

明 細 書

発明の名称：

幹細胞を作製するための細胞培養補助剤、及び幹細胞の作製方法

技術分野

[0001] [関連出願の相互参照]

本出願は、2021年5月31日に出願された、日本国特許出願第2021-091262号明細書（その開示全体が参照により本明細書中に援用される）に基づく優先権を主張する。本発明は、幹細胞を作製するための細胞培養補助剤、及び、細胞培養補助剤を用いて幹細胞を作製する方法に関する。

背景技術

[0002] 現在、体細胞から人工多能性幹細胞を作製する方法として、大別して2つの技術が用いられている。第一には、山中によって創出された人工多能性幹細胞iPS細胞に関するもので、線維芽細胞にウイルスベクターを用いてOCT4、SOX2、KLF4、c-MYCの転写因子タンパクを過剰発現させ、リプログラミングさせる方法である（非特許文献1）。第二には前川らが初めて報告した、化合物による体細胞のダイレクト・リプログラミング技術である（非特許文献2，3，4）。iPS細胞技術は、既に再生医療分野、疾患臓器モデルの創薬応用で実用化が進められているが、免疫拒絶又は遺伝子変異による腫瘍形成のリスク回避が大きな課題となっている。加えて、iPS細胞樹立から目的臓器細胞へのリプログラミングに要する時間とコスト軽減が、重要な医療課題となっている。一方、化合物ダイレクト・リプログラミング技術は遺伝子変異による腫瘍形成の心配が無く、患者自身の体細胞と化合物カクテルのみで臓器再生が達成できることから、個別化再生医療への応用に期待が寄せられている。しかしながら、現時点では本技術で作製できる臓器細胞種が神経細胞及び脂肪細胞に限定的であり、作製法開発が課題となっている。

[0003] また、がんはがん幹細胞と呼ばれるごく少数の細胞を起源として形成され

、増殖能、分化機能において不均一な細胞集団として腫瘍が形成されることが近年分かってきた（非特許文献5）。がん幹細胞は、健常な生体組織に存在する多能性幹細胞と同様に、自己複製能と多様な細胞を生み出す分化能を有する特徴を持つ。がん治療の際には、抗がん剤、放射線、がん免疫療法、外科手術によって多くのがん細胞を除去できるが、治療抵抗性の高い非常にわずかながん幹細胞が残ることによって再発、転移が起これと考えられている。そのため、がん幹細胞を標的とした新たな薬剤、治療法、診断技術の開発が重要課題となっている。

[0004] がん幹細胞を標的とした新薬開発、新しい治療法及び診断法を開発するためには、モデルとなるがん幹細胞を大量かつ安定的に作製することが不可欠である。ハイスループットスクリーニング、薬理試験、安全性試験に応用するために、がん幹細胞の作製が不可欠なためである。しかしながら、がん患者検体から検出するごくわずかながん幹細胞を分離する方法に依存せざるを得ない点が技術上の大きな障壁となってきた。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676.

非特許文献2：Maekawa M, Yamaguchi K, Nakamura T, Shibukawa R, Kodanaka I, Ichsaka T, et al. Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature* 2011; 474:225-229

非特許文献3：Yang Z, Ting Z, Hongkui D, et al. A XEN-like state bridges somatic cells to Pluripotency during chemical reprogramming. *Cell* 2015; 163:1678-1691.

非特許文献4：Takeda Y, Harada Y, Yoshikawa T, Dai P. Chemical compound-based direct reprogramming for future clinical application. *Bioscience Reports* 2018; 38: 1-19.

非特許文献5:Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells, Nature 2001;414:105-11.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 人工多能性幹細胞iPS細胞は、ウイルスベクターを用いてSOX2, OCT4, KLF4, c-MYC等の転写因子遺伝子を線維芽細胞等の体細胞に強発現させるため、iPS細胞の染色体に外部遺伝子が組み込まれ腫瘍形成が起こるリスクがある。また、線維芽細胞を初期化して多量のiPS細胞を培養し、それを目的臓器細胞に分化誘導して移植に必要な量を培養するためには6ヶ月から1年の時間と多大なコストが必要である。
- [0007] また、化学合成物の複数カクテルを培養液に加えるダイレクト・リプログラミングは、60日程度の培養期間で体細胞から多能性幹細胞を直接作製できると言われている。加えて、小分子化合物を用いることから、外部遺伝子の染色体への組込リスクと腫瘍形成リスクが無い。さらには患者由来の自己線維芽細胞を用いることで免疫拒絶リスクを回避できるものとして、個別化再生医療への実用化に期待が寄せられている。しかしながら、本技術で作製できる臓器細胞種は未だ神経細胞又は脂肪細胞に限られており、医療、創薬領域で実用化には至っていない。
- [0008] 一方、がん幹細胞の存在が放射線治療、化学療法剤治療の予後を悪化させる事が知られているが、その細胞の分離法は未だに確立しておらず、医学的な検討が出来ていない。がん患者検体からわずかな数の細胞を摘出し、免疫不全NODマウスにがん患者検体を一旦移植して作製した腫瘍塊（PD0X）からセルソーター法で分離する方法、又は、bFGF、EGF、PDGF等複数の遺伝子組換えタンパク因子又はホルモンを添加した培養法が試みられるものの、大量かつ安定的な方法は未だに確立されていない。医薬品候補物のハイスループットスクリーニング、薬効評価、安全性評価には、がん幹細胞の使用が不可欠である。
- [0009] 本発明の課題は、体細胞由来の幹細胞の新規作製法を提供することにある

。

課題を解決するための手段

[0010] 上記課題を解決すべく、発明者らは鋭意研究を重ねた。そして、Ⅰ型コラーゲンを構成するアミノ酸配列であるPro-Hyp-Glyのみの繰り返し配列を持つポリペプチドで、細胞接着増殖を検討した結果、コラーゲンのアミノ酸配列の一部であるにもかかわらず、予想に反して細胞は当該ポリペプチドコーティングされた培養容器に接着せず、浮いた状態で凝集しスフェロイドを形成することが見出された。さらに、前記ポリペプチドの水溶液を細胞培養補助剤としてとして使用することで、健常ヒト線維芽細胞又は乳腺上皮細胞等の体細胞を初期化（リプログラミング）して、分化能を有する多能性幹細胞を作製出来る事を見出した。また、一般的な培養がん細胞株（幹細胞マーカーを持たない細胞）からがん幹細胞を作製できることを見出した。

[0011] 本発明はこれらの知見に基づいて完成されたものであり、以下に示す広い態様の発明を含むものである。

[項 1]

下記式（１）で表されるポリペプチドを含む、細胞培養補助剤。



（式中、Hypはヒドロキシプロリンを表し、nは2～1000の整数を表す）

[項 2]

幹細胞の製造に用いられる、項 1 に記載の細胞培養補助剤。

[項 3]

前記幹細胞が、多能性細胞又はがん幹細胞である、項 2 に記載の細胞培養補助剤。

[項 4]

スフェロイド形成に用いられる、項 1 に記載の細胞培養補助剤。

[項 5]

下記式（１）で表されるポリペプチドを含む、スフェロイド形成剤。



(式中、Hypはヒドロキシプロリンを表し、nは2～1000の整数を表す)

[項 6]

項 1 ～ 4 のいずれか1項に記載の細胞培養補助剤又は項 5 に記載のスフェロイド形成剤で培養面が表面処理された、細胞培養基材。

[項 7]

項 1 ～ 4 のいずれか1項に記載の細胞培養補助剤又は項 5 に記載のスフェロイド形成剤、及び培養細胞を含む、細胞培養系。

[項 8]

項 1 ～ 4 のいずれか1項に記載の細胞培養補助剤又は項 5 に記載のスフェロイド形成剤を用いて細胞を培養する工程を含む、幹細胞の製造方法。

[項 9]

前記幹細胞が、SOX2、OCT4、NANOGから選択される少なくとも1種の幹細胞未分化マーカー遺伝子を発現する、項 8 に記載の製造方法。

[項 10]

前記幹細胞が、多能性幹細胞又はがん幹細胞である、項 8 又は 9 に記載の製造方法。

[項 11]

項 8 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法により得られる幹細胞を用いた、組織の製造方法。

発明の効果

- [0012] 本発明により、幹細胞を作製するための細胞培養補助剤を提供する。また、本発明の新規な細胞培養補助剤から、体細胞由来幹細胞製造法が提供される。本発明の幹細胞作製法を用いることで、細胞培養補助剤のポリペプチドが培養細胞に必要な足場剤又は接着因子のような受容体／リガンド作用を発揮して、さらにはサイトカイン、ケモカイン、ホルモン等と同様のシグナル伝達因子として作用し、簡便かつ効率的に幹細胞を作製することが可能となる。これにより、疾患を抱える患者個人から自己の幹細胞を簡便に作製することが可能になり、iPS細胞のような遺伝子変異による腫瘍形成リスクが無く

、免疫拒絶を回避した個別化再生医療、細胞治療、移植治療が実現できる。

[0013] また、本発明の細胞培養補助剤を用いることで、がん幹細胞マーカー遺伝子と幹細胞未分化マーカー遺伝子を発現するがん幹細胞を製造することが可能になる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]細胞培養基材（半透膜、中空糸）に細胞培養補助剤を使用する際の一例。半透膜、中空糸／マイクロ流体デバイス。本発明の細胞培養補助剤を半透膜・中空糸の内側にコーティング、あるいは培地中に添加し、マイクロ流体デバイスとして使用。

[図2]細胞培養基材（カプセル）に細胞培養補助剤を使用する際の一例。培養補助剤自体で形成したカプセル又は生分解性基材によるカプセル。本発明の細胞培養補助剤をゲル状の固形基材として用い、その中に細胞を埋め込んでスフェロイドを形成させる。

[図3]細胞培養基材（繊維状素材、半透膜、中空糸）に細胞培養補助剤を使用する際の一例。生分解性基材、半透膜、中空糸、繊維状素材の内腔に本発明の細胞培養補助剤をコーティング、あるいは培地中に添加し、スフェロイドを入れて培養する。

[図4]細胞培養基材（マイクロキャリア／フィルム／繊維状素材をベースにした包埋キャリアー）に細胞培養補助剤を使用する際の一例。網目状、半透性、繊維状、フレキシブルなフィルムの内側に本発明の細胞培養補助剤をコーティングし、スフェロイドを巻き込む、挟み込む、包む等の状態で培養する。

[図5]健常ヒト新生児線維芽細胞の2次元接着培養と3次元スフェロイド培養。

（A：平面2次元培養（培養2日目）。細胞培養補助剤無しのPS製培養容器（平面底）では、線維芽細胞は底面に接着して増殖した。B：3次元培養（培養2日目）。細胞培養補助剤処理をしたPS製培養容器（平面底）で、培養開始2日目には線維芽細胞が凝集してスフェロイドを形成した。C：3次元培養（培養20日目）。細胞培養補助剤処理をしたPS製培養容器（平面底）で、球形の

スフェロイドを形成する線維芽細胞。細胞培養補助剤を塗布した培養容器（ポリスチレン；PS製／6穴プレート、平底）で健常ヒト新生児線維芽細胞を培養すると、経時的に細胞が自己組織化を起こして凝集し2日目以降20日目までスフェロイドを形成して生長した。

[図6]健常ヒト新生児線維芽細胞3次元スフェロイドにおける幹細胞未分化マーカー遺伝子の発現。培養容器（PS製／6穴プレート、平底）に細胞培養補助剤を塗布し、健常ヒト新生児線維芽細胞を20日間培養してスフェロイドを形成させると、代表的な幹細胞未分化マーカー遺伝子3種（SOX2, OCT4, NANOG）のmRNA発現量が増加し、幹細胞誘導（reprogramming）の特徴を検出した。

[図7]96wellプレートによる健常ヒト新生児線維芽細胞3次元スフェロイド培養。（A：96well（丸底）培養（0日目）。PS製96well培養容器（丸底）に細胞培養補助剤処理をして、線維芽細胞40,000個を播種した。B：96well（丸底）培養（2日目）。播種した線維芽細胞が凝集し始めてスフェロイド形成を始めた。C：96well（丸底）培養（20日目）。6日目以降は1個のスフェロイドを形成し、培養開始20日目以降も良好な状態を維持した。）丸底の培養容器（PS製/96穴マイクロプレート）に細胞培養補助剤を塗布し、ヒト新生児線維芽細胞をスフェロイド培養すると、経時的に細胞が凝集し2日目以降20日目までスフェロイドを形成して生長した。

[図8]健常ヒト新生児線維芽細胞3次元スフェロイドにおける幹細胞未分化マーカー遺伝子発現の経時変化。丸底培養容器（PS製/96穴マイクロプレート）に細胞培養補助剤を塗布し、健常ヒト新生児線維芽細胞をスフェロイド培養すると、幹細胞未分化マーカー遺伝子3種（SOX2, OCT4, NANOG）のmRNA発現量が経時的に増加し、培養開始20日目に最高値になった。体細胞の線維芽細胞に遺伝子導入（iPS細胞作製の山中法）することなく、幹細胞を誘導（direct-reprogramming）出来る事を見出した。

[図9]健常ヒト新生児線維芽細胞由来幹細胞の分化誘導：3胚葉分化関連遺伝子の発現。細胞培養補助剤を塗布した培養容器で健常ヒト新生児線維芽細胞をスフェロイド培養したところ、初期三胚葉への分化マーカー遺伝子mRNA（S

OX17;内胚葉、GATA6 ; 中胚葉、MAP2;外胚葉) の発現量が経時的に増大し、20日目に最高値になった。幹細胞が、各種臓器への分化初期段階の三胚葉に分化誘導 (differentiation) できることを見出した。

[図10]健常ヒト線維芽細胞スフェロイドにおける幹細胞未分化マーカー蛋白の発現。蛍光色素標識抗体を用いた免疫染色法で、幹細胞マーカー蛋白であるSOX2、OCT4、NANOGを検出でき、スフェロイド構成細胞に幹細胞が存在する事を示した。A : NL557標識抗SOX2抗体により、蛍光を検出。B : NL637標識抗OCT4抗体により、蛍光を検出。C : NL493標識抗NANOG抗体により、蛍光を検出。

[図11]スフェロイド内に存在するNANOG蛋白陽性の幹細胞。20日間培養したスフェロイドをアクターゼ酵素試薬で分散し、蛍光色素標識抗NANOG抗体で免疫染色した。スフェロイド形成細胞の一部に、核内NANOG陽性の幹細胞が誘導されていることを見出した。A : スフェロイドから分散させた細胞の一部、明視野像。B : NANOG抗体陽性細胞 (Aと同一細胞集団)、細胞核にNANOG蛋白陽性の幹細胞を検出した。C : DAPIによる核の染色 (Aと同一細胞集団)、核内DNAをブルーに染色し、核の形を示す対照像。

[図12]成人皮膚線維芽細胞の2次元培養と3次元スフェロイド培養。ヒト身体から低侵襲で検体採取し易い成人皮膚線維芽細胞を用いて、本発明の細胞培養補助剤によるスフェロイド培養が可能なことを示した。A : 平面2次元培養、成人皮膚線維芽細胞はPS製培養容器の底面に接着して増殖した。B : 3次元培養 (培養20日目)、細胞培養補助剤処理した96well培養容器でスフェロイドを形成した成人皮膚線維芽細胞。

[図13]成人皮膚線維芽細胞の3次元スフェロイド培養における未分化幹細胞マーカー遺伝子の発現解析。個別化再生治療の実施に不可欠な、最も低侵襲で検体採取し易い皮膚由来線維芽細胞を用いて、細胞培養補助剤スフェロイド培養法により幹細胞を誘導できることを示した。A : SOX2。B : OCT4。C : NANOG。

[図14]成人皮膚線維芽細胞の3次元スフェロイド培養における3胚葉分化関連

遺伝子の発現解析。個別化再生治療の実施に不可欠な、最も低侵襲で検体採取し易い皮膚由来線維芽細胞を用いて、細胞培養補助剤スフェロイド培養法により幹細胞を誘導できることを示した。A : SOX17。B : GATA6。C : HAND1。D : SOX1。

[図15]健常ヒト成人乳腺上皮細胞の2次元接着培養と3次元スフェロイド培養。(A : 2次元培養(培養2日目)。細胞培養補助剤無しのPS製培養容器(平面底)では、乳腺上皮細胞は底面に接着して増殖した。B : 3次元培養(培養2日目)。細胞培養補助剤処理をしたPS製培養容器(平面底)で、乳腺上皮細胞はスフェロイドを形成した。C : 3次元培養(培養20日目)。細胞培養補助剤処理をした96well培養容器(丸底)で、培養20日目の乳腺上皮細胞スフェロイド。)細胞培養補助剤処理をしたPS製培養容器(平底又は丸底)で健常ヒト成人乳腺上皮細胞を培養すると、経時的に細胞が凝集し2日以降20日目までスフェロイドを形成して生長した。成人由来細胞、新生児由来細胞を問わず、また上皮細胞、線維芽細胞等広い種類の細胞で実施可能であることを示した。

[図16]健常ヒト成人乳腺上皮細胞の3次元スフェロイド培養における幹細胞未分化マーカー遺伝子の検出。細胞培養補助剤を塗布した培養容器で健常ヒト成人乳腺上皮細胞を培養してスフェロイドを形成させると、代表的な幹細胞未分化マーカー3種(SOX2, OCT4, NANOG)のmRNA発現量が増加し、培養開始20日目に最高値になった。体細胞の上皮細胞に遺伝子導入することなく、幹細胞を誘導(direct-reprogramming)出来る事を見出した。

[図17]健常ヒト成人乳腺上皮細胞由来幹細胞の分化誘導：3胚葉関連遺伝子の発現。細胞培養補助剤を塗布した培養容器で健常ヒト成人乳腺上皮細胞を20日間培養してスフェロイドを形成させると、初期三胚葉マーカー遺伝子のうちSOX17;内胚葉、MAP2;外胚葉のmRNA発現量が20日目に最高値になった。一方、FOXA2(内胚葉)は減少し、GATA4(中胚葉)は検出できなかった。幹細胞が、各種臓器への分化初期段階の三胚葉に分化誘導(differentiation)できることを見出した。

[図18]細胞培養補助剤有無によるがん細胞の2次元接着増殖と3次元スフェロイド増殖。細胞培養補助剤を塗布した培養容器（ポリスチレン；PS製／6穴プレート、平底）で3種がん細胞（A549細胞；ヒト肺がん、ES2細胞；ヒト卵巣癌、143B；ヒト骨肉腫）を培養すると、経時的に細胞が凝集し15日目までスフェロイドを形成して増殖した。

[図19]細胞培養補助剤濃度とスフェロイドの関係を示す。

[図20]各種マイクロプレートでのスフェロイド形成の結果を示す。

[図21]U字プレートで作製したスフェロイドのアポトーシス誘導の定量結果を示す。

[図22]V字プレートで作製したスフェロイドのアポトーシス誘導の定量結果を示す。

[図23]A549ヒト肺がん細胞のがん幹細胞マーカー遺伝子の発現量。A549ヒト肺がん細胞を細胞培養補助剤を塗布した培養容器でスフェロイド培養すると、3種がん幹細胞マーカー遺伝子mRNA（CD24、CD44、CD133）の発現量が経時的に増加し、培養開始15日目に最高値となった。肺がん幹細胞の特徴を有する細胞を作製できることを見出した。

[図24]ES2ヒト卵巣癌細胞のがん幹細胞マーカー遺伝子の発現量。ES2ヒト卵巣癌細胞を細胞培養補助剤を塗布した培養容器でスフェロイド培養すると、3種がん幹細胞マーカー遺伝子mRNA（CD24、CD44、CD133）の発現量が経時的に増加し、培養開始15日目に最高値となった。卵巣がん幹細胞の特徴を有する細胞を作製できることを見出した。

[図25]143Bヒト骨肉腫細胞のがん幹細胞マーカー遺伝子の発現量。143Bヒト骨肉腫細胞を細胞培養補助剤を塗布した培養容器でスフェロイド培養すると、3種がん幹細胞マーカー遺伝子mRNAのうち2種（CD44、CD133）の発現が経時的に増加し、培養開始15日目に最高値となった。CD24は優位に増加しなかった。骨肉腫幹細胞の特徴を有する細胞を作製できることを見出した。

[図26]A549ヒト肺がん細胞の3次元スフェロイドにおける遺伝子の検出。A549ヒト肺がん細胞を細胞培養補助剤を塗布した培養容器でスフェロイド培養す

ると、代表的な幹細胞未分化マーカー遺伝子3種（SOX2, OCT4, NANOG）のmRNA発現量が経時的に増加し、培養開始15日目に最高値になった。

[図27]ES2ヒト卵巣がん細胞の3次元スフェロイドにおける遺伝子の検出。ES2ヒト卵巣がん細胞を細胞培養補助剤を塗布した培養容器でスフェロイド培養すると、未分化幹細胞未分化マーカー遺伝子3種（SOX2, OCT4, NANOG）のmRNA発現量が経時的に増加し、培養開始15日目に最高値になった。

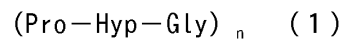
[図28]143Bヒト骨肉腫細胞の3次元スフェロイドにおける幹細胞未分化マーカー遺伝子の検出。143Bヒト骨肉腫細胞を細胞培養補助剤を塗布した培養容器でスフェロイド培養すると、幹細胞未分化マーカー遺伝子3種（SOX2, OCT4, NANOG）のmRNA発現量が、培養開始4日目から15日目まで増加した。

発明を実施するための形態

[0015] 本明細書において、単数形（a, an, the等）は、本明細書で別途明示がある場合又は文脈上明らかに矛盾する場合を除き、単数と複数を含むものとする。

[0016] <細胞培養補助剤>

本発明の細胞培養補助剤は、下記式（1）で表されるポリペプチドを含む。



（式中、Hypはヒドロキシプロリンを表し、 n は2～1000の整数を表す）

n は2～1000の整数を表す。 n は好ましくは10～1000の整数、より好ましくは500～1000の整数である。

[0017] 本発明の細胞培養補助剤は、幹細胞を製造する際に用いることができる。

本発明の細胞培養補助剤を細胞培養に用いることで、培養細胞がスフェロイドを形成し、簡便且つ効率的に幹細胞を製造することができる。

[0018] 本明細書において、スフェロイド（細胞塊ともいう）とは、複数の細胞が立体的に集まり、互いに接着したものを包含する。

[0019] 式（1）で表されるポリペプチドは、公知の製造方法により製造することができる。例えば、

(Pro-Hyp-Gly)_m (mは例えば1~10、1~5、10~1000、500~1000程度の整数)

で表されるペプチドオリゴマーを縮合反応させることにより製造することができる。

[0020] 本発明の細胞培養補助剤は、好ましくは、前記式(1)で表されるポリペプチドの水溶液を含む。前記水溶液は、前記式(1)で表されるポリペプチドを0.001~0.5重量%(w/v)程度含むことが好ましく、0.01~0.25重量%(w/v)程度含むことがより好ましい。本発明の細胞培養補助剤は、前記式(1)で表されるポリペプチド以外の成分を実質的に含まない水溶液とすることができるが、これに限定されない。

[0021] 前記式(1)で表されるポリペプチドの水溶液として、「PURECOLLA」(JNC株式会社製)等の市販品を使用することができる。

[0022] <表面処理剤、添加剤としての使用>

本発明の細胞培養補助剤は、1つの態様において、細胞培養基材の培養面を表面処理するために使用することができる。

[0023] このような細胞培養基材としては特に限定されず、例えば、ディッシュ、シャーレ、マイクロウェルプレート(平底、U字底、V字底等)、チューブ、フィルム、繊維状素材、半透膜、中空膜、中空糸、カプセル、マイクロキャリア等が例示される。細胞培養基材は、例えばガラス、金属、ポリスチレン(PS)、ポリプロピレン(PP)、ポリカーボナイト(PC)、ポリエチレンテレフタレート(PET)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、ポリフッ化ビニリデン(PVDF)、シクロオレフィン(COP)、アクリル/メタクリル(PMMA)、親水性フッ化樹脂、ポリ乳酸(PLA)、ポリブチレンサクシネート(PBS)、ポリヒドロキシブチレート/ヒドロキシヘキサノエート(PHBH)等のプラスチック、セルロース膜、カーボンナノチューブ、セルロースナノファイバー等を材質とするものを使用することができる。

[0024] 細胞培養基材に細胞培養補助剤を使用する際の例を図1~図4に示すが、これに限定されない。

- [0025] 図1は、半透膜、中空糸への適用例を示す。図1のように、本発明の細胞培養補助剤を半透膜、中空糸の内側にコーティング、あるいは培地中に添加し、マイクロ流体デバイスとして使用することができる。このようなマイクロ流体デバイスは、(i) 腎臓、肝臓等の臓器機能再現、(ii) 腎臓、肝臓等の体外循環臓器（キャリア型）医療機器、(iii) モノクローナル抗体等の遺伝子組み換え体タンパクの生産、(iv) 創薬モデル／薬理評価、毒性評価、等の分野への応用が期待できる。
- [0026] 図2は、カプセルへの適用例を示す。図2のように、本発明の細胞培養補助剤をゲル状の固形基材として用い、その中に細胞を埋め込んでスフェロイドを形成させることができる。このようなカプセルは、(i) 再生医療用の臓器：体内に幹細胞あるいは分化誘導したオルガノイドを移植するキャリアー、(ii) 造血幹細胞の輸血、(iii) 人工筋肉の製造、等の分野への応用が期待できる。
- [0027] 図3は、繊維状素材、半透膜、中空糸への適用例を示す。図3のように、生分解性基材、半透膜、中空糸、繊維状素材の内腔に本発明の細胞培養補助剤をコーティング、あるいは培地中に添加し、スフェロイドを入れて培養することができる。このような繊維状素材、半透膜、中空糸は、(i) 再生医療用の臓器：血管、神経、腸管、尿細管等細い臓器の移植再生、(ii) 神経による電位、光、匂い成分、味の成分等センサー回路、等の分野への応用が期待できる。
- [0028] 図4は、マイクロキャリア等への適用例を示す。図4のように、網目状、半透性、繊維状、フレキシブルなフィルムの内側に本発明の細胞培養補助剤をコーティングし、スフェロイドを巻き込む、挟み込む、包む等の状態で培養することができる。このようなマイクロキャリア等は、再生医療用の脾臓、腎臓、肝臓、骨髓、骨、軟骨、筋肉、皮膚、毛髪等の移植再生等の分野への応用が期待できる。
- [0029] なお、本発明の細胞培養補助剤で細胞培養基材の培養面を表面処理する場合、細胞培養基材として、親水性処理加工の超低接着表面を有する培養容器

（例えば、ディッシュ、フラスコ、マイクロ流体デバイス、セルスタック・チャンバー、バック等）を使用する必要はない。本発明の細胞培養補助剤を用いると、超低接着表面を有する培養容器を用いずとも、スフェロイドを容易に形成し、多能性幹細胞、がん幹細胞を製造することができる。

[0030] 前記細胞培養基材の培養面とは、細胞が培養時に接触する面を指す。培養面の一部又は全部を表面処理することができる。また、培養面以外の面が表面処理されることは妨げられない。

[0031] 前記表面処理は、本発明の細胞培養補助剤の有効成分である前記式（１）で表されるポリペプチドを前記細胞培養基材の培養面に固定（例えば、コーティング）することができる手段であれば特に限定されない。例えば、塗布、浸漬、吹き付け等が挙げられる。なお、プラスチックを材質とする細胞培養基材を用いる際には、任意選択で、プラズマ処理等の表面処理を先に行ってから、本発明の細胞培養補助剤で表面処理することが好ましい。また、本発明の細胞培養補助剤を表面処理に用いる際に、公知の添加剤を混合し、使用しても良い。

[0032] 細胞培養基材の培養面の表面処理に用いる場合の本発明の細胞培養補助剤の有効成分である前記式（１）で表されるポリペプチドの濃度は特に限定されず、例えば0.001～0.5重量％（w/v）、好ましくは0.01～0.25重量％（w/v）とすることができる。

[0033] 本発明の細胞培養補助剤を用いて細胞培養基材を表面処理する場合、前記表面処理の後に、水を除去するために乾燥をすることができる。乾燥を行う手段は特に限定されず、例えば減圧乾燥、乾燥剤により行うことができる。

[0034] さらに前記乾燥を行った後に、細胞培養基材を滅菌することができる。滅菌を行う手段は特に限定されず、例えばエチレンオキサイドガス、電子線、ガンマ線、オートクレーブ等の手段により行うことができる。

[0035] 本発明の細胞培養補助剤は、別の態様において、培養媒体に添加して使用することができる。

[0036] 本発明の細胞培養補助剤を添加する培養媒体としては、通常の細胞培養に

用いられる液性培地、ゲル状培地等を広く使用することができる。培地には、動物由来成分であるFBS、FCS等の血清／血漿添加剤、アルブミン等のタンパク質添加剤が含まれても良い。例えば、 α MEM培地、Neurobasal培地、Neural Progenitor Basal培地、NS-A培地、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、最小必須培地（MEM）、GMEM培地、Eagle MEM培地、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、DMEM／F12培地、StemPro-34SFM培地、ハム培地、RPMI 1640培地、HTF培地、Fischer's培地等が挙げられる。さらには、動物由来成分を含まない（xeno-free）培地又は無血清（serum-free）培地では、mTeSR培地、Stem Fit培地、Cellartis DEF-CS500培地、Cellartis MSC-CS500培地、NutriStem培地、PluriStem Human ES/iPS 培地、Fibroblast Growth Medium培地、Mammary Epithelial Cell Growth培地等が例示される。ゲル状培地としては、ソフト・アガー培地、マトリゲル培地、Methylcellulose-based 培地等が例示されるが、これらに限定されない。また、培地には、その他公知の添加物を含んでもよい。

[0037] 本発明の細胞培養補助剤の培養媒体への添加量は特に限定されず、本発明の細胞培養補助剤の有効成分である前記式（１）で表されるポリペプチドの終濃度で例えば0.001～0.5重量％（w/v）、好ましくは0.01～0.25重量％（w/v）とすることができる。

[0038] また、本発明の細胞培養補助剤で表面処理した細胞培養基材と、本発明の細胞培養補助剤を添加した培養媒体を組み合わせ、細胞培養に用いることもできる。

[0039] ＜スフェロイド形成剤＞

前記式（１）で表されるポリペプチドを含む、本発明の細胞培養補助剤は、別の態様において、スフェロイド形成剤として使用することができる。

[0040] スフェロイドの形成方法としては、本発明の細胞培養補助剤を培養面に有する細胞培養器具を用いて細胞培養を行う、又は、本発明の細胞培養補助剤を添加した培養媒体中で細胞培養を行うこと以外は、通常のスフェロイドの

形成方法に準じて行うことができる。

[0041] 通常のスフェロイドの形成方法としては、non-adhesive surface細胞培養法、hanging drop細胞培養法、micromolding techniquesの利用、rotary細胞培養法等が挙げられる。

[0042] スフェロイド形成に用いられる細胞は特に制限されず、例えば 皮膚組織由来の線維芽細胞、各種臓器由来の上皮細胞をはじめ、肺、肝臓、すい臓、腎臓、腸、軟骨、骨、中枢神経、末梢神経等各組織由来体細胞の初代培養細胞が挙げられる。しかしながら、これら初代培養細胞では、平面培養を行った場合には本来備えている機能が失われ、また異常活性化が惹起されることが多く、併せてアノイキスと言われるアポトーシス（プログラムされた細胞死）を誘発することが問題となる。そうしたなか、本発明の細胞培養補助剤で初代培養細胞のスフェロイドを形成させると、アポトーシスの発生を抑制し、生存、増殖を補助しながら生理機能を維持する効果が確認されている。このことから、平面培養した細胞に比べ、スフェロイド形成した細胞では生体機能を高度に維持でき、生体機能を反映したモデルを提供できることが期待されている。一方、株化したがん細胞でスフェロイド形成させることも有用である。がん細胞をスフェロイド形成させると、患者生体に存在した時の「悪性腫瘍機能」を再現でき、抗がん剤への薬剤耐性をもたらす酵素、ポンプ受容体等の活性状況が維持されることが知られている。このことから、がん細胞スフェロイドは、がん患者モデルとして病態を再現できるものとして、創薬研究用途に応用が期待されている。さらにiPS細胞の分化誘導の場合では、一旦スフェロイド培養して胚様体（embryoid body）を作製したのちに、各臓器に分化させる方法が多用される。この場合は、スフェロイド形成することで三胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）への分化が促進されることが知られており、臓器細胞への分化誘導工程を促進することが大きな効用となっている。

[0043] スフェロイド形成の培地としては血清含有であっても無血清培地であっても良い。血清含有培地としては例えば、 α MEM培地、Neurobasal培地、Neural

Progenitor Basal培地、NS-A培地、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、最小必須培地 (MEM)、GMEM培地、Eagle MEM培地、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、DMEM/F12培地、StemPro-34SFM培地、ハム培地、RPMI 1640培地、HTF培地、Fischer's培地、及びこれらの混合培地等が挙げられるが、これらに限定されない。添加する血清 (例えば、ウシ胎児血清 (FBS)、ヒト血清等) の濃度は、2~20%が用いられるが、5~10%が好ましく使用される。

[0044] 無血清培地 (SFM) とは、動物由来成分を含まないもの (xeno-free) と未処理又は未精製の血清をいずれも含まない培地 (serum-free) を意味し、遺伝子組み換え法で製造された増殖因子 (basic-FGF、EGF、インシュリン、等) を含有する培地が挙げられる。SFMは任意の血清代替物を含んでもよい。血清代替物としては、例えば、KnockOut Serum Replacement、アルブミン (例えば、脂質リッチアルブミン、組換えアルブミン等のアルブミン代替物、植物デンプン、デキストラン及びタンパク質加水分解物等)、トランスフェリン (又は他の鉄輸送体)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオグリセロールあるいはこれらの均等物等が挙げられる。これらは1種単独で、又は2種以上を組み合わせ使用することができる。

[0045] 培地は、その他公知の添加物を含んでもよい。添加物は特に限定されないが、例えば、成長因子 (例えば、インシュリン、成長ホルモン、EGF、FGF、TGF、BMP、Activin、Wnt、LIF、Noggin等)、バルプロ酸、フォルスコリン、レチノイン酸、各種阻害剤/活性剤 (例えば、A83-01、DZNep、Y27632、SB202190、PD0325901、CHIR99021)、ポリアミン類、ミネラル、糖類 (例えば、グルコース等)、有機酸 (例えば、ピルビン酸、乳酸等)、アミノ酸 (例えば、非必須アミノ酸 (NEAA)、L-グルタミン等)、還元剤 (例えば、2-メルカプトエタノール等)、ビタミン類 (例えば、アスコルビン酸、d-ビオチン等)、ステロイド、抗生物質 (例えば、ストレプトマイシン、ペニシリン等)

、界面活性剤（例えば、Tween-20、Nonidet P-40）緩衝剤（例えば、HEPES等）、栄養添加物（例えば、B27 supplement、N2 supplement、StemPro-Nutrient Supplement、KnockOut Media、GlutaMax等）を挙げることができる。これらは1種単独で、又は2種以上を組み合わせで使用することができる。各添加物は公知の濃度範囲で含まれることが好ましい。

[0046] スフェロイド形成における培養条件は、目的とするスフェロイドが形成されるものであれば特に限定されない。例えば、培養温度は、20～40℃、好ましくは34～38℃とすることができる。また、培養は3～10%CO₂雰囲気下、好ましくは、4～6%CO₂雰囲気下で実施することができる。スフェロイドを形成する培養期間は、例えば、0.5時間～14日間程度、好ましくは1日間～4日間程度である。また、任意選択で、培養期間中に1回以上、培地の交換を行うことができる。

[0047] スフェロイドの大きさとしては通常、直径が10～500μm程度、好ましくは50～200μm程度である。スフェロイドが大きくなりすぎると内部に栄養が浸透しにくくなるため、適当なサイズに達するとスフェロイドを分離するのが望ましい。得られたスフェロイドはトリプシン及び／又はコラゲナーゼによる酵素処理で細胞をばらばらにした後、再度本発明の細胞培養補助剤を用いた培養を行うことにより、繰り返しスフェロイドを形成することができる。

[0048] 培養における細胞の濃度は、スフェロイドが効率的に形成されるものであればよく、特に限定されないが、例えば、約1×10³～約1×10⁷個／well、好ましくは約3×10³～約5×10⁶個／wellが挙げられる。

[0049] 本発明の細胞培養補助剤を適用したスフェロイドの形成方法においては、本発明の細胞培養補助剤のポリペプチドが培養細胞に必要な足場剤又は接着因子のような受容体／リガンド作用を発揮して、さらにはサイトカイン、ケモカイン、ホルモン等と同様のシグナル伝達因子として作用し、細胞の自己組織化を促進することで、スフェロイドの形成が促進されと考えられる。

[0050] 本発明の別の態様において、本発明の細胞培養補助剤、及び培養細胞を含む、細胞培養系を提供する。培養細胞としては、スフェロイド形成に用いら

れる細胞として上記列挙したものが広く使用される。当該培養系を用いて多能性幹細胞又はがん幹細胞を作製する際には、体細胞又はがん細胞がそれぞれ好ましく用いられる。

[0051] 本発明の別の態様において、本発明の細胞培養補助剤を用いて細胞を培養する工程を含む、幹細胞の製造方法を提供する。

[0052] 本発明における「幹細胞」とは、幹細胞未分化マーカー遺伝子を発現する細胞であり、例えば、多能性幹細胞、がん幹細胞、体性幹細胞、間葉系幹細胞、等が挙げられる。その中でも、本発明の細胞培養補助剤は、多能性幹細胞、がん幹細胞の製造に好ましく用いられる。以下、多能性幹細胞、がん幹細胞の製造方法に関して詳述する。

[0053] <多能性幹細胞の製造方法>

本発明の別の態様において、本発明の細胞培養補助剤を用いて体細胞を培養する、多能性幹細胞の製造方法を提供する。本発明の細胞培養補助剤を用いて体細胞を培養することで、培養細胞がスフェロイドを形成し、簡便且つ効率的に多能性幹細胞を作製することができる。

[0054] 多能性幹細胞を製造する際の本発明の細胞培養補助剤の使用方法としては、例えば、本発明の細胞培養補助剤を細胞培養基材の培養面を表面処理するために使用すること、及び／又は本発明の細胞培養補助剤を培養媒体に添加して使用することが挙げられるが、これに限定されない。好ましくは、培養面が本発明の細胞培養補助剤で表面処理された細胞培養基材を用いて、体細胞を培養する。細胞培養補助剤の、細胞培養基材の培養面を表面処理するための使用、及び培養媒体への添加による使用については、<表面処理剤、添加剤としての使用>の項における記載と同様である。

[0055] 本発明の多能性幹細胞の製造に供される体細胞は、哺乳類（ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ、サル、ヒツジ、ウサギ、イヌ等）由来のものであれば特に限定されず、広く用いることができる。その中でも、ヒト、サル、マウスが好ましく、ヒトが特に好ましい。また、体細胞の種類も特に限定されず、線維芽細胞、上皮細胞、軟骨細胞、筋細胞、骨細胞、肝細胞、脾細胞、

腸内細胞、神経細胞、骨髄細胞、皮膚細胞等を広く用いることができる。また、健常者由来の体細胞であっても、疾患を持つ患者由来の体細胞であっても、本発明の多能性幹細胞の製造に用いることができる。

[0056] 多能性幹細胞の製造に用いられる培地としては、＜スフェロイド形成剤＞の項において列挙したものを広く使用することができる。

[0057] また、本発明における多能性幹細胞の製造方法においては、細胞増殖因子（例えばPDGF、TGF- β 、Activin、BMP、Noggin、LIF、R-Spondin、Wnt-3a、EGF、TP0、SCF、Neuregulin）、Mesenchymal stem cell maintenance medium、レチノイン酸等の各種分化増殖補助剤を添加する必要はない。本発明の細胞培養補助剤を使用すると、細胞増殖因子を培地に添加せずとも、体細胞から多能性幹細胞を製造することが可能である。

[0058] 多能性幹細胞の製造方法としては、本発明の細胞培養補助剤を培養面に有する細胞培養基材を用いて細胞培養を行うこと以外は、通常のスフェロイドの形成方法に準じて行うことができる。例えば、non-adhesive surface細胞培養法、hanging drop細胞培養法、micromolding techniquesの利用、rotary細胞培養法等が挙げられ、non-adhesive surface細胞培養法が特に好ましい。

[0059] 多能性幹細胞の製造における培養条件は特に限定されないが、例えば、培養温度は、20～40℃、好ましくは34～38℃とすることができる。また、培養は3～10%CO₂雰囲気下、好ましくは、4～6%CO₂雰囲気下で実施することができる。培養期間は、例えば、10～40日間程度、好ましくは15～30日間程度である。また、任意選択で、培養期間中に1回以上、培地の交換を行うことができる。また、任意選択で、培養期間中に1回以上、細胞培養基材の交換を行うことができる。

[0060] 多能性幹細胞の製造におけるスフェロイドの大きさとしては通常、直径が10～500 μ m程度、好ましくは50～200 μ m程度である。スフェロイドが大きくなりすぎると内部に栄養が浸透しにくくなるため、適当なサイズに達するとスフェロイドを分離するのが望ましい。得られたスフェロイドはトリプシン

及び／又はコラゲナーゼによる酵素処理で細胞をばらばらにした後、再度本発明の細胞培養補助剤を用いた培養を行うことにより、再び多能性幹細胞としての機能を有するスフェロイドを形成することができる。

[0061] 培養における体細胞の濃度は、多能性幹細胞が効率的に産生されるものであればよく、特に限定されないが、例えば、約 1×10^3 ～約 1×10^7 個／well、好ましくは約 3×10^3 ～約 5×10^6 個／wellが挙げられる。

[0062] 本発明の多能性幹細胞の製造方法において、幹細胞未分化マーカーの発現を確認することにより、多能性幹細胞が製造できたことを確認することができる。幹細胞未分化マーカーとしては例えば、OCT4、SOX1、SOX2、SOX3、SOX18、NANOG、Klf2、Klf4、Essrb、Sall4、Tcl1、Tcl3、c-Myc、c-Mycn、LIN28、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、AP、Fzd1-10、TGF-1等が挙げられる。

[0063] また、本発明により得られる多能性幹細胞が分化誘導能を有することの確認は、三胚葉関連遺伝子の確認により行うことができる。三胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）関連遺伝子としては、例えば、SOX17、FOXA2、Nestin、Flk1/KDRAP、Cripto、Bmp4/Wnt3、GATA4、GATA6、Brachyury、HAND1、CXCR4、SOX1、Otx-2、Pax2、Pax6、MAP2が挙げられる。

[0064] 本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞は、ES細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞、転写因子による細胞運命変換（iPS細胞）、化合物カクテル（各種サイトカイン、ホルモン、作動薬、阻害剤等）によるExtraembryonic endoderm細胞（XEN-like細胞）のような段階的胚分化の表現形質を持つもの、さらにはiPS細胞の浮遊培養で得られる胚様体（embryoid body）の特徴を持つもの等、種々の分化状態を含む不均一な細胞の集団であっても良い。

[0065] 本発明における多能性幹細胞の製造方法では、人工多能性幹細胞iPS細胞の半年～1年といった培養期間と比較し、非常に短期間（10～40日間程度）に多能性幹細胞を製造することができる。また、人工多能性幹細胞iPS細胞で知られているような、外部遺伝子の組み込みが無いことから、移植における腫瘍形成リスクがない。加えて、ヒトの皮膚組織からでも採取し易い線維芽細胞

のような体細胞を用いて、簡便に自己の多能性幹細胞を作製することが可能であるため、免疫拒絶の問題を回避することができる。そのため、移植治療応用を視野に入れた場合、本邦の再生医療安全確保法における取り扱い区分がiPS細胞の第1種再生医療等（高リスク）とは異なり、第2種再生医療等（中リスク）となることが考えられる。

[0066] さらに、本発明における多能性幹細胞の製造方法では、ダイレクト・リプログラミング法による多能性幹細胞の製造期間（約60日間）よりも短期間に多能性幹細胞を製造することができる。また、本発明における多能性幹細胞の製造方法はスフェロイド形成によるダイレクト・リプログラミング法であるため、化合物カクテルによるダイレクト・リプログラミング法よりも樹立に用いる材料組織の選択、拡大培養方法等において適用範囲が広い。

[0067] 本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞の用途は特に限定されず、各種の試験・研究、疾病の治療等に使用することができる。

[0068] ＜がん幹細胞の製造方法＞

本発明の別の態様において、本発明の細胞培養補助剤を用いてがん細胞を培養する、がん幹細胞の製造方法を提供する。本発明の細胞培養補助剤を用いてがん細胞を培養することで、細胞がスフェロイドを形成し、簡便且つ効率的にがん幹細胞を作製することができる。

[0069] がん幹細胞を製造する際の本発明の細胞培養補助剤の使用方法としては、例えば、本発明の細胞培養補助剤を細胞培養基材の培養面を表面処理するために使用すること、及び／又は本発明の細胞培養補助剤を培養媒体に添加して使用することが挙げられるが、これに限定されない。好ましくは、培養面が本発明の細胞培養補助剤で表面処理された細胞培養基材を用いて、がん細胞を培養する。細胞培養補助剤の、細胞培養基材の培養面を表面処理するための使用、及び培養媒体への添加による使用については、＜表面処理剤、添加剤としての使用＞の項における記載と同様である。

[0070] 本発明のがん幹細胞の製造に供されるがん細胞は、哺乳類（ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ、サル、ヒツジ、ウサギ、イヌ等）由来のものであれ

ば特に限定されず、広く用いることができる。その中でも、ヒト、サル、マウスが好ましく、ヒトが特に好ましい。また、がんの種類も特に限定されず、例えば大腸がん、乳がん、卵巣がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、前立腺がん、胃がん、肝臓がん、食道がん、膵臓がん、膀胱がん、胆管がん、喉頭がん、黒色腫、肺がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、甲状腺がん、多発性骨髄腫、肉腫等、広く用いることができる。また、株化細胞、患者検体由来初代培養細胞、患者検体由来継代可能細胞（PDCC）、動物移植がん組織由来がん細胞（PDOX）、実験動物由来がん細胞等、広く用いることができる。

[0071] 多能性幹細胞の製造に用いられる培地としては、＜スフェロイド形成剤＞の項において列挙したものを広く使用することができる。その中でも、DMEM/F12培地が好ましい。

[0072] また、本発明におけるがん幹細胞の製造方法においては、細胞増殖因子（例えばPDGF、TGF- β 、Activin、BMP、Noggin、LIF、R-Spondin、Wnt-3a、EGF、TPO、SCF、Neuregulin）、Mesenchymal stem cell maintenance medium、レチノイン酸等の各種分化増殖補助剤を添加する必要はない。本発明の細胞培養補助剤を使用すると、細胞増殖因子を培地に添加せずとも、がん細胞からがん幹細胞を製造することが可能である。

[0073] がん幹細胞の製造方法としては、本発明の細胞培養補助剤を培養面に有する細胞培養基材を用いて細胞培養を行うこと以外は、通常のスフェロイドの形成方法に準じて行うことができる。例えば、non-adhesive surface細胞培養法、hanging drop細胞培養法、micromolding techniquesの利用、rotary細胞培養法等が挙げられ、non-adhesive surface細胞培養法が特に好ましい。

[0074] がん幹細胞の製造における培養条件は特に限定されないが、例えば、培養温度は、20～40℃、好ましくは34～38℃とすることができる。また、培養は3～10%CO₂雰囲気下、好ましくは、4～6%CO₂雰囲気下で実施することができる。培養期間は、例えば、10～40日間程度、好ましくは15～30日間程度である。また、任意選択で、培養期間中に1回以上、培地の交換を行うことができ

る。また、任意選択で、培養期間中に1回以上、細胞培養基材の交換を行うことができる。

[0075] がん幹細胞の製造におけるスフェロイドの大きさとしては通常、直径が10～500 μm 程度、好ましくは50～200 μm 程度である。スフェロイドが大きくなりすぎると内部に栄養が浸透しにくくなるため、適当なサイズに達するとスフェロイドを分離するのが望ましい。得られたスフェロイドは細胞をばらばらにした後、再度本発明の細胞培養補助剤を用いた培養を行うことにより、再びがん幹細胞としての機能を有するスフェロイドを形成することができる。

[0076] 培養におけるがん細胞の濃度は、がん幹細胞が効率的に産生されるものであればよく、特に限定されないが、例えば、約 1×10^3 ～約 1×10^7 個/well、好ましくは約 3×10^3 ～約 5×10^6 個/wellが挙げられる。

[0077] 本発明のがん幹細胞の製造方法において、がん細胞表面マーカーの発現を確認することにより、がん幹細胞が製造できたことを確認することができる。がん細胞表面マーカーとしては例えば、CD133、CD44、CD24、ABCB5、EAS、CD34、CD38、CD90、CD117、CXCR4 等が挙げられる。

[0078] また、本発明の製造方法により得られるがん幹細胞は、幹細胞未分化マーカーの発現も確認できる。幹細胞未分化マーカーとしては、例えばOCT4、SOX1、SOX2、SOX3、SOX18、NANOG、Klf2、Klf4、Essrb、Sall4、Tcl1、Tcl3、c-MYC、c-MYCN、LIN28、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、AP、Fzd1-10、TDGF-1等が挙げられる。

[0079] 本発明の製造方法により得られるがん幹細胞は、種々のがん幹細胞を含む不均一ながん幹細胞の集団であっても良く、がん細胞をさらに含んでも良い。

[0080] 本発明の製造方法により得られるがん幹細胞の用途は特に限定されず、各種の試験・研究、疾病の治療等に使用することができる。

[0081] <幹細胞の分化誘導>

本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞を公知の方法で分化誘導す

ることにより、内胚葉系器官（例えば、肝臓、膵臓、腸管、肺、甲状腺、副甲状腺、尿路、脂肪組織、軟骨組織等）、中胚葉系器官（例えば、腎臓、尿管、心臓、血液、生殖腺、副腎皮質、筋肉、骨格、真皮、結合組織、中皮等）、外胚葉系器官（例えば、脳、脊髄、副腎髄質、表皮、毛髪・爪・皮膚腺、感覚器、末梢神経、水晶体等）の細胞へと分化することができる。さらに公知の方法を用いて、上記器官のオルガノイド、組織を製造することもできる。

[0082] 分化誘導については、ES細胞、iPS細胞等の多能性幹細胞で報告されている分化処理方法を参考に任意の細胞への分化誘導法を用いて適宜行うことができる。例えば、造血系細胞への分化誘導は、文献（Niwa A, Heike T, Saito K, et al. A Nobel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. PLoS One 2011; issue7, Vol.6, ）に記載の方法に従って行うことができる。

[0083] 本発明の方法で得られるオルガノイド、組織は、被検物質の薬効／毒性評価又は作用メカニズムの解明、あるいは生物現象メカニズムの解析に用いることが可能である。

実施例

[0084] 以下、本発明を実施例によりさらに説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0085] 実施例1：健常ヒト新生児線維芽細胞のスフェロイド培養と幹細胞未分化マーカー遺伝子の発現

（方法）

式（1）で表されるポリペプチドの水溶液（0.125%）（細胞培養補助剤）2 mLを市販のポリスチレン製6well平底培養容器（CellBIND、CORNING社）に添加し、4℃で24時間静置した。

[0086] その後、余分な細胞培養補助剤を除去し、37℃の乾燥機内で96時間乾燥して細胞培養補助剤塗布処理を完成した。健常ヒト新生児線維芽細胞（ATCC PC

S-201-010, Primary Dermal Fibroblasts, Neonatal、以下「線維芽細胞」と記載)は無血清培地(Promo Cell社; Fibroblast Basal Medium, basic-FGF 5 ng/ mL及びInsulin2.5 μ g/mL)で維持培養した。上記細胞培養補助剤塗布培養容器に、上記培地2mLに浮遊させた線維芽細胞 2×10^6 個/wellを播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下で培養した。対照として、細胞培養補助剤を塗布しない同型培養容器に線維芽細胞 2×10^6 個/wellを播種した。培養開始後2日目と20日目に顕微鏡観察を行い、スフェロイド形成状況を撮影した(図5)。

[0087] 遺伝子mRNAの発現解析はリアルタイム-PCR法で行った。線維芽細胞を上記と同じ方法でスフェロイド培養し、20日目(Day20)にスフェロイドを15mL遠心チューブに集めて遠心分離を行い、リン酸緩衝液PBS(-)で細胞を洗浄し回収した。対照の細胞培養補助剤無し培養容器で培養した細胞は(Day0)、培地を除去した後PBS(-)で洗浄し、0.05%トリプシン-EGTAで培養容器から細胞を剥離分散させて15mL遠心チューブに集め、再度PBS(-)洗浄した。回収したスフェロイド及び対照細胞からRNAを抽出して、リアルタイム-PCR法による幹細胞未分化マーカー遺伝子の発現解析を行った。

[0088] 具体的には、各細胞にNucleoZOL(マッハライ・ナーゲル社)試薬を加えて、試薬メーカー推奨プロトコールに従ってtotal-RNAを抽出し、幹細胞未分化マーカー検出の鋳型RNAとした。リアルタイム-PCR解析では、QuantiFast Probe RT-PCR Kits (QIAGEN;No.204454)とTaqMan Gene Expression Assay Probe(Thermo Fisher Scientific社)のPCRプローブを使用し、Rotor-Gene Q(QIAGEN社)装置を用いてPCR解析を行った。検出を試みた遺伝子は、スフェロイド形成に関与することが予想されるサイトカイン、ケモカイン類の他に、幹細胞未分化マーカー遺伝子の発現検出用プローブとしてiPS細胞作製(非特許文献1)で用いられる転写因子SOX2(sex-determining region Y-box 2)、OCT4(octamer binding transcription factor 4)、NANOG(homeodomain transcription factor)の3種と、内在性コントロール遺伝子として β -Actinを使用した。遺伝子発現解析では、 $\Delta\Delta$ Ct法(デルタデルタCt法)による相対定量を行った。 $\Delta\Delta$ Ct法解析の結果は、対照とする「細胞培養補助剤なし、平面2次元増

殖Day0」の細胞が発現する遺伝子量を相対的に「1.0」とし、比較する「スフェロイド増殖の20日目の発現量」の増加倍率を求めた（図6）。

[0089] （結果）

図5に、細胞培養補助剤処理培養容器を用いた線維芽細胞のスフェロイド培養結果を示した。細胞培養補助剤無しの対照容器では、線維芽細胞は底面に接着2次元増殖した（培養2日目）。一方、細胞培養補助剤塗布処理をした培養容器では、細胞が凝集体/スフェロイドを形成し3次元増殖した。培養開始2日目から20日目にかけてスフェロイドを構成する細胞が増殖してスフェロイド自体のサイズも増大した。

[0090] 図6に、遺伝子mRNAのリアルタイムPCR結果を示した。培養開始20日目の線維芽細胞スフェロイドでは、幹細胞の性質を定義するマーカータンパクSOX2、OCT4、NANOGの遺伝子発現量が増加し、幹細胞の性質を獲得している事を見出した。具体的には、対照とする細胞培養補助剤無しで培養した線維芽細胞のSOX2、OCT4、NANOG遺伝子発現量を相対的に1.0とし、3次元スフェロイド培養した20日目のSOX2、OCT4、NANOG遺伝子発現量を $\Delta\Delta Ct$ 法で相対較した。その結果、SOX2は34.4倍に増加、OCT4は5.1倍に増加、NANOGは9.1倍に増加した。

[0091] （考察）

図5では、線維芽細胞をポリプロピレン製細胞培養容器で培養すると、一般的に容器底面は親水化処理又は疎水化処理により細胞との接着性が高められているため、細胞は培養容器の底面に接着して増殖する（2次元接着増殖）。これに対して、式（1）で表されるポリペプチドの水溶液を培養容器にコーティングすると、細胞は底面に接着せず、細胞どうしが動き回り相互に凝集して3次元の立体的な細胞集合体であるスフェロイドを形成した。ヒトの身体は細胞の立体的な集合体として構築されて生命現象が営まれるため、2次元培養細胞よりも3次元培養の方が生体内組織を反映しており、様々な生理機能及び遺伝子発現が制御されている。

[0092] 図6の結果より、細胞培養補助剤処理をした培養容器で線維芽細胞をスフ

ェロイド培養すると、従来のiPS細胞製造法で用いる遺伝子を導入することなく、化合物によるdirect-reprogrammingで用いる化合物カクテルを使用することなく、多能性幹細胞の特徴を持った幹細胞を誘導できることを見出した。

[0093] 即ち、新規なdirect-reprogramming機序で体細胞の線維芽細胞から多能性幹細胞の特徴を備えた細胞を誘導できる、新規な細胞培養補助剤スフェロイド培養法を見出したと言える。

[0094] なお、幹細胞未分化マーカーのmRNA発現量増加倍率は、この数値に限定されるものではない。また、ヒト幹細胞未分化マーカーとしてはSOX2、OCT3/4、NANOG以外にもKlf4、Essrb、Sall4、Lin28、SSEA、TRA-1-60、c-MYC等が知られており、本発明はこれら実施例の3種遺伝子により限定されるものではない。

[0095] 実施例2：健常ヒト新生児線維芽細胞で作製した幹細胞の初期三胚葉への分化誘導

(方法)

健常ヒト新生児線維芽細胞のスフェロイド形成と幹細胞誘導を経時的に観察するため、96well丸底培養容器を用いた培養を行った。式(1)で表されるポリペプチドの水溶液(0.125%) (細胞培養補助剤)を市販のポリスチレン製96well丸底培養容器(Nunclon Delta 96U Bottom、Thermo Scientific社)に100 μ L/wellで添加し、4℃で24時間静置した。その後、余分な細胞培養補助剤を除去し、37℃の乾燥機内で96時間乾燥して細胞培養補助剤塗布処理を完成した。線維芽細胞は無血清培地(Promo Cell社; Fibroblast Basal Medium, basic-FGF 5 ng/mL及びInsulin2.5 μ g/mL)で維持培養した。上記細胞培養補助剤塗布培養容器に、上記培地に浮遊させた線維芽細胞 4×10^4 個/well/100 μ Lを播種し、37℃、5%CO₂条件下で培養した。

[0096] スフェロイド形成の観察は、培養開始後0日目、2日目、20日目に顕微鏡観察を行った(図7)。

[0097] 実施例1で見出した幹細胞未分化マーカー遺伝子の発現機序を経時的に調

べるため、転写因子SOX2(sex-determining region Y-box 2)、OCT4(octamer binding transcription factor 4)、NANOG (homeodomain transcription factor)の3種、及び内在性コントロール遺伝子として β -Actin のTaqMan Gene Expression Assay Probeを使用し、リアルタイム-PCR解析を行った。発現解析では $\Delta\Delta Ct$ 法（デルタデルタCt法）による相対定量を行った（図8）。

[0098] 線維芽細胞から誘導した幹細胞が分化誘導能を持つかどうかを調べるためには、分化の初期段階を示す三胚葉関連遺伝子の発現解析を行った。上記と同様の細胞培養補助剤処理96well培養容器を用いて線維芽細胞を同様の方法で培養した。三胚葉分化関連遺伝子の発現検出用プローブには、胚葉マーカー遺伝子であるSOX17(sex-determining region Y-box 17; 内胚葉)、GATA6(GATA family of zinc finger transcription factors; 中胚葉)、MAP2 (microtubule associated protein 2: 外胚葉)の3種、及び内在性コントロール遺伝子として β -Actin のTaqMan Gene Expression Assay Probeを使用し、リアルタイム-PCR解析を行った。発現解析では、 $\Delta\Delta Ct$ 法（デルタデルタCt法）による相対定量を行った（図9）。

[0099] （結果）

結果を図7に、96well丸底培養容器で線維芽細胞のスフェロイドが経時的に生長する状況を示した。細胞培養補助剤処理した96well丸底培養容器を用いることで、細胞は1個のスフェロイドを形成するため、スフェロイドごとの遺伝子発現及び生理活性を均質に測定できた。

[0100] 図8に、幹細胞未分化マーカーmRNAのリアルタイム-PCR結果を示した。その結果、線維芽細胞スフェロイドの培養開始5日目以降、幹細胞未分化マーカーSOX2、OCT4、NANOGの遺伝子発現量が経時的に増加する事を見出した。

[0101] 具体的には、対照とする細胞培養補助剤無しで2次元接着培養（Day0）した線維芽細胞のSOX2、OCT4、NANOG遺伝子発現量を相対的に1.0とし、3次元スフェロイド培養した5日目（Day5）、10日目（Day10）、20日目（Day20）のSOX2、OCT4、NANOG遺伝子発現量を $\Delta\Delta Ct$ 相対定量で比較した。いずれの遺伝子も経時的に増加して20日目に最高値を示し、SOX2は144.0倍に増加、OCT4は30

.1倍に増加、NANOGは35.4倍に増加した。

[0102] 図9では、三胚葉関連遺伝子mRNAのリアルタイムPCR結果を示した。その結果、線維芽細胞のスフェロイド培養開始5日目以降、三胚葉への分化を定義するマーカータンパクSOX17、GATA6、MAP2の遺伝子発現量が増加する事を見出した。

[0103] 具体的には、対照とする細胞培養補助剤無しで2次元接着培養（Day0）した線維芽細胞のSOX17、GATA6、MAP2遺伝子発現量を相対的に1.0とし、3次元スフェロイド培養した5日目（Day5）、10日目（Day10）、20日目（Day20）のSOX17、GATA4、MAP2遺伝子発現量を $\Delta\Delta Ct$ 相対定量で比較した。いずれの遺伝子も経時的に増加して20日目に最高値を示し、SOX17は359.6倍に増加、GATA4は4.2倍に増加、MAP2は24.2倍に増加した。

[0104] （考察）

図7では、体細胞である線維芽細胞から、多能性幹細胞の特徴を持つ幹細胞を作製（direct-reprogramming）できることを示した。さらに培養容器の形状に関しても、平底培養容器でも丸底培養容器でも同様に達成できる事を示した。

[0105] 図8では、細胞培養補助剤処理をした96well培養容器で線維芽細胞をスフェロイド培養すると、1個の均質なスフェロイドを作製できることから、精密な遺伝子発現解析が可能になる。その結果、iPS細胞作製で用いる転写因子遺伝子の導入法をとらず、さらには化合物によるdirect-reprogrammingで用いる化合物カクテルを培養液に添加することなく、SOX2、OCT4、NANOG遺伝子の発現増強を伴う多能性幹細胞に初期化（direct-reprogramming）できることを見出した。即ち、細胞培養補助剤によるスフェロイド培養法で、体細胞の線維芽細胞から多能性幹細胞の特性を備えた細胞を作製する新規なdirect-reprogramming法を発明したといえる。

[0106] 図9の結果から、線維芽細胞から作製した幹細胞が、三次元細胞集塊である胚様体（embryoid body）の形質を持つ細胞に分化誘導（differentiation）出来る事示した。一般的に幹細胞から成熟臓器細胞を分化誘導するために

は、幹細胞から一旦目的臓器系列の胚葉に分化誘導する工程が必要である。本培養方法は、従来のiPS細胞法又は化合物によるdirect-reprogramming法とは異なる機序で、体細胞から幹細胞への初期化（direct-reprogramming）をもたらし、同時にSOX17（内胚葉マーカー遺伝子）陽性、GATA6（中胚葉マーカー遺伝子）、MAP2（外胚葉マーカー遺伝子）陽性の胚葉体に分化誘導（differentiation）を実現する新規培養法であると言える。

[0107] なお、幹細胞未分化マーカー遺伝子はSOX2、OCT4、NANOG以外にもKlf4、Esrrb、Sall4、Lin28、SSEA、TRA-1-60等が知られており、本発明はこれらの遺伝子によって限定されるものではない。同様に三胚葉マーカー遺伝子もSOX17、GATA6、MAP2以外に知られており、本発明はこれらのマーカー遺伝子によって限定されるものではない。さらに、幹細胞未分化マーカーならびに三胚葉マーカーの遺伝子発現量増加率は、この数値に限定されるものではない。

[0108] 実施例3：健常ヒト新生児線維芽細胞スフェロイドにおける幹細胞マーカー蛋白質の発現

（方法）

線維芽細胞スフェロイドに幹細胞が誘導されているかを確認するため、蛍光色素標識抗体を用いた免疫染色法で、幹細胞マーカー蛋白質の発現を調べた。式（1）で表されるポリペプチドの水溶液（0.125%）（細胞培養補助剤）を用い、市販のポリスチレン製96well丸底培養容器（Nunclon Delta 96U Bottom、Thermo Scientific社）に100 μ L/wellで添加し、前述実施例2と同様の方法で細胞培養補助剤塗布処理を完成させた。線維芽細胞は無血清培地（富士フイルム和光純薬（株）；DMEM/F12培地、ヒト・血清アルブミン遺伝子組み換え体0.5mg/mL、ヒト・トランスフェリン遺伝子組み換え体 10 μ g/mL、basic-FGF 5 ng/mL及びInsulin2.5 μ g/mL）で維持培養した。上記細胞培養補助剤塗布培養容器に、上記培地に浮遊させた線維芽細胞 4×10^4 個/well/100 μ Lを播種し、37°C、5%CO₂条件下で培養した。培養開始後20日目に96well丸底培養容器からスフェロイドを回収し、4%パラホルムアルデヒド溶液で細胞固定の後、免疫染色を行った。蛍光標識抗体にはR&D system社製のヒト幹細胞

マーカー蛋白質検出用の、NL557蛍光色素標識抗SOX2抗体（オレンジ色蛍光）、NL493蛍光色素標識抗NANOG抗体（ミドリ色蛍光）、及びNL637標識抗OCT4抗体（アカ色蛍光）の3種を同時に反応させて、蛍光顕微鏡観察を行った。

[0109] （結果）

図10に、線維芽細胞スフェロイドの免疫染色による蛍光顕微鏡観察写真を示した。幹細胞マーカータンパクであるSOX2（オレンジ）、OCT4（アカ）、NANOG（ミドリ）を示す蛍光が検出され、スフェロイドを形成する細胞に3種幹細胞マーカー蛋白質を発現する幹細胞が誘導されていることが確認できた。

[0110] （考察）

図6、図8ではリアルタイム-PCR解析で、スフェロイドを形成する細胞が幹細胞未分化マーカー遺伝子を発現している事を見出した。ここでは、線維芽細胞スフェロイドに未分化マーカー遺伝子から作られるマーカー蛋白質も発現していることが分かり、幹細胞の存在が遺伝子とタンパク質の両面で確認できた。

[0111] 実施例4：健常ヒト新生児線維芽細胞スフェロイドにおける幹細胞の検出
（方法）

線維芽細胞スフェロイドに誘導された幹細胞を検出するため、蛍光色素標識抗体を用いた免疫染色法で、スフェロイド構成細胞に含まれる幹細胞を検出した。式（1）で表されるポリペプチドの水溶液（0.125%）（細胞培養補助剤）を用い、市販のポリスチレン製96well丸底培養容器（Nunclon Delta 96U Bottom、Thermo Scientific社）に100 μ L/wellで添加し、前述実施例2と同様の方法で細胞培養補助剤塗布処理を完成させた。線維芽細胞は無血清培地（富士フイルム和光純薬（株）；DMEM/F12培地、ヒト・血清アルブミン遺伝子組み換え体0.5mg/mL、ヒト・トランスフェリン遺伝子組み換え体 10 μ g/mL、basic-FGF 5 ng/mL及びInsulin2.5 μ g/mL）で維持培養した。上記細胞培養補助剤塗布培養容器に、上記培地に浮遊させた線維芽細胞2 $\times$ 10⁴個/well/100 μ Lを播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下で培養した。培養開始後20日目に96well

丸底培養容器からスフェロイドを無菌的に回収し、アキュターゼ酵素試薬で細胞を分散した後、免疫染色用培養器（MilliCell Chamber、ミリポア社）に移して同一培地で培養を継続した。24時間後に4%パラホルムアルデヒド溶液で細胞を固定し、免疫染色を行った。蛍光標識抗体にはR&D system社製のNL493蛍光色素標識抗NANOG抗体（ミドリ色蛍光）を使用し、蛍光顕微鏡観察を行った。

[0112] （結果）

図11に、スフェロイドを分散させて得た細胞集団内にNANOG蛋白陽性の幹細胞が存在する事を示した。図11では大多数の線維芽細胞の核はNANOG陰性であるが、細胞の核部分にNANOG抗体陽性のミドリ色蛍光を強く示すものが認められ、幹細胞マーカー細胞が誘導できている事を示した。

[0113] （考察）

NANOG蛋白はホメオボックス転写因子であり、細胞質で作られて核内に移行し、幹細胞の多能性維持に重要な役割を果たしている。スフェロイド全体で幹細胞マーカー蛋白が確認できたこと（図10）に加え、細胞レベルにおいても核内NANOG蛋白陽性の幹細胞を誘導できることを示した。

[0114] 実施例5：ヒト成人皮膚線維芽細胞のスフェロイド培養による幹細胞の作製（方法）

健常ヒト成人皮膚線維芽細胞で幹細胞を誘導（direct-reprogramming）するために、実施例2と同様の方法で成人皮膚線維芽細胞を培養しスフェロイドを形成させた。式（1）で表されるポリペプチドの水溶液（0.125%）（細胞培養補助剤）を市販のポリスチレン製96well丸底培養容器（Nunc lon Delta 96U Bottom、Thermo Scientific社）に添加し、4℃で24時間静置した。その後、細胞培養補助剤を除去し、37℃の乾燥機内で96時間乾燥して細胞培養補助剤塗布処理を完成した。健常ヒト成人皮膚線維芽細胞（Lonza社、Normal Human Dermal Fibroblast-Adult、以下「成人皮膚線維芽細胞」と記載）は無血清培地（富士フイルム和光純薬（株）；DMEM/F12培地、ヒト・血清アルブミン遺伝子組み換え体0.5mg/mL、ヒト・トランスフェリン遺伝子組み換え体 10

$\mu\text{g/mL}$ 、basic-FGF 5 ng/ mL及びInsulin $2.5\mu\text{g/mL}$)で維持培養した。上記細胞培養補助剤塗布96well丸底培養容器を使用し、上記培地 $100\mu\text{L}$ に浮遊させた成人皮膚線維芽細胞 2×10^4 個/wellを播種し、それぞれ 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で培養した。

[0115] 幹細胞マーカー遺伝子の検出は、リアルタイム-PCR法でmRNAの発現解析を行った。具体的には、培養開始20日目 (Day20) にスフェロイドを15mL遠心チューブに集めて遠心分離を行い、リン酸緩衝液PBS(-)で細胞を洗浄し回収した。対照の細胞培養補助剤無し培養容器で2次元培養した細胞は (Day0) 、培地を除去した後PBS(-)で洗浄し、 0.05% トリプシン-EGTAでプレートから細胞を剥離分散させて15mL遠心チューブに集め、再度PBS(-)洗浄した。スフェロイドにNucleoZOL(マッハライ・ナーゲル社)試薬を加えて、試薬メーカー推奨プロトコールに従ってRNAを抽出し鋳型RNAとした。リアルタイム-PCR解析では、QuantiFast Probe RT-PCR Kits (QIAGEN;No.204454)とTaqMan Gene Expression Assay Probe(Thermo Fisher Scientific社)のPCRプローブを使用し、Rotor-Gene Q(QIAGEN社)装置を用いてPCR解析した。遺伝子の検出には、幹細胞未分化マーカー遺伝子の発現検出用プローブとして、転写因子SOX2(sex-determining region Y-box 2)、OCT4(octamer binding transcription factor 4)、NANOG(homeodomain transcription factor)の3種と、内在性コントロール遺伝子として β -Actinを使用した(図13)。

[0116] スフェロイドに誘導した幹細胞が初期三胚葉に分化できるかを調べるため、三胚葉マーカー遺伝子発現をリアルタイム-PCR法で調べた。検出用プローブには、三胚葉マーカー遺伝子であるSOX17(sex-determining region Y-box 17; 内胚葉)、GATA6(GATA family of zinc finger transcription factors; 内胚葉)、HAND1(Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 1; 中胚葉)、SOX1(HMG-box (high mobility group) DNA-binding domain; 外胚葉)の4種、及び内在性コントロール遺伝子として β -ActinのTaqMan Gene Expression Assay Probeを使用した(図14)。

遺伝子発現解析では、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法(デルタデルタCt法)による相対定量を行っ

た。ΔΔCt法解析の結果は、対照とする「細胞培養補助剤なし、平面2次元増殖Day0」の細胞が発現する遺伝子量を相対的に「1.0」とし、比較する「スフェロイド増殖の20日目の発現量」の増加倍率を求めた。

[0117] (結果)

図12に、細胞培養補助剤処理培養容器を用いた成人皮膚線維芽細胞のスフェロイド培養結果を示した。細胞培養補助剤無しの対照容器では、成人皮膚線維芽細胞は底面に接着2次元増殖した(培養2日目)。一方、細胞培養補助剤塗布処理をした培養容器では、細胞がスフェロイドを形成し3次元増殖した。

[0118] 図13に、遺伝子mRNAのリアルタイムPCR結果を示した。

培養開始20日目の成人皮膚線維芽細胞スフェロイドでは、幹細胞の性質を定義するマーカー蛋白SOX2、OCT4、NANOGの遺伝子発現量が増加し、幹細胞の性質を獲得している事を見出した。具体的には、2次元培養した対照細胞のSOX2、OCT4、NANOG遺伝子発現量を相対的に1.0とし、3次元スフェロイド培養した20日目のSOX2、OCT4、NANOG遺伝子発現量をΔΔCt法で相対較した。その結果、SOX2は9.4倍に増加、OCT4は13.0倍に増加、NANOGは50.5倍に増加した。

[0119] 図14に、同様に三胚葉への分化を定義するマーカー蛋白SOX17、GATA6、HAND1、SOX1の発現量が増加する事を示した。対照細胞のSOX17、GATA6、HAND1、SOX1遺伝子発現量を相対的に1.0とし、3次元スフェロイド培養した20日目(Day20)のSOX17、GATA4、MAP2遺伝子発現量をΔΔCt相対定量で比較した。いずれの遺伝子も発現量が増加し、SOX17は11.4倍に増加、GATA6は2.2倍に増加、HAND1は33.9倍に増加、SOX1は7.1倍に増加した。

[0120] (考察)

これまで化合物による体細胞ダイレクト・リプログラミング技術では、マウスの胎児線維芽細胞又は成体線維芽細胞を使用した幹細胞誘導の実験が報告されている。しかしながら、ヒト成人由来の線維芽細胞への応用技術は未だに確立されていない。ここでは、ヒト新生児由来の線維芽細胞に加えて成人皮膚線維芽細胞においても、本発明の細胞培養補助剤で、安定して再現性

良く幹細胞を作製できる方法を見出したと言える。

[0121] 患者個人の最も低侵襲で検体採取し易い皮膚由来線維芽細胞を用いて、細胞培養補助剤スフェロイド培養法により幹細胞を誘導できることから、個別化再生治療、個別化診断法・治療薬スクリーニングへの実用技術となる。

[0122] 実施例6：健常ヒト成人乳腺上皮細胞のスフェロイド培養と幹細胞未分化マーカー遺伝子の発現

(方法)

式(1)で表されるポリペプチドの水溶液(0.125%) (細胞培養補助剤)を市販のポリスチレン製6well平底培養容器(CellBIND、CORNING社)、あるいはポリスチレン製96well丸底培養容器(Nuncclon Delta 96U Bottom、Thermo Scientific社)に添加し、4℃で24時間静置した。

[0123] その後、細胞培養補助剤を除去し、37℃の乾燥機内で96時間乾燥して細胞培養補助剤塗布処理を完成した。健常ヒト成人乳腺上皮細胞(ATCC PCS-600-010, Primary Mammary Epithelial Cells、以下「乳腺上皮細胞」と記載)は無血清培地(Promo Cell社; Mammary Epithelial Cell Growth Medium, EGF 5 ng/mL及びInsulin2.5μg/mL)で維持培養した。上記細胞培養補助剤塗布培養容器に、6well平底培養容器の場合は上記培地2mLに浮遊させた乳腺上皮細胞 2×10^6 個/wellを播種し、96well丸底培養容器の場合は上記培地100μLに浮遊させた乳腺上皮細胞 2×10^4 個/wellを播種し、それぞれ37℃、5%CO₂条件下で培養した。対照として、細胞培養補助剤を塗布しない同型培養容器に乳腺上皮細胞を同様条件で播種した。培養開始後2日目と20日目に顕微鏡観察を行い、スフェロイド形成状況を撮影した(図15)。

[0124] 体細胞の乳腺上皮細胞から幹細胞を誘導(direct-reprogramming)できるかを調べるため、細胞培養補助剤処理をした96well培養容器で乳腺上皮細胞を培養しスフェロイドを形成させた。遺伝子mRNAの発現解析はリアルタイムPCR法で行った。

[0125] 具体的には、培養開始20日目(Day20)にスフェロイドを15mL遠心チューブに集めて遠心分離を行い、リン酸緩衝液PBS(-)で細胞を洗浄し回収した。対

照の細胞培養補助剤無し培養容器で2次元培養した細胞は (Day0)、培地を除去した後PBS(-)で洗浄し、0.05%トリプシン-EGTAでプレートから細胞を剥離分散させて15mL遠心チューブに集め、再度PBS(-)洗浄した。スフェロイドにNucleoZOL(マッハライ・ナーゲル社)試薬を加えて、試薬メーカー推奨プロトコールに従ってRNAを抽出し鋳型RNAとした。リアルタイム-PCR解析では、QuantiFast Probe RT-PCR Kits (QIAGEN;No.204454)とTaqMan Gene Expression Assay Probe(Thermo Fisher Scientific社)のPCRプローブを使用し、Rotor-Gene Q(QIAGEN社)装置を用いてPCR解析した。検出を試みた遺伝子は、幹細胞未分化マーカー遺伝子の発現検出用プローブとして、転写因子SOX2(sex-determining region Y-box 2)、OCT4(octamer binding transcription factor 4)、NANOG(homeodomain transcription factor)の3種と、内在性コントロール遺伝子として β -Actinを使用した(図16)。

[0126] 初期三胚葉分化関連遺伝子の検出用プローブには、三胚葉マーカー遺伝子であるSOX17(sex-determining region Y-box 17; 内胚葉)、GATA4(GATA family of zinc finger transcription factors; 中胚葉)、MAP2 (microtubule associated protein 2: 外胚葉)の3種、及び内在性コントロール遺伝子として β -Actin のTaqMan Gene Expression Assay Probeを使用した(図17)。

[0127] 遺伝子発現解析では、 $\Delta\Delta$ Ct法(デルタデルタCt法)による相対定量を行った。 $\Delta\Delta$ Ct法解析の結果は、対照とする「細胞培養補助剤なし、平面2次元増殖Day0」の細胞が発現する遺伝子量を相対的に「1.0」とし、比較する「スフェロイド増殖の20日目の発現量」の増加倍率を求めた。

[0128] (結果)

図15に、細胞培養補助剤処理培養容器を用いた乳腺上皮細胞のスフェロイド培養結果を示した。細胞培養補助剤無しの対照容器では、乳腺上皮細胞は底面に接着し平面2次元増殖が見られた(培養2日目)。一方、細胞培養補助剤塗布処理をした培養容器では、細胞が自己組織化してスフェロイドを形成し3次元増殖した。培養開始2日目から20日目にかけてスフェロイドを構成する細胞が増殖してスフェロイド自体のサイズも増大した。

- [0129] 図16に、乳腺上皮細胞から誘導 (direct-reprogramming) した幹細胞未分化マーカー遺伝子の発現を調べるため、mRNAのリアルタイムPCR解析結果を示した。その結果、乳腺上皮細胞2次元接着培養 (Day0) に比べ、スフェロイドの培養開始20日目 (Day20) に幹細胞未分化マーカータンパクSOX2、OCT4、NANOGの遺伝子発現量が増加する事を見出した。
- [0130] 具体的には、対照とする細胞培養補助剤無しで2次元接着培養した乳腺上皮細胞のSOX2、OCT4、NANOG遺伝子発現量を相対的に1.0とし、3次元スフェロイド培養した20日目 (Day20) のSOX2、OCT4、NANOG遺伝子発現量を $\Delta\Delta Ct$ 相対定量で比較した。いずれの遺伝子も20日目に増加しており、SOX2は24.0倍、OCT4は1.5倍、NANOGは28.7倍に増加した。
- [0131] 図17に、初期三胚葉関連遺伝子mRNAのリアルタイムPCR結果を示した。その結果、乳腺上皮細胞のスフェロイド培養開始20日目に、三胚葉への分化を定義するマーカー遺伝子のうちSOX17、MAP2の遺伝子発現量が増加する事を見出した。
- [0132] 具体的には、対照とする細胞培養補助剤無しで2次元接着培養 (Day0) した乳腺上皮細胞のSOX17、GATA4、MAP2遺伝子発現量を相対的に1.0とし、3次元スフェロイド培養した20日目 (Day20) のSOX17、GATA4、MAP2遺伝子発現量を $\Delta\Delta Ct$ 相対定量で比較した。その結果、培養開始20日目にSOX17は14.7倍、MAP2は24.2倍に増加した。一方、中胚葉マーカーのGATA4遺伝子発現は検出されなかった。
- [0133] (考察)
- 図15の結果から、成人乳腺上皮細胞においても、多能性幹細胞の特徴を持つ幹細胞を作製 (direct-reprogramming) できることを示した。さらに培養容器の形状に関しても、平底培養容器でも丸底培養容器でも同様に達成できる事示した。
- [0134] 図16では、細胞培養補助剤処理をした96well培養容器で乳腺上皮細胞をスフェロイド培養すると、1個の均質なスフェロイドを作製できることから、精密な遺伝子発現解析が可能になる。その結果、iPS細胞作製で用いる転写因

子遺伝子の導入法をとらず、さらには化合物によるdirect-reprogrammingで用いる化合物カクテルを培養液に添加することなく、SOX2、OCT4、NANOG遺伝子の発現増強を伴う多能性幹細胞に初期化（direct-reprogramming）できることを見出した。即ち、細胞培養補助剤によるスフェロイド培養法で、体細胞の乳腺上皮細胞から多能性幹細胞の特性を備えた細胞を作製する新規なdirect-reprogramming法を発明したといえる。

[0135] 図17の結果から、乳腺上皮細胞から本法で作製した幹細胞が、各種臓器細胞に分化する初期段階の三胚葉体に分化誘導(differentiation)出来る事を示した。一般的に幹細胞から成熟臓器細胞を分化誘導するためには、幹細胞から一旦目的臓器系列の胚葉に分化誘導する工程が必要である。本培養方法は、従来のiPS細胞法、化合物によるdirect-reprogramming法とは異なる機序で、体細胞から幹細胞への初期化（direct-reprogramming）をもたらし、同時にSOX17（内胚葉マーカー遺伝子）陽性、MAP2（外胚葉マーカー遺伝子）陽性の胚様体に分化誘導（differentiation）を実現する新規培養法であると言える。

[0136] なお、幹細胞未分化マーカー遺伝子はSOX2、OCT4、NANOG以外にもKlf4、Esrrb、Sall4、Lin28等が知られており、本発明はこれらの遺伝子によって限定されるものではない。同様に初期三胚葉マーカー遺伝子もSOX17、GATA4、MAP2以外に知られており、本発明はこれらのマーカー遺伝子によって限定されるものではない。さらに、幹細胞マーカーならびに初期三胚葉体マーカーの遺伝子発現量増加率は、この数値に限定されるものではない。

[0137] 実施例7：がん細胞の2次元接着培養と3次元スフェロイド培養
(方法)

式(1)で表されるポリペプチドの水溶液(0.125%)（細胞培養補助剤）2 mLを市販のポリスチレン製6well平底培養容器（CellBIND、CORNING社）に添加し、4℃で24時間静置した。

[0138] その後、細胞培養補助剤を除去し、37℃の乾燥機内で96時間乾燥して細胞培養補助剤塗布処理を完成した。ヒトがん細胞として、一般的ながん細胞株

であるA549細胞（ヒト肺がん細胞、ATCC CCL-185, carcinoma）、ES2細胞（ヒト卵巣がん細胞、ATCC CRL-1978, clear cell carcinoma）、HOS-143細胞（ヒト骨肉腫細胞、ATCC CRL-8303, osteosarcoma）を用いた。それぞれのがん細胞を 2×10^5 個/well/ $100 \mu\text{L}$ の条件で培養容器に播種し、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した。培地はDMEM培地に10%FBS、ペニシリン／ストレプトマイシンを添加したものを使用した。対照として、細胞培養補助剤を塗布しない同型培養容器にがん細胞 2×10^6 個/wellを播種した。培養開始後4日目、15日目に顕微鏡観察を行い、スフェロイド形成状況を撮影した（図18）。

[0139] （結果）

結果を図18に示す。細胞培養補助剤無しの培養容器では、細胞は底面に接着して増殖した（2次元接着増殖）。一方、細胞培養補助剤を処理した培養容器では、細胞が凝集体を形成し複数個のスフェロイドを形成した。培養開始4日目から15日目にかけてスフェロイドを構成する細胞が増殖してスフェロイド自体のサイズも増大することが見られた。

[0140] （考察）

実施例1～6の結果と同様に、がん細胞においても、スフェロイドを形成することが明らかとなった。2次元培養したがん細胞に比べ3次元スフェロイド培養したがん細胞は生体内の病状に近い特性を現すと言われている。換言すると、がん細胞を3次元培養できると、培養容器の中でがんの病状を反映したモデルを作製できると言える。

[0141] 式（1）で表されるポリペプチド細胞培養補助剤は、3種のがん細胞株A549細胞（肺がん）、ES2（卵巣がん）、HOS-143B（骨肉腫）を同様にスフェロイド形成させたことから、これら3種細胞に限定された反応ではなく、広く共通してインビトロの（in vitro；培養容器内）がんモデルを提供できる方法と言える。

[0142] 実施例8：細胞培養補助剤の濃度の検討

（方法）

式（1）で表されるポリペプチドの水溶液（0.5%）の4倍希釈～1024倍希釈

まで希釈液（細胞培養補助剤）を調製し、これを100 μ lずつ市販の96 well平底プレート（CellBIND、corning社）のwellへ添加し、4℃で16時間放置した。

[0143] その後、余分な細胞培養補助剤を除去し、室温で減圧乾燥を24時間行った。

細胞培養補助剤でコーティングされた培養プレートにHOS-143B（ヒト骨肉腫）を3,000 cells/well播種し、37℃、5% CO₂条件下で培養した。培地はDMEM+10%FBSを用いた。

[0144] 3日間培養後、顕微鏡を用いて細胞を観察した。

[0145] （結果）

結果を図19に示す。式（1）で表されるポリペプチドの水溶液の256倍希釈溶液までのコートプレートにおいて、スフェロイドの形成が認められ、さらに希釈したものでは、スフェロイドの形成が認められなかった。

[0146] （考察）

式（1）で表されるポリペプチドの水溶液のスフェロイド形成能には濃度依存性があることが明らかとなった。

[0147] 実施例9：プレート形状に関する検討

（方法）

式（1）で表されるポリペプチドの水溶液（0.125%）（細胞培養補助剤）を200 μ lずつ市販の96 well平底プレート（Thermofisher社）、V底プレート（Thermofisher社）、U底プレート（Thermofisher社）のwellへ添加し、4℃で16時間放置した。

[0148] その後、余分な細胞培養補助剤を除去し、室温で減圧乾燥を24時間行った。

[0149] 細胞培養補助剤でコーティングされた培養プレートにHeLa細胞（ヒト子宮頸部類上皮がん、JCRB9004, 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所）及びHOS-143B（ヒト骨肉腫）を2,000 cells/well播種し、37℃、5% CO₂条件下で培養した。培地はDMEM+10%FBSを用いた。2日間培養後、顕微鏡を用い

て細胞を観察した。

[0150] (結果)

結果を図20に示す。コートなしのwellでは、細胞は接着伸展が見られた。一方、式(1)で表されるポリペプチドの水溶液をコートしたV底プレートでは1つのスフェロイド形成がみられ、U底プレートでは数個のスフェロイドの形成がみられた。平底プレートでは数多くの小さなスフェロイド形成が見られた。

[0151] (考察)

式(1)で表されるポリペプチドをコートしたプレートでは、どのような形状のプレートでも、スフェロイド(細胞塊)を形成することが確認できた。

[0152] 実施例10：アポトーシスの誘導抑制に関する検討

(方法)

プレート底面の形状の異なる二種類の96 well細胞培養用プレート { (U字底プレート#163320;Corning, NY, USA) 、 (V字底プレート#277143;Thermo Fisher Scientific, MA, USA) } に二種類の濃度の式(1)で表されるポリペプチドの水溶液(0.5%溶液を4倍希釈と8倍希釈したもの)を各々100 μ L/well、200 μ L/wellずつ注入し、4℃で一晩静置した。その後、余分な細胞培養補助剤を除去し、クリーンベンチ内で約6時間乾燥して細胞培養補助剤処理を完成した。細胞株2種(イヌ尿細管由来 MDCK II細胞及びHOS-143B細胞)をそれぞれ3,000 個/well/100 μ Lとなるよう播種し、37℃ 5% CO₂雰囲気下のインキュベーター内で6日間培養した。対照は、細胞培養補助剤なしのプレートで培養した。3日後及び6日後にCaspase活性測定キット(Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay kit; Promega, WI, USA)を用いて1 well中のアポトーシス活性を測定した。すなわち、蛍光前駆基質、bis-(N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-aspartic acid amide)rhodamine 110(Z-DEVD-rhodamine 110)を付属のバッファーを用いて100倍濃度となるよう希釈したものを50 μ Lずつwell内に添加し、well内のスフェロイドを崩さないようプレートを穏やかに揺

らすことにより混和した後、室温にて1時間静置した。その後、培養液を100 μ Lずつ黒色の96 well細胞培養用プレート（#237105;Thermo Fisher Scientific, MA, USA）に移し、プレートリーダーを用いて蛍光590nm（励起光560nm）の値を測定した。細胞を加えず試薬のみの値をblank値として測定値より差し引いた値を用いて、各培養日数における測定値とし、式（1）で表されるポリペプチドの水溶液でコーティングしていないプレート（対照）と比較した相対値をプロットした。

[0153] （結果）

結果を図21及び図22に示す。式（1）で表されるポリペプチドの水溶液でコーティングしていないプレートでの培養細胞に比較して、MDCK II及びHOS-143Bのいずれの細胞においても、式（1）で表されるポリペプチドの濃度に依存して、アポトーシスが抑制されることを見出した。なお、アポトーシスの抑制効果は、培養6日目の方が顕著であった。

[0154] （考察）

従来、初代培養細胞のアノイキスによる細胞死、スフェロイド形成細胞に発生するスフェロイド中心部分のアポトーシス、ネクローシスの誘導による生細胞減少が3次元スフェロイド培養のが大きな問題であった。しかし、本発明の細胞培養補助剤は、細胞のスフェロイド形成時のアポトーシス誘導を抑制しており、スフェロイドを用いた幹細胞製造のみならず創薬研究、医療応用に極めて有用であることを見出した。

[0155] 実施例11：がん幹細胞マーカーの遺伝子発現検出

（方法）

実施例7と同様の方法で、細胞培養補助剤処理培養容器を完成し、実施例7と同様の3種がん細胞を培養した。培養開始4日と15日目に、各培養容器から3種がん細胞スフェロイドそれぞれを15mL遠心チューブに集めて遠心分離を行い、リン酸緩衝液PBS(-)で細胞を洗浄した。対照の細胞培養補助剤無しプレートで培養したがん細胞は、培地を除去した後PBS(-)で洗浄し、0.05%トリプシン-EGTAでプレートから細胞を剥離分散させて15mL遠心チューブに集め、

再度PBS(-)洗浄した。回収したスフェロイド及び対照細胞からmRNAを抽出して、リアルタイムPCR法によるがん幹細胞マーカー遺伝子の発現解析を行った。

[0156] 具体的には、各細胞にNucleoZOL(マッハライ・ナーゲル社)試薬を加えて、試薬メーカー推奨プロトコールに従ってRNAを抽出し、幹細胞マーカー検出の鋳型RNAとした。リアルタイム-PCR解析では、QuantiFast Probe RT-PCR Kits (QIAGEN;No.204454)とTaqMan Gene Expression Assay Probe(Thermo Fisher Scientific社)のPCRプローブを使用し、Rotor-Gene Q(QIAGEN社)装置を用いてPCR解析を行った。がん幹細胞マーカー遺伝子の発現検出用プローブには、CD24 (mucin-type glycoprotein, ligand for P-selectin, Oncogene)、CD44(cell surface glycoprotein involved cell-cell interaction, adhesion and migration, cancer stem cell marker)、CD133(five transmembrane glycoprotein, stem cell marker and cancer stem cell marker protein)PCRプローブの3種を使用した。内在性コントロール遺伝子には、 β -Actinを用いた。幹細胞未分化マーカー遺伝子の発現検出用プローブは、iPS細胞作製で用いられる転写因子SOX2(sex-determining region Y-box 2)、OCT4(octamer binding transcription factor 4)、NANOG(homeodomain transcription factor)の3種と、内在性コントロール遺伝子として β -Actinを使用した。遺伝子発現解析では、 $\Delta\Delta Ct$ 法(デルタデルタCt法)による相対定量を行った。 $\Delta\Delta Ct$ 法解析の結果は、対照とする「細胞培養補助剤なし、2次元接着増殖4日目」の細胞が発現する遺伝子量を相対的に「1.0」とし、比較する「スフェロイド増殖の15日目の発現量」の増加倍率を求めた(図23~25)。

[0157] (結果)

がん幹細胞マーカー遺伝子の発現結果を図23、24、25に示す。

[0158] 図23ではA549肺がん細胞におけるがん幹細胞マーカーCD24、CD44、CD133の遺伝子発現量が、培養時間の経過(4日目から15日目)とともに増加する事を見出した。

[0159] 具体的には、スフェロイド培養4日目にCD24は2.2倍に増加、15日目に4.2倍

に増加、CD44は4日目に1.6倍、15日目に2.9倍に増加、CD133は4日目に3.4倍に増加、15日目に13.5倍に増加した。

[0160] 図24では、ES2卵巣がん細胞におけるCD24の遺伝子発現量が、スフェロイド培養4日目に11.6倍に増加、15日目に63.2倍に増加した。CD44は4日目に1.3倍に増加、15日目に2.9倍に増加した。CD133は接着増殖細胞では検出されなかったため、スフェロイド培養した4日目を対照値1.0とした場合に15日目には8.5倍に増加した。

[0161] 図25では、HOS-143B骨肉腫細胞のCD24が4日目に1.34倍に増加、15日目に1.2倍に増加し、CD44は4日目に2.3倍に増加、15日目に1.9倍に増加し、CD133は4日目に0.3倍に減少したものの15日目には2.1倍に増加した。

[0162] (考察)

A549細胞、ES2細胞、HOS-143細胞は、接着増殖する細胞として樹立されたがん細胞株である。がん細胞分化ヒエラルキーでは、がん幹細胞から分化程度が進行した“分化型がん細胞株”として分類されている。従って、通常の2次元接着培養した細胞では、CD24、CD44、CD133のがん幹細胞マーカー遺伝子は発現していないか、非常に低レベルの発現であることが分かっている。こうしたがん細胞を、本発明の細胞培養補助剤で培養すると、3次元構造をもったスフェロイドを形成して増殖し、培養4日目以降から15日目にはがん幹細胞の指標であるCD24、CD44、CD133遺伝子の発現が増大することを見出した。

[0163] 従来、がん幹細胞を取得するためには、がん患者検体から摘出したがん組織をマウスに移植する方法、がん組織からセルソーターで分取した微量のがん幹細胞を、多くの高額な増殖因子・ホルモンを添加した培養液で長期間かけて増やすことが行われてきた。こうしたなか本培養法は、細胞培養補助剤培養のみで簡便かつ大量のがん幹細胞を作製する方法を提供するものと言える。

[0164] なお、がん幹細胞マーカーとしてはCD24、CD44、CD133以外にも知られているが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

[0165] 実施例12：がん細胞における幹細胞未分化マーカー転写因子の遺伝子発現

検出

(方法)

実施例 7 及び 1 1 と同様の方法で培養容器のコーティングを完成し、3種がん細胞A549細胞、ES2細胞、143B細胞を培養した。幹細胞未分化マーカー遺伝子の発現検出用プローブには転写因子SOX2(sex-determining region Y-box 2)、OCT4(octamer binding transcription factor 4)、NANOG(homeodomain transcription factor)の3種と、内在性コントロール遺伝子として β -Actin を使用した。遺伝子発現解析では、 $\Delta\Delta$ Ct法(デルタデルタCt法)による相対定量を行った。 $\Delta\Delta$ Ct法解析の結果は、対照とする「細胞培養補助剤なし、2次元接着増殖4日目」の細胞が発現する遺伝子量を相対的に「1.0」とし、比較する「スフェロイド増殖の15日目の発現量」の増加倍率を求めた(図 2 6 ~ 2 8)。

[0166] (結果)

図 2 6 では、A549肺がん細胞における幹細胞未分化マーカーSOX2、OCT4、NANOGの遺伝子発現量が、経時的に(4日目から15日目にかけて)増加する事を示した。

[0167] 具体的には、SOX2は4日目に5.0倍、15日目に6.0倍に増加し、OCT4は4日目に1.6倍、15日目に3.7倍に増加し、NANOGは4日目に10.6倍に増加、15日目に55.7倍に増加した。

[0168] 図 2 7 では、ES2卵巣がん細胞のSOX2が4日目に1.1倍で変化無し、15日目に3.4倍に増加し、OCT4は4日目に2.6倍に増加、15日目に4.6倍に増加し、NANOGは4日目に3.9倍に増加、15日目には10.9倍に増加した。

[0169] 図 2 8 では、HOS-143B骨肉腫細胞のSOX2が4日目に3.5倍に増加、15日目に11.6倍に増加し、OCT4は4日目に2.5倍に増加、15日目に2.4倍に増加し、NANOGは4日目に1.6倍に増加、15日目には1.4倍に増加した。

[0170] (考察)

SOX2、OCT4、NANOG等の幹細胞未分化マーカー遺伝子は、一部のがん組織において発現していることが臨床上知られている。従来SOX2、OCT4、NANOG 転

写因子はES細胞、iPS細胞が持つ幹細胞未分化マーカーであることから、これらの遺伝子発現を伴うがん細胞は「がん幹細胞」の特性を有すると考えられている。ここで用いたA549細胞、ES2細胞、HOS-143細胞では、SOX2、OCT4、NANOG等の幹細胞未分化マーカー遺伝子は発現していないか非常に低レベルの発現であることが分かっている。こうしたなか、これら3種がん細胞を本発明の細胞培養補助剤で培養すると、3次元構造をもったスフェロイドを形成して増殖し、培養4日目以降から15日目には幹細胞のマーカーであるSOX2、OCT4、NANOG遺伝子の発現が増大することを見出した。

[0171] 以上より、本細胞培養補助剤でがん細胞を培養することで、簡便かつ大量に、SOX2、OCT4、NANOGの幹細胞未分化マーカー遺伝子が発現し、かつCD24、CD44、CD133のがん幹細胞マーカー遺伝子発現を伴うがん幹細胞の作製方法を発明するに至った。

[0172] なお、がん幹細胞未分化マーカーとしては、SOX2、OCT4、NANOG以外にも知られているが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

請求の範囲

- [請求項1] 下記式（１）で表されるポリペプチドを含む、細胞培養補助剤。
(Pro-Hyp-Gly) n （１）
（式中、Hypはヒドロキシプロリンを表し、 n は2～1000の整数を表す）
- [請求項2] 幹細胞の製造に用いられる、請求項１に記載の細胞培養補助剤。
- [請求項3] 前記幹細胞が、多能性細胞又はがん幹細胞である、請求項２に記載の細胞培養補助剤。
- [請求項4] スフェロイド形成に用いられる、請求項１に記載の細胞培養補助剤。
- [請求項5] 下記式（１）で表されるポリペプチドを含む、スフェロイド形成剤。
(Pro-Hyp-Gly) n （１）
（式中、Hypはヒドロキシプロリンを表し、 n は2～1000の整数を表す）
- [請求項6] 請求項１～４のいずれか１項に記載の細胞培養補助剤又は請求項５に記載のスフェロイド形成剤で培養面が表面処理された、細胞培養基材。
- [請求項7] 請求項１～４のいずれか１項に記載の細胞培養補助剤又は請求項５に記載のスフェロイド形成剤、及び培養細胞を含む、細胞培養系。
- [請求項8] 請求項１～４のいずれか１項に記載の細胞培養補助剤又は請求項５に記載のスフェロイド形成剤を用いて細胞を培養する工程を含む、幹細胞の製造方法。
- [請求項9] 前記幹細胞が、SOX2、OCT4、NANOGから選択される少なくとも１種の幹細胞未分化マーカー遺伝子を発現する、請求項８に記載の製造方法。
- [請求項10] 前記幹細胞が、多能性幹細胞又はがん幹細胞である、請求項８に記載の製造方法。
- [請求項11] 請求項８に記載の方法により得られる幹細胞を用いた、組織の製造方法。