

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7039473号  
(P7039473)

(45)発行日 令和4年3月22日(2022.3.22)

(24)登録日 令和4年3月11日(2022.3.11)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 M	3/00 (2006.01)	C 1 2 M	3/00	Z
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 N	5/071(2010.01)	C 1 2 N	5/071	
C 1 2 N	5/0735(2010.01)	C 1 2 N	5/0735	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	

請求項の数 6 (全20頁)

(21)出願番号	特願2018-530441(P2018-530441)	(73)特許権者	000002853 ダイキン工業株式会社 大阪府大阪市北区中崎西2丁目4番12号 梅田センタービル
(86)(22)出願日	平成29年7月28日(2017.7.28)	(73)特許権者	504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町3番地1
(86)国際出願番号	PCT/JP2017/027557	(74)代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(87)国際公開番号	WO2018/021566	(72)発明者	駒澤 梢 大阪府大阪市北区中崎西2丁目4番12号 梅田センタービル ダイキン工業株式会社内
(87)国際公開日	平成30年2月1日(2018.2.1)	(72)発明者	樋口 達也 大阪府大阪市北区中崎西2丁目4番12号 梅田センタービル
審査請求日	平成30年11月19日(2018.11.19)		
審判番号	不服2020-7664(P2020-7664/J1)		
審判請求日	令和2年6月3日(2020.6.3)		
(31)優先権主張番号	特願2016-150725(P2016-150725)		
(32)優先日	平成28年7月29日(2016.7.29)		
(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】 分化細胞の製造方法、及びその製造方法のために使用する培養バッグ

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

多能性幹細胞から胚様体(EB)法により分化細胞を製造する方法であって、  
(1)パーフルオロポリマーを内側表面に有する培養バッグを用いて多能性幹細胞を培養することにより胚様体を形成する工程、及び  
(2)前記工程(1)において得られた胚様体に含まれる多能性幹細胞を分化誘導させることにより分化細胞を得る工程  
を含み、かつ

前記パーフルオロポリマーが、テトラフルオロエチレン/ヘキサフルオロプロピレン共重合体、テトラフルオロエチレン/パーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体及びテトラフルオロエチレン/ヘキサフルオロプロピレン/パーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体からなる群より選択される少なくとも一種のパーフルオロポリマーである、  
方法。

## 【請求項2】

多能性幹細胞を胚様体(EB)法により分化誘導する方法であって、  
(1)パーフルオロポリマーを内側表面に有する培養バッグを用いて多能性幹細胞を培養することにより胚様体を形成する工程、及び  
(2)前記工程(1)において得られた胚様体に含まれる多能性幹細胞を分化誘導させる工程  
を含み、かつ

前記パーフルオロポリマーが、テトラフルオロエチレン/ヘキサフルオロプロピレン共重合体、テトラフルオロエチレン/パーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体及びテトラフルオロエチレン/ヘキサフルオロプロピレン/パーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体からなる群より選択される少なくとも一種のパーフルオロポリマーである、方法。

【請求項 3】

多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞（iPS細胞）又は胚性幹細胞（ES細胞）である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記工程（2）において、多能性幹細胞を前駆細胞へと分化誘導させる、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 5】

パーフルオロポリマーを内側表面に有する培養バッグであって、多能性幹細胞を胚様体（EB）法により分化誘導するために用いられ、かつ

前記パーフルオロポリマーが、テトラフルオロエチレン/ヘキサフルオロプロピレン共重合体、テトラフルオロエチレン/パーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体及びテトラフルオロエチレン/ヘキサフルオロプロピレン/パーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体からなる群より選択される少なくとも一種のパーフルオロポリマーである、培養バッグ。

【請求項 6】

多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞（iPS細胞）又は胚性幹細胞（ES細胞）である、請求項 5 に記載の培養バッグ。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分化細胞の製造方法、及びその製造方法のために使用する培養バッグに関する。

【背景技術】

【0002】

さまざまな細胞に分化する能力を有する多能性幹細胞（pluripotent stem cell）の、臨床や創薬研究等への利用が期待されている。多能性幹細胞としては、人工多能性幹細胞（induced Pluripotent Stem cell：iPS cell）及び胚性幹細胞（Embryonic Stem cell：ES cell）の利用に関する研究が進んでいる。

30

【0003】

多能性幹細胞の利用に際しては、所望の分化細胞に分化誘導する効率的な方法が求められている。多能性幹細胞の分化誘導には、低接着性の培養皿（シャーレ）で培養することにより、多能性幹細胞を自然凝集させて三次元の塊である胚様体（Embryoid Body：EB）を形成させる、いわゆる胚様体（EB）法が頻用されている。胚様体の培養に分化誘導作用を有するサイトカイン、増殖因子又はその他の化合物を添加すること等により、目的細胞腫への誘導効率を高めることができる。

【0004】

EB法においては、従来、非付着性の培養皿（シャーレ）として、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン等のリン脂質類似構造を有する親水性ポリマーやハイドロゲル等をコーティングした低接着性のシャーレ等が用いられてきた（特許文献1）。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】国際公開第2005/001019号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

50

本発明は、EB法を、従来の培養皿を用いる方法と比べて、より大スケールかつ閉鎖系で行うことのできる方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記目的を達成すべく、鋭意検討を重ねていたところ、まず、従来のようなシャーレ培養よりも、より大量の多能性幹細胞を浮遊培養できるバッグ培養が有利であると着想するに至った。しかし、従来EB法のために使用されてきた培養シャーレで用いられている材料と同種の材料を用いて、ガス透過性を有する培養バッグを製造することは困難であることが判った。本発明者らは、さらなる試行錯誤を重ね、十分なガス透過性を有し、かつ超疎水性であるパーフルオロポリマーを内側表面に有する培養バッグを用いることにより、従来の培養皿を用いる方法と同様の効率で、閉鎖系で、かつより大スケールでEB法を行うことができることを見出し、本発明を完成するに至った。

10

【0008】

本発明はこれらの知見に基づいて完成したものであり、下記の実施形態を有する。

【0009】

項1.

多能性幹細胞から胚様体(EB)法により分化細胞を製造する方法であって、

(1)パーフルオロポリマーを内側表面に有する培養バッグを用いて多能性幹細胞を培養することにより胚様体を形成する工程、及び

(2)前記工程(1)において得られた胚様体に含まれる多能性幹細胞を分化誘導させることにより分化細胞を得る工程

20

を含む、方法。

項2.

多能性幹細胞を胚様体(EB)法により分化誘導する方法であって、

(1)パーフルオロポリマーを内側表面に有する培養バッグを用いて多能性幹細胞を培養することにより胚様体を形成する工程、及び

(2)前記工程(1)において得られた胚様体に含まれる多能性幹細胞を分化誘導させる工程

を含む、方法。

項3.

前記パーフルオロポリマーが、テトラフルオロエチレン/ヘキサフルオロプロピレン共重合体、テトラフルオロエチレン/パーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体及びテトラフルオロエチレン/ヘキサフルオロプロピレン/パーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体からなる群より選択される少なくとも一種のパーフルオロポリマーである、項1又は2に記載の方法。

30

項4.

多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞(iPS細胞)又は胚性幹細胞(ES細胞)である、項1~3のいずれか一項に記載の方法。

項5.

前記工程(2)において、多能性幹細胞を前駆細胞へと分化誘導させる、項1~4のいずれか一項に記載の方法。

40

項6.

パーフルオロポリマーを内側表面に有する培養バッグであって、多能性幹細胞を胚様体(EB)法により分化誘導するために用いられる、培養バッグ。

項7.

前記パーフルオロポリマーが、テトラフルオロエチレン/ヘキサフルオロプロピレン共重合体、テトラフルオロエチレン/パーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体及びテトラフルオロエチレン/ヘキサフルオロプロピレン/パーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体からなる群より選択される少なくとも一種のパーフルオロポリマーである、項6に記載の培養バッグ。

50

項 8 .

多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞 ( i P S 細胞 ) 又は胚性幹細胞 ( E S 細胞 ) である、  
項 6 又は 7 に記載の培養バッグ。

項 9 .

項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の工程 ( 1 ) により得られうる、胚様体。

項 1 0 .

項 1 及び 3 ~ 5 のいずれか一項に記載の製造方法により得られうる、分化細胞集団。

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明によれば、E B 法を、従来の培養皿を用いる方法と比べて、より大スケールで行う  
ことができる。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】本発明の培養バッグの一例である。

【図 2】実施例の結果を示す図面である。

【図 3】実施例の結果を示す図面である。

【図 4】実施例の結果を示す図面である。

【図 5】実施例の結果を示す図面である。

【図 6】実施例の結果を示す図面である。

【図 7】実施例の結果を示す図面である。

20

【図 8】実施例の結果を示す図面である。

【図 9】実施例の結果を示す図面である。

【図 1 0】実施例の結果を示す図面である。

【図 1 1】実施例の結果を示す図面である。

【図 1 2】実施例の結果を示す図面である。

【図 1 3】実施例の結果を示す図面である。

【図 1 4】実施例の結果を示す図面である。

【図 1 5】実施例の結果を示す図面である。

【図 1 6】実施例の結果を示す図面である。

【図 1 7】実施例の結果を示す図面である。

30

【図 1 8】実施例の結果を示す図面である。

【図 1 9】実施例の結果を示す図面である。

【図 2 0】実施例の結果を示す図面である。

【図 2 1】実施例の結果を示す図面である。

【図 2 2】実施例の結果を示す図面である。

【図 2 3】実施例の結果を示す図面である。

【図 2 4】実施例の結果を示す図面である。

【図 2 5】実施例の結果を示す図面である。

【図 2 6】実施例の結果を示す図面である。

【図 2 7】実施例の結果を示す図面である。

40

【図 2 8】実施例の結果を示す図面である。

【図 2 9】実施例の結果を示す図面である。

【図 3 0】実施例の結果を示す図面である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 2 】

#### 1 . 分化細胞の製造方法及びその方法のために使用する培養バッグ

本発明の分化細胞の製造方法は、多能性幹細胞から胚様体 ( E B ) 法により分化細胞を製  
造する方法であって、

( 1 ) パーフルオロポリマーを内側表面に有する培養バッグを用いて多能性幹細胞を培養  
することにより胚様体を形成する工程、及び

50

(2) 前記工程(1)において得られた胚様体に含まれる多能性幹細胞を分化誘導させる工程を含む、方法である。

【0013】

1.1 工程(1)

1.1.1 培養バッグ

培養バッグは、パーフルオロポリマーを内側表面に有する培養バッグであり、培養時に培養細胞が接触しうる表面が、少なくともパーフルオロポリマーで覆われている。これにより、培養バッグ表面に多能性幹細胞が付着しにくく、胚様体が正常に形成されうる。

【0014】

培養バッグは、十分なガス透過性を有するパーフルオロポリマー自体により成形されているものであってもよい。その場合は、培養バッグを形成するフィルムが、パーフルオロポリマー自体により成形されており、さらに必要に応じて、一種又は二種以上のコーティングがなされていてもよい。

【0015】

本発明の効果が得られるためには、パーフルオロポリマーが細胞と接触する部分に存在する必要がある、その限りにおいて、そのようなコーティングがなされていてもよい。したがって、コーティングがなされている場合、特別な事情がある場合を除き、通常、それは培養バッグの外側であるか、あるいは、細胞と接触しない部分である。

【0016】

培養バッグの大きさは特に制限されず、適宜設定しうる。特に限定されず、例えば、容量の下限が、10ml、20ml、50ml又は100mlであってもよい。また、容量の上限が、500ml、400ml、300ml又は200mlであってもよい。培養バッグの容量の範囲の一例として、10ml～500ml等が挙げられる。

【0017】

本明細書において、「パーフルオロポリマー」とは、基本的に、分子内に水素を含まず、炭素とフッ素とから構成されるポリマー、又は基本的に炭素とフッ素とから構成され、一部に酸素等を含むポリマーを意味する。

【0018】

ただし、パーフルオロポリマーは、非フッ素化基末端を含んでいてもよい。本発明において、「非フッ素化基末端」とは、反応性を示し、一般に不安定末端といわれる末端を意味し、具体的には、 $-COF$ 、 $-COOH$ 、水と会合した $-COOH$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CONH_2$ 及び $-COOCH_3$ 等の官能基が挙げられる。これら非フッ素化基末端は、重合反応時において、反応開始剤等に由来して生じるものである。

【0019】

パーフルオロポリマーは、非フッ素化基末端を合計した数が、炭素 $1 \times 10^6$ 当たり70個以下のパーフルオロポリマーであることが好ましい。この場合、強い細胞非接着性が発揮されうる。本発明のより具体的な態様においては、パーフルオロポリマーは、 $-COF$ 、 $-COOH$ 、水と会合した $-COOH$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CONH_2$ 及び $-COOCH_3$ を合計した数が、炭素 $1 \times 10^6$ 当たり70個以下のパーフルオロポリマーであることが好ましい。

【0020】

また、上記の、非フッ素化基末端を合計した、炭素 $1 \times 10^6$ 当たりの数の範囲としては、50個以下、35個以下、15個以下、10個以下、5個以下及び2個以下が、この順で好ましい。 $-COF$ 、 $-COOH$ 、水と会合した $-COOH$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CONH_2$ 及び $-COOCH_3$ を合計した数についても同様である。

【0021】

パーフルオロポリマーは、非フッ素化基末端と $-CF_2H$ 基末端とを合計した数が、炭素 $1 \times 10^6$ 当たり70個以下のパーフルオロポリマーであることが好ましい。上記の、非フッ素化基末端と $-CF_2H$ 基末端とを合計した、炭素 $1 \times 10^6$ 当たりの数の範囲とし

10

20

30

40

50

ては、35個以下、20個以下及び10個以下が、この順で好ましい。

【0022】

パーフルオロポリマーは、 $-CF_2H$ 基末端を含まないことが好ましい。

【0023】

非フッ素化基末端及び $-CF_2H$ 基末端の数は、FT-IRにより算出することができる。

【0024】

パーフルオロポリマー中の非フッ素化基末端の量を上記範囲内とするには、特に限定されず、以下の方法を採用することができる。例えば、重合反応時に連鎖移動剤又は重合触媒等を使用することにより末端基を制御して非フッ素化基末端の生成を抑制する方法が挙げられる。また、重合反応により得られたポリマーと、フッ素ラジカル源となるフッ素含有化合物とを接触させて非フッ素化基末端をフッ素化する方法等も挙げられる。

10

【0025】

上記において、重合反応により得られたパーフルオロポリマーと、フッ素ラジカル源となるフッ素含有化合物とを接触させる操作は、パーフルオロポリマーを懸濁重合又は乳化重合等の方法により得た後、溶融押出する前後のいずれの段階においても行うことができる。さらに、該操作は、パーフルオロポリマーを成形加工した後の段階においても行うことができる。また、該操作は、溶融押出する前後、並びに成形加工した後、という三段階のうち二段階以上において重ねて行っても効果的であり得る。

【0026】

非フッ素化基末端をフッ素化する方法において用いられるフッ素ラジカル源となるフッ素含有化合物としては、特に限定されず、幅広く用いることができる。例えば、 $IF_5$ 及び $ClF_3$ 等のフッ化ハロゲン、並びにフッ素ガス( $F_2$ )、 $CoF_3$ 、 $AgF_2$ 、 $UF_6$ 、 $OF_2$ 、 $N_2F_2$ 及び $CF_3OF$ 等が挙げられる。

20

【0027】

フッ素ガスを使用する場合、100%濃度のガスを使用してもよいが、安全面からは不活性ガスと混合した上で使用することが推奨されうる。その場合の混合比率としては、特に限定されず、例えば、フッ素ガス濃度5~50質量%とすることができ、なかでもフッ素ガス濃度15~30質量%が好ましい。不活性ガスとしては、特に限定されず、窒素ガス、ヘリウムガス及びアルゴンガス等を幅広く使用できるが、費用対効果の面では窒素ガスが好ましい。

30

【0028】

重合反応により得られたポリマーと、フッ素ラジカル源となるフッ素含有化合物とを接触させて非フッ素化基末端をフッ素化する方法においては、処理温度を20~220とすることが好ましく、100~200とすることがより好ましい。処理時間は、5~30時間が好ましく、10~20時間がより好ましい。

【0029】

パーフルオロポリマーは、少なくとも1種のパーフルオロエチレン性単量体から誘導される繰り返し単位を有する単独重合体又は共重合体であることが好ましい。

【0030】

パーフルオロポリマーは、テトラフルオロエチレン(TFE)及びヘキサフルオロプロピレン(HFP);並びに $CF_2=CF-R_f$ (式中、 $R_f$ は、炭素数1~8のパーフルオロアルキル基を表す。)で表されるパーフルオロ(アルキルビニルエーテル)(PAVE)からなる群より選択される少なくとも1種の含フッ素エチレン性単量体由来する繰り返し単位を有することが好ましい。

40

【0031】

PAVEとしては、特に限定されず、例えば、パーフルオロ(メチルビニルエーテル)(PMVE)、パーフルオロ(エチルビニルエーテル)(PEVE)、パーフルオロ(プロピルビニルエーテル)(PPVE)、パーフルオロ(ブチルビニルエーテル)、パーフルオロ(ペンチルビニルエーテル)、パーフルオロ(ヘキシルビニルエーテル)及びパーフルオロ(ヘプチルビニルエーテル)等が挙げられる。

50

## 【0032】

パーフルオロポリマーとしては、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、TFE/HFP共重合体（FEP）、TFE/PAVE共重合体（PFA）及びTFE/HFP/PAVE共重合体等を挙げることができる。これらのうち、FEP及びPFAが好ましく、FEPがより好ましい。

## 【0033】

FEPにおけるTFE：HFPの質量比は、80：20～97：3が好ましく、84：16～92：8がより好ましい。

## 【0034】

PFAにおけるTFE：PAVEの質量比は、90：10～98：2が好ましく、92：8～97：3がより好ましい。

10

## 【0035】

TFE/HFP/PAVE共重合体におけるTFE：HFP：PAVEの質量比は、70～97/2.5～20/0.1～10が好ましい。

## 【0036】

培養バッグは、例えば、上記パーフルオロポリマーからなるフィルムを二枚、重ね合わせた上で、縁部を、レーザー溶着又はインパルスシーラー等を用いてヒートシールする方法等により製造することができる。

## 【0037】

## 1.1.2 多能性幹細胞

多能性幹細胞としては、特に限定されず、未分化状態を保持したまま増殖できるという意味での自己再生能と、三胚葉系列すべてに分化できるという意味での分化多能性（pluripotency）、とを兼ね備える未分化細胞を使用できる。

20

## 【0038】

多能性幹細胞の具体的としては、例えば、ES細胞、iPS細胞、奇形癌腫細胞由来である胚性癌（EC）細胞（Embryonal Carcinoma cell）、始原生殖細胞由来である胚性生殖（EG）細胞（Embryonic Germ cell）、精巣組織からGS細胞を樹立培養する過程で単離されうるmultipotent Germ line Stem（mGS）細胞及び骨髄から単離されうるMultipotent Adult Progenitor Cell（MAPC）等が挙げられる。

30

## 【0039】

ES細胞としては、体細胞から核初期化されて生じたES細胞も使用できる。

## 【0040】

多能性幹細胞として、好ましくはES細胞又はiPS細胞を使用できる。

## 【0041】

多能性幹細胞の由来は哺乳動物の中から特に限定されず、目的とする分化細胞の使用用途に応じて選択すればよい。例えば、樹立可能な限りにおいて、ヒト、サル、ブタ、ウサギ、イヌ、ラット及びマウス等の中から選択することができる。

## 【0042】

iPS細胞の由来については特に限定されず、各種体細胞から適宜選択することができる。例えば、線維芽細胞、滑膜細胞、Tリンパ球、歯髄幹細胞、臍帯血細胞及び末梢血単核球等が挙げられる。

40

## 【0043】

多能性幹細胞の培養液中の濃度は、特に限定されず、使用細胞種等に応じて適宜設定できる。例えば、 $3.3 \times 10^3 \sim 3.3 \times 10^5$  個/mlであってもよく、 $3.3 \times 10^4 \sim 3.3 \times 10^5$  個/mlであれば好ましく、 $3.3 \times 10^4$  個/ml程度であればより好ましい場合がある。

## 【0044】

## 1.1.3 培養条件

培養条件は、特に限定されず、通常のEB法に準じて行うことができ、適宜改変を行って

50

もよい。

【0045】

胚様体が形成されるまでの概略は以下の通りである。多能性幹細胞を、必要に応じて血清や成長因子等の各種添加物を含みうる培養液に分散させ、細胞懸濁液を得る。この細胞懸濁液を、本発明の培養容器内に入れ、CO<sub>2</sub>インキュベーター内等の、所定の環境下で培養する。培養開始後、通常2～7日間程度で胚様体が形成されうる。

【0046】

培養は、培養バッグを振とうしながら行うことが好ましい。振とう条件は、特に限定されず、適宜設定しうる。

【0047】

#### 1.2 工程(2)

工程(2)は、前記工程(1)において得られた胚様体に含まれる多能性幹細胞を分化誘導させることにより分化細胞を得る工程である。

【0048】

分化誘導の条件は、特に限定されず、使用細胞種及び目的とする分化細胞種等に応じて適宜設定できる。通常、所定のサイトカイン、増殖因子又はその他の化合物を培養液中に所定濃度添加して培養を行うことにより分化を誘導しうる。

【0049】

工程(1)と工程(2)とを同時に行ってもよい。この場合、工程(2)において用いる上記化合物の存在下で、工程(1)を行うことができる。

【0050】

分化細胞は、特に限定されず、各種前駆細胞でありうる。例えば、Tリンパ球由来のT-iPS細胞を多能性幹細胞として用いて工程(1)及び(2)を所定条件下で行うことにより、造血前駆細胞が得られうる。

【0051】

#### 2. 胚様体及び分化細胞集団

本発明の胚様体は、本発明の製造方法の工程(1)により得られうる、胚様体である。

【0052】

本発明の胚様体は、少なくとも従来のEB法により得られる胚葉体と同様の特性を有していると考えられる。

【0053】

本発明の分化細胞集団は、本発明の製造方法により得られうる、分化細胞集団である。

【実施例】

【0054】

以下に本発明の構成及び効果をより明らかに示すために、実験例(実施例及び比較例を含む)を示す。ただし、当該実験例は本発明の理解を容易にするための一例であり、本発明の範囲は、かかる実験例によって拘束されるものではない。

【0055】

#### 実施例1～4. 培養バッグの作成

材質として、FEP及びPFAをそれぞれ用い、これらのペレットを溶融成形することにより、それぞれのフィルムを得た。

【0056】

また、上記のペレット溶融押出時に、フッ素化を行った他は同様にして、二種類のフィルムを得た。

【0057】

106mm×66mmサイズで厚さ100μmのフィルムを、インパルスシーラーを用いてシール時間50秒、シール圧0.2MPa、シール幅3mmの条件でヒートシールし、上部に各フィルムと同じ材質のポートを1個付けた4種類の各バッグ(実施例1～4)を製造した(図1)。

【0058】

10

20

30

40

50



厚さ250～300 μm程度の各材質のサンプルを、各フィルムを重ね合わせるにより作製し、FT-IR Spectrometer 1760X (Perkin-Elmer社製)を用いて分析を行った。

【0059】

上記サンプルは、各フィルムを重ね合わせるにより作製した。

【0060】

標準スペクトル(もはやスペクトルに実質的に差異がみられなくなるまで十分にフッ素化したサンプル)との差スペクトルを取得し、各ピークの吸光度を読み取り、次式にしたがって炭素数 $1 \times 10^6$ 個あたりの非フッ素化基末端数及び $-CF_2H$ 基末端数を算出した。培養バッグそれぞれの、非フッ素化基末端数及び $-CF_2H$ 基末端数を表2に示す。

10

【0061】

非フッ素化基末端及び $-CF_2H$ 基末端の合計数(炭素数 $1 \times 10^6$ 個あたり) =  $1 \cdot k / t$

l : 吸光度

k : 補正係数(表1)

t : サンプルの厚さ(mm)

【0062】

【表1】

末端基	吸収波数 ( $cm^{-1}$ )	補正係数
-COF	1884	405
-COOH (水と会合していない)	1813	455
=COOH (水と会合した)	1775 1790	455
-COOCH <sub>3</sub>	1795	355
-CONH <sub>2</sub>	3438	480
-CH <sub>2</sub> OH	3648	2325
-CF <sub>2</sub> H	3006	26485

20

【0063】

【表2】

	フッ素樹脂	非フッ素化基末端数	$-CF_2H$ 基末端数
実施例1	FEP	21	424
実施例2	FEP	13	0
実施例3	PFA	201	159
実施例4	PFA	25	0

30

【0064】

実施例5. 分化誘導細胞集団の製造

(1) EBの作成

Matrigel (Corning Life Sciences) でコーティングしたプラスチックプレート (BD Biosciences) で、T-iPS細胞を培養した。

40

【0065】

培養した未分化のT-iPS細胞をTryp-LE (GIBCO) で処理し、緩やかに細胞をはがした。なお、T-iPS細胞は、公知文献 (Nishimura、他20名、「Generation of Rejuvenated Antigen-Specific T Cells by Reprogramming to Pluripotency and Redifferentiation」、Cell Stem Cell、2013年、12、pp. 114-126) に記載の方法により得たものを使用した。

【0066】

細胞凝集物を、ペニシリン/ストレプトマイシン (10 ng/mL)、L-グルタミン (

50

2 mM)、アスコルビン酸(1 mM)、モノチオグリセロール(MTG、 $4 \times 10^{-4}$  M; Sigma)、トランスフェリン(150  $\mu$ g/mL)及びBMP-4(骨形成タンパク質-4)(10 ng/mL)を添加したStemPro-34(Invitrogen)に再懸濁した。

【0067】

実施例1~4の各バッグに、15 mLの上記細胞懸濁液を加えて培養した。細胞数は、培養開始時の量が、 $5 \times 10^5$ /バッグ及び $5 \times 10^6$ /バッグとなるようにした。

【0068】

24時間後に、最終濃度が5 ng/mLになるようにbFGF(塩基性線維芽細胞成長[増殖]因子)を加えて培養を続けた。その結果、全てのバッグにおいてEBの形成が認められた(図2)。

10

【0069】

培養開始後14日目に細胞を回収し、FACSを用いて分化傾向を解析した。フローサイトメーターとして、BD Biosciences社製、FACS Aria<sup>TM</sup> IIを使用した。

【0070】

本解析には、CD34(APCで蛍光標識)、CD34(パシフィックブルーで蛍光標識)、CD43(PEで蛍光標識)、CD-14(PE-Cy7で蛍光標識)及びCD235a(APCで蛍光標識)のそれぞれに対する蛍光標識抗体を使用した。

【0071】

解析結果を図3及び4(実施例1、細胞数 $5 \times 10^5$  cells)、図5及び6(実施例1、細胞数 $5 \times 10^6$  cells)、図7及び8(実施例2、細胞数 $5 \times 10^5$  cells)、図9及び10(実施例2、細胞数 $5 \times 10^6$  cells)、図11及び12(実施例3、細胞数 $5 \times 10^5$  cells)、図13及び14(実施例3、細胞数 $5 \times 10^6$  cells)、図15及び16(実施例4、細胞数 $5 \times 10^5$  cells)、並びに図17及び18(実施例4、細胞数 $5 \times 10^6$  cells)に示す。

20

【0072】

単球系細胞(CD14<sup>+</sup>)、赤血球系細胞(CD235a<sup>+</sup>)等が観察された。

【0073】

実施例1の培養バッグを用いて分化誘導を行った後、CD34/CD43抗体を用いて分画したCD34<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup>である造血前駆細胞の数量を測定した結果、培養開始時の細胞数が $5 \times 10^5$ /バッグのときに10,401個、 $5 \times 10^6$ /バッグのときに3,836個であった。

30

【0074】

さらに、実施例3及び4の培養バッグをそれぞれ用いて分化誘導を行った後、上記と同様に分画したCD34<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup>である造血前駆細胞の数量を測定した結果、表3の通りであった。

【0075】

【表3】

	$5 \times 10^5$ /バッグ	$5 \times 10^6$ /バッグ
実施例3の培養バッグ	9,409個	6,479個
実施例4の培養バッグ	9,202個	6,425個

40

【0076】

これらの結果から、いずれの培養バッグを用いた場合においても、大量にかつ効率よく、T-iPS細胞から造血前駆細胞へと分化誘導できることが確認された。培養開始時の細胞数については、 $5 \times 10^5$ /バッグのときのほうが、 $5 \times 10^6$ /バッグのときよりも、造血前駆細胞の収量がより高かった。

【0077】

(2) T細胞への分化誘導

50

上記の実験でソートして得られたCD34<sup>+</sup>細胞のT細胞への分化誘導能を、先述の公知文献Nishimuraに記載の方法に準じて確認した。

【0078】

4つのバッグから得られた細胞を回収して混合したものを、ガンマ線を照射したOP9-DL1細胞（理研バイオリソースセンターより提供；Watarai H、他14名、「Generation of functional NKT cells in vitro from embryonic stem cells bearing rearranged invariant Va14-Ja18 TCRa gene」、2010年、Blood、115、pp.230-237）の上に移し、OP9培地（15%ウシ胎仔血清、2mM L-グルタミン、100U/mlペニシリン、及び100ng/mlストレプトマイシンが添加されたMEM培地）を加えて、FLT-3L（FMS-related tyrosine kinase 3 Ligand）及びIL-7（インターロイキン-7）存在下で共培養することにより、T細胞系の分化誘導を行い、FACSを用いて上記と同様に分化傾向を解析した。尚、培養は、5%CO<sub>2</sub>の環境下で行った。

10

【0079】

本解析には、CD45（ブリリアントバイオレット510で蛍光標識）、TCRab（FITCで蛍光標識）、CD3（APC-Cy7で蛍光標識）、CD7（APCで蛍光標識）、CD5（PE-Cy7で蛍光標識）、CD4（ブリリアントバイオレット421で蛍光標識）、CD8（PerCP-Cy5.5で蛍光標識）及びCD8（PEで蛍光標識）のそれぞれに対する蛍光標識抗体を使用した。

20

【0080】

解析結果を図19～30に示す。

【0081】

図19～24には、末梢血をコントロールとして同様に解析を行った結果を合わせて示している。バッグから得られた細胞を分化誘導した（30日目）細胞群（図25～30）においても、分化の途中にある細胞群（CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>）が確認された。CD4及びCD8の発現量としては、それぞれ末梢血のT細胞と同等であった。これにより、バッグ内で誘導を行って得られた造血前駆細胞も、非常に高い効率でT細胞系列へ分化する能力を有していることが確認された。

【符号の説明】

30

【0082】

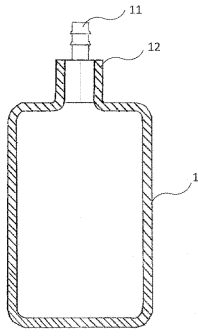
- 1 培養バッグ
- 11 ポート
- 12 シール部

40

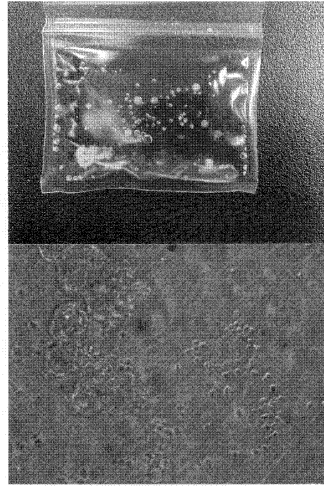
50

【図面】

【図 1】

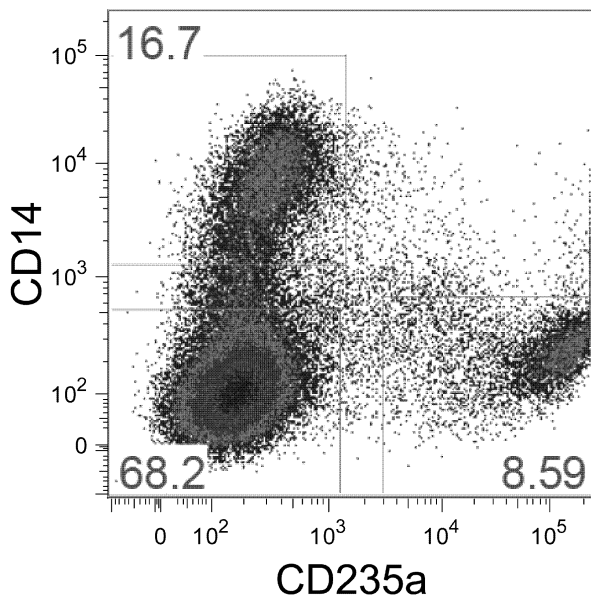


【図 2】

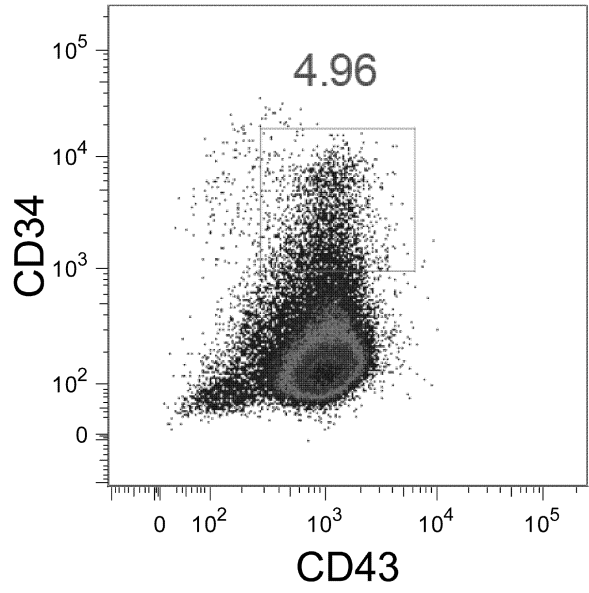


10

【図 3】



【図 4】



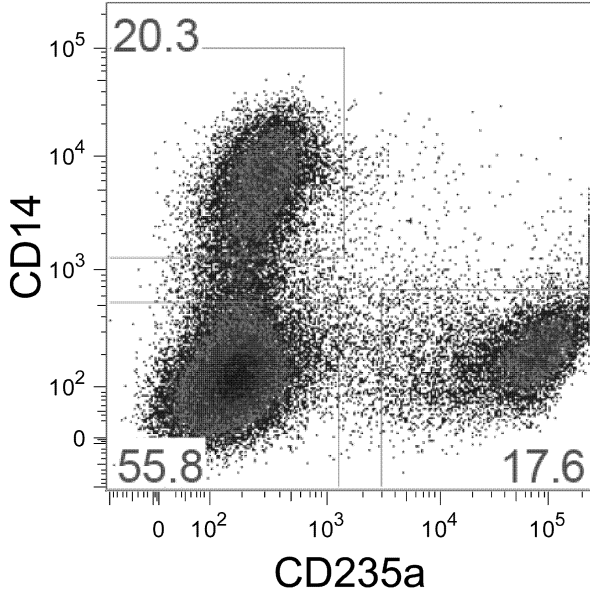
20

30

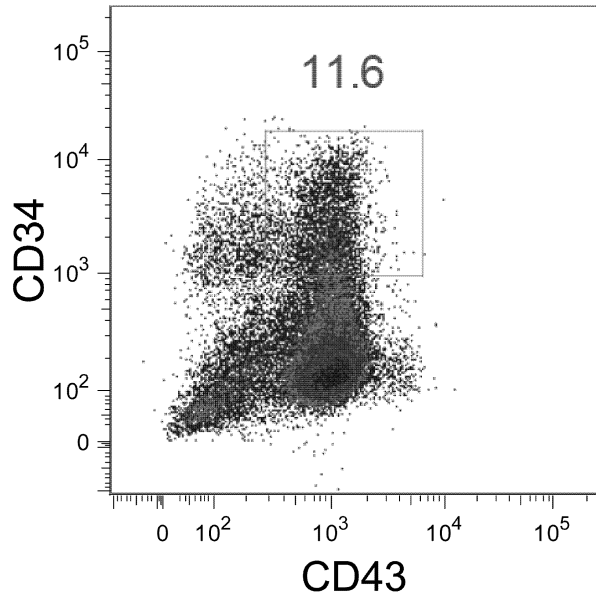
40

50

【 図 5 】

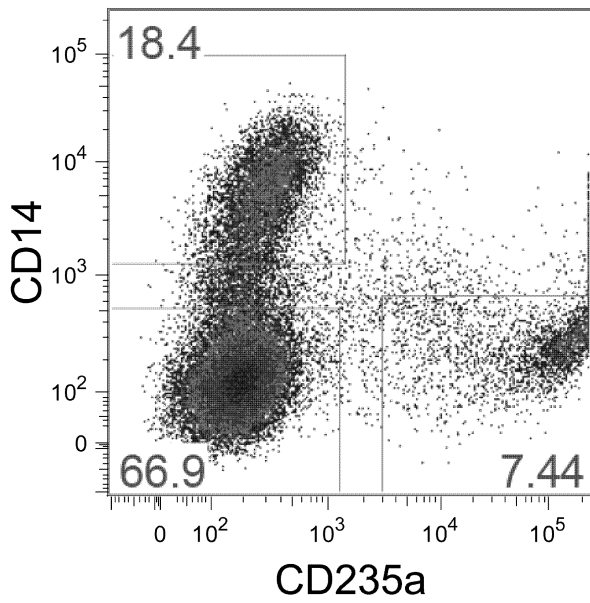


【 図 6 】

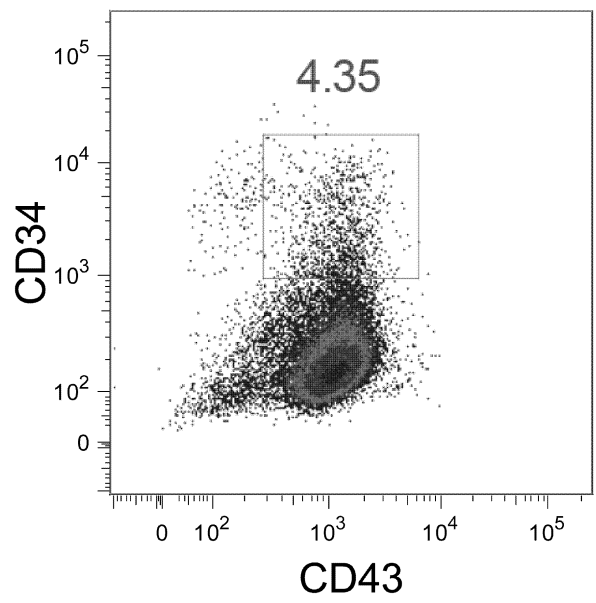


10

【 図 7 】



【 図 8 】



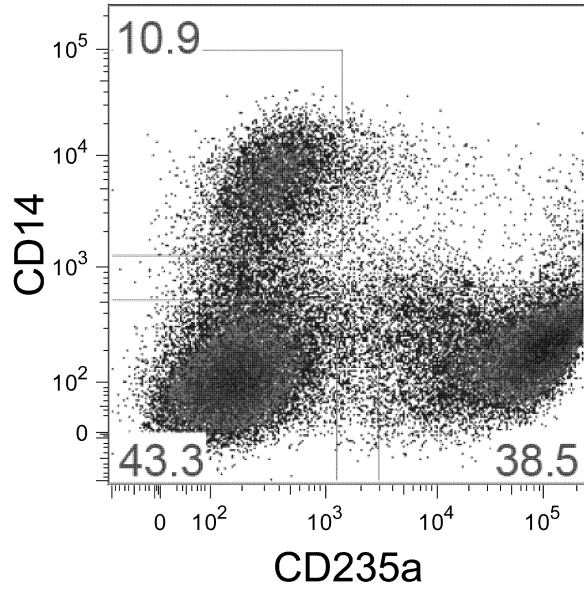
20

30

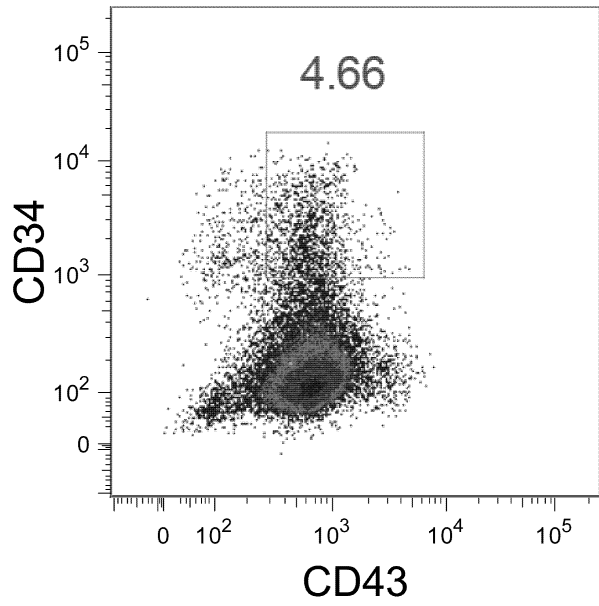
40

50

【 図 9 】

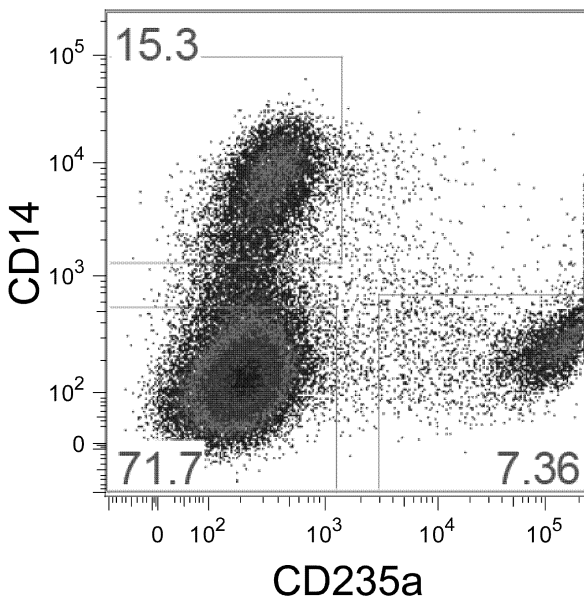


【 図 1 0 】

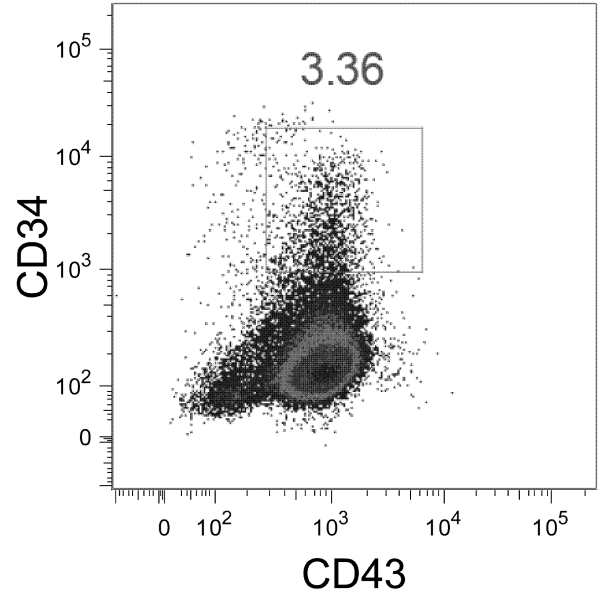


10

【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



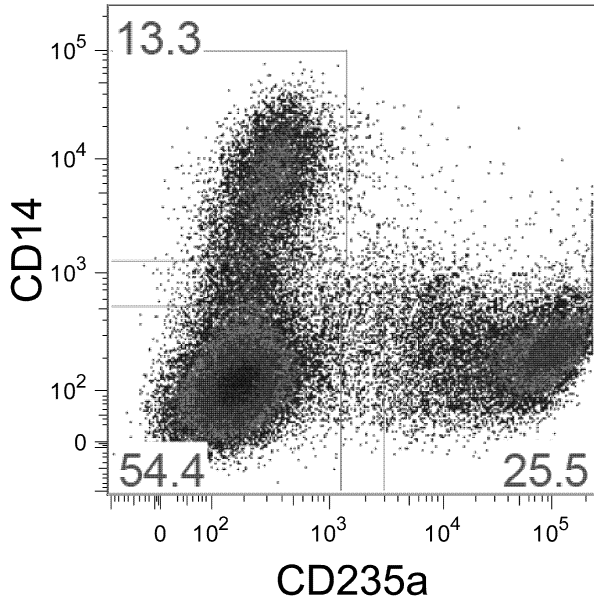
20

30

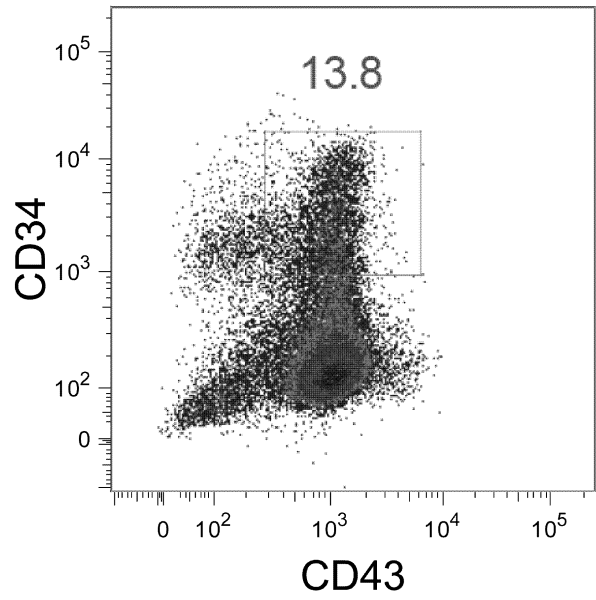
40

50

【 1 3 】

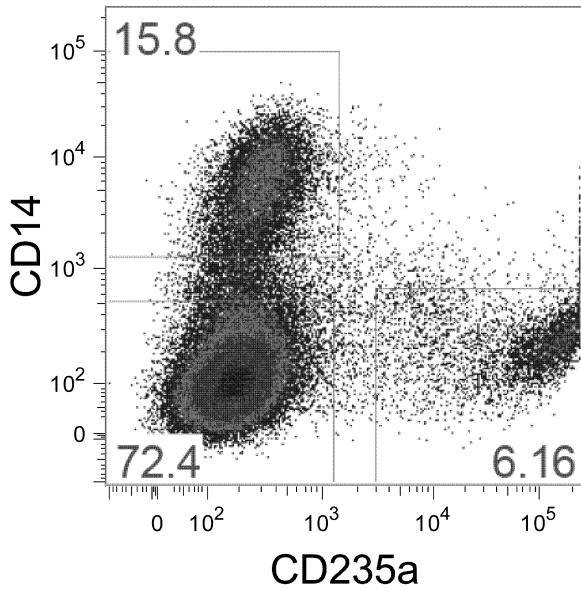


【 1 4 】

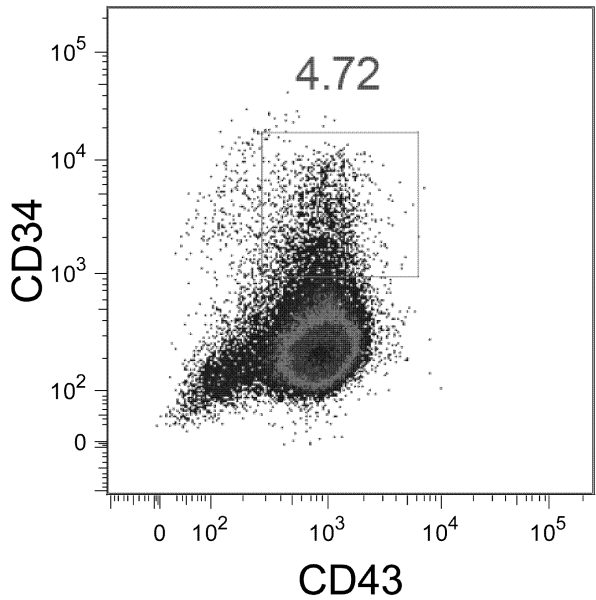


10

【 1 5 】



【 1 6 】



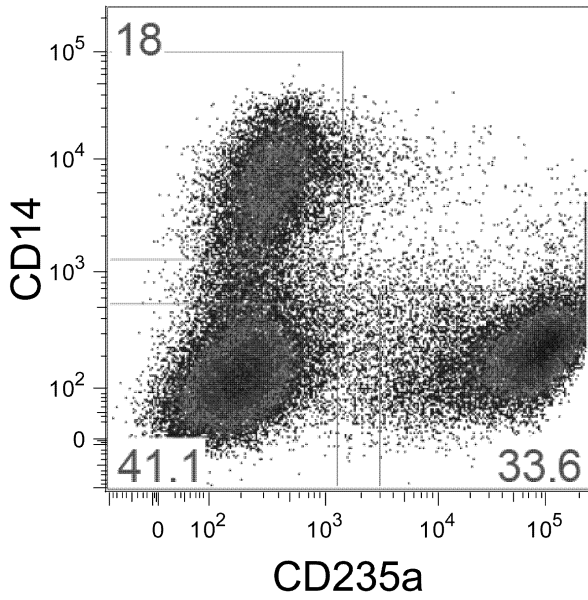
20

30

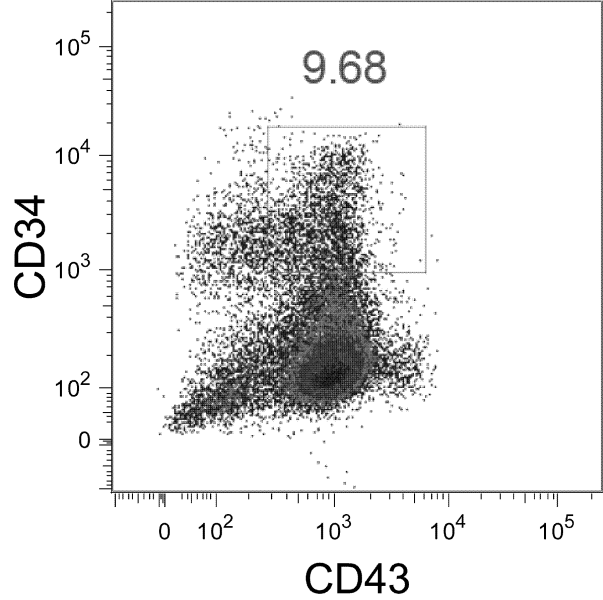
40

50

【 17 】

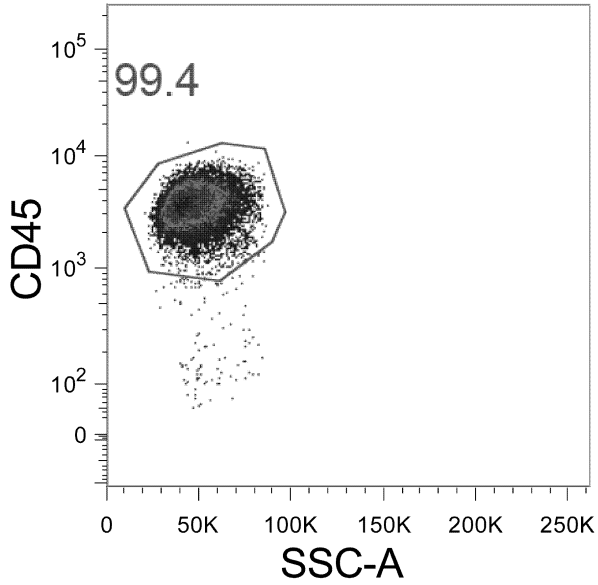


【 18 】



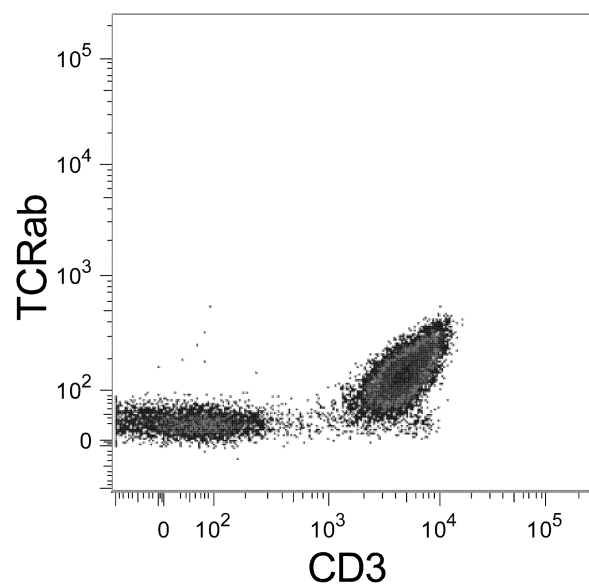
10

【 19 】



20

【 20 】



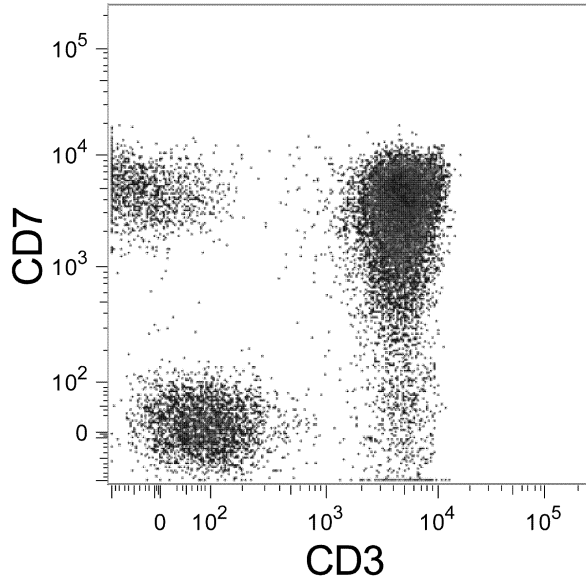
30

40

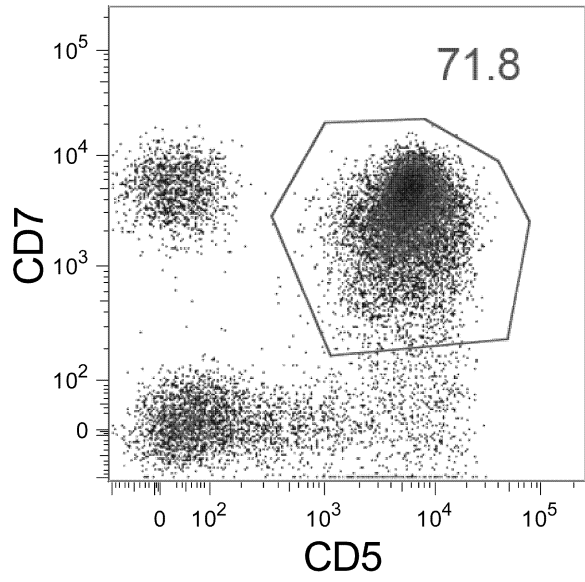
50



【 2 1 】

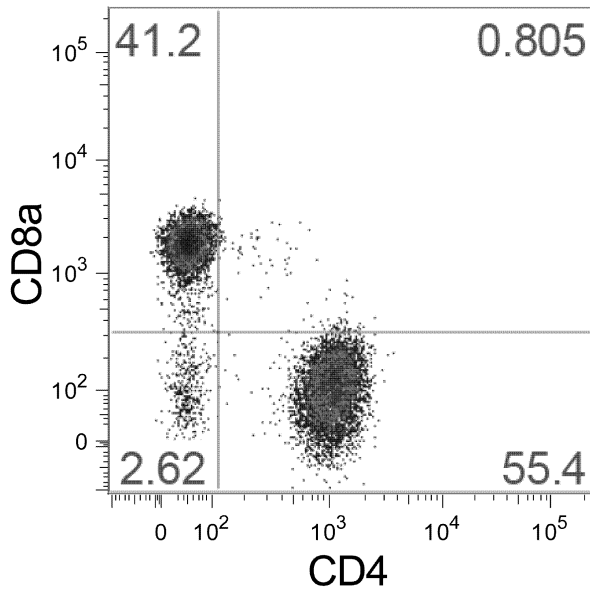


【 2 2 】



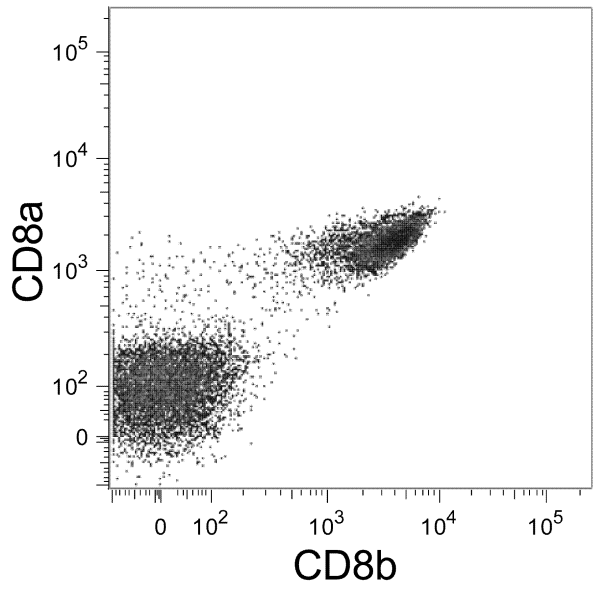
10

【 2 3 】



20

【 2 4 】

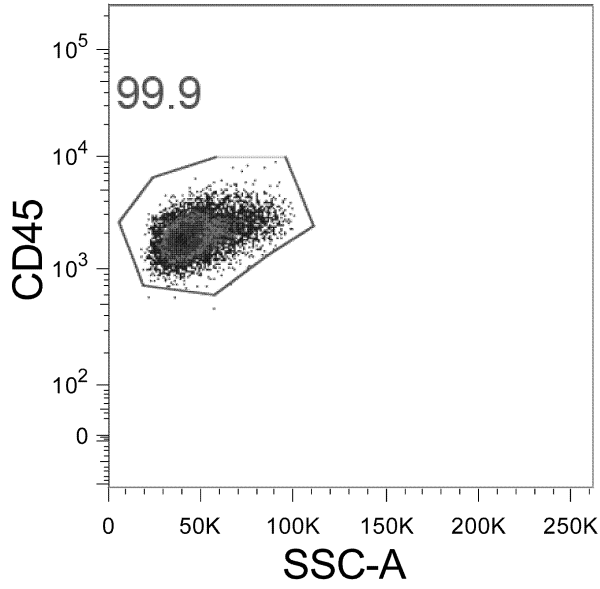


30

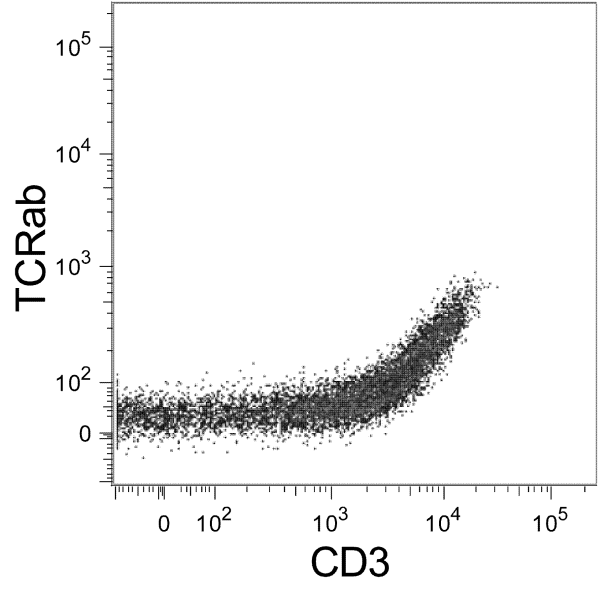
40

50

【 2 5 】

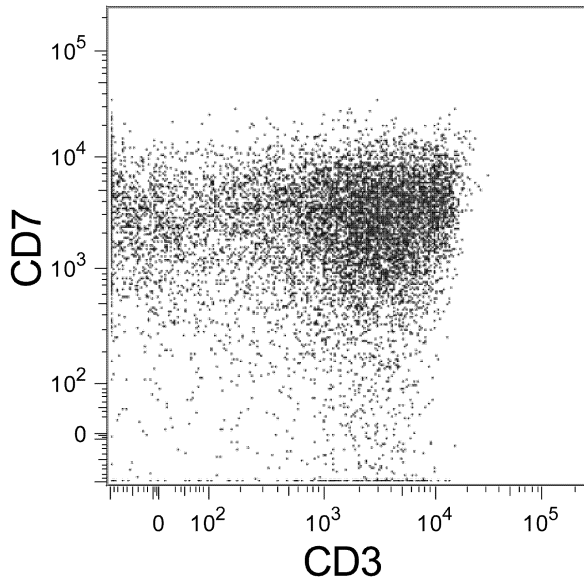


【 2 6 】

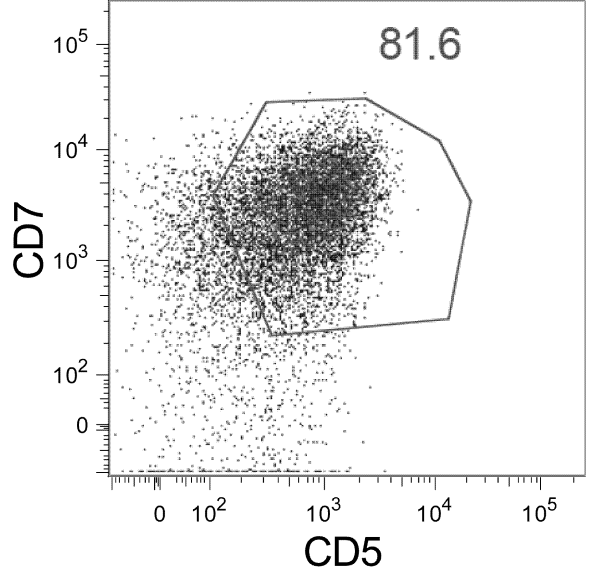


10

【 2 7 】



【 2 8 】



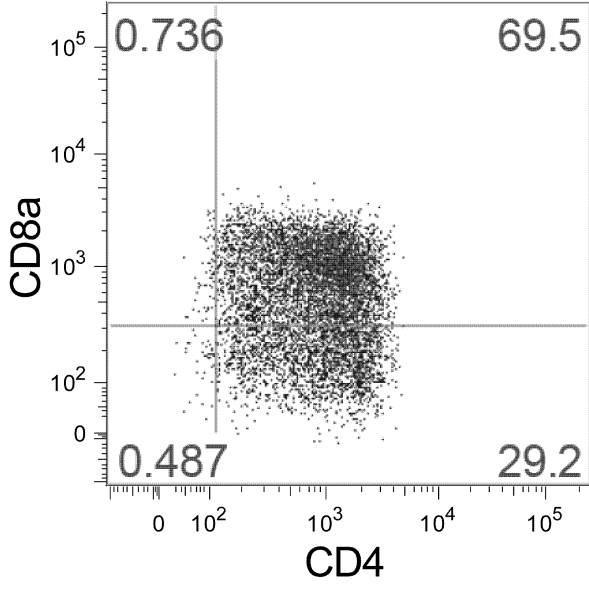
20

30

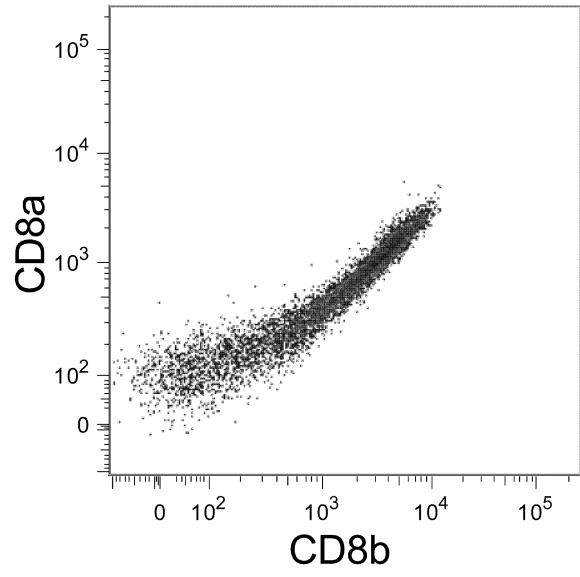
40

50

【 2 9 】



【 3 0 】



10

20

30

40

50

## フロントページの続き

号 梅田センタービル ダイキン工業株式会社内

(72)発明者 金子 新

京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 安井 裕

京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

合議体

審判長 長井 啓子

審判官 中島 庸子

伊藤 良子

(56)参考文献 国際公開第2016/104596号

特開昭63-198972号公報

MEMBRANE, 2012年, Vol. 37, No. 3, p. 132 - 139

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

IPC C12M 1/00-3/10

C12N 1/00-15/90

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)JSTPlus/JMED

Plus/JST7580(JDreamIII)

PubMed