、複数の細胞塊に分割される。

10

【0158】

第2の分割機構80に、複数の細胞塊をパッケージ装置100に順次送る細胞塊搬送機構90が接続されている。細胞塊搬送機構90と、パッケージ装置100と、の間には、パッケージ前細胞流路91が接続されている。細胞塊搬送機構90は、ポンプ等を用いて、第2の分割機構80で分割された細胞塊のそれぞれを、パッケージ前細胞流路91を介して、パッケージ装置100に順次送る。

【0159】

パッケージ前細胞流路91には、細胞が接着しないよう、poly-HEMAをコーティングしてもよい。あるいは、パッケージ前細胞流路91の材料に、細胞が接着しにくい材料を用いてもよい。また、パッケージ前細胞流路91の材料に、温度伝導率が良く、CO₂透過性の材料を用いることにより、パッケージ前細胞流路91内の条件が、容器200内の管理された温度及びCO₂濃度と同等になる。パッケージ前細胞流路91には、コンタミネーション防止の観点から、逆流防止弁が設けられていてもよい。

20

【0160】

パッケージ前細胞流路91には、凍結保存液送液機構110が接続されている。凍結保存液送液機構110は、細胞凍結保存液をパッケージ前細胞流路91に送り込む。これにより、パッケージ前細胞流路91内で、細胞塊が細胞凍結保存液で懸濁される。

【0161】

パッケージ装置100は、パッケージ前細胞流路91を介して送られてきた複数の細胞塊のそれぞれを順次凍結する。例えば、パッケージ装置100は、細胞塊を受け取るたびに細胞塊をクライオチューブに入れ、細胞塊溶液を例えば-80以下で瞬間的に凍結する。体積あたりの表面積が小さいクライオチューブを用いると、凍結に時間がかかる傾向にあるため、体積あたりの表面積が大きいクライオチューブを用いることが好ましい。体積あたりの表面積が大きいクライオチューブを用いることにより、解凍後の細胞の生存率を高くすることが可能となる。クライオチューブの形状としては、キャピラリー状及び球状が挙げられるが、これらに限定されない。また、必要とされる解凍後の細胞の生存率によっては、必ずしも瞬間凍結をしなくともよい。

30

【0162】

凍結には、例えば、ガラス化(Vitrification)法を用いる。この場合、細胞凍結保存液としては、DAP213(コスモバイオ株式会社)及びFreezing Medium(リプロセル株式会社)が使用可能である。凍結は、ガラス化法以外の通常の方法で行ってもよい。この場合、細胞凍結保存液としては、CryoDefend-STEM Cell(R&Dシステム社)や、STEM-CELLBANKER(登録商標、日本全薬工業株式会社)等が使用可能である。凍結は、液体窒素によって行ってもよいし、ペルチェ素子によっておこなってもよい。ペルチェ素子を用いると、温度変化を管理したり、温度のムラを抑制したりすることが可能となる。パッケージ装置100は、クライオチューブを、容器200の外に搬出する。凍結細胞が臨床用途である場合は、クライオチューブは完全閉鎖系であることが好ましい。ただし、パッケージ装置100は、幹細胞を凍結することなく、クライオチューブ内にパッケージしてもよい。

40

50

【 0 1 6 3 】

幹細胞製造システムは、パッケージ装置 1 0 0 におけるパッケージ工程を撮影するパッケージ工程撮影装置をさらに備えていてもよい。

【 0 1 6 4 】

幹細胞製造システムは、容器 2 0 0 内を滅菌する滅菌装置をさらに備えていてもよい。滅菌装置は、乾熱滅菌装置であってもよい。この場合、分離装置 1 0、導入前細胞送液路 2 0、誘導因子送液機構 2 1、因子導入装置 3 0、細胞塊作製装置 4 0、及びパッケージ装置 1 0 0 等の電気を使用する装置の配線は、耐熱性を有する配線であることが好ましい。あるいは、滅菌装置は、オゾンガス、過酸化水素ガス、又はホルマリンガス等の滅菌ガスを容器 2 0 0 内に放出して、容器 2 0 0 内を滅菌してもよい。

10

【 0 1 6 5 】

幹細胞製造システムは、分離装置 1 0、導入前細胞送液路 2 0、誘導因子送液機構 2 1、因子導入装置 3 0、細胞塊作製装置 4 0、及びパッケージ装置 1 0 0 等の動作記録、並びに撮影装置が撮影した画像を、有線又は無線により、外部のサーバーに送信してもよい。また、外部のサーバーにおいて、ニューラルネットワークにより、例えば、誘導因子導入条件、培養条件、及び凍結条件等の条件と、幹細胞の不完全な初期化、幹細胞の分化及び増殖の失敗、及び染色体異常等の結果と、の関連を分析し、結果を導く条件を抽出したり、結果を予測したりしてもよい。さらに、外部サーバーは、標準作業手順 (S O P) に基づいて、幹細胞製造システムの分離装置 1 0、誘導因子送液機構 2 1、因子導入装置 3 0、細胞塊作製装置 4 0、及びパッケージ装置 1 0 0 等を制御し、 S O P に基づいて各装置が稼働しているか否かを監視し、各装置の稼働記録を自動的に生成してもよい。

20

【 0 1 6 6 】

以上説明した幹細胞製造システムによれば、全自動で、i P S 細胞等の幹細胞の誘導、樹立、拡大培養、及び凍結保存を一括して行うことが可能となる。

【 0 1 6 7 】

(その他の実施の形態)

なお、例えば、因子導入装置 3 0 は、エレクトロポレーションではなく、RNA トランスフェクションにより細胞を誘導してもよい。あるいは、レトロウイルス、レンチウイルス、及びセンダイウイルス等のウイルスベクターや、プラスミドにより、細胞を誘導してもよい。また、導入前細胞送液路 2 0、導入細胞送液路 3 1、細胞塊送液路 5 1、拡大培養送液路 7 1、細胞塊送液路 7 2、及びパッケージ前細胞流路 9 1 はマイクロfluidics 技術により基板上に設けられていてもよい。また、誘導された幹細胞に誘導因子リボ核酸 (R N A) をリポフェクションにより導入し、体細胞に分化させる装置が、幹細胞製造システムに接続されていてもよい。誘導された幹細胞に誘導因子リボ核酸 (R N A) をリポフェクションにより導入し、体細胞に分化させる方法は、例えば、後述する第 6 の実施の形態に記載の方法を用いることができる。体細胞は、例えば神経系細胞である。

30

【 0 1 6 8 】

(第 2 の実施の形態)

本発明の第 2 の実施の形態に係る幹細胞の浮遊培養方法は、ゲル培地で幹細胞を浮遊培養することを含む。幹細胞は、例えば、人工多能性幹 (i P S) 細胞、及び胚性幹細胞 (E S 細胞) である。ゲル培地は、攪拌されない。また、ゲル培地は、フィーダー細胞を含まない。幹細胞は、未分化の状態を保ったまま、ゲル培地中で増殖する。

40

【 0 1 6 9 】

例えば、幹細胞は、浮遊培養される前に、シングルセルに分解され、シングルセルに分解された幹細胞が、ゲル培地に入れられる。シングルセルは、クローナリティを保ったまま増殖し、ゲル培地中でコロニーを形成する。

【 0 1 7 0 】

ゲル培地は、例えば、幹細胞用培地に脱アシル化ジェランガムを終濃度が 0 . 5 重量% から 0 . 0 0 1 重量%、0 . 1 重量% から 0 . 0 0 5 重量%、あるいは 0 . 0 5 重量% から 0 . 0 1 重量% となるよう添加することにより調製される。

50

【0171】

ゲル培地は、ジェランガム、ヒアルロン酸、ラムザンガム、ダイユータンガム、キサンタンガム、カラギーナン、フコイダン、ペクチン、ペクチン酸、ペクチニン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヘパリチン硫酸、ケラト硫酸、コンドロイチン硫酸、デルタマン硫酸、ラムナン硫酸、及びそれらの塩からなる群から選択される少なくとも1種の高分子化合物を含んでいてもよい。また、ゲル培地は、メチルセルロースを含んでいてもよい。メチルセルロースを含むことにより、細胞同士の凝集がより抑制される。

【0172】

あるいは、ゲル培地は、poly(glycerol monomethacrylate) (PGMA)、poly(2-hydroxypropyl methacrylate) (PHPMA)、Poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)、amine terminated、carboxylic acid terminated、maleimide terminated、N-hydroxysuccinimide (NHS) ester terminated、triethoxysilane terminated、Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-butylacrylate)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid-co-octadecyl acrylate)、及びN-Isopropylacrylamideから選択される少なくとも1種の温度感受性ゲルを含んでいてもよい。

10

【0173】

幹細胞用培地としては、例えば、Primate ES Cell Medium (ReproCELL)等のヒトES/iPS培地を使用可能である。

20

【0174】

ただし、幹細胞用培地は、これに限定されず、種々の幹細胞培地が使用可能である。例えばPrimate ES Cell Medium、Reprostem、ReproFF、ReproFF2、ReproXF (Reprocell)、mTeSR1、TeSR2、TeSRE8、ReproTeSR (STEMCELL Technologies)、PluriSTEM (登録商標) Human ES/iPS Medium (Merck)、NutriStem (登録商標) XF/FF Culture Medium for Human iPS and ES Cells、Pluriton reprogramming medium (Stemgent)、PluriSTEM (登録商標)、Stemfit AK02N、Stemfit AK03 (Ajinomoto)、ESC-Sure (登録商標) serum and feeder free medium for hESC/iPS (Applied StemCell)、及びL7 (登録商標) hPSC Culture System (LONZA)等を利用してもよい。

30

【0175】

ゲル培地には、例えば、ROCK阻害剤を終濃度が1000 $\mu\text{mol/L}$ 以上0.1 $\mu\text{mol/L}$ 以下、100 $\mu\text{mol/L}$ 以上1 $\mu\text{mol/L}$ 以下、あるいは5 $\mu\text{mol/L}$ 以上20 $\mu\text{mol/L}$ 以下となるよう、毎日添加する。ROCK阻害剤をゲル培地に添加することにより、幹細胞によるコロニー形成が促進される。

【0176】

ゲル培地は、例えば、basic fibroblast growth factor (bFGF)等の成長因子を含まない。あるいは、ゲル培地は、bFGF等の成長因子を、400 $\mu\text{g/L}$ 以下、40 $\mu\text{g/L}$ 以下、あるいは10 $\mu\text{g/L}$ 以下の低濃度で含む。ゲル培地がbFGF等の成長因子を高濃度で含む場合と比較して、ゲル培地がbFGF等の成長因子を含まないか、あるいはbFGF等の成長因子を低濃度で含む方が、幹細胞によるコロニー形成が促進される傾向にある。

40

【0177】

また、ゲル培地は、tgf- を含まないか、tgf- を600 ng/L以下、300 ng/L以下、あるいは100 ng/L以下の低濃度で含む。

【0178】

ゲル培地における幹細胞の濃度は、例えば、 2×10^5 個/mL以上、 2.25×10^5

50

個/mL以上、あるいは 2.5×10^5 個/mL以上である。ゲル培地における幹細胞の濃度が 2×10^5 個/mLより低いと、コロニー形成率が低下する傾向にある。

【0179】

本発明の第2の実施の形態に係る幹細胞の浮遊培養方法によれば、シングルセルから幹細胞のコロニーを形成することが可能である。また、培地を攪拌する必要がないため、浮遊培養法であるにも関わらず、幹細胞同士が衝突することがない。そのため、コロニーにおいてクローナリティを維持することが可能である。したがって、例えば、幹細胞がiPS細胞である場合、1つの体細胞由来のiPS細胞のクローナリティを担保することが可能である。また、幹細胞同士が衝突することがないため、幹細胞のコロニーの大きさを均質に保つことが可能である。さらに、浮遊培養法は、接着培養法と比較して、少ないスペースで多数のコロニーを培養することが可能である。なお、浮遊培養することにおいて、幹細胞の細胞塊（クランプ）を維持培養してもよい。

10

【0180】

また、ES/iPS細胞の発見がなされて以来、bFGF、及びTGF-等の成長因子は、ES/iPS細胞の培養に必須であると考えられてきた。しかし、bFGF等の成長因子は、37℃程度の培養条件下では、急速に分解されるため、毎日bFGF及びTGF-含有培養液を交換、或はbFGF及びTGF-等を添加する必要がある。さらに、培養に用いられるbFGFは、通常、リコンビナントタンパク質であるが、クリニカルグレードのリコンビナントタンパク質は、非常に厳格なルールに従って作製する必要がある。

20

【0181】

また、例えばbFGFの濃度が10ng/mLのような低濃度である場合、マウス由来の線維芽細胞をフィーダー細胞として用いる必要があると考えられてきた。しかし、マウスのような動物由来のフィーダー細胞と共培養された幹細胞を、移植再生医療に用いることはできず、幹細胞の臨床利用が進まない原因となっていた。

【0182】

フィーダー細胞を用いないフィーダーフリー用の幹細胞培養液も開発されてきているが、フィーダーフリー培養液は、フィーダー細胞を用いる場合の培養液と比較して、通常、25倍近いbFGFを含有しており、100ng/mLのような非常に高濃度なbFGFを含有している。しかし、高濃度のbFGFを含有するフィーダーフリー培養液を用いて、ES/iPS細胞を核型異常なく培養することは難しく、多くのiPS細胞が死滅する。また、高濃度のbFGFを含有するフィーダーフリー培養液で培養されたES/iPS細胞は、特定の体細胞に分化しにくくなる傾向にある。そのため、フィーダーフリー培養液は、幹細胞から移植に必要な体細胞を作製する効率を落とす一つの原因となっている。

30

【0183】

これに対し、本発明の第2の実施の形態に係る幹細胞の浮遊培養方法によれば、フィーダー細胞を用いずに、幹細胞を未分化の状態を保ったまま培養し、増殖させることが可能である。また、本発明の第2の実施の形態に係る幹細胞の浮遊培養方法によれば、フィーダー細胞を用いなくても、bFGF等の成長因子を用いずに、あるいは低濃度のbFGF等の成長因子を用いて、幹細胞を未分化の状態を保ったまま培養し、増殖させることが可能である。

40

【0184】

(第3の実施の形態)

本発明の第3の実施の形態に係る幹細胞の浮遊培養器は、図5に示すように、幹細胞とゲル培地が入られる透析チューブと、透析チューブが入られ、透析チューブの周囲にゲル培地が入られる容器と、を備える。

【0185】

透析チューブは、例えば、ROCK阻害剤を透過させる。透析チューブの分画分子量は、0.1kDa以上、10kDa以上、あるいは50kDa以上である。透析チューブは、例えば、セルロースエステル、エチルセルロース、セルロースエステル類、再生セルロ

50

ース、ポリスルホン、ポリアクリルニトリル、ポリメチルメタクリレート、エチレンビニルアルコール共重合体、ポリエステル系ポリマーアロイ、ポリカーボネート、ポリアミド、セルロースアセテート、セルロースジアセテート、セルローストリアセテート、銅アンモニウムレーヨン、醜化セルロース、ヘモファン膜、フォスファチジルコリン膜、及びビタミンEコーティング膜等からなる。容器としては、遠心チューブのような円錐チューブが使用可能である。容器は、例えば、ポリプロピレンからなる。

【0186】

透析チューブ内に入れられる幹細胞は、第2の実施の形態と同様である。また、透析チューブ内に入れられるゲル培地も、第2の実施の形態と同様である。ただし、透析チューブ内に入れられるゲル培地は、ROCK阻害剤を含んでいなくてもよい。容器内の透析チューブの周囲に入れられるゲル培地は、第2の実施の形態と同様である。容器内の透析チューブの周囲に入れられるゲル培地は、ROCK阻害剤を含む。

10

【0187】

透析チューブ内で幹細胞を浮遊培養する間、容器内の透析チューブの周囲のゲル培地は、新鮮なゲル培地に交換、あるいは補充される。ただし、透析チューブ内のゲル培地は交換しなくともよい。

【0188】

従来の浮遊培養系においては、細胞を吸い出すことなく、培地を交換することが困難である場合がある。しかし、培地を新鮮な培地に交換しないと、老廃物が蓄積する場合がある。また、培地を新鮮な培地に交換あるいは補充しないと、培地中の培地成分が不足する場合がある。

20

【0189】

これに対し、本発明の第3の実施の形態に係る幹細胞の浮遊培養器を用いれば、幹細胞は透析チューブの中にあるため、透析チューブの周囲の培地を新鮮な培地に交換しても、幹細胞を吸い取るおそれがない。また、透析チューブの周囲の培地を新鮮な培地に交換しても、透析チューブ内の培地の量はほぼ変わらないため、透析チューブ内の幹細胞の密度に変化が生じない。また、透析チューブ内の高濃度の老廃物は、透析チューブの外に移動する。透析チューブ内の培地の培地成分の濃度が低下すると、透析チューブの外の培地から培地成分が透析チューブ内に移動する。そのため、幹細胞の周囲の培地を新鮮に保つことが可能である。

30

【0190】

(第4の実施の形態)

本発明の第4の実施の形態に係る幹細胞の誘導方法は、ゲル培地で浮遊培養されている体細胞を幹細胞へ誘導することを含む。体細胞は、例えば、繊維芽細胞である。幹細胞は、例えば、iPS細胞である。ゲル培地は、攪拌されない。また、ゲル培地は、フィーダー細胞を含まない。

【0191】

ゲル培地は、例えば、幹細胞用培地に脱アシル化ジェランガムを終濃度が0.5重量%から0.001重量%、0.1重量%から0.005重量%、あるいは0.05重量%から0.01重量%となるよう添加することにより調製される。

40

【0192】

ゲル培地は、ジェランガム、ヒアルロン酸、ラムザンガム、ダイユータンガム、キサンタンガム、カラギーナン、フコイダン、ペクチン、ペクチン酸、ペクチニン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヘパリチン硫酸、ケラト硫酸、コンドロイチン硫酸、デルタマン硫酸、ラムナン硫酸、及びそれらの塩からなる群から選択される少なくとも1種の高分子化合物を含んでいてもよい。また、ゲル培地は、メチルセルロースを含んでいてもよい。メチルセルロースを含むことにより、細胞同士の凝集がより抑制される。

【0193】

あるいは、ゲル培地は、poly(glycerol monomethacrylate) (PGMA)、poly(2-hydroxypropyl methacrylate) (PHPMA)、Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)

50

、 amine terminated、 carboxylic acid terminated、 maleimide terminated、 N-hydroxysuccinimide (NHS) ester terminated、 triethoxysilane terminated、 Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)、 Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid)、 Poly (N-isopropylacrylamide-co-butylacrylate)、 Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid)、 Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid-co-octadecyl acrylate)、 及びN-Isopropylacrylamideから選択される少なくとも1種の温度感受性ゲルを含んでいてもよい。

【0194】

幹細胞用培地としては、例えば、Primate ES Cell Medium(ReproCELL)等のヒトES/iPS培地を使用可能である。

10

【0195】

ただし、幹細胞用培地は、これに限定されず、種々の幹細胞培地が使用可能である。例えばPrimate ES Cell Medium、Reprostem、ReproFF、ReproFF2、ReproXF(Reprocell)、mTeSR1、TeSR2、TeSRE8、ReproTeSR(STEMCELL Technologies)、PluriSTEM(登録商標) Human ES/iPS Medium(Merck)、NutriStem(登録商標) XF/FF Culture Medium for Human iPS and ES Cells、Pluriton reprogramming medium(Stemgent)、PluriSTEM(登録商標)、Stemfit AK02N、Stemfit AK03(Ajinomoto)、ESC-Sure(登録商標) serum and feeder free medium for hESC/iPS(Applied StemCell)、及びL7(登録商標) hPSC Culture System(LONZA)等を利用してよい。ゲル培地は、例えば、チューブに入れられる。

20

【0196】

ゲル培地は、例えば、basic fibroblast growth factor(bFGF)等の成長因子を含まなくともよい。あるいは、ゲル培地は、bFGF等の成長因子を、400 µg/L以下、40 µg/L以下、あるいは10 µg/L以下の低濃度で含んでいてもよい。

【0197】

また、ゲル培地は、tgf- を含まないか、tgf- を600 ng/L以下、300 ng/L以下、あるいは100 ng/L以下の低濃度で含んでもよい。

30

【0198】

(実施例1)

500 mLのPrimate ES Cell Medium(ReproCELL)、及び0.2 mLの濃度が10 µg/mLのbFGF(Gibco PHG0266)を混合し、bFGF含有ヒトiPS培地を調製した。

【0199】

また、bFGF含有ヒトiPS培地に脱アシル化ジェランガム(日産化学)を濃度が0.02重量%となるよう添加し、bFGF含有ヒトiPSゲル培地を調製した。さらに、5 mLの濃度が2.5重量%のトリプシン、5 mLの濃度が1 mg/mLのコラゲナーゼIV、0.5 mLの濃度が0.1 mol/LのCaCl₂、10 mLのKnockOut血清代替(登録商標、Invitrogen 10828-028)、及び30 mLの精製水を混合して、一般にCTK溶液と呼ばれる剥離液を調製した。

40

【0200】

フィーダー細胞上でiPS細胞を培養している6ウェルディッシュ(Thermoscientific 12-556-004)にCTK溶液を300 µL添加し、CO₂インキュベータ中で3分インキュベートした。3分後、インキュベータからディッシュを取り出し、フィーダー細胞のみが剥がれていることを確認し、アスピレータを用いてCTK溶液を取り除いた。CTK溶液を取り除いた後、6ウェルディッシュにPBS(Santa

50

Cruz Biotech sc-362183)を500 μ L添加し、iPS細胞を洗浄後、6ウェルディッシュからPBSを取り除き、0.3mLの剥離液(Accutase、登録商標)を6ウェルディッシュに添加し、CO₂インキュベータに入れ、5分間インキュベートした。その後、0.7mLのbFGF含有iPS培地を6ウェルディッシュに添加し、iPS細胞をシングルセルになるまで懸濁した。

【0201】

iPS細胞を懸濁後、4mLのbFGF含有ヒトiPS培地を15mLの遠心チューブに添加し、遠心機を用いてiPS細胞懸濁液を270gで遠心した。遠心後、上清を取り除き、1mLのbFGF含有ヒトiPS培地を15mLの遠心チューブに添加し、血球計算版を用いて細胞数を計算した。細胞計算後、5 \times 10⁵個ずつiPS細胞を15mLファルコンチューブ(登録商標、Corning 352096)又は非接着ディッシュに播種し、以後攪拌することなく浮遊培養した。

10

【0202】

15mLチューブにおいては、bFGF含有ヒトiPSゲル培地を2mL用いた。非接着ディッシュにおいては、ジェランガムを含有していないbFGF含有ヒトiPS培地を2mL用いた。各培地にはROCK阻害剤(Seleck S1049)が10 μ mol/Lとなるよう添加した。その後、15mLチューブ及び非接着ディッシュに、毎日500 μ LのbFGF含有ヒトiPSゲル培地を添加し、非接着ディッシュに、毎日500 μ LのbFGF含有ヒトiPS培地を添加した。また、15mLチューブ及び非接着ディッシュに、毎日、終濃度が10 μ mol/LとなるようROCK阻害剤を添加し、7日間、浮遊培養を続けた。

20

【0203】

その結果を図6に示す。図6(b)に示すように、非接着ディッシュでジェランガムを含有していないbFGF含有ヒトiPS培地を用いてiPS細胞を培養した場合、iPS細胞のコロニー同士の凝集が顕著に認められた。これに対し、図6(a)に示すように、15mLチューブ中でbFGF含有ヒトiPSゲル培地を用いてiPS細胞を培養した場合、目立った凝集は認められなかった。図7(a)は、15mLチューブにおいて、bFGF含有ヒトiPSゲル培地を用いてiPS細胞を培養したときの1日目の写真であり、図7(b)は、15mLチューブにおいて、bFGF含有ヒトiPSゲル培地を用いてiPS細胞を培養したときの9日目の写真である。図7(a)及び図7(b)の写真から、異なる株のiPS細胞同士が凝集せずに、コロニーを形成したことが確認された。

30

【0204】

図8(a)は、ゲル培地中で7日間浮遊培養したiPS細胞のコロニーをフィーダー細胞上に再播種する直前時の写真である。図8(b)は、その3日後にコロニーの形態を確認した時の写真である。その結果、図9に示すように、95%以上のコロニーが未分化であることが確認された。よって、iPS細胞をゲル培地中で、未分化の状態を維持したまま培養することができることが示された。

【0205】

(実施例2)

実施例1と同じbFGF含有ヒトiPS培地、及びbFGF含有ヒトiPSゲル培地を調製した。フィーダー細胞上でiPS細胞を培養している6ウェルディッシュにCTK溶液を300 μ L添加し、CO₂インキュベータ中で3分間インキュベートした。3分後、インキュベータからディッシュを取り出し、フィーダー細胞のみがはがれていることを確認し、アスピレータを用いてCTK溶液を取り除いた。CTK溶液を取り除いた後、ディッシュにPBSを500 μ L添加し、iPS細胞を洗浄後、ディッシュからPBSを取り除き、0.3mLのAccumaxをディッシュに添加し、ディッシュをCO₂インキュベータに入れ、5分間インキュベートした。その後、0.7mLのbFGF含有iPS培地をディッシュに添加し、iPS細胞をシングルセルになるまで懸濁した。

40

【0206】

iPS細胞を懸濁後、4mLのbFGF含有ヒトiPS培地を15mL遠心チューブに

50

添加し、遠心機を用いて i P S 細胞懸濁液を 270 g で遠心した。遠心後、上清を取り除き、1 mL の b F G F 含有ヒト i P S 培地を 15 mL 遠心チューブに添加し、血球計算版を用いて細胞数を計算した。細胞計算後、 5×10^5 個ずつ i P S 細胞を、15 mL チューブに播種し、以後攪拌することなく浮遊培養した。

【0207】

15 mL チューブにおいては、b F G F 含有ヒト i P S ゲル培地を 2 mL 用いた。各培地には R O C K 阻害剤が $10 \mu\text{mol/L}$ となるよう添加した。その後、15 mL チューブに、毎日 500 μL の b F G F 含有ヒト i P S ゲル培地を添加した。なお、500 μL のゲル培地は、0.5 μL の R O C K 阻害剤を含んでいた。また、コントロールとして、R O C K 阻害剤を添加していない以外は同じ条件で、i P S 細胞を、7日間、浮遊培養した。

10

【0208】

図10(a)に示すように、b F G F 含有ヒト i P S 培地に R O C K 阻害剤を添加しなかった場合、i P S 細胞はコロニーを形成しなかった。これに対し、図10(b)に示すように、b F G F 含有ヒト i P S 培地に R O C K 阻害剤を添加した場合、i P S 細胞はコロニーを形成した。この結果から、シングルセルから i P S 細胞を浮遊培養する場合、R O C K 阻害剤が有効であることが示された。

【0209】

(実施例3)

実施例1と同様に、b F G F 含有ヒト i P S ゲル培地を用意した。また、b F G F を含まない以外は b F G F 含有ヒト i P S 培地と同じである b F G F 非含有ヒト i P S 培地を用意した。さらに、b F G F を含まない以外は b F G F 含有ヒト i P S ゲル培地と同じである b F G F 非含有ヒト i P S ゲル培地を用意した。またさらに、市販の血清フリー及びゼノフリーのフィーダーフリーリプログラミング用培地に脱アシル化گرانガム(日産化学)を濃度が 0.02 重量%となるよう添加し、比較用ゲル培地を調製した。

20

【0210】

ここで、比較用ゲル培地と比較して、b F G F 含有ヒト i P S ゲル培地は、b F G F を、25分の1程度の濃度しか含まない。

【0211】

フィーダー細胞上で i P S 細胞を培養している 6 ウェルディッシュに C T K 溶液を 300 μL 添加し、C O ₂ インキュベータ中で 3 分 インキュベートした。3 分後、インキュベータからディッシュを取り出し、フィーダー細胞のみが剥がれていることを確認し、アスピレータを用いて C T K 溶液を取り除いた。C T K 溶液を取り除いた後、P B S で一度洗浄し、1 mL の b F G F 非含有ヒト i P S 培地を添加し、スクレーパーで i P S 細胞を掻き集め、シングルセルにならないよう 15 mL の遠心チューブ中で 10 回程度懸濁した。その後、2 mL の b F G F 非含有ヒト i P S 培地を添加し、1 mL ずつ 3 等分し、遠心機を用いて 270 g で遠心した。

30

【0212】

遠心後、15 mL の遠心チューブから上清を取り除き、2 mL の比較用ゲル培地、b F G F 含有ヒト i P S ゲル培地、及び b F G F 非含有ヒト i P S ゲル培地をそれぞれ 15 mL の遠心チューブに添加した。翌日から、遠心チューブのそれぞれに 500 μL の最初と同じゲル培地を毎日添加し、7日間浮遊培養をした。

40

【0213】

図11(a)は、市販のフィーダーフリー培地から調製した比較用ゲル培地で7日間浮遊培養した i P S 細胞のコロニーの代表例を示しており、図11(b)は、b F G F 含有ヒト i P S ゲル培地で7日間浮遊培養した i P S 細胞のコロニーの代表例を示しており、図11(c)は、b F G F 非含有ヒト i P S ゲル培地で7日間浮遊培養した i P S 細胞のコロニーの代表例を示している。

【0214】

b F G F 非含有ヒト i P S ゲル培地、及び比較用ゲル培地と比べて 25 分の 1 程度の濃

50

度しか b F G F を含まない b F G F 含有ヒト i P S ゲル培地でも、i P S 細胞は培養できていた。

【0215】

7日間浮遊培養した i P S 細胞のコロニーが未分化であるか否かを確認するために、i P S 細胞をフィーダー細胞上に再播種し、コロニーの形態を観察した。図12の上段の写真は、ゲル培地中のコロニーを示す。図12の中段の写真は、7日間浮遊培養した i P S 細胞をフィーダー細胞上に再播種して2日後のコロニーを示す。いずれの場合も、未分化なコロニーが90%以上であることが確認された。これらの結果から、b F G F を含まないゲル培地、あるいは比較用ゲル培地と比べて b F G F 濃度が25倍以上低いゲル培地を使用しても、i P S 細胞を未分化状態を維持させたまま浮遊培養できることが示された。

10

【0216】

図12の下段の写真は、7日間浮遊培養した i P S 細胞をフィーダー細胞上に再播種して7日後のコロニーを示す。i P S 細胞をゲル培地で浮遊培養した後、フィーダー細胞上で長期間(7日間)培養しても、分化しないことが示された。

【0217】

(実施例4)

実施例3と同じ b F G F 非含有ヒト i P S 培地、b F G F 含有ヒト i P S ゲル培地、及び b F G F 非含有ヒト i P S ゲル培地を用意した。また、市販の血清フリーのフィーダーフリー培地に脱アシル化ゲランガム(日産化学)を濃度が0.02重量%となるよう添加し、比較用ゲル培地を調製した。いずれのゲル培地にも、濃度が10 $\mu\text{mol/L}$ となるよう、R O C K 阻害剤を添加した。

20

【0218】

フィーダー細胞上で i P S 細胞を培養している6ウェルディッシュに C T K 溶液を300 μL 添加し、C O ₂ インキュベータ中で3分インキュベートした。3分後、インキュベータからディッシュを取り出し、フィーダー細胞のみが剥がれていることを確認し、アスピレータを用いて C T K 溶液を取り除いた。C T K 溶液を取り除いた後、6ウェルディッシュに P B S を500 μL 添加し、i P S 細胞を洗浄後、6ウェルディッシュから P B S を取り除き、0.3 mL の A c c u m a x を6ウェルディッシュに添加し、6ウェルディッシュを C O ₂ インキュベータに入れ、5分間インキュベートした。その後、0.7 mL の b F G F 含有 i P S 培地を6ウェルディッシュに添加し、i P S 細胞をシングルセルになるまで懸濁した。

30

【0219】

i P S 細胞を懸濁後、4 mL の b F G F 非含有ヒト i P S 培地を15 mL の遠心チューブに添加し、遠心機を用いて270 g で遠心した。遠心後、上清を取り除き、1 mL の b F G F 非含有ヒト i P S 培地を遠心チューブに添加し、血球計算版を用いて細胞数を計算した。

【0220】

その後、1本の遠心チューブあたり、 5×10^5 個の i P S 細胞を入れ、2 mL の b F G F 含有ヒト i P S ゲル培地、b F G F 非含有ヒト i P S ゲル培地、及び比較用ゲル培地をそれぞれ遠心チューブに添加した。翌日から、遠心チューブのそれぞれに500 μL の最初と同じゲル培地を毎日添加し、7日間浮遊培養をした。

40

【0221】

その結果、図13(c)に示すように、比較用ゲル培地では、シングルセル由来の i P S 細胞を培養できなかった。これに対し、図13(a)及び図13(b)に示すように、b F G F 含有ヒト i P S ゲル培地、及び b F G F 非含有ヒト i P S ゲル培地では、シングルセル由来の i P S 細胞を培養できた。なお、b F G F 含有ヒト i P S ゲル培地における b F G F 濃度は4 $\mu\text{g/mL}$ であり、比較用ゲル培地における b F G F 濃度は、100 $\mu\text{g/mL}$ である。

【0222】

また、コロニー数を定量したところ、図14に示すように、b F G F 非含有ヒト i P S

50

ゲル培地で浮遊培養したほうが、bFGF含有ヒトiPSゲル培地で浮遊培養した場合よりも、2倍以上のiPS細胞のコロニーが形成されていた。よって、ゲル培地においては、bFGFの濃度が低いか、bFGFが含まれないことが好ましいことが示された。

【0223】

また、iPS細胞をシングルセルにし、bFGF含有ヒトiPS培地、又はbFGF非含有ヒトiPS培地に脱アシル化ゲランガムが0.02重量%なるよう添加した培地に、ロックインヒビターが $10\ \mu\text{mol/L}$ となるよう添加した培地を用いて7日間培養した。その際、 5×10^5 個の細胞を1.5mLの各ゲル培地に懸濁し、毎日各ゲル培地にロックインヒビターが $10\ \mu\text{mol/L}$ 添加してある培地を1.5mL加えていった。

【0224】

7日間培養したiPS細胞に、10倍量のPBSを添加し、遠心機を用いて270gで遠心後、上清を廃棄し、アキュマックスを0.3mL添加し、CO₂インキュベータに入れ、5分間インキュベートした。その後、0.7mLのbFGF含有ヒトiPS培地を添加し、iPS細胞をシングルセルになるまで懸濁した。懸濁後、1.5mLのヒトiPS培地（bFGF含有培地で培養していた細胞にはbFGF含有培地、bFGF非含有培地で培養していた細胞にはbFGF非含有培地）を添加し、遠心機を用いてさらに7日間、前7日間と同様に培養した。培養後、一部をフィーダー細胞上にまきなおし、さらに三日後、NANOG及びOCT3/4に対する抗体で染色し、観察を行った。結果を図15に示す。合計で14日間ゲル培地で培養したiPS細胞は、未分化マーカーであるNANOG及びOCT3/4陽性であった。この結果から、ゲル培地において長期にわたる培養を行ったときに、bFGFを含まない培地であっても、未分化を維持したまま培養が行えることが示された。

【0225】

（実施例5）

実施例3と同じbFGF非含有ヒトiPS培地、及びbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を用意した。ゲル培地には、濃度が $10\ \mu\text{mol/L}$ となるよう、ROCK阻害剤を添加した。

【0226】

フィーダー細胞上でiPS細胞を培養している6ウェルディッシュにCTK溶液を300 μL 添加し、CO₂インキュベータ中で3分インキュベートした。3分後、インキュベータからディッシュを取り出し、フィーダー細胞のみが剥がれていることを確認し、アスピレータを用いてCTK溶液を取り除いた。CTK溶液を取り除いた後、6ウェルディッシュにPBSを500 μL 添加し、細胞を洗浄後、PBSを取り除き、0.3mLのAccutaseを6ウェルディッシュに添加し、6ウェルディッシュをCO₂インキュベータに入れ、5分間インキュベートした。その後、0.7mLのbFGF非含有ヒトiPS培地を6ウェルディッシュに添加し、iPS細胞をシングルセルになるまで懸濁した。

【0227】

iPS細胞を懸濁後、4mLのbFGF非含有ヒトiPS培地を遠心チューブに添加し、遠心機を用いてiPS細胞懸濁液を270gで遠心した。遠心後、上清を取り除き、1mLのbFGF非含有ヒトiPS培地を遠心チューブに添加し、血球計算版を用いて細胞数を計算した。

【0228】

その後、1本の遠心チューブあたり、 1×10^5 個、 2.5×10^5 個、あるいは 5×10^5 個のiPS細胞を入れ、2mLのbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を添加した。翌日から、遠心チューブのそれぞれに500 μL のゲル培地を毎日添加し、7日間浮遊培養をした。

【0229】

各播種細胞数におけるコロニーの写真を図16に示す。また、播種したiPS細胞に対してコロニーを形成したiPS細胞数の割合を定量化した結果を図17に示す。 1×10^5 個又は 2.5×10^5 個のiPS細胞を播種した場合と比較して、 5×10^5 個のiPS細胞

10

20

30

40

50

胞を播種した場合、10倍以上のiPS細胞のコロニーが形成された。したがって、iPS細胞の播種濃度が低いと、iPS細胞のコロニーが形成されないことが示された。

【0230】

また、1本の遠心チューブあたり 1×10^5 個のiPS細胞を入れ、遠心チューブに、200 μ L、400 μ L、1000 μ L、及び2000 μ LのbFGF非含有ヒトiPSゲル培地をそれぞれ添加した。翌日から、遠心チューブに、100 μ L、200 μ L、500 μ L、及び1000 μ Lのゲル培地をそれぞれ毎日添加し、7日間浮遊培養をした。

【0231】

播種したiPS細胞に対してコロニーを形成したiPS細胞数の割合を定量化した結果を図18に示す。ゲル培地の量が増えるほど、換言すれば、iPS細胞の播種濃度が低くなるほど、iPS細胞のコロニーが形成されないことが示された。

10

【0232】

(実施例6)

実施例3と同じbFGF非含有ヒトiPS培地、及びbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を用意した。

【0233】

フィーダー細胞上でiPS細胞を培養している6ウェルディッシュにCTK溶液を300 μ L添加し、CO₂インキュベータ中で3分インキュベートした。3分後、インキュベータからディッシュを取り出し、フィーダー細胞のみが剥がれていることを確認し、アスピレータを用いてCTK溶液を取り除いた。CTK溶液を取り除いた後、6ウェルディッシュにPBSを500 μ L添加し、細胞を洗浄後、PBSを取り除き、0.3mLのAccumaxを6ウェルディッシュに添加し、6ウェルディッシュをCO₂インキュベータに入れ、5分間インキュベートした。その後、0.7mLのbFGF非含有ヒトiPS培地を6ウェルディッシュに添加し、iPS細胞をシングルセルになるまで懸濁した。

20

【0234】

iPS細胞を懸濁後、4mLのbFGF非含有ヒトiPS培地を15mLの遠心チューブに添加し、遠心機を用いてiPS細胞懸濁液を270gで遠心した。遠心後、上清を取り除き、1mLのbFGF非含有ヒトiPS培地を15mLの遠心チューブに添加し、血球計算版を用いて細胞数を計算した。

【0235】

その後、 5×10^5 個のiPS細胞を含有する2mLのbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を分画分子量が100kDaの透析チューブを備える透析モジュール(Spectrum G235035)に入れた。透析チューブ内には、ROCK阻害剤を入れなかった。さらに、図5に示すように、透析モジュールを50mL遠心チューブに入れ、遠心チューブ内の透析チューブの周囲に20mLのbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を入れた。さらに、透析チューブの周囲のbFGF非含有ヒトiPSゲル培地に終濃度が10 μ mol/LとなるようROCK阻害剤を添加した。一部の遠心チューブには、コントロールとしてROCK阻害剤を添加しなかった。その後、2日に1回、透析チューブの周囲のbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を10mL交換し、7日間浮遊培養を続けた。なお、交換の際に新たに入れられるbFGF非含有ヒトiPSゲル培地は10 μ mol/Lの濃度でROCK阻害剤を含んでいた。

30

40

【0236】

図19(a)に示すように、透析チューブの周囲にROCK阻害剤を添加していないbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を入れて培養した場合と比較して、図19(b)に示すように、透析チューブの周囲にROCK阻害剤を添加したbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を入れて培養した場合、図20に示すようにiPS細胞はコロニーを優位に形成していた。

【0237】

これらの結果から、ROCK阻害剤等の低分子が透析チューブの膜を透過することが示された。また、透析チューブ中の培地成分の濃度を維持したまま、iPS細胞を培養でき

50

ることが示された。

【0238】

(実施例7)

実施例3と同じbFGF非含有ヒトiPS培地、及びbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を用意した。

【0239】

フィーダー細胞上でiPS細胞を培養している6ウェルディッシュにCTK溶液を300 μ L添加し、CO₂インキュベータ中で3分インキュベートした。3分後、インキュベータからディッシュを取り出し、フィーダー細胞のみが剥がれていることを確認し、アスピレータを用いてCTK溶液を取り除いた。CTK溶液を取り除いた後、6ウェルディッシュにPBSを500 μ L添加し、細胞を洗浄後、6ウェルディッシュからPBSを取り除き、0.3mLのAccumaxを6ウェルディッシュに添加し、6ウェルディッシュをCO₂インキュベータに入れ、5分間インキュベートした。その後、0.7mLのbFGF非含有ヒトiPS培地を6ウェルディッシュに添加し、iPS細胞をシングルセルになるまで懸濁した。

10

【0240】

iPS細胞を懸濁後、4mLのbFGF非含有ヒトiPS培地を15mLの遠心チューブに添加し、遠心機を用いてiPS細胞懸濁液を270gで遠心した。遠心後、上清を取り除き、1mLのbFGF非含有ヒトiPS培地を遠心チューブに添加し、血球計算版を用いて細胞数を計算した。

20

【0241】

その後、 5×10^5 個のiPS細胞を含有する2mLのbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を透析モジュールの透析チューブに入れた。さらに、透析モジュールを50mL遠心チューブ(Corning 352070)に入れ、遠心チューブ内の透析チューブの周囲に20mLのbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を入れた。さらに、透析チューブの周囲のbFGF非含有ヒトiPSゲル培地に10 μ mol/LのROCK阻害剤を添加した。その後、2日に1回、透析チューブの周囲のbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を新鮮なゲル培地に10mL交換し、7日間浮遊培養を続けた。なお、交換の際に新たに入れられるbFGF非含有ヒトiPSゲル培地は10 μ mol/Lの濃度でROCK阻害剤を含んでいた。また、一部の遠心チューブにおいては、コントロールとして、透析チューブの周囲のbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を交換することなく、7日間浮遊培養を続けた。

30

【0242】

図21(b)に示すように、透析チューブの周囲のbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を新鮮なゲル培地に交換しなかった場合と比較して、図21(a)に示すように、透析チューブの周囲のbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を交換した場合、図22に示すように、iPS細胞が形成する個々のコロニーが大きいことが示された。これらの結果から、透析チューブの周囲のbFGF非含有ヒトiPSゲル培地の交換が、iPS細胞の増殖能を促進することが示された。

【0243】

さらに、7日間浮遊培養したiPS細胞のコロニーをフィーダー細胞上に再播種し、コロニーの形態からiPS細胞の未分化性維持を確認した。図23及び図24に示すように、透析チューブの周囲のbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を交換した場合も、交換しなかった場合も、80%以上のコロニーが未分化の状態を維持していた。

40

【0244】

(実施例8)

実施例3と同じbFGF非含有ヒトiPS培地、及びbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を用意した。

【0245】

フィーダー細胞上でiPS細胞を培養している6ウェルディッシュにCTK溶液を300 μ L添加し、CO₂インキュベータ中で3分インキュベートした。3分後、インキュベ-

50

タからディッシュを取り出し、フィーダー細胞のみが剥がれていることを確認し、アスピレータを用いてCTK溶液を取り除いた。CTK溶液を取り除いた後、6ウェルディッシュにPBSを500 μ L添加し、細胞を洗浄後、PBSを取り除き、0.3mLのAccumaxを6ウェルディッシュに添加し、6ウェルディッシュをCO₂インキュベータに入れ、5分間インキュベートした。その後、0.7mLのbFGF非含有ヒトiPS培地を6ウェルディッシュに添加し、iPS細胞をシングルセルになるまで懸濁した。

【0246】

iPS細胞を懸濁後、4mLのbFGF非含有ヒトiPS培地を15mLの遠心チューブに添加し、遠心機を用いてiPS細胞懸濁液を270gで遠心した。遠心後、上清を取り除き、1mLのbFGF非含有ヒトiPS培地を遠心チューブに添加し、血球計算版を用いて細胞数を計算した。

10

【0247】

その後、 5×10^5 個のiPS細胞を含有する2mLのbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を透析モジュールの透析チューブに入れた。さらに、透析モジュールを50mL遠心チューブに入れ、遠心チューブ内の透析チューブの周囲に20mLのbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を入れた。さらに、透析チューブの周囲のbFGF非含有ヒトiPSゲル培地に10 μ mol/LのROCK阻害剤を添加した。その後、2日に1回、透析チューブの周囲のbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を新鮮なゲル培地に10mL交換し、7日間浮遊培養を続けた。なお、交換の際に新たに入れられるbFGF非含有ヒトiPSゲル培地は10 μ mol/Lの濃度でROCK阻害剤を含んでいた。

20

【0248】

また、第1のコントロールとして、 5×10^5 個のiPS細胞を含有する2mLのbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を透析モジュールの透析チューブに入れた。さらに、透析チューブを50mL遠心チューブに入れ、遠心チューブ内の透析チューブの周囲に20mLのジェランガム及びbFGF非含有ヒトiPS培地を入れた。さらに、透析チューブの周囲のbFGF及びジェランガム非含有ヒトiPS培地に10 μ mol/LのROCK阻害剤を添加した。その後、2日に1回、透析チューブの周囲のbFGF及びジェランガム非含有ヒトiPS培地を新鮮な培地に10mL交換し、7日間浮遊培養を続けた。

【0249】

さらに、第2のコントロールとして、透析チューブを用いることなく、 5×10^5 個のiPS細胞を含有する2mLのbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を50mL遠心チューブに入れた。その後、毎日1回、50mL遠心チューブに500 μ LのbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を追加し、7日間浮遊培養を続けた。

30

【0250】

その結果、図25及び図26に示すように、透析チューブを用いなかった場合と比較して、透析チューブを用いた場合のほうが、iPS細胞のコロニー数が増えていた。さらに、透析チューブの周囲にbFGF及びジェランガム非含有ヒトiPS培地を用いた場合と比較して、透析チューブの周囲にbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を用いたほうが、iPS細胞のコロニー数が増えていた。

【0251】

(実施例9：ポリマー培地におけるiPS細胞の誘導)

500mLのPrimate ES Cell Medium(ReproCELL)及び0.2mLの濃度が10 μ g/mLのbFGF(Gibco PHG0266)を混合し、bFGF含有ヒトiPS培地を調製した。また、500mLのPrimate ES Cell Medium(ReproCELL)にbFGF(Gibco PHG0266)を混合しなかったbFGF非含有ヒトiPS培地を調製した。さらに、市販の血清フリーのフィーダーフリー培地を用意した。

40

【0252】

また、bFGF非含有ヒトiPS培地、bFGF含有ヒトiPS培地、市販の血清フリーのフィーダーフリー培地に脱アシル化ジェランガム(日産化学)を濃度が0.02重量

50

%となるよう添加し、bFGF非含有ヒトiPSゲル培地、bFGF含有ヒトiPSゲル培地、比較用ゲル培地を調製した。

【0253】

レトロウイルスを用いてOCT3/4、SOX2、KLF4、C-MYCをヒト繊維芽細胞に導入し、7日間浮遊培養後、 1×10^5 個の細胞をbFGF非含有ヒトiPSゲル培地に懸濁し、bFGF非含有ヒトiPSゲル培地、bFGF含有ヒトiPSゲル培地、比較用ゲル培地中で培養した。その結果、iPS細胞が作製された。その図を図27に示す。そこで、bFGF非含有ヒトiPSゲル培地中で作製されたiPS細胞をフィーダー上にまきなおし、二日後にコロニーの形態を確認したところ、図28(a)に示すように、未分化なiPS細胞コロニーであった。さらにOCT3/4及びNANOGの抗体で染色をしたところ、図28(b)及び図28(c)に示すように、陽性であった。このことから、iPS細胞をポリマー培地中で誘導できることが示された。

10

【0254】

(実施例10：ポリマー培地で誘導されたiPS細胞のクローナリティ)

ポリマー培地で誘導されたiPS細胞を培養している6cmディッシュにCTK溶液を300 μ L添加し、CO₂インキュベータ中で3分インキュベートした。3分後、インキュベータからディッシュを取り出し、フィーダー細胞のみがはがれていることを確認し、アスピレータを用いてCTK溶液を取り除いた。CTK溶液を取り除いた後、ディッシュにPBSを500 μ L添加し、iPS細胞を洗浄後、PBSを取り除き、0.3mLの剥離液(Accumax)をディッシュに添加し、CO₂インキュベータに入れ、5分間インキュベートした。その後、0.7mLのbFGF非含有iPS培地をディッシュに添加し、iPS細胞をシングルセルになるまで懸濁した。

20

【0255】

iPS細胞を懸濁後、4mLのbFGF非含有iPS培地を遠心チューブに添加し、遠心機を用いて270gで遠心した。遠心後、上清を取り除き、1mLのbFGF非含有iPS培地を添加し、血球計算版を用いて細胞数を計算した。細胞計算後、 2.5×10^5 個ずつiPS細胞をCell explorer live cell labeling kit Red及びcell explorer live cell labeling kit Green(AAT bioquest)を用いて染色した。染色後、各染色した細胞を混合し、 5×10^5 個ずつiPS細胞を非接着ディッシュ又は15mLチューブに播種し、以後攪拌することなく浮遊培養した。15mLチューブにおいては、bFGF非含有ヒトiPSゲル培地を2mL用いた。非接着ディッシュにおいては、ゲル化していないbFGF非含有ヒトiPS培地を2mL用いた。各培地にはROCK阻害剤(Selleck S1049)を濃度が10 μ mol/Lとなるよう添加した。その後、15mLチューブ及び非接着ディッシュに、毎日500 μ LのbFGF非含有ヒトiPS培地を添加した。なお、交換の際に新たに入れられるbFGF非含有ヒトiPSゲル培地は10 μ mol/Lの濃度でROCK阻害剤を含んでいた。また、15mLチューブ及び非接着ディッシュに、毎日、終濃度が10 μ mol/LとなるようROCK阻害剤を添加し、7日間、浮遊培養を続けた。

30

【0256】

その結果、図29(a)に示すように、非接着ディッシュにおいてゼランガムを含まない培地を用いてiPS細胞を培養した場合、異なる染色をされたiPS細胞コロニー同士の凝集が顕著に認められた。定量したところ、40%以上の細胞が凝集していた。これに対し、15mLチューブ中において、bFGF非含有ヒトiPSゲル培地を用いてiPS細胞を培養した場合、図29(b)に示すように、凝集は認められなかった。

40

【0257】

(実施例11)

iPS細胞を懸濁後、4mLのbFGF含有ヒトiPS培地を15mLの遠心チューブに添加し、遠心機を用いてiPS細胞懸濁液を270gで遠心した。遠心後、上清を取り除き、1mLのbFGF含有ヒトiPS培地を15mLの遠心チューブに添加し、血球計

50

算版を用いて細胞数を計算した。細胞計算後、 5×10^5 個ずつiPS細胞を15 mLファルコンチューブ（登録商標、Corning 352096）又は非接着ディッシュに播種し、以後攪拌することなく浮遊培養した。

【0258】

培地は、bFGF含有ヒトiPSゲル培地またはジェランガムを含有しないbFGF含有ヒトiPS培地を2 mL用いて、チューブまたは非接着ディッシュで5日から7日間培養した。各培地にはROCK阻害剤（Selleck S1049）が $10 \mu\text{mol/L}$ となるよう添加した。その後、15 mLチューブ及び非接着ディッシュに、毎日 $500 \mu\text{L}$ のジェランガムを含むbFGF含有ヒトiPS培地または、ジェランガムを含まないbFGF含有ヒトiPS培地を添加した。また、15 mLチューブ及び非接着ディッシュに、毎日、終濃度が $10 \mu\text{mol/L}$ となるようROCK阻害剤を添加し、5日から7日間、浮遊培養を続けた。

10

【0259】

図30(a)は、iPS細胞をチューブで、ジェランガムを含まないbFGF含有ヒトiPS培地で培養した写真である。この場合、iPS細胞が沈殿して培養は不可能であった。図30(b)は、iPS細胞をチューブで、ジェランガムを含むbFGF含有ヒトiPS培地で培養した写真である。この場合、iPS細胞の沈殿や凝集は起きなかった。図30(c)は、iPS細胞をディッシュで、ジェランガムを含まないbFGF含有ヒトiPS培地で培養した写真である。この場合、iPS細胞が凝集して培養は不可能であった。図30(d)は、iPS細胞をディッシュで、ジェランガムを含むbFGF含有ヒトiPS培地で培養した写真である。この場合、iPS細胞が凝集して培養は不可能であった。

20

【0260】

（実施例12）

実施例3と同じbFGF非含有ヒトiPS培地、及びbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を用意した。また、市販の血清フリーのフィーダーフリー培地を用意した。

【0261】

さらに、上部開口の直径が 0.8 mm で、下部開口の直径が 0.5 mm である貫通孔が格子状に複数設けられた格子プレート（Spheroid Generator MPs 500及びMPC 500、クラレ）を用意した。

【0262】

フィーダー細胞上でiPS細胞を培養している6ウェルディッシュにCTK溶液を $300 \mu\text{L}$ 添加し、 CO_2 インキュベータ中で3分インキュベートした。3分後、インキュベータからディッシュを取り出し、フィーダー細胞のみが剥がれていることを確認し、アスピレータを用いてCTK溶液を取り除いた。CTK溶液を取り除いた後、ディッシュにPBSを $500 \mu\text{L}$ 添加し、細胞を洗浄後、PBSを取り除き、 0.3 mL のAccumaxをディッシュに添加し、ディッシュを CO_2 インキュベータに入れ、5分間インキュベートした。その後、 0.7 mL のbFGF非含有ヒトiPS培地をディッシュに添加し、iPS細胞をシングルセルになるまで懸濁した。

30

【0263】

その後、 4 mL のbFGF非含有ヒトiPS培地を 15 mL の遠心チューブに添加し、遠心機を用いてiPS細胞懸濁液を 270 g で遠心した。遠心後、上清を取り除き、 1 mL のbFGF非含有ヒトiPS培地を遠心チューブに添加し、血球計算版を用いて細胞数を計算した。

40

【0264】

その後、 2.5×10^5 個ずつiPS細胞を格子プレートにまき、2日間、格子プレートの各貫通孔を用いて懸滴型（ハンギングドロップ型）の培養して、図31(a)に示すような均一な大きさのコロニーを形成させた。次に、均一な大きさのコロニーを 2 mL のbFGF非含有ヒトiPSゲル培地に入れ、コロニーを含むbFGF非含有ヒトiPSゲル培地を透析モジュールの透析チューブに入れた。さらに、透析モジュールを 50 mL 遠心チューブに入れ、遠心チューブ内の透析チューブの周囲に 20 mL のジェランガムを含ま

50

ない市販の血清フリーのフィーダーフリー培地を入れた。その後、2日に1回、透析チューブの周囲のジェランガムを含まない市販の血清フリーのフィーダーフリー培地を新鮮な培地に10 mL交換し、7日間浮遊培養を続けた。なお、交換の際に入れられる培地は、 $10 \mu\text{mol/L}$ の濃度でROCK阻害剤を含んでいた。

【0265】

7日間の浮遊培養の後、図31(b)及び図32に示すように、iPS細胞のコロニーが大きくなっていることが観察された。これらの結果から、コロニーにおいてiPS細胞が増殖していることが示された。

【0266】

さらに、浮遊培養したiPS細胞コロニーをフィーダー細胞上に再播種し、3日後、コロニーの形態からiPS細胞の未分化性維持を確認した。その結果、図33及び図34に示すように全てのコロニーが未分化であった。したがって、格子プレートでiPS細胞のコロニーを均一な大きさにし、その後、iPS細胞の未分化の状態を維持したままポリマー培地中で培養できることが示された。

【0267】

(第5の実施の形態)

本発明の実施の形態に係る人工多能性幹(iPS)細胞の作製方法は、体細胞を用意することと、体細胞に初期化因子をコードしているRNAをリポフェクション法により導入することと、を含む。

【0268】

体細胞は、例えば血液細胞である。血液細胞は、血液から分離される。血液は、例えば末梢血及び臍帯血であるが、これらに限定されない。血液は、成年から採取されてもよいし、未成年から採取されてもよい。採血の際には、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ヘパリン、及び生物学的製剤基準血液保存液A液(ACD-A)液等の抗凝固剤を用いる。

【0269】

血液細胞は、例えば、単核球細胞(Monocyte)、好中球、好酸球、好塩基球、及びリンパ球等の有核細胞であり、赤血球、顆粒球、及び血小板を含まない。血液細胞は、例えば血管内皮前駆細胞、血液幹・前駆細胞、T細胞、又はB細胞であってもよい。T細胞は、例えば T細胞である。

【0270】

単核球細胞は、血液細胞の分離用媒体、及び遠心分離装置等を用いて、血液から分離される。血液細胞の分離用媒体としてFicoll(GEヘルスケア)を使用する場合の、単核球細胞の分離方法は、以下のとおりである。

【0271】

低温では単核球細胞の分離精度が悪くなる傾向にあるため、遠心機を4 から42 好ましくは18 に設定する。成年又は未成年のヒトから10 μL から50 mLの血液を採血し、血液が固まらないように血液にEDTAを含むキレート剤を加えて優しく混ぜる。また、ヒトリンパ球分離用の媒体(Ficoll-Paque PREMIUM、GEヘルスケアジャパン)を5 mLずつ2本の15 mLチューブに分注する。5 mLの血液に対して5 mLのPBSを加えて希釈し、チューブ中のヒトリンパ球分離用の媒体の上に5 mLずつ重層する。この時、界面を乱さないように、希釈血液をチューブの管壁を伝わらせてゆっくりと媒体上加える。

【0272】

チューブ中の溶液を、 $10 \times g$ から $1000 \times g$ 、好ましくは $400 \times g$ で、4 から42 好ましくは18 で5分から2時間、好ましくは30分間遠心する。遠心後、チューブ中に白く濁った中間層が現れる。この白く濁った中間層は、単核球細胞を含んでいる。チューブ中の白く濁った中間層をピペットマンでゆっくりと回収し、新しい15 mLチューブに移す。この際、下層は吸い取らないようにする。白く濁った中間層は、1本のチューブより1 mL程度回収できる。2本分の中間層をまとめて1本のチューブに移す。

10

20

30

40

50

【0273】

回収した単核球細胞に対し、1 mL から 48 mL、好ましくは 12 mL の PBS を加えて、溶液をさらに $10 \times g$ から $1000 \times g$ 、好ましくは $200 \times g$ 、4 から 42、好ましくは 18 で 1 分から 60 分、好ましくは 10 分間遠心する。その後、アスピレータを用いて溶液の上清を吸引して除去し、1 mL から 12 mL、好ましくは 3 mL の既知組成無血清造血細胞培地 (X-VIVO (登録商標) 10、ロンザ) を加えて懸濁し、単核球細胞懸濁液を得る。そのうち 10 μ L の単核球細胞懸濁液をトリパンブルーで染色して血球計算盤でカウントする。

【0274】

採血管としてバキュティナ (登録商標、BD) を使用する場合は、単核球細胞の分離方法は、以下のとおりである。

10

【0275】

低温では単核球細胞の分離精度が悪くなる傾向にあるため、遠心機を 4 から 42、好ましくは 18 に設定する。成年又は未成年のヒトから、採血管 (バキュティナ (登録商標)、BD) を用いて 8 mL 採血し、転倒混和して抗凝固剤と混和する。その後、バランスを調整し、溶液を 4 から 42、好ましくは 18、 $100 \times g$ から $3000 \times g$ 、好ましくは $1500 \times g$ から $1800 \times g$ でスイングロータで 1 分から 60 分、好ましくは 20 分間遠心する。遠心後、血漿層である上層を取り除き、ピペティングして単核球層とゲルに張り付いている血球を懸濁して懸濁液を得る。得られた懸濁液を、別の 15 mL チューブに移す。

20

【0276】

15 mL チューブの懸濁液に 1 mL から 14 mL、好ましくは 12 mL の PBS を加えて、懸濁液を 4 から 42、好ましくは 18、 $100 \times g$ から $3000 \times g$ 、好ましくは $200 \times g$ で 1 分から 60 分、好ましくは 5 分間遠心する。遠心後、上清をアスピレータで除去する。また、溶血剤 (PharmLyse (登録商標)、10 倍濃度、BD) を滅菌水で 1 倍濃度に希釈する。15 mL チューブ中のペレットをタッピングでほぐし、1 mL から 14 mL、好ましくは 1 mL の溶血剤を加える。その後、室温で遮光し、1 分から 60 分間、好ましくは 1 分間溶液を静置する。

【0277】

次に、15 mL チューブに 1 mL から 14 mL、好ましくは 12 mL の PBS を加えて、4 から 42、好ましくは室温で、 $100 \times g$ から $3000 \times g$ 、好ましくは $200 \times g$ で 1 分から 60 分、好ましくは 5 分間遠心する。遠心後、上清をアスピレータで除去し、1 mL から 15 mL、好ましくは 3 mL の既知組成無血清造血細胞培地 (X-VIVO (登録商標) 10、ロンザ) を加えて懸濁し、単核球細胞懸濁液を得る。そのうち 10 μ L の単核球細胞懸濁液をトリパンブルーで染色して血球計算盤でカウントする。

30

【0278】

血液から単核球細胞を分離する方法は、上記の方法に限られず、例えば、透析膜を使用して、血液から単核球を分離してもよい。また、全血単核球濃縮用ピュアセルセレクトシステム (登録商標、PAL) 、血球細胞除去用浄化器 (セルソーバE、登録商標、旭化成) 、及び血小板製剤用白血球除去フィルター (セパセルPL、登録商標、PLX-5B-SCD、旭化成) 等も使用可能である。

40

【0279】

また、単核球細胞としては、Cellular Technology Limited 社から販売されている CTL-UP1 や、Sanguine Biosciences 社の PBMC-001 等を使用してよい。

【0280】

あるいは、血液細胞としては、セルバンカー 1、ステムセルバンカー GMP グレード、及びステムセルバンカー DMSO フリー GMP グレード (ゼノアック) 等の細胞凍結保存液を用いて凍結保存された血液細胞を解凍して用いてもよい。

【0281】

50

単核球細胞を解凍する際には、まず、15 mLチューブに1 mLから15 mL、好ましくは8 mLの既知組成無血清造血細胞培地（X-VIVO（登録商標）10、ロンザ）を入れておき、凍結した単核球細胞の入ったチューブを4 から42、好ましくは37の温浴槽に置いて、単核球細胞を溶かし始める。その後、少し氷が残っている状態で、単核球細胞の入ったチューブを温浴槽から引きあげ、単核球細胞を既知組成無血清造血細胞培地の入ったチューブに移す。そのうち100 µLの単核球細胞懸濁液をトリパンブルーで染色して血球計算盤でカウントする。

【0282】

血液細胞は、細胞表面マーカーに基づいて分離されてもよい。血液幹・前駆細胞は、CD34が陽性である。T細胞は、CD3、CD4、CD8のいずれかが陽性である。B細胞は、CD10、CD19、CD20のいずれかが陽性である。血液幹・前駆細胞、T細胞、又はB細胞は、例えば、自動磁気細胞分離装置を用いて、血液細胞から分離される。あるいは、予め分離された単核球細胞を用意してもよい。ただし、細胞表面マーカーに基づいて分離されていない血液細胞に、初期化因子RNAを導入してもよい。

10

【0283】

CD34陽性細胞は、幹・前駆細胞であり、リプログラミングされやすい傾向にある。また、CD3陽性細胞であるT細胞を用いてiPS細胞を作製すると、T細胞由来のiPS細胞はTCRリコンビネーションの型を保持しているため、T細胞に効率的に分化誘導できる傾向にある。

【0284】

CD34陽性細胞の分離方法は、以下のとおりである。

20

【0285】

10 mLの無血清培地（StemSpan H3000、STEMCELL Technologies）に、100 µLのIL-6（100 µg/mL）、100 µLのSCF（300 µg/mL）、100 µLのTPO（300 µg/mL）、100 µLのFlt3リガンド（300 µg/mL）、及び100 µLのIL-3（10 µg/mL）を加えて血球培地（血液幹・前駆細胞培地）を調製する。

【0286】

6ウェルプレートの1ウェルに1 mLから6 mL、好ましくは2 mLの血球培地を入れる。また、培地の蒸発を防ぐために、他の5ウェルのそれぞれに1 mLから6 mL、2 mLのPBSを入れる。その後、6ウェルプレートを4 から42、好ましくは37のインキュベータに入れて温める。

30

【0287】

20 mLのPBSに対し、100 µLから1 mL、好ましくは800 µLのEDTA（500 mmol/L）及び100 µLから1 mL、好ましくは200 µLのFBSを加えたカラムバッファを用意する。1 × 10⁴から1 × 10⁹個、好ましくは2 × 10⁷個の単核球細胞を含有する単核球細胞懸濁液を15 mLチューブに分注し、単核球細胞懸濁液を、4 から42、好ましくは4、100 × gから3000 × g、好ましくは300 × gで10分間遠心する。遠心後、上清を除き、単核球細胞を100 µLから1 mL、好ましくは300 µLのカラムバッファで懸濁する。

40

【0288】

15 mLチューブ中の単核球細胞懸濁液に、100 µLから1 mL、好ましくは100 µLのFcRブロック試薬（Miltenyi Biotec）及び100 µLから1 mL、好ましくは100 µLのCD34マイクロビーズキット（Miltenyi Biotec）を加える。FcRブロック試薬は、マイクロビーズ標識の特異性を高めるために用いられる。その後、単核球細胞懸濁液を混和して、4 から42、好ましくは4で1分から2時間、好ましくは30分間静置する。

【0289】

次に、15 mLチューブ中の単核球細胞懸濁液に1 mLから15 mL、好ましくは10 mLのカラムバッファを加えて希釈し、4 から42、好ましくは4、100 × gが

50

ら1000×g、好ましくは300×gで1分から2時間、好ましくは10分間遠心する。遠心後、15mLチューブ中の上清をアスピレータで除き、10μLから10mL、好ましくは500μLのカラムバッファを加えて再懸濁する。

【0290】

自動磁気細胞分離装置用のカラム(MSカラム、Miltenyi Biotec)を自動磁気細胞分離装置(MiniMACS Separation Unit、Miltenyi Biotec)に取り付け、カラムに10μLから10mL、好ましくは500μLのカラムバッファを入れて洗浄する。次に、単核球細胞をカラムに入れる。さらに、カラムに10μLから10mL、好ましくは500μLのカラムバッファを入れて、カラムを1回から10回、好ましくは3回洗浄する。その後、カラムを自動磁気細胞分離装置から外し、15mLチューブに入れる。次に、カラムに10μLから10mL、好ましくは1000μLのカラムバッファを入れ、速やかにシリンジを押してCD34陽性細胞を15mLチューブに流出させる。

10

【0291】

10μLのCD34陽性細胞懸濁液をトリパンブルーで染めて、細胞数を血球計算版でカウントする。また、15mLチューブ中のCD34陽性細胞懸濁液を、4から42、好ましくは4、100×gから1000×g、好ましくは300×gで1分から2時間、好ましくは10分間遠心する。遠心後、上清をアスピレータで除く。さらに、温めておいた血球培地でCD34陽性細胞を再懸濁し、CD34陽性細胞を培養プレートにまく。その後、4から42、好ましくは37、1%から20%、好ましくは5%CO₂でCD34陽性細胞を6日間培養する。この間、培地交換はしなくてもよい。

20

【0292】

CD34以外のマーカーで細胞を単離する方法は、CD34陽性細胞を単離する方法と同様である。

【0293】

初期化因子RNAを導入される血液細胞は、例えばT細胞培地又は血液幹・前駆細胞培地で培養される。T細胞由来のiPS細胞を作製する場合は、T細胞培地を用い、CD34陽性細胞からiPS細胞を作製する場合は、血液幹・前駆細胞培地を用いる。培養条件は、例えば、CO₂濃度が5%、酸素濃度が25%以下、及び温度が37以下である。

【0294】

初期化因子RNAを導入される血液細胞は、Matrigel(Corning)、CELLstart(登録商標、ThermoFisher)、あるいはLaminin511(nippi)等の基底膜マトリックスを用いて、フィーダーフリーで培養する。

30

【0295】

培養液としては、Primate ES Cell Medium、Reprostem、ReproFF、ReproFF2、ReproXF(ReproCELL)、mTESR1、TESR2、TESRE8、ReproTeSR(STEMCELL Technologies)、PluriSTEM(登録商標)Human ES/iPS Medium(Merck)、NutriStem(登録商標)XF/FF Culture Medium for Human iPS and ES Cells、Pluriton reprogramming medium(Stemgent)、PluriSTEM(登録商標)、Stemfit AK02N、Stemfit AK03(Ajinomoto)、ESC-Sure(登録商標)serum and feeder free medium for hESC/iPS(Applied StemCell)、及びL7(登録商標)hPSC Culture System(LONZA)等を利用してもよい。

40

【0296】

浮遊培養で行なう場合は、血液細胞をスピナーフラスコに入れて攪拌培養する。あるいは、血液細胞を0.001%から10%のゼランガム溶液、脱アシル化ゼランガム、ヒアルロン酸、ラムザンガム、ダイユータンガム、キサントガム、カラギーナン、フコ

50

イダン、ペクチン、ペクチン酸、ペクチニン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ケラト硫酸、コンドロイチン硫酸、デルタマン硫酸、及びラムナン硫酸、並びにそれらの塩からなる群から選択される少なくとも1種の高分子化合物、又は温度感受性ゲルに入れて培養してもよい。また、ゲル培地は、メチルセルロースを含んでいてもよい。メチルセルロースを含むことにより、細胞同士の凝集がより抑制される。

【0297】

温度感受性ゲルは、poly(glycerol monomethacrylate) (PGMA)、poly(2-hydroxy propyl methacrylate) (PHPMA)、ポリイソプロピルアクリルアミド、Poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)、amine terminated、carboxylic acid terminated、maleimide terminated、N-hydroxysuccinimide (NHS) ester terminated、triethoxysilane terminated、Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-butylacrylate)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid-co-octadecyl acrylate)、及びN-Isopropylacrylamideから選択される少なくとも1種を含んでいてもよい。

10

【0298】

培地は、カドヘリン、ラミニン、フィブロネクチン、及びビトロネクチンからなる群から選択される少なくとも1種の物質を含んでいてもよい。

【0299】

血液細胞には、初期化因子RNAが導入される。初期化因子RNAは、例えば、Oct 3/4のmRNA、Sox 2のmRNA、Klf 4のmRNA、及びc-MycのmRNAを含む。また、初期化因子RNAは、LIN28A、LIN28B、GLIS1、FOXH1、p53-dominant negative、p53-P275S、L-MYC、NANOG、DPPA2、DPPA4、DPPA5、ZIC3、BCL-2、ERAS、TPT1、SALL2、NAC1、DAX1、TERT、ZNF206、FOXD3、REX1、UTF1、KLF2、KLF5、ESRRB、miR-291-3p、miR-294、miR-295、NR5A1、NR5A2、TBX3、MBD3sh、TH2A、及びTH2Bからなる群から選択される少なくとも一つの因子のmRNAをさらに含んでいてもよい。これらのmRNAは、TriLinkから入手可能である。

20

【0300】

mRNAは、プソイドウリジン()、5-メチルウリジン(5meU)、N1-メチルシュードウリジン(me1)、5-メトキシウリジン(5moU)、5-ヒドロキシメチルウリジン(5hmU)、5-フォーミルウリジン(5fU)、5-カルボキシメチルエステルウリジン(5camU)、チエノグアノシン(thG)、N4-メチルシチジン(me4C)、5-メチルシチジン(m5C)、5-メトキシチジン(5moC)、5-ヒドロキシメチルシチジン(5hmC)、5-ヒドロキシシチジン(5hoC)、5-フォルムシチジン(5fC)、5-カルボキシシチジン(5caC)、N6-メチル-2-アミノアデノシン(m6DAP)、ジアミノプリン(DAP)、5-メチルウリジン(m5U)、2'-O-メチルウリジン(Umまたはm2'-OU)、2-チオウリジン(s2U)、及びN6-メチルアデノシン(m6A)からなる群から選択される少なくとも1つで修飾されていてもよい。

30

40

【0301】

mRNAは、ポリアデニル化されていてもよい。

【0302】

mRNAは、インビトロで転写される(IVT)RNAのポリアデニル化によって調製されてもよい。mRNAは、ポリ(A)末端をコードするDNAテンプレートを用いることによって、IVTの間にポリアデニル化されてもよい。mRNAがキャッピングされてもよい。細胞における発現の効率性を最大化するために、大部分のmRNA分子がキャップを含有することが好ましい。mRNAは5'cap[m7G(5')ppp(5')G]構造を有していてもよい。当該配列はmRNAを安定化させ、mRNA転写を促進させる。

50

5' triphosphateをもつmRNAからは、脱リン酸化処理により5' triphosphateを取り除いてもよい。mRNAはAnti-Reverse Cap Analog (ARCA)として[3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G]を有しているもよい。ARCAは転写開始点より前に挿入される配列であり、転写されるmRNAの効率は二倍となる。mRNAはPolyAテールを有しているもよい。

【0303】

また、mRNAは、自己増殖能を持つリプリケイティブRNAであってもよい。リプリケイティブRNAとは、自己増殖能を持つRNAであり、通常のRNAと異なり、RNAの複製に必要なタンパク質を発現させる能力を併せ持っている。リプリケイティブRNAはアルファウイルスであるベネズエラ馬脳炎(VEE)ウイルス由来である。リプリケイティブRNAを細胞にリポフェクションすると、リプログラミング因子を作り続けるRNAを細胞に発現させることができるため、毎日RNAを添加する必要を省くことが可能となる。

10

【0304】

リプリケイティブRNAの配列は、アルファウイルスレプリコンRNA、東部ウマ脳炎ウイルス(EEE)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEE)、エバングレーズ(Everglades)ウイルス、ムカンボ(Mucambo)ウイルス、ピクスナ(Pixuna)ウイルス、及び西部ウマ脳炎ウイルス(WEE)からなる群から選択されるアルファウイルスから得られる配列を含んでいてよい。

【0305】

また、リプリケイティブRNAは、シンドビス(Sindbis)ウイルス、セムリキ森林(Semliki Forest)ウイルス、ミデルブルグ(Middelburg)ウイルス、チクングニア(Chikungunya)ウイルス、オニヨンニヨン(O'nyong-nyong)ウイルス、ロスリバー(Ross River)ウイルス、バーマフォレスト(Barmah Forest)ウイルス、ゲタ(Getah)ウイルス、サギヤマ(Sagiyama)ウイルス、ベバル(Bebaru)ウイルス、マヤロ(Mayaro)ウイルス、ウナ(Una)ウイルス、アウラ(Aura)ウイルス、ワタロア(Whataroa)ウイルス、ババンキ(Babanki)ウイルス、Kyzylagachウイルス、ハイランドJ(Highlands J)ウイルス、フォートモーガン(Fort Morgan)ウイルス、ヌドウム(Ndumu)ウイルス、及びバギー Creek(Buggy Creek)ウイルスからなる群から選択されるアルファウイルスから得られる配列を含んでいてよい。

20

30

【0306】

リプリケイティブRNAは、5'から3'に向かって、(VEE RNAレプリカーゼ) - (プロモーター) - (RF1) - (自己切断型ペプチド) - (RF2) - (自己切断型ペプチド) - (RF3) - (IRESもしくはコアプロモーター) - (RF4) - (IRESもしくは任意のプロモーター) - (任意に選択可能なマーカー) - (VEE 3' UTR及びポリAテール) - (任意に選択可能なマーカー) - プロモーターを含んでおり、上記のRF1-4は、多能性細胞への体細胞の脱分化を誘導する因子であって、上記のRF2-3、RF3-4、RF4は任意であり、上記のRF1-4は、Oct-4、Klf4、Sox-2、c-Myc、LIN28A、LIN28B、GLIS1、FOXH1、p53-dominant negative、p53-P275S、L-MYC、NANO G、DPPA2、DPPA4、DPPA5、ZIC3、BCL-2、E-RAS、TPT1、SALL2、NAC1、DAX1、TERT、ZNF206、FOX D3、REX1、UTF1、KLF2、KLF5、ESRRB、miR-291-3p、miR-294、miR-295、NR5A1、NR5A2、TBX3、MBD3sh、TH2A、及びTH2Bからなる群から選択されてもよい。

40

【0307】

初期化因子RNAは、例えばリポフェクション法により血液細胞に導入される。リポフェクション法とは、陰性荷電物質である核酸と、陽性荷電脂質と、の複合体を、電氣的な

50

相互作用により形成し、複合体をエンドサイトーシスや膜融合により細胞内に取り込ませる方法である。リポフェクション法は、細胞へのダメージが少なく、導入効率に優れており、操作が簡便であり、時間がかからない等の利点を有する。

【0308】

初期化因子RNAのリポフェクションには、例えば、低分子干渉RNA (siRNA) 或いはリポフェクション試薬が用いられる。RNAのリポフェクション試薬としては、siRNAのリポフェクション試薬及びmRNAのリポフェクション試薬が使用可能である。より具体的には、RNAのリポフェクション試薬としては、Lipofectamine (登録商標) RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)、Lipofectamine (登録商標) MessengerMAX (Thermo Fisher Scientific)、Lipofectamine (登録商標) 2000、Lipofectamine (登録商標) 3000、Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific)、Stemfect RNA transfection reagent (STEMGENT)、NextFect (登録商標) RNA Transfection Reagent (Bio Scientific)、Amaya (登録商品) Human T cell Nucleofector (登録商品) kit (Lonza社、VAPA-1002)、Amaya (登録商品) Human CD34 cell Nucleofector (登録商品) kit (Lonza社、VAPA-1003)、及びReproRNA (登録商標) トランスフェクション試薬 (STEMCELL Technologies) 等が使用可能である。

10

20

【0309】

初期化因子RNAのリポフェクションの際の血液細胞数は、例えば、1個から 1×10^8 個、 1×10^4 個から 5×10^6 個、あるいは 5×10^5 個から 5×10^6 個である。1 mLの培養液あたり、リポフェクションの際の初期化因子RNAの量は、例えば、1回あたり5 ngから50 μ g、50 ngから10 μ g、あるいは600 ngから3 μ gである。また、リポフェクションの際のリポフェクション試薬の量は、例えば、1回あたり0.1 μ Lから500 μ L、1 μ Lから100 μ L、あるいは1 μ Lから40 μ Lである。初期化因子のリポフェクションは、1回あたり0.1時間以上24時間以下、2時間以上21時間以下、12時間30分以上18時間30分以下、あるいは18時間行う。例えば、12

30

【0310】

初期化のリポフェクションは、例えば、2日に1回、あるいは1日に1回、5日間以上9日間以内、6日間以上8日間以内、あるいは7日間繰り返して行う。ただし、mRNAがリプリーケイティブRNAである場合、リポフェクションは1回でもよい。初期化因子RNAのリポフェクションの際に用いられる培地は、例えばOpti-MEM (登録商標、Gibco) 等の低血清培地である。

【0311】

血液細胞が人工多能性幹細胞に誘導 (リプログラミング) されたか否かは、例えば、サイトフロメータで、未分化であることを示す細胞表面マーカーであるTRA-1-60、TRA-1-81、SSEA-1、及びSSEA5から選択される少なくとも一つの表面マーカーが陽性であるか否かを分析することにより行う。TRA-1-60は、iPS/ES細胞に特異的な抗原であり、体細胞では検出されない。iPS細胞はTRA-1-60陽性画分からのみできることから、TRA-1-60陽性細胞はiPS細胞の種と考えられる。

40

【0312】

以上説明した本発明の実施の形態に係る人工多能性幹細胞の作製方法においては、初期化因子を発現させることができるRNAを血液細胞等の体細胞に導入して、初期化因子を発現させ、人工多能性幹細胞を作製している。そのため、体細胞のDNAに初期化因子が

50

取り込まれることなく、人工多能性幹細胞を作製することが可能である。

【0313】

従来の人工多能性幹細胞の作製方法においては、体細胞DNAへ初期化因子を挿入しているため、ゲノムに傷がつき、細胞の癌化の原因となっている。これに対し、本発明の実施の形態に係る人工多能性幹細胞の作製方法においては、初期化因子をコードしているRNAを用いているため、ゲノムへ遺伝子が挿入することなく、人工多能性幹細胞を作製することが可能であり、これに伴う癌化の可能性がない。そのため、本発明の実施の形態に係る作製方法で作製された人工多能性幹細胞は、臨床利用可能な細胞の適正製造基準を満たし得る。

【0314】

また、従来のレトロウイルス又はレンチウイルスを用いる人工多能性幹細胞の作製方法においては、作製された人工多能性幹細胞にウイルスが残存する。これに対し、本発明の実施の形態に係る人工多能性幹細胞の作製方法においては、初期化因子RNAをリポフェクションにより導入するため、ウイルスを必要としない。そのため、作製される人工多能性幹細胞にウイルスが残存しない。この点においても、本発明の実施の形態に係る作製方法で作製された人工多能性幹細胞は、臨床利用可能な細胞の適正製造基準を満たし得る。

【0315】

さらに、従来のエレクトロポレーションを用いる人工多能性幹細胞の作製方法は、細胞へのダメージが大きく、多数の細胞を誘導前に破壊する。これに対し、本発明の実施の形態に係る人工多能性幹細胞の作製方法が用いるリポフェクションは、細胞へのダメージが少なく、多数の細胞を誘導前に破壊することがない。また、リポフェクションは、高価な機器を必要とせず、工程が簡便である。

【0316】

また、繊維芽細胞から人工多能性幹細胞を作製する場合、高侵襲なバイオプシーを行って皮膚の細胞を採取する必要がある。これに対し、本発明の実施の形態に係る人工多能性幹細胞の作製方法においては、血液細胞は低侵襲な採血によって採取することが可能である。また、一般に、採血からは、人工多能性幹細胞の作製に必要な十分な数の血液細胞が得られる。そのため、繊維芽細胞のように、血液細胞を人工多能性幹細胞に誘導する前に増殖させる必要がない。さらに、増殖培養時に生じうるDNAに傷が入るリスクも、血液細胞では生じない。またさらに、血液細胞は、皮膚細胞と異なり、外気に触れずに採取することが可能である。そのため、採血の段階からクリーンな閉鎖系の中で、血液細胞を人工多能性幹細胞に誘導することが可能である。この点においても、血液細胞は、臨床利用に適している。

【0317】

(実施例13)

(準備)

ヒト血液細胞は健康な成人男性から入手した。また、修飾化mRNA (TriLink社)、非接着ディッシュ、15mLチューブ、50mLチューブ、フィコール、サイトフロメータ (BD)、CD34に対する抗体 (Miltenyi Biotec)、CD3に対する抗体 (Miltenyi Biotec)、MACS (登録商標) バッファ (Miltenyi Biotec)、T細胞培地、低血清培地 (Opti-MEM (登録商標)、Gibco)、siRNA導入試薬 (Lipofectamine (登録商標) RNAiMAX、ThermoFisher Science)、及びTRA-1-60に対する抗体 (BD) を用意した。

【0318】

T細胞 (CD3陽性細胞) 培地は、以下A培地とB培地の混合液であった。A培地は、15mLのX vivo-10 (Lonza社、04-743Q) 及びIL-2 (10µg/mL) の混合液であった。B培地は1.5mLチューブにX vivo-10及びDynabeads CD3/CD28 (Life Technologies社、111-31D) 50µLを混合し、5秒間ボルテックス後、スピンドウンし、DynaMag-

10

20

30

40

50

2 (Thermo fisher Science) に静置し、一分静置後、上清を取り除いたものであった。

【0319】

また、10 mL の無血清培地 (StemSpan H3000、STEMCELL Technologies) に、10 μ L の IL-6 (100 μ g/mL)、10 μ L の SCF (300 μ g/mL)、10 μ L の TPO (300 μ g/mL)、10 μ L の Flt3 リガンド (300 μ g/mL)、及び 10 μ L の IL-3 (10 μ g/mL) を加えて血球培地 (血液幹・前駆細胞培地) を調製した。

【0320】

また、それぞれ濃度が 100 ng/ μ L の OCT3/4 の mRNA 含有液、SOX2 の mRNA 含有液、KLF4 の mRNA 含有液、c-MYC の mRNA 含有液、LIN28A の mRNA 含有液、及び緑色蛍光タンパク質 (GFP) の mRNA 含有液を用意した。次に、385 μ L の OCT3/4 の mRNA 含有液、119 μ L の SOX2 の mRNA 含有液、156 μ L の KLF4 の mRNA 含有液、148 μ L の c-MYC の mRNA 含有液、83 μ L の LIN28A の mRNA 含有液、及び 110 μ L の GFP の mRNA 含有液を混合し、初期化因子混合液を得た。得られた初期化因子混合液を 50 μ L ずつ容量 1.5 mL の RNase-Free のチューブ (エッペンドルフチューブ (登録商標)、エッペンドルフ) に分注し、-80 の冷凍庫に保存した。

【0321】

(単核球細胞の調製)

遠心機を 18 に設定した。5 mL から 50 mL の血液を採血し、血液に EDTA を加えて優しく混ぜた。また、ヒトリンパ球分離用の媒体 (Ficoll-Paque PREMIUM、GEヘルスケアジャパン) を 5 mL ずつ 2 本の 15 mL チューブに分注した。5 mL の PBS を血液に加えて希釈し、チューブ中のヒトリンパ球分離用の媒体の上に 5 mL ずつ重層した。この時、界面を乱さないように、希釈血液をチューブの管壁を伝わらせてゆっくりと媒体上加えた。

【0322】

チューブ中の溶液を、400 \times g、18 で 30 分間遠心した。この際、加速、減速ともゆっくり行った。遠心後、チューブ中に白く濁った中間層が現れた。この白く濁った中間層は、単核球細胞を含んでいる。チューブ中の白く濁った中間層をピペットマンでゆっくりと回収し、新しい 15 mL チューブに移した。この際、下層は吸い取らないようにした。白く濁った中間層は、1 本のチューブより 1 mL 程度回収できた。2 本分の中間層をまとめて 1 本のチューブに移した。

【0323】

回収した単核球細胞に対し、12 mL の PBS を加えて、溶液をさらに 200 \times g、18 で 10 分間遠心した。その後、アスピレータを用いて溶液の上清を吸引して除去し、3 mL の既知組成無血清造血細胞培地 (X-VIVO (登録商標) 10、ロンザ) を加えて懸濁し、単核球細胞懸濁液を得た。そのうち 10 μ L の単核球細胞懸濁液をトリパンブルーで染色して血球計算盤でカウントした。

【0324】

(CD34 又は CD3 陽性細胞の分離)

1×10^7 個の単核球細胞と、CD34 抗体又は CD3 抗体と、を、4 の溶液 100 μ L 中で 15 分反応させた。反応後、溶液に 5 mL の MACS (登録商標) バッファ (Miltenyi Biotec) を加え、270 g で遠心した。遠心後、上清を除去し、1 mL の MACS バッファを添加した。その後、自動磁気細胞分離装置 (autoMACS、Miltenyi Biotec) の分離プログラムを利用して、単核球細胞のうち、CD34 陽性細胞又は CD3 陽性細胞を分離した。

【0325】

(分離した細胞の培養)

分離した 5×10^6 個の単核球細胞を 1 mL の T 細胞培地、又は血液幹・前駆細胞培地に

10

20

30

40

50

懸濁し、12ウェルプレートに播種し、培養した。培養条件は、CO₂濃度が5%、酸素濃度が19%、及び温度が37度であった。

【0326】

(初期化因子のリポフェクション)

100μLの低血清培地(Opti-MEM(登録商標)、Gibco)と25μLの初期化因子混合液を混合し、第1の混合液とした。また、112.5μLの低血清培地(Opti-MEM(登録商標)、Gibco)と12.5μLのsiRNA導入試薬(Lipofectamine(登録商標)RNAiMAX、ThermoFisherScience)を混合し、第2の混合液とした。その後、第1の混合液と、第2の混合液とを混合し、15分室温で静置してリポフェクション反応液とした。

10

【0327】

得られたリポフェクション反応液のうち60μLを単核球細胞を培養している12ウェルプレートに穏やかに添加し、引き続き、37度で18時間、単核球細胞をフィーダーフリーで培養した。培養条件は、CO₂濃度が5%、酸素濃度が19%、及び温度が37度であった。リポフェクション反応液を添加した時の単核球細胞の密度は 3×10^6 であった。18時間後、単核球細胞を15mLチューブに回収し、300gで遠心し、上清を除去した。その後、1.25mLのCD34用血球培地を15mLチューブに添加して、単核球細胞懸濁液を同じ12ウェルプレートに戻し、一晚37度で単核球細胞をフィーダーフリーで培養した。培養条件は、CO₂濃度が5%、及び酸素濃度が19%であった。上記工程を2日に1回、7日間繰り返した。

20

【0328】

(GFPの発現の確認)

リポフェクションを開始してから7日目に、リポフェクションを合計4回した細胞の密度は、 3×10^6 であった。細胞の一部を12ウェルプレートから取り出し、蛍光顕微鏡でGFPの発現を確認したところ、図35に示すように、GFPの発現が確認された。これにより、単核球細胞にmRNAがトランスフェクションし、トランスフェクトされたmRNAからタンパク質が合成されていることが確認された。

【0329】

(TRA-1-60の発現の確認)

リポフェクションを開始してから7日目に、細胞の一部を12ウェルプレートから取り出し、取り出した細胞を初期化された細胞で特異的に発現する表面抗原であるTRA-1-60に対する抗体であって、Allophycocyanin(APC)蛍光色素で標識された抗体で染色した。その後、蛍光活性化セルソータ(FACS(登録商標)、BD)で、TRA-1-60陽性細胞の割合を確認することによって、細胞においてリプログラミングが開始され、iPS細胞遺伝子が発現し、iPS細胞ができる事を確認した。

30

【0330】

図36に示すように、自家蛍光の強度をx軸に、蛍光標識抗TRA-1-60抗体の蛍光強度をy軸にとったドットプロットを作成した。遺伝子を導入しなかったネガティブコントロールでは、TRA-1-60陽性細胞は検出されなかった。これに対し、実験1、2及び3において、TRA-1-60陽性細胞が検出された。なお、実験1では、マーカーによる分離をしていない単核球全体から誘導した結果であり、実験2は、CD3陽性で分離した細胞から誘導した結果であり、実験3は、CD34陽性で分離した細胞から誘導した結果である。したがって、初期化因子RNAのリポフェクションを用いて、血液由来の細胞に初期化因子を導入し、iPS細胞を誘導できることが示された。

40

【0331】

(第6の実施の形態)

本発明の実施の形態に係る動物細胞から体細胞を作製する方法は、動物細胞を用意することと、動物細胞に誘導因子リボ核酸(RNA)をリポフェクションにより導入し、体細胞に分化させることと、を含む。

50

【0332】

動物細胞は、幹細胞を含む。幹細胞としては、人工多能性幹細胞（iPS細胞）及び胚性幹細胞（ES細胞）の両方が使用可能である。動物細胞は、ヒト繊維芽細胞又はヒト血液細胞であってもよい。

【0333】

幹細胞を培養する培養液には、Primate ES Cell Medium、mTeSR1、TeSR2、及びTeSRE8（STEMCELL Technologies）等を利用してよい。

【0334】

また、幹細胞を培養する培地はゲルを含んでいてもよい。ゲルは、脱アシル化ジェランガム、ジェランガム、ヒアルロン酸、ラムザンガム、ダイユータンガム、キサンタンガム、カラギーナン、フコイダン、ペクチン、ペクチン酸、ペクチニン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヘパリチン硫酸、ケラト硫酸、コンドロイチン硫酸、デルタマン硫酸、及びラムナン硫酸、並びに及びそれらの塩からなる群から選択される少なくとも1種の高分子化合物を含んでいてもよい。また、ゲル培地は、メチルセルロースを含んでいてもよい。メチルセルロースを含むことにより、細胞同士の凝集がより抑制される。

10

【0335】

ゲルは、温度感受性ゲルであってもよい。温度感受性ゲルは、poly(glycerol monomethacrylate) (PGMA)、poly(2-hydroxypropyl methacrylate) (PHPMA)、Poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)、amine terminated、carboxylic acid terminated、maleimide terminated、N-hydroxysuccinimide (NHS) ester terminated、trithoxysilane terminated、Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-butylacrylate)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid-co-octadecyl acrylate)、及びN-Isopropylacrylamideから選択される少なくとも1種であってもよい。

20

【0336】

幹細胞を培養する培地は、カドヘリン、ラミニン、フィブロネクチン、及びビトロネクチンからなる群から選択される少なくとも1種の物質を含んでいてもよい。

【0337】

動物細胞から作製される体細胞は、例えば、神経系細胞であるが、これに限定されない、例えば、心筋、肝細胞、網膜、角膜細胞、及び血液細胞等の体細胞も作製可能である。神経系細胞を作製する場合、動物細胞に導入される誘導因子RNAは、例えば、neurogenin2 (Ngn2)のmRNAを含む。Ngn2 (neurogenin2)は、神経系細胞分化に必要なスイッチタンパク質である。誘導因子RNAは、薬剤耐性遺伝子に対応するmRNAを含んでいてもよい。薬剤とは、例えばピューロマイシン、ネオマイシン、プラストサイジン、G418、ハイグロマイシン、及びゼオシン等の抗生物質である。誘導因子RNAが導入された細胞は、薬剤耐性を示す。

30

【0338】

誘導因子RNAに含まれるmRNAは、プソイドウリジン()、5-メチルウリジン(5meU)、N1-メチルシュードウリジン(me1)、5-メトキシウリジン(5moU)、5-ヒドロキシメチルウリジン(5hmU)、5-フォーミルウリジン(5fU)、5-カルボキシメチルエステルウリジン(5camU)、チエノグアノシン(thG)、N4-メチルシチジン(me4C)、5-メチルシチジン(m5C)、5-メトキシシチジン(5moC)、5-ヒドロキシメチルシチジン(5hmC)、5-ヒドロキシシチジン(5hoC)、5-フォルムシチジン(5fC)、5-カルボキシシチジン(5cac)、N6-メチル-2-アミノアデノシン(m6DAP)、ジアミノプリン(DAP)、5-メチルウリジン(m5U)、2'-O-メチルウリジン(Um又はm2'-OU)、2-チオウリジン(s2U)、及びN6-メチルアデノシン(m6A)からなる群から選択される少なくとも1つで修飾されていてもよい。

40

50

【0339】

mRNAは、ポリアデニル化されていてもよい。mRNAは、インビトロで転写される (IVT) RNAのポリアデニル化によって調製されてもよい。mRNAは、ポリ(A)末端をコードするDNAテンプレートをを用いることによって、IVTの間にポリアデニル化されてもよい。mRNAがキャッピングされてもよい。細胞における発現の効率性を最大化するために、大部分のmRNA分子がキャップを含有してもよい。

【0340】

mRNAは5' cap [m7G(5')ppp(5')G]構造を有していてもよい。当該配列はmRNAを安定化させ、転写を促進させる配列である。5' triphosphateをもつmRNAからは、脱リン酸化処理により5' triphosphateを取り除いてもよい。mRNAはAnti-Reverse Cap Analog (ARCA)として[3' O-Me-m7G(5')ppp(5')G]を有していてもよい。ARCAは転写開始点より前に挿入される配列であり、転写されるmRNAの効率は二倍となる。mRNAはPolyAテールを有していてもよい。

【0341】

誘導因子RNAは、例えば、Ngn2-T2A-Puro mRNA (TriLink、配列番号1に記載のDNAに対応するRNA)を含む。Ngn2-T2A-Puro mRNA (TriLink)をトランスフェクトされた細胞は、neurogenin2 (Ngn2)を産生し、かつ、ピューロマイシン耐性を示す。mRNAは、Anti-Reverse Cap Analog (ARCA)でキャップされ、ポリアデニル化されており、5-メチルシチジン及びプソイドウリジンで置換されていてもよい。5-メチルシチジン及びプソイドウリジンは、抗体によるmRNAの認識力を低下させる。また、配列番号2に記載のDNAに対応するRNAを用いてもよい。配列番号2に記載のDNAは、配列番号1のDNAからxba1制限部位を除去したDNAである。

【0342】

誘導因子RNAは、リポフェクション法により動物細胞に導入される。リポフェクション法とは、陰性荷電物質である核酸と、陽性荷電脂質と、の複合体を、電気的な相互作用により形成し、複合体をエンドサイトーシスや膜融合により細胞内に取り込ませる方法である。リポフェクション法は、細胞へのダメージが少なく、導入効率に優れており、操作が簡便であり、時間がかからない等の利点を有する。

【0343】

誘導因子RNAのリポフェクションには、リポフェクション試薬として、例えば、リポフェクタミン メッセンジャーマックス (登録商標)が用いられる。さらに、リポフェクション試薬としては、Lipofectamine (登録商標) RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)、Lipofectamine (登録商標) 2000、Lipofectamine (登録商標) 3000、Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific)、Stemfect RNA transfection reagent (STEMGENT)、NextFect (登録商標) RNA Transfection Reagent (BiooScientific)、Amaxa (登録商品) Human T cell Nucleofector (登録商品) kit (Lonza社、VAPA-1002)、Amaxa (登録商品) Human CD34 cell Nucleofector (登録商品) kit (Lonza社、VAPA-1003)、及びReproRNA (登録商標) トランスフェクション試薬 (STEMCELL Technologies)等を利用してよい。

【0344】

誘導因子RNAのリポフェクションの際の細胞の数は、例えば、12ウェルプレートを利用する場合、1ウェルあたり 1×10^4 個から 1×10^8 個、 5×10^4 個から 1×10^6 個、あるいは 1×10^5 個から 5×10^5 個である。なお、1ウェルの底面積は 4 cm^2 である。誘導因子RNAのリポフェクションの際の誘導因子RNAの量は、1回あたり20

0 ng から 5000 ng、400 ng から 2000 ng、あるいは 500 ng から 1000 ng である。誘導因子 RNA のリポフェクションの際のリポフェクション試薬の量は、0.1 μ L から 100 μ L、1 μ L から 50 μ L、あるいは 1.5 μ L から 10 μ L である。

【0345】

誘導因子 RNA のリポフェクションの際に用いられる培地は、例えば Opti-MEM (登録商標、Gibco) 等の低血清培地である。誘導因子 RNA のリポフェクションの際、及びその前後に用いられる培地は、B18R タンパク質を含んでいてもよい。B18R タンパク質は、細胞の先天性抗ウイルス反応を緩和する。B18R タンパク質は、細胞への RNA の挿入時に伴う免疫反応に伴う細胞死を抑制するために使用されることがある。ただし、実施の形態に係る動物細胞から体細胞を作製する方法は、短期間で動物細胞を体細胞に分化させるため、培地は B18R タンパク質を含まなくともよく、あるいは、B18R タンパク質を 0.01% から 1% のような薄い濃度で含有してもよい。

10

【0346】

誘導因子 RNA のリポフェクションから 10 日以内、9 日以内、8 日以内、あるいは 7 日以内に動物細胞が体細胞に分化する。作製される体細胞が神経系細胞である場合、神経系細胞に分化したか否かは、Ngn2、 β -III Tubulin、MAP2、Psa-NCAM、又は vGlu が陽性であるか否かによって確認される。Ngn2 は、神経系細胞分化に必要なスイッチタンパク質である。 β -III Tubulin、MAP2、Psa-NCAM、及び vGlu は、神経系細胞を標識するマーカーであり、神経細胞突起中の微小管の構成タンパク質である。

20

【0347】

誘導因子 RNA が、薬剤耐性遺伝子に対応する mRNA を含んでいた場合、リポフェクションの後、薬剤耐性を示す細胞を選択してもよい。例えば、誘導因子 RNA が、ピューロマイシン耐性遺伝子に対応する mRNA を含んでいた場合、リポフェクションの後の細胞をピューロマイシンに曝すことにより、誘導因子 RNA が導入された細胞以外を死滅させ、誘導因子 RNA が導入された細胞を選別することが可能である。誘導因子 RNA が、薬剤耐性遺伝子に対応する mRNA として、ネオマイシン、プラスタサイジン、G418、ハイグロマイシン、及びゼオシン等から選択されるいずれかを含んでいてもよい。

【0348】

以上説明した本発明の実施の形態に係る動物細胞から体細胞を作製する方法によれば、iPS/ES 細胞等を含む動物細胞に特定の遺伝子をコードする RNA を発現させることで、iPS/ES 細胞等を含む動物細胞の遺伝子に傷をつけることなく、神経系細胞等の体細胞を効率よく作製することが可能である。

30

【0349】

ホルモンや化学物質を利用して iPS/ES 細胞等から体細胞を作製する方法では、体細胞が作製されるまで非常に長い時間が必要である。これに対し、本発明の実施の形態に係る動物細胞から体細胞を作製する方法によれば、非常に短い時間で体細胞を作製することが可能である。

【0350】

また、ホルモンや化学物質を利用して iPS/ES 細胞等を含む動物細胞から体細胞を作製する方法においては、iPS/ES 細胞等を含む動物細胞のうちの一部のみが目的の体細胞になる。これに対し、本発明の実施の形態に係る動物細胞から体細胞を作製する方法によれば、RNA を導入する細胞の 90% 以上が目的の体細胞となる。

40

【0351】

さらに、ホルモンや化学物質を利用して iPS/ES 細胞等から体細胞を作製する方法においては、同じプロトコールに従っても、目的の体細胞になるクローンと、ならないクローンがあり、クローン間にばらつきが生じる。これに対し、本発明の実施の形態に係る動物細胞から体細胞を作製する方法によれば、複数のクローンで高い分化誘導効率を得ることが可能である。

50

【0352】

また、ES/iPS細胞などの未分化な細胞集団からサイトカイン等を用いて分化誘導を行って移植用細胞を作製する場合、移植用細胞の中に未分化細胞が残存する可能性がある。この残存未分化細胞は移植位置で独自に細胞分裂、増殖をし、テラトーマ等を形成する危険性がある。これに対し、本発明の実施の形態に係る動物細胞から体細胞を作製する方法によれば、薬剤耐性遺伝子も同時に発現させることができるため、誘導因子RNAが導入された細胞の薬剤選択が可能である。そのため未分化細胞の混入やテラトーマ形成などの危険性を回避することが可能であり、移植医療に適している。

【0353】

さらに、本発明の実施の形態に係る動物細胞から体細胞を作製する方法において、リポフェクション法を用いる場合、ウイルスを利用しない。そのため、幹細胞の遺伝子に傷がつかず、作製される体細胞に癌化のリスクがないため、臨床への利用が可能である。

【0354】

また、ウイルスを使用して幹細胞から体細胞を作製する方法では、ウイルスベクターを作製及び増殖させるには大腸菌が必要である。しかし、ヒト以外の生物を利用して作製した物質が導入されて作製された細胞は、臨床応用に適していない。これに対し、本発明の実施の形態に係る動物細胞から体細胞を作製する方法において、リポフェクション法を利用してRNAをiPS/ES細胞等を含む動物細胞に導入する場合がある。RNAは化学物質であり人工的に合成できるため、大腸菌等の生物を利用せず作製することが可能であり、臨床応用に適している。

【0355】

またさらに、例えば血液の細胞からiPS細胞を完全閉鎖系のクリーンな環境下で作製し、引き続き、iPS細胞から体細胞を完全閉鎖系のクリーンな環境下で作製すれば、より清潔で安全な体細胞を作製することが可能である。

【0356】

加えて、本発明の実施の形態に係る動物細胞から体細胞を作製する方法によれば、短期間で体細胞を作製することが可能であるため、mRNAの挿入時に伴う免疫反応に伴う細胞死を抑制するB18R等を使用しなくてもよく、また、使用する場合も、非常に薄い濃度にする事が可能である。

【0357】

(実施例14)

可溶化基底膜調製品(Matrigel、Corning)でコートされた12ウェルディッシュを用意し、各ウェルに10 μ mol/Lの濃度でROCK(Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho結合キナーゼ)阻害剤(Selleck)を含むフィーダーフリー培地(mTeSR(登録商標)1、STEMCELL Technologies)を入れた。ROCK阻害剤は、細胞死を抑制する。

【0358】

iPS細胞を組織・培養細胞の剥離/分離/分散溶液(Accutase、Innovative Cell Technologies)で分散させ、12ウェルディッシュにまいた。トランスフェクトされる細胞は、1ウェルあたり、4 \times 10⁵個の密度でまかれた。なお、1ウェルの底面積は4cm²であった。トランスフェクトされないコントロール細胞は、1ウェルあたり、2 \times 10⁵個の密度でまかれた。その後、細胞を、フィーダーフリー培地中で24時間培養した。この際、温度は37 $^{\circ}$ C、CO₂濃度は5%、酸素濃度は25%以下であった。

【0359】

1.25mLのゼノフリー培地(Pluriton、STEMGENT)と、0.5 μ LのPluriton Supplement(STEMGENT)と、2 μ Lの濃度が100ng/ μ LのB18R組み換えタンパク質含有液(eBioscience)と、を混合し、トランスフェクション培地を用意した。トランスフェクションの前に各ウェル

10

20

30

40

50

のフィーダーフリー培地をトランスフェクション培地に交換し、37 で2時間、細胞を培養した。

【0360】

緑色蛍光タンパク質 (GFP) mRNA (TriLink) と、を用意した。mRNA は、Anti-Reverse Cap Analog (ARCA) でキャップされ、ポリアデニル化されており、5 -メチルシチジン及びプソイドウリジンで置換されていた。

【0361】

さらに、1.5 mL のマイクロ遠心分離チューブ A と、1.5 mL のマイクロ遠心分離チューブ B と、をそれぞれウェルの数だけ用意した。

【0362】

チューブ A に、62.5 μ L の低血清培地 (Opti-MEM (登録商標)、Gibco) を入れ、そこに1.875 μ L の mRNA 導入用試薬 (Lipofectamine Messenger Max (登録商標)、Invitrogen) を加え、よく混ぜて第1の反応液とした。その後、室温で10分間、第1の反応液が混合するよう、チューブ A を軽くたたいた。

【0363】

チューブ B に、62.5 μ L の低血清培地 (Opti-MEM (登録商標)、Gibco) を入れ、500 ng の GFP mRNA (TriLink) を加え、よく混ぜて第2の反応液とした。

【0364】

第2の反応液をチューブ A 内の第1の反応液に加えて混合反応液とし、その後、室温で5分間、リボソームが形成されるよう、チューブ A を軽くたたいた。次に、混合反応液をそれぞれのウェルに加え、37 で一晩静置した。これにより、それぞれのウェルに、500 ng の GFP mRNA が加えられた。

【0365】

その翌日に蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察したところ、図37及び図38に示すように、メッセンジャーマックスを利用してトランスフェクションした細胞が最も強く発色していた。さらに、図39に示すように、生存率もメッセンジャーマックスを利用したものが一番高かった。このことから、メッセンジャーマックスが mRNA を導入するうえで一番適していることを明らかにした。さらに、リポフェクション試薬と RNA を用いて iPS 細胞に mRNA を導入し、タンパク質を発現させることが可能である事が示された。

【0366】

(実施例15)

可溶化基底膜調製品 (Matrigel, Corning) でコートされた12ウェルディッシュを用意し、各ウェルに10 μ mol/L の濃度で ROCK (Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho 結合キナーゼ) 阻害剤 (Selleck) を含むフィーダーフリー培地 (mTeSR (登録商標) 1, STEMCELL Technologies) を入れた。ROCK 阻害剤は、細胞死を抑制する。

【0367】

iPS 細胞を組織・培養細胞の剥離/分離/分散溶液 (Accutase, Innovative Cell Technologies) で分散させ、12ウェルディッシュにまいた。トランスフェクトされる細胞は、1ウェルあたり、 4×10^5 個の密度でまかれた。トランスフェクトされないコントロール細胞は、1ウェルあたり、 2×10^5 個の密度でまかれた。その後、細胞を、フィーダーフリー培地中で24時間培養した。

【0368】

1.25 mL のゼノフリー培地 (Pluriton, STEM GENT) と、0.5 μ L の Pluriton Supplement (STEM GENT) と、2 μ L の濃度が100 ng/ μ L の B18R 組み換えタンパク質含有液 (eBioscience) と、を混合し、トランスフェクション培地を用意した。トランスフェクションの前に各ウェル

10

20

30

40

50

のフィーダーフリー培地をトランスフェクション培地に交換し、37℃で2時間、細胞を培養した。

【0369】

Ngn2-T2A-Puro mRNA (Trilink)と、緑色蛍光タンパク質 (GFP) mRNA (Trilink)と、を用意した。mRNAは、Anti-Reverse Cap Analog (ARCA)でキャップされ、ポリアデニル化されており、5-メチルシチジン及びプソイドウリジンで置換されていた。また、mRNAは、シリカ膜で精製されており、mRNA導入用試薬 (Lipofectamine Messenger Max (登録商標)、Invitrogen)とともに、pH6の1mmol/Lのクエン酸ナトリウムを溶媒とする溶液によってされる。さらに、1.5mLのマイクロ遠心分離チューブAと、1.5mLのマイクロ遠心分離チューブBと、を、それぞれウェルの数だけ用意した。

10

【0370】

チューブAに、62.5μLの低血清培地 (Opti-MEM (登録商標)、Gibco)を入れ、そこに1.875μLのmRNA導入用試薬 (Lipofectamine Messenger Max (登録商標)、Invitrogen)を加え、よく混ぜて第1の反応液とした。その後、室温で10分間、第1の反応液が混合するよう、チューブAを軽くたたいた。

【0371】

チューブBに、62.5μLの低血清培地 (Opti-MEM (登録商標)、Gibco)を入れ、そこに500ngのNgn2-T2A-Puro mRNA (Trilink)と1500ngのGFP mRNA (Trilink)を加え、よく混ぜて第2の反応液とした。

20

【0372】

第2の反応液をチューブA内の第1の反応液に加えて混合反応液とし、その後、室温で5分間、リポソームが形成されるよう、チューブAを軽くたたいた。次に、混合反応液をそれぞれのウェルに加え、37℃で一晩静置した。これにより、それぞれのウェルに、500ngのNgn2 mRNAと、100ngのGFP mRNAが加えられた。

【0373】

mRNA導入後、一日目に観察したところ、図40に示すように、メッセンジャーマックスを利用してトランスフェクションした細胞が最も強く発色していた。

30

【0374】

その後の2日間、1日ごとに、培地を、10μmol/Lの濃度でROCK阻害剤 (Sellect)と、1mg/Lの濃度で抗生物質 (ピューロマイシン)を含む、神経分化培地 (N2/DMEM/F12/NEAA、Invitrogen)で完全に交換し、mRNAがトランスフェクトされた細胞をセレクションした。3日目に、培地を、200ng/mLの濃度でB18R組み換えタンパク質含有液 (eBioscience)を含む神経分化培地 (N2/DMEM/F12/NEAA、Invitrogen)で置き換えた。その後、7日目までに、同じ培地で半量ずつ培地交換した。

【0375】

7日目にウェルから培地を除き、1mLのPBSで洗った。その後、4%PFAを入れ15min4℃で反応させ、固定した。その後PBSで2回洗浄後、5%CCS, 0.1%トライトン in PBS培地で一次抗体を希釈し、500μL添加した。一次抗体としては、ウサギ抗ヒトTuj1抗体 (BioLegend 845501)及びマウス抗ラット及びヒトNgn2抗体 (Rand D Systems)を利用し、ウサギ抗ヒトTuj1抗体 (BioLegend 845501)をバッファで1/1000希釈、又はマウス抗ラット及びヒトNgn2抗体 (Rand D Systems)をバッファで1/75希釈し、さらにDAPIをバッファで1/10000希釈したものを各ウェルに添加し、室温で一時間反応させた。Tuj1抗体は、III Tubulinに対する抗体である。

40

50

【0376】

室温で一時間反応後、各ウェルに1 mLのPBSを添加し、ウェルによくなじませた後、PBSを廃棄した。再度、PBSを添加、廃棄し、透過バッファ中に、1/1000希釈のロバ抗マウスIgG(H+L)二次抗体Alexa Fluor(登録商標)555複合体(ThermoFisher)を1/1000希釈のロバ抗ウサギIgG(H+L)二次抗体Alexa Fluor(登録商標)647複合体(ThermoFisher)を含む、二次抗体含有透過バッファを500 µLずつ添加し、室温で30分間反応させた。

【0377】

室温で30分反応後、細胞をPBSで2回洗浄し、蛍光顕微鏡で観察し、蛍光を発している細胞をカウントした。

10

【0378】

図41は、Ngn2-T2A-Puro mRNAをリポフェクションを用いて導入し、その後、ピューロマイシンを添加し2日間培養後、さらにピューロマイシンを添加せず5日間培養して、Tuj1で染色して蛍光顕微鏡で観察した写真である。図42は上記の手順によって各トランスフェクション試薬を利用して、Ngn2-T2A-Puro mRNAをトランスフェクションし、7日目にTUJ-1陽性細胞の割合を示したものである。RNAiMAX, StemfectにくらべてMessengerMAXは4倍以上、iPS細胞を神経系細胞へ変化させる能力が高いことが示された。

図43は、Ngn2-T2A-Puro mRNAを3回のリポフェクションを用いて導入し、その後、ピューロマイシンを添加し6日間培養後、さらにピューロマイシンを添加せず16日間培養して、MAP2(Sigma Cat#M4403)及びvGlut(Synaptic Systems Cat#135302)で染色して、蛍光顕微鏡で観察した細胞の写真である。

20

【0379】

(実施例16)

可溶化基底膜調製品(Matrigel, Corning)でコートされた12ウェルディッシュを用意し、各ウェルに10 µmol/Lの濃度でROCK(Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho結合キナーゼ)阻害剤(Selleck)を含むフィーダーフリー培地(mTeSR(登録商標)1, STEMCELL Technologies)を入れた。

30

【0380】

iPS細胞を組織・培養細胞の剥離/分離/分散溶液(Accutase, Innovative Cell Technologies)で分散させ、12ウェルディッシュにまいた。トランスフェクトされる細胞は、1ウェルあたり、 4×10^5 個の密度でまかれた。トランスフェクトされないコントロール細胞は、1ウェルあたり、 1×10^5 個の密度でまかれた。その後、細胞を、フィーダーフリー培地中で24時間培養した。この際、温度は37、CO₂濃度は5%、酸素濃度は25%以下であった。

【0381】

1.25 mLのゼノフリー培地(Pluriton, STEMGENT)と、0.5 µLのPluriton Supplement(STEMGENT)と、2 µLの濃度が100 ng/µLのB18R組み換えタンパク質含有液(eBioscience)と、を混合し、B18R含有トランスフェクション培地を用意した。また、1.25 mLのゼノフリー培地(Pluriton, STEMGENT)と、0.5 µLのPluriton Supplement(STEMGENT)と、を混合し、B18R非含有トランスフェクション培地を用意した。

40

【0382】

トランスフェクションの前に各ウェルのフィーダーフリー培地をB18R含有トランスフェクション培地又はB18R非含有トランスフェクション培地に交換し、37で2時間、細胞を培養した。

50

【0383】

Ngn2-T2A-Puro mRNA (Trilink)と、GFP mRNA (Trilink)と、を用意した。mRNAは、Anti-Reverse Cap Analog (ARCA)でキャップされ、ポリアデニル化されており、5-メチルシチジン及びプソイドウリジンで置換されていた。

【0384】

さらに、1.5 mLのマイクロ遠心分離チューブAと、1.5 mLのマイクロ遠心分離チューブBと、を、それぞれウェルの数だけ用意した。

【0385】

チューブAに、62.5 μ Lの低血清培地 (Opti-MEM (登録商標)、Gibco)を入れ、そこに1.875 μ LのmRNA導入用試薬 (Lipofectamine Messenger Max (登録商標)、Invitrogen)を加え、よく混ぜて第1の反応液とした。その後、室温で10分間、第1の反応液が混合するよう、チューブAを軽くたたいた。

10

【0386】

チューブBに、62.5 μ Lの低血清培地 (Opti-MEM (登録商標)、Gibco)を入れ、そこに500 ngのNgn2-T2A-Puro mRNA (Trilink)と100 ngのGFP mRNA (Trilink)を加え、よく混ぜて第2の反応液とした。

【0387】

第2の反応液をチューブA内の第1の反応液に加えて混合反応液とし、その後、室温で5分間、リボソームが形成されるよう、チューブAを軽くたたいた。次に、混合反応液をそれぞれのウェルに加え、37 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。これにより、それぞれのウェルに、500 ngのNgn2 mRNAと、100 ngのGFP mRNAが加えられた。また、図44に示すように、1回トランスフェクションを行ったサンプル、2回トランスフェクションを行ったサンプル、及び3回トランスフェクションを行ったサンプルを用意した。

20

【0388】

その後の2日間、1日ごとに、培地を、10 μ mol/Lの濃度でROCK阻害剤 (Sellect)と、1 mg/Lの濃度で抗生物質 (ピューロマイシン)を含む、神経分化培地 (N2/DMEM/F12/NEAA、Invitrogen)で完全に交換し、mRNAがトランスフェクトされた細胞をセレクトした。3日目に、培地を、200 ng/mLの濃度でB18R組み換えタンパク質含有液 (eBioscience)を含む神経分化培地 (N2/DMEM/F12/NEAA、Invitrogen)で置き換えた。その後、7日目までに、同じ培地で半量ずつ培地交換した。

30

【0389】

7日目にウェルから培地を除き、1 mLのPBSで洗った。その後、4% PFAを入れ15 min 4 $^{\circ}$ Cで反応させ、固定した。その後PBSで2回洗浄後、PBS中に5%のCS及び0.1%のTriton Xを含む透過バッファで希釈した一次抗体を各ウェルに50 μ Lずつ添加し、室温で1時間反応させた。一次抗体は、マウス抗ヒトTuj1抗体 (BioLegend 845501)を1:1000で、マウス抗ヒトNgn2抗体 (Rand D Systems, MAB3314-SP)を1:150となるよう透過バッファで希釈したものであり、さらにDAPIが1:10,000になるよう添加した。

40

【0390】

一時間後、各ウェルに1 mLのPBSを添加し、ウェルによくなじませた後、PBSを廃棄した。再度、PBSを添加、廃棄し、透過バッファ中にロバ抗マウスIgG (H+L)二次抗体Alexa Fluor (登録商標) 555複合体 (ThermoFisher, A-21428)を1:1000で、ロバ抗ウサギIgG (H+L)二次抗体Alexa Fluor (登録商標) 647複合体 (ThermoFisher, A31573)を1:1000で含む、二次抗体含有透過バッファを500 μ L添加し、室温で30分反応させた。

50

【 0 3 9 1 】

細胞をPBSで2回洗浄し、蛍光顕微鏡で観察し、蛍光を発している細胞をカウントした。その結果、図45に示すように、mRNAを一回だけトランスフェクションしたものは、9日目にはGFPはほとんど発現していなかった。その一方で、mRNAを3回トランスフェクションしたものは、9日目においてもGFPが発現していた。このことから、mRNAは細胞内で分解され、タンパク質の発現は一過性であることが明らかとなった。図46は、mRNAを3回トランスフェクトし、7日目においてGFPを発現していた細胞の拡大画像である。

【 0 3 9 2 】

以上示したように、iPS細胞を播種後、RNAをトランスフェクションして数日で神経系細胞に誘導できることが示された。また、短期間で神経系細胞に誘導できることから、細胞へのRNAの挿入時に伴う免疫反応に伴う細胞死を抑制するために通常使用されるB18Rタンパク質を培地に含めなくともよいことが示された。

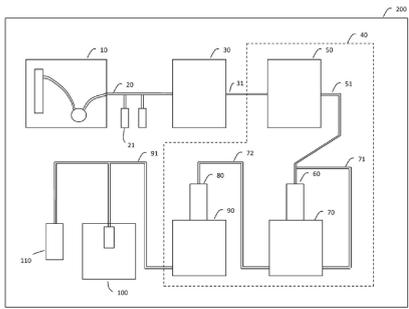
【 符号の説明 】

【 0 3 9 3 】

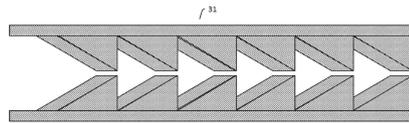
1 0	分離装置	
2 0	導入前細胞送液路	
2 1	誘導因子送液機構	
3 0	因子導入装置	
3 1	導入細胞送液路	20
4 0	細胞塊作製装置	
5 0	初期化培養装置	
5 1	細胞塊送液路	
6 0	分割機構	
7 0	拡大培養装置	
7 1	拡大培養送液路	
7 2	細胞塊送液路	
8 0	分割機構	
9 0	細胞塊搬送機構	
9 1	パッケージ前細胞流路	30
1 0 0	パッケージ装置	
1 1 0	凍結保存液送液機構	
2 0 0	容器	

【図面】

【図 1】

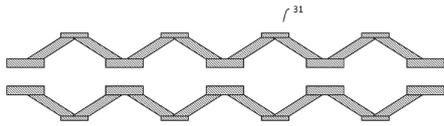


【図 2】

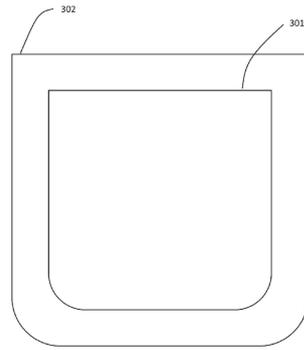


10

【図 3】

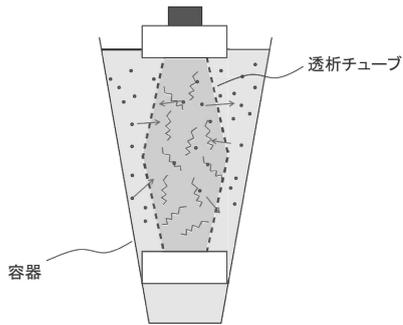


【図 4】

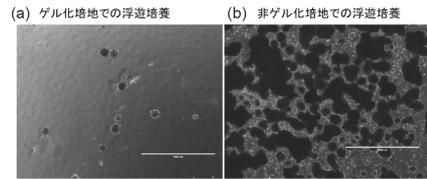


20

【図 5】



【図 6】

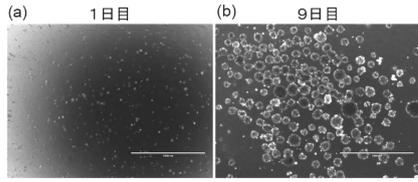


30

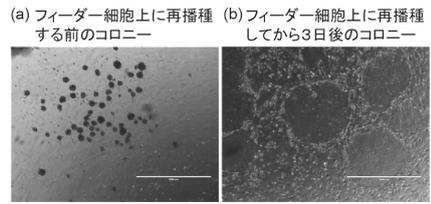
40

50

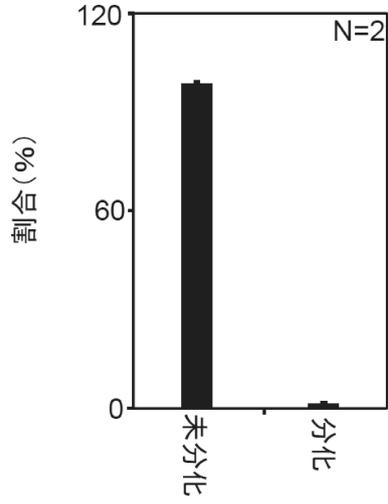
【図 7】



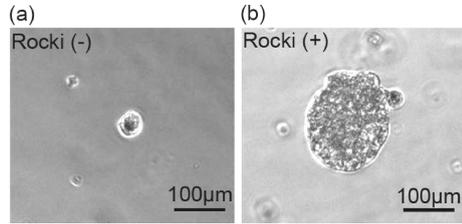
【図 8】



【図 9】



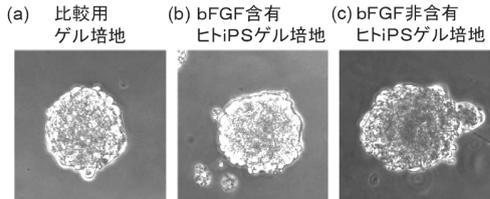
【図 10】



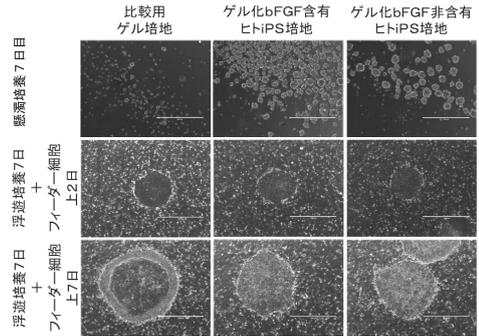
10

20

【図 11】



【図 12】

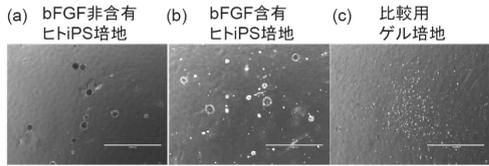


30

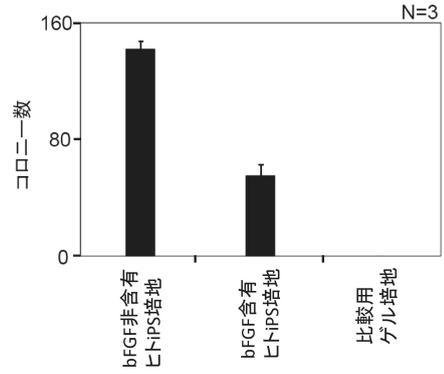
40

50

【図 1 3】

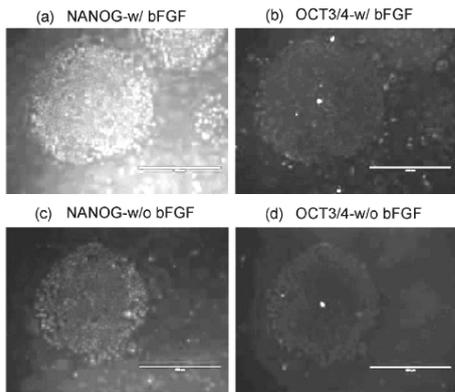


【図 1 4】

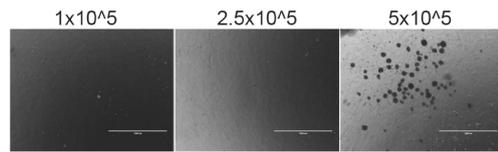


10

【図 1 5】

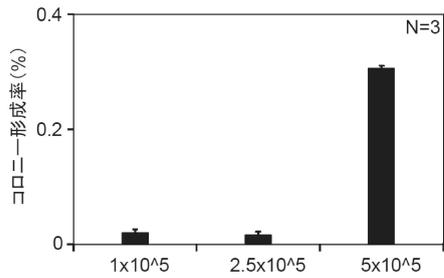


【図 1 6】

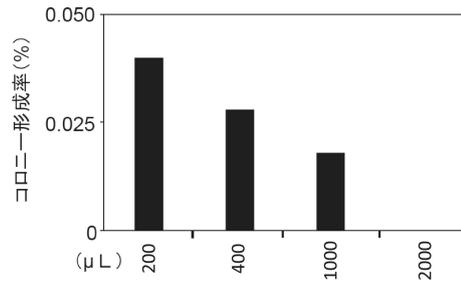


20

【図 1 7】



【図 1 8】

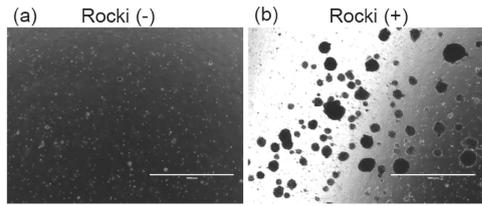


30

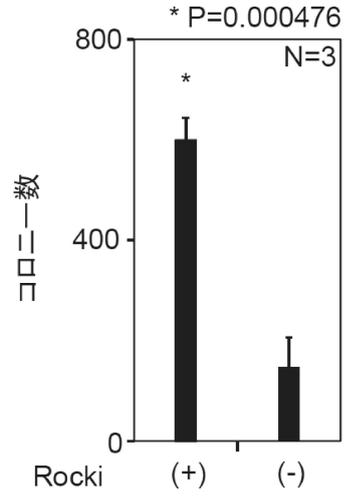
40

50

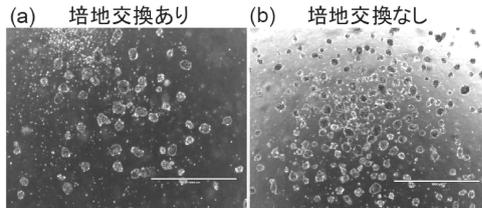
【図 19】



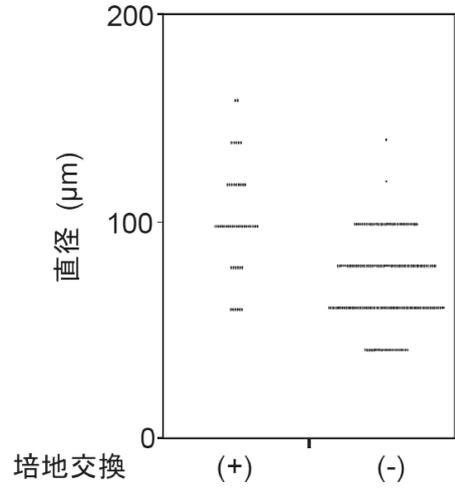
【図 20】



【図 21】



【図 22】



10

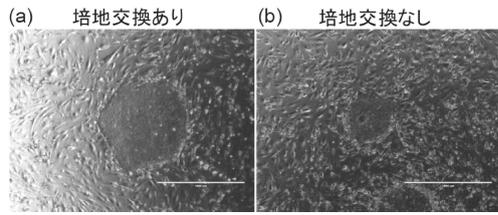
20

30

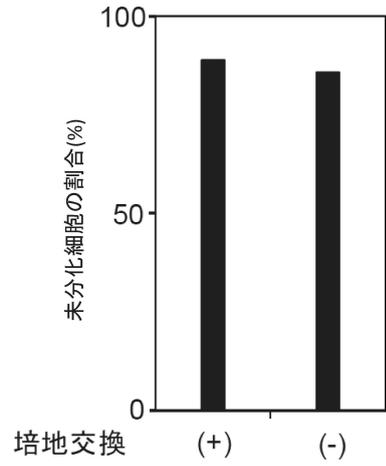
40

50

【図 2 3】

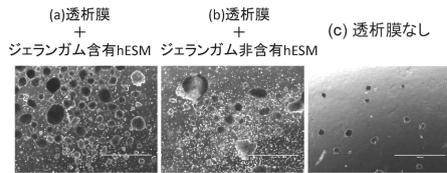


【図 2 4】

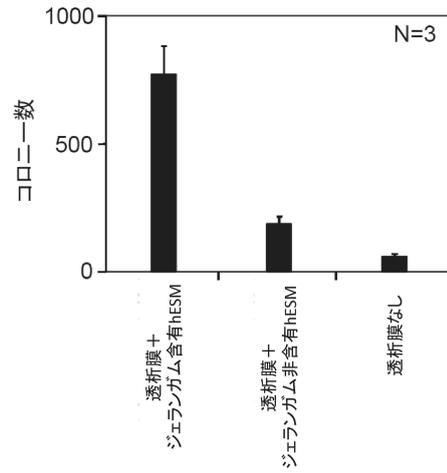


10

【図 2 5】



【図 2 6】



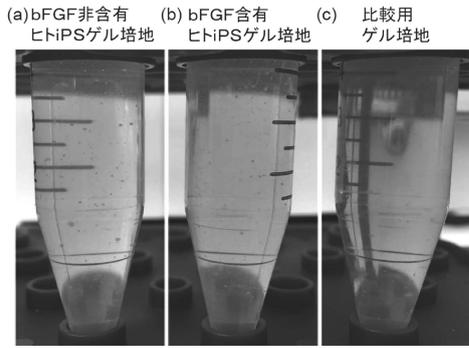
20

30

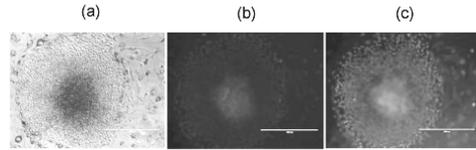
40

50

【図 27】

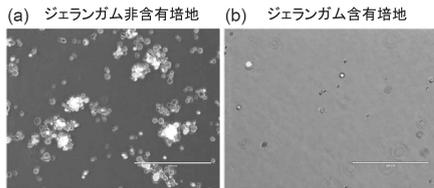


【図 28】

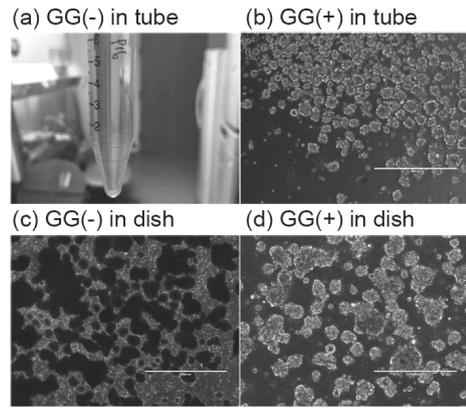


10

【図 29】

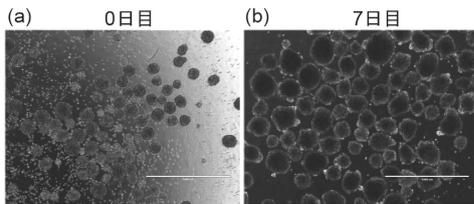


【図 30】

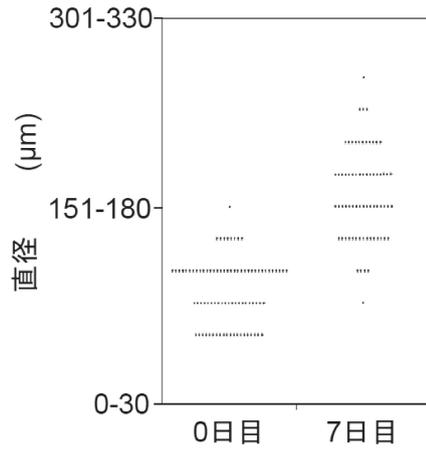


20

【図 31】



【図 32】



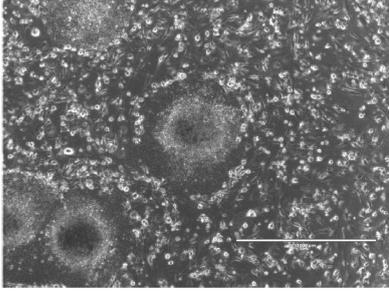
30

40

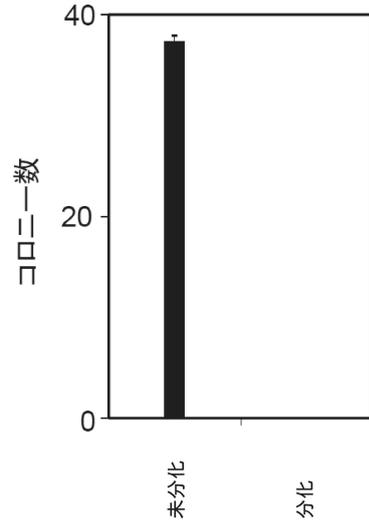
50

【図 3 3】

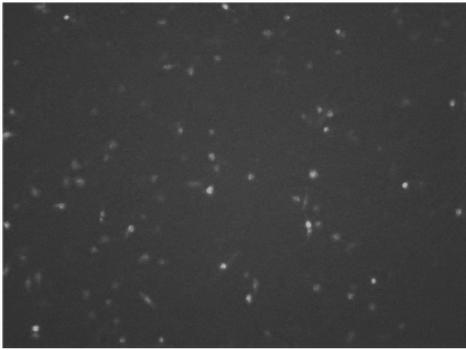
フィーダー細胞上に再播種してから3日後のコロニー



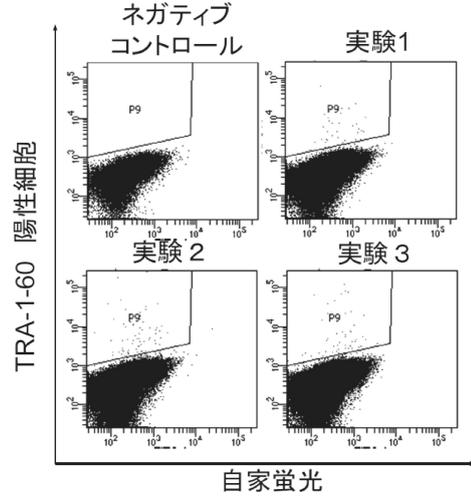
【図 3 4】



【図 3 5】



【図 3 6】



10

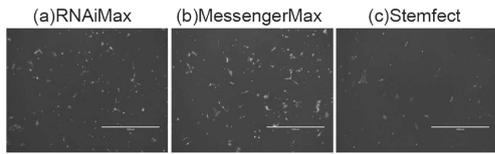
20

30

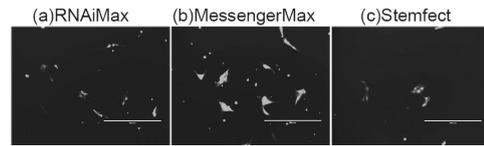
40

50

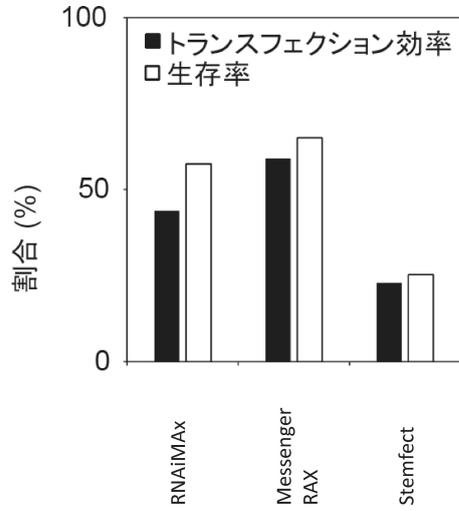
【図 3 7】



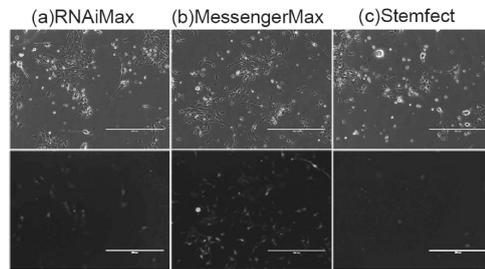
【図 3 8】



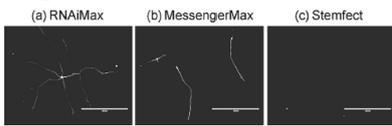
【図 3 9】



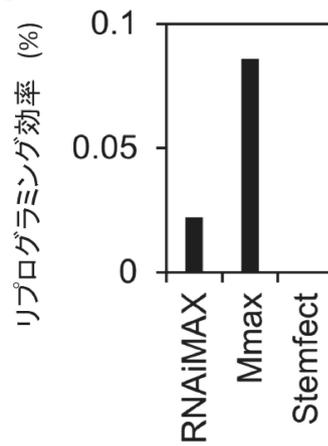
【図 4 0】



【図 4 1】



【図 4 2】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 特願2015-170797(P2015-170797)

(32)優先日 平成27年8月31日(2015.8.31)

(33)優先権主張国・地域又は機関

日本国(JP)

弁理士 江口 昭彦

(74)代理人 100134120

弁理士 内藤 和彦

(72)発明者 田邊 剛士

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 3 , パロアルト , サン アントニオ ロード 8 0 9 ,
スイート 7

(72)発明者 ケリー ブランダン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 3 , パロアルト , サン アントニオ ロード 8 0 9 ,
スイート 7

(72)発明者 須藤 健太

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 3 , パロアルト , サン アントニオ ロード 8 0 9 ,
スイート 7

合議体

審判長 福井 悟

審判官 飯室 里美

審判官 藤井 美穂

(56)参考文献 特表2012-528599(JP,A)

特表2005-521405(JP,A)

国際公開第2009/096614(WO,A1)

国際公開第2014/017513(WO,A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N5/00

B I O S I S / M E D L I N E / C A p l u s / E M B A S E (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)