

明 細 書

発明の名称：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製造方法に関する。

背景技術

[0002] 学術分野、創薬分野及び再生医療分野等の研究分野において、人工多能性幹細胞（iPS細胞）が注目されている。iPS細胞は、体細胞に初期化因子（例えば、OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC）を導入することにより作製することができる（例えば、特許文献1）。

[0003] iPS細胞の作製方法として、初期化因子が導入された体細胞を、ラミニンがコーティングされたプレート上で培養する方法が広く行われている（例えば、非特許文献1）。ラミニンは細胞足場材としての役割を果たす。

[0004] ところで、下記の特許文献2には、ポリビニルアルコール誘導体部及びペプチド部を有するペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体を含む細胞培養用足場材料が記載されている。また、特許文献2の実施例には、上記足場材料を用いてiPS細胞を培養したことが記載されている。しかしながら、特許文献2には、体細胞からiPS細胞を樹立することについての記載はない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2019-162054号公報

特許文献2：WO2020/230885A1

非特許文献

[0006] 非特許文献1：プロトコール フィーダーフリーでのヒトiPS細胞の樹立・維持培養、CiRA_Ff-iPSC_protocol_JP_v140310（京都大学iPS細胞研究所、https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/img/protocol/hipsprotocol_Ff_140311.pdf、英語版のURL：<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research>

rch/img/protocol/Ff-iPSC-culture_protocol_E_v140311.pdf)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 従来、細胞培養容器に体細胞を播種して培養した後、浮遊している体細胞を別の容器に回収し、回収した体細胞に初期化因子を導入することにより、人工多能性幹細胞（iPSC細胞）を製造している。しかしながら、従来の方法では、浮遊している体細胞を別の容器に回収する工程が必要であるため、作業が煩雑である。
- [0008] また、従来の方法では、品質の良い人工多能性幹細胞を短期間で得ることは困難である。例えば、従来の方法では、未分化マーカーであるTRA-1-60の陽性率を十分に高めることができないことがある。
- [0009] 本発明の目的は、簡便かつ短期間で品質の良い人工多能性幹細胞を得ることができる人工多能性幹細胞の製造方法を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0010] 本明細書において、以下の人工多能性幹細胞の製造方法を開示する。
- [0011] 項1．細胞足場材を備える細胞培養基材に、体細胞を播種する播種工程と、前記細胞足場材に接着せずに浮遊している体細胞を除去する除去工程と、前記細胞足場材に接着している体細胞に、初期化因子を導入する導入工程とをこの順に備える、人工多能性幹細胞の製造方法。
- [0012] 項2．前記播種工程において播種される体細胞が、末梢血単核細胞を含む、項1に記載の人工多能性幹細胞の製造方法。
- [0013] 項3．前記導入工程において前記細胞足場材に接着している体細胞が、食作用を有する細胞を含む、項1又は2に記載の人工多能性幹細胞の製造方法。
- [0014] 項4．前記細胞足場材が、RGD配列を有する、項1～3のいずれか1項に記載の人工多能性幹細胞の製造方法。
- [0015] 項5．前記細胞足場材が、合成樹脂部とペプチド部とを有するペプチド含有樹脂を含む、項1～4のいずれか1項に記載の人工多能性幹細胞の製造方

法。

[0016] 項6．前記ペプチド含有樹脂が、ポリビニルアセタール樹脂部とペプチド部とを有する、項5に記載の人工多能性幹細胞の製造方法。

[0017] 項7．前記導入工程において、センダイウイルスベクターを用いて前記細胞足場材に接着している体細胞に、初期化因子を導入する、項1～6のいずれか1項に記載の人工多能性幹細胞の製造方法。

発明の効果

[0018] 本発明に係る人工多能性幹細胞の製造方法は、細胞足場材を備える細胞培養基材に、体細胞を播種する播種工程と、上記細胞足場材に接着せずに浮遊している体細胞を除去する除去工程と、上記細胞足場材に接着している体細胞に、初期化因子を導入する導入工程とをこの順に備える。本発明に係る人工多能性幹細胞の製造方法では、上記の構成が備えられているので、簡便かつ短期間で品質の良い人工多能性幹細胞を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]図1は、実施例1において、除去工程によって除去された体細胞（浮遊している体細胞）と、除去工程後に細胞足場材に接着している体細胞とのそれぞれをフローサイトメトリーで測定したときのFSC-SSCのドットプロット図である。

[図2]図2は、実施例1において、除去工程後に細胞足場材に接着している体細胞の貪食能を評価したときの顕微鏡写真である。

[図3]図3は、実施例1及び比較例2において、初期化因子を導入した体細胞を培養してから1日目の細胞の顕微鏡写真である。

[図4]図4は、初期化因子を導入した体細胞を培養してからの継代数と、ウイルスの残存率との関係を示す図である。

[図5]図5は、初期化因子を導入した体細胞を培養してからの継代数と、TRA-1-60の発現量との関係を示す図である。

[図6]図6は、実施例3において単球から樹立したiPS細胞のコロニーの顕微鏡写真である。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、本発明の詳細を説明する。

[0021] 本発明に係る人工多能性幹細胞の製造方法は、細胞足場材を備える細胞培養基材に、体細胞を播種する播種工程と、上記細胞足場材に接着せずに浮遊している体細胞を除去する除去工程と、上記細胞足場材に接着している体細胞に、初期化因子を導入する導入工程とをこの順に備える。

[0022] 本発明に係る人工多能性幹細胞の製造方法では、上記の構成が備えられているので、簡便かつ短期間で品質の良い人工多能性幹細胞を得ることができる。

[0023] 以下、本明細書において、「人工多能性幹細胞」を「iPS細胞」と称することがある。

[0024] 従来、細胞培養容器に体細胞を播種して培養した後、浮遊している体細胞を別の容器に回収し、回収した体細胞に初期化因子を導入することにより、iPS細胞を製造している。本発明者らは、意外なことに、浮遊している体細胞ではなく、浮遊している体細胞を除去した後の細胞足場材に接着している体細胞に初期化因子を導入すると、簡便かつ短期間で品質の良いiPS細胞を得ることができることを見出した。本発明に係るiPS細胞の製造方法では、浮遊している体細胞を回収するという煩雑かつ慎重を要する作業を行うことなく、上記播種工程から上記導入工程までを同一の細胞培養基材を用いて行うことができるので、簡略な工程で簡便にiPS細胞を製造することができる。また、本発明に係るiPS細胞の製造方法では、短期間で品質の良いiPS細胞を得ることができる。例えば、本発明に係るiPS細胞の製造方法では、未分化マーカーであるTRA-1-60の発現量の高いiPS細胞を早期に得ることができる。したがって、本発明に係るiPS細胞の製造方法では、未分化性が高いiPS細胞を、簡便かつ短期間で樹立することができる。また、本発明に係るiPS細胞の製造方法では、初期化因子としてウイルスベクターを用いた場合に、ウイルスベクターの消失までの時間が短くなり、ウイルスベクターの残存量の少ないiPS細胞を得ることができる。

[0025] さらに、本発明に係る i P S 細胞の製造方法では、従来の方法と比べて、i P S 細胞の製造のために必要な初期化因子の使用量を削減することができる。そのため、i P S 細胞の製造コストを削減することもできる。

[0026] まず、本発明で使用可能な体細胞及び細胞培養基材について説明する。

[0027] (体細胞)

上記体細胞として、i P S 細胞を樹立するために用いられる従来公知の体細胞を使用可能である。上記体細胞は、動物細胞であることが好ましく、哺乳動物細胞であることがより好ましく、ヒト細胞であることが更に好ましい。

[0028] 上記体細胞としては、血液細胞、繊維芽細胞、肝細胞、脾臓細胞、腸上皮細胞、平滑筋細胞、及び歯髄細胞等が挙げられる。上記体細胞の由来としては、末梢血、臍帯血、皮膚組織、及び歯等が挙げられる。

[0029] 上記血液細胞としては、単核球細胞、好中球、好酸球、好塩基球、及びリンパ球等の有核細胞が挙げられる。上記血液細胞は、血管内皮前駆細胞、血液幹・前駆細胞、T 細胞、又は B 細胞であってもよい。

[0030] 上記播種工程において播種される体細胞は、血液細胞であることが好ましく、単核細胞を含むことがより好ましく、末梢血単核細胞 (P M B C) を含むことが更に好ましい。上記播種工程では、末梢血単核細胞 (P M B C) を含む細胞集団を、細胞足場材を備える細胞培養基材に播種することが好ましい。末梢血単核細胞 (P M B C) は、採取時の患者への侵襲性が低く、また、ゲノム変異の可能性が低く、さらに、無菌操作も容易であることから、特に好適に用いられる。

[0031] (細胞培養基材)

上記細胞培養基材は、細胞足場材を備える。上記細胞培養基材は、細胞培養容器であってもよく、細胞培養マイクロキャリアであってもよく、細胞培養繊維であってもよく、これら以外であってもよい。

[0032] 上記細胞培養基材は、基材 (細胞培養基材本体) と、細胞足場材とを備えることが好ましい。

[0033] <基材（細胞培養基材本体）>

上記基材の材質、サイズ及び形状は特に限定されない。上記基材として、従来公知の基材を使用可能である。

[0034] 上記基材としては、容器、繊維、不織布、中空糸、粒子、フィルム、及び多孔質膜等が挙げられる。

[0035] 上記基材の材質としては、合成樹脂、金属、及びガラス等が挙げられる。上記合成樹脂としては、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエーテルスルホン、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリイソプレン、シクロオレフィンポリマー、ポリイミド、ポリアミド、ポリアミドイミド、（メタ）アクリル樹脂、エポキシ樹脂、及びシリコン等が挙げられる。

[0036] 上記基材は、容器であることが好ましい。上記細胞培養基材は、細胞培養容器であることが好ましい。上記細胞培養基材は、容器（細胞培養容器本体）と、上記容器の第1の表面上に配置された細胞足場材とを備える細胞培養容器であることが好ましい。この場合に、上記細胞足場材は、上記容器の第1の表面上の全体に配置されていてもよく、上記容器の第1の表面上の一部分に配置されていてもよい。

[0037] 上記容器（細胞培養容器本体）の形状及び大きさは特に限定されない。上記容器（細胞培養容器本体）としては、2〜384ウェルプレート、単層フラスコ、多層フラスコ、多面フラスコ、ディッシュ、ローラーボトル、バッグ、インサートカップ、及びマイクロ流路チップ等が挙げられる。上記容器は、閉鎖系の容器であってもよい。上記容器の上記第1の表面は、上記容器の底面であることが好ましい。

[0038] 上記基材は、粒子（基材粒子）であることが好ましい。上記細胞培養基材は、細胞培養マイクロキャリアであることが好ましい。上記細胞培養基材は、基材粒子と、上記基材粒子の外表面を被覆する細胞足場材とを備える細胞培養マイクロキャリアであることが好ましい。この場合に、上記細胞足場材は、上記基材粒子の外表面の全体を被覆していてもよく、上記基材粒子の外表面の一部分を被覆していてもよい。

[0039] <細胞足場材>

上記細胞培養基材は、細胞足場材を備える。上記細胞足場材は、細胞を培養する際の該細胞の足場として用いられる。

[0040] 上記細胞足場材に含まれる成分としては、細胞接着性タンパク質、及び合成樹脂等が挙げられる。上記成分は、1種のみが用いられてもよく、2種以上が併用されてもよい。

[0041] 上記細胞足場材は、RGD配列を有することが好ましい。より具体的には、上記細胞足場材は、RGD配列を有する成分を含むことが好ましい。この場合には、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。

[0042] 上記細胞接着性タンパク質としては、ラミニン、ビトロネクチン及びコラーゲン等が挙げられる。上記細胞足場材に含まれる成分は、マトリゲル等の細胞接着性タンパク質を含む成分であってもよい。上記マトリゲルとしては、マウス肉腫由来のマトリゲル等が挙げられる。

[0043] 上記合成樹脂は、後述のように、合成樹脂部とペプチド部とを有する合成樹脂（ペプチドが結合した合成樹脂）を含んでいてもよい。上記合成樹脂は、ペプチド部を有さない合成樹脂（ペプチドが結合していない合成樹脂）を含んでいてもよい。上記合成樹脂としては、ポリビニルアルコール誘導体、ポリビニルアルコール誘導体部とペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体、（メタ）アクリル共重合体、及びポリ（メタ）アクリル酸エステル部とペプチド部とを有するペプチド含有（メタ）アクリル共重合体等が挙げられる。上記ポリビニルアルコール誘導体としては、ポリビニルアセタール樹脂等が挙げられる。

[0044] 以下、本明細書において、上記「合成樹脂部とペプチド部とを有する合成樹脂」を「ペプチド含有樹脂」と記載することがある。

[0045] 上記細胞足場材は、細胞接着性タンパク質、又は合成樹脂を含むことが好ましく、ラミニン、ビトロネクチン、又はペプチド含有樹脂を含むことがより好ましく、ペプチド含有樹脂を含むことが更に好ましい。この場合には、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。

[0046] <ペプチド含有樹脂 (peptide-conjugated resin) >

本発明の効果をより一層効果的に発揮する観点及び細胞培養基材の製造効率を高める観点から、上記細胞足場材は、合成樹脂部とペプチド部とを有するペプチド含有樹脂を含むことが好ましい。上記ペプチド含有樹脂は、ペプチドが結合した合成樹脂である。上記ペプチド含有樹脂は、合成樹脂部とペプチド部とを有する。上記ペプチド含有樹脂は、1種のみが用いられてもよく、2種以上が併用されてもよい。

[0047] 上記合成樹脂部は、ポリビニルアルコール誘導体部又はポリ（メタ）アクリル酸エステル部を有することが好ましく、ポリビニルアルコール誘導体部又はポリ（メタ）アクリル酸エステル部であることがより好ましい。上記ペプチド含有樹脂は、ポリビニルアルコール誘導体部又はポリ（メタ）アクリル酸エステル部とペプチド部とを有することが好ましい。この場合には、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。上記ペプチド含有樹脂は、ポリビニルアルコール誘導体部とポリ（メタ）アクリル酸エステル部との双方を有していてもよい。

[0048] 上記ポリビニルアルコール誘導体部を有するペプチド含有樹脂では、上記ポリビニルアルコール誘導体部と上記ペプチド部とが、リンカー部を介して結合していることが好ましい。したがって、上記ポリビニルアルコール誘導体部を有するペプチド含有樹脂は、ポリビニルアルコール誘導体部と、ペプチド部と、リンカー部とを有することが好ましい。

[0049] 上記ポリ（メタ）アクリル酸エステル部を有するペプチド含有樹脂では、上記ポリ（メタ）アクリル酸エステル部と上記ペプチド部とが、リンカー部を介して結合していてもよく、リンカー部を介さずに直接結合していてもよい。上記ポリ（メタ）アクリル酸エステル部を有するペプチド含有樹脂は、ポリ（メタ）アクリル酸エステル部と、ペプチド部と、リンカー部とを有していてもよい。

[0050] なお、本明細書において、「（メタ）アクリル」とは、「アクリル」と「メタクリル」との一方又は双方を意味し、「（メタ）アクリレート」とは、

「アクリレート」と「メタクリレート」との一方又は双方を意味する。

[0051] <<ポリビニルアルコール誘導体部>>

上記ポリビニルアルコール誘導体部（ポリビニルアルコール誘導体骨格）は、ポリビニルアルコール誘導体に由来する構造部分である。上記ポリビニルアルコール誘導体は、ポリビニルアルコールによって誘導される化合物である。

[0052] 上記ペプチド含有樹脂は、ポリビニルアルコール誘導体部とペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体であることが好ましい。上記細胞足場材は、ポリビニルアルコール誘導体部とペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体を含むことが好ましい。上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体を用いることにより、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができ、また、細胞の増殖性をより一層高めることができる。

[0053] 本発明の効果を更により一層効果的に発揮する観点及び細胞の増殖性を更により一層高める観点からは、上記ポリビニルアルコール誘導体は、ポリビニルアセタール樹脂であることが好ましく、上記ポリビニルアルコール誘導体部は、ポリビニルアセタール樹脂部であることが好ましい。すなわち、上記ペプチド含有樹脂は、ポリビニルアセタール樹脂部とペプチド部とを有することが好ましい。上記細胞足場材は、ポリビニルアセタール樹脂部とペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂を含むことが好ましい。上記ポリビニルアルコール誘導体及び上記ポリビニルアセタール樹脂は、それぞれ1種のみが用いられてもよく、2種以上が併用されてもよい。

[0054] 上記ポリビニルアルコール誘導体部及び上記ポリビニルアセタール樹脂部は、側鎖にアセタール基と、水酸基と、アセチル基とを有することが好ましい。ただし、上記ポリビニルアルコール誘導体部及び上記ポリビニルアセタール樹脂部は、例えば、アセチル基を有していなくてもよい。例えば、ポリビニルアセタール樹脂部のアセチル基の全てが、リンカーと結合することによって、上記ポリビニルアルコール誘導体部及び上記ポリビニルアセタール

樹脂部がアセチル基を有していなくてもよい。

- [0055] 上記ポリビニルアセタール樹脂は、ポリビニルアルコールをアルデヒドによりアセタール化することによって合成することができる。
- [0056] ポリビニルアルコールのアセタール化に用いられる上記アルデヒドは、特に限定されない。上記アルデヒドとしては、例えば、炭素数が1～10のアルデヒドが挙げられる。上記アルデヒドは、鎖状脂肪族基、環状脂肪族基又は芳香族基を有していてもよく、有していなくてもよい。上記アルデヒドは、鎖状アルデヒドであってもよく、環状アルデヒドであってもよい。上記アルデヒドは、1種のみが用いられてもよく、2種以上が併用されてもよい。
- [0057] 細胞足場材と細胞との接着性をより一層高める観点及び本発明の効果をより一層効果的に発揮させる観点からは、上記アルデヒドは、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、又はペンタナールであることが好ましく、ブチルアルデヒドであることがより好ましい。したがって、上記ポリビニルアセタール樹脂は、ポリビニルブチラール樹脂であることがより好ましい。細胞足場材と細胞との接着性をより一層高める観点及び本発明の効果をより一層効果的に発揮させる観点からは、上記ポリビニルアセタール樹脂部は、ポリビニルブチラール樹脂部であることが好ましい。上記ペプチド含有樹脂は、ポリビニルブチラール樹脂部とペプチド部とを有することが好ましい。上記細胞足場材は、ポリビニルブチラール樹脂部とペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルブチラール樹脂を含むことが好ましい。
- [0058] 上記ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂において、上記ポリビニルアセタール樹脂部のアセタール化度（ポリビニルブチラール樹脂部の場合にはブチラール化度）は、好ましくは40モル%以上、より好ましくは50モル%以上、好ましくは90モル%以下、より好ましくは85モル%以下である。上記アセタール化度が上記下限以上であると、培地中でペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂が膨潤しにくくなる。上記アセタール化度が上記上限以下であると、溶剤への溶解性を良好にすることができる。

- [0059] 上記ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂において、上記ポリビニルアセタール樹脂部の水酸基の含有率（水酸基量）は、好ましくは15モル%以上、より好ましくは20モル%以上、好ましくは45モル%以下、より好ましくは30モル%以下、更に好ましくは25モル%以下である。
- [0060] 上記ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂において、上記ポリビニルアセタール樹脂部のアセチル化度（アセチル基量）は、好ましくは1モル%以上、より好ましくは2モル%以上、好ましくは5モル%以下、より好ましくは4モル%以下である。上記アセチル化度が上記下限以上及び上記上限以下であると、ポリビニルアセタール樹脂とリンカーとの反応効率を高めることができる。
- [0061] 上記ポリビニルアセタール樹脂部のアセタール化度、アセチル化度及び水酸基量は、 $^1\text{H-NMR}$ （核磁気共鳴スペクトル）により測定することができる。
- [0062] <<ポリ（メタ）アクリル酸エステル部>>
上記ポリ（メタ）アクリル酸エステル部（ポリ（メタ）アクリル酸エステル骨格）は、ポリ（メタ）アクリル酸エステルに由来する構造部分である。
- [0063] 上記ペプチド含有樹脂は、ポリ（メタ）アクリル酸エステル部を有することが好ましく、ポリ（メタ）アクリル酸エステル部とペプチド部とを有するペプチド含有（メタ）アクリル共重合体であることがより好ましい。上記細胞足場材は、ポリ（メタ）アクリル酸エステル部とペプチド部とを有するペプチド含有（メタ）アクリル共重合体を含むことが好ましい。上記ペプチド含有（メタ）アクリル共重合体を用いることにより、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができ、また、細胞の増殖性をより一層高めることができる。
- [0064] 上記ポリ（メタ）アクリル酸エステル部は、（メタ）アクリル酸エステルに由来する骨格を有する。上記ポリ（メタ）アクリル酸エステルは、（メタ）アクリル酸エステルを重合することにより得られる。上記ポリ（メタ）アクリル酸エステルは、1種のみが用いられてもよく、2種以上が併用されて

もよい。

[0065] 上記（メタ）アクリル酸エステルとしては、（メタ）アクリル酸アルキルエステル、（メタ）アクリル酸環状アルキルエステル、（メタ）アクリル酸アリールエステル、（メタ）アクリル酸ポリエチレングリコール類、（メタ）アクリル酸ホスホリルコリン等が挙げられる。上記（メタ）アクリル酸エステルは、1種のみが用いられてもよく、2種以上が併用されてもよい。

[0066] 上記（メタ）アクリル酸アルキルエステルとしては、メチル（メタ）アクリレート、エチル（メタ）アクリレート、n-プロピル（メタ）アクリレート、イソプロピル（メタ）アクリレート、n-ブチル（メタ）アクリレート、イソブチル（メタ）アクリレート、t-ブチル（メタ）アクリレート、n-オクチル（メタ）アクリレート、イソオクチル（メタ）アクリレート、2-エチルヘキシル（メタ）アクリレート、ノニル（メタ）アクリレート、イソノニル（メタ）アクリレート、デシル（メタ）アクリレート、イソデシル（メタ）アクリレート、ラウリル（メタ）アクリレート、ステアリル（メタ）アクリレート、及びイソテトラデシル（メタ）アクリレート等が挙げられる。

[0067] 上記（メタ）アクリル酸アルキルエステルは、炭素数1～3のアルコキシ基及びテトラヒドロフルフリル基等の置換基で置換されていてもよい。このような（メタ）アクリル酸アルキルエステルの例としては、メトキシエチルアクリレート、テトラヒドロフルフリルアクリレート等が挙げられる。

[0068] 上記（メタ）アクリル酸環状アルキルエステルとしては、シクロヘキシル（メタ）アクリレート、及びイソボルニル（メタ）アクリレート等が挙げられる。

[0069] 上記（メタ）アクリル酸アリールエステルとしては、フェニル（メタ）アクリレート、及びベンジル（メタ）アクリレート等が挙げられる。

[0070] 上記（メタ）アクリル酸ポリエチレングリコール類としては、例えば、メトキシーポリエチレングリコール（メタ）アクリレート、エトキシーポリエチレングリコール（メタ）アクリレート、ヒドロキシーポリエチレングリコ

ール（メタ）アクリレート、メトキシジエチレングリコール（メタ）アクリレート、エトキシジエチレングリコール（メタ）アクリレート、ヒドロキシジエチレングリコール（メタ）アクリレート、メトキシトリエチレングリコール（メタ）アクリレート、エトキシトリエチレングリコール（メタ）アクリレート、及びヒドロキシトリエチレングリコール（メタ）アクリレート等が挙げられる。

[0071] 上記（メタ）アクリル酸ホスホリルコリンとしては、2-（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン等が挙げられる。

[0072] 上記ポリ（メタ）アクリル酸エステル部を有するペプチド含有樹脂は、（メタ）アクリル酸エステル以外のモノマーに由来する骨格を有していてもよい。

[0073] 上記（メタ）アクリル酸エステル以外のモノマーとしては、（メタ）アクリルアミド類及びビニル化合物等が挙げられる。上記（メタ）アクリル酸エステル以外のモノマーは、1種のみが用いられてもよく、2種以上が併用されてもよい。

[0074] 上記（メタ）アクリルアミド類としては、（メタ）アクリルアミド、N-イソプロピル（メタ）アクリルアミド、N-tert-ブチル（メタ）アクリルアミド、N,N'-ジメチル（メタ）アクリルアミド、（3-（メタ）アクリルアミドプロピル）トリメチルアンモニウムクロリド、4-（メタ）アクリロイルモルホリン、3-（メタ）アクリロイル-2-オキサゾリジノン、N-[3-（ジメチルアミノ）プロピル]（メタ）アクリルアミド、N-（2-ヒドロキシエチル）（メタ）アクリルアミド、N-メチロール（メタ）アクリルアミド、及び6-（メタ）アクリルアミドヘキサン酸等が挙げられる。

[0075] 上記ビニル化合物としては、エチレン、アリルアミン、ビニルピロリドン、無水マレイン酸、マレイミド、イタコン酸、（メタ）アクリル酸、及びビニルアミン等が挙げられる。

[0076] <<ペプチド部>>

上記ペプチド部（ペプチド骨格）は、ペプチドに由来する構造部分である。上記ペプチド部は、アミノ酸配列を有する。上記ペプチド部を構成するペプチドは、オリゴペプチドであってもよく、ポリペプチドであってもよい。上記ペプチドは、1種のみが用いられてもよく、2種以上が併用されてもよい。

[0077] 上記ペプチド部のアミノ酸残基の数は、好ましくは3個以上、より好ましくは4個以上、更に好ましくは5個以上、好ましくは10個以下、より好ましくは8個以下、更に好ましくは6個以下である。上記アミノ酸残基の数が上記下限以上及び上記上限以下であると、細胞足場材と播種後の細胞との接着性をより一層高めることができ、細胞の増殖率をより一層高めることができる。ただし、上記ペプチド部のアミノ酸残基の数は10個を超えていてもよく、15個を超えていてもよい。

[0078] 上記ペプチド部は、細胞接着性のアミノ酸配列を有することが好ましい。なお、細胞接着性のアミノ酸配列とは、ファージディスプレイ法、セファロースビーズ法、又はプレートコート法によって細胞接着活性が確認されているアミノ酸配列をいう。上記ファージディスプレイ法としては、例えば、「The Journal of Cell Biology, Volume 130, Number 5, September 1995 1189-1196」に記載の方法を用いることができる。上記セファロースビーズ法としては、例えば「蛋白質 核酸 酵素 Vol. 45 No. 15 (2000) 2477」に記載の方法を用いることができる。上記プレートコート法としては、例えば「蛋白質 核酸 酵素 Vol. 45 No. 15 (2000) 2477」に記載の方法を用いることができる。

[0079] 上記細胞接着性のアミノ酸配列としては、例えば、RGD配列（Arg-Gly-Asp）、YIGSR配列（Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg）、PDSGR配列（Pro-Asp-Ser-Gly-Arg）、HAV配列（His-Ala-Val）、ADT配列（Ala-Asp-Thr）、QAV配列（Gln-Ala-Val）、LDV配列（Leu-Asp-Val）、IDS配列（Ile-Asp-Ser）、REDV配列（A

rg-Glu-Asp-Val)、IDAPS配列(Ile-Asp-Ala-Pro-Ser)、KQAGDV配列(Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val)、及びTDE配列(Thr-Asp-Glu)等が挙げられる。また、上記細胞接着性のアミノ酸配列としては、「病態生理、第9巻 第7号、527～535頁、1990年」、及び「大阪府立母子医療センター雑誌、第8巻 第1号、58～66頁、1992年」に記載されている配列等も挙げられる。上記ペプチド部は、上記細胞接着性のアミノ酸配列を1種のみ有していてもよく、2種以上を有してもよい。

[0080] 上記ペプチド部は、上述した細胞接着性のアミノ酸配列の内の少なくともいずれかを有することが好ましく、RGD配列、YIGSR配列、又はPDSGR配列を少なくとも有することがより好ましく、RGD配列を有することが更に好ましく、下記式(1)で表されるRGD配列を少なくとも有することが特に好ましい。この場合には、細胞足場材と播種後の細胞との接着性をより一層高めることができ、細胞の増殖率をより一層高めることができる。

[0081] $\text{Arg-Gly-Asp-X} \cdots \text{式(1)}$

[0082] 上記式(1)中、Xは、Gly、Ala、Val、Ser、Thr、Phe、Met、Pro、又はAsnを表す。

[0083] 上記ペプチド部は、直鎖状であってもよく、環状ペプチド骨格を有していてもよい。上記環状ペプチド骨格とは、複数個のアミノ酸により構成された環状骨格である。本発明の効果を一層効果的に発揮させる観点からは、上記環状ペプチド骨格は、4個以上のアミノ酸により構成されることが好ましく、5個以上のアミノ酸により構成されることがより好ましく、10個以下のアミノ酸により構成されることが好ましい。

[0084] 上記ペプチド含有樹脂において、上記ペプチド部の含有率は、好ましくは0.05モル%以上、より好ましくは0.1モル%以上、更に好ましくは0.15モル%以上、特に好ましくは0.2モル%以上、好ましくは25モル%以下、より好ましくは20モル%以下、更に好ましくは15モル%以下、

特に好ましくは10モル%以下である。上記ペプチド部の含有率が上記下限以上であると、細胞足場材と播種後の細胞との接着性をより一層高めることができ、細胞の増殖率をより一層高めることができる。また、上記ペプチド部の含有率が上記上限以下であると、製造コストを抑えることができる。

[0085] 上記ペプチド部の含有率（モル%）は、上記ペプチド含有樹脂を構成する各構造単位の水質量の総和に対する上記ペプチド部の水質量である。

[0086] 上記ペプチド部の含有率は、例えばNMR（核磁気共鳴）により測定することができる。

[0087] <<リンカー部>>

上記リンカー部は、リンカーに由来する構造部分である。上記リンカー部は、通常、上記ポリビニルアルコール誘導体部又は上記ポリ（メタ）アクリル酸エステル部と上記ペプチド部との間に位置する。上記ポリビニルアルコール誘導体部又は上記ポリ（メタ）アクリル酸エステル部と上記ペプチド部とが、上記リンカー部を介して結合している。上記リンカー部は、リンカー（架橋剤）によって形成される。上記リンカーは、1種のみが用いられてもよく、2種以上が併用されてもよい。

[0088] 上記リンカーは、上記ペプチドと結合可能な官能基を有する化合物であることが好ましく、上記ペプチドのカルボキシル基と縮合可能な官能基又はアミノ基と縮合可能な官能基を有する化合物であることがより好ましい。

[0089] 上記ペプチドのカルボキシル基と縮合可能な官能基又はアミノ基と縮合可能な官能基としては、カルボキシル基、チオール基、アミノ基、水酸基及びシアノ基等が挙げられる。

[0090] ペプチドと良好に反応させる観点からは、上記リンカーは、カルボキシル基又はアミノ基を有する化合物であることが好ましく、カルボキシル基を有する化合物であることがより好ましい。

[0091] ポリビニルアルコール誘導体部を有するペプチド含有樹脂を得る場合、上記カルボキシル基を有するリンカーとしては、（メタ）アクリル酸及びカルボキシル基含有アクリルアミド等が挙げられる。上記カルボキシル基を有す

るリンカーとして重合性不飽和基を有するカルボン酸（カルボン酸モノマー）を用いることにより、リンカーの導入時にグラフト重合により該カルボン酸モノマーを重合させることができるため、ペプチドと反応させることができるカルボキシル基の個数を増やすことができる。

[0092] ポリビニルアルコール誘導体とペプチドとを良好に結合させる観点からは、上記リンカーは、（メタ）アクリル酸であることが好ましく、アクリル酸であることがより好ましい。

[0093] ポリ（メタ）アクリル酸エステル部を有するペプチド含有樹脂を得る場合、上記リンカーは、（メタ）アクリル酸エステルと結合可能な官能基を有することが好ましい。上記（メタ）アクリル酸エステルと結合可能な官能基としては、ビニル基、（メタ）アクリロイル基及びアリル基等が挙げられる。上記リンカーは、上記（メタ）アクリル酸エステルと結合可能な官能基として、（メタ）アクリロイル基を有することがより好ましく、カルボキシル基又はアミノ基を有し、かつ（メタ）アクリロイル基を有する化合物であることが好ましい。

[0094] ポリ（メタ）アクリル酸エステル部を有するペプチド含有樹脂を得る場合の上記リンカーとしては、（メタ）アクリル酸、イタコン酸、及びアクリルアミド等が挙げられる。

[0095] ポリ（メタ）アクリル酸エステルとペプチドとを良好に結合させる観点からは、上記リンカーは、（メタ）アクリル酸又はイタコン酸であることが好ましく、（メタ）アクリル酸であることがより好ましい。

[0096] <細胞足場材の他の詳細>

上記ペプチド含有樹脂の数平均分子量は、好ましくは10000以上、より好ましくは50000以上、更に好ましくは100000以上、好ましくは5000000以下、より好ましくは2500000以下、更に好ましくは1000000以下である。上記数平均分子量が上記下限以上であると、細胞培養中に細胞足場材が液体培地中へ溶出しにくくなり、また、細胞培養中に細胞足場材が基材から剥離しにくくなる。上記数平均分子量が上記上限

以下であると、アルコール溶媒への溶解性を高めることができる。

[0097] なお、上記ペプチド含有樹脂の数平均分子量は、例えば以下の方法により測定することができる。上記ペプチド含有樹脂をテトラヒドロフラン（THF）に溶解し、ペプチド含有樹脂の0.2重量%溶液を調製する。次に、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）測定装置（APCシステム、Waters社製）を用いて、以下の測定条件により評価する。

[0098] カラム：HSPgel HR MB-M 6.0×150mm

流量：0.5mL/min

カラム温度：40℃

注入量：10μL

検出器：RI、PDA

標準試料：ポリスチレン

[0099] 上記細胞足場材は、ペプチド部を有さない合成樹脂（ペプチドが結合していない合成樹脂）と、ペプチド含有樹脂とを含んでいてもよい。上記細胞足場材は、上記ポリビニルアルコール誘導体部又はポリ（メタ）アクリル酸エステル部を有しかつペプチド部を有さない合成樹脂と、ペプチド含有樹脂とを含んでいてもよい。上記細胞足場材は、上記ポリビニルアルコール誘導体部及びポリ（メタ）アクリル酸エステル部の双方を有さない樹脂等の他の成分を含んでいてもよい。上記他の成分としては、ポリオレフィン樹脂、ポリエーテル樹脂、ポリエステル、エポキシ樹脂、ポリアミド樹脂、ポリイミド樹脂、ポリウレタン樹脂、ポリカーボネート樹脂、セルロース、及びポリペプチド等が挙げられる。上記他の成分は、1種のみが用いられてもよく、2種以上が併用されてもよい。

[0100] 上記細胞足場材は、上記ペプチド含有樹脂を含み、かつ、ペプチドが結合していない合成樹脂を含まないか又は含むことが好ましい。

[0101] 上記細胞足場材は、上記ペプチド含有樹脂を含む層を有することが好ましい。上記細胞足場材は、上記ペプチド含有樹脂を含む層のみを有していてもよく、上記ペプチド含有樹脂を含む層と、ペプチドが結合していない合成樹脂

脂を含む層とを有していてもよい。本発明の効果をより一層効果的に発揮する観点及び細胞の増殖性をより一層高める観点からは、上記ペプチド含有樹脂を含む層の第1の表面は、上記細胞足場材の上面であることが好ましい。上記ペプチド含有樹脂は、体細胞と接着する表面（体細胞との接着面）に少なくとも存在することが好ましい。

[0102] 上記細胞足場材100重量%中、上記ペプチド含有樹脂の含有量は、好ましくは90重量%以上、より好ましくは95重量%以上、更に好ましくは97.5重量%以上、特に好ましくは99重量%以上、最も好ましくは100重量%（全量）である。上記ペプチド含有樹脂の含有量が上記下限以上であると、本発明の効果をより一層効果的に発揮させることができる。上記細胞足場材100重量%中、上記ペプチド含有樹脂の含有量は、100重量%以下であってもよく、100重量%未満であってもよい。

[0103] 上記細胞足場材100重量%中、上記ペプチド含有樹脂の含有量とペプチドが結合していない合成樹脂の含有量との合計は、好ましくは90重量%以上、より好ましくは95重量%以上、更に好ましくは97.5重量%以上、特に好ましくは99重量%以上、最も好ましくは100重量%（全量）である。上記合計が上記下限以上であると、本発明の効果をより一層効果的に発揮させることができる。上記細胞足場材100重量%中、上記ペプチド含有樹脂の含有量とペプチドが結合していない合成樹脂の含有量との合計は、100重量%以下であってもよく、100重量%未満であってもよい。

[0104] 上記細胞足場材は、上記細胞接着性タンパク質を含む層を有することが好ましい。上記細胞足場材は、上記細胞接着性タンパク質を含む層のみを有していてもよく、上記細胞接着性タンパク質を含む層と、細胞接着性タンパク質を含まない層とを有していてもよい。本発明の効果をより一層効果的に発揮する観点及び細胞の増殖性をより一層高める観点からは、上記細胞接着性タンパク質を含む層の第1の表面は、上記細胞足場材の上面であることが好ましい。上記細胞接着性タンパク質は、体細胞と接着する表面（体細胞との接着面）に少なくとも存在することが好ましい。

- [0105] 上記細胞足場材 100 重量%中、上記細胞接着性タンパク質の含有量は、好ましくは 90 重量%以上、より好ましくは 95 重量%以上、更に好ましくは 97.5 重量%以上、特に好ましくは 99 重量%以上、最も好ましくは 100 重量%（全量）である。上記細胞接着性タンパク質の含有量が上記下限以上であると、本発明の効果をより一層効果的に発揮させることができる。上記細胞足場材 100 重量%中、上記細胞接着性タンパク質の含有量は、100 重量%以下であってもよく、100 重量%未満であってもよい。
- [0106] ペプチド含有樹脂を含む細胞足場材を備える細胞培養基材は、例えば、以下の（A）又は（B）の方法で作製することができる。以下の（A）は、ペプチド含有樹脂を液相法により合成する方法を用いて細胞培養基材を作製する方法の一例であり、以下の（B）は、ペプチド含有樹脂を固相法により合成する方法を用いて細胞培養基材を作製する方法の一例である。
- [0107] （A）アミノ基と反応可能な官能基又はカルボキシル基と反応可能な官能基を有する合成樹脂（以下、「合成樹脂 X」と記載することがある）とペプチドとを含む溶液を用意する。合成樹脂 X とペプチドとを反応させてペプチド含有樹脂を得る。ペプチド含有樹脂と溶媒とを含む溶液を、基材の表面上に塗布した後、溶媒を揮発させる。
- [0108] （B）アミノ基と反応可能な官能基又はカルボキシル基と反応可能な官能基を有する合成樹脂（合成樹脂 X）を含む溶液を用意する。合成樹脂 X を含む溶液を、基材の表面上に塗布する。基材の表面上にペプチドを含む液を添加し、合成樹脂 X とペプチドとを反応させる。
- [0109] なお、上記合成樹脂 X としては、（メタ）アクリレート重合体、及びリンカーが結合したポリビニルアセタール誘導体等が挙げられる。
- [0110] 細胞接着性タンパク質を含む細胞足場材を備える細胞培養基材は、例えば、細胞接着性タンパク質を含む溶液を、基材の表面上に塗布した後、溶媒を揮発させることにより作製することができる。
- [0111] 以下、本発明に係る iPS 細胞の製造方法の詳細について、更に説明する。

[0112] 上記 i P S 細胞の製造方法は、細胞足場材を備える細胞培養基材に、体細胞を播種する播種工程と、上記細胞足場材に接着せずに浮遊している体細胞を除去する除去工程と、上記細胞足場材に接着している体細胞に、初期化因子を導入する導入工程とをこの順に備える。上記 i P S 細胞の製造方法では、上記播種工程から上記導入工程までを同一の細胞培養基材を用いて行うことができる。

[0113] 上記 i P S 細胞の製造方法は、上記播種工程と上記除去工程との間に、播種された体細胞を培養する培養工程 (A) を備えることが好ましい。上記 i P S 細胞の製造方法は、上記播種工程と上記培養工程 (A) と上記除去工程と上記導入工程とをこの順に備えることが好ましい。

[0114] 上記 i P S 細胞の製造方法は、上記初期化因子が導入された体細胞を、上記細胞足場材の表面上で培養する培養工程 (B) を備えることが好ましい。上記培養工程 (B) は、上記導入工程で使用した細胞培養基材を用いて、上記体細胞を培養する工程である。上記 i P S 細胞の製造方法は、上記播種工程と上記除去工程と上記導入工程と上記培養工程 (B) とをこの順に備えることが好ましい。上記 i P S 細胞の製造方法は、上記播種工程と上記培養工程 (A) と上記除去工程と上記導入工程と上記培養工程 (B) とをこの順に備えることがより好ましい。上記 i P S 細胞の製造方法では、上記播種工程から上記培養工程 (B) までを同一の細胞培養基材を用いて行うことができる。

[0115] (播種工程)

上記 i P S 細胞の製造方法は、細胞足場材を備える細胞培養基材に、体細胞を播種する工程 (播種工程) を備える。

[0116] 上記播種工程における体細胞の播種密度は、上記細胞培養基材が細胞培養容器である場合、上記細胞足場材の上面の面積 1 cm^2 に対して、 $2 \times 10^3\text{ cells}$ 以上が好ましく、 $5 \times 10^3\text{ cells}$ 以上がより好ましく、 $1 \times 10^4\text{ cells}$ 以上が更に好ましく、 $1 \times 10^8\text{ cells}$ 以下が好ましく、 $1 \times 10^7\text{ cells}$ 以下がより好ましく、 $1 \times 10^6\text{ cells}$ 以下が更

に好ましい。

[0117] 上記播種工程における体細胞の播種密度は、上記細胞培養基材が細胞培養マイクロキャリア又は細胞培養繊維である場合に、上記細胞足場材の外表面の面積 1 cm^2 に対して、 $1 \times 10^3\text{ cells}$ 以上が好ましく、 $2 \times 10^3\text{ cells}$ 以上がより好ましく、 $5 \times 10^3\text{ cells}$ 以上が更に好ましく、 $1 \times 10^7\text{ cells}$ 以下が好ましく、 $1 \times 10^6\text{ cells}$ 以下がより好ましく、 $1 \times 10^5\text{ cells}$ 以下が更に好ましい。

[0118] (培養工程 (A))

上記 iPS 細胞の製造方法は、播種された体細胞を培養する工程 (培養工程 (A)) を備えることが好ましい。上記培養工程 (A) では、上記播種工程で播種した体細胞を培養する。上記培養工程 (A) は、体細胞を前培養する工程であることが好ましい。

[0119] 上記培養工程 (A) で体細胞を培養するための培地として、従来公知の培地を使用可能である。上記培地は、液体培地であることが好ましい。上記培地として、市販品の培地を用いてもよく、自家調製した培地を用いてもよい。上記培地としては、例えば、上述の非特許文献 1 に記載の培地を用いることができる。

[0120] 培地の市販品としては、味の素社製「Stem Fit」、STEMCELL Technologies 社製「StemSpan-ACF」、「TeSR E8」及び「mTeSR1」、Lonza 社製「X-VIVO 10」、並びに、Thermo Fisher Scientific 社製「StemFlex」及び「Essential 8」等が挙げられる。また、上記培地として、上記市販品に各種サイトカインを添加した培地を用いてもよい。

[0121] 上記体細胞として末梢血単核細胞 (PMBC) を用いる場合、サイトカインの終濃度として、IL-6 を $45 \sim 55\text{ ng/mL}$ 、SCF を $45 \sim 55\text{ ng/mL}$ 、TPO を $9 \sim 11\text{ ng/mL}$ 、Flt-3L を $18 \sim 22\text{ ng/mL}$ 、IL-3 を $18 \sim 22\text{ ng/mL}$ 、G-CSF を $9 \sim 11\text{ ng/mL}$ で含む培地が好適に用いられる。上記サイトカイン濃度を有する培地は、例えば、上記市販品にこれらのサイトカインを上記終濃度となるように添加

することにより得ることができる。

[0122] 上記培養工程（A）の培養温度は、好ましくは35℃以上、好ましくは38℃以下である。上記培養工程（A）の培養時のCO₂濃度は、好ましくは4%以上、好ましくは6%以下である。例えば、上記培養工程（A）の培養条件は、37℃及びCO₂濃度5%の条件である。

[0123] 上記培養工程（A）の培養時間は、好ましくは3日以上、より好ましくは4日以上、更に好ましくは5日以上、好ましくは8日以下、より好ましくは7日以下、更に好ましくは6日以下である。上記培養工程（A）の培養時間は、上記播種工程で体細胞を播種してからの日数である。上記培養工程（A）の培養時間は、より具体的には、上記播種工程で体細胞を播種してから、上記除去工程で細胞足場材に接着せずに浮遊している体細胞を除去するまでの日数である。上記播種工程で体細胞を播種した日を0日目とし、播種翌日を1日目とする。

[0124] 上記培養工程（A）の培養時には、培地交換を行ってもよく、行わなくてもよい。培地交換を行う場合には、上記播種工程において播種された体細胞のうち、接着性を有する体細胞の細胞足場材への接着を待ってから行うことが好ましい。具体的には、例えば、上記培養工程（A）の培養時に培地交換を行う場合には、培養工程（A）の培養開始から3日目以降に培地交換を行うことが好ましい。

[0125] 上記培養工程（A）において培地交換を行う場合、培地交換1回あたり、培地交換前の培地100体積%に対して、20体積%以上の培地を交換することが好ましく、40体積%以上の培地を交換することがより好ましい。

[0126] （除去工程）

上記iPS細胞の製造方法は、上記細胞足場材に接着せずに浮遊している体細胞を除去する工程（除去工程）を備える。上記除去工程前には、上記細胞足場材に接着せずに浮遊している体細胞と、上記細胞足場材に接着している体細胞とが存在する。例えば、上記培養工程（A）を行うと、上記細胞足場材に接着せずに浮遊している体細胞と、上記細胞足場材に接着している体

細胞とが存在する。上記除去工程では、上記細胞足場材に接着せずに浮遊している体細胞を除去する。

[0127] 上記除去工程において、上記浮遊している体細胞を除去する方法としては、上記浮遊している体細胞を培地とともに除去する方法等が挙げられる。上記浮遊している体細胞を培地とともに除去する方法としては、ピペットを用いる方法等が挙げられる。なお、上記浮遊している体細胞を培地とともに除去する前又は除去した後に、PBS等の緩衝液、及び培地等の液体で洗浄を行ってもよい。

[0128] 上記浮遊している体細胞を簡便に除去する観点からは、上記除去工程において、上記浮遊している体細胞を除去する方法は、上記浮遊している体細胞を培地とともに除去する方法であることが好ましい。上記除去工程では、上記浮遊している体細胞を含む培地を除去することにより、上記浮遊している体細胞を除去することが好ましい。

[0129] 上記除去工程では、上記浮遊している体細胞のうち、細胞数基準で、50%以上の体細胞を除去することが好ましく、70%以上の体細胞を除去することがより好ましく、90%以上の体細胞を除去することが更に好ましく、95%以上の体細胞を除去することが特に好ましく、99%以上の体細胞を除去することが最も好ましい。この場合には、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。上記除去工程では、上記浮遊している体細胞のうち、細胞数基準で、100%以下の体細胞を除去してもよく、100%未満の体細胞を除去してもよく、99%以下の体細胞を除去してもよい。

[0130] 上記除去工程において培地を除去する場合、培地除去前の培地100体積%に対して、10体積%以上の培地を除去することが好ましく、20体積%以上の培地を除去することがより好ましく、40体積%以上の培地を除去することがより一層好ましく、60体積%以上の培地を除去することが更に好ましく、80体積%以上の培地を除去することが特に好ましく、90体積%以上の培地を除去することが最も好ましい。除去する培地の割合が上記下限以上であると、より多くの浮遊している体細胞を除去できるため、本発明の

効果をより一層効果的に発揮することができる。上記除去工程において培地を除去する場合、培地除去前の培地100体積%に対して、100体積%以下の培地を除去してもよく、100体積%未満の培地を除去してもよく、95体積%以下の培地を除去してもよく、90体積%以下の培地を除去してもよい。

[0131] 上記播種工程で体細胞を播種してから、上記除去工程で上記浮遊している体細胞を除去するまでの時間は、好ましくは1日以上、より好ましくは2日以上、より一層好ましくは3日以上、更に好ましくは4日以上、特に好ましくは5日以上、好ましくは15日以下、より好ましくは10日以下、より一層好ましくは8日以下、更に好ましくは7日以下、特に好ましくは6日以下である。上記時間が上記下限以上及び上記上限以下であると、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。上記時間は、上記播種工程で体細胞を播種してからの日数である。上記播種工程で体細胞を播種した日を0日目とし、播種翌日を1日目とする。

[0132] (導入工程)

上記iPS細胞の製造方法は、上記細胞足場材に接着している体細胞に、初期化因子を導入する工程(導入工程)を備える。上記導入工程では、上記除去工程後の上記細胞足場材に接着している体細胞(体細胞集団)に、初期化因子を導入する。すなわち、上記導入工程では、上記除去工程後の上記細胞足場材の表面上に残存している体細胞(体細胞集団)に、初期化因子を導入する。

[0133] 上記導入工程では、上記細胞足場材に接着している体細胞を採取することなく、上記細胞足場材に接着している体細胞に初期化因子を導入することができる。そのため、簡略な工程で簡便にiPS細胞を製造することができる。

[0134] 上記導入工程において上記細胞足場材に接着している体細胞は、食作用を有する細胞を含むことが好ましく、単球、マクロファージ又は樹状細胞を含むことがより好ましく、単球又はマクロファージを含むことが更に好ましい。

。この場合には、短期間で品質の良い i P S 細胞を得ることができる。

[0135] 上記初期化因子（核初期化因子）として、従来公知の初期化因子を用いることができる。

[0136] 上記初期化因子に含まれる遺伝子としては、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、Glis1等が挙げられる。上記初期化因子は、1種のみが用いられてもよく、2種以上が併用されてもよい。

[0137] 上記初期化因子は、Octファミリー遺伝子、Soxファミリー遺伝子、Klfファミリー遺伝子、Mycファミリー遺伝子、Lin28ファミリー遺伝子、又はNanogファミリー遺伝子を含むことが好ましい。

[0138] 上記初期化因子は、Octファミリー遺伝子、Klfファミリー遺伝子、及びSoxファミリー遺伝子を含むことがより好ましく、Oct3/4、Sox2及びKlf4を含むことがより一層好ましく、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycを含むことが更に好ましく、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、Lin28及びNanogを含むことが更に好ましい。

[0139] 上記初期化因子の体細胞への導入方法として、従来公知の導入方法を用いることができる。

[0140] 上記初期化因子を体細胞に導入する方法としては、ベクターを用いる方法及びmRNAを用いる方法等が挙げられる。上記ベクターとしては、センダイウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等のウイルスベクター、並びに、エピゾーマルベクター及びプラスミドベクター等の非ウイルス性ベクター等が挙げられる。

[0141] 上記導入工程では、ベクターを用いることがより好ましく、ウイルスベクターを用いることがより好ましく、センダイウイルスベクターを用いることが更に好ましい。すなわち、上記導入工程において、センダイウイルスベクターを用いて上記細胞足場材に接着している体細胞に、初期化因子を導入す

ることが更に好ましい。この場合には、安全性を高めることができる。

[0142] 上記センダイウイルスベクターの市販品としては、IDファーマ社製「Cyt oTune-iPS」シリーズ、及びときわバイオ社製「SRV iPSC Vector」シリーズ等が挙げられる。

[0143] 上記iPS細胞の製造方法では、上記導入工程において、従来の方法と比べて、少ない量のウイルスベクターでiPS細胞を樹立することができる。上記導入工程では、ウイルスベクター（特にセンダイウイルスベクター）を3以下のMOI（Multiplicity of Infection）で感染させることが好ましく、2以下のMOIで感染させることがより好ましく、1以下のMOIで感染させることが更に好ましく、0.001以上のMOIで感染させることが好ましく、0.01以上のMOIで感染させることがより好ましい。上記導入工程では、ウイルスベクター（特にセンダイウイルスベクター）を0.001以上3以下のMOIで感染させることが好ましく、0.2以上3以下のMOIで感染させることがより好ましく、0.5以上2以下のMOIで感染させることが更に好ましい。また、感染時間は、15分間以上4時間以下であることが好ましく、30分間以上4時間以下であることがより好ましい。なお、本明細書におけるMOIは、上記播種工程において播種された体細胞数に対するウイルスベクターの量を意味する。

[0144] 上記導入工程では、初期化因子としてmRNAを用いることも好ましい。上記初期化因子は、mRNAであることも好ましい。すなわち、上記導入工程において、mRNAを用いて上記細胞足場材に接着している体細胞に初期化因子を導入してもよい。この場合には、より少ない量のmRNAでもiPS細胞を製造することができる。また、mRNAを用いる場合には、初期化因子としてウイルスベクターを用いる場合と比較して、安全性を高めることができる。

[0145] 上記導入工程において、初期化因子としてmRNAを用いる場合、体細胞に初期化因子（mRNA）を導入する方法としては、プラズマ遺伝子導入法、電気穿孔法及びリポフェクション法等が挙げられる。

[0146] 上記導入工程は、上記除去工程で上記浮遊している体細胞を除去してから、2分以内に行うことが好ましく、1分以内に行うことがより好ましく、0.5分以内に行うことが更に好ましい。この場合には、より短時間で品質の良いiPS細胞を得ることができる。なお、「上記導入工程は、上記除去工程で上記浮遊している体細胞を除去してから、X分以内に行う」とは、上記除去工程で上記浮遊している体細胞を除去してから、上記細胞足場材に接合している体細胞が初期化因子を含む成分（ベクター等）と接触するまでの時間がX分以内であることを意味する。

[0147] （培養工程（B））

上記iPS細胞の製造方法は、上記初期化因子が導入された体細胞（体細胞集団）を、上記細胞足場材の表面上で培養する工程（培養工程（B））を備えることが好ましい。上記培養工程（B）では、上記導入工程で得られた体細胞（体細胞集団）を培養する。上記培養工程（B）では、接着培養を行うことが好ましい。

[0148] 上記培養工程（B）で体細胞を培養するための培地として、従来公知の培地を使用可能である。上記培地は、液体培地であることが好ましい。上記培地として、市販品の培地を用いてもよく、自家調製した培地を用いてもよい。上記培地としては、例えば、上述の非特許文献1に記載の培地を用いることができる。

[0149] 培地の市販品としては、味の素社製「Stem Fit」、Stemcell Technologies社製「StemSpan-ACF」、「TeSR-E8」及び「mTeSR1」、Lonza社製「X-VIVO 10」、並びに、Thermo Fisher Scientific社製「StemFlex」及び「Essential 8」等が挙げられる。また、上記培地として、上記市販品の各種サイトカインを添加した培地を用いてもよい。

[0150] 上記培養工程（B）の培養温度は、好ましくは36℃以上、好ましくは38℃以下である。上記培養工程（B）の培養時のCO₂濃度は、好ましくは4%以上、好ましくは6%以下である。例えば、上記培養工程（B）の培養条件は、37℃及びCO₂濃度5%の条件である。また、上記培養工程（B）の

培養時には、培地の交換を行ってもよく、行わなくてもよい。培地の交換を行う場合には、例えば、2日間に1回の頻度で新鮮な培地に交換することができる。

[0151] 上記培養工程（B）では、i P S細胞が樹立されていてもよく、樹立されていなくてもよい。また、上記培養工程（B）の終了時にi P S細胞が樹立されているか否かを必ずしも確認しなくてもよい。本発明に係るi P S細胞の製造方法では、上記培養工程（B）の培養開始から、例えば、14日間程度でi P S細胞が誘導され、i P S細胞を含む細胞集団を得ることができる。

[0152] （継代培養工程）

品質のより一層良いi P S細胞を含む細胞集団を得る観点からは、上記i P S細胞の製造方法は、上記培養工程（B）で得られた細胞（細胞集団）を、継代培養する継代培養工程を備えることが好ましい。

[0153] 上記継代培養工程では、上記播種工程から上記培養工程（B）までに用いられた上記細胞培養基材と同じ種類の細胞培養基材を用いてもよく、異なる種類の細胞培養基材を用いてもよい。

[0154] 上記継代培養工程における継代方法としては、コロニーピックを行う方法、及び細胞剥離剤を用いる方法等が挙げられる。

[0155] 簡便に継代する観点からは、上記継代培養工程における継代方法は、細胞剥離剤を用いる方法であることが好ましい。従来のi P S細胞の製造方法では、特に1回目の継代時において、コロニーピックを行うことが必要であったものの、本発明のi P S細胞の製造方法では、上記除去工程及び上記導入工程が備えられているので、1回目の継代時でも、細胞剥離剤を用いて細胞を継代することができる。

[0156] 上記細胞剥離剤の市販品としては、Thermo Fisher Scientific社製「TrypLE Select」及び「TrypLE Express」等が挙げられる。

[0157] 上記継代培養工程における細胞培養時には、接着培養を行うことが好ましい。

[0158] 上記継代培養工程で使用可能な培地として、従来公知の培地を使用可能で

ある。上記培地は、液体培地であることが好ましい。上記培地として、市販品の培地を用いてもよく、自家調製した培地を用いてもよい。上記培地としては、例えば、上述の非特許文献1に記載の培地を用いることができる。上記培地としては、上記培養工程（B）の欄に記載した培地を使用可能である。

- [0159] 上記継代培養工程の培養温度は、好ましくは36℃以上、好ましくは38℃以下である。上記継代培養工程の培養時のCO₂濃度は、好ましくは4%以上、好ましくは6%以下である。例えば、上記継代培養工程の培養条件は、37℃及びCO₂濃度5%の条件である。また、上記継代培養工程の培養時には、培地の交換を行ってもよく、行わなくてもよい。培地の交換を行う場合には、例えば、2日間に1回の頻度で新鮮な培地に交換することができる。
- [0160] 上記継代培養工程における細胞の継代回数は、1回であってもよく、2回であってもよく、2回以上であってもよく、3回であってもよく、3回以上であってもよく、4回以上であってもよく、5回以上であってもよく、6回以上であってもよく、7回以上であってもよく、10回以下であってもよく、9回以下であってもよく、8回以下であってもよく、7回以下であってもよく、6回以下であってもよく、5回以下であってもよく、4回以下であってもよい。
- [0161] 従来のiPS細胞の製造方法では、品質の良いiPS細胞を得るために、細胞の継代を繰り返す必要があるものの、本発明に係るiPS細胞の製造方法では、細胞の継代回数が少なくても、品質の良いiPS細胞を得ることができる。したがって、本発明に係るiPS細胞の製造方法では、短期間で品質の良いiPS細胞を得ることができる。
- [0162] 体細胞がiPS細胞に誘導されたか否かは、例えば、細胞の形態を観察したり、フローサイトメーターにより細胞に未分化マーカーが発現しているかを分析したりすることにより、確かめることができる。上記未分化マーカーとしては、TRA-1-60及びSSEA4等が知られている。特に、TRA-1-60は、iPS細胞又はES細胞に特異的な抗原であり、体細胞では検出されないことから

、iPS細胞に誘導されたか否かを確認するために好適なマーカーである（例えば、WO 2018/155595 A1、特開 2019-162054 号公報、Elayne M Chan1 et al. (Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells, nature biotechnology volume 27 number 11 november 2009)）。

[0163] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。本発明は以下の実施例に限定されない。

[0164] 細胞培養基材として、以下の細胞培養容器及び細胞培養マイクロキャリアを用意した。

[0165] 培養容器（P）（ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂を含む細胞足場材を備えるプレート、下記の「培養容器（P）の作製方法」により作製）

マイクロキャリア（P）（ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂を含む細胞足場材を備えるマイクロキャリア、下記の「マイクロキャリア（P）の作製方法」により作製）

培養容器（L）（ニッピ社製「ラミニン511E8フラグメント（iMatrix-511）」がコーティングされたプレート、下記の「培養容器（L）の作製方法」により作製）

[0166] なお、下記の表では、上記培養容器（P）及び上記マイクロキャリア（P）が備える細胞足場材である「ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂」を「PVB-AA」と記載し、上記培養容器（L）が備える細胞足場材である「ラミニン511E8フラグメント（iMatrix-511）」を「ラミニン」と記載した。

[0167] [培養容器（P）の作製方法]

ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂を含む塗工液の作製：

ポリビニルアセタール樹脂として、アセタール化度（ブチラール化度）65モル%、水酸基量32モル%、アセチル基量3モル%のポリビニルブチラール樹脂を用意した。アクリル酸30重量部とポリビニルアセタール樹脂70重量部とをテトラヒドロフラン255重量部に溶解させてポリマー混合溶

液を得た。得られたポリマー混合溶液にパーブチルO（日油社製）0.015重量部を溶解させ、90℃で6時間反応させた。次いで、反応後の溶液を30000重量部の水に混合した。得られた沈殿物を80℃で3時間真空乾燥し、リンカー（アクリル酸）を有するポリビニルアセタール樹脂（リンカーを有するポリビニルブチラール樹脂）を作製した。以下、「リンカーを有するポリビニルアセタール樹脂」を「ポリビニルアセタール樹脂（X）」と記載することがある。

[0168] 第1の溶媒としてジメチルホルムアミド（DMF）を用意した。第2の溶媒としてジメチルホルムアミド（DMF）を用意した。ペプチドとして、A r g - G l y - A s p - P h e - L y s のアミノ酸配列を有する環状のペプチド（アミノ酸残基数5個、A r g と L y s とが結合することにより環状骨格を形成、P h e はD体）を用意した。縮合剤として1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩を用意した。第1の溶媒1000重量部にポリビニルアセタール樹脂（X）50重量部とペプチド2重量部とを混合して、第1の溶液を調製した。また、第2の溶媒1000重量部に縮合剤1重量部を混合して、第2の溶液を調製した。第1の溶液と第2の溶液とを混合して、ポリビニルアセタール樹脂（X）とペプチドと縮合剤とを含む溶液を調製した。

[0169] 得られた溶液を40℃で2時間反応させ、ポリビニルアセタール樹脂（X）のアクリル酸に由来する構造単位におけるカルボキシル基と、ペプチドのL y s のアミノ基とを脱水縮合させ、ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂を含む溶液を得た。

[0170] 得られたペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂を含む溶液をDMFで100倍希釈し、イオン交換樹脂（オルガノ社製）が充填されたカラムに0.3 mL / m i n の速度で滴下して洗浄した。洗浄後の溶液を60℃、3時間の真空乾燥をして得られた乾固物をブタノール（アルコール溶媒）に溶解後、ブタノール（アルコール溶媒）100重量部に対して酢酸（pH調整剤）5重量部を添加して、ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂とブタノール

とを含む塗工液を得た。なお、塗工液中のペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂の含有量は0.1重量%とした。

[0171] 培養容器（P）の作製：

得られた塗工液20 μ Lをキャストコート法で96ウェルプレート（各ウェルの底面積：0.32cm²）の各ウェルに塗工した後、60℃、3時間の真空乾燥でアルコール溶媒を除去した。このようにして各ウェルの底面に、ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂を含む細胞足場材（塗工液の乾燥物層である樹脂膜）が配置された培養容器（P）を得た。なお、ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂において、ペプチド部の含有率は1モル%であった。また、ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂の数平均分子量は5000であった。

[0172] [マイクロキャリア（P）の作製方法]

基材粒子として、平均粒子径300 μ m、粒子径のCV値1%のジビニルベンゼン粒子を用意した。上記のポリビニルアセタール樹脂（X）1重量部をブタノール19重量部に溶解させた。得られた溶液に基材粒子を1重量部加えて攪拌後、濾過して純水にて洗浄し、60℃で5時間真空乾燥することで、リンカー部を形成したポリビニルアセタール樹脂被覆粒子を得た。また、上記のペプチド（A r g - G l y - A s p - P h e - L y sのアミノ酸配列を有する環状のペプチド（アミノ酸残基数5個、A r gとL y sとが結合することにより環状骨格を形成、P h eはD体））を用意した。このペプチド1重量部と、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（縮合剤）1重量部とを、カルシウム及びマグネシウムの双方を含まないリン酸緩衝生理食塩水に該ペプチドの終濃度が1mMとなるように添加し、ペプチド含有液を作製した。得られたペプチド含有液20重量部に、リンカー部を形成したポリビニルアセタール樹脂被覆粒子を1重量部加えることでリンカー部のカルボキシル基と、ペプチドのL y sのアミノ基とを脱水縮合した。得られた懸濁液を濾過して純水にて洗浄し、60℃で5時間真空乾燥した。このようにして、基材粒子の外表面にペプチド含有ポリビ

ニルアセタール樹脂を含む細胞足場材が配置されたマイクロキャリア（P）を得た。なお、ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂において、ペプチド部の含有率は1モル%であった。また、ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂の数平均分子量は50000であった。

[0173] [培養容器（L）の作製方法]

ニッピ社製「ラミニン511E8フラグメント（iMatrix-511、0.5mg/mL）」を、リン酸緩衝生理食塩水（PBS（Ca²⁺/Mg²⁺））で300倍に希釈し、得られた液を、96ウェルプレート（各ウェルの底面積：0.32cm²）の各ウェルに0.5μg/cm²になるように添加した。この96ウェルプレートを、インキュベーター内にて37℃及びCO₂濃度5%の条件下で1時間静置した後、上清を除去し、各ウェルの底面にラミニン511E8フラグメントが配置された培養容器（L）を得た。

[0174] 培地として、以下を用意した。

[0175] 培地（1）（下記の「培地（1）の作製方法」により作製、非特許文献1に記載のNon-Tcell用単核球培養培地に相当）

培地（2）（下記の「培地（2）の作製方法」により作製、非特許文献1に記載の維持培養培地StemFitに相当）

[0176] [培地（1）の作製方法]

味の素社製「Stem Fit AK02N用A液」400mLと、味の素社製「Stem Fit AK02N用B液」100mLとを混合した。得られた混合液に、サイトカインの終濃度として、IL-6を50ng/mL、SCFを50ng/mL、TPOを10ng/mL、Flt-3Lを20ng/mL、IL-3を20ng/mL、G-CSFを10ng/mLとなるように添加した。このようにして、培地（1）を得た。

[0177] [培地（2）の作製方法]

味の素社製「Stem Fit AK02N用A液」400mLと、味の素社製「Stem Fit AK02N用B液」100mLと、味の素社製「Stem Fit AK02N用C液」2mLとを混合した。このようにして、培地（2）を得た。

[0178] 以下の実施例では、下記に特記している部分を除き、非特許文献1に記載の Protocol に従って細胞培養及び初期化因子の導入を行った。

[0179] (実施例1)

＜播種工程＞

体細胞として、末梢血単核細胞 (Precision for Medicine 社製「正常ヒトPBMC-日本人ドナー精製済」) を用意した。また、培養容器 (P) に、1 ウェルあたり $150 \mu\text{L}$ の培地 (1) を添加した。次いで、培養容器 (P) に $8.0 \times 10^4 \text{ cells/well}$ の播種量で末梢血単核細胞を播種した。

[0180] <培養工程 (A)>

培養容器 (P) に播種された細胞を、インキュベーター内にて、 37°C 及び CO_2 濃度 5 % の条件下で 5 日間培養した。なお、培養開始から 3 日目に、浮遊している体細胞をなるべく除かないように、ピペットを用いて液面に近い位置からウェル内の液体培地 $75 \mu\text{L}$ を回収した後、新鮮な液体培地 $75 \mu\text{L}$ と交換した。

[0181] <除去工程>

培養開始から 5 日目 (上記播種工程で体細胞を播種してから 5 日目) に、細胞足場材に接着せずに浮遊しているすべての体細胞を、培養容器内の液体培地とともに除去した。

[0182] <導入工程>

$\text{MOI} = 0.75$ かつ全体量が $50 \mu\text{L}$ となるように、センダイウイルスベクター (ときわバイオ社製「SRV™iPSC-4 Vector」) と培地 (1) とを混合し、ウイルスベクター含有液を得た。上記除去工程後の培養容器 (P) の各ウェルに、ウイルスベクター含有液をウェル内全面が浸るように添加した。なお、培養容器 (P) の各ウェルへのウイルスベクター含有液の添加は、上記除去工程で浮遊している体細胞を除去してから、0.5 分以内に行った。ウイルスベクター含有液が添加された培養容器 (P) を、 37°C 及び CO_2 濃度 5 % のインキュベーター内に 2 時間静置した。次いで、各ウェルに新鮮な培

地（１）を $150\mu\text{L}$ 添加し、 $150\mu\text{L}$ の培地を除去するという洗浄操作を合計で３回行った。洗浄操作後、各ウェルに新鮮な培地（１）を $100\mu\text{L}$ 添加した。このようにして、体細胞へ初期化因子を導入した。

[0183] <培養工程（Ｂ）>

培養容器（Ｐ）の各ウェルに新鮮な培地（２）を $70\mu\text{L}$ 添加し、 37°C 及び CO_2 濃度 ５％のインキュベーター内で初期化因子を導入した体細胞を接着培養した。なお、培養工程（Ｂ）の培養開始から３日目に、新鮮な培地（２） $70\mu\text{L}$ を、培養容器（Ｐ）の各ウェルに添加した。培養工程（Ｂ）の培養開始から５日目及び７日目に、培養容器（Ｐ）の各ウェルから培地 $70\mu\text{L}$ を除去し、新鮮な培地（２）を $70\mu\text{L}$ 添加した。培養工程（Ｂ）の培養開始から９日目以降は、２日間に１回又は２回の頻度でウェル内の液体を新鮮な培地（２） $70\mu\text{L}$ に交換した。

[0184] <継代培養工程>

培養工程（Ｂ）を開始してから１４日目の細胞集団を、細胞剥離剤（Thermo Fisher Scientific社製「TrypLE Select」）を用いてシングル細胞とした。得られたシングル細胞から、全自動細胞カウンターにより細胞培養容器の各ウェル内に存在する総細胞数を算出した。また、算出した総細胞数に基づいて、 $1 \times 10^4 \text{ cells} \sim 50 \times 10^4 \text{ cells}$ の細胞を、新たな培養容器（Ｐ）に播種することで、細胞の継代を行った。なお、細胞の継代は、１週間に１回又は２回行い、培地は、培地（２）を使用した。継代時は、培地（２）に ROCK 阻害剤（Y-27632）を最終濃度 $10\mu\text{mol/L}$ となるように添加した。また、継代を行った翌日以降は、３日間に１回以上の頻度で培地交換を行った。

[0185] （実施例２）

培養容器（Ｐ）に代えて培養容器（Ｌ）を用いたこと以外は、実施例１と同様にして、播種工程から継代培養工程までを行った。

[0186] （実施例３）

体細胞として、単球（ケー・エー・シー社製「ヒト末梢血由来 CD14 陽

性単球」)を用いたこと、播種工程における播種量を下記の表に記載のように変更したこと以外は、実施例1と同様にして、播種工程から継代培養工程までを行った。

[0187] (実施例4)

前処理としてマイクロキャリア(P)をPBSに30分間浸漬した。96ウェルプレート(各ウェルの底面積: 0.32 cm^2)の各ウェルに、マイクロキャリア(P)がウェル内で2~3層となるように、前処理後のマイクロキャリア(P)を添加した。播種工程における播種量を下記の表に記載のように変更したこと、この96ウェルプレートを用いてマイクロキャリア(P)の表面で接着培養を行ったこと以外は、実施例1と同様にして、播種工程から培養工程(B)までを行った。

[0188] 継代培養工程は、下記以外は実施例1と同様にして行った。

[0189] 培養工程(B)を開始してから21日目に、各ウェルに細胞剥離剤(Thermo Fisher Scientific社製「TrypLE Express」) $100\text{ }\mu\text{L}$ を添加して10分静置した。次に、20~30回ピペッティングを行い、チューブにセットした細胞濾過器(コーニング社製、 $40\text{ }\mu\text{m}$ pore size)でマイクロキャリア(P)を分離し、細胞のみをチューブ内に回収した。新たなマイクロキャリア(P)を用意して、上記と同様にして前処理を行った後、48ウェルプレートの各ウェルに、該マイクロキャリア(P)がウェル内で2~3層となるように、前処理後のマイクロキャリア(P)を添加した。回収した細胞を、48ウェルプレートに、 $1.25 \times 10^4\text{ cells/well}$ となるように播種することで、細胞の継代を行った。

[0190] (比較例1)

比較例1では、細胞足場材に接着している体細胞を回収し、回収した体細胞に初期化因子を導入した。具体的には、以下の手順でiPS細胞を樹立した。

[0191] <播種工程及び培養工程(A)>

播種工程における播種量を下記の表に記載のように変更したこと以外は、

実施例 1 と同様にして、播種工程から培養工程（A）までを行った。

[0192] <回収工程>

培養上清を全て除去した後、各ウェルを P B S 1 m L で 2 回洗浄した。次いで、細胞足場材に接着している体細胞を、細胞剥離剤（Thermo Fisher Scientific 社製「TrypLE Select」）で剥離し、1.5 m L チューブに回収した。

[0193] <導入工程>

1.5 m L チューブに回収した体細胞を 3×10^5 c e l l s の細胞数で 1.5 m L チューブに収容し、1.5 m L チューブを $300 \times g$ 及び 5 分間の条件で遠心した。遠心後、上清を除去し、1.5 m L チューブに培地（1）を適量添加した。次いで、1.5 m L チューブに、M O I = 3 となるように、センダイウイルスベクター（ときわバイオ社製「SRVTMiPSC-4 Vector」）を添加した。次いで、1.5 m L チューブを 37°C インキュベーター内で 2 時間静置した。次いで、1.5 m L チューブに、培地（1）を 1 m L 添加した後、 $300 \times g$ 及び 5 分間の条件で遠心した。遠心後、上清を除去してタッピングした。上述の培地（1）の添加、遠心、及び上清の除去の工程をさらに 2 回繰り返した。次いで、1.5 m L チューブに、培地（1）を 0.1 m L 添加してよく混和した。このようにして、体細胞へ初期化因子を導入した。

[0194] <培養工程（B）>

培養容器（P）に、1 ウェルあたり 0.75 m L の培地（2）を添加した。導入工程で得られた初期化因子を導入した体細胞を、 1.5×10^5 c e l l s / w e l l の細胞数で培養容器（P）における細胞足場材上に播種し、インキュベーター内にて、 37°C 及び CO_2 濃度 5 % の条件下で接着培養した。なお、培養工程（B）の培養開始から、1 日目、3 日目、5 日目及び 7 日目に、培養容器（P）に新鮮な培地（2）を 0.5 m L 添加した。また、培養工程（B）の培養開始から 9 日目以降は、2 日間に 1 回以上の頻度で培養容器（P）内の液体を新鮮な培地（2）0.75 m L に交換した。

[0195] <継代培養工程>

培養工程（B）で得られた細胞集団に対して、実施例 1 と同様にして、継

代培養工程を行った。

[0196] (比較例 2)

培養工程 (A) の後、細胞足場材に接着せずに浮遊している体細胞を回収し、この体細胞を用いて導入工程を行ったこと以外は、比較例 1 と同様にして、播種工程から継代培養工程までを行った。

[0197] 実施例 1 ～ 4 及び比較例 1, 2 のいずれにおいても、培養工程 (B) の培養開始から 14 日目にコロニー形態を確認したところ、i P S 細胞のコロニー形態が確認された。

[0198] (評価)

以下の説明及び図において、P と共に用いられている数字は、継代培養工程を開始してからの継代数を意味する。P 0 は、0 継代目であり、培養工程 (B) 後の細胞 (継代培養工程に供する前の細胞) である。

[0199] (1) ウイルス感染前の細胞のフローサイトメトリー測定

実施例 1 において、上記除去工程によって除去された体細胞 (浮遊している体細胞) と、上記除去工程後に細胞足場材に接着している体細胞とのそれぞれを、フローサイトメトリー (Thermo Fisher Scientific 社製「Attune NxT Flow Cytometer」) にて測定した。なお、フローサイトメトリーに供するための上記細胞足場材に接着している体細胞のサンプルは、ウェルを P B S 1 mL で 2 回洗浄したのち、細胞剥離剤 (Thermo Fisher Scientific 社製「TrypLE Select」) で剥離することにより得た。F S C - S S C のドットプロットの結果を図 1 に示す。図 1 に示すように、浮遊している体細胞と比べて、細胞足場材に接着している体細胞には、F S C、S S C がともに大きい性質の細胞が顕著に多かった。

[0200] (2) 細胞足場材に接着している体細胞の貪食能

実施例 1 において、以下の手順で、上記除去工程後に細胞足場材に接着している体細胞の貪食能を評価した。pHrodo Green S.aureus BioParticles conjugates (Life Technologies 社製) を終濃度 0.1 mg/mL となるように培地 (1) に添加し、上記除去工程後の培養容器のウェルに 750 μ L 添加

した。次いで、インキュベーター内にて37℃及びCO₂濃度5%の条件下で90分間静置した。次いで、蛍光顕微鏡（キーエンス社製「BZ-X800」）を用いて、蛍光視野及び明視野のそれぞれにて、200倍の倍率でウェルを観察した。なお、陰性コントロールとして、以下の手順での評価も行った。まず、cytochalasin Dを終濃度10 μMとなるよう培地（1）に添加し、上記除去工程後の培養容器のウェルに750 μL添加した。次いで、インキュベーター内にて37℃及びCO₂濃度5%の条件下で30分間静置した。次いで、pHrodo Green S.aureus BioParticles conjugatesを終濃度0.1 mg/mLとなるようにウェルに添加し、インキュベーター内で37℃及びCO₂濃度5%の条件下で90分間静置した。次いで、上記と同様の観察条件でウェルを観察した。結果を図2に示す。図2に示すように、蛍光視野では、細胞足場材に接着している細胞が、cytochalasin Dの非存在下でのみ観察された。pHrodo Green S.aureus BioParticles conjugatesは、ファゴソーム外では蛍光を呈さないが、ファゴソーム内では蛍光を呈する。また、cytochalasin Dは、貪食作用の抑制剤として作用する。そのため、上記除去工程後に細胞足場材に接着している細胞は、貪食作用を有する細胞であることが確認された。

[0201] （3）ウイルス感染後の細胞の形態観察

実施例1及び比較例2において、以下の手順で、初期化因子を導入した体細胞を培養してから1日目（ウイルスを感染させてから1日目）の細胞の形態を観察した。培養工程（B）を開始してから1日目の培養容器のウェルを1×DPBSで1回洗浄した。蛍光顕微鏡（キーエンス社製「BZ-X800」）を用いて、明視野にて、100倍の倍率でウェルを観察し、撮影した。結果を図3に示す。図3に示すように、実施例1では、比較例2と比べて、サイズが大きく、細長い形状の細胞が多数観察された。

[0202] （4）ウイルスの残存率

実施例1～3及び比較例1，2において、以下の手順で、ウイルスの残存率を評価した。細胞の継代時にシングル細胞の一部を1.5 mLチューブに回収した。回収したシングル細胞をフローサイトメトリー（Thermo Fisher S

cientific社製「Attune NxT Flow Cytometer」)にて測定した。F S C - S S Cのドットプロットに展開されたメインの細胞集団に含まれるG F P陽性細胞の割合を分析した。結果を表1～3及び図4に示す。なお、図4では、実施例1, 2及び比較例1, 2の結果及びN数を示している。図4において、左から順にP2、P3のデータである。図4の縦軸のG F P陽性率が小さいほどウイルスの残存率が少ないことを意味する。表1～3及び図4に示すように、実施例1～3では、ウイルスの残存率の結果に特に優れており、また、ウイルスの消失までの時間が短かった。

[0203] (5) 未分化性 (TRA-1-60陽性率)

TRA-1-60に対する抗体であって、PE蛍光色素で標識された抗体 (Thermo Fisher Scientific社製「TRA-1-60 PE Antibody」) を用意した。P2、P4の細胞それぞれをこの抗体と接触させた。次いで、フローサイトメトリー (Thermo Fisher Scientific社製「Attune NxT Flow Cytometer」) を用いて、TRA-1-60の陽性率を求めた。具体的には、実施例1～3及び比較例1, 2において、以下の手順で評価した。

[0204] P2、P4の細胞を、剥離剤 (Thermo Fisher Scientific社製「TrypLE Select」) を用いてシングル細胞とした。得られたシングル細胞を全自動細胞カウンターに供し、細胞濃度を算出した。次いで、 5×10^5 cellsの細胞を1.5 mLチューブに採取し、この1.5 mLチューブを $300 \times g$ 及び5分間の条件で遠心した。遠心後、上清を除去して、1.5 mLチューブに $1 \times DPBS$ を添加した。次いで、再度、上記の条件で、遠心及び上清の除去を行った。次いで、1重量% BSA含有DPBSでブロッキングを実施した。次いで、1.5 mLチューブに、上述した抗体 (Thermo Fisher Scientific社製「TRA-1-60 PE Antibody」) を適量で含む抗体溶液を添加し、暗所及び室温で1時間インキュベーションした。次いで、1.5 mLチューブを $300 \times g$ 及び5分間の条件で遠心した後、上清を除去し、 $1 \times DPBS$ で2回洗浄した。次いで、1.5 mLチューブに1重量% BSA含有PBSを0.4 mL加えて混和し、フローサイトメトリーにて測定した。F S C - S

SCのドットプロットに展開されたメインの細胞集団に含まれるTRA-1-60陽性細胞の割合（TRA-1-60陽性率）を分析した。結果を表1～3及び図5に示す。なお、図5では、実施例1，2及び比較例1，2の結果及びN数を示している。図5において、左から順にP2，P4のデータである。表1～3及び図5に示すように、実施例1～3では、短期間でTRA-1-60の陽性率が高い細胞集団（iPS細胞を含む細胞集団）が得られた。

[0205] 詳細及び結果を下記の表1～3及び図に示す。なお、実施例4では、目視にてiPS細胞の樹立を確認した。

[0206] [表1]

		実施例 1	実施例 2
体細胞の種類		末梢血単核細胞	末梢血単核細胞
細胞培養基材	種類	培養容器(P)	培養容器(L)
	細胞足場材	PVB-AA	ラミニン
播種工程	播種量(cells／well)	8.0×10 ⁴	8.0×10 ⁴
	播種密度(cells／cm ²)	2.5×10 ⁵	2.5×10 ⁵
除去工程		浮遊している細胞を除去	浮遊している細胞を除去
回収工程		－	－
導入工程	初期化因子を導入した細胞	細胞足場材に 接着している細胞	細胞足場材に 接着している細胞
	MOI	0.75	0.75
評価	ウイルスの残存率 (GFP陽性率(平均))	0.38%(P2) 0.05%(P3)	0.83%(P2) 0.06%(P3)
	未分化性 (TRA-1-60陽性率)	90.5%(P2) 90.3%(P4)	88.9%(P2) 89.2%(P4)

[0207]

[表2]

		実施例 3	実施例 4
体細胞の種類		単球	末梢血単核細胞
細胞培養基材	種類	培養容器(P)	マイクロキャリア (P)
	細胞足場材	PVB-AA	PVB-AA
播種工程	播種量(cells／well)	2.0×10^4	1.6×10^5
	播種密度(cells／cm ²)	6.3×10^4	5.5×10^4
除去工程		浮遊している細胞を除去	浮遊している細胞を除去
回収工程		－	－
導入工程	初期化因子を導入した細胞	細胞足場材に 接着している細胞	細胞足場材に 接着している細胞
	MOI	0.75	0.75
評価	ウイルスの残存率 (GFP陽性率(平均))	0.03%(P2) 0.03%(P3)	－
	未分化性 (TRA-1-60陽性率)	61.9%(P2) 76.0%(P4)	－

[0208]

[表3]

		比較例 1	比較例 2
体細胞の種類		末梢血単核細胞	末梢血単核細胞
細胞培養基材	種類	培養容器(P)	培養容器(P)
	細胞足場材	PVB-AA	PVB-AA
播種工程	播種量(cells／well)	2.0×10^6	2.0×10^6
	播種密度(cells／cm ²)	6.3×10^6	6.3×10^6
除去工程		－	－
回収工程		接着している細胞を回収	浮遊している細胞を回収
導入工程	初期化因子を導入した細胞	回収した細胞	回収した細胞
	MOI	3	3
評価	ウイルスの残存率 (GFP陽性率(平均))	0.15%(P2) 0.07%(P3)	1.31%(P2) 0.85%(P3)
	未分化性 (TRA-1-60陽性率)	77.1%(P2) 75.1%(P4)	76.2%(P2) 75.6%(P4)

[0209] 図6は、実施例3において単球から樹立したiPS細胞のコロニーの顕微鏡写真である。より具体的には、図6は、P2の細胞を培養してから5日目の顕微鏡写真（倍率100倍）である。

請求の範囲

- [請求項1] 細胞足場材を備える細胞培養基材に、体細胞を播種する播種工程と、
前記細胞足場材に接着せずに浮遊している体細胞を除去する除去工程と、
前記細胞足場材に接着している体細胞に、初期化因子を導入する導入工程とをこの順に備える、人工多能性幹細胞の製造方法。
- [請求項2] 前記播種工程において播種される体細胞が、末梢血単核細胞を含む、請求項1に記載の人工多能性幹細胞の製造方法。
- [請求項3] 前記導入工程において前記細胞足場材に接着している体細胞が、食作用を有する細胞を含む、請求項1又は2に記載の人工多能性幹細胞の製造方法。
- [請求項4] 前記細胞足場材が、RGD配列を有する、請求項1～3のいずれか1項に記載の人工多能性幹細胞の製造方法。
- [請求項5] 前記細胞足場材が、合成樹脂部とペプチド部とを有するペプチド含有樹脂を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の人工多能性幹細胞の製造方法。
- [請求項6] 前記ペプチド含有樹脂が、ポリビニルアセタール樹脂部とペプチド部とを有する、請求項5に記載の人工多能性幹細胞の製造方法。
- [請求項7] 前記導入工程において、センダイウイルスベクターを用いて前記細胞足場材に接着している体細胞に、初期化因子を導入する、請求項1～6のいずれか1項に記載の人工多能性幹細胞の製造方法。