

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7677949号  
(P7677949)

(45)発行日 令和7年5月15日(2025.5.15)

(24)登録日 令和7年5月7日(2025.5.7)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	5/0775(2010.01)	C 1 2 N	5/0775
C 1 2 N	5/0735(2010.01)	C 1 2 N	5/0735
C 1 2 N	5/074(2010.01)	C 1 2 N	5/074
C 1 2 N	5/0797(2010.01)	C 1 2 N	5/0797
C 1 2 N	5/0789(2010.01)	C 1 2 N	5/0789
請求項の数 4 (全10頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-512069(P2022-512069)	(73)特許権者	000103840 オリエンタル酵母工業株式会社 東京都板橋区小豆沢 3 丁目 6 番 1 0 号
(86)(22)出願日	令和3年3月25日(2021.3.25)	(74)代理人	100165179 弁理士 田 崎 聡
(86)国際出願番号	PCT/JP2021/012557	(74)代理人	100147267 弁理士 大槻 真紀子
(87)国際公開番号	WO2021/200545	(74)代理人	100126882 弁理士 五十嵐 光永
(87)国際公開日	令和3年10月7日(2021.10.7)	(72)発明者	何 あゆみ 滋賀県長浜市加納町 5 0 番地 オリエン タル酵母工業株式会社内
審査請求日	令和5年8月7日(2023.8.7)	(72)発明者	黄瀬 啓太 滋賀県長浜市加納町 5 0 番地 オリエン タル酵母工業株式会社内
(31)優先権主張番号	特願2020-60490(P2020-60490)	最終頁に続く	
(32)優先日	令和2年3月30日(2020.3.30)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		
前置審査			

(54)【発明の名称】 幹細胞の染色体安定化剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- ニコチンアミドモノヌクレオチド若しくはその薬理学的に許容される塩、又はそれらの溶媒和物を有効成分とすることを特徴とする、幹細胞の染色体安定化剤であって、前記幹細胞が、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、及び造血幹細胞からなる群より選択される一種以上であり、

前記染色体安定化剤は、染色体の異数性異常を抑制する、幹細胞の染色体安定化剤。

【請求項 2】

前記幹細胞の培養培地に、 - ニコチンアミドモノヌクレオチド換算で 0 . 0 1 ~ 5 m M 添加される、請求項 1 に記載の染色体安定化剤。

【請求項 3】

幹細胞を、 - ニコチンアミドモノヌクレオチド若しくはその薬理学的に許容される塩、又はそれらの溶媒和物を含有する培養培地中で培養することを特徴とし、

前記幹細胞が、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、及び造血幹細胞からなる群より選択される一種以上である、幹細胞の染色体安定化方法であり、

前記染色体安定化方法は、染色体の異数性異常を抑制する、幹細胞の染色体安定化方法。

【請求項 4】

前記幹細胞の培養培地に、 - ニコチンアミドモノヌクレオチド換算で 0 . 0 1 ~ 5 m M 添加される、請求項 3 に記載の染色体安定化方法。

【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、幹細胞の培養・継代の過程において染色体異常の発生を防止することができる素材、及び当該素材を使用した幹細胞の染色体安定化剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

多分化能性幹細胞に代表される幹細胞は、自己複製能を有する未分化細胞であり、様々な細胞へ分化可能な細胞である。近年、患者の損なわれた組織に幹細胞や幹細胞から分化誘導させた細胞を移植し、その機能の再生をはかる再生医療が盛んに研究されている。再生医療では、幹細胞やその分化細胞を大量に準備する必要があるため、幹細胞を効率よく増殖させる方法や、幹細胞を効率よく分化させる方法の開発が盛んである。

10

## 【0003】

しかし、幹細胞は、培養期間が長くなったり、継代回数が多くなると、染色体異常が起こることがある。染色体異常には、2本で対となっている染色体が1本になるモノソミー、3本になるトリソミー等の異数性異常の他、転座、逆位、部分重複、部分欠失等の構造異常がある。幹細胞にそのような染色体異常が生じると、幹細胞が保持している増殖能や分化能が失われるだけでなく、その幹細胞から分化した細胞や組織を再生医療等に使用すると、癌細胞に変異したり、腫瘍となる危険性がある。癌細胞や腫瘍では染色体異常が起きていることがあり、近年、染色体異常をより正確に検知する方法が報告されている（例えば、特許文献1及び2参照。）。

20

## 【0004】

一方で、ニコチンアミドモノヌクレオチド（NMN）は、補酵素NAD<sup>+</sup>の生合成中間代謝産物である。近年、NMNは、老化マウスにおけるインスリン分泌能の改善効果、高脂肪食や老化によって引き起こされる2型糖尿病のマウスモデルにおいてインスリン感受性や分泌を劇的に改善する効果を有すること（例えば、特許文献3参照。）、老化した筋肉のミトコンドリア機能を顕著に高める効果を有することなどが報告されている。さらに、NMNの存在下で多能性幹細胞を培養することにより、その増殖能や分化能を向上させることができることも報告されている（例えば、特許文献4及び5参照。）。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

30

## 【0005】

【文献】特開2019-213537号公報

【文献】特開2019-144097号公報

【文献】米国特許第7737158号明細書

【文献】国際公開第2018/143258号

【文献】国際公開第2019/182044号

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

本発明は、幹細胞の培養・継代の過程において染色体異常の発生を防止することができる素材、並びに当該素材を使用した幹細胞の染色体安定化剤、幹細胞の培養方法、及び幹細胞の染色体安定化方法を提供することを目的とする。

40

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、 - NMNの存在下では、幹細胞中の染色体の安定性が向上し、染色体異常が抑制・防止されることを見出し、本発明を完成させた。

## 【0008】

即ち、本発明は、以下の幹細胞の染色体安定化剤、幹細胞の培養方法、及び幹細胞の染色体安定化方法を提供するものである。

50

[ 1 ] - ニコチンアミドモノヌクレオチド若しくはその薬理学的に許容される塩、又はそれらの溶媒和物を有効成分とすることを特徴とする、幹細胞の染色体安定化剤。

[ 2 ] 幹細胞の培養培地に、 - ニコチンアミドモノヌクレオチド換算で 0 . 0 1 ~ 5 m M 添加される、前記 [ 1 ] の染色体安定化剤。

[ 3 ] 胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、及び造血幹細胞からなる群より選択される一種以上の幹細胞の染色体安定化のために用いられる、前記 [ 1 ] 又は [ 2 ] の染色体安定化剤。

[ 4 ] 多能性幹細胞を、 - ニコチンアミドモノヌクレオチド若しくはその薬理学的に許容される塩、又はそれらの溶媒和物を含有する培養培地中で培養することを特徴とする、幹細胞の培養方法。

10

[ 5 ] 前記培養培地の - ニコチンアミドモノヌクレオチド濃度が 0 . 0 1 ~ 5 m M である、前記 [ 4 ] の培養方法。

[ 6 ] 前記幹細胞が、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、及び造血幹細胞からなる群より選択される一種以上である、前記 [ 4 ] 又は [ 5 ] の培養方法。

[ 7 ] 幹細胞を、 - ニコチンアミドモノヌクレオチド若しくはその薬理学的に許容される塩、又はそれらの溶媒和物を含有する培養培地中で培養することを特徴とする、幹細胞の染色体安定化方法。

#### 【発明の効果】

#### 【 0 0 0 9 】

本発明に係る幹細胞の染色体安定化剤は、幹細胞に働きかけることにより、その幹細胞の染色体の安定性を向上させ、染色体異常の発生を抑制ないし防止させることができる。このため、当該染色体安定化剤を培養培地に含有させることによって、幹細胞の染色体の安定性を向上させ、染色体異常の発生を抑制ないし防止し、幹細胞をより安定的に培養することができる。加えて、当該染色体安定化剤を用いることにより、幹細胞から分化させた細胞や組織の癌化・腫瘍化のリスクを低減することができる。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【 0 0 1 0 】

【図 1】 ( a ) は、実施例 2 において、細胞を P I で染色した蛍光写真であり、 ( b ) は、実施例 2 において、細胞を抗 H 2 A . X 抗体で免疫染色した蛍光写真であり、 ( c ) は、 ( a ) と ( b ) をマージした写真である。

30

【図 2】 P I で染色された全細胞中の H 2 A . X 陽性の細胞核の比率を示すグラフである。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【 0 0 1 1 】

本発明及び本願明細書において、幹細胞とは、自己複製能を有し、かつ分化能（多様な細胞種へ分化可能な能力）を備える未分化細胞であり、例えば E S 細胞（胚性幹細胞）、i P S 細胞（人工多能性幹細胞）などの多能性幹細胞の他、間葉系幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞、皮膚幹細胞などの体性幹細胞が挙げられる。好ましくは外胚葉、中胚葉、及び内胚葉由来のいずれの細胞にも分化しうる幹細胞、中胚葉由来の細胞に分化しうる幹細胞などである。

40

#### 【 0 0 1 2 】

本発明に係る幹細胞の染色体安定化剤（以下、「本発明に係る染色体安定化剤」ということがある。）は、NMN（化学式： $C_{11}H_{15}N_2O_8P$ ）を有効成分とし、幹細胞を培養・継代させる際にその培養培地中に添加されるものである。NMN の存在下で幹細胞を培養・継代させることにより、幹細胞の染色体の安定性を向上させ、染色体異常の発生を抑制ないし防止することができる。

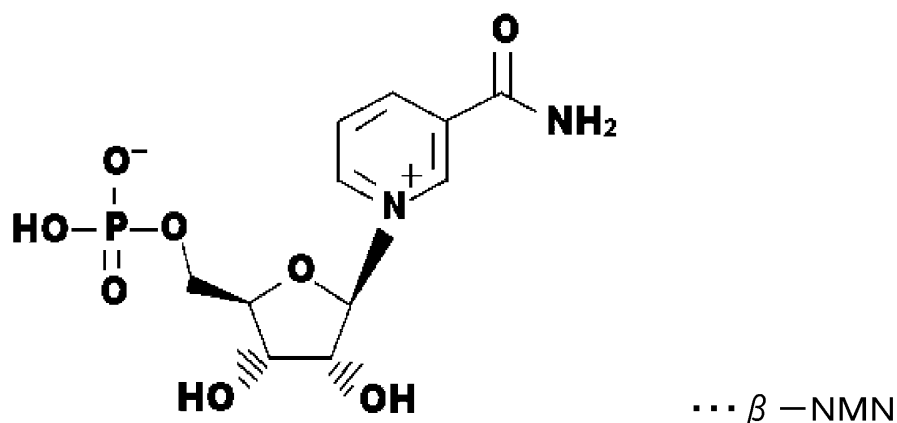
#### 【 0 0 1 3 】

NMN には、光学異性体として、 の 2 種類が存在するが、本発明に係る染色体安定化剤の有効成分となる NMN は、 - NMN（C A S 番号：1 0 9 4 - 6 1 - 7）である。  
- NMN の構造を下記に示す。

50

【 0 0 1 4 】

【 化 1 】



10

【 0 0 1 5 】

有効成分とする  $\beta$ -NMNとしては、いずれの方法で調製されたものであってもよい。例えば、化学合成法、酵素法、発酵法等により、人工的に合成した  $\beta$ -NMNを精製したものを、有効成分として用いることができる。また、 $\beta$ -NMNは広く生体に存在する成分であるため、動物、植物、微生物などの天然原料から抽出・精製することによって得られた  $\beta$ -NMNを有効成分として用いることもできる。また、市販されている精製された  $\beta$ -NMNを使用してもよい。

20

【 0 0 1 6 】

$\beta$ -NMNを合成する化学合成法としては、例えば、NAMとL-リボーステトラアセテートとを反応させ、得られたニコチンアミドモノヌクレオシドをリン酸化することにより  $\beta$ -NMNを製造できる。また、酵素法としては、例えば、NAMと5'-ホスホリボシル-1'-ピロリン酸 (PRPP) から、ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ (NAMPT) により  $\beta$ -NMNを製造できる。発酵法としては、例えば、NAMPTを発現している微生物の代謝系を利用して、NAMから  $\beta$ -NMNを製造できる。

【 0 0 1 7 】

本発明に係る染色体安定化剤の有効成分としては、 $\beta$ -NMNの薬理的に許容される塩であってもよい。 $\beta$ -NMNの薬理的に許容される塩としては、無機酸塩であってもよく、アミンのような塩基性部位を有する有機酸塩であってもよい。このような酸塩を構成する酸としては、例えば、酢酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、カンファースルホン酸、クエン酸、エテンスルホン酸、フマル酸、グルコン酸、グルタミン酸、臭化水素酸、塩酸、イセチオン酸、乳酸、マレイン酸、リンゴ酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、ムチン酸、硝酸、パモ酸、パントテン酸、リン酸、コハク酸、硫酸、酒石酸、p-トルエンスルホン酸等が挙げられる。また、 $\beta$ -NMNの薬理的に許容される塩としては、アルカリ塩であってもよく、カルボン酸のような酸性部位を有する有機塩であってもよい。このような酸塩を構成する塩基としては、例えば、アルカリ金属塩又はアルカリ土類金属塩であって、水素化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化アルミニウム、水酸化リチウム、水酸化マグネシウム、水酸化亜鉛、アンモニア、トリメチルアンモニア、トリエチルアンモニア、エチレンジアミン、リジン、アルギニン、オルニチン、コリン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、プロカイン、ジエタノールアミン、N-ベンジルフェネチルアミン、ジエチルアミン、ピペラジン、トリス (ヒドロキシメチル) -アミノメタン、水酸化テトラメチルアンモニウム等の塩基から誘導されるものが挙げられる。

30

40

【 0 0 1 8 】

本発明に係る染色体安定化剤の有効成分としては、遊離の  $\beta$ -NMN又は  $\beta$ -NMNの薬理的に許容される塩の溶媒和物であってもよい。当該溶媒和物を形成する溶媒としては、水、エタノール等が挙げられる。

50

## 【0019】

本発明に係る染色体安定化剤は、 $\gamma$ -NMNに加えてその他の有効成分を含有していてもよい。 $\gamma$ -NMNと併用するその他の有効成分は、1種類のみであってもよく、2種類以上の組み合わせであってもよい。当該他の有効成分としては、例えば、アルブミン、アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロール、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、エタノールアミン、Rock阻害剤などの幹細胞の生存効率や増殖効率を高めることが知られている成分や；パルプロ酸、ジメチルスルホキシド、デキサメタゾン、酪酸、トリコスタチンA、GSK3阻害剤、BMP阻害剤、Wnt阻害剤、アクチビン、ノギンなどの幹細胞の分化効率を高めることが知られている成分等の中から適宜選択して用いることができる。

10

## 【0020】

幹細胞を培養する際に、培養培地に本発明に係る染色体安定化剤を含有させることにより、幹細胞の染色体の安定性を向上させ、染色体異常の発生を抑制ないし防止させつつ、幹細胞を増殖させることができる。幹細胞の培養培地に本発明に係る染色体安定化剤を含有させる量としては、当該染色体安定化剤を含有させていない培養培地で培養した場合と比較して、染色体異常が発生した幹細胞数を低く抑えるために十分な濃度となる量であれば特に限定されるものではなく、幹細胞の種類や、培養培地のその他の成分とのバランス等を考慮して適宜調整することができる。培養培地の $\gamma$ -NMN濃度が低すぎる場合には、染色体安定化効果が弱いおそれがあり、また、 $\gamma$ -NMNを過剰量含有させた場合には、却って細胞増殖が抑えられる可能性がある。培養培地の本発明に係る染色体安定化剤の含有量としては、 $\gamma$ -NMN濃度が0.01～5mMとなる量であることが好ましく、0.05～2mMとなる量であることがより好ましく、0.1～1mMとなる量であることがさらに好ましい。 $\gamma$ -NMN濃度が前記範囲内であることにより、幹細胞の染色体を十分に安定化することができる。

20

## 【0021】

本発明に係る染色体安定化剤の存在下での幹細胞の培養は、培養培地に本発明に係る染色体安定化剤を含有させる以外は、常法により行うことができる。例えば、培養培地としては、一般的に、幹細胞の維持又は増殖のために用いられる培地や、動物細胞の培養に用いられる培地を用いることができる。また、市販されている各種の幹細胞のための培養培地を用いることもできる。本発明において、本発明に係る染色体安定化剤を含有させて幹細胞の培養に使用される培地としては、例えば、イーグル最小必須培地(MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、イーグル最小必須培地(MEM)、Iscove改変ダルベッコ培地(IMDM)、F-12培地、F-10培地、DMEM/F12培地、RPMI-1640培地、間葉系細胞基礎培地(MSCBM)、E8(Essential 8)培地、TeSR-E8培地、mTeSR1培地、MCD8培地等が挙げられる。これらの培地に、必要に応じて、アミノ酸、無機塩類、ビタミン類、抗生物質等を添加してもよい。

30

## 【0022】

これらの培養培地には、本発明に係る染色体安定化剤のほかに、幹細胞の生存効率や増殖効率を高めることが知られている成分や、幹細胞の未分化状態を維持する作用を有することが知られている成分等を適宜含有させてもよい。これらの成分としては、前述のものを用いることができる。

40

## 【0023】

また、培養条件は、一般的に動物細胞を培養する培養条件とすることができ、必要に応じて適宜改変してもよい。例えば、培養温度が30～40℃、CO<sub>2</sub>濃度が1～10体積%、O<sub>2</sub>濃度が0.1～2.5体積%で培養できる。

## 【0024】

本発明に係る染色体安定化剤によって染色体が安定化される幹細胞としては、動物由来の幹細胞が好ましく、哺乳類に由来する幹細胞がより好ましく、ヒトに由来する幹細胞がさらに好ましい。また、本発明に係る染色体安定化剤によって染色体が安定化される幹細胞

50

胞としては、動物由来のES細胞、iPS細胞、又は間葉系幹細胞であることが好ましく、哺乳類に由来するES細胞、iPS細胞、又は間葉系幹細胞であることがより好ましく、ヒトに由来するES細胞、iPS細胞、又は間葉系幹細胞であることがさらに好ましい。

#### 【実施例】

#### 【0025】

次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

#### 【0026】

#### [実施例1]

間葉系幹細胞の培養時における、染色体に対する - NMN の効果を調べた。間葉系幹細胞としては、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) (製品番号: PT-5006、Lonza社製) の2ドナーを用いた。

#### 【0027】

間葉系幹細胞の培養においては、DMEMとMCDB培地を1:1で混合した培地を基礎培地 (特許第5804385号公報を参照) とし、当該基礎培地に、FGF、PDGF、TGF- $\beta$ 、HGF、EGF、リン脂質、及び脂肪酸等を添加した培地を基本培地とした。 - NMN添加培地は、当該基本培地に、 - NMNを0.25mMとなるように添加して調製した。

#### 【0028】

#### <継代培養>

予め  $2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  フィブロネクチンでコーティングした培養用ディッシュに、間葉系幹細胞を  $5 \times 10^3 \text{ cells}/\text{cm}^2$  となるように播種し、基礎培地を用いて培養した。播種1日後に、基本培地又は - NMN添加培地に培地交換した。以降、2又は3日ごとに一回培地交換を実施した。培養用ディッシュ内の細胞密度が約80~90%のコンフルエンスになった時点で、継代培養を行った。

#### 【0029】

まず、培養上清を除き、 $1 \times \text{PBS}(-)$  で洗浄した後、 $1 \times \text{Tryple select}$  (製品番号: 12563011、Thermo Fisher社製) を用いて細胞を剥離させ、37度、5%CO<sub>2</sub>の条件下で4分間静置させた。ピペティングにより細胞をシングル化した後に、基本培地又は - NMN添加培地を加え、遠心分離処理をした。回収した細胞を各培地中に懸濁させた後、セルカウントを行い、予めコーティングした培養用ディッシュに、 $5 \times 10^3 \text{ cells}/\text{cm}^2$  となるように播種した。培地交換は、基本培地又は - NMN添加培地を用いて、2又は3日ごとに一回の頻度で実施した。

#### 【0030】

上記の継代培養を5回実施した後、細胞凍結用保存液「STEM-CELLBANKER DMSO Free GMP grade」 (製品番号CB061、日本全薬工業社製) を用いて、製造元による推奨プロトコルを参照して、細胞を凍結した。

#### 【0031】

凍結した細胞を、コーティングした培養用ディッシュに  $5 \times 10^3 \text{ cells}/\text{cm}^2$  となるように、基本培地又は - NMN添加培地に播種し、播種1日後に培地交換をした。その後は、培地交換を2又は3日ごとに一回の頻度で実施した。

#### 【0032】

継代培養を1回行い、T25フラスコに、 $5 \times 10^3 \text{ cells}/\text{cm}^2$  となるように播種した。播種3日後に、T25フラスコ内を培地で満たした状態で、染色体安全性試験の試験委託機関 (株式会社日本遺伝子研究所) に送付し、染色体の分析に供した。

#### 【0033】

#### <染色体安定性試験>

培養後の間葉系幹細胞について、Gバンド分染法により、染色体の状態を確認した。染色体本数の測定結果を表1、核型分析結果を表2に示す。なお、分析結果は、国際規約に基づく染色体核型記載法 (ISCN: International System for Human Cytogenomic N

10

20

30

40

50

omenclature) に順じて記載した。

【 0 0 3 4 】

【 表 1 】

	$\beta$ -MNM	染色体数	細胞数
試験区 1	—	46	46
		47	4
			計 50
試験区 2	—	45	1
		46	49
			計 50
試験区 3	+	46	50
			計 50
試験区 4	+	46	50
			計 50

10

【 0 0 3 5 】

【 表 2 】

	$\beta$ -MNM	染色体数	核型分析結果	細胞数
試験区 1	—	46	46, XY	17
		47	47, XY, +5	3
				計 20
試験区 2	—	45	45, XX, -7, -18, +mar	1
		46	46, XX	19
				計 20
試験区 3	+	46	46, XY	20
				計 20
試験区 4	+	46	46, XX	20
				計 20

20

30

【 0 0 3 6 】

試験区 1 は基本培地で培養した間葉系幹細胞 ( A D S C ドナー 1、男性)、試験区 2 は基本培地で培養した間葉系幹細胞 ( A D S C ドナー 2、女性) を示す。一方、試験区 3 は - N M N 添加培地で培養した間葉系幹細胞 ( A D S C ドナー 1、男性)、試験区 4 は - N M N 添加培地で培養した間葉系幹細胞 ( A D S C ドナー 2、女性) を示す。

【 0 0 3 7 】

基本培地で培養した間葉系幹細胞では、2 ドナー ( 試験区 1 及び 2 ) とともに染色体本数の異常がみられた ( 表 1 )。即ち、各試験区で 5 0 個の細胞の染色体数を測定した結果、試験区 1 では、4 個の細胞において、染色体数が 4 6 から 4 7 へ 1 つ増加した。また、試験区 2 では、1 個の細胞において、染色体数が 4 6 から 4 5 へ 1 つ減少した。一方、 - N M N 添加培地で培養した間葉系幹細胞では、2 ドナー ( 試験区 3 及び 4 ) とともにすべての細胞において、染色体数が 4 6 であり、これはヒトの正常な染色体数であった。核型分析の結果、ドナーによって異なる番号の染色体の異常が認められた ( 表 2 )。各試験区で 2 0 個の細胞の染色体の核型分析の結果、試験区 1 では、3 個の細胞において 5 番染色体が 1 本増加し、トリソミーになっていた。試験区 2 では、1 個の細胞で染色体 7 番及び 1 8 番がそれぞれ 1 本ずつ減少し、由来不明のマーカー染色体が 1 本増加した。これに対して、 - N M N 添加培地で培養した間葉系幹細胞では、2 ドナー ( 試験区 3 及び 4 ) とともに染色

40

50

体の核型に異常はみられなかった（表 2）。正常な場合、試験区 3 の男性のドナーでは「46, XY」と記載され、試験区 4 の女性ドナーの場合、「46, XX」と記載される。これらの結果から、-NMN には、幹細胞の染色体の安定性を向上させる効果があることが確認された。

〔実施例 2〕

【0038】

ヒト多分化能性幹細胞（iPSC）の培養時における、染色体に対する -NMN の効果を調べた。

< 培地・培養 >

ヒト多分化能性幹細胞（iPSC）としては 201B7 株を用い、細胞外マトリックス（マトリゲル：コーニング社）で事前にコーティングした 24 穴の細胞培養用プレートにて 80% 程度の細胞密度となるまで 5% CO<sub>2</sub>、37℃ で培養したものを試験に供した。

【0039】

培地としては、基礎培地（DMEM-F12）に iPSC の維持継代培養に必要であることが知られているサイトカインや塩類（インスリン、トランスフェリン、TGF- $\beta$ 、FGF、亜セレン酸ナトリウム、アスコルビン酸、炭酸水素ナトリウム）を加えた基本培地を用い、基本培地で培養を行う -NMN 無添加区（NMN（-））と基本培地に最終濃度 1 mM となるように -NMN を添加した -NMN 添加区（NMN（+））を設けた。

【0040】

上記 -NMN 無添加区及び -NMN 添加区それぞれに、最終濃度 5  $\mu$ M となるように NCX4016（シグマ-アルドリッチ社、製品番号 SML1669）を添加し、2 時間インキュベートすることにより染色体損傷を誘発した。その後、染色体がどれだけ損傷されているかを調べる目的で、核ゲノム DNA が損傷した細胞を、リン酸化されたヒストン H2A.X（H2A.X）標識することにより検出した。

【0041】

< 免疫染色 >

NCX4016 添加下でインキュベートされた細胞を 0.99% ホルムアルデヒドで固定し、0.10% Triton X-100 で透過処理をしたのち、抗 H2A.X 抗体（サーモフィッシャー社、製品番号 14-9865-82）と FITC で蛍光標識された抗マウス IgG 抗体（サーモフィッシャー社、製品番号 11-4015-82）を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡下で観察することにより、H2A.X を検出した。また、同時にすべての細胞の核を観察できるように、ヨウ化プロピジウム（ナカライテスク社、製品番号 19174-31）によって DNA を蛍光染色した。

【0042】

< 結果 >

図 1（b）に示すように、H2A.X で染色された細胞核（丸印で示す）は、-NMN 無添加区（NMN（-））より、-NMN 添加区（NMN（+））で顕著に少なかった。また、図 2 に示すように、ヨウ化プロピジウム（PI）で染色された全細胞核中の H2A.X 陽性の細胞核の比率は、-NMN 無添加区（NMN（-））より、-NMN 添加区（NMN（+））で統計的に有意に少なかった（母比率の差の検定、 $p < 0.05$ 、 $n > 8000$ ）。図 2 において、棒グラフは、それぞれの区の H2A.X 陽性の細胞核の比率を示し、エラーバーはその標準誤差の幅を表している。この結果は、幹細胞において、-NMN の添加により染色体異常の原因となるゲノム DNA への損傷が緩和されることを示している。

10

20

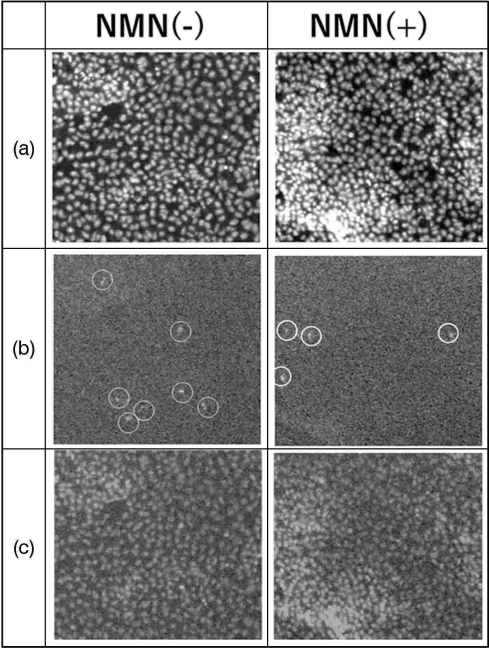
30

40

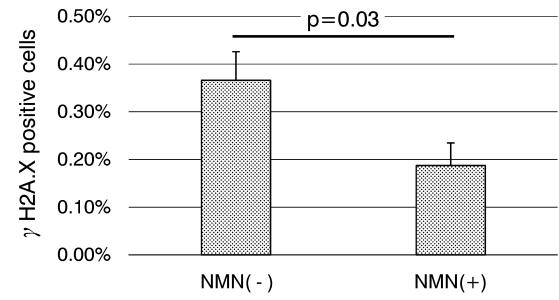


【図面】

【図 1】



【図 2】



10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 5/095(2010.01)

F I

C 1 2 N 5/095

(72)発明者 富盛 賀也

滋賀県長浜市加納町 5 0 番地 オリエンタル酵母工業株式会社内

(72)発明者 保田 尚孝

滋賀県長浜市加納町 5 0 番地 オリエンタル酵母工業株式会社内

審査官 吉岡 久史

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 8 / 1 4 3 2 5 8 ( W O , A 1 )

国際公開第 2 0 1 9 / 1 8 2 0 4 4 ( W O , A 1 )

特表 2 0 1 8 - 5 3 4 2 6 5 ( J P , A )

松尾英典, et al, ヒト多能性幹細胞における - ニコチンアミドモノヌクレオチドの効果, 2 0 1 7 年度生命科学系学会合同年次大会オンライン要旨集 ( C o n B i o 2 0 1 7 ) , 2 0 1 7 年 1 2 月 0 6 日 , [ 1 P - 0 8 9 1 ]

WILK A. et al. , Extracellular NAD+ enhances PARP-dependent DNA repair capacity independently of CD73 activity , Scientific Reports , 2020年01月20日 , Vol.10, No.651 , pp.1-21

木村直子, et al. , - NMN添加成熟培養によるマウス老齢個体卵の紡錘体形態と初期発生の改善 , 第 1 0 9 回日本繁殖生物学会大会 講演要旨集 , 2016年09月16日 , OR2-5

FAKOURI N.B. et al. , Toward understanding genomic instability, mitochondrial dysfunction and aging , The FEBS Journal , 2019年 , Vol.286 , pp.1058-1073

Tiss. Cult. Res. Commun , 2011年 , Vol.30 , pp.145-157

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )