

明 細 書

発明の名称： 未分化幹細胞除去剤、及び未分化幹細胞除去方法

技術分野

[0001] 本発明は、未分化幹細胞除去剤、及び未分化幹細胞除去方法に関する。また、前記未分化幹細胞除去剤を含む培地、移植用細胞の製造方法、及び医薬組成物に関する。

本願は、2016年10月17日に、日本に出願された特願2016-203839号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 近年、胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）などの多能性を有する幹細胞についての研究が進められている。これらの細胞は多能性を有することから、分化・誘導して所望の系譜に分化した細胞を作製し、移植医療において使用することが可能になりつつある。

[0003] 胚性幹細胞や人工多能性幹細胞の分化・誘導は、通常、*in vitro*で行われる。

しかしながら、*in vitro*では、全ての幹細胞に対して目的とする系譜の分化を惹起することは難しく、分化・誘導操作後も一部に未分化幹細胞が残存することがある。このような未分化幹細胞は、増殖活性を有し、かつ多種類の細胞に分化できることから、生体内に移植された場合、奇形腫を形成する恐れがある（例えば、非特許文献1を参照）。このような理由から、幹細胞を分化・誘導して作製した細胞集団を、そのまま生体に移植して治療に用いることは困難である。

[0004] したがって、幹細胞から分化・誘導した細胞の生体への移植を安全に実行し、理想的な治療効果を得るために、未分化幹細胞を除去することが必要である。また、未分化幹細胞が残存したまま移植されてしまった場合には、生体内における未分化幹細胞の増殖を抑制する必要がある。

[0005] これまでに、未分化幹細胞を培養条件中で選択的に除去できるとされる方

法が報告されている（例えば、非特許文献2～4を参照）。本発明者らの研究グループでも、非心筋細胞や未分化幹細胞から、心筋細胞を選抜する方法を開発してきた（特許文献1～6、非特許文献5を参照）。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：国際公開第2006/022377号
特許文献2：国際公開第2007/088874号
特許文献3：国際公開第2009/017254号
特許文献4：国際公開第2010/114136号
特許文献5：国際公開第2011/052801号
特許文献6：国際公開第2016/010165号

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Miura et al., (2009) Nature Biotech., 8, 743-745.
非特許文献2：Ben-David, et al., (2013) Cell Stem Cell, 12, 167-179.
非特許文献3：Wang, et al., (2009) Science, 325, 435-439.
非特許文献4：Shiraki, et al., (2014) Cell Metabolism, 19, 780-794.
非特許文献5：Tohyama, et al., (2016) Cell Metabolism, 23, 663-674.

発明の概要

- [0008] しかしながら、未分化幹細胞の残存率を低減させる目的において、未分化幹細胞の除去技術については未だ検討の余地があった。
- [0009] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、未分化幹細胞の高効率な除去を可能とする未分化幹細胞除去剤、及び未分化幹細胞除去方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、未分化幹細胞を、脂肪酸合成阻害剤、脂肪酸利用阻害剤、又はコレステロール合成阻害剤の存在下で培養することにより、未分化幹細胞の細胞死を誘導可能である

ことを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0011] すなわち、本発明は以下の態様を含む。

[1] 脂肪酸合成阻害剤、脂肪酸利用阻害剤、及びコレステロール合成阻害剤からなる群から選択される少なくとも一種を含有することを特徴とする、未分化幹細胞除去剤。

[2] 前記脂肪酸合成阻害剤が、ATPクエン酸リアーゼ、脂肪酸合成酵素、アセチル-CoAカルボキシラーゼ、及びマロニル-CoAデカルボキシラーゼからなる群から選ばれる少なくとも一種の因子を標的として脂肪酸合成を阻害するものであり、

前記脂肪酸利用阻害剤が、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1を標的として脂肪酸利用を阻害するものである、

前記[1]に記載の未分化幹細胞除去剤。

[3] 前記脂肪酸合成阻害剤又は脂肪酸利用阻害剤の適用対象中の濃度が、0.1～500 μ Mである前記[1]又は[2]に記載の未分化幹細胞除去剤。

[4] 前記コレステロール合成阻害剤が、アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼ、HMG-CoA合成酵素、及びHMG-CoAレダクターゼからなる群から選ばれる少なくとも一種の因子を標的としてコレステロール合成を阻害するものである、前記[1]に記載の未分化幹細胞除去剤。

[5] 前記コレステロール合成阻害剤の適用対象中の濃度が、0.01～50 μ Mである、前記[1]又は[4]に記載の未分化幹細胞除去剤。

[6] グルコース、グルタミン、及びメチオニンからなる群から選ばれる少なくとも一種の化合物を含む、前記[1]～[5]のいずれか一つに記載の未分化幹細胞除去剤。

[7] オルリスタット、C75、LY294002、SB204990、エトモキシル、ペルヘキシリン、及びシンバスタチン、並びにこれらの塩からなる群から選ばれる1又は2以上を含有することを特徴とする、未分化幹細胞除去剤。

〔８〕前記〔１〕～〔７〕のいずれか一つに記載の未分化幹細胞除去剤を含む培地。

〔９〕未分化幹細胞及び分化細胞を含む細胞混合物を、前記〔１〕～〔７〕のいずれか一つに記載の未分化幹細胞除去剤の存在下で培養することを含む、未分化幹細胞除去方法。

〔１０〕前記未分化幹細胞が人工多能性幹細胞である、前記〔９〕に記載の未分化幹細胞除去方法。

〔１１〕前記分化細胞が心筋細胞である、前記〔９〕又は〔１０〕に記載の未分化幹細胞除去方法。

〔１２〕以下の（ｉ）及び（ｉｉ）の工程を含む、移植用細胞の製造方法：

（ｉ）未分化幹細胞から所望の分化細胞を誘導する工程；及び

（ｉｉ）前記工程（ｉ）により得られた細胞混合物を、前記〔１〕～〔７〕のいずれか一つに記載の未分化幹細胞除去剤の存在下で培養する工程。

[0012] 〔１３〕前記未分化幹細胞が人工多能性幹細胞である、前記〔１２〕に記載の製造方法。

〔１４〕前記分化細胞が心筋細胞である、前記〔１２〕又は〔１３〕に記載の製造方法。

〔１５〕未分化幹細胞から誘導された分化細胞を移植された対象において、前記未分化幹細胞の増殖に起因する疾患を治療又は予防するための医薬組成物であって、前記〔１〕～〔７〕のいずれか一つに記載の未分化幹細胞除去剤を含む、医薬組成物。

〔１６〕前記未分化幹細胞が人工多能性幹細胞である、前記〔１５〕に記載の医薬組成物。

〔１７〕前記未分化幹細胞から誘導された分化細胞が心筋細胞である、前記〔１５〕又は〔１６〕に記載の医薬組成物。

発明の効果

[0013] 本発明の未分化幹細胞除去剤によれば、未分化幹細胞の高効率な除去が可

能である。

本発明の未分化幹細胞除去方法によれば、未分化幹細胞の高効率な除去が可能である。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]細胞内での脂肪酸の合成経路の概略を説明する図である。

[図2]実験例1で、ヒトiPS細胞由来心筋細胞とiPS細胞との、FASNの発現の比較の結果を示す画像である。

[図3]実験例2で培養した未分化幹細胞株の画像である。

[図4]実験例3で培養した未分化幹細胞株の画像である。

[図5]実験例4で培養した純化精製心筋細胞の画像である。

[図6]実験例5で培養した線維芽細胞の画像である。

[図7]実験例6で培養した、ヒトiPS細胞由来心筋細胞とヒトiPS細胞とを含む細胞混合物の画像である。

[図8]実験例6で、脂肪酸合成阻害剤を含む培地と含まない培地とで培養された細胞混合物における、Oct4陽性のコロニー数を比較した結果を示すグラフである。

[図9]細胞内でのコレステロールの合成経路の概略を説明する図である。

[図10]実験例7で、ヒトiPS細胞由来心筋細胞とヒトiPS細胞との、FASNの発現の比較の結果を示す画像である。

[図11]実験例7で、ヒトiPS細胞由来心筋細胞とヒトiPS細胞との、FASNの発現の比較の結果を示すウエスタンブロッティングの写真である。

[図12]実験例8で培養した未分化幹細胞株の画像である。

[図13]実験例9で、脂肪酸合成阻害剤及び脂肪酸を含む培地（PA-BSA）と、脂肪酸合成阻害剤を含み、脂肪酸を含まない培地（BSA）と、で培養されたヒトiPS細胞のウェルの画像である。

[図14]実験例9で、脂肪酸合成阻害剤及び脂肪酸を含む培地（PA-BSA）と、脂肪酸合成阻害剤を含み、脂肪酸を含まない培地（BSA）と、で培養されたヒトiPSにおける、生存細胞数を比較した結果を示すグラフであ

る。

[図15]実験例10で、FASN siRNAを導入した未分化幹細胞株と、陰性対照 siRNA (N/C siRNA) を導入した未分化幹細胞株との、FASNの発現を比較した結果を示すウェスタンブロットティングの写真である。

[図16]実験例10で、FASN siRNAを導入した未分化幹細胞株 (FASN ND) と、陰性対照 siRNA を導入した未分化幹細胞株 (N/C) との、細胞増殖を比較した結果を示すグラフである。

[図17]実験例11で、脂肪酸合成阻害剤及び脂肪酸を含む培地 (PA-BSA) と、脂肪酸合成阻害剤を含み、脂肪酸を含まない培地 (BSA) と、で培養された、FASN siRNAを導入した未分化幹細胞株 (FASN KD) と、陰性対照 siRNA を導入した未分化幹細胞株 (N/C) との、細胞増殖を比較した結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0015] <<定義等>>

本明細書において、「未分化幹細胞」は、分化多能性を有する多能性幹細胞を包含する概念として用いられ、胚性幹細胞 (embryonic stem cells: ES細胞)、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS細胞)、及びこれらの幹細胞から誘導された分化多能性を有する細胞、並びに各種体性幹細胞を含み得る。「未分化幹細胞」は、分化多能性を有する細胞であれば特に限定されず、上記例示したES細胞やiPS細胞と同等の性質を有する未知の細胞も包含する。

[0016] 細胞が未分化幹細胞であることは、未分化幹細胞に特異的な性質の有無や、未分化幹細胞に特異的な各種マーカーの発現等から判断することができる。例えば、未分化幹細胞に特異的な性質としては、自己複製能を有し、未分化幹細胞とは異なる性質を有する別種の細胞へと分化可能である性質が挙げられる。また、テラトーマ形成能やキメラマウス形成能等も未分化幹細胞に

特異的な性質として挙げられる。

[0017] 未分化幹細胞に特異的な各種マーカー（以下、「未分化幹細胞マーカー」という。）とは、未分化幹細胞に特異的に発現する因子であり、例えば、Oct 3／4、Nanog、Sox 2、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA1-60、TRA1-81、Lin 28、Fbx 15等を例示することができる。これら未分化幹細胞マーカーの少なくとも1つの発現が観察された場合には、当該細胞を未分化幹細胞と判断することができる。未分化幹細胞マーカーは、1種を単独で用いてもよく、2種以上を組み合わせて用いてもよい。一実施形態として、Oct 3／4を発現する細胞を未分化幹細胞と判断してもよい。なお、細胞における未分化幹細胞マーカーの発現は、RT-PCRやマイクロアレイ等の公知の方法を用いて確認することができる。

[0018] 未分化幹細胞は、哺乳類の未分化幹細胞であってもよく、げっ歯類の未分化幹細胞であってもよく、霊長類の未分化幹細胞であってもよく、ヒトの未分化幹細胞であってもよい。一例として、ヒト由来の未分化幹細胞を挙げることができ、より具体的な例としては、ヒトiPS細胞及びヒトES細胞等を挙げることができる。

[0019] 本明細書において、「分化細胞」とは、上記「未分化幹細胞」の性質を有しない細胞のことを指す。分化細胞は、未分化幹細胞から誘導・分化された細胞であり得るが、分化多能性を有しない。分化細胞としては、例えば、ES細胞から分化した細胞、iPS細胞から分化した細胞であってよい。分化細胞の例としては、心筋細胞、筋細胞、繊維芽細胞、神経細胞、リンパ球等の免疫細胞、血管細胞、網膜色素上皮細胞等の眼細胞、巨核球や赤血球等の血液細胞、その他各組織細胞、及びそれらの前駆細胞等が挙げられる。

[0020] 《未分化幹細胞除去剤》

1 実施形態において、本発明は、未分化幹細胞除去剤を提供する。

本実施形態の未分化幹細胞除去剤は、脂肪酸合成阻害剤、脂肪酸利用阻害剤、及びコレステロール阻害剤からなる群から選ばれる少なくとも一種を含

有する。

以下、実施の形態に基づき、本発明を説明する。

[0021] 後述する実施例に示されるように、本発明者らは、脂肪酸合成阻害剤又は脂肪酸分解阻害剤（脂肪酸利用阻害剤）を未分化幹細胞に接触させると、細胞死を誘導可能であることを見出した。この理由として、本発明者らは、ヒト iPS 細胞（未分化幹細胞）において、当該脂肪酸合成経路が亢進されていることを見出した。おそらく、当該脂肪酸合成経路及びその代謝経路は未分化幹細胞の生存に非常に重要であるものと考えられる。そのため、係る脂肪酸合成又は脂肪酸分解の阻害により、未分化幹細胞に細胞死が誘導されるものと考えられる。

さらに、本発明者らは、コレステロール合成阻害剤を未分化幹細胞に接触させると、細胞死を誘導可能であることを見出した。コレステロールは細胞膜の構成成分であり、当該コレステロール合成経路は未分化幹細胞の生存に非常に重要であるものと考えられる。そのため、係るコレステロール合成の阻害により、未分化幹細胞に細胞死が誘導されるものと考えられる。

また、未分化幹細胞が残存する細胞集団が生体内に移植された場合であっても、当該生体に対して脂肪酸合成阻害剤、脂肪酸利用阻害剤又はコレステロール合成阻害剤を投与することにより、生体内の未分化幹細胞を選択的に除去することができる。

[0022] 本明細書において「脂肪酸利用阻害剤」は、脂肪酸を利用した物質の合成に係る代謝経路の反応を阻害する機能、及び/又は脂肪酸の分解に係る代謝経路の反応を阻害する機能を有するものである。本明細書において「脂肪酸利用阻害剤」は、脂肪酸の分解に係る代謝経路の反応を阻害する「脂肪酸分解阻害剤」を包含する。

脂肪酸の分解に係る代謝経路としては、 β 酸化に係る代謝経路が好ましい。脂肪酸利用阻害剤は「 β 酸化に係る脂肪酸代謝阻害剤」であることが好ましい。 β 酸化に係る脂肪酸代謝としては、 β 酸化、 β 酸化に利用される脂肪酸代謝産物の合成、 β 酸化に利用される脂肪酸代謝産物のミトコンドリアへ

の取り込み等が挙げられる。

[0023] また、脂肪酸を利用した物質の合成に係る代謝経路としては、トリグリセリド及び／又はリン脂質の合成に係る代謝経路が好ましい。脂肪酸利用阻害剤は「トリグリセリド及び／又はリン脂質の合成に係る脂肪酸代謝阻害剤」であることが好ましい。

[0024] これら阻害剤の種類は特に限定されるものではなく、脂肪酸合成阻害、脂肪酸利用阻害、又はコレステロール合成阻害の機能を有する物質であればよく、有機物であっても無機物であってもよい。有機物としては有機化合物が好ましく、低分子化合物、核酸、ペプチド、タンパク質等も例示できる。

[0025] 図1は、天然の細胞の細胞質における脂肪酸合成経路及び脂肪酸分解（脂肪酸利用）経路の概略を説明する図である。クエン酸（c i t r a t e）から、ATPクエン酸リアーゼ（ATP c i t r a t e l y a s e : A C L Y）によりアセチル-CoA（a c e t y l - C o A）が合成され、アセチル-CoA及びマロニル-CoA（m a l o n y l - C o A）から、脂肪酸合成酵素（F a t t y a c i d s y n t h a s e : F A S N）により脂肪酸（F a t t y a c i d : F A）が合成される。

アセチル-CoAカルボキシラーゼ（a c e t y l - C o A c a r b o x y l a s e : A C C）は、アセチル-CoAからのマロニル-CoAの生成を触媒する。マロニル-CoAデカルボキシラーゼ（m a l o n y l - C o A d e c a r b o x y l a s e : M C D）は、マロニル-CoAからのアセチル-CoAの生成を触媒する。

合成された脂肪酸は、アシルCoA合成酵素（a c y l - C o A s y n t h e t a s e : A C S）の働きにより、脂肪酸アシル-CoA（F A - C o A）となり、その後いくつかの反応を経て、結果としてカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1（c a r n i t i n e p a l m i t o y l t r a n s f e r a s e - 1 : C P T 1）によってミトコンドリア内へ輸送され、 β 酸化に利用される。

[0026] 本実施形態の脂肪酸合成阻害剤は、図1に示す脂肪酸合成経路のいずれか

の反応を完全又は部分的に阻害して、脂肪酸合成を阻害するものであってよい。本実施形態の脂肪酸合成阻害剤は、ATPクエン酸リアーゼ、脂肪酸合成酵素、アセチル-CoAカルボキシラーゼ、及びマロニル-CoAデカルボキシラーゼからなる群から選ばれる少なくとも一種の因子を標的として脂肪酸合成を阻害するものであってよい。好ましくは、本実施形態の脂肪酸合成阻害剤は、ATPクエン酸リアーゼ、脂肪酸合成酵素、及びアセチル-CoAカルボキシラーゼからなる群から選ばれる少なくとも一種の因子を標的として脂肪酸合成を阻害するものであってよく、ATPクエン酸リアーゼ、及び脂肪酸合成酵素からなる群から選ばれる少なくとも一種の因子を標的として脂肪酸合成を阻害するものであってよい。

[0027] 本実施形態の脂肪酸分解阻害剤は、図1に示す β 酸化に係る脂肪酸分解経路のいずれかの反応を完全又は部分的に阻害して、脂肪酸分解を阻害するものであってよい。本実施形態の脂肪酸分解阻害剤は、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1を標的として、脂肪酸分解を阻害するものであってよい。

[0028] 脂肪酸は、 β 酸化に利用される他、トリグリセリド及びリン脂質の合成等にも利用される。脂肪酸アシル-CoAは、グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (glycerol-3-phosphate acyltransferase: GPAT) によるリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid: LPA) の合成に利用される。また、脂肪酸アシル-CoAは、アシルグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (acyl-glycerol-3-phosphate acyltransferase: AGPAT) によるホスファチジン酸 (Phosphatidic acid: PA) の合成に利用される。また、脂肪酸アシル-CoAは、ホスファチジン酸ホスファターゼ (phosphatidate phosphatase: PAP) によるジアシルグリセロール (diacylglycerol: DAG, DG) の合成に利用される。また、脂肪酸アシル-CoAは、ジアシルグリセロールアシルトラ

ンスフェラーゼ (diacylglycerol acyltransferase: DGAT) によるトリグリセリドの合成に利用される。更には、脂肪酸アシル-CoAは、モノアシルグリセロールリパーゼ (monoacylglycerol lipase: MAGL) によって脂肪酸とグリセロールにも分解される。本実施形態の脂肪酸利用阻害剤は、脂肪酸を利用するこれらの経路のいずれかの反応を完全又は部分的に阻害して、脂肪酸利用を阻害するものであってよい。

[0029] 図9は、コレステロール合成経路の概略を説明する図である。アセチル-CoA (acetyl-CoA) から、アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼ (acetyl-CoA acetyltransferase: ACAT2) によりアセトアセチル-CoA (acetoacetyl-CoA) が合成される。アセトアセチル-CoAから、ヒドロキシメチルグルタリル-CoA合成酵素1 (hydroxymethylglutaryl-CoA Synthase 1: HMG-CoA Synthase 1) によりヒドロキシメチルグルタリル-CoA (hydroxymethylglutaryl-CoA: HMG-CoA) が合成される。HMG-CoAから、ヒドロキシメチルグルタリル-CoAレダクターゼ (hydroxymethylglutaryl-CoA reductase: HMG-CoA reductase) によりメバロン酸 (mevalonate) が合成される。その後いくつかの反応を経て、結果としてコレステロール (cholesterol) が合成される。

[0030] 本実施形態のコレステロール合成阻害剤は、図9に示すコレステロール合成経路のいずれかの反応を完全又は部分的に阻害して、コレステロール合成を阻害するものであってよい。本実施形態のコレステロール合成阻害剤は、アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼ、HMG-CoA合成酵素、及びHMG-CoAレダクターゼからなる群から選ばれる少なくとも一種の因子を標的としてコレステロール合成を阻害するものであってよい。好ましくは、本実施形態のコレステロール合成阻害剤は、HMG-CoAレダクター

ぜを標的としてコレステロール合成を阻害するものであってよい。

[0031] 脂肪酸合成阻害剤は、1種又は2種以上を組み合わせて用いることができる。脂肪酸利用阻害剤は、1種又は2種以上を組み合わせて用いることができる。コレステロール合成阻害剤は、1種又は2種以上を組み合わせて用いることができる。

未分化幹細胞除去剤は、脂肪酸合成阻害剤を1種又は2種以上を組み合わせて含有することができる。未分化幹細胞除去剤は、脂肪酸利用阻害剤を1種又は2種以上を組み合わせて含有することができる。未分化幹細胞除去剤は、コレステロール合成阻害剤を1種又は2種以上を組み合わせて含有することができる。未分化幹細胞除去剤は、脂肪酸合成阻害剤、脂肪酸利用阻害剤、及びコレステロール合成阻害剤からなる群から選ばれる1種又は2種以上を組み合わせて含有することができる。

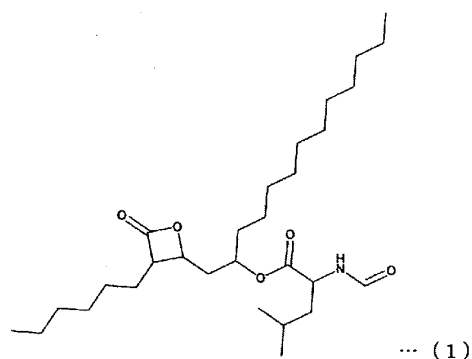
[0032] 本実施形態の脂肪酸合成阻害剤は、脂肪酸合成酵素を標的として脂肪酸合成を阻害するものであってよい。脂肪酸合成酵素を標的として脂肪酸合成を阻害する脂肪酸合成阻害剤として、オルリスタット (Orlistat)、C75、フラボノイズ、Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 等が挙げられ、オルリスタット (Orlistat)、C75が好ましい。

オルリスタット (Orlistat) 及びC75は、市販のものを使用できる。また、本実施形態の脂肪酸合成阻害剤は、オルリスタット (Orlistat) 又はC75と同等の機能を有するものであれば、これらの化合物の塩又は誘導体であってもよい。

[0033] オルリスタットは、下記式(1)で表される化合物 (N-formyl-L-leucine-(1S)-1-[[(2S,3S)-3-hexyl-4-oxo-2-oxetanyl] methyl] dodecyl ester) として知られる。

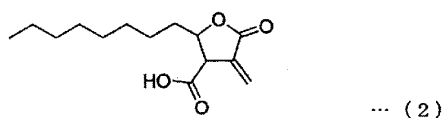
[0034]

[化1]



[0035] C75は、下記式(2)で表される化合物(tetrahydro-4-methylene-2R-octyl-5-oxo-3S-furancarboxylic acid)として知られる。

[0036] [化2]



[0037] 本実施形態に係る脂肪酸合成阻害剤は、ATPクエン酸リアーゼを標的として脂肪酸合成を阻害するものであってよい。ATPクエン酸リアーゼを標的として脂肪酸合成を阻害する脂肪酸合成阻害剤として、LY294002及びSB204990が好ましく挙げられる。LY294002及びSB204990は、市販のものを使用できる。また、本実施形態の脂肪酸合成阻害剤は、LY294002又はSB204990と同等の機能を有するものであれば、これらの化合物の塩又は誘導体であってもよい。

[0038] 本実施形態の脂肪酸分解阻害剤は、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1を標的として、脂肪酸分解を阻害するものであってよい。カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1を標的として、脂肪酸分解を阻害する脂肪酸分解阻害剤としては、エトモキシル(Etomoxir)、ペルヘキシリン(Perhexiline)、ラノラジン(Ranolazine)

等が挙げられ、エトモキシル、ペルヘキシリンが好ましい。エトモキシル及びペルヘキシリンは、市販のものを使用できる。また、本実施形態の脂肪酸合成阻害剤は、エトモキシル又はペルヘキシリンと同等の機能を有するものであれば、これらの化合物の塩又は誘導体であってもよい。

[0039] 本実施形態の脂肪酸合成阻害剤は、アセチル-CoAカルボキシラーゼを標的として脂肪酸合成を阻害するものであってよい。アセチル-CoAカルボキシラーゼを標的として脂肪酸合成を阻害する脂肪酸合成阻害剤として、ソラフェンA (Sorafen A)、TOFA、A769662、メトホルミン (Metformin)、AICAR等が挙げられ、TOFA、A769662が好ましい。TOFA及びA769662は、市販のものを使用できる。また、本実施形態の脂肪酸合成阻害剤は、TOFA又はA769662と同等の機能を有するものであれば、これらの化合物の塩又は誘導体であってもよい。

[0040] 本実施形態の脂肪酸合成阻害剤は、アシルCoA合成酵素を標的として脂肪酸合成を阻害するものであってよい。アシルCoAシンターゼを標的として脂肪酸合成を阻害する脂肪酸合成阻害剤として、トリアクシンC (Triascinc)、TZDs等が挙げられる。

[0041] また、上記のATPクエン酸リアーゼやアセチル-CoAカルボキシラーゼ、脂肪酸合成酵素、グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ、アシルCoA合成酵素などの発現を制御する転写因子として、SREBPが知られている。実施形態の脂肪酸合成阻害剤及び／又は脂肪酸利用阻害剤としては、SREBPの機能を阻害するものであってもよく、ファトスタチン (Fatosatin) やFGH110019等が挙げられる。

[0042] 本実施形態のコレステロール合成阻害剤は、HMG-CoAレダクターゼを標的としてコレステロール合成を阻害するものであってよい。HMG-CoAレダクターゼを標的としてコレステロール合成を阻害するコレステロール合成阻害剤として、プラバスタチン (Pravastatin)、シンバスタチン (Simvastatin)、フルバスタチン (Fluvastatin)

tin)、アトルバスタチン (Atorvastatin)、ピタバスタチン (Pitavastatin)、ロスバスタチン (Rosuvastatin)、セリバスタチン (Cerivastatin)、ロバスタチン (Lovastatin)、メバスタチン (Mevastatin) 等が挙げられ、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、アトルバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチンが好ましく、シンバスタチンがより好ましい。プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、アトルバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチンは、市販のものを使用できる。また、本実施形態のコレステロール合成阻害剤は、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、アトルバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチンと同等の機能を有するものであれば、これらの化合物の塩又は誘導体であってもよい。

[0043] 実施形態の未分化幹細胞除去剤は、オルリスタット、C75、LY294002、SB204990、エトモキシル、ペルヘキシリン、及びシンバスタチン、並びにこれらの塩からなる群から選ばれる1又は2以上を含有してもよい。

[0044] 本実施形態の未分化幹細胞除去剤は、適用対象中の含有する脂肪酸合成阻害剤の濃度が、0.1～500 μM であってよい。なお、本明細書中において、単位としての「M」は、mol/Lを意味する。また、本明細書中において、「適用対象中」とは、培地中、又は血中を意味する。

また、本実施形態の未分化幹細胞除去剤は、適用対象中の含有する脂肪酸利用阻害剤の濃度が0.1～500 μM であってよい。

また、本実施形態の未分化幹細胞除去剤は、適用対象中の含有する脂肪酸合成阻害剤の濃度が0.1～500 $\mu\text{g/mL}$ であってよい。

また、本実施形態の未分化幹細胞除去剤は、適用対象中の含有する脂肪酸利用阻害剤の濃度が0.1～500 $\mu\text{g/mL}$ であってよい。

また、本実施形態の未分化幹細胞除去剤は、適用対象中の含有するコレステロール合成阻害剤の濃度が0.01～50 μM であってよい。

また、本実施形態の未分化幹細胞除去剤は、適用対象中の含有するコレステロール合成阻害剤の濃度が $0.01 \sim 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ であってよい。

本実施形態に係る脂肪酸合成阻害剤がオルリスタットである場合、適用対象中のオルリスタットの濃度は、 $0.1 \sim 500 \mu\text{M}$ が好ましく、 $1 \sim 50 \mu\text{M}$ がより好ましく、 $3 \sim 15 \mu\text{M}$ がさらに好ましい。

本実施形態に係る脂肪酸合成阻害剤がC75である場合、適用対象中のC75の濃度は、 $0.1 \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ が好ましく、 $1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ がより好ましく、 $5 \sim 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ がさらに好ましい。

本実施形態に係る脂肪酸合成阻害剤がSB204990である場合、適用対象中のSB204990の濃度は、 $0.1 \sim 500 \mu\text{M}$ が好ましく、 $1 \sim 200 \mu\text{M}$ がより好ましく、 $20 \sim 100 \mu\text{M}$ がさらに好ましい。

本実施形態に係る脂肪酸合成阻害剤がLY294002である場合、適用対象中のLY294002の濃度は、 $0.1 \sim 500 \mu\text{M}$ が好ましく、 $1 \sim 200 \mu\text{M}$ がより好ましく、 $20 \sim 100 \mu\text{M}$ がさらに好ましい。

本実施形態に係る脂肪酸分解阻害剤（脂肪酸利用阻害剤）がエトモキシルである場合、適用対象中のエトモキシルの濃度は、 $0.1 \sim 500 \mu\text{M}$ が好ましく、 $1 \sim 200 \mu\text{M}$ がより好ましく、 $20 \sim 100 \mu\text{M}$ がさらに好ましい。

本実施形態に係る脂肪酸分解阻害剤（脂肪酸利用阻害剤）がペルヘキシリンである場合、適用対象中のペルヘキシリンの濃度は、 $0.1 \sim 500 \mu\text{M}$ が好ましく、 $1 \sim 100 \mu\text{M}$ がより好ましく、 $5 \sim 50 \mu\text{M}$ がさらに好ましい。

本実施形態に係るコレステロール合成阻害剤がシンバスタチンである場合、適用対象中のシンバスタチンの濃度は、 $0.01 \sim 50 \mu\text{M}$ が好ましく、 $0.1 \sim 30 \mu\text{M}$ がより好ましく、 $0.1 \sim 10 \mu\text{M}$ がさらに好ましい。

[0045] 本実施形態に係る脂肪酸合成阻害剤と未分化幹細胞とが接触すると、脂肪酸合成阻害剤が未分化幹細胞の細胞質に取り込まれ、図1に示す脂肪酸合成経路のいずれかの反応が完全又は部分的に阻害されることとなる。

本実施形態に係る脂肪酸分解阻害剤と未分化幹細胞とが接触すると、脂肪酸分解阻害剤が未分化幹細胞の細胞質及び／又はミトコンドリアに取り込まれ、図 1 に示す脂肪酸分解経路のいずれかの反応が完全又は部分的に阻害されることとなる。

本実施形態に係るコレステロール合成阻害剤と未分化幹細胞とが接触すると、コレステロール合成阻害剤が未分化幹細胞の細胞質に取り込まれ、図 9 に示すコレステロール合成経路のいずれかの反応が完全又は部分的に阻害されることとなる。

[0046] 本実施形態の未分化幹細胞除去剤は、脂肪酸合成阻害剤、脂肪酸利用阻害剤、及びコレステロール合成阻害剤からなる群から選ばれる少なくとも一種を含有するものであればよい。本実施形態の未分化幹細胞除去剤は、脂肪酸合成阻害剤、脂肪酸利用阻害剤、及びコレステロール合成阻害剤からなる群から選ばれる少なくとも一種のみからなるものであってもよく、未分化幹細胞除去能を有する限りにおいて、その他の任意成分を含有していてもよい。

他の成分は、特に限定されないが、例えば、薬学的に許容される担体、トランスフェクション促進剤、緩衝剤、賦形剤、安定剤、抗酸化剤、浸透圧調整剤、pH調整剤、キレート剤等が挙げられる。

本実施形態の未分化幹細胞除去剤の剤型は、特に限定されず、液状物、粉末状物、顆粒状物、ゲル状物、固形物等の種々の形態であり得る。また、脂肪酸合成阻害剤、脂肪酸利用阻害剤、コレステロール合成阻害剤、又はこれらの組合せをミセル内に封入したエマルション形態や、リポソーム内に封入したリポソーム形態であってもよい。

[0047] 患者への投与は、例えば、非経口的または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。非経口的な投与方法としては、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等のほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、または経皮的投与等が挙げられる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。

例えば、未分化幹細胞から誘導された分化細胞組織の移植を受けた患者は

、本実施形態の未分化幹細胞除去剤の投与により、分化細胞組織中に残存する未分化幹細胞を生体内で除去することができる。これにより、移植組織の癌化等の未分化幹細胞の増殖に起因する疾患を予防又は治療できる。

[0048] 本実施形態の未分化幹細胞除去剤は、後述する培地、未分化幹細胞除去方法、移植用細胞の製造方法、未分化幹細胞の増殖に起因する疾患を治療又は予防するための医薬組成物、及び未分化幹細胞の増殖に起因する疾患を治療又は予防する方法等に使用することができる。

[0049] 本実施形態の未分化幹細胞除去剤が、除去の対象とする未分化幹細胞は、特に限定されないが、i P S細胞又はE S細胞であることが好ましく、i P S細胞であることがより好ましい。

[0050] 《培地》

1 実施形態において、本発明は、培地を提供する。本実施形態の培地は、上記実施形態の未分化幹細胞除去剤を含む。本実施形態の培地は、細胞の培養に使用できる。本明細書において、「培養」とは、生体（個体）外において細胞を飼育又は生育させることを意味し、いわゆる *in vitro* で細胞を扱うことを含む。「培地」とは、前記培養環境を細胞に提供する液体又は固体の物質のことを指す。

[0051] 本実施形態の培地は、例えば、任意の培地成分と、脂肪酸合成阻害剤、脂肪酸利用阻害剤、及びコレステロール合成阻害剤からなる群から選択される少なくとも一種（以下、「脂肪酸合成阻害剤等」ということがある。）と、を含む組成物であり得る。本実施形態の培地は、媒体と脂肪酸合成阻害剤等とを含む組成物である。媒体としては、水、緩衝液等が挙げられる。媒体は、脂肪酸合成阻害剤等を溶解させるものであってもよく、分散させるものであってもよい。培地成分は、細胞の生育に有効な成分を含有していてもよく、そのような成分としては、例えば、アミノ酸、ビタミン類、無機塩類、糖類、成長因子等の各種成分が挙げられる。その他、抗生物質、緩衝液、キレート剤、フェノールレッド指示薬等の成分を含有していてもよい。

[0052] 本実施形態の培地から脂肪酸合成阻害剤等を除いた残りの成分は、従来培

地として用いられている一般的な細胞培養液〔例えば、ダルベッコ改変イーグル培養液（DMEM）、MEM培養液（例えば、 α -MEM、MEM〔Hank's BSS〕）、RPMI培養液（例えば、RPMI 1640など）、F12培養液、StemPro34、mTeSR1など〕と同様の組成としてもよい。前記成分は、未分化幹細胞維持培地として用いられている一般的な細胞培養液〔例えばStemFit培地、mTeSR（登録商標）Essential 8（登録商標）培地、StemSure（登録商標）培地など〕と同様の組成としてもよい。

[0053] 本実施形態の培地中の脂肪酸合成阻害剤等の濃度は、前述した未分化幹細胞除去剤中の適用対象中の脂肪酸合成阻害剤等の濃度と同じであってよい。本実施形態の培地が脂肪酸合成阻害剤等を上記濃度で含むことにより、効果的に未分化幹細胞を除去可能である。また、未分化幹細胞と分化細胞とが混在する場合、分化細胞の生育を良好な状態とさせつつ、未分化幹細胞を除去可能である。

[0054] 本実施形態の培地は、脂肪酸を含まないことが好ましい。また脂肪酸が合成されないよう、使用される脂肪酸合成阻害剤の標的の下流に位置する脂肪酸合成の前駆体（図1参照）を含まないことが好ましい。また脂肪酸が利用されないよう、使用される脂肪酸利用阻害剤の標的の下流に位置する物質を含まないことが好ましい。また、本実施形態の培地は、コレステロールを含まないことが好ましい。またコレステロールが生合成されないよう、使用されるコレステロール合成阻害剤の標的の下流に位置するコレステロール合成の前駆体を含まないことが好ましい。

[0055] 本実施形態の培地は、グルコース、グルタミン、及びメチオニンからなる群から選ばれる少なくとも一種の化合物を含んでもよい。これらの化合物を含まない培地で未分化幹細胞を培養することでも、未分化幹細胞の細胞死を誘導可能であるとされる。

しかし、本実施形態の培地は、脂肪酸合成阻害剤等を含んでいるので、これら、グルコース、グルタミン、及びメチオニンからなる群から選ばれる少

なくとも一種の化合物を含んでいても、未分化幹細胞除去能が良好に発揮される。また、グルコース、グルタミン、及びメチオニンを含んでいてもよい。また、これらの成分を含まない場合と比べて、細胞の生育が良好となることが期待される。

[0056] また、他の態様において、本発明は、未分化幹細胞除去剤の製造のための、脂肪酸合成阻害剤、脂肪酸利用阻害剤、及びコレステロール合成阻害剤からなる群から選ばれる少なくとも一種の使用、を提供する。

[0057] <<キット>>

1 実施形態において、本発明は、上記実施形態の未分化幹細胞除去剤を備えるキットを提供する。

[0058] 本実施形態のキットは、上記実施形態の未分化幹細胞除去剤のほか、未分化幹細胞から分化細胞を誘導するための試薬類、培地類、細胞培養器具、使用説明書等をさらに備えるものであってもよい。分化細胞を誘導するための試薬類は、誘導しようとする分化細胞に応じて、適宜選択することができる。心筋細胞を誘導するための試薬類としては、例えば、デメチラーゼ、5-アザシチジン、DMSOなどの染色体DNA脱メチル化剤；PDGF、繊維芽細胞増殖因子8（FGF-8）、エンドセリン1（ET1）、ミドカイン（Midkine）および骨形成因子4（BMP-4）、G-CSFなどのサイトカイン；ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチンなどの接着分子；レチノイン酸などのビタミン；Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3、TEF-5およびMesP1などの転写因子；心筋細胞由来の細胞外基質；ノギン、コーディン、フェチュイン、フォリスタチン、スクレロスチン、ダン、サーベラス、グレムリン、ダンテなどのBMPアンタゴニスト等を挙げることができるが、これらに限定されない。また、培地類としては、例えば、ダルベッコ改変イーグル培養液（DMEM）、MEM培養液（ α -MEM、MEM [Hank's Bss] 等）、RPMI培養液（RPMI 1640等）、F12培養液、St

emPro34、mTeSR1、StemFit培地、mTeSR Essential 8培地、StemSure培地等を挙げることができるが、これらに限定されない。また、細胞培養器具等としては、細胞培養プレート等を挙げることができるが、これに限定されない。

[0059] 本実施形態のキットは、後述の未分化幹細胞除去方法に好適に用いることができ、当該未分化幹細胞除去方法を説明する指示書等をさらに備えることができる。上記実施形態の未分化幹細胞除去剤と共に、未分化幹細胞除去方法に使用する試薬類、指示書等をキット化することにより、より簡便かつ短時間に未分化幹細胞除去方法を実施することができる。

[0060] 《未分化幹細胞除去方法》

1 実施形態において、本発明は、未分化幹細胞及び分化細胞を含む細胞混合物を、未分化幹細胞除去剤の存在下で培養することを含む、未分化幹細胞除去方法を提供する。

[0061] 本実施形態の未分化幹細胞除去方法に使用する未分化幹細胞除去剤は、上記実施形態の未分化幹細胞除去剤である。

本明細書において、「細胞混合物」とは、2種以上の細胞を含む細胞集団である。「細胞混合物」は、2種以上の細胞のほか、培地の成分等を含み得る。「未分化幹細胞及び分化細胞を含む細胞混合物」は、1個以上の未分化幹細胞と1個以上の分化細胞とを含み、任意に培地の成分等を含み得る。未分化幹細胞及び分化細胞を含む細胞混合物の形態は、特に限定されず、集合状態、分散状態、培養容器に接着した状態、細胞外マトリクス等の接着因子へ接着した状態、シート状、塊状、コロニー、胚様体、細胞塊、組織、器官等であり得る。

[0062] 未分化幹細胞に、分化・誘導処理を行うと、未分化幹細胞から分化細胞が誘導される。しかしながら、*in vitro*では、全ての未分化幹細胞を分化細胞に誘導することは難しく、通常、未分化幹細胞が残存し、未分化幹細胞と分化細胞との細胞混合物が形成される。本実施形態の方法では、このような未分化幹細胞と分化細胞との細胞混合物から、未分化幹細胞のみを選

択的に除去することができる。なお、本実施形態の方法において、未分化幹細胞及び分化細胞を含む細胞混合物は、未分化幹細胞と分化細胞とを混合したものであってもよい。

[0063] 本実施形態の方法において、未分化幹細胞は、特に限定されないが、i P S細胞又はE S細胞であることが好ましく、i P S細胞であることがより好ましい。

[0064] 本実施形態の方法において、分化細胞は、特に限定されないが、混在する未分化幹細胞と同種の未分化幹細胞から分化・誘導されたものであることが好ましい。未分化幹細胞から分化細胞への分化・誘導方法は、これまでに幾つか報告されており、これら公知の方法を用いて分化細胞を誘導することができる。

[0065] 前記細胞混合物中の未分化幹細胞を、選択的に除去できる効率は、高いほど好ましい。上記実施形態の未分化幹細胞除去剤の存在下で、未分化幹細胞及び分化細胞を含む細胞混合物を培養し、細胞混合物を得た場合、未分化幹細胞数／（未分化幹細胞数＋分化細胞数）×100で表される未分化幹細胞残存率は、0.1%未満であることが好ましく、0.01%未満であることがより好ましく、0.001%未満であることがさらに好ましい。なお、死細胞は上記細胞数に含めないものとする。

前記細胞混合物中に残存する未分化幹細胞は、前記未分化幹細胞に特異的な各種マーカーを発現する細胞を、未分化幹細胞と判断することで検出する。ただし、上記に挙げた未分化幹細胞残存率は、Oct 3／4を発現する細胞を未分化幹細胞と判断して、前記細胞混合物中に残存する未分化幹細胞を検出したものとする。ここでは、上記実施形態の未分化幹細胞除去剤を含有しない培地で培養した未分化幹細胞を陽性対照として、前記陽性対照の未分化幹細胞におけるOct 3／4の発現量と同等程度の発現量を示す細胞を、Oct 3／4を発現する細胞として検出すればよい。

[0066] 分化細胞としては、心筋細胞、筋細胞、繊維芽細胞、神経細胞、免疫細胞（例、リンパ球等）、血管細胞、眼細胞（例、網膜色素上皮細胞等）、血液

細胞（例、巨核球、赤血球等）、その他各組織細胞、及びそれらの前駆細胞等であってよい。中でも、心筋細胞又は線維芽細胞が好ましく、心筋細胞がより好ましい。

[0067] 多能性を有する幹細胞から心筋細胞を誘導する場合、心筋細胞への分化が進行するにつれて、未分化中胚葉、心臓中胚葉（又は予定心筋細胞）を経て心筋細胞に分化すると考えられている。ここで、未分化中胚葉とは、未分化中胚葉に特異的なBrachyuryタンパク質の発現が認められる段階をいう。一方、心臓中胚葉（又は予定心筋細胞）とは、Brachyury等の未分化中胚葉に特異的なタンパク質の発現が認められ、かつ同一細胞においてNkx2.5やアクチニン等の心筋細胞特異的タンパク質の発現が認められない細胞であって、培養液に対して新たに物質が加えられることを必要とせず、専ら心筋細胞へ分化する能力を有する細胞を意味する。心筋細胞とは、自律拍動を行っている細胞のことを意味する。心筋細胞は、Nkx2.5、GATA4、アクチニン等のマーカーを発現する。本明細書においては、「心筋細胞」という用語は、心筋細胞及び心臓中胚葉（又は予定心筋細胞）を包含する概念として用いられる。

[0068] 未分化幹細胞から心筋細胞への分化・誘導は、例えば、国際公開第01/048151号、国際公開第2005/033298号、国際公開第2008/150030等に記載の方法を用いて行うことができる。例えば、未分化幹細胞を培養する培地に、心筋細胞への分化を惹起する物質を添加することにより、心筋細胞への分化・誘導を行ってもよい。

そのような物質としては、例えば、デメチラーゼ、5-アザシチジン、DMSOなどの染色体DNA脱メチル化剤；PDGF、繊維芽細胞増殖因子8（FGF-8）、エンドセリン1（ET1）、ミドカイン（Midkine）および骨形成因子4（BMP-4）、G-CSFなどのサイトカイン；ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチンなどの接着分子；レチノイン酸などのビタミン；Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、

TEF-1、TEF-3、TEF-5およびMesP1などの転写因子；心筋細胞由来の細胞外基質；ノギン、コーディン、フェチュイン、フォリスタチン、スクレロスタチン、ダン、サーベラス、グレムリン、ダンテなどのBMPアンタゴニスト等を挙げることができる。

[0069] 線維芽細胞とは、線維産生能を有する細胞のことを意味する。細胞が線維芽細胞であることは、線維産生能等の線維芽細胞に特異的な性質や、各種マーカーの発現から判断してもよい。線維芽細胞マーカーとしては、ビメンチン、ER-TR7等のマーカーが知られており、マーカーが陽性である細胞を線維芽細胞であると判断できる。

[0070] 本実施形態の方法は、未分化幹細胞除去剤の存在下で、未分化幹細胞及び分化細胞を含む細胞混合物を培養する工程を含む。当該工程は、上記のような細胞培養用培地に未分化幹細胞除去剤を添加し、細胞混合物を培養することにより、実施することができる。あるいは、未分化幹細胞及び分化細胞を含む細胞混合物を培養している培地中に、未分化幹細胞除去剤を添加してもよい。

[0071] 未分化幹細胞除去剤の培地への添加量は、特に限定されないが、培地に添加したときの最終濃度として、例えば、0.1～500 μ M、1～50 μ M、3～15 μ M等を例示することができる。

[0072] 未分化幹細胞除去剤の存在下での細胞混合物の培養は、細胞培養に一般的に用いられる温度で行えばよい。例えば、培養温度として、20～40℃、好ましくは25～38℃、より好ましくは30～37℃を例示することができる。

[0073] 未分化幹細胞除去剤の存在下での細胞混合物の培養時間は、特に限定されないが、好ましくは24時間以上、より好ましくは48時間以上である。必要に応じて、細胞は継代培養されてもよい。継代の前後で、培地の組成は、未分化幹細胞除去剤を含む限りにおいて、同一であってもよく異なってもよい。

[0074] 未分化幹細胞除去剤の存在下での細胞混合物の細胞密度は、特に限定され

ないが、 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^7$ cells/mL が好ましく、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ cells/mL がより好ましく、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ cells/mL がさらに好ましい。

[0075] 本実施形態の方法により、未分化幹細胞を除去した細胞混合物は、未分化幹細胞の割合が低減され、専ら分化細胞により構成される。そのため、本実施形態の未分化幹細胞除去方法によれば、未分化幹細胞を実質的に含まないか、未分化幹細胞の割合が低減された細胞混合物を得ることができる。したがって、本実施形態の方法で得られた細胞混合物は、生体へと移植される移植用細胞として好適に使用することができる。

[0076] また、他の態様において、本発明は、未分化幹細胞を除去するための、脂肪酸合成阻害剤、脂肪酸利用阻害剤、及びコレステロール合成阻害剤からなる群から選ばれる少なくとも一種の使用、を提供する。

[0077] 《移植用細胞の製造方法》

1 実施形態において、本発明は、以下の (i) 及び (i i) の工程を含む、移植用細胞の製造方法、を提供する：

(i) 未分化幹細胞から所望の分化細胞を誘導する工程；及び

(i i) 前記工程 (i) により得られた細胞混合物を、未分化幹細胞除去剤の存在下で培養する工程。

[0078] 本実施形態の移植用細胞の製造方法に使用する未分化幹細胞除去剤は、上記実施形態の未分化幹細胞除去剤である。

[0079] 本実施形態の方法における工程 (i) は、未分化幹細胞から所望の分化細胞を誘導する工程である。工程 (i) における未分化幹細胞は、特に限定されないが、iPS細胞又はES細胞であることが好ましく、iPS細胞であることがより好ましい。

[0080] 工程 (i) において、未分化幹細胞から誘導する分化細胞の種類は、特に限定されず、所望の分化細胞に誘導すればよい。未分化幹細胞から分化細胞への誘導方法は、目的とする分化細胞に応じて、公知の方法を適宜選択して用いることができる。未分化幹細胞から誘導する分化細胞の例としては、例

例えば、心筋細胞、筋細胞、繊維芽細胞、神経細胞、免疫細胞（例、リンパ球等）、血管細胞、眼細胞（例、網膜色素上皮細胞等）、血液細胞（例、巨核球、赤血球等）、その他各組織細胞、及びそれらの前駆細胞等が挙げられるが、これらに限定されない。好適な分化細胞の例としては、心筋細胞が挙げられる。未分化幹細胞から心筋細胞への誘導は、上記《未分化幹細胞除去方法》で例示したような方法により行うことができる。

[0081] 一般的に、*in vitro*では、全ての未分化幹細胞を分化細胞に誘導することは難しいため、工程（i）で得られる細胞混合物は、通常、未分化幹細胞が残存し、未分化幹細胞と分化細胞との細胞混合物となっている。また、前記細胞混合物は、任意に培地の成分等を含み得る。前記細胞混合物の形態は、特に限定されず、集合状態、分散状態、培養容器に接着した状態、細胞外マトリクス等の接着因子へ接着した状態、シート状、塊状、コロニー、胚様体、細胞塊、組織、器官等であり得る。

[0082] 本実施形態の製造方法における工程（ii）は、前記工程（i）により得られた細胞集団を、未分化幹細胞除去剤の存在下で培養する工程である。本工程（ii）における培養は、上記《未分化幹細胞除去方法》で例示したような方法により行うことができる。

[0083] 本実施形態の製造方法は、上記工程（i）及び（ii）に加えて、他の工程を追加してもよい。他の工程としては、例えば、分化細胞を精製する工程、分化細胞を回収する工程等が挙げられる。これらの工程を追加する場合、これらの工程は、上記工程（i）及び（ii）の間、又は上記工程（ii）の後に行われる。

[0084] 分化細胞の精製工程や回収工程は、分化細胞の種類に応じて、適宜適切な方法を選択することができる。例えば、分化細胞が心筋細胞である場合には、国際公開第2006/022377号、国際公開第2007/088874号、国際公開2016/010165号に記載の方法等を、精製工程に適用してもよい。また、回収工程としては、遠心分離法等を適用してもよい。

[0085] 本実施形態の製造方法において得られる移植用細胞において、分化細胞／

(未分化幹細胞＋分化細胞) × 100 で表される分化細胞率は、例えば、50%以上であってよく、70%以上であってよく、80%以上であってよく、90%以上であってよく、95%以上であってよい。なお、死細胞は上記細胞数に含めないものとする。

[0086] 本実施形態の製造方法により製造された移植用細胞は、未分化幹細胞が選択的に除去されているため、未分化幹細胞の割合が低減されており、専ら分化細胞により構成される。そのため、本実施形態の製造方法によれば、未分化幹細胞を実質的に含まないか、未分化幹細胞の割合が低減された移植用細胞を得ることができる。そのため、前記移植用細胞を生体に移植した場合でも、奇形腫形成等のリスクが低減される。

[0087] また、他の態様において、本発明は、移植用細胞を製造するための、脂肪酸合成阻害剤、脂肪酸利用阻害剤、及びコレステロール合成阻害剤からなる群から選ばれる少なくとも一種の使用、を提供する。

[0088] さらに、他の態様において、本発明は、以下の (i) 及び (ii) の工程を含む、移植用細胞の製造方法によって製造された移植用細胞、を提供する：

(i) 未分化幹細胞から所望の分化細胞を誘導する工程；及び

(ii) 前記工程 (i) により得られた細胞混合物を、未分化幹細胞除去剤の存在下で培養する工程。

[0089] ≪医薬組成物≫

1 実施形態において、本発明は、未分化幹細胞から誘導された分化細胞を移植された対象において、前記未分化幹細胞の増殖に起因する疾患を治療又は予防するための医薬組成物であって、未分化幹細胞除去剤を含む、医薬組成物、を提供する。

[0090] 本実施形態の医薬組成物が含む未分化幹細胞除去剤は、上記≪未分化幹細胞除去剤≫で記載したものと同様である。

未分化幹細胞から誘導された分化細胞を移植される対象は、特に限定されないが、当該分化細胞の移植を必要とするヒト、又はヒト以外の動物であり

得る。例えば、当該分化細胞が正常に機能していない患者、当該分化細胞を含む組織に欠損、障害等を有する患者であってよい。ヒト以外の動物は、特に限定されないが、哺乳類が挙げられる。哺乳類としては、サルなどの霊長類；マウス、ラットなどのげっ歯類；イヌ、ネコなどのペット動物；牛、ウマ、ヒツジ、ブタなどの家畜類等が挙げられる。未分化幹細胞から誘導された分化細胞を移植される対象は、未分化幹細胞が由来する生物と同種の生物であることが好ましく、未分化幹細胞が由来する個体と同一の個体であることがより好ましい。未分化幹細胞から誘導された分化細胞を移植される対象は、後述の《治療方法等》に記載の「移植が必要な対象」であってもよい。

[0091] 治療的有効量である限り、本実施形態の医薬組成物における、脂肪酸合成阻害剤等の含有量は特に制限されないが、上記《未分化幹細胞除去剤》で記載したもの等を挙げることができる。

[0092] 本実施形態の医薬組成物は、未分化幹細胞除去剤に加えて、他の成分を含んでいてもよい。他の成分は、特に限定されないが、上記《未分化幹細胞除去剤》で記載したもの等を挙げることができる。

[0093] また、本実施形態の医薬組成物は、他の成分として、上記《未分化幹細胞除去剤》で記載したもののほかに、アジュバント等の免疫賦活剤を含んでいてもよい。アジュバントの例としては、例えば、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、ミョウバン、コレラ毒素、サルモネラ毒素、IFA（不完全フロイントアジュバント）、CFA（完全フロイントアジュバント）ISCOMATRIX、GM-CSF、CpG、O/Wエマルジョン等が含まれるが、これらに限定されない。また、本実施形態の医薬組成物は、未分化幹細胞除去剤に加えて、薬理活性を有する他の薬剤を含んでいてもよい。他の薬剤の例としては、例えば、抗炎症剤、鎮痛剤、解熱剤、未分化幹細胞に対して免疫誘導できる化合物等が挙げられる。

[0094] 本実施形態の医薬組成物の剤型は、特に限定されず、液剤、粉末剤、顆粒剤、錠剤、散剤、懸濁剤、乳剤、エマルション製剤、リポソーム製剤等の種々の剤型とすることができる。

- [0095] 本実施形態の医薬組成物は、未分化幹細胞から誘導された分化細胞を移植された対象において、前記未分化幹細胞の増殖に起因する疾患を治療又は予防するために使用される。一般に、*in vitro*では、全ての未分化幹細胞を分化細胞に誘導することは難しいため、移植用細胞として調製された分化細胞中に、未分化幹細胞が残存してしまう場合がある。未分化幹細胞が残存したまま移植された場合、生体内で未分化幹細胞が増殖し、奇形腫等の疾患を生じる恐れがある。本実施形態の医薬組成物は、そのような疾患を治療又は予防するために、当該分化細胞を移植された対象に投与される。なお、未分化幹細胞の増殖に起因する疾患は、特に限定されないが、奇形腫や癌等を挙げることができる。
- [0096] 本実施形態の医薬組成物の投与対象において、移植される分化細胞は、未分化幹細胞から誘導された分化細胞であれば、特に限定されない。分化細胞は、好ましくは、iPS細胞又はES細胞から誘導されたものであり、より好ましくはiPS細胞から誘導されたものである。一例として、分化細胞は、iPS細胞から誘導された心筋細胞である。また、分化細胞は、上記《移植用細胞の製造方法》で記載した方法により製造された移植用細胞であってもよい。
- [0097] 本実施形態の医薬組成物の投与経路は、有効成分の種類、製剤の形態、移植された分化細胞の種類、分化細胞が移植された場所等に応じて、適宜選択することができる。例えば、《未分化幹細胞除去剤》で述べたものと同様の投与方法であってもよい。
- [0098] 本実施形態の医薬組成物の投与量及び投与間隔は、移植した分化細胞の種類、移植量、及び移植場所等；移植を受けた対象の年齢、性別、体重等；医薬組成物の投与方法等により、適宜選択することができる。投与量は、例えば、0.001mg～1000mg、0.01mg～100mg、0.1mg～30mg、0.1mg～10mg、0.5mg～5mg等を例示することができる。また、投与間隔は、1日に1～数度、数日～数ヶ月に1度等であってもよい。例えば、1日に一度、又は1週間に一度等の投与を例示するこ

とができる。

[0099] 本実施形態の医薬組成物によれば、生体内に移植された細胞に未分化幹細胞が残存していた場合であっても、生体内で未分化幹細胞を選択的に除去することができる。そのため、生体内で未分化幹細胞が増殖することに起因する疾患を治療又は予防することができる。

[0100] 他の態様において、本発明は、未分化幹細胞から誘導された分化細胞を移植された対象において、前記未分化幹細胞の増殖に起因する疾患を治療又は予防するための医薬組成物の製造における、肪酸合成阻害剤、脂肪酸利用阻害剤、及びコレステロール合成阻害剤からなる群から選ばれる少なくとも一種の使用、を提供する。

[0101] また、他の態様において、本発明は、未分化幹細胞から誘導された分化細胞を移植された対象において、前記未分化幹細胞の増殖に起因する疾患を治療又は予防するための、肪酸合成阻害剤、脂肪酸利用阻害剤、及びコレステロール合成阻害剤からなる群から選ばれる少なくとも一種の使用、を提供する。

[0102] さらに、他の態様において、本発明は、未分化幹細胞から誘導された分化細胞を移植された対象における、前記未分化幹細胞の増殖に起因する疾患の治療又は予防に使用するための、肪酸合成阻害剤、脂肪酸利用阻害剤、及びコレステロール合成阻害剤からなる群から選ばれる少なくとも一種、を提供する。

[0103] 《治療方法等》

1 実施態様において、本発明は、未分化幹細胞除去剤を、未分化幹細胞から誘導された分化細胞を移植された対象に投与することを含む、前記未分化幹細胞の増殖に起因する疾患を治療又は予防する方法、を提供する。

[0104] 本実施形態の方法において、対象に投与される未分化幹細胞除去剤は、上記《未分化幹細胞除去剤》で記載したものと同様である。本実施形態の方法は、肪酸合成阻害剤、脂肪酸利用阻害剤、及びコレステロール合成阻害剤からなる群から選ばれる少なくとも一種を、未分化幹細胞から誘導された分化

細胞を移植された対象に投与することを含む、前記未分化幹細胞の増殖に起因する疾患を治療又は予防する方法であるともいえる。

また、未分化幹細胞から誘導された分化細胞を移植される対象は、上記《医薬組成物》で記載したものと同様である。上記未分化幹細胞除去剤は、上記《医薬組成物》に記載の医薬組成物の形態で対象に投与されてもよい。また、未分化幹細胞除去剤は、上記脂肪酸合成阻害剤等以外の他の成分と組み合わせ、対象に投与されてもよい。他の成分は、特に限定されないが、上記《未分化幹細胞除去剤》及び《医薬組成物》で記載したもの等を挙げることができる。

[0105] 上記未分化幹細胞除去剤は、未分化幹細胞から誘導された分化細胞を移植された対象に、脂肪酸合成阻害剤等についての治療的有効量が投与される。脂肪酸合成阻害剤等の治療的有効量は、移植した分化細胞の種類、移植量、及び移植場所等；移植を受けた対象の年齢、性別、体重等；未分化幹細胞除去剤の投与方法等により異なるが、脂肪酸合成阻害剤等の有効成分量として、例えば、0.001mg～1000mg、0.01mg～100mg、0.1mg～30mg、0.1mg～10mg、0.5mg～5mg等を例示することができる。

[0106] 投与対象、及び対象疾患は、上記《医薬組成物》で記載したものと同様のものを対象とすることができる。また、投与方法は、上記《医薬組成物》で記載したものと同様に行うことができる。

[0107] また、1実施態様において、本発明は、以下の(i)～(iii)の工程を含む、移植用細胞の移植方法を提供する：

(i) 未分化幹細胞から所望の分化細胞を誘導する工程；

(ii) 前記工程(i)により得られた細胞混合物を、未分化幹細胞除去剤の存在下で培養し、移植用細胞を得る工程；及び

(iii) 前記工程(ii)で得られた移植用細胞を、移植が必要な対象に移植する工程。

[0108] 本実施形態の移植方法における工程(i)及び(ii)は、上記《移植用

細胞の製造方法》で記載した工程（i）及び（i i）と同様に行うことができる。また、本実施形態の移植方法の工程（i i）で使用する未分化幹細胞除去剤は、上記《未分化細胞除去剤》で記載したものと同様である。

[0109] 本実施形態の移植方法における工程（i i i）は、前記工程（i i）で得られた移植用細胞を、移植が必要な対象に移植する工程である。「移植が必要な対象」とは、当該対象の生体内において、前記工程（i i）で得られた移植用細胞と同種の細胞に欠陥、損傷等が生じており、前記移植用細胞を移植することにより、当該細胞の欠陥、損傷等に起因する症状の改善が見込める対象である。移植は、一般的な細胞移植の手法により行うことができる。

[0110] 本実施形態の移植方法は、上記工程（i）～（i i i）に加えて、他の工程を追加してもよい。他の工程としては、例えば、分化細胞を精製する工程、分化細胞を回収する工程等が挙げられる。これらの工程を追加する場合、これらの工程は、上記工程（i i）と工程（i i i）の間に行われる。このような精製工程や回収工程は、前記《移植用細胞の製造方法》に記載したように行うことができる。

[0111] 本実施形態の移植方法によれば、未分化幹細胞を実質的に含まないか、未分化幹細胞の割合が低減された移植用細胞を生体内に移植することができるため、奇形腫形成等のリスクが低減される。

[0112] また、本実施形態の移植方法は、工程（i i i）の後に、さらに以下の工程（i v）を行ってもよい。

（i v）前記工程（i i i）で移植用細胞を移植した対象に、未分化幹細胞除去剤を投与する工程

[0113] 上記工程（i v）は、上記実施形態の治療又は予防する方法と同様に行うことができる。工程（i v）を行うことにより、たとえ移植用細胞に未分化幹細胞が残存したまま移植された場合であっても、奇形腫等の当該未分化幹細胞の増殖に起因する疾患の発症を予防することができる。

[0114] 以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例

[0115] 細胞の培養は、37℃、5%CO₂条件に設定されたインキュベーター内で行った。

[0116] (未分化幹細胞の培養)

ヒト胚性幹細胞は、WiCell Research Instituteから入手したH9株を使用し、ヒト人工多能性幹細胞は、国立大学法人・京都大学iPS細胞研究所山中伸弥教授から入手した。

ヒト胚性幹細胞およびヒト人工多能性幹細胞は、マトリゲル(BD Bioscience cat 354277)を用いて未分化維持培養を行った。培養液は、mTeSR1(STEMCELL Technologies Inc. cat 11875-119)を用いた。未分化維持培養液に関しては、mTeSR1の他に、Essential 8(Life Technologies)やTeSR2(STEMCELL Technologies Inc.)など、フィーダーフリー用の培地として一般的に使用されているものであれば使用可能である。またマトリックスとして、マトリゲルの他に、Vitronectin(Life Technologies)やiMatrix-511(Takara no. 892001)などがあり、その他のフィーダーフリー用のマトリックスとして一般的に使用されているものであれば使用可能である。

植え継ぎに際しては、CTK solution(Repro CELL)、37℃5分にてヒト胚性幹細胞および人工多能性幹細胞のコロニーを分離した。細胞の分散処理に関しては、CTK solution以外に、StemPro Accutase(Life Technologies no. 1110501)やTrypLE Express/Select(Life Technologies)も使用可能である。

[0117] (未分化幹細胞からの心筋細胞の誘導)

未分化幹細胞から心筋細胞への分化・誘導にあたり、今回の実験で用いた心筋細胞の分化誘導法は以下の通りである。

・心筋細胞への分化・誘導にあたり、ヒト胚性幹細胞またはヒト人工多能性幹細胞が50～90%コンフルエントになったところで、RPMI培地（Invitrogen）にB27（インスリンなし、Invitrogen）およびCHIR99021（ Selleckchem又はWako）6 μ Mを添加したものに培地を交換した（Day 0）。

・Day 1～Day 2は、RPMI/B27インスリン（-）培地で培養を行った。

・次いで、Day 3～Day 5は、RPMI/B27インスリン（-）培地に、さらにIWP2 5 μ M又はIWR-1（Sigma 10161）5 μ Mを添加した培地で培養を行った。

・さらに、Day 6～Day 7は、RPMI/B27インスリン（-）培地で培養を行った。

・そして、Day 8以降は、RPMI/B27インスリン（+）培地で培養を行った（Lian, X., et al., Nat Protocol, 2013, 8, 162-175）。Day 8～Day 11の段階で、拍動する心筋細胞を確認することができた。

[0118] （未分化幹細胞からの線維芽細胞の誘導）

未分化幹細胞から線維芽細胞への分化・誘導にあたり、今回の実験で用いた線維芽細胞誘導法は、以下の通りである。

・ヒト胚性幹細胞またはヒト人工多能性幹細胞が50～90%コンフルエントになったところで、MEM α 培地（Invitrogen）に10%FBSを添加した培養液（bFGF不含）に交換し、培養を行った。、2～4日おきに培養液を交換して培養することにより、約10日でビメンチン陽性の線維芽細胞を得ることが出来た（Tohyama S, Cell Metabolism 2016参照）。

[0119] [実験例1] ヒトiPS細胞由来心筋細胞とiPS細胞とでのFASNの発現の比較

上記に示す手順によりヒトiPS細胞から誘導した心筋細胞と、ヒトiP

S細胞とが混在した状態にある細胞混合物を用意した。OCT4は未分化状態を表すマーカーとして使用した。FASNは、図1に示すとおり、脂肪酸合成に関与する酵素タンパク質である。上記細胞混合物の免疫染色により、OCT4及びFASNを発現する細胞を検出した。結果を図2に示す。また、DAPI染色の結果も併せて示す。

[0120] 図2に示される結果から、OCT4及びFASNの発現細胞が重なることが判明した。このことから、OCT4を発現しないヒトiPS細胞由来心筋細胞では、FASNの発現が低い一方で、OCT4を発現する未分化のヒトiPS細胞では、FASNの発現が非常に高いことが明らかとなった。

[0121] [実験例2] 脂肪酸合成阻害剤を含有する培地での、各種未分化幹細胞株の培養

StemFit培地(AJINOMOTO社製)又はmTeSR1(Stem Cell Technologies社製)に、図3に示す各終濃度(2 μ M、4 μ M、6 μ M、8 μ M、10 μ M)となるようOrlistat(Sigma社製、O4139)を添加し、本発明の1実施形態に係る培地を得た。Orlistatを含まない培地(0 μ M)、及び上記の各終濃度でOrlistatを含む各培地にて、以下の3種の細胞株を72時間培養した。

- ・253G4:ヒト人工多能性幹細胞(ヒトiPS細胞)株
- ・Ff114:ヒト人工多能性幹細胞(ヒトiPS細胞)株
- ・H9:ヒト胚性幹細胞(ヒトES細胞)株

72時間の培養の後、細胞が有するアルカリホスファターゼ(ALP)の活性を、StemTAG(登録商標)アルカリホスファターゼ染色キット(Sigma 86-R)で発色させてAP染色を行い、赤色に染色された細胞を生細胞として確認した。各ウェルの様子を図3に示す。

[0122] 図3に示される結果から、Orlistatを含む培地での培養により、Orlistat濃度依存的に、各未分化幹細胞の細胞死が誘導されることが確認された。

[0123] [実験例3] 各種脂肪酸合成阻害剤又は脂肪酸利用阻害剤を含有する培地での、未分化幹細胞株の培養

StemFit培地(AJINOMOTO社製)又はmTeSR1培地(Stem Cell Technologies社製)に、図4に示す各終濃度となるよう以下の6種の脂肪酸合成阻害剤又は脂肪酸利用阻害剤をそれぞれ添加し、本発明の1実施形態に係る培地を得た。

- ・ C75 : FASN阻害
- ・ LY 294002 : ACLY阻害
- ・ SB 204990 : ACLY阻害
- ・ Etomoxier : CPT1阻害
- ・ Perhexiline : CPT1阻害

上記の脂肪酸合成阻害剤又は脂肪酸利用阻害剤を含む各培地にて、253G4細胞を72時間培養した。

72時間の培養の後、ALP染色を行い、赤色に染色された細胞を生細胞として確認した。各ウェルの様子を図4に示す。

[0124] 図4に示される結果から、上記のいずれの脂肪酸合成阻害剤又は脂肪酸利用阻害剤を含む培地での培養によっても、脂肪酸合成阻害剤又は脂肪酸利用阻害剤の濃度依存的に、未分化幹細胞の細胞死が誘導されることが確認された。

[0125] [実験例4] 脂肪酸合成阻害剤を含有する培地での、純化精製心筋細胞の培養

上記に示す手順によりヒトiPS細胞から誘導した心筋細胞と、ヒトiPS細胞とを含む細胞混合物を用意した。文献(Tohyama, et al., (2016) Cell Metabolism, 23, 663-674.)に記載の方法に沿って、グルコース(-)グルタミン(-)乳酸添加培地で5日間ほど上記細胞混合物を培養して心筋細胞以外の細胞を死滅させ、純化精製心筋細胞を得た。次いで、終濃度10 μ MでOrlistatを含むMEM α +10%FBS培地(Orlistat(+))で、16日間培養した。コントロールとして、Orlistatを

含まないMEM α +10%FBS培地（Orlistat（-））でも同様に培養を行った。Day 9及びDay 16の心筋細胞の様子を図5に示す。

[0126] 図5に示される結果から、Day 9～Day 16にかけて心筋細胞の成熟化（肥大化）が確認され、本実施形態に係る培地を用いて、純化精製心筋細胞を良好に培養可能であることが示された。

[0127] [実験例5] 脂肪酸合成阻害剤を含有する培地での、線維芽細胞の培養

上記に示す手順によりヒトiPS細胞から誘導した線維芽細胞と、ヒトiPS細胞とを含む細胞混合物を用意した。前記細胞混合物を、終濃度10 μ MでOrlistatを含むMEM α +10%FBS培地（Orlistat（+））で、9日間培養した。コントロールとして、Orlistatを含まないMEM α +10%FBS培地（Orlistat（-））でも同様に、前記細胞混合物の培養を行った。Day 9の心筋細胞及びそのVimentin染色の結果を図6に示す。

[0128] 図6に示される結果から、本発明の1実施形態に係る培地を用いて、ヒトiPS細胞由来線維芽細胞を良好に培養可能であることが示された。

[0129] [実験例6] 脂肪酸合成阻害剤を含有する培地での、ヒトiPS細胞由来心筋細胞とiPS細胞とを含む細胞混合物の培養

上記に示す手順によりヒトiPS細胞から誘導した後に純化精製した心筋細胞と、ヒトiPS細胞とが混在した状態にある細胞混合物を用意した。上記細胞混合物の、OCT4に対する免疫染色を実施した。上記細胞混合物を、終濃度10 μ MでOrlistatを含むStemFit培地（AJINOMOTO社製）又はmTeSR1（Stem Cell Technologies社製）（Orlistat（+））で、72時間培養した。コントロールとして、Orlistatを含まないStemFit培地（AJINOMOTO社製）又はmTeSR1（Stem Cell Technologies社製）（Orlistat（-））でも同様に培養を行った。72時間の培養の後、免疫染色によりOCT4の発現細胞を検出した。2反復試験分の結果を図7に示す。また、DAPI染色の結果も併せて示す。同

結果からOct 4を発現する細胞のコロニー数を定量した3反復試験分の結果を図8に示す。

[0130] 図7～8に示される結果から、Orlistatを含まない培地（Orlistat（－））で培養を行った場合、OCT4を発現する未分化幹細胞が残存していること確認された。一方、Orlistatを含む培地（Orlistat（＋））で培養を行った場合、OCT4を発現する未分化幹細胞の残存は検出されなかった。

このことから、本発明の1実施形態に係る未分化幹細胞除去剤で、ヒトiPS細胞由来心筋細胞と、ヒトiPS細胞と、が混在した状態にある細胞混合物を培養することにより、当該細胞混合物において、未分化状態の細胞特異的に細胞死を誘導することができることが示された。また、当該細胞混合物から、ヒトiPS細胞由来心筋細胞を含む分化状態の細胞のみを、選択的に選抜することができることが示された。

実験例6にて、このようにして得られた細胞混合物からは、未分化幹細胞の性質を有する細胞が除かれており、未分化幹細胞の除去率も非常に高いものであった。当該細胞混合物は、生体への移植等の用途への適用が見込まれ、際立った顕著な有用性が示された。

[実験例7] ヒトiPS細胞由来心筋細胞とiPS細胞とでのFASNの発現の比較

上記に示す手順によりヒトiPS細胞から誘導した心筋細胞と、ヒトiPS細胞とが混在した状態にある細胞混合物を用意した。トロポニンI（Troponin I：TnI）は心筋細胞のマーカーとして使用した。FASNは、図1に示すとおり、脂肪酸合成に関与する酵素タンパク質である。上記細胞混合物の免疫染色により、TnI及びFASNを発現する細胞を検出した。結果を図10に示す。また、DAPI染色の結果も併せて示す。

[0131] 図10に示される結果から、TnI及びFASNの発現細胞は重ならないことが判明した。このことから、TnIを発現するヒトiPS細胞由来心筋細胞では、FASNの発現が低い一方で、TnIを発現しない未分化のヒト

iPS細胞では、FASNの発現が非常に高いことが明らかとなった。

- [0132] また、抗FASN抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、ヒトiPS細胞(253G4)及びヒトiPS細胞から誘導した心筋細胞における、FASNの発現を確認した。陰性対照として、ヒト皮膚繊維芽細胞(HDF)を用いた。結果を図11に示す。

図11に示される結果から、ヒトiPS細胞由来心筋細胞ではFASNの発現は検出されず、ヒトiPS細胞ではFASNが高発現することが示された。

- [0133] [実験例8] コレステロール合成阻害剤を含有する培地での、未分化幹細胞株の培養

StemFit培地(AJINOMOTO社製)又はmTeSR1培地(Stem Cell Technologies社製)に、図12に示す各終濃度(0.125 μ M、0.25 μ M、0.5 μ M、1 μ M、2 μ M)となるようSimvastatin(S6196:Sigma Aldrich社製)を添加し、本発明の1実施形態に係る培地を得た。

Simvastatinを含まない培地(0 μ M)及び上記各終濃度でSimvastatinを含む培地にて、253G4細胞を72時間培養した。

72時間の培養の後、ALP染色を行い、赤色に染色された細胞を生細胞として確認した。各ウェルの様子を図12に示す。

- [0134] 図12に示される結果から、Simvastatinを含む培地での培養によっても、Simvastatinの濃度依存的に、未分化幹細胞の細胞死が誘導されることが確認された。

- [0135] [実験例9] 脂肪酸合成阻害剤及びパルミチン酸を含有する培地での、未分化幹細胞株の培養

StemFit培地(AJINOMOTO社製)又はmTeSR1(Stem Cell Technologies社製)に、図13に示す各終濃度(2 μ M、6 μ M、8 μ M)となるようOrlistat(Sigma社

製、O4139)を添加し、本発明の1実施形態に係る培地を得た。Orlistatを含まない培地(0 μ M)、及び上記の終濃度でOrlistatを含む各培地に、さらに、パルミチン酸(終濃度50 μ M)、カルニチン(終濃度0.5 mM)、及びBSA(終濃度8.3 μ M)を添加した各培地、並びにカルニチン(終濃度0.5 mM)とBSA(終濃度8.3 μ M)とのみを添加した各培地を用意した。前記の各培地にて、ヒトiPS細胞株(253G4)を72時間培養した。

72時間の培養の後、生細胞をLIVE/DEAD Assay(L3224:Thermo Fisher Scientific社製)で検出した。各ウェルの様子を図13に示す。また、同結果から、生細胞数を定量した結果を図14に示す。

[0136] 図13～14に示される結果から、Orlistatに加えてカルニチンとBSAとのみを添加した培地(BSA)での培養では、Orlistat濃度依存的に、ヒトiPSの細胞死が誘導されることが確認された。一方、Orlistatに加えて、パルミチン酸、カルニチン、及びBSAを添加した培地(PA+BSA)での培養では、ヒトiPS細胞の細胞死が抑制されることが確認された。脂肪酸であるパルミチン酸の添加により、ヒトiPS細胞の細胞死が抑制されたことから、OrlistatによるヒトiPS細胞の細胞死の誘導は、脂肪酸合成の阻害により生じていることが確認された。

[0137] [実験例10] FASNをノックダウンした未分化幹細胞株の培養

ヒトiPS細胞株(253G4)に、FASNに対するsiRNA(FASN siRNA)を導入して、FASNノックダウン未分化幹細胞株(FASN KD未分化幹細胞株)を作製した。また、陰性対照(Negative Control:N/C)のsiRNAを導入した未分化幹細胞株を、陰性対照株(N/C未分化幹細胞株)として作製した。FASN KD未分化幹細胞株、及びN/C未分化幹細胞株におけるFASN発現を、抗FASN抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認した結果を図15に

示す。図15の結果から、FASN siRNA導入により、FASNの発現がノックダウンできていることを確認した。使用した各siRNAは、以下の通りである。

FASN siRNA: Applied Biosystems (登録商標) siRNA ID: s5030 (Thermo Fisher Scientific社製)

N/C siRNA: Silencer™ Negative Control No. 1 siRNA (AM4611: Thermo Fisher Scientific社製)

上記FASN KD未分化幹細胞株、及びN/C未分化幹細胞株を、StemFit培地(AJINOMOTO社製)又はmTeSR1(Stem Cell Technologies社製)で72時間培養し、細胞増殖を確認した。結果を図16に示す。

[0138] 図16に示される結果から、FASN KD未分化幹細胞株では、N/C未分化幹細胞株と比較して、細胞増殖が抑制されることが確認された。このことから、FASNは、未分化幹細胞の生存及び増殖に、必須な因子であることが示された。

[0139] [実験例11] パルミチン酸を含有する培地での、FASN KD未分化幹細胞株の酸培養

StemFit培地(AJINOMOTO社製)又はmTeSR1(Stem Cell Technologies社製)に、パルミチン酸(終濃度50 μ M)、カルニチン(終濃度0.5 mM)、及びBSA(終濃度8.3 μ M)を添加した培地(PA-BSA培地)、並びにカルニチン(終濃度0.5 mM)とBSA(終濃度8.3 μ M)とのみを添加した培地(BSA培地)の各培地を用意した。前記の各培地にて、上記実験例11で作製したFASN KD未分化細胞株及びN/C未分化細胞株を72時間培養し、細胞増殖を確認した。結果を図17に示す。

[0140] 図17に示される結果から、PA-BSA培地で培養したFASN KD

未分化幹細胞株（FASN KD w/PA-BSA）、BSA-PA培地で培養したN/C未分化幹細胞株（N/C w/PA-BSA）、及びBSA培地で培養したN/C未分化幹細胞株（N/C w/BSA）は、同程度の細胞増殖を示した。一方、BSA培地で培養したFASN KD未分化幹細胞株は、上記3株と比較して、細胞増殖が抑制された。このことから、FASNにより合成されるパルミチン酸は、未分化幹細胞の生存及び増殖に、必須な成分であることが示された。

産業上の利用可能性

[0141] 本発明によれば、未分化幹細胞の高効率な除去を可能とする未分化幹細胞除去剤、及び未分化幹細胞除去方法等を提供することができ、再生医療分野等に広く利用可能である。