明　細　書

発明の名称 ：

多能性幹細胞の増殖を促進するための組成物、及び多能性幹細胞の増殖促進方法

技術分野

[0001] 本開示は、多能性幹細胞の増殖を促進するための組成物、及び多能性幹細胞の増殖促進方法に関する。

背景技術

[0002] 再生医療を含む幹細胞産業では、多能性幹細胞を、その未分化状態を維持したまま、大量に培養することが必要とされる。

特許文献１は、iPS細胞等の多能性幹細胞の未分化状態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。

[0003] 一方、特許文献２及び３は、ヘマグルチニン及びその改変体を用いて、多様性幹細胞の培養中に発生する未分化状態を逸脱する細胞を除去する方法を開示する。また、特許文献３は、ヘマグルチニンを用いて多様性幹細胞の浮遊培養における細胞集塊を小塊に分割する方法を開示する。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2012-143229号公報

特許文献2：WO2014/104207

特許文献3：WO2015/199243

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本開示は、多能性幹細胞の増殖を促進するための組成物、及び多能性幹細胞の増殖促進方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0006] 本開示は、一態様において、多能性幹細胞の増殖を促進するための組成物であって、ヘマグルチニン又はその改変体を有効成分として含む増殖促進組成物に関する。

[0007] 本開示は、その他の態様において、本開示に係る増殖促進組成物が添加された培地で多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞の増殖を促進する方法に関する。

[0008] 本開示は、その他の態様において、本開示に係る増殖促進方法を行うことを含む、多能性幹細胞の培養方法に関する。

発明の効果

[0009] 本開示によれば、一又は複数の実施形態において、多能性幹細胞の増殖を、その未分化状態を維持したまま、促進できるという効果を奏しうる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図１は、ヒトiPS細胞の単一細胞に由来するクローン細胞培養におけるヘマグルチニン（HA）の増殖促進効果を確認した結果の図である。

[図2]図２は、実施例における実験スキームの概略図である。

[図3]図３は、ヒトiPS細胞の細胞集塊の浮遊培養における培養時間と細胞密度をプロットした図である。

[図4]図４は、ヒトiPS細胞の細胞集塊の浮遊培養におけるヘマグルチニン（HA）の影響を確認した顕微鏡観察写真の結果の図である。

[図5]図５は、細胞集塊における細胞数に対するHA添加の影響を確認したグラフの一例である。○：HA無添加、△：5 mM HA添加、□：10 mM HA添加。

[図6]図６は、細胞集塊内部の分裂可能細胞の局在性の蛍光染色顕微鏡観察の結果の一例である。

発明を実施するための形態

[0011] 本願発明者らは、多能性幹細胞の培養中に発生する「未分化状態から逸脱した細胞」を取り除く技術の開発に携わってきた。「未分化状態から逸脱した細胞」は、培養中の多能性幹細胞のコロニー中央部やコロニー周辺部に発生する傾向がある。そして、培養中のコロニーにヘマグルチニンを添加する

ことで、コロニー中央部に発生した／発生する「未分化状態から逸脱した細胞」を取り除くことができることなどが明らかにされた（WO2014/104207及びWO2015/199243）。また、多能性幹細胞を浮遊培養して形成された細胞集塊にヘマグルチニンを添加すると、該細胞集塊を容易に小塊に分割することができることが明らかにされた（WO2015/199243）。これらの結果は、ヘマグルチニンが細胞接着分子であるE-カドヘリンに特異的に結合して細胞間接着を阻害するというメカニズムに依るものであると推測されている。

本開示は、本願発明者らが、さらなる鋭意研究を重ねた結果、ヘマグルチニンに多能性幹細胞の増殖促進に寄与する効果があることを見出したことに基づく。具体的には、ヘマグルチニンは、細胞間接着を緩和するように機能し、培養される多能性幹細胞のコロニーや細胞集塊内の細胞環境が増殖しやすいものとなり、増殖が促進されるものと推測される。さらに、細胞間接着が緩和されることで、培養される多能性幹細胞のコロニーの細胞間接着力が均一化し、「未分化状態から逸脱した細胞」の発生を抑制できると推測される。但し、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。

[0012] ［多能性幹細胞］

本開示において、多能性（pluripotent）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。

[0013] ［未分化状態を逸脱した細胞］

本開示において未分化状態を逸脱した細胞（未分化逸脱細胞）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。さらに未分化逸脱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。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。

[0014] ［ヘマグルチニン（HA）］

本開示において、ヘマグルチニンは、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（Clostridiumbotulinum）のヘマグルチニンである。本開示において、ヘマグルチニンは、特に言及がない場合、神経毒素複合体（ヘマグルチニン複合体ともいう）をいう。多能性を有する細胞の増殖促進の点から、ヘマグルチニンは、ボツリヌス菌（Clostridiumbotulinum）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が挙げられる。ヘマグルチニンは、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。

[0015] 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、多能性を有する細胞の増殖促進の点から、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。 ヘマグルチニンは、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。

[0016] ［ヘマグルチニンの改変体］

本開示において、ヘマグルチニンは、多能性幹細胞の増殖促進に寄与する効果を有する範囲で、ヘマグルチニンの改変体であってもよい。該改変体の一又は複数の実施形態として、サブコンポーネントの１つ、２つ又は３つのアミノ酸配列が、少なくとも１つのアミノ酸変異を有するものが挙げられる。該改変体としては、WO2015/199243に挙げるものが使用できる。

本開示において、特に言及のない場合、「ヘマグルチニン」は、「ヘマグルチニン改変体」を含む。また、本開示において、特に言及のない場合、「ヘマグルチニン改変体」は、多能性幹細胞の増殖促進に寄与する効果を有するものをいう。

[0017] ［多能性幹細胞の増殖促進組成物］

本開示は、一態様として、ヘマグルチニン又はその改変体を含む、多能性幹細胞の増殖を促進するための組成物に関する。

多能性を有する細胞の増殖促進の点から、本開示に係る増殖促進組成物は、有効量のヘマグルチニン又はその改変体を含むことが好ましい。

[0018] 本開示に係る増殖促進組成物によれば、多能性幹細胞の増殖を促進することができる。本開示に係る増殖促進組成物によれば、一又は複数の実施形態において、さらに、均一性の高い培養が可能となる。ここで、均一性が高いとは、例えば、培養される細胞の細胞間接着の均一性が高いこと、細胞間接着力の均一性が高いこと、あるいは、細胞集塊の大きさが揃うことを含みうる。均一性の高い培養は、増殖後に得られる多能性幹細胞の品質の向上に貢献しうる。本開示に係る増殖促進組成物は、一又は複数の実施形態において、従来の培養方法と異なり、細胞塊やコロニーにおける各細胞間の均一性が高い培養を可能とする。その結果、従来の培養方法では増殖能の低い細胞が多くなる位置、例えば、細胞塊内部やコロニーの周辺部以外の位置においても、細胞増殖能を維持する細胞の存在数が増加し、結果的に効率よく細胞を増殖させることを可能とする。

[0019] 本開示に係る増殖促進組成物は、多能性幹細胞の培地に添加して使用できる。培地への添加濃度としては、一又は複数の実施形態において、多能性を有する細胞の増殖促進の点から、添加後の培地におけるヘマグルチニン又はその改変体の濃度が、５ｎＭ以上、１０ｎＭ以上、又は１５ｎＭ以上となる濃度が挙げられる。また、同様の観点から、２００ｎＭ以下、１５０ｎＭ以下、又は１００ｎＭ以下となる濃度が挙げられる。

[0020] 本開示に係る増殖促進組成物の使用方法としては、後述する、多能性幹細胞の増殖促進方法、及び、多能性幹細胞の培養方法が挙げられる。

[0021] ［多能性幹細胞の増殖促進方法］

本開示は、一態様として、本開示に係る増殖促進組成物が添加された培地で多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞の増殖促進方法に関する。本開示に係る増殖促進組成物が添加される培地としては、特に制限され

ず、多能性幹細胞の培養に使用されうる培地でよい。本開示に係る増殖促進化合物の添加濃度は、上述のとおり、有効量が挙げられる。一又は複数の実施形態において、添加後の培地におけるヘマグルチニン又はその改変体の濃度が、５ｎＭ以上、１０ｎＭ以上、又は１５ｎＭ以上となる濃度が挙げられる。また、同様の観点から、２００ｎＭ以下、１５０ｎＭ以下、又は１００ｎＭ以下となる濃度が挙げられる。

[0022] ［第１の形態：単一細胞又は分散細胞からの培養］

本開示に係る増殖促進方法の一又は複数の実施形態として、単一細胞状態、又は分散状態の多能性幹細胞を播種すること、及び、ヘマグルチニン又はその改変体が添加された培地で多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞の増殖を促進する方法に関する。単一細胞状態又は分散状態の多能性幹細胞集団をヘマグルチニン又はその改変体と接触させることで、一又は複数の実施形態において、培養した際、コロニーの中心であっても細胞増殖能を維持する細胞の存在数が増加し、均一性が向上した培養が可能となる。その結果細胞の増殖促進が効率化され、最終的に従来法と比べて高い増殖率での培養が可能となる。

[0023] 本開示において、単一細胞状態の細胞とは、細胞分散処理により細胞塊を単一細胞まで分散させて得られた１又は複数の細胞をいう。播種する細胞数は特に制限されず、１細胞でもよく、複数細胞でもよい。細胞分散処理の方法は、とくに制限されず、例えばトリプシンやプロナーゼ等の酵素処理、例えばピペッティング等の物理的処理、又はこれらの組み合わせなどが挙げられる。

[0024] 本開示において、分散状態の細胞を播種するとは、細胞塊を細胞分散処理して得られる細胞集団であって、すべての細胞が単一細胞になっていない状態の細胞集団を播種することをいう。前記細胞集団には単一細胞が含まれていてもよい。

[0025] ヘマグルチニン又はその改変体の培地への添加と多能性幹細胞の播種とは、何れが先でもよく同時でもよい。

[0026] 第１の形態の増殖促進方法は、平面培養（接着培養）であってもよく、浮遊培養であってもよい。平面培養の場合、ヘマグルチニン又はその改変体は、多能性幹細胞のコロニーが形成される前に、培地に添加することが好ましい。

[0027] ［第２の形態：浮遊培養］

本開示に係る増殖促進方法の一又は複数の実施形態として、多能性幹細胞の増殖を促進する方法であって、多能性幹細胞の細胞集塊の浮遊培養の培地にヘマグルチニン又はその改変体を添加し、かつ、前記細胞集塊を小塊に分割しないで培養することを含む増殖促進方法が挙げられる。本開示において、細胞集塊とは、一又は複数の実施形態において、多能性幹細胞を浮遊培養すると形成されるスフェロイド状の細胞塊をいう。本開示において、「細胞集塊を小塊に分割しない」とは、一又は複数の実施形態において、ヘマグルチニン又はその改変体の添加後に、一部又は全部の培養が終了するまで添加前の細胞集塊の大きさより小さな細胞集塊、分散細胞、及び単一細胞等を産生する作業若しくは処理をしないことをいう。

本実施形態では、均一性が高い培養が可能となるため、細胞に与えるダメージやストレスが小さいままに増殖を促進でき、結果的に細胞塊が分割することなく、効率よく細胞を増殖させることが可能となる。

[0028] 本開示において、「細胞集塊を小塊に分割する」とは、特に言及のない場合、ヘマグルチニンによる多能性幹細胞の細胞集塊の分割をいう（WO2015/199243参照）。WO2015/199243は、培養中のiPS細胞の細胞集塊を有する培養液にヘマグルチニンを添加すると、iPS細胞のようなデリケートな細胞の細胞集塊であっても、ピペッティング等により穏やかに小塊へ分割できることを開示する。同文献はまた、細胞集塊が小塊に分割されることにより、培養される生細胞濃度を向上することができることを開示する。

[0029] 一方、本実施形態（第２の実施形態）に係る増殖促進方法は、細胞集塊に対してヘマグルチニンを作用させた後に細胞集塊を分割することなく培養する方法である。本実施形態の増殖促進方法のメカニズムは以下のように推定

される。細胞集塊に対してヘマグルチニンを作用させると、細胞集塊の細胞間の相互作用が緩まる状態となり、細胞集塊の内部であっても細胞増殖能を維持する細胞の存在数が増加し、均一性が向上した培養が可能となる。その結果、より大きな細胞集塊の形成が可能となり、結果として効率的な増殖が促進される。但し、本開示は、このメカニズムに限定して解釈されなくてもよい。

[0030] 本実施形態（第２の実施形態）に係る増殖促進方法によれば、iPS細胞のようなデリケートな細胞であっても、細胞集塊の分割にともなうダメージを抑制しつつ細胞の増殖を促進できる。

[0031] 本開示において、多能性幹細胞の浮遊培養は、例えば、バイオリアクターを使用して行うことができる。

[0032] ［多能性幹細胞の培養方法］

本開示は、その他の態様において、本開示の増殖促進方法を行うことを含む、多能性幹細胞の培養方法に関する。本開示の増殖促進方法については、上記を参照できる。

本開示に係る培養方法によれば、多能性幹細胞の増殖を促進することができる。本開示に係る培養方法によれば、一又は複数の実施形態において、さらに、均一性の高い培養が可能となる。

[0033] 本開示は、以下の実施形態にも関しうる。

［１］ 多能性幹細胞の増殖を促進するための組成物であって、ヘマグルチニン又はその改変体を含む、増殖促進組成物。

［２］ ［１］に記載の増殖促進組成物が添加された培地で多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞の増殖を促進する方法。

［３］ 多能性幹細胞の増殖を促進する方法であって、単一細胞状態、又は分散状態の多能性幹細胞を播種すること、及び、ヘマグルチニン又はその改変体が添加された培地で前記多能性幹細胞を培養することを含む、方法。

［４］ ヘマグルチニン又はその改変体を、多能性幹細胞のコロニーが形成される前に、培地に添加することを含む、［３］記載の増殖促進方法。

［５］　多能性幹細胞の増殖を促進する方法であって、多能性幹細胞の細胞集塊の浮遊培養の培地にヘマグルチニン又はその改変体を添加し、かつ、前記細胞集塊を小塊に分割しないで培養することを含む、方法。

［６］　［２］から［５］のいずれかに記載の増殖促進方法を行うことを含む、多能性幹細胞の培養方法。

実施例

[0034]　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。

[0035]　［接着培養：クローン細胞培養］

ヒトiPS細胞の単一細胞に由来するクローン細胞培養におけるヘマグルチニン（HA）の効果を確認した。iMatrixコート培養面にiPS細胞（単一細胞）を播種して下記条件で培養し、HAの有無による影響を確認した。

〔細胞〕

ヒトiPS細胞：Tic株の単一細胞

〔培地〕

Stemfit（商標）AK03培地（味の素社製）

〔容器〕

iMatrixコート培養面

〔HA調製・添加方法〕

HA：B型

添加濃度：50 nM

添加頻度（培養1日目から毎日）

〔培養条件〕

37℃、5%CO_2雰囲気下

培養開始時（t=0）からHA複合体が添加された培地を使用した。

〔観察〕

t=24 h、t=216 h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１に示す。

[0036] 〔結果〕

図１に示されるとおり、HAが添加された培地を使用した培養では、HAが添加されていない培地を使用した培養に比べて、増殖の速度が高いことが認められた。また、HAが添加された培地を使用した培養では、HAが添加されていない培地を使用した培養に比べて、未分化を逸脱した細胞の出現頻度が抑制されていた。

[0037] ［浮遊培養：細胞集塊培養］

iPS細胞の浮遊培養におけるヘマグルチニン（HA）の効果を確認した。

〔細胞〕

ヒトiPS細胞：Tic株

〔培地〕

mTeSR1培地（Stemcell Technologies）

〔容器〕

30 ml バイオリアクター（Able co. Ltd.）

〔播種密度〕

1 x 10^5 細胞/mL

〔HA調製・添加方法〕

HA：Type B

添加濃度：10 nM

〔培養条件〕

37℃、5%CO_2雰囲気下

培養開始時（t=0）の72時間後から24時間ごとに3日間、ヘマグルチニン濃度が10nMとなるように添加した（図２）。

〔観察〕

t=0から24時間ごとにおいて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するとともに、培地の体積当たりの細胞密度を測定した（図３及び４）。

[0038] 〔結果〕

t=0からt=72 hまでを第１相、t=72 hからt=168 hまでを第２相として、培養時間を2つに分け、それぞれの相における細胞生存率（α）と、見かけ上の比増殖速度（μ）を算出した（表１）。下記表１に示されるとおり、HAが添加された第２相では、第１相及びHAが添加されてない第２相に比べて、増殖のスピードが優れていた。また、HAが添加された第２相では、第１相及びHAが添加されてない第２相に比べて、細胞集塊の大きさが均一であり、また、未分化を逸脱した細胞の出現頻度が抑制されていた。

[0039] α値とμ値の算出方法

$\alpha = X_{24}/X_0$

X_0＝播種時（0 h）における細胞密度

X_{24}＝播種後24 hにおける細胞密度

$\mu = LN(X_2/X_1)/(t_2-t_1)$

t_1＝24 h（第1相）または96 h（第2相）

t_2＝72 h（第1相）または168 h（第2相）

[0040] [表1]

Table 1 Comparison of cell survival ratio (α) and apparent specific growth rate (μ)

	HA (Type B, 10 nM)		Control	
	1st phase	2nd phase	1st phase	2nd phase
α (-)	0.35		0.33	
μ (h^{-1})	0.031	0.035	0.033	0.013

[0041] ［浮遊培養：細胞集塊培養２］

ヒトiPS細胞集塊の増殖に対するHAの添加効果として、細胞増殖特性と、集塊内における細胞分裂の局在性の2点について評価を行った。

〔細胞〕

ヒトiPS細胞：Tic株

〔培地〕

Stemfit（商標）AK02培地（味の素社製）

培地交換頻度：24時間ごと

〔容器〕

96 well plate V-bottom （住友ベークライト社製, PrimeSurface（商標））

〔HA調製・添加方法〕

HA：B型

添加濃度（培養24h以降）：0, 5, 10 nM

〔培養条件〕

37℃、5%CO_2雰囲気下

播種細胞数：3.0 x 10^3 cells/well

培養時間240 時間

〔測定項目〕

細胞増殖特性：集塊細胞数と、培養24 hから168 hにおける見かけ上の比増殖速度（μ）を測定した。

集塊内特性：凍結切片に対する蛍光染色法による観察（核＝DAPI, 分裂可能細胞＝抗ki-67抗体）により細胞分裂の局在性を観察した。

測定頻度：培養 24 h以降 48 h毎

[0042] 〔細胞増殖特性の結果〕

Tic株を、HAの添加濃度を0, 5, 10 nM含む培地を用いて、上記の培養条件で培養を行った。増殖特性として、集塊細胞数、及び、比増殖速度（μ）を測定した。

集塊細胞数の結果を図５に示す。同図のおとり、HA添加条件（添加濃度：△＝5 nM、□＝10 nM）は、無添加条件（○＝0 nM)に比べて集塊細胞数が増加することが確認された。 比増殖速度（μ）は、培養24 hから168 hにおける見かけ上の比増殖速度として下記式に基づき算出した。その結果を下記表２に示す。同表のとおり、比増殖速度（μ）の値は、HA添加時に無添加時に比べて高くなり、増殖が促進されていることが確認された。

$\mu = LN(X_2/X_1)/(t_2-t_1)$

$X_1 = t_1 = 24$ h

$X_2 = t_2 = 168$ h

[0043] [表2]

表２ 増殖特性の比較	
HA濃度（nM）	μ (10^{-2} h^{-1})
0	2.04±0.12
5	2.33±0.15
10	2.35±0.05

[0044] 〔集塊内特性の結果〕

集塊内特性として、蛍光染色法による顕微鏡観察を行った。核をDAPIで染色（赤）し、分裂可能細胞を抗Ki-67抗体で染色（緑）して集塊内での分裂可能細胞の局在性を確認した。その結果の一例を図６に示す。

HA無添加条件では、培養24 hにおいて分裂可能細胞（Ki-67陽性細胞）は、集塊内にてほぼ均一に存在していいた（黄色い部分）。その後、集塊内部においては、分裂可能細胞は観察されず、周辺部のみの局在性を示した。すなわち、集塊周辺部のみで分裂が行われることで細胞集塊の細胞数が増えることが確認された。

HA添加条件（5, 10 nM）では、培養24 hにおいてHA無添加での培養同様の傾向がみられたが、その後の培養において、集塊周辺部での分裂可能細胞の頻度がHA無添加に比べて高くなった。10 nM HA添加での培養では、集塊内部でも分裂可能細胞が存在することが確認された。以上により，HAの添加により，集塊内の細胞分裂頻度が向上し，増殖速度が上昇することが示された。また、HAによる増殖速度上昇が、HA濃度依存性を示すことが確認された。

産業上の利用可能性

[0045] 本開示に係る方法及び組成物は、例えば、再生医療の分野に有用である。