

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6940835号
(P6940835)

(45) 発行日 令和3年9月29日(2021.9.29)

(24) 登録日 令和3年9月7日(2021.9.7)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10 Z N A
C 1 2 N 5/071 (2010.01) C 1 2 N 5/071

請求項の数 4 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2016-572120 (P2016-572120)	(73) 特許権者	504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
(86) (22) 出願日	平成28年1月27日 (2016.1.27)	(73) 特許権者	000108454 ソマール株式会社 東京都中央区銀座四丁目11番2号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2016/052398	(74) 代理人	100096714 弁理士 本多 一郎
(87) 国際公開番号	W02016/121840	(72) 発明者	酒井 康行 日本国東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
(87) 国際公開日	平成28年8月4日 (2016.8.4)	(72) 発明者	堀口 一樹 日本国東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
審査請求日	平成31年1月25日 (2019.1.25)		
(31) 優先権主張番号	特願2015-16045 (P2015-16045)		
(32) 優先日	平成27年1月29日 (2015.1.29)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞の培養方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

浮遊培養による細胞の培養方法であって、

前記細胞の細胞接着分子を阻害する物質（但し、ボツリヌス菌由来のヘマグルチニンを除く）を培地中に添加して浮遊培養し、前記細胞の細胞凝集を制御する凝集制御工程、及び、

前記凝集制御工程で得られた細胞の凝集体を、前記細胞接着分子を阻害する物質を含まない培地中で浮遊培養する工程を含み、

前記細胞接着分子を阻害する物質が、(1) E - カドヘリン、(2) E - カドヘリンの細胞外領域とアミノ酸配列の同一性が90%以上であり、かつE - カドヘリンと同種親和性の結合能を有するタンパク質、及び、(3) E - カドヘリンの細胞外領域とアミノ酸配列の同一性が90%以上の領域を含み、かつE - カドヘリンと同種親和性の結合能を有する融合タンパク質の中から選ばれる少なくとも1種を含有することを特徴とする培養方法

10

【請求項2】

前記凝集制御工程において、前記培地中に前記細胞接着分子を阻害する物質を10~50 μg/mlの濃度で含有するように添加することを特徴とする請求項1記載の培養方法

【請求項3】

前記細胞が、幹細胞または上皮細胞である請求項1または2記載の培養方法。

20

【請求項4】

請求項1～3のいずれか一項記載の培養方法で、細胞を培養することを特徴とする細胞の凝集体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞の培養方法、細胞の凝集体、細胞凝集制御剤、及び、培地に関し、詳しくは、細胞の凝集塊の径を制御すること、及び、細胞を大量に得ることが可能な細胞の培養方法、該方法により得られる細胞の凝集体、細胞凝集制御剤、及び、該細胞凝集制御剤を含有する培地に関するものである。

10

【背景技術】

【0002】

通常、ヒトの肝臓は約2500億個の細胞で構成されている。多能性幹細胞を用いて肝臓を組織化する場合、元の肝臓の1割程度が必要になると考えた場合、細胞数としては約250億個の細胞が必要になる。また、薬物試験でも均一な品質（以下「均質」とも言う）の細胞で試験を行う必要があることから多能性幹細胞を均質でかつ大量に培養する技術は産業への応用展開には不可欠なプロセスである。このような背景から多能性幹細胞を安定的に大量供給するために、簡便かつ高密度な培養が可能であることから浮遊培養法が提案されている。この培養方法は再生医療等への応用に堪えうる細胞数を得られることが期待されている培養方法の一つで、特に設備面及びコスト面で有利である。

20

【0003】

しかしながら、多能性幹細胞は凝集体を形成し易いため、巨大凝集体を形成したり、得られる凝集体の径が不均一であるなど、様々な凝集体を形成する。また、このような凝集体は継代時の細胞生存率が低い等という問題があった。そこで培養容器中での細胞及び細胞塊の沈降を防止するためにスピナーフラスコ等を用いた攪拌操作を伴う三次元浮遊培養法が提案されている（非特許文献1及び非特許文献2参照）。しかしながら多能性幹細胞が攪拌操作により発生する力学的ストレスに敏感であるため、培養中に細胞にダメージが発生する可能性があり、ストレスによる質の低下が発生するという点で問題がある。

【0004】

そこで近時、培養バッグ中に培養液、メチルセルロース及びジェランガムを含有させ、その中で多能性幹細胞を培養し、継代時にナイロンメッシュフィルターを用いて多能性幹細胞スフェアを分解することが提案されている（非特許文献3参照）。しかしながら、この方法では、得られる細胞の数の面で満足できるものではなかった。さらに、ジェランガムにより細胞及び細胞塊の沈降を防止するために培養液の粘度を上昇させているため、細胞が増殖するのに最低限必要な栄養と酸素を供給する程度の攪拌をもすることができないことから、大きな細胞塊とする場合は内側の細胞が生存できなくなり、細胞の質が低下するという問題がある。また、得られる細胞塊の細胞すべてを生存させようとして、細胞塊を大きく成長させない場合は得られる細胞数が少なくなるという問題がある。このようなことから、この培養方法から得られる幹細胞は細胞の質及び得られる細胞数の両方を同時に満足できるものではなかった。

30

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Vol. 92, NO. 7, 920~933, DECEMBER 30, 2005

【0006】

【非特許文献2】TISSUE ENGINEERING: Part C Vol. 18, NO. 10, 1~13, 2012

【0007】

【非特許文献3】Stem Cell Reports, Vol. 2, 734~745,

50

May 6, 2014

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

そこで本発明の目的は、細胞の凝集塊の径を制御すること、及び、細胞を大量に得ることが可能な細胞の培養方法、該方法により得られる細胞の凝集体、細胞凝集制御剤、及び、該細胞凝集制御剤を含有する培地を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者等は鋭意検討した結果、培地中に細胞接着分子を阻害する物質を含有させることによって、凝集体の形成に關与する細胞接着分子の機能を制御することが可能であること、及び、これによって浮遊培養において凝集体の径を制御することによって、上記課題を解決しうることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】

即ち、本発明は、細胞の培養方法に関する、以下の[1]~[4]である。

[1] 浮遊培養による細胞の培養方法であって、

前記細胞の細胞接着分子を阻害する物質（但し、ボツリヌス菌由来のヘマグルチニンを除く）を培地中に添加して浮遊培養し、前記細胞の細胞凝集を制御する凝集制御工程、及び、

前記凝集制御工程で得られた細胞の凝集体を、前記細胞接着分子を阻害する物質を含まない培地中で浮遊培養する工程を含み、

前記細胞接着分子を阻害する物質が、(1) E-カドヘリン、(2) E-カドヘリンの細胞外領域とアミノ酸配列の同一性が90%以上であり、かつE-カドヘリンと同種親和性の結合能を有するタンパク質、及び、(3) E-カドヘリンの細胞外領域とアミノ酸配列の同一性が90%以上の領域を含み、かつE-カドヘリンと同種親和性の結合能を有する融合タンパク質の中から選ばれる少なくとも1種を含有することを特徴とする培養方法。

[2] 前記凝集制御工程において、前記培地中に前記細胞接着分子を阻害する物質を10~50 µg/mlの濃度で含有するように添加することを特徴とする前記[1]記載の培養方法。

[3] 前記細胞が、幹細胞または上皮細胞である前記[1]または[2]のいずれかに記載の培養方法。

[4] 前記[1]~[3]のいずれかに記載の培養方法で、細胞を培養することを特徴とする細胞の凝集体の製造方法。

【発明の効果】

【0011】

本発明により、細胞の凝集塊の径を制御し、細胞を大量に得ることが可能な細胞の培養方法、該方法により得られる細胞の凝集体、細胞凝集制御剤、及び、該細胞凝集制御剤を含有する培地を提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】本発明の培養方法の一実施形態を示す説明図である。

【図2】実施例1-1~1-5及び比較例1-1で得られた、E-カドヘリン-Fcの使用量を0、5、10、20、50及び100 µg/mlの範囲でそれぞれ処理し、5日間ヒトiPS細胞を旋回浮遊懸濁培養した際の凝集体の形状を位相差顕微鏡で撮影した写真図((A)~(F))である。スケールバーは500 µmを示す。

【図3】実施例1-1~1-5及び比較例1-1で用いた培地から測定した細胞のグルコース消費量を示すグラフ図である。

【図4】実施例1-1~1-5及び比較例1-1で5日間培養して回収した細胞の培地1 ml当たりの密度を示すグラフ図である。

10

20

30

40

50

【図5】実施例2-1~2-3及び比較例2-1で得られた、それぞれリコンビナントE-カドヘリン(10 μ g/ml)、E-カドヘリン抗体(16 μ g/ml)、及び、E-カドヘリン-Fc(10 μ g/ml)で処理、並びに、細胞接着分子を阻害する物質を添加せずに処理し、1日間ヒトiPS細胞を旋回浮遊懸濁培養した際の凝集体の形状を位相差顕微鏡で撮影した写真図((A)~(D))である。スケールバーは500 μ mを示す。

【図6】実施例3-1、3-2及び比較例3-1で得られた、E-カドヘリン-Fcの使用量を0、50及び100 μ g/mlの範囲でそれぞれ処理し、2日間ヒトiPS細胞を旋回浮遊懸濁培養した際の凝集体の形状を位相差顕微鏡で撮影した写真図((A)~(C))である。スケールバーは500 μ mを示す。

10

【図7】実施例3-1、3-2及び比較例3-1で得られた、E-カドヘリン-Fcの使用量を0、50及び100 μ g/mlの範囲でそれぞれ処理し、5日間ヒトiPS細胞を旋回浮遊懸濁培養した際の凝集体の形状を位相差顕微鏡で撮影した写真図((A)~(C))である。スケールバーは500 μ mを示す。図7(C)の凝集体の形態はピペッティングの際に変形したものと考えられる。

【図8】実施例3-1、3-2及び比較例3-1で用いた培地から測定した細胞のグルコース消費量を示すグラフ図である。

【図9】実施例3-1、3-2及び比較例3-1で5日間培養して回収した細胞の培地1ml当たりの密度を示すグラフ図である。

【発明を実施するための形態】

20

【0013】

本発明の培養方法は、浮遊培養による細胞の培養方法であって、前記細胞の細胞接着分子を阻害する物質を培地中に添加し、前記細胞の細胞凝集を制御する凝集制御工程を含むことを特徴とするものである。また、本発明の培養方法によれば、凝集体の径を均一に制御することにより均一な質の細胞を大量に培養することも可能である。

【0014】

下記に詳述するように、浮遊培養に用いる細胞を得る方法は特に限定されない。また、細胞は、E-カドヘリンを有する細胞であることが好ましく、幹細胞又は上皮細胞であることがより好ましい。

【0015】

30

前記細胞の細胞接着分子を阻害する物質としては、細胞接着分子、細胞接着分子の一部の領域からなるタンパク質、細胞接着分子の全部または一部の領域を含む融合タンパク質、細胞接着分子の中和抗体、細胞接着分子と結合するペプチド、及び、これらの誘導体の中から選ばれる少なくとも1種であることが好ましい。前記細胞接着分子は、カドヘリン・ファミリーに属する分子であることがより好ましい。前記カドヘリン・ファミリーに属する分子は、E-カドヘリンであるか、又は当該分子と構造的に類似性を有する分子であってE-カドヘリンに係るEC1ドメイン並びにEC2ドメイン、EC3ドメイン、EC4ドメイン及びEC5ドメインのうち1つ以上のドメインを含み、かつ、前記多能性幹細胞と同種親和性の結合能を有する分子であることが好ましい。

【0016】

40

また、前記細胞の細胞接着分子を阻害する物質としては、E-カドヘリン、E-カドヘリンの一部の領域からなるタンパク質、E-カドヘリンの全部または一部の領域を含む融合タンパク質、E-カドヘリンの中和抗体、E-カドヘリンと結合するペプチド、及び、これらの誘導体の中から選ばれる少なくとも1種であることがより好ましい。

【0017】

また、前記凝集制御工程の後に、得られた細胞の凝集体を、前記細胞接着分子を阻害する物質を含まない培地中で浮遊培養してもよい。これは、前記凝集制御工程において初期の凝集体の径を均一に制御すれば、その後の培養において前記細胞接着分子を阻害する物質を含まない培地中で浮遊培養しても、凝集体の大きさを均一に制御できるからである。このように後で前記細胞接着分子を阻害する物質を含まない培地中で浮遊培養することは

50

、細胞数を増やす観点から好ましい。

【0018】

本発明の細胞の培養方法の具体的な一実施形態として、ヒトiPS細胞を用いた一例を、図1を参照しつつ説明するが、本発明はこれに限定されない。まず、浮遊培養するための細胞を得るために、一般的な培養基材であるマトリゲル上に接着しているヒトiPS細胞を酵素処理によって剥離し(図1(A))、回収する(図1(B))。前記凝集制御工程として、回収したiPS細胞と、iPS細胞の細胞接着分子を阻害する物質であるE-カドヘリン-Fc融合タンパク質とを混合し、浮遊培養することで細胞同士の接着阻害処理を行う(図1(C))。E-カドヘリンはヒトiPS細胞の細胞間接着を司る膜タンパクであり、E-カドヘリン-Fc融合タンパク質はE-カドヘリンの接着ドメインに抗体のFcタグを付けたリコンビナントタンパクであり、ヒトiPS細胞上のE-カドヘリン接着ドメインにE-カドヘリン-Fc融合タンパク質を接着させることで、細胞同士のE-カドヘリンを用いた接着を阻害する。他のE-カドヘリン阻害物質としては、例えばリコンビナントE-カドヘリン、E-カドヘリン抗体、E-カドヘリン阻害ペプチド等が挙げられる。この処理時間は1日から2日間程度で、その間シェーカーを用いて巡回培養を行う。前記処理後、通常の培養液に交換し、その後毎日培地交換を行う(図1(D))。

10

【0019】

本発明を実施するための形態を、以下に詳細に説明する。尚、本明細書中に使用するとき、用語「多能性幹細胞」とは、*in vitro*培養により未分化状態を保ったまま、ほぼ永続的または長期間の細胞増殖が可能であり、正常な核(染色体)型を呈し、適当な条件下において三胚葉(外胚葉、中胚葉、および内胚葉)すべての系譜の細胞に分化する能力をもった細胞をいう。「多能性幹細胞」は、初期胚より単離されるES細胞、iPS細胞及びその類似細胞であり、胎児期の始原生殖細胞から単離されるEG細胞を含むが、これに限定されない。本明細書中、「ES細胞」と表記した場合は「EG細胞」も含むこともある。

20

【0020】

本明細書中に使用するとき、用語「未分化性」とは、多能性幹細胞において、少なくとも1つ以上の未分化マーカー、例えばALP活性やOct-3/4遺伝子(産物)の発現、または種々の抗原分子の発現により確認することができる未分化な状態を呈する性質を意味する。多能性幹細胞における未分化な状態とは、多能性幹細胞が、ほぼ永続的または長期間の細胞増殖が可能であり、正常な核(染色体)型を呈し、適当な条件下において三胚葉すべての系譜の細胞に分化する能力をもった状態を意味する。

30

【0021】

本明細書中に使用するとき、用語「分化多能性」とは、様々な種類の細胞に分化する能力をいう。分化細胞としては、一般的に多能性幹細胞から分化誘導することができる種の細胞であれば、特にこれを限定しない。具体的には、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞、中胚葉細胞または中胚葉由来の細胞、内胚葉細胞または内胚葉由来の細胞等が挙げられる。

【0022】

本明細書中に使用するとき、用語「培地」とは、多能性幹細胞を継代培養する従来の方法に適用することができる液体培地をすべて含む。

40

【0023】

本発明の浮遊培養で使用される細胞を得る方法は特に限定されず、従来から行われている培養方法を用いることができる。以下では、多官能性幹細胞の培養方法について説明する。

【0024】

多官能性幹細胞の培養方法としては培養皿(ディッシュ)や96穴、48穴などのマイクロプレート、プレート等の容器を用いる平面培養法、フラスコやバッグ、リアクター等を用いる浮遊培養法など、多能性幹細胞の培養に用いられているもののいずれをも使用できる。

50

【0025】

前記平面培養を行う場合、ディッシュやプレート等の容器表面に細胞接着基材を設ける必要がある。このような細胞接着基材としては、寒天、ゼラチン、マトリゲルやラミニン、ビトロネクチン、E-カドヘリン等が挙げられる。これらの使用量は多能性幹細胞を培養する際に用いられる濃度であれば、特に制限はないが、容器に固定する際の水溶液濃度としては、2～50 μg/ml程度である。

【0026】

前記接着基材を、前記容器の固相表面に固定又はコーティングする方法としては、吸着等の物理学的方法や共有結合等の化学的方法を適用することができるが、操作の容易さから吸着による方法が好ましい。吸着とは、接着基材を含む溶液と、基材表面とを一定時間、好ましくは数分間～一昼夜、より好ましくは20分間～12時間、接触させることで達成できる。また、前もって接着性分子に人為的に抗原性分子を付加・融合させておき、当該抗原性分子に対する特異抗体との結合を利用することもできる。

10

【0027】

上述の様に作製した培養容器は、多能性幹細胞の通常の培養法にそのまま使用することができる。すなわち、適当数の多能性幹細胞を、通常用いられる液体培地又は細胞培養液に懸濁し、それを当該培養基材に添加すればよい。その後の液体培地の交換や継代も、従来法と同様に行なうことができる。

【0028】

前記材料により多能性幹細胞を培養することで、浮遊培養で必要な数の多能性幹細胞を得ることができる。細胞基材と細胞との分離及び細胞の回収は、通常、酵素処理によって行われる。このとき用いる酵素としては、トリプシン、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、エラスターゼ、プロナーゼ等が挙げられる。

20

【0029】

[細胞接着分子を阻害する物質]

本発明の培養方法に用いられる細胞接着分子を阻害する物質は、細胞の凝集性に関する細胞接着分子を阻害することが可能なものであり、上記のとおり、細胞接着分子やその誘導体等が好ましく、E-カドヘリン、E-カドヘリンの一部の領域からなるタンパク質、E-カドヘリンの全部または一部の領域を含む融合タンパク質、E-カドヘリンの中和抗体、E-カドヘリンと結合するペプチド、及び、これらの誘導体の中から選ばれる少なくとも1種であることがより好ましい。

30

【0030】

カドヘリンとは、接着結合又はアドヘレンス・ジャンクション (adherens junction) と呼ばれる Ca^{2+} 依存性の細胞間接着・結合に関する接着分子であり、E(上皮)型、N(神経)型、P(胎盤)型の3種が代表例として知られている。これらのカドヘリン分子は、700～750アミノ酸残基からなる膜結合型糖タンパク分子であり、その細胞外領域には、約110アミノ酸残基からなる繰り返し構造、いわゆる Extracellular Cadherin (EC) ドメインと呼ばれる領域が5個存在する。例えば、ヒトE-カドヘリン(そのアミノ酸配列を配列番号1に示す)の場合、EC1、EC2、EC3、EC4、EC5の各ドメインは、それぞれ157～262、265～375、378～486、487～595、596～700に相当する(数値は配列番号1に示すアミノ酸配列内の残基の番号である)。また、マウスE-カドヘリン(そのアミノ酸配列を配列番号2に示す)の場合、EC1、EC2、EC3、EC4、EC5の各ドメインは、それぞれ159～264、267～377、380～488、489～597、598～702に相当する(数値は配列番号2に示すアミノ酸配列内の残基の番号である)。これらのECドメインは、異なるカドヘリン分子種の間で相同性を有しており、特にN末端側に位置するドメイン(EC1、EC2)の相同性が高い。このような類似の構造を呈するカドヘリン分子としては、現在、50種類以上のものが知られており、これらの分子を総称してカドヘリン・ファミリーと呼ぶ。以上、カドヘリンに関する総説としては、Takeichi, Curr. Opin. Cell Biol. 7: 619,

40

50

1995; Marrs & Nelson, *Int. Rev. Cytol.* 165: 159, 1996; Yap et al., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 119, 1997; Yagi & Takeichi, *Genes Dev.* 14: 1169, 2000; Gumbiner, *J. Cell Biol.* 148: 399, 2000等を参照のこと。

【0031】

また、E - カドヘリン (別名、カドヘリン - 1) は、肝臓や腎臓、肺等の内臓臓器の実質細胞やケラチノサイト等の上皮細胞に広く発現し、その細胞間接着を担う重要な接着分子であることが知られている (総説としては、Mareel et al., *Int. J. Dev. Biol.* 37: 227, 1993; Mays et al., *Cord Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 60: 763, 1995; El-Bahrawy & Pignatelli, *Microsc. Res. Tech.* 43: 224, 1998; Nollet et al., *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* 2: 77, 1999等を参照のこと)。

10

【0032】

E - カドヘリンに属するタンパク質を作製する方法は、特に限定されないが、分子生物学的手法を用いてリコンビナント・タンパク質を作製・精製し、これを使用することが望ましい。その他にも、同様の効果を示す方法であれば、いずれをも用いることができ、例えば、多能性幹細胞のE - カドヘリンに属するタンパク質を、生体組織・細胞から抽出、精製して使用すること、又は当該ペプチドを化学的に合成して使用することも可能である。

20

【0033】

例えばE - カドヘリン遺伝子は、既にヒト (配列番号1)、マウス (配列番号2)、ラット等の動物で単離・同定され、その塩基配列が、NCBI等の公的なDNAデータベースにおいて利用可能である (アクセス番号: (ヒト) NM_004360; (マウス) NM_009864; (ラット) NM_031334)。そのため、当業者であれば、E - カドヘリン遺伝子に特異的なプライマー又はプローブを設計し、一般的な分子生物学的手法を用いることにより、E - カドヘリン遺伝子のcDNAを取得・使用することが可能である。また、E - カドヘリン遺伝子のcDNAは、理化学研究所ジーンバンク (日本・筑波) や American Type Culture Collection (ATCC) 、Invitrogen社 / ResGen等からも購入することができる。使用するカドヘリンファミリーに属するタンパク質をコードする遺伝子としては、多能性幹細胞が由来する種と同種の動物由来のものが好ましく、例えば、マウスES細胞を用いて本発明を実施する場合、マウスのE - カドヘリンcDNAの使用が望ましい。しかし、異種動物由来のもの、即ち、ヒトやサル、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、又は鳥類 (例えば、ニワトリ等)、又は両生類 (例えば、アフリカツメガエル等) 由来のE - カドヘリンcDNAも使用することができる。

30

【0034】

E - カドヘリンに属するタンパク質のリコンビナント・タンパク質を作製するための好適な方法の一例は、当該分子をコードする遺伝子を、COS細胞や293細胞、CHO細胞等の哺乳動物細胞に導入し、発現させることを特徴としている。好ましくは、当該遺伝子は、広範な哺乳動物細胞における遺伝子の転写および発現を可能にする核酸配列、いわゆるプロモーター配列と、当該プロモーターの制御下に転写・発現が可能になる様な形で連結される。また、転写・発現させる遺伝子は、さらにポリA付加シグナルと連結されることが望ましい。好適なプロモーターとしては、SV (Simian Virus) 40 ウイルスやサイトメガロウイルス (Cytomegalo Virus; CMV)、ラウス肉腫ウイルス (Rous sarcoma virus) 等のウイルスに由来するプロモーターや、 λ - アクチン・プロモーター、EF (Elongation Factor) 1 プロモーター等が挙げられる。

40

【0035】

50

上記のリコンビナント・タンパク質を作製するために用いる遺伝子は、当該分子をコードする遺伝子の全長領域を含むものである必要はなく、部分的な遺伝子配列であっても、その部分配列がコードするタンパク質またはペプチド分子が、本来の当該分子と同程度、又はそれ以上の接着活性を有するものであればよい。例えば、本発明の好適な事例に用いられる E - カドヘリンの場合、細胞外領域をコードする、N 末端側から 690 ~ 710 アミノ酸残基を含む部分配列から作製されるリコンビナント・タンパク質、すなわち EC1 ~ EC5 ドメインを含むタンパク質を使用することができる。また、一般的にカドヘリン分子は、最も N 末端側に位置するドメイン (EC1) が、当該分子の結合特異性、すなわち、同種親和性を規定している (Nose et al., Cell 61: 147, 1990) ため、少なくとも EC1 を含み、それ以外のドメインの 1 個又は数個を除いたタンパク質分子を作製、使用することも可能である。さらには、上記のタンパク質分子と、アミノ酸レベルで 80% 以上、好ましくは 85% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の相同性を示し、かつ、接着活性を有するタンパク質も使用することができる。

10

【0036】

また、上記のリコンビナント・タンパク質は、他のタンパク質やペプチドとの融合タンパク質として作製することも可能である。例えば、イムノグロブリンの Fc 領域や GST (Glutathione-S-Transferase) タンパク質、MBP (Mannose-Binding Protein) タンパク質、アビジン・タンパク質、His (オリゴ・ヒスチジン) タグ、HA (HemAgglutinin) タグ、Myc タグ、VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein) タグ等との融合タンパク質として作製し、プロテイン A / G カラムや特異的抗体カラム等を用いることにより、リコンビナント・タンパク質の精製を容易に、しかも効率よく行なうことができる。特に Fc 融合タンパク質は、2 両体を形成するため、タンパク質としての活性が安定しているため、本発明の実施において好適である。

20

【0037】

イムノグロブリンの Fc 領域をコードする遺伝子は、既にヒトをはじめとする哺乳動物で、多数、単離・同定されている。その塩基配列も数多く報告されており、例えば、ヒト IgG1、IgG2、IgG3、及び IgG4 の Fc 領域を含む塩基配列の配列情報は、NCBI 等の公的な DNA データベースにおいて利用可能であり、それぞれ、アクセス番号: AJ294730、AJ294731、AJ294732、及び AJ294733 として登録されている。したがって、当業者であれば、Fc 領域に特異的なプライマー又はプローブを設計し、一般的な分子生物学的手法を用いることにより、Fc 領域部分をコードする cDNA を取得・使用することが可能である。この場合、使用する Fc 領域をコードする遺伝子としては、動物種やサブタイプは特にこれを限定しないが、プロテイン A / G との結合性が強いヒト IgG1 や IgG2、又はマウス IgG2a や IgG2b 等の Fc 領域をコードする遺伝子が好ましい。また、Fc 領域に変異を導入することによりプロテイン A との結合性を高める方法も知られており (Nagaoka et al., Protein Eng. 16: 243, 2003 参照)、当該法により遺伝子改変を加えた Fc タンパク質も使用することもできる。

30

40

【0038】

なお、本発明を実施するための好適に用いられる E - カドヘリンの場合、当該リコンビナント・タンパク質の作製法の一例が報告されている (Nagaoka et al., Biotechnol. Lett. 24: 1857, 2002; Protein Eng. 16: 243, 2003 参照)。

【0039】

また、マウス又はヒトの E - カドヘリンの細胞外領域をコードする cDNA に、ヒト IgG の Fc 領域部分をコードする配列及び His タグ配列の cDNA を連結させた融合遺伝子をマウス細胞に導入し、これを発現させて作製した精製リコンビナント・タンパク質 (Recombinant Human / Mouse E-cadherin-Fc Ch

50

imera; R&D systems社、Genzyme Techno社)が市販されており、マウス又はヒト由来のE-カドヘリン・タンパク質として使用することもできる(E-Cad-Fcタンパク質)。

【0040】

また、E-カドヘリン等の細胞接着分子と結合するペプチドを作製する方法は、特に限定されず、例えば、E-カドヘリン等の細胞接着分子を標的分子として、従来から行われているファージディスプレイ等の親和性選択法(アフィニティセレクション)を用いてスクリーニングすればよい(例えば、Devemy E, Blaschuk O. Identification of a novel N-cadherin antagonist. Peptides 2008; 29: 1853-61)。具体的な方法の一例としては、まず、ペプチドライブラリーから選ばれたペプチドを、予めプレートのウェルにE-カドヘリン-Fc融合タンパク質をコーティングされたウェル中に入れインキュベートする。次いで、ウェルから未結合ファージを除去するために洗浄する。結合したファージは、2段階で溶出する。第一溶出工程で2mM EDTAを含有するTBSを用いて行い、第2溶出工程では0.2MのグリシンHCl(pH2.2)で溶出する。pH2.2の溶出液に1MのTris-HCl(pH9.1)を使用し中和する。溶出したファージの各画分をER2738細胞に感染させることにより増幅し、ポリエチレングリコール沈殿により精製する。EDTA画分からの増幅したファージは、2回目のバイオパニング操作に用い、EDTA溶出液のみは3回目のバイオパニング操作に使用した。酸分画から増幅したファージはまた、2回目のバイオパニング操作に用いられ、酸溶出液のみは増幅され、最終バイオパニング操作に用いられた。スクリーニングの最後に、ファージを播種し、単離されたクローンをランダムに採取し、増幅する。各ファージクローンの一本鎖DNAを抽出し、アミノ酸配列を、DNAシーケンスにより推定する。E-カドヘリンと結合するペプチドとしては、例えば配列番号3のアミノ酸配列に示すSWELYPLRANLや配列番号4~30のアミノ酸配列に示すペプチド等が挙げられる。これらのペプチドは、標的分子との結合が失われない範囲で公知慣用の修飾(例えばPEG化やC末端のアミド化等)がされていてもよい。これらのペプチドは単独でも用いることもできるが2種以上を組み合わせて用いることもできる。

【0041】

また、E-カドヘリン等の細胞接着分子の中和抗体を作製する方法は、特に限定されず、従来から行われている公知の方法を用いることができる。前記E-カドヘリン等の細胞接着分子と結合するペプチドを抗体化して用いてもよい。例えば、細胞接着分子や細胞接着分子と結合するペプチドを抗原とし、動物に免疫して作製する方法や、発現ベクターに組み込んだ目的タンパク質の遺伝子を動物に導入し、動物の体内で発現させ、その目的タンパク質を抗原として抗体を作製、回収する方法(DNA免疫法)等が挙げられる。

【0042】

本明細書において、細胞接着分子やE-カドヘリンの一部の領域からなるタンパク質とは、細胞接着分子やE-カドヘリンの親分子と比較して、1以上の分子が欠損したタンパク質であって、細胞接着性を有するものである。

【0043】

また、本明細書において、誘導体とは、親分子と比較してその配列に1つ以上の相違を呈する分子であり、かつ、細胞接着性を有するものである。例えば細胞接着分子やE-カドヘリンの全部または一部と、他の化学物質または低分子量のポリマー成分もしくはオリゴマー成分との反応生成物が挙げられる。前記誘導体は、親分子との相同性が75%以上であることが好ましく、85%以上であることがより好ましく、90%以上であることがさらに好ましい。

【0044】

[凝集制御工程]

本発明の培養方法における凝集制御工程は、培養する細胞の細胞接着分子を阻害する物質を培地中に添加し、前記細胞の細胞凝集を制御する工程である。凝集制御工程は、容器

10

20

30

40

50

内に所望の培地を入れ、その中に細胞と細胞接着分子を阻害する物質とを含有させ、静置もしくは攪拌等を行いながら浮遊培養すればよい。これによって、細胞表面に細胞接着分子を阻害する物質を作用させ、所望の凝集体の大きさになるように細胞間接着性を制御することができる。

【0045】

このときの細胞接着分子を阻害する物質の添加量は細胞の量や培地成分により適宜選択され、特に細胞接着分子を阻害する物質を添加して浮遊培養を開始してから48時間経過後の凝集体の大きさ(径)が20 μ m以上1mm未満になるように適宜選択されるが、例えば、E-カドヘリンに属するタンパク質や中和抗体を用いた場合は5~100 μ g/mlの濃度となるように、また、E-カドヘリン等の細胞接着分子と結合するペプチドを用いた場合は0.01~1000 μ Mの濃度となるように、添加するのが好ましい。上記範囲より添加量が少ないと得られる凝集体の大きさが大きくなり過ぎる場合があるため、凝集体の内側の細胞が生存できなくなったり、幹細胞の場合は未分化性を失う場合がある。また、上記範囲を超えると、凝集体の大きさが顕著に不均一になったり、大きな凝集体の表面を小さな凝集体が覆われることによって、内側の大きな凝集体の細胞が生存できなくなる場合がある。また、均質な細胞を大量に得るという点からは、E-カドヘリンに属するタンパク質や中和抗体を用いた場合の濃度は、好ましくは7~80 μ g/ml、より好ましくは8~65 μ g/mlの範囲、さらに好ましくは10~50 μ g/mlの範囲であり、E-カドヘリン等の細胞接着分子と結合するペプチドを用いた場合の濃度は、好ましくは0.1~900 μ M、より好ましくは0.5~800 μ Mの範囲、さらに好ましくは1~600 μ Mの範囲である。上記範囲であれば、48時間経過後の凝集体の大きさを20 μ m以上1mm未満の範囲にコントロールすることができる。凝集体をこの大きさにコントロールすることにより、最終的に得られる凝集体の大きさを均質にすることができ、結果的に細胞生存率及び細胞数を多くすることができる。これは、従来のように細胞同士を単に接着しにくくする方法とは異なり、本発明においては、細胞接着分子を阻害する物質が接着因子に直接働きかけ細胞同士の接着量を細胞レベルでコントロールしているからであると考えられる。

【0046】

さらに、E-カドヘリンに属するタンパク質や中和抗体を用いた細胞接着分子を阻害する物質の添加量は、培地中のタンパク質含有量に起因するタンパク質吸着性を考慮すると、タンパク質含有量が少ない培地(例えばタンパク質含有量が1mg/ml以下)を用いる場合は25~100 μ g/ml、30~100 μ g/ml、好ましくは40~100 μ g/ml、さらに好ましくは50~100 μ g/mlの範囲、タンパク質含有量が多い培地(例えば10mg/ml以上)を用いる場合は7~80 μ g/ml、より好ましくは8~65 μ g/ml、さらに好ましくは10~50 μ g/mlの範囲が好ましい。このような量で細胞接着分子を阻害する物質を添加することで、細胞接着分子を阻害する物質が目的の細胞膜カドヘリンをブロックする前に他の細胞膜や培養基材への吸着し、細胞膜カドヘリンを確実にブロックすることが可能である。

【0047】

また、細胞接着分子を阻害する物質を添加した際の細胞への処理時間は、凝集体の大きさにより適宜決定することができるが、通常、24~48時間である。この期間より短いと凝集体を形成することが難しくなる場合があり、また、この範囲を超えると凝集体が大きくなり難くなるため得られる細胞数が少なくなる場合がある。

【0048】

本発明の培養方法においては、細胞数を増やす観点から、上記のとおり、凝集制御工程で得られた細胞の凝集体を、通常の浮遊培養、即ち前記細胞接着分子を阻害する物質を含まない培地中で浮遊培養することが好ましい。この際、培養終了の目安は、全ての凝集体の大きさが250 μ m以上1mm未満、好ましくは250~950 μ m、より好ましくは300~750 μ m、さらに好ましくは300~600 μ m程度の範囲となるタイミングである。

【0049】

本発明において、浮遊培養方法は、バッグやフラスコ、リアクター等の容器内で細胞を浮遊培養する方法であれば特に限定されない。浮遊培養であれば静地培養でもよいが、細胞への栄養付与性及び酸素付与性の面からこれらを付与できる条件、例えば攪拌や流れ等を伴う条件下で培養するのが好ましい。

攪拌を行う際の条件としては、例えば20～150rpm程度の攪拌を行うことが好ましい。攪拌以外で栄養分や酸素を付与する方法としては培養液中に気体を含有させるバブリング方法や培養液を還流させる方法などが挙げられるまた、酸素を付与する方法としては、前述の方法以外に培養液中にヘモグロビンを含有させて効率的に酸素を供給する方法等が挙げられる。

10

【0050】

本発明の浮遊培養で用いる培地は、特に制限はなく細胞を培養する際に使用されている培地を細胞の種類に合わせ用いることができる。以下では、多能性幹細胞を培養するための培地について詳述する。多能性幹細胞を培養するための液体培地としては、多能性幹細胞を継代培養する従来の方法に適用することができるものであれば特に限定されない。その具体例としては、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM)、RPMI 1640培地等が挙げられ、通常、2mM程度のグルタミン及び/又は100µM程度の2-メルカプトエタノールを添加して使用する。また、ES細胞培養用培地として市販されているKnockOut DMEM (Invitrogen社)や、ES cell-qualified DMEM (Cell & Molecular Technologies社)、TX-WES (Thromb-X社)等も用いることができる。これらの培地にはFBSを5～25%程度添加することが好ましいが、無血清培養することも可能で、例えば、15～20%のKnockOut Serum Replacement (Invitrogen社)を代用することができる。また、MEF細胞の培養上清やbFGF/FGF-2、SCF等を添加した培地を使用してもよく、その詳細な方法は公知である (Xu et al., Nature Biotech. 19:971, 2001; 国際公開番号第01/51616号; 国際公開番号第03/020920号; Amit et al., Biol. Reprod., 70:837, 2004)。多能性幹細胞の培養に用いる液体培地としては、上記のほかに、ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagles's Medium; DMEM)、DMEM/F12培地、マッコイ5A培地 (McCoy's 5A medium)、ハムF12培地 (Ham's Nutrient Mixture F12)、MEM培地 (Minimum Essential Medium)、MEM培地 (alpha Modified Eagles's Minimum Essential Medium; MEM) イーグルMEM培地 (Eagles's Minimum Essential Medium; MEM)、RPMI 1640培地、IPL41培地、イスコフ改変ダルベッコ培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; IMDM)、ウィリアム培地E、MCDB131培地、Fischer's培地、StemPro34 (インビトロジェン社製)、StemProhESC SFM (インビトロジェン社製)、Sf-900II (インビトロジェン社製)、Opti-Pro (インビトロジェン社製)、X-VIVO 10 (ケンプレックス社製)、X-VIVO 15 (ケンプレックス社製)、HPGM (ケンプレックス社製)、StemSpan H3000 (ステムセルテクノロジー社製)、StemSpan SFEM (ステムセルテクノロジー社製)、mTeSR1 或いは2培地 (ステムセルテクノロジー社製)、Stemline II (シグマアルドリッチ社製)、QBSF-60 (クオリティバイオロジカル社製)、Essential 8培地 (ギブコ社製)、MesenPRO RS培地 (ギブコ社製)、リプロFF 或いはリプロFF2 (リプロセル社製)、PSGro hESC/iPSC培地 (システムバイオサイエンス社製)、NutriStem培地 (バイオロジカルインダストリーズ社製)、CSTI-7培地 (細胞科学研究所社製)、MF-Medium

20

30

40

50

間葉系幹細胞増殖培地（東洋紡社製）等の公知慣用の培地を用いることができる。

【0051】

培地としてアルブミンをはじめとしたタンパク質を多く含む培地（例えばタンパク質含有量が10mg/ml以上）を用いる場合、培地中のタンパク質により細胞膜表面や培養基材などへのタンパク質の吸着は抑制される傾向を示し、タンパク質含有量が少ない培地（例えば1mg/ml以下）を用いると、タンパク質を多く含む培地に比べ細胞膜表面や培養基材などへのタンパク質の吸着が発生する可能性が高くなる傾向を示す。

【0052】

また、培地中には多能性幹細胞を培養する際に慣用的に用いられている成分、例えばナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、リン、塩素、各種アミノ酸、各種ビタミン、抗生物質、血清、脂肪酸、糖等を目的に合わせて添加してもよい。動物由来の細胞及び/又は組織培養の際には、目的に合わせてその他の化学成分あるいは生体成分を一種以上組み合わせて添加することもできる。

【0053】

前記動物由来の細胞及び/又は組織の培地に添加される成分としては、例えばウシ胎児血清、ヒト血清、ウマ血清、インシュリン、トランスフェリン、ラクトフェリン、コレステロール、エタノールアミン、ウシ血清アルブミン、亜セレン酸ナトリウム、モノチオグリセロール、2-メルカプトエタノール、ポリエチレングリコール、ピルビン酸ナトリウム、各種ビタミン、各種アミノ酸、寒天、アガロース、コラーゲン、メチルセルロース、各種サイトカイン、各種ホルモン、各種増殖因子、各種細胞外マトリックス、各種細胞接着分子等が挙げられる。

【0054】

前記サイトカインとしては、例えばインターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-3(IL-3)、インターロイキン-4(IL-4)、インターロイキン-5(IL-5)、インターロイキン-6(IL-6)、インターロイキン-7(IL-7)、インターロイキン-8(IL-8)、インターロイキン-9(IL-9)、インターロイキン-10(IL-10)、インターロイキン-11(IL-11)、インターロイキン-12(IL-12)、インターロイキン-13(IL-13)、インターロイキン-14(IL-14)、インターロイキン-15(IL-15)、インターロイキン-18(IL-18)、インターロイキン-21(IL-21)、インターフェロン- (IFN-)、インターフェロン- (IFN-)、インターフェロン- (IFN-)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、単球コロニー刺激因子(M-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、幹細胞因子(SCF)、白血病細胞阻害因子(LIF)、f1k2/f1t3リガンド(FL)、オンコスタチンM(OM)、エリスロポエチン(EPO)、トロンプオエチン(TPO)等が挙げられる。

【0055】

前記ホルモンとしては、例えばメラトニン、セロトニン、チロキシン、トリヨードチロニン、エピネフリン、ノルエピネフリン、ドーパミン、アディポネクチン、抗ミューラー管ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン、アンジオテンシノゲン、アンジオテンシン、抗利尿ホルモン、心房ナトリウム利尿性ペプチド、カルシトニン、コレシストキニン、コルチコトリピン放出ホルモン、エリスロポイエチン、卵胞刺激ホルモン、ガストリン、グレリン、グルカゴン、ゴナドトロピン放出ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ヒト胎盤性ラクトゲン、成長ホルモン、インスリン、インスリン様成長因子、インヒピン、レプチン、黄体形成ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、副甲状腺ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、チロトロピン放出ホルモン、オキシトシン、セクレチン、ソマトスタチン、トロンプオイエチン、プロラクチン、コルチゾール、アルドステロン、テストステロン、デヒドロエピアンドロステロン、アンドロステンジオン、ジヒドロテストステロン、エストラジオール、エストロン、エストリオール、プロゲステロン、カルシトリオール、カルシジオール、プロスタグランジン、プロスタサイクリン、ロイコトリエ

10

20

30

40

50

ン、トロンボキサン、プロラクチン放出ホルモン、リポトロピン、脳ナトリウム利尿ペプチド、神経ペプチドY、ヒスタミン、エンドセリン、膵臓ポリペプチド、レニン、エンケファリン等が挙げられる。

【0056】

前記増殖因子としては、例えばトランスフォーミング成長因子 - (T G F -)、トランスフォーミング成長因子 - (T G F -)、マクロファージ炎症蛋白質 - 1 (M I P - 1)、上皮細胞増殖因子 (E G F)、繊維芽細胞増殖因子 - 1、2、3、4、5、6、7、8又は9 (F G F - 1、2、3、4、5、6、7、8、9)、神経細胞増殖因子 (N G F)、白血球阻止因子 (L I F)、肝細胞増殖因子 (H G F)、血小板由来成長因子 (P D G F)、プロテアーゼネキシン I、プロテアーゼネキシン II、コリン作動性分化因子 (C D F)、ケモカイン、N o t c h リガンド (D e l t a 1 等)、W n t 蛋白質、アンジオポエチン様蛋白質 2、3、5又は7 (A n g p t 2、3、5、7)、インスリン様成長因子 (I G F)、インスリン様成長因子結合蛋白質 (I G F B P)、プレイオトロフィン (P l e i o t r o p h i n) 等が挙げられるが、これらに限られるわけではない。

10

【0057】

遺伝子組替え技術により前記サイトカインや増殖因子のアミノ酸配列を人為的に改変させたものも培地に添加してもよい。その例としては、I L - 6 / 可溶性 I L - 6 受容体複合体あるいは H y p e r I L - 6 (I L - 6 と可溶性 I L - 6 受容体との融合タンパク質) 等が挙げられる。

20

【0058】

前記細胞外マトリックスや細胞接着分子としては、例えばコラーゲン I ~ X I X、フィブロネクチン、ピトロネクチン、ラミニン - 1 ~ 1 2、ニトジェン、テネイシン、トロンボスポンジン、フォンビルブランド (v o n W i l l e b r a n d) 因子、オステオポンチン、フィブリノーゲン、各種エラスチン、各種プロテオグリカン、各種カドヘリン、各種インテグリン、デスモコリン、デスモグレイン、E - セレクチン、P - セレクチン、L - セレクチン、免疫グロブリンスーパーファミリー、ポリ - D - リジン、ポリ - L - リジン、キチン、キトサン、セファロース、ヒアルロン酸、マトリゲル、アルギン酸ゲル、各種ハイドロゲル等が挙げられ、これらの切断断片等であってもよい。

【0059】

前記抗生物質としては、例えばサルファ製剤、ペニシリン、アンピシリン、フェネチシリン、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、アモキシシリン、シクラシリン、カルベニシリン、チカルシリン、ピペラシリン、アズロシリン、メクズロシリン、アンジノシリン、メシリナム、セファロスポリン及びその誘導体、オキシリン酸、アミフロキサシン、テマフロキサシン、ナリジクス酸、ピロミド酸、ピベミド酸、クラプリン酸、 - プロモペニシラン酸、 - クロロペニシラン酸、6 - アセチルメチレン - ペニシラン酸、シプロフロキサシン、シノキサシン、ノルフロキサシン、パーフロキサシン、ロザキサシン、オフロキサシン、エノキサシン、スルバクタム、セフォキサゾール、スルタンピシリン、アディノシリン及びスルバクタムのホルムアルデヒド・フードラートエステル、タゾバクタム、アズトレオナム、スルファゼチン、イソスルファゼチン、ノルカディシン、m - カルボキシフェニル、フェニルアセトアミドホスホン酸メチル、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、デメクロサイクリン、ドキシサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン等が挙げられる。

30

40

【0060】

本発明の凝集体は、本発明の培養方法により得られた細胞の凝集体であって、均一な凝集体径を有することを特徴とするものである。本発明の凝集体からは、多くの細胞が得られ、かつ、得られる細胞はいずれも未分化性、分化多能性を維持している。細胞の増殖性及び分化多能性の観点から、浮遊培養 4 8 時間後の全ての凝集体の径が 2 0 μ m 以上 1 m m 未満の範囲、好ましくは 2 0 ~ 9 5 0 μ m の範囲、より好ましくは 2 0 ~ 7 5 0 μ m の範

50

囲、さらに好ましくは50～500 μmの範囲、特に好ましくは100～300 μmの範囲である。

【0061】

また、本発明の細胞凝集制御剤は、細胞接着分子を阻害する物質を含有することを特徴とするものである。本発明の細胞凝集制御剤は、細胞の浮遊培養で凝集体の粒径を制御するために用いることが好ましい。細胞接着分子を阻害する物質は特に限定されないが、E-カドヘリン、E-カドヘリンの一部の領域からなるタンパク質、E-カドヘリンの全部または一部の領域を含む融合タンパク質、E-カドヘリンの中和抗体、E-カドヘリンと結合するペプチド、及び、これらの誘導体の中から選ばれる少なくとも1種であることが好ましい。

10

【0062】

本発明の培養方法は、細胞、特にiPS細胞やES細胞等の多能性幹細胞を均一な品質でかつ大量に得ることが可能な幹細胞の培養する方法として極めて有用である。また、本発明の培養、細胞の凝集体、細胞凝集制御剤、細胞凝集制御剤、及び、培地は再生医療や創薬分野において極めて有用である。

【実施例】

【0063】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら制限されることはない。

【0064】

20

<多能性幹細胞の準備>

マトリゲル水溶液(DMEMにて50倍で希釈)を未処理のティッシュカルチャー6ウェルプレート(Iwaki社製)に1mL/wellの量で加え、37℃で2時間インキュベートした。その後、コート剤を取り除き、ヒトiPS細胞培養プレートを準備した。

多能性幹細胞としてhiPS細胞(TkDN4-M、東京大学ステムセルバンク)を用いた。この細胞を準備した前記培養プレートに100,000～400,000個/wellの密度で細胞を播種し、4日間培養した。培養液にはmTeSR1(Stemcell technologies社製)を用い、2mL/wellの培地量で培養した。その間、播種1日後を除き、毎日培地交換を行った。

細胞の剥離・回収にはトリプシン様酵素であるTrypLE select(Lifetechnologies社製)を用いた。培養液を取り除いた後、TrypLE selectを1mL/wellとなるように添加し、37℃で2～5分インキュベートした。その後、TrypLE selectを取り除き、ROCK阻害剤であるY-27632を10 μM含んだmTeSR1を2mL/wellで加え、1000 μLマイクロピペットでピペティングすることで細胞を剥離した。この回収した細胞懸濁液は、40 μmのセルストレーナー(BD)を透過させ、細胞を単一細胞あるいは微小凝集体として回収し、浮遊懸濁培養への導入用細胞を得た。

30

【0065】

<E-カドヘリン-Fc融合タンパク質の発現及び精製>

E-カドヘリン-Fc融合タンパク質の発現と精製を、Nagaoka M, Aikake T., Protein Eng. 2003; 16: 243-245. に準拠して行った。本実施例において、マウスのE-カドヘリン全長(理研BRC DNAバンク、コード1184)から得た細胞外ドメインcDNAと、変異導入IgG1-FcドメインcDNA(T252M/T254S)をライゲーションし、E-cad-Fc融合タンパク質を発現させた。

40

【0066】

<細胞の凝集体の径の測定>

下記実施例及び比較例では、培養期間中の細胞の凝集体の形態及び大きさは位相差顕微鏡(製品名:DMIRB、LEICA社製)を用いて観察及び測定した。

【0067】

50

< 実施例 1 >

[実施例 1 - 1]

低細胞接着処理を施した12ウェルプレートにmTeSR1を1mL/mlを加え、その中にあらかじめ用意したhiPS細胞(2×10^5 cells/ml)と、hiPS細胞の細胞接着分子を阻害する物質としてE-カドヘリン-Fc($5 \mu\text{g/ml}$)とを同時に入れ、90~120rpmの速度で48時間巡回培養した。E-カドヘリン-Fcで処理後48時間経過時の凝集体の大きさは300~700 μm の範囲であった。次いで培地交換を行いE-カドヘリン-Fcを添加しない以外は前記と同条件で3日間培養し凝集体を得た。この凝集体の大きさは500~1000 μm の範囲であった。

【0068】

10

[実施例 1 - 2]

実施例1-1においてE-カドヘリン-Fcの濃度を10 $\mu\text{g/ml}$ とした以外は全て実施例1と同様にして凝集体を得た。E-カドヘリン-Fcで処理後48時間経過時の凝集体の大きさは200~400 μm の範囲であり、培地交換を行いE-カドヘリン-Fcを添加しないで3日間培養した時の凝集体の大きさは300~1000 μm の範囲であった。

【0069】

[実施例 1 - 3]

実施例1-1においてE-カドヘリン-Fcの濃度を20 $\mu\text{g/ml}$ とした以外は全て実施例1と同様にして凝集体を得た。E-カドヘリン-Fcで処理後48時間経過時の凝集体の大きさは100~500 μm の範囲であり、培地交換を行いE-カドヘリン-Fcを添加しないで3日間培養した時の凝集体の大きさは300~600 μm の範囲であった。

20

【0070】

[実施例 1 - 4]

実施例1-1においてE-カドヘリン-Fcの濃度を50 $\mu\text{g/ml}$ とした以外は全て実施例1と同様にして凝集体を得た。E-カドヘリン-Fcで処理後48時間経過時の凝集体の大きさは100~300 μm の範囲であり、培地交換を行いE-カドヘリン-Fcを添加しないで3日間培養した時の凝集体の大きさは300~600 μm の範囲であった。

30

【0071】

[実施例 1 - 5]

実施例1-1においてE-カドヘリン-Fcの濃度を100 $\mu\text{g/ml}$ とした以外は全て実施例1と同様にして凝集体を得た。E-カドヘリン-Fcで処理後48時間経過時の凝集体の大きさは150~700 μm の範囲であり、培地交換を行いE-カドヘリン-Fcを添加しないで3日間培養した時の凝集体の大きさは300~1000 μm の範囲であった。

【0072】

[比較例 1 - 1]

実施例1-1においてE-カドヘリン-Fcを用いなかった以外は全て実施例1と同様にして凝集体を得た。E-カドヘリン-Fcで処理後48時間経過時の凝集体の大きさは1000~3000 μm の範囲、3日間培養した時の凝集体の大きさもまた1000~3000 μm の範囲であった。

40

【0073】

< 細胞の凝集体の観察 >

実施例1-1~1-5及び比較例1-1において、培養2日目(48時間E-カドヘリン-Fcで処理)における細胞の凝集体の形態を位相差顕微鏡(製品名:DMIRB、LEICA社製)を用いて観察した。得られた顕微鏡写真を図2(A)~(F)に示す。図2(A)~(F)から、比較例1-1(E-カドヘリン-Fc濃度=0 $\mu\text{g/ml}$)で得られた凝集体に比べ、実施例1-1~1-5(それぞれE-カドヘリン-Fc濃度=5

50

、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で得られた凝集体は大きさが制御されていることが分かる。特にE-カドヘリン-Fcの濃度を10~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲としたものは、過剰凝集が抑制され、単純な旋回培養であっても均一な凝集体形成を達成させる効果も得られていることが分かる。

【0074】

<グルコース消費量の測定>

全培養期間中、培地交換の際に培養液を300 μL 採取し、酵素電極式バイオアナライザー(YSI2950)を用いてのグルコース濃度を解析し、グルコース消費量変化を求めた。その結果を図3に示す。

【0075】

<細胞数の測定>

培養終了後、細胞はTrypLE selectを用いて単一細胞に分散した後、トリパンプル(Lifetechnologies社製)およびエオジノフィルカウンター(タイ社製)を用いて生細胞数を計数した。その結果を図4に示す。

【0076】

図3、4に示すグラフからグルコース消費量を生存している細胞数の指標とすることができる。図3、4に示す結果から、比較例1-1(E-カドヘリン-Fc濃度=0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で得られた凝集体に比べ、実施例1-1~1-5(それぞれE-カドヘリン-Fc濃度=5、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で得られた凝集体はグルコース消費量及び細胞数のいずれにおいても優れた効果を発揮していることが分かる。特に培養5日目におけるグルコース消費量は、実施例1-1は比較例1-1に比べ約2倍、細胞数は1.5~1.75倍程度まで増加している。この傾向は実施例1-2~1-5ではさらに強く、グルコース消費量は実施例1-2及び1-5で2倍、実施例1-3及び1-4で2.5倍となり、細胞数はおおよそ実施例1-2で1.8倍、実施例1-3で2.5倍、実施例1-4で3倍、実施例1-5で2.3倍まで増加していることから、大量の多能性幹細胞が得られていることが分かる。また、図2に示すように凝集体の径がより均一に制御された実施例1-2~1-4の方が優れた結果であったことから、過剰な細胞の凝集を抑制し、適正な粒径の凝集体をより多く形成させることで増殖効率を高めることが可能となること分かる。このことから、得られる細胞は未分化性及び分化多能性を維持した幹細胞であることが分かる。一般に細胞凝集体は栄養基質や酸素の拡散により成長できる限界のサイズが存在することも考慮すると、凝集体の径の制御はヒトiPS細胞の大量培養プロセスの簡易化に大いに寄与することが推察される。

【0077】

<実施例2>

[実施例2-1]

低細胞接着処理を施した12ウェルプレートにmTeSR1を1mL加え、その中にあらかじめ用意したhiPS細胞(TkDN4-M、東京大学ステムセルバンク)(5×10^5 cells/ml)と、hiPS細胞の細胞接着分子を阻害する物質としてリコンビナントE-カドヘリン(LD Biopharma社製hRP-0339)(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)とを同時に入れ、90rpmの速度で1日旋回培養した。

【0078】

[参考例2-2]

実施例2-1において、hiPS細胞の細胞接着分子を阻害する物質をE-カドヘリンの中和抗体(ミリポア社製のE-カドヘリン抗体、MAB3199Z)(16 $\mu\text{g}/\text{ml}$)に変えた以外は全て実施例2-1と同様にして凝集体を得た。

【0079】

[実施例2-3]

実施例2-1において、hiPS細胞の細胞接着分子を阻害する物質をE-カドヘリン-Fc(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)に変えた以外は全て実施例2-1と同様にして凝集体を得た。

【0080】

10

20

30

40

50

[比較例 2 - 1]

実施例 2 - 1 においてリコンビナント E - カドヘリンを用いなかった以外は全て実施例 2 - 1 と同様にして凝集体を得た。

【 0 0 8 1 】

< 細胞の凝集体の観察 >

実施例 2 - 1、参考例 2 - 2、実施例 2 - 3 及び比較例 2 - 1 における細胞の凝集体の形態を位相差顕微鏡（製品名：DM I R B、L E I C A 社製）を用いて観察した。得られた顕微鏡写真を図 5（A）～（D）に示す。図 5（A）～（D）から、比較例 2 - 1（細胞接着分子を阻害する物質の添加なし）で得られた凝集体に比べ、リコンビナント E - カドヘリン、E - カドヘリンの中和抗体及び E - カドヘリン - F c はいずれも凝集体の径を均一に調整できることが分かる。また、E - カドヘリン - F c は、リコンビナント E - カドヘリン及び E - カドヘリンの中和抗体と比べ、凝集体が大きくかつその形状が均一であることから、リコンビナント E - カドヘリン及び E - カドヘリンの中和抗体よりも 4 8 時間後の全ての凝集体の径を 2 0 μ m 以上 1 m m 未満の範囲で大きくすることができ、多くの細胞が得られることが推測される。

10

【 0 0 8 2 】

< 実施例 3 >

[実施例 3 - 1]

低細胞接着処理を施した 1 2 ウェルプレートに E s s e n t i a l 8 を 1 m L 加え、その中にあらかじめ用意した h i P S 細胞（T k D N 4 - M、東京大学ステムセルバンク）（ 2×10^5 c e l l s / m l ）と、h i P S 細胞の細胞接着分子を阻害する物質として E - カドヘリン - F c（5 0 μ g / m l ）とを同時に入れ、1 0 0 r p m の速度で 5 日間巡回培養した。尚、培養 2 日目以降（培養開始から 4 8 時間経過後）は、E - カドヘリン - F c を添加していない培地で毎日培地交換を行った。

20

【 0 0 8 3 】

[実施例 3 - 2]

実施例 3 - 1 において E - カドヘリン - F c の濃度を 1 0 0 μ g / m l とした以外は全て実施例 3 - 1 と同様にして凝集体を得た。

【 0 0 8 4 】

[比較例 3 - 1]

実施例 3 - 1 において E - カドヘリン - F c を用いなかった以外は全て実施例 3 - 1 と同様にして凝集体を得た。

30

【 0 0 8 5 】

< 細胞の凝集体の観察 >

実施例 3 - 1、3 - 2 及び比較例 3 - 1 において、培養 2 日目及び 5 日目における細胞の凝集体の形態を位相差顕微鏡（製品名：DM I R B、L E I C A 社製）を用いて観察した。得られた顕微鏡写真を図 6、7 に示す。図 6、7 に示す結果から、E s s e n t i a l 8 を培地として用いた場合にも、凝集体の大きさを制御できることがわかる。E - カドヘリン - F c を添加した場合、培養 5 日目は、凝集体サイズが培養 2 日目よりも成長しており、その直径は 5 0 0 μ m 前後で制御されている。

40

ここで、培地として m T e S R 1 を用いた実施例 1 - 1 ~ 1 - 5（図 2）を考慮すると、培地としてタンパク質含有量が多い m T e S R 1（タンパク質含有量約 1 8 m g / m l）を用いた場合、タンパク質含有量が少ない培地である E s s e n t i a l 8（タンパク質含有量約 9 μ g / m l）を用いた場合と比較して、細胞接着分子を阻害する物質の量が少なくても同等の効果が得られることが分かる。これは、タンパク質含有量が少ない培地を用いた場合、細胞接着分子を阻害する物質が目的の細胞膜カドヘリンをブロックする前に他の細胞膜や培養基材に吸着したことが推察される。

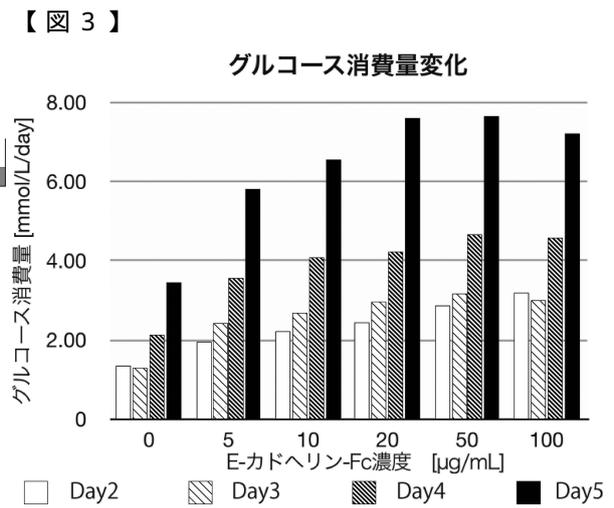
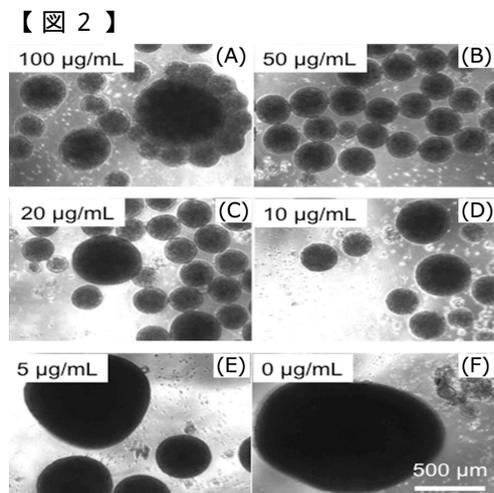
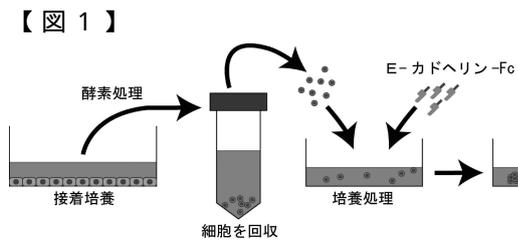
【 0 0 8 6 】

< グルコース消費量及び細胞数の測定 >

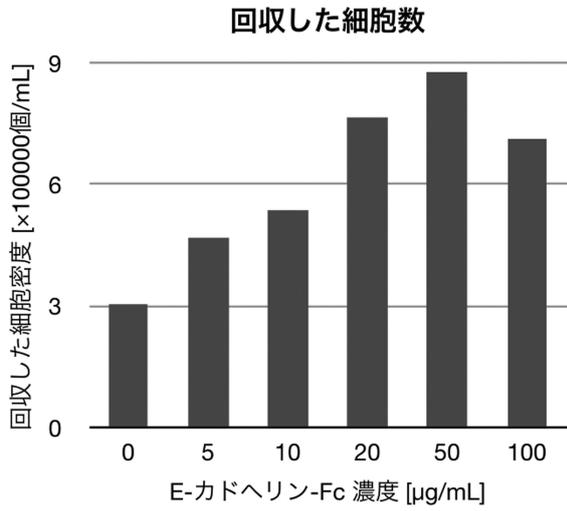
実施例 3 - 1、3 - 2 及び比較例 3 - 1 について、上記と同様にグルコース消費量及び

50

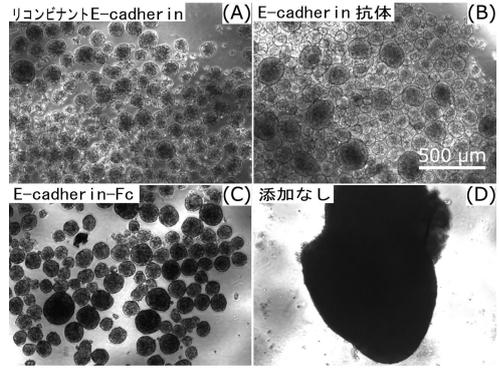
細胞数を測定した結果（図8及び図9）、E-cad-Fcの添加によってグルコース消費量及び細胞数のいずれにおいても優れた効果が示されることを確認した。



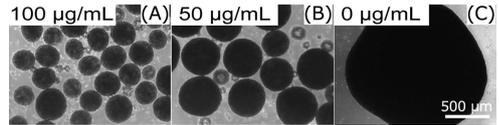
【 図 4 】



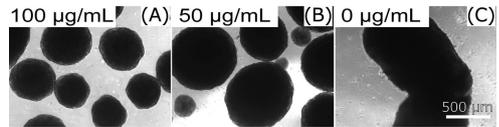
【 図 5 】



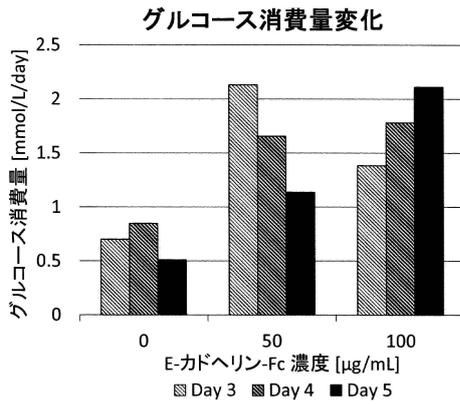
【 図 6 】



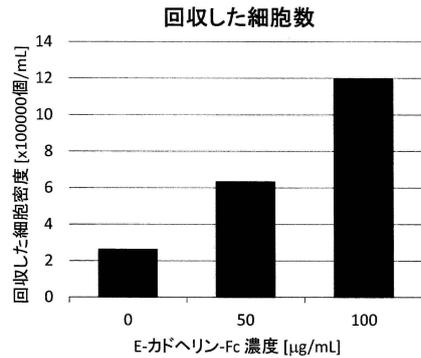
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

0006940835000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 松永 久美子
日本国東京都中央区銀座四丁目11番2号 ソマール株式会社内
- (72)発明者 早坂 俊二
日本国東京都中央区銀座四丁目11番2号 ソマール株式会社内

審査官 星 功介

- (56)参考文献 国際公開第2014/072720(WO, A1)
特表2012-523240(JP, A)
特表2004-536606(JP, A)
国際公開第2007/088372(WO, A1)
国際公開第2015/199243(WO, A1)
PLOS ONE, 2010, Vol.5, No.9, e12921, pp.1-12

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00 - 5/28

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)