明 細 書

多能性幹細胞及び心筋細胞以外の分化細胞に対する細胞死誘導方法

技術分野

[0001] 本発明は、胚性幹細胞や誘導性多能性幹細胞等の多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導する際の心筋細胞の精製に関する手段として、多能性幹細胞及び多能性幹細胞由来の心筋細胞以外の分化細胞に細胞死を誘導する方法に関する。

背景技術

[0002] 成体における心筋細胞は増殖活性を喪失しており、重症な心筋梗塞、心筋症などの疾患を治療するためには、心臓移植に頼らざるを得ない。しかし、現状では心臓のドナー不足の問題を克服するには至っておらず、心臓移植以外の治療方法を見出すことが急務である。これに対して、心筋細胞を体外で作製・精製し、疾患治療の際の心筋細胞の補充に充てることは、心臓移植に頼らなくてはならない心臓疾患の患者を救済するための最も有望な方法と予想されている。

[0003] 心筋細胞を得るための方法としては、幹細胞（例えば、胚性幹細胞や種々の成体幹細胞）を分化させて用いる方法、胎児から取得する方法などが知られている。例えば、マウスの多能性幹細胞を使用する場合には分化を抑制する因子（フィーダー細胞、白血病抑制因子（LIF）など）を、ヒトの多能性幹細胞の場合には分化を抑制する因子（フィーダー細胞、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、トランスフォーミング成長因子（TGF）など）を培養液から除き、それによって細胞塊（胚様体）を形成させることによって、積極的に心筋細胞への分化を惹起することが出来ることが、幹細胞を分化させる方法として知られている。

[0004] 体外における幹細胞から心筋細胞への分化の様式は、生体内での生理的な発生段階を一部踏襲しており、特に発生初期のイベントに関して、受精卵細胞

で生じる生理的発生とinvitroでの分化の様式との間には共通点が多い。体外での心筋細胞への分化の系譜は、生理的発生と同じく、先ず幹細胞が未分化な中胚葉細胞へと分化し、その一部が予定心筋細胞（前心臓中胚葉）へと分化した後、心筋細胞へと分化する。

[0005] 多能性幹細胞は臓器を構成する全ての細胞に分化する能力を有する細胞であるため、心筋細胞のみに分化させることは技術的に困難である。一方で、全ての多能性幹細胞を一斉に分化段階に誘導することも非常に困難であるため、胚様体の中には、未分化な幹細胞が残存することが非常に多い。

[0006] このように、体外において幹細胞から心筋細胞への分化を誘導する場合、全ての幹細胞の場合において、心筋細胞以外の細胞を副産物として産生してしまうことや未分化な細胞を残存させるという臨床応用に対して有害な性質が残ってしまう。特に、残存してしまう未分化な細胞は、増殖活性を有しかつ多種類の細胞に分化できることから、治療に際して生体に移植された細胞の中に未分化な細胞が残存すれば、この未分化な細胞から奇形腫が形成される危険性がきわめて高い。このような理由から、多能性幹細胞に分化誘導を行って作製された心筋細胞を含有する細胞集団を、そのまま生体に移植し治療に用いることは困難である。従って、多能性幹細胞由来の心筋細胞を用いた治療を安全に実行し、理想的な治療効効果を得るために、未分化の多能性幹細胞を完全に排除し、かつ高度に心筋細胞を精製する方法（即ち、心筋細胞以外の細胞を除去する方法）を見出すことが必要である。

[0007] 現在、心筋細胞を精製することは、あらかじめ幹細胞の遺伝子（ゲノム）に何らかのマーカー遺伝子（例えばGFP）の導入を行う方法が知られている（非特許文献1）。しかしながら、この様な方法ではゲノムを改変することが必要になり、それ自体に倫理的な問題を持つ上、細胞ガン化率の変化等、安全性に関して

予測不可能な重大リスクを伴う（非特許文献 2)。未分化な多能性幹細胞を積極的に除去する方法としても、遺伝子改変を用いる方法が報告されている（非特許文献 3)。これに対して、細胞死誘導作用を持つことが知られているセラミド類を用いて、胚性幹細胞に比較的特異的に細胞死を誘導する方法が報告されている（非特許文献 4）。しかしながら、この方法ではセラミド類で処理後、培養を行った細胞群における多能性幹細胞（OCT 陽性細胞）が未処理（コントロール）の場合の 1/3 にも相当する多能性幹細胞が残ってしまい、十分な除去方法ではない。また、ヒト胚性幹細胞の除去についてもアポトーシスを起こした細胞が見出されるとの記載があるだけで十分な除去が行なわれたとの記載はない。また、細胞毒性のある抗体を用いた方法が報告されているが（非特許文献 5）、当該方法では、抗体処理後でも 20％前後の胚性幹細胞が残存することが記載されている。更に抗体の治療的な処理に関しては抗原性の回避など、当該方法の利用に際して制約がある。よって、細胞死を誘導する公知の方法では、心筋疾患の治療に用いうる心筋細胞の精製方法としては改善されるべき余地があり、更に効率の良い新たな細胞死誘導法が望まれている。

先行技術文献

非特許文献

非特許文献 1： Muller M, et al., FASEB J. 2000; 14: 2540-2548

非特許文献 2： Schroder AR, et al., Cell. 2002; 110: 521-529

非特許文献 3： Schuldiner M, et al., Stem Cells 2003; 21, 257-265

非特許文献 4： Bieberich E et al., J Cell Biol. 2004； 167: 723-734

非特許文献 5： CHOO AB, et al., Stem Cells 2008； 26: 1454-1463.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、遺伝子改変を行うことなく、胚性幹細胞や誘導性多能性幹細胞等の多能性幹細胞、及び多能性幹細胞由来の心筋細胞以外の分化細胞には細胞死を誘導するが、心筋細胞に対しては細胞死を誘導しない方法を開発することを課題とする。本発明はまた、このような方法により、奇形腫の危険性の無い安全で高純度な心筋細胞を多能性幹細胞から作製する方法を開発することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、鋭意研究を行った結果、物質的な毒性や細胞死誘導作用が認められていない物質を多能性幹細胞や非心筋細胞の培養条件に対して添加することにより、短時間で、かつ非常に効率的に心筋細胞以外の分化細胞に対して細胞死を誘導する方法を構築することにより、遺伝子改変によることなく、上記の課題を解決することができることを明らかにした。この方法は、心筋細胞に対しては細胞死を誘導しないことから、効率的な心筋細胞精製方法でもある。

[0010] 具体的には、本発明は、多能性幹細胞、多能性幹細胞由来の心筋細胞以外の分化細胞、及び多能性幹細胞由来心筋細胞を含む細胞集団を、370 mOsm/kg以上の浸透圧を有する高張液で培養することにより、多能性幹細胞及び多能性幹細胞由来の心筋細胞以外の分化細胞を細胞死に導く方法を提供することにより、上述した課題を解決することができることを明らかにした。即ち、本願発明は具体的には以下の事項に関する。

(1) 多能性幹細胞、多能性幹細胞由来の心筋細胞以外の細胞、及び多能性幹細胞由来心筋細胞を含む細胞集団を、370 mOsm/kg 以上の浸透圧を有する高張液で培養することにより、多能性幹細胞及び多能性幹細胞由来の心筋細胞以外の細胞を細胞死に導く方法。

(2) 高張液での培養を2時間以上行う、上記 (1) に記載の方法。

(3) 370 mOsm/kg 以上の浸透圧を有する高張液が、培養液に対して糖質（炭水化物）を添加することにより調製されたものである、上記（1）又は（2）に記載の方法。

(4) 370 mOsm/kg 以上の浸透圧を有する高張液が、0.1～1 M の糖質を含有するものである、上記（3）に記載の方法。

(5) 糖質が、糖アルコール類、糖類、又はベタイン類である、上記（3）又は（4）に記載の方法。

(6) 糖アルコール類、糖類、又はベタイン類が、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、グリセロール、スクロース、グルコース及びトリメチルグリシンからなる群から選択される、上記（5）に記載の方法。

(7) 370 mOsm/kg 以上の浸透圧を有する高張液が、0.1～0.6 M のグリセロールを含有するものである、上記（4）に記載の方法。

(8) 培養を 10 時間以上行う、上記（7）に記載の方法。

(9) 細胞集団を高張液で培養した後、200～300 mOsm/kg の通常浸透圧を有する培養液に戻して更に培養する、上記（1）～（8）のいずれか 1 項に記載の方法。

発明の効果

[0011] 本発明の方法により多能性幹細胞、多能性幹細胞由来の心筋細胞以外の分化細胞、及び多能性幹細胞由来心筋細胞を含む細胞集団を処理することにより、細胞集団中の未分化の多能性幹細胞及び非心筋細胞を効率的に除去することができると同時に、心筋細胞のみが生存することができることから心筋細胞を効率的に濃縮・精製することができる。

図面の簡単な説明

[0012] 図 1 は、胚性幹細胞（ES 細胞）由来心筋細胞と残存する未分化胚性幹細胞の免疫染色を示す。

図 2 は、胚性幹細胞由来心筋細胞と、残存する胚性幹細胞が混入した培養系におけるマンニトール処理を示す。

図 3 は、マンニトール処理後の細胞における Nkx2.5 及び Oct-3/4 に対する免疫染色を示す。

図 4 は、マウス胚性幹細胞に対する、マンニトール 0.45 M の細胞死誘導作用を示す。

図 5 は、マーモセット胚性幹細胞に対するマンニトールの作用を示す。ミトコンドリア膜電位感受性色素 TMRM を用いて生死判定を行った。

図 6 は、マーモセット胚性幹細胞に対するマンニトールの効果を示す。

図 7 は、ヒト胚性幹細胞に対するマンニトールの作用（FACS 解析）を示す。

図 8 は、ヒト胚性幹細胞に対するマンニトールの効果（直後）を示す。

図 9 は、ヒト胚性幹細胞に対するマンニトールの効果（5 時間後）を示す。

図 10 は、は、ヒト胚性幹細胞胚様体のマンニトール処理を示す。

図 11 は、ヒト胚性幹細胞細胞胚様体のマンニトール処理による、Oct-3／4 陽性細胞の死滅を示す。

図 12 は、ヒト誘導性多能性幹細胞（iPS 細胞）に対するマンニトールの作用（FACS 解析）を示す。

図 13 は、マンニトール以外の種々の糖質における、ヒト胚性幹細胞に対する細胞死誘導作用を示す。

図 14 は、ヒト胚性幹細胞由来心筋・非心筋細胞に対するグリセロールの作用を示す。

図 15 は、0.2 M マンニトールを含有する培養液で、48 時間または 72 時間処理した細胞の状態を示す。下段にそれぞれのコロニーの拡大像を示し、代表的な細胞形態を図示した。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明者らは、胚性幹細胞や心筋細胞、非心筋細胞を含む混合細胞系に対して、高濃度のマンニトールを溶解した高張液を用いたところ、高張液に曝露することで胚性幹細胞及び非心筋細胞が細胞死を起こしやすいという事実を見出した。この知見に関して、更に詳細にマンニトール濃度やマンニトールへの曝露時間と胚性幹細胞及び非心筋細胞の細胞死における関係を検討した結果、低濃度のマンニトールでは長時間の曝露が効果的に胚性幹細胞及び非心筋細胞に細胞死を誘導し、ほぼ飽和濃度である1 Mでは、短時間に胚性幹細胞の細胞死を誘導することが分かった。

[0014] 同時に、全ての濃度において、胚性幹細胞及び非心筋細胞が細胞死を起こす濃度・時間でありながら胚性幹細胞から分化した心筋細胞に細胞死を誘導しない条件が存在することが分かった。よって、そのような条件のもとで培養を行う本発明の方法は、効率的な胚性幹細胞及び非心筋細胞の除去方法であると同時に、効率的な心筋細胞の濃縮精製方法である。

[0015] 従って、本発明は一態様において、未分化の多能性幹細胞、多能性幹細胞由来の心筋細胞以外の分化細胞、及び多能性幹細胞由来心筋細胞を含む細胞集団を、370 mOsm/kg 以上の浸透圧を有する高張液で培養することにより、多能性幹細胞及び多能性幹細胞由来の心筋細胞以外の分化細胞を細胞死に導く方法を提供する。

[0016] マウス胚性幹細胞に対して、胚様体形成法を用いて分化誘導を行う場合、分化誘導開始後3～6日の胚様体には中胚葉ないし予定心筋細胞が含まれると言われる。また、心筋細胞が出現するのは、分化開始後7日目（ヒトの胚性幹細胞では、10日目）である。胚様体には、上記の他に未分化細胞、内皮上皮様細胞、神経細胞などが含まれる。胚様体を構成する細胞をより詳細に検討すると、胚様

体を構成する細胞集団の内、7～8割が心筋細胞以外の分化細胞であり、その中には未分化な胚性幹細胞が含まれることがある。これらの夾雑細胞は盛んに増殖し、時間経過とともにその存在する割合が増加する。本発明者らは、このような細胞構成を有する胚様体を、培養液中で適切な範囲の高浸透圧に曝露することにより、胚様体中に残存する胚性幹細胞や心筋細胞以外の分化細胞が細胞死を起こすことを見出した。本発明者らはまた、この条件下で培養する場合においても、心筋細胞は細胞死を呈することは無く、生理的浸透圧の培養液に置換することで、自律拍動を再開することを見いだした。

[0017] 本発明の方法において、細胞の供給源としては心筋細胞が含まれる細胞集団であればどのような供給源由来の細胞集団であってもよく、例えば、多能性幹細胞（胚性幹細胞（ES細胞）、生体幹細胞、誘導性多能性幹細胞（iPS細胞）などが含まれる）から公知の心筋細胞誘導条件を使用して分化させた心筋細胞を含む細胞集団、胎児組織由来の細胞集団を使用して、本発明の方法を実施することができる。このようにして多能性幹細胞から分化させた心筋細胞を含む細胞集団には、多能性幹細胞由来心筋細胞の他に、多能性幹細胞、多能性幹細胞由来の心筋細胞以外の分化細胞が含まれてもよい。

[0018] 本発明の方法は、かかる細胞集団を、370 mOsm/kg 以上の浸透圧を有する高張液で培養することを特徴とする。本発明の方法において使用する浸透圧は、心筋細胞以外の細胞（多能性幹細胞及び心筋細胞以外の分化細胞）には細胞死を誘導するが、心筋細胞に対しては細胞死を誘導しない浸透圧である。このような浸透圧としては、370 mOsm/kg以上、好ましくは370 mOsm/kg～1600 mOsm/kg、より好ましくは 370 mOsm/kg～1000 mOsm/kg、更に好ましくは 480 mOsm/kg～1000 mOsm/kg、最も好ましくは700 mOsm/kg～1000mOsm/kgである。通常、in vitroにおける培養条件下における浸透圧が、200～300 mOsm/kg程度であること（通常の

浸透圧または生理学的浸透圧ともいう）と比較すると、これらの値は非常に高い値であり、この条件下で培養する場合に心筋細胞以外の細胞は死滅する。

[0019] 培養液に対して糖質を添加することにより作製された 370 mOsm/kg 以上の浸透圧を有する高張液を使用する場合、本発明の方法は、かかる高張液中での培養を 2 時間以上、好ましくは 2～72 時間、より好ましくは 2～48 時間、更に好ましくは 2～24 時間、最も好ましくは 4～12 時間行うことを特徴とする。

[0020] 本発明の方法において、ヒト ES 細胞や iPS 細胞を含めた未分化な多能性幹細胞、又は心筋細胞以外の分化細胞にのみ細胞死を誘導することができる条件は、高張液の浸透圧の程度と、細胞の高張液への曝露時間との関係によって決定される。即ち、心筋細胞を誘導するために使用される細胞種に関わらず、高張液の浸透圧が高ければ高いほど細胞の高張液への曝露時間は短くてよく、一方、高張液の浸透圧を低く設定すればそれだけ細胞の高張液への曝露時間を長くすることが必要になる。

[0021] 本発明の方法において高張液中に細胞集団を曝露すると、心筋細胞以外の細胞（未分化の多能性幹細胞又は非心筋細胞）を細胞死に導く（即ち、細胞死を誘導するか、細胞死のシグナルを与える）ことができる。このように細胞死に導かれた細胞は、高張液中で細胞死を起こすか、あるいは高張液から通常の培養液に戻された後に細胞死を起こす。

[0022] 本発明の方法における細胞死は、生理学的なストレスを細胞に対して曝露することにより誘導されるものであることから、生き残った細胞には遺伝的な損傷を与えることなく、目的とする細胞以外の細胞にのみ細胞死を誘導できる点で、直接遺伝子に損傷を与える物理的な条件（放射線ストレスや酸化ストレスなど）や化学的な条件（化合物ストレス）により細胞死を誘導するよりも非常に好ましい。というのも、生理学的なストレスに耐えて生き残った細胞は、その細胞

死を誘導するための生理学的なストレスを除去した培養条件に戻すことにより、再びもともとの細胞の機能を回復し、正常な機能を発揮することができる。この特徴は、ex vivo で調製された組織又は組織を構成する細胞を体内に移植することにより行う再生医療の現場においては、非常に利用しやすい特徴である。

[0023] 本発明において 370 mOsm/kg 以上の浸透圧を有する高張液という場合、細胞の代謝に対して影響を及ぼすことなく、浸透圧のみを 370 mOsm/kg 以上とした高張液を意味しており、例えば、培養液に対して糖質（炭水化物）を添加することにより調製されたものを例として挙げることができる。本願発明に用いることができる糖質の例としては、細胞の代謝に影響を及ぼすことなく培養液の浸透圧を上げることができる糖質、即ち、本発明の培養液中に添加することができる糖質の例としては、例えば糖類（単糖類、少糖類、多糖類）、グリコサミノグリカン類、アミノグリコシド類、糖アルコール類又はベタイン類を挙げることができるが、これらには限定されない。より具体的には表１に記載された物質を挙げることができる。

[0024]

[表 1]

糖質（炭水化物）		
分類（大）	分類（小）	構成物質例
単糖類	トリオース	ケトトリオース（ジヒドロキシアセトン）、アルドトリオース（グリセルアルデヒド）
	テトロース	ケトテトロース（エリトルロース）、アルドテトロース（エリトロース、トレオース）
	ペントース	ケトペントース（リブロース、キシルロース）
		アルドペントース（リボース、アラビノース、キシロース、リキソース）
		デオキシ糖（デオキシリボース）
	ヘキソース	ケトヘキソース（プシコース、フルクトース、ソルボース、タガトース）
		アルドヘキソース（アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロース）
		デオキシ糖（フコース、フクロース、ラムノース）
	ヘプトース	セドヘプツロース
少糖類	二糖類	スクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、ツラノース、セロビオース
	三糖類	ラフィノース、メレジトース、マルトトリオース
	四糖類	アカルボース、スタキオース
	その他のオリゴ糖	フラクトオリゴ糖（FOS）、ガラクトオリゴ糖（GOS）、マンナンオリゴ糖（MOS）
多糖類	多糖類	グリコーゲン、デンプン（アミロース、アミロペクチン）、セルロース、デキストリン、グルカン（β1,3-グルカン）
		フルクトース：フルクタン（イヌリン、レバンβ2→6）
		N-アセチルグルコサミン：キチン質
グリコサミノグリカン類		ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロナン、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸
アミノグリコシド類		カナマイシン、ストレプトマイシン、ブラマイシン、ネオマイシン、パロモマイシン、アプラマイシン、ゲンタマイシン、ネチルマイシン、アミカシン
糖アルコール類		エリトリトール、グリセロール、イソマルトラクチトール、マルチトール、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、D-トレイトール、L-トレイトール、D-アラビニトール、L-アラビニトール、リビトール（アドニトール）、D-イジトール、ガラクチトール（ダルシトール）、ボレミトール、ペルセイトール、D-エリトロ-D-ガラクト-オクチトール、イノシトール
ベタイン類		カルニチン、トリメチルグリシン（ベタイン）

[0025] 更に、ソルビトール（糖アルコール類）やトリメチルグリシン（ベタイン類）等の生理的に成体内の浸透圧調節に関わる物質を用いた場合にも、本願発明に係る効果が認められているので、有機浸透圧調節物質（organic osmolytes）としてベタイン、タウリン、イノシトール、グリセロフォスフォコリン（glycerophosphocholine）等を使用することができる。

[0026] 培養液に対して糖質を添加することにより 370 mOsm/kg 以上の浸透圧を有する高張液を作製する場合、高張液が 0.1～1 M（mol/L）の糖質を、好ましくは、0.1～0.6 M の糖質を、含有するものであることを特徴とする。糖質濃度(mol/L)と浸透圧（mOsm/kg）との関係は、ほぼ直線的な関係として近似することができ、0.1 M の糖質を含有する高張液は、約 370 mOsm/kg の浸透圧を有する高張液に相当し、1 M の糖質を含有する高張液は約 1300～1600 mOsm/kg の浸透圧を有する高張液に相当する。

[0027] 但し、糖質がグリセロールの場合は、高張液が 0.1～0.6 M のグリセロールを、好ましくは 0.1～0.5 M のグリセロールを、含有するものであることを特徴とし、かかる高張液中で培養を 10 時間以上、例えば 10～24 時間、好ましくは 10～18 時間行うことを特徴とする。

[0028] 各糖質を用いて高張液を作製した場合の糖質濃度と浸透圧との関係のうち代表的な糖質に関するものを、以下の表に示した。

[0029] 表 2：糖質濃度と浸透圧（実測値）

濃度（M）	0	0.45	0.6	0.9
グリセロール	258	706	869	1232
グルコース	258	758	939	1336
マンニトール	258	717	875	1234
スクロース	258	779	988	1496
キシリトール	258	779	940	1230
ソルビトール	258	748	922	1289
ベタイン	258	763	965	1421

[0030] 本発明の方法においては、細胞集団を 370 mOsm/kg 以上の浸透圧を有する高張液で培養して、多能性幹細胞や非心筋細胞に対して細胞死を誘導した後、通常の浸透圧（即ち、200～300 mOsm/kg の浸透圧）を有する培養液に戻して更に培養することが好ましい。本発明の方法において使用する高張液中で培養を行うと、心筋細胞は細胞死を起こさないものの、一過的に拍動を停止する場合がある。しかし、かかる場合であっても、通常の浸透圧の培養液中に戻すことにより、再び拍動を開始し、心筋細胞として機能することができる。また、高張液中で細胞死のシグナルを受けたが外見上は依然として生存しているように見える細胞も存在する。そのような細胞を培養中から除去するためにも、通常の浸透圧を有する培養液に戻して更に培養することは好ましい。

[0031] 本発明の方法は、実施例において調べた全ての細胞（即ち、マウス由来胚性幹細胞、マーモセット由来の胚性幹細胞、ヒト由来の胚性幹細胞、ヒト由来の iPS 細胞）において、同様の結果を示すことができた。本発明の方法が動物種に依存しなかったことから、本発明の方法はマウスからヒトまで全ての哺乳動物由来の細胞について適用することができることが示された。更に、胚性幹細胞においても誘導性多能性幹細胞においても本発明の方法を利用して目的を達成することができたことから、多能性幹細胞が遺伝子操作を行っていない幹細胞（例えば胚性幹細胞）であるか遺伝子操作を行った幹細胞（例えば iPS 細胞）であるかにかかわらず適用することができることも示された。

[0032] 例えば、本発明の方法を、胚性幹細胞又は iPS 細胞から分化した心筋細胞を含む細胞集団に対して行う方法を具体的に説明する。まず、胚性幹細胞又は iPS 細胞を分化用の培養液（例えば、α-MEM（Minimum Essential Medium）（SIGMA）、10%FBS（EQUITEC BIO）、100 units/ml ペニシリン、50μg/ml ストレプトマイシン（GIBCO）からなる培養液）中でハンギングドロップ法等により浮遊培養して適

切な心筋分化誘導を行い、心筋細胞を含む胚様体を形成する。心筋細胞を分化させた後更に2日間以上の成熟期間を経てから、次いで胚様体を培養するための培養液を、マンニトール、ソルビトール、グルコース、スクロース又はキシリトール0.1～1Mを含有する血清不含α-MEM培養液もしくは血清不含D-MEM培養液(即ち、高張液）に交換し、更に所定の時間、高張液である培養液に曝露する。このようにして高張液に曝露すると、心筋細胞以外の細胞（未分化の多能性幹細胞又は非心筋細胞）に対して細胞死を誘導し、もしくは細胞死のシグナルを与えることができる。

[0033] 高張液への曝露を行う培養が終了した後、処理後の細胞を通常の浸透圧の培養液に交換して更に培養を継続することにより、心筋細胞のみが選択的に培養条件中で生存することができる。必要に応じて、酵素処理による細胞の分散化、培養液の交換や遠心分離などの手法のいずれか又は組み合わせを利用して細胞を洗浄することにより、細胞死を起こした非心筋細胞を積極的に除去することもできる。

[0034] 本発明の方法により心筋細胞と未分化細胞を含む心筋細胞以外の細胞との両方を含む細胞集団に対して高張液への曝露を行った場合、細胞集団に含まれる心筋細胞以外の細胞のうちの90%以上、好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、最も好ましくは100%の細胞に、細胞死を誘導することができる。

実施例

[0035] 本発明を以下の実施例により更に詳細に説明する。しかしながら、以下の実施例は、本発明の例示であって、本発明を限定することを意図するものではない。

[0036] 実施例 1：胚性幹細胞由来心筋細胞と残存する未分化胚性幹細胞の免疫染色

本実施例においては、幹細胞から心筋細胞を含む細胞塊（胚様体）を形成した場合の、細胞塊（胚様体）中の心筋細胞と未分化細胞との混在状態を確認することを目的とした。

[0037] マウス胚性幹細胞（細胞株名 EB3、Nat Genet 2000; 24: 372-376）は、独立行政法人・理化学研究所の丹羽仁史博士より恵与していただいた。このマウス胚性幹細胞を既存の方法（Bader A, et al., Differentiation 2001, 68, p31-43）（即ち、培養液［α-MEM (Minimum Essential Medium) (SIGMA)、10%FBS (EQUITEC BIO)、100 units/ml ペニシリン、50μg/ml ストレプトマイシン (GIBCO)］を用いて、EB あたり 75 個の胚性幹細胞をハンギングドロップ法により細胞塊として合計 7 日間培養する方法）にて、心筋細胞を含む細胞塊へと分化させた後、胚様体を上記培養皿に接着させて、37℃、5%CO_2の条件下にて 3～5 日間培養した。

[0038] 得られた胚様体を 4%パラホルムアルデヒドにて固定化し、0.1% Triton X100 で細胞膜を半可溶化した。4%BSA溶液によってブロッキングを行い、最も発生初期の予定心筋細胞において発現すると言われる Nkx2.5 に対する抗体（ヤギ抗 Nkx2.5 抗体（Santacruz 社 No. N-19））、及びマウス胚性幹細胞の未分化能維持に重要な働きをしていることが知られている転写因子 Oct-3/4 に対する抗体（マウス抗 Oct-3/4 モノクローナル抗体、BD Transduction Laboratories 社 No. 084720)をそれぞれを 1 次抗体として、ブロッキング液にて 100 倍希釈した後、4℃にて 12 時間浸透させた。4 回の洗浄後、それぞれの抗体に対する 2 次抗体として、Alexa Flow488 でラベルしたロバ抗ヤギ抗体（Molecular Probe 社）と、TRITC ラベルしたウサギ抗マウス抗体（DAKO 社）を共に 1/200 希釈した後、室温にて 1 時間浸透させた。洗浄後、核 DNA 染色試薬である DAPI（Molecular probe 社）を含有する溶液を用いて、室温にて 5 分間核染色を行い、洗浄後、蛍光顕微鏡下で観察を行った。結果を図 1 に示す。図 1 においては、2 つの胚様体（(a) 及び (b)）

に関して、左上：Oct-3（赤色）、右下：Nkx2.5（緑色）、右上：Oct-3（赤色）とNkx2.5（緑色）の重ね合わせ像にDAPI染色（青色）を更に重ね合わせたもの、そして左下：位相差像、をそれぞれ示す。

[0039] 図1に示すように、胚様体（a）及び（b）の両方共において、一つの胚様体内部に、Oct-3/4陽性の未分化細胞とNkx2.5陽性である心筋細胞が共存していることが判明した。

[0040] 実施例 2：胚性幹細胞由来心筋細胞と残存する胚性幹細胞が混入した培養系における糖質（糖アルコール類）処理

本実施例においては、胚性幹細胞から形成された心筋細胞を含む細胞塊（胚様体）に対して糖質（糖アルコール類）処理を行った後の、心筋細胞の培養状態とそれ以外の細胞の培養状態とを確認することを目的とした。

[0041] マウス由来胚性幹細胞を実施例1に記載した方法にて胚様体を形成して、予定心筋細胞（前心臓中胚葉）を含む段階へと分化させた。得られた胚様体を、細胞障害を与えないように注意深く消化酵素処理（トリプシン、コラゲナーゼ）することによって部分的に分散させたものを、再接着培養した。5日間培養を継続したところ、図2に示すように自律拍動を行う心筋細胞の集団（赤線で囲った細胞集団）と、胚性幹細胞様の細胞形質を有する細胞集団（黄線で囲った細胞集団）と、そしてその他の細胞集団とが混在した状態となった（図2（a）を参照）。

[0042] 次に、この混合培養の培養液を、0.45 M（約720 mOsm/kgに相当）のマンニトールとITS｛インスリン（10 mg/L）、トランスフェリン（5.5 mg/L）、亜セレン酸ナトリウム（6.7 mg/L）｝（GIBCO社）を含む無血清のα-MEM培養液に置換し、36時間培養を行った。その結果、この段階で、既に大多数の細胞が典型的な細胞死を呈していた。その後、培養液を20％ウシ胎仔血清を含むα-MEM培養液へと交換し、培養を継続したところ、1～2日後には心筋細胞の自律拍動が回復した。

一方、培養ディッシュに単層を形成するように広がって存在していた未分化細胞（胚性幹細胞）（図 2（a）右下を参照）を含め、心筋細胞以外の細胞の殆ど全てが死滅していた（図 2（b）を参照）。

[0043] この図 2 に示した培養に対して、実施例 1 と同様の方法により Nkx2.5 と Oct-3/4 に対する免疫染色を行った結果を図 3 として示した。図 3 においては、左上に示す位相差像の四角で囲われた部分の細胞に関して、左下：Nkx2.5 抗体染色（緑色）、そして右上：DAPI 染色（青色）、そして右下：Nkx2.5 抗体染色（緑色）と DAPI 染色（青色）との重ね合わせ像、をそれぞれ示す。この結果、得られた細胞のうち 98％以上が Nkx2.5 陽性の心筋細胞であり（図 3 左下及び右下を参照）、Oct-3/4 陽性の未分化細胞は存在しないことが明らかになった。

[0044] 実施例 3：マウス胚性幹細胞に対する糖質（糖アルコール類）の細胞死誘導作用

本実施例においては、マウス胚性幹細胞を糖質（糖アルコール類）にて処理した後の幹細胞の生存状態を確認することを目的とした。

[0045] ミトコンドリア膜電位は、死細胞では失われるために、生存の指標である膜電位を検出して蛍光を発するミトコンドリア膜電位感受性試薬、TMRM（Molecular Probes 社）により染色を行った場合、この試薬由来の蛍光シグナルは、生細胞では高く、死細胞では低くなる。

[0046] この特性を利用して、実施例 1 に記載した方法により培養した胚性幹細胞を、マンニトール 0.45 M（約 720 mOsm/kg に相当）と 1 μM TMRM を含むα-MEM 培養液中で、0 h（Pre）、3 h、6 h、20 h のあいだ培養したのち、採取した胚性幹細胞を洗浄後 FACS 解析を行い、ミトコンドリア膜電位感受性試薬 TMRM の蛍光強度に基づいて、幹細胞の生存状態を確認し、図 4 に示した。図 4 において、0 h（Pre）、3 h、6 h、20 h のそれぞれの FACS 解析結果に関して、ドットプロット

に記した境界線よりも上部に存在する細胞は生細胞であり、ドットプロットに記した境界線よりも下部の細胞は死細胞を示す。

[0047] 図4に示すように、処理前（Pre）はほぼ全てが生細胞であるが、3時間マンニトール処理した後には約90％の細胞が死に、6時間の処理後には98％、20時間の処理後では、すべての細胞が死滅した（図4）。

[0048] 実施例4：マーモセット胚性幹細胞に対する糖質（糖アルコール類）の細胞死誘導作用

本実施例においては、マーモセット胚性幹細胞を糖質（糖アルコール類）にて処理した後の幹細胞の生存状態を確認することを目的とした。

[0049] マーモセット胚性幹細胞は、財団法人実験動物中央研究所から入手した（Stem Cells. 2005 Oct;23(9):1304-13）。基本的な培養方法も本文献に従った。即ち、マーモセット胚性幹細胞の未分化維持培養を、マイトマイシンC処理により増殖不活性化したマウス胚性線維芽細胞（mouse embryonic fibroblast；MEF）を用いて行った。培養液としては、KO-DMEM（GIBCO）、20％KO-SERUM（GIBCO）、1.6 mM L-グルタミン、0.1 mM非必須アミノ酸（MEM）、0.2 mMβ-メルカプトエタノール（2-ME；Sigma）、100 IU/mlペニシリン、100μg/ml硫酸ストレプトマイシン、及び8 ng/ml組換えヒト白血病阻止因子（LIF；Chemicon）、組換えヒト塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF；Peprotech）を用いた。継代に際しては、0.1％III型コラゲナーゼ（Wortington）を用いて、37℃10分処理することによりESコロニーを分離した。

[0050] 継代後、TE（0.25％トリプシン（GIBCO）と1 mM EDTA）を用いて細胞をバラバラに分散した後、文献（Watanabe K, et al., Nat Biotechnol., 2007, 25: 681-686, Epub 2007 May 27）に従い選択的Rho-関連キナーゼ（ROCK）阻害剤（Y27632）を10μM加え、細胞死を抑制した。同時に50 nM TMRMを用いて生細胞

のミトコンドリアを染色した。

[0051] この染色細胞をマンニトール 0.45 M（約 720 mOsm/kg に相当）を含むα-MEM 培養液中で 2 時間処理した細胞のサンプルを作製し、マンニトールを含まないα-MEM 培養液中で 2 時間処理した細胞のサンプルをコントロールとして作製した。FACS 解析に先立って、コントロールでは、細胞どうしが接着し、細胞塊を形成していたので、再び TE 処理を行って、バラバラな細胞とした。その後、マンニトールで 2 時間処理した細胞及びコントロールの細胞をそれぞれ、TMRM の蛍光強度に基づいて FACS にてミトコンドリア膜電位の有無について解析を行い、幹細胞の生存状態を確認し、図 5 に示した。この結果、コントロール（図 5（a））と比較して、マンニトールを用いて 2 時間処理することによって、殆どすべての細胞が膜電位を消失したことが分かった（図 5（b））。

[0052] 更に同時に、マンニトールで 2 時間処理した細胞及びコントロールの細胞について、染色された細胞の写真を撮影した（図 6（a））。次いで、これらの細胞をそれぞれ 5 日間、培養液〔KO-DMEM（GIBCO）、20%KO-SERUM（GIBCO）、1.6 mM L-グルタミン、0.1 mM 非必須アミノ酸（MEM）、0.2 mMβ-メルカプトエタノール（2-ME；Sigma）、100 IU/ml ペニシリン、100μg/ml 硫酸ストレプトマイシン、及び 8 ng/ml 組換えヒト白血病阻止因子（LIF；Chemicon）〕を用いて接着培養したところ、コントロール細胞（即ちマンニトール未処理細胞）では、生存する細胞を多数見出した（図 6（b）下段）。しかし、マンニトールに曝露された細胞では生存する細胞は全く見られなかった（図 6（b）上段）。

[0053] 実施例 5：ヒト胚性幹細胞に対する糖質（糖アルコール類）の細胞死誘導作用

本実施例においては、ヒト胚性幹細胞を糖質（糖アルコール類）にて処理した後の幹細胞の生存状態を確認することを目的とした。

[0054] ヒト胚性幹細胞京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センター（ナショナルバイオリソースプロジェクトによるES細胞センター）から入手した（文献：Suemori H, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.345, 2006, p.926-932）。基本的な培養方法も上記文献に従った。即ち、ヒト胚性幹細胞を、マイトマイシン C 処理により増殖不活性化したマウス胚性線維芽細胞（mouse embryonic fibroblast;MEF）を用いて未分化維持培養を行った。培養液としては、F12/DMEM（1:1）（SIGMA、製品番号D6421）、20%KO-SERUM（GIBCO）、1.6 mM L-グルタミン、0.1 mM非必須アミノ酸（MEM）、0.1 mMβ-メルカプトエタノール（2-ME；Sigma）、100 IU/ml ペニシリン、100μg/ml 硫酸ストレプトマイシン、及び組換えヒト塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF；Peprotech）を用いた。継代に際しては、0.1%III型コラゲナーゼ（Wortington）を用いて、37℃10分処理することにより胚性幹細胞コロニーを分離した。

[0055] 継代後、TE（0.25%トリプシン（GIBCO）と1 mM EDTA）を用いて細胞をバラバラに分散した後、文献（Watanabe K, et al., Nat Biotechnol., 2007, 25: 681-686, Epub 2007 May 27）に従いROCK阻害剤（Y27632）を10μM加え細胞死を抑制した。同時に50 nM TMRMを用いて生細胞のミトコンドリアを染色した。

[0056] この染色細胞を、マンニトール0.45 M（約720 mOsm/kgに相当）を含むα-MEM培養液中で2、3又は4時間処理した細胞のサンプルを作製し、マンニトールを含まないα-MEM培養液中で2時間処理した細胞のサンプルをコントロールとして作製した。FACS解析に先立って、コントロールで細胞どうしが接着し、細胞塊を形成していたので、再び両者に対し同様のトリプシンとEDTA処理を行い細胞を分散させた。マンニトールで2、3、又は4時間処理した細胞及びコントロールの細胞をそれぞれ、TMRMの蛍光強度に基づいてFACSにてミトコンドリア膜電位の有無について解析を行い、幹細胞の生存状態を確認し、図7に示した。この

結果、コントロール（図 7（a））と比較して、マンニトールを用いて 2 時間処理することによって、殆どすべての細胞が膜電位を消失したことが分かった（図 7（b））。

[0057] 更にマンニトールで 2 時間処理した細胞及びコントロールの細胞について、TMRM 染色された細胞の写真を撮影した（図 8）。マンニトール未処理の細胞（図 8 上段）は、細胞間接着により自己集塊を形成していたが、マンニトールで処理した細胞（図 8 下段）は、分散したままの状態であった（図 8）。

[0058] 次いで、これらの細胞をそれぞれ 5 日間、培養液[F12/DMEM(1:1)（SIGMA、製品番号 D6421）、20%KO-SERUM（GIBCO）、1.6 mM L-グルタミン、0.1 mM 非必須アミノ酸（MEM）、0.1 mMβ-メルカプトエタノール（2-ME；Sigma）、100 IU/ml ペニシリン、100μg/ml 硫酸ストレプトマイシン、及び組換えヒト塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF；Peprotech）] を用いて接着培養したところ、コントロール細胞（即ちマンニトール未処理細胞）では、生存する細胞を多数見出した（図 9 上段）。しかし、マンニトールに曝露された細胞では生存する細胞は全く見られなかった（図 9 下段）。

[0059] 実施例 6：ヒト胚性幹細胞由来胚様体において残存する幹細胞に対する糖質（糖アルコール類）の細胞死誘導作用と心筋細胞の濃縮

本実施例においては、ヒト胚性幹細胞から形成された心筋細胞を含む細胞塊（胚様体）に対して糖質（糖アルコール類）処理を行った後の、心筋細胞の培養状態とそれ以外の細胞の培養状態とを確認することを目的とした。

[0060] ヒト胚性幹細胞を継代操作の後、培養液［α-MEM（Minimum Essential Medium）（SIGMA）、10%FBS（EQUITEC BIO）、100 units/ml ペニシリン、50μg/ml ストレプトマイシン（GIBCO）］中で浮遊培養することにより、胚様体を誘導した。分化開始（浮遊培養開始）から 14 日目～18 日目にかけて、自律拍動能を有する

細胞が分化し、これは別途心筋細胞であることを確認した。

[0061] 分化開始後3ヶ月を経た胚様体は、依然として自律拍動能を維持していた。これらを0.1%コラゲナーゼ（Wortington社）及び0.1%トリプシン（DIFCO社）により部分的に酵素処理し、細かな細胞塊とした。これを2つに分割し、一方に対し、マンニトール0.45 M（約720 mOsm/kgに相当）を添加して2時間処理し、もう一方に対照（コントロール）群として、マンニトール処理した場合と同一量の生理的浸透圧溶液Ads buffer（116.4 mM NaCl、5.4 mM KCl、5.6 mMデキストロース、10.9 mM NaH_2PO_4、405.7 μM $MgSO_4$、20 mM Hepes、pH 7.3）のみを加え2時間処理した。処理後、両細胞群ともに、10%ウシ胎児血清を含むDMEM溶液で3日間接着培養した。

[0062] 3日後にこれらを顕微鏡下で観察したところ、コントロール群の細胞を培養するディッシュでは、細胞質に対して核の占有面積が大きい未分化細胞と思われる細胞集団からなるコロニーが多数見出された。しかし、マンニトール処理を施した細胞を培養するディッシュにおいては、これらの細胞集団は全く見出されなかった。

[0063] マンニトール処理を施した細胞を培養するディッシュにおいては、代わりに自律拍動を行う細胞集団や自律拍動を行う単細胞が接着し、又は浮遊していた。これらの細胞を、胚性幹細胞のマーカーであり核内転写因子であるOct-3/4タンパク質及び、心筋細胞マーカーであり核内転写因子であるNkx2.5タンパク質の発現について、それぞれに対して特異的な2種類の抗体（マウス抗Oct-3/4モノクローナル抗体、BD Transduction Laboratories社No. 084720、及び、ヤギ抗Nkx2.5抗体、Santacruz社No. N-19）を一次抗体として用いて、実施例1と同様の実験手順に従って解析した。上述した2つに分割したサンプルのうちコントロール群についての結果を図10に、マンニトール処理を2時間行った実験群につい

ての結果を図11に、それぞれ示した。図10の上段は心筋細胞を示し、下段は胚性幹細胞を示す。

[0064] この結果、コントロールで多数見出された胚性幹細胞様コロニーは、Oct-3/4陽性であり、胚性幹細胞と考えられた（図10下段）。また、0.45 M（約720 mOsm/kgに相当）マンニトール処理で見出された自律拍動細胞は、Nkx2.5陽性であり、心筋細胞と同定された（図11（a））。これらの結果からマンニトール処理は、未分化幹細胞に対しては細胞死を誘導し、心筋細胞に対しては、顕著な毒性を示さないことが強く示唆された（図10、図11）。

[0065] よって本処理方法は、ヒト胚性幹細胞においても、幹細胞に対し効率的に細胞死を誘導する方法であることが示された。一方で、心筋細胞に対しては細胞死を誘導しないことも示されたことから、心筋細胞を濃縮する方法としても利用できる方法であることが示された。マンニトール処理後1週間において免疫組織化学的手法を用いて生存細胞の種類及び数を検討したところ、コントロールの細胞（非処理群）とは対照的に、生存細胞の大半がNkx2.5陽性心筋細胞であり、Oct-3/4陰性の細胞が殆ど見出されなかった（図11（b））。

[0066] 実施例7：ヒト誘導性多能性幹細胞（iPS細胞）に対する糖質（糖アルコール類）の細胞死誘導作用

本実施例においては、ヒト誘導性多能性幹細胞（iPS細胞）を糖質（糖アルコール類）にて処理した後のiPS細胞の生存状態を確認することを目的とした。

[0067] ヒトiPS細胞は京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センター（ナショナルバイオリソースプロジェクトによるES細胞センター）から入手した。基本的な培養方法はヒト胚性幹細胞と同じであり、実施例5に記載した方法と同様の方法により培養を行った。継代後、TE（0.25％トリプシン（GIBCO）と1 mM EDTA）を用いて細胞をバラバラに分散した、文献（Watanabe K, et al., Nat. Biotechnol.,

2007, 25: 681-686, Epub 2007 May 27）に従いROCK阻害剤（Y27632）を10μM加え細胞死を抑制した。同時に50 nM TMRMを用いて生細胞のミトコンドリアを染色した。

[0068] この染色細胞を、マンニトール0.45 M（約720 mOsm/kgに相当）を含むα-MEM培養液中で2時間処理した細胞のサンプルを作製し、マンニトールを含まないα-MEM培養液中で2時間処理した細胞のサンプルをコントロールとして作製した。FACS解析に先立って、コントロールサンプルで細胞同志が接着し、細胞塊を形成していたので、再び両者に対し同様のトリプシンとEDTA処理を行い細胞を分散させた後、TMRMの蛍光強度に基づいてFACSにてミトコンドリア膜電位の有無について解析を行い、幹細胞の生存状態を確認し、図12に示した。この結果、コントロール（図12（a））と比較して、マンニトールを用いて2時間処理することによって、殆どすべての細胞が膜電位を消失したことが分かった（図12（b））。これらの細胞は、ヒト胚性幹細胞の場合と同様、死滅したと考えられた。

[0069] 実施例8：ヒト胚性幹細胞に対する種々の糖質（糖アルコール類、糖類、ベタイン類）の細胞死誘導作用

本実施例においては、ヒト胚性幹細胞をマンニトール以外の糖質（糖アルコール類、糖類、ベタイン類）にて処理した後の幹細胞の生存状態を確認することを目的とした。

[0070] ヒト胚性幹細胞に対して、マンニトールの代わりに種々の糖質（糖アルコール類：ソルビトール、キシリトール、糖類：スクロース、グルコース、ベタイン類：トリメチルグリシン）0.45 M（約750～780 mOsm/kgに相当）を2時間添加すること以外は実施例5と同様の実験手法を使用して、ミトコンドリア膜電位の変化を観察した。この結果、コントロール（図13（a））と比較して、2時間の処理によって、全ての細胞が膜電位を消失したことが分かった（図13（b）～（f））。

[0071] 実施例 9：ヒト胚性幹細胞由来胚様体において残存する幹細胞に対する種々の糖質（糖アルコール類、糖類、ベタイン類）の細胞死誘導作用と心筋細胞の濃縮

本実施例においては、ヒト胚性幹細胞から形成された心筋細胞を含む細胞塊（胚様体）に対してマンニトール以外の糖質（糖アルコール類、糖類、ベタイン類）にて処理を行った後の、心筋細胞の培養状態とそれ以外の細胞の培養状態とを確認することを目的とした。

[0072] ヒト胚性幹細胞を継代操作の後、培養液［α-MEM（Minimum Essential Medium）（SIGMA）、10%FBS（EQUITEC BIO）、100 units/ml ペニシリン、50μg/ml ストレプトマイシン（GIBCO）］中で浮遊培養することにより、胚様体を誘導した。分化開始（浮遊培養開始）から 14 日目～18 日目にかけて、自律拍動能を有する細胞が分化し、これは別途心筋細胞であることを確認した。

[0073] 分化開始後 3 ヶ月を経た胚様体は、依然として自律拍動能を維持していた。これらを 0.1%コラゲナーゼ（Wortington 社）及び 0.1%トリプシン（DIFCO 社）により部分的に酵素処理し、細かな細胞塊とした。これを 2 つに分割し、一方に対し、0.45 M（約 700～780 mOsm/kg に相当）及び 0.6 M（約 850～1000 mOsm/kg に相当）の糖質（糖アルコール類：ソルビトール、キシリトール、グリセロール、糖類：スクロース、グルコース、ベタイン類：トリメチルグリシン）を添加して 12 時間処理し、もう一方に対照（コントロール）群として、糖質処理した場合と同一量の生理的浸透圧溶液 Ads buffer（116.4 mM NaCl、5.4 mM KCl、5.6 mM デキストロース、10.9 mM NaH_2PO_4、405.7μM $MgSO_4$、20 mM Hepes、pH 7.3）のみを加え 2 時間処理した。処理後、両細胞群ともに、10%ウシ胎児血清を含む DMEM 溶液で 12 時間培養した。

[0074] 12 時間後にこれらを顕微鏡下で観察したところ、コントロール群の細胞

を培養するディッシュでは、細胞質に対して核の占有面積が大きい未分化細胞と思われる細胞集団からなるコロニーが多数見出された。しかし、糖質処理を施した細胞を培養するディッシュにおいては、これらの細胞集団は全く見出されなかった。糖質処理を施した細胞を培養するディッシュにおいては、代わりに自律拍動を行う細胞集団や自律拍動を行う単細胞が接着し、又は、浮遊していた。

[0075] 実施例10：ヒト胚性幹細胞由来胚様体において残存する幹細胞に対する糖質（糖アルコール類）の細胞死誘導作用の組織学的解析

本実施例においては、ヒト胚性幹細胞から形成された心筋細胞を含む細胞塊（胚様体）に対して糖質（糖アルコール類）にて処理を行った後の、心筋細胞の培養条件下での細胞の形態を確認することを目的とした。

[0076] グリセロール0.45 M（約710 mOsm/kgに相当）及び0.6 M（約870 mOsm/kgに相当）で10時間処理したヒト胚性幹細胞由来の分化細胞サンプルについて、培養条件下での形態について検討した。その結果、心筋細胞以外の分化細胞の殆どが死滅していることが示された。この細胞死誘導効果は、グリセロールに10時間以上曝露した場合に顕著であった（図14）。

[0077] 上記の結果から、グリセロールは、長時間処理した場合に、効果的に多能性幹細胞（胚性幹細胞／iPS 細胞）及び心筋細胞以外の分化細胞に細胞死を誘導することが判明した。

[0078] 実施例11：マウス胚性幹細胞に対する低濃度糖質（マンニトール）の細胞死誘導作用

本実施例においては、マウス胚性幹細胞を低濃度のマンニトールにて処理した後の幹細胞の生存状態を確認することを目的とした。

[0079] 実施例1に記載した方法により培養した胚性幹細胞を、マンニトール0.2 M（約480 mOsm/kgに相当）を含むα-MEM培養液中で、48時間、72時間培養した

のち、細胞の接着、非接着及び形態観察によって、幹細胞の生存状態を確認し、図 15 に示した。

[0080] 図 15 に示すように、48 時間処理後は、既に殆ど全てのコロニーは、培養皿から脱離し、細胞死に特有の形態を示した。72 時間後では更にこの状況は顕著であり、完全に細胞は死滅した。48 時間処理した場合の写真（48 h）72 時間処理した場合の写真（72 h）に示すようなバラバラの点が一つの細胞である。塊として見えるものは、ES 細胞のコロニーに由来する死細胞塊である。下に典型的な拡大像を示す。

[0081] 更に、実施例 1 に記載の方法と同様に、培養液[α-MEM(Minimum Essential Medium) (SIGMA)、10%FBS (EQUITEC BIO)、100 units/ml ペニシリン、50μg/ml ストレプトマイシン (GIBCO)] を用いて、EB 当り 75 個のマウス胚性幹細胞をハンギングドロップ法により細胞塊として合計 7 日間培養することにより、心筋細胞を含む細胞塊へと分化させた後、胚様体を上記培養皿に接着させて、37℃、5% CO_2 の条件下にて 3～5 日間培養した。当該培養により、分化誘導し、接着培養した心筋細胞を含むマウス胚様体に対して、マンニトール 0.2 M を最長 72 時間処理すると、72 時間後には、心筋細胞以外の細胞の殆ど全てが死滅して心筋細胞が選択的に生存しており、心筋細胞以外の分化細胞に細胞死が誘導されたことが確認された。

産業上の利用可能性

[0082] 本発明の方法により多能性幹細胞、多能性幹細胞由来の心筋細胞以外の細胞、及び多能性幹細胞由来心筋細胞を含む細胞集団を処理することにより、細胞集団中の胚性幹細胞及び非心筋細胞を効率的に除去することができると同時に、心筋細胞のみが生存することができることから心筋細胞を効率的に濃縮・精製することができる。

請求の範囲

[1] 多能性幹細胞、多能性幹細胞由来の心筋細胞以外の細胞、及び多能性幹細胞由来心筋細胞を含む細胞集団を、370 mOsm/kg 以上の浸透圧を有する高張液で培養することにより、多能性幹細胞及び多能性幹細胞由来の心筋細胞以外の細胞を細胞死に導く方法。

[2] 高張液での培養を 2 時間以上行う、請求項 1 に記載の方法。

[3] 370 mOsm/kg 以上の浸透圧を有する高張液が、培養液に対して糖質（炭水化物）を添加することにより調製されたものである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

[4] 370 mOsm/kg 以上の浸透圧を有する高張液が、0.1～1 M の糖質を含有するものである、請求項 3 に記載の方法。

[5] 糖質が、糖アルコール類、糖類又はベタイン類である、請求項 3 又は 4 に記載の方法。

[6] 糖アルコール類、糖類又はベタイン類が、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、グリセロール、スクロース、グルコース及びトリメチルグリシンからなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

[7] 370 mOsm/kg 以上の浸透圧を有する高張液が、0.1～0.6 M のグリセロールを含有するものである、請求項 4 に記載の方法。

[8] 培養を 10 時間以上行う、請求項 7 に記載の方法。

[9] 細胞集団を高張液で培養した後、200～300 mOsm/kg の通常浸透圧を有する培養液に戻して更に培養する、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。