



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I814716 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 09 月 11 日

(21)申請案號：106145757

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 12 月 26 日

(51)Int. Cl. : C12Q1/02 (2006.01)

C12N5/071 (2010.01)

C12N5/10 (2006.01)

(30)優先權：2016/12/27 日本

2016-252672

(71)申請人：日商住友化學股份有限公司(日本) SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED (JP)

日本

國立大學法人京都大學(日本) KYOTO UNIVERSITY (JP)

日本

(72)發明人：佐佐木克典 SASAKI, KATSUNORI (JP)；山田幸子 YAMADA, SACHIKO (JP)；
齊藤幸一 SAITO, KOICHI (JP)；金子新 KANEKO, SHIN (JP)；喜多山秀一
KITAYAMA, SHUICHI (JP)；沖田圭介 OKITA, KEISUKE (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

US 2016/0252523A1

期刊 Guokuan Fan et al. Isolation of mouse mesenchymal stem cells with normal ploidy from bone marrows by reducing oxidative stress in combination with extracellular matrix. BMC Cell Biol. 12 2011 Jul 6. 30.

期刊 Lidiya Luzhna et al. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. Front Genet. Volume 4 2013 Jul 11. 131.

期刊 Jie Na et al. Aneuploidy in pluripotent stem cells and implications for cancerous transformation. Protein Cell. 5(8). Epub 2014 Jun 5. 569-579.

期刊 Toshinobu Nishimura et al. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. Cell Stem Cell. 12(1). 2013 Jan 3. 114-26.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：25 項 圖式數：4 共 51 頁

(54)名稱

人工多能性幹細胞的評估方法及選拔方法，以及人工多能性幹細胞的製造方法

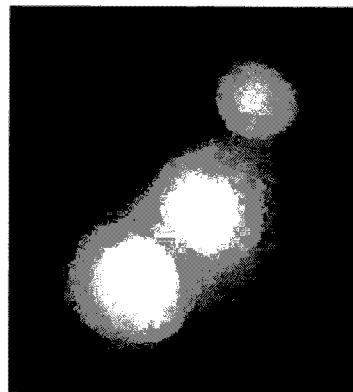
(57)摘要

本發明提供一種人工多能性幹細胞之評估方法，其包含：提供經培養之人工多能性幹細胞的步驟；測定所提供之人工多能性幹細胞中具有異常核酸構造之細胞胞器之自然出現頻率的步驟；以及識別自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，及自然出現頻率超過基準值之人工多能性幹細胞的步驟；本發明也提供一種人工多能性幹細胞的選拔方法，其除了包含上述步驟外，進一步包

含選拔自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞的步驟。再者，本發明提供一種人工多能性幹細胞之製造方法，其包含：提供經建立、培養之人工多能性幹細胞的步驟；測定所提供之人工多能性幹細胞中具有異常核酸構造之細胞胞器之自然出現頻率的步驟；識別自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，及自然出現頻率超過基準值之人工多能性幹細胞的步驟；以及選拔自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞的步驟。

The present invention provides an evaluating method of induced pluripotent stem cells including a step of providing cultivated induced pluripotent stem cells, a step of measuring the natural appearance frequency of cell organelles having abnormal nucleic acid structures in the provided induced pluripotent stem cells, and a step of discriminating the induced pluripotent stem cells having a natural appearance frequency less than or equal to a reference value from the induced pluripotent stem cells having a natural appearance frequency higher than the reference value, and also provides a selecting method of induced pluripotent stem cells further including a step of selecting the induced pluripotent stem cells having a natural appearance frequency less than or equal to the reference value. Further, the present invention provides a manufacturing method of induced pluripotent stem cells including a step of providing the established and cultivated induced pluripotent stem cells, a step of measuring the natural appearance frequency of cell organelles having abnormal nucleic acid structures in the provided induced pluripotent stem cells, and a step of discriminating the induced pluripotent stem cells having a natural appearance frequency less than or equal to the reference value from the induced pluripotent stem cells having a natural appearance frequency higher than the reference value, and a step of selecting the induced pluripotent stem cells having a natural appearance frequency less than or equal to the base value.

指定代表圖：



【第1圖】

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

人工多能性幹細胞的評估方法及選拔方法，以及人工多能性幹細胞的製造方法

EVALUATING METHOD AND SELECTING METHOD
OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS, AND
MANUFACTURING METHOD OF INDUCED
PLURIPOTENT STEM CELLS

【中文】

本發明提供一種人工多能性幹細胞之評估方法，其包含：提供經培養之人工多能性幹細胞的步驟；測定所提供之人工多能性幹細胞中具有異常核酸構造之細胞胞器之自然出現頻率的步驟；以及識別自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，及自然出現頻率超過基準值之人工多能性幹細胞的步驟；本發明也提供一種人工多能性幹細胞的選拔方法，其除了包含上述步驟外，進一步包含選拔自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞的步驟。再者，本發明提供一種人工多能性幹細胞之製造方法，其包含：提供經建立、培養之人工多能性幹細胞的步驟；測定所提供之人工多能性幹細胞中具有異常核酸構造之細胞胞器之自然出現頻率的步驟；識別自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，及自然出現頻率超過基準值之人工多能性幹細胞的步驟；以及選拔自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞的步驟。

【英文】

The present invention provides an evaluating method of induced pluripotent stem cells including a step of providing cultivated induced pluripotent stem cells, a step of measuring the natural appearance frequency of cell organelles having abnormal nucleic acid structures in the provided induced pluripotent stem cells, and a step of discriminating the induced pluripotent stem cells having a natural appearance frequency less than or equal to a reference value from the induced pluripotent stem cells having a natural appearance frequency higher than the reference value, and also provides a selecting method of induced pluripotent stem cells further including a step of selecting the induced pluripotent stem cells having a natural appearance frequency less than or equal to the reference value. Further, the present invention provides a manufacturing method of induced pluripotent stem cells including a step of providing the established and cultivated induced pluripotent stem cells, a step of measuring the natural appearance frequency of cell organelles having abnormal nucleic acid structures in the provided induced pluripotent stem cells, and a step of discriminating the induced pluripotent stem cells having a natural appearance frequency less than or equal to the reference value from the induced pluripotent stem cells having a natural appearance frequency higher than the reference value, and a step of selecting the induced pluripotent stem cells having a natural appearance frequency less than or equal to the base value.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

該代表圖無元件符號及其代表之意義。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

本案無化學式

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

人工多能性幹細胞的評估方法及選拔方法，以及人工多能性幹細胞的製造方法

EVALUATING METHOD AND SELECTING METHOD OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS, AND MANUFACTURING METHOD OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

【技術領域】

【0001】 本發明係關於人工多能性幹細胞的評估方法及選拔方法，以及人工多能性幹細胞的製造方法。

【先前技術】

【0002】 人工多能性幹細胞(iPS 細胞)為藉由對體細胞施加人工操作而製作的多能性幹細胞，例如，可列舉山中氏等於 2006 年從小鼠細胞，2007 年從人類細胞，所建立的 iPS 細胞。人工多能性幹細胞與胚性幹細胞(ES 細胞)不同，由於不使用受精卵而從各個活體之體細胞製作，可期待避免使用 ES 細胞時所擔心的倫理問題，及移植時的排斥反應。

因此，來自人工多能性幹細胞之分化細胞在再生醫療上的應用，很受關注。

【0003】 在使用人工多能性幹細胞進行再生醫療上，擔心源自移植細胞的腫瘤化。腫瘤化之原因，除了未

分化細胞之混入以外，取決於所使用之人工多能性幹細胞的品質。

例如，報導在人工多能性幹細胞之製造過程中，於培養所建立之人工多能性幹細胞的步驟，可能使基因組構造發生變化，出現「發生有利於細胞增殖之變化」的細胞集團。由於有利於細胞增殖之基因組構造變化與癌化有密切關連，發生該變化之細胞集團成為人工多能性幹細胞應用於再生醫療之風險要因。

由於研判與基因組構造之變化，及基因組構造之變化的容易度，亦即基因組不安定性具有密切關係，為了排除該風險要因，使用於臨床應用之人工多能性幹細胞在實施長期培養後，最後，必須藉由細胞或核之形態的觀察、或觀察分裂中期之染色體數或形態的核型解析、檢查基因之變異的全基因組序列解析、為一鹼基多型解析之 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism)解析、為複本數多型解析之 CNV(Copy Number Variation)解析等試驗，選拔基因組構造之安定性高的高品質人工多能性幹細胞(非專利文獻 1)。

[先前技術文獻]

[非專利文獻]

【0004】

[非專利文獻 1] Martins-Taylor K., Xu R.H.: Concise review: Genomic stability of human induced pluripotent stem cells. Stem Cells 30(1): p22-27, 2012.

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

【0005】 然而，由於上述之試驗很花時間及高額成本，新穎人工多能性幹細胞之評估方法，基因組構造之安定性高、腫瘤化風險低之人工多能性幹細胞的選拔方法，及基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低之人工多能性幹細胞之製造方法的提供，成為用於進行使用人工多能性幹細胞之再生醫療的課題。

【0006】 本發明之目的，為提供能以比先前方法迅速且廉價地實施的新穎人工多能性幹細胞的評估方法，基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低之人工多能性幹細胞的選拔方法，基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低之人工多能性幹細胞的製造方法，及基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低的人工多能性幹細胞。

[用於解決課題之手段]

【0007】 亦即，本發明提供下述[1]至[24]。

[1]一種人工多能性幹細胞之評估方法，其特徵為包含下述(1)至(3)之步驟：

(1)提供經培養之人工多能性幹細胞的步驟；

(2)測定所提供之人工多能性幹細胞中具有異常核酸構造之細胞胞器之自然出現頻率的步驟；及

(3)識別前述自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，及前述自然出現頻率超過基準值之人工多能性幹細胞的步驟。

[2]如[1]記載之評估方法，其中前述具有異常核酸構造之細胞胞器係小核。

[3]如[1]或[2]記載之評估方法，其中前述自然出現頻率之基準值係胚性幹細胞中之自然出現頻率的統計值。

[4]如[3]記載之評估方法，其中前述胚性幹細胞為人類胚性幹細胞。

[5]如[1]或[2]記載之評估方法，其中前述自然出現頻率之基準值係作為基準之人工多能性幹細胞中之自然出現頻率的統計值。

[6]如[2]記載之評估方法，其中前述自然出現頻率的基準值係 2%。

[7]如[1]至[6]中任一項記載之評估方法，其中前述人工多能性幹細胞係人類人工多能性幹細胞。

[8]一種人工多能性幹細胞的選拔方法，其特徵為包含下述(1)至(4)之步驟：

(1)提供經培養之人工多能性幹細胞的步驟；

(2)測定所提供之人工多能性幹細胞中具有異常核酸構造之細胞胞器之自然出現頻率的步驟；

(3)識別前述自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，及前述自然出現頻率超過基準值之人工多能性幹細胞的步驟；以及

(4)選拔前述自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞的步驟

[9]如[8]記載的選拔方法，其中前述具有異常核酸構造之細

胞胞器係小核。

[10]如[8]或[9]記載的選拔方法，其中前述自然出現頻率之基準值為胚性幹細胞中之自然出現頻率的統計值。

[11]如[10]記載的選拔方法，其中前述胚性幹細胞係人類胚性幹細胞。

[12]如[8]或[9]記載的選拔方法，其中前述自然出現頻率之基準值係作為基準之人工多能性幹細胞之自然出現頻率的統計值。

[13]如[9]記載的選拔方法，其中前述自然出現頻率之基準值係 2%。

[14]如[8]至[13]中任一項記載的選拔方法，其中前述人工多能性幹細胞係人類人工多能性幹細胞。

[15]一種人工多能性幹細胞之製造方法，其特徵為包含下述(1)至(4)之步驟：

(1)提供經建立、培養之人工多能性幹細胞的步驟；

(2)測定所提供之人工多能性幹細胞中具有異常核酸構造之細胞胞器之自然出現頻率的步驟；

(3)識別前述自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，及前述自然出現頻率超過基準值之人工多能性幹細胞的步驟；以及

(4)選拔前述自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞的步驟。

[16]如[15]記載之製造方法，其特徵為在前述(1)步驟之前，更包含下述步驟：

(A)建立人工多能性幹細胞之步驟；及

(B)培養所建立之人工多能性幹細胞的步驟。

[17]如[15]或[16]記載之製造方法，其中前述具有異常核酸構造之細胞胞器係小核。

[18]如[15]至[17]中任一項記載之製造方法，其中前述自然出現頻率之基準值係胚性幹細胞中之自然出現頻率的統計值。

[19]如[18]記載之製造方法，其中前述胚性幹細胞係人類胚性幹細胞。

[20]如[15]至[17]中任一項記載之製造方法，其中前述自然出現頻率之基準值係人工多能性幹細胞中之自然出現頻率的統計值。

[21]如[17]記載之製造方法，其中前述自然出現頻率之基準值係 2%。

[22]如[15]至[21]中任一項記載之製造方法，其中前述人工多能性幹細胞係人類人工多能性幹細胞。

[23]一種人工多能性幹細胞，其小核自然出現頻率係 2%以下。

[24]一種人工多能性幹細胞之評估方法，其特徵為包含下述(1)至(3)之步驟：

(1)提供經培養之人工多能性幹細胞的步驟；

(2)測定所提供之人工多能性幹細胞中具有異常核酸構造之細胞胞器之自然出現頻率的步驟；及

(3)將前述自然出現頻率為基準值以下之人工多能性

幹細胞評估為分化效率比前述自然出現頻率超過基準值之人工多能性幹細胞高之人工多能性幹細胞的步驟。

[發明之效果]

【0008】 若依照本發明，可提供新穎的人工多能性幹細胞之評估方法；基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低之人工多能性幹細胞的選拔方法；基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低的人工多能性幹細胞之製造方法；以及基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低的人工多能性幹細胞。

【圖式簡單說明】

【0009】

第 1 圖展示在人類 iPS 細胞之核形態之觀察(實施例 3)中所得到的人類 iPS 細胞「2」之標本影像，其為正常細胞之代表影像。

第 2 圖展示在人類 iPS 細胞之核形態之觀察(實施例 3)中所得到的人類 iPS 細胞「D-1R(-)#2」之標本影像，其為異常細胞之代表影像。明顯地可見到核膜表面不平滑，呈現多角形般之形狀，疑似核膜損傷的細胞。

第 3 圖展示在人類 iPS 細胞之核形態之觀察(實施例 3)中所得到的人類 iPS 細胞「F-1R(+)#1」之標本影像，其為異常細胞之代表影像。明顯地可見到 1 細胞中具有 2 個以上之核的多核細胞。

第 4 圖展示在人類 iPS 細胞之核形態之觀察(實施例 3)中所得到的人類 iPS 細胞「9」之標本影像，其為異常細

胞之代表影像。明顯地可見到具有來自核膜之突起構造的細胞。

【實施方式】

【0010】 以下，針對用於實施本發明之態樣詳細說明。

【0011】

<共同術語之說明>

以下，本說明書中共同使用之術語，只要未特別記載，為以下之意義。

【0012】 「具有異常核酸構造之細胞胞器」意指源自染色體異常而形成，於分裂後期至間期或休止期之細胞中可見到，具有包含核酸之異常構造的細胞胞器。具體而言，可列舉小核、NPB(Nucleoplasmic bridge；核質間架橋)或 NBUD(Nuclear bud；核芽)。

【0013】 「具有異常核酸構造之細胞胞器之自然出現頻率」(以下，有時記載為本自然出現頻率)意指在通常之維持培養時等，於未進行「會影響具有異常核酸構造之細胞胞器之形成」之特殊處理的狀態下，所測定之具有異常核酸構造之細胞胞器的頻率。具有異常核酸構造之細胞胞器之頻率，可藉由計算全細胞中具有異常核酸構造之細胞胞器之細胞所佔的比率而求得。

【0014】 「小核」意指比主核小之具有異常核酸構造的細胞胞器，其在分裂後期至間期或休止期之細胞的細胞質內可見到。小核，已知係以源自染色體之構造異常的

無著絲點染色體片段、或於有絲分裂期藉由染色體分配異常而無法向極移動的全部染色體為成因而產生，其為細胞分裂時產生染色體異常的指標。小核頻率表示在一定之培養期間中藉由細胞分裂而引起染色體之構造異常、或數異常的頻率。

【0015】 「小核之自然出現頻率」，亦即小核自然頻率，意指通常維持培養時等，在對於細胞未進行暴露於小核誘發因子等能影響小核形成之特殊處理的狀態下所測得的小核頻率。已知即使未暴露於小核誘發因子等，在通常細胞分裂過程中，依概率論會發生 DNA 之複製錯誤或染色體分配異常等，而自然產生染色體異常，形成小核。在細胞中產生小核之情況，其中一部分雖然被細胞之恆常性維持功能當作異常細胞，而被導向細胞死亡，快速排除，但殘存之細胞以具有小核之細胞被檢測出。因此，小核自然頻率，可成為綜合地顯示在成為染色體異常原因之細胞分裂過程中各種異常發生的容易度，及一旦產生異常之除去該異常之恆常性維持功能的程度等細胞遺傳資訊之安定性的指標。

【0016】 「幹細胞」意指具有分裂而製作與原細胞相同之細胞的能力，亦即自己複製能力，及分化為別種細胞之能力，而可持續增殖的細胞。

【0017】 「多能性幹細胞」意指可在試管中培養，且具有分化成源自三胚葉(外胚葉、中胚葉及內胚葉)之組織的能力，亦即具有多能性(pluripotency)的幹細胞。「多

能性幹細胞」可從受精卵、純系胚、生殖幹細胞、或組織內幹細胞等建立。就「多能性幹細胞」之更具體例而言，可列舉胚性幹細胞(ES 細胞)、從體細胞誘導之人工多能性幹細胞(iPS 細胞)。

【0018】 「ES 細胞」意指具有自己複製能力，為具有多能性(pluripotency)之幹細胞之來自初期胚的多能性幹細胞。胚性幹細胞最早於 1981 年建立，1989 年以後，亦可應用於製作基因剔除小鼠。1998 年建立人類胚性幹細胞，同時亦利用於再生醫學。

【0019】 「人工多能性幹細胞」意指從體細胞誘導之多能性幹細胞，藉由將體細胞重編程(reprogram)，以人工方式使其具有類似胚性幹細胞之多能性的細胞。例如，可列舉將纖維母細胞等分化之細胞藉由 Oct3/4、Sox2、Klf4、Myc 等基因之表現而重編程所建立的具有多分化能力的 iPS 細胞(induced pluripotent stem cell)等。2006 年，由山中氏等，從小鼠纖維母細胞建立人工多能性幹細胞(Cell, 2006, 126(4), p663-676)。2007 年從人類纖維母細胞，建立與胚性幹細胞同樣具有多分化能力的人工多能性幹細胞(Cell, 2007, 131(5),p861-872; Science, 2007, 318(5858), p1917- 1920; Nat Biotechnol., 2008, 26(1), p101-106)。本發明所用之人工多能性幹細胞可藉由本身周知之方法從體細胞製作，亦可為已經建立之人工多能性幹細胞。又，本發明所用之為人工多能性幹細胞之來源的體細胞無特別限定。

【0020】 就人工多能性幹細胞之來源而言，無特別限定。例如，源自小鼠、大鼠、倉鼠、天竺鼠等齧齒類之人工多能性幹細胞，及源自人類、猴、猩猩、黑猩猩等靈長類之人工多能性幹細胞，較佳為源自人類之人工多能性幹細胞。

【0021】 「核型解析」意指將對象細胞培養一定期間，添加乙醯甲基秋水仙素(colcemid)等分裂抑制劑，從富含分裂中期細胞者製作染色體標本，施行能區別一細胞中各個染色體之染色後，於顯微鏡下觀察各染色體，檢查對象細胞之染色體之構造或數是否異常，亦即是否有與正常核型不同之特徵的解析方法。當核型解析時，廣泛採用 G 區帶法或 Q 區帶法等古典分染法，或使用染色體特異性之 DNA 探針之原位螢光雜交(FISH；Fluorescence in situ Hybridization)法等。關於進行 iPS 細胞之核型解析的報告，係整理於「Stem Cells 30(1), p22-27, 2012.」等中，在一部分 iPS 細胞中可見到核型之異常，就有複數個報告例之特徵性異常而言，已知有 12 號染色體之三倍體等。

核型解析之特徵為可藉由直接觀察染色體構造之形態學的特徵或染色體數之增減而鑑定異常之種類，不過另一方面，在各個染色體之觀察必須熟練。又，由於觀察時需要許多勞力，能檢查之細胞數只有極少數，所以有所謂低頻率產生之異常的檢測、異常產生頻率的定量累積或細胞間之定量比較有困難的問題。此外，由於核型解析為解析某一時點之染色體特徵，要定量性比較伴隨培養中之細

胞分裂的經時變化有困難。

【0022】 「全基因組序列解析」意指藉由將對象細胞中之 DNA 片段化，使用各種定序器平行進行解析，將 DNA 分子之全鹼基序列全面地特定，檢測 DNA 之變異的解析方法。基於解析機器・技術之顯著進步，現今已能進行使用次世代定序器之高精度解析。

全基因組序列解析為解像度非常高之解析手法，除了可得到關於後述之 SNPs 或 CNV 的資料外，亦能檢測出低頻率發生之 DNA 的 1 鹼基程度變異。另一方面，該解析有需要龐大成本及時間的問題，在檢查所建立之眾多人工多能性幹細胞之全數並選拔品質良好之株為非實用的。

【0023】 「SNPs 解析」意指檢測在對象細胞中之 DNA 可見到之一鹼基多型(SNPs)的解析方法。SNPs 意指於個體集團中以一定以上之頻率可見到之 DNA 中之 1 鹼基變異，在人類方面迄今亦有各種 SNPs 的報告，指出疾病感受性以及與個人差異之關連性。就 SNPs 解析而言，已知有藉由前述之全基因組序列解析的全面性解析方法，利用聚合酶連鎖反應(PCR; Polymerase Chain Reaction)，將已知之 SNPs 迅速檢測出的方法。又，藉由利用在微小區間配置無數之 SNP 序列探針的 SNP 陣列，可有效率地解析多個 SNPs 之有無。藉由 SNP 陣列之解析，能以高解像度解析比較小之變異，不過畢竟成本及時間仍是障礙，在被利用作為多個人工多能性幹細胞之選拔法為非實用的。

【0024】 「CNV 解析」意指檢測在對象細胞中之 DNA 中可見到之複本數多型(CNV)的解析方法。CNV 意指通常每一細胞存在 2 個(2 複本)之基因成為只有 1 複本(刪除)、或存在 3 複本以上(重複)之基因數的變動，已指出其與為鹼基序列之變動的 SNPs 皆與個人差異具關連性。CNV 解析方面，可利用與 SNPs 解析同樣之手法，已知有全基因組序列解析、藉由 PCR 之解析法、比較基因組雜交 (CGH; Comparative Genomic Hybridization)法、利用 SNP 陣列之解析法等。關於 iPS 細胞之 SNP 解析及 CNV 解析之結果，亦整理於「Stem Cells 30(1), p22-27, 2012.」等中，已知有 12 號染色體短臂 12p 之重複、或 17 號染色體長臂 17q21.1 基因位之刪除等複數種特徵性變異。關於 CNV 解析，亦與其他解析手法同樣地，成本及時間成為障礙，在被利用作為多個人工多能性幹細胞之選拔法為非實用的。

【0025】 「基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低」意指與自然出現頻率超過後述之基準值的人工多能性幹細胞相比，細胞或核之形態異常少，藉由核型解析、全基因組序列解析、SNPs 解析、或 CNV 解析等既有基因組構造的評估方法，可得到良好之結果，或分化成一定細胞種類的效率高，就此等結果而言，意指分化成腫瘤細胞之風險低。其中，「分化成一定細胞種類的效率高」意指與使用自然出現頻率超過後述基準值之人工多能性幹細胞之分化效率相比，能以更高頻率得到目標分化細胞，亦包含與假設可臨床應用之既有分化手法中之先前分化效率相比，

能以更高頻率得到目標分化細胞。就假設可臨床應用之既有分化手法而言，可列舉如分化成 T 細胞之手法、分化成間葉系幹細胞之手法、分化成造血幹細胞之手法、分化成紅血球之手法、分化成血小板之手法、分化成血管內皮細胞之手法、分化成心肌細胞之手法、分化成骨骼肌之手法、分化成神經幹細胞之手法、分化成大腦皮質神經細胞之手法、分化成大腦邊緣系神經細胞之手法、分化成多巴胺神經細胞之手法、分化成肝細胞之手法、分化成骨之手法、分化成軟骨之手法、分化成原始生殖細胞之手法、分化成胰臟細胞之手法、分化成網膜細胞之手法、分化成角膜細胞之手法、分化成腎臟細胞之手法、分化成肺泡上皮細胞之手法、分化成支氣管上皮細胞之手法、分化成腸管之手法等。就分化成 T 細胞之手法而言，可適宜地選擇各種周知之分化誘導方法。就周知之分化誘導方法而言，可列舉例如「Timmermans, F. et al., J. Immunol., 2009, 182, 6879-6888」所記載之從人類 ES 細胞誘導 T 淋巴球的方法。又，例如，可依照「Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell, 2013, 12, 114-126」所記載之方法，將藉由人類末梢血 T 淋巴球所建立之人類 iPS 細胞分化誘導成 T 淋巴球。

【0026】 在一實施態樣中，本發明提供一種人工多能性幹細胞之評估方法(以下簡稱為「本發明之評估方法」)，其特徵為包含：

- (1)提供所培養之人工多能性幹細胞的步驟；
- (2)測定所提供之人工多能性幹細胞中具有異常核酸

構造之細胞胞器之自然出現頻率的步驟；及

(3)識別自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，及自然出現頻率超過基準值之人工多能性幹細胞的步驟。

【0027】 在其他實施態樣中，本發明提供一種人工多能性幹細胞的選拔方法(以下簡稱為「本發明的選拔方法」)，其特徵為在本發明之評估方法之步驟(3)後，進一步包含(4)選拔自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞的步驟。在該實施態樣中，可選拔自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，其與自然出現頻率超過基準值之人工多能性幹細胞相比，為基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低的人工多能性幹細胞。

【0028】 在進一步其他之實施態樣中，本發明提供一種人工多能性幹細胞之製造方法(以下簡稱為「本發明之製造方法」)，其中將本發明的選拔方法之步驟(1)，取代為提供所建立、培養之人工多能性幹細胞的步驟。

【0029】 在進一步其他實施態樣中，本發明提供一種源自人工多能性幹細胞之分化細胞之製造方法，其特徵為在本發明之製造方法之步驟(4)之後，進一步包含(5)將(4)中所選拔之人工多能性幹細胞進行分化誘導，得到分化細胞的步驟。亦即，提供一種源自人工多能性幹細胞之分化細胞之製造方法，其特徵為包含：

(1)提供所建立、培養之人工多能性幹細胞的步驟；

(2)測定所提供之人工多能性幹細胞中具有異常核酸

構造之細胞胞器之自然出現頻率的步驟；

(3)識別前述自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，及前述自然出現頻率超過基準值之人工多能性幹細胞的步驟；

(4)選拔前述自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞的步驟；及

(5)將(4)中所選拔之人工多能性幹細胞進行分化誘導，得到分化細胞的步驟。

前述之源自人工多能性幹細胞之分化細胞之製造方法，可在前述(1)步驟之前進一步包含下述步驟：

(A)建立人工多能性幹細胞之步驟；及

(B)培養所建立之人工多能性幹細胞的步驟。

【0030】 在進一步其他實施態樣中，本發明提供一種人工多能性幹細胞，其特徵為就基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低的人工多能性幹細胞而言，小核自然出現頻率為 2%以下、1.9%以下、1.8%以下、1.7%以下、1.6%以下、1.5%以下、1.4%以下或 1.3%以下。

以下，對於各步驟加以具體說明。

【0031】

<提供所培養之人工多能性幹細胞的步驟>

建立人工多能性幹細胞之方法，只要包含將特定之重編程因子導入體細胞的步驟，無特別限定。例如，可列舉採取體細胞，導入 Oct3/4、Sox2、Klf4、Myc 等重編程因子，以人工方式使其表現後，選擇獲得多能性之細胞並擴

大培養的步驟，或使用反轉錄病毒載體或仙台病毒載體，將重編程因子(Oct3/4、Sox2、Klf4、及 c-Myc)導入人類末梢血淋巴球，並培養的步驟(Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell 2013, 12, 114-126)等。

【0032】 就體細胞而言，可列舉如末梢血中之淋巴球、皮膚等之纖維母細胞、皮膚細胞、視覺細胞、腦細胞、毛細胞、口腔黏膜、肺細胞、肝細胞、胃黏膜細胞、腸細胞、脾細胞、胰細胞、腎細胞、神經幹細胞、造血幹細胞、源自智齒等之間葉系幹細胞、組織幹細胞、組織前驅細胞、血液細胞(例如末梢血單核球細胞(包含 T 細胞及非 T 細胞)、臍帶血細胞等)、上皮細胞、內皮細胞(例如血管內皮細胞)、肌肉細胞等，然而不以此等為限。

【0033】 就重編程因子所含之基因而言，可列舉例如 Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-連環蛋白(catenin)、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3 或 Glis1 等，此等重編程因子可單獨使用，亦可組合而使用。就重編程因子之組合而言，可例示 WO2007/069666 、 WO2008/118820 、 WO2009/007852 、 WO2009/032194 、 WO2009/058413 、 WO2009/057831 、 WO2009/075119 、 WO2009/079007 、 WO2009/091659 、 WO2009/101084 、 WO2009/101407 、 WO2009/102983 、 WO2009/114949 、 WO2009/117439 、 WO2009/126250 、 WO2009/126251 、 WO2009/126655 、

WO2009/157593 、 WO2010/009015 、 WO2010/033906 、
 WO2010/033920 、 WO2010/042800 、 WO2010/050626 、 WO
 2010/056831 、 WO2010/068955 、 WO2010/098419 、
 WO2010/102267 、 WO 2010/111409 、 WO 2010/111422 、
 WO2010/115050 、 WO2010/124290 、 WO2010/147395 、
 WO2010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol.,
 26: 795-797 、 Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2:
 525-528 、 Eminli S, et al. (2008), Stem Cells.
 26:2467-2474 、 Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol.
 26:1269-1275 、 Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3,
 568-574 、 Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479 、
 Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al.
 (2009), Nat Cell Biol. 11:197-203 、 Judson R.L. et al.,
 (2009), Nat. Biotech., 27:459-461 、 Lyssiotis CA, et al.
 (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB,
 et al. (2009), Nature. 461:649-643 、 Ichida JK, et al. (2009),
 Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem
 Cell. 6:167-74 、 Han J, et al. (2010), Nature.
 463:1096-100 、 Mali P, et al. (2010), Stem Cells.
 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-229
 所記載之組合。

【0034】 就將重編程因子導入體細胞之方法而言，
 在重編程因子為 DNA 形式之情況，可列舉如病毒、質體、
 人工染色體等載體；脂轉染、脂質體、顯微注射等手法等；

在為 RNA 形式之情況，可列舉如脂轉染、顯微注射等手法等；在為蛋白質形式之情況，可列舉如脂轉染、與細胞膜透過性肽(例如，源自 HIV 之 TAT 及聚精胺酸)之融合、顯微注射等手法等。就使用病毒載體之方法而言，可列舉使用反轉錄病毒載體之方法、使用游離基因載體之方法、使用如以 iD Pharma 公司之重編程套組「CytoTune(註冊商標)-iPS 2.0」為代表的仙台病毒載體之方法、使用慢病毒載體之方法、使用腺病毒載體之方法等，然而不以此等為限。

【0035】 培養人工多能性幹細胞之方法，只要以維持未分化狀態，使人工多能性幹細胞生存或增殖，無特別限定，可列舉如將細胞暴露於添加各種因子之培養基中，於維持未分化狀態下，使其生存或增殖的方法。又，於經絲裂黴素 C 處理之小鼠纖維母細胞上之飼養器(on-feeder)培養法或使用人工基底膜基質之無飼養器(feederless)培養法等，然而在本發明中培養方法不以此為限。

【0036】 就培養基而言，可列舉如伊格爾培養基(例：DMEM、BME、MEM、 α MEM)、哈姆培養基(例：F10 培養基、F12 培養基)、RPMI 培養基(例：RPMI-1640 培養基、RPMI-1630 培養基)、MCDB 培養基(例：MCDB104、107、131、151、153 培養基)、費舍爾培養基、199 培養基、或市售之培養液[靈長類 ES 細胞用培養基(靈長類 ES/iPS 細胞用培養液，Reprocell 公司)、小鼠 ES 細胞用培養基(TX-WES 培養液，Thrombo X 公司)、無血清培養基(mTeSR，

Stemcell Technology 公司)、ReproFF、StemSpan(註冊商標)SFEM、StemSpan(註冊商標)H3000、StemlineII、ESF-B 培養基、ESF-C 培養基、CSTI-7 培養基等]，然而不以此為限。再者，此等培養基亦可視需要混合等而使用，例如，可列舉 DMEM/F12 培養基等。

【0037】 培養基方面，可適宜添加 10 至 20%之血清(胎牛血清(FBS)、人類血清、馬血清)或血清代替物(KSR 等)、胰島素、各種維生素、L-麩胺酸、非必須胺基酸等各種胺基酸、 β -巰基乙醇、各種細胞激素(介白素類(IL-2、IL-7、IL-15 等)、幹細胞因子(SCF)、激活素等)、各種荷爾蒙、各種增殖因子(白血病抑制因子(LIF)、鹼性纖維母細胞增殖因子(bFGF)、TGF- β 等)、各種細胞外基質、各種細胞接著分子、青黴素/鏈黴素、嘌呤黴素等抗生物質、酚紅等 pH 指示劑等。

【0038】 培養可為例如在含有 1 至 10%，較佳為 2 至 5% CO₂ 之大氣下，於 30 至 40℃，較佳為 37 至 38.5℃，進行約 25 至 50 日。

【0039】 為了以高精度測定小核自然頻率，確保充分觀察細胞數，藉由將人工多能性幹細胞擴大培養至 1×10^3 細胞以上，較佳為 1×10^4 細胞以上，更佳為 5×10^4 細胞以上，可有效率地測定小核自然頻率。

【0040】 提供如此得到之「經培養之人工多能性幹細胞」或「經建立、培養之人工多能性幹細胞」的方式，無特別限定。例如，可將所培養之細胞以存在於培養液中

之狀態提供，或將細胞以凍結保存之狀態提供。或者，亦可將細胞以固定於培養皿上或標本上之狀態(標本化之狀態)提供。又，前述細胞之提供來源及提供對象可為相同，亦可為相異。

【0041】

<測定具有異常核酸構造之細胞胞器之自然出現頻率的步驟>

在本發明中，小核自然頻率等具有異常核酸構造之細胞胞器之自然出現頻率的測定方法沒有限定，可利用各種周知之方法。

【0042】 以下，雖然具有異常核酸構造之細胞胞器為小核，並主要記載有關小核自然頻率之測定，然而具有異常核酸構造之細胞胞器並不限定於小核。

【0043】 就小核自然頻率之測定而言，可列舉如以下之方法。回收培養後之細胞，以細胞固定液置換培養基，將細胞固定。將固定後之細胞懸浮液，調製成懸浮液呈約略白濁程度之細胞密度後，滴至載玻片上，風乾，製作小核標本。對小核標本施行染色，於具備對應於染色法之光學系統的顯微鏡下觀察細胞。再者，亦可如後述，於回收細胞前添加細胞質分裂抑制劑。在不使用細胞質分裂抑制劑之情況，測定不具有小核之細胞的細胞數及具有小核之細胞的細胞數，藉由算出具有小核之細胞數佔所觀察之總細胞的比率，可求得小核自然頻率。在使用細胞質分裂抑制劑之情況，測定 2 核細胞之細胞數及具有小核之 2 核細

胞的細胞數，藉由算出具有小核之 2 核細胞佔總 2 核細胞之比率，測定小核自然頻率。

【0044】 用於調製小核標本之細胞固定液的組成，無特別限定，可列舉乙醇、甲醇、乙醇與乙酸之混合液、甲醇與乙酸之混合液、或多聚甲醛稀釋液等。

【0045】 亦可為了良好地保持細胞質並容易觀察之目的，於固定前進行低張處理。低張液之組成無特別限定，例如，可列舉 75mM KCl 溶液等。

【0046】 小核標本之染色法無特別限定，可列舉如藉由吖啶橙的核及細胞質之二重染色法或吉姆薩染色法、利用 DAPI(2-(4-脒基苯基)-1H-吡啶-6-甲脒)、Hoechst 33342、Hoechst 33258、PI(碘化丙錠(propidium iodide))、溴化乙錠、SYBR(註冊商標) Gold、SYBR(註冊商標) Green 或其他核酸染色試藥之核染色法等。

【0047】 作為觀察對象之細胞數無特別限定，一般而言，為了擔保統計學上之精度，觀察 1000 個細胞以上之對象細胞。小核標本之觀察步驟，亦可使用成像細胞儀等影像解析裝置而自動化。又，為了容易實施多檢體之試驗，亦可不回收細胞，而直接將細胞固定於 96 孔盤等培養器材上，於培養器材表面製作小核標本，藉由使用前述之影像解析裝置而進行多檢體之高速自動解析。就影像解析裝置之適用例而言，可如「Mutat Res 2013, 751(1), p1-11」等所報導，然而不以此為限。或者，亦可對回收之細胞懸浮液施行適當染色，使用藉由流式細胞儀或雷射掃描細胞儀

等流路系統的細胞解析裝置，將眾多細胞進行自動解析。就流式細胞儀之活用例而言，可如「Mutat Res 2010, 703(2), p191-199」等所報導，然而不以此為限。

【0048】 進行小核自然頻率之測定時，除小核之外，亦可測定 NBUD 等小核以外之細胞胞器的自然出現頻率。又，為了得到關於細胞分裂動態之資料等目的，可於回收細胞前添加細胞質分裂抑制劑。藉由添加細胞質分裂抑制劑，可測定 NPB 之自然出現頻率。細胞質分裂抑制劑係以對細胞不呈現顯著毒性的濃度及處理時間來使用。就細胞質分裂抑制劑而言，可列舉 3 至 6 μ g/mL 之細胞鬆弛素 B 稀釋液等，然而不以此為限。

【0049】 就測定 NPB 之自然出現頻率的方法而言，可利用與使用細胞質分裂抑制劑之情況的小核自然頻率之測定方法相同的方法，然而不以此為限。

【0050】

<識別本自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，及本自然出現頻率超過基準值之人工多能性幹細胞的步驟>

在本步驟中，對於已測定本自然出現頻率之人工多能性幹細胞，識別該本自然出現頻率係在基準值以下，或本自然出現頻率超過基準值。

其中，「基準值」可藉由已知安全性高之 ES 細胞的本自然出現頻率為基礎而設定。又，亦可藉由複數個 ES 細胞之細胞株中的本自然出現頻率之統計值為基礎而設定。

例如，關於各 ES 細胞之細胞株，藉由複數次實驗分別算出本自然出現頻率之平均值，比較 ES 細胞之細胞株間之本自然出現頻率之平均值，可採用平均值最大之 ES 細胞之細胞株的該平均值，作為基準值。在此情況中，較佳之基準值為例如 2%。或者，對於各 ES 細胞之細胞株，藉由複數次實驗，分別算出本自然出現頻率之最大值，比較 ES 細胞之細胞株間之本自然出現頻率的最高值，可採用最高值為最大的 ES 細胞之細胞株的該最高值作為基準值。

或者，「基準值」亦可藉由設為基準之 iPS 細胞中的本自然出現頻率之統計值為基礎而設定。例如，對於藉由已知之品質評估指標確認安全性高的特定 iPS 細胞株群，藉由複數次實驗分別算出本自然出現頻率之平均值，比較 iPS 細胞株間之本自然出現頻率的平均值，可採用平均值為最大的 iPS 細胞株之該平均值作為基準值。或者，對於各 iPS 細胞株，藉由複數次實驗，分別算出本自然出現頻率之最高值，比較 iPS 細胞株間之本自然出現頻率的最高值，可採用最高值為最大之 iPS 細胞株的該最高值作為基準值。又，可用 iPS 細胞株之本自然出現頻率的 50 百分比值(中值)作為基準值，亦可用 30 百分比值作為基準值，亦可用平均值作為基準值。具體而言，關於包含複數種細胞株之特定之 iPS 細胞株群，藉由複數次實驗，分別算出本自然出現頻率之平均值，可採用該 iPS 細胞株群之本自然出現頻率之平均值的中值、30 百分比值或平均值等作為基準值。

繼而，可識別本自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，作為基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低的人工多能性幹細胞。

又，如後述之實施例所示，本自然出現頻率為特定基準值以下之人工多能性幹細胞，與本自然出現頻率超過該基準值之人工多能性幹細胞相比，顯示分化效率高。因此，在本發明之其他態樣中，提供一種人工多能性幹細胞之評估方法，其中將前述識別之步驟置換成「將本自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞評估為：分化效率比本自然出現頻率超過基準值之人工多能性幹細胞高的人工多能性幹細胞」的步驟。

【0051】

<選拔本自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞的步驟>

在本步驟中，選拔本自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，作為基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低的人工多能性幹細胞。藉由既有之方法，可評估基因組構造，或藉由測定分化效率，可確認所選拔之人工多能性幹細胞為基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低的人工多能性幹細胞。又，藉由選拔小核自然頻率之基準值為 2%以下、1.9%以下、1.8%以下、1.7%以下、1.6%以下、1.5%以下、1.4%以下或 1.3%的人工多能性幹細胞，可得到基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低的人工多能性幹細胞。

【0052】

<將所選拔之人工多能性幹細胞分化誘導，得到分化細胞的步驟>

將本發明中所選拔之人工多能性幹細胞分化誘導的方法無限定，可利用各種周知之分化手法。就周知之分化手法而言，可列舉如分化成 T 細胞之手法、分化成間葉系幹細胞之手法、分化成造血幹細胞之手法、分化成紅血球之手法、分化成血小板之手法、分化成血管內皮細胞之手法、分化成心肌細胞之手法、分化成骨骼肌之手法、分化成神經幹細胞之手法、分化成大腦皮質神經細胞之手法、分化成大腦邊緣系神經細胞之手法、分化成多巴胺神經細胞之手法、分化成肝細胞之手法、分化成骨之手法、分化成軟骨之手法、分化成原始生殖細胞之手法、分化成胰臟細胞之手法、分化成網膜細胞之手法、分化成角膜細胞之手法、分化成腎臟細胞之手法、分化成肺泡上皮細胞之手法、分化成支氣管上皮細胞之手法、分化成腸管之手法等。就分化成 T 細胞之手法而言，可適宜地選擇各種周知之誘導分化方法。就周知之誘導分化方法而言，可列舉如「Timmermans, F. et al., J. Immunol., 2009, 182, 6879-6888」所記載之從人類 ES 細胞誘導 T 淋巴球的方法。又，例如，可依照「Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell, 2013, 12, 114-126」所記載之方法，將藉由人類末梢血 T 淋巴球所建立之人類 iPS 細胞分化誘導成 T 淋巴球。

【0053】 以下，藉由實施例更詳細說明本發明，然

而本發明並不受此等之限定。

[實施例]

【0054】

參考例 1 人類 ES 細胞之小核自然頻率之測定

(1)人類 ES 細胞

對於由京都大學再生醫科學研究所提供之 5 種人類 ES 細胞株 KhES-1、KhES-2、KhES-3、KhES-4、及 KhES-5，進行小核自然頻率之測定。人類 ES 細胞，係仿照「Ueno, M. et al. PNAS 2006, 103(25), 9554-9559」、「Watanabe, K. et al. Nat Biotech 2007, 25, 681-686」所記載之方法，播種於經絲裂黴素 C 處理的小鼠纖維母細胞(Reprocell)上，於 37℃、2% CO₂ 條件下維持培養。此時之培養基，係在 DMEM/F12 培養基(Sigma-Aldrich)中添加有 20% KnockOut™ Serum Replacement (KSR, Invitrogen)、0.1mM 非必需胺基酸(NEAA; nonessential amino acids, Invitrogen)、2mM L-麩胺酸(Sigma-Aldrich)、及 0.1mM 2-巰基乙醇(Wako)的培養基(以下，記為 hES 培養基)中，添加 bFGF(Wako) (KhES-1 為 10ng/ml，KhES-2 為 30ng/ml，KhES-3 為 15ng/ml，KhES-4 及 KhES-5 為 20ng/ml)來使用。就 KhES-2、KhES-3、KhES-4、及 KhES-5 而言，係於上述培養基中進一步添加 10μM 之 Y-27632 (Wako)而使用。從維持培養開始 1 日後，每日分別以不含 Y-27632 以外，為相同組成之培養基進行培養基交換。

【0055】 將維持培養之人類 ES 細胞，以接著於細胞

培養皿原樣，用磷酸緩衝生理食鹽液(PBS, Invitrogen)洗淨 2 次後，將添加 0.25% 胰蛋白酶(Invitrogen)、1mg/ml 膠原酶 IV(Invitrogen)、20% KSR、及 1mM CaCl_2 (Nacalai Tesque)之 PBS 添加於該皿中，於 37℃、2% CO_2 條件下培育 5 分鐘。在前述皿中添加 hES 培養基後，藉由移液(pipetting)將細胞剝離，回收含細胞之培養基，進行離心(1000rpm, 3 分鐘)。從離心之前述培養物中除去上清液後，在沉澱中添加已添加 20 μM 之 Y-27632(Wako)的 hES 培養基，將細胞塊懸浮後，將所得之細胞塊懸浮液播種於以 0.1%明膠(Sigma-Aldrich)塗布之細胞培養皿(BD Falcon)上，在 37℃、2% CO_2 條件下培育 2 小時。藉由將未與培養皿接著之人類 ES 細胞塊與培養基一起回收，得到不含小鼠纖維母細胞的人類 ES 細胞塊之懸浮液。將懸浮液離心(1000rpm, 1 分鐘)，除去上清液後，添加已添加 20 μM 之 Y-27632 的 TrypLETM Express(Invitrogen)，於 37℃ 熱水中培育 5 分鐘。藉由移液將細胞分散成單一細胞後，藉由添加 hES 培養基，得到使單一細胞分散之細胞懸浮液。

【0056】

(2)小核自然頻率之測定方法及結果

將(1)中所得之細胞懸浮液離心(1000rpm, 5 分鐘)，並將上清液以磷酸緩衝生理食鹽液(PBS, 日水製藥)置換。將所得之細胞懸浮液再度離心(1000rpm, 5 分鐘)，除去上清液，添加加溫至 37℃ 之 75mM KCl(Wako)，進行 5 分鐘之低張處理。在低張處理後之細胞懸浮液中添加 1/5 體

積之固定液(甲醇(nacalai tesque)：冰醋酸(nacalai tesque) = 3：1)，離心(4℃，1000rpm，5分鐘)同時將細胞半固定。離心後，將上清液置換為新鮮之固定液，離心(4℃，1000rpm，5分鐘)同時將細胞固定。除去上清液後，以懸浮液成為約略白濁程度之細胞密度，再懸浮於甲醇中，並滴至載玻片上，風乾，形成小核標本。小核標本係以100μg/mL 吖啶橙(Wako)溶液染色，於螢光顯微鏡下，使用寬帶藍色激發濾波器觀察。對於每種細胞株提供2片載玻片來觀察，每1片載玻片有1000個人類ES細胞，亦即對於每種細胞株，測定2000個人類ES細胞中可見到具有小核的細胞數目，並算出小核自然頻率。將結果示於表1。從表1可知小核自然頻率最高者為2%。由於考慮ES細胞之腫瘤化風險低、安全，可採用該2%作為基準值。

【0057】 [表 1]

人類 ES 細胞中之小核自然頻率

ES 細胞株	測定時從建立開始的繼代數	小核自然頻率
KhES-1	36	1.05%
KhES-2	30	2.00%
KhES-3	26	1.20%
KhES-4	37	1.50%
KhES-5	35	1.60%

【0058】

實施例 1 人類 iPS 細胞之小核自然頻率及分化效率之測定

(1)人類 iPS 細胞

對於在京都大學 iPS 細胞研究所金子研究室，依照「Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell 2013, 12, 114-126」記載之方法，從人類末梢血淋巴球建立之人類 iPS 細胞株「2」、「3」、「5」、「9」、「10」、「11」、及「12」共計 7 株的人類 iPS 細胞，進行小核自然頻率及分化效率之測定。

【0059】

(2)小核自然頻率之測定方法

將(1)所記載之人類 iPS 細胞，仿照「Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell 2013, 12, 114-126」記載之方法，播種於經絲裂黴素 C 處理的小鼠纖維母細胞(Reprocell)上，於 37℃、2% CO₂ 條件下進行維持培養。此時之培養基，係在 DMEM/F12 培養基(Sigma-Aldrich)中添加有 20% KSR、2mM L-麩胺酸、1% NEAA、及 10μM 2-巰基乙醇的培養基中，添加 5ng/ml 之 bFGF 來使用。

【0060】 使用胰蛋白酶-EDTA (Sigma-Aldrich)，從已進行維持培養之人類 iPS 細胞中只除去小鼠纖維母細胞後，將人類 iPS 細胞懸浮於 D-PBS(2% FBS)中，作為小核自然頻率測定檢體。使用該細胞懸浮液，依照參考例 1(2)記載之方法，製作小核標本，進行觀察。對於每種細胞株提供 2 片載玻片進行觀察，而載玻片每 1 片有 1000 個人類 iPS 細胞，亦即對於每種細胞株，測定在 2000 個人類 iPS 細胞中可見到之具有小核的細胞數，算出小核自然頻率。將結果示於表 2。

【0061】 依照參考例 1 將基準值當作 2%之情況，為

該基準值以下之人類 iPS 細胞株為「2」及「3」。

【0062】

(3)分化效率之測定方法

對於(1)記載之人類 iPS 細胞，依照「Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell 2013, 12, 114-126」記載之方法，進行朝向 T 細胞系列的分化誘導。

【0063】 使用針對表面抗原 CD4 及 CD8 之抗體進行免疫染色，使用流式細胞儀測定 $CD45^{+}CD3^{+}CD7^{+}$ 細胞中 $CD4^{+}CD8^{+}$ 細胞所佔的比率，作為分化效率。將結果示於表 2。

【0064】 [表 2]

人類 iPS 細胞之小核自然頻率及分化效率

iPS 細胞株	小核自然頻率測定結果		分化效率 測定結果
	測定時從建立 開始的繼代數	小核自然頻率	
[2]	45	1.35%	58.1%
[3]	33	1.75%	11.6%
[10]	27	2.60%	2.01%
[11]	31	3.05%	2.95%
[12]	12	3.05%	0.90%
[9]	14	3.30%	1.55%
[5]	45	3.80%	1.99%

【0065】 從參考例 1 及實施例 1，可知人類 ES 細胞

之小核自然頻率為 1.05%至 2.00%，顯示屬安定低值，與此相對地，人類 iPS 細胞之小核自然頻率為 1.35%至 3.80%，隨株不同而變動大。由此研判人類 ES 細胞，從發生過程之初期胚以無基因操作方式建立，基因組構造安定，另一方面，人類 iPS 細胞藉由重編程時之基因操作成為異質之集團時，隨著所選擇之株，基因組構造之安定性等性質之變動較大。

【0066】 又，從測定由人類 iPS 細胞分化成 T 細胞系列之效率的實施例 1 之結果，可見到小核自然頻率與分化效率之間具相關關係，在將基準值當作 2%之情況，小核自然頻率為基準值以下之人類 iPS 細胞株「2」及「3」，與小核自然頻率超過基準值之人類 iPS 細胞株相比，顯示分化效率較高，為 3 倍以上。

【0067】

實施例 2 源自人類 iPS 細胞之 T 細胞中的小核自然頻率之測定

對於人類 iPS 細胞株「2」、「12」，依照「Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell 2013, 12, 114-126」記載之方法，進行朝向成為 CD8SP(單陽性)之 T 細胞的分化誘導。將所得到之 CD8SP T 細胞(以下，將該細胞記為再分化 T 細胞)擴大培養後，依照以下之方法測定小核自然頻率。亦即，將再分化 T 細胞在以 1.0 μ g/mL 抗 CD3 抗體 OKT3(eBioscience)塗布之 12 孔盤(BD Falcon)上，以 1.0 $\times 10^6$ 細胞/mL 之細胞密度播種，並賦予增殖刺激。播種時之培養基係使用在含

有 L-麩胺酸之 RPMI-1640 培養基(Wako)中，添加 10% 人類血清 AB(Nova Biologics)、1% 青黴素-鏈黴素(nacalaitesque)、100U/mL IL-2(Wako)、10ng/mL IL-7(Wako)、及 10ng/mL IL-15(R&D SYSTEMS)而成的培養基(以下，記為 Rh 培養基)。17 小時之增殖刺激後，將再分化 T 細胞全量回收，在 90 μ L 之細胞懸浮液中添加 60 μ L 之 Rh 培養基，並再播種於未以 OKT3 塗布之 96 孔盤(nunc)上。從再播種約 24 小時後，除去 15 μ L 之上清液，並添加 15 μ L 之已添加有 60 μ g/mL 細胞鬆弛素 B(Wako)之 Rh 培養基 (細胞鬆弛素 B 之最終濃度：6 μ g/mL)。添加細胞鬆弛素 B 之 33 小時後，除去上清液，添加 PBS 並攪拌。離心(1500rpm，3 分鐘)之後，再度將上清液以 PBS 置換，並攪拌。再度離心(1500rpm，3 分鐘)，除去上清液，添加加溫至 37 $^{\circ}$ C 之 75mM KCl，進行 5 分鐘之低張處理。在低張後之細胞懸浮液中添加 1/5 體積之固定液(甲醇：冰醋酸 = 3：1)，離心(4 $^{\circ}$ C，1500rpm，3 分鐘)同時將細胞半固定。離心後，將上清液置換成新鮮固定液，離心(4 $^{\circ}$ C，1500rpm，3 分鐘)同時將細胞固定。再度將上清液置換成新鮮固定液，離心(4 $^{\circ}$ C，1500rpm，3 分鐘)同時將細胞固定。進一步將上清液以甲醇置換，離心(4 $^{\circ}$ C，1500rpm，3 分鐘)同時將細胞固定。除去上清液後，將懸浮液以成為約略白濁程度之細胞密度的方式，再懸浮於甲醇中，並滴至載玻片上，風乾，形成小核標本。小核標本以 40 μ g/mL 吖啶橙溶液染色，在螢光顯微鏡下，使用寬帶藍色激發濾波器觀察。對株「2」

觀察 1000 個之 2 核細胞，對於株「12」，觀察 1500 個之 2 核細胞，測定具有小核的 2 核細胞數，算出全部 2 核細胞中具有小核之 2 核細胞所佔的比率。將結果示於表 3。在表 3 中，附記實施例 1 中所測定之小核自然頻率。

【0068】 [表 3]

再分化 T 細胞中之小核自然頻率

來源之 iPS 細胞株	再分化 T 細胞之小核自然頻率	iPS 細胞之小核自然頻率
[2]	1.80%	1.35%
[12]	3.33%	3.05%

【0069】 暗示人類 iPS 細胞之小核自然頻率，亦與分化後之 T 細胞的小核自然頻率相關，依照本發明之選拔方法，選拔人類 iPS 細胞株，即使為分化後之細胞，亦有得到基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低之細胞的可能性。

【0070】

實施例 3 人類 iPS 細胞之小核自然頻率之測定、核型解析及核形態之觀察

(1)人類 iPS 細胞

在京都大學 iPS 細胞研究所金子研究室，對於使用「CytoTune(註冊商標)-iPS 2.0」(iD Pharma)，從人類末梢血淋巴球建立之人類 iPS 細胞株，即「D-1R(-)#1」、「D-1R(-)#2」、「F-1R(-)#2」、「F-1R(+)#1」、及「F-3R(+)#1」

共計 5 株之人類 iPS 細胞，進行小核自然頻率之測定。

又，對於上述 5 株加上實施例 1 記載之人類 iPS 細胞 7 株，合計 12 株之人類 iPS 細胞，分別進行核形態之觀察，並對於從該 12 株除去「F-1R(+)#1」，合計 11 株之人類 iPS 細胞，分別進行核型解析。

【0071】

(2)小核自然頻率之測定

將供給(1)所記載之小核自然頻率測定的 5 株人類 iPS 細胞，仿照「無飼養器之人類 iPS 細胞之建立及維持培養(藉由 CiRA HP)」記載之方法，播種於 iMatrix(Nippi)上，並在 37℃、2% CO₂ 條件下進行維持培養。此時之培養基，係使用 Stemfit AK03N(味之素)。

【0072】 使用 0.5×TriPLE(商品商標)Select (ThermoFisher SCIENTIFIC)，將從經維持培養之人類 iPS 細胞予以細胞單一化後，將人類 iPS 細胞懸浮於 Stemfit AK03N 中，作為小核自然頻率測定檢體。將該細胞懸浮液進行離心(1000rpm，3 分鐘)，並將上清液以磷酸緩衝生理食鹽液(PBS，日水製藥)置換。再度離心(1000rpm，3 分鐘)，除去上清液，添加加溫至 37℃ 之 75mM KCl(Wako)，進行 5 分鐘之低張處理。在低張處理後之細胞懸浮液中添加 1/5 體積之固定液(甲醇(nacalai tesque):冰醋酸(nacalai tesque) = 3:1)，離心(4℃，1000rpm，3 分鐘)同時將細胞半固定。離心後，將上清液置換成新鮮固定液，離心(4℃，1000rpm，3 分鐘)同時將細胞固定。除去上清液後，以使懸浮液成為

約略白濁程度之細胞密度的方式，再懸浮於 2%固定液(甲醇：冰醋酸 = 98：2)中，並滴至載玻片上，風乾，形成小核標本。小核標本係以 50 μ g/mL 吖啶橙溶液染色，在螢光顯微鏡下，使用寬帶藍色激發濾波器觀察。對於每種細胞株提供 2 片載玻片來觀察，每 1 片載玻片有 1000 個人類 iPS 細胞，亦即對於每種細胞株，測定 2000 個人類 iPS 細胞中可見之具有小核的細胞數，算出小核自然頻率。將結果與實施例 1(2)之小核自然頻率測定結果一起示於表 4。

【0073】

(3)核形態之觀察

將(2)所製作之 5 株人類 iPS 細胞之小核標本載玻片，及實施例 1(2)所製作之 7 株人類 iPS 細胞之小核標本載玻片，與小核自然頻率之測定同樣地藉由吖啶橙溶液染色，於螢光顯微鏡下使用寬帶藍色激發濾波器，觀察核形態。

【0074】 當進行核形態之觀察時，將滿足以下之[1]及[2]的細胞判定為「正常細胞」，將不滿足[1]或[2]之任一項的細胞或不滿足[1]及[2]之細胞，判定為「異常細胞」，將標本中大多數細胞為正常細胞所構成之人類 iPS 細胞株，判定為「正常」株，將標本中顯然可見異常細胞之人類 iPS 細胞株，判定為「異常」株。將結果示於表 4。將代表性之正常細胞或異常細胞之影像示於第 1 圖至第 4 圖。

[1]核膜之外緣明晰， 1 細胞具有 1 個核。

[2]核膜未見損傷或突起等異常構造，為平滑之圓形或橢圓形。

【0075】**(4)核型解析**

關於(1)所記載之共計 11 株人類 iPS 細胞，除與(2)或實施例 1(2)同樣地進行維持培養外，回收細胞，形成細胞懸浮液，作為核型解析檢體。核型解析係委託 LSI Medience 股份有限公司實施。從細胞懸浮液製作分裂期之染色體標本，藉由 G 條帶法進行分染，除了將染色體分類為每個染色體編號外，對於每種人類 iPS 細胞株之 20 個細胞進行解析。

【0076】 當進行核型解析時，將具有染色體之構造異常(刪除、插入、倒位、移位等伴隨染色體切斷之染色體的異常構造)及/或數異常(單體、三體、四倍體等與 2 對 46 條相異數目之染色體)的細胞，判定為「異常細胞」，將未見任何異常之細胞判定為「正常細胞」，將所解析之 20 個細胞全部為正常細胞的人類 iPS 細胞株，判定為「正常」株，將具有 1 個細胞以上之異常細胞的人類 iPS 細胞株，判定為「異常」株。將結果示於表 4。

【0077】 [表 4]

人類 iPS 細胞之小核自然頻率、核形態之觀察結果及核型解析結果

iPS 細胞株	小核自然頻率	核形態之觀察結果	核型解析結果
[2]	1.35%	正常	正常
[3]	1.75%	正常	正常
[F-3R(+)#1]	1.75%	正常	正常
[F-1R(-)#2]	1.85%	正常	正常
[D-1R(-)#2]	2.55%	異常 ¹⁾	異常 ⁴⁾
[10]	2.60%	異常 ²⁾	正常
[11]	3.05%	異常 ¹⁾	正常
[12]	3.05%	正常	異常 ⁵⁾
[F-1R(+)#1]	3.15%	異常 ²⁾	-
[9]	3.30%	異常 ³⁾	正常
[5]	3.80%	正常	正常
[D-1R(-)#1]	4.35%	異常 ¹⁾	正常

1)核膜表面不平滑，呈現多角形般之形狀，顯然可見疑似核膜損傷之細胞。

2)顯然可見 1 個細胞中具有 2 個以上之核的多核細胞。

3)顯然可見具有從核膜突起之構造的細胞。

4)20 個細胞中，於 1 個細胞中可見染色體刪除。

5)20 個細胞中，於 1 個細胞中可見染色體重複。

【0078】 小核自然頻率與顯示基因組構造有無異常之核型或核之形態之間可見相關關係，於基準值為 2%之情況，小核自然頻率為基準值以下之 4 株人類 iPS 細胞株，全部核型、核之形態均為正常，相對地在小核自然頻率超過基準值之人類 iPS 細胞株中，8 株中有 7 株，顯示核型或核之形態的至少一者有異常。亦即，暗示依照本發明的選拔方法選拔人類 iPS 細胞株，有得到基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低之細胞的可能性。

【0079】

實施例 4 小核自然出現頻率為基準值以下之人類 iPS 細胞的製造

(1)人類 iPS 細胞

依照「Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell 2013, 12, 114-126」記載之方法，從人類末梢血淋巴球建立人類 iPS 細胞株。

【0080】

(2)小核自然頻率之測定

將(1)所記載之人類 iPS 細胞，仿照「Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell 2013, 12, 114-126」記載之方法，播種在經絲裂黴素 C 處理之小鼠纖維母細胞(Reprocell)上，並於 37℃、2% CO₂ 條件下進行維持培養。此時之培養基，係在 DMEM/F12 培養基(Sigma-Aldrich)中添加有 20% KSR、2mM L-麩胺酸、1% NEAA、及 10μM 2-巰基乙醇的培養基中，添加 5ng/ml 之 bFGF 而使用。

【0081】 使用胰蛋白酶-EDTA(Sigma-Aldrich)，從進行維持培養之人類 iPS 細胞只除去小鼠纖維母細胞後，將人類 iPS 細胞懸浮於 D-PBS(2% FBS)，作為小核自然頻率測定檢體。使用該細胞懸浮液，依照參考例 1(2)記載之方法，製造小核標本，進行觀察。對於每種細胞株提供 2 片載玻片進行觀察，而每 1 片載玻片有 1000 個人類 iPS 細胞，亦即對每種細胞株，測定 2000 個人類 iPS 細胞中可見之具有小核的細胞數，並算出小核自然頻率。

【0082】 識別小核自然頻率為 2%以下之人工多能性幹細胞，及小核自然頻率超過 2%之人工多能性幹細胞。接著，藉由選拔小核自然頻率為 2%以下之人工多能性幹細胞，得到該人類 iPS 細胞株，作為小核自然頻率為 2%以下之人類 iPS 細胞。

識別小核自然頻率為 1.3%以下之人工多能性幹細胞，及小核自然頻率超過 1.3%之人工多能性幹細胞。接著，藉由選拔小核自然頻率為 1.3%以下之人工多能性幹細胞，得到該人類 iPS 細胞株，作為小核自然頻率為 1.3%以下之人類 iPS 細胞。

【0083】 從此種結果，研判藉由測定所建立之各個人工多能性幹細胞之小核自然頻率，選拔顯示與 ES 細胞相同程度之小核自然頻率的細胞株，可簡便地以低成本有效率地製造基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低的人工多能性幹細胞，進一步提高人工多能性幹細胞之臨床應用的可能性。

【0084】 本申請案係以 2016 年 12 月 27 日截止於日

本國申請的特願 2016-252672 為基礎，根據其中所述及者，將其內容全部包含於本說明書中。

[產業上之可利用性]

【0085】 藉由測定所建立之人工多能性幹細胞的小核自然頻率，選拔與 ES 細胞相同程度之小核自然頻率的細胞株，可簡便地以低成本有效率地製造基因組構造之安定性高、腫瘤化之風險低的人工多能性幹細胞。藉此，除了可更有效率地製作高品質之人工多能性幹細胞資料庫，活用於研究・醫療上之外，在先前技術中無法達成，可臨床應用之自體人工多能性幹細胞的選拔，現具可行性，使用人工多能性幹細胞之基礎研究・臨床應用的可能性因而進一步提高。

【符號說明】

無

申請專利範圍

1. 一種人工多能性幹細胞之評估方法，其特徵為包含下述(1)至(3)之步驟：
 - (1)提供經培養之人工多能性幹細胞的步驟；
 - (2)測定所提供之人工多能性幹細胞中具有異常核酸構造之細胞胞器之自然出現頻率的步驟；及
 - (3)識別該自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，及該自然出現頻率超過基準值之人工多能性幹細胞的步驟。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之評估方法，其中該具有異常核酸構造之細胞胞器為小核。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之評估方法，其中該基準值為胚性幹細胞之自然出現頻率的統計值。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之評估方法，其中該胚性幹細胞為人類胚性幹細胞。
5. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之評估方法，其中該自然出現頻率之基準值為作為基準之人工多能性幹細胞之自然出現頻率的統計值。
6. 如申請專利範圍第 2 項所述之評估方法，其中該自然出現頻率之基準值為 2%。
7. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之評估方法，其中該人工多能性幹細胞為人類人工多能性幹細胞。
8. 一種人工多能性幹細胞的選拔方法，其特徵為包含下述(1)至(4)之步驟：

- (1)提供經培養之人工多能性幹細胞的步驟；
 - (2)測定所提供之人工多能性幹細胞中具有異常核酸構造之細胞胞器之自然出現頻率的步驟；
 - (3)識別該自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，及該自然出現頻率超過基準值之人工多能性幹細胞的步驟；及
 - (4)選拔該自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞的步驟。
9. 如申請專利範圍第 8 項所述之選拔方法，其中該具有異常核酸構造之細胞胞器為小核。
 10. 如申請專利範圍第 8 或 9 項所述之選拔方法，其中該自然出現頻率之基準值為胚性幹細胞之自然出現頻率的統計值。
 11. 如申請專利範圍第 10 項所述之選拔方法，其中該胚性幹細胞為人類胚性幹細胞。
 12. 如申請專利範圍第 8 或 9 項所述之選拔方法，其中該自然出現頻率之基準值為作為基準之人工多能性幹細胞之自然出現頻率的統計值。
 13. 如申請專利範圍第 9 項所述之選拔方法，其中該自然出現頻率之基準值為 2%。
 14. 如申請專利範圍第 8 或 9 項所述之選拔方法，其中該人工多能性幹細胞為人類人工多能性幹細胞。
 15. 一種人工多能性幹細胞之製造方法，其特徵為包含下述
(1)至(4)之步驟：

- (1)提供經建立、培養之人工多能性幹細胞的步驟；
- (2)測定所提供之人工多能性幹細胞中具有異常核酸構造之細胞胞器之自然出現頻率的步驟；
- (3)識別該自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，及該自然出現頻率為超過基準值之人工多能性幹細胞的步驟，及
- (4)選拔該自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞的步驟。

16. 如申請專利範圍第 15 項所述之製造方法，其特徵為在該步驟(1)之前，更包含下述步驟：

- (A)建立人工多能性幹細胞之步驟；及
- (B)培養所建立之人工多能性幹細胞的步驟。

17. 一種源自人工多能性幹細胞之分化細胞之製造方法，其包含下述步驟(1)至(5)：

- (1)提供所建立、培養之人工多能性幹細胞的步驟；
- (2)測定所提供之人工多能性幹細胞中具有異常核酸構造之細胞胞器之自然出現頻率的步驟；
- (3)識別前述自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞，及前述自然出現頻率超過該基準值之人工多能性幹細胞的步驟；
- (4)選拔前述自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞的步驟；及
- (5)將(4)中所選拔之人工多能性幹細胞進行分化誘導，得到分化細胞的步驟。

18. 如申請專利範圍第 17 項所述之製造方法，其在步驟(1)之前更包含下列步驟：

(A)建立人工多能性幹細胞之步驟；及

(B)培養所建立之人工多能性幹細胞的步驟。

19. 如申請專利範圍第 15 至 18 項中任一項所述之製造方法，其中該具有異常核酸構造之細胞胞器為小核。

20. 如申請專利範圍第 15 至 18 項中任一項所述之製造方法，其中該自然出現頻率之基準值為胚性幹細胞之自然出現頻率的統計值。

21. 如申請專利範圍第 20 項所述之製造方法，其中該胚性幹細胞為人類胚性幹細胞。

22. 如申請專利範圍第 15 至 18 項中任一項所述之製造方法，其中該自然出現頻率之基準值為人工多能性幹細胞之自然出現頻率的統計值。

23. 如申請專利範圍第 19 項所述之製造方法，其中該自然出現頻率之基準值為 2%。

24. 如申請專利範圍第 15 至 18 項中任一項所述之製造方法，其中該人工多能性幹細胞為人類人工多能性幹細胞。

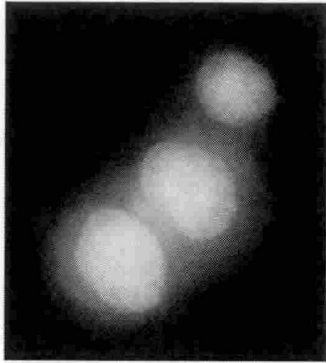
25. 一種人工多能性幹細胞之評估方法，其特徵為包含下述(1)至(3)之步驟：

(1)提供經培養之人工多能性幹細胞的步驟；

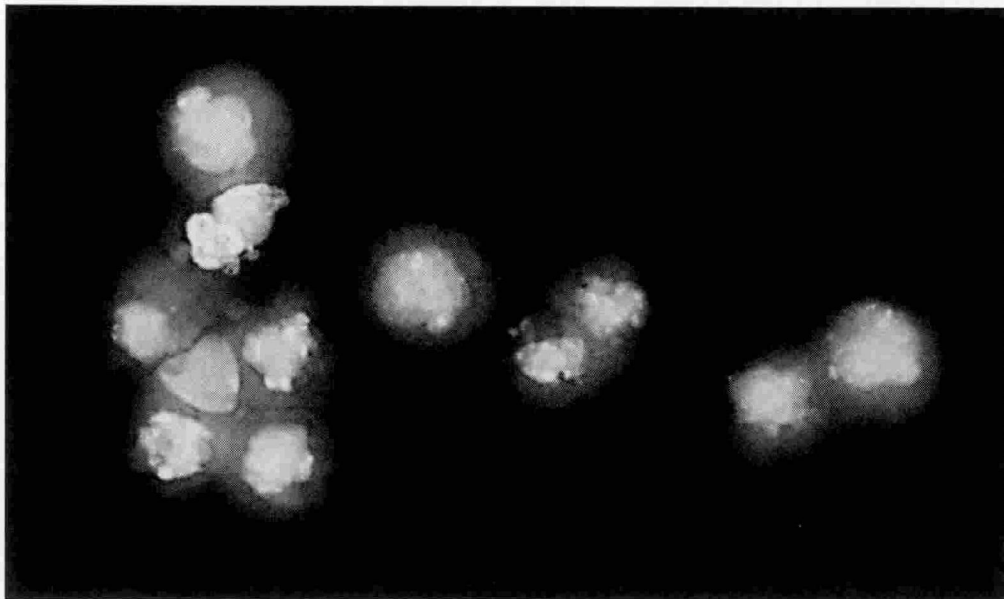
(2)測定所提供之人工多能性幹細胞中具有異常核酸構造之細胞胞器之自然出現頻率的步驟；及

(3)將該自然出現頻率為基準值以下之人工多能性幹細胞評估為分化效率比該自然出現頻率超過基準值之人工多能性幹細胞還高之人工多能性幹細胞的步驟。

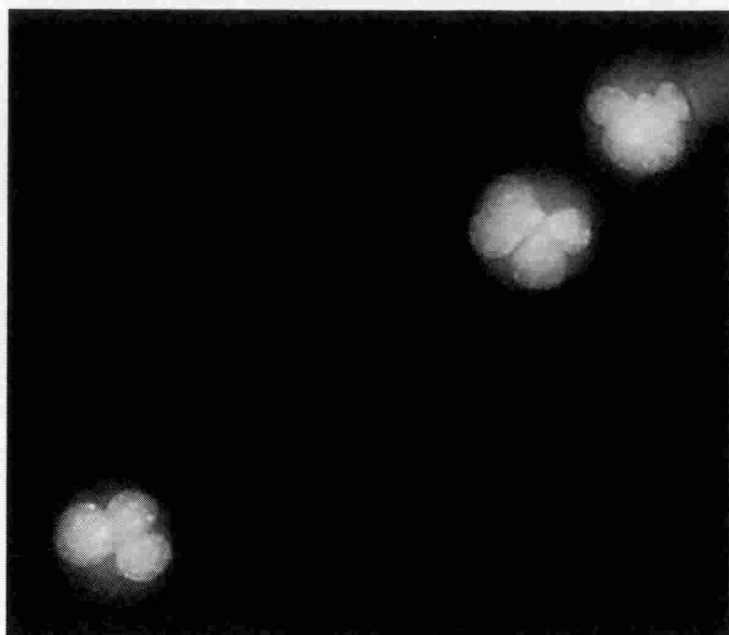
【發明圖式】



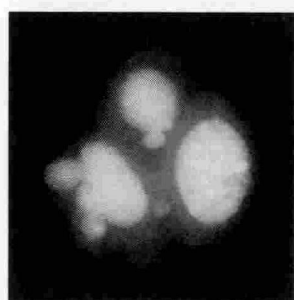
【第1圖】



【第2圖】



【第3圖】



【第4圖】