明　細　書

発明の名称 ：

未分化細胞が除去された分化誘導細胞集団、その利用及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、未分化細胞が除去された分化誘導細胞集団、その利用及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団について、研究開発が盛んに行われている。これらの細胞集団（多能性幹細胞加工製品）は、医薬（細胞医薬品）として、あるいは創薬や発生等における研究ツールとしての有用性が注目されている。医薬として利用される場合はヒトの細胞が主に用いられるが、研究ツールとして利用する場合は特にヒト細胞に限定されず、幅広い生物由来の細胞が用いられている。目的に応じて、ｉＰＳ細胞やＥＳ細胞等の多能性幹細胞が幅広く利用されている。

[0003] しかし、これらの分化誘導細胞集団においては、未分化な状態のままの多能性幹細胞の残存及び混入が避けられない。いずれの目的で利用するにせよ、分化誘導細胞の純度は高いほうが好ましいため、この点は問題となる。特に、多能性幹細胞を用いる場合、未分化のままでは造腫瘍性を有するなど、分化誘導細胞集団に未分化多能性幹細胞が混入していると、医薬として用いる場合、安全面のリスクを伴う。

[0004] そのため、分化誘導細胞集団の純度をより向上させる技術が種々提案されている。これらの技術は、主に分化誘導効率を向上させる技術群と、分化誘導細胞を純化・精製する技術群とに大別される。後者としては、分化誘導細胞を選択的に選り分ける技術（ポジティブセレクション）と、不可避的に混入する未分化多能性幹細胞を除去する技術（ネガティブセレクション）とにさらに分けられる。分化誘導細胞を純化・精製する技術として提案されてい

るものを手法の違いによって整理すると、以下の通りとなる。例えば、特殊培地を用いたアプローチとして、メチオニン（－）培地を利用する方法（非特許文献１及び２）、及び無糖培地を利用する方法（非特許文献３及び４）等が提案されている。また、生存シグナル阻害剤を用いたアプローチとして、Ｓｕｒｖｉｖｉｎ阻害剤を利用する方法（非特許文献５）等が提案されている。さらに、ＦＡＣＳソーティングを用いたアプローチとして、抗ＳＳＥＡ－５抗体によるパージング（非特許文献６）、及び糖鎖抗体（レクチン）を用いたパージング（非特許文献７）等が提案されている。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Matsuura K, Kodama F, Sugiyama K, Shimizu T, Hagiwara N, Okano T. Elimination of remaining undifferentiated iPS cells in the process of human cardiac cell sheet fabrication using a methionine-free culture condition. Tissue Eng Part C Methods. 2014 Sep 23. [Epub ahead of print]

非特許文献2：Shiraki N, Shiraki Y, Tsuyama T, Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H, Kume K, Endo F, Kume S. Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. Cell Metab. 2014 May 6;19(5):780-94.

非特許文献3：Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Cell Stem Cell. 2013 Jan 3;12(1):127-37.

非特許文献4：Hemmi N, Tohyama S, Nakajima K, Kanazawa H, Suzuki T, Hattori F, Seki T, Kishino Y, Hirano A, Okada M, Tabei R, Ohno R, Fujita C, Haruna T, Yuasa S, Sano M, Fujita J, Fukuda K. A Massive Suspens

ion Culture System With Metabolic Purification for Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. Stem Cells Transl Med. 2014 Oct 29. pii: sctm.2014-0072. [Epub ahead of print]

非特許文献5：Lee MO, Moon SH, Jeong HC, Yi JY, Lee TH, Shim SH, Rhee YH, Lee SH, Oh SJ, Lee MY, Han MJ, Cho YS, Chung HM, Kim KS, Cha HJ. Inhibition of pluripotent stem cell-derived teratoma formation by small molecules. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Aug 27;110(35):E3281-90.

非特許文献6：Tang C, Lee AS, Volkmer JP, Sahoo D, Nag D, Mosley AR, Inlay MA, Ardehali R, Chavez SL, Pera RR, Behr B, Wu JC, Weissman IL, Drukker M. An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells. Nat Biotechnol. 2011 Aug 14;29(9):829-34.

非特許文献7：Onuma Y, Tateno H, Hirabayashi J, Ito Y, Asashima M. rBC2LCN, a new probe for live cell imaging of human pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Feb 15;431(3):524-9.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団であって、未分化多能性幹細胞の含有割合が、従来のものよりもより低減されている細胞集団を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団であって、未分化多能性幹細胞の含有割合が、０．２％以下である細胞集団を、いくつかの新しい方法によって得ることに成功した。本発明は、以下の態様を含む。

[0008] 項１－１．

多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団であって、未分化多能性幹細胞の含有割合が、０．２％以下である細胞

集団。

項１－２．

前記多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞又は胚性幹細胞である、項１－１に記載の細胞集団。

項１－３．

前記人工多能性幹細胞が、ｉＰＳ細胞である、項１－２に記載の細胞集団。

項１－４．

前記胚性幹細胞が、ＥＳ細胞である、項１－２に記載の細胞集団。

項１－５．

総細胞数が、１×１０^{4}個以上である、項１－１～１－４のいずれか一項に記載の細胞集団。

項１－６．

前記未分化多能性幹細胞の含有割合が、フローサイトメトリーを用いた未分化細胞マーカー解析により求められるものである、項１－１～１－５のいずれか一項に記載の細胞集団。

項１－７．

医薬として用いられる、項１－１～１－６のいずれか一項に記載の細胞集団。

項２－１．

多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団の製造方法であって、

（Ａ）抗ＣＤ３０抗体結合薬剤の存在下で、多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団を培養することにより、未分化多能性幹細胞の含有割合を低減する工程；及び／又は

（Ｂ）ＢＥＴ阻害剤の存在下で、多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団を培養することにより、未分化多能性幹細胞の含有割合を低減する工程

を含む、製造方法。

項２－２．

前記多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞又は胚性幹細胞である、項２－１に記載の製造方法。

項２－３．

前記人工多能性幹細胞が、ｉＰＳ細胞である、項２－２に記載の製造方法。

項２－４．

前記胚性幹細胞が、ＥＳ細胞である、項２－２に記載の製造方法。

項３－１．

多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団の製造方法において、未分化多能性幹細胞の含有割合を低減するために用いられる、抗ＣＤ３０抗体結合薬剤を含有する組成物。

項３－２．

多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団の製造方法において、未分化多能性幹細胞の含有割合を低減するために用いられる、ＢＥＴ阻害剤を含有する組成物。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、従来のものよりも純度の高い分化誘導細胞集団を利用することができ、造腫瘍性等の副作用がより低減された医薬や、より精度の高い研究ツール等が提供される。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]実施例１の結果を表わす図面である。

[図2]実施例１の結果を表わす図面である。

[図3]実施例２の結果を表わす図面である。

[図4]実施例２の結果を表わす図面である。

[図5]実施例２の結果を表わす図面である。

[図6]実施例３の結果を表わす図面である。

[図7]実施例４の結果を表わす図面である。

[図8]実施例４の結果を表わす図面である。

[図9]実施例５の結果を表わす図面である。

[図10]実施例６の結果を表わす図面である。

[図11]試験例の結果を表わす図面である。

[図12]試験例の結果を表わす図面である。

[図13]実施例７の結果を表わす図面である。

発明を実施するための形態

[0011] １．本発明の細胞集団

本発明は、多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団であって、未分化多能性幹細胞の含有割合が、０．２％以下である細胞集団である。

本発明の細胞集団は、未分化多能性幹細胞の含有割合が、好ましくは０．１％以下であり、より好ましくは０．０５％以下である。

[0012] 多能性幹細胞としては、特に限定されず、幅広く用いることができる。多能性幹細胞としては、人工多能性幹細胞又は胚性幹細胞のいずれも用いることができる。

[0013] 人工多能性幹細胞としては、特に限定されないが、例えば、ｉＰＳ細胞等を用いることができる。胚性幹細胞としては、特に限定されないが、例えば、ＥＳ細胞等を用いることができる。これらの中でも、特に医薬としての利用を考えた場合、安全性等の面からｉＰＳ細胞及びＥＳ細胞が特に好ましい。

[0014] 本発明は、細胞集団における未分化多能性幹細胞の含有割合（すなわち、残存率）が従来よりも低減されていることを特徴とする。すなわち、従来では実現不可能であった未分化多能性幹細胞の残存率を実現可能とする新たな方法を開発したことに基づき、本発明は完成されたものである。後述する通り、これらの新たな方法は、具体的には、未分化の状態のまま残存している多能性幹細胞の特性に着目して純化を行う技術である。したがって、本発明においては、分化細胞の種類は特に限定されない。

[0015] 特に限定されないが、分化細胞としては、心筋細胞、神経細胞、網膜色素

上皮細胞などの網膜細胞、血液（造血）細胞、肝細胞、膵ベータ細胞、腎臓細胞、軟骨細胞及び生殖細胞等が挙げられる。これらの中でも特に心筋細胞が好ましい。

[0016] 本発明の細胞集団は、未分化多能性幹細胞の含有割合が低いことが特徴であり、必要に応じて、分化誘導細胞及び未分化多能性幹細胞とは異なる細胞をさらに含んでいてもよい。

[0017] 本発明の細胞集団は、特に限定されないが、総細胞数が、通常は1×10^4個以上であり、好ましくは1×10^5個～1×10^9個、より好ましくは1×10^8個～1×10^9個である。

[0018] 本発明の細胞集団における未分化多能性幹細胞の含有割合は、フローサイトメトリーを用いた未分化細胞マーカー解析により求められるものとして定義できる。この解析は、具体的には以下のようにして行うことができる。

[0019] 未分化多能性幹細胞を分化誘導した後、約1×10^5～5×10^5個の分化細胞にＡｃｃｕｔａｓｅ等の細胞剥離液を３７℃、５分間作用させ、分化細胞を剥離及び遠心回収する。分化細胞をＰＢＳ１００μＬずつに懸濁し、蛍光標識された抗ヒトＴＲＡ－１－６０抗体及びアイソタイプコントロール抗体をそれぞれ添加し、４℃、暗所で２０分間反応させる。分化細胞をＰＢＳで洗浄し遠心回収後、それぞれＰＢＳ３００μＬずつに懸濁し、セルストレイナーを通した後ＦＡＣＳチューブに回収する。フローサイトメトリーにおいては、標識蛍光に対応した検出器でその蛍光発光を検出し定量化する。アイソタイプコントロール抗体で染まる分画を陰性分画と定義し、それに比して蛍光強度の高い分画を陽性分画と定義する。抗ヒトＴＲＡ－１－６０抗体で染まる分画のうち、陽性分画に属する割合をパーセンテージで定量表記する。

[0020] 本発明の細胞集団は、特に限定されず、幅広い用途に用いることができる。例えば、未分化多能性幹細胞の含有割合がより低減されているため、医薬（細胞医薬品）として利用する場合、安全面のリスクがより少なく、好ましい。医薬としての用途、すなわち対象疾患、用量・用法等については、分化

細胞の種類によって適宜決定することができる。特に限定されないが、例えば分化細胞が心筋細胞である場合、本発明の細胞集団は、心筋梗塞や心筋症（拡張型心筋症など）に伴う重症心不全等の治療の目的で使用することができる。

[0021] 本発明の細胞集団は、医薬として用いる場合、造腫瘍等の安全面のリスクが低減されているという効果を有する。

[0022] 本発明の細胞集団は、医薬として用いる場合、医薬組成物における有効成分として使用できる。この医薬組成物は、特に限定されず、いわゆる細胞医薬品において含まれうる種々のその他の成分を含有していてもよい。

[0023] 本発明の細胞集団は、上記の通り説明される細胞集団を、使用目的等に応じて適宜、細胞培養培地中に含有していてもよいし、シート化していてもよい。

[0024] ２．本発明の細胞集団の製造方法

本発明の細胞集団は、特に限定されないが、以下に説明する方法により得ることができる。必要に応じて、これらの方法を組み合わせて行ってもよい。これらの方法は、いずれも不可避的に混入する未分化多能性幹細胞を除去する技術に属し、従来の方法では実現できなかったレベルにまで未分化多能性幹細胞の含有割合を低減することができる新しい方法である。

[0025] （１）抗ＣＤ３０抗体結合薬剤を用いる方法

この方法では、未分化細胞マーカーとして知られるＣＤ３０を特異的に認識する抗体からなる抗ＣＤ３０抗体結合薬剤を用いる。

[0026] ＣＤ３０は、ＴＮＦ－Ｒ ｓｕｐｅｒｆａｍｉｌｙに属し、一部のリンパ腫に発現している。正常組織では活性化リンパ球に発現するのみとされる。下流のシグナルとしてＮＦ－κＢやＭＡＰＫ経路が知られ、これらを介して生存に寄与するとされる。

[0027] 具体的には、この抗ＣＤ３０抗体結合薬剤は、細胞を死滅させる活性を有する薬剤を細胞内環境で開裂するリンカーで結合させた抗体薬物複合体（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ＤｒｕｇＣｏｎｊｕｇａｔｅ；ＡＤＣ）である。この抗Ｃ

Ｄ３０抗体結合薬剤は、抗体認識した細胞内に侵入し、薬剤が細胞内に放出されることによって、その細胞を選択的に死滅させることができる。

[0028] 薬剤としては、特に限定されないが、例えば、微小管阻害剤ＭＭＡＥ等が挙げられる。

また、リンカーとしては、特に限定されないが、例えば、蛋白質分解酵素により開裂するリンカー等が挙げられる。

[0029] 抗ＣＤ３０抗体結合薬剤として、特に限定されないが、例えば、抗体医薬として市販されているＡｄｃｅｔｒｉｓ（登録商標）（ＳＧＮ－３５）（Ｍｉｌｌｅｎｉｕｍ社、ＳｅａｔｔｌｅＧｅｎｅｔｉｃｓ社及び武田薬品）等を用いることができる。なお、Ａｄｃｅｔｒｉｓ（登録商標）は、適応疾患をＣＤ３０陽性リンパ腫として、ＦＤＡ承認を２０１１年に受けているほか、日本においても薬事承認を２０１４年４月に受けている。

[0030] 抗ＣＤ３０抗体結合薬剤の存在下で、多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団を培養することにより、未分化多能性幹細胞の含有割合を低減することができる。

[0031] 抗ＣＤ３０抗体結合薬剤の細胞培地中における濃度は、多能性幹細胞の種類等に応じて適宜設定することができるが、５μｇ／ｍｌ～５０μｇ／ｍｌが好ましく、１０μｇ／ｍｌ～５０μｇ／ｍｌがより好ましく、２５μｇ／ｍｌ～５０μｇ／ｍｌがさらに好ましい。

[0032] 上記において、培養時間も、多能性幹細胞の種類等に応じて適宜設定できるが、２４時間～９６時間が好ましく、４８時間～９６時間がより好ましく、７２時間～９６時間がさらに好ましい。

[0033] （２）ＢＥＴ阻害剤を用いる方法

この方法では、ヒストンアセチル化阻害剤であるＢＥＴ阻害剤を用いる。

[0034] ＢＥＴ（Ｂｒｏｍｏｄｏｍａｉｎ ａｎｄｅｘｔｒａｔｅｒｍｉｎａｌ）タンパクファミリーはＢＲＤ２、ＢＲＤ３、ＢＲＤ４及びＢＲＤＴからなり、ＲＮＡポリメラーゼ ＩＩによる転写制御に深く関わっている。Ｂｒｏｍｏｄｏｍａｉｎを介して ヒストンテイルのアセチル化リジン残基を認識し（Ｅｐ

ｉｇｅｎｅｔｉｃｒｅａｄｅｒ）、 アセチル化クロマチンへ転写制御複合体をリクルートする。低分子化合物ＪＱ１等のＢＥＴ阻害剤は癌や炎症における治療的役割が報告されている（Ｎａｔｕｒｅ．２０１０；４６８：ｐｐ．１０６７－７３、Ｃｅｌｌ．２０１１；１４６：ｐｐ．９０４－１７）。特にＢＲＤ４は幾つかの癌腫でｃ‐Ｍｙｃ、ＮＫ‐κＢ及び Ｎａｎｏｇの発現を制御するといわれ、これはＳｕｐｅｒ‐ｅｎｈａｎｃｅｒへのＢＲＤ４結合による。

[0035] 未分化多能性幹細胞は、ＢＥＴ阻害剤の存在下で培養することにより死滅する。上記（１）の方法と同様、ＢＥＴ阻害剤の存在下で、多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団を培養することにより、未分化多能性幹細胞の含有割合を低減することができる。

[0036] ＢＥＴ阻害剤としては、ＪＱ１の他、Ｉ－ＢＥＴ１５１及びＩ－ＢＥＴ７６２等を用いることができる。

[0037] ＢＥＴ阻害剤の細胞培地中における濃度は、ＢＥＴ阻害剤の種類や多能性幹細胞の種類等に応じて適宜設定することができるが、例えばＪＱ１を使用する場合、０．１μＭ～１０μＭが好ましく、０．２μＭ～１０μＭがより好ましく、０．５μＭ～１０μＭがさらに好ましい。

[0038] 上記において、培養時間も、ＢＥＴ阻害剤の種類や多能性幹細胞の種類等に応じて適宜設定できるが、例えばＪＱ１を使用する場合、２４時間～９６時間が好ましく、４８時間～９６時間がより好ましく、７２時間～９６時間がさらに好ましい。

３．本発明の組成物

本発明はさらに、上記の方法のために用いられる、以下の組成物を提供する。

（ａ）抗ＣＤ３０抗体結合薬剤を含有する組成物；

（ｂ）ＢＥＴ阻害剤を含有する組成物；及び

（ｃ）抗ＣＤ３０抗体結合薬剤及びＢＥＴ阻害剤を含有する組成物。

これらの組成物における、抗ＣＤ３０抗体結合薬剤及び／又はＢＥＴ阻害

剤の配合濃度は、特に限定されず、要求される保存安定性や使用目的等に応じて適宜設定することができる。

これらの組成物は、上記の方法を阻害しない限りにおいて、さらに他の成分を含有していてもよい。その他の成分としては、特に限定されないが、例えば、グルコース、マルトース、シュークロース、ラクトース、ラフィノース、トレハロース、マンニトール、ヒドロキシエチル澱粉及びプルラン等の糖質、グルコン酸、乳酸、酢酸、プロピオン酸、β－ヒドロキシ酪酸及びクエン酸等の有機酸、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素二カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸ナトリウム及び炭酸カリウム等の電解質、Ｌ－アスコルビン酸及びビタミンＥ等のビタミン、グリシン、グルタミン酸及びリジン等のアミノ酸、抗利尿ホルモン及びインスリン等のホルモン、クエン酸、クエン酸塩、ヘパリン及びエデト酸ナトリウム等の抗凝固剤、カルシウム拮抗剤、アドレナリンβ受容体拮抗剤及びアンギオテンシン変換酵素阻害剤等の降圧剤、アデノシン三リン酸等の核酸塩基、凍結防止蛋白質等の凍結防止剤；並びに活性酸素消去剤、細胞賦活剤、抗生物質、抗血小板因子、肝障害抑制剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、分散剤、粘性剤、再吸収促進剤、界面活性剤、溶解補助剤、保存剤、防腐剤、乳化剤、等張化剤、安定化剤、緩衝剤及びｐＨ調整剤等が挙げられ、これらの少なくとも一種を必要に応じて配合することができる。

実施例

[0039] 以下に実施例を示して、本発明をさらに具体的に説明する。なお、本発明は、以下の実施例に何ら限定されるものではない。

[0040] 実施例１．抗ＣＤ３０抗体結合薬剤による未分化細胞除去方法

ヒトｉＰＳ細胞株ＭＹＨ－ＧＩＰ４を１２穴プレートへ播種した（細胞密度：２０％ ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｙ）。播種４８時間後、各ウェルに抗ＣＤ３０抗体結合薬剤（一般名：Ｂｒｅｕｔｕｘｉｍａｂ ｖｅｄｏｔｉｎ、ＢＶ

と略す）（商品名：Ａｄｃｅｔｒｉｓ（登録商標））を０、０．０５及び５μｇ／ｍｌずつ添加（２４時間毎に薬剤含有培地を交換）。以後、２４時間毎に顕微鏡下に観察した。なお、Ａｄｃｅｔｒｉｓ（登録商標）には、ＢＶの他、添加物が含まれる為、ＢＶ正味の重量をもとに換算した数値を記載した。すなわち「ＢＶとして０、０．０５及び５μｇ／ｍｌ」となる。

[0041] その結果、ＢＶ５μｇ／ｍｌ添加群において、４８～７２時間後に一部細胞死が誘導されることが確認された（図１）。

[0042] 同様に、ヒト正常細胞（ＮＨＤＦ）に対してＢＶが及ぼす影響を調べる目的で、実施例１と同様の実験を行った。

[0043] ヒト線維芽細胞（ＮＨＤＦ）を１２穴プレートへ播種した（細胞密度：５０％ ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｙ）。播種４８時間後、各ウェルにＢＶを０、０．０５及び５μｇ／ｍｌずつ添加（２４時間毎に薬剤含有培地を交換）。以後、２４時間毎に顕微鏡下に観察した。

[0044] その結果、ＢＶ５μｇ／ｍｌ添加で７２時間経過しても、肉眼的に細胞死誘導は認めなかった（図２）。

[0045] 実施例２．抗ＣＤ３０抗体結合薬剤による未分化細胞除去方法

種々のＢＶ濃度、ＢＶ処理時間で、ヒトｉＰＳ細胞の細胞数がどのように変化するかを明らかにする目的で、ｉｎ ｖｉｔｒｏでヒトｉＰＳ細胞にＢＶを添加し、細胞数を反映する細胞増殖アッセイ （ＣＣＫ－８アッセイ）を行い、生細胞の評価を定量的に行った。

[0046] ヒトｉＰＳ細胞株３株 （１２３１Ａ３、ＭＹＨ－ＧＩＰ４及び２５３Ｇ１）並びにＮＨＤＦを１２穴プレートへ播種した（細胞密度：２０％ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｙ）。但しＮＨＤＦの細胞密度は５０％ ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｙとした。

[0047] 播種４８時間後、各ウェルにＢＶを０、５、２５及び５０μｇ/ｍｌずつ添加（２４時間毎に薬剤含有培地を交換）。以後、添加２４時間後、４８時間後及び７２時間後にそれぞれ細胞増殖アッセイを行った。

[0048] その結果を図３（２４時間後）、図４（４８時間後）及び図５（７２時間

後）にそれぞれ示す。ヒトｉＰＳ細胞では７２時間後に最大の細胞増殖抑制効果を認め、ＢＶの濃度依存的な効果も確認された。７２時間でほぼ完全に細胞数を抑制するに至ったＢＶ濃度は、１２３１Ａ３では５～５０μｇ/ｍｌ、ＭＹＨ－ＧＩＰ４及び２５３Ｇ１では２５～５０μｇ/ｍｌであった。一方、ＮＨＤＦはほぼＢＶの影響を受けないことが確認された。

[0049] 実施例３．抗ＣＤ３０抗体結合薬剤による未分化細胞除去方法

種々のＢＶ濃度・ＢＶ処理時間で、ヒトｉＰＳ細胞の細胞数がどのように変化するかを明らかにする目的で、ｉｎｖｉｔｒｏでヒトｉＰＳ細胞にＢＶを添加し、細胞数を反映する細胞増殖アッセイ（ＣＣＫ－８アッセイ）を行い、生細胞の評価を定量的に行った。

[0050] ヒトｉＰＳ細胞株３株（２５３Ｇ１、ＭＹＨ－ＧＩＰ４及び２０１Ｂ７）及びＮＨＤＦを１２穴プレートへ播種した（細胞密度：２０％ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｙ）。但しＮＨＤＦの細胞密度は５０％ ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｙとした。

[0051] 播種４８時間後、各ウェルにＢＶを０、０．１、０．２５、０．５、１、２．５、５、１０、２５及び５０μｇ／ｍｌずつ添加（２４時間毎に薬剤含有培地を交換）。以後、添加７２時間後に細胞増殖アッセイを行った。

[0052] その結果を図６に示す。ヒトｉＰＳ細胞ではＢＶの濃度依存的な効果が確認された。特にＢＶ５０μｇ／ｍｌ、７２時間処理では、いずれの株も（ＢＶ０μｇ／ｍｌに比較して）細胞増殖は２０％以下に抑制されることが判明した。一方、ＮＨＤＦはほぼＢＶの影響を受けないことが確認された。

[0053] 実施例４．抗ＣＤ３０抗体結合薬剤による未分化細胞除去方法

ヒトｉＰＳ細胞由来心筋細胞（ｉＰＳ－ＣＭ）を対象とする。ｉＰＳ－ＣＭは心筋細胞の他、造腫瘍性を有する未分化細胞も含有すると考えられる。

[0054] 心筋分化誘導方法は、Ｍａｔｓｕｕｒａ Ｋ，ｅｔ ａｌ．Ｃｒｅａｔｉｏｎ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｃａｒｄｉａｃ ｃｅｌｌ ｓｈｅｅｔｓ ｕｓｉｎｇｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ．Ｂｉｏｃｈｅｍ ＢｉｏｐｈｙｓＲｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ、２０１２、４２５（２）、ｐｐ．３２１－７に従

った。ヒトｉＰＳ細胞株２５３Ｇ１から誘導したｉＰＳ－ＣＭを１２穴プレートへ播種した（細胞密度：９０％ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｙ）。播種４８時間後、各ウェルにＢＶを０、５、　１０μｇ／ｍｌずつ添加（２４時間毎に薬剤含有培地を交換）。以後、添加７２時間後、９６時間後にそれぞれｍＲＮＡを抽出。定量ＰＣＲでＬｉｎ２８発現量を定量化した。

[0055]　その結果、７２時間処理群では、コントロール（ＢＶ０μｇ／ｍｌ）に対し、ＢＶ添加群で未分化マーカーＬｉｎ２８の発現は約５０％に減少した。９６時間処理群では、コントロールに対し、ＢＶ添加群でＬｉｎ２８発現は約５０～７０％に減少した（図７）。

[0056]　また、純粋なヒトｉＰＳ細胞のＬｉｎ２８発現量を１００％とした場合、７２時間時点のコントロール群ではＬｉｎ２８発現量は約０．７％であったのに対し、７２時間ＢＶ添加群では同０．３％まで減少した。また、９６時間ＢＶ添加群で同０．１％まで減少した（図８）。

[0057]　以上から、ｉＰＳ－ＣＭをＢＶ処理することで未分化細胞を効率的に除去することが可能と判明した。特に未分化マーカーＬｉｎ２８を指標にした場合、ヒトｉＰＳ細胞と比較して、ｉＰＳ－ＣＭにおけるＬｉｎ２８陽性率はＢＶ処理後０．１％まで抑制され、ＢＶの強力な未分化細胞除去効果によるものと考えられた。

[0058]　実施例５．ＢＥＴ阻害剤による未分化細胞除去方法

ＢＥＴ阻害剤　（使用薬剤名：ＪＱ１）がヒトｉＰＳ細胞およびヒト正常細胞（ＮＨＤＦ；Ｎｏｒｍａｌ　ｈｕｍａｎ　ｄｅｒｍａｌ　ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ）に及ぼす影響を調べる目的で、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでヒトｉＰＳ細胞及びヒト正常細胞（ＮＨＤＦ）にＪＱ１を添加し、細胞増殖及び細胞死に関して肉眼的に観察した。

[0059]　ヒトｉＰＳ細胞株２５３Ｇ１を１２穴プレートへ播種した（細胞密度：２０％　ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｙ）。ヒト線維芽細胞（ＮＨＤＦ）を１２穴プレートへ播種した（細胞密度：５０％　ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｙ）。

[0060]　播種４８時間後、各ウェルにＪＱ１を０、０．０１、０．０２、０．０５

、０．１、０．２、０．５、１、２、５及び１０μＭずつ添加（４８時間毎に薬剤含有培地を交換）。

以後、９６時間後に顕微鏡下に観察し、細胞を可視化するためにクリスタル・バイオレット染色を行った（図９）。

[0061] その結果、ヒトｉＰＳ細胞に関しては、ＪＱ１；０．２μＭ以上の添加群において、９６時間後に完全な細胞死が誘導されることが確認された。一方、ＮＨＤＦに関しては、細胞死は認めなかった。

[0062] 実施例６．ＢＥＴ阻害剤による未分化細胞除去方法

種々のＪＱ１濃度で、ヒトｉＰＳ細胞の細胞数がどのように変化するかを明らかにする目的で、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでヒトｉＰＳ細胞にＪＱ１を添加し、細胞数を反映する細胞増殖アッセイ（ＣＣＫ－８アッセイ）を９６時間後に行い、生細胞の評価を定量的に行った。

[0063] ヒトｉＰＳ細胞株２５３Ｇ１を１２穴プレートへ播種した（細胞密度：２０％　ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｙ）。

[0064] 播種４８時間後、各ウェルにＪＱ１を０、０．０１、０．０２、０．０５、０．１、０．２、０．５、１、２、５及び１０μＭずつ添加（４８時間毎に薬剤含有培地を交換）。

以後、添加９６時間後に細胞増殖アッセイを行った（図１０）。

[0065] その結果、ヒトｉＰＳ細胞２５３Ｇ１ではＪＱ１；０．２μＭ以上の添加群において、９６時間後に細胞増殖率１０％以下まで増殖抑制されることが確認された。

[0066] 試験例．ＪＱ１の毒性試験

ヒト正常分化細胞（ＮＨＤＦ及びｉＰＳ－ＣＭ）に対してＪＱ１が毒性を有することがないかを調べる目的で、実施例６と同様の細胞増殖アッセイを行った。

[0067] ＮＨＤＦ及びｉＰＳ－ＣＭを１２穴プレートへ播種した（細胞密度：それぞれ５０％、９０％　ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｙ）。

[0068] ＮＨＤＦ及びｉＰＳ－ＣＭについての結果をそれぞれ図１１及び１２に示

す。ＮＨＤＦ及びｉＰＳ－ＣＭに対してＪＱ１の毒性はほぼ無いことが確認された。

[0069] 実施例７．ＢＥＴ阻害剤による未分化細胞除去方法

ヒトｉＰＳ細胞株ＭＹＨ－ＧＩＰ４から誘導したｉＰＳ－ＣＭを１２穴プレートへ播種した（細胞密度：９０％　ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｙ）。播種４８時間後、各ウェルにＪＱ１を０、１及び５μＭｌずつ添加（４８時間毎に薬剤含有培地を交換）。以後、添加９６時間後にＴＲＡ－１－６０陽性率を定量化した。コントロールとして、ｌｓｏｔｙｐｅｃｏｎｔｒｏｌ抗体を用いて同様に測定を行い、擬陽性がないことを確認した。

[0070] その結果（図１３）、コントロール（ＪＱ１：０μＭ）群ではＴＲＡ－１－６０陽性率が２．０％であったのに対し、ＪＱ１：１μＭ群では同０．２％、また、ＪＱ１：５μＭ群では同０．１％まで減少した。

[0071] 以上から、ｉＰＳ－ＣＭをＪＱ１処理することで未分化細胞を効率的に除去することが可能と判明した。特に未分化マーカーＴＲＡ－１－６０を指標にした場合、ヒトｉＰＳ細胞と比較して、ｉＰＳ－ＣＭにおけるＴＲＡ－１－６０陽性率はＪＱ１処理後０．１％まで抑制され、ＪＱ１の強力な未分化細胞除去効果によるものと考えられた。

請求の範囲

[請求項1] 多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団であって、未分化多能性幹細胞の含有割合が、０．２％以下である細胞集団。

[請求項2] 前記多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞及び胚性幹細胞である、請求項１に記載の細胞集団。

[請求項3] 前記人工多能性幹細胞が、ｉＰＳ細胞である、請求項２に記載の細胞集団。

[請求項4] 前記胚性幹細胞が、ＥＳ細胞である、請求項２に記載の細胞集団。

[請求項5] 総細胞数が、１×１０^{4}個以上である、請求項１～４のいずれか一項に記載の細胞集団。

[請求項6] 前記未分化多能性幹細胞の含有割合が、フローサイトメトリーを用いた未分化細胞マーカー解析により求められるものである、請求項１～５のいずれか一項に記載の細胞集団。

[請求項7] 医薬として用いられる、請求項１～６のいずれか一項に記載の細胞集団。

[請求項8] 多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団の製造方法であって、

（Ａ）抗ＣＤ３０抗体結合薬剤の存在下で、多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団を培養することにより、未分化多能性幹細胞の含有割合を低減する工程；及び／又は

（Ｂ）ＢＥＴ阻害剤の存在下で、多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団を培養することにより、未分化多能性幹細胞の含有割合を低減する工程

を含む、製造方法。

[請求項9] 多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団の製造方法において、未分化多能性幹細胞の含有割合を低

減するために用いられる、抗ＣＤ３０抗体結合薬剤を含有する組成物。

[請求項10] 多能性幹細胞を分化誘導することにより得られうる分化細胞を含有する細胞集団の製造方法において、未分化多能性幹細胞の含有割合を低減するために用いられる、ＢＥＴ阻害剤を含有する組成物。