明　細　書

発明の名称 ：

人工多能性幹細胞の評価方法及び選抜方法、並びに人工多能性幹細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、人工多能性幹細胞の評価方法及び選抜方法、並びに人工多能性幹細胞の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）は体細胞に人工的な操作を加えることで作製される多能性幹細胞であり、例えば、２００６年にマウス細胞より、２００７年にヒト細胞より、山中らにより樹立されたｉＰＳ細胞を挙げることができる。人工多能性幹細胞は、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）と異なり、受精卵を用いず個々の生体の体細胞から作製されるため、ＥＳ細胞を用いる際に懸念されている倫理的な問題や、移植時の拒絶反応の回避が期待されている。

したがって、人工多能性幹細胞由来の分化細胞の再生医療への応用は、大変注目されている。

[0003] 人工多能性幹細胞を用いて再生医療をおこなう上で、移植細胞由来の腫瘍化が懸念されている。腫瘍化の原因は未分化細胞の混入以外に、使用される人工多能性幹細胞の品質によるとされている。

例えば、人工多能性幹細胞の製造過程で、樹立された人工多能性幹細胞を培養する工程において、ゲノム構造に変化が起き、細胞増殖にとって有利な変化を起こした細胞集団が出現する可能性が報告されている。細胞増殖に有利に働くゲノム構造の変化は癌化と密接な関連があるため、当該変化をおこした細胞集団は、人工多能性幹細胞の再生医療応用におけるリスク要因となる。

ゲノム構造の変化と、ゲノム構造の変化のしやすさ、即ちゲノム不安定性とは密接な関係をもつと考えられるため、当該リスク要因を排除するために

、臨床応用に使用する人工多能性幹細胞は、長期培養を実施した後に、最終的に、細胞や核の形態の観察や、分裂中期の染色体の数や形態を観察する核型解析、遺伝子の変異を検査する全ゲノム配列解析、一塩基多型解析であるＳＮＰｓ（Single Nucleotide Polymorphism）解析、コピー数多型解析であるＣＮＶ（Copy Number Variation）解析などの試験を実施することで、ゲノム構造の安定性の高い高品質な人工多能性幹細胞を選抜する必要があった（非特許文献１）。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Martins-Taylor K., Xu R.H.: Concise review: Genomic stability of human induced pluripotent stem cells. Stem Cells 30(1): p22-27, 2012.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、上記の試験は期間と高額なコストがかかるため、新たな人工多能性幹細胞の評価方法、ゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い人工多能性幹細胞の選抜方法及びゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い人工多能性幹細胞の製造方法の提供が、人工多能性幹細胞を用いた再生医療を進めるための課題となっていた。

[0006] 本発明の目的は、従来法に比べて迅速かつ安価で実施可能な、新たな人工多能性幹細胞の評価方法、ゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い人工多能性幹細胞の選抜方法、ゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い人工多能性幹細胞の製造方法及びゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い人工多能性幹細胞を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 即ち、本発明は、下記［１］～［２４］を提供する。

［１］下記（１）～（３）の工程を含むことを特徴とする人工多能性幹細胞

の評価方法。

（１）培養された人工多能性幹細胞を提供する工程、

（２）提供された人工多能性幹細胞中の異常核酸構造を有する細胞小器官の自然出現頻度を測定する工程、及び

（３）前記自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞と、前記自然出現頻度が基準値を超える人工多能性幹細胞とを識別する工程

［２］前記異常核酸構造を有する細胞小器官が小核である、［１］記載の評価方法。

［３］前記自然出現頻度の基準値が胚性幹細胞における自然出現頻度の統計値である、［１］又は［２］に記載の評価方法。

［４］前記胚性幹細胞がヒト胚性幹細胞である、［３］記載の評価方法。

［５］前記自然出現頻度の基準値が、基準とする人工多能性幹細胞における自然出現頻度の統計値である、［１］又は［２］に記載の評価方法。

［６］前記自然出現頻度の基準値が２％である、［２］記載の評価方法。

［７］前記人工多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞である、［１］～［６］のいずれか記載の評価方法。

［８］下記（１）～（４）の工程を含むことを特徴とする人工多能性幹細胞の選抜方法。

（１）培養された人工多能性幹細胞を提供する工程、

（２）提供された人工多能性幹細胞中の異常核酸構造を有する細胞小器官の自然出現頻度を測定する工程、

（３）前記自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞と、前記自然出現頻度が基準値を超える人工多能性幹細胞とを識別する工程、及び

（４）前記自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞を選抜する工程

［９］前記異常核酸構造を有する細胞小器官が小核である、［８］記載の選抜方法。

［１０］前記自然出現頻度の基準値が胚性幹細胞における自然出現頻度の統

計値である、［８］又は［９］に記載の選抜方法。

［１１］前記胚性幹細胞がヒト胚性幹細胞である、［１０］記載の選抜方法。

［１２］前記自然出現頻度の基準値が、基準とする人工多能性幹細胞における自然出現頻度の統計値である、［８］又は［９］に記載の選抜方法。

［１３］前記自然出現頻度の基準値が２％である、［９］記載の選抜方法。

［１４］前記人工多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞である、［８］～［１３］のいずれか記載の選抜方法。

［１５］下記（１）～（４）の工程を含むことを特徴とする人工多能性幹細胞の製造方法。

（１）樹立され、培養された人工多能性幹細胞を提供する工程、

（２）提供された人工多能性幹細胞中の異常核酸構造を有する細胞小器官の自然出現頻度を測定する工程、

（３）前記自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞と、前記自然出現頻度が基準値を超える人工多能性幹細胞とを識別する工程、及び

（４）前記自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞を選抜する工程

［１６］前記（１）工程の前に、さらに下記工程を含むことを特徴とする［１５］記載の製造方法。

（Ａ）人工多能性幹細胞を樹立する工程、及び

（Ｂ）樹立された人工多能性幹細胞を培養する工程

［１７］前記異常核酸構造を有する細胞小器官が小核である、［１５］または［１６］に記載の製造方法。

［１８］前記自然出現頻度の基準値が胚性幹細胞における自然出現頻度の統計値である、［１５］～［１７］のいずれか記載の製造方法。

［１９］前記胚性幹細胞がヒト胚性幹細胞である、［１８］記載の製造方法。

［２０］前記自然出現頻度の基準値が人工多能性幹細胞における自然出現頻

度の統計値である、［１５］～［１７］のいずれか記載の製造方法。

［２１］前記自然出現頻度の基準値が２％である、［１７］記載の製造方法。

［２２］前記人工多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞である、［１５］～［２１］のいずれか記載の製造方法。

［２３］小核自然出現頻度が２％以下である、人工多能性幹細胞。

［２４］下記（１）～（３）の工程を含むことを特徴とする、人工多能性幹細胞の評価方法。

（１）培養された人工多能性幹細胞を提供する工程、

（２）提供された人工多能性幹細胞中の異常核酸構造を有する細胞小器官の自然出現頻度を測定する工程、及び

（３）前記自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞を、前記自然出現頻度が基準値を超える人工多能性幹細胞よりも分化効率が高い人工多能性幹細胞であると評価する工程

発明の効果

[0008] 本発明によれば、新たな人工多能性幹細胞の評価方法、ゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い人工多能性幹細胞の選抜方法、ゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い人工多能性幹細胞の製造方法及び、ゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い人工多能性幹細胞を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]ヒトｉＰＳ細胞の核形態の観察（実施例３）で得られた、正常細胞の代表的画像として、ヒトｉＰＳ細胞「２」の標本画像を示す。

[図2]ヒトｉＰＳ細胞の核形態の観察（実施例３）で得られた、異常細胞の代表的画像として、ヒトｉＰＳ細胞「Ｄ－１Ｒ（－）＃２」の標本画像を示す。核膜表面が滑らかでなく多角形様の形状を取り、核膜の損傷が疑われる細胞が顕著に認められる。

[図3]ヒトｉＰＳ細胞の核形態の観察（実施例３）で得られた、異常細胞の代

表的画像として、ヒトｉＰＳ細胞「Ｆ－１Ｒ（＋）＃１」の標本画像を示す。１細胞中に２個以上の核を有する多核細胞が顕著に認められる。

[図4]ヒトｉＰＳ細胞の核形態の観察（実施例３）で得られた、異常細胞の代表的画像として、ヒトｉＰＳ細胞「９」の標本画像を示す。核膜からの突起構造を有する細胞が顕著に認められる。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。

[0011] ＜共通する用語の説明＞

以下、本明細書で共通して用いられる用語は、特記しない限り、以下の意味である。

[0012] 「異常核酸構造を有する細胞小器官」とは、染色体異常に由来して形成され、分裂後期から間期あるいは休止期の細胞中に認められる、核酸からなる異常構造を有する細胞小器官を意味する。具体的には、小核、ＮＰＢ（Nucleoplasmic bridge；核質間架橋）やＮＢＵＤ（Nuclear bud；核芽）が挙げられる。

[0013] 「異常核酸構造を有する細胞小器官の自然出現頻度」（以下、本自然出現頻度と記すことがある。）とは、通常の維持培養時など、異常核酸構造を有する細胞小器官の形成に影響し得る特段の処理を行わない状態で測定した、異常核酸構造を有する細胞小器官の頻度を意味する。異常核酸構造を有する細胞小器官の頻度は、全細胞に占める異常核酸構造を有する細胞小器官を有する細胞の割合を算出することにより、求めることができる。

[0014] 「小核」とは、分裂後期から間期あるいは休止期の細胞の細胞質内に認められる、主核よりも小さな異常核酸構造を有する細胞小器官を意味する。小核は、染色体の構造異常に由来する無動原体染色体断片、または、有糸分裂期に染色体分配異常により極へ移動できなかった染色体全体を原因として生じることが知られており、細胞分裂時に発生した染色体異常の指標となる。小核頻度は、一定の培養期間における細胞分裂によって染色体の構造異常、または数的異常が起こる頻度を示す。

[0015] 「小核の自然出現頻度」、すなわち小核自然頻度とは、通常の維持培養時など、細胞に対する小核誘発因子の曝露等の小核形成に影響し得る特段の処理を行わない状態で測定した小核頻度を意味する。小核誘発因子の曝露等がなくとも、通常の細胞分裂の過程でＤＮＡの複製ミスや染色体分配異常などが確率論的に生じることで染色体異常が自然発生し、小核を形成することが知られている。細胞中に小核を生じた場合、その一部は細胞の恒常性維持機能により異常細胞として細胞死に至り速やかに排除されるが、残存した細胞が小核を有する細胞として検出される。従って、小核自然頻度は、染色体異常の原因となる細胞分裂過程での各種異常の起こりやすさや、一旦生じた異常を除去する恒常性維持機能の程度等、細胞の遺伝情報の安定性を総合的に示す指標となり得る。

[0016] 「幹細胞」とは、分裂して元の細胞と同じ細胞を作る能力、すなわち自己複製能と、別の種類の細胞に分化する能力とを持ち、持続的に増殖できる細胞を意味する。

[0017] 「多能性幹細胞」とは、in vitroにおいて培養することが可能で、且つ、三胚葉（外胚葉、中胚葉および内胚葉）由来の組織に分化しうる能力、すなわち多能性(pluripotency)を有する幹細胞を意味する。「多能性幹細胞」は、受精卵、クローン胚、生殖幹細胞、または組織内幹細胞等から樹立することができる。「多能性幹細胞」のより具体的な例としては、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）、体細胞から誘導された人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）を挙げることができる。

[0018] 「ＥＳ細胞」とは、自己複製能を有し、多能性（pluripotency）を有する幹細胞であり、初期胚に由来する多能性幹細胞を意味する。胚性幹細胞は、１９８１年に初めて樹立され、１９８９年以降ノックアウトマウス作製にも応用されている。１９９８年にはヒト胚性幹細胞が樹立されており、再生医学にも利用されつつある。

[0019] 「人工多能性幹細胞」とは、体細胞から誘導された多能性幹細胞であり、体細胞を初期化することにより、胚性幹細胞に似た多能性を人工的に持たせ

た細胞を意味する。例えば、線維芽細胞等の分化した細胞をOct3/4、Sox2、Klf4、Myc等の遺伝子の発現により初期化して樹立した多分化能を有するｉＰＳ細胞（induced pluripotent stem cell）等を挙げることができる。2006年、山中らによりマウス線維芽細胞から人工多能性幹細胞が樹立された（Cell, 2006, 126(4), p663-676）。2007年にはヒト線維芽細胞から、胚性幹細胞と同様に多分化能を有する人工多能性幹細胞が樹立された（Cell, 2007, 131(5),p861-872; Science, 2007, 318(5858), p1917-1920; Nat Biotechnol., 2008, 26(1), p101-106）。本発明に用いる人工多能性幹細胞は、自体公知の方法により体細胞から作製してもよいし、既に樹立されている人工多能性幹細胞であってもよい。また、本発明に用いる人工多能性幹細胞の由来となる体細胞は特に限定されない。

[0020] 人工多能性幹細胞の由来としては特に限定されない。例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモットなどのげっ歯類由来の人工多能性幹細胞、およびヒト、サル、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類由来の人工多能性幹細胞が挙げられ、好ましくはヒト由来の人工多能性幹細胞である。

[0021] 「核型解析」とは、対象細胞を一定期間培養し、コルセミド等の分裂阻害剤を添加して分裂中期細胞をエンリッチさせたものから染色体標本を作製し、１細胞中の個々の染色体を区別し得る染色を施した後にそれぞれの染色体を顕微鏡下で観察することで、対象細胞の染色体の構造や数に異常、すなわち正常な核型とは異なる特徴がないかを検査する解析方法を意味する。核型解析にあたってはＧバンド法あるいはＱバンド法等の古典的な分染法や、染色体特異的なＤＮＡプローブを用いた蛍光in situハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ；Fluorescece in situ Hybridization）法等が汎用される。ｉＰＳ細胞の核型解析を行った報告について「Stem Cells 30(1), p22-27, 2012.」等にまとめられているが、一部のｉＰＳ細胞には核型の異常が認められ、複数の報告例がある特徴的な異常として１２番染色体のトリソミー等が知られている。

核型解析は、染色体の構造の形態学的特徴あるいは染色体数の増減を直接

的に観察することで異常の種類を同定することができる点に特徴があるが、一方で個々の染色体の観察には熟練が必要である。また、観察に多大な労力を要することから検査できる細胞数がごく少数に限られ、低頻度に発生する異常の検出や、異常が発生する頻度の定量的な見積もりや細胞間での定量的な比較が困難であるという課題がある。加えて、核型解析はある一時点における染色体の特徴を解析するため、培養における細胞分裂に伴う経時的変化の定量的な比較が困難である。

[0022] 「全ゲノム配列解析」とは、対象細胞中のＤＮＡを断片化し、各種のシークエンサーを用いて並列的に解析を行うことでＤＮＡ分子の全塩基配列を網羅的に特定し、ＤＮＡの変異を検出する解析方法を意味する。解析機器・技術の目覚ましい進歩を背景に、現在では次世代シークエンサーを用いた高精度解析が可能となっている。

全ゲノム配列解析は非常に解像度の高い解析手法であり、後述するＳＮＰｓやＣＮＶに関する情報が得られる他、低頻度に発生したＤＮＡの変異を１塩基レベルで検出可能である。一方で、当該解析には多大なるコストと期間を要するという課題があり、樹立された多数の人工多能性幹細胞の全てを検査して品質のよい株を選抜するには非実用的である。

[0023] 「ＳＮＰｓ解析」とは、対象細胞中のＤＮＡに認められる一塩基多型（ＳＮＰｓ）を検出する解析方法を意味する。ＳＮＰｓとは、個体集団に一定以上の頻度で認められるＤＮＡ中の１塩基の変異を意味し、ヒトにおいてもこれまでに種々のＳＮＰｓが報告されており、疾患感受性をはじめとした個人差との関連性が指摘されている。ＳＮＰｓ解析としては、前述の全ゲノム配列解析による網羅的な解析方法や、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ;Polymerase Chain Reaction）を利用して既知のＳＮＰｓを迅速に検出する方法が知られている。また、微小区間に無数のＳＮＰ配列プローブを配置したＳＮＰアレイを利用することで、多数のＳＮＰｓの有無を効率的に解析することができる。ＳＮＰアレイによる解析は、比較的小さな変異を高解像度で解析できるが、やはりコストや期間が障害となり、多数の人工多能性幹細胞の選抜法

として利用するには非実用的である。

[0024] 「ＣＮＶ解析」とは、対象細胞中のＤＮＡに認められるコピー数多型（ＣＮＶ）を検出する解析方法を意味する。ＣＮＶとは、通常１細胞あたり２個（２コピー）存在する遺伝子が１コピーしかない（欠失）、あるいは３コピー以上存在する（重複）といった遺伝子の数の変動を意味し、塩基配列の変動であるＳＮＰｓと共に個人差との関連性が指摘されている。ＣＮＶ解析にはＳＮＰｓ解析と同様の手法が利用でき、全ゲノム配列解析、ＰＣＲによる解析法、比較ゲノムハイブリダイゼーション（ＣＧＨ；Comparative Genomic Hybridization）法、ＳＮＰアレイを利用した解析法等が知られている。ｉＰＳ細胞のＳＮＰ解析及びＣＮＶ解析の結果についても「Stem Cells 30(1), p22-27, 2012.」等にまとめられており、１２番染色体短腕１２ｐの重複や、１７番染色体長腕１７ｑ２１．１座位の欠失等、特徴的な変異が複数知られている。ＣＮＶ解析についても他の解析手法と同様、コストや期間が障害となり、多数の人工多能性幹細胞の選抜法として利用するには非実用的である。

[0025] 「ゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い」とは、自然出現頻度が後述の基準値を超える人工多能性幹細胞に比べて、細胞や核の形態に異常が少なく、核型解析、全ゲノム配列解析、ＳＮＰｓ解析、もしくはＣＮＶ解析などの既存のゲノム構造の評価方法で良好な結果が得られ、又は、一定の細胞種への分化効率が高く、それらの結果として、腫瘍細胞への分化リスクが低いことを意味する。ここで、「一定の細胞種への分化効率が高い」とは、自然出現頻度が後述の基準値を超える人工多能性幹細胞を用いた分化効率よりも高頻度で目的の分化細胞が得られることを意味し、臨床応用が想定される既存の分化手法において、従来の分化効率よりも高頻度で目的の分化細胞が得られることも含む。臨床応用が想定される既存の分化手法としては、例えば、Ｔ細胞への分化手法、間葉系幹細胞への分化手法、造血幹細胞への分化手法、赤血球への分化手法、血小板への分化手法、血管内皮細胞への分化手法、心筋細胞への分化手法、骨格筋への分化手法、神経幹細胞への分

化手法、大脳皮質神経細胞への分化手法、大脳辺縁系神経細胞への分化手法、ドパミン神経細胞への分化手法、肝細胞への分化手法、骨への分化手法、軟骨への分化手法、始原生殖細胞への分化手法、膵臓細胞への分化手法、網膜細胞への分化手法、角膜細胞への分化手法、腎臓細胞への分化手法、肺胞上皮細胞への分化手法、気管支上皮細胞への分化手法、腸管への分化手法等を挙げることができる。Ｔ細胞への分化手法としては、種々の公知の分化誘導方法を適宜選択して用いることができる。公知の分化誘導方法としては、例えば、「Timmermans, F. et al., J. Immunol., 2009, 182, 68879-6888」に記載のヒトＥＳ細胞からＴリンパ球を誘導する方法が挙げられる。また、例えば、「Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell, 2013, 12, 114-126」に記載の方法により、ヒト末梢血Ｔリンパ球より樹立したヒトｉＰＳ細胞をＴリンパ球に分化誘導することができる。

[0026] 一実施態様において、本発明は、

（１）培養された人工多能性幹細胞を提供する工程、

（２）提供された人工多能性幹細胞中の異常核酸構造を有する細胞小器官の自然出現頻度を測定する工程、及び

（３）自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞と、自然出現頻度が基準値を超える人工多能性幹細胞とを識別する工程を含むことを特徴とする、人工多能性幹細胞の評価方法（以下「本発明の評価方法」と略記する。）を提供する。

[0027] 別の実施態様において、本発明は、本発明の評価方法の工程（３）の後に、さらに（４）自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞を選抜する工程を含むことを特徴とする、人工多能性幹細胞の選抜方法（以下「本発明の選抜方法」と略記する。）を提供する。当該実施態様において、自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞を、自然出現頻度が基準値を超える人工多能性幹細胞に比べて、ゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い人工多能性幹細胞として選抜することができる。

[0028] さらに別の実施態様において、本発明は、本発明の選抜方法の工程（１）

を、樹立され、培養された人工多能性幹細胞を提供する工程に置き換えた、人工多能性幹細胞の製造方法（以下「本発明の製造方法」と略記する。）を提供する。

[0029] さらに別の実施態様において、本発明は、本発明の製造方法の工程（４）の後に、さらに（５）（４）で選抜された人工多能性幹細胞を分化誘導し、分化細胞を得る工程を含むことを特徴とする、人工多能性幹細胞由来分化細胞の製造方法を提供する。すなわち、

（１）樹立され、培養された人工多能性幹細胞を提供する工程、

（２）提供された人工多能性幹細胞中の異常核酸構造を有する細胞小器官の自然出現頻度を測定する工程、

（３）前記自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞と、前記自然出現頻度が基準値を超える人工多能性幹細胞とを識別する工程、

（４）前記自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞を選抜する工程、及び

（５）（４）で選抜された人工多能性幹細胞を分化誘導し、分化細胞を得る工程

を含むことを特徴とする、人工多能性幹細胞由来分化細胞の製造方法を提供する。

前記の人工多能性幹細胞由来分化細胞の製造方法は、前記（１）工程の前に、さらに下記工程を含むこともできる：

（Ａ）人工多能性幹細胞を樹立する工程、及び

（Ｂ）樹立された人工多能性幹細胞を培養する工程。

[0030] さらに別の実施態様において、本発明は、ゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い人工多能性幹細胞として、小核自然出現頻度が２％以下、１．９％以下、１．８％以下、１．７％以下、１．６％以下、１．５％以下、１．４％以下または１．３％以下であることを特徴とする、人工多能性幹細胞を提供する。

以下、各工程について具体的に説明する。

[0031] ＜培養された人工多能性幹細胞を提供する工程＞

人工多能性幹細胞を樹立する方法は、体細胞に特定の初期化因子を導入する工程を含む限り特に限定されない。例えば、体細胞を採取し、Oct3/4、Sox2、Klf4、Myc等の初期化因子を導入して人工的に発現させた後、多能性を獲得した細胞を選択して拡大培養する工程、レトロウイルスベクター又はセンダイウイルスベクターを用いて初期化因子（Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Myc）をヒト末梢血リンパ球に導入し培養する工程（Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell 2013, 12, 114-126）等を挙げることができる。

[0032] 体細胞としては、例えば、末梢血中のリンパ球、皮膚等の線維芽細胞、皮膚細胞、視覚細胞、脳細胞、有毛細胞、口腔粘膜、肺細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞、腎細胞、神経幹細胞、造血幹細胞、智歯などに由来する間葉系幹細胞、組織幹細胞、組織前駆細胞、血液細胞（例、末梢血単核球細胞（T細胞及び非T細胞を含む）、臍帯血細胞等）、上皮細胞、内皮細胞（例、血管内皮細胞）、筋肉細胞等が挙げられるが、これに限定されるものではない。

[0033] 初期化因子に含まれる遺伝子としては、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGlis1等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO 2010/111409、WO 2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、

Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat Cell Biol. 11:197-203、Judson R.L. et al., (2009), Nat. Biotech., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-229に記載の組み合わせが例示される。

[0034] 初期化因子を体細胞に導入する方法としては、初期化因子がDNAの形態の場合、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体等のベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクション等の手法等、RNAの形態の場合、例えば、リポフェクション、マイクロインジェクション等の手法等、タンパク質の形態の場合、例えば、リポフェクション、細胞膜透過性ペプチド（例えば、HIV由来のTAT及びポリアルギニン）との融合、マイクロインジェクションなどの手法等を挙げることができる。ウイルスベクターを用いた方法としては、レトロウイルスベクターを用いた方法、エピソーマルベクターを用いた方法、iDファーマ社の初期化キット「CytoTune（登録商標）-iPS 2.0」に代表されるようなセンダイウイルスベクターを用いた方法、レンチウイルスベクターを用いた方法、アデノウイルスベクターを用いた方法等が挙げられるが、これに限定されるものではない。

[0035] 人工多能性幹細胞を培養する方法は、未分化状態を維持した状態で人工多能性幹細胞を生存あるいは増殖させる限り特に限定されず、例えば、種々の因子を添加した培地中に細胞を曝し、未分化状態を維持して生存あるいは増殖させる方法を挙げることができる。また、マイトマイシンC処理したマウス

線維芽細胞上でのオンフィーダー培養法や人工基底膜マトリックスを用いたフィーダーレス培養法等が挙げられるが、本発明において培養の方法は限定されるものではない。

[0036] 培地としては、例えば、イーグル培地（例：ＤＭＥＭ、ＢＭＥ、ＭＥＭ、αＭＥＭ）、ハム培地（例：Ｆ１０培地、Ｆ１２培地）、ＲＰＭＩ培地（例：ＲＰＭＩ－１６４０培地、ＲＰＭＩ－１６３０培地）、ＭＣＤＢ培地（例：ＭＣＤＢ１０４、１０７、１３１、１５１、１５３培地）、フィッシャー培地、１９９培地、又は市販の培養液[霊長類ＥＳ細胞用培地（霊長類ＥＳ/ｉＰＳ細胞用培養液、リプロセル社）、マウスES細胞用培地(ＴＸ-ＷＥＳ培養液、トロンボＸ社)、無血清培地（ｍＴｅＳＲ、Stemcell Technology社）、ＲｅｐｒｏＦＦ、ＳｔｅｍＳｐａｎ（登録商標）ＳＦＥＭ、ＳｔｅｍＳｐａｎ（登録商標）Ｈ３０００、Ｓｔｅｍｌｉｎｅｌｌ、ＥＳＦ-Ｂ培地、ＥＳＦ-Ｃ培地、ＣＳＴＩ-７培地等]、が挙げられるがこれに限定されるものではない。さらに、これらの培地は、必要に応じて、混合等して使用することもでき、例えば、ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地等が挙げられる。

[0037] 培地には、１０～２０％の血清（ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、ヒト血清、ウマ血清）又は血清代替物（ＫＳＲ等）、インシュリン、各種ビタミン、L-グルタミン、非必須アミノ酸等の各種アミノ酸、β-メルカプトエタノール、各種サイトカイン（インターロイキン類（ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５等）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、アクチビン等）、各種ホルモン、各種増殖因子（白血病抑制因子（ＬＩＦ）、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、ＴＧＦ-β等）、各種細胞外マトリックス、各種細胞接着分子、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン等の抗生物質、フェノールレッド等のｐＨ指示薬などを適宜添加することができる。

[0038] 培養は、例えば、１～１０％、好ましくは２～５％ CO_2含有大気下、３０～４０℃、好ましくは３７～３８．５℃で、２５～５０日間程度行うことができる。

[0039] 小核自然頻度を高い精度で測定するために十分な観察細胞数を確保する目

的で、人工多能性幹細胞は１×１０^{3}細胞以上、好ましくは１×１０^{4}細胞以上、より好ましくは５×１０^{4}細胞以上に拡大培養することで小核自然頻度の効率的な測定が可能となる。

[0040] このようにして得られた「培養された人工多能性幹細胞」又は「樹立され、培養された人工多能性幹細胞」を提供する形態は、特に限定されない。例えば、培養された細胞を培養液中に存在する状態で提供してもよいし、又は細胞を凍結保存した状態で提供してもよい。あるいは、細胞を培養皿上又はプレパラート上に固定した状態（標本化した状態）で提供してもよい。また、前記細胞の提供元と提供先は同一であってもよいし、異なっていてもよい。

[0041] ＜異常核酸構造を有する細胞小器官の自然出現頻度を測定する工程＞

本発明において小核自然頻度等の異常核酸構造を有する細胞小器官の自然出現頻度の測定方法は限定されるものではなく、種々の公知の方法が利用できる。

[0042] 以下に、異常核酸構造を有する細胞小器官が小核である、小核自然頻度の測定について主に記載するが、異常核酸構造を有する細胞小器官は小核に限定されるものではない。

[0043] 小核自然頻度の測定としては、例えば、以下の方法が挙げられる。培養後の細胞を回収し、培地を細胞固定液で置換して細胞を固定する。固定後の細胞懸濁液を、懸濁液がわずかに白濁する程度の細胞密度に調製した後スライドガラス上に滴下、風乾して小核標本を作製する。小核標本に染色を施し、染色法に対応した光学系を備えた顕微鏡下で細胞を観察する。なお、後述の通り、細胞を回収する前に細胞質分裂阻害剤を添加してもよい。細胞質分裂阻害剤を用いない場合、小核を有しない細胞の細胞数及び小核を有する細胞の細胞数を測定し、観察した総細胞に占める小核を有する細胞の割合を算出することにより小核自然頻度を求めることができる。細胞質分裂阻害剤を用いる場合、２核細胞の細胞数及び小核を有する２核細胞の細胞数を測定し、総２核細胞に占める小核を有する２核細胞の割合を算出することにより小核

自然頻度を測定する。

[0044] 小核標本の調製に用いる細胞固定液の組成は特に限定されず、エタノール、メタノール、エタノールと酢酸との混合液、メタノールと酢酸との混合液、あるいはパラホルムアルデヒド希釈液等が挙げられる。

[0045] 細胞質を良好に保持し観察を容易にする目的で固定前に低張処理を行ってもよい。低張液の組成は特に限定されず、例えば、７５ｍＭ　ＫＣｌ溶液等が挙げられる。

[0046] 小核標本の染色法は特に限定されず、例えば、アクリジンオレンジによる核および細胞質の二重染色法やギムザ染色法、DAPI (2-(4-amidinophenyl)-1H -indole-6-carboxamidine)、Hoechst 33342、Hoechst 33258、PI (Propidium Iodide)、臭化エチジウム、SYBR（登録商標） Gold、SYBR（登録商標） Greenあるいはその他の核酸染色試薬を利用した核染色法等が挙げられる。

[0047] 観察対象とする細胞数は特に限定されないが、一般には、統計学的精度を担保するために１０００細胞以上の対象細胞を観察する。小核標本の観察工程は、イメージングサイトメーター等の画像解析装置を用いて自動化することもできる。また、多検体の試験を容易に実施する目的で、細胞を回収せずに96ウェルプレート等の培養器材上で直接細胞を固定して培養器材表面に小核標本を作製してもよく、前述の画像解析装置を用いることで多検体の高速自動解析が可能となる。画像解析装置の適用例としては、「Mutat Res 2013, 751(1), p1-11」等が報告されているが、これに限定されるものではない。あるいは、回収した細胞懸濁液に適切な染色を施し、フローサイトメーターやレーザースキャニングサイトメーター等の流路系での細胞解析装置を用い、多数の細胞を自動解析することもできる。フローサイトメーターの活用例としては、「Mutat Res 2010, 703(2), p191-199」等が報告されているが、これに限定されるものではない。

[0048] 小核自然頻度の測定にあたっては、小核に加えてＮＢＵＤ等の小核以外の細胞小器官の自然出現頻度を測定してもよい。また、細胞分裂動態に関する情報を得る等の目的で、細胞を回収する前に細胞質分裂阻害剤を添加しても

よい。細胞質分裂阻害剤を添加することで、ＮＰＢの自然出現頻度を測定することもできる。細胞質分裂阻害剤は細胞に対して顕著な毒性を示さない濃度および処理時間で使用する。細胞質分裂阻害剤としては３～６μｇ／ｍＬのサイトカラシンＢ希釈液等が挙げられるが、これに限定されるものではない。

[0049] ＮＰＢの自然出現頻度を測定する方法としては、細胞質分裂阻害剤を用いる場合の小核自然頻度の測定方法と同じ方法が利用できるが、これに限定されるものではない。

[0050] ＜本自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞と、本自然出現頻度が基準値を超える人工多能性幹細胞とを識別する工程＞

本工程では、本自然出現頻度を測定した人工多能性幹細胞を、本自然出現頻度が基準値以下であるか又は本自然出現頻度が基準値を超えるかによって識別する。

ここで、「基準値」は、安全性が高いことが既知であるＥＳ細胞の本自然出現頻度を基に設定することができる。また、複数のＥＳ細胞の細胞株における本自然出現頻度の統計値を基に設定することもできる。例えば、各ＥＳ細胞の細胞株について、複数回の実験によりそれぞれ本自然出現頻度の平均値を算定し、ＥＳ細胞の細胞株間での本自然出現頻度の平均値を比較し、平均値が最大であるＥＳ細胞の細胞株の該平均値を基準値として採用することができる。この場合において、好ましい基準値は例えば２％である。あるいは、各ＥＳ細胞の細胞株について、複数回の実験によりそれぞれ本自然出現頻度の最大値を算定し、ＥＳ細胞の細胞株間での本自然出現頻度の最大値を比較し、最大値が最大であるＥＳ細胞の細胞株の該最大値を基準値として採用することができる。

あるいは、「基準値」は、基準とするｉＰＳ細胞における本自然出現頻度の統計値を基に設定することもできる。例えば、既存の品質評価指標により安全性が高いことが確認されている特定のｉＰＳ細胞株群について、複数回の実験によりそれぞれ本自然出現頻度の平均値を算定し、ｉＰＳ細胞株間で

の本自然出現頻度の平均値を比較し、平均値が最大であるｉＰＳ細胞株の該平均値を基準値として採用することができる。あるいは、各ｉＰＳ細胞株について、複数回の実験によりそれぞれ本自然出現頻度の最大値を算定し、ｉＰＳ細胞株間での本自然出現頻度の最大値を比較し、最大値が最大であるｉＰＳ細胞株の該最大値を基準値として採用することができる。また、ｉＰＳ細胞株の本自然出現頻度の５０パーセンタイル値（中央値）を基準値としてもよく、３０パーセンタイル値を基準値としてもよく、平均値を基準値としてもよい。具体的には、複数の細胞株からなる特定のｉＰＳ細胞株群について、複数回の実験によりそれぞれ本自然出現頻度の平均値を算定し、該ｉＰＳ細胞株群における本自然出現頻度の平均値の中央値、３０パーセンタイル値または平均値等を基準値として採用することができる。

次いで、本自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞をゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い人工多能性幹細胞として識別することができる。

また、後述の実施例に示す通り、本自然出現頻度が特定の基準値以下である人工多能性幹細胞は、本自然出現頻度が該基準値を超える人工多能性幹細胞と比べて、分化効率が高いことが示された。従って、本発明の別の態様において、前記識別する工程は、本自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞を、本自然出現頻度が基準値を超える人工多能性幹細胞よりも分化効率が高い人工多能性幹細胞であると評価する工程に置き換えた、人工多能性幹細胞の評価方法が提供される。

[0051] ＜本自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞を選抜する工程＞

本工程では、本自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞を、ゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い人工多能性幹細胞として選抜する。既存の方法によりゲノム構造を評価する、あるいは分化効率を測定することにより、選抜された人工多能性幹細胞がゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い人工多能性幹細胞であることを確認することができる。また、小核自然頻度の基準値を２％以下、１．９％以下、１．８％以下

、１．７％以下、１．６％以下、１．５％以下、１．４％以下または１．３％として人工多能性幹細胞を選抜することで、ゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い人工多能性幹細胞を得ることができる。

[0052] ＜選抜された人工多能性幹細胞を分化誘導し、分化細胞を得る工程＞

本発明において選抜された人工多能性幹細胞を分化誘導する方法は限定されるものではなく、種々の公知の分化手法が利用できる。公知の分化手法としては、例えば、Ｔ細胞への分化手法、間葉系幹細胞への分化手法、造血幹細胞への分化手法、赤血球への分化手法、血小板への分化手法、血管内皮細胞への分化手法、心筋細胞への分化手法、骨格筋への分化手法、神経幹細胞への分化手法、大脳皮質神経細胞への分化手法、大脳辺縁系神経細胞への分化手法、ドパミン神経細胞への分化手法、肝細胞への分化手法、骨への分化手法、軟骨への分化手法、始原生殖細胞への分化手法、膵臓細胞への分化手法、網膜細胞への分化手法、角膜細胞への分化手法、腎臓細胞への分化手法、肺胞上皮細胞への分化手法、気管支上皮細胞への分化手法、腸管への分化手法等を挙げることができる。Ｔ細胞への分化手法としては、種々の公知の分化誘導方法を適宜選択して用いることができる。公知の分化誘導方法としては、例えば、「Timmermans, F. et al., J. Immunol., 2009, 182, 68879-6888」に記載のヒトＥＳ細胞からＴリンパ球を誘導する方法が挙げられる。また、例えば、「Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell, 2013, 12, 114-126」に記載の方法により、ヒト末梢血Ｔリンパ球より樹立したヒトｉＰＳ細胞をＴリンパ球に分化誘導することができる。

[0053] 以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0054] 参考例１　ヒトＥＳ細胞の小核自然頻度の測定

（１）ヒトＥＳ細胞

京都大学再生医科学研究所より提供を受けた５種類のヒトＥＳ細胞株ＫｈＥＳ－１、ＫｈＥＳ－２、ＫｈＥＳ－３、ＫｈＥＳ－４、及びＫｈＥＳ－５

について、小核自然頻度の測定を行った。ヒトＥＳ細胞は、「Ueno, M. et al. PNAS 2006, 103(25), 9554-9559」、「Watanabe, K. et al. Nat Biotech 2007, 25, 681-686」に記載の方法に倣い、マイトマイシンC処理したマウス線維芽細胞（リプロセル）上に播種し、３７℃、２％ CO_2条件下で維持培養した。その際の培地には、ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地（Sigma-Aldrich）に、２０％ KnockOut™ Serum Replacement（ＫＳＲ、Invitrogen）、０．１ｍＭ 非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ；nonessential amino acids、Invitrogen）、２ｍＭ L-glutamine（Sigma-Aldrich）、及び０．１ｍＭ 2－メルカプトエタノール（Wako）が添加された培地（以下、ｈＥＳ培地と記す。）に、ｂＦＧＦ（Wako）（ＫｈＥＳ－１では１０ｎｇ／ｍｌ、ＫｈＥＳ－２では３０ｎｇ／ｍｌ、ＫｈＥＳ－３では１５ｎｇ／ｍｌ、ＫｈＥＳ－４及びＫｈＥＳ－５では２０ｎｇ／ｍｌ）を添加して用いた。ＫｈＥＳ－２、ＫｈＥＳ－３、ＫｈＥＳ－４、及びＫｈＥＳ－５では、Y-27632（Wako）を１０μＭさらに上記培地に添加して用いた。維持培養開始１日後から毎日、Y-27632を含まないこと以外はそれぞれ同じ組成の培地への培地交換を行った。

[0055] 維持培養したヒトＥＳ細胞を、セルカルチャーディッシュに接着したままで、リン酸緩衝生理食塩液（ＰＢＳ、Invitrogen）で２回洗浄した後、０．２５％ トリプシン（Invitrogen）、１ｍｇ／ｍｌ collagenase ＩＶ（Invitrogen）、２０％ ＫＳＲ、及び１mM $CaCl_2$（ナカライテスク）が添加されたＰＢＳを当該ディッシュに添加し、３７℃、２％CO_2条件下で５分間インキュベートした。前記ディッシュにｈＥＳ培地を添加した後、ピペッティングにより細胞を剥離して、細胞を含む培地を回収し、遠心分離（１０００ｒｐｍ、３分間）を行った。遠心分離された前記培養物から上清を除去した後、沈殿に、Y-27632（Wako）を２０μＭ添加したｈＥＳ培地を添加して細胞塊を懸濁した後、得られた細胞塊懸濁液を０．１％ゼラチン（Sigma-Aldrich）でコートしたセルカルチャーディッシュ（BD Falcon）上に播種し、３７℃、２％ CO_2条件下で２時間インキュベートした。ディッシュに接着していないヒトＥＳ細胞塊を培地とともに回収することにより、マウス線維芽細

胞が含まれないヒトＥＳ細胞塊の懸濁液を得た。懸濁液を遠心分離（１０００ｒｐｍ、１分間）して上清を除去した後、Y-27632を２０μM添加したＴｒｙｐＬＥ™ Ｅｘｐｒｅｓｓ（Invitrogen）を添加し、３７℃湯浴で５分間インキュベートした。ピペッティングにより細胞を単一細胞に分散後、ｈＥＳ培地を添加することにより単一細胞に分散された細胞懸濁液を得た。

[0056] （２）小核自然頻度の測定方法と結果

（１）で得た細胞懸濁液を遠心分離（１０００ｒｐｍ、５分間）し、上清をリン酸緩衝生理食塩液（ＰＢＳ、日水製薬）で置換した。得られた細胞懸濁液を再度遠心分離（１０００ｒｐｍ、５分間）して上清を除去し、３７℃に加温した７５ｍＭ　ＫＣｌ（Wako）を添加して５分間の低張処理を行った。低張処理後の細胞懸濁液に１／５容の固定液（メタノール（nacalai tesque）：氷酢酸（nacalai tesque）＝３：１）を添加し、遠心分離（４℃、１００ｒｐｍ、５分間）しながら細胞を半固定した。遠心分離後、上清を新鮮な固定液に置換し、遠心分離（４℃、１０００ｒｐｍ、５分間）しながら細胞を固定した。上清を除去した後、懸濁液がわずかに白濁する程度の細胞密度となるようにメタノール中に再懸濁してスライドグラス上に滴下、風乾して小核標本とした。小核標本は１００μｇ／ｍＬ　アクリジンオレンジ（Wako）溶液で染色し、蛍光顕微鏡下で広帯域Ｂｌｕｅ励起のフィルターを用いて観察した。細胞株ごとに２枚のスライドグラスを観察に供し、スライドグラス１枚あたり１０００個、すなわち細胞株あたり２０００個のヒトＥＳ細胞中に認められる小核を有する細胞数を測定し、小核自然頻度を算出した。結果を表１に示した。表１より、小核自然頻度が最も高いものは２％であった。ＥＳ細胞は、腫瘍化リスクが低く安全であると考えられているため、この２％を基準値として採用することができる。

[0057]

[表1]

ヒトＥＳ細胞における小核自然頻度

ＥＳ細胞株	測定時の樹立からの継代数	小核自然頻度
ＫｈＥＳ－１	３６	１．０５％
ＫｈＥＳ－２	３０	２．００％
ＫｈＥＳ－３	２６	１．２０％
ＫｈＥＳ－４	３７	１．５０％
ＫｈＥＳ－５	３５	１．６０％

[0058] 実施例１　ヒトｉＰＳ細胞の小核自然頻度および分化効率の測定

（１）ヒトｉＰＳ細胞

京都大学ｉＰＳ細胞研究所金子研究室にて、「Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell 2013, 12, 114-126」に記載の方法に従ってヒト末梢血リンパ球より樹立したヒトｉＰＳ細胞株「２」、「３」、「５」、「９」、「１０」、「１１」、及び「１２」の、計７株のヒトｉＰＳ細胞について小核自然頻度および分化効率の測定を行った。

[0059] （２）小核自然頻度の測定方法

（１）に記載のヒトｉＰＳ細胞を、「Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell 2013, 12, 114-126」に記載の方法に倣い、マイトマイシンC処理したマウス線維芽細胞（リプロセル）上に播種し、３７℃、２％　CO_2条件下で維持培養した。その際の培地には、ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地（Sigma-Aldrich）に、２０％　ＫＳＲ、２ｍＭ　L-glutamine、１％　ＮＥＡＡ、及び１０μＭ　２－メルカプトエタノールが添加された培地に、ｂＦＧＦを５ｎｇ／ｍｌ添加して用いた。

[0060] 維持培養を行ったヒトｉＰＳ細胞から、Trypsin-EDTA（Sigma-Aldrich）を用いてマウス線維芽細胞のみを除去した後、ヒトｉＰＳ細胞をD-PBS（2% FBS）に懸濁し、小核自然頻度測定検体とした。当該細胞懸濁液を用いて、参考例１（２）に記載の方法に従って小核標本を作製し、観察を行った。スライドグラス１枚あたり１０００個、すなわち細胞株あたり２０００個のヒトｉＰＳ細胞中に認められる小核を有する細胞数を測定し、小核自然頻度を算出した。結果を表２に示した。

[0061] 参考例１より基準値を２％とした場合には、この基準値以下であるヒトｉＰＳ細胞株は「２」及び「３」であった。

[0062] （３）分化効率の測定方法

（１）に記載のヒトｉＰＳ細胞について、「Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell 2013, 12, 114-126」に記載の方法に従ってＴ細胞系列への分化誘導を行った。

[0063] 表面抗原ＣＤ４及びＣＤ８に対する抗体を用いた免疫染色を行い、フローサイトメーターを用いてＣＤ４５$^{+}$ＣＤ３$^{+}$ＣＤ７$^{+}$細胞に占めるＣＤ４$^{+}$ＣＤ８$^{+}$細胞の割合を測定して分化効率とした。結果を表２に示した。

[0064] [表2]

ヒトｉＰＳ細胞の小核自然頻度および分化効率

ｉＰＳ細胞株	小核自然頻度測定結果		分化効率測定結果
	測定時の樹立からの継代数	小核自然頻度	
「２」	４５	１．３５％	５８．１％
「３」	３３	１．７５％	１１．６％
「１０」	２７	２．６０％	２．０１％
「１１」	３１	３．０５％	２．９５％
「１２」	１２	３．０５％	０．９０％
「９」	１４	３．３０％	１．５５％
「５」	４５	３．８０％	１．９９％

[0065] 参考例１及び実施例１から、ヒトＥＳ細胞の小核自然頻度は１．０５％～２．００％と安定して低い値を示したのに対して、ヒトｉＰＳ細胞の小核自然頻度は、１．３５％～３．８０％と株によって変動が大きいことがわかった。これは、ヒトＥＳ細胞は発生の過程にある初期胚から遺伝子操作無しに樹立されてゲノム構造が安定している一方で、ヒトｉＰＳ細胞は初期化時の遺伝子操作によりヘテロな集団となり、選択する株によってゲノム構造の安定性をはじめとした性質の変動が比較的大きいことによるものと考えられる。

[0066] また、ヒトｉＰＳ細胞からＴ細胞系列への分化効率を測定した実施例１の結果から、小核自然頻度と分化効率との間に相関関係が認められ、基準値を２％とした場合に小核自然頻度が基準値以下であるヒトｉＰＳ細胞株「２」及び「３」は、小核自然頻度が基準値を超えるヒトｉＰＳ細胞株と比べて３

倍以上、分化効率が高いことが示された。

[0067] 実施例２　ヒトｉＰＳ細胞由来Ｔ細胞における小核自然頻度の測定

ヒトｉＰＳ細胞株「２」、「１２」について、「Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell 2013, 12, 114-126」に記載の方法に従ってＣＤ８ＳＰ（Single Positive）となるＴ細胞への分化誘導を行った。得られたＣＤ８ＳＰ　Ｔ細胞（当該細胞を、以下、再分化Ｔ細胞と記す）を拡大培養した後、以下の方法に従って小核自然頻度を測定した。すなわち、再分化Ｔ細胞を１．０μｇ／ｍＬ　抗ＣＤ３抗体ＯＫＴ３（eBioscience）でコートした１２ウェルプレート（BD Falcon）上に１．０×１０^{6}細胞／ｍＬの細胞密度で播種し、増殖刺激を与えた。播種時の培地には、L-glutamine含有ＲＰＭＩ－１６４０培地（Wako）に、１０％　human serum AB（Nova Biologics）、１％　Penicillin-Streptomycin（nacalai tesque）、１００Ｕ／ｍＬ　ＩＬ－２（Wako）、１０ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－７（Wako）、及び１０ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－１５（R&D SYSTEMS）が添加された培地（以下、Ｒｈ培地と記す）を用いた。１７時間の増殖刺激の後、再分化Ｔ細胞を全量回収し、細胞懸濁液９０μＬにＲｈ培地６０μＬを加えて、ＯＫＴ３でコートしていない９６ウェルプレート（nunc）上に再播種した。再播種から約２４時間後に、上清１５μＬを除去し、６０μｇ／ｍＬ　サイトカラシンＢ（Wako）を添加したＲｈ培地１５μＬを加えた（サイトカラシンＢの最終濃度：６μｇ／ｍＬ）。サイトカラシンＢ添加から３３時間後、上清を除去し、ＰＢＳを添加して撹拌した。遠心分離（１５００ｒｐｍ、３分間）の後、再度上清をＰＢＳで置換して撹拌した。再度遠心分離（１５００ｒｐｍ、３分間）して上清を除去し、３７℃に加温した７５ｍＭ　ＫＣｌを添加して５分間の低張処理を行った。低張後の細胞懸濁液に１／５容の固定液（メタノール：氷酢酸＝３：１）を添加し、遠心分離（４℃、１５００ｒｐｍ、３分間）しながら細胞を半固定した。遠心分離後、上清を新鮮な固定液に置換し、遠心分離（４℃、１５００ｒｐｍ、３分間）しながら細胞を固定した。再度上清を新鮮な固定液に置換し、遠心分離（４℃、１５００ｒｐｍ、３分間）しながら細胞を固定した。更に上清を

メタノールに置換し、遠心分離（４℃、１５００ｒｐｍ、３分間）しながら細胞を固定した。上清を除去した後、懸濁液がわずかに白濁する程度の細胞密度となるようにメタノール中に再懸濁してスライドグラス上に滴下、風乾して小核標本とした。小核標本は４０μｇ／ｍＬ　アクリジンオレンジ溶液で染色し、蛍光顕微鏡下で広帯域Ｂｌｕｅ励起のフィルターを用いて観察した。株「２」では１０００個、株「１２」では１５００個の２核細胞を観察して小核を有する２核細胞数を測定し、総２核細胞に占める小核を有する２核細胞の割合を算出した。結果を表３に示した。表３には、実施例１で測定した小核自然頻度を付記した。

[0068] [表3]

再分化Ｔ細胞中の小核自然頻度

由来元のｉＰＳ細胞株	再分化Ｔ細胞における小核自然頻度	ｉＰＳ細胞における小核自然頻度
「２」	１．８０％	１．３５％
「１２」	３．３３％	３．０５％

[0069] ヒトｉＰＳ細胞における小核自然頻度は分化後のＴ細胞における小核自然頻度とも相関しており、本発明の選抜方法によってヒトｉＰＳ細胞株を選抜することで、分化後の細胞としてもゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い細胞が得られる可能性が示唆された。

[0070] 実施例３　ヒトｉＰＳ細胞の小核自然頻度の測定、核型解析および核形態の観察

（１）ヒトｉＰＳ細胞

京都大学ｉＰＳ細胞研究所金子研究室にて、「CytoTune（登録商標）-iPS 2.0」（iDファーマ）を用いてヒト末梢血リンパ球より樹立したヒトｉＰＳ細胞株「Ｄ－１Ｒ（－）＃１」、「Ｄ－１Ｒ（－）＃２」、「Ｆ－１Ｒ（－）＃２」、「Ｆ－１Ｒ（＋）＃１」、及び「Ｆ－３Ｒ（＋）＃１」の、計５株のヒトｉＰＳ細胞について小核自然頻度の測定を行った。

また、上記５株に実施例１に記載のヒトｉＰＳ細胞７株を加えた、計１２株のヒトｉＰＳ細胞について核形態の観察を、該１２株から「Ｆ－１Ｒ（＋）＃１」を除いた、計１１株のヒトｉＰＳ細胞について核型解析を、それぞれ

行った。

[0071] （２）小核自然頻度の測定

（１）に記載の小核自然頻度測定に供した５株のヒトｉＰＳ細胞を、「フィーダーフリーでのヒトｉＰＳ細胞の樹立および維持培養（ＣｉＲＡ　ＨＰより）」に記載の方法に倣い、iMatrix（ニッピ）上に播種し、３７℃、２％CO_2条件下で維持培養した。その際の培地には、Stemfit AK03N（味の素）を用いた。

[0072] 維持培養を行ったヒトｉＰＳ細胞から、０．５×TriPLE（商品商標）Select（ThermoFisher SCIENTIFIC）を用いて細胞を単一化した後、ヒトｉＰＳ細胞をStemfit AK03Nに懸濁し、小核自然頻度測定検体とした。当該細胞懸濁液を遠心分離（１０００ｒｐｍ、３分間）し、上清をリン酸緩衝生理食塩液（ＰＢＳ、日水製薬）で置換した。再度遠心分離（１０００ｒｐｍ、３分間）して上清を除去し、３７℃に加温した７５ｍＭ　ＫＣｌ（Wako）を添加して５分間の低張処理を行った。低張後の細胞懸濁液に１／５容の固定液（メタノール（nacalai tesque）：氷酢酸（nacalai tesque）＝３：１）を添加し、遠心分離（４℃、１０００ｒｐｍ、３分間）しながら細胞を半固定した。遠心分離後、上清を新鮮な固定液に置換し、遠心分離（４℃、１０００ｒｐｍ、３分間）しながら細胞を固定した。上清を除去した後、懸濁液がわずかに白濁する程度の細胞密度となるように２％固定液（メタノール：氷酢酸＝９８：２）中に再懸濁してスライドグラス上に滴下、風乾して小核標本とした。小核標本は５０μｇ／ｍＬ　アクリジンオレンジ溶液で染色し、蛍光顕微鏡下で広帯域Ｂｌｕｅ励起のフィルターを用いて観察した。細胞株ごとに２枚のスライドグラスを観察に供し、スライドグラス１枚あたり１０００個、すなわち細胞株あたり２０００個のヒトｉＰＳ細胞中に認められる小核を有する細胞数を測定し、小核自然頻度を算出した。結果を実施例１（２）の小核自然頻度測定結果と共に表４に示した。

[0073] （３）核形態の観察

（２）で作製した５株のヒトｉＰＳ細胞の小核標本スライドグラス、およ

び実施例１（２）で作製した７株のヒトｉＰＳ細胞の小核標本スライドグラスを、小核自然頻度の測定と同様にアクリジンオレンジ溶液で染色し、蛍光顕微鏡下で広帯域Ｂｌｕｅ励起のフィルターを用いて核形態を観察した。

[0074] 核形態の観察にあたっては、以下の［１］および［２］を満たす細胞を「正常細胞」、［１］または［２］のいずれかを満たさない細胞あるいは［１］および［２］を満たさない細胞を「異常細胞」と判定し、標本中の大多数の細胞が正常細胞からなるヒトｉＰＳ細胞株を「正常」株、標本中に異常細胞が顕著に認められるヒトｉＰＳ細胞株を「異常」株と判定した。結果を表４に示した。代表的な正常細胞あるいは異常細胞の画像を図１～図４に示した。

［１］核膜の外縁が明瞭であり、１細胞につき１個の核を有する。

［２］核膜に損傷あるいは突起等の異常構造が認められず、滑らかな円形あるいは楕円形である。

[0075]（４）核型解析

（１）に記載の計１１株のヒトｉＰＳ細胞について、（２）あるいは実施例１（２）と同様に維持培養を行った上で細胞を回収して細胞懸濁液とし、核型解析検体とした。核型解析は株式会社ＬＳＩメディエンスに委託して実施した。細胞懸濁液から分裂期の染色体標本を作製し、Ｇバンド法による分染を行って染色体を染色体番号ごとに分類した上でヒトｉＰＳ細胞株あたり２０細胞について解析を行った。

[0076] 核型解析にあたっては、染色体の構造異常（欠失、挿入、逆位、転座など、染色体切断に伴う染色体の異常構造）および／あるいは数的異常（モノソミー、トリソミー、４倍体など、２対４６本と異なる数の染色体）を有する細胞を「異常細胞」、いずれの異常も認められない細胞を「正常細胞」と判定し、解析した２０細胞全てが正常細胞であるヒトｉＰＳ細胞株を「正常」株、異常細胞を１細胞以上有するヒトｉＰＳ細胞株を「異常」株と判定した。結果を表４に示した。

[0077]

[表4]

ヒトｉＰＳ細胞の小核自然頻度、核形態の観察結果および核型解析結果

ｉＰＳ細胞株	小核自然頻度	核形態の観察結果	核型解析結果
「２」	１．３５％	正常	正常
「３」	１．７５％	正常	正常
「Ｆ－３Ｒ（＋）＃１」	１．７５％	正常	正常
「Ｆ－１Ｒ（－）＃２」	１．８５％	正常	正常
「Ｄ－１Ｒ（－）＃２」	２．５５％	異常[1)]	異常[4)]
「１０」	２．６０％	異常[2)]	正常
「１１」	３．０５％	異常[1)]	正常
「１２」	３．０５％	正常	異常[5)]
「Ｆ－１Ｒ（＋）＃１」	３．１５％	異常[2)]	－
「９」	３．３０％	異常[3)]	正常
「５」	３．８０％	正常	正常
「Ｄ－１Ｒ（－）＃１」	４．３５％	異常[1)]	正常

１）核膜表面が滑らかでなく多角形様の形状を取り、核膜の損傷が疑われる細胞が顕著に認められた。
２）１細胞中に２個以上の核を有する多核細胞が顕著に認められた。
３）核膜からの突起構造を有する細胞が顕著に認められた。
４）２０細胞中１細胞に染色体欠失が認められた。
５）２０細胞中１細胞に染色体重複が認められた。

[0078] 小核自然頻度と、ゲノム構造の異常の有無を示す核型あるいは核の形態との間に相関関係が認められ、基準値を２％とした場合に小核自然頻度が基準値以下であるヒトｉＰＳ細胞株４株は全て核型、核の形態共に正常であるのに対して、小核自然頻度が基準値を超えるヒトｉＰＳ細胞株では８株中７株で、核型あるいは核の形態の少なくとも一方に異常を有することが示された。すなわち、本発明の選抜方法によってヒトｉＰＳ細胞株を選抜することで、ゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い細胞が得られる可能性が示唆された。

[0079] 実施例４　小核自然出現頻度が基準値以下である、ヒトｉＰＳ細胞の製造

（１）ヒトｉＰＳ細胞

「Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell 2013, 12, 114-126」に記載の方法に従ってヒト末梢血リンパ球よりヒトｉＰＳ細胞株を樹立する。

[0080] （２）小核自然頻度の測定

（１）に記載のヒトｉＰＳ細胞を、「Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell 2013, 12, 114-126」に記載の方法に倣い、マイトマイシンC処理したマウス線維芽細胞（リプロセル）上に播種し、３７℃、２％　CO_2条件下で維持

培養する。その際の培地には、ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地（Sigma-Aldrich）に、２０％　ＫＳＲ、２ｍＭ　L-glutamine、１％　ＮＥＡＡ、及び１０μＭ　２－メルカプトエタノールが添加された培地に、ｂＦＧＦを５ｎｇ／ｍｌ添加して用いる。

[0081] 維持培養を行ったヒトｉＰＳ細胞から、Trypsin-EDTA（Sigma-Aldrich）を用いてマウス線維芽細胞のみを除去した後、ヒトｉＰＳ細胞をD-PBS（2% FBS）に懸濁し、小核自然頻度測定検体とする。当該細胞懸濁液を用いて、参考例１（２）に記載の方法に従って小核標本を作製し、観察を行う。スライドグラス１枚あたり１０００個、すなわち細胞株あたり２０００個のヒトｉＰＳ細胞中に認められる小核を有する細胞数を測定し、小核自然頻度を算出する。

[0082] 小核自然頻度が２％以下である人工多能性幹細胞と、小核自然頻度が２％を超える人工多能性幹細胞とを識別する。そして、小核自然頻度が２％以下である人工多能性幹細胞を選抜することで、該ヒトｉＰＳ細胞株を、小核自然頻度が２％以下であるヒトｉＰＳ細胞として得る。

小核自然頻度が１．３％以下である人工多能性幹細胞と、小核自然頻度が１．３％を超える人工多能性幹細胞とを識別する。そして、小核自然頻度が１．３％以下である人工多能性幹細胞を選抜することで、該ヒトｉＰＳ細胞株を、小核自然頻度が１．３％以下であるヒトｉＰＳ細胞として得る。

[0083] このような結果から、樹立したそれぞれの人工多能性幹細胞の小核自然頻度を測定し、ＥＳ細胞と同程度の小核自然頻度を示す細胞株を選抜することによって、ゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い人工多能性幹細胞を簡便に低コストで効率的に製造することができ、人工多能性幹細胞の臨床応用の可能性がさらに高まると考えられる。

[0084] 本出願は、２０１６年１２月２７日付で日本国に出願された特願２０１６－２５２６７２を基礎としており、ここで言及することによりその内容は全て本明細書に包含される。

産業上の利用可能性

[0085] 樹立した人工多能性幹細胞の小核自然頻度を測定し、ＥＳ細胞と同程度の小核自然頻度を示す細胞株を選抜することによって、ゲノム構造の安定性が高く、腫瘍化のリスクが低い人工多能性幹細胞を、簡便に低コストで効率的に製造することができる。これにより、高品質な人工多能性幹細胞バンクをより効率的に作製して研究・医療に活用することができる上、従来の技術では断念せざるを得なかった、臨床応用可能な自家人工多能性幹細胞の選抜が現実味を帯びるなど、人工多能性幹細胞を用いた基礎研究・臨床応用の可能性がさらに高まると考えられる。

請求の範囲

[請求項1] 下記（１）～（３）の工程を含むことを特徴とする人工多能性幹細胞の評価方法。

（１）培養された人工多能性幹細胞を提供する工程、

（２）提供された人工多能性幹細胞中の異常核酸構造を有する細胞小器官の自然出現頻度を測定する工程、及び

（３）前記自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞と、前記自然出現頻度が基準値を超える人工多能性幹細胞とを識別する工程

[請求項2] 前記異常核酸構造を有する細胞小器官が小核である、請求項１記載の評価方法。

[請求項3] 前記基準値が胚性幹細胞における自然出現頻度の統計値である、請求項１又は２に記載の評価方法。

[請求項4] 前記胚性幹細胞がヒト胚性幹細胞である、請求項３記載の評価方法。

[請求項5] 前記自然出現頻度の基準値が、基準とする人工多能性幹細胞における自然出現頻度の統計値である、請求項１又は２に記載の評価方法。

[請求項6] 前記自然出現頻度の基準値が２％である、請求項２記載の評価方法。

[請求項7] 前記人工多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞である、請求項１～６のいずれか一項記載の評価方法。

[請求項8] 下記（１）～（４）の工程を含むことを特徴とする人工多能性幹細胞の選抜方法。

（１）培養された人工多能性幹細胞を提供する工程、

（２）提供された人工多能性幹細胞中の異常核酸構造を有する細胞小器官の自然出現頻度を測定する工程、

（３）前記自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞と、前記自然出現頻度が基準値を超える人工多能性幹細胞とを識別する工程、及び

（４）前記自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞を選抜する工程

[請求項9] 前記異常核酸構造を有する細胞小器官が小核である、請求項８記載の選抜方法。

[請求項10] 前記自然出現頻度の基準値が胚性幹細胞における自然出現頻度の統計値である、請求項８又は９に記載の選抜方法。

[請求項11] 前記胚性幹細胞がヒト胚性幹細胞である、請求項１０記載の選抜方法。

[請求項12] 前記自然出現頻度の基準値が、基準とする人工多能性幹細胞における自然出現頻度の統計値である、請求項８又は９に記載の選抜方法。

[請求項13] 前記自然出現頻度の基準値が２％である、請求項９記載の選抜方法。

[請求項14] 前記人工多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞である、請求項８～１３のいずれか一項記載の選抜方法。

[請求項15] 下記（１）～（４）の工程を含むことを特徴とする人工多能性幹細胞の製造方法。

（１）樹立され、培養された人工多能性幹細胞を提供する工程、

（２）提供された人工多能性幹細胞中の異常核酸構造を有する細胞小器官の自然出現頻度を測定する工程、

（３）前記自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞と、前記自然出現頻度が基準値を超える人工多能性幹細胞とを識別する工程、及び

（４）前記自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞を選抜する工程

[請求項16] 前記（１）工程の前に、さらに下記工程を含むことを特徴とする請求項１５記載の製造方法。

（Ａ）人工多能性幹細胞を樹立する工程、及び

（Ｂ）樹立された人工多能性幹細胞を培養する工程

[請求項17] 前記異常核酸構造を有する細胞小器官が小核である、請求項１５または１６に記載の製造方法。

[請求項18] 前記自然出現頻度の基準値が胚性幹細胞における自然出現頻度の統計値である、請求項１５～１７のいずれか一項記載の製造方法。

[請求項19] 前記胚性幹細胞がヒト胚性幹細胞である、請求項１８記載の製造方法。

[請求項20] 前記自然出現頻度の基準値が人工多能性幹細胞における自然出現頻度の統計値である、請求項１５～１７のいずれか一項記載の製造方法。

[請求項21] 前記自然出現頻度の基準値が２％である、請求項１７記載の製造方法。

[請求項22] 前記人工多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞である、請求項１５～２１のいずれか一項記載の製造方法。

[請求項23] 小核自然出現頻度が２％以下である、人工多能性幹細胞。

[請求項24] 下記（１）～（３）の工程を含むことを特徴とする、人工多能性幹細胞の評価方法。

（１）培養された人工多能性幹細胞を提供する工程、

（２）提供された人工多能性幹細胞中の異常核酸構造を有する細胞小器官の自然出現頻度を測定する工程、及び

（３）前記自然出現頻度が基準値以下である人工多能性幹細胞を、前記自然出現頻度が基準値を超える人工多能性幹細胞よりも分化効率が高い人工多能性幹細胞であると評価する工程