# 明　細　書

## 発明の名称 ： 多能性（pluripotency）を有する幹細胞の培養方法

## 技術分野

[0001] 本開示は多能性を有する幹細胞の培養方法、多能性を有する幹細胞の培養中に発生した又は発生しうる未分化状態を脱した細胞を除去する方法、多能性を有する幹細胞の未分化状態を維持する方法、これらの方法に使用する組成物、及び、これらの方法に使用するキットに関する。

## 背景技術

[0002] ヒトｉＰＳ細胞などの多能性幹細胞を大量培養する際には、一連の増幅培養（継代培養）の繰り返しにより多くの未分化な細胞を調製する。この一連の培養において、未分化状態から逸脱した細胞“脱未分化細胞”が偶発的に発生することが知られている。

[0003] この脱未分化細胞は、未分化細胞とほぼ同等の分裂能力を有し、かつ、未分化細胞から脱未分化細胞への転換を誘発することが知られている。すなわち、脱未分化細胞が発生すると、その増殖速度は未分化細胞のそれを上回り、未分化細胞の増殖が抑制される。

[0004] 脱未分化細胞の発生は、熟練してない培養操作者による培養で多く観察される。また、コロニーサイズの過大や、コロニー同士の合一が発生の一因であると知られている。よって、低コンフルエントでの継代、播種時の均一性維持により、脱未分化細胞の発生頻度をある程度下げることができる。また、近年の開発された培地によっても、脱未分化細胞の発生頻度がある程度抑制されている。しかしながら、それでも脱未分化細胞は偶発的に発生し、発生した場合には、脱未分化細胞を含むコロニーを除去することが未だ必須である。

[0005] 脱未分化細胞を含むコロニーは、未分化状態を維持するため、継代時に顕微鏡下のピペッティング作業により丁寧に除去される。このようなコロニー除去の手技を模した装置、例えば、観察装置とロボットハンドリングによる

ピペッティングを組み合せた装置も開発されている。

[0006] また、特許文献１には、ｉＰＳ細胞等の多能性幹細胞の未分化を維持しつつ増殖させるために、アクチビン存在下で多能性幹細胞を培養することを開示する。

## 先行技術文献

## 特許文献

[0007] 特許文献1：特開２０１２－１４３２２９号公報

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0008] 上述したとおり、ヒトｉＰＳ細胞等の多能性幹細胞の継代培養では、脱未分化現象を引き起こしやすく、未分化維持が困難で、数回の継代後には多くのｉＰＳ細胞コロニーが脱未分化現象を引き起こし、未分化状態を脱した細胞を含む劣化コロニーとなりうる。よって、丁寧な培養、及び、丁寧なコロニーの選別という煩雑な操作が不可欠となる。幹細胞産業を促進する点からも、煩雑な操作が少なく、熟練者でなくても可能な、多能性幹細胞の未分化維持方法が望まれている。

[0009] 本開示は、一態様において、多能性（“pluripotency”、以下同様）を有する幹細胞の培養中のコロニーに発生する「未分化状態を脱した細胞」を除去できる方法を提供する。

## 課題を解決するための手段

[0010] 本開示は、一態様において、多能性を有する幹細胞の培養方法であって、細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で細胞培養することを含む方法に関する。本開示は、その他の態様において、多能性を有する幹細胞の培養中に発生した又は発生しうる未分化状態を脱した細胞を除去する方法であって、細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で細胞培養することを含む方法に関する。本開示は、その他の態様において、多能性を有する幹細胞の未分化状態を維持する方法であって、細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で細胞培養す

ることを含む方法に関する。本開示は、その他の態様において、本開示にかかる上述の方法に使用するための、細胞間接着を阻害可能な物質を含む組成物に関する。本開示は、その他の態様において、多能性を有する幹細胞用の培地成分と細胞間接着を阻害可能な物質とを含むキットに関する。

## 発明の効果

[0011] 本開示によれば、一態様において、多能性を有する幹細胞の培養中のコロニーに発生する「未分化状態を脱した細胞」を除去できるという効果が奏されうる。

## 図面の簡単な説明

[0012] [図1]図１は、本開示の一実施形態における、多能性を有する幹細胞の培養中のコロニーに発生した「未分化状態を脱した細胞」が、細胞間接着を阻害可能な物質の添加により除去される様子を説明する図である。

[図2]図２は、本開示の一実施形態における、多能性を有する幹細胞の培養中のコロニーに発生した「未分化状態を脱した細胞」が、細胞間接着を阻害可能な物質の添加により除去される様子を説明する図である。

[図3]図３は、本開示の一実施形態における、多能性を有する幹細胞の培養中のコロニーに発生する「未分化状態を脱した細胞」が、細胞間接着を阻害可能な物質の添加により除去される様子を説明する図である。

[図4]図４は、本開示の一実施形態における、多能性を有する幹細胞の培養中のコロニーに発生する「未分化状態を脱した細胞」が、細胞間接着を阻害可能な物質の添加により除去される様子を説明する図である。

[図5]図５は、実施例で行った実験のスケジュールを説明する図である。

[図6]図６は、終濃度１００ｎＭのＨＡ－１をｄａｙ３に添加した時の顕微鏡観察写真の一例である。

[図7]図７は、終濃度５０ｎＭのＨＡ－１をｄａｙ３に添加した時の顕微鏡観察写真の一例である。

[図8]図８は、終濃度１０ｎＭのＨＡ－１をｄａｙ３に添加した時の顕微鏡観察写真の一例である。

[図9]図９は、終濃度１ｎＭのＨＡ－１をｄａｙ３に添加した時の顕微鏡観察写真の一例である。

[図10]図１０は、終濃度１００ｎＭのＨＡ－２をｄａｙ３に添加した時の顕微鏡観察写真の一例である。

[図11]図１１は、終濃度５０ｎＭのＨＡ－２をｄａｙ３に添加した時の顕微鏡観察写真の一例である。

[図12]図１２は、終濃度１ｎＭのＨＡ－２をｄａｙ３に添加した時の顕微鏡観察写真の一例である。

[図13]図１３は、終濃度１００ｎＭのＨＡ－２をｄａｙ３に添加した時の顕微鏡観察写真の一例である。

[図14]図１４は、終濃度５０ｎＭのＨＡ－３をｄａｙ３に添加した時の顕微鏡観察写真の一例である。

[図15]図１５は、終濃度１０ｎＭのＨＡ－３をｄａｙ３に添加した時の顕微鏡観察写真の一例である。

[図16]図１６は、終濃度１００、５０、及び１０ｎＭのＨＡ－４をｄａｙ３に添加した時の顕微鏡観察写真の一例である。

[図17]図１７は、ＭＥＦフィーダ細胞を用いた多能性を有する幹細胞の培養時の顕微鏡観察写真の一例である。

[図18]図１８は、Ｒａｃ－１　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒをｄａｙ３に添加した後、終濃度５０ｎＭのＨＡ－１をｄａｙ５に添加した時の顕微鏡観察写真の一例である。

[図19]図１９は、多能性を有する幹細胞のフィーダレス培養時の顕微鏡観察写真の一例である。

[図20]図２０は、２０１Ｂ７株又は４５４Ｅ－２株を用いた時の顕微鏡観察写真の一例である。

[図21]図２１は、実施例で行った実験のスケジュールを説明する図である。

[図22]図２２は、継代培養時の未分化コロニーの割合を示すグラフである。

## 発明を実施するための形態

[0013] 本開示は、一態様において、多能性を有する幹細胞を、細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で培養すると、培養中のコロニー内に発生した及び／又は発生する未分化状態を脱した細胞を除去することができる、という知見に基づく。また、本開示は、一態様において、培養細胞中に未分化細胞と未分化状態を脱した細胞とが混合している場合において、細胞間接着を阻害可能な物質が、未分化状態を脱した細胞を選択的に除去できるという知見に基づく。

[0014] 本開示における、細胞間接着を阻害可能な物質の添加により、多能性を有する幹細胞の培養中のコロニーに発生した「未分化状態を脱した細胞」を除去する、限定されない一又は複数の実施形態を、図１に基づき説明する。図１Ａは、プレート上で培養される未分化状態の細胞コロニーの中央部に、未分化状態を脱した細胞が発生した状態を示す。この状態で培養液に「細胞間接着を阻害可能な物質」を添加すると、未分化状態を脱した細胞が除去され始め（図１Ｂ）、やがて、コロニー中央部から未分化を脱した細胞が消滅する（図１Ｃ）。その後培養を続けることにより未分化状態の細胞が増殖し、未分化状態のコロニーが形成される（図１Ｄ）。同図に示すとおり、本開示によれば、限定されない一又は複数の実施形態において、「未分化状態を脱した細胞」を“消しゴムで消すように”取り除くことができる。

[0015] 図１の実施形態において未分化状態を脱した細胞が除去されるメカニズムは以下のように推定されるが、本開示はこれらのメカニズムに限定して解釈されなくてもよい。まず、未分化状態を脱した細胞は、未分化状態の細胞よりも細胞間接着及び足場への接着が弱く、細胞間にギャップができやすくなると考えられる（図２Ａ）。この細胞間のギャップに細胞間接着を阻害可能な物質が入り込むことにより、未分化状態を脱した細胞の細胞間接着はさらに弱くされ、形態変化が生じ、細胞増殖が抑制されると考えられる（図２Ｂ）。また、このとき、培養面の足場との細胞接着が弱くなった未分化状態を脱した細胞は、浮遊し、アポトーシスにより取り除かれると考えられる（図２Ｂ）。周囲の未分化状態の細胞が増殖するにつれ、未分化状態を脱した細

胞は中央部分に押し込まれ（図２Ｃ）、最終的にはアポトーシスにより排除される（図２Ｄ）。

[0016] 本開示における、細胞間接着を阻害可能な物質の添加により、多能性を有する幹細胞の培養中のコロニーに発生する「未分化状態を脱した細胞」を除去する、限定されない一又は複数の実施形態を、図３に基づき説明する。図３Ａは、プレート上で培養される未分化状態の細胞コロニーを示す。この状態で培養液に「細胞間接着を阻害可能な物質」を添加すると、このコロニーに未分化状態を脱した細胞が発生しても（図３Ｂ）、未分化状態を脱した細胞の増殖が抑制され、やがて、除去される（図３Ｃ）。その後培養を続けることにより未分化状態のコロニーが形成され続ける（図３Ｄ）。

[0017] 図３の実施形態において未分化状態を脱した細胞が除去されるメカニズムは以下のように推定されるが、本開示がこれらのメカニズムに限定して解釈されなくてもよい。最初は未分化状態の細胞のコロニーであり、相互の細胞間接着が強いと考えられる（図４Ａ）。このコロニーに偶発的に未分化状態を脱した細胞が発生する（図４Ｂ）。未分化状態を脱した細胞は、未分化状態の細胞よりも細胞間接着が弱く、細胞間にギャップができやすくなると考えられる。この細胞間のギャップに細胞間接着を阻害可能な物質が入り込むことにより、未分化状態を脱した細胞の細胞間接着はさらに弱くされ、形態変化が生じ、細胞増殖が抑制されると考えられる。また、このとき、培養面との細胞接着がなくなった未分化状態を脱した細胞は、増殖を続ける周囲の未分化状態の細胞に押し出され、アポトーシスにより取り除かれると考えられる（図４Ｃ）。

[0018] よって、本開示は、一態様において、多能性を有する幹細胞の培養方法であって、細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で細胞培養することを含む方法（以下、「本開示にかかる培養方法」ともいう。）に関する。本開示にかかる培養方法によれば、一態様において、多能性を有する幹細胞の培養中のコロニーに発生する「未分化状態を脱した細胞」を除去できるという効果が奏されうる。

[0019] したがって、本開示は、その他の態様において、多能性を有する幹細胞の培養中に発生した又は発生しうる未分化状態を脱した細胞を除去する方法であって、細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で細胞培養することを含む方法（以下、「本開示にかかる除去方法」ともいう。）に関する。本開示にかかる培養方法、及び／又は、本開示にかかる除去方法によれば、一態様において、未分化状態を脱した細胞が発生し劣化した未分化状態の細胞のコロニーから、未分化状態を脱した細胞を除去し、未分化状態の細胞のコロニー又は未分化状態の細胞からなるコロニーとすることができる。

[0020] したがって、本開示は、その他の態様において、未分化状態を脱した細胞が発生し劣化したコロニーから未分化状態の細胞からなるコロニーを形成する方法であって、細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で前記劣化したコロニーを培養することを含む方法（以下、「本開示にかかるコロニー形成方法」ともいう。）に関する。

[0021] また、本開示にかかる培養方法、及び／又は、本開示にかかる除去方法によれば、一態様において、未分化状態細胞又は未分化状態細胞のみを培養することができる。したがって、本開示は、その他の態様において、多能性を有する幹細胞の未分化状態を維持する方法であって、細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で細胞培養することを含む方法（以下、「本開示にかかる維持方法」ともいう。）に関する。

[0022] ［多能性を有する幹細胞］

本開示において、多能性を有する幹細胞は、限定されない一又は複数の実施形態において、ヒト多能性（pluripotent）幹細胞である。本開示において、ヒト多能性幹細胞は、限定されない一又は複数の実施形態において、ヒトｉＰＳ細胞又はヒトＥＳ細胞である。

[0023] ［未分化状態を脱した細胞］

本開示において、未分化状態を脱した細胞とは、限定されない一又は複数の実施形態において、細胞の形態が未分化状態の細胞のそれとは異なり、判別可能である。本開示において「未分化状態を脱した細胞」は、「脱未分化

細胞」又は「未分化逸脱細胞」とも言う場合がある。脱未分化細胞となったことは、限定されない一又は複数の実施形態において、未分化マーカーの消失で確認できる。前記未分化マーカーは、限定されない一又は複数の実施形態において、Ｏｃｔ３／４、Ｎａｎｏｇ、ＳＳＥＡ－４、ＴＲＡ－１－６０である。

[0024] ［細胞間接着を阻害可能な物質］

本開示において、細胞間接着を阻害可能な物質は、限定されない一又は複数の実施形態において、Ｅ－カドヘリンの機能阻害活性を有する物質である。本開示において、細胞間接着を阻害可能な物質は、限定されない一又は複数の実施形態において、効率的に脱未分化細胞を除去する観点から、Ｅ－カドヘリンの機能阻害活性に加え、細胞表面への結合能を有することが好ましい。前記細胞表面への結合能は、限定されない一又は複数の実施形態において、多能性を有する幹細胞の細胞表面への結合能である。

[0025] 〔ＨＡ〕

本開示において、細胞間接着を阻害可能な物質は、限定されない一又は複数の実施形態において、ボツリヌス菌（Clostridium botulinum）の神経毒素複合体におけるヘマグルチニン（ＨＡ）である。本開示において、細胞間接着を阻害可能な物質は、限定されない一又は複数の実施形態において、効率的に脱未分化細胞を除去する観点から、ボツリヌス菌（Clostridium botulinum）の神経毒素複合体における３つのヘマグルチニンサブコンポーネントＨＡ１（ＨＡ３３）、ＨＡ２（ＨＡ１７）、及び、ＨＡ３（ＨＡ７０）からなる群から選択される２又は３成分で構成される複合体又はその複合体を含むものである。また、細胞間接着を阻害可能な物質は、限定されない一又は複数の実施形態において、効率的に脱未分化細胞を除去する観点から、ＨＡ２（ＨＡ１７）及びＨＡ３（ＨＡ７０）で構成される複合体若しくは３成分で構成される複合体又はその複合体を含むものである。前記サブコンポーネントＨＡ３（ＨＡ７０）は、一又は複数の実施形態において、Ｅ－カドヘリンの機能阻害活性を発現する観点、及び、効率的に脱未分化細胞を除去する観

点から、Ａ型又はＢ型のボツリヌス菌のものであることが好ましい。また、サブコンポーネントＨＡ１（ＨＡ３３）及びＨＡ２（ＨＡ１７）は、限定されない一又は複数の実施形態において、Ａ型、Ｂ型、及びＣ型のいずれのボツリヌス菌のものであってもよい。ＨＡは、限定されない一又は複数の実施形態において、各サブコンポーネントは、それぞれ、リコンビナントであってもよく、天然型であってもよい。

[0026] ［細胞間接着を阻害可能な物質の存在下での細胞培養］

本開示において、「細胞間接着を阻害可能な物質の存在下での細胞培養」は、従来用いられる及び／又は今後開発される、多能性を有する幹細胞の培養条件及び培養培地等を採用でき、該培養条件の培地に細胞間接着を阻害可能な物質を存在させることで行える。限定されない一又は複数の実施形態において、細胞間接着を阻害可能な物質を培養中の培養培地に添加してもよく、或いは、細胞間接着を阻害可能な物質を予め添加した培地を使用して培養してもよい。培養培地、培養プレート等は市販のものを使用してもよい。

[0027] 「細胞間接着を阻害可能な物質」は、脱未分化細胞を確認してから培地に添加してもよく、脱未分化細胞が発生しない段階で培地に添加してもよい。

[0028] 培地に存在させる「細胞間接着を阻害可能な物質」の濃度は、限定されない一又は複数の実施形態において、脱未分化細胞を除去できる実質的な有効濃度であり、当業者であれば設定できる。培地に存在させる「細胞間接着を阻害可能な物質」の濃度は、限定されない一又は複数の実施形態において、効率的に脱未分化細胞を除去する観点から、５ｎＭ以上、１０ｎＭ以上、又は１５ｎＭ以上が挙げられる。同様の観点から、２００ｎＭ以下、１５０ｎＭ以下、又は１００ｎＭ以下である。

[0029] 「細胞間接着を阻害可能な物質」を培地に存在させる限定されない一又は複数の実施形態として、次の培地交換を区切りとして単回の投与でもよく、連続の投与でもよく、断続的な投与でもよい。

[0030] 本開示において、細胞培養は、限定されない一又は複数の実施形態において、継代培養を含む。本開示にかかる培養方法、及び／又は、本開示にかか

る除去方法によれば、一態様において、継代培養後に形成されるコロニーにおける未分化コロニー（未分化細胞で形成され、未分化逸脱細胞を実質的に含まないコロニー）の割合を向上できるという効果を奏する。継代は、限定されない一又は複数の実施形態において、従来公知及び今後開発される手法により行うことができる。

[0031] 本開示において、細胞培養は、限定されない一又は複数の実施形態において、フィーダ細胞を用いた培養であってもよいし、フィーダレス培養であってもよい。フィーダ細胞は、限定されない一又は複数の実施形態において、ＭＥＦ（Ｍｏｕｓｅ　Ｅｍｂｒｙｏ　Ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ）細胞、ＳＬ１０、及びＳＮＬ　７６／７フィーダ細胞等が挙げられる。フィーダ細胞は、限定されない一又は複数の実施形態において、フィーダ細胞の中でも、多能性を有する幹細胞の遊走速度が比較的ゆっくりなフィーダ細胞が好ましい。フィーダ細胞は、限定されない一又は複数の実施形態において、多能性を有する幹細胞の遊走が比較的ゆっくりであり、多能性を有する幹細胞の培養中のコロニーに未分化逸脱細胞をコロニー中央部に発生させることができる点から、ＳＮＬ　７６／７フィーダ細胞が好ましい。

[0032] 細胞培養は、限定されない一又は複数の実施形態において、効率よく未分化逸脱細胞を除去できる点から、多能性を有する幹細胞の培養中のコロニー中央部に未分化逸脱細胞を発生させることができる条件で行うことが好ましい。限定されない一又は複数の実施形態において、多能性を有する幹細胞の遊走を阻害及び／又は抑制することによって、コロニー中央部に未分化逸脱細胞を効率よく発生させることができる。

[0033] 本開示は、その他の一態様において、多能性を有する幹細胞の培養方法であって、遊走を阻害可能な物質の存在下で細胞を培養すること、及び細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で細胞培養することを含む方法に関する。本態様にかかる培養方法によれば、一態様において、多能性を有する幹細胞の培養中のコロニーに未分化逸脱細胞をコロニー中央部に発生させることができることから、効率よく未分化逸脱細胞を除去できるという効果が奏されう

る。

[0034] 本開示は、その他の態様において、多能性を有する幹細胞の培養中に発生した又は発生しうる未分化逸脱細胞を除去する方法であって、遊走を阻害可能な物質の存在下で細胞を培養すること、及び細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で細胞培養することを含む方法に関する。本態様にかかる培養方法、及び／又は、本態様にかかる除去方法によれば、一態様において、未分化逸脱細胞が発生し劣化した未分化状態の細胞のコロニーから、未分化逸脱細胞を除去し、未分化状態の細胞のコロニー又は未分化状態の細胞からなるコロニーとすることができる。

[0035] 本開示は、その他の態様において、未分化逸脱細胞が発生し劣化したコロニーから未分化状態の細胞からなるコロニーを形成する方法であって、遊走を阻害可能な物質の存在下で細胞を培養すること、及び細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で前記劣化したコロニーを培養することを含む方法に関する。

[0036] 本開示において、遊走を阻害可能な物質は、限定されない一又は複数の実施形態において、多能性を有する幹細胞の遊走に関連する物質の活性を抑制／阻害する物質等が挙げられる。本開示において、遊走を阻害可能な物質は、限定されない一又は複数の実施形態において、遊走阻害剤が挙げられる。遊走を阻害可能な物質は、限定されない一又は複数の実施形態において、Ｒａｃ－１阻害剤等が挙げられる。培地に存在させる「遊走を阻害可能な物質」の濃度は、限定されない一又は複数の実施形態において、未分化逸脱細胞を効率的にコロニー中央部に移動させ、未分化逸脱細胞を効率的に除去する観点から、５０μＭ以上、１００μＭ以上、又は１５０μＭ以上であり、同様の観点から、２００μＭ以下である。

[0037] 遊走を阻害可能な物質は、限定されない一又は複数の実施形態において、培養開始時に培地に添加してもよいし、培地交換時に添加してもよい。遊走を阻害可能な物質は、限定されない一又は複数の実施形態において、未分化逸脱細胞が発生しない段階で培地に添加してもよいし、未分化逸脱細胞を確

認してから培地に添加してもよい。

[0038] 本開示にかかる培養方法、及び／又は、本開示にかかる除去方法によれば、細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で細胞培養することによって、一態様において、閉鎖空間を維持しながら自動的にコロニーから未分化逸脱細胞を除去できる。また、一態様において、人為的な操作及び／又は確認や、ロボット等の特殊な装置等を用いない場合であっても自動的にコロニーから未分化逸脱細胞を除去できる。また、本開示にかかる培養方法、及び／又は、本開示にかかる除去方法によれば、一態様において、さらには、形成されるコロニーを、自動的に未分化状態の細胞のコロニー又は未分化状態の細胞からなるコロニーとすることができる。

[0039] したがって、本開示にかかる培養方法、及び／又は、本開示にかかる除去方法を用いることによって、自動培養装置において、未分化状態の細胞のコロニー又は未分化状態の細胞からなるコロニーを効率的に得ることができ、さらには未分化状態の細胞を簡単かつ効率よく大量生産することができる。

[0040] 本開示は、その他の態様において、細胞間接着を阻害可能な物質を含む組成物（以下、「本開示にかかる組成物」ともいう。）に関する。本開示にかかる組成物における「細胞間接着を阻害可能な物質」は、上述のとおりである。本開示にかかる組成物は、本開示にかかる培養方法、本開示にかかる除去方法、本開示にかかるコロニー形成方法、及び／又は本開示にかかる維持方法のために使用できる。したがって、本開示は、その他の態様において、本開示にかかる培養方法、本開示にかかる除去方法、本開示にかかるコロニー形成方法、及び／又は本開示にかかる維持方法における前記「細胞間接着を阻害可能な物質」の使用に関する。

[0041] 本開示は、その他の態様において、多能性を有する幹細胞用の培地成分と細胞間接着を阻害可能な物質とを含むキット（以下、「本開示にかかるキット」ともいう。）に関する。本開示にかかるキットにおける「細胞間接着を阻害可能な物質」は、上述のとおりである。本開示にかかるキットは、本開示にかかる培養方法、本開示にかかる除去方法、本開示にかかるコロニー形

成方法、及び／又は本開示にかかる維持方法のために使用できる。多能性を有する幹細胞用の培地成分は、特に限定されず、従来使用される又は今後開発されるものを使用できる。

[0042] 本開示はさらに以下の限定されない一又は複数の実施形態に関する。

[0043] 〔１〕 多能性を有する幹細胞の培養方法であって、細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で細胞培養することを含む、方法。

〔２〕 多能性を有する幹細胞の培養中に発生した又は発生しうる未分化状態を脱した細胞を除去する方法であって、細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で細胞培養することを含む、方法。

〔３〕 多能性を有する幹細胞の未分化状態を維持する方法であって、細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で細胞培養することを含む、方法。

〔４〕 多能性を有する幹細胞が、ヒト多能性幹細胞である、〔１〕から〔３〕のいずれかに記載の方法。

〔５〕 ヒト多能性幹細胞が、ヒトｉＰＳ細胞又はヒトＥＳ細胞である、〔４〕記載の方法。

〔６〕 細胞間接着を阻害可能な物質が、Ｅ－カドヘリンの機能阻害活性を有する物質である、〔１〕から〔５〕のいずれかに記載の方法。

〔７〕 細胞間接着を阻害可能な物質が、さらに、細胞表面への結合能を有する物質である、〔６〕記載の方法。

〔８〕 細胞間接着を阻害可能な物質が、ボツリヌス菌（Clostridium botulinum）の神経毒素複合体におけるヘマグルチニン（ＨＡ）である、〔１〕から〔７〕のいずれかに記載の方法。

〔９〕 細胞間接着を阻害可能な物質が、ボツリヌス菌（Clostridium botulinum）の神経毒素複合体における３つのヘマグルチニンサブコンポーネントＨＡ１、ＨＡ２、及び、ＨＡ３からなる群から選択される２又は３成分で構成される複合体である、〔１〕から〔８〕のいずれかに記載の方法。

〔１０〕 前記複合体のＨＡ３サブコンポーネントは、Ａ型又はＢ型のボツリヌス菌のものである、〔９〕記載の方法。

〔１１〕　培養が、継代培養である、〔１〕から〔１０〕のいずれかに記載の方法。

〔１２〕　細胞間接着を阻害可能な物質を含む、多能性を有する幹細胞の培養のための、組成物。

〔１３〕　細胞間接着を阻害可能な物質を含む、多能性を有する幹細胞の培養中に発生した又は発生しうる未分化状態を脱した細胞を除去するための、組成物。

〔１４〕　細胞間接着を阻害可能な物質を含む、多能性を有する幹細胞の未分化状態を維持するための、組成物。

〔１５〕　多能性を有する幹細胞が、ヒト多能性幹細胞である、〔１２〕から〔１４〕のいずれかに記載の組成物。

〔１６〕　ヒト多能性幹細胞が、ヒトｉＰＳ細胞又はヒトＥＳ細胞である、〔１５〕記載の組成物。

〔１７〕　細胞間接着を阻害可能な物質が、Ｅ－カドヘリンの機能阻害活性を有する物質である、〔１２〕から〔１６〕のいずれかに記載の組成物。

〔１８〕　細胞間接着を阻害可能な物質が、さらに、細胞表面への結合能を有する物質である、〔１７〕記載の組成物。

〔１９〕　細胞間接着を阻害可能な物質が、ボツリヌス菌（Clostridium botulinum）の神経毒素複合体におけるヘマグルチニンである、〔１２〕から〔１８〕のいずれかに記載の組成物。

〔２０〕　細胞間接着を阻害可能な物質が、ボツリヌス菌（Clostridium botulinum）の神経毒素複合体における３つのヘマグルチニンサブコンポーネントＨＡ１、ＨＡ２、及び、ＨＡ３からなる群から選択される２又は３成分で構成される複合体である、〔１２〕から〔１９〕のいずれかに記載の組成物。

〔２１〕　前記複合体のＨＡ３サブコンポーネントは、Ａ型又はＢ型のボツリヌス菌のものである、〔２０〕記載の組成物。

〔２２〕　培養が、継代培養である、〔１２〕から〔２１〕のいずれかに記

載の組成物。

〔２３〕　〔１〕から〔１１〕のいずれかに記載の方法のための、〔１２〕から〔２２〕のいずれかに記載の組成物。

〔２４〕　多能性を有する幹細胞用の培地成分と、細胞間接着を阻害可能な物質とを含む、キット。

〔２５〕　多能性を有する幹細胞の培養中に発生する又は発生しうる未分化状態を脱した細胞を除去するための、〔２４〕記載のキット。

〔２６〕　多能性を有する幹細胞の培養のための、〔２４〕記載のキット。

〔２７〕　細胞間接着を阻害可能な物質を含む、多能性を有する幹細胞の培養中に発生した又は発生しうる未分化状態を脱した細胞を除去するための、〔２４〕記載のキット。

〔２８〕　多能性を有する幹細胞が、ヒト多能性幹細胞である、〔２４〕から〔２７〕のいずれかに記載のキット。

〔２９〕　ヒト多能性幹細胞が、ヒトｉＰＳ細胞又はヒトＥＳ細胞である、〔２８〕記載のキット。

〔３０〕　細胞間接着を阻害可能な物質が、Ｅ－カドヘリンの機能阻害活性を有する物質である、〔２４〕から〔２９〕のいずれかに記載のキット。

〔３１〕　細胞間接着を阻害可能な物質が、さらに、細胞表面への結合能を有する物質である、〔３０〕記載のキット。

〔３２〕　細胞間接着を阻害可能な物質が、ボツリヌス菌（Clostridium botulinum）の神経毒素複合体におけるヘマグルチニンである、〔２４〕から〔３１〕のいずれかに記載のキット。

〔３３〕　細胞間接着を阻害可能な物質が、ボツリヌス菌（Clostridium botulinum）の神経毒素複合体における３つのヘマグルチニンサブコンポーネントＨＡ１、ＨＡ２、及び、ＨＡ３からなる群から選択される２又は３成分で構成される複合体である、〔２４〕から〔３２〕のいずれかに記載のキット。

〔３４〕　前記複合体のＨＡ３サブコンポーネントは、Ａ型又はＢ型のボツ

リヌス菌のものである、〔３３〕記載のキット。

〔３５〕　培養が、継代培養である、〔２４〕から〔３４〕のいずれかに記載のキット。

〔３６〕　〔１〕から〔１１〕のいずれかに記載の方法のための、〔２４〕から〔３５〕のいずれかに記載のキット。

〔３７〕　〔１〕から〔１１〕のいずれかに記載の方法における細胞間接着を阻害可能な物質の使用。

## 実施例

[0044]　以下、実施例により本開示をさらに詳細に説明するが、これらは例示的なものであって、本開示はこれら実施例に制限されるものではない。

[0045]　［ヘマグルチニン（ＨＡ）がｉＰＳ細胞に及ぼす影響（その１）］

図５に示す実験スケジュールに従ってｉＰＳ細胞を培養した。まず、フィーダ細胞上にｉＰＳ細胞を播種し（day 0）、２４時間ごとに維持培地で培地交換した。３日後（day 3）においてＨＡを添加し２４時間インキュベートし、ＰＢＳで２度洗浄して維持培地で培地交換した（day 4）。その後、９日後（day 9）まで２４時間ごとに維持培地で培地交換した。培養後、培養された細胞のＯｃｔ３／４の発現を免疫細胞染色法で確認し、また、ＤＡＰＩ染色を行った。使用した細胞、培地、ＨＡ、及び培養条件は以下のとおりである。

[0046]　〔細胞〕

ｉＰＳ細胞：Ｔｉｃ（Ｎｐ　３９）

フィーダ細胞：ＳＮＬ　７６／７（Ｎｐ　５）マイトマイシン－ｃ処理済み

〔培地〕

ｉＰＳ細胞：Ｒｅｐｒｏ　Ｓｔｅｍ（商品名、ＲｅｐｒｏＣＥＬＬ社製）、５ｎｇ／ｍＬ　ＦＧＦ－２

フィーダ細胞：ＤＭＥＭ（７％ＦＢＳ，１％Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ）

〔容器〕

２４ウェルプレート（底面積：１．９ｃｍ$^2$／ウェル、培地量：０．４ｍＬ／ウェル）

〔ＨＡ〕

ＨＡ複合体試料として、下記表１に記載のボツリヌス菌の神経毒素複合体試料であるヘマグルチニンＨＡ－１～ＨＡ－４を使用した。なお、ＨＡ－１及びＨＡ－２は、ともに、ＨＡ１～３のサブコンポーネントが全てＢ型の複合体であり、別個に調製されたＨＡ複合体試料である。ＨＡ－３は、ＨＡ１がＣ型でＨＡ２及び３がＢ型のＨＡ複合体試料である。ＨＡ－４は、ＨＡ１及び２がＢ型でＨＡ３がＣ型のＨＡ複合体試料である。

[表1]

（表1）

| HA | HA1 (HA33) | HA2 (HA17) | HA3 (HA70) | E-cadherin阻害能 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | B型 | B型 | B型 | ＋ |
| 2 | B型 | B型 | B型 | ＋ |
| 3 | C型 | B型 | B型 | ＋ |
| 4 | B型 | B型 | C型 | － |

〔ＨＡ調製・添加方法〕

ＨＡの希釈：同じ希釈系列に含まれるＰＢＳ濃度を同じにするため、２段階希釈を行った。まず、ＰＢＳでＨＡを段階希釈し、さらに、培地（Ｒｅｐｒｏ　Ｓｔｅｍ）を用いて希釈した。（終濃度：１００，５０，１０，１ｎＭ）

さらにｂＦＧＦ（終濃度５ｎｇ／ｍｌ）を加え、ｉＰＳ細胞に添加した。

〔培養条件〕

３７℃、５％$CO_2$雰囲気下

ｉＰＳ細胞の継代後、ｔ＝７２ｈ（day 3）の培地交換において、ＨＡ－１～４を各濃度で添加し、２４時間培養した。その後、ｔ＝９６ｈ（day 4）の培地交換において、ＨＡ無添加の培地に切り替え、培養を継続した。

〔観察〕

ｄａｙ３、ｄａｙ４、ｄａｙ５、及びｄａｙ９において、ＩＮ　Ｃｅｌｌ

Ａｎａｌｙｚｅｒ　２０００（商品名、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社製）で培養細胞を観察し画像を取得した。ＨＡ－１を１００ｎＭ、５０ｎＭ、１０ｎＭ、及び、１ｎＭで添加した場合の顕微鏡観察写真をそれぞれ図６、７、８、及び９に示す。

[0047] 図６に示すとおり、ＨＡ－１を１００ｎＭ添加した場合、ｄａｙ３の時点で発生していた脱未分化細胞は、ｄａｙ４以降観察できなかった。ｄａｙ４では、細胞間に隙間ができ、細胞がやや長く伸びた形態となった。ｄａｙ５以降、隙間が埋まり、細胞の形態が小さくなり、細胞同士が密集した敷石状の形態となり、コロニーの拡大が起こった。ｄａｙ９において、ｄａｙ５以降に発生した脱未分化細胞を含む領域が見られた。

[0048] 図７に示すとおり、ＨＡ－１を５０ｎＭ添加した場合、ｄａｙ３～５では１００ｎＭ添加した場合と同様であった。ただし、ｄａｙ９において脱未分化細胞は見られなかった。

[0049] 図８に示すとおり、ＨＡ－１を１０ｎＭ添加した場合、ｄａｙ４では、ｄａｙ３の時点で発生していた脱未分化細胞が減少しているように見えた。しかし、ｄａｙ５で再び脱未分化細胞の拡大が起こった。以降、脱未分化細胞の領域は、拡大した。

[0050] 図９に示すとおり、ＨＡ－１を１ｎＭ添加した場合、ｄａｙ３以降、ｄａｙ３の時点で発生していた脱未分化細胞の領域の拡大が続いた。細胞の形態変化や脱未分化細胞の減少は、見られなかった。

[0051] ＨＡ－２を１００ｎＭ、５０ｎＭ、及び、１ｎＭで添加した場合の顕微鏡観察写真をそれぞれ図１０、１１及び１２に示す。図１０に示すとおり、ＨＡ－２を１００ｎＭ添加の場合は、ＨＡ－１を１００ｎＭ添加の場合（図６）と同様であった。図１１に示すとおり、ＨＡ－２を５０ｎＭ添加の場合は、ＨＡ－１を５０ｎＭ添加の場合（図７）と同様であった。図１２に示すとおり、ＨＡ－２を１ｎＭ添加の場合は、ＨＡ－１を１ｎＭ添加の場合（図９）と同様であった。

[0052] ＨＡ－１及びＨＡ－２の結果を下記表２にまとめる。表２に示すとおり、

ＨＡ－１及びＨＡ－２は、１００ｎＭ及び５０ｎＭ添加した場合、ｄａｙ３の時点で発生していた脱未分化細胞が縮小及び／又は消滅した。

[0053] 図１３に、継代時に持ち込んだ脱未分化細胞に対するＨＡ－２の影響を観察した結果を示す。同図に示すとおり、ＨＡ－２を１００ｎＭで添加して２４時間処理すると、脱未分化細胞が徐々に剥離した。

[0054] ＨＡ－３を５０ｎＭ、及び１０ｎＭで添加した場合の顕微鏡観察写真をそれぞれ図１４、及び１５に示す。

[0055] 図１４に示すとおり、ＨＡ－３を５０ｎＭ添加した場合、ｄａｙ３の時点で発生していた脱未分化細胞領域の拡大が止まり、ｄａｙ４以降、脱未分化細胞の増殖とともに脱未分化細胞領域は縮小していった。ｄａｙ９において、コロニーの中心の一部に脱未分化細胞が残った。ｄａｙ４において、ｉＰＳ細胞間に隙間ができ、ｉＰＳ細胞の形がやや長く伸びた形態となった。ｄａｙ５以降、ｉＰＳ細胞の増殖に伴い、細胞同士が密集した敷石状の形態のｉＰＳ細胞で構成されたコロニーとなった。一方で、フィーダ細胞の剥離が起こった。なお、ＨＡ－３を１００ｎＭ添加した場合も、ＨＡ－３を５０ｎＭ添加した場合と同様な結果がえられた。

[0056] 図１５に示すとおり、ＨＡ－３を１０ｎＭ添加した場合、ｄａｙ３以降、脱未分化細胞の領域の拡大が続いた。細胞の形態変化、脱未分化細胞の減少、及び、フィーダ細胞の剥離は観察できなかった。

[0057] ＨＡ－４を１００ｎＭ、５０ｎＭ、及び、１０ｎＭで添加した場合の顕微鏡観察写真を図１６に示す。同図に示すとおり、ｄａｙ３の時点で発生していた脱未分化細胞の領域の拡大が続いた。しかし、ＨＡ－４が１００ｎＭの場合、脱未分化細胞領域の縮小が起きているかもしれない。

[0058] ＨＡ－３及びＨＡ－４の結果を下記表２にまとめる。

[0059]

[表2]

（表2）

| HA | 終濃度 | day3に発生していた脱未分化細胞領域の経過 | コロニー、iPS細胞の形態 | その他 |
|---|---|---|---|---|
| 1, 2 | 100nM | 消滅 | ・day4において細胞間に隙間があり、細胞がやや長く伸びた形態 | 継代時に持ち込んだ脱未分化細胞の消滅 |
| | 50nM | | ・day5以降に細胞が密集し、正常なコロニーの形態へと変化 | |
| | 10nM | 縮小後、再度拡大 | 顕著な差なし | |
| | 1nM | 拡大 | | |
| 3 | 100nM | 縮小 | ・day4において細胞間に隙間があり、細胞がやや長く伸びた形 | Feeder細胞の剥離 |
| | 50nM | | ・day5以降に細胞が密集し、正常なコロニーの形態へと変化。 | |
| | 10nM | 拡大 | 顕著な差なし | Feeder細胞の剥離なし |
| 4 | 100nM | 拡大 | 顕著な差なし | |
| | 50nM | | | |
| | 10nM | | | |

[0060] 前記表２に示すとおり、ＨＡ－１及びＨＡ－２の場合、ＨＡ－３及び４の場合よりも効率よく脱未分化細胞の領域が縮小及び又は消滅した。また、ＨＡ－３の場合、ＨＡ－４の場合よりも効率よく脱未分化細胞の領域が縮小及び又は拡大抑制された。

[0061] ［フィーダ細胞がｉＰＳ細胞に及ぼす影響］

フィーダ細胞上にｉＰＳ細胞を播種し、７日後まで２４時間ごとに維持培地で培地交換した。培養後、培養された細胞のＯｃｔ３／４の発現を免疫細胞染色法で確認し、また、ＤＡＰＩ染色を行った。使用した細胞、培地、及び培養条件は以下のとおりである。

[0062] 〔細胞〕

ｉＰＳ細胞：Ｔｉｃ（Ｎｐ　３９）

フィーダ細胞：ＭＥＦ

〔培地〕

ｉＰＳ細胞：Ｒｅｐｒｏ　Ｓｔｅｍ（商品名、ＲｅｐｒｏＣＥＬＬ社製）、５ｎｇ／ｍＬ　ＦＧＦ－２

フィーダ細胞：ＤＭＥＭ（７％ＦＢＳ，１％Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ）

〔容器〕

２４ウェルプレート（底面積：１．９ｃｍ$^2$／ウェル、培地量：０．４ｍＬ／ウェル）

〔培養条件〕

３７℃、５％$CO_2$雰囲気下

〔観察〕

ｄａｙ３、及びｄａｙ７において、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　２０００（商品名、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社製）で培養細胞を観察し画像を取得した。得られた顕微鏡観察写真を図１７に示す。

[0063] 図１７に示すように、未分化逸脱細胞はコロニーの外縁部（外側）に発生した。

[0064] つぎに、培養開始から３日後（ｄａｙ３）に、遊走阻害剤であるＲａｃ－１　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ（商品名：ＮＳＣ２３７６６、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ社製）を５０、１００又は１５０μＭ添加した以外は、上記と同様にして細胞培養及び観察を行った。得られた顕微鏡観察写真を図１７に示す。

〔Ｒａｃ－１　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ調製・添加方法〕

Ｒａｃ－１　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ希釈：培地（Ｒｅｐｒｏ　Ｓｔｅｍ）を用いて希釈した(終濃度：５０又は１００μＭ)。

さらにｂＦＧＦ（商品名、ＲｅｐｒｏＣＥＬＬ社製、終濃度５ｎｇ／ｍｌ）を加え、ｉＰＳ細胞に添加した。

[0065] 図１７に示すように、Ｒａｃ－１　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ未添加の場合にはコロニー外縁部に発生した未分化逸脱細胞が、遊走阻害剤であるＲａｃ－１　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒを添加することによってコロニー中央部に発生した。細胞遊走を阻害することによって未分化逸脱細胞をコロニー中央部に発生させることができた。よって、細胞の遊走を阻害することによって未分化逸脱細胞をコロニー中央部に発生させることができ、これにより未分化逸脱細胞

を除去できることが示唆された。

[0066] フィーダ細胞としてＳＮＬフィーダ細胞を用い、Ｒａｃ－１　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ（５０又は１００μM）を培養開始から３日後（ｄａｙ３）に添加して培養を行ったところ、Ｒａｃ－１　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ未添加の場合と同様に、未分化逸脱細胞はコロニー中央部に発生した（date not shown）。

[0067] ［ヘマグルチニン（ＨＡ）がｉＰＳ細胞に及ぼす影響（その２）］

Ｒａｃ－１　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒによって誘導された未分化逸脱細胞に及ぼすＨＡの影響を確認した。まず、フィーダ細胞上にｉＰＳ細胞を播種し（day 0）、２４時間ごとに維持培地で培地交換した。３日後（day 3）において１００μM　Ｒａｃ－１　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒを添加し２４時間インキュベートし、ＰＢＳで２度洗浄して維持培地で培地交換した（day 4）。５日後（day 5）においてＨＡ－１を添加し２４時間インキュベートし、ＰＢＳで２度洗浄して維持培地で培地交換した（day 6）。その後、８日後（day 8）まで２４時間ごとに維持培地で培地交換した。培養後、培養された細胞のＯｃｔ３／４の発現を免疫細胞染色法で確認し、また、ＤＡＰＩ染色を行った。使用した細胞、培地、及び培養条件は以下のとおりである。Ｒａｃ－１　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ及びＨＡの調製及び添加方法は上述の通りとした。

[0068] 〔細胞〕

ｉＰＳ細胞：Ｔｉｃ（Ｎｐ　３９）

フィーダ細胞：ＭＥＦ

〔培地〕

ｉＰＳ細胞：Ｒｅｐｒｏ　Ｓｔｅｍ（商品名、ＲｅｐｒｏＣＥＬＬ社製）、５ｎｇ／ｍＬ　ｂＦＧＦ（商品名、ＲｅｐｒｏＣＥＬＬ社製）

フィーダ細胞：ＤＭＥＭ（１０％ＦＢＳ（ＧＩＢＣＯ社製），１％ＨＥＰＥＳ（ｓｉｇｍａ社製）、１％Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ（ＮＡＣＡＬＡＩ　ＴＥＳＱＵＥ社製））

〔容器〕

２４ウェルプレート（底面積：１．９ｃｍ$^2$／ウェル、培地量：０．４ｍＬ

／ウェル）

〔観察〕

ｄａｙ３、ｄａｙ４、ｄａｙ５、ｄａｙ６、及びｄａｙ８において、ＩＮＣｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　２０００（商品名、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社製）で培養細胞を観察し画像を取得した。得られた顕微鏡観察写真を図１８に示す。

[0069] ｃｏｎｔｒｏｌとして、ＨＡ－１の添加を行わなかった以外は、上記と同様の培養及び観察を行った。得られた顕微鏡観察写真を図１８に示す。

[0070] 図１８に示すとおり、Ｒａｃ－１　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒの添加によりコロニー中心部に発生していた未分化逸脱細胞を含む領域が、ＨＡの添加により、縮小及び／又は消滅したことが確認された。

[0071] ［フィーダレス培養がｉＰＳ細胞に及ぼす影響］

培養面としてＳｙｎｔｈｅｍａｘ　Ｓｕｒｆａｃｅ（商品名、Ｃｏｒｎｉｎｇ社製）を使用し、その上にｉＰＳ細胞を播種し、７日後まで２４時間ごとに維持培地で培地交換した。培養後、培養された細胞のＯｃｔ３／４の発現を免疫細胞染色法で確認し、また、ＤＡＰＩ染色を行った。使用した細胞、培地、及び培養条件は以下のとおりである。

[0072] 〔細胞〕

ｉＰＳ細胞：Ｔｉｃ（Ｎｐ　３９）

〔培地〕

ｍＴｅＳＲ(R)１ｍｅｄｉｕｍ（商品名、ＳＴＥＭＣＥＬＬ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）

〔容器〕

２４ウェルプレート（底面積：１．９ｃｍ$^2$／ウェル、培地量：０．４ｍＬ／ウェル）

〔培養条件〕

３７℃、５％$CO_2$雰囲気下

〔観察〕

ｄａｙ６において、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　２０００（商品名、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社製）で培養細胞を観察し画像を取得した。

[0073] フィーダレス培養の場合もＭＥＦフィーダ細胞と同様に、未分化逸脱細胞はコロニーの外縁部（外側）に発生した。

[0074] つぎに、培養開始から３日後（ｄａｙ３）に、Ｒａｃ－１　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒを１００又は１５０μＭ添加した以外は、上記と同様にして細胞培養及び観察を行った。得られた顕微鏡観察写真を図１９に示す。図１９は、Ｒａｃ－１　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒが１５０μＭの場合の顕微鏡観察写真である。図１９に示すように、Ｒａｃ－１　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒを添加することによって、未分化逸脱細胞はコロニー中央部に発生させることができた。これにより、フィーダレス培養の場合も、細胞遊走を阻害することによって未分化逸脱細胞をコロニー中央部に発生させることができ、これにより未分化逸脱細胞を除去できることが示唆された。

[0075] ［ヘマグルチニン（ＨＡ）がｉＰＳ細胞に及ぼす影響（その３）］

細胞として以下の細胞１又は２を使用し、ＨＡとしてＨＡ－１を使用し、ＨＡの添加濃度を５０ｎＭとした以外は、ヘマグルチニン（ＨＡ）がｉＰＳ細胞に及ぼす影響（その１）と同じ条件で、培養及び観察を行った。得られた顕微鏡観察写真をそれぞれ図２０に示す。

[0076] 〔細胞１〕

〔細胞〕

ｉＰＳ細胞：２０１Ｂ７株

フィーダ細胞：ＳＮＬ７６／７細胞

〔培地〕

ｉＰＳ細胞：Ｒｅｐｒｏ　Ｓｔｅｍ（商品名、ＲｅｐｒｏＣＥＬＬ社製）

フィーダ細胞：ＤＭＥＭ（７％ＦＢＳ，１％Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ）

〔細胞２〕

〔細胞〕

ｉＰＳ細胞：４５４Ｅ－２株

フィーダ細胞：ＳＮＬ７６／７細胞

〔培地〕

ｉＰＳ細胞：Ｒｅｐｒｏ　Ｓｔｅｍ（商品名、ＲｅｐｒｏＣＥＬＬ社製）

フィーダ細胞：ＤＭＥＭ（７％ＦＢＳ，１％Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ）

[0077] 図２０に示すとおり、未分化逸脱細胞を含むコロニーは、ＨＡを添加すると、脱未分化細胞の領域が縮小及び又は消滅した。

[0078] ［ヘマグルチニン（ＨＡ）が継代に及ぼす影響］

図２１に示す実験スケジュールに従ってｉＰＳ細胞を継代培養した。まず、フィーダ細胞上にｉＰＳ細胞を播種し（day 0）、２４時間ごとに維持培地で培地交換した。３日後（day 3）においてＨＡを５０ｎＭ添加し２４時間インキュベートし、ＰＢＳで２度洗浄して維持培地で培地交換した（day 4）。その後、１０日後（day 10）まで２４時間ごとに維持培地で培地交換した。培養後、通常の操作で継代を行い、継代から３日後（day 13）においてＨＡを５０ｎＭ添加し２４時間インキュベートし、ＰＢＳで２度洗浄して維持培地で培地交換した（day 14）。その後、１０日間の培養、継代、ＨＡの添加及び培養（１０日間）を行った。培養された細胞のＯｃｔ３／４の発現を免疫細胞染色法で確認し、また、ＤＡＰＩ染色を行った。使用した細胞、培地、及び培養条件は以下のとおりである。ＨＡとしては、ＨＡ－１を使用した。

[0079] 〔細胞〕

ｉＰＳ細胞：Ｔｉｃ（Ｎｐ　３９）

フィーダ細胞：ＳＮＬ　７６／７（Ｎｐ　５）マイトマイシン－ｃ処理済み

〔培地〕

ｉＰＳ細胞：Ｒｅｐｒｏ　Ｓｔｅｍ（商品名、ＲｅｐｒｏＣＥＬＬ社製）

、５ｎｇ／ｍＬ　ＦＧＦ－２

フィーダ細胞：ＤＭＥＭ（７％ＦＢＳ，１％Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ）

〔容器〕

２４ウェルプレート（底面積：１．９ｃｍ$^2$／ウェル、培地量：０．４ｍＬ／ウェル）

〔ＨＡ調製・添加方法〕

ＨＡの希釈：同じ希釈系列に含まれるＰＢＳ濃度を同じにするため、２段階希釈を行った。まず、ＰＢＳでＨＡを段階希釈し、さらに、培地（Ｒｅｐｒｏ　Ｓｔｅｍ）を用いて希釈した。（終濃度：５０ｎＭ）

さらにｂＦＧＦ（終濃度５ｎｇ／ｍｌ）を加え、ｉＰＳ細胞に添加した。

〔培養条件〕

３７℃、５％$CO_2$雰囲気下

ｉＰＳ細胞の継代後、ｔ＝７２ｈ（day 3）の培地交換において、ＨＡを各濃度で添加し、２４時間培養した。その後、ｔ＝９６ｈ（day 4）の培地交換において、ＨＡ無添加の培地に切り替え、培養を継続した。

〔観察〕

ｄａｙ３、ｄａｙ４、ｄａｙ１０、ｄａｙ１３、ｄａｙ１４、ｄａｙ２０、ｄａｙ２３、ｄａｙ２４及びｄａｙ３０において、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　２０００（商品名、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社製）で培養細胞を観察し画像を取得した。また、形成されたコロニー及び未分化コロニー（未分化細胞で形成され、未分化逸脱細胞を含まないコロニー）の数を計測し、未分化コロニーの割合を算出した。その結果を図２２に示す。

[0080] 比較例として、ＨＡを添加しない以外は、同じ条件で継代培養を行った。その結果を図２２に示す。

[0081] 図２２において、白丸がＨＡを添加した系、黒丸がＨＡを添加しなかった系を示す。図２２に示すように、ＨＡを添加することによって、ＨＡを添加しなかった場合と比較して継代培養後に形成される未分化コロニーの割合が

増加した。つまり、未分化逸脱細胞を除去することにより、未分化コロニーを効率よく形成することができた。

# 請求の範囲

[請求項1] 多能性（pluripotency）を有する幹細胞の培養方法であって、細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で細胞培養することを含む、方法。

[請求項2] 多能性（pluripotency）を有する幹細胞の培養中に発生した又は発生しうる未分化状態を脱した細胞を除去する方法であって、細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で細胞培養することを含む、方法。

[請求項3] 多能性（pluripotency）を有する幹細胞の未分化状態を維持する方法であって、細胞間接着を阻害可能な物質の存在下で細胞培養することを含む、方法。

[請求項4] 多能性を有する幹細胞が、ヒト多能性（pluripotent）幹細胞である、請求項１から３のいずれかに記載の方法。

[請求項5] ヒト多能性幹細胞が、ヒトｉＰＳ細胞又はヒトＥＳ細胞である、請求項４記載の方法。

[請求項6] 細胞間接着を阻害可能な物質が、Ｅ－カドヘリンの機能阻害活性を有する物質である、請求項１から５のいずれかに記載の方法。

[請求項7] 細胞間接着を阻害可能な物質が、さらに、細胞表面への結合能を有する物質である、請求項６記載の方法。

[請求項8] 細胞間接着を阻害可能な物質が、ボツリヌス菌（Clostridium botulinum）の神経毒素複合体におけるヘマグルチニン（ＨＡ）である、請求項１から７のいずれかに記載の方法。

[請求項9] 細胞間接着を阻害可能な物質が、ボツリヌス菌の神経毒素複合体における３つのヘマグルチニンサブコンポーネントＨＡ１、ＨＡ２、及び、ＨＡ３からなる群から選択される２又は３成分で構成される複合体である、請求項１から８のいずれかに記載の方法。

[請求項10] 前記複合体のＨＡ３サブコンポーネントは、Ａ型又はＢ型のボツリヌス菌のものである、請求項９記載の方法。

[請求項11] 培養が、継代培養である、請求項１から１０のいずれかに記載の方法。

[請求項12] 細胞間接着を阻害可能な物質を含む、請求項１から１１のいずれかに記載の方法のための、組成物。

[請求項13] 多能性を有する幹細胞用の培地成分と、細胞間接着を阻害可能な物質とを含む、キット。

[請求項14] 請求項１から１１のいずれかに記載の方法のための、請求項１３記載のキット。