

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7538554号  
(P7538554)

(45)発行日 令和6年8月22日(2024.8.22)

(24)登録日 令和6年8月14日(2024.8.14)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 V
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10

請求項の数 22 (全26頁)

(21)出願番号 特願2022-529759(P2022-529759)	(73)特許権者 301021533 国立研究開発法人産業技術総合研究所 東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1
(86)(22)出願日 令和3年6月11日(2021.6.11)	
(86)国際出願番号 PCT/JP2021/023128	
(87)国際公開番号 WO2021/251507	(74)代理人 230104019 弁護士 大野 聖二
(87)国際公開日 令和3年12月16日(2021.12.16)	(74)代理人 100119183 弁理士 松任谷 優子
審査請求日 令和5年1月12日(2023.1.12)	(74)代理人 100149076 弁理士 梅田 慎介
(31)優先権主張番号 特願2020-102063(P2020-102063)	(74)代理人 100144794 弁理士 大木 信人
(32)優先日 令和2年6月12日(2020.6.12)	(72)発明者 渡邊 朋子 茨城県つくば市梅園 1 - 1 - 1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内
(33)優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	(72)発明者 舘野 浩章
特許法第30条第2項適用 ウェブサイトの掲載日： 令和2年7月15日 ウェブサイトのアドレス： <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X20312912">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X20312912</a> 公開者名：渡邊 最終頁に続く	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 培養液を用いたヒト多能性幹細胞の品質管理技術

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト多能性幹細胞の未分化性を判定又は評価する方法であって、  
ヒト多能性幹細胞の培養液中のSSEA-1陽性フィブロネクチンを検出、又は測定する工程を含み、ただし、前記ヒト多能性幹細胞は、ヒト受精卵及びヒト胚を含まない、方法。

【請求項2】

前記ヒト多能性幹細胞の培養液中のSSEA-1陽性フィブロネクチンを検出、又は測定する工程を、SSEA-1陽性フィブロネクチンを認識する一又は複数のプローブを用いて行う、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記プローブが、(a)SSEA-1をエピトープとして認識するプローブ、及び(b)フィブロネクチンを認識するプローブを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記プローブが、抗体又はそのフラグメントである、請求項2又は3に記載の方法。

【請求項5】

前記ヒト多能性幹細胞の培養液中のSSEA-1陽性フィブロネクチンを検出、又は測定する工程を、サンドイッチアッセイ法により行う、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

ヒト多能性幹細胞の未分化性を判定又は評価する方法において使用するためのキットであって、S S E A - 1 陽性フィブロネクチンを認識する一又は複数のプローブを含む、キット。

【請求項 7】

前記プローブが、( a ) S S E A - 1 をエピトープとして認識するプローブ、及び( b ) フィブロネクチンを認識するプローブを含む、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 8】

前記プローブが、抗体又はそのフラグメントである、請求項 6 又は 7 に記載のキット。

【請求項 9】

基板に固定化されている前記プローブ、及び標識化されている前記プローブを含み、基板に固定化されている前記プローブと標識化されている前記プローブとは異なる、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載のキット。

10

【請求項 10】

ヒト多能性幹細胞の品質を管理する方法であって、  
ヒト多能性幹細胞の培養液中の S S E A - 1 陽性フィブロネクチンを検出、又は測定する工程を含み、ただし、前記ヒト多能性幹細胞は、ヒト受精卵及びヒト胚を含まない、方法。

【請求項 11】

前記ヒト多能性幹細胞の培養液中の S S E A - 1 陽性フィブロネクチンを検出、又は測定する工程を、S S E A - 1 陽性フィブロネクチンを認識する一又は複数のプローブを用いて行う、請求項 10 に記載の方法。

20

【請求項 12】

前記プローブが、( a ) S S E A - 1 をエピトープとして認識するプローブ、及び( b ) フィブロネクチンを認識するプローブを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記プローブが、抗体又はそのフラグメントである、請求項 11 又は 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記ヒト多能性幹細胞の培養液中の S S E A - 1 陽性フィブロネクチンを検出、又は測定する工程を、前記プローブを用いたサンドイッチアッセイ法により行う、請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 15】

さらに、培養液中に S S E A - 1 陽性フィブロネクチンが検出された培養物より、S S E A - 1 陽性フィブロネクチン陽性細胞を除去する工程を含む、請求項 10 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記 S S E A - 1 陽性フィブロネクチン陽性細胞を除去する工程が、前記細胞と I R 7 0 0 で標識された S S E A - 1 陽性フィブロネクチンを認識する一又は複数のプローブとを結合させた後、近赤外線 ( N e a r - I n f r a r e d : N I R ) 照射を行うことを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

ヒト多能性幹細胞の品質を管理する方法において使用するためのキットであって、S S E A - 1 陽性フィブロネクチンを認識する一又は複数のプローブを含む、キット。

40

【請求項 18】

前記プローブが、( a ) S S E A - 1 をエピトープとして認識するプローブ、及び( b ) フィブロネクチンを認識するプローブを含む、請求項 17 に記載のキット。

【請求項 19】

基板に固定化されている前記プローブ、及び標識化されている前記プローブを含み、基板に固定化されている前記プローブと標識化されている前記プローブとは異なる、請求項 17 又は 18 に記載のキット。

【請求項 20】

50

さらに、IR700で標識されたSSEA-1陽性フィブロネクチンを認識する一又は複数のプローブを含む、請求項17~19のいずれか一項に記載のキット。

【請求項21】

前記プローブが、IR700で標識されたSSEA-1をエピトープとして認識するプローブ、及びIR700で標識されたフィブロネクチンを認識するプローブを含む、請求項20に記載のキット。

【請求項22】

前記プローブが、抗体又はそのフラグメントである、請求項17~21のいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は培養液を用いて、ヒト多能性幹細胞の未分化性を判定又は評価する方法、及び、ヒト多能性幹細胞の品質を管理する方法、ならびに、それらの方法に用いられるキットに関する。

【背景技術】

【0002】

再生医療とは、機能が損なわれた組織、臓器に対し、自己あるいは他人から採取した多能性幹細胞、又はそれら細胞から分化させた細胞を移植して補い、組織の再構築や臓器の再生を行う医療である。近年、薬物治療等の対症療法しかない疾病に対しても根本的な修復と再生が可能な医療として、大きな期待が寄せられている。

20

【0003】

胚性幹細胞(ES細胞)や人工の多能性幹細胞(iPS細胞)等の多能性幹細胞は、未分化性を保持し、様々な細胞(例えば、肝細胞や心筋細胞等)へと分化誘導することができるため、再生医療における移植用細胞の供給源として期待されている。ただし医療で実際に使用されるためには、ヒト多能性幹細胞から同じ品質の移植用細胞が再現性よく作製できることが必須である。そのためには、細胞源であるヒト多能性幹細胞の品質が安定していること(言い換えれば、未分化性が維持されていること)が重要となる。しかしながら、ヒト多能性幹細胞は継代や操作によりその性質はたやすく変化してしまうため、未分化性を維持することは容易ではない。このため、ヒト多能性幹細胞の未分化性を判定又は評価することはその品質を管理する上で極めて重要といえる。

30

【0004】

従来、ヒト多能性幹細胞の未分化性の判定又は評価は、顕微鏡下で観察した細胞中に、形態の変化した分化の進んだ細胞を見出すことにより行われていた。しかしこの場合、分化の進んだ細胞を見出すことは容易ではなく、またどの程度そのような細胞が混入しているのか定量的に評価することは困難であった。

【0005】

また、ヒト多能性幹細胞の未分化性を示すマーカー(例えば、Oct3/4、rBC2-LCN、SSEA-4、Nanog、SOX2、c-Myc、Klf4、Lin28、TRA-1-60、TRA-1-81等)、ならびに分化の進んだ細胞において発現が認められるマーカー(例えば、SSEA-1等)が知られており(非特許文献1,2)、これらマーカー発現の有無をフローサイトメーターや免疫染色等を用いて確認し、ヒト多能性幹細胞の未分化性を評価することができる。しかしこの場合、ヒト多能性幹細胞において発現しているマーカーを検出するために、細胞を回収する煩雑な工程が必須であるばかりでなく、本来移植治療に用いるための貴重なヒト多能性幹細胞を検査で使うという問題点があった。

40

【0006】

そのため当該分野においては、ヒト多能性幹細胞の未分化性を簡便かつ効率的に、かつ非侵襲的に評価することを可能とする新たな手法の確立が切望されていた。

【先行技術文献】

50

## 【非特許文献】

【0007】

【文献】Stem Cell Res. 2009 Jul; 3(1): 3-11

【文献】Stem Cells. 2004; 22(5): 659-68

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、従来行なわれていたヒト多能性幹細胞の未分化性を判定又は評価する方法における上記課題を解決し、簡便かつ効率的に、かつ非侵襲的にヒト多能性幹細胞の未分化性を判定又は評価することを可能とする新たな方法を提供することを目的とする。

10

## 【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、未分化性が低下した細胞を含むヒト多能性幹細胞の培養液中にはフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンが含まれ、また、未分化性が低下した細胞の割合と培養液中のフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンの量は相関していることを見出した。そして、ヒト多能性幹細胞の培養液中に含まれるフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンを検出、又は測定することにより、ヒト多能性幹細胞の未分化性を判定又は評価できること、さらに、当該判定又は評価の結果に基づいて、ヒト多能性幹細胞の品質を管理できることを見出した。そして、フィブロネクチン陽性細胞を標的として除去することによって、未分化性が低下した細胞を選択的に除去することが可能であり、ヒト多能性幹細胞の品質を管理できることを見出した。

20

【0010】

本発明はこれらの知見に基づくものであり、以下の発明を包含する。

[1] ヒト多能性幹細胞の未分化性を判定又は評価する方法であって、

ヒト多能性幹細胞の培養液中のフィブロネクチンを検出、又は測定する工程を含む、方法。

[2] 前記ヒト多能性幹細胞の培養液中のフィブロネクチンを検出、又は測定する工程を、フィブロネクチンを認識する一又は複数のプローブを用いて行う、[1]の方法。

[3] 前記ヒト多能性幹細胞の培養液中のフィブロネクチンが、SSEA-1陽性フィ

30

ブロネクチンであり、前記プローブが、(a) SSEA-1をエピトープとして認識するプローブ、及び(b) フィブロネクチンを認識するプローブを含む、[2]の方法。

[4] 前記プローブが、抗体又はそのフラグメントである、[2]又は[3]の方法。

[5] 前記ヒト多能性幹細胞の培養液中のフィブロネクチンを検出、又は測定する工程を、サンドイッチアッセイ法により行う、[1]～[4]のいずれかの方法。

【0011】

[6] ヒト多能性幹細胞の未分化性を判定又は評価する方法において使用するためキットであって、フィブロネクチンを認識する一又は複数のプローブを含む、キット。

[7] 前記フィブロネクチンが、SSEA-1陽性フィブロネクチンであり、

40

前記プローブが、(a) SSEA-1をエピトープとして認識するプローブ、及び(b) フィブロネクチンを認識するプローブを含む、[6]のキット。

[8] 前記プローブが、抗体又はそのフラグメントである、[6]又は[7]のキット。

[9] 基板に固定化されている前記プローブ、及び標識化されている前記プローブを含み、基板に固定化されている前記プローブと標識化されている前記プローブとは異なる、[6]～[8]のいずれかのキット。

【0012】

[10] ヒト多能性幹細胞の品質を管理する方法であって、

ヒト多能性幹細胞の培養液中のフィブロネクチンを検出、又は測定する工程を含む、方法。

50

[ 1 1 ] 前記ヒト多能性幹細胞の培養液中のフィブロネクチンを検出、又は測定する工程を、フィブロネクチンを認識する一又は複数のプローブを用いて行う、[ 1 0 ]の方法。

[ 1 2 ] 前記ヒト多能性幹細胞の培養液中のフィブロネクチンが、S S E A - 1陽性フィブロネクチンであり、

前記プローブが、( a ) S S E A - 1をエピトープとして認識するプローブ、及び( b )フィブロネクチンを認識するプローブを含む、[ 1 1 ]の方法。

[ 1 3 ] 前記プローブが、抗体又はそのフラグメントである、[ 1 1 ]又は[ 1 2 ]の方法。

[ 1 4 ] 前記ヒト多能性幹細胞の培養液中のフィブロネクチンを検出、又は測定する工程を、前記プローブを用いたサンドイッチアッセイ法により行う、[ 1 0 ] ~ [ 1 3 ]のいずれかの方法。

10

[ 1 5 ] さらに、培養液中にフィブロネクチンが検出された培養物より、フィブロネクチン陽性細胞を除去する工程を含む、[ 1 0 ] ~ [ 1 4 ]のいずれかの方法。

[ 1 6 ] 前記フィブロネクチン陽性細胞を除去する工程が、前記細胞とI R 7 0 0で標識されたフィブロネクチンを認識する一又は複数のプローブとを結合させた後、近赤外線( N e a r - I n f r a r e d : N I R )照射を行うことを含む、[ 1 5 ]の方法。

#### 【 0 0 1 3 】

[ 1 7 ] ヒト多能性幹細胞の品質を管理する方法において使用するためのキットであって、フィブロネクチンを認識する一又は複数のプローブを含む、キット。

[ 1 8 ] 前記フィブロネクチンが、S S E A - 1陽性フィブロネクチンであり、

20

前記プローブが、( a ) S S E A - 1をエピトープとして認識するプローブ、及び( b )フィブロネクチンを認識するプローブを含む、[ 1 7 ]のキット。

[ 1 9 ] 基板に固定化されている前記プローブ、及び標識化されている前記プローブを含み、基板に固定化されている前記プローブと標識化されている前記プローブとは異なる、[ 1 7 ]又は[ 1 8 ]のキット。

[ 2 0 ] さらに、I R 7 0 0で標識されたフィブロネクチンを認識する一又は複数のプローブを含む、[ 1 7 ] ~ [ 1 9 ]のいずれかのキット。

[ 2 1 ] 前記プローブが、I R 7 0 0で標識されたS S E A - 1をエピトープとして認識するプローブ、及びI R 7 0 0で標識されたフィブロネクチンを認識するプローブを含む、[ 2 0 ]のキット。

30

[ 2 2 ] 前記プローブが、抗体又はそのフラグメントである、[ 1 7 ] ~ [ 2 1 ]のいずれかのキット。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2 0 2 0 - 1 0 2 0 6 3 号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとりいれるものとする。

#### 【発明の効果】

#### 【 0 0 1 4 】

本発明によれば、簡便かつ効率的に、かつ非侵襲的にヒト多能性幹細胞の未分化性を判定又は評価することを可能とする新たな方法を提供することができる。

40

より詳細には、本発明においては、ヒト多能性幹細胞の培養液を被験試料とし、それに含まれるフィブロネクチン、又はS S E A - 1陽性フィブロネクチンを検出又は測定し、フィブロネクチン、又はS S E A - 1陽性フィブロネクチンの検出結果又は測定結果に基づいて、ヒト多能性幹細胞の未分化性を判定又は評価するものであり、貴重なヒト多能性幹細胞を減らすことなく、かつ簡便にその未分化性を判定又は評価すること、さらには未分化性が低下した細胞を選択的に除去することができ、ヒト多能性幹細胞の品質を管理することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【 0 0 1 5 】

【 図 1 】 図 1 は、未分化性を低下させたヒト i P S 細胞の作製過程( 0 日目 ~ 1 0 日目)

50

における顕微鏡像を示す写真図である。Aは、未分化性を低下させたヒトiPS細胞の作製過程（0日目，2日目，5日目，10日目）における位相差顕微鏡像を示す。Bは、ヒトiPS細胞及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞における、DAPI（青）及びOct3/4、rBC2-LCN、SSEA-4、SSEA-1（緑）についての各免疫染色像（蛍光顕微鏡像）を示す。

【図2】図2は、未分化性を低下させたヒトiPS細胞の培養上清におけるSSEA-1陽性糖タンパク質の解析結果を示す。Aは、ヒトiPS細胞及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞の各培養上清を、rABAレクチンを用いて免疫沈降した後、抗SSEA-1モノクローナル抗体を利用したウェスタンブロッティングに供した結果を示す写真図である。未分化性を低下させたヒトiPS細胞の培養上清に由来するサンプルにおいて矢印で示された領域は $>250$  kDaのバンドを示す。Bは、ヒトiPS細胞及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞の各培養上清を、rABAレクチンを用いて免疫沈降した後、銀染色に供した結果を示す写真図である。未分化性を低下させたヒトiPS細胞の培養上清に由来するサンプルにおいて矢印で示された領域は $>250$  kDaのバンドを示す。Cは、Bに示す銀染色後にSDSゲルから切り出した $>250$  kDaのバンド領域に含まれるタンパク質の解析結果を示す。

10

【図3】図3は、未分化性を低下させたヒトiPS細胞の培養上清におけるSSEA-1陽性フィブロネクチンの解析結果を示す。Aは、ヒトiPS細胞及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞の各培養上清を、抗フィブロネクチンポリクローナル抗体を用いて免疫沈降した後、抗SSEA-1モノクローナル抗体又は抗フィブロネクチンポリクローナル抗体を利用したウェスタンブロッティングに供した結果を示す写真図である。Bは、ヒトiPS細胞及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞の各培養上清を、抗フィブロネクチンモノクローナル抗体を用いて免疫沈降した後、抗SSEA-1モノクローナル抗体又は抗フィブロネクチンモノクローナル抗体を利用したウェスタンブロッティングに供した結果を示す写真図である。Cは、ヒトiPS細胞（左）及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞（右）の、DAPI（青）及びフィブロネクチン（赤）についての免疫染色像（蛍光顕微鏡像）を示す写真図である。各図において、四角で囲まれた領域の拡大図を右に示す。

20

【図4】図4は、フィブロネクチン抗体とSSEA-1抗体を用いたサンドイッチELISAアッセイの結果を示すグラフ図である。Aは、ヒトiPS細胞（白三角）及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞（黒丸）をそれぞれ24時間培養した培養上清を段階希釈し、作成された検量線を示す。Bは、未分化性を低下させたヒトiPS細胞を25000細胞/mL、12500細胞/mL、6250細胞/mL、0細胞/mLの密度でそれぞれ播種した際の培養上清を用いたサンドイッチELISAの結果を示すグラフ図である。黒は実際の細胞数、灰色は未分化性を低下させたヒトiPS細胞を単独で培養した際の見かけの細胞数、白色はヒトiPS細胞と共培養した際の見かけの細胞数を示す。

30

【図5】図5は、フィブロネクチンモノクローナル抗体とフィブロネクチンポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAアッセイの結果を示すグラフ図である。ヒトiPS細胞（白三角）及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞（黒丸）をそれぞれ24時間培養した培養上清を段階希釈し、作成された検量線を示す。

40

【図6】図6は、ヒトiPS細胞と未分化性を低下させたヒトiPS細胞を、IR700標識フィブロネクチン抗体で染色した免疫染色像（蛍光顕微鏡像）を示す写真図である。Aは、未分化性を低下させたヒトiPS細胞（左）とヒトiPS細胞（対照：右）を、IR700標識フィブロネクチン抗体（赤色）及びヘキスト33342（青色）で染色した免疫染色像であり、四角で囲まれた領域の拡大図を右下枠内に示す。Bは、未分化性を低下させたヒトiPS細胞を、IR700標識フィブロネクチン抗体（赤色）で1時間（左）及び6時間（右）処理して得られた免疫染色像を示す。各図において、スケールバーは $100\ \mu\text{m}$ を示す。

【図7】図7は、ヒトiPS細胞と未分化性を低下させたヒトiPS細胞に対するIR700標識フィブロネクチン抗体処理とそれに続く近赤外線（Near-Infrared

50

：N I R）照射処理後の、各細胞の生存率を分析した結果（蛍光顕微鏡像）を示す写真図である。Aは、未分化性を低下させたヒトi P S細胞を、無処理、I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体処理、N I R照射処理、ならびに、I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体処理とそれに続くN I R照射処理にそれぞれ付した後、生細胞染色（カルセイン - アセトキシメチル（A M）：上段（緑色））及び死細胞染色（E t h D - 1：下段（赤色））により細胞生存率を分析した結果を示す。Bは、ヒトi P S細胞について同様に細胞生存率を分析した結果を示す。各図において、スケールバーは1 0 0 μ mを示す。

【図8】図8は、ヒトi P S細胞と未分化性を低下させたヒトi P S細胞の生存率に対する、I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体処理とそれに続くN I R照射処理の定量的効果の分析結果を示すグラフ図である。Aは、所定濃度（0 ~ 1 0 n g / m L）のI R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体で処理した後、N I R照射処理に付したヒトi P S細胞（白丸）と未分化性を低下させたヒトi P S細胞（黒丸）の細胞生存率（%）を示すグラフ図である。細胞生存率（%）は、N I R照射後C C K - 8 溶液を培地に添加し、4 5 0 n mでの吸光度を測定した後、未処理の細胞を1 0 0 %とする相対値にて示し、3回の測定の平均±標準偏差として示される。Bは、I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体で処理した後、所定時間（0 ~ 1 0 分）のN I R照射処理に付したヒトi P S細胞（白丸）と未分化性を低下させたヒトi P S細胞（黒丸）の細胞生存率（%）を示すグラフ図である。細胞生存率（%）は、N I R照射後C C K - 8 溶液を培地に添加し、4 5 0 n mでの吸光度をI R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体のみで処理した細胞を1 0 0 %とする相対値にて示し、3回の測定の平均±標準偏差として示される。

【図9】図9は、ヒトi P S細胞の共存下における、I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体処理とそれに続くN I R照射処理を用いた未分化性を低下させたヒトi P S細胞の選択的除去の実験結果を示す。Aは、未分化性を低下させたヒトi P S細胞とヒトi P S細胞の共培養物を、無処理、I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体処理、N I R照射処理、ならびに、I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体処理とそれに続くN I R照射処理にそれぞれ付した後、生細胞染色（カルセイン - アセトキシメチル（A M）：上段（緑色））及び死細胞染色（E t h D - 1：下段（赤色））により各細胞の生存率を分析した結果（蛍光顕微鏡像）を示す写真図である。スケールバーは1 0 0 μ mを示す。Bは、ヒトi P S細胞とC e l l T r a c k e r G r e e n - 5 - クロロメチルフルオレセインジアセテートで染色した未分化性を低下させたヒトi P S細胞の共培養物を、無処理、I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体処理、N I R照射処理、ならびに、I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体処理とそれに続くN I R照射処理にそれぞれ付した後に回収し、フローサイトメーターにより各細胞の割合を測定した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

1. ヒト多能性幹細胞の未分化性について

本発明において「多能性」とは、3 胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）のどの系統の細胞にも分化し得る能力（ただし、胚盤胞には分化できない）、すなわちp l u r i p o t e n c yを意味する。

【0017】

「ヒト多能性幹細胞」とは、多能性を有し、3 胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）にわたる生体の様々な組織に分化し得る能力を潜在的に有するヒト細胞を意味する。このような細胞としては、ヒト胚性幹細胞（E S細胞）やヒト人工多能性幹細胞（i P S細胞）、ならびにそれらと同等の多能性を有する細胞が挙げられる。好ましくは本発明において「ヒト多能性幹細胞」とは、ヒトE S細胞又はヒトi P S細胞であり、より好ましくはヒトi P S細胞である。

【0018】

「ヒトE S細胞」とは、ヒトの初期胚（胚盤胞）より内部細胞塊を取り出し、フィーダー細胞上で培養することによって製造することができる多能性幹細胞を意味する（T h o m s o n J A . e t a l . , S c i e n c e . 1 9 9 8 N o v 6 ; 2 8 2 ( 5 3 9

10

20

30

40

50

1) : 1145 - 7.)。

【0019】

本発明において「ヒトES細胞」は、従来公知の手段に従ってヒトの初期胚（胚盤胞）より製造されたものであってもよいし、あるいは、既に樹立されたヒトES細胞株（例えば、KHES-1~KHES-5株、HES1~HES6株、CHB-1~CHB-12株、RUES1株、RUES2株、HUES1~HUES28株、WA01(H1)株、WA07(H7)株、WA09(H9)株、WA13(H13)株、WA14(H14)株、SA002株、SA181株、SA611株等（これらに限定はされない））であつてもよい。

【0020】

「ヒトiPS細胞」とは、ヒトの体細胞又は未分化幹細胞に、核初期化因子と知られる特定の因子（例えば、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanog、Lin28、L-Myc、hTERT、SV40 large T等）を導入してリプログラミング（初期化）することによって製造することができる人工の多能性幹細胞を意味する（Takahashi K. et al., Cell (2007) 131, 861-872; Okita, K. et al., Nature (2007) 448, 313-317; Nakagawa M. et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, 101-106; Yu J. et al., Science (2007) 318, 1917-1920; Park I.H. et al., Nature (2007) 451, 141-146等）。

【0021】

本発明において「ヒトiPS細胞」は、従来公知の手段に従ってヒトの体細胞又は未分化幹細胞より製造されたものであってもよいし、あるいは、既に樹立されたヒトiPS細胞株（例えば、201B7株、253G1株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株、Ff-WJ-18株、Ff-I01s01株、Ff-I01s02株、Ff-I01s04株、Ff-I01s06株、Ff-I14s03株、Ff-I14s04株、QHJI01s01株、QHJI01s04株、QHJI14s03株、QHJI14s04株、253G1株、HiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株等（これらに限定はされない））であつてもよい。

【0022】

本明細書において、ヒト多能性幹細胞の「未分化性」とは、ヒト多能性幹細胞が多能性を保持し、分化（「逸脱」とも称される）を生じていない状態を意味する。一方、ヒト多能性幹細胞に分化（逸脱）が生じると多能性が低下もしくは消失し、これに伴い「未分化性」は低下もしくは消失する。未分化性を保持しているヒト多能性幹細胞では通常、Oct3/4、rBC2-LCN、SSEA-4、Nanog、SOX2、c-Myc、Klf4、Lin28、TRA-1-60、TRA-1-81等からなる群から選択される一又は複数の未分化マーカーの遺伝子及び/又はタンパク質の発現が認められる。一方、未分化性が低下もしくは消失した細胞では、未分化性を保持しているヒト多能性幹細胞と比べて上記未分化マーカーの遺伝子及び/又はタンパク質の発現が低下又は消失し、代わりに、SSEA-1、ピメンチン、N-カドヘリン、Twist、Zeb1/2、Snail、Slug等の分化マーカーやフィブロネクチンの遺伝子及び/又はタンパク質の発現が認められる。

【0023】

本明細書において、「未分化性が低下したヒト多能性幹細胞（もしくはヒトiPS細胞）」、「未分化性を低下させたヒト多能性幹細胞（もしくはヒトiPS細胞）」又は「ヒト多能性幹細胞（もしくはヒトiPS細胞）の未分化性は低下している」という場合、上記未分化性が低下もしくは消失した細胞を含むヒト多能性幹細胞（もしくはヒトiPS細胞）集団を意味する。すなわち、「未分化性が低下したヒト多能性幹細胞（もしくはヒトiPS細胞）」、「未分化性を低下させたヒト多能性幹細胞（もしくはヒトiPS細胞）」

10

20

30

40

50

」又は「ヒト多能性幹細胞（もしくはヒトiPS細胞）の未分化性は低下している」という場合には、未分化性を保持しているヒト多能性幹細胞（もしくはヒトiPS細胞）と未分化性が低下もしくは消失した細胞とが共存する態様が含まれ得る。

【0024】

2. ヒト多能性幹細胞の未分化性の判定又は評価

(2-1) フィブロネクチン

「フィブロネクチン」は、細胞接着分子として知られる分泌性の巨大な糖タンパク質であり、様々な細胞において合成され、細胞外に分泌されることが知られている（NCBIデータベースにおけるGene ID: 2335）。フィブロネクチンは、細胞外マトリックスへの接着、結合組織の形成・保持、創傷治癒、胚発生での組織や器官の形態・区画の形成・維持等、脊椎機能の正常な生命機能を支える多くの機能を有することが公知となっている。フィブロネクチン（単量体）は、分子量210~250kDa（2,146~2,325アミノ酸残基）の可溶性糖タンパク質であって、7つのN型糖鎖及び1つのO型糖鎖を有することが知られている。本発明において「フィブロネクチン」には、下記の「SSEA-1陽性フィブロネクチン」が含まれてもよい。

10

【0025】

(2-2) SSEA-1陽性フィブロネクチン

本発明において「SSEA-1陽性フィブロネクチン」とは、SSEA-1が結合した分泌性のフィブロネクチンをコアタンパク質とする糖タンパク質を意味する。

【0026】

「SSEA-1 (Stage-specific Embryonic Antigen-1)」は、Lewis X、すなわちGal 1-4 (Fuc 1-3) GlcNAcを糖鎖抗原（エピトープ）として有する糖鎖マーカーである。SSEA-1は、未分化性を保持しているヒト多能性幹細胞では発現しておらず、分化に伴い細胞膜上での発現が増大することが報告されている（Thomson J A. et al., Science. 1998 Nov 6; 282 (5391): 1145-7.）。SSEA-1は、フィブロネクチンの7つのN型糖鎖及び1つのO型糖鎖の1つ又は複数の糖鎖の非還元末端に結合していると考えられる。

20

【0027】

(2-3) 培養液

本発明において、フィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンの検出、又は測定は、ヒト多能性幹細胞のインビトロ培養物の培養液を被験試料として用いて行う。培養液を利用することにより、本来移植治療に用いるための貴重なヒト多能性幹細胞を用いることなく、非侵襲的にその未分化性を判定又は評価することができる。培養工程においては一般に一定期間毎に新鮮な培養液と交換する。このため、フィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンの検出又は測定は、交換後の培養液中にフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンが検出可能な量分泌された後に行う。培養液交換後、培養液中に検出可能な量のフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンが分泌されるまでに要する時間は、細胞の種類や量、培養条件によって異なり得る。したがって、培養液交換後、フィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンの検出又は測定に用いる培養液を採取するまでの時間は、細胞の種類や培養条件によって適宜設定され得るが、例えば18~72時間程度とされる。通常は1~3日程度毎に培地交換を行うので、培地交換の際に廃棄する培養液を利用することが好ましい。培養液は、従来公知の固液分離法（例えば、遠心分離、ろ過等）を用いて回収された培養上清を利用することが好ましい。

30

【0028】

(2-4) プローブ

(2-4-1) フィブロネクチンを認識するプローブ

本発明において、「フィブロネクチンを認識するプローブ」としては、フィブロネクチンを認識して結合することができるタンパク質やポリペプチド、ならびに化合物を利用す

40

50

ることができ、好ましくはフィブロネクチンを抗原（エピトープ）として認識する抗フィブロネクチン抗体又はそのフラグメントを利用することができる。抗フィブロネクチン抗体は従来慣用の手法により調製することができる、例えば、フィブロネクチンもしくはその断片をそのまま、又はアルブミンやK L H等のキャリアタンパク質に結合させて動物に免疫することで得ることができる。あるいは、抗フィブロネクチン抗体は、フィブロネクチンをエピトープとして認識して結合する、好ましくは特異的に結合する能力を有するものであればよく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体等、特に限定されることなく用いることができる。また、本発明においては、フィブロネクチンをエピトープとして認識して結合する、好ましくは特異的に結合する能力を有する限り、抗フィブロネクチン抗体のフラグメントも利用することができる。この

10

#### 【0029】

フィブロネクチンを認識するプローブは1種のプローブを単独で用いてもよいし、2種又はそれ以上の複数種のプローブを組み合わせ用いてもよい。

#### 【0030】

(2-4-2) S S E A - 1 をエピトープとして認識するプローブ

20

培養液中のS S E A - 1 陽性フィブロネクチンの検出又は測定は、(a) S S E A - 1 をエピトープとして認識するプローブと、(b) 上述のフィブロネクチンを認識するプローブとを利用して行うことができる。これら2種類のプローブを用いることで、目的タンパク質を特異性高く、かつ高感度に検出することができ、好ましい。

#### 【0031】

本発明において、(a) 「S S E A - 1 をエピトープとして認識するプローブ」としては、S S E A - 1 の糖鎖構造を認識して結合するS S E A - 1 結合性レクチン（例えば、ミヤコグザ凝集素 (Lotus Tetragolionobusレクチン、L T L)、D C - S I G N、緑膿菌由来レクチン (Pseudomonas aeruginosaレクチン、P A - I I L) 等（これらに限定されない））、ペプチド、アプタマーや、S S E A - 1 を糖鎖抗原（エピトープ）として認識する抗S S E A - 1 抗体又はそのフラグメントを利用することができる。好ましくは、本発明において「S S E A - 1 をエピトープとして認識するプローブ」は、抗S S E A - 1 抗体又はそのフラグメントである。抗S S E A - 1 抗体は従来慣用の手法により調製することができ、例えば、S S E A - 1 をそのまま、又はアルブミンやキーホールリンペットヘモシアニン (K L H) 等のキャリアタンパク質に結合させて動物に免疫することで得ることができる。あるいは、既知の又は市販の抗S S E A - 1 抗体も、本発明において利用することができる。抗S S E A - 1 抗体は、S S E A - 1 をエピトープとして認識して結合する、好ましくは特異的に結合する能力を有するものであればよく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体等、特に限定されることなく用いることができる。また、本発明

30

40

#### 【0032】

S S E A - 1 をエピトープとして認識するプローブは1種のプローブを単独で用いてもよいし、2種又はそれ以上の複数種のプローブを組み合わせ用いてもよい。

#### 【0033】

(2-5) フィブロネクチン、又はS S E A - 1 陽性フィブロネクチンの検出又は測定

培養液中のフィブロネクチン、又はS S E A - 1 陽性フィブロネクチンの検出又は測定は、上述の各プローブの使用と組み合わせた、タンパク質の検出又は定量に一般的に用い

50

られる手法、例えば、酵素結合免疫吸着（E L I S A）法、サンドイッチアッセイ法、競合法、ウェスタンブロット法、クロマトグラフィー法、免疫沈降等の一又は複数を用いて行うことができる。好ましくは、培養液中のフィブロネクチンの検出又は測定は、2種又はそれ以上のフィブロネクチンを認識するプローブを用いたサンドイッチアッセイ法により行い、より好ましくは、培養液中のS S E A - 1陽性フィブロネクチンの検出又は測定は、前記（a）及び（b）のプローブを用いたサンドイッチアッセイ法により行う。

**【0034】**

サンドイッチアッセイ法においては、用いるプローブのうちのいずれか（以下、「第一のプローブ」と記載する）を基板に固定化する。第一のプローブを固定化する基板としては、プレート（例えば、マイクロウェルプレート等）、マイクロアレイ基板（例えば、マイクロアレイ用スライドガラス等）、チューブ、ビーズ（例えば、プラスチックビーズ、磁気ビーズ等）、クロマトグラフィー用担体（例えば、S e p h a r o s e（商標）等）、メンブレン（例えば、ニトロセルロースメンブレン、P V D F膜等）、ゲル（例えば、ポリアクリルアミドゲル等）等が例示される。その中でもプレート、ビーズ及びメンブレンが好ましく用いられ、取り扱いの簡便性からプレートが最も好ましく用いられる。

10

**【0035】**

第一のプローブの基板への固定化は、ビオチン - アビジン結合による固定化により行うことができる。すなわち、あらかじめ固定化する第一のプローブをビオチン化しておき、ビオチン化した当該プローブをストレプトアビジンコートした基板（ウェル）上に固定化した形態で調製することができる。この場合、検出感度が向上し、バックグラウンドを大幅に減少させることができる。

20

**【0036】**

他の固定化法としては、物理的吸着法や化学的結合法が挙げられる。物理的吸着法を使用する場合は線処理、電子線処理、UV処理、プラズマ処理、コロナ処理等による表面を活性化する方法が挙げられ、化学的結合法を使用する場合はp - ニトロフェニル基等である置換又は無置換のフェノール活性エステル基；及び、N - ヒドロキシスクシンイミド基、N - ヒドロキシフタルイミド基、N - ヒドロキシ - 5 - ノルボルネン - 2 , 3 - ジカルボキシイミド、等であるN - ヒドロキシイミド活性エステル基、カルボキシル基、カルボニル基、アルデヒド基、エポキシ基、アミノ基、チオール基、マレイミド基等を基板表面に有することが好ましい。

30

**【0037】**

被験試料である培養液は、緩衝液で希釈し、又は希釈せずに第一プローブを固定化したウェル内に添加して相互作用させた後、非特異的結合をしている夾雑物を、緩衝液を用いて洗浄する。

**【0038】**

次いで、間接的又は直接的に標識化された、第一のプローブとは異なるプローブ（以下、「第二のプローブ」と記載する）を含有させた緩衝液を添加して反応させる。第二のプローブの標識には例えば、蛍光物質（例えば、F I T C、ローダミン、C y 3、C y 5等）、放射性物質（例えば、<sup>13</sup>C、<sup>3</sup>H等）、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ（西洋ワサビペルオキシダーゼ等）、グルコースオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ等）等の標識物質が挙げられるが、これらに限定はされない。また、第二のプローブをビオチン標識し、（ストレプト）アビジンを上記標識物質で標識して、ビオチンと（ストレプト）アビジンとの結合を利用してもよい。

40

**【0039】**

また、本明細書において、「間接的又は直接的に標識化された、第一のプローブとは異なるプローブ」又は「標識化された第二のプローブ」等という場合、当該プローブ自体を直接標識化せずに、当該プローブをそれと結合する標識化された二次抗体で間接的に標識して検出する場合も含まれる。

**【0040】**

標識物質として酵素を用いる場合、使用する酵素に応じた適切な基質を用いて検出を行

50

なう。例えば、酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合、基質としては *o*-フェニレンジアミン (OPD)、テトラメチルベンジジン (TMB)、2, 2'-アジノビス[3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸] (ABTS)、3, 3'-ジアミノベンジジン (DAB)、Amplex (登録商標) Red、3-(*p*-ヒドロキシフェニル)プロピオン (HPPA)、ルミノール等が使用され、アルカリホスファターゼを使用する場合には、*p*-ニトロフェニルホスフェート (PNPP)、4-メチルウンベリフェリルリン酸、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート (BCIP) / ニトロブルーテトラゾリウムクロライド (NBT)、AttoPhos (登録商標)、リン酸4-メチルウンベリフェリル (4-MUP)、ECF、DDAO phosphate、ジオキセタン、CDP-Star<sup>TM</sup>、AMP PD (登録商標)、CSPD (登録商標) 等が使用される。酵素反応停止液、基質溶解液についても、選択した酵素に応じて、従来公知のものを適宜選択して使用することができる。

10

## 【0041】

サンドイッチアッセイ法では、培養液中のフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンは前記基板上に固定化された第一のプローブと結合し、かつ前記標識化された第二のプローブとも結合して複合体を形成する。そして、この複合体における標識化された第二プローブより生じたシグナルを検出、又は測定することにより、試料中のフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンを検出、又は測定することができる。シグナルの検出又は測定は、使用した標識物質に応じて適切な検出又は測定装置を用いて行なうことができる。

20

## 【0042】

前記シグナルの検出または測定の方法としては、ELISA、イムノクロマトグラフィー、ラジオイムノアッセイ (RIA)、蛍光イムノアッセイ (FIA法)、化学発光イムノアッセイ、エバネッセント波分析法等を利用することができる。これらの方法は当業者に公知であり、いずれの方法を選択してもよい。また、これらの方法は通常の手順に従って実施すればよく、実際の反応条件の設定等は、当業者が通常行い得る技術範囲内のものである。本発明において好ましくは、西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素で標識化された第二プローブより生じたシグナルを検出、又は測定するサンドイッチELISAアッセイ法により行う。

## 【0043】

培養液中のフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンの定量的な測定のために、例えばヒト細胞発現のリコンビナントフィブロネクチン、あるいは、フィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンを発現する細胞の培養液から精製されたフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンを標準物質として用いて、上記サンドイッチアッセイ法により、標準物質にに応じた標識シグナル量を検出・プロットして検量線を作成することができる。これにより標識シグナル量を、フィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンの量として換算することができ、培養液中のフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンを定量的に測定することができる。また、未分化性が低下したヒト多能性幹細胞の培養液や、フィブロネクチンをコードする遺伝子を導入した遺伝子組換え細胞の培養液、Lewis X合成を行うFut9をコードする遺伝子とフィブロネクチンをコードする遺伝子を導入した遺伝子組換え細胞の培養液、フィブロネクチン発現細胞の培養液、もしくはSSEA-1陽性フィブロネクチン発現細胞の培養液、またはそれらの培養液から精製したフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンを標準物質として用いて、上記サンドイッチアッセイ法により、所定の細胞数に応じた標識シグナル量を検出・プロットして検量線を作成することができる。これにより標識シグナル量を、フィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンを発現する細胞数として換算することができ、培養中のフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンを発現する細胞を定量的に測定することができる。

30

40

## 【0044】

(2-6) 未分化性の判定又は評価

50

本発明において、ヒト多能性幹細胞の未分化性の判定又は評価は、上述のヒト多能性幹細胞の培養液中のフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンの検出又は測定結果に従って行うことができる。ヒト多能性幹細胞の培養液中のフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンの検出又は測定結果は、ヒト多能性幹細胞の未分化性と相関し、培養液中にフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンが検出される場合には当該多能性幹細胞の未分化性は低下している、すなわち未分化性が低下もしくは消失した細胞が含まれると判定、評価することができる。また培養液中のフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンの量が多いほど、ヒト多能性幹細胞の未分化性がより低下している、すなわち未分化性が低下もしくは消失した細胞がより多く含まれると判定、評価することができる。

10

【0045】

### 3. ヒト多能性幹細胞の品質の管理

本発明において「ヒト多能性幹細胞の品質を管理する」とは、ヒト多能性幹細胞の未分化性を管理することを意味し、これは上述のヒト多能性幹細胞の未分化性の判定又は評価結果にしたがって行うことができる。例えば、上述のヒト多能性幹細胞の未分化性の判定又は評価方法において、培養液中にフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンが検出される場合、又は所定量のフィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンが検出される場合、当該培養におけるヒト多能性幹細胞は未分化性が低下したヒト多能性幹細胞であると判定し、当該培養を廃棄処分、当該培養よりヒト多能性幹細胞を回収、もしくは当該培養より未分化性が低下した細胞を除去等することができる。すなわち、ヒト多能性幹細胞の未分化性の判定又は評価結果にしたがって、未分化性が低下したヒト多能性幹細胞（もしくは未分化性を有するヒト多能性幹細胞）をスクリーニングすることができ、安定した品質のヒト多能性幹細胞の供給を可能とする。例えば、「未分化性が低下したヒト多能性幹細胞（もしくはヒトiPS細胞）」、「未分化性を低下させたヒト多能性幹細胞（もしくはヒトiPS細胞）」又は「ヒト多能性幹細胞（もしくはヒトiPS細胞）の未分化性は低下している」とは、全細胞数のうち未分化性が低下もしくは消失した細胞が10%以上の割合で含まれるとする基準を設けることができる。そして、この基準に基づいて、全細胞数のうち未分化性が低下もしくは消失した細胞の割合が10%未満である場合に、安定した品質のヒト多能性幹細胞として供給することができる。ただし、当該基準は任意で定めることができ、上述の値に限定されるものではない。

20

30

【0046】

当該培養より未分化性が低下した細胞の除去は、当該培養よりフィブロネクチンを発現する細胞（「フィブロネクチン陽性細胞」と記載する）、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンを発現する細胞（「SSEA-1陽性フィブロネクチン陽性細胞」と記載する）を単離、又は死滅させることにより行うことができる。本発明において「フィブロネクチン陽性細胞」には、「SSEA-1陽性フィブロネクチン陽性細胞」が含まれてもよい。

【0047】

フィブロネクチン陽性細胞、又はSSEA-1陽性フィブロネクチン陽性細胞の単離は、上記プローブの使用と組み合わせた、細胞の単離、又は精製に一般的に用いられる手法、例えば、クロマトグラフィー、磁気分離、遠心分離、フローサイトメーター、セルソーター（蛍光活性化セルソーター（FACS）等）等の一又は複数を用いて行うことができる。

40

【0048】

フィブロネクチン陽性細胞、又はSSEA-1陽性フィブロネクチン陽性細胞の死滅は、これら細胞を選択的に、好ましくは特異的に、死滅させることが可能な任意の手段を用いて行うことができる。例えば、所定の光感受性物質で標識された上記プローブの使用と、近赤外線（波長700 - 2500 nm）、紫外線（波長10 - 400 nm）、又は熱中性子線への暴露を組み合わせた、所謂、光免疫療法、中性子捕捉療法等の手法を用いて行うことができる。光感受性物質としては、例えば、近赤外線照射によって活性化される光吸収性フタロシアニン色素IRDye 700Dx（IR700）、ホウ素10（<sup>10</sup>B）

50

、セレン化カドミウム（CdSe）等が挙げられる。本発明の一態様においては、IR700で標識した上記プローブを標的であるフィブロネクチン陽性細胞、又はSSEA-1陽性フィブロネクチン陽性細胞に結合させ、近赤外線に暴露することによって；<sup>10</sup>Bで標識した上記プローブを標的であるフィブロネクチン陽性細胞、又はSSEA-1陽性フィブロネクチン陽性細胞に結合させ、熱中性子線に暴露することによって；あるいは、CdSeで標識した上記プローブを標的であるフィブロネクチン陽性細胞、又はSSEA-1陽性フィブロネクチン陽性細胞に結合させ、紫外線に暴露することによって、当該プローブが結合したフィブロネクチン陽性細胞、又はSSEA-1陽性フィブロネクチン陽性細胞を選択的に、好ましくは特異的に、死滅させることができる。あるいは、細胞の所定因子の阻害剤やアポトーシスを促す薬剤（例えば、抗がん剤や分子標的薬等）を結合させた上記プローブを用いたドラッグデリバリーシステムを用いることができる。所定の阻害剤や薬剤を結合させた上記プローブを標的であるフィブロネクチン陽性細胞、又はSSEA-1陽性フィブロネクチン陽性細胞に結合させ、当該細胞に阻害剤や薬剤を送達・作用させることによって当該細胞を選択的に、好ましくは特異的に、死滅させることができる。

10

【0049】

## 4. キット

本発明においてキットとは、上述のヒト多能性幹細胞の未分化性を判定又は評価する方法において使用するためのキット、又は上述のヒト多能性幹細胞の品質を管理する方法において使用するためのキットであり、培養液中のフィブロネクチンを検出、又は測定するために用いられる、フィブロネクチンを認識する一又は複数のプローブを含む。

20

【0050】

ここで「フィブロネクチン」が、SSEA-1陽性フィブロネクチンである場合、前記プローブには、(a) SSEA-1をエピトープとして認識するプローブ、及び(b) フィブロネクチンを認識するプローブが含まれる。

【0051】

本発明のキットに含まれる前記プローブはいずれも、上記定義のとおりである。

【0052】

一態様において、本発明のキットに含まれる前記プローブは、上述の基板上に固定化された第一のプローブと、標識化された第二のプローブを含む。例えば、本発明のキットには、当該第一のプローブとして、基板に固定化されている抗フィブロネクチンモノクローナル抗体又はそのフラグメント、ならびに、当該第二のプローブとして、標識化されている抗フィブロネクチンポリクローナル抗体又はそのフラグメントが含まれ、あるいは、基板に固定化されている抗フィブロネクチンポリクローナル抗体又はそのフラグメント、ならびに標識化されている抗フィブロネクチンモノクローナル抗体又はそのフラグメントが含まれる。また、例えば、本発明のキットには、当該第一のプローブとして、基板に固定化されている(a) SSEA-1をエピトープとして認識するプローブ、ならびに、当該第二のプローブとして、標識化されている(b) フィブロネクチンを認識するプローブが含まれ、あるいは、標識化されている(a) SSEA-1をエピトープとして認識するプローブ、ならびに基板に固定化されている(b) フィブロネクチンを認識するプローブが含まれる。

30

【0053】

また、本発明のキットには、標準物質として利用可能な、ヒト細胞発現のリコンビナントフィブロネクチンや、未分化性が低下したヒト多能性幹細胞、フィブロネクチンをコードする遺伝子を導入した遺伝子組換え細胞、Lewis X合成を行うFut9をコードする遺伝子とフィブロネクチンをコードする遺伝子を導入した遺伝子組換え細胞、フィブロネクチン発現細胞の培養液、SSEA-1陽性フィブロネクチン発現細胞の培養液や、当該培養液より精製したフィブロネクチン又はSSEA-1陽性フィブロネクチン等を含めることもでき、フィブロネクチン、又はSSEA-1陽性フィブロネクチンやその発現細胞の定量的な測定のための検量線を作成するために利用することができる。

40

【0054】

50

また、本発明のキットが、ヒト多能性幹細胞の品質を管理する方法において使用するためのキットである場合にはさらに、当該培養より未分化性が低下した細胞を除去するための手段を含むことができる。未分化性が低下した細胞を除去するための手段には、例えば、フィブロネクチンを認識する一又は複数のプローブが任意の担体に結合されて充填されたクロマトグラフィー用カラム、前記プローブが磁性体ビーズに結合されてなる磁気分離用ビーズ、IR700、<sup>10</sup>B、CdSe等の光感受性物質により標識された前記プローブ等が挙げられるがこれらに限定はされない。「フィブロネクチン」がSSEA-1陽性フィブロネクチンである場合には、前記プローブには(a)SSEA-1をエピトープとして認識するプローブ、ならびに(b)フィブロネクチンを認識するプローブが含まれる。

10

【0055】  
さらに、本発明のキットには、試薬用の容器、パッケージ、取扱説明書等の他、測定装置、近赤外光線、紫外線、熱中性子線を照射するための光源等を含めてもよい。

以下、本発明を実施例により、更に詳しく説明する。

#### 【実施例】

#### 【0056】

実施例1：未分化性を低下させたヒトiPS細胞の作製

ヒトiPS細胞、201B7(HPS0063)は、理化学研究所バイオリソースセンターから入手した。ヒトiPS細胞は、mTeSR1培地(カタログ番号ST-05850; Stem Cell Technologies)を用いてマトリゲル(カタログ番号354230; BD Biosciences)上でフィーダーフリーの条件で培養した。

20

#### 【0057】

未分化性を低下させたヒトiPS細胞は、以下の方法で作製した。ヒトiPS細胞を低密度(1:15~1:20)で継代し、サプリメントを56で30分間インキュベートして不活性化し、それをmTeSR1培地に添加して、37、5%CO<sub>2</sub>で培養した。培地交換は3~4日ごとに行い、約2週間培養した。培養8日目に細胞密度が80%に達した際に、rBC2LCN-PE38(Tateno et al. Stem Cell Reports 2015)を100ng/mLの濃度で添加した。なお、実施例中、細胞の培養はいずれの場合も、37、5%CO<sub>2</sub>の環境下で行った。

#### 【0058】

未分化性を低下させたヒトiPS細胞の作製過程における位相差顕微鏡像を、図1Aに示す。培養過程で徐々に細胞コロニーの形態が変化し、細胞間接着が緩んでいく様子が観察され、培養2日目にはコロニーの輪郭にトゲ状の部位が生じ、培養5日目には細胞間の接着が緩み、隙間が生じている様子が観察された。培養10日目には大きく扁平な細胞集団が観察された。この結果より、rBC2LCN-PE38処理に付されたヒトiPS細胞は、未分化性が低下した細胞であると判断された。

30

#### 【0059】

ヒトiPS細胞(対照)及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞をそれぞれ、4%パラホルムアルデヒド(カタログ番号163-20145; 和光)で15分間、室温で固定し、PBSですすいだ。転写因子染色では、細胞サンプルを0.4%Triton X-100(カタログ番号T8787; Sigma)を含むPBSに10分間浸した。細胞をブロッキング試薬、1%BSAおよび5%血清を含むPBSで室温1時間プレハイブリダイズした後、ブロッキング試薬で希釈した一次抗体溶液にて4で一晩インキュベートした。一次抗体として以下の抗体を使用した。抗マウスOct3/4抗体(IgG; モノクローナル; 1:300希釈; カタログ番号sc-5279; Santa Cruz Biotechnology)、抗マウスSSEA-4抗体(IgG; モノクローナル; 1:300希釈; カタログ番号MAB4304; メルク)、抗マウスSSEA-1抗体(IgM; モノクローナル; 1:250希釈; カタログ番号MAB4301; メルク)。

40

#### 【0060】

次に、各細胞をPBSで2回洗浄し、ブロッキング試薬で希釈した二次抗体溶液と室温

50

で30分間インキュベートした。二次抗体として以下の抗体を使用した。Alexa Fluor 488に結合した抗マウスIgG抗体(IgG;ポリクローナル;1:300希釈;カタログ番号A21202;Thermo Fisher Scientific)および抗ウサギAlexa 594に結合したIgG抗体(IgG;ポリクローナル;1:300希釈;カタログ番号A21207;Thermo Fisher Scientific)。サンプルは、4',6-diamidino-2-phenylindole溶液(DAPI、1:1000希釈;カタログ番号D523;同仁堂)で共染色した。画像は、BZ-9000蛍光顕微鏡(Keyence)を使用して取得した。

#### 【0061】

ヒトiPS細胞と未分化性を低下させたヒトiPS細胞を、4%パラホルムアルデヒドで15分間室温固定した。PBSでリンスした後、細胞をPBSで希釈した10 $\mu$ g/mLのFITC結合rBC2LCN(カタログ番号180-02991、和光)溶液で室温1時間インキュベートした。サンプルは、DAPI溶液(1:1000希釈;カタログ番号D523;同仁堂)で共染色した。画像は、BZ-9000蛍光顕微鏡(Keyence)を使用して取得した。

10

#### 【0062】

ヒトiPS細胞と未分化性を低下させたヒトiPS細胞の作製過程における免疫染色像を、図1Bに示す(培養3~4日目の細胞)。ヒトiPS細胞は未分化マーカーであるOct3/4、rBC2-LCN、SSEA-4で緑色蛍光染色されたものの、分化の進んだヒトiPS細胞に反応するSSEA-1(ルイスX糖鎖抗原)抗体では染色されなかった。一方、作製した未分化性を低下させたヒトiPS細胞では、未分化マーカー(Oct3/4、rBC2-LCN、SSEA-4)で一部の細胞しか染色されず、SSEA-1抗体で染色される細胞が確認された。

20

#### 【0063】

以上の結果より、未分化性を低下させたヒトiPS細胞では、形態が変化し、かつSSEA-1抗体で染色される細胞が含まれることがわかった。

#### 【0064】

##### 実施例2: SSEA-1陽性糖タンパク質の同定

細胞培養上清(100 $\mu$ L)を、9 $\mu$ gのrABAレクチンを固定化した90 $\mu$ Lのストレプトアビジン被覆磁気ビーズ(Life Technologies)を用いて室温で3時間インキュベートした。200 $\mu$ LのPBST(1%Triton X-100を含むPBS)で5回洗浄した後、結合したサンプルを20 $\mu$ Lの0.2%SDSで95、5分間溶出した。溶出したサンプルは、5~20%ポリアクリルアミドゲル(DRC)の還元条件下で電気泳動した。分離されたタンパク質をポリビニリデンジフルオリド(PVDF)メンブレンに転写し、1 $\mu$ g/mLのHRP標識抗マウスSSEA-1モノクローナル抗体(1:200,カタログ番号sc-21702;Santa Cruz Biotechnology)溶液でインキュベートした。最後に、Western Lighting Plus(PerkinElmer)で検出した。銀染色はSilver Staining MS kit(カタログ番号293-77601,Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)を用いて行った。

30

40

#### 【0065】

ヒトiPS細胞(対照)及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞の各培養上清を用いた免疫沈降及びウェスタンブロットティングの結果を、図2Aに示す。ムチン様糖タンパク質に反応するrABAレクチンを用いて、各培養上清からムチン様糖タンパク質を濃縮し、SSEA-1抗体で染色したところ、未分化性を低下させたヒトiPS細胞の培養上清において>250kDaのバンド(矢印で示される)が見られた。一方、ヒトiPS細胞の培養上清においては、>250kDaのバンドは見られなかった。

#### 【0066】

未分化性を低下させたヒトiPS細胞及びヒトiPS細胞の培養上清を用いた免疫沈降サンプルにおいて銀染色を行った結果を、図2Bに示す。未分化性を低下させたヒトiP

50

S細胞の培養上清における > 250 kDa のバンド (矢印で示される) を LC-MS/MS の分析に用いた。

#### 【0067】

LC-MS/MS分析では、未分化性を低下させたヒトiPS細胞の培養上清の分析領域 (矢印で示される) を銀染色後にSDSゲルから切り出した。対照として、ヒトiPS細胞の培養上清における対応領域も同様に、SDSゲルから切り出した。ゲル内での消化は、従来公知の手法に準じて実施した (Shevchenko et al. Anal. Chem. 1996)。すなわち、ゲル片を水とアセトニトリルで洗浄し、次にサンプルをジチオスレイトール (DTT) とヨードアセトアミドでアルキル化した。その後、トリプシンを添加し、37℃で16時間保持して加水分解反応を行った。反応後、25mM炭酸水素アンモニウム、5%ギ酸、およびアセトニトリルを使用して、ゲル片からペプチドを抽出した。最後に、抽出溶液を減圧下で乾燥させた。

10

#### 【0068】

次いで、乾燥させたペプチドサンプルを水、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸 (体積比98:2:0.1) からなる溶媒に溶解し、LC-MS/MS分析に供した。LC-MS/MS分析は、パラダイムMS4液体クロマトグラフ (Michrom Bioresources) とLTQ Orbitrap XL質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) を使用して行った。

#### 【0069】

LC-MS/MS分析で取得したMS/MSデータを配列データベース検索に供した。検索ソフトウェアとしてMatrix Science社のMascot (ver. 2.5) (<http://www.matrixscience.com/>) を用いた。検索用配列データセットは、SwissProt (<http://www.uniprot.org/>) 2017\_08版から出力したヒト (Homo sapiens) 由来のタンパク質エントリー (計20,192件) にブタ (Sus scrofa) トリプシンのアミノ酸配列を加えて構築した。検索結果を閲覧ソフトウェアScaffold (Proteome Software社) に入力した。Identity threshold以上のMascotイオンスコアを示すユニークペプチドが2件以上帰属したタンパク質同定を有意とみなした。同定されたタンパク質の一覧を図2Cに示す。その結果、未分化性を低下させたヒトiPS細胞の培養上清の分析領域 (矢印で示される) において最も多く検出されたペプチドは、フィブロネクチンであることがわかった。一方、ヒトiPS細胞の培養上清の対応領域においては、フィブロネクチンは検出されなかった。

20

30

#### 【0070】

実施例3：未分化性を低下させたヒトiPS細胞の培養上清におけるSSEA-1陽性フィブロネクチンの検出

##### 1. 免疫沈降及びウェスタンブロットティング

細胞培養上清 (95 µL) を、4 µg のビオチン標識フィブロネクチンポリクローナル抗体 (カタログ番号AF1918; R&D) を固定化した40 µL のストレプトアビジン被覆磁気ビーズ (Life Technologies) を用いて室温で3時間インキュベートした。200 µL のPBST (1% Triton X-100を含むPBS) で5回洗浄した後、結合したサンプルを20 µL の0.2% SDSで95℃、5分間溶出した。溶出したサンプルは、5~20% ポリアクリルアミドゲル (DRC) の還元条件下で電気泳動した。分離されたタンパク質をポリビニリデンジフルオリド (PVDF) メンブレンに転写し、1 µg/mL のHRP標識抗マウスSSEA-1モノクローナル抗体 (1:200, カタログ番号sc-21702; Santa Cruz Biotechnology) 溶液あるいはフィブロネクチンポリクローナル抗体 (カタログ番号AF1918; R&D) でインキュベートした。フィブロネクチンポリクローナル抗体においては、二次抗体反応にHRP標識抗ヒツジIgG抗体 (カタログ番号313-035-003; Jackson ImmunoResearch) を用いた。最後にWestern Lighting Plus-ECL (PerkinElmer) で検出した。

40

50

## 【0071】

また、細胞培養上清(95  $\mu$ L)を、4  $\mu$ gのビオチン標識フィブロネクチンモノクローナル抗体(カタログ番号MAB1918; R&D)を固定化した40  $\mu$ Lのストレプトアビジン被覆磁気ビーズ(Life Technologies)を用いて室温で3時間インキュベートした。200  $\mu$ LのPBST(1% Triton X-100を含むPBS)で5回洗浄した後、結合したサンプルを20  $\mu$ Lの0.2% SDSで95、5分間溶出した。溶出したサンプルは、5~20%ポリアクリルアミドゲル(DRC)の還元条件下で電気泳動した。分離されたタンパク質をポリビニリデンジフルオリド(PVDF)メンブレンに転写し、1  $\mu$ g/mLのHRP標識抗マウスSSEA-1モノクローナル抗体(1:200, カタログ番号sc-21702; Santa Cruz Biotechnology)溶液あるいはフィブロネクチンモノクローナル抗体(カタログ番号MAB1918; R&D)でインキュベートした。フィブロネクチンポリクローナル抗体においては、二次抗体反応にHRP標識抗マウスIgG抗体(カタログ番号115-035-003; Jackson ImmunoResearch)を用いた。最後にWestern Lighting Plus(PerkinElmer)で検出した。

10

## 【0072】

## 2. 免疫染色

ヒトiPS細胞(対照)及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞をそれぞれ、4%パラホルムアルデヒド(カタログ番号163-20145; 和光)で15分間、室温で固定し、PBSですすいだ。細胞をブロッキング試薬、1% BSAおよび5%血清を含むPBSで室温1時間プレハイブリダイズした後、ブロッキング試薬で希釈した抗体溶液にて4で一晩インキュベートした。以下の抗体を使用した。ビオチン標識フィブロネクチンモノクローナル抗体(1:150; カタログ番号MAB1918; R&D)。

20

## 【0073】

次に、各細胞をPBSで2回洗浄し、ブロッキング試薬で希釈したPE標識アビジン(1:100希釈; カタログ番号016-110-084; Jackson ImmunoResearch)で室温30分間インキュベートした。サンプルは、DAPI溶液(1:1000希釈; カタログ番号D523; 同仁堂)で共染色した。画像は、BZ-9000蛍光顕微鏡(Keyence)を使用して取得した。

## 【0074】

ヒトiPS細胞(対照)及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞の各培養上清を用いた免疫沈降およびウェスタンブロッティングの結果を、図3Aと図3Bに示す。未分化性を低下させたヒトiPS細胞の培養上清では>250kDaのバンドが検出された(矢印で示される)。一方で、ヒトiPS細胞の培養上清では>250kDaのバンドは検出されなかった。そのため、SSEA-1抗体陽性の>250Daの糖タンパク質はフィブロネクチンであり、未分化性を低下させたヒトiPS細胞では、培養上清中に分泌されていることがわかった。

30

## 【0075】

ヒトiPS細胞と未分化性を低下させたヒトiPS細胞の免疫染色像を、図3Cに示す。ヒトiPS細胞はフィブロネクチンについて染色されなかったものの、未分化性を低下させたヒトiPS細胞ではフィブロネクチンについて染色された。

40

## 【0076】

実施例4: フィブロネクチン抗体とSSEA-1抗体を用いたサンドイッチELISAアッセイ

ビオチン標識ヒトフィブロネクチンモノクローナル抗体(カタログ番号FN 30-8、タカラバイオ)をアビジンコートマイクロプレートウェル(カタログ番号BS-X7603、住友ベークライト)の表面に固定化した。ヒトiPS細胞(対照)及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞の各培養上清を所定の濃度に希釈して室温で1時間反応させた。続いて、HRP標識SSEA-1モノクローナル抗体(カタログ番号sc-21702; Santa Cruz Biotechnology)を反応させた。0.1%(v/v

50

) Tween 20を含む1×PBSで洗浄した後、サンプルをTMB溶液(カタログ番号208-17371、和光)で室温30分間インキュベートした。1N HClを加えることで酵素反応を停止し、microtiter plate readerを使用して、マイクロプレート上の酵素活性を主波長450/副波長620nm(OD450/620)で測定した。

【0077】

フィブロネクチン抗体とSSEA-1抗体を用いたサンドイッチELISAを構築し、ヒトiPS細胞及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞の各培養上清の各希釈段階の解析を行った結果を、図4Aに示す。その結果、未分化性を低下させたヒトiPS細胞の培養上清(黒丸)に高い反応性を示すものの、ヒトiPS細胞の培養上清(白三角)には反応しないことが分かった。未分化性を低下させたヒトiPS細胞の下限検出値は100細胞/mLであり、少ない細胞数の未分化性を低下させたヒトiPS細胞を検出できることがわかった。そのため、培養上清を用いてSSEA-1陽性フィブロネクチンを検出することで、未分化性が低下もしくは消失したヒトiPS細胞を非侵襲的、かつ高感度に検出できることがわかった。

10

【0078】

図4Bは、未分化性を低下させたヒトiPS細胞を25000細胞/mL、12500細胞/mL、6250細胞/mL、0細胞/mLでそれぞれ播種した際の培養上清を用いたサンドイッチELISAの結果を示すグラフ図である。黒は実際の細胞数、灰色は未分化性を低下させたヒトiPS細胞を単独で培養した際の見かけの細胞数、白色はヒトiPS細胞と共培養した際の見かけの細胞数を示している。サンドイッチELISA法で算出された細胞数は播種した細胞数依存的に反応性を示し、実際の細胞数とほぼ一致することがわかった。さらに、ヒトiPS細胞共存下でも逸脱細胞を検出できることがわかった。ヒトiPS細胞共存下で若干高い値が確認されたのは、播種したヒトiPS細胞中に逸脱細胞が混在していたためであると想定された。

20

【0079】

実施例5：フィブロネクチンモノクローナル抗体とフィブロネクチンポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAアッセイ

ビオチン標識ヒトフィブロネクチンモノクローナル抗体(カタログ番号FN 30-8、タカラバイオ)をアビジンコートマイクロプレートウェル(カタログ番号BS-X7603、住友ベークライト)の表面に固定化した。ヒトiPS細胞(対照)及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞の各培養上清を所定の濃度に希釈して室温で1時間反応させた。続いて、HRP標識フィブロネクチンポリクローナル抗体(カタログ番号AF1918; R&D)を反応させた。0.1%(v/v) Tween 20を含む1×PBSで洗浄した後、サンプルをTMB溶液(カタログ番号208-17371、和光)で室温30分間インキュベートした。1N HClを加えることで酵素反応を停止し、microtiter plate readerを使用して、マイクロプレート上の酵素活性を主波長450/副波長620nm(OD450/620)で測定した。

30

【0080】

フィブロネクチンモノクローナル抗体とフィブロネクチンポリクローナル抗体を用いた以外は上記実施例4と同様にして、サンドイッチELISAを構築した。これを用いて、ヒトiPS細胞及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞の各培養上清の各希釈段階の解析を行った結果を、図5に示す。その結果、未分化性を低下させたヒトiPS細胞の培養上清(黒丸)に高い反応性を示すものの、ヒトiPS細胞の培養上清(白三角)には反応しないことが分かった。未分化性を低下させたヒトiPS細胞の下限検出値は100細胞/mLであり、少ない細胞数の未分化性を低下させたヒトiPS細胞を検出できることがわかった。そのため、培養上清を用いてフィブロネクチンを検出することで、未分化性が低下もしくは消失したヒトiPS細胞を非侵襲的、かつ高感度に検出できることがわかった。

40

【0081】

50

実施例 6 : I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体によるヒト i P S 細胞 ( 対照 ) 及び未分化性を低下させたヒト i P S 細胞の生細胞イメージング

I R 7 0 0 標識は、I R D y e 7 0 0 D X タンパク質標識キット ( L I - C O R I n c ) を用いて行われた。フィブロネクチン抗体 ( カタログ番号 A F 1 9 1 8 ; R & D ) またはヒツジ免疫グロブリン G ( カタログ番号 5 - 0 0 1 - A ; R & D ) に対するポリクローナル抗体を I R 7 0 0 とともに室温で 2 時間インキュベートした。タンパク質のモル比および濃度は、U V - 1 9 0 0 分光光度計 ( 島津製作所 ) を使用して、それぞれ 2 8 0 n m ( タンパク質 ) および 6 8 9 n m ( I R 7 0 0 ) での吸光度を測定することによって決定された。

【 0 0 8 2 】

細胞を、5 % C O <sub>2</sub>、3 7 ° C で 1 時間または 6 時間、I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体とともにインキュベートした。核染色のために、細胞をさらにヘキスト 3 3 3 4 2 溶液 ( 1 : 1 0 0 0 希釈、D o j i n d o M o l e c u l a r T e c h n o l o g i e s , I n c ) で 5 から 1 0 分間インキュベートした。画像は、共焦点顕微鏡 ( オリンパス株式会社 ) または B Z - 9 0 0 0 蛍光顕微鏡 ( 株式会社キーエンス ) で取得した。

【 0 0 8 3 】

図 6 A に、生きたヒト i P S 細胞 ( 対照 ) 及び生きた未分化性を低下させたヒト i P S 細胞を I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体 ( 赤色 ) を用いて室温で 1 時間染色した免疫染色像を示す。核はヘキスト 3 3 3 4 2 ( 青色 ) で染色した。スケールバーは 1 0 0 μ m を示す。また、図 6 B に、生きた未分化性を低下させたヒト i P S 細胞を、3 7 ° C で 1 時間 ( 左パネル ) または 6 時間 ( 右パネル ) I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体 ( 赤色 ) を用いて染色した免疫染色像を示す。スケールバーは 1 0 0 μ m を示す。

【 0 0 8 4 】

未分化性を低下させたヒト i P S 細胞には、I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体の結合が確認されたが、ヒト i P S 細胞ではその結合は確認されなかった。未分化性を低下させたヒト i P S 細胞と I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体との結合量は、共インキュベーションの時間が 6 時間の場合も 1 時間の場合と差が見られない ( 6 時間後も十分に結合が維持されている ) ことが確認された。

【 0 0 8 5 】

実施例 7 : ヒト i P S 細胞 ( 対照 ) 及び未分化性を低下させたヒト i P S 細胞の生存率に対する I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体と近赤外線 ( N e a r - I n f r a r e d : N I R ) 照射の影響の検証

N I R 照射の前日、細胞を 9 6 ウェルあるいは 1 2 ウェルプレートに播種し、2 4 時間インキュベートした。培地を交換した後、細胞を I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体または I R 7 0 0 標識ヒツジ免疫グロブリン G と 1 時間または 6 時間インキュベートし、次に 1 0 m W / c m <sup>2</sup> の電力密度で N I R 発光ダイオードを照射した ( エビス電子株式会社 ) 。画像は、B Z - 9 0 0 0 蛍光顕微鏡 ( 株式会社キーエンス ) を使用して取得した。

【 0 0 8 6 】

哺乳類細胞用 L I V E / D E A D V i a b i l i t y / C y t o t o x i c i t y K i t ( T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c ) を使用して、細胞生存率を分析した。生細胞は 2 μ M のカルセイン - アセトキシメチル ( A M ) で染色され、死細胞は 4 μ M のエチジウムホモダイマー 1 ( E t h D - 1 ) で 3 7 ° C で 4 0 分間染色された。画像は B Z - 9 0 0 0 蛍光顕微鏡 ( 株式会社キーエンス ) で取得した。

【 0 0 8 7 】

図 7 A に、無処理、I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体処理、N I R 照射処理、ならびに、I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体処理とそれに続く N I R 照射処理にそれぞれ付した、未分化性を低下させたヒト i P S 細胞の生存率を生細胞染色 ( カルセイン - A M : 緑色 ) および死細胞染色 ( E t h D - 1 : 赤色 ) によって分析した結果を示す。無処理、I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体処理、および N I R 照射処理に付した細胞では死細胞はほとんど認められなかったが、I R 7 0 0 標識フィブロネクチン抗体処理とそれに

10

20

30

40

50

続くNIR照射処理に付した細胞においては、死細胞の増大と生細胞の減少が確認された。

【0088】

図7Bに、無処理、IR700標識フィブロネクチン抗体処理、NIR処理、ならびに、IR700標識フィブロネクチン抗体とそれに続くNIR照射処理にそれぞれ付した、ヒトiPS細胞(対照)の生存率を生細胞染色(カルセイン-AM:緑色)および死細胞染色(EthD-1:赤色)によって分析した結果を示す。上述の未分化性を低下させたヒトiPS細胞の場合と異なり、IR700標識フィブロネクチン抗体処理とそれに続くNIR照射処理に付した細胞においても、死細胞はほとんど認められなかった。

【0089】

実施例8:ヒトiPS細胞(対照)及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞の生存率に対するIR700標識フィブロネクチン抗体とNIR照射の定量的効果

10

Cell-Counting Kit-8(Dojindo Molecular Technologies, Inc)を使用して、細胞生存率を定量化した。10 $\mu$ LのCell-Counting Kit-8溶液を96ウェルプレートの各ウェルの細胞に添加し、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。その後、マイクロタイタープレートリーダー(SpectraMax M3, Molecular Devices)を使用して450nmでの吸光度を測定した。細胞生存率を計算するために、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした未処理培地をネガティブコントロールとして使用した。

【0090】

ヒトiPS細胞(対照)及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞をさまざまな濃度のIR700標識フィブロネクチン抗体(0~10ng/mL)とそれぞれ1時間インキュベートした後、NIR照射に10分間曝露した。24時間後、10 $\mu$ LのCCK-8溶液を培地に添加し、さらに2時間インキュベートした後、450nmでの吸光度を測定した。図8Aに、ヒトiPS細胞(対照)(白丸)及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞(黒丸)の各細胞生存率(%)を示す。細胞生存率(%)は、IR700標識フィブロネクチン抗体処理とそれに続くNIR照射処理に付した細胞の450nmでの吸光度を、未処理の細胞のそれと比較して計算した。データは、3回の測定の平均 $\pm$ 標準偏差として示されている。この結果、IR700標識フィブロネクチン抗体処理とそれに続くNIR照射処理により、未分化性を低下させたヒトiPS細胞の生存率を顕著に低下できることが確認された。また、その効果は、1ng/mL程度のわずかな量のIR700標識フィ

20

30

【0091】

また、ヒトiPS細胞(対照)及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞をそれぞれ、10ng/mLのIR700標識フィブロネクチン抗体と1時間インキュベートし、さらにさまざまな時間(0~10分)NIR照射に曝露した。24時間後、10 $\mu$ LのCCK-8溶液を培地に添加し、さらに2時間インキュベートした後、450nmでの吸光度を測定した。図8Bに、ヒトiPS細胞(対照)(白丸)及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞(黒丸)の各細胞生存率(%)を示す。細胞生存率(%)は、IR700標識フィブロネクチン抗体のみで処理された細胞と比較したIR700標識フィブロネクチン抗体処理とそれに続くNIR照射処理に付した細胞の450nmでの吸光度を、IR700標識フィブロネクチン抗体のみで処理された細胞のそれと比較して計算した。データは、3回の測定の平均 $\pm$ 標準偏差として示されている。この結果、およそ3分程度の短いNIR照射処理により、IR700標識フィブロネクチン抗体処理した未分化性を低下させたヒトiPS細胞の生存率を顕著に低下できることが確認され、5分程度の照射によれば当該細胞を完全に死滅させることができた。

40

【0092】

実施例9:IR700標識フィブロネクチン抗体処理とNIR照射処理によるヒトiPS細胞(対照)培養での未分化性を低下させたヒトiPS細胞の選択的除去

図9Aに、無処理、IR700標識フィブロネクチン抗体処理、NIR照射処理、なら

50

びに、IR700標識フィブロネクチン抗体処理とそれに続くNIR照射処理にそれぞれ付した、ヒトiPS細胞(対照)(コロニー形成細胞)及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞(長く伸びた、大きく平らな形状)の共培養物を生細胞染色(カルセイン-AM:緑色)および死細胞染色(EthD-1:赤色)によって分析した結果を示す。この結果、IR700標識フィブロネクチン抗体処理とそれに続くNIR照射処理に付した未分化性を低下させたヒトiPS細胞において、死細胞の増大と生細胞の減少が確認された。

【0093】

また、付着した未分化性を低下させたヒトiPS細胞を20 $\mu$ MのCellTracker Green-5-クロロメチルフルオレセインジアセテート(CMFD A)(ThermoFisher Scientific)で染色し、12ウェルプレートのウェルでヒトiPS細胞(対照)と共培養した。これを無処理、IR700標識フィブロネクチン抗体処理、NIR照射処理、ならびに、IR700標識フィブロネクチン抗体処理とそれに続くNIR照射処理にそれぞれ付した後、TrypLE Express組換え酵素溶液(ThermoFisher Scientific)を使用して、ヒトiPS細胞(対照)及び未分化性を低下させたヒトiPS細胞を含む単一細胞懸濁液を調製し、1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁した。得られた細胞懸濁液を、Cyt oFLEXフローサイトメーター(Beckman Coulter Inc.)及びFlowJo v10ソフトウェア(BDBiosciences)を使用してデータ分析し、各細胞の存在量を確認した。分析結果を図9Bに示す。この結果、IR700標識フィブロネクチン抗体処理とそれに続くNIR照射処理により、共培養物の中から未分化性を低下させたヒトiPS細胞を選択的に除去できることが確認された。

【産業上の利用可能性】

【0094】

本発明によれば、細胞を減らすことなく非侵襲的に、簡便かつ効率的にヒトiPS細胞の未分化性を判定又は評価することができ、さらに、未分化性が低下した細胞のみを選択的に除去することができる。このため、本発明はヒトiPS細胞の品質管理への貢献が期待される極めて有用な技術であるといえる。

10

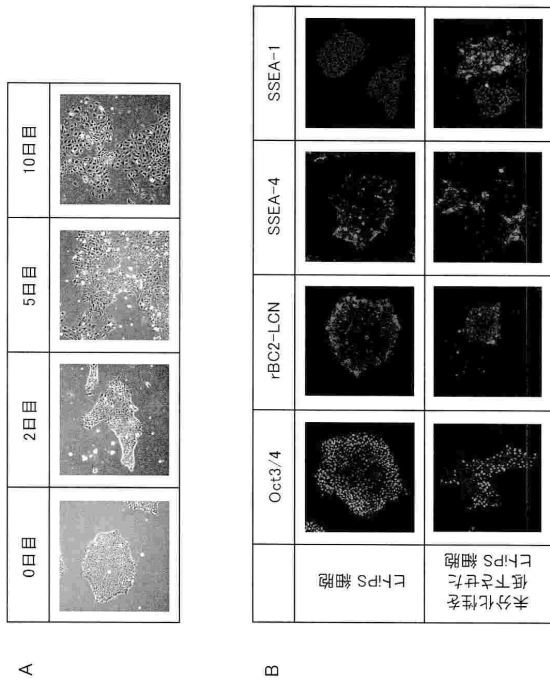
20

30

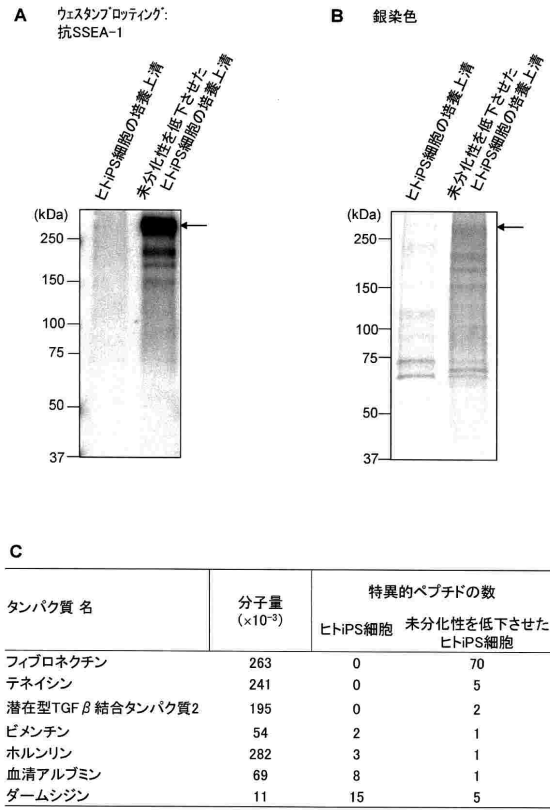
40

50

【図面】  
【図 1】



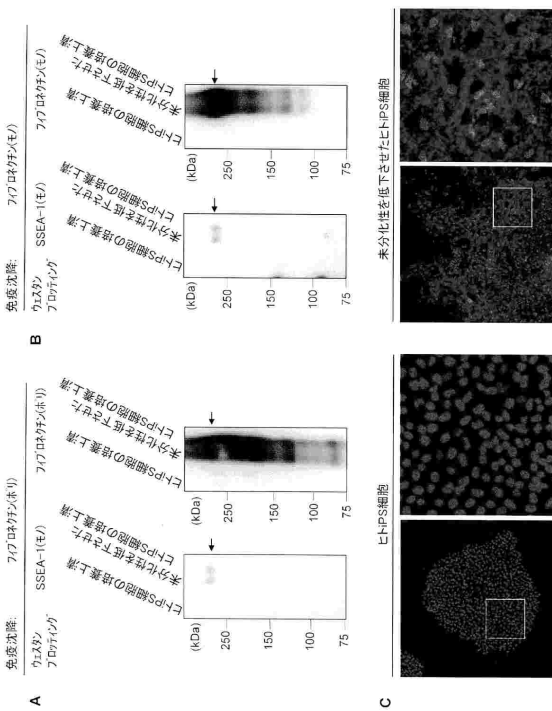
【図 2】



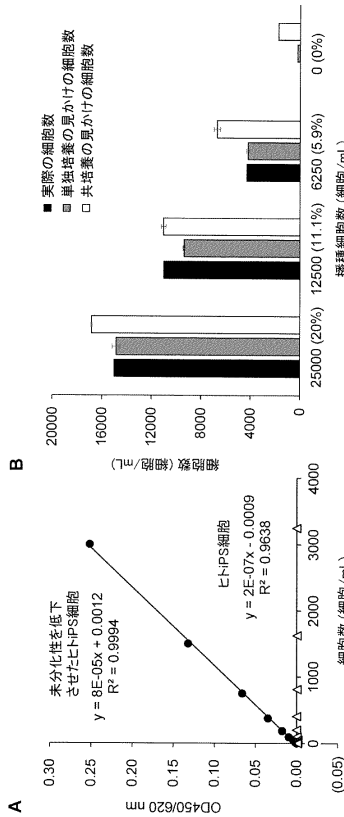
10

20

【図 3】



【図 4】

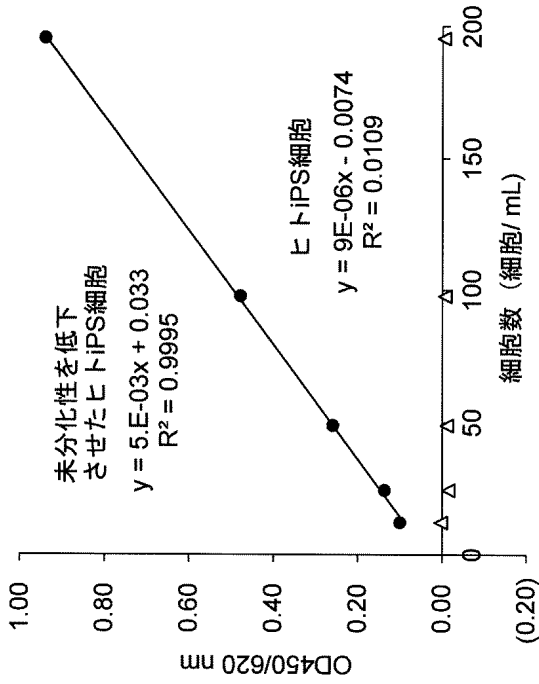


30

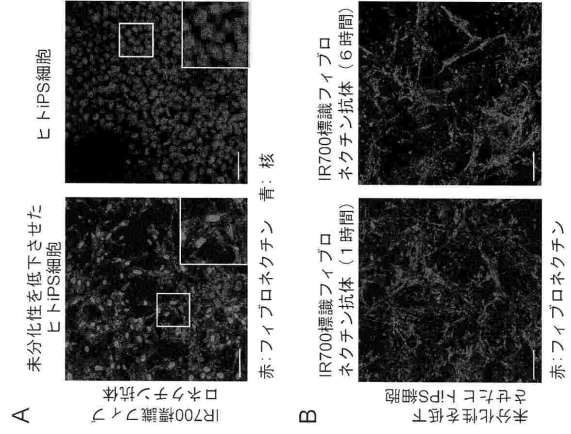
40

50

【 図 5 】



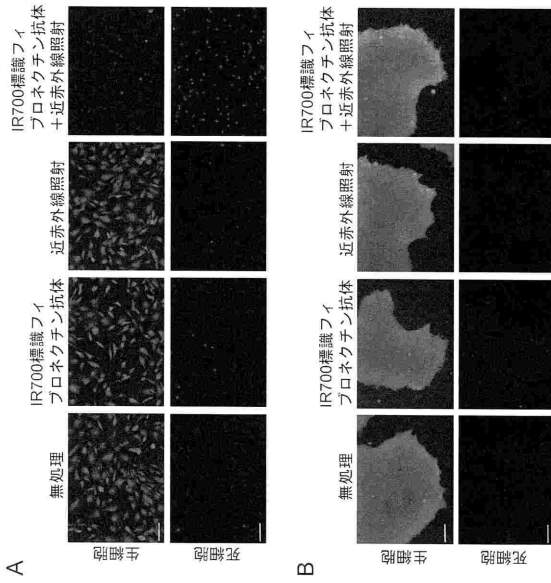
【 図 6 】



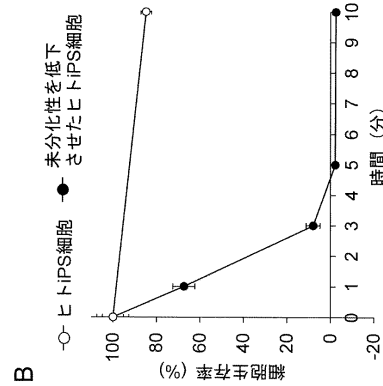
10

20

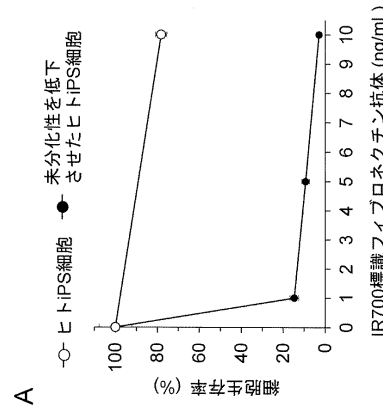
【 図 7 】



【 図 8 】



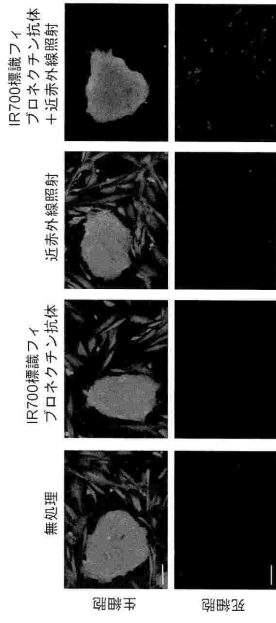
30



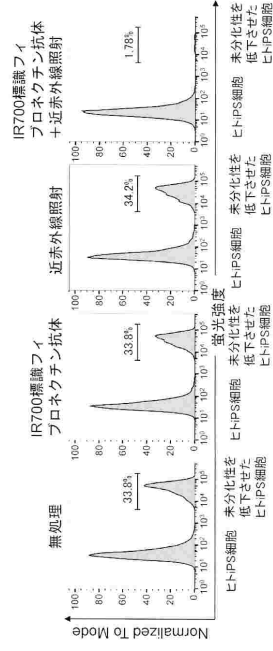
40

50

【 図 9 】



A



B

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

朋子、齊藤 佐代子、比江森 恵子、清井 佳代、回淵 修治、原本 悦和、館野 浩章 ウェブサイトの掲載日：  
令和3年3月25日 ウェブサイトのアドレス：<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X21004691?via%3DiHub> 公開者名：渡邊 朋子、館野 浩章

茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内

(72)発明者 回淵 修治

茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内

(72)発明者 原本 悦和

茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内

審査官 大久保 智之

(56)参考文献 Stem Cells, 2013年06月14日, Vol.31, pp.2084-2094

Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020年07月15日, Vol.529, pp.575-581

Biochemical and Biophysical Research Communications, 2021年03月25日, Vol.554, pp.13-18

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 Q 1 / 0 4

C 1 2 N 1 5 / 1 2

G 0 1 N 3 3 / 5 3

C 1 2 N 5 / 1 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )